



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0017169
(43) 공개일자 2019년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 15/203 (2006.01) C12P 19/18 (2006.01)
C12P 19/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 15/203 (2013.01)
C12P 19/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0101574
(22) 출원일자 2017년08월10일
심사청구일자 2017년08월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박제원
경기도 고양시 일산동구 위시터1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시터블루밍5단지아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

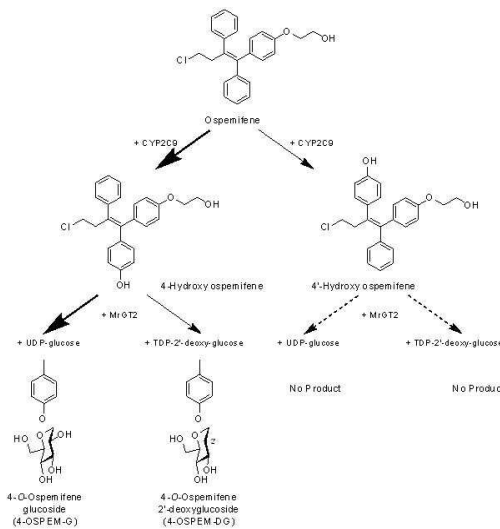
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 당 부가된 오스페미펜, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 선택적 에스트로젠 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator; 이하 SERM)의 일종인 오스페미펜(ospemifene)에 당이 부가된 신규 오스페미펜 유도체 화합물 및 상기 화합물의 제조방법에 관한 것으로, 기존의 오스페미펜에 비하여 생체이용율이 향상되어, 폐경기 여성들에 있어서 나타나는 성교통(dyspareunia) 및 질 건조증(vaginal dryness) 등의 질환 치료 효과를 제공하고 있는 원래 화합물인 오스페미펜에 비하여 생체이용률 또한 일부 향상시키고 있는 바, 개량 제형으로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 19/46 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 N01201702080041

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 생합성 경로공학 기반의 토양 방선균 유전자원 활용 신규 당부가 항생물질 생산

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017036598

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제 후보물질 디자이너

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017029343

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (원천)바이오의료기술개발사업

연구과제명 의약품 분자 재설계 플랫폼 기반 글로벌 예비창업

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2017.04.01 ~ 2017.08.31

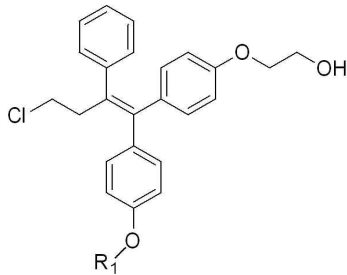
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



상기 식에서,

R₁은 독립적으로 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 화합물은

오스페미펜 글루코사이드, 오스페미펜 갈락토사이드, 오스페미펜 알로사이드, 오스페미펜 탈로사이드, 오스페미펜 자일로사이드, 오스페미펜 N-아세틸글루코사민이드(ospemifene-4-O-2'-N-acetylglucosaminide), 오스페미펜 락토사이드 및 오스페미펜 디옥시글루코사이드(ospemifene-4-O-2'-deoxyglucoside)로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 화합물을 포함하는, 폐경기 여성의 성교통(dyspareunia), 질 건조증(vaginal dryness), 골다공증(osteoporosis), 안면홍조 혹은 일과성 열감(hot flashes), 갱년기성 질 위축증(vaginal atrophy), 여유증(gynecomastia), 남성 이차 성선기능저하증, 인슐린 비의존성 당뇨병, 지방이영양증, 불임증, 남성전립선비대증, 전립선암, 난소암 및 유방암으로 구성되는 군에서 선택되는 질환의 치료용 약학적 조성물.

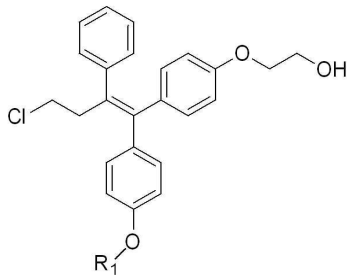
청구항 4

다음 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체의 제조방법:

(a) 오스페미펜 용액과 당전이효소, 사이토크롬 P450, 핵산당으로서 UDP-글루코스 또는 TDP-2-deoxy-글루코스 및 글루코오스 6-인산, 글루코스 6-인산 탈수효소 및 NADP+를 혼합하여 원판 반응을 수행하는 단계; 및

(b) 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체를 수득하는 단계.

[화학식 1]



상기 식에서,

R₁은 독립적으로 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 당전이 효소는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator; 이하 SERM)의 일종인 오스페미펜(ospemifene)에 당이 부가된 신규 오스페미펜 유도체 화합물 및 상기 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오스페미펜(혹은 deaminohydroxy-toremifene)은 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM) 중 하나로서 보편적인 호르몬 테스트에서 상대적으로 낮은 에스트로겐 효과 및 항-에스트로겐 활성과 같이 혼합된 활성을 제공하는 것으로 알려져 있었고(비특허문헌 1, 2, 3), 유방암 실험동물 모델을 대상으로 한 전임상 실험에서 항종양 활성을 보였다(비특허문헌 4). 2013년도에 건강한 여성의 갱년기 증후군 중 성교통과 질 건조증과 같은 특정 갱년기 성기능 장애를 치료하는 목적으로 미국 FDA의 승인을 받아 현재 상품명 오스페나(Ospena)로 일본 제약회사인 시오노기(Shinogi)사에서 판매하고 있는 처방전 의약품이다. 성교통은 폐경 후 체내 에스트로겐 수치의 감소를 통해 질 위축증이 발생하여 성 행위 중 통증이 나타나는 갱년기 여성 장애질환이다. 오스페미펜의 투약은 질 조직에 대하여 에스트로겐성 효과를 제공함으로써 자궁내막을 자극하여 조직을 보다 두텁게 하므로 폐경기 여성들이 성 행위 중 경험하는 통증을 완화시켜 준다. 임상 보고된 오스페미펜의 부작용은 홍조, 질 분비물 증가, 근육경축 및 발한 등으로 나타났으며, 박스형 경고문에 개별 여성들의 치료 목표와 위험에 일관되게 최단기간 동안만 처방되어야 함을 제공하고 있다.

[0003] 2013년 영국의 비즈니스 정보 서비스 및 컨설팅 업체인 글로벌데이터사가 공개한 폐경기 후 질 위축증 관련 세계전망 및 분석 보고서에서 주요 7개국(미국, 영국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인 및 일본 포함)의 폐경기 후 질 위축증 치료제 시장이 연평균 6%로 성장할 것으로 예상하고 있다(비특허문헌 5). 미국 시장의 경우엔 2012년 9억 달러를 상회하여 2022년에는 19억 달러를 넘는 수준으로 팽창할 것으로 전망하였으며, 일본 시장의 경우에도 2022년에 2000천만 달러에 도달할 것으로 예측하고 있다. 특히 오스페미펜의 FDA 승인은 폐경기 후 질 위축증 시장의 주요 성장 동력으로 제시한 바 있다.

[0004] 오스페미펜은 보편적인 선택적 에스트로겐 수용체(SERM)들과 유사하게 인체 투여 후 간 내 마이크로솜의 사이토크롬 p450 효소계의 대사과정을 통하여, 즉 주로 CYP2D6 혹은 CYP2C9 작용에 의하여 4-하이드록시 오스페미펜(4-hydroxyospemifene, 이하 4-OH-OSPEM) 또는 4'-하이드록시 오스페미펜(4'-hydroxyospemifene, 이하 4'-OH-OSPEM)으로 대사된다(비특허문헌 6). 오스페미펜은 고도의 지용성(hydrophobic) 화합물로서 뛰어난 내성(tolerability)을 제공하고 있으나, 그에 따른 낮은 수용성(solubility) 및 나아가 현저히 떨어지는 생체이용률

(bioavailability)은 오스페미펜 일일 투약 권장 용량을 60mg 또는 그 이상으로 제공하는 바, 상기 의약품의 제제학적인 개선은 필요하다.

