

NP-77A계열 바이러스성 B형 간염치료제의 개발

Development of New NP-77A Series
Anti-Hepatitis B Agents

연구기관
한국신약개발연구조합

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부장관 귀하

본 보고서를 "NP-77A계열 바이러스성 B형 간염치료제의 개발에 관한 연구"과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 7. 31

주관연구기관명 : 한국신약개발연구조합

단위과제연구책임자 : 조 인 구

참여기업명 : (주) 중 외 제 약

연 구 원 : 하 종 렬

박 문 수

윤 성 훈

문 기 호

정 동 훈

김 종 명

양 정 윤

오 세 용

이 경 준

임 재 옥

김 승 결

박 종 우

홍 성 진

위탁연구기관명 : 서울대학교 약학대학

위탁연구책임자 : 김 종 국

여 백

요 약 문

I. 제 목

NP-77A계열 바이러스성 B형 간염치료제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

B형 간염의 확산은 전 세계적인 문제로서 세계인구의 70%가 B형간염 만연지역에 살고 있고, 이들은 대부분 지역적으로 동남아 및 열대지방등 개발도상국에 편중되어 있다.

1986년도 경제계획원의 통계에 따르면, 40대 중년 남자의 사인중 만성간질환이 차지하는 비율은 22.2%(만성간염, 간경변증14.8%, 간암 7.4%)로 가장 높은 비율을 보이고 있어 간염의 문제점이 심각하게 대두되고 있다.

실제 우리나라의 경우, HBsAg, anti-HBsAg, anti-HBc중 한가지라도 양성인 경우는 81.0%로 보고되고 있어 전염 및 만연여부를 추측케 해준다.

이러한 만성간염, 간경변, 간암 등으로 사망까지 이르게 하는 B형 감염에 안전하고, 효과적인 치료대책이 절실히 요구되고 있으며, 개발도상국같이 B형 간염의 빈도가 높아, 그 피해 대상자가 많은 지역에서는 그 관리가 더욱 심각한 과제로 등장하고 있으나, 안타깝게도 치료제로서는 아직 인터페론 외에 개발된 약물이 없고, 단지 B형 간염을 미연에 방지할 수 있는 백신만이 있을 뿐이다.

그러나, 인터페론은 높은 약가 때문에, 사용상의 제한이 있으며, 심각한 부작용 및 재발율이 높은 것으로 알려져 있다.

따라서, 낮은 독성으로, 사용할 때 안전하며, 간염 바이러스의 증식을 억제하는 높은 유효성 및 저렴한 약가로서 용이하게 사용할 수 있는 B형 간염치료제가 개발된다면, 인류의 복지 건강에의 기여는 실로 크다 하겠다.

경제적인 면에서도 2000년대에는 세계시장 규모가 50억에서 100억불대의 잠재구매력을 갖는다고 추산되고, 국내 시장은 현재 간장질환용제 및 해독제로 드링크류를 제외하고 1000억원(1991년)의 시장을 형성하고 있어 실질적인 치료제가 개발되면 국내의 시장의 많은 부분을 차지하고 그 증가율은 매우 높으리라 예상된다.

반면에 선진국에서는 낮은 이환율 때문에 개발의 필요성을 크게 느끼지 못하고

있는 상태에서 우리 나라의 높은 이환율을 감안하여 국내에서 자체적으로 치료제를 개발하는 것이 절실히 요청된다고 보이며, 또한 국내 제약기업의 활성화와 국제화를 도모하여 국제경쟁력 강화에 크게 기여할 것으로 사료된다.

본 연구과제는, 1단계 연구사업을 통해서, 생체내에서의 항 HBV작용을 보유하며, 안전한 물질임이 확인되어, 임상에서도 유효성있는 약물로 사용될수 있을 것으로 추정되었다. 따라서, 2단계 연구 사업을 통해서, 신약허가의 필요한 전임상 연구 및 임상에서의 약효를 확인코자 하였으며, 또한 본물질이 주사제로만 가능하기 때문에, 경구제제에 비한 경쟁력면에서 취약함을 고려하여, 경구 제형으로서의 개발을 위한 유도체화 연구를 병행하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

우선, 계획된 전임상연구에 충분한 양의 원료를 공급할수 있도록 원료/추출/분리 연구 및 이의 단가를 낮출수 있도록 공정법 개선 연구를 계속 하였으며, 생체내에서의 부작용을 확인하기 위한 일반약리 연구 항목중 자율신경계에 미치는 영향과, Dog를 이용한 급성독성, 아급성 독성을 검색 하였다.

작용기전을 확인하기 위한 Polymerase assay 및 RNA 바이러스 / HSV 바이러스에 미치는 영향을 관찰하였고, 임상용 제형 설계를 위한 제제연구를 수행하였다.

이상의 연구결과를 바탕으로, 만성간염환자를 대상으로 하여, 임상에서의 항바이러스 작용을 소규모로 실시하였으며, 한편으로는, 경구용 간염치료제의 개발을 위한 유도체화 연구를 수행하여, 관련화합물 300여종을 합성하였고, 이들 화합물에 대한 항 HBV작용, 간보호작용 및 약물 동력학 연구, 독성 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발결과

원료확보에 있어서는, 전임상연구에 필요한 원료를 확보하여 공급하였으며, 공정개선 연구를 통해, 1단계에 비해 원료가격을 40%정도 인하시켰다.

자율신경계에 미치는 영향을 관찰하여, NP-77A가 자율신경계에 특별한 영향이 없음을 확인하였고, Dog의 급성/아급성 독성 연구를 통해, 임상사용 예상용량의 100배까지의 용량에서 독성을 나타내지 않음을 확인 하였다.

제제연구를 통해서, 임상용 제제설계를 위한 연구를 완료하였고, 예비 임상연구를 수행하여 NP-77A가 만성간염 환자에서 10mg/kg으로의 용량으로, 1개월 투여시 특별한 부작용없이 간염치료작용을 나타내는 경향을 보였다.

또한, 경구용 간염치료제의 개발을 목표로 하여, NP-77A의 유도체화 연구를 실시하여, 이들중 수개의 화합물에서 우수한 항HBV 작용을 확인할 수 있었다.

V. 연구개발 결과 활용 계획

NP-77A의 연구를 통해서, 본 화합물이 안전하고, 독특한 항 HBV작용을 나타낼 수 있었다.

그러나, NP-77A는 경구투여시 장내세균에 의해 분해되는 성질을 가지고 있어, 약효의 소실은 물론, 부작용을 초래하는 단점이 있어, 주사제형만으로 가능한 문제점이 있기 때문에, 최근 Glaxo 등에서 개발되는 경구용 간염치료제(라미부딘 등)에 비해, 경쟁력면에서 큰 열세이다.

따라서, 이들 연구결과를 이용하여, 경구용으로서의 개발을 병행하여 추진하였으며, 이들 유도체화 연구를 통하여, 핵산계열의 물질인 라미부딘(3-TC)과 유사한 정도의 항 HBV 작용을 갖는 물질을 발견하였다.

이들 물질에 대해서는, 외국의 항바이러스 전문연구기관과 공동연구 또는 다른 형태의 협력을 통해서 경구용 치료제로서의 개발을 시도할 예정이다.

여 백

SUMMARY

I. Title

Development of a New NP-77A series Anti-Hepatitis B Agent

II. The Purpose and Necessity of the Research

Chronic viral hepatitis is the most important cause of liver disease worldwide, and the two most important factors are hepatitis B virus and hepatitis C virus.

It was estimated that more than three billion individuals have been infected globally with HBV, of whom some three hundred million individuals are chronically infected carriers at high risk of liver cirrhosis and primary liver cancer. Several agents including interferons and nucleoside analogues have been used to treat in patients with HBV with severe adverse effects related to drug therapy, are only transiently effective for hepatitis B virus(HBV)replication, or are only effective for a small portion of individuals with HBV infection.

In the course of searching for liver-protective, possibly curative agents derived from traditional oriental medicines including chinese herbs, an iridoid glycoside, namely NP-77A isolated from *Plantago asiatica* and *Aucuba japonica* was found to be an active component with significant liver-protective activities against several animal models of hepatic damage as follows: protection from hepatic damage induced by carbon tetrachloride intoxication in mice (Change et al., 1983; Chang and Mar, 1986), and by α -amanitin intoxication(Chang et al., 1984). It was also noted that NP-77A showed a potent antidotal effect towards severe hepatic damage produced by an aqueous extract of the noxious *Amanita* mushroom ingestion in beagle dogs (Chang and Yamaura, 1993). On the basis of these observations of NP-77A, we have tested in vitro and in vivo anti-hepatitis B activity using 2,2,15 cell line and Woodchuck hepatitis model.

Surprisingly, we have found that it had significant anti-hepatitis B activity and be very safe in rat toxicological experiment during the past 3 years research.

At the moment, interferon alpha is recommended for all patients with HBV infection with raised transaminase and liver disease.

The recommended dose is 10 million international units three times weekly or 5 million IU/day for 16-24 weeks.

This is a high dose and very expensive to pay for the most HBV patients. Furthermore, low cure rate(18-33%) and serious side effect such as bone marrow suppression, peripheral neuropathy prohibit the clinician to use interferon as a first choice of drug for HBV patients.

For this reason, we tried to develop anti-hepatitis B agent with NP-77A and its chemical derivatives, as mono and combination therapy.

III. Details and Scopes of Research

To provide sufficient amount of raw material for pharmacological and toxicological study, we develop a new process development method.

Pharmacological study was performed to elucidate its possible side effect in autonomic nervous system in clinical study using in vitro and in vivo study.

And, we have tested the toxicological effect in dogs by single and 4 week intravenous administration.

For formulation study, we tried to select most effective formulation for clinical study by the contract research with University.

With these all experimental data, we tried to find out its clinical efficacy and side effect in chronically infected HBV patients as a preliminary clinical study.

On the other hand, to find out orally available anti-hepatitis B agents, we have synthesized about 300 chemically derived compounds for NP-77A and tested their anti-HBV activities with 2.2.15 cell line and hepatoprotective effect with hepatotoxicant induced rat models.

IV. Results of the Research

Sufficient amount of NP-77A for pharmacology, toxicology and preliminary clinical study was isolated from Aucuba Japonica.

The raw material cost of NP-77A reached to 1,827 thousand won per kg which was reduced almost 1/4 by the research of process development for the past 3 years.

No side effects of NP-77A was found for autonomic nervous system in animal experiment and no toxicological signs was found in single dose and multiple dose dog study by the intravenous administration.

Most adequate injectable formulation was selected by formulation research for clinical study.

With these all experiment results, we have performed preliminary clinical study in China with chronically infected HBV patients in small scale and found to be effective without significant side effect.

For chemical derivative study for NP-77A, we have synthesized about 300 new compounds and tested their anti-HBV, hepatoprotective activity.

Some of those compounds showed potent anti-HBV activities in 2.2.15 cell line which warranted us to develop orally available anti-HBV compounds.

V. Plans to apply the research of the research

From the research so far, we have noticed that NP-77A can be applied to the patients with HBV in combination or mono therapy. However, because intravenous injection formulation is not competitive to the oral formulation commercially, we have turned the strategy to develop orally available drugs with chemical derivative of NP-77A. Many compounds have shown potent anti-HBV activity in 2.2.15 cell line and hepatoprotective activity in chemically hepatotoxic models. We are now studying another pharmacological activity of those chemical derivatives of NP-77A and contacting with some virus specified research company of USA for discussing the licensing availability or co-research of those compounds.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. INTRODUCTION	15
Chapter 2. INTERNAL AND EXTERNAL STATE OF THE ARTS	19
Chapter 3. CONTENTS AND RESULTS OF THE RESEARCH	25
Chapter 4. MEASURES OF ACHIEVEMENT AND CONTRIBUTION ...	139
Chapter 5. PLANS TO APPLY THE RESULTS OF THE RESEARCH ...	143
Chapter 6. REFERENCES	147
Chapter 7. CONTRACT PROJECT	155

여 백

목 차

제1장 서 론	15
제2장 국내외 기술개발 현황	19
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	25
제4장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	139
제5장 연구개발 결과의 활용계획	143
제6장 참고문헌	147
제7장 위탁연구과제	155

여 백

제1장 서 론

여 백

제 1 장 서론

B형 간염은 B형 간염바이러스(HBV)의 감염에 의해 일어나는 바이러스성 질병으로서 전세계적으로 3.5억명 이상이 감염되어 있으며, 매년 이병으로 인해 100~200만명이 사망하는 심각한 질병이다.

지역적으로는, 감염자의 95% 이상이 중국을 비롯한 동남아시아 및 아프리카 등의 후진국에 분포되어 있으며, 후진국에서는 대부분 출생시나 어릴 때 감염되어 90% 정도가 만성 감염으로 이행됨으로 인해 감염자의 25% 정도가 성인이 된 후 간경변 (liver cirrhosis)이나 간암(liver cancer)으로 사망하게 된다. 물론 B형 감염 백신의 개발로 B형 감염의 예방이 가능하게 되었으나 백신의 낮은 항체 역가 및 10~20%에 달하는 nonresponder 등으로 인해 여전히 많은 감염자가 발생하고 있기 때문에 효과적인 B형 간염 치료제의 개발이 요구되고 있다.

1986년도 경제계획원의 통계에 따르면, 40대 중년 남자의 사인중 만성간질환이 차지하는 비율은 22.2%(만성간염, 간경변증 14.8%, 간암 7.4%)로 가장 높은 비율을 보이고 있어 간염의 문제점이 심각하게 대두되고 있다.

실제 우리나라의 경우, HBsAg, anti-HBsAg, anti-HBc 중 한가지라도 양성인 경우는 81.0%로 보고되고 있어 전염 및 만연여부를 추측케 해 준다.

경제적인 면에서도 2,000년대에는 세계시장 규모가 50억에서 100억불대의 잠재 구매력을 갖는다고 추산되고, 국내시장은 현재 간장질환용제 및 해독제로 드링크류를 제외하고 1,000억원(1991년)의 시장을 형성하고 있어 실질적인 치료제가 개발되면 국내의 시장의 많은 부분을 차지하고 그 증가율은 매우 높으리라 예상된다.

본 연구과제는, 1단계 연구사업을 통해서, 생체내에서의 항 HBV 작용 및 안전성을 확인하였고, 임상에서도 유효성있는 약물로 사용될수 있을 것으로 추정 되었다. 따라서, 2단계 연구 사업을 통해서 신약허가시 필요한 전임상 연구 및 임상 연구를 수행하고자 하였으며, 또한 본물질이 주사제로만 가능하며, 경구제제에 비하여 경쟁력면에서 취약함을 고려하여, 경구제형으로의 개발을 위한 유도체화 연구를 시도하였다.

여 백

제2장 국내외 기술개발 현황

여 백

제 2 장 국내외 기술개발 현황

B형 간염 치료제에 대한 연구는 백신의 개발, *in vitro* 및 *in vivo*에서의 효능 측정 연구 방법의 개발 지연 및 서구에서의 비교적 적은 발명 빈도로 인해 그 연구가 활발하지 못했고, 아주 고전적인 약물인 Ara-A(Vidarabine)가 일부 임상적으로 사용되었으나 낮은 효능 및 독성 때문에 효과는 크지 못했다.

현재 임상적으로 interferon- α 가 사용이 되고 있으나 그 완치율이 30% 이하이고, 고가일 뿐만 아니라 치료 용량에서 부작용도 커서 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있다. 현재 B형 간염 치료제로 개발중에 있는 화합물은 항바이러스제의 대부분이 그렇듯이, nucleoside 유도체가 대부분을 차지하고 있다.

Nucleoside 유도체가 아닌 화합물로는 thymosin $\alpha 1$ 이 Phase III 단계에서 개발중에 있는데 thymosin $\alpha 1$ 은 아미노산 28의 peptide로 nucleoside 유도체와는 달리 HBV에 대한 직접적인 작용보다는 면역능을 증가시키는 작용을 한다.

한편 80년대말부터 문제가 심각해진 AIDS를 일으키는 HIV에 대한 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발해지면서 새로운 구조의 nucleoside 유도체들이 많이 합성되었는데 HIV에 활성이 있는 2',3'-dideoxynucleoside들이 HBV에도 효과가 있음이 알려지고 이에 따라 HBV에 활성이 있는 nucleoside 유도체에 대한 연구가 활기를 띠게 되었다. HIV나 HBV는 전혀 다른 virus이지만 그 복제 mechanism중 reverse transcription을 거친다는 공통점이 있다는 사실과 연관시켜 볼 때 매우 흥미있는 사실이라고 볼수 있다.

지금까지 문헌에 보고된 항 HBV 작용을 가진 nucleoside가 많이 있지만 아직까지 임상적으로 사용되는 nucleoside 유도체는 없으며 현재 여러 개발 단계에 있는 대표적인 항 HBV nucleoside 유도체들을 예로 들어 보면 다음과 같다

Lamivudine (3-TC, BCH-189)

Lamivudine은 원래 Canada의 Biochem Pharma 社の 연구진에 의해 항 HIV제로 개발되어 Glaxo-Wellcome社에 licensing된 화합물로, 현재 항 HIV제로 임상적으로 사용되고 있으며 HIV의 reverse transcriptase를 억제하는 작용 mechanism을 가지고 있다.

이 화합물은 고전적인 nucleoside의 sugar가 아닌 sugar ring에 황을 가진 사이티딘 유도체로서 특이한 것은 지금까지 보고된 nucleoside 유도체 약물들이

모두 당으로서 천연형의 D-configuration을 가지고 있음에 비하여 이 화합물은 비천연형의 L-configuration을 가지고 있다. Phase II 시험에서 lamivudine을 경구로 1일 100mg씩 투여했을 때 4주내에 virus가 검출한계 이하로 소실되었으며 6개월간 투여했을 때 특이한 독성은 발견되지 않았다.

그러나, 약물의 투여를 중단하였을 경우 virus의 rebound가 일어났으며 최근에는 lamivudine에 내성을 가진 HBV의 출현에 대한 보고도 있다. 현재 Phase III 상태에 있으며 long term treatment나 α -interferon과의 combination therapy에 대한 임상도 진행중이다.

Famciclovir

Smithkline & Beecham에서 현재 herpes virus 치료제로 개발하여 상품화된 acyclic nucleoside의 일종의 화합물로 항 HBV 효과도 우수한 것으로 알려져 있다.

이 화합물은 경구 흡수율 개선을 위한 prodrug로서 생체내 이용률이 77%이며 인체내에서 대사를 받아 원래의 약물인 penciclovir로 변환된다.

Penciclovir의 in vitro에서의 항 HBV 효과는 lamivudine보다 3-4배 열등하며 ($EC_{50} = 0.20 \mu M$ $CC_{50} = 448 \mu M$) 현재 Phase III 단계에 있다.

Adefovir dipivaxil (GS 840)

Acyclic phosphonate nucleoside의 일종으로 현재 Gilead社에서 항 HBV제로 Phase II의 개발 단계에 있다. 원 약물의 경구 흡수도 개선을 위해 ester로 만든 prodrug로서 생체이용률이 35%정도이며 HIV에도 활성이 있어 AIDS 치료제로 Phase III의 개발 단계에 있다.

Lobucavir

BMS에서 개발중인 항 HBV제로, 구조적으로 4원환의 당을 가진 oxetanocin의 일종인 carboxetanocin 유도체이며 Phase II 단계에 있다.

CMV에 ganciclovir와 동등한 활성을 나타내며 in vivo 항HBV 활성은 $EC_{50}=2.5\mu M$ 로 보고되었다. Woodchuck에서 10mg/kg/day로 1-2주 경구 투여했을 때 virus가 소실되었고 투여를 중지하면 1~2주내에 virus의 rebound가 일어났다.

BMS 200475

BMS 200475는 BMS에서 개발중인 화합물로 carbonucleoside이다. 이 화합물의 항HBV효과는 in vivo에서 lamivudine보다 100배나 우수한 효과($EC_{50} = 0.003\mu M$, $CC_{50} = 30\mu M$, lamivudine $EC_{50} = 0.2\mu M$)를 나타내었으며 woodchuck에서 0.1mg/kg/day 용량으로 경구 투여했을 때 3주째 virus가 소실되었고 투여를 중단 후 8~12주 지나서 virus의 rebound가 일어났다. 한편 이 화합물은 HIV, HSV 및 CMV 등에는 효과가 없었다. 현재 전임상 단계에 있다.

L-FMAU

이 화합물은 Georgia 대학의 주중광 박사팀이 합성한 화합물로 현재 부광약품에서 항 HBV제로 개발중에 있는 화합물이다. 원래 이 화합물의 대항체인 천연형의 D-FMAU가 Sloan-Kettering 연구소의 Watanabe팀에 의해 합성되었고 우수한 항 HSV 효과를 나타내어서 Bristol Mayers社에서 개발을 시도하였으나, 골수억제 및 신경계 독성 때문에 개발이 중단되었다.

최근의 비천연형의 L-nucleoside의 연구분배에 따라 합성된 이 화합물이 우수한 in vitro 항 HBV 효과를 나타내고 독성 또한 적음이 알려졌다.

Woodchuck에서 10mg/kg/day 용량으로 경구 투여했을 때 2주내에 virus가 소실되었다. 현재 전임상 단계에 있다.

L-Fd4C

이 화합물은 Yale大의 Yung-Chi Cheng 팀에서 보고한 화합물로 역시 비천 유형의 L-nucleoside 유도체이다. in vitro에서 항 HBV 효과가 $EC_{50}=0,002\mu M$ $CC_{50}=7\mu M$ 로 lamivudine 보다 10배 우수한 효과를 나타내었다. 전임상 단계에 있다.

기 타

Triangle社의 FTC와 DAPD가 Phase I 단계에서 개발 중에 있다.

이상에서 본 바와 같이 현재 항 HBV제로 개발중인 약물들은 대부분이 nucleoside 유도체들이다. Nucleoside 유도체는 2~4주 투여후에 대개 virus가 검출 한계 이하로 떨어지나, 투여를 중지하면 virus level이 투여전과 같은 수준으로 rebound한다.

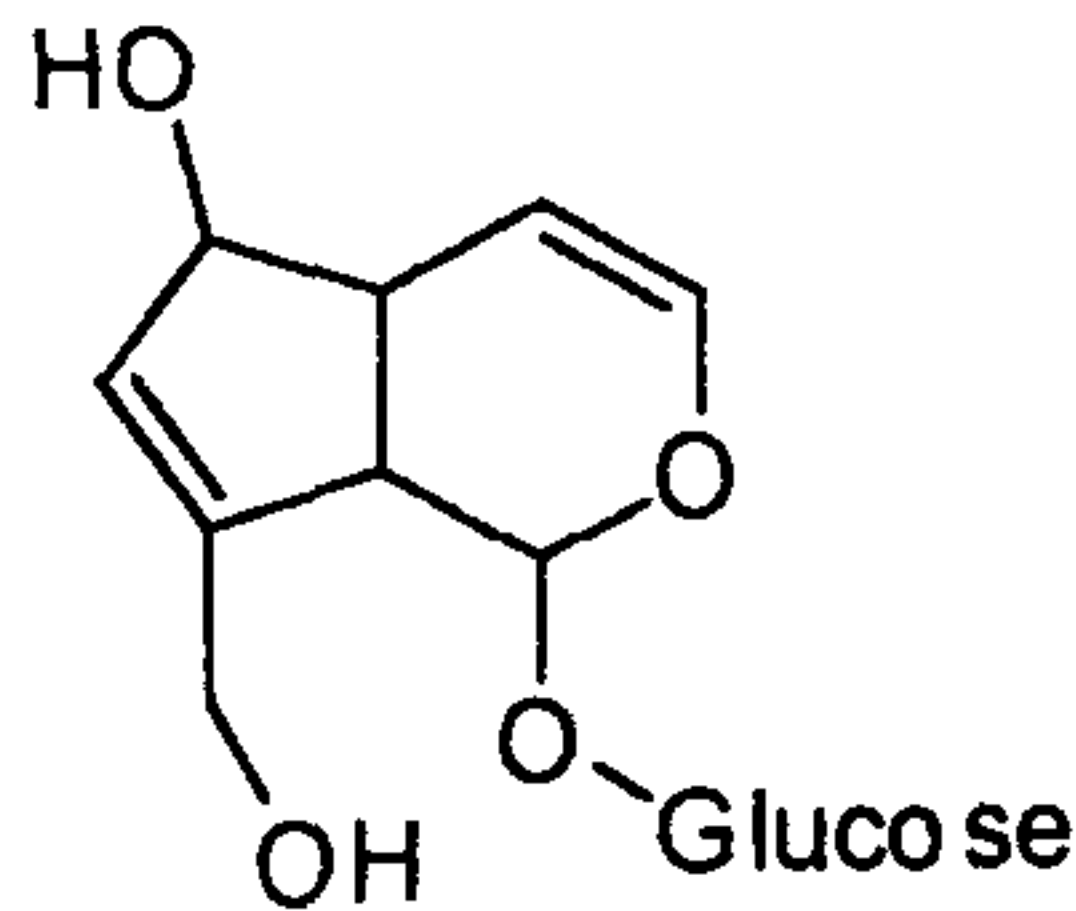
또 이미 lamivudine에서 나타났듯이 내성(resistance)이 유발된다. 이러한 사실들로 볼 때 B형 간염의 치료는 환자가 장기간 약물을 복용해야 하는 long term therapy가 필요할 가능성이 크며, HIV의 치료에서 보는 바와 같이 몇가지의 약물을 병용 투여하는 combination therapy가 될 가능성이 크다. 한편 1993년 Lilly社에서 Phase II 개발중이던 nucleoside 유도체 FIAU (Fialuridine)의 임상시험중 부작용으로 인해 다수의 환자가 사망하는 일이 일어났다. 그 원인은 mitochondrial DNA에 독성을 일으켜서 결과적으로 lactic acidosis에 의해 neuropathy와 liver damage가 일어난 것으로 추정되고 있다.

제3장 연구개발
수행내용 및 결과

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 기준 및 시험방법의 설정



$C_{15}H_{22}O_9$

M. W=346.33

1. **성상** : 백색 내지는 희백색의 결정성 가루이다. 물, 메탄올에는 잘 녹으나 클로로포름, 에테르에는 거의 녹지 않는다.
2. **확인**
 - 가. 적외선흡수스펙트럼 : 이 약을 가지고 약전 적외선흡수스펙트럼법에 따라 시험할 때 표준품과 동일한 스펙트럼을 가져야 한다.
 - 나. 박층 크로마토그래프법: 이 약 약5mg을 취해 메탄올 5ml에 녹인 후 약전 박층크로마토그래프법에 따라 시험할 때 같은 방법으로 만든 표준품의 반점과 동일한 Rf값을 나타내어야 한다.
 - TLC 조건
 - 이동상 : 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 7 : 3.5 : 1
 - 고정상 : 실리카겔 F254
 - 발색제 : 10%황산(100℃에서 가온하여 발색)
3. 비선광도 $[\alpha]_D^{20}$: $-163.1^\circ \pm 1^\circ$ (c=용매를 물로 하여 1.6% 조제하여 측정한다.)
4. 녹는점 : 108 ~ 183 °C
5. 강열잔분 : 0.2%이하(1g, 600℃, 2시간)

6. 중금속 : 20ppm 이하 (1g, 제1법)

7. 수분(KF 법) : 3% 이하

8. 잔류유기용매(GC법) : 검체 중 에탄올 5mg/g 이하.

가. 검액의 조제 : 이 약 약 0.5g을 아세토니트릴을 가해 10ml 되게 하고 30분간 초음파 수욕조에서 진탕한 후 10분간 원심분리(10,000rpm/분)한 액의 상등액을 검액으로 한다.

나. 표준액의 조제 : 에탄올 표준품 1ml를 아세토니트릴을 가해 10ml가 되게 하고 이 액 10ul를 취해 아세토니트릴을 가해 10ml가 되게하여 표준액으로 한다.

다. 크로마토그래피 조건

- 기기 : HP 5890 series II
- 칼럼 : HP ultra 2(Crosslinked 5%Ph, Me silicone, 25M length × 0.32mm i.d×0.52um filmthickness)
- Temperature
오븐 : 40℃ 주입구 : 250℃ 검출기 : FID 250℃
- 주입량 : 1ul
- Gas 유량 : air : 300ml / min 수소 : 30ml/min
- carrier gas : He 1ml/min

라. 계산

- 에탄올의 양(mg/g) = $t_{sa}/s_{sa} \times 0.79\text{mg/ml} \times ds/wt$
 - t_{sa} : 검액중 에탄올의 피크면적
 - s_{sa} : 표준액중 에탄올의 피크면적
 - 0.790 : 에탄올의 비중
 - ds : 희석 배수
 - wt : 검체 칭취량(g)

9. 함량(HPLC) : 97.0% 이상

가. 표준액의 조제 : NP-77A 표준품 약 20mg을 정밀히 취해 100ml 용량 플라스크에 옮긴후 5% 이동상으로 표준액까지 채우고, 0.45um 멤브레인필터로 여과한액을 표준액으로 한다.

나. 검액의 조제 : 표준액과 동일한 방법으로 조제한다.

다. 방법 : 표준액과 검액을 가지고 다음의 조건에서 고속액체크로마토그래프법에 따라 시험한다.

- 다 음 -

- 칼 램 : Capcellpak C18(4.6mm×250mm, 5um)
- 이동상 : 아세토니트릴 (0.1% TFA) : 물 (25:75)
- 검출과장 : UV 225nm(0.05aufs)
- 유 속 : 1ml:min
- 주입량 : 20ul

라. 계 산

$$\text{함량(\%)} = (\text{Aspl}/\text{Astd}) \times (\text{Wspl}/\text{Wstd}) \times 100 \times P$$

- Aspl : 검액에서의 NP-77A 피이크 면적
- Astd : 표준액에서의 NP-77A 피이크 면적
- Wspl : 시료칭취량(mg)
- Wstd : 표준품칭취량(mg)
- P : 표준품의 속도

제 2 절 NP-77A의 분리 및 정제

1. 실험방법

기존의 set up된 방법을 개선하여 식나무로부터 NP-77A 분리, 정제하는 공정을 4단계로 나누어 진행하였다.

가. 식나무 잎의 세절 및 수 추출

잎에 함유된 유기산의 산성화 방지를 위해 H₂O 1L당 0.5%의 CaCO₃를 첨가하고, 100℃에서 열탕 추출 하였다.

나. EtOH 처리 및 농축 (전 처리)

- ① 수 추출물을 여과후 원식물량의 1/4 량 까지 농축한다.
- ② 농축한 농축ext에 Ethanol을 동일량 첨가하고 약 30분간 교반한다.
- ③ 상기 ②액을 여과하여 여액을 1/2량 까지 농축한다.

다. Charcoal 흡착

기존의 Alumina column ch.에서 분리한 NP-77A 함유 fraction을 농축후 재결정에 의해 정제하였으나, 이 방법은 천연물 특성상 다량의 색소가 따라와서 NP-77A의 순도 및 외관에 영향을 미치므로 이를 개선하기 위하여 농축액을 charcoal 처리하여 색소등 비극성 물질을 제거하였다.

라. Alumina column chromatography

Alumina를 충전한다음 상기ext.을 column에 loading하고, 수포화BuOH 용매를 elution시켜 TLC를 통해 NP-77A 함유분획을 모아 농축한다.

마. Recrystallization

상기농축액에 적량의 Ethanol을 가해 가온시켜 재용해 시킨후 저온하에 방치시켜 재결정하는 과정을 1~2차 반복하여 순백색의 NP-77A를 얻는다.

2. 실험 결과

가. 시간적 비교 (20g분리 기준)

	column법	Alumina short filter법	비 고
Elution time	1 column 2 days	1 column 1/3 days	
Concentration	3 days	0.5 days	column법의 경우 사용된 용매가 많으므로 시간이 많이 소요됨.
BuOH 재생	2 -3 days	None	short filter법의 경우 농축과 동시에 BuOH 회수.

나. 분리 단가 비교 : 1kg 분리 기준 (단위:천원)

항 목	세부항목	Column 법		Filter 법		비 고
		필요량	단 가	필요량	단 가	
원 료	원 식 물	200kg	600	200kg	600	
추출, 전처리	Ethanol	200l	300	60l	50	
1차 분리	coating Al ₂ O ₃	30kg	600	30kg	300	
	Matrix Al ₂ O ₃	250kg	5,000	10kg	200	재생가능
	n-butanol	800l 60%	850	180l 100%	180	recycling %
EtOAc-MeOH 2nd column	SiO ₂	10kg	380	10kg	200	
	EtOAc	150l	337	150l	237	
	MeOH	50l	75	40l	40	
재 결 정	EtOH	100l	200	10l	20	
합 계			8,342		1,827	

단, 인건비, 고정자산 구입 비용 및 가동유지비 제외됨.

4. 결론 및 고찰

본 연구를 통해서, 기존의 set up된 방법을 개선하여 기원 식물인 식나무 잎으로부터 NP-77A 분리방법을 새롭게 정립하였고, 정립된 NP-77A 분리 방법에 의해 순수한 NP-77A 10Kg 을 분리하였으며, 분리한 NP-77A의 함량은 평균 99.7% 이상을 나타내었다. 또한, 새로 정립한 NP-77A 분리법은 기존방법보다 분리 소요시간은 20%, 분리비용은 17% 낮았다.

이상과 같이 천연물로부터 NP-77A 대량분리 공정법 확립을 통해 분리 소요시간, 분리비용 및 원식물중의 NP-77A 분리효율을 향상시켰고, 또한 기원식물인 식나무의 국내 채집상의 제한성으로 인한 문제점은 식나무 엑기스를 중국으로부터 수입 대체시킴으로서 향후 NP-77A 원료공급상의 문제점을 해결하였다.

제 3 절 일반약리연구

본 연구는, NP-77A를 임상에 투여시 나타날 수 있는 부작용을 검색할 목적으로, 실험동물의 적출기관을 이용하여, 자율신경계에 미치는 NP-77A의 영향을 관찰하였다.

1. 실험방법

가. 자율신경계에 대한 영향

(1) Guinea pig 적출기관에 대한 작용

체중 300-400g의 3마리의 수컷 guinea pig의 후두부를 강타하여 방혈치사시킨 후 기관을 노출하여 기관 ring 6개를 silk suture로 묶어 strip-chain으로 만들고 95% O₂+5% CO₂ 혼합 gas가 통하는 37±1°C의 tyrode액의 organ bath중에 현수하였다. 1g의 resting tension을 주어 60분 동안 평형시킨후 NP-77A를 organ bath내에 적용하고 histamine을 누적 용량법으로 적용하여 그 수축반응을 isometric transducer를 통하여 polygraph상에 표시하였으며 3회 반복 시험하였다.

(2) 적출수정관시험

체중 300-350g의 3마리의 수컷 guinea pig를 후두부를 강타하여 방혈치사시킨 후 하복부를 절개하였다. 음낭을 압착하여 고환이 나오게 한후 수정관을 분리하고 결합조직을 제거하였다. 부고환과 요도 근접부위에서 각각 절단하여 결합조직과 함께 수정관을 분리하였다. 약 15mm의 길이로 표본을 만들어 95% O₂+5% CO₂ 혼합 gas가 통하는 37±1°C의 tyrode액의 organ bath중에 현수하였다. 1g의 resting tension을 주어 60분 동안 평형시킨후 norepinephrine 10⁻⁵M을 적용하여 수축반응을 isometric transducer를 통하여 polygraph상에 기록하였다. NP-77A는 10분전에 전처치하고 resting tension의 변화와 수축반응에 대한 영향을 확인하였다. 대조약물로는 phentolamine 3×10⁻⁴M을 사용하였다.

(3) 적출 비임신 자궁시험

체중 150-180g의 6마리의 암컷 rat에 0.1mg/kg의 diethylstilbesterol(DES)을 olive oil에 현탁하여 1ml/100g를 피하주사하여 발정기 상태(estrus)로 만들었다. 24시간 후 rat의 후두부를 강타하여 방혈치사 시킨후 복부를 절개하여 자궁을 적출하고 결합조직을 제거한 후 종축을 따라 절개하여 폭 2mm, 길이 1cm의 자궁 표본을 만들었다. 표본 양쪽에 ring microwire clamp를 고정시키고 95% O₂+5% CO₂ 혼합 gas가 통하는 32±1℃의 De Jalon's 용액에 현수하였다. 0.5g의 resting tension을 주고 30-60분동안 평형시킨 후 norepinephrine 5×10⁻⁵M을 적용하여 수축반응을 isometric transducer를 통하여 polygraph상에서 확인하였다. NP-77A는 3분간 전처치후 측정하였다.

(4) 적출 위기저부 시험

체중 150-180g의 6마리의 수컷 rat 후두부를 강타하여 방혈치사 시킨 후 복부를 절개하여 위를 적출하고 위기저부를 분리하였다. 먼저 fundus 위기저부(회백색)와 pyloric parts(적색)를 횡절개로 분리하고, fundus의 소만부위를따라 절개하여 평면상의 위기저부로 만들었다. 평면상의 위기저부의 중앙선이 된 대만선에 직각으로 절개하여 두께 3mm의 위기저부 표본을 만들었다. 위기저부 표본에 clip microclamp를 고정하고 95% O₂+5% CO₂ 혼합 gas가 통하는 32±1℃의 Krebs solution 용액에 현수하였다. 1g의 resting tension을 주고 60분 동안 평형시킨후 5-Hydroxytryptamine 10⁻⁶과 acetylcholine 10⁻⁵M 적용하여 수축반응을 isometric transducer를 통하여 polygraph상에서 확인하였다.

(5) 적출 혈관시험

체중 200-250g의 6마리의 수컷 rat 후두부를 강타하여 방혈치사 시킨 후 즉시 개흉하여 심장과 함께 흉곽 대동맥을 적출 하였다. KRB 용액 속에서 지방조직과 결합조직을 제거하고 길이 3mm의 ring 상으로 절단하여 혈관 표본을 제작하였다. 이 혈관 ring을 28G needle hook에 걸어 organ bath내의 KRB 용액 속에서 hook holder와 transducer의

고리 사이에 현수시켰다. 영양액의 온도는 37℃로 유지시키고 95% O₂ +5% CO₂ 혼합 gas로 송기 시켰다. 2g의 resting tension을 주고 1cm/1g tension으로 반응하도록 sensitivity를 조정한 후, 15분마다 KRB 용액으로 세척하면서 60분 동안 평형 시켰다. 평형을 이룬 적출 흉곽 대동맥 ring을 고농도의 KCl로 2회 수축시키고 세척하였다. 재평형후 norepinephrine 10⁻⁶으로 농도반응곡선을 작성하고 acetylcholine 10⁻⁶M을 이용하여 이완반응을 확인하였다.

2. 실험결과

가. 자율신경계에 대한 영향

(1) Guinea pig 적출기관에 대한 작용

Guinea pig 적출 기관지의 histamine 10^{-6} g/ml에 의한 수축에 대하여 NP-77A 10^{-1} - 10^{-3} M의 전 농도에서 거의 영향을 미치지 않았다.

(Figure 1)

(2) 적출수정관시험

Guinea pig 수정관에 대하여 NP-77A 10^{-1} - 10^{-3} M의 전 농도에서 거의 영향을 미치지 않았으며 phentolamine 유발 수축작용에도 영향을 미치지 않았다. (Figure 2)

(3) 적출 비임신 자궁시험

NP-77A는 10^{-1} - 10^{-3} M의 전 농도에서 rat의 적출 비임신 자궁에 대한 영향이 없었으며 norepinephrine 유발 수축작용에도 영향을 미치지 않았다. (Figure 3)

(4) 적출 위기저부 시험

NP-77A는 10^{-1} - 10^{-3} M의 전 농도에서 rat의 적출 위기저부에 대한 영향이 없었으며 5-HT 및 acetylcholine 유발 수축작용에도 모두 영향을 미치지 않았다. (Figure 4)

(5) 적출 혈관시험

NP-77A는 10^{-1} - 10^{-3} M의 전 농도에서 rat의 적출 흉곽대동맥에 대한 영향이 없었으며 norepinephrine 유발 수축작용과 이에 대한 acetylcholine 유발 이완작용에도 모두 영향을 미치지 않았다.

(Figure 5)

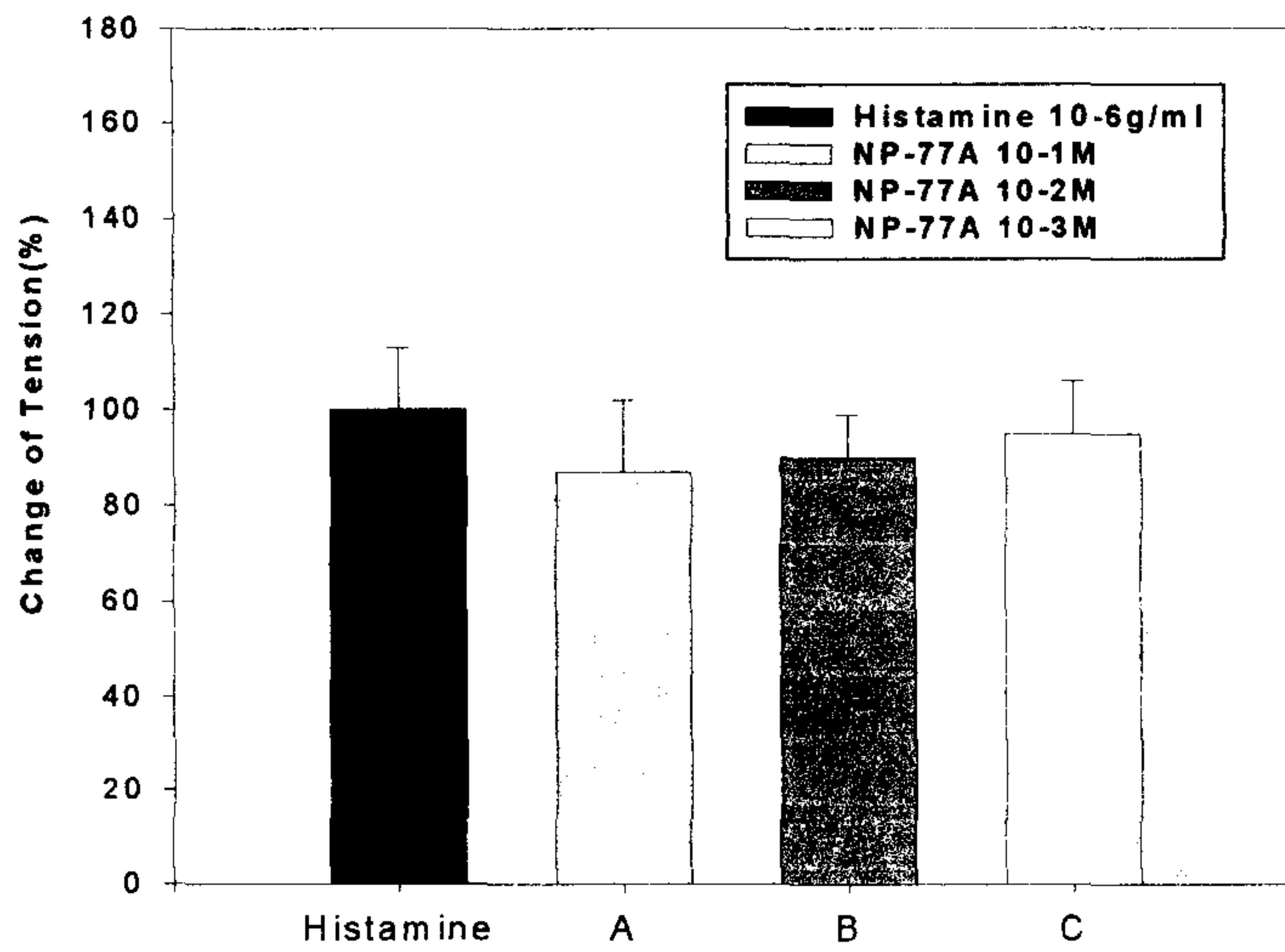
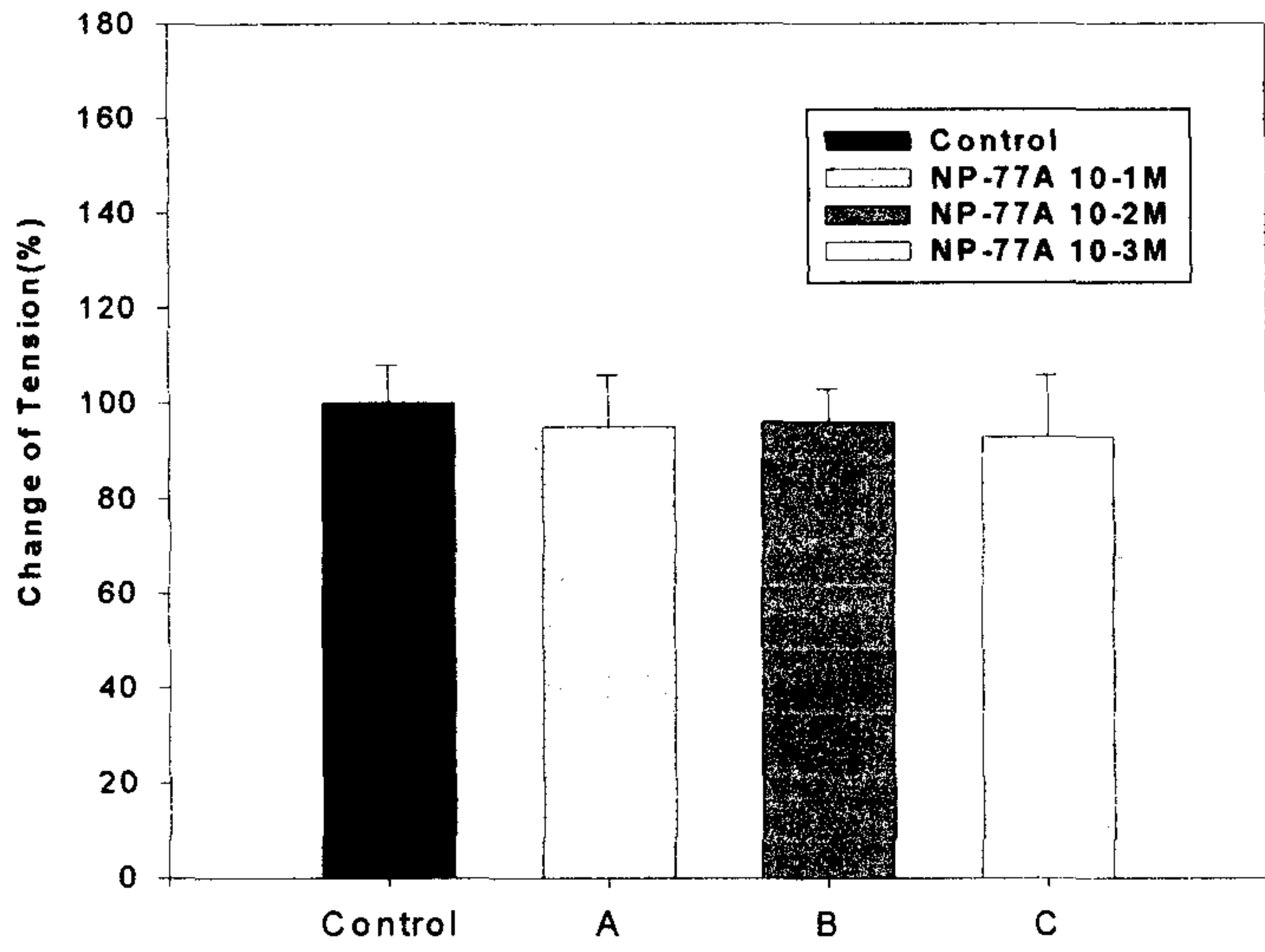


Fig 1. NP-77A가 guinea pig 적출 기관지 및 histamine 유발 기관지 수축작용에 미치는 영향 (Mean±S.E.)

