



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0016108
(43) 공개일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 15/18 (2006.01) *A61K 31/70* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 15/18 (2013.01)
A61K 31/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0100098
(22) 출원일자 2016년08월05일
심사청구일자 2016년08월05일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
박제원
경기도 고양시 일산동구 위시터1로 7, 504동 904
호 (식사동, 위시터블루밍5단지아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 9 항

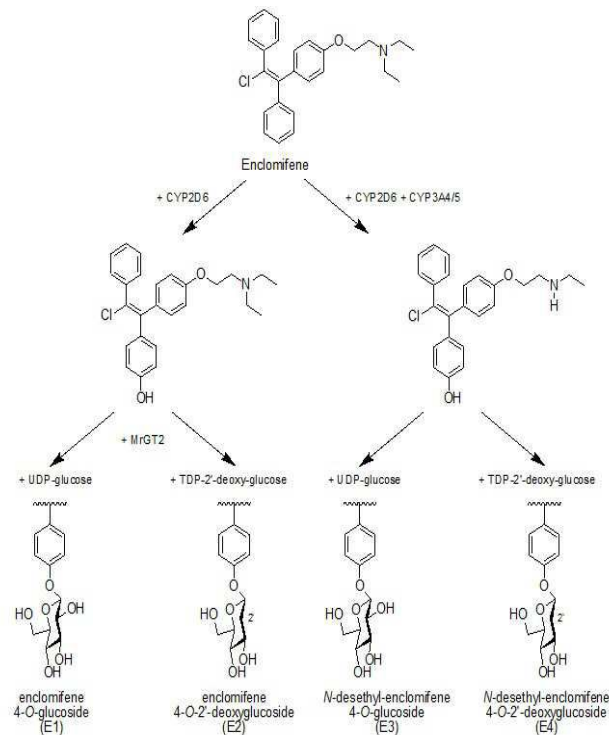
(54) 발명의 명칭 당 부가된 엔클로미펜, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명에 따른 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 에스트로젠 수용체 α (ER α)에 길항 활성을 유지하면서 생체이용률을 향상시키는 효과가 있는 당부가 엔클로미펜 유도체들로서, 남성 이차 성선기능저하증 및 인슐린 비의존성 당뇨병 혹은 지방이영양증, 불임증, 남성전립선비대증, 전립선암, 난소암, 유방암 등의

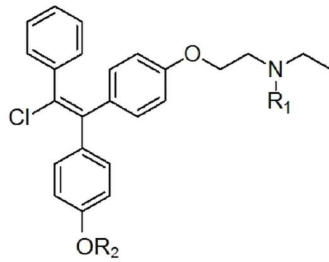
(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



에스트로겐 수용체 관련 질환을 치료할 수 있는 프로드럭 혹은 대체 개량 제형으로서 유용하게 사용될 수 있다:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R_1 은 CH_2CH_3 또는 H이고, R_2 는 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)이다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011066

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린21

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

기여율 1/2

주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부

연구기간 2016.01.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01002524

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원(핵심연구)사업

연구과제명 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제 후보물질 디자인

기여율 1/2

주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부

연구기간 2016.05.01 ~ 2018.04.30

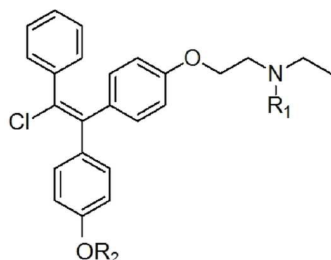
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R_1 은 CH_2CH_3 또는 H이고, R_2 는 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)임.

청구항 2

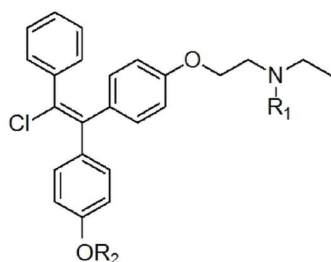
제1항에 있어서, 상기 엔클로미펜 유도체는 엔클로미펜 4-*O*-글루코사이드, N-데스에틸-엔클로미펜 4-*O*-글루코사이드, 엔클로미펜 4-*O*-2'-디옥시 글루코사이드 또는 N-데스에틸-엔클로미펜 4-*O*-2'-디옥시 글루코사이드인 것을 특징으로 하는 엔클로미펜 유도체, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체의 제조방법:

- (a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이효소(MrGT2)와 사이토크롬의 존재하에 엔클로미펜 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체를 합성시키는 단계; 및
- (b) 상기 합성된 엔클로미펜 유도체를 회수하는 단계:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R_1 은 CH_2CH_3 또는 H이고, R_2 는 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)임.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 엔클로미펜 유도체는 엔클로미펜 4-*O*-글루코사이드, N-데스에틸-엔클로미펜 4-*O*-글루코사이드, 엔클로미펜 4-*O*-2'-디옥시 글루코사이드, N-데스에틸-엔클로미펜 4-*O*-2'-디옥시 글루코사이드인 것을 특징으로 하는 제조방법.

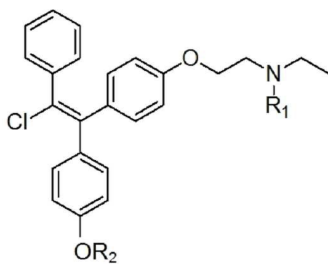
청구항 5

제3항에 있어서, 수득한 효소반응물을 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC) 방법으로 분리 또는 정제하는 단계를 추가로 포함하는 제조방법.

청구항 6

제1항의 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 에스트로겐 수용체 관련 질환 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R_1 은 CH_2CH_3 또는 H이고, R_2 는 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)임.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 엔클로미펜 유도체는 엔클로미펜 4-*O*-글루코사이드, N-데스에틸-엔클로미펜 4-*O*-글루코사이드, 엔클로미펜 4-*O*-2'-디옥시 글루코사이드, N-데스에틸-엔클로미펜 4-*O*-2'-디옥시 글루코사이드인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 의약적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 에스트로겐 수용체 관련 질환은 남성 이차 성선기능저하증, 인슐린 비의존성 당뇨병, 지방이영양증, 불임증, 남성전립선비대증, 전립선암, 난소암 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 당 부가된 엔클로미펜, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 불임치료약으로 사용되고 있는 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator, SERM)의 일종인 클로미펜(clomifene)의 구조 이성질체 중 트랜스-이성질체인 엔클로미펜(enclofime, enclomiphene)에 당이 부가된 화합물 및 상기 화합물의 효소적 제조방법 및 이를 포함하는 약학조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 클로미펜(clomifene 또는 clomiphene)은 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator, 이하 'SERM' 라 함) 중 하나로서 무배란증(anovulation)이나 희소배란증(oligo-ovulation)에 배란 유도를 일으키는 여성 불임치료에 가장 빈번히 사용되고 있는 처방전이다(Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, a committee opinion. *Fertil. Steril.* 2013. 100(2): p341-348).

