



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0024283
(43) 공개일자 2020년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/58 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/58 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7003037
(22) 출원일자(국제) 2019년02월04일
심사청구일자 2020년01월31일
(85) 번역문제출일자 2020년01월31일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2019/003860
(87) 국제공개번호 WO 2019/151516
국제공개일자 2019년08월08일
- (30) 우선권주장
JP-P-2018-018388 2018년02월05일 일본(JP)
JP-P-2019-009224 2019년01월23일 일본(JP)
- (71) 출원인
테라 스톤 가부시기가이샤
일본 2220033 가나가와켄 요코하마시 고호쿠구 신
요코하마 3-24-5
- (72) 발명자
나가마츠, 도모히사
일본 8600811 구마모토켄 구마모토시 츄오쿠 혼조
5-2-15 #503
아카이케, 노리오
일본 8620908 구마모토켄 구마모토시 히가시쿠 신
세이 2-15-6
- (74) 대리인
특허법인에이아이피

전체 청구항 수 : 총 4 항

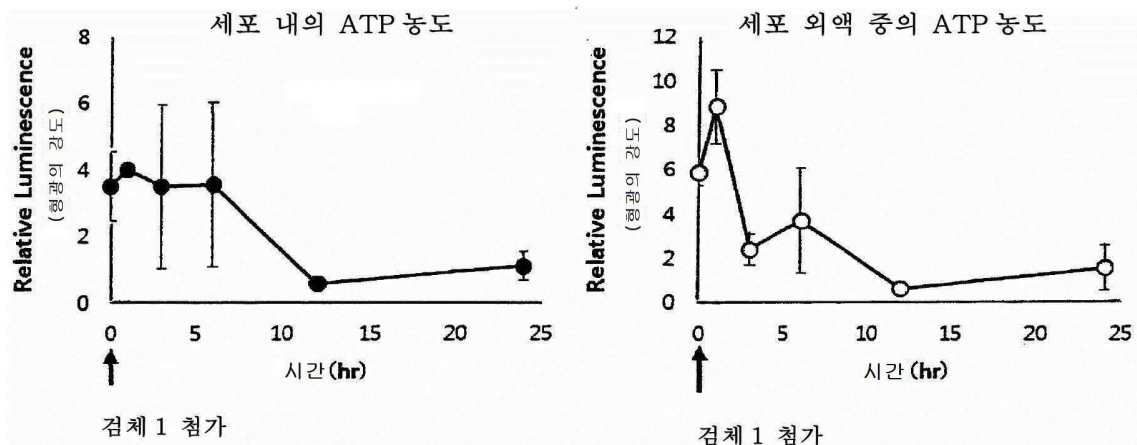
(54) 발명의 명칭 세포 내에서 ATP 생산을 활성화하기 위한 보호소 인자의 사용

(57) 요약

과제: 세포 내에 ATP 생산을 활성화시키기 위한 활성제를 제공한다.

(뒷면에 계속)

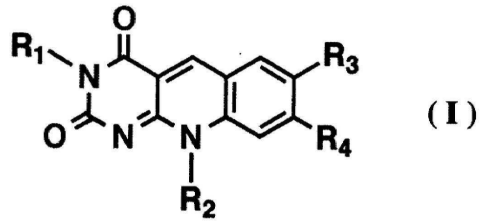
대표도 - 도1



해결수단: 화학식 I로 나타낸 5-데아자플라빈 화합물의 사용

화학식 1:

5-데아자플라빈
(피리미도[4,5-b]퀴놀린-2,4(3H,10H)-디온)



(식 중, R₁은 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카복시 치환 알킬기, 또는 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐 치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 혹은 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로, 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타내고, R₃ 및 R₄는, 수소 원자, 저급 알킬기, 할로젠 원자, 히드록실기, 니트로기, 시아노기, 저급 알콕시기, 페닐 치환 저급 알콕시, 저급 알킬 아미노기, 페닐 치환 저급 알킬 아미노기, 또는 저급 알킬 술폰닐기를 나타낸다.)

(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

명세서

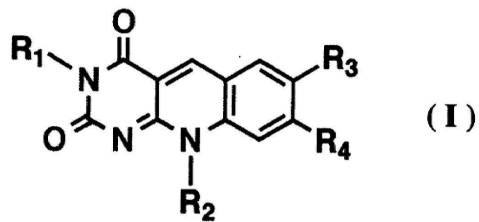
청구범위

청구항 1

세포 내의 ATP 생산을 활성화시키기 위한 화학식 I로 나타낸 5-데아자플라빈 화합물의 사용:

[화학식 1]

5-데아자플라빈
(피리미도[4,5-b]퀴놀린-2,4(3H,10H)-디온)



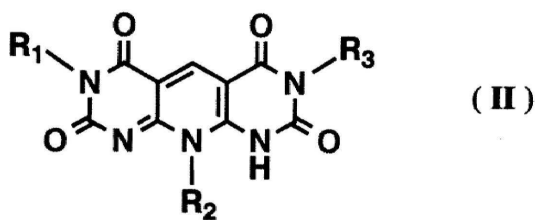
상기 식에서, R₁은 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카복시 치환 알킬기, 또는 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐 치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 혹은 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로, 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타내고, R₃ 및 R₄는, 수소 원자, 저급 알킬기, 할로젠 원자, 히드록실기, 니트로기, 시아노기, 저급 알콕시기, 페닐 치환 저급 알콕시, 저급 알킬 아미노기, 페닐 치환 저급 알킬 아미노기, 또는 저급 알킬 술폰닐기를 나타낸다.

청구항 2

세포 내의 ATP 생산을 활성화시키기 위한 화학식 II로 피리도디피리미딘 화합물의 사용:

[화학식 2]

피리도디피리미딘 (피리도[2,3-d:6,5-d']디피리미딘-2,4,6,8(1H,3H,7H,10H)-테트라온)



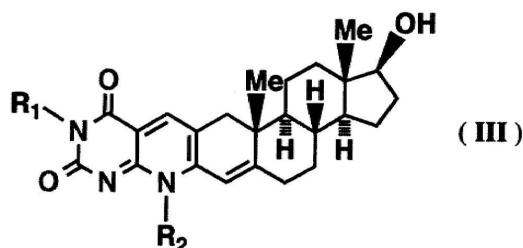
상기 식에서, R₁ 및 R₃은, 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카르복시 치환 알킬기, 또는 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐 치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타낸다.

청구항 3

세포 내의 ATP 생산을 활성화시키기 위한 화학식 III으로 나타낸 데아자플라빈의 테스토스테론 화합물의 사용:

[화학식 3]

데아자플라비노-테스토스테론
(3',8'-이치환된 5'-데아자-17 β -하이드록시안드로스
트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온)



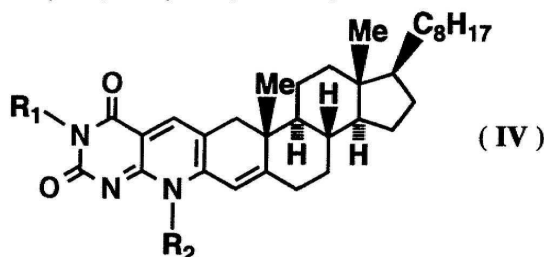
상기 식에서, R₁은 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카복시 치환 알킬기, 또는 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐 치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타낸다.

청구항 4

세포 내의 ATP 생산을 활성화시키기 위한 화학식 IV로 나타낸 데아자플라빈의 콜레스테롤 화합물의 사용:

[화학식 4]

데아자플라비노-콜레스테롤
(3',8'-이치환된 5'-데아자콜레스트-2,4-디에노[2,3-g]프
테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온)



상기 식에서, R₁은 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카복시 치환 알킬기, 또는 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐 치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타낸다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 세포 내에서 ATP 생산을 활성화하기 위한 보호소 인자의 사용에 관한 것으로, 자세하게는, ATP 생산에 관여하는 산화 환원 효소를 보조하는 보호소 인자의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌출혈·경색에 동반하는 신경 변성 질환이나 우울 장애는, 최근의 노령화 사회의 도래와 함께 급격하게 증가하고 있으며, 이들의 신경 변성 질환의 예방·치료약에 대한 수요가 높아지고 있다.

[0003] 상기 질환의 발병 요인의 하나는, 세포 내에서 에너지 생산(ATP 생산)의 기능 저하가 예로 들어지고 있다. ATP 생산은, 세포질 기질에서도 일어나지만, 유산소 하에서는 주로 미토콘드리아 복합체에 의해 행해진다. 미토콘드리아는 모든 동물 세포 내에서 존재하고, 전자 전달계를 통해 세포의 이동에 필요한 에너지 생산을 담당하고 있

다. 미토콘드리아 및 미토콘드리아 유전자는 전자 전달 이상에 의한 산화적 스트레스에 취약하기 때문에 결과적으로 에너지 대사의 저하, 세포의 변성에 이른다. 특히 뇌 세포는 에너지 요구량이 높기 때문에 미토콘드리아는 더 변성을 받기 쉽고 노화에 따른 미토콘드리아 전자 전달 이상에 의한 이른바 뇌 미토콘드리아 장애가 야기된다.

[0004] 한편, 최근의 연구에 따르면 서큐인(Sirtuin) 유전자의 활성화에 의해 노화의 지연, 생물의 수명 연장이 가능하다고 생각된다(비특허문헌 1).

[0005] 서큐인 유전자와 미토콘드리아와의 관계에 대해서도 연구가 진행되고 있고, 서큐인 유전자가 활성화되면 세포 내의 소기관인 미토콘드리아의 양이 늘어, 더욱 활성화되어 치매 예방, 동맥 경화 예방, 난청 예방, 지방 연소, 세포 복구, 활성 산소의 제거를 촉진하고 노화 요인의 발현을 억제할 뿐만 아니라 미토콘드리아 장애를 치료하는 효과도 얻을 수 있다고 생각된다(비특허문헌 2).

[0006] 예를 들어 매사추세츠 대학의 연구팀은, 서큐인 유전자의 하나인 SIRT1 유전자를 결손시킨 쥐가 기억 장애를 보이는 것으로부터, 본 유전자가 기억에 관여할 가능성을 제안했다. 게다가 알츠하이머병과 근육 위축 측삭 경화증의 질환 모델 동물을 이용하여 SIRT1 유전자 활성화의 신경 변성 질환 치료의 응용을 시사했다. 한편 2008년, 워싱턴 의과 대학 이마이 신이치로 교수는 인간의 노화를 컨트롤하는 물질로서 NMN (Nicotinamide mononucleotide)을 동정하고, NMN에 의해, 노화하여 비활성화된 랑게르한스섬을 다시 활성화하는 데에도 성공했다. 이 NMN은 모든 유전자를 활성화하여, 미토콘드리아를 활성화하는 것으로 밝혀졌다(비특허문헌 3).

[0007] 또한, 이마이 교수 등이 발견한 긴 수명 단백질 서큐인 유전자의 하나인 SIRT2는 텔로미어 및 리보솜 DNA의 전사를 정지시키는 이질 크로마틴 성분이며, NAD 의존성 히스톤 탈아세틸화 효소인 것으로 밝혀졌다. 이 효소는 아세틸화에 의해 약해진 히스톤의 DNA의 결합을 탈아세틸화에 의해 원상복구시켜, DNA의 히스톤의 결합을 강화시켜, 전사를 억제하는 기능을 가지고 있으며, 이 것이 장수와 관련이 있다고 간주되고 있다(비특허문헌 4).

[0008] 이마이 교수 등은, 이 효소의 활성화 인자인 NAD^+ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)의 생합성 촉진제가 항노화 효과를 가질 가능성을 시사하고, NAD^+ 합성의 중간 물질인, NMN이 NAD^+ 의 생합성을 촉진하고, 이것이 항노화 작용에 관련할 가능성을 보고하고 있다(비특허문헌 5).

[0009] 또한, 밀(Mills) 등은, 쥐에게 NMN을 첨가한 식이를 장기간 섭취시키면, 조직 내에 NAD^+ 의 생산이 증가하여, 연령 증가에 의한 개체의 생리적 기능 저하 억제가 가능하다고 보고하고 있다(비특허문헌 6).

[0010] 이것은 NAD^+ 가 미토콘드리아에 의한 산화적 인산화의 제1단계 및 TCA 사이클에 있어서, 산화 반응에 관한 에너지 생산의 가장 중요한 분자 중 하나인 것으로부터도 이해 가능하다.

[0011] 한편, 긴 수명 단백질 서큐인 유전자의 하나인 SIRT1은 주로, 핵에 발현하면서도 장애를 받은 미토콘드리아의 복구, 재생에도 관여하는 것으로 알려져있다. 게다가 지금까지 발견된 포유동물의 7개의 서큐인 유전자 중, SIRT3, SIRT4 및 SIRT5가 주로 미토콘드리아로 발현하고 있는 것으로 밝혀지고 있다(비특허문헌 7, 8).

[0012] 이러한 결과를 종합하면, 다양한 서큐인 유전자가 미토콘드리아 기능의 활성화를 통해 수명 연장 작용에 관여하고 있다고 생각된다(비특허문헌 9).

[0013] 정상 시의 미토콘드리아에서는 NMN (NAD^+ (니코틴·아미드·아데닌·디뉴클레오티드)의 전구체 화합물)은 상시 지속적으로 생산되지만, 노화나 병태 시에는 그 생산량이 저하하여 NAD^+ 가 감소한다. 그 결과, 미토콘드리아 전자 전달계에 의한 산화적 인산화와 세포질 기질에서 해당계에 의해 생산되는 생명 유지의 에너지원인 ATP(adenosine triphosphate)가 감소한다(비특허문헌 10).

[0014] NAD^+ 의 환원형인 NADH(Dihydro-nicotinamide adeninedinucleotide) 나 $FADH_2$ (Dihydro-flavin adenine dinucleotide)는 미토콘드리아 내의 매트릭스의 TCA (구연산) 회로나 세포질의 해당계에서 보효소로서 기능하고 있다.

[0015] NAD(니코틴 아미드 아데닌 디뉴클레오티드)는 산화 환원 효소에 관여하는 보효소 중 하나로, 환원형은 NADH로 체내에 가장 다량으로 존재하는 보효소이다.

[0016] NAD의 구조는 니코틴 아미드 모노 뉴클레오티드 (NMN)과 아데닐산 포스포디에스테르 결합하고 있다. 산화형 NAD

의 피리딘 고리의 질소 원자는 피리디움 이온으로 존재하므로, 이를 NAD^+ 라 표현한다. NAD^+ 의 중요한 기능은 ATP 생산 기전(산화 반응)에 NAD^+ 의 환원이 공역하고 있다는 점에 있다.

[0017] 또한, FAD (플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드)도 산화 환원 효소에 관여하는 보조소의 하나로, 환원형은 $FADH_2$ 로, 미토콘드리아의 전자 전달계의 ATP 생산에 사용된다.

[0018] 진핵 생물의 대사에서 FAD의 1차 공급처는 미토콘드리아 내의 구연산 회로와 β 산화가 진행되는 세포질 기질이다. 구연산 회로에서는, FAD가 숙신산을 푸마르산으로 산화시키는 숙신산 탈수소 효소의 보조소로서 기능하고, β 산화에서는 아실 CoA 탈수소 효소 반응의 보조소 역할을 하고 있다. 그러나 redox (산화 환원)계에 속하는 NMN이나 NAD^+ 는 대사계에서 분해되기 쉽고 화학적으로도 불안정하여 장래 의약품으로 개발하기 어려운 것으로 생각된다. 또한, 합성한다고 해도 고가이다.

[0019] 따라서, 우수한 ATP 생산 기능 활성화 작용을 가지고, 우수한 체내 동태(체내 흡수성, 뇌내 이행성 등)을 나타내는 점에서 의약품으로서 충분히 만족할 수 있는 화합물의 개발이 요구되고 있다.

[0020] 그런데, 본 발명자 등은 수년에 거쳐 플라빈 골격을 가지는 화합물의 합성 및 그 약리작용에 대해 예의 연구를 거듭해 왔다. 리보플라빈 5위의 N을 CH로 치환한 특유의 화학 구조를 갖는 5-테아자플라빈(피리미드[4,5-b]퀴놀린-2,4(3H,10H)-디온)유도체는, 1970년에 리보플라빈의 유사체로서 처음으로 합성된 화합물이다. 5-테아자플라빈의 유도체 중에는 우수한 항암 활동을 나타내는 것이나, 항헤르페스 바이러스 활성을 가지는 것도 알려져 있으며, 항암제나 항헤르페스 바이러스체로서 사용되는 것도 있다(특허문헌 1~5).

[0021] 그 구조의 변화에 따라 일어나는 알코올의 케톤이나 알데히드로의 변환반응에 대한 촉매적 기능, 아민의 이민(케톤)으로의 변환반응, 카보닐 화합물의 알코올로 환원과 이민의 아민으로의 환원 및 비대칭 환원 등과 NAD^+ (니코틴 아미드 뉴클레오타이드)와의 유사성도 연구되고 있다(비특허문헌 11). 미토콘드리아 기능 활성화제에 대해서도 여러 특허 문헌이 공개되어 있다(특허문헌 6~8). 그러나, 이 5-테아자플라빈 유도체의 산화 환원 촉매 활성에 착안하여, 미토콘드리아 기능 활성화 작용에 적용한 문헌은 발견되지 않는다. 5-테아자플라빈 유도체는, 산화 환원 촉매 활성을 가지고 있어서, 미토콘드리아의 산화적 인산화에 의한 ATP 활성 기능에 영향을 주는 것은 분명하다. 5-테아자플라빈 골격은, 메탄 발효의 산화 환원 반응에 관한 보조소인, 보조소 F_{420} (Coenzyme F_{420})으로 발탁되어, 플라빈의 유연체이기도 하다. 그 산화 환원 동작은 플라빈 보다는 오히려 $NAD(P)^+$ 에 유사하다. 또한, 공명 극한식 중 하나는 $NAD(P)^+$ 구조를 분자 중에 내장하고 있고, 전자 밀도(분자 궤도 계산 화학에서 구한 것)을 보고 "플라빈형의 $NAD(P)^+$ "로 간주하였다.

[0022] 본 발명자 등은, 5-테아자플라빈이 NAD^+ 나, FAD 와 동일한 redox(산화 환원)기능을 가지고 있는 것으로부터, 세포 내의 ATP 생산을 활성화시켜, 서유인 유전자를 직접 또는 간접적으로 활성화시킨다고 생각하여,

[0023] 예의 연구를 거듭한 결과, 특정 구조를 갖는 5- 테아자플라빈 화합물은 화학적으로 매우 안정되고, 게다가 저렴하게 합성할 수 있으며 ATP 생산을 활성화하고, 미토콘드리아의 기능을 제어하는 서유인 유전자를 활성화시키는 것을 밝혀내고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0024] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 일본 특허 제3073309호
(특허문헌 0002) [특허문헌 2] 일본 특개 제평6-199857호
(특허문헌 0003) [특허문헌 3] 일본 특개 제평11-322746호
(특허문헌 0004) [특허문헌 4] 일본 특개 제2000-202087호
(특허문헌 0005) [특허문헌 5] 일본 특개 제평6-73058호
(특허문헌 0006) [특허문헌 6] 일본 특개 제2001-48784호

(특허문헌 0007) [특허문헌 7] 일본 특개 제2002-322058호

(특허문헌 0008) [특허문헌 8] 일본 특개 제2008-255059호

비특허문헌

[0025]

(비특허문헌 0001) [비특허문헌 1] 140. 미토콘드리아 제어에 의한 항노화 대책, 우에하라 기념 생명 과학 재단 연구보고집, 25 (2011)

(비특허문헌 0002) [비특허문헌 2] SIRT1에 의한 대사억제기전의 해명, www.mishima-kaiun.or.jp/assist/docs/SNo4-hasegawa.pdf

(비특허문헌 0003) [비특허문헌 3]

(비특허문헌 0004) 신체 기능을 회복하고 건강 수명을 연장. - 노화 · 수명의 연구에서 규명 된 물질 "NMN"의 놀라운 효용, <https://www.mugendai-web.jp/archives/6576>

(비특허문헌 0005) [비특허문헌 4] Imai SI, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L(2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature. 403(6771):795-800.

(비특허문헌 0006) [비특허문헌 5] Imai (2010) A possibility of nutraceuticals as an anti-aging intervention: activation of sirtuins by promoting mammalian NAD biosynthesis. Pharmacol Res. 62(1):42-7.

(비특허문헌 0007) [비특허문헌 6] Mills KF, Yoshida S, Stein LR, Grozio A, Kubota S, Sasaki Y, Redpath P, Migaud ME, Apte RS, Uchida K, Yoshino J, Imai SI (2016) Long-Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age-Associated Physiological Decline in Mice. Cell Metab. 24(6):795-806.

(비특허문헌 0008) [비특허문헌 7] Michishita EI, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I.(2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. Mol Biol Cell. Oct; 16(10):4623-35

(비특허문헌 0009) [비특허문헌 8] Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K.(2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. J Biol Chem. 285(11):8340-51.

(비특허문헌 0010) [비특허문헌 9] Tang BL (2016) Sirt1 and the Mitochondria Mol. Cells 39(2):87-95

(비특허문헌 0011) [비특허문헌 10] 노화 관련 질환의 NAD⁺ 합성계의 역할 및 약물 표적으로서의 가능성, <https://seikagaku.jbsoc.or.jp/10.14952/SEIKAGAKU.2015.870239/data/index.pdf>

(비특허문헌 0012) [비특허문헌 11] [산화 환원 기능성을 갖는 복소환 화합물의 합성], www.waseda.jp/prj-prac-chem/product/research%20product/2002_nitta.pdf

발명의 내용

해결하려는 과제

[0026]

본 발명의 과제는, 각종 5-데아자플라빈 유도체 중에서 세포내에서 ATP 생산을 활성화하는 데 유효한 구조식을 가지는 5-데아자플라빈 화합물을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0027]

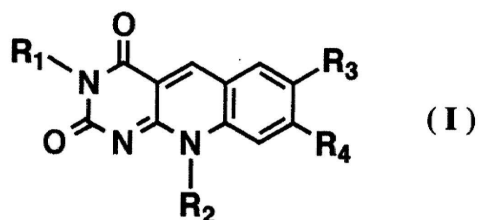
본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해 예의 연구를 수행하고 각종 다른 구조를 갖는 5-데아자플라빈 유도체 화합물을 검체로 제작하고, 그것을 사용하여 시험관내 (in vitro)에서 다양한 실험을 거듭한 결과 세포 내에서

ATP 생산을 증가시키는 구조를 가진 화합물을 발견했다.

