(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0072795
(43) 공개일자 2020년06월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/22 (2006.01) *A61K 31/195* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/22 (2013.01)
A61K 31/195 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0160777
(22) 출원일자 2018년12월13일
심사청구일자 2018년12월13일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
손기훈
서울특별시 서대문구 수색로 100, 308동 1302호(북가좌동, DMC래미안e편한세상)
정종화
대구광역시 수성구 무열로 143(만촌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

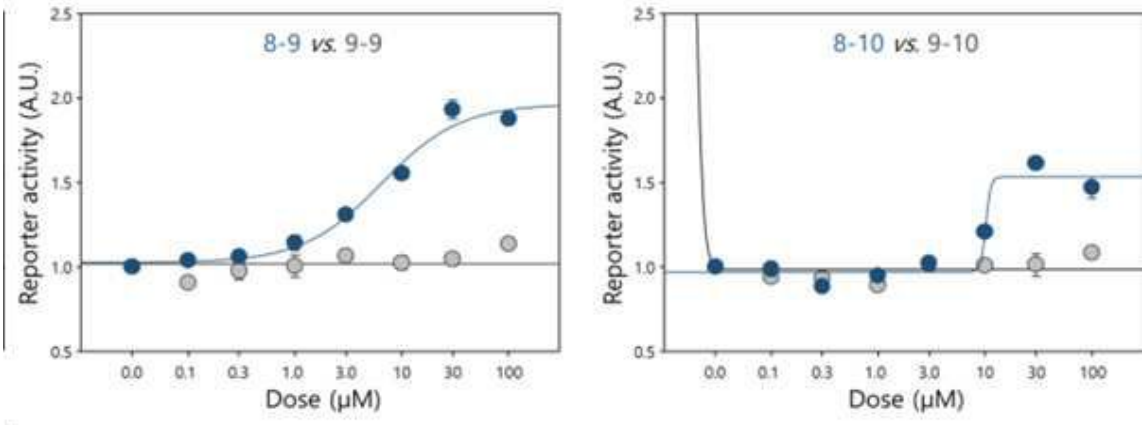
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **옥시이미노메틸벤젠 유도체를 유효성분으로 포함하는 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 옥시이미노메틸벤젠(Oxyiminomethylbenzene) 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 일주기 연관성 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 3/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자
차효경
충청북도 청주시 상당구 월평로253번길 110, 206동 303호(용암동, 동산빌리지)
임혜영
서울특별시 동대문구 장한로8길 23-9(장안동)
김민준
대구광역시 달서구 상화로58길 86(도원동, 롯데캐슬레이크)
최고영
대구광역시 달서구 죽전1길 18-2(죽전동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711073081
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오, 의료기술개발
연구과제명 일주기 생체시계 기반 식이/비만 조절물질 개발 및 향정신성 부작용 평가
기 여 율 1/3
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.01.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711064755
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발
연구과제명 일주기적 수면 조절 기전 규명 및 활용기술 개발
기 여 율 1/3
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345277818
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)
연구과제명 3급아민을 함유한 핵산 표지 화합물 라이브러리 연구
기 여 율 1/3
주관기관 경북대학교 산학협력단
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

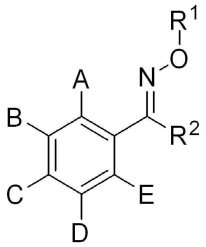
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

R^1은 C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬; C4~C10의 사이클로알킬; 탄소, 산소, 질소, 또는 황이 첨가된 5 내지 7원의 치환 또는 비치환 방향족기, 이때 방향족기는 퓨란일기, 티오펜일기, 페닐기, 티아졸기, 인돌기, 이소인돌기, 피리딘일기, 피페라진일기, 피리다진일기, 나프틸기, 퀴놀린일기, 이소퀴놀린일기를 나타내고, 이때 치환기는 수소, 할로젠, 시아노, 니트로, 하이드록시, C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C1~C10의 알콕시, C1~C10의 할로알킬, C1~C10의 할로알콕시, C1~C10의 알킬티오, C1~C10의 알킬 카보닐 및 C1~C10의 알콕시 카보닐로로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환기를 나타내고;

R^2는 수소원자; C1~C10의 직쇄 또는 분쇄 또는 고리형 알킬기로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기를 나타내며;

A, B, C, D, E는 각각 독립적으로 수소; 할로젠; 시아노; 니트로; 하이드록시; C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬; C1~C10의 알콕시; C1~C10의 할로알킬; C1~C10의 할로알콕시; C1~C10의 알킬티오; C1~C10의 알킬 카보닐; 또는 C1~C10의 알콕시 카보닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기를 나타내고, 이 때 직쇄 또는 측쇄 C1~C10의 알킬 또는 알콕시 카르복시산 또는 이의 에스터를 포함할 수 있다.)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체는

1) 메틸 {3-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

2) {3-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

3) 메틸 (3-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

4) (3-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

5) 메틸 (3-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

6) (3-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

7) 2-{3-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[(피리딘-2-일)메틸]아세트아미드;

8) 2-{3-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[2-(1H-이미다졸-2-일)에틸]아세트아미드;

9) 메틸 (3-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

10) (3-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

11) 메틸 {3-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

12) {3-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

13) 메틸 (3-{(N-[(4-플루오로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

14) (3-{N-[(4-플루오로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

15) 메틸 {4-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

16) {4-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

17) 메틸 (4-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

18) (4-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

19) 메틸 (4-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

20) (4-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

21) 2-{4-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[(피리딘-2-일)메틸]아세트아미드;

22) 2-{4-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[2-(1H-이미다졸-2-일)에틸]아세트아미드;

23) 메틸 (4-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

24) (4-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

25) 메틸 {4-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트; 및

26) {4-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 화합물인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 일주기 연관성 질환은 수면장애, 대사장애, 심혈관 질환, 면역 및 염증성 질환, 기분장애, 중독장애, 퇴행성 뇌질환 또는 암인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 수면장애는 시차증후군, 교대근무 수면장애, 진행성 수면 위상 증후군, 수면 위상 지연 증후군, 호흡관련 수면장애, 하지불안 증후군 또는 렘수면 행동장애인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 대사장애는 비만, 고혈압, 고지혈증, 고혈당증 또는 다뇨증인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 기분장애는 우울증, 양극성 기분장애, 계절성 장애 또는 불안장애인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 또는 치매 질환인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서,

상기 심혈관 질환은 허혈성 심질환, 급성 심근경색, 뇌 경색 또는 심방세동인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서,

상기 암은 대장암, 위암, 전립선암, 유방암, 신장암, 간암, 폐암, 자궁암, 결장암, 췌장암, 난소암 또는 혈액암인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체는 일주기 생체시계 분자 네트워크의 전사 조절인자인 CRYs의 활성의 억제 및 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성 강화를 통해 일주기 생체리듬의 진폭을 강화하고, 주기를 안정화 시키는 것인, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 지구상의 다른 모든 생명체와 마찬가지로 인간 역시 생리적 혹은 행동적인 측면에서 낮과 밤의 변화에 따른 24시간 주기에 맞추어 진 일주기 리듬을 보인다. 가장 잘 알려진 인간의 일주기 행동은 수면이지만, 그 외에도 체온, 식사, 체내 호르몬, 혈당 수치 및 기타 체내 대사 활동 그리고 세포 분열 주기도 이러한 일주기 리듬에 의해 조절된다. 유전적 혹은 환경적인 요인으로 인해 이러한 일주기 리듬이 망가지게 되는 경우, 다양한 생리적 혹은 정신적 이상의 원인이 될 수 있는데 이를 일주기 연관성 질환(Circadian rhythm-related disorder)이라 한다. 특히 산업화된 현대 사회에서는 대다수의 사람들이 과다한 야간 조명, 교대 근무 등의 지나친 야간 활동,

비정상적인 식이 형태 등 다양한 환경적인 생체시계 교란 원인에 노출되어 있으며, 이 때문에 일주기 연관성 질환의 원인과 치료에 대한 연구가 그 중요성을 더해가고 있다.

[0004] 생물은 일주기성 리듬의 제어에 관한 유전자를 가지며, 일주기성 리듬 제어 유전자는 일주기성 리듬을 조절한다. 최근의 연구를 통해 일주기 리듬을 관장하는 생체시계 분자 네트워크가 규명되었다. 포유류의 일주기성 리듬 제어 유전자는, Period (PER) 유전자(Per1, Per2, Per3), CLOCK 유전자, BMAL 유전자(Bmal1, Bmal2), Cryptochrome (CRY) 유전자(Cry1, Cry2), REV-ERB 유전자(Rev-erbα, Rev-erbβ), ROR 유전자(Rora, Rorb, Rorc) 등이 알려져 있으며, 이들은 분자 네트워크를 이룬다. 특히 최상위 단계에서 CLOCK과 BMAL1 단백질의 이합체가 전사인자로서 그 하위 단계에 위치하는 피드백 유전자들인 PER 및 CRY 유전자들의 프로모터에 존재하는 cis-element인 E-box에 결합하여 그 발현을 촉발하고, 해당 유전자 산물들이 상위 단계 전사 인자들을 저해하는 일련의 분자적 순환 구조가 일주기 분자 생체시계의 핵심으로 이를 생체시계 중추고리(Core loop)라고 부른다를 이룬다. 이들 분자 네트워크는 하위에 조절 받는 유전자들의 일주기성을 촉발함으로써 다양한 생리 과정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 1). 또한 이들 일주기 생체시계 유전자의 분자 네트워크는 포유류의 중추 생체시계가 위치한 시상하부의 시신경교차상핵(suprachiasmatic nucleus, SCN)에서 뿐만 아니라 다양한 말초 기관에서 발견되고 있으며, 이들 말초 기관의 세포들 에서도 시신경교차상핵과 유사한 양상으로 독자적인 일주기 리듬을 가지고 주기적으로 발현된다. 이러한 다양한 말초 기관에서 발현되는 생체시계 분자 네트워크를 중추 생체시계에 대비적으로 말초 혹은 국부 생체시계(peripheral or local clock)라고 한다(비특허문헌 1).

[0005] 생체시계가 행동과 생리 전반을 조절하는 범용적인 조절 기구이기 때문에 일주기 연관성 질환의 종류도 수면장애, 암, 대사질환, 심혈관질환, 면역 및 염증질환, 기분장애, 중독장애, 퇴행성 뇌질환 등 매우 광범위하다.

[0006] 실제로 기상과 수면의 정상적인 24시간 리듬을 바꾸어 교대로 근무하는 비상 근무요원 등은 당뇨병과 같은 대사장애를 비롯한 다양한 질환에 걸릴 위험이 노출되어 있으며(비특허문헌 2), 장기적인 교대 근무에 노출되어 있는 간호사들에 대한 역학 연구를 통해 이들의 교대 근무의 횟수와 강도는 유방암의 발병률이 정상인에 비해 높다는 보고가 발표된 바 있다(비특허문헌 3).

[0007] 다양한 환경적, 유전적 생체시계 교란으로 인한 일주기 연관성 질환의 원인 과 치료에 대한 연구가 현재까지 많이 진행되어 왔으며 그 중 하나는 생체시계 핵심 유전자들의 인산화를 통하여 일주기성 리듬을 조절하는 것이다. 포유동물 키나제인 카제인 키나제 Iε (CKIε) 및 카제인 키나제 Iδ (CKIδ)가 생체시계 핵심 유전자를 인산화하여 일주기성 리듬을 조절한다는 것이 알려진 이후, CKI 단백질을 표적으로 하여 일주기 리듬을 조절하는 연구가 진행되어 왔다(비특허문헌 4). 하지만, CKI 유전자를 억제하는 것은 생체시계 분자 네트워크에 직접적인 영향을 미치지 못하기 때문에 그 효과는 미미하다.

[0008] 또 다른 연구로는 생체시계 보조고리(Auxiliary loop)를 구성하는 유전자인 Rev-erbα/β에 대한 연구로서, BMAL1의 발현을 억제시키는 REV-ERBα/β에 대한 효현제(agonist) 및 길항제(antagonist)를 통해 일주기성 리듬을 조정하는 것(비특허문헌 5)으로, REV-ERBα/β의 주요 역할은 생체시계 분자 네트워크에서 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성을 늦추어 시계가 제대로 작동되는데 필요한 미세조정을 하는 역할로 효과적으로 일주기성 리듬을 조정하는 것에는 어려움이 있다.

[0009] 최근 2-에톡시프로피온산 유도체의 일종인 KS15가 CRY 단백질의 억제를 통해 CLOCK:BMAL1 이합체의 전사 활성을 증가시킬 수 있다는 사실이 규명되었고 일주기 분자 생체리듬을 약화시킴이 확인되었다. (비특허문헌 6).

[0010] 따라서, 일주기 리듬의 생리적, 임상적 중요성이 부각된 현 시점에서, 각종 일주기 리듬 연관성 질환의 예방 및 치료를 위해, 보다 직접적이고 효과적으로 생체시계 분자 네트워크를 항진 시킬 수 있는 약물의 개발이 절실한 상황이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Stratmann M, Schibler U. Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. J Biol Rhythms. (2006) 21(6): 494-506.

(비특허문헌 0002) Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. Proc Natl Acad Sci U S A. (2009) 106(11): 4453-4458.

