

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2009년 10월 1일 (01.10.2009)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2009/119987 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/415 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/001315
- (22) 국제출원일: 2009년 3월 17일 (17.03.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0027414 2008년 3월 25일 (25.03.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **이화여자대학교 산학협력단 (EWha University - Industry Collaboration Foundation)** [KR/KR]; 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 내, 120-750 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **배윤수 (BAE, Yun Soo)** [KR/KR]; 경기 고양시 일산동구 장항동 코오롱레이크 1차 A동 303호, 410-380 Gyeonggi-do (KR). **이기인 (LEE, Kee-In)** [KR/KR]; 대전 유성구 어은동 한빛아파트 113동 305호, 305-755 Daejeon (KR). **이수영 (LEE, Soo Young)** [KR/KR]; 서울 강남구 대치2동 은마아파트 5동 1111호, 135-778 Seoul (KR). **최선 (CHOI, Sun)** [KR/KR]; 서울 용산구 효창동 베네스빌

아파트 101동 805호, 140-120 Seoul (KR). **이지현 (LEE, Jee Hyun)** [KR/KR]; 서울 송파구 잠실6동 장미아파트 18동 206호, 138-918 Seoul (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 삼성동 159-9 도림공원타워 6층, 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

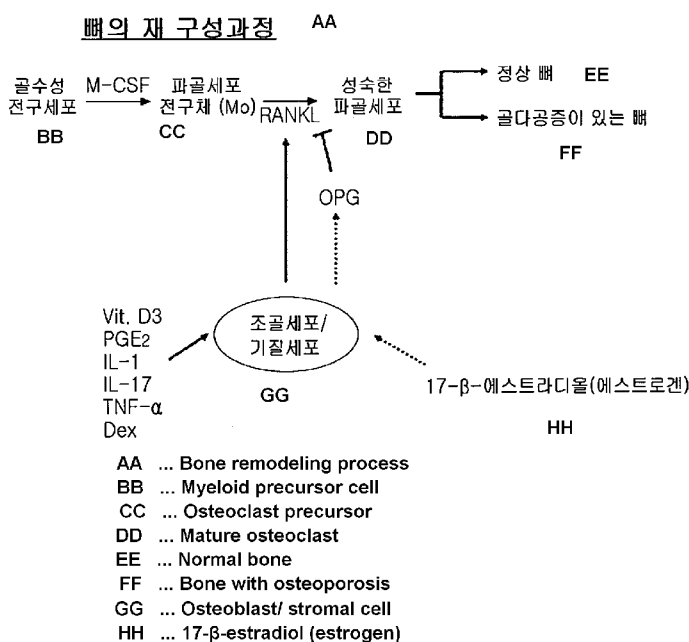
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING PYRAZOLE DERIVATIVES FOR PREVENTING OR TREATING OSTEOPOROSIS

(54) 발명의 명칭: 피라졸 유도체를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising pyrazole derivatives or pharmaceutically acceptable salts thereof for preventing or treating osteoporosis, and a method for preventing or treating osteoporosis comprising a step for administering the composition to individuals. More specifically, since the pyrazole derivatives or pharmaceutically acceptable salts thereof have inhibitory effects on osteoclast differentiation due to excellent inhibitory activities against NADPH oxidase and RANKL, the pyrazole derivatives or pharmaceutically acceptable salts thereof can be used for preventing or treating osteoporosis.

(57) 요약서: 본 발명은 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물과, 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골다공증의 예방 및 치료 방법에 관한 것으로서, 구체적으로는 본 발명에 따른 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염은 NADPH 옥시다아제 및 RANKL 억제 활성이 우수함으로 인해 파골세포 분화 억제 효과가 뛰어나 골다공증 치료 및 예방에 사용될 수 있다.



CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, **공개:**
TD, TG).

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

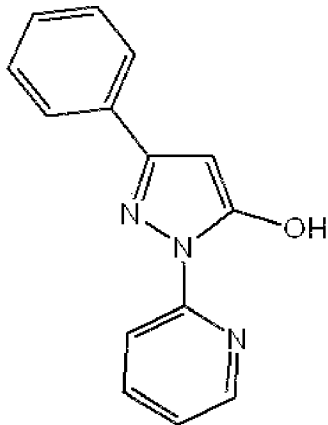
피라졸 유도체를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 하기 화학식 1 내지 8로 구성되는 군으로부터 선택되는 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하여 골다공증을 예방 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

[2]

[3] <화학식 1>

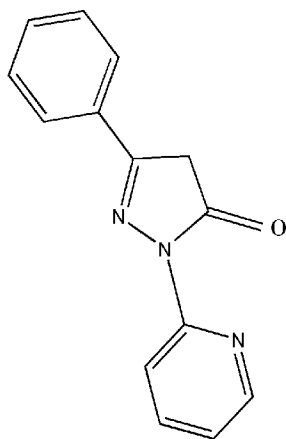
[4]



[5]

[6]

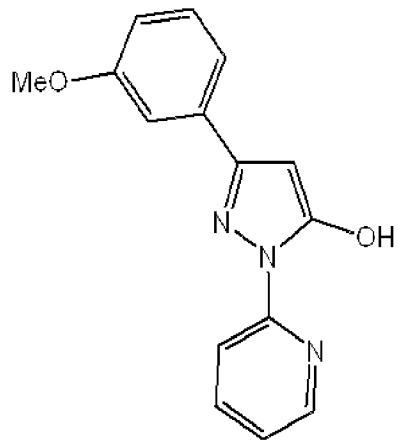
<화학식 2>



[7]

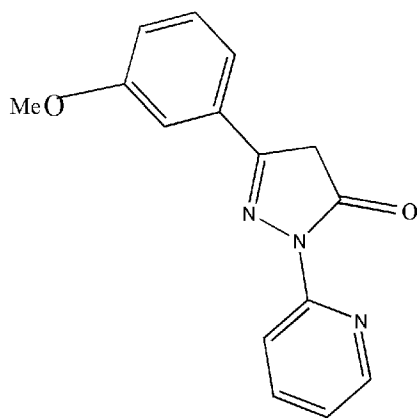
[8]