- [0028] 우선, 본 발명자들은, NMN (도 17 참조)의 유연 화합물로서 성장 인자로 알려진 수용성 비타민인 리보플라빈(비타민 B₂)의 플라빈 골격에서 5위의 질소를 메틸렌기로 치환시킨 5-테아자플라빈에 주목했다. 5-테아자 리보플라빈은 리보플라빈과 대사 길항하고, 강력한 항콕시딴 활성을 나타냈다. 최근 메탄 생성균으로부터 5-테아자플라빈 골격을 갖는 보효소 F₄₂₀ (도 18 참조)이 발견되었으며, 이는 탄산가스의 메탄으로의 환원 과정이나 항생 물질의 생합성 과정에서 중요한 역할을 하고 있는 것이 밝혀졌다. 5-테아자플라빈의 산화 환원 동작은 플라빈보다 오히려 NAD(P)⁺(도 19 참조)와 유사하다. 또한 공명 극한식 중 하나는 NAD(P)⁺ 구조를 분자 중에 내장하고 있고, 전자 밀도 (분자 궤도 계산 화학에서 구한 것)을 보고 "플라빈형의 NAD(P)⁺"로 간주하였다 (도 20 참조). Hückel MO 법 계산으로, 5-테아자플라빈환의 5위가 매우 π 전자 결핍(정미하전 net charge + 0.24)으로 되어 있으며, 니코틴 아미드 뉴클레오타이드의 4위도 동일하게 π 전자 결핍(net charge + 0.210)으로 되어 있다. 그러므로, 5-테아자플라빈 환은 NAD⁺와 FAD(도 21 참조)의 양방의 전자 전달계에 속하는 것으로 생각된다. 니코틴 아미드 아데닌 디뉴클레오타이드 (NAD, nicotinamide adenine dinucleotide)는, 모든 진핵 생물과 많은 고세균, 진정 세균에서 사용되는 전자 전달체이다.
- [0029] 사실, 마이트 추적기 형광 염색으로 미토콘드리아 막 전위를 형광 표식한 결과, 신규 NMN 유연체 (5-테아자플라빈)의 처리에 의해 현저한 미토콘드리아 활성의 촉진에 보였다. 서유인 유전자가 활성화되면, 세포 내의 소기관 [미토콘드리아]이 활성화되어, 지대 예방, 동맥 경화 예방, 난청 예방, 지방 연소, 세포 복구와 유전자에 유해한 활성 산소의 제거를 촉진하고, 노화 요인의 발현을 억제하는 효과를 얻을 수 있다고 생각되며, 이 전자 전달계에서 작동하는 5-테아자플라빈은 β -NMN에 비교하여 저용량으로 장수 유전자인 서유인 유전자의 스위치온으로 활성화와 동시에 미토콘드리아의 활성화에 의한 ATP 생산을 촉진시킨다.
- [0030] 한편, NAD⁺나 FAD와 같은 redox 기능을 가진 5-테아자플라빈 화합물은, 현재 NMN을 보충하는 의약품으로 사용되기 위해 검토되고 있는 β -NMN과 비교하면, 화학적으로 매우 안정되고 저가에 합성 가능하여, NAD⁺를 활성화하고, 게다가 미토콘드리아의 장수 유전자 (SIRT1 및 SIRT3)도 직접 또는 간접적으로 활성화시킨다고 발명자들은 생각하였다. 즉, 본 발명자들은 NAD⁺ 의존적으로 활성화되어, 미토콘드리아 기능 유지에 중요한 유전자로서 이미 밝혀져 있는 장수 유전자 SIRT1의 활성화를 평가할 목적으로, SIRT1의 표적 전사 인자인 FOXO1의 발현을 활성화 지표로 하여, HCT116 세포를 이용하여 q-RT-PCR 법에 의해 mRNA 증가의 스크리닝 평가를 실시했다.
- [0031] 그 결과, β -NMN과 비교하여, 본 발명에 따른 화합물이 보다 저용량으로 SIRT1 활성능이 있는 것을 밝혀냈다. 따라서, 본 발명에 관한 화합물은 NAD⁺를 직접 활성화하여 허혈 등의 병태 조건 하에서도 지속적으로 ATP를 생산하고, 그 결과는 지속적이고 강력할 것으로 예상된다. 따라서 본 발명에 따른 화합물은 의약품으로 개발 가능한 필요조건을 충분히 갖추고 있다고 생각된다. 또한, 그 화학적 구조가 기능적 및 전자론적으로 NAD⁺와 FAD의 보효소의 코어 부분의 합체형 구조, 즉, 니코틴아미드 (nicotinamide)와 플라빈(flavin)의 하이브리드로 자연계에 존재하는 구조에 가깝기 때문에, 부작용의 발현은 거의 없을 것이라고 짐작할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 화합물의 구조는, 산화 환원 전위 측정값으로 판단하면, 보효소로서의 NAD와 FAD보다도 redox 포텐셜이 높고 산화 환원 능력이 뛰어나다.
- [0032] 본 발명은 상기의 지식을 기초로 하여 완성된 것이다.
- [0033] 즉, 본 발명에 따른 세포 내에서 ATP 생산을 활성화하기 위해 유효한 보효소 인자로서, 하기 화학식 (I) ~ 화학식 (IV)로 표시된 화합물을 특정하였다.

[0034] [화학식 1]

5-데아자플라빈
(피리미도[4,5-b]퀴놀린-2,4(3H,10H)-디온)

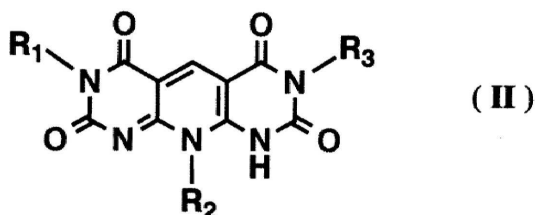


[0035]

[0036] (식 중, R₁은 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카복시 치환 알킬기, 또는 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐 치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 혹은 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로, 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타내고, R₃ 및 R₄는, 수소 원자, 저급 알킬기, 할로젠 원자, 히드록실기, 니트로기, 시아노기, 저급 알콕시기, 페닐 치환 저급 알콕시, 저급 알킬 아미노기, 페닐 치환 저급 알킬 아미노기, 또는 저급 알킬 술폰닐기를 나타낸다.)

[0037] [화학식 2]

피리도디피리미딘 (피리도[2,3-d:6,5-d']디피리미딘-2,4,6,8(1H,3H,7H,10H)-테트라온)

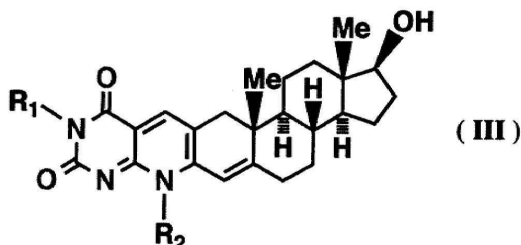


[0038]

[0039] (식 중, R₁ 및 R₃는, 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카복시 치환 알킬기, 또는 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타낸다.

[0040] [화학식 3]

데아자플라비노-테스토스테론
(3',8'-이치환된 5'-데아자-17β-하이드록시안드로스
트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온)

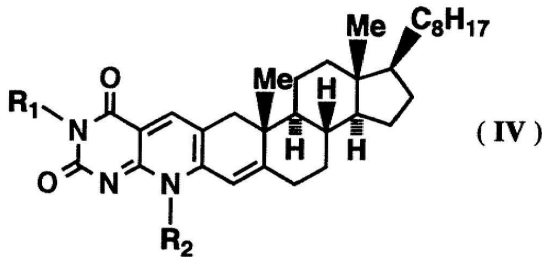


[0041]

[0042] (식 중, R₁은 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카복시 치환 알킬기, 또는 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐 치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타낸다.)

[0043] [화학식 4]

데아자플라비노-콜레스테롤
(3',8'-이치환된 5'-데아자콜레스트-2,4-디에노[2,3-g]프
테리딘-2',4'-(3'H,8'H)-디온)



[0044]

[0045] (식 중, R₁은 수소원자, 알킬기, 할로젠 치환 알킬기, 카복시 치환 알킬기, 또는 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기를 나타내고, R₂는, 알킬기, 시클로 알킬기, 페닐 치환 저급 알킬기, 페닐기, 할로젠 원자 또는 저급 알킬기 또는 저급 알콕시기 중 하나로 치환된 페닐기, 저급 알킬 디치환 페닐기를 나타낸다.)

발명의 효과

[0046] 본 발명에 의해 제공된 ATP 생산을 활성화시키는 보호소 인자를 사용하는 것에 의해, 세포 내에서 에너지 생산의 기능 저하를 개선하는 것이 가능하다.

[0047] 따라서, 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌출혈·경색에 동반하는 신경 변성 질환이나 우울 장애 등의 예방·치료약으로서 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0048] [도 1] 도 1은, 인간 유래 신경 아세포(뉴로블라스토머) SH-SY5Y 주의 배양세포에 검체 1을 첨가한 후 세포내·외부의 ATP 농도를 형광 측정된 결과를 나타내는 도면이다.

[도 2a] 도 2a는, 중추 신경계의 글리아(glia) 세포의 일종인 배양 아스트로사이트 세포에 검체 1을 첨가하여, 형광 측정된 결과를 나타내는 도면이다.

[도 2b] 도 2b는, 도 2a의 측정 결과를 정량화한 도면이다.

[도 3] 도 3은 인간 신경 교종 U251의 배양세포 (Sig1-R transfected cells)에 검체 1, 2를 첨가하고, 첨가 후 세포 내의 ATP 농도를 첨가하지 않은 경우(Cont.)와 상대 비교하여 나타낸 도면이다.

[도 4] 도 4는, 유아기(생후 0일째)의 ICR 마우스 뇌로부터 해마 배양 세포를 채취하여 배양 접시에서 신경 세포를 배양하고, 검체 1을 첨가한 후에 해마 신경 세포(뉴런)의 신경 축삭(Axon)의 신장·발달·분기를 나타내는 면역 염색 이미지이다.

[도 5] 도 5는, 도 4의 경우와 동일하게 하여 검체 1을 첨가하고, 해마 신경 세포 축삭(Axon)의 분기수를 측정된 결과를 나타낸 도면이다.

[도 6] 도 6은, 도 4의 경우와 동일하게 하여 검체 1을 첨가한 후의, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 신장·발달·분기를 나타내는 면역 염색 이미지이다.

[도 7] 도 7은, 도 6의 경우와 동일하게 검체 1을 첨가하고, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 분기수를 측정된 결과를 나타낸 도면이다.

[도 8] 도 8은, 도 4의 경우와 동일하게 배양하여, 14일째의 흥분성 시냅스를 면역 염색한 오타푸스 표본의 시냅스의 면역 염색 이미지이다.

[도 9] 도 9는, 도 4의 경우와 동일하게 배양하여, 14일째의 흥분성 시냅스의 수를 정량한 도면이다.

[도 10] 도 10은, 성숙 배양 해마 세포(배양 11일째)에 검체 1을 1회 투여하고 3일 후 (배양 14일째)에 정량한

해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 면역 염색 이미지이다.

[도 11] 도 11은, 도 10의 경우와 동일하게, 배양 14일째의 발달기에, MAP2 항체에 의해 면역 염색하고, 수상돌기(Dendrite)의 분기수를 측정한 도면이다.

[도 12] 도 12는, 성숙 C57BL/6N 마우스(10~17주령, 체중 28~31g)에 생리식염수(대조)과 검체 3 ($10 \mu\text{g} / \text{kg}$)을 복강 내 투여하고, 22시간 후에 피질 (Cortex)과 해마(Hippocampus) 영역을 포함한 뇌 얇은 절편(슬라이스) 표본을 제작하고, 외액에 80 mM KCl(80K)를 첨가하여 세포막의 탈분극을 일으켜, K^+ 탈분극에 의해 발생하는 뇌 피질 뉴런(신경세포) 내에 존재하는 미토콘드리아 내의 Ca^{+2} 농도 상승과 검체 3에 의한 그 억제 효과를 측정한 도면이다.

[도 13] 도 13은, 도 12의 경우와 동일하게, 해마 뉴런(신경세포)의 K^+ 탈분극에 의한 미토콘드리아 내의 Ca^{+2} 농도 상승과 검체 3에 의한 그 억제 효과를 측정한 도면이다.

[도 14] 도 14는, 흡입 마취 하의 위스터계 성숙 쥐 (체중 200~230g)의 두개골에 작은 구멍을 뚫은 후, 우뇌 선조체에 대조군에는 생리 식염수를, 출혈군에는 0.24U의 콜라게나아제(type N)을 포함한 생리식염수 $1.2 \mu\text{l}$ 를 주입한 뇌출혈 모델 쥐의 뇌 단면을 나타내는 도면이다.

[도 15] 도 15는, 뇌내 출혈 모델 쥐에 대한 검체 4의 뇌 세포 보호 작용을 확인하기 위해 콜라게나아제 투여 1시간 후에 검체 4, $100 \mu\text{g} / \text{kg}$ 를 뇌 내의 스팟에 주입하여, 쥐의 운동 자취를 정량적으로 측정한 도면이다.

[도 16] 도 16은, 도 15의 경우와 동일하게 하여, 검체 4 투여 유무에 따른 쥐의 운동 거리와 운동 스피드의 변화를 측정한 도면이다.

[도 17] 도 17은, β -NMN의 화학 구조식을 나타낸 도면이다.

[도 18] 도 18은, 보조소 F_{420} 의 화학 구조식을 나타낸 도면이다.

[도 19] 도 19는, NAD(P)^+ 의 화학구조식과 이의 산화환원 반응 (Redox)를 설명하는 도면이다.

[도 20] 도 20은, 5-테아자플라빈과 NAD(P)^+ 의 플라빈환의 분자 궤도 계산 화학으로 구한 전자 밀도를 나타낸 도면이다.

[도 21] 도 21은, NAD^+ 와의 비교로서 FAD와의 구조의 유사성을 설명한 도면이다.

[도 22] 도 22는, 검체 5를 첨가하고, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 분기수를 정량 검정한 결과를 나타낸 도면이다.

[도 23] 도 23은, 검체 6을 첨가하고, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 분기수를 정량 검정한 결과를 나타낸 도면이다.

[도 24] 도 24는, 검체 7을 첨가하고, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 분기수를 정량 검정한 결과를 나타낸 도면이다.

[도 25] 도 25는, 검체 8을 첨가하고, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 분기수를 정량 검정한 결과를 나타낸 도면이다.

[도 26] 도 26은, 검체 9를 첨가하고, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 분기수를 정량 검정한 결과를 나타낸 도면이다.

[도 27] 도 27은, 검체 10을 첨가하고, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 분기수를 정량 검정한 결과를 나타낸 도면이다.

[도 28] 도 28은, 검체 11을 첨가하고, 해마 신경 세포 수상 돌기(Dendrite)의 분기수를 정량 검정한 결과를 나타낸 도면이다.

[도 29] 도 29는, 24시간 전에 β -NMN를 피하 투여한 마우스의 뇌 표본의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 의 분석 결과를 나타낸 도면이다. 미토콘드리아 선택적 Ca^{2+} 지시약 Xrhod-1로 염색된 표본을 5분간 80K ACFS 노출 -5 분간 세

척 작업을 3회 반복했다. 이 때의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 의 변화에 미치는 β -NMN의 용량 반응 관계로, A : 대조군, B : β -NMN 10mg/kg; C : β -NMN 30mg/kg; D : β -NMN 100mg/kg 각각의 용량의 β -NMN을 피하 투여하고 24시간 후에 전뇌 슬라이스 표본을 만들고 미토콘드리아 특이적 Ca^{2+} 지시약 Xrhod-1으로 염색했다. 580nm 여기시의 빨간색 (> 600nm)의 형광 이미지로부터 3회 80K ACSF 자극에서 얻은 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 상승을 경시 측정했다. 실선: 대뇌 피질 부위 (CTX); 점선: 해마 CA1 부위 (CA1)의 반응. 5 ~ 6 예의 평균치와 표준 오차를 나타낸다.

[도 30] 도 30은, 24시간 전에 검체 1(TND1128)을 피하 투여한 마우스의 뇌 표본의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 의 분석 결과를 나타낸 도면이다. 미토콘드리아 선택적 Ca^{2+} 지시약 Xrhod-1로 염색된 표본을 도 22와 마찬가지로 5분간 80K ACSF 노출 -5분간 세척 작업을 3회 반복했다. 이 미토콘드리아 Ca^{2+} 의 변화에 미치는 검체 1(TND1128)의 용량 반응 관계, A: 대조군, B: TND1128 0.01mg/kg; C: TND1128 0.1mg/kg; D: TND1128 1.0mg/kg (피하 주사). 도 22와 같이 Xrhod-1의 580nm 여기시의 빨간색 (> 600nm) 형광 이미지로부터 3회 80K ACSF 자극에서 얻은 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 상승을 경시 측정했다. 실선: 대뇌 피질 부위 (CTX), 점선: 해마 CA1 부위 (CA1)의 반응. 5 ~ 6 예의 평균치와 표준 오차를 나타낸다.

[도 31] 도 31은, β -NMN의 80K ACSF 노출시의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도에 대한 보호 작용의 용량 반응 관계를 나타내는 도면이다.

도 29의 데이터를 정량적으로 정리했다 (도 37 참조). A: 80K ACSF 3연속 노출 전체에서 대뇌 피질 (CTX) (흰색)와 해마 (CA1) (검은 색)의 미토콘드리아의 Ca^{2+} 캡처량에 대한 β -NMN의 작용, B: 대뇌 피질의 80K ACSF 노출, 각 회에서 미토콘드리아의 Ca^{2+} 캡처 용량 반응 관계, C: 해마에서 80K ACSF 노출, 각 회에서 미토콘드리아의 Ca^{2+} 캡처 용량 반응 관계. * : Tukey 법에 의한 다중 분석에서 유의한 차이 ($P < 0.05$)

[도 32] 도 32는, 검체 1 (TND1128)의 80K ACSF 노출 시의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도에 대한 보호 작용의 용량 반응 관계를 나타내는 도면이다. 도 29의 데이터를 정량적으로 정리했다 (도 37 참조). A: 80K ACSF 3회 노출 전체에서 대뇌 피질 (CTX) (흰색)와 해마 (CA1) (검은 색)의 미토콘드리아의 Ca^{2+} 캡처 량에 대한 TND1128의 작용, B: 대뇌 피질의 80K ACSF 노출, 각 회에서 미토콘드리아의 Ca^{2+} 캡처 용량 반응 관계, C: 해마에서 80K ACSF 노출, 각 회에서 미토콘드리아의 Ca^{2+} 캡처 용량 반응 관계. * : Tukey 법에 의한 다중 분석에서 유의한 차이 ($P < 0.05$)

[도 33] 도 33은, 24 시간 전에 β -NMN을 피하 투여한 마우스의 뇌 표본의 세포질 내 Ca^{2+} 의 분석 결과를 나타낸 도면이다. 각각의 용량의 β -NMN을 피하 투여하고 24 시간 후에 전뇌 슬라이스 표본을 만들고 뇌 슬라이스 표본을 세포질에 남아있는 Ca^{2+} 지시약 Fura-4F로 염색했다. 이 뇌 표본에서 360nm와 380nm의 여기 광을 조사했을 때의 청록색 (> 500nm)의 형광 강도 (F360와 F380)의 비율을 10 초마다 경시적으로 얻고 3회 80K-ACSF 자극에서 얻은 세포질 내 Ca^{2+} 증가를 시간 경과에 따라 측정했다. A: 대조군, B: β -NMN 10mg/kg; C: β -NMN 30mg/kg; D: β -NMN 100mg/kg, 실선: 대뇌 피질 부위 (CTX) 점선: 해마 CA1 부위 (CA1)의 반응. 5 ~ 6 예의 평균치와 표준 오차를 나타낸다.

[도 34] 도 34는, 24 시간 전에 검체 1 (TND1128)을 피하 투여한 마우스의 뇌 표본의 세포질 내 Ca^{2+} 의 분석 결과를 나타낸 도면이다. 세포질 선택적 Ca^{2+} 지시약인 Fura-4F로 염색된 표본을 도 29와 마찬가지로 5분 80K ACSF 노출 -5분간 세척 작업을 3회 반복했다. 이 세포질의 Ca^{2+} 의 변화에 미치는 TND1128의 용량 반응 관계로, A: 대조군, B: TND1128 0.01mg/kg; C: TND1128 0.1mg/kg; D: TND1128 1.0mg/kg (피하 투여). 도 33과 같이 360nm와 380nm의 여기 광을 조사했을 때의 Fura-4F 청록색 (> 500nm) 형광의 강도 (F360와 F380)의 비율을 10 초마다 경시적으로 얻었다. 실선: 대뇌 피질 부위 (CTX), 점선: 해마 CA1 부위 (CA1)의 반응. 5 ~ 6 예의 평균치와 표준 오차를 나타낸다.

[도 35] 도 35는, β -NMN의 80K ACSF 노출시의 세포질 내 Ca^{2+} 농도에 대한 보호 작용의 용량 반응 관계를 나타

내는 도면이다. 도 33의 데이터를 정량적으로 정리했다 (도 37 참조). A: 80K ACSF 3회 노출 전체에서 대뇌 피질 (CTX) (흰색)와 해마 (CA1) (검은 색)의 세포질 Ca^{2+} 캡처량에 대한 β -NMN의 작용, B: 대뇌 피질의 80K ACSF 노출, 각 회기의 세포질 Ca^{2+} 캡처 용량 반응 관계, C: 해마에서 80K ACSF 노출, 각 회기의 세포질 Ca^{2+} 캡처 용량 반응 관계

[도 36] 도 36은, 검체 1 (TND1128)의 80K ACSF 노출시의 세포질 내 Ca^{2+} 농도에 대한 보호 작용의 용량 반응 관계를 나타내는 도면이다. 도 34의 데이터를 정량적으로 정리했다 (도 37 참조). A: 80K ACSF 3회 노출, 전체에서 대뇌 피질 (CTX) (흰색)와 해마 (CA1) (검은 색)의 세포질 Ca^{2+} 캡처량에 대한 β -NMN의 작용, B: 대뇌 피질의 80K ACSF 노출, 각 회기의 세포질 Ca^{2+} 캡처 용량 반응 관계, C: 해마에서 80K ACSF 노출, 각 회기의 세포질 Ca^{2+} 캡처 용량 반응 관계. * Tukey 법에 의한 다중 분석에서 유의한 차이 ($P < 0.05$).

[도 37] 도 37은, 80K 연속 3회 노출 시의 미토콘드리아 또는 세포질의 Ca^{2+} 상승량의 정량법을 설명한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

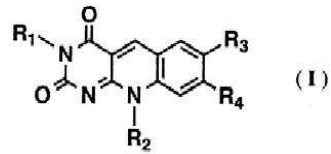
[0049] (화합물의 구조)

[0050] 본 발명에서는, 화학식 (I), (II), (III) 및 (IV)로 표시되는 구조를 가지는 화합물의 사용이 세포 내의 ATP 생산을 활성화하는데 유효하다.

[0051] 이하, 그 화합물의 구체 예와 그 제법을 나타내는 문헌을 제1표~제4표로 나타낸다.

