



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0038222
(43) 공개일자 2024년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07J 1/00 (2006.01) A61K 31/565 (2006.01)
A61K 31/566 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07J 1/0018 (2013.01)
A61K 31/565 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0116705

(22) 출원일자 2022년09월15일

심사청구일자 2022년09월15일

(71) 출원인

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이연중

충청북도 청주시 흥덕구 신정로81번길 60

신정용

광주광역시 북구 호동로 99, 105동 1008호(문흥동, 우성아파트)

백승만

경상남도 진주시 진양호로 74-1, 5층

(74) 대리인

공병욱

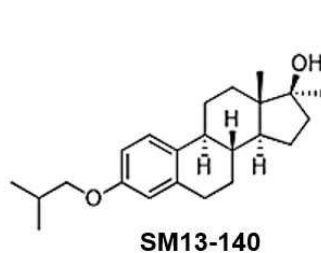
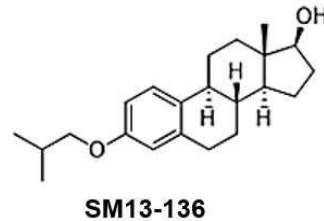
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 비정상 단백질 응집체 억제제 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 비정상 단백질 응집체 억제제 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 스테로이드 구조 유도체 화합물을 이용하는 경우, α -시누클레인, AIMP2 또는 이의 조합의 응집을 효과적으로 억제할 수 있다. 특히, 본 발명의 스테로이드 구조 유도체 화합물인 SM13-136은 α -시누클레인과 AIMP2의 응집을 동시에 억제하고, 나아가 유의한 응집 억제능은 유지하면서 성호르몬 수용체에 작용하지 않아 부작용의 위험이 적은 신경 퇴행성 질환 치료제로 사용이 가능하다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

A61K 31/566 (2013.01)

A61P 25/16 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C07J 1/0025 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036753
과제번호	HU22C0143000022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	치매극복연구개발사업
연구과제명	알파-시누클레인 응집체 형성/전파 촉진 시스템-기반 AIMP2 타겟의 루이소체치매 발
병 원인/기전 및 병변 전파	너지도 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2022.04.01 ~ 2024.12.31

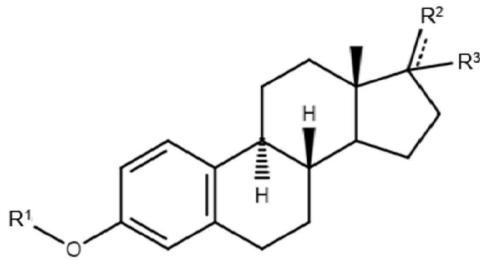
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:

[화학식 I]



상기 화학식 I에서,

상기 R^1 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R^3 은 생략되고, 상기 R^2 는 C_{1-6} 알킬, O, $N-R_a$, N_2 및 $N-OH$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R^2 및 상기 R^3 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, OR^a , 및 $OCOR^a$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기 R^a 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R^1 은 H, C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 알키닐이고,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R^3 은 생략되고, 상기 R^2 는 O 또는 $N-OH$ 이고,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R^2 및 상기 R^3 은 H, C_{1-6} 알킬, OR^a , 및 $OCOR^a$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기 R^a 는 H 또는 C_{1-6} 알킬인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 R^1 은 아이소뷰틸(isobutyl)이고,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R^3 은 생략되고, 상기 R^2 는 O 또는 $N-OH$ 이고,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R^2 및 상기 R^3 은 H, OH, CH_3 및 $OCOCH_3$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:

(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-isobutoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-ol;

(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-isobutoxy-13,17-dimethyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-ol; 및

(8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-isobutoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-yl propionate.

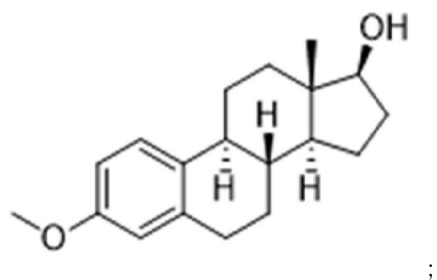
청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-isobutoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-ol인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

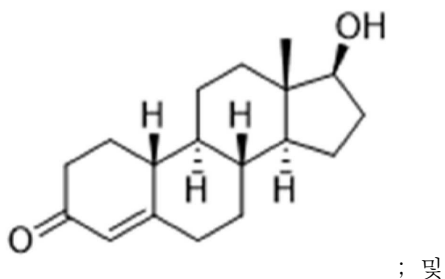
청구항 6

하기 화학식으로 표시되는 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

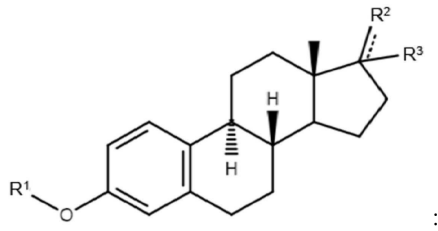
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 1]



상기 화학식 I에서,

상기 R^1 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고,

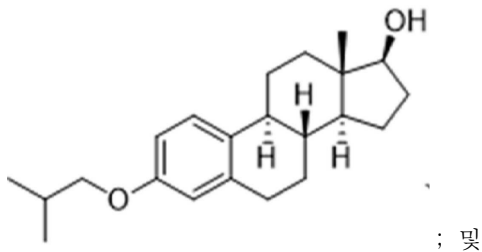
상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R^3 은 생략되고, 상기 R^2 은 C_{1-6} 알킬, O, $N-R_a$, N_2 및 $N-OH$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R^2 및 상기 R^3 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, OR^a , 및 $OCOR^a$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기 R^a 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

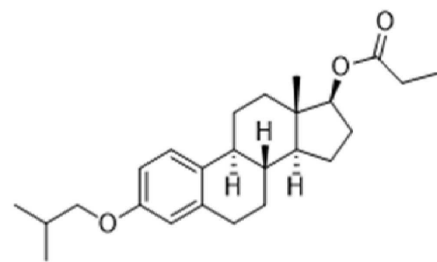
청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 하기 화학식으로 표시되는 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 3]



[화학식 4]



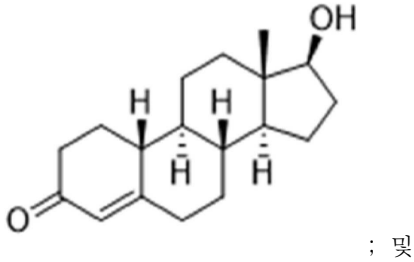
청구항 8

제6항에 있어서, 상기 비정상 단백질 응집체는 AIMP2 응집체, α -시누클레인 응집체 또는 이들의 조합인, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

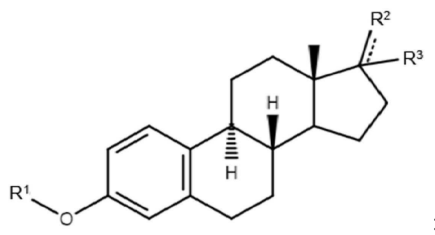
청구항 9

제6항에 있어서, 하기 화학식으로 표시되는 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고, 상기 비정상 단백질 응집체는 AIMP2 응집체 및 α -시누클레인 응집체인, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물:

[화학식 2]



[화학식 1]



상기 화학식 I에서,

상기 R¹은 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐 및 C₂₋₆ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고,

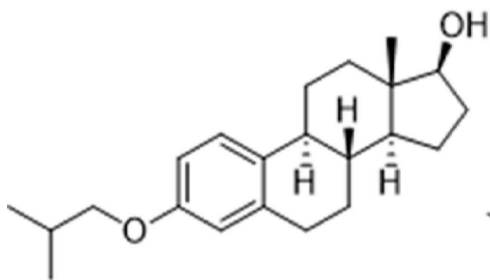
상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R³은 생략되고, 상기 R²는 C₁₋₆ 알킬, O, N-R_a, N₂ 및 N-OH로 이루어진 군으로부터 선택되며,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R² 및 상기 R³은 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, OR^a, 및 OCOR^a로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기 R^a는 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐 및 C₂₋₆ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물인 것인, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물:

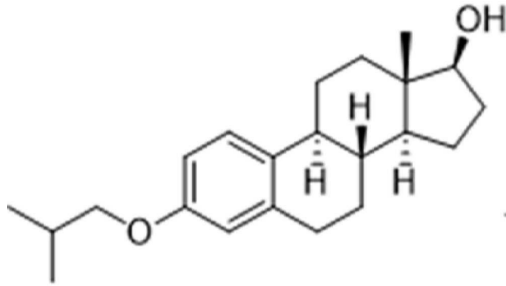
[화학식 3]



청구항 11

제6항에 있어서, 하기 화학식으로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고, 상기 비정상 단백질 응집체는 AIMP2 응집체 및 α -시누클레인 응집체이며, 상기 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 에스트로겐 수용체를 조절하지 않는 것인, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 3]



청구항 12

제6항에 있어서, 상기 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애는 파킨슨병(Parkinson's disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD), 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy)인, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비정상 단백질 응집체 억제제 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현대 사회가 노령화 사회로 진입하면서, 파킨슨병(Parkinson's disease)과 같은 신경 퇴행성 질환 환자의 수가 급격하게 증가하는 추세에 있으나, 그 치료법으로서 신경전달물질 도파민을 보충하는 대증치료법 외에 병변 진행을 근본적으로 치료할 수 있는 약물은 부재하는 실정이다.

[0004] 신경 퇴행성 질환은 특징적인 변성 단백질 응집체를 주요 병변으로 한다. 파킨슨병(Parkinson's disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD) 및 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy)의 경우 변성된 α -시누클레인(α -synuclein)으로 이루어진 루이소체를 주요 병변으로 나타내며, 이러한 루이소체 병변으로 인하여 신경세포의 기능 이상 및 사멸이 유도된다.

[0005] AIMP2(Aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2)는 파킨슨병 흑질(substantia nigra)의 루이소체 응집체(Lewy body inclusion)에 존재하는 병원성 parkin 기질로서, Parkin $-/-$ 마우스의 복측 중뇌(ventral midbrain)에서 AIMP2의 수준이 증가하고, Parkin 돌연변이 또는 산발적 파킨슨병을 가진 환자의 사후 뇌에서 AIMP2의 수준이 높아지고 용해도가 감소된 구조 변성된 AIMP2가 관찰된다. 이와 같이 AIMP2는 루이소체에서 α -시누클레인과 함께 발현되며, 파킨슨병의 주요 병변인 도파민 세포 사멸과 루이소체 형성에 중요한 기능을 하는 질환 단백질이다.

[0006] 현재까지 시험관 내(*in vitro*)에서 재조합 α -시누클레인 응집 시스템을 활용하여 α -시누클레인의 응집을 억제하는 화합물이나 항체 제제를 발굴함으로써 파킨슨병의 루이소체 병변을 제어하는 연구가 광범위하게 이루어져 왔으나, α -시누클레인 AIMP2에 동시에 응집 억제 효과를 갖는 화합물에 대한 연구는 미비한 실정이었다.

[0007] 본 발명자들은 α -시누클레인 AIMP2의 응집을 동시에 억제하는 효과를 가지는 화합물에 대한 연구 중 에스트리올(estriol)을 발굴하였으나, 에스트리올은 에스트로겐 수용체를 활성화시켜 다양한 호르몬 작용을 유도할 수

있기 때문에, 약물의 장기 투여가 필요한 파킨슨병과 같은 만성 질환에 적용하기에는 한계가 있었다.

