(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월16일
(11) 등록번호 10-1512485
(24) 등록일자 2015년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) *A61K 31/4162* (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0039066
(22) 출원일자 2013년04월10일
심사청구일자 2013년04월10일
(65) 공개번호 10-2014-0122422
(43) 공개일자 2014년10월20일
(56) 선행기술조사문헌
Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol.107(20), pp.9446-945*
Bone. Vol.48(5), pp.1075-1086*
US20130084275 A1
KR1020120068607 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
김성환
대전 유성구 가정로 65, 101동 801호 (신성동, 대림두레아파트)
최식원
대전 서구 도안동로 177, 107동 601호 (도안동, 도안신도시수목토아파트)
(74) 대리인
손민

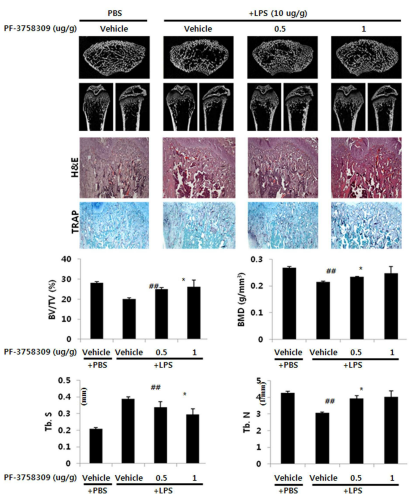
전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 보다 자세하게 본 발명의 조성물은 파골세포의 분화 및 활성을 억제시키는 효과가 있어, 골다공증 등으로 인한 골손실을 억제할 수 있으므로, 이들 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 SI-1304
부처명 기획예산처
연구관리전문기관 산업기술연구회
연구사업명 정부출연 일반사업
연구과제명 생명통합정보시스템 활용 독창적 신약개발협동연구사업
기 여 율 1/1
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

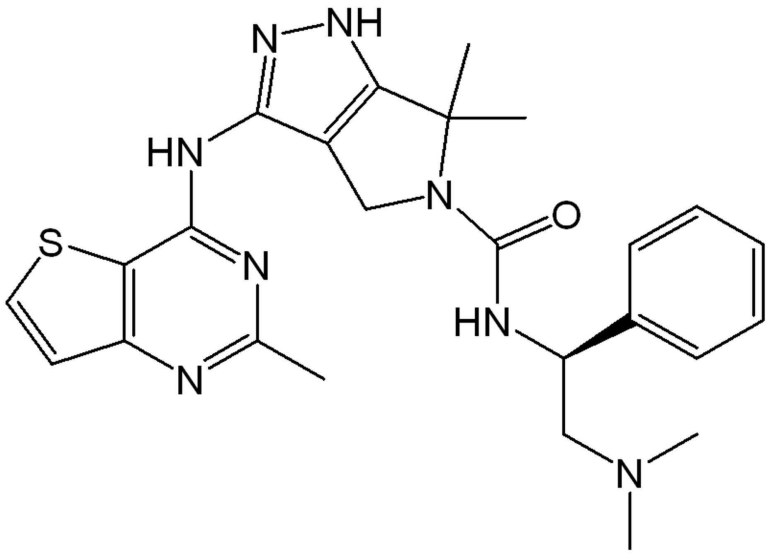
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 분리된 파골세포 형성(osteoclastogenesis) 억제용 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

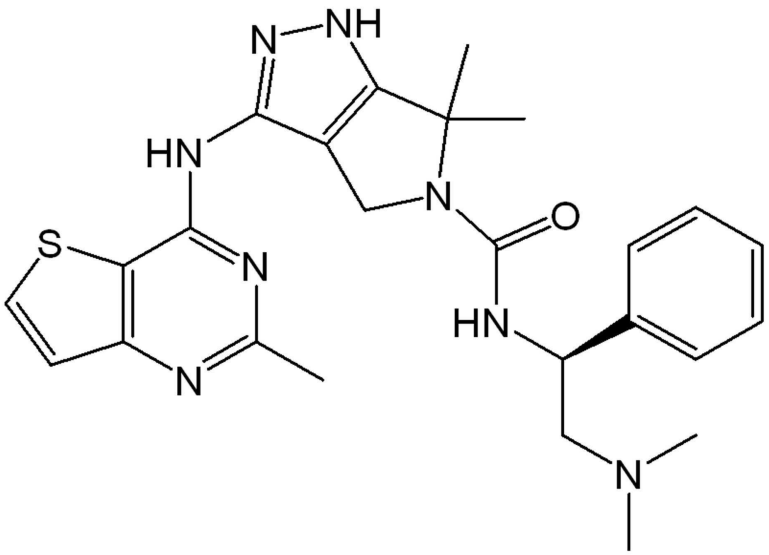
청구항 5

삭제

청구항 6

분리된 골수세포를 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 광학이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 존재 하에 배양하는 단계를 포함하는, 파골세포의 형성(osteoclastogenesis)을 억제하는 방법:

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 화학식 1로 표시되는 화합물의 신규 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골조직은 연골 및 골격계를 구성하며 기계적 기능으로 지지와 근 부착의 역할을 하고, 생체기관 및 골수를 보호하는 기능을 한다. 또한 칼슘과 인 이온의 항상성 유지를 위해 이들을 보존하는 기능을 담당한다. 골은 매일 조금씩 분해되고, 분해된 양에 비례하여 새로운 골이 형성됨으로써 항상성을 유지하는 매우 역동적인 조직이다. 구체적으로 골은 파골세포에 의한 골흡수, 골아세포에 의한 골형성 및 휴지기를 포함하여 약 120 내지 150일 주기의 순환을 반복하고 있다. 건강한 성인의 경우, 골흡수와 골형성은 엄밀하게 콘트롤되고, 종합 골량은 거의 변화하지 않고 일정 수준을 유지한다.

[0003] 조골세포는 간엽줄기세포에서 기원하여 형성되는데 조골세포의 분화에 의한 칼슘형성과 같은 무기질화는 뼈의 강도를 유지시켜줄 뿐만 아니라, 신체 전체의 칼슘 및 호르몬 대사의 항상성에도 매우 중요한 기능을 한다. 조골세포의 분화에 의한 칼슘형성은 비타민 D 및 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone) 등에 의해 조절되며, 조골세포의 분화에 의한 골형성은 세포 내에서 뼈 형태형성 단백질(bone morphogenetic protein; BMP), Wnt, MAP 키나아제, 칼시뉴린-칼모듈린 키나아제(calcineurin-calmodulin kinase), NF-κB, AP-1 등의 다양한 신호전달 체계의 상호작용(cross-talk)에 의해 조골세포의 분화와 관련된 알칼린 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)가 초기 분화단계에서 합성된 후, 무기질화와 관련된 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin), 제1형 콜라겐(type 1 collagen) 등이 합성됨으로써 이루어진다고 알려져 있다(Pittenger, M. F. *et al.*, Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science*, 1999, 284: 143-147). 즉, 알칼린 포스파타제의 활성을 촉진하는 화합물들은 골세포의 분화를 촉진하므로 골질환 치료제의 표적이 될 수 있다.

