



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월22일
(11) 등록번호 10-1737051
(24) 등록일자 2017년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/166 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/5377 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A61K 31/166 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0103713
(22) 출원일자 2015년07월22일
심사청구일자 2015년08월13일
(65) 공개번호 10-2017-0012682
(43) 공개일자 2017년02월03일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020070117872 A
W02007015632 A1

(73) 특허권자
(주)노바셀테크놀로지
경상북도 포항시 남구 청암로 77 내 (효자동, 포항
공과대학교)
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
윤종혁
경상북도 포항시 남구 효자동길 10번길 40, 홍석
빌라트 201호
이대훈
서울특별시 강남구 선릉로 222 111동 303호 (대치
동, 대치아이파크아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한윤호

전체 청구항 수 : 총 3 항

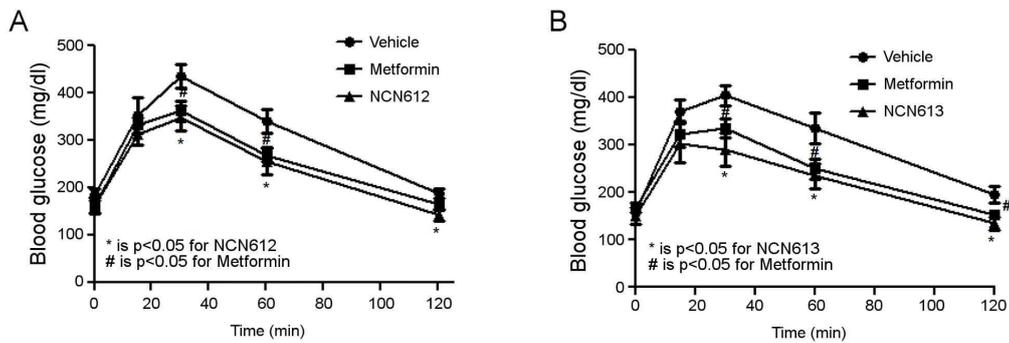
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 당뇨병 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 당뇨병 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 2,2,2-트리클로로에틸 포름아마이드 유도체(N-(2,2,2-trichloroethyl)formamide derivative)를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 31/5377 (2013.01)

(72) 발명자

최중권

대전광역시 유성구 대덕대로 541번길 68 현대아파트 103-604

이현규

대전광역시 유성구 어은로 57 한빛아파트 130동 703호

김진아

부산광역시 금정구 금샘로 582번길 45, 대명하이츠 3차 303호

류성호

경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 5-204 (지곡동, 교수아파트)

권용훈

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 2동 705호

송박용

경기도 의왕시 갈미1로 22 105동 1506호 (내손동, 내손주공아파트)

김재왕

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 4동 1201호

강병준

대전광역시 중구 태평로 35 212동 1704호 (태평동, 동양아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A111345

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업-선도형특성화연구개발사업

연구과제명 지방산대사 조절 물질을 이용한 당뇨병·비만 치료제 개발

기여율 1/3

주관기관 경북대학교병원

연구기간 2011.10.01 ~ 2013.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SI- 1305

부처명 기획재정부

연구관리전문기관 한국화학연구원

연구사업명 정부출연 일반사업

연구과제명 고수준 신약소재 확보를 통한 화합물은행 고도화사업

기여율 1/3

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013037974

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래기반기술개발사업

연구과제명 생리활성 화합물 등록 활용사업

기여율 1/3

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

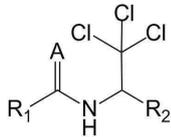
공지예외적용 : 있음

명세서

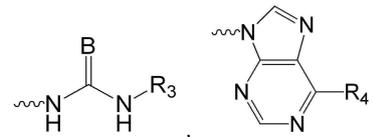
청구범위

청구항 1

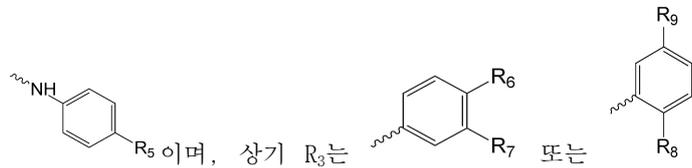
하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨병 치료용 약학적 조성물:

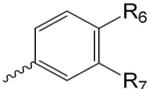
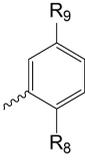


(상기 식에서, R₁은 디페닐메틸, 페닐, n-펜틸, 또는 9H-잔틸이고, R₂은



또는



이며, 상기 R₃는  또는  이고, R₄는 1-피페리디닐 또는 4-모폴리닐, R₅는 수소, 히드록시, 메틸, 에틸, 프로필, 메톡시, 에톡시 또는 프로폭시이며, R₆는 수소, 히드록시 또는 할로겐 원자이고, R₇은 수소, 히드록시, 니트로, 시아노, 포름아미도 또는 아세트아미도이며, R₈은 할로겐 원자이고, R₉은 트리할로메틸이며, A 및 B는 각각 독립적으로 O 또는 S이다).

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 할로겐 원자는 불소, 염소 또는 요오드인, 약학적 조성물

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물은 N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-nitrophenyl)carbamothioyl]amino)ethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide, N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-cyanophenyl)carbamothioyl]amino)ethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide, 2-methyl-N-(2,2,2-trichloro-1-[(4-ethoxyphenyl)amino]ethyl) benzamide, N-[2,2,2-trichloro-1-([2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl] carbamothioyl)amino)ethyl]hexanamide, 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(3-hydroxyphenyl)thioureido)ethyl)acetamide, N-{2,2,2-trichloro-1-[6-(4-morpholinyl)-9H-purin-9-yl]ethyl}benzamide, 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(3-cyanophenyl)thioureido)ethyl)acetamide, N-{2,2,2-Trichloro-1-[6-(1-piperidinyl)-9H-purin-9-yl]ethyl}benzamide, 3-[(2,2,2-Trichloro-1-[(diphenylacetyl)amino]ethyl)carbamothioyl]amino]benzamide, 2,2-Diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-cyanophenyl)carbamoyl]amino)ethyl)acetamide, N-(1-[(3-acetamidophenyl)carbamothioyl]amino)-2,2,2-trichloroethyl)-2,2-diphenyl- acetamide, 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)thioureido)ethyl)acetamide 또는 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(4-fluoro-3-nitrophenyl)thioureido)ethyl)acetamide인, 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 당뇨병 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현대사회에서 비만 및 당뇨로 대표되는 대사질환은 그 유병율이 급속도로 증가하고 있으며, 세계보건기구 발표에 따르면 2006년 기준 전세계 인구 중 약 4억명 정도가 비만이며, 2011년 National diabetics statics 발표 기준 미국 인구의 8.3%가 당뇨 환자라는 발표로 확인 할 수 있다. 당뇨는 인슐린 분비의 이상이나 인슐린 수용체의 이상에 의해서 발생되며 이에 따른 결과로 체내 혈당의 수치가 정상적으로 조절되어지지 않아서 발생하며 혈관질환, 시력저하와 같은 합병증이 존재한다. 당뇨의 대표적인 치료법으로는 인슐린 의존적인 치료법과 혈중 당 강하를 통한 치료법이 있다. 혈중 당 강하를 통한 치료법을 위한 종래의 물질로는 비구아나이드 계열의 화합물과 치아졸리딘디온 계열의 화합물, 레즈베라트롤, 황련추출물 등이 알려져 있다. 식약청 보고에 의하면 국내 당뇨병 치료제는 약 470여 종이 허가를 받아 유통되어 진다.

