(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 2 월 14 일 (14.02.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/031754 A1

(51) 국제특허분류:
C07H 15/203 (2006.01) *C12P 19/46* (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/008662

(22) 국제출원일: 2018 년 7 월 31 일 (31.07.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0101574 2017 년 8 월 10 일 (10.08.2017) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 박제원 (PARK, Je Won); 10324 경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7 504-904, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

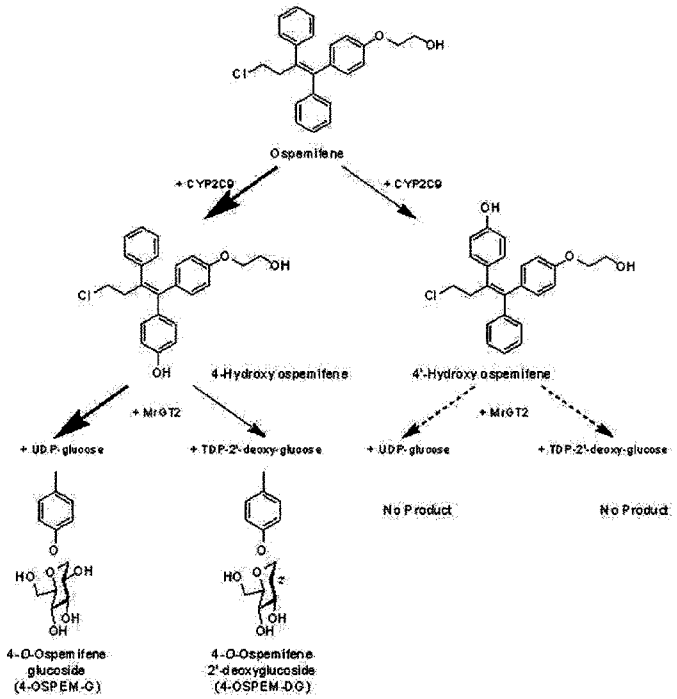
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

WO 2019/031754 A1

(54) **Title:** SUGAR-ADDED OSPEMIFENE, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME AS ACTIVE INGREDIENT

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



(57) **Abstract:** The present invention relates to a novel ospemifene derivative compound in which a sugar is added to ospemifene as one kind of selective estrogen receptor modulator (hereinafter, SERM), and to a preparation method for the compound. The ospemifene derivative compound has improved bioavailability compared with existing ospemifene, and also has partially improved bioavailability compared with the original compound ospemifene, which provides a disease treatment effect for dyspareunia, vaginal dryness, and the like appearing in menopausal women, and thus can be favorably used as a modified dosage form.

[다음 쪽 계속]

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 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 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.

명세서

발명의 명칭: 당 부가된 오스페미펜, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물

기술분야

[1] 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.

[2]

배경기술

[3] 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 성 기능 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 성행위 중 통증이 나타나는 갱년기 여성 장애질환이다. 오스페미펜의 투약은 질 조직에 대하여 에스트로겐성 효과를 제공함으로서 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.

[4] 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.

[5] 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)를 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 오스페미펜의 제조방법 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.

[9] 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 가능하게 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.

[10] 이에, 본 발명자들은 OSPEM의 생체이용율을 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 생체이용율이 증가되고 향상된 약리활성을 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[11]

[12] **선행기술문헌**

[13] **특허문헌**

[14] (특허문헌 1) WO 1996007402A

[15] (특허문헌 2) WO 2003103649A1

[16]

[17] **비특허문헌**

[18] (비특허문헌 1) Kangas L, Biochemical and pharmacological effects of toremifene metabolites. Cancer Chemother Pharmacol. 1990. 27: p. 8-12.

[19] (비특허문헌 2) 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.

[20] (비특허문헌 3) 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.

[21] (비특허문헌 4) Nappi R.E., et al., Advances in pharmacotherapy for treating female sexual dysfunction. Exp. Opin. Pharmacother. 2015. 16(6): p. 875-887.

[22] (비특허문헌 5) GlobalData, PharmaPoint: Postmenopausal vaginal atrophy-Global drug forecast and market analysis to 2022. 2013.

[23] (비특허문헌 6) 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.

[24]

[25] **발명의 요약**

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

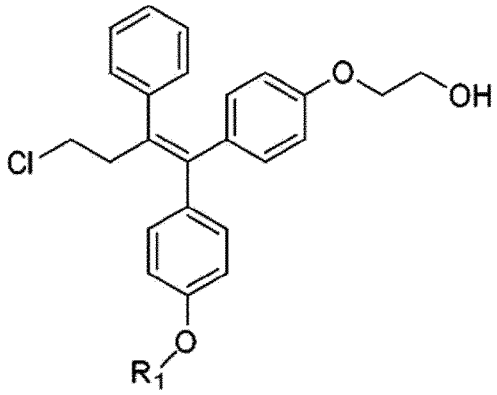
[27] 본 발명의 다른 목적은 인간 유래 재조합 사이토크롬효소와 미생물 유래 재조합 당전이효소의 원팟(one-pot) 생전환 방법에 의해 오스페미펜을 당부가 오스페미펜 유도체로 전환하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

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

[29]

[30] [화학식 1]

[31]



[32]

[33] 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.

[34] 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.

