(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0160458
(43) 공개일자 2024년11월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 31/575* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6951 (2017.08)
A61K 31/575 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0057301
(22) 출원일자 2023년05월02일
심사청구일자 2023년05월02일

(71) 출원인
(주)카보엑스퍼트
대전광역시 유성구 대학로 99, 산학연교육연구관 705호 (궁동, 충남대학교)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박종태
대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 603동 1102호 (하기동, 송림마을6단지아파트)
김재한
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트2단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

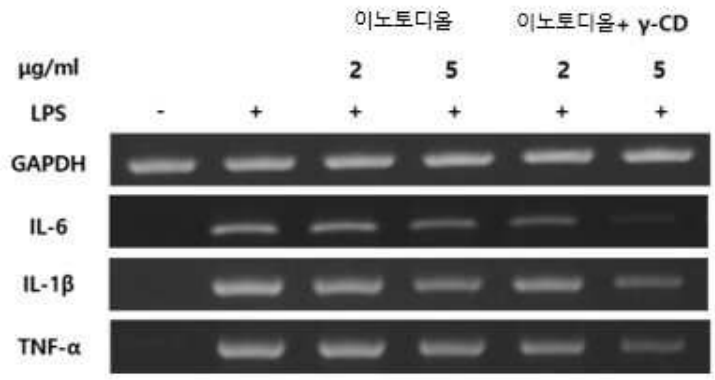
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **라노스테롤과 그 유도체 및 사이클로덱스트린을 포함하는 약제학적 제형**

(57) 요 약

Lanosterol과 그 유도체 및 사이클로덱스트린을 포함하는 약제학적 제형에 관한 것으로, 일 양상에 따른 약제학적 제형에 따르면 수용해도 및 체내 흡수성이 향상되어 생체 이용률이 증가하는 효과가 있다.

대 표 도 - 도6a



(72) 발명자

김대렬

충청북도 증평군 증평읍 충청대로 1746, 104동 305호 (파라디아아파트)

반소영

대전광역시 유성구 원신흥남로27번길 68, 대전도안2 행복주택 201동 410호 (원신흥동)

곽지윤

세종특별자치시 대평로 34, 420동 2801호 (대평동, 해들마을4단지)

이난영

대전광역시 유성구 온천북로33번길 22-4, 811호 (봉명동, 신영 미소랑 도시형생활주택)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425173685
과제번호	S3291899
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	중소기업기술혁신개발사업(시장확대형)
연구과제명	천식 치료제 신약 후보물질 CE9A215의 특성 향상을 위한 전구약물(prodrug)의 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)카보엑스퍼트
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

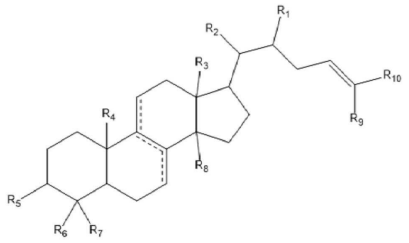
청구범위

청구항 1

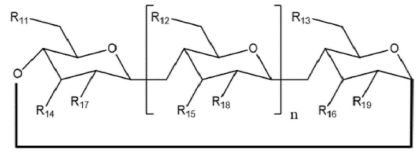
하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및

하기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체를 포함하는 약제학적 제형:

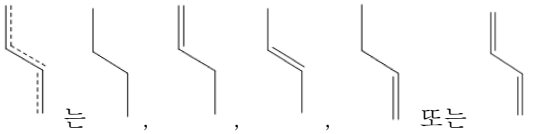
[화학식 1]



[화학식 2]



상기 화학식 1에서 R_1 내지 R_{10}은 독립적으로 H, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알케닐, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알키닐, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 할로겐, 하이드록시, 알데하이드, 카르복시, 아미노, 니트로, 또는 시아노이고,

상기 화학식 1에서  는 , , , 또는 이다.

상기 화학식 2에서 n은 4, 5 또는 6이고, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{18} 및 R_{19}는 독립적으로 -OH, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 또는 C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬싸이오(alkylthio)이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 상기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린 유도체의 내부에 포접되어 있는 것인, 약제학적 제형.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 상기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린 유도체의 몰비는 1:1 내지 10으로 혼합된 것인, 약제학적 제형.

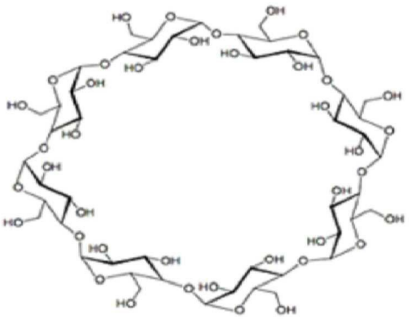
청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 라노스테롤(lanosterol), 이노토디올(inotodiol), 트라메테놀산(trametenolic acid), 가노데마디올(ganodermadiol), 및 가노데마트리올(ganodermatriol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것인, 약제학적 제형.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린 유도체는 하기 화학식 3의 감마-사이클로덱스트린(γ-cyclodextrin)인 것인, 약제학적 제형.

[화학식 3]



.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 제형은 고형제제 또는 액상제제인 것인, 약제학적 제형.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 고형제제는 정제, 캡슐, 분말, 분산성 과립, 카시에제(cachet) 및 좌약, 지효성 방출 및 지연성 방출 제형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 제조된 것인, 약제학적 제형.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 액상제제는 용액, 현탁액, 에멀젼, 주사가능한 제형, 비강, 볼 점막 또는 설하 투여를 위한 용액 또는 스프레이, 흡입을 위한 적절한 에어로졸 제형, 경피성 제형, 크림, 로션 및 경피성 패치에 합입될 수 있는 제형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 제조된 것인, 약제학적 제형.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 약학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함하는 것인, 약제학적 제형.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 첨가제는 희석제, 결합제, 붕해제 및 활택제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약제학적 제형.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 희석제는 유당, 셀룰로스 분말, 미세결정질 셀룰로스, 규화된 미세결정질 셀룰로스, 전분, 호화전분, 칼슘 카보네이트, 사이클로덱스트린, 칼슘 설페이트, 칼슘 실리케이트, 마그네슘 카보네이트, 디칼슘 포스페이트, 트리칼슘 포스페이트, 마그네슘 트리실리케이트, 염화칼륨, 염화나트륨, 이염기 인산칼슘 이수화물, 삼염기 인산칼슘, 카올린, 탄산마그네슘, 산화마그네슘, 만니톨, 말티톨, 솔비톨, 자일리톨, 락토스, 덱스트로스, 말토스, 수크로스, 글루코스, 프룩토스, 말토덱스트린, 덱스트레이트, 덱스트린 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약제학적 제형.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 결합제는 포비돈, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 경질무수 규산, 규산 알루미늄, 규산 칼슘, 인산수소 칼슘, 탄산칼슘 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약제학적 제형.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 붕해제는 크로스카멜로오스 나트륨(croscarmellose sodium, CrosCMC-Na), 카르복시

메틸셀룰로스, 크로스포비돈 (가교된 폴리비닐피롤 리돈), L-HPC (저치환도 히드록시프로필셀룰로스), 전분, 나트륨 카르복시메틸 전분, 전분 글리콜산 나트륨, 부분적으로 가수분해된 전분 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약제학적 제형.

청구항 14

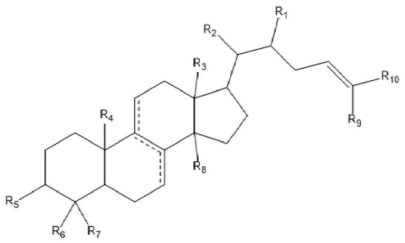
청구항 10에 있어서, 상기 활택제는 스테아르산 마그네슘, 푸마르산, 스테아르산, 스테아르산 칼슘, 소디움 스테아릴 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 전분, 활석, 고도 분산형 (콜로이드형) 실리카, 마그네슘 옥시드, 마그네슘 카르보네이트, 글리세릴 베헤네이트, 글리세릴 모노 스테아레이트, 이산화규소, 칼슘 실리케이트, 마그네슘 실리케이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약제학적 제형.

