

국소적용 소염제인 Prednisolone 유도체의 개발 및 구조와 활성의 상관관계(Ⅱ)

김현표 · 이종욱* · 주왕기 · 이선향
강원대학교 약학과 · * 유한양행(주) 중앙연구소
(Received November 30, 1987)

Development and Structural Activity Relationship of New Local Anti-inflammatory Steroid, Prednisolone Derivatives

Hyun Pyo Kim, Jong Wook Lee*, Wang Kee Jhoo and Sean Hyang Lee

Dept. of Pharmacy, Kang Weon National Univ., Chuncheon, 200

*Yuhan Research Center, Yuhan Corp., Seoul, 151 Korea

Abstract—New prednisolone derivatives including methyl 20 ξ -acetoxy-prednisolonate have been synthesized and evaluated for local anti-inflammatory agents with reduced systemic side effect. Methyl 20 β -dihydroprednisolonate and methyl 20 ξ -acetoxy-prednisolonate showed comparable anti-inflammatory activity *in vivo* with significantly reduced systemic side effects.

소염 활성(anti-inflammatory activity)과 항알러지 작용(anti-allergic activity)을 보이는 부신 피질 호르몬인 당 대사 호르몬(glucocorticoid)은 류마티스성 관절염, 기관지 천식 및 여러가지의 피부질환에 사용되어 왔다. 그러나, 이들 스테로이드 유도체들의 장기적인 사용은 필연적으로 전신 부작용(Cushing's syndrome)을 발현하게 된다.¹⁾ 이런 부작용은 소염활성이 높은 스테로이드 유도체의 경우 더욱 심각하게 된다. 그러므로, 1970년대 후반부부터 이들 유도체의 사용시에 전신 부작용을 없애거나 줄이기 위하여 부작용이 적은 국소적용 스테로이드의 개발이 본격적으로 시도되었다. 이러한 시도의 일환으로, 소수성의 알킬 치환기를 붙여 스테로이드 자체의 국소적인 흡수를 높여 효과를 증강시킨 유도체로 HBP²⁾ 등이 있고, 이런 방법 이외에도 C-21 steroid 골격 자체를 변형하여 부작용이 적은 국소적용 스테로이드를 개발한 예에는 thixocortol pivalate,³⁾ budesonide⁴⁾ 등이 있는데, 특히 budesonide는 간에서 빠른 속도로 불활성형으로 대사되어 현저히 적은 전신 부작용만을 보이는 좋은 스테로이드 유도체이다. 그러나, 이들 유도체들도 역시 다량 또는 장기적인 사용시에는

부작용이 발현되게 된다. 이렇게 전신 부작용이 적은 국소적용 스테로이드 유도체의 개발이 활발하게 진행되고 있으나, 부작용을 완전히 제거하지는 못하였다.

Lewbart 등⁵⁾은 1963년 hydrocortisone을 cupric acetate를 사용하여 oxidative rearrangement를 통해서 methyl 20 ξ -dihydrocortisolonate를 합성하였다. 이 물질은 cotton pellet granuloma bioassay에서 소염 활성은 보이나, 현저히 적은 전신 부작용을 발현하였다(unpublished result). 이 결과를 바탕으로 Lee등^{6,7)}이 1982년 prednisolone (I)으로 부터 methyl 20 ξ -dihydroprednisolonate (II a, b)를 합성하여 소염력을 검정한 결과, 비슷한 결론을 얻었으며 특히 이 유도체는 피부 위축(skin atrophy)도 보이지 않았다. 이들은 이 물질이 국소적용 부위에서는 기존의 유도체와 마찬가지로 소염작용을 보이나, 국소적용 부위를 떠나서 혈액내로 들어가면 esterase에 의해 빠른 속도로 가수분해 되어 불활성의 20 ξ -dihydroprednisolonic acid (III a, b)로 변하여 전신 부작용이 나오지 않게 된다고 추론하고, 이런 약물을 prodrug의 반대 개념인 "antedrug"이라고 명명하였다.⁸⁾ 이들 물질은 methyl 17, 20 ξ -iso-

