(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0033104
(43) 공개일자 2017년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 49/76 (2006.01) *A61K 31/12* (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01) *C07C 49/786* (2006.01)
C07C 49/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 49/76 (2013.01)
A61K 31/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0131005
(22) 출원일자 2015년09월16일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333,
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
서영거
서울특별시 서초구 서운로6길 15-13, 102동 702호 (서초동, 롯데캐슬주피터)
이지연
서울특별시 마포구 새창로8길 72, 205동 1304호 (도화동, 현대홈타운)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

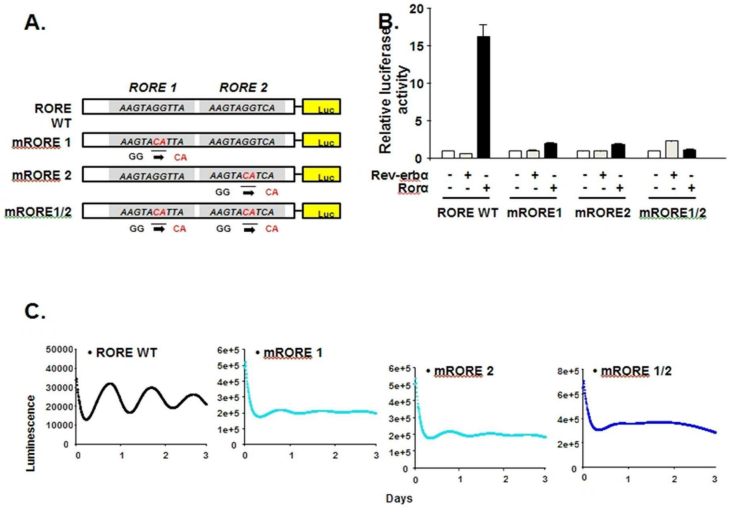
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **생체 시계 조절용 화합물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 생체시계를 구성하는 핵심 유전자인 Rev-erbα에 의존하여 활성을 보이는 신규 화합물에 관한 것으로, 본 발명의 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 생체리듬 조절용 약학조성물을 제조할 수 있으며, Rev-erbα 유전자의 하위 단계에서 조절되는 유전자인 Pai-1 또는 Citrate synthase 활성을 저해하는 약학 조성물을 사용하여 일주기 생체리듬의 조절, 동맥경화증, 면역질환, 심혈관 질환을 포함하는 대사성 질환을 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



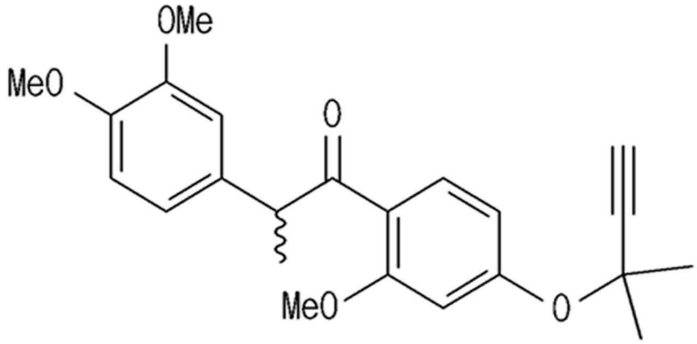
(52) CPC특허분류
A61K 31/122 (2013.01)
C07C 49/786 (2013.01)
C07C 49/86 (2013.01)
(72) 발명자
김경진
서울특별시 마포구 마포대로 109, A102동-1402호 (공덕동, 롯데캐슬프레지던트)
손기훈
서울특별시 용산구 한강대로 115, 1003호 (한강로2가)
정수영
서울특별시 성북구 장월로1길 28, 113동 903호 (상월곡동, 동아에코빌아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

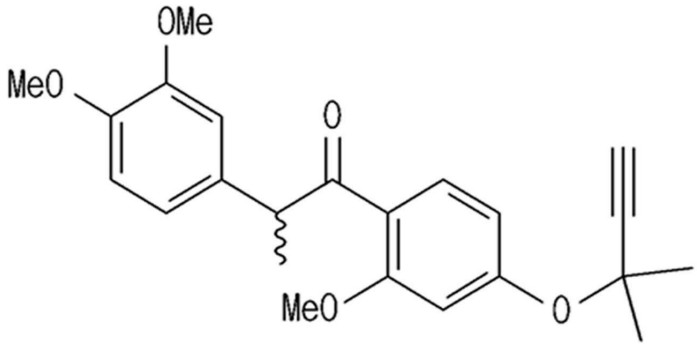
하기 화학식 1로 표시되는 화합물:



[화학식 1].

청구항 2

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 생체리듬 조절용 약학 조성물:



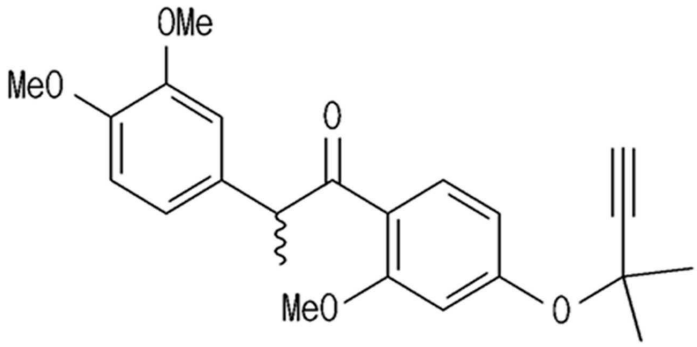
[화학식 1].

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 생체리듬 조절은 Rev-erbα 유전자의 활성화 또는 Bmal1 유전자의 억제에 의한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 치료용 약학 조성물:



[화학식 1].

청구항 5

제 4항에 있어서, 대사성 질환 치료는 Rev-erbα 유전자의 활성화 또는 Bmal1 유전자의 억제에 의한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 대사성 질환은 면역질환 및 동맥 경화증을 포함하는 심혈관계 질환으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 면역질환 및 동맥경화증을 포함하는 심혈관계 질환 치료는 Pai-1 또는 Citrate synthase 유전자 발현 조절에 의한 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체 시계 구성 유전자의 활성을 조절하는 신규 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 생체리듬 조절용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 포유동물을 비롯한 대부분의 생명체는 낮과 밤의 변화에 적응하면서 약 24시간의 주기성을 획득하게 되고 이를 “생체리듬”이라 한다. 빛 혹은 섭식과 같은 외부 자극에 의한 신호는 망막시상하부 경로 (retino-hypothalamic tract, RHT)를 통하여 시신경 교차상핵 (suprachiasmatic nucleus, SCN)으로 전달되고, 분자수준에서 생체 시계 구성 유전자들의 동기화를 야기하며 전사/해독 되먹임 고리를 작동케 한다. 이러한 중추시계 이외에도 말초 조직의 SCN 비의존적인 생체 시계와 더불어 생명체는 안정적인 체내리듬을 유지하게 된다 [Dibner et al., 2010, Annu Rev Physiol. 72:517].