[0003] 최근 로지글리타존(미국 특허 제5,002,953호), 부트포민, 메트포민(metformin) 등의 일부 당뇨병 치료제에서 심혈관계 질환, lactic acidosis 등의 부작용이 발견 되어, 해당 치료제를 복용하는 환자들은 다른 치료제에 의존을 해야 한다. 또한 기존에 가장 많이 사용되는 메트포민의 경우 상대적 복용 농도가 높기 때문에 당뇨병 치료에 드는 일인당 비용 또한 높아진다. 또한 경구용 당뇨병 치료제는 설포닐 유레아 등이 있으나 당뇨병 치료에 대한 기전에 있어서 인슐린 분비를 촉진시키는 것으로, 당 흡수를 촉진 시키는 방법과는 상이하다.

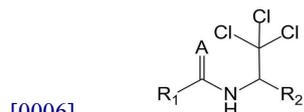
발명의 내용

해결하려는 과제

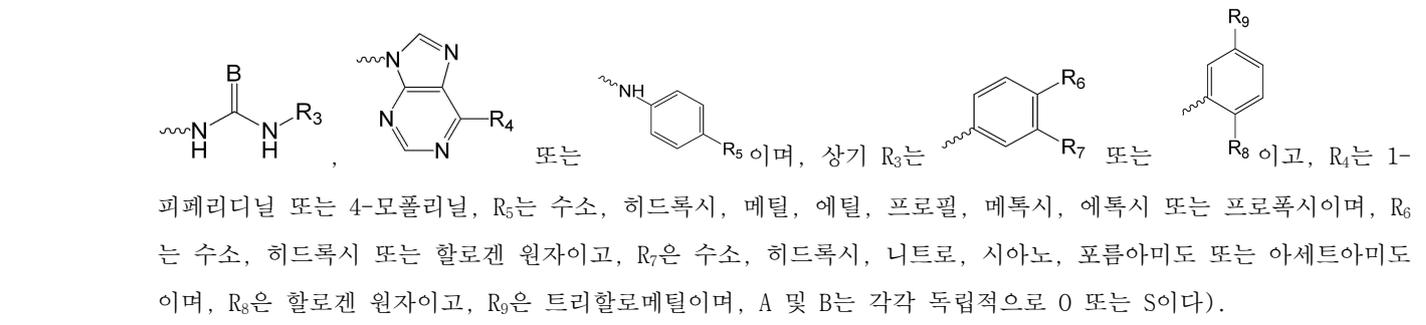
[0004] 그러나 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 비교적 적은 농도의 화합물을 이용하여 효과적으로 당 흡수 효율을 증진시킴으로써 당뇨병 치료에 효능이 있는 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 약학적 조성물이 제공된다:

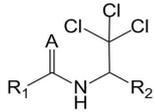


[0007] (상기 식에서, R₁은 벤질, 디페닐메틸, 페닐, n-펜틸, 메틸벤질, 에틸벤질 또는 9H-잔틸이고, R₂은



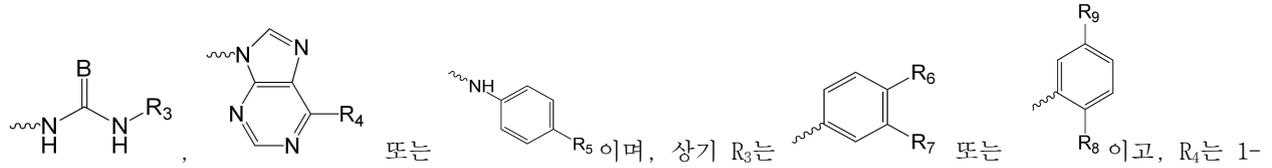
[0008] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 당뇨병은 제1형 또는 제2형 당뇨병일 수 있다.

[0009] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 하기 구조식을 갖는 화합물을 당뇨병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 혈당 강하방법이 제공된다:



[0010]

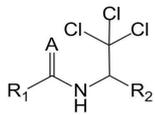
[0011] (상기 식에서, R₁은 벤질, 디페닐메틸, 페닐, n-펜틸, 메틸벤질, 에틸벤질 또는 9H-잔틸이고, R₂은



피페리디닐 또는 4-모폴리닐, R₅는 수소, 히드록시, 메틸, 에틸, 프로필, 메톡시, 에톡시 또는 프로폭시이며, R₆는 수소, 히드록시 또는 할로젠 원자이고, R₇은 수소, 히드록시, 니트로, 시아노, 포름아미도 또는 아세트아미도이며, R₈은 할로젠 원자이고, R₉은 트리할로메틸이며, A 및 B는 각각 독립적으로 O 또는 S이다).