[0004] 클로미펜은 1956년 유기 합성법으로 첫 합성된 후 1960년대부터 사용되기 시작하였으며, 초기에는 희발월경(oligomenorrhea) 증후군의 치료로 사용되다가 배란 유도효과에 따른 불임치료제로 사용되고 있다. 생체 내 클로미펜은 시상하부 내 에스트로겐 수용체에 작용하여 융모생식샘자극호르몬인 고나도트로핀(gonadotropin)에 대한 에스트로겐의 피드백 저해(feedback inhibition)를 방해하고, 이는 결국 시상하부-뇌하수체-성선축(hypothalamic-pituitary-gonadal axis)의 활성화를 촉진하여 배란을 유도하게 된다(Goldstein, S.R. *et al.*, *Human Reprod. Update*, 2000. 6(3): p212-224.). 클로미펜은 또한 남성의 이차 성선기능저하증(hypogonadism)의 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다. 이 약리적 기능은 기존 테스토스테론 대체요법(testosterone replacement therapy)과 비교하여 비용 상 절감 및 투여의 편리성이라는 이점이 있다(Hill, S. *et al.*, *Drugs* 2009. 12(2): p109-119). 반면, 클로미펜 투여에 따른 부작용으로 가역적인 난소 비대증(ovarian enlargement)이나 변시증(blurred vision)이나 암점(scotomata)과 같은 시각 장애 현상, 두통 및 안면홍조(hot flash) 등이 나타날 수 있으며 드문 경우로 간 비대증, 가역적 탈모증 및 난소 고자극 신드롬 등이 나타날 수 있다.

[0005] 클로미펜은 대표적 SERM인 타목시펜(tamoxifen)과 구조적으로 유사한 트리페닐에틸렌(triphenylethylene) 구조의 트랜스(trans) 및 시스(cis)형의 기하 구조 이성질체인 엔클로미펜(enclofime, 이하 ENCLOM)과 주클로미펜(zuclomifene)으로 이루어져 있으며, 클로미펜의 에스트로겐성 및 항-에스트로겐성의 혼합된 활성에 기여하고 있다(Adashi E.Y., *Fertil Steril*, 1984. 42(3): p331-344). 특히, 전술한 바와 같은 클로미펜의 남성 이차 성선기능저하증(secondary hypogonadism) 치료 효과와 관련하여, 최근 클로미펜의 단순 트랜스 이성질체인 엔클로미펜(혹은 브랜드명으로 Androxal)이 임상 3상에 진입 중이며, 이밖에도 인슐린 비의존성 당뇨병에 대한 치료제로서 연구가 진행 중이다(Hill S., *et al.*, *Drugs*, 2009. 12(2): p109-119.).

[0006] 엔클로미펜 및 그 구조 대사체에 대한 선행문헌들은 대부분 클로미펜의 체내 투여 후 대사과정 중 나타나는 대사체들에 대한 내용이 대부분이다(Mazzarino M., *et al.*, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 2008. 14(3): p171-180; Ganchev B., *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011. 400(10): p3429-3441; Murdter, T.E., *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 2012. 21(5): p1145-1154). 엔클로미펜은 전술한 바 있는 타목시펜과 유사하게 인체 투여 후 간 내 마이크로솜의 사이토크롬 p450 효소계의 대사과정을 통하여, 즉 주로 CYP2D6 작용에 의한 4-하이드록시 엔클로미펜(4-hydroxyenclofime, 이하 4-OH-ENCLOM)과 CYP2D6와 CYP3A4/5의 연속적 대사 작용에 의한 N-데스에틸-4-하이드록시 엔클로미펜(N-desethyl-4-hydroxyenclofime, 이하 N-DE-4-OH-ENCLOM) 활성대사체로 대사된다. 상기 활성 대사체들은 원래 화합물인 ENCLOM에 비하여 적어도 100배 이상 높은 에스트로겐 수용체 길항활성을 보이고 있으며 이를 통하여 클로미펜도 프로드럭의 일종임을 알 수 있다(Murdter, T.E., *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 2012. 21(5): p1145-1154). 이와 같이 신규한 유도체의 개발이나 혹은 기존 클로미펜이나 ENCLOM의 생체이용률(bioavailability)보다 높은 생체이용률을 제공할 수 있는 신규한 프로드럭의 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 부작용 위험성을 감소시킬 수 있을 것이다.

[0007] 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, 엔클로미펜과 그 구조적 유사 화합물들의 당전이화는 원래 물질에 비하여 초회 통과(first pass)를 거친 대사(metabolism) 과정에서 혈중 약물 농도

를 일정 수준이상으로 유지하여 생체이용률을 향상시킬 수가 있으므로, 의약품의 제형 개량, 신규 제형 개발 및 프로드럭(prodrug)화 등에 유용한 생전환(bio-conversion) 기술이라 할 것이다.

[0008] 엔클로미펜 및 그 관련 유도체들의 제조 방법 및 용도에 대한 특허는 대부분 미국 텍사스 소재 리프로스 테라퓨틱스(Repros Therapeutics)에 의하여 출원되었으며, 그 대표적인 특허는 국제특허공개 WO 2013020017A1 및 WO 2014197477A1에 개시되어 있다. 상기 공개특허들은 트랜스형 클로미펜인 ENCLOM과 인체 간 대사를 포함한 다양한 대사반응으로 생전환된 대사체들(4-OH-ENCLOM 및 N-DE-4-OH-ENCLOM을 포함)의 구조적 신규성과 그 제조방법 및 약리적 용도를 포함하여 기재하고 있다. 하지만 상기 특허들의 경우엔 효소적 생전환을 통하여 ENCLOM 및 그 대사체들에 대한 특허 범위가 제한되어 있는 바, ENCLOM 및 그 활성대사체들에 당이 부가한 화합물의 제조는 현재까지 그 유래가 없다.

[0010] 본 발명자는 대한민국 특허출원 제10-2015-0104325호(발명의 명칭: 당전이 효소를 이용한 당 부가된 에스트로겐 수용체 조절제의 제조방법)를 통해 SERM의 일종으로 유방암 예방 및 치료제로 응용 가능한 당 부가 타목시펜 유도체들의 생전환에 성공한 바 있다. 이를 위하여, SERM 활성을 지닌 타목시펜 구조 유사체들을 기질로 하여 당전이 반응을 가능케 하는 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangia*) 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 확인하였다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 ENCLOM을 기질로 하여 인간 재조합 사이토크롬 P450과 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangia*) 방선균 유래 재조합 당전이 효소(glycosyltransferase; 이하 MrGT2) 조합을 활용한 원팟(one-pot) 당부가 엔클로미펜 유도체들을 생합성한 결과, 이들 유도체들이 당부가 전의 원래 SERM들과 그 유도체들의 에스트로겐 수용체(ER)에 대한 인 비트로(in vitro) 길항 활성 및 약물동력학적으로 생체이용률이 향상된 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

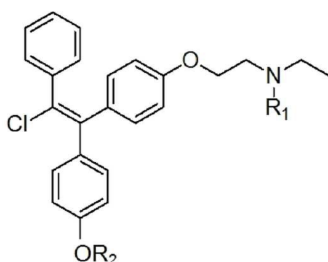
해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 남성 이차 성선기능저하증 및 인슐린 비의존성 당뇨병 혹은 지방이영양증, 불임증, 남성전립선비대증, 전립선암, 난소암, 유방암 등의 질환 치료 목적으로 사용될 수 있는 당부가 SERM 유도체를 인간 유래 재조합 사이토크롬효소와 미생물 유래 재조합 당전이효소의 원팟(one-pot) 생전환 방법에 의해 제조하여 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 제공한다:

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 상기 화학식 1에서 R₁은 CH₂CH₃ 또는 H이고, R₂는 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)이다.

