



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0018458

(43) 공개일자 2022년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07J 63/00 (2006.01) A61K 31/575 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07J 63/008 (2013.01)

A61K 31/575 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0104009

(22) 출원일자 2021년08월06일

심사청구일자 2021년08월06일

(30) 우선권주장

1020200098773 2020년08월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인

(주)카보엑스퍼트

대전광역시 유성구 대학로 99, 산학연교육연구관
705호 (공동, 충남대학교)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (공동, 충남대학교)

(72) 발명자

박종태

대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 603동 110
2호(하기동, 송림마을6단지아파트)

누엔푸공

대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 학생생
활관 10동 207호(공동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인더웨이브

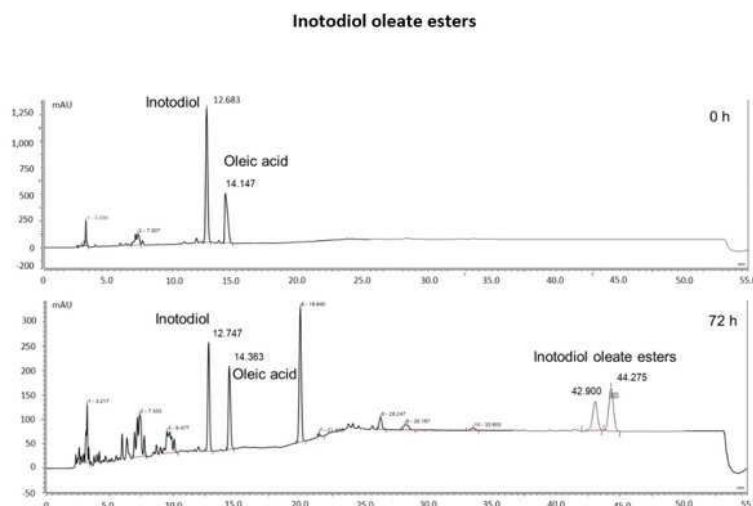
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 이노토디올 에스테르 유도체 전구 약물

(57) 요약

이노토디올의 에스테르 유도체 전구 약물 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 전구 약물은 무기 용매 및 유기 용매에 대한 용해도가 증가할 뿐만 아니라, 안정성이 향상되었는 바 염증성 질환 또는 알레르기성 질환을 포함한 다양한 염증 질환의 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 37/08 (2018.01)

(72) 발명자

박규빈

세종특별자치시 다정중앙로 77, 609동 1002호(다정동, 가운마을6단지)

이난영

대전광역시 유성구 농대로21번길 17, 501호(궁동, 공감)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425149366

과제번호 S2758812

부처명 중소벤처기업부

과제관리(전문)기관명 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 창업성장기술개발(R&D)

연구과제명 선택적 “비만세포(Mast Cell) 저해제” 인 이노토디올(Inotodiol)을 이용한 천식 치료제 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 (주)카보엑스퍼트

연구기간 2020.06.01 ~ 2021.05.31

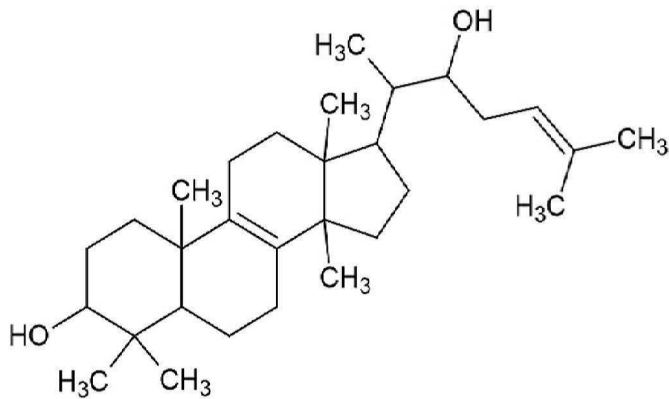
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 이노토디올 화합물의 하이드록실기와 지방산, 글루쿠론산 알킬 무수 숙신산, 또는 페놀산의 카르복실기가 에스테르 축합반응을 통해 형성된 이노토디올 에스테르 유도체 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

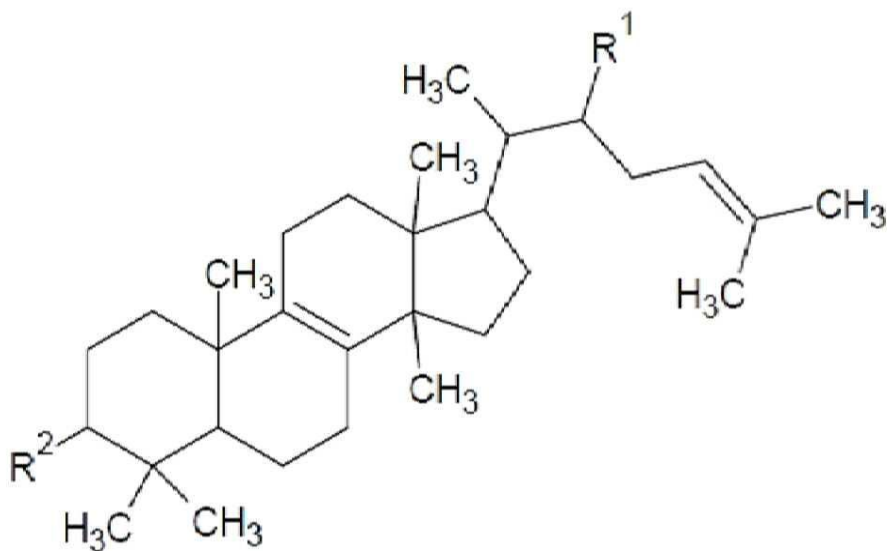
[화학식 1]



청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 이노토디올 에스테르 유도체 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 2]



상기 식에서 R1 및 R2는 서로 독립적으로, OH, 또는 -OC(O)-R3이고, R3는 1 내지 30개의 탄소수를 가진 직선형 또는 분지형 알킬, 알켄일 또는 알킨일 사슬이며,

R1 및 R2 중 적어도 하나는 -OC(O)-R3이다.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 R3는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a-$, 또는 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_b(\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2))_c(\text{CH}_2)_d-$ 를 갖는 비치환된 직선형 알킬 또는 알켄일 사슬이되, a는 8 내지 24의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고, c는 1 내지 6의 정수이고, d는 3 내지 7의 정수인 것인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 지방산은 불포화 지방산 또는 포화 지방산인 것인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 불포화 지방산은 미리스톨레산, 팔미톨레산, 사피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라이드산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루크산, 및 도코사헥사엔산으로 구성된 군에서 선택된 것인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 포화 지방산은 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 리그노세르산, 세로트산, 및 미리스틴산(Myristic Acid)으로 구성된 군에서 선택된 것인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 이노토디올 및 지방산은 1:10 내지 30의 몰비로 혼합된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 페놀산은 p-쿠마린산, 신남산, 페룰산, 3,4-디하이드록시 벤조산, p-하이드록시 벤조산, 바닐린산, 카페인산, 시링산, 및 시나편산으로 구성된 군에서 선택된 것인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 이노토디올 에스테르 유도체 전구 약물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전구 약물은 처음에는 불활성이지만 체내에 투여된 후 대사과정을 통해 활성형으로 변화하여 효과가 나타나는 약물을 말한다. 전구 약물은 체내에 투입하면 바로 분해되는 어떤 치료제(A)를 다른 물질(B)과 결합시켜 표적 세포 또는 조직 등으로 전달한 뒤, 체내 대사과정을 통해 B는 배출시키고 A성분만 남아 치료가 이루어지도록 한다.

[0003] 한편, 이노토디올은 차가 버섯의 알코올 추출물에서 분리된 화합물로서 불포화 디올(diol)의 속성을 가지고 있다. 이노토디올은 수용성이 없으며 유기용매에 대하여 용해도가 비교적 낮고, 불안정하여 쉽게 석출되는 바, 경구 투여시 체내 흡수율이 낮다. 또한, 경구 투여시 석출되지 않은 분획은 소장에서 쉽게 흡수되므로 소장 말단이나 대장에 도달하지 못하며 석출된 이노토디올은 생체 활성을 나타내지 않고 체외로 배출된다는 문제점이 있다.

[0004] 따라서, 상기와 같은 문제점을 극복하기 위하여, 이화학적, 생리학적 및 약학적 특성을 개선한 이노토디올 전구 약물의 개발이 필요한 실정이다.

