



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년05월21일
C07D 311/68 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0720045
C07D 311/66 (2006.01)	(24) 등록일자	2007년05월14일

(21) 출원번호	10-2006-0025022	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2006년03월17일	(43) 공개일자
심사청구일자	2006년03월17일	

(73) 특허권자 한국화학연구원
 대전 유성구 장동 100번지

(72) 발명자 이규양
 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 132동 605호

 이선경
 대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 107동 1004호

 서지희
 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 107동 603호

 김낙정
 대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 101동 601호

 이병호
 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 116동 804호

 오광석
 대전 유성구 송강동 그린아파트 305동 1102호

 서호원
 대전 중구 유천동 317-44번지

 황순희
 대전 서구 둔산2동 샘머리아파트 215동 1502호

(74) 대리인 이원희

(56) 선행기술조사문헌	
KR100518184 B1	KR100598133 B1
KR1020060082656 A	논문

심사관 : 조정환

전체 청구항 수 : 총 16 항

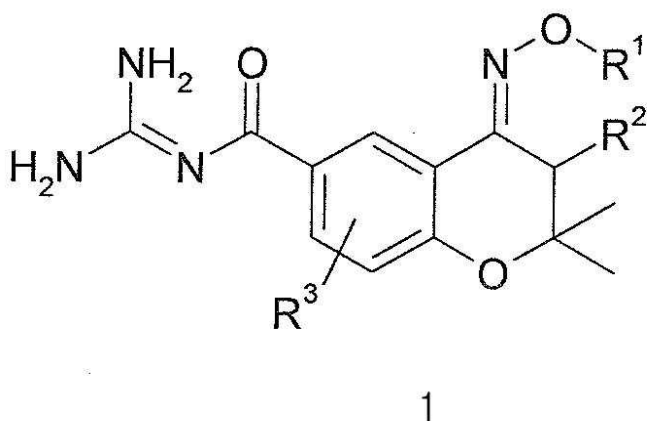
(54) 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체, 이의약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료용약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료, 또는 수술요법 또는 약물요법 시술시에 심장보호 용도로 사용되는 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체는 심근경색, 심부전증, 협심증을 포함하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료제, 또는 관동맥우회술, 관동맥경피성형술을 포함하는 수술요법 또는 혈전용해제를 이용한 약물요법을 포함하는 재관류요법 시술 시에 심장보호제로 유용하게 사용될 수 있다.

<화학식 1>

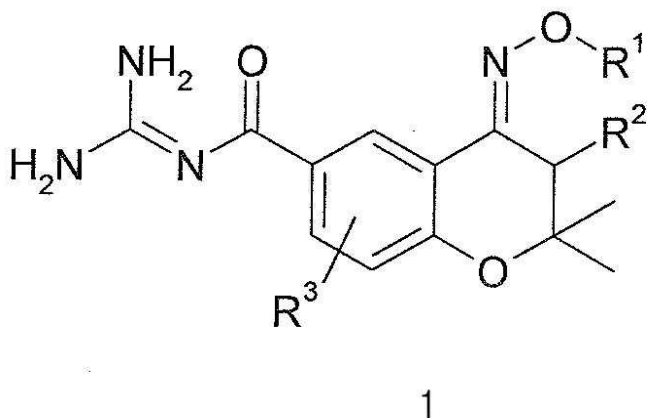


특허청구의 범위

청구항 1.

하기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

<화학식 1>



(상기 식에서,

R_1 은 H, $C_1 \sim C_5$ 의 직쇄 또는 측쇄 알킬기, 또는 $C_6 \sim C_{10}$ 의 아릴기이고,

R_2 는 H 또는 할로젠이며,

R_3 는 $C_1 \sim C_5$ 의 직쇄 또는 측쇄 알킬기, 나이트로기, H 또는 $C_1 \sim C_5$ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기를 가지는 아민기이다.)

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 R_1 은 H, 메틸기 또는 벤질기이고, R_2 는 H 또는 Br이며, R_3 는 H, Cl, Br 또는 NO_2 인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체는

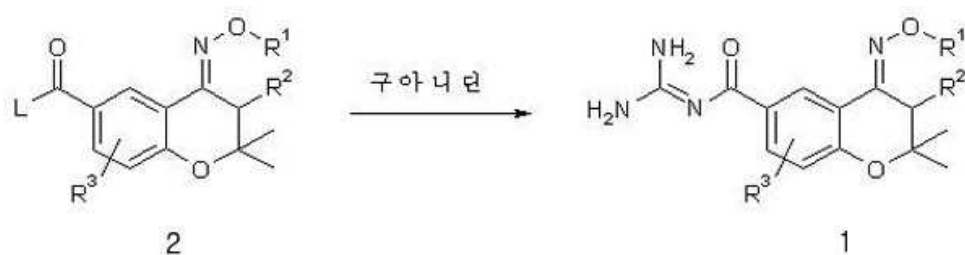
- 1) N-(4-하이드록시아미노-2,2-다이하메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 2) N-(4-메톡시아미노-2,2-다이하메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 3) N-(4-벤질옥시아미노-2,2-다이하메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 4) N-(3-브로모-4-메톡시아미노-2,2-다이하메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 5) N-(7-클로로-4-메톡시아미노-2,2-다이하메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 6) N-(8-나이트로-4-메톡시아미노-2,2-다이하메틸크로만-6-카보닐)구아니딘; 또는
- 7) N-(8-브로모-4-메톡시아미노-2,2-다이하메틸크로만-6-카보닐)구아니딘인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4.

하기 반응식 1과 같이,

카복실산 유도체(2) 및 과량의 구아니딘과 반응시키거나, 적절한 염기하에서 당량의 구아니딘과 반응시키는 단계를 포함하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법.

<반응식 1>



(상기 식에서, R_1 , R_2 및 R_3 는 상기 화학식 1에서 정의된 바와 같고, 화학식 2의 L은 구아니딘에 의해 쉽게 이탈될 수 있는 $C_1 \sim C_5$ 알콕시기, 할라이드기, 카복실레이트기, p-니트로페녹시기, N-히드록시석신이미드기 또는 펜타플루오로페녹시기와 같은 이탈기를 나타낸다.)

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 카복실산 유도체(2)의 이탈기(L)는 $C_1 \sim C_5$ 의 알콕시기중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 카복실산 유도체(2)의 이탈기(L)는 메톡시기 또는 에톡시기인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법.

청구항 7.

제4항에 있어서, 상기 과량의 구아니딘의 당량은 카복실산 유도체(2)에 대하여 1~10 당량인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법.

청구항 8.

제4항에 있어서, 상기 염기는 피리딘, 트리에틸아민, 소듐 아세테이트, 포타슘 아세테이트, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 탄산칼륨, 탄산나트륨, 탄산바륨 또는 탄산수소나트륨 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법.

청구항 9.

제4항에 있어서, 상기 반응 용매로는 메탄올, 에탄올 또는 이소프로판올 중에서 선택되는 알코올계 용매, 테트라하이드로퓨란(THF), 디옥산 또는 1,2-디메톡시에탄(DME) 중에서 선택되는 에테르계 용매 및 디메틸포름아마이드(DMF)로부터 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합용매인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법.

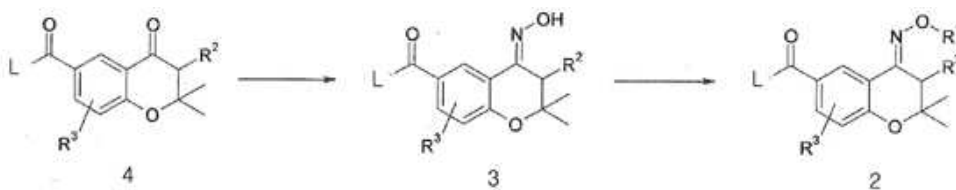
청구항 10.