[0019] 본 발명은 또한, (a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이효소(MrGT2)와 사이토크롬의 존재하에 엔클로미펜 및 당 공여체를 반응시켜 상기 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체를 합성시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 엔클로미펜 유도체를 회수하는 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용 가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 에스트로겐 수용체 관련 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따라 마이크로모노스포라 로도랑지아(Micromonospora rhodorangea) 균주 유래의 대장균 내 발현된 신규한 재조합 당전이효소(MrGT2)와 인간 유래 재조합 CYP 효소들의 순차적인 반응을 원뿔 생전환함으로써 제조한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)에 대한 일부 인비트로(in vitro) 길항 활성을 보이는 동시에 당 부가 전 화합물들과 비교시 생체이용률이 향상된 효과가 있다.

[0023] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 남성 이차 성선기능저하증 및 인슐린 비의존성 당뇨병 혹은 지방이영양증, 불임증, 남성전립선비대증, 전립선암, 난소암, 유방암 등의 질환의 치료를 목적으로 한 구조적 또는 약리적으로 개량된 의약품으로 응용화가 가능한 동시에 기존 SERM 혹은 엔클로미펜의 투여에 따라 발생할 수 있는 부작용을 감소시킬 수 있는 신규 의약품 제형으로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 인간 유래 재조합 CYP들과 방선균 유래 재조합 당전이효소 MrGT2 효소 반응을 통한 엔클로미펜 원뿔 생전환 모식도이다.

도 2는 당부가 엔클로미펜 유도체들과 생전환 전 엔클로미펜의 에스트로겐 수용체에 대한 인비트로 길항 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3는 실험동물 혈청 중 엔클로미펜 및 그 활성대사체들의 농도를 분석함으로써 제조된 유도체들의 생체이용률 향상 정도를 비교한 그래프이다.

도 4는 실험동물 혈청 중 엔클로미펜 및 그 활성대사체들의 농도를 투약 후 72시간 동안 분석한 약물동력학 곡선 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

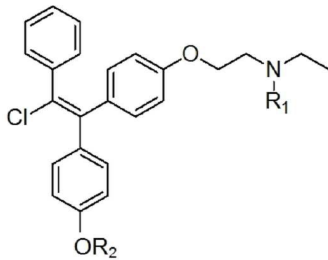
[0026] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0028] 본 발명은 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주의 유전체(genome)로부터 GT 암호화 유전자를 분리하고, 이를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 형질전환 대장균을 제작한 다음, 상기 발현된 당전이 효소에 ENCLOM의 대사에 관여하는 재조합 CYP2D6와 CYP3A4/5를 각각 첨가하고, 엔클로미펜 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, TDP-2 ‘-deoxy-Glc)를 당 공여체로 반응시킨 원뿔 반응에 의하여 당부가 ENCLOM 유도체를 생합성하였다. 그 다음, 질량분석기와 핵자기 공명 스펙트로미트리(nuclear magnetic resonance spectrometry) 기기분석을 통하여 그 구조를 확인하였다.

[0030] 따라서, 본 발명의 일 관점은 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가

능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭에 관한 것이다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R₁은 CH₂CH₃ 또는 H이고, R₂는 글루코스(glucose), 2-데옥시글루코스(2-deoxy-glucose) 또는 갈락토스(galactose)이다.

또한, 본 발명의 다른 관점에서 (a) 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 당전이효소(MrGT2)와 사이토크롬의 존재하에 엔클로미펜 및 당 공여체를 반응시켜 하기 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체를 합성시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 엔클로미펜 유도체를 회수하는 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 엔클로미펜 유도체는 엔클로미펜 4-O-글루코사이드, N-데스에틸-엔클로미펜 4-O-글루코사이드, 엔클로미펜 4-O-2'-디옥시 글루코사이드, N-데스에틸-엔클로미펜 4-O-2'-디옥시 글루코사이드일 수 있다.

본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 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, 말레인산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈록투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

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

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.

본 발명에서 수득한 효소반응물을 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC) 방법으로 분리 또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

본 발명은 당이 효소적으로 부가된 SERM 유도체들 즉 엔클로펜 유도체의 생화학적 활성을 확인하고자, 당부가 전의 원래 SERM들과 그 유도체들의 ER에 대한 인 비트로(in vitro) 길항 활성 및 실험동물을 대상으로 한 생체이용률을 검사하였으며, 길항 활성 및 생체이용률이 향상된 것을 확인하였다.

따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 화학식 1로 표시되는 엔클로미펜 유도체, 이의 이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 용매화물, 수화물 또는 프로드럭을 유효성분으로 포함하는 에스트로겐 수용체 관련 질환 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 약학 조성물은 의약적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

본 발명에서 상기 에스트로겐 수용체 관련 질환은 남성 이차 성선기능저하증, 인슐린 비의존성 당뇨병, 지방이영양증, 불임증, 남성전립선비대증, 전립선암, 난소암 또는 유방암일 수 있다.

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

- [0048] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 ER에 대한 일부 인비트로 길항 활성을 나타내고(실험예 1), 기존 엔클로미펜의 투약에 비하여 당부가 엔클로미펜 유도체들의 생체이용률이 향상(실험예 2)됨을 나타내므로 기존 투여량을 낮출 수 있을 뿐 만 아니라 장기 투여에 대한 부작용을 일부 개선할 수 있는 제형으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시예에 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.
- [0050] 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.
- [0051] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캡셀제, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산의 마그네슘염, 스테아르산의 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분, 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [0052] 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.
- [0053] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001~1,000 mg/일이고, 바람직하게는 0.01~500mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0055] 또한, 본 발명은 서열번호 3의 염기 서열의 전부를 포함하는 당전이 효소(MrGT2) 유전자를 제공한다.
- [0056] 본 발명의 일 태양에서, 상기 GT는 마이크로모노스포라 로도랑지아 균주 유래의 당전이 효소 MrGT2일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0057] 또한, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열의 전부를 포함하는 MrGT2를 제공한다.
- [0058] 또한, 본 발명은 1) 방선균 유래 재조합 GT 효소를 대장균에서 얻는 단계 및 2) 인간 유래 재조합 CYP와 상기 1) 단계에서 얻어진 재조합 GT(즉, MrGT2)의 순차적 효소반응으로 얻어진 주요 산물 총 4종의 당부가 엔클로펜 유도체들을 얻는 단계를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [0059] 본 발명의 제조방법은 3) 상기 2) 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.
- [0060] 본 발명에서, 상기 1) 단계의 재조합 당전이 효소는 마이크로모노스포라 로도랑지아로부터 분리할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0061] 본 발명에서, 상기 1) 단계의 재조합 당전이 효소는 바람직하게는 MrGT2이고, 더욱 바람직하게는 대장균에서 발현된 MrGT2이다.
- [0062] 본 발명에서, 상기 3) 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 방법에 사용되는 고정상은 역상 C18일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0063] 본 발명에서, 상기 3) 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 방법에 사용되는 이동상은 메탄올:물:포름산

65:35:0.2(v/v/v/v) 혼합액일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0064] 본 발명에서, 상기 3) 단계에서 중압 액체 크로마토그래피 유지 시간(Retention time)은 14~16분일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0068] [실시예]

[0069] **실시예 1~2: 당부가 엔클로미펜 유도체들의 제조**

[0070] **(1) 마이크로모노스포라 로도랑지아 유전체로부터 GT 암호화 유전자의 분리**

[0071] 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.

[0073] 서열번호 1: 5' - GGCATATGATCCACGCGCACGACTTCGGATG - 3' (NdeI 제한위치)

[0074] 서열번호 2: 5' - CGCTCGAGATTCGGCCTGCGCCTCCCACGTCCA - 3' (XhoI 제한위치)

[0076] 상기 균주의 유전체 DNA 및 상기 프라이머들을 Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)와 함께 혼합하여 전체 32 사이클을 수행하였다(초기 불활성 98에서 5분, 52.8에서 69.3로 기울기 반응 후, 72에서 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 42에서 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. 전체 ORF의 염기서열은 1146bp이며, 그 번역 후 단백질은 총 381개의 아미노산으로 구성(총 41.1kDa)되어 있다.