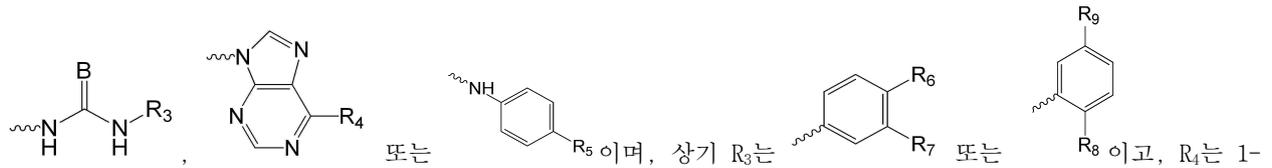
[0012] 상기 방법에 있어서, 상기 당뇨병은 제1형 또는 제2형 당뇨병일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 하기 구조식을 갖는 화합물을 당뇨병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병의 치료방법이 제공된다:



[0014]

[0015] (상기 식에서, R₁은 벤질, 디페닐메틸, 페닐, n-펜틸, 메틸벤질, 에틸벤질 또는 9H-잔틸이고, R₂은



피페리디닐 또는 4-모폴리닐, R₅는 수소, 히드록시, 메틸, 에틸, 프로필, 메톡시, 에톡시 또는 프로폭시이며, R₆는 수소, 히드록시 또는 할로젠 원자이고, R₇은 수소, 히드록시, 니트로, 시아노, 포름아미도 또는 아세트아미도이며, R₈은 할로젠 원자이고, R₉은 트리할로메틸이며, A 및 B는 각각 독립적으로 O 또는 S이다).

[0016] 상기 방법에 있어서, 상기 당뇨병은 제1형 또는 제2형 당뇨병일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 기존에 잘 알려진 당뇨병 치료제인 멧포민 보다 1000배 낮은 농도에서 당 흡수를 증가시키는 물질을 제조할 수 있어서, 당뇨병 치료를 효율적으로 달성할 수 있게 된다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 화합물 벵크로부터 AMPK 활성을 증가시키는 화합물의 스크리닝 결과와 관련된 웨스턴 블랏 분석결과를 나타낸 사진이다.

도 2는 본 발명의 일실험예에 따른 L6 세포에 NCN612 및 NCN613 화합물 처리에 따른 농도 및 시간 의존적으로 AMPK 활성의 증가를 웨스턴블랏 분석 결과를 나타낸 그림이다.

도 3은 본 발명의 일실험예에 따른 MTT 분석을 통해 NCN612 및 NCN613 화합물의 독성을 평가한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일실험예에 따른 L6 세포에서 데옥시글루코오스를 이용한 NCN612 및 NCN613 화합물에 의한 당 흡수 측정을 나타낸 그래프이며(3A), o-페닐렌디아민 분석을 통한 NCN612 및 NCN613 화합물의 당수송체의 세

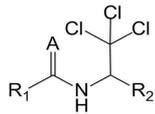
포막 이동 측정을 나타낸 그래프(3B)이다.

도 5는 본 발명의 일실험예에 따른 AMPK 특이적 저해제 처리시 NCN612 및 NCN613의 당흡수율의 변화를 나타낸 그래프(5A)이며, 동일한 조건에서 당수송체의 세포막 이동의 감소를 나타낸 그래프(5B)이다.

도 6은 본 발명의 일실험예에 따른 고지방식이 유도 당뇨마우스에서 NCN612(6A) 및 NCN613(6B) 혈당강하의 효과를 나타내는 그래프이다.

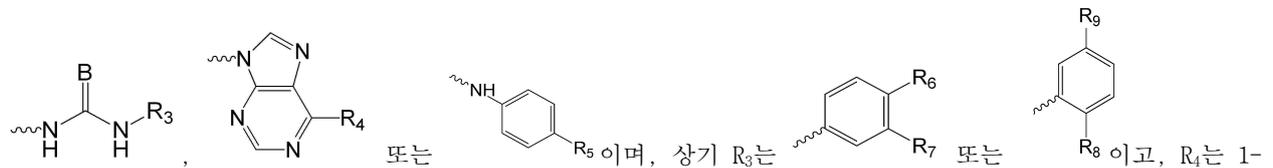
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 일 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 약학적 조성물이 제공된다:



[0020]

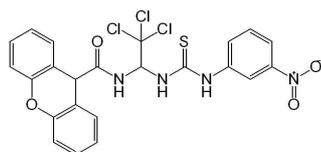
[0021] (상기 식에서, R₁은 벤질, 디페닐메틸, 페닐, n-헥틸, 메틸벤질, 에틸벤질 또는 9H-잔틸이고, R₂은



[0022] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 당노병은 제2형 당노병일 수 있다.

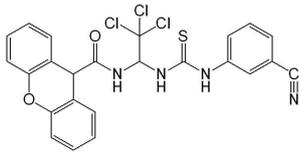
[0023] 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 화합물은 N-(2,2,2-Trichloro-1-[(3-nitrophenyl)carbamothioyl]amino)ethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide, N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-cyanophenyl)carbamothioyl]amino)ethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide, 2-methyl-N-{2,2,2-trichloro-1-[(4-ethoxyphenyl)amino]ethyl} benzamide, N-[2,2,2-trichloro-1-([2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl]carbamothioyl)amino)ethyl]hexanamide, 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(3-hydroxyphenyl)thioureido)ethyl)acetamide, N-{2,2,2-trichloro-1-[6-(4-morpholinyl)-9H-purin-9-yl]ethyl}benzamide, 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(3-cyanophenyl)thioureido)ethyl)acetamide, N-{2,2,2-trichloro-1-[6-(1-piperidinyl)-9H-purin-9-yl]ethyl}benzamide, 3-[(2,2,2-trichloro-1-[(diphenyl-acetyl)amino]ethyl)carbamothioyl]amino]benzamide, 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-cyanophenyl)carbamoyl]amino)ethyl)acetamide, N-(1-[(3-acetamidophenyl)carbamothioyl]amino)-2,2,2-trichloroethyl)-2,2-diphenyl-acetamide, 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)thioureido)ethyl)acetamide, 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(4-fluoro-3-nitrophenyl)thioureido)ethyl)acetamide일 수 있다.

