(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0132168
(43) 공개일자 2013년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 493/04 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0056348
(22) 출원일자 2012년05월25일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
배현수
서울시 서초구 잠원동 76번지 한신시티 21 오피스텔 218호
정진현
서울시 동대문구 이문동 삼성래미안 202동 101호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

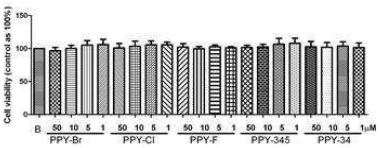
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 피라노피란디온 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 알레르기성 염증 반응 유래 질환 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 피라노피란디온 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 알레르기성 염증 반응 유래 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 피라노피란디온 화합물은 세포에 독성을 나타내지 않으면서도, 용량에 비례해서 에오탁신 생산을 억제하고, 천식치료 효과를 나타내므로, 보다 효과적인 천식치료제의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최승일

서울시 강남구 대치1동 개포1차우성아파트 2동 1405호

정환석

서울시 동대문구 이문동 현대아파트 102동 1307호

김영은

경기도 용인시 처인구 유방동 인정프린스아파트 2003동 105호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

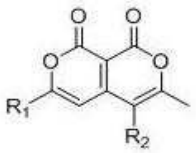
과제고유번호	20110006225
부처명	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터육성사업(기초의과학분야)
연구과제명	면역조절 및 항암제 부작용 억제 효능 한방소재 개발
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교 산합협력단
연구기간	2007.05.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 피라노피란디온 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



상기 식에서,

R_1은 할로겐으로 치환된 페닐기 또는 2 내지 3개의 메톡시기로 치환된 페닐기이고; 및,

R_2는 아세틸기이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 4-아세틸-3-메틸-6-(3,4-디메톡시페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온, 4-아세틸-3-메틸-6-(3,4,5-트라이메톡시페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온, 4-아세틸-3-메틸-6-(2-브롬화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온, 4-아세틸-3-메틸-6-(2-염화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온, 4-아세틸-3-메틸-6-(2-불화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 피라노피란디온 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

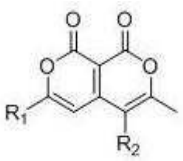
하기 단계를 포함하는 제1항의 피라노피란디온 화합물의 제조방법:

1) 화학식 2의 화합물을 THF(tetrahydrofuran)의 존재하에 NaH 및 CS_2와 순차적으로 반응시켜 화학식 3의 화합물을 수득하는 단계;

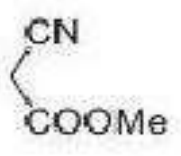
2) 상기 수득한 화학식 3의 화합물을 무수 DMF(dimethylformamide)의 존재하에 디옥시벤조인 및 KOH와 반응시켜 화학식 4의 화합물을 수득하는 단계; 및

3) 상기 수득한 화학식 4의 화합물을 무수 DMF의 존재하에 아릴 아세톤 및 수산화칼륨과 반응시키고, HCl로 중화시켜 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계:

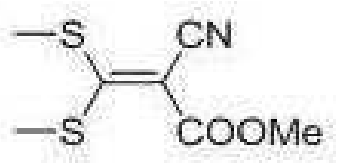
[화학식 1]



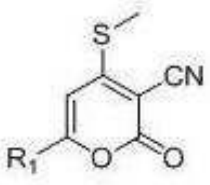
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



상기 식에서,

R_1은 할로겐으로 치환된 페닐기 또는 2 내지 3개의 메톡시기로 치환된 페닐기이다.

청구항 4

제1항의 피라노피란디온 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 알레르기성 염증 반응 유래 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은 기관지천식, 고초열, 혈관운동신경성 비염, 비후성 비염, 알레르기성 비염, 알레르기성 기관지염, 뢰플러 증후군, 식이성 알레르기성 위염, 알레르기성 설사, 알레르기성 구내염, 장성자반병, 결절성 동맥주위염, 폐색성 동맥내막염, 협심증, 심내막염, 두드러기, 퀸케 부종, 혈관신경성 부종, 결절성 홍반, 자반병, 플릭텐, 교감성 안염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 각막염, 미만성 사구체신염, 편두통 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은 기관지천식, 아토피 또는 알레르기성 비염인 것인 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 피라노피란디온 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 포함하

는 알레르기성 염증 반응 유래 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 주변의 위험 요소들에의 노출은 알레르기성 천식, 아토피성 피부염 및 알레르기성 비염과 같은 알레르기성 질환의 원인이 되지만, 이러한 노출을 피하는 것은 현실적으로 매우 어려운 일이므로, 알레르기가 발생하는 기작과 이에 대한 치료제들을 개발하거나 증상들을 예방하기 위하여, 제도적이고 산업적인 연구들이 수행되고 있다.

[0003] 천식이란 폐 속에 있는 기관지가 아주 예민해진 상태로, 때때로 기관지가 좁아져서 숨이 차고 기침을 심하게 하는 증상을 수반하는 질병을 의미하는데, 대체로 기관지에서 발생하는 알레르기성 염증 반응 때문에 기관자 점막이 비후되고 기관지 근육이 경련을 유발하면서, 기관지를 통하는 공기의 유통이 순간적으로 또는 간헐적으로 단절되면서 숨이 차는 증상이 수반되는 것으로 알려져 있다.

[0004] 천식의 원인이 되는 염증반응에는 호산구(eosinophil)가 중요한 역할을 하는데, 정상인에서는 기도 주위의 혈액내에 존재한다. 알레르겐에 의하여 알레르기 반응이 유발되면, 호흡기 상피(respiratory epithelium) 내에서 호산구 특이적인 케모카인(chemokines)인 에오탁신(Eotaxin)의 발현이 증가하고, 발현된 에오탁신이 기도내로 분비되며, 상기 에오탁신은 혈액내에 존재하는 호산구를 기도로 이동시키고, 기도로 이동된 호산구는 혈관 내피세포에 부착한 다음, 염증반응을 유발시키는 것으로 알려져있다. 이때, 에오탁신의 분비는 미토겐-활성 단백질(MAP) 키나아제(MAPK)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 호산구의 기능 및/또는 침입을 저해할 수 있는 천연물질 또는 합성물질들은 모두 천식을 비롯한 다양한 알레르기성 질환의 치료제로 사용될 가능성이 있기 때문에, 이에 대한 연구가 활발히 진행되어 다양한 알레르기성 질환 치료제가 개발되었다.