(비특허문헌 0003) Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Colditz

GA. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. J Natl Cancer Inst. (2001) 93(20): 1563-1568.

(비특허문헌 0004) Chen Z, Yoo SH, Takahashi JS. Development and Therapeutic Potential of Small-Molecule Modulators of Circadian Systems. Annu Rev Pharmacol Toxicol. (2018) 58: 231-252.

(비특허문헌 0005) Kojetin DJ, Burris TP. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. Nat Rev Drug Discov. (2014) 13(3): 197-216.

(비특허문헌 0006) Chun SK, Jang J, Chung S, Yun H, Kim NJ, Jung JW, Son GH, Suh YG, Kim K. Identification and validation of cryptochrome inhibitors that modulate the molecular circadian clock. ACS Chem Biol. (2014) 9(3): 703-710.

(비특허문헌 0007) Son GH, Chung S, Choe HK, Kim HD, Baik SM, Lee H, Lee HW, Choi S, Sun W, Kim H, Cho S, Lee KH, Kim K. Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. Proc Natl Acad Sci U S A. (2008) 105(52): 20970-20975.

(비특허문헌 0008) Schirmacher A, Hor H, Heidbreder A, Happe S, Kelsch R, Kuhlenb ä

aumer G, Mei ß a

(비특허문헌 0009) Wisor JP, O'Hara BF, Terao A, Selby CP, Kilduff TS, Sancar A, Edgar DM, Franken P. A role for cryptochromes in sleep regulation. BMC Neurosci. (2002) 3: 20.

(비특허문헌 0010) Trachsel L, Edgar DM, Seidel WF, Heller HC, Dement WC. Sleep homeostasis in suprachiasmatic nuclei-lesioned rats: effects of sleep deprivation and triazolam administration. Brain Res. (1992) 589(2): 253-261.

(비특허문헌 0011) Spiegel K, Tasali E, Leproult R, Van Cauter E. Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. Nat Rev Endocrinol. (2009) 5(5): 253-261.

(비특허문헌 0012) Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. Science. (2005) 308(5724): 1043-1045.

(비특허문헌 0013) Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. Proc Natl Acad Sci U S A. (2008) 105(39): 15172-15177.

(비특허문헌 0014) Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. PLoS Biol. (2004) 2(11): e377.

(비특허문헌 0015) Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, Wada T, Aoyagi T, Tezuka M. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. (2005) 102(34):12071-12076.

(비특허문헌 0016) Bur IM, Cohen-Solal AM, Carmignac D, Abecassis PY, Chauvet N, Martin AO, van der Horst GT, Robinson IC, Maurel P, Mollard P, Bonnefont X. The circadian clock components CRY1 and CRY2 are necessary to sustain sex dimorphism in mouse liver metabolism. J Biol Chem. (2009) 284(14): 9066-9073.

(비특허문헌 0017) Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. Nat Med. (2010) 16(10):1152-1156.

(비특허문헌 0018) Gouin JP, Connors J, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Malarkey WB, Atkinson C, Beversdorf D, Quan N. Altered expression of circadian rhythm genes among individuals with a history of depression. J Affect Disord. (2010) 126(1-2): 161-166.

(비특허문헌 0019) McClung CA, Sidiropoulou K, Vitaterna M, Takahashi JS, White FJ, Cooper DC, Nestler EJ. Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. Proc Natl Acad Sci U S A. (2005) 102(26): 9377-9381.

(비특허문헌 0020) Chung S, Lee EJ, Yun S, Choe HK, Park SB, Son HJ, Kim KS, Dluzen DE, Lee I, Hwang O, Son GH, Kim K. Impact of circadian nuclear receptor REV-ERBα on midbrain dopamine production and mood regulation. Cell. (2014) 157(4): 858-868.

(비특허문헌 0021) Schnell A, Sandrelli F, Ranc V, Ripperger JA, Brai E, Alberi L, Rainer G, Albrecht U. Mice lacking circadian clock components display different mood-related behaviors and do not respond uniformly to chronic lithium treatment. Chronobiol Int. (2015) 32(8): 1075-1089.

(비특허문헌 0022) Moon JH, Cho CH, Son GH, Geum D, Chung S, Kim H, Kang SG, Park YM, Yoon HK, Kim L, Jee HJ, An H, Kripke DF, Lee HJ. Advanced Circadian Phase in Mania and Delayed Circadian Phase in Mixed Mania and Depression Returned to Normal after Treatment of Bipolar Disorder. EBioMedicine. (2016) 11:285-295.

(비특허문헌 0023) Menculini G, Verdolini N, Murru A, Pacchiarotti I, Volpe U, Cervino A, Steardo L, Moretti P, Vieta E, Tortorella A. Depressive mood and circadian rhythms disturbances as outcomes of seasonal affective disorder treatment: A systematic review. J Affect Disord. (2018) 241: 608-626.

(비특허문헌 0024) Hood S, Amir S. Neurodegeneration and the Circadian Clock. Front Aging Neurosci. (2017) 9: 170.

(비특허문헌 0025) Musiek ES, Lim MM, Yang G, Bauer AQ, Qi L, Lee Y, Roh JH, Ortiz-Gonzalez X, Dearborn JT, Culver JP, Herzog ED, Hogenesch JB, Wozniak DF, Dikranian K, Giasson BI, Weaver DR, Holtzman DM, Fitzgerald GA. Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration. J Clin Invest. (2013) 123(12): 5389-5400.

(비특허문헌 0026) Lauretti E, Di Meco A, Merali S, Pratico D. Circadian rhythm dysfunction: a novel environmental risk factor for Parkinson's disease. Mol Psychiatry. (2017) 22(2): 280-286.

(비특허문헌 0027) Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, Cherukuri S, Gudkov AV, Takahashi JS, Antoch MP. Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. Proc Natl Acad Sci U S A. (2005) 102(9): 3407-3412.

(비특허문헌 0028) Ozturk N, Lee JH, Gaddameedhi S, Sancar A. Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A. (2009) 106(8): 2841-2846.

(비특허문헌 0029) van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. Nature. (1999) 398(6728): 627-630.

(비특허문헌 0030) Chun SK, Chung S, Kim HD, Lee JH, Jang J, Kim J, Kim D, Son GH, Oh YJ, Suh YG, Lee CS, Kim K. A synthetic cryptochrome inhibitor induces anti-proliferative effects and increases chemosensitivity in human breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. (2015) 467(2): 441-446.

(비특허문헌 0031) Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. (2004) 101(15): 5339-5346.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 CLOCK:BMAL1의 이합체의 활성을 측정하는 세포 기반 시험법을 통해 분자 생체

시계 중추고리에 직접적으로 작용하는 약물을 개발하던 중, 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물들이 CRY의 작용을 억제함으로써 생체시계 분자 네트워크의 일주기적 활성을 강화하는 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 유기 합성기술을 이용하여 제조된 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

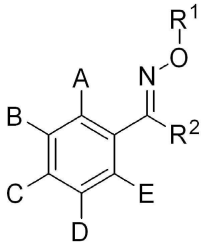
[0014] 본 발명의 다른 목적은, 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0018] [화학식 1]

[0019] 

[0020] (상기 화학식 1에서,

[0021] R^1은 C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬; C4~C10의 사이클로알킬; 탄소, 산소, 질소, 또는 황이 첨가된 5 내지 7원의 치환 또는 비치환 방향족기, 이때 방향족기는 퓨란일기, 티오펜일기, 페닐기, 티아졸기, 인돌기, 이소인돌기, 피리딘일기, 피페라진일기, 피리다진일기, 나프틸기, 퀴놀린일기, 이소퀴놀린일기를 나타내고, 이때 치환기는 수소, 할로젠, 시아노, 니트로, 하이드록시, C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C1~C10의 알콕시, C1~C10의 할로알킬, C1~C10의 할로알콕시, C1~C10의 알킬티오, C1~C10의 알킬 카보닐 및 C1~C10의 알콕시 카보닐로로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환기를 나타내고;

[0022] R^2는 수소원자; C1~C10의 직쇄 또는 분쇄 또는 고리형 알킬기로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기를 나타내며;

[0023] A, B, C, D, E는 각각 독립적으로 수소; 할로젠; 시아노; 니트로; 하이드록시; C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬; C1~C10의 알콕시; C1~C10의 할로알킬; C1~C10의 할로알콕시; C1~C10의 알킬티오; C1~C10의 알킬 카보닐; 또는 C1~C10의 알콕시 카보닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기를 나타내고, 이 때 직쇄 또는 측쇄 C1~C10의 알킬 또는 알콕시 카르복시산 또는 이의 에스터를 포함할 수 있다.)

[0024] 일 측에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체는

[0025] 1) 메틸 {3-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

[0026] 2) {3-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

[0027] 3) 메틸 (3-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0028] 4) (3-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0029] 5) 메틸 (3-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0030] 6) (3-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0031] 7) 2-{3-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[(피리딘-2-일)메틸]아세트아미드;

[0032] 8) 2-{3-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[2-(1H-이미다졸-2-일)에틸]아세트아미드;

[0033] 9) 메틸 (3-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0034] 10) (3-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0035] 11) 메틸 {3-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

[0036] 12) {3-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

[0037] 13) 메틸 (3-{(N-[(4-플루오로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0038] 14) (3-{N-[(4-플루오로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0039] 15) 메틸 {4-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

[0040] 16) {4-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

[0041] 17) 메틸 (4-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0042] 18) (4-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0043] 19) 메틸 (4-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0044] 20) (4-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0045] 21) 2-{4-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[(피리딘-2-일)메틸]아세트아미드;

[0046] 22) 2-{4-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[2-(1H-이미다졸-2-일)에틸]아세트아미드;

[0047] 23) 메틸 (4-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0048] 24) (4-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0049] 25) 메틸 {4-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트; 및

[0050] 26) {4-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

[0051] 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 화합물일 수 있다.

[0052] 일 측에 따르면, 상기 일주기 연관성 질환은 수면장애, 대사장애, 심혈관 질환, 면역 및 염증성 질환, 기분장애, 중독장애, 퇴행성 뇌질환 또는 암일 수 있다.

[0053] 일 측에 따르면, 상기 수면장애는 시차증후군, 교대근무 수면장애, 진행성 수면 위상 증후군, 수면 위상 지연 증후군, 호흡관련 수면장애, 하지불안 증후군 또는 렘수면 행동장애일 수 있다.

[0054] 일 측에 따르면, 상기 대사장애는 비만, 고혈압, 고지혈증, 고혈당증 또는 다뇨증일 수 있다.

[0055] 일 측에 따르면, 상기 기분장애는 우울증, 양극성 기분장애, 계절성 장애 또는 불안장애일 수 있다.

[0056] 일 측에 따르면, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 또는 치매 질환일 수 있다.

[0057] 일 측에 따르면, 상기 심혈관 질환은 허혈성 심질환, 급성 심근경색, 뇌 경색 또는 심방세동일 수 있다.

[0058] 일 측에 따르면, 상기 암은 대장암, 위암, 전립선암, 유방암, 신장암, 간암, 폐암, 자궁암, 결장암, 췌장암, 난소암 또는 혈액암일 수 있다.

[0059] 일 측에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체는 일주기 생체시계 분자 네트워크의 전사 조절인자인 CRYs의 활성의 억제 및 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성 강화를 통해 일주기 생체리듬의 진폭을 강화하고, 주기를 안정화 시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0061] 본 발명의 옥시이미노메틸벤젠 유도체는 CRY의 작용을 억제하여 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성을 촉진시킴으로써

생체시계 분자 네트워크의 기능을 효과적으로 항진할 수 있다. 따라서, 본 발명의 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 일주기 연관성 질환인 수면장애, 대사성 질환, 심혈관 질환, 면역 및 염증성 질환, 기분장애, 퇴행성 뇌질환 및 암 등의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[0062] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 옥시이미노메틸벤젠 유도체 중 화학식 8-9, 9-9, 8-10 및 9-10의 화합물이 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성을 측정하는 루시퍼라제 리포터(E-box-LUC)에 미치는 농도 의존적인 영향을 평가한 것으로, 화학식 8-9 및 8-10의 화합물이 농도 의존적으로 E-box-LUC의 활성을 증가시키는 결과를 도시한 것이다.

도 2는 CLOCK:BMAL1 이합체(C/B)에 의한 E-box-LUC 리포터 활성의 증가가 CRY1의 과발현에 의해 억제되며, CRY1에 의한 CLOCK:BMAL1 활성의 억제는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 중, 화학식 8-9 및 8-10의 화합물의 처리에 의해 농도 의존적으로 회복되는 결과를 도시한 것이다.

도 3은 옥시이미노메틸벤젠 유도체 중 화학식 8-9 및 8-10의 화합물이 생쥐 섬유아세포주에서 관찰되는 PER2-LUC 융합 단백질의 일주기적 발현에 미치는 영향을 2-에톡시프로피온산 유도체 계열의 CRY 저해물질인 KS15와 비교하여 평가한 결과이다. 도 3의 a는 8-9, 8-10의 화합물 및 KS15가 PER2-LUC 융합 단백질의 일주기적 발현에 미치는 영향을 확인한 것이고, 도 3의 b는 8-9, 8-10의 화합물 및 KS15가 PER2-LUC 융합 단백질의 발현이 나타내는 일주기 진폭(Amplitude, 좌), 주기(Period, 중) 및 안정성(Robustness, 우)에 미치는 영향을 통계적으로 분석한 결과를 나타낸다.