[0004] 한편, 파골세포는 뼈가 성장하도록 하기 위하여 석회화한 연골 및 뼈조직을 녹이는 세포로서 다핵거대세포이다. 상기 파골세포는 조골세포에서 분비되는 RANKL(receptor activator of NF-κB ligand)와 M-CSF(macrophage colony stimulating receptor)가 파골세포 표면에 있는 수용체와 결합하게 되어 분화가 일어난다.

[0005] 상기 조골세포와 파골세포의 상호작용의 균형이 깨지게 되면 전신적(systemic) 또는 국부적(local) 골질환을 일

으키게 된다. 상기 질병들은 대부분 파골세포의 수와 활성의 증가로 인한 것으로 알려져 있다. 이러한 파골세포의 활성증가로 인해 야기되는 질환에는 골절, 류마티스 관절염, 원발성 골종양, 암의 골전이 등이 있다. 또한 나이든 사람에게 많이 나타나는 원활하지 못한 혈액순환으로 인하여 일시적 또는 만성적으로 산소장력(oxygen tension)이 정상 골보다 낮은 상태가 되는 현상인 저산소증(hypoxia)이 발생한 산소함량이 부족한 골에서 파골세포의 활성이 증가하여 골상태의 악화를 초래하기도 한다.

[0006] 상기 골질환의 대표적인 예인 골다공증은 골형성과 골흡수의 평형이 깨져 골밀도가 약화되어 일어나는 질환으로, 현재 미국에서만 약 천만명이 이미 골다공증 질환을 앓고 있으며, 1천 8백만명이 골다공증의 발생 위험에 놓여 있다. 또한, 일생 동안 여성 2명 중 1명, 남성의 경우 8명 중 1명이 골다공증과 관련된 골절을 경험하며, 이미 2백만명 이상의 미국 남성들이 골다공증 질환을 앓고 있다. 미국에서는 골다공증과 관련된 질병과 골절로 인한 직접적인 지출이 매년 140억 달러에 달하고 있으며, 국내에서의 경우에도 약 400백만명이 골다공증에 걸려있거나 그 위험에 노출되어 있다. 이는 노령화 사회로 접어들면서 더욱 증가할 것으로 추정되어, 이로 인한 사회적 지출과 가족 구성원의 정신적, 경제적 지출이 증가할 것으로 예상된다.

[0007] 상기와 같은 골질환을 치료하기 위해서는 파골세포와 조골세포의 균형을 조절하는 것이 필요하며, 따라서 이에 대한 치료제로는 크게 골흡수 억제제 및 골형성 자극제가 있다. 일반적으로 상기 골흡수 억제제 또는 골형성 자극제 등의 골질환 치료제는 환자에게 장기 투여하여야 하기 때문에 독성이 적어야 하며, 투여의 번거로움을 해결하기 위하여 경구투여가 가능한 것이 바람직하므로, 이에 대한 연구가 절실히 필요한 실정이다. 한편, 상기 골질환 치료제 중 조골세포를 활성화 시킴으로써 골형성을 촉진하는 골형성 자극제에 대한 연구가 보다 활발하게 진행되고 있으나, 골형성 자극제로 인한 골밀도 강화가 반드시 골절의 감소를 의미하지는 않는다. 한편 현재 사용되고 있는 파골세포의 활성을 억제하는 골질환 치료제로는 데노수맙(Denosumab; Prolia™, Amgen®) 등이 있으며 이외에도 다양한 약물들이 개발되고 있으나, 약물치료는 장기간 지속되어야 함을 고려할 때 아직 부작용 등이 충분히 검증되지 않았으며, 파골세포의 정확한 메커니즘은 아직까지 밝혀지지 않은 상태이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 파골세포 형성을 억제함으로써 골손실을 감소시켜 골손실에 의해 유도되는 또는 골손실을 유발하는 질환의 발병 또는 진행을 억제할 수 있는 화합물을 찾고자 예의 노력한 결과, 항암제로 알려진 화합물인 PF-3758309가 파골세포의 형성 및 활성을 억제함으로써 골질환에 대한 예방 또는 치료효과를 갖는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

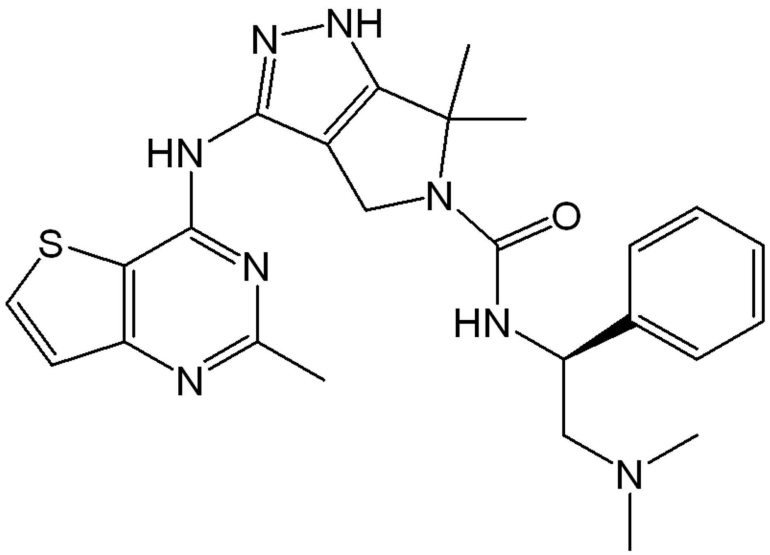
해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 (S)-N-(2-(디메틸아미노)-1-페닐에틸)-6,6-디메틸-3-(2-메틸티에노[3,2-d]피리미딘-4-일아미노)피롤로[3,4-c]피라졸-5(1H,4H,6H)-카르복사미드((S)-N-(2-(dimethylamino)-1-phenylethyl)-6,6-dimethyl-3-(2-methylthieno[3,2-d]pyrimidin-4-ylamino)pyrrolo[3,4-c]pyrazole-5(1H,4H,6H)-carboxamide)이다.

