



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0081313
(43) 공개일자 2020년07월07일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 305/08 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) C07D 405/12 (2006.01)
C07D 407/12 (2006.01) C07D 409/12 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07D 305/08 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0176032
(22) 출원일자 2019년12월27일
심사청구일자 2019년12월27일</p> <p>(30) 우선권주장
1020180170642 2018년12월27일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)</p> <p>(72) 발명자
서홍석
서울특별시 용산구 한강대로 211, 101동 2804호(한강로1가, 대우 월드마크 용산)
이용직
인천광역시 남동구 구월로 78, 8동 507호(간석동, 극동아파트)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 다해</p> |
|---|---|

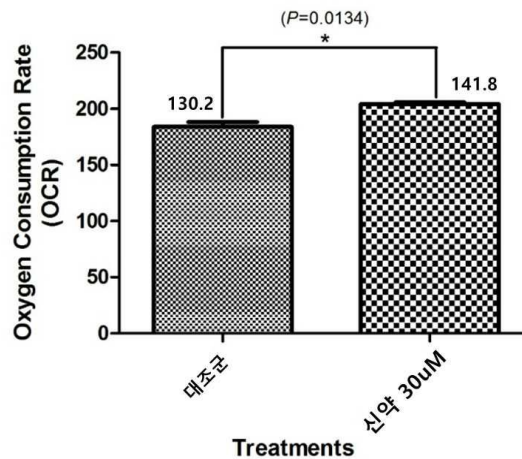
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 세포 내 ATP 생성 촉진을 위한 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 보다 상세하게는, 상기 유도체에는 ATP 생성을 촉진하는 효과가 있으므로, 상기 유도체는 ATP 증가가 필요한 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

A61P 3/04 (2018.01)

C07D 405/12 (2013.01)

C07D 407/12 (2013.01)

C07D 409/12 (2013.01)

C07D 417/12 (2013.01)

(72) 발명자

심태보

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

산디프 쉐넬타

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

신인재

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

허우영

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

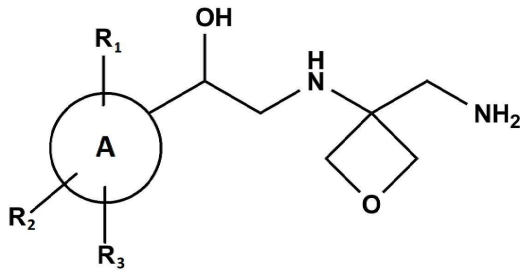
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

A는 C₆-C₁₅ 아릴기, 또는 질소(N), 산소(O) 및 황(S) 원자로부터 선택된 헤테로원자가 1 내지 4개 포함된 5원 내지 14원의 헤테로아릴기를 나타내고,

R₁, R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 H; OH; 할로젠기; C₁-C₇알킬기; C₁-C₇ 알콕시기; C₁-C₇ 아미노기; 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀ 아릴기; 및 N, O 및 S로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 C₃-C₁₀ 헤테로 아릴기 또는 헤테로 사이클릴기임.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 유도체는 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2-메톡시페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4-다이메톡시페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(3,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올;

2-(2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-하이드록시에틸)-4-메톡시페놀;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(4-아미노페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4,6-트라이메톡시페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(피리딘-3-일)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(5-브로모사이오펜-2-일)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(1-메틸-1H-피롤-3-일)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(퓨란-2-일)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(사이아졸-5-일)에탄-1-올; 및

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(벤조퓨란-2-일)에탄-1-올.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 ATP 생성을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

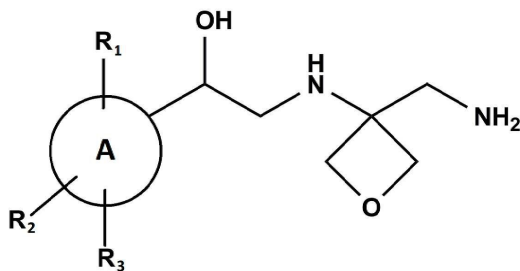
제 1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약물 내성 및 약물 부작용이 감소된 체중 조절 및/또는 체중 경감 용도를 가지는 것인 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 ATP 증가가 필요한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

A는 C₆-C₁₅ 아릴기, 또는 질소(N), 산소(O) 및 황(S) 원자로부터 선택된 헤테로원자가 1 내지 4개 포함된 5원 내지 14원의 헤테로아릴기를 나타내고,

R₁, R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 H; OH; 할로젠기; C₁-C₇알킬기; C₁-C₇ 알콕시기; C₁-C₇ 아미노기; 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀ 아릴기; 및 N, O 및 S로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 C₃-C₁₀ 헤테로 아릴기 또는 헤테로 사이클릴기임.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학 조성물:

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2-메톡시페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4-다이메톡시페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(3,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올;

2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-하이드록시에틸)-4-메톡시페놀;
 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(4-아미노페닐)에탄-1-올;
 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4,6-트라이메톡시페닐)에탄-1-올;
 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(피리딘-3-일)에탄-1-올;
 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(5-브로모사이오펜-2-일)에탄-1-올;
 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(1-메틸-1H-피롤-3-일)에탄-1-올;
 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(퓨란-2-일)에탄-1-올;
 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(사이아졸-5-일)에탄-1-올; 및
 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(벤조퓨란-2-일)에탄-1-올.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 ATP 증가는, 골격근의 ATP 증가, 심근의 ATP 증가, 백혈구의 ATP 증가, 또는 미토콘드리아 산화기능 증가인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

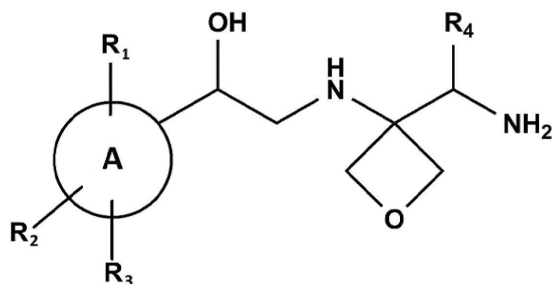
제5항에 있어서,

상기 ATP 증가가 필요한 질환은 대사증후군, 비만, 당뇨, 고혈압, 이상지혈증, 만성 피로증후군, 알콜성 간장질환, 비알콜성 간장질환, 비알콜성지방간염(NASH), 동맥경화성 혈관질환, 노화, 퇴행성 신경질환, 근무력증, 갑상선 기능저하 관련 대사질환, 심부전, 심근증, 좌심실비대, 저산소혈증 재관류 손상, 심장 아밀로이드증, 고혈압과 고혈압성 심장질환, 저혈압이 동반된 심부전, 관상동맥의 연축 및 변이형 협심증, 죽상동맥경화성 혈관질환-심근경색, 협심증, 뇌경색, 말초동맥 폐쇄성 질환, Buerger씨 병, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐 섬유화증, 죽상동맥경화성 혈관질환, 심근경색, 협심증, 뇌경색, 건선, 아토피, 만성 염증성 질환, 악성 종양, 미토콘드리아 기능저항성 질병 및 노화 관련 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 약학 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약물 내성 및 약물 부작용이 감소된 체중 조절 및/또는 체중 경감용 약학 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

A는 각각 C₆-C₁₅ 아릴기, 또는 질소(N), 산소(O) 및 황(S) 원자로부터 선택된 헤테로원자가 1 내지 4개 포함된 5

원 내지 14원의 헤테로아릴기를 나타내고,

R_1 , R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H; OH; 할로젠기; C_1 - C_7 알킬기; C_1 - C_7 알콕시기; C_1 - C_7 아미노기; 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{10} 아릴기; 및 N, O 및 S로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 C_3 - C_{10} 헤테로 아릴기 또는 헤테로 사이클릴기이임.

청구항 10

제9항에 있어서,

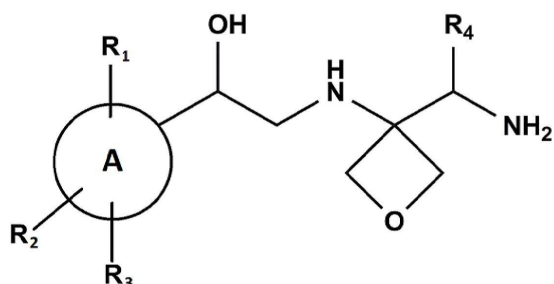
상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학 조성물:

- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2-메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4-다이메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(3,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-(2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-하이드록시에틸)-4-메톡시페놀;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(4-아미노페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4,6-트라이메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(피리딘-3-일)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(5-브로모사이오펜-2-일)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(1-메틸-1H-피롤-3-일)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(퓨란-2-일)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(사이아졸-5-일)에탄-1-올; 및
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(벤조퓨란-2-일)에탄-1-올.

청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

A는 각각 C_6 - C_{15} 아릴기, 또는 질소(N), 산소(O) 및 황(S) 원자로부터 선택된 헤테로원자가 1 내지 4개 포함된 5원 내지 14원의 헤테로아릴기를 나타내고,

R_1 , R_2 및 R_3 는 각각 독립적으로 H; OH; 할로젠기; C_1 - C_7 알킬기; C_1 - C_7 알콕시기; C_1 - C_7 아미노기; 치환 또는 비치

환된 C₃-C₁₀ 아릴기; 및 N, O 및 S로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 C₃-C₁₀ 헤테로 아릴기 또는 헤테로 사이클릴기임.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학 조성물:

- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2-메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4-다이메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(3,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-(2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-하이드록시에틸)-4-메톡시페놀;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(4-아미노페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4,6-트라이메톡시페닐)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(피리딘-3-일)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(5-브로모사이오펜-2-일)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(1-메틸-1H-피롤-3-일)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(퓨란-2-일)에탄-1-올;
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(사이아졸-5-일)에탄-1-올; 및
- 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(벤조퓨란-2-일)에탄-1-올.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 피부 염증 질환은 아토피성 피부염, 접촉성 피부염 및 건선으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 피부 염증 질환의 예방 또는 치료는 피부 세포의 IL-17A의 발현 증가를 억제하는 것에 의해 달성되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포내 ATP 생성 촉진을 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대사성 질환(Metabolic Disease, Metabolic Syndrome)은 포도당, 지방, 단백질 등의 대사 이상에서 기원하는 질병을 말하며, 주로 포도당과 지방대사의 이상으로 유발되는 암, 당뇨병 골대사 질환, 지방간, 비만, 심혈관계 질환 등을 통칭한다.

[0003] 알파 교감 신경 자극제인 미도드린 (Midodrine)은 현재 임상에서 환자들에게 처방되는 부작용이 거의 없는 비교적 안전한 약제로서 기존(既存) 연구에서 세포와 조직 내 이화 대사를 활성화시켜 고혈압, 고지혈증, 비만, 동맥경화, 지방간 심부전 등을 개선시키는 운동유사효과를 발견한 바 있다. 따라서 이 미도드린의 화학적 구조를 일부 변형시킨 유사체들 (analogues)은 기존 약제의 안전성을 유지하면서 심혈관, 대사성 및 염증성 질환에 더 좋은 작용을 할 수 있는 신약으로 개발할 가능성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국 특허등록 제10-1845952호

발명의 내용

해결하려는 과제

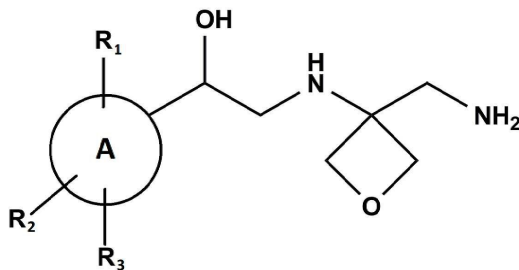
[0005] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

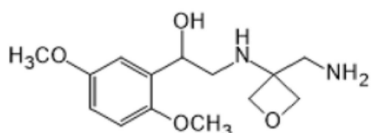
[0011] 상기 화학식 1에서,

[0012] A는 C₆-C₁₅ 아릴기, 또는 질소(N), 산소(O) 및 황(S) 원자로부터 선택된 헤테로원자가 1 내지 4개 포함된 5원 내지 14원의 헤테로아릴기를 나타내고,

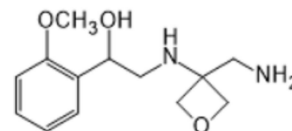
[0013] R₁, R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 H; OH; 할로젠기; C₁-C₇알킬기; C₁-C₇ 알콕시기; C₁-C₇ 아미노기; 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀ 아릴기; 및 N, O 및 S로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 C₃-C₁₀ 헤테로 아릴기 또는 헤테로 사이클릴기임.