[0005] 따라서 상기 내용과 같은 기존 오스페미펜의 투여 시 문제점인 생체이용률의 향상을 도모할 수 있는 신규 유도체의 개발은 향후 중요하다 할 것이다. 즉, 높은 생체이용률은 임상 처치 용량(dose)의 일부 감소화를 가능케 할 것이며, 그 저용량 투약에 따라서 처치 환자 대상으로 발생 가능한 부작용의 위험성을 한층 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 제한적인 투여 기간의 연장이 가능할 것이다.

[0006] SERM의 구조적 변형을 통한 신규 유도체의 개발은 개량신약 및 의약품 전달 시스템(drug delivery system) 개발의 주요 기술로서 인식되고 있으며, 그 중 하나는 그 화학구조 내 수산기(hydroxy function)에 당 분자를 전이시킬 수 있는 당전이 효소(GT)를 이용한 효소적 제조 방법이 있다. 특히, 오스페미펜과 그 구조적 유사 화합물들의 당전이화는 원래 물질에 비하여 초회 통과(first pass)를 거친 대사(metabolism) 과정에서 혈중 약물 농도를 일정 수준이상으로 유지하여 생체이용률을 향상시킬 수가 있으므로, 의약품의 제형 개량 및 신규 제형 개발 등에 유용한 생전환(bio-conversion) 기술이라 할 것이다.

[0007] 오스페미펜의 제조 방법 및 용도에 대한 특허는 유기합성법을 통한 화학적 합성법과 폐경 이후의 여성 질 위축증 관련 질환 또는 장애의 치료 및 예방을 위한 용도로 기재하고 있다(특허문헌 1, 2). 하지만, 오스페미펜(이하 OSPEM)의 대사체인 4-OH-OSPEM 과 4'-OH-OSPEM 대사체들에 당이 부가한 화합물의 제조는 현재까지 그 유래가 없다.

[0008] 본 발명자는 대한민국 특허 제10-1717212호(발명의 명칭: 당전이 효소를 이용한 당 부가된 에스트로겐 수용체 조절제의 제조방법) 및 국제출원 PCT-KR2017-004022호(발명의 명칭: 당 부가된 엔클로미펜, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물)를 통해 SERM의 일종으로 유방암 예방 및 치료제로 응용 가능한 당 부가 타목시펜과 엔클로미펜 유도체들의 생전환에 성공한 바 있다. 이를 위하여, SERM 활성을 지닌 타목시펜 구조 유사체들을 기질로 하여 당전이 반응을 가능케 하는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래 신규 당전이효소(GT)의 발견, 효소적 반응을 통한 당부가 SERM의 생합성, 나아가 당부가 유도체들의 원래 화합물과 비교하여 생체이용률과 같은 제형적 특성의 개선 등을 확인한 바 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 OSPEM의 생체이용률과를 증가시켜 사용량을 감소시킬 수 있는 OSPEM 유도체를 개발하고자 예의 노력한 결과, OSPEM을 기질로 하여 인간 재조합 사이토크롬 P450의 일종인 CYP2C9이 우선 OSPEM에 수산기를 부가하여 4-OH-OSPEM과 4'-OH-OSPEM을 생성하고, 동시에 마이크로모노스포라 로도랑지아 방선균 유래 재조합 당전이 효소(glycosyltransferase; 이하 MrGT2)를 활용하여 제작한 신규한 당부가 오스페미펜 유도체가 생체이용률이 증가되고 향상된 약리활성을 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) WO 1996007402A
(특허문헌 0002) WO 2003103649A1

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Kangas L, Biochemical and pharmacological effects of toremifene metabolites. Cancer Chemother Pharmacol. 1990. 27: p. 8-12.
(비특허문헌 0002) Unkila M., et al., Vaginal effects of ospemifene in the ovariectomized rat preclinical model of menopause. J. Steroid Biochem, Mol. Biol. 2013. 138: p. 107-115.
(비특허문헌 0003) Kaur G., et al., Design, synthesis and evaluation of ospemifene analogs as anti-breast cancer agents. Eur. J. Med. Chem. 2014. 86: p. 211-218.
(비특허문헌 0004) Nappi R.E., et al., Advances in pharmacotherapy for treating female sexual dysfunction. Exp. Opin. Pharmacother. 2015. 16(6): p. 875-887.
(비특허문헌 0005) GlobalData, PharmaPoint: Postmenopausal vaginal atrophy-Global drug forecast and

market analysis to 2022. 2013.

(비특허문헌 0006) Tolonen A., et al., Ospemifene metabolism in human in vitro and in vivo: metabolite identification, quantification, and CYP assignment of major hydroxylations. Drug Metabol. Drug Interact. 2013. 28(3): p. 153-161.

발명의 내용

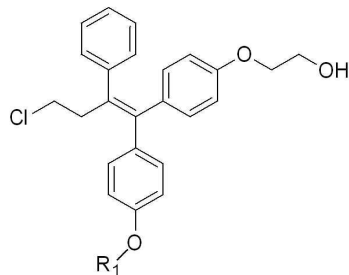
해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 오스페미펜(OSPEM)의 생체이용율을 증가시킨 신규한 당부가 오스페미펜 유도체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 인간 유래 재조합 사이토크롬효소와 미생물 유래 재조합 당전이효소의 원팟(one-pot) 생 전환 방법에 의해 오스페미펜을 당부가 오스페미펜 유도체로 전환하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.



[0015] [화학식 1]

[0016] 상기 식에서, R₁은 독립적으로 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

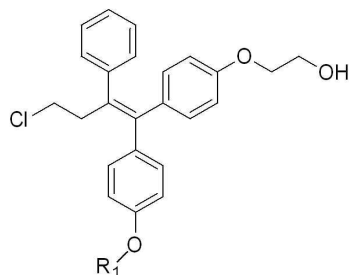
[0017] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 성교통(dyspareunia) 및 질 건조증(vaginal dryness) 치료약물인 오스페미펜(OSPEM)과 유사한 약리활성을 제공하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체의 제조방법을 제공한다:

[0019] (a) 오스페미펜 용액과 당전이효소, 사이토크롬 P450, 핵산당으로서 UDP-글루코스 또는 TDP-2-deoxy-글루코스 및 글루코오스 6-인산, 글루코스 6-인산 탈수소효소 및 NADP⁺를 혼합하여 원팟 반응을 수행하는 단계; 및

[0020] (b) 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체를 수득하는 단계.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 상기 식에서,

[0024] R₁은 독립적으로 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 원캄 생전환으로 제조된 당부가 오스페미펜 유도체로서, 오스페미펜 보다 낮은 세포독성을 나타내면서도, 생체이용률이 향상되어, 기존 오스페미펜의 적용질환에 신규 의약품 제형으로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 인간 유래 재조합 CYP효소와 방선균 유래 재조합 당전이효소 MrGT2 효소 반응을 통한 오스페미펜 원캄 생전환 모식도이다.

도 2는 당부가 오스페미펜 유도체 2종(4-OSPEM-G, 4-OSPEM-DG)과 생전환 전 오스페미펜(OSPEM) 및 유방암 치료제인 타목시펜(tamoxifene)의 2종의 유방암 세포주 MCF-7 및 MDA-MB-231에 대한 세포독성을 반수저해농도(IC₅₀)로 나타낸 그래프이다.

