



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0022944
(43) 공개일자 2011년03월08일

(51) Int. Cl.

C07J 13/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0080474

(22) 출원일자 2009년08월28일

심사청구일자 2009년08월28일

(71) 출원인

한양대학교 산학협력단

서울 성동구 행당동 17 한양대학교 내

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

김정목

서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트
236-801

김주성

서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 117-1302

(74) 대리인

장수영

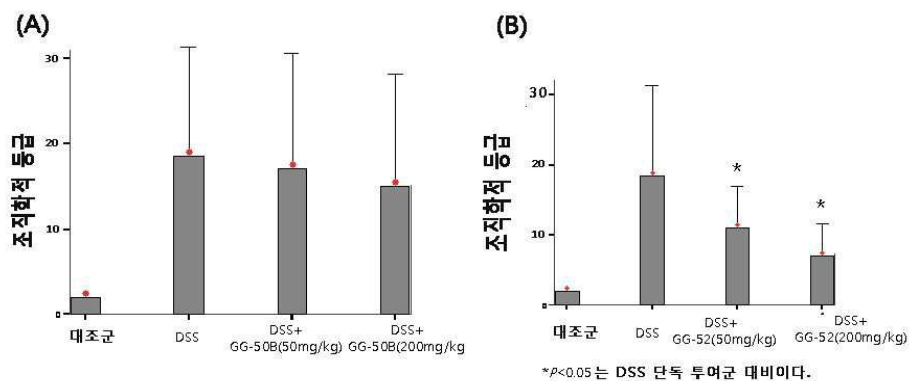
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 구글스테론 유도체, 이의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 NF- κ B 신호 전달 체계를 방해하여 염증반응을 억제함으로써 생체내에서도 우수한 염증성 장질환의 예방 및 치료 효과를 갖는 구글스테론 유도체, 이의 제조방법, 및 이의 염증성 장질환 예방 및 치료용 약학 조성물로서의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10527

부처명 서울특별시

연구관리전문기관

연구사업명 서울시 산학연 협력사업(기술기반 구축사업)

연구과제명 신호전달제어를 통한 항암 및 항염증 신약개발

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

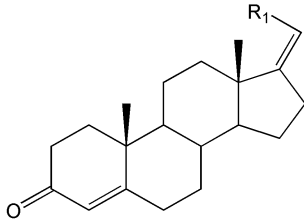
연구기간 2005년 12월 01일 ~ 2009년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 구굴스테론(guggulsterone) 유도체, 이의 라세미체, 이의 광학이성질체 및 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서, R₁은 C3~C8의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이다)

청구항 2

제1항에 있어서,

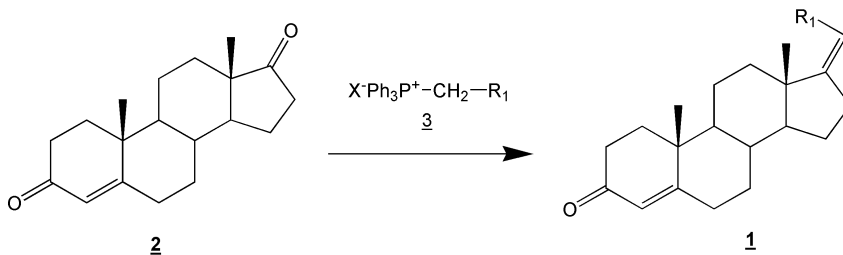
상기 화학식 1에서 R₁은 1-프로필기인 것인 구굴스테론 유도체.

청구항 3

하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

하기 화학식 2의 화합물과 하기 화학식 3의 트리페닐포스포늄 할라이드를 염기 및 용매 존재 하에 위티그 반응(Wittig reaction)시켜 화학식 1의 구굴스테론 유도체를 제조하는 방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서, X는 Br, Cl 또는 I이고, R₁은 전술한 바를 따른다)

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 반응식 1에서 R₁은 1-프로필기인 것인 방법.

청구항 5

제1항의 구굴스테론 유도체, 이의 라세미체, 이의 광학이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 구굴스테론 유도체, 이의 제조방법, 및 이의 염증성 장질환 예방 및 치료용 약학 조성물로서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증성 장질환(inflammatory bowel diseases, IBD)은 장에 만성적인 원인 불명의 염증이 발생하는 질환으로 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)와 크론병(Crohn's disease, CD)로 나눌 수 있다. 궤양성 대장염은 병변이 대장에 국한되어 나타나며, 병변이 점막층에서만 있으면서 출혈이 주증상인데 반해 크론병은 병변이 소장과 대장에 다발성으로 발현하면서 병변이 장 전층을 침범하여 협착, 누공 등을 일으키며 복통, 설사, 체중 감소가 주증상으로 나타난다.

[0003] 이와 같은 염증성 장질환은 쉽게 치료되지 않는 만성질환으로, 증상 호전과 재발을 반복하는 성질이 있다. 또한, 아직까지 완치를 나타내는 치료법이 개발되어 있지 않을 뿐만 아니라, 기존의 치료법도 많은 부작용을 나타내고 있는 실정이다.

[0004] 그동안 서구의 질환으로 알려졌던 염증성 장질환이 최근 국내 역학조사에서 발생률과 유병률이 급격히 증가하고 있음이 밝혀졌다(Yang SK *et al.*, *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:542-549). 국내 역학조사에서 나타난 문제점을 살펴보면, 우리나라에서의 염증성 장질환은 주로 젊은 나이에 발생하고 평생 지속된다는 점에 있다. 또한, 여러 가지 합병증과 더불어 대장암의 발생 확률을 증가시킨다는 점에서 향후 의료비용의 증가뿐만 아니라 사회적 문제로 대두할 가능성이 클 것으로 판단된다.

[0005] 염증성 장질환의 발생기전은 정확히 밝혀져 있지 않지만, 최근의 연구들을 종합해 보면 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 역할이 보고되고 있다(Pallone F *et al.*, *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10 Suppl 2:75-79; discussion 80; Plevy SE *et al.*, *J Immunol* 1997;159:6276-628). 한편, 이들 염증성 사이토카인 발현 조절은 핵 전사인자인 nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)가 중요한 역할을 담당한다. 즉, NF- κ B는 장의 염증 반응에서 증가하는 유도성 물질로서, 면역 및 염증 반응에서 중요한 역할을 한다(Jobin C *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C451-462; Neurath MF *et al.*, *Gut* 1998;43:856-860; Schottelius AJ *et al.*, Baldwin AS, *Int J Colorectal Dis* 1999;14:18-28). 이러한 NF- κ B는 실제로 크론병 환자의 장의 고유층(lamina propria)에서 그 발현이 증가되어 있으며(Rogler G *et al.*, *Gastroenterology* 1998;115:357-369), 여러 동물 모델에서도 발현이 증가하고 있음이 관찰된다(Neurath MF *et al.*, *Nat Med* 1996;2:998-1004). 즉, NF- κ B의 활성화 증가는 수많은 염증과 관련된 유전자의 발현을 증가시켜서 장의 염증을 일으키게 된다. 따라서, 염증성 장질환과 NF- κ B의 연관성은 염증성 장질환의 치료제 개발이라는 관점에서 중요한 타겟이 될 수 있음을 시사해 주고 있다(Jobin C *et al.*, *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:206-213).

[0006] 최근 전통의학에서 사용하고 있는 많은 식물 추출물의 합성이 가능해졌고, 이중 식물 색소가 항염증 효과를 가져온다는 것이 알려지고 있다. 예를 들어, 인도의 전통의학에서는 관절염, 비만, 염증 등에 사용되던 *Commiphora mukul*이라는 나무의 송진이 사용되고 있다. 본 발명자는 *Commiphora mukul* 추출물 중 구굴스테론 [4,17(20)-프레그나디엔-3,16-디온]이 장 상피세포에서 NF- κ B 신호 전달 경로를 억제하여 염증성 시그널을 차단할 뿐만 아니라, 텍스트란 셀페이트 소듐(DSS)에 의한 생쥐의 장염모델에서 염증 경감효과가 있음을 밝혀내어, 대한민국 특허등록 제10-0825501호로 등록받은 바 있다.

[0007] 그런데, 실제로 구굴스테론을 임상치료에 응용할 경우 많은 용량이 필요할 뿐만 아니라, 투여할 경우 생체 내로 흡수되어 부작용을 초래할 가능성이 크다. 이런 부작용을 최소화하기 위해 유도체의 개발이 요구되고 있다. 즉, 기존의 구굴스테론 보다 지용성을 높인 유도체를 개발하면, 실제 복용 시 흡수되지 않을 뿐만 아니라 장점막 표면에 존재하는 염증부위와도 직접 접촉이 가능하기 때문에 저용량으로도 염증성 장질환의 치료에 좀 더 효과적으로 사용할 수 있을 것이다. 또한, 유도체의 합성은 천연물질의 추출에 따른 용량 부족 현상을 해결할 수 있다는 장점도 있다.

