(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 6 월 20 일 (20.06.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/128568 A1

(51) 국제특허분류:
C07D 235/30 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 5/38 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/017975

(22) 국제출원일: 2023 년 11 월 9 일 (09.11.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0172776 2022 년 12 월 12 일 (12.12.2022) KR

(71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (**KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 41566 대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교), Daegu (KR). 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR). 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).

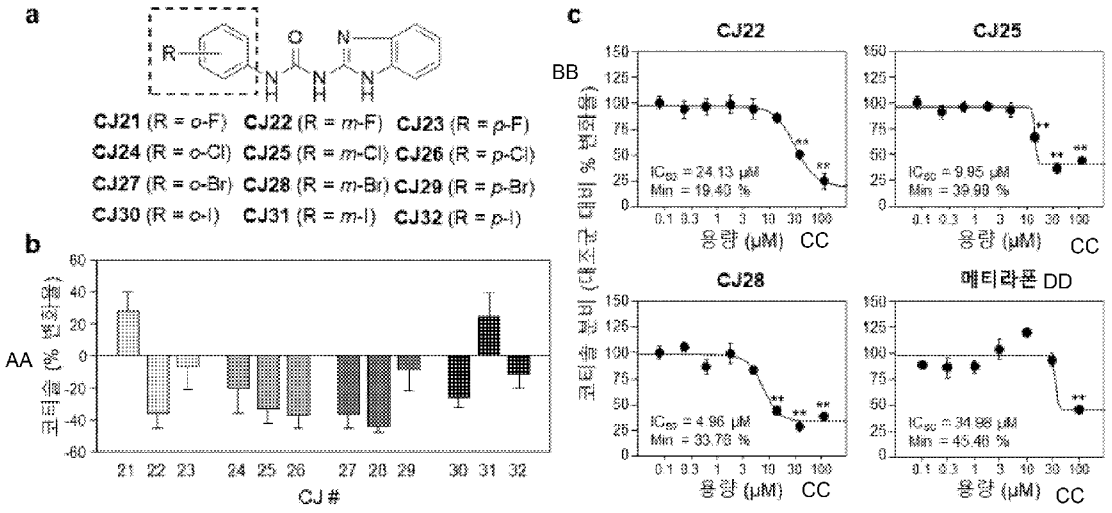
(72) 발명자: 정종화 (**JUNG, Jong Hwa**); 42047 대구광역시 수성구 무열로 143, Daegu (KR). 정수영 (**CHUNG, Sooyoung**); 03709 서울특별시 서대문구 수색로 100, 308-1302, Seoul (KR). 김수현 (**KIM, Soohyun**); 04114 서울특별시 마포구 신촌로28길 50, 101-1007, Seoul (KR). 손기훈 (**SON, Gihoon**); 03709 서울특별시 서대문구 수색로 100, 308-1302, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (**TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 08505 서울특별시 금천구 가산디지털2로 101, 비동 1802호(가산동,한라원앤원타워), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

(54) **Title:** BENZIMIDAZOLYLUREA DERIVATIVE AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 및 이의 약학적 용도



AA ... Cortisol (% change)
BB ... Cortisol secretion (% change compared to control)
CC ... Dose (μM)
DD ... Metyrapone

(57) **Abstract:** The present invention relates to a benzimidazolylurea derivative and a pharmaceutical use thereof. The benzimidazolylurea derivative exhibits excellent effects in treating and preventing pathological symptoms caused by excessive glucocorticoids by inhibiting adrenal corticosteroid production and cholesterol biosynthesis and can be used for the prevention and treatment of endogenous hypercortisolism.

(57) **요약서:** 본 발명은 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 및 이의 약학적 용도에 관한 것으로, 상기 벤즈이미다졸릴우레아 유도체는 부신피질 스테로이드 생성 및 콜레스테롤 생합성을 억제하여 과다한 글루코코티코이드로 인한 병적 증상의 치료 및 예방에 뛰어난 효과를 나타내고, 내인성 고코티솔혈증 예방 및 치료에 사용할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2024/128568 A1

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 및 이의 약학적 용도

기술분야

[1] 본 발명은 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 및 이의 약학적 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 인간의 경우 코티솔로 대표되는 부신피질 글루코코티코이드 호르몬의 과도한 분비는 당/지질 대사, 면역 반응, 심혈관 기능, 기분 및 뇌인지 기능 등을 방해하여 다양한 병적 증상을 초래한다. 예를 들면, 쿠싱증후군은 뇌하수체 선종, 부신 과증식, 부신 종양, 이소성 부신피질자극 호르몬 분비증 등 여러 원인에 의해 만성적으로 혈중 글루코코티코이드 양이 과다해지는 내분비 장애로 고혈압, 고혈당, 골다공증, 심혈관계 및 수면장애의 위험성과 감염의 위험성이 커져 합병증으로 인한 5년 사망률이 50%에 달한다.

[3] 부신피질자극호르몬(ACTH) 또는 글루코코티코이드 과다 환자의 경우 수술적 중재가 항상 가능한 것은 아니어서 수술 전 뿐만 아니라 수술이 성공적이지 못하거나 수술적 중재가 불가능한 경우 약물요법이 매우 중요하다. 수술 후 재발률 또한 20-30%에 달한다. 지금까지 개발된 치료제들은 효과가 충분하지 못하거나 부작용으로 사용이 제한적이었다. 예를 들면, 케토코나졸(ketoconazole)은 쿠싱증후군에 가장 많이 사용된 약 중 하나였으나 간 손상 위험으로 2013년 KFDA에서 중지 명령을 내렸다.

[4] 따라서 치료제에 대한 미충족 의료수요가 충분하고 새로운 치료제 개발이 시급한 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

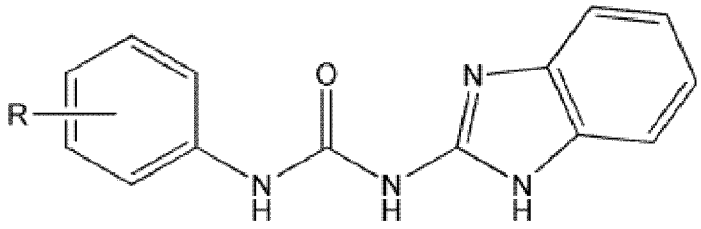
[5] 본 발명의 목적은 부신피질 스테로이드 생성 및 콜레스테롤 생합성을 억제하는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 및 이의 약학적 용도를 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

[6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체를 제공한다:

[7] [화학식 1]

[8]



[9] 화학식 1에서,

[10] 상기 R은 수소, 할로겐, (C1~C4)알킬, 테트라플루오로메틸(CF_3), (C1~C4)알콕시, 아미노(NH_2), 이산화질소(NO_2), 시아노(CN), 시아노메틸(CH_2CN), 페닐, 벤질 또는 나프틸임.

[11] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 고코티솔혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 고코티솔혈증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[13] 본 발명에 따른 벤즈이미다졸릴우레아 유도체는 부신피질 스테로이드 생성 및 콜레스테롤 생합성을 억제하여 코티솔을 포함한 글루코코티코이드의 과분비로 인한 병적 증상의 치료 및 예방에 뛰어난 효과를 나타내고, 내인성 고코티솔혈증 예방 및 치료에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 본 발명에 따른 벤즈이미다졸릴우레아 유도체의 구조와 코티솔 생성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. a는 코티솔 생성 억제제로 할로겐화 벤즈이미다졸릴우레아 유도체를 나타낸 것이고, b는 코티솔 생성에 대한 할로겐화 벤즈이미다졸릴우레아 유도체(CJ21-CJ32)의 구조 의존적 효과를 나타낸 것이고, c는 CJ22, CJ25, CJ28 및 메티라폰에 대한 코티솔 생산의 용량-반응 곡선 그래프이다.

[15] 도 2는 본 발명에 따른 벤즈이미다졸릴우레아 유도체가 부신 스테로이드 생성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. a는 주요스테로이드 중간체 및 코티솔 수준에 대한 벤즈이미다졸릴우레아 유도체의 효과를 나타낸 것이고, b는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 처리시 스테로이드 생성 유전자의 mRNA 발현을 나타낸 것이다.

[16] 도 3은 본 발명에 따른 벤즈이미다졸릴우레아 유도체의 포스콜린 유도 코티솔 생산 및 스테로이드 생성 유전자 발현 효과를 나타낸 결과이다. a는 1 μM 포스콜린(Forskolin, 이하 FSK)의 부재 또는 존재 하에서 코티솔 생산에 대한 CJ28의 용량 의존적 효과를 나타낸 것이고, b는 FSK의 부재 또는 존재 하에 CJ28로 처리 시 스테로이드 생성 유전자의 mRNA 발현을 나타낸 것이다.

[17] 도 4는 H295R 세포에서 벤즈이미다졸릴우레아 유도체(CJ28) 반응성 유전자 전사체의 특성화를 나타낸 것이다. a는 24시간 동안 CJ28(30μM) 또는 비히클(VEH, 0.1% DMSO) 처리 시 차등적으로 발현된 유전자(DEG)의 벤다이어그램이고, b는 CJ28 처리 후 상위 5개 상향 조절 또는 하향 조절된 유전자 전사체를 나타낸 것이고, c는 부신피질 스테로이드(corticosteroid) 생산 조절에 관여하는 CJ28 반응성 DEG를 나타낸 것이다.

[18] 도 5는 본 발명에 따른 벤즈이미다졸릴우레아 유도체(CJ28) 반응 DEG에 대한 경로 및 업스트림 레귤레이터 강화 분석 결과이다. a는 CJ28 처리 세포에서 DEG에 대한 경로 및 생물학적 프로세스 강화를 나타낸 것이고, b는 IPA에서 제안한 바와 같이 DEG가 풍부한 상위 10개 상류 전사조절인자를 나타낸 것이고, c는 주어진 경로/GO 용어 및 상류 조절자 중에서 포함된 타겟 DEG의 비교를 위한 벤 다이어그램이고, d는 CJ28 처리 시 표적 유전자 NR5A1(좌) 및 SREBF1/2(우)의 mRNA 발현 수준의 변화를 나타낸 것이다.

[19] 도 6은 본 발명에 따른 벤즈이미다졸릴우레아 유도체가 콜레스테롤 생합성 및 스테로이드 생성에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. a는 새로운 콜레스테롤 합성 및 수송을 조절하는 유전자의 mRNA 발현에 대한 벤즈이미다졸릴우레아 유도체의 효과를 나타낸 것이고, b는 콜레스테롤 생산에 대한 CJ28, 메티라폰 및 콜레스테롤 생합성 억제의 효과를 비교한 것이고, c는 코티솔 생산에 대한 CJ28, 메티라폰 및 콜레스테롤 생합성 억제의 효과를 비교한 것이고, d는 스테로이드 생성 유전자 발현에 대한 CJ28, 메티라폰 및 콜레스테롤 생합성 억제의 효과를 비교한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[20] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 서술한다.

[21]

[22] 본 발명에서, "예방"이란, 본 발명에 따른 약학 조성물, 화장료 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 쿠싱증후군 등으로 예시할 수 있는 고코티솔혈증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

[23] 본 발명에서, "치료"란, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 고코티솔혈증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

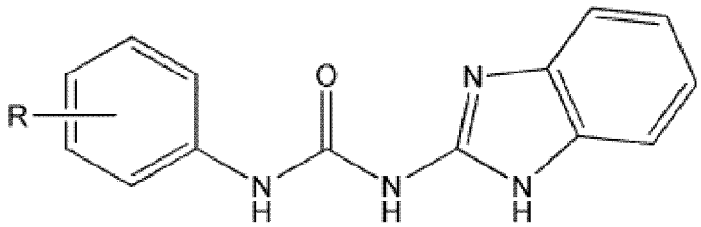
[24] 본 발명에서, "개선"이란, 본 발명에 따른 화장료 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 고코티솔혈증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[25]

[26] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체를 제공한다:

[27] [화학식 1]

[28]



[29] 화학식 1에서,

[30] 상기 R은 수소, 할로겐, (C1~C4)알킬, 테트라플루오로메틸(CF_3), (C1~C4)알콕시, 아미노(NH_2), 이산화질소(NO_2), 시아노(CN), 시아노메틸(CH_2CN), 페닐, 벤질 또는 나프틸임. 구체적으로, 상기 R은 불소, 염소, 브롬 및 요오드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 할로겐일 수 있다.