[0077] 서열번호 3:

ATGCGCATCC	TCATCGCCAC	CGCCGGCTCG	CGGGGCGACG	TGGCCCCGTA	50
CACCGGCCTC	GGCGCGGCCC	TGCGGCGCGC	GGGGTACGAC	GTGGCCGTCG	100
CCACGACCGA	CACGTTCGCC	CGGATGGTCC	GGGACGCCGG	CCTGGGGTTC	150
CGCCGGCTCC	CGGCCGACAC	CCGCGGCCAC	GCGGGCGTGC	GCTCCAACCG	200
CGAGGTCGTG	CGCGCGGCCG	GCGTTCACCG	CGGAACTCGG	CCAGCGCTTC	250
GCCGACGCGC	CGTCTCGGAG	GGCACGGACC	TCCTGCTGCT	GTCGACGACC	300
ACCGCGCCGC	TGCGGTGGCT	CATCGGCGAG	GCGACGGCCA	TCCGGTACCT	350
CCGGCTCTAC	CTCCAGCCCA	CCGCCACCAC	CGCCGACTTC	CCGCCGGTCG	400
TCACCGGCGC	GCGCTCCCTG	GGGCGGCTCG	GCAACCGCAC	GGCCGGCCGC	450
CTGGCCCTGC	GCATGGCCGA	CCGGATCTAC	GCCGAGGCCG	TCGCGCGCCT	500
GCGGGAGCGG	CTGTGCCTGC	CGCCGCTGTC	CGCGGCCCGC	ATGCCGGCGC	550
GGCAGGAGCG	GGCCGGCTGG	CCCGTCCTGC	ACGGCTTCGG	CACGGCCCTC	600
GTCCCGCGGC	CGGCCGACTG	GCGCCCCGGC	CTCGAGGTCG	TCGGGCCGTG	650
GTGGCCGCAC	CACGACGCCG	GCGAGCGCCT	GCCCTCGGAA	CTCGAGGACT	700
TCCTGGACGC	GGGACCGCGG	CCGGTCCTGG	TGCGCTTCGG	CAGCATGGCC	750
GCCCGGCACG	GCGAGCGGCT	CAGCGAACTG	GCGGTGCGCG	CGCTGCGCCG	800
CGCCGGCCTC	CGCGGCATCC	TCCAGTCCGG	CAACGCCTGC	CTCGCGGCGG	850
AGGGCGACGA	CGTCTGACG	GTCGGCGACG	TCCCCACGC	CCTCCTGTTC	900
CCCCGGCTCG	CGGCGGTGGT	GCACCACGCG	CGCCGGCACC	AGCGCCGCGA	950
CCCTGCGGGC	GGCCGTACCC	TCGGTGGCGG	TCCCGGTGAC	CGCCGACCAG	1000
AGCCGTTCTG	GGCCGGCCGG	CTGGCGCGGA	TCCGGGCCGC	CCCAGCCCCG	1050
GTCCCCTTCA	CGTCGTCGGC	GACGAGGCGT	ACGCGCGGGC	CCCTGGGCCG	1100
CCGCCGCCCG	GACCTGGCCG	CGGAGGACGG	CGCCGCGCGC	GTGTGA	1146

[0078]

[0079] 서열번호 4:

MRILIATAGSRGDVAPYTG	LGAAALRRAGYDVA	VATTDTFARMVRDAGL	GFRRLPADTRGH	60
AGVRSNREVVRAAGVHRG	TRPALRRRAVSEGT	DLLLLSTTTAPLRWL	LIGEATAIRYLRLY	120
LQPTATTADFPVVTGAR	SLGRLGNRTAGRL	LALRMADRIYAEAV	ARLRERLCLPLSAAA	180
MPARQERAGWPVLHGF	TALVPRPADWRP	GLEVVGPWWPHD	AGERLPSELEDFLD	240
PVLVRFGSMAARHGERL	SELAVRALRRAGL	RILQSGNACLA	AEAGDDVLTVDVPHALLF	300
PRLAAVVHHARRHQRRD	PAGGRTLGGGPG	DRRPEPFWAGRL	ARIRAAPVPFTSSATRR	360
TRGPLGRRRPDLAAED	GAAARV			381

[0080]

[0082] (2) 대장균에서 재조합 당전이 효소 MrGT2의 발현

[0083] 상기 T-이지 벡터를 *NdeI*과 *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 50ppm을 사용하였다.

[0084] 상기 재조합 대장균을 전술한 항생제와 최종 농도 1 M의 소르비톨(sorbitol) 및 2.5mM 베타인(betaine)이 첨가된 LB 배지(Luria Bertani)에 1% 부피비로 접종한 후, 30에서 배양하였고, 광학농도(optical density) 0.6~0.8 사이로 성장이 확인될 때, 단백질 발현을 유도시키고자, 최종 농도 0.5mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside, IPTG; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하였다. 재조합 대장균 균주를 22에서 18시간 추가 배양하였다. 배양 후 배양액을 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 50mM 인산나트륨 용균(lysis) 완충용액(300mM NaCl, 10mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100)에 균체를 용해시키고, 초음파 분해(sonication)를 실시하였다. 이 후, 12000rpm에서 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 50mM 인산 완충용액(0.3M NaCl, 20mM imidazole)으로 평형화된 탈론-금속 친화성 수지(Talon-metal affinity resin, Clontech, Mountain View, CA, USA)와 섞은 후 4에서 한시간 동안 배양하였다. 2000rpm에서 5분간 냉장 원심분리한 후, 수지를 일회용 컬럼에 도입한 후, 수지 10배 용량의 50mM 이미다졸을 포함하는 인산 완충용액으로 세척하였다. 최종적으로 150mM 이미다졸을 포함한 인산 완충용액 3 ml로 수지에 결합된 재조합 당전이 효소 MrGT2를 정제하였다.

[0085] (3) 인간 유래 재조합 CYP들과 방선균 유래 재조합 MrGT2 연쇄 효소 반응에 의한 엔클로미펜의 당전이 유도체로 생전환, 분리 및 정제

[0086] 기질로 사용되는 엔클로미펜(enclofenone 혹은 [E]-clomifene, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)을 20mM 수준으로 디메틸설폭시드(dimethyl sulfoxide; 이하 DMSO)에 용해한 후, 반응 완충용액(50mM 인산 완충용액, 10mM 염화마그네슘)으로 최종 1mM의 농도가 되게 각각을 희석한 후, BD Gentest사 (Woburn, MA, USA)에서 구입한 인간 유래 재조합 CYP(CYP2D6, CYP3A4 그리고 CYP3A5, 각각 20uM 수준), 재조합 당전이 효소 MrGT2 25uM와 핵산당인 UDP-Glc 및 TDP-2'-deoxy-Glc 각각 2mM의 수준으로, 그리고 CYP의 산화 반응을 위한 NADH조효소의 지속적 공급을 위하여 추가적으로 글루코스 6-인산(10mM, Sigma-Aldrich), NADP⁺(1mM, Sigma-Aldrich) 및 글루코스 6-인산 탈수효소(8U/ml 수준, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 37에서 2시간 동안 원뿔 반응을 실시하였다(도 1). 반응 후, 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 6000rpm에서 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) 혼합액을 분당 140 μ l 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18(Waters, 50x1.0mm, 1.7 μ m; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다.