<화학식 3>



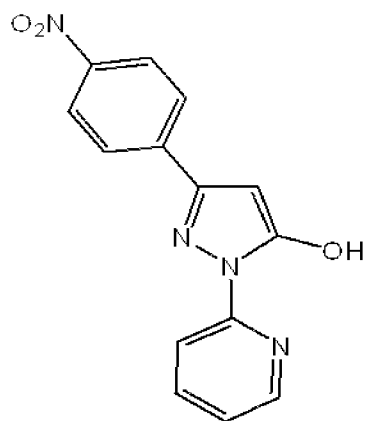
[9] <화학식 4>

[10]



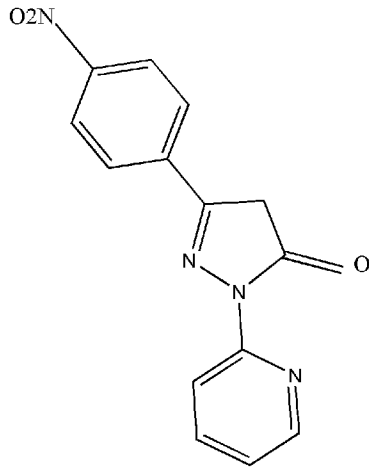
[11] <화학식 5>

[12]

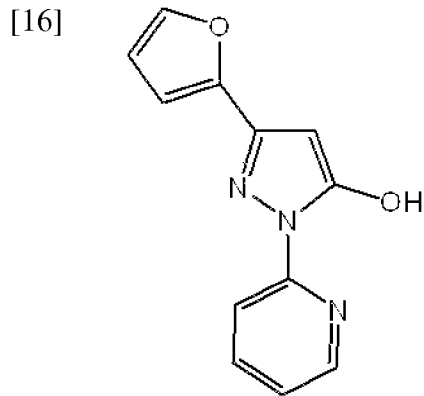


[13] <화학식 6>

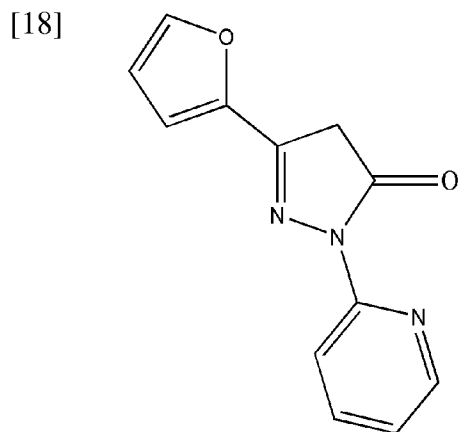
[14]



[15] <화학식 7>



[17] <화학식 8>



배경기술

- [19] 뼈의 발생, 성장 및 대사과정에서는 뼈의 형성(bone modeling)과 재형성(remodeling) 과정이 중요한 역할을 한다. 뼈의 형성은 태생기부터 시작하여 이후 골격이 성숙되어 성장이 끝나는 청장년기까지 지속되어 20대에서 30대 초반까지 최대 골량을 형성하게 된다. 이후 약 30년 동안은 뼈를 제거하고 다시 이를 보충하는 골재형성 과정을 반복하게 되는데 이때는 골형성과 골흡수가 서로 짝을 이루어 균형을 유지하게 된다. 이 시기가 지난

후에는 골흡수에 따른 골소실을 골형성이 충분히 따라갈 수 없어 결국 연 0.3 ~ 0.5% 정도의 골량 감소를 겪게 되며, 특히 여성의 경우에는 폐경 초기에 연 2 ~ 3%의 상당한 골손실을 겪게 된다.

[20] 뼈는 크게 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 라이닝세포(lining cell) 및 골세포(osteocyte)의 네 가지 세포로 구성되어 있다. 이때, 골수내 간질세포(bone marrow stromal cell)로부터 유래되는 조골세포는 골기질을 합성하는 분화된 세포로서 골형성을 주도하며, 조혈모세포로부터 유래되는 파골세포는 골흡수를 주도한다.

[21] 골다공증(osteoporosis)은 골 조직의 석회가 감소되어 뼈의 치밀질이 얇아지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지는 상태로, 증세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다. 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있다. 한편, 개인차는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준 (bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높으며, 대개 골량은 14 ~ 18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히, 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다. 즉, 폐경기에 이르면 에스트로겐 농도가 급속히 감소하는데, 이때, IL-7(interleukin-7)에 의한 것처럼 B-림파구(B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수 (bone marrow)에 B 세포 전구체 (pre-B cell)가 축적되고, 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골 세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소하게 된다.

[22] 이와 같이, 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가하고 있다. 또한, 전 세계적으로 골질환 치료와 관련되어 약 1300억 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 알려져 있으며, 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다. 국내에서도 근래에 평균수명이 80세에 육박하면서 골다공증 유병률이 급격하게 증가하고 있는데, 최근 지역 주민을 대상으로 실시된 연구에 의하면 전국 인구로 표준화하였을 경우 남성의 4.5%, 여성의 19.8%가 골다공증을 갖고 있다고 보고된 바 있다. 이는 골다공증이 당뇨병이나 심혈관계 질환보다 더 흔한 질환이며, 골절로 인해 받는 환자들의 고통이나 치료를 위해 들어가는 비용을 추정할 때 골다공증은 매우 중요한 보건 문제임을 시사한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[23] 지금까지 여러 물질이 골다공증 치료제로 개발되었다. 그 중 골다공증

치료제로 가장 많이 사용되는 에스트로젠은 그 실제적인 효능이 아직 검증되지 않은 상태이며 생애 내내 복용해야하는 단점이 있으며, 장기간 투여하는 경우 유방암이나 자궁암이 증가하는 부작용이 있다. 알렌드로네이트(alendronate)도 그 효능이 명확하지 않고 소화관에서의 흡수가 더디며 위장과 식도점막에 염증을 유발하는 문제가 있다. 칼슘 제제는 부작용이 적으면서도 효과가 우수한 것으로 알려져 있지만 치료제라기보다는 예방제에 해당한다. 그 외에 칼시토닌과 같은 비타민 D 제제가 알려져 있으나 아직 그 효능 및 부작용에 대한 연구가 충분히 되어있지 않은 상태이다. 이에, 부작용이 적고 효과가 우수한 새로운 대사성 골 질환 치료제가 요구되고 있는 실정이다.