[31] 상기 화학식 1에서, R은 오르토(ortho-), 메타(meta-) 또는 파라(para-) 위치에 치환될 수 있고, 구체적으로 R은 메타(meta-) 치환될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서, R은 불소, 염소, 브롬 및 요오드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 할로겐이 메타 위치에 치환된 것일 수 있다.

[32]

[33] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 고코티솔혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[34] 상기 화학식 1에서, 상기 R은 수소, 할로겐, (C1~C4)알킬, 테트라플루오로메틸(CF_3), (C1~C4)알콕시, 아미노(NH_2), 이산화질소(NO_2), 시아노(CN), 시아노메틸(CH_2CN), 페닐, 벤질 또는 나프틸임. 구체적으로, 상기 R은 불소, 염소, 브롬 및 요오드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 할로겐일 수 있다.

[35] 상기 화학식 1에서, R은 오르토(ortho-), 메타(meta-) 또는 파라(para-) 위치에 치환될 수 있고, 구체적으로 R은 메타(meta-) 치환될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화학식 1에서, R은 불소, 염소, 브롬 및 요오드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 할로겐이 메타 위치에 치환된 것일 수 있다.

[36] 상기 약학적으로 허용가능한 염은 상기 약제학적으로 허용가능한 염은 염산염, 브롬산염, 황산염, 인산염, 질산염, 구연산염, 초산염, 젖산염, 주석산염, 말레산염, 글루콘산염, 숙신산염, 포름산염, 트리플루오로아세트산염, 옥살산염, 푸마르산염, 메탄술폰산염, 벤젠술폰산염, 파라톨루엔술폰산염, 캠퍼술폰산염, 나트륨염, 칼륨염, 리튬염, 칼슘염 및 마그네슘염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[37] 상기 조성물은 1 내지 100 μM, 1 내지 70 μM 또는 10 내지 50 μM의 벤즈이미다졸릴우레아 유도체를 포함할 수 있다.

[38] 상기 조성물은 부신피질 스테로이드 생성 및 콜레스테롤 생합성을 억제할 수 있다.

[39] 상기 고코티솔혈증은 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 쿠싱병(Cushing's disease) 및 이소성 부신피질 자극호르몬 증후군(ectopic adrenocorticotropic hormone syndrome) 등을 포함한 글루코코티코이드 과분비에 기인하는 질환군에서 선택될 수 있다.

[40] 본 발명에서, "약학 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물로, 본 발명의 목적상 고코티솔혈증의 증상을 예방하거나 또는 치료하기 위해 투여되는 것을 의미한다.

[41] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[42] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로 서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[43] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[44] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 외용제 형태로 제형화될 수 있다.

[45] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면 활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[46] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경

우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[47] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10mg/kg의 범위일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[48] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

[49]

[50] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 고코티솔혈증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[51] 상기 조성물은 부신피질 스테로이드 생성 및 콜레스테롤 생합성을 억제하는 효과를 가질 수 있다.

[52] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.

[53] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.

[54] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품으로, 영양 공급 외에도 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미하며 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용할 수 있다. 예를 들어, 건강보조식품, 특수 영양 보충용 식품, 기능성 음료 등으로 제조될 수 있고, 또는 천연식품, 가공식품 등에 본 발명에 따른 조성물이 첨가될 수 있다.

[55] 상기 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있고, 상기 건강기능식품 조성물이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과실 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.

[56] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용 가능한 식품 첨가제 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민, 전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 식품 첨가제 및 기타 보조 성분 등은 그것이 첨가되는 용도를 달성할 수 있는 한 극미량으로 첨가되어 사용되는 것이 바람직하다. 극미량이란 수치적으로 표현할 때 건강기능식품 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0005 중량% 내지 약 0.5 중량% 범위일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[57] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[58]

[59] 실험방법

[60] 1. 세포 배양 및 치료

[61] NCI-H295R(H295R) 세포는 1% ITS+ Premix(Corning, Corning, NY, USA), 2.5% Nu-Serum(Corning) 및 1% 항생제-항진균 용액(Thermo Fisher Scientific)이 보충된 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지-F12(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 37°C에서 5% CO_2를 포함하는 가습 인큐베이터에서 유지되었다. 모든 실험은 6웰 또는 12웰 세포 배양 플레이트(SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에서 수행하였다. 컨플루언트(Confluent) 세포를 무혈청 배지에서 12시간 동안 배양한 다음 비히클(0.1 또는 0.2% DMSO) 또는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체로 처리하였다. 메티라폰(카탈로그 번호: M2696), 미토탄(카탈로그 번호: SML1885) 및 포스콜린(카탈로그 번호: F3917)은 Merck(Burlington, MA, USA)에서 입수하였다. Ketoconazole(카탈로그 번호: 1103) 및 AY9944(카탈로그 번호: 1639)는 Tocris Bioscience(Bristol, UK)에서 입수하였다. U-18666A(카탈로그 번호: 10009869)는 Cayman Chemical Co.(Ann Arbor, MI, USA)로부터 입수하였다. 24시간 또는 48시간 배양한 후, 스테로이드 측정을 위해 배양 배지를 수집하였다. 배지를 4 ℃에서 5분 동안 원심분리(10,000 x g)하고 상층액을 빠르게 동결시켰다. 세포를 차가운 Dulbecco의 인산염 완충 식염수로 세척하고 -80 ℃에서 보관하였다.

[62]

[63] 2. 스테로이드 측정

[64] 배양 배지에 분비된 스테로이드 농도는 상용화된 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 키트를 사용하여 결정되었다. 코티솔(Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA), 프레그네놀론(ALPCO, Salem, NH, USA), 17α-하이드록시 프로게스테론(IBL-America, Minneapolis, MN, USA) 및 프로게스테론(ALPCO)에 대한 ELISA 키트를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 호르몬 농도를 측정하였다.

[65] 3. 총 콜레스테롤 함량 측정

[66] 1% Triton™ X-100을 함유하는 차가운 Tris 완충 식염수(pH 7.4)로 세포를 수확하고, 미세원심분리 튜브로 옮기고, 얼음 위에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 용해물의 일부를 단백질 정량을 위해 동일한 부피의 소듐 도데실 설페이트 (SDS) 샘플 완충액 (20% 글리세롤, 100mM Tris-HCl[pH 6.8] 및 8% SDS)과 혼합하고 나머지는 4 ℃에서 20분 동안 원심분리하였다(10,000 x g). 상층액을 콜레스테롤/콜레스테릴 에스테르 정량 분석 키트(Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Assay Kit) (catalog number: ab65359, Abcam, Cambridge, UK)의 콜레스테롤 분석 완충액으로 희석하고 총 콜레스테롤 함량을 제조업체의 지침에 따라 측정하였다.

[67] 4. RNA 분리 및 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)

[68] 총 RNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 microRNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출되었다. qRT-PCR의 경우 PrimeScript™ 1st Strand cDNA 합성 키트(Takara Bio, Kusatsu, Japan)를 사용하여 각 RNA 샘플 500ng을 역전사하였다. 합성된 cDNA의 분취량을 Power SYBR® Green PCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific) 및 표시된 프라이머 세트와 혼합하였다. 상대적인 mRNA 발현 수준은 비교 Ct 방법을 사용하여 계산되었으며 TBP는 내부 대조군으로 사용되었다. qRT-PCR에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

[69] [표1]

Gene		Sequence (5'→3')
TBP	Forward	ACG CCG AAT ATA ATC CCA AG
	Reverse	CTT CAC TCT TGG CTC CTG TG
STAR	Forward	TTG AGA GAA GAG GCA GCA GC
	Reverse	GCT TGA ATG TCG CTA GCA GC
CYP11A1	Forward	GAC TTC GTC AGT GTC CTG CA
	Reverse	AGC GGA ACA GGT CAT CAC TG
CYP17A1	Forward	CTC CAG CAT CGG TGA GTT TG
	Reverse	TGG TGC CAC TCC TTC TCA TT
HSD3B2	Forward	GGA CTC CTC TGT CCA GCT TT

	Reverse	CAT CGT GGC CAA TCC AAA GT
DHCR7	Forward	TGA GAA GGA TCA AGC AGG CA
	Reverse	TGG TGA CGC CAT CTA GAC TC
FDFT1	Forward	AAG ATT CGG AAA GGG CAA GC
	Reverse	GTC CGG ATG GTG GAG ATG AT
FDPS	Forward	GCA GGA TTT CGT TCA GCA CT
	Reverse	AGC TCC CGG AAT GCT ACT AC
HMGCS1	Forward	TCA CCA TGC CTG GAT CAC TT
	Reverse	CAA GGG CAA CAA TTC CCA CA
LSS	Forward	ACC CTG TTC CCA GAG ATG TG
	Reverse	GGC GAA GTC CTC CAC ATA GA
MVK	Forward	CTC TCC AGC TGT TTC CTC CA
	Reverse	AGA CGC ACA ACA AAG TGA CC
SQLE	Forward	CAA GTG CAG AGT GGA AGA GC
	Reverse	AAC AGT CAG TGG AGC ATG GA
ABCA1	Forward	GGC CTA CCA AGG GAG AAA CT
	Reverse	TGG CTT CAG GAT GTC CAT GT

[70] 5. RNA 시퀀싱(RNA-Seq) 및 생물정보학적 분석

[71] 24시간 동안 용매(0.1% DMSO) 또는 CJ28(30μM)로 처리된 H295R 세포에서 총 RNA를 추출하였다. RNA 품질은 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에서 평가되었다. 전사체 프로파일링 및 후속 생물정보학 분석을 위한 RNA-Seq는 이전에 설명된 대로 약간의 수정으로 수행되었다. 즉, 총 RNA는 Ribo-Zero™ 시약(Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용하여 ribosomal RNA 고갈에 적용되었고 cDNA 라이브러리는 제조업체의 지침에 따라 TruSeq™ Stranded Total RNA Prep Kit(Illumina)를 사용하여 준비되었다. 1차 시퀀스 데이터는 HiSeq™ 2500 시퀀싱 플랫폼(Illumina)에서 페어드 엔드 시퀀싱(pair-end sequencing)을 사용하여 획득했으며 원시 판독값은 기본 매개변수와 함께 Trimmomatic을 사용하여 어댑터 및 저품질 시퀀스(<Q20)를 제거하여 사전 처리되었다. TopHat v2.0.13 및 Cuffdiff v2.2.0은 처리된 판독값을 인간 참조 게놈(Ensembl GRCh38.p13)에 매핑하고 차등 발현 유전자(DEG) 분석을 위해 유의하게 검출된 전사체를 식별하는 데 사용되었다. >2배 변화(FC) 및 P-값<0.05를 갖는 DEG를 사용하여 기본 데이터 세트를 구성하였다. DEG들이 구성하는 분자 경로에 대한 분석을 위해 1차적으로는 선택된 DEG를 기 보고된 부신 스테로이

드 생성 경로와 비교하였다. 또한 ENRICHR 및 Ingenuity Pathway Analysis(IPA, Qiagen)를 사용하여 전반적인 분자경로 변조 양상을 분석하였다. ENRICHR을 위한 "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway", "Wiki Pathway" 및 "Gene Ontology (GO) Biological Functions" 데이터베이스를 활용하여 DEG들이 구성하는 생물학적 분자경로를 추정하였으며, IPA의 "상위 조절인자 탐색" 기능을 이용하여 CJ28 화합물 처리에 영향을 받는 전사인자를 추정하였다.

