



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0134305
(43) 공개일자 2010년12월23일

(51) Int. Cl.

A61K 31/35 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0052858

(22) 출원일자 2009년06월15일

심사청구일자 2009년06월15일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

배현수

서울특별시 서초구 잠원동 한신시티21 218호

이희경

서울특별시 노원구 하계2동 시영6단지장미아파트 614-1104

한아름

서울특별시 은평구 불광2동 198-4호

(74) 대리인

윤여강, 오대웅

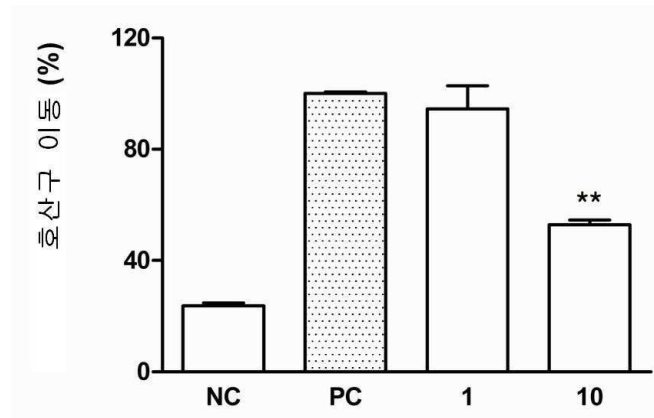
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 피라노피란-1,8-다이를 함유하는 천식치료제

(57) 요약

본 발명은 *Vitex rotundifolia* Linne fil (Verbenaceae) 의 과실로부터 추출한 화합물인 피라노피란-1,8-다이를 천식 치료제로서의 용도에 관한 것이다. 상기 화합물은 관련된 신호전달 경로를 억제함으로써 호산구의 이동을 저해한다. 따라서 천식을 비롯하여 에오탁신의 분비 및/또는 호산구의 이동과 관련된 알레르기성 질환에 대한 신규한 치료제로서 효과적이다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

피라노피란-1,8-다이온(Pyranopyran-1,8-dione)을 함유하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은 천식, 아토피 또는 알레르기성 비염인 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 피라노피란-1,8-다이온(Pyranopyran-1,8-dione)이 면역세포의 이동 및/또는 침착 작용을 저해하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 면역세포는 호산구인 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 피라노피란-1,8-다이온(Pyranopyran-1,8-dione)이 케모카인의 분비를 억제하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 케모카인은 에오타신인 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 피라노피란-1,8-다이온(Pyranopyran-1,8-dione)이 NF- κ B 및/또는 ERK1/2 신호전달 경로의 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 피라노피란-1,8-다이온(Pyranopyran-1,8-dione)이 사이토카인의 분비를 조절하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-4, IL-5 및/또는 IL-8인 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 피라노피란-1,8-다이온(Pyranopyran-1,8-dione)이 세포부착인자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 세포부착인자는 VCAM 인 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- [0001] 주변의 위험 요소들에의 노출은 알레르기성 천식, 아토피성 피부염 및 알레르기성 비염과 같은 알레르기성 질환의 원인이 된다. 하지만, 알레르기성 질환에 영향을 받는 미국인들이 매년 5천만 명 이상이라는 사실에서 알 수 있듯이, 그러한 노출은 피하기 어렵다. 이들 질환들은 미국의 경우 건강관리 시스템에 매년 약 180억의 비용이 소요되게 만든다(1). 따라서, 알레르기가 발생하는 기작과 이에 대한 치료제들을 개발하거나 증상들을 예방하기 위하여, 제도적이고 산업적인 연구들이 수행되고 있다(2).
- [0002] 천식이란 폐 속에 있는 기관지가 아주 예민해진 상태로, 때때로 기관지가 좁아져서 숨이 차고 가랑가랑하는 숨 소리가 들리면서 기침을 심하게 하는 증상을 나타내는 병을 말하는데, 기관지의 알레르기 염증 반응 때문에 발생하는 알레르기 질환이다. 이런 증상들은 반복적으로, 발작적으로 나타나며 유전적 요인과 환경적 요인이 합쳐져서 나타난다. 공기가 흐르는 길인 기관지의 염증으로 기관지 점막이 부어 오르고 기관지 근육이 경련을 일으키면서 기관지가 막혀서 숨이 차게 된다.

배경 기술

- [0003] 천식의 초기 증상에는 기도의 염증이 포함되며, 이에 호산구(eosinophil)가 중요한 역할을 한다(3). 호산구들은 천식 환자들의 기도에서 언제나 과량으로 발견되지만, 천식 질환의 증상이 약화됨에 따라 그 축적량도 감소한다. 호산구는 주변의 혈액으로부터 선택적으로 이동하여 혈관 내피세포에 부착함으로써 영향을 미친다(4). 그 후 케모카인(chemokines)에 의해 기도로 이동하고, 그곳에 침입하여 감염을 일으킨다. 에오타신(Eotaxin)은 알레르기 자극에 따라 호흡기 상피(respiratory epithelium) 내에서 분비되는 주요한 호산구-특이적 케모카인이다. 에오타신은 호산구의 이동을 야기시킬 뿐만 아니라, 호산구 내에서 생성되어 호산구 이동의 영향력을 증가시킨다(5). 에오타신의 발현은 미토겐-활성 단백질(MAP) 키나아제(MAPK)에 의해 조절되며, 다른 많은 케모카인들을 유도함으로써 기도의 리모델링에도 관여한다(6, 7).
- [0004] 호산구의 기능 및/또는 침입을 저해할 수 있는 자연적 산물들은 천식 및 다른 알레르기성 질환들에 대한 바람직한 치료제들이다(8). 본 발명자들은 이전에 Moutan Cortex Radicis 가 NF- κ B 활성을 저해함으로써 에오타신의 분비를 억제한다는 사실을 보고한 바 있다(9, 10). 이전의 많은 연구들은 활성화된 NF- κ B가 천식에서 기도 염증과 관련된 많은 염증 유전자들의 발현 증가(11-14) 및 호산구들의 조절(15)에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다.
- [0005] 본 발명자들은 약용 식물들에서 생산되는 새로운 항-천식제에 대한 탐색을 위해, 표준 에오타신 ELISA 어세이(assay)를 이용하여 270 개의 표준화된 약용 식물 추출물들이 사이토카인(cytokine) 활성 A549 사람 폐 상피 세포들에 미치는 영향을 측정하였다. A549 세포 내 에오타신 분비의 상당한 감소효과 때문에, 다수의 아시아 국가들에서 편두통 및 알레르기 질환의 치료를 위한 전통적인 한약제로 널리 사용되는 *Vitex rotundifolia* Linn fil 추출물(16)을 활성-유도 분획(activity-guided fractionation) 대상으로 선별하였다. 여러 차례의 활성-유도 분획(activity-guided fractionation) 후에, 페일 옐로우 파우더(pale yellow powder)로 피라노피란-1,8-다이온(1H,8H-Pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione)을 분리하였다. 이 화합물에 대한 동정 결과, 그 인공합성법은 이미 공지되어 있으나(23), 천연물질로부터 이전에 분리된 적이 없는 신규한 화합물임을 알게 되었다. 그 후 피라노피란-1,8-다이온이 폐 상피세포 염증 반응들에 미치는 영향을 시험관 내에서(*in vitro*) 측정하였고, 항-염증 효과에 기여하는 것으로 나타났다. 그 후 본 발명자들은 피라노피란-1,8-다이온이 난백알부민-민감성 알레르기 천식(ovalbumin-sensitized allergic asthma)의 쥐 모델에서 폐 호산성 염증의 발달을 저해함으로써 항-천식 작용에 기여한다는 것을 확인하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 신규한 치료제를 제공하는 것에 있다.

과제 해결수단

- [0007] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 피라노피란-1,8-다이온을 함유하는 것을 특징으로 하는 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환의 치료용 조성물을 제공한다.
- [0008] 상기 피라노피란-1,8-다이온은 도 1의 구조식을 갖는 화합물로서, IUPAC명은 1H,8H-Pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione 이다. 이 화합물은 공지 또는 신규한 방법으로 합성될 수도 있고, 자연계의 식물 등으로부터 추출될 수도 있다.
- [0009] 상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은, 이에 제한되는 것은 아니나, 호흡기계 질환으로 기관지천식, 고초열, 혈관운동신경성 비염, 비후성 비염, 알레르기성 기관지염, 뇌플러 증후군(일과성 폐침윤) 등, 소화기계 질환으로 식이성 알레르기성 위염, 알레르기성 설사, 알레르기성 구내염, 장성자반병(腸性紫斑病) 등, 순환기계 질환으로 결절성 동맥주위염, 폐색성 동맥내막염, 협심증, 심내막염 등, 피부 관계에는 두드러기, 쾨케 부종(혈관신경성 부종), 결절성 홍반, 자반병 등, 눈 관계에는 플릭텐, 교감성 안염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 각막염 등이며, 그 밖에 미만성 사구체신염이나 편두통 등을 들 수 있다. 바람직하게는 천식, 아토피 또는 알레르기성 비염이다.
- [0010] 바람직하게 상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은 면역세포의 이동 및/또는 침착과 관련된 질환이며, 더욱 바람직하게는 호산구의 이동 및/또는 침착과 관련된 질환이다.
- [0011] 바람직하게 상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은 케모카인의 분비와 관련된 질환이며, 더욱 바람직하게는 에오타신의 분비와 관련된 것이다.
- [0012] 바람직하게 상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은 NF- κ B 및/또는 ERK1/2 신호전달 경로의 활성화와 관련된 질환이다.
- [0013] 바람직하게 상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은 사이토카인의 분비와 관련된 질환이며, 더욱 바람직하게는 IL-4, IL-5, IL-8의 분비와 관련된 질환이다.
- [0014] 바람직하게 상기 알레르기성 염증 반응에 의해 발생하는 질환은 세포부착인자의 발현과 관련된 질환이며, 더욱 바람직하게는 VCAM의 발현과 관련된 질환이다.
- [0015] 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.
- [0016] 상기 "치료"는 알레르기성 질환의 경감, 예방, 치료를 모두 포함하는 의미이다.
- [0017] 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 경구투

여가 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.

