



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0026462
(43) 공개일자 2016년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 211/94 (2006.01) A61K 31/45 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0115409

(22) 출원일자 2014년09월01일

심사청구일자 2014년09월01일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전종갑

강원도 춘천시 한림대학길 1, 화학과 (옥천동, 한림대학교)

서영화

강원도 춘천시 교동길18번길 12, 101호 (교동)

(74) 대리인

강성혜

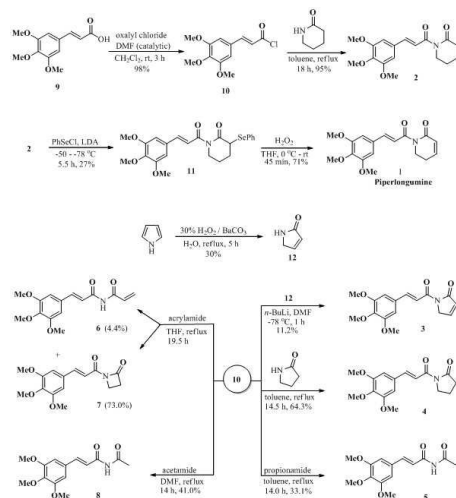
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 피페론구민과 그 유도체 및 그 합성방법

(57) 요약

3,4,5-트리메톡시시나믹산의 산 염화물과 다양한 아마이드/락탐 간의 직접적인 반응으로 피페론구민과 그 유도체들을 합성하였다. 또한, 이 화합물들에 대하여 LPS로 유도되는 RAW264.7 대식세포에서 항염증 효과를 평가하였다. 이 화합물들 중 최대 저해효능은 피페론구민 (91.3%)이 나타내었으나 세포독성이 있는 반면, α , β -불포화 부티로락탐 부위를 가진 화합물 3은 세포독성을 나타내지 않으면서 64.8%의 현저한 저해효과를 나타내었다. 이 연구 결과, 최소 3개의 탄소 사슬 길이의 α , β -불포화된 시나모일 기에 연결된 아마이드/락탐 부위가 세포독성 없이 강력한 항염증 활성을 나타내는 것으로 나타났다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012H1B8A2026036

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역혁신창의인력양성사업

연구과제명 천연활성물질의 합성 및 활성검증 인력양성

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2009-0094071

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중점연구소사업

연구과제명 중추신경계 질환 치료를 위한 천연물 유래 신소재 개발 및 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2016.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

가) 화합물 10으로 표시되는 3,4,5-트리메톡시시나믹산 (3,4,5-trimethoxycinnamic acid) 염화물을 톨루엔에 넣어 교반한 용액과 피페리딘-2-온 (piperidin-2-one)을 재환류하며 커플링 반응시키는 단계;

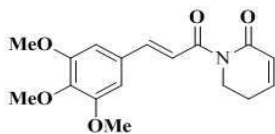
나) 상기 가)의 커플링 반응 완료 후 용매를 제거하는 단계;

다) 용매 제거 후 정제하는 단계를 거쳐 화합물 2로 표시되는 (E)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피페리딘-2-온 {(E)-1-(3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)acryloyl)piperidin-2-one}을 얻는 단계;

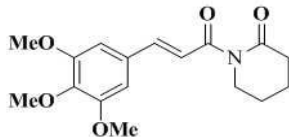
라) 상기 (E)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피페리딘-2-온을 페닐셀레네닐 클로라이드 (phenylselenenyl chloride) 및 LDA (lithium di-isopropyl amide)와 -50~-78 ℃에서 반응시켜 화합물 11로 표시되는 (E)-3-(페닐셀라닐)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피페리딘-2-온 {(E)-3-(Phenylselanyl)-1-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl)piperidin-2-one}을 얻는 단계; 및

마) 상기 화합물 11을 산화시켜 화합물 1로 표시되는 피페론구민을 합성하는 단계;를 포함하는 피페론구민 (piperlongumine) 합성방법.

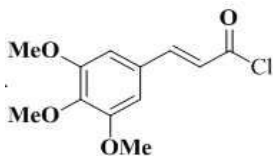
<화합물 1>



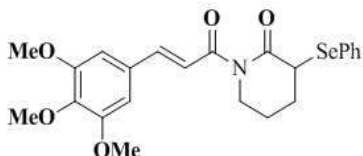
<화합물 2>



<화합물 10>



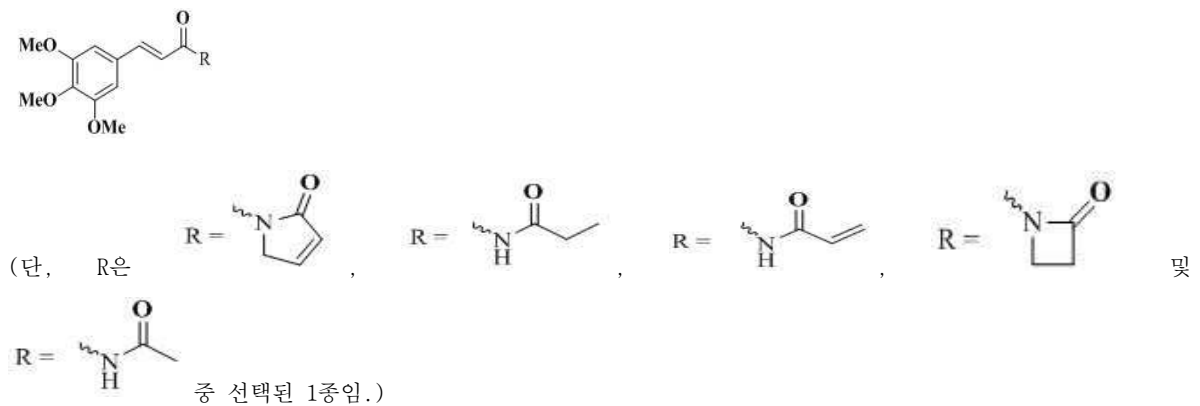
<화합물 11>



청구항 2

항염증 활성을 나타내며, 다음의 화학식으로 표시되는 피페론구민 유도체.