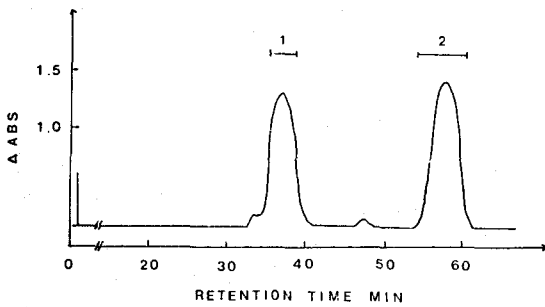


Fig. 2—Semipreparative HPLC separation of methyl 20 ξ -dihydroprednisolone

HPLC (Waters Associates), column; μ -bondapak C-18 semipreparative steel column (C-18 cartridge column for analytical separation), detector; UV 254nm, mobile phase; MeOH/water (6:4), flow rate; 6ml/min. Fraction 1 for 20 α -isomer, fraction 2 for 20 β -isomer, peak just prior to fraction 1 for prednisolone

분리된 각각의 isomer, **IIa** (methyl 20 α -dihydroprednisolone=methyl 11 β , 17, 20 α -trihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate)와 **IIb** (methyl 20 β -dihydroprednisolone=methyl 11 β , 17, 20 β -trihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate)로부터 acetylation을 하여 각각의 methyl 20 ξ -acetoxy-prednisolone를 얻었는데, **IIa** (100 mg)에 pyridine (1ml)와 Ac₂O (1ml)를 가하고 45°C에서 2시간 반응시킨 후 iced-water에 넣어 침전시킨 다음 여과한 후에 잘 세척하였다. Filter cake를 건조한 후 ethyl acetate에 녹이고 무수 Na₂SO₄로 건조하였다. 유기용매층을 감압 증류하여 고체를 얻은 후 acetone/hexane 혼합 용액으로 결정을 얻었다. 그 후 acetone에서 다시 재결정을 하여 순수한 methyl 20 α -acetoxy-prednisolone (**IVa**, methyl 20 α -acetoxy-11 β , 17-dihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate), 52mg (needles)을 얻었다. m.p. = 218~220°C (197°C decomp.), Rf=0.54 (acetone/CH₂Cl₂/hexane = 3:2:5), RT (HPLC) = 23.1 min, $[\alpha]_D^{20}$ = +61.0°, UV λ_{max} 245nm (ϵ =16,800), IR 3,460cm⁻¹ (OH), ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.23 (s, 3H, 13-CH₃), 1.45 (s, 3H, 10-CH₃), 2.15 (s, 3H, 20-OCOCH₃), 3.75 (s, 3H, 21-OCH₃), 4.40 (m, 1H, 11-H), 5.10 (s, 1H, 20-H), 5.95 (s, 1H,

4-H), 6.20 (dd, 1H, J=10 and 2 Hz, 2-H), 7.25 (d, 1H, J=10 Hz, 1-H), Anal. Calcd for C₂₄H₃₂O₇: C, 66.65; H, 7.46, Found C, 66.5; H, 7.42.

같은방법으로 **IIa** (100mg)으로 부터 acetone에서 재결정을 하여 순수한 methyl 20 β -acetoxy-prednisolone (**IVb**, methyl 20 β -acetoxy-11 β , 17-dihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate), 64mg (colorless platelets)를 합성하였다. m.p. = 167~171°C, Rf=0.46 (acetone/CH₂Cl₂/hexane = 3:2:5), RT (HPLC)=24.4min, $[\alpha]_D^{20}$ = +40.4°, UV λ_{max} 245nm (ϵ =14,900), IR 3,460 cm⁻¹(OH), ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.12 (s, 3H, 13-CH₃), 1.52 (s, 3H, 10-CH₃), 2.22 (s, 3H, 20-OCOCH₃), 3.86 (s, 3H, 21-OCH₃), 4.52 (m, 1H, 11-H), 5.16 (s, 1H, 20-H), 6.05 (s, 1H, 4-H), 6.27 (dd, 1H, J=10 and 2 Hz, 2-H), 7.25 (d, 1H, J=10Hz, 1-H), Anal. Calcd for C₂₄H₃₂O₇: C, 66.65; H, 7.46, Found C, 66.6; H, 7.42.