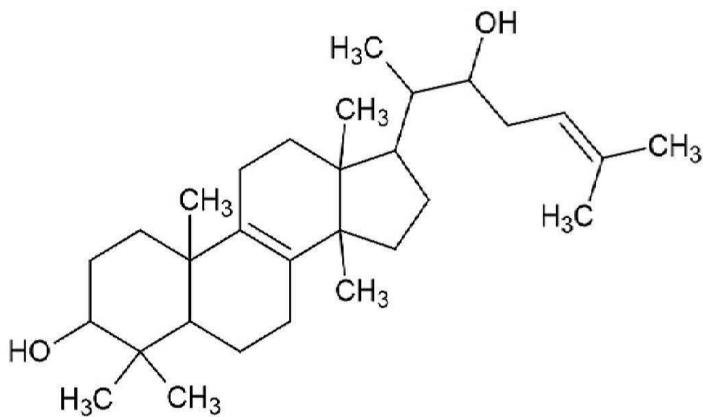
발명의 내용

해결하려는 과제

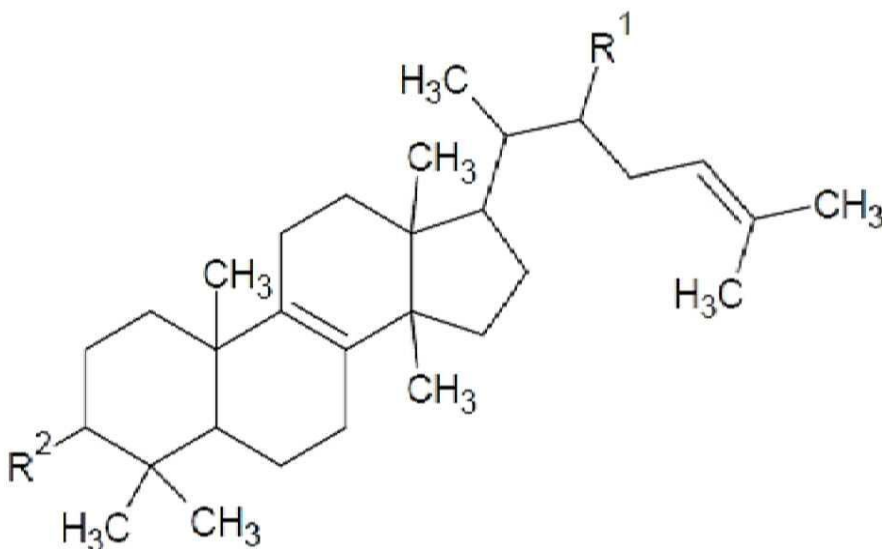
- [0005] 일 양상은 이노토디올 에스테르 유도체 전구 약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.
- [0006] 다른 양상은 상기 전구 약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 또 다른 양상은 상기 전구 약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0008] 또 다른 양상은 유효한 양의 상기 전구 약물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 일 양상은 이노토디올 에스테르 유도체 전구 약물을 제공한다.
- [0010] 일 양상은 하기 화학식 1의 이노토디올 화합물의 하이드록실기와 지방산 글루쿠론산(glucuronic acid), 알킬 무수 숙신산 또는 페놀산의 카르복실기가 에스테르 축합반응을 통해 형성된 이노토디올 에스테르 유도체 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:
- [0011] [화학식 1]



- [0012]
- [0014] 일 양상은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:
- [0015] [화학식 2]



- [0016]
- [0017] 상기 식에서 R1 및 R2는 서로 독립적으로, OH, 또는 -OC(O)-R3이고, R3는 1 내지 30개, 4 내지 30개, 또는 6

내지 30개의 탄소수를 가진 직선형 또는 분지형 알킬, 알켄일 또는 알킨일 사슬이며,

[0018]

R1 및 R2 중 적어도 하나는 $-OC(O)-R3$ 이다.

[0019]

일 구체예에 있어서, 상기 R3는 $CH_3(CH_2)_a-$, 또는 $CH_3(CH_2)_b(CH=CH[CH_2])_c(CH_2)_d-$ 를 갖는 비치환된 직선형 알킬 또는 알켄일 사슬이되, a는 8 내지 24의 정수이고, b는 1 내지 5의 정수이고, c는 1 내지 6의 정수이고, d는 3 내지 7의 정수이다.

[0020]

본 명세서에서, 용어 "전구 약물(Prodrug)"은 그 자체로 생물학적 불활성일 수 있지만, 체내에서 그의 체류 시간 동안에 화학적/생화학적 구조변형 후 유효한 약효가 나타나는 약을 의미할 수 있다. 즉, 유용한 약물임에도 불구하고 부작용, 안정성, 용해성, 흡수성, 작용 시간 등에서 적합치 않는 성질을 가지고 있는 것에 화학적 수식을 가하여 임상 사용을 가능하게 한 것이다. 일 구체예에 따른 이노토디올 유도체는 이노토디올과 지방산의 에스테르 결합을 통해 형성된 화합물로서 무기용매 및/또는 유기용매에 대한 용해도가 증가하고 안정성이 향상되었을 뿐만 아니라 소장에서 이노토디올과 지방산으로 쉽게 분해되어 소장에서의 흡수가 용이하다. 예를 들어, 상기 이노토디올 유도체는 이노토디올과 숙신산의 에스테르 결합을 통해 형성된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 이노토디올 유도체는 p-톨루엔술폰산 촉매 하에서 알킬 무수 숙신산과 이노토디올과의 축합반응을 행하여 합성할 수 있으며 알킬 무수 숙신산을 이노토디올에 비해 과량으로 투입하여 이노토디올의 모든 또는 적어도 하나의 하이드록시기에 숙신산 에스테르 결합을 유도할 수 있다. 반응 완료 후, p-톨루엔술폰산을 탄산수소나트륨으로 중화시켜 제거한다. 상기 방법에 의해 합성된 이노토디올 유도체 화합물은 상기 화학식 2의 R1 및 R2가 모두 또는 적어도 하나가 숙신산 에스테르 결합을 형성하여 수용성이 향상되었을 뿐만 아니라 에스테르 결합이 쉽게 분해되어 소장에서 쉽게 흡수될 수 있다. 또한, 다른 구체예에 따른 이노토디올 유도체는 이노토디올과 지방산의 에스테르 결합을 통해 이노토디올의 수용성을 증가시킬 뿐만 아니라 소장에서의 가수분해 및 체내 흡수도를 낮춰 이노토디올 유도체가 대장으로 도달할 수 있는 확률을 증가시켜 대장 내 다양한 미생물에 의해 이노토디올 유도체가 분해되면 이노토디올이 직접적인 약리작용을 가능하도록 한다. 예를 들어, 상기 이노토디올 유도체는 이노토디올과 페놀산의 에스테르 결합을 통해 형성된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 이노토디올 유도체는 대장 내에서 에스테르 결합이 가수분해되어 이노토디올과 페놀산을 방출함으로써 이노토디올과 페놀산 각각의 다양한 생리활성을 기대할 수 있다. 따라서, 일 양상에 따른 전구 약물은 이노토디올의 복용량을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 고농도로 섭취시에 발생할 수 있는 부작용을 감소시킬 수 있다.

[0021]

상기 이노토디올은 차가버섯(*Inonotus obliquus*)의 주요 생리 활성성분으로서, 통상적인 방법에 따라 화학적으로 합성할 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수 있으며 또는 차가 버섯 추출물로부터 분리, 정제된 것일 수 있다.

[0022]

본 명세서에서 용어, "이노토디올(Inotodiol)"의 IUPAC 명칭은 (3S,5R,10S,13R,14R,17R)-17-[(2S,3R)-3-하이드록시-6-메틸헵트-5-엔-2-일]-4,4,10,13,14-펜타메틸-2,3,5,6,7,11,12,15,16,17-데카하이드로-1H-사이클로펜타[a]페나트렌phenanthren-3-올 ((3S,5R,10S,13R,14R,17R)-17-[(2S,3R)-3-hydroxy-6-methylhept-5-en-2-yl]-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,11,12,15,16,17-decahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol)이다.