도 4는 생쥐를 대상으로 10주간 고지질 식이(High-fat diet, HFD)를 공급하여 비만이 유발되는 과정에서 화학식 8-9의 화합물이 나타내는 비만 억제 효능을 보여주는 결과이다. 해당 과정에서 화학식 8-9의 화합물은 10 mg/kg의 용량으로, 2일 마다 1회, ZT06에 복강주사를 통해 투여하고, 고지질 식이 공급 3주차부터 8주간 투여하였으며, 대조군(Vehicle, VEH)으로는 0.1% DMSO를 포함하는 동일 부피(200 μl)의 식염수를 주사한 것으로 하였다.

도 4의 a는 10주간의 고지질 식이 공급 및 8주간의 화학식 8-9의 화합물을 투여를 받은 생쥐들의 외양이고, b는 고지질 식이 공급 및 화학식 8-9의 화합물 투여가 생쥐의 체중에 미치는 영향을 주 별로 도시한 것이며, c는 화학식 8-9의 화합물의 투여가 시작된 시점부터 투여 종료 시점까지의 몸무게 증가량(Weight gain)을 실험군 별로 도시한 것이다.

도 5는 상기 도 4에 기재된 것과 동일한 과정을 거친 후, 최종 투여일 다음날 ZT02 및 ZT12 시기에 SCN을 대상으로 생체시계 유전자(Bmal1, Npas2, Rev-erbα, Per2의 발현 양상을 정량적 RT-PCR 기법을 이용하여 측정하고, 이를 처리군 별로 나타낸 것이다. TBP (TATA-binding protein) mRNA를 정량 분석을 위한 internal control로 사용하였다.

도 6은 상기 도 4에 기재된 것과 동일한 과정을 거친 후, 최종 투여일 다음날 ZT04~ZT08 사이에 동물행동검사로서 sucrose preference test (SPT), tail suspension test (TST) 및 open field test (OFT)의 결과를 처리군 별로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0066] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는

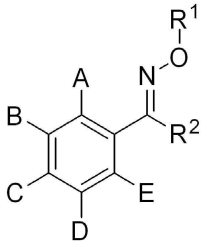
이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0067] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0068] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0069] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 일주기 연관성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0070] [화학식 1]

[0071] 

[0072] (상기 화학식 1에서,

[0073] R^1은 C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬; C4~C10의 사이클로알킬; 탄소, 산소, 질소, 또는 황이 첨가된 5 내지 7원의 치환 또는 비치환 방향족기, 이때 방향족기는 퓨란일기, 티오펜일기, 페닐기, 티아졸기, 인돌기, 이소인돌기, 피리딘일기, 피페라진일기, 피리다진일기, 나프틸기, 퀴놀린일기, 이소퀴놀린일기를 나타내고, 이때 치환기는 수소, 할로젠, 시아노, 니트로, 하이드록시, C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C1~C10의 알콕시, C1~C10의 할로알킬, C1~C10의 할로알콕시, C1~C10의 알킬티오, C1~C10의 알킬 카보닐 및 C1~C10의 알콕시 카보닐로로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환기를 나타내고;

[0074] R^2는 수소원자; C1~C10의 직쇄 또는 분쇄 또는 고리형 알킬기로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기를 나타내며;

[0075] A, B, C, D, E는 각각 독립적으로 수소; 할로젠; 시아노; 니트로; 하이드록시; C1~C10의 직쇄 또는 측쇄 알킬; C1~C10의 알콕시; C1~C10의 할로알킬; C1~C10의 할로알콕시; C1~C10의 알킬티오; C1~C10의 알킬 카보닐; 또는 C1~C10의 알콕시 카보닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기를 나타내고, 이 때 직쇄 또는 측쇄 C1~C10의 알킬 또는 알콕시 카르복시산 또는 이의 에스터를 포함할 수 있다.)

[0076] 보다 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체는

[0077] 1) 메틸 {3-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

[0078] 2) {3-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

[0079] 3) 메틸 (3-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0080] 4) (3-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0081] 5) 메틸 (3-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0082] 6) (3-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0083] 7) 2-{3-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[(피리딘-2-일)메틸]아세트아미드;

[0084] 8) 2-{3-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[2-(1H-이미다졸-2-일)에틸]아세트아미드;

[0085] 9) 메틸 (3-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0086] 10) (3-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0087] 11) 메틸 {3-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

[0088] 12) {3-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

[0089] 13) 메틸 (3-{(N-[(4-플루오로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0090] 14) (3-{N-[(4-플루오로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0091] 15) 메틸 {4-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트;

[0092] 16) {4-[N-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

[0093] 17) 메틸 (4-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0094] 18) (4-{N-[(4-메톡시페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0095] 19) 메틸 (4-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0096] 20) (4-{N-[(4-브로모페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0097] 21) 2-{4-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[(피리딘-2-일)메틸]아세트아미드;

[0098] 22) 2-{4-[N-(4-브로모페닐)메톡시에탄이미도일]페녹시}-N-[2-(1H-이미다졸-2-일)에틸]아세트아미드;

[0099] 23) 메틸 (4-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세테이트;

[0100] 24) (4-{N-[(4-니트로페닐)메톡시]에탄이미도일}페녹시)아세트산;

[0101] 25) 메틸 {4-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세테이트; 및

[0102] 26) {4-[N-{[4-(메탄설포닐)페닐]메톡시}에탄이미도일]페녹시}아세트산;

[0103] 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 화합물일 수 있다.

[0104] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물 및 용매화물을 포함한다.

[0105] 본 명세에서, 화학식 1로 표시되는 화합물을 지칭할 경우에는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 의도하는 것으로 이해될 수 있으며, 이러한 약학적으로 허용가능한 염은 통상적으로 이용되는 염의 제조방법에 의해서 제조될 수 있다.

[0106] 상기 '약학적으로 허용가능한 염'은 무기 또는 유기 염기 및 무기 또는 유기산을 포함하는 약학적으로 허용가능한 비독성 염기 또는 산으로부터 제조되는 염을 말한다. 무기 염기로부터 유도되는 염은 알루미늄, 암모늄, 칼슘, 구리, 제이철, 제일철, 리튬, 마그네슘, 망간 염, 망간, 칼륨, 나트륨, 아연 등을 포함한다. 특히 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 칼륨 또는 나트륨 염이 바람직하다. 고형의 염은 하나 이상의 결정 구조로 존재할 수 있고, 또한 수화물 형태로 존재할 수 있다. 약학적으로 허용되는 비독성 유기 염기로부터 유도된 염은 일차, 이차 또는 삼차 아민, 천연적으로 치환된 아민을 포함하는 치환된 아민, 아민 환, 또는 아르기닌, 베타인, 카페인, 콜린, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 디에틸아민, 2-디에틸아미노에탄올, 2-디메틸아미노에탄올, 에탄올아민, 에틸렌디아민, N-에틸몰포린, N-에틸피페리딘, 글루카민, 글루코사민, 히스티딘, 하이드라바민, 이소프로필 아민, 라이신, 메틸글루카민, 포폴린, 피페라진, 피페리딘, 폴리아민 수지, 프로카인, 퓨린, 테오브로민, 트리에틸아민, 트리메틸아민, 트리프로필아민, 트로메타민 등과 같은 염기성 이온교환 수지를 포함한다.

[0107] 본 발명의 화합물이 염기성인 경우, 염은 무기 및 유기 산을 포함하는 약학적으로 허용되는 비독성 산으로부터 제조될 수 있다. 상기 산은 아세트산, 벤젠술폰산, 벤조산, 캄포르술폰산, 시트르산, 에탄술폰산, 퓨마르산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드로브롬산, 염산, 이세티온산, 락트산, 말레산, 말산, 만델산, 메탄술폰산, 뮤크산, 질산, 파모산, 판토텐산, 인산, 숙신산, 황산, 타르타르산, p-톨루엔 술폰산 등을 포함한다. 시트르산, 하이드로브롬산, 염산, 말레산, 인산, 황산, 퓨마르산 또는 타르타르산이 특히 바람직하다.

[0108] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 수화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 물을 포함하고 있는 것으로 이해될 수 있다. 상기 수화물은 1 당량 이상, 일반적으로는 1 내지 5 당량의 물을 함유할 수 있다. 이러한 수화물

은 물 또는 물을 함유하는 용매로부터 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 결정화시켜 제조될 수 있다.

[0109] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용매화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 용매를 포함하고 있는 것으로 이해될 수 있다. 상기 용매로서 바람직한 것은 휘발성, 비독성 또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들을 들 수 있다.

[0110] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물을 유효성분으로 함유하고, 여기에 통상의 무독성 약제학적으로 허용 가능한 담체, 보강제 및 부형제 등을 첨가하여 약제학적 분야에서 통상적인 제제, 예를 들면 정제, 캅셀제, 트로키제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제 또는 비경구투여용 제제로 제제화할 수 있다.

[0111] 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 부형제로는 감미제, 결합제, 용해제, 용해보조제, 습윤제, 유화제, 등장화제, 흡착제, 붕해제, 산화방지제, 방부제, 활탁제, 충진제, 방향제 등이 포함될 수 있다. 예를 들면 락토스, 덱스트로스, 슈크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스, 글라이신, 실리카, 탈크, 스테아린산, 스테린, 마그네슘 스테아린산염, 마그네슘 알루미늄 규산염, 녹말, 젤라틴, 트라가칸트 고무, 알지닌산, 소디움 알진산염, 메틸셀룰로오스, 소디움 카르복실메틸셀룰로오스, 아가, 물, 에탄올, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 염화나트륨, 염화칼슘, 오렌지 엣센스, 딸기 엣센스, 바닐라 향 등을 들 수 있다.

[0112] 본 발명의 약학적 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 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 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.

[0113] 구체적으로, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 1일 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 1 내지 30 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 또는 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0114] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0115] 본 발명의 약학적 조성물은 CRY 분자의 활성을 저해하고, 이를 통해 분자 생체시계 중추고리의 일주기성을 강화할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 약학적 조성물은 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함함으로써, 상기 유도체가 가지는 CRY 활성의 억제 효과 혹은 일주기 분자 생체시계 중추고리 항진 효과를 통해 일주기 연관성 질환의 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0116] 상기 일주기 연관성 질환은 수면장애, 대사성 질환, 심혈관 질환, 면역 및 염증성 질환, 기분장애, 중독장애, 퇴행성 뇌질환 및 암을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0117] 본 발명에서 "일주기 연관성 질환"은 유전적 혹은 환경적인 요인으로 인해 생체시계 분자 네트워크가 저해되어 다양한 생리적, 정신적 이상의 원인이 됨으로써 나타나는 질환을 의미하며, 일주기 연관성 질환으로는 시차 및 교대근무 증후군을 포함하는 수면장애, 비만 및 당뇨를 포함하는 대사장애, 심혈관 질환, 면역 및 염증성 질환, 기분장애, 퇴행성 뇌질환 및 암 등을 예로 들 수 있다. 이외에도 그 질병의 종류는 매우 다양하며, 이들 질병은 일주기 생체시계 분자 네트워크를 조절하는 것으로 예방 또는 치료될 수 있다.

[0118] 예를 들면, 본 발명의 약학적 조성물은 수면장애, 대사성 질환, 심혈관 질환, 면역 및 염증성 질환, 기분장애, 퇴행성 뇌질환 및 암 등 일주기 리듬 연관성 질환의 예방, 조절 혹은 치료제로서 유효한 효과를 가지고 있다.

[0119] 아울러, 본 발명의 약학적 조성물은 수면장애, 대사성 질환, 심혈관 질환, 면역 및 염증성 질환, 기분장애, 퇴

행성 뇌질환 및 암 등 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0120] 본 발명에서 용어, "일주기 연관성 수면장애"란 생체시계에 가해지는 유전적 혹은 환경적인 교란에 의해서 수면/각성 리듬이 비정상적인 패턴으로 나타나는 장애를 의미한다. 수면장애 환자들은 사회적으로 필요한 시간에 잠들거나 깨어나는 것이 어려움을 겪기 때문에 수면 부족에 의한 장애를 호소하기 쉬운데, 발병 원인으로는 생체시계 네트워크의 하위 유전자인 CRY에 의한 수면장애 질환이 보고된 바 있다. 최근 수행된 수면장애 환자에 대한 유전학적 연구에 의하면 낮 시간에 지나치게 과도한 수면을 취하는 수면장애 환자에 대한 유전학적 연구에서, CRY1 유전자의 인트론에 존재하는 rs17289712이라는 유전적 다형성이 이 질환의 증상과 유의미한 연관관계를 보였다. 이는 생체시계에 의한 수면/각성 리듬의 조절에 있어서 CRY가 가지는 독특한 역할을 수행하는 것을 의미한다(비특허문헌 8).