도 3는 오스페미펜(OSPEM), 당부가 오스페미펜 2종(4-OSPEM-G, 4-OSPEM-DG) 및 비교군인 라록시펜(raloxifene)을 2주간 10 mg/kg/day 용량으로 경구 투여한 난소 적출 쥐를 대상으로 질 상피 조직학적 변화를 비교한 막대 그래프이다. 양성 대조군인 에티닐에스트라디올 처치군(0.1 mg/kg/day의 낮은 용량)에 2주간 경구 투여 한 후 적출한 질의 상피 두께 및 중량 그리고 자궁 중량을 100%로 하여, 전술한 오스페미펜, 당부가 유도체 및 라록시펜 처치군에서 나타난 상기 파라미터들을 백분율 퍼센트(%)로 환산하여 상대적 상피 두께, 상대적 질 중량 및 상대적 자궁 중량으로 나타냈다.

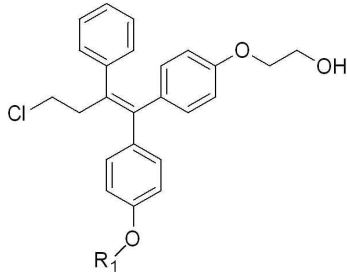
도 4는 오스페미펜(OSPEM) 및 당부가 오스페미펜 유도체 2종(4-OSPEM-G, 4-OSPEM-DG)을 각각 2주간 10 mg/kg/day 용량으로 경구 투여한 난소 적출 쥐를 대상으로 하여, 마지막 투여 후 24시간 뒤 채혈한 시료를 분석함으로써 혈 중 오스페미펜의 잔존량을 분석함으로써 당부가 유도체들의 생체이용률 정도를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명에서는 기존의 생체이용률이 낮았던 오스페미펜의 단점을 극복할 수 있는 오스페미펜 유도체를 개발하고자, 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주의 유전체(genome)로부터 GT 암호화 유전자를 분리하고, 이를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질전환 대장균을 제작하였다. 다음으로 상기 발현된 당전이 효소에 OSPEM의 산화 대사과정에 관여하는 재조합 CYP2C9를 첨가하고, 오스페미펜 및 핵산당(nucleotidyl sugar)인 우리딘 이인산 글루코스(uridine diphosphate glucose; 이하 UDP-Glc)와 티미딘 이인산 2'-디옥시-글루코스(thymidine diphosphate 2'-deoxy-glucose, 이하 TDP-2'-deoxy-Glc)를 당 공여체로 반응시킨 원캄 반응으로 신규한 당부가 OSPEM 유도체(오스페미펜 글루코사이드(4-O-ospemifene glucoside, 이하 4-OSPEM-G)와 오스페미펜 디옥시글루코사이드(4-O-ospemifene 2'-deoxyglucoside, 이하 4-OSPEM-DG) 유도체)를 생합성하고, 이후 질량분석기와 핵자기 공명스펙트로메트리(nuclear magnetic resonance spectrometry) 기기분석을 통하여 그 구조를 확인하는 한편, 당부가 전의 원래 오스페미펜과 그 유도체들의 인 비트로 세포독성 비교 및 실험동물을 대상으로 한 생체이용률의 향상을 일부 확인하였다.

[0028] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0029] [화학식 1]



[0030]

[0031] 상기 식에서,

[0032] R₁은 독립적으로 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 화합물은 오스페미펜 글루코사이드, 오스페미펜 갈락토사이드, 오스페미펜 알로사이드, 오스페미펜 탈로사이드, 오스페미펜 자일로사이드, 오스페미펜 N-아세틸글루코사민이드(ospemifene-4-O-2'-N-acetylglucosaminide), 오스페미펜 락토사이드 또는 오스페미펜 디옥시글루코사이드(ospemifene-4-O-2'-deoxyglucoside) 인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 아세트산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔술폰산, 갈록투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 포함한다.

[0036] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화학식 1의 화합물이 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 오스페미펜 유도체로서, 당부가 전 원래 화합물인 오스페미펜 보다는 상대적으로 낮은 인 비트로(in vitro) 유방암 세포독성을 보이지만, 난소 적출 쥐 실험동물을 대상으로 생체이용률이 향상됨을 확인할 수 있던 바, 현재 오스페미펜이 임상 적용되고 있는 성교통(dyspareunia) 및 질 건조증(vaginal dryness) 등의 질환 치료 목적의 의약품으로 응용화가 가능한 동시에 생체이용률이 낮은 오스페미펜의 단점을 극복할 수 있는 신규 의약품 제형으로 활용이 가능할 것이다.

[0038] 따라서, 다른 관점에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 성교통(dyspareunia) 및 질 건조증(vaginal dryness) 등의 갱년기 여성 장애질환, 폐경기 여성의 성교통(dyspareunia), 질 건조증(vaginal dryness), 골다공증(osteoporosis), 안면홍조 혹은 일과성 열감(hot flashes), 갱년기성 질 위축증(vaginal atrophy), 여유증(gynecomastia), 남성 이차 성선기능저하증, 인슐린 비의존성 당뇨병, 지방이영양증, 불임증, 남성전립선비대증, 전립선암, 난소암 또는 유방암의 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 상기 질환들의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[0040] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 유방암 세포주에 대하여 일부 인 비트로(in vitro) 세포독성 활성을 나타내며 정상 세포에는 세포독성을 보이지 않는 한편(실험예 1), 난소 적출 쥐를 대상으로는 인 비보(in vivo) 동물 실험시에는 당부가 전 원래 화합물인 오스페미펜과 유사한 질 상피 조직에 대한 활성을 제공하는 동시에(실험예 2), 오스페미펜의 투여와 비교하여 당부가 유도체들의 생체이용률이 개선(실험예 3)됨을 나타내므로 기존 오스페미펜의 낮은 생체이용률을 일부 개선할 수 있는 개량 제형으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시예 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제

형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.

- [0042] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상 투여시에 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캡셀제, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산의 마그네슘염, 스테아르산의 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [0044] 비경구 투여용 제형으로는 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의할 수 있다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 적어도 하나 이상 포함하고, 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하며, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수 회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0046] 또 다른 관점에서 본 발명은 (a) 오스페미펜 용액과 당전이효소, 사이토크롬 P450, 핵산당으로서 UDP-글루코스 또는 TDP-2-deoxy-글루코스 및 글루코오스 6-인산, 글루코스 6-인산 탈수소효소 및 NADP+를 혼합하여 원광 반응을 수행하는 단계; 및 (b) 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체를 수득하는 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명은 방선균 유래 재조합 GT 효소를 대장균에서 얻고, 2) 인간 유래 재조합 CYP와 상기 재조합 GT(즉, MrGT2)의 순차적 효소반응으로 얻어진 주요 산물 총 2종의 당부가 오스페미펜 유도체들을 얻는 단계를 포함한다.
- [0048] 본 발명의 일 태양에서, 상기 제조방법은, 상기 단계에서 얻어진 효소반응 산물을 중압 액체 크로마토그래피 (Medium Pressure Liquid Chromatography; 이하 MPLC) 방법으로 분리, 정제, 또는 분리 및 정제하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 태양에서, 상기 1) 단계의 재조합 당전이 효소는 마이크로모노스포라 로도랑지아로부터 분리할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 본 발명의 일 태양에서, 상기 재조합 당전이 효소는 바람직하게는 MrGT2이고, 더욱 바람직하게는 대장균에서 발현된 MrGT2이다.
- [0051] 본 발명의 일 태양에서, 상기 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 방법에 사용되는 고정상은 역상 C18일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 본 발명의 일 태양에서, 상기 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 방법에 사용되는 이동상은 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v) 혼합액일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 본 발명의 일 태양에서, 상기 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 유지 시간(Retention time)은 11 ~ 13 분일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 본 발명에서, “벡터 (vector)”는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되

는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 “플라스미드 (plasmid)” 및 “벡터 (vector)” 는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0055] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM101, *E. coli* K12, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* XL-1Blue(Stratagene), *E. coli* B, *E. coli* B21 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르세스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

[0056] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook et al., supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann et al., EMBO J., 1:841, 1982) 또한 이러한 세포들의 형질전환에 사용될 수 있다.