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

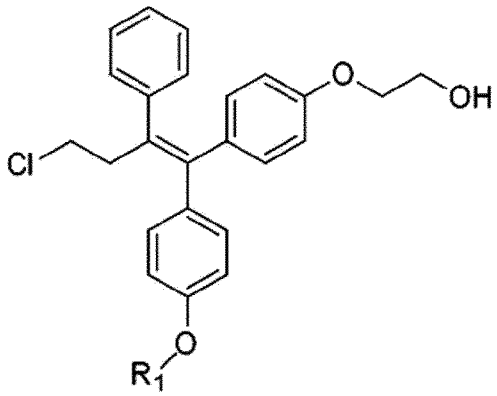
[36] (a) 오스페미펜 용액과 당전이효소, 사이토크롬 P450, 핵산당으로서 UDP-글루코스 또는 TDP-2-deoxy-글루코스 및 글루코오스 6-인산, 글루코스 6-인산 탈수소효소 및 NADP+를 혼합하여 원팟 반응을 수행하는 단계; 및

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

[38]

[39] [화학식 1]

[40]



[41]

[42] 상기 식에서,

[43] 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.

[44] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 투여하는 단계를 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 구성된 군에서 선택되는 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[45] 본 발명은 또한, 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 구성된 군에서 선택되는 질환의 치료 또는 예방을 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.

[46] 본 발명은 또한, 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 구성된 군에서 선택되는 질환의 치료 또는 예방용 약제 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 사용을 제공한다.

[47]

도면의 간단한 설명

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

[49] 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.

[50] 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.

[51] 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 분석함으로서 혈 중 오스페미펜의 잔존 량을 분석함으로서 당부가 유도체들의 생체이용률 정도를 비교한 그래프이다.

[52]

[53] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**

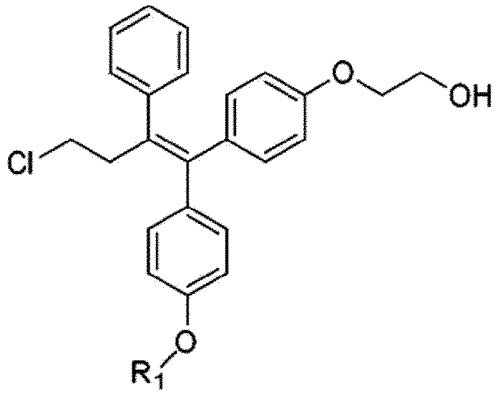
[54] 본 발명에서는 기존의 생체이용율이 낮았던 오스페미펜의 단점을 극복할 수 있는 오스페미펜 유도체를 개발하고자, 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주의 유전체(genome)로부터 GT 암호화 유전자를 분리하고, 이를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질전환 대장균을 제작하였다. 다음으로 상기 발현된 당전이 효소에 OSPEM의 산화 대사과정에 관여하는 재조합 CYP2C9를 첨가하고, 오스페미펜 및 핵산당(nucleotidyl sugar)인 우리딘 이인산 글루코스(uridine diphosphate glucose; 이하 UDP-Glc)와 티미딘 이인산 2'-디옥시-글루코스(thymidine diphosphate 2'-deoxy-glucose, 이하 TDP-2'-deoxy-Glc)를 당 공여체로 반응시킨 원팟 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 공명 스펙트로미트리(nuclear magnetic resornance 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.

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

[56]

[57] [화학식 1]

[58]



[59]

[60] 상기 식에서,

[61] 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.

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

[63] 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, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

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

[65] 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.

[66] 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.

[67] 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.

[68] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 투여하는 단계를 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 구성된 군에서 선택되는 질환의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

[69] 본 발명은 또 다른 관점에서, 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 구성된 군에서 선택되는 질환의 치료 또는 예방을 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도에 관한 것이다.

[70] 본 발명은 또 다른 관점에서, 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 구성된 군에서 선택되는 질환의 치료 또는 예방용 약제 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 사용에 관한 것이다.

[71]

[72] 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.

[73] 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.

[74] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시에 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.

[75] 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.

[76] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캅셀제, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 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.

[77] 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.

[78] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 ㎏인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 ㎎/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500 ㎎/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[79] 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 원팟 반응을 수행하는 단계; 및 (b) 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체를 수득하는 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

[80] 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.

[81] 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.

[82] 본 발명의 일 태양에서, 상기 1) 단계의 재조합 당전이 효소는 마이크로모노스포라 로도랑지아로부터 분리할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[83] 본 발명의 일 태양에서, 상기 재조합 당전이 효소는 바람직하게는MrGT2이고, 더욱 바람직하게는 대장균에서 발현된 MrGT2이다.

[84] 본 발명의 일 태양에서, 상기 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 방법에 사용되는 고정상은 역상 C18일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[85] 본 발명의 일 태양에서, 상기 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 방법에 사용되는 이동상은 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v/v) 혼합액일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[86] 본 발명의 일 태양에서, 상기 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 유지 시간(Retention time)은 11 ~ 13 분일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[87] 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 사용되는 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.

[88] 라이게이션 후에, 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환 되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 E. coli DH5α, E. col 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(speices) 및 속(genera)등이 또한 사용될 수 있다. 전술한 E. coli에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 섭틸리스(Bacillus subtilis)와 같은 바실리(bacilli), 살모넬라 타이피뮤리움(Salmonella typhimurium) 또는 세라티아 마르게센스(Serratia marcescens)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(Pseudomonas) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.

[89] 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.

[90] 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 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보좀 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그날 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SRα 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 포스파타제의 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.

[91] 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 리보좀 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보좀 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 올리고뉴클레오티드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

[92] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 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 (이종) DNA가 생성될 수 있다.