청구항 15

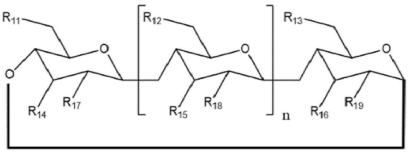
하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및

하기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체를 혼합하는 단계;를 포함하는 제형의 제조방법:

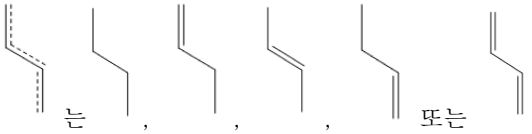
[화학식 1]



[화학식 2]



상기 화학식 1에서 R_1 내지 R_{10}은 독립적으로 H, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알케닐, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알키닐, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 할로겐, 하이드록시, 알데하이드, 카르복시, 아미노, 니트로, 또는 시아노이고,

상기 화학식 1에서  는 , , , 또는 이다.

상기 화학식 2에서 n은 4, 5 또는 6이고, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{18} 및 R_{19}는 독립적으로 -OH, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 또는 C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬싸이오(alkylthio)이다.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 혼합하는 단계는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 상기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체;를 몰비 1:1 내지 10으로 혼합하는 것인, 제형의 제조방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 혼합물에 계면활성제를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것인, 제형의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 라노스테롤과 그 유도체 및 사이클로덱스트린을 포함하는 약제학적 제형에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사이클로덱스트린은 제약학적 용도를 갖고 다수 화합물의 용해화 또는 안정화에 사용되지만, 이러한 용도는 치료제에 적용하기에는 한계가 있으며 사이클로덱스트린 복합체화가 불가능한 화합물이 많고, 또는 제약학적 용도에 부적합하게 되는 단점들이 있다 [J. Szejtli, Pharmaceutical Technology, 1991, 24-38; 및 미국 특허 제5,362,860호 참조]. 특히, 약물: 사이클로덱스트린 혼합물의 생체 이용율은 종종 예측할 수 없고, 실제로 약물: 사이클로덱스트린 복합체 형성으로 종종 약물의 생체 이용율이 떨어질 수 있다 [T. Loftsson, Pharmaceutical Technology, 1999, 12, 40-50; 및 Uekama, K, et al., CRC Critical Reviews in therapeutic Drug Carrier Systems, 1987, 3(1), 1-40 참조].

[0003] 한편, 차가버섯으로부터 유용한 화합물들을 분리하는 연구들이 진행되어 왔고, 이노토디올(inotodiol), 트라메테놀산(trametenolic acid), 라노스테롤(lanosterol), 이노노트술리드(inonotsulide) 등과 같은 다양한 화합물들이 분리되었다(Ma L., et al., 2013). 상기 라노스테롤과 그 유도체는 항암, 항염증, 항알레르기 등의 생리활성이 있음이 밝혀져 있다.

[0004] 본 발명자들은 라노스테롤과 그 유도체의 생리활성을 증대시키기 위한 약제학적 제제에 대한 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

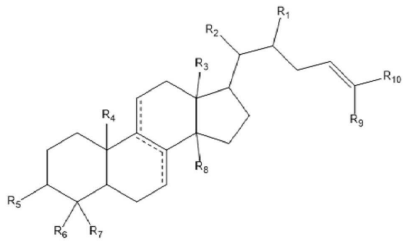
[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2312284호

발명의 내용

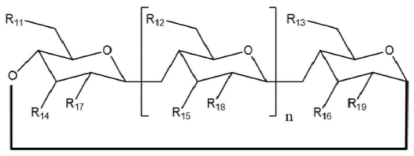
해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 하기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체;를 포함하는 약제학적 제형을 제공하는 것이다.

[0007] [화학식 1]

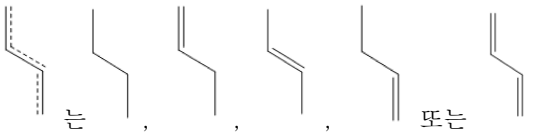
[0008] 

[0009] [화학식 2]

[0010] 

[0011] 상기 화학식 1에서 R_1 내지 R_{10}은 독립적으로 H, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬, C_2 내지 C_4의 치환 또는

비치환된 알케닐, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알키닐, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 할로겐, 하이드록시, 알데하이드, 카르복시, 아미노, 니트로, 또는 시아노이고,

[0012] 상기 화학식 1에서  이다.

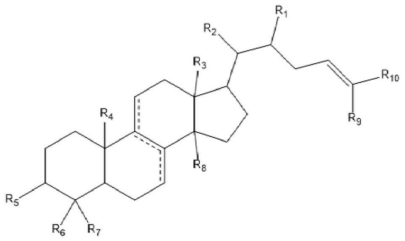
[0013] 상기 화학식 2에서 n은 4, 5 또는 6이고, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18 및 R19는 독립적으로 -OH, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 또는 C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬싸이오(alkylthio)이다.

[0014] 다른 양상은 상기 제형을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

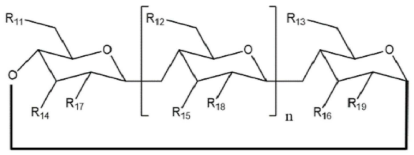
과제의 해결 수단

[0015] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 하기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체;를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다.

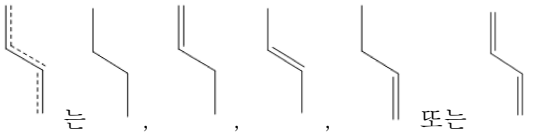
[0016] [화학식 1]

[0017] 

[0018] [화학식 2]

[0019] 

[0020] 상기 화학식 1에서 R_1 내지 R_{10}은 독립적으로 H, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알케닐, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알키닐, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 할로겐, 하이드록시, 알데하이드, 카르복시, 아미노, 니트로, 또는 시아노이고,

[0021] 상기 화학식 1에서  이다.

[0022] 상기 화학식 2에서 n은 4, 5 또는 6이고, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{18} 및 R_{19}는 독립적으로 -OH, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 또는 C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬싸이오(alkylthio)이다.

[0023] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '포함하는(comprising)'은 '포함하는(including)'을 의미하며, 문맥에서 달리 암시하지 않는 한, 예를 들어 성분들이 함께 합계가 100%인 경우를 제외하고 추가 성분의 존재를 배제하지 않도록 의도된다.

[0024] 일 구체예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 라노스테롤(Lanosterol)과 그 유도체를 의미하는 것일 수 있다.

[0025] 본 명세서의 용어, "라노스테롤(Lanosterol)과 그 유도체"는 라노스테롤(lanosterol), 이노토디올(inotodiol), 트라메테놀산(trametenolic acid), 가노데마디올(ganodermadiol), 및 가노데마트리올

(ganodermatriol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0026] 상기 "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]페나트렌 phenanthren-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. 상기 이노토디올은 차가버섯(Inonotus obliquus)의 주요 생리 활성 성분으로서, 통상적인 방법에 따라 화학적으로 합성할 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조 또는 차가 버섯 추출물로부터 분리, 정제된 것일 수 있다. 상기 이노토디올 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다.

[0027] 본 명세서의 용어, “약학적으로 허용 가능한 염”은 산 또는 염기의 부가염 및 그의 입체 화학적 이성체 형태를 모두 포함하며, 예컨대, 유기산 또는 무기산의 부가염일 수 있다. 상기 염에는 투여 대상에서 모화합물(parent compound)의 활성을 유지하며 바람직하지 못한 효과를 유발하지 않는 염이라면 어느 것이든 포함되는 것으로, 특별히 제한되는 것이 아니다.

[0028] 이러한 염에는 무기염과 유기염이 포함되며, 예를 들어, 아세트산, 질산, 아스파트산, 술폰산, 설퓨릭산, 말레산, 글루탐산, 포름산, 숙신산, 인산, 프탈산, 탄닌산, 타르타르산, 히드로브롬산, 프로피온산, 벤젠술폰산, 벤조산, 스 테아르산, 락트산(lactic acid), 비카르본산, 비설퓨릭산, 비타르타르산, 옥살산, 부틸산, 칼슘 이데트, 카르보닉산, 클로로벤조산, 시트르산, 이데트산, 톨루엔술폰산, 푸마르산, 글루셉트산, 에실린산, 파모익산, 글루코닉산, 메틸니트릭산, 말론산, 히드로클로린산, 히드로요도익산, 히드록시나프톨산, 이세티온산, 락토비오닉산, 만델산, 점액산, 나프실릭산, 뮤코닉산, p-니트로메탄설포닉산, 헥사믹산, 판토테닉산, 모노히드로겐인산, 디히드로겐인산, 살리실산, 술파민산, 술파닐린산, 메탄술폰산일 수 있다.