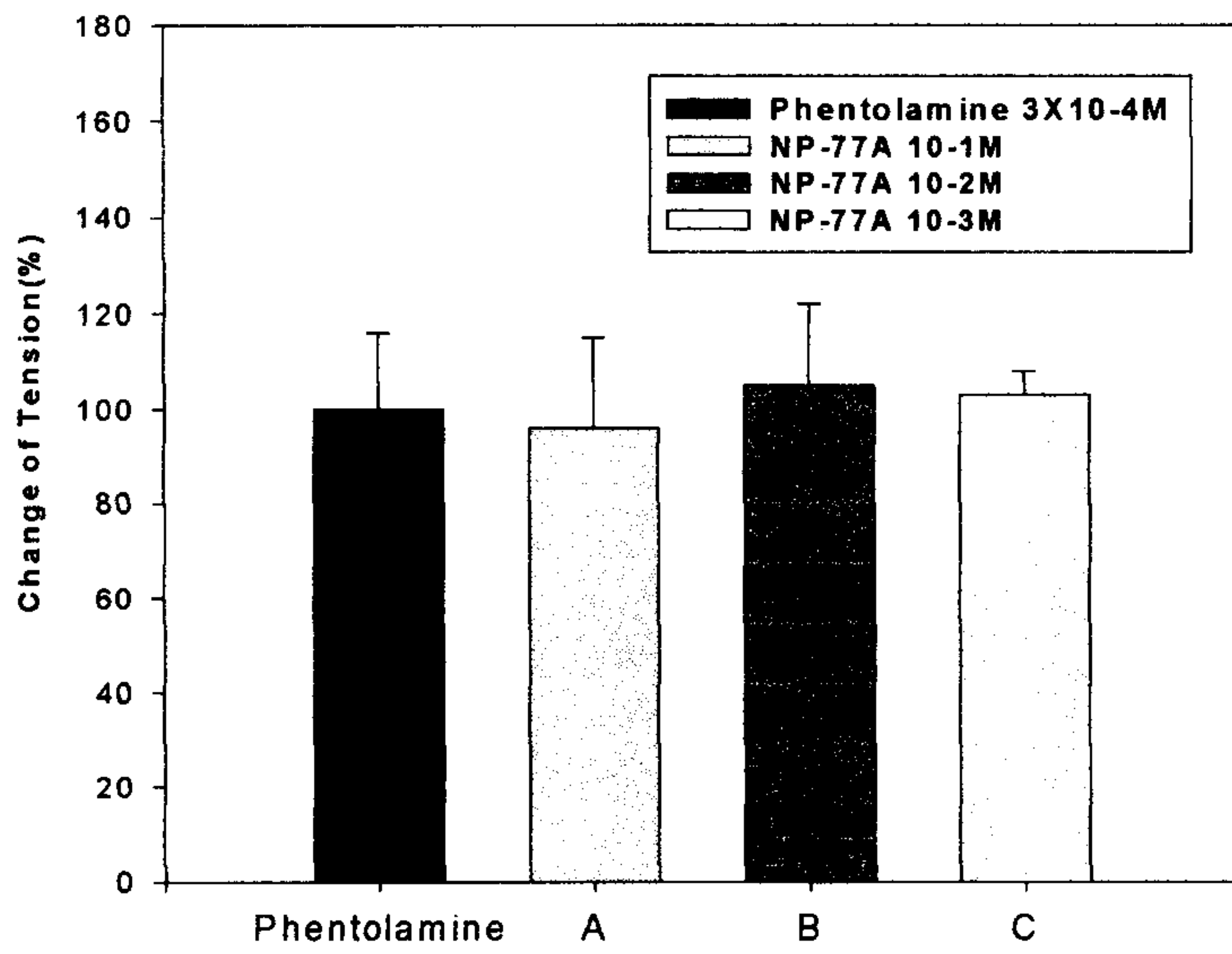
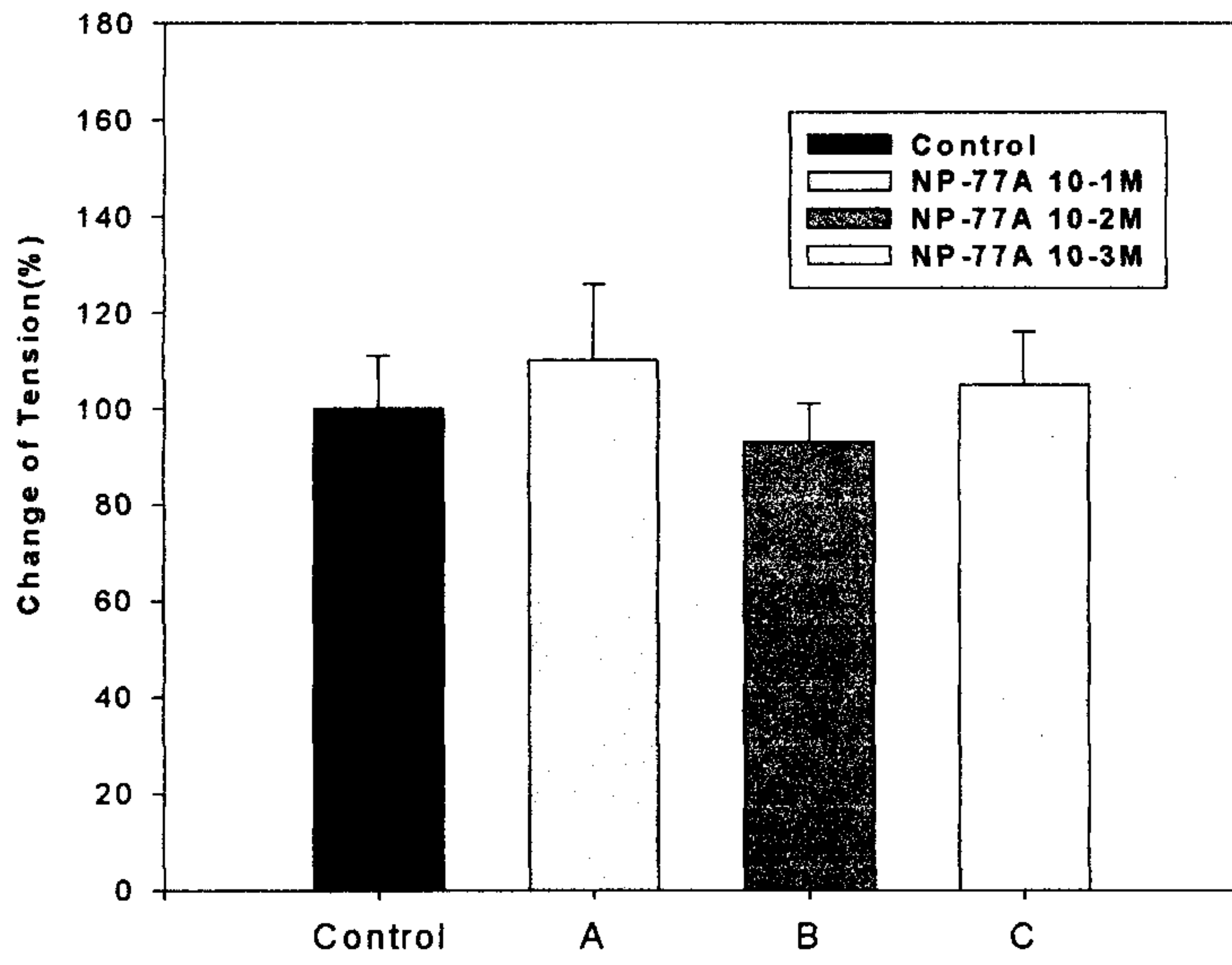


Fig 2. NP-77A가 적출 수정관 및 phentolamine 유발 수정관 수축작용에 미치는 영향 (Mean \pm S.E.)

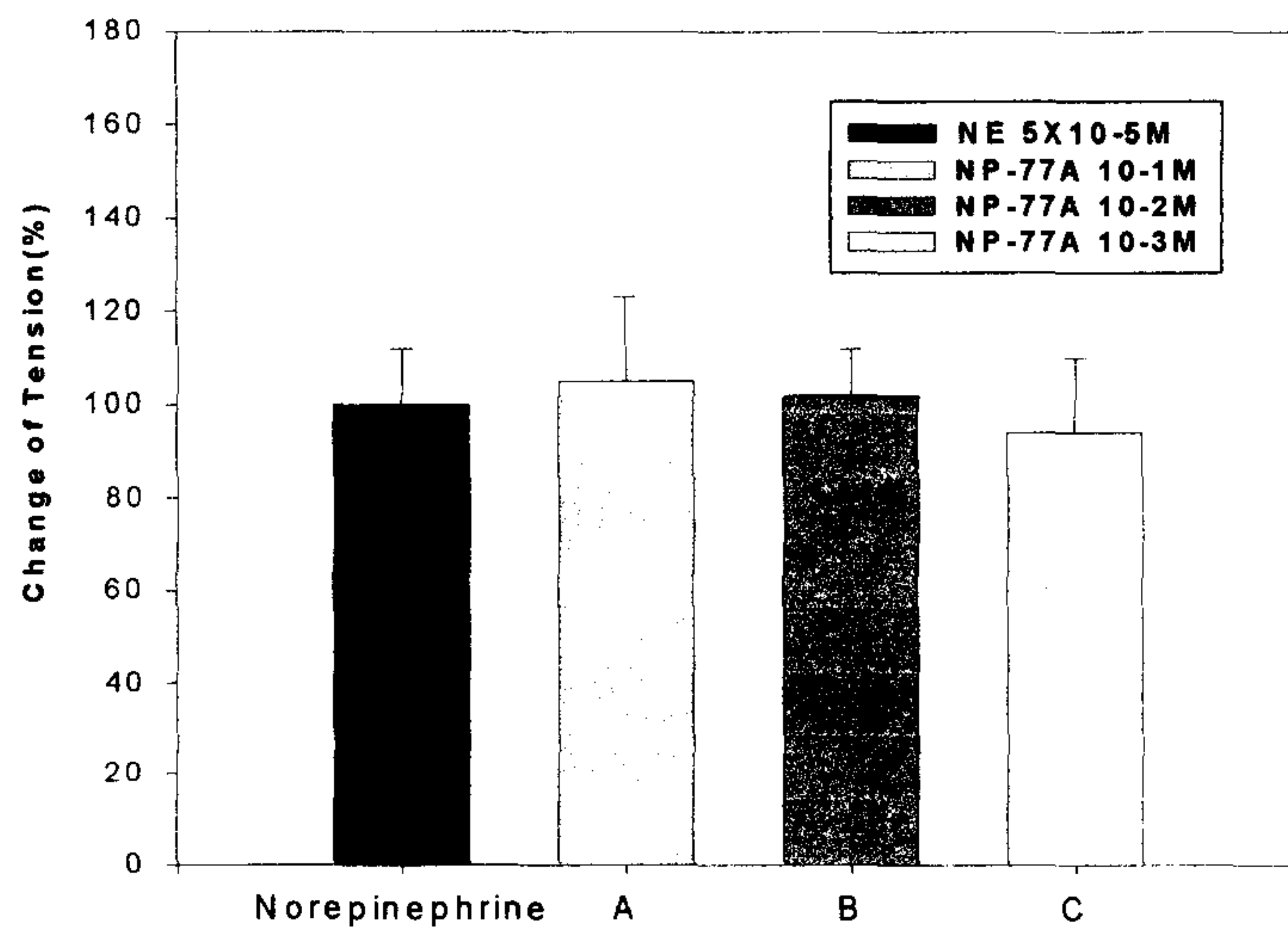
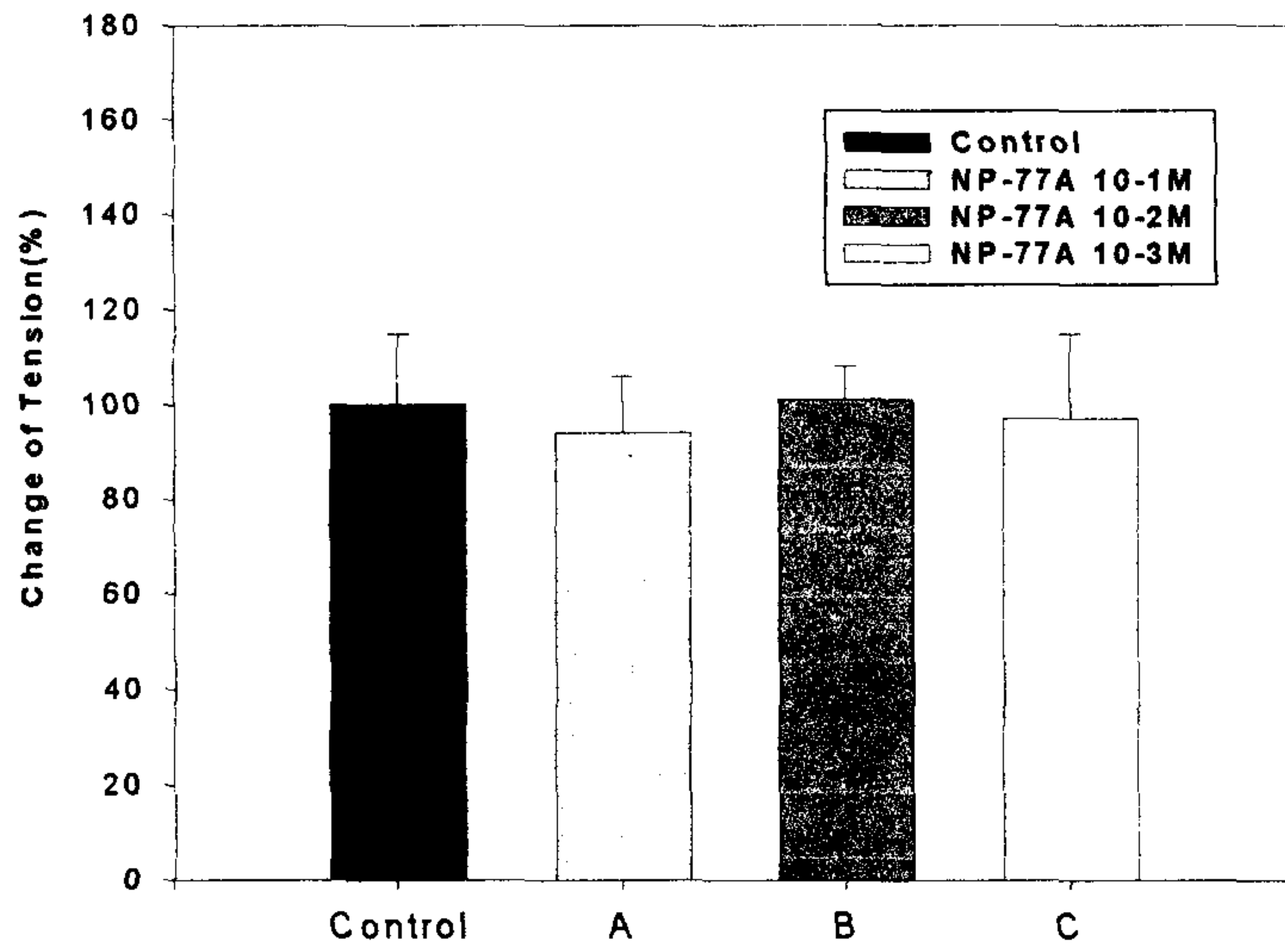


Fig 3. NP-77A가 적출 비임신 자궁 및 norepinephrine 유발 자궁 수축에 미치는 영향 (Mean \pm S.E.)

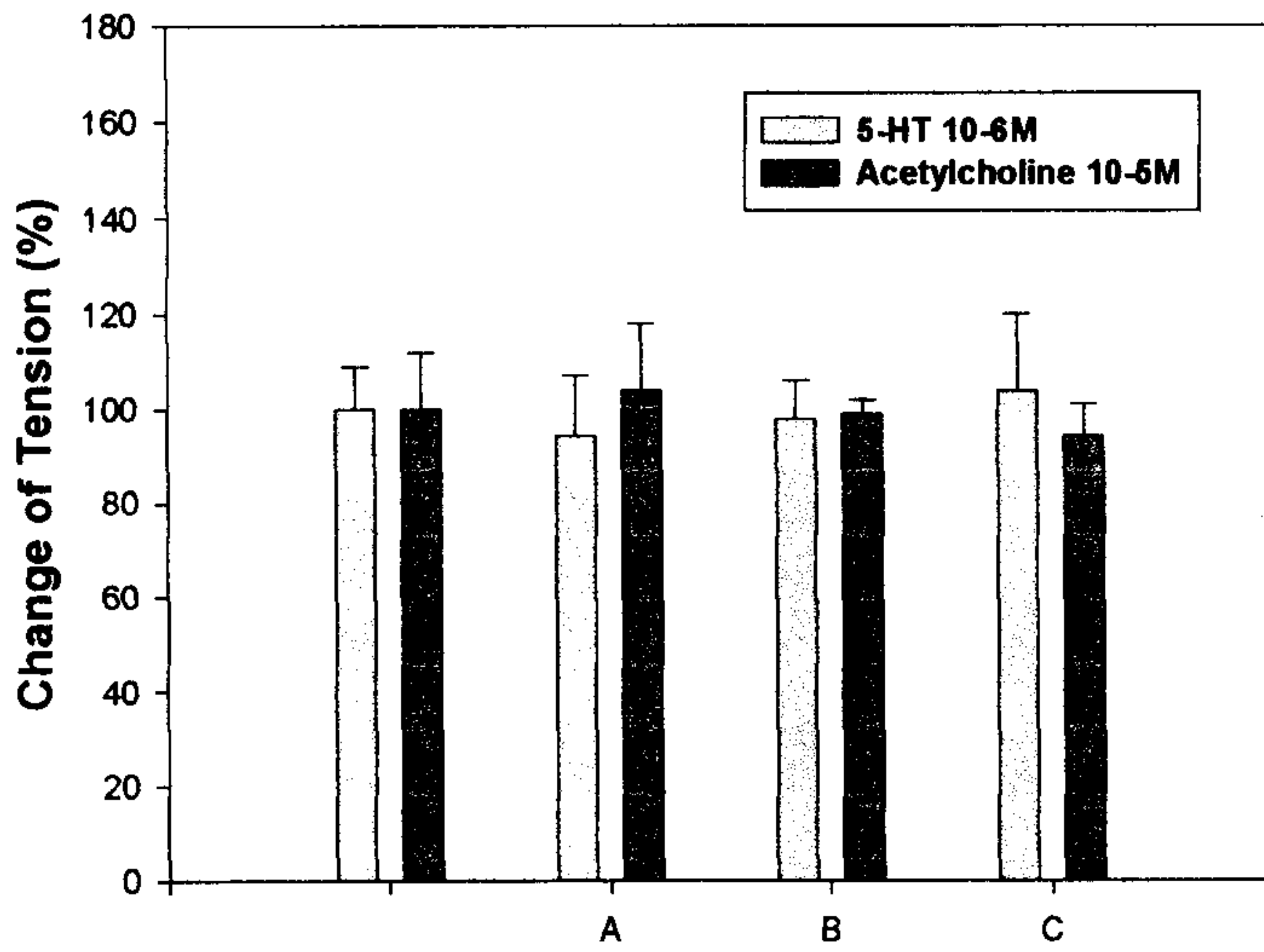
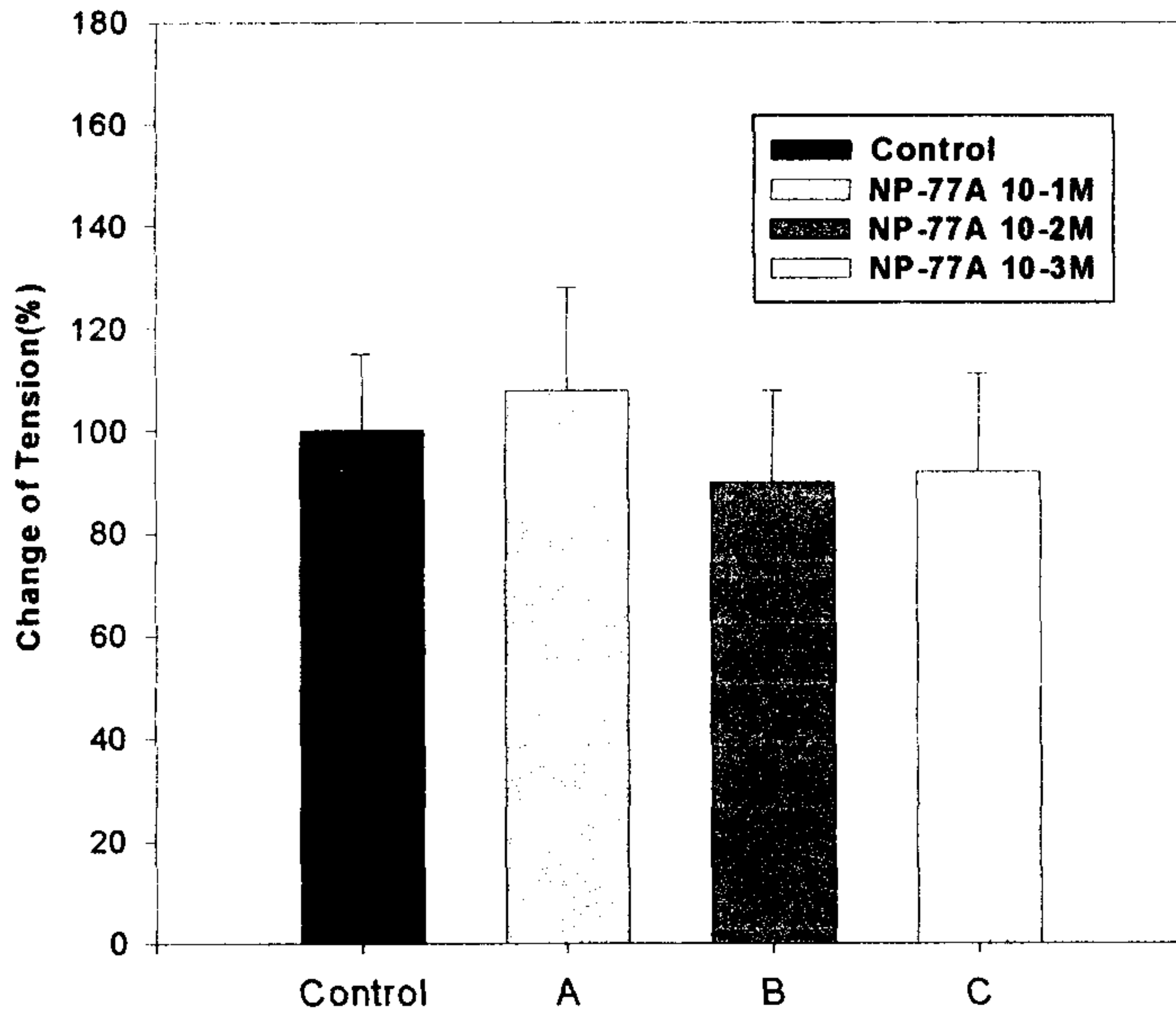


Fig 4. NP-77A가 적출 위기저부 및 5-HT, acetylcholine 유발 위기저부 수축에 미치는 영향.

(A : NP-77A $10^{-1}M$, B : NP-77A $10^{-2}M$, C : NP-77A $10^{-3}M$ Mean \pm S.E.)

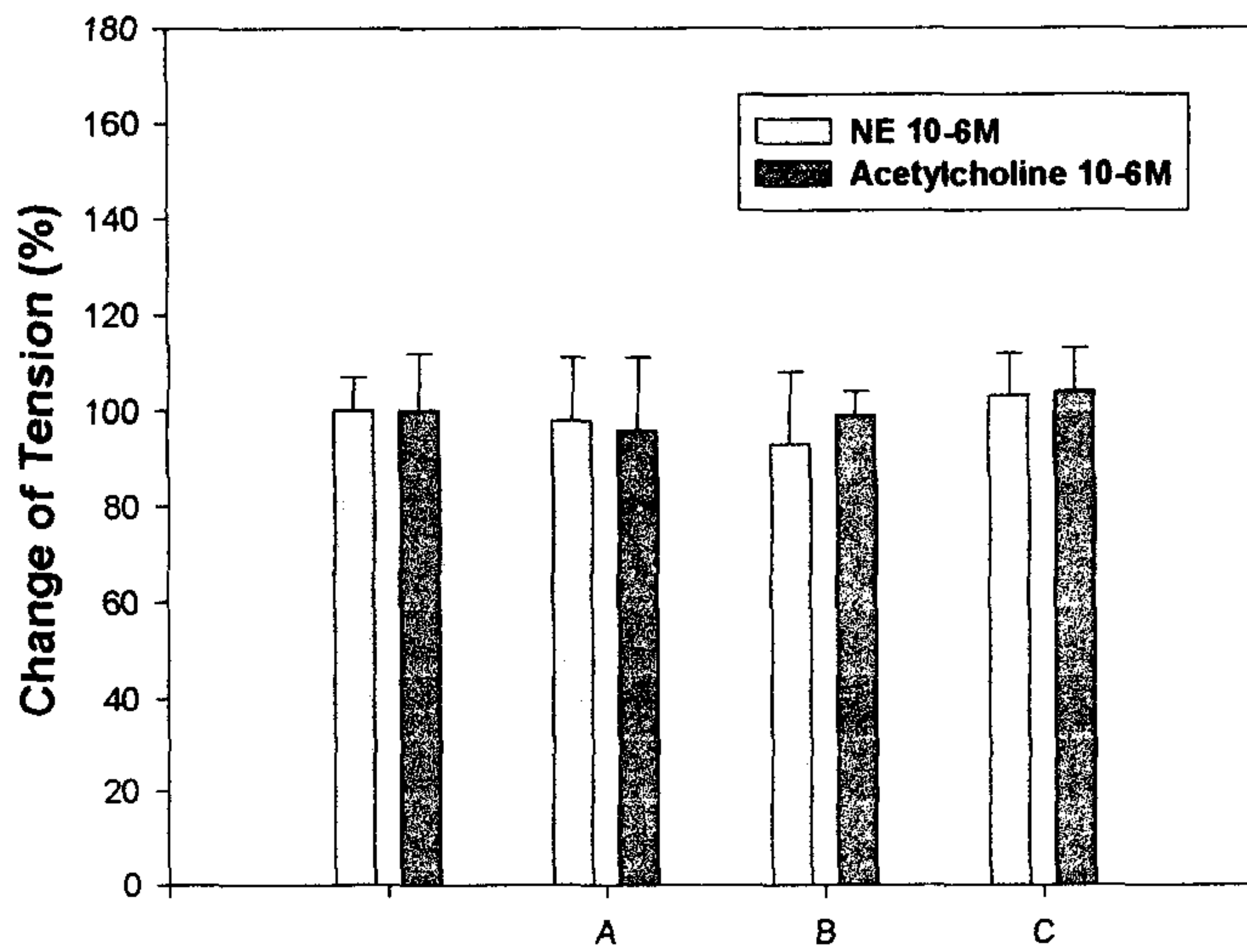
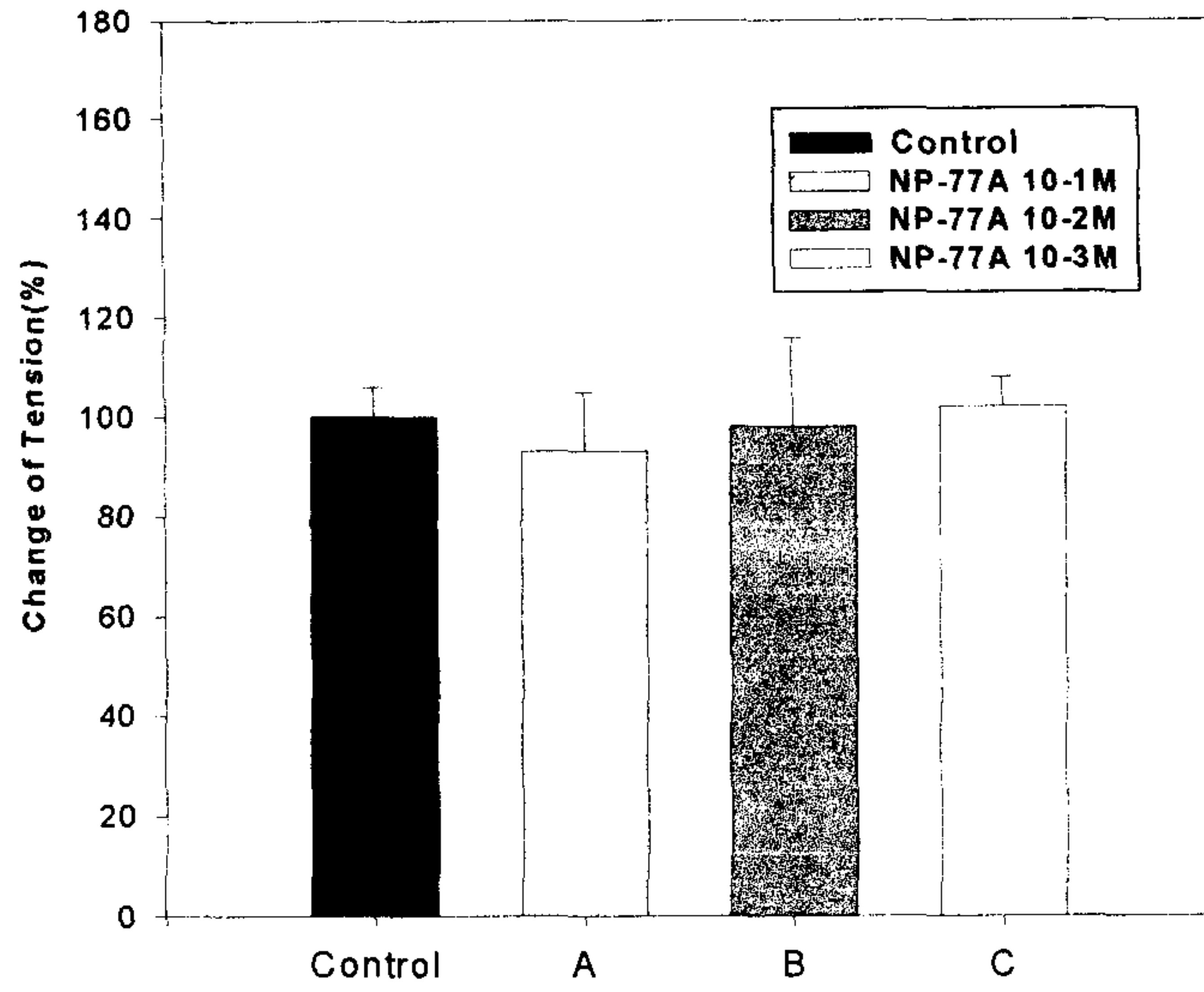


Fig 5. NP-77A가 적출 혈관 및 norepinephrine, acetylcholine 유발 혈관 수축, 이완 작용에 미치는 영향.

(A : NP-77A $10^{-1}M$, B : NP-77A $10^{-2}M$, C : NP-77A $10^{-3}M$ Mean \pm S.E.)

제 4 절 NP-77A의 항 HBV (Hepatitis B virus) 작용기전 연구

1. 서론

NP-77A가 시험관내 (in vitro) 및 생체내 (in vivo)에서 보이는 항 HBV 효과 (anti-HBV activity)의 작용에 대한 그 기전을 밝히는 것이 NP-77A를 신약으로서 개발됨에 있어 무엇보다도 중요한 요건이 될 것이다. 이에 HBV의 증식환 (life cycle)에 입각하여 증식에 필수적이며 既 개발되어 그 작용기전이 알려진 작용기전에 대하여 NP-77A 및 그의 유도체를 적용하여 NP-77A의 작용기전을 밝히고져 하였다. 또한 기전연구에 대한 간접적인 방법으로 시험관내에서 잘 증식하며 대표적인 다른 바이러스에 대한 효과를 측정하였다.

2. HBV 증식에 따른 각 단계에서의 NP-77A의 작용

HBV는 생체내에서 복제시 다른 바이러스와 달리 특이적인 증식을 한다. 즉 HBV의 게놈(genome) 으로 가지고있는 환형의 DNA는 증식세포인 간세포 (hepatocyte)내로 침입후 자신의 복제에 필요한 단백질을 만들기 위한 mRNA 및 게놈형성의 주형이 되는 RNA (pre-genomic mRNA)를 만든다. 이후 구성 capsid가 되는 HBc 단백질과 pre-genomic mRNA 가 pre-mature core를 형성한 뒤 자신의 DNA polymerase를 이용하여 게놈의 형성을 이룬다. 이러한 증식 방법은 일반적인 DNA 바이러스나 역전사를 하는 retro virus와 달리 헤파드나바이러스 (hepadnaviridea)에서만 보이는 현상이다. 이러한 증식단계 중 바이러스 증식의 key가 되는 단계는

- ① 바이러스 침입단계
- ② core 형성단계

③ HBV polymerase에 의한 HBV 게놈 형성 등이 있을 수 있다. 그러나 NP-77A의 항HBV 효과는 HBV를 포함하고 있는 2.2.15세포주에서 확인된 것임을 생각할 때 바이러스의 침입 단계저해가 NP-77A의 기전일 가능성은 매우 희박하다고 유추할 수 있다. 따라서 core의 형성단계 및 HBV polymerase에 대한 NP-77A의 효과를 측정하여 작용기전을 밝히고져 하였다.

가. 재료 및 방법

1) HBV polymerase의 클로닝.

PCR을 수행하기 위한 primer로서 5'-GATCCATGGCTATGCCCC-TATCTTATCAAC-3를

senseprimer로, 5'-TAAGCTTCTAGGAGTTCCGCAGTATGG-3'를 antisense primer로 하여 primer를 합성하였다. PCR의 수행은 Stratagene(USA)사의 TaqPlus를 이용하여 200 μ M dNTP, 50pmol primer, 2.2.15 purified HBV DNA 0.1ng를 사용 94°C 1min, 57°C 1min, 72°C 2.5min. 30cycle의 조건으로 수행하였다. PCR 산물을 Nco I, Hind III로 제한효소 처리를 한 후, 역시 Nco I, Hind III처리된 pET29(c)와 16°C에서 16시간동안 ligation 하였다. 이렇게 얻어진 clone을 pHEP-3로 명명하였다. (그림1). 이 pHEP-3은 T7 promoter하에 놓여져 있으며, N-terminal 부위에 S-tag을 in-frame으로 붙어있다.

- 2) 토끼 적혈구세포를 이용한 시험관내 HBV polymerase의 발현
 시험관내 단백질 발현은 TNT in vitro translation system (Promega)를 이용하였다. PEG로 정제된 pHEP-3 plasmid 1 μ g, rabbit reticulocyte lysate(RRL) 25ul, T7 RNA polymerase 5unit, aminoacid, reaction buffer를 혼합한 뒤 30°C 상에서 1시간 30분간 반응시켰다. 또한 HBV polymerase의 생성 여부 모니터링을 위하여는 Biotin-labelled lysine을 이용하여 반응후 전기영동한 뒤 이를 PVDF membrane으로 전사한 뒤 Streptaavidin-AP를 이용, 확인하였다. 또한 S-AP를 이용하여서도 확인 하였다.
- 3) 시험관내 발현 HBV의 characterization
 RRL내에 발현된 HBV polymerase의 작용이 자연계에 발현되는 HBV polymerase activity를 갖는지를 확인 하기 위하여 각종 primer 및 template를 이용하여 그 activity를 확인 하였다. 즉 DNA polymerase activity 확인을 위하여 RRL 20ul, 2X reaction buffer (200mM Tris-HCl pH 7.5, 60mM NaCl, 20mM MgCl₂) 10ul, dNTP mix (200uM dATP, dCTP, dGTP, 40uM dTTP, 0.3 nM Fluor-11 dUTP (Fluorogreen TM, Amersham)) 8ul, 에 각 primer 및 template 2ul를 첨가하여 30°C에서 45분간 반응하였다. 반응산물의 확인은 dot blotter를 이용, ECL detection 방법에따라 수행하였다. 이중 template dependent polymerase activity 의 확인을 위하여 DNA dependent DNA polymerase activity 확인시는 poly dA/oligo dT를, RNA dependent DNA polymerase activity 확인시는 polyA/oligo dT를 주형/프라이머로 하여 이용하였다.
- 4) 발현 polymerase의 정제
 발현된 RRL내에는 polymerase 외에도 다른 많은 부산물이 있어 이것이 약효 검색에 방해를 줄 수 있기 때문에 이를 제거 하기위해 다음

과 같이 정제하였다. 발현된 HBV polymerase는 N-terminl 부위에 S-tag을 가지므로 S-tag purification system (Novagen)을 이용하여 정제하였다. 정제한 Polymerase는 200mM KPO4, 2mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, 1mg/ml BSA 상태로 -70℃에 보관하여 이용시에 사용하였다.

5) HBP polymerase에 대한 약효 test

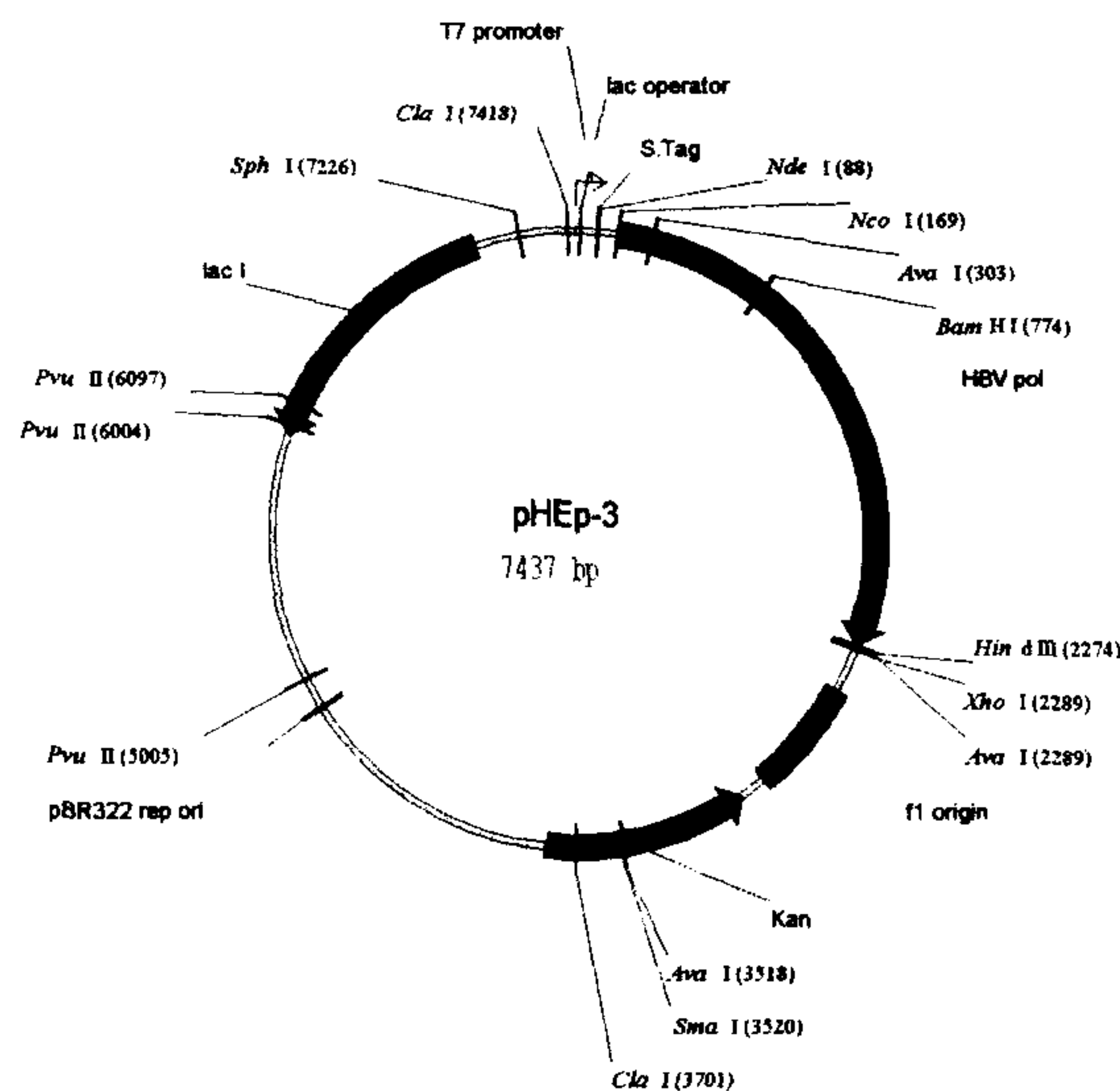
정제된 HBV polymerase를 이용하여 이를 스크리닝에 이용하였다. 즉 2X reaction buffer 25ul, dNTP 1.25 ul, HBc RNA 1ug, HBc primer 50pmol RNasin 1ul, drug 2.5ul, HBV polymerase 1ul, 16.25ul ddH2O 의 조건으로 30℃에서 30분간 반응한 뒤 이를 slot blotter를 이용하여 Nylon membrane (Amersham)으로 전사하여 상기 방법에 의거 detection 하였다. 얻어진 결과물은 Scanning 후 densitometer로 흑화정도를 정량하였다.

나. 결과

1) HBV polymerase 의 cloning.

cloning 한 pHEp-3의 구성은 다음의 그림과 같다.

그림 1. HBV polymerase 발현을 위한 vector pHEp-3의 구조



구성한 pHEP는 T7 promoter의 영향을 받아 전사를 하게됨을 이용하여 이를 Novablue DE3 strain에 transformation 하여 발현을 조사하였으나 발현을 확인할 수 없었다.

2) 토끼 적혈구세포를 이용한 시험관내 HBV polymerase의 발현

RRL 내에서 발현된 HBV polymerase를 확인 하기 위하여, PVDF로 전사된 RRL에 S-AP를 이용 detection 하였다. detection 결과 약 80kDa 부근에서 HBV polymerase band가 확인 되었다. 이는 HBV polymerase가 대장균내에서는 잘 발현되지 않는 codon의 배열로 인해 대장균내에서는 발현 확인이 되지 않고, 척추 동물의 trnslation 기구를 이용 시 발현이 잘 일어난 것으로 보인다.

3) polymerase의 characterization.