[0008] 이에 본 발명자는 지용성을 높인 새로운 구굴스테론 유도체를 합성한 다음, 이를 대장 상피세포 모델에서의 염증 억제효과와 동시에 DSS에 의한 장염 동물모델에서 장염의 예방 및 치료 효과를 확인하였고, 그 결과 합성된 구굴스테론 유도체가 생체외(*in vitro*)에서 NF- κ B 신호 전달 체계를 방해하여 염증반응을 억제할 뿐만 아니라 생체내(*in vivo*)에서도 염증성 장염의 예방 및 치료 효과가 매우 우수함을 발견하고, 이를 토대로 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

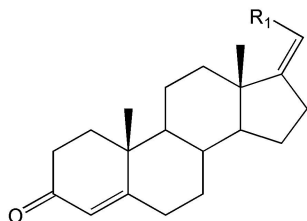
해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 NF- κ B 신호 전달 체계를 방해하여 염증반응을 억제함으로써 생체내에서도 우수한 염증성 질환의 예방 및 치료 효과를 갖는 신규한 구굴스테론 유도체, 이의 제조방법, 및 이의 염증성 질환 예방 및 치료용 약학 조성물로서의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 구굴스테론(guggulsterone) 유도체, 이의 라세미체, 이의 광학 이성질체 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0011] [화학식 1]



[0012]

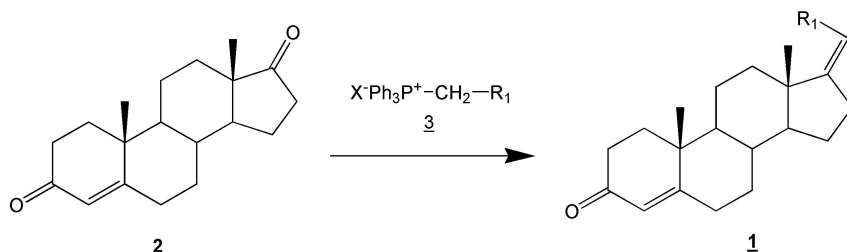
[0013] (상기 화학식 1에서, R₁은 C3~C8의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이다)

[0014] 또한, 본 발명은

[0015] 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0016] 하기 화학식 2의 화합물과 하기 화학식 3의 트리페닐포스포늄 할라이드를 염기 및 용매 존재 하에 위티그 반응(Wittig reaction)시켜 화학식 1의 구굴스테론 유도체를 제조하는 방법을 제공한다:

[0017] [반응식 1]



[0018]

[0019] (상기 반응식 1에서, X는 Br, Cl 또는 I이고, R₁은 전술한 바를 따른다)

[0020] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 구굴스테론(guggulsterone) 유도체, 이의 라세미체, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

효 과

[0021] 본 발명에 따른 구굴스테론 유도체는 생체외(*in vitro*)에서 NF- κ B 신호 전달 체계를 방해하여 염증반응을 억제할 뿐만 아니라 생체내(*in vivo*)에서도 우수한 염증성 질환의 예방 및 치료 효과를 나타낸다.

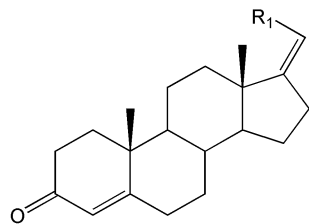
발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 구굴스테론(guggulsterone) 유도체, 이의 라세미체, 이의 광학 이성질체

및 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서, R₁은 C3~C8의 직쇄 또는 측쇄형의 알킬기이다)

바람직하기로, R₁은 1-프로필기, 2-프로필기, 1-부틸기, 2-부틸기, 3-부틸기, 1-펜틸기, 2-펜틸기, 4-펜틸기, 1-헥실기, 2-헥실기, 5-헥실기, 1-헵틸기, 2-헵틸기, 4-헵틸기 또는 6-헵틸기 및 1-옥틸기이다.

본 발명의 대표적인 화합물에는 하기 나타내는 바의 화합물들이 포함된다:

1) (10R, 13S)-17-부틸리덴-10, 13-디메틸-1, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H, 9H, 14H)-온

2) (10R, 13S)-17-펜틸리덴-10, 13-디메틸-1, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H, 9H, 14H)-온

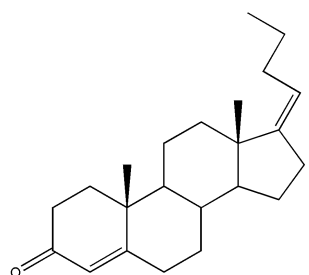
3) (10R, 13S)-17-헥실리덴-10, 13-디메틸-1, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H, 9H, 14H)-온

4) (10R, 13S)-17-헵틸리덴-10, 13-디메틸-1, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H, 9H, 14H)-온

5) (10R, 13S)-17-옥틸리덴-10, 13-디메틸-1, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H, 9H, 14H)-온

더욱 바람직하기로, 본 발명에 따른 화학식 1의 구굴스테론 유도체는 하기 화학식 5로 표시되는 (10R, 13S)-17-부틸리덴-10, 13-디메틸-1, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H, 9H, 14H)-온이다:

[화학식 5]



상기 화학식 1로 표시되는 본 발명의 구굴스테론 유도체는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 이때 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다.

유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탈설포산, 아세트산, 글리콜산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔설포산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있다.

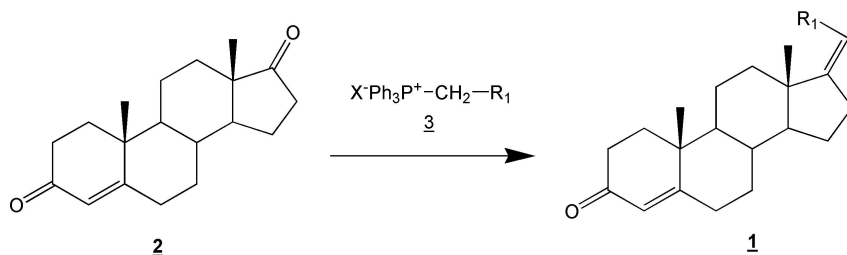
이때 상기 부가염은 통상의 방법, 즉, 화학식 1의 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 당량 또는 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전 시키거나 결정화시켜서 제조하거나, 또는 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조하거나 석출된 염을 흡인 여과시

켜 제조할 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 그 구조 내에 비대칭 탄소중심을 가지므로, 그의 광학 이성질체로 존재할 수 있고, 라세미체를 포함한 이들의 혼합물로도 존재할 수 있다. 따라서, 이러한 이성체 또는 이들의 혼합물 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 바람직하기로는 E-, Z-가 혼합된 라세미체이다.

[0041] 본 발명에 따른 화학식 1의 구굴스테론 유도체는 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 하기 화학식 2의 화합물과 하기 화학식 3의 트리페닐포스포늄 할라이드를 염기 및 용매 존재 하에 위티그 반응(Wittig reaction)시켜 제조된다:

[0042] [반응식 1]



[0043]

[0044] (상기 반응식 1에서, X는 Br, Cl 또는 I이고, R₁은 전술한 바를 따른다)

[0045] 출발물질로 사용하는 화학식 2의 화합물은 시판되는 것을 구입하거나 직접 제조하여 사용이 가능하다. 화학식 2의 화합물을 강염기하에 화학식 3의 트리페닐포스포늄 할라이드를 반응시키면 강염기와 트리페닐포스포늄 할라이드의 일리드 반응으로 생성된 트리페닐포스핀 일리드(ylide)가 C-17 위치의 케톤에서 선택적으로 위티그 반응(Wittig reaction)함으로써 화학식 1의 구굴스테론 유도체가 제조된다.

[0046] 화학식 3의 트리페닐포스포늄 할라이드는 화학식 2의 화합물을 기준으로 1 내지 3 당량, 바람직하게는 1 내지 1.5 당량으로 사용된다.

[0047] 상기 반응의 강염기로는 일반적으로 위티그 반응에서 사용되는 수소화리튬, 수소화나트륨, 수소화칼륨 등의 알칼리금속 수소화물; n-부틸리튬, sec-부틸리튬, tert-부틸리튬 등의 유기금속시약; 및 나트륨 메톡사이드, 나트륨 에톡사이드, 칼륨-t-부톡사이드 등의 알칼리금속 알코올 염기시약을 사용하는 것이 바람직하다. 반응에서 사용되는 염기의 양은 화학식 2의 화합물을 기준으로 1 내지 1.5 당량이다.

[0048] 이때 사용되는 용매는 테트라하이드로퓨란, 디에틸에테르, 헥산, 헵탄, 메탄올, 에탄올, 벤젠, 톨루엔, 또는 이들의 혼합물이 가능하다.

[0049] 상기 반응은 -10 ℃ 내지 120 ℃에서 30분 내지 10시간 동안 수행한다.

[0050] 아울러, 본 발명은 상기 화학식 1의 구굴스테론 유도체, 이의 라세미체, 이의 광학 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0051] 본 발명의 바람직한 실험예 1에 따르면, 화학식 1의 구굴스테론 유도체는 TNF-α에 의해 증가한 IL-8 mRNA 발현을 크게 저하함을 알 수 있다.

[0052] 실험예 2에 따르면, 화학식 1의 구굴스테론 유도체는 TNF-α에 의해 자극된 IκBα의 인산화를 차단하여 NF-κB에 의한 염증성 유도체의 발현을 억제하였다.

[0053] 이러한 결과는 본 발명에 따른 화학식 1의 구굴스테론 유도체가 생체외(in vitro)에서 NF-κB 신호 전달 체계를 방해하여 염증반응을 억제함을 의미한다.