[0018] 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 adenostrix) 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.

[0019] D-솔비톨(sorbitol), D-만노스(mannose), D-마니톨(mannitol), 염화나트륨과 같은 보조제를 포함하는 등장성용액, 글루코스, 생리식염수는 주사액 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.

[0020] 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 주사액을 적절한 앰플(ampule)에 넣는다.

[0021] 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.

[0022] 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.

[0023] 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 축축해진 가루 화합물의 혼합물을 적절한 기계 내에서 성형하여 만든다. 이 알

약들은 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 매개체와 조성(contitution)하기 위해 건조한 상품으로 제조할 수도 있다. 이러한 경구용 액체의 제조는 현탁제, 유상제, 비수성(non-aqueous) 매개체(식용유를 포함한다)나 방부제 등 종래의 첨가제를 포함할 수 있다. 이 알약들은 유효 성분들이 유리되는 것을 통제하거나 천천히 제공되도록 제조될 수 있다.

[0024] 비경구 투약을 위한 조제는, 비후제(thickening agents) 및 현탁 물질이 포함된 수성 및 비수성 무균 현탁액;과 항산화제, 완충용액, 정균제(bacteriostats), 수혈자의 피와 등장의 제제인 용질을 포함하는 수성 및 비수성무균 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 무균액체 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.

[0025] 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.

[0026] 본 발명으로 얻은 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.

[0027] 흡입으로 투여하기 위해서, 화합물은 주입기(insufflator), 분무기(nebulizer), 압축팩이나 에어로졸 스프레이(aerosol spray)를 운반하는 다른 적당한 수단으로 적절히 운반될 수 있다. 압축팩은 디클로로디플루오로메탄(dichlorodifluoromethane), 트리클로로플루오로메탄(trichlorofluoromethane), 디클로로테트라플루오로에탄(dichlorotetrafluoroethane), 이산화탄소나 기타 적절한 가스와 같은 적절한 추진제를 포함할 수 있다. 압축된 에어로졸의 경우, 용량이 제공된 밸브로 정해져, 측정량만큼 운반된다.

[0028] 또한, 흡입이나 통기법으로 투여하기 위해 이 화합물은 락토오스(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(cartridges), 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 향균물질, 면역억제제나 보존제와 같은 다른 유효 성분을 포함할 수도 있다.

[0029] 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.

[0030] 약학적 조성물은 바람직하게는 (정맥이나 피하)주사로 투여되거나 경구투여되며, 피실험자에게 투여되는 정확한 양은 담당 의사의 재량이 될 것이다. 그러나 채택된 용량은, 피실험자의 나이나 성별, 치료받아야 할 정확한 질환 및 그 심각한 정도 등 여러 요인에 따라 결정되어야 할 것이다. 또한 투여 과정은 상태와 위중한 정도에 따라 다양할 수 있다.

효 과

[0031] OVA(ovalbumin)에 의한 기도 및 폐의 감각과 유발에 앞선 피라노피란-1,8-다이온의 투여는 전형적인 천식 반응들의 상당한 억제를 가져왔다. 하지만, 피라노피란-1,8-다이온에 의해 OVA 특이적 IgE의 혈청 수준 및 혈액 세포 서브파플레이션(sub-population)은 큰 변화가 없었다. 또한, 피라노피란-1,8-다이온 처리 마우스에서 간이나 신장 기능의 이상은 나타나지 않았다. 이러한 결과들로 볼 때, 피라노피란-1,8-다이온은 알레르기성 천식에 대한 새로운 치료제로 사용될 수 있을 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] **실시예 1. 피라노피란-1,8-다이온의 동정**

[0034] (1) 식물로부터의 추출 및 분리

[0035] 식물재료로 *Vitex rotundifolia* Linne fil (Verbenaceae) 의 과실을 사용하였으며, Sun Ten Pharmaceutical (Taipei, Taiwan)에서 구입하였다. 증거 표본(No. E10)은 경희대학교 한의과대학의 식물표본실에 보관되어 있다.

[0036] *V. rotundifolia* 의 과실(3 kg)을 MeOH (5 × 10L) 로 24시간 동안 여과 추출하였다(도 13). 용매를 진공상태로 증발시켜 MeOH 추출물(100 g)을 만들고, 이것을 물 (1L)에 녹인 후, *n*-hexane (5 × 1L), EtOAc (5 × 1L), 및 *n*-BuOH (3 × 1L) 으로 순차적으로 분획하였다. EtOAc 추출물(17 g)을 CHCl₃ 에서 MeOH의 기울기(gradient) 혼합물(0→50 %, 및 각 5 l MeOH 100% 로 세척)을 이동상(mobile phase)으로 이용한 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(φ 4.5 cm; 실리카겔 70-230 mesh, 500 g)로 분리한 결과, 1H,8H-피라노[3,4-*c*]피란-1,8-다이온을 수득하였다(235 mg, 0.0078% w/w).

[0037] (2) 피라노피란-1,8-다이온의 동정

[0038] UV 및 IR 스펙트럼을 Hitachi U-3000 분광광도계 및 Bio-Rad FTS 135 FT-IR 분광광도계에 각각 기록하였다. 1D 및 2D NMR 실험들은 Bruker Avance 400 MHz FT-NMR 장비에서 내부 표준을 테트라메틸실레인(tetramethylsilane, TMS)으로 하여 수행하였다. EIMS는 JEOL JMS 700 Mstation HRMS 분광광도계에서 얻었다. Si gel 60 (70-230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany)으로 칼럼 크로마토그래피를 수행하였다. TLC 분석은 가열처리가 뒤따른(120°C, 5분) UV (254 및 365 nm) 및 10% (v/v) 황산스프레이 조건의 시각화로 코팅된 0.25 mm 두께의 Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany) 판에서 수행하였다.

[0039] 추출된 화합물은 HREIMS에서 m/z 165.0114 [M+H]⁺ 에서 분자 이온 피크를 보였으며, 이것은 분자식 C₈H₄O₄ 에 대응된다. 피라노피란-1,8-다이온의 UV 스펙트럼은 256 nm에서 최대 흡수를 보였고, 이것은 방향족 켄주게이팅 시스템(aromatic conjugating system)의 존재를 나타낸다. 이 화합물의 ¹H 스펙트럼은 δ_H 7.88 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3, H-6) 및 6.82 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-4, H-5)에서 오쏘-결합 양성자들(*ortho*-coupled protons)의 전형적인 신호를 나타냈으며, HSQC NMR 스펙트럼에서 δ_C 131.6 (C-3, C-6) 및 114.6 (C-4, C-5)의 ¹³C NMR 신호들과 관계가 있다. 추가로, δ_C 168.7 (C-1, C-8)의 에스터 그룹 신호들 및 δ_C 162.0 (C-4a) 및 121.3 (C-8a)에서의 4차 탄소(quaternary carbon) 신호들 역시 ¹³C NMR 스펙트럼에서 측정되었다. 추가로, H-3 및 H-6/C-1, C-8, C-4, C-5, 및 C-4a의 HMBC 상관관계들은 α-피론(pyrones)의 존재를 나타내며, H-4 및 H-5/C-3, C-6, C-4a, 및 C-8a의 HMBC 상관관계는 이 α-피론들이 C-4a 및 C-8a에 연결되어 있다는 것을 나타낸다. 이러한 발견에 근거하여, 상기 화합물의 구조를 1H,8H-피라노[3,4-*c*]피란-1,8-다이온으로 결정하였다(도 1). 이 화합물의 인공합성법이 이미 공지되어 있으나(23), 아직 자연에서는 분리되지 않았다.

[0040] **실시예 2. 피라노피란-1,8-다이온의 항-염증 효과에 대한 *in vitro* 실험**

[0041] (1) 세포배양

[0042] 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 1×10^6 cells/ml 의 농도로 배양하였다. 그 후 상기 배양 플레이트들을 37°C, 습도 100 % 및 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 1×10^6 cells/ml의 농도를 유지하기 위해 상기 세포들을 매 3-4일마다 서브컬처하였다.

[0043] (2) 실시간(real time) PCR 분석

[0044] 트리졸(Trizol) 시약(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA., U.S.A)을 이용하여 생산자의 프로토콜에 따라 총(total) 세포 RNA를 추출하고, 흡광도 260 nm (OD 260) 에서 그 농도를 정량화하였다. 그 후 반응 혼합물에 대해 95°C에서 15초간 변성(denaturation) 및 60°C에서 1분간 접합(annealing)을 40사이클 수행하였다. 실시간(Real-time) PCR은 dsDNA-특이적 결합 다이(dye)로 SYBR Green I 및 지속적 형광 모니터링을 이용한 GeneAmp 7300 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 수행하였다(표 1).