[0052] [표 1-1]

제 1 표



화합물 번호	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	제법 문헌
I-1	H	Me	H	H	(4)
I-2	H	Me	Me	Me	(4)
I-3	H	Et	H	H	(4)
I-4	H	Et	Me	H	(4)
I-5	H	<i>n</i> -Pr	H	H	(4)
I-6	H	<i>n</i> -Bu	H	H	(1) (4)
I-7	H	<i>n</i> -Bu	NO ₂	H	(1)
I-8	H	<i>n</i> -Bu	H	Cl	(1)
I-9	H	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	H	(1)
I-10	H	CH ₃ [CH ₂] ₇	NO ₂	H	(1)
I-11	H	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	Cl	(1)
I-12	H	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	OCH ₂ Ph	(13)
I-13	H	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	OMe	(13)
I-14	H	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	COMe	(13)
I-15	H	CH ₃ [CH ₂] ₁₁	H	H	(1)
I-16	H	CH ₃ [CH ₂] ₁₁	NO ₂	H	(1)
I-17	H	CH ₃ [CH ₂] ₁₁	H	Cl	(1)
I-18	H	HO[CHOH] ₃ CH ₂	H	OBn	(13)
I-19	H	HO[CHOAc] ₃ CH ₂	H	OBn	(13)
I-20	H	Ph	H	H	(1)
I-21	H	Ph	NO ₂	H	(1)
I-22	H	Ph	H	Cl	(1)
I-23	H	Ph	H	OH	(1)
I-24	H	2,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	H	H	(1)
I-25	H	2,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	NO ₂	H	(1)
I-26	H	2,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	H	Cl	(1)
I-27	H	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	H	H	(1)
I-28	H	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	NO ₂	H	(1)
I-29	H	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	H	Cl	(1)
I-30	H	4-Cl-C ₆ H ₄	H	H	(1)
I-31	H	4-Cl-C ₆ H ₄	H	Cl	(1)
I-32	Me	Me	H	H	(4) (9)

[0053]

[0054] [표 1-2]

I-33	Me	Me	Me	H	(6)
I-34	Me	Me	H	Me	(5)
I-35	Me	Me	H	F	(9)
I-36	Me	Me	Cl	H	(6) (9)
I-37	Me	Me	H	Cl	(5) (9)
I-38	Me	Me	Cl	Cl	(5) (9)
I-39	Me	Me	H	OH	(1) (9)
I-40	Me	Me	H	OMe	(5) (9)
I-41	Me	Me	H	N ₃	(10)
I-42	Me	Me	H	NH ₂	(10)
I-43	Me	Me	H	NMe ₂	(10)
I-44	Me	Me	H	CN	(6) (9)
I-45	Me	Me	H	NHCH ₂ Ph	(9)
I-46	Me	Me	H	NHCOMe	(10)
I-47	Me	Me	H	NHCOPh	(10)
I-48	Me	Me	H	OCH ₂ Ph	(9)
I-49	Me	Me	-O-CH ₂ -O-		(6)
I-50	Me	Et	H	H	(4) 검체 1
I-51	Me	Et	Me	H	(4)
I-52	Me	Et	H	OH	(12)
I-53	Me	<i>n</i> -Pr	H	H	(1) (4)
I-54	Me	<i>n</i> -Bu	H	H	(1) 검체 2
I-55	Me	<i>n</i> -Bu	H	OH	(1)
I-56	Me	<i>n</i> -Bu	H	OH	(12)
I-57	Me	C ₆ H ₁₁	H	Cl	(1)
I-58	Me	CH ₃ [CH ₂] ₅	H	H	(2)
I-59	Me	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	H	(2)
I-60	Me	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	F	(14)
I-61	Me	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	OH	(12)
I-62	Me	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	NH(CH ₂) ₆ NH ₂	(14)
I-63	Me	CH ₃ [CH ₂] ₁₁	H	H	(2)
I-64	Me	CH ₃ [CH ₂] ₁₁	H	OH	(12)
I-65	Me	CH ₃ [CH ₂] ₁₇	H	H	(2)
I-66	Me	PhCH ₂	H	H	(1)
I-67	Me	HO ₂ C[CH ₂] ₃	H	OH	(12)
I-68	Me	HO ₂ C[CH ₂] ₅	H	OH	(12)
I-69	Me	Ph	H	H	(1)
I-70	Me	Ph	Me	H	(7)
I-71	Me	Ph	H	Me	(7)
I-72	Me	Ph	OMe	H	(7)
I-73	Me	Ph	H	OMe	(7)
I-74	Me	Ph	Cl	H	(7)
I-75	Me	Ph	H	Cl	(1) 검체 4
I-76	Me	Ph	H	Br	(3)
I-77	Me	3-Me-C ₆ H ₄	H	H	(1)

[0055]

[0056] [표 1-3]

I-78	Me	4-Me-C ₆ H ₄	H	H	(1)
I-79	Me	4-Me-C ₆ H ₄	Me	H	(3)
I-80	Me	4-Me-C ₆ H ₄	H	Me	(3)
I-81	Me	4-Me-C ₆ H ₄	Cl	H	(11)
I-82	Me	4-Me-C ₆ H ₄	OH	H	(11)
I-83	Me	4-Me-C ₆ H ₄	NMe ₂	H	(11)
I-84	Me	4-Me-C ₆ H ₄	SMe	H	(11)
I-85	Me	4-Me-C ₆ H ₄	SO ₂ Me	H	(11)
I-86	Me	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	H	H	(7)
I-87	Me	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	NO ₂	H	(1)
I-88	Me	4-MeO-C ₆ H ₄	H	H	(7)
I-89	Me	4-F-C ₆ H ₄	H	H	(7)
I-90	Me	4-Cl-C ₆ H ₄	H	H	(1)
I-91	Me	4-Cl-C ₆ H ₄	H	Cl	(1)
I-92	Me	4-Br-C ₆ H ₄	H	H	(3)
I-93	Br(CH ₂) ₆	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	H	(14)
I-94	N ₃ (CH ₂) ₆	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	H	(14)
I-95	NH ₂ (CH ₂) ₆	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	H	(14)
I-96	Ph	Me	H	H	(8)
I-97	Ph	Me	H	OH	(1)
I-98	Ph	Et	H	H	(8)
I-99	Ph	Et	H	OH	(12)
I-100	Ph	<i>n</i> -Pr	H	H	(8)
I-101	Ph	<i>n</i> -Bu	H	H	(1) (8)
I-102	Ph	<i>n</i> -Bu	NO ₂	H	(1)
I-103	Ph	<i>n</i> -Bu	H	OH	(12)
I-104	Ph	<i>n</i> -Bu	H	Cl	(1)
I-105	Ph	CH ₃ [CH ₂] ₅	H	H	(2)
I-106	Ph	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	H	(1)
I-107	Ph	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	Cl	(1) (2)
I-108	Ph	CH ₃ [CH ₂] ₇	H	OH	(12)
I-109	Ph	CH ₃ [CH ₂] ₁₁	H	H	(1) (2)
I-110	Ph	CH ₃ [CH ₂] ₁₁	H	Cl	(1)
I-111	Ph	CH ₃ [CH ₂] ₁₂	H	OH	(12)
I-112	Ph	CH ₃ [CH ₂] ₁₇	H	H	(2)
I-113	Ph	Ph	H	H	(1)
I-114	Ph	Ph	H	Cl	(1)
I-115	Ph	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	H	H	(1)
I-116	Ph	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	H	Cl	(1)
I-117	Ph	4-Cl-C ₆ H ₄	H	H	(1)
I-118	Ph	4-Cl-C ₆ H ₄	H	Cl	(1)

[0057]

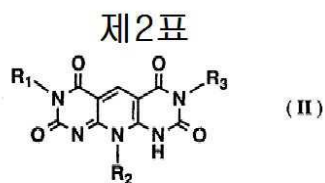
[0058] [표 1-4]

문헌:

- (1) T. Nagamatsu, Y. Hashiguchi, and Y. Yoneda, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 561-565 (1984)
- (2) K. Kuroda, T. Nagamatsu, Y. Sakuma, and F. Yoneda, *J. Heterocyclic Chem.*, **19**, 929-931(1982)
- (3) K. Kuroda, T. Nagamatsu, R. Yanada, and F. Yoneda, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 547-550 (1993)
- (4) F. Yoneda, Y. Sakuma, S. Mizumoto, and R. Ito, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1805-1808 (1976)
- (5) K. Mori, K. Shinozuka, Y. Sakuma, and F. Yoneda, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 764 (1978)
- (6) F. Yoneda, K. Mori, and Y. Sakuma, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 978-981 (1980)
- (7) F. Yoneda, K. Tsukuda, K. Shinozuka, F. Hirayama, K. Uekama, and A. Koshiro, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3049-3056 (1980)
- (8) F. Yoneda, K. Mori, M. Ono, Y. Kadokawa, E. Nagao, and H. Yamaguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3514-3520 (1980)
- (9) F. Yoneda, K. Mori, S. Matsuo, Y. Kadokawa, and Y. Samuma, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1836-1839 (1981)
- (10) F. Yoneda, K. Mori, Y. Sakuma, and A. Koshiro, *J. Heterocyclic Chem.*, **19**, 945-947 (1982)
- (11) K. Tanaka, T. Kimura, X. Chen, T. Kawamoto, and F. Yoneda, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 312-317 (1990)
- (12) R. Hirayama, M. Kawase, T. Kimachi, K. Tanaka, and F. Yoneda, *J. Heterocyclic Chem.*, **26**, 1255-1259 (1989)
- (13) T. Kimachi, K. Tanaka, and F. Yoneda, *J. Heterocyclic Chem.*, **28**, 439-443 (1991)
- (14) Y. Eikyu, Y. Nakamura, T. Akiyama, F. Yoneda, K. Tanaka, and K. Fuji, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 291-293 (1992)

[0059]

[0060] [표 2-1]



화합물 번호	R ₁	R ₂	R ₃	제법 문헌
II-1	H	CH ₃ (CH ₂) ₇	H	(15)
II-2	H	CH ₃ (CH ₂) ₁₁	H	(15)
II-3	H	CH ₃ (CH ₂) ₁₇	H	(15)
II-4	H	Me	Me	(16)
II-5	H	Et	Me	(16)
II-6	H	<i>n</i> -Bu	Me	(16) (19)
II-7	H	CH ₃ (CH ₂) ₇	Me	(16) (19)
II-8	H	CH ₃ (CH ₂) ₁₁	Me	(16) (19)
II-9	H	CH ₃ (CH ₂) ₁₇	Me	(18) (19)
II-10	H	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂	Me	(16)
II-11	Me	Me	Me	(15) (16) (17)
II-12	Me	Et	Me	(15) (17) 검제5
II-13	Me	<i>n</i> -Pr	Me	(16) (17)
II-14	Me	<i>n</i> -Bu	Me	(15) (16) (17)
II-15	Me	CH ₃ (CH ₂) ₇	Me	(15) (16) (17)
II-16	Me	CH ₃ (CH ₂) ₁₁	Me	(15) (16)
II-17	Me	CH ₃ (CH ₂) ₁₇	Me	(15)
II-18	Me	Ph(CH ₂) ₂	Me	(15)
II-19	Me	Ph	Me	(15)
II-20	Me	4-Me-C ₆ H ₄	Me	(15)
II-21	Me	4-Cl-C ₆ H ₄	Me	(15)
II-22	Me	4-Br-C ₆ H ₄	Me	(15)
II-23	Me	4-MeO-C ₆ H ₄	Me	(15)
II-24	Me	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₄	Me	(15)
II-25	Br(CH ₂) ₁₀	<i>n</i> -Bu	Me	(19)
II-26	Br(CH ₂) ₁₀	CH ₃ (CH ₂) ₇	Me	(19)
II-27	Br(CH ₂) ₁₀	CH ₃ (CH ₂) ₁₁	Me	(19)
II-28	Br(CH ₂) ₁₀	CH ₃ (CH ₂) ₁₈	Me	(19)
II-29	Ph	Ph	Ph	(15)
II-30	Ph	4-Me-C ₆ H ₄	Ph	(15)
II-31	Ph	4-Cl-C ₆ H ₄	Ph	(15) 검제6
II-32	Ph	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₄	Ph	(15)

[0061]

[0062] [표 2-2] 문헌:

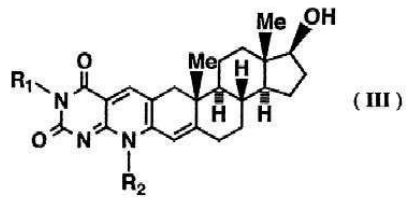
문헌:

- (15) T. Nagamatsu, H. Yamato, M. Ono, S. Takarada, and F. Yoneda, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2101-2109 (1992)
- (16) T. Nagamatsu, Y. Sakuma, and Y. Yoneda, *Synthesis*, 923-924 (1983)
- (17) F. Yoneda, T. Nagamatsu, M. Takamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 344-347 (1983)
- (18) F. Yoneda, H. Yamato, T. Nagamatsu, and H. Egawa, *J. Polymer Sci.:Polymer Lett. Ed.*, 20, 667-670 (1982)
- (19) F. Yoneda, K. Tanaka, H. Yamato, K. Moriyama, and T. Nagamatsu, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 9199-9202 (1989)

[0063]

[0064] [표 3]

제3표



화합물 번호	R ₁	R ₂	제법 문헌
III-1	H	Me	(20) (21)
III-2	Me	Me	(20) (21) 검체7
III-3	Me	Et	(미지화합물)
III-4	Me	<i>n</i> -Bu	(미지화합물) 검체3
III-5	Me	Bn	(미지화합물)
III-6	Me	Ph	(미지화합물)
III-7	Me	4-Me-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-8	Me	4-MeO-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-9	Me	3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₃	(미지화합물)
III-10	Me	4-HO-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-11	Me	4-F-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-12	Me	4-Cl-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-13	Me	4-Br-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-14	Ph	Et	(미지화합물) 검체8
III-15	Ph	<i>n</i> -Bu	(미지화합물)
III-16	Ph	Bn	(미지화합물)
III-17	Ph	Ph	(미지화합물)
III-18	Ph	4-Me-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-19	Ph	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	(미지화합물)
III-20	Ph	4-MeO-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-21	Ph	4-F-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-22	Ph	4-Cl-C ₆ H ₄	(미지화합물)
III-23	Ph	4-Br-C ₆ H ₄	(미지화합물)

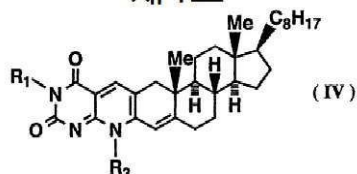
문헌:

- (20) T. Nagamatsu, H. Yamada, and K. Shiromoto, *Heterocycles*, 63, 9-16 (2004)
 (21) 特開 2005-104868

[0065]

[0066] [표 4]

제4표



화합물번호	R ₁	R ₂	제법 문헌
IV-1	H	Me	(22)
IV-2	H	Et	(22)
IV-3	H	<i>n</i> -Bu	(22)
IV-4	H	Ph	(22)
IV-5	H	3-Me-C ₆ H ₄	(22)
IV-6	H	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	(22)
IV-7	H	4-MeO-C ₆ H ₄	(22)
IV-8	H	4-F-C ₆ H ₄	(22)
IV-9	H	4-Cl-C ₆ H ₄	(22)
IV-10	Me	Me	(22) 검체9
IV-11	Me	Et	(22)
IV-12	Me	<i>n</i> -Bu	(22)
IV-13	Me	Ph	(22)
IV-14	Me	3-Me-C ₆ H ₄	(22)
IV-15	Me	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	(22) 검체10
IV-16	Me	4-MeO-C ₆ H ₄	(22)
IV-17	Me	4-F-C ₆ H ₄	(22)
IV-18	Me	4-Cl-C ₆ H ₄	(22)
IV-19	Me	4-Br-C ₆ H ₄	(22)
IV-20	Ph	Me	(22)
IV-21	Ph	Ph	(22)
IV-22	Ph	3-Me-C ₆ H ₄	(22)
IV-23	Ph	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₃	(22) 검체11
IV-24	Ph	4-MeO-C ₆ H ₄	(22)
IV-25	Ph	4-F-C ₆ H ₄	(22)
IV-26	Ph	4-Cl-C ₆ H ₄	(22)

문헌:

(22) A. R. Shrestha, T. Shindo, N. Ashida, and T. Nagamatsu, *Bioorg. & Med. Chem.*, 16, 8685-8696 (2008)

[0067]

[0068] (화합물의 제조 방법)

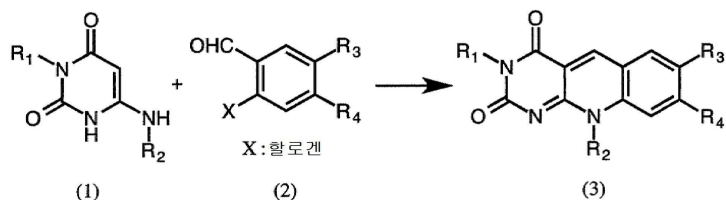
[0069]

화학식 I로 표시된 5-테아자플라빈 화합물(I-1~I-118)(3)은 기지문헌(1~14)에 기재된 제조방법에 의해 합성 가능하다. 특히, (제법 A)를 기술한 문헌 (1)의 일반 제조 방법에 의해 대부분의 유도체가 합성 가능하다. 즉, 6-N-치환-아미노 우라실류 (1)과 적당한 o-할로겐 벤즈알데히드 (2)를 디메틸 포름아미드(DMF)중에 가열 환류한다. 가열 시간은 3~7시간이 적당하다. 반응액을 감압하에 농축하여 잔류액을 정당한 용매(알코올, 디옥산 또는 DMF 등)에서 재결정하여, 반응한 5-테아자플라빈 (3)을 얻는다.

[0070]

[반응식 1]

(제법 A)



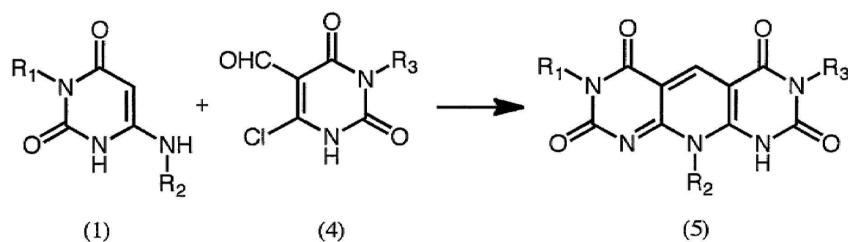
[0071]

[0072]

화학식 II로 표시된 피리도 디피리미딘 화합물 (II)(II-1~II-32)(5)는 기지 문헌(15~19)에 기재된 제조방법에 의해 합성 가능하다. 특히, (제법 B)를 기재한 문헌 (15)의 일반 제조 방법에 의해 대부분의 유도체가 합성 가능하다. 즉, 6-N-치환 아미노 우라실류 (1)과 적당한 3-치환-6-클로로 우라실-5-칼브 알데히드 (4)를 디메틸포름아미드 또는 아세트산 중에 가열 환류한다. 가열 시간은 2~5시간이 적당하다. 반응액을 감압하에 농축하여 잔류액을 정당한 용매(알코올, 아세트산 또는 DMF 등)에서 재결정하여, 반응한 피리도디피리미딘 (5)를 얻는다.

[0073] [반응식 2]

(제법 B)

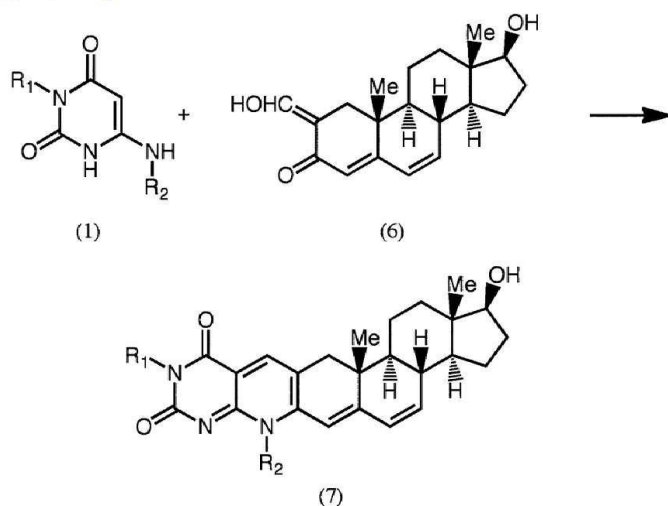


[0074]

[0075] 화학식 III으로 표시된 데아자플라빈의 테스토스테론 화합물 (III)(III-1~III-2)(7)은 기재문헌 (20,21)에 기재된 제조 방법에 의해 합성 가능하다. 동일한 방법으로 미지 화합물 (III-3 ~ III-23)도 합성 가능하다. 즉, 디페닐 에테르에 6-N-모노 치환-아미노 우라실류 (1)와 2-히드록시 메틸렌 테스토스테론(6)을 첨가하고, 이 혼합물에 p-톨루엔 술폰산을 첨가한 후에, 180℃에서 아르곤 분위기에서 30분~60분간 가열 교반한다. 반응 후에 이 반응물을 칼럼 크로마토그래피로 정제한다. 또한, 이 반응은 디옥산 중에서 몇 시간 가압하 가열해도 합성 가능하다.

[0076] [반응식 3]

(제법 C)



[0077]

[0078] [제조예 1]

[0079] (8'-치환-5'-데아자-17β-히드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디엔노[2,3-g]프테리딘-2', 4' (3'H, 8'H)-디온 유도체 (III-3 ~ III-13)의 일반합성)

[0080] 디옥산 (50ml)에 p-톨루엔 술폰산(60mg, 0.32mmol)과 6-모노 치환 아미노-3-메틸 우라실(1)(2.84mmol)을 추가하고, 2-히드록시 메틸렌 테스토스테론(6) (1.0g, 3.16mmol)을 첨가한 후, 아르곤 분위기 하에서 봉관 중 12시간 가열한다. 반응 후, 이를 칼럼 크로마토 그래피 (Fuji Silysia 230~400 mesh; 용출액 : 에틸아세트산:에탄올 = 12 : 1 또는 에틸아세트산 만)로 분리 정제하여 분말 결정을 얻는다. 재결정에는 에틸아세트산과 n-헥산의 혼합 용액에서 행할 수 있다.