[0054] 또한, 본 발명의 바람직한 실험예 3에 따르면, DSS에 의해 유도된 급성 장염 동물모델에서 화학식 1의 구굴스테론 유도체는 Z-구굴스테론, 구굴스테론 유도체 GG-50B와 비교하여 체중변화, 대장길이 변화, 질병 활성지수를

모두 상당히 호전시켜 우수한 급성 장염 예방 및 치료 효과를 확인할 수 있었다.

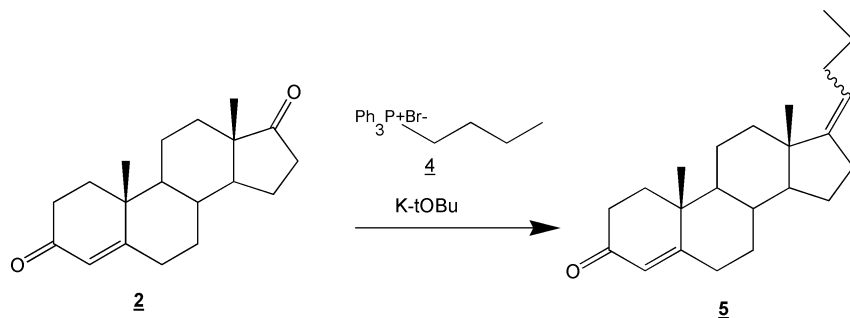
- [0055] 실험예 4에 따르면, 화학식 1의 구굴스테론 유도체는 기존의 염증성 장질환 치료제로 사용되는 설파살라진, 프레드니솔론과 동등한 염증성 장질환 치료 효과를 나타내었다.
- [0056] 이러한 결과를 통해, 본 발명에 따른 화학식 1의 구굴스테론 유도체가 생체내(*in vivo*)에서도 우수한 염증성 장질환의 예방 및 치료 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0057] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 의한 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하고 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용할 수 있으며, 제제화 할 경우에는 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다.
- [0059] 경구투여를 위한 고형제제는 본 발명에 따른 구굴스테론 유도체에 적어도 하나의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 혼합하여 제조할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등의 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 포함되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0060] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 상기 비수성용제 또는 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있으며, 상기 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등을 사용할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여용량은 체중 1kg 당 0.01 내지 1000 mg 의 양을 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 이때 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 조절될 수 있다.

실시예

- [0062] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0063] **실시예 1: (10R,13S)-17-부틸리덴-10,13-디메틸-1,7,8,10,11,12,13,15,16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H,9H,14H)-온의 제조**
- [0064] 하기 반응식 2로 표시되는 바에 의해 화학식 2의 화합물과 화학식 4의 트리페닐포스포늄 브로마이드를 염기 및 용매 존재 하에 위티그 반응 (Wittig reaction) 시켜 화학식 5의 구굴스테론 유도체(이하, GG-52)를 제조하였다.
- [0065] 반응기에 질소를 퍼징한 후 테트라하이드로퓨란 500ml를 실린지를 통해 부가하였다. 이후 화학식 4의 트리페닐포스포늄 브로마이드(알드리치 사)를 51.8g(130 mmol)을 첨가한 다음 여기에 포타슘 t-부톡사이드(알드리치 사) 130 ml(130 mmol)을 천천히 적가하고, 반응기 온도를 0℃로 조정하였다. 실온에서 2시간 동안 교반하면 용액의 색깔이 진한 오렌지 색을 변하게 되고 이때 2시간 동안 더 교반하였다.

[0066] 다음으로, 상기 반응기에 테트라하이드로퓨란 500 ml에 화학식 2의 화합물(TCI 사) 28.6g(100 mmol)을 녹인 용액을 실린지를 통해 천천히 적가하고 3시간 동안 상온에서 교반하였다. TLC로 화학식 2의 화합물인 출발물질이 없어졌음을 확인한 후 메탄올과 물을 2:1의 부피비로 혼합한 혼합용액 32.6ml를 부가하여 30분 동안 교반한 후 헥산을 부가하였다. 이후 염수로 2회 세척하고, 생성된 유기층을 황산나트륨으로 건조한 다음 여과하여 용매를 로터리 증발기로 제거하였다. 이어서 15%에틸아세테이트/85%헥산 전개액으로 실리카 칼럼을 이용하여 정제하여 50%의 수율로 화학식 5의 (10R,13S)-17-부틸리덴-10,13-디메틸-1,7,8,10,11,12,13,15,16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H,9H,14H)-온을 얻었다. HPLC로 확인결과 E-, Z- 이성체가 3:7의 비율로 혼합되어 있었다. 제조된 유도체는 -20 ℃에 보관하였고, 실험에 이용할 때는 DMSO에 녹인 뒤 증류수 또는 PBS로 희석하여 사용하였다. 도 1은 수득한 GG-52의 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0067] [반응식 2]



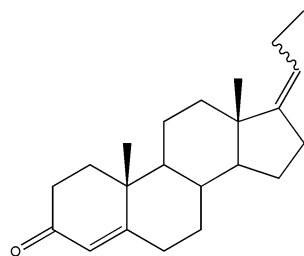
[0068]

[0069] ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ 5.80 (s, 1H), 5.25 (t, J= 7.2 Hz, 1H), 2.55-2.41 (m, 2H), 2.19 -2.01 (m, 6H), 1.92-1.88 (m, 3H), 1.75-1.62 (m, 4H), 1.54-1.31 (m, 8H), 1.20 (s, 6H), 1.01-0.97 (m, 3H)

[0070] **비교예 1: (10R,13S)-10,13-디메틸-17-프로필리덴-1,7,8,10,11,12,13,15,16, 17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H,9H,14H)-온의 제조**

[0071] 반응물질로 화학식 4의 부틸트리페닐포스포늄 브로마이드 대신 프로필트리페닐포스포늄 브로마이드를 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일하게 수행하여 화학식 6의 (10R,13S)-10,13-디메틸-17-프로필리덴-1,7,8,10,11,12,13,15, 16,17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3(6H,9H,14H)-온(이하, GG-46)을 제조하였다. 도 2는 수득한 GG-46의 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0072] [화학식 6]



[0073]

[0074] ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ 6.39 (t, J= 7.6 Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 2.45-2.39 (m, 2H), 2.29 -2.19 (m, 2H), 2.02-1.90 (m, 4H), 1.71-1.52 (m, 6H), 1.20-1.02 (m, 10H), 0.99-0.97 (m, 6H)

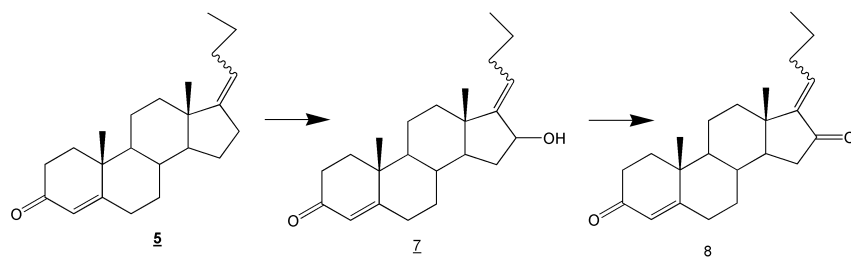
[0075] **비교예 2: (10R,13S)-17-부틸리덴-10,13-디메틸-1,7,8,10,11,12,13,14, 15,17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3,16(6H,9H)-디온의 제조**

[0076] 0℃에서 셀레늄 디옥사이드 2.3 g(2.1 mmol)을 디클로로메탄 100 ml에 넣고 잘 섞어주면서 t-부틸퍼옥사이드 15 ml를 서서히 적가한 후, 상기 실시예 1에서 수득한 화학식 5의 화합물 32.2g(84 mmol)을 디클로로메탄 85ml에 녹인 용액을 10분에 걸쳐 서서히 가하고, 온도를 실온으로 올려 90분간 교반하였다. 반응이 완결되면 생성

된 유기층을 소금물과 증류수로 세척하고, 황산 마그네슘으로 건조한 다음 감압 증류하여 화학식 7의 화합물을 93%의 수율로 얻었다.