[0121] 한편, 생체시계 하위 유전자인 CRY의 수면에 대한 영향을 알아보는 또 다른 연구에서는 CRY1과 CRY2 유전자가 모두 결손된 생쥐는 정상 생쥐에 비해 비렘수면(non-REM sleep; NREMS)이 증가하고, 비렘수면 도중 델타파의 강도도 증가하는 경향을 보였다(비특허문헌 9). 이것은 깊은 수면이 증가하는 것을 뜻하며, CRY1과 CRY2 유전자 결손 생쥐의 이러한 수면 패턴은 시상하부의 시신경교차상핵을 인위적으로 파괴하여 일주기성을 망가뜨린 동물모델에서 나타나는 증상과 차이를 보이는데, 생쥐의 시신경교차상핵이 파괴되면 전체 수면 시간에는 변화가 없으나 수면 패턴이 파편화하며 델타파의 강도도 감소하는 경향을 보인다(비특허문헌 10). 이는 CRY가 일주기 생체시계에서 수행하는 역할과 별개로 수면 항상성의 조절에 미치는 독립적인 역할이 존재할 수 있는 가능성을 시사한다.

[0122] 이에 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체의 CRY 단백질 활성 조절을 검증하기 위해 하기에 나타난 실험예 1 내지 3을 수행한 결과, 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물은 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성을 억제하는 CRY 단백질에 대한 저해 효능이 우수할 뿐만 아니라, PER2-LUC 융합 단백질을 통해 측정되는 세포 수준의 일주기 분자 생체리듬의 진폭을 높임으로써 그 활성을 강화하는 효과가 우수한 것을 확인 하였다. 따라서, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 생체시계 핵심 유전자와 관련된 일주기 연관성 수면장애의 예방 또는 치료에 용이하게 사용될 수 있다.

[0123] 일주기 연관성 장애 중 하나인 대사장애는 유전적 혹은 환경적인 원인에 의해 생체시계의 기능적 이상으로 인해 발병할 수 있다는 연구들이 보고된 바 있다. 장기적인 교대 근무나 수면 부족 등의 비정상적인 생활 패턴은 체내에서 성장호르몬 및 멜라토닌 분비의 일주기성을 둔화시키고, 코티솔의 레벨을 증가시킨다고 알려져 있으며(비특허문헌 11), 이러한 호르몬의 변화 양상은 비만의 초기 증상과 유사한 체중의 증가를 가져온다.

[0124] 이외에, 생체시계 시스템과 대사장애와의 관계는 유전자 조작 동물 모델에 대한 분석 결과를 통해서 더욱 분명하게 나타난다. CLOCK 돌연변이 생쥐에서는 렙틴 과다증 및 인슐린의 분비가 저하된다는 것이 발견되었으며, 고지혈증과 고혈당증의 증세가 나타났다(비특허문헌 12). 또한, BMAL1 유전자 결핍 생쥐에서는 지방 세포의 성장 및 분화에 장애가 나타났으며, 간에서의 탄수화물 대사에서도 이상 증상이 발견되었다(비특허문헌 13-15). 더불어, CRY는 고혈당증의 원인인 간에서 일어나는 포도당 신생합성(gluconeogenesis) 과정에서도 중요한 조절 인자로 기능한다는 것이 최근 연구를 통해 밝혀졌다. CRY가 결손된 생쥐에서는 정상 생쥐에 비해 혈당 조절에 이상이 관찰되는데, 이는 CRY가 글루코코르티코이드 호르몬 수용체(glucocorticoid receptor, GR)에 결합하여 호르몬에 의한 포도당 신생합성 유전자의 발현을 조절하기 때문으로 밝혀졌다(비특허문헌 16). 또한, CRY는 GR 뿐만 아니라 G-단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor)의 구성 요소 중에 하나인 G 소단위체(G subunit)와도 결합하여 아데닐 사이클라아제의 활성을 조절하는데, 이를 통해 cAMP(cyclic adenosine monophosphate)에 의해서 유도되는 포도당 신생합성에 작용하는 유전자들의 발현을 조절하는 효과를 나타낸다(비특허문헌 17).

[0125] 이는 대사장애가 생체시계의 위상 변형과 관련이 있음을 나타낼 뿐만 아니라, CLOCK, BMAL1의 결핍 및 CRY1의 이상 발현이 대사장애를 유발할 수 있다는 것을, 보다 분명하게 보여주는 연구 결과이다. 또한, 이러한 결과들은 CLOCK 및 BMAL1의 발현 및 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성 강화와 CRY의 활성 억제가 치료에 효과가 있다는 것을 시사한다.

[0126] 이에, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체에 의한 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성 강화 및 CRY 활성 억제 효과를 확인하기 위하여, 실험예 1내지 3을 수행한 결과, 옥시이미노메틸벤젠 유도체는 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성을 억제하는 CRY 단백질에 대한 저해 효능이 우수할 뿐만 아니라, PER2-LUC 융합 단

백질을 통해 측정되는 세포 수준의 일주기 분자 생체리듬의 진폭을 높임으로써 그 활성을 강화하는 효과가 뛰어난 것을 확인하였다.

[0127] 이에 더하여 하기 실험예 4의 결과를 통해 고지질 식이의 공급을 통해 비만이 유도된 생쥐에 본 발명의 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체를 반복 투여한 결과 통계적으로 유의한 체중 감소 효능을 확인하였다. 또한, 실험예 5에서는 고지질 식이에 의해 비만과 더불어 시신경 교차상 핵에 위치하는 일주기 중추 생체시계의 위상에 이상이 발생한 생쥐에 옥시이미노메틸벤젠 유도체를 반복투여 하는 경우 일주기 분자 생체리듬을 회복시키는 효과를 확인할 수 있었다.

[0128] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 허용가능한 염을 함유하는 약학적 조성물은 생체시계의 기능적 교란에 의해 발생하는 대사성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0129] 이때, 상기 일주기 연관 대사성 질환은 비만, 고혈압, 고지혈증, 고혈당증 또는 다뇨증일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0130] 기분장애 및 중독장애 역시 일주기 리듬의 변형으로 인해 발병이 가능하며, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대사 활동이나 세포 분열과 같은 신체적 기능과 마찬가지로, 뇌의 고등 기능 중의 하나인 감정의 변화도 일주기성을 나타내며 이러한 감정의 조절에 있어서 병적인 증상을 보이는 다양한 형태의 기분장애의 발병과 진행에 있어서도 생체시계의 역할이 중요시되고 있다.

[0131] 기분장애와 생체시계와의 연관성을 알아보기 위하여 주요 우울증이 있었던 사람과 장애가 없었던 각각 30명에게 4가지 일주기 리듬 유전자와 관계되는 mRNA 발현 양상을 평가하기 위하여 혈액 샘플을 분석하였다. mRNA는 유전자 활성도를 나타내는데, 우울증 과거력이 있었던 참가자가 우울증이 없었던 사람보다 CLOCK 유전자의 활성도가 더 높았으며, 이로부터 우울성 장애는 생체시계 핵심 유전자인 CLOCK의 활성과 연관되어 있다는 것을 예측할 수 있다(비특허문헌 18).

[0132] 기분장애 중 생체시계와의 연관성이 가장 두드러지는 것은 양극성 기분장애, 즉 조울증이다. Clock, Rev-erbα, Per, Cry 등 다양한 생체시계 유전자에 대한 유전자 적중 생쥐에서 조울증과 유사한 행동 표현형이 나타날 뿐만 아니라(비특허문헌 19-21), 특히 조울증 환자의 조증 삽화 발생에 선행하여 일주기 생체리듬 위상의 변조가 보고되었다(비특허문헌 22). 이상의 결과들은 일주기 생체시계의 활성 및 안정성의 약화가 조울증 발병의 핵심 기전임을 강력히 시사하는 것이다.

[0133] 이외에 생체시계와 기분장애와의 연관관계는 광치료(light therapy)를 통해서도 알 수 있다. 약물 치료 이외에 생체시계를 조절할 수 있는 인위적 자극을 통해 기분장애를 치료하는 방법 중에 널리 사용되는 방법 중의 하나로서 광치료는 계절성 기분장애에 특히 효과적인 것으로 알려져 있는데, 계절성 기분장애는 사계절이 있는 온대 기후대에 거주하는 인구 중 5 내지 10 %가 증상을 나타내는 가장 흔한 정신질환 중의 하나로서, 해가 뜨는 시점이 늦어지고 낮이 짧아지는 동절기에 우울증과 유사한 증상이 나타나게 된다. 이때, 계절성 기분장애 환자를 인위적으로 강한 빛에 노출시키면 우울증 증상이 완화되는데, 이른 아침에 수행하는 광치료가 저녁에 수행하는 것에 비해 더욱 효과적이다(비특허문헌 23). 이는 계절성 기분장애의 증상이 생체시계의 위상 변조와 관련되어 있음을 나타낼 뿐만 아니라, 빛이 있는 낮 시간에 활성화되는 생체시계 핵심 유전자인 CLOCK 및 BMAL1의 발현 및 CLOCK:BMAL1의 이합체의 활성이 치료에 효과가 있다는 것을 의미한다.

[0134] 이러한 사실을 고려하여 본 발명의 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물의 CLOCK:BMAL1의 이합체의 활성 및 일주기 분자 생체리듬 강화 효과를 확인하였다. 실험예 1 내지 3의 실험을 수행한 결과, 옥시이미노메틸벤젠 유도체는 CLOCK:BMAL1 이합체의 활성을 억제하는 CRY 단백질에 대한 저해 효능이 우수할 뿐만 아니라, PER2-LUC 융합 단백질을 통해 측정되는 세포 수준의 일주기 분자 생체리듬의 진폭을 증가시키는 등 그 활성을 강화하는 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 이에 더하여 실험예 6를 통해 생쥐를 대상으로 우울, 불안, 쾌락반응 등 기분장애와 관련된 행동 표현형에 대한 효능을 평가한 결과, 옥시이미노메틸벤젠 유도체의 투여가 항우울 및 항불안 효과를 가진다는 사실을 입증하였다. 따라서 본 발명의 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 약학적 조성물은 일주기 생체시계에 대한 약리학적 조절을 통해 기분장애 관련 질환을 예방 또는 치료하는 데 유용하게 이용될 수 있다.

[0135] 이때, 상기 일주기 연관성 기분장애는 대표적으로 주요 우울증, 양극성 기분장애, 계절성 장애 또는 불안장애일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0136] 다양한 퇴행성 뇌질환 역시 일주기 리듬의 변형으로 인해 발병이 가능하며, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고

있다. 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 등 다양한 퇴행성 뇌질환 환자들에서 발병 초기부터 수면장애를 비롯한 일주기 생체리듬의 이상이 보고되고 있는데(비특허문헌 24), 이는 퇴행성 뇌질환 환자들의 삶의 질을 저하시키는 주요 원인이 된다. 특히, 일주기 리듬 이상 및 이와 관련된 수면장애는 파킨슨병 및 헌팅턴병에 있어서 대표적인 비운동성 증상으로 간주되기도 한다. 동물모델을 이용한 최신 연구에서 생체시계의 활성 약화가 퇴행성 뇌질환의 발병 위험을 높이고, 증상을 악화시키는 주요 병인임이 입증되었다(비특허문헌 25-26).

[0137] 이러한 사실을 고려하여 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물의 CLOCK:BMAL1의 이합체의 활성 및 일주기 분자 생체리듬 강화 효과를 확인하기 위해서, 실험예 1 및 3을 수행하였으며, 그 결과 CLOCK:BMAL1의 이합체의 활성 강화와 더불어 일주기적인 PER-LUC 융합 단백질 발현의 진폭을 증가시키는 등 일주기 분자 생체리듬의 항진 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 옥시이미노메틸벤젠 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 약학적 조성물은 일주기 생체시계에 대한 약리학적 조절을 통해 퇴행성 뇌질환 관련 질환을 예방 또는 치료하는 데 유용하게 이용될 수 있다.

[0139] 이때, 상기 일주기 연관성 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 파킨슨병 또는 헌팅턴병일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0140] 일주기 연관성 질환 중 하나인 암에 있어서, 항암제에 대한 감수성의 일주기적 변화는 생체시계 핵심 유전자와 종양과의 연관성을 단적으로 보여준다. CRY 유전자 적중 생쥐에서는 항암제 내성이 모든 시간대에서 정상 생쥐에 비해 높게 나타났다. 이러한 내성의 차이가 나는 것은 간세포에서 CLOCK:BMAL1 이합체의 기능적 상태가 정상 생쥐와 일주기 유전자 조작 생쥐에서 다르게 나타나며, 이 때문에 간에서 항암제의 독성을 처리하는 능력에 차이가 나는 것이 원인으로 밝혀졌다(비특허문헌 27). 이 연구는 항암제에 대한 효과에 있어 생체주기 핵심 유전자인 CLOCK:BMAL1 이합체 및 하위 유전자인 CRY의 영향이 크다는 것을 보여준다.

[0141] 항암제에 대한 감수성의 일주기적 변화에 영향을 미치는 것 외에 생체시계 유전자는 보다 직접적으로 종양의 생성과 성장을 억제하는 효과가 있다. 종양 유발에 대한 동물 모델 중의 하나인 p53 유전자 결손 생쥐에서 CRY를 추가로 결손 시켰을 때 종양의 생성과 성장이 억제된다(비특허문헌 28). CRY의 유전자 결손이 개체의 내재적 일주기성을 완전히 망가뜨리기 때문에(비특허문헌 29), 생체시계에 대한 교란과 종양 발달로 이르는 진행 경로가 반드시 일치하는 것은 아니며, 보다 복잡한 상관관계가 존재할 수 있음을 보여준다.