[93] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 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.

[94] 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 염색체외 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.

[95] 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.

[96]

[97] 실시예 1: 당부가 오스페미펜 유도체들의 제조

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

[99] 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.

[100] 서열번호 1: 5' - GGCATATGATCCACGCGCACGACTTCCGGATG - 3' (NdeI 제한위치)

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

[102] 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.

[103]

[104] (2) 대장균에서 재조합 당전이 효소 MrGT2의 발현

[105] 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.

[106] 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-티오갈락토피라노시드(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 nM 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 rmp에서 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.

[107]

[108] (3) 인간 유래 재조합 CYP들과 방선균 유래 재조합 MrGT2 연쇄 효소 반응에 의한 오스페미펜 당부가 유도체로 생전환, 분리 및 정제

[109] 기질로 사용되는 오스페미펜(OSPEM, Sigma-Aldrich)을 20 mM 수준으로 디메틸설폭시드(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 μM 수준), 재조합 당전이 효소 MrGT2 25 uM와 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℃에서 2시간 동안 원팟 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 μl 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18(Waters, 50x1.0 mm, 1.7 μm; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다.

[110] 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 분취하였다. 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 분취되었고, 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 원팟 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.

[111] NMR 시료들은 200 μl의 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 데이타 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 당부가 SERM 유도체들의 13C-NMR 스펙트럼을 기질로 사용한 오스페미펜과 비교하였다.

[112] 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)

[113] 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)

[114]

[115] 실험예 1: 유방암 및 정상 세포주 들을 대상으로 실시한 세포 독성 비교

[116] 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 μg/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 × 103)를 96-웰 플레이트 내 개별 웰에 분주하고 다양한 농도(0.1, 1, 3, 10, 30, 100 μM 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 흡광도를 측정하였고, Prism 소프트웨어를 통한 비직선 회귀 분석으로 각 처리군들의 반수저해농도(IC50) 수치를 계측하였다.

[117] 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 전술한 MTT 검정법으로 처리군 농도 별 세포독성을 비교하였다.

[118] 암 세포주 대상 세포독성 결과는 도 2에 나타내었다. 대조군인 오스페미펜 처리군의 경우, 반수저해농도는 유방암 세포주인 MCF-7과 MDA-MB-231에 대하여 각각 약 52.7μM 및 100μM 이상으로 나타난대 비하여, 비교군인 타목시펜 처리군에서는 반수저해농도가 62.6μM 및 77.7μM로 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 58.2μM와 57.2μM로 제시되었다. 반면, ER 음성 유방암 세포주인 MDA-MB-231 대상으로 2종의 당부가 유도체들의 반수저해농도는 오스페미펜 처리군과 동일하게 100μM 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, 100μM 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.

[119]

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

[121] 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 처치군(5에서 6마리 사이)은 무작위로 선별하였으며 처리군 별 평균 체중은 동일하게 하였다. 경구 투여를 위하여 오스페미펜과 당 부가 오스페미펜 신규 유도체 2종(4-OSPEM-G과 4-OSPEM-DG) 및 양성 대조군인 에티닐에스트라디올(17α-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.

[122] 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 헤마콕실린-에오신(hematoxylin-eosin) 염색을 실시하였다. 상대적 질 중량은 아래 계산식 1로 환산하였다.

[123]

[124] [계산식 1]

[125]

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

[126]

[127] 질 내 상피 두께는 CCD 카메라가 장착된 현미경을 이용하여 이미지를 캡쳐한 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.

[128] 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.

[129] 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.

[130]

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

[132] 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.

[133] 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 잔존 량을 HPLC-ESI-MS 기기분석을 기준으로 실시하였다.

[134] 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.

[135] 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.

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

[137]

[138] 제제예 1: 정제(직접 가압)

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

[140]

[141] 제제예 2: 정제(습식 조립)

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

[143]

[144] 제제예 3: 분말과 캡슐제

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

[146]

[147] 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.

[148]

산업상 이용가능성

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

[150]

[151] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 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.

[152]

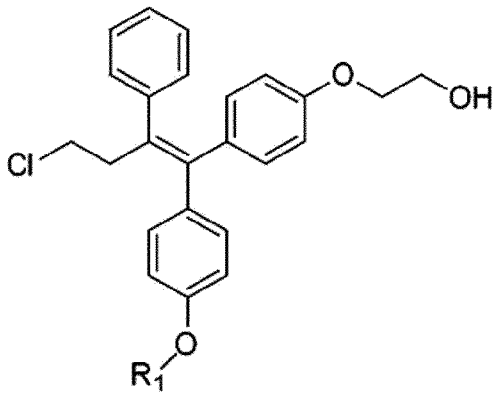
서열목록 Free Text

[153] 전자파일 첨부하였음.

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-아세틸글로코사민이드(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.

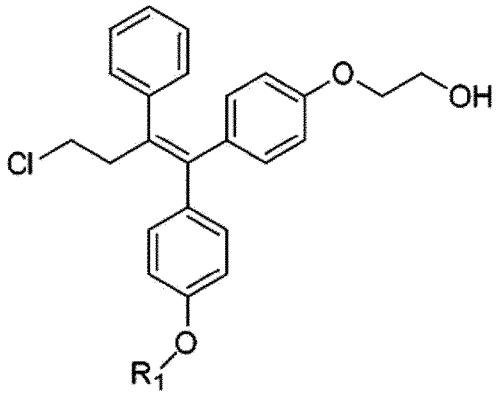
[청구항 4] 다음 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체의 제조방법:

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

수행하는 단계; 및

(b) 화학식 1로 표시되는 오스페미펜 유도체를 수득하는 단계.