[0087] 한편, 상기 조추출물로부터 목적하는 당부가 SERM 유도체들의 분리 및 정제를 위하여 하기 콤플렉스 Rf MPLC 시스템을 적용하였다. 역상(reverse-phased) C18 카트리지에 메탄올:물:포름산 65:35:0.2(v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 15ml의 속도로 흘려가는 MPLC 시스템에, 동일한 이동상 6ml에 용해시킨 전술한 조추출물을 주입한 후, 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분취를 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 엔클로미펜은 MPLC 시스템 상 약 17~18분의 유지 시간으로 분취되었고, 목적하는 당부가 유도체들은 기질보다 빠른 유지 시간인 14~16분으로 검출되었다. 이들 정제된 당부가 화합물은 도 1에 나타내었다. 핵산당으로 UDP-Glc 당공여체를 이용한 생전환 반응의 수율은 약 40% 정도로 반응이 일어났으나, TDP-2'-deoxy-Glc의 경우엔 그 생전환 수율이 25% 이하 수준으로 상대적으로 낮게 나타난 바, 이는 당전이 효소의 당수용체 및 당공여체 기질들에 대한 특이성의 차이를 제시하였다.

[0088] NMR 시료들은 200 μ l의 DMSO-d₆에 각 유도체들을 용해시킨 후, 5mm 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브(Shigemi advanced NMR microtube, Sigma, St. Louis, MO)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. ¹³C NMR 스펙트럼은 배리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298 K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이터 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 당부가 SERM 유도체들의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 기질로 사용한 SERM들과 비교하였다.

[0089] 엔클로미펜 4-O-글루코사이드(**E1**; 22.3mg; 생전환율 42%; ¹³C NMR [125 MHz, DMSO-d₆] δ 13.2, 49.7, 54.0, 62.1, 66.8, 71.4, 73.2, 76.8, 81.3, 109.0, 114.1, 120.3, 127.6, 128.4, 129.1, 130.1, 131.1, 131.8, 137.3, 156.2, 158.3)

[0090] N-데스에틸-엔클로미펜 4-O-글루코사이드(**E2**, 20.7mg; 생전환율 38%; ¹³C NMR [125 MHz, DMSO-d₆] δ 15.5, 44.2, 49.2, 62.1, 68.9, 71.4, 73.4, 76.8, 81.5, 109.1, 114.1, 120.3, 127.6, 128.4, 129.1, 130.1, 131.1, 131.8, 137.3, 156.2, 158.3)

[0091] 엔클로미펜 4-O-2'-디옥시 글루코사이드(**E3**, 13.0mg; 생전환율 24%; ¹³C NMR [125 MHz, DMSO-d₆] δ 13.2, 37.6, 49.8, 54.1, 62.1, 66.8, 68.9, 71.3, 81.4, 104.4, 114.1, 120.3, 127.6, 128.4, 129.1, 130.1, 131.1, 131.8, 137.5, 156.4, 158.6)

[0092] N-데스에틸-엔클로미펜 4-O-2'-디옥시 글루코사이드(**E4**, 11.3mg; 생전환율 20%; ¹³C NMR [125 MHz, DMSO-d₆] δ 15.5, 37.5, 44.2, 49.3, 62.1, 68.8, 71.4, 81.4, 104.6, 114.1, 120.3, 127.6, 128.4, 129.1, 130.1,

131.1, 131.7, 137.5, 156.6, 158.6)

[0094] **실험예 1: 당부가 엔클로미펜 유도체들의 에스트로겐 수용체 α(ER α)에 대한 길항 활성 검증**

[0095] 생전환 된 당전이 SERM 유도체들의 에스트로겐 수용체 α(ER α)에 대한 결합 친화도(binding affinity)를 검증하기 위하여 NR peptide ER α ELISA 키트(ActiveMotif, Carlsbad, CA, 미국)를 사용하였으며, 그 경쟁 대조군으로 에스트라디올(17β-estradiol)을 이용하였다. 세부적인 실험 방법은 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. DMSO에 용해된 각 대조구들을 키트 내 포함되어 있는 완충용액으로 희석하여 25μM 수준으로 준비하였고, 96-웰 마이크로플레이트(96-well microplate) 내 각각의 웰 당 키트 제조사의 프로토콜에 따라서 핵 추출물(nuclear extract)을 15ug 수준으로 첨가하였다. 한편, 당부가 유도체들의 경우에도 25 μM 수준으로 시료를 준비하였다. 에스트로겐 수용체 α(ER α)에 대한 활성도는 최종 흡광도 450nm의 마이크로플레이트 리더(microplate reader)로 정량화 하였으며, 모든 검정은 최소 삼 반복의 평균 값 및 표준 편차로 표시하였다. 그 결과, 양성 길항 대조구인 엔클로미펜은 25μM 수준에서 ER α에 대한 길항 활성이 뚜렷이 나타났다. 한편, 당부가 엔클로미펜 유도체 총 4종의 경우에도 모두 25 μM 수준에서 통계적으로 유의한 길항 활성을 보였다. 위 결과는 상기 당부가 유도체들이 검정 시 첨가되는 핵 추출물 내 ER α 외에 존재하는 대사 효소계(즉, 글루코시다아제(glucosidase 등)의 반응을 통하여 당부가 이전의 엔클로미펜 활성대사체로 전환되어 길항 활성을 제공하고 있음을 제시하고 있다.

[0096] 따라서, 본 발명의 당부가 엔클로미펜 유도체들은 에스트로겐 수용체 α(ER α)에 대하여 모두 엔클로미펜 양성 대조구와 유사한 길항 활성이 유지되고 있음을 확인할 수 있었다.

[0098] **실험예 2: 당부가 엔클로미펜 유도체들의 생체이용률 비교**

[0099] 상기 실시예에 의해 생성된 당부가 엔클로미펜 유도체들의 생체이용률을 자궁 절개된 실험 쥐 모델을 활용하여 기존 임상 이용 중인 클로미펜을 대조구로 하여 비교하고자 하였다. 세부적인 실험예는 아래와 같이 진행하였다. 약 150g 정도의 암컷 쥐에 자궁 절개 수술을 행한 일주일 후 본 실험에 활용되었다. 4마리를 각각의 하나의 처리 그룹으로 설계하여 총 여섯 그룹(즉, 한 그룹은 플라시보(placebo)이며, 또 다른 한 그룹은 클로미펜 처리 대조 그룹으로, 나머지 네 그룹은 각각의 당부가 유도체 처리 그룹)하여 투약 전 체중을 측정하였다. 하루에 한번 3μmole 수준으로 경구 투여로 일주일을 지속한 후, 마지막 투여 후 24시간 이후 각 그룹 내 쥐들의 체중을 측정하는 동시에 채혈을 실시하였다. 채혈 후, 전혈에 동일 부피의 에틸아세테이트로 처리하여 30초간 강하게 혼합한 후, 4000rpm에서 5분간 원심분리를 실시하였다. 이 후, 유기용매 상층을 분리하여 감압건조한 후 분석 전까지 -70에 보관하였다. 혈중 활성대사체인 4-OH-ECLOM 및 N-DE-4-OH-ECLOM 그리고 엔클로미펜(ECLOM)의 정량은 본 발명에서 제시한 HPLC-ESI-MS 기기분석으로 실시하였다. 한편, 총 여섯 처리 그룹 중 클로미펜과 당 부가 클로미펜 유도체 처리 그룹 총 5개 그룹의 경우, 생체 이용률의 정밀한 비교를 위하여 마지막 투여 후 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 그리고 72시간까지 채혈을 실시하였다. 시간대 별 채혈 시료들은 상기 시료 추출법에 맞추어 동일하게 준비한 후, 활성대사체인 4-OH-ECLOM 및 N-DE-4-OH-ECLOM 그리고 엔클로미펜(ECLOM)의 정량을 HPLC-ESI-MS 기기분석으로 실시하였다.