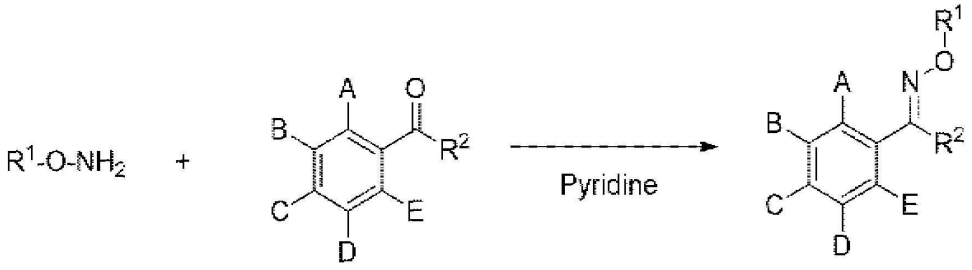
[0142] 특히 생체시계 핵심 유전자들이 일주기성의 유지뿐만 아니라 개별적으로 세포 주기와 종양 발달 과정에 있어서 독자적인 기능을 가질 가능성을 제시하며, 항암 작용에 있어서 CRY의 일시적 억제가 가질 수 있는 새로운 가능성에 대해서 고려해 볼 수 있는 여지를 제공한다. 실제로 지속성 CRY 억제제인 KS15의 경우 일주기 생체리듬 강화 효과는 미미함에도 불구하고, 유방암 세포주에 대해 항암 효과를 나타내었다(비특허문헌 30).

[0143] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물은 실험예 1의 결과로 나타난 바와 같이 CRY의 작용을 억제하는 효과가 뛰어나므로 이를 이용한 CRY 활성의 약리적 제어를 통해 특정 시간대에 한정적으로 약물을 통하여 약물의 효능을 높이고 독성을 감소시키는 효과가 있다. 게다가, 종양세포의 생성 및 성장을 억제하므로 이를 유효 성분으로 함유하는 약학적 조성물은 일주기 리듬의 변형으로 발병하는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

[0144] 이때, 상기 일주기 연관성 암은 대장암, 위암, 전립선암, 유방암, 신장암, 간암, 폐암, 자궁암, 결장암, 췌장암, 난소암 또는 혈액암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0146] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체의 제조 방법은 다음과 같다.

[0147] [반응식1]



[화학식 2] [화학식 3] [화학식 1]

[0148]

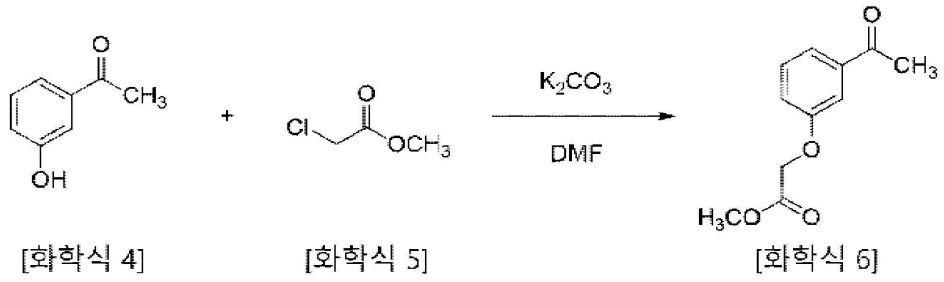
[0150] (상기 반응식 1에서 A~E, R1, R2는 각각 상기에서 정의한 바와 같다.)

[0151] 보다 구체적으로, 통상적으로 획득할 수 있는 상기 화학식 2로 표시되는 R1이 치환된 아민 화합물 또는 그 염과 통상적으로 획득할 수 있는 상기 화학식 3으로 표시되는 A~E, R2가 치환된 알데히드 또는 케톤 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸화합물을 합성하는 단계로 이루어진다.

[0153] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0155] **실시예 1: 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물(화학식 8-9, 화학식 8-10 화합물)의 합성**

[0157] [반응식 2]



[화학식 4] [화학식 5] [화학식 6]

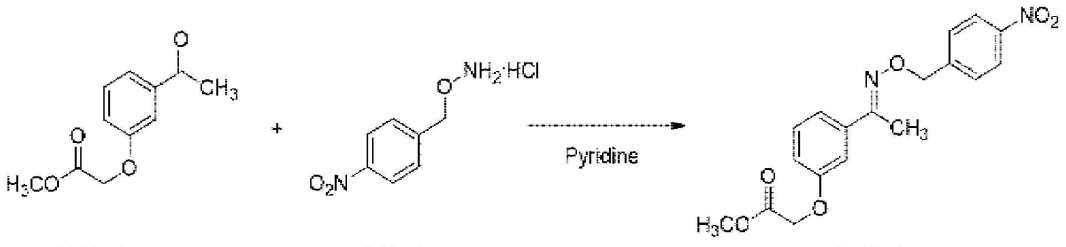
[0159]

[0161] **단계 1: 아세토페논 유도체(화학식 6)의 제조**

[0162] 상기 반응식 2에 기재된 바와 같이, 상업적으로 구입 가능한 3-히드록시아세토페논(화학식 4, 1 g)를 반응기에 넣고 N,N-디메틸포름알데히드를 첨가하였다. 반응기를 0 ℃로 냉각한 후, 탄산칼륨(3 당량, 3 g)과 메틸클로로아세테이트(화학식 5, 1.2 당량, 0.767 ml)를 천천히 첨가하고, 상기 반응액의 온도를 상온으로 승온하고 12시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 상기 반응액을 여과하고 여액을 감압 농축하였다. 상기 농축 화합물을 에틸아세테이트와 핵산을 이동상으로 하여 실리카겔 크로마토그래피를 수행하여 목적 화합물인 아세토페논 유도체(화학식 6, 1453 mg, 수득률 95%)을 얻었다.

[0163] 1H-NMR (CDCl3, 500 MHz) δ 7.60 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.40 (dd, J = 8.1, 7.5 Hz, 1H), 7.15 (m, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.60 (s, 3H).

[0165] [반응식 3]



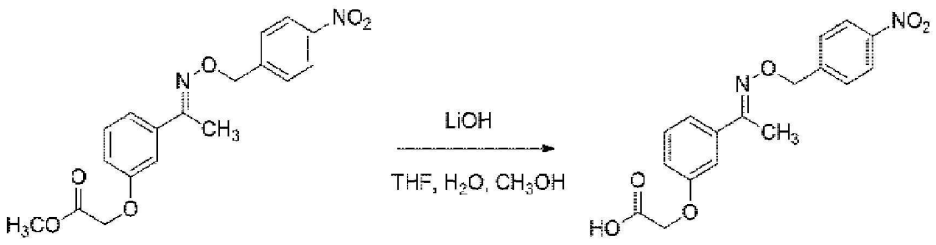
[화학식 6] [화학식 7] [화학식 8-9]

[0166]

[0168] **단계 2: 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물(화학식 8-9)의 제조**

[0169] 상기 반응식 3에 기재된 바와 같이, 아세토페논 유도체(화학식 6, 208 mg)와 상업적으로 구입 가능한 알콕시아민 화합물(화학식 7, 1.2 당량, 246 mg)을 반응기에 넣고 피리딘을 첨가하였다. 상기 반응액을 가열 환류하면서 5시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 상기 반응액을 상온으로 냉각하고 감압 농축하였다. 상기 농축화합물을 에틸아세테이트와 핵산을 이동상으로 하여 실리카겔 크로마토그래피를 수행하여 목적 화합물인 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물(화학식 8-9, 197 mg, 수득률 55%)을 얻었다.

[0171] [반응식 4]



[화학식 8-9] [화학식 8-10]

[0172]

[0174] **단계 3: 옥시이미노메틸벤젠 유도체 가수분해물(화학식 8-10)의 제조**

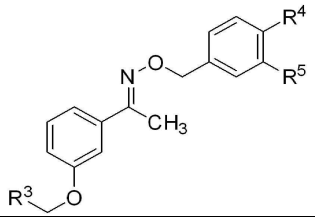
[0175] 상기 반응식 4에 나타낸 바와 같이, 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물(화학식 8-9, 20 mg)을 반응기에 넣고 테트라하이드로퓨란과 물, 메탄올을 첨가하였다. 반응기를 0 ℃로 냉각한 후, 수산화리튬(3 당량, 7 mg)을 천천히 첨가하고 상기 반응액의 온도를 상온으로 승온한 후 8시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 상기 반응액을 묽은 염산으로 중화한 후 감압 농축하였다. 잔류물을 에틸아세테이트로 희석하고 물로 세척한 후, 무수 황산마그네슘으로 건조 후 여과하였다. 여액을 감압 농축하고 에틸아세테이트와 핵산을 이동상으로 하여 실리카겔 크로마토그래피를 수행하여 목적 화합물인 옥시이미노메틸벤젠 유도체 가수분해물(화학식 8-10, 19 mg, 수득률 99%)을 얻었다.

[0176] 화학식 1로 표시되는 화합물에서 A~E, R^1, R^2를 하기 [표 1]에 기재된 바와 같이 실시하는 것 외에는, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 가수분해물을 포함하는 옥시이미노메틸벤젠 유도체(8-1~14, 9-1~12)를 합성하였다. 합성된 옥시이미노메틸벤젠 유도체 화합물의 구조 및 분석 결과는 하기 [표 1]에 정리하여 나타내었다.

표 1

[0177]

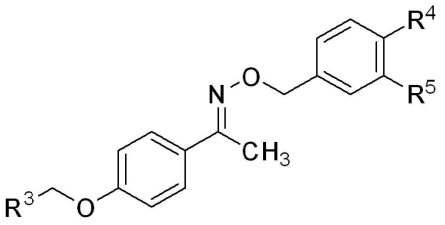
[화학식 8]



화합물	R^3	R^4	R^5	분석자료 (1H/13C-NMR 또는 LC-MS)	Max (%)	EC_{50}
8-1	CO_2CH_3	H	CF_3	1H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ 7.56 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.49(t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.29 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.25(t, J = 1.5 Hz, 1H), 6.91-6.89 (m, 1H), 5.27 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 3.80 (s, 3H)	171.49	27.43
8-2	CO_2H	H	CF_3	1H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ 7.47 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.30 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.92 (t, J = 15.5 Hz, 2H), 6.74 (s, 1H),6.57 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.17 (s, 2H) 1.86 (s, 3H).	130.73	N/A
8-3	CO_2CH_3	OCH_3	H	1H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ 7.36 (d, J = 6.5Hz, 2H), 7.34-7.27 (m, 2H), 7.25 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.91-6.89 (m, 3H), 5.16 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 3.81 (t, J = 2.0 Hz, 6H), 2.21 (s, 3H).	151.78	6.32
8-4	CO_2H	OCH_3	H	1H-NMR (500 MHz, CDCl3) δ 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 6.908-6.891 (m, 3H), 5.16 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.21 (d, J = 2.0 Hz, 3)	182.06	9.88
8-5	CO_2CH_3	Br	H	1H-NMR(500 MHz, CDCl3) δ7.52-7.50 (m, 2H), 7.32-7.27 (m, 3H), 6.94-6.92 (m, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.26 (s, 3H); 13C-NMR (CDCl3, 125 MHz) δ169.2, 157.7, 154.7, 138.0, 137.1, 131.5, 129.8, 129.5, 121.7, 119.7, 115.3, 112.4, 75.4, 65.3, 52.3, 12.8; LRMS (ESI+) m/z 391.84 [M]+.	149.13	N/A (Tox.)
88-6	CO_2H	Br	H	1H-NMR(500 MHz, CDCl3) δ7.51-7.50 (t, 2H, J = 2 Hz), 7.34-7.27 (m, 3H), 6.95-6.93 (m, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.73 (s, 1H), 2.27 (s, 3H) ; 13C-NMR (CDCl3, 125 MHz) δ174.2, 157.4, 154.9, 138.0, 137.0, 131.5, 129.8, 129.6, 121.8, 120.0, 115.3, 112.4, 75.4, 64.8, 13.0; LRMS (ESI+) m/z 378.99 [M]+.	123.78	N/A (Tox.)