[72] 6. 통계분석

[73] Student's t-test는 용매 및 화합물(벤즈이미다졸릴우레아 유도체) 처리 그룹 간의 간단한 비교에 사용되었다. 분산 분석(ANOVA)과 사후 비교를 위한 Bonferroni 테스트를 사용하여 여러 화합물의 용량 의존적 효과 또는 조합 효과를 통계적으로 평가하였다. DEG들이 구성하는 분자경로의 유의성은 Fisher의 정확도 검정(Fisher's exact test)을 사용하여 입력 DEG 목록과 표시된 데이터베이스의 분자경로 별 유전자 세트 사이의 중첩도를 통계적으로 평가하였다. 그룹 간의 차이는 $P<0.05$에서 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[74]

[75] <실시예 1> 화합물 합성

[76] 1. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-브로모페닐)우레아(1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(3-bromophenyl)urea, CJ28)

[77] 벤즈이미다졸릴우레아 유도체의 합성방법은 다음과 같다. 1,1′-카르보닐디이미다졸(96 mg, 0.58 mmol)을 N,N-디메틸포름아마이드(3 mL)에 녹인 3-브로모아닐린(100 mg, 0.58 mmol)의 용액에 조금씩 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그런 다음, N,N-디메틸포름아마이드(1 mL)에 녹인 2-아미노벤즈이미다졸(77 mg, 0.58 mmol)을 혼합물에 적가하고 밤새 교반하였다. 반응물을 물로 켄칭(quenching)하고 에틸아세테이트로 추출하였다. 유기층을 감압 농축하고 중압 액체 크로마토그래피(MPLC)로 정제하여 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-브로모페닐)우레아(CJ28, 155 mg)을 얻었다; 수율 81%, 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 11.35 (br, 2H), 9.56 (br, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.46 (d, *J*=8.30 Hz, 1H), 7.36-7.33 (m, 2H), 7.23 (t, *J*=8.05 Hz, 1H), 7.14 (d, *J*=7.95 Hz, 1H), 7.07-7.06 (m, 2H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{14}H_{12}BrN_4O$ calculated: 331.0194, found: 331.0198.

[78] 이하, 벤즈이미다졸릴우레아 유도체는 CJ01-CJ33은 3-브로모아닐린 대신에 해당 아닐린 기질을 사용한 것을 제외하고는 CJ28 제조방법과 동일한 방법으로 제조되었다.

[79] 2. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(p-톨릴)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(*p*-tolyl)urea, CJ01)

[80] :수율 64%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 11.02 (s, 2H), 9.53 (s, 1H), 7.48-7.42 (m, 2H), 7.38 (dd, *J*=5.8, 3.2 Hz, 2H), 7.12 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), 7.06 (dd, *J*=5.9, 3.2 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H); LRMS (ESI) *m/z* 267 $[M+H]^+$.

[81] 3. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-(트리플루오로메틸)페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-(trifluoromethyl)phenyl)urea, CJ02)

[82] :수율 58%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.09 (d, *J*=10.25 Hz, 1H), 7.74-7.67 (m, 2H), 7.38-7.31 (m, 3H), 7.09-7.07 (m, 2H); LRMS (ESI) *m/z* 321 $[M+H]^+$.

[83] 4. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-(트리플루오로메틸)페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)urea, CJ03)

[84] :수율 48%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.62 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.67 (d, *J*=12.3 Hz, 1H), 7.48 (t, *J*=12.8 Hz, 1H), 7.34-7.26 (m, 3H), 7.08-7.05 (m, 2H); LRMS (ESI) *m/z* 321 $[M+H]^+$.

[85] 5. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-(트리플루오로메틸)페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)urea, CJ04)

[86] :수율 66%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.73 (s, 1H), 7.82 (d, *J*=14.1 Hz, 2H), 7.62 (d, *J*=14.7 Hz, 2H), 7.36-7.31 (m, 2H), 7.09-7.06 (m, 2H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{15}H_{12}F_3N_4O$ calculated: 321.0963, found: 321.0970.

[87] 6. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-(tert-부틸)페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-(tert-butyl)phenyl)urea. CJ05)

[88] :수율 36%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7.45 (d, *J*=9.5 Hz, 1H), 7.42-7.37 (m, 3H), 7.25-7.15 (m, 2H), 7.07-7.05 (m, 2H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{18}H_{21}N_4O$ calculated: 309.1715, found: 309.1718.

[89] 7. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-(tert-부틸)페닐)우레아 (1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-3-(3-(tert-butyl)phenyl)urea, CJ06)

[90] :수율 74%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.40 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.47-7.37 (m, 2H), 7.31 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.23 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.06-7.04 (m, 3H), 1.29 (s, 9H); LRMS (ESI) *m/z* 309 $[M+H]^+$.

[91] 8. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-(tert-부틸)페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-(tert-butyl)phenyl)urea, CJ07)

[92] :수율 65%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.47 (s, 1H), 7.48 (d, *J*=14.35 Hz, 2H), 7.38-7.30 (m, 4H), 7.04 (dd, *J*=5.5 Hz, 2H), 1.26 (s, 9H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{18}H_{21}N_4O$ calculated: 309.1715, found: 309.1722. LRMS (ESI) *m/z* 321 $[M+H]^+$.

[93] 9. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-메톡시페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-methoxyphenyl)urea, CJ08)

[94] :수율 84%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.20 (d, *J*=1.0 Hz, 1H), 7.40 (t, *J*=4.3 Hz, 2H), 7.07-7.00 (m, 4H), 6.95 (t, *J*=1.1 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H); LRMS (ESI) *m/z* 283 $[M+H]^+$.

[95] 10. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-메톡시페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(3-methoxyphenyl)urea, CJ09)

[96] :수율 73%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.53 (s, 1H), 7.38-7.35 (m, 3H), 7.19 (t, *J*=12.8 Hz, 1H), 7.07-7.02 (m, 3H), 6.58 (d, *J*=14.1 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H); LRMS (ESI) *m/z* 283 $[M+H]^+$.

[97] 11. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-메톡시페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-methoxyphenyl)urea, CJ10)

[98] :수율 77%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.44 (s, 1H), 7.47-7.34 (m, 4H), 7.05-7.02 (t, *J*=5.5 Hz, 2H), 6.90 (d, *J*=14.6 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{15}H_{15}N_4O_2$ calculated: 283.1195, found: 283.1197.

[99] 12. 1-(2-아미노페닐)-3-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)우레아 (1-(2-aminophenyl)-3-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)urea, CJ11)

[100] CJ11은 에탄올에서 $SnCl_2$을 사용하여 CJ14를 환원하여 얻었다.

[101] :수율 84%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7.41-7.33 (m, 3H), 7.02-6.99 (m, 2H), 6.87 (t, *J*=14.1 Hz, 1H), 6.75 (d, *J*=13.1 Hz, 1H), 6.58 (t, *J*=12.2 Hz, 1H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{14}H_{14}N_5O$ calculated: 268.1198, found: 268.1201.

[102] 13. 1-(4-아미노페닐)-3-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)우레아 (1-(4-aminophenyl)-3-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)urea, CJ12)

[103] CJ12은 에탄올에서 $SnCl_2$을 사용하여 CJ16을 환원하여 얻었다.

[104] :수율 89%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.17 (t, 1H), 7.37 (dd, 2H), 7.27 (dd, 1H), 7.18 (t, 1H), 7.10-7.04 (m, 3H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{14}H_{14}N_5O$ calculated: 268.1198, found: 268.1187.

[105] 14. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-페닐우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-phenylurea, CJ13)

[106] :수율 73%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 9.56 (s, 1H), 7.56 (d, *J*=13.5 Hz, 2H), 7.38-7.35 (m, 2H), 7.33-7.28 (m, 2H), 7.07-6.97 (m, 3H); LRMS (FAB) *m/z* 253 $[M+H]^+$.

[107] 15. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-니트로페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-nitrophenyl)urea, CJ14)

[108] :수율 82%; 노란색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.42 (d, *J*=12.2 Hz, 1H), 8.09 (d, *J*=12.2 Hz, 1H), 7.70 (t, *J*=11.9 Hz, 1H), 7.36-7.34 (m, 2H), 7.19 (t, *J*

=13.4 Hz, 1H), 7.10-7.07 (m, 2H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for calculated: $C_{14}H_{12}N_5O_3$ 298.0940, found: 298.0934.

[109] 16. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-니트로페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(3-nitrophenyl)urea, CJ15)

[110] :수율 81%; 노란색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.73 (br, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.79 (t, *J*=15.9 Hz, 2H), 7.53 (t, *J*=13.5 Hz, 1H), 7.34-7.31 (m, 2H), 7.10-7.07 (m, 2H); LRMS (FAB) *m/z* 298 $[M+H]^+$.

[111] 17. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-니트로페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-nitrophenyl)urea, CJ16)

[112] :수율 87%; 노란색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.17 (d, *J*=15.3 Hz, 2H), 7.87 (d, *J*=15.3 Hz, 2H), 7.35-7.32 (m, 2H), 7.12-7.09 (m, 2H); LRMS (ESI) *m/z* 298 $[M+H]^+$.

[113] 18. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-시아노페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-cyanophenyl)urea, CJ17)

[114] :수율 68%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.73 (br, 1H), 7.80 (d, *J*=15.0 Hz, 2H), 7.69 (d, *J*=14.7 Hz, 2H), 7.34-7.31 (m, 2H), 7.10-7.07 (m, 2H); LRMS (ESI) *m/z* 278 $[M+H]^+$.

[115] 19. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-(시아노메틸)페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-(cyanomethyl)phenyl)urea, CJ18)

[116] :수율 66%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7.82 (d, *J*=9.45 Hz, 1H), 7.68-7.35 (m, 5H), 7.28-7.17 (m, 1H), 7.08-7.06 (m, 2H), 6.95-6.78 (m, 1H); LRMS (ESI) *m/z* 292 $[M+H]^+$.

[117] 20. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-벤조일페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-benzoylphenyl)urea, CJ19)

[118] :수율 69%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7.78-7.55 (m, 9H), 7.34 (m, 2H), 7.09 (m, 2H); HRMS (FAB) m/z $[M+H]^+$ for calculated: $C_{21}H_{17}N_4O_2$ 357.1352, found: 357.1341.

[119] 21. 1-([1,1'-비페닐]-4-일)-3-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)우레아 (1-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)urea, CJ20)

[120] :수율 58%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.64 (br, 1H), 7.69-7.60 (m, 6H), 7.46-7.28 (m, 5H), 7.07-7.04 (m, 2H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for calculated: $C_{20}H_{17}N_4O$ 329.1402, found: 329.1395.

[121] 22. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-플루오로페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-fluorophenyl)urea, CJ21)

[122] :수율 82%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.17 (m, 1H), 7.91-7.88 (m, 2H), 7.79 (m, 2H), 7.34-7.19 (m, 5H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{14}H_{12}FN_4O$ calculated: 271.0995, found: 271.1003.

[123] 23. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-플루오로페닐)우레아(1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(3-fluorophenyl)urea, CJ22)

[124] :수율 68%; 백색 고체; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.63 (br, 1H), 7.64 (d, *J* =11.8 Hz, 1H), 7.35-7.28 (m, 4H), 7.07 (m, 2H), 6.78 (s, 1H); HRMS (FAB) *m/z* [M +H]$^+$ for calculated: $C_{14}H_{12}FN_4O$ 271.0995, found: 271.0984.

[125] 24. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-플루오로페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-fluorophenyl)urea, CJ23)

[126] :수율 64%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.57 (br, 1H), 7.60-7.56 (m, 2H), 7.37-7.34 (m, 2H), 7.13 (t, *J*=14.7 Hz, 2H), 7.06-7.03 (m, 2H); LRMS (ESI) *m/z* 271 $[M+H]^+$.

[127] 25. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-클로로페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-chlorophenyl)urea, CJ24)

[128] :수율 54%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.26 (d, *J*=7.1 Hz, 1H), 7.50 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.41-7.32 (m, 3H), 7.32-7.05 (m, 3H); LRMS (ESI) *m/z* 287 $[M+H]^+$.