- [24] 한편, 산화 스트레스가 세포 기능에 중요한 작용을 한다는 사실은 1970년대 초에 이미 알려지기 시작하였는데, 초기의 연구들은 주로 세포 독성학적 관점에서 연구가 진행되었다 (Boveris, A. and Chance, B., *Biochem J.*, 134: 707-716, 1973). 즉, 산화 스트레스가 세포에 직접 작용하여 세포막의 지질 과산화 반응, DNA 손상, 세포내 지질과 단백질의 산화, poly(ADP-ribosylation) 및 세포 내 에너지 고갈 등을 일으킴으로써, 세포의 사멸을 촉진하여 다양한 여러 가지 질환을 야기할 수 있다는 것이다 (Beckman, K.B. and Ames, B.N., *Physiol. Rev.*, 78: 547-581, 1998). 그러나, 이후의 연구들은 산화 스트레스가 직접적인 세포 독성을 가지고 있을 뿐만 아니라, 세포 내 이차전령 물질로서 작용하는 등 다양한 세포기능 조절 작용을 갖고 있음을 제시하고 있다 (Hensley, K. et al., *Free Radic Biol Med.*, 28: 1456-1462, 2000). 즉, 산화 스트레스의 작용이 단순한 세포 독성 작용이 아닌, 다양한 세포에 다양한 작용을 일으킴으로써 인간의 건강 및 질환에 직간접적인 영향을 줄 수 있음을 의미한다.
- [25] 따라서, 많은 질환 모델에서 산화 스트레스의 작용에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있는바, 현재까지의 연구들은 혈관염, 사구체신염 및 전신성 홍반성 루프스 등의 염증성 질환, 허혈성 심질환, 중풍 및 장 허혈 등의 심혈관계 질환, 파킨슨씨병, 근육위축증 및 치매 등의 신경-근육계 질환, 암, 알코올 중독, 흡연과 연관된 질환, AIDS, 위궤양 및 고혈압 등 수많은 질환이 산화 스트레스와 연관되어 있다 (McCord, J.M., *Am. J. Med.*, 108: 652-659, 2000).
- [26] 최근에는 ROS (Reactive Oxygen Species)가 뼈의 대사에 연관이 있다는 연구들이 보고되고 있다 (Darden, A.G., et al., *J. Bone Miner. Res.*, 11:671-675, 1996; Yang, S., et al., *J. Biol. Chem.*, 276:5452-5458, 2001; Fraser, J.H., et al., *Bone* 19:223-226, 1996; Yang, S., et al., *Clacif. Tissue Int.*, 63:346-350, 1998). 더구나, 뼈의 재생(bone remodeling)은 뼈를 형성하는(bone forming) 조골세포(osteoblasts)와 뼈를 흡수하는(bone resorbing) 파골세포(osteoclast, OC)의 상대적인 작용을 통하여 이루어진다고 알려져 있다.
- [27] 다중 핵 (multinuclear) 파골세포는 다중 핵화된 거대 세포(multi-nucleated giant cell)를 형성하기 위한 세포 부착 (cell adhesion), 증식 (proliferation), 운동성 (motility), 세포간 연결 (cell-cell contact) 및 말단 융합 (terminal fusion)의 다단계

과정을 통한 조혈전구세포 (hematopoietic progenitor cell)의 단핵구 대식세포 계통 (monocyte macrophage lineage)으로부터 분화된다. 이 과정은 NF- κ B의 수용체 활성화인자 (receptor activator of nuclear factor- κ B, 이하 "RANK"로 약칭)라 불리는 수용체와 NF- κ B의 수용체 활성화인자 리간드 (receptor activator of NF- κ B ligand, 이하 "RANKL"로 약칭)라 불리는 RANKL이 결합하면서 시작되고, 이어서, 몇 가지 신호전달계 (signaling cascade)의 활성화에 의해 전달된다. 활성화된 신호전달경로 (signaling pathway)는 TNF 수용체 연관성인자 (tumor necrosis factor receptor-associated factor) 6 (이하 "TRAF6"로 약칭)를 통한 NF- κ B, 세포외 신호조절 키나제 (extracellular signal-regulated kinase, 이하 "ERK"로 약칭), c-Jun, N-말단 키나제 (N-terminal kinase, 이하 "JNK"로 약칭) 및 p38 MAP 키나제 (p38 mitogen-activated protein kinase)를 포함한다. 이러한 신호전달 현상은 파골세포의 분화 및 작용의 조절에 직접적인 영향을 미친다 (Boyle, W.J., et al., Nature, 423:337-342, 2003). 일단 파골세포들이 분화되면, 뼈의 흡수는 NADPH 옥시다제 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)에 의해 발생되어진 ROS에 의해 촉진된다. NADPH 옥시다제의 억제제 (inhibitor)는 ROS와 뼈 흡수의 감소를 유도한다 (Yang, S., et al., Clacif. Tissue Int., 63:346-350, 1998). 이러한 결과는 파골세포에서 ROS의 발생이 NADPH 옥시다제 활성화에 의존적이고 파골세포의 기능에 직접적인 연관이 있다는 이론과 일치한다.

기술적 해결방법

- [28] 이에, 본 발명자들은 RANKL의 활성을 억제하는 분자적 기전을 이용하여 골다공증의 치료제를 개발할 수 있다는 점에 착안하여 예의 연구를 거듭한 결과, 본 발명의 피라졸 유도체가 NADPH 옥시다아제 및 RANKL 억제 활성이 우수함을 발견하였으며 이들이 골다공증의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

유리한 효과

- [29] 본 발명에 따른 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물은 NADPH 옥시다아제 및 RANKL 억제 활성이 우수하며 또한 종래의 치료제와 같은 특별한 부작용 없이 골다공증 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

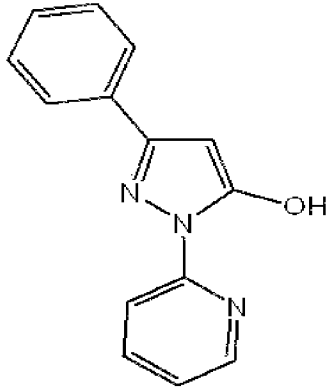
- [30] 도 1은 뼈 흡수 및 생성에 관한 일반적인 뼈 재구성 과정을 도식화한 것이다.
 [31] 도 2는 RANKL에 의한 파골세포 분화 저해능을 농도별로 처리하여 TRAP 염색한 사진 및 분화 정도를 측정한 그래프이다.
 [32] 도 3은 본 발명의 화합물이 RANKL 또는 LPS 주입에 의해 생쥐에서 발생하는 뼈의 파괴를 억제한다는 것을 나타내는 사진이다.
 [33] 도 4는 본 발명의 화합물이 RANKL 또는 LPS 주입에 의해 생쥐에서 발생하는 뼈의 파괴 작용을 억제하는 정도를 정량화한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 본 발명은 하기 화학식 1 내지 8로 구성되는 군으로부터 선택되는 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