[0005] 이러한 연구결과 개발된 다양한 다양한 알레르기성 질환 치료제 중의 하나인 피라노피란디온(Pyranopyrandione, PPY)은 순비기나무(Vitex rotundifolia)에서 분리된 천식 치료제이다. 상기 PPY는 항-염증 효과를 나타내고, 난백알부민-민감성 알레르기 천식(ovalbumin-sensitized allergic asthma)의 쥐 모델에서 폐 호산성 염증의 발달을 저해함으로써 항-천식 효과를 나타낸다(특허공개 제2010-0134305호).

[0006] 본 발명자들은 상기 피라노피란디온의 천식치료효과를 향상시키기 위하여, 상기 화합물의 특정한 부위를 변형시켜서, 신규한 피라노피란디온 화합물을 합성하고, 이의 천식치료제로서의 효과를 검증한 결과, 상기 합성된 유도체 화합물이 종래의 피라노피란디온보다도 우수한 천식치료 효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 신규한 피라노피란디온 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공하는 것이다.

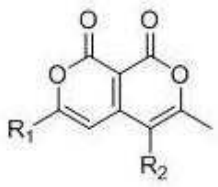
[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물 또는 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 염증 반응 유래 질환 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태에 의하면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 피라노피란디온 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다.

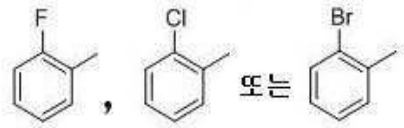
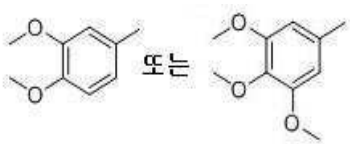
화학식 1

[0011] 

[0012] 상기 식에서,

[0013] R_1은 할로겐으로 치환된 페닐기 또는 2 내지 3개의 메톡시기로 치환된 페닐기이고; 및,

[0014] R_2는 아세틸기이다.

[0015] 바람직하게는, 상기 화학식 1에서 R_1은 2번 위치에 할로겐(F, Cl, Br 등)이 치환된 페닐기 () 또는 3번 및 4번 위치 또는 3번, 4번 및 5번 위치에 메톡시기가 각각 치환된 페닐기()가 될 수 있다.

[0016] 본 발명의 화학식 1의 피라노피란디온 화합물 중 바람직한 화합물은 구체적으로 하기와 같다:

[0017] 4-아세틸-3-메틸-6-(3,4-디메톡시페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(3,4-dimethoxyphenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione),

[0018] 4-아세틸-3-메틸-6-(3,4,5-트라이메톡시페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione),

[0019] 4-아세틸-3-메틸-6-(2-브롬화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(2-bromophenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione),

[0020] 4-아세틸-3-메틸-6-(2-염화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(2-chlorophenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione),

[0021] 4-아세틸-3-메틸-6-(2-불화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(2-fluorophenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione).

[0022] 본 발명의 화합물들은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.

[0023] 약학적으로 허용가능한 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다.

[0024] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산 (propionic acid),

젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

[0025] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 제조할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0026] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식 1의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0027] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1의 피라노피란디온 화합물의 제조방법을 제공한다.

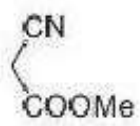
[0028] 본 발명의 바람직한 일 양태로서, 상기 화학식 1의 피리돈 화합물의 제조방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0029] 1) 화학식 2의 화합물을 THF(tetrahydrofuran)의 존재하에 NaH 및 CS_2와 순차적으로 반응시켜 화학식 3의 화합물을 수득하는 단계;

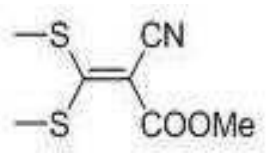
[0030] 2) 상기 수득한 화학식 3의 화합물을 무수 DMF(dimethylformamide)의 존재하에 디옥시벤조인 및 KOH와 반응시켜 화학식 4의 화합물을 수득하는 단계; 및

[0031] 3) 상기 수득한 화학식 4의 화합물을 무수 DMF의 존재하에 아릴 아세톤 및 수산화칼륨과 반응시키고, HCl로 중화시켜 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계.

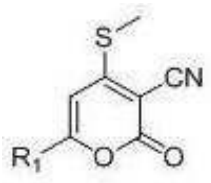
화학식 2

[0032] 

화학식 3

[0033] 

화학식 4

[0034] 

[0035] 상기 식에서,

[0036] R_1은 할로겐으로 치환된 페닐기 또는 2 내지 3개의 메톡시기로 치환된 페닐기이다.

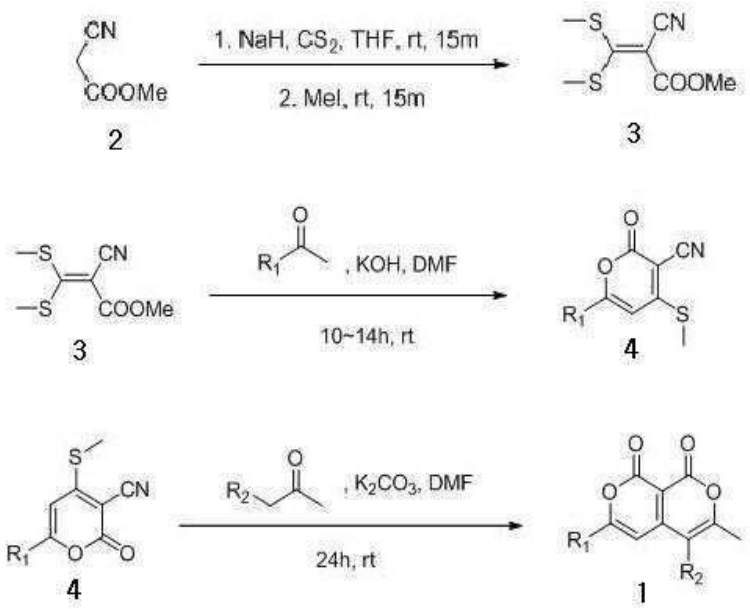
[0037] 본 발명의 화학식 1의 피라노피란디온 화합물의 제조방법에 대해 하기 반응식 1을 참조하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0038] 1) 화학식 2의 화합물인 메틸 사이아노아세테이트(methyl cyanoacetate, 35.2㎖, 0.4mol)를 냉각한 소디움 하이드라이드(10.08g, 60% oil suspension, 0.42mol)에 THF에서 한방울씩 15분간 가하여 반응고상태인 백색물질을 생성시키고, 이를 15분간 강하게 교반하였다. 상기 반응액에 카본 다이설파이드(25.33㎖, 0.4mol)을 한방울씩 넣어주고 20℃ 이하에서 혼합하여, 노란색 반응액을 수득하였다. 상기 노란색 반응액을 교반하면서 메틸 아이오다이드(62.55㎖, 1mol)를 30분간 한방울씩 가하였다. 이어, 15분간 상온에서 교반한 다음, 감압시켜서 THF를 제거하였다. 상기 반응액에 소량의 잘게 부순 얼음을 가하여 반응하지 않은 NaH를 제거하고, 잔류물을 냉각된 물에 넣고 교반하여 백색결정을 생성시켰다. 상기 백색결정을 여과하여 수득하고, 냉각수로 세척한 다음, 건조시키고, 에틸 아세테이트/핵산(1:4)으로 재결정화하여, 백색 바늘형상의 화학식 3의 화합물(72.54g, 89.33%)을 수득하였다:

[0039] 2) 화학식 3의 화합물(10mmol), 디옥시벤조인(11mmol) 및 분말화된 수산화칼륨(12mmol)의 혼합물에 무수 DMF(50㎖)를 가하고, 상온에서 10-14시간 동안 교반하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 반응물에 얼음물을 가하고 교반하여 침전물을 형성시켰다. 상기 반응물을 여과하여 침전물을 수득하고, 상기 수득한 침전물을 클로로포름으로 용해시킨 다음, 실리카겔 컬럼에 적용하여 정제함으로써 하기의 화합물을 포함하는 화학식 4의 화합물을 수득하였다.

[0040] 3) 화합식 4의 화합물(1mmol), 아릴 아세톤(1mmol) 및 수산화칼륨(84 mg, 1.5mmol)의 혼합물에 무수 DMF(10㎖)를 가하고, 상온에서 24시간 동안 교반하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 분쇄된 얼음에 안치시켜서 냉각시키면서 교반한 다음, 10% HCl을 가하여 중화시킴으로써, 침전물을 형성시켰다. 상기 반응물을 여과하여 침전물을 수득하고, 상기 수득한 침전물을 0.5% 및 5% 에틸 아세테이트를 포함하는 헥산으로 용해시킨 다음, 실리카겔 컬럼에 적용하여 정제함으로써 하기의 화합물을 포함하는 화학식 1의 화합물을 제조하였다.

[0041] [반응식 1]



[0042]

[0043] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1의 피라노피란디온 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 알레르기성 염증 반응 유래 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은, 이에 제한되는 것은 아니나, 면역세포의 이동 또는 침착과 관련된 질환, 케모카인의 분비와 관련된 질환, ERK1/2 신호전달 경로의 활성과 관련된 질환, 사이토카인의 분비와 관련된 질환 등이 될 수 있는데, 바람직하게는 호산구의 이동 또는 침착과 관련된 질환, 에오탁신의 분비와 관련된 질환, TNF-α, IL-4, IL-1β 등의 분비와 관련된 질환 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 호흡기계 질환(기관지천식, 고초열, 혈관운동신경성 비염, 비후성 비염, 알레르기성 비염, 알레르기성 기관지염, 뢰플러 증후군 등), 소화기계 질환(식이성 알레르기성 위염, 알레르기성 설사, 알레르기성 구내염, 장성자반병 등), 순환기계 질환(결절성 동맥주위염, 폐색성 동맥내막염, 협심증, 심내막염 등), 피부질환(두드러기, 아토피, 퀸케 부종, 혈관신경성 부종, 결절성 홍반, 자반병 등), 안구질환(플릭텐, 교감성 안염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 각막염 등), 미만성 사구체신염이나 편두통 등이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 기관지천식, 아토피, 알레르기성 비염 등이 될 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 화합물은 종래의 피라노피란디온 화합물 보다도 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 천식을 비롯한 다양한 알레르기성 염증 반응 유래 질환 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 피라노피란디온보다 천식치료제로서 더 효과적일거라고 예상되는 정해진 부위를 변형시킨 피라노피란디온 유도체를 합성하였다. 케텐 디티오아세탈(Ketene dithioacetal)은 상업적으로 입수가능한 이황화탄소(carbon disulfide), 아이오딘화메틸(methyl iodide), 메틸시아노아세테이드(methylcyanoacetate) 및 수소화나트륨(sodium hydride)으로부터 제조되었다. 케텐 디티오아세탈을 활성화된 아세토페논(acetophenone)과 반응시켜서, 치환된 2H-피란-2-one 화합물(2H-pyran-2-ones)을 제조하였다. 치환된 2H-피란-2-one 화합물을 활성화된 페닐아세톤과 반응시켜서 피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dion) 유도체로 변환시켰다. 피라노피란디온 유도체의 항-천식 반응 기작을 실험실적 환경에서 수행하여 반응기작을 설명하기 위하여, 폐의 표피세포(A549 세포)를 TNF-α, IL-4 및 IL-1β를 처리하여 자극시켜서, 호산성구 화학주성에 관여하는 키모카인과 점착물질의 발현을 유도하였다. 피라노피란디온 유도체의 처리는 에오탁신, CCL11, NO 생산, IL-6 및 MCP1의 발현을 유의하게 감소시켰다.

[0047] 한편, 상기 치료용 조성물에는 약제학적으로 허용되는 염 및/또는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 매질, 특히 멸균된 물, 생리식염수, 식물성 기름, 유화제, 현탁제, 계면 활성제, 안정제, 향미제(flavoring agent), 부형제(excipient), 매개제(vehicle), 보존제, 결합제 등을 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용되는 염"이란 환자의 치료에 적합한 산 부가 염 또는 염기 부가 염을 의미한다. "약제학적으로 허용되는 담체"란 무독성 용매, 분산제, 부형제, 보조제 또는 활성 성분과 혼합되어 약제학적 조성물, 즉 환자에게 투여할 수 있는 투여 제형을 형성할 수 있는 기타 물질이다.

[0048] 상기 "치료"는 알레르기성 질환의 경감, 예방, 치료를 모두 포함하는 의미이다.

[0049] 인간이나 마우스, 랫, 기니피그, 토끼, 고양이, 쥐, 개, 양, 돼지, 소, 원숭이, 비비, 침팬지 등 동물들의 의약으로 사용하기 위해 본 발명의 방법을 이용해 분리한 물질이나 화합물을 투여할 때에는, 이 분리된 물질이나 화합물을 직접적으로 투여되거나, 기존의 조제 방법을 이용해 1회 분량으로 제작해 투여할 수 있다. 예를 들면, 필요한 경우, 이러한 의약들은 설탕으로 코팅된 알약이나 캡슐, 엘릭시르(elixir), 마이크로캡슐과 같이 경구투여가 가능한 것들일 수도 있고, 물이나 다른 약학적으로 가능한 액체로 된 현탁액(suspension)이나 무균용액(sterile solution)들이 든 주사제의 형태로 된 것, 즉 경구투여하지 않는 것들일 수도 있다. 예를 들어, 이러한 물질이나 화합물들은, 일반적인 의약사용을 위해 1회투약분이 개별단위로 포장된 형태(a unit dose form)로, 약학적으로 사용 가능한 담체 또는 매질, 특히 멸균된 물, 생리식염수, 식물성 기름, 유화제, 현탁제, 계면 활성제, 안정제, 향미제(flavoring agent), 부형제(excipient), 매개제(vehicle), 보존제, 결합제 등과 혼합될 수 있다. 이러한 의약 제조에서 지시된 가능한 범위 내에서 적절한 투여량으로 주성분의 양을 정하게 된다.