[129] 26. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-클로로페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(3-chlorophenyl)urea, CJ25)

[130] :수율 68%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.56 (br, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.43-7.26 (m, 4H), 7.08-6.98 (m, 3H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{14}H_{12}ClN_4O$ calculated: 287.0700, found: 287.0701.

[131] 27. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-클로로페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-chlorophenyl)urea, CJ26)

[132] :수율 68%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 11.26 (s, 2H), 9.64 (s, 1H), 7.68-7.61 (m, 2H), 7.42-7.32 (m, 4H), 7.13-7.05 (m, 2H); LRMS (ESI) *m/z* 287 $[M+H]^+$.

[133] 28. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-브로모페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-bromophenyl)urea, CJ27)

[134] :수율 73%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.19 (d, *J*=12.2 Hz, 1H), 7.65 (d, *J*=13.4 Hz, 1H), 7.41-7.38 (m, 3H), 7.08-7.02 (m, 3H); HRMS (FAB) *m/z* [M +H]$^+$ for calculated: $C_{14}H_{12}BrN_4O$ 331.0194, found 331.0195.

[135] 29. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-브로모페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(4-bromophenyl)urea, CJ29)

[136] :수율 77%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.65 (br, 1H), 7.57 (d, *J* =14.7 Hz, 2H), 7.45 (d, *J*=14.7 Hz, 2H), 7.35-7.32 (m, 2H), 7.07-7.04 (m, 2H); LRMS (ESI) *m/z* 331, 333 $[M+H]^+$.

[137] 30. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(2-요오도페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(2-iodophenyl)urea, CJ30)

[138] :수율 78%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.00 (d, *J*=13.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J*=11.3 Hz, 1H), 7.41-7.35 (m, 3H), 7.08-7.05 (m, 2H), 6.90-6.85 (m, 1H); LRMS (ESI) *m/z* 379 $[M+H]^+$.

[139] 31. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(3-요오도페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(3-iodophenyl)urea, CJ31)

[140] :수율 61%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.48 (br, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.46 (d, *J*=12.9 Hz, 1H), 7.35-7.30 (m, 3H), 7.09-7.05 (m, 3H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{14}H_{12}N_4O$ calculated: 379.0056, found: 379.0060.

[141] 32. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(4-요오도페닐)우레아 (1-(1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)-3-(4-iodophenyl)urea, CJ32)

[142] :수율 75%; 백색 고체; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7.61 (d, *J*=10.3 Hz, 2H), 7.45 (d, *J*=10.7 Hz, 2H), 7.35 (d, *J*=4.3 Hz, 2H), 7.06 (d, *J*=3.7 Hz, 2H); LRMS (FAB) *m/z* 379 $[M+H]^+$.

[143] 33. 1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(나프탈렌-2-일)우레아 (1-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)-3-(naphthalen-2-yl)urea, CJ33)

[144] :수율 64%; 백색 고체; ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.21 (s, 1H), 7.94-7.81 (m, 3H), 7.60-7.57 (m, 5H), 7.31 (m, 2H); HRMS (FAB) *m/z* $[M+H]^+$ for $C_{18}H_{15}N_4O$ calculated: 303.1246, found: 303.1252.

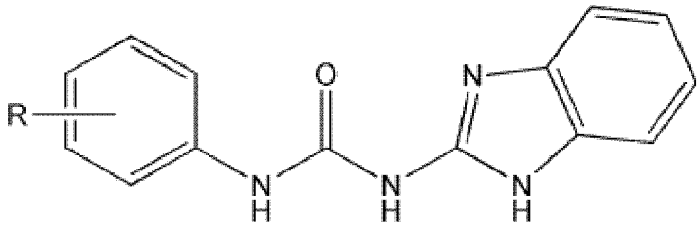
[145]

[146] <실시예 2> 코티솔 생성 억제제로서의 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 확인

[147] 인간 부신피질 세포에서 코티솔 생성을 억제하는 작은 분자를 확인하기 위해, 약물과 유사한 화학 지지체(scaffolds) 모음을 스크리닝했다. H295R 세포를 자체 보유한 화합물 라이브러리(in-house chemical library)의 각 화합물 20 μM로 24시간 동안 처리한 후 배양 배지의 코티솔 분비 수준을 측정했다. 초기 스크리닝을 기반으로 H295R 세포에서 코티솔 분비에 대한 억제활성을 나타내는 벤즈이미다졸릴우레아 화합물을 확인했다.

[148] 구조적으로 유사한 벤즈이미다졸릴우레아 유도체는 코티솔 분비에 대한 치환기 의존적 억제 효과를 나타냈다(표 2).

[149] [표2]



		Substituents[a]			
Entry	Chemical	*o*-	*m*-	*p*-	% of VEH[b]
1	CJ01			CH_3	93.8784 ± 11.0819
2	CJ02	CF_3			89.8151 ± 17.8345
3	CJ03		CF_3		89.9192 ± 14.121
4	CJ04			CF_3	106.3575 ± 12.7523
5	CJ05	t-Bu			121.1574 ± 18.1175
6	CJ06		t-Bu		119.3091 ± 17.5061
7	CJ07			t-Bu	108.5315 ± 3.5641
8	CJ08	OCH_3			93.243 ± 17.8648
9	CJ09		OCH_3		102.8753 ± 5.3901
10	CJ10			OCH_3	82.6843 ± 10.3727
11	CJ11	NH_2			181.442 ± 13.6119
12	CJ12			NH_2	83.0002 ± 8.9391
13	CJ13				159.1055 ± 35.3166
14	CJ14	NO_2			184.4196 ± 19.3821
15	CJ15		NO_2		62.5476 ± 6.5497
16	CJ16			NO_2	90.9283 ± 13.8344
17	CJ17			CN	180.1641 ± 12.197
18	CJ18	CH_2CN			184.6928 ± 28.1734
19	CJ19			Bz	67.4127 ± 6.0059
20	CJ20			Ph	91.2977 ± 3.3398
21	CJ21	F			127.9705 ± 12.2584
22	CJ22		F		64.5018 ± 9.6092
23	CJ23			F	92.8399 ± 13.749

24	CJ24	Cl			79.8989 ± 15.6996
25	CJ25		Cl		66.707 ± 9.0948
26	CJ26			Cl	63.1732 ± 8.6169
27	CJ27	Br			63.9599 ± 9.2256
28	CJ28		Br		55.9365 ± 3.9289
29	CJ29			Br	91.1935 ± 12.8431
30	CJ30	I			73.949 ± 6.717
31	CJ31		I		124.3085 ± 14.8809
32	CJ32			I	88.4001 ± 8.8483
33	CJ33	2-Naphthyl[c]			68.1691 ± 9.699

[a]벤즈이미다졸릴우레아 그룹에 대한 치환기 위치; 치환기인 H는 생략함; [b]% of vehicle(VEH)로 표시되는 화합물질(20μM) 처리에 의한 코티솔 분비의 변화; [c]1-(1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-3-(나프탈렌-2-일)우레아(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-3-(naphthalen-2-yl)urea).

[150] 상기 화합물 중에서 코티솔 생성의 억제제로 할로겐화 벤즈이미다졸릴우레아 유도체(CJ21-CJ32)를 선택했다(도 1a). 도 1b를 살펴보면, 이러한 화합물은 대부분 은 H295R 세포에서 코티솔 분비를 억제하는 것을 확인하였다.

[151] 선정된 12개의 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 중 CJ22, CJ25, CJ28의 H259R 세포에서 코티솔 성생 억제 효과를 측정하였다. 도 1c를 살펴보면, 상기 세 가지 화합물 모두 용량 의존적으로 코티솔 분비를 유의하게 감소시켰다(일방향 ANOVA에 의해 CJ22의 경우 $F_{(7,17)}=14.78$, $p<0.01$; CJ25의 경우 $F_{(7,17)}=23.77$, $p<0.01$ 7,16; CJ28의 경우 $F_{(7,17)}=29.46$, $p<0.01$.) CJ22, CJ25, CJ28의 IC_{50} 값은 각각 24.13, 9.95, 4.96 μM이었다. 처리 시 최소 코티솔 분비 수준은 비히클 처리 시 관찰된 것과 비교하여 CJ22의 경우 19.40%, CJ25의 경우 39.98%, CJ28의 경우 33.76%였다. 세 가지 화합물 모두의 억제 효과는 메티라폰과 비슷하였다(IC_{50}=34.98μM 및 최소 수준=45.46%).

[152]

[153] <실시예 3> 부신 스테로이드 생성에 대한 벤즈이미다졸릴우레아 유도체의 효과

[154] 본 발명에 따른 벤즈이미다졸릴우레아 유도체가 H295R 세포에서 코티솔 생산을 위한 스테로이드 생성 경로에 영향을 미치는지에 대해 조사하였다. 다양한 스테로이드 생성 유전자는 콜레스테롤의 코티솔로의 전환을 매개하는 부신 GC 생합성의 스테로이드 생성 경로를 조절한다. 이에, 용매(0.1% DMSO), 메티라폰 또는 상기 화합물로 24시간 처리했을 때, 프레그네놀론, 프로게스텔론 및 17α-하이

드록시프로게스테론을 포함한 코티솔 생합성의 주요 중간 스테로이드의 상대적 수준 변화를 조사하였으며, 그 결과를 도 2a에 나타냈다.

[155] 도 2a를 살펴보면, 콜레스테롤의 첫 번째 단계 대사산물인 프레그네놀론의 합성은 세 가지 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 모두로 처리했을 때 유의하게 감소했지만 메티라폰으로 처리했을 때는 그렇지 않았다. 프로게스테론과 17α-하이드록시프로게스테론 수치도 상기 벤즈이미다졸릴우레아 유도체에 의해 감소하였다. 메티라폰은 CYP11B1(11β-히드록실레이즈)의 활성을 선택적으로 억제하는데, 이는 11-디옥시코티솔에서 코티솔로의 전환를 촉매한다. 따라서 메티라폰으로 처리하면 코티솔 수치만 감소한 반면, 스테로이드 생성 경로를 차단하면 프레그네놀론과 프로게스테론이 축적된다. 이러한 결과는 CJ22, CJ25 및 CJ28 화합물이 메티라폰에 의해 영향을 받는 화합물과 비교하여 부신 스테로이드 생성의 상위 단계에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

[156] 그런 다음 코티솔 생산에 관여하는 스테로이드 생성 유전자의 mRNA 발현 수준을 조사하였으며, 그 결과는 도 2b에 나타냈다.

[157] 도 2b를 살펴보면, 초기 단계를 중재하는 CYP11A1(콜레스테롤 측쇄 절단 모노옥시게나제 인코딩) 및 STAR(스테로이드 생성 급성 조절 단백질 인코딩)과 같은 모든 주요 스테로이드 생성 유전자와 HSD3B2(3β-하이드록시스테로이드 탈수소효소 인코딩) 및 CYP17A1(17α-하이드록실레이즈 인코딩)은 벤즈이미다졸릴우레아 유도체(CJ22, CJ25 및 CJ28)로 처리시 감소된 mRNA 발현을 나타냈다. 각 유도체에 의해 유도된 각 유전자의 mRNA 발현의 배수 변화는 코티솔 및 중간 스테로이드의 변화와 연관되어, 이러한 벤즈이미다졸릴우레아 유도체가 부신피질 세포에서 스테로이드 생성 유전자 발현을 통합 조정하는 전사 네트워크에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

[158] 또한, H295R 세포에서 포스콜린(Forskolin) 유도 코티솔 생산에 대한 CJ28 화합물의 효과를 조사하였으며, 그 결과는 도 3a에 나타냈다. 아데닐릴 고리화효소(adenylyl cyclase)를 활성화하여 세포 내 cyclic AMP (cAMP) 수준을 증가시키는 포스콜린은 부신 스테로이드 생성에 대한 ACTH의 자극 효과를 모방한다. 코티솔 분비는 용매 혹은 포스콜린(1 μM)을 CJ28 화합물과 함께 24시간 동안 배양한 후 조사하였다. 도 3a를 살펴보면, CJ28 화합물은 H295R 세포에서 기저 및 자극된 코티솔 분비를 모두 유의미하게 억제하였고, 30 μM CJ28 화합물 처리하는 경우는 포스콜린 유도 코티솔 생산을 완전히 억제했다(양방향 ANOVA에 의해 CJ28의 경우 $F_{(2,18)}$=1280, $p<0.01$; FSK의 경우 $F_{(1,18)}$=2082, $p<0.01$; 상호작용의 경우 $F_{(2,18)}$=758.1, $p<0.01$). 위에서 언급한 바와 같이 부신 스테로이드 생성을 매개하는 주요 유전자의 기저 mRNA 발현은 CJ28 화합물 처리에 반응하여 감소하였다.