[0008] 이에, 루이소체 병변 발현, 신경세포 기능 이상 및 신경세포 사멸에 중요한 기능을 하는 α -시누클레인과 AIMP2의 응집을 동시에 억제하고, 유의한 응집 억제능은 유지하면서 성호르몬 수용체에 작용하지 않는 신경 퇴행성 질환 치료제의 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2306867호 (2021.09.23. 등록)

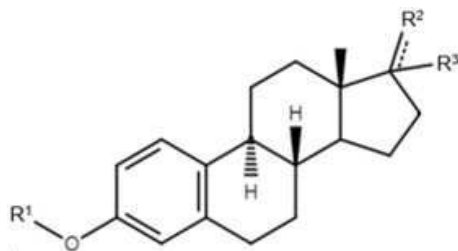
발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 α -시누클레인과 AIMP2의 응집을 동시에 억제하고, 나아가 유의한 응집 억제능은 유지하면서 성호르몬 수용체에 작용하지 않는 신경 퇴행성 질환 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, α -시누클레인, AIMP2 또는 이의 조합의 응집을 억제하는 스테로이드 구조 유도체 화합물을 발굴 및 합성함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공하는 것이다:

[0013] [화학식 I]



[0014]

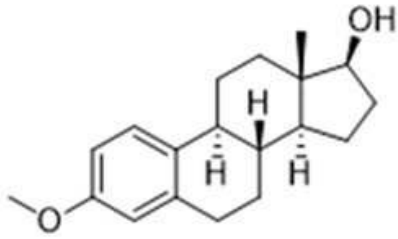
[0015] 상기 화학식 I에서, 상기 R¹은 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐 및 C₂₋₆ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0016] 상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R³은 생략되고, 상기 R²는 C₁₋₆ 알킬, O, N-R_a, N₂ 및 N-OH로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0017] 상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R² 및 상기 R³은 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, OR^a, 및 OCOR^a로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기 R^a는 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐 및 C₂₋₆ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

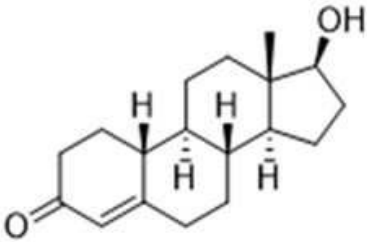
[0018] 본 발명의 다른 목적은 하기 화학식으로 표시되는 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다:

[0019] [화학식 1]



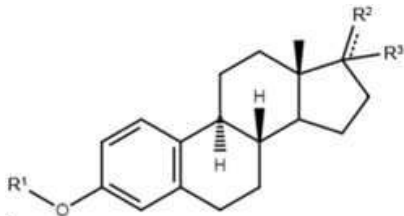
[0020] ;

[0021] [화학식 2]



[0022] ; 및

[0023] [화학식 1]



[0024] ;

[0025] 상기 화학식 I에서,

[0026] 상기 R^1 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고,

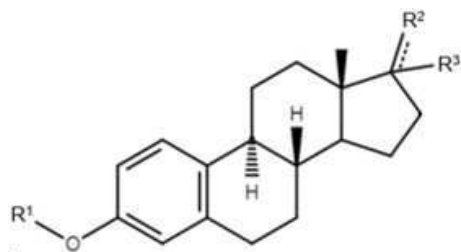
[0027] 상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R^3 은 생략되고, 상기 R^2 는 C_{1-6} 알킬, O, $N-R_a$, N_2 및 $N-OH$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0028] 상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R^2 및 상기 R^3 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, OR^a , 및 $OCOR^a$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기 R^a 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

과제의 해결 수단

[0030] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다:

[0031] [화학식 I]



[0032]

[0033] 상기 화학식 I에서, 상기 R^1 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0034] 상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R^3 은 생략되고, 상기 R^2 는 C_{1-6} 알킬, O, $N-R_a$, N_2 및 $N-OH$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0035] 상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R^2 및 상기 R^3 은 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, OR^a , 및 $OCOR^a$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기 R^a 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0036] 본 발명자들은 α -시누클레인과 AIMP2의 응집을 동시에 억제하고, 나아가 유의한 응집 억제능을 유지하면서 성호르몬 수용체에 작용하지 않는 신경 퇴행성 질환 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, α -시누클레인, AIMP2 또는 이의 조합의 응집을 억제하는 스테로이드 구조 유도체 화합물을 발굴 및 합성하였다.

[0037] 본 명세서의 임의의 화학식은 구조식에 의해 도시된 구조 및 특정 변형 또는 형태를 갖는 화합물을 나타낸다. 특히, 본원에 제공된 임의의 화학식의 화합물은 비대칭 중심을 가질 수 있으므로 상이한 거울상이성질체(enantiomer) 형태로 존재할 수 있다. 상기 일반 화학식의 화합물의 모든 광학 이성질체(optical isomer) 및 이의 혼합물은 상기 화학식의 범주 내에 있는 것으로 간주된다. 따라서, 본원에 제공된 임의의 화학식은 라세미체(racemate), 하나 이상의 거울상이성질체 형태, 하나 이상의 부분입체이성질체(diastereomer) 형태, 하나 이상의 회전장애이성질체(atropisomer) 형태, 및 이들의 혼합물을 나타내고자 한다. 또한, 특정 구조는 기하 이성질체(geometric isomer, 즉 및 이성질체), 호변이성질체(tautomer) 또는 회전장애이성질체로 존재할 수 있다.

[0038] 본 명세서 상의 용어 "이성질체(isomer)"는 동일한 분자식을 갖지만 원자 결합의 성질 또는 시퀀스 또는 공간에서의 원자 배열이 상이한 화합물을 의미한다. 서로 거울상이 아닌 입체이성질체를 "부분입체이성질체"라고 하고, 거울상들이 서로 겹쳐지지 않는 것을 "거울상이성질체"라고 한다. 예를 들어, 화합물이 비대칭 중심을 갖는 경우, 이것은 4개의 다른 기에 결합되고, 한 쌍의 거울상이성질체가 가능하다. 거울상이성질체는 비대칭 중심의 절대 배열에 의해 특성화될 수 있으며 Cahn 및 Prelog의 *R*- 및 *S*-시퀀싱 규칙에 의해 설명되거나 분자가 편광면을 회전시키고 우선성 또는 좌선성으로(즉, 각각 (+)- 또는 (-)-이성질체로서) 지정되는 방식에 의해 설명된다. 카이랄 화합물은 개별 거울상이성질체 또는 이들의 혼합물로 존재할 수 있다. 동일한 비율의 거울상이성질체들을 포함하는 혼합물은 "라세미 혼합물"로 칭해진다. "호변이성질체"는 특정 화합물 구조의 상호교환 가능한 형태이고 수소 원자 및 전자의 변위가 다양한 화합물을 지칭한다. 따라서 두 구조는 δ 전자 및 원자(보통 H)의 이동을 통하여 평형 상태에 있을 수 있다. 예를 들어, 엔올과 케톤은 산 또는 염기 처리에 의해 빠르게 상호 전환되기 때문에 호변이성질체이다. 호변이성질체의 또 다른 예로는 페닐 니트로메탄의 산- 및 니트로-형태가 있으며, 이들도 마찬가지로 산 또는 염기 처리에 의해 형성된다. 호변이성질체 형태는 관심 화합물의 최적의 화학 반응성 및 생물학적 활성의 달성과 관련될 수 있다.

[0039] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 가질 수 있고; 따라서 이러한 화합물은 개별 (*R*)- 또는 (*S*)-입체이성질체로서 또는 이들의 혼합물로서 생성될 수 있다.

[0040] 달리 지시되지 않는 한, 명세서 및 청구범위에서의 특정 화합물의 설명 또는 명명은 개별 거울상이성질체 및 이들의 혼합물(라세미 혼합물 또는 기타) 모두를 포함하고자 한다. 입체화학의 결정 방법 및 입체이성질체의 분리 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

- [0041] 본 명세서의 임의의 화학식은 이러한 형태가 명시적으로 열거되지 않은 경우에도 이러한 화합물의 수화물, 용매 화물, 다형체 및 이들의 혼합물을 지칭한다. 화학식 I의 화합물, 또는 화학식 I의 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염은 용매화물로서 수득될 수 있다. 용매화물은 용액 상태의 또는 고체 또는 결정질 형태로서의, 본 발명의 화합물과 하나 이상의 용매와의 상호작용 또는 착물화로부터 형성된 것을 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서 용어 " C_{1-6} 알킬"은 선형이거나 가지형의 1 개 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 포화된 탄화수소기를 의미한다. 예를 들어, 메틸, 에틸, *n*-프로필, 아이소프로필, *n*-뷰틸, *sec*-뷰틸, 아이소뷰틸, *tert*-뷰틸, *n*-펜틸, *tert*-펜틸, 네오펜틸, 아이소펜틸, *sec*-펜틸, 3-펜틸, *sec*-아이소펜틸, 2-메틸뷰틸, *n*-헥실, 1-메틸펜틸, 2-메틸펜틸, 4-메틸-2-펜틸, 3,3-다이메틸뷰틸, 2-에틸뷰틸 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 명세서에서 용어 " C_{2-6} 알케닐"은 탄소-탄소, 이중 결합을 갖는 2 개 내지 6 개 탄소 원자의 선형 또는 가지형의 탄화수소기를 말하며, "시스(*cis*)" 또는 "트랜스(*trans*)" 배향을 갖거나, 대안적으로 "*E*" 또는 "*Z*" 배향을 갖는 이중 결합을 포함한다. 예를 들어, 크로틸($-CH_2CH=CHCH_3$), 바이닐($-CH=CH_2$) 또는 알릴($-CH_2CH=CH_2$) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 명세서에서 용어 " C_{2-6} 알키닐"은 적어도 하나의 불포화 부위, 즉, 탄소-탄소, 삼중 결합을 갖는 2개 내지 6 개 탄소 원자의 선형 또는 가지형의 탄화수소기를 말한다. 예를 들어, 에티닐($-C\equiv CH$) 또는 프로파질($-CH_2C\equiv CH$) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 명세서에서 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은, 모계 화합물(parent compounds)의 생물학적 유효성 및 특성을 보유하고, 1회 용량(dosage)이 투여될 때, 생물학적으로 또는 다른 방향으로 해롭지 않은 염들을 의미할 수 있다.
- [0046] 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 염기 부가 염들은 무기 및 유기 염기들로부터 제조될 수 있다. 무기 염기들로부터 유도된 염들은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 및 마그네슘 염들을 포함할 수 있다. 유기 염기들로부터 유도된 염들은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 일차, 이차 및 삼차 아민; 천연적으로 발생하는 치환된 아민들을 포함하는 치환된 아민들; 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 다이에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 에탄올아민, 2-다이메틸아미노에탄올, 트로메타민(tromethamine), 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인(procaine), 히드라바민 (hydrabamine), 콜린(choline), 베타인(betaine), 에틸렌다이아민, 글루코사민, N-알킬글루카민, 테오브로민(theobromine), 퓨린, 피페라진, 피페리딘, 및/또는 N-에틸피페리딘을 포함하는 사이클릭 아민들의 염들을 포함할 수 있다. 다른 카르복실산 유도체, 예를 들어 카르복사마이드(carboxamides), 저급 알킬 카르복사마이드, 다이(저급 알킬) 카르복사마이드 등을 포함하는 카르복실산 아마이드도 본 발명의 실시예에 있어서 유용하다는 것 또한 이해되어야 할 것이다.
- [0047] 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 산 부가 염들은 무기 및 유기산들로부터 제조될 수 있다. 무기산들로부터 유도된 염들은 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등을 포함한다. 유기산들로부터 유도된 염들은 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말산 (malic acid), 말론산, 숙신산, 말레산(maleic acid), 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산(cinnamic acid), 만델산(mandelic acid), 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 및/또는 살리실산 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 R^1 은 H, C_{1-6} 알킬 또는 C_{1-6} 알키닐일 수 있으며, 보다 구체적으로는 아이소뷰틸이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, R^2 는 O 또는 N-OH일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R^2 및 상기 R^3 은 H, C_{1-6} 알킬, OR^a , 및 $OCOR^a$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 보다 구체적으로는 H, C_{1-6} 알킬, OR^a , 및 $OCOR^a$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 더욱 구체적으로는 H, OH, CH_3 및 $OCOCH_3$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 여기서 상기 R^a 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 보다 구체적으로는 H 또는 C_{1-6} 알

킬일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0052] (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-isobutoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-ol;

[0053] (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-isobutoxy-13,17-dimethyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-ol; 및

[0054] (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-isobutoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-yl propionate.

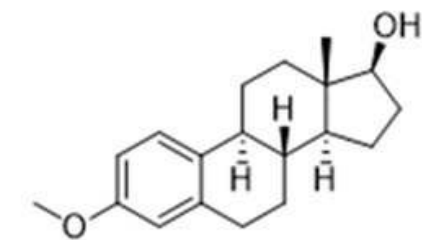
[0055] 보다 구체적으로, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 (8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-3-isobutoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-17-ol일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명자들은 상기 화학식 I로 표시되는 신규 화합물을 합성하였으며, 도 1c에서와 같이 명명하였고, 이러한 신규 화합물이 AIMP2(Aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2) 응집체, α-시누클레인(α-synuclein) 응집체 또는 이들의 조합을 억제하는 활성을 가짐을 확인하였다.

[0057] 특히, 도 1c의 SM13-141은 AIMP2 응집체를 선택적으로 억제하는 활성을 보였다. 또한, 도 1c의 SM13-136은 AIMP2 응집체 및 α-시누클레인 응집체 모두를 동시에 억제하는 활성을 보였을 뿐만 아니라, 성호르몬 수용체를 조절하지 않아 장기 투여에도 부작용을 줄일 수 있음을 시사하였다.