[0014] 상기 (S)-N-(2-(디메틸아미노)-1-페닐에틸)-6,6-디메틸-3-(2-메틸티에노[3,2 -d]피리미딘-4-일아미노)피롤로[3,4-c]피라졸-5(1H,4H,6H)-카르복사미드는 일명 PF-3758309라고도 불리는 화합물로써, 항암활성을 갖는 것으로 알려져 있다(B.W. Murray et al., PNAS, 2010, 107(20): 9446-9451). 그러나, 이의 골질환의 예방 또는 치료효과에 대해서는 알려진 바 없으며, 본 발명자들에 의해 최초로 규명되었다.

[0015] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 천연 공급원으로부터 분리되거나, 천연 공급원으로부터 수득하여 화학적인 개질에 의해 제조하거나, 또는 공지의 제조방법에 의해 당업자가 용이하게 화학적으로 합성하여 제조하거나, 상업적으로 제조된 상품일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 상기 PF-3758309 화합물을 상업적으로 구입하여 사용하였다.

[0016] 본 발명의 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 이성질체를 포함한다. "이성질체(isomer)"는 동일한 분자식을 갖지만 다른 구조식을 갖는 화합물을 의미하는 화학 용어이다. 상기 이성질체는 크게 구조이성질체(constitutional or structural isomer)와 입체이성질체(stereoisomer)로 구분된다. 구조이성질체는 원자 및 작용기가 서로 다른 방식으로 결합된 화합물을 지칭한다. 따라서 이들 이성질체는 서로 다른 화합물명을 가지는 경우가 일반적이며, 동일한 작용기에 속하거나 속하지 않을 수 있다. 상기 구조이성질체는 원자의 연결순서가 다르므로 치환기의 종류가 다르거나, 치환된 위치가 다르다. 상기 구조이성질체는 예컨대 탄화수소 사슬이 다양한 가지결합을 갖는 사슬이성질체(chain isomerism), 사슬의 다른 위치에 작용기가 결합된 위치이성질체(position isomerism) 및 하나의 작용기가 상이한 작용기들로 분해되는 작용기이성질체(functional group isomerism)를 포함한다. 한편, 입체성질체는 다시 부분입체이성질체(diastereomer)와 광학이성질체(enantiomer)로 세분화된다. 상기 부분입체이성질체는 시스-트랜스 이성질체, 이형태체(conformational isomer; conformer) 및 회전이성질체(rotamer)를 포함한다. 상기 이성질체는 치환기의 상대적인 위치 차이에 의한 것으로 특정 공유결합의 회전에 의해 발생하며, 이로 인해 입체적 환경이 달라지고 서로 다른 에너지 수준을 나타낸다. 마지막으로 광학이성질체는 광학활성을 갖는 두 분자가 서로 거울대칭인 경우를 의미한다. 따라서 이들 이성질체는 회전에 의해서는 서로 중첩되지 않으며, 4개 이상의 치환기가 결합된 원소 즉, 입체중심을 갖는다. 이들 이성질체는 동일한 화학식을 가지며, 대칭환경에서 편광을 제외하고 동일한 화학적 및/또는 물리적 특성을 갖는다. 편광면을 회전시키는 방식에 따라 시계방향으로 회전시키는 경우 (+) 또는 *d*(dextrorotatory)로 표기하고, 반시계방향으로 회전시키는 경우를 (-) 또는 *l*(levorotatory)로 표기한다. 또는 칸-인골드-프렐로그 우선법칙(Cahn-Ingold-Prelog priority rule)에 따라 치환기의 순위를 정하고 그 회전방향에 따라 (S) 또는 (R)로 구

분하여 표기할 수도 있다. 바람직하게 본 발명의 이성질체는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 광학이성질체이며, 상기 이성질체는 (R)-N-(2-(디메틸아미노)-1-페닐에틸)-6,6-디메틸-3-(2-메틸티에노[3,2-d]피리미딘-4-일아미노)피롤로[3,4-c]피라졸-5(1H,4H,6H)-카르복사미드이다.

[0017] 또한, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 이성질체는 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 또한 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합하거나 집합으로 사용될 수 있다.

[0018] 상기 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 이성질체의 약학적으로 허용가능한 염은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 제조된 염을 의미하며, 이러한 제조방법은 당업자에게 공지되어 있다. 구체적으로, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 약리학적 또는 생리학적으로 허용되는 하기 무기산과 유기산 및 염기로부터 유도된 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0019] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0020] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0021] 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 이성질체의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식 1의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0022] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 이성질체의 염으로는 약학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 화합물 또는 이의 이성질체와 동등한 파골세포 생성 또는 이동 억제효과를 나타내는 상기 화합물 또는 이의 이성질체의 염이면 제한없이 모두 사용 가능하다.

[0023] 본 발명의 조성물은 필요 이상의 파골세포의 존재로 인해 발생하는 골질환에 제한없이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명에서 사용된 용어, "골질환"은 파골세포의 과다한 생성 및/또는 이동으로 인해 나타나는 상태 또는 질병을 의미하는 것으로, 골량 저하 질환을 포함한다. 상기 골량 저하 질환이란 골밀도의 저하, 골조직의 열화 등의 증상을 수반하는 골량의 저하가 나타나는 상태 또는 질환을 의미하는 것으로, 이의 비제한적인 예로는 골다공증(osteoporosis), 파제트병(Paget's disease), 치주질환, 골성장장애 및 류마티스관절염 등이 있다. 또한 암세포에 의해 활성화되는 파골세포에 의한 골손실도 본 발명의 범주에 포함된다.

[0025] 바람직하게 본 발명의 조성물은 골다공증 또는 골감소증의 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다. 구체적으로 본 발명에서 사용된 용어, "골다공증"은 골량이 감소하고 질적인 변화로 인해 골절이 일어날 가능성이 있는 상태를 의미하며, "골감소증"이란 골다공증의 초기 증세를 의미한다. 일반적으로 골밀도 수치(T 수치)를 기준으로

-1.0 내지 -2.5인 경우 골감소증, -2.5 이상인 경우 골다공증으로 분류한다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어, "골질환의 예방 또는 치료"는 본 발명에 따른 조성물을 개체에 투여하여 달성되는 상기 골질환의 예방 및 완전한 또는 부분적인 치료를 포함한다. 이는 또한 골질환 증상의 감소, 개선, 그 증상의 고통 경감, 골질환 발생율 감소 또는 치료결과를 증가시키는 환자의 어떠한 다른 변화를 포함한다.