[0003] 내재적 분자생체시계는 일련의 유전자로 구성된 음성피드백에 의해 작동된다. 최상위 단계 전사인자인 CLOCK과 BMAL1이 이합체를 형성하여 프로모터 내 E-box (CACGTG)에 결합함으로써 *Per* 와 *Cry*의 전사를 촉진하고, 단백질로 합성된 PERs와 CRYs는 다시금 CLOCK과 BMAL1 이합체의 전사 활성 기능을 억제하면서 음성 되먹임 고리를 완성한다. 핵 수용체 계열로 분류되는 Rorα와 Rev-erbα는 프로모터 내 RORE (AAGTAGGTNA) 영역에 경쟁적으로 작용하여 Bmal1의 전사 활성을 촉진 혹은 억제하면서 생체시계 리듬 형성을 돕고 있다. 즉 시간조절계에서 최초 개시자가 빛과 같은 외부 정보라면, SCN을 포함한 대부분의 조직 내 발현하고 있는 BMAL1과 CLOCK은 개체 내 생체시계를 동조화시키는 조절자인 셈이다 [Partch et al., 2014, Trends Cell Biol. 24:90.] .

[0004] 이들 분자 네트워크는 하위 단계 유전자들의 일주기성을 촉발함으로써 체내 다양한 생리과정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 [Stratmann and Schibler, 2006, J Biol Rhythms. 21:494]. 실제로 CLOCK::BMAL1 이형복합체가 결합하는 E-box와 Ror α 및 Rev-erbα가 인식하는 RORE는 생체시계 분자기구 자체의 일주기성 형성에 필수적일 뿐만 아니라 신진대사 관련 유전자를 포함하는 생체시계조절 유전자 (clock-controlled gene, CCG)의 일주기적 발현을 관장함으로써 생체시계 출력 경로의 주요 기작으로 기능하고 있기 때문에 위 두 영역을 경유하는 신호 전달 체계는 연구의 중요한 표적이 되고 있다.

[0005] 생체시계 유전자 중 Rev-erbα 는 고아 핵 수용체로 분류되는데 2000년대 초반, 리간드의 존재가 규명됨에 따라 활성 조절 화합물의 발굴 연구가 현재까지 활발하게 진행되고 있다 [Yin et al., 2007, Science. 318:1786.]. Rev-erbα 돌연변이 생쥐의 간에서 약 90%의 유전자가 비정상적으로 발현하고 있음이 조사되었고, 합성 화합물을 사용한Rev-erbα의 활성화는 여러 가지 생리적 변화를 야기함이 보고되었다 [Cho et al., 2012, Nature. 485:123.]. 즉, Rev-erbα와 각종 질병들 사이의 연관관계가 실험적 증거를 바탕으로 주목 받고 있다. 최근에 이르러 도파민을 전사수준에서 억제하는 Rev-erbα의 추가적인 역할이 밝혀짐에 따라 비정상적인 도파민 수준으로 인해 야기되는 여러 질환들을 Rev-erbα 활성 조절을 통해 치료하고자 하는 가능성에 대해서도 제기되고 있다 [Chung et al., 2014, Cell. 157:858.].

[0006] 분자 생체시계의 활성 조절을 통해 생체리듬 뿐만 아니라 이와 관련된 질환 치료까지 해결하고자 하는 목적 하에 Rev-erbα 활성 조절 화합물의 발굴 연구가 활발 하게 진행 중이다. 대표적으로 현재까지 총 3종이 보고된 바 있지만 표적 유전자의 활성 조절 메커니즘에 대한 연구가 미약하고 화합물간 구조의 유사성이 크다 [Grant et al., 2010, ACS Chem Biol. 5:925.]. 본 발명에서는 RORE 영역에 의해 매개되는 전사 활성을 기반으로 한 CBA (세포-기반 시험, Cell-based assay) 시스템 하에서 질환-집중형 플랫폼 화합물 라이브러리 (Disease-focused platform chemical library)를 적용시켜 RORE를 경유하는 Rev-erbα 활성 조절 화합물을 발굴하고, 화학적 구조에 기반하여 기존 보고된 화합물과는 구별되는 활성 조절 메커니즘에 대한 가능성을 제시하며 본 발명을 완성하였다.

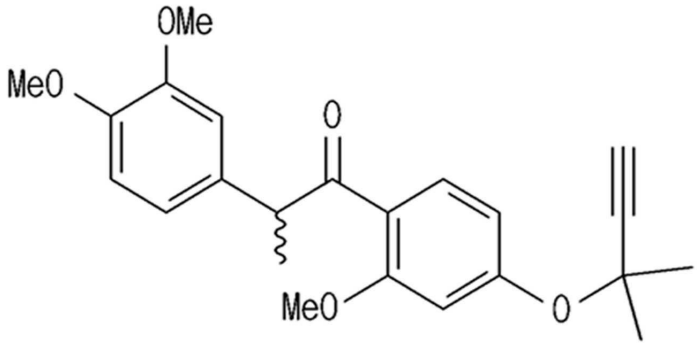
발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 생체시계 구성 유전자인 Rev-erbα 활성을 조절하는 신규 화합물 및 이를 포함하는 생체리듬 조절용 약학조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 구체예에서 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:



[0009]

[0010] [화학식 1]