[0077] 화학식 7의 화합물 23.9g(70 mmol)을 실온에서 디클로로메탄 200 ml에 녹인 후, 활성화 망간디옥사이드 60 g(700 mmol)을 한번에 가하고 2시간 동안 강력히 교반하였다. 반응이 완결되면 반응혼합물을 짧은 실리카겔 칼럼으로 여과하여 망간디옥사이드를 제거하고, 용매를 감압 증류하여 화학식 8의 (10R,13S)-17-부틸리텐-10,13-디메틸-1,7,8,10,11,12,13,14, 15,17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3,16(6H,9H)-디온(이하, GG-53)을 92%의 수율로 얻었다. 도 3은 수득한 GG-53의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0078] [반응식 3]



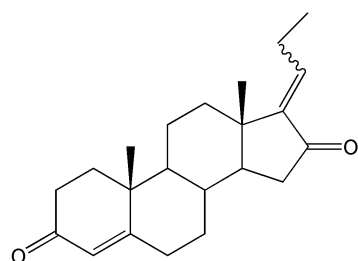
[0079]

[0080] ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ 6.39 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.19 (s, 1H), 2.69-2.65 (m, 1H), 2.53 -2.39 (m, 3H), 2.38-2.19 (m, 3H), 2.11-1.89 (m, 5H), 1.59-1.42 (m, 6H), 1.39-1.30 (m, 2H), 1.12-1.08 (m, 4H), 1.00-0.96 (m, 6H)

[0081] **비교예 3: (10R,13S)-10,13-디메틸-17-프로필리텐-1,7,8,10,11,12,13,14, 15,17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3,16(6H,9H)-디온의 제조**

[0082] 반응물질로 화학식 4의 부틸트리페닐포스포늄 브로마이드 대신 프로필트리페닐포스포늄 브로마이드를 사용한 것을 제외하고, 상기 비교예 2와 동일하게 수행하여 화학식 9의 (10R,13S)-10,13-디메틸-17-프로필리텐-1,7,8,10,11,12,13,14, 15,17-데카하이드로-2H-시클로펜타[a]페난트렌-3,16(6H,9H)-디온(이하, GG-50B)을 제조하였다. 도 4는 수득한 GG-50B의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0083] [화학식 9]



[0084]

[0085] ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3) δ 6.34 (t, $J=7.8$ Hz, 1H), 6.16 (s, 1H), 2.41-2.40 (m, 2H), 2.38 -2.21 (m, 2H), 2.16-1.82 (m, 6H), 1.61-1.57 (m, 5H), 1.40-1.35 (m, 2H), 1.20-1.06 (m, 8H), 0.99-0.96 (m, 3H)

[0086] **비교예 4: Z-구글스테론**

[0087] 염증성 장질환에 대한 구글스테론 유도체의 생체외(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*) 효과를 비교평가하기 위해 Z-구글스테론(Calbiochem Inc)(GGS)을 비교예 4로 사용하였다.

[0088] **실험예 1 : 구글스테론 유도체에 의한 염증성 시그널 IL-8 mRNA 발현 억제 확인**

[0089] 상기에서 제조한 구글스테론 유도체의 COLO 205 장상피세포에 대한 염증성 시그널로서 IL-8 mRNA 효과를 관찰하

였다.

[0090] 1-1. 세포 배양과 처치

[0091] 사람 대장세포주인 COLO 205 [KCLB 10222, Korean Cell Line Bank (KCLB), Seoul, Korea]를 20~40세대 계대 배양을 하였고 기존의 방법대로 세포 배양을 시행하였다(Jobin C *et al.*, *J Immunol* 1997;158:226-234; Sakakima Y *et al.*, *Cancer Gene Ther* 2005;12:884-889). 이 세포주에 구글스테론 유도체를 24시간 전 처치 후에 TNF- α (10 ng/mL)로 자극하였다.

[0092] 1-2. RNA추출과 실시간 PCR

[0093] 구글스테론 유도체로 전처리하고 TNF- α (10 ng/mL)로 자극한 세포를 트리졸 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 1 μ g을 역전사(reverse transcription)시켰다. 이후 ABI 프리즘 7000 서열 검출 시스템(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 사람의 IL-8에 대한 실시간 PCR을 기존의 방법에 따라 시행하였다(Kim JM *et al.*, *Infect Immun* 2007;75:3373-3381). 대조군으로 β -액틴을 이용하였다. 모든 프라이머는 Applied Biosystems사에 의뢰하여 프라이머 익스프레스 v2.0을 이용하여 제작하였다. PCR은 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)를 이용하였다.

[0094] 도 5는 본 발명에 따른 구글스테론 유도체 구글스테론 유도체 GG-46, GG-53, GG-50B 및 GG-52가 TNF- α 에 의해 유도된 IL-8 mRNA 발현을 억제하는 정도를 비교한 그래프이다.

[0095] 도 5를 참조하면, TNF- α 에 의해 증가한 IL-8 mRNA가 구글스테론 유도체 GG-50B와 GG-52의 전처리에 의해 감소하였다. 그리고 감소 정도는 약제 용량과 비례하였다. 반면, 구글스테론 유도체 GG-46와 GG-53를 처리한 경우에는 억제 효과를 관찰할 수 없었다.

[0096] 실험예 2: I κ B α 인산화와 NF- κ B DNA 결합 활성에 대한 구글스테론 유도체의 효과

[0097] 2-1. 웨스턴 블롯 분석

[0098] NF- κ B 활성화와 관계되는 I κ B α 인산화(phosphorylation)에 구글스테론 유도체가 관여하는지를 알아보기 위하여 하기와 같이 웨스턴 블롯을 시행하였다.

[0099] 상기 1-1에서 구글스테론 유도체로 전처리한 세포주를 TNF- α (10 ng/mL)로 자극한 뒤, 1X Laemmli buffer에 용해(lysis)시켜 단백질을 추출하였다. 이후 SDS-PAGE 겔 전기 영동 후 니트로셀룰로오스 막(Hybond ECL, Amersham, Buckinghamshire, England)으로 옮겼다. 1차 항체로서 항-포스포세린 I κ B α (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), 항-I κ B α polyclonal 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA) 그리고 항- β -액틴(Santa Cruz Biotechnology)을 사용해서 1:1,000으로 반응시킨 후, 2차 항체로 퍼옥시다제가 콘주게이션된 항체(peroxidase-conjugated antibody, Biosource)를 이용하여 반응 후, ECL kit (Amersham, Buckinghamshire, England)에 처리 후에 Kodak X-OMAT 필름에 노출시켜 발현 시그널을 확인하고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0100] 도 6은 COLO 205 세포주에서 TNF- α 에 의해 자극된 I κ B α 의 인산화에 대한 구글스테론 유도체 GG-50B와 GG-52의 효과를 비교하기 위해 실시한 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이다.

[0101] 도 6을 참조하면, 본 발명에 따른 구글스테론 유도체 GG-52는 TNF- α 자극 10분과 30분에서 모두 I κ B α 의 인산화 시그널을 감소시켰고, 구글스테론 유도체 GG-50B는 자극 10분에서 I κ B α 의 인산화 시그널을 감소시켰다.

[0102] 2-2. 전기영동 이동 쉬프트 검정 (EMSA)

[0103] COLO 205 세포에서 I κ B α 인산화는 NF- κ B가 핵내로 전좌(translocation)될 수 있음을 의미한다. 그래서 다음 실험으로 구글스테론 유도체에 의한 핵내에서 NF- κ B의 DNA 결합 활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 EMSA를 시행하였다.

[0104] 실험 대상 세포에 대한 세포 추출물을 이전 방법과 같이 만들었다(Jobin C *et al.*, *J Immunol* 1997;158:226-234.). DNA 결합 분석을 위해 이중 스트랜드 NF- κ B 올리고뉴클레오타이드(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') (Promega, Madison, WI, USA)에 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제(5-10 U/ μ l)를 이용하여 [γ -³²P] ATP (3,000 Ci/mmol at 10 mCi/mL) (Amersham)를 라벨화하고, G-25 스핀 컬럼 (Boehringer Mannheim GmbH,

Germany)을 이용하여 라벨화 되지 않은 올리고뉴클레오타이드를 제거하였다. 5 μ g의 핵 추출물을 이용하여 30,000-50,000 CPM의 32 P-라벨화된 DNA와 실온에서 20분 반응시킨 후 4%의 비변성 폴리아크릴아미드 겔 상에 로딩하여 전기영동하였다. 그 뒤, 겔을 말리고 자기방사(autoradiography)를 시행한 후, 필름을 현상하였다.

[0105] 도 7은 COLO 205 세포에서 TNF- α 에 의해 자극된 NF- κ B의 DNA 결합 활성화에 대한 구굴스테론 유도체 GG-50B 및 GG-52의 영향을 평가하기 위해 실시한 EMSA 결과를 나타낸 것이다.

[0106] 도 7을 참조하면, 본 발명에 따른 구굴스테론 유도체 GG-52와 구굴스테론 유도체 GG-50B 모두 용량 의존적으로 NF- κ B의 DNA 결합 활성을 감소시켰다. 이러한 결과는 구굴스테론 유도체 GG-50B 및 GG-52는 I κ B α 인산화를 차단하여 NF- κ B에 의한 염증성 유도체의 발현을 억제시킨다는 것을 의미한다.

[0107] 실험예 3: 생쥐에서 장염의 유발과 구굴스테론 유도체에 의한 장염 예방 효과 및 치료 효과 확인

[0108] 구굴스테론 유도체의 생체내(*in vivo*)에서의 장염 예방 및 치료 효과를 알아 보기 위해, 텍스트란 술페이트 소듐(Dextran Sulfate Sodium, 이하 'DSS', MP Biochemicals, CA, USA)로 유도시킨 급성 장염 모델을 사용하였다. 통계적 분석에서, 모든 수치는 평균 $\pm$ 표준 편차로 얻었다. 각 그룹간에 차이는 Student's test 또는 Man Whitney U test로 비교하였고, *P* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 의미있다고 판정하였다.

[0109] 3-1. 실험동물

[0110] 8주의 암컷 특정 병원성 미생물 부재(specific-pathogen free: SPF) C57BL/6 생쥐(체중 20~25 g)를 오리엔트사(Seongnam, Korea)에서 구입하였고, SPF 환경에서 12시간은 빛을 주고 12시간은 빛이 없는 상태에서 사육하였다. 생후 9주째까지, 즉 1주간 적응 후에 실험을 시행하였다. 모든 동물실험 절차는 서울대학교 병원 동물 실험 윤리 위원회 심의를 통과하였다.