[0027] 본 발명에서 사용된 용어, "개체"는 골질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에게 투여하여 상기 골질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물은 기존의 골질환 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"란, 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 활성물질을 약 0.01 mg/kg/일 내지 1000 mg/kg/일의 용량으로 투여할 수 있다. 경구 투여하는 경우, 50 내지 500 mg/kg의 범위가 적합할 수 있으며, 1일 1회 이상 투여할 수 있다.

[0030] 바람직하게, 본 발명의 조성물은 파골세포의 생성 또는 이동을 억제하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 사용된 용어, "파골세포(osteoclast)"는 뼈가 자라도록 하기 위하여 석회화한 연골과 뼈조직을 녹이는 세포로 골 재흡수에 관여하는 다핵거대세포(large multinuclear cell)이다. 2 내지 100개의 조밀하게 들어찬 타원형의 핵을 가지고 있으며 지름은 20 내지 100 μm이고 전형적인 파골세포는 자기 자신에 의해 형성된 뼈 표면의 얕고 작은 홈에 존재한다. 뼈 흡수면에 위치한 파골세포는 밝은 띠와 파도모양의 가장자리가 관찰되며 상기 파골세포에 의해 분비된 가수분해효소에 의한 유기기질의 소화흡수, 산에 의한 무기질 용해와 흡수에 의하여 뼈흡수가 일어나는 것으로 알려져 있다. 뼈를 형성하는 조골세포와 뼈를 재흡수하는 파골세포의 활성이 유기적으로 균형을 이루어 골조직의 양을 조절한다.

[0031] 파골세포는 화학주성(chemotaxis)에 의해 뼈에서 미세골절부위로 이동한다. 단핵세포-대식세포주의 세포 융합에 의해 형성되며 TRAP(Tartrate Resistant Acid Phosphatase)과 카텝신 K(cathepsin K)를 높은 수준으로 발현하는 특징을 갖는다. 또한 고농도의 소포(vesicles)와 공포(vacuoles)로 인한 균일한 표말형 외관(homogeneous, foamy appearance)을 갖는 세포질을 특징으로 한다. 상기 공포는 산성 포스파타제(acid phosphatase)로 채워진 라이소좀이다. 파골세포의 내형질의 망상조직(endoplasmic reticulum)은 성글며(sparse), 골지 복합체는 광범위하다. 뼈와 같은 기질의 제거에 유용한 주름잡힌 경계부분은 활발하게 골을 재흡수하는 파골세포의 형태적 특징이다. 수산화인회석(hydroxyapatite)이라 불리는 기질의 무기질 부분(mineral portion)은 칼슘과 인산 이온을 포함하며 상기 이온들은 세포내섭취(endocytosis)에 의해 작은 소포 내로 흡수되어 세포를 가로질러 이동하여 결과적으로 세포외액(extracellular fluid)으로 방출되어 혈액 중 이온의 농도를 증가시킨다.

[0032] 상기 파골세포는 부갑상선으로부터 분비되는 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone; PTH), 갑상선으로부터 분비되는 칼시토닌(calcitonin) 및 성장인자 인터루킨 6(interleukin 6; IL-6)에 의해 조절된다. 상기 IL-6는 골재흡수와 골형성 간의 불균형에 의한 골다공증과 같은 질환의 요인 중 하나이다. 또한 파골세포의 활성은 조골세포에 의해 생성되는 두 가지 분자, 오스테오프로테그린(osteoprotegerin) 및 RANK 리간드의 상호작용에 의해 매개되며, 따라서 파골세포의 분화는 상기 두 가지 분자에 의해 조절된다. 이러한 파골세포의 과다한 생성 및/또는 이동은 다양한 골질환의 원인이되며 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 의해 파골세포의 생성 또는 이동을 억제하여 치료될 수 있다.

[0033] 한편, 파골세포에 의한 골 파괴(bone destruction)가 파골세포의 생성 및 활성화를 촉진하는 암세포에 의해 생성되는 또는 유도되는 인자들에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 또한 상기 파골세포의 생성 및 활성화를 증진시키는 것으로 알려진 인자로는 인터루킨-1, 인터루킨-6, 부갑상선 호르몬(PTHrP), MIP-1α 및 RANKL 등이 있다. 본 발명자들은 PF-3758309 화합물이 RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 형성을 억제할 수 있음을 확인하였

다. 따라서, 본 발명에 따른 PF-3758309 화합물은 암세포에 의한 RANKL 유도 파골세포의 생성 및/또는 이동을 억제할 수 있고 결과적으로 이로 인한 골손식을 억제할 수 있다. 이와 같이 암세포에 의해 유도된 골손실을 억제하는 기전은 일반적인 암세포의 치료 또는 전이 기전과 일치하지 않는다. 즉, 일반적인 항암제는 상기한 기전에 의해 암세포에 의해 활성화되는 파골세포의 생성 또는 이동을 억제하지 못한다.

[0034] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 PF-3758309 화합물(화학식 1)이 RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 형성(도 1 및 2) 및 TRAP 활성(도 3)을 농도의존적으로 억제하며, 파골세포 분화의 시발점이 되는 전파골세포의 융합(도 4) 및 이동(도 5)을 억제하는 한편, 골다공증 동물모델에서 LPS에 의해 유도되는 골침식을 억제함(도 6)을 확인하여 파골세포의 생성으로 인한 골손실에 의해 유도되는 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0035] 바람직하게, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 0.001 내지 1 중량% 함유할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 본 발명에 따른 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어, "약학적으로 허용가능한"은 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간 등의 개체에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 조성물을 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다.

[0038] 경구 투여를 위하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 고형 제제로 제조할 수 있다. 이러한 고형제제는 상기 조성물 이외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스, 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 쉽기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈61. 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 펩타이드의 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스, 덱스트란 등의 카보하이드레이트, 아스코르빅산, 글루타치온 등의 항산화제, 킬레이팅 물질, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제들을 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0040] 따라서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골질환의 치료방법을 제공한다.