[0011] 본 발명의 일 구체예에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 생체리듬 조절용 약학 조성물을 제공하고, 상기 구체예에서 제시한 생체리듬 조절효과는 Rev-erbα 유전자의 활성화에 의한 Bmal1 유전자의 억제에 의한 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 일 구체예에서 프로모터 내 RORE 서열을 갖는 유전자들의 활성 조절이 가능한 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구체예에서 뇌의 시상하부 내 시신경 교차상핵 (SCN)의 생체시계 활성을 효과적으로 조절 가능한 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구체예에서 Rev-erbα 유전자가 없거나 혹은 낮은 수준에서는 그 활성이 소멸되는 특성의 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 치료용 약학 조성물을 제공하고, 상기 구체예에서 상기 질환 치료는 Rev-erbα의 활성 촉진에 의한 것이다. 상기 신진대사 질환은 심혈관 질환 및 신장질환으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하며 이는 Rev-erbα의 활성 촉진으로 인한 Pai-1 유전자의 억제에 의한 것임을 특징으로 하는 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구체예에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 치료용 약학 조성물을 제공하고, 상기 구체예에서 상기 질환 치료는 Rev-erbα의 활성 촉진에 의한 것이다. 상기 신진대사 질환은 체내 콜레스테롤 축적 및 혈액 내 비정상적인 함량으로 인한 동맥 경화증을 포함하는 혈관계 질환을 특징으로 하며 이는 Rev-erbα의 활성 촉진으로 인한 Citrate synthase 유전자의 억제에 의한 것임을 특징으로 하는 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 생체시계 조절이 갖는 생리학적 의미는 유전체 변이연구를 통하여 유추될 수 있다. BMAL1, CLOCK, PERs 및 CRYs 등의 생체 시계 유전자가 결여된 돌연변이 생쥐는 비정상적인 생체 리듬을 보이는 것 뿐만 아니라 조기 노화, 비만 및 암 등의 대사성 질환에 높은 민감성을 나타낸다는 사실이 보고된 바 있다. 생체 시계 유전자들이 각기 다른 조직 내 발현하고 있는 표적 유전자의 전사과정을 상위단계에서 특이적으로 조절해내고 있기 때문에 위와 같은 현상이 초래되는 것으로 보인다. 특히 히스톤 아세틸화 및 메틸화, 인산화, 유비퀴틴화 등을 포괄하는 '크로마틴 리모델링' 과정은 위 현상을 설명할 수 있는 대표적인 사례이다. Period 2/3 유전자의 경우 Casein kinase에 의해 인산화되는 것으로 알려져 있는데 위 과정에 문제가 발생할 시 체내 생체주기의 변화가 촉진되면서 ASPS (advanced sleep phase syndrome), DSPS (delayed sleep phase syndrome) 등의 질환이 유발된다. 다른 예로 생체 시계 보조고리 구성 인자인 핵 수용체 계열의 Rev-erbα는 본래의 역할 뿐 아니라 포도당 생합성과정, 면역반응, 지질대사를 비롯한 생체 대사 기능을 포괄하는 생체시계-신진대사 조절에 연결고리적 성향을 갖고 있다. 특히 가스 인자 (NO, CO)와 heme이 상기 유전자의 내재적인 리간드로 밝혀짐에 따라 Rev-erbα의 활성 조절 가능성이 제기되었다. 상기와 같은 이유에서 전 세계의 연구진들은 생체 시계 유전자의 활성을 조절할 수 있는 인위적인 화합물 발굴에 박차를 가하고 있는 추세이다.

[0018] 본 발명의 명세서에서 사용하는 "RORE" (Rorα/Rev-erbα-response element)란 생체 시계 중심 유전자인 Bmal1의 프로모터 내 Rorα 및 Rev-erbα 유전자가 반응하는 특이 영역을 의미한다.

[0019] 본 발명의 명세서에서 사용되는 "생체 리듬"이란 포유동물을 비롯한 생명체가 지구 자전으로 인해 형성되는 낮과 밤의 변화에 적응하면서 획득한 약 24시간의 주기성을 의미한다.

[0020] 본 발명의 명세서에서 사용되는 "생체리듬 조절용"이란 Rev-erbα의 변조된 활성을 통하여 생체리듬을 조절하는 것으로, 이에 한정하지 않고 대사 혹은 인지 장애 및 기분 장애를 포함하는 생체리듬 교란 질환과 깊은 관련이 있다.

[0021] 본 발명의 명세서에서 사용되는 "신진대사 질환"이란, 혈관 내 콜레스테롤 축적에 의한 혈관 질환, 비정상적 심혈관 생성을 포함하는 심혈관 질환 및 간 조직에서의 항상성 조절 이상에 의해 발생되는 것으로서, 표적 유전자로 Pai-1, Citrate synthase가 있으며, 비만, 지방간, 신진대사 증후군, 선천성 대사이상 질환, 갑상선 질환 및 내분비 질환을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0022] 본 발명의 명세서에서 "Pai-1"은 혈관내피에서 합성되는 인자로써 동맥 경화증, 면역 질환, 용혈성 요독 증후군과 같은 신장 질환과 연관되어 있다. 또한 암의 악성화 및 전이 과정에도 기여하고 있기 때문에 "Pai-1" 발현 수준을 억제하면 표적 질병의 치료뿐만 아니라 암의 악성화 과정을 늦출 수 있다.

[0023] 본 발명의 명세서에서 "Citrate synthase"은 콜레스테롤 합성 과정을 위해 생성된 아세틸 CoA를 citrate로 전환시키는 중요 인자로서, 해당 유전자의 비정상적인 발현은 동맥 경화증을 유발할 수 있기 때문에, "Citrate synthase"의 발현 수준을 조절하는 것은 위의 질병을 치료하는 데 효과적이다.

[0024] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽,

에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.2 내지 200 ㎎/㎏으로, 바람직하게는 2 내지 100 ㎎/㎏으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 신규 화합물을 이용하여 분자 생체시계를 구성하는 유전자를 조절하고, 신규 화합물을 포함하는 약학 조성물을 사용하여 생체 리듬 교란에 의해 발생하는 각종 질환 및 신진대사 질환을 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1(a)는 본 발명의 일 구체예에서 제시하고 있는 화학식 1 화합물의 RORE 영역 특이적 활성을 검증하기 위해 제작한 돌연변이 RORE 프로모터 시스템이다.

도 1(b)는 도 1(a)에서 제작한 돌연변이 RORE 프로모터 시스템을 사용하여 화학식 1 화합물의 RORE 영역 특이적 활성을 검증한 결과이다.

도 2(a)는 본 발명의 일 구체예에 따라 선별된 화학식 1 화합물이 생체리듬의 주기 또는 진폭에 미치는 영향을 RORE 리포터를 과발현시킨 세포주에서 실시간으로 측정한 그래프이다.