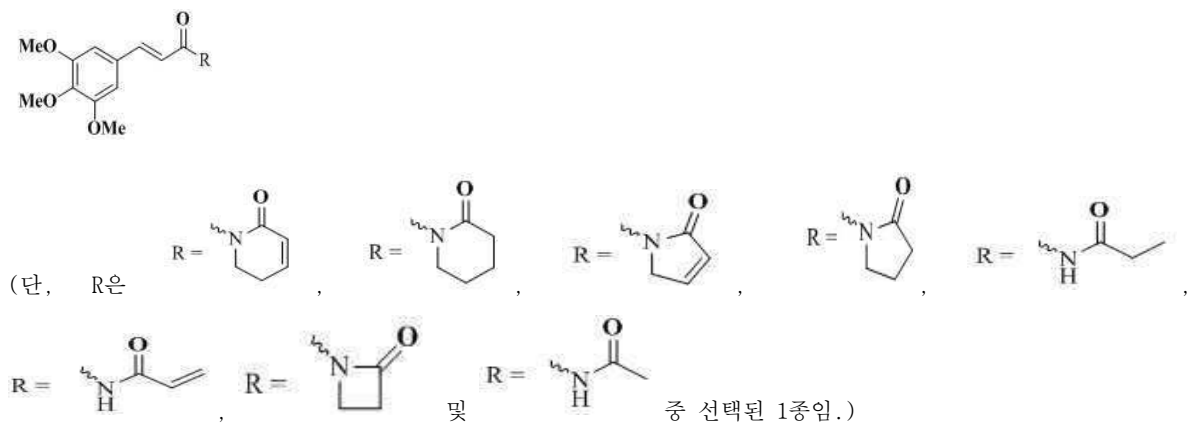
<화학식 13>



청구항 3

다음의 화학식으로 표시되는 피페론구민 및 피페론구민 유도체 중 1종 이상을 함유하는 항염증 약학 조성물.

<화학식 13>



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항염증 활성을 나타내는 피페론구민과 그 유도체 및 이들의 효과적인 합성방법, 그리고 피페론구민과 그 유도체를 함유하는 항염증 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증은 감염, 질병 및 조직 손상에 대한 신체의 자연스러운 반응이며, 면역반응의 총체적인 부분이다 ((a) Ruedi, K. B.; Christina, F.; Paul, N.; Michael, S.; Sterner-Kock, A.; Kock, M.; Putney, L.; Ferrick, D. A.; Hyde, D. M.; Love, R. B. *Inflammation* **2008**, *31*, 167. (b) Coussens, L. M.; Werb, Z. *Nature* **2002**, *420*, 860).

[0003] 염증 증상은 부종, 부분적인 붓어짐, 통증 및 때때로 동작 또는 기능의 손상을 포함한다 (Smith, W. L.; Marnett, L. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1083*, 1). 염증은 급성 또는 만성이 있고, 특이한 환경 하에서 급성 염증은 만성 염증이 될 수 있으며, 이는 발병의 원인이 될 수 있다. 프로스타글란딘 (prostaglandins; PG), 류코트라이엔 (leukotrienes; LT) 및 산화질소와 같은 다양한 분자들이 염증반응에 관여한다. 프로스타글란딘은 사이클로옥시제네이스 (COX, 주로 COX-1과 COX-2 두 가지 형태가 있다)에 의해 생성되고 류코트라이엔은 리포옥시제네이스 (LOX)에 의해 생성된다. 산화질소는 L-아르기닌으로부터 산화질소 합성효소 (nitric oxide synthases; NOS)에 의해 생성되는, 반감기가 짧고 지용성인 프리 라디칼이다. 산화질소 합성효소 중 유도 가능

한 아이소폼인 iNOS는 염증 손상에서 주로 다량의 산화질소 생성을 담당한다. 산화질소는 혈관확장, 신경전달, 혈소판 응집 저해, 면역 방어 및 세포내 신호전달에 관여한다. 그러나, 산화질소는 수퍼옥사이드 (O_2^-)와 반응하여 과산화질소 (peroxynitrite; $ONOO^-$)를 형성하는데, 이것은 강력한 산화제이다. 산화질소의 생물학적 활성은 많은 반응성 중간체들의 생성과 관련이 있지만, 이들 중 많은 활성질소종은 DNA를 손상시키거나 DNA 재생을 저해한다 (Poderoso, J. J.; Carreras, M. C.; Lisdero, C.; Riobo, N.; Schopfer, F.; Boveris, A. *Arch Biochem Biophys* **1996**, 328, 85). 따라서, iNOS를 저해함으로써 과량의 산화질소 생성을 제어하면 항염증 효과를 거둘 수 있다.

[0004]

비스테로이드성 항염증 약제 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) 사용은 급성 및 만성 염증성 질환과 관련된 증세들을 경감하기 위한 치료적 접근에서 통상적인 방법이다. 비스테로이드성 항염증 약제의 활성은 대부분 COX, LOX 및 iNOS를 저해하는 능력을 통하여 매개된다. 비록 비스테로이드성 항염증 약제가 효과적이긴 하지만, 위험하다고 알려져 있다. 이 약제들은 COX-1뿐만 아니라 항상 발현되는 효소 (housekeeping enzyme)인 COX-2도 저해할 수 있다. 문제는 COX-1 저해가 위 내벽 (stomach lining)의 재생 및 유지와 같은 기능을 "꺼 (switch off)" 버림으로써 다양한 정도의 장 건강 문제를 일으킬 수 있고, 가장 심각하게는 위장 출혈을 일으킬 수 있다는 점이다. 따라서, 최소의 부작용을 나타내는 좀 더 강력하고 선택적인 항염증제를 개발하려는 노력이 계속되고 있다.

[0005]