[0041] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0042] 즉, 본 발명의 조성물은 골 질환의 예방 또는 개선을 위하여 골 질환의 발병단계 이전 또는 발병 후, 질환의 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0044] 또한 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어, "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 화합물을 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0047] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0048] 상기 외에 본 발명의 조성물은 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물인 PF-3758309, 이의 이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 파골세포의 분화 및 활성을 억제시킴으로써, 골다공증 등으로 인한 골손실을 억제할 수 있으므로, 다양한 골질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 PF-3758309 화합물에 의한 RANKL-유도 파골세포 형성 억제효과를 나타낸 도이다. BMM(골수-유래 마크로파지) 세포를 RANKL(10 ng/ml) 및 M-CSF(30 ng/ml) 존재 또는 부재(음성대조군) 하에 DMSO(대조군) 또는 다양한 농도의 PF-3758309로 처리한 후 TRAP 용액으로 염색하여 다핵성 파골세포를 가시화하였다.

도 2는 PF-3758309 처리 농도에 따른 TRAP-양성세포의 수를 나타낸 도이다. TRAP-양성 다핵성 파골세포(핵≥10)를 계수하였으며, PF-3758309 처리 농도에 따른 이들 다핵성 파골세포의 현저한 감소가 관찰되었다. **, p <

0.01, ***, p < 0.001(대 양성대조군). 최소 3회 반복실험하여 대표적인 데이터를 도시하였다.

도 3은 PF-3758309 처리 농도에 따른 TRAP 활성 억제효과를 나타낸 도이다.

도 4는 PF-3758309 처리 시점에 따른 전파골세포(preosteoclast; pOC)의 융합 억제효과를 나타낸 도이다. BMM을 DMSO 또는 5 nM PF-3758309로 처리하고 M-CSF와 RANKL로 자극하였다. 세포를 고정하고 TRAP 용액으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하고 다핵세포를 계수하여 그래프로 나타내었다.

도 5는 PF-3758309 처리에 따른 전파골세포의 이동 억제효과를 나타낸 도이다. 각기 다른 농도의 PF-3758309로 처리한 후 젤라틴으로 코팅한 폴리카보네이트 필터를 통해 이동한 세포를 염색하여 관찰하고 계수하였다. 데이터는 3회 실험을 평균하여 평균±SD로 나타내었다. *, P < 0.05 및 **, P < 0.01 DMSO 처리 대조군과 비교(Vehicle로 표기).

도 6은 마우스 모델에서 PF-3758309 처리 농도에 따른 골손실 억제효과를 나타낸 도이다. LPS를 처리하여 골침식을 유발하고 DMSO(양성대조군; Vehicle) 또는 PF-3758309(0.5 및 1 μg/g 체중)를 처리한 후 마이크로CT 스캔을 통해 골손실을 확인하였다. 또한 골부피비(골부피/조직부피; BV/TV) , 골 미네랄 밀도(bone mineral density; BMD), 섬유주 분리(trabecular separate; Tb. S) 및 섬유주 수(trabecular number; Tb. N)를 측정하여 대퇴골의 섬유주 골 미세구조를 확인하였다. 조직을 제거하고 석회질을 제거한 뼈를 파라핀에 포매시키고 절편을 제조하여 각각 H&E 염색과 TRAP 염색을 수행하여 골 표면에서 파골세포를 동정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **실시예 1: PF-3758309의 RANKL-유도 파골세포형성(RANKL-induced osteoclastogenesis) 억제효과**

[0053] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물인 PF-3758309의 RANKL-유도 파골세포형성에 대한 효과를 확인하기 하였다. 5주령의 수컷 ICR 마우스를 구입하여 대퇴골(fermur) 및 경골(tibia)을 취하고 항생제(100 units/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신)을 포함하는 α-MEM으로 세척하여 골수세포(bone marrow cell)를 획득하였다. 상기 골수세포를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor; 10 ng/ml)를 포함하는 α-MEM에 1일간 배양하였다. 비부착(non-adherent) 골수세포를 페트리접시에 분주하고 M-CSF(30 ng/ml) 존재 하에 3일간 배양하였다. 비부착세포를 세척한 후 부착세포(adherent cell)를 골수-유래 마크로파지(bone marrow-derived macrophage; BMM)로 사용하였다. BMM 세포를 RANKL(10 ng/ml) 및 M-CSF(30 ng/ml) 존재 하에 DMSO 또는 PF-3758309를 다양한 농도(0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 nM)로 처리하여 4일간 배양하였다. 다핵성 파골세포(multinucleated osteoclast)를 3.7% 포르말린으로 10분간 고정하고 0.1% 트리톤 X-100으로 10분간 처리하여 투과성을 갖도록 하였다. 세포를 TRAP 용액(Sigma-Aldrich)으로 염색하였다. 다핵성 파골세포를 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 염색으로 가시화하였다. 최소 3회 반복실험하여 대표적인 데이터를 도시하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0054] 한편, 도 2에는 상기 TRAP 염색 실험으로부터 TRAP 양성 반응을 나타내는 다핵세포 수를 계수하여 처리한 PF-3758309 농도의 함수로 나타내었다. TRAP-염색에 의해 가시화하여 도 1에 나타난 바와 같이, RANKL 처리에 의해 파골세포형성을 유도하였을 때, 다핵성 파골세포가 다량 생성되었으며, 이는 PF-3758309 처리로 인해 억제되었다. 특히, PF-3758309의 처리량을 증가시켰을 때 이에 비례하여 파골세포의 생성이 감소하는 것을 확인하였다.

[0055] 이를 객관적으로 비교하기 위하여 염색된 다핵성 파골세포를 계수하여 처리한 PF-3758309의 농도에 대한 함수로 도시하여 도 2에 나타내었다. 상기 육안검사로부터 확인된 바와 일치하여 TRAP-양성 다핵성 파골세포의 수는 PF-3758309 처리농도에 비례하여 감소하였다. 특히, 10개 이상의 핵을 갖는 파골세포의 수가 PF-3758309의 농도가 증가함에 따라 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0056] **실시예 2: PF-3758309의 TRAP 활성 억제효과**

[0057] 상기 실시예 1로부터 PF-3758309가 농도 의존적으로 TRAP 발현을 억제함을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 PF-3758309가 TRAP의 활성에도 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 다핵성 파골세포를 다핵성 파골세포를 3.7% 포르말린으로 5분간 고정하고 0.1% 트리톤 X-100으로 10분간 처리하여 투과성을 갖도록 하였다. 파골세포를 3 mM p-니트로페닐 포스페이트(p-nitrophenyl phosphate, Sigma-Aldrich)를 포함하는 TRAP 완충액(100 mM 시트르산 나트륨 pH 5.0, 50 mM 주석산 나트륨(sodium tartrate))으로 37℃에서 5분간 처리하였다. TRAP 활성을 유발하기 위해서는 RANKL을 10 ng/ml로 처리하였다. 반응혼합물을 동일한 부피의 0.1 N NaOH를 포함하는 새 접시에 옮기고, 405 nm에서 광학밀도(optical density; OD) 값을 결정하였다. ###, p<0.001(대 음성대조군). **, p<0.01; ***, p<0.001(대 양성대조군). RANKL을 처리하되 PF-3758309를 처리하지 않은 세포를 양성대조군으로, RANKL과 PF-3758309를 모두 처리하지 않은 세포를 음성대조군으로 사용하였다. 실험군으로는 상기 실시예 1에서와 동일한 농도로 PF-3758309를 처리한 세포를 사용하였다. PF-3758309 처리 농도에 따른 TRAP 활성을 도 3에 나타내었다.