[0100] 그 결과, 투여 전 쥐의 체중은 모든 그룹에서 일정하게 나타났으나, 마지막 투여를 마친 후 24 시간 후에 각 그룹들의 평균 체중을 측정한 바, 플라시보 투여 그룹에서 체중의 증가(약 28~33g 정도)를 확인하였다. 한편, 클로미펜의 활성대사체인 4-OH-ECLOM 및 N-DE-4-OH-ECLOM 혈중 농도는 클로미펜 처리 대조 그룹과 비교하여 모든 처리 그룹에서 그 활성대사체들의 혈중 농도가 다소 높게 유지됨을 확인할 수 있었다(도 3). 이 때 당부가 엔클로미펜 유도체들과 생전환 전 엔클로미펜을 자궁 절개 수술 후 쥐에 일주일 간 하루에 한번 3μmole 수준으로 경구 투여한 다음, 마지막 투여 후 24시간에 채혈하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 실험예 1의 결과와 마찬가지로 당부가 유도체들이 활성대사체인 4-OH-ECLOM 및 N-DE-4-OH-ECLOM으로 대사되는 프로드럭의 기능이 가능함을 보여주고 있을 뿐만 아니라, 당부가 유도체들의 경우 활성 대사체의 직접적인 경구 투여보다 혈액 순환계에 상대적으로 오랜 기간 잔존할 수 있음을 시사하고 있다.

[0101] 한편, 보다 정확하게 당부가 클로미펜의 클로미펜 대비 생체이용률의 향상 정도를 확인하기 위하여 약물동력학적 분석을 실시하였다. 즉, 각 처리 그룹에서 준비된 72시간까지의 12구획의 혈장 시료로 부터 엔클로미펜 및 그 활성대사체들의 총 농도를 기기분석으로 분석한 후, 시간에 따른 혈장 내 엔클로미펜 및 그 활성대사체들의 농도 변화를 그래프로 나타내었다. 약물동력학 파라미터들은 WinNonlin Professional 소프트웨어(version 5.1; Pharsight Co., Mountain View, CA, USA)의 비구획적 분석(non-compartmental analysis)법을 통하여 측정하였

다. 각 처리 그룹들의 약물동력학 지표로 최고 혈중 농도(C_{max} , peak concentration), 최고 혈중 농도 도달 시간(T_{max} , peak time), 곡선하면적(AUC_{72hr} , area under curve) 파라미터를 측정하여 표 1에 나타내었다.

[표 1]

Parameter/ mean(SD)	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (hr)	AUC_{0-72} (ng h/ml)
—○— Enclomifene	27.3(1.1)	5.7(0.3)	72.2(3.1)
—□— E1	27.7(0.8)	6.2(0.4)	92.6(3.7)
—■— E2	27.0(1.1)	6.5(0.5)	101.5(4.0)
—△— E3	27.2(1.3)	6.2(0.3)	93.7(3.9)
—▲— E4	27.5(1.0)	6.6(0.4)	102.1(4.6)

도 4에 나타난 바와 같이, 클로미펜 처리 대조 그룹에 비하여, 나머지 당 부가 클로미펜 처리 네 그룹들의 곡선하면적들이 높게 나타났다. 다만, 4종의 당부가 클로미펜 유도체 처리 그룹들 간에 있어서는 곡선하면적에 눈에 띄는 차이를 확인할 수는 없었으나, 글루코스 부가된 클로미펜 글루코사이드 유도체들(E1과 E3)에 비하여 디옥시글루코스 부가된 클로미펜 디옥시글루코사이드 유도체들(E2과 E4)의 처리 결과에서 다소 높은 곡선하면적 값이 나타났다. 한편, 대조 그룹을 포함한 전체 처리 그룹들의 최고 혈중 농도들의 분포는 모두 유의 수준 내로 차이가 나타나지 않았으나, 최고 혈중 농도 도달 시간의 경우엔 클로미펜 대조 처리 그룹에 비하여 나머지 4종의 당 부가 유도체 처리 그룹들에서 다소 높게 나타났다. 이는 각 처리 그룹 내 투여 화합물의 간 대사속도에는 차이가 나타나지 않았으나, 투여 화합물들의 혈 중 머무름 시간에는 차이가 있음을 보여주고 있으며, 곡선하면적 값 비교를 통하여 당 부가된 클로미펜 유도체들의 생체이용률이 당 부가 전 클로미펜의 생체이용률 보다 1.2배에서 1.4배 향상됨을 제시하는데 성공하였다. 따라서, 당 부가 유도체 내에서도 디옥시글루코사이드 유도체들(E2와 E4)의 상대적으로 향상된 생체이용률은 프로드럭으로의 이용 가능성을 제시하고 있다. 이를 통하여 기존 에스트로겐 수용체 조절제 투약 시 문제점 중 하나인 장기 투약에 따른 문제점을 실시예에 의해 생성된 당부가 엔클로미펜 유도체들을 활용하여 해결할 수 있을 것이다.

상기 실시예에서 생성된 화합물에 대하여 하기와 같이 제제화하였다.

제제예 1: 정제(직접 가압)

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

제제예 2: 정제(습식 조립)

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

제제예 3: 분말과 캡슐제

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

이상의 결과에 나타난 바와 같이, 기존 약리 활성 화합물의 당 전이에 의한 구조 변형 유도체 생전환을 통하여 기존 화합물을 개량할 수 있으며, 이러한 개량화로서 기존 약물의 대체 가능한 프로드럭화 및 신규 제형(dosage