[0081] 화합물 III-3

[0082] (5'-데아자-8'-에틸-17β-하이드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디엔노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 황색의 분말 결정 (0.77g, 60%), mp 260℃ (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 1.00 (3H, s, 19-CH₃), 1.41 (3H, t, J = 7.2 Hz, 8'-CH₂CH₃), 2.46-2.62 (2H, br dd, 6-H), 2.67 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1β-H), 2.92 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1α-H), 3.43 (3H, s, 3'-CH₃), 3.68 (1H, dd, J_{16α,17α} = 8.7 Hz,

$J_{16\beta,17\alpha} = 8.1$ Hz, 17 α -H), 4.46-4.73 (1H, m, 8'-CH_aH_b), 4.73-5.00 (1H, m, 8'-CH_aH_b), 6.39 (1H, s, 4-H), 8.25 (1H, s, 5'-H)

[0083] 화합물 III-4

[0084] (8'-n-부틸-5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 황색의 분말 결정 (0.79 g, 58%), mp 246 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 0.99 (3H, s, 19-CH₃), 1.50 (3H, t, J = 7.2 Hz, 8'-CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.46-2.61 (2H, br dd, 6-H), 2.66 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1 β -H), 2.91 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1 α -H), 3.45 (3H, s, 3'-CH₃), 3.69 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 7.8$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.1$ Hz, 17 α -H), 4.28-4.60 (1H, m, 8'-CH_aH_b), 4.60-4.92 (1H, m, 8'-CH_aH_b), 6.35 (1H, s, 4-H), 8.25 (1H, s, 5'-H)

[0085] 화합물 III-5

[0086] (8'-벤질-5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 황색의 분말 결정 (0.63 g, 43%), mp 215 °C ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.95 (3H, s, 19-CH₃), 2.37-2.45 (2H, br dd, 6-H), 2.64 (1H, d, J = 15.5 Hz, 1 β -H), 2.90 (1H, d, J = 15.5 Hz, 1 α -H), 3.45 (3H, s, 3'-CH₃), 3.66 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 8.4$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.5$ Hz, 17 α -H), 5.59 (1H, br d, J = 15.3 Hz, 8'-CH_aH_b), 6.26 (1H, br d, J = 15.3 Hz, 8'-CH_aH_b), 6.28 (1H, s, 4-H), 7.07-7.19 (2H, m, Bn-mH), 7.25-7.35 (3H, m, Bn-o, pH), 8.33 (1H, s, 5'-H)

[0087] 화합물 III-6

[0088] (5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-메틸-8'-페닐안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 등색의 분말 결정 (0.54 g, 38%), mp 215 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 1.01 (3H, s, 19-CH₃), 2.20-2.43 (2H, br dd, 6-H), 2.76 (1H, d, J = 15.9 Hz, 1 β -H), 2.96 (1H, d, J = 15.9 Hz, 1 α -H), 3.40 (3H, s, 3'-CH₃), 3.67 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 8.7$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.9$ Hz, 17 α -H), 5.60 (1H, s, 4-H), 6.90-7.22 (2H, m, Ph-mH), 7.22-7.49 (3H, m, Ph-o, pH), 8.39 (1H, s, 5'-H)

[0089] 화합물 III-7

[0090] (5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-메틸-8'-(4-메틸페닐)안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 등색의 분말 결정 (0.58 g, 40%), mp 205 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 2.92 (1H, d, J = 15.9 Hz, 1 β -H), 3.10 (1H, d, J = 15.9 Hz, 1 α -H), 2.46 (3H, s, 8'-CH₃), 3.40 (3H, s, 3'-CH₃), 3.67 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 8.4$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.7$ Hz, 17 α -H), 5.56 (1H, s, 4-H), 6.88-7.20 (2H, m, Ar-mH), 7.20-7.47 (2H, m, Ar-oH), 8.37 (1H, s, 5'-H)

[0091] 화합물 III-8

[0092] (5'-테아자-17 β -하이드록시-8'-(4-메톡시페닐)-3'-메틸안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 등색의 분말 결정 (0.69 g, 47%), mp 220 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 2.18-2.41 (2H, br dd, 6-H), 2.70 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1 β -H), 2.96 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1 α -H), 3.40 (3H, s, 3'-CH₃), 3.67 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 8.7$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.4$ Hz, 17 α -H), 3.89 (3H, s, OCH₃), 5.61 (1H, s, 4-H), 7.02-7.24 (4H, m, Ar-m, oH), 8.36 (1H, s, 5'-H)

[0093] 화합물 III-9

[0094] (5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-메틸-8'-(3,4-메틸렌디옥시페닐)-안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 등색의 분말 결정 (0.72 g, 47%), mp 214 °C ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 1.01 (3H, s, 19-CH₃), 2.22-2.46 (2H, br dd, 6-H), 2.70 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1 β -H), 2.96 (1H,

d, $J = 15.6$ Hz, 1α -H), 3.40 (3H, s, $3'$ -CH₃), 3.67 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 9.9$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.4$ Hz, 17β -H), 5.67 (1H, s, 4-H), 6.08 (2H, s, OCH₂O), 6.51-7.17 (1H, m, Ar-mH), 6.86-6.98 (2H, m, Ar-oH), 8.36 (1H, s, $5'$ -H)

[0095] 화합물 III-1 0

[0096] (5'-테아자-17 β -하이드록시-8'-(4-하이드록시페닐)-3'-메틸안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 등색의 분말 결정 (0.47 g, 32%), mp 280 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 1.00 (3H, s, 19-CH₃), 2.61-2.78 (2H, br dd, 6-H), 2.71 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, 1β -H), 2.98 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, 1α -H), 3.45 (3H, s, $3'$ -CH₃), 3.67 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 7.6$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.4$ Hz, 17α -H), 5.68 (1H, s, 4-H), 6.73-6.98 (4H, m, Ar-m, oH), 8.40 (1H, s, $5'$ -H)

[0097] 화합물 III-1 1

[0098] (5'-테아자-8'-(4-플루오로페닐)-17 β -하이드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 등색의 분말 결정 (0.69 g, 47%), mp 270 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 1.00 (3H, s, 19-CH₃), 2.68 (2H, dd, $J = 15.0$, 6-H), 2.93 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, 1β -H), 3.11 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, 1α -H), 3.70 (3H, s, $3'$ -CH₃), 3.56-3.80 (1H, br dd, 17α -H), 6.54 (1H, s, 4-H), 7.12-7.66 (4H, m, Ar-m, oH), 8.50 (1H, s, $5'$ -H)

[0099] 화합물 III-1 2

[0100] (8'-(4-클로로페닐)-5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 황색의 분말결정 (0.74 g, 49%), mp 270 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 1.03 (3H, s, 19-CH₃), 2.19-2.42 (2H, br dd, 6-H), 2.70 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, 1β -H), 3.96 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, 1α -H), 3.40 (3H, s, $3'$ -CH₃), 3.67 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 8.4$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.4$ Hz, 17α -H), 5.53 (1H, s, 4-H), 7.06-7.21 (2H, m, Ar-mH), 7.50-7.60 (2H, m, Ar-oH), 8.37 (1H, s, $5'$ -H)

[0101] 화합물 III-1 3

[0102] (8'-(4-브로모페닐)-5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 등색의 분말결정 (0.72 g, 44%), mp 250 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 1.03 (3H, s, 19-CH₃), 2.25-2.42 (2H, br dd, 6-H), 2.70 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, 1β -H), 3.96 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, 1α -H), 3.39 (3H, s, $3'$ -CH₃), 3.67 (1H, dd, $J_{16\alpha,17\alpha} = 8.7$ Hz, $J_{16\beta,17\alpha} = 8.1$ Hz, 17α -H), 5.53 (1H, s, 4-H), 6.99-7.15 (2H, m, Ar-mH), 7.65-7.75 (2H, m, Ar-oH), 8.38 (1H, s, $5'$ -H)

[0103] [제조예 2]

[0104] (8'-치환-5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-페닐안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온 유도체 (III-1 4 ~ III-2 3) 의 일반합성)

[0105] 디페닐 에테르 (1 m l) 에 p-톨루엔 술폰산 (60 mg, 0.32 mmol), 6-모노 치환 아미노-3-페닐 우라실 (1) (0.66 g, 2.84 mmol) 및 2-하이드록시 메틸렌 테스토스테론 (6) (1.0 g, 3.16 mmol)을 첨가하고, 질소 분위기 하 155 °C에서 45분간 교반한다. 반응 후, 이것을 칼럼 크로마토그래피 (Fuji Silysia 230 ~ 400 mesh; 용출액: 에틸아세트산:에탄올 = 10:1 또는 에틸아세트산 만)로 분리 정제하여 분말 결정을 얻는다. 재결정은 에틸아세트산과 n-헥산의 혼합 용액에서 행할 수 있다.

[0106] 화합물 III-1 4

[0107] (5'-테아자-8'-에틸-17 β -하이드록시-3'-페닐안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 황색의 분말결정 (0.79g, 54%), mp 240 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 1.01 (3H, s, 19-CH₃), 1.45 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, $8'$ -CH₂CH₃), 2.52-2.61 (2H, br dd, 6-H), 2.67 (1H, d, J

=15.6 Hz, 1 β -H), 2.93(1H, d, J =15.6 Hz, 1 α -H), 3.68 (1H, dd, J_{16 α ,17 α} =7.5 Hz, J_{16 β ,17 α} =8.1 Hz, 17 α -H), 4.46-4.76(1H, m, 8'-CH_aH_b), 4.76-5.05(1H, m, 8'-CH_aH_b), 6.41(1H, s, 4-H), 7.21-7.45 (2H, m, Ph-mH), 7.45-7.52 (3H, m, Ph-o, pH), 8.27(1H, s, 5'-H)

[0108] 화합물 III-1 5

[0109] (8'-n-부틸-5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-페닐안드로스트-2,4-디에노 [2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 황색의 분말결정 (0.77g, 50%), mp 200℃ ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.99 (3H, s, 19-CH₃), 1.18 (3H, t, J = 7.2 Hz, 8'-CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.45-2.62 (2H, br dd, 6-H), 2.65 (1H, d, J =15.6 Hz, 1 β -H), 2.91(1H, d, J = 15.6 Hz, 1 α -H), 3.63 (1H, dd, J_{16 α ,17 α} = 7.1 Hz, J_{16 β ,17 α} =7.1 Hz, 17 α -H), 4.35-4.64 (1H, m, 8'-CH_aH_b), 4.64-4.94 (1H, m, 8'-CH_aH_b), 6.39 (1H, s, 4-H), 7.21-7.52 (5H, m, Ph-o, m, pH), 8.27 (1H, s, 5'-H)

[0110] 화합물 III-1 6

[0111] (8'-벤질-5'-테아자-17 β -하이드록시-3'-페닐안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 황색의 분말결정 (0.72 g, 44%), mp 224 ℃ ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 0.92 (3H, s, 19-CH₃), 2.30 (2H, dd, J = 10.5 Hz, 6-H), 2.63 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1 β -H), 2.87 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1 α -H), 3.67 (1H, dd, J_{16 α ,17 α} = 8.4 Hz, J_{16 β ,17 α} = 7.8 Hz, 17 α -H), 5.37-5.61 (1H, br, 8'-CH_aH_b), 6.41-6.64 (1H, br, 8'-CH_aH_b), 7.02 (1H, s, 4-H), 7.24-7.56 (10H, m, Bn-o, m, pH 및 Ph-o, m, pH), 8.33 (1H, s, 5'-H)

[0112] 화합물 III-1 7

[0113] (5'-테아자-17 β -하이드록시-3',8'-디페닐안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 등색의 분말결정 (0.57 g, 36%), mp 257 ℃ ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 1.04 (3H, s, 19-CH₃), 2.71 (1H, d, J= 15.6 Hz, 1 β -H), 2.98 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1 α -H), 3.65 (1H, dd, J_{16 α ,17 α} = 8.4Hz, J_{16 β ,17 α} = 8.7Hz, 17 α -H), 5.57(1H, s, 4-H), 7.16-7.66(10H, m, 3'-Ph-o, m, pH 및 8'-Ph-o, m, pH), 8.40 (1H, s, 5'-H)

[0114] 화합물 III-1 8

[0115] (5'-테아자-17 β -하이드록시-8'-(4-메틸페닐)-3'-페닐안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 등색의 분말결정 (0.90 g, 55%), mp 246 ℃ (decomp.) ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 0.88 (3H, s, 19-CH₃), 2.47 (3H, s, 8'-CH₃), 2.58-2.74 (2H, br dd, 6-H), 2.92 (1H, d, J = 15.0 Hz, 1 β -H), 3.16 (1H, d, J = 15.0 Hz, 1 α -H), 3.68 (1H, dd, J_{16 α ,17 α} = 8.7 Hz, J_{16 β ,17 α} = 7.8 Hz, 17 α -H), 6.61 (1H, s, 4-H), 6.89-7.49 (7H, m, 3'-Ph-m, pH 및 8'-Ar-o, mH), 8.40-8.56 (2H, m, 3'-Ph-oH), 8.49 (1H, s, 5'-H)

[0116] 화합물 III-1 9

[0117] (5'-테아자-17 β -하이드록시-8'-(3,4-디메틸페닐)-3'-페닐안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온) ; 등색의 분말결정 (0.90 g, 54%), mp 260 ℃ (decomp.) ; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.77 (3H, s, 18-CH₃), 0.80 (3H, s, 19-CH₃), 2.33 (3H, s, 8'-Ar-CH₃), 2.35 (3H, s, 8'-Ar-CH₃) 2.71(1H, d, J=15.0 Hz, 1 β -H), 2.97(1H, d, J = 15.0 Hz, 1 α -H), 3.67 (1H, dd, J_{16 α ,17 α} = 7.5 Hz, J_{16 β ,17 α} = 8.4 Hz, 17 α -H), 5.60 (1H, s, 4-H), 6.88-7.50 (8H, m, 3'-Ph-o, m, pH 및 8'-Ar-o, mH), 8.38 (1H, s, 5'-H)

[0118] 화합물 III-2 0

[0119] (5'-테아자-17 β -하이드록시-8'-(4-메톡시페닐)-3'-페닐안드로스트-2,4-디에노[2,3-g]프테리딘-

2',4'(3'H,8'H)-디온); 등색의 분말결정 (0.96 g, 57%), mp 250 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.81 (3H, s, 19-CH₃), 2.23-2.38 (2H, br dd, 6-H), 2.71 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1β-H), 2.93 (1H, d, J = 15.6 Hz, 1α-H), 3.62 (1H, dd, J_{16α,17α} = 6.9 Hz, J_{16β,17α} = 6.6 Hz, 17α-H), 3.87 (3H, s, OCH₃), 6.19 (1H, s, 4-H), 7.00-7.13 (7H, m, 3'-Ph-m, pH 및 8'-Ar-o, mH), 7.17-7.50 (2H, m, 3'-Ph-oH), 8.38 (1H, s, 5'-H)

[0120] 화합물 III-2 1

[0121] (5'-테아자-8'-(4-플루오로페닐)-17β-하이드록시-3'-페닐안드로스트-2,4-디엔노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 등색의 분말결정(0.61 g, 37%), mp 260 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.79 (3H, s, 18-CH₃), 1.04 (3H, s, 19-CH₃), 2.70 (1H, d, J = 15.9 Hz, 1β-H), 2.97 (1H, d, J = 15.9 Hz, 1α-H), 3.66 (1H, dd, J_{16α,17α} = 8.1 Hz, J_{16β,17α} = 8.7 Hz, 17α-H), 5.54 (1H, s, 4-H), 7.18-7.54 (10H, m, 3'-Ph-o, m, pH 및 8'-Ph-o, m, pH), 8.39 (1H, s, 5'-H)

[0122] 화합물 III-2 2

[0123] (8'-(4-클로로페닐)-5'-테아자-17β-하이드록시-3'-페닐안드로스트-2,4-디엔노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 등색의 분말결정(0.56 g, 33%), mp 241 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.77 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 (3H, s, 19-CH₃), 2.29-2.44 (2H, br dd, 6-H), 2.79 (1H, d, J = 16.2 Hz, 1β-H), 3.07 (1H, d, J = 16.2 Hz, 1α-H), 3.67 (1H, dd, J_{16α,17α} = 7.8 Hz, J_{16β,17α} = 8.4 Hz, 17α-H), 6.46 (1H, s, 4-H), 7.17-7.59 (10H, m, 3'-Ph-o, m, pH 및 8'-Ph-o, m, pH), 8.47 (1H, s, 5'-H)

[0124] 화합물 III-2 3

[0125] (8'-(4-브로모페닐)-5'-테아자-17β-하이드록시-3'-페닐안드로스트-2,4-디엔노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온); 등색의 분말결정(0.93, 51, mp 300 °C (decomp.); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 0.83 (3H, s, 19-CH₃), 2.69 (1H, d, J = 15.0 Hz, 1β-H), 3.12 (1H, d, J = 15.0 Hz, 1α-H), 3.07 (1H, dd, J_{16α,17α} = 7.9 Hz, J_{16β,17α} = 8.7 Hz, 17α-H), 6.56 (1H, s, 4-H), 6.69-7.52 (7H, m, 3'-Ph-m, pH 및 8'-Ar-o, mH), 7.67-7.79 (2H, m, 3'-Ph-oH), 8.48 (1H, s, 5'-H)

[0126] 상기 신규 화합물 (III-3 ~ III-23) 의 기기 분석 값을 제5표와 제6표로 표시한다.

[0127] [표 5]

제5표 8'-치환된 5'-데아자-17β-하이드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디엔노[2,3-g]프테리딘-2',4'-(3'H,8'H)-디온(III-3~III-13)의 물리적 데이터

화합물 번호	R	수율(%) ^a 식	Mp (°C)	분석(%) 계산치(확인치)		
				C	H	N
III-3	Et	60 C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₃	260 (decomp.)	c		
III-4	Bu	58 C ₂₉ H ₃₉ N ₃ O ₃	246	72.92 (72.88)	8.23 7.84	8.80 9.17)
III-5	Bn	43 C ₃₂ H ₃₇ N ₃ O ₃ · 3/2H ₂ O	215	71.35 (71.55)	7.48 7.30	7.80 7.83)
III-6	Ph	38 C ₃₁ H ₃₅ N ₃ O ₃ · 8/5H ₂ O	215 (decomp.)	70.72 (70.32)	7.31 7.13	7.98 8.08)
III-7	4-Me-C ₆ H ₄	40 C ₃₂ H ₃₇ N ₃ O ₃ · 1/4H ₂ O	205 (decomp.)	74.46 (74.25)	7.32 6.93	8.14 8.17)
III-8	4-MeO-C ₆ H ₄	46 C ₃₂ H ₃₇ N ₃ O ₄ · H ₂ O	220 (decomp.)	70.44 (70.06)	7.20 7.15	7.70 8.05)
III-9	3,4-OCH ₂ O-C ₆ H ₄	47 C ₃₂ H ₃₅ N ₃ O ₅ · 6/5H ₂ O	214 (decomp.)	68.24 (68.26)	6.69 6.49	7.46 7.24)
III-10	4-HO-C ₆ H ₄	32 C ₃₁ H ₃₅ N ₃ O ₄ · 1/2H ₂ O	280 (decomp.)	71.24 (71.04)	6.94 6.74	8.04 8.23)
III-11	4-F-C ₆ H ₄	47 C ₃₁ H ₃₄ FN ₃ O ₃ · 3/2H ₂ O	270 (decomp.)	68.61 (68.54)	6.87 6.48	7.74 7.79)
III-12	4-Cl-C ₆ H ₄	49 C ₃₁ H ₃₄ ClN ₃ O ₃ · 1/2H ₂ O	270 (decomp.)	68.81 (68.48)	6.52 6.20	7.77 7.64)
III-13	4-Br-C ₆ H ₄	44 C ₃₁ H ₃₄ BrN ₃ O ₃ · 1/2H ₂ O	250 (decomp.)	63.59 (63.88)	6.02 6.06	7.18 7.18)

^a 모든 화합물들은 황색 분말로 수득되었다.

^b 모든 화합물들은 EtOAc-n-헥산으로 재결정화되었다.

^c Mass Spectrum: MH⁺ = 450 (Matrix : Gly)

[0128]

[0129] [표 6]

제6표 8'-치환된 5'-데아자-17β-하이드록시-3'-메틸안드로스트-2,4-디엔노[2,3-g]프테리딘-2',4'(3'H,8'H)-디온(III-14 ~ III-23)의 물리적 데이터

화합물 번호	R	수율(%) ^a 식	Mp (°C)	분석(%) 계산치(확인치)		
				C	H	N
III-14	Et	54 C ₃₂ H ₃₇ N ₃ O ₃ · 1/2 H ₂ O	240 (decomp.)	73.82 (73.48)	7.36 7.64	8.07 7.94
III-15	Bu	50 C ₃₄ H ₄₃ N ₃ O ₃ · 9/10 H ₂ O	200	73.46 (73.25)	7.76 7.66	7.56 7.77
III-16	Bn	44 C ₃₇ H ₃₉ N ₃ O ₃ · H ₂ O	224	75.10 (75.38)	6.98 7.06	7.10 7.43
III-17	Ph	36 C ₃₆ H ₃₇ N ₃ O ₃ · 2/3 H ₂ O	257	75.63 (75.55)	6.76 6.58	7.35 7.69
III-18	4-Me-C ₆ H ₄	55 C ₃₇ H ₃₉ N ₃ O ₃ · 3/2 H ₂ O	246	73.97 (73.78)	7.05 6.66	6.99 7.33
III-19	3,4-Me ₂ -C ₆ H ₄	54 C ₃₈ H ₄₁ N ₃ O ₃ · 5/6 H ₂ O	260 (decomp.)	75.72 (75.49)	7.13 6.75	6.97 6.83
III-20	4-MeO-C ₆ H ₄	57 C ₃₇ H ₃₉ N ₃ O ₄ · 2/3 H ₂ O	250 (decomp.)	73.85 (73.54)	6.76 6.75	6.98 7.07
III-21	4-F-C ₆ H ₄	37 C ₃₆ H ₃₆ FN ₃ O ₃ · 1/2 H ₂ O	260 (decomp.)	73.70 (73.81)	6.36 6.72	7.16 6.97
III-22	4-Cl-C ₆ H ₄	33 C ₃₆ H ₃₆ ClN ₃ O ₃ · 7/8 H ₂ O	241 (decomp.)	70.89 (71.06)	6.24 6.48	6.89 6.50
III-23	4-Br-C ₆ H ₄	51 C ₃₆ H ₃₆ BrN ₃ O ₃	300 (decomp.)	c		

^a모든 화합물들은 황색 분말로 수득되었다.

^b모든 화합물들은 EtOAc-n-헥산으로 재결정화되었다.

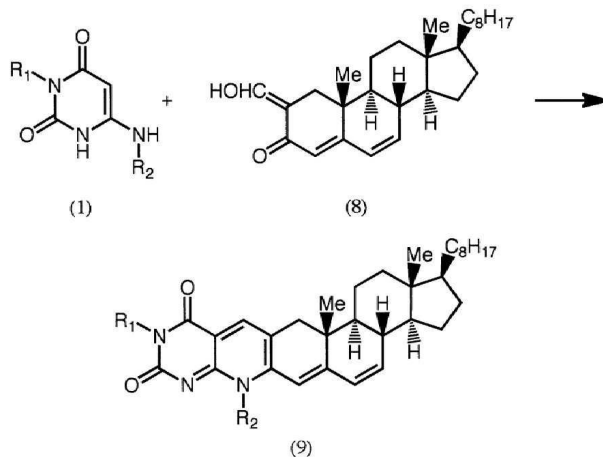
^cMass spectrum: MH⁺ = 640, MH⁺ + 2 = 642 (Matrix: Gly)

[0130]

[0131] 화학식 IV으로 표시된 피리도 디피리미딘 화합물 (IV) (IV-1 ~ IV-26) (9)은 기지문헌(22)에 기재된 제조 방법에 의해 합성 가능하다 (제법 D). 즉, 디페닐에테르에 p-톨루엔 술폰산, 3-치환-6-모노 치환 아미노 우라실 (1) 및 2-히드록시 메틸렌 코레스토-4-엔-3-온 (8)을 첨가하고, 질소 분위기하 180℃에서 45분간 가열 교반한다. 반응 후, 이를 칼럼 크로마토그래피 (Fuji Silysia 230 ~ 400 mesh; 용출액: 에틸아세트산)로 분리 정제하여 분말 결정을 얻는다.