하기 반응식 2와 같이,

화합물(4), 및 하이드록시아민 또는 하이드록시아민 하이드로클로라이드를 적당한 염기 존재하에 반응시켜 화합물(3)을 제조하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 제조된 화합물(3), 및 $C_1 \sim C_5$ 의 알킬 또는 $C_6 \sim C_{10}$ 의 아릴 할로젠 화합물을 적당한 염기 존재하에 반응시켜 제4항의 카복실산 유도체(2)를 제조하는 단계(단계 2)를 포함하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조 방법.

<반응식 2>



(상기 식에서, R₁, R₂, R₃ 및 L은 제1항 또는 제4항에서 정의된 바와 같다.)

청구항 11.

제10항에 있어서, 상기 단계 1의 염기는 피리딘, tri에틸아민, 소듐 아세테이트, 포타슘 아세테이트, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 탄산칼륨, 탄산나트륨, 탄산바륨 또는 탄산수소나트륨 중에서 선택되는 어느 하나이고, 상기 단계 2의 염기는 소듐 하이드라이드, 포타슘 t-부톡사이드, 소듐 메톡사이드, 소듐 에톡사이드, N,N-디이소프로필아민, 또는 DBU 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법.

청구항 12.

제10항에 있어서, 상기 단계 1의 반응 용매는 메탄올, 에탄올 또는 이소프로판올 중에서 선택되는 알코올계 용매, 테트라하이드로퓨란(THF), 1,2-디메톡시에탄(DME) 및 디메틸설폭사이드(DMSO)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 물과의 혼합용매이고, 상기 단계 2의 반응 용매는 테트라하이드로퓨란(THF), 디옥산 또는 1,2-디메톡시에탄 중에서 선택되는 에테르계 용매, 디메틸포름아마이드(DMF) 및 디메틸설폭사이드(DMSO)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법.

청구항 13.

제1항의 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 14.

제12항에 있어서, 상기 허혈성 심장질환은 심근경색, 심부전증 또는 협심증인 것을 특징으로 하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 15.

제1항의 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 수술요법 또는 약물요법 시술시에 심장보호 용도로 사용되는 약학적 조성물.

청구항 16.

제15항에 있어서, 상기 수술요법은 관동맥우회술 또는 관동맥경피성형술이고, 상기 약물요법은 혈전 용해제를 이용한 재관류 요법인 것을 특징으로 하는 심장보호 용도로 사용되는 약학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

최근, 이유를 알 수 없는 돌연사로 인해 사망하는 경우가 많이 발생하고 있다. 예를 들면, 운동 중에 갑자기 사망하게 되고, TV를 보다가 사망하게 되며, 수면 중에도 사망하게 된다. 이런 돌연사는 증상이 갑자기 발생하여 1시간 이내에 사망하는 경우로 정의하고 있다. 또한, 돌연사는 이전에 건강했던 경우 외에도 기존에 있던 질병으로 인해 증상이 갑자기 악화되어 1시간 이내에 사망에 이르게 되는 경우도 돌연사의 정의에 포함된다. 상기 돌연사는 일반적으로 1년에 인구 1000명당 1~2명(0.1~0.2%)의 환자가 발생하며 여자에 비해 남자가 4배 정도 많은 것으로 통계되고 있다.

대체로 돌연사의 원인으로는 심장성 급사로 인한 것으로, 대개 심장에 구조적 이상이 있는 경우에 발생하는 것으로 알려져 있다.

심장성 급사의 원인질환으로는 급성 심근 경색증, 협심증 등과 같은 허혈성 심장 질환, 고혈압, 악성 부정맥 질환, 확장성 심근증 또는 비후성 심근증과 같은 심근 질환, 대동맥 박리증과 같은 대동맥 질환, 대동맥 판막 협착증과 같은 판막질환, 심낭압전과 같은 심낭 질환 등이 있으며, 이들 중 허혈성 심장질환, 확장성 심근증, 비후성 심근증이 대부분을 차지하며 특히 허혈성 심장 질환이 돌연사의 대부분을 차지한다. 따라서, 허혈성 심장질환의 예방 및 치료에 대한 관심이 높아지고 있다.

상기 허혈성 심장질환은 심장으로 공급되는 혈류가 차단됨으로써 심근의 산소 공급량이 요구량에 비해 현저하게 부족하게 되는 현상을 말한다. 이와 같은 허혈성 심장질환은 궁극적으로 비가역적인 심근의 손상, 즉 세포 및 조직의 괴사로 이어지게 된다. 손상의 정도가 가역적인 초기에는 관동맥경피성형술 및 관동맥우회술 등의 수술요법이나 혈전용해제 등을 이용하는 약물요법과 같은 재관류요법에 의해 비가역적 손상을 막을 수 있으나, 이러한 재관류요법 후에도 심근 경색의 재발, 심장 기능 저하, 부정맥, 신경인지능력 저하 등 재관류 손상이 높은 비율로 나타나는 것으로 알려져 있다(Robert, M. (2003) Ann. Thorac. Surg. 75: S700-708). 이러한 허혈/재관류 시의 심근 세포 손상과 심기능 저하에 의해 발생하는 심근 경색, 부정맥, 심부전증 등의 허혈성 심장 질환은 유병률 및 사망률이 높고 완치가 어려워 지난 50년 동안 집중적인 기초 연구 및 임상 연구가 진행되어 왔다(Wang, QD. et al., (2002) Cardiovasc. Res. 55: 25-37).

허혈성 심장질환의 인위인인 상기 허혈/재관류 손상은 대사, 면역반응 및 이온항상성의 변화, 산소유리기 등 다양한 생리학적 기전이 관여된다. 따라서, 이를 예방 및 치료하기 위한 시도로써 면역조절 물질, 세포사멸 관련물질, 이온통로 조절물질 등 다양한 분야에서 연구가 이루어지고 있다(Hearse, DJ. (1998) Prog.Cariovasc. Dis. 30: 381-402). 이러한 종래의 기전연구와 함께 새로운 작용점에 의한 치료제의 개발 및 외과적 시술의 개발 등이 활발히 이루어졌으나 허혈/재관류로부터 심근세포를 보호할 수 있는 기술은 아직 상용화될 수 있을 만큼의 임상적 성공을 거두지는 못하였다. 따라서, 허혈에 의한 심근세포 손상의 진행을 늦추고 재관류 손상을 완화시킬 수 있는 허혈성 심장 질환의 예방 및 치료제, 또는 심장 보호제의 개발이 요구되고 있다.

한편, 세포 내 pH 변화는 본태성 고혈압, 허혈성 심근질환, 허혈/재관류에 따른 기능 장애 및 세포 사멸의 병태생리학에 중요한 역할을 하고 있다. 세포는 세포 내 pH를 조절하는 기전을 갖고 있는데, 이러한 세포 내 pH 조절기전은 허혈 및 재관류에 의한 세포 내 산성화를 보정하기 위하여 활성화된다. 산성화된 세포 내 pH의 알칼리화는 주요 이온통로 중의 하나로서 나트륨 수소 교환 통로(sodium-hydrogen exchanger, 이하 NHE)를 들 수 있다. 상기 NHE의 활성화는 세포 내 pH의 정상화에 필수적이지만 나트륨의 과부하로 인한 세포손상을 유발할 수 있다.