도 2(b)는 본 발명의 일 구체예에 따라 선별된 화학식 1 화합물이 생체리듬의 주기 또는 진폭에 미치는 영향을 Per2 유전자의 프로모터 활성을 형광으로 반영하는 생쥐의 시상하부에서 적출한 SCN 조직에서 실시간으로 측정한 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 구체예에 따라 선별된 화학식 1 화합물의 Rev-erbα 의존적 활성을 검증한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 구체예에 따라 선별된 화학식 1 화합물이 Rev-erbα의 하위단계에서 조절되는 관련 유전자

2종 및 생체시계 중심유전자 1종의 mRNA 수준에 미치는 영향을 기존에 보고된 Rev-erbα 조절화합물 (GSK4112)과 Rev-erbα의 내재적 리간드인 heme과 비교 측정한 그래프이다.

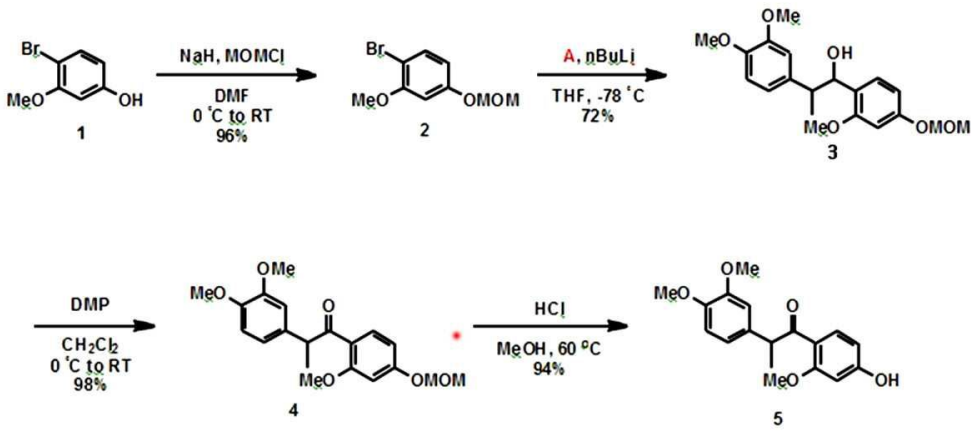
도 5는 본 발명의 일 구체예에 따라 선별된 화학식 1 화합물이 기존에 보고된 Rev-erbα 조절 화합물 (GSK4112)과는 다르게 Rev-erbα 리간드 비의존적 활성을 보임을 검증한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하 본 발명의 구성요소와 기술적 특징을 다음의 실시예들을 통하여 보다 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1. 신규화합물2-(3,4-디메톡시페닐)-1-(2-메톡시-4-((2-메틸부트-3-인-2-일)옥시)페닐)프로판-1-온(KK-S6)의 제조**

[0033] **실시예 1-1. 공통 중간체(5)의 합성**



[0034]

[0035] 특별한 언급이 없는 한, 모든 출발 물질 및 시약은 구매하여 사용하였고, 추가로 정제하지 않고 사용하였다. 테트라하이드로푸란 및 디에틸에테르(Et_2O)를 소듐 벤조페논 케틸로부터 증류하였고, 디클로로메탄, 클로로포름, 트리에틸아민, 아세토니트릴 및 피리딘은 수소화칼슘으로부터 사용 전에 증류하였다. 생성물의 통상적인 분리 및 크로마토그래피에 사용된 모든 용매는 시약 등급이고, 증류하였다. 반응 플라스크는 100℃에서 건조하였으며, 공기 및 습도 민감성 반응은 아르곤 대기 하에서 수행하였다. 플래시 컬럼 크로마토그래피(Flash column chromatography)는 실리카겔 60(230~400 메쉬, Merck)를 이용하여 지시된 용매로 수행하였다. 얇은막 크로마토그래피(Thin layer chromatography)는 0.25mm 실리카겔 플레이트(Merck)를 이용하여 수행하였다. 광회전도(optical rotations)는 1.5 내지 2mL 용량의 100mm 셀을 이용하여 JASCO P-2000 디지털 편광계로 측정하였다. 적외선 스펙트럼은 Perkin-Elmer 1710 FT-IR 분광기에서 측정하였다. 질량 스펙트럼은 VG Trio-2 GC-MS 기기에서 얻었다. 고해상도 질량 스펙트럼은 JEOL JMS-AX 505WA 기기에서 얻었다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker Avance 500 (500 MHz), Avance 400 (400 MHz) 또는 JEOL JNM-LA 300 분광기에서 듀테리오클로로포름($CDCl_3$) 중 용액으로 측정하였다. 화학적 이동(chemical shifts)은 테트라메틸실레인(tetramethylsilane)으로부터의 ppm(δ) 다운필드(downfield)로 표현하였으며, 중수소로 치환된 용매($CHCl_3$)에 대해 표준화하였다. ^{1}H-NMR 데이터를 화학적 이동, 다중도(s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad and/or multiple resonances), 양성자의 수, 및 헤르츠(Hz) 단위의 짝지음 상수의 순으로 보고하였다.

[0037] **[단계 1] 1-브로모-2-메톡시-4-(메톡시메톡시)벤젠 (2)의 제조**

[0038] DMF(20 mL) 중 수소화 나트륨의 현탁액(60%, 유동 파라핀 중 분산액, 912.8 mg, 22.82 mmol)에 DMF(6 mL) 중 페놀 (1)(2632.4 mg, 12.97 mmol)을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 H_2 가스가 멈출 때까지 0℃에서 30분간 교

반하였다. 이후, MOMCl(1.76 mL, 21.78 mmol)을 0℃에서 첨가하고, 그 현탁액의 온도를 실온이 되도록 하였으며 2시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 0℃로 식히고, 얼음물로 희석하였으며, Et2O로 추출하였다. 결합된 유기층을 브라인(brine)으로 세척하고, $MgSO_4$에 건조하였으며, 감압 하에서 여과 및 농축하였다. 그 잔류물을 실리카 겔(EtOAc/n-헥산 = 1:6 내지 1:4)에서 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 아릴 브로마이드(3079.9 mg, 96%)를 무색의 오일로 수득하였다.

[0040] **[단계 2] 2-(3,4-디메톡시페닐)-1-(2-메톡시-4-(메톡시메톡시)페닐)프로판-1-올 (3)의 제조**

[0041] THF(22.5 mL) 중 상기 아릴 브로마이드의 용액(1056.6 mg, 4.28 mmol)에 *n*-BuLi 용액(n-헥산 중 1.6 M 용액 2.5 mL, 4.00 mmol)을 -78 ℃에서 점적하였다. 그 용액을 -78℃에서 30분간 교반하고, THF(10.0 mL) 중 알데하이드 (A)(415.5 mg, 2.14 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 -78 ℃에서 1시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 포화 NH4Cl 용액으로 세척하고, EtOAc로 추출하였다. 결합된 유기층을 브라인(brine)으로 세척하고, $MgSO_4$에 건조하였으며, 감압 하에서 여과 및 농축하였다. 그 잔류물을 실리카 겔(EtOAc/n-헥산 = 1:3 내지 1:2)에서 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 2차 알코올(557.0 mg, 72%)를 노란색 고체로 수득하였다.