표 1

실시간 PCR에 사용한 프라이머들

Gene	Oligonucleotide Sequences
Hu GAPDH	FW 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3' (서열번호 1) RV 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3' (서열번호 2)
Hu Eotaxin	FW 5'-CAC ACC TTC AGC CTC CAA CAT G-3' (서열번호 3) RV 5'-CCA CTG GTG ATT CTC CTG TAG C-3' (서열번호 4)
Hu RANTES	FW 5'-CTG CCT CCC CAT ATT CCT CGG-3' (서열번호 5) RV 5'-GAG TTG ATG TAC TCC CGA ACC C-3' (서열번호 6)
Hu ICAM-1	FW 5'-TGA GGA GAG ATC ACC ATG GAGC-3' (서열번호 7) RV 5'-GCC AGG GAA CAG ACC ACG GT-3' (서열번호 8)
Hu VCAM-1	FW 5'-GAG AAC CCA GAT AGA CAG CCC -3' (서열번호 9) RV 5'-TTC ACG AGG CCA CCA CTC ATC-3' (서열번호 10)
Hu IL-8	FW 5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG-3' (서열번호 11) RV 5'-TGT GTT GGC GCA GTG TGG TC-3' (서열번호 12)
Hu IL-16	FW 5'-CTC GCT CAA CCT TTC AGA GCT-3' (서열번호 13) RV 5'-GAC ATG GAT GCC GTC TAA TTG C-3' (서열번호 14)
Mu GAPDH	FW 5'-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA-3' (서열번호 15) RV 5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3' (서열번호 16)
Mu eotaxin	FW 5'-CAG ATG CAC CCT GAA AGC CAT-3' (서열번호 17) RV 5'-TGC TTT GTG GCA TCC TGG AC-3' (서열번호 18)
Mu RANTES	FW 5'-TGC CCT CAC CAT CAT CCT CAC-3' (서열번호 19) RV 5'-GGC GGT TCC TTC GAG TGA CA-3' (서열번호 20)
Mu VCAM-1	FW 5'-ATG CCT GTG AAG ATG GTC GC-3' (서열번호 21) RV 5'-TGG TCA GAA CGG ACT TGG AC-3' (서열번호 22)
Mu ICAM-1	FW 5'-ATG GCT TCA ACC CGT GCC AA-3' (서열번호 23) RV 5'-AGC TTC CAG TTG GGT CCA CT-3' (서열번호 24)

[0045]

[0046] (3) 피라노피란-1,8-다이온에 의한 에오타신(Eotaxin) 분비 억제

[0047] 세포들을 6-well flat bottomed plates (Corning, New York, USA) 에 1×10^6 cells/ml 의 밀도로 평판배양하였다. 전면성장(confluency)에 이른 뒤 배지를 무혈청(serum free) RPMI 로 교체한 뒤, 시료들을 추가적으로 24시간 동안 배양하였다. 그 후 상기 세포들을 IL-1 β (10 ng/ml) (Biosource, Camarillo, CA, USA), TNF- α (100 ng/ml) (Biosource) 및 IL-4 (100 ng/ml) (Biosource) 의 조합으로 자극한 뒤, 24시간 동안 배양하였다. 그 후 다양한 농도의 피라노피란-1,8-다이온 (0.01, 0.1, 1, 10, 100g/ml) 을 배지에 추가하고, 세포들을 추가로 48시간 동안 배양하였다(17). 그 후에 세포가 포함되지 않은 배양 상층액을 모으고, 효소결합면역흡착측정 키트(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 생산자의 매뉴얼에 따라 에오타신을 측정하였다(18).

[0048] 호산구 주화성과 관련된 케모카인(chemokines) 및 부착(adhesion) 분자들의 발현을 유도하기 위하여 사람 폐 상피 A549 세포들을 TNF- α , IL-4 또는 IL-1 β 로 자극하였다. 그 후 다양한 농도의 피라노피란-1,8-다이온 처리에 의한 에오타신 분비의 억제를 조사하기 위하여 ELISA를 이용하였다. ELISA 결과 1 μ g/ml의 피라노피란-1,8-다이온 처리로 에오타신 분비가 45% 감소하는 것으로 나타났으며(도 2), 10 μ g/ml 처리시 70 % 이상 감소하였다.

[0049] (4) 피라노피란-1,8-다이온에 의한 호산구 이동(주화성) 억제 측정

[0050] 사람 호산구성 백혈병 세포주, EoL-1 을 RIKEN 세포은행(Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)에서 얻었다. 정확한 결과들을 확보하기 위하여, 측정에 앞서 EoL-1 세포들(19)을 0.2% 소 혈청 알부민을 첨가한 무혈청배양액(serum-free media)에서 굶겼다. 그 후 A549 세포들을 TNF- α (100 ng/ml), IL-4 (100 ng/ml) 및 IL-1 β (10 ng/ml) 로 24시간 동안 자극시키고, 다양한 투여량으로 피라노피란-1,8-다이온을 48시간 동안 처리하였다. 그 상층액에서 QCM_{TM} chemotaxis 96-well (5 μ M) Cell Migration Kit (Millipore, Billerica, U.S.A.)의 생산자 매뉴얼에 따라 주화성을 측정하였다. 간략하게, 150 μ l의 상층액을 상기 키트의 낮은 웰에 투여한 뒤, 높은 웰을 낮은 웰 위에 놓고, 100 μ l의 RPMI 배지에서 EoL-1 세포들을 1×10^4 cells/ml 의 농도로 뿌렸다. 4시간의 배양 후에, 상기 높은 웰의 배지를 제거하고, 100 μ l의 세포 부착 버퍼로 채워진 새로운 낮은 웰을 높은 웰에 30분간 부착시켰다. 그 후, 처음의 낮은 웰의 상층액 75 μ l, 두 번째 낮은 웰의 세포 부착 버퍼 75 μ l (키트에 포함; Millipore, Billerica, U.S.A.), 및 염색용액 50 μ l (dye:lysis buffer = 1:75) 를 플랫-바텀(flat-bottomed) 웰 플레이트에 첨가하였다(총 부피 = 200 μ l). 그 후에, 상기 혼합물 150 μ l를 형광 판독에 적합한 웰 플레이트에 옮겼다. 그리고 나서 Fluoroskan Ascent fluorometer (Labsystems, Helsinki, Finland)를 이용하여 484/527 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 조합을 3번씩 측정하였다.

[0051] 호산구의 이동은 484/527 nm의 OD(optical density)를 측정하여 결정하였다. 다른 그룹들의 OD값을 표준화하기 위하여 피라노피란-1,8-다이온을 처리하지 않은 미리 자극시킨 A549 세포들의 상층액을 사용하였다. 트랜스-웰 이동 측정(trans-well migration assay) 결과, 10 μ g/ml의 피라노피란-1,8-다이온을 처리한 세포들로부터 A549 세포 배지를 포함하는 챔버(chamber)로의 호산구 (EoL, 사람 호산구 세포) 이동이 48 % 까지 감소하였다(도 3). 이러한 결과들은 A549 세포들에 피라노피란-1,8-다이온을 처리함으로써 호산구 이동이 억제된다는 것을 보여준다.

[0052] (5) A549 세포에서의 케모카인(chemokine) 및 부착 분자(adhesion molecule)의 발현

[0053] 본 발명자들은 real-time PCR을 이용하여 에오타신(eotaxin) 및 호산구-관련 케모카인들 및 부착 분자들의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 피라노피란-1,8-다이온의 처리는 에오타신 및 VCAM-1 의 mRNA 발현을 각각 46 % 및 37% 억제했다(도 4). 또한, 10 μ g/ml의 피라노피란-1,8-다이온 처리로 IL-8 mRNA 수준은 약 30% 감소하였으며, VCAM-1 환원(reduction) 역시 24 % 감소하였다. 결론적으로, 변화의 양상과 범위는 다르지만, 조사된 유전자들은 mRNA 발현 감소를 일으켰다.

[0054] (6) 피라노피란-1,8-다이온은 ERK1/2 및 NF- κ B 활성을 억제한다.

[0055] NF- κ B의 활성 및 MAPK 인산화 상태는 각각 Bio-Plex 인산단백질(phosphoprotein) 측정 및 전체 표적 단백질 측정(total target protein assay)(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 생산자의 프로토콜에 따라 분석하였다. 간략하게, Bio-Plex 세포 용해 키트를 이용하여 A549 세포 용출물(lysates)을 30분, 1시간 및 3시간째 수집하였다(20). NF- κ B 활성을 측정하기 위하여, 핵 추출물을 준비하고 단백질 농도를 600 μ g/ml 에 맞추었다. 인산화 및 전체 ERK1/2, p38, JNK 및 NF- κ B 를 인식하는 50 마이크로리터의 결합된 비드들을 96-웰 필터 플레이트에 추가하고 2번 세척하였다. 그 후 같은 부피의 세포 용출물을 플레이트에 넣고, 상기 시료를 비드와 함께 15-18 시간동안 배양하였다. 그 후, 25 μ l 의 검출 항체들을 세척하고 상기 플레이트에 넣은 뒤, 연속적으로 30 분간 배양하였다. 그 후, 50 마이크로리터의 스트렙타비딘(streptavidin)-PE 를 넣고, 상기 시료들을 세척한 뒤 어두운 곳에서 10 분간 배양하였다. 상기 시료들을 씻어낸 뒤, 125 μ l 의 재현탁(resuspension) 버퍼를 넣고,

Luminex 100TM 분석기 및 Bio-Plex Manager 소프트웨어(BioRad)를 이용하여 인산화 수준을 분석하였다.