[0023]

상기 이노토디올 유도체는 화학적 또는 생물학적 방법을 통해 합성될 수 있다. 구체적으로, 상기 이노토디올 유도체는 이노토디올과 지방산의 에스테르화 반응에 의해 합성될 수 있다. 상기 지방산은 C_{10} 내지 C_{30} 불포화 또는 포화 지방산 일 수 있으며, C_1 내지 C_{10} 카르복시산 또는 페놀산으로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 불포화 지방산은 예를 들어, 미리스톨레산, 팔미톨레산, 사피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라이드산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루크산, 및 도코사헥사엔산 등 일 수 있다. 상기 포화 지방산은 예를 들어, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 리그노세르산, 세로트산, 및 미리스틴산 등 일 수 있다. 상기 포화 카르복시산은 예를 들어, 포름산(Formic acid), 아세트산(Acetic acid), 프로피온산(Propionic acid), 뷰티르산(Butyric acid), 숙신산(succinic acid) 등 일 수 있다. 상기 페놀산은 예를 들어, p-쿠마린산(p-coumaric acid), 신남산(cinnamic acid), 페룰산(ferulic acid), 3,4-디하이드록시 벤조산(3,4-dihydroxy benzoic acid), p-하이드록시 벤조산(p-hydroxy benzoic acid), 마닐린산(vanilic acid), 카페인산(caffeic acid), 시링산(syringic acid), 시나핀산(sinapinic acids) 등 일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 이노토디올 유도체는 이노토디올과 불포화 지방산, 포화 지방산 및 C_1 내지 C_{10} 카르복시산으로 구성된 군에서 선택된 지방산을 1:10 내지 30의 몰비로 혼합하여 합성한 것일 수 있다. 예를 들어, 1:10 내지 30, 1:10 내지 25, 1:10 내지 20, 1:10 내지 15, 1:10 내지 13, 5:10 내지 30, 또는 5:10 내지 15의 몰비로 혼합한 것일 수 있다. 이때, 이노토디올 및 지방산의 혼합 비율이 상기 범위 미만이거나 또는 상기

범위를 초과하는 경우, 반응이 충분히 일어나지 않아 이노토디올 유도체의 생성 효율이 떨어지거나 또는 반응 소요 시간이 늘어나는 문제점이 있다. 또한, 상기 에스테르화 반응은 55 내지 65℃에서 48 내지 96시간 동안 반응하는 것일 수 있다. 이때, 에스테르화 반응 조건이 상기 범위 미만이거나 또는 상기 범위를 초과하는 경우, 반응 기질인 지방산의 완전한 용해가 어려워 반응이 거의 일어나지 않거나 또는 효소 활성이 저하되어 에스테르 반응 효율이 떨어져 최종 산물인 이노토디올 유도체를 고수율로 합성할 수 없다는 문제점이 있다. 또한, 상기 에스테르화 반응이 종료된 이후, 공지된 여러 증류 방법 또는 정제 방법을 통하여 생성물에 포함된 에스테르의 순도를 더 높일 수 있다.

[0024] 또한, 상기 이노토디올과 지방산의 혼합물에 생물학적 효소를 추가하여 합성할 수 있으며, 상기 생물학적 효소는 고효율의 이노토디올 유도체를 생산하는데 적합한 효소로서 예를 들어 칸디다 엔탁티카 리파아제 B(Candida Antarctica Lipase B, CalB)인 것일 수 있다. 상기 칸디다 엔탁티카 리파아제 B는 최종 산물인 이노토디올 유도체의 수율을 높이기 위하여 일반 효소보다 고정화 효소(immobilized enzyme)를 사용할 수 있으며, 상기 고정화 효소는 시판 제품을 사용하거나 통상적인 방법으로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 상기 엔탁티카 리파아제 B는 이노토디올 100 중량부 기준으로 400 내지 500 중량부를 추가하여 이노토디올 유도체를 합성할 수 있다. 이때, 엔탁티카 리파아제 B의 함량이 상기 범위 미만인 경우, 에스테르 반응이 충분히 일어나지 않아 에스테르를 생산하는 효율이 낮다는 문제점이 있으며 상기 범위를 초과하는 경우, 최종 산물인 이노토디올 유도체를 고수율로 합성할 수 없어 경제적이지 않다는 문제점이 있다.

[0026] 일 양상은 상기 전구 약물을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0027] 본 명세서에서, 용어 "염증성 질환"이란 급성 및/또는 만성 염증 질환을 포함한다. 상기 염증성 질환은 예를 들어, 피부염, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 동맥 경화증, 과민성 대장증후군(IRS), 염증성 장질환(IRD), 다발성 경화증, 급성 염증 질환 및 만성 염증 질환으로 구성된 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0028] 본 명세서에서, 용어 "알레르기"는 알레르기 유발 물질인 알레르겐과의 접촉을 통해 항원-항체 반응에 의하여 생체 내에서 급격한 반응이 일어나는 현상을 의미한다. 상기 알레르기는 예를 들어, 꽃가루, 집먼지 진드기, 약물, 식물성 섬유, 세균, 식품, 염색약 및 화학물질, 식품 등에 의해 유도되는 알레르기 질환인 것일 수 있다.

[0029] 상기 알레르기 질환은 알레르기에 의해 생기는 질환으로 예를 들어, 두드러기 아나필락시스(anaphylaxis), 알레르기성 비염, 기관지천식, 아토피성 피부염, 약진, 약제 알레르기, 혈청병 등인 것일 수 있으며, 알레르겐의 종류나 알레르기 반응을 일으키는 조직에 따라 여러 가지 질환의 유형을 나타낼 수 있다.

[0030] 일 양상에 따른 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구제 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되어 사용할 수 있고, 제형화를 위하여 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0031] 상기 담체 또는, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.

[0032] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.

[0033] 경구 투여를 위한 고형제제는 상기 두류 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 제조할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다.

[0034] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용하는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0035] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비

수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등을 사용할 수 있다.

[0036] 일 양상에 따른 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.0001 내지 2,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 2,000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0037] 일 양상에 따른 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유 동물에 다양한 경로로 투여할 수 있다. 투여의 모든 방식은 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해서 투여할 수 있다.

[0039] 다른 양상은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 또는 화장품 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 화합물의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[0041] 일 양상에 따른 염증성 질환 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 있어서, 상기 화합물을 건강기능식품의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.

[0042] 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.

[0043] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.

[0044] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 화합물은 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 천연물로부터의 분획물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[0045] 일 양상에 따른 건강기능식품 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스화 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.

[0046] 상기 외에 일 양상에 따른 알레르기 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 수면 개선용 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0047] 일 양상에 따른 전구 약물은 무기용매 및 유기 용매에 대한 용해도가 증가할 뿐만 아니라, 안정성이 향상되었는바, 염증성 질환 또는 알레르기성 질환을 포함한 다양한 염증 질환의 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048]

도 1은 이노토디올의 올레산 전구 약물의 HPLC-ELSD 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 이노토디올의 리놀레산 전구 약물의 HPLC-ELSD 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 이노토디올의 팔미트산 전구 약물의 HPLC-ELSD 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 이노토디올의 숙신산 전구 약물의 HPLC-ELSD 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 이노토디올의 올레산 전구 약물의 LC-MS/MS 결과를 나타낸 도면이다:

도 5A는 이노토디올 올레산 에스테르의 분자량을 확인한 도면이고; 및 도 5B는 이노토디올 올레산 에스테르의 단편 패턴을 확인한 도면이다.

도 6은 이노토디올의 숙신산 전구 약물의 LC-MS/MS 결과를 나타낸 도면이다:

도 6A는 이노토디올 숙신산 에스테르의 분자량을 확인한 도면이고; 및 도 6B는 이노토디올 숙신산 에스테르의 단편 패턴을 확인한 도면이다.

도 7은 이노토디올의 리놀레산 전구 약물의 LC-MS/MS 결과를 나타낸 도면이다:

도 7A는 이노토디올 리놀레산 에스테르의 분자량을 확인한 도면이고; 및 도 7B는 이노토디올 리놀레산 에스테르의 단편 패턴을 확인한 도면이다.

도 8은 이노토디올의 팔미트산 전구 약물의 LC-MS/MS 결과를 나타낸 도면이다:

도 8A는 이노토디올 팔미트산 에스테르의 분자량을 확인한 도면이고; 및 도 8B는 이노토디올 팔미트산 에스테르의 단편 패턴을 확인한 도면이다.

도 9는 이노토디올의 올레산 전구 약물의 $^1\text{H-NMR}$ 결과를 나타낸 도면이다:

도 9A는 이노토디올의 $^1\text{H-NMR}$ 을 확인한 도면이고; 도 9B는 22-O-올레일-이노토디올의 $^1\text{H-NMR}$ 을 확인한 도면이며; 및 도 9C는 3-O-올레일-이노토디올의 $^1\text{H-NMR}$ 을 확인한 도면이다.

도 10은 이노토디올의 올레산 전구 약물의 $^{13}\text{C-NMR}$ 결과를 나타낸 도면이다:

도 10A는 이노토디올의 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 확인한 도면이고; 도 10B는 22-O-올레일-이노토디올의 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 확인한 도면이며; 및 도 10C는 3-O-올레일-이노토디올의 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 확인한 도면이다.

도 11은 이노토디올의 올레산 전구 약물의 2D 이핵 다중 결합 상관 관계(HMBC) 결과를 나타낸 도면이다:

도 11A는 22-O-올레일-이노토디올의 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC를 확인한 도면이고; 및 도 11B는 3-O-올레일-이노토디올의 2D $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC를 확인한 도면이다.

도 12는 이노토디올의 올레산 전구 약물의 DSC 결과를 나타낸 도면이다:

도 12A는 이노토디올의 DSC 결과를 나타낸 도면이고; 및 도 12B는 이노토디올 올레산 에스테르의 DSC 결과를 나타낸 도면이다.