[화학식 1]

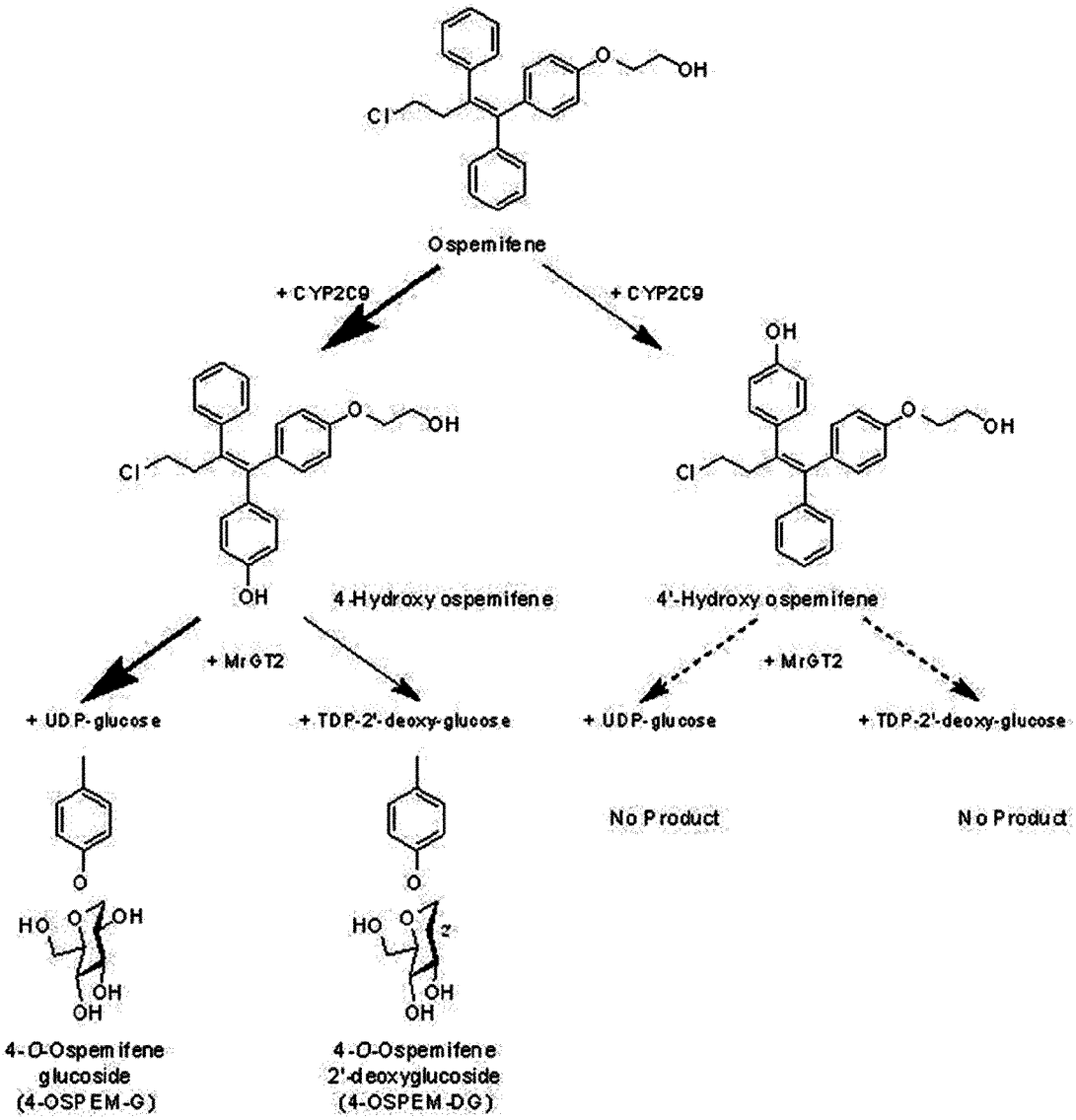


상기 식에서,

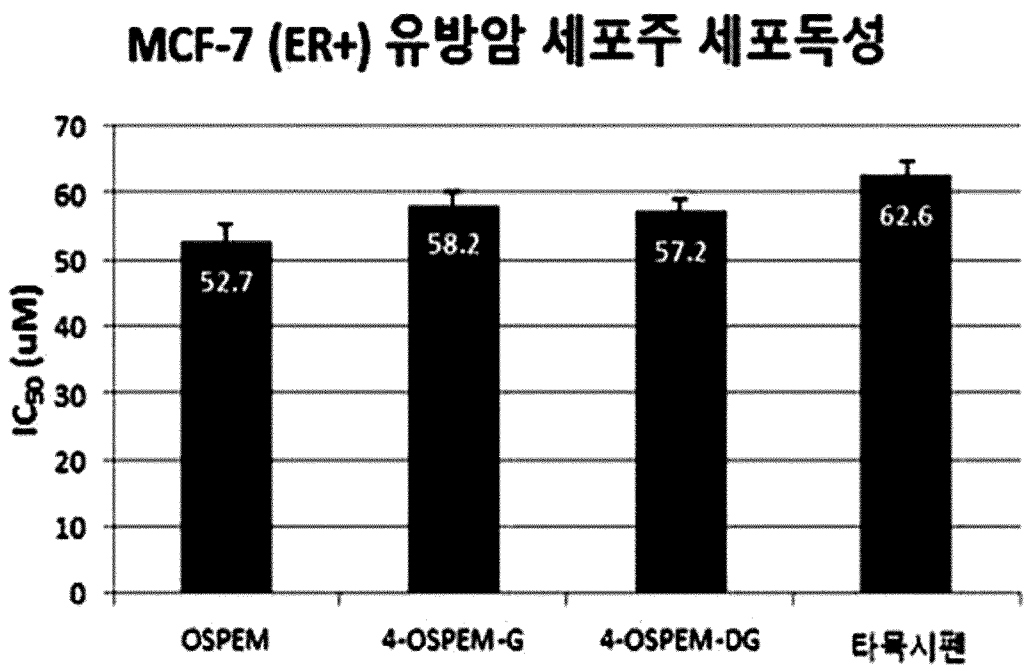
R1은 독립적으로 글루코스(glucose), 갈락토오스(galactose), 알로스(allose), 탈로스(tallose), 자일로스(xylose), N-아세틸글루코사민(N-acetyl-glucosamine), 