[0111] 3-2. 급성 장염 모델 I에서의 예방 및 치료 효과 관찰

[0112] 이전 연구 방법에 따라(Lee JY *et al.*, *Int Immunopharmacol* 2007;7:241-248), 식수에 DSS를 섞어 4% DSS용액을 만들고 5일간 음수 투여하여 대장염을 유발시켰다. DSS 투여 전 2일전부터 양성 대조군에는 식염수를, 약물 투여군은 5군으로 나누어 GG-50B (50 mg/kg qd), GG-50B (200 mg/kg qd), GG-52 (50 mg/kg qd), GG-52 (200 mg/kg qd), GGS (200 mg/kg qd)를 경구 투여하였다. 용매로는 0.5% 메틸셀룰로오스를 사용하였다. 실험 동물에 대해 체중 측정과 대변의 굳은 정도, 혈변 유무를 매일 측정 및 확인하였다. 이를 바탕으로 이전의 방법에 따라(Cooper HS *et al.*, *Lab Invest* 1993;69:238-249), 질병 활성 지수(disease activity index)를 측정하여 각 실험군 간에 비교하였다. 약물 투여 7일째 생쥐를 희생하여 대장을 박리하였고, 이를 기존의 방법에 따라(Dieleman LA *et al.*, *Clin Exp Immunol* 1998;114:385-391), 병리학적으로 점수화하였다. 점수화는 염증의 정도(severity of inflammation), 손상의 범위(extent of injury), 음와 손상(crypt damage)을 기준으로 하였고, 숙련된 병리의사가 판정하였고, 그 결과는 아래 표 1에 나타내었다.

표 1

[0113]

구분	체중 변화(%)	대장 길이(cm)	질병 활성 지수
대조군	100.8 $\pm$ 1.4	10.5 $\pm$ 0.6	-
DSS	81.6 $\pm$ 6.4	8.5 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.6
DSS+GG-50B (50 mg/kg)	90.3 $\pm$ 5.7*	8.7 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.9*
DSS+GG-50B (200 mg/kg)	85.3 $\pm$ 4.5	9.4 $\pm$ 0.4*	1.8 $\pm$ 1.1
DSS+GG-52 (50 mg/kg)	90.9 $\pm$ 2.5*	9.4 $\pm$ 0.4*	1.8 $\pm$ 0.8
DSS+GG-52 (200 mg/kg)	94.3 $\pm$ 1.2*	9.5 $\pm$ 0.6*	1.3 $\pm$ 0.6*
DSS+GGS (200 mg/kg)	89.2 $\pm$ 3.8*	9.1 $\pm$ 0.3*	2.1 $\pm$ 0.3*

*p<0.05는 DSS 단독 투여군 대비이다.

- [0114] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 구굴스테론 유도체 GG-50B는 매일 50 mg/kg로 7일 동안 경구로 투여했을 경우, 체중 변화와 질병 활성 지수(DAI)의 호전을 나타내었으나, 대장 길이 변화에는 별다른 영향을 미치지 않았다. 또한 200 mg/kg을 투여할 경우에는 대장 길이의 변화에만 호전을 보였으나, 체중 변화와 DAI의 완화 작용은 관찰할 수 없었다. 반면, 본 발명에 따른 구굴스테론 유도체 GG-52는 투여 용량 50 mg/kg 및 200 mg/kg에서 DSS 만을 투여한 양성대조군에서 나타난 체중변화, 대장길이 변화와 DAI 수치를 모두 호전시켰다.
- [0115] 도 8은 대조군, DSS, DSS와 구굴스테론 유도체 GG-52로 처치된 생쥐의 대장조직을 헤마톡실린-에오신으로 염색 하여 관찰한 결과($\times 100$)를 나타낸 사진이다.
- [0116] 도 8을 참조하면, 대조군과 비교하여 DSS만 처치된 생쥐의 대장은 내상, 상피보전의 손실, 점막하부 부종 및 모든 층내 격렬한 염증 세포 침투 등 완전한 파괴를 보였다. 구굴스테론 유도체 GG-52 투여에 의해 조직 손상이 감쇄되었다.
- [0117] 도 9는 대조군, DSS, DSS와 구굴스테론 유도체 GG-50B, DSS와 구굴스테론 유도체 GG-52로 처치된 생쥐의 대장 조직의 병리조직 검사에 의한 염증 점수를 나타낸 그래프이다.
- [0118] 도 9의 (A)를 참조하면, 조직 검사에서도 구굴스테론 유도체 GG-50B는 DSS만을 투여한 양성 대조군에 비해 염증 점수를 호전시키는 효과도 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과로 미루어 구굴스테론 유도체 GG-50B는 생체외(*in vitro*)에서는 염증억제 효과를 나타내어도 생체내(*in vivo*)에서는 염증억제제로서의 기능이 미흡하다는 결론을 내리게 되었다.
- [0119] 도 9의 (B)를 참조하면, 조직 검사에서 구굴스테론 유도체 GG-52는 양성 대조군에 비해 염증 점수를 현저하게 감소시켰고, 이와 같은 예방효과는 용량에 비례하였다. 이와 같은 결과들은 실험실적 연구에서 효과가 관찰된 2종의 구굴스테론 유도체 중 구굴스테론 유도체 GG-52가 생체에서도 염증억제 효과를 나타낼 수 있음을 제시해 준다.
- [0120] 3-3. 급성 장염 모델 II에서의 예방 및 치료 효과 관찰
- [0121] 급성 장염 모델 I에서 더 효과적인 결과를 보인 구굴스테론 유도체 GG-52를 대상으로 급성 장염 모델 II에 대한 실험을 시행하였다. 이전의 방법에 따라(Nam KS *et al.*, *J Microbiol Biotechnol* 2007;17:1546-1549), 4% DSS 를 5일간 음수 투여하여 대장염을 유발시키고 난 후, 이어 3일간 식염수, 구굴스테론 유도체 GG-52 25 mg/kg qd, 100 mg/kg qd를 직장 내로 투여하였다. 급성 장염 예방 효과 실험과 마찬가지로, 질병 활성 지수를 측정하였고, 약물 투여 3일째 생쥐를 희생하여 병리학적 소견에 따라 점수화 하고, 그 결과는 아래 표 2에 나타내었다.

표 2

[0122]

구분	체중 변화(%)	대장 길이(cm)	질병 활성 지수
대조군	103.6 $\pm$ 1.8	10.5 $\pm$ 0.7	-
DSS	86.4 $\pm$ 2.9	8.4 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.5
DSS+GG-52 (25 mg/kg)	83.9 $\pm$ 3.9	8.1 $\pm$ 1.1*	1.7 $\pm$ 0.8
DSS+GG-52 (100 mg/kg)	97.3 $\pm$ 1.2*	8.9 $\pm$ 0.3*	0.8 $\pm$ 0.4*
*p<0.05는 DSS 단독 투여군 대비이다.			

[0123]

상기 표 2에 나타난 바와 같이, DSS에 의해 발생한 체중의 감소, 대장길이의 축소와 질병 활성 지수(DAI) 모두 Z-구굴스테론인 GGS와 비교하여 구굴스테론 유도체 GG-52 투여에 의해 현저하게 개선되고 있음을 확인할 수 있었다.

[0124]

실험예 4: DSS 유도 생쥐 장염 모델에서 기존 약제 및 구굴스테론 유도체 GG-52에 의한 장염 치료 효과의 비교

[0125]

생체 실험에서 구굴스테론 유도체 GG-52가 염증성 장질환 치료제로 이용될 수 있음을 확인하였다. 그러나 구굴스테론 유도체 GG-52가 실제 임상에서 활용되기 위해서는 기존의 치료제에 비해 그 효과가 동등하거나 혹은 그

이상이 되어야 할 필요성이 제기된다. 이를 위해, 기존의 염증성 장질환 치료제인 설파살라진 (200 mg/kg) 혹은 프레드니솔론(1 mg/kg) 투여군과의 장염 치료 효과를 비교하였다.

[0126] 이전 연구 방법에 따라(Lee JY *et al.*, *Int Immunopharmacol* 2007;7:241-248), 4% DSS용액을 5일간 음수 투여하여 대장염을 유발시켰다. 음성 대조군에는 실험기간에 지속적으로 식염수를 경구 투여하였다. DSS 투여 전 2일전부터 양성 대조군에는 식염수를, 약물 투여군은 4군으로 나누어 설파살라진(Sigma Chemical Co., USA; 200 mg/kg qd), 프레드니솔론(Sigma; 1 mg/kg qd), GG-52 (50 mg/kg qd), GG-52 (200 mg/kg qd)를 경구 투여하였다. 용매로는 0.5% 메틸셀룰로오스를 사용하였다. 쥐는 매일 체중을 측정하였고, 대변의 굳은 정도, 혈변 유무를 매일 확인하였다. 이를 바탕으로 급성 장염 예방 효과 관찰에 기술한 방법과 동일하게 각 군 사이의 장염 예방 효과를 비교하고, 그 결과를 아래 표 3에 나타내었다.