[0014] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체는 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

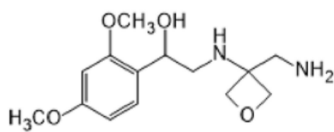
[0015] 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올 (화학식 1-1, 2-((3-(aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(2,5-dimethoxyphenyl)ethanol, Chemical Formula: C₁₄H₂₂N₂O₄),



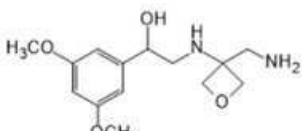
[0016] 2-((3-((aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(2-methoxyphenyl)ethanol, Chemical Formula: $C_{13}H_{20}N_2O_3$;



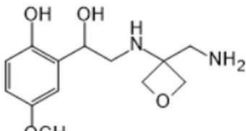
[0017] 2-((3-((aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(2,4-dimethoxyphenyl)ethanol, Chemical Formula: $C_{14}H_{22}N_2O_4$;



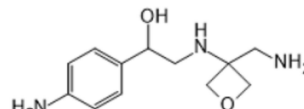
[0018] 2-((3-((aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(3,5-dimethoxyphenyl)ethanol, Chemical Formula: $C_{14}H_{22}N_2O_4$;



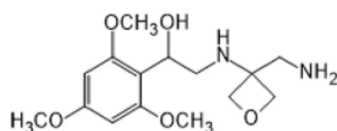
[0019] 2-((3-((aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-hydroxyethyl)-4-methoxyphenol, Chemical Formula: $C_{13}H_{20}N_2O_4$;



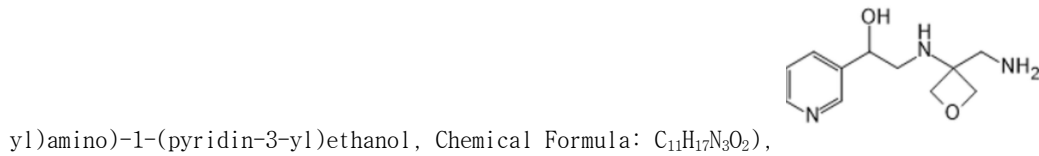
[0020] 2-((3-((aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(4-aminophenyl)ethanol, Chemical Formula: $C_{12}H_{19}N_3O_2$;



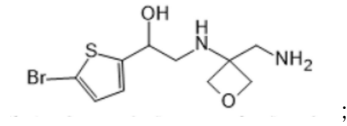
[0021] 2-((3-((aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(2,4,6-trimethoxyphenyl)ethanol, Chemical Formula: $C_{15}H_{24}N_2O_5$;



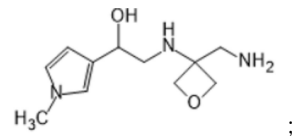
[0022] 2-((3-((aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(pyridin-3-yl)ethanol, Chemical Formula: $C_{13}H_{14}N_3O$;



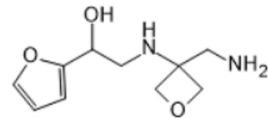
[0023] 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(5-브로모사이오펜-2-일)에탄-1-올(화학식 1-9, 2-((3-(aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(5-bromothiophen-2-yl)ethanol, Chemical Formula: $C_{10}H_{15}BrN_2O_2S$),



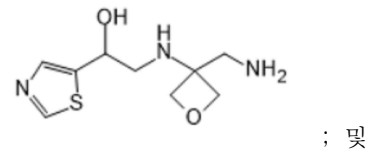
[0024] 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(1-메틸-1H-피롤-3-일)에탄-1-올(화학식 1-10, 2-((3-(aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(1-methyl-1H-pyrrol-3-yl)ethanol, Chemical Formula: $C_{11}H_{19}N_3O_2$),



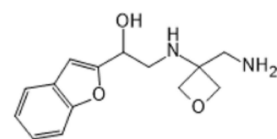
[0025] 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(퓨란-2-일)에탄-1-올(화학식 1-11, 2-((3-(aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(furan-2-yl)ethanol, Chemical Formula: $C_{10}H_{16}N_2O_3$),



[0026] 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(사이아졸-5-일)에탄-1-올(화학식 1-12, 2-((3-(aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(thiazol-5-yl)ethanol, Chemical Formula: $C_9H_{15}N_3O_2S$),



[0027] 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(벤조퓨란-2-일)에탄-1-올(화학식 1-13, 2-((3-(aminomethyl)oxetan-3-yl)amino)-1-(benzofuran-2-yl)ethanol, Chemical Formula: $C_{14}H_{18}N_2O_3$),



[0028] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 ATP 생성을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 미토드린 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염일 수 있다.

[0029] 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약물 내성 및 약물 부작용이 감소된 체중 조절 및/또는 체중 경감 용도를 가질 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 ATP 증가가 필요한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 ATP 증가는, 골격근의 ATP 증가, 심근의 ATP 증가, 백혈구의 ATP 증가, 또는 미토콘드리아 산화기능 증가인 것을 특징으로 한다.

[0032] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 ATP 증가가 필요한 질환은 대사증후군, 비만, 당뇨, 고혈압, 이상지혈증, 만성 피로증후군, 알콜성 간장질환, 비알콜성 간장질환, 비알코올성지방간염(NASH), 동맥경화성 혈관질환, 노화, 퇴행성 신경질환, 근무력증, 갑상선 기능저하 관련 대사질환, 심부전, 심근증, 좌심실비대, 저산소혈증 재관류 손상, 심장 아밀로이드증, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐 섬유화증, 죽상동맥경화성 혈관질환, 심근경색, 협심증, 뇌

경색, 만성 염증성 질환, 악성 종양, 미토콘드리아 기능저항성 질병 및 노화 관련 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

- [0033] 아울러, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약물 내성 및 약물 부작용이 감소된 체중 조절 및/또는 체중 경감용 약학 조성물을 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있으며, 이때 약학 조성물은 외용제의 형태로 제공될 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 피부 염증 질환의 예방 또는 치료는 피부 세포의 IL-17A의 발현 증가를 억제하는 것에 달성되는 것일 수 있으며, 상기 피부 염증 질환은 건선, 아토피성 피부염, 및 접촉성 피부염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 만성 피부염일 수 있다.
- [0036] 한편, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 ATP 증가가 필요한 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 체중 조절 및/또는 체중 경감 방법을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 염증 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 보호용 화장료 조성물을 제공하며, 상기 피부 장벽 보호는 피부 각질세포를 외부 유해물질로부터 보호하는 것으로서 염증을 유발하는 사이토카인의 발현 증가를 억제하는 것에 의해 달성되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 신규 화합물은, 아데노신삼인산(Adenosine Tri-Phosphate, ATP) 생성을 촉진하여 대사질환, 심혈관질환, 염증질환 등의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다. 또한 본 발명의 화합물은 약물 내성 약물 부작용이 감소된 체중 조절 및/또는 체중 경감용 조성물로 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 피부 각질세포의 염증성 사이토카인의 발현 증가를 감소시킬 수 있는바, 피부 염증 질환의 예방, 치료, 및/또는 개선용 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 미도드린(MIDO)와 desglymidodrine(ST1059)의 혈관수축 작용의 비교이다.
- 도 2는 에너지 대사 단백질 분자인 PPAR δ , AMPK, PGC1 α 에 미도드린과 desglymidodrine이 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 3은 미토콘드리아의 TCA cycle과 ETC의 기능을 반영하는 succinate dehydrogenase의 활성도에 미도드린과 desglymidodrine이 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 4는 미토콘드리아의 산화기능 상태를 반영하는 oxygen consumption rate(OCR)에 미도드린과 desglymidodrine이 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 5는 화학식 1-1 화합물의 NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 화학식 1-2 화합물의 NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 화학식 1-3 화합물의 NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 화학식 1-4 화합물의 NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 화학식 1-6 화합물의 NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 C2C12 세포에 미도드린 신약(sanmido-0571001, 화학식 1-1) 농도 별 처리 시 세포생존을 변화를 나타낸

것이다.

도 11은 C2C12 세포에 미도드린 신약(sanmido-0571001) 30 uM 처리 시 산소소비율 (세포 내 산화적 인산화) 변화를 나타낸 것이다.

도 12는 C2C12 세포에 미도드린 신약(NM)을 10, 30, 50 uM 농도로 처리 후 세포 내 ATP 농도 (세포 내 에너지 상태) 변화를 나타낸 것이다.

도 13은 H9C2 세포에 미도드린 신약 농도 별 처리 시 세포생존율 변화를 나타낸 것이다.

도 14는 H9C2 세포에 미도드린 신약 (sanmido-0571001) 10, 30, 50 uM 처리 시 PPAR δ , AMPK, PGC-1 α 단백질 발현량 변화를 나타낸 것이다.

도 15는 H9C2 세포에 미도드린 신약 (sanmido-0571001) 30 uM 처리 시 산소소비율 (세포 내 산화적 인산화) 변화를 나타낸 것이다.

도 16은 H9C2 세포에 미도드린 신약 (sanmido-0571001)을 10, 30, 50 uM 농도로 처리 후 세포 내 ATP 농도 (세포 내 에너지 상태) 변화를 나타낸 것이다.

도 17은 Raw264.7 세포에 미도드린 신약을 10, 30, 50 uM 처리한 상태에서 CCR2와 mannose receptor 단백질 발현의 면역세포화학 염색(immunocytochemistry: ICC) 소견을 나타낸 것이다.

도 18은 HUVECs에 콜레스테롤과 팔미틱산을 각각 50 uM 처리한 상태에서 미도드린 신약(sanmido-0571001)을 30M 농도로 처리 후 p-eNOS ICC를 나타낸 것이다.

도 19는 HUVECs에 sanmido-0571001을 10, 30, 50 uM 처리한 상태에서 AT1R (Angiotensin II type-1 receptor) ICC를 나타낸 것이다.

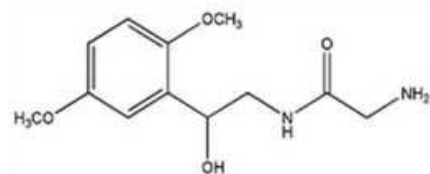
도 20은 마우스의 체외 동맥실험에서 sanmido-0571001[CVT1: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올], CVT2[2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4-다이메톡시페닐)에탄-1-올], CVT3[2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2-메톡시페닐)에탄-1-올], CVT4[2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(3,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올], CVT5[2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(4-아미노페닐)에탄-1-올] 등을 각각 0.1, 1, 10, 30, 50 uM 처리한 상태에서 15분간 혈관의 수축반응을 나타낸 것이다.

도 21은 HaCaT세포에서 SDS 또는 DNCB로 증가된 IL-17A 발현에 대한 신약(sanmido-0571001) 투여에 따른 IL-17A의 발현의 변화를 보여주는 웨스턴 블랏 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

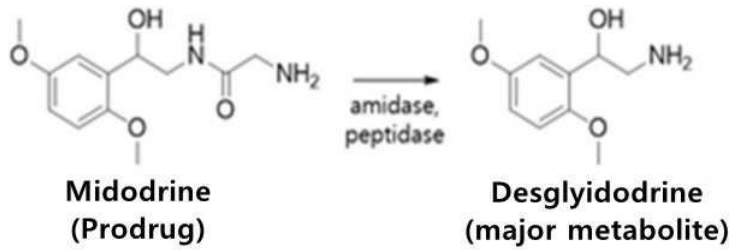
[0044] 알파 교감 신경 자극제로 고혈압, 고지혈증, 비만, 동맥경화, 지방간 심부전 등을 개선시키는 효과가 알려진 미도드린 화합물은 아마틴(amatine), 프로아마틴(proamatine), 구트론(gutron) 등의 상표명으로 판매되고, 그 IUPAC 명은 (RS)- N-[2-(2,5-디메톡시페닐)-2-히드록시에틸]글리신아미드 ((RS)-N-[2-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-hydroxyethyl]glycinamide)으로서, 하기 화학식 2로 표시된다.

[0045] [화학식 2]



[0046]

[0047] 기존의 미도드린 화합물은, 다음과 같이, prodrug상태에서 반감기는 25분이며, 혈중 amidase나 peptidase에 의하여 active drug인 desglymidodrine(ST1059)로 대사되면 반감기가 3-4시간으로 길어지는 현상을 보였다.



[0048]

[0049] 혈관 수축작용은 prodrug의 경우는 거의 없으나, active drug의 경우는 10-15배 강력해진다(Thulesius O et al. Eur J Clin Pharmacol 1979;16:423-24 및 도 1). 반면 에너지 대사작용의 경우는 본 발명자들이 세포실험을 이용하여 측정해본 결과 prodrug 인, 미도드린이, active drug인 desglymidodrine보다 오히려 강하게 나타나는 것이 확인되었다(도 2).

[0050] 또한, 미토콘드리아의 에너지 생성 기능을 나타내는 TCA cycle과 ETC의 기능을 반영하는 succinate dehydrogenase의 활성도에 미도드린과 desglymidodrine이 미치는 영향은 오히려 미도드린이 desglymidodrine보다 더 강하게 나타나는 결과를 보였다(도 3).

[0051] 이에 더하여 미토콘드리아에서 산화작용의 정도를 측정하는 검사에서 미도드린의 투여시 desglymidodrine보다 더 산화작용이 많이 일어나는 것이 확인되었다(도 4).

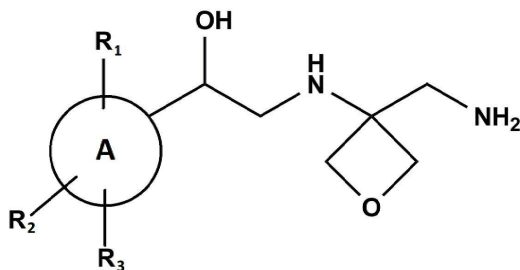
[0052] 따라서 prodrug인 미도드린이 active drug인 desglymidodrine보다 대사적으로는 더 강력한 미토콘드리아의 에너지 생성 대사 작용이 강한 것을 알 수 있다.

[0053] 이에, 본 발명에서는 prodrug 상태인 미도드린 [DMAE-glycine: (1-(2',5'- dimethoxyphenyl)-2-aminoethanol)-glycine 에서 active drug,인 desglymidodrine [DMAE: (1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-2-aminoethanol)로 대사가 되지 않은 상태를 유지하기 위해 DMAE와 glycine을 연결하는 peptide bond가 혈액 내 peptidase나 aminase에 의하여 가수 분해되지 않고 그대로 연결을 유지하는 새로운 bond로 대체하여 DMAE-glycine 상태로 남아 있는 새로운 물질을 합성하여 그 대사 작용을 확인하였다.