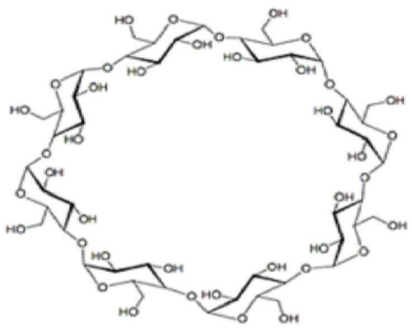
[0029] 또한, 상기 염의 형태로는, 암모늄염, 리튬염, 소듐염, 포타슘염, 마그네슘염 및 칼슘염과 같은 알칼리 및 알칼리 토금속의 염, 예를 들어, 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이드라바민 염과 같은 유기 염기를 갖는 염, 및 아르기닌, 리신과 같은 아미노산을 갖는 염을 포함한다. 또한, 상기 염 형태는 적당한 염기 또는 산으로 처리함으로써 유리 형태로 전환될 수도 있다.

[0030] 본 명세서의 용어 “포접”은 게스트 분자가 사이클로덱스트린 분자의 공동과 상호작용하여 포획되는 화학양론적 분자성 현상을 의미한다.

[0031] 본 명세서의 용어 “사이클로덱스트린(cyclodextrin, CD)”은 포도당을 기본단위로 α-(1→4)-글리코시딕 결합으로 연결된 환상 화합물을 의미한다. 상기 사이클로덱스트린은 공동이 있는 반지 모양의 당 미립자로, 구조에 따라 알파(α), 베타(β), 감마(γ) 형으로 분류될 수 있다. 상기 사이클로덱스트린의 구조에 따른 내부 공극은 α-사이클로덱스트린이 5.3Å, β-사이클로덱스트린이 6.5Å, γ-사이 클로덱스트린이 8.3Å이다. 상기 사이클로덱스트린의 환 외부에는 히드록시기가 존재하기 때문에 친수성을 띠는 반면 내부는 소수성을 나타낸다. 상기 사이클로덱스트린 내부구조에 적합한 분자구조를 지닌 물질들은 사이클로덱스트린의 소수성 내부 공동으로 포접되어 포접화합물을 형성할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 이노토디올은 상기 사이클로덱스트린의 내부 공동에 포접되어 있는 것일 수 있다.

[0032] 일 구체예에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린 유도체는 하기 화학식 3의 감마-사이클로덱스트린(γ-cyclodextrin)일 수 있다.

[0033] [화학식 3]

[0034] 

[0036] 일 구체예에 있어서, 상기 약제학적 제형은 라노스테롤(Lanosterol)과 그 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염;과 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 1:1 내지 10의 몰비로 혼합한 것일 수 있다. 구체적으로, 제형은 라노스테롤(Lanosterol)과 그 유도체 및 사이클로덱스트린의 몰비는 1:1 내지 10, 1:1 내지 9, 1:1 내지 8, 1:1 내지 7, 1:1 내지 6, 1:1 내지 5, 1:1 내지 4, 1:1 내지 3 또는 1:1 내지 2로 혼합된 것일 수 있다. 예를 들어, 이노토디올 및 사이클로덱스트린은 1:3의 몰비로 혼합되어 이노토디올이 사이클로덱스트린의 공동에 포접되어 있는 포접 복합체를 형성하는 것일 수 있다.

[0037] 또한, 상기 약제학적 제형은 사이클로덱스트린 유도체에 라노토디올 또는 그 유도체를 포접시킴으로써 소수성인 라노토디올 또는 그 유도체의 수용해도가 높아지는 것일 수 있다. 일 구체예에 따른 약제학적 제형은 라노토디올 또는 그 유도체의 생체 이용률 및 항염증 효과를 증가시키는 것일 수 있다.

[0038] 한편, 일 구체예에 있어서, 상기 제형은 고형제제 또는 액상제제인 것일 수 있다.

[0039] 상기 고형제제는 정제, 캡슐, 분말, 분산성 과립, 카시에제(cachet) 및 좌약, 지효성 방출 및 지연성 방출 제형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 제조된 것일 수 있다.

[0040] 상기 액상제제는 용액, 현탁액, 에멀젼, 주사가능한 제형, 비강, 볼점막 또는 설하 투여를 위한 용액 또는 스프레이, 흡입을 위한 적절한 에어로졸 제형, 경피성 제형, 크림, 로션 및 경피성 패치에 합입될 수 있는 제형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 제조된 것일 수 있다.

[0041] 일 구체예에 있어서, 상기 제형은 약학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 상기 첨가제는 희석제, 결합제, 붕해제 및 활택제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

[0043] 상기 희석제는 유당, 셀룰로스 분말, 미세결정질 셀룰로스, 규화된 미세결정질 셀룰로스, 전분, 호화전분, 칼슘 카보네이트, 사이클로덱스트린, 칼슘 설페이트, 칼슘 실리케이트, 마그네슘 카보네이트, 디칼슘 포스페이트, 트리칼슘 포스페이트, 마그네슘 트리실리케이트, 염화칼륨, 염화나트륨, 이염기 인산칼슘 이수화물, 삼염기 인산칼슘, 카올린, 탄산마그네슘, 산화마그네슘, 만니톨, 말티톨, 솔비톨, 자일리톨, 락토스, 덱스트로스, 말토스, 수크로스, 글루코스, 프룩토스, 말토덱스트린, 덱스트레이트, 덱스트린 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

[0044] 상기 결합제는 포비돈, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 경질 무수 규산, 규산 알루미늄, 규산 칼슘, 인산수소칼슘, 탄산 칼슘 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

[0045] 상기 붕해제는 크로스카멜로오스 나트륨(croscarmellose sodium, CrosCMC-Na), 카르복시메틸셀룰로스, 크로스포비돈 (가교된 폴리비닐피롤리돈), LHPC (저치환도 히드록시프로필셀룰로스), 전분, 나트륨 카르복시메틸 전분, 전분 글리콜산 나트륨, 부분적으로 가수분해된 전분 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

[0046] 상기 활택제는 스테아르산 마그네슘, 푸마르산, 스테아르산, 스테아르산 칼슘, 소디움 스테아릴 푸마레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 전분, 활석, 고도 분 산형 (콜로이드형) 실리카, 마그네슘 옥시드, 마그네슘 카르보네이트, 글리세릴 베헤네이트, 글리세릴 모노 스테아레이트, 이산화규소, 칼슘 실리케이트, 마그네슘 실리케이트 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

[0047] 상기 제형은 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 추가적인 부 형제를 함유할 수도 있다. 이러한 추가적인 부형제로는 본 발명의 조성물을 코팅하기 위한 가소제, 필름 형성제, 착색제, 점착 방지제 (anti-tacking agent) 및/또는 안료를 포함할 수 있다. 존재할 수 있는 추가적인 유형의 부형제로는 완충제, 착향제, 감미제, 항산화제 및/또는 흡수 촉진제를 포함한다.

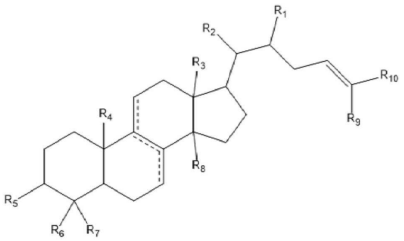
[0048] 상기 제형을 코팅하기 위한 코팅기제는 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 히 드록시프로필메틸셀룰로스 (HPMC), 카르복시메틸셀룰로스 (나트륨염 및 칼슘염), 에틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 에틸히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스 (HPC), L-HPC (저치환도의 HPC), 폴리비닐알콜, 아크릴산 및 그의 염의 중합체, 비닐피롤리돈-비닐아세테이트 공중합체, 젤라틴, 구아 고무, 부분적으로 가수분해된 전분, 알기네이트, 잔탄 및 이들의 조합으로 구성된 군으로 부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.