자연계에 존재하는 HBV polymerase는 앞서 설명했듯이 Reverstranscription과 DNA dependant polymerization을 모두 매개한다. 따라서 시험관내에서 발현된 HBV polymerase의 성상이 HBV의 것과 같은지를 확인 하기 위하여 각종의 primer 및 template couple을 이용하여 이를 확인 하였다. 그림에서 보듯이 poly A/oligo dT, poly dA/oligo dT, random primer only의 모든 reaction에서 DNA 합성을 보였다. 이는 시험관내 발현된 HBV polymerase가 자연계에서 발현되는 HBV polymerase와 마찬가지로 역전사활성 및 DNA polymerization activity를 갖는 것을 말한다고 할 수 있다. 또한 random primer만으로 반응을 시켜도 강력한 signal을 보이는데, 이는 RRL 내의 많은 RNA들을 주형으로 하는 reverse transcription의한 활성으로 일어난 것으로 보인다. 이는 단백질 발현이 끝난 RRL에 RNase를 처리한후 Random primer 만을 이용하여 역전사 시키면 이러한 활성을 보이지 않음으로 확인 하였다.

4) NP-77A 및 계열 약물의 항 HBV polymerase 활성 조사

반응의 standardization을 위하여 mock로서 DMSO를 이용, 약효 및 reaction이 일정한 농도를 구하였다. 이때 DMSO가 0.5%이하에서 유의성있는 enzyme activity를 나타내었으며, 이를 근거로 모든 약물의 처리는 10% DMSO에 녹인 뒤 final 0.5%가 되도록 처치하였다. 처치의 양성대조군으로서는 현재 잘알려진 항 HBV 물질인 3TC와 ddC, 그리고 ddC의 생체내 활성 물질인 ddCTP를 이용하였다.

이때 3TC 및 ddC의 경우 활성이 매우 낮게 나타났는데, 이는 3TC와 ddC가 생체내에서 각기 triphosphate form으로 전환된 뒤에 약효를 나타내는 것을 상기 할 때, 이와 같은 결과는 nucleoside자체의 약효

는 polymerase에 대해 평가 절하 될 수 있음을 보인다 할 수 있다. 반면 ddCTP는 그 활성이 HBV에 대해 높은 저해를 나타내는 것으로 확인 되었다.

NP-77A 계열의 약물의 항 HBV polymerase에 대한 효과는 미미하며, 보여진 효과 역시 polymerase의 activity를 저해 한다기 보다, 다른 원인에 의한 약효, 즉 protein과의 비특이적 결합등으로 나타내는 것으로 추론된다.

Drug	Drug conc (uM)	inhibition activity(%)	ED50
3TC	0.05	22	>50nM
	0.025	18	
	0.0125	3	
ddC	100	8	>100uM
	50	0	
	25	0	
ddCTP	50	100	< 3uM
	12.5	92	
	3.125	80	
NP-77A	1000	0	no activity
	250	0	
	125	0	
NP-77A aglycon	500	31	> 500uM
	250	12	
	125	0	
NP-01	1000	15	> 1000uM
	250	0	
	62.5	0	

Table 1. Activity screening against HBV polymerase

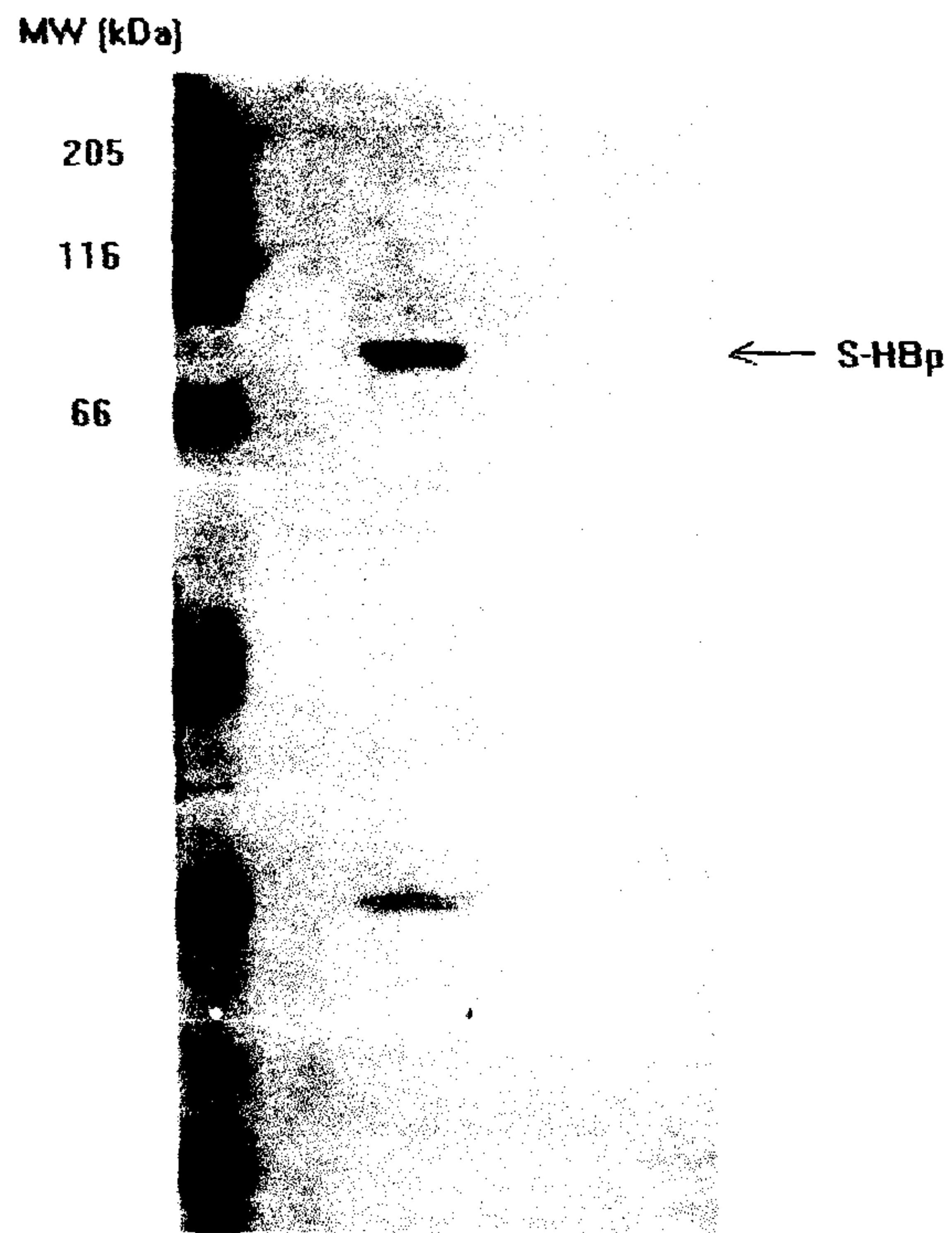


Fig.6 Rabbit reticulocyte를 이용한 HBV polymerase의 발현

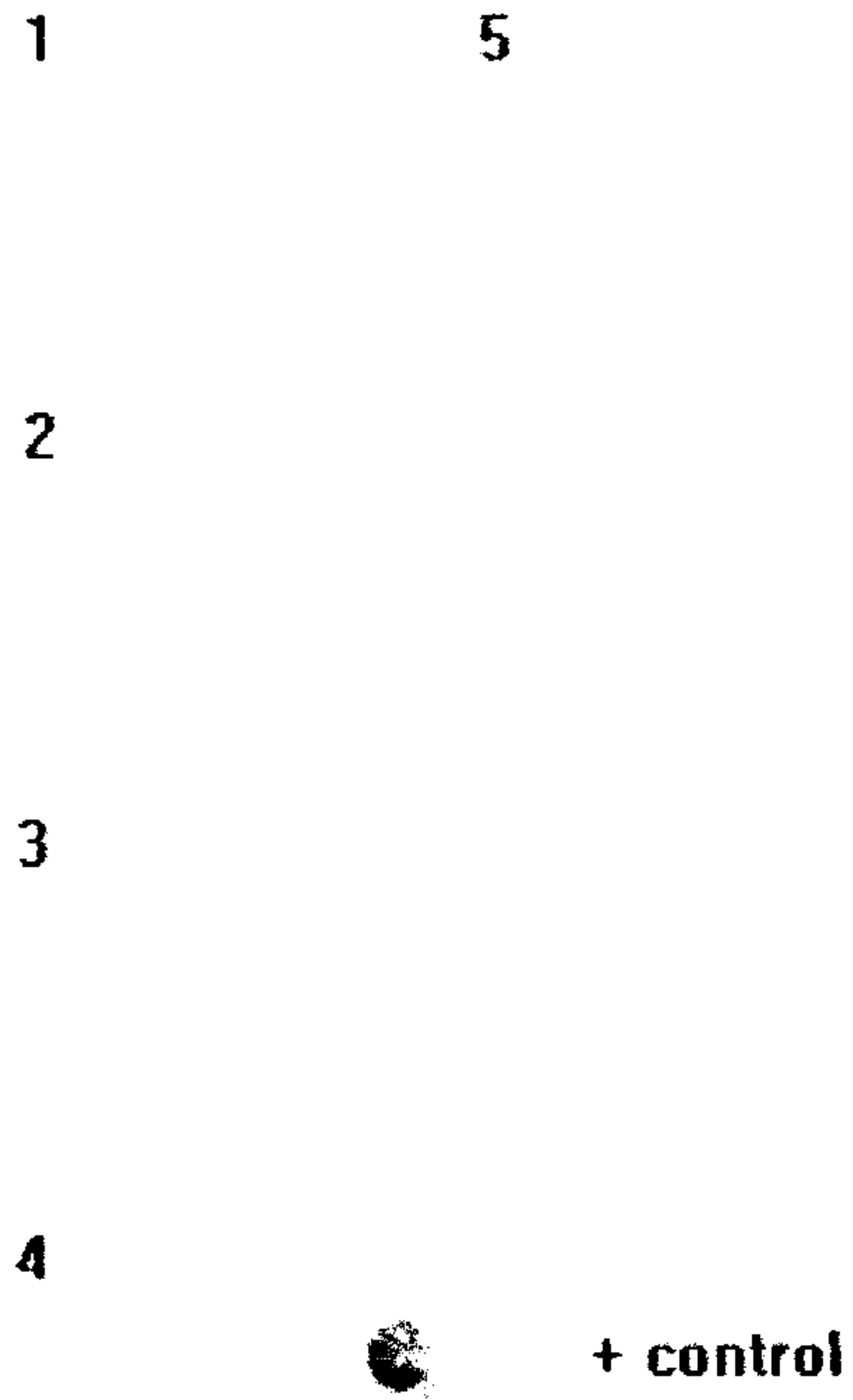


Fig. 7 발현된 HBV polymerase의 substrate 에 따른 activity.
 ① poly A /oligo dT ②, ④ random primer ③ poly dA/ oligo dT
 ⑤ RNase /random primer

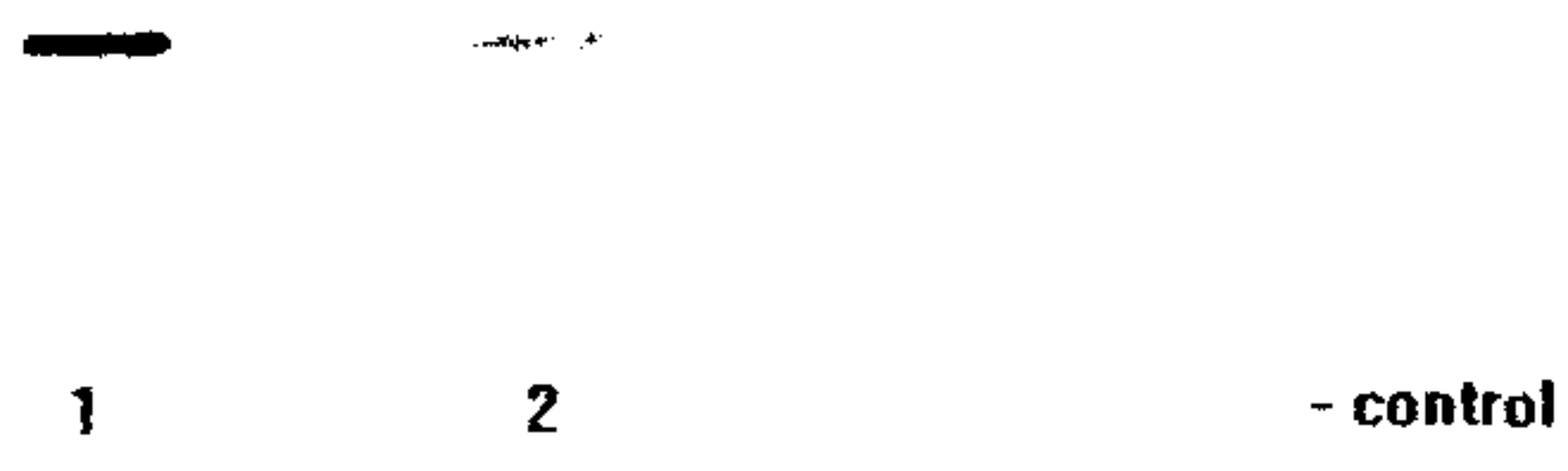


Fig. 8 S-Agarose purified HBV polymerase의 효소 활성
① Poly A/ oligo dT ② Poly dA/ oligo dT
③ - control ; without primer

3. 기타 바이러스에 대한 항 바이러스 효과 검색

바이러스는 그 구성 계층과 복제 양식에 따라 몇가지로 구별 되는데 이는 DNA virus, RNA virus, retro virus가 그것이다. 각 군은 복제를 위해 여러 가지 방법으로 복제가 되나 각각 공통적인 biology를 갖는다. 즉 DNA virus는 복제의 최종적 산물로 DNA 계층을 구성하여야 하며, RNA virus 역시 복제의 산물로 RNA genome을 만들게 된다. 일반적으로 한 바이러스에 항 바이러스 효과가 있을 경우 같은 계열의 바이러스에 효과가 있을 확률이 매우 높으며, 이러한 공통의 약효는 그 작용기전에 대한 background가 된다. 이를 위하여 NP-77A 및 이의 유도체인 몇몇 화합물의 항 바이러스 효과를 조사하여 이를 작용기전의 연구방법으로 하였다. 연구는 아사의 실험 및 화학연구소 또한 미국의 Viropharma 사에서 각기 독립적으로 수행하였다.

가. 재료 및 방법

1) test virus로서 HSV, polio virus, measles virus, HCMV를 이용하였으며, 이는 고려대학교 바이러스병원연구소에서 분양 받아 사용하였다. 바이러스 증식 및 CPE assay를 위한 세포주로서 Vero E-6 세포주를 DMEM 5%하에서 배양하여 사용하였다.

2) CPE assay

바이러스의 증식에 따른 Cytopathic effect를 측정하고 이를 약물이 줄여 주는 정도를 항바이러스 효과로 환산 하였다. T-75에서 배양된 세포는 CPE assay를 위하여 96 well plate로 옮긴 뒤 여기에 2~3 TCID50에 해당하는 각 바이러스를 접종한다. 접종 30 분 후 attach 되지 않은 바이러스를 제거한다. 이후 Methyl cellulose 0.7%가 함유된 DMEM을 세포에 overlay한 후 24시간 뒤 이를 제거한다. 남겨진 세포에 Crystal violet을 이용 세포를 염색하고 생성된 plaque를 계수 하여 약효를 확인 하였다.

3) Cytotoxicity test

CPE test와 마찬가지로 준비된 96 well plate에 DMSO에 녹여진 각 약제를 함유한 DMEM 배지를 세포에 준 후 48시간 후 이를 제거하고 남아 있는 세포를 MTT assay/ SRB assay를 이용하여 살아있는 세포의 수를 계수하였다. 이를 양성대조군과 비교후 이를 이용 CC50를 계산하였다.

나) 결과

① Anti HSV effect of NP-77A derivatives

Compound	CC50(ug/ml)	ED 50(ug/ml) Vero cell	SI index
1	5.6	>5.6	<1
2	16.7	>16.7	<1
3	14.2	>14.2	<1
4	>100	>100	NC
5	20.9	>20.9	<1
6	34.1	>34.1	<1
7	47.8	>47.8	<1
Acyclovir	>250	0.64	>342

Table 2. Activity screening against HSV replication

Compound	CC50(ug/ml) HeLa cell	ED 50(ug/ml)	SI index
1	<3.7	<3.7	NC
2	55.9	>55.9	<1
3	17.8	>17.8	<1
4	>300	>300	NC
5	67.4	>67.4	<1
6	64.1	>64.1	<1
7	300	>300	<1
Ribavirin	>100	69.6	>5

Table 3. Activity screening against Poliovirus replication

Compound	CC50(ug/ml) HeLa cell	ED 50(ug/ml)	SI index
1	<11.1	<11.1	NC
2	>33.3	>33.3	<1
3	<11	>11	<1
4	>33.3	>33.3	NC
5	<11	>11	<1
6	>33	>33	<1
7	>100	>100	<1
Gancyclovir	>100	0.37	>40

Table 4. Activity screening against HCMV replication

4. 결론 및 고찰

NP-77A는 HBV의 복제 저해가 2.2.15 cell을 이용한 실험에서나, Woodchuck을 이용한 생체내의 실험에서 관찰 되어 이의 작용기전을 밝히는 것이 매우 중요한 일이다. 그러나 상기의 실험 결과에서 보듯 일반적으로 가장 널리 알려진 DNA polymerase에 대한 NP-77A 및 이의 유도체의 약효를 검색한 결과 이 system에 대한 약효과 관찰 되지 않았다. 이는 NP-77A가 새로운 target 에 약효를 나타내는 것을 시사하는 것으로서, 일반적인 HBV polymerase inhibitor인 3TC, ddC등이 갖는 약물의 한계, 즉 mutant에 대한 저항성 약화, rebound effect등을 개선할 수 있을 것으로 볼 수 있다. 이런 상황에서 가장 대두되는 anti-HBV target으로는 encapsidation 저해를 생각할 수 있을 것이다. 이 step은 바이러스의 증식환에서 볼 때, DNA replication 이 일어나기 전에 일어난는 것으로 HBc, HBp, pregenomic RNA등이 관여하는 복잡한 과정이다. 이때 HBc 단백질의 말단이 HBV pregenomic RNA의 ϵ sequence와 특이적인 결합을 하는데, NP-77A 및 그의 활성형이 갖는 단백질 결합력, 특히 amine과의 높은 친화력을 갖는 성질에서 유추 할 때 충분히 가능한 이야기 일 것이다. 이런 HBV 의 encapsidation 은 다른 바이러스에서는 관찰 되지 않은 매우 특이한 것으로 아사의 약물이 다른 바이러스에 대한 약효를 보이지 않음을 볼 때 매우 가능성이 높은 target이 될 것이다. 따라서 앞으로 NP-77A의 작용기전으로서 encapsidation 에 대한 study가 계속 되어야 할 것이다.

제 5 절 독성연구

1. Dog에서의 급성독성 시험

가. 서론

(1) 목적

본 시험은 NP-77A의 전신성 독성을 검색하기 위해서 실시하였고, 일본과 한국의 MHW 가이드라인에 준하여 실시하였다.

(2) 시험동물의 적정성

본 시험에서 사용한 dog은 인간에서 나타나는 독성과 유사한 profile을 보이며, 또한 비설치류중의 한 종을 사용해야 한다는 관련 규정에 따라 선택하였다.

(3) 용량설정의 적정성

NP-77A는 임상에서 정맥용 투여제제로 고려되고 있기 때문에, dog study에서도 정맥으로 투여하였고, 급성독성시험의 결과를 바탕으로, 500, 1000, 2000mg/kg의 용량을 선택하였다.

(4) 시험

(가) 시험시설

Huntingdon Life Sciences
Eye Suffolk, IP23, 7px, England

(나) 시험기간

시험동물 배치	1997. 1. 20
약물처치 (Group 1)	1997. 1. 25
부 검 (Group 2)	1997. 2. 8
약물처치 (Group 1)	1997. 2. 1
부 검 (Group 2)	1997. 2. 15
약물처치 (Group 1)	1997. 2. 14
부 검 (Group 2)	1997. 2. 28

(5) 기록의 보관

본 시험의 완료후, 모든 raw data와 표본, 시료 등은 HLS 문서/자료 보관고에 최종보고서와 함께 보관하였다.

나. 시험 방법 및 재료

(1) 시험 설계

(가) 시험동물

6마리의 웅성, 6마리의 자성 순종 비글견을 사용하였다. 시험동물 들은 동물용 샴푸로 1, 3, 5회 세척하였고, 시험사용 당시 웅성은 10.7~13.4kg, 자성은 9.1~11.7 kg 이었다.

(나) 표식

모든 시험동물은 각각의 사료/음수 섭취량을 측정하기 위해 개별적으로 표식하였다. Dog가 도착되는 즉시 각각의 귀에 고유번호를 표식하였고, 수컷은 짝수, 암컷은 홀수로서 구분하였다. 표식물은 정기적으로 검사하고 필요시 교체하였다.

(다) 시험착수 당시의 별도관리 및 연령

모든 시험동물은 연구소 도착 19주후 별도 관리하였다. 시험동물은 최소한 15주간 샴푸세척과 시험물질 투여에 순응시켰으며, 시험 착수 당시의 연령은 대략 27~28주 사이였다.

(라) 수의학적 처치

모든 시험동물은 간염, 렙토스피라, 디스토펜퍼, 파보바이러스 예방접종을 실시하였고, 구충제를 복용시켰다. 시험동물이 도착한 후, 곧 세부적인 수의학적 관찰을 실시하였고, 일정한 간격으로 구충제를 투여하였다. 시험기간중 어느 동물도 수의학적 이상 소견을 관찰되지 않았다.

(마) 환경의 조절

모든 시험동물은 외부와 차단된 dog 사육실에서 사육되었다. 모든 시험동물실은 여과된 공기를 공급하여, 일정한 양압을 유지시켰고, 온도는 21℃, 상대습도 55%로 유지하였으며, 시간당 12회의

내부공기를 순환시켰다. 조명은 12시간 간격으로 주기적으로 변화시켰으며, 시험동물실에는 외부로부터 어떠한 화학물질이나, 생물학적 물질이 들어가지 않도록 설계되었다.

(바) 동물사육

실험동물은 약물투여 바로전과 투여후 1~2시간 사이를 제외하고는, 2.5×0.75m의 사육실에 짝수로 사육하였다. 매일 지도 관찰하여 운동시간을 두었으며, 사육실과 운동실, 사료섭취기구는 적당한 간격으로 세척하여 청결상태를 유지하였다.

(사) 사료 및 음수의 공급

모든 시험동물은 400g의 dog용 사료를 매일 아침 공급하였고, 본 사료에는 아무런 항생제나 화학물질이 첨가되지 않았다. 섭취하지 않은 사료는 다음날 사료공급전까지 방치시켰고, 남은 사료의 양을 측정후 폐기하였다. 음수의 공급은 자유롭게 하였다.

(아) 품질관리

사육에 필요한 물품의 분석에 관련된 자료는 정기적으로 접수하여 검토하였으며, 이중에는 DDT, dieldrin, pentachlorophenol, 납 및 구리 성분이 포함되어있다. 또한 본 품질관리에서는 살모넬라균주의 시험결과도 검사하였다. 6개월 간격으로 공급자의 검사결과와는 상관없이, 사육용톱밥중의 제초제, polychlorinated biphenyls, 납, 구리 및 살모넬라균주의 양을 측정하였다.

각 batch의 사료도 영양학적으로나, 화학적, 미생물학적 검사를 정기적으로 실시하였고, 6개월 간격으로 공급자의 시험결과와는 무관하게, 무작위로 샘플채취하여, 가능성 있는 오염 여부를 측정하였다.

음수의 질은 환경국에서 발간된 기준에 따라서, 공급자로부터 정기적으로 검사보고서를 접수하였다. 대략, 6개월 간격으로 자체적으로 염화제초제, 유기인제, polychlorinated biphenyls와 납, 카드뮴 오염도 및 coliform bacteria 오염도를 측정하였다.

(자) 약물처치 및 그룹의 배치

시험동물이 도착하는 즉시, 성별/체중별로 임의로 분리하고, 7~8주령의 각 동물을 짝수로 사육하였고, 환경에 의한 변수를 최소화하기 위한 고려를 하였다. 각 시험동물의 배치는 다음과 같다.

Group	Treatment	Dosage (mg/kg/day)	Animal numbers	
			Male	Female
1	NP-77A	500	732, 738	729, 735
2	NP-77A	1000	724, 728	721, 747
3	NP-77A	2000	726, 740	725, 737

(2) 약물처치

(가) 시험물질

NP-77A 시료는 batch No. 13에서 취했으며, 1997년 6월 6일 (주)중외제약으로부터 공급받았다. 시료는 흰색의 고체로서 100g 이었다. 시험물질은 냉장고에 보관하였다. 시험을 실시하기전에 시료 1g을 취하여 잘 밀봉된 유리용기에 별도 보관하였다.

(나) 제형

투여를 위하여 NP-77A에 필요한 량의 용매를 가하고, 완전히 녹을 때까지 교반하였다. 이후 peristaltic pump를 사용, 여과하여 멸균하였다.

(다) 사용량의 기록

각 군에 필요한 시험물질의 양과 실제 사용한 양을 기록하였다. 각 제형의 무게와 투여후 잔존량을 기록하였다.

(라) 투여

시험물질은 비글견의 좌측 또는 우측 완정맥에 5ml/min의 속도로 주사하였다. 투여부위는 투여전에 제모하였으며, 투여전(0.4ml)과 투여후 (0.7ml)에 생리식염수를 정맥으로 관주하였다. 모든 동물은 식이 급여전에 투여하였다.

투여 부피는 8.0ml/kg bodyweight이었고, 각 동물에 투여하기 전에 가장 최근에 측정된 체중에 근거하여 필요량을 계산하였다.

(마) 투여기간

모든 동물에 1회 투여하였고, 14일간 관찰하였다. 1군과 2군은 7일 간격으로 투여하였으며, 2군과 3군은 2주 간격으로 투여하였다.

(3) 관찰 사항

(가) 임상 증상

동물은 시험기간 동안 투여에 의한 반응의 증거나, 건강상의 이상에 대해 일정간격으로 관찰하였다. 정상에서 벗어나는 어떤 이상도 즉시 기록하였으며, 그 성상, 정도, 발생한 날짜와 시간 그리고 지속 기간 및 진행을 적절히 기록하였다. 투여 당일에는 다음 계획에 따라서 투여절차와 관련한 세부 관찰을 실시하였다.

- 투여 직전
- 투여종료 1/2 ~ 2 시간후
- 근무시간중 가능한 늦은 시간

14일의 관찰기간동안 세부 관찰을 1일 2회 이상 실시하였다. 그러나, 지속적으로 간주되는 관찰사항은 1주에 1회만 기록하였다. 또한 매일 구토, 혈액, 연변 등의 건강이상 증상에 대한 관찰을 실시하였다. 순응기 동안에는, 최소한 1일 이상 관찰하였다.

(나) 체중

각 동물은 순응기, 관찰기, 투여당일, 부검전의 기간을 통틀어 1주일에 1회 측정하였다.

부검 바로 전에 기록한 경우의 예외를 제외하고는 체중 측정은 사료 급여 전에 실시하였다.

(다) 사료 섭취량

각 동물에 공급된 사료의 량, 잔존량, 손실추정량을 순응기와 처치기간 동안 매일 기록하였다. 이 기록으로부터 순응기의 최종 2주간 및 시험기간동안의 각 주별 동물당 섭취량을 계산하였다.

(4) 최종 관찰

(가) 안락사

시험이 종료된 동물은 sodium pentobarbitone을 정맥주사하여 마취한후, 신속한 방혈을 통해 도태하였다.

(나) 해부 병리

모든 동물에 대해 정밀부검을 실시하였다. 부검에는 각 동물의 병력의 검토, 외부 소견의 정밀 관찰, 두부, 흉부, 복부 그리고 골반강 및 그 내부장기에 대한 정밀 검사가 포함되었다. 정해진 장기는 무게를 측정하였고, 장기의 외관 및 절단면에 대한 검사를 실시하였다. 이상소견이 발견된 장기는 고정액에 보존하였다.

(다) 장기 중량

다음의 장기를 적출하여, 주변 지방조직과 다른 결합조직을 제거하고, 중량을 측정하였다. 각 장기의 중량은 부검 직전에 기록한 체중에 대한 백분율로 나타내었다.

부신	난소
뇌	비장
부고환	고환
심장	흉선
신장	갑상선 및 부갑상선
간장	자궁경부 포함한 자궁
폐	

(라) 보존하였으나 검사하지 않은 조직

아래의 조직시료는 4% 중성완충포르말린 용액에 보관하였다. 조직학적으로 처리과정을 거치지 않았으며, 추후의 현미경적 검사에 대비하여 보존하였다.

부신	난소
뇌	투여부위 - 처치부
맹장	- 대조부
결장	전립선
십이지장	직장
부고환	좌골신경
심장	척수
회장	비장
공장	위
신장	고환
간장	흉선
폐장	갑상선 및 부갑상선
림파절 - 악하 림프절	기관
- 장간막 림프절	방광
식도	자궁경부 포함한 자궁

그외 이상소견을 나타낸 모든 조직을 조직병리학적인 검사를 위해 보존하였다. 이러한 경우에 병변의 경계가 명확하지 않을 때에는 주변조직도 함께 고정하였다.

대퇴골의 골수도말을 모든 동물에 대해 실시하였다. 도말표본은 공기중에서 건조하여, 메탄올에 고정한후 May-Grünwald-Giemsa 염색을 실시하였다.

(5) 자료의 처리

군의 평균치는 각 표와 그림에 나타낸 개체치로부터 계산하였다.

(6) 결과

(가) 임상증상

NP-77A 투여로 인한 것으로 생각되는 아무런 임상증상도 발견되지 않았다.

(나) 체중 (Figure 1, Table 1)

체중 증가에 대한 영향은 없었다.

(다) 사료 섭취량 (Table 2)

모든 동물이 처치전과 관찰기 동안 동등한 량의 사료를 섭취하였다.

(라) 장기 중량 (Table 3)

절대 중량과 체중에 대한 장기중량에 대한 분석결과 NP-77A 투여로 인한 어떠한 영향도 나타나지 않았다.

(마) 해부병리 (Table 4)

육안적 검사결과 NP-77A 투여로 인한 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

Figure 1A: Group mean bodyweight versus period of treatment
- males

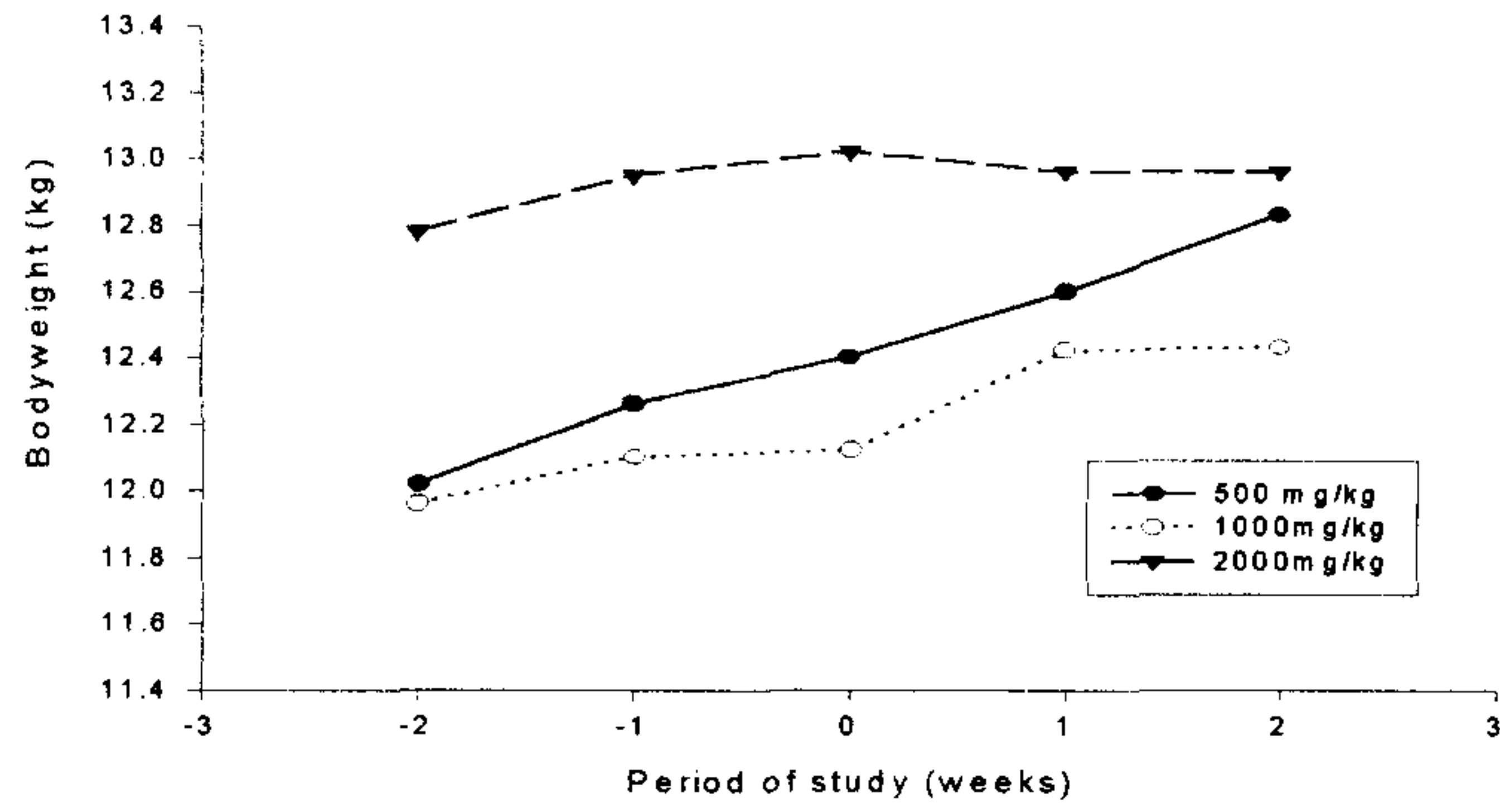


Figure 1B: Group mean bodyweight versus period of treatment
- females

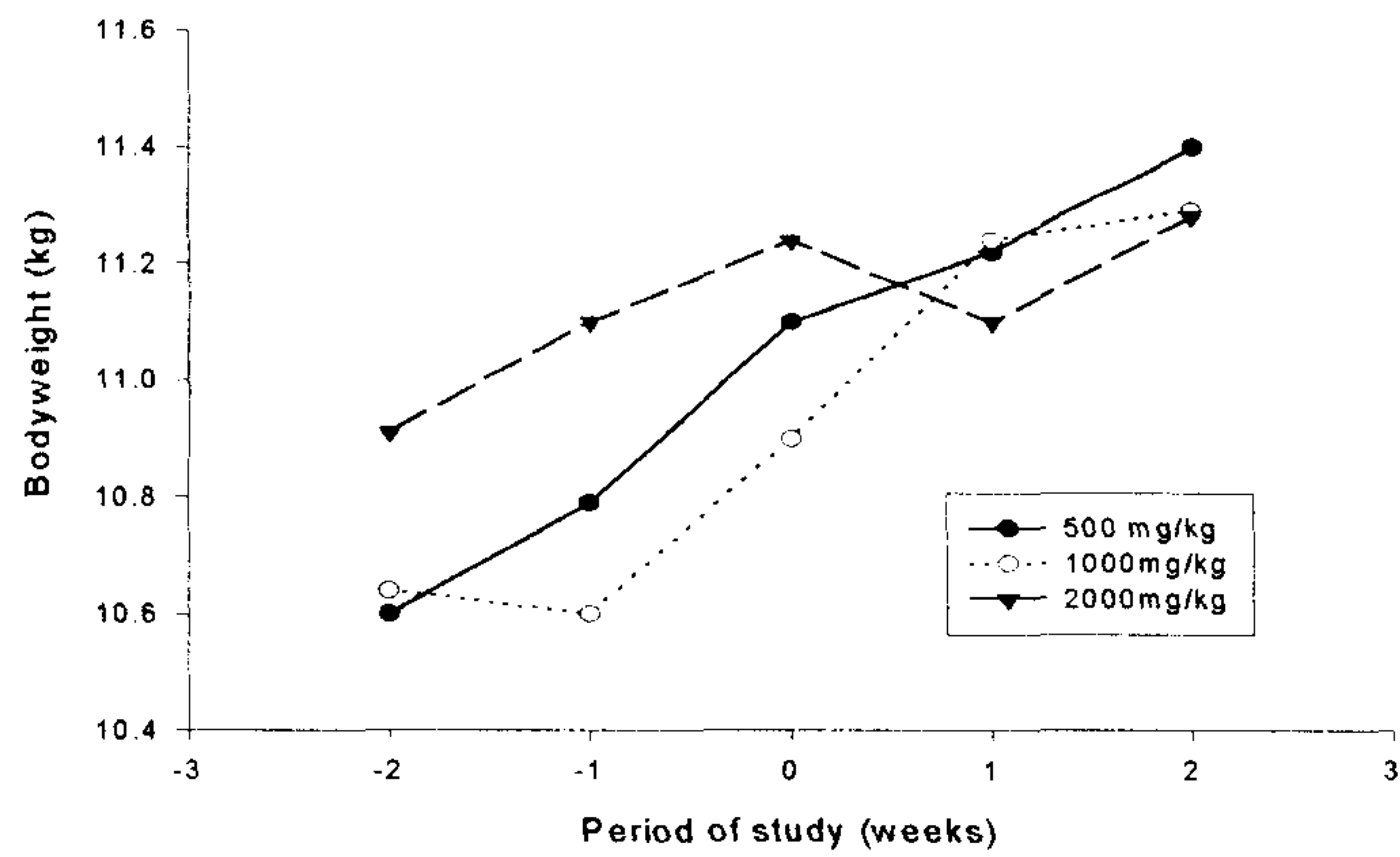


Table 1A-a. Bodyweights - group mean values (kg) - male

Week of study		Male		
		500mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
-2	Mean	12.0	11.9	12.8
	S. D.	0.9	0.8	1.5
-1	Mean	12.3	12.1	13.0
	S. D.	1.1	0.9	1.6
0	Mean	12.4	12.1	13.0
	S. D.	0.8	0.8	1.2
1	Mean	12.6	12.4	12.9
	S. D.	1.0	0.7	1.3
2	Mean	12.8	12.4	12.9
	S. D. 6	0.9	0.8	1.3

Table 1A-b. Bodyweights - group mean values (kg) - female

Week of study		Female		
		500mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
-2	Mean	10.6	10.7	10.9
	S. D.	1.6	1.3	1.9
-1	Mean	10.8	10.6	11.1
	S. D.	1.7	1.3	1.5
0	Mean	11.1	10.9	11.2
	S. D.	1.7	1.6	1.6
1	Mean	11.2	11.2	11.0
	S. D.	2.0	1.3	1.7
2	Mean	11.4	11.3	11.3
	S. D.	1.9	1.1	1.6

S.D. : standard deviation

Number of animals per sex per group = 2

Table 1B-a. Bodyweight gains: group mean values (kg) - male

Week of study		Male		
		500mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
0 to 1	Mean	0.20	0.30	-0.05
	S.D.	0.14	0.14	0.07
1 to 2	Mean	0.15	-0.05	0.00
	S.D.	0.07	0.07	0.00
0 to 2	Mean	0.35	0.25	-0.05
	S.D.	0.07	0.07	0.07

Table 1B-b. Bodyweight gains: group mean values(kg) - female

Week of study		Female		
		500mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
0 to 1	Mean	0.10	0.25	-0.15
	S.D.	0.28	0.21	0.07
1 to 2	Mean	0.15	0.15	0.25
	S.D.	0.07	0.21	0.07
0 to 2	Mean	0.25	0.40	0.10
	S.D.	0.21	0.42	0.00

S.D. : standard deviation

Number of animals per sex per group = 2

Table 2A. Food consumption - group mean values (g/dog/week)

Week of study	Male		
	500mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
-2	2800	2800	2800
-1	2800	2800	2800
Total -1 to -2	5600	5600	5600
1	2800	2800	2800
2	2800	2800	2800
Total 1 to 2	5600	5600	5600

Table 2B. Food consumption - group mean values (g/dog/week)

Week of study	Female		
	500mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
-2	2800	2800	2800
-1	2800	2800	2800
Total -1 to -2	5600	5600	5600
1	2800	2800	2800
2	2800	2800	2800
Total 1 to 2	5600	5600	5600

Table 3A. Absolute organ weight - group mean values (g)
for animals killed after a 2 week observation period

Organ		Male (mg/kg)			Female (mg/kg)		
		500	1000	2000	500	1000	2000
Terminal B. W.	Mean	12750	12350	12900	11350	11300	11250
	S. D.	919	777	1272	1909	1131	1626
Adrenals (L&R)	Mean	1.2425	1.1580	1.3490	0.9725	1.0600	0.9585
	S. D.	0.1110	0.0947	0.2687	0.0148	0.2998	0.1945
Brain	Mean	76	78	78	74	81	81
	S. D.	1	3	3	1	2	7
Epididymis (L&R)	Mean	2.6900	2.2085	3.7400	-	-	-
	S. D.	0.0735	0.1237	0.3352	-	-	-
Heart	Mean	107	88	101	92	84	97
	S. D.	11	14	12	13	7	18
Kidneys (L&R)	Mean	54.2410	47.2920	54.4760	49.4860	48.3010	48.0665
	S. D.	1.0900	2.3658	3.2399	3.2399	8.0058	6.3674
Liver	Mean	416	456	424	354	387	330
	S. D.	54	30	48	65	6	60
Lungs	Mean	118	105	114	91	103	102
	S. D.	16	5	2	21	16	3
Ovaries (L&R)	Mean	-	-	-	0.7520	0.6710	0.7940
	S. D.	-	-	-	0.0665	0.0933	0.2942
Spleen	Mean	88	63	84	63	88	78
	S. D.	10	37	29	24	27	17
Testes (L&R)	Mean	13.8625	9.3830	17.9245	-	-	-
	S. D.	4.1783	7.2224	4.3989	-	-	-
Thymus	Mean	16.5	17.0	16.6	18.4	23.8	19.5
	S. D.	0.9	9.6	7.6	4.6	4.9	6.9
Thyroids + Paras	Mean	0.8790	0.8360	0.8740	0.7490	0.7720	0.8295
	S. D.	0.0693	0.0226	0.1061	0.0863	0.0368	0.0049
Uterus + Cervix	Mean	-	-	-	1.9	2.1	2.7
	S. D.	-	-	-	0.0	0.2	0.4

Table 3B. Organ weights relative to bodyweight - group mean values (%) for animals killed after a 2 week observation period

Organ		Male (mg/kg)			Female (mg/kg)		
		500	1000	2000	500	1000	2000
Terminal B. W.	Mean	12750	12350	12900	11350	11300	11250
	S. D.	919	777	1272	1909	1131	1626
Adrenals (L&R)	Mean	0.0097	0.0094	0.0104	0.0087	0.0093	0.0085
	S. D.	0.0002	0.0014	0.0011	0.0013	0.0017	0.0005
Brain	Mean	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7
	S. D.	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
Epididymis (L&R)	Mean	0.0211	0.0179	0.0293	-	-	-
	S. D.	0.0009	0.0001	0.0055			
Heart	Mean	0.8	0.7	0.8	0.8	0.7	0.9
	S. D.	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Kidneys (L&R)	Mean	0.4262	0.3831	0.4222	0.04398	0.4260	0.4276
	S. D.	0.0222	0.0050	0.0026	0.0454	0.0282	0.0052
Liver	Mean	3.3	3.7	3.3	3.1	3.4	2.9
	S. D.	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4	0.1
Lungs	Mean	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9	0.9
	S. D.	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1
Ovaries (L&R)	Mean	-	-	-	0.0067	0.0060	0.0069
	S. D.				0.0005	0.0014	0.0016
Spleen	Mean	0.7	0.5	0.6	0.5	0.8	0.7
	S. D.	0.0	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1
Testes (L&R)	Mean	0.1102	0.0743	0.1379	-	-	-
	S. D.	0.0407	0.0538	0.0205			
Thymus	Mean	0.13	0.14	0.13	0.16	0.21	0.17
	S. D.	0.00	0.07	0.05	0.01	0.07	0.04
Thyroids + Paras	Mean	0.0069	0.0068	0.0068	0.0068	0.0068	0.0075
	S. D.	0.0010	0.0002	0.0002	0.0019	0.0004	0.0011
Uterus + Cervix	Mean	-	-	-	0.02	0.02	0.02
	S. D.				0.00	0.00	0.00

Table 4. Macropathology - group distribution of findings for animals killed after a 2 week observation period

Organ and keyword(s) or phrase	Male (mg/kg)			Female (mg/kg)		
	500	1000	2000	500	1000	2000
Epididymidis						
intra abdominal	1	1	0	-	-	-
abnormal shape	1	1	0			
Lungs						
lobe(s) small	1	0	0	1	0	0
abnormal shape	1	0	0	1	0	0
lobe(s) pale	0	1	0	0	0	0
vasculature prominent	0	1	0	0	0	0
Skin						
encrustation(s)	0	0	1	1	0	0
Testes						
intra-abdominal	1	1	0	0	0	0
flaccid	1	0	0	0	0	0
appears small	0	1	0	0	0	0

APPENDIX 2

Bodyweights - individual values (kg)

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

Group / sex	Animal number	Week of study				
		-2 *	-1 *	0	1	2
1M	732	12.6	13.0	13.0	13.3	13.4
	738	11.3	11.5	11.8	11.9	12.1
2M	724	12.5	12.7	12.7	12.9	12.9
	728	11.3	11.4	11.5	11.9	11.8
3M	726	11.7	11.8	12.1	12.0	12.0
	740	13.8	14.1	13.8	13.8	13.8
1F	729	11.7	12.0	12.3	12.6	12.7
	735	9.5	9.6	9.9	9.8	10.0
2F	721	11.6	11.5	12.0	12.1	12.1
	747	9.8	9.7	9.8	10.2	10.5
3F	725	9.5	10.0	10.0	9.8	10.1
	737	12.2	12.1	12.3	12.2	12.4

* Group 1 weighed Day-11 and Day-5.
 Group 2 weighed Day-12 and Day-7.
 Group 3 weighed Day-13 and Day-6.