[0054] 그 결과 본 발명에서 합성한 하기 화학식 1로 표시되는 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 골격근, 심근, 백혈구에서의 ATP 증가 효과 및 미토콘드리아 산화 기능 증가 효과와 함께 피부 각질세포에서 외부 자극에 의한 염증성 사이토카인 발현 증가 억제 효과가 확인되어 본 발명을 완성하였다.

[0055] 이에 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아릴 치환된 아미노메틸옥세테닐 아미노 알코올 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것을 목적으로 한다:

[0056] [화학식 1]



[0057]

[0058] 상기 화학식 1에서,

[0059] A는 C₆-C₁₅ 아릴기, 또는 질소(N), 산소(O) 및 황(S) 원자로부터 선택된 헤테로원자가 1 내지 4개 포함된 5원 내지 14원의 헤테로아릴기를 나타내고,

[0060] R₁, R₂ 및 R₃는 각각 독립적으로 H; OH; 할로젠기; C₁-C₇알킬기; C₁-C₇ 알콕시기; C₁-C₇ 아미노기; 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀ 아릴기; 및 N, O 및 S로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 C₃-C₁₀ 헤테로 아릴기 또는 헤테로 사이클릴기임.

- [0061] 따라서 본 발명의 신규 화합물은 전형적인 알파-1 아드레날린 수용체 활성화 약제의 특성인 혈관수축 기능이 없으나, 에너지 대사 활성화 기능이 주로 나타나는 새로운 종류의 활성화 약제를 제공할 수 있는 것이다.
- [0062] 한편, 본 발명에서 합성한 신규 화합물은 "미도드린 신약" 및 "미도드린 유사체"라는 용어와 혼용될 수 있고, 본 명세서에서 "신약"은 상기의 미도드린 신약을 지칭한다.
- [0063] 다른 측면에서 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 ATP 증가가 필요한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0064] 상기 ATP 증가는, 골격근의 ATP 증가, 심근의 ATP 증가, 백혈구의 ATP 증가, 또는 미토콘드리아 산화기능 증가일 수 있다.
- [0065] 또 다른 측면에서 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 체중 조절 및/또는 체중 감소용 조성물을 제공하며, 이는 체중 조절 및/또는 체중 감소를 위한 목적으로 약물 또는 식품에 첨가될 수 있다.
- [0066] 또 다른 측면에서 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 피부 염증 질환의 예방, 치료, 및/또는 개선용 조성물을 제공하며, 이는 피부 각질 세포에서 염증성 사이토카인의 발현 감소 또는 그 발현의 증가를 억제할 수 있고, 피부 염증 질환의 예방, 치료, 및/또는 개선을 위한 목적으로 약물 또는 화장품에 첨가될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 새로운 화합물의 효과는 다음과 같다:
- [0069] 가). 골격근의 ATP 증가
- [0070] - 중간 대사 표지자: PPAR δ (Peroxisome Proliferator activated Receptor- δ), AMPK (AMP-activated protein kinase), PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α), 미토콘드리아의 산화적 인산화(oxygen consumption rate: OCR), 석신산 탈수소효소 활성(Succinate dehydrogenase activity)
- [0071] - 직접 효과: 심장 수축기 기능과 확장기 기능의 개선
- [0072] - 타겟질환: 대사증후군, 비만, 당뇨, 고혈압, 이상지혈증, 만성 피로증후군, 알콜성 간장질환, 비알콜성 간장질환, 비알코올성지방간염(NASH), 동맥경화성 혈관질환, 노화, 퇴행성 신경질환(AD, PD, MS, hypoxic brain damage 등), 근무력증, 갑상선 기능저하 관련 대사질환 등
- [0074] 나). 심근의 ATP 증가
- [0075] - 중간 대사 표지자: PPAR δ , AMPK, PGC-1 α , 미토콘드리아의 산화적 인산화(oxygen consumption rate: OCR), 석신산 탈수소효소 활성
- [0076] - 직접 효과: 골격근 근력증가 및 운동능력 및 지구력 개선
- [0077] - 타겟질환: 심부전(수축기 심부전: Heart failure with reduced Ejection Fraction: HFrEF, 확장기 심부전: Heart failure with preserved Ejection Fraction: HFpEF), 비후성 심근증(hypertrophic cardiomyopathy), 좌심실비대(left ventricular heart failure), 저산소혈증 재관류 손상(Hypoxia-reperfusion injury), 심장 아밀로이드증(amyloid heart), 독소루비신-유도 심근증(doxorubicin-induced cardiomyopathy), 패혈성 심근증(septic cardiomyopathy)
- [0079] 다). 혈관 내피세포의 인산화 eNOS 발현의 증가와 Angiotensin II의 AT1R발현의 감소
- [0080] - 중간 대사 표지자: PPAR δ , AMPK, PGC-1 α , 미토콘드리아의 산화적 인산화(oxygen consumption rate: OCR), 석신산 탈수소효소 활성
- [0081] - 직접 효과: 혈관 수축작용의 억제 및 이완 작용
- [0082] - 타겟질환: 고혈압과 고혈압성 심장질환, 저혈압이 동반된 심부전, 관상동맥의 연축 및 변이형 협심증, 죽상동맥경화성 혈관질환-심근경색, 협심증, 뇌경색, 말초동맥 폐쇄성 질환, Buerger씨 병

- [0084] 라). 백혈구의 ATP 증가
- [0085] - 중간 대사 표지자: PPAR δ , AMPK, PGC-1 α , 미토콘드리아의 산화적 인산화(oxygen consumption rate: OCR), 석신산 탈수소효소 활성(Succinate dehydrogenase activity), CCR 감소, Mannose 수용체 발현 증가
- [0086] - 직접 효과: 항염증 작용
- [0087] - 타겟질환: 만성 폐쇄성 폐질환, 폐 섬유화증, 죽상동맥경화성 혈관질환-심근경색, 협심증, 뇌경색, 만성 염증성 질환, 악성 종양
- [0089] 마). 미토콘드리아 산화기능 증가
- [0090] - 중간 대사 표지자: 미토콘드리아의 산화적 인산화(oxygen consumption rate: OCR), 석신산 탈수소효소 활성 증가,
- [0091] - 직접 효과: 세포에너지 충전
- [0092] - 타겟질환: 미토콘드리아 기능저하성 질병
- [0094] 바). 피부 케라틴 세포(HaCaT)의 IL-17A 발현의 감소
- [0095] - 중간 대사 표지자: PPAR δ , AMPK, PGC-1 α , 미토콘드리아의 산화적 인산화(oxygen consumption rate: OCR), 석신산 탈수소효소 활성
- [0096] - 직접 효과: 피부 염증 유도 사이토카인 발현의 감소로 인한 항염증작용
- [0097] - 타겟질환: 건선, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염등의 만성 피부염
- [0099] 또 다른 측면에서 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약물 내성 및 약물 부작용이 감소된 체중 조절 및/또는 체중 경감용 약학 조성물을 제공한다.
- [0101] 다음은 본 발명에 따른 용어와 여러 가지 치환기의 정의를 설명한다.
- [0102] 본 발명에서 사용된 용어 " C_6-C_{15} 아릴기"는 단일링(예를 들면 페닐) 또는 복수의 축합링(예를 들면 나프틸)을 갖는 탄소원자수 6 내지 15의 불포화 방향족 고리화합물을 의미한다. 상기 아릴은 페닐, 나프틸 등을 포함한다.
- [0103] 상기 헥테로 아릴기는 고리 구성 원자 중 1개 내지 4개의 상이한 원자가 존재하는 고리 화합물을 의미하는 것으로, 상기 상이한 원자는 질소, 산소, 또는 황일 수 있으며, 예를 들어 퓨란, 벤조퓨란, 피롤, 사이아졸 등과 같은 기능기를 예로 들 수 있다.
- [0104] 본 발명에서 사용된 용어 " C_1-C_7 알킬"은 탄소원자수 1 내지 7의 1가 알킬기를 의미한다. 이 용어는 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, tert-부틸, n-헥실 등과 같은 기능기를 예로 들 수 있다. 본 발명에 기재된 알킬, 및 그 외 알킬 부분을 포함하는 치환체는 직쇄 또는 분쇄 형태를 모두 포함한다.
- [0105] 본 발명에서 사용된 용어 " C_1-C_7 알콕시"는 -OR기를 의미하며, 여기서 R은 " C_1-C_7 알킬"을 의미한다. 바람직한 알콕시기는 예를 들면, 메톡시, 에톡시, 페녹시 등을 포함한다. 본 발명에 기재된 알킬, 알콕시 및 그 외 알킬 부분을 포함하는 치환체는 직쇄 또는 분쇄 형태를 모두 포함한다.
- [0106] 본 발명에서 사용된 용어 " C_7-C_{13} 아릴알킬"은 벤질, 페닐에틸 등을 포함하는 아릴 치환체를 갖는 알킬기를 의미하는 것이다.
- [0107] 본 발명의 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다.

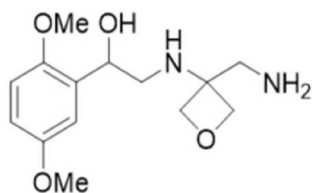
- [0108] 본 발명에서 사용되는 용어 "염"은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.
- [0109] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0110] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0111] 또한, 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.
- [0112] 본 발명에서 "예방"이란, 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 ATP 감소를 억제하거나 ATP 증가가 필요한 질환을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 ATP 생성 증가 또는 그에 따른 ATP 증가가 필요한 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0113] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 미도르린 신약으로 제공하며, 상기 신약을 개체에 투여하여 ATP 증가가 필요한 질환 및/또는 피부 염증 질환의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0114] 또한, 본 발명은 상기 신약을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 체중 조절 및/또는 체중 경감 방법을 제공하며, 본 발명의 체중 조절 및/또는 체중 경감 방법은 개체를 이루는 각 세포(특히, 골격근 세포, 심근 세포, 및 백혈구 세포)의 대사 능력 및 기능(미토콘드리아의 기능 및 ATP 생성량)을 향상시켜 개체의 체중 증가를 억제하거나 그 감소를 유도하는 것으로서 약물에 대한 내성 및 부작용이 없다.
- [0115] 따라서, 본 발명은 상기 신약, 즉 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공할 수 있으며, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염은 체중 조절 및/또는 체중 경감을 목적으로 식품에 첨가될 수 있다. 본 발명에 있어서 식품은 기능성 식품 및 건강기능성 식품을 포함하는 의미이다. 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염을 식품 첨가물로 사용할 경우 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강, 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0116] 또한, 본 발명은 구체적인 실시예를 통하여 피부 케라틴 세포(HaCaT)에 DNCB 또는 SDS를 처리하여 HaCaT 세포에서 IL-17A의 발현이 증가됨을 확인하였으며, DNCB 또는 SDS를 본 발명의 신약과 병용 처리하는 경우 IL-17A의 발현 증가 폭이 현저하게 낮음을 확인하였는바, 본 발명의 신약은 SDS 및 DNCB와 같이 피부 장벽의 손상과 피부 염증을 야기하는 유해물질로부터 피부 장벽을 보호하고 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료가 가능함을 알 수 있었다.

- [0117] 아울러, SDS 및 DNCB는 일상에서 쉽게 접촉할 수 있는 계면활성제 및 유기용매로서 본 발명의 신약은 피부 장벽 보호 기능과 함께 피부 염증 질환을 예방 또는 개선을 목적으로 화장품 조성물에 포함될 수 있다. 이 경우에 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 피부 각질세포에서 염증성 사이토카인의 발현 증가를 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 피부 염증 질환 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 피부의 물리적 장벽을 이루고 있는 각질세포(Keratinocyte 등을 포함)의 염증성 사이토카인(IL-17A 등을 포함)의 발현 증가를 억제하거나 피부 염증 질환과 관련된 파라미터, 예를 들어 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0118] 한편, 본 발명에서 "개체"란 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 ATP의 증가가 필요하거나, 체중 조절 및/또는 경감이 필요하거나, 피부 염증 질환의 예방 또는 치료가 필요한 인간을 의미한다.
- [0119] 본 발명에 따른 화장품 조성물의 제형은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 또는 바디클렌저의 형태일 수 있다.
- [0120] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0121] 본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0122] 본 발명의 약제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0123] 구체적으로 본 발명의 약제학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0124] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 ATP 증가가 필요한 질환의 치료 방법을 제공한다. 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse, 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0125] 본 발명의 실시예 4-6에서는 ATP 생성 증가 효과를 확인하였고, 혈관에서 혈압 강하 효과를 확인하였는 바, 본 발명의 유도제는 ATP의 증가가 필요한 질환의 치료 및 예방에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.
- [0127] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0129] [실시예]

[0130] 실시예 1: 화합물 합성

[0131] 1-1: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올 합성 [sanmido-0571001]

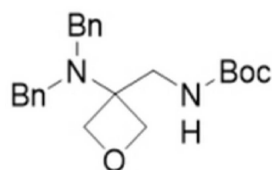
[0132] [화학식 1-1]



[0133]

[0134] 단계 1: tert-부틸((3-(다이벤질아미노)옥세탄-3-일)메틸)카바메이트

[0135] [화학식 1-1-1]

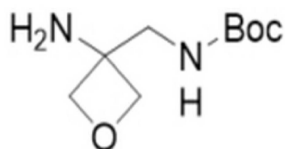


[0136]

[0137] 둥근 바닥 플라스크에 3-(아미노메틸)-N,N-다이벤질옥세탄-3-아민(1.0 g, 3.54 mmol)을 넣고, 테트로하이드로퓨란(20 mL)을 넣어 녹인다. 소듐카보네이트(1.05 g, 10.6 mmol)을 증류수(6 mL) 녹여 0 °C에서 첨가한다. 0 °C에서 10분 간 교반한 후, 다이-tert-부틸 다이카보네이트(864 mg, 4.25 mmol)을 첨가한다. 상온 4 시간 동안 교반한 후, 반응액을 에틸아세테이트와 물을 이용하여 추출하였다. 모아진 유기층을 무수 황산 마그네슘으로 건조하고 농축하였다. 잔사를 관 컬럼크로마토그래피(20% 에틸아세테이트/헥세인)로 정제하여 목적화합물(1.0 g, 72%)을 얻었다. LCMS(ESI) m/z 383 [M + H]⁺.