락토오스(lactose) 또는 2'-디옥시-글루코스(2'-deoxy-glucose)이다.

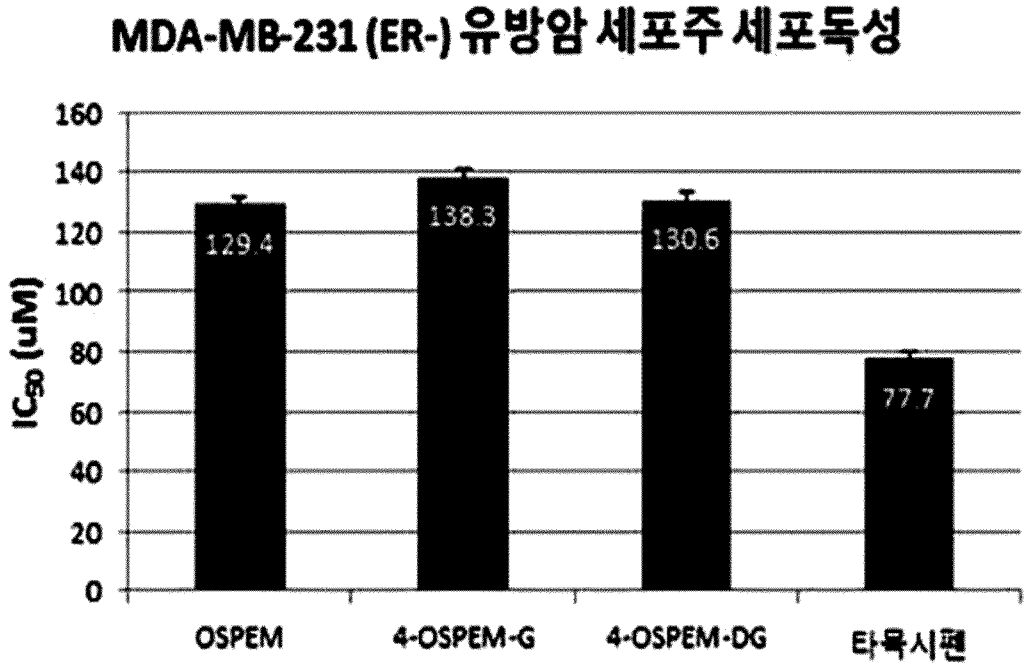
[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 당전이 효소는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

[도1]