피페론구민(Piperlongumine; PL) (화합물 1)은 필발 (*piper longum* L.)의 다양한 부분에서 분리한, 생화학적으로 활성이 있는 다이하이드로피리돈 알칼로이드이다. 필발에는 피페론구민 외에도 피페린 (piperine), 실바틴 (sylvatin), 세사민 (sesamin) 및 다이에우데스민 피페론구민 (diaeudesmin piperlongumine)과 같은 성분들이 들어 있다 (1. Kumar, S.; Kamboj, J.; Suman; Sharma, S. J. *Acupunct. Meridian. Stud.* **2011**, 4, 134)). 필발은 인도의 아유르베다 의학에서 기침, 호흡기 감염, 위통 및 기타 질환 치료에 이용된다 (Bezerra, D. P.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O.; Saker-Neto, N.; Silveira, E. R.; Costa-Lotufo, L. V. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, 48, 453). 피페론구민의 화학 구조는 다이하이드로피리돈 (dihydropyridone)에 결합된 3,4,5-트리메톡시시나모일 부분 (3,4,5-trimethoxycinnamoyl moiety)을 갖고 있으며 특성이 잘 밝혀져 있다 (도 1). 피페론구민은 항균 및 살충 특성이 있는 것으로 보고된바 있다 ((a) Bernard, C. B.; Krishnamurthy, H. G.; Chauret, D.; Durst, T.; Philogene, B. J. R.; Sanchezvindas, P.; Hasbun, C.; Poveda, L.; Sanroman, L.; Arnason, J. T. *J. Chem. Ecol.* **1995**, 21, 801. (b) Reddy, P. S.; Jamil, K.; Madhusudhan, P.; Anjani, G.; Das, B. *Pharm. Biol.* **2001**, 39, 236. (c) Kumar, J. U.; Shankaraiah, G.; Kumar, R. S. C.; Pitke, V. V.; Rao, G. T.; Poornima, B.; Babu, K. S.; Sreedhar, A. S.; *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2013**, 15, 658). 뿐만 아니라, 피페론구민은 항암 ((a) Duh, C. -Y.; Wu, Y. -C.; Wang, S. -K. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1575. (b) Jyothi, D.; Vanathi, P.; Gowri, P. M.; Rao, V. R. S.; Rao, J. M.; Sreedhar, A. S. *Toxicol. In Vitro* **2009**, 23, 1085. (c) Ginzburg, S.; Golovine, K. V.; Makhov, P. B.; Uzzo, R. G.; Kutikov, A.; Kolenko, V. M. *Prostate* **2014**, 74, 177. (d) Han, S. -S.; Tompkins, V. S.; Son, D. -J.; Kamberos, N. L.; Stunz, L. L.; Halwani, A.; Bishop, G. A.; Janz, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 436, 660. (e) Jarvius, M.; Fryknas, M.; D'Arcy, P.; Sun, C.; Rickardson, L.; Gullbo, J.; Haglund, C.; Nygren, P.; Linder, S.; Larsson, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 431, 117. (f) Adams, D. J.; Dai, M.; Pellegrino, G.; Wagner, B. K.; Stern, A. M.; Shamji, A. F.; Schreiber, S. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, 109, 15115. (g) Wu, Y.; Min, X.; Zhuang, C.; Li, J.; Yu, Z.; Dong, G.; Yao, J.; Wang, S.; Liu, Y.; Wu, S.; Zhu, S.; Sheng, C.; Wei, Y.; Zhang, H.; Zhang, W.; Miao, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 82, 545), 항혈소판응집 ((a) Tsai, I. -L.; Lee, F. -P.; Wu, C. -C.; Duh, C. -Y.; Ishikawa, T.; Chen, J. -J.; Chen, Y. -C.; Seki, H.; Chen, I. -S. *Planta Med.* **2005**, 71, 535. (b) Park, B. -S.; Son, D. -J.; Park, Y. -H.; Kim, T. W.; Lee, S. -E. *Phytomedicine* **2007**, 14, 853. (c) Fontenele, J. B.; Leal, L. K. A. M.; Silveira, E. R.; Felix, F. H.; Felipe, C. F. B.; Viana, G. S. B. *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, 61, 511. (d) Son, D. J.; Kim, S. Y.; Han, S. S.; Kim, C. W.; Kumar, S.; Park, B. S.; Lee, S. E.; Yun, Y. P.; Jo, H.; Park, Y. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 427, 349. (e) Park, B. -S.; Son, D. -J.; Choi, W. -S.; Takeoka, G. R.; Han, S. O.; Kim, T. -W.; Lee, S. -E. *Phytother. Res.* **2008**, 22, 1195), 항곰팡이 ((a) Navickiene, H. M. D.; Alecio, A. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. D.; Young, M. C. M.; Cavaleiro, A. J.; Furlan, M. *Phytochemistry* **2000**, 55, 621. (b) da Silva, R. V.; Navickiene, H. M. D.; Kato, M. J.; Bolzani, V. D. S.; Meda, C. I.; Young, M. C. M.; Furlan, M. *Phytochemistry* **2002**, 59, 521)

및 향당뇨 (Rao, V. R.; Muthenna, P.; Shankaraiah, G.; Akileshwari, C.; Babu, K. H.; Suresh, G.; Babu, K. S.; Kumar, R. S. C.; Prasad, K. R.; Yadav, P. A.; Petrash, J. M.; Reddy, G. B.; Rao, J. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 344) 활성을 포함하는 주목할 만한 활성도 나타낸다. 최근의 연구에서 항암 가능성이 있는 화합물로서 피페론구민은 정상 세포를 공격하지 않고 13종의 인간 고형암세포 (흑색종, 방광암, 유방암 및 폐암을 포함)를 선택적으로 사멸할 수 있음이 보고된바 있다 (Raj, L.; Ide, T.; Gurkar, A. U.; Foley, M.; Schenone, M.; Li, X.; Tolliday, N. J.; Golab, T. R.; Carr, S. A.; Shamji, A. F.; Stern, A. M.; Mandinova, A.; Schreiber, S. L.; Lee, S. W. *Nature* **2011**, *475*, 231).

[0006] 피페론구민 합성방법 관련 논문 중 [*Phytother. Res.* **2008**, *22*, 1195]과 [*J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1449]의 두 논문은 DCC 또는 EDC 커플링을 이용하여 피페론구민을 합성하는 반응으로 커플링 수율이 67~76%이다.

[0007] 또한, [*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 15115], [*Tetrahedron* **2013**, *69*, 7559], [*Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 344] 및 [*Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 545]의 네 가지는 모두 합성의 주요 반응이 아실 클로라이드 (acyl chloride)를 만든 후 염기 (n-BuLi 또는 Et₃N)를 이용하여 다이하이드로피리딘-2(1H)-온 {dihydropyridin-2(1H)-one} (또는 α,β-불포화 δ-락탐이라고도 부름)과 반응하여 피페론구민 또는 그 유도체들을 합성하는 방법에 관한 것이며 (도 3), 이와 같은 커플링 반응의 수율은 19~88%이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기 피페론구민 합성방법들은 커플링 반응의 수율이 낮아 효과적으로 피페론구민을 합성할 수 없다는 문제점이 있다. 본 발명은 이를 극복하여 높은 수율로 피페론구민을 합성하는 방법을 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 아실 클로라이드를 만든 후 커플링 반응에 염기를 사용하지 않고 반응시킬 수 있는 조건을 찾아내어 커플링 수율을 최대 95%까지 높였고, 상업적으로 구하기 어려운 다이하이드로피리딘-2(1H)-온 (dihydropyridin-2(1H)-one) 대신 입수가 용이하고 저렴한 피페리딘-2-온 (piperidin-2-one)과 직접 커플링 반응을 시킨 후 이중결합을 도입하는 합성방법을 발명하였다.