[0058] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, PF-3758309가 농도의존적으로 TRAP 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0059] **실시예 3: PF-3758309의 전파골세포(preosteoclast) 융합 억제효과**

[0060] 파골세포 전구체인 전파골세포에 대한 PF-3758309의 분화단계별 영향을 확인하였다. 구체적으로 DMSO 또는 5 nM PF-3758309를 분화 0-1일차, 1-2일차, 2-3일차, 3-4일차에만 처리될 수 있도록 M-CSF(30ng/ml) 및/또는 RANKL(10ng/ml)를 포함하는 분화 배지를 제조하여 이에 배양함으로써 BMM을 자극하였다. 분화 4일차에, 세포를 고정하고 TRAP 용액으로 염색하였다. 광학현미경으로 TRAP 양성 다핵세포를 관찰하고 TRAP-양성 MNC를 계수하였다. 도 4에 그 결과를 나타내었다. 도 4의 상단에는 PF-3758309에 노출시킨 기간을 표시하였고, 중간에는 TRAP 염색한 세포의 현미경 이미지를, 하단에는 PF-3758309 처리 기간에 따른 TRAP-양성 다핵세포 수의 변화를 나타내었다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 대 대조군. 최소 3회 반복실험하여 대표적인 데이터를 도시하였다.

[0061] 도 4에 나타난 바와 같이, 전파골세포의 융합시점인 분화 3-4일차에 PF-3758309를 처리하였을 때, 파골세포의 분화가 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 이는 PF-3758309를 포함하는 본 발명의 조성물이 전파골세포의 융합을 억제함으로써 파골세포 분화를 억제할 수 있음을 시사하는 바이다.

[0062] **실시예 4: PF-3758309의 전파골세포 이동 억제효과**

[0063] pOC의 이동은 융합을 필요로 하는 것으로 알려져있다. 따라서, PF-3758309의 pOC의 이동에 대한 효과를 확인하였다. 구체적으로 boyden chamber를 이용하여 9시간 동안 RANKL 유도-전파골세포(pOC) 침습을 측정하였다. 이때, 폴리카보네이트 필터(polycarbonate filter; 기공 크기=8 μm)는 젤라틴으로 선코팅하였다. 세포(1×10^6 cells/ml)를 다양한 농도(0, 0.1, 0.3, 1, 3 and 6 nM)의 PF-3758309로 9시간 동안 처리하였다. pOC 세포의 침습 및 이동 능력은 다공성 폴리카보네이트막 아래로 침습한 세포를 계수하여 계산하였으며, 3회 실험을 평균하여 평균±SD로 나타내었다. *, p<0.05 및 **, p<0.01 DMSO 처리 대조군(비히클; vehicle)과 비교하였으며, 결과를 도 5에 나타내었다. 세포를 염색하여 현미경으로 관찰하고(도 5 상부) 이동한 세포를 계수하여 처리한 PF-3758309의 농도에 대한 함수로 도시하였다(도 5 하부).

[0064] 도 5에 나타난 바와 같이, PF-3758309는 농도의존적으로 RANKL에 의해 유도되는 전파골세포의 이동을 억제하였다. 이는 PF-3758309를 포함하는 본 발명의 조성물이 전파골세포의 이동을 억제함으로써 파골세포 분화를 억제할 수 있음을 시사하는 바이다.

[0065] **실시예 5: 골다공증 동물모델에서 PF-3758309의 골침식(bone erosion) 억제효과**

[0066] 마지막으로 PF-3758309를 마우스에 주입하여 동물모델에서 골침식에 미치는 영향을 확인하였다. 우선 ICR 마우

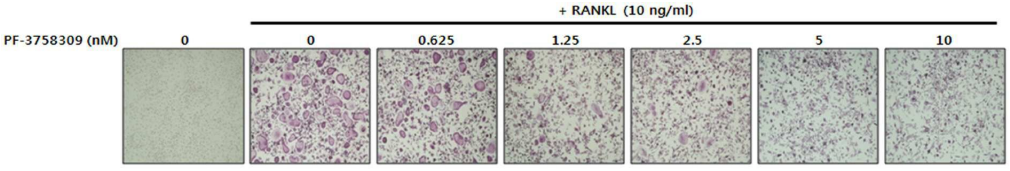
스(5주령)를 각 3마리씩 4개군으로 나누었다. 마우스에 PF-3758309(0.5 ug/g 체중, 1 ug/g 체중) 또는 대조군으로써 PBS를 LPS(10 ug/g 체중) 주사 1일전에 복강 내 주사하였다. PF-3758309 또는 PBS를 8일간 매일 복강 내 주사하였다. 골침식을 유도하기 위하여 LPS는 1일과 4일에 복강 내 주사하였다. 최초 LPS 주사 후 8일에 모든 마우스를 치사시키고 좌측 대퇴골을 고해상도 마이크로CT(high-resolution microCT; SkyScan 1173; SKYSCAN, Kartuizersweg 3B 2550 Kontich, Belgium)로 스캔하였다. CTAn 소프트웨어로부터 제공되는 소프트웨어(skyscan anlaysis tool, Belgium)를 이용하여 마이크로CT 데이터로 골 조직형태학적 분석(Bone histomorphometric analyses)을 수행하였다. 골부피/조직부피(BV/TV)로 나타나는 골부피비(bone volume ratio), 골 미네랄 밀도(bone mineral density; BMD), 섬유주 분리(trabecular separate; Tb.S) 및 섬유주 수(trabecular number; Tb.N)를 측정하여 대퇴골의 섬유주 골 미세구조를 확인하였다. 조직을 제거하고 4% 파라포름알데하이드로 4℃에서 1일간 고정한 후 12% EDTA로 석회질을 제거하였다. 석회질이 제거된 뼈를 파라핀에 포매시켜 절단하였다. 조직학적 분석을 위하여, 절편을 헤마톡실린과 에오신(hematoxylin and eosin; H&E)으로 염색하였다. 다른 절편은 골표면에서 파골세포를 동정하기 위하여 TRAP으로 염색하였다. 상기 실험 결과를 도 6에 나타내었다.