20 ξ -Dihydroprednisolone (**Va, b**)은 각각 "Delta-triol acetate"와 prednisolone-21-acetate로부터 합성하였다. 이들 유도체는 m.p., $[\alpha]_D^{20}$, ¹H-NMR에서 Kim 등¹⁰⁾에서 기술한 바와 동일하였다.

Glucocorticoid receptor binding affinity— [³H]-Dexamethasone을 labeled ligand로 사용하여 competition binding assay를 행하였다. Receptor source로는 rat liver cytosol을 분리하여 Kim 등¹¹⁾의 방법에 따라 행하였다. Nonspecific binding은 사용된 [³H]-dexamethasone보다 1,000배 excess로 unlabeled dexamethasone을 넣어서 측정하였고 모든 시험은 복제로 하였다.

소염력 검정 (Cotton pellet granuloma assay)— Sprague-Dawley Rat (♂, 100~200g)을 ether로 가볍게 마취시키고, 가슴 부위를 1cm 정중절개하고 구부러진 핀셋으로 양쪽 겨드랑이의 밑까지 피하로 구멍을 만들고 cotton pellet을 1개씩 이식하였다. 그 후 절개부위를 다시 봉합하고 medi-spray를 뿌려 감염을 예방한 후 1주일 동안 사육하였다. 이때 사용된 cotton pellet은 cotton dental roll을 미리 35±1mg으로 자르고

여기에 유도체를 적당한 용액에 녹여서 주입한 후 (0.2ml) 건조시켰다. 그 후 모든 pellet에 항생제 용액 (80mg penicillin G와 104mg dihydrostreptomycin을 40ml의 증류수에 녹인것)을 0.2ml 씩 주사하고 1일간 실온에서 건조시켰다. 합성된 유도체와 항생제 둘 다 처리된 pellet(treated side)은 rat의 오른쪽 겨드랑이에 끼우고 항생제만 처리된 control pellet (untreated side)은 rat의 왼쪽 겨드랑이에 끼워서 국소와 전신 작용을 측정했다. 1주일 후 rat을 cervical dislocation으로 안락사시키고 pellet을 꺼내어 60°C에서 2일간 건조한 후 중량을 측정하고, 각 pellet에서 35mg씩을 제한 값을 granuloma의 중량으로 판단했다. 이와 동시에 흉선과 부신을 떼어 내어 각각의 중량을 측정하여 전신 부작용의 유무를 관찰하였다.

실험결과 및 고찰

최근까지 glucocorticoid의 구조에 있어서 소염 활성을 갖기 위하여는, 17β-ketol side chain은 필수적이라고 생각되어 왔으나 methyl 20ξ-dihydrocortisolonate의 활성의 측정으로 그런 관념이 다 적용되는 것은 아니다. 이 물질은 전신 부작용도 현저히 적었다. 본 연구는 여기에 착안하여 prednisolone을 모핵으로 하여 비슷한 유도체를 합성하였다. Prednisolone으로 부터 Cu(OAc)₂를 methanol 용액에서 반응시키면 1시간 내에 aldehyde로 산화가 일어나고, 그 후 서서히 rearrangement가 일어나서 methyl 20ξ-dihydroprednisolonate로 되는데 이 반응의 기전은 Lewbart 등이 보고하였다.⁵⁾ 이렇게 생긴 혼합물을 semipreparative HPLC로 20α와 20β-isomer로 각각 분리하였는데, 그 조건과 chromatogram은 Fig. 2와 같다. 이 물질로 부터 20ξ-acetoxy compound의 합성은 통상의 acetylation 방법을 사용하였는데 비교적 좋은 수율을 보였다(47% for 20α, 58% for 20β). 이들 유도체들의 성질 중 특이한 것은 Table I과 같이 optical rotation에 있어서 모든 종류의 유도체에서 20α-isomer가 20β-isomer보다 더 dextrorotation(+) 현상을

Table I—Optical rotation of the derivatives.