다양한 세포종에서 발현되는 NHE는 막단백질의 일종으로서 세포 내의 수소이온 한 개를 밖으로 내보내고 Na^+ 한 개를 세포 내로 들여온다. 그 결과, 정전기적으로 중성을 유지하여 세포 내 pH를 조절하는 중요한 역할을 수행한다. 현재까지 7개의 아형이 확인되었으며, 심근세포의 주아형인 NHE-1이 허혈/재관류 손상에 주요 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Avkiran, M. *et. al.*, (2002) *J. Am. Coll. Cardiol.* 39: 747-753). 정상적인 생리적 pH(≈ 7.2)에서 NHE-1은 거의 작동을 하지 않는다. 산소가 부족한 허혈 상태에서는 에너지 생성을 해당작용(glycolysis)에 의존하므로, 세포 내 수소이온 농도가 증가하여 산성화가 되고(pH ≈ 6.4), 수소이온 감지기(proton sensor)를 갖는 NHE-1이 활성화되어 수소이온을 내보내고 나트륨이온을 세포 내로 들여오므로, 세포 내의 나트륨이온의 농도가 증가하게 된다. 허혈시에는 ATP 에너지 생성의 감소로 Na^+/K^+ ATP활성효소가 억제되므로 나트륨 펌프에 의해 세포 내에 축적된 나트륨이온을 내보낼 수 없게 된다. 따라서 정상상태에서는 칼슘을 내보내고 나트륨을 들여오는 나트륨/칼슘 통로인 NCX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger)가 높아진 나트륨 농도를 조절하기 위해 역방향으로 작동하여 나트륨이온을 내보내고 칼슘이온을 들여와 세포 내 칼슘이온의 농도가 높아지게 된다. 세포 내 칼슘농도의 증가는 프로테아제, 포스포리파제, 엔도뉴클레아제 등의 효소를 활성화시킴으로써 각종 단백질 분해, 지방대사장애에 의한 활성산소 유리기의 증가, DNA 변형 등을 유발하여 세포손상을 일으키게 된다. 따라서, NHE-1의 활성을 저해하여 세포 내 나트륨 이온농도의 증가를 억제함으로써 NCX의 역방향 작동을 억제할 수 있고, 세포 내 칼슘이온농도의 증가를 억제하여 허혈/재관류에 의한 세포손상을 막을 수 있다. 증가된 수소이온은 다른 이온통로에 의해 조절됨으로써 NHE-1의 억제에 의한 세포 내 산성화는 일어나지 않는 것으로 보고되었다.

종래, 이러한 NHE 억제제로는 이노제인 피라진 유도체 아밀로라이드(amiloride)가 처음으로 알려졌다(Benos, DJ. (1982) *A. J. Physiol.* 242: C131). 상기 아밀로라이드는 NHE-1의 활성을 억제하며, 랫트 적출심장 실험에서 허혈/재관류 후에 심기능의 회복을 증진시키는 것으로 확인되었으나, NHE-1 이외에도 NHE-2 및 나트륨 채널을 억제하는 등 선택성이 부족하여 심장보호제로서는 문제가 있었다. 그 후, NHE-1에 대해 선택성이 있는 약물 개발 연구가 진행되었다. 그 결과, 헤스트 마리온 루셀(Hoechst Marion Roussel; 현재 Aventis)에 의하여 NHE-1에 대해 높은 선택성을 갖는 벤조일 구아니딘 유도체인 카리포라이드(cariporide, HOE-694)가 개발되었다(Scholz, W. *et. al.*, (1993) *Br. J. Pharmacol.* 109: 562). 상기 카리포라이드는 동물 모델에서 우수한 심장 보호효과를 나타내었으며, 임상에서도 관동맥우회술 환자에 투여하여 유의성 있는 보호효과를 나타내었다.

이에, 본 발명자들은 허혈에 의한 심근세포 손상의 진행을 늦추고, 재관류 손상을 완화시킬 수 있으며, 높은 안정성 및 우수한 효과를 갖는 약물을 개발하기 위한 연구를 수행하던 중, 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체를 합성하였고, 이들 유도체들이 NHE-1을 선택적으로 억제하는 효과가 우수함을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 NHE-1에 대한 선택적 억제 효과가 우수한 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 크로만온 유도체 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 허혈성 심장질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 크로만온 유도체 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는, 수술요법 또는 약물요법 시술시에 심장보호 용도로 사용되는 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

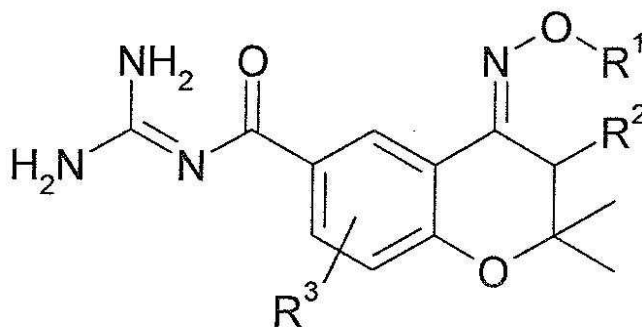
발명의 구성

상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 신규 크로만은 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 허혈성 심장질환을 예방 및 치료, 또는 수술요법 또는 약물요법 시술시에 심장보호 용도로 사용되는 약학적 조성물을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만은 옥심 카보닐구아니딘 유도체를 제공한다.

화학식 1



1

본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만은 옥심 카보닐구아니딘 유도체에 있어서, R₁은 H, C₁~C₅의 직쇄 또는 측쇄 알킬기, 또는 C₆~C₁₀의 아릴기이며, 바람직하게는 R₁은 H, 메틸기 또는 벤질기이다.

R₂는 H 또는 할로젠이며, 바람직하게는 R₂는 H 또는 Br이다.

R₃는 C₁~C₅의 직쇄 또는 측쇄 알킬기, 나이트로기, H 또는 C₁~C₅ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기를 가지는 아민기이고, 바람직하게는 R₃는 H, Cl, Br 또는 NO₂이다.

본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만은 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 바람직한 예는 하기와 같다:

- 1) N-(4-하이드록시아미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 2) N-(4-메톡시아미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 3) N-(4-벤질옥시아미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 4) N-(3-브로모-4-메톡시아미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 5) N-(7-클로로-4-메톡시아미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘;
- 6) N-(8-나이트로-4-메톡시아미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘; 또는
- 7) N-(8-브로모-4-메톡시아미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘.

본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만은 옥심 카보닐구아니딘 유도체는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로

는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈록투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게, 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설폰산을 사용할 수 있다.

상기 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 화합물을 수혼화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

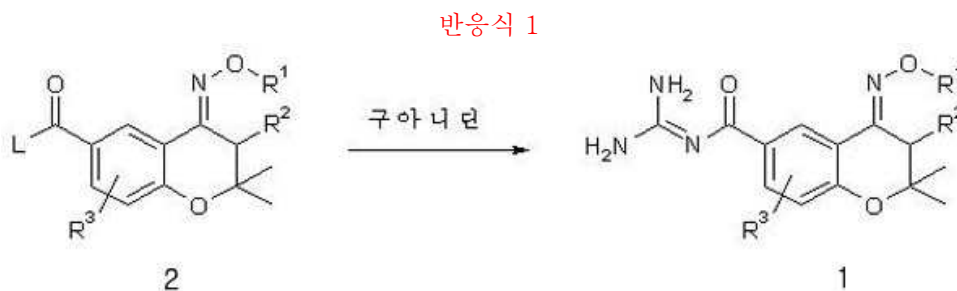
또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체는 약학적으로 허용가능한 염 뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물, 용매화물 및 가능한 입체이성질체도 모두 포함한다.

본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 수화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 물을 포함하고 있는 것으로 이해될 수 있다. 상기 수화물은 1 당량 이상, 일반적으로는 1~5 당량의 물을 함유할 수 있다. 이러한 수화물은 물 또는 물을 함유하는 용매로부터 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 결정화시켜 제조될 수 있다.

본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체는 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용매화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 용매를 포함하고 있는 것으로 이해될 수 있다. 상기 용매로서 바람직한 것은 휘발성, 비독성 또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들을 들 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체를 제조하는 방법을 제공한다.

구체적으로, 본 발명에 따른 상기 제조방법은 하기 반응식 1로 표시되는 바와 같이, 카복실산 유도체(2) 및 과량의 구아니딘과 반응시키거나, 적절한 염기하에서 당량의 구아니딘과 반응시키는 단계를 포함하여 이루어진다.



(상기 식에서, R_1 , R_2 및 R_3 는 상기 화학식 1에서 정의된 바와 같고, L은 이탈기이다.)