[0057] 본 발명에서 “발현 조절 서열 (expression control sequence)” 이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SR α 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다. 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스포타제의 프로모터들, 예를 들어, Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵 세포 또는 바이러스의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려진 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 프로모터는 대장균에서 본 발명의 단백질을 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0058] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 “작동가능하게 연결 (operably linked)” 된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더 (leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, “작동가능하게 연결된” 은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인핸서 (enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[0059] 본원 명세서에 사용된 용어 “발현 벡터” 는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.

[0060] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선

택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점 (replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다.

[0061] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포는 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질전환”은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 본원 명세서에 사용된 용어 “형질감염”은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되든 아니든 발현 벡터가 숙주 세포에 의해 수용되는 것을 의미한다.

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0063] 실시예 1: 당부가 오스페미펜 유도체들의 제조

[0064] (1) 마이크로모노스포라 로도랑지아 유전체로부터 GT 암호화 유전자의 분리

[0065] 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주로부터 유래한 스테롤 당전이 효소를 분리하기 위하여, 우선 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주에서 분리한 유전체를 주형으로 사용하고, 기존 마이크로모노스포라 속에서 보고된 유전체의 염기서열을 기초로 하여 제작한 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머(primer)로 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 다음과 같이 실시하였다. N-터미널 프라이머는 하기 서열번호 1의 서열이고, C-터미널 프라이머는 하기 서열번호 2의 서열이다.

[0066] 서열번호 1: 5' - GGCATATGATCCACGCGCAGACTTCCGGATG - 3' (NdeI 제한위치)

[0067] 서열번호 2: 5' - CGCTCGAGATTCGGCCTGCGCCTCCCACGTCCA - 3' (XhoI 제한위치)

[0068] 상기 균주의 유전체 DNA 및 상기 프라이머들을 Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)와 함께 혼합하여 전체 32 사이클을 수행하였다(초기 불활성 98 ℃에서 5분, 52.8 ℃에서 69.3 ℃로 기울기 반응 후, 72 ℃에서 5분 동안 반응 후 종결). PCR 산물을 정제한 후, pGEMR-T 이지 벡터(pGEMR-T easy vector, Promega, Madison, WI, USA)에 접합한 다음, 대장균 XL1 블루(XL1 blue, Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 42 ℃에서 45초간 열처리한 후, 형질전환을 수행하였다. 선발된 형질전환 대장균으로부터 T-이지 벡터를 분리, 정제한 후 그 염기서열(서열번호 3) 및 이로부터 유추한 아미노산 서열(서열번호 4)을 결정하였다.

[0069] (2) 대장균에서 재조합 당전이 효소 MrGT2의 발현

[0070] 상기 T-이지 벡터를 NdeI과 XhoI 제한효소로 처리한 MrGT2 DNA 절편을, 동일한 제한효소들로 처리한 단백질 발현 벡터인 pET-28(a+)(Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입한 후, 대장균 BL21(DE3)(Stratagene, La Jolla, CA, USA)에 형질전환시켰다. 이때, 형질전환체의 선발을 위하여 카나마이신 항생제 50 ppm을 사용하였다.

[0071] 상기 재조합 대장균을 전술한 항생제와 최종 농도 1 M의 소르비톨(sorbitol) 및 2.5 mM 베타인(betaine)이 첨가된 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 30℃에서 배양하였고, 광학농도(optical density) 0.6 ~ 0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자, 최종 농도 0.5 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)를 첨가하였다. 재조합 대장균 균주를 22℃에서 18시간 추가 배양하였다. 배양 후 배양액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 50 mM 인산나트륨 용균(lysis) 완충용액(300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100)에 균체를 용해시키고, 초음파 분해(sonication)를 실시하였다. 이 후, 12000 rpm에서 20분간 냉장 원심분리하고, 상등액을 따로 모아 일부 시료를 12% SDS-PAGE로 분석하여 재조합 당전이 효소 MrGT1의 발현 정도를 확인하였다. 발현이 확인된 재조합 단백질을 정제하기 위하여, 전술한 상등액을 50 mM 인산 완충용액 (0.3 M NaCl, 20 mM imidazole)으로 평형화된 탈론-금속 친화성 수지(Talon-metal affinity resin, Clontech, Mountain View, CA, USA)와 섞은 후 4℃에서 한시간 동안 배양하였다. 2000 rpm에서 5분간 냉장 원심분리한 후, 수지를 일회용 컬럼에 도입한 후, 수지 10배 용량의 50 mM 이미다졸을 포함하는 인산 완충용액으로 세척하였다. 최종적으로 150 mM 이미다졸을 포함한 인산 완충용액 3 ml로 수지에 결합된 재조합 당전이 효소 MrGT2를 정제하였다.

[0072]