APPENDIX 3A

Absolute organ weights - individual values (g) for animals killed after a 2 week observation period

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

GROUP	ANIMAL	TERMINAL BODY WT (g)	LT ADRENAL	RT ADRENAL	BRAIN	LT EPIDIDY	RT EPIDIDY	HEART	LT KIDNEY	RT KIDNEY	LIVER
1M	732	13400.0	0.62	0.70	75	1.0	1.7	115	27	28	454
	738	12100.0	0.59	0.57	77	1.3	1.3	99	27	27	377
2M	724	12900.0	0.58	0.51	80	1.2	1.1	97	26	23	477
	728	11800.0	0.71	0.51	77	1.1	1.0	78	23	22	435
3M	726	12000.0	0.59	0.57	76	2.1	1.9	93	24	27	390
	740	13800.0	0.80	0.74	80	1.8	1.8	110	30	29	458

APPENDIX 3A - continued.

Absolute organ weights - individual values (g) for animals killed after a 2 week observation period

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

GROUP	ANIMAL	TERMINAL BODY WT (g)	LUNGS	SPLEEN	LT TESTIS	RT TESTIS	THYMUS	LT THYROID	RT THYROID
1M	732	13400.0	130	95	3.1	7.8	17.1	0.47	0.36
	738	12100.0	107	80	8.4	8.4	15.9	0.46	0.47
2M	724	12900.0	109	37	7.5	7.0	23.8	0.49	0.36
	728	11800.0	102	89	2.0	2.2	10.2	0.47	0.35
3M	726	12000.0	112	63	7.0	7.8	11.2	0.35	0.44
	740	13800.0	115	105	10.4	10.6	21.9	0.45	0.50

APPENDIX 3A - continued.

Absolute organ weights - individual values (g) for animals killed after a 2 week observation period

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

GROUP	ANIMAL	TERMINAL BODY WT (g)	LT ADRENAL	RT ADRENAL	BRAIN	HEART	LT KIDNEY	RT KIDNEY	LIVER	LUNGS	LT OVARY
1F	729	12700.0	0.48	0.50	74	102	26	26	400	106	0.40
	735	10000.0	0.48	0.49	73	83	24	24	309	76	0.34
2F	721	12100.0	0.59	0.68	83	88	27	27	382	114	0.30
	747	10500.0	0.40	0.44	80	79	21	21	391	91	0.32
3F	725	10100.0	0.44	0.38	76	85	22	22	287	100	0.30
	737	12400.0	0.53	0.56	85	110	26	27	373	104	0.49

APPENDIX 3A - continued.

Absolute organ weights - individual values (g) for animals killed after a 2 week observation period

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

GROUP	ANIMAL	TERMINAL BODY WT (g)	RT OVARY	SPLEEN	THYMUS	LT THYROID	RT THYROID	UTERUS+C
1F	729	12700.0	0.40	80	21.6	0.35	0.34	1.9
	735	10000.0	0.36	46	15.1	0.43	0.38	2.0
2F	721	12100.0	0.31	107	20.3	0.40	0.40	2.0
	747	10500.0	0.41	69	27.2	0.40	0.35	2.2
3F	725	10100.0	0.29	66	14.6	0.47	0.36	2.4
	737	12400.0	0.51	90	24.4	0.46	0.37	3.0

APPENDIX 3B

Organ weights relative to bodyweight - individual values (%) for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

GROUP	ANIMAL	TERMINAL BODY WT (g)	LT ADRENAL	RT ADRENAL	BRAIN	LT EPIDIDY	RT EPIDIDY	HEART	LT KIDNEY	RT KIDNEY	LIVER
1M	732	13400.0	0.005	0.005	0.6	0.01	0.01	0.9	0.2	0.2	3.4
	738	12100.0	0.005	0.005	0.6	0.01	0.01	0.8	0.2	0.2	3.1
2M	724	12900.0	0.005	0.004	0.6	0.01	0.01	0.8	0.2	0.2	3.7
	728	11800.0	0.006	0.004	0.6	0.01	0.01	0.7	0.2	0.2	3.7
3M	726	12000.0	0.005	0.005	0.6	0.02	0.02	0.8	0.2	0.2	3.2
	740	13800.0	0.006	0.005	0.6	0.01	0.01	0.8	0.2	0.2	3.3

APPENDIX 3B - continued.

Organ weights relative to bodyweight - individual values (%) for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

GROUP	ANIMAL	TERMINAL BODY WT (g)	LUNGS	SPLEEN	LT TESTIS	RT TESTIS	THYMUS	LT THYROID	RT THYROID
1M	732	13400.0	1.0	0.7	0.02	0.06	0.13	0.003	0.003
	738	12100.0	0.9	0.7	0.07	0.07	0.13	0.004	0.004
2M	724	12900.0	0.8	0.3	0.06	0.05	0.18	0.004	0.003
	728	11800.0	0.9	0.8	0.02	0.02	0.09	0.004	0.003
3M	726	12000.0	0.9	0.5	0.06	0.06	0.09	0.003	0.004
	740	13800.0	0.8	0.8	0.08	0.08	0.16	0.003	0.004

APPENDIX 3B - continued.

Organ weights relative to bodyweight - individual values (%) for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

GROUP	ANIMAL	TERMINAL BODY WT (g)	LT ADRENAL	RT ADRENAL	BRAIN	HEART	LT KIDNEY	RT KIDNEY	LIVER	LUNGS	LT OVARY
1F	729	12700.0	0.004	0.004	0.6	0.8	0.2	0.2	3.2	0.8	0.003
	735	10000.0	0.005	0.005	0.7	0.8	0.2	0.2	3.1	0.8	0.003
2F	721	12100.0	0.005	0.006	0.7	0.7	0.2	0.2	3.2	0.9	0.002
	747	10500.0	0.004	0.004	0.8	0.8	0.2	0.2	3.7	0.9	0.003
3F	725	10100.0	0.004	0.004	0.8	0.8	0.2	0.2	2.8	1.0	0.003
	737	12400.0	0.004	0.005	0.7	0.9	0.2	0.2	3.0	0.8	0.004

APPENDIX 3B - continued.

Organ weights relative to bodyweight - individual values (%) for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

GROUP	ANIMAL	TERMINAL BODY WT (g)	RT OVARY	SPLEEN	THYMUS	LT THYROID	RT THYROID	UTERUS+C
1F	729	12700.0	0.003	0.6	0.17	0.003	0.003	0.02
	735	10000.0	0.004	0.5	0.15	0.004	0.004	0.02
2F	721	12100.0	0.003	0.9	0.17	0.003	0.003	0.02
	747	10500.0	0.004	0.7	0.26	0.004	0.003	0.02
3F	725	10100.0	0.003	0.7	0.14	0.005	0.004	0.02
	737	12400.0	0.004	0.7	0.20	0.004	0.003	0.02

APPENDIX 4

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

ANIMAL NUMBER: 0732 SEX: MALE DOSE GROUP: 1 SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE DATE OF DEATH: 08-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 15 STUDY WEEK OF DEATH: 3 TERMINAL BODY WEIGHT: 13400.0 GRAMS		
* * * GROSS PATHOLOGY OBSERVATIONS * * *		
ORGAN NAME	SEVERITY, KEYWORD(S) OR PHRASE	FREE-TEXT COMMENTS AND NOTES
EPIDIDYMIDES(ED)	- INTRA ABDOMINAL - ABNORMAL SHAPE	- LEFT. - LEFT. CAPUT REGION MISSHAPEN.
LUNGS (LLO)	- LOBE(S) SMALL - ABNORMAL SHAPE	- LEFT CRANIAL LOBE. - LEFT CRANIAL LOBE MISSHAPEN.
TESTES (TS)	- INTRA-ABDOMINAL - FLACCID	- LEFT. - LEFT.

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

ANIMAL NUMBER: 0738 SEX: MALE DOSE GROUP: 1 SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE DATE OF DEATH: 08-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 15 STUDY WEEK OF DEATH: 3 TERMINAL BODY WEIGHT : 12100.0 GRAMS		
* * * ANIMAL HAS NO GROSS OBSERVATIONS RECORDED * * *		

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

ANIMAL NUMBER: 0724 SEX: MALE DOSE GROUP: 2 SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE DATE OF DEATH: 15-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 22 STUDY WEEK OF DEATH: 4 TERMINAL BODY WEIGHT: 12900.0 GRAMS
* * * ANIMAL HAS NO GROSS OBSERVATIONS RECORDED * * *

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

ANIMAL NUMBER: 0728 SEX: MALE DOSE GROUP: 2 SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE DATE OF DEATH: 15-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 22 STUDY WEEK OF DEATH: 4 TERMINAL BODY WEIGHT: 11800.0 GRAMS		
* * * GROSS PATHOLOGY OBSERVATIONS * * *		
ORGAN NAME	SEVERITY, KEYWORD(S) OR PHRASE	FREE-TEXT COMMENTS AND NOTES
EPIDIDYMIDES (ED)	- INTRA ABDOMINAL - ABNORMAL SHAPE	- CAUDA REGION MISSHAPEN.
LUNGS (LLO)	- LOBE(S) PALE - VASCULATURE PROMINENT	- RIGHT CAUDAL LOBE. - RIGHT CAUDAL LOBE.
TESTES (TS)	- INTRA-ABDOMINAL APPEARS SMALL	

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

ANIMAL NUMBER: 0726 SEX: MALE DOSE GROUP: 3 SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE DATE OF DEATH: 28-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 35 STUDY WEEK OF DEATH: 5 TERMINAL BODY WEIGHT: 12000.0 GRAMS		
* * * GROSS PATHOLOGY OBSERVATIONS * * *		
ORGAN NAME	SEVERITY, KEYWORD(S) OR PHRASE	FREE-TEXT COMMENTS AND NOTES
SKIN (SKO)	- ENCRUSTATION(S)	- OCCASIONAL POORLY DEFINED, PALE AREAS, ON TIPS OF PINNAE.

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

ANIMAL NUMBER: 0740 SEX: MALE DOSE GROUP: 3 SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE DATE OF DEATH: 28-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 35 STUDY WEEK OF DEATH: 5 TERMINAL BODY WEIGHT: 13800.0 GRAMS		
* * * ANIMAL HAS NO GROSS OBSERVATIONS RECORDED * * *		

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

ANIMAL NUMBER: 0729 SEX: MALE DOSE GROUP: 1 SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE DATE OF DEATH: 08-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 15 STUDY WEEK OF DEATH: 3 TERMINAL BODY WEIGHT: 12700.0 GRAMS
* * * ANIMAL HAS NO GROSS OBSERVATIONS RECORDED * * *

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group : 1 2 3
 Compound : ----- NP-77A -----
 Dosage (mg/kg/day) : 500 1000 2000

ANIMAL NUMBER: 0735 SEX: FEMALE DOSE GROUP: 1 SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE DATE OF DEATH: 08-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 15 STUDY WEEK OF DEATH: 3 TERMINAL BODY WEIGHT: 10000.0 GRAMS		
* * * GROSS PATHOLOGY OBSERVATIONS * * *		
ORGAN NAME	SEVERITY, KEYWORD(S) OR PHRASE	FREE-TEXT COMMENTS AND NOTES
LUNGS (LLO)	- LOBE(S) SMALL - ABNORMAL SHAPE	- LEFT CRANIAL LOBE. - LEFT CRANIAL LOBE MISSHAPEN.
SKIN (SKO)	- ENCRUSTATION(S)	- OCCASIONAL POORLY DEFINED, PALE AND DARK AREAS, ON RIGHT PINNA.

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group	:	1	2	3
Compound	:	-----	NP-77A	-----
Dosage (mg/kg/day)	:	500	1000	2000

ANIMAL NUMBER: 0721 SEX: FEMALE DOSE GROUP: 2
SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE
DATE OF DEATH: 15-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 22
STUDY WEEK OF DEATH: 4 TERMINAL BODY WEIGHT: 12100.0 GRAMS

*** ANIMAL HAS NO GROSS OBSERVATIONS RECORDED ***

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group	:	1	2	3
Compound	:	-----	NP-77A	-----
Dosage (mg/kg/day)	:	500	1000	2000

ANIMAL NUMBER: 0747 SEX: FEMALE DOSE GROUP: 2
SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE
DATE OF DEATH: 15-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 22
STUDY WEEK OF DEATH: 4 TERMINAL BODY WEIGHT: 10500.0 GRAMS

*** ANIMAL HAS NO GROSS OBSERVATIONS RECORDED ***

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group	:	1	2	3
Compound	:	-----	NP-77A	-----
Dosage (mg/kg/day)	:	500	1000	2000

ANIMAL NUMBER: 0725 SEX: FEMALE DOSE GROUP: 3
SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE
DATE OF DEATH: 28-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 35
STUDY WEEK OF DEATH: 5 TERMINAL BODY WEIGHT: 10100.0 GRAMS

* * * ANIMAL HAS NO GROSS OBSERVATIONS RECORDED * * *

APPENDIX 4 - continued.

Macropathology - individual findings for animals killed after a 2 week observation period.

Group	:	1	2	3
Compound	:	-----	NP-77A	-----
Dosage (mg/kg/day)	:	500	1000	2000

ANIMAL NUMBER: 0737 SEX: FEMALE DOSE GROUP: 3
SACRIFICE STATUS: SCHEDULED, TERMINAL SACRIFICE
DATE OF DEATH: 28-FEB-97 STUDY DAY OF DEATH: 35
STUDY WEEK OF DEATH: 5 TERMINAL BODY WEIGHT: 12400.0 GRAMS

* * * ANIMAL HAS NO GROSS OBSERVATIONS RECORDED * * *

2. Dog에서의 MTD study

(1) 서론

(가) 목적

본 시험은 NP-77A의 반복 정맥투여시 최대내성용량을 파악하고, 추후 비글견에서의 심화된 독성시험시 용량설정을 위해 실시하였다.

(나) 시험동물의 적정성

본 시험에서 사용한 dog은 인간에서 나타나는 독성과 유사한 profile을 보이며, 또한 비설치류중의 한 종을 사용해야 한다는 관련 규정에 따라 선택하였다. 비글 품종은 역사적으로 대조 자료가 많이 축적되어 있기 때문에 사용하였다.

(다) 용량설정의 적정성

NP-77A는 임상에서 정맥용 투여제제로 고려되고 있기 때문에, dog study에서도 정맥으로 투여하였고, 초기 3일간의 시험을 위한 용량은 급성독성시험 결과를 바탕으로 250 mg/kg을 선택하였다.

(라) 시험

1) 시험시설

Huntingdon Life Sciences
Eye Suffolk, IP23, 7PX, England

2) 시험기간

시험동물 배치7	1997. 2. 10
약물처치 (Group 1)	1997. 11. 14
부 검 (Group 1)	1997. 11. 24
약물처치 (Group 2)	1998. 3. 20
부 검 (Group 2)	1998. 4. 17

(마) 기록의 보관

본 시험의 완료후, 모든 raw data와 표본, 시료 등은 HLS 문서/자료 보관고에 최종보고서와 함께 보관하였다.

(2) 시험 방법 및 재료

(가) 시험 설계

1) 시험동물

2마리의 웅성, 2마리의 자성 순종 비글견을 사용하였다. 시험동물들은 동물용 샴푸로 1, 3, 5회 세척하였고, 시험에 할당되었을때, 웅성은 10.3 kg과 12.3 kg이었고, 자성은 9.5 kg과 13.5 kg 이었으며, 29~30 주령이었다.

2) 표식

모든 시험동물은 각 동물의 유래를 알 수 있도록 개체 표식하였다. Dog가 도착되는 즉시 각각의 귀에 문신을 새겨 고유번호를 표식하였고, 수컷은 짝수, 암컷은 홀수로서 구분하였다. 표식물은 정기적으로 검사하였다.

3) 시험착수 당시의 별도관리 및 연령

모든 시험동물은 연구소 도착 21주후 시험에 할당되었다. 시험 착수 당시의 연령은 대략 69주령 (1군)과 87주령 (2군) 이었다.

4) 수의학적 처치

모든 시험동물은 간염, 렙토스피라, 디스토펜퍼, 파보바이러스, 파라인플루엔자 예방 접종을 실시하였고, 구충제를 복용시켰다. 시험동물이 도착한 후, 곧 세부적인 수의학적 관찰을 실시하였고, 일정한 간격으로 구충제를 투여하였다. 시험기간중 어느 동물도 수의학적 이상 소견을 관찰되지 않았다.

5) 환경의 조절

모든 시험동물은 외부와 차단된 dog 사육실에서 사육되었다. 모든 시험동물실은 여과된 공기를 공급하여, 일정한 양압을 유지시켰고, 온도는 21℃, 상대습도 55%로 유지하였으며, 시간당 12회의 내부공기를 순환시켰다. 조명은 12시간 간격으로 주기적으로 변화시켰으며, 시험동물실에는 외부로부터 어떠한 화학물질이나, 생물학적 물질이 들어가지 않도록 설계되었다. 동물실에는 허가된 사람만이 출입토록 하였으며, 출입시 멸균복으로 갈아입도록 하였다.

6) 동물사육

실험동물은 바닥에 보온 기능을 갖춘 2.5×0.75m의 금속 케이지에 사육하였으며, 매일 톱밥깔짚(Lignocel, RS Biotech, England)을 교체하였다. 매일 지도 관찰하에 운동시간을 두었으며, 사육실과 운동실, 사료섭취기구는 적당한 간격으로 세척하여 청결상태를 유지하였다.

7) 사료 및 음수의 공급

모든 실험동물은 400g의 dog용 펠렛사료(Laboratory Diet A, Special Diets Services Ltd., England)를 매일 아침 공급하였고, 본 사료에는 아무런 항생제나 화학물질이 첨가되지 않았다. 섭취하지 않은 사료는 다음날 사료공급전까지 방치시켰고, 남은 사료의 양을 측정후 폐기하였다. 음수의 공급은 자유롭게 하였다.

8) 품질관리

사육에 필요한 물품의 분석에 관련된 자료는 정기적으로 접수하여 검토하였으며, 이중에는 DDT, dieldrin, pentachlorophenol, 납 및 구리 성분이 포함되어있다. 또한 본 품질관리에서는 살모넬라균주의 시험결과도 검사하였다. 6개월 간격으로 공급자의 검사결과와는 상관없이, 사육용 톱밥중의 제초제, polychlorinated biphenyls, 납, 구리 및 살모넬라균주의 양을 측정하였다.

각 batch의 사료도 영양학적으로나, 화학적, 미생물학적 검사를 정기적으로 실시하였고, 6개월 간격으로 공급자의 시험결과와는 무관하게, 무작위로 샘플채취하여, 가능성 있는 오염 여부를 측정하였다.

음수의 질은 환경국에서 발간된 기준에 따라서, 공급자로부터 정기적으로 검사보고서를 접수하였다. 대략, 6개월 간격으로 자체적으로 염화제초제, 유기인제, polychlorinated biphenyls와 납, 카드뮴 오염도 및 coliform bacteria 오염도를 측정하였다.

9) 약물처치 및 그룹의 배치

각 실험동물의 배치는 다음과 같다.

Group	Treatment	Animal numbers	
		Male	Female
1	NP-77A	774	727
2	NP-77A	736	733

Group	Day number	Dosage
1	1 to 3	250
	4 to 7	500
2	8 to 10	1000
	1 to 28	1000

(나) 약물처치

1) 시험물질

NP-77A 시료는 batch No. 19971031에서 취했으며, 1997년 10월 27일 (주)중외제약으로부터 공급받았다. 시료는 흰색의 고체로서 200g 이었다. 두번째 시료는 batch No.980220이었으며, 1998년 3월 9일 (주)중외제약으로부터 공급받았다. 그 양은 1000g 이었다. 시료는 적절한 온도에서 광선을 차단한 상태로 보관하였다. 시험을 실시하기전에 시료 1g을 취하여 잘 밀봉된 유리용기에 별도 보관하였다.

2) 제형

투여를 위하여 NP-77A에 필요한 량의 용매를 가하고, 완전히 녹을때까지 교반하였다. 이후 peristaltic pump를 사용, 여과하여 멸균하였다.

3) 사용량의 기록

각 군에 필요한 시험물질의 양과 실제 사용한 양을 기록하였다. 각 제형의 무게와 투여후 잔존량을 기록하였다.

4) 투여

시험물질은 syringe pump를 사용하여, 비글견의 좌측 또는 우측 완정맥(매

일 교체)에 10ml/min의 속도로 주사하였다. 투여부위는 투여전에 제모하였으며, 투여전(0.4ml)과 투여후(0.7ml)에 생리식염수를 정맥으로 관주하였다. 모든 동물은 식이 급여전에 투여하였다.

투여 부피는 5.0ml/kg bodyweight이었고, 각 동물에 투여하기 전에 가장 최근에 측정된 체중에 근거하여 필요량을 계산하였다.

5) 투여기간

1군에는 10일간 연속투여 하였는데, 3일후와 7일후에 용량을 증가시켰다. 2군은 28일간 연속 투여 하였다.

(다) 관찰 사항

1) 임상 증상

동물은 시험기간 동안 투여에 의한 반응의 증거나, 건강상의 이상에 대해 일정간격으로 관찰하였다. 정상에서 벗어나는 어떤 이상도 즉시 기록하였으며, 그 성상, 정도, 발생한 날짜와 시간 그리고 지속 기간 및 진행을 적절히 기록하였다.

투여시에는 다음 계획에 따라서 투여절차와 관련한 세부 관찰을 실시하였다.

최소 관찰 일정: 1군 - 매일
2군 - week 1 - 매일
- week 2~4 - 주당 2회

관찰 빈도: 1. 투여 직전 (주사부위 포함)
2. 투여후 30분에서 2시간
3. 근무시간중 가장 늦은 시간

매일 구토, 혈액, 연변 등의 건강이상 증상에 대한 관찰을 실시하였다. 순응기 동안에는, 최소한 1일 1회 이상 관찰하였다.

2) 체 중

각 동물은 순응기에는 1주일에 1회 측정하였으며, 투여개시일, 1군에서 용량 증가시에 측정하였고, 2군에서는 약물투여기간중 주당 2회와 부검전에 측정하였다.

3) 사료 섭취량

각 동물에 공급된 사료의 량, 잔존량, 손실추정량을 순응기와 처치기간 동안 매일 기록하였다. 이 기록으로부터 순응기의 최종 2주간 및 시험기간동안의 각 주별 동물당 섭취량을 계산하였다.

4) 혈액분석

혈액은 14시간 절식후에 1군의 경우 약물투여전과 Day 10에 채혈하였고, 2군의 경우 week 4에 채혈하였다. 채혈은 경정맥을 통해 실시하였으며, 혈액분석기(Technicon H-1)를 사용하여 다음 항목을 검사하였다.

Packed cell volume (PCV)

Haemoglobin concentration (HB)

Erythrocyte count (RBC)

Total and differential leucocyte count (WBC)

Platelet count (PLAT)

Mean cell haemoglobin concentration (MCHC)

Mean cell haemoglobin (MCH)

Mean cell volume (MCV)

또한, 혈액도말 표본을 제작하여 Romanowsky 염색을 실시한후 광학현미경으로 형태학적인 이상이나, 비정상적 세포유형의 출현 여부를 검사하였다.

혈액의 일부는 citrate 항응고제를 처리한 후 prothrombin time (PT)을 측정하였다.

5) 혈액생화학

혈액을 헤파린을 처리한 후 혈장을 분리하여 다음 검사를 실시하였다.

Alkaline phosphatase activity (ALP)

Alanine amino-transferase activity (ALT)

Aspartate amino-transferase activity (AST)

Glucose concentration (GLUC)

Total bilirubin concentration (BILT)

Total cholesterol concentration (CHOL)

Total triglyceride concentration (TRIG)

Creatine concentration (CREA)
 Urea concentration (UREA)
 Total protein concentration (TP)
 Albumin concentration (CHEM ALB)
 Albumin/Globulin ration (A/G)
 Sodium(Na) and potassium (K)
 Chloride (Cl)
 Calcium concentration (Ca)
 Inorganic phosphorus (Phos)

(라) 최종 관찰

1) 안락사

시험이 종료된 동물은 sodium pentobarbitone을 이정맥에 주사하여 마취한 후, 신속한 방혈을 통해 도태하였다.

2) 해부 병리

모든 동물에 대해 정밀부검을 실시하였다. 부검에는 각 동물의 병력의 검토, 외부 소견의 정밀 관찰, 두부, 흉부, 복부 그리고 골반강 및 그 내부 장기에 대한 정밀 검사가 포함되었다. 정해진 장기는 무게를 측정하였고, 장기의 외관 및 절단면에 대한 검사를 실시하였다. 이상소견이 발견된 장기는 고정액에 보존하였다.

3) 장기 중량

다음의 장기를 적출하여, 주변 지방조직과 다른 결합조직을 제거하고, 중량을 측정하였다. 각 장기의 중량은 부검 직전에 기록한 체중에 대한 백분율로 나타내었다.

부신	난소
뇌	비장
부고환	고환
심장	흉선
신장	갑상선 및 부갑상선
간장	자궁경부 포함한 자궁
폐	

4) 고정된 조직

고환과 부고환은 Bouin's 액에 고정한후 70% industrial methylated spirit에 보관하였고, 그외 아래의 조직시료는 4% 중성완충포르말린 용액에 보관하였다.

부신	난소
뇌	투여부위 - 처치부
맹장	- 대조부
결장	전립선
십이지장	직장
부고환	좌골신경
심장	척수
회장	비장
공장	위
신장	고환
간장	흉선
폐장	감상선 및 부감상선
림파절 - 악하 림프절	기관
- 장간막 림프절	방광
식도	자궁경부 포함한 자궁

그외 이상소견을 나타낸 모든 조직을 조직병리학적인 검사를 위해 보존하였다. 이러한 경우에 병변의 경계가 명확하지 않을 때에는 주변조직도 함께 고정하였다.

(마) 자료의 처리

군의 평균치는 각 표와 그림에 나타낸 개체치로부터 계산하였다. 혈액학적 데이터중의 각 혈구의 수는 혈액 리터당 세포수이다.

(3) 결과

가. 임상증상 (Table 1)

시험기간중 NP-77A 투여로 인한 것으로 생각되는 아무런 임상증상도 발견되지 않았다.

나. 체중 (Figure 1, Table 2)

모든 시험 기간중 체중 증가에 대한 영향은 없었다. 각 개체 체중의 약간의 변동이 나타났으나, 이는 NP-77A의 투여와 무관한 것으로 판명되었다.

다. 사료 섭취량 (Table 3)

NP-77A에 투여에 의한 사료 섭취량의 변화는 없었다.

라. 혈구분석 (Table 4)

용량증가시험시 Day 10과, 일정용량시험시 Week 4에 채혈하여 분석한 결과, 투여전과 비교할 때 투여와 관련된 어떤 변화도 나타나지 않았다.

마. 혈액생화학 (Table 5)

용량증가시험시 Day 10과, 일정용량시험시 Week 4에 채혈하여 분석한 결과, 투여전과 비교할 때 투여와 관련된 어떤 변화도 나타나지 않았다.

바. 장기 중량 (Table 6)

절대 중량과 체중에 대한 장기중량에 대한 분석결과 NP-77A 투여로 인한 어떠한 영향도 나타나지 않았다.

사. 해부병리 (Table 4)

육안적 검사결과 NP-77A 투여와 관련된 주사부위의 소견이 모든 동물에서 관찰되었으며, 그외 다른 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다.

(4) 고찰 및 결론

비글견에 NP-77A를 250mg/kg/day (3일), 500mg/kg/day (4일) 그리고 1000mg/kg/day (3일)간 투여하거나, 28일간 1000mg/kg/day를 정맥주사하였을 때, 주사부의 피하의 변화가 관찰되었으며, 이는 투여로 인한 것으로 간주되었다.

본 연구결과 NP-77A의 비글견 정맥투여시 최대내성용량(Maximum tolerated dosage; MTD)는 1000mg/kg/day 이상이었으며, 추후 비글견에서의 독성시험시 1000mg/kg/day의 용량이 추천된다.

Figure 2A. Bodyweight versus period of treatment - Group 1

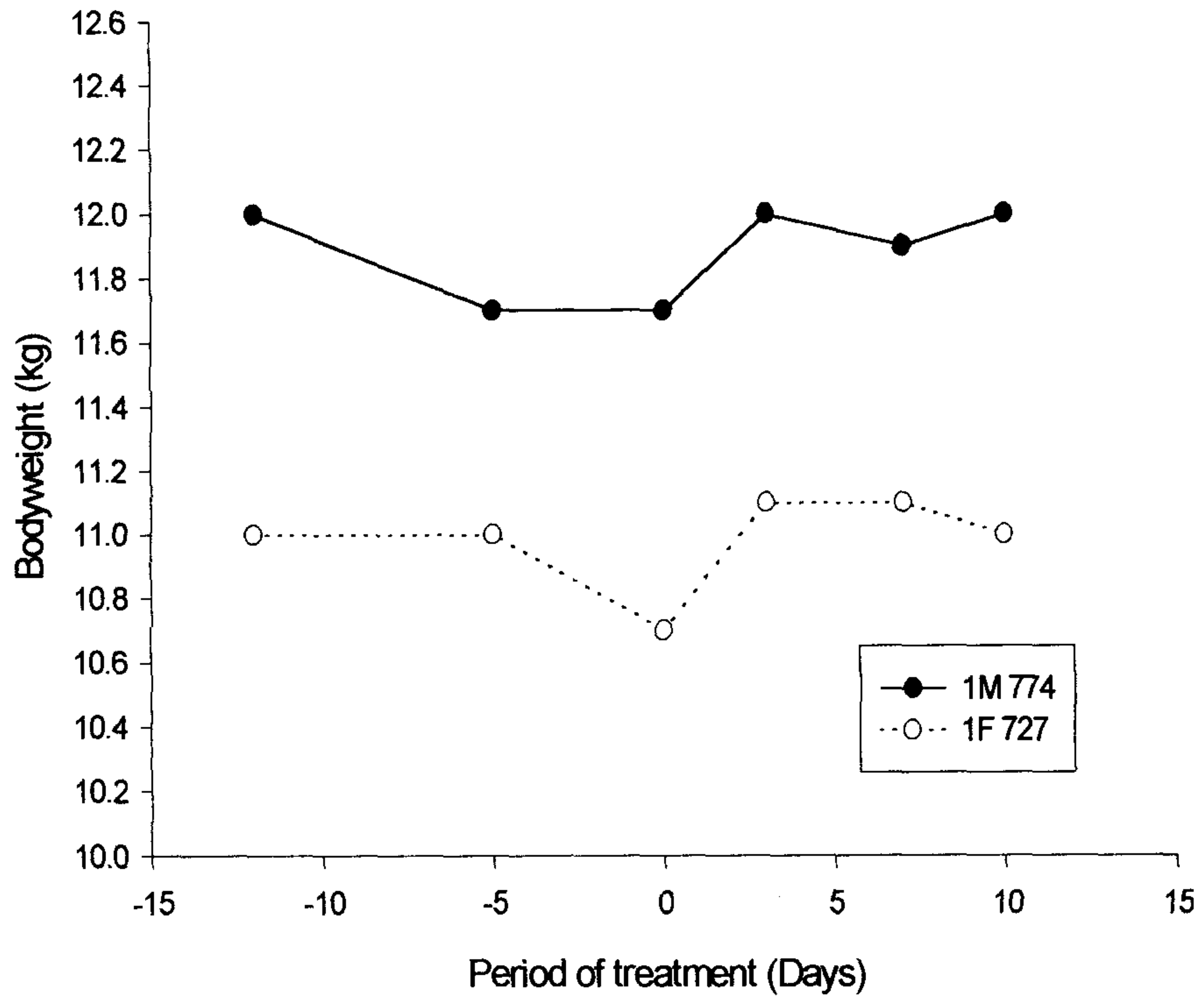


Figure 2B. Bodyweight versus period of treatment - Group 2

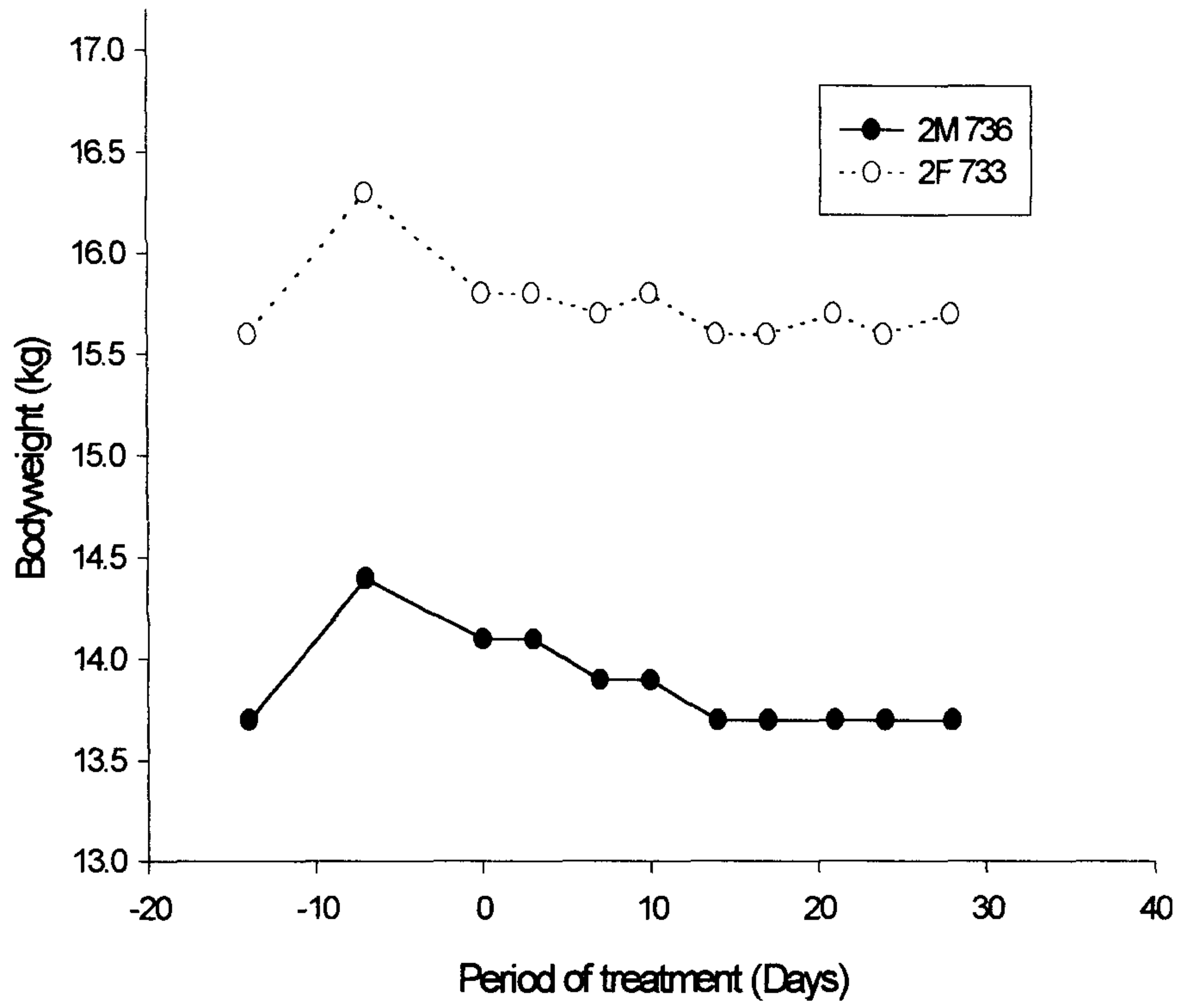


Table 1. Signs - individual observations

Group : 1 2
 Compound : NP-77A NP-77A
 Dosage (mg/kg/day) : 250/500/1000 1000

Group / Sex	Animal number	Sign	Days observed
1M	774	No signs of reaction to treatment	-
1F	727	No signs of reaction to treatment	-
2M	736	Salivation	1*, 8
2F	733	Salivatioin	8

* : Sign observed pre-dose.

Table 2. Bodyweight - individual values (kg)

Group	: 1	2
Compound	: NP-77A	NP-77A
Dosage (mg/kg/day)	: 250/500/1000	1000

Table 2A. Bodyweight - individual values (kg) - Group 1

Group / Sex	Animal number	Day								
		-12	-7	0	3	7	10	0-3	3-7	7-10
1M	774	12.0	11.7	11.7	12.0	11.9	12.0	0.3	-0.1	0.1
1F	727	11.0	11.0	10.7	11.1	11.1	11.0	0.4	0.0	-0.1

Table 2B. Bodyweight - individual values (kg) - Group 2

Group / Sex	Animal number	Day												
		-14	-5	0	3	7	10	14	17	21	24	28	0-28	
1M	736	13.7	14.4	14.1	14.1	13.9	13.7	13.7	13.7	13.7	13.7	13.7	13.7	-0.4
1F	733	15.6	16.3	15.8	15.8	15.8	15.6	15.6	15.6	15.7	15.6	15.7	15.7	-0.1

Table 3. Food consumption - individual values (g/dog/day)

Group	: 1	2
Compound	: NP-77A	NP-77A
Dosage (mg/kg/day)	: 250/500/1000	1000

Table 3A. Food consumption - individual values (g/dog/day) - Group 1

Group / Sex	Animal number	Day				
		-14 to -8	-7 to -1	1 to 3	4 to 7	8 to 10
1M	774	400	400	400	400	400
1F	727	400	400	400	400	400

Table 3B. Food consumption - individual values (g/dog/day) - Group 2

Group / Sex	Animal number	Week					
		-1	-2	1	2	3	4
1M	736	400	400	400	400	400	400
1F	733	400	400	400	400	400	400

Table 4. Haematology - individual values

Group / Sex	Animal number	Day number	PCV	HB g/dl	RBC $\times 10^{12}$	MCH pg	MCHC g/dl	MCV fl	WBC $\times 10^9$
1M	774	P-T	0.49	15.8	7.17	22.0	32.4	68.1	14.9
		10	0.47	15.4	6.85	22.5	32.6	69.1	16.0
1F	727	P-T	0.53	17.1	7.48	22.8	32.2	70.9	14.3
		10	0.53	17.2	7.54	22.8	32.6	70.0	10.9
2M	774	P-T	0.49	16.4	7.43	22.1	33.6	65.7	14.5
		4	0.50	17.0	7.60	22.4	34.0	65.9	12.2
2F	727	P-T	0.39	13.1	5.79	22.6	33.3	67.9	10.3
		4	0.39	12.8	5.67	22.6	33.2	68.0	9.5

Group / Sex	Animal number	Day number	N $\times 10^9$	L $\times 10^9$	E $\times 10^9$	B $\times 10^9$	M $\times 10^9$	LUC $\times 10^9$	PLAT $\times 10^9$	PT sec
1M	774	P-T	9.9	3.7	0.8	0.1	0.5	0.1	340	6.1
		10	11.1	3.6	0.4	0.0	0.8	0.1	321	6.5
1F	727	P-T	9.8	3.2	0.8	0.0	0.5	0.0	308	6.4
		10	6.9	2.7	0.7	0.0	0.6	0.1	316	6.8
2M	774	P-T	10.5	3.5	0.1	0.0	0.4	0.0	238	6.5
		4	7.9	3.8	0.1	0.0	0.4	0.1	260	6.7
2F	727	P-T	6.7	3.0	0.2	0.0	0.3	0.1	283	6.3
		4	5.9	3.1	0.2	0.0	0.2	0.1	281	6.4

P-T: pre-treatment, N: neutrophil, L: lymphocyte, E: eosinophil,
B: basophil, M: monocyte

Table 5A. Blood chemistry - individual values

Group	Animal	Day	ALP	ALT	AST	BILT	GLUC	UREA	CREA	CHOL
/Sex	number	number	iu/l	iu/l	iu/l	umol/l	mmol/l	mmol/l	umol/l	mmol/l
1M	774	P-T	45	44	36	1	6.0	5.5	82	2.7
		10	39	41	56	2	5.9	4.2	77	2.4
1F	727	P-T	52	50	44	1	5.7	5.4	84	2.6
		10	49	46	62	1	5.8	6.6	84	2.2
2M	774	P-T	54	210	113	1	5.6	5.2	87	1.9
		4	50	95	72	1	5.3	5.5	84	2.6
2F	727	P-T	52	53	32	1	5.5	5.0	98	4.5
		4	43	41	30	1	5.5	5.0	82	5.8

Group	Animal	Day	TRIG	TP	ALB	A/G	Na	K	Cl	Ca	Phos
/Sex	number	number	mmol/l	g/l	g/l		mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
1M	774	P-T	0.34	55	34	1.6	148	4.6	110	2.64	1.46
		10	0.38	55	34	1.6	144	4.5	114	2.46	1.36
1F	727	P-T	0.35	53	35	1.9	149	4.1	112	2.57	1.57
		10	0.46	55	34	1.6	146	4.3	116	2.44	1.61
2M	774	P-T	0.36	53	33	1.7	145	4.2	115	2.47	1.39
		4	0.36	52	34	1.9	145	4.3	114	2.32	1.53
2F	727	P-T	0.90	57	35	1.6	147	4.4	117	2.62	1.53
		4	0.85	58	35	1.5	145	4.4	113	2.43	1.50

P-T: pre-treatment

Table 6A. Organ weight and macropathology - individual findings for animals killed after 10 days of treatment

Group : 1 2
 Compound : NP-77A NP-77A
 Dosage (mg/kg/day) : 250/500/1000 1000

◦ Animal number: 0774 ◦ Sex: Male ◦ Dose Group: 1 ◦ Study Day of Death: 11 ◦ Terminal bodyweight: 11800g		
Organ name	Absolute organ weight (g)	Organ weight relative to body weight (%)
Adrenals	1.89	0.016
Brain	90	0.8
Epididymides	4.5	0.04
Heart	102	0.9
Kidneys	57	0.5
Liver	374	3.2
Lungs	106	0.9
Spleen	107	0.9
Testes	23.4	0.20
Thymus	6.8	0.06
Thyroid+Paras	0.68	0.006
Gross Pathology Observations		
Organ Name	Severity, Keyword(s)	Comments & Notes
parenteral site	area(s) of change	multiple poorly defined, dark areas, within subcutis of left cephalic region

Table 6A. Organ weight and macropathology - individual findings for animals killed after 10 days of treatment

Group : 1 2
 Compound : NP-77A NP-77A
 Dosage (mg/kg/day) : 250/500/1000 1000

◦ Animal number: 0727 ◦ Sex: Female ◦ Dose Group: 1 ◦ Study Day of Death: 11 ◦ Terminal bodyweight: 10800.0 g		
Organ name	Absolute organ weight (g)	Organ weight relative to body weight (%)
Adrenals	1.72	0.016
Brain	80	0.7
Heart	16	1.1
Kidneys	47	0.4
Liver	371	3.4
Lungs	-	-
Spleen	1.36	0.013
Testes	125	1.2
Thymus	5.8	0.05
Thyroid+Paras	0.60	0.006
Uterus+Cervix	7.1	0.07
Gross Pathology Observations		
Organ Name	Severity, Keyword(s)	Comments & Notes
parenteral site	area(s) of change	multiple poorly defined, dark areas, within subcutis of Lt. & Rt. cephalic region
L N Inguinal	regional to mass	right nodes
lungs	area(s) of change	occasional pale areas
skin	mass(es) present	firm, pale, cutaneous mass, 10*10*5mm on right hindlimb,

Table 6B. Organ weight and macropathology - individual findings for animals killed after 4 weeks of treatment

Group : 1 2
 Compound : NP-77A NP-77A
 Dosage (mg/kg/day) : 250/500/1000 1000

◦ Animal number: 0736 ◦ Sex: Male ◦ Dose Group: 2 ◦ Study Day of Death: 29 ◦ Terminal bodyweight: 13700.0 g		
Organ name	Absolute organ weight (g)	Organ weight relative to body weight (%)
Adrenals	1.19	0.009
Brain	82	0.6
Epididymides	4.4	0.03
Heart	126	0.9
Kidneys	74	0.5
Liver	387	2.8
Lungs	114	0.8
Spleen	98	0.7
Testes	24.4	0.18
Thymus	10.8	0.08
Thyroid+Paras	0.75	0.005
Gross Pathology Observations		
Organ Name	Severity, Keyword(s)	Comments & Notes
parenteral site	area(s) of change	multiple poorly defined, dark areas, within subcutis of left cephalic region
gall bladder	abnomal contents	contains dark, caseous material
skin	encrustation(s)	occasional poorly defined, on tips of pinnae

Table 6B. Organ weight and macropathology - individual findings for animals killed after 4 weeks of treatment

Group : 1 2
 Compound : NP-77A NP-77A
 Dosage (mg/kg/day) : 250/500/1000 1000

◊ Animal number: 0733 ◊ Sex: Female ◊ Dose Group: 2 ◊ Study Day of Death: 29 ◊ Terminal bodyweight: 15700.0 g		
Organ name	Absolute organ weight (g)	Organ weight relative to body weight (%)
Adrenals	1.77	0.011
Brain	69	0.4
Heart	118	0.8
Kidneys	59	0.4
Liver	478	3.0
Lungs	113	0.7
Spleen	2.18	0.014
Testes	136	0.9
Thymus	17.2	0.11
Thyroid+Paras	0.78	0.005
Uterus+Cervix	16.4	0.10
Gross Pathology Observations		
Organ Name	Severity, Keyword(s)	Comments & Notes
parenteral site	area(s) of change	multiple poorly defined, dark areas, within subcutis of right cephalic region
gall bladder	abnormal contents	contains dark, granular material
cecum	area(s) of change	multiple punctate, dark foci

제 6 절 예비 임상 연구

NP-77A의 임상적용시의 유효성 및 부작용을 확인하기 위한 1단계로서, 만성 간염으로 판정된 소규모의 환자를 대상으로 하여 예비임상연구를 수행하였다.