본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 출발물질로 사용되는 화학식 2의 카복실산 유도체로는 에스터, 아실 할라이드, 카복실산 무수물(acid anhydride) 등을 사용할 수 있다. 상기 카복실산 유도체(2)는 쉽게 이탈될 수 있는 이탈기(L)를 가지고 있기 때문에, 구아니딘과 용이하게 친핵성 치환반응을 수행할 수 있다.

이러한 이탈기(L)로는 $C_1 \sim C_5$ 알콕시기, 할라이드기, 카복실레이트기, p-니트로페녹시기, N-히드록시석신이미드기, 펜타플루오로페녹시기 등이 바람직하고, 이 중에서도 $C_1 \sim C_5$ 의 알콕시기인 것이 더욱 바람직하며, 메톡시기 또는 에톡시기인 것이 가장 바람직하다.

본 발명에 따른 상기 제조방법에 있어서, 적절한 염기의 사용없이 과량의 구아니딘을 카복실산 유도체(2)와 반응시키는 경우, 상기 구아니딘의 당량은 상기 카복실산 유도체(2)에 대하여 1~10 당량인 것이 바람직하다.

한편, 적절한 염기를 사용하여 구아니딘을 카복실산 유도체(2)와 반응시키는 경우, 상기 구아니딘은 상기 카복실산 유도체(2)에 대하여 당량으로 사용한다. 적절한 염기의 사용은 구아니딘의 친핵성 치환반응을 용이하게 하는 역할을 하기 때문이다. 이때, 사용될 수 있는 염기로는 피리딘, 트리에틸아민, 소듐 아세테이트, 포타슘 아세테이트, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 탄산칼륨, 탄산나트륨, 탄산마그네슘, 탄산수소나트륨 등이 바람직하다.

본 발명에 따른 상기 제조방법에 있어서, 반응 용매로는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 등과 같은 알코올계 용매, 테트라하이드로퓨란(THF), 디옥산, 1,2-디메톡시에탄(DME) 등과 같은 에테르계 용매, 디메틸포름아마이드(DMF), 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다. 나아가, 상기 반응의 온도는 상온에서 용매의 비등점까지의 범위 내에서 수행되는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 제조방법에 있어서, 상기 출발물질로 사용되는 카복실산 유도체(2)는 하기 반응식 2로 표시되는 바와 같이,

화합물(4), 및 하이드록시아민 또는 하이드록시아민 하이드로클로라이드를 적당한 염기 존재하에 반응시켜 화합물(3)을 제조하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 제조된 화합물(3), 및 $C_1 \sim C_5$ 의 알킬 또는 $C_6 \sim C_{10}$ 의 아릴 할로젠 화합물을 적당한 염기 존재하에 반응시켜 카복실산 유도체(2)를 제조하는 단계(단계 2)를 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있다.



(상기 식에서, R_1 , R_2 , R_3 및 L은 반응식 1에서 정의된 바와 같다.)

본 발명에 따른 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체를 제조하는 방법에 있어서, 출발물질로 사용되는 카복실산 유도체(2)를 제조하는 방법은 옥심화 반응(단계 1) 및 알킬화 반응(단계 2)으로 이루어진다. 이하에서, 상기 각 단계를 분설한다.

상기 단계 1의 옥심화 반응은 상업적으로 시판되거나, 공지의 방법으로 제조한 상기 화합물(4)와 하이드록시아민 또는 하이드록시아민 하이드로 클로라이드를 반응시켜 수행될 수 있다.

이 경우, 반응을 용이하게 수행될 수 있도록 하기 위해, 적절한 염기를 사용할 수 있다. 상기 염기로는, 예를 들면, 피리딘, 트리에틸아민, 소듐 아세테이트, 포타슘 아세테이트, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 탄산칼륨, 탄산나트륨, 탄산바륨, 탄산수소나트륨 등을 사용할 수 있다.

동일한 목적으로, 상기 단계 1의 반응 용매로는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 등의 알코올계 용매, 테트라하이드로퓨란(THF), 1,2-디메톡시에탄(DME), 디메틸설폭사이드(DMSO) 등을 사용하는 것이 바람직하며, 이들과 물과의 혼합용매를 사용할 수도 있다.

다음으로, 상기 단계 2의 알킬화 반응은 상기 단계 1에서 제조된 화합물(3)을 알킬 또는 아릴 할로젠 화합물과 친핵성 치환반응을 유도함으로써 수행될 수 있다.

상기 알킬 또는 아릴 할로젠 화합물은 $C_1 \sim C_5$ 의 알킬 또는 $C_6 \sim C_{10}$ 의 아릴 할로젠 화합물로서, 바람직하게는 메틸 할라이드 또는 벤질 할라이드 등을 사용할 수 있다.

상기 단계 2의 알킬화 반응을 용이하게 수행하기 위해, 적절한 염기를 사용할 수 있다. 상기 염기로는, 예를 들면, 소듐 하이드라이드, 포타슘 t-부톡사이드, 소듐 메톡사이드, 소듐 에톡사이드, N,N-디이소프로필아민, 2,4-디아미노부틸산(DBU) 등을 사용할 수 있다.

동일한 목적으로, 상기 단계 2의 반응 용매로는 테트라하이드로퓨란(THF), 디옥산, 1,2-디메톡시에탄(DME) 등과 같은 에테르계 용매, 디메틸포름아마이드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO) 등을 사용할 수 있다.

나아가, 상기 단계 1 및 2의 옥심화 반응 및 알킬화 반응의 온도는 0℃ 내지 사용되는 용매의 비등점의 범위 내에서 수행될 수 있다.

본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 심장보호 용도로 사용되는 약학적 조성물로서 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 인간의 NHE-1을 발현시킨 세포에서 NHE-1에 대해 강력한 억제효과를 갖는다. 또한, 적출 허혈심장 모델에서 허혈/재관류에 의한 심근 손상의 회복을 증진시키고, 생체 내 허혈동물 모델에서 심근경색의 크기를 유의성 있게 감소시켜 우수한 심장보호효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 심근경색, 심부전증, 협심증을 포함하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료제로서 사용될 수 있으며, 관동맥우회술, 관동맥경피성형술을 포함하는 수술요법 또는 혈전용해제를 이용한 약물요법을 포함하는 재관류 요법 시술 시에 심장보호제로서 유용하게 사용될 수 있다.

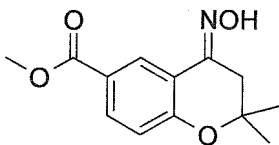
본 발명의 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상 투여 시에 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 포함되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있다. 구체적으로, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.1~1000 mg/일이고, 바람직하게는 1~500 mg/일이다. 또한, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

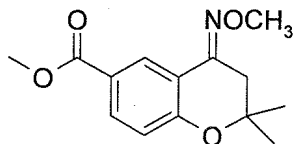
<제조예 1> 4-하이드록시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터의 제조



2,2-다이메틸-4-옥소크로만-6-카복실산 메틸 에스터 470 mg (분자량: 233.83, 2.01 mmol)을 메탄올 10 ml에 녹이고, 하이드록실아민 하이드로클로라이드 182 mg (분자량: 69.73, 2.61 mmol)과 소듐 아세테이트 247 mg (분자량: 81.79, 3.02 mmol)을 첨가한 후 메탄올에서 2시간 동안 가열 환류시켰다. 상기 반응액을 냉각시킨 후 에틸아세테이트 50 ml로 2회 추출하였다. 이후, 추출액 중 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하였다. 상기 여과액은 감압하여 농축하였으며, 얻어진 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산:아세트산에틸=4:1 부피비)로 정제하여 목적화합물(흰색 고체, 315 mg, 63%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.40(s, 6H), 2.70(s, 1H), 2.89(s, 2H), 3.89(s, 3H), 6.87(d, 1H), 7.90(dd, 1H), 8.51(d, 1H)