[0073] (3) 인간 유래 재조합 CYP들과 방선균 유래 재조합 MrGT2 연쇄 효소 반응에 의한 오스페미펜 당부가 유도체로

생전환, 분리 및 정제

- [0074] 기질로 사용되는 오스페미펜(OSPEM, Sigma-Aldrich)을 20 mM 수준으로 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; 이하 DMSO)에 용해한 후, 반응 완충용액(50 mM 인산 완충용액, 10 mM 염화마그네슘)으로 최종 1 mM의 농도가 되게 각각을 희석한 후, BD Gentest사 (Woburn, MA, USA)에서 구입한 인간 유래 재조합 CYP(CYP2C9 20 μ M 수준), 재조합 당전이 효소 MrGT2 25 μ M와 핵산당인 UDP-Glc 및 TDP-2'-deoxy-Glc 각각 2 mM의 수준으로, 그리고 CYP의 산화 반응을 위한 NADH조효소의 지속적 공급을 위하여 추가적으로 글루코스 6-인산(10 mM, Sigma-Aldrich), NADP⁺(1 mM, Sigma-Aldrich) 및 글루코스 6-인산 탈수소효소(8 U/ml 수준, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 원뿔 반응을 실시하였다(도 1). 반응 후, 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 6000 rpm에서 10분간 원심분리한 후의 상층 유기 용매층만을 모아서 감압건조를 실시하였다. 상기 추출물 내 목적 화합물의 생합성 여부를 확인하기 위하여 HPLC-ESI-MS 분석을 수행 하였다. 이동상으로 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 분당 140 μ l 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18(Waters, 50x1.0 mm, 1.7 μ m; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다.
- [0075] 한편, 상기 조추출물로부터 목적하는 당부가 SERM 유도체들의 분리 및 정제를 위하여 하기 콤비플래시 Rf MPLC 시스템을 적용하였다. 역상(reverse-phased) C18 카트리지에 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 15 ml의 속도로 흘러가는 MPLC 시스템에, 동일한 이동상 6 ml에 용해시킨 전술한 조추출물을 주입한 후, 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분리하였다. 개별 분획을 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기(LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 당부가 SERM 유도체들을 분리하였다. 기질로 오스페미펜은 MPLC 시스템 상 약 15 ~ 16분의 유지 시간으로 분리되었고, 목적하는 당부가 유도체들은 기질보다 빠른 유지 시간인 11 ~ 13분으로 검출되었다. 이들 정제된 당부가 화합물은 도 1에 나타내었다. 핵산당으로 UDP-Glc 당공여체를 이용한 생전환 반응의 수율은 약 48% 정도로 반응이 일어났으나, TDP-2'-deoxy-Glc의 경우엔 그 생전환 수율이 30% 이하 수준으로 상대적으로 낮게 나타난 바, 이는 당전이 효소가 당공여체 기질에 대한 일부 기질 유연성(flexibility)를 가지고 있는 동시에 당공여체 기질들에 대한 선호도(preference)의 차이를 제시하고는 있다. 또한 CYP와 MrGT2의 원뿔 반응 시 제조된 오스페미펜 유도체의 당부가 위치는 4'-위치가 아닌 4-위치의 수산기에 제한되어 있는 점은 당전이 효소의 당 수용체에 대한 기질 특이성(specificity)을 제공하였다.
- [0076] NMR 시료들은 200 μ l의 DMSO-d₆에 각 유도체들을 용해시킨 후, 5 mm 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브(Shigemi advanced NMR microtube, Sigma, St. Louis, MO)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. ¹³C NMR 스펙트럼은 배리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298 K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이터 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 당부가 SERM 유도체들의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 기질로 사용한 오스페미펜과 비교하였다.
- [0077] 오스페미펜 글루코사이드 (4-OSPEM-G, 24.3 mg; 생전환율 48%; ¹³C NMR [125 MHz, DMSO-d₆] δ 35.8, 42.7, 60.7, 62.2, 69.4, 71.5, 73.3, 76.7, 81.4, 109.2, 114.1, 126.3, 127.5, 127.9, 128.7, 129.1, 131.6, 139.2, 156.4, 161.5)
- [0078] 오스페미펜 디옥시글루코사이드 (4-OSPEM-DG, 15.8 mg; 생전환율 29%; ¹³C NMR [125 MHz, DMSO-d₆] δ 35.8, 37.5, 42.7, 60.7, 62.2, 68.9, 69.4, 71.4, 81.2, 104.1, 114.1, 126.3, 127.5, 127.9, 128.6, 129.1, 131.6, 139.3, 156.4, 161.5)
- [0079] **실험예 1: 유방암 및 정상 세포주 들을 대상으로 실시한 세포 독성 비교**
- [0080] 2종의 유방암 인간 세포주인 MCF-7(ER 양성, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, 미국)과 MDA-MB-231 세포주(ER 음성, ATCC)들은 10% 소 태아혈청(Fetal Bovine Serum)과 페니실린(100 unit/ml 수준), 스트렙토마이신(100 μ g/ml 수준)을 추가적으로 첨가한 DMEM 배지에서 5% 이산화탄소 농도 하에서 섭씨 37도로 배양하였다. 대조군인 오스페미펜(OSPEM)과 당부가 유도체 2종(4-OSPEM-G과 4-OSPEM-DG) 및 비교군인 타목시펜의 상기 2종의 유방암 세포주들에 대한 세포 독성을 MTT 검정법으로 확인하였다. 각 활성화된 세포주(2 x 10³)를 96-웰 플레이트 내 개별 웰에 분주하고 다양한 농도(0.1, 1, 3, 10, 30, 100 μ M 수준)의 OSPEM(Sigma-Aldrich), 상기 발명의 신규한 당부가 유도체 2종 및 타목시펜(tamoxifene, Sigma-Aldrich)을 첨가한 후 배양하였으며, 4일(96시간) 배양 후 MTT 시약을 각 웰에 분주하여 추가적으로 3시간 더 배양하였다. DMSO를 첨가한 후, 570 nm 파장으로 세팅된 Tecan 마이크로 웰 플레이트 리더기(Tecan AG, Mannedorf, Switzerland)로 그 흡

광도를 측정하였고, Prism 소프트웨어를 통한 비직선 회귀 분석으로 각 처리군들의 반수저해농도(IC₅₀) 수치를 계측하였다.

[0081] 한편, OSPEM 및 당부가 OSPEM 유도체들의 유방암 세포주 특이적 세포독성을 확인하기 위하여 정상 세포를 대상으로 그 세포독성을 비교해 보았다. 정상 세포로는 생쥐 태아섬유아세포(Mouse Embryonic Fibroblast, ATCC)이 활용되었으며, 상기 기술한 MTT 검정법으로 처리군 농도 별 세포독성을 비교하였다.

[0082] 암 세포주 대상 세포독성 결과는 도 2에 나타내었다. 대조군인 오스페미펜 처리군의 경우, 반수저해농도는 유방암 세포주인 MCF-7과 MDA-MB-231에 대하여 각각 약 52.7 μM 및 100 μM 이상으로 나타난데 비하여, 비교군인 타목시펜 처리군에서는 반수저해농도가 62.6 μM 및 77.7 μM로 나타났다. 한편, 상기 발명의 신규 당부가 오스페미펜 유도체 2종(4-OSPEM-G, 4-OSPEM-DG)의 경우에는 ER 양성 유방암 세포주인 MCF-7 세포주 대상으로 반수저해농도가 각각 58.2 μM와 57.2 μM로 제시되었다. 반면, ER 음성 유방암 세포주인 MDA-MB-231 대상으로 2종의 당부가 유도체들의 반수저해농도는 오스페미펜 처리군과 동일하게 100 μM 이상으로 나타났다. 따라서, 당부가 유도체 2종은 오스페미펜 대조군보다는 2종의 유방암 세포주들을 대상으로 상대적으로 낮은 세포독성을 제시하고 있으나, 오스페미펜과 유사하게 ER 양성 유방암 세포주에 대하여 선택적인 세포독성을 제공하는 동일한 경향을 보여주었다. 다음으로 정상 세포인 생쥐 태아섬유아세포를 대상으로 한 세포독성 실험의 경우에, 100 μM 수준까지의 모든 처리군에 있어서 그 독성이 나타나지 않았고 이를 통하여 오스페미펜과 타목시펜 및 당부가 신규 오스페미펜 유도체 2종 모두 암 세포에 특이적인 세포독성을 가지고 있음을 알 수 있다.

[0083] 실험예 2: 난소 적출 쥐 대상으로 실시한 질 상피 조직학적 변화 비교

[0084] 암컷 Sprague Dawley 쥐(DBL, 충북, 대한민국)들을 개별 케이지에서 12시간 암명 주기로 사육하였다. 9주에서 11주령 구간의 암컷 쥐들을 경구 투여 실험에 사용하였으며, 투여 시작 10에서 14일 전 기간에 실험 쥐들의 난소를 적출하였다. 난소 적출 쥐를 대상으로 다음과 같은 실험을 수행하였다. 각 실험에서 처리군(5에서 6마리 사이)은 무작위적으로 선별하였으며 처리군 별 평균 체중은 동일하게 하였다. 경구 투여를 위하여 오스페미펜과 당부가 오스페미펜 신규 유도체 2종(4-OSPEM-G과 4-OSPEM-DG) 및 양성 대조군인 에티닐에스트라디올(17 α-ethinyl estradiol, Sigma-Aldrich)과 비교군인 라록시펜(raloxifene, Sigma-Aldrich)을 우선 에탄올에 용해한 후 PEG로 준비된 무처리군으로 적절한 농도로 까지 희석하였으며, 그 투여용량은 체중 kg 당 3 mL로 하였다. 투여 용량과 효과와의 관계성 실험을 위하여, 하루에 한번 씩 총 2주간에 걸쳐 경구투여를 실시 하였다.