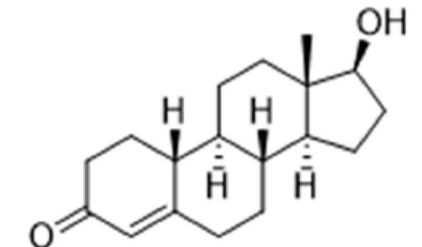
[0059] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식으로 표시되는 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다:

[0060] [화학식 1]



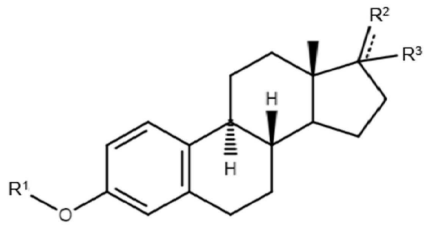
[0061] ;

[0062] [화학식 2]



[0063] ; 및

[0064] [화학식 1]



[0065]

[0066]

[0067]

[0068]

[0069]

[0070]

[0071]

[0072]

[0073]

[0074]

[0075]

[0076]

[0077]

[0078]

[0079]

[0080]

[0081]

[0082]

[0083]

[0084]

[0085]

[0086]

[0087]

[0088]

[0089]

[0090]

[0091]

[0092]

[0093]

[0094]

[0095]

[0096]

[0097]

[0098]

[0099]

[0100]

[0101]

[0102]

상기 화학식 I에서,

상기 R¹은 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐 및 C₂₋₆ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고,

상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 이중결합인 경우, 상기 이중결합을 구성하는 탄소 원자에 부착된 상기 R³은 생략되고, 상기 R²는 C₁₋₆ 알킬, O, N-R_a, N₂ 및 N-OH로 이루어진 군으로부터 선택되며,

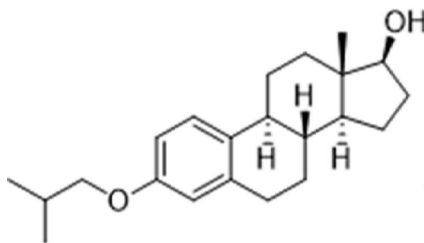
상기 실선 및 파선으로 표시된 결합이 단일결합인 경우, 상기 R² 및 상기 R³은 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, OR^a, 및 OCOR^a로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기 R^a는 H, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐 및 C₂₋₆ 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

후술할 실시예에서 입증한 바와 같이, 상기 화학식 1로 표시된 에스트라디올-3-메틸 에터(Estradiol-3-methyl ether)는 AIMP2 응집을 효율적으로 억제하며, 상기 화학식 2로 표시된 난드로론(Nandrolone)은 AIMP2의 응집 및 α-시누클레인의 응집을 동시에 효율적으로 억제한다.

본 발명의 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 포함되는 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 상술한 상기 화학식 I로 표시되는 화합물과 동일하므로, 양 발명 간에 공통된 사항은 본 명세서의 과도한 중복성을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 하기 화학식으로 표시되는 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이다:

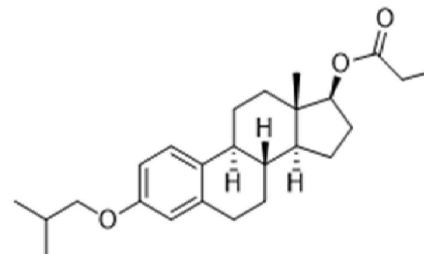
[화학식 3]



[0074]

[0075]

[화학식 4]



[0076]

[0077]

후술할 실시예에서 입증한 바와 같이 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물(상술한 도 1c의 SM13-136)은 AIMP2 응집체 및 α-시누클레인 응집체 모두를 동시에 억제하는 활성을 보였을 뿐만 아니라, 성호르몬 수용체를 조절하지 않아 장기 투여에도 부작용을 줄일 수 있음을 시사하였다. 상기 화학식 4로 표시되는 화합물(상술한 도 1c의 SM13-141)은 AIMP2 응집체를 선택적으로 억제하는 활성을 보였다.

- [0078] 본 명세서에서 용어 "비정상 단백질"은 응집체(aggregate)를 형성할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 독성 단백질 응집체를 형성할 수 있는 β -아밀로이드(β -amyloid), 프리온(Prion), 폴리글루타민(Polyglutamine), 토신A(torsinA), 아밀로이드 트랜스티레틴(Amyloid Transthyretin), 아밀로이드성 단백질, 루이소체(Lewy body), 타우(Tau), α -시누클레인(α -synuclein) 및 AIMP2 (Aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2) 단백질일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 상기 비정상 단백질은 AIMP2 또는 α -시누클레인일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상술한 단백질 외에도 단백질 응집체를 형성할 수 있는 단백질, 특히 독성 단백질 응집체를 형성할 수 있는 단백질, 및 후술하는 질환 또는 장애의 원인이 되는 단백질은 모두 적용 대상이 될 수 있다. 상기 비정상 단백질은 단백질의 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴(fibril), 플라크, 타 단백질과 결합된 단백질 단량체 및 중합체, 지방 혹은 탄수화물과 결합된 단백질, 핵산과 결합된 단백질 및 혈액세포와 결합된 단량체가 분해된 것을 포함할 수 있으며, 상기 피브릴은 비정상 단백질의 올리고머(oligomer)를 포함할 수 있다.
- [0079] 본 명세서에서 용어 "비정상 단백질 응집체"는 상술한 비정상 단백질들이 DNA 서열의 돌연변이, 전사·번역 단계에서의 문제, 온도, pH, 산화적 스트레스 등의 환경적 스트레스, 노화 등의 다양한 원인에 의하여 IDP(Intrinsically disordered proteins) 또는 미스폴딩된 단백질(misfolded proteins)이 응집하여 생성된다.
- [0080] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 비정상 단백질 응집체는 AIMP2 응집체, α -시누클레인 응집체 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 본 명세서에서 용어 "비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애"는 비정상 단백질 응집체가 발명원인이 되는 질환 또는 장애를 의미하며, 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴 질환(Huntington's disease), 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy), 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD) 등의 신경 퇴행성 질환 뿐만 아니라, 트랜스티레틴 아밀로이드 심근병증(Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy, ATTR-CM) 등의 심혈관계 질환, 제 II형 당뇨병 등 다양한 질환 또는 장애를 포함한다.
- [0082] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 상기 화학식 I로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고, 상기 비정상 단백질 응집체는 AIMP2 응집체 및 α -시누클레인 응집체인 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있다.
- [0083] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 화학식 2으로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하고, 여기서 상기 비정상 단백질 응집체는 AIMP2 응집체 및 α -시누클레인 응집체이며, 상기 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 에스트로겐 수용체를 조절하지 않는 것일 수 있다.
- [0084] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 이미 형성된 비정상 단백질 응집체를 분해할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 비정상 단백질 응집체 관련 질환 또는 장애는 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴 질환(Huntington's disease), 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy), 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 루게릭 병(amyolateral sclerosis), 폴리글루타민 확장증(polyglutamine expansion disease), 척 수소뇌성 실조증(spino cerebellar ataxia), 척수 및 연수 근육위축(spinal and bulbar muscular atrophy), 타우증(tauopathy), 근육긴장 이상(dystonia), 서핀 결핍증(Serin deficiency), 경변증(cirrhosis), 제 II형 당뇨병, 일차 전신성 아밀로이드증, 이차 전신성 아밀로이드증, 프론토-일시적 치매(Fronto-temporal dementias), 노인 전신성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드 다발신경병(familial amyloid polyneuropathy), 유전성 대뇌 아밀로이드 맥관병(hereditary cerebral amyloid angiopathy), 혈투석-관련 아밀로이드증, 황반 퇴화(age-related macular degeneration), 치매(dementia), 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD), 가족성 AD, 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD), 방사선 치료로 유도된 치매(radiotherapy induced dementia), 권투선수 치매(dementia pugilistica), 다운 증후군, 게르스트만-슈트라우슬러 샤인커병, 봉입체 근염(inclusion-body myositis), 프리온 단백질 뇌 아밀로이드 혈관병증(prion protein cerebral amyloid angiopathy), 축삭 돌기 상해(axon injury), 급성 확산성 피질 억제(acute cortical spreading depression), 알파-시누클레인성 병태(alpha-synucleinopathies), 괄의 파킨슨증-치매 복합증(Parkinsonism-dementia complex of Guam), 신경 섬유 엉킴을 갖는 비-파메니언 운동 뉴런 질환(non-Guamanian motor neuron disease with neurofibrillary tangles), 은친화성 입자 질환(arginophilic grain disease), 피질기저 변성(corticobasal degeneration), 석회화가 있는 확산 신경 섬유 엉킴(diffuse

neurofibrillary tangles with calcification), 17번 염색체와 연관된 파킨슨증이 있는 전두측두부 치매(frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17), 할러포르텐-스파츠병(Hallervorden-Spatz disease), 뇌졸중(stroke), 뇌경색(cerebral infarct), 머리외상(head trauma), 뇌동맥 경화증(cerebral arteriosclerosis), 뇌허혈(brainischemia), 영구 중뇌 허혈(permanent focal cerebral ischemia), 말초 신경 재생(peripheral nerve regeneration), 중첩성 간질 후 모델(post-status epilepticus model), 척수손상(spinal cord injury), 니만-피크 병 C형(Niemann-Pick disease type C), 팔리도-폰토-니그랄 변성(pallido-ponto-nigral degeneration), 픽병, 진행성 피질하 신경아교증(progressive subcortical gliosis), 진행성 핵상 마비(PSP: progressive supranuclear palsy), 아급성 경화성 범뇌염(subacute sclerosing panencephalitis), 엉킴만 있는 치매(tangle only dementia), 경도 인지 장애(mild cognitive impairment, MCI), 뇌염후 파킨슨증, 근긴장성 이영양증(myotonic dystrophy), 타우 범뇌병증(Tau panencephalopathy), 성상세포가 있는 AD 유사증(AD-like with astrocytes), 노년 심 아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 내분비 종양, 녹내장, 안구 아밀로이드증(ocular amyloidosis), 원발성 망막 변성(primary retinal degeneration), 시신경 드루젠(optic nerve drusen), 시신경병증(optic neuropathy), 시신경염(optic neuritis), 격자 이상증(lattice dystrophy), 산발성루게릭병(sporadic amyotrophic lateral sclerosis) 및 크로이즈펠트-야콥병으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 질환일 수 있으며, 보다 구체적으로는 파킨슨병(Parkinson's disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD), 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy)이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제, 담체, 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0087] "약제학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)"은 제제가 멸균이고 발열원(pyrogen)이 없는 것이다. 적절한 약제학적 담체는 약제학 분야에서 잘 알려져 있다. 상기 담체(들)은 본 발명의 유효성분의 효능에 악영향을 미치지 않고 그의 수용자(recipient)에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용가능(acceptable)"해야 한다. 전형적으로, 상기 담체는 멸균되고 발열원이 없는 물 또는 식염수일 것이다; 그러나, 다른 허용가능한 담체가 사용될 수 있다. 따라서, "약제학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)" 및 "약제학적으로 허용가능한 부형제(pharmaceutically acceptable excipient)"는 단순히 담체로서 작용하도록 의도된, 즉, 그 자체의 생물학적 활성을 갖는 것으로 의도되지 않는, 제제의 일부를 형성하는데 사용된 화합물(들)을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 일반적으로 안전하고, 무독성이다. 본 명세서에 사용된 것과 같은 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제는 1 이상의 담체 및/또는 부형제를 모두 포함한다.

[0088] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비 톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0089] 부형제는 하나 이상의 탄수화물, 폴리머, 지질 및 미네랄일 수 있다. 탄수화물의 예는 락토스, 수크로스, 만니톨, 및 시클로덱스트린을 포함하고, 이것은 예를 들어, 동결건조를 가능하게 하기 위해 조성물에 첨가된다. 폴리머의 예는 전분, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 에틸히드록시에틸 셀룰로스, 알기네이트, 카라기난, 히알루론산 및 그의 유도체, 폴리아크릴산, 폴리술포네이트, 폴리에틸렌글리콜/폴리에틸렌 옥시드, 폴리에틸렌옥시드/폴리프로필렌 옥시드 코폴리머, 상이한 가수분해도(degree of hydrolysis)의 폴리비닐알콜/폴리비닐아세테이트, 및 모든 상이한 분자량의 폴리비닐피롤리돈이고, 이들은 예를 들어, 점도 조절을 위해, 점착을 이루기 위해, 또는 화학적 및 단백질 분해성 분해로부터 지질을 보호하기 위해 상기 조성물에 첨가된다. 지질의 예는 지방산, 인지질, 인산, 모노-, 다이-, 및 트리글리세리드, 세라마이드, 모든 상이한 아실 사슬 길이 및 포화의 스펅고지질 및 당지질, 달걀 레시틴, 콩 레시틴, 수소화된 달걀 및 콩 레시틴이고, 이들은 폴리머에 대한 이유와 유사한 이유로 조성물에 첨가된다. 미네랄의 예는 탈크, 산화마그네슘, 산화아연 및 산화티타늄이고, 이들은 액체 축적의 감소 또는 유리한 색소 특성과 같은 이점을 수득하기 위해 상기 조성물에 첨가된다.