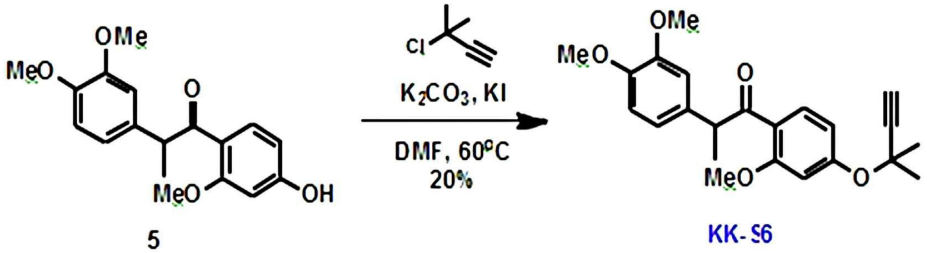
[0043] **[단계 3] 2-(3,4-디메톡시페닐)-1-(2-메톡시-4-(메톡시메톡시)페닐)프로판-1-온 (4)의 제조**

[0044] CH_2Cl_2(5 mL) 중 상기 2차 알코올의 용액(354.0 mg, 0.98 mmol)에 Dess-Matin periodinane(497.0 mg, 1.17 mmol)을 0 ℃에서 첨가하였다. 그 후, 상기 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 후, 10% 티오황산나트륨 용액으로 켄칭하였다. 그 혼합물을 CH_2Cl_2로 추출하였다. 결합된 유기층을 포화 $NaHCO_3$ 용액으로 세척하고, $MgSO_4$에 건조하였으며, 감압 하에서 여과 및 농축하였다. 그 잔류물을 실리카 겔(EtOAc/n-헥산 = 1:2)에서 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 케톤(346.0 mg, 98%)을 무색 오일로 수득하였다.

[0046] **[단계 4] 2-(3,4-디메톡시페닐)-1-(4-하이드록시-2-메톡시페닐)프로판-1-온 (5)의 제조**

[0047] 메탄올(17 mL) 중 상기 케톤(311.2 mg, 0.86 mmol)의 용액에 3*N* HCl(3.44 mL)를 첨가하였다. 상기 용액을 60℃로 가열하고, 같은 온도에서 2시간 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 주위 온도로 식히고, EtOAc로 추출하였으며, 물로 세척하고, $MgSO_4$에 건조하였으며, 감압 하에서 여과 및 농축하였다. 그 잔류물을 실리카 겔(EtOAc/n-헥산 = 1:2 내지 1:1)에서 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 페놀(256.7 mg, 94%)를 연한 노란색 고체로 수득하였다.

[0049] **실시예 1-2. KK-S6의 합성**



5 KK-S6

[0050]

[0051] DMF(5 mL) 중 상기 페놀(175.0 mg, 0.55 mmol)의 용액에 탄산칼륨(193.0 mg, 1.38 mmol), 요오드화칼륨(93.0 mg, 0.55 mmol) 및 3-클로로-3-메틸-1-부틴(175 mg, 1.66 mmol)을 첨가하였다. 상기 용액을 60℃로 가열하고, 동일한 온도에서 하룻밤 동안 교반하였다. 그 반응 혼합물을 주위 온도로 식혔고, 포화 NH_4Cl 용액으로 켄칭하였으며, EtOAc로 추출하였다. 결합된 유기층을 물 및 브라인으로 세척하고, $MgSO_4$에 건조하였으며, 감압 하에서 여과 및 농축하였다. 그 잔류물을 실리카 겔(EtOAc/n-헥산 = 1:3 내지 1:1)에서 플래시 컬럼 크로마토그래피에

의해 정제하여 **KK-S6**(42.0 mg, 20%)을 무색 오일로 수득하였다.

[0053] **실시예 2. RORE 특이적 활성 검증**

[0055] 리포터 내 RORE 두개 영역 (원위: AAGTAGGTTA, 근위: AAGTAGGTCA)의 6번째 GG서열을 CA로 치환하여 RORE 기능을 특이적으로 손상시킨 3종의 돌연변이 리포터 시스템을 구축하였다. 정상 리포터 혹은 돌연변이 리포터 각각을 지속적으로 발현하는 세포주를 구축하였고, 각 세포주 (RORE 혹은 RORE 원위/근위 돌연변이 리포터)의 활성을 실시간 관측 장비를 사용하여 측정하였다. RORE 손상은 비정상적인 주기 형성을 야기하였고 해당 돌연변이 리포터의 구축이 성공적으로 이루어졌음이 검증되었다. 정상 RORE 리포터 발현 세포주 포함 4종의 세포주에서 실시예 1의 신규 화합물을 5 μM 농도로 24 시간 동안 처리하고 그 효과를 분석하여 신규화합물의 RORE 영역 의존적 활성을 검증하였다 (도 1b).

[0057] **실시예 3. 생체리듬의 주기 및 진폭에 미치는 영향**

[0058] 상기 실시예 2에서 구축한 정상 RORE 리포터 발현 세포주를 대상으로, 분자 생체시계를 동기화시키는 덱사메타손 (DEX)을 1 μM 농도로 처리하여 세포 내 생체시계상을 동기화시켰다. 이후 실시예 1의 신규 화합물을 100 nM 루시페린을 포함하고 있는 세포배양액에 처리하여 약 72시간 동안 주기와 진폭을 측정함으로써 해당 화합물이 생체리듬에 미치는 영향을 분석하였다 (도 2a). 그 결과 RORE 프로모터 활성을 반영하는 일주기 진폭은 처리한 화합물의 농도에 의존적으로 감소하는 양상을 보였지만, 주기에는 변화가 없는 것으로 관찰되었다. 실시예 1의 신규 화합물이 생체리듬의 활성에 미치는 영향을 보다 상위수준에서 검증하기 위하여 Per2 유전자의 전사 활동을 루시퍼라아제 활성으로 반영하는 생쥐의 시상하부로부터 SCN 조직을 획득하여 배양하였다. 100 nM 루시페린을 포함하고 있는 조직배양액에 5 μM 농도의 신규 화합물을 처리하였더니 SCN의 진폭이 현저하게 감소하였다. 화합물 성분을 제거한 이후에는 다시금 정상적인 생체리듬으로 회복되는 것을 관찰함으로써 실시예 1의 신규 화합물은 중추시계인 SCN의 활동을 효과적으로 조절하고 있음을 알 수 있었다 (도 2b).