8-7	CO_2X,X=(2pyridyl) methylamine	Br	H	1H-NMR (CDC13, 500 MHz) δ 8.60-8.58 (m, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.52-7.50 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.46-7.44 (m, 1H), 7.35-7.27 (m, 5H), 7.01-6.98 (m, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.76-4.75 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.60 (s, 2H), 2.26 (s, 3H); 13C-NMR (CDC13, 500 MHz) δ 168.46, 157.31, 155.52, 154.74, 148.40, 147.44, 138.77, 138.16, 137.08, 131.52, 129.85, 123.15, 121.76, 119.99, 115.66, 112.40, 75.45, 67.40, 43.18, 12.92; LRMS (ESI+) m/z 468.49 [M]+.	129.69	N/A
8-8	CO_2Y,Y=histamine	Br	H	1H-NMR (CDC13, 500 MHz) δ 8.95 (s, 1H), 7.51-7.46 (m, 2H), 7.29-7.22 (m, 4H), 7.03 (s, 1H), 6.89-6.88 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.00 (s, 2H), 2.22 (s, 3H); 13C-NMR (CDC13, 500 MHz) δ 157.1, 154.8, 137.0, 131.5, 130.9, 129.7, 121.7, 115.8, 115.3, 112.4, 75.3, 67.2, 24.9, 13.0; LRMS (ESI+) m/z 494.26 [M+Na]+.	121.10	N/A (Tox.)
8-9	CO_2CH_3	NO_2	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.36 (d, J = 6.5Hz, 2H), 7.34-7.27 (m, 2H), 7.25 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.91-6.89 (m, 3H), 5.16 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 3.81 (t, J = 2.0 Hz, 6H), 2.21 (s, 3H).	193.04	6.44
8-10	CO_2H	NO_2	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 6.91-6.89 (m, 3H), 5.16 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.21 (s, 3H).	161.26	10.17
8-11	CO_2CH_3	SO_2CH_3	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.93 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.59 (d, J =1.5 Hz, 2H), 7.30-7.25 (m 1H), 7.24-7.22 (m 2H), 6.91-6.89 (m 1H), 5.31 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 2.28 (s, 3H).	104.72	N/A
8-12	CO_2H	SO_2CH_3	H	1H-NMR (500 MHz, MeOH) δ 7.96 (d, J =7.0 Hz, 2H), 7.67 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.30-7.21 (m 3H), 6.96-6.94 (m 1H), 6.91-6.89 (m 1H), 5.32 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 3.11(s, 3H), 2.27 (s, 3H).	98.71	N/A
8-13	CO_2CH_3	F	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.39-7.36 (m, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.228 (t, J =2.5 1H), 7.059-7.024 (m, 2H), 6.90-6.88 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.81 (s, 3H).	119.93	N/A (Tox.)
8-14	CO_2H	F	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.38-7.36 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.03 (t, J =8.5 2H), 6.90 (t, J =3.0 1H), 5.17 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 2.20 (s, 3H).	N/D	N/D

[화학식 9]



화합물	R^3	R^4	R^5	분석자료 (1H/13C-NMR 또는 LC-MS)	Max (%)	EC_{50}
9-1	CO_2CH_3	H	CF_3	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.66 (s, 1H), 7.59-7.55 (m, 4H), 7.48 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.89-6.87(m, 2H) 5.25 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.25 (s, 3H).	107.89	N/A
9-2	CO_2H	H	CF_3	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.66 (s, 1H), 7.60-7.55 (m, 4H), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.91-6.89 (m, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 2.26 (s, 3H).	115.15	N/A
9-3	CO_2CH_3	OCH_3	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.60-7.59 (m, 2H), 7.36-7.35 (m, 2H), 6.90-6.88 (m, 4H), 5.14 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.81 (d, J = 2.5 Hz, 6H), 2.21 (s, 3H)	103.87	N/A
9-4	CO_2H	OCH_3	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.61 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.91-6.89 (m, 4H), 5.14 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.21 (s, 3H).	102.65	N/A
9-5	CO_2CH_3	Br	H	1H-NMR(500 MHz, CDC13) δ 7.58-7.56 (d, 2H, J = 9 Hz), 7.48-7.47 (d, 2H, J = 8 Hz), 7.28-7.25 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 6.89-6.87 (d, 2H, J = 9 Hz), 5.15 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.22(s, 3H); 13C-NMR (CDC13, 125 MHz) δ 169.1, 158.5, 154.6, 137.3, 131.4, 130.1, 129.8, 127.5, 121.6, 114.4, 75.2, 65.2,52.3, 12.8; LRMS (ESI+) m/z 392.13 [M]+.	111.88	N/A
9-6	CO_2H	Br	H	1H-NMR(500 MHz, CDC13) δ7.56-7.51 (m, 4H), 7.35-7.34 (d, 2H, J = 8.5), 5.12 (s, 2H), 4.39 (s, 2H), 2.16 (s, 3H); 13C-NMR (CDC13, 125 MHz) δ159.4, 154.3, 137.7, 131.2, 130.1, 127.8, 127.0, 120.7, 114.3, 74.2, 66.3, 12.4; LRMS (ESI+) m/z 400.78 [M+Na]+.	106.70	N/A
9-7	CO_2X, X=(2-pyridyl) methylamine	Br	H	1H-NMR (MeOD, 500 MHz) δ7.90 (s, 1H), 7.62-7.60 (d, 2H), 7.52-7.50 (d, 2H), 7.34 (s, 2H), 6.96-6.95 (d, J = 8.5 Hz, 3H), 5.16 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.86 (s, 2H), 2.24 (s, 3H); 13C-NMR (MeOD, 500 MHz) δ169.56, 158.56, 154.76, 137.70, 134.38, 133.68, 131.07, 129.95, 129.58, 127.26, 121.09, 116.35, 114.25, 74.70, 66.79, 25.80, 11.44; LRMS (ESI+) m/z 493.06 [M+Na]+.	135.47	N/A

9-8	CO_2Y, Y=histamine	Br	H	1H-NMR (CDC13, 500 MHz) δ 8.74 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.53-7.48 (m, 4H), 7.26-7.25 (d, J = 1.0 Hz, 2H), 6.99-6.97 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 5.14 (s, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 2.21 (s, 1H); 13C-NMR (CDC13, 500 MHz) δ 168.43, 158.03, 155.18, 154.57, 146.73, 139.55, 137.28, 131.48, 130.40, 129.81, 127.64, 123.74, 123.42, 121.67, 114.68, 75.26, 67.30, 42.81, 30.93, 12.80; LRMS (ESI+) m/z 490.00 [M+Na]+.	120.89	N/A
9-9	CO_2CH_3	NO_2	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 8.22 (d, J =9.0 Hz, 2H), 7.57-7.53 (m, 4H), 6.89 (d, J =9.0 2H), 5.30 (s, 2H), 4.64 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.27 (s, 3H).	113.52	N/A
9-10	CO_2H	NO_2	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 8.22 (d, J =7.0 Hz, 2H), 7.59-7.54 (m, 4H), 6.90 (d, J =7.5 2H), 5.30 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 2.28 (s, 3H).	108.43	N/A
9-11	CO_2CH_3	SO_2CH_3	H	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.94 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.59-7.56 (m, 4H), 6.89 (m 2H), 5.29 (s 2H), 4.65 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 2.27 (s, 3H).₩	100.39	N/A
9-12	CO_2H	SO_2CH_3	H	1H-NMR (500 MHz, MeOH) δ 7.95 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.65 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.60 (d, J =9.0 Hz, 2H), 6.93-6.91(m, 2H), 5.29 (s 2H), 4.67 (s, 2H), 3.11 (s, 3H), 2.27 (s, 3H).	111.38	N/A
9-13	CO_2CH_3	H	CF_3	1H-NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.66 (s, 1H), 7.59-7.55 (m, 4H), 7.48 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.89-6.87(m, 2H) 5.25 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.25 (s, 3H).	107.89	N/A

[0178] **실험예 1. CLOCK:BMAL1 이합체 전사활성에 대한 효능평가**

[0179] E-box에 의해 매개되는 CLOCK:BMAL1 이합체의 전사 활성에 미치는 옥시이미노메틸벤젠 유도체들의 효과를 평가하기 위하여 E-box-LUC 리포터를 발현하는 NIH-3T3 섬유아세포주(비특허문헌 6)를 이용하였다. 리포터 발현 섬유아세포주는 10 % 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린/스트렙토미신(streptomycin, Invitrogen) 및 1% L-글루타민이 첨가된 둘베코변형이글배지(Dulbecco's modified eagles medium, Invitrogen)를 이용하여 이산화탄소 5%, 섭씨 37도의 가습 상태가 유지되는 배양기 내에서 유지, 배양하였다.

[0180] 리포터 발현 세포주를 화합물 처리 24시간 전에 48-well 배양 플레이트에 분주하여 배양하였다. 배양된 세포들을 대상으로 최종적으로 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30 또는 100㎛M의 농도가 되도록 화합물을 처리하였다. 대조군(0 ㎛M)으로는 동량의 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO)를 처리한 세포를 사용하였다. 화합물을 처리하고 36시간이 경과한 후, 세포들을 1X D-PBS로 2회 씻어주고, well 당 100 ㎕의 세포용해 완충용액(Possive Lysis buffer, Promega)으로 15분간 용해시켰다. 용해물 중 20 ㎕의 시료를 동량의 루시페라제 활성 평가 시약(Lucifase assay reagent, Promega)과 반응시킨 뒤, 루시페라제의 활성을 루미노미터(TD-20/20 Luminometer, Turner systems)를 이용하여 측정하였다. 측정된 루시페라제의 활성을 용해물의 단백질 함량으로 보정하였으며, 단백질 함량은 Bio-rad사의 브래드포드(Bradford) 염색 시약을 이용하여 측정하였다.

[0181] 각 유도체에 대한 농도-반응 상관관계는 Four Parameter Logistic Equation을 통해 표준 곡선으로 변환하여 분석하였으며, 계산 과정은 시그마플롯 10.0 (SigmaPlot 8.0, Systat Software Inc.)에서 제공하는 통계 분석 기

능을 활용하였다. 농도-반응 곡선을 기준으로 각 유도체의 최대 활성(Max)과 EC_{50} 값을 계산하여 상기 [표 1]에 기입하였다. 화합물 중 세포사를 유발한 경우는 EC_{50} 기입란에 세포독성(Tox.)이 발생했음을 명시하였다. 대표적인 예로서 화학식 8-9, 9-9, 8-10 및 9-10의 화합물의 농도-반응 상관곡선을 도 1에 나타냈다.

[0182] 도 1 및 표 1에서 나타난 바와 같이, 실시예 1의 화합물 중 화학식 8-9의 화합물은 최대 활성이 대조군 대비 193.04%이고, EC_{50} 값이 6.44㎛M였으며, 100㎛M까지 유의한 세포독성이 관찰되지 않는 등 최대 활성, EC_{50} 및 세포독성 측면에서 가장 우수한 것으로 나타났다. 화학식 8-9와 유사한 구조를 가지는 화학식 8-10의 화합물 역시 유의한 수준의 최대 활성(161.26%) 및 EC_{50} 값(10.17㎛M)을 나타냈다.

[0184] **실험예 2. 화합물 처리에 따른 CRY 의존성 검증**

[0185] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물(8-9 및 8-10)이 실제로 CRY를 경유하여 E-box 매개 전사 활성을 조절하는지를 검증하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0186] 본 실험에 이용된 HEK293 세포주는 10 % 혈청, 1% 페니실린/스트렙토미신 및 1% L-글루타민이 첨가된 둘베코변형이글배지를 이용하여 이산화탄소 5%, 섭씨 37도의 가습 상태가 유지되는 배양기 내에서 유지, 배양하였다. 형질도입 24시간 전 HEK293 세포를 48-well 배양 플레이트에 분주한 후, E-box-LUC 루시퍼라제 리포터(50 ng/well), pRL-mTK 리포터(100 ng/well)와 더불어 생쥐 CLOCK 발현 벡터(600 ng/well)과 생쥐 BMAL1 발현 벡터(200 ng/well) 혼합물 혹은 동량의 pcDNA3.1 플라스미드와 Flag-CRY1 발현 벡터(20 ng/well) 혹은 동량의 pcDNA3.1 플라스미드를 세포에 도입하였다. 형질도입(Transfection)은 리포펙타민(Lipofectamine 3000, Invitrogen)을 사용하였고, 절차는 생산자 매뉴얼을 따라 수행하였다.

[0187] 형질도입으로부터 48시간이 경과한 후에, 최종적으로 1, 3 혹은 10㎛M의 농도가 되도록 화학식 9-9 또는 8-10의 화합물을 처리하였다. 대조군(0 ㎛M)으로는 동량의 디메틸설폭사이드를 처리한 것을 이용하였다. 화합물을 처리하고 36시간이 경과한 후, 세포들을 1X D-PBS로 2회 씻어주고, well 당 100 ㎕의 세포용해 완충용액으로 15분간 용해하였다. 용해물 중 20 ㎕의 시료를 동량의 루시페라제 활성평가 시약과 반응시킨 뒤, 루시페라제의 활성을 루미노미터를 이용하여 측정하였다. 측정된 E-box-LUC 루시페라제의 활성을 함께 도입한 pRL-mTK 라닐라 루시퍼라제 활성을 이용하여 보정하였다.

[0188] 각 유도체 처리에 대한 각 실험 군 내의 E-box-LUC 리포터 활성 변화의 정도를 대조군(E-box-LUC 루시퍼라제 리포터와 pRL-mTK 리포터 및 pcDNA3.1만 도입하고, 디메틸설폭사이드를 처리한 그룹, CTL로 표기)의 평균값에 대한 비율로 환산하여 [도 2]와 같이 도시하였다. 그 결과, 알려진 대로 CRY1의 발현은 CLOCK:BMAL1의 E-box 매개 전사활성을 유의한 수준으로 억제하였으며, 이러한 CRY의 작용은 화학식 8-9 및 8-10의 화합물 처리에 대해 농도 의존적으로 저해되었다.

[0189] 도 2에 나타낸 바와 같이, 실시예 1의 화합물 중 화학식 8-9, 8-10의 화합물이 CRY 의존적으로 CLOCK:BMAL1의 전사활성을 항진시키며, 따라서 본 발명의 옥시이미노메틸벤젠 유도체들이 CRY 단백질에 대한 저해제로 작용한다는 사실을 보여준다.