도 13은 이노토디올의 숙신산 전구 약물의 DSC 결과를 나타낸 도면이다:

도 13A는 이노토디올의 DSC 결과를 나타낸 도면이고; 및 도 13B는 이노토디올 숙신산 에스테르의 DSC 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 이노토디올의 올레산 전구 약물의 FT-IR 결과를 나타낸 도면이다:

도 14A는 이노토디올의 FT-IR 결과를 나타낸 도면이고; 및 도 14B는 이노토디올 올레산 에스테르의 FT-IR 결과를 나타낸 도면이다.

도 15는 이노토디올의 숙신산 전구 약물의 FT-IR 결과를 나타낸 도면이다:

도 15A는 이노토디올의 FT-IR 결과를 나타낸 도면이고; 및 도 15B는 이노토디올 숙신산 에스테르의 FT-IR 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예 1. 이노토디올의 수용성 측정

[0052] 이노토디올의 수용성을 측정하기 위해 아래와 같이 수행하였다.

[0053] 먼저, 이노토디올 시료 50 mg 을 1 ml의 유기 용매에 혼합하였다. 이후에, 볼텍싱 하고, water bath sonicator 에서 15분간 두었다. 25 °C에서 1시간 동안 방치한 후, 13,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하였다. 이후에 상등액을 취하여 HPLC-UV-VIS 분석을 수행하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

용매	온도(°C)	이노토디올 농도(mg/ml)
Acetonitrile	30	0.976
Ethyl acetate	30	8.685
Ethanol	30	25.152
Methanol	30	7.964
t-butanol	60	26.493
Hexane	30	0.094
Dichloromethane	30	24.675

[0057] 실시예 2. 이노토디올 지방산 에스테르의 효소적 합성 및 정제

[0058] 이노토디올 에스테르를 생산하기 위해 올레산, 리놀레산, 팔미트산 및 숙신산을 포함한 다양한 아실 공여체를 리파아제 반응에 의해 이노토디올(몰비 이노토디올/산 = 1:4)로 에스테르화하였다.

[0059] 먼저, 스크류 캡이 있는 50mL 유리병에 0.1mmol 이노토디올과 0.4mmol 산을 준비하고 자기 교반기(400rpm)를 사용하여 60°C에서 30분 동안 5mL t-부탄올에 용해시켰다. 그 다음, 효소 용액(*Candida antarctica* lipase A) 0.5 mL를 혼합물에 첨가하고 인큐베이션 동안 400 rpm으로 교반하면서 60°C에서 72시간 동안 반응을 수행하였다. 반응을 정지시키기 위해 반응 용액에 에탄올(10mL)을 첨가하고 60°C에서 30분 동안 유지하여 리파아제를 침전시켰다. 그런 다음, 용액을 여과하여 효소를 제거하였다. 마지막으로, 상층액을 수집하고 회전 증발기(Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 진공 하에 소량으로 농축시켰다.

[0060] 그 다음, 에스테르화 생성물을 정제하기 위해 분취용 HPLC 시스템(LC-Forte/R, YMCKOREA)을 통해 ODS-AQ C18(YMCKOREA, 성남, 한국)이 채워진 유리 컬럼(15 x 250mm)에 농축된 혼합물(1mL)을 10 ml/min의 유속으로 로딩했다. 이노토디올 올레산 에스테르(Inotodiol oleate ester), 이노토디올 리놀레산 에스테르(inotodiol linoleate ester) 및 이노토디올 팔미테이트산 에스테르(inotodiol palmitate ester) 정제의 경우, 이동상은 증류수(용매 A) 및 메탄올:에탄올 = 1:1(용매 B)을 사용하였으며 다음과 같은 구배 용출 프로그램으로 용출하였다: (0-10분; 90-95% B), (10-25분, 95-100% B), (25-80분, 100% B). 이노토디올 숙신산 에스테르(inotodiol succinate ester) 정제의 경우에는 다음과 같은 구배 용출 프로그램으로 용출하였다: (0-10분, 0-10% B), (10-30분, 10-50% B), (30-80분, 100% B). 유출물은 210 nm 검출 파장에서 지속적으로 모니터링하였다. 이노토디올 에스테르의 피크 분석은 크로마토그램을 관찰하여 수동으로 수집했다.

[0062] 실험예 1. 고성능 액체 크로마토그래피-증발 광산란 검출기(High-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector: HPLC-ELSD) 분석

- [0063] HPLC 분석은 RS 다이오드 어레이 검출기(Dionex)와 YMC-triart C18 컬럼(4.6 mm X 250 mm, YMCKOREA, 성남, 한국)이 장착된 Ultimate 3000 UHPLC 시스템(Ultimate 3000, Dionex, Idstein, Germany)에서 수행하였다. 크로마토그래피 분리는 물(용매 A) 및 메탄올(용매 B)로 구성된 이원 이동상 구배를 사용하여 수행하였다. 이노토디올 올레산 에스테르(Inotodiol oleate ester), 이노토디올 리놀레산 에스테르(inotodiol linoleate ester) 및 이노토디올 팔미트산 에스테르(inotodiol palmitate ester)의 경우, 용매 B 구배는 0분에서 85%, 7분에서 92%, 15분에서 94%, 20분에서 100%, 50분에서 100%, 50.1분에서 85%, 및 55분에서 85%였다. 이노토디올 숙신산 에스테르(inotodiol succinate ester)의 경우, 용매 B 구배는 0분에서 0%, 5분에서 5%, 12분에서 50%, 15분에서 100%, 30분에서 100%, 30.1분에서 0%, 및 40분에서 0%였다. 주입 부피는 10 μ L이었고 용출은 210 nm에서 모니터링하였다. 유속은 50℃의 컬럼 온도에서 1mL/분으로 설정하였다.
- [0064] ELSD 분석은 증발 광산란 검출기(Alltech 2000, Deerfield, IL, USA)와 YMC-triart C18 컬럼(4.6 mm X 250 mm, YMCKOREA, 성남, 대한민국)이 장착된 Waters 1525 Binary HPLC system (Waters Corp.)에서 수행하였다. 주입 부피는 10 μ L이고 용출액은 90℃의 드리프트-튜브 온도에서 ELSD로 모니터링되었으며 운반 가스 유속은 2.0L/min이고 검출기는 1로 설정하였다. 유속은 50℃의 컬럼 온도에서 1mL/분으로 설정하였다.
- [0065] 그 결과, 도 1 내지 도 4에 나타난 바와 같이 이노토디올의 전구 약물인 이노토디올 올레산 에스테르, 이노토디올 리놀레산 에스테르, 이노토디올 팔미트산 에스테르 및 이노토디올 숙신산 에스테르의 합성이 잘 이루어졌음을 알 수 있었다.
- [0066] 도 1은 이노토디올의 올레산 전구 약물의 HPLC-ELSD 결과를 나타낸 도면이다.
- [0067] 도 2는 이노토디올의 리놀레산 전구 약물의 HPLC-ELSD 결과를 나타낸 도면이다.
- [0068] 도 3은 이노토디올의 팔미트산 전구 약물의 HPLC-ELSD 결과를 나타낸 도면이다.
- [0069] 도 4는 이노토디올의 숙신산 전구 약물의 HPLC-ELSD 결과를 나타낸 도면이다.
- [0071] **실험예 2. 고성능 액체 크로마토그래피 탠덤 질량 분석(High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: LC/MS)**
- [0072] 이노토디올 에스테르는 ESI(electrospray ionization) 소스가 장착된 Agilent-1290 UPLC/6470A 및 Agilent-1290 UPLC/6430A QQQ 시스템(Agilent Technologies Korea, Seoul, South Korea)을 사용하여 식별하였다. 이동상은 각 용매에 5mM 암모늄 아세테이트와 0.1% 포름산을 포함하는 용액 A(증류수)와 용액 B(메탄올)로 구성하였다. 분리는 Zorbax Eclipse Plus C18 컬럼(2.1X50 mm, 3.5 μ m)(Agilent Technologies Korea)이 장착된 컬럼에서 수행하였다. 용액 B 구배는 0-2분에서 85%, 7분에서 90%, 18-25분에서 100%, 및 26-35분에서 85%였다. 주입 부피는 2 μ L이고 유속은 40℃의 컬럼 온도에서 0.2mL/분으로 설정되었다. 질량 분석기는 다음의 매개변수를 사용하여 포지티브 모드에서 수행하였다: 건조 가스 온도: 270℃; 건조 가스 유속: 10L/min; 분무기 압력: 40psi; 시스(Sheath) 가스 온도: 300℃; 시스 가스 유속: 11L/min; 모세관 전압: 3500V(양); 노즐 전압: 500V(양).
- [0073] 그 결과, 도 5 내지 8에 나타난 바와 같이 이노토디올의 전구 약물인 이노토디올 올레산 에스테르, 이노토디올 리놀레산 에스테르, 이노토디올 팔미트산 에스테르 및 이노토디올 숙신산 에스테르 각각의 특이적인 피크를 확인하였다.
- [0074] 도 5A는 이노토디올 올레산 에스테르의 분자량을 확인한 도면이고; 및 도 5B는 이노토디올 올레산 에스테르의 단편 패턴을 확인한 도면이다.
- [0075] 도 6A는 이노토디올 숙신산 에스테르의 분자량을 확인한 도면이고; 및 도 6B는 이노토디올 숙신산 에스테르의 단편 패턴을 확인한 도면이다.
- [0076] 도 7A는 이노토디올 리놀레산 에스테르의 분자량을 확인한 도면이고; 및 도 7B는 이노토디올 리놀레산 에스테르의 단편 패턴을 확인한 도면이다.
- [0077] 도 8A는 이노토디올 팔미트산 에스테르의 분자량을 확인한 도면이고; 및 도 8B는 이노토디올 팔미트산 에스테르의 단편 패턴을 확인한 도면이다.