표 3

구분	체중 변화(%)	대장 길이(cm)	질병 활성 지수
대조군	103.6±1.77	10.5±0.71	-
DSS	82.1±2.59 [*]	7.5±0.87	3.0±0.0 [*]
설파살라진 (200 mg/kg)	90.3±2.99 ^{**}	8.6±1.5 [*]	1.7±0.9 ^{**}
프레드니솔론 (1 mg/kg)	89.6±3.40 ^{**}	8.7±0.46 ^{**}	1.8±1.3 [*]
DSS+GG-52 (50 mg/kg)	85.4±3.92 [*]	8.3±0.39 ^{**}	2.2±0.2 [*]
DSS+GG-52 (200 mg/kg)	92.8±6.01 ^{**}	9.5±0.7 ^{**}	1.58±0.8 [#]

^{*}p<0.05는 대조군 대비이고, [#]p<0.05는 DSS 단독 투여군 대비이다.

[0128] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, GG-52 (50 mg/kg 혹은 200 mg/kg)를 투여한 군과 설파살라진 혹은 프레드니솔론을 투여한 군 사이에 체중 변화, 대장길이 변화 및 질병 활성 지수(DAI)를 비교했을 때 이 지표 모두 통계적인 유의성이 관찰되지 않았다.

[0129] 도 10은 설파살라진, 프레드니솔론, 구글스테론 유도체 GG-52로 처리된 생쥐의 대장 조직의 병리조직 검사에 의한 염증 점수를 나타낸 그래프이다.

[0130] 도 10을 참조하면, 설파살라진, 프레드니솔론, 구글스테론 유도체 GG-52 사이에 병리조직 검사에 의한 염증 점수도 통계적인 차이를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과들은 구글스테론 유도체 GG-52는 염증성 장질환 치료제로서 실제 임상에서 사용되고 있는 기존 약제와 동등한 효과를 보이고 있음을 제시해 준다.

[0131] 실험예 5: 독성검사

[0132] 5-1. 실험 방법

[0133] 본원발명에 따른 구글스테론 유도체의 독성 시험을 전문시험기관인 (주)캠온 (Yongin, Korea)에 의뢰하여 확인하였다.

[0134] 단회 경구투여 독성시험은 ICR 마우스를 이용하였고, 장염동물모델에서 치료용량으로 사용하였던 200 mg/kg의 10배에 해당하는 2,000 mg/kg를 마우스에 투여하였다. 반복경구투여 독성시험은 일정 용량의 유도체를 경구로 1일 1회씩 2주간 동안 투여하여 아래와 같은 항목을 검사하였다.

[0135] (1) 일반증상관찰 [SOP-AT-004]

[0136] (2) 체중측정 [SOP-AT-006]

[0137] (3) 사료섭취량 산출 [SOP-AT-008]

[0138] (4) 물섭취량 측정[SOP-AT-009]

[0139] (5) 요검사[SOP-AT-010, SOP-BL-008, 009]: 투여 마지막 주에 3~4 시간 동안 채뇨한 신선뇨로 아래의 항목을

요검사용 시험지(Multistix 10SG, Bayer)와 요자동분석장치(CliniTek 100, Bayer)를 이용하여 측정하였다. 해당항목은 다음과 같다: 요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 요비중(specific gravity), 잠혈(occult blood), pH, 요단백(protein), 유로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite) 및 백혈구(leukocyte)

[0140] (6) 혈액관련검사

[0141] 가) 혈액학적 검사 [SOP-BL-005, 014, 015]: 부검 시 생존동물 및 실험중 빈사동물을 ether로 흡입 마취시킨 후, 마취가 확인되면 개복하여 후대정맥에서 채혈한 다음, 혈액학적 검사를 실시하였다. 채혈한 혈액은 항응고제인 EDTA-2K 가 들어있는 CBC bottle 에 주입한 후, CELL-DYN 3700 (Abbot, USA)을 활용하여 혈구수를 측정하였다. 검사항목은 아래와 같다.

항 목	단 위	방 법
㉑ WBC (White blood cell count)	$10^3/\text{mm}^3$	전기저항법
㉒ RBC (Red blood cell count)	$10^6/\text{mm}^3$	전기저항법
㉓ HGB (Hemoglobin conc.)	g/dl	시안메트헤모글로빈변법
㉔ HCT (Hematocrit)	%	b, e 항목으로 산출
㉕ MCV (Mean corpuscular volume)	fl	전기저항법
㉖ MCH (Mean corpuscular hemoglobin)	pg	㉑㉒ 항목으로 산출
㉗ MCHC (Mean corpuscular Hb. conc.)	g/dl	㉑㉒ 항목으로 산출
㉘ RDW (Red cell distribution with)	%	Histogram
㉙ Platelet	$10^3/\text{mm}^3$	전기저항법
㉚ MPV (Mean platelet volume)	fl	Histogram
㉛ 백혈구 감별계수	%	산란광검출법

[0143] 나) 혈액생화학적 검사 [SOP-BL-002, 003]: 채혈한 혈액을 Vacutainer tube에 주입하고 15~20 분간 상온에 방치하여 응고시킨 후, 3000 rpm, 10 분간 원심분리하여 얻은 혈청으로 AU400 혈액생화학검사기(Olympus, Japan)를 활용하여 측정하였고 전해질은 전해질 분석장치(644 Na, K, Cl Analyzer, Ciba-Corning, USA)로 측정하였다.

항 목	단 위	방 법
㉑ AST (Aspartate aminotransferase)	IU/L	IFCC법
㉒ ALT (Alanine aminotransferase)	IU/L	IFCC법
㉓ ALP (Alkaline phosphatase)	IU/L	P-NPP법
㉔ BUN (Blood urea nitrogen)	mg/dl	Urease-UV법
㉕ CRE (Creatinine)	mg/dl	Jaffe법
㉖ GLU (Glucose)	mg/dl	UV법
㉗ CHO (Total cholesterol)	mg/dl	Enzyme법
㉘ PRO (Total protein)	g/dl	Biuret법
㉙ CPK (Creatine phosphokinase)	IU/l	UV-Rate 법
㉚ ALB (Albumin)	g/dl	BCG 법
㉛ BIL (Total bilirubin)	mg/dl	Evelyn-Malloy법
㉜ TG (Triglyceride)	mg/dl	Enzyme법
㉝ IP (Inorganic phosphorus)	mg/dl	Enzyme법
㉞ Ca^{++} (Calcium ion)	mg/dl	O-CPC 법
㉟ A/G ratio	ratio	PRO, ALB로 산출
㊱ Na^+ (Sodium ion)	mmol/L	전극법
㊲ K^+ (Potassium ion)	mmol/L	전극법
㊳ Cl^- (Chloride ion)	mmol/L	전극법
㉑-㉟: 혈액생화학검사기(AU400, Olympus, Japan)를 이용하여 측정. ㊱-㊳: 전해질자동분석장치(644 Na, K, Cl Analyzer, Ciba-Corning, USA)로 측정.		