[0024] 상기 N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-nitrophenyl)carbamothioyl]amino)ethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide는 하기의 구조식을 갖는다:



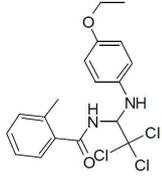
[0025]

[0026] 상기 N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-cyanophenyl)carbamothioyl]amino)ethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide는 하기의 구조식을 갖는다:



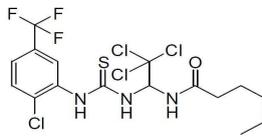
[0027]

[0028] 상기 2-methyl-N-(2,2,2-trichloro-1-[(4-ethoxyphenyl)amino]ethyl)benzamide는 하기의 구조식을 갖는다:



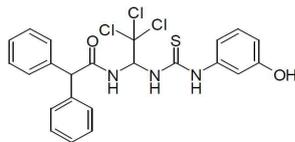
[0029]

[0030] 상기 N-[2,2,2-Trichloro-1-([2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl] carbamothioyl)amino]ethyl]hexanamide는 하기의 구조식을 갖는다:



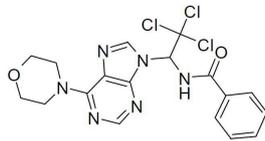
[0031]

[0032] 상기 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(3-hydroxyphenyl)thioureido) ethyl)acetamide는 하기의 구조식을 갖는다:



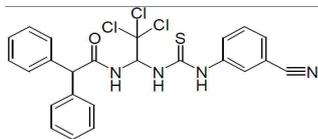
[0033]

[0034] 상기N-{2,2,2-trichloro-1-[6-(4-morpholinyl)-9H-purin-9-yl]ethyl} benzamide는 하기의 구조식을 갖는다:



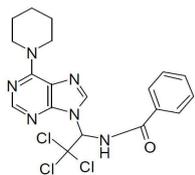
[0035]

[0036] 상기 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(3-cyanophenyl)thioureido) ethyl)acetamide는 하기의 구조식을 갖는다:



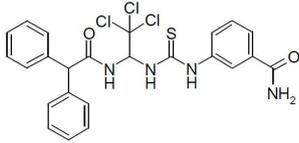
[0037]

[0038] 상기 N-{2,2,2-trichloro-1-[6-(1-piperidiny)-9H-purin-9-yl]ethyl} benzamide는 하기의 화학식을 갖는다:



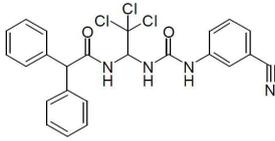
[0039]

[0040] 상기 3-[(2,2,2-Trichloro-1-[(diphenylacetyl)amino]ethyl}carbamothioyl) amino]benzamide는 하기의 구조식을 갖는다:



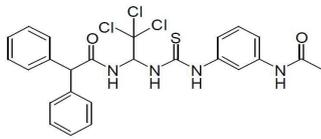
[0041]

[0042] 상기 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-((3-cyanophenyl)carbamoyl)amino)ethylacetamide는 하기의 구조식을 갖는다:



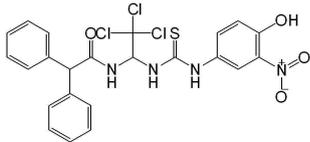
[0043]

[0044] 상기 N-(1-((3-acetamidophenyl)carbamothioyl)amino)-2,2,2-trichloroethyl)-2,2-diphenylacetamide는 하기의 구조식을 갖는다:



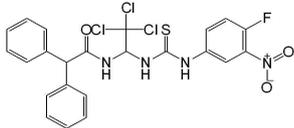
[0045]

[0046] 상기 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)thioureido)ethyl)acetamide는 하기의 구조식을 갖는다:



[0047]

[0048] 상기 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(4-fluoro-3-nitrophenyl)thioureido)ethyl)acetamide는 하기의 구조식을 갖는다:



[0049]

[0050] 상기 화합물들 중 N-(2,2,2-trichloro-1-((3-nitrophenyl)carbamothioyl)amino)ethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide 및 N-(2,2,2-trichloro-1-((3-cyanophenyl)carbamothioyl)amino)ethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide는 각각 PubChem에 CID: 16067620 및 16067621로 등록된 공지의 화합물로, W02007/015632A1에 개시되어 있다. 그러나, 상기 W02007/015632A1에 개시된 화합물들은 ATM/ATR 저해제로서 항암제로 사용되는 것으로 기재되어 있어, 본 발명의 용도와는 상이하다.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물의 유효량은 환자의 환부의 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, 0.01 μg/kg/day 내지 10 mg/kg/day일 수 있다. 상기 1일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일(數日) 간격으로 간헐(間歇)투여해도 된다.

[0052] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1-100 중량%로 함유될 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다.

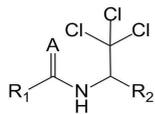
[0054] 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(corn starch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 텍스트린, 카올린, 탄산칼슘, 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스(tragacanth), 젤라틴, 셀락

(shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 텍스트린, 펙틴(pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 파립제에는 당의(糖衣), 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수 있다.

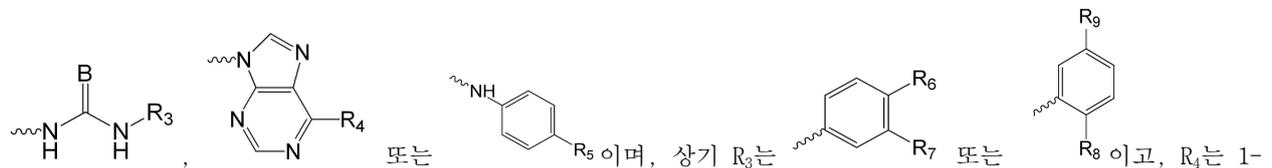
[0055] 본 발명의 약학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며(예: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 최신판; Mack Publishing Company, Easton PA), 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 외용제일 수 있다. 본 발명의 외용제에는 시트제, 액상도포제, 분무제, 로션제, 크림제, 파프제, 분제, 침투 패드제, 분무제, 수화젤을 포함한 겔제, 파스타제, 리니먼트제, 연고제, 에어로졸, 분말제, 현탁액제, 경피흡수제 등의 통상적인 외용제의 형태가 포함될 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042(Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기술되어 있다.

[0056] 본 발명자들은 화합물뱅크에 등재된 공지 화합물을 대상으로 당뇨병의 표적 분자인 pAMPK의 발현 또는 AMPK의 인산화 정도를 조절하는 화합물을 탐색한 결과, 2,2,2-트리클로로에틸 포름아마이드 유도체(N-(2,2,2-trichloroethyl)form- amide derivative) 중 일부 화합물이 pAMPK의 발현 또는 AMPK의 인산화 정도를 대조군에 비해 상향조절을 확인하였고, 그 중 일부 화합물에 대하여 동물실험을 수행한 결과, 당뇨병 모델 동물의 포도당 흡수를 촉진시킴으로써, 혈당치를 유의하게 저하시킬 수 있음을 실험적으로 입증하였다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물들은 당뇨병 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0057] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 하기 구조식을 갖는 화합물을 당뇨병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 혈당 강하방법이 제공된다:



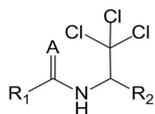
[0059] (상기 식에서, R₁은 벤질, 디페닐메틸, 페닐, n-헥틸, 메틸벤질, 에틸벤질 또는 9H-잔틸이고, R₂은



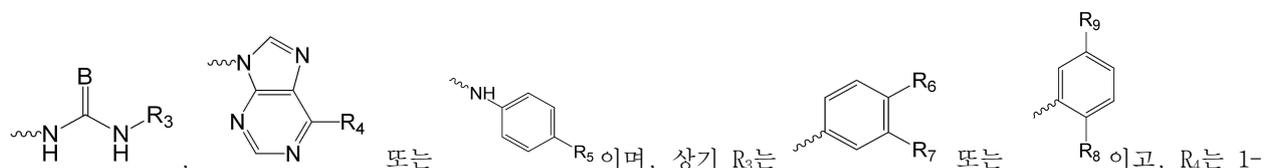
피페리디닐 또는 4-모폴리닐, R₅는 수소, 히드록시, 메틸, 에틸, 프로필, 메톡시, 에톡시 또는 프로폭시이며, R₆는 수소, 히드록시 또는 할로겐 원자이고, R₇은 수소, 히드록시, 니트로, 시아노, 포름아미도 또는 아세트아미도이며, R₈은 할로겐 원자이고, R₉은 트리할로메틸이며, A 및 B는 각각 독립적으로 O 또는 S이다).

[0060] 상기 방법에 있어서, 상기 당뇨병은 제1형 또는 제2형 당뇨병일 수 있다.

[0061] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 하기 구조식을 갖는 화합물을 당뇨병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병의 치료방법이 제공된다:



[0063] (상기 식에서, R₁은 벤질, 디페닐메틸, 페닐, n-헥틸, 메틸벤질, 에틸벤질 또는 9H-잔틸이고, R₂은



피페리디닐 또는 4-모폴리닐, R₅는 수소, 히드록시, 메틸, 에틸, 프로필, 메톡시, 에톡시 또는 프로폭시이며, R₆는 수소, 히드록시 또는 할로젠 원자이고, R₇은 수소, 히드록시, 니트로, 시아노, 포름아미도 또는 아세트아미도이며, R₈은 할로젠 원자이고, R₉은 트리할로메틸이며, A 및 B는 각각 독립적으로 O 또는 S이다).

[0064] 상기 방법에 있어서, 상기 당뇨병은 제1형 또는 제2형 당뇨병일 수 있다.

[0065] 이하, 본 발명은 실시예 및 실험예를 통해 더 상세히 설명된다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0066] **실시예**

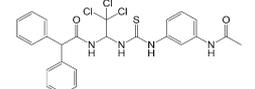
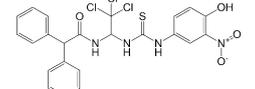
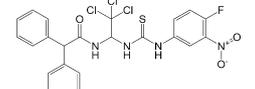
[0067] 이하, 표 1의 실시예에 기재된 화합물은 상업적 화합물 은행(한국화합물 은행, 한국화학연구원, 대한민국)에서 구매하였다.

표 1

본 발명의 실시예들

[0068]

| 실시예 | 구조식 | IUPAC Name (References) |
|-----|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | | N-(2,2,2-Trichloro-1-[(3-nitrophenyl)carbamothioyl]aminoethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide (PubChem CID: 16067620) |
| 2 | | N-(2,2,2-Trichloro-1-[(3-cyanophenyl)carbamothioyl]aminoethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide (PubChem CID: 16067621) |
| 3 | | 2-methyl-N-2,2,2-trichloro-1-[(4-ethoxyphenyl)amino]ethylbenzamide (PubChem CID: 2884847) |
| 4 | | N-[2,2,2-Trichloro-1-({[2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl]carbamothioyl}amino)ethyl]hexanamide (PubChem CID: 3438816) |
| 5 | | 2,2-Diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(3-hydroxyphenyl)thioureido)ethyl)acetamide (W02007/015632A1) |
| 6 | | N-{2,2,2-Trichloro-1-[6-(4-morpholinyl)-9H-purin-9-yl]ethyl} benzamide (W02007/015632A1) |
| 7 | | 2,2-Diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(3-cyanophenyl)thioureido)ethyl)acetamide (PubChem CID: 16067523) |
| 8 | | N-{2,2,2-Trichloro-1-[6-(1-piperidiny)-9H-purin-9-yl]ethyl} benzamide (PubChem CID: 2830406) |
| 9 | | 3-[(2,2,2-Trichloro-1-[(diphenylacetyl)amino]ethyl)carbamothioyl]aminobenzamide (W02007/015632A1) |
| 10 | | 2,2-Diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-cyanophenyl)carbamoyl]amino)ethyl)acetamide (W02007/015632A1) |

| | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11 |  | N-(1-((3-Acetamidophenyl)carbamothioyl)amino)-2,2,2-trichloroethyl)-2,2-diphenylacetamide (PubChem CID: 5259198) |
| 12 |  | 2,2-Diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)thioureido)ethyl)acetamide (PubChem CID: 16067617) |
| 13 |  | 2,2-diphenyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-(4-fluoro-3-nitrophenyl)thioureido)ethyl)acetamide (PubChem CID: 6605258) |

[0069] **일반적 방법**

[0070] **L6 세포의 배양**

[0071] 본 발명에서 랫트 골격근세포인 L6 세포(ATCC)는 10% FBS(Lonza, USA)를 첨가한 DMEM배지(Lonza, 미국)를 이용하여 95% 습도, 5% CO₂, 37 온도 조건에서 배양하였다. 상기 L6 세포는 5 내지 20번 사이의 계대 배양된 세포를 이용하였고, 화합물을 처리하기 4시간 동안에는 FBS가 없는 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0072] **실험예 1: AMPK 활성을 증진시키는 유도체의 성질 규명**

[0073] 본 발명의 일 실시예에 따른 2,2,2-트리클로로에틸 포름아마이드 유도체(N-(2,2,2-trichloroethyl)formamide derivative)는 한국화학연구원 소재 화합물 은행에서 구입하였으며, 다양한 화합물에 대한 기초 스크리닝 결과 N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-nitrophenyl)carbamothioyl]aminoethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide(이하, 'NCN612'로 약칭함) 및 N-(2,2,2-trichloro-1-[(3-cyanophenyl)carbamothioyl]aminoethyl)-9H-xanthene-9-carboxamide(이하, 'NCN613'라 약칭함)를 포함한 표 1에 기재된 13개의 화합물이 대조군 대비 L6 골격근 세포에서의 pAMPK의 발현을 효율적으로 증가시킨 것으로 확인되었다(도 1 및 표 2).