[0085] 처리군으로는 PEG 무처리군, 양성 대조군인 에티닐에스트라디올(0.1 mg/kg/day 용량) 그리고 오스페미펜(10 mg/kg/day 용량), 4-OSPEM-G(10 mg/kg/day 용량), 4-OSPEM-DG(10 mg/kg/day 용량) 및 비교군인 라록시펜 처리군(10 mg/kg/day 용량)으로 수행되었으며, 양성 대조군을 제외하고 각 처리군 별 용량은 기존 문헌(Unkila M. et al., J Steroid Biochem Mol.Biol. 138:107, 2013)의 용량을 참고하여 10 mg/kg/day 용량으로 고정시켰다. 마지막 투여를 끝낸 24시간 후 각 처치 그룹 내 쥐들의 체중을 측정하는 동시에 채혈을 실시하였다. 채혈 후 각 그룹 내 쥐들은 이산화 탄소 챔버 내 경추 탈구법으로 안락사 시켰다. 자궁경부를 제외한 질을 적출하여 계량하였으며, 자궁은 10% 완충 포르말린에 보존하였다. 개별 질 부위를 반으로 절개하여 파라핀 블록 안에 10% 완충 포르말린에 고정화한 후, 4 μm 단면으로 절단하여 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin) 염색을 실시하였다. 상대적 질 중량은 아래 계산식 1로 환산하였다.

[0086] [계산식 1]

$$[0087] \text{상대적 질 중량} = \frac{\text{질 중량(g)}}{\text{체중(g)}} \times 100,000$$

[0088] 질 내 상피 두께는 CCD 카메라가 장착된 현미경을 이용하여 이미지를 캡처한 후 이미지 프로 플러스 소프트웨어로 이미지 분석하여 측정하였다. 질 내 상피 두께를 측정하기 위하여 상기 준비된 단면을 100배 확대하여 3번에서 4번에 걸쳐 계측하였다. 모든 기관의 적출 및 조직학적 분석은 개별 처리군에 대한 암맹 실시 후 수행되었다. 한편, 개별 처리군 별로 계측되는 상피 두께와 상대적 질 중량 및 상대적 자궁 중량의 비교를 위하여 양성 대조군인 에티닐에스트라디올 처리군의 상기 계측 평균을 100으로 하여 그에 상대적인 수치, 즉 에티닐에스트라디올 반응 백분율 퍼센트(%)로 환산하여 다른 처리군들의 질 내 상피 두께와 상대적 질 중량 및 상대적 자궁 중량을 표현하였다. 상기 3가지 파라미터들에 대한 통계적 분석을 위하여 Dunnett의 사후검증법을 통한 일원(1-way) ANOVA 분산분석 및 비모수 검증법인 Kruskal-Wallis법이 활용되었고, 통계 분석 프로그램으로는 SPSS 버전 14.0을 사용하였다.

[0089] 오스페미펜과 본 발명에 따른 신규 당부가 오스페미펜 유도체 2종 및 비교군인 라록시펜에 2주간 노출된 난소

적출 쥐를 대상으로 수행된 질 상피 두께, 질 중량 및 자궁 중량의 비교 결과를 도 3에 나타내었다. 특히, 모든 결과는 양성 대조군인 에티닐에스트라디올 처치 그룹에서 나타난 상기 파라미터들을 100%로 고정하여 오스페미펜(OSPEM)과 본 발명에 따른 신규 당부가 오스페미펜 유도체 2종(4-G-OSPEM, 4-DG-OSPEM) 및 비교군인 라록시펜 개별 처리군들에서 나타난 질 상피 두께, 질 중량 및 자궁 중량의 변화를 상대적 수치로 제시하였다.

[0090] 그 결과, 오스페미펜 유도체 2종의 처치 그룹에 있어서 라록시펜 처치 그룹과는 확연히 상이한 상대적 질 상피 두께, 질 중량 및 자궁 중량 차이를 보여주었으며, 원래 화합물인 오스페미펜 처치 그룹과 비교 시에는 통계적으로 매우 유사한 경향을 보여주었다.

[0091] 실험예 3: 오스페미펜과 당부가 오스페미펜 유도체들의 생체이용률 비교

[0092] 상술한 바와 같은 인 비보(in vivo) 동물 실험 결과(도 3)는 실험예 1에서 제시된 오스페미펜 당부가 유도체들의 오스페미펜과 비교하여 상대적으로 낮게 나타난 인 비트로(in vitro) 유방암 세포독성(도 2)과는 다른 경향을 보여주고 있는 바, 난소 적출 쥐에 2주간 경구 투여된 신규한 당부가 오스페미펜 유도체 2종의 경우 실험 동물 내 초회통과를 거치는 대사과정을 거치면서 상대적으로 향상된 약리 활성을 제공하는 것으로 예상된다. 즉, 당이 부가된 오스페미펜 유도체 2종의 경우 경구 투여 후 실험 동물 내 대사과정 중 원래 화합물인 오스페미펜과는 상이한 속도로 대사될 가능성을 제기하고 있는 바, 처치 그룹 별로 2주간의 경구 투여를 끝내고 24시간 후 채혈한 전혈 시료들로부터 혈 중 오스페미펜의 잔존 용량을 측정하여 당부가 유도체들의 생체이용률 향상 가능성을 확인하였다.

[0093] 세부적인 실험은 아래와 같이 진행하였다. 즉, 채혈 후, 전혈에 동일 부피의 에틸아세테이트로 처리하여 30초간 강하게 혼합한 후, 4000rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 이후, 유기용매 상층을 분리하여 감압 건조한 후 분석 전까지 70℃에 보관하였다. 혈중 오스페미펜 주요대사체인 4-OH-OSPEM의 잔존량을 HPLC-ESI-MS 기기분석을 기준으로 실시하였다.

[0094] 그 결과, 오스페미펜 대조 그룹(2.1 ng/ml)과 비교하여 당부가 유도체인 4-OSPEM-G과 4-OSPEM-DG를 투여한 2개 그룹에서 4-OH-OSPEM의 혈중 농도가 각각 약 8.4와 9.3으로 4배 이상 높게 나타남을 확인 할 수 있었다(도 4). 이는 당부가 유도체들이 경구 투여 후 흡수(Absorption), 분포(Distribution), 대사(Metabolism) 및 배출(Excretion)과 같은 기본적인 ADME 과정을 거치면서 혈액 순환계에 상대적으로 오랜 기간 잔존할 수 있음을 시사하고 있는 바, 기존 오스페미펜의 낮은 생체이용률(Bioavailability)을 개선하는 동시에 그에 따른 약효의 지속성을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

[0095] 이상의 결과에서 나타난 바와 같이, 기존 약리 활성 화합물의 당 전이에 의한 구조 변형 유도체 생전환을 통하여 기존 화합물을 개량할 수 있으며, 이러한 개량화로서 기존 약물의 신규 제형(dosage form)으로의 응용 가능성을 포함하는 의약품 및 의약품 원료로서의 활용 잠재성을 확인할 수 있다.

[0096] 상기 실시예에서 생성된 화합물에 대하여 하기와 같이 제제화하였다.