[0139] 단계 2: tert-부틸((3-(아미노옥세탄-3-일)메틸)카바메이트

[0140] [화학식 1-1-2]

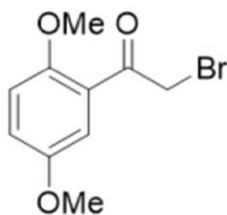


[0141]

[0142] 둥근 바닥 플라스크에 tert-부틸((3-(다이벤질아미노)옥세탄-3-일)메틸)카바메이트(1.0 g, 2.61 mmol)을 넣고, 메탄올(10 mL)을 가하여 녹였다. 그 후 Pd/C(100 mg)을 첨가하고, 수소 풍선을 이용하여 수소 기체를 가압하였다. 6시간 교반한 후, 셀라이트 패드를 통과시켜 여과하고, 농축하였다. 그 후, 다이클로로메세인과, 에틸이썬을 사용하여 씻어주어서 목적 화합물(400 mg, 76%)을 얻었다. LCMS(ESI) m/z 203 [M + H]⁺.

[0144] 단계 3: 2-브로모-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올

[0145] [화학식 1-1-3]

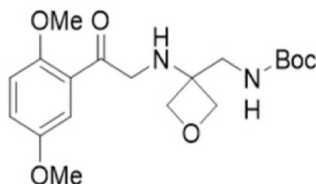


[0146]

[0147] 둥근 바닥 플라스크에 2,5-다이메톡시 아세트페논(1.0 g, 5.55 mmol)을 넣고, 에탄올(25 mL)을 가하여 녹인다. 상온에서 쿠퍼(II)브로마이드(2.0 g, 1.61 mmol)을 첨가한 후, 60 oC에서 24 시간 동안 교반하였다. 셀라이트 패드를 통과시켜 여과한 후, 다이클로로메세인과 싸이오황산나트륨 용액을 사용하여 추출하였다. 모아진 유기층을 무수 황산 마그네슘으로 건조하고 농축하였다. 잔사를 관 컬럼크로마토그래피(10% 에틸아세테이트/헥세인)로 정제하여 목적화합물(850 mg, 60%)을 얻었다. LCMS(ESI) m/z 259 [M + H]⁺.

[0149] 단계 4: tert-부틸((3-((2-(2,5-다이메톡시페닐)-2-옥소에틸)아미노)옥세탄-3-일)메틸)카바메이트

[0150] [화학식 1-1-4]

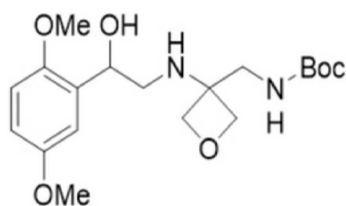


[0151]

[0152] 둥근 바닥 플라스크에 tert-부틸((3-아미노옥세탄-3-일)메틸)카바메이트(100 mg, 0.49 mmol)을 넣고, 아세트나이트릴(5 mL)을 가하여 녹였다. 2-브로모-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-온(125 mg, 0.5 mmol)을 아세트나이트릴(2 mL)에 녹여 0 oC에서 천천히 첨가하고, 다이아이소프로필에틸아민(0.14 mL, 1 mmol) 하였다. 3 시간 동안 상온에서 교반한 후, 반응액을 에틸아세테이트와 물을 이용하여 추출하였다. 모아진 유기층을 무수 황산 마그네슘으로 건조하고 농축하였다. 잔사를 관 컬럼크로마토그래피(50% 에틸아세테이트/헥세인)로 정제하여 목적화합물(760 mg, 40%)을 얻었다. LCMS(ESI) m/z 381 [M + H]⁺.

[0154] 단계 5: tert-부틸((3-((2-(2,5-다이메톡시페닐)-2-하이드록시에틸)아미노)옥세탄-3-일)메틸)카바메이트

[0155] [화학식 1-1-5]

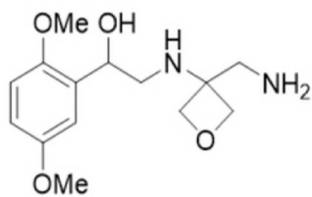


[0156]

[0157] 둥근 바닥 플라스크에 tert-부틸((3-((2-(2,5-다이메톡시페닐)-2-옥소에틸)아미노)옥세탄-3-일)메틸)카바메이트(50 mg, 0.13 mmol)을 넣고, 메탈올(5 mL)을 가하여 녹였다. 소듐보로하이드라이드(12 mg, 0.3 mmol)을 0℃에서 천천히 첨가한 후, 20분 동안 상온에서 교반한 후 포화 암모늄클로라이드 수용액(2 mL)을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응액을 에틸아세테이트와 물을 이용하여 추출하였다. 모아진 유기층을 무수 황산 마그네슘으로 건조하고 농축하였다. 잔사를 관 컬럼크로마토그래피(50% 에틸아세테이트/헥세인)로 정제하여 목적화합물(35 mg, 78%)을 얻었다. LCMS(ESI) m/z 383 [M + H]⁺.

[0159] 단계 6: 2-((3-((3-아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올

[0160] [화학식 1-1]



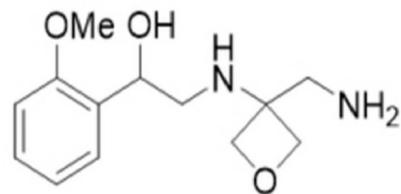
[0161]

[0162] 둥근 바닥 플라스크에 tert-부틸((3-((2-(2,5-다이메톡시페닐)-2-하이드록시에틸)아미노)옥세탄-3-일)메틸)카바메이트(20 mg, 0.05 mmol) 을 넣고, 다이클로로메세인 1 mL을 가하여 녹였다. 4 N HCl-1,4-다이옥세인 용액(1 mL)을 첨가한 후, 상온에서 30 분 동안 교반하였다. 반응액을 농축한 후 메탈올과 에틸이써로 씻어주어 목적화합물(11 g, 66%), 을 얻었다. LCMS(ESI) m/z 283 [M + H]⁺.

[0163] 상기 제조된 화합물을 NMR 분석한 결과를 도 5에 나타내었다. 상기 NMR 분석에 사용한 분석 장비는 Bruker 400MHz FT-NMR이고, 분석용매는 메탄올, 주파수 400MHz으로 하여 분석을 진행하였다.

[0165] 1- 2: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2-메톡시페닐)에탄-1-올

[0166] [화학식 1-2]



[0167]

[0168] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(2,5-다이메톡시페닐)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 253 [M + H]⁺.

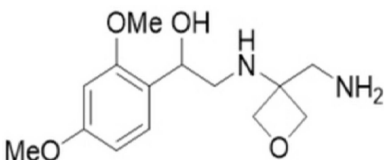
[0169] 상기 제조된 화합물을 NMR 분석한 결과를 하기에 나타내었다(도 6).

[0170] ¹H NMR: ES13771-29-P1B (Bruke, 400 MHz, DMSO-d₆)

[0171] δ 10.49 (s, 1H), 79.67 (s, 1H), 8.57 (s, 2H), 7.50-7.52 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.30-7.34 (m, 1H), 7.00-7.04 (m, 2H), 6.03 (s, 1H), 5.24 (s, 1H), 4.66-4.77 (m, 4H), 3.83 (s, 3H), 3.51 (s, 2H). 3.07-3.19 (m, 2H)

[0173] 1-3: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4-다이메톡시페닐)에탄-1-올

[0174] [화학식 1-3]



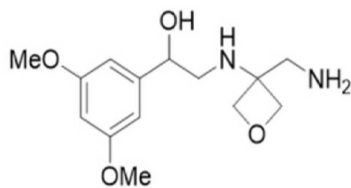
[0175]

[0176] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(2,4-다이메톡시페닐)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 283 [M + H]⁺.

[0177] 상기 제조된 화합물을 NMR 분석한 결과를 도 7에 나타내었다. 상기 NMR 분석에 사용한 분석 장비는 Bruker 400MHz FT-NMR이고, 분석용매는 메탄올, 주파수 400MHz으로 하여 분석을 진행하였다.

[0179] 1-4: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(3,5-다이메톡시페닐)에탄-1-올

[0180] [화학식 1-4]



[0181]

[0182] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(3,5-다이메톡시페닐)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 283 [M + H]⁺.

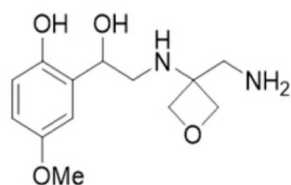
[0183] 상기 제조된 화합물을 NMR 분석한 결과를 하기에 나타내었다(도 8).

[0184] ¹H NMR: ES13771-17-P1D (Bruke, 400 MHz, CD₃OD)

[0185] δ 6.65-6.67 (t, J = 4 Hz, 2H), 6.44-6.46 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 5.00-5.02 (m, 1H), 4.90-4.95 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 4.73-4.79 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.64-3.75 (m, 2H), 3.36-3.37 (m, 1H), 3.20-3.23 (m, 1H).

[0187] 1-5: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-하이드록시에틸)-4-메톡시페놀

[0188] [화학식 1-5]

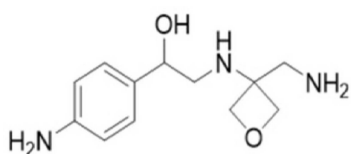


[0189]

[0190] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(2-하이드록시-5-메톡시페닐)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 269 [M + H]⁺.

[0192] 1-6: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(4-아미노페닐)에탄-1-올

[0193] [화학식 1-6]



[0194]

[0195] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(4-아미노페닐)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 238 [M + H]⁺.

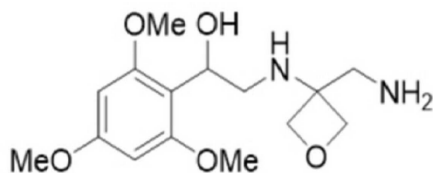
[0196] 상기 제조된 화합물을 NMR 분석한 결과를 하기에 나타내었다(도 9).

[0197] ¹H NMR: ES13736-34-P1E (Bruke, 400 MHz, CD₃OD)

[0198] δ 7.71 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.45 (d, J=8.4 Hz, 2H), 5.12-5.16 (m, 1H), 4.89-4.93 (m, 2H), 4.74 (br t, J =8.4 Hz, 2H), 3.62-3.77 (m, 2H), 3.40-3.43 (m, 1H), 3.19-3.28 (m, 1H).

[0200] 1-7: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(2,4,6-트라이메톡시페닐)에탄-1-올

[0201] [화학식 1-7]

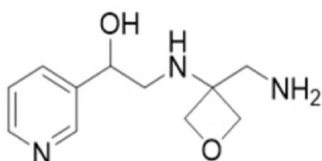


[0202]

[0203] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(2,4,6-트라이메톡시페닐)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 313 $[M + H]^+$.

[0205] 1-8: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(피리딘-3-일)에탄-1-올

[0206] [화학식 1-8]

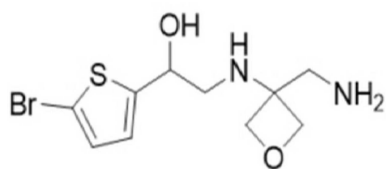


[0207]

[0208] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(피리딘-3-일)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 224 $[M + H]^+$.

[0210] 1-9: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(5-브로모사이오펜-2-일)에탄-1-올

[0211] [화학식 1-9]

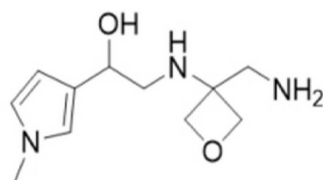


[0212]

[0213] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(5-브로모사이오펜-2-일)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 308 $[M + H]^+$.

[0215] 1-10: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(1-메틸-1H-피롤-3-일)에탄-1-올

[0216] [화학식 1-10]

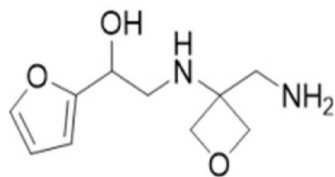


[0217]

[0218] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(1-메틸-1H-피롤-3-일)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 226 $[M + H]^+$.

[0220] 1-11: 2-((3-(아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(퓨란-2-일)에탄-1-올

[0221] [화학식 1-11]

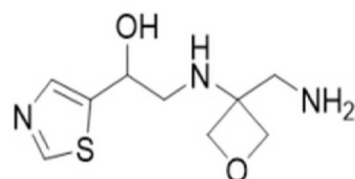


[0222]

[0223] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(퓨란-2-일)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 213 $[M + H]^+$.