표 2

[0074] 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 AMPK 발현 증가율

| 실시예 | 대조군(NT) 대비 AMPK 발현 증가 배율 |
|-----|--------------------------|
| 1 | 11.9 |
| 2 | 13.3 |
| 3 | 2.60 |
| 4 | 3.07 |
| 5 | 13.17 |
| 6 | 2.11 |
| 7 | 17.83 |
| 8 | 9.97 |
| 9 | 5.57 |
| 10 | 27.34 |
| 11 | 6.35 |
| 12 | 5.16 |
| 13 | 16.57 |

[0075] 상기 화합물 중 추가합성이 용이한, 상기 NCN612(실시예 1) 및 NCN613(실시예 2)에 대하여 추가적인 시험관내 (*in vitro*) 실험 및 동물(*in vivo*) 실험을 수행하였다. 구체적으로 화합물 बैं크의 화합물들에 대하여 AMPK 활성 수준을 웨스턴블랏 분석을 통하여 확인하였다. L6 골격근세포에 NCN612 및 NCN613 화합물을 0, 0.1, 0.5, 1, 3 및 5 μM 농도로 5분 동안 처리한 후, 처리한 세포 내에서 AMPK의 활성 정도를 웨스턴블랏 분석하였다(도 2의 A 및 B). 이어, L6 골격근세포에 NCN612 및 NCN613 화합물에 대해서 처리 시간에 따른 AMPK 활성 수준을 웨스턴블랏 분석을 통하여 확인하였다. 5 μM의 동일 농도로 NCN612 및 NCN613 물질을 2, 5, 10, 30, 60 분 동안 L6 골격근세포에 처리한 후, 처리 시간에 따른 AMPK의 활성을 웨스턴블랏으로 확인하였다(도 2의 D 및 E). 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴블랏 방법은 하기와 같다. 각 처리군은 본 발명의 화합물 NCN612 및 NCN613의 처리가

끝나는 즉시 차가운 PBS를 처리하여 실험 외적인 활성을 최소화 하였으며 이후 용해 완충액에서 초음파 분쇄한 후, 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 동량의 단백질을 5x 시료 완충액에 혼합하여 95°C에서 5분간 가열한 다음, 6~16% 농도구배 SDS-PAGE(SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)에서 전기영동하였다. 그런 다음 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 막에 흡착시켰다. 1차 항-AMPK 항체(Upstate, USA), 1차 항-ACC-항체(Cellsignaling, USA), 1차 항-인산화 AMPKa 항체(Cellsignaling, USA), 1차 항-인산화 ACC(cellsignaling) 및 1차 항-액틴 항체(Santa Cruz, USA)를 5% 탈지유(skimmed milk)를 포함하는 TBST 완충액(0.05% Tween 20-Tris buffered saline, pH 7.6)에 희석시켜 16시간 동안 반응시킨 후, TBST로 10분간 4차례 세척하였다. 그런 다음, 2차 항-마우스 래빗 퍼옥시다제-결합 항체(KPL, USA)를 처리하고 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 다시 TBST로 10분간 4차례 세척하였고, ECL(enhanced chemiluminescent) 용액(Thermo, USA)으로 발색하여 확인하였다. 또한, 웨스턴 블랏 분석 이미지를 이미지J 프로그램(Ver 1.38, rsbweb.nih.gov/ij/index.html)을 이용하여 농도 분석(densitometric analysis)으로 정량적으로 활성도를 비교하였다. 도 2의 A 및 도의 B에서 보이는 바와 같이, L6 세포에 NCN612 및 NCN613 화합물을 처리한 결과 농도 의존적으로 AMPK의 활성을 증가시키는 것을 웨스턴블랏 분석을 통해 확인하였다. 또한 이미지J 프로그램을 이용하여 AMPK의 활성을 정량하여 그래프를 그려 본 결과 약 2 μ M 정도에서 EC₅₀을 기록하였다(도 2의 C). 이는 메트포닌(metformin)에 비해서 1,000배 이상 낮은 농도임을 확인할 수 있었다. 또한 L6 골격근세포에 NCN612 및 NCN613 화합물 각각을 모두 5 μ M 농도로 처리한 후부터 60분까지 시간에 따른 AMPK의 활성을 웨스턴블랏으로 확인하였다. 도 2의 D 및 E에서 보이는 바와 같이, NCN612 및 NCN613 화합물을 L6 세포에 처리 하였을 때에 시간 의존적인 AMPK의 활성도 변화를 웨스턴블랏 분석으로 조사하였고, NCN612 및 NCN613 모두 30분까지 시간 의존적으로 AMPK의 활성이 증가를 하며 5~10분 사이 그 활성이 최대치임을 보였고, 빠른 시간에서의 AMPK 활성에 기여 하는 것을 확인하였다.

[0076] **실험예 2: 화합물에 의한 세포 생존율 변화 분석**

[0077] 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물의 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 화합물 처리농도에 따른 세포생존율을 MTT 분석을 통하여 확인하였다. L6 세포를 96웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰의 비율로 심은 후, 24시간 동안 배양하였으며, 그 후 FBS가 없는 배지에서 4시간동안 더 배양하였다. NCN612 및 NCN613 화합물을 5, 10 μ M의 농도로 처리하고 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고, 세포에 FBS가 없는 배지에 녹인 0.5 mg/ml MTT(Sigma-Aldrich, 미국)를 첨가하고 3시간동안 37°C, 5% CO₂세포 배양기에서 반응시켰다. 그 후, 상기 MTT 용액을 제거하고 100 μ l DMSO 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 상기 플레이트를 10분 동안 볼텍싱(vortexing)하고, 540 nm에서 용액의 흡광도를 측정하였다. 도 3에서 보이는 바와 같이, 그 결과 화합물을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 본 발명의 실시예 1 및 2의 화합물을 처리한 세포 생존율은 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 화합물 처리량 의존적인 세포 생존율의 차이 또한 관찰되지 않았으며 세포 생존에 약영향을 미치지 않음을 확인할 수 있다. 도 3은 NCN612 및 NCN613 화합물의 독성을 평가한 결과로, L6 세포에 상기 화합물들을 각각 5, 10 μ M 처리한 후에 MTT 분석을 통하여 세포의 생존율을 확인한 결과이다.