[0097] 제제예 1: 정제(직접 가압)

[0098] 화합물 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 14.1 mg, 크로스포비돈(USNF) 0.8 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg을 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

[0099] 제제예 2: 정제(습식 조립)

[0100] 화합물 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 16.0 mg과 녹말 4.0 mg을 섞었다. 폴리솔베이트 800.3 mg을 순수한 물에 녹인 후, 이 용액의 적당량을 첨가하여 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후, 콜로이달 실리콘 디옥사이드 2.7 mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 mg과 혼합하였다. 상기 혼합물을 가압하여 정제로 제조하였다.

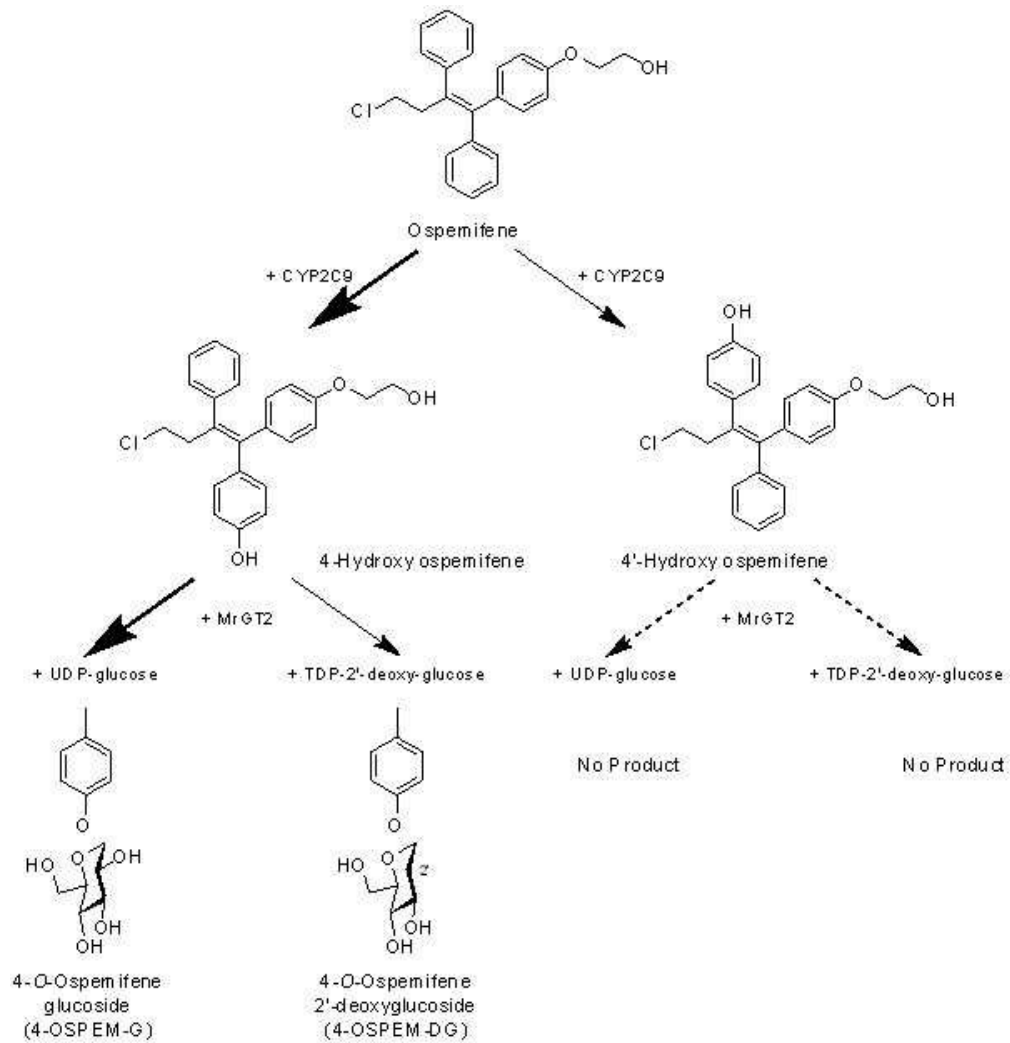
[0101] 제제예 3: 분말과 캡슐제

[0102] 화합물 5.0 mg을 체로 친 후에, 락토스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg과 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 캡슐 제조기를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

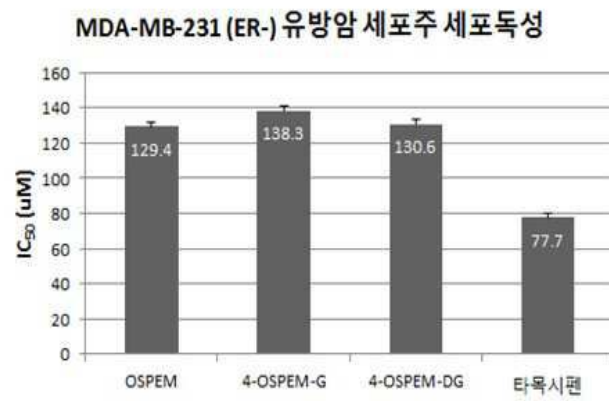
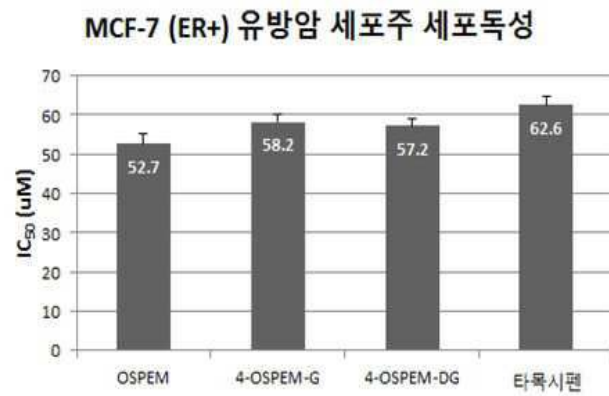
[0103] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