[159] 다음으로, 자극 호르몬(trophic hormone) 유도 부신 스테로이드 생성을 매개하는 스테로이드 생성 유전자를 조사하였으며, 그 결과는 도 3b에 나타냈다.

[160] 도 3b에 나타난 바와 같이 CJ28 화합물(30 μM)은 포스콜린에 의해 유도된 CYP11A1, STAR 및 CYP17A1 mRNA 발현 증가를 유의미하게 약화시켰다

(CY11A1: 양방향 ANOVA에 의해 CJ28의 경우 F(1,8)=68.79, p<0.01, FSK의 경우 $F_{(1,8)}$=146.5, p<0.01, 양방향 ANOVA에 의한 상호작용의 경우 $F_{(1,8)}$=26.55, p<0.01이고; STAR: CJ28의 경우 $F_{(1,8)}$=90.31, p<0.01, FSK의 경우 $F_{(1,8)}$=737.1, p<0.01, 상호작용의 경우 $F_{(1,8)}$=58.48, p<0.01이고; CYP17A1: CJ28의 경우 $F_{(1,8)}$=113.2, p<0.01, FSK의 경우 $F_{(1,8)}$=294.0, p<0.01, 상호작용의 경우 $F_{(1,8)}$=39.04, p<0.01). 특히 동일한 조건에서 포스콜린에 의한 HSD3B2 mRNA 발현 유도는 CJ28 화합물 존재 하에서 완전히 차단되었다(양방향 ANOVA에 의해 CJ28의 경우 $F_{(1,8)}$=2121, p<0.01, FSK의 경우 $F_{(1,8)}$=1965, p<0.01, 상호작용의 경우 $F_{(1,8)}$=1776, p<0.01). 결론적으로, CJ28 화합물은 스테로이드 생성 유전자 발현의 전사 활성화를 억제함으로써 ACTH 자극에 의한 코티솔 생산을 억제하였다.

[161]

[162] <실시예 4> 전사체 수준 RNA 발현 프로파일에 대한 CJ28의 효과

[163] CJ28 화합물의 영향을 매개하는 분자생물학적 기전을 조사하기 위해 RNA-Seq를 사용하여 용매(0.1% DMSO) 또는 CJ28(30 μM)로 24시간 동안 처리한 H295R 세포의 전사체 수준 RNA 발현 프로필을 비교하였으며, 그 결과는 도 4에 나타냈다.

[164] 유의한 수준으로 발현된 14,167개의 유전자 중에서, 기준 >2-FC 및 P<0.05를 사용하여 두 그룹 사이에서 1,278개의 차등적으로 발현된 전사체(609개의 상향 조절된 DEG 및 669개의 하향 조절된 DEG)를 확인했다(도 4a). 도 4b에 나타난 바와 같이 배수 차이(fold differences) (5개 상향 조절 및 5개 하향 조절) 측면에서 상위 10개 DEG를 확인하였다. 처음에 인간 부신피질 세포의 스테로이드 생합성 경로를 구성하는 주요 유전자들을 대상으로 CJ28 화합물에 의해 발현이 변조되는 양상을 조사하였다. 특히 도 4c를 살펴보면, 다수의 스테로이드 생성 유전자들의 발현 양상이 CJ28 화합물 처리에 의해 유의하게 영향을 받았다. 저밀도 지단백질 수용체(LDLR), 스테로이드 생성 급성 조절 단백질(STAR) 및 스테로이드 설파타제(STS)와 같은 콜레스테롤 흡수 및 미토콘드리아로의 수송을 조절하는 유전자들의 발현이 통계적으로 유의하게 억제되었다. 또한, 3β-하이드록시 스테로이드 탈수소효소(HSD3B2), 콜렛테롤 측쇄 절단 효소(CYP11A1), 스테로이드 17-α-하이드록실레이즈(CYP17A1) 및 ACTH 수용체(MC2R)와 같은 주요 스테로이드 생성 매개인자를 인코딩하는 유전자들의 발현도 현저하게 감소하였다. 부신피질 스테로이드 생합성에 관여하는 유전자의 광범위한 발현 억제는 CJ28 화합물이 부신피질 세포에서 기저 및 호르몬 유도 스테로이드 생성에 필요한 상위 전사 조절인자를 표적으로 한다는 점을 보여준다.

[165] 스테로이드 생합성 경로 뿐만 아니라 CJ28 화합물에 의해 유발되는 분자세포 생물학적인 변화에 대한 보다 체계적인 정보를 획득하기 위하여, DEG를 대상으로 한 생물정보학적 분자경로 분석을 수행하였으며 그 결과를 도 5에 요약하였다. 도 5a에서 도시된 바와 같이, ENRICHR를 사용하여 생물학적 분자경로에

대한 여러 데이터베이스와 DEG를 비교하면 스테로이드/코티솔 생합성 및 분비(KEGG Pathway)와 콜레스테롤 생합성 및 대사(Wiki Pathway 및 GO)에 관련된 유전자가 크게 영향을 받았음을 알 수 있다. 또한, 도 5b에서 도시된 바와 같이, IPA의 "상위 전사 조절자"분석은 CJ28 화합물의 처리에 의해 조절된 것으로 추정되는 일련의 상위 전사 인자를 예측했다. 특히, 핵 수용체 서브 패밀리 5 그룹 A 멤버 1(nuclear receptor subfamily 5 group A member 1, NR5A1) 및 스테롤-반응성 요소 결합인자 1/2(sterol-responsive element-binding factors 1/2, SREBF1/2)의 전사활성(transactivation)이 유의하게 억제되는 것으로 예측되었다. 스테로이드 생성인자-1(SF-1)으로 알려진 NR5A1은 핵 수용체 슈퍼패밀리에 속하는 전사인자로서 다수의 스테로이드 생성 유전자를 통합적으로 조절하는 것으로 알려져 있는데, 부신피질과 같은 스테로이드 생성 조직의 발달 및 정상적 기능을 위해 반드시 필요한 전사인자이다. SREBF1 및 2(스테롤 반응성 요소 결합 단백질이라고 함)는 지질 대사를 매개하는 광범위한 유전자들의 발현을 통합적으로 조절하는 전사 조절인자이다. 이들 전사인자들의 활성이 억제되는 것으로 예측된 결과와 일맥상통하게, NR5A1 및 SREBF1의 mRNA 수준은 CJ28 화합물 처리에 따라 유의하게 감소하였다(도 5b). 도 5c를 살펴보면, 위에서 언급한 주요 생물학적 분자경로에 관여하는 DEG의 2/3 이상이 이러한 전사 인자의 표적 유전자로 동정된 것이었다; 스테로이드/코르티솔 생합성 및 분비와 관련된 DEG 21개 중 14개, 콜레스테롤 합성 및 대사와 관련된 DEG 27개 중 21개가 NR5A1 또는 SREBF의 전사 표적으로 이미 보고된 것들이다. 도 5d를 살펴보면, 스테로이드 생성을 억제하는 전사인자로 잘 알려진 DAX-1을 인코딩하는 NR0B를 제외한 대부분의 표적 유전자는 CJ28 화합물 처리에 반응하여 유의하게 감소된 mRNA 발현을 나타내었다. 종합해보면, 전사체 분석을 통해 CJ28 화합물의 처리는 인간 부신피질 세포에서 관련 분자경로를 조절하는 전사 조절 네트워크에 영향을 미침으로써 코티솔을 비롯한 부신피질 스테로이드와 콜레스테롤 생합성을 동시에 억제할 수 있음을 확인할 수 있다.

[166]

[167] <실시예 5> CJ28에 의한 콜레스테롤 및 코티솔 생합성의 동시 억제

[168] 전사체 분석을 통해 CJ28 화합물이 전사 네트워크를 변경함으로써 코티솔과 콜레스테롤 생합성 경로를 모두 억제한다는 것을 알 수 있다. 따라서, 벤즈이미다졸릴우레아 유도체가 세포 내 콜레스테롤 수치를 조절하는 핵심 유전자의 발현 프로파일을 변경할 수 있는지 여부를 조사하였으며, 그 결과는 도 6에 나타냈다.

[169] 아세테이트로부터 시작되는 콜레스테롤의 생합성은 여러 효소의 순차적인 작용에 의해 부신피질을 포함한 스테로이드 생성 세포의 소포체에서 이루어지는데, 콜레스테롤이 스테로이드의 전구체라는 측면에서 세포 내 콜레스테롤 농도는 스테로이드 합성 효율과 직결된다. 도 6a에서 볼 수 있듯이 HMGCS, MVK, FDPS, FDFT1, SQLE, LSS 및 DHCR7과 같은 주요 콜레스테롤 생합성 유전자의

mRNA 수준은 24시간 동안 30 μM의 CJ28 화합물을 처리하였을 때, 유의하게 감소하였다. 또한 CJ25 화합물 처리는 HMGCS1, MKV, FDPS 및 LSS의 mRNA 발현을 유의하게 감소시켰으나 CJ22 화합물은 이들의 유전자의 발현에 거의 영향을 미치지 않았다. 반면, 모든 벤즈이미다졸릴우레아 유도체는 ABCA1 mRNA 발현을 강하게 감소시켰는데, 이는 콜레스테롤의 세포 내 이동을 매개하는 핵심 인자인 ATP 결합 카세트 서브패밀리 A 멤버 1(ATP-binding cassette subfamily A member 1)을 코딩한다. 이러한 결과를 통해 벤즈이미다졸릴우레아 유도체의 일반적인 구조가 콜레스테롤 항상성의 여러 단계에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있다.

[170] 이러한 가설을 증명하기 위해 CJ28 화합물이 H295R 세포의 세포 내 콜레스테롤 수치에 영향을 미치는지 조사하였으며, 그 결과는 도 6b에 나타냈다.

[171] 도 6b를 살펴보면, 유전자 발현 프로필과 일치하게 CJ28 화합물은 부신피질 세포의 총 콜레스테롤 함량을 유의하게 감소시켰는데, 48시간까지 처리한 경우 대조군 대비 약 절반 수준으로 감소시켰다. CJ28 화합물 효과의 느린 시작(slow-onset)은 콜레스테롤 생합성 억제제 U1666A 및 AY9944가 발휘하는 효과와는 양상이 다른데, 특정 효소를 억제하는 이들 억제제들은 24시간 처리 후 세포 내 콜레스테롤 함량을 더 빠르게 낮추었고, 그 후 감소는 48시간 동안 지속되었다. 이들과 달리 스테로이드 합성 효소 저해제인 메티라폰은 세포 내 콜레스테롤 수치에 거의 영향을 미치지 않았다.

[172] 도 6c를 살펴보면, 코티솔 생산은 이러한 모든 억제제에 의해 현저하게 악화되었다. 특히 CJ28은 48시간 처리 후 지속적이고 강력한 억제를 유도했다.

[173] 다음으로 콜레스테롤 생합성 억제가 주요 스테로이드 생성 유전자의 mRNA 수준에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 테스트하여 콜레스테롤 합성 및 스테로이드 생성의 전사 네트워크에 대한 CJ28 화합물의 영향을 확인하였으며, 그 결과는 도 6d에 나타냈다.