[0050] 알약이나 캡슐과 혼합될 수 있는 첨가물들은 예를 들면, 젤라틴(gelatin), 옥수수 전분, 트라가칸스 고무(tragacanth gum), 아라비아 고무 등 결합제들이나 셀룰로스 결정(crystalline cellulose)와 같은 첨가제들, 옥수수 전분, 젤라틴, 알긴산(alginic acid)등 팽윤제들(swelling agents), 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate)와 같은 윤활제들, 수크로스(sucrose), 락토스(lactose), 사카린(saccharin) 등 감미료, 박하, 가울테리아 아데노트릭스(Gaultheria adenothrix) 기름, 체리와 같은 향미제 등이다. 만약 개별단위로 포장된 형태가 캡슐이라면, 기름과 같은 액체 운반체도 이러한 성분에 포함될 것이다. 주사액에 사용되는 증류수와 같은 매개제를 이용해 하기 일반적으로 의약을 사용하는 식으로 주사액에 사용되는 멸균된 합성물을 만들 수 있다. D-솔비톨(sorbitol), D-만노스(mannose), D-마니톨(mannitol), 염화나트륨과 같은 보조제을 포함하는 등장성용액, 글루코스, 생리식염수는 주사약 수용액으로 이용할 수 있다. 이러한 것들은 알콜, 특히 에탄올과 같은 적절한 용해화제(solubilizer)나 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 같은 폴리알콜(polyalcohol), 또는 HCO-50, 폴리솔베이트 80 (Polysorbate 80 (TM))과 같은 비이온성(nonionic) 계면활성제들과 함께 사용할 수 있다. 참기름이나 콩기름은 유성 액체(oleaginous liquid)로 이용가능한데, 벤질벤조에이트(benzyl benzoate)나 벤질알콜(benzyl alcohol)과 같은 용해화제, 인 완충용액(buffer) 또는 아세트산나트륨(sodium acetate) 완충용액과 같은 완충용액, 염산프로카인(procaine hydrochloride)과 같은 마취제나 진통제, 벤질알콜이나 페놀과 같은 안정화제, 항산화제와 함께 사용할 수 있다. 이렇게 만들어진 주사약을 적절한 앰플(ample)에 넣는다.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물을 환자에게 투약하는 데는, 동맥주사, 정맥주사, 경피주사(percutaneous injection), 비강내 투여, 근육내 투여, 경구 투여와 같이 널리 알려진 방법들이 사용된다. 투약 시 1회 용량(dosage)이나 방법은 환자의 몸무게, 나이, 투약방법에 따라 다양하며, 이때 당업자는 적절한 투약방법을 용이하게 선택할 수 있다. 게다가 그 물질이나 화합물을 DNA로 코딩할 수 있다면, 그 DNA를 유전자 치료를 위해 벡터에 삽입시키고, 그 벡터를 환자에게 투약해 치료를 할 수 있다. 그 투약 시 1회 용량 및 방법은 환자의 몸무게, 나이, 증세에 따라 달라지지만, 당업자는 이들을 용이하게 선택할 수 있다. 비경구 투약시, 환자나 의약이 목적하는 기관(organ), 증세, 투약방법에 따라 어느 정도 차이가 있다.

[0052] 본 발명은 본 명세서에 기재된 치료 물질이나 화합물을 하나 또는 그 이상 포함하는 약학적 또는 치료용 조성물을 포함한다. 선택적으로, 본 발명은 암, 특히 유방암, 전립선암, 결장암의 예방 및/또는 치료를 위한 약학적 또는 치료용 조성물의 제조를 위한, 본 문서에 기재된 하나 또는 그 이상의 치료제나 화합물의 용도도 제공한다. 의약의 제조는, 구강, 직장, 비강(nasal), 국소(볼이나 혀 밑을 포함한다), 질이나 비경구(근육내, 피하 또는 정맥을 포함한다)투약 또는 흡입(inhalation)이나 통기법(insufflation)을 통한 투약에 적합한 것들을 포함한다. 이 제법은 적당히, 무엇이든 간에 제약 업계에 잘 알려진 방법으로 만들 수도 있고, 분량 단위로 따로따로 편리하게 만들 수도 있다. 이러한 의약의 제법들은 모두 유효 화합물(active compound)들을 액체 담체나 세밀하게 분리된 고체 담체, 또는 필요하다면 양자 모두와 결합시키는 단계 및, 필요에 따라, 원하는 제제로

생산품을 만드는 단계를 포함한다.

[0053] 구강 투여에 적합한 의약의 제조는, 각각 유효 성분을 미리 계산한 만큼 포함한 알약이나 교갑제(cachet), 캡슐과 같이 분리된 단위 또는 분말이나 과립(granules) 또는 용액, 현탁액(suspension)이나 유상액(emulsion)으로 적당하게 만들 수 있다. 유효 성분은 예를 들면 담체 없이 순수한 형태 또는 페이스트(paste), 덩어리 연질약(bolus electuary)으로 될 수 있다. 구강 투여를 위한 알약이나 캡슐은 결합제(binding agent), 충전제, 윤활제, 붕해제나 습윤제(wetting agent)들과 같은 적당한 부형제들을 포함할 수 있다. 알약은 하나나 그 이상의 제조 성분들을 선택적으로 압축(compression) 또는 성형(molding)해서 만들 수 있다. 분말이나 과립과 같이 자유유동형태(free-flowing form)의 유효성분들이 결합제나 윤활제, 불활성 희석제(inert diluent), 윤활시키는, 계면활성 또는 분산제와 선택적으로 섞이는 적절한 기계 내에서 압축되어, 압출된 알약들이 만들어진다. 성형된 알약들은, 불활성 액체 희석제로 촉촉해진 가루 화합물의 혼합물을 적절한 기계 내에서 성형하여 만든다. 이 알약들은 당업계에 잘 알려진 방법들로 코팅할 수 있다. 예를 들면, 수성 또는 유성 현탁액, 용액, 유상액, 시럽(syrups)이나 엘릭세르의 형태로 구강액을 제작할 수 있고, 사용 전 물이나 다른 적합한 매개제와 조성(contitution)하기 위해 건조한 상품으로 제조할 수도 있다. 이러한 경구용 액체의 제조는 현탁제, 유상제, 비수성(non-aqueous) 매개제(식용유를 포함한다)나 방부제 등 종래의 첨가제를 포함할 수 있다. 이 알약들은 유효성분들이 유리되는 것을 통제하거나 천천히 제공되도록 제조될 수 있다.