- [0145] (7) 부검 [SOP-PA-001]: 혈액 관련 검사를 위한 채혈을 마친 동물은 복대동맥 및 후대동맥을 절단하여 방혈 치사시킨 다음, 복강, 흉강 및 두부의 모든 장기에 대하여 부검소견을 관찰한 후 부검소견기록지에 기록하였다.
- [0146] (8) 장기중량측정 [SOP-PA-001]: 부검시 심장, 폐, 가슴샘, 간장, 비장, 신장, 부신, 고환, 전립샘, 난소, 자궁을 적출한 후, 전자저울을 이용하여 중량을 측정하며, 양측성 장기는 모두 측정하였다.
- [0147] (9) 장기고정 [SOP-PA-002]: 주요 장기 및 부검 중 이상소견이 있는 장기는 10 % 중성완충포르말린 용액에 고정하며, 필요한 경우 조직검체를 제작하여 조직병리학적 검사를 실시하였다.
- [0148] 독성시험에서 투여군간의 비교는 일반적으로 모수적 또는 비모수적인 다중비교(parametric or nonparametric multiple comparison procedures)를 사용하였다. 즉, 모수적인 다중비교의 경우는 우선 일원배치분산분석(ANOVA)을 통하여 군간 유의성을 관찰하여 군간의 유의성이 인정되면 사후 검정을 실시하였고, 사후 검정방법은 Levene test에서 분산의 동질성이 인정되면 Duncan T-test를 수행하고, 분산의 동질성이 인정되지 않으면 Dunnett T-test를 수행하였다. 요검사에서 관찰한 일반검사자료는 척도변환을 실시하여 비모수적인 검사를 실시하였고, 순위화한 데이터를 이용한 Kruskal-Wallis'H test를 실시하여 군간 유의성이 인정되면 Mann-Whitney U 검정을 통하여 대조군과의 유의성을 검정하였다. 모든 통계학적인 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하였다.
- [0149] 5-2. 실험 결과
- [0150] 먼저 ICR 마우스를 이용한 단회 경구투여 독성시험을 시행하였다. 이를 위해 장염동물모델에서 치료용량으로 사용하였던 200 mg/kg의 10배에 해당하는 2,000 mg/kg를 마우스에 투여하였다. 그 결과 구갈스테론 유도체 GG-52 (2,000 mg/kg)를 마우스에 투여해도 사망동물이 발생하지 않았다. 또한 일반소견 및 부검소견에서도 이상소견이 관찰되지 않았다. 따라서 GG-52의 최소치사량(minimal lethal dose, MLD)은 2,000 mg/kg 이상이 될 것으로 보인다.
- [0151] 다음으로 반복경구투여 독성시험을 시행하였다. 이를 위해 1) 투여하지 않는 대조군; 2) 222 mg/kg를 투여한 그룹; 3) 666 mg/kg를 투여한 그룹; 4) 2,000 mg/kg를 투여한 그룹으로 나누었고, 이 용량을 경구로 1일 1회씩 2주간 투여하였다. 시험 결과는 다음과 같다.
- [0152] 1) 사망동물: 2,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 투여 4 일째 빈사 처리한 동물의 부검 결과, 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 밝혀졌다.
- [0153] 2) 일반증상: 특이적인 이상소견을 관찰할 수 없었다.
- [0154] 3) 체중: 시험물질 투여군 암수 모두 투여 1 주체부터 증가 경향을 보였다. 수컷에서는 부형제 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었고, 암컷에서는 체중증가(weight gains)가 666 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 부형제 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나($p<0.05$, $p<0.01$), 독성학적으로 의미 없는 변화로 판단되었다.
- [0155] 4) 사료 및 물 섭취량: 시험물질 투여군 모두 부형제 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었다.
- [0156] 5) 뇨검사: 시험물질 GG-52 투여군 암수에서 부형제 대조군에 비해 pH의 감소경향이 있었으나, 통계학적으로 유의한 변화는 아니었다. 수컷에서는 666 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 요비중(SG)이 부형제 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였으나($p<0.05$), 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단되고, 암컷에서는 222 mg/kg/day 투여군에서 요당(glucose)이 유의하게 감소하였으나 ($p<0.05$), 용량 상관성 없는 변화로 독성학적으로 의미 없는 변화로 판단되었다.
- [0157] 6) 혈액학적 검사: 222 mg/kg/day 투여군 수컷에서 RDW가 부형제 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소하였으나, 용량 상관성이 없는 변화로 독성학적으로 의미 없는 변화로 판단되었다.
- [0158] 7) 혈액생화학적 검사: 2,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 ALP의 증가 경향이 관찰되었다. 수컷에서는 부형제 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 없었으나, 암컷에서는 유의성이 인정되었다($p<0.05$). 또한 동일 용량군 암컷에서 총콜레스테롤(CHOL)이 부형제 대조군에 비해 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 그러나 이들은 모두 정상수치 이내의 변화로 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판단되었다.
- [0159] 8) 장기중량: 2,000 mg/kg/day 투여군 암수에서 간장의 절대 및 상대중량이 부형제 대조군에 비해 유의한 증가를 보였고($p<0.05$, $p<0.01$), 666 및 2,000 mg/kg/day 투여군 암컷에서 좌우측 신장의 절대 및 상대중량이 증가 및 증가 경향을 보였다($p<0.05$, $p<0.01$). 그러나 이는 관련 항목의 유의한 변화가 뒷받침되지 않은 변화들로 신장 및 간장의 기능적 이상을 초래하지 않은 것으로 판단되어 독성학적으로 유해한 변화는 아닌 것으로 판

단되었다.

[0160] 9) 육안적 부검소견 관찰 결과, 시험물질 투여에 의한 변화는 없었다.

[0161] 결론적으로, GG-52를 ICR 계통의 암수 마우스에 대한 2 주간 반복 경구 투여하였을 때 시험물질 GG-52 투여에 의한 독성학적 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험조건 하에서 시험물질 GG-52의 마우스에 대한 무독성량 (NOAEL: no observed adverse effect level)은 암수 모두 2,000 mg/kg/day을 상회하는 것으로 결론지었다.

산업이용 가능성

[0162] 본 발명에 따른 구굴스테론 유도체는 염증성 장질환의 예방 및 치료제로 사용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0163] 도 1은 구굴스테론 유도체 GG-52 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0164] 도 2는 구굴스테론 유도체 GG-52 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0165] 도 3은 구굴스테론 유도체 GG-52 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0166] 도 4는 구굴스테론 유도체 GG-52 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0167] 도 5는 구굴스테론 유도체 GG-46, GG-53, GG-50B 및 GG-52가 TNF- α 에 의해 유도된 IL-8 mRNA 발현을 억제하는 정도를 비교하여 나타낸 그래프이다.

[0168] 도 6은 COLO 205 세포주에서 TNF- α 에 의해 자극된 I κ B α 의 인산화에 대한 구굴스테론 유도체 GG-50B와 GG-52의 효과를 비교하기 위해 실시한 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이다.

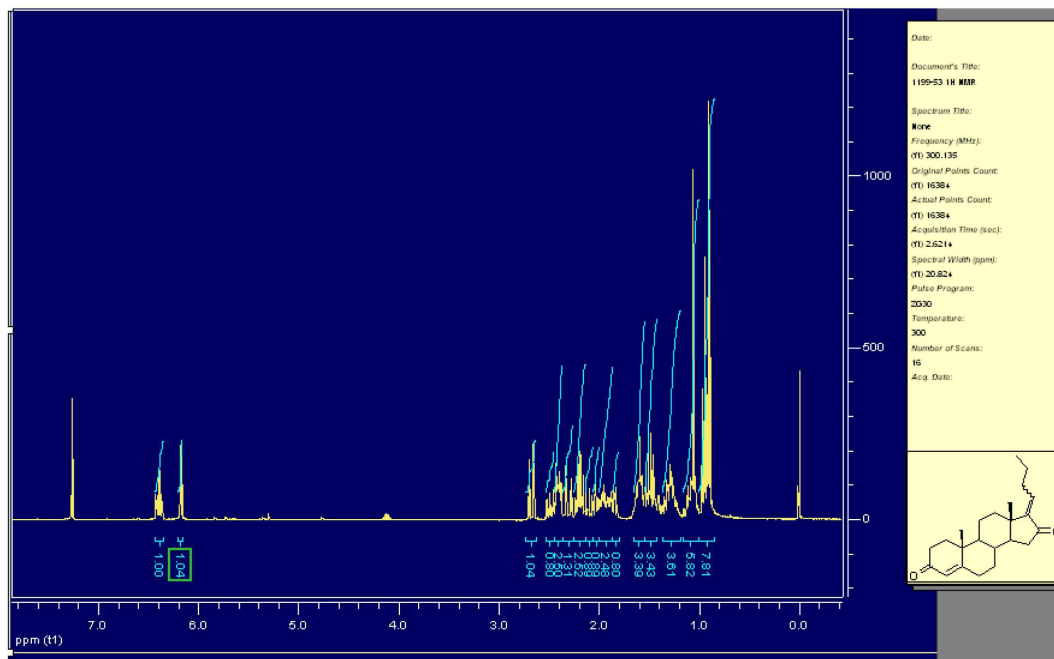
[0169] 도 7은 COLO 205 세포에서 TNF- α 에 의해 자극된 NF- κ B의 DNA 결합 활성에 대한 구굴스테론 유도체 GG-50B와 GG-52의 영향을 평가하기 위해 실시한 EMSA 결과를 나타낸 것이다.

[0170] 도 8은 대조군, DSS, DSS와 구굴스테론 유도체 GG-52로 처리된 생쥐의 대장조직을 헤마톡실린-에오신으로 염색하여 관찰한 결과를 나타낸 사진이다.

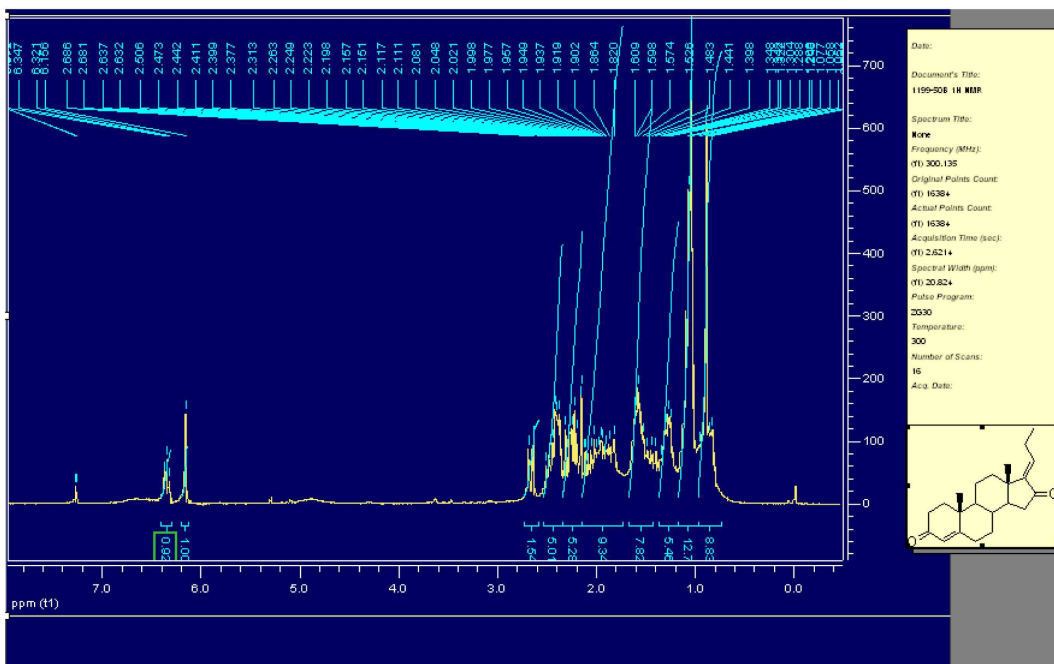
[0171] 도 9는 대조군, DSS, DSS와 구굴스테론 유도체 GG-50B, DSS와 구굴스테론 유도체 GG-52로 처리된 생쥐의 대장 조직의 병리조직 검사에 의한 염증 점수를 나타낸 그래프이다.