[174] 도 6d를 살펴보면, 이전 결과와 일치하게 CJ28 화합물은 CYP11A1, STAR, HSD3B2 및 CYP17A1을 포함한 주요 스테로이드 생성 유전자의 mRNA 발현을 유의하게 감소시켰으나, 이러한 효과는 U18666A 및 AY9944의 처리에 의해서는 나타나지 않았다. 또한 메티라폰 역시 스테로이드 생성 유전자 발현에 대한 억제 효과가 없었다. 종합해보면, 이러한 결과는 CJ28 화합물이 콜레스테롤 및 코티솔 생합성에 관여하는 핵심 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 상위 전사인자 수준에서 통합적으로 조절함으로써 코티솔 수치를 낮추는 것을 알 수 있다. 콜레스테롤이 스테로이드 호르몬의 일반적인 전구체라는 점을 고려할 때, CJ28 화합물의 독특한 작용 방식은 코티솔 과잉으로 인한 다양한 병적 상태의 예방, 개선 및 치료를 위한 효과적이고 장기적인 코티솔 생산 억제 전략인 동시에, 기존 스테로이드 합성 억제제에 의해 유발되는 대표적인 부작용인 고콜레스테롤혈증에 대해서도 유의한 예방 전략이 될 수 있음을 보여준다.

[175]

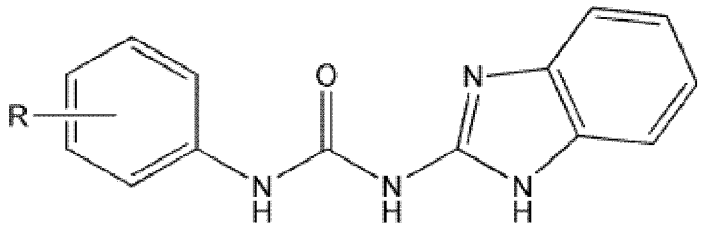
[176] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[177] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체:

[화학식 1]



화학식 1에서,

상기 R은 수소, 할로겐, (C1~C4)알킬, 테트라플루오로메틸(CF_3), (C1~C4)알콕시, 아미노(NH_2), 이산화질소(NO_2), 시아노(CN), 시아노메틸(CH_2CN), 페닐, 벤질 또는 나프틸임.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 R은 메타(meta-) 위치에 치환된 것을 특징으로 하는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체.

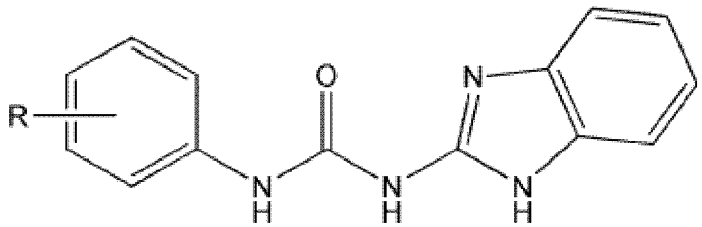
[청구항 3] 제 1 항에 있어서,

상기 화학식 1에서,

R은 불소, 염소, 브롬 및 요오드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 할로겐인 것을 특징으로 하는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체.

[청구항 4] 하기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 고코티솔혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



화학식 1에서,

상기 R은 수소, 할로겐, (C1~C4)알킬, 테트라플루오로메틸(CF_3), (C1~C4)알콕시, 아미노(NH_2), 이산화질소(NO_2), 시아노(CN), 시아노메틸(CH_2CN), 페닐, 벤질 또는 나프틸임.

[청구항 5] 제 4 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 R은 메타(meta-) 위치에 치환된 것을 특징으로 하는 고코티솔혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 6] 제 4 항에 있어서,

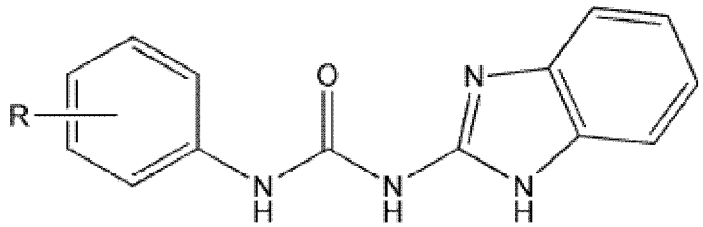
상기 화학식 1에서,
R은 불소, 염소, 브롬 및 요오드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 할로겐인 것을 특징으로 하는 고코티솔혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 7] 제 4 항에 있어서,
상기 조성물은 부신피질 스테로이드 생성 및 콜레스테롤 생합성을 억제하는 것을 특징으로 하는 고코티솔혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 8] 제 4 항에 있어서,
상기 고코티솔혈증은 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 쿠싱병(Cushing's disease) 및 이소성 부신피질 자극호르몬 증후군(ectopic adrenocorticotropic hormone syndrome)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 고코티솔혈증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 9] 하기 화학식 1로 표시되는 벤즈이미다졸릴우레아 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 고코티솔혈증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물:

[화학식 1]

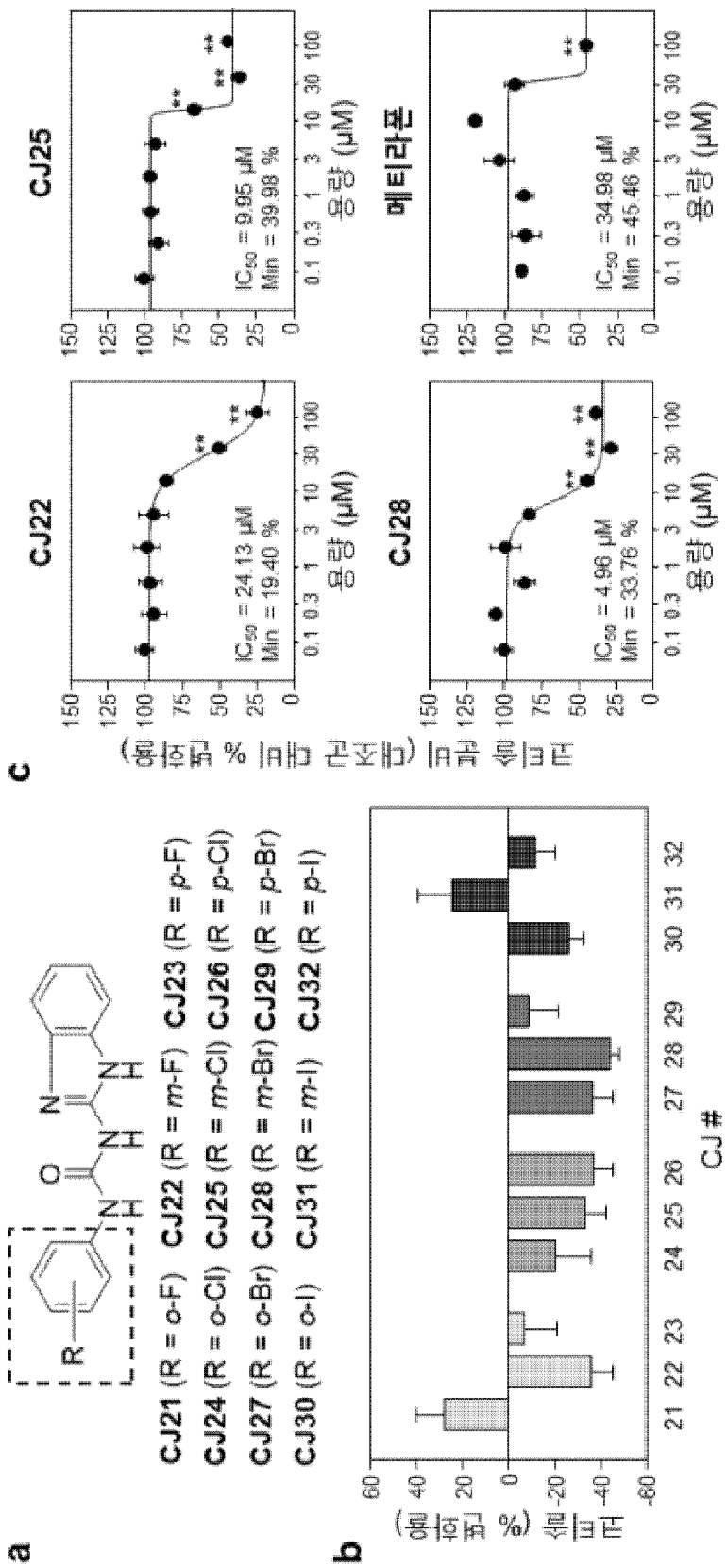


화학식 1에서,
상기 R은 수소, 할로겐, (C1~C4)알킬, 테트라플루오로메틸(CF_3), (C1~C4)알콕시, 아미노(NH_2), 이산화질소(NO_2), 시아노(CN), 시아노메틸(CH_2CN), 페닐, 벤질 또는 나프틸임.

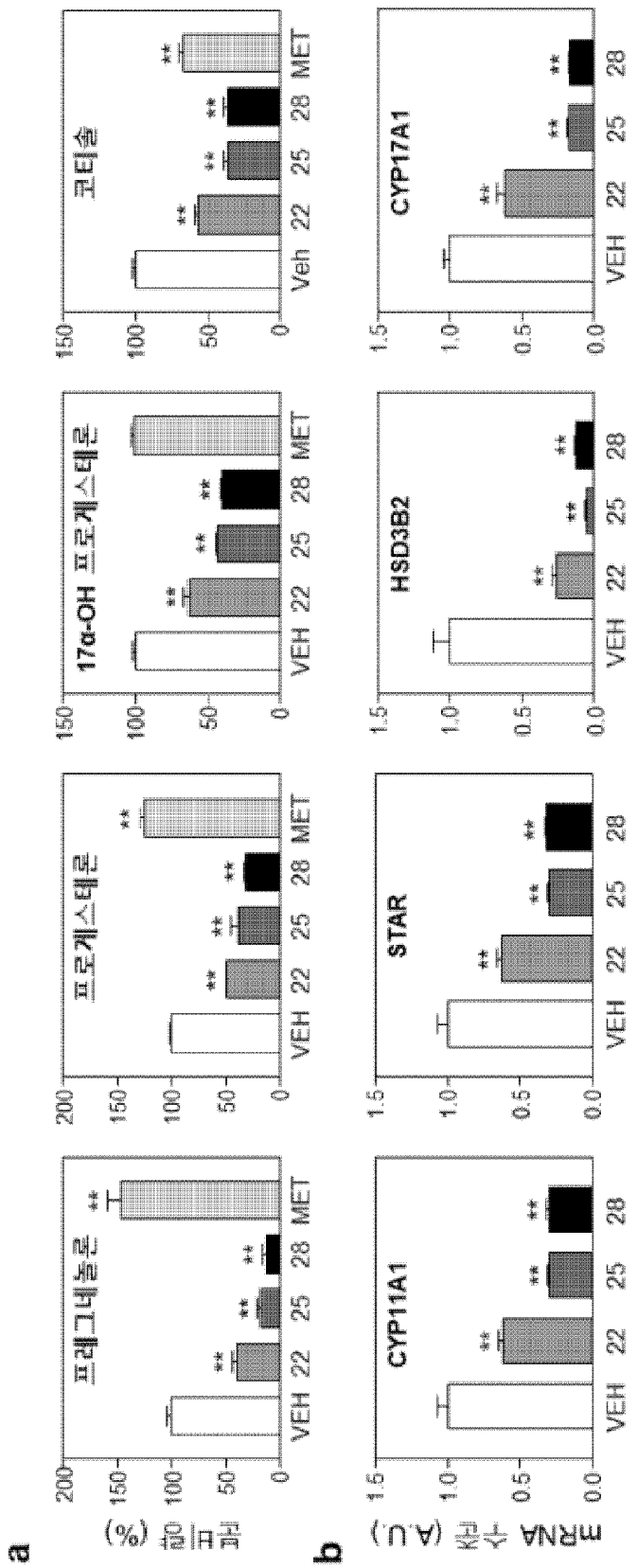
[청구항 10] 제 9 항에 있어서,
상기 조성물은 부신피질 스테로이드 생성 및 콜레스테롤 생합성을 억제하는 것을 특징으로 하는 고코티솔혈증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[청구항 11] 제 9 항에 있어서,
상기 건강기능 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료인 것을 특징으로 하는 고코티솔혈증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