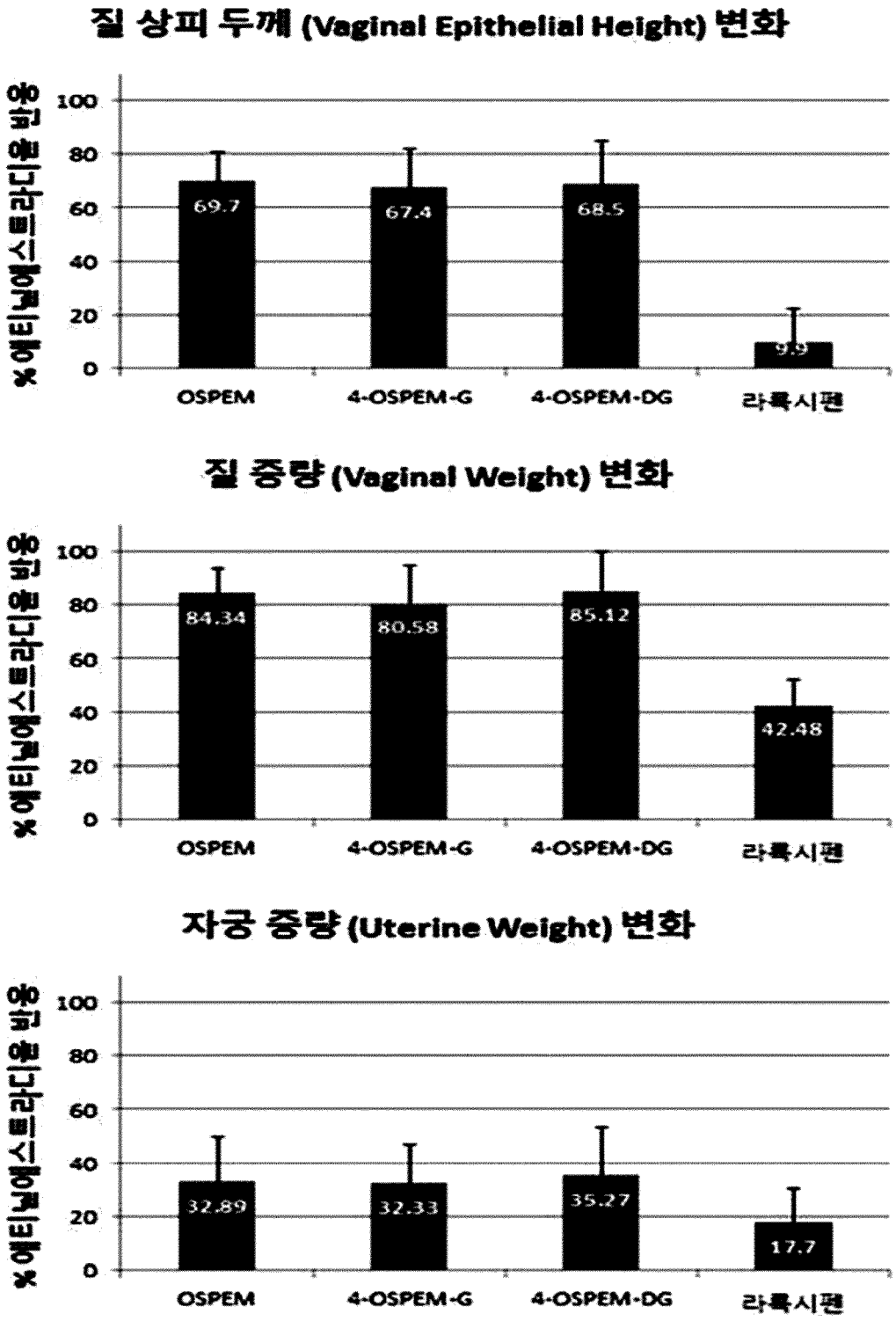

Ospemifene
+ CYP2C9
+ CYP2C9
4-Hydroxy ospemifene
4'-Hydroxy ospemifene
+ MrGT2
+ MrGT2
+ UDP-glucose
+ TDP-2'-deoxy-glucose
+ UDP-glucose
+ TDP-2'-deoxy-glucose
No Product
No Product
4-O-Ospemifene glucoside (4-OSPEM-G)
4-O-Ospemifene 2'-deoxyglucoside (4-OSPEM-DG)

[도2]

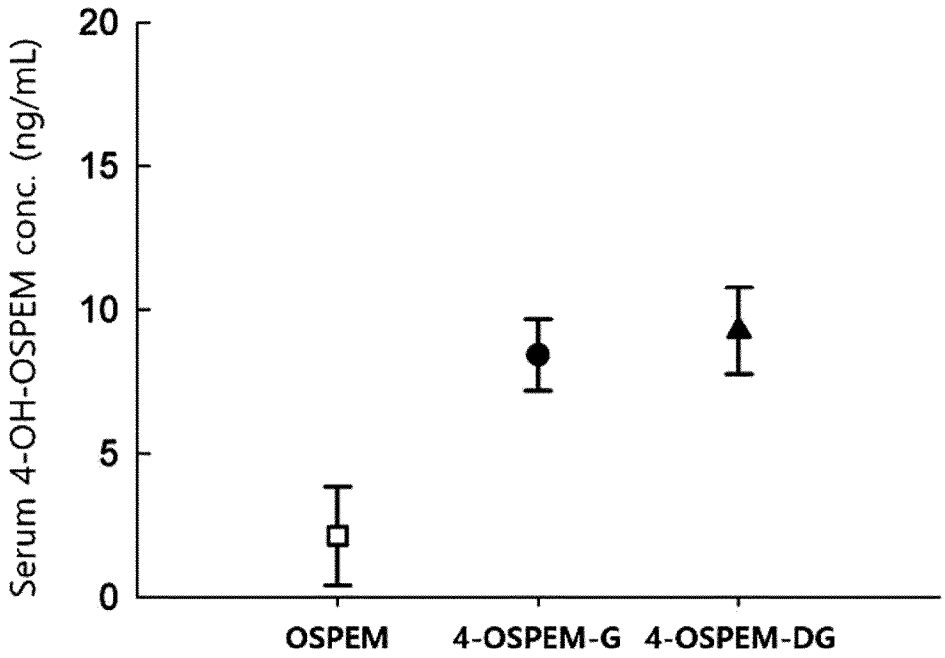

MCF-7 (ER+) 유방암 세포주 세포독성
IC50 (uM)
70
60
50
40
30
20
10
0
52.7
58.2
57.2
62.6
OSPEM
4-OSPEM-G
4-OSPEM-DG
타목시펜


MDA-MB-231 (ER-) 유방암 세포주 세포독성
IC50 (uM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
129.4
138.3
130.6
77.7
OSPEM
4-OSPEM-G
4-OSPEM-DG
타목시펜

[도3]


질 상피 두께 (Vaginal Epithelial Height) 변화
% 에티닐에스트라디올 반응
100
80
60
40
20
0
69.7
67.4
68.5
9.9
OSPEM
4-OSPEM-G
4-OSPEM-DG
라록시펜
질 증량 (Vaginal Weight) 변화
% 에티닐에스트라디올 반응
84.34
80.58
85.12
42.48
OSPEM
4-OSPEM-G
4-OSPEM-DG
라록시펜
자궁 증량 (Uterine Weight) 변화
% 에티닐에스트라디올 반응
32.89
32.33
35.27
17.7
OSPEM
4-OSPEM-G
4-OSPEM-DG
라록시펜