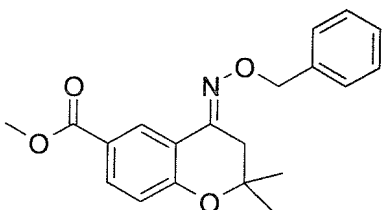
<제조예 2> 4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터의 제조



제조예 1에서 얻은 화합물 160 mg(분자량: 250, 0.64 mmol)을 DMF 2 ml에 녹이고 0 °C에서 소듐 하이드라이드(60%) 51 mg(분자량: 39.84, 1.28 mmol)을 서서히 가하여 30분 동안 교반시켰다. 상기 반응액에 요오드화메탄 0.29 ml를 첨가하고 실온까지 온도를 올리면서 30분 동안 교반시켰다. 상기 반응액에 물 10 ml를 가하고 에틸 아세테이트 20 ml로 2회 추출하였다. 이후, 추출액 중 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하였다. 상기 여과액을 감압하여 농축하였으며, 얻어진 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산:아세트산에틸=6:1 부피비)로 정제하여 목적화합물(무색 오일, 118mg, 70%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.38(s, 6H), 2.81(s, 2H), 3.90(s, 3H), 4.01(s, 3H), 6.85(d, 1H), 7.90(dd, 1H), 8.55(d, 1H)

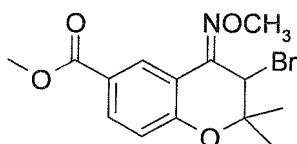
<제조예 3> 4-벤질옥시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터의 제조



제조예 1에서 얻은 화합물 122 mg(분자량: 248.98, 0.49 mmol)과 벤질 브로마이드 0.17 ml(1.47 mmol)을 사용하여 제조예 2와 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(무색 오일, 130 mg, 78%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.36(s, 6H), 2.85(s, 2H), 3.90(s, 3H), 5.26(s, 2H), 6.85(d, 1H), 7.37(m, 5H), 7.89(dd, 1H), 8.56(d, 1H)

<제조예 4> 3-브로모-4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터의 제조

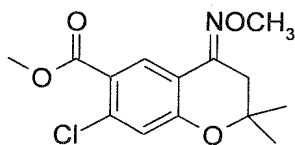


제조예 2에서 얻은 화합물 122 mg(분자량: 265.22, 0.46 mmol)을 CHCl_3 5 ml에 녹이고, 0 °C에서 브롬 0.035 ml(0.69 mmol)을 서서히 가했다. 이후, 빙초산 1방울을 반응액에 적하시키고 80 °C에서 24시간 가열하였다. 상기 반응액에 물 10 ml를 가하고 에틸 아세테이트 20 ml로 2회 추출하였다. 이후, 추출액 중 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하였다. 상기 여과액을 감압하여 농축하고, 얻어진 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산:아세트산에틸=6:1 부피비)로 정제하여 목적화합물(무색 고체, 65 mg, 41%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.36(s, 3H), 1.64(s, 3H), 3.90(s, 3H), 4.10(s, 3H), 5.23(s, 1H), 6.93(d, 1H), 7.96(dd, 1H), 8.55(d, 1H)

Mass: 343(Br81), 341(Br79), 311, 299

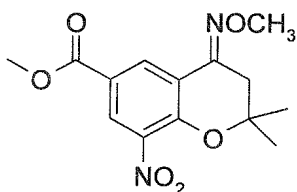
<제조예 5> 7-클로로-4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터의 제조



7-클로로-4-하이드록시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터 152 mg(분자량: 281.48, 0.54 mmol)을 제조예 2와 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(무색 고체, 158 mg, 98%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.37(s, 6H), 2.79(s, 2H), 3.91(s, 3H), 4.00(s, 1H), 6.95(s, 1H), 8.42(s, 1H)

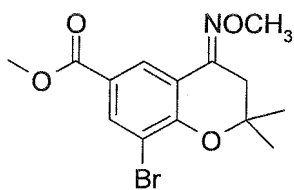
<제조예 6> 8-나이트로-4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터의 제조



8-나이트로-4-하이드록시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터 110 mg(분자량: 297.30, 0.37 mmol)을 제조예 2와 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(노란색 고체, 114 mg, 100%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.45(s, 6H), 2.88(s, 2H), 3.94(s, 3H), 4.04(s, 3H), 8.02(s, 1H), 8.44(d, 1H), 8.75(d, 1H)

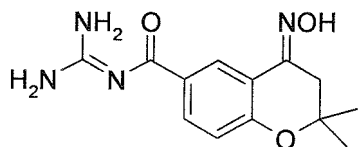
<제조예 7> 8-브로모-4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터의 제조



8-브로모-4-하이드록시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카복실산 메틸 에스터 100 mg(분자량: 333.33, 0.30 mmol)을 제조예 2와 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(노란색 고체, 95 mg, 93%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.43(s, 6H), 2.82(s, 2H), 3.90(s, 3H), 4.01(s, 3H), 8.18(d, 1H), 8.51(d, 1H)

<실시예 1> N-(4-하이드록시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘의 제조

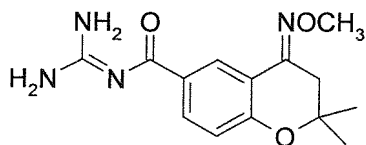


제조예 1에서 얻은 화합물 100 mg(분자량: 250.0, 0.40 mmol)을 DMF 3 ml에 녹인 후, 2.0M 구아니딘 메탄올 용액 1.2 ml을 가하였다. 상온에서 24시간 동안 교반시킨 후 반응액을 물 20 ml로 희석하고 에틸 아세테이트(25 ml)로 2회 추출하였다. 이후, 추출액 중 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하였다. 상기 여과액을 감압하여 농축하였으며, 얻어진 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(메탄올:디클로로메탄 = 1:9 부피비)로 정제하여 목적화합물 53 mg(수율: 48%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ 1.29(s, 6H), 2.78(2, 2H), 6.72(d, 1H), 7.85(d, 1H), 8.50(d, 1H)

Mass: 276(M^+), 275, 259, 237

<실시예 2> N-(4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘의 제조

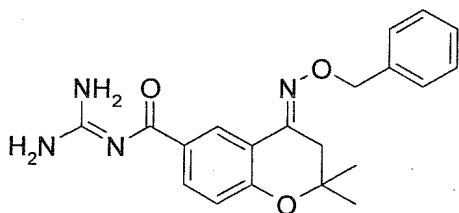


제조예 2에서 얻은 화합물 100 mg(분자량: 263.16, 0.38 mmol)을 실시예 1과 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(94 mg, 84%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ 1.37(s, 6H), 2.84(s, 2H), 3.99(s, 3H), 6.81(d, 1H), 7.96(dd, 1H), 8.61(d, 1H)

Mass: 290(M^+), 275, 258, 242

<실시예 3> N-(4-벤질옥시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘의 제조

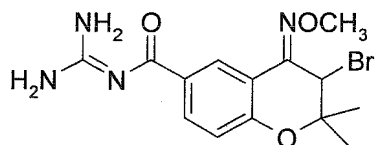


제조예 3에서 얻은 화합물 126 mg(분자량: 340.54, 0.37 mmol)을 실시예 1과 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(100 mg, 73%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.36(s, 6H), 2.85(s, 2H), 5.26(s, 2H), 6.82(d, 1H), 7.36(m, 5H), 8.04(dd, 1H), 8.66(d, 1H)

Mass: 366(M^+)

<실시예 4> N-(3-브로모-4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘의 제조

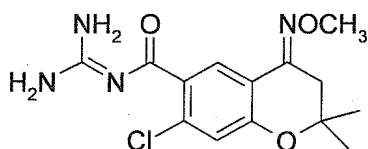


제조예 4에서 얻은 화합물 60 mg(분자량: 333.33, 0.18 mmol)을 실시예 1과 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(15 mg, 23%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.33(s, 3H), 1.62(s, 3H), 4.05(s, 3H), 5.21(s, 1H), 6.82(br, 4H), 6.89(d, 1H), 8.06(dd, 1H)