[0049] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 상기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체;를 포함하는 포접 화합물은 필요시 당업계의 기술을 가진 자에게 알려진 어떠한

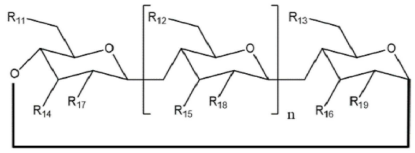
방법을 통해 정제될 수 있다. 이러한 정제 방법이 실시될 수 있을 때 당업계의 기술을 가진 자가 정제 방법에 친숙하다는 것을 유의해야 한다. 예를 들면, 특정 화합물에 이르는 것을 돕는 다-단계 합성에서, 정제 단계는 모든 합성 단계 후, 모든 몇가지 단계 후, 합성 동안 다양한 시점에서, 및/또는 합성의 맨 마지막에서 수행될 수 있다. 일부 방법에서, 하나 이상의 정제 단계는 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피, C-18 역상 칼럼 크로마토그래피, 겔 투과 칼럼 크로마토그래피, HPLC (고-성능 액체 크로마토그래 피) 및 LC (액체 크로마토그래피)으로 구성된 군으로부터 선택된 기술을 포함한다.

[0050] 다른 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 하기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체를 혼합하는 단계를 포함하는 제형의 제조방법을 제공한다.

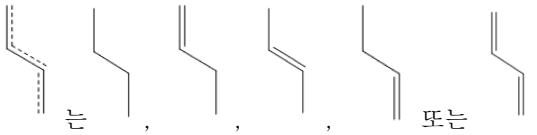
[0051] [화학식 1]

[0052] 

[0053] [화학식 2]

[0054] 

[0055] 상기 화학식 1에서 R_1 내지 R_{10}은 독립적으로 H, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알케닐, C_2 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알키닐, C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 할로겐, 하이드록시, 알데하이드, 카르복시, 아미노, 니트로, 또는 시아노이고,

[0056] 상기 화학식 1 에서  는 , , , 또는 이다.

[0057] 상기 화학식 2에서 n은 4, 5 또는 6이고, R_{11}, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{15}, R_{16}, R_{17}, R_{18} 및 R_{19}는 독립적으로 -OH, C1 내지 C4의 치환 또는 비치환된 알콕시, 또는 C_1 내지 C_4의 치환 또는 비치환된 알킬싸이오(alkylthio)이다.

[0058] 일 구체예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 라노스테롤(Lanosterol)과 그 유도체를 의미하는 것일 수 있다. 상기 라노토디올 및 그의 유도체, 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 사이클로덱스트린에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0059] 일 구체예에 있어서, 상기 혼합하는 단계는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염; 및 상기 화학식 2로 표시되는 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 유도체;를 1:1 내지 10의 몰비로 혼합하는 것일 수 있다.

[0060] 상기 제조방법은 초음파 처리(Ultrasonic Method), 고압균질기, 고온처리, 동결건조(Lyophilization Method), 반죽법(Kneading Method) 또는 동시 증착 방법(Co-Evaporation Method) 등의 방법을 이용하는 것일 수 있다.

[0061] 일 구체예에 있어서, 상기 혼합물에 계면활성제를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 계면활성제는 Tween 20, Tween 80 또는 자당 에스테르 등이 있으나 이에 제한되지는 않는다. 상기 계면활성제는 0.1 내지 5% 농도로 첨가하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0062] 일 양상에 따른 약제학적 제형에 따르면 수용해도, 용액 내 안정성, 체내 흡수성이 향상되어 생체 이용률이 증가하고, 항염증 효과가 향상된다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 사이클로덱스트린에 이노토디올이 포접된 복합체를 제조하는 방법을 도식화한 그림이다.

도 2는 사이클로덱스트린에 이노토디올이 포접된 복합체를 제조하는 것을 나타낸 그림이다.

도 3은 시차주사 열량법(Differential Scanning Calorimetry: DSC) 분석을 통해 사이클로덱스트린 및 이노토디올 포접 복합체 형성 유무를 확인한 그래프이다:

도 3a는 베타-사이클로덱스트린에 이노토디올을 포접시켜 DSC 분석을 한 결과 그래프이고, 도 3b는 감마-사이클로덱스트린에 이노토디올을 포접시켜 DSC 분석을 한 결과 그래프이다.

도 4는 이노토디올 및 사이클로덱스트린의 혼합 비율에 따른 포접 복합체 형성을 나타낸 그래프이다.

도 5는 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체의 시간에 따른 분해율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 마우스 유래 마크로파지 세포주(Raw264.7)를 이용한 LPS에 대한 항염 효능 평가 결과를 나타낸 것이다:

도 6a는 포접되지 않은 이노토디올과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체의 IL-6, IL-1β, TNF-α 발현량을 나타낸 사진이고, 도 6b는 상대적인 IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이며, 도 6c는 상대적인 IL-1β의 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 6d는 상대적인 TNF-α의 발현량을 나타낸 그래프이다.

도 7은 인간 비만세포주 LUVA cell에서 포접되지 않은 이노토디올과 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/γ-CD)의 EC_{50} 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 폐혈증 전신 마우스 모델에서 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD)의 항염효과를 확인한 것이다:

도 8a는 폐혈증 전신 마우스 모델에서 항염증 효과를 확인하는 실험 과정을 보여주는 모식도이고, 도 8b는 폐혈증 모델 마우스에 염증 유발 후 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 처리하여 체온을 측정한 결과 그래프이며, 도 8c는 폐혈증 모델 마우스에 염증 유발 후 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 처리하여 전염증성 사이토카인 IL-1β 발현량을 확인한 결과 그래프이고, 도 8d는 폐혈증 모델 마우스에 염증 유발 후 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 처리하여 전염증성 사이토카인 TNF-α 발현량을 확인한 결과 그래프이다(naive (2 mice), sham (3 mice), Dexa 4 mpk in water (2 mice), G1: inotodiol 0.25 (ino -γCD 0.25 mpk in saline) (4 mice), G2: inotodiol 0.5 (ino -γCD 0.5 mpk in saline) (4 mice), G3: inotodiol 1(ino 1 mpk in oil) (4 mice), G4: inotodiol 4 (ino 4 mpk in oil) (4 mice)).

도 9는 포접되지 않은 이노토디올과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체의 투여량에 따른 In vivo에서 생체 이용률을 비교한 결과를 나타내는 것이다:

도 9a는 포접되지 않은 이노토디올(0.5 mpk)과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(0.5 mpk)를 마우스에 경구투여 후 serum 내의 이노토디올 농도를 측정하여 비교한 결과 그래프이고, 도 9b는 포접되지 않은 이노토디올(1 mpk)과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(1 mpk)를 마우스에 경구투여 후 serum 내의 이노토디올 농도를 측정하여 비교한 결과 그래프이며, 도 9c는 포접되지 않은 이노토디올(4 mpk)과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(4 mpk)를 마우스에 경구투여 후 serum 내의 이노토디올 농도를 측정하여 비교한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0065] **실시예 1. 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체 제조**

[0066] **1.1 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체 제조**

[0067] 이노토디올이 γ-사이클로덱스트린에 포접된 복합체를 도 1 및 도 2와 같은 방법으로 제조하였다.

[0068] 구체적으로, 먼저 γ-사이클로덱스트린을 이노토디올 대비 몰비(1:1 내지 1:10)에 비례하여 9 ml DDW에 용해시킨 후 Ultrasound 처리(1차적으로 Microtip 사용 : Amp 30%, 10분; 2차적으로 Flat tip 사용 : Amp 50%, 5분)하는 동안, EtOH 1 ml에 녹인 이노토디올 10 mg을 15초 간격으로 서서히 주입하였다. 그 다음, 용액을 현탁액 상태로 25℃에서 24시간 동안 incubation을 하였고 동결 건조기(-45℃, 2~3일)로 건조시켜 포접 복합체를 제조하였다. 추가적으로 Ultrasound 처리 후 용액의 상태인 현탁액에 보조제로서 여러 종류의 계면활성제를 0.1 ~ 5% 까지 추가하여 현탁액의 안정성을 향상시켰다.