[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/008662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 15/203(2006.01)i, C12P 19/18(2006.01)i, C12P 19/46(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H 15/203; A23L 33/10; A61K 31/075; A61K 31/085; C07C 43/225; C07C 43/23; C12N 15/63; C12N 9/10; C12P 19/18; C12P 19/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, CAplus), Google & Keywords: glycosyl-attached, ospemifene, selective estrogen receptor modulator, bioavailability

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TOLONEN, A. et al., "Ospemifene Metabolism in Humans in Vitro and in Vivo: Metabolite Identification, Quantitation, and CYP Assignment of Major Hydroxylations", Drug Metabolism and Personalized Therapy, 2013, vol. 28, no. 3, pages 153-161 See page 153, right column, first paragraph; page 154, right column, third paragraph; figure 2.	1-5
Y	KR 10-2017-0011543 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 02 February 2017 See claims 9, 11, 14, 15; paragraphs [0081]-[0085], [0116].	1-5
Y	KR 10-2008-0015924 A (HORMOS MEDICAL LTD.) 20 February 2008 See claims 1, 4; paragraphs [33], [34].	1-3
Y	WO 96-07402 A1 (ORION-YHTYMAE OY.) 14 March 1996 See claims 1-7.	1-3
A	KR 10-2017-0011542 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 02 February 2017 See claims 1-13.	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 NOVEMBER 2018 (01.11.2018)	**01 NOVEMBER 2018 (01.11.2018)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/008662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0011543 A	02/02/2017	KR 10-1717212 B1	16/03/2017
KR 10-2008-0015924 A	20/02/2008	AT 317378 T	15/02/2006
		AU 2001-11503 A1	30/05/2001
		AU 778296 B2	25/11/2004
		BG 106413 A	29/11/2002
		BG 65853 B1	31/03/2010
		BR 0014901 A	11/06/2002
		BR PI0014901 B1	02/08/2016
		CA 2390116 A1	25/05/2001
		CA 2390116 C	07/04/2009
		CN 1263720 C	12/07/2006
		CN 1399622 A	26/02/2003
		CN 1861555 A	15/11/2006
		CN 1861555 C	10/12/2008
		CZ 20021623 A3	14/08/2002
		CZ 304738 B6	17/09/2014
		DE 60025938 T2	10/08/2006
		DK 1235776 T3	10/04/2006
		EE 05126 B1	16/02/2009
		EE 200200190 A	16/06/2003
		EP 1235776 A1	04/09/2002
		EP 1235776 B1	08/02/2006
		EP 1705169 A2	27/09/2006
		EP 1705169 A3	15/11/2006
		ES 2253268 T3	01/06/2006
		HK 1051850 A1	23/02/2007
		HR P20020223 A2	28/02/2005
		HR P20020223 C1	31/12/2012
		HR PK20020223 B3	30/11/2006
		HU 0204029 A2	28/03/2003
		HU 0204029 A3	28/04/2005
		HU 228512 B1	28/03/2013
		IL 148198 A	04/05/2009
		JP 2003-514786 A	22/04/2003
		JP 4202647 B2	24/12/2008
		KR 10-0877487 B1	12/01/2009
		KR 10-2002-0072278 A	14/09/2002
		MX PA02002154 A	18/09/2002
		NO 20022317 L	15/05/2002
		NO 20093175 A	15/05/2002
		NO 328010 B1	09/11/2009
		NO 332328 B1	27/08/2012
		NZ 518542 A	30/06/2003
		PL 201512 B1	30/04/2009
		PL 355708 A1	17/05/2004
		PT 1235776 E	31/05/2006
		RU 2247715 C2	10/03/2005
		SI EP1235776 T1	30/06/2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/008662

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		SK 287752 B6	04/08/2011
		SK 6712002 A3	10/09/2002
		TW 593256 B	21/06/2004
		UA 76409 C2	16/09/2002
		US 2003-0225130 A1	04/12/2003
		US 6576645 B1	10/06/2003
		US 6875775 B2	05/04/2005
		WO 01-36360 A1	25/05/2001
		ZA 200201433 B	30/04/2003
WO 96-07402 A1	14/03/1996	AT 183389 T	15/09/1999
		AU 3347895 A	27/03/1996
		AU 699845 B2	17/12/1998
		CA 2198389 A1	14/03/1996
		CA 2198389 C	20/02/2007
		DE 69511566 T2	27/04/2000
		DK 0779808 T3	13/03/2000
		EP 0779808 A1	13/05/1998
		EP 0779808 B1	18/08/1999
		ES 2135083 T3	16/10/1999
		FI 118755 B	14/03/2008
		FI 970920 A	04/03/1997
		GR 3031109 T3	31/12/1999
		IL 115171 A	26/08/2001
		JP 10-505079 A	19/05/1998
		JP 3910211 B2	25/04/2007
		NO 315785 B1	27/10/2003
		NO 971037 A	29/04/1997
		NZ 291836 A	26/06/1998
		SI 0779808 T1	31/10/1999
		US 5750576 A	12/05/1998
		US 5912273 A	15/06/1999
		ZA 9507481 B	09/04/1996
KR 10-2017-0011542 A	02/02/2017	KR 10-1704706 B1	08/02/2017