Mass: 369(M^+), 310, 289

<실시예 5> N-(7-클로로-4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘의 제조

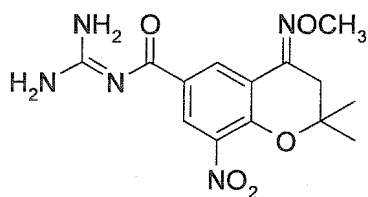


제조예 5에서 얻은 화합물 110 mg(분자량: 297.30, 0.37 mmol)을 실시예 1과 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(90 mg, 78%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ 1.35(s, 6H), 2.81(s, 2H), 3.93(s, 3H), 6.87(s, 1H), 8.059(s, 1H)

Mass: 324(M^-), 309, 289

<실시예 6> N-(8-나이트로-4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘의 제조

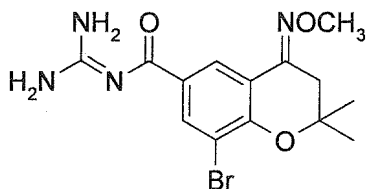


제조예 6에서 얻은 화합물 110 mg(분자량: 305.56, 0.36 mmol)을 실시예 1과 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(63 mg, 52%)을 얻었다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ 1.43(s, 6H), 2.87(s, 2H), 4.02(s, 3H), 6.35(br, 3H), 8.65(d, 1H), 8.88(d, 1H)

Mass: 335(M^+), 320, 304

<실시예 7> N-(8-브로모-4-메톡시이미노-2,2-다이메틸크로만-6-카보닐)구아니딘의 제조



제조예 7에서 얻은 화합물 90 mg(분자량: 346.15, 0.26 mmol)을 실시예 1과 같은 방법으로 반응시켜 목적화합물(67 mg, 70%)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.42(s, 6H), 2.81(s, 2H), 4.00(s, 3H), 6.36(br, 3H), 8.36(d, 1H), 8.63(d, 1H)

Mass: 370(Br81), 368(Br79), 353

<실험예 1> NHE-1 억제효과

본 발명의 신규 크로마논 옥심 카보닐구아니딘 유도체의 NHE-1 억제효과를 세포단계에서 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<1-1> PS120/NHE-1 세포 준비

실험 세포는 CCL39에서 유래된 PS120 세포에 사람 NHE-1를 발현시켜 사용하였으며, 10% 소태아혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신(100X 용액), 1% L-글루타민(200mM 수용액)이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 세포를 배양하였다. 상기 PS120/NHE-1 세포를 직경 100 mm 디쉬에서 약 80~90% 키운 후, 트립신으로 처리하였다. 상기 트립신으로 처리된 세포를 인산완충용액(PBS, phosphate buffer saline)로 1회, 나트륨 없는 완충용액(138.2 mM의 염화 칼륨, 4.9 mM의 KCl, 1.5 mM의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM의 KH_2PO_4 , 15 mM의 D-글루코스, 20 mM의 HEPES, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 상기 세척한 세포를 원심분리하여 침전물을 20 mM NH_4Cl 및 10 μM BCECF-AM(2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5,6-carboxy-fluorescein acetoxymethyl ester)을 함유하는 나트륨 없는 완충용액에 부유시킨 후, 37 $^\circ\text{C}$, CO_2 배양기에서 30분간 배양시켰다. NH_4Cl 을 제거하고 동시에 세포 밖에 남아있는 BCECF-AM을 세척해주기 위하여, PS120/NHE-1 세포를 원심분리한 후 나트륨 없는 완충용액으로 1회 세척하였다. 이후, 세포수가 2.5×10^4 세포/ $10\mu\text{l}$ 되도록 부유액을 만들어 4 $^\circ\text{C}$ 의 암실에 보관하였다.

<1-2> NHE-1 억제효과 측정

96 웰 플레이트에 180 μl 의 HBS 완충액(137 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 15 mM D-글루코스, 20 mM HEPES, pH 7.4)과 DMSO 또는 실시예 1~7에서 제조한 크로마논 옥심 카보닐 구아니딘 화합물(0.03~10 μM) 10 μl 씩을 분주하여 잘 섞어준 후, 마지막으로 세포 내 산성화가 유발된 PS120/NHE-1 세포를 10 μl 씩 첨가하여 교반시켰다. 세포를 첨가하고 4분 후에 96 웰 플레이트용 형광분광광도계(XEMINI-XS; Molecular Device)를 사용하여 형광(여기:485/444nm, 방출:535nm)을 측정하였다. 측정된 형광값은 칼륨이온/나이제리신 테크닉(high- K^+ /nigericin technique)을 이용하여 pH로 환산하였다. NH_4Cl 프리펄스(prepulse)로 세포 내 산성화를 유발시킨 세포는 NHE-1의 작동에 의해 세포 내 산성화가 다시 정상으로 회복되게 되는데, 이때 세포 내 산성화의 회복을 50% 억제시키는 화합물의 농도를 구하여(IC_{50} 값) NHE-1에 대한 억제효과를 측정하였다. 대조물질로는 카리포라이드(cariporide, 심장보호제)를 사용하여 실험하고, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[표 1]

화학식 1의 화합물의 NHE-1에 대한 억제효과

화합물	IC_{50} (μM)
카리포라이드	1.6

실시예1	16.8
실시예2	2.5
실시예3	25.5
실시예4	0.6
실시예5	1.5
실시예6	2.7
실시예7	0.7

표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 2, 4, 5, 6 및 7의 화합물들은 3.0 μM 이하의 IC_{50} 값, 즉 각각 2.5, 0.6, 1.5, 2.7, 및 0.7 μM 의 IC_{50} 값을 나타냄으로써, 우수한 NHE-1 억제효과를 나타내었다. 특히, 실시예 4 및 7의 화합물은 0.6 및 0.7의 IC_{50} 값을 갖는 바, 이는 종래 심장보호제의 하나로 사용되고 있는 상기 카리포라이드($\text{IC}_{50}=1.6 \mu\text{M}$)와 비교하여 3배에 가까운 NHE-1 억제효과를 나타냄을 알 수 있다. 이로부터, 본 발명에 따른 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체들은 NHE-1 억제를 통하여 허혈/재관류 손상에 대한 보호제로서 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

<실험예 2> 흰쥐의 적출 허혈심장에 대한 심장보호효과

본 발명의 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체들이 적출심장에서 허혈 심장의 기능 회복을 증진시켜 심장보호작용을 나타내는지 알아보기 위하여, 흰쥐에 대하여 하기와 같은 적출심장 실험을 수행하였다.

수컷 흰쥐(300~450 g, 한국화학연구소 실험동물실)에 펜토바비탈 나트륨염 (Sodium pentobarbital) 100mg/kg을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 헤파린 1000 U/kg을 정맥 투여하고 심장을 적출하였다. 구체적으로 기관에 캐눌라(cannula, PE 240)를 삽입하고 설치류 호흡기(rodent ventilator)를 이용해 인공호흡시키면서, 대동맥 캐눌라를 대동맥에 삽입하고 역행성 관류 하에 심장을 적출하여 랑겐돌프 기기(Langendorff Apparatus)에 재빨리 매달고 심장에 붙어있는 불필요한 조직을 제거한 후, 정압 관류(85 mmHg) 하에서 95% O_2 / 5% CO_2 로 포화된 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 생리액(modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer; 조성 <mM/L>: 116 NaCl, 4.7 KCl, 1.1 MgSO_4 , 1.17 KH_2PO_4 , 24.9 NaHCO_3 , 2.52 CaCl_2 , 8.32 글루코스, 2.0 피루베이트)으로 관류시켰다. 에탄올과 증류수 혼합액(1:1 부피비)으로 채운 고무 풍선(latex balloon)이 연결된 금속 캐눌라를 폐정맥을 통해 좌심실에 삽입시키고 풍선에 전달되는 좌심실압을 압력 변환기(pressure transducer)를 통해 등량적으로 (isovolumetric) 확대기(Plugsys bridge amplifier)로 처리하여 기록계 (Linearcorder mark 8 WR 3500)에 기록하였다. 심장을 15분 동안 안정화시킨 후, 좌심실 이완기말압(LVEDP, left ventricular enddiastolic pressure)을 5 mmHg로 r가하고 이 풍선 부피를 전 실험기간 동안 유지시켰다.