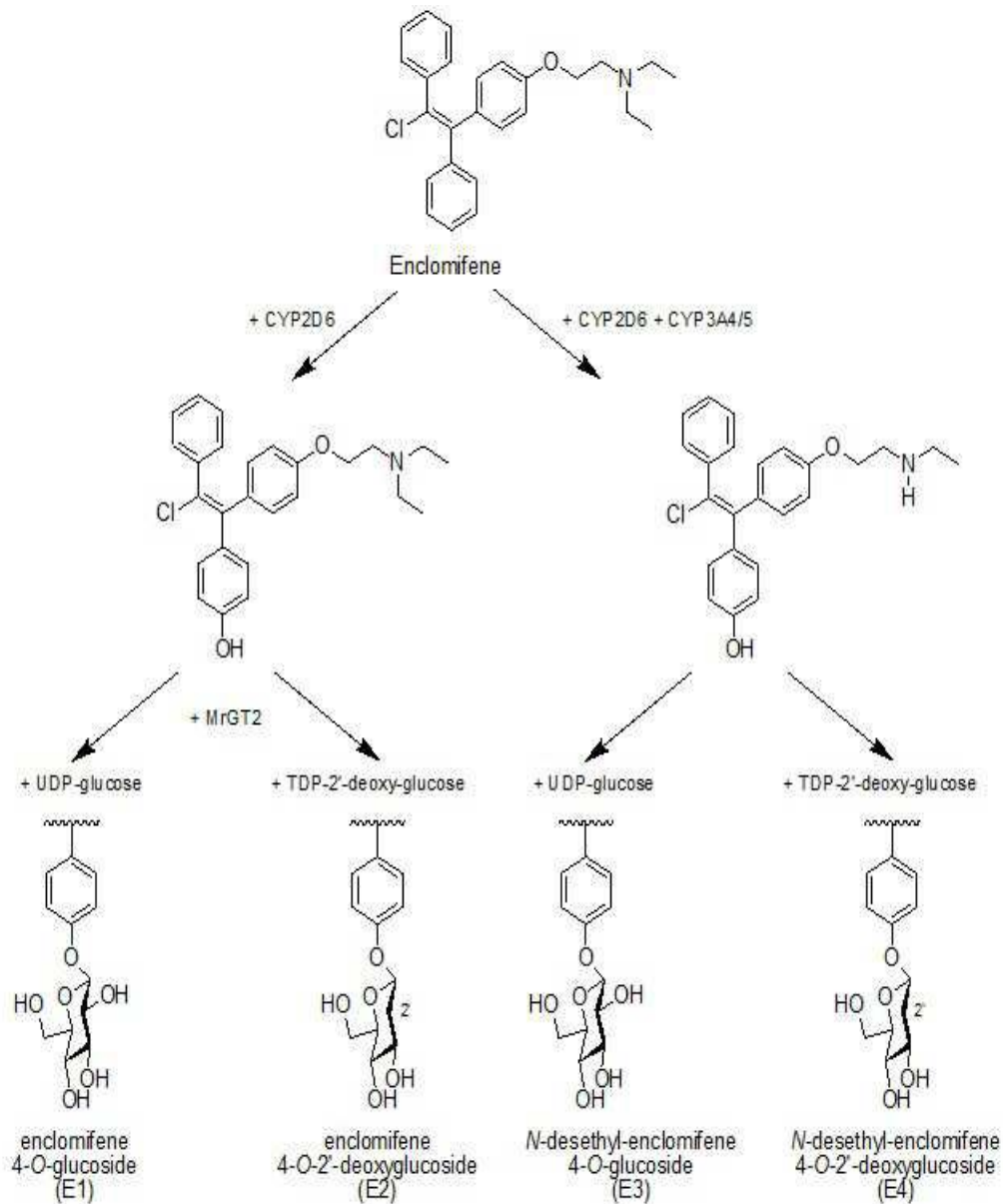
form)으로의 응용 가능성을 포함하는 의약품 및 의약품 원료로서의 활용 잠재성을 확인할 수 있다.

[0118]

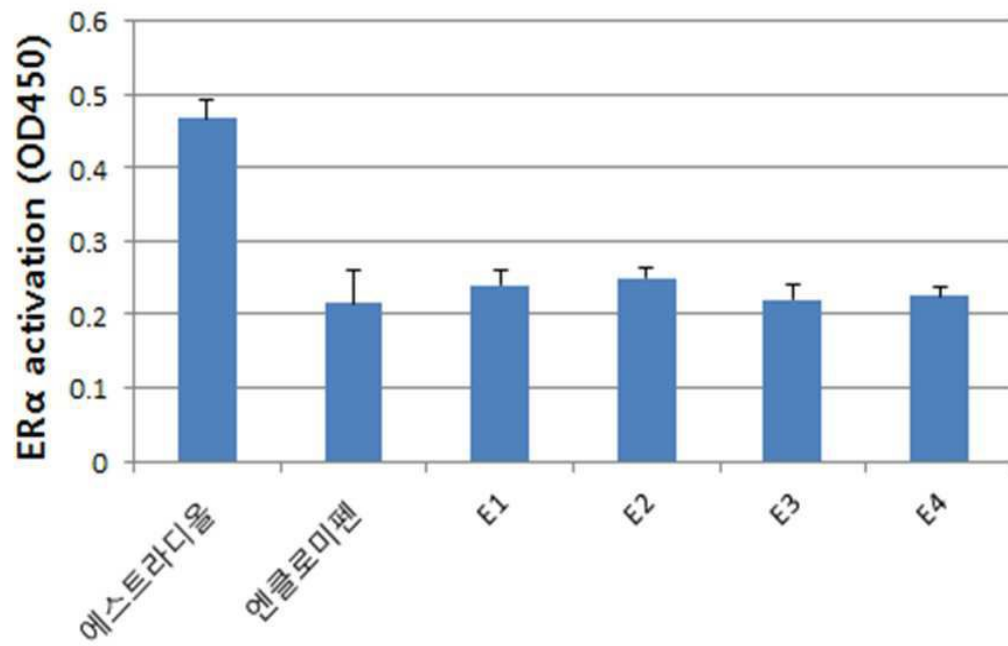
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