[0132] [반응식 4]

(제법 D)



[0133]

- [0134] 다음으로, 화합물 번호 I-50(검체 1), I-54(검체 2), III-4(검체 3) 및 I-75(검체 4)의 화합물을 이용하여, 이들 검체의 첨가가 세포 내에 ATP 생산에 직접 또는 간접적으로 공헌하고 있는 것을 실험에 의해 검증하였으므로, 이하 실시예로서 설명한다.
- [0135] [실시예 1]
- [0136] 인간 유래 신경 아세포 (뉴로블라스토마) SH-SY5Y 주의 배양세포에 검체 1을 첨가한 후 세포 내 · 외부의 ATP 농도를 형광 측정했다. 그 결과를 도 1에 나타낸다. 세포 내에서는 검체 1 (1 μ M) 첨가 직후부터 5시간 후까지 ATP 생산의 증가 (형광 강도의 증가)가 보이며, 12시간 후에는 작용 소실한다. 또한 검체 처리에 의한 배양 세포의 형태 변화는 없다.
- [0137] 세포 외액 중에도 검체 1 (1 μ M) 첨가 직후부터 5시간 후까지 ATP 생산의 증가를 보여 ATP 농도가 증가했다. 이것은 세포 내에서 증가된 ATP가 세포 밖으로 유출된 것으로 보인다.
- [0138] [실시예 2]
- [0139] 중추 신경계의 글리아 세포의 일종인, 배양 아스트로사이트 세포에 검체 1을 첨가하여, 형광 측정한 결과를 도 2a와 도 2b에 나타낸다.
- [0140] 글리아 세포 내의 ATP 양은 검체 1을 1 μ M로 투여했을 때, 12시간과 24시간 후에 유의하게 증가하였으며, 세포 외에 대해서도 유사한 동향을 보이고 있다.
- [0141] [실시예 3]
- [0142] 인간 신경 교종 U251 배양 세포 (Sig1-R transfected cells)에 검체 1, 2를 각각 첨가하고, 첨가 후 세포 내 ATP 농도를 첨가하지 않은 경우 (Cont.)와 상대 비교했다. 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 검체 1 및 검체 2는 인간 신경 교종 U251 세포의 ATP 생산량을 크게 증가시키고 있는 것이 확인되었다. 지용성이 높은 검체 2는 검체 1에 비해 효과가 크다. 또한 형광 측정은 검체 투여 후 6시간 동안에 행했다.
- [0143] 또한, 실시예 1~3은 뇌신경 세포(뉴런)에 관해 실험한 것이지만, 뇌 신경 세포(뉴런)은 산소 (O_2) 와 글루코오스를 필요로 한다. 이 두 물질은 혈액보다 글리아 (아스트로사이트)에 먼저 채워지며, 그 후 글리아로부터 신경 세포로 전달된다. 검체도 마찬가지이다. 따라서 검체에 의한 글리아 내 ATP 량 증가는 글리아의 기능을 직접적으로 촉진하고 있음을 나타냄과 동시에 간접적으로 뉴런을 활성화 시키는 것을 시사한다.
- [0144] [실시예 4]
- [0145] 유아기(생후 0일째)의 ICR 마우스 뇌로부터 해마 배양 세포를 채취하여 배양접시에 신경 세포를 배양했다.
- [0146] 발달 초기의 세포(배양 1일째)에 검체 1을 1회 첨가하여, 3일 후 (배양 4일째)에 해마 신경 세포(뉴런)의 신경 축삭(Axon)의 수상돌기(Dendrite)나 발달하는 시냅스 수를 정량하였다. 검체 1(0.1 μ M, 0.3 μ M, 1.0 μ M)은 배양 1일째에 1회만 첨가했다. 첨가 3일 후 (배양 4일째)에, 축삭(Axon)와 수상돌기(Dendrite)를 tau 항체와 MAP2 항체를 이용하여 각각 형광 염색하고, 형태를 관측했다.
- [0147] 도 4는 해마 신경 세포 축삭(Axon)의 면역 염색 이미지를 나타낸 것으로, 배양 4일째에 tau 항체로서 축삭을 면역 염색했다. 왼쪽은 대조군, 오른쪽은 배양 1일째에 검체 1(1 μ M)을 1회만 첨가한 검체 처리 신경 세포를 나타낸다.
- [0148] 도 5는 해마 신경 세포 축삭(Axon)의 분기 수를 나타낸 것으로, 배양 4일째에 tau 항체에 축삭의 분기수를 정량하였다. 실험은 세포체를 중심으로 10 μ m 간격으로 동심원(도시하지 않음)을 그리고, 그 원을 교차하는 축삭의 개수를 계측했다.
- [0149] 도4와 도 5에서, 검체 1은 농도의존적으로 신경 축삭(Axon)의 신장·발달과, 그 분기수를 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, 검체 농도 0.3 μ M와 1.0 μ M에서는 거의 동일한 정도의 최대 약효를 나타내었다.
- [0150] 도 6은 해마 신경 세포 수상 돌기 (Dendrite)의 면역 염색 이미지를 나타낸 것으로, 배양 4일째에 MAP2 항체에 수상 돌기를 면역 염색했다. 왼쪽은 대조군, 오른쪽은 배양 1일째에 검체 1(1 μ M)을 1회만 첨가한 신경 세포를 나타낸다.
- [0151] 도 7은 해마 신경 세포 수상 돌기 (Dendrite) 분기 수를 나타낸 것으로, 배양 4일째에 MAP2항체에 면역 염색하고, 수상 돌기의 분기수를 정량하였다. 실험은, 세포체를 중심에 10 μ m간격으로 동심원 (도시하지 않

고)을 그리고, 그 원을 교차하는 수상 돌기의 개수를 측정했다.

- [0152] 도 6과 도 7에서, 검체 1은 농도 의존적으로 수상 돌기의 신장과 그 분기 수를 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, 검체 농도 $0.3\mu\text{M}$ 와 $1.0\mu\text{M}$ 에서는 거의 동일한 정도의 최대 약효를 나타내었다.
- [0153] 이어서, 배양 14일째에 흥분성 시냅스를 VGLUT1 항체를 이용하여 면역 염색하고 시냅스 수를 정량하였다.
- [0154] 도 8은, 오타푸스 표본에서 시냅스의 면역 염색 이미지를 나타낸 것으로 왼쪽은 Control (대조군), 오른쪽은 배양 1 일째에 검체 1 ($1\mu\text{M}$)을 한 번만 첨가하여 배양 14 일째, VGLUT1 항체에서 흥분성 시냅스를 면역 염색 한 신경 세포를 나타낸다.
- [0155] 도 9는, 해마 신경 세포에 투여하는 흥분성 시냅스의 증가를 계측한 도이다. 뇌에는 신경의 흥분과 억제를 신속하게 전달하는 글루타민산 작동 성 및 GABA 작동성의 2시냅스가 있지만, 도 9는 배양 14 일째에 VGLUT1 항체의 면역 염색 흥분성 시냅스 수를 정량 한 것이다.
- [0156] 도 8과 도 9에서 검체 1은 $0.3\mu\text{M}$ 의 첨가에 의해 흥분성 시냅스 수를 유의하게 최대값까지 증가시키는 것이 나타났다.
- [0157] [실시예 5]
- [0158] 실시예 4와 동일하게 유아기(생후 0일째)의 ICR 마우스 뇌에서 해마 배양 세포를 채취하여 배양 접시에서 신경 세포를 배양하였다.
- [0159] 성숙 배양 해마 세포 (배양 11일째)에 검체 1을 1회 투여하고 3일 후 (배양 14 일째)에 해마 신경 세포 (뉴런)의 신경 축삭 (Axon), 수상 돌기 (Dendrite)의 모습을 관찰했다. 배양 14일째의 축삭은 신장 및 축삭끼리의 교차가 현저하여 축삭 개수의 정량이 불가능했기 때문에, 돌기의 형태만을 관찰했다.
- [0160] 도 10은, 해마 신경 세포 수상 돌기 (Dendrite)의 면역 염색 이미지를 나타낸 것으로, 왼쪽은 대조군, 오른쪽은 배양 14일째의 이미지로, 검체 1을 투여하고, 배양 14일째에 MAP2 항체로 면역 염색을 한 것이다.
- [0161] 도 11은 배양 14일째의 발달 후기에 MAP2 항체로 면역 염색하고 수상 돌기 (Dendrite)의 분기 수를 검체 농도 $0.1 \sim 1\mu\text{M}$ 로 정량한 것으로, 세포체를 중심으로 $10\mu\text{m}$ 간격으로 동심원을 그리며 그 원형과 교차하는 수상돌기의 수를 측정했다.
- [0162] 수상 돌기는 유아기 배양 세포 4일째 (도 7)와 비교되며 세포체에서 자라는 수상 돌기의 개수는 배양 기간에 따라 증가하고 있다 (도 11). 첨가되는 검체 농도 ($0.3\mu\text{M}$ 와 $1\mu\text{M}$)에 의해 수상 돌기는 성숙 배양 세포로 증가하는 경향은 인정되지만, 배양 4일째 세포에서 보였던 약효 정도의 현저한 분기 수의 증가는 인정되지 않았다.
- [0163] 실시예 4 및 5의 실험 결과를 감안하면 검체 첨가에 의해 쥐의 유아기 · 성숙 배양 신경 세포의 발달 · 분기 · 시냅스의 수의 증가 및 축진이 신경 세포의 ATP 생산 증가로 촉진되고 있는 것을 간접적으로 증명하고 있다고 할 수 있다.
- [0164] [실시예 6]
- [0165] 성숙 C57BL/6N 마우스 (10 ~ 17 주령, 체중 28 ~ 31g)에, 한쪽에는 생리 식염수 (대조군)를, 다른 한 쪽에는 검체 3 ($10\mu\text{g} / \text{kg}$)을 복강 내 투여하고 22 시간 후에 각각의 마우스 피질 (Cortex)과 해마 (Hippocampus) 영역을 포함한 뇌의 얇은 절편 (슬라이스) 표본을 제작하였다. 외액에 80mM KCl (80K)를 첨가하여 세포막의 탈분극을 일으키고 그 결과 발생하는 미토콘드리아 내의 Ca^{2+} 농도의 증가를 Rhod-2 (주 1)를 이용하여 형광 방법으로 측정했다. 뇌 슬라이스에서 80K 에 의해 증가하는 Ca^{2+} 농도 (주 2)가 검체 3에 의해 어떻게 억제되는지를 지표로 하여, 미토콘드리아에서 ATP 활성화에 검체 3이 적극적으로 관여하고 있음을 간접적으로 검증하였다(주 3).
- [0166] (주 1) Rhod-2 : 미토콘드리아에 선택적으로 받아들여지는 Ca^{2+} 형광 염료
- [0167] (주 2) 80K 에 의한 신경 세포막의 탈분극은 세포 외에서 세포 내로의 Ca^{2+} 의 유입 및 세포 내 Ca 스토어에서 Ca^{2+} 의 유리의 양자에 의해 일어난다. 세포 내에 증가된 유리 Ca^{2+} 은 세포 내의 독립 기관인 미토콘드리아 내로 쉽게 유입된다. 그 결과 미토콘드리아의 Ca^{2+} 농도가 상승한다.
- [0168] (주 3) 80K 자극에 의한 탈분극으로 신경 세포질 내에 증가된 유리 Ca^{2+} 는 즉시 세포질 내에서 미토콘드리아 내

로 신속하게 이행한다. 검체에 의한 미토콘드리아 내 유리 Ca^{2+} 농도의 감소는 신경 세포질 막에 존재하는 외향 Ca 펌프에 의해 유리 Ca^{2+} 이 세포 외로 빠져나오거나 미토콘드리아 내부의 일부에 흡착 고정하는 것에 기인한다. 따라서 에너지는 미토콘드리아에서 생산되는 ATP로부터 공급된다. 따라서 얻어진 결과로부터 복강 내 주사된 검체 3은 혈액 중으로부터 글리아 (아스트로사이트) 세포를 거쳐 대뇌 피질과 해마 신경 세포 내의 미토콘드리아에 흡수되며 이에 따라 미토콘드리아에서 ATP 생산이 활성화되어 신경 세포가 활성화되고 신경 세포막의 Ca 펌프가 에너지원인 ATP를 미토콘드리아로부터 얻어, 여분의 세포 내 유리 Ca^{2+} 을 세포 외로 배출하고 신경 세포를 간접적으로 보호한다.

- [0169] 도 12는, K^+ 탈분극에 의해 발생하는 대뇌 피질 뉴런 (신경 세포)내에 존재하는 미토콘드리아 내의 Ca^{2+} 농도 상승과 검체 3에 의한 그 억제 효과를 측정한 도이다.
- [0170] a는 정상 마우스에서 얻은 뇌 슬라이스 표본에 80mM KCl 외액 (5분간 적용한 후 5분간 세척)를 3회 연속했을 때의 대조군 반응. 세포측은 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도의 증가의 형광 측정의 결과를 나타낸다.
- [0171] b는 검체 3을 10 $\mu\text{g/kg}$ 복강 내 (i.p.) 주사 후 22시간 후에 쥐로부터 적출 제작한 뇌 슬라이스 표본에 80K 외액을 주입했을 때의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도의 변화. a와 비교하여 Ca^{2+} 농도 상승의 억제와 80K 탈분극에 의해 상승된 Ca^{2+} 농도의 빠른 회복을 보인다.
- [0172] c는 대뇌 피질 신경 세포의 미토콘드리아 내에서 Ca^{2+} 농도에 대한 대조군 및 검체 3의 비교. 10 $\mu\text{g/kg}$ 에서 Ca^{2+} 농도 억제의 최대 효력을 나타낸다. (1000 배량의 10mg/kg 결과와 다르지 않다.) (n = 3 평균치 : 동일한 고체에서 얻은 3개의 슬라이스에서 얻은 데이터)
- [0173] 도 13은 해마 뉴런 (신경 세포)의 K^+ 탈분극에 의한 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도 상승을 측정한 도면이다.
- [0174] a는 80mM KCl 외액 (5분간 적용한 후 5분간 세척)를 3회 연속했을 때의 대조군 반응.
- [0175] b는 검체 3을 10 $\mu\text{g/kg}$, 복강 내 주사 후 22시간 후에 뇌 슬라이스 표본을 제작하고 이에 80K 외액을 주입했을 때의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도의 변화를 나타내는 도면.
- [0176] c는 해마 신경 세포의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도의 대조군 및 검체 3, 10 μg 및 10 mg/kg i.p.에 의한 억제 효과의 비교를 나타낸 도면. 10 $\mu\text{g/kg}$ 에서 최대 효과를 얻을 수 있다. (n = 3 평균치 : 동일한 개체로부터 얻은 3개의 슬라이스에서 얻은 데이터)
- [0177] 실시예 6의 실험 결과를 감안하면 검체 3은 10 $\mu\text{g/kg}$ i.p 생체 내 전처치에 의해 마우스 피질과 해마 신경 세포 (뉴런)의 80K 탈분극에 의한 각각의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도의 상승이 현저하게 최대한 감소한다. 본 결과는 검체 3이 뇌허혈에 발생하는 신경 세포의 손상을 구제하는 것을 시사한다.
- [0178] 즉, 성숙 마우스 뇌 세포 (뉴런)를 손상시키는 미토콘드리아 내의 유리 Ca^{2+} 증가에 따른 Ca 부하에 검체 3에 의한 ATP 증가가 세포막에 Ca 펌프를 활성화시키고 미토콘드리아 내 유리 Ca^{2+} 양을 감소시키고, 그 결과로 신경 세포 사멸의 방지에 기여하는 것을 나타낸다 (ATP 증가 간접 증명).
- [0179] [실시예 7]
- [0180] 뇌허혈 모델 성체 쥐에서 운동 행동의 저하에 검체 첨가가 미치는 효과를 확인하기 위한 실험을 실시했다.
- [0181] 위스터계 성숙 쥐 (체중 200 ~ 230g)의 두개골에 흡입 마취로 작은 구멍을 뚫은 후 우뇌 선조체에 대조군에는 생리식염수, 출혈군에는 0.24 U의 콜라게나제 (type IV)를 포함하는 식염수 1.2 μl 를 주입하여 뇌출혈 모델 쥐를 제작하였다.
- [0182] 도 14는, 뇌출혈 모델 쥐의 뇌 단면을 나타낸 도면이다.
- [0183] 뇌출혈 모델 쥐에 대한 검체 4의 뇌 세포 보호 작용을 확인하기 위해, 콜라게나제 투여 1시간 후 검체 4를 100 $\mu\text{g/kg}$ 으로 뇌의 스폿 (도면 중 / 흰색 마름모)에 주입하여 쥐의 운동 자취를 정량적으로 측정했다.
- [0184] 운동량의 측정은 쥐를 5분간 동영상 촬영. 그 촬영 시간의 후반 3분 자유 행동(운동 거리와 운동 속도)을 분석

했다.

- [0185] 도 15는 쥐의 운동 자취를 측정한 도면이며, 도 16은 운동 거리와 운동 스피드의 경일 변화를 측정한 도면이다.
- [0186] 검체 4는 쥐의 뇌출혈에 의해 생기는 허혈성 운동 거리와 운동 속도의 저하를 완화한다 (도면 15와 16). 그 효과는 출혈 1일째와 1주 후에도 나타난다.
- [0187] 실험 결과를 고려하면 성숙 쥐의 뇌 세포의 허혈성 손상 방지에 검체 4가 공헌하는 것이 나타났다 (ATP 증가 간접 증명).
- [0188] 이어서, 화합물 번호 II-13 (검체 5), II-31 (검체 6), III-2 (검체 7), III-14 (검체 14), IV-10 (검체 9), IV-15 (검체 10) 및 IV-23 (검체 11)의 화합물을 이용하여 그 검체의 첨가에 의해 해마 신경 세포 수상 돌기 (Dendrite)의 분기 수가 크게 신장하고 있는지를 검정하였다.
- [0189] 유아기 (생후 0 일째)의 ICR 마우스 뇌에서 해마 배양 세포를 채취하여 배양 접시에서 배양하였다.
- [0190] 발달 초기의 세포 (배양 1일째)에 각 검체를 1회 첨가하고 3일 후 (배양 4 일째)에 MAP2 항체로 면역 염색하고 수상 돌기의 분기 수를 측정하였다.
- [0191] 측정은 세포체 (soma)를 중심으로 $10\mu\text{m}$ 간격으로 $20\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ 의 동심원 (미도시)을 그리고 그 원형을 교차하는 수상돌기의 수를 측정했다.
- [0192] 검정은 세포체로부터의 거리마다 측정한 교차하는 수상 돌기의 개수를 꺾은선 그래프화하고 꺾은선 그래프 아래의 면적 (Area Under the Curve : AUC)에 대하여 Student's t-test, paired (t-검정 양측 분포)로 행하였다.
- [0193] 예시 수가 충분한 검체에 대해서는 최대값과 최소값을 제외하여 검정했다. 첨가 검체 농도는 모두 $0.3\mu\text{M}$ 였다.
- [0194] 수상 돌기가 크게 신장하고 있는지 여부의 판정은 t-값보다 p-값을 산출하고, p 값이 $p < 0.05$ 에서 유의한 신장 (효과 ++), $0.05 < p < 0.2$ 에서는 말초 또는 근위에서 신장 (효과 +), $p > 0.2$ 에서는 큰 차이가 없는 것 (효과 $\pm$)으로 했다.
- [0195] 도 22 ~ 도 28은 각각 검체 5 ~ 10을 첨가하여 해마 신경 세포 수상 돌기 (Dendrite)의 분기 수를 정량 검정한 결과를 나타내는 도면이다.
- [0196] a는 세포체 (soma)로부터의 거리에 대한 교차 수상 돌기의 개수를, b는 AUC를 비교한 검정 결과를 나타낸 도면이다.
- [0197] 또한, 실선은 검체를 첨가한 경우를, 점선은 검체의 첨가가 없었던 경우 (대조군)를 나타내고 있다. 또한 n은 표본 수이다.
- [0198] 도면에서 알 수 있듯이, 통계적으로 유의한 차이가 인정되는 것($p < 0.05$)은 검체 7 (III-2)과 검체 II (IV-23) 뿐이지만, 다른 검체 5 (II -13), 6 (II-31), 8 (III-2), 9 (IV-10), 10 (IV-15), 11 (IV-23)에 대해서도 돌기 신장의 효과가 인정된다.
- [0199] 다음으로, 검체 1 (TND1128)을 선택하고, β -NMN와의 작용 비교 실험을 실시했다. 이 실험에서는 마우스 뇌 슬라이스 표본을 격렬한 탈분극 자극에 노출되었을 때 발생하는 현저한 세포질 내 및 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도의 변화에 대한 억제 효과를 비교 평가했다. 이것은 발명자 등의 예비 실험에서 검체 1 (TND1128)로 24 시간 처리한 선충에서 SIRT1이 유의하게 상승하는 결과를 얻을 수 있었으므로, 투여 24시간 후에서 β -NMN도 같은 효과를 얻을 수 있는지 비교하기 위함이다.
- [0200] [실험 방법]
- [0201] 뇌 슬라이스 표본 작성 및 칼슘 농도 측정 : 24 시간 전에 검체 1을 피하 투여한 마우스 (C57B/6NL)의 전체 뇌 슬라이스 ($300\mu\text{m}$)를 정중선에서 절단한 전체 뇌 반절 표본을 사용하였다. 이 표본을 O_2 95%, CO_2 5%로 통기시킨 인공 뇌척수액 (ACSF) 내에 실온에서 보관하고 미토콘드리아에 선택적으로 받아들여지는 Xrhod-1/AM ($\text{Kd} = 700\mu\text{M}$) 및 세포질에 머무르는 fura-4F / AM ($\text{Kd} = 770\mu\text{M}$)로 이중 염색했다. 이 표본을 도립 형광 현미경 (Olympus IX71)의 스테이지에 장착된 챔버에 두고 검은 색 면포 조각으로 커버하고 백금 링으로 고정하여, O_2 95 %, CO_2 5 %의 통기성 ACSF에서 관류했다 ($70\text{ml} / \text{hr}$). 표본의 형광 이미지를 4배 대물 렌즈로 취득하여, 해마 배 측부와 대뇌 피질 측두부의 이미지를 한 화면에 나타냈다. 미토콘드리아 내 칼슘 농도의 측정은 여기광

580nm 의해 생기는 적색 형광 (> 600nm)의 강도 변화를, 세포질 칼슘 측정은 360nm 여기와 380nm 여기에 의한 형광 (> 500nm)의 비율로 하여 구했다. 측정 부위 (ROI)은 해마 CA1 부위와 대뇌 피질의 두 곳을 뒀다.

[0202] [약물 조정법과 투여법]

[0203] β -NMN은 물에 용해시켜, 10mg/kg, 30mg/kg 또는 100mg/kg, 검체 1은 알코올에 용해하여, 1mg / ml로 하고 물로 희석하고 0.01mg/kg, 0.1mg/kg, 또는 1.0mg/kg 을 표본 작성 24 시간 전에 마우스에 피하 투여했다 (0.1ml / 10g).

[0204] [효력 평가 방법]

[0205] 본 시험에서는 두 가지 약물의 각 농도를 투여한 마우스로부터 제작된 뇌 표본을 등장 80mM KCl-ACSF (인공 뇌척수액)에 5분간 노출한 후, 5 분간 정상 ACSF로 되돌리기 작업을 3회 연속하여 실시하는 것으로, 표본에 심한 칼슘 부하를 주고, 그 때의 세포질 내와 미토콘드리아의 칼슘 농도의 변화를 측정했다.

[0206] [실험 결과]

[0207] 미토콘드리아 내 칼슘 농도의 변화에 미치는 β -NMN 및 검체 1 (TND1128)의 작용

[0208] 도 29는 β -NMN (A : 0 (대조군) (n = 6), B : 10 (n = 5) C : 30 (n = 5) 및 D : 100mg/kg (n = 5))가 피하 투여된 마우스에서 24시간 후 생성된 표본을 80K ACSF에 3회 노출했을 때의 미토콘드리아에서 Ca^{2+} 농도 변화를 보여주고 있다. 도 30은 마찬가지로 80K ACSF 노출시의 검체 1 (TND1128) (A : 0 (대조군) (n = 6), B : 0.01 mg/kg (n = 5), C : 0.1 mg/kg (n = 5) 및 D : 1.0mg/kg (n = 5) s.c.) 투여 마우스의 뇌 표본의 미토콘드리아의 칼슘 농도의 변화를 나타낸다. 두 약물의 각각의 용량으로 처리된 개체에서 얻은 표본의 반응은 첫 번째 80K 투여 시점의 형광 강도를 기준으로 표준화 (normalize)하여 세포질 또는 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도의 시간 평균치와 표준 오차를 나타내고 있다. 이 도 29과 도 30에서 두 약물은 사용된 용량 범위에서 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 상승을 용량 의존적으로 억제하고 있는 것은 분명하다.

[0209] 도 31 및 도 32는 각각 β -NMN 및 검체 1 (TND1128)의 각 농도의 작용을 정량화한 결과이다. 도 31 및 도 32의 A는 투여시 실험 시작 5분 후부터 80K-ACSF에 3회 노출하고 5분 세척할 때 35분까지의 미토콘드리아 내 칼슘 농도의 크기를 AUC (Area under the curve)로 계산한 결과이다 (도 37 참조). B와 C는 각각 대뇌 피질 (CTX)와 해마 (CA1)의 80K 투여 5분 동안과 그 이후의 세척 5분 (1st : 5분 내지 15 분, 2nd : 15분 내지 25 분, 3rd : 25 분 내지 35 분) 각각 대한 약물 작용을 나타내고 있다 (도 37 참조). 유의차 검정은 Tukey 법을 사용하였다. 검토한 용량 범위에서 β -NMN과 TND1128의 용량 반응 관계가 나타났다.