[0054] 비경구 투약을 위한 조제는, 비후제(thickening agents) 및 현탁 물질이 포함된 수성 및 비수성 무균 현탁액; 과항산화제, 완충용액, 정균제(bacteriostats), 수혈자의 피와 등장의 제제인 용질을 포함하는 수성 및 비수성 무균 주사액을 포함한다. 이 제제는 바이알(vials)이나 밀봉된 앰플과 같이 다회용량(multi-dose)나 일회용량(unit dose)용 용기로 제작될 수도 있고, 사용 직전 식염수, 주사용 증류수(water for injection)와 같은 무균 액체 담체만 있으면 되는 냉동건조(동결건조)조건에서 보관할 수도 있다. 또한 계속주입(continuous infusion)을 위한 제제를 만들 수도 있다. 현탁액이나 임시주사용액(extemporaneous injection solution)으로 앞서 기재한 종류의 무균 분말이나 과립, 알약을 만들 수 있다.

[0055] 직장(rectal)투여 용 제제는 코코아 버터나 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 같은 일반적인 담체를 이용해 좌약으로 만들 수 있다. 입이나 혀 밑과 같이 입에 국소 투약을 위한 제제는 수크로스(sucrose), 아카시아나 트라가칸스 고무(tragacanth)와 같은 향이 나는 베이스를 주성분으로 하는 사탕정제(lozenge)와 수크로스와 아카시아 또는 젤라틴(gelatin)과 글리세린(glycerin)등을 유효성분으로 하는 패스틸(pastille)을 포함한다.

[0056] 본 발명의 화합물은 비강투여를 위해서 드랍(drop) 형태의 분산용(dispersible) 분말이나 액체 스프레이(spray)로 사용될 수 있다. 드랍은 하나나 그 이상의 현탁제나 용해제(solubilizing agent), 분산제(dispersing agent)로 구성된 수성 또는 비수성 베이스(base)로 만들 수 있다. 액체 스프레이는 기존의 방식대로 압축팩(pressurized packs)으로 운반된다.

[0057] 흡입으로 투여하기 위해서, 화합물은 주입기(insufflator), 분무기(nebulizer), 압축팩이나 에어로졸 스프레이(aerosol spray)를 운반하는 다른 적당한 수단으로 적절히 운반될 수 있다. 압축팩은 디클로로디플루로메탄(dichlorodifluoromethane), 트리클로로플루오로메탄(trichlorofluoromethane), 디클로로테트라플루오로에탄(dichlorotetrafluoroethane), 이산화탄소나 기타 적절한 가스와 같은 적절한 추진제를 포함할 수 있다. 압축된 에어로졸의 경우, 용량이 제공된 밸브로 정해져, 측정량만큼 운반된다.

[0058] 또한, 흡입이나 통기법으로 투여하기 위해 이 화합물은 락토오즈(lactose)나 전분과 같이 적절한 분말 베이스나 화합물의 분말 조성물과 같이 건조한 분말 조성물의 형태가 될 수도 있다. 이 분말 조성물은, 분말이 흡입기나 주입기로 투여될 수 있도록 캡슐, 카트리지(catridges), 젤라틴이나 블리스터팩(blister packs)과 같은 단위용량 형태로 제조될 수 있다. 원하는 경우, 상기 기재된 제제들은 유효 성분들을 지속적으로 방출시키기 위해 변형될 수도 있다. 약학적 조성물은 또한 항균물질, 면역억제제나 보존제와 같은 다를 유효 성분을 포함할 수도 있다.

[0059] 본 발명의 제제는, 앞서 따로 언급한 성분들 외에도, 적절히 경구투여하기 위해 향미제를 포함하는 것과 같이, 필요한 제제 타입에 따라 당업계에 알려진 기존의 물질들을 포함할 수도 있다.

[0060] 약학적 조성물은 바람직하게는 (정맥이나 피하)주사로 투여되거나 경구투여되며, 피실험자에게 투여되는 정확한 양은 담당 의사의 재량이 될 것이다. 그러나 채택된 용량은, 피실험자의 나이나 성별, 치료받아야할 정확한 질환 및 그 심각한 정도 등 여러 요인에 따라 결정되어야 할 것이다. 또한 투여 과정은 상태와 위중한 정도에 따라 다양할 수 있다.

[0061] 본 발명에 따른 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 화합물은 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0062] 본 발명에 따른 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 기타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 약학 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0064] 본 발명의 신규한 피라노피란디온 화합물은 세포에 독성을 나타내지 않으면서도, 용량에 비례해서 에오탁신 생산을 억제하고, 천식치료 효과를 나타내므로, 보다 효과적인 천식치료제의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 각 피라노피란디온 유도체의 처리에 의한 세포생존성을 나타내는 그래프이다.

도 2는 각 피라노피란디온 유도체를 처리한 세포에서 생성되는 에오탁신의 생산성을 비교한 그래프이다.

도 3은 p65의 핵내 이동에 미치는 PPY-345의 효과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 4는 STAT-6의 인산화에 미치는 PPY-345의 효과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 5는 본 발명에서 제공하는 PPY-345의 천식치료효과를 공지된 천식치료제인 덱사메타손의 효과와 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 기도세척액내의 면역세포수준에 미치는 PPY-345의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 혈청내 IgE의 수준에 미치는 PPY-345의 효과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