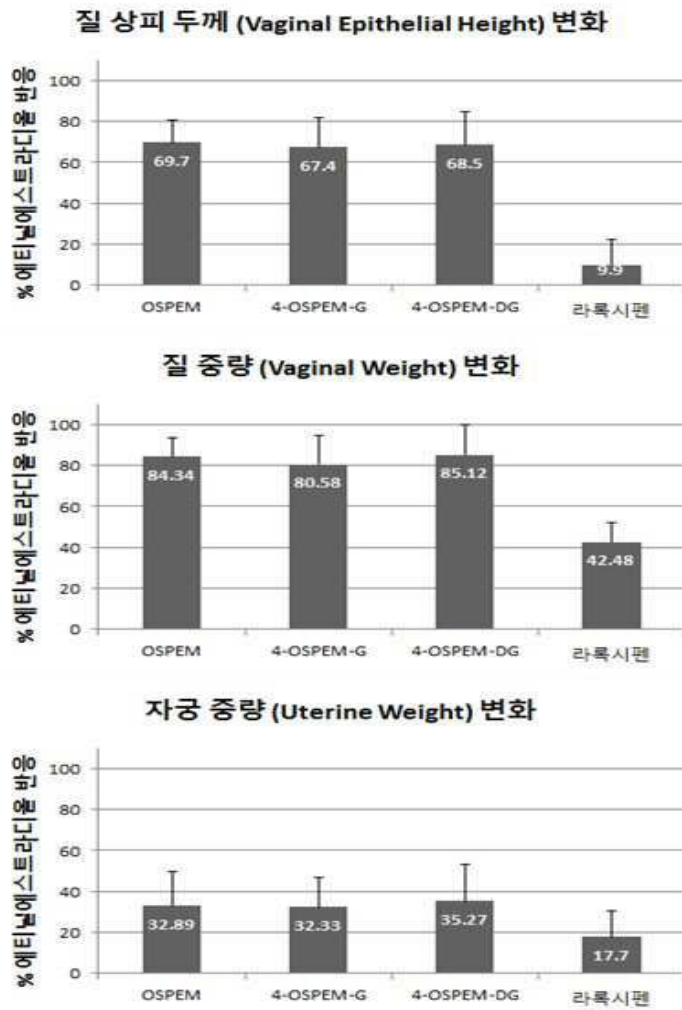
도면1



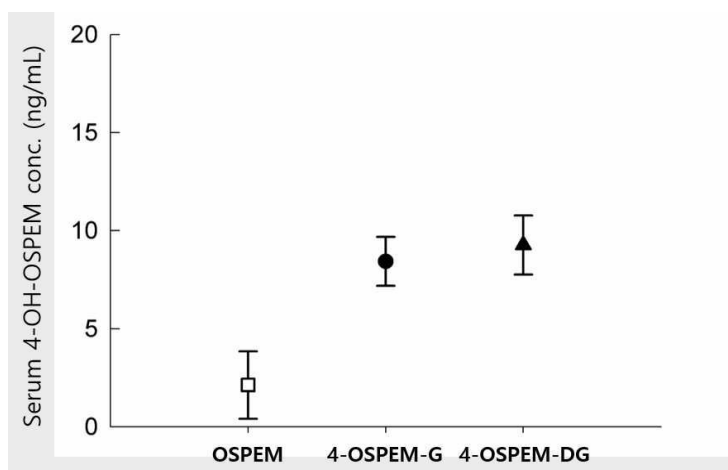
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea University Research & Business Foundation
- <120> Glycosyl-attached Ospemifene, Method for Preparing Thereof and

Pharmaceutical Compositions Containing The Same as Active Ingredients	
<130>	P17-B153
<160>	4
<170>	KopatentIn 2.0
<210>	1
<211>	32
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	primer
<400>	1
ggcatatgat ccacgcgcac gacttccgga tg	32
<210>	2
<211>	33
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	primer
<400>	2
cgctcgagat tcggcctgcg cctcccacgt cca	33
<210>	3
<211>	1146
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	MrGT2 gene
<400>	3
atgcgcaccc tcagcgccac cgccggcccg cggggcgcacg gggccccgta caccggccgc	60
ggcgcggccc ggcggcgcgc ggggcacgac gtggccgtcg ccacgaccga cacgtcggcc	120
cgagtgggtcc gggagcccg gccaagggttc cgggccctcc cgcccgacca ccgcgcgcac	180
gcgggctggc ggccccaccg cgaggtcgtg cgcgcggccg gcgggcaccg cggaactccg	240
ccagccgttc gccgacgcgc cgtctcggag ggcacggacc tccggccgcg gccgacgacc	300
accgcgcgcg tcgggtggct cagcggcgag gcgacggccc cccgggacct ccggcgcgac	360
caccagccca ccgccaccac cgccgacggc ccgccgtcg tcaccggcgc gcgtccctg	420
gggcggcccc gcaaccgcac ggccggccgc ctggccctgc gcatggccga ccgatctac	480

gccgaggcgc tcgcgcgcct gcgggagcgg ctgtgcctgc cgccgctgtc cgcggccgcg 540
atgccggcgc ggcaggagcg ggccggctgg cccgtcctgc acggcttcgg caccggcctc 600
gtcccgcggc cggccgactg gcgccccggc ctcgaggteg tcgggcccgtg gtggccgcac 660

cacgacgccg gcgagcgcct gccctcggaa ctcgaggact tcctggacgc gggaccgcgg 720
ccggtcctgg tgcgttcgg cagcatggcc gcccggcacg gcgagcggct cagcgaactg 780
gcggtgcgcg cgtcgcgcgc cgccggcctc cgcggcatcc tccagtccgg caacgcctgc 840
ctcgcggcgg agggcgacga cgtcctgacg gtcggcgacg tccccacgc ctcctgttc 900
ccccgcctcg cggcgggtgt gcaccacgcg cgcgggcacc agcggccga cctgcgggc 960
ggccgtaccc tcggtggcgg tcccggtgac cgcgcaccag agccgttctg ggccggccgg 1020
ctggcgcgga tccgggcccgc ccagccccg gtccccttca cgtcgtcggc gacgaggcgt 1080

acgcgcgggc cctggggcgc cgcgcgcgcg gacctggccg cggaggacgg cgccgcgcgc 1140
gtgtga 1146

<210> 4

<211> 381

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MrGT2 protein

<400> 4

Met Arg Thr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Pro Arg Gly Asp Gly Ala Pro

1 5 10 15

Tyr Thr Gly Arg Gly Ala Ala Arg Arg Arg Ala Gly His Asp Val Ala

20 25 30

Val Ala Thr Thr Asp Thr Ser Ala Arg Val Val Arg Glu Pro Gly Pro

35 40 45

Gly Phe Arg Ala Leu Pro Ala Asp His Arg Ala His Ala Gly Trp Arg

50 55 60

Pro His Arg Glu Val Val Arg Ala Ala Gly Gly His Arg Gly Thr Pro

65 70 75 80

Pro Ala Val Arg Arg Arg Ala Val Ser Glu Gly Thr Asp Leu Arg Pro

85 90 95

Arg Pro Thr Thr Thr Ala Pro Leu Arg Trp Leu Ser Gly Glu Ala Thr

100	105	110	
Ala Pro Arg Asp Leu Arg Arg Asp His Gln Pro Thr Ala Thr Thr Ala			
115	120	125	
Asp Gly Pro Pro Val Val Thr Gly Ala Arg Ser Leu Gly Arg Pro Gly			
130	135	140	
Asn Arg Thr Ala Gly Arg Leu Ala Leu Arg Met Ala Asp Arg Ile Tyr			
145	150	155	160
Ala Glu Ala Val Ala Arg Leu Arg Glu Arg Leu Cys Leu Pro Pro Leu			
165	170	175	
Ser Ala Ala Ala Met Pro Ala Arg Gln Glu Arg Ala Gly Trp Pro Val			
180	185	190	
Leu His Gly Phe Gly Thr Ala Leu Val Pro Arg Pro Ala Asp Trp Arg			
195	200	205	
Pro Gly Leu Glu Val Val Gly Pro Trp Trp Pro His His Asp Ala Gly			
210	215	220	
Glu Arg Leu Pro Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Asp Ala Gly Pro Arg			
225	230	235	240
Pro Val Leu Val Arg Phe Gly Ser Met Ala Ala Arg His Gly Glu Arg			
245	250	255	
Leu Ser Glu Leu Ala Val Arg Ala Leu Arg Arg Ala Gly Leu Arg Gly			
260	265	270	
Ile Leu Gln Ser Gly Asn Ala Cys Leu Ala Ala Glu Gly Asp Asp Val			
275	280	285	
Leu Thr Val Gly Asp Val Pro His Ala Leu Leu Phe Pro Arg Leu Ala			
290	295	300	
Ala Val Val His His Ala Arg Arg His Gln Arg Arg Asp Pro Ala Gly			
305	310	315	320
Gly Arg Thr Leu Gly Gly Gly Pro Gly Asp Arg Arg Pro Glu Pro Phe			
325	330	335	
Trp Ala Gly Arg Leu Ala Arg Ile Arg Ala Ala Pro Ala Pro Val Pro			
340	345	350	
Phe Thr Ser Ser Ala Thr Arg Arg Thr Arg Gly Pro Leu Gly Arg Arg			

355	360	365
Arg	Pro	Asp
Leu	Ala	Ala
Glu	Asp	Gly
Ala	Ala	Arg
Val		
370	375	380