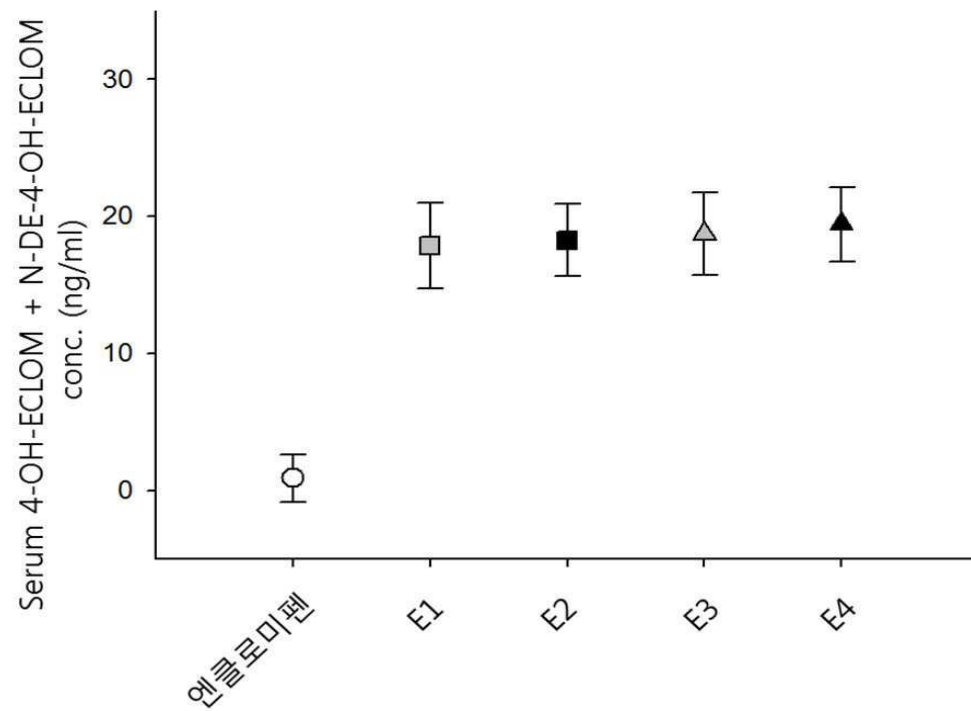
도면1



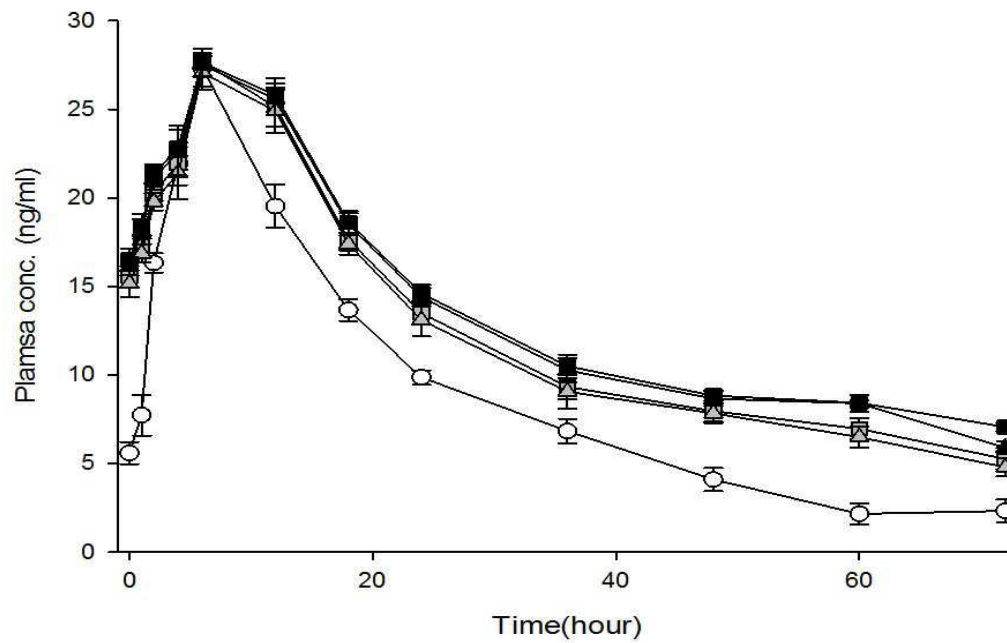
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Preparing Glycosylated Estrogen Receptor Modulators
Using Glycosyltransferase
- <130> P15-B199
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> P1
- <400> 1
- ggcatatgat ccacgcgcac gacttccgga tg
- <210> 2
- <211> 33
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> P2
- <400> 2

32

cgctcgagat tcggcctgcg cctcccacgt cca	33
<210> 3	
<211> 1146	
<212> DNA	
<213> Micromonospora rhodorangea	
<400> 3	
atgcgcaccc tcagcgccac cgccggccccg cggggcgacg gggccccgta caccggccgc	60
ggcgcgggccc ggcggcgcgcg ggggcacgac gtggccgtcg ccacgaccga cacgtcggcc	120
cgagtggtec gggagccccg gccagggttc cgggcccctcc cggccgacca ccgcgcgcac	180
gcgggctggc ggccccaccg cgaggtcgtg cgcgcggccg gcgggcaccg cggaaactccg	240
ccagccgttc gccgacgcgc cgtctcggag ggcacggacc tccggccgcg gccgacgacc	300
accgcgccgc tgcggtggct cagcggcgag gcgacggccc cccgggacct ccggcgcgac	360
caccagccca ccgccaccac cgccgacggc ccgccgtcg tcaccggcgc gcgtccctg	420
gggcggcccc gcaaccgcac ggccggccgc ctggccctgc gcatggccga ccgatctac	480
gccgaggccg tcgcgcgcct gcgggagcgg ctgtgcctgc cgcgctgtc cgcggccgcg	540
atgccggcgc ggcaggagcg ggccggctgg cccgtcctgc acggttcgg cacggccctc	600
gtcccgggcg cggccgactg gcgccccggc ctcgaggtcg tcgggcccgtg gtggccgcac	660
cacgacgccg gcgagcgctt gccctcgga ctcgaggact tcctggacgc gggaccgcgg	720
ccggtcctgg tgcgttcgg cagcatggcc gcccggcacg gcgagcggt cagcgaactg	780
gcggtgcgcg cgctgcgccg cgccggcctc cgcggcatcc tccagtccgg caacgcctgc	840
ctcgcggcgg agggcgacga cgtcctgacg gtgcggcagc tccccacgc cctcctgttc	900
ccccggctcg cggcgggtgt gcaccacgcg cgccggcacc agcgcgcga ccctgcgggc	960
ggccgtacct tcggtggcgg tcccgtgac cgcgaccag agccgttctg ggccggccgg	1020
ctggcgcgga tccgggccgc ccagccccg gtccccctca cgtcgtcggc gacgaggcgt	1080
acgcgcgggc ccctgggccg ccgcgcgccg gacctggccg cggaggacgg cgcgcgcgc	1140
gtgtga	1146
<210> 4	
<211> 381	
<212> PRT	
<213> Micromonospora rhodorangea	
<400> 4	
Met Arg Thr Leu Ser Ala Thr Ala Gly Pro Arg Gly Asp Gly Ala Pro	

1 5 10 15
 Tyr Thr Gly Arg Gly Ala Ala Arg Arg Arg Ala Gly His Asp Val Ala
 20 25 30
 Val Ala Thr Thr Asp Thr Ser Ala Arg Val Val Arg Glu Pro Gly Pro
 35 40 45

 Gly Phe Arg Ala Leu Pro Ala Asp His Arg Ala His Ala Gly Trp Arg
 50 55 60
 Pro His Arg Glu Val Val Arg Ala Ala Gly Gly His Arg Gly Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Ala Val Arg Arg Arg Ala Val Ser Glu Gly Thr Asp Leu Arg Pro
 85 90 95
 Arg Pro Thr Thr Thr Ala Pro Leu Arg Trp Leu Ser Gly Glu Ala Thr
 100 105 110
 Ala Pro Arg Asp Leu Arg Arg Asp His Gln Pro Thr Ala Thr Thr Ala

 115 120 125
 Asp Gly Pro Pro Val Val Thr Gly Ala Arg Ser Leu Gly Arg Pro Gly
 130 135 140
 Asn Arg Thr Ala Gly Arg Leu Ala Leu Arg Met Ala Asp Arg Ile Tyr
 145 150 155 160
 Ala Glu Ala Val Ala Arg Leu Arg Glu Arg Leu Cys Leu Pro Pro Leu
 165 170 175
 Ser Ala Ala Ala Met Pro Ala Arg Gln Glu Arg Ala Gly Trp Pro Val
 180 185 190

 Leu His Gly Phe Gly Thr Ala Leu Val Pro Arg Pro Ala Asp Trp Arg
 195 200 205
 Pro Gly Leu Glu Val Val Gly Pro Trp Trp Pro His His Asp Ala Gly
 210 215 220
 Glu Arg Leu Pro Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Asp Ala Gly Pro Arg
 225 230 235 240
 Pro Val Leu Val Arg Phe Gly Ser Met Ala Ala Arg His Gly Glu Arg
 245 250 255

Leu Ser Glu Leu Ala Val Arg Ala Leu Arg Arg Ala Gly Leu Arg Gly

260 265 270

Ile Leu Gln Ser Gly Asn Ala Cys Leu Ala Ala Glu Gly Asp Asp Val

275 280 285

Leu Thr Val Gly Asp Val Pro His Ala Leu Leu Phe Pro Arg Leu Ala

290 295 300

Ala Val Val His His Ala Arg Arg His Gln Arg Arg Asp Pro Ala Gly

305 310 315 320

Gly Arg Thr Leu Gly Gly Gly Pro Gly Asp Arg Arg Pro Glu Pro Phe

325 330 335

Trp Ala Gly Arg Leu Ala Arg Ile Arg Ala Ala Pro Ala Pro Val Pro

340 345 350

Phe Thr Ser Ser Ala Thr Arg Arg Thr Arg Gly Pro Leu Gly Arg Arg

355 360 365

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

370 375 380