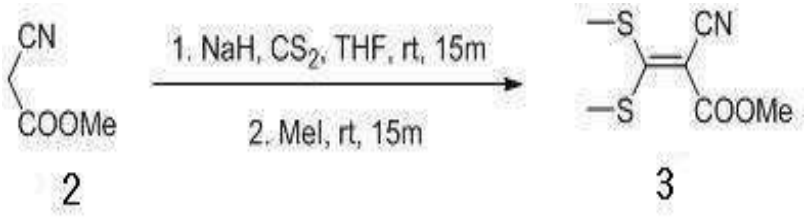
[0067] **실시예 1: 피라노피란디온 유도체의 제조**

[0068] **실시예 1-1: 재료**

[0069] 화학물은 알드리치사와 TCI에서 구입했다. 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran)은 아르곤 하에서 나트륨 금속염과 벤조퀴논 위에서 증류했다. 디클로로메탄은 산화칼슘 위에서 증류했다. 다른 용매들은 알드리치, J. T. Baker사에서 최고등급(absolute grade)의 제품을 구입하였다. NMR 스펙트럼은 $CDCl_3$를 용매로 하여 기록하였다. 화합물 변이는 테트라메틸셀라인의 신호에 상대적으로 ppm 단위로 이루어졌다. IR 스팩트럼은 Jasco 420 RT-R 분광기로 얻었다. 박막 크로마토그래피는 미리 코팅된 실리카겔 플레이트에서 수행하였다(Merck 60 F254; Merck, Darmstadt, Germany). Fresh 컬럼 크로마토그래피는 silica gel 60(Merck, 0.040-0.063 mm, 230-400 mesh)상에서 엑산과 에틸 아세테이트를 전개용매로 사용하여 수행하였다.

[0070] **실시예 1-2: 피라노피란디온 유도체의 제조**

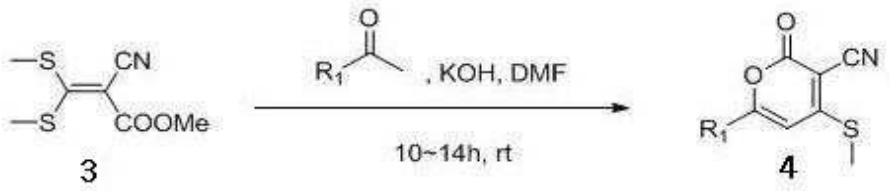
[0071] [반응식 2]

[0072] 

[0073] 상기 화학식 2의 화합물인 메틸 사이아노아세테이트(methyl cyanoacetate, 35.2㎖, 0.4mol)를 냉각한 소디움 하이드라이드(10.08g, 60% oil suspension, 0.42mol)에 THF(tetrahydrofuran)에서 한방울씩 15분간 가하여 반응 고상태인 백색물질을 생성시키고, 이를 15분간 강하게 교반하였다. 상기 반응액에 카본 다이설파이드(25.33㎖, 0.4mol)을 한방울씩 넣어주고 20℃ 이하에서 혼합하여, 노란색 반응액을 수득하였다. 상기 노란색 반응액을 교반하면서 메틸 아이오다이드(62.55㎖, 1mol)를 30분간 한방울씩 가하였다. 이어, 15분간 상온에서 교반한 다음, 감압시켜서 THF를 제거하였다. 상기 반응액에 소량의 잘게 부순 얼음을 가하여 반응하지 않은 NaH를 제거하고, 잔류물을 냉각된 물에 넣고 교반하여 백색결정을 생성시켰다. 상기 백색결정을 여과하여 수득하고, 냉각수로 세척한 다음, 건조시키고, 에틸 아세테이트/핵산(1:4)으로 재결정화하여, 백색 바늘형상의 화학식 3의 화합물(72.54g, 89.33%)을 수득하였다:

[0074] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 3.46(s, 3H), 2.72(s, 3H), 2.62(s, 3H)

[0075] [반응식 3]

[0076] 

[0077] 화학식 3의 화합물(10mmol), 디옥시벤조인(11mmol) 및 분말화된 수산화칼륨(12mmol)의 혼합물에 무수 DMF(dimethylformamide)(50㎖)를 가하고, 상온에서 10-14시간 동안 교반하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 반응물에 얼음물을 가하고 교반하여 침전물을 형성시켰다. 상기 반응물을 여과하여 침전물을 수득하고, 상기 수득한 침전물을 클로로포름으로 용해시킨 다음, 실리카겔 컬럼에 적용하여 정제함으로써 하기의 화합물을 포함하는 화학식 4의 화합물(4a 내지 4e)을 합성하였다:

[0078] 6-(3,4-디메톡시페닐)-4-(메틸티오)-2-옥소-2H-피란-3-카보나이트릴(6-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-(methylthio)-2-oxo-2H-pyran-3-carbonitrile)(4a)

[0079] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 7(dd, 1H, J=8.3, 2.1 Hz), 7.37(d, 1H, J=2.4 Hz), 6.93(d, 1H, J=8.89 Hz), 6.60(s, 1H), 3.96(s, 6H), 2.67(s, 3H)

[0080] 6-(3,4,5-트라이메톡시페닐)-4-(메틸티오)-2-옥소-2H-피란-3-카보나이트릴(6-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-

(methylthio)-2-oxo-2H-pyran-3-carbonitrile)(4b)

[0081] 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 7.05(s, 2H), 6.59(s, 1H), 3.94(s, 6H), 2.73(s, 3H)

[0082] 6-(2-브롬화페닐)-4-(메틸티오)-2-옥소-2H-피란-3-카보나이트릴(6-(2-bromophenyl)-4-(methylthio)-2-oxo-2H-pyran-3-carbonitrile)(4c)

[0083] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 7.73(dd, 1H, J=8.09, 1.42 Hz), 7.66(dd, 1H, J=7.86, 1.90 Hz), 7.47(dt, 1H, j+7.42, 1.37 Hz), 7.39(dt, 1H, J=7.86, 1.90 Hz), 6.83(s, 1H), 2.86(s, 3H)

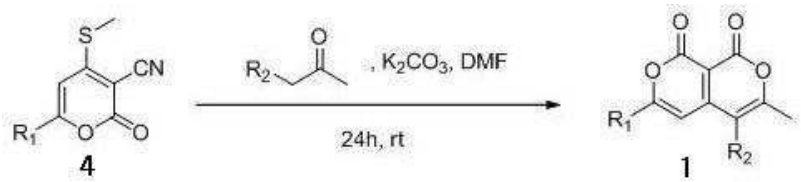
[0084] 6-(2-염화페닐)-4-(메틸티오)-2-옥소-2H-피란-3-카보나이트릴(6-(2-chlorophenyl)-4-(methylthio)-2-oxo-2H-pyran-3-carbonitrile)(4d)

[0085] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 7.75(dd, 1H, J=7.57, 1.95 Hz), 7.54(dd, 1H, J=7.93, 1.54 Hz), 7.47(dt, 1H, J=7.36, 1.89 Hz), 7.43(dt, 1H, J=7.51, 1.60 Hz), 6.92(s, 1H), 2.68(s, 3H)

[0086] 6-(2-불화페닐)-4-(메틸티오)-2=옥소-2H-피란-3-카보나이트릴(6-(2-fluorophenyl)-4-(methylthio)-2-oxo-2H-pyran-3-carbonitrile)(4e)