[0079] **실험예 3. 핵자기 공명법(Nuclear magnetic resonance: NMR) 분석**

[0080] NMR 분석을 위해 이노토디올 올레산 에스테르(5 mg)를 600 μ L의 CDCl_3 에 용해시킨 다음 NMR 튜브(Eurisotop, Saint Aubin, France)로 옮겼다. ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 각각 600.23 MHz 및 150.93 MHz의 주파수에서 Bruker Avance-III-600(Bruker, Seongnam, South Korea) 기기로 얻었다. 이노토디올 올레산 에스테르의 에스테르 결합 형성 및 화학 구조를 확인하기 위해 2D 이핵 다중 결합 상관 관계(HMBC)를 사용했다. 2D HMBC NMR 스펙트럼은 13시간 32회 스캔을 사용하여 획득했다. 데이터는 TopSpin™ 4.0 소프트웨어(Bruker)의 교육용 버전을 사용하여 처리하였다.

[0081] 그 결과, 도 9 내지 도 11에 나타난 바와 같이 이노토디올 올레산 에스테르의 구조를 확인하였다.

[0082] 도 9A는 이노토디올의 ^1H -NMR을 확인한 도면이고; 도 9B는 22-O-올레일-이노토디올의 ^1H -NMR을 확인한 도면이며; 및 도 9C는 3-O-올레일-이노토디올의 ^1H -NMR을 확인한 도면이다.

[0083] 도 10A는 이노토디올의 ^{13}C -NMR을 확인한 도면이고; 도 10B는 22-O-올레일-이노토디올의 ^{13}C -NMR을 확인한 도면이며; 및 도 10C는 3-O-올레일-이노토디올의 ^{13}C -NMR을 확인한 도면이다.

[0084] 도 11A는 22-O-올레일-이노토디올의 2D ^1H - ^{13}C HMBC를 확인한 도면이고; 및 도 11B는 3-O-올레일-이노토디올의 2D ^1H - ^{13}C HMBC를 확인한 도면이다.

[0086] **실험예 4. 시차 주사 열량측정법(differential scanning calorimetry: DSC)**

[0087] 이노토디올 올레산 에스테르 및 이노토디올 숙신산 에스테르의 열 분석은 DSC-1 기기(Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)에서 수행하였다. 약 2 mg의 각 건조된 샘플을 밀봉된 알루미늄 팬에 넣었다. 그 다음, 팬을 질소 분위기 하에서 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 25에서 400 $^{\circ}\text{C}$ 로 가열하였다. 아무것도 넣지 않은 팬은 기준으로 사용했다.

[0088] 그 결과, 도 12 내지 도 13에 나타난 바와 같이 이노토디올 올레산 에스테르 및 이노토디올 숙신산 에스테르가 이노토디올에 비해 녹는점이 낮아진 것을 확인하였다.

[0089] 도 12A는 이노토디올의 DSC 결과를 나타난 도면이고; 및 도 12B는 이노토디올 올레산 에스테르의 DSC 결과를 나타난 도면이다.

[0090] 도 13A는 이노토디올의 DSC 결과를 나타난 도면이고; 및 도 13B는 이노토디올 숙신산 에스테르의 DSC 결과를 나타난 도면이다.

[0092] **실험예 5. 푸리에 변환 적외선 분광법(Fourier transform infrared spectroscopy: FT-IR)**

[0093] 이노토디올 올레산 에스테르 및 이노토디올 숙신산 에스테르에 대하여 FT-IR 분석을 하였다. 약 1mg의 시료 대 100mg KBr(1:100)의 비율로 적외선 스펙트럼은 진공 적외선 분광계(VERTEX 80v)에서 기록하였다. 스펙트럼은 4000-400 cm^{-1} 의 주파수 범위에서 평균 스캔에서 얻었다.

[0094] 그 결과, 도 14 내지 도 15에 나타난 바와 같이 이노토디올 올레산 에스테르 및 이노토디올 숙신산 에스테르의 구조를 확인하였다.

[0095] 도 14A는 이노토디올의 FT-IR 결과를 나타난 도면이고; 및 도 14B는 이노토디올 올레산 에스테르의 FT-IR 결과를 나타난 도면이다.

[0096] 도 15A는 이노토디올의 FT-IR 결과를 나타난 도면이고; 및 도 15B는 이노토디올 숙신산 에스테르의 FT-IR 결과를 나타난 도면이다.

[0098] **실험예 6. 이노토디올 지방산 에스테르의 용해도 확인**

[0099] 이노토디올 에스테르의 물에 대한 용해도를 측정하기 위해 시료 5 mg을 증류수 1mL에 현탁시킨 다음 초음파 수조에서 30분 동안 처리하였다. 이어서, 혼합물을 초음파 수조(Power sonic 410)로 30분 동안 처리하였다. 그 후, 혼합물을 30℃에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 원심분리(20,000 xg, 10분) 후 얻은 상층액을 ADVANTEC(Tokyo, Japan)의 0.45 μm 멤브레인 필터를 통해 여과하여 용해되지 않은 결정을 제거하였다. 이노토디올 숙신산 에스테르 측정은 Agilent-1290 UPLC/6470A(Agilent Technologies Korea, Seoul, South Korea)에서 수행하였다. 상층액 중 이노토디올 숙신산 에스테르 농도는 확립된 표준 곡선(0-5 mg/mL, $R^2=0.9998$)을 사용하여 계산하였다.

[0100] 그 결과, 하기 표 2 및 3에 나타낸 바와 같이, 이노토디올과 비교하여 전구체인 이노토디올 지방산 에스테르의 용해도가 높은 것을 확인하였다.

표 2

[0101]

농도 (mg/L)	
이노토디올	이노토디올 숙신산 에스테르
0.50 ± 0.18	2.71 ± 0.25

표 3

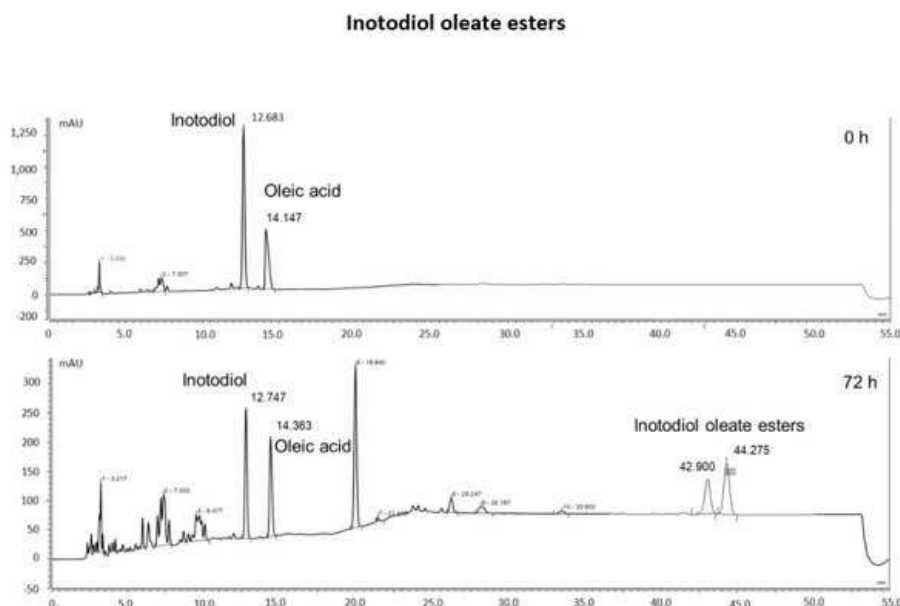
[0102]

화합물	농도 (mg/mL)
이노토디올	31 ± 3.8
이노토디올 팔미트산	452 ± 3.8
이노토디올 올레산 (액상)	>1000
이노토디올 리놀레산 (액상)	>1000