[0010] 피페론구민과 그 유도체를 합성하는 본 발명의 방법은 도 2에 개시되어 있다. 합성은 3,4,5-트리메톡시시나믹산 (3,4,5-trimethoxycinnamic acid) (화합물 9)을 산 염화물 (acid chloride) (화합물 10)로 변환시킴으로써 시작된다 (도 2). 화합물 9를 옥살릴 클로라이드 (oxalyl chloride)로 처리하고 DMF를 촉매량 정도 가하여 산 염화물 (화합물 10)을 98% 수율로 얻었다. 화합물 10을 가지고 먼저 화합물 10과 피페리딘-2-온 간의 직접 반응으로 피페론구민 유도체인 화합물 2 합성을 시도하였고, 산물은 95% 수율로 얻었다. 화합물 2를 페닐셀레닐 클로라이드 (phenylselenenyl chloride)로 처리하여 α-페닐셀레노아미드 (화합물 11)를 얻고, 이것을 과산화수소와 산화반응시켜 피페론구민 (화합물 1)을 71% 수율로 얻었다.

[0011] 다음으로, 본 발명자들은 피롤로부터 1H-피롤-2(5H)-온 {1H-pyrrol-2(5H)-one} (화합물 12)을 합성 (Choudhury, A. R.; Mukherjee, S. *Org. Biomol. Chem.* 2012, *10*, 7313)한 다음 피페론구민 유도체인 화합물 3 제조에 이를 이용하였다. 화합물 12를 -78 °C에서 n-BuLi로 처리하고 화합물 10을 서서히 가하여 화합물 3을 얻었다. 피페론구민 유도체 4, 5 및 8은 화합물 10을 상업적으로 판매하는 피롤리딘-2-온 (pyrrolidin-2-one), 프로피온아마이드 (propionamide) 및 아세트아마이드와 직접 반응시켜 각각 64.3%, 33.1% 및 41.0% 수율로 얻었다. 마지막으로, 화합물 10과 아크릴아마이드를 반응하여 피페론구민 유도체인 화합물 7을 주요 산물로 얻었고, 화합물 6도 얻었다. 모든 산물의 화학구조는 스펙트럼 (¹H, ¹³C-NMR 및 MS) 데이터로부터 결정하였다. 제조한 피페론구민 (화합물 1)과 그 유도체들 (화합물 2~8)의 항염증 효과를 평가하기 위하여 리포폴리사카라이드(LPS)로 자극한 RAW264.7 대식세포에서 염증에 대한 필수 매개체 중 하나인 산화질소의 양을 측정하였다 (Kwon, K. H.; Murakami, A.; Hayashi, R.; Ohigashi, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *337*, 647).

본 발명은

가) 화합물 10으로 표시되는 3,4,5-트리메톡시시나믹산 (3,4,5-trimethoxycinnamic acid) 염화물을 톨루엔에 넣어 교반한 용액과 피페리딘-2-온 (piperidin-2-one)을 재환류하며 커플링 반응시키는 단계;

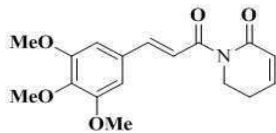
나) 상기 가)의 커플링 반응 완료 후 용매를 제거하는 단계;

다) 용매 제거 후 정제하는 단계를 거쳐 화합물 2로 표시되는 (E)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피페리딘-2-온 {(E)-1-(3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)acryloyl)piperidin-2-one}을 얻는 단계;

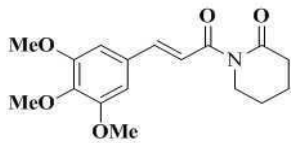
라) 상기 (E)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피페리딘-2-온을 페닐셀레네닐 클로라이드 (phenylselenenyl chloride) 및 LDA (lithium di-isopropyl amide)와 -50~-78 ℃에서 반응시켜 화합물 11로 표시되는 (E)-3-(페닐셀라닐)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피페리딘-2-온 {(E)-3-(Phenylselanyl)-1-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl)piperidin-2-one}을 얻는 단계; 및

마) 상기 화합물 11을 산화시켜 화합물 1로 표시되는 피페론구민을 합성하는 단계;를 포함하는 새로운 피페론구민 (pipelongumine) 합성방법을 제공한다.

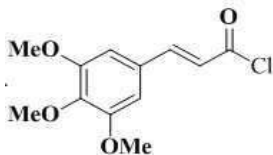
<화합물 1>



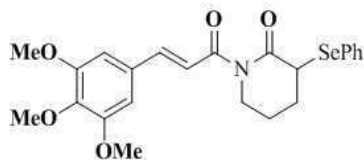
<화합물 2>



<화합물 10>

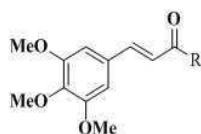


<화합물 11>

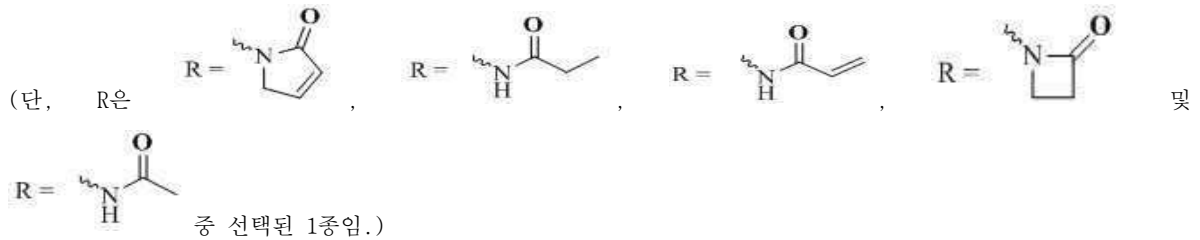


또한, 본 발명은 항염증 활성을 나타내며, 다음의 화학식으로 표시되는 새로운 피페론구민 유도체를 제공한다.

<화학식 13>



[0029]

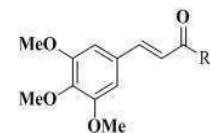


[0030]

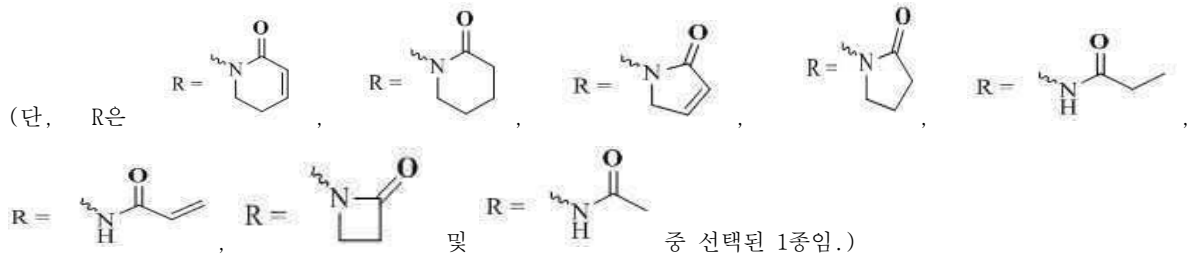
뿐만 아니라, 본 발명은 다음의 화학식으로 표시되는 피페론구민 및 피페론구민 유도체 중 1종 이상을 함유하는 항염증 약학 조성물을 제공한다.