[0070] **1.2 사이클로덱스트린 종류에 따른 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체 형성 확인**

[0071] 시차주사 열량법(Differential Scanning Calorimetry: DSC) 분석을 통해 상기 실시예 1에서 제조된 포접 복합체(inotodiol/CD) 형성 유무를 확인하였다.

[0072] 구체적으로, 2 mg의 건조된 각 샘플을 밀봉된 알루미늄 팬에 넣고, 상기 팬을 질소 분위기 하에서 10 ℃/min의 속도로 25℃에서 310℃까지 가열하였다. 빈 팬이 참조로 사용되었다. DSC 분석을 통해 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD) 형성 유무를 확인한 그래프를 도 3에 나타내었다.

[0073] 도 3a는 베타-사이클로덱스트린(β-CD)에 이노토디올을 포접시켜 DSC 분석을 한 결과 그래프이고, 도 3b는 감마-사이클로덱스트린(γ-CD)에 이노토디올을 포접시켜 DSC 분석을 한 결과 그래프이다.

[0074] 도 3a 및 도 3b에 나타낸 바와 같이 이노토디올 결정(lipid crystal)의 melting peak (192℃)가 이노토디올과 β-사이클로덱스트린(β-CD)의 포접물에서는 감지되었으나, 이노토디올과 γ-사이클로덱스트린(γ-CD)의 포접물에서는 감지되지 않았다.

[0075] 이는 이노토디올과 유사한 구조를 가지는 콜레스테롤은 β-사이클로덱스트린과 포접물을 형성하나, 이노토디올은 1번 ring 4번 탄소에 2개의 메틸기가 존재하고 3, 4번 ring 사이 14번 탄소에 하나의 메틸기가 있어 전체적으로 콜레스테롤보다 큰 부피를 차지하여 내부 소수성 공동의 크기가 큰 γ-사이클로덱스트린에서만 포접 복합체를 형성하는 것을 의미한다. 즉, 상기와 같은 결과는 이노토디올이 내부 소수성 공동의 크기가 큰 γ-사이클로덱스트린에서만 포접 복합체를 형성하는 것을 의미한다.

[0077] **1.3 이노토디올과 사이클로덱스트린 혼합 비율에 따른 포접 복합체 형성 확인**

[0078] 이노토디올과 사이클로덱스트린의 혼합 비율에 따른 포접 복합체(inotodiol/CD) 형성 여부를 확인하였다. 그 결과를 표 1 및 도 4에 나타내었다.

[0079] 표 1은 이노토디올 및 사이클로덱스트린을 1:1 내지 5의 몰비로 혼합하였을 경우 포접여부를 나타낸 결과이고, 도 4는 이노토디올 및 사이클로덱스트린의 혼합 비율(몰비)에 따른 포접 복합체 형성을 나타낸 그래프이다.

[0080] 표 1 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린을 1:3 내지 5 몰비로 혼합하였을 경우 이노토디올이 γ-사이클로덱스트린에 완전히 포접되는 것을 확인하였다.

표 1

[0081]

	Inotodiol (mg)	mJ	mJ/mg	Yield of complexation (%)
PM 1:5	0.13	7.91	61.89	0
1:1	0.51	26.30	51.68	16.51
1:2	0.29	12.15	41.67	32.67
1:3	0.20			>95
1:5	0.13			>95

[0083] **실험예 1. 포접 복합체(inotodiol/CD)의 분해율 확인**

[0084] 포접 복합체(inotodiol/CD)로부터 이노토디올의 방출 효율을 확인하기 위하여 상기 실시예 1로부터 제조된 포접 복합체(inotodiol/CD)의 분해율을 확인하였다.

[0085] 구체적으로, γ-사이클로덱스트린(γ-CD) 및 실시예 1의 포접 복합체(inotodiol/CD) 각각을 PBS (pH 7.5)에 0.1 mg/ml 농도가 되도록 용해시켰다. 그후 인간 및 마우스의 췌장 α-amylase와 동일한 약물 활성 부위를 가지며 각각 87.1%, 85.5%로 높은 유사성을 가지는 돼지 췌장 α-amylase (Porcine pancreatic α-amylase, PPA) 0.25 U/ml을 처리하여 37℃ 100 rpm에서 4시간 동안 반응시켰다. 가수분해 정도는 α-amylase에 의한 반응 분해 산물인 환원당 말토오스를 CBC 방법(Copper bicinchoninate method)으로 측정하여 표 2 및 도 5에 그 결과를 나타내었다.

[0086] 표 2는 포접 복합체(inotodiol/CD)의 시간에 따른 분해율을 수치로 나타낸 결과이고, 도 5는 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD)의 시간에 따른 분해율을 나타낸 그래프이다.

표 2

[0087]

Sample	0 min	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min
γ-CD (PPA 0.25 U)	3.45 ± 0.10	7.10 ± 0.02	15.04 ±0.03	24.22 ± 0.25	33.07 ± 0.46	34.23 ± 0.62	34.85 ± 0.50	35.81 ± 0.54	37.56 ± 0.62	41.3 4 ±2. 41
Ino/γ-CD (PPA 0.25 U)	4.09 ± 0.22	7.69 ± 0.35	13.57 ±0.38	25.46 ± 0.17	30.20 ± 0.66	33.57 ± 0.96	36.81 ± 0.04	37.31 ± 0.12	38.76 ± 0.58	45.3 7 ±0. 04

[0088] 표 2 및 도 5에 나타낸 바와 같이, PPA에 의한 포접 복합체의 분해는 γ-사이클로덱스트린과 비교적 동일한 분해율을 나타냈으며, 모두 초기단계에서 90분까지 빠른 분해율을 나타냈다. 이는 초기에 γ-사이클로덱스트린의 링오픈 반응이 일어나서 빠르게 이노토디올이 방출될 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 인간 및 마우스의 췌장 α-amylase와 동일한 약물 활성 부위를 가지며 각각 87.1%, 85.5%로 높은 유사성을 가지는 PPA 처리하에서 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD)가 높은 분해율을 나타냈다. 이는 상기 포접 복합체(inotodiol/CD)가 인간과 마우스에도 적용될 수 있음을 의미한다.

[0090] **실험예 2. 포접되지 않은 이노토디올과 포접 복합체(inotodiol/CD)의 용액 내 안정성 비교**

[0091] 상기 실시예 1로부터 제조된 포접 복합체(inotodiol/CD)의 용액 안정성을 포접되지 않은 이노토디올과 비교하였다.

[0092] 구체적으로, 포접되지 않은 이노토디올 또는 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD)를 준비된 보조제와 섞어주었다. 이노토디올 무게 기준으로 100~15000 ppm 사이의 농도로 준비하고 sonic bath를 이용하여 50℃에서 30분간 처리하였다. 이후 상온에서 24시간 방치하여 침전이 발생하는지를 육안으로 관찰하여 안정성을 판단하였다.

[0093] 그 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이, 포접 복합체(inotodiol/CD)의 경우 포접되지 않은 이노토디올 보다 용액 내에서 안정함을 확인하였다.

표 3

[0094]

	ppm of inotodiol in solution	
	CE9A215	CE9A215/CD
Tween 80 (1%)	100 <	1500
Kolliphor (5%)	500 <	15000

[0096] **실험예 3. 이노토디올과 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체의 생리활성 비교**

[0097] **3.1 마우스 유래 마크로파지 세포주(Raw264.7)에서 항염증 효과 비교**

[0098] 마우스 유래 마크로파지(macrophage) 세포주(Raw264.7)에서 상기 실시예 1의 포접 복합체(inotodiol/CD)와 포접되지 않은 이노토디올의 항염증 효과를 비교하였다.