Compounds ^a	20α-isomer	20β-isomer
IIa, b	+38.4°	+17.7°
IIIa, b	+34.7°	+18.2°
IVa, b	+61.0°	+40.4°
Va, b	+ 7.6°	- 2.0°
VIa, b ^b	+58.1°	-20.1°

a. All compounds were dissolved in MeOH.
b. Data from ref. 10.

Table II—¹H-NMR Peak of C-20 Hydrogen of the derivatives.

Compounds	20α-isomer	20β-isomer
IIa, b	4.06 ^a	4.36 ^b
IIIa, b	3.94 ^a	4.07 ^a
IVa, b	5.10 ^b	5.16 ^b
VIa, b ^c	3.78 ^a	3.93 ^a

a in Me₂SO-d₆, b in CDCl₃, c. Data from ref. 10.

Table III—Glucocorticoid receptor binding affinity.

Compounds	IC ₅₀ ^a
dexamethasone	80.3 nM
prednisolone	170.0 nM
IIa	32.3 μM
IIb	52.2 μM
IIIa	— ^b
IIIb	— ^b
IVa	2.0 μM
IVb	4.8 μM

a. Concentration required for 50% inhibition of the specific binding of 28nM [³H]-dexamethasone to receptor. b. Virtually no binding affinity.

보였는데, 이것은 이런 종류의 유도체들(steroid 20ξ-dihydro compounds)에 있어서 C-20의 configuration 판정시 사용되는 acetylation에 의해 많이 dextrorotation이 일어나는 쪽이 20α라는 Lewbart 등의 보고보다⁵⁾ 더 간편한 방법으로 20ξ-dihydroprednisolonic acid 유도체에 적용할 수 있는 좋은 방법이라고 사료된다. ¹H-NMR 결과 C-20의 H peak는 Table II에서와 같았는데, 일반적으로 20α가 20β-isomer보다 H의 δ

Table IV—Anti-inflammatory activity of the derivatives.

Comp'ds	Treated side		Untreated side		Thymus wt. (mg)/ 100g b.wt.	Adrenal wt. (mg)/ 100g b.wt.
	granuloma wt.	% inhibition	granuloma wt.	% inhibition		
control			55.5±3.8mg		220.4±52.1	22.9±4.7
pred.	18.0±0.8**	68%	30.3±3.2**	45%	102.1±10.1*	14.3±3.2*
IIa	37.7±3.2**	32%	57.0±4.3	0%	240.8±18.2	23.9±2.3
IIb	25.5±1.8**	54%	54.0±3.8	0%	232.1±12.8	21.5±3.4
IVa	29.2±6.6**	47%	36.6±8.7*	34%	249.8±22.2	23.1±3.5
IVb	27.2±5.5**	51%	33.3±6.5**	40%	214.0±20.4	22.7±3.2
Va	56.8±4.3	0%	60.1±6.9	0%	232.1±18.6	24.3±6.0
Vb	53.1±8.8	0%	59.4±7.2	0%	212.0±12.8	22.1±2.3

Table values are the mean±SE for six animals. Treated pellets received 2.5mg steroid derivatives. The Student's T test was used to determine significant differences from the control values at $p < 0.01$ (*), $p < 0.001$ (**).

value가 낮아서 이들 유도체에 대한 공간상의 shielding effect를 보였다.

이상에 합성된 유도체들의 glucocorticoid receptor affinity를 비교하여 보면 모든 유도체가 모핵인 prednisolone에 비해 affinity가 낮은 것을 알 수 있었고, 20 α -configuration을 갖고있는 isomer가 20 β -isomer 보다 receptor affinity가 높은 것을 알 수 있었다(Table III). Methyl 20 ξ -dihydroprednisolonate에 있어서 C-20의 수산기를 acetylation하면 receptor binding affinity가 증가하였다. 그러나, C-20의 더 이상의 크기의 증가(tosylation)는 소염 활성의 감소를 보이므로 (unpublished observation), C-20의 크기는 acetyl기가 적당하다고 생각된다.