[0031]

<화학식 13>



[0032]



[0034]

피페론구민 또는 그 유도체를 유효성분으로 함유하는 항염증 약학 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0035]

이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0036]

나아가, 본 발명은 상기 피페론구민 또는 그 유도체를 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 아토피, 피부소양증과 같은 피부염증을 비롯한 염증질환의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0037]

본 발명에서 정의되는 염증질환이란 아토피 피부염을 포함하는 피부염증질환, 신경교종세포 등 신경세포 염증질환, 척추염, 요도염, 방광염, 신염, 신우신염, 혈관염, 비염, 인후염, 편도염, 급성통증 또는 염증성 장질환 등이며, 바람직하게는 피부염증질환, 요도염, 방광염, 신염, 신우신염, 비염, 인후염, 편도염 또는 염증성 장질환이다.

발명의 효과

[0038]

본 발명의 방법에 의하면 생물학적 활성을 지닌 피페론구민과 그 유도체들을 높은 수율로 합성할 수 있다.

- [0039] 또한, 본 발명에 따르면, 항암활성이 알려져 있었던 피페론구민과 그 유도체들의 항염증 활성을 발견하여 피페론구민과 그 유도체들 중 1종 이상을 함유하는 항염증 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- [0040] 뿐만 아니라, 본 발명에 따르면 종래 알려지지 않았던 피페론구민 유도체들이 합성되었다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 피페론구민과 그 유도체들의 화학구조를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명에 따른 피페론구민과 그 유도체들의 합성방법을 나타내는 반응식이다.
- 도 3은 종래 방법에 따른 피페론구민 합성방법을 간단히 나타낸 반응식이다.
- 도 4는 본 발명의 방법에 따라 합성된 피페론구민과 그 유도체들의 IC₅₀ 값을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

- [0043] 모든 화학시약은 Sigma-Aldrich Chemicals에서 구입하였고, 다른 언급이 없는 경우 별도의 정제과정 없이 사용하였다. NMR 스펙트럼은 Varian Mercury에 300 MHz FT-NMR 및 ¹³C에 대해서는 75 MHz로 기록하였고, 화학적 이동 (δ)은 TMS에 대하여 ppm (parts per million)로 나타내었고, 커플링 상수 (J)는 Hz로 인용하였다. CDCl₃/CD₃OD는 용매 및 내부 스탠다드로 이용하였다. 질량 스펙트럼은 JMS-700 (JEOL) spectrometer를 이용하여 기록하였다. 녹는점은 MEL-TEMP II 장치에서 측정하고, 보정하지 않았다. TLC (Thin-layer chromatography)는 DC-Plastikfolien 60, F₂₅₄ (Merck, layer thickness 0.2 mm) 플라스틱을 덴 실리카 젤 플레이트 상에서 수행하였고, UV (254 nm)를 조사하거나 또는 *p*-아니스알데하이드 (*p*-anisaldehyde)로 염색하였다.

- [0044] **(*E*)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피페리딘-2-온** **{(*E*)-1-(3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)acryloyl)piperidin-2-one}** (화합물 2)

- [0045] 화합물 10의 교반한 톨루엔 용액 (0.513 g, 2.00 mmol) (8 mL)을 피페리딘-2-온 (piperidin-2-one) (0.218 g, 2.20 mmol)에 가한 후 혼합물을 18시간 동안 재환류하였다. 반응이 완료된 후 진공 상태에서 용매를 제거하고 화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane = 1/2)로 정제하여 백색 고체인 화합물 2 (0.607 g, 95%)를 얻었다.

- [0046] R_f = 0.31 (EtOAc/hexane = 1/1); mp 128-130 °C.

- [0047] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.34 (1H, d, J = 15.6 Hz), 6.77 (2H, s), 3.88 (6H, s), 3.87 (3H, s), 3.80 (2H, t, J = 5.4 Hz), 2.61 (2H, t, J = 5.4 Hz), 1.87-1.91 (4H, m); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 174.1, 169.8, 153.4, 143.7, 130.8, 121.7, 105.6, 105.3, 56.6, 56.2, 45.1, 35.4, 22.9, 21.1; EI-MS m/z 319 (M⁺), 276, 221 (base), 190.

- [0048] **(*E*)-3-(페닐셀라닐)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피페리딘-2-온** **{(*E*)-3-(Phenylselanyl)-1-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl)piperidin-2-one}** (화합물 11)

- [0049] LDA (0.68 mL, 1.22 mmol; 1.8 M THF, EtPh 및 헵탄 용매에 녹임)를 THF (5 mL)에 교반하여 녹인 화합물 2 (0.3 g, 0.94 mmol)에 -50 °C에서 한 방울씩 가하였다. 45분간 교반한 다음 -78 °C로 냉각하고 페닐셀레닐 클로라이드 (phenylselenenyl chloride) (0.198 g, 1.03 mmol) THF (5 mL) 용액에 서서히 가하였다. 반응 혼합물은

-78 °C에서 4.5시간 동안 교반하고 반응 진행은 TLC로 모니터하였다. 반응 완료 후 H₂O (5 mL)를 가하여 0 °C에서 15분간 교반한 다음 CH₂Cl₂ (2 x 50 mL)로 추출하였다. 조합된 유기물층은 식염수 (2 x 50 mL)로 세척한 후 무수 Na₂SO₄로 건조하고 진공농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane = 1/4)로 정제하여 백색 고체상의 화합물 11 (0.12 g, 27%)을 얻었다.

[0050] R_f = 0.55 (EtOAc/hexane = 1/1); mp 127-129 °C.

[0051] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.65-7.69 (2H, m), 7.62 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.22-7.46 (3H, m), 7.09 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 6.73 (2H, s), 3.90 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.67-3.76 (2H, m), 1.84-2.50 (4H, m); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 169.2, 153.0, 143.2, 136.6, 135.2, 130.4, 129.6, 129.0, 128.5, 120.4, 105.3, 60.9, 56.1, 44.7, 44.4, 28.6, 20.8.