[0191] **실험예 3. PER2-LUC 융합 단백질의 일주기적 발현에 대한 유도체 효능평가**

[0192] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물(8-9 및 8-10)이 CRY의 저해 및 CLOCK:BMAL1의 전사활성 증진을 통해 세포가 발현하는 분자 생체시계의 일주기적 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 이를 위해 PER2 유전자의 정지 코돈이 있던 위치부터 루시퍼라제 유전자가 연결되어 PER2-LUC 융합 단백질을 발현하는 돌연변이 섬유아세포주(PER2-LUC knock-in fibroblast)를 이용하였다. 해당 세포주는 태어난 지 1주일이 경과된, PER2-LUC knock-in 돌연변이 생쥐(비특허문헌 31)의 폐 조직으로부터 확립하였다. PER2-LUC knock-in (KI) 섬유아세포는 10 % 혈청, 1% 페니실린/스트렙토미신 및 1% L-글루타민이 첨가된 둘베코변형이글배지를 이용하여 이산화탄소 5%, 섭씨 37도의 가습 상태가 유지되는 배양기 내에서 유지, 배양하였다.

[0193] PER2-LUC KI 세포를 화합물 처리 24시간 전에 35 mm 배양 접시에 분주하여 배양하였다. 배양된 세포들을 대상으로 2시간 동안 200nM 덱사메타손(Dexamethasone, 이하 DEX)을 처리하여 동기화 한 후, 20㎛M의 화학식 8-9 또는 8-10의 화합물과 더불어 루시퍼라제의 기질인 루시페린(최종 농도 0.1 mM)을 포함하는 배지로 교체하였다. 대조군으로는 화합물 대신 동량의 디메틸설폭사이드를 처리한 세포(VEH)를 사용하였으며, 또 다른 비교군으로는

2-에톡시프로피온산 계열의 CRY 저해제(비특허문헌 6)인 KS15 (최종 농도 20 μM)를 이용하였다. 대조군 및 KS15 처리 세포들 역시 같은 농도의 루시페린을 포함하는 배지로 교체하였다.

[0194] 화합물과 루시페린을 포함하는 배지에 배양된 세포에서 발생하는 생체인광 신호를 실시간 생체인광 측정 장비(Kronos-DIO, ATTO)를 이용하여 10분 간격으로 최대 5일간 연속 측정하였으며, 그 결과를 통계적인 경향 제거(detrending)를 거쳐 도 3에 나타냈다. PER2-LUC 융합 단백질의 일주기적 발현 양상을 Cosinor 분석 프로그램(http://www.circadian.org에서 무료 배포)을 이용하여 분석함으로써 주기성의 진폭(Amplitude), 주기(Period) 및 안정성(Robustness)을 계산하였고, 4회 반복실험을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 화합물 처리에 따른 변화의 통계적 유의성을 검증하였다.

[0195] 그 결과, 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이 화학식 8-9 또는 8-10의 화합물 처리는 PER2-LUC 융합 단백질의 일주기적 발현이 가지는 진폭은 유의한 수준으로 증가시키면서, 주기나 안정성에는 큰 영향을 끼치지 않았다. 이는 KS15의 처리가 CLOCK:BMAL1 이합체의 전사 활성을 증진함에도 불구하고, 일주기 분자리듬의 진폭을 감소시키며, 그 안정성을 유의한 수준으로 감소시키는 KS15와는 극명히 대비되는 양상이다. 즉, KS15와 같은 2-에톡시프로피온산 유도체와는 달리 본 발명의 옥시이미노메틸벤젠 유도체는 일주기 분자 생체시계의 활성에 대한 항진 효능을 가진다.

[0197] **실험예 4. 고지질 식이에 유도되는 비만에 대한 유도체 효능평가**

[0198] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물(8-9)이 고지질 식이에 의해 유발되는 비만에 미치는 영향을 검증하였다. 총 열량의 60%에 해당하는 지질을 포함하는 고지질 식이는 생쥐에서 비만 및 각종 대사 이상을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 가장 널리 이용되는 대사성 질환 동물모델이다(비특허문헌 15).

[0199] 실험 개시 후 생쥐(총 28두)들을 2종의 실험군으로 나누어 각각 정상 식이(Normal chow, NC, 15.2%의 단백질과 2.9%의 지질 포함) 혹은 고지질 식이(High-fat diet, HFD, 20.3% 단백질과 27.0% 지질 포함)를 2주 간 공급하였다. 3주차가 시작되면서 각 식이 군을 다시 2종의 실험군으로 나누어 화학식 8-9의 화합물 투여 군 혹은 대조군으로 사용하였다. 각 식이 군 별 투여군의 경우 총 8주 동안 2일 당 1회 8-9 화합물(회당 10 mg/kg 체중, 200 ㎕ 투여)을 복강주사를 통해 투여하였으며, 대조군은 같은 방법으로 용매(VEH, 0.5% 디메틸설폭사이드를 포함하는 동일 부피의 생리식염수)를 투여하였다. 1주일에 2회(1주일 중 제1일 및 제4일), 하루 중 ZT06-07 시기에 생쥐들의 체중을 측정하였으며, 2회 측정치의 평균을 해당 주차의 몸무게로 기록하여 도 4에 나타냈다.

[0200] 도 4a는 총 10주 동안의 실험이 종료된 직후, 각 실험 군 별 생쥐(각 7두)의 외양을 보여주는 대표적인 사진이며, 도 4b는 1주일 간격으로 체중의 변화 양상을 도시한 것이다. 도 4c는 8주 동안의 8-9 혹은 용매 투여 기간 중 체중의 변화 양상을 도시한 결과이다.

[0201] 도 4에서 알 수 있듯이, 화학식 8-9의 화합물의 투여는 대조군에 비해 고지질 식이에 의해 유발되는 체중의 증가를 약 40% 감소시키는 등 비만 억제 효과를 나타냈다. 이에 비해 정상 식이를 제공받은 생쥐에서는 처리군과 대조군 사이에 통계적으로 유의미한 차이가 나타나지 않는데, 이는 화학식 8-9의 화합물 투여 효과가 비만이 유도되는 특이 상황에서 나타나며, 특히 화학식 8-9의 화합물의 체중 감소 효과가 잠재적인 화합물의 독성에 기인하는 것은 아니라는 사실을 의미한다.

[0203] **실험예 5. 고지질 식이에 유도되는 일주기 생체시계 이상에 대한 유도체 효능평가**

[0204] 전술한 바와 같이 비만을 비롯한 대사성 질환은 일주기 생체리듬의 이상을 매우 빈번하게 동반한다는 사실을 바탕으로 상기 실시예 1에서 제조한 화합물(8-9)이 고지질 식이에 의해 유발되는 시신경 교차상 핵의 중추 생체시계의 일주기적 기능에 미치는 영향을 검증하였다.

[0205] 이를 위해 상기 실험예 4에 기재된 식이 및 화합물 투여가 완료된 다음날, ZT02 (실험군 당 3두) 및 ZT12 (실험군당 4두) 시기에 생쥐를 희생한 후, 뇌를 적출하여 1 ㎜ 두께의 뇌 조직 절편을 준비하여 이로 부터 시상하부에 위치하는 시신경 교차상 핵 영역을 일정한 크기(가로 2 ㎜, 세로 1 ㎜ 및 두께 1 ㎜)로 적출하였다. 상용화된 RNA 분리 키트(microRNeasy, Qiagen)를 이용하여 시신경 교차상 핵으로부터 RNA를 분리하였으며, 각각 500 ng의 RNA 시료에 대해 상용화된 cDNA 합성 키트(cDNA synthesis kit, Takara)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 대상으로 SYBR Green I PCR 키트(Invitrogen)를 이용한 정량적 실시간 중합연쇄반응(quantitative real-time PCR)을 통해 표적 유전자 mRNA의 발현양을 측정하였다. 생체시계 유전자인 Bmal1, Npas2,

Rev-erbα, Per2의 유전자 발현 수준은 하우스 키핑(house-keeping) 유전자 중 하나인 TATA-box binding protein (TBP) mRNA의 발현양으로 보정하였고, 전체 결과는 표준 RNA 시료에서 측정된 유전자 레벨에 대한 비율로 표시하였다. 측정 결과를 도 5에 나타냈다.

[0206] 도 5에 나타낸 바와 같이, 정상 식이를 공급받고 용매를 투여한 대조군 생쥐(NC 및 VEH)와 달리 고지질 식이에 의해 비만이 유도(HFD 및 VEH)되었을 때, Bmal1 및 Rev-erbα의 일주기적 발현이 사라지며, Npas2 mRNA의 발현 양상이 역전되는 현상이 나타났다. 이에 비해 고지질 식이를 공급했음에도 불구하고, 실시예 1의 화합물을 투여한 생쥐들(HFD 및 8-9)에서는 이들 생체시계 유전자들의 발현이 정상적으로 유지되었다. 실험예 4에서와 마찬가지로 정상 식이를 공급받고, 8-9 화합물을 투여한 생쥐군(NC 및 8-9)에서도 생체시계 유전자들의 일주기적 발현 양상이 정상적으로 나타났다.

[0207] 이상의 결과는 실험예 3의 배양세포 모델의 결과와 일맥상통하게 실시예 1의 유도체(8-9)의 투여가 생체에서도 일주기 분자 생체시계의 강화에 기여할 수 있으며, 그 결과 일주기 교란이 동반되는 비만 동물모델에서도 체중 감소만이 아니라 중추 생체시계의 일주기적 기능을 유지시킬 수 있음을 보여주는 결과이다.

[0209] **실험예 6. 정서 및 중독 조절 뇌기능에 대한 유도체 효능평가**

[0210] 전술한 바와 같이 정서 및 중독장애가 일주기 생체리듬의 이상을 매우 빈번하게 동반한다는 사실을 바탕으로 본 발명에 따른 상기 실시예 1에서 제조한 화합물(8-9)이 생쥐의 정서 및 중독 관련 행동에 미치는 영향을 검증하였다.

[0211] 이를 위해 실험예 4에 기재된 것과 동일한 용량(2일 당 1회, 회당 10 mg/kg 체중, 200 ㎕ 투여)으로 화합물(8-9) 혹은 용매를 6주간 반복 투여한 후, 하기 3종의 동물 행동검사를 순차적으로 수행하고, 그 결과를 도 6에 나타냈다. 화합물 및 용매는 행동검사가 진행되는 중에도 동일한 방식으로 투여되었다.

[0212] Sucrose preference test (이하 SPT)는 중독 위험성 및 우울도와 관련된 쾌락 반응을 측정하는 행동검사법이다(비특허문헌 20). 일반 음용수와 2% 설탕물을 형태가 동일한 음용수병에 각각 담아 피험체 생쥐에 48시간 동안 공급하였다. 3일차에 두 음용수병의 위치를 바꾼 후, 24시간 동안 소비한 일반 음용수와 2% 설탕물의 무게를 측정하였다. 설탕물 선호도는 전체 소비량(일반 음용수와 설탕물 소비량의 합계)에 대한 설탕물 소비량의 비율을 %로 표시한 것인데, 두 생쥐군 사이에 유의한 차이는 나타나지 않았다(도 6a). 대사 및 정서 개선 효능을 보이는 많은 물질들이 중독 위험성이 높은 반면, 본 실험예의 결과는 화학식 8-9의 화합물의 처리가 쾌락 반응에 큰 문제는 야기하지 않는 것을 의미한다.

[0213] Tail suspension test (이하 TST)는 우울증 유발 위험도를 측정하는 행동검사법이다(비특허문헌 20). 피험체 생쥐의 꼬리를 미리 설치된 스탠드에 고정한 후, 6분 동안 생쥐의 움직임을 촬영하였다. 호흡 이외의 움직임이 없는 것을 '부동(Immobility)'으로 정의하며, 6분 중 부동 반응을 보인 시간을 %로 표시하였는데, 우울도가 높을수록 부동 반응을 나타내는 시간이 증가하며, 항우울 효과를 보이는 약물들은 부동 반응의 시간을 줄이는 것으로 알려져 있다. 화학식 8-9의 화합물을 투여한 생쥐에서는 통계적으로 유의한 수준으로 대조군에 비해 부동 시간이 감소하였는데, 이는 화학식 8-9의 화합물이 항우울 효과를 가진다는 것을 의미한다(도 6b).

[0214] Open field test (이하 OFT)는 생쥐의 불안도를 측정하는 행동검사법이다(비특허문헌 20). 피험체 생쥐를 상단이 열린 챔버(가로, 세로, 깊이 각각 45 cm) 안에 혼자 둘 경우, 본능적으로 열린 공간인 중앙 영역 보다는 벽이 있는 가장자리에서 머무르는 경향을 나타낸다. 따라서 15분 동안 생쥐의 행동을 촬영한 후, 전체 면적의 25%에 해당하는 중앙 영역에 머무르는 시간을 %로 표시하였는데, 불안도가 높을수록 중앙 영역에 머무르는 시간이 감소하며, 항불안 효과를 보이는 약물들을 투여할 경우 중앙 영역에 머무르는 시간이 늘어나는 것으로 알려져 있다. 화학식 8-9의 화합물을 투여한 생쥐에서는 통계적으로 유의한 수준으로 대조군에 비해 중앙 영역에 머무르는 시간이 증가하였는데, 이는 화학식 8-9의 화합물이 항불안 효과를 가진다는 것을 의미한다(도 6c). 15분 동안 시험용 챔버 내에서 이동한 총 거리는 투여군과 대조군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이는 TST의 부동 시간이나 OFT의 중앙 영역 점유 시간의 차이가 운동 기능의 변조에 기인하는 것은 아니며, 실제로 우울 및 불안도의 차이에 의해 야기되는 특징이라는 사실을 의미한다(도 6d).