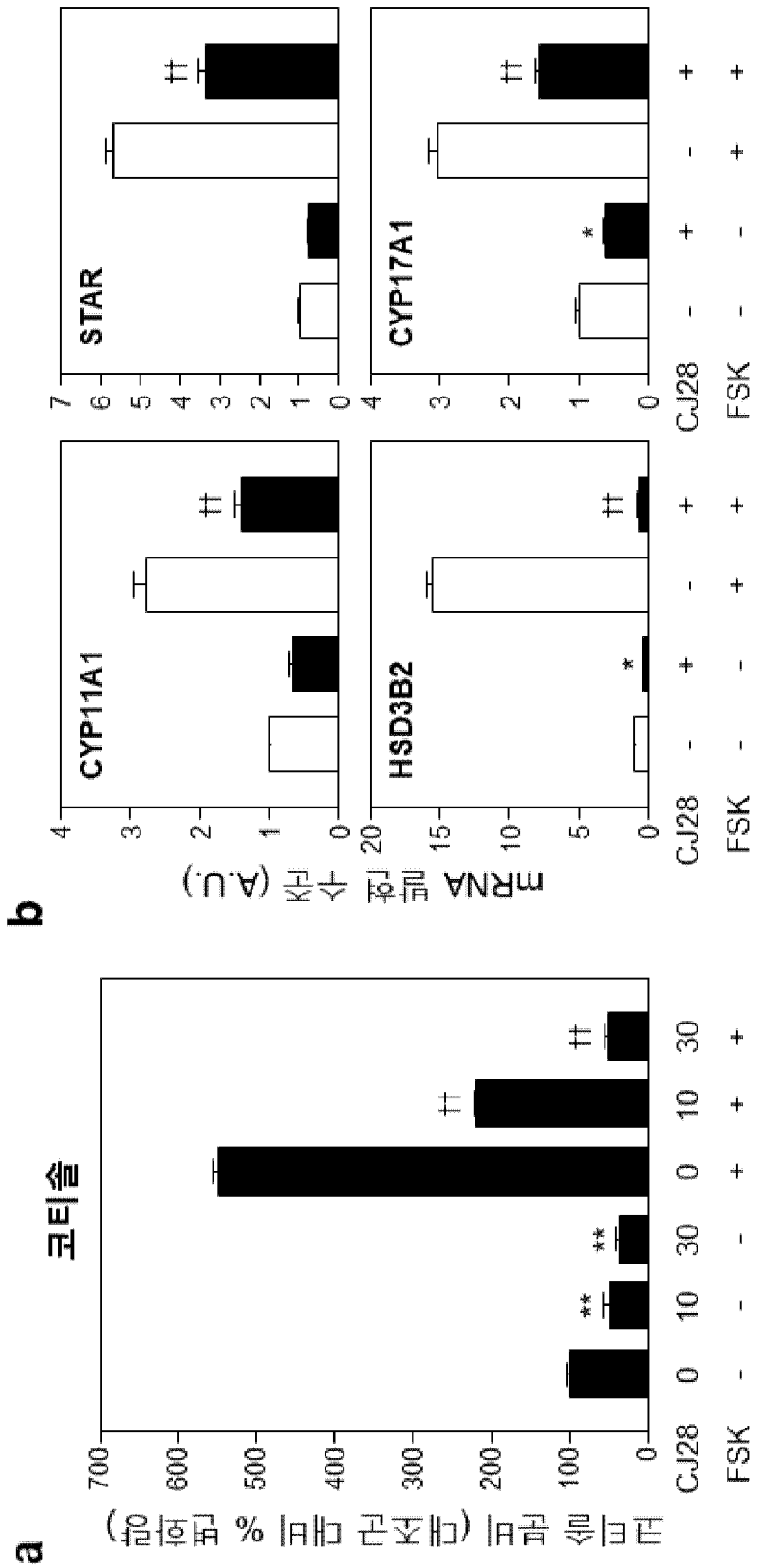
[도1]


a
CJ21 (R = o-F) CJ22 (R = m-F) CJ23 (R = p-F)
CJ24 (R = o-Cl) CJ25 (R = m-Cl) CJ26 (R = p-Cl)
CJ27 (R = o-Br) CJ28 (R = m-Br) CJ29 (R = p-Br)
CJ30 (R = o-I) CJ31 (R = m-I) CJ32 (R = p-I)
b
세포 독성 (% 억제율)
CJ #
c
CJ25
CJ22
CJ28
메티라폰
세포 독성 (대조군 대비 % 억제율)
IC50 = 9.95 μM
Min = 39.98 %
IC50 = 24.13 μM
Min = 19.40 %
IC50 = 4.96 μM
Min = 33.76 %
IC50 = 34.98 μM
Min = 45.46 %
용량 (μM)

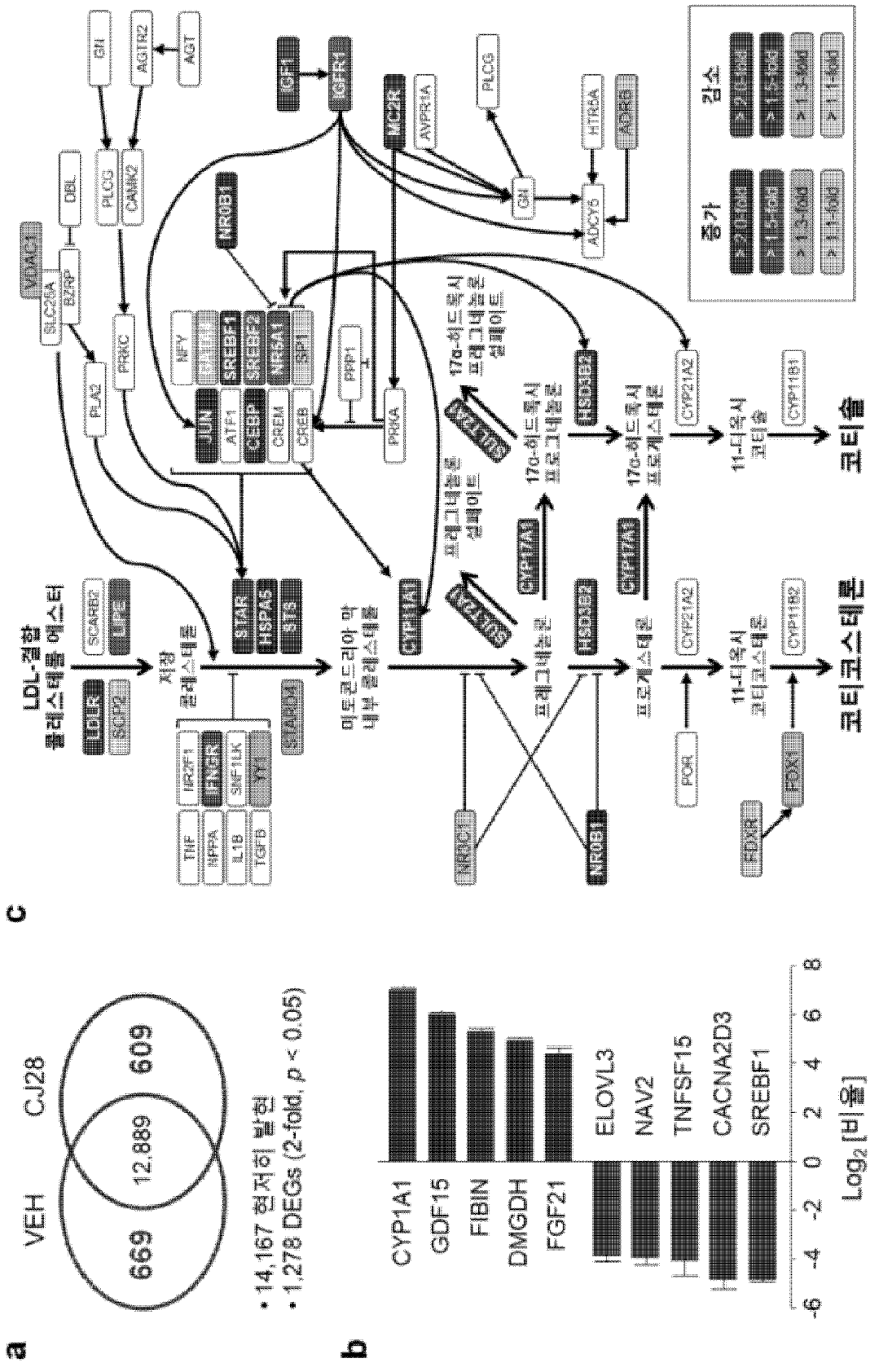
[도2]


a
b
상대비율 (%)
mRNA 수준 (A.U.)
프레그네놀론
프로게스테론
17α-OH 프로게스테론
코티솔
CYP11A1
STAR
HSD3B2
CYP17A1
VEH
Veh
22
25
28
MET

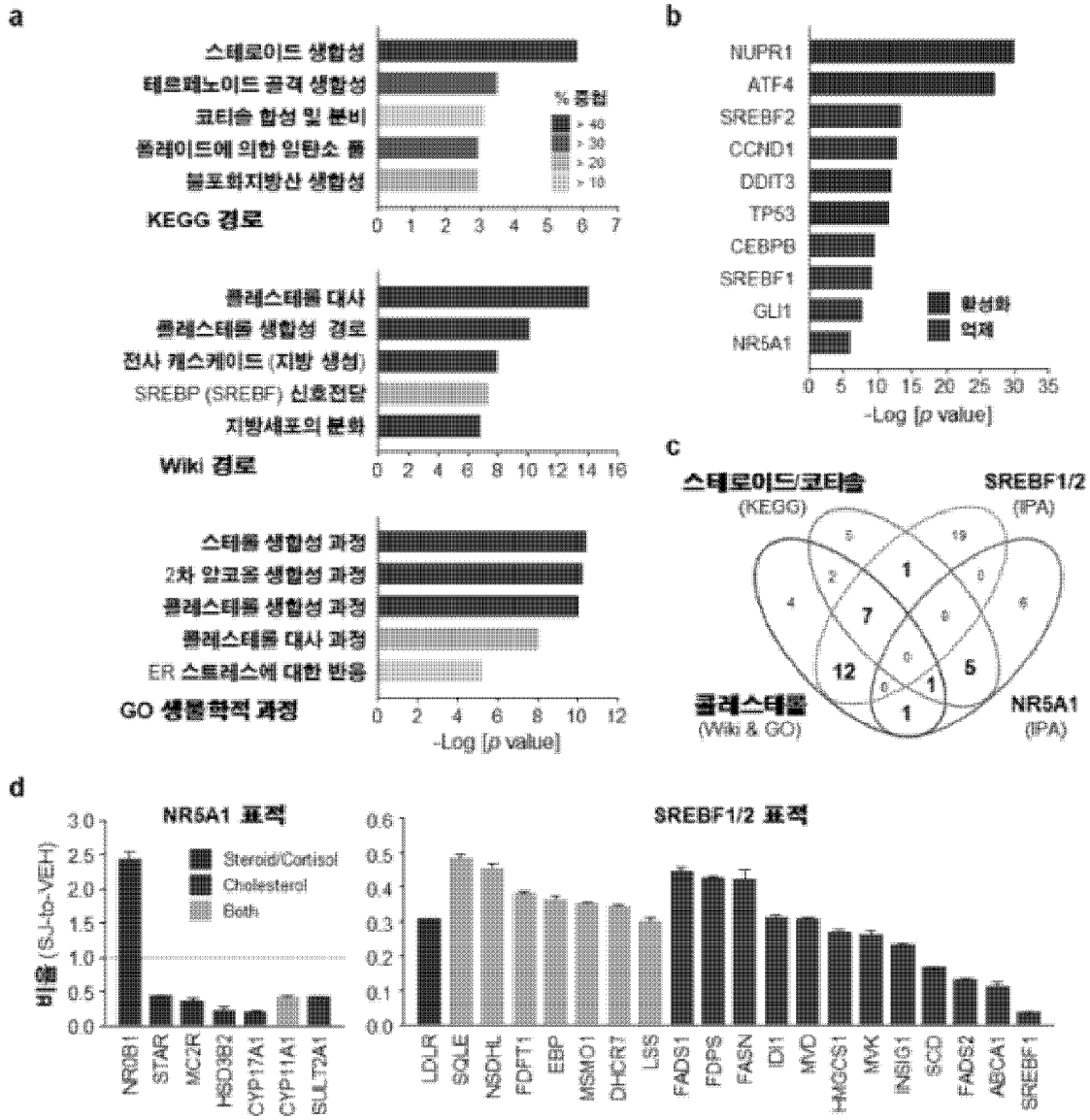
[도3]


a
코티솔
코티솔 분비 (대조군 대비 % 변화량)
CJ28
FSK
b
mRNA 발현 수준 (A.U.)
CYP11A1
HSD3B2
STAR
CYP17A1