[0052] **(*E*)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)-5,6-다이하이드로피리딘-2(1H)-온** {(*E*)-1-(3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)acryloyl)-5,6-dihydropyridin-2(1H)-one} (피페론구민) (화합물 1)

[0053] 화합물 11 (0.026 g, 0.055 mmol)을 교반한 THF (0.5 mL) 용액을 0 °C에서 서서히 H₂O₂ (0.014 mL, 0.154 mmol)에 가하였다. 15분 동안 교반한 후 실온이 되도록 방치한 다음 30분 더 교반하였다. 반응 완료 후 포화 NaHCO₃ (2 mL) 용액을 가한 다음 CH₂Cl₂ (2 x 20 mL)로 추출하였다. 조합된 유기물층을 식염수 (2 x 20 mL)로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조한 다음 진공농축하였다. 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane = 1/3)로 정제하여 백색 고체상의 화합물 11 (0.017 g, 71%)을 얻었다.

[0054] R_f = 0.37 (EtOAc/hexane = 1/1); mp 122-123 °C.

[0055] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.40 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 6.91-6.97 (1H, m), 6.79 (2H, s), 6.04 (1H, dt, *J* = 9.9, 1.8 Hz), 4.04 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 3.89 (6H, s), 3.88 (3H, s); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.0, 166.0, 153.5, 145.7, 144.0, 140.1, 130.8, 126.0, 121.3, 105.7, 61.3, 56.5, 42.0, 25.2; EI-MS *m/z* 317 (M⁺, base), 274, 221, 177.

[0056] **(*E*)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)-1H-피롤-2(5H)-온** {(*E*)-1-(3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)acryloyl)-1H-pyrrol-2(5H)-one} (화합물 3)

[0057] -50 °C에서 화합물 12 (0.194 g, 2.34 mmol)를 교반한 THF (3 mL) 용액에 LDA (1.17 mL, 2.34 mmol, 2.0 M 용액)를 한 방울씩 가하고 45분간 교반하였다. 화합물 10 (0.500 g, 1.95 mmol) THF (3 mL) 용액을 -50 °C에서 상기 혼합물에 서서히 가하고 10시간 반 동안 같은 온도에서 교반하였다. 반응 완료 후 과량의 염기는 1N HCl을 넣어 중화했고, 그 후 EtOAc (2 x 50 mL)로 추출하였다. 조합된 유기물층은 식염수 (2 x 50 mL)로 세척하고, 무수 Na₂SO₄로 건조하고 진공농축하였다. 화합물은 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane = 1/1)로 1차 정제하였고, 컬럼 크로마토그래피 (acetone/hexane = 1/1)로 2차 정제하여 연한 황색 고체인 화합물 3 (0.66 mg, 11.2%)을 얻었다.

[0058] R_f = 0.24 (EtOAc/hexane = 1/1); mp 116-118 °C.

[0059] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 7.33-7.36 (1H, dt, *J* = 6.0, 1.8 Hz), 6.20 (1H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.53 (2H, t, *J* = 1.8 Hz), 3.91 (6H, s), 3.88 (3H, s); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 165.2, 153.5, 147.0, 146.2, 140.5, 128.0, 118.0, 61.3, 56.5, 51.4; EI-MS *m/z* 303 (M⁺, base), 260, 221, 177.

[0060] **(*E*)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)피롤리딘-2-온** **{{(*E*)-1-(3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)acryloyl)pyrrolidin-2-one}** (화합물 4)

[0061] 화합물 2 제조 절차 이후, 화합물 10과 피롤리딘-2-온 (1.5 eq)을 14.5 h 동안 커플링 반응 후 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane = 1/1) 하여 백색 고체상 화합물 4 (64.3%)를 얻었다.

[0062] R_f = 0.22 (EtOAc/hexane = 1/1); mp 126-128 °C.

[0063] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.74 (1H, d, J = 15.6 Hz), 6.82 (2H, s), 3.93 (2H, t, J = 7.2 Hz), 3.90 (6H, s), 3.88 (3H, s), 2.66 (2H, t, J = 8.1 Hz), 2.08 (2H, quint, J = 6.8 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 175.9, 166.4, 153.5, 145.8, 140.4, 130.6, 118.4, 105.9, 61.3, 56.5, 46.2, 34.4, 17.6; EI-MS m/z 305 (M^+ , base), 262, 221, 177.

[0064] **(*E*)-*N*-프로피오닐-3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴아마이드** **{{(*E*)-*N*-Propionyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acrylamide}** (화합물 5)

[0065] 화합물 2 제조 절차 이후 화합물 10과 프로피온아마이드 (1.5 eq)를 14시간 동안 커플링한 후 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane = 1/4 - 1/1)로 정제하여 백색 고체상 화합물 5 (64.3%)를 얻었다.

[0066] R_f = 0.38 (EtOAc/hexane = 1/1); mp 117-119 °C.

[0067] ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.66 (1H, d, J = 15.6 Hz), 6.91 (2H, s), 6.84 (1H, d, J = 15.6 Hz), 3.87 (6H, s), 3.86 (3H, s), 2.62 (2H, q, J = 7.3 Hz), 1.14 (3H, t, J = 7.3 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 175.8, 165.8, 153.5, 144.9, 130.4, 119.1, 117.6, 105.4, 60.1, 55.6, 30.5, 7.9; EI-MS m/z 293 (M^+ , base), 222, 190, 163.

[0068] **(*E*)-*N*-아크릴로일-3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴아마이드** **{{(*E*)-*N*-Acryloyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acrylamide}** (화합물 6)

[0069] 화합물 2 제조 절차 이후 화합물 10과 아크릴아마이드 (1 eq) THF 용액을 19.5 h 동안 아크릴아마이드 (1 eq)와 커플링한 다음 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane = 1/5)로 정제하여 백색 고체상의 화합물 6 (4.4 %)과 연황색 고체상의 화합물 7 (73.0%)을 얻었다.

[0070] R_f = 0.77 (EtOAc/hexane = 1/1); mp 157-159 °C.

[0071] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.62 (1H, br s), 7.78 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.28 (1H, d, J = 15.6 Hz), 6.82 (2H, s); 6.70 (1H, dd, J = 17.1, 10.5 Hz), 6.54 (1H, dd, J = 17.4, 1.5 Hz), 5.95 (1H, dd, J = 10.5, 1.5 Hz), 3.90 (6H, s), 3.89 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 167.2, 165.8, 153.6, 146.6, 140.7, 131.5, 130.5, 130.0, 118.8, 105.9, 61.3, 56.5; EI-MS m/z 291 (M^+), 260, 222, 194 (base).