[0078] **실험예 3: 방사성 동위원소를 이용한 화합물에 의한 당흡수 측정**

[0079] 본 발명에서 NCN612 및 NCN613 화합물이 세포 내에서 AMPK의 활성을 통해 당흡수 증진여부를 방사성 동위원소가 표지된 데옥시글루코오스를 이용하여 확인하였다. 데옥시글루코오스는 세포 내로 흡수되어 들어가지만 세포 내에서 대사 될 수 없는 형태의 물질로서 세포 내로 흡수된 양을 확인 할 수 있는 물질이다. 먼저 L6세포를 FBS 없는 배지에서 3시간 동안 배양한 후 L6 세포에 NCN612 및 NCN613 각각의 화합물을 5 μ M 농도로 1시간 동안 처리 한 후 포도당 함유량이 없는 용액인 크렘스-헨셀라이트(Krebs-Henseleit) 완충액(NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 4.6 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, Glucose free)으로 한번 세척 후 각 웰에 250 μ L 씩 분주 한 후 0.1 mCi/ml 의 2-데옥시[¹⁴탄소-글루코즈]를 10분간 실온에서 처리한 후, 차가운 PBS 완충액으로 3번 세척하여 포도당의 흡수를 중지하였다. 그런 다음 세포는 0.5 M NaOH, 0.1% SDS 용액으로 용해한 후 세포 내에 잔존 되어 있는 방사성 동위원소 양을 측정함으로써 포도당의 흡수 정도를 확인 하였다. 즉 2-데옥시[¹⁴탄소-글루코즈] 처리 후 신틸레이터(scintillator)를 이용하여 세포 내에 축적되어 있는 2-데옥시[¹⁴탄소-글루코즈] 양을 측정하였다. 도 4의 A에서 나타난 바와 같이 NCN612 및 NCN613 화합물을 처리 해 준 실험군에서 당흡수가 증가됨을 확인하였다.

[0080] **실험예 4: α -폐닐렌디아민 분석을 통한 당수송체의 세포막 이동 측정**

[0081] 상기 실험예 3과 동일한 조건에서 각 화합물을 처리한 플레이트에 PBS로 세척을 한 후 3% BSA 에 10분간 보관하

였다. 이후 항 myc 항체를 플레이트에 분주 한 후 1시간 동안 반응한 후 PBS 세척을 하였다. 이후 3% 파라포름 알데히드를 10분간 처리하여 각 웰의 샘플을 고정시킨 후 PBS로 세척하였다. 이후 10% H₂O₂ *o*-페닐렌디아민(*o*-phenylenediamine) 용액을 처리하여 발색을 확인한 후 3 M HCl 을 넣어서 발색을 중지 시킨 후 492 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 도 4의 B에서 나타난 바와 같이, 당흡수 환경에서 당수송체의 세포막으로 이동의 증가를 통해 당 흡수의 기작을 확인하였다.

[0082] **실험예 5: AMPK 특이적 활성저해제를 이용한 화합물에 의한 당흡수 메커니즘**

[0083] 상기 실험예 3를 통해 당흡수 능력이 상기 실험예 1, 2의 AMPK 활성의 결과로써 나타난 일련의 기능임을 재확인 하기 위해, AMPK 특이적인 활성 저해제를 처리하여 당흡수 능력이 저해되는지 여부를 확인하였다. 24웰 플레이트에 L6세포를 1x10⁴ 세포/웰로 분주 한 후 48시간 동안 키운 후 FBS 없는 배지에서 2시간 30분 더 배양한 후 실험군에 10 μM의 캄파운드(CC)를 30분 동안 처리하였고, 그런 다음 NCN612 및 NCN613 화합물을 각각 1시간씩 추가적으로 처리하였다. 그 후 크랩스-헨셀라이트 완충액으로 1회 세척하였고 각 웰에 250 μL씩 분주한 후 0.1 mCi/ml의 2-데옥시[¹⁴탄소-글루코즈]를 10분간 실온에서 처리하였다. 포도당의 흡수를 중지하기 위해 차가운 PBS 완충액으로 3번 세척하였다. 이후 세포는 0.5 M NaOH, 0.1% SDS 용액으로 용해한 후 세포 내에 잔존 되어 있는 방사성 동위원소 양을 측정하여, 포도당의 흡수 증진의 효과가 AMPK 특이적 저해제를 처리함으로 사라진다는 것을 확인 하였다. 도 5의 A는 AMPK 특이적 저해제인 CC를 처리하였을 때의 당 흡수율의 변화를 확인한 결과이다. 도 4과 동일한 조건에 CC를 30분간 전처리함으로써 AMPK를 특이적으로 저해시킨 실험군을 만들었으며, NCN612 및 NCN613 화합물을 처리하여 얻은 당 흡수율 증가가 CC의 전처리에 의해 사라진 것으로 말미암아 AMPK 활성에 특이적인 결과물으로써 당 흡수가 증진되었음을 재확인 하였다.

[0084] **실험예 6: *o*-페닐렌디아민 분석을 이용한 화합물에 의한 당수송체의 세포막 이동 메커니즘**

[0085] 상기 실험예 4에서 확인된 당수송체의 세포막 이동 증가가 AMPK 활성에 의한 결과인지 조사하기 위해 상기 실험예 5에서 사용한 AMPK 특이적 활성저해제 CC를 같은 조건으로 처리하였다. 상기 실험예 4와 동일한 실험방법과 상기 실험예 5와 동일한 조건으로 CC를 처리하였다. 그 결과 화합물 처리에 의하여 증가된 당 수송체의 세포막 이동 증가가 CC를 전처리 하였을 때에 사라지는 것을 통해 AMPK 활성에 의한 현상임을 확인하였다. 도 5의 B에서 나타난 바와 같이 도 4A와 동일한 조건에서 당수송체의 세포막 이동이 감소하였음을 확인한 결과이다.