[0172] 도 10은 설파살라진, 프레드니솔론 실시예 1의 구굴스테론 유도체(GG-52)로 처리된 생쥐의 대장 조직의 병리조직 검사에 의한 염증 점수를 나타낸 그래프이다.

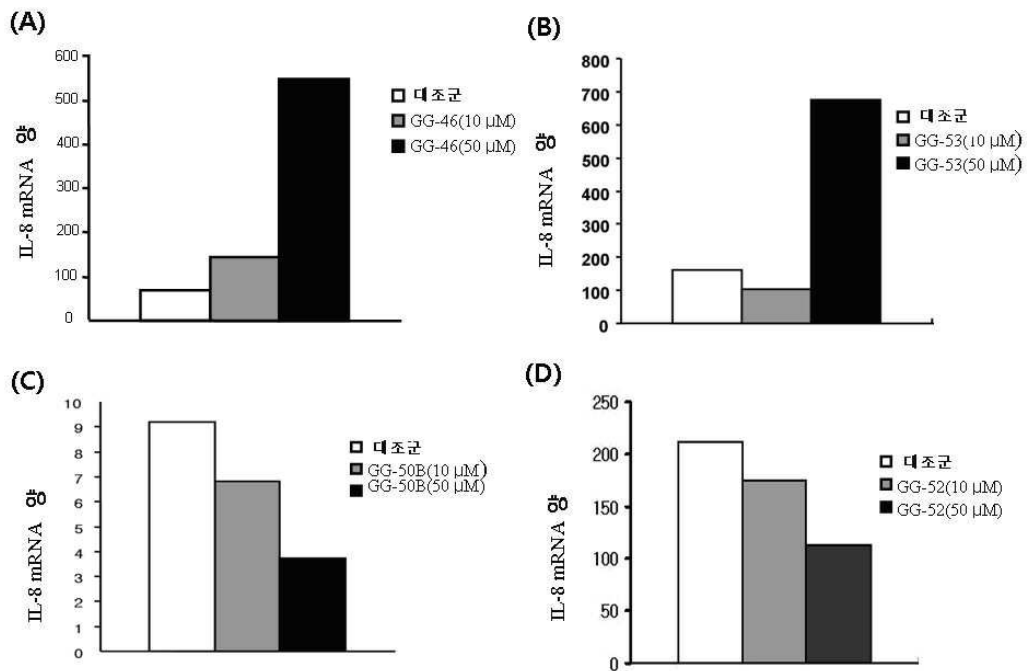
도면3



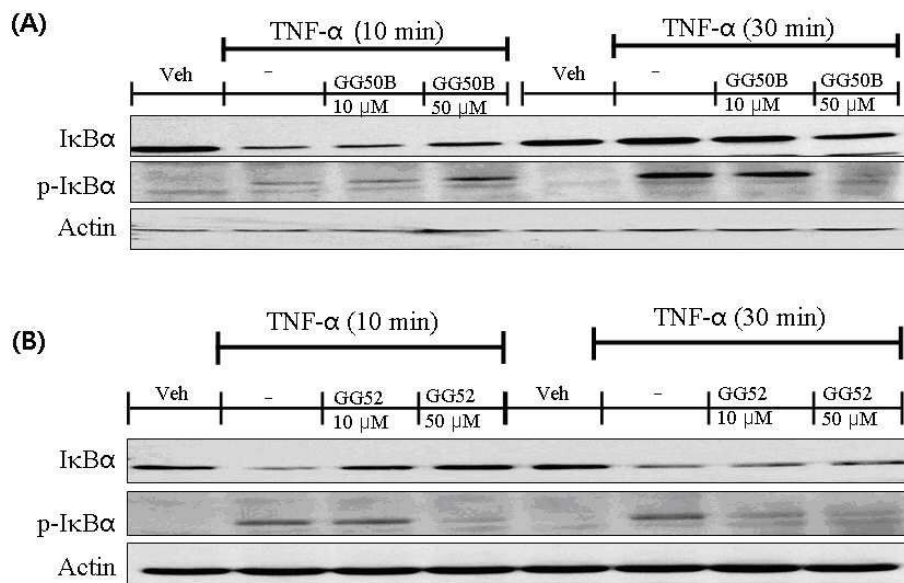
도면4



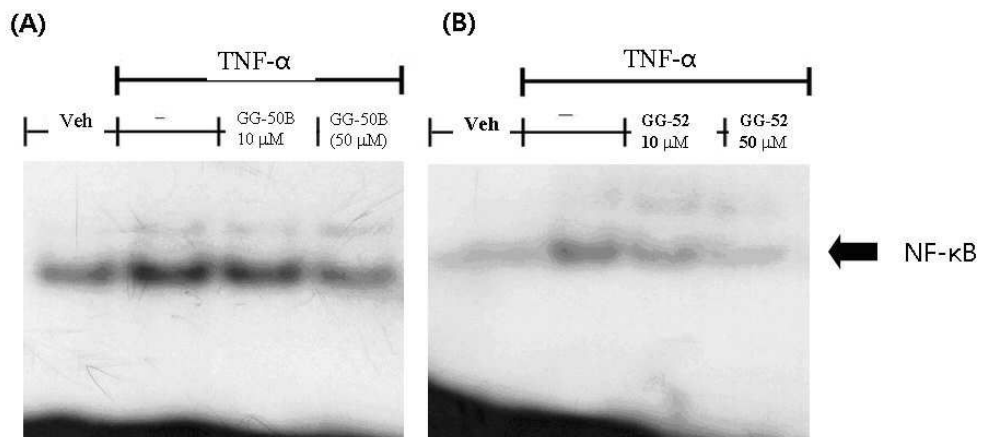
도면5



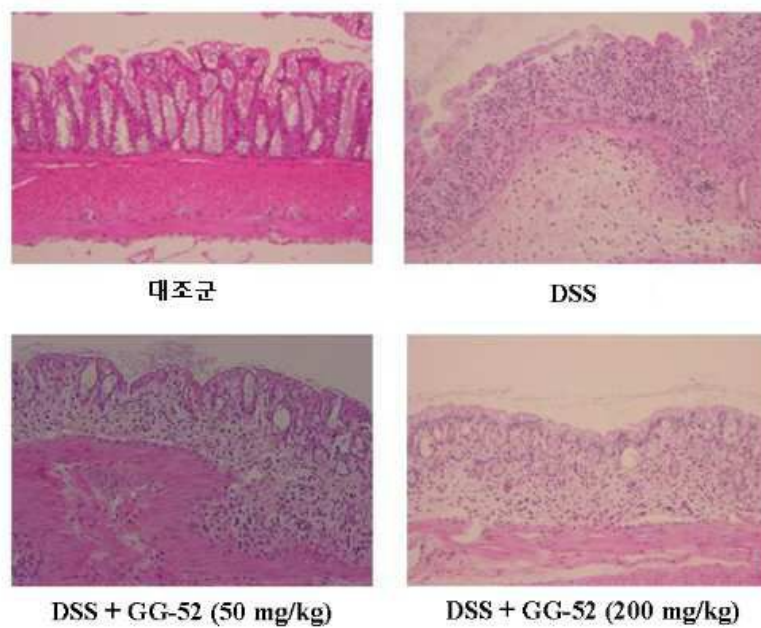
도면6



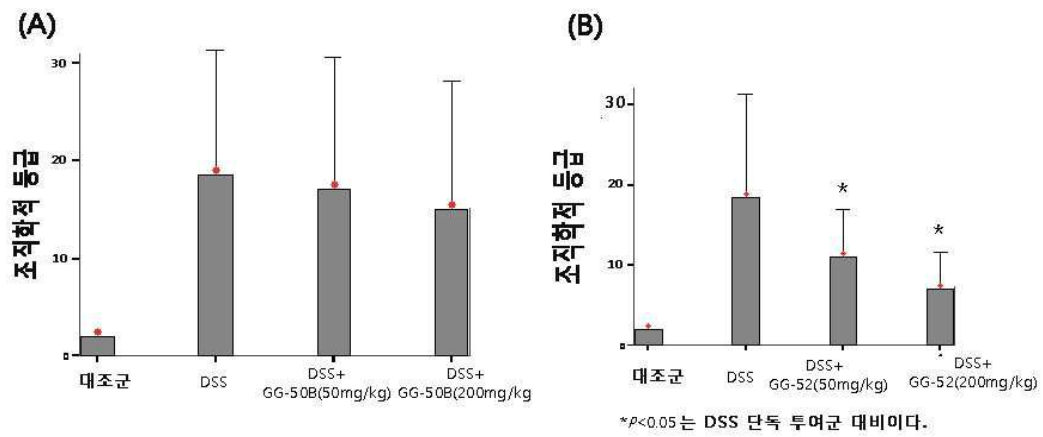
도면7



도면8



도면9



도면10