[0225] 1-12: 2-((3-((아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(사이아졸-5-일)에탄-1-올

[0226] [화학식 1-12]

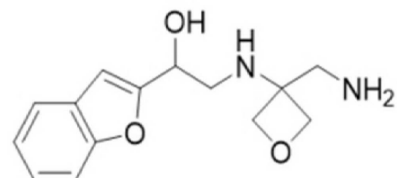


[0227]

[0228] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(사이아졸-5-일)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 230 $[M + H]^+$.

[0230] 1-13: 2-((3-((아미노메틸)옥세탄-3-일)아미노)-1-(벤조퓨란-2-일)에탄-1-올

[0231] [화학식 1-13]



[0232]

[0233] 단계 3에서 2,5-다이메톡시 아세트페논 대신 1-(벤조퓨란-2-일)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 합성 방법은 실시예 1과 같다. LCMS (ESI) m/z 263 $[M + H]^+$.

[0235] 실시예 2: 실험 방법

[0236] 2-1) C2C12, H9C2, HUVEC, Raw264.7 세포 배양법

[0237] C2C12(mouse skeletal cell line), H9C2(rat cardiac muscle cell line), Raw264.7(mouse macrophage cell line) 세포들은 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기 안에서 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotic antimycotic solution (AA)를 함유한 high glucose Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. HUVEC(human umbilical vein endothelial cells)은 혈관 내피 세포 배양용 전용 배지 (Therma사 제품)를 갖고 배양하였다. 그 외 모든 세포배양관련 시약들은 웰진 (Gyeongsangbuk-do, Korea)에서 구입하였다.

[0238] C2C12, H9C2, Raw264.7 세포들을 6 well plate와 96 well plate에 각각 well 당 2.0×10^5 cell 그리고 1.0×10^4 cells씩 분주하여 80~90% 정도 자라면 1% FBS와 1% AA를 포함한 high glucose DMEM 배지를 첨가한 상태에서 미도르린 실험을 10, 30, 50 uM 농도로 처리 후 24시간 동안 배양 후 실험하였다.

- [0239] HUVEC 세포는 96 well plate에 각 well 당 1.0×10^4 cells씩 분주하여 80 % 정도 자라면 HUVEC 전용 배지를 첨가한 상태에서 미도드린 신약을 10, 30, 50 μM 농도로 처리 후 24시간 동안 배양 후 실험하였다.
- [0241] 2-2) 세포 생존율 실험 (Cell viability test)
- [0242] 세포 생존율은 cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan)을 사용하여 측정하였다. 세포를 96 well culture plate 에 각 well 당 1.0×10^4 cells씩 분주하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건의 배양기 안에서 24 시간 동안 배양하였다. 미도드린 신약(samido-0571001)을 각각 농도 별로 처리하여 24 시간 동안 배양 후 CCK-8 용액을 well 당 10 μl 씩 첨가하여 3 시간 동안 배양하였다.
- [0243] 배양 후 SpectraMax Plus 384 Microplate Reader (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA)기를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0245] 2-3) Western blot analysis
- [0246] 약물 처리 후 24시간 배양된 세포들을 scraper로 긁어서 모은 뒤에 단백질 추출용액에 20분간 정치하여 단백질을 추출하고 Bradford 시약을 이용하여 정량하였다. 추출한 단백질을 sample buffer와 섞어서 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 끓여준 후 10% polyacrylamide gel에서 전기영동 후 Nitrocellulose membrane으로 단백질을 옮겨주고 (blotting) membrane blocking -> 1차와 2차 항체의 순차적 결합 -> 화학발광시약 (chemiluminescent reagents)을 첨가 후 x-ray film에 감광 -> 현상의 과정을 통해 단백질 발현을 확인하였다.
- [0248] 2-4) 면역세포화학 염색법 (Immunocytochemistry, ICC)
- [0249] 96 well plate에 분주 된 세포를 영하 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 methanol 15 분, 4% formaldehyde (Biosesang)에 5 분 동안 고정하였다. 0.3% H_2O_2 용액에 5 분 동안 반응 시킨 후 PBS로 세척하였다. 0.5% SDS에 10 분 동안 반응 시키고 PBS로 3 회 세척한 후 Blocking solution으로 1 시간 동안 blocking 하였다. CCR2 (Abcam), phosphorylated-eNOS (Invitrogen), AT1R (Novus), mannose receptor (Abcam) 일차항체를 실온에서 1 시간 반응시킨 후 PBS 로 3 회 세척하였다. VECTASTAIN ABC kit는 Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)에서 구입하였다. 이차 항체를 30 분 동안 처리한 다음 PBS로 세척 후 VECTASTAIN ABC reagent를 30 분 동안 처리한 다음 PBS로 세척 후 DAB 용액으로 원하는 정도로 발색이 될 때까지 반응 시킨 후 흐르는 물에 세척하였다. Hematoxylin (Sigma-Aldrich)으로 핵을 염색 한 후에 현미경으로 관찰하였다.
- [0251] 2-5) 산소 소비율 (Oxygen consumption rate) 측정
- [0252] 1. Clean bench 에서 'Cell Culture Microplate' (파란색 패키지)를 꺼내어 각각의 well 에 실험하고자하는 cell 을 seeding 해주었다(한 그룹은 최소 triplicate 이상으로 seeding 하는 것을 권장함). 그리고, well 주변에 있는 8 군데 moat chamber 에 각각 400 μL 씩 총 3,200 μL 의 D.W.를 채워주었다.
- [0253] 2. 80 μL CO_2 culture media/cell 을 well 에 넣고 XF assay 하는 당일까지 다시 CO_2 incubation 하였다. (실험 당일 일반적인 96 well 기준으로 80%-90% confluence 에 해당하는 cell number 의 약 1/3 까지 배양될 수 있도록 seeding 함.)
- [0254] 3. Seeding 되지 않은 well(background well)에는 동일한 양의 culture media 로 채워주었다 (XFp; 80 μL)
- [0255] 4. drug 처리
- [0256] 5. Clean bench 에서 'Sensor Cartridge+Utility Plate' (초록색 패키지)를 꺼내서 'Utility Plate' 가운데 well 에 XF calibrant buffer 200 μL /well 넣고 well 주변 8 군데 moat 에 각각 400 μL 씩 총 3.2mL 의 D.W.를 채우고 'Sensor Cartridge+Spacer'를 다시 덮어 non- CO_2 incubator(37 $^{\circ}\text{C}$) 에서 Overnight 시켰다.
- [0257] 6. CO_2 culture 시 사용한 media 의 carbon source 조성 확인 후 동일한 농도의 D-glucose, Sodium pyruvate

그리고 L-glutamine 을 'XF Base Media'에 첨가하였다.

[0258] - 37℃까지 예열을 한 후 pH 를 7.4 로 보정하였다(NaOH 사용을 권장).

[0259] 7. CO₂ Incubator 에서 incubation 하고 있는 'Cell Culture Microplate'를 꺼내어 준비된 'XF Running Media'로 조심스럽게 2 회 rinse 후 동일 media로 최종 180 μL/well가 되도록 채웠다. (Rinse 시 suction시 잔압 또는 'PIPETTING')

[0260] ; Rinse 시 well 마다 20 μL 씩 남기면서 media 를 교체해주었다(각각의 well 에 들어있는 cell 들이 마르는 것을 방지하기 위함).

[0261] 8. 위와 같이 'XF Running Media'를 채우고 1시간 동안 non-CO₂ incubation 하였다.

[0262] 9. Drug port 에 넣을 drug compound를 준비하였다. ('XF base Media'를 이용하여 재부유 및 희석함.)

[0263] 10. Non-CO₂ Incubator 에 들어있던 'Sensor Cartridge+Utility Plate'를 꺼내서 각각의 drug port 에 준비한 drug 을 해당량만큼 조심스럽게 넣는다.

[0264] 11. 해당 drug가 채워진 'Sensor Cartridge+Utility Plate'를 약 5-10분간 non-CO₂ incubation 한다.

[0266] 2-6) ATP 농도 측정

[0267] 1. holder에 원하는 수의 코팅된 well을 고정하고 첨가하였다.

[0268] 100 μL의 표준 시료 용액과 시료 용액들을 각 well에 첨가하였다. 10 μL의 Balance Solution을 시료가 담긴 wells에 넣는다. blank control well에는 PBS(pH 7.0-7.2) 100 μL를 넣는다.

[0269] 2. 50 μL의 Conjugate 용액을 각 well에 넣은 뒤 (blank control well에는 넣지 않음)37℃ 에서 1시간 동안 배양하였다.

[0270] 3. 반응액을 버린 후 1× wash solution 200 μL를 넣고 세척한다. 이 과정을 다섯 번 반복하였다.

[0271] 4. 50 μL의 Substrate A 와 B 용액을 각 well에 첨가 후 37℃에서 10~15분 동안 반응시켰다.

[0272] 5. 50 μL의 반응 정지액을 첨가 후 micro plate reader기에서 자외선 파장을 450 nm로 설정 후 흡광도를 측정하였다.

[0274] 실시예 3: C2C12 세포에 미도드린 신약을 농도 별도 처리 후 세포생존율 확인

[0275] 50 uM의 농도까지는 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가하였고 150 uM의 고농도까지 세포 생존율에 변화가 없었다(도 10). 따라서, 본 발명의 미도드린 신약을 사용하여도 약물 부작용이 나타나지 않을 것이라는 점을 확인할 수 있었다.

[0277] 실시예 4: 골격근 세포의 미토콘드리아 기능 개선과 ATP 생성 증가 효과

[0278] C2C12 세포에 미도드린 신약(sanmido-0571001) 30 uM 처리 후 산소 소비율을 측정하였다. 30 uM의 미도드린 신약을 24시간 처리 후 산소 소비율이 대조군에 비해 소폭 증가하였다(도 11).

[0279] C2C12 세포에 미도드린 신약을 10, 30, 50 uM 농도로 처리 후 ATP 농도를 측정하였다. 미도드린 신약 30 uM 처리 실험군이 대조군에 비해 세포 내 ATP 농도가 증가하였다(도 12).

[0280] 상기 결과를 통해, 본 발명의 미도드린 신약은 골격근 세포에서 ATP의 증가가 필요한 질환의 치료 및 예방에 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0282] 실시예 5: 심근 세포의 미토콘드리아 기능 개선과 ATP 생성 증가 효과

[0283] H9C2 세포에 미도드린 신약을 농도 별도 처리 후 세포생존율 측정하였다. 미도드린 신약은 50 uM까지 세포 생존

율에 변화가 없었고 30 μ M에서 세포생존율이 가장 높게 증가하였다(도 13).

- [0284] H9C2 세포에 미도드린 신약 (sanmido-0571001)을 10, 30, 50 μ M 농도로 처리 후 PPAR δ , AMPK, 및 PGC-1 α 의 발현량 변화를 미도드린(30 μ M)과 비교 확인하였다. 웨스턴 블롯 결과는 도 14와 같다. 미도드린 신약 (sanmido-0571001) 30 μ M 처리군에서 PPAR δ , AMPK, PGC-1 α 단백질 발현량이 대조군에 비해 증가하였다.
- [0285] H9C2 세포에 미도드린 신약 (sanmido-0571001)을 30 μ M 처리 후 산소 소비율을 측정하였다(도 15). 30 μ M의 sanmido-0571001을 24시간 처리 후 산소 소비율이 대조군에 비해 의미 있게 증가하였다.
- [0286] H9C2 세포에 미도드린 신약 (sanmido-0571001)을 10, 30, 50 μ M 농도로 처리 후 ATP 농도를 측정하였다(도 16). 대조군에 비해 미도드린 신약 처리 시 ATP 농도가 증가하는 경향을 보였다.
- [0287] 상기 결과를 통해, 본 발명의 미도드린 신약은 심근 세포에서 ATP의 증가가 필요한 질환의 치료 및 예방에 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0289] **실시예 6: 백혈구의 미토콘드리아 기능 개선과 ATP 생성 증가 효과**

- [0290] Raw264.7 세포에 미도드린 신약 (sanmido-0571001)을 10, 30, 50 μ M 농도로 처리 후 CCR2 (염증 유발 작용)와 mannose receptor (항염증 표지 인자) Immunocytochemistry는 도 17과 같다. 미도드린 신약을 처리 시 대조군에 비해 CCR2는 감소하였고, mannose receptor는 증가하였다.
- [0291] 상기 결과를 통해, 본 발명의 미도드린 신약은 백혈구에서 ATP의 증가가 필요한 질환의 치료 및 예방에 활용될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0293] **실시예 7: 혈관 내피세포의 eNOS 와 angiotensin II의 AT1 수용체에 미치는 효과**

- [0294] HUVECs에 Cholesterol 50 μ M, palmitic acid 50 μ M을 처리한 상태에서 미도드린 신약(sanmido-0571001) 30 μ M 처리 후 p-eNOS (혈관 이완을 통한 혈압 강하 작용)의 Immunocytochemistry는 도 18에 나타내었다.
- [0295] 그 결과, 콜레스테롤과 팔미틱산을 처리시 정상 대조군에 비해 p-eNOS의 단백질 발현이 감소하였으나 미도드린 신약(sanmido-0571001) 처리 시 콜레스테롤과 팔미틱산 처리군보다 증가하였으며, 이를 통해 본 발명의 미도드린 신약에는 혈관을 이완하는 효과가 있음을 알 수 있다.
- [0296] HUVECs에 미도드린 신약(sanmido-0571001)을 10, 30, 50 μ M 농도로 처리 후 AT1R (혈관 수축을 통한 혈압 상승 작용)의 Immunocytochemistry는 도 19에 나타내었다. 미도드린 신약 30 μ M 과 50 μ M 처리군에서 대조군에 비해 AT1R 단백질 발현이 의미 있게 감소하였다.
- [0297] 상기 결과를 통해 본 발명의 신약에 혈압을 강하하는 효과가 있음을 확인할 수 있다.