이후, 기조(Baseline) 심장 수축 기능과 심박동수(HR, heart rate) 및 관상혈류(CF, coronary flow)를 측정하였다. 심장 수축 기능을 평가하는 지표인 좌심실 발생압(LVDP, left ventricular developed pressure)은 좌심실 최대 수축기압(LVSP, left ventricular peak systolic pressure)과 좌심실 이완기말압(LVEDP, left ventricular end diastolic pressure)의 차이로 산출하였다. 생체 내 심장과 달리 심장 박출량(cardiac output)을 측정할 수 없는 랑겐돌프 심장(Langendorff heart)에서 간접적으로 심장의 기능(cardiac performance)을 알아보는 중요한 지표인 심박동수-압력의 곱[Double product RPP(rate-pressure product)]은 심박동수(HR)에 좌심실 발생압(LVDP)을 곱하여 계산하였다. 심장의 온도는 실험 전 기간에 걸쳐 심장을 95% O_2 / 5% CO_2 가 지속적으로 공급되는 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 생리액에 담금으로써 일정하게 유지하였다. 안정화 후, 관류액을 각각 10분 동안 심장에 관류시킨 후, 심장 수축 기능 및 심박동수(HR, heart rate)를 측정 한 후 관류액 공급을 완전히 차단하여 30분 동안 전허혈(global ischemia)을 유발시켰다. 이후 30분 동안 관류액을 재관류 한 후에 각 지표(LVDP, HR, LVEDP)를 재차 측정하였다. 이때, 관류액은 상기 실시예 2, 4, 5, 6 및 7에서 제조한 화합물을 일정농도(10 μM)로 DMSO에 녹인 후, HBS 완충액으로 희석하여 상기 DMSO의 농도가 0.04%가 되도록 제조하였다. 음성대조군으로는 0.04%의 DMSO를 함유하는 HBS 완충액을 관류액으로 사용하였으며, 대조물질로는 카리포라이드를 사용하고, 상기 RPP 및 LVEDP값을 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

화학식 1의 화합물의 흰쥐의 적출 허혈/재관류 심장에 대한 보호효과

화합물	농도 (μM)	RPP ¹ (%)	LVEDP ² (mmHg)
-----	----------------------	----------------------	---------------------------

음성대조군	-	15.5	55.3
카리포라이드	10	69.8	22.4
실시예2	10	51.2	9.0
실시예4	10	16.1	49.7
실시예5	10	26.0	37.7
실시예6	10	57.3	11.7
실시예7	10	8.7	34.0
1: 심박동수-압력의 곱; RPP(rate pressure product), LVDP(좌심실압) × HR(심박동수) 허혈유발 전 값에 대한 % 2: 좌심실이완기말압(left ventricular end diastolic pressure)			

표 2에 나타난 바와 같이, 흰쥐의 적출심장을 이용한 적출 허혈심장 실험에서, 음성대조군으로부터는 심장의 수축기능을 잘 반영하는 좌심실 발생압(LVDP)과 심박동수의 곱(Double Product parameter, LVDP × HR)이 허혈유발 전의 15.5%로 심장의 수축기능이 현저히 저하되었음을 알 수 있으며, 허혈/재관류에 의한 심근의 수축(contracture)을 나타내어 심장 보호작용의 또 다른 지표인 재관류 좌심실이완기말압도 5 mmHg에서 55.3 mmHg로 유의성 있게 증가되었다.

반면에, 실시예 2 및 6의 화합물들은 10 μM 처리에 의해 허혈/재관류에 의해 저하된 심근 수축 기능(LVDP × HR)을 허혈유발 전의 50% 이상으로 회복시켰으며, 특히 좌심실이완기말압도 각각 9.0 및 11.7 mmHg로 저하시켜 카리포라이드와 유사하게 우수한 허혈/재관류 심장에 대한 보호효과를 나타내었다.

이로부터, 본 발명의 신규 크로마온 옥심 카보닐구아니딘 유도체들은 허혈/재관류 손상에 의한 심장기능의 회복을 증진시킴으로써, 허혈성 심장에 대한 보호작용이 우수하고 허혈성 심장질환에 관련된 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

<실험예 3> 흰쥐의 생체내(*in vivo*) 허혈심장 모델에 대한 심장 보호작용

본 발명의 화학식 1의 화합물이 생체 내 허혈 심장을 보호하는 작용을 나타내는지 알아보기 위하여, 흰쥐에 대한 항허혈 효과(Antiischemic effects; 심근경색 감소 효과)를 하기와 같은 실험을 수행하였다.

수컷 흰쥐(350~450 g, 한국화학연구소 실험동물실)에 75 mg/kg의 펜토바비탈을 복강주사하여 흰쥐를 마취시켰다. 기관 절개술(tracheotomy)을 실시한 후, 10 ml/kg의 일회 심박출량(stroke volume), 분당 60 심박수로 인공호흡을 실시하였다. 대퇴정맥과 대퇴동맥에 캐눌러를 삽입하여 각각 약물 투여 및 혈압 측정에 이용하였다. 한편, 허혈성 심근손상 모델에서 체온은 결과에 중요한 영향을 미치므로, 직장에 삽입한 체온 측정용 탐침(probe)과 항온 피복 조절 유니트(Homeothermic blanket control unit)를 사용하여 쥐의 체온을 37 °C로 일정하게 유지시켰다. 이후, 실험기간 동안 쥐의 평균 동맥압(mean arterial blood pressure)과 심박동수(HR)를 계속해서 측정하였다. 이때, 혈압 측정에는 슈타탐 P23XL 압력 변환기(Statham P23XL pressure transducer, Grass Ins., MA, 미국)를 사용하고 심박동수 측정에는 심전도/심박동수 카플러(ECG/RATE Coupler, Hugo Sachs Electronic, 독일)를 사용하였다. 또한, 그래프텍 리니어코더 차트 리코더(Graphtec Linearcorder WR 3310, Hugo Sachs Electronic)를 사용하여 모든 변화를 연속적으로 기록하였다.

좌관상 동맥은 셀리(Selye H.)의 방법에 의해 하기와 같이 결찰시켰다. 즉, 좌개흉술(left thoracotomy)에 의해 흰쥐의 가슴 일부를 열고 왼손의 장지(長指)로 마취된 흰쥐의 오른쪽 가슴에 압력을 가하여 심장을 외부로 밀어내어 왼손의 엄지와 검지 손가락으로 심장을 가볍게 고정시켰다. 이후, 수술사(5~0 silk ligature)가 부착된 봉합용(suture) 바늘로 조심스럽게 좌심실 하행성 관상동맥(left anterior descending coronary artery, LAD)을 포함하는 부분을 뜯 뒤 재빨리 심장을 흉곽(thoracic cavity)에 재위치시키고 수술사 양끝을 외부에 위치시켰다. 상기 수술사 양끝은 PE 튜브(PE100, 2.5cm)에 통과시킨 후 20분 동안 그대로 두어 안정화시켰다. 그 후, 대퇴정맥에 삽입된 캐눌러를 통해 실시예 2, 4, 5 및 6에서 제조한 화합물을 50% PEG 400에 녹인 약물을 투여하였으며, 대조군은 50% PEG 400만을 투여하였다. 약물의 효과가 충분히 나타나도록 30분간 그대로 두었다. 이후, 실에 끼워 놓았던 PE 튜브를 심장에 밀어 넣고 튜브의 끝부분 실을 지혈(hemostatic) 핀셋으로 당겨 PE 튜브를 관상동맥에 수직으로 밀착시켜 압력을 가하였으며, 45분 동안 그대로 두어 관상동맥을 결찰(occlusion)시킨 후, 지혈 핀셋을 제거하고 90분간 재관류시켰다.