[0072] **(*E*)-1-(3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴로일)아제티딘-2-온** **{{(*E*)-1-(3-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)acryloyl)azetidin-2-one}** (화합물 7)

[0073] Yield: 73.0%; white solid; R_f = 0.43 (EtOAc/hexane = 1/1); mp 60-64 °C.

[0074] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (1H, d, J = 15.6 Hz), 6.75 (2H, s), 6.34 (1H, d, J = 15.6 Hz), 4.24 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.60 (2H, t, J = 6.0 Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 178.6, 167.0, 153.6, 145.0, 140.3, 130.0, 117.4, 105.4, 61.3, 56.5, 44.9, 29.6; EI-MS m/z 291 (M^+), 221 (base), 194, 163.

- [0075] (*E*)-*N*-아세틸-3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴아마이드 {(*E*)-*N*-Acetyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acrylamide} (화합물 8)
- [0076] 화합물 2 제조 절차 이후 화합물 10을 아세트아마이드 (1.5 eq)와 DMF 용매 내에서 14시간 동안 커플링하고 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc/hexane = 1/1)로 정제하여 연황색 고체상의 화합물 8 (64.3%)을 얻었다.
- [0077] $R_f = 0.26$ (EtOAc/hexane = 1/1); mp 85-87 °C
- [0078] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.72 (1H, br s), 7.71 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 6.80 (2H, s), 6.36 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 3.89 (9H, s), 2.47 (3H, s); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 173.1, 165.9, 153.6, 146.2, 140.8, 129.8, 118.7, 106.0, 61.3, 56.5, 25.6; EI-MS m/z 279 (M^+ , base), 251, 222, 177.
- [0079] 항염증 활성: LPS로 유도된 대식세포에 의한 산화질소 생성에 대해 피페론구민 (화합물 1)과 그 유도체들 (화합물 2-8)의 효과를 모니터하였다 (표 1). 리포폴리사카라이드 (LPS)로 처리한 RAW 264.7 세포는 iNOS 활성화를 통하여 산화질소 생성을 자극하는 데 이용하였다. 본 발명에서 제조된 피페로그 (piperlogs) 중에서 네 개의 화합물 (즉, 피페론구민, 화합물 2, 3 및 6)만이 10 μM 에서 현저한 활성을 나타내었다. 여덟 개의 화합물 중 최대의 저해활성은 피페론구민 (91.3%)이 나타내었고, 그 다음은 화합물 3 (64.8%), 화합물 2 (46.0%) 그리고 화합물 6 (41.2%) 순이었다. 10 μM 에서 세포생존을 분석 결과 화합물 2, 3, 4, 5 및 8은 표 2와 같이 세포독성을 나타내지 않았다. 이 화합물들 (화합물 1-8)의 IC_{50} 값은 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어를 이용하여 평가하였고, 각각 2.68, 13.92, 6.01, 80.22, 64.23, 17.25, 63.85 및 340.7 μM 였다 (도 4). 상기 결과로부터 본 발명자들은 화합물 3과 같이 최소 3개의 탄소 사슬 길이며 α, β -불포화된 시나모일 기에 연결된 아마이드/락탐 부위가 세포독성 없이 강력한 항염증 활성을 나타내는 것으로 결론지을 수 있다.
- [0080] 결론적으로, 본 발명은 3,4,5-트리메톡시시나믹산의 산 염화물과 다양한 아마이드/락탐 간의 직접적인 반응으로 피페론구민 (화합물 1)과 그 유도체 (화합물 2-8)를 합성할 수 있음을 밝혔다. 또한, 이 화합물들의 항염증 활성을 LPS-로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 평가하였다. 그 결과 최대 저해활성은 피페론구민 (91.3%)이 나타내었으나 세포독성이 있는 반면, α, β -불포화 부티로락탐 부위를 가진 화합물 3은 세포독성을 나타내지 않으면서 64.8%의 저해효과를 나타내었다. 이 연구 결과, 최소 3개의 탄소 사슬 길이의 α, β -불포화된 시나모일 기에 연결된 아마이드/락탐 부위가 세포독성 없이 강력한 항염증 활성을 나타내는 것으로 나타났다.

표 1

Compound	NO Production (% inhibition)	
	1 μ M	10 μ M
Medium(MED)	1.7 $\pm$ 1.20 (98.3)***	1.7 $\pm$ 1.20 (98.3)***
1	88.7 $\pm$ 1.53 (11.3)***	8.7 $\pm$ 0.62 (91.3)***
2	99.1 $\pm$ 1.58 (0.9)	54.0 $\pm$ 10.96 (46.0)***
3	95.0 $\pm$ 0.34 (5.0)**	35.2 $\pm$ 0.77 (64.8)***
4	99.2 $\pm$ 0.93 (0.8)	72.2 $\pm$ 0.84 (27.8)***
5	101.4 $\pm$ 2.68 (-1.4)	83.9 $\pm$ 5.71 (16.1)
6	96.6 $\pm$ 1.62 (0.4)	58.8 $\pm$ 0.88 (41.2)***
7	98.7 $\pm$ 0.92 (1.3)	78.2 $\pm$ 1.09 (21.8)***
8	101.0 $\pm$ 2.02 (-1.0)	83.8 $\pm$ 1.84 (16.2)**
LPS	100.0 $\pm$ 0.58 (0.0)	100.0 $\pm$ 0.58 (0.0)

The results are reported as mean value $\pm$ SEM for n=3. Statistical significance is based on the difference when compared with LPS-treated groups (** P < 0.01, *** P < 0.001).
%Inhibition is based on LPS as shown in parenthesis.

[0081]