[0299] **실시예 8: 동맥 혈관의 수축작용에 미치는 효과**

- [0300] 4주령의 실험용 C57BL/6 마우스에서 흉부 대동맥을 적출한 즉시, 혈관내피세포의 손상없이 주변 결합 조직 제거 후 3 mm 절편으로 나누었다. 각각의 절편을 Krebs's solution이 들어있는 챔버에 담근 후 근수축변환기(Mechano-transducer 620M, Denmark)에 연결시켰다. 실험 중 챔버는 온도 37 $^{\circ}$ C, 산소 95%, 이산화탄소 5% 조건이 유지되도록 하였다. 초기 장력을 0.7~0.9 g으로 설정하여 한 시간 동안 안정화 후 각각의 신약을 농도 별(0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M)로 처리하고 15분간 수축 반응을 관찰하였다(도 20).
- [0301] 상기 결과를 통해 본 발명의 신약은 정상적인 혈관을 수축하지 않는 효과가 있음을 확인할 수 있다.

[0303] **실시예 9: 피부세포(HaCaT)에서 SDS와 DNCB 처리후 IL-17A발현에 대한 신약(sanmido-0571001)의 효과**

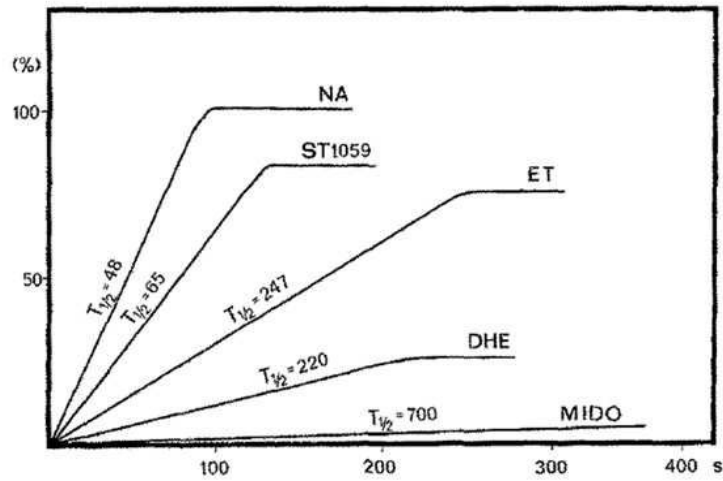
- [0304] 96 well 배양 접시에 세포를 분주한 뒤 10% FBS 및 1% 항생제 함유 배지(DMEM)로써 80% 정도 세포밀집도(cell confluence)를 형성할 때까지 자라게 한 뒤 1% FBS 함유 배지로 배지를 갈아주고 약물(SDS, DNCB, 및/또는 sanmido-0571001)을 처리한 후 24시간 뒤에 실험을 진행하였다. 모든 배양과정은 무균 실험대(클린벤치)에서 진

행하고 세포의 배양은 37℃의 CO₂ 배양기 안에서 하였다.

- [0305] HaCaT 세포주에 처리하는 SDS(sodium dodecyl sulfate)와 DNCB (2,4-Dinitrochlorobenzene)의 적정 농도를 결정하기 위해 96 웰 배양 접시에 세포를 웰당 5000개씩 분주하고 24시간 뒤에 SDS와 DNCB를 각각 5~2000 μM, 그리고 0.5~400 μM로 농도별 처리한 다음 24시간 후 CCK-8 시약을 각 웰 당 10 μl 첨가하고 2시간이 지난 다음 450nm의 파장에서 흡광도를 ELISA reader기를 이용하여 측정하였으며, 세포 생존율을 50% 감소시키는 농도를 적정 처리 농도로 결정하였고 그 농도는 SDS는 50 μM, 그리고 DNCB는 10 μM 이었다. 또한, 미도드린의 경우 적정 처리 농도를 30 μM로 결정하였다. 참고로, SDS(sodium dodecyl sulfate)는 계면활성제로서 피부에 장기간 접촉 시 피부 장벽을 손상시켜 피부를 거칠게 하고 심하면 피부염을 유발할 수 있는 물질이다. DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene)는 일반적으로 접촉성 피부염과 아토피 피부염을 유발한다고 알려진 유기용매이다.
- [0306] DNCB 10 μM 또는 SDS 50 μM 농도를 처리한 피부세포(HaCaT)에 동시에 신약(sanmido-0571001) 30 μM을 24시간 동안 처리 후 단백질을 추출하여 Bradford 방법을 사용하여 단백량을 측정 한 뒤 실험 하였다. 추출한 단백질 10 ug을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide) 전기영동 후 니트로셀룰로오스 멤브레인에 블랏팅한 다음 5% 스킵 밀크 용액 (0.05% tween20 함유 TBS (TBS-T)에 용해)으로 실온에서 2시간 또는 4℃에서 12시간 이상 블럭킹(blocking)을 한 후 IL-17A 1차 항체를 2시간 동안 실온에서 결합시켰다. TBS-T로 세척 후 2차 항체를 1시간 동안 실온에서 결합 시킨 뒤 TBS-T 세척을 하고 화학 형광 시약 (chemiluminescent substrate 및 enhancer solutions)을 처리하고 암실에서 x-ray 필름에 감광 시킨 뒤 현상액(developing solution)과 고정액(fixing solution)에 적당한 시간 동안 담가 단백질 발현량을 확인하였다.
- [0307] 도 21은 차례대로 신약(sanmido-0571001) 처리에 따른 IL-17A의 발현양을 보여주는 웨스턴 블랏 결과를 나타낸 것이다. SDS 또는 DNCB만 처리한 경우에 비하여 SDS 또는 DNCB에 sanmido-0571001을 병합 처리한 경우 IL-17A 단백질의 발현양이 두 경우에서 모두 감소 하였다 (도 21).
- [0308] 상기 결과는 피부가 SDS와 DNCB와 같은 유해물질에 노출된 경우 신약(sanmido-0571001)을 유효성분으로 포함하는 약물을 사용함으로써 피부 장벽을 보호하고, 세포대사와 염증 감소를 통해 피부보호 또는 피부 염증 예방 및 치료에 효과를 나타낼 수 있음을 의미한다.
- [0310] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

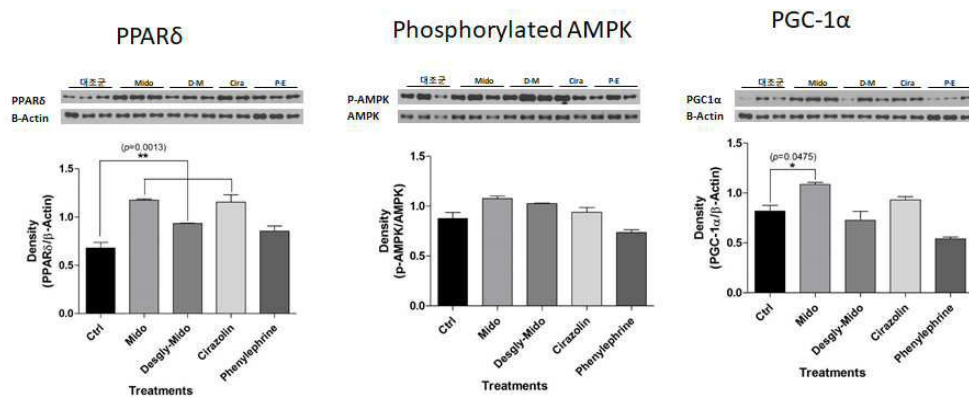
도면1



미도드린(MIDO)와 desglymidodrine(ST1059)의 혈관수축 작용의 비교.
중간유효량(ED50)에 해당하는 단위 투여

도면2

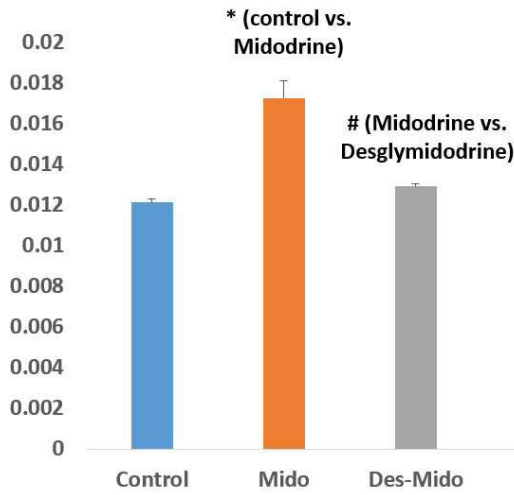
Western blot analysis for the Effect of α 1-adrenergics treatment on
Energetic molecules Expression in C2C12 cells with low glucose media



각각의 Drug 농도: 30μM
Exposure time: 24 hr
Glucose concentration in the culture
media: 5.6mM