[0067] 도 6에 나타난 바와 같이, 염증성 골손실을 유발하는 LPS(lipopolysaccharide)를 처리한 마우스 골다공증 모델에 PF-3758309를 처리한 경우 골손실 정도가 감소하는 것을 확인하였다. 마이크로CT 결과는 육안으로 구분가능할만큼 현저한 골손실 억제효과를 나타내었다. 뿐만 아니라 골상태를 수치화하여 그래프로 나타낸 결과를 살펴보면, LPS 처리에 의해 감소하였던 골부피비, 골밀도(골 미네랄 밀도) 및 섬유주 수는 1 μg/g 체중의 PF-3758309 투여시 거의 정상수준으로 회복되었으며, LPS 처리에 의해 증가되었던 섬유주 분리는 증가 폭이 현저히 감소하였음을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 PF-3758309를 포함하는 조성물이 생체 내에서도 우수한 파골세포 생성 억제활성을 나타내며 효과적으로 골손실을 억제할 수 있음을 나타내는 바이다.

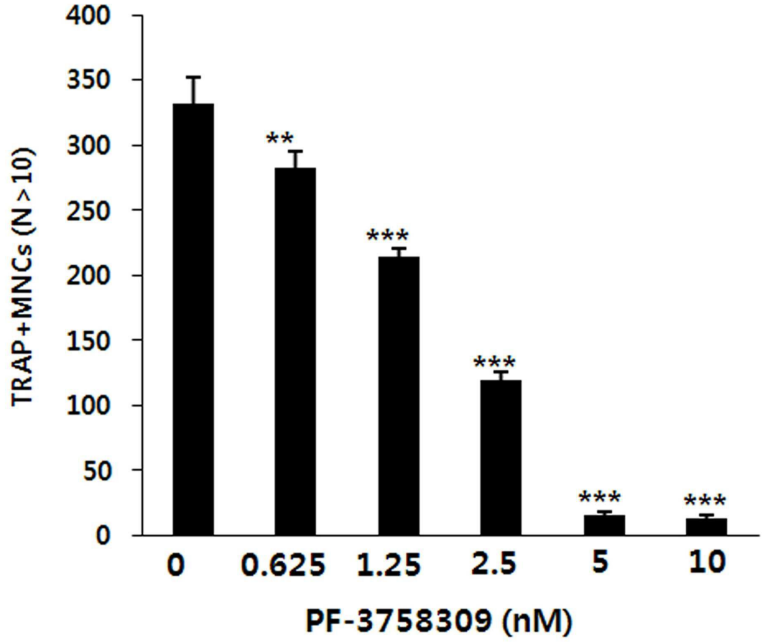
[0068] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 PF-3758309 화합물이 파골세포 생성 또는 이동에 의해 발생하는 골손실에 따른 다양한 골질환의 치료 또는 예방 효과가 있음을 뒷받침한다.

도면

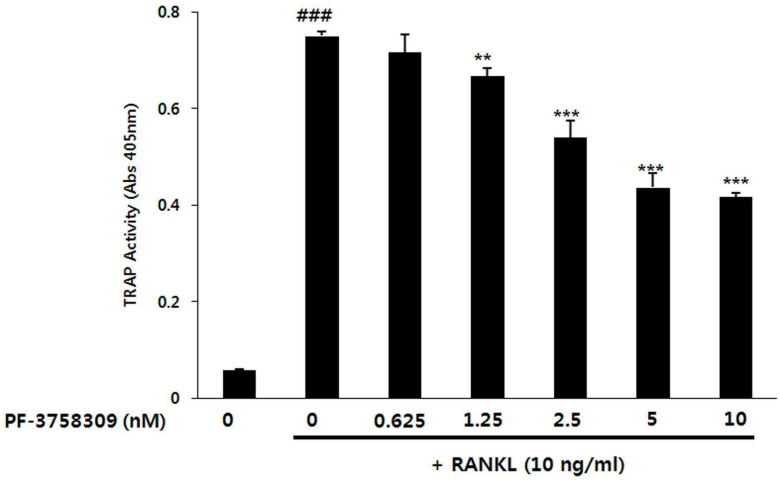
도면1



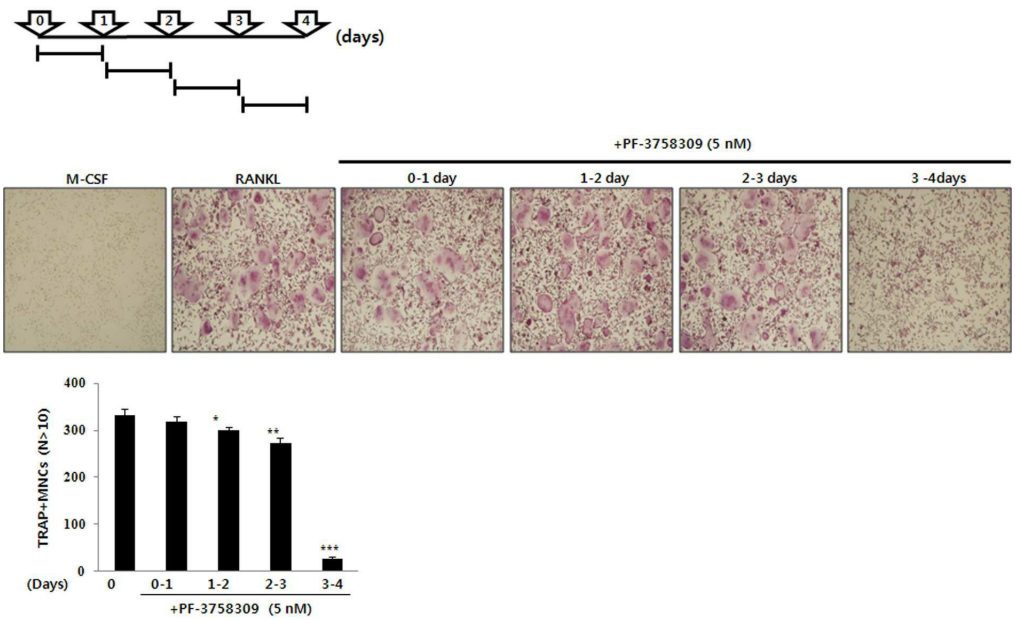
도면2


TRAP+MNCs (N>10)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
**
***
***
***
***
0
0.625
1.25
2.5
5
10
PF-3758309 (nM)