이들 유도체들의 소염력을 cotton pellet assay로 검정하였는데, Table IV에서와 같은 결과를 나타냈다. Prednisolone의 소염 활성이 가장 높았으며 그 다음은 methyl 20 ξ -acetoxyprednisolonate=methyl 20 β -dihydroprednisolonate였고 methyl 20 α -dihydroprednisolonate가 약한 활성을 보이며, 나머지 유도체는 2.5mg/pellet의 용량에서 활성을 나타내지 않았다. 이 용량에서는 prednisolone에 있어서 thymus atrophy 등의 전신 부작용이 발현되었으나, 합성된 유도체는 thymus와 adrenal atrophy는 나오지 않았다. 그러나, methyl 20 ξ -acetoxyprednisolonate는 un-

treated side에도 소염활성을 보여 전신적인 작용이 있음을 알았다. 이상의 결과로 보면, 합성된 유도체 중 methyl 20 β -dihydroprednisolonate(II b), methyl 20 ξ -acetoxyprednisolonate(IVa, b)들이 소염활성을 보이며 전신 부작용은 낮아서, 이들 유도체에 대한 계속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 1986년도 문교부 자유과제 학술연구 조성비의 지원으로 이루어 졌으므로 이에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Jones, E.W. Steroid atrophy—A historical appraisal. *Dermatologica* 152(Suppl. 1), 107 (1976).
- 2) Kimura, M., Tarumoto, Y., Nakane, S. and Otomo, S. Comparative toxicity study of hydrocortisone-17-butyrate-21-propionate (HBP) ointment and other topical corticosteroids in rats. *Drugs. Exptl. Clin. Res.* 12, 643 (1986).
- 3) Davies, J.E., Kellet, D.N., Staniforth, M.W., Torossian, R. and Grouhel, A. Pharmacological study on a new anti-inflammatory steroid, Tixocortol pivalate (JO 1016). *Arzneim.-Forsch./Drug*

- Res.* 31, 453 (1981).
- 4) Thalen, A. and Brattsand, E. Synthesis and anti-inflammatory properties of budesonids, a new non-halogenated glucocorticoid with high local activity. *Arzneim-Forsch./Drug Res.* 29, 687 (1979).
 - 5) Lewbart, M.L. and Mattox, V.R. Glycolic acids and esters from cortisone. *J. Org. Chem.* 28, 1773 (1963).
 - 6) Lee, H.J. and Soliman, M.R.I. Anti-inflammatory steroids without pituitary-adrenal suppression. *Science.* 215, 989 (1982).
 - 7) DiPetrillo, T., Lee, H.J. and Cutroneo, K.R. Anti-inflammatory steroids that neither inhibit collagen synthesis nor cause dermal atrophy. *J. Invest. Dermatol.* 19, 878 (1984).
 - 8) Lee, H.J., Khalil, M.A. and Lee, J.W. Antedrug: A conceptual basis for safer anti-inflammatory steroids. *Drug Exptl. Clin. Res.* 10, 835 (1984).
 - 9) Bird, J., Kim, H.P. and Lee, H.J. Toical anti-inflammatory activity of esters of steroid-21-oic acids. *Steroids* 47, 35 (1986).
 - 10) Kim, H.P., Bird, J., Heiman, A.S., Hudso, G.F., Taraporewala, I.B. and Lee H.J. Synthesis of new anti-inflammatory steroidal 20-carboxamides: (20R)-and (20S)-21-(N-Substituted amino)-11 β , 17, 20-trihydroxy-3, 21-dioxo-1, 4-pregnadiene. *J. Med. Chem.* 30, 2239 (1987).
 - 11) Kim, H.P., Lee, J.W., Kim, H.J., Byun, S.M. and Lee, H.J. Development and structural-activity relationship of new local anti-inflammatory steroid, prednisolone derivatives. I. Binding affinities to rat liver glucocorticoid receptor. *Arch. Pharm. Res.* 10, 184 (1987).