[0099] 구체적으로, Raw264.7을 0.8 X 10^6 cells가 되도록 96 웰 플레이트에 파종하고 밤새 배양한 뒤, 이노토디올과

이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 각각 농도별로 2 시간 전처리하였다. Lipopolysaccharide(LPS)를 0.1 μg/ml 농도로 처리 후 4시간 동안 배양하여 염증을 유발한 후 RNA를 추출하고 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법으로 IL-6, IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 확인하였으며 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0100] 도 6a는 포접되지 않은 이노토디올과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체 처리 시 IL-6, IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현량을 나타낸 전기영동 사진이고, 도 6b 내지 도 6d는 전기영동 사진의 밴드를 정량하여 GAPDH로 수치 정량화하여 나타낸 그래프이다. 도 6b는 상대적인 mRNA IL-6의 발현량을 나타낸 그래프이며, 도 6c는 상대적인 IL-1β의 mRNA 발현량을 나타낸 그래프이고, 도 6d는 상대적인 TNF-α의 mRNA 발현량을 나타낸 그래프이다.

[0101] 도 6a 내지 도 6d에 나타낸 바와 같이, 포접되지 않은 이노토디올의 경우에는5 ug/ml 처리 시 IL-6, TNF-α mRNA 발현량이 유의적으로 감소하였고, 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/γ-CD)의 경우에는 모든 농도에서 IL-6, IL-1β, TNF-α mRNA 발현량이 유의적으로 감소하였음을 확인하였다. 이는 포접되지 않은 이노토디올 대비 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/γ-CD)가 더욱 효과적인 항염 효능을 보이는 것을 의미한다.

[0102] **3.2 LUVA cell에서 비만세포 탈과립 저해효과 비교**

[0103] 인간 비만세포(mast cell) 세포주 (LUVA cell)에서 포접되지 않은 이노토디올과 상기 실시예 1의 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/ γ-CD)의 비만세포 탈과립 저해효과를 비교하였다.

[0104] 구체적으로, LUVA cell을 1 X 10^5 cells가 되도록 96 웰 플레이트에 파종하고 1시간 동안 배양 후 이노토디올과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 각각 농도별로 처리하였다. IgE를 1 μg/ml 농도로 처리 후 밤새 배양하고 상등액 제거 후 tyrode buffer(130mM NaCl, 5mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1.4 mM $CaCl_2.2H_2O$, 10 mM hepes, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA) 50 μl를 각 웰에 분주한다. 이전과 동일한 농도로 이노토디올과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 처리하고 2 μM A23187 및 10μg/ml anti-human IgE antibody 복합물 20 μl를 각 웰에 분주하고 2시간 동안 배양한다. 상등액 50 μ를 취해 2 mM p-nitrophenyl N-acetyl-b-D-glucosamine 50 μl와 혼합 후 2시간 동안 배양하고 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 플레이트에 남아있는 세포에 0.1 mM Triton X-100 75 μl를 첨가하고 4℃에서 40분간 보관하여 용해시킨 후 50 μ를 취해 2 mM p-nitrophenyl N-acetyl-b-D-glucosamine 50 μl와 혼합하고 1시간 동안 배양 후 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 상등액과 세포 용해액의 흡광도를 아래 식에 대입하여 탈과립 비율을 계산하였고 미처리군 대비 탈과립 비율을 절반으로 감소시키는데 필요한 약물 농도(EC_{50})를 비교하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

$$\%\ \text{degranulation} = \frac{Tx1.5}{Tx1.5 + Lx1.5} x100$$

[0105]

[0107] (T: 상등액 흡광도, L: 세포 용해액 흡광도)

[0109] 도 7은 LUVA cell에 포접되지 않은 이노토디올과 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/γ-CD) 처리 시 탈과립 비율 및 EC_{50} 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0110] 도 7에 나타낸 바와 같이, 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/γ-CD)는 포접되지 않은 이노토디올에 비하여 상대적으로 낮은 농도에서 효과적으로 비만세포의 탈과립을 저해함을 확인하였다.

[0111] 또한 Calcium ionophore + PMA의 두 종류로 염증자극을 주었을 때 비만세포의 탈과립을 50% 이상 억제할 수 있는 약물의 필요 농도는 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/γ-CD)의 경우가 포접되지 않은 이노토디올에 비하여 약 절반가량 낮게 나타남을 확인하였다.

[0112] **3.3 패혈증 전신 마우스 모델에서 항염증 효과 비교**

[0113] 상기 실시예 1의 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD)의 항염증 효과를 패혈증 전신 마

우스 모델에서 확인하였다.

[0114] 구체적으로, LPS에 의해 활성화된 대식세포에 의한 임상 증상에 대해 상기 실시예 1의 포접 복합체(inotodiol/CD)의 효과를 패혈증 전신 마우스 모델에서 확인하였다. 도 8a에 나타낸 바와 같이, 마우스에 연속 4일 동안 이노토디올 및 γ-사이클로덱스트린을 1:3으로 혼합시켜 생성한 포접 복합체를 이노토디올 농도 기준으로 0.5, 4 mg/kg을 전처리한 다음, 마지막 처리 1시간 후에 LPS (5 mg/kg)를 복강 내 주사하였다.

[0115] 한편, 마우스의 체온은 LPS로 염증 유발 후 4시간 후에 하루에 2시간마다 직장 온도를 측정하였다. 또한 LPS로 활성화된 대식세포에 의한 전염증성 사이토카인 TNF-α 및 IL-1β은 LPS로 염증 유발 후 각각 2시간 및 6시간 후에 마우스의 혈액을 채취하여 ELISA를 통해 측정하였다.

[0116] 상기 실험 과정으로 확인한 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD)의 항염증 효과를 도 8b 내지 도 8d에 나타내었다.

[0117] 도 8b는 폐혈증 모델 마우스에 염증 유발 후 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 처리하여 체온을 측정한 결과 그래프이며, 도 8c는 폐혈증 모델 마우스에 염증 유발 후 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 처리하여 전염증성 사이토카인 IL-1β 발현량을 확인한 결과 그래프이고, 도 8d는 폐혈증 모델 마우스에 염증 유발 후 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체를 처리하여 전염증성 사이토카인 TNF-α 발현량을 확인한 결과 그래프이다.

[0118] 도 8에 있어서 Naive군은 동량의 비히클 용액만 투여한 군을 나타내고(2 mice), Sham 군은 LPS만 처리한 군을 나타내며(3 mice), Dexa군은 양성 대조군으로서 dexamethasone을 4.0 mg/kg(mpk) 처리한 군을 나타낸다(2 mice). G1군은 생리식염수(saline)에 용해시킨 포접 접합체 (inotodiol/γCD)를 0.25 mg/kg(mpk) 처리한 군을(4 mice), G2군은 생리식염수(saline)에 용해시킨 포접 접합체 (inotodiol/γCD)를 0.5 mg/kg(mpk) 처리한 군을(4 mice), G3군은 기름(oil)에 용해시킨 inotodiol을 1 mg/kg(mpk) 처리한 군을(4 mice), G4 군은 기름(oil)에 용해시킨 inotodiol을 4 mg/kg(mpk) 처리한 군을 나타낸다(4 mice).

[0119] 데이터는 각 군의 마우스 평균±SD로 표시하였다. 통계적 유의성은 일원 ANOVA에 따라 Bonferroni 사후 검정에 의해 확인되었으며, LPS 단독 처리 대비하여 다음과 같이 표시되었다: $p<0.005$(*), $p<0.05$(#).

[0120] 도 8b에 나타낸 바와 같이, 마우스의 체온은 LPS만 처리한 Sham 군에서 가장 낮았고, 동량의 비히클 용액만 투여한 Naive군에서 가장 높았다. Dexa군, G1 내지 G4군의 경우35~36℃ 사이의 직장온도 분포를 보였다.

[0121] 이는 정상체온을 나타낸 Naive 군에 비해 Sham 군에서는 아나필락시스에 의해 체온이 크게 감소하였으나, 이노토디올 투여에 의해 아나필락시스 반응이 감소하여 체온저하가 방지되거나 회복된 결과이다.

[0122] 또한, 도 8c 및 도 8d에 나타낸 바와 같이, 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD)를 처리한 경우 전염증성 사이토카인(IL-1β, TNF-α)의 발현이 낮아짐을 확인하였다.

[0123] 특히, IL-1β의 발현량의 경우(도 8c), LPS만 처리한 군에 비하여 전염증성 사이토카인(IL-1β)의 발현량이 현저히 감소했을 뿐만 아니라, 기름(oil)에 용해시킨 inotodiol을 처리한 경우보다 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(inotodiol/CD)를 처리한 경우에 IL-1β의 발현량이 감소한 것을 확인하였다.