[0060] **실시예 4. Rev-erbα 의존적 활성 검증**

[0062] 생쥐 세포주에 RORE 리포터와 Rev-erbα 유전자를 동시에 발현시킨 후, 실시예 1에서 제시하고 있는 신규 화합물을 10 μM 농도로 처리하였더니 Rev-erbα에 의한 RORE 리포터 활성 감소 현상이 더욱 강화되었다. 또한 Bmal1::Eluc 형질전환 생쥐와 Rev-erb$^{+/-}$ 형질전환 생쥐를 교배한 임산모 생쥐로부터 태아를 분리하여 세포주 (야생형 및 Rev-erbα$^{-/-}$ MEF)를 구축하고, 이 세포주를 대상으로 화학식 1의 KK-S6 화합물을 5 μM 농도로 24시간 동안 처리한 뒤 루시퍼레이즈 활성을 측정함으로써 화합물의 효과를 분석하였다. 그 결과 Rev-erbα$^{-/-}$ 세포주에서는 화합물의 효과가 사라졌다 (도 3b). 이와 같은 결과를 통해 실시예 1에서 제시하고 있는 신규화합물 KK-S6의 활성은 Rev-erbα에 의존적임이 검증되었다.

[0064] **실시예 5. RORE를 가지는 신진대사 관련 Rev-erbα 하위 유전자들의 mRNA 수준 변화**

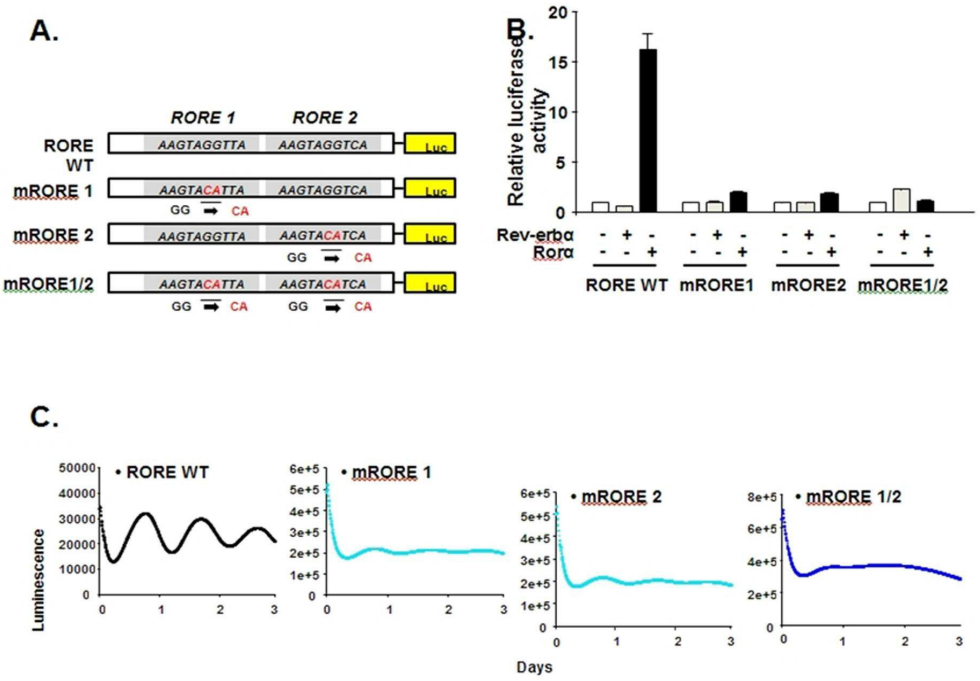
[0066] 사람 간에서 유래한 HepG2 세포주에 영양소 결핍 배양액을 16시간 동안 제공해 줌으로써 Rev-erbα의 내재적인 리간드인 heme의 작용을 최소화시켰다. 실시예 1의 신규 화합물 5 μM과 양성대조군인 GSK4112 및 heme을 각각 24시간 동안 처리한 후 표적 유전자인 Bmal1, Pai-1, Citrate synthase의 mRNA 변화 수준을 분석한 결과, 각 유전자의 mRNA 발현양이 약 40% 가량 감소하였다 (도 4).

[0069] **실시예 6. 기존에 보고된 다른 Rev-erbα 조절 화합물과는 차별화된 활성 메커니즘**

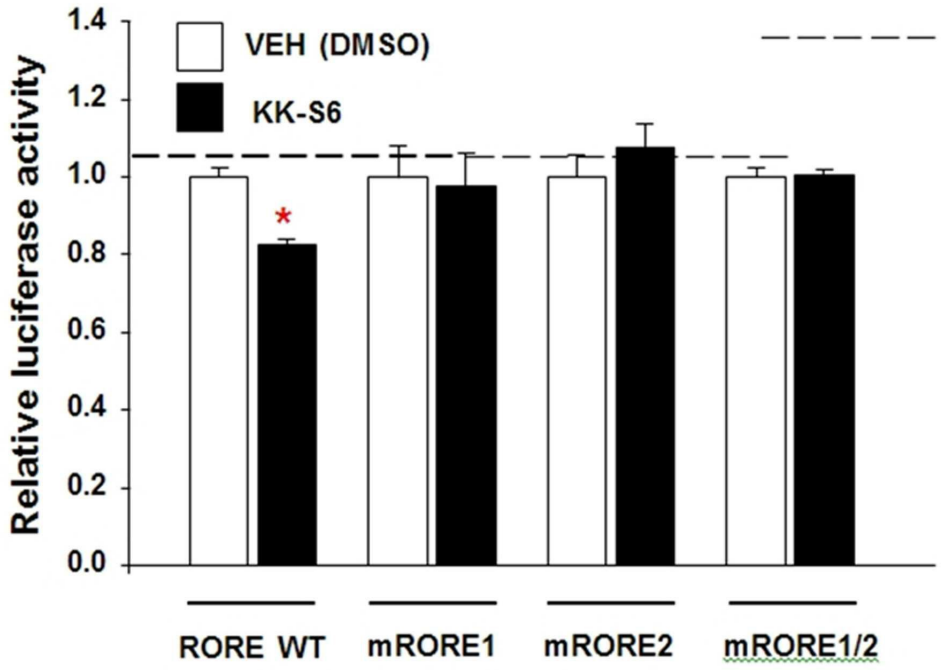
[0071] 생쥐 세포주에 Rev-erbα 리간드 결합 도메인을 과발현시킨 후, 기존 보고된 Rev-erbα 활성 조절 화합물인 GSK4112와 실시예 1의 신규 화합물 KK-S6을 처리한 후 그 효과를 비교하였다. Rev-erbα 리간드 결합 도메인의 발현에 의해 감소한 UAS::Luc 리포터 활성은 GSK4112에 의해 더욱 감소하였지만, KK-S6에 의한 변화는 확인 할 수 없었다. 이 결과를 통해 신규 화합물 KK-S6 는 기존 보고된 화합물과 다른 메커니즘으로 Rev-erbα의 활성을 조절함을 예측할 수 있었다.