[0216] 한편, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 옥시이미노메틸벤젠 유도체는 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 활성성분으로 포함시키는 몇 가지의

제제화 방법을 예시한 것이다.

[0218] **제제예 1. 정제(가압 방식)의 제조**

[0219] 활성성분으로서, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 5.0 mg을 체로 친 후, 락토오스 14.1 mg, 크로스포비돈 USNF 0.8 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg을 혼합하고 가압하여 정제로 만들었다.

[0221] **제제예 2. 정제(습식 조립)의 제조**

[0222] 활성성분으로서, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 5.0 mg을 체로 친 후, 락토오스 16.0 mg과 녹말 4.0 mg을 섞었다. 0.3 mg의 폴리솔베이트80을 순수한 물에 녹인 후 이 용액의 적당량을 첨가한 다음, 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후 콜로이달 실리콘디옥사이드 2.7 mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 mg과 섞었다. 미립을 가압하여 정제로 만들었다.

[0224] **제제예 3. 분말 및 캡슐제의 제조**

[0225] 활성성분으로서, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 5.0 mg을 체로 친 후에, 락토오스 14.8 mg, 폴리비닐피롤리돈 10.0 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg와 함께 섞었다. 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

[0227] **제제예 4. 주사제의 제조**

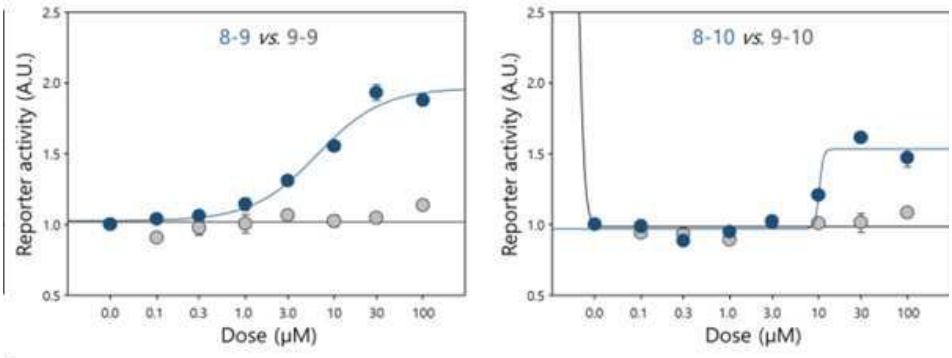
[0228] 활성성분으로서, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 100 mg을 함유시키고, 그밖에도 만니톨 180 mg, Na2HPO4, 12H20 26 mg 및 증류수 2,974 mg를 함유시켜 주사제를 제조하였다.

[0229] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

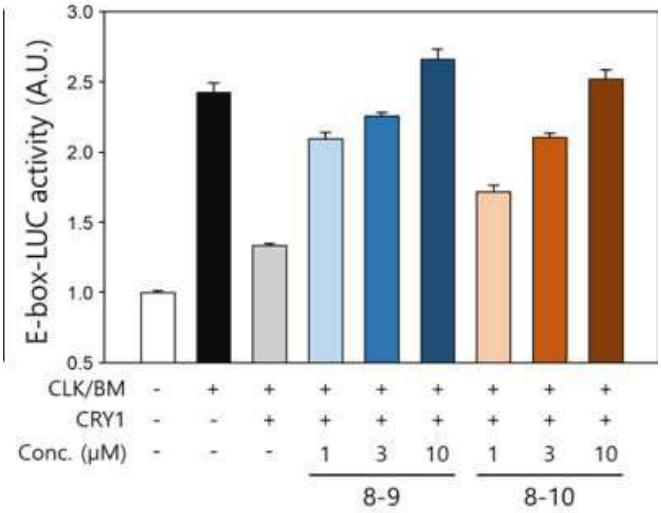
[0230] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

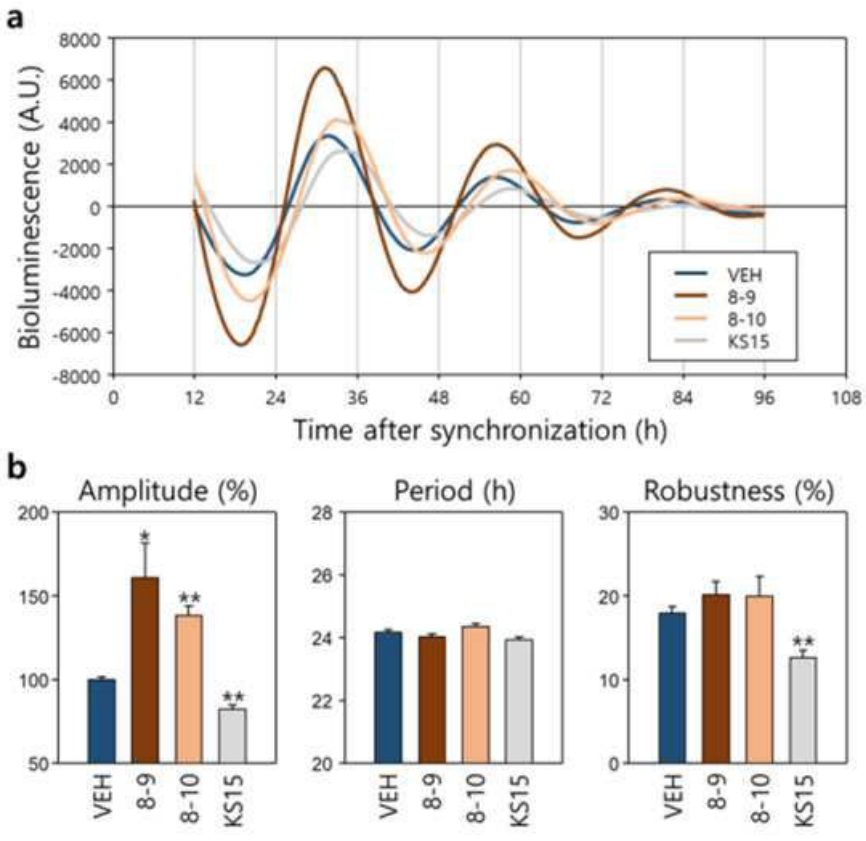
도면1



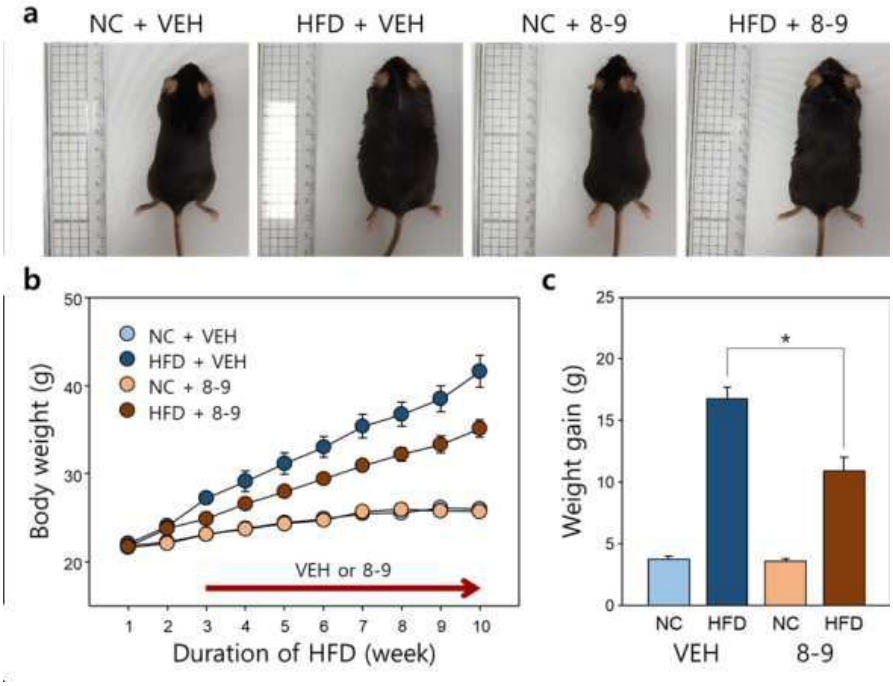
도면2


E-box-LUC activity (A.U.)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
CLK/BM - + + + + + + + +
CRY1 - - + + + + + + +
Conc. (μM) - - - 1 3 10 1 3 10
8-9
8-10

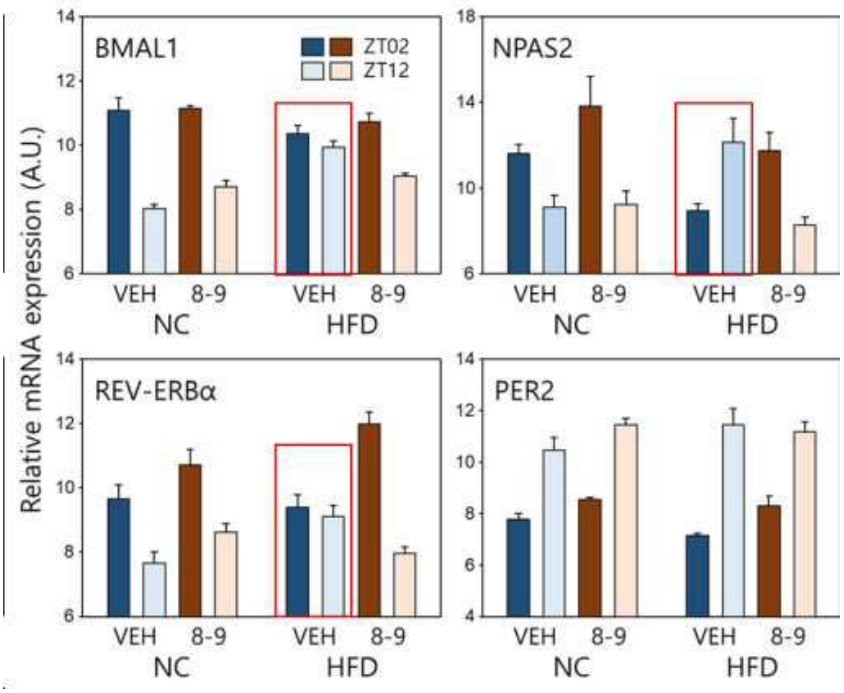
도면3


a
Bioluminescence (A.U.)
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
-6000
-8000
0 12 24 36 48 60 72 84 96 108
Time after synchronization (h)
VEH
8-9
8-10
KS15
b
Amplitude (%)
Period (h)
Robustness (%)
VEH
8-9
8-10
KS15

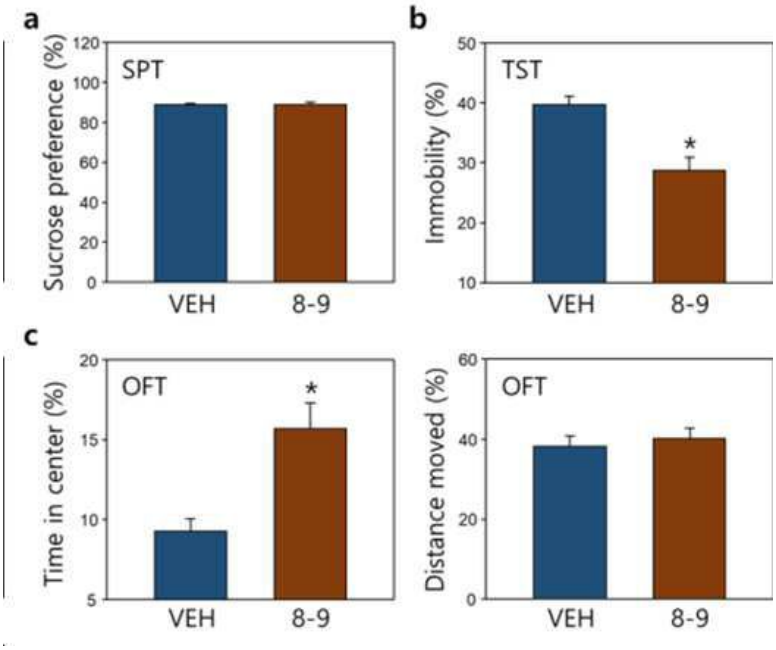
도면4


a
NC + VEH
HFD + VEH
NC + 8-9
HFD + 8-9
b
Body weight (g)
NC + VEH
HFD + VEH
NC + 8-9
HFD + 8-9
VEH or 8-9
Duration of HFD (week)
c
Weight gain (g)
*
NC
HFD
NC
HFD
VEH
8-9

도면5


BMAL1
ZT02
ZT12
NPAS2
REV-ERBα
PER2
Relative mRNA expression (A.U.)
VEH
8-9
NC
HFD

도면6


a
SPT
Sucrose preference (%)
120
100
80
60
40
20
0
VEH
8-9
b
TST
Immobility (%)
50
40
30
20
10
*
VEH
8-9
c
OFT
Time in center (%)
20
15
10
5
*
VEH
8-9
OFT
Distance moved (%)
60
40
20
0
VEH
8-9