[0090] 희석제(diluent)는 약제학적 제제에서 팍타이드를 희석할 목적을 갖는 수성 또는 비-수성 용액을 의미하는 것으로 의도된다. 희석제는 하나 이상의 식염수(saline), 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올 또는 (홍화유, 옥수수유, 땅콩 기름, 면실유 또는 참기름과 같은) 오일일 수 있다.

[0091] 희석제는 또한 완충액으로서 기능할 수 있다. 용어 "완충액(buffer)"은 pH를 안정화하는 목적을 갖는 산-염기

혼합물을 함유하는 수성 용액을 의미하는 것으로 의도된다. 완충액의 예는 Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, 포스페이트, 카르보네이트, 아세테이트, 시트레이트, 글리콜레이트, 락테이트, 보레이트, ACES, ADA, 타르타레이트, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, 카코딜레이트, CHES, DIPSO, EPPS, 에탄올아민, 클리신, HEPPSO, 이미다졸, 이미다졸락트산, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO 및 TES이다.

[0092] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0093] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 정맥내 투여, 피하 투여, 근육 투여, 복강 내 투여, 척수강 내 투여, 뇌내 투여, 흉골내 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0094] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 질환을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0095] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질환 상태의 방지 또는 보호적인 치료를 의미한다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 질환 상태의 감소, 억제, 진정 또는 근절을 의미한다.

[0096] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0098] 본 발명의 스테로이드 구조 유도체 화합물은 AIMP2 응집체, α -시누클레인 응집체, 또는 이의 조합에 대한 억제 활성을 보이며, 특히, 본 발명의 스테로이드 구조 유도체 화합물인 SM13-136은 α -시누클레인과 AIMP2의 응집을 동시에 억제하고, 나아가 유의한 응집 억제능을 유지하면서 성호르몬 수용체에 작용하지 않아 부작용의 위험이 적은 신경 퇴행성 질환 치료제로 사용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0100] 도 1a는 스테로이드 골격의 2 가지 기본 화학 구조를 나타낸 것이다.

도 1b는 본 발명에서 실험을 통하여 AIMP2 응집체 및/또는 α -시누클레인 응집체 억제 활성을 확인한 기존 화합물들을 나타낸 것이다.

도 1c는 본 발명자들이 합성한 신규한 합성 화합물(에스트리올 유도체)를 나타낸 것이다.

도 1d는 생성된 SM13-135의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 1e는 생성된 SM13-136의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 1f는 생성된 SM13-140의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 1g는 생성된 SM13-141의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2a 및 도 2b는 각 스테로이드 구조 유도체 화합물의 AIMP2에 대한 응집 억제능을 Thioflavin T 어세이로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3a 및 도 3b는 각 스테로이드 구조 유도체 화합물의 α -시누클레인에 대한 응집 억제능을 Thioflavin T 어세이로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 각 스테로이드 구조 유도체의 AIMP2 유도 세포 독성 저해능을 트리판 블루 어세이로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5a 및 도 5b는 유방암 세포주인 MCF-7 세포주에 각 스테로이드 구조 유도체 처리 후 에스트로겐 수용체 타겟 유전자인 EBAG9 및 Cyclin D1의 전사체 발현량을 RT-PCR 분석을 통하여 정량한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

<실시예 1> 에스트리올 유도체의 합성

본 발명자들은 α -시누클레인(alpha-synuclein)의 응집을 억제하는 것으로 알려진 에스트리올(estriol)이 AIMP2 응집 억제 활성이 있음을 확인하였으며, α -시누클레인 및 AIMP2의 응집을 동시에 억제하는 신규 화합물 확보를 위하여 아래와 같이 에스트리올 유도체 화합물을 신규 합성하였다(도 1c).

1-1. SM13-135의 합성

에스트론(Estrone) 1.0 g을 DMF 10 mL에 녹이고 NaH (60% in mineral oil) 178 mg을 0°C에서 가하였다. 30 분간 교반한 후 아이소뷰틸 브로마이드(isobutyl bromide) 0.48 mL을 가하였다. 12 시간 동안 상온에서 교반한 후 포화 염화암모늄 수용액으로 반응을 종료하였다. 반응액을 EtOAc로 희석한 후 물로 세 차례 씻어주었다. 유기층을 모아 $MgSO_4$ 로 건조하고 여과한 후 농축하였다. 잔사를 실리카겔 칼럼크로마토그래피로 분리하여 1.1 g의 생성물을 합성하였다.

생성된 SM13-135의 구조를 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR로 특성화한 결과는 다음과 같다:

^1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.17 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.70 (1H, dd, J = 8.5, 2.5 Hz), 6.62 (1H, d, J = 2.5 Hz), 3.67 (2H, d, J = 7.0 Hz), 2.88 (2H, m), 2.48 (1H, dd, J = 19.0, 8.5 Hz), 2.37 (1H, m), 2.32 (1H, m), 2.14-1.92 (5H, m), 1.60-1.39 (6H, m), 1.00 (3H, s), 0.98 (3H, s), 0.89 (3H, s); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ 157.3, 137.6, 131.7, 126.2, 114.5, 112.1, 74.4, 50.4, 67.0, 66.0, 38.4, 35.8, 31.6, 29.6, 28.3, 26.5, 25.9, 21.6, 19.2(2C), 13.8; HRMS (TOF): Calcd. for $C_{22}H_{31}O_2$ ($[M+H]^+$): 327.2324, found: 327.2317.

^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼은 도 1d에 나타내었다.

1-2. SM13-136의 합성

상기 실시예 1-1에서 합성한 SM13-135 210 mg을 THF 10 mL에 녹이고 $LiAlH_4$ 24 mg을 0°C에서 가하였다. 12 시간 상온에서 교반한 후 0°C에서 물을 가하여 반응을 종료하고 반응액을 여과하였다. 유기층을 농축한 후, 잔사를 실리카겔 칼럼크로마토그래피로 분리하여 190 mg의 생성물을 합성하였다.

생성된 SM13-136의 구조를 ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR로 특성화한 결과는 다음과 같다:

[0117] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.18 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.70 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz), 6.62 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 3.71 (1H, t, $J = 8.5$ Hz), 3.67 (2H, d, $J = 7.0$ Hz), 2.84 (2H, m), 2.30 (1H, m), 2.17 (1H, m), 2.15-2.03 (2H, m), 1.94 (1H, dt, $J = 12.5, 3.5$ Hz), 1.86 (1H, m), 1.68 (1H, m), 1.50-1.11 (7H, m), 1.00 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.77 (3H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 157.2, 137.9, 132.4, 126.3, 114.5, 112.0, 81.8, 74.4, 50.1, 44.0, 43.3, 38.9, 36.8, 30.5, 29.8, 28.3, 27.3, 26.4, 23.2, 19.3, 11.1; HRMS (TOF): Calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 329.2481, found: 329.2480.

[0118] $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 도 1e에 나타내었다.

[0120] 1-3. SM13-140의 합성

[0121] 상기 실시예 1-1에서 합성한 SM13-135 530 mg을 THF 10 mL에 녹이고 MeMgBr(3.0 M in Et_2O) 2.4 mL을 0°C에서 가하였다. 12 시간 동안 상온에서 교반한 후 포화 염화암모늄 수용액으로 반응을 종료하였다. 반응액을 물로 희석한 후 EtOAc로 세 차례 추출하였다. 유기층을 모아 MgSO_4 로 건조하고 여과한 후 농축하였다. 잔사를 실리카겔 칼럼크로마토그래피로 분리하여 170 mg의 생성물을 합성하였다.

[0122] 생성된 SM13-140의 구조를 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 로 특성화한 결과는 다음과 같다:

[0123] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.11 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.62 (1H, dd, $J = 8.5, 3.0$ Hz), 6.54 (1H, s), 3.60 (1H, d, $J = 6.5$ Hz), 2.77 (2H, m), 2.24 (1H, m), 2.09 (1H, m), 1.94 (1H, m), 1.78 (3H, m), 1.59 (2H, m), 1.43-1.20 (5H, m), 1.19 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.81 (3H, s).

[0124] $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 도 1f에 나타내었다.

[0126] 1-4. SM13-141의 합성

[0127] 상기 실시예 1-2에서 합성한 SM13-136 89 mg을 CH_2Cl_2 6 mL에 녹이고 $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ 0.071 mL, 프로피오닐 클로라이드(propionyl chloride) 0.032 mL, DMAP 3 mg을 0°C에서 가하였다. 12 시간 상온에서 교반한 후 반응액을 포화 염화암모늄 수용액으로 희석하고 CH_2Cl_2 로 세 차례 추출하였다. 유기층을 모아 MgSO_4 로 건조하고 여과한 후 농축하였다. 잔사를 실리카겔 칼럼크로마토그래피로 분리하여 27 mg의 생성물을 합성하였다.

[0128] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.11 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.62 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz), 6.55 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 4.85 (1H, m), 3.60 (1H, d, $J = 6.5$ Hz), 2.77 (2H, m), 2.60 - 2.36 (2H, m), 2.22 - 2.10 (3H, m), 1.98 (1H, m), 1.79 (2H, m), 1.70 (1H, m), 1.50-1.10 (8H, m), 1.01 (2H, m), 0.94 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.70 (3H, m).

[0129] $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 도 1g에 나타내었다.

[0131] <실시예 2> 스테로이드 구조 유도체의 AIMP2 및 α -시누클레인에 대한 응집 억제능 분석

[0132] 2-1. 실험방법

[0133] 2-1-1. 시험관 내(*in vitro*) 응집

[0134] 재조합 AIMP2 모노머 또는 재조합 α -시누클레인 모노머로 인큐베이션 하는 경우, PBS에 최종 1 μM 농도의 단백질(재조합 AIMP2 모노머 또는 재조합 α -시누클레인 모노머)과 최종 50 μM 농도의 화합물을 첨가하여 E-tube에 준비하고, 37°C, 250 rpm의 조건으로 3 일 동안 인큐베이션하였다. 재조합 AIMP2 모노머 및 재조합 α -시누클레인 모노머로 인큐베이션 하는 경우, PBS에 각각 최종 1 μM 농도의 AIMP2 모노머와 α -시누클레인 모노머를 최종 50 μM 농도의 화합물에 첨가하여 E-tube에 준비하고, 37°C, 250 rpm의 조건으로 3 일 동안 인큐베이션하였

다. 그 후, 인큐베이션이 완료된 단백질 중 80 μ l를 이후 Thioflavin-T 어세이에 사용하였다.

[0136] 2-1-2. Thioflavin-T 어세이 (Thioflavin-T assay)

[0137] 최종 25 μ M 농도의 Thioflavin T 용액 0.8 μ l과 상기 2-1-1.에서 인큐베이션한 AIMP2 모노머; 재조합 α -시누클레인; 및 AIMP2 모노머 및 재조합 α -시누클레인 각각을 80 μ l씩 함께 섞어주었다. 96-웰 플레이트에 각 샘플을 넣고 45 분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. Excitation: 450nm & emission:480nm 조건에서 fluorescence-reader(SYNERGY neo microplate reader, BioTek.)를 이용하여 형광값을 얻어냈다.

[0139] 2-1-3. 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)

[0140] Thioflavin-T 어세이에서 인큐베이션한 각각의 그룹 20 μ l와 2X 샘플 버퍼(sample buffer)+ β ME 20 μ l + 1X 샘플 버퍼+ β ME 100 μ l를 섞어주었고, 95°C에서 5 분 동안 끓여주었다. 이후 마커와 함께 샘플들을 겔의 콤(comb)에 15 μ l씩 넣고 로딩하였다. 80 V에서 30 분, 100 V에서 1 시간 30 분 정도 러닝(running)해 주었다. 이후 스티로폼 박스에 얼음을 담고 탱크를 완전히 파묻은 후, 아이스 팩과 랙(rack)을 조립하였다. 버퍼에 스핀지를 담그고, 다음과 같이 사용한 셀룰로오스 블랏팅 페이퍼 2 장, 멤브레인 순으로 쌓았다. 겔의 왼쪽 위를 살짝 잘라내어 표시하고 뒤집어서 멤브레인 위에 떨어뜨린 후, 기포나 먼지 등이 들어가지 않도록 정리하였다. 새로운 셀룰로오스 블랏팅 페이퍼 2 장을 뒤의 셀룰로오스 블랏팅 페이퍼에 맞춰서 넣고, 그대로 들어서 압축판의 흰 판에 올렸다. 스핀지에 트랜스퍼 버퍼(transfer buffer)를 적셔 3M 페이퍼 위에 올린 뒤 조립하였다. 이후, 탱크에 버퍼를 부어주고 100 V에서 1.5 시간 동안 트랜스퍼(transfer)하였다.