[0210] [세포질 내 칼슘 농도의 변동에 미치는 β -NMN과 검체 1 (TND1128)의 작용]

[0211] 도 33 및 도 34는 80K ACSF 3회 투여시의 세포질 내 칼슘 변동에 미치는 β -NMN 및 검체 1 (TND1128)의 작용을 나타낸다. 도 33과 도 34에 나타난 대조군 반응은 80K-ACSF 투여마다 반응의 회복이 작고, 일견, 칼슘 지시약의 반응이 한계점에 도달해 있는 것처럼 보이지만, 이 시험에 사용된 세포 내 칼슘 농도의 지시약인 fura-4F의 Ca^{2+} 킬레이트능 (Kd)는 770nM이며, 예상되는 세포 내 칼슘 농도의 심한 상승에도 충분히 대응할 수 있다고 생각되기 때문에, 대조군의 세포 내 Ca^{2+} 의 움직임은 세포질 막의 Ca^{2+} 펌프 기능 한계에 도달하고 있다는 것을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. β -NMN의 30mg/kg과 100mg/kg로 처리된 마우스에서 얻은 표본, 또한 검체 1 (TND1128)의 0.01mg/kg에서 1.0mg/kg로 처리된 마우스의 표본은 투여 당 세포질 칼슘 농도의 변동에 유사한 회복을 보이고 있다. 그러나 도 35 및 도 36에 보이는 것처럼, 이 값을 미토콘드리아와 같은 방법으로 정량화한 경우 β -NMN의 10mg/kg 투여군 이외의 농도에서는 유의한 차이는 보이지 않았다.

[0212] [유효 농도로 본 양 약물의 작용 양식]

[0213] 두 약물은 거의 동일한 정도의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도 제어 작용을 나타내지만, 유효 농도에서 그 작용은 검체 1 (TND1128) 쪽이 100배 더 강력했다. 비 특허 문헌 6에서는 β -NMN 투여 후 NAD^+ 가 30분 후에는 절정에 도달하고 투여된 NMN의 혈중 농도는 이에 대응하여 감소할 것으로 보고 있으며, 투여된 NMN가 NAD^+ 생합성 기질이 될 가능성을 보여주고 있다. 그러나 본 실험에서 사용한 검체 1 (TND1128)의 유효량은 1.0mg/kg 이하의 미량이며, 이것을 β -NMN처럼 생합성 원료로 생각할 수 없다. 결국 미토콘드리아의 산화적 에너지 획득 과정에서

NAD^+ 의 생합성 양이 증가하고 있다해도, 투여 후 24 시간 후에 보였던 상당한 미토콘드리아 기능 안정 작용은 서취인 유전자 군의 발현 촉진에 의한 NAD^+ 증가로 인한 것으로 생각해야 할 것이다. 본 연구에서는 24시간 전에 투여한 β -NMN로 상당한 미토콘드리아 보호 기능이 보인 점에서 β -NMN의 작용도 단순히 NAD^+ 의 기질로 공급된 결과가 아니라 서취인 유전자 군으로의 작용을 통한 것으로 생각해야 할 것이다.

[0214] 한편, 세포질 내 Ca^{2+} 농도의 80K-ACSF 의한 격렬한 상승에 대한 작용에 대해서는 β -NMN 및 검체 1 (TND1128) 모두 유의한 효과를 보이지 않았다. 도 29과 도 30에 나타난 β -NMN 100mg/kg 및 검체 1 (TND1128) 1mg/kg의 미토콘드리아 내 Ca^{2+} 농도 변화에 대한 작용과, 도 33과 도 34에 나타난 β -NMN 및 검체 1 (TND1128)의 세포질 내 Ca^{2+} 농도 변화에 대한 작용으로부터, 이 표본에서 80K-ACSF의 심한 자극에도 불구하고 매우 안정적인 생리적 반응을 유지할 수 있는 상태임을 보여주고 있다. 이것이 인간의 뇌에서 재현된다면, 강력한 뇌 보호 작용을 기대할 수 있다.

[0215] 이미 레드 와인의 성분인 레스베라트롤(resveratrol) 및 그 유도체로 SRT1720 등의 합성 서취인 활성화 약물의 약리 작용이 보고되어 있지만 (비 특허 문헌 8), 실제로 본 실험과 같이 피하 투여된 마우스 뇌 미토콘드리아 기능에 대한 효과를 언급한 보고는 없다.

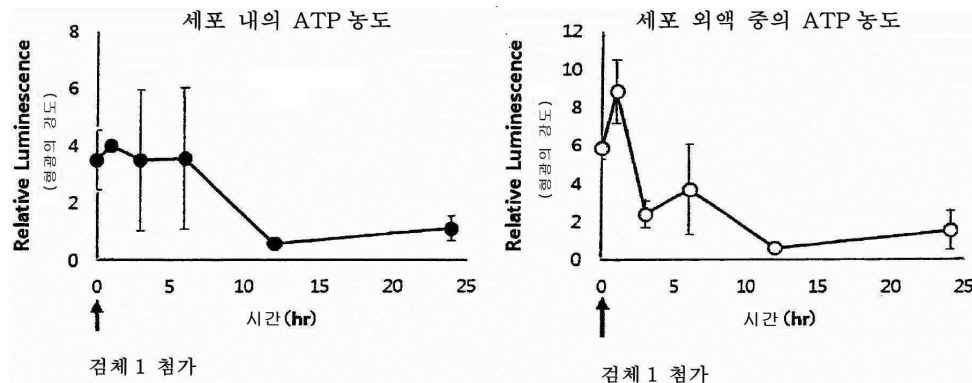
[0216] 이상으로부터 분명하게 알 수 있듯이, 검체 1(TND1128)은 소수성이 높고 매우 안정된 화합물이며, 이것이 β -NMN을 능가하는 더 큰 장점이다.

[0217] 상기 장점을 이용하여 외용약을 조정하고 약해진 모근을 활성화하여 백발이나 대머리 치료에 또한 연약한 피부 세포의 회춘에도 사용 가능하다고 생각된다. 또한 경피 흡수에 의해 뇌에 작용도 기대할 수 있는 것은 아닐까 생각된다.

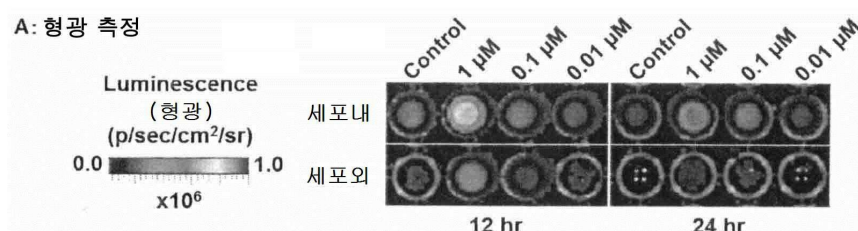
[0218] 위의 실험 결과를 감안하면 화학식 (I) ~ (IV)로 표시되는 5-데아자플라빈 화합물은 세포 내에서 ATP 생산을 활성화하고 있다고 할 수 있다.