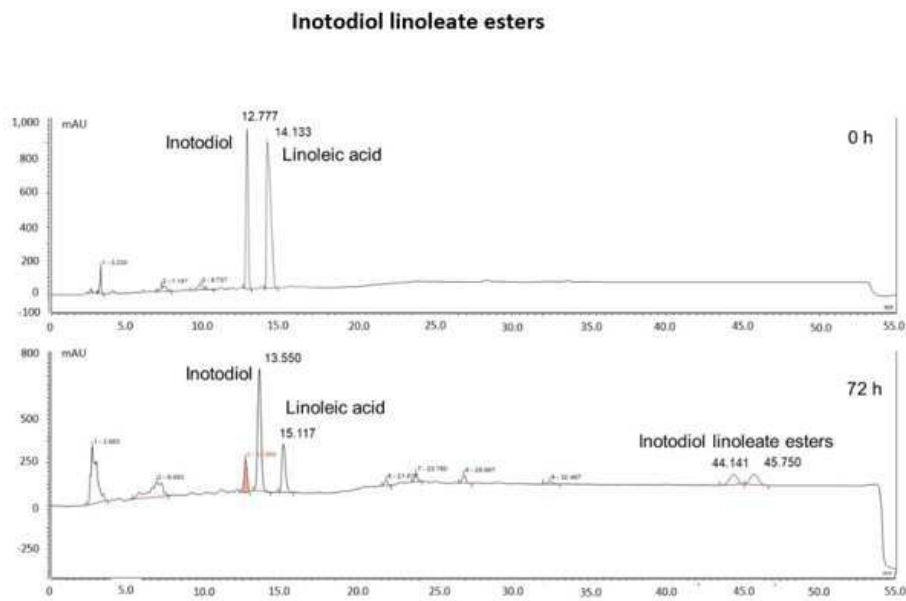
[0104] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