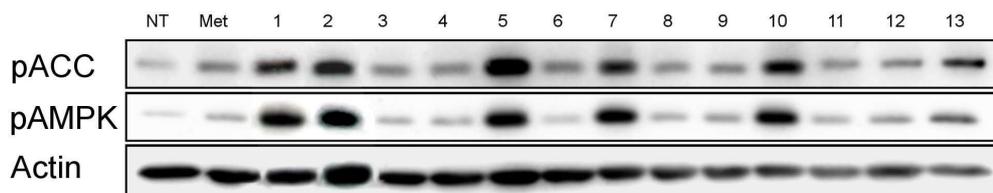
[0086] **실험예 7: 고지방식이(HFD: high fat diet)로 유도한 당뇨마우스 혈당강하 확인**

[0087] 본 발명에서 생후 4주 후 부터 12주 동안 고지방식이(HDF)를 통해 당뇨가 유발 된 쥐에서 GTT를 시행하여 생체 내 실험을 하였다. 실험 전 쥐는 16시간 단식을 하였고, 정맥 내 주사법으로 각각의 물질(대조군, NCN612 3 mg/kg, NCN613 3 mg/kg, 메포민 125 mg/kg)을 주사하였다. 주사 30분 이후 혈당을 확인한 후 1 mg/kg의 포도당을 복막 내 주사법으로 처리한 후 15, 30, 60 120 분에서의 혈당을 확인 하였다. 도 6에서 보이는 바와 같이 고 지방 식이 유도 당뇨마우스에서 NCN612 및 NCN613 처리군에서 혈당 수치가 감소되는 혈당강하 효과를 확인하였다.

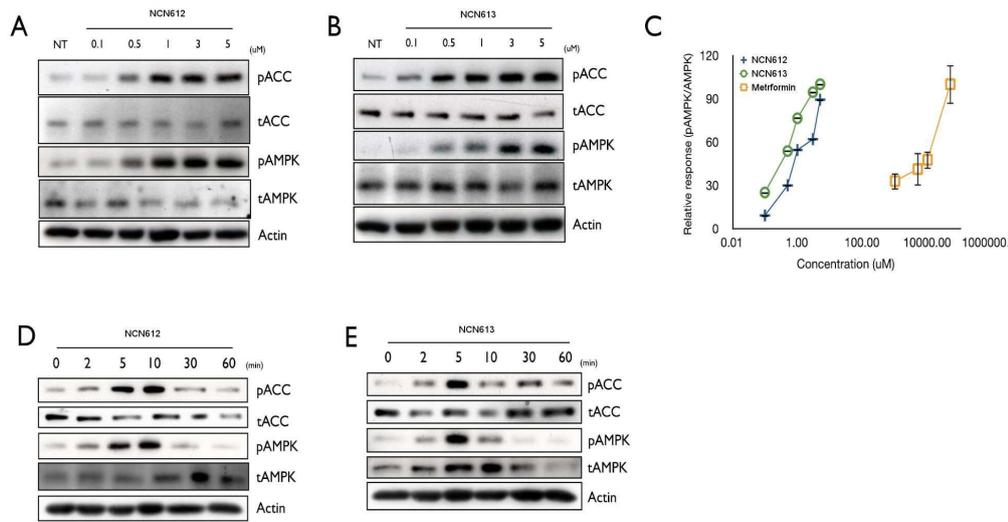
[0088] 본 발명은 상기 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

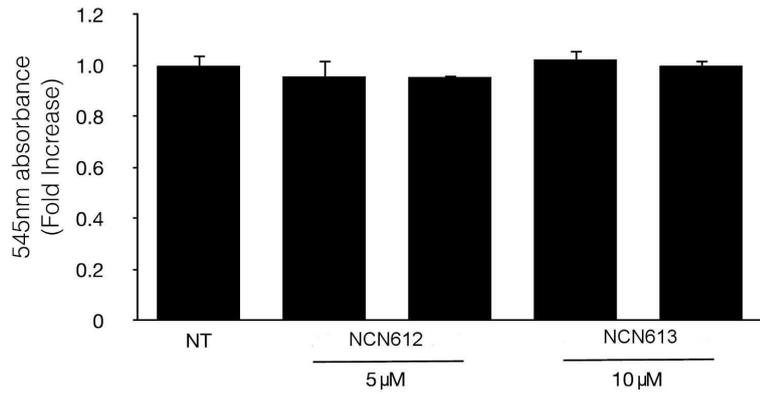
도면1



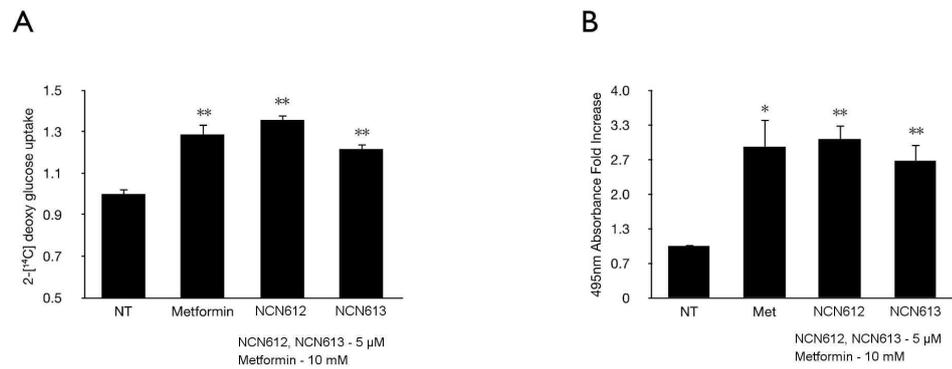
도면2



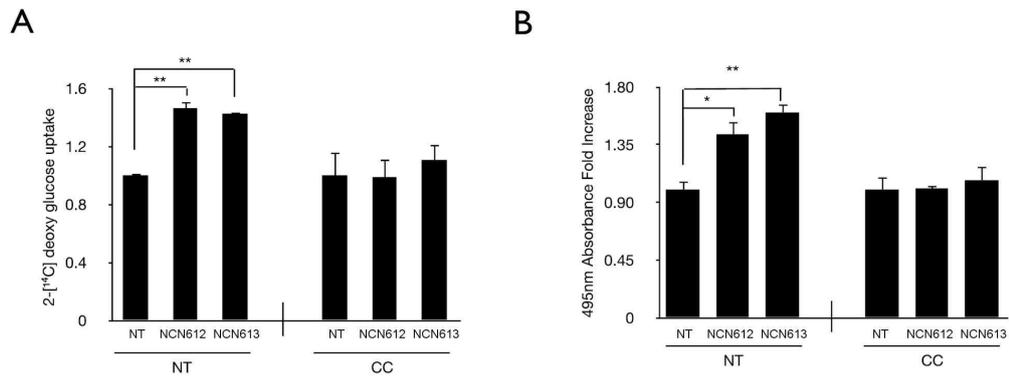
도면3



도면4



도면5



도면6