[0141] 트랜스퍼가 끝난 멤브레인을 ponceau S를 부어둔 통에 담겨서 밴드가 보이게 하고, 필요한 크기에 따라 가위로 일직선이 되도록 잘랐다. Ponceau S를 TBS-T로 제거한 후 미리 라벨링한 통에 하나씩 담아주고 5% 탈지유(skim milk)를 잠길 만큼 넣고 45 분 내지 1 시간 동안 블로킹해주었다. 블로킹 완료 후 탈지유를 버리고 TBS-T로 세척하였으며, 1차 항체를 부어주고 상온에서 로커(rocker)에 1 시간 동안 두었다. 사용한 1차 항체는 다음과 같다: TBS-T : Ab = 5000 : 1 + 10% sodium azide 10 μ l (0.01%). 1차 항체를 붙인 멤브레인을 꺼내고 TBS-T로 5 분씩 3 번 세척하였다. 5% 탈지유(10 ml)에 2차 항체(2 μ l)를 5000:1로 넣고 멤브레인에 잠길 만큼 부어준 뒤 상온에서 30 분 동안 로커(rocker)에 두었다. 1 시간 30 분 후 TBS-T로 5 분씩 3 번 세척하였다. ECL (Enhanced chemiluminescence) 용액을 적신 멤브레인을 꺼내서 살짝 물기를 제거하고 현상(develop) 판에 올리고 암실에서 필름으로 현상하였다.

[0143] 2-2. 실험결과 1: 스테로이드 구조 유도체의 AIMP2에 대한 응집 억제능 분석

[0144] 재조합 AIMP2 모노머(1 μ M AIMP2 in PBS, 3 일)를 DMSO 및 각 스테로이드 구조 유도체 화합물(50 μ M)과 함께 진탕 인큐베이션(shaking incubation) 한 (0, 3 일) 후, 재조합 AIMP2 단백질의 응집체 형성을 Thioflavin T 어세이로 분석한 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다(n = 3 per group).

[0145] 각 스테로이드 구조 유도체 화합물물 AIMP2 응집체 형성 여부를 AIMP2 특이 항체를 이용하여 웨스턴 블랏 이미징 및 고분자량(high molecular weight) AIMP2 밴드에 대한 정량 분석결과를 도 2c 및 도 2d에 나타내었다(n = 3 per group).

[0146] 정량 그래프는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였으며, 유의성 판단은 ANOVA Tukey HSD post hoc 테스트로 판단하였다(* P < 0.05, *** P < 0.001, ns: nonsignificant).

[0147] 도 2a 내지 도 2d에 나타난 바와 같이, 에스트리올(Estriol), 에스트라디올 3-메틸 에터(Estradiol 3-methyl ether), 난드로론(Nandrolone), 신규 화합물 SM13-136 및 SM13-141이 AIMP2 응집 억제 활성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0149] 2-3. 실험결과 2: 스테로이드 구조 유도체의 α -시누클레인에 대한 응집 억제능 분석

[0150] 재조합 α -시누클레인 모노머(1 μ M AIMP2 in PBS, 3 일)를 DMSO 및 각 스테로이드 구조 유도체 화합물(50 μ M)과 함께 진탕 인큐베이션(shaking incubation) 한 (0, 3 일) 후, 재조합 α -시누클레인 단백질의 응집체 형성을

Thioflavin T 어세이로 분석한 결과를 도 3a 및 도 3b에 나타내었다($n = 3$ per group).

[0151] 정량 그래프는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였으며, 유의성 판단은 ANOVA Tukey HSD post hoc 테스트로 판단하였다($***P < 0.001$).

[0152] 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, 에스트리올(Estriol), 난드로론(Nandrolone) 및 신규 화합물 SM13-136이 α -시누클레인 응집 억제 활성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0154] 상기 실험을 통하여, 에스트라디올 3-메틸 에터(Estradiol 3-methyl ether) 및 신규 화합물 SM13-141은 AIMP2에 대하여 선택적인 응집 억제 활성을 가지며, 신규 화합물 SM13-136은 에스트리올(Estriol), 난드로론(Nandrolone)과 같이 AIMP2 뿐만 아니라 α -시누클레인에 대한 응집 억제 활성을 보여 두 단백질 응집체를 동시에 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0157] **<실시예 3> 스테로이드 구조 유도체의 AIMP2 유도 세포 독성 저해능 분석**

[0158] **3-1. 실험방법**

[0159] **3-1-1. 세포 계대배양(Cell subculture)**

[0160] 10% FBS(Fetal Bovine Serum, 소태아혈청), 1% P/S(Penicillin-Streptomycin)가 들어있는 DMEM(Dulbecco's Modified Essential Medium) 배지에서 배양 중인 인간 신경모세포종(Human neuroblastoma) SH-SY5Y 세포주의 배지를 제거해주었다. 1X PBS 2 ml로 세척하고, 트립신(Trypsin) 2 ml을 넣은 뒤 37°C CO₂ 인큐베이터(incubator)에 2 분간 넣어두었다. 2 분 뒤 2ml 배지를 첨가하여 트립신을 불활성화(inactivation) 시킨 뒤 피펫을 사용하여 세포들을 풀어주었다. 15 ml 튜브에 모아 상온에서 1500 rpm의 조건으로 3 분간 원심분리하였다. 새로운 디쉬에 배지 10 ml를 넣고 원심분리한 후, 부유시킨 세포액 중 1 ml를 첨가하여 배양하였다.

[0162] **3-1-2. 형질감염**

[0163] 다음과 같은 방법으로 Myc-AIMP2 플라스미드(Myc로 태깅한 AIMP2 유전자를 포함하는 플라스미드) 또는 β -갈락토시데이즈(Beta-galactosidase) 컨트롤(control) 플라스미드로 SH-SY5Y 세포주를 형질감염시켰다.

[0164] Opti-MEM 100 μ l에 DNA 1 μ g을 첨부하였다(12-웰 스케일 기준). 3 μ l의 형질감염 제제(transfection reagent) (X-treme GENE HP)를 추가하고 가볍게 태핑(tapping)한 후, 상온에서 약 15 분 정도 반응시켰다. 세포 배지에 DNA-X-treme gene 혼합액 100 μ l을 떨어뜨려 분주하였다.

[0166] **3-1-3. 세포 생존능 분석(Cell viability analysis)- 트리판 블루 어세이(Trypan Blue Assay)**

[0167] 12-웰 플레이트의 각 웰에 0.3×10^6 세포/웰로 로딩하고, 16 시간 후에 형질감염시켰다. 12-웰에 DNA : X-treme gene : OPTI-MEM를 1 μ g : 3 μ l : 100 μ l을 E-튜브 또는 15 ml 튜브에 웰과 형질감염할 개수에 맞게 제조하고, 시약이 DNA를 감쌀 수 있도록 15 분 정도 벤치(bench)에서 인큐베이션하였다. 이후 각 웰에 [6well = 200 μ l / 12well = 100 μ l / 24well = 50 μ l] 혼합물을 떨어뜨려 주고, 플레이트를 기울여 배지를 모은 다음 그 위에 드롭한 후 37°C 인큐베이터로 인큐베이션하였다. 24 시간 후 각각의 스테로이드 구조 유도체를 배지에 희석하여 최종 농도가 10 μ M이 되도록 제조하여 플레이트의 배지를 털어낸 후 절반을 제조한 것으로 채워주었다. 36 시간 후에 플레이트에 있는 세포를 E-tube에 옮겨 담아서 2000 rpm, 5 분간 원심분리한 뒤 석션하고, 1X PBS 1 ml을 넣은 다음 2000 rpm, 5 분간 원심분리 후 석션하였다. 1X PBS를 100 μ l 추가한 다음 피펫으로 세포를 석여주었다. 빈 E-튜브에 트리판 블루(trypan blue)를 20 μ l 넣고, 섞은 세포 20 μ l을 추가하여 섞은 다음, 1 분간 기다린 후 어세이에 사용할 플라스틱 슬라이드 A/B 구역에 각각 10 μ l씩 넣어 반응시켰다. 반응시킨 후 10 μ l를 세포 카운팅 슬라이드(cell counting slide)에 넣고 Countess II Automated Cell Counter를 이용하여 세포 생존능(%)을 확인하였다.

[0169] **3-2. 실험결과**

[0170] Myc-AIMP2 플라스미드 또는 β -갈락토시다이스 컨트롤 플라스미드로 형질감염시킨(72 시간) SH-SY5Y 세포주에 실시예 2-2에서 AIMP2 응집 억제 활성을 보인 스테로이드 구조 유도체 화합물들(에스트라디올, 에스트리올, 에스트라디올 3-메틸 에터, 난드롤론, 신규 화합물 SM13-136 및 신규 화합물 SM13-141)을 처리($10 \mu\text{M}$, 48 시간) 하고, 트리판 블루 배제 어세이(trypan blue exclusion assay)를 이용하여 세포 생존능을 분석하였다($n = 6$ per group). 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0171] 정량 그래프는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였으며, 유의성 판단은 ANOVA Tukey HSD post hoc 테스트로 판단하였다($***P < 0.001$).

[0172] 도 4에 나타난 바와 같이, Myc-AIMP2 플라스미드를 통해 유도된 AIMP2의 과발현은 SH-SY5Y 세포주에서 40 % 정도의 세포 사멸을 유도하였으며, 실시예 2-2의 시험관 내(*in vitro*) 실험에서 AIMP2 응집 억제 활성을 보인 에스트리올, 에스트라디올 3-메틸 에터, 난드롤론, 신규화합물 SM13-136 및 신규 화합물 SM13-141 모두 강한 세포 보호 활성을 보였다. 특히, 에스트리올과 신규 화합물 SM13-136이 AIMP2 유도 세포 독성을 가장 강하게 억제하는 효과를 보였음을 알 수 있었다.

[0175] **<실시예 4> 스테로이드 구조 유도체의 에스트로겐 수용체 조절 여부 분석**

[0176] **4-1. 실험방법**

[0177] **4-1-1. 세포에서의 RNA 추출 및 cDNA 합성**

[0178] 실시예 3-1-1에서와 같은 방법으로 인간 유방암세포종 MCF-7 세포주를 배양하고, 6-웰 플레이트 각 웰에 0.4×10^6 세포/웰로 넣어주었다. 16 시간 후 각 스테로이드 구조 유도체를 최종 농도 $10 \mu\text{M}$ 이 되도록 처리하였다. 처리 48 시간 후에, QIAzol Lysis Reagent (cat# 79306, QIAGEN], chloroform, Isopropanol, Invitrogen water, 75% EtOH, cDNA synthesis kit)를 이용하여 세포를 prep(preperation)해 주었다. 실험과정이 끝난 세포를 1X PBS로 씻어준 뒤, 각 웰 당 1 ml의 QIAzol Lysis Reagent를 넣어준 다음 모아서 E-튜브에 옮기고 상온에서 1 분 마다 볼텍싱(vortex)하며 5 분 동안 인큐베이션하였다. 각 튜브 당 클로로포름(chloroform)을 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣고 20 초 간 볼텍싱한 다음, 상온에서 3 분 동안 인큐베이션하였다. 3 분 후 $12,000 \text{ g}$, 4°C 에서 15 분간 원심분리하였고, 분리된 RNA 층(약 $450 \mu\text{l}$)만 새 E-튜브에 옮기고, 옮긴 RNA 층에 2-프로판올 $450 \mu\text{l}$ 를 넣고 볼텍싱한 후, 상온에서 10 분 간 인큐베이션하였다. 10 분 후, $12,000 \text{ g}$, 4°C 에서 10 분간 원심분리하였다. 원심분리 완료 후 상층액을 피펫으로 조심히 제거한 다음, 75% 에탄올 1 ml를 벽면을 타게끔 넣어주고 $7,500 \text{ g}$, 4°C 에서 5 분간 원심분리하였다. 상층액을 조심히 제거한 후, 뚜껑을 열고 10 분 동안 얼음에서 건조시켰다. 10 분 후 Invitrogen water $50 \mu\text{l}$ 를 넣고 RNA 펠렛을 피펫팅하여 풀어준 다음 농도를 측정하였다. 농도를 측정하는 RNA를 각 그룹별로 600 ng 으로 맞추었다. 컴포넌트(Component)는 5X iScript Reaction Mix ($2 \mu\text{l}$), iScript Reverse Transcriptase ($0.5 \mu\text{l}$), RNA (600ng), Nuclease-free water ($7.5 \mu\text{l}$ -RNA)로 총 $10 \mu\text{l}$ 를 반응시켜주었다. 반응 조건은 25°C 5 분, 46°C 20 분, 95°C 1 분, 4°C 홀드(hold)로 진행시켜주었다. cDNA 합성이 완료된 후 Invitrogen water $40 \mu\text{l}$ 를 넣고 5 배 희석하여 아래와 같이 RT-PCR을 실시하였다.