도면

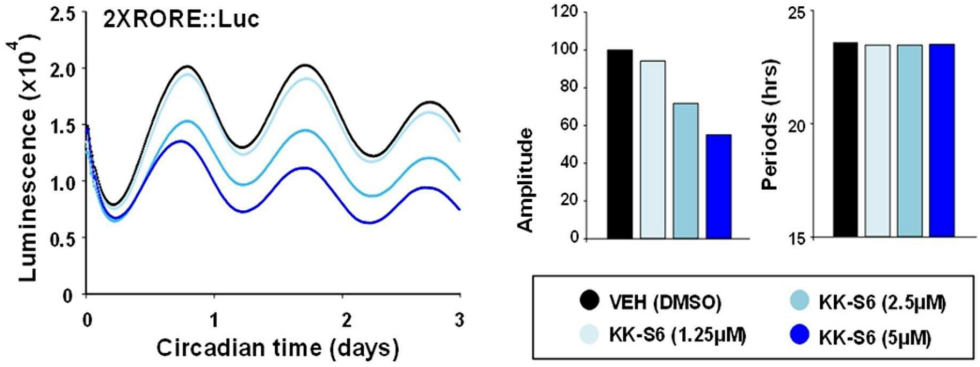
도면1a



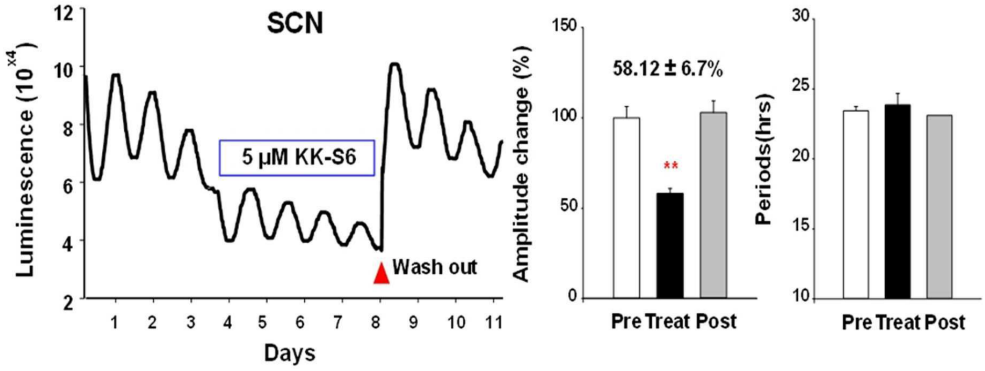
도면1b



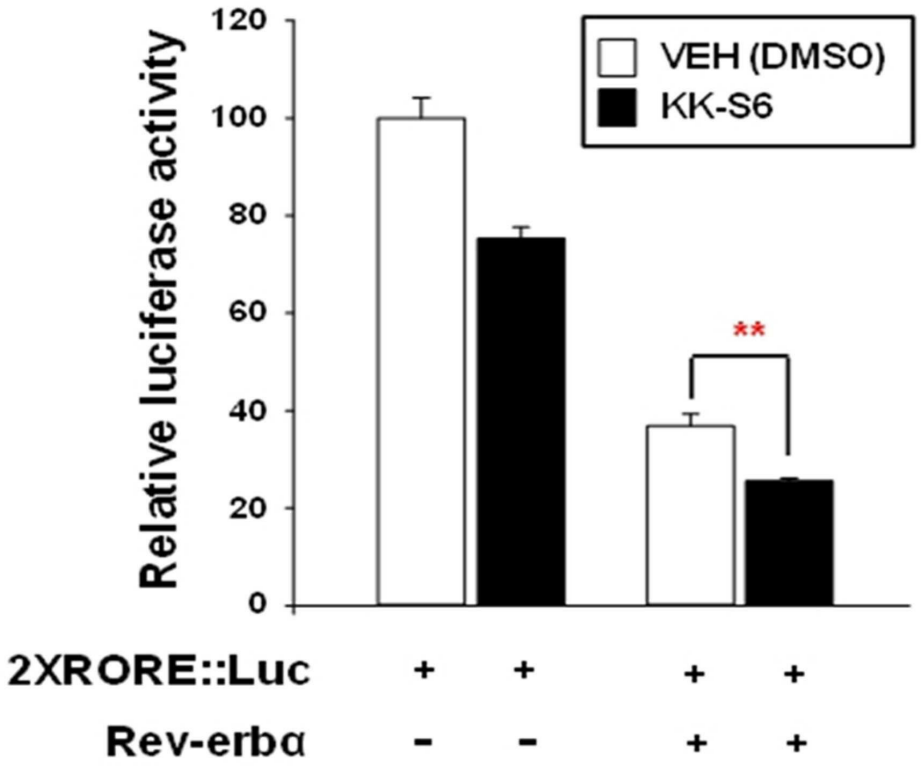
도면2a



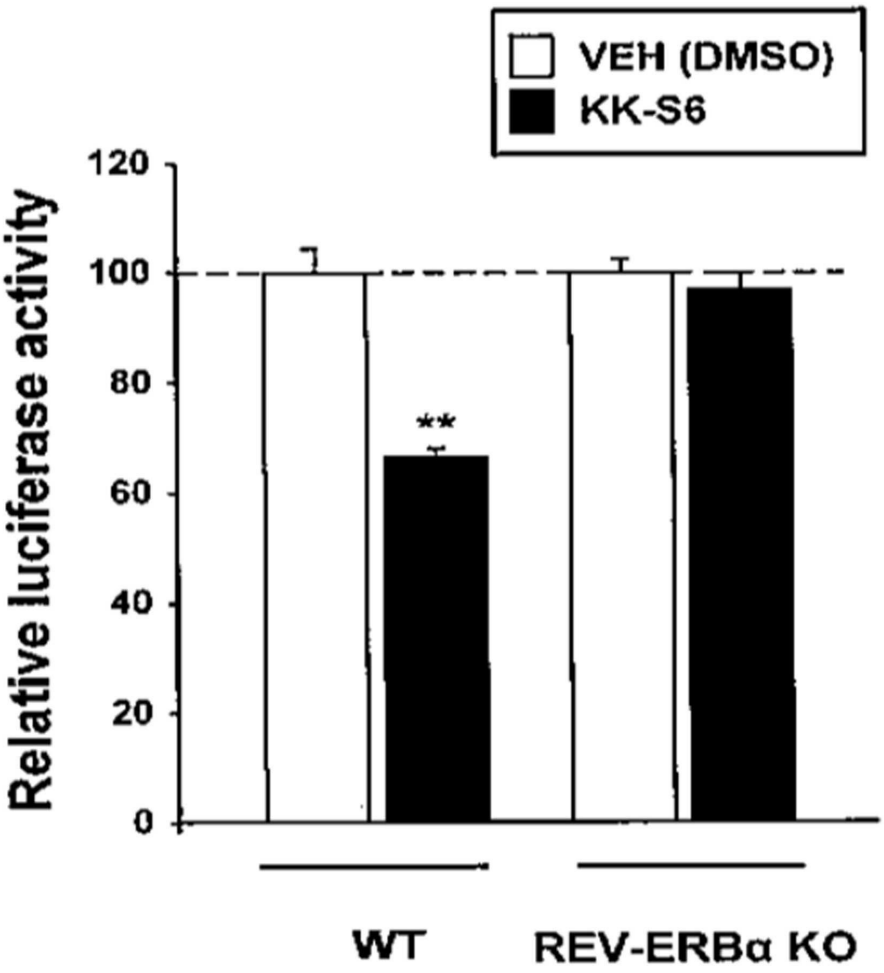
도면2b



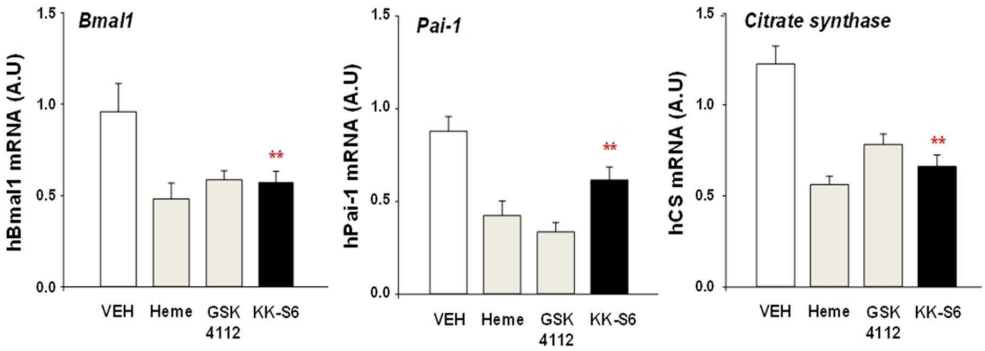
도면3a


Relative luciferase activity
120
100
80
60
40
20
0
VEH (DMSO)
KK-S6
**
2XRORE::Luc + + + +
Rev-erbα - - + +

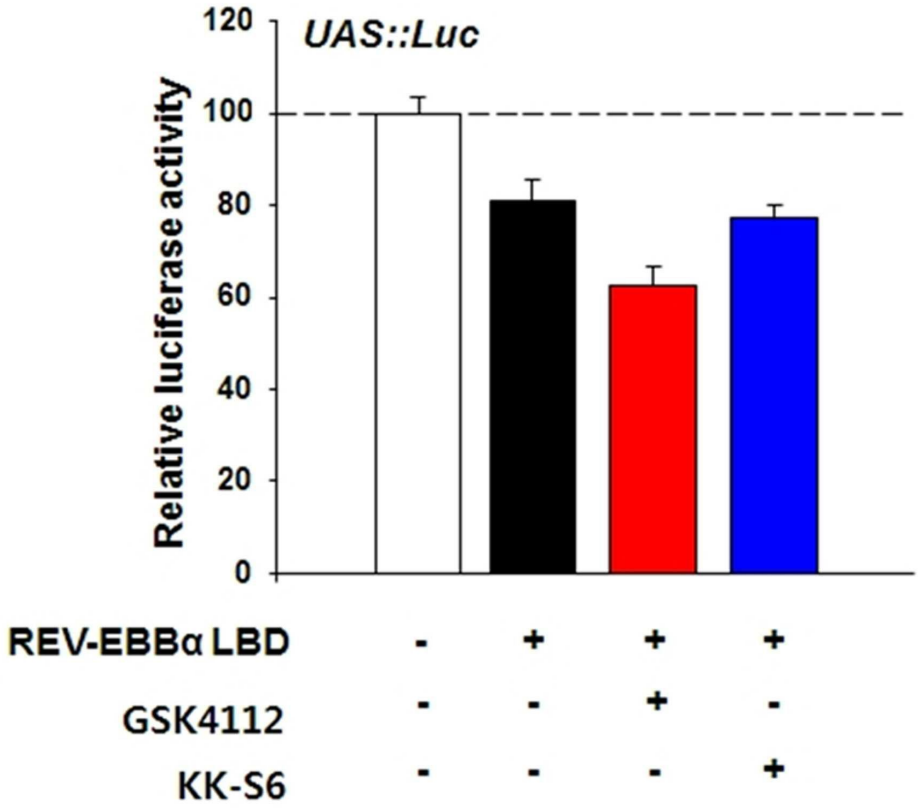
도면3b


VEH (DMSO)
KK-S6
Relative luciferase activity
120
100
80
60
40
20
0
**
WT
REV-ERBα KO

도면4


Bmal1
hBmal1 mRNA (A.U)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
VEH
Heme
GSK 4112
KK-S6
Pai-1
hPai-1 mRNA (A.U)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
VEH
Heme
GSK 4112
KK-S6
Citrate synthase
hCS mRNA (A.U)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
VEH
Heme
GSK 4112
KK-S6

도면5


UAS::Luc
Relative luciferase activity
120
100
80
60
40
20
0
REV-EBBα LBD
GSK4112
KK-S6
- + + +
- - + -
- - - +