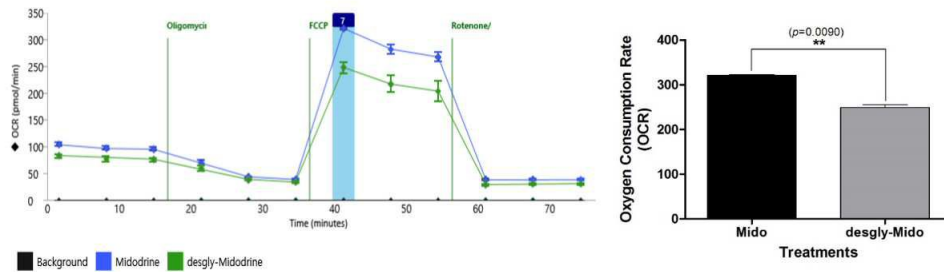
도면3

Midodrine 30uM 및 desglymidodrine 30uM이 24시간 노출된 C2C12 세포에서 석시네이트 탈수소효소활성 분석 결과

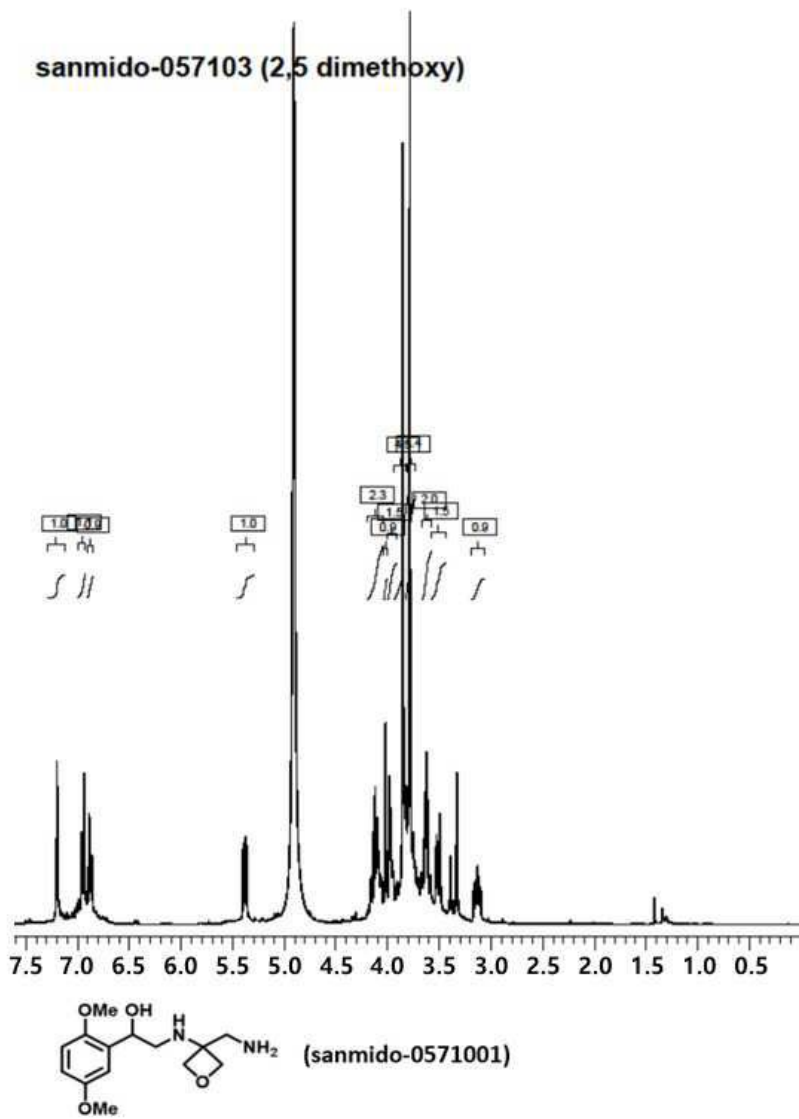


도면4

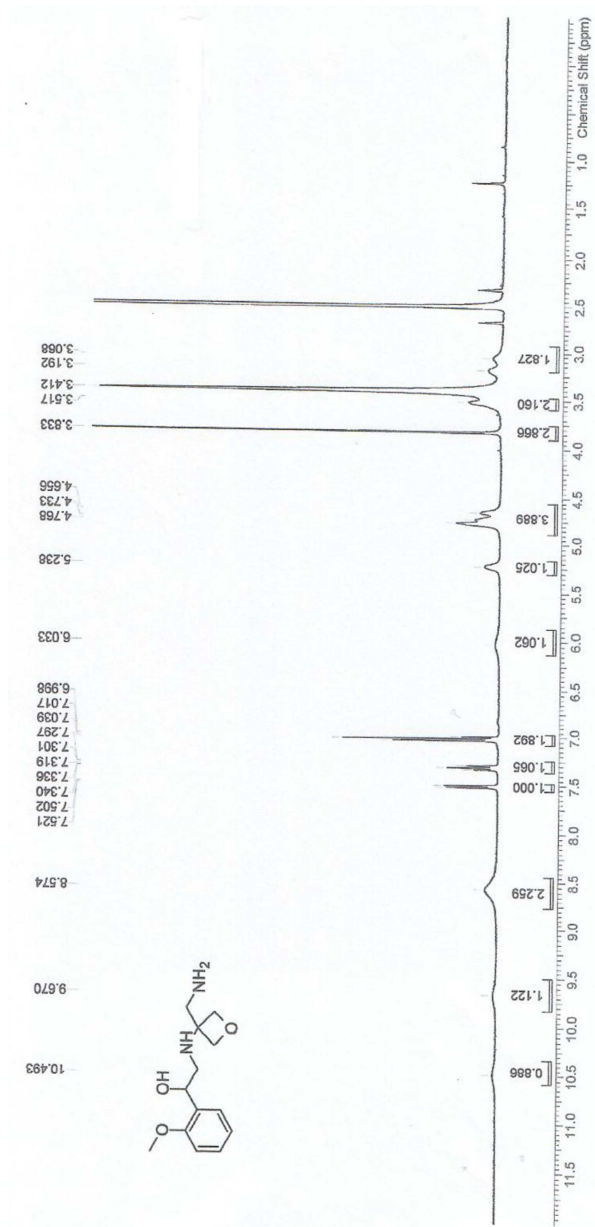
Midodrine 30uM 및 desglymidodrine 30uM에 24 시간 동안 노출시켜 저포도당 농도에서 배양된 C2C12 세포에서의 세포질 미토콘드리아 스트레스 테스트의 OCR 결과