[0056] 피라노피란-1,8-다이온의 활성화와 관련된 신호전달 경로를 더 잘 이해하기 위해서, 본 발명자들은 MAPKs 과정에서 피라노피란-1,8-다이온의 가능한 연관단계를 조사하기 위하여 Luminex 100TM 분석기 및 Bio-Plex Manager 소프트웨어를 사용하였다(도 5A). 구체적으로, 본 발명자들은 피라노피란-1,8-다이온이 NF- κ B의 활성화 뿐만 아니라 ERK1/2, p38 및 c-Jun N-말단 단백질 키나아제(JNK)에 미치는 영향을 측정하였다(도 5B). 10 μ g/ml의 피라노피란-1,8-다이온에 의해 NF- κ B 및 ERK1/2의 활성화가 상당히 억제되었으나, JNK 및 p38의 활성화에서는 많은 변화를 관찰할 수 없었다. 이러한 결과들은 피라노피란-1,8-다이온 처리에 의한 TNF- α , IL-4 및 IL-1 β 유도 에 오타신 분비의 억제가 A549 세포들에서 ERK1/2 및 NF- κ B 신호전달 경로의 감소된 활성을 통해 매개된다는 것을 보여준다.

[0057] (7) 통계 분석

[0058] 데이터의 통계 분석은 Prism 4.02 소프트웨어(GraphicPad Software Inc. San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M.으로 나타냈으며, 통계분석은 다중 비교(multiple comparison)를 위하여 일방(one-way) ANOVA를 이용하여 수행하였다. 모든 경우에, P values<0.05 를 유의성 있는 것으로 보았다.

[0059] **실시예 3. 피라노피란-1,8-다이온의 항-천식작용에 대한 *in vivo* 실험**

[0060] (1) 실험동물

[0061] 몸무게 22-25g 의 8주된 수컷 BALB/C 마우스를 Charles River Korea (Sungnam, Korea)에서 구입하였다. 상기 마우스는 22-24 $^{\circ}$ C에서 12시간 명암 사이클로 유지되는 실내의 플라스틱 우리(cage)에서 사육되었으며, 물에는 자유롭게 접근할 수 있게 하였다. 모든 동물 실험들은 NIH 지침에 따라 수행하였으며, 경희대학교의 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다.

[0062] (2) OVA 감작 및 유발

[0063] 24마리의 수컷 마우스를 임의적으로 정상 그룹(대조구)과 만성 천식 그룹으로 나누었다(그룹당 n=6). 만성 천식 그룹의 마우스는 0일 및 7일째 0.2 mL 의 멸균 PBS(phosphate- buffered saline)에서 20mg의 알루미늄 히드록사이드(aluminum hydroxide) (Sigma-Aldrich)에 흡수된 100 μ g의 OVA (Grade V; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 를 복강내 투여함으로써 감작되었다. 다음으로, 분무화된(aerosolized) OVA로 유발(challenged)되기 30분 전에 덱사메타손(dexamethasone) (PBS 내 0.5 mg/kg) (Sigma-Aldrich) 또는 피라노피란-1,8-다이온 (PBS 내 10 μ g/kg) 을 상기 마우스에 복강내 투여하였다. 이 과정은 14, 15 및 16일째 3번 반복되었다. 음성 대조구에 투여하고 PBS에 노출시켰다.

[0064] (3) 피라노피란-1,8-다이온이 BALF 사이토카인(cytokines) 및 OVA-특이적 혈청 IgE 에 미치는 영향

[0065] IL-4 및 IL-5를 포함한 Th2 사이토카인은 알레르기성 염증반응의 발병 및 전파에 중요한 역할을 한다. 천식에서 Th2 사이토카인은 기도 감염을 촉진하나, Th1 사이토카인은 알레르기성 질환 및 천식을 막는다. 피라노피란-1,8-다이온 처리가 BALF에서 사이토카인의 분비에 영향을 미치는지를 결정하기 위하여 IL-4, IL-5, IL-13 및 IFN- γ 의 수준을 ELISA로 결정하였다. ELISA 키트(BD Biosciences, Camarillo, CA, USA)를 이용하여 농축된 BALF 상층액에서 IL-4, IL-5, IL-13 및 인터페론 (IFN)- γ 를 분석하였다(9). 도 6A에 나타나듯이, 피라노피란-1,8-다이온 처리는 IL-4 및 IL-5의 양을 각각 67% 및 88% 감소시켰다. 하지만, OVA-특이적 IgE의 혈청 수준 뿐만 아니라 IFN- γ 및 IL-13의 수준들은 처리구 및 대조구에서 큰 차이가 없었다(도 6B).

[0066] (4) BALF에서 감염세포들의 유입에 미치는 피라노피란-1,8-다이온의 억제 효과

[0067] 피라노피란-1,8-다이온가 세포들의 기도로의 보충에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 본 발명자들은 기관지폐포

세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서 총 폐 세포들, 총 림프구, 호중구, 마크로파지 및 호산구를 조사하였다.

[0068] BALF 내에서의 세포수 측정은, 마우스를 죽인 뒤 1 mL의 식염수(saline)를 기관 캐놀라(tracheal cannula)를 통해 폐에 떨어트린 후, 서서히 상기 용액을 빨아들이는 방법으로 기관지폐포를 세척하였다(21). 이 과정을 세 번 반복한 후, 헤마사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 기관지폐포 세척액(BALF) 내의 세포들을 샘플로써 총 세포수를 결정하였다. 추가로, 상기 용액 시료들을 세포도말기(cytospin centrifuge)(Cellspin, Hanil, South Korea) (4분간 400×g)를 이용하여 유리 슬라이드에 세포도말한 뒤, 헤마토실린(hematoxylin) 2 및 에오신(eosin)-Y (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA)로 염색하였다. 사이토카인(cytokine)의 연속적인 측정을 위해 상기 BALF 상층액을 -70℃에 보관하였다.

[0069] OVA-유발 그룹의 BALF에서 세포 및 호산구의 총 개수는 각각 대조구보다 4.1배 및 36배 높았다(도 7). 놀랍게도, 피라노피란-1,8-다이온-처리구의 BALF에서 관찰된 호산구의 개수는 대조구보다 겨우 16배 높았다.

[0070] (5) 실시간(real time) PCR에 의한 폐 조직으로부터의 mRNA 검출

[0071] 피라노피란-1,8-다이온이 폐 조직의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 총 세포 RNA를 OVA 감작 및 흡입의 존재 또는 부존재 하에서 피라노피란-1,8-다이온을 처리 또는 처리하지 않은 폐 세포들로부터 추출하였다. 그 후, 에오탁신, VCAM-1, ICAM-1 및 RANTES mRNA를 실시간 PCR 분석을 이용하여 정량화했다. 피라노피란-1,8-다이온은 에오탁신 및 VCAM-1 mRNA 발현에 강한 억제효과를 미쳤으며(도 8), 이것은 시험관내(*in vitro*) 실험의 결과와 유사하다.

[0072] (6) 폐 섹션들의 조직학적 분석

[0073] 마지막 유발 이후 24시간째, 마우스를 죽이고 폐와 기관(trachea)을 제거하였다(22). 그 후 상기 조직들을 4 % (v/v) 파라포름알데히드(paraformaldehyde) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 고정한 뒤, 상기 조직들을 건조시키고 파라핀에 넣었다. 조직학적 실험을 위하여, 고정된 조직 4μm 섹션을 Leica model 2165 박절기(rotary microtome) (Leica, Nussloch, Germany)를 이용하여 자르고, 유리 슬라이드에 올리고, 파라핀을 제거한 뒤, 연속적으로 헤마토실린(hematoxylin) 2 및 에오신(eosin)-Y 로 염색하였다.

[0074] OVA에 노출된 마우스 폐 조직의 조직 섹션들은 기도 감염을 보였으며, 폐의 기관지 주변에는 침윤성 호산구들을 갖는 것으로 밝혀졌다(도 9). 반대로, 덱사메타손(dexametasone) 및 피라노피란-1,8-다이온을 처리한 마우스로부터 얻은 폐 조직의 조직 섹션(histological section)에서 기도 감염은 감소하였다.

[0075] (7) 통계 분석

[0076] 데이터의 통계 분석은 Prism 4.02 소프트웨어(GraphicPad Software Inc. San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 모든 데이터는 평균±S.E.M.으로 나타냈으며, 통계분석은 다중 비교(multiple comparison)를 위하여 일방(one-way) ANOVA를 이용하여 수행하였다. 모든 경우에, *P* values<0.05 를 유의성 있는 것으로 보았다.

[0077] <인용문헌>

[0078] 1. Elsner J, Escher SE, Forssmann U. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy*. 2004;59:1243-58.

[0079] 2. Factor P. Gene therapy for asthma. *Mol Ther*. 2003;7:148-52.

[0080] 3. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;87:893-910.

[0081] 4. Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest*. 1996;97:604-12.