[0087] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 8.03(dd, 1H, J=7.78, 1.84 Hz), 7.57(dt, 1H, J=7.42, 1.92 Hz), 7.35(dt, 1H, J=7.80, 0.95 Hz), 7.25(d, 1H, J=3.80 Hz), 7.04(s, 1H), 2.71(s, 3H)

[0088] [반응식 4]

[0089] 

[0090] 화학식 4의 화합물(1mmol), 아릴 아세톤(1mmol) 및 수산화칼륨(84 mg, 1.5mmol)의 혼합물에 무수 DMF(10㎖)를 가하고, 상온에서 24시간 동안 교반하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 분쇄된 얼음에 안치시켜서 냉각시키면서 교반한 다음, 10% HCl을 가하여 중화시킴으로써, 침전물을 형성시켰다. 상기 반응물을 여과하여 침전물을 수득하고, 상기 수득한 침전물을 0.5% 및 5% 에틸 아세테이트를 포함하는 헥산으로 용해시킨 다음, 실리카겔 컬럼에 적용하여 정제함으로써 하기의 화합물을 포함하는 화학식 1의 화합물(1a 내지 1e)를 합성하였다:

[0091] 4-아세틸-3-메틸-6-(3,4-디메톡시페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(3,4-dimethoxyphenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione)(1a)("PPY-34")

[0092] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 7.65(d, 1H, J=9.62 Hz), 7.51(s, 1H), 7.45(s, 1H), 7.13(d, 1H, J=8.72 Hz), 3.86(s, 6H), 2.16(s, 6H)

[0093] 4-아세틸-3-메틸-6-(3,4,5-트라이메톡시페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione)(1b)("PPY-345")

[0094] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 7.55(s, 1H), 7.28(s, 2H), 3.88(s, 9H), 2.17(s, 6H)

[0095] 4-아세틸-3-메틸-6-(2-브롬화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(2-bromophenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione)(1c)("PPY-Br")

[0096] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 7.74(dd, 1H, J=8.14, 0.86), 7.71(dd, 1H, J=7.77, 1.60), 7.50(dt, 1H, J=7.65, 0.99), 7.41(dt, 1H, J=8.02, 1.73), 6.67(s, 1H), 2.19(s, 6H)

[0097] 4-아세틸-3-메틸-6-(2-염화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(2-chlorophenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione)(1d)("PPY-Cl")

[0098] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 7.79(dd, 1H, J=7.34, 2.34), 7.55(dd, 1H, J=7.46, 1.55), 7.50(dt, 1H, J=7.17, 1.58), 7.46(dt, 1H, J=7.45, 1.58), 6.87(s, 1H), 2.18(s, 6H)

[0099] 4-아세틸-3-메틸-6-(2-불화페닐)피라노[3,4-c]피란-1,8-디온(4-acetyl-3-methyl-6-(2-fluorophenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione)(1e)("PPY-F")

[0100] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$, ppm) 8.04(dt, 1H, J=7.87, 1.73), 7.57(dd, 1H, J=4.97, 1.80), 7.36(dt, 1H, J=7.87, 1.03), 7.24(dd, 1H, J=3.52, 0.83), 6.95(s, 1H), 2.17(s, 1H)

[0101] **실시예 2: 피라노피란디온 유도체의 생물학적 활성분석**

[0102] **실시예 2-1: 세포배양**

[0103] 사람 II형-유사 상피 폐 세포(Human type II-like epithelial lung cells)인 A549 세포들은 한국 세포주 은행(Cancer Research Institute, Seoul, Korea)에서 얻었다. 그 후 이 세포들을 조직배양 플레이트(Corning, New York, USA)에서 10 % 열-불활성화 소 태아 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum) (Hyclone, Logan, MA, USA) 및 페니실린-스트렙토마이신(Invitrogen)이 보충된 RPMI 배지(Invitrogen, Rockville, MD, USA)에서 1×10^6세포/ml의 농도로 배양하였다. 그 후 상기 배양 플레이트들을 37℃, 습도 100 % 및 5 % CO_2 조건에서 배양하였다. 1×10^6세포/ml의 농도를 유지하기 위해 상기 세포들을 매 3-4일마다 계대배양하였다.

[0104] **실시예 2-2: MTS 분석법을 이용한 세포 생존성 비교**

[0105] MTS는 살아있는 세포의 탈수소화효소에 의하여 보라색 포르마잔(purple formazan)이 감소하고, 상기 포르마잔을 포함하는 수용액의 흡광도는 특정 파장(490 nm)을 흡광기로 측정함으로서 정량화 할 수 있다. 상기 파장의 흡광도는 생존하는 세포수에 비례한다.

[0106] 세포 생존력을 비교하기 위해 사람의 폐 표피세포인 A549 세포를 대상으로 하여 MTS 분석법을 수행하였다. 상기 A549 세포에 상기 실시예 1에서 합성한 각각의 피라노피란디온 유도체(PPY-34, PPY-345, PPY-Br, PPY-Cl 또는 PPY-F)를 1, 5, 10 또는 50μM의 농도로 처리하고, 20ul의 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)) 용매를 각 웰에 넣어준 6시간 후, UV 파장인 490

nm에서 ELISA plate의 흡광도 측정에 의한 세포 생존력을 비교하였다(도 1). 이때, 대조군으로는 아무것도 처리하지 것을 사용하였다. 도 1은 각 피라노피란디온 유도체의 처리에 의한 세포생존성을 나타내는 그래프이다. 도 1에서 보듯이, 각 피라노피란디온 유도체를 처리하여도 세포에 대하여 별다른 독성을 나타내지는 않음을 알 수 있었다.

[0107] **실시예 2-3: CCL11 생산에 미치는 영향**

[0108] 키모카인 리간드 11(CCL11)는 에오탁신이라고도 하며, 염증과 면역반응을 조절하는 사이토카인에 속하는 CC type 키모카인의 일종으로 호산성구의 주화인자(chemoattractant)로서의 능력을 갖는 반면, 단핵 백혈구 및 중성구의 주화인자로서의 능력은 갖지 않는다. 단백질 서열면에서, 쥐의 에오탁신은 사람 및 기니피그의 에오탁신과 60%의 상동성을 갖는다. 사람의 폐 표피세포인 A549 세포에 상기 실시예 1에서 합성한 각각의 피라노피란디온 유도체를 다양한 농도로 처리하여 반응시킨 다음, 호산성구의 키모카인과 부착성분을 포함하는 화학주성을 유발하기 위해 TNF-α, IL-4 및 IL-1β로 자극하였다. 24시간이 경과한 후, CCL11의 분비억제 정도를 ELISA로 측정하였다(도 2). 이때, 대조군은 실시예 2-1과 동일하게 설정하였다. 도 2는 각 피라노피란디온 유도체를 처리한 세포에서 생성되는 에오탁신의 생산성을 비교한 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 피라노피란디온 유도체는 용량에 비례해서 에오탁신 생산을 억제함을 알 수 있었다. 특히, 상기 5개의 피라노피란디온 유도체 중에서도 PPY-345를 처리한 경우에는 1μM의 농도에서도 CCL11의 분비억제 정도가 상대적으로 가장 우수함을 확인할 수 있었다.