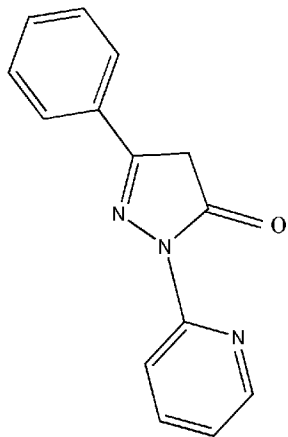
[35] <화학식 1>

[36]



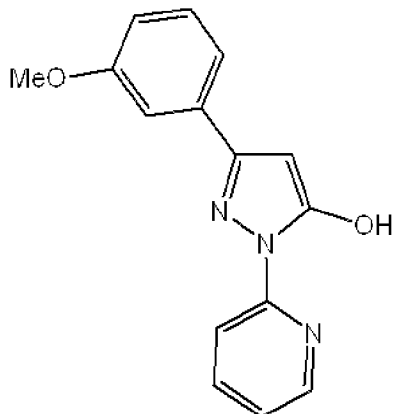
[37] <화학식 2>

[38]



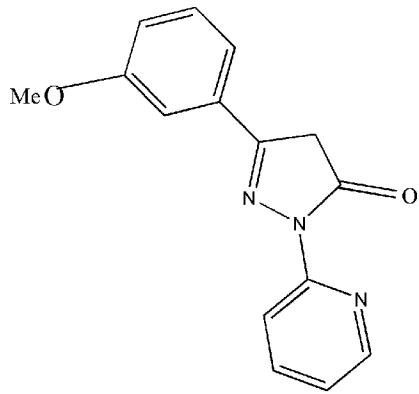
[39] <화학식 3>

[40]

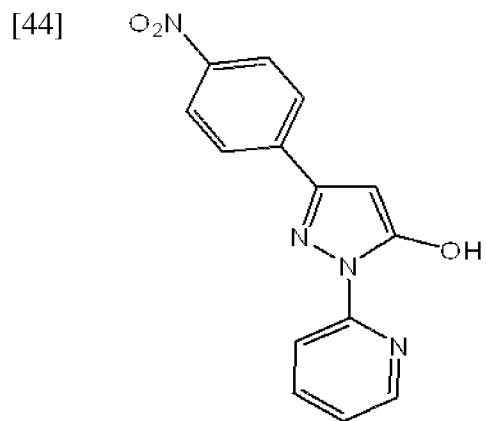


[41] <화학식 4>

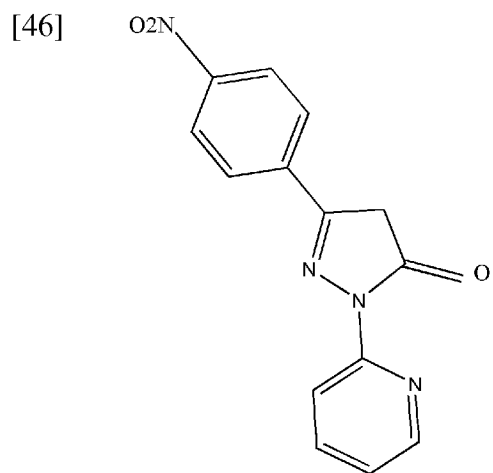
[42]



[43] <화학식 5>

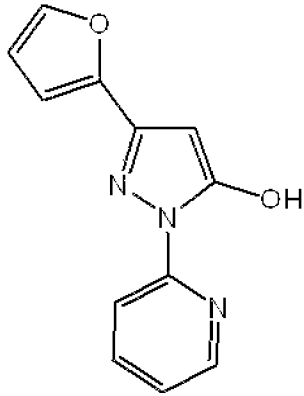


[45] <화학식 6>



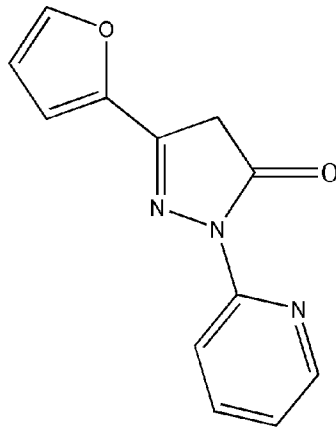
[47] <화학식 7>

[48]



[49] <화학식 8>

[50]



[51]

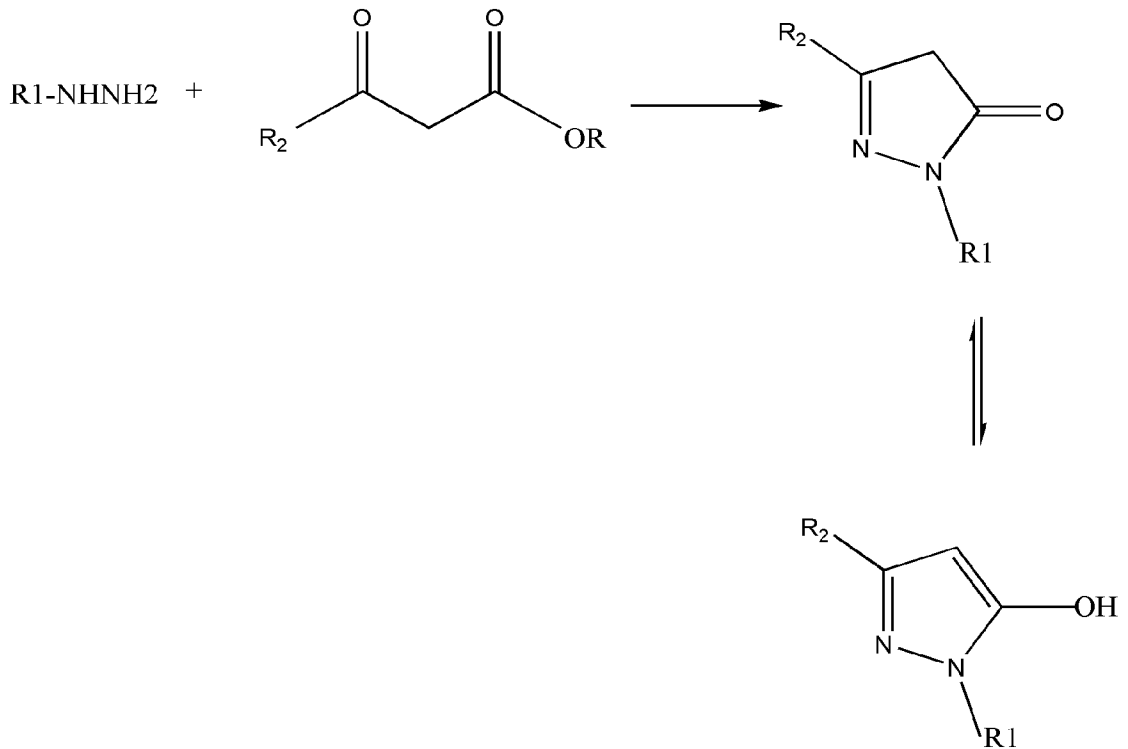
[52] 상기 화학식 1의 화합물은 상기 화학식 2의 화합물의 케토-엔올 토포머 반응에 의하여 생성되는 화학식 2의 화합물의 엔올형 (enol form)이다. 마찬가지로, 상기 화학식 3, 5 및 7의 화합물은 각각 상기 화학식 4, 6 및 8의 화합물의 엔올형이다.