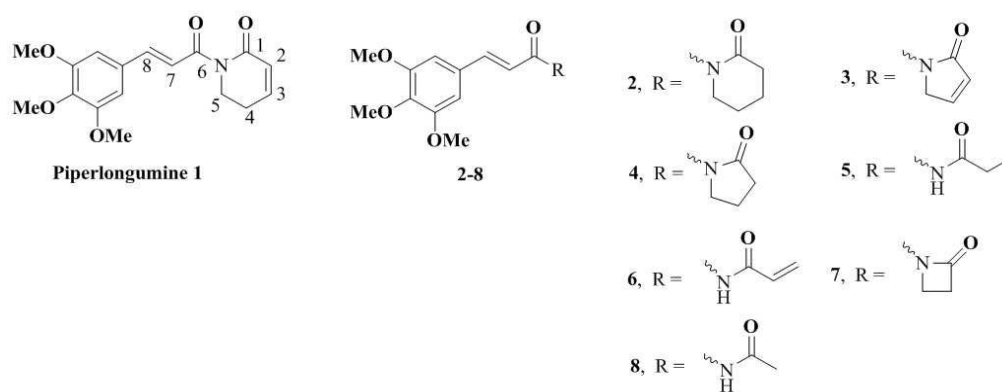
표 2

Compound	Proliferation	
	1 μ M	10 μ M
Medium(MED)	100.1 $\pm$ 4.45	100.1 $\pm$ 4.45
1	115.4 $\pm$ 3.10	76.6 $\pm$ 0.79**
2	107.1 $\pm$ 4.06	101.3 $\pm$ 2.10
3	100.5 $\pm$ 3.05	113.4 $\pm$ 2.02
4	104.6 $\pm$ 1.60	101.5 $\pm$ 8.09
5	97.1 $\pm$ 6.56	102.6 $\pm$ 6.36
6	102.7 $\pm$ 1.35	83.2 $\pm$ 1.82*
7	97.3 $\pm$ 4.84	92.1 $\pm$ 8.35
8	103.7 $\pm$ 5.81	103.6 $\pm$ 2.50

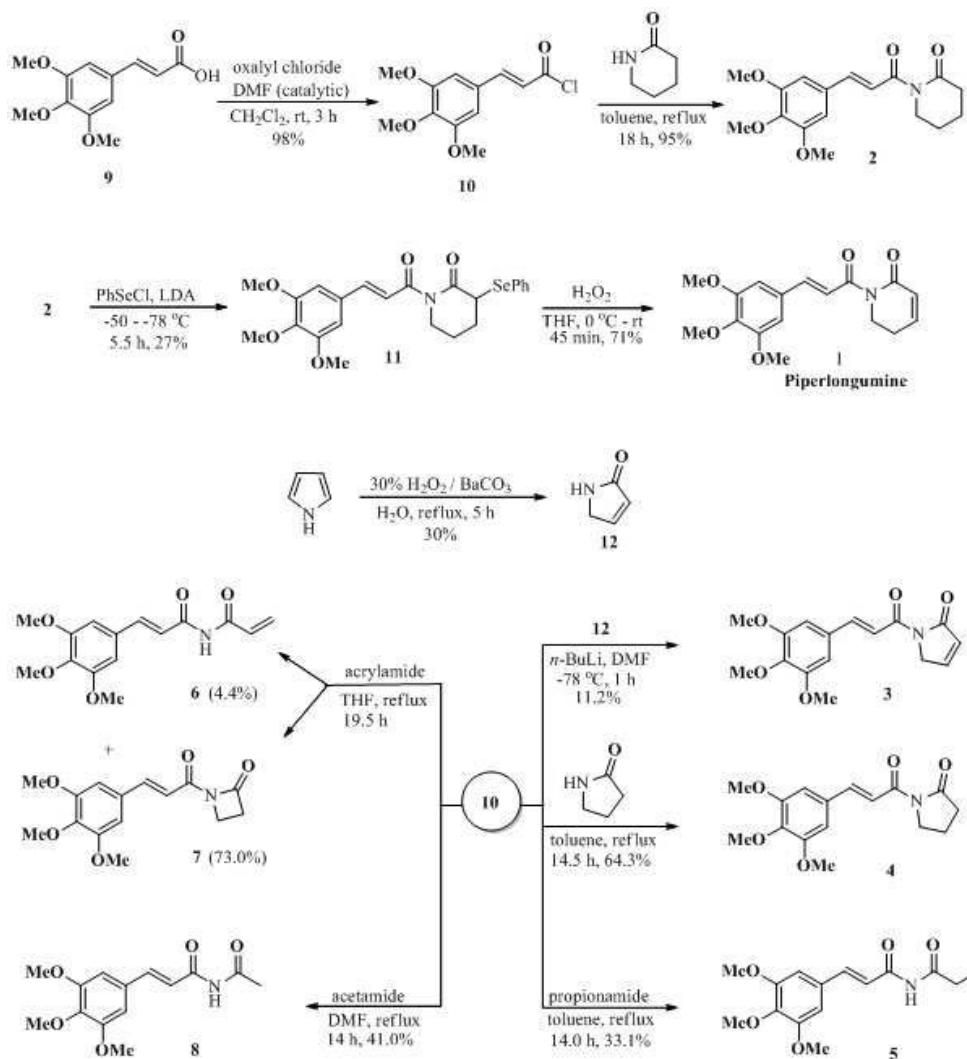
The results are reported as mean value $\pm$ SEM for n=3. Statistical significance is based on the difference when compared with Medium groups (* P < 0.05, ** P < 0.01).

도면

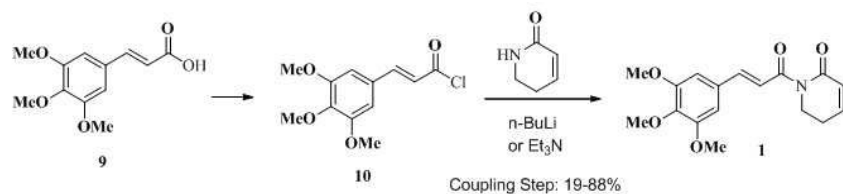
도면1



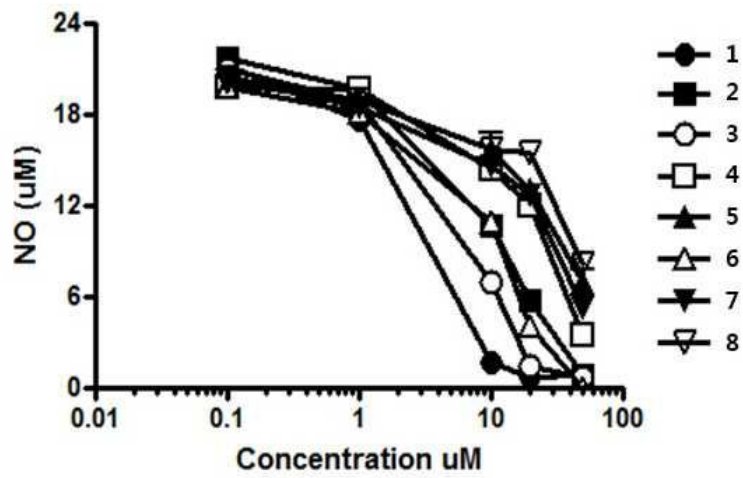
도면2



도면3



도면4



IC₅₀ Values 1: 2.680 μM, 2: 13.92 μM, 3: 6.012 μM, 4: 80.22 μM, 5: 64.23 μM, 6: 17.25 μM, 7: 63.85 μM, 8: 340.7 μM