[0124] 이는 상기 포접 복합체가 항염증 효과가 있을 뿐만 아니라 포접되지 않은 이노토디올보다 현저한 항염증 효과가 있음을 의미한다.

[0126] **실험예 4. Inotodiol과 포접 복합체(inotodiol/CD)의 생체이용률 비교**

[0127] 상기 실시예 1의 포접 복합체(inotodiol/CD)와 사이클로덱스트린에 포접되지 않은 이토노디올 간의 생체 이용률을 각 농도별로 비교하였다.

[0128] 구체적으로, 포접되지 않은 이노토디올은 1% Tween 80 함유 0.9% 생리식염수에 용해했으며, 포접 복합체(inotodiol/CD)는 0.9% 생리식염수에만 용해시킨 후 0.5, 1, 4 mg/kg(mpk)에 해당하는 제재를ICR 수컷 마우스(30 g)에 200 ul 경구투여하였다. 경구투여 후 일정 시간에 (0.5, 1, 2, 3, 6h) 채혈하였다. 채혈한 샘플을 원심분리하여 혈장 분리 후 LC-MS 분석을 통해 혈장 내 이노토디올 농도를 측정하여 생체 이용률 개선 여부를 조사한 결과를 도 9에 나타내었다.

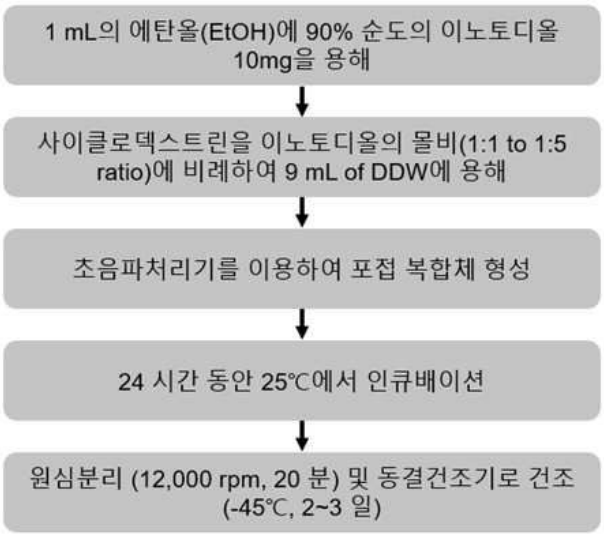
[0129] 도 9a는 포접되지 않은 이노토디올(0.5 mpk)과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(0.5 mpk)를 마우스

에 경구투여 후 serum 내의 이노토디올 농도를 측정하여 비교한 결과 그래프이고, 도 9b는 포접되지 않은 이노토디올(1 mpk)과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(1 mpk)를 마우스에 경구투여 후 serum 내의 이노토디올 농도를 측정하여 비교한 결과 그래프이며, 도 9c는 포접되지 않은 이노토디올(4 mpk)과 이노토디올 및 사이클로덱스트린 포접 복합체(4 mpk)를 마우스에 경구투여 후 serum 내의 이노토디올 농도를 측정하여 비교한 결과 그래프이다.

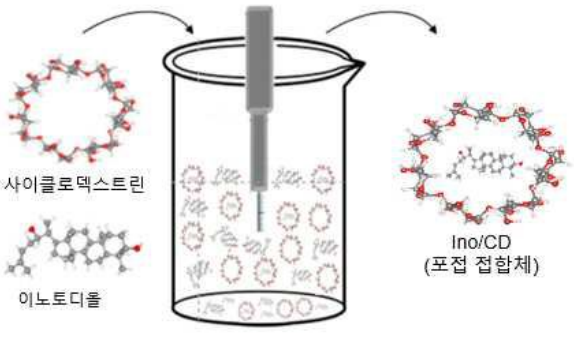
[0130] 도 9a내지 도 9c에 나타낸 바와 같이, 포접 복합체(inotodiol/CD)가 포접되지 않은 이노토디올보다 더 높은 생체 이용률을 가지는 것으로 나타났다. 구체적으로 마우스 serum 내의 이노토디올 농도가 포접되지 않은 이노토디올 보다 포접 복합체(inotodiol/CD)의 경우 전반적으로 높음을 확인하였다. 이는 포접 접합체(inotodiol/CD)의 경우가 포접되지 않은 이노토디올 보다 생체 이용률이 높음을 의미한다.