- [0082] 5. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*. 1994;179:881-7.
- [0083] 6. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:434-57.
- [0084] 7. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145:669-74.
- [0085] 8. Sa-Nunes A, Rogerio AP, Medeiros AI, Fabris VE, Andreu GP, Rivera DG, Delgado R, Faccioli LH. Modulation of eosinophil generation and migration by *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Int Immunopharmacol*. 2006;6:1515-23.
- [0086] 9. Kim J, Lee H, Lee Y, Oh BG, Cho C, Kim Y, Shin M, Hong M, Jung SK, Bae H. Inhibition effects of Moutan Cortex Radicis on secretion of eotaxin in A549 human epithelial cells and eosinophil migration. *J Ethnopharmacol*. 2007;114:186-93.
- [0087] 10. Chung HS, Kang M, Cho C, Parvez S, Park CH, Kim D, Oh J, Kim H, Shin M, Hong M, Kim Y, Bae H. Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α by moutan cortex in activated mouse peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull*. 2007;30:912-6.
- [0088] 11. Matsukura S, Stellato C, Plitt JR, Bickel C, Miura K, Georas SN, Casolaro V, Schleimer RP. Activation of eotaxin gene transcription by NF- κ B and STAT6 in human airway epithelial cells. *J Immunol*. 1999;163:6876-83.
- [0089] 12. Jedrzkiewicz S, Nakamura H, Silverman ES, Luster AD, Mansharamani N, In KH, Tamura G, Lilly CM. IL-1 β induces eotaxin gene transcription in A549 airway epithelial cells through NF- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L1058-65.
- [0090] 13. Wong CK, Zhang JP, Ip WK, Lam CW. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B in tumour necrosis factor-induced eotaxin release of human eosinophils. *Clin Exp Immunol*. 2002;128:483-9.
- [0091] 14. Wong CK, Wang CB, Ip WK, Tian YP, Lam CW. Role of p38 MAPK and NF- κ B for chemokine release in coculture of human eosinophils and bronchial epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2005;139:90-100.
- [0092] 15. Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. NF- κ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J Biol Chem*. 1999;274:4309-18.
- [0093] 16. Shin TY, Kim SH, Lim JP, Suh ES, Jeong HJ, Kim BD, Park EJ, Hwang WJ, Rye DG, Baek SH, An NH, Kim HM. Effect of *Vitex rotundifolia* on immediate-type allergic reaction. *J Ethnopharmacol*. 2000;72:443-50.
- [0094] 17. Cheng G, Ueda T, Eda F, Arima M, Yoshida N, Fukuda T. A549 cells can express interleukin-16 and stimulate eosinophil chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25:212-8.
- [0095] 18. Sanmugalingham D, De Vries E, Gauntlett R, Symon FA, Bradding P, Wardlaw AJ. Interleukin-5 enhances eosinophil adhesion to bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:255-63.
- [0096] 19. Terakawa M, Tomimori Y, Goto M, Hayashi Y, Oikawa S, Fukuda Y. Eosinophil migration induced by mast cell chymase is mediated by extracellular signal-regulated kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332:969-75.
- [0097] 20. Mu H, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, Yao Q, Chen C. Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2006;70:146-57.
- [0098] 21. Lai WQ, Goh HH, Bao Z, Wong WS, Melendez AJ, Leung BP. The role of sphingosine kinase in a murine

model of allergic asthma. J Immunol. 2008;180:4323-9.

- [0099] 22. Lee KS, Lee HK, Hayflick JS, Lee YC, Puri KD. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. Faseb J. 2006;20:455-65.
- [0100] 23. Creak GA, Liew SE, Tan SF (1973) Pyranopyrandiones: a molecular orbital study. Journal of the Singapore National Academy of Science 3(3):223-226.
- [0101] 24. Vecchiarelli A, Siracusa A, Cenci E, Puliti M, Abbritti G. Effect of corticosteroid treatment on interleukin-1 and tumour necrosis factor secretion by monocytes from subjects with asthma. Clin Exp Allergy. 1992;22:365-70.
- [0102] 25. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Drazen JM, Luster AD. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. J Clin Invest. 1997;99:1767-73.
- [0103] 26. Seder RA, Paul WE, Ben-Sasson SZ, LeGros GS, Kagey-Sobotka A, Finkelman FD, Pierce JH, Plaut M. Production of interleukin-4 and other cytokines following stimulation of mast cell lines and in vivo mast cells/basophils. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1991;94:137-40.
- [0104] 27. Broide D, Sriramaraio P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. Immunol Rev. 2001;179:163-72.
- [0105] 28. Bentley AM, Durham SR, Robinson DS, Menz G, Storz C, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. In: J Allergy Clin Immunol. 1993:857-68.
- [0106] 29. Krunkosky TM, Jarrett CL. Selective regulation of MAP kinases and chemokine expression after ligation of ICAM-1 on human airway epithelial cells. Respir Res. 2006;7:12.
- [0107] 30. Halden Y, Rek A, Atzenhofer W, Szilak L, Wabnig A, Kungl AJ. Interleukin-8 binds to syndecan-2 on human endothelial cells. Biochem J. 2004;377:533-8.
- [0108] 31. Pease JE, Williams TJ. Eotaxin and asthma. Curr Opin Pharmacol. 2001;1:248-53.
- [0109] 32. Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez AC, Siegelman MH, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. J Clin Invest. 1996;98:2332-45.
- [0110] 33. Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. J Allergy Clin Immunol. 1994;94:427-38; quiz 439.
- [0111] 34. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J Clin Invest. 1999;103:779-88.

도면의 간단한 설명

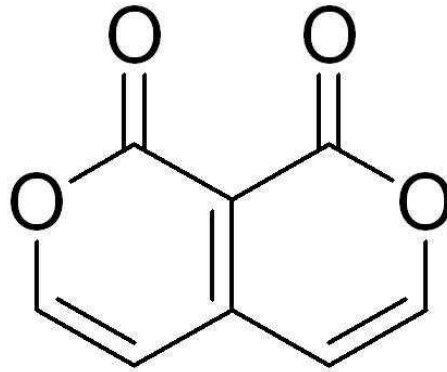
- [0112] 도 1은 1H,8H-피라노[3,4-c]피란-1,8-다이온의 구조식이다.
- [0113] 도 2는 자극받은 A549 세포들에서 피라노피란-1,8-다이온(PPD)의 에오타신 억제 측정을 보여준다. 상층액에서 에오타신의 양은 ELISA로 측정하였다. NC(음성 대조구); 자극받지 않은 A549 세포 상층액, PC(양성 대조구); 사이토카인-자극 A549 세포 상층액. 데이터는 평균±S.E.M으로 나타내었다. ***p < 0.001. **p < 0.01.
- [0114] 도 3은 피라노피란-1,8-다이온(PPD) 처리로 인한 호산구 이동 억제를 보여준다. A549 세포들을 TNF- α , IL-4, 및 IL-1 β 로 자극시킨 뒤, 피라노피란-1,8-다이온을 처리하였다. 그 상층액을 주화성 측정에 이용하였다. 데이터는 평균±S.E.M으로 나타내었다. C: 대조구(TNF- α , IL-4, 및 IL-1 β 자극. 피라노피란-1,8-다이온 미처리.)