[53]

[54] 상기 피라졸 유도체는 하기 반응식 1과 같이, 히드라진과 β -케토에스테르의 고리화반응에 의하여 합성될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
고리화반응은 한국등록특허 제726,672호, Min-Sup Park et al. Synthetic Communications 2004, 34, 1541-1550; Hyun-Ja Park, et. al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2005, 15, 3307-3312에 개시되어 있다.

[55] <반응식 1>

[56]



[57] 여기서, R_1 은 피리딘이고, R_2 는 페닐, 메톡시페닐, 니트로페닐 또는 푸라닐이다.

[58] R_1 이 피리딘일 때, 상기 히드라진은 2-히드라지노피리딘이다. 또한, R_2 가 페닐, 메톡시페닐, 니트로페닐 또는 푸라닐일 때, 상기 β -케토에스테르는 에틸 벤조일아세테이트, 3-(3-메톡시페닐)-3-옥소-프로피온산 에틸 에스테르, 3-(4-니트로페닐)-3-옥소-프로피온산 또는 에틸 3-(3-푸릴)-3-옥소프로파노에이트이다.

[59]

[60] 반응 용매로는 에탄올 또는 초산을 사용하는 것이 바람직하다.

[61] 상기 고리화 반응은 100 내지 130°C의 온도에서 2 내지 72시간 동안 수행되는 것이 바람직하다.

[62] 통상적으로 반응식 1에 의하여 합성되는 생성물은 케토형 (keto form)으로 표현되나, 케토-엔올 토타머 반응에 의하여 본 발명에 따른 생성물은 엔올형 (enol form)으로도 존재한다.

[63]

[64] 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다. 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, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플루오로아세트산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 말레인산, 벤조산, 글루콘산, 글리콜산, 숙신산, 4-모폴린에탄술폰산, 캄포술폰산, 4-니트로벤젠술폰산, 히드록시-O-술폰산,

4-톨루엔술폰산, 칼록투론산, 엠보산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

[65]

[66] 본원에서, "골다공증"이라는 용어는 뼈 전체에서 골수강 등의 빈 부분을 제외한 뼈의 절대량이 감소된 상태를 가리키는 것으로서, 노인성 및 폐경 후 골다공증, 내분비성 골다공증, 선천성 골다공증, 부동성 골다공증 또는 외상성 골다공증이 포함될 수 있다.

[67]

[68] 본 발명의 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염은 NADPH 옥시다아제 활성을 억제하는 특성을 지닌다.

[69]

본 발명의 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염은 파골세포에서 RANKL 활성을 억제하는 특성을 지닌다. 특히, 본 발명의 피라졸 유도체 또는 그 염의 농도에 비례하여 RANKL 활성이 억제되므로, 피라졸 유도체의 농도가 고농도일수록 파골세포 분화 저해능이 우수하다.

[70]

또한, 본 발명의 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염은 LPS 및 RANKL 주입에 의해 발생하는 뼈의 파괴를 억제하는 효과를 나타낸다.

[71]

전술한 바와 같은 본원발명의 피라졸 유도체, 또는 그 염의 효과는 화학식 1 내지 8의 엔올형과 케토형의 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염 모두에서 나타난다.

[72]

따라서, 본 발명의 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물은 NADPH 옥시다아제 및 RANKL 억제 활성이 우수함으로 인해 파골세포 분화 억제 효과가 뛰어나 골다공증의 예방 및 치료에 효과적이다.

[73]

[74] 본 발명의 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 골다공증의 예방 및 치료용 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[75]

본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[76]

본 발명에 따른 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[77]

상세하게는, 제형화할 경우에는 통상 약학 조성물의 제형화에 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를

사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 들 수 있으며, 이러한 고형 제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 활석과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 들 수 있는데, 통상 사용되는 단순 희석제인 물, 액상 파라핀 이외에 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등의 여러 가지 부형제가 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성 용제 또는 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[78]

[79] 본 발명은 또한 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골다공증의 예방 및 치료 방법에 관한 것이다. 구체적인 일 양태로서, 본 발명에 있어서 골다공증의 예방 및 치료 방법은 개체에 본 발명의 피라졸 유도체를 포함하는 조성물을 투여하여 골다공증의 치료 효과를 높이는 방법에 관한 것이다.

[80] 본 발명에 있어서, "투여"라 함은 환자에게 어떠한 적절한 방법에 의하여 본 발명의 골다공증 예방 및 치료용 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 골다공증 예방 및 치료용 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 임의의 일반적인 경로에 의하여 투여될 수 있다.

[81] 투여 경로로는 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여 및 경막내 투여를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[82] 본 발명에 따른 골다공증 예방 및 치료용 조성물은 1일 1회 투여되거나, 일정한 시간 간격을 두고 1일 2회 또는 3회 투여될 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[83] 골다공증의 종류나 투여 형태, 그리고 치료 효과 등을 고려하여 당업자에게 통상적으로 알려진 다양한 방법에 따라 본 발명에 따른 골다공증 예방 및 치료용 조성물을 적절히 투여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[84] 하기 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것이다. 이들 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[85]

[86] 제조예: 피라졸 유도체의 합성방법

[87] **화학식 1 (3-페닐-1-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-5-올)의 제조**

[88] 둥근 바닥플라스크에 에틸 벤조일아세테이트(1당량)와 에탄올 4ml을 넣고, 여기에 2-히드라지노피리딘(1.1당량)을 에탄올 3ml에 희석시켜 0°C에서 천천히 적가하였다. 20분 동안 가열 환류시켰다. 감압 증류하여 용매를 제거한 다음 생성된 고체를 헥산과 에틸아세테이트로 세척한 후 진공 건조시켜 87%의 수율로 표제의 화합물을 얻었다.