도면

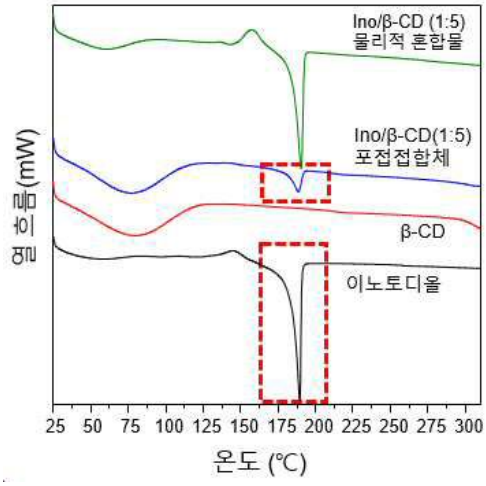
도면1



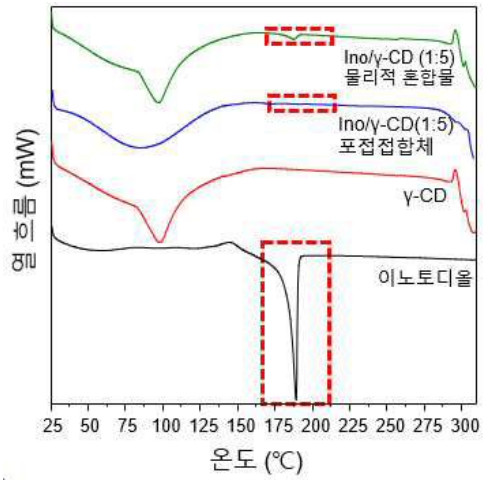
도면2



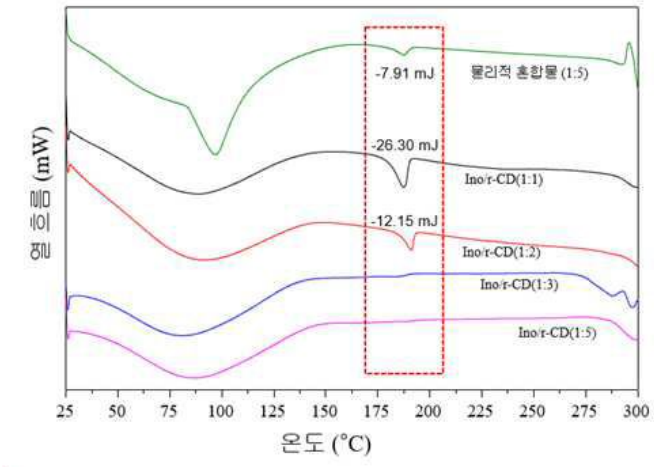
도면3a



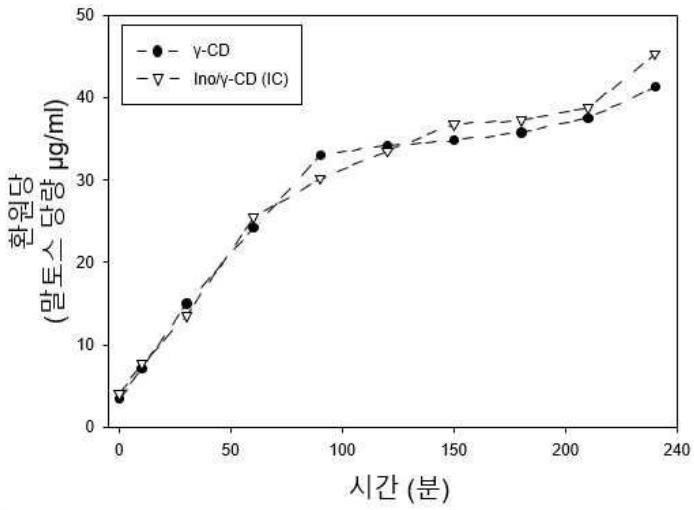
도면3b



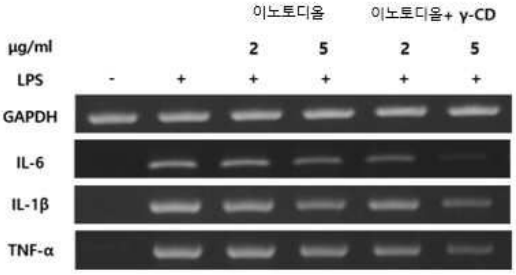
도면4



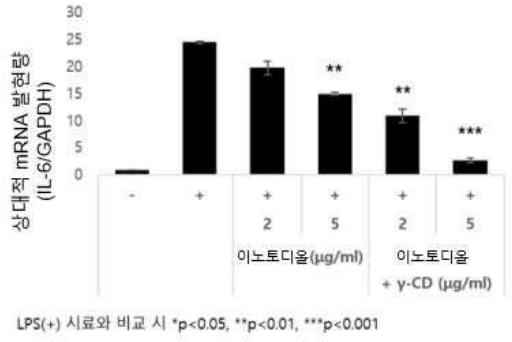
도면5



도면6a

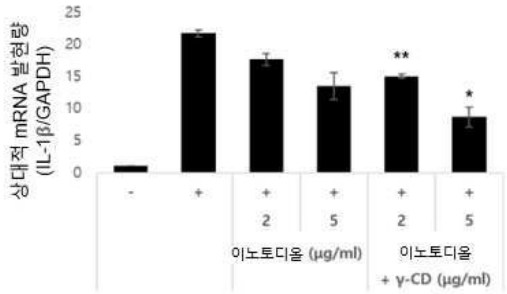


도면6b

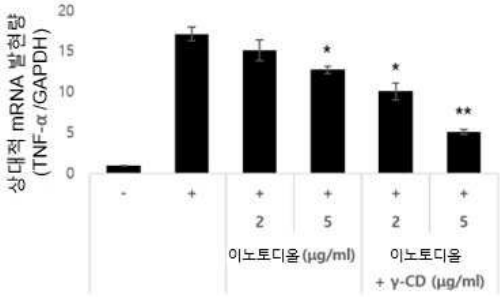


LPS(+) 시료와 비교 시 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

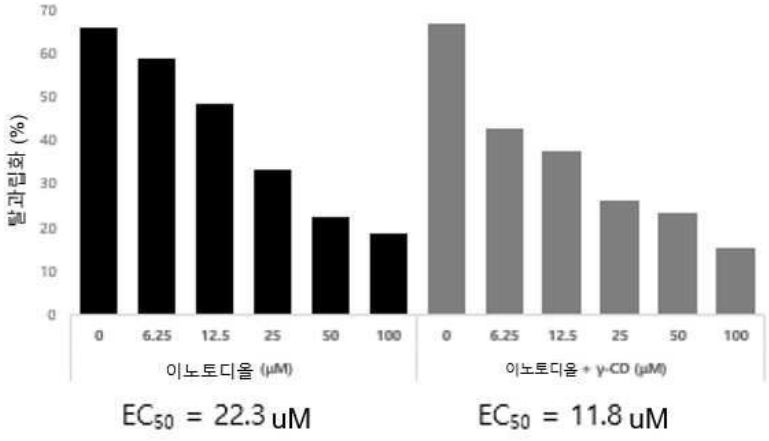
도면6c



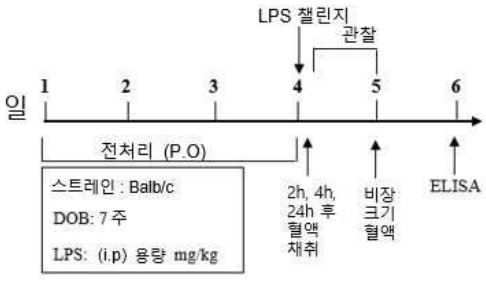
도면6d



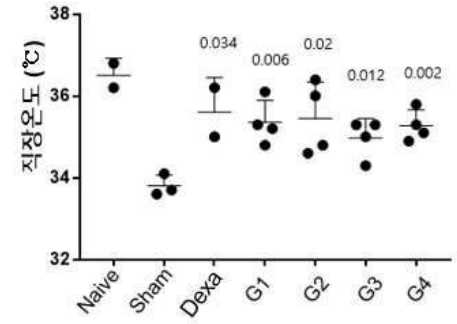
도면7



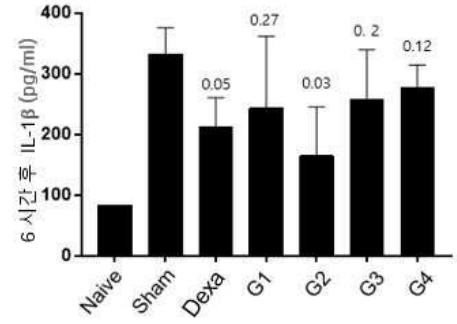
도면8a



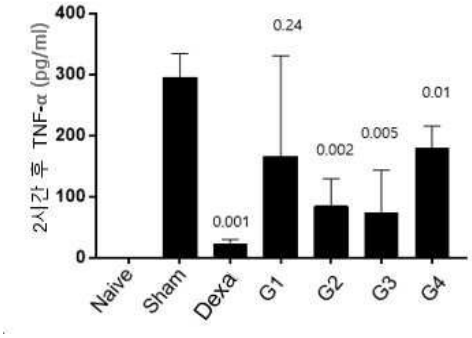
도면8b



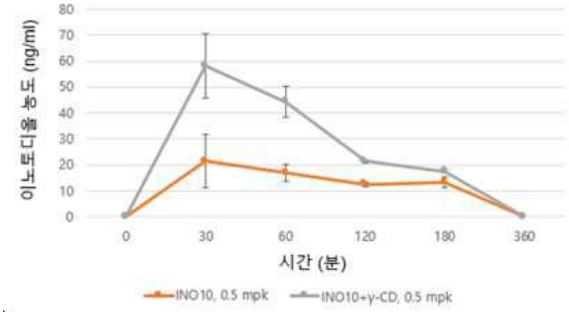
도면8c



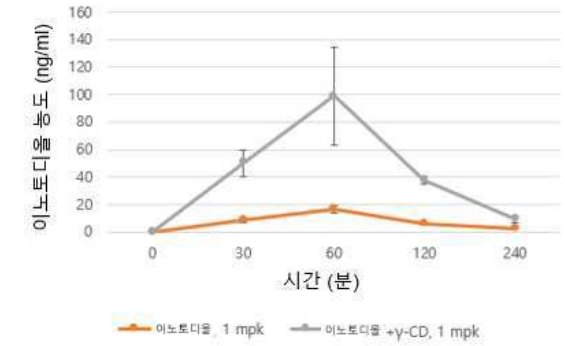
도면8d



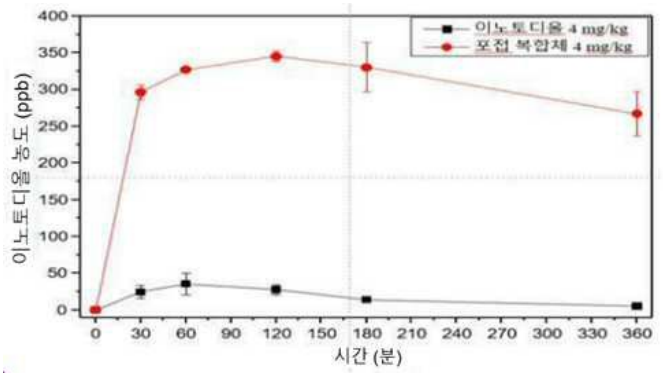
도면9a



도면9b


이노토디올 농도 (ng/ml)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
120
240
시간 (분)
이노토디올, 1 mpk
이노토디올 +γ-CD, 1 mpk

도면9c


이노토디올 농도 (ppb)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
330
360
시간 (분)
이노토디올 4 mg/kg
포접 복합체 4 mg/kg