1. 연구기관 : 중국연변의학원 부속병원 전염병동

2. 연구책임자 : 중국연변의학원 내과 윤정일

3. 연구방법

가. 대상환자의 선정

중국 연변의학원에 만성 B형 간염으로 내원하는 환자중 20~42세의 비교적 건강한 성인 남녀를 대상으로 하였으며, 본 예비임상 연구방법 및 실시에 대해서는, 중국 길림성의 관련 당국으로부터, 사전 심사/승인을 거쳐 이루어졌다.

나. 약물의 투여

NP-77A 10mg/kg을 5% 포도당액에 용해시켜 1개월(4주)간 점적주사 하면서, 투여직전, 투여 2,4주후, 투여종료 4주의 환자로부터 혈액을 채취하여 혈중 HBV DNA 양을 정량하였다.

4. 연구결과

가. 유효성

중국에서의 예비임상연구는 총 30명의 바이러스성 B형 간염환자를 3그룹으로 나누어, 10, 20, 30mg/kg씩 각각 10명의 환자에게 1개월간 투여하는 것으로 계획하였으며, 본 연구는 10mg/kg 투여 시험은 1차적으로 10명의 환자에게 최소량을 투여하여, NP-77A의 유효성 및 투여시 일어날 수 있는 부작용 등을 확인할 목적이었다.

본 1차 연구에서, NP-77A는 10mg/kg의 용량에서 강력하지는 않지만, 대상환자 총 8명의 환자중 4명의 환자에서, 투여기간에 따라, 혈중 바이러스의 농도(HBV DNA)가 미약하나마 감소하는 것으로 확인되었으며, 투여

종료후에는 대상 환자 8명 모두에게서 혈중 바이러스의 농도가 다시 상승되었다는 점에서, NP-77A 10mg/kg은 임상에서 항 HBV 작용을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

이는, Woodchuck을 이용한 연구결과와 거의 일치하는 것으로, 따라서, NP-77A의 용량을 증가(20mg/kg, 30mg/kg)시키거나, 투여기간을 연장(최소 3개월)시키면, 임상에서 유의성있는 항 HBV 작용을 보일수 있을 것으로 기대되었다.

나. 부작용

NP-77A 4주 연속투여에 의한 부작용은, 투여 초기, 투여부위의 국소적 발진(2명) 및 복부 팽만감, 소화불량 등의 소화기계 부작용(2-3명) 외에는 특기할 만한 부작용은 나타나지 않았다.

그런, NP-77A도 인터페론 및 핵산 계열의 간염치료제(라미부딘 등)와 마찬가지로, 투여종료후, 감소되었던 혈중 HBV DNA치가 다시 상승하는 rebound현상이 일어났다.

No.	성 별	연 령	혈 압	HBV DNA 수치 (pg/mg)			
				투여전	투여 2주후	투여 4주후	투여종료 4주후
1	女	42	120/80	3339	3398	2963	3196
2	女	34	150/90	327	316	331	437
3	女	38	130/90	0	0	0	0
4	女	36	120/80	3535	2739	3238	4011
5	男	20	130/90	17	14	29	70
6	男	45	110/80	291	102	103	354
7	男	35	120/90	1638	905	1705	-
8	男	35	120/80	1206	1040	731	1124
9	男	33	140/90	0	0	0	0
10	女	34	120/80	874	872	531	1120

5. 결론 및 고찰

이상의 연구결과에서 NP-77A는 투여최소용량인 10mg/kg을 정맥투여시 항 HBV 작용이 인정되었으며, 이때 나타나는 유의할 만한 부작용은 없었다. 다만, 복부 팽만감 등의 소화기계 부작용이 투여초기에 일부 나타났으나, 곧 소실되었으며, 이는 iridoid계열 물질이 갖는 공통적인 현상인 것으로 추정되었다.

따라서, NP-77A는 동물실험에서의 결과와 동일한 양상으로 임상에서도 작용함이 인정되었다.

Table 1. NP-77A 투여후 HBV DNA 검사 수치

환자명	검사명	결과
1-1-1	DNA Probe (HBV)	3339.00 pg/ml
1-2-1	DNA Probe (HBV)	327.80 pg/ml
1-3-1	DNA Probe (HBV)	0 이하
1-4-1	DNA Probe (HBV)	3535.00 pg/ml
1-5-1	DNA Probe (HBV)	17.29 pg/ml
1-6-1	DNA Probe (HBV)	291.80 pg/ml
1-7-1	DNA Probe (HBV)	1638.00 pg/ml
1-8-1	DNA Probe (HBV)	1206.00 pg/ml
1-9-1	DNA Probe (HBV)	0 이하
1-10-1	DNA Probe (HBV)	874.30 pg/ml
1-1-2	DNA Probe (HBV)	3398.00 pg/ml
1-2-2	DNA Probe (HBV)	316.60 pg/ml
1-3-2	DNA Probe (HBV)	0 이하
1-4-2	DNA Probe (HBV)	2739.00 pg/ml
1-5-2	DNA Probe (HBV)	14.14 pg/ml
1-6-2	DNA Probe (HBV)	102.10 pg/ml
1-7-2	DNA Probe (HBV)	905.30 pg/ml
1-8-2	DNA Probe (HBV)	1040.00 pg/ml
1-9-2	DNA Probe (HBV)	0 이하
1-10-2	DNA Probe (HBV)	872.70 pg/ml

환자명	검사명	결과
1-1-3	DNA Probe (HBV)	2963.00 pg/ml
1-2-3	DNA Probe (HBV)	331.00 pg/ml
1-3-3	DNA Probe (HBV)	0 이하
1-4-3	DNA Probe (HBV)	3238.00 pg/ml
1-5-3	DNA Probe (HBV)	29.48 pg/ml
1-6-3	DNA Probe (HBV)	103.30 pg/ml
1-7-3	DNA Probe (HBV)	1705.00 pg/ml
1-8-3	DNA Probe (HBV)	731.50 pg/ml
1-9-3	DNA Probe (HBV)	0 이하
1-10-3	DNA Probe (HBV)	531.50 pg/ml
1-1-4	DNA Probe (HBV)	3196.00 pg/ml
1-2-4	DNA Probe (HBV)	437.80 pg/ml
1-3-4	DNA Probe (HBV)	0 이하
1-4-4	DNA Probe (HBV)	4011.00 pg/ml
1-5-4	DNA Probe (HBV)	70.86 pg/ml
1-6-4	DNA Probe (HBV)	354.50 pg/ml
1-8-4	DNA Probe (HBV)	1124.00 pg/ml
1-9-4	DNA Probe (HBV)	0 이하
1-10-4	DNA Probe (HBV)	1120.00 pg/ml

제 7 절 유도체화 연구

1. 합성연구

화합물 1: (1R, 4aS, 7aS)-4, 7-디포르밀-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로 사이클로펜타[c]피란(1)의 합성

메틸 (4aS, 7aS)-1-하이드록시-7-하이드록시메틸-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 5g(22.1mmol)을 메탄올 250ml에 용해시키고 트리플루오로붕소 디에틸에테르를 촉매량 가한 다음 실온에서 20 시간 동안 교반하다가 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응을 정지시켰다. 유기층을 분리하여 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 여과, 농축한 후 잔류물을 실리카겔 컬럼크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 5/1, v/v)로 정제하여 오일상의 메틸 (1R, 4aS, 7aS)-7-하이드록시메틸-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4- 카복실레이트를 5.26g(수율:100%) 수득하였다.

위에서 수득된 메틸 (1R, 4aS, 7aS)-7-하이드록시메틸-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.15g (0.62mmol)을 무수 테트라하이드로푸란 6ml에 용해시킨 후 질소분위기하에서 -78℃로 온도를 낮추었다. 여기에 디이소부틸알루미늄 하이드리드(톨루엔중의 1.5M 농도) 2.7ml (4.11mmol)를 천천히 적가하고 서서히 실온으로 승온시키면서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 메탄올을 가하여 반응을 종결시키고 포화 소듐 설페이트 수용액과 실리카겔을 가하여 30분 정도 교반하였다. 규조토로 여과하고 여액을 농축시켜 무색오일상의 (1R, 4aS, 7aS)-4, 7-디하이드록시메틸-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 0.11g (0.49mmol)을 수득하였다.

(1R, 4aS, 7aS)-4, 7-디하이드록시메틸-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 0.11g (0.49mmol)을 메틸렌클로라이드 5ml에 용해시킨 후, 여기에 피리디늄클로로크로메이트 0.608g (2.82mmol)을 가하고 하룻동안 교반하였다. 반응혼합물을 규조토로 여과하고 여액을 농축시킨 다음, 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 3/1, v/v)로 분리, 정제

하여 무색 오일상의 표제화합물을 0.03g (수율: 30%) 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 2.55-2.70(m, 1H), 2.90-3.05(m, 1H), 3.35-3.40(m, 2H), 3.50(s, 3H), 5.60(d, 1H, $J=1.98\text{Hz}$), 6.95(d, 1H, $J=2.77\text{Hz}$), 7.20(s, 1H), 7.30(s, 1H), 9.30 (s, 1H), 9.80(s, 1H)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) : δ 31.46, 38.70, 45.85, 57.13, 99.73, 123.41, 144.19, 156.13, 162.37, 189.74, 191.01

ESIMS(Electron Spray Impact Mass Spectrometer): 230($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 308, 338, 369, 439($2\text{M}+\text{Na}$)⁺(base peak), 470

IR (KBr) : 2950, 2830, 1680, 1635 cm^{-1}

화합물 2: (1R, 4aS, 7aS)-7-하이드록시이미노메틸-1-메톡시-4-(p-메톡시벤질옥시메틸)-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란(2)의 합성

메틸 (1R, 4aS, 7aS)-7-하이드록시메틸-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 3g (12.5mmol)을 디메틸포름아미드 50ml에 용해시킨 후 질소분위기하에서 트리에틸아민 1.9ml (13.8mmol)를 가하였다. 반응액을 1시간 동안 교반한 다음, 여기에 디메틸포름아미드 10ml에 용해시킨 t-부틸디메틸실릴클로라이드 2.07g (13.8mmol)을 적가하였다. 3시간 동안 교반한 후 1N-염산 수용액을 가하여 반응을 종결시키고 에테르를 가하여 추출한 유기층을 포화 중탄산나트륨 수용액 및 포화 식염수로 세척해주었다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조시키고 여과, 농축시켜 무색 오일상의 메틸 (1R, 4aS, 7aS)-7-(t-부틸디메틸실릴옥시메틸)-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트를 4.16g (수율: 94%) 수득하였다

위에서 수득한 메틸 (1R, 4aS, 7aS)-7-(t-부틸디메틸실릴옥시메틸)-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 4.16g (11.7mmol)을 테트라하이드로푸란 100ml에 용해시킨 후 질소분위기하에서 -78°C 로 온도를 낮추었다. 반응액에 디이소부틸암모늄하이드리드(톨루엔중의 1.5M 농도) 19.55ml (29.33mmol)를 천천히 가한 후 30분 동안 교반하였다. 실온으로 승온시키면서 3시간 동안 교반한 다음 메탄올을 가하여 반

응을 종결시키고 포화 소듐설페이트 수용액과 실리카겔을 가하여 30분 동안 교반하였다. 규조토로 여과하고 여액을 농축시켜 무색오일상의 (1R, 4aS, 7aS)-7-(t-부틸디메틸실릴옥시메틸)-4-하이드록시메틸-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 3.45g (수율: 90%)을 수득하였다.

소듐하이드리드 0.402g (10.04mmol)을 반응용기에 넣고 무수 디메틸포름아미드 10ml를 질소분위기하에서 가하였다. 온도를 5°C로 낮춘 후, 위에서 수득한 (1R, 4aS, 7aS)-7-(t-부틸디메틸실릴옥시메틸)-4-하이드록시메틸-1-메톡시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 3g (8.37mmol)을 무수 디메틸포름아미드 20ml에 희석시켜 천천히 적가하였다. 1시간 동안 교반한 다음, p-메톡시벤질클로라이드 1.36ml (10.04mmol)를 가하고 실온으로 천천히 승온시키면서 6 시간 동안 교반하였다. 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응을 종결시키고 에테르와 포화식염수로 추출한 후 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 8/1, v/v)로 분리, 정제하여 무색 오일상의 (1R, 4aS, 7aS)-7-(t-부틸디메틸실릴옥시메틸)-1-메톡시-4-(p-메톡시벤질옥시메틸)-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 1.578 g (수율: 42.2%)을 수득하였다.

(1R, 4aS, 7aS)-7-(t-부틸디메틸실릴옥시메틸)-1-메톡시-4-(p-메톡시벤질옥시메틸)-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 1.578g (3.53mmol)을 테트라하이드로푸란 13ml에 용해시킨 후 테트라부틸암모늄플루오라이드(THF 중의 1M 농도) 3.8ml (3.89mmol)을 가하였다. 2시간 동안 교반한 다음 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응을 종결시키고 에테르와 포화식염수로 추출한 후 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 3/1, v/v)로 분리, 정제하여 무색 오일상의 (1R, 4aS, 7aS)-7-하이드록시메틸-1-메톡시-4-(p-메톡시벤질옥시메틸)-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 0.821g (수율: 70%)을 수득하였다.

(1R, 4aS, 7aS)-7-하이드록시메틸-1-메톡시-4-(p-메톡시벤질옥시메틸)-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 0.240g (0.72mmol)을 메틸렌클로라이드 5ml에 용해시키고 피리디늄클로로크로메이트 0.311g (1.44mmol)을 가하였다. 반응액을 1시간 동

안 교반한 다음 구조토로 여과하고 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 4/1, v/v)로 분리, 정제하여 무색 오일상의 (1R, 4aS, 7aS)-7-포르밀-1-메톡시-4-(p-메톡시벤질옥시메틸)-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 0.167g (수율: 70%)을 수득하였다.

하이드록실아민 하이드로클로라이드 0.064g (0.92mmol)을 에탄올 3ml에 용해시킨 다음 여기에 트리에틸아민 0.15ml (1.10mmol)를 가하여 중화시켰다. 에탄올 1ml로 (1R, 4aS, 7aS)-7-포르밀-1-메톡시-4-(p-메톡시벤질옥시메틸)-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란 0.152g (0.46mmol)을 희석시키고 상기 혼합액에 적가하여 1시간 동안 교반하였다. 반응액을 농축시키고 에틸아세테이트와 포화식염수로 추출한 후 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 4/1, v/v)로 분리, 정제하여 백색고체상의 표제화합물 0.12g (수율: 75%)을 수득하였다.

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.15-2.30(m, 1H), 2.55-2.70(m, 1H), 2.90-3.05(m, 2H), 3.40(s, 3H), 3.72(s, 3H), 3.80(d, 1H, J=11.67Hz), 3.85(d, 1H, J=11.67Hz), 4.30(dd, 2H, J= 11.43, 27.82Hz), 4.70(d, 1H, J=6.1Hz), 6.15(s, 1H), 6.30(s, 1H), 6.70-6.80(m, 2H), 7.10-7.20(m, 2H), 7.85(s, 1H), .30(bs, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃) : δ 37.03, 38.44, 46.87, 55.69, 57.01, 69.80, 70.98, 101.08, 114.20, 114.38, 129.84, 130.81, 137.83, 139.17, 140.25, 147.66, 159.55

화합물 3: 메틸 (1S, 4aS, 7aS)-1-t-부틸아세틸옥시-7-t-부틸아세틸옥시메틸-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트(3)의 합성

메틸 (4aS, 7aS)-1-하이드록시-7-하이드록시메틸-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.1g (0.44mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 5ml 에 용해시킨 다음, 피리딘 0.17ml (2.12mmol)를 가하고 t-부틸아세틸클로라이드 0.24ml (1.77mmol)를 가하여 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응혼합물을 농축시킨 후 잔류물을 에틸아세테이트에 용해시키고 여기에 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 2시간 동안 교반하였다. 에틸아세

테이트층을 분리하고 포화 식염수로 세척한 다음, 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시켰다. 잔류물을 컬럼크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 5/1, v/v)로 분리, 정제하여 백색고체상의 표제화합물 0.15g (수율 : 81%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) : δ 1.61(s, 9H), 1.07(s, 9H), 2.20-2.24(m, 1H), 2.25(s, 2H), 2.26(d, 1H, J=-13.8Hz), 2.33(d, 1H, J=13.8Hz), 2.88-2.96(m, 2H), 3.25-3.33(m, 1H), 3.75(s, 3H), 4.62(d, 1H, J=13.6Hz), 4.70(d, 1H, J=13.6Hz), 5.89(s, 1H), 5.86(bs, 1H), 7.45(s, 1H)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃) : δ 29.90, 30.05, 31.16, 31.28, 34.84, 39.00, 45.71, 47.90, 48.25, 51.73, 61.77, 91.64, 111.65, 132.98, 137.08, 152.18, 167.69, 170.91, 172.29

ESIMS : 445(M+Na)

화합물 4: 메틸 (1S, 4aS, 7aS)-1-t-부틸아세틸옥시-7-포르밀-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트(4)의 합성

메틸 (4aS, 7aS)-1-하이드록시-7-하이드록시메틸-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.5g (2.21mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 10ml에 용해시킨 후 피리디늄클로로코로메이트 0.954g (4.42mmol)을 첨가하였다. 반응액을 3시간 동안 교반한 다음 셀라이트로 여과하여 여액을 농축시키고, 컬럼크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 2/1, v/v)를 수행하여 메틸 (4aS, 7aS)-7-포르밀-1-하이드록시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.376g (수율: 76%)을 수득하였다.

위에서 수득한 메틸 (4aS, 7aS)-7-포르밀-1-하이드록시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.20g (0.89mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 5ml에 용해시킨 다음, 피리딘 0.17ml (2.12mmol)를 가하고 t-부틸아세틸클로라이드 0.25ml (1.89mmol)를 가하여 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응혼합물을 농축시킨 후 잔류물을 에틸아세테이트에 용해시키고 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 2시간 동안 교반하다가 에틸아세테이트층을 분리하였다. 분리된 층을 포화 식염수로 세척한 후 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시켰다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 5/1, v/v)로

분리, 정제하여 백색고체상의 표제화합물 0.124g (수율: 43%)을
수득하였다.

¹H NMR (CDCl₃) : δ 1.05(s, 9H), 2.24(d, 1H, J=13.8Hz),
2.31(d, 1H, J=13.8Hz), 2.59 -2.66(m, 1H), 3.08(m, 1H),
3.32-3.42(m, 2H), 3.77(s, 3H), 6.48(d, 1H, J=5.02Hz),
7.06(s, 1H), 7.48(s, 1H), 9.76(s, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃) : δ 29.89, 31.19, 34.05, 40.01, 44.22,
47.85, 51.82, 89.67, 110.90, 144.44, 152.58, 155.91',
167.43, 170.81, 189.02

ESIMS : 345(M+Na)

**화합물 5: 메틸 (1S, 4aS, 7aS)-1-라우로일옥시-7-라우로일옥시메틸
-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레
이트(5)의 합성**

메틸 (4aS, 7aS)-1-하이드록시-7-하이드록시메틸-1, 4a, 5, 7a-테
트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.2g
(0.88mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 5ml 에 용해시킨 다음, 피
리딘 0.36ml (4.42mmol)를 가하고 라우로일클로라이드 1.02ml
(4.42mmol)를 가하여 하룻동안 교반하였다. 포화 중탄산나트륨
수용액을 가하여 반응을 종결시키고 포화 식염수로 세척하였다.
유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시킨 후,
칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 9/1, v/v)를 수행하여
표제화합물 0.416g (수율: 80%)을 수득하였다.

¹H NMR (CDCl₃) : δ 0.80(m, 3H), 1.10-1.32(m, 32H),
2.15(m, 1H), 2.20-2.35(m, 4H), 2.82(m, 2H), 3.20(m, 1H),
3.65(s, 3H), 4.50(d, 1H, J=13.4Hz), 4.60(d, 1H, J= 13.6Hz),
5.75-5.89(d, s, 2H, J=7.3Hz), 7.38(s, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃) : δ 14.43, 23.04, 24.92, 25.34, 29.40,
29.54, 29.60, 29.63, 29.69, 29.80, 29.84, 29.97, 32.28,
34.56, 34.61, 35.06, 39.05, 45.72, 51.65, 61.93, 92.06,
111.69, 132.81, 137.27, 152.09, 167.63, 172.44, 173.70,
186.12

ESIMS : 613(M+Na)

화합물 6: 메틸 (1S, 4aS, 7aS)-7-포르밀-1-라우로일옥시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트(6)의 합성

메틸 (4aS, 7aS)-7-포르밀-1-하이드록시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.1g (0.45mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 3ml에 용해시킨 다음, 여기에 피리딘 0.09ml (1.13mmol)을 가하고 라우로일클로라이드 0.29ml (1.13mmol)을 가하여 하룻동안 교반하였다. 그 후, 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응을 종결시키고 포화 식염수로 세척하였다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시키고, 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 3/1, v/v)를 수행하여 표제 화합물 0.124g (수율: 68%)을 수득하였다

¹H NMR (CDCl₃) : δ 0.80(m, 3H), 1.10-1.30(m, 18H), 2.25(m, 2H), 2.50(m, 1H), 3.00(m, 1H), 3.15(m, 1H), 3.30(m, 1H), 3.68(s, 3H), 6.25(d, 1H, J=5.7Hz), 6.92(d, 1H, J=1.2Hz), 7.38(s, 1H), 9.70(s, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃) : δ 14.44, 23.04, 24.86, 29.38, 29.58, 29.69, 29.80, 29.95, 32.27, 34.44, 34.49, 40.11, 43.98, 51.75, 90.33, 110.87, 144.72, 152.52, 155.70, 167.39, 172.41, 188.81

ESIMS : 429(M+Na)

IR(KBr) : 2950, 2860, 1770, 1720, 1700, 1660 cm⁻¹

화합물 7: 메틸 (1S, 4aS, 7aS)-1-디하이드로신나모일옥시-7-디하이드로신나모일옥시메틸-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트(7)의 합성

메틸 (4aS, 7aS)-1-하이드록시-7-하이드록시메틸-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.2g (0.88mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 5ml에 용해시킨 다음, 피리딘 0.36ml (4.42mmol)를 가하고 디하이드로신나모일클로라이드 0.66ml (4.42mmol)를 가하여 3시간 동안 교반하였다. 그 후 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응을 종결시키고 포화 식염수로 세척하였다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시킨 후, 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 5/1, v/v)를 수행하여 표제화합물 0.354g (수율: 82%)을 수득하였다.

¹H NMR (CDCl₃) : δ 2.20(m, 1H), 2.60-2.80(m, 5H), 2.80-2.95(m, 1H), 2.95-3.10(m, 4H), 3.25(m, 1H), 3.75(s, 3H), 4.58(d, 1H, J=13.5Hz), 4.65(d, 1H, J=13.5Hz), 5.82(s, 2H), 5.90(d, 1H, J=7Hz), 7.15-7.22(bs, 6H), 7.22-7.40(m, 4H), 7.45(s, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃) : δ 25.64, 26.04, 29.58, 30.81, 40.43, 46.43, 55.732, 86.80, 106.50, 121.44, 121.56, 123.42, 123.64, 123.70, 127.84, 131.70, 135.07, 135.47, 146.74, 162.33, 166.35, 167.47

ESIMS : 513(M+Na)

화합물 8: 메틸 (1S, 4aS, 7aS)-1-디하이드로신나모일옥시-7-포르밀-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트(8)의 합성

메틸 (4aS, 7aS)-7-포르밀-1-하이드록시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.3g (1.34mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 5ml에 용해시킨 다음, 피리딘 0.27ml (3.35mmol)를 가하고 디하이드로신나모일클로라이드 0.5ml (3.35mmol)를 가하여 3시간 동안 교반하였다. 그 후, 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응을 종결시키고 포화 식염수로 세척하였다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시킨 후, 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 3/1, v/v)를 수행하여 표제화합물 0.358g (수율: 75%)을 수득하였다

¹H NMR (CDCl₃) : δ 2.60(m, 1H), 2.65-2.80(m, 2H), 2.90-3.00(m, 2H), 3.10(m, 1H), 3.25(m, 1H), 3.75(s, 3H), 6.40(d, 1H, J=5.4Hz), 7.00(s, 1H), 7.15-7.25(m, 3H), 7.25-7.35(m, 2H), 7.42(s, 1H), 9.75(s, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃) : δ 30.86, 34.24, 35.98, 40.07, 43.98, 51.77, 90.38, 110.91, 126.71, 128.89, 140.43, 144.58, 152.42, 155.78, 167.34, 171.52, 188.87

ESIMS : 379(M+Na)

화합물 9: 메틸(1S, 4aS, 7aS)-1-페녹시아세틸옥시-7-페녹시아세틸옥시메틸-1,4a, 5,7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트(9)의 합성

메틸 (4aS, 7aS)-1-하이드록시-7-하이드록시메틸-1,4a, 5,7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.1g (0.44mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 3ml에 용해시킨 다음, 피리딘 0.18ml (2.21mmol)를 가하고 페녹시아세틸클로라이드 0.31ml(2.21mmol)을 가하여 하룻동안 교반하였다. 그 후, 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응을 종결시키고 포화 식염수로 세척하였다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시킨 후, 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 5/1, v/v)를 수행하여 표제화합물 0.164g (수율: 75%)을 수득하였다.

¹H NMR (CDCl₃) : δ 2.15(m, 1H), 2.70-2.88(m, 2H), 3.15(m, 1H), 3.65(s, 3H), 4.50 -4.78(m, 6H), 5.85(s, 1H), 5.95(d, 1H, J=6.7Hz), 6.75-6.85(m, 4H), 6.85-7.00(m, 2H), 7.10-7.25(m, 2H), 7.35(s, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃) : δ 34.63, 39.02, 45.81, 51.72, 62.49, 62.65, 92.38, 111.98, 115.08, 115.17, 122.22, 122.41, 129.97, 130.01, 134.58, 136.02, 151.62, 158.02, 158.18, 167.33, 167.96, 169.02

ESIMS : 517(M+Na)

화합물 10: 메틸 (1S, 4aS, 7aS)-7-포르밀-1-페녹시아세틸옥시-1,4a, 5,7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트(10)의 합성

메틸 (4aS, 7aS)-7-포르밀-1-하이드록시-1,4a, 5,7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카복실레이트 0.2g (0.89mmol)을 무수 메틸렌클로라이드 5ml에 용해시킨 다음, 피리딘 0.18ml (2.23mmol)를 가하고 페녹시아세틸클로라이드 0.31ml (2.23mmol)를 가하여 하룻동안 교반하였다. 그 후, 포화 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응을 종결시키고 포화 식염수로 세척하였다. 유기층을 무수 마그네슘 설페이트로 건조, 여과, 농축시킨 후, 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 3/1, v/v)를 수행하여

표제화합물 0.217g (수율: 68%)을 수득하였다

¹H NMR (CDCl₃) : δ 2.58(m, 1H), 3.10(m, 1H), 3.35(m, 2H), 3.75(s, 3H), 4.70(s, 2H), 6.50(d, 1H, J=4.7Hz), 6.85-6.95(m, 2H), 6.95-7.00(m, 1H), 7.25-7.35(m, 2H), 7.40(s, 1H), 9.75(s, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃) : δ 34.02, 40.04, 44.10, 51.79, 65.47, 90.72, 116.17, 115.12, 122.26, 129.93, 144.23, 151.99, 156.17, 158.05, 167.11, 167.79, 189.04

화합물11: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-메톡시-5-메톡시카보닐-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d]인덴(1)의 합성

메틸(4aS, 7aS)-1-하이드록시-7-하이드록시메틸-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카르복실레이트 10g(44.2mmol)을 메틸렌클로라이드 600ml에 녹이고 실온에서 피리디늄클로로코로메이트 19.06g(88.4mmol)을 가한 다음, 동온도에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 구조토를 통과시켜 여과한 다음 여과액을 농축시키고 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=3/1, v/v)로 정제하여 메틸(4aS, 7aS)-7-포르밀-1-하이드록시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카르복실레이트 8.78g(수율 89%)을 수득하였다.

제조된 메틸(4aS, 7aS)-7-포르밀-1-하이드록시-1, 4a, 5, 7a-테트라하이드로사이클로펜타[c]피란-4-카르복실레이트 10g(44.6mmol)을 에탄올 300ml에 녹인 후 상온에서 10% Pd/C(0.5g)를 가하고 수소분위기(1기압)하에 1시간 동안 교반하였다. 반응혼합물을 구조토를 통과시켜 여과한 후 감압하에 농축하였다. 농축된 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=4/1, v/v)로 정제하여 흰색 고체상의 메틸(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d]인덴-카르복실레이트 6.05g(수율 60%)을 수득하였다.

제조된 메틸(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d]인덴-카르복실레이트 2.3g(10.17mmol)을 무수 메탄올 60ml에 녹이고 0℃로 냉각시켰다. 여기에 트리플루오로붕소 디에틸에테르(48%) 2.3ml

를 가하고 서서히 실온으로 올리면서 2시간 동안 교반하였다. 반응액을 0℃로 냉각시킨 후 포화 중조수로 중화시키고 감압하에 유기용매를 제거하였다. 수층을 에틸아세테이트로 두번 추출한 다음 추출액을 포화식염수로 세척하고, 무수황산나트륨으로 건조시키고 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=4/1, v/v)로 정제하여 오일상의 표제화합물 2.1 g(수율 86%)을 수득하였다.

¹H NMR(CDCl₃) : δ 1.01-1.13(m, 1H), 1.69(m, 1H), 1.85(m, 1H), 2.26(m, 2H), 2.54- 2.75(m, 1H), 3.38(s, 3H), 3.71(s, 3H), 4.56(d, 1H, J=1.28Hz), 5.73(d, 1H, J=4.83 Hz), 7.53(s, 1H)

¹³C NMR(CDCl₃) : 25.99, 30.01, 33.85, 39.73, 51.59, 51.68, 55.60, 99.78, 109.58, 110.51, 150.16, 168.18

화합물12: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-하이드록시메틸-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 (2)의 합성

실시에 1에서 합성한 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-메톡시-5-메톡시 카보닐- 2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 1.05g(4.358mmol)을 무수 테트라하이드로푸란 30ml에 녹이고 용액의 온도를 -78℃로 냉각시켰다. 여기에 1.5M-다이소부틸 알루미늄하이드라이드 7.26ml(10.895mmol)을 적가한 다음 서서히 0℃로 승온시키면서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완결된 후 반응액에 메탄올 3ml와 포화된 소듐설페이트 수용액 1ml를 가한 다음, 약간의 실리카겔과 무수 소듐설페이트를 가하고 30분간 교반한 후 규조토를 통과시켜 여과하였다. 여액을 농축시켜 수득된 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=2/1, v/v)로 정제하여 오일상의 표제화합물 0.92g(수율 99%)을 수득하였다.

¹H NMR(CDCl₃) δ 1.13-1.30(m, 1H), 1.57-1.73(m, 1H), 1.82(m, 1H), 2.02(m, 1H), 2.48 (m, 1H), 2.61(m, 1H), 2.80(t, 1H, J=6.94Hz), 3.37(s, 3H), 4.01(d, 1H, J=12.16Hz), 4.11(d, 1H, J=12.19Hz), 4.56(d, 1H, J=1.33Hz), 5.65(d, 1H, J=4.75Hz), 6.38(d, 1H, J=7.45Hz)

¹³C NMR(CDCl₃) : 30.07, 33.29, 33.54, 40.33, 51.47, 55.53, 63.81, 99.4

7, 109.22, 117.19, 136.48

MASS : 235[M+Na]⁺

화합물13: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 (3)의 합성

실시에 2에서 합성한 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-하이드록시메틸-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 1.0g(4.71mmol)을 메틸렌클로라이드 30ml에 녹인 후 -20℃로 냉각시켰다. 여기에 트리에틸아민 6.6ml(47.11mmol)를 가하고 메탄설폰닐클로라이드 1.1ml(14.13mmol)를 서서히 적가한 다음 30분간 교반하였다. 동온도에서 티올아세트산 1.7ml(47.11mmol)를 가한 후 서서히 실온으로 승온시키면서 5 시간 동안 교반하였다. 반응혼합물을 포화중조수, 포화식염수 순으로 세척하고 무수 황산나트륨으로 건조시킨 후 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=20/1, v/v)로 정제하여 노란색 고체상의 표제화합물 0.67g(수율 53%)을 수득하였다.

¹H NMR(CDC1₃) : δ 1.13(m, 1H), 1.53(m, 1H), 1.75(m, 1H), 2.0(m, 1H), 2.25(m, 1H), 2.26(s, 3H), 2.51(m, 1H), 2.71(m, 1H), 3.29(s, 3H), 3.43(d, 1H, J=13.92Hz), 3.58(d, 1H, J=13.87Hz), 4.47(d, 1H, J=1.45Hz), 5.58(d, 1H, J=4.83Hz), 6.31(s, 1H)

¹³C NMR(CDC1₃) : 29.96, 30.97, 31.85, 33.20, 34.45, 40.28, 51.63, 55.54, 99.23, 109.20, 112.96, 136.67, 196.00

MASS: 293[M+Na]⁺

화합물 14: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-하이드록시이미노메틸-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(4)의 합성

실시에 2에서 수득한 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-하이드록시메틸-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.843g(3.92mmol)을 메틸렌클로라이드 30ml에 녹인 후 0℃에서 피리디늄클로로크로메이트 1.69g(7.83mmol)을 가하였

다. 반응액의 온도를 서서히 실온으로 올리면서 1 시간동안 교반하였다. 반응액을 구조토를 통과시켜 여과한 후 여액을 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=5/1, v/v)로 정제하여 흰색 고체상의 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-포르밀-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.33g(수율 40%)을 수득하였다.

제조된 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-포르밀-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 50mg(0.238mmol)을 무수 메탄올 1ml에 녹인 후 여기에 하이드록실아민 하이드로클로라이드 41.3mg(0.595mmol)을 가하고 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응액을 감압하에 농축시키고 에틸아세테이트에 녹인 후 포화식염수로 세척하였다. 그 후 무수 황산나트륨으로 건조시키고 농축한 다음, 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=5/1, v/v)로 정제하여 흰색 고체상의 표제 화합물 31mg(수율 57%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.10(m, 1H), 1.60(m, 1H), 1.75(m, 1H), 2.18(m, 1H), 2.50-2.58 (m, 2H), 2.70(m, 1H), 3.32(s, 3H), 4.52(d, 1H, J=1.2Hz), 5.65(d, 1H, J=5.4Hz), 6.58(s, 1H), 7.59(s, 1H), 8.05(s, 1H)
 $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 30.29, 32.06, 33.51, 39.68, 51.36, 55.62, 100.13, 109.50, 114.28, 145.11, 150.13
MASS ; 225[M]⁺, 248[M+Na]⁺, 473[2M+Na]⁺

화합물 15: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-아세틸옥시-5-아세틸티오메틸-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(5)의 합성

실시에 3에서 수득한 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.6g(2.22mmol)을 0.1M-TsOH (in 테트라하이드로푸란/물/아세톤=4/2/1) 55.5ml(5.55mmol)에 녹이고 40°C에서 이틀 동안 교반하였다. 유기용매를 감압하에 제거하고 에틸아세테이트로 녹인 후 포화중조수로 중화시켰다. 유기층을 분리하고 수층은 다시 에틸아세테이트로 추출하였다. 유기층과 에틸아세테이트 추출액을 합쳐 포화식염수로 세척한 다음 무수 마그네슘술페이트로 건조시키고 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래

피(헥산/에틸아세테이트=2/1, v/v)로 정제하여 연한 노란색 고체상의 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.228g(수율 40%)을 수득하였다.

제조된 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 196mg(0.765mmol)을 피리딘 3mL에 녹이고 아세트산무수물 0.145mL(1.529mmol)를 가한 다음 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완결된 후 감압하에 유기용매를 제거하고 에테르에 녹였다. 이를 포화중조수, 포화식염수 순으로 세척한 후 무수 마그네슘설페이트로 건조시키고 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=10/1, v/v)로 정제하여 연한 노란색 고체상의 표제화합물 0.202mg(수율 89%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.26(m, 1H), 1.66(m, 1H), 1.95(m, 1H), 2.08(s, 3H), 2.15(m, 1H), 2.35(s, 3H), 2.36(m, 1H), 2.64(m, 1H), 2.93(m, 1H), 3.53(d, 1H, J=13.98Hz), 3.67(d, 1H, J=13.96), 5.76(d, 1H, J=4.85Hz), 5.85(d, 1H, J=0.99), 6.39(s, 1H)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 21.68, 29.82, 31.01, 31.73, 32.98, 34.34, 39.88, 51.50, 100.36, 101.95, 112.81, 136.54, 170.52, 195.96

MASS ; 321[M+Na]⁺

화합물 16: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-아세틸옥시-5-포르밀-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(6)의 합성

(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-포르밀-2-메톡시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.96g(4.568mmol)을 0.1M-TsOH(in 테트라하이드로푸란/중류수/아세톤=4/2/1, 부피비) 91mL(9.137mmol)에 녹이고 실온에서 하루동안 교반하였다. 유기용매를 감압하에 제거하고 에틸아세테이트로 녹인 후 포화중조수로 중화시켰다. 유기층을 분리하고 수층을 다시 에틸아세테이트로 추출한 다음, 유기층과 에틸아세테이트 추출액을 합하여 포화식염수로 세척하고 무수 마그네슘설페이트로 건조시키고 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=2/1, v/v)로 정제하여 흰색 고체상의 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-

-포르밀-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.71g(수율 79%)을 수득하였다.
 제조된 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-포르밀-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.71g (3.62mmol)을 피리딘 5ml에 녹이고 아세트산무수물 0.68ml(7.24mmol)을 가한 다음 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완결된 후 감압하에 유기용매를 제거하고 에테르에 녹였다. 이를 포화중조수, 포화식염수 순으로 세척하고 무수 마그네슘설페이트로 건조시킨 후 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=3/1, v/v)로 정제하여 흰색 고체상의 표제화합물 0.605g(수율 70%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.02(m, 1H), 1.66(m, 1H), 1.88(m, 1H), 2.01(s, 3H), 2.28(m, 1H), 2.56-2.72(m, 2H), 2.9(m, 1H), 5.78(s, 1H), 5.85(d, 1H, J=5.02), 7.15(s, 1H), 9.3 (s, 1H)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 21.60, 30.21, 30.37, 32.98, 39.44, 50.97, 101.85, 123.14, 159.24, 170.32, 190.86

MASS : 261[M+Na]⁺

화합물 17: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-t-부틸아세틸옥시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(7)의 합성

(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.1g (0.39mmol)을 피리딘 2ml에 녹이고 여기에 t-부틸아세틸 클로라이드 0.11ml(0.78mmol)를 가한 다음 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완결된 후 감압하에 유기용매를 제거하고 에테르에 녹였다. 이를 포화중조수, 포화식염수 순으로 세척한 후 무수 마그네슘설페이트로 건조시키고 농축시켰다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=10/1, v/v)로 정제하여 연한 노란색 고체상의 표제화합물 0.112g(수율 81%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.08(s, 9H), 1.26(m, 1H), 1.68(m, 1H), 1.98(m, 1H), 2.06(m, 1H), 2.21(s, 2H), 2.36(s, 3H), 2.37(m, 1H), 2.65(m, 1H), 2.91(m, 1H), 3.54(d, 1H, J=14.0Hz), 3.68(d, 1H, J=13.98Hz), 5.74(d, 1H, J=4.83Hz), 5.87(d, 1H, J=0.83Hz), 6.40(s, 1H)

^{13}C NMR(CDCl_3) : 29.83, 30.04, 31.00, 31.26, 31.73, 32.98, 34.36, 39.92, 48.38, 51.55, 100.31, 101.59, 112.83, 136.53, 171.76
MASS : 377[M+Na]⁺

화합물 18: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-라우로일옥시-5-메톡시카보닐-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(8)의 합성

메틸(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴-5-카르복실레이트 0.12g(0.53mmol)을 피리딘 2ml에 녹이고 라우로일 클로라이드 0.245ml(1.061mmol)를 가한 다음 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완결된 후 감압하에 유기용매를 제거하고 에틸아세테이트로 녹였다. 이를 포화중조수, 포화식염수 순으로 세척하고 무수 마그네슘설페이트로 건조시킨 후 농축하였다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=10/1, v/v)로 정제하여 흰색 고체상의 표제화합물 0.12g(수율 55%)을 수득하였다.