[0109] **실시예 2-4: CCL11에 대한 억제활성**

[0110] 상기 실시예 2-3의 결과로부터, 본 발명에서 합성한 5개의 피라노피란디온 유도체 중에서 CCL11의 분비억제 정도가 상대적으로 가장 우수한 것이 PPY-345임을 확인하였으므로, 상기 PPY-345를 이용한 CL-11의 억제 기전을 연구 하기 위해 기존에 알려진 NF-kB의 서브유닛인 p65의 핵내 이동을 확인하였다(도 3). 도 3은 p65의 핵내 이동에 미치는 PPY-345의 효과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 3에서 보듯이, NC(negative control)에 비해 PC(Positive control; cytokines treated sample)군은 핵내 NF-kB가 크게 증가하였고, PPY-345(50uM) 처리군은 PC군과 유사한 수준을 나타내었다.

[0111] 한편, STAT-6의 인산화에 미치는 PPY-345의 효과를 측정하였다(도 4). 도 4는 STAT-6의 인산화에 미치는 PPY-345의 효과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 4에서 보듯이, PPY-345에 의한 CCL-11의 억제는 STAT-6의 인산화를 억제함으로써 수행됨을 알 수 있었다.

[0112] **실시예 3: 천식동물모델에 미치는 PPY-345의 효과**

[0113] **실시예 3-1: 천식횟수에 미치는 효과**

[0114] 천식을 유발시킬 수 있는 OVA(ovalbumin) 100㎍ 및 상기 OVA의 작용을 보조하는 알루미늄 히드록사이드 20mg를 포함하는 PBS 200㎕를 6주령 웅성 Balb/c 마우스의 복강에 투여하고, 천식반응을 보다 활성화시키기 위하여 14일이 경과한 후에 동일한 용액을 다시 복강에 투여하였다. 1, 3, 5, 7, 9 및 11일 후, 덱사메타손(양성 대조군) 또는 PPY-345를 상기 마우스의 기도에 투여하고, 30분후에 1.5mg의 OVA를 포함하는 PBS 100㎕를 복강에 투여하였다. 하루가 경과한 후, 기도과민성 실험(air hyper-responsiveness, AHR)을 수행하고, 다시 하루후에 sampling을 수행하였다(도 5). 이때, 대조군으로는 OVA 대신에 PBS를 투여한 마우스를 사용하였다. 도 5는 본 발명에서 제공하는 PPY-345의 천식치료효과를 공지된 천식치료제인 덱사메타손의 효과와 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 5에서 보듯이, 본 발명의 피라노피란디온 유도체 중의 하나인 PPY-345는 비록 덱사메타손의

효과에는 미치지 못하지만, 천식동물모델에서 천식을 유의하게 감소시킬 수 있는 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0115] **실시예 3-2: 기도내 면역세포에 미치는 효과**

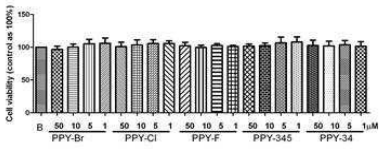
[0116] 상기 실시예 3-1의 실험동물을 희생시키고, 기도세척액에 있는 면역세포를 측정하였다(도 6). 도 6은 기도세척액내의 면역세포수준에 미치는 PPY-345의 효과를 나타내는 그래프이다. 도 6에서 보듯이, PPY-345를 처리한 실험동물에서는 OVA만을 처리한 실험동물에 비해 림파구, 호산구, 대식세포 및 전체 세포의 숫자가 유의성 있게 감소됨을 알 수 있었다.

[0117] **실시예 3-3: 혈청내 IgE의 수준에 미치는 효과**

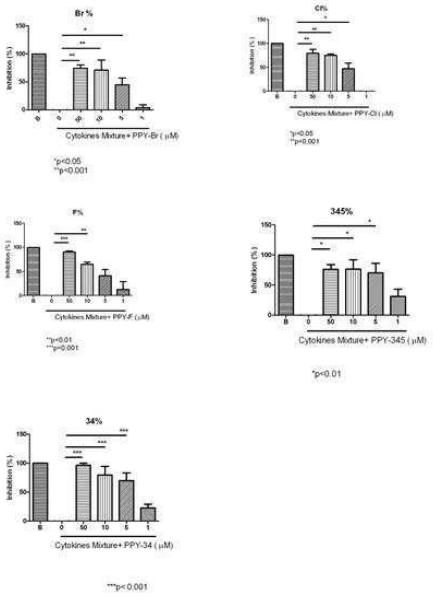
[0118] 각 실험동물의 혈청중 IgE의 수치를 ELISA로 측정하였다(도 7). 도 7은 혈청내 IgE의 수준에 미치는 PPY-345의 효과를 나타내는 그래프이다. 도 7에서 보듯이, PPY-345를 처리한 실험동물에서는 혈청내 IgE의 수준이 유의하게 감소됨을 알 수 있었다.

도면

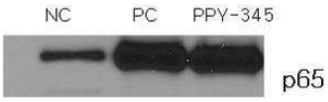
도면1



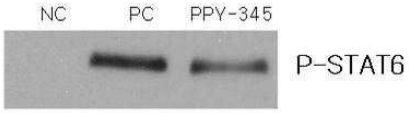
도면2



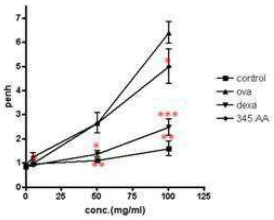
도면3



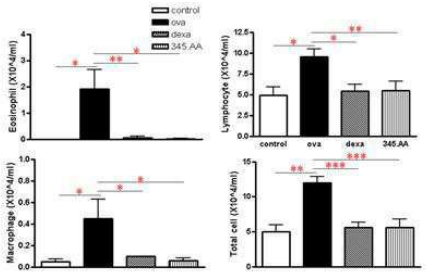
도면4



도면5



도면6



(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, n=5-6)

도면7