**p < 0.01.

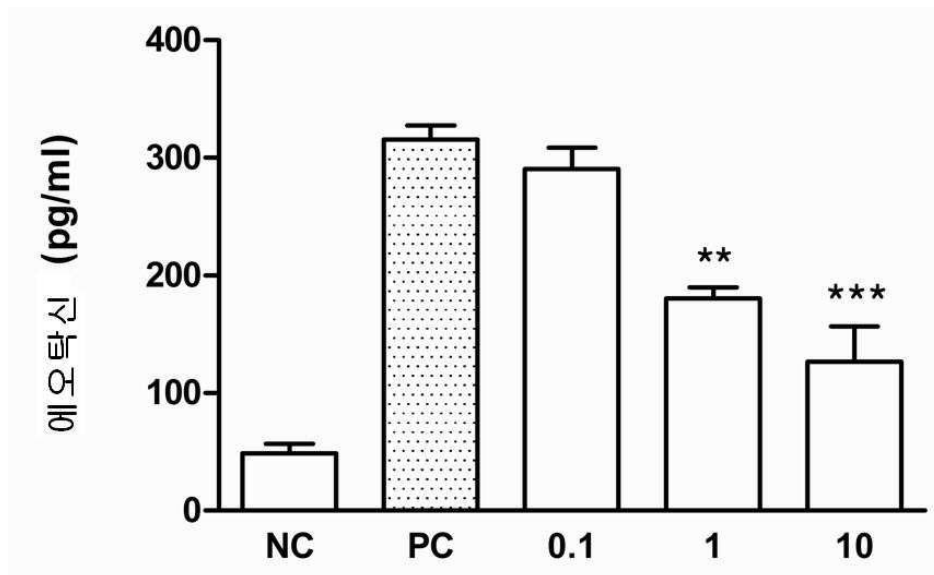
- [0115] **도 4**는 피라노피란-1,8-다이온(PPD)이 mRNA 수준에 미치는 영향을 실시간 RT-PCR로 측정한 결과이다. 실시간 PCR 측정은 에오타신(A), RANTES(B), IL-8 (C), IL-16 (D), ICAM-1 (E) 및 VCAM-1 (F)의 mRNA 수준을 정량화하기 위해 수행되었다. 발현율은 대조구로서 GAPDH mRNA 발현을 사용하여 표준화하였다. NC: 음성 대조구(자극받지 않은 A549 세포), PC: 양성 대조구(TNF- α , IL-4, 및 IL-1 β 로 자극받은 A549 세포들). 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었다. *P<0.05, **P<0.01 vs. 일방 ANOVA에 의해 결정된 양성대조구.
- [0116] **도 5**는 MAKP(A) 및 NF- κ B(B) 활성의 다양한 분석. 무혈청 처리한 A549 세포들에 TNF- α , IL-4, 및 IL-1 β 를 처리한 후 피라노피란-1,8-다이온(10 μ g/ml)을 3시간 동안 처리하였다. 상기 세포 용출물을 Bio-Plex Cell Lysis Kit를 이용하여 수집하였다. Luminex 100TM 분석기를 이용하여 인산화 및 전체 ERK1/2, p38, JNK 및 NF- κ B를 인식한 항체 결합 비드들로부터 형광 강도를 분석하였다. NC (음성 대조구); 비자극 A549 세포들로부터 얻은 상층액, PC (양성 대조구); 사이토카인 자극 A549 세포들로부터 얻은 상층액. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. 일방 ANOVA로 결정된 양성 대조구.
- [0117] **도 6**은 피라노피란-1,8-다이온(PPD)이 OVA-유발 쥐 천식 모델의 BALF 내 사이토카인 및 면역글로불린 E 수준에 미치는 영향을 나타낸다. 천식을 유발하기 위해 BALB/C 마우스에 다양한 물질들을 주사투여한 뒤, 14일간 흡입을 통해 OVA를 투여하였다. 실험의 마지막 단계에서, BALF를 수집하고 사이토카인 생산량을 ELISA로 분석하였다. 추가로, 혈액을 심장천자(cardiac puncture)로 수집하고, 시료에서 OVA-특이적 IgE의 수준을 ELISA로 측정하였다. (A) BALF 내 사이토카인사이토카인 PBS 내 OVA-특이적 IgE: 정상 BALB/C 마우스, OVA: Ovalbumin 흡입 (대조구), DEX: OVA + Dexamethasone (0.5mg/kg), PPD; OVA+PPD (10 μ g/kg). 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M(n=6)으로 나타내었다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. 일방 ANOVA로 결정된 양성 대조구.
- [0118] **도 7**은 OVA-유발 알레르기성 천식 쥐에서 피라노피란-1,8-다이온(PPD)이 감염성 세포들의 BAL로의 집합에 미치는 영향을 나타낸다. 마우스를 염처리하고, OVA를 흡입 및 염으로 투여(OVA), OVA를 흡입 및 0.5mg/kg 텍사메타손으로 투여(OVA+DEX) 또는 OVA를 흡입 및 10 μ g/kg PPD 투여(OVA+PPD). 그 후 세포도말기를 이용하여 BAL 세포들을 분리한 후, H&E로 염색하였다. 일반적인 형태적 기준을 이용하여 세포수를 세었다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M(n=6)으로 나타내었다.
- [0119] **도 8**은 OVA-유발 쥐 천식 모델로부터 수집된 폐 조직에서 피라노피란-1,8-다이온이 에오타신(A), RANTES (B), VCAM-1 (C) 및 ICAM-1 (D) mRNA 발현에 미치는 영향을 나타낸다. 실시예에 기재된 바와 같이 천식을 유발하기 위해 BALB/C 마우스를 주사처리하고 14일간 흡입으로 OVA를 투여하였다. 실험의 마지막 단계에서, 마우스로부터 폐를 제거하고 실시간 PCR로 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M으로 나타내었다. *P<0.05, **P<0.01 vs. 일방 ANOVA로 결정된 양성 대조구.
- [0120] **도 9**는 OVA-유발 쥐에서 피라노피란-1,8-다이온이 폐 조직(H&E)에 미치는 영향을 나타낸다. 섹션들은 PBS, OVA + 염 (OVA), OVA + 0.5mg/kg 텍사메타손 (OVA+DEX) 및 OVA + 10 μ g/kg PPD (OVA+PPD)를 처리한 마우스의 폐로부터 얻었다. 섹션들을 헤마톡실린(haematoxylin) 및 에오신 염색으로 염색했다($\times 200$).
- [0121] **도 10**은 피라노피란-1,8-다이온의 표준검량선(Standard Calibration Curve)을 나타낸다.
- [0122] **도 11**은 실제 피라노피란-1,8-다이온의 HPLC 크로마토그램이며, **도 12**는 피라노피란-1,8-다이온의 결정을 위한 *Vitex rotundifolia*의 HPLC 크로마토그램이다. 농도와 피크 면적간의 관계는 최소제곱법(minimum square method) (R^2 value)으로 측정하였다. 피라노피란-1,8-다이온의 표준검량선은 도 1에 나타난 바와 같이 $Y = 202377000X - 42150.0$ ($R^2 = 0.9998$)이다. VR 내의 피라노피란-1,8-다이온의 평균 함량은 상기 식에 의해 0.224 ± 0.01 mg/g ($n = 3$)로 계산되었다.
- [0123] **도 13**은 *Vitex rotundifolia* Linn fil에서 피라노피란-1,8-다이온을 MeOH로 여과 추출하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도면