[0180] **4-1-2. RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)**

[0181] PCR 플레이트 한 웰 당 증류수 $4 \mu\text{l}$, 2X SYBR green $6 \mu\text{l}$, 프라이머(정방향+역방향) $10 \mu\text{M} - 1 \mu\text{l}$, cDNA - $1 \mu\text{l}$ 로 총 $12 \mu\text{l}$ 를 사용하여 반응을 진행하였다. 그룹 별로 $n=3$ 내지 6 정도로 진행하였다. 샘플 수를 계산하여 증류수와 2X SYBR green, 프라이머(정방향+역방향) $10 \mu\text{M}$ 을 혼합물로 만들어 $11 \mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 그 후, cDNA $1 \mu\text{l}$ 씩을 각각의 웰에 넣어주고 섞어준 다음, 그 위에 필름을 붙였다. Quantstudio 6 flex 기계에 플레이트를 넣고, Quant studio RT-PCR system 프로그램을 실행하였다. 각 웰의 정보들을 영역별로 설정하고, RT-PCR 조건을 설정하였다. 95°C 10 분, (95°C 10 초, 60°C 10 초, 72°C 20 초)-42 사이클(cycles), 95°C 15 초, 60°C 1 분, 95°C 15 초로 설정하고 반응시켰다. 반응 완료 후 CT 값을 산출해서 그룹별로 대조군(control) 대비 RNA 수준을 얻어냈다. 사용한 프라이머의 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

프라이머	서열 (5' → 3')	서열번호
EBAG9 (human) 정방향 프라이머	AGTTCCTAAGCAGACAGATGTTG	1
EBAG9 (human) 역방향 프라이머	CCCATTCCCTCCTTCGATCTTTA	2
CyclinD1 (human) 정방향 프라이머	GCTGCGAAGTGGAAACCATC	3
CyclinD1 (human) 역방향 프라이머	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA	4
GAPDH (human) 정방향 프라이머	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	5
GAPDH (human) 역방향 프라이머	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	6

4-2. 실험결과

에스트리올은 에스트로겐 수용체에 결합하여 활성을 나타내며 본 발명의 다른 스테로이드 구조 유도체들도 이러한 성호르몬 수용체를 조절할 목적으로 개발된 바 있다. 신경 퇴행성 질환은 만성 질환으로서 치료제가 장기적으로 투여되므로, 성호르몬 수용체가 조절된다면 치료 시 부작용 등의 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 실시예 2-2에서 AIMP2 응집 억제 활성 및 실시예 3-2에서 AIMP 유도 세포 독성으로부터 세포 보호 활성을 보인 스테로이드 구조 유도체에 대하여 에스트로겐 수용체 활성 조절 여부를 확인하고자 하였다. 에스트로겐 활성을 확인하기 유리한 유방암 세포주인 MCF-7 세포주에 대하여 위와 같은 방법으로 각 스테로이드 구조 유도체(에스트라디올, 에스트리올, 에스트라디올 3-메틸 에터, 난드로론, 신규 화합물 SM13-136, 신규 화합물 SM13-141)를 처리한 후 에스트로겐 수용체 타겟 유전자인 EBAG9(Estrogen Receptor Binding Site Associated Antigen 9) 및 Cyclin D1의 전사체 발현량을 RT-PCR 분석을 통하여 정량하였다.

그 결과를 도 5a 및 도 5b에 나타내었다. 정량 그래프는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였으며, 유의성 판단은 ANOVA Tukey HSD post hoc 테스트로 판단하였다(*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ns: nonsignificant).

도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, 에스트라디올 3-메틸 에터 및 신규화합물 SM13-141은 에스트로겐 수용체를 활성화시키는 것을 확인할 수 있었으며, 반대로 난드로론은 에스트로겐 수용체를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 신규 화합물 SM13-136의 경우에는 에스트로겐 수용체 타겟 유전자인 EBAG9 및 Cyclin D1의 전사체 발현량에 대하여 전혀 변화가 없어, 에스트로겐 수용체를 조절하지 않고 효과적으로 AIMP2 및 α -시누클레인의 응집을 동시에 억제할 수 있는 효과적인 치료제 후보임을 확인할 수 있었다.

하기 표 2는 실시예 2 내지 4에서 확인한 스테로이드 구조 유도체들의 약리 활성을 요약한 것이다. 실시예 2에서 확인한 시험관 내(*in vitro*) AIMP2 및 α -시누클레인(α Syn) 응집 억제능을 % 억제효과 평균으로 표시하였고, 실시예 3에서 확인한 SH-SY5Y 세포주에서의 AIMP2 유도 세포 독성 억제 효능 %을 평균으로 표시하였으며, 실시예 4에서 확인한 에스트로겐 수용체 조절여부는, 에스트로겐 수용체를 활성화하는 경우 0, 억제하는 경우 X, 수용체를 조절하지 않은 경우에는 -로 표시하였다. 실험을 진행한 바 없어 분석 데이터가 없는 경우는 NA로 표시하였다.

표 2

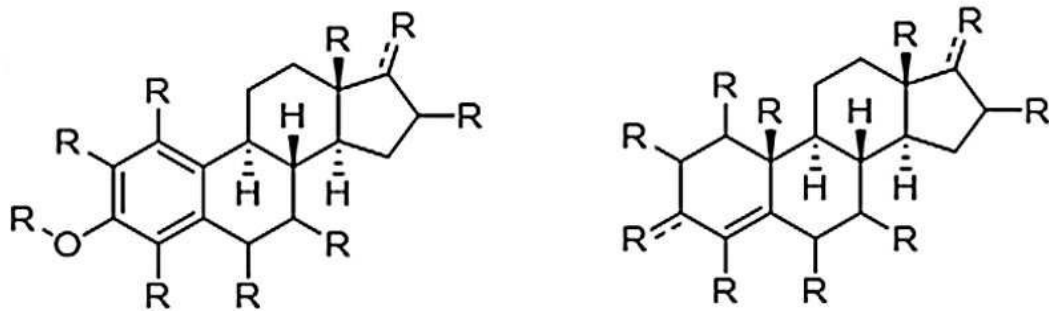
화합물	AIMP2 응집 억제능	α Syn 응집 억제능	AIMP2 세포 독성 억제능	에스트로겐 수용체 조절 여부
에스트리올	73.9%	59.7%	82.5%	0
에스트라디올 3-메틸 에터	72.6%	7.0%	71.7%	0
17 α -메틸-에스트라디올 3-메틸 에터	18.8%	9.3%	NA	NA
에스트론	29.8%	7.3%	NA	NA
에스트론 3-메틸 에터	6.5%	6.6%	NA	NA
난드로론	73.2%	40.0%	79.1%	X
신규 화합물 SM13-135	5.6%	3.7%	NA	NA

신규 136	화합물 SM13-	56.2%	36.7%	81.0%	-
신규 140	화합물 SM13-	15.9%	2.1%	NA	NA
신규 141	화합물 SM13-	47.4%	5.9%	73.8%	0

[0191] (에스트로겐 수용체 조절 여부: 0, 활성화; X, 억제; -, 조절하지 않음(영향 없음); NA, 분석 데이터 부재.)

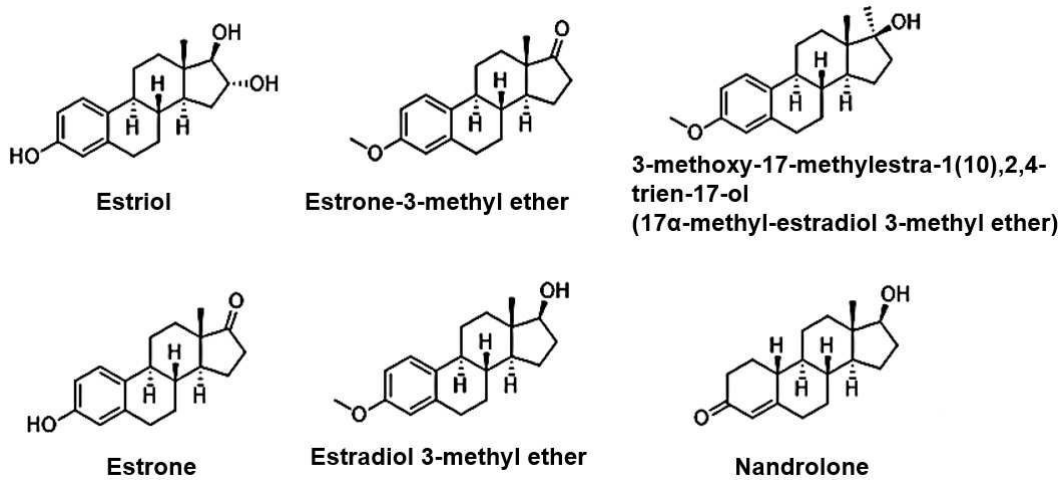
도면

도면1a

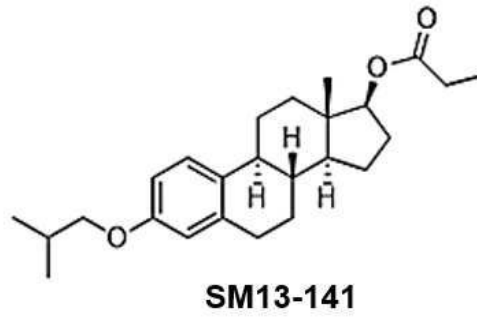
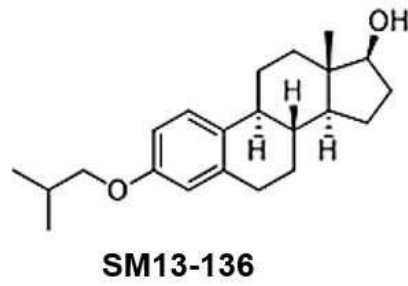
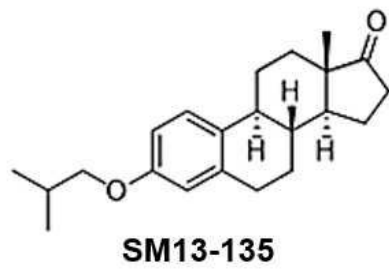