[89]

[90] **화학식 3 (3-(3-메톡시페닐)-1-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-5-올)의 제조**

[91] 둥근 바닥플라스크에 3-(3-메톡시페닐)-3-옥소-프로피온산 에틸 에스테르(1당량)와 에탄올 4ml을 넣고, 여기에 2-히드라지노피리딘(1.1당량)을 에탄올 3ml에 희석시켜 0°C에서 천천히 적가하였다. 20분 동안 가열 환류시켰다. 감압 증류하여 용매를 제거한 다음 생성된 고체를 헥산과 에틸아세테이트로 세척한 후 진공 건조시켜 67%의 수율로 표제의 화합물을 얻었다.

[92]

[93] **화학식 5 (3-(4-니트로페닐)-1-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-5-올)의 제조**

[94] 둥근 바닥플라스크에 3-(4-니트로페닐)-3-옥소-프로피온산 에틸 에스테르(1당량)와 에탄올 4ml을 넣고, 여기에 2-히드라지노피리딘(1.1당량)을 에탄올 3ml에 희석시켜 0°C에서 천천히 적가하였다. 20분 동안 가열 환류시켰다. 감압 증류하여 용매를 제거한 다음 생성된 고체를 헥산과 에틸아세테이트로 세척한 후 진공 건조시켜 92%의 수율로 표제의 화합물을 얻었다.

[95]

[96] **화학식 7 (3-(퓨란-2-일)-1-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-5-올)의 제조**

[97] 둥근 바닥 플라스크에 에틸 3-(3-퓨릴)-3-옥소프로파노에이트(1.2당량)와 초산 3ml을 넣고, 여기에 2-히드라지노피리딘(1당량)을 초산 2ml에 희석한 용액을 천천히 적가한 후, 130°C에서 72시간 동안 가열 환류시켰다. 감압 증류하여 용매를 제거한 다음 생성된 고체를 헥산으로 세척한 후 건조시켜 66%의 수율로 표제의 화합물을 얻었다.

[98]

[99] 실시예 1: 본 발명에 따른 화합물의 RANKL에 의한 파골세포 분화 저해능 실험

[100] 5 내지 6주령인 생쥐 (C57BL/6J)로부터 채취한 골수세포를 48-웰 플레이트에 넣고, 대식세포(macrophage) 분화 인자인 hM-CSF(R&D system Inc.)를 30ng/ml의

농도로 포함하는 분화배지 (α -MEM (Invitrogen. co.), 10%(v/v) 우태아혈청(FBS), 100units/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신)에서 3일 동안 4x10⁴ 세포/웰로 37°C, 95%(v/v) 공기, 5% (v/v) CO₂에서 배양하여 골수세포로부터 파생된 대식세포를 얻었다. 여기에 상기 30ng/ml의 농도의 hM-CSF에 더하여, 파골세포 분화 인자인 생쥐 RANKL을 대장균에서 발현시켜 순수 분리 정제하여 100ng/ml의 농도로 첨가한 후, 동일한 조건에서 배양을 계속하여 파골세포로의 세포분화를 유도하였다. 이때, 본 발명의 화합물을 각각 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M 및 20 μ M의 농도로 첨가하여 세포 배양하였다. 실험시 분화 배지의 교환은 2일 간격으로 해 주었다. 그 결과 파골세포로의 정상적인 분화가 이루어지는 대조군과는 달리 실험군에서는 세포분화가 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.

[101] 도 2는 생쥐 골수에서 분리한 파골 전구세포가 RANKL 처리에 의하여 파골세포로 분화되는 과정에 있어서 본 발명의 화합물의 효과를 농도별로 처리하여 TRAP 염색한 사진 및 분화 정도를 측정한 그래프로서, 본 발명의 화합물을 첨가하여 배양하기 시작한 날로부터 5일째 되는 날에 TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) 염색하고 광학현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 구체적으로, 상기 TRAP 염색은 세포를 3.7% 포름알데히드로 15분 동안 실온에서 고정시키고 증류수로 2회 세척한 후 Acid Phosphatase, Leukocyte(TRAP) kitTM(Sigma Co.)의 사용설명서에 기재된 비율로 아세테이트, 패스트 가르넷 GBC 염기 (Fast Gargnet GBC base), 나프톨 AS-BI 인산, 소듐 니트라이트, 타르트레이트를 섞어 만든 염색액을 200 μ l/웰을 넣고 37°C에서 20분 동안 반응시켜 이루어졌다.

[102] 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 화합물의 농도에 비례하여 파골세포 분화가 저해됨을 확인할 수 있었다.

[103]

[104] 실시예 2: 본 발명에 따른 화합물의 RANKL 또는 LPS에 의해 유도되는 뼈 파괴 작용 억제 효능

[105] 골소실 생쥐모델에서 본 발명에 따른 화합물의 RANKL 또는 LPS에 의해 유도되는 뼈 파괴작용 억제 효능을 살펴보기 위하여, 7주령인 생쥐의 머리뼈 두개관(頭蓋冠 calvaria)에 대조군 3 그룹 (아무것도 처리하지 않은 무처리군, LPS(12.5mg/kg) 및 RANKL(2mg/kg) 처리 그룹)과, 본 발명의 화합물 40mg/kg을 처리한 실험군 3 그룹 (아무것도 처리하지 않은 무처리군, LPS(12.5mg/kg) 및 RANKL(2mg/kg) 처리 그룹)의 총 6개 그룹을 4일간 매일 주입하였다. 5일째 생쥐 두개관을 채취해 그 단면을 H&E 염색하여 살펴보고, Image-pro Plus4.5(Media Cybernetics, Inc.)를 이용하여 뼈 파괴작용 억제 정도를 분석하였다.

[106] 도 3 및 도 4는 본 발명의 화합물이 RANKL 또는 LPS 주입에 의해 생쥐에서 발생하는 뼈 파괴 작용을 억제함을 보여주는 사진 및 그 정도를 정량한 그래프이다.