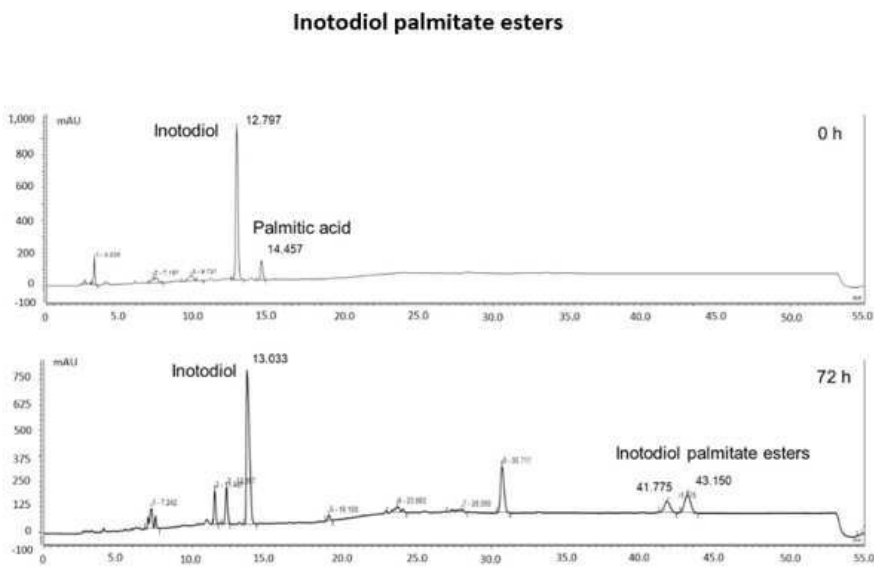
도면1



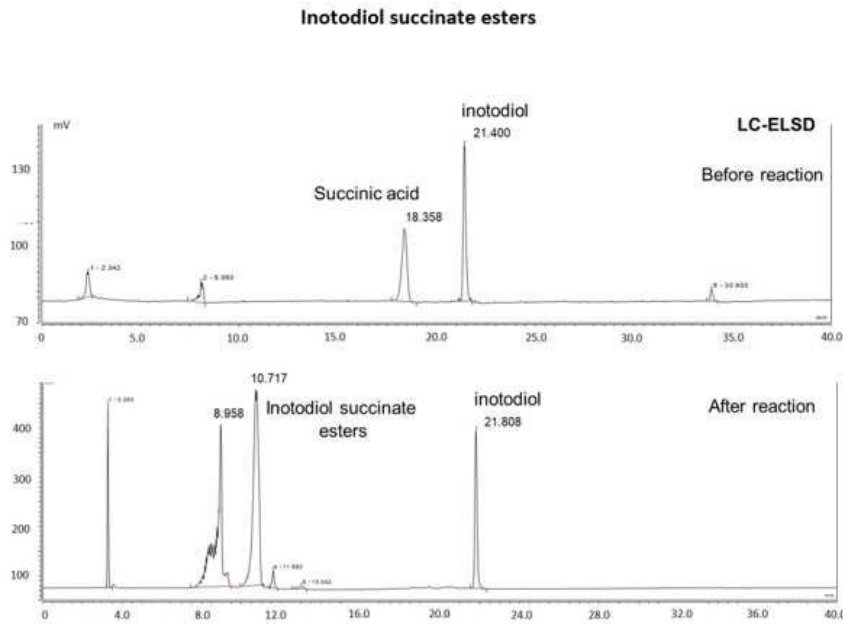
도면2



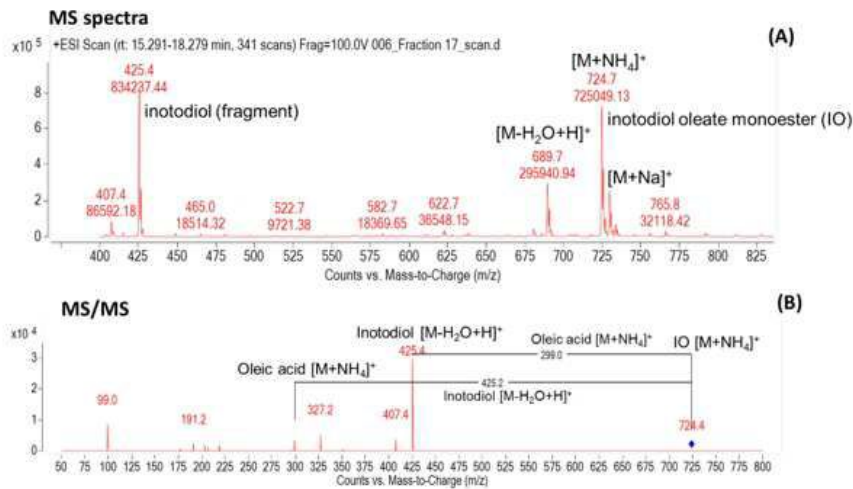
도면3



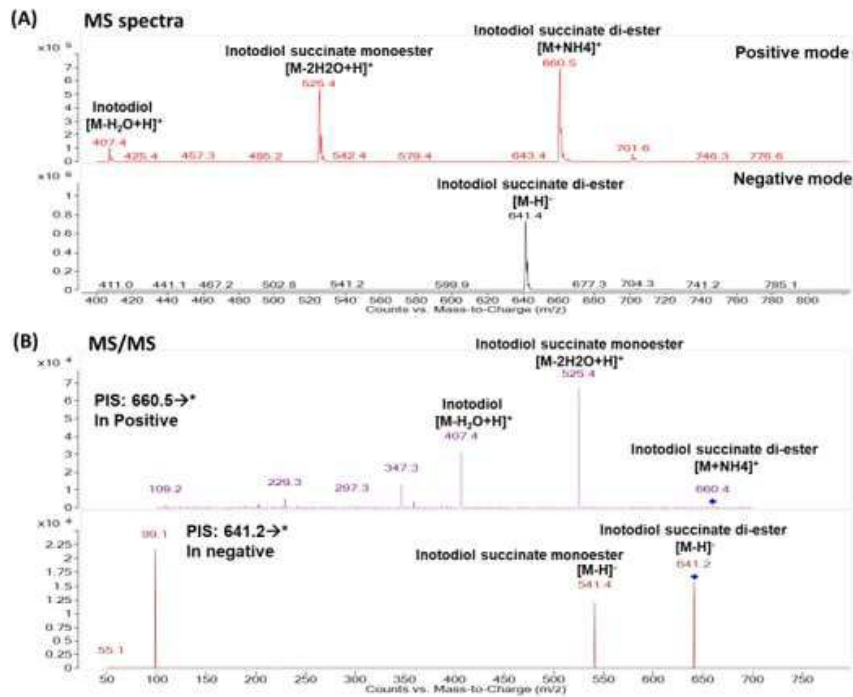
도면4



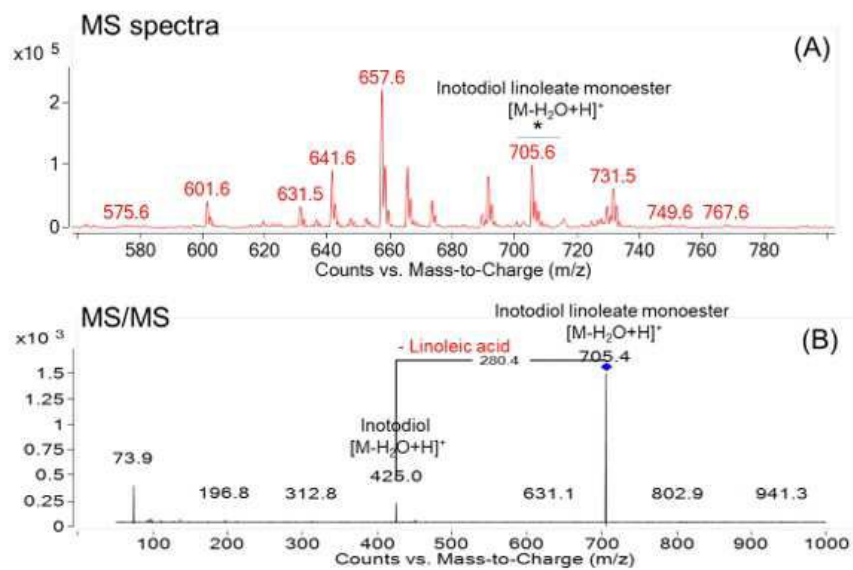
도면5



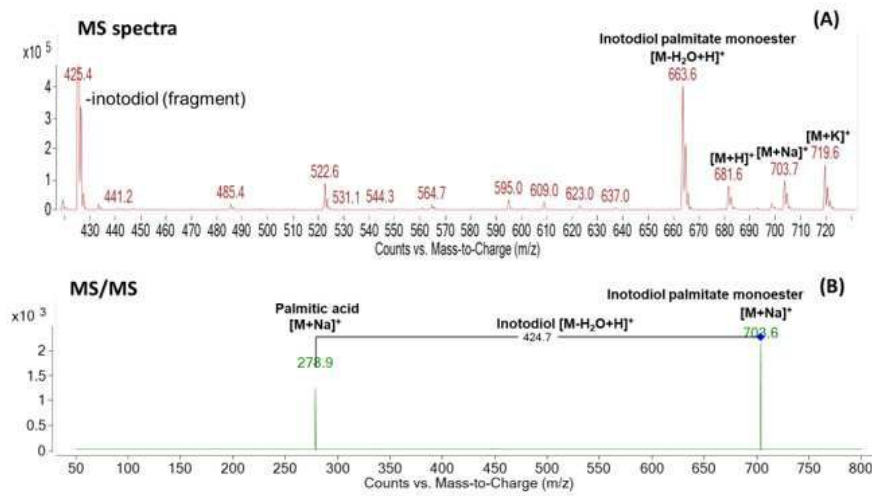
도면6



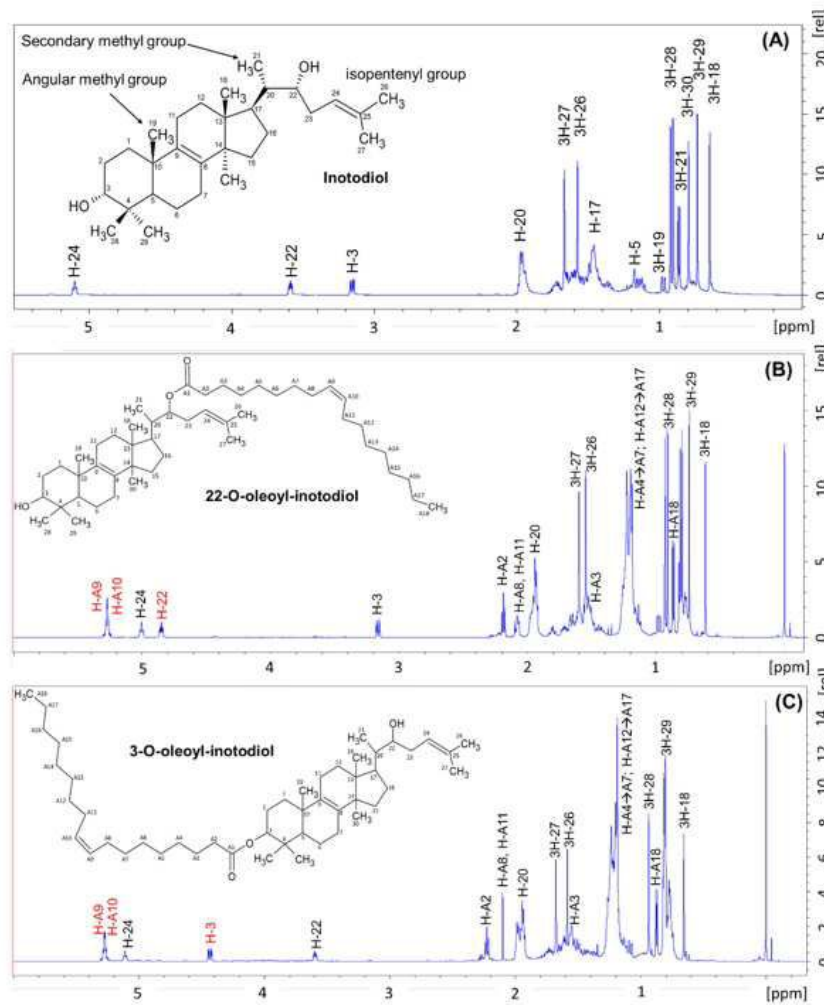
도면7



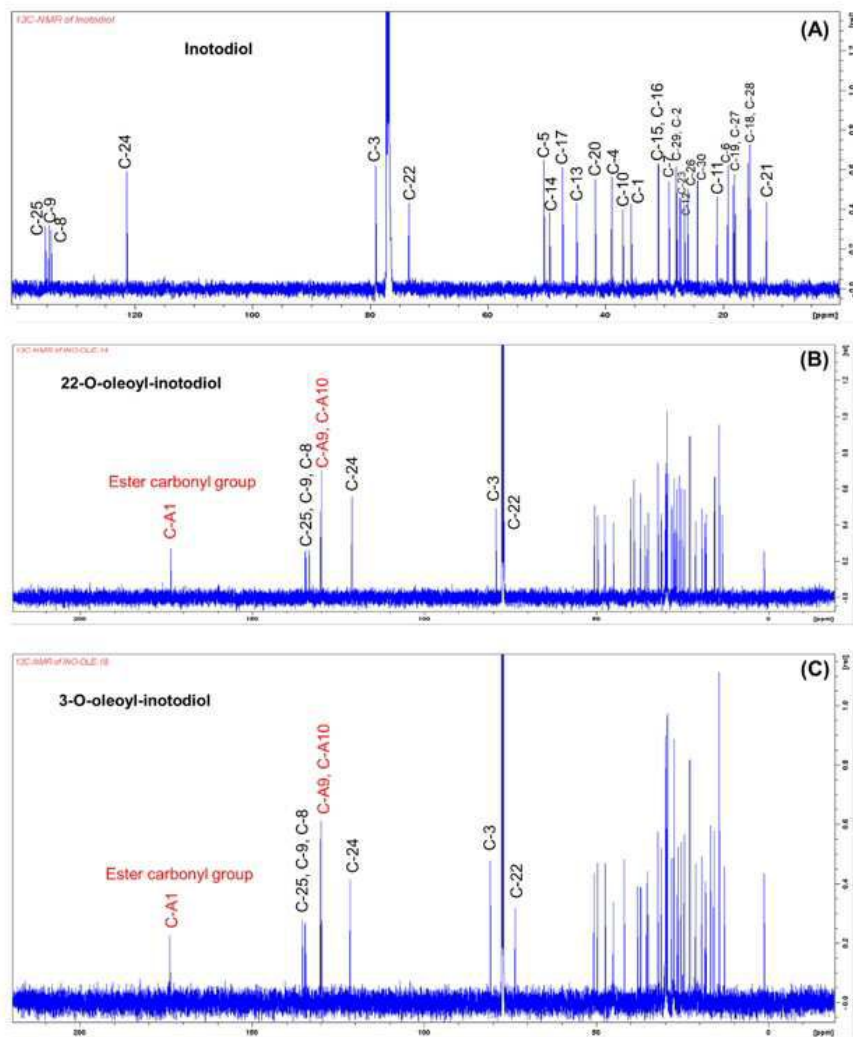
도면8



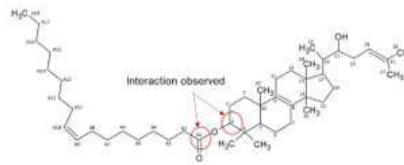
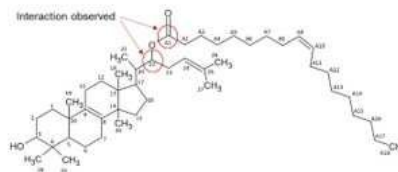
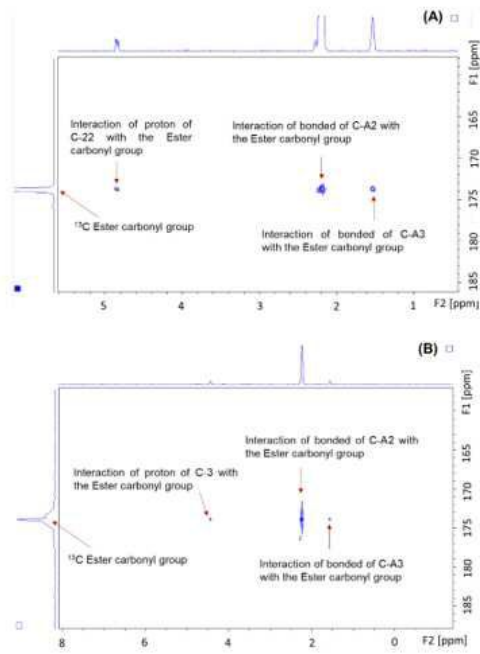
도면9