상기 방법에 의해 관상동맥을 재결찰(reocclusion)시키고, 1% 에반스 블루 용액(Evans blue) 2 ml를 정맥투여하였다. 이후, 펜토바비탈을 과량 정맥 투여하여 흰쥐를 도살시키고 심장을 떼어내어 우심실과 양쪽 심방을 제거하였다. 좌심실은 심첨으로부터 5~6 개의 절편(slice)으로 수평 절단하고, 절편 각각의 무게를 측정하였다. 심장 절편 각각의 표면은 콤팩트 미세 영상 측정장치(compact micro vision system)인 하이-스코프(Hi-scope)와 화상분석용 컴퓨터 프로그램(Image pro plus)을 이용해 컴퓨터에 입력시키고, 이로부터 각 절편에서 푸른색으로 착색된 정상혈류 조직의 면적과 착색되지 않은 영역의 면적을 측정하였다. 각 절편의 총면적에 대하여 착색되지 않은 영역의 면적비를 구하고, 여기에 각 절편의 무게를 곱하여 각 절편의 위험영역인 AAR(area at risk)을 계산하였다. 이렇게 구한 각 절편에 대한 AAR를 모두 합하고 이것을 전체 좌심실 무게로 나누어, 하기 수학적 식 1에 의해 AAR(%)을 구하였다.

수학적 식 1

$$AAR(\%) = [(\text{각 절편에 대한 } AAR \text{의 합}) / (\text{전체 좌심실 무게})] \times 100$$

또한, 심장 절편을 1% 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드 인산 완충 용액(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) phosphate buffer, 37°C, pH 7.4)에서 15분 동안 배양시키고 10% 포르말린(formalin) 용액에서 20~24시간 동안 고정시켰다. 이렇게 함으로써 심근의 탈수소효소(dehydrogenase)와 보조인자(cofactor)인 NADH에 의해 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드가 환원되어 포르마잔 염료(formazan dye)가 되므로, 조직의 정상 부위는 붉은 벽돌색(brick-red color)을 띠게 된다. 반면 조직의 경색 부위에는 탈수소효소와 보조인자가 없으므로 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드가 환원되지 않고, 따라서 붉은 벽돌색을 띠지 않게 된다.

상기와 같이 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드에 의해 조직 부위가 착색되는지 여부에 의해 각 절편의 정상 영역 및 경색 크기(Infarct size)를 상기 AAR 측정시와 동일한 방법으로 구하였다. 이렇게 구한 각 절편에 대한 경색 영역을 모두 합하고 이것을 전체 AAR 무게 또는 전체 좌심실 무게로 나누어, 하기 수학적 식 2에 의해 IS(%)를 구하였다. 이 실험 모델에 있어서는, IS(%)가 낮을수록 경색부위가 적은 것이므로 시험물질의 항허혈 효과가 강한 것으로 판정하였다.

수학적 식 2

$$IS(\%) = [(\text{각 절편에 대한 경색크기의 합}) / (\text{전체 좌심실 또는 전체 } AAR \text{의 무게})] \times 100$$

상기 수학적 식 1 및 2에 의해 구해진 AAR에 대한 IS의 비를 심근경색율로 계산하고 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[표 3]

화학적 식 1의 화합물의 흰쥐의 생체내 허혈/재관류 심장에 대한 보호효과

화합물	심근경색율 (IS/AAR1, %)	
음성대조군	58.6	
실시예2	1.0 mg/kg	47.6
실시예4	1.0 mg/kg	36.0
실시예5	1.0 mg/kg	36.1
실시예6	1.0 mg/kg	46.3

1: IS/AAR(infarct size/area at risk)

표 3에 나타난 바와 같이, 흰쥐를 이용한 생체 내 허혈 심근 손상 모델에서도 본 발명의 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체들은 위험영역에 대한 심근경색율이 유의적으로 감소된 수치를 나타내었다. 구체적으로 음성대조군은 위험영역(AAR)에 대한 심근경색율이 58.6%로서 허혈에 의한 심근 손상이 매우 심한 것을 알 수 있다. 이에 비해, 실시예 2, 4, 5 및 6의 화합물은 심근경색율이 음성대조군보다 유의성있는 감소를 나타내었다. 특히, 실시예 4 및 5의 화합물은 1.0 mg/kg 투여에 의해 각각 36.0% 및 36.1%의 심근경색율을 나타내어 심근경색 크기가 대조군에 비해 40% 정도 감소하여 우수한 허혈심장 보호효과를 나타내었다.

이로부터, 본 발명의 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체는 생체 내 허혈심장 모델에서 심근경색을 감소시켜 허혈심장에 대한 보호작용이 우수하므로, 심근경색, 부정맥, 협심증 등의 허혈성 심장질환의 예방 및 치료제로 사용할 수 있으며, 관동맥우회술, 관동맥경피성형술 등 심장시술 시의 심장보호제 등으로 사용할 수 있다.

<실험예 4> 랫트에 대한 경구투여 급성 독성실험

본 발명의 화학식 1의 화합물의 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

6주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 군당 2 마리씩의 랫트에 실시예 1~7에서 제조한 화학식 1의 화합물을 각각 0.5% 메틸셀룰로스 용액에 현탁하여 10 mg/kg/15ml의 용량으로 단회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 랫트의 폐사 여부, 임상증상 및 체중변화 등을 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상 여부를 관찰하였다.

실험 결과, 실시예 1~7의 화학식 1의 화합물을 투여한 모든 랫트에서 특기할 만한 임상증상은 없었고 폐사된 랫트도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

이로부터, 본 발명의 화학식 1의 화합물은 모두 랫트에서 10 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며, 경구 투여 최소치사량(LD₅₀)은 적어도 10 mg/kg 이상인 안전한 물질임을 알 수 있다.

하기에 본 발명의 약학적 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

<제제예 1> 정제의 제조(직접 가압)

본 발명의 화학식 1의 화합물 5.0 mg을 체질한 후, 락토스 14.1 mg, 크로스포비돈 USNF 0.8 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg을 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

<제제예 2> 정제의 제조(습식 조립)

본 발명의 화학식 1의 화합물 5.0 mg을 체질한 후, 락토스 16.0 mg과 녹말 4.0 mg을 혼합하였다. 폴리솔베이트 80 0.3 mg을 순수한 물에 녹이고, 이 용액의 적당량을 첨가한 후, 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후, 콜로이드성 실리콘 디옥사이드 2.7 mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 mg과 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

<제제예 3> 캡슐제의 제조

본 발명의 화학식 1의 화합물 5.0 mg을 체질한 후, 락토스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg과 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 경질 캡슐에 상기 분말을 넣어 캡슐제를 제조하였다.

<제제예 4> 주사액제의 제조

본 발명의 화학식 1의 화합물 100 mg, 만니톨 180 mg, Na₂HPO₄ · 12H₂O 26 mg 및 증류수 2974 mg을 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120 °C에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

발명의 효과

본 발명에 의하면, 나트륨/수소 교환통로인 NHE-1에 대하여 강력한 억제작용을 나타내고, 적출 허혈심장모델에서 허혈/재관류에 의한 심장기능 손상의 회복을 증진시키며, 생체 내 허혈동물 모델에서 심근경색의 크기를 유의성있게 감소시킬 수 있는, 우수한 심장보호효과를 갖는 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체를 얻을 수 있다.

따라서, 본 발명의 신규 크로만온 옥심 카보닐구아니딘 유도체는 심근경색, 심부전증, 협심증을 포함하는 허혈성 심장질환의 예방 및 치료제, 또는 관동맥우회술, 관동맥경피성형술을 포함하는 수술요법 또는 혈전용해제를 이용한 약물요법을 포함하는 재관류요법 시술 시에 심장보호제로 유용하게 사용될 수 있다.