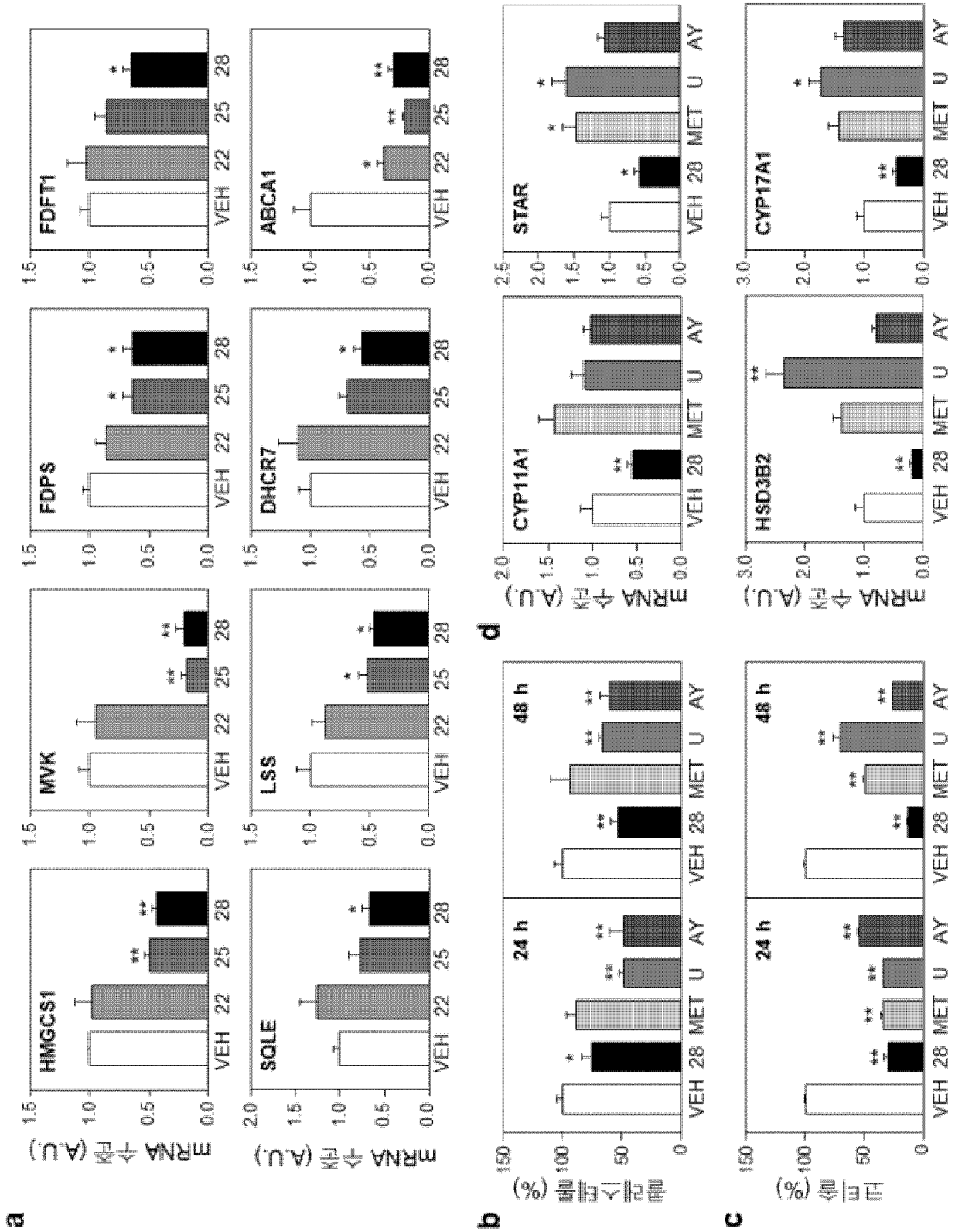
[도4]


a
VEH
CJ28
669
12,889
609
• 14,167 현저히 발현
• 1,278 DEGs (2-fold, p < 0.05)
b
CYP1A1
GDF15
FIBIN
DMGDH
FGF21
ELOVL3
NAV2
TNFSF15
CACNA2D3
SREBF1
-6
-4
-2
0
2
4
6
8
Log2 [비율]
c
LDL-결합 콜레스테롤 에스터
저장 콜레스테롤
내부 콜레스테롤
프레그네놀론
17α-히드록시 프레그네놀론
17α-히드록시 프로게스테론
11-디옥시 코티솔
코티솔
11-디옥시 코티코스테론
코티코스테론
증가
감소

[도5]


a
스테로이드 생합성
테르페노이드 골격 생합성
코티솔 합성 및 분비
폴레이드에 의한 임탄소 풀
불포화지방산 생합성
KEGG 경로
% 중첩
> 40
> 30
> 20
> 10
0 1 2 3 4 5 6 7
플레스테롤 대사
플레스테롤 생합성 경로
전사 캐스케이드 (지방 생성)
SREBP (SREBF) 신호전달
지방세포의 분화
Wiki 경로
0 2 4 6 8 10 12 14 16
스테롤 생합성 과정
2차 알코올 생합성 과정
플레스테롤 생합성 과정
플레스테롤 대사 과정
ER 스트레스에 대한 반응
GO 생물학적 과정
0 2 4 6 8 10 12
-Log [p value]
b
NUPR1
ATF4
SREBF2
CCND1
DDIT3
TP53
CEBPB
SREBF1
GLI1
NR5A1
활성화
억제
0 5 10 15 20 25 30 35
-Log [p value]
c
스테로이드/코티솔
(KEGG)
SREBF1/2
(IPA)
콜레스테롤
(Wiki & GO)
NR5A1
(IPA)
5
19
2
1
0
4
7
8
6
0
12
6
1
5
1
d
NR5A1 표적
Steroid/Cortisol
Cholesterol
Both
비율 (SJ-tb-VEH)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NR0B1
STAR
MC2R
HSD3B2
CYP17A1
CYP11A1
SULT2A1
SREBF1/2 표적
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
LDLR
SQLE
NSDHL
FDFT1
EBP
MSMO1
DHCR7
LSS
FADS1
FDPS
FASN
IDI1
MVD
HMGCS1
MVK
INSIG1
SCD
FADS2
ABCA1
SREBF1

[도6]


a
HMGCS1
MVK
FDPS
FDFT1
SQLE
LSS
DHCR7
ABCA1
mRNA 수준 (A.U.)
VEH 22 25 28
b
24 h
48 h
세포 생존율 (%)
VEH 28 MET U AY
c
24 h
48 h
독성 (%)
VEH 28 MET U AY
d
CYP11A1
STAR
HSD3B2
CYP17A1
mRNA 수준 (A.U.)
VEH 28 MET U AY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/017975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 235/30(2006.01)i; **A61K 31/4184**(2006.01)i; **A61P 5/38**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 235/30(2006.01); A61K 31/4184(2006.01); A61K 31/423(2006.01); A61K 31/425(2006.01); C07D 235/18(2006.01); C07D 277/82(2006.01); C07D 403/12(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (registry, caplus) & keywords: 벤즈이미다졸릴우레아(benzimidazolylurea), 고코티솔혈증(hypercortisolism), 쿠싱증후군(Cushing's syndrome), 부신피질스테로이드(corticosteroid)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4088768 A (PAGET, C. J. et al.) 09 May 1978 (1978-05-09) See abstract; columns 5-6; and table 1.	1-3
A		4-11
X	WO 2022-219123 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et al.) 20 October 2022 (2022-10-20) See pages 2 and 30.	1-3
X	KR 10-2021-0100604 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE et al.) 17 August 2021 (2021-08-17) See claims 1, 5 and 16; and paragraphs [0002], [0303] and [0305].	1-3
A	WO 2021-242790 A1 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 02 December 2021 (2021-12-02) See entire document.	1-11

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 March 2024	**07 March 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KIM, S. H. et al. Identification of a novel class of cortisol biosynthesis inhibitors and its implications in a therapeutic strategy for hypercortisolism. Life sciences. 2023, [electronic publication] 29 April 2023, vol. 325, article no. 121744, pp. 1-10. See abstract; page 9, right column; and figure 1.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/017975

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	4088768	A	09 May 1978	None			
WO	2022-219123	A1	20 October 2022	AU	2023-259559	A1	30 November 2023
				CA	3216385	A1	20 October 2022
				EP	4322944	A1	21 February 2024
KR	10-2021-0100604	A	17 August 2021	AU	2021-363148	A1	20 May 2021
				CA	3115888	A1	23 April 2020
				CN	113271941	A	17 August 2021
				EP	3866791	A2	25 August 2021
				JP	2022-505439	A	14 January 2022
				US	2021-0380547	A1	09 December 2021
				WO	2020-079184	A2	23 April 2020
				WO	2020-079184	A3	22 May 2020
WO	2021-242790	A1	02 December 2021	US	2023-0192626	A1	22 June 2023

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/017975

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 235/30(2006.01)i; **A61K 31/4184**(2006.01)i; **A61P 5/38**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 235/30(2006.01); A61K 31/4184(2006.01); A61K 31/423(2006.01); A61K 31/425(2006.01); C07D 235/18(2006.01); C07D 277/82(2006.01); C07D 403/12(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(registry, caplus) & 키워드: 벤즈이미다졸릴우레아(benzimidazolylurea), 고코티솔혈증(hypercortisolism), 쿠싱증후군(Cushing's syndrome), 부신피질스테로이드(corticosteroid)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 4088768 A (PAGET, C. J. 등) 1978.05.09 요약; 컬럼 5-6; 표 1	1-3
A		4-11
X	WO 2022-219123 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 등) 2022.10.20 페이지 2, 30	1-3
X	KR 10-2021-0100604 A (상뜨로 나쇼날 드 라 러쉐르쉐 샹띠피크 등) 2021.08.17 청구항 1, 5, 16; 단락 [0002], [0303], [0305]	1-3
A	WO 2021-242790 A1 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 2021.12.02 전문	1-11
PX	KIM, S. H. 등, "Identification of a novel class of cortisol biosynthesis inhibitors and its implications in a therapeutic strategy for hypercortisolism", Life sciences, 2023, [전자공개] 2023.04.29, 325권, 아티클 번호 121744, 페이지 1-10 초록; 페이지 9, 오른쪽 컬럼; 도면 1	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년03월06일(06.03.2024)	**2024년03월07일(07.03.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/017975

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 4088768 A	1978/05/09	없음	
WO 2022-219123 A1	2022/10/20	AU 2023-259559 A1	2023/11/30
		CA 3216385 A1	2022/10/20
		EP 4322944 A1	2024/02/21
KR 10-2021-0100604 A	2021/08/17	AU 2021-363148 A1	2021/05/20
		CA 3115888 A1	2020/04/23
		CN 113271941 A	2021/08/17
		EP 3866791 A2	2021/08/25
		JP 2022-505439 A	2022/01/14
		US 2021-0380547 A1	2021/12/09
		WO 2020-079184 A2	2020/04/23
		WO 2020-079184 A3	2020/05/22
WO 2021-242790 A1	2021/12/02	US 2023-0192626 A1	2023/06/22