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/008662

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07H 15/203(2006.01)i, C12P 19/18(2006.01)i, C12P 19/46(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07H 15/203; A23L 33/10; A61K 31/075; A61K 31/085; C07C 43/225; C07C 43/23; C12N 15/63; C12N 9/10; C12P 19/18; C12P 19/46

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템),STN(Registry, CAplus), Google & 키워드: 당부가, 오스페미펜, 선택적 에스트로겐 수용체 조절제, 생체이용률

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	TOLONEN, A. 등, "Ospemifene metabolism in humans in vitro and in vivo: metabolite identification, quantitation, and CYP assignment of major hydroxylations", Drug Metabolism and Personalized Therapy, 2013, 28권, 3호, 페이지 153-161 페이지 153, 오른쪽 컬럼, 첫 번째 단락; 페이지 154, 오른쪽 컬럼, 3번째 단락; 도면 2 참조.	1-5
Y	KR 10-2017-0011543 A (고려대학교 산학협력단) 2017.02.02 청구항 9, 11, 14, 15; 단락 [0081]-[0085], [0116] 참조.	1-5
Y	KR 10-2008-0015924 A (호르모스 메디칼 리미티드) 2008.02.20 청구항 1, 4; 단락 [33], [34] 참조.	1-3
Y	WO 96-07402 A1 (ORION-YHTYMAE OY) 1996.03.14 청구항 1-7 참조.	1-3
A	KR 10-2017-0011542 A (고려대학교 산학협력단) 2017.02.02 청구항 1-13 참조.	1-5

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2018년 11월 01일 (01.11.2018)	2018년 11월 01일 (01.11.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
남의호
전화번호 +82-42-481-5580

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/008662

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0011543 A	2017/02/02	KR 10-1717212 B1	2017/03/16
KR 10-2008-0015924 A	2008/02/20	AT 317378 T	2006/02/15
		AU 2001-11503 A1	2001/05/30
		AU 778296 B2	2004/11/25
		BG 106413 A	2002/11/29
		BG 65853 B1	2010/03/31
		BR 0014901 A	2002/06/11
		BR PI0014901 B1	2016/08/02
		CA 2390116 A1	2001/05/25
		CA 2390116 C	2009/04/07
		CN 1263720 C	2006/07/12
		CN 1399622 A	2003/02/26
		CN 1861555 A	2006/11/15
		CN 1861555 C	2008/12/10
		CZ 20021623 A3	2002/08/14
		CZ 304738 B6	2014/09/17
		DE 60025938 T2	2006/08/10
		DK 1235776 T3	2006/04/10
		EE 05126 B1	2009/02/16
		EE 200200190 A	2003/06/16
		EP 1235776 A1	2002/09/04
		EP 1235776 B1	2006/02/08
		EP 1705169 A2	2006/09/27
		EP 1705169 A3	2006/11/15
		ES 2253268 T3	2006/06/01
		HK 1051850 A1	2007/02/23
		HR P20020223 A2	2005/02/28
		HR P20020223 C1	2012/12/31
		HR PK20020223 B3	2006/11/30
		HU 0204029 A2	2003/03/28
		HU 0204029 A3	2005/04/28
		HU 228512 B1	2013/03/28
		IL 148198 A	2009/05/04
		JP 2003-514786 A	2003/04/22
		JP 4202647 B2	2008/12/24
		KR 10-0877487 B1	2009/01/12
		KR 10-2002-0072278 A	2002/09/14
		MX PA02002154 A	2002/09/18
		NO 20022317 L	2002/05/15
		NO 20093175 A	2002/05/15
		NO 328010 B1	2009/11/09
		NO 332328 B1	2012/08/27
		NZ 518542 A	2003/06/30
		PL 201512 B1	2009/04/30
		PL 355708 A1	2004/05/17
		PT 1235776 E	2006/05/31
		RU 2247715 C2	2005/03/10
		SI EP1235776 T1	2006/06/30

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		SK 287752 B6	2011/08/04
		SK 6712002 A3	2002/09/10
		TW 593256 B	2004/06/21
		UA 76409 C2	2002/09/16
		US 2003-0225130 A1	2003/12/04
		US 6576645 B1	2003/06/10
		US 6875775 B2	2005/04/05
		WO 01-36360 A1	2001/05/25
		ZA 200201433 B	2003/04/30
WO 96-07402 A1	1996/03/14	AT 183389 T	1999/09/15
		AU 3347895 A	1996/03/27
		AU 699845 B2	1998/12/17
		CA 2198389 A1	1996/03/14
		CA 2198389 C	2007/02/20
		DE 69511566 T2	2000/04/27
		DK 0779808 T3	2000/03/13
		EP 0779808 A1	1998/05/13
		EP 0779808 B1	1999/08/18
		ES 2135083 T3	1999/10/16
		FI 118755 B	2008/03/14
		FI 970920 A	1997/03/04
		GR 3031109 T3	1999/12/31
		IL 115171 A	2001/08/26
		JP 10-505079 A	1998/05/19
		JP 3910211 B2	2007/04/25
		NO 315785 B1	2003/10/27
		NO 971037 A	1997/04/29
		NZ 291836 A	1998/06/26
		SI 0779808 T1	1999/10/31
		US 5750576 A	1998/05/12
		US 5912273 A	1999/06/15
		ZA 9507481 B	1996/04/09
KR 10-2017-0011542 A	2017/02/02	KR 10-1704706 B1	2017/02/08