도면

도면1

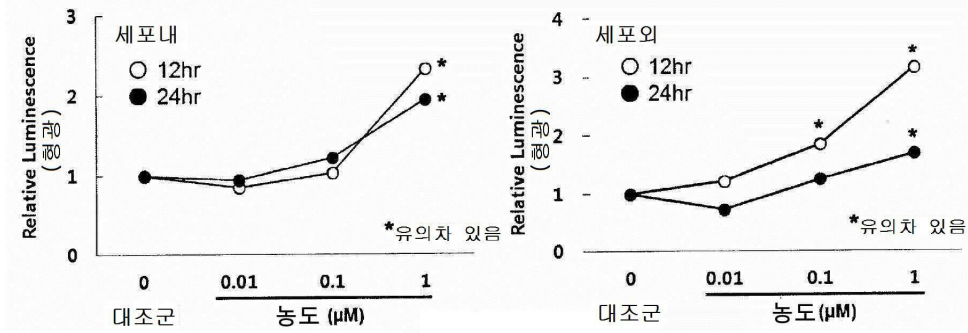


도면2a

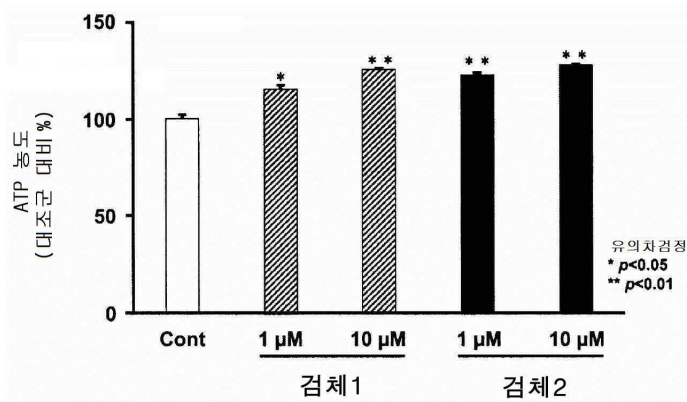


도면2b

B:A의 측정 결과를 정량한 것

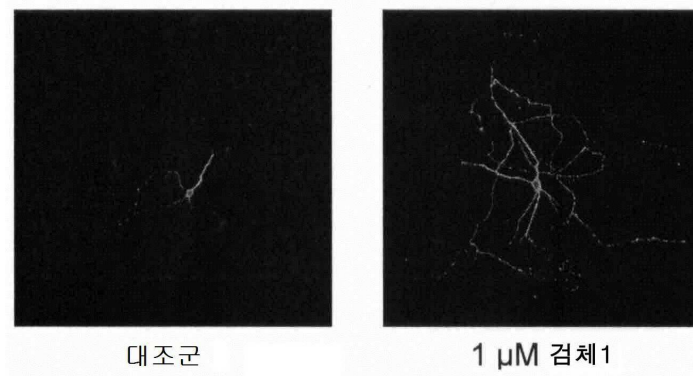


도면3

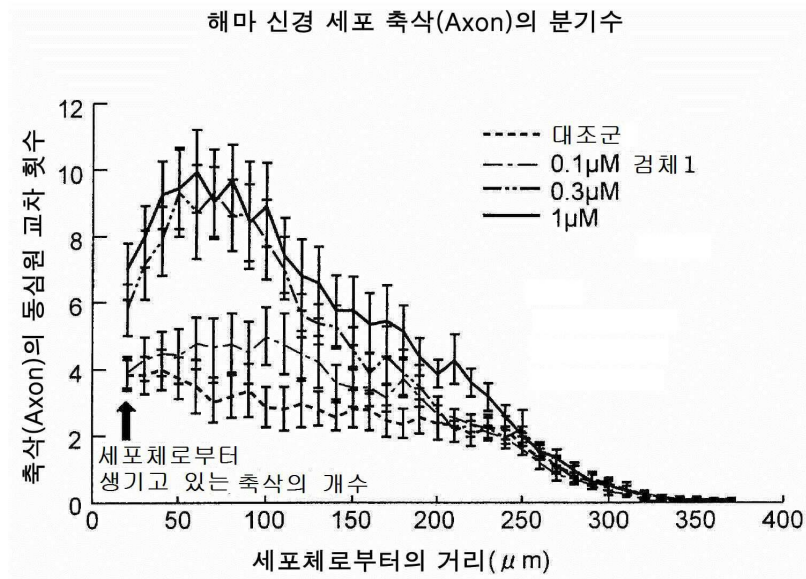


도면4

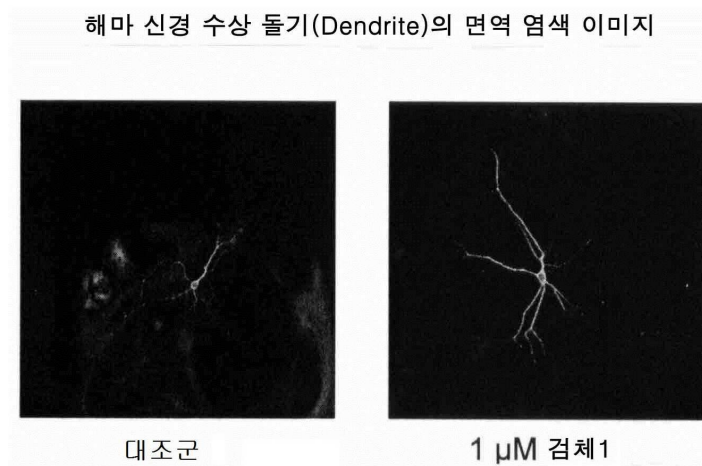
해마 신경 세포 축삭(Axon)의 형광 면역 이미지



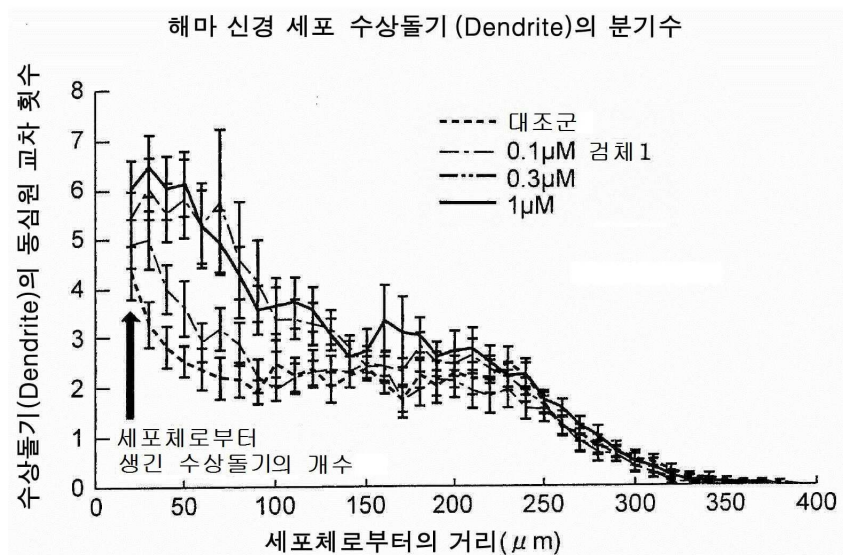
도면5



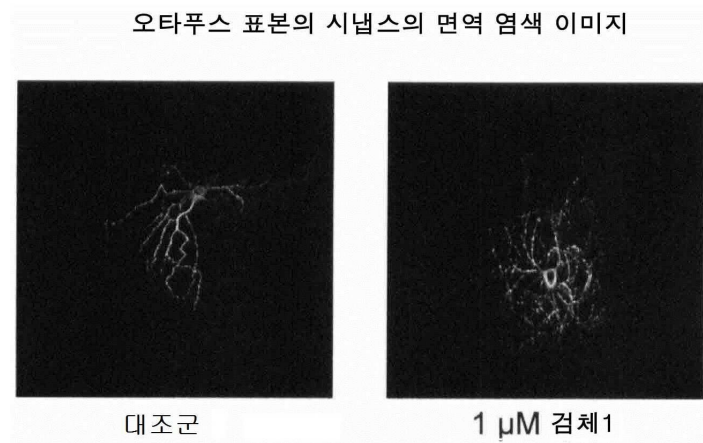
도면6



도면7

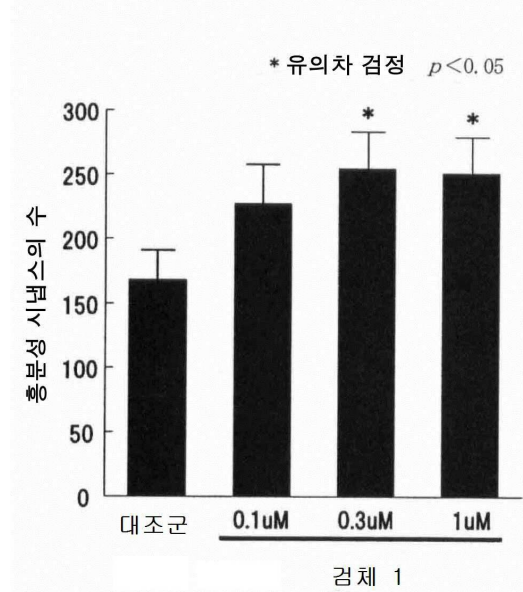


도면8

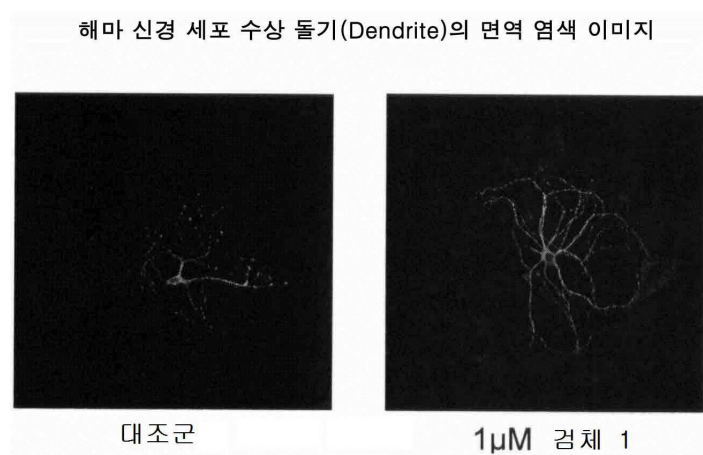


도면9

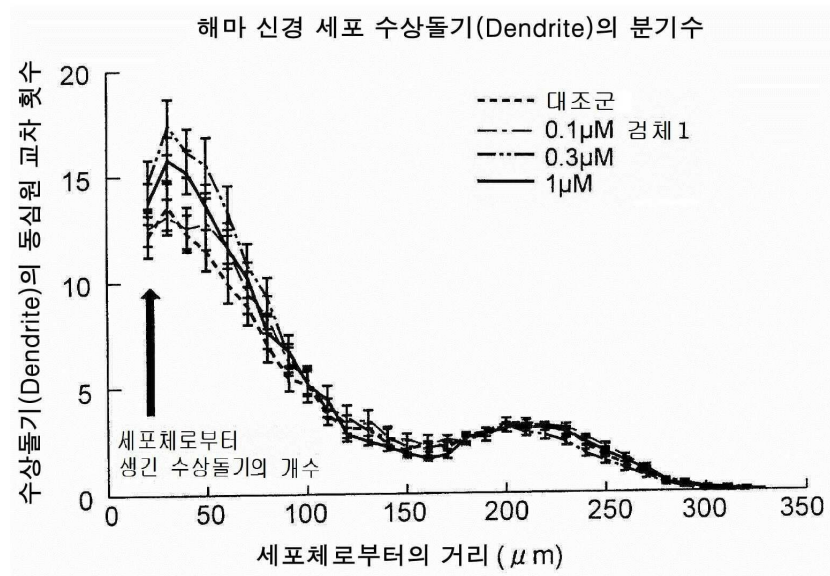
해마 신경 세포에 투사하는 흥분성 시냅스의 증가



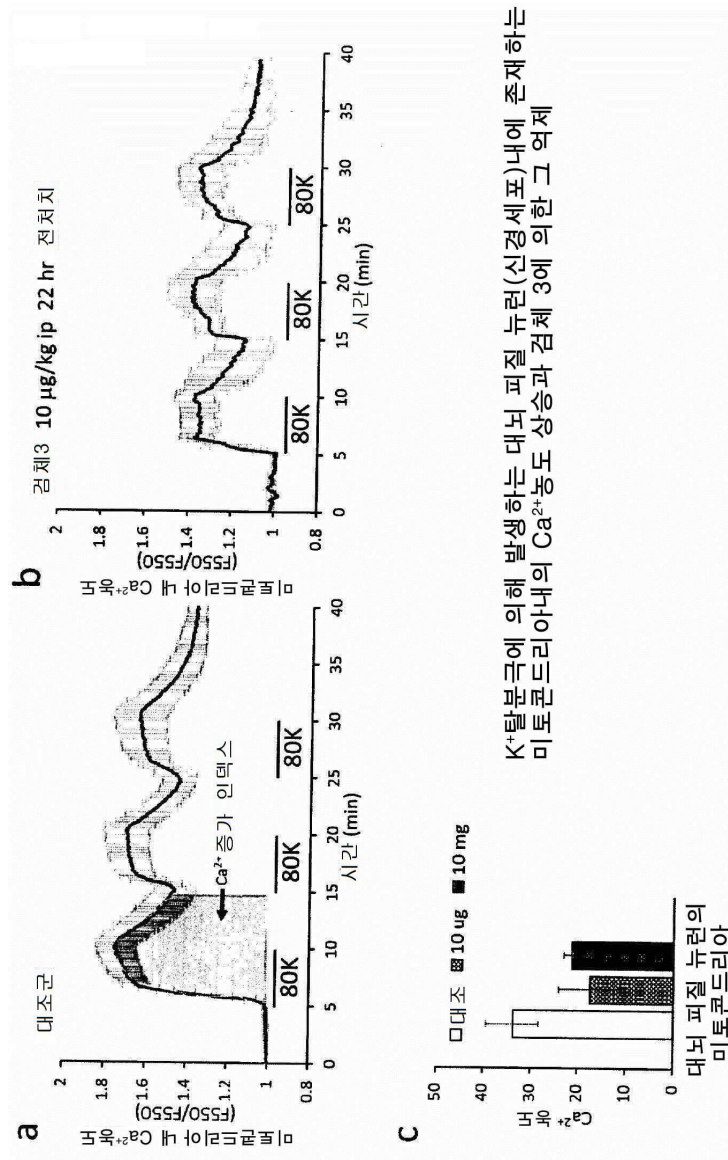
도면10



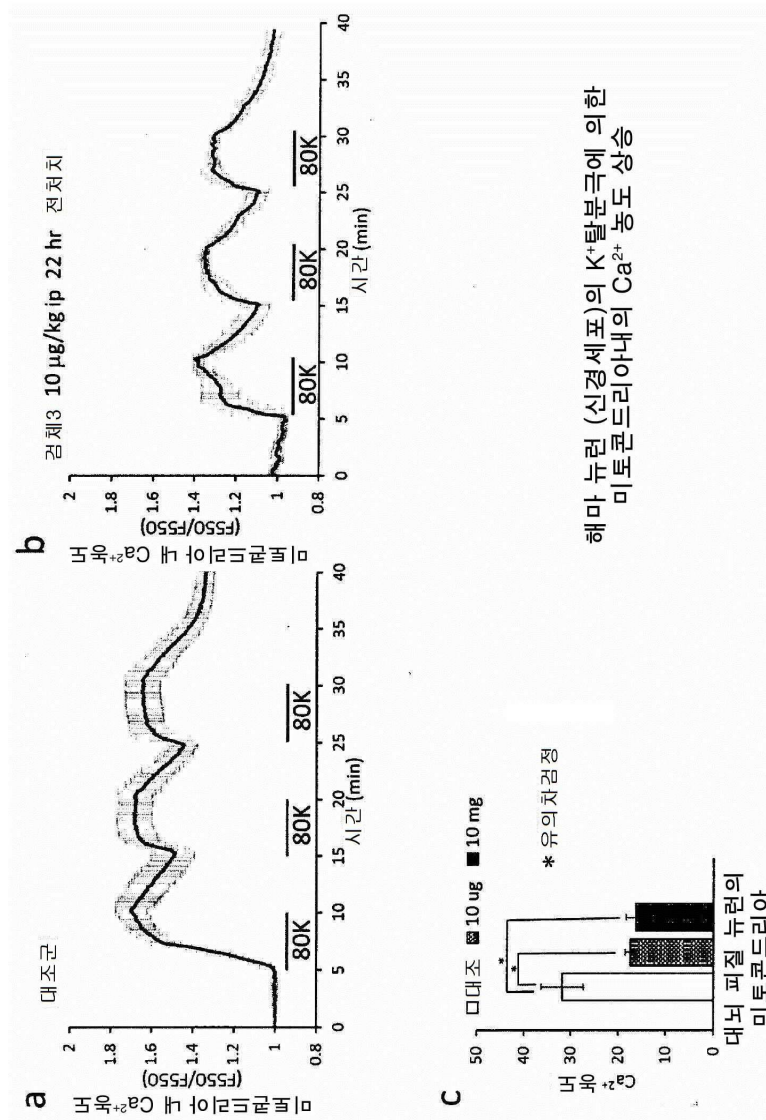
도면11



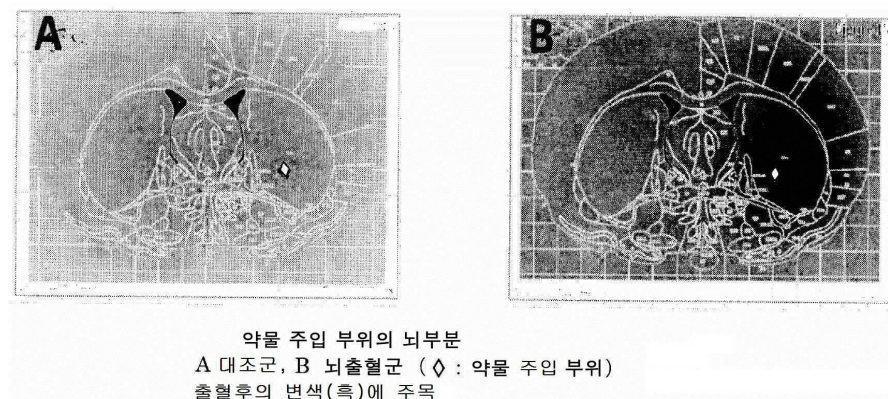
도면12



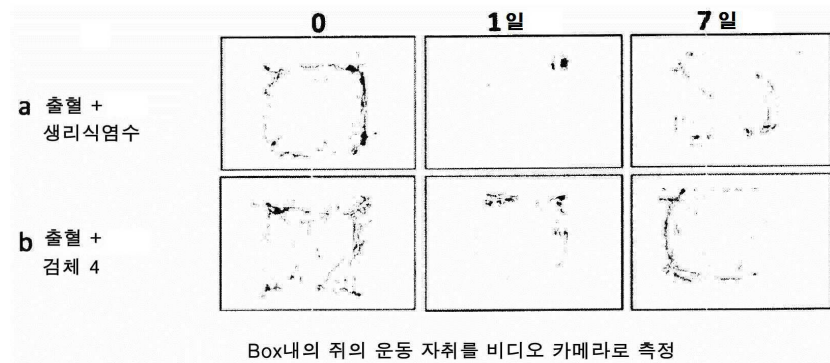
도면13



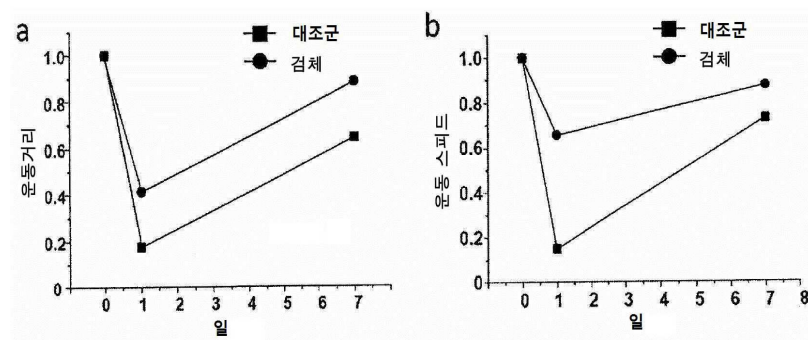
도면14



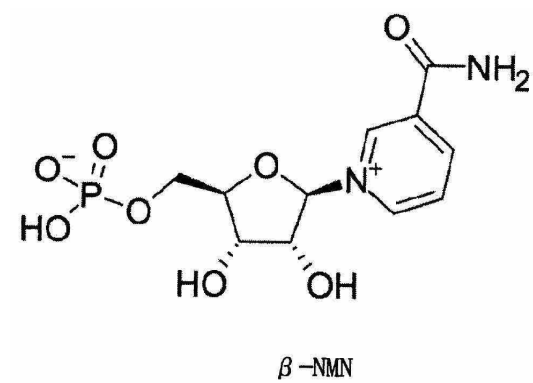
도면15



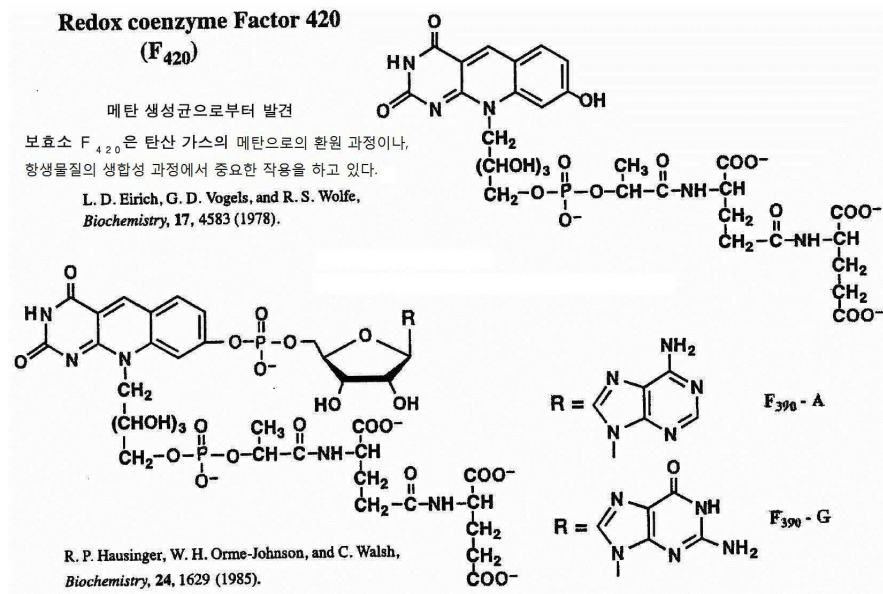
도면16



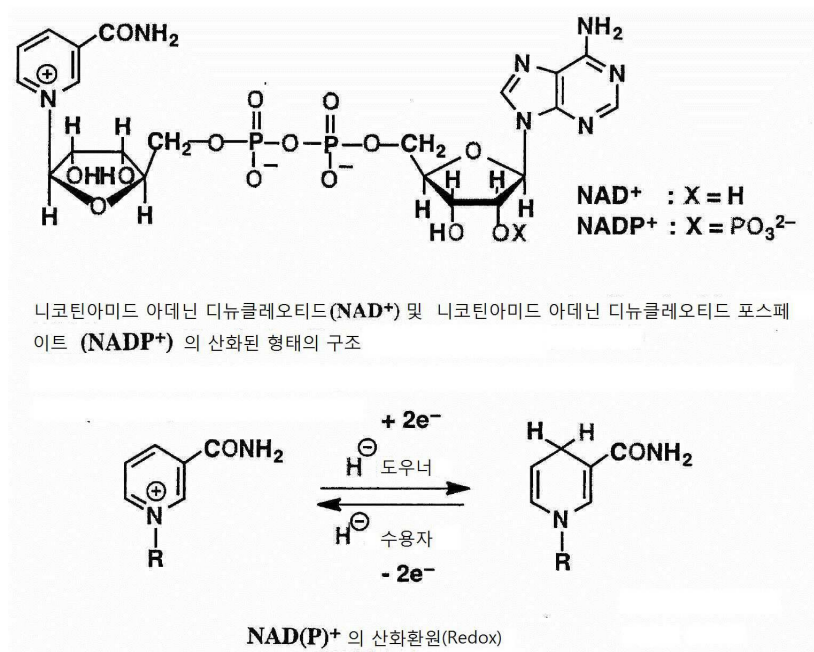
도면17



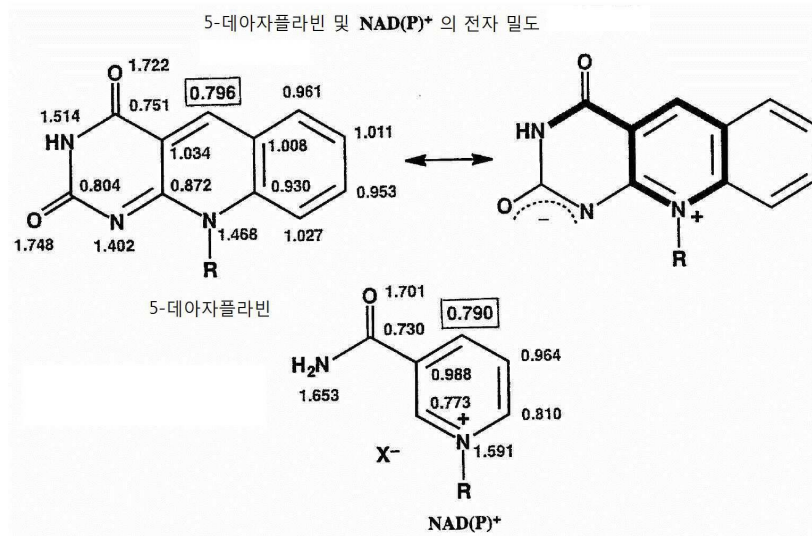
도면18



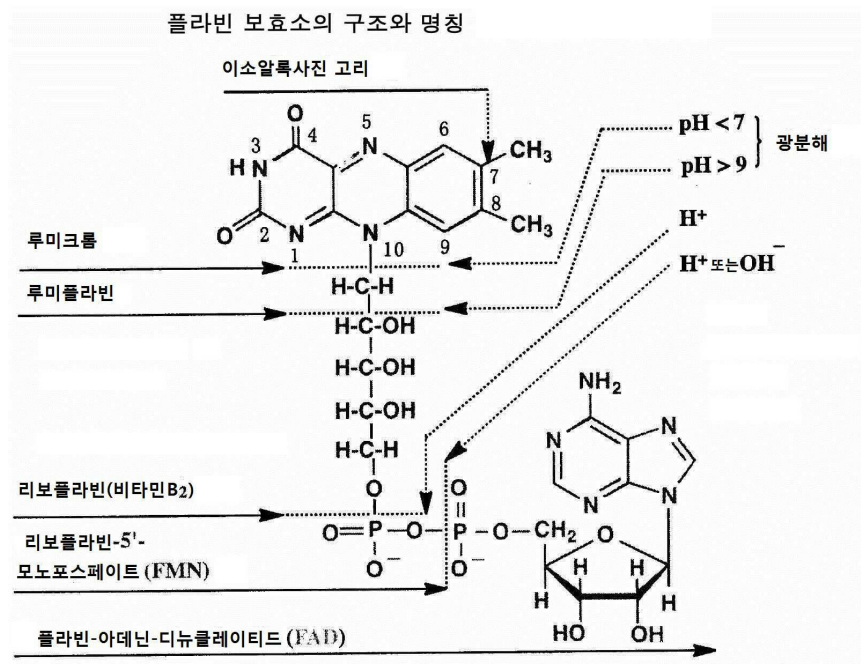
도면19



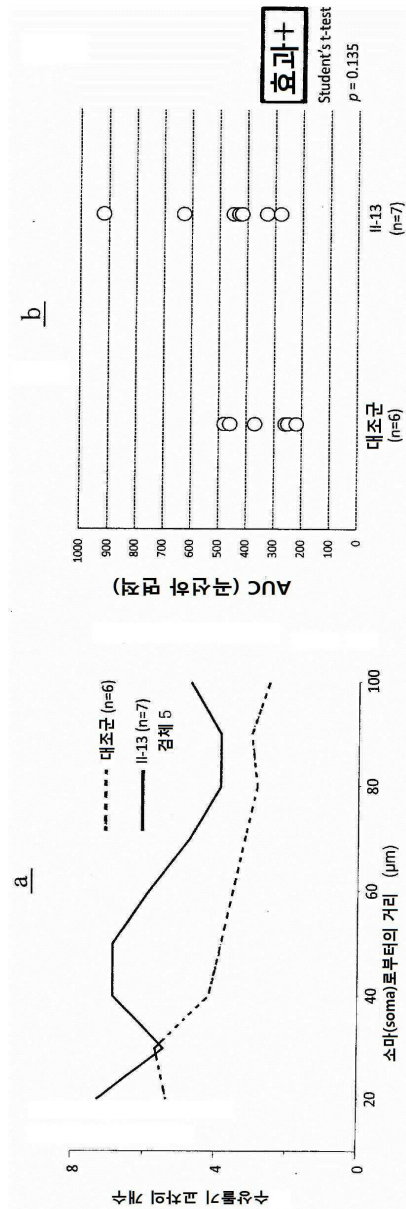
도면20



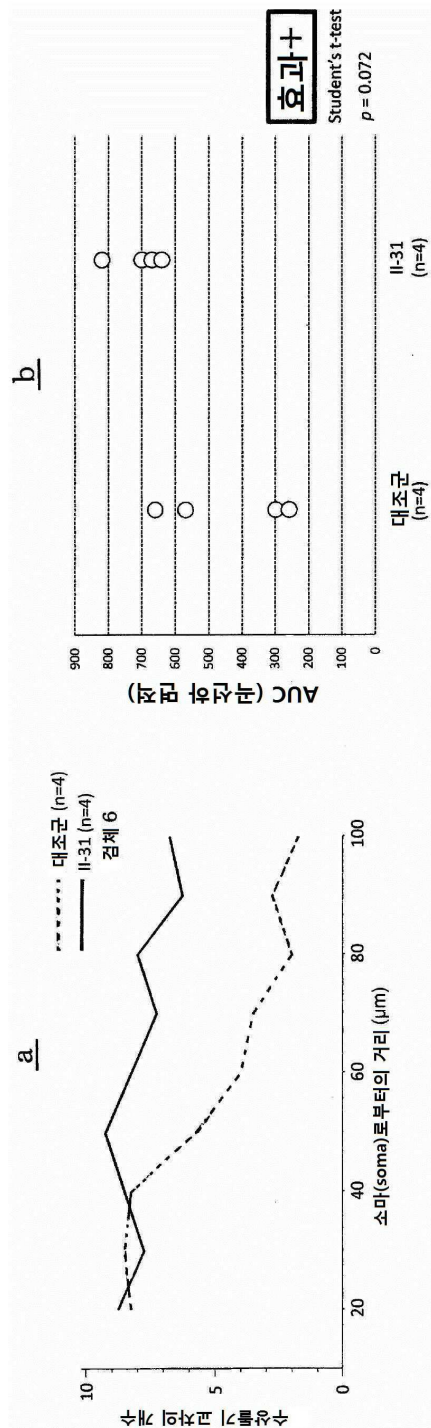
도면21



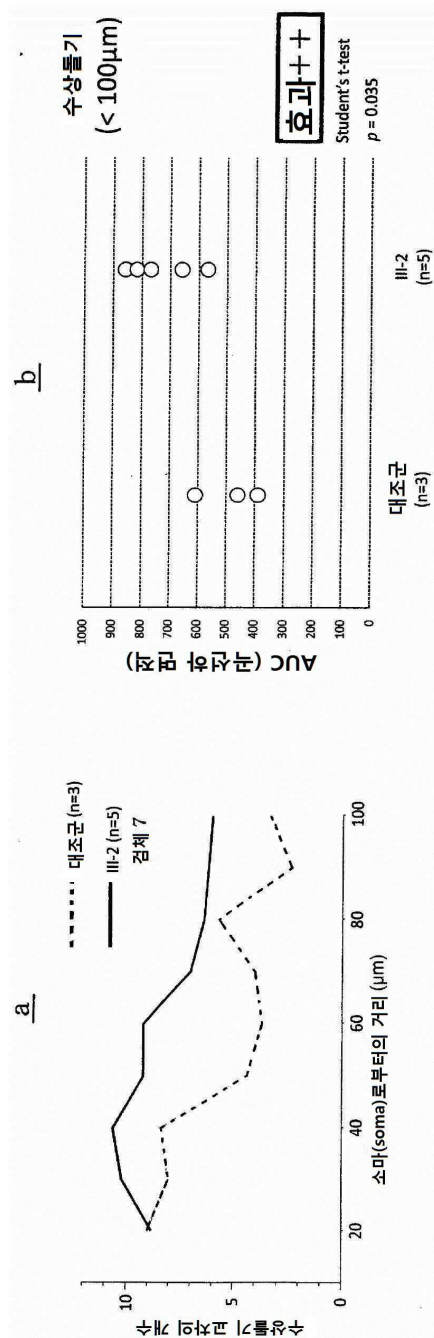
도면22



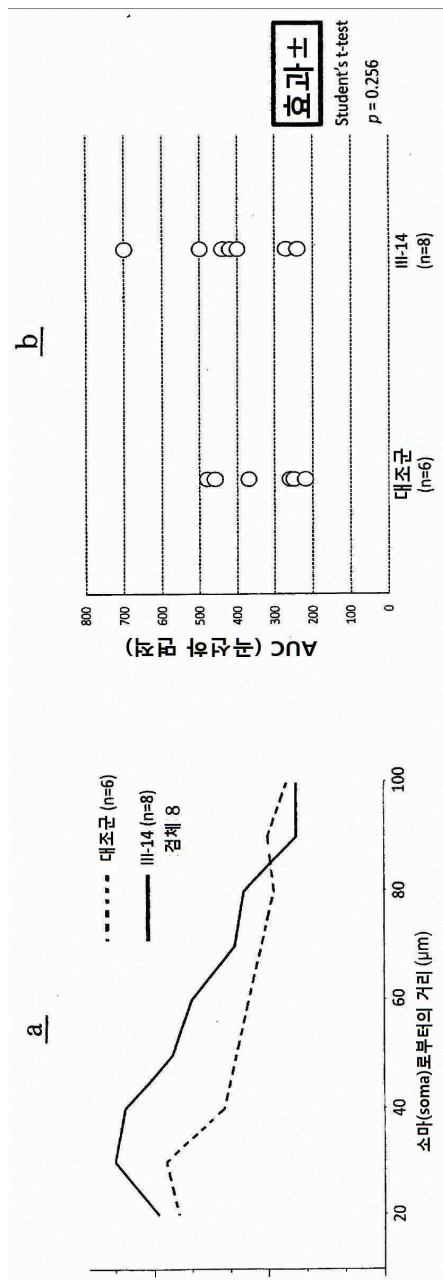
도면23



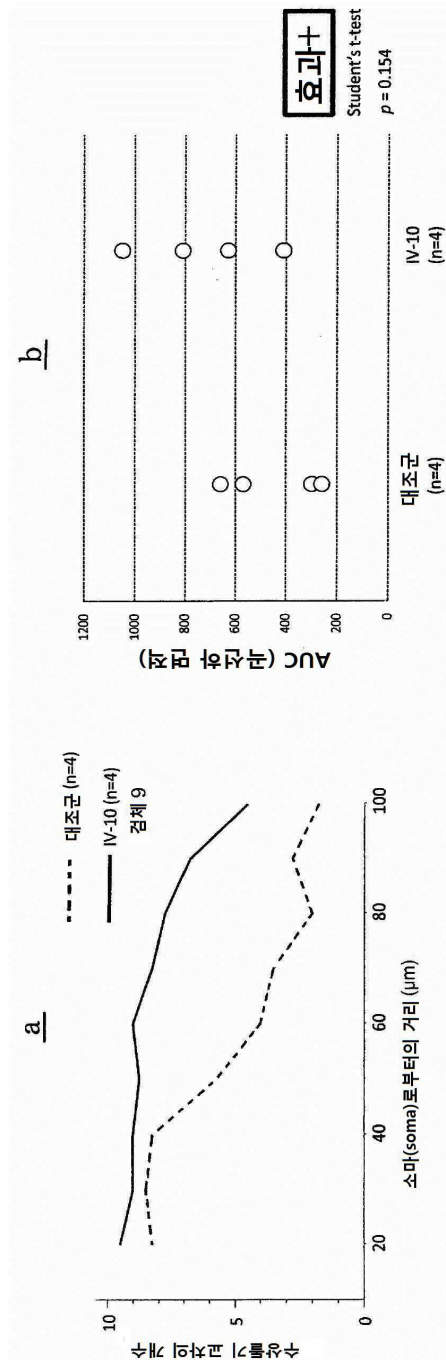
도면24



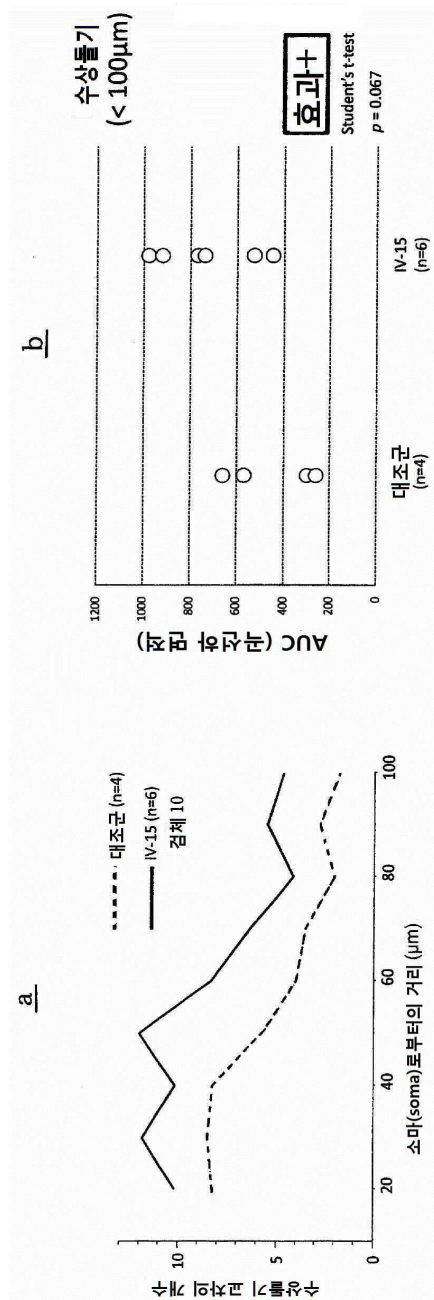