- [107] 도 3 및 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 화합물을 함께 투여할 때, LPS 주입에 의해 발생하는 뼈의 파괴가 평균 50% 저해되고, RANKL 주입에 의한 뼈의 파괴는 평균 64% 저해된다는 것을 알 수 있었다.

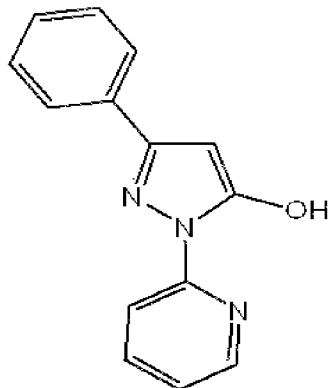
산업상 이용가능성

- [108] 본원 발명은 화학식 1 내지 8로 구성되는 군으로부터 선택되는 피라졸 유도체를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물 및 상기 조성물을 개체에 투여하여 골다공증을 예방 및 치료하는 방법에 관한 것으로서, 의료 분야에서 활용 가능하다.

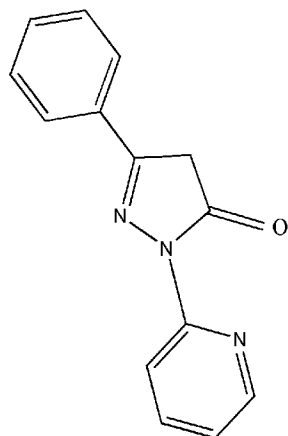
청구범위

- [1] 하기 화학식 1 내지 8로 구성되는 군으로부터 선택되는 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물:

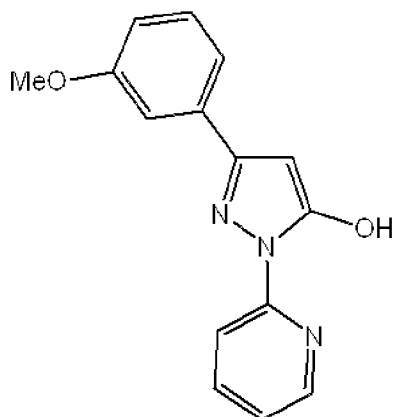
<화학식 1>



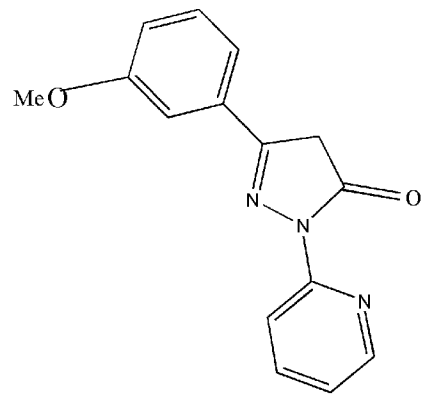
<화학식 2>



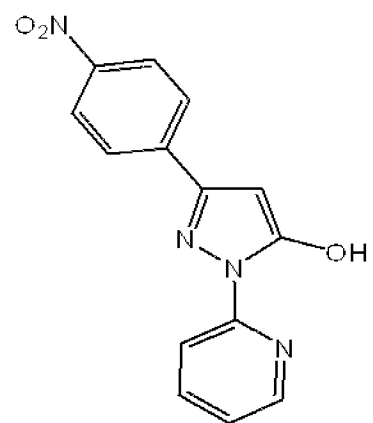
<화학식 3>



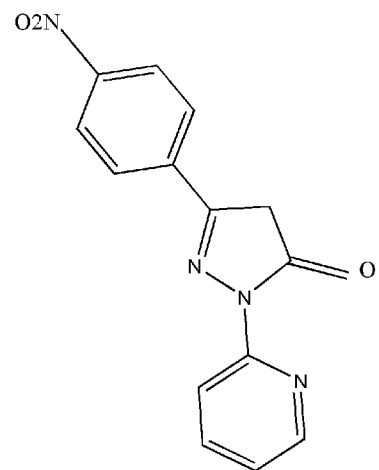
<화학식 4>



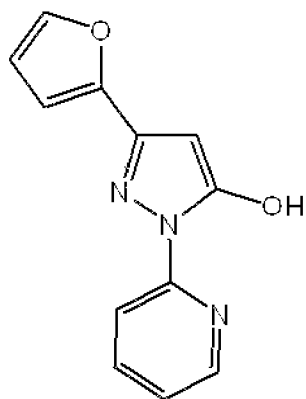
<화학식 5>



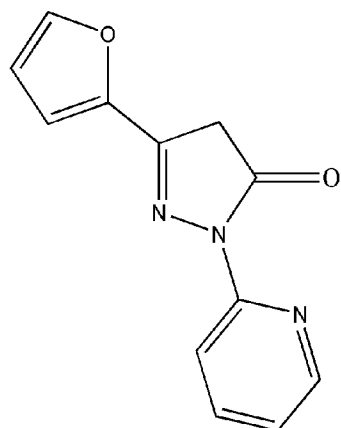
<화학식 6>



<화학식 7>

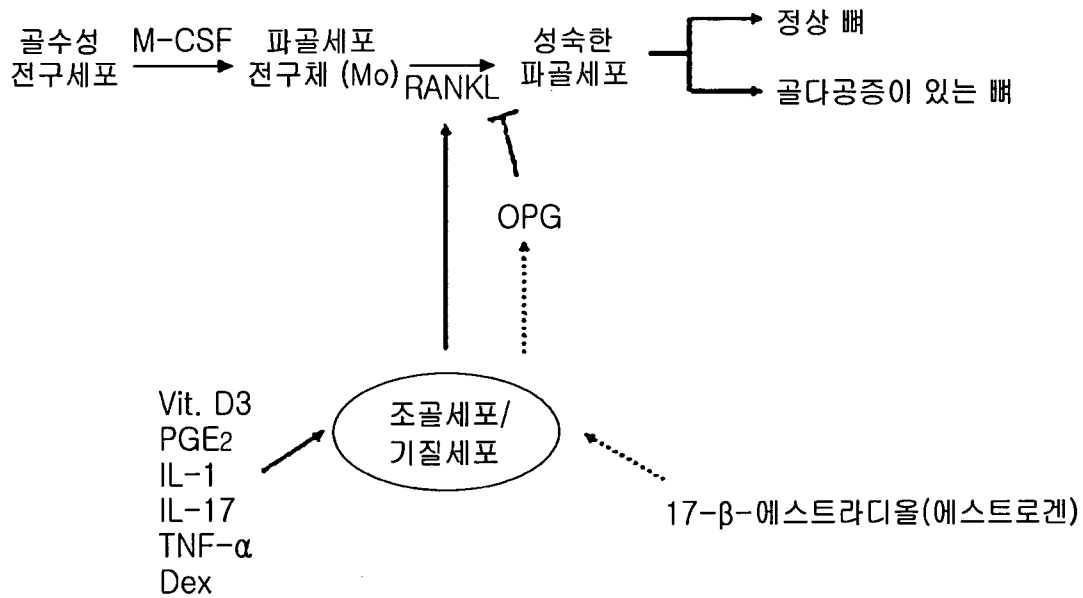


<화학식 8>

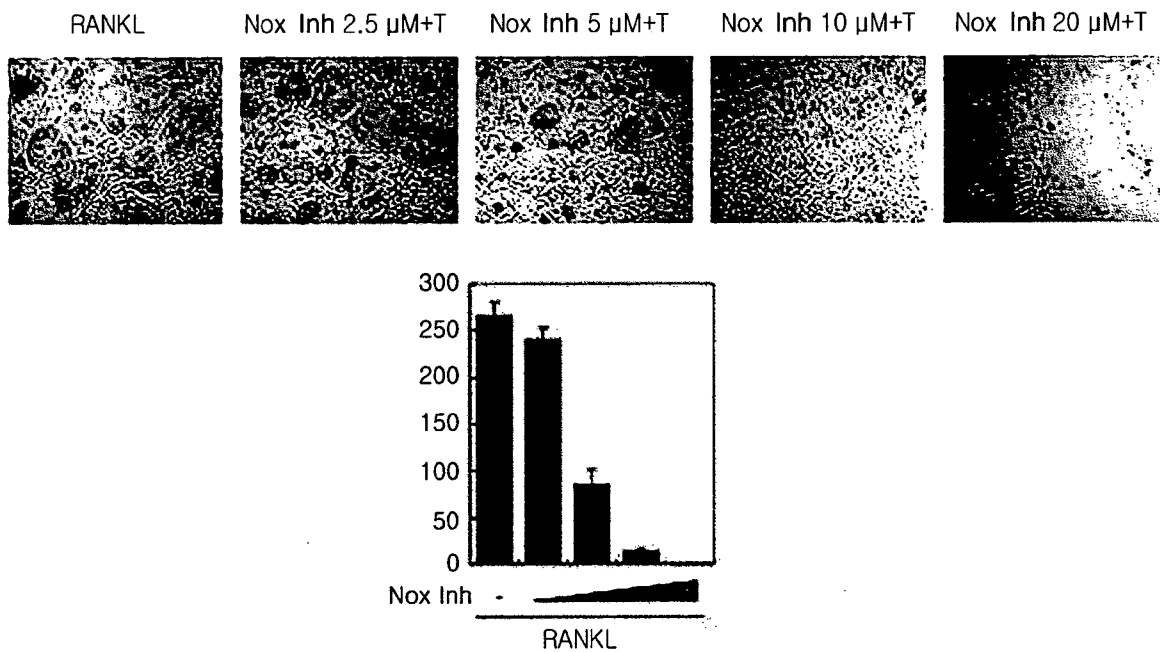


- [2] 제1항에 있어서, 상기 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염은 NADPH 옥시다아제(oxidase) 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [3] 제1항에 있어서, 상기 피라졸 유도체, 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 염은 파골세포에서 RANKL 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [4] 제1항 또는 제3항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골다공증의 예방 및 치료 방법.

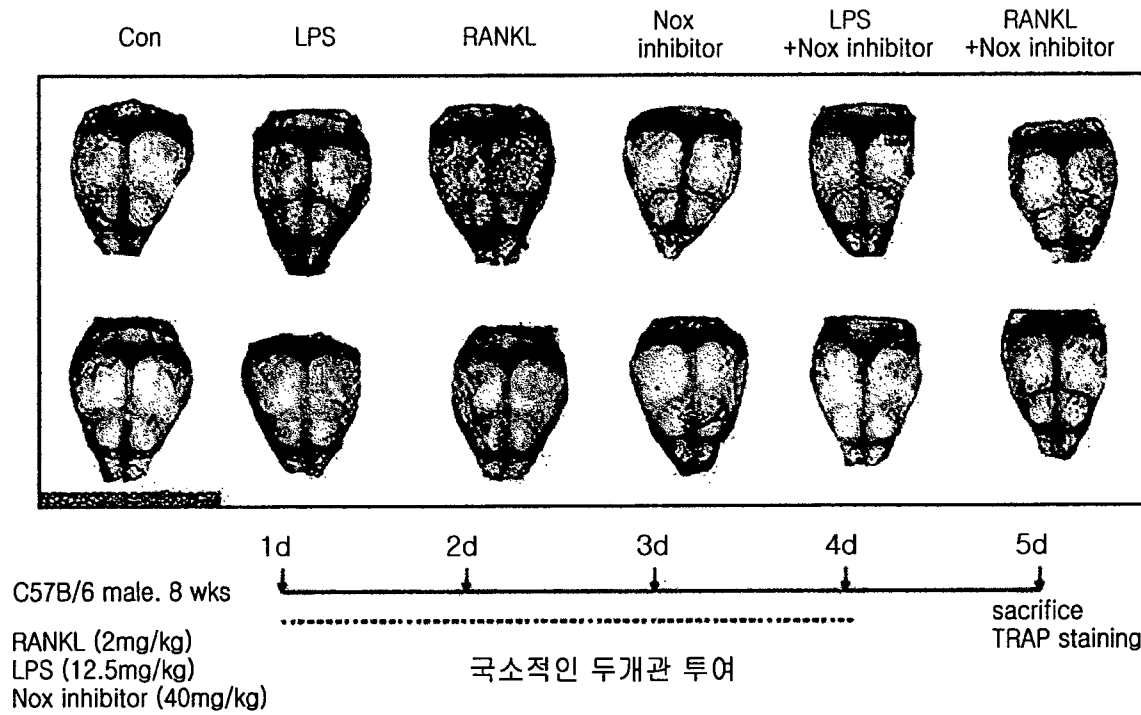
[Fig. 1]

뼈의 재 구성과정

[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