^1H NMR(CDCl_3) : δ 0.89(t, 3H, J=6.42Hz), 1.18(m, 1H), 1.28(s, 16H), 1.63(m, 2H), 1.64(m, 1H), 1.75(m, 1H), 1.96(m, 1H), 2.25-2.38(m, 3H), 2.61-2.79(m, 2H), 2.91(m, 1H), 5.82(d, 1H, J=4.7Hz), 5.87(s, 1H), 7.52(s, 1H)

^{13}C NMR(CDCl_3) : 14.45, 23.04, 25.09, 29.46, 29.61, 29.69, 29.81, 29.88, 29.96, 32.28, 32.49, 33.66, 34.81, 39.49, 51.35, 51.70, 100.70, 101.93, 110.52, 149.86, 167.96, 173.09
MASS : 431[M+Na]⁺

화합물 19: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-메톡시카보닐-2-페닐아세틸옥시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(9)의 합성

메틸(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴-5-카르복실레이트 0.1g(0.442mmol), 페닐아세틸 클로라이드 0.117ml(0.884mmol) 및 피리딘 2ml를 사용하는 점을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하

계 실시하여 연한 노란색 오일상의 표제화합물 0.136g(수율 89%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.16(m, 1H), 1.72(m, 1H), 1.94(m, 1H), 2.31(m, 1H), 2.58-2.79 (m, 2H), 2.96(m, 1H), 3.77(s, 2H), 3.79(s, 3H), 5.77(d, 1H, J=4.86Hz), 5.89(s, 1H), 7.26-7.42(m, 5H), 7.5(s, 1H)

화합물 20: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-메톡시카보닐-2-페녹시아세틸옥시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(10)의 합성

메틸(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴-5-카르복실레이트 0.1g(0.442mmol), 페녹시아세틸 클로라이드 0.122ml(0.884mmol) 및 피리딘 2ml를 사용하는 점을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 실시하여 연한 노란색 오일상의 표제화합물 0.135g(수율 85%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.27(m, 1H), 1.73(m, 1H), 1.98(m, 1H), 2.32(m, 1H), 2.59-2.81 (m, 2H), 3.0(m, 1H), 3.77(s, 3H), 4.68(s, 2H), 5.72(d, 1H, J=4.82Hz), 5.98(s, 1H), 6.89-7.06(m, 3H), 7.23-7.38(m, 2H), 7.51(s, 1H)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 29.82, 32.45, 33.65, 39.34, 51.43, 51.74, 63.79, 65.85, 100.89, 102.91, 110.56, 115.15, 122.32, 130.00, 149.72, 158.20, 167.86, 168.45

MASS : 383[M+Na]⁺

화합물 21: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-벤조일옥시-5-메톡시카보닐-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(11)의 합성

메틸(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴-5-카르복실레이트 0.1g(0.442mmol), 벤조일 클로라이드 0.103ml(0.884mmol) 및 피리딘 2ml를 사용하는 점을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 실시하여 흰색 고체상의 표제화합물 0.124g(수율 85%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.24(m, 1H), 1.82(m, 1H), 2.03(m, 1H), 2.34(m, 1H), 2.74(m, 2H), 3.13(m, 1H), 3.78(s, 3H), 5.94(d, 1H, J=5.3Hz), 6.10(d, 1H, J=0.7Hz), 7.45-7.58 (m, 2H), 7.58 -7.64(m, 2H), 8.05-8.08 (m, 2H)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 29.95, 32.50, 33.68, 39.39, 51.54, 51.80, 100.86, 102.90, 110.54, 128.84, 130.13, 133.77, 149.87, 165.88, 168.01

MASS : 352[M+Na] $^+$

화합물 22: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-벤조일옥시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(12)의 합성

(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.1g (0.39mmol), 벤조일 클로라이드 0.91ml(0.78 mmol) 및 피리딘 2 ml를 사용하는 점을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 실시하여 표제화합물 0.105g(수율 75%)를 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.32(m, 1H), 1.75(m, 1H), 2.07(m, 1H), 2.20(m, 1H), 2.36(m, 3H), 2.43 (m, 1H), 2.72(m, 1H), 3.08(m, 1H), 3.59(d, 1H, J=13.99Hz), 3.71(d, 1H, J=13.92Hz), 5.89(d, 1H, J=4.84Hz), 6.08(d, 1H, J=0.86Hz), 6.43(s, 1H), 7.47(m, 1H), 7.60(m, 1H), 8.07 (m, 1H)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 29.87, 31.01, 31.75, 33.03 34.41, 39.85, 51.85, 100.55, 102.89, 112.85, 128.81, 130.12, 13032, 130.67, 136.50, 166.01

MASS : 383[M+Na] $^+$

화합물 23: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-이소니코티노일옥시-5-메톡시카보닐-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트 [c, d] 인덴(13)의 합성

메틸(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H- 1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴-5-카르복실레이트 0.1g(0.442mmol), 이소니코티노일 클로라이드 0.157g(0.884mmol)

및 피리딘 2ml 를 사용하는 점을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 실시하여 표제화합물 0.129g(수율 88%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.21(m, 1H), 1.82(m, 1H), 2.04(m, 1H), 2.38(m, 1H), 2.78(m, 2H), 3.13 (m, 1H), 3.75(s, 3H), 5.79(d, 1H, J=5.49Hz), 6.10 (s, 1H), 7.54(s, 1H), 7.82(m, 2H), 8.82(d, 1H, J=4.2Hz)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 29.90, 32.42, 33.64, 39.32, 51.52, 51.85, 100.96, 103.57, 110.57, 123.26, 137.36, 149.72, 151.11, 164.52, 167.90

MASS : 332[M+H]⁺

화합물 24: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-이소니코티노일옥시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(14)의 합성

(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-5-아세틸티오메틸-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.1g (0.39mmol), 이소니코티노일 클로라이드 0.139g(0.78mmol) 및 피리딘 2ml를 사용하는 점을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 실시하여 연한 노란색 고체상의 표제화합물 0.071g(수율 50%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.25(m, 1H), 1.66(m, 1H), 1.94(m, 1H), 2.11(m, 1H), 2.26(s, 3H), 2.32(m, 1H), 2.62(m, 1H), 3.10(m, 1H), 3.48(d, 1H, J=14.0Hz), 3.58(d, 1H, J=13.97Hz), 5.79 (d, 1H, J=4.83Hz), 5.99(s, 1H), 6.32(s, 1H), 7.76(d, 2H, J=5.88Hz), 8.72(d, 2H, J=5.45Hz)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 24.58, 25.75, 26.40, 27.75, 29.07, 34.54, 46.55, 95.44, 98.31, 107.66, 118.01, 131.22, 132.27, 145.82, 159.36, 190.66

MASS : 362[M+H]⁺

화합물 25: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-아세틸티오-5-메톡시카보닐-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(15)의 합성

메틸(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-하이드록시-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴-5-카르복실레이트

0.15g(0.663mmol)을 피리딘 3ml에 녹이고 아세트산무수물 0.125ml(1.326mmol)를 가한 다음 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완결된 후 감압하에 유기용매를 제거하고 에틸아세테이트로 녹였다. 이를 포화중조수, 포화식염수 순으로 세척하고 무수 마그네슘설페이트로 건조시킨 후 농축하였다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=10/1, v/v)로 정제하여 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-아세틸옥시-5-메톡시카보닐-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트 [c, d] 인덴 0.161g(수율 91%)을 수득하였다.

제조된 (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-아세틸옥시-5-메톡시카보닐-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 0.123g(0.458mmol)을 벤젠 5ml에 녹이고, 티올아세트산 0.325ml(4.584mmol) 및 피리디늄 p-톨루엔설페이트 0.047g(0.092mmol)을 가한 다음 하루밤 동안 환류교반하였다. 반응액의 온도를 실온으로 냉각시키고 에테르로 희석한 다음 포화중조수, 포화식염수 순으로 세척하고 유기층은 무수 마그네슘설페이트로 건조시킨 후 농축하였다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=10/1, v/v)로 정제하여 표제화합물 0.078g(수율 60%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$; δ 1.18-1.32(m, 1H), 1.66(m, 1H), 1.77(m, 1H), 2.21(m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.55(m, 1H), 2.65(m, 1H), 2.94(m, 1H), 3.65 (s, 1H), 5.48(d, 1H, J=3.3 Hz), 5.56(d, 1H, J=4.86Hz), 7.43(s, 1H)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$; 31.40, 31.89, 32.64, 40.43, 51.10, 51.77, 86.41, 100.34, 110.62, 150.34, 168.01, 194.71

MASS ; 307[M+Na]⁺

화합물 26: (2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-아세틸티오-5-아세틸티오메틸-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴(16)의 합성

(2S, 2aR, 4aS, 7aR, 7bS)-2-아세틸옥시-5-아세틸티오메틸-2a, 3, 4, 4a, 7a, 7b-헥사하이드로-2H-1, 7-디옥사사이클로펜트[c, d] 인덴 90mg (0.302mmol)을 벤젠 3ml에 녹이고, 티올아세트산 0.214ml(3.016mmol) 및 피리디늄 p-톨루엔설페이트 31mg (0.060mmol)을 가

한 다음 이를 동안 환류교반하였다. 반응액의 온도를 실온으로 냉각시키고 에테르로 희석한 후 이를 포화중조수, 포화식염수로 세척하고 유기층을 무수 마그네슘설페이트로 건조시키고 농축하였다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트=15/1, v/v)로 정제하여 연한 노란색 고체상의 표제화합물 52mg(수율 55%)을 수득하였다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.37-1.49(m, 1H), 1.67-1.75(m, 1H), 1.87-1.94(m, 1H), 2.11-2.19(m, 1H), 2.36(m, 1H), 2.37(2s, 6H), 2.59(m, 1H), 2.98(m, 1H), 3.53(d, 1H, J=13.97 Hz), 3.64(d, 1H, J=13.96Hz), 5.51(d, 1H, J=3.32Hz), 5.53(d, 1H, J=10.91Hz), 6.38(s, 1H)

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3)$: 30.99, 31.41, 31.72, 31.77, 32.66, 34.65, 40.80, 51.32, 86.13, 99.98, 113.01, 137.00, 194.96, 195.96

MASS : 313[M+H]⁺

2. 항바이러스 작용

가. 시험방법

세부적인 시험방법은 Korba의 시험방법을 참고하였다.

(Korba and Gerin, Antiviral Res. 19: 55-70, 1992)

항바이러스 작용은 4개의 다른 농도로 시험하였고 모든 well은 같은 농도로 같은 시간에 세포배양하였다. 세포내, 세포의 HBV DNA의 수치의 고유변동 차이로 인하여 대조군의 HBV DNA 수치보다 3배 이상의 HBV virion DNA변화를 기준으로 유의성을 검정하였다. ($P < 0.05$) 세포의 HBV virion DNA수치를 일반적으로 대조군에서 50 - 150 pg/ml을 나타내었다(평균 76 pg/ml). 참고로, hybridization 분석에 의했을 경우, 세포의 배양액중의 HBV DNA는 1.0 pg은 3×10^5 viral particales/ml에 해당하였다.

관찰된 항바이러스 작용이 독성에 기인하는 것인지 확인하기 위하여 약물의 세포독성을 확인하기 위한 시험을 실시하였다. 본실험은 보통 널리 사용하는 neutral red dye uptake 방법을 사용하였으며, 본 방법은 HSV, HIV에 대한 항바이러스 작용을 검색하는데 널리 쓰이는 방법이다.

시험물질은 100% 세포배양용 DMSO에 용해시켜 30-100 mM로 만들었으며, 각각의 tube에 aliquot를 만들어 -20°C에 보관하였다.

매일 매일의 약물처리를 위해서 각 aliquot는 실온에서 배양액 중에 현탁시킨후

곧바로 세포배양액 중에 첨가하였으며 시험물질은 항바이러스 작용을 위해서는 0.1-100 μM , 세포독성을 위해서는 30-100 μM 농도로 사용하였다. 본 assay를 위해서, 세포배양액을 96-well에서 유지시키며 각각의 약물 농도에 따라 replicate 하였다. 약물은 9일동안 매일 처리한 후, 세포의 HBV DNA수치를 측정하였다.

나. 시험 결과

1) 항바이러스 작용의 평가

정상적인 변동의 범위에서, 대조군의 세포의 HBV DNA수치를 시험기간 동안 일정하게 유지되었다. 양성 대조군으로 사용한 ddc나 3-TC는 사용한 농도에서 매우 유의성있는 억제 효과를 나타내었으며, ddc 8-12 μM 에서 90%이상의 항바이러스 작용을 나타내었다. 사용한 약물중 NP-01, CW-209273은 ddc나 3-TC에 유사한 항 HBV작용을 나타내어 주목되었다.

2) 세포 독성평가

항바이러스 작용을 나타내는 농도에서 NP-01, CW-209273화합물은 유의할만한 세포독성을 나타내지 않았다.

Table S1 Selectivity Indexes of test compounds against HBV replication in 2.2.15 cell cultures.

Extracellular HBV Virion DNA

Compounds	CC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₉₀ (μ M)	Selectivity Index (CC ₅₀ /EC ₉₀)
2',3'-ddc	279 \pm 24	1.6 \pm 0.2	9.3 \pm 0.8	30
NP-01	351 \pm 29	0.2 \pm 0.03	7.6 \pm 0.8	46
NP-02	730 \pm 58	>100	>100	22

Values presented(\pm standard deviations[S.D.]) were calculated by linear regression analysis using data combined from all treated cultures. S.D. were calculated using the standard error of regression generated from the linear regression analyses. EC₅₀, EC₉₀ drug concentration at which a 2-fold, or a 10-fold depression of HBV DNA(relative to the average levels in untreated cultures), respectively, was observed; CC₅₀, drug concentration at which a 2-fold depression of neutral red dye uptake(relative to the average levels in untreated cultures) was observed. The EC₅₀ values were used for the calculation of the Selectivity Indexes [S. I.] since at least a 3-fold depression of HBV RI levels is typically required to achieve statistical significance in this assay system(Korba & Gerin, Antiviral Res. 19: 55-70, 1992)

Table T1 Toxicity analysis of test compounds in 2.2.15 cells
 Neutral red dye uptake at indicated drug concentration(% of control)

Compounds	1000 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M
ddc	3 \pm 1	26 \pm 3	92 \pm 2	101 \pm 2
NP-01	12 \pm 1	39 \pm 2	101 \pm 2	100 \pm 1
NP-02	31 \pm 3	86 \pm 2	100 \pm 1	102 \pm 1

Toxicity analyses were performed in 96 well flat bottomed tissue culture plates. Cells for the toxicity analyses were cultured and treated with test compounds with the same schedule as used for the antiviral evaluations. Each compound was tested at 4 concentrations, each in triplicate cultures. Uptake of neutral red dye was used to determine the relative level of toxicity. The absorbance of internalized dye at 510nm(A_{510}) was used for the quantitative analysis. Values are presented as a percentage of the average A_{510} values(\pm standard deviations) in 9 separate cultures of untreated cells maintained on the same 96-well plate as the test compounds. The percentage of dye uptake in the control(untreated) cell cultures in this experiment was 100 \pm 2.

Table AV1 Antiviral analysis of test compounds in 2.2.15 cells assays.
 HBV Virion DNA levels at indicated Durg concentration
 (pg/ml culture medium)

Compound	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M
ddc	0	3 \pm 1	22 \pm 4	76 \pm 5

HBV virion DNA levels at indicated durg concentration
 (pg/ml culture medium)

Compound	100 μ M	10 μ M	1 μ M	0.1 μ M
NP-01	0	1 \pm 1	14 \pm 2	70 \pm 4
NP-02	93 \pm 9	103 \pm 14	98 \pm 10	100 \pm 7

Analysis of extracellular HBV DNA was performed 24 hours following the 9th day of treatment. A "zero" indicates an undetectable level of HBV DNA, sensitivity cutoff was 0.1 pg/ml. A total of 6 cultures were treated at each drug concentration on two separate plates. The level of HBV virion DNA in the 24 control(untreated) cultures in these experiments was 101 \pm 12 pg/ml culture medium.

Table S1. Selectivity Indexes of test compounds against HBV replication in 2.2.15 cell cultures.

Compounds	CC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ M)	EC ₉₀ (μ M)	Selectivity Index (CC ₅₀ /EC ₉₀)
3TC	1901 \pm 48	0.065 \pm 0.008	0.202 \pm 0.027	10770
CW-50TL1	211 \pm 21	>10 ^s	>10	NA [#]
CW-50TL2	406 \pm 43	>10 ^s	>10	NA [#]
CW-50TL3	704 \pm 36	>10 ^s	>10	NA [#]
CW-209237	166 \pm 10	0.096 \pm 0.011	0.691 \pm 0.072	240

Values presented(\pm standard deviations[S.D.]) were calculated by linear regression analysis using data combined from all treated cultures. S.D. were calculated using the standard error of regression generated from the linear regression analyses. EC₅₀, EC₉₀ drug concentration at which a 2-fold, or a 10-fold depression of HBV DNA(relative to the average levels in untreated cultures), respectively, was observed; CC₅₀, drug concentration at which a 2-fold depression of neutral red dye uptake(relative to the average levels in untreated cultures) was observed. The EC₅₀ values were used for the calculation of the Selectivity Indexes [S. I.] since at least a 3-fold depression of HBV RI levels is typically required to achieve statistical significance in this assay system(Korba & Gerin, Antiviral Res. 19: 55-70, 1992)

">" indicates that no significant antiviral or cytotoxic effect was observed at the highest concentration tested.

"NA" indicates that S.I. is not available due to a lack of an antiviral effect.

Table T1 toxicity analysis of test compounds in 2.2.15 cells

Neutral red dye uptake at indicated durg concentration(% of control)

Compounds	3000 μ M	1000 μ M	300 μ M	100 μ M
3TC	18 \pm 1	92 \pm 3	101 \pm 1	99 \pm 1

Neutral red dye uptake at indicated durg concentration(% of control)

Compounds	1000 μ M	300 μ M	100 μ M	30 μ M
CW-50TL1	13 \pm 2	27 \pm 1	67 \pm 2	100 \pm 2
CW-50TL2	19 \pm 1	44 \pm 2	100 \pm 2	99 \pm 1
CW-50TL3	38 \pm 2	73 \pm 3	102 \pm 1	100 \pm 1
CW-209237	4 \pm 1	30 \pm 2	102 \pm 1	100 \pm 2

Toxicity analyses were performed in 96 well flat bottomed tissue culture plates. Cells for the toxicity analyses were cultured and treated with test compounds with the same schedule as used for the antiviral evaluations. Each compound was tested at 4 concentrations, each in triplicate cultures. Uptake of neutral red dye was used to determine the relative level of toxicity. The absorbance of internalized dye at 510nm(A_{510}) was used for the quantitative analysis. Values are presented as a percentage of the average A_{510} values(\pm standard deviations) in 9 separate cultures of untreated cells maintained on the same 96-well plate as the test compounds. The percentage of dye uptake in the control(untreated) cell cultures in this experiment was 100 \pm 2.

Table AV1 Antiviral analysis of test compounds in 2.2.15 cells assays.

HBV Virion DNA levels at indicated Durg concentration(pg/ml culture medium)

Compound	1.0 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M	0.03 μ M
3-TC	4 \pm 1	13 \pm 1	35 \pm 2	103 \pm 11

HBV virion DNA levels at indicated durg concentration (pg/ml culture medium)

Compound	10 μ M	1.0 μ M	0.1 μ M	0.01 μ M
CW-50TL1	13 \pm 2	27 \pm 1	67 \pm 2	100 \pm 2
CW-50TL2	19 \pm 1	44 \pm 2	100 \pm 2	99 \pm 1
CW-50TL3	38 \pm 2	73 \pm 3	102 \pm 1	100 \pm 1
CW-209237	4 \pm 1	30 \pm 2	102 \pm 1	100 \pm 2

Analysis of extracellular HBV DNA was performed 24 hours following the 9th day of treatment. A "zero" indicates an undetectable level of HBV DNA, sensitivity cutoff was 0.1 pg/ml. A total of 6 cultures were treated at each drug concentration on two separate plates. The level of HBV virion DNA in the 24 control(untreated) cultures in these experiments was 113 \pm 16 pg/ml culture medium.

3. 간보호작용 연구

가. 실험방법

1) CCl₄유발 간독성

시료 투여군에는 CW화합물 50mg/kg(P.O), 대조군에는 saline을 3일간 경구 투여 하였고, 대조약물로는 silymarin을 사용하였다. 마지막 시료 투여 1시간후 50% CCl₄(2ml/kg, corn oil)를 복강내에 투여하여 독성을 유발하고, 24시간후에 혈액을 채취하여 혈청으로부터 SGOT, SGPT를 측정하였다.

2) D-Galactosamine 유발 간독성

Galactosamine은 galactose의 대사경로에 들어가서 UDP-galactosamine으로부터 UDP-galactosamine으로 되어, UDP를 보충하여 대사경로에 장애를 일으키는 간독성 물질이다.

웅성 S.D계 rat를 실험동물로 하여, 시료 투여군에는 CW화합물, 대조군에는 saline을 3일간 복강내 투여하고, 대조약물로는 silymarin을 사용하였다. 마지막 시료투여 1시간 후 saline을 용해시킨 D-galactosamine 500mg/kg을 복강내에 투여하여 간독성을 유발시키고, 48시간 후에 혈액을 채취하여 혈청으로부터 SGOT, SGPT를 측정하였다.

나. 실험결과

Compounds	Dose(mg/kg)	Hepatoprotective (% of inhibition of GOT, GPT)			
		CCl ₄		D-Galactosamine	
Silymarin	100, P.O	76	86	68.3	84.4
CW-209001	50, P.O	64	37	10.4	6.4
CW-209055	50, P.O	85	87	18	9
CW-209061	50, P.O	71	77	24	28
CW-209072	50, P.O	71	60	83	80
CW-209077	50, P.O	56	47	7.6	17.8
CW-209172	50, P.O	27	28		
CW-209199	50, P.O	77	74	4.2	3.1
CW-209212	50, P.O	20	39	28	19
CW-209215	50, P.O	20	44		
CW-209222	50, P.O	56	54	23	37
CW-209226	50, P.O	64	70	13	22
CW-209231	50, P.O	80	84	21	19
CW-209232	50, P.O	6.3	7.7		
CW-209235	50, P.O	50	45		
CW-209236	50, P.O	81	83	67.7	54.6
CW-209237	50, P.O	83	86	25.2	35.8
CW-209240	50, P.O	20.6	24.1		
CW-209241	50, P.O	1.4	3.0		
CW-209242	50, P.O	29.5	34.4	51.0	40.4
CW-209247	50, P.O	9.9	1.8		
CW-209249	50, P.O	19.6	24.2		
CW-209255	50, P.O	47	19		
CW-209278	50, P.O	45	7.9		

4. 약동력학 시험

- Rat에서 경구투여시의 혈중반감기 및 PK profile을 측정하였다.

Compds	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	T 1/2 (min)	Vd/F (ml)	Clt/F (ml/min)	T _{max} (min)	C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
CW-209237 (50mg, P.O, Rat)	1722.04	26.76	202.61	5.25	26.27	22.59

5. 독성 시험

- Rat에서의 LD50치 및 Salmonella를 이용한 복귀 돌연변이 시험을 실시하였다.

Compounds	LD ₅₀ (mg/kg)	Ame's Test	Others
CW-209001	>2,000	Negative	P.O, Rat
CW-209237	>2,000	Negative	P.O, Rat
CW-209900	237mg/kg	Negative	P.O, Rat

여 백

제4장 연구개발목표
달성도 및 대외기여도

여 백

제4장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

본기간 동안 추구했던 본 과제의 목표는 NP-77A의 임상에서의 유효성을 확인하고, 유도체 연구를 통해서 세계적으로 경쟁력있는 경구용 바이러스성 B형 간염 치료제의 개발을 목표로 하였다.

그 결과, NP-77A의 유효성 및 독성을 전임상 연구를 통해서 확인하였고, 이를 이용하여 실제 임상에서의 유효성을 예비임상연구를 통해서 확인하였다. 즉, NP-77A는 10mg/kg의 용량으로 정맥 투여시 미약하나마 항 HBV작용을 나타내었고, 본 투여 용량에서의 특별한 독성 및 부작용으로 나타나지 않았다. 이는 동물실험에서의 결과를 통해서도 알수 있듯이, NP-77A가 B형 감염치료제가 어느정도 유효성있게 사용될수 있을 것으로 추정 되었다.

따라서, 본 과제에서 추구했던, NP-77A의 임상에서의 유효성을 확인하는 목표는 어느정도 달성 되었다고 판단된다.

그러나, 세계 최초의 경구용 간염 치료제를 개발코자 하는 시도가 세계적으로 활발히 추진되고 있으며, 실제로 핵산 유도체인 라이부딘(3-TC)은 경구투여시 임상에서 우수한 유효성이 입증되고 있다. 따라서, 세계적인 경쟁력을 갖기 위해서는, 주사제형 보다는 경구제제가 필수적이며, 이를 위해서 NP-77A의 유도체를 합성하여 경구제형으로의 개발을 시도 하였다.

이를 통해, 총 300여개의 신규 화합물을 합성하였으며, 이들 물질중 작용을 나타내었고, 더욱이 이들 물질은 NP-77A와 동일한 양상으로 우수한 간보호작용을 나타내었다.

이들 물질이 개발 된다면, 국내의 우수한 신약 개발력에 대해 국내외적으로 이미지 제고에 크게 기여 할수 있게 됨은 물론, 경제적으로 큰 효과를 창출할수 있을 뿐만 아니라, 향후 기존의 핵산계열과는 다른 우수한 항 HBV약물의 개발로 인류 건강 복지에 크게 기여하게 될것으로 사료된다.

여 백

제5장 연구개발결과의
활용계획

여 백

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구를 통해서 도출된 항 HBV 작용 및 간보호작용을 나타내는 NP-77A의 대해서, 현재 라이선싱 및 공동연구 가능성을 타진하고 있다.

이와같은 기술 라이선싱 및 공동연구를 통해서 기존의 핵산계열과는 전혀 다른 구조의 경구로서 가능한 항 HBV제의 출현이 가시화 될것이고 기대된다.

또한, 본 연구개발을 통해서 얻은, 항 HBV약물의 약효검색법 및 독성/약리/약동력학 연구 기술은, 향후의 신약개발에 큰 견인차 역할을 할 것이다.

여 백

제6장 참고문헌

여 백

제 6 장 참고 문헌

1. Acs, G, Sells, M, A, Purcell, R, H, et al. (1987). Hepatitis B virus produced by transfected HepG2 cells causes hepatitis in chimpanzees. Proc. Natl Acad. Acad, Sci. USA 84, 4641-4644
2. Beasley, R, P. and Hwang, L.Y. (1984) epidemiology of hepatocellular carcinoma. In : G. N. Vyas. J.L. Dienstag and J. H. Hoofnagle (Eds), viral Hepatitis and Liver Disease, pp. 209-224. Grune and Stratton, New York.
3. Chang, I, M, Ryu, J. C, Park, Y, C, Yun (Choi), H. S, and Yang, K, H. (1983). Protective activities of aucubin against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. Drug Chem Toxicol. 6, 443-453
4. Chang, I, M, and Yamaura Y. (1993). Aucubin: a new antidote for poisonous Amanita mushrooms. Phytother. Res, 7, 53-56
5. Chang. I, M, Yun, H. S, Kim, Y, S, and Ahn, J. W. (1984). Aucubin: potential antidote for alpha-amanitin poisoning. Clin, Toxicol. 22, 443-453
6. Civitico, G, Wang, Y, Luscombe, C, Bishop, N, Tachedjian, G, Gust, I, and Locarnini. S. (1990) Antiviral strategies in chronic hepatitis B virus infection : I, Inhibition of duck hepatitis B virus in vitro using conventional antiviral agents and supercoiled-DNA active compounds. J, Med. Virol 30, 253-258.
7. Chou. T, C, Kong, X. B, fanucchi, M.P, Cheng, Y. C, Takahashi, K., Watanabe. A. and Fox, J. J (1987) Synthesis and biological effects of 2'-fluoro-5-ethyl-1-b-D-arabinofuranouracil. Anti-microb. Agents Chemother. 31, 1355-1358
8. finter. N.B. (1969) Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their applicatic to interferon assay. J. Gen. virol, 5, 419-427.
9. Fourel, I, Hantz, O, Watanabe, K. A Jactet , C, Chomel, b, Fox, J, J. and Trepo. C. (1990) Inhibitory effects of 2'-fluorinated arabinosyl -pyrimidine nucleosides on woodchuck hepatitis virus replicatio in chronically infected woodchucks. Antimicrob. Agents Chemother, 34, 473-475.

10. Gerin, J.L, Cote, P,J, Korba, B.E. and Tennant, b.C(1989) Hepadnavirus -induced liver cancer in woodchucks. *Cancer prevention and Detection* 14, 227-229.
11. Gerin, J. L. (1991). Antiviral agents for hepatitis B. *Hematology* 14, 198-199
12. Hoofnagle, J,H.(1991) Current status and future directions in the treatment of chronic viral hepatitis. In : F.B. Hollinger, S.M. Lemon and H.S. Margolis(Eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease*, pp. 632-640. Williams & Wilkins.
13. Hur, S, O, Kim, J, H, and Chang, I, M.(1985). Effects of iridoid compounds on RNA and protein biosyntheses in sarcoma 180 cells. *J. Pharmacog.* 16, 99-104
14. Ishiguro, K, Yamaki, M, and Takagi, S.(1982). Studies on the iridoid-related compound. I, On the antimicrobial activity of aucubigenin and certain iridoid aglucones. *Yakugaku Zasshi* 102, 755-759
15. Kane, M, A, Ghendon, Y, and Lambert, P, H.(1991). Hepatitis B in 1990-Where are we and where we going? The WHO programme for control of viral hepatitis. In, *Viral Hepatitis and Liver Disease*, ed. by F.B.Hollinger, S.M.Lemon, and H.S. Margolis, pp. 706-708. Williams & Wilkins, Baltimore.
16. Korba, B, Cote. P, Tennant, b, and Gerin, J.(1991). Woodchuck hepatitis virus infection as a model for the development of antiviral therapies. In. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, ed. by f. B. Hollinger, S. M. Lemon. and H.S. Margolis, pp. 663-668. Williams & Wilkins, Baltimore.
17. Korba, B. E, and Milman, g.(1991). A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B Virus replication. *Antiviral Res.* 15, 217-228
18. Korba, B.E, Wells, F.V, Baldwin, B, Cote, P,J, Tennant, B.C, Popper, H. and Gerin, J.L(1989) Hepatocellular carcinoma in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks presence of viral DNA in tumor tissue from chronic carriers and animals serologically recovered from acute infections. *Hepatology* 9, 461-470.
19. Lee, E. S, Ahn, J. W, Mar, W.C, and Chang, I.M.(1985). *Pharmacology*

- of iridoid : Antimicrobial activities of aucubin. Kor, J. Pharamcog. 17. 129-133.
20. Lee, B, Luo, W, Suzuki, S, Robins, M, J, and Tyrrell, D. L. J.(1989) In vitro and in vivo comparison of the abilities of purine and pyrimidine 2',3'-dideoxynucleosides to inhibit duck hepadnavirus. Antimicrob Agents and Chemother 33:336-339.
 21. Lin. T. S, Luo, M. Z. Liu, M, C, Pai, S.B, Dutschman, G.E. and Cheng. Y,C(1994) Antiviral activity of 2', 3'-dideoxy- β -L-5-fluorocytidine (β -L-FddC) and 2',3'-dideoxy- β -L-cytidine(β -L-ddC)against hepatitis B virus and human immunodeficiency virus type 1 in vitro. biochem Pharmacol 47:171-174.
 22. Lin, t. S, Luo, M, Z. Zhn, J.L, Liu, M,C, Zhy, Y, L, Dutschman, G.E, and Cheng, Y, C.(1995) Synthesis of a series of purine 2',3'-dideoxy-L-nucleoside analogues an potential antiviral agents. Nucleosides & Nucleotides 14: 1759-1783
 23. Mansour, T. S. Tse, A, and Charron, M.(1995) Anti-HIV and anti-HBV activities of L-2',3'-dideoxynucleoside analogues : ddC, 5Fddc, 5-azaddC and ddG. Med Chem res 5: 417-425
 24. Parker. W.B, and Cheng. Y, C.(1994) Mitochondrial toxicity of antiviral nucleoside analogues. The Journal of NIH Research 6" 57-61.
 25. Perrillo, r, P.(1991), Treatment of chronic hepatitis b. In, Viral Hepatitis and Liver Disease, ed. by F. B Hollinger, S. M. Lemon, and H.S Margolis, pp. 706-708. Williams & Wilkins, Baltimore.
 26. Price, P.M, Bancrjee, R. and Acs, G.(1989) Inhibition of the replication of hepatitis B virus by the carbocyclic analogue of 2'-deoxyguanosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 806-809
 27. Perlilo, R, P.(1989) Interteron therapy for chronic type B hepatitis : the promise comes of age, Gastroenterol 96 : 532-536
 28. Schinazi, R,F, McMilian, A, Cannon, D, Mathis, R, Lioyd, r,M, Peck, A, Sommadossi, J, P, St Clair, M, Wilson, J, furman, P, A. Painter, G, Choi, W, B, and Liotta, D,C(1992) Selective inhibition of hyman immunodeficiency virus by recemates and enantiomer of cis-5-fluoro -1-[2-(hydroxymethyl)-1-3oxathiolan-5-yl]cytosine. Antimicrob agents Chemother 36: 2423-2431.

29. Schinazi, R.F, gosselin, G, Faraj, A, Korba, B.E, Liotta, D.C, Chu, C.K, Mathe, C. Imbach, J. L, and Sommadossi, J,P (1994) Pure nucleoside enantiomers of β -2',3'-dideoxycytidine analogues are selective inhibitors of hepatitis b in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2172-2174
30. Sommadossi, J, P.(1994) treatment of hepatitis B by nucleoside analogs: still a reality. *Current Opinion in Infectious Diseases* :7: 678-682
31. Staschke, K. A, Clacino, J,M, Mabry, T.E, and Jones, D,C.(1994) The in vitro anti-hepatitis B virus activity of FIAU[1-2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl]-5-iodouracil] is selective, reversible and determined, at least in part, by the host cell, *Antiviral Res* 23: 45-61
32. Sells, M. A, Chen, M,L, and Acs, G.(1987). Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 84, 1005-1009.
33. Suh, N. J, Shim, C. K, Lee, M, H, Kim, S. K, and Chang, I, M. (1991). Pharmacokinetic study of an iridoid glucoside: aucubin. *Pharmac. Res*, 8, 1059-1063.
34. Summers, J, and Mason, W.S(1982) Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reversible transcription of an RNA intermediate, *Cell* 29: 403-415
35. Suzuki, s, Lee, b, Luo, W, Tovell, D, Robins, m. J. and Tyrrell, D.L.J.(1988) Inhibition of duck hepatitis B virus replication by purine 2'.3'-dideoxynucleosides. *biochem biophys Res Comm* 156 : 1144-1151
36. Sureau, C. Romet-Lemonne, J. L, Mullins, J. L, and Essex, M.(1986). Production of hepatitis b virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47, 37-47.
37. Tsurimoto. t, Fujiyama, A, and Matsubara, K.(1987). Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoblastoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84. 444-448.
38. Yarchoan, r, Pemo, C,F, thomas, R.V, Klecker, R,W, Allain, J, P, Wills, R.W, Allain, J, P, Wills, r.J, McAtee, N, fischi, M,A,

Dubinsky, r, McNealy, M.C, Mitsuya, H, Pluda, J.M, Lawley, t,J,
Leuther, M. Safai, B, Collins, J,M, Myers, C.E, and Broder, S(1988)
Phase I studies of 2',3'-dideoxycytidine in severe human
immunodeficiency virus infection as a single agent and alternation
with zidovudine (AZT). Lanceti, 76-81.

여 백

제7장 위탁연구과제

여 백

위탁과제

과제명 : NP-77A 물성 및 주사제의 제제화 연구

위탁연구기관명:서울대학교 약과대학

위탁연구책임자:김 종 국

여 백

제 출 문

과학기술부장관 귀하

본 보고서를 “NP-77A계열 바이러스성B형 간염치료제의 개발에 관한 연구”과제의 위탁과제 “NP-77A 물성 및 주사제의 제제화에 관한 연구”의 위탁과제보고서로 제출합니다.

1998. 7. 31

주관연구기관명 : 한국신약개발연구조합

단위과제연구책임자 : 조 인 구

위탁연구기관명 : 서울대학교 약학대학

위탁연구책임자 : 김 종 국

연 구 원 : 임 수 정

고 종 호

김 인 수

김 정 환

여 백

요 약 문

I. 제 목 : NP-77A 물성 및 주사제의 제제화 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

신약후보 물질인 NP-77A의 물리화학적 성질을 규명하고, 동결건조 제제와 분말제제 각각에 대하여 용액중 NP-77A 및 원말의 안정성에 영향을 미치는 인자를 검토하여 NP-77A의 임상적용을 위한 주사제 처방을 확립하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 물리화학적 성질의 규명

- (1) 성상 : 육안적 성장, 색상, 냄새
- (2) pH : 일정 농도에서의 pH
- (3) 용점 : 색상, 결정형의 변화, 용해 온도
- (4) 선광도 : 측정 농도 결정, 일정 농도에서의 선광도, 비선광도
- (5) 흡광도 : 측정 용매, 농도, 파장 결정, 측정 조건에서의 비흡광도
- (6) 결정형 : 결정형인 경우 현미경적 결정형, Polymorphysm, 가능하면 Crystallography
- (7) 용해도 : pH-용해도, 유기용매에 대한 용해도
- (8) 흡습성 : PH-Time-Moisture content curve, Hygroscopicity

나. 동결 건조 제제의 제조 및 용액중 안정성

- 제조 조건 확립
- 안정성 연구 (시험항목 : 성상, pH, 함량, 유연물질)
 - (1) pH-Stability: pH에 따른 NP-77A의 분해속도를 측정
 - (2) Temp-Stability: 온도에 따른 영향 (40℃, 60℃)
 - (3) Light, Concentration Oxygen의 영향
 - Light : 갈색용기, 무색용기
 - Head Space의 기체에 의한 영향 (공기, nitrogen gas)

- (4) Ionic Strength, Ion Species의 영향
- (5) Interaction : Reconstitution 용액내 안정성
(5, 10, 20% 포도당, 아미노산 수액 등)
- (6) Long-term stability : 수용액의 pH (injectable buffer)에 따른
장기 안정성 (4℃, 실온, 40℃)

다. 분말 제제의 용액중 안정성

동결 건조 제제의 안정성과 동일하게 시험하여 분말 건조 제제의 용액중 안정성을 평가한다.

라. 제제의 안정성

용액중 안정성 결과를 근거로 하여 주사제 처방을 확립하고 이에 따른 제제의 안정성을 가속시험, 가혹 시험 및 장기 보존시험을 실시한다.

IV. 연구 개발 결과

신약후보 물질인 NP-77A의 물리화학적 성질을 규명하였으며, 이것을 바탕으로 설계된 동결건조제제의 각종 주사용액에 대한 안정성 및 고체상태에서의 안정성을 검토하여 임상시험에서의 적용 및 제품화가 가능한 안정한 동결건조 주사제 처방을 확립하였다.

목 차

제1장 서 론	165
제2장 연구개발수행 내용 및 결과	166
제3장 연구개발목표 달성도	195
제4장 참고문헌	196

여 백

제 1 장 서 론

1. 연구배경

우리나라에 널리 분포되어 있는 질경이과 식물이나 층층나무과 식물의 잎에서 분리된 NP-77A는 새로운 간염치료제로 B형 바이러스의 증식을 효과적으로 억제함과 동시에 간보호작용을 동시에 나타내는 신물질이다. 더욱이 NP-77A는 안전역이 매우 높아 생체 내에서도 부작용 없이 투여할 수 있는 안전한 물질이다.

하지만, 신약후보물질인 NP-77A가 인체에 투여가능한 신약으로서 개발되기 위해서는 물리화학적 성질을 규명하고 그것을 토대로 한 임상에 적용가능한 제제의 설계가 요구되고 있다.

2. 연구목표

신약 후보 물질인 NP-77A의 물리화학적 성질을 규명하고, 동결건조제제와 분말제제 각각에 대하여 용액 중 NP-77A 및 원말의 안정성에 영향을 미치는 인자를 검토하여 NP-77A의 임상적용을 위한 주사제 처방을 확립하고자 하였다.

제 2 장 연구개발 수행내용 및 결과

1. 물리화학적 성질의 규명

가. 색상

육안관찰 : 약간의 미색을 띤 백색의 침상 결정성 분말

나. 포화용액에서의 pH

25℃에서 포화용액에서의 pH 5.39

다. 용점

한 쪽이 막힌 모세관에 NP-77A 분말 (표준품)을 packing한 후 용점측정기 (Gallenkamp® MF-370b, 영국) 및 DSC (Seiko I SSC 5000 Series)를 이용하여 용점을 측정하였다. 그 결과 약 181 ℃에서 갈색으로 변하며 용융되었다 (Fig. 19).

라. 선광도

NP-77A 수용액 2%를 제조하여 25℃에서 편광계 (polarimeter, JASCO, DIP-360)로 측정하였다.

$$[\alpha]_D^{25} = -17.47 \quad (c=2\%, H_2O)$$

마. 흡습성

NP-77A 표준품 100 mg을 정밀히 달아 상대습도 75%로 유지된 데시케이터에 넣고 일주일 경과 후의 수분흡습량을 측정한 결과 1% 미만으로 흡습성이 거의 없었다.

바. 용해도

· pH에 따른 용해도

바이알에 과량의 NP-77A에 pH의 완충용액 (Titrisol[®] buffer system, pH 1~13, $\mu = 0.15$)을 가한 후 마개를 닫고 24시간동안 교반시키고 0.45 μm 여과지(Whatman Autovial (PTFE) syringeless filter device (VWR Scientific, West Chester, MA)) 로 여과한 액을 HPLC법으로 분석하였다.

NP-77A는 약산성 약물로 알칼리성에서 용해도가 증가하는 양상을 보였다. Fig. 1에 pH에 따른 용해도 곡선을 나타내었으며 Table 1는 각 pH에서의 용해도를 나타낸 것이다. 여기서 고유용해도 (intrinsic solubility)는 pH 1 ~ 10까지의 용해도의 평균값으로 232.87 mg/ml이었다. 또한 pH 12.50의 완충용액에 대한 용해도는 311.99 mg/ml이었다.

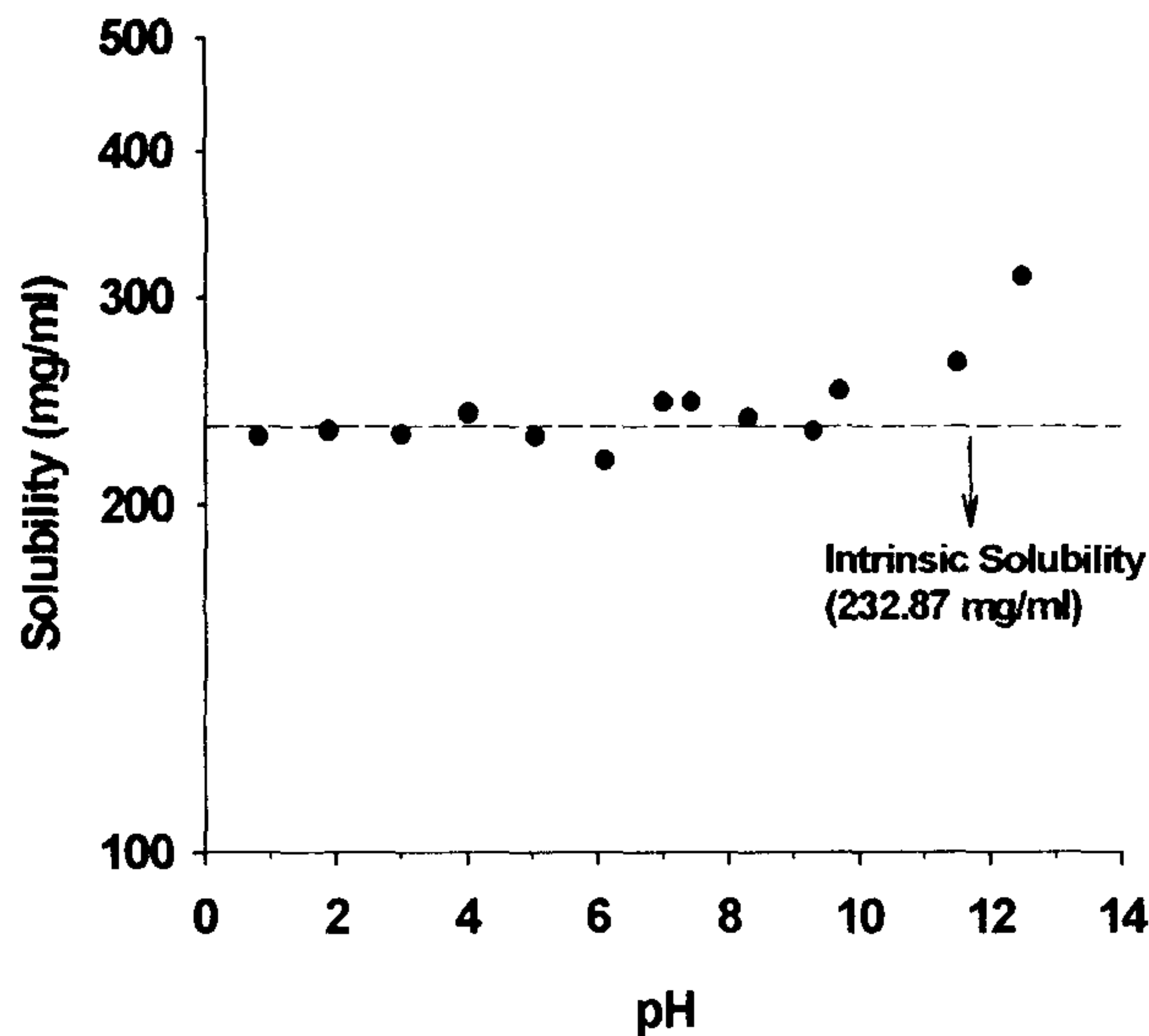


Fig. 1 Solubility of NP-77A as a function of pH at ambient temperature.

Table 1. Solubility of NP-77A as a function of pH at ambient temperature,
 $\mu=0.15$

pH	eq. pH	Solubility (mg/ml)
1	0.83	228.22
2	1.90	230.86
3	3.01	229.28
4	4.03	238.83
5	5.06	228.33
6	6.11	217.79
7	7.00	243.97
8	7.43	244.21
9	8.31	236.63
10	9.31	230.55
11	9.71	249.54
12	11.49	263.83
13	12.50	311.99
0.1 N NaOH Solution	-	296.22

· 온도에 따른 용해도

과량의 NP-77A를 바이알에 넣고 정제수를 가한 후 마개를 닫고 4°C, 18°C, 25°C 및 37°C에서 24시간동안 교반한다. 이 액을 0.45 μm 여과지 (Whatman Autovial (PTFE) syringeless filter device (VWR Scientific, West Chester, MA)) 로 여과하여 HPLC법으로 분석하였다.

온도가 증가함에 따라 용해도는 현저히 증가하였다. 즉 4, 18, 25, 및 37°C에서 각각 218, 302, 376 및 511 mg/ml을 나타내었다 (Table 3).

Table 2. Solubility of NP-77A in water at various temperatures

Temperature (°C)	Solubility (mg/ml)
4	218.01
18	302.31
25	375.53
37	510.52

· 염의 효과

일정 과량의 NP-77A를 바이알에 넣고 0.1M, 0.5M, 1M NaCl 용액을 가한 후 마개를 닫고 25°C에서 24시간동안 교반한다. 이 액을 0.45 μ m 여과지 (Whatman Autovial (PTFE) syringeless filter device (VWR Scientific, West Chester, MA)) 로 여과하여 HPLC법으로 분석하였다.

용해도에 미치는 염의 효과는 'Setschenow equation'으로 나타낼 수 있다. 즉,

$$\text{Log} \frac{S_0}{S} = kC_a$$

여기서 S_0 는 염이 없을 때의 용해도, S 는 염 존재하의 용해도 k 는 salting coefficient, C_a 는 염의 농도이다. C_a 에 대하여 $\text{Log} \frac{S_0}{S}$ 를 plot하였을 때 (Fig. 2) 기울기 k 가 양의 값을 가지면 'salting-out effect'를 나타내며, 음의 값을 가지면 'salting-in effect'를 나타낸다.