R=탄소나 산소 또는 질소로 이루어진 치환체

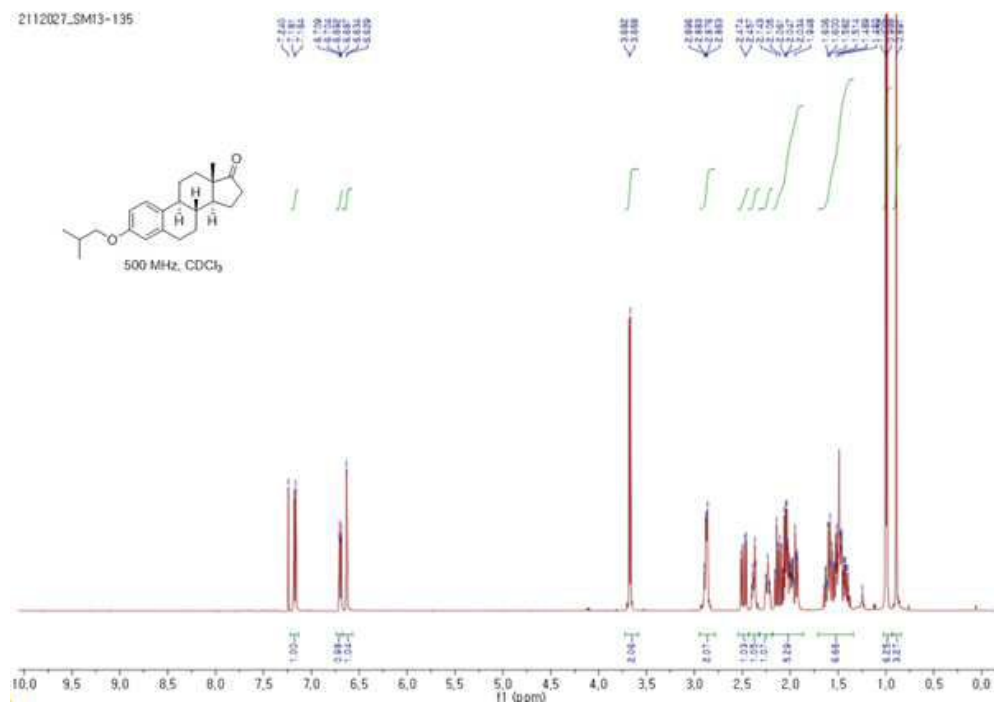
도면1b



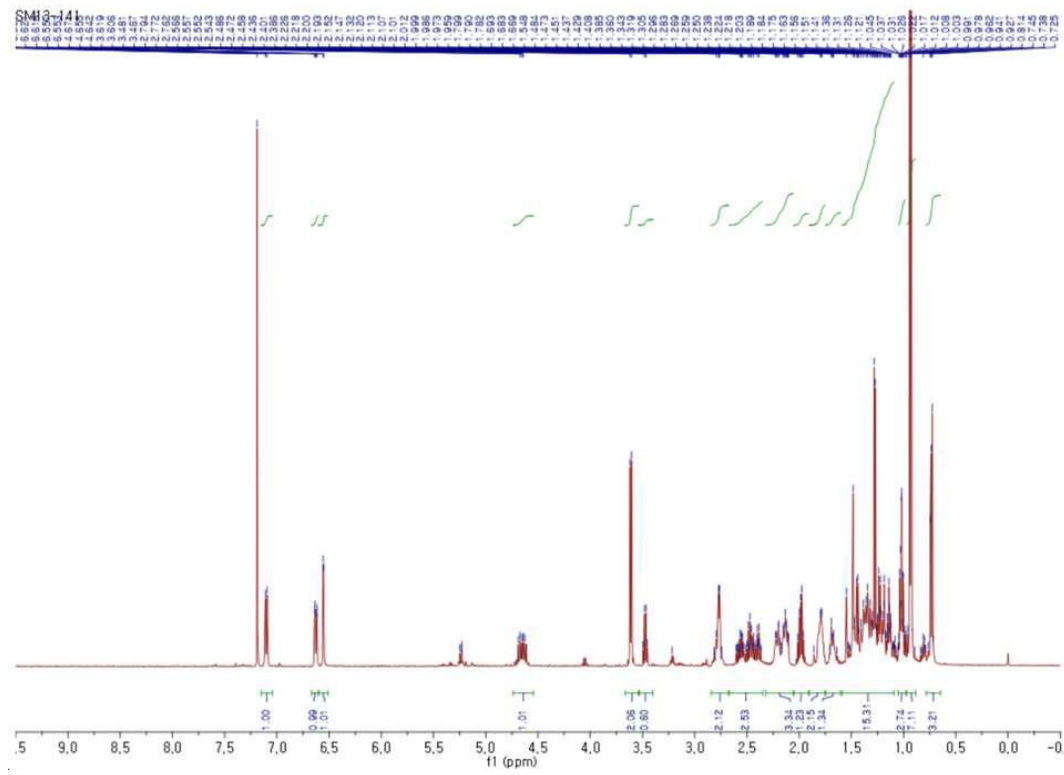
도면1c



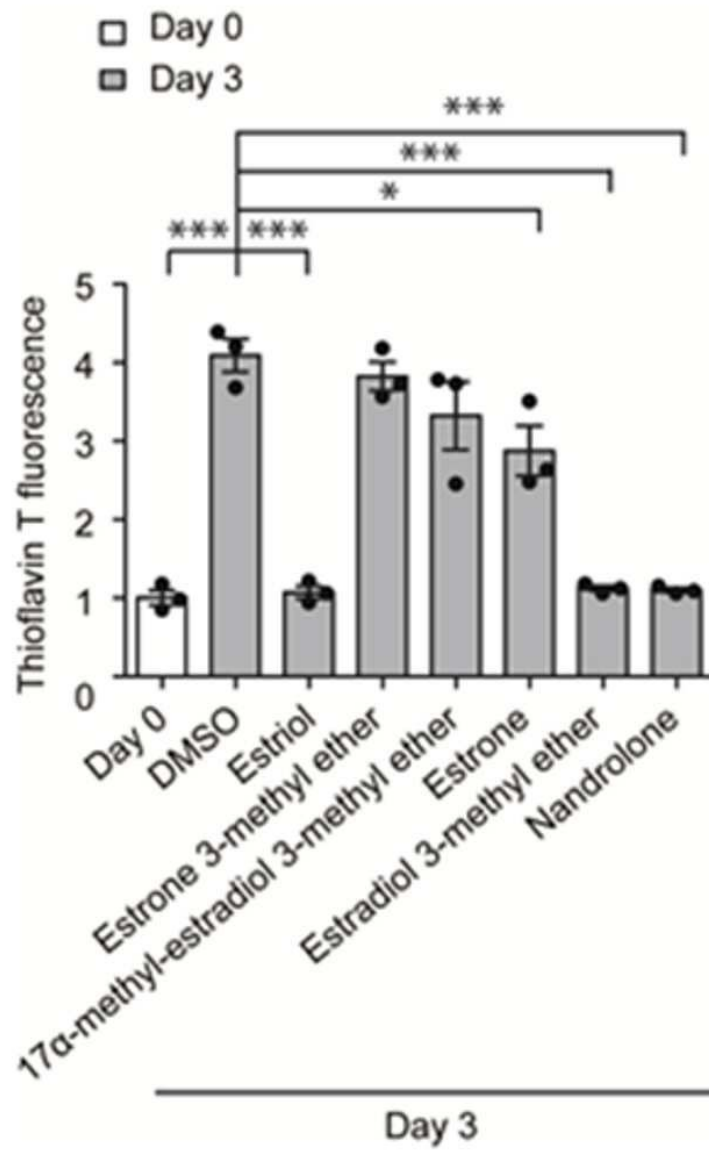
도면1d



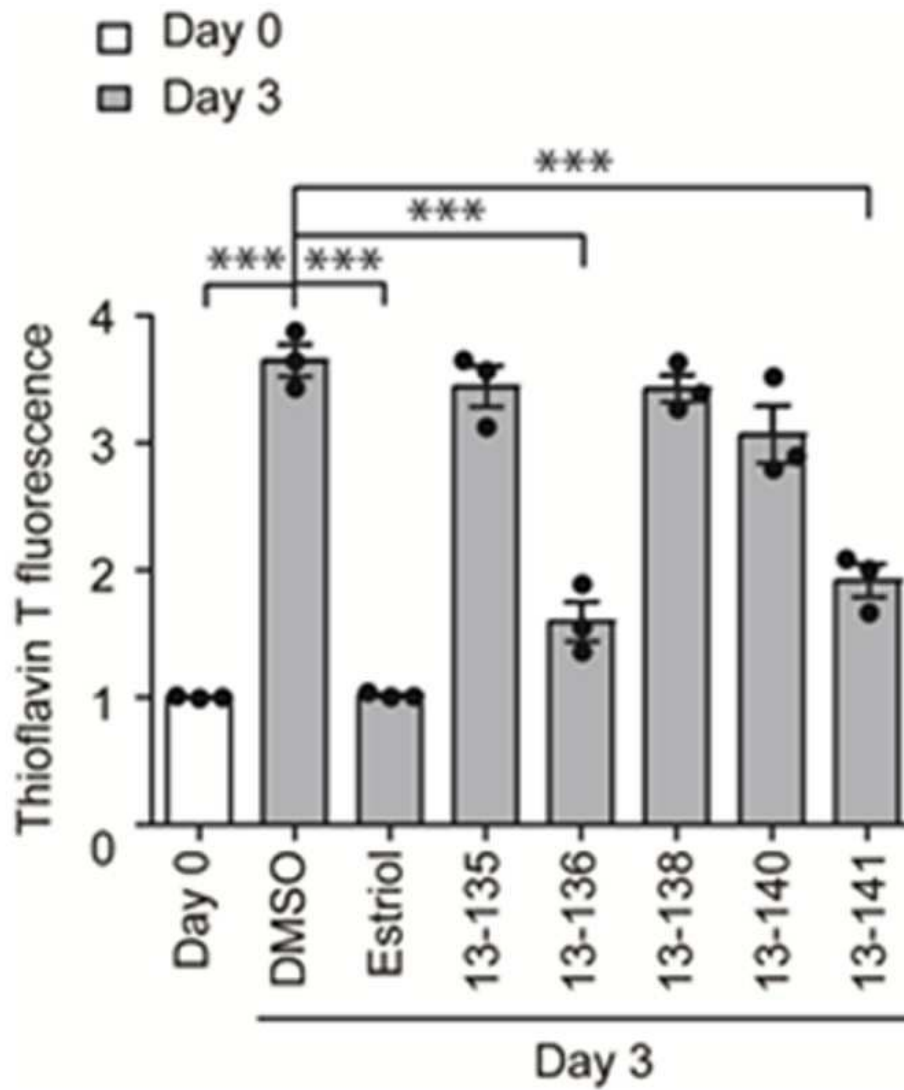
도면1g



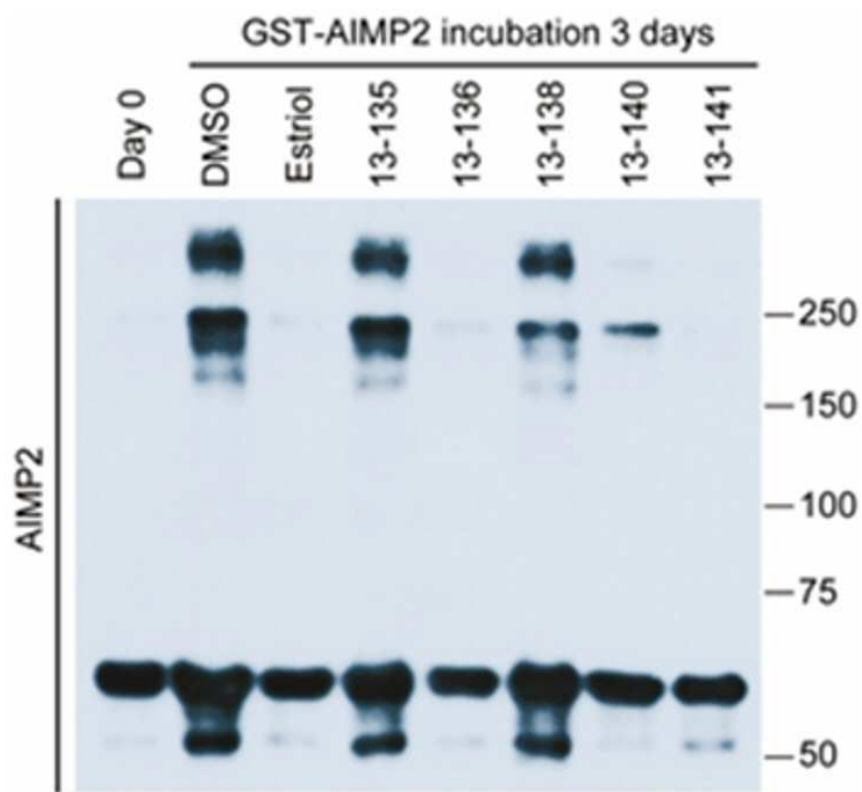
도면2a



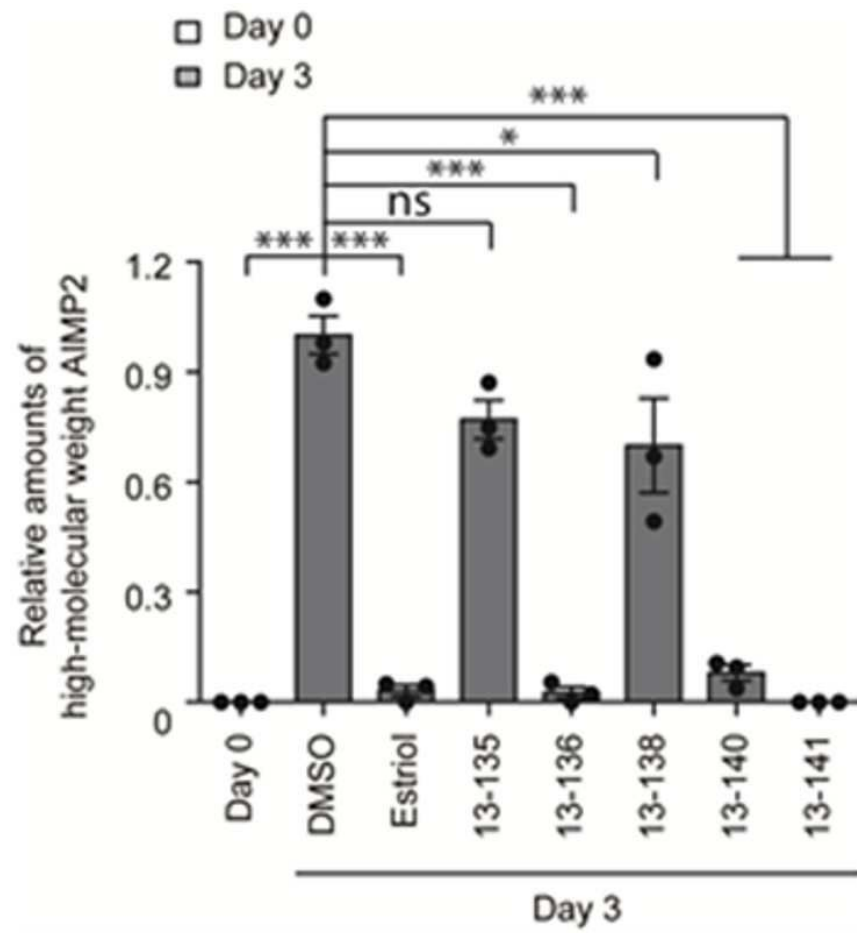