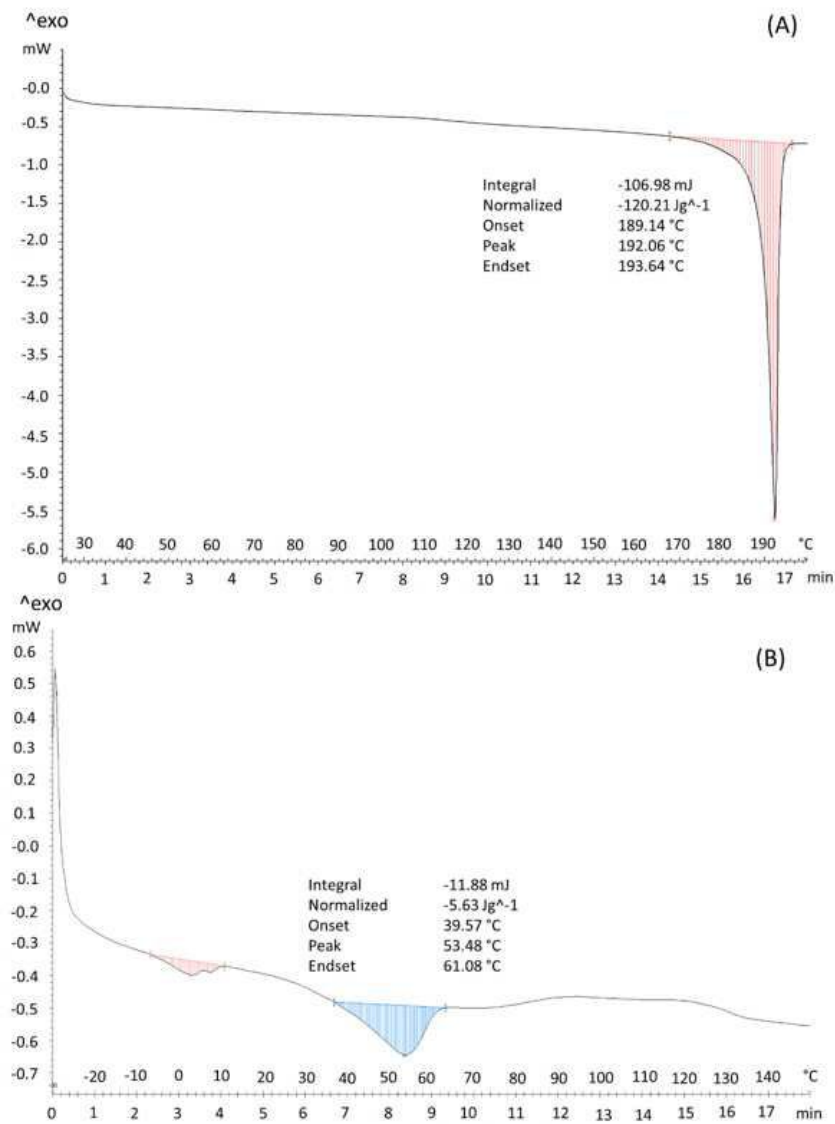
도면10



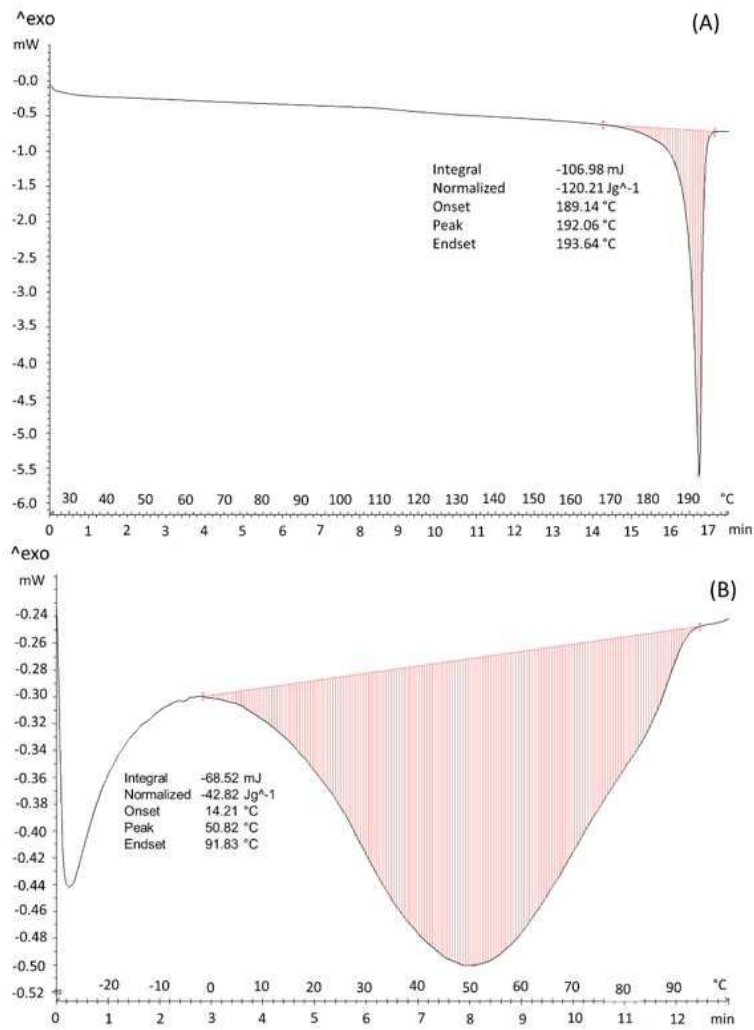
도면11



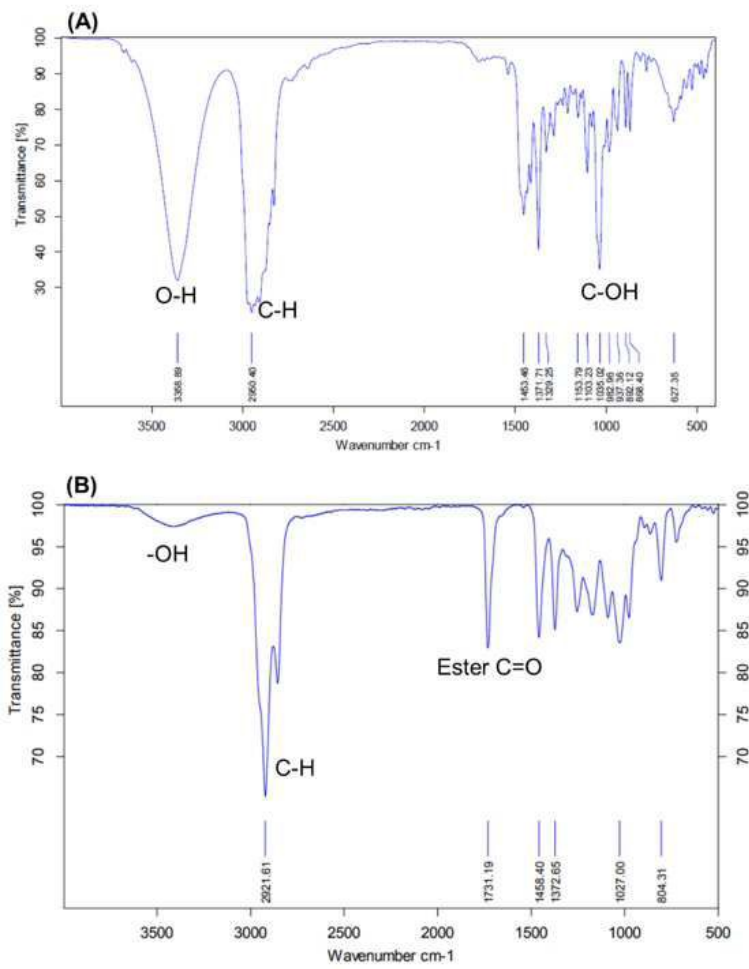
도면12



도면13



도면14



도면15