NP-77A의 경우 염의 농도가 증가함에 따라 용해도가 감소하는 경향을 보였으며 (Table 3) 'Salting-out effect'에 의한 것으로 사료된다.

Table 3. Salt effect on the solubility of NP-77A at 25°C

NaCl Concentration (M)	Solubility (mg/ml)
0	375.53
0.1	367.40
0.5	330.78
1.0	306.53

Salt Effect on Solubility (Setschenow Equation)

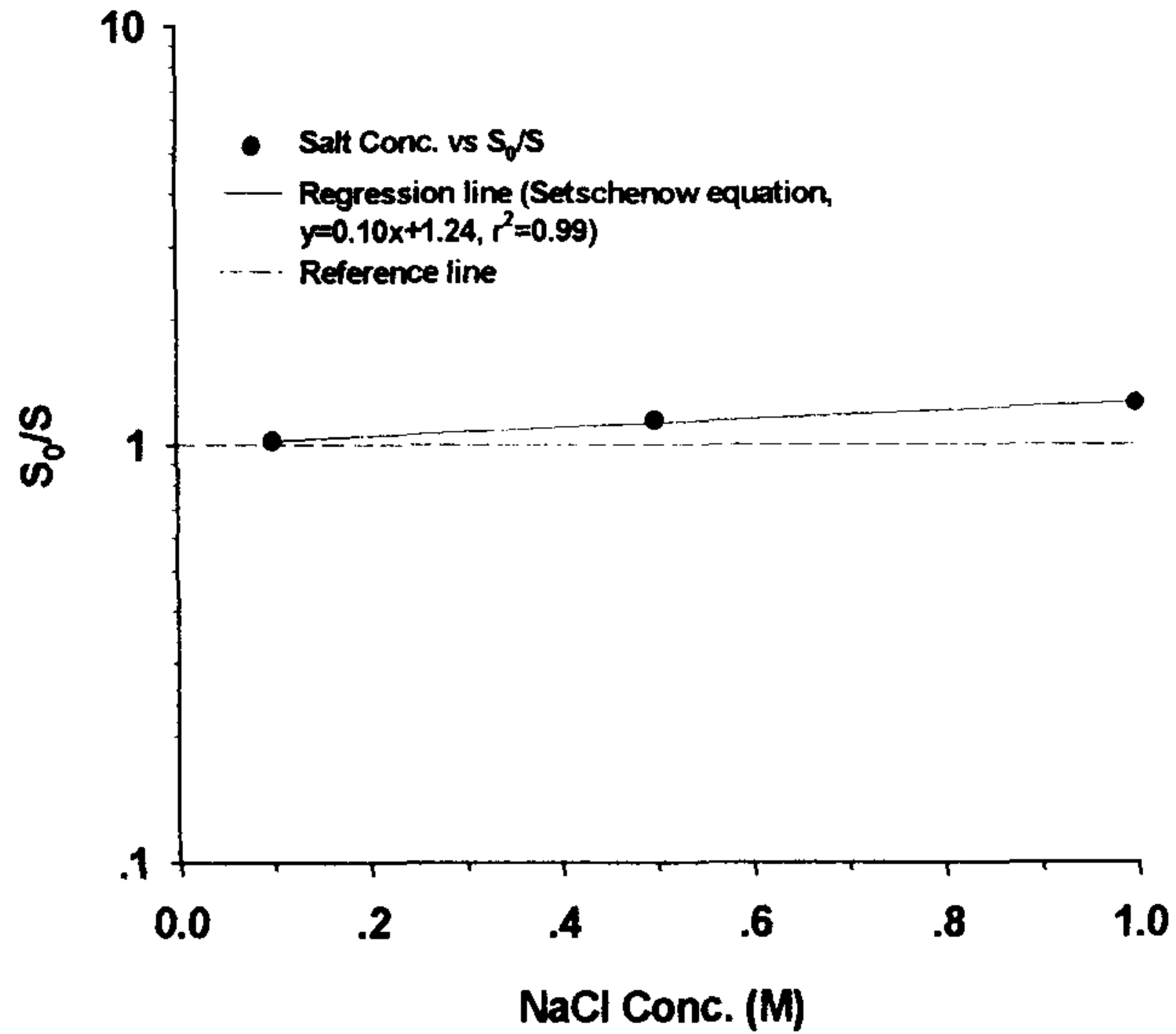


Fig. 2 Salt effect on the solubility of NP-77A

· 각종 용매에 대한 용해도

일정 과량의 NP-77A를 바이알에 넣고 에탄올, 아세토니트릴, 메탄올을 가한 후 마개를 닫고 25°C에서 24시간동안 교반한다. 이 액을 원심분리하여 상등액을 회석하여 HPLC법으로 분석하였다.

물, 메탄올, 에탄올 및 아세토니트릴에 대한 용해도는 각각 375.53, 242.66, 27.27, 및 0.57 mg/ml이었다 (Table 4).

Table 4. Solubility of NP-77A in various solvents at 25°C.

Solvent	Solubility (mg/ml)
Water	375.53
Methanol	242.66
Ethanol	27.27
Acetonitrile	0.57

사. 수용액 중의 NP-77A의 안정성

바이알에 각 완충액 (Table 5) 20 ml를 넣고 NP-77A 10 mg/ml 메탄올 표준원액 200 μ l을 각각의 완충액에 가해 100 μ g/ml로 하여 37°C에서 30일간 방치하면서 각 용액에 남아있는 NP-77A의 양을 경시적으로 HPLC로 측정하였다. 완충액의 이온강도는 0.5로 고정하였고 그 조성은 Table 5에 나타내었다.

고유산-염기촉매반응의 pH의존성을 일반적인 속도법칙에 의하면

$$-dD/dt = [k_0 + k_1(H^+) + k_2(OH^-)](D)$$

여기서 D는 약물, k_0 , k_1 과 k_2 는 각각 용매촉매효과, 고유수소이온촉매반응 및 수산화이온촉매반응에 의한 분해속도상수를 나타낸다. 따라서 겉보기 분해속도상수는 다음과 같이

$$k_{obs} = k_0 + k_1(H^+) + k_2(OH^-)$$

가 된다.

Table 5. Constituent of various buffers

(at constant ionic strength, $\mu=0.5$)

pH	Composition
1.45	0.2 M HCl - 0.2 M KCl
2.58	1 M Formic acid - 1 M Sodium formate
3.25	1 M Formic acid - 1 M Sodium formate
4.97	0.2 M Acetic acid - 0.2 M Sodium acetate
5.78	0.2M Na ₂ HPO ₄ - 0.2M NaH ₂ PO ₄
6.75	0.1M KH ₂ PO ₄ - 0.1M NaOH
7.68	0.1M KH ₂ PO ₄ - 0.1M NaOH
8.91	0.1 M Boric acid - 0.1 M KCl - 0.1 M NaOH
12.02	0.05 M Na ₂ HPO ₄ - NaOH
13.00	0.2 M KCl - 0.2 M NaOH

NP-77A도 이러한 고유산-염기촉매반응의 일반적인 속도법칙을 따랐는데 Fig. 3에 NP-77A의 pH 1-13 완충액에서의 분해속도(degradation kinetics)를 나타내었다. 이 그림에서의 기울기는 각 완충액에서의 겉보기 분해속도정수(k_{obs} , apparent degradation rate constant)를 나타낸다. Fig. 3을 기초로 하여 NP-77A의 pH-rate profiles를 얻었다 (Fig. 4). Fig. 3와 4에서 나타난 바와 같이 NP-77A는 pH 8과 12사이에서 분해속도가 가장 느렸으나, 이 약물의 분해가 주로 산의 첨가에 의해 촉진됨을 알 수 있다. 만약 약물용액이 완충작용을 갖는다면 분해반응은 주로 수소이온이 촉매작용을 갖는 것으로 추정된다. Table 6에 각 pH에서의 겉보기분해속도 상수 (k_{obs})와 반감기 ($t_{1/2}$) 그리고 Shelf life ($t_{90\%}$)를 나타내었다. pH 8.91에서 가장 안정하였으며 이 때의 약물의 분해속도 정수는 $4.0 \times 10^{-5} \text{ day}^{-1}$, 소실반감기 ($t_{1/2}$)와 Shelf life ($t_{90\%}$)는 각각 15412일 및 2335일이었다.

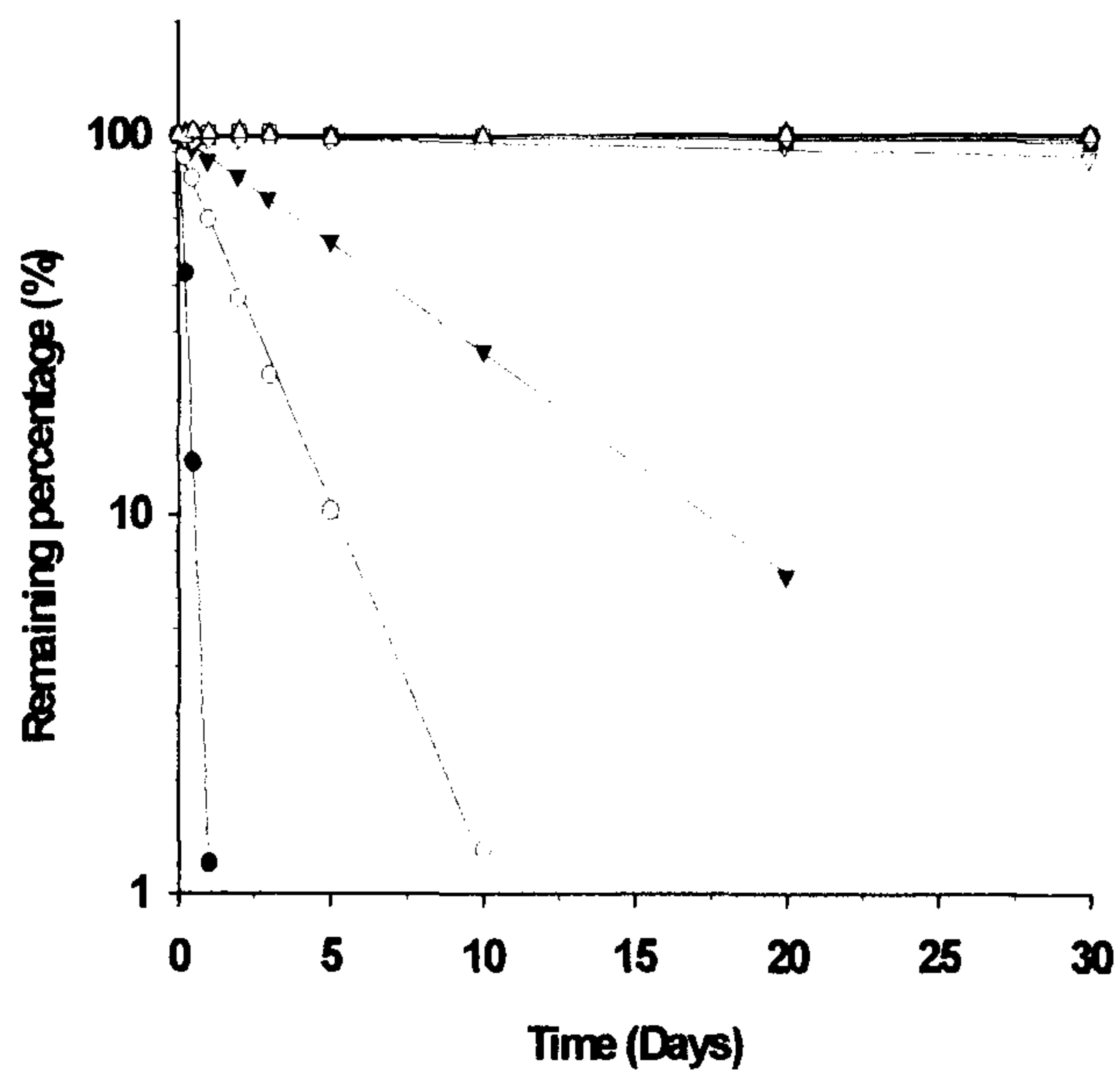


Fig. 3 Plots of observed pseudo-first-order kinetic degradation of NP-77A at various pH values, 37°C, and ionic strength of 0.5.

Key : ●, pH 1.25 ($r^2 = 0.9849$) ; ○, pH 2.58 ($r^2 = 0.9983$) ; ▼, pH 3.25 ($r^2 = 0.9997$) ; ▽, pH 4.97 ($r^2 = 0.9229$) ; ■, pH 5.78 ($r^2 = 0.7768$) ; □, pH 6.57 ($r^2 = 0.0990$) ; ◆, pH 7.68 ($r^2 = 0.0012$) ; ◇, pH 8.91 ($r^2 = 0.0006$) ; ▲, pH 12.02 ($r^2 = 0.0214$) ; △, pH 13.00 ($r^2 = 0.0378$) ; —, regression line

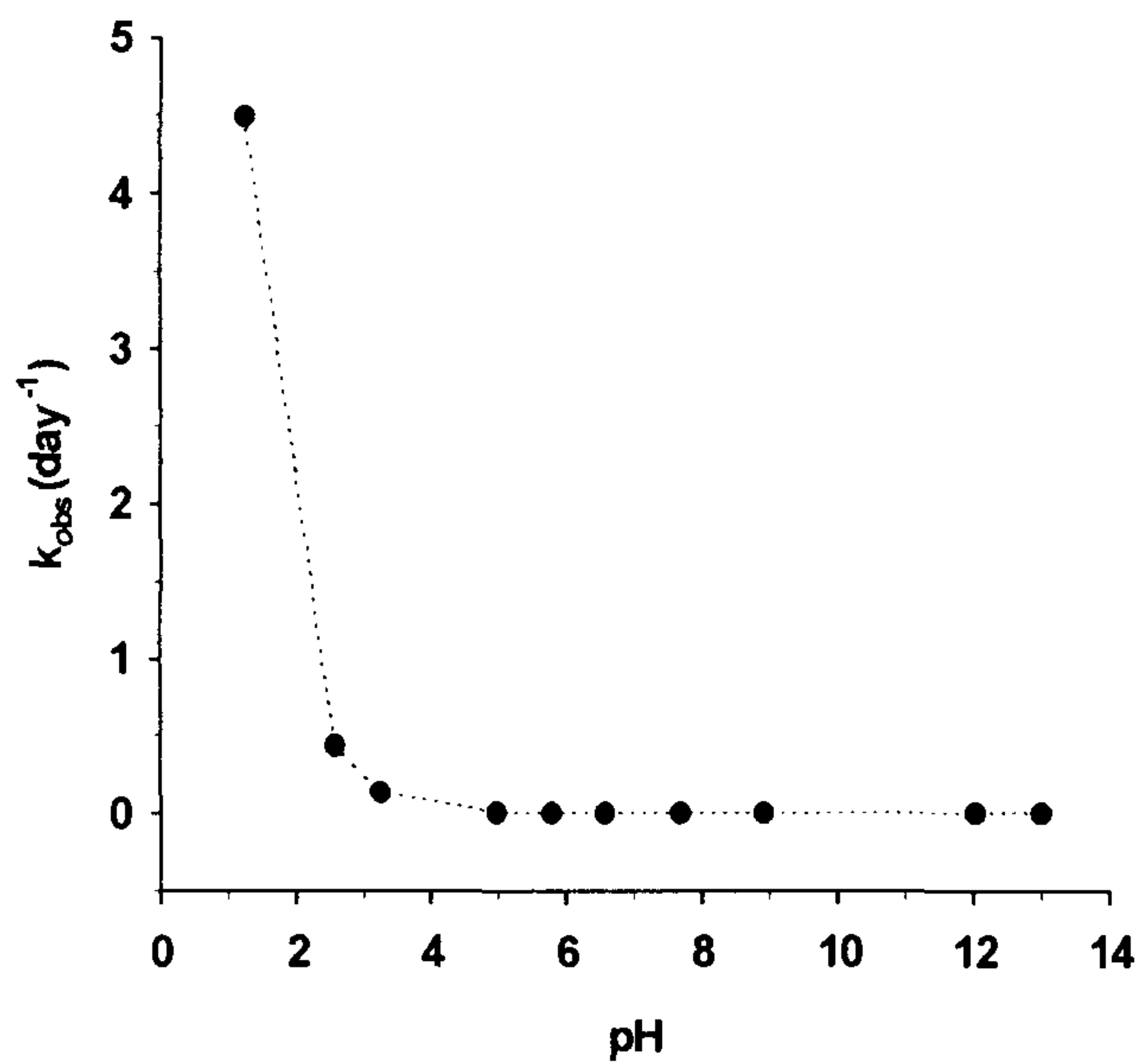


Fig. 4 $\log k_{obs}$ - pH profile of degradation of NP-77A in aqueous solution at 37°C and ionic strength of 0.5.

Table 6. First-order degradation rate constants and degradation half life ($t_{1/2}$) and shelf life ($t_{90\%}$) of NP-77A in various buffer solutions.

pH	k_{obs} (day ⁻¹)	$t_{1/2}$ (day)	$t_{90\%}$ (day)
1.25	4.49	0.15	0.02
2.58	0.43	1.60	0.24
3.25	0.13	5.20	0.79
4.97	0.0041	168	25
5.78	0.0014	484	73
6.57	0.00028	2466	374
7.68	0.00005	13181	1997
8.91	0.00004	15412	2335
12.02	-	-	-
13.00	0.00025	2733	414

아. 분배계수의 측정

1-옥탄올로 포화된 수용액과 물로 포화된 1-옥탄올을 사용하여 다음의 실험을 진행하였다. NP-77A 100 µg/ml 수용액에 동량의 옥탄올을 가하고 그 혼합물을 실온에서 5분간 격렬히 교반한 다음, 방치하여 분리된 수상과 유기상의 NP-77A의 농도를 HPLC로 정량하였다. 겉보기 분배계수 (P_{app})는 수상과 유기상의 NP-77A의 농도비로 구하였다.

NP-77A의 P_{app} 는 0.0034 ± 0.0004 (mean \pm S.D.)으로 유기상에 거의 분배되지 않았다.

2. 동결건조제제의 제조 및 안정성 평가

가. 동결건조제제의 제조

NaOH 수용액 (pH 9.0)에 NP-77A 표준품을 가해 녹인 후 (200 mg/ml, pH 7.02), -80°C에서 넣어 24시간동안 방치하여 예비동결시키고 이것을 동결건조기 (Bondiro Freeze Dryer, IIShin Ltd., Korea)에 넣어 건조시켰을 때 NP-77A의 다공성 cake이 생성되었다.

나. 각종 주사제에서의 안정성

동결건조시료 (NP-77A로 200 mg에 해당)에 주사용 증류수 1 ml을 가해 녹이고 5%, 10% 포도당 수용액, 생리식염수, 10% 만니톨 수용액, 5% 과당수용액 및 링결액으로 희석하여 약 1 mg/ml의 시료용액을 제조하였다. 이 액을 바이알에 넣어 밀봉하고 실온, 50, 60, 70°C에서 30일 간 보관한 후 경시적으로 남아 있는 NP-77A의 양을 HPLC로 측정하였다.

반응속도에 미치는 온도의 영향은 Arrhenius가 처음 제안한 다음식으로 주어진다.

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (24)$$

또는

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2.303R} \frac{1}{T} \quad (25)$$

여기서 k 는 比반응속도이며 A 는 빈도인자 (frequency factor)라고 알려진 상수, E_a 는 활성화 에너지 (energy of activation), R 은 기체상수로서 1.987 cal/deg · mole이며 T 는 절대온도이다. E_a 와 A 는 여러온도에서 k 를 측정하여 (Table 8) $\log k$ 에 대해 $1/T$ 를 plot하여 구할 수 있다 (Fig.5). 즉, plot하여 얻은 직선의 기울기는 $-E_a/2.303R$ 이고 수직축에서의 절편은 $\log A$ 가 된다.

이상의 이론적 배경을 바탕으로 NP-77A의 분해에 미치는 온도의 영향을 5%, 10% 포도당 수용액, 생리식염수, 10% 만니톨 수용액, 5% 과당수용액 및 링결액을 이용하여 50, 60, 70°C에서 분해속도를 측정하여 검토하였다. 각 온도에서의 k_{obs} 의 값을 Table 8에 나타내었다.

Fig. 5~16은 각 용액에 대한 50, 60 및 70°C에서의 약물이 남아 있는 비율을 시간에 따라 plot하고 그 기울기인 분해속도상수를 위의 Arrhenius식을 이용하여 plot한 것이다. 각 용액에서의 분해속도는 모두 온도가 증가함에 따라 증가하였는데 특히 5%, 10% 포도당 용액, 5% 과당용액 및 생리식염수의 경우 현저한 온도의존성을 나타냈다. Table 8에 안정성 매개변수들, 즉 분해속도 상수, 반감기 및 활성화에너지를 나타냈다. Table 8의 데이터로부터 4°C 및 25°C에서의 각 용액에서의 Shelf life (t_{90})을 산출하였다 (Table 9).

25°C에서 추정된 5%, 10% 포도당 수용액, 생리식염수, 10% 만니톨 수용액, 5% 과당수용액 및 링겔액 중의 NP-77A의 shelf life를 보면 각각 83, 664, 3661, 49, 1038, 및 18 일로 각 주사용액에 희석하여 iv infusion 시 함량에 거의 변화가 없을 것으로 사료된다.

Table 8. First-order degradation rate constants and degradation half life of NP-77A in various injectable solutions as a function of temperatures

Injectable solutions	Temperature °C	$k_{obs} \times 10^{-2}$ day ⁻¹	$t_{1/2}$ day	E_a kcal/mol
5% Glucose solution	50	4.19	16.53	27.3 ($r^2=0.9907$)
	60	18.41	3.76	
	70	49.63	1.40	
10% Glucose solution	50	1.08	64.05	32.9 ($r^2=0.9893$)
	60	6.59	10.52	
	70	21.42	3.24	
10% Mannitol solution	50	0.83	83.61	10.8 ($r^2=0.9999$)
	60	1.36	51.12	
	70	2.23	31.13	
5% Fructose solution	50	1.74	39.88	38.5 ($r^2=0.9877$)
	60	7.53	9.20	
	70	57.81	1.20	
Ringer's solution	50	1.51	45.94	7.2 ($r^2=0.9880$)
	60	2.25	30.81	
	70	2.90	23.88	
Saline	50	0.28	246.85	33.2 ($r^2=0.9201$)
	60	0.62	111.78	
	70	5.83	11.89	

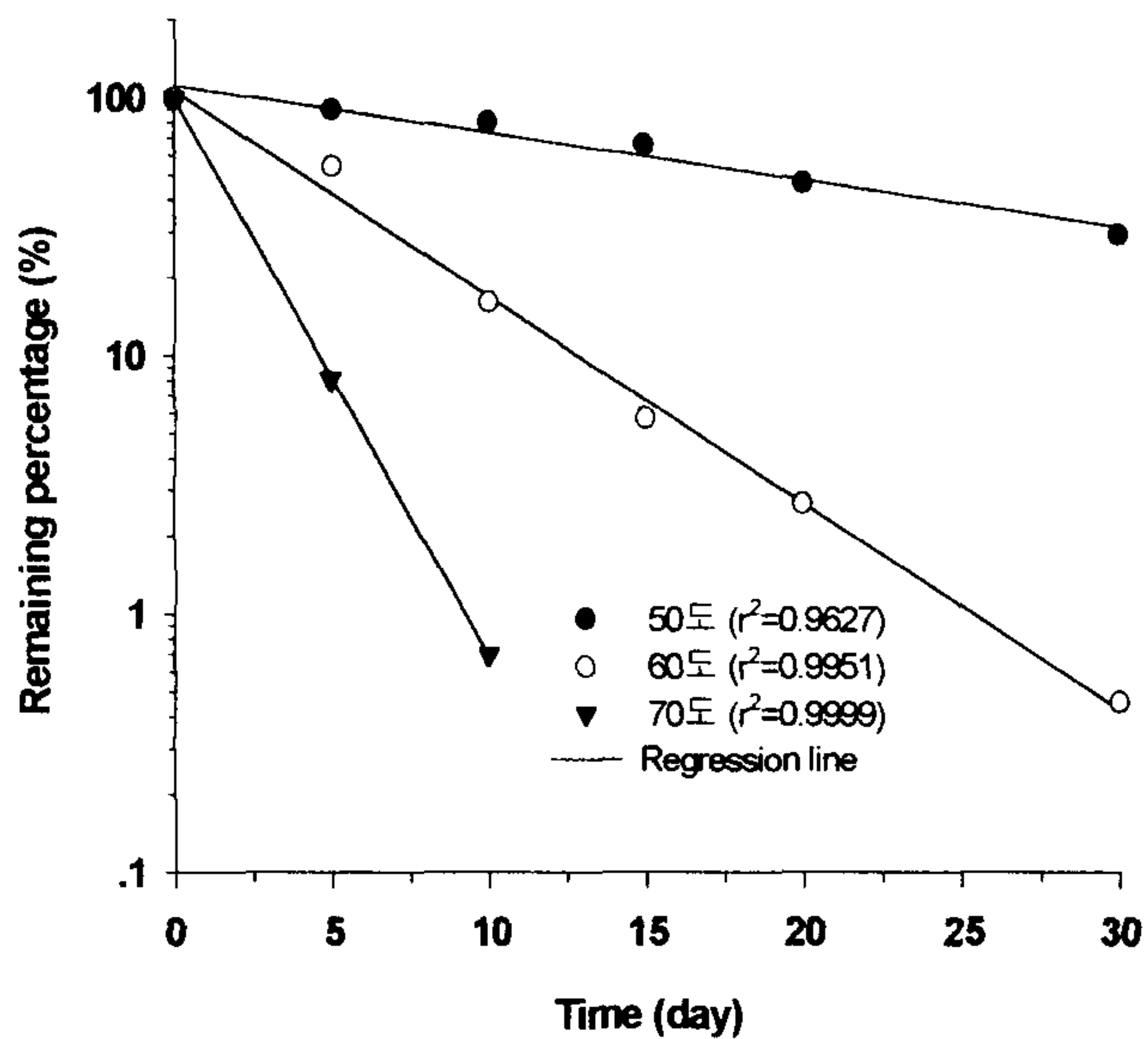


Fig. 5 Plots of observed pseudo-first-order kinetic degradation of NP-77A in 5% glucose solution at different temperature

Key : ●, 50°C ; ○, 60°C ; ▼, 70°C, Slope is the degradation rate constant at each temperature.

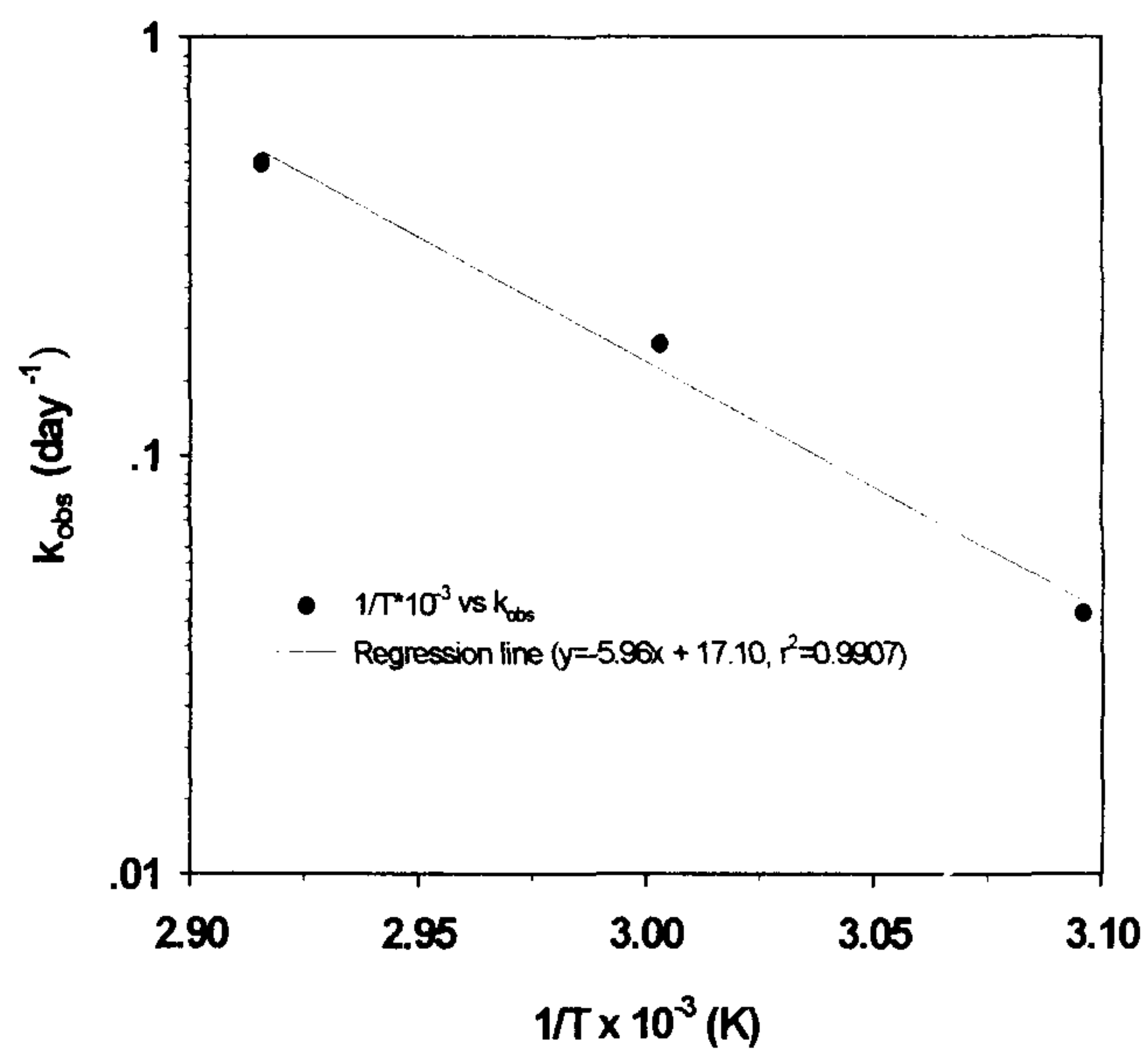


Fig. 6 Arrhenius plot of NP-77A ($r^2 = 0.9907$) in 5% glucose solution

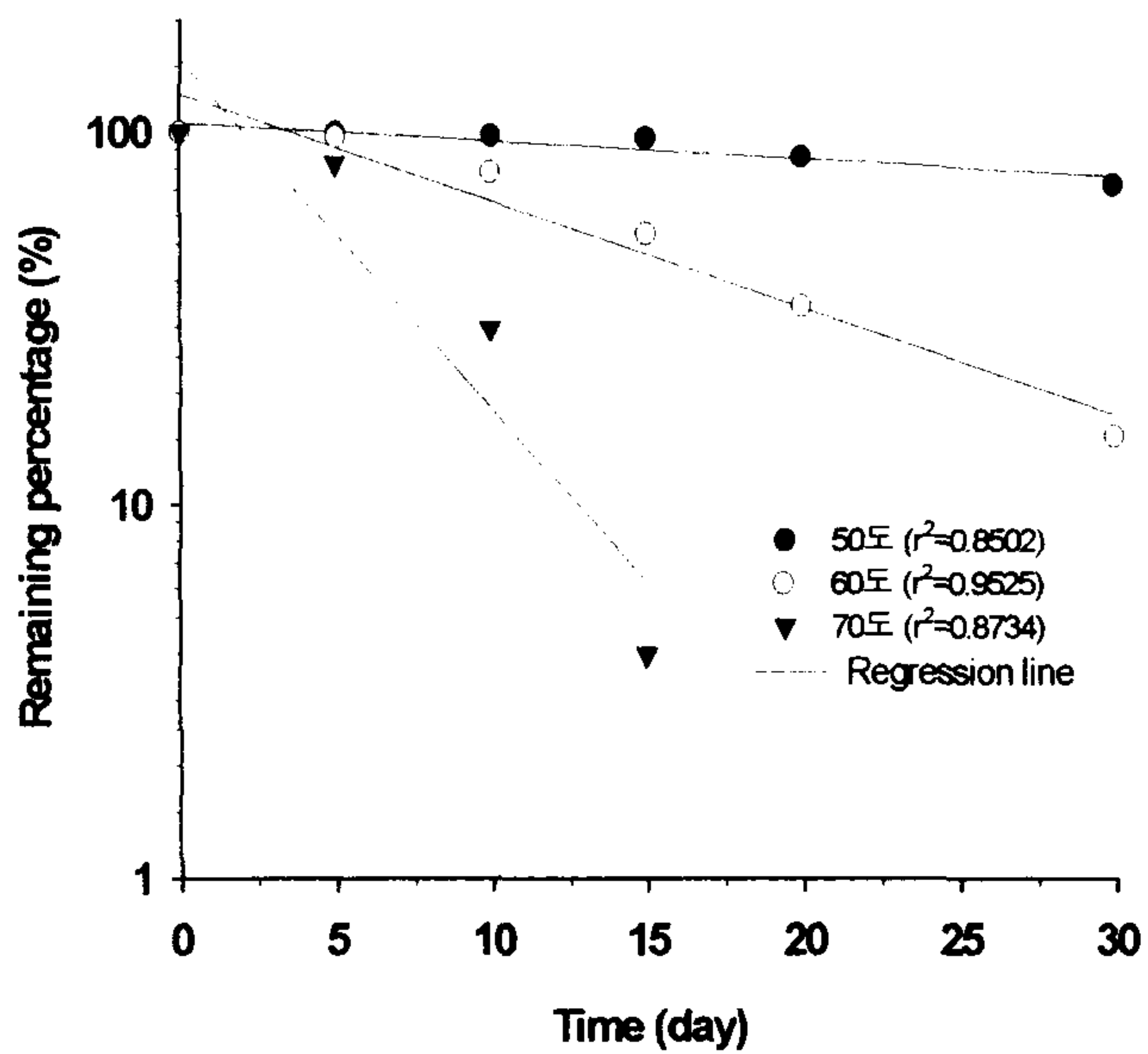


Fig. 7 Plots of observed pseudo-first-order kinetic degradation of NP-77A in 10% glucose solution at different temperature

Key : ●, 50°C ; ○, 60°C ; ▼, 70°C, Slope is the degradation rate constant at each temperature.

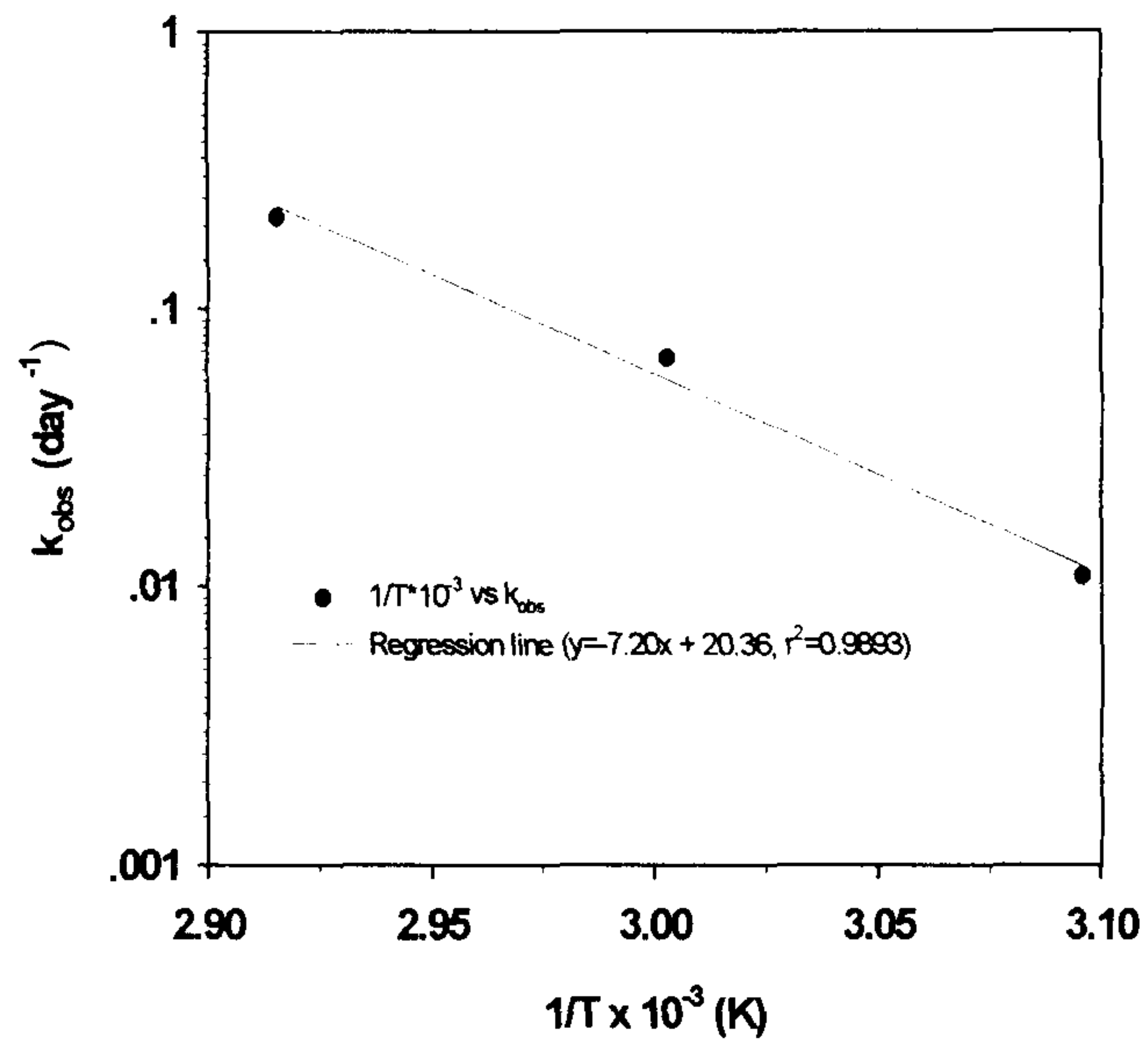


Fig. 8 Arrhenius plot of NP-77A ($r^2 = 0.9893$) in 10% glucose solution

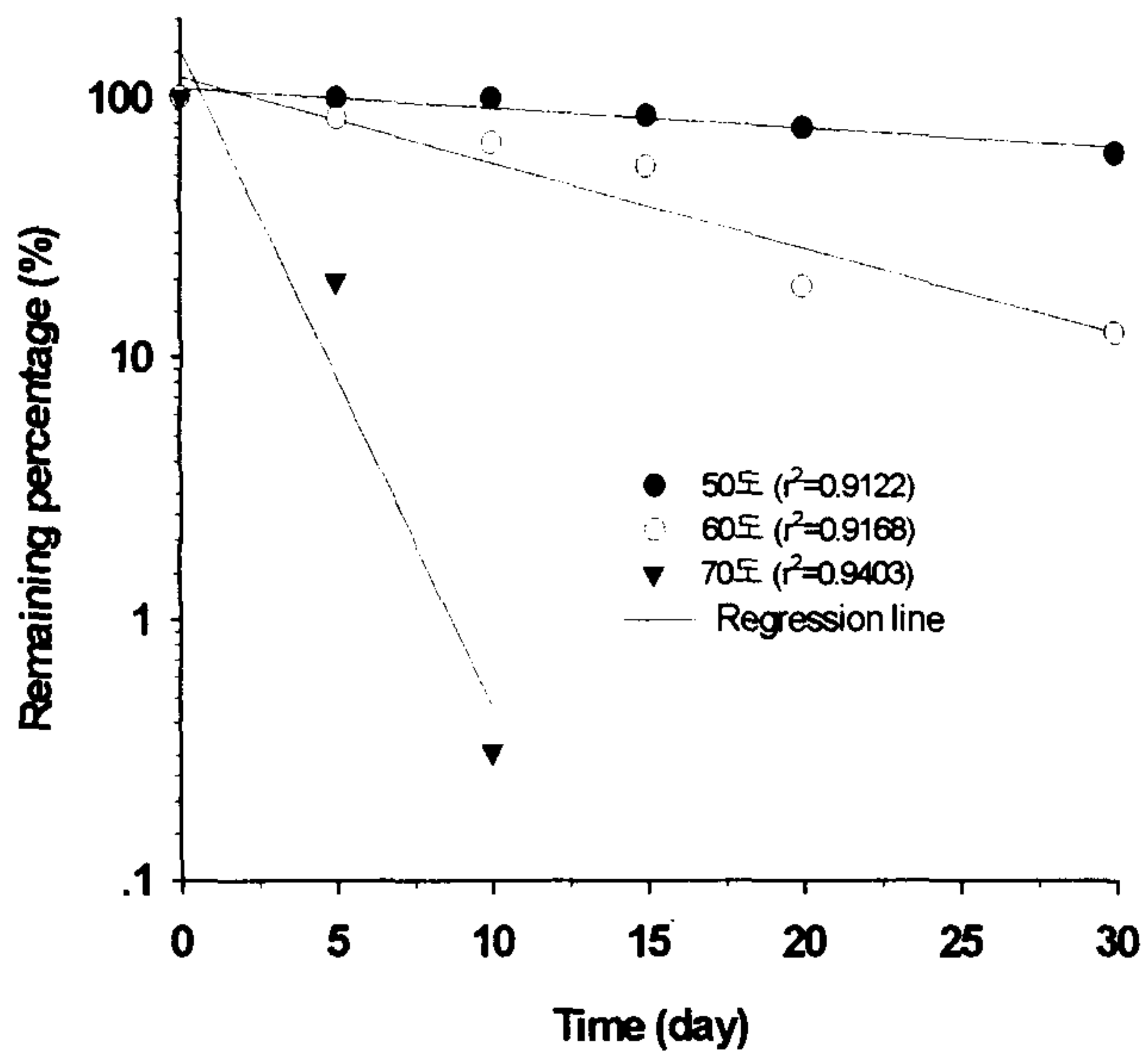


Fig. 9 Plots of observed pseudo-first-order kinetic degradation of NP-77A in 5% fructose solution at different temperature

Key : ●, 50°C ; ○, 60°C ; ▼, 70°C, Slope is the degradation rate constant at each temperature.