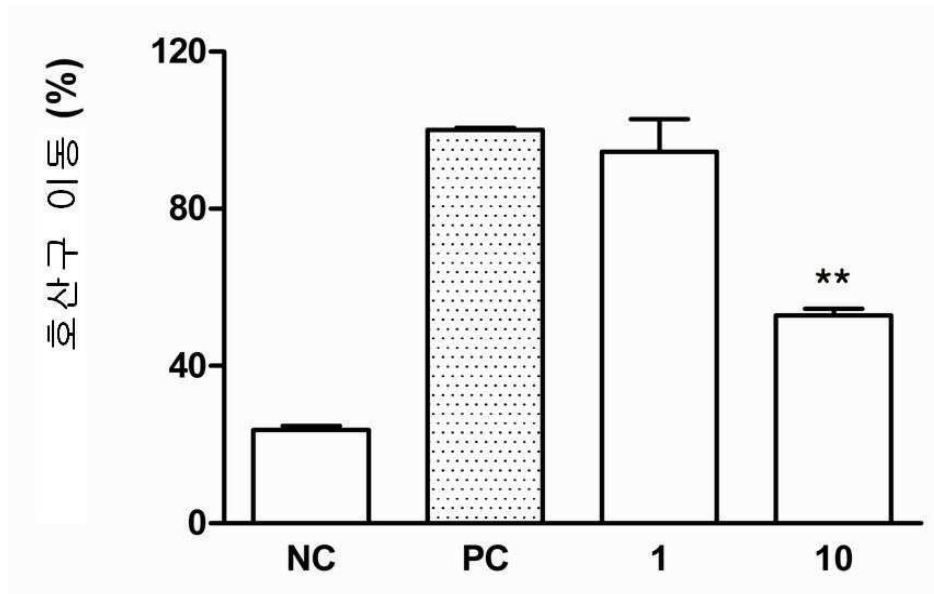
도면1



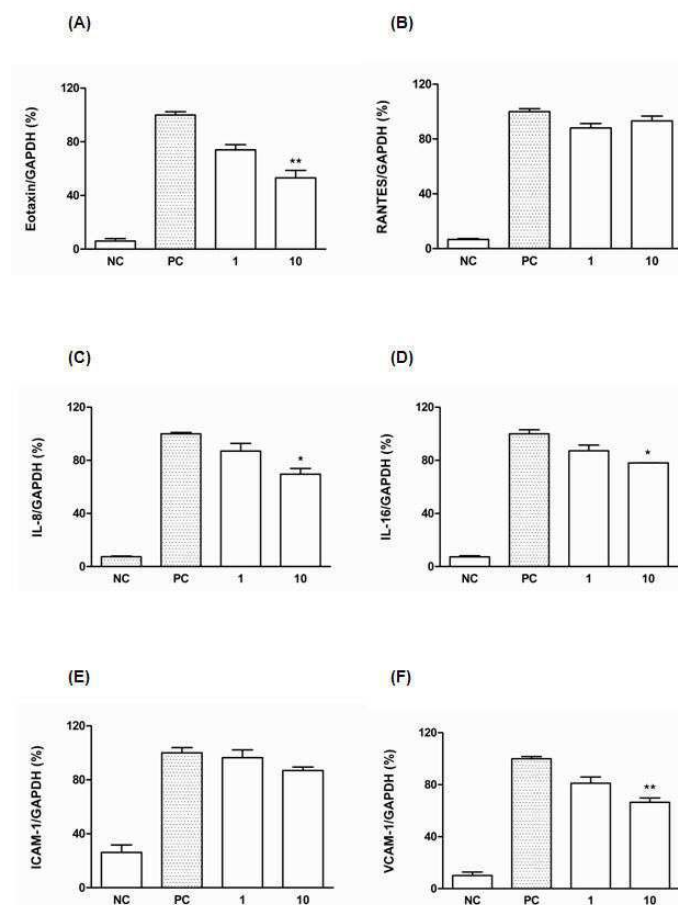
도면2



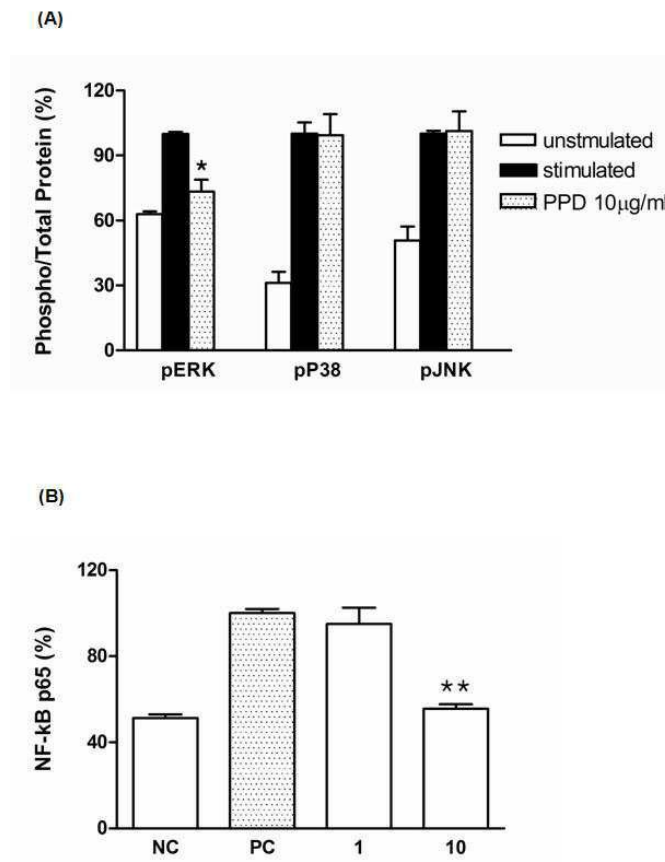
도면3



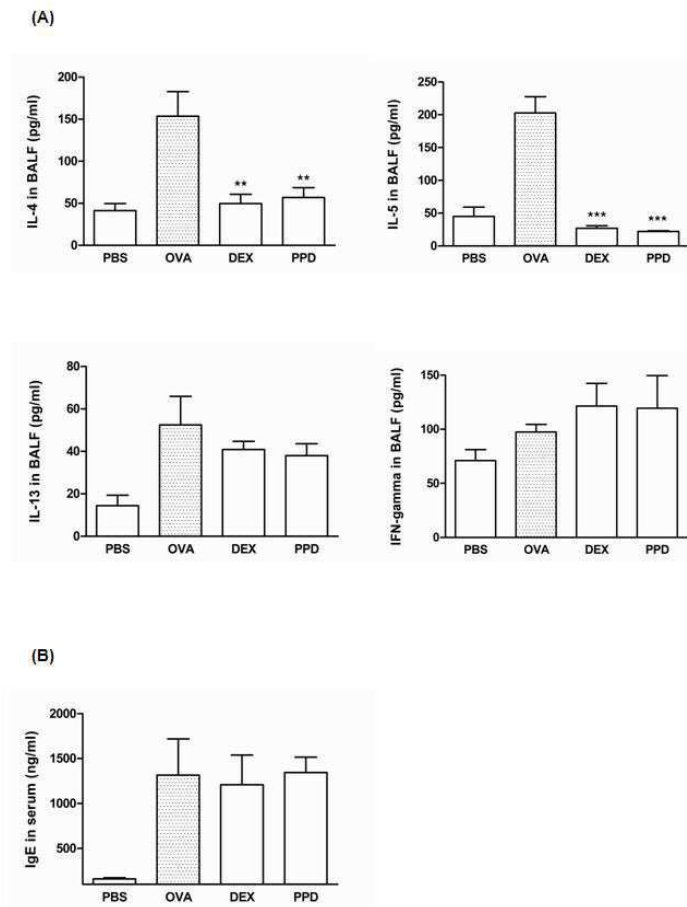
도면4



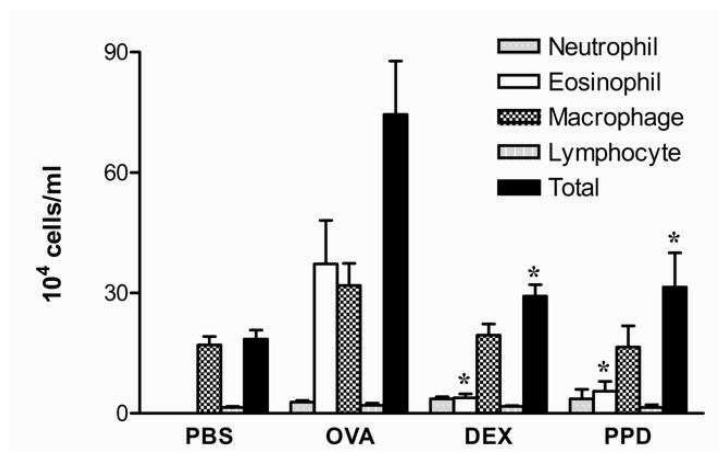
도면5



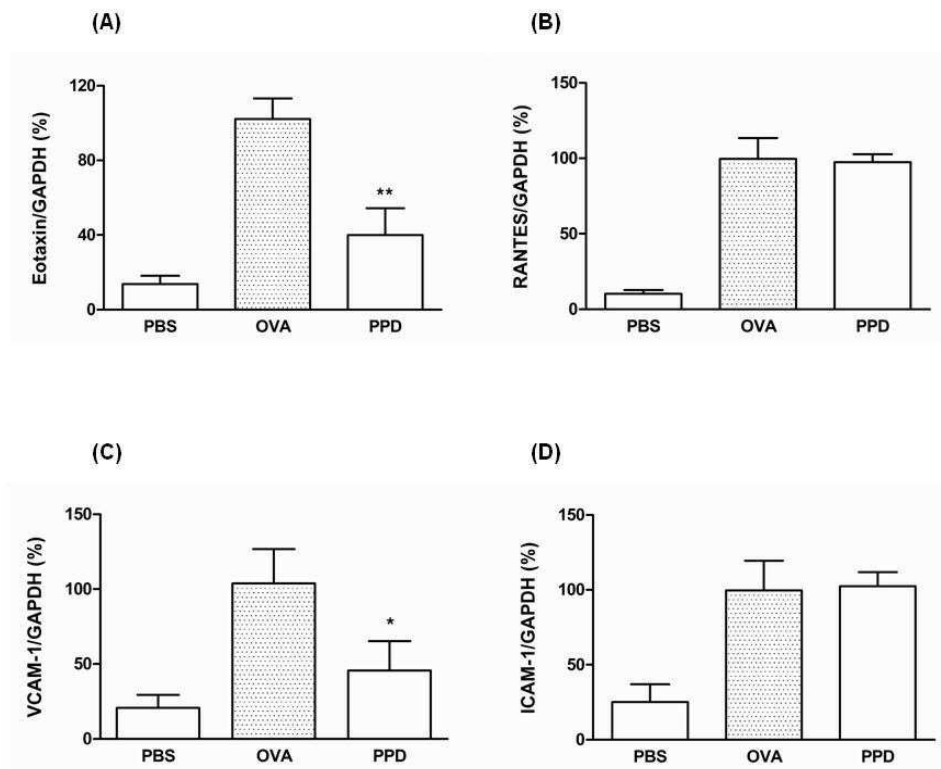
도면6



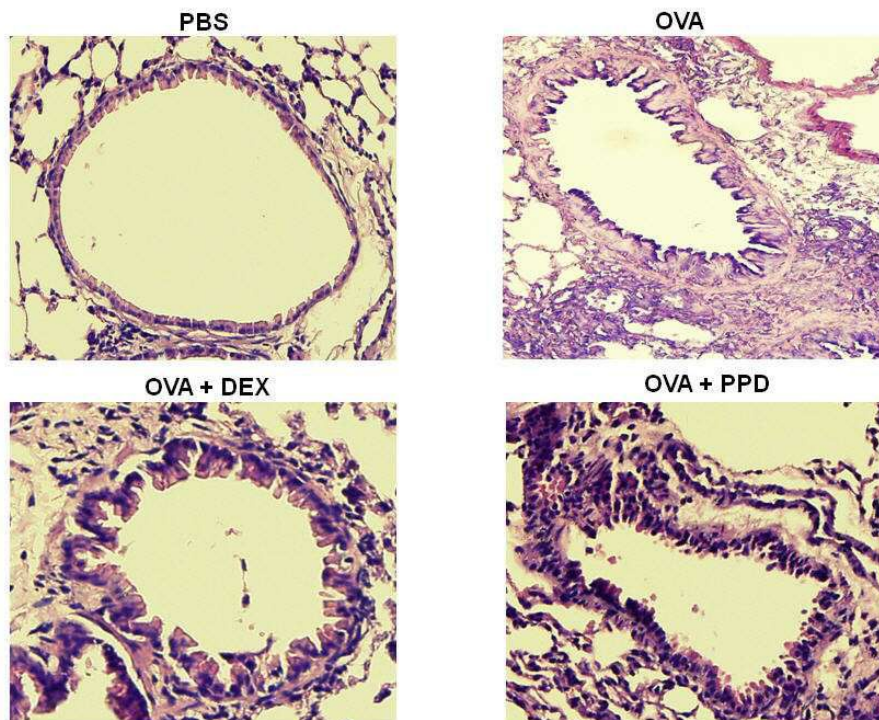
도면7



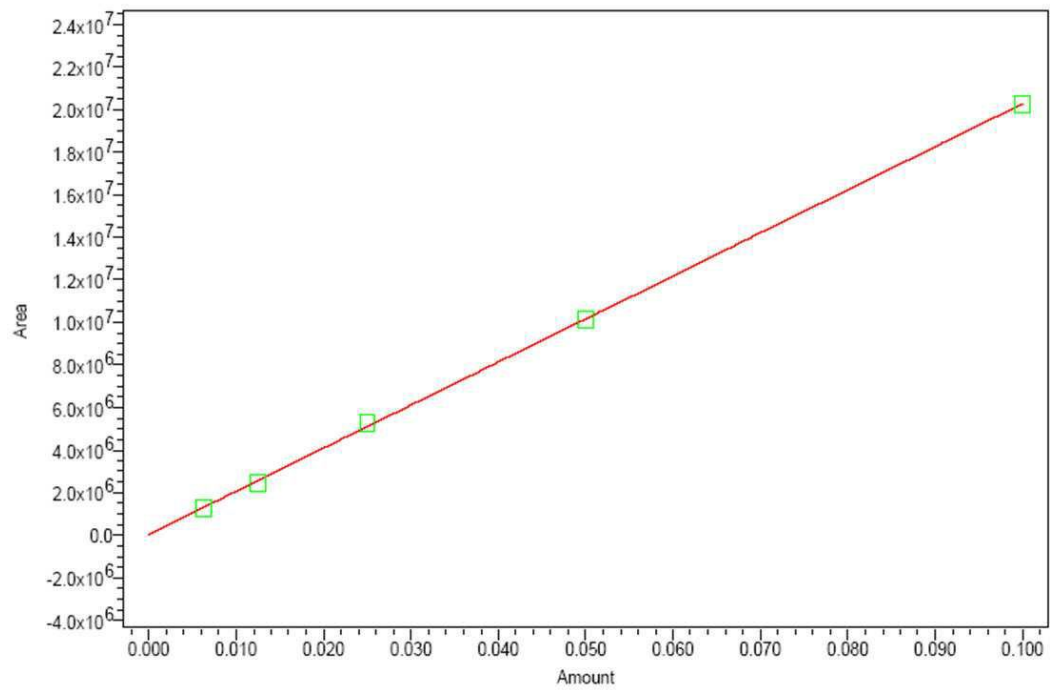
도면8



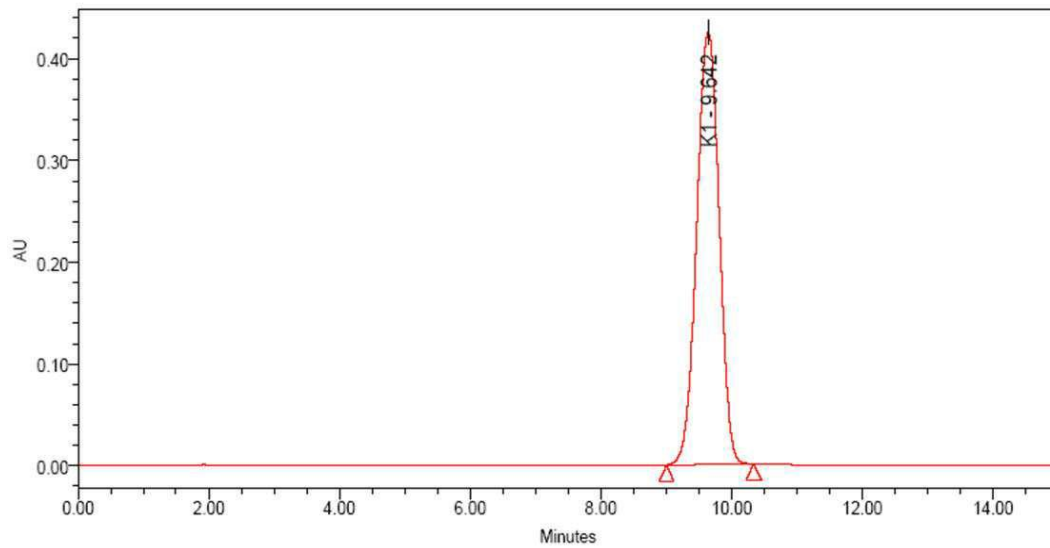
도면9



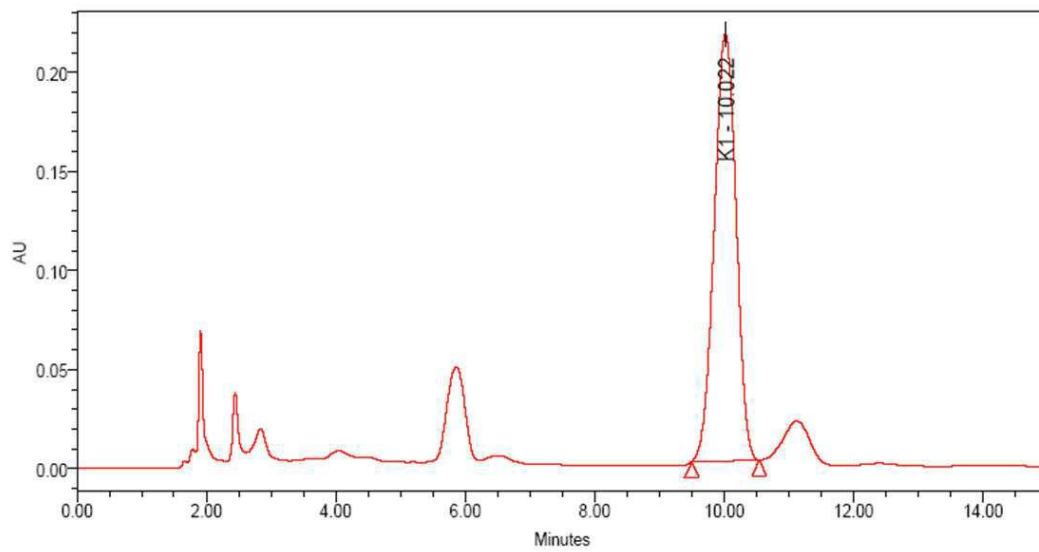
도면10



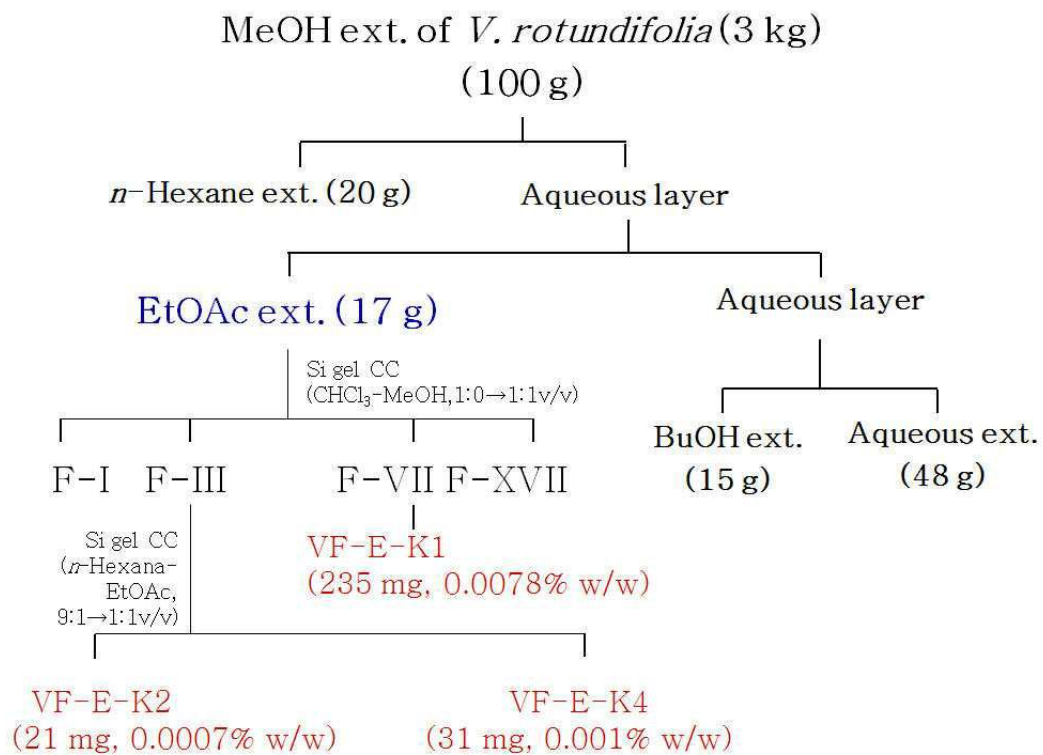
도면11



도면12



도면13



서열 목록

- <110> PURIMED
- <120> A NEW THERAPEUTIC DRUG FOR THE TREATMENT OF ALLERGIC ASTHMA
CONTAINING Pyranopyran-1,8-dione AND/OR DERIVATIVES THEREOF

<160> 24

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HuGAPDH/FW

<400> 1

ttcaccacca tggagaaggc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hu GAPDH/RV

<400> 2

ggcatggact gtggtcatga

20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hu Eotaxin/FW

<400> 3

cacaccttca gcctccaaca tg

22

<210> 4

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Hu Eotaxin/RV

<400> 4
 ccactgggtga ttctcctgta gc 22

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Hu RANTES/FW

<400> 5
 ctgcctcccc atattcctcg g 21

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Hu RANTES/RV

<400> 6
 gagttgatgt actcccgaac cc 22

<210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Hu ICAM-1/FW

<400> 7
tgaggagaga tcaccatgga gc 22

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Hu ICAM-1/RV

<400> 8
gccaggaac agaccacggt 20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Hu VCAM-1/FW