도면 2b



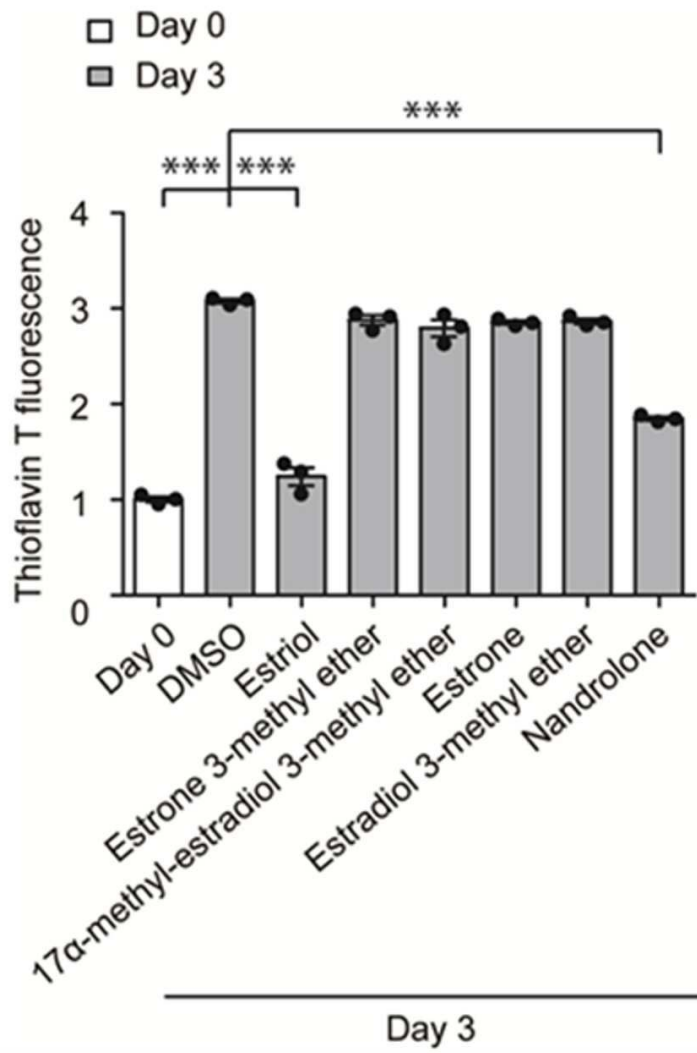
도면2c



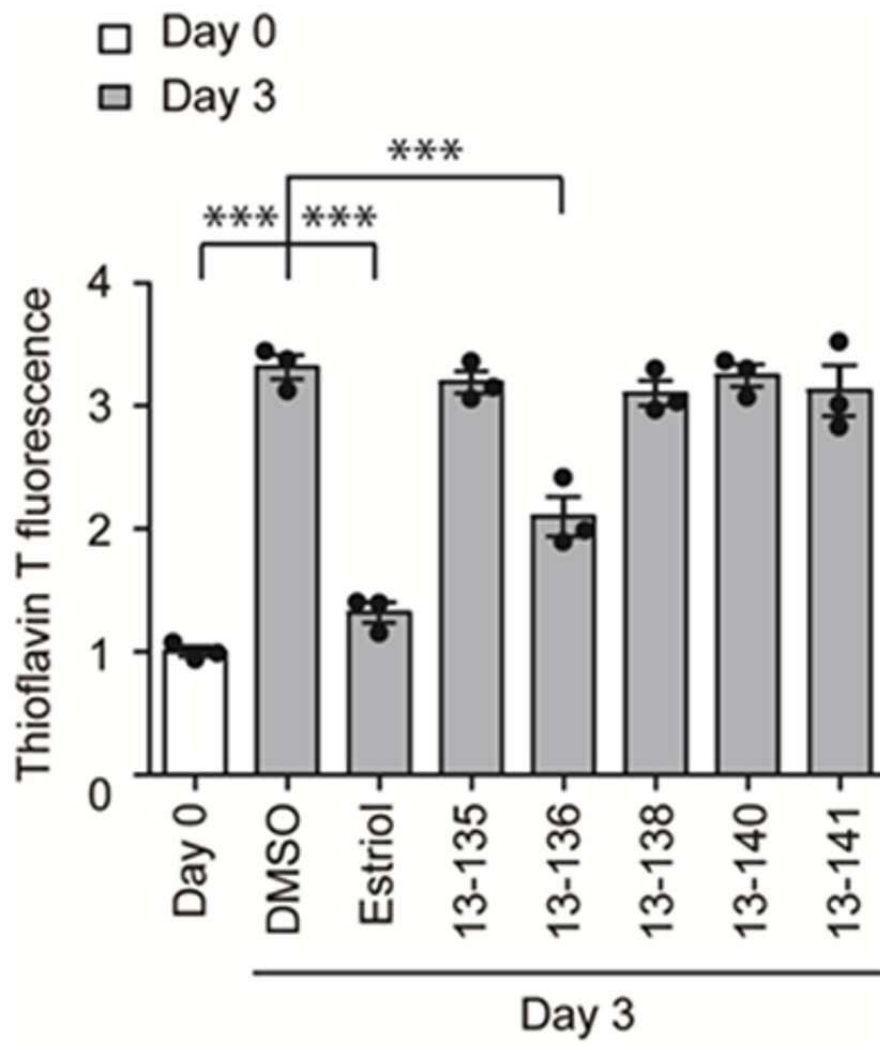
도면2d



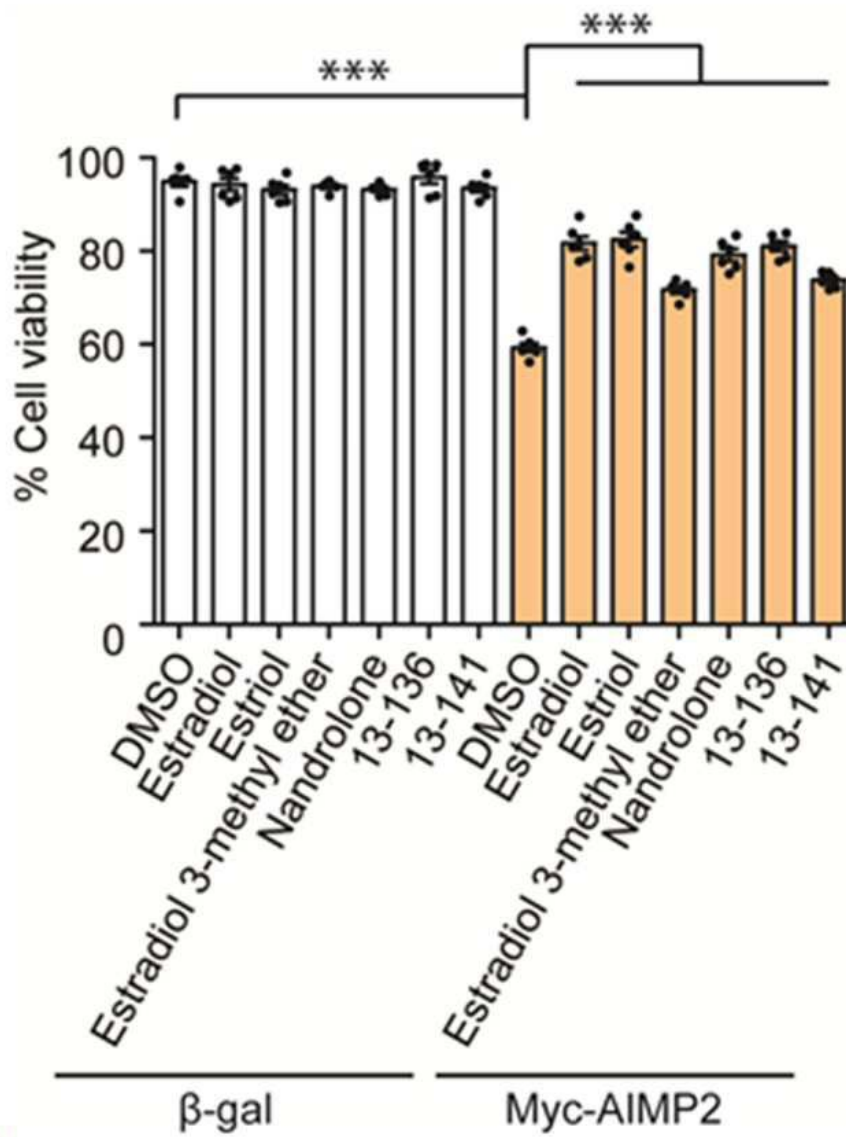
도면3a



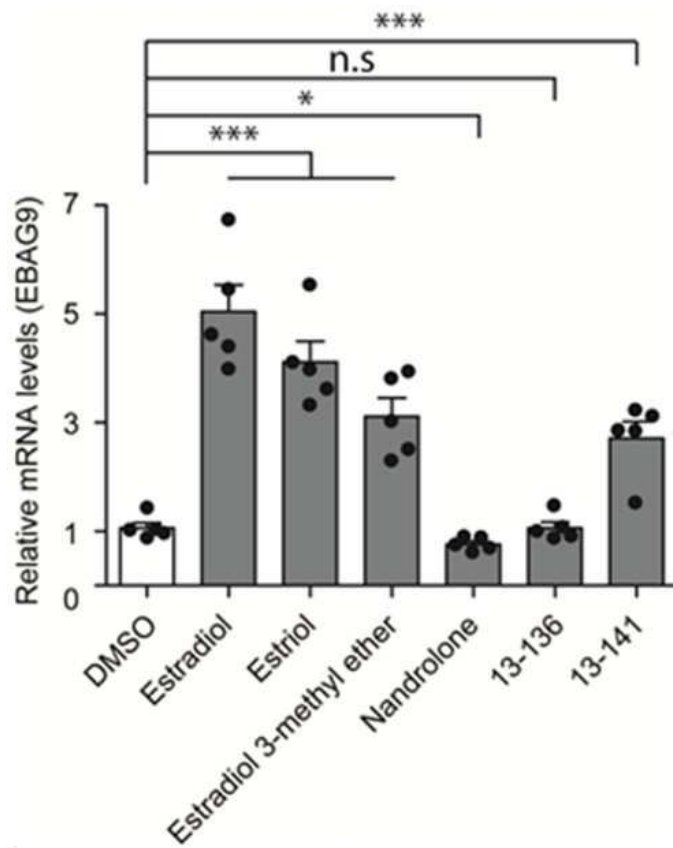
도면3b



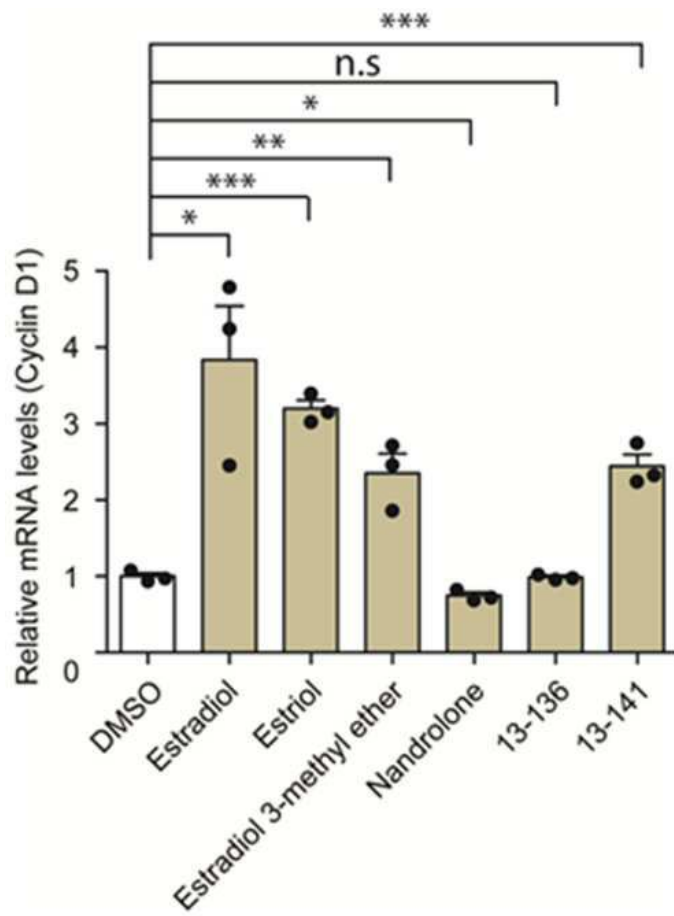
도면4



도면5a



도면5b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.