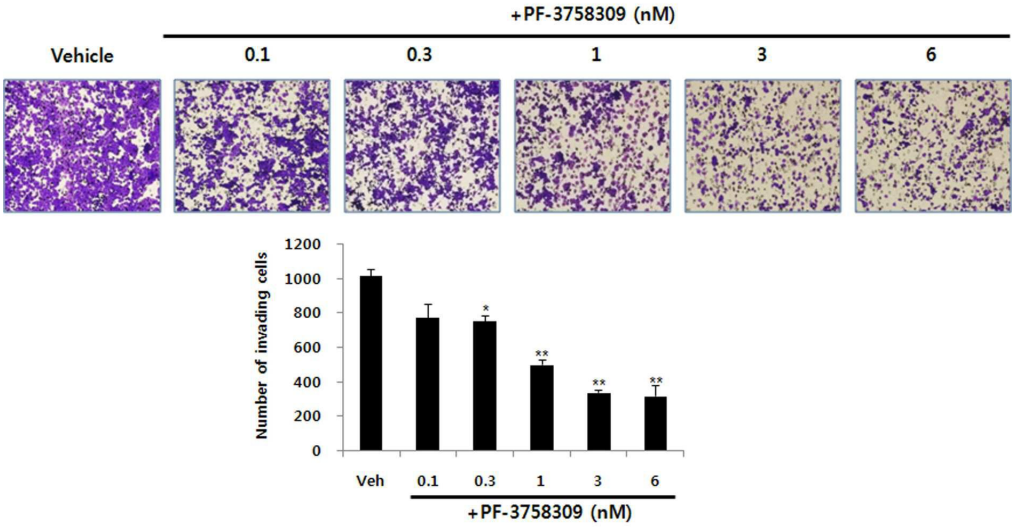
도면3


TRAP Activity (Abs 405nm)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
###
**
***
***
***
PF-3758309 (nM)
0
0
0.625
1.25
2.5
5
10
+ RANKL (10 ng/ml)

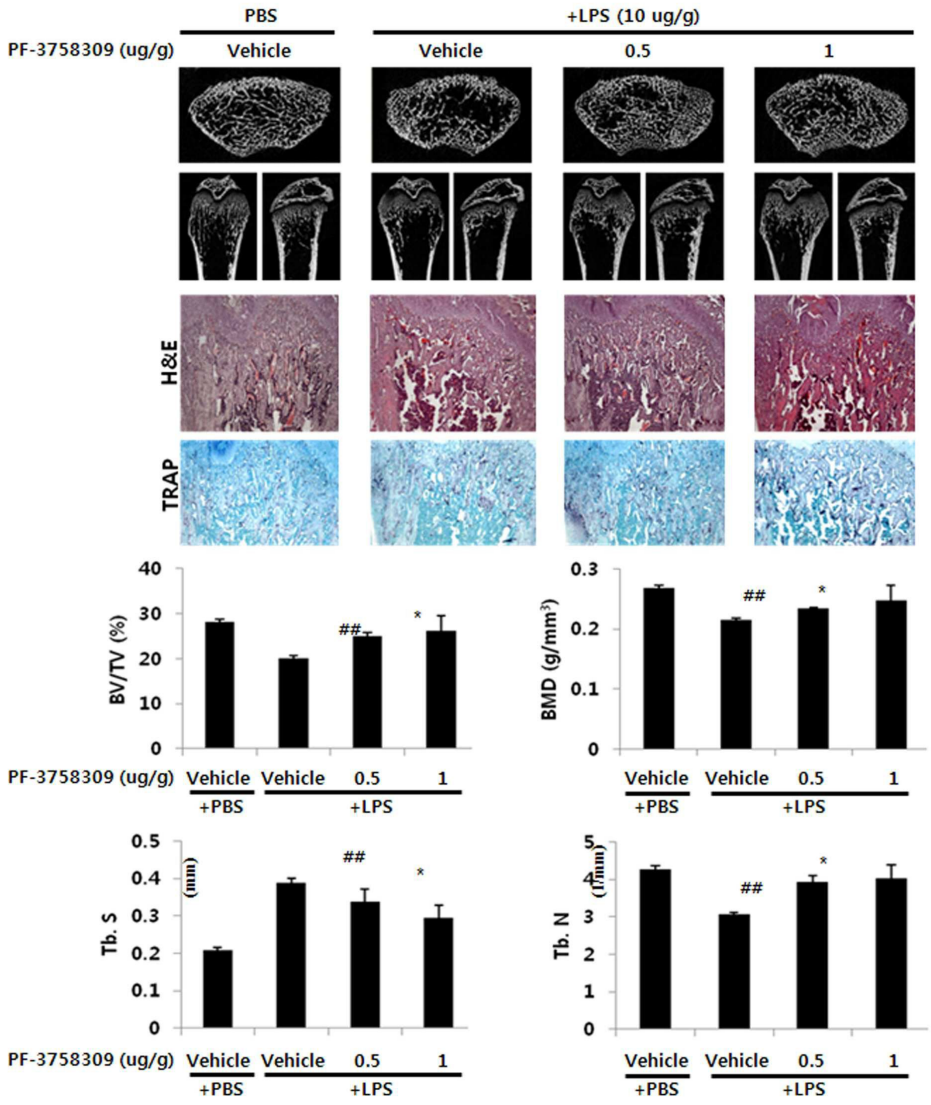
도면4


0
1
2
3
4
(days)
+PF-3758309 (5 nM)
M-CSF
RANKL
0-1 day
1-2 day
2-3 days
3 -4days
TRAP+MNCs (N>10)
400
300
200
100
0
*
**
***
(Days)
0
0-1
1-2
2-3
3-4
+PF-3758309 (5 nM)

도면5


+PF-3758309 (nM)
Vehicle
0.1
0.3
1
3
6
Number of invading cells
1200
1000
800
600
400
200
0
*
**
**
**
Veh
0.1
0.3
1
3
6
+PF-3758309 (nM)

도면6


PBS
+LPS (10 ug/g)
PF-3758309 (ug/g)
Vehicle
Vehicle
0.5
1
H&E
TRAP
BV/TV (%)
BMD (g/mm³)
Tb. S (mm)
Tb. N (1/mm)
##
*
+PBS
+LPS