<400> 9
gagaaccag atagacagcc c 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Hu VCAM-1/RV

<400> 10
ttcacgagc caccactcat c 21

<210> 11
<211> 21

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Hu IL-8/FW

<400> 11
atgacttcca agctggccgt g 21

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Hu IL-8

<400> 12
tgtgttggcg cagtgtggtc 20

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Hu IL-16/FW

<400> 13
ctcgctcaac ctttcagagc t 21

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Hu IL-16/RV

<400> 14
gacatggatg ccgtctaatt gc 22

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mu GAPDH/FW

<400> 15
acacattggg ggtaggaaca 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mu GAPDH/RV

<400> 16
aactttggca ttgtggaagg 20

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mu eotaxin/FW

<400> 17
cagatgcacc ctgaaagcca t 21

<210> 18
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mu eotaxin/RV

<400> 18

tgctttgtgg catcctggac

20

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mu RANTES/FW

<400> 19

tgccctcacc atcatcctca c

21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mu RANTES/RV

<400> 20

ggcggttcct tcgagtgaca

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mu VCAM-1/FW

<400> 21

atgcctgtga agatggtcgc	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Mu VCAM-1/RV	
<400> 22	
tggtcagaac ggacttgac	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Mu ICAM-1/FW	
<400> 23	
atggcttcaa cccgtgccaa	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Mu ICAM-1/RV	
<400> 24	
agcttccagt tgggtccact	20