도면25



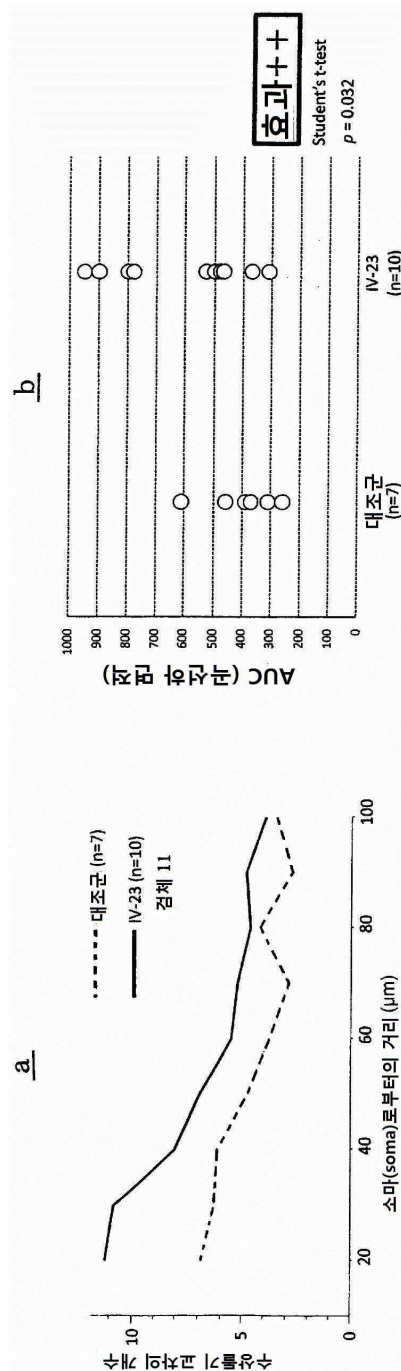
도면26



도면27

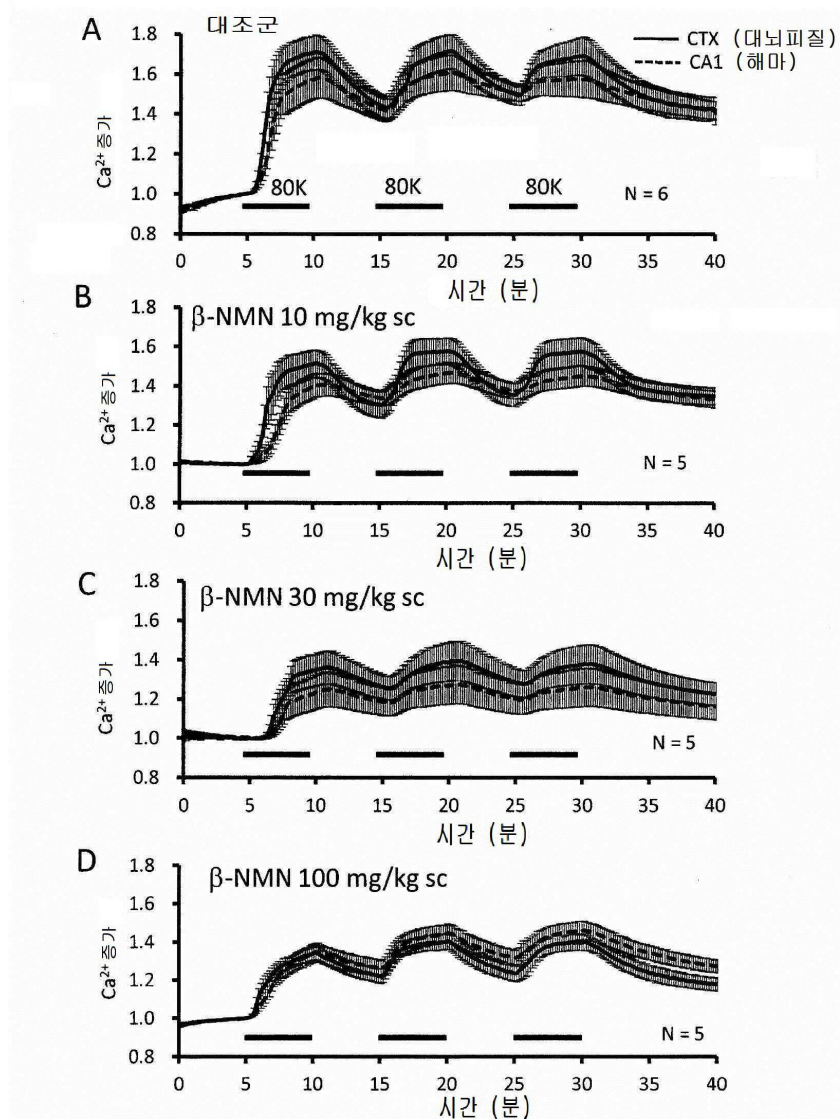


도면28



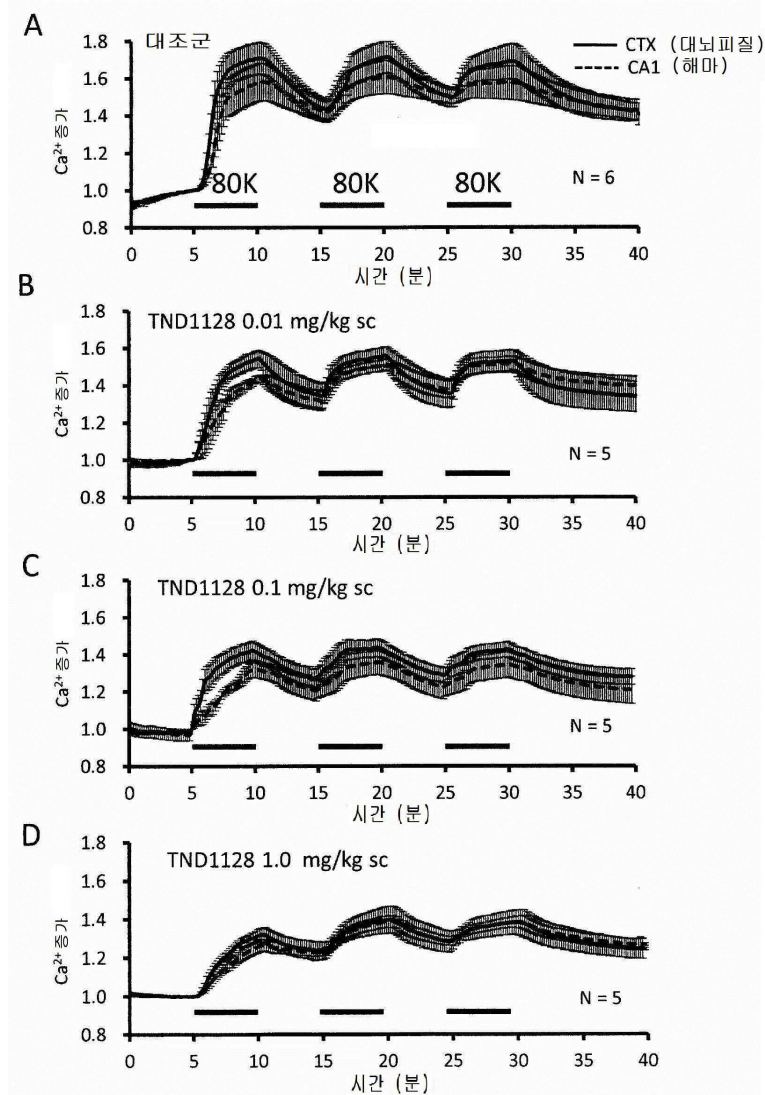
도면29

Xrhod1로딩된 쥐 뇌 제조물의 반복적인 80K 노출에 대한 β -NMN (24 시간 전처리)의 효과 (미토콘드리아 Ca^{2+})



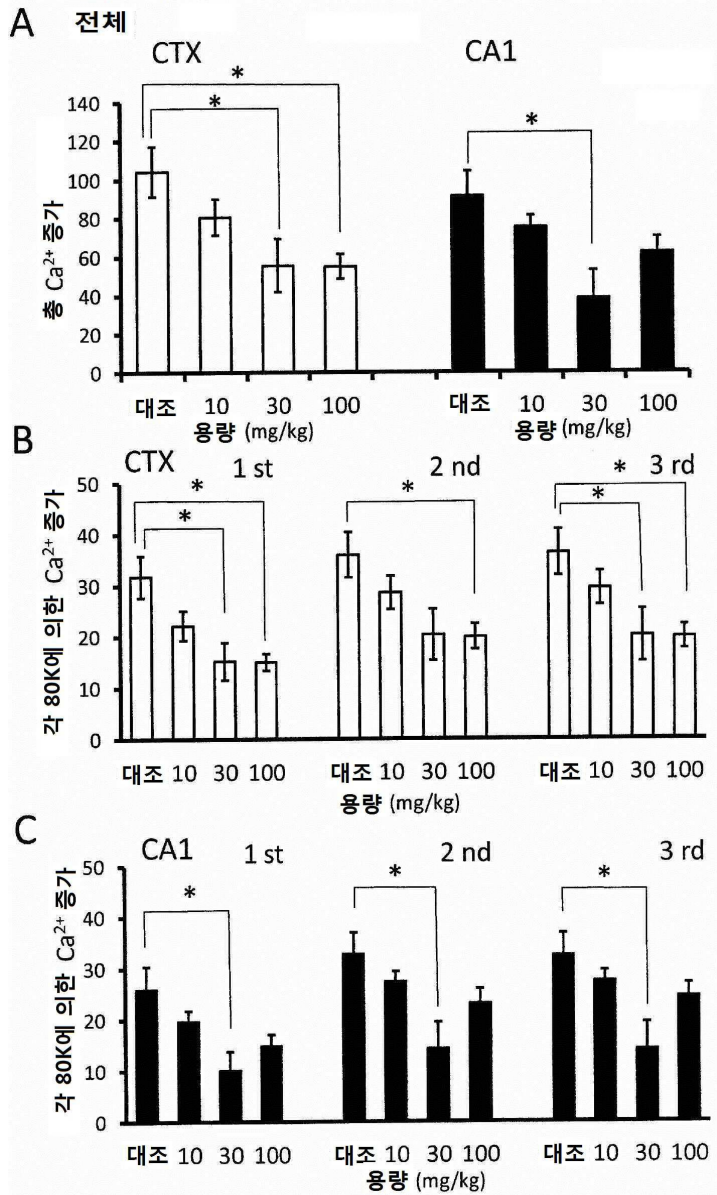
도면30

Xrhod1로딩된 쥐 뇌 제조물의 반복적인 80K 노출에 대한 TND1128 (24시간 전처리)의 효과 (미토콘드리아 Ca^{2+})



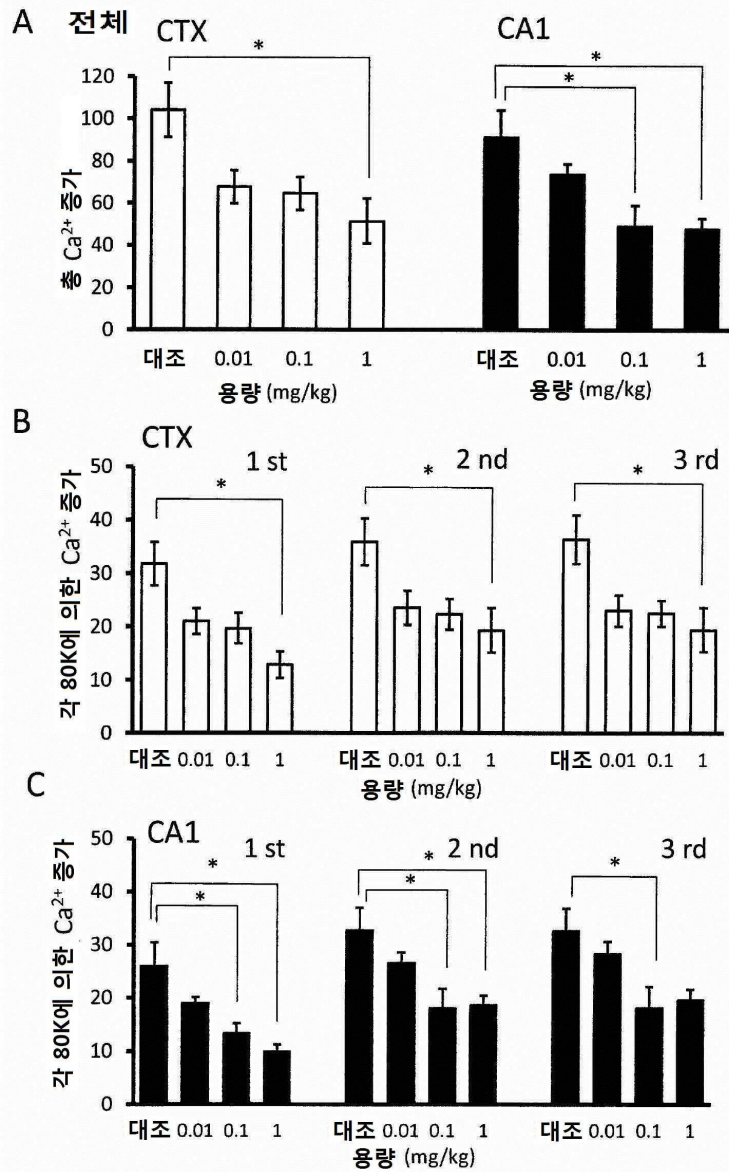
도면31

80K 유도된 미토콘드리아 Ca^{2+} 증가에 대한 β -NMN 효과의
통계적 분석



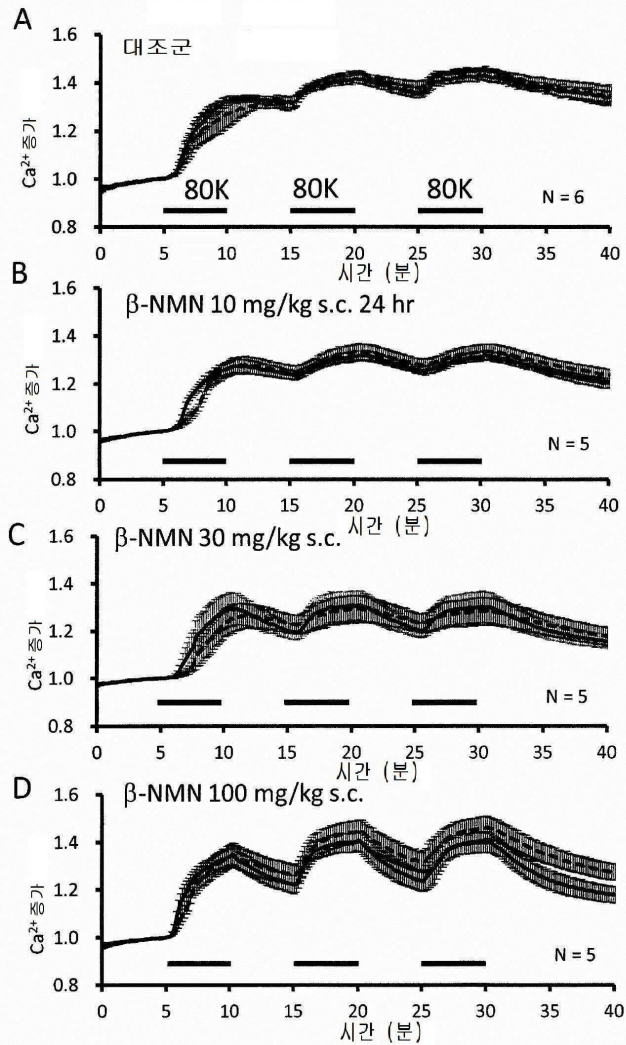
도면32

3회 80K 감각에 의해 유도된 미토콘드리아 Ca^{2+} 증가에 대한 1128의 효과와 용량 반응 관계



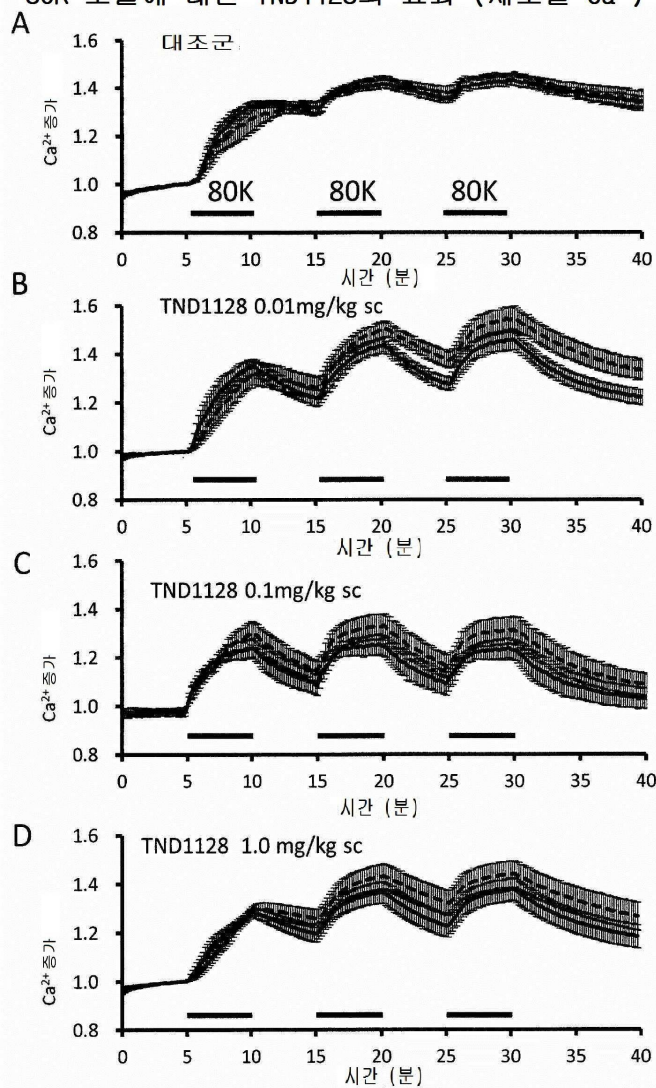
도면33

Fura-4F 로딩된 쥐 뇌 제조물의 반복적인 80K 노출에 대한 β -NMN 24시간 전처리)의 효과 (세포질 Ca^{2+})

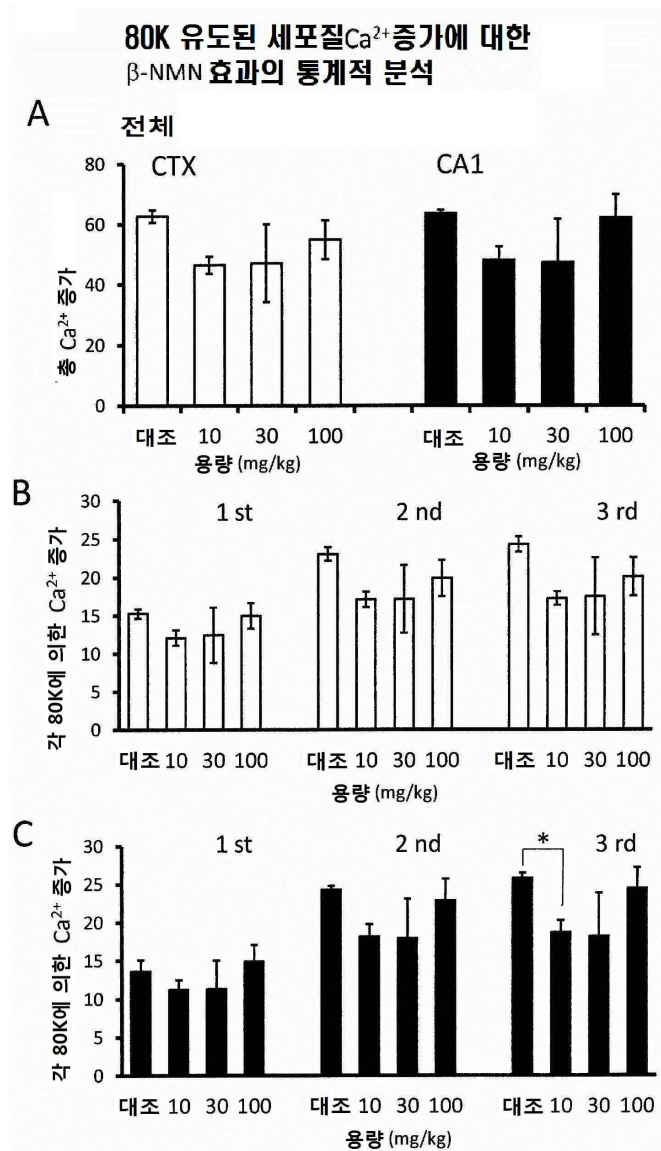


도면34

Fura-4F 로딩된 쥐 뇌 슬라이스 제조물의 반복적인 80K 노출에 대한 TND1128의 효과 (세포질 Ca^{2+})

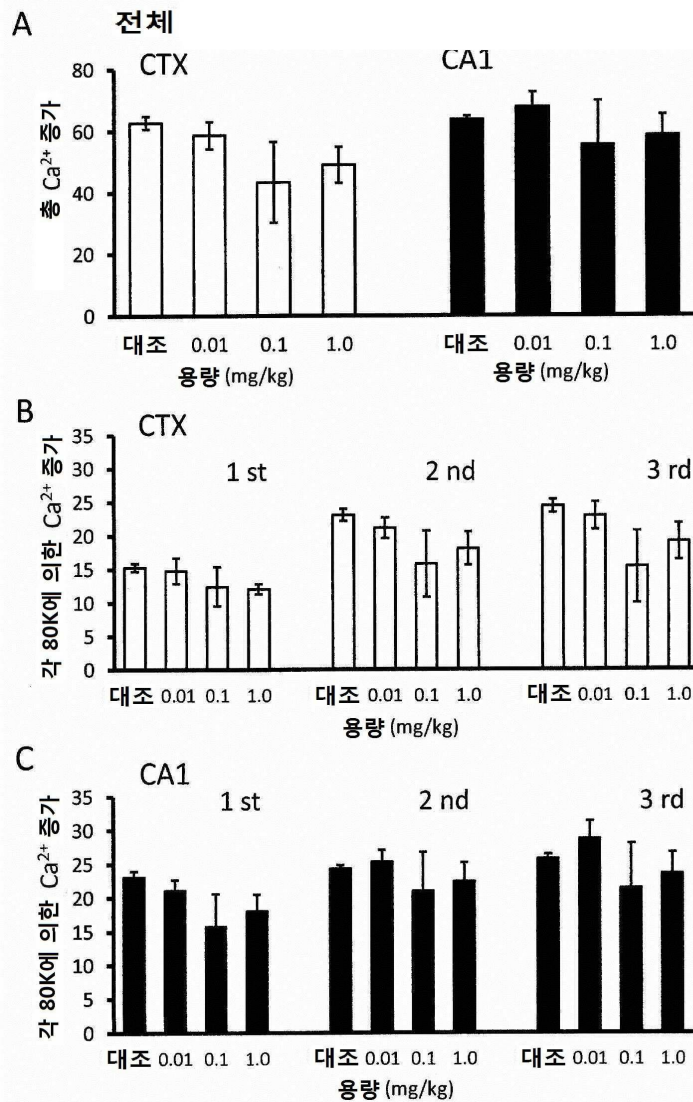


도면35



도면36

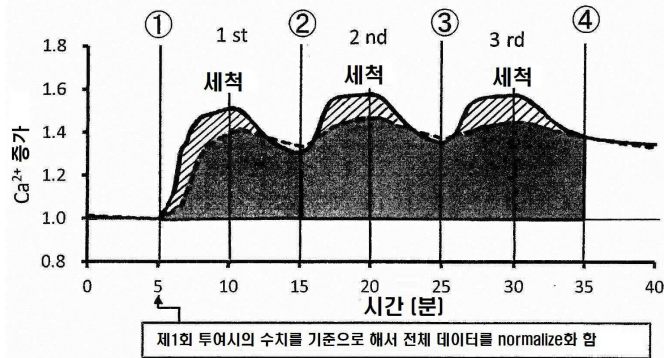
3회의 80K 감각에 의해 유도된 세포질 Ca^{2+} 증가에 대한 1128의 효과의 용량반응관계



도면37

Ca²⁺ 상승의 정량화

80K연속 3회 노출 시의 미토콘드리아 또는 세포질의 Ca²⁺상승량의 정량법



1 st: 최초 80 ACSF 투여 ①로부터 제2회 투여 ②까지

2 nd: 2회째의 80 ACSF 투여 ②로부터 제3회 투여 ③까지

3 rd: 3회째의 80 ACSF 투여 ③으로부터 제4회 투여 ④까지

총 반응 : 1 st + 2 nd + 3 rd

AUC구하는 법

10초마다의 normalize된 Ca²⁺ 반응의 총계로부터, 측정수(10분간의 경우에는 60을; total의 경우에는 180을 제한 값으로 곡선 아래 면적 Area Under the Curve(AUC)를 구한다.