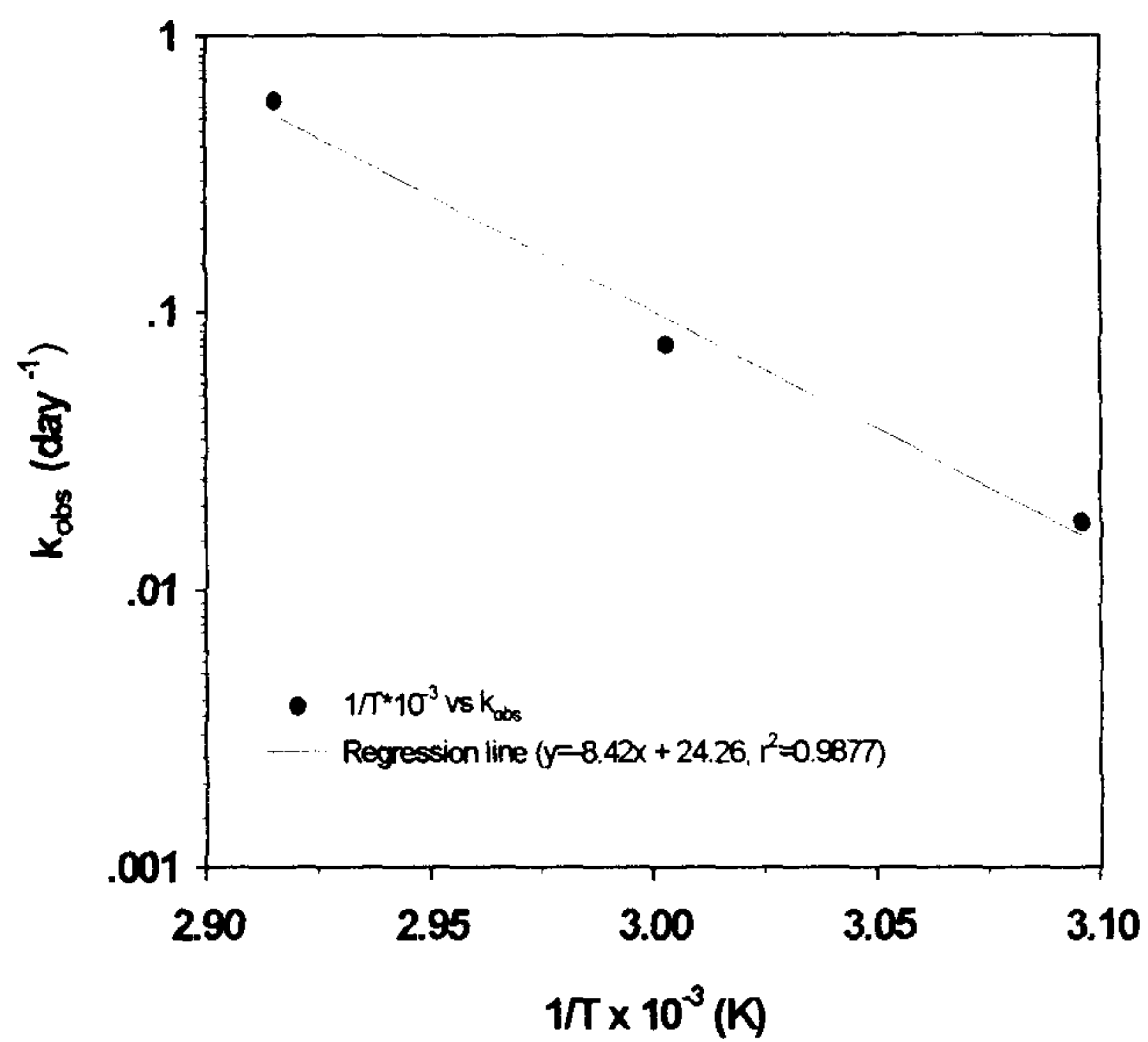


Fig. 10 Arrhenius plot of NP-77A ($r^2 = 0.9877$) in 5% fructose solution

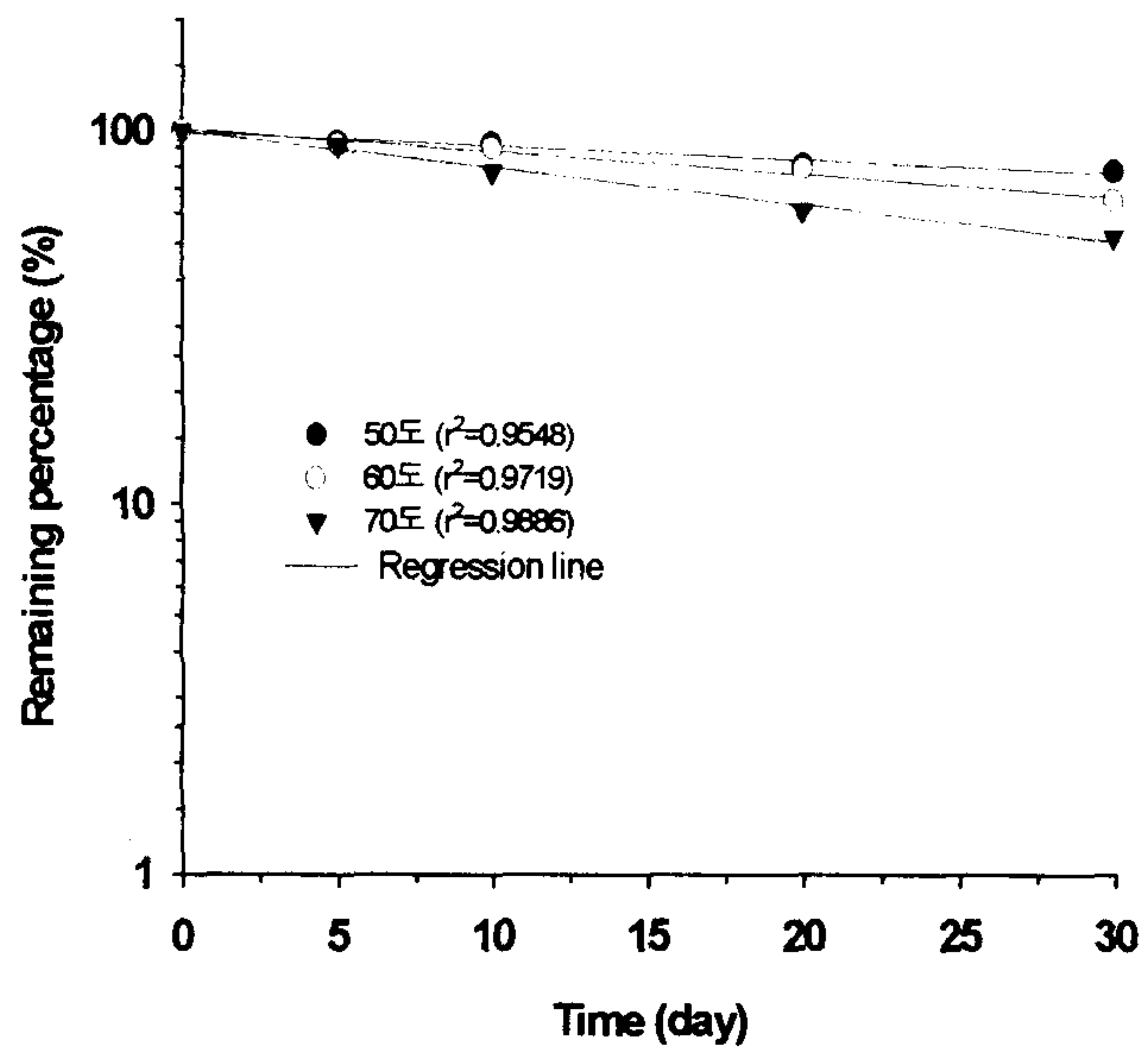


Fig. 11 Plots of observed pseudo-first-order kinetic degradation of NP-77A in 10% mannitol solution at different temperature

Key : ●, 50°C ; ○, 60°C ; ▼, 70°C, Slope is the degradation rate constant at each temperature.

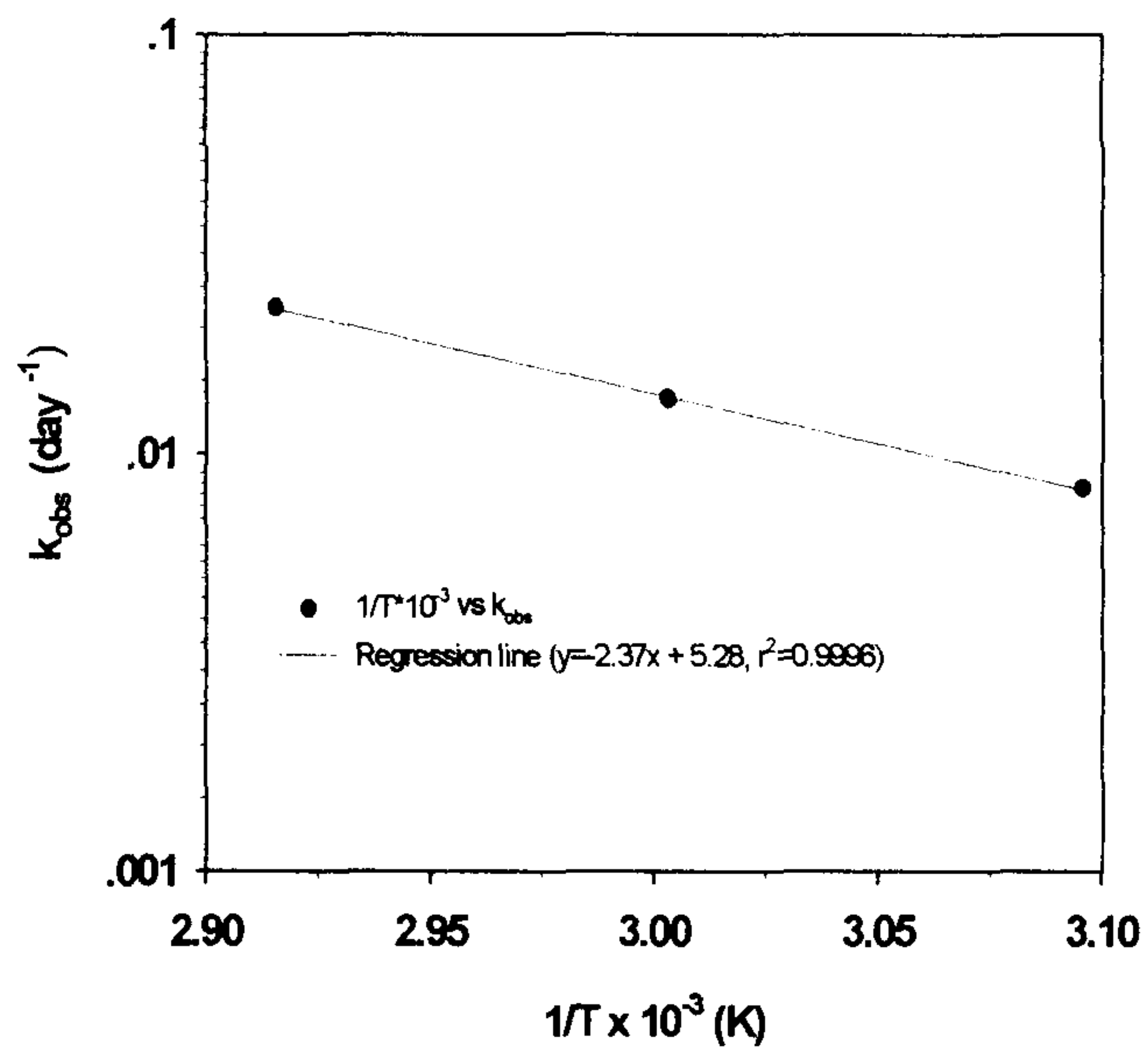


Fig. 12 Arrhenius plot of NP-77A ($r^2 = 0.9996$) in 10% mannitol solution

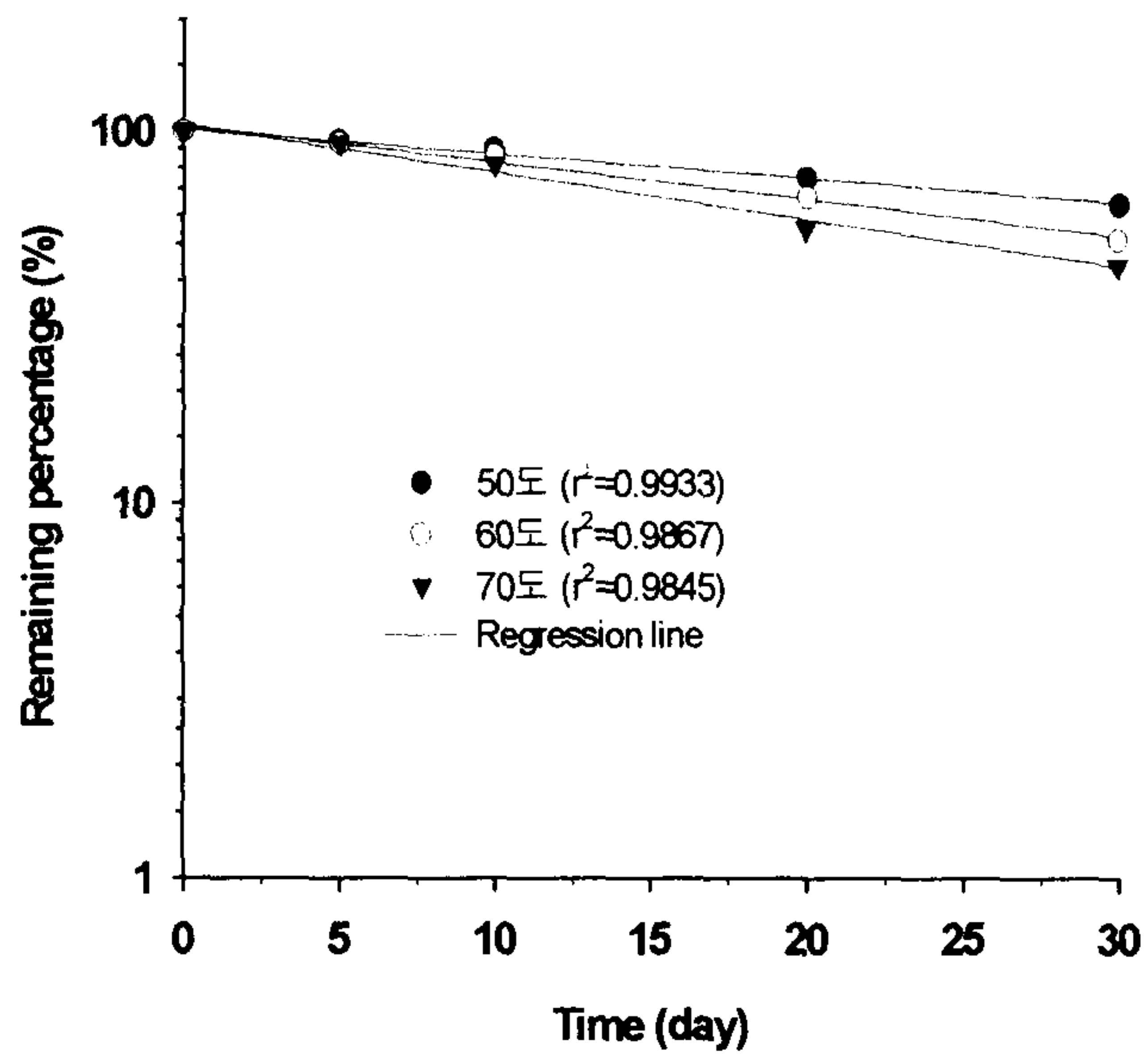


Fig. 13 Plots of observed pseudo-first-order kinetic degradation of NP-77A in Ringer's solution at different temperature

Key : ●, 50°C ; ○, 60°C ; ▼, 70°C, Slope is the degradation rate constant at each temperature.

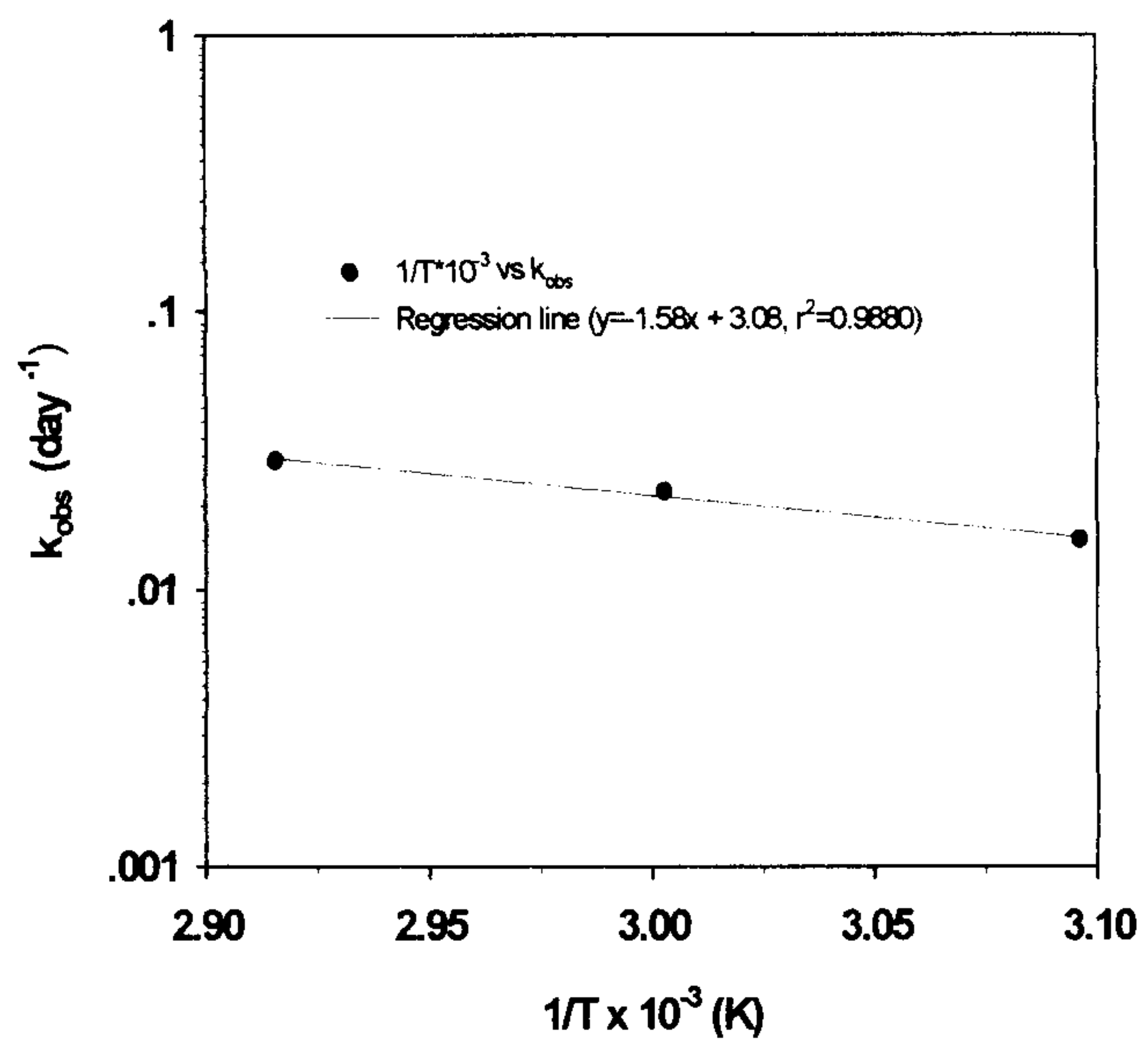


Fig. 14 Arrhenius plot of NP-77A ($r^2 = 0.9880$) in Ringer's solution

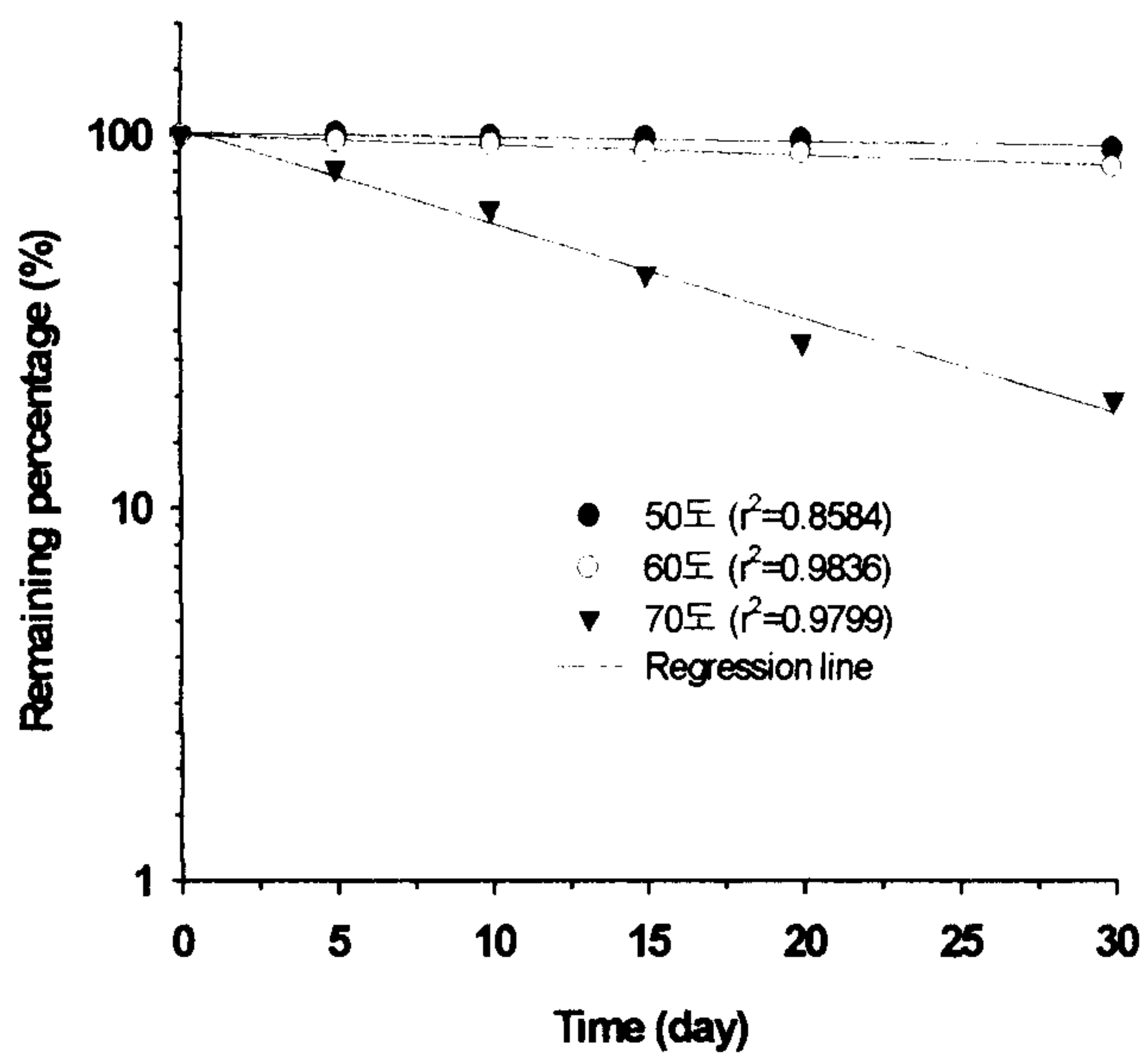


Fig. 15 Plots of observed pseudo-first-order kinetic degradation of NP-77A in saline at different temperature

Key : ●, 50°C ; ○, 60°C ; ▼, 70°C, Slope is the degradation rate constant at each temperature.

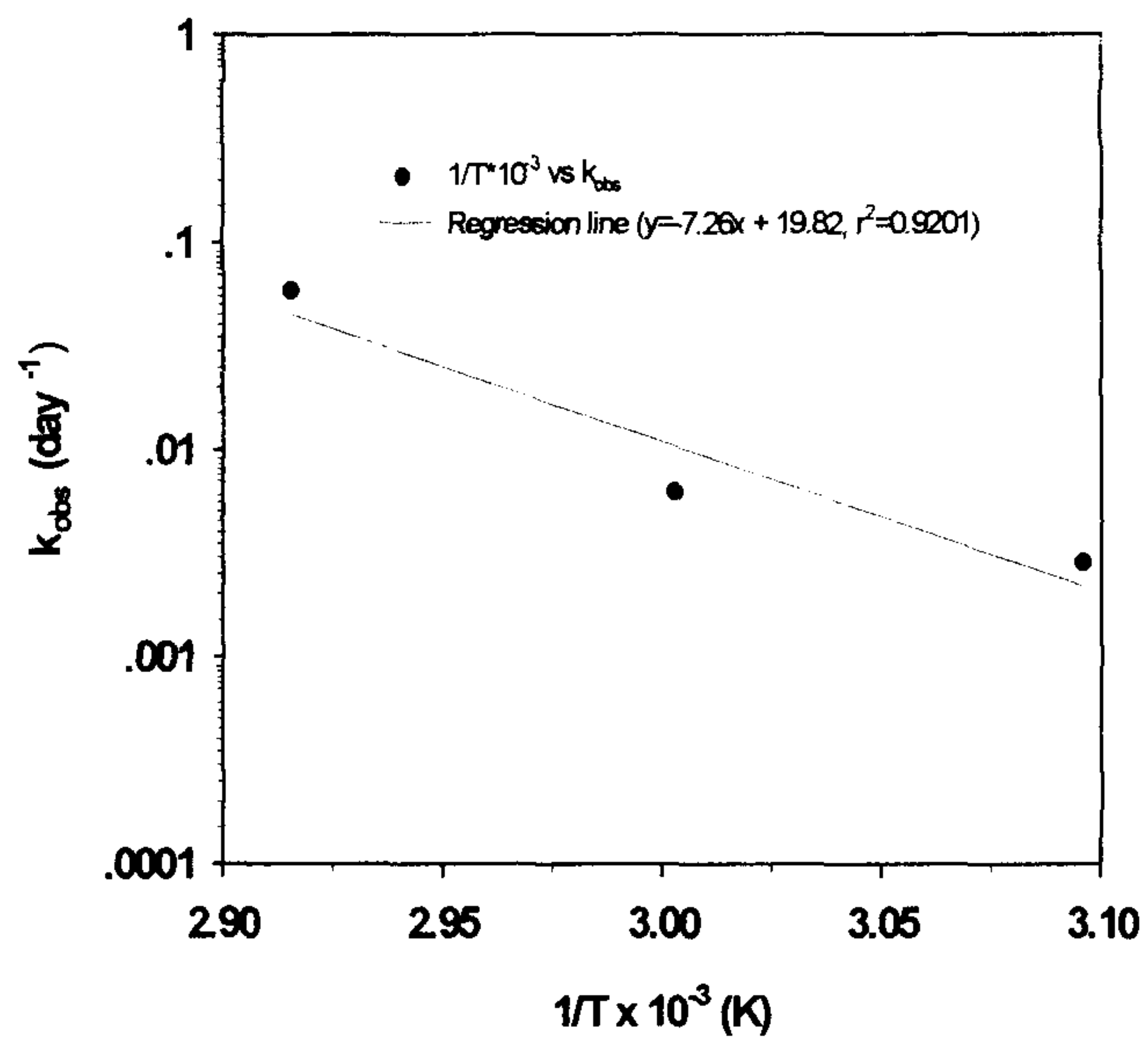


Fig. 16 Arrhenius plot of NP-77A ($r^2 = 0.9201$) in saline

Table 9. Predicted first-order degradation constants and shelf lives of NP-77A in various injectable solutions at 4°C and 25°C.

Injectable solutions	Temperature °C	Shelf Life (t_{90}) (days)	k_{obs} day ⁻¹
5% glucose solution	4	2738	3.83×10^{-5}
	25	83	1.26×10^{-3}
10% glucose solution	4	45084	2.30×10^{-6}
	25	664	4.57×10^{-4}
5% fructose solution	4	144033	7.00×10^{-7}
	25	1038	1.01×10^{-4}
10% mannitol solution	4	198	5.30×10^{-4}
	25	49	2.12×10^{-3}
Ringer's solution	4	44	2.38×10^{-3}
	25	18	6.00×10^{-3}
Saline	4	257985	4.00×10^{-7}
	25	3661	2.87×10^{-5}

다) 고체상태에서의 안정성

동결건조제제와 NP-77A 표준품 분말 일정량을 바이알에 넣고 밀봉한 후 45, 60, 70℃로 유지된 차광된 life tester에 넣고 6개월에 걸쳐 경시적으로 시료를 꺼내 물로 희석하여 HPLC로 정량하였다.

각 온도에서 함량이 경시적으로 약간 감소하는 경향을 보였으나 (Fig. 17, 18) 25℃에서 추정된 shelf life는 동결건조제제와 NP-77A 표준품 각각 895년 및 459년으로 매우 안정하였다 (Table 10).

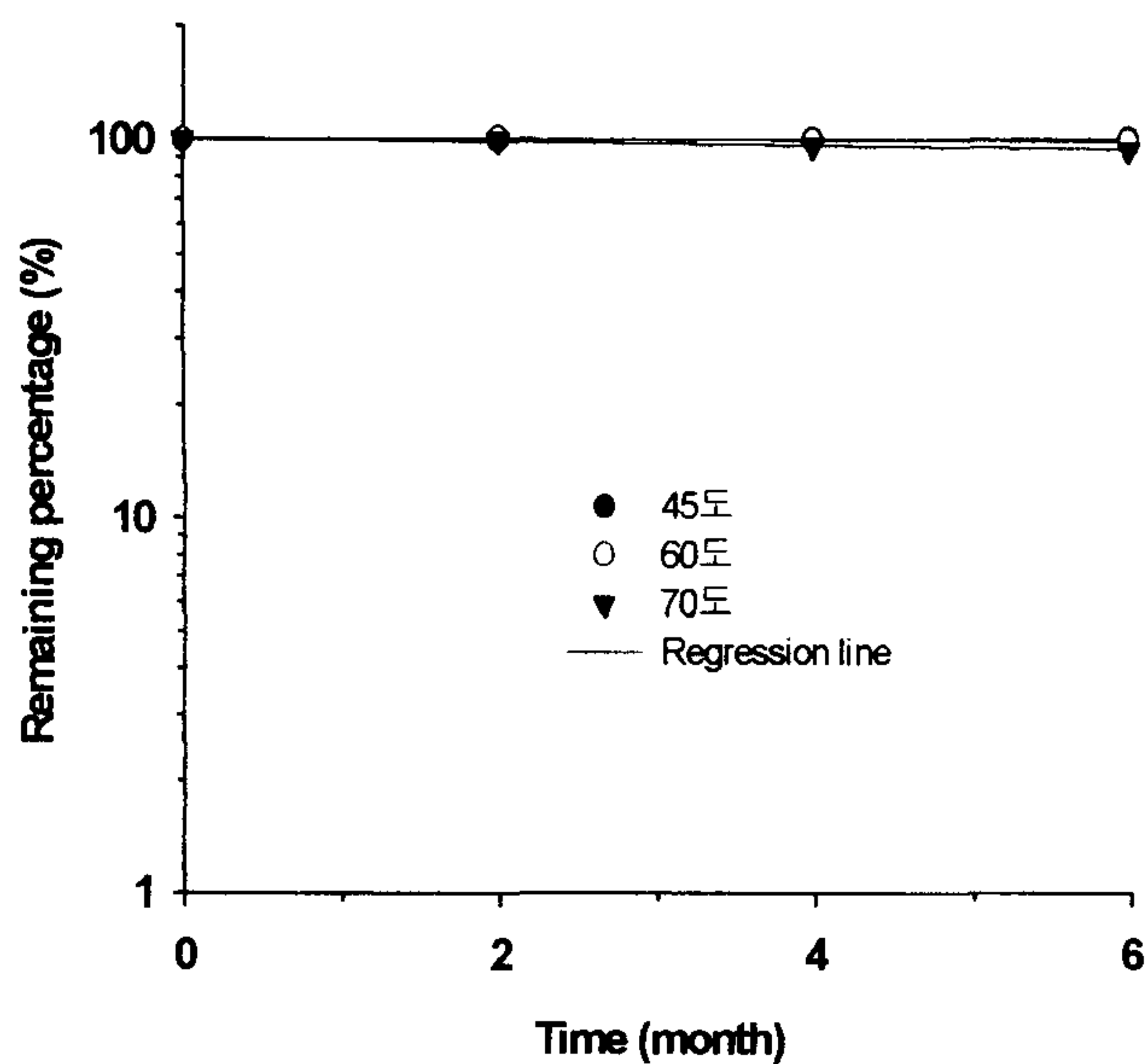


Fig. 17 Stability of NP-77A bulk in solid state

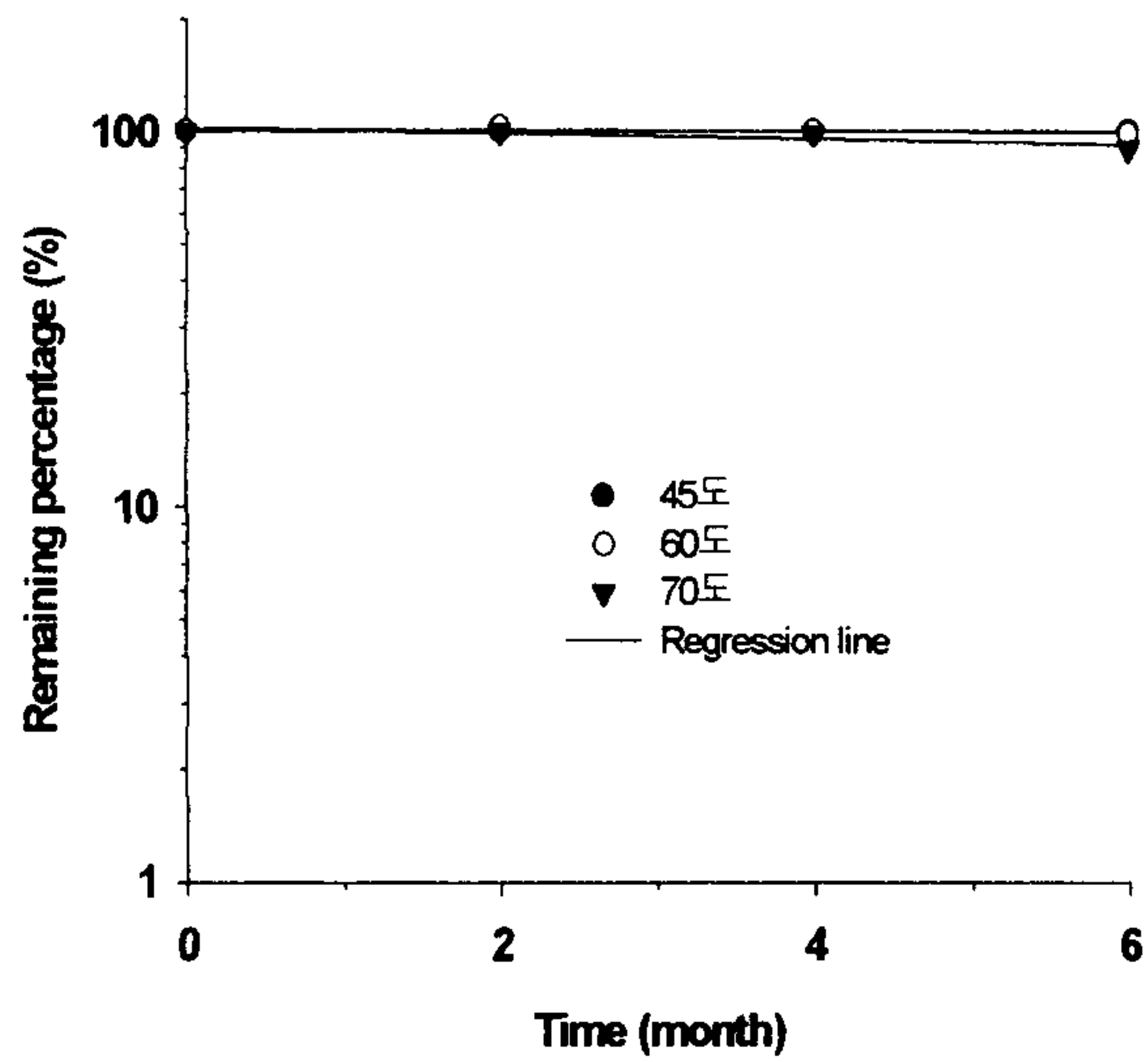


Fig. 18 Stability of the freeze-dried formulation in solid state

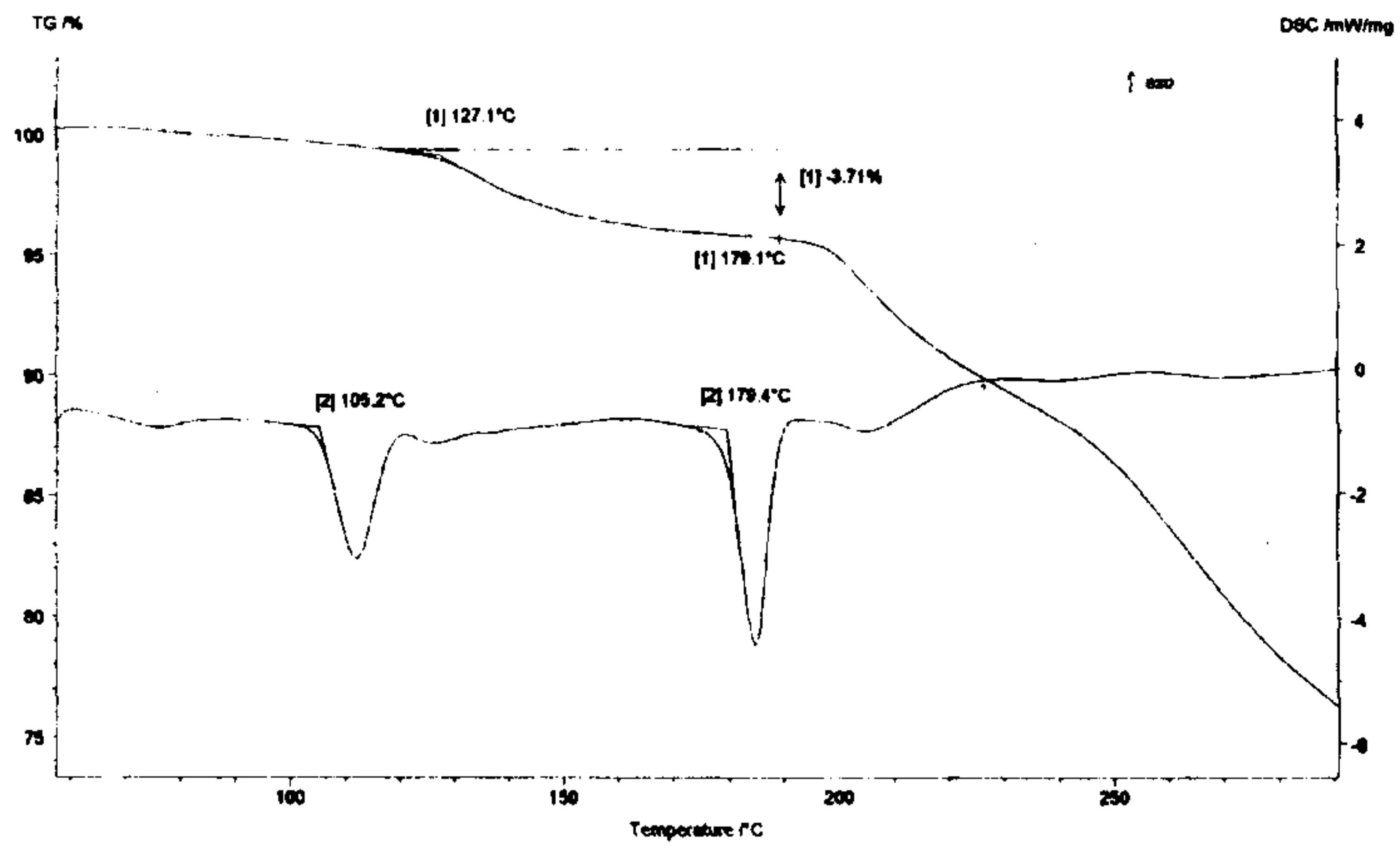
Table 10. Predicted first-order degradation constants and shelf lives of NP-77A in solid state at 4°C and 25°C.

Injectable solutions	Temperature °C	Shelf Life (t_{90}) (years)	k_{obs} (month ⁻¹)
NP-77A bulk	4	19147	5.00×10^{-7}
	25	459	1.91×10^{-6}
Freeze-dried formulation	4	66794	1.00×10^{-7}
	25	895	9.80×10^{-6}

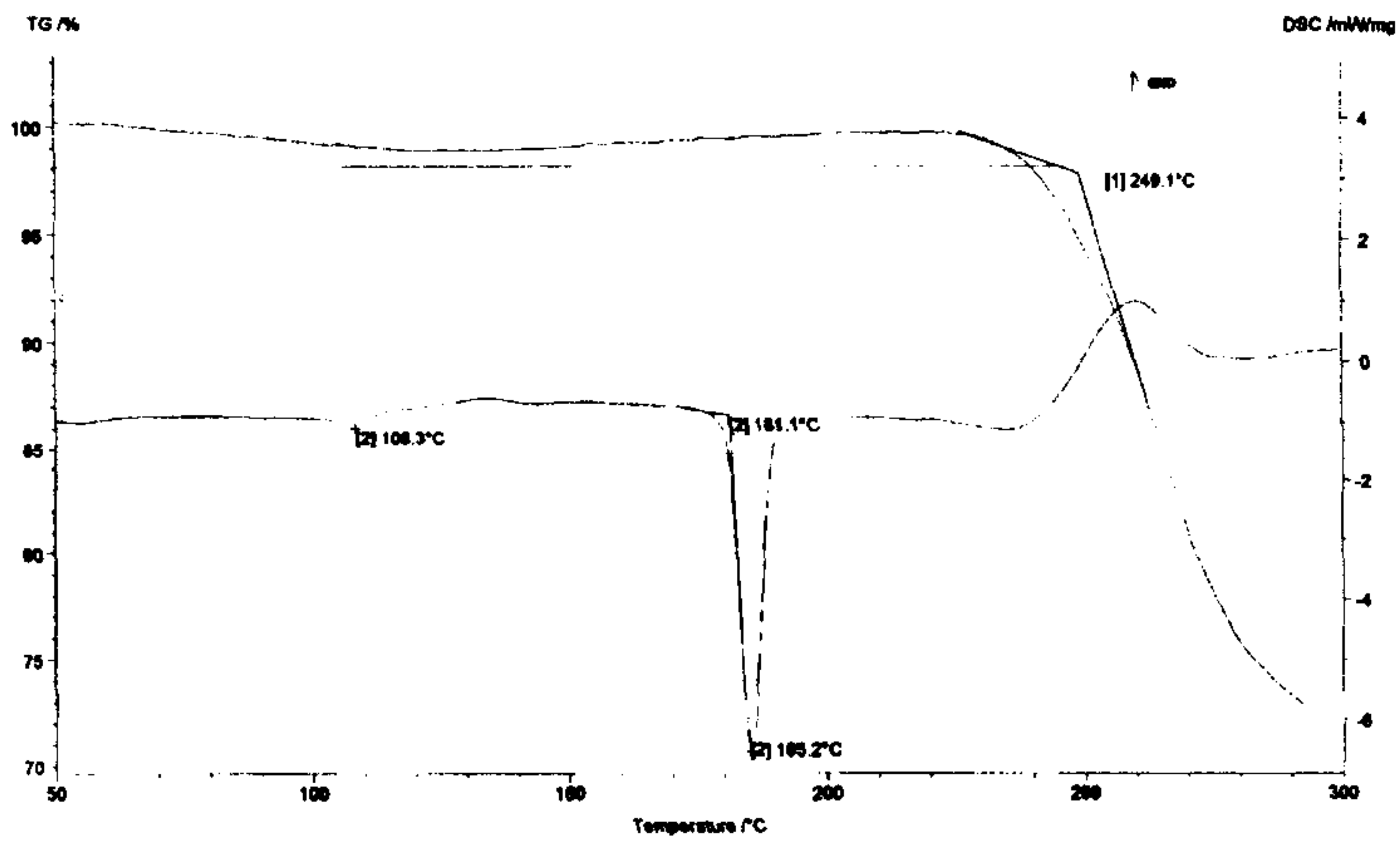
3) DSC 및 TG측정

동결건조제제와 NP-77A 표준품 분말을 DSC (NETZSCH-Gerätebau GmbH DSC 204, 독일) 및 TG (NETZSCH-Gerätebau GmbH TG 209, 독일)을 이용하여 온도범위 50 ~ 300°C, 온도상승속도 10 °C/min로 측정하여 thermogram을 얻었다.

NP-77A표준품의 경우 TG에서 수분증발에 의한 약 3.7%의 무게 감소가 127°C 부근에서 있었으나 동결건조제제는 무게의 감소가 보이지 않았다 (Fig. 19). DSC의 경우 두 제제 모두 185°C 부근에서 흡열 피크가 나타났으나 NP-77A표준품은 105°C 부근에서 수분에 의한 것으로 생각되는 흡열피크가 나타났다. 그 외 thermogram에서의 특별한 변화는 관찰되지 않았다. 즉, 동결건조과정에서 NaOH와의 화학적 변화가 없는 것으로 사료된다.



(A)



(B)

Fig. 19 DSC and TG curves of NP-77A powder (A) and freeze dried formulation (B) (heating rate : 10 °C/min)

제 3 장 연구개발 목표 달성도

1. 연구개발 목표

연 도	연구개발 목표	평가 착안점	달성도
3차년도 ('97. 8. 1 ~ '98. 7. 31)	물리화학적 성질의 규명	기준 및 시험법 연구	100%
	동결건조 제제의 제조 및 용액중 안정성	제제조건 확립 및 안정성 연구	100%
	분말 제제의 용액중 안정성	동결건조 제제의 안정성과 동일하게 시험하여 분말 건조제제의 용액중 안정성을 평가	100%
	제제의 안정성	용액중 안정성 결과를 근거로 하여 주사제 처방을 확립하고 이에 따른 제제의 안정성을 가속시험 및 장기보존시험을 실시	100%

2. 관련 분야에의 기여도

본 연구를 수행하는 동안 축적된 주사제의 개발 기술은 타약물의 제제개발에 응용할 수 있을 뿐만 아니라, 국제기술 경쟁력 강화에 크게 기여할 수 있을 것이다.

제 4 장 참고문헌

- 1) Preformulation studies for new biological substances, '96 Workshop, January 26, 1996, Seoul Korea, RCNDD, Seoul National University.
- 2) Alfred Martin, Physical Pharmacy, 4th Ed., Lea & Febiger, (1993).
- 3) James I. Wells, Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances, Ellis Horwood, (1988).
- 4) En-Ling Lan, Sydney O. Ugwu, James Blanchard, Xiaojun Fang, Victor J. Hruby, and Shubh Sharma, Preformulation Studies with Melanotan-II: A Potential Skin Cancer Chemopreventive Peptide, *J. Pharm. Sci.*, Vol. 83, No. 8, August, 1081-1084, (1994).
- 5) Joseph Hajdu, Gloria Adams, and Hyuk-Koo Lee, Preformulation Study of Pelrinone Hydrochloride, *J. Pharm. Sci.*, Vol. 77, No. 11, November, 921-925, (1988).
- 6) Marcela R. Longhi, Maria M. de Bertorello, and Gladys E. Granero, Isoxazoles. 8. Preformulation Studies of an Isoxazolylnaphthoquinone Derivative, *J. Pharm. Sci.*, Vol. 83, No. 3, March, 336-338, (1994).
- 7) J. de Bolos. C. Galindo. M. Gallardo and A. Rodriguez Pico, Prediction of stability of cefazolin sodium in perfusion fluids, *Int. J. Pharm.*, 40, 175-177, (1987)