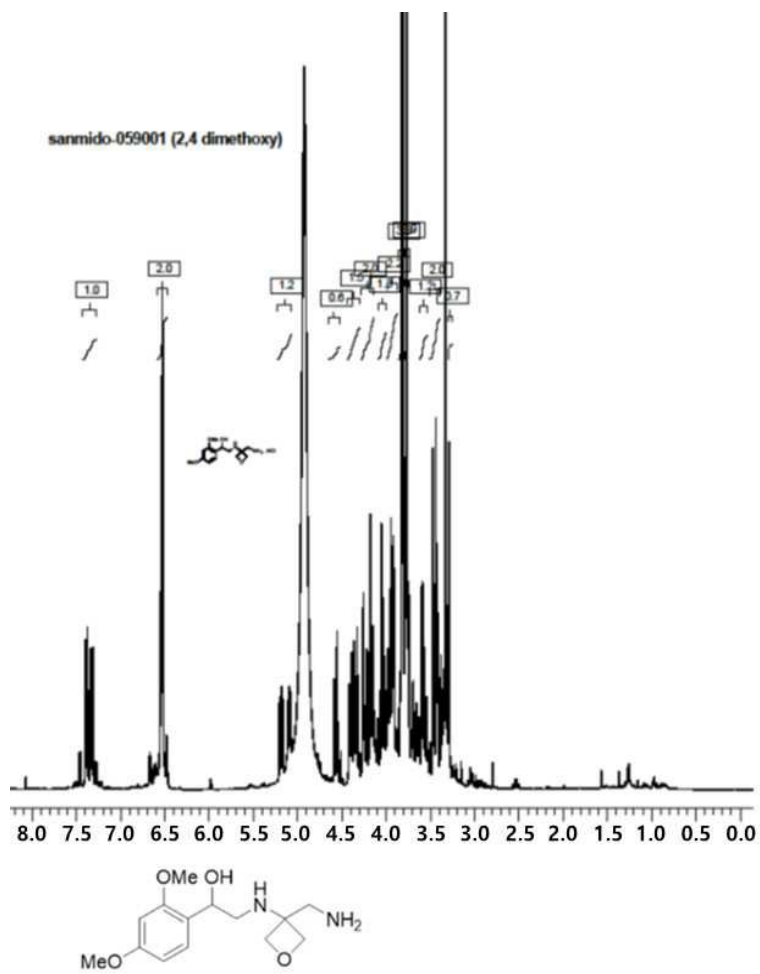
도면5



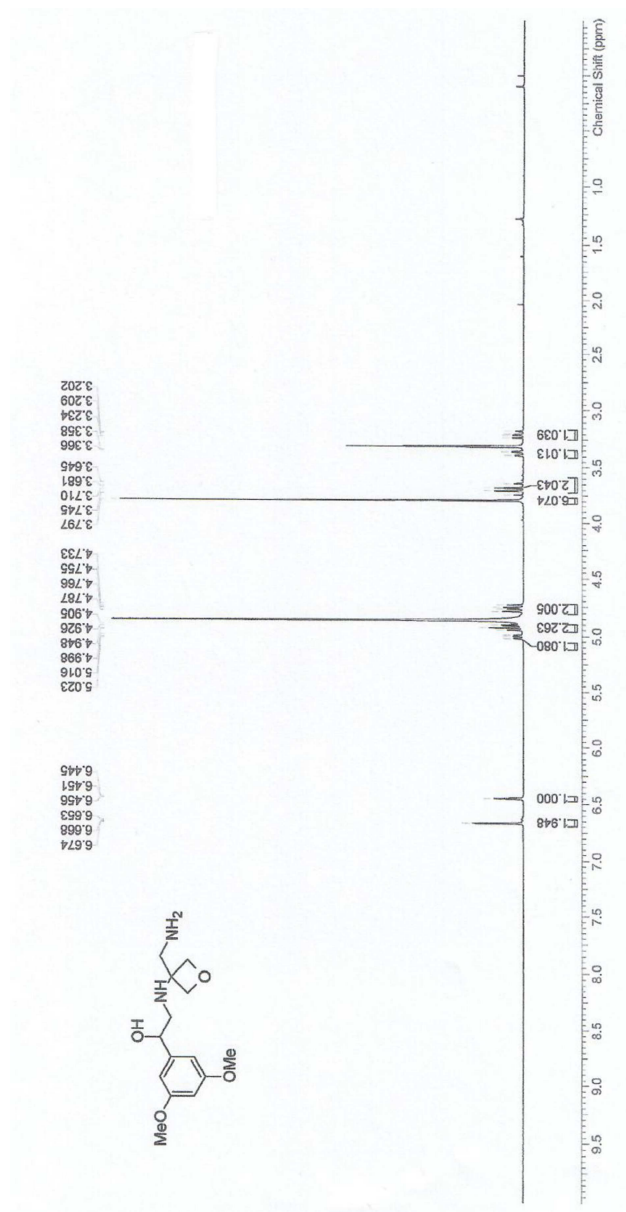
도면6



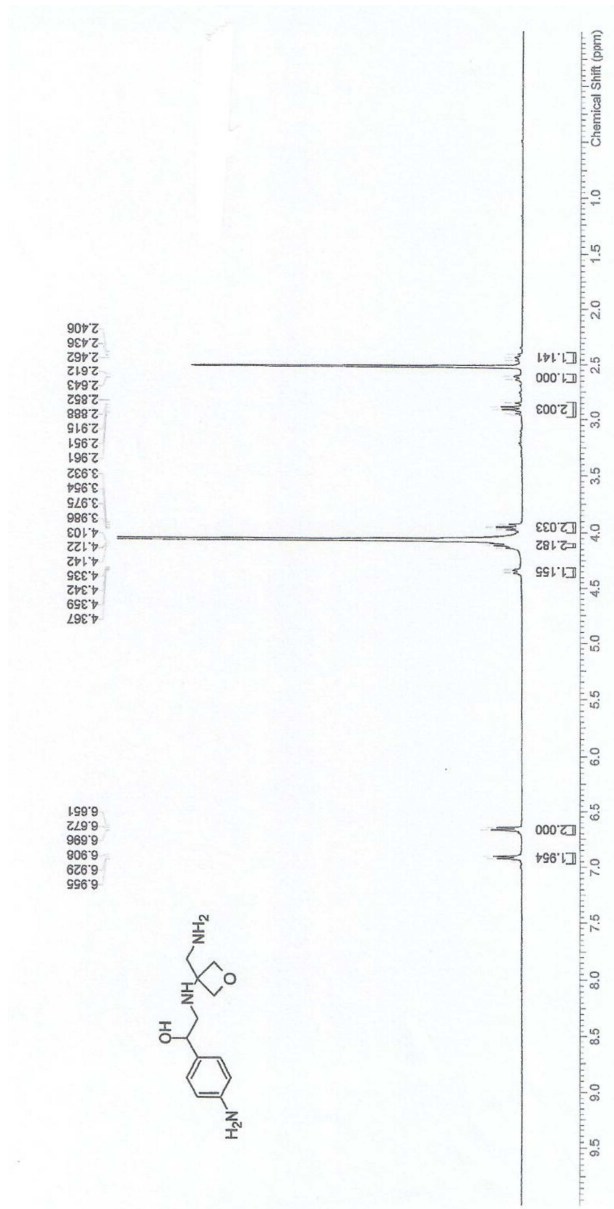
도면7



도면8

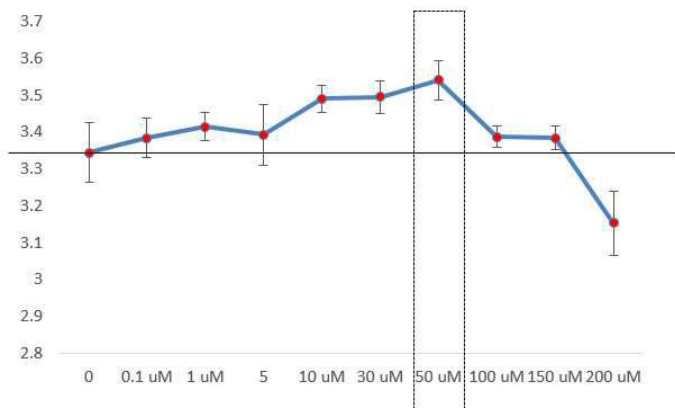


도면9

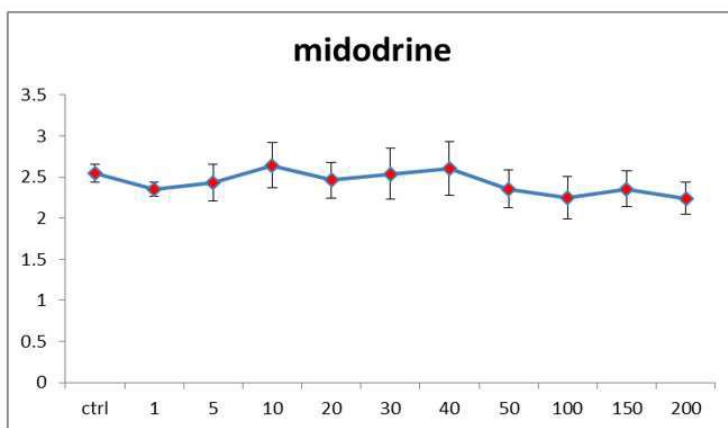


도면10

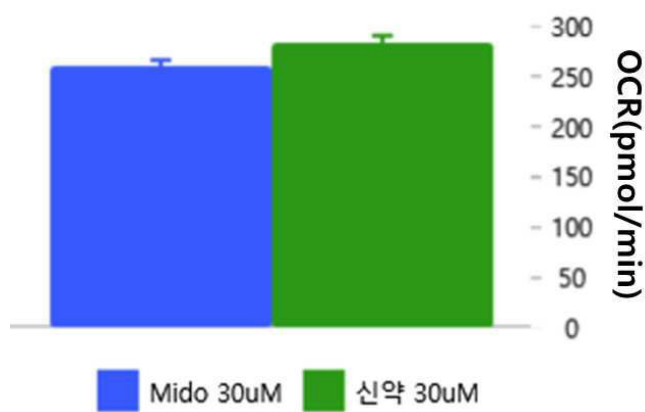
합성된 미도드린 신약으로 처리한 C2C12의 세포생존율 테스트



미도드린으로 처리한 C2C12의 세포생존율 테스트

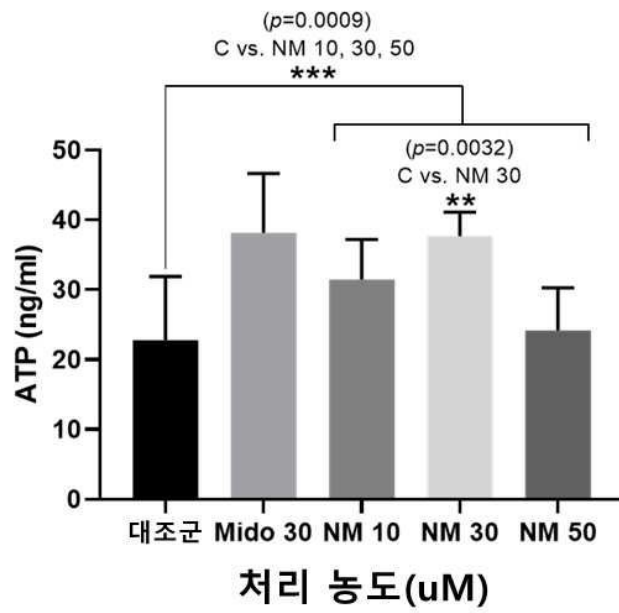


도면11



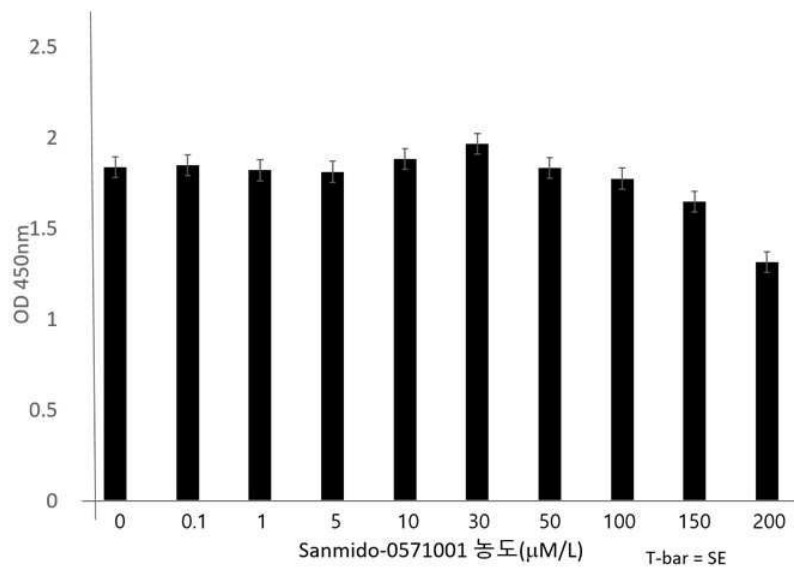
sanmido-0571001 treatment

도면12

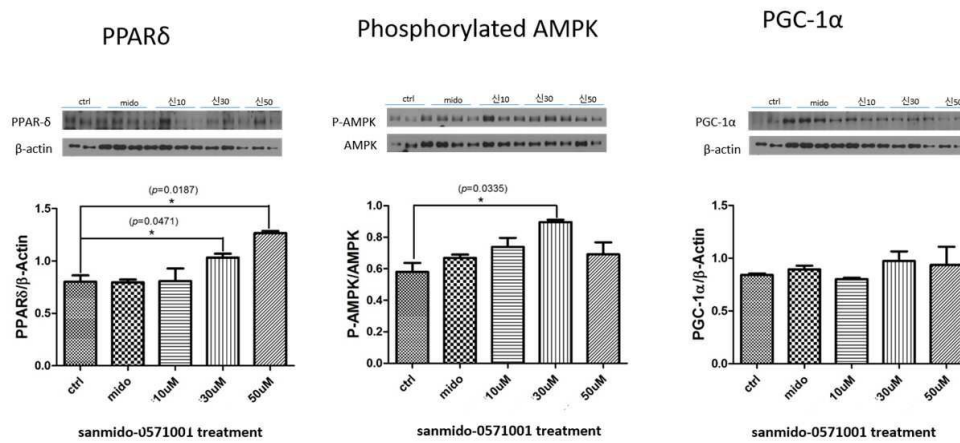


도면13

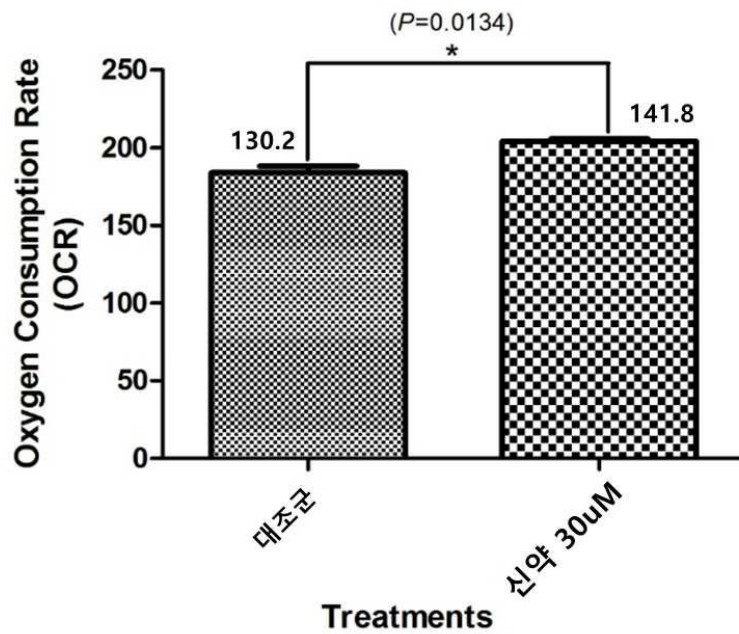
sanmido-0571001 농도에 따른 H9C2의 세포생존율 측정 결과



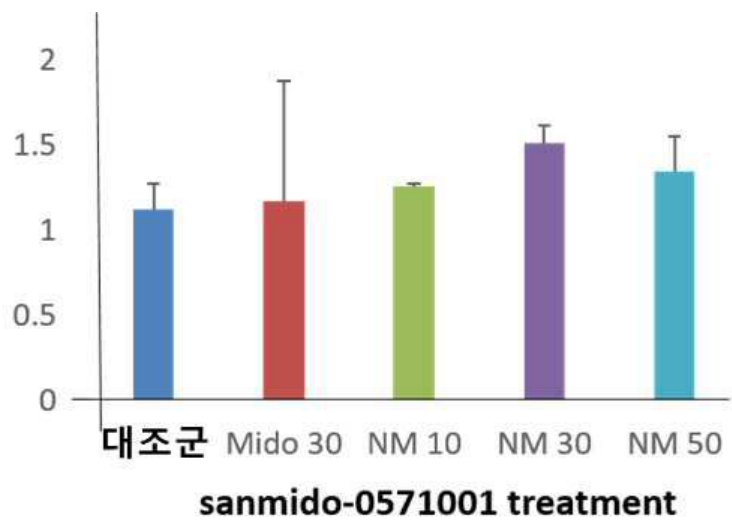
도면14



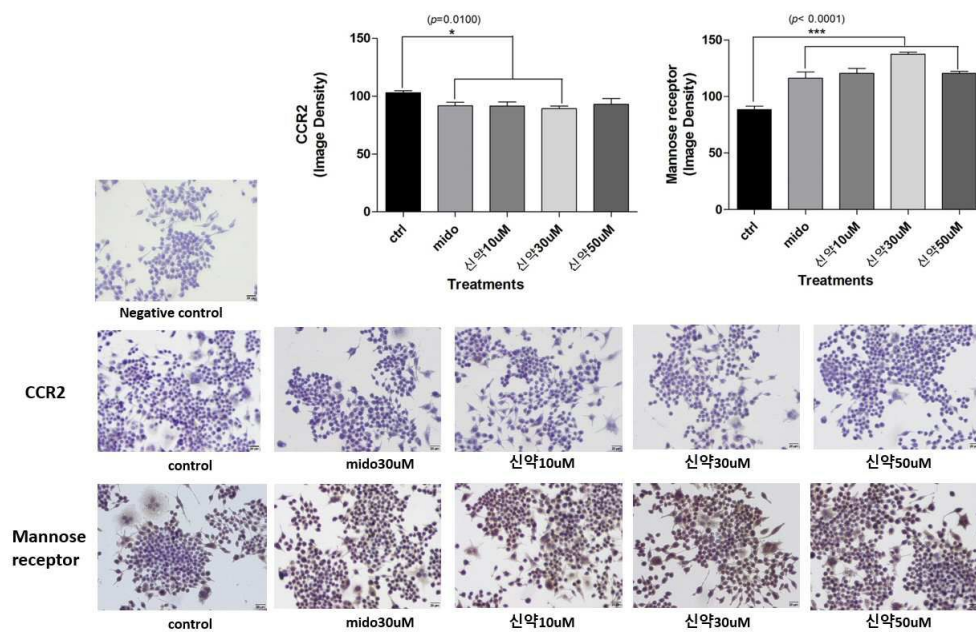
도면15



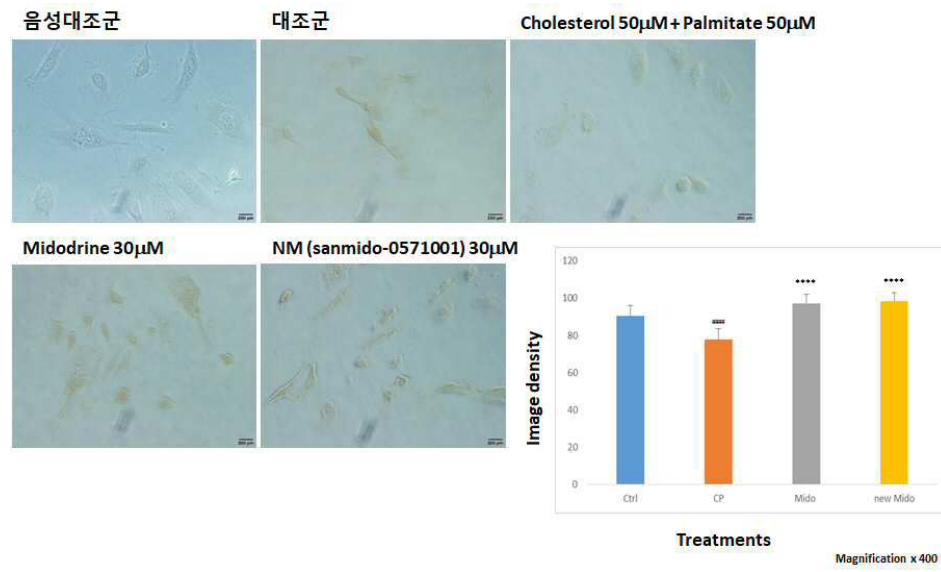
도면16



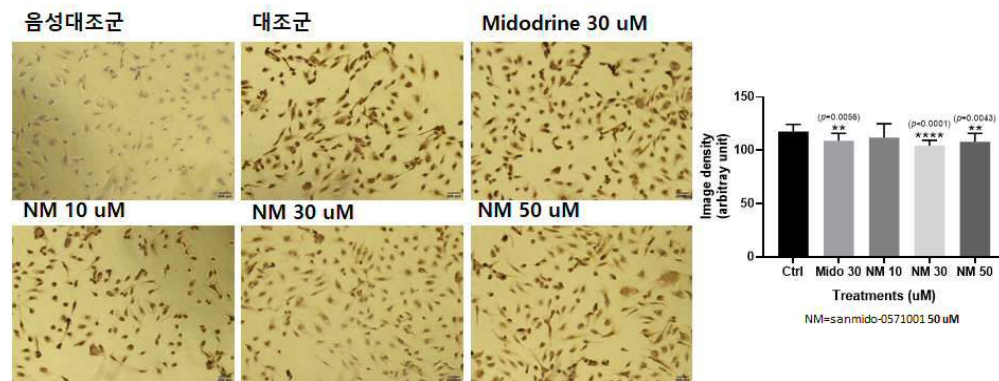
도면17



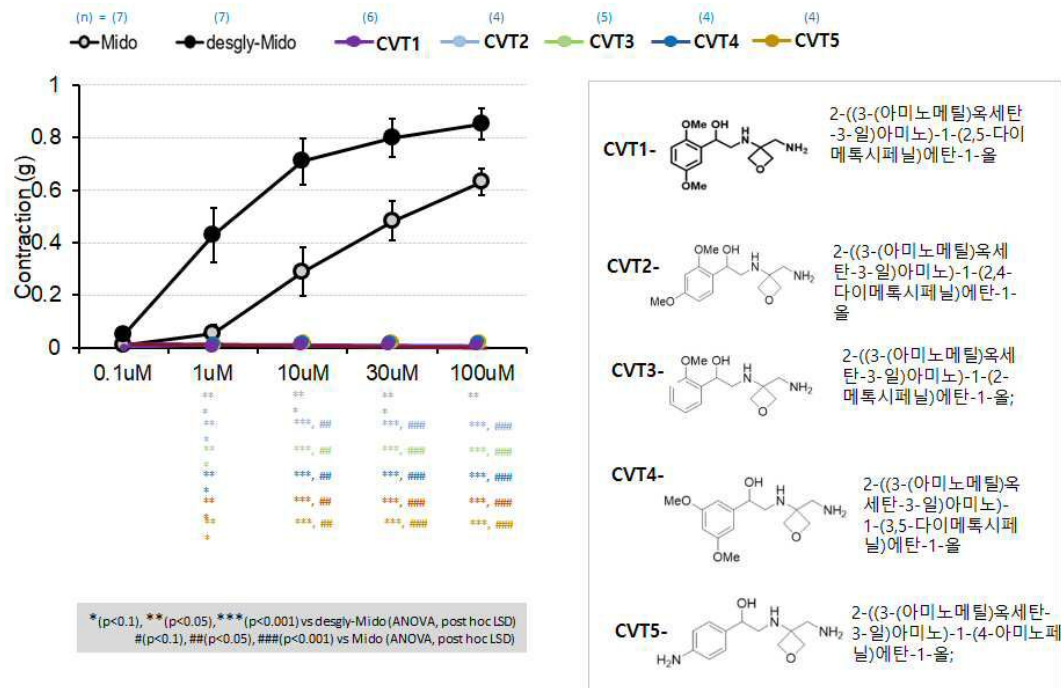
도면18



도면19



도면20



도면21

