(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0035386
(43) 공개일자 2019년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 213/53 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/4164 (2006.01) *A61K 31/44* (2006.01)
C07D 233/66 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 213/53 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0124527
(22) 출원일자 2017년09월26일
심사청구일자 2017년09월26일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
(72) 발명자
임미희
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김상태
서울특별시 성동구 왕십리로 241, 101동 3605호(행당동, 서울숲 더샵)
한호성
서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호(삼성동, 삼성 대우 멤버스카운티1차)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 18 항

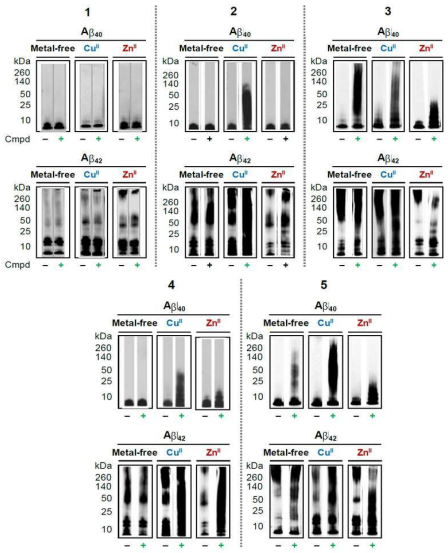
(54) 발명의 명칭 **벤젠 디아민 유도체를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

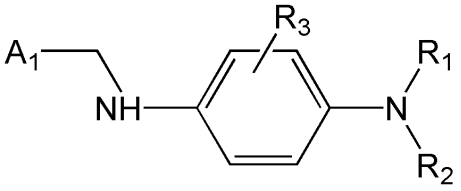
하기의 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2로 표시되는 화합물, 및 상기 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는,

(뒷면에 계속)

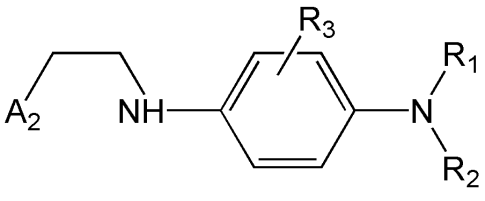
대 표 도 - 도1



치매 또는 알츠하이머의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다:



[화학식 Ⅰ-1]



[화학식 Ⅰ-2].

(52) CPC특허분류
A61K 31/4164 (2013.01)
A61K 31/44 (2013.01)
C07D 233/66 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
G01N 2333/4709 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)

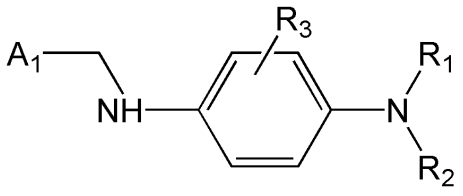
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711050877
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)(1311101505112001234301)
연구과제명 치매 병리에 금속-단백질-활성산소종 네트워크의 역할 규명 연구
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

명 세 서

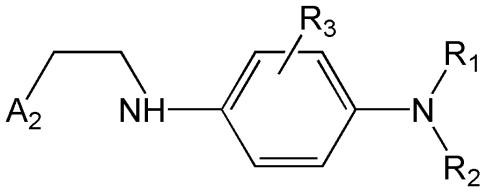
청구범위

청구항 1

하기의 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:



[화학식 Ⅰ-1]



[화학식 Ⅰ-2]

상기 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2에서,

R_1 및 R_2는 서로 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬, 또는 함께 치환 또는 비치환된 C_3~C_{10} 시클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로시클로알킬을 이루는 것이고;

R_3은 선택적이고 독립적으로 수소, 할로겐, 히드록시, 치환 또는 비치환된 아민, 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알콕시이고;

A_1은 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로시클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로아릴이고,

R_1 및 R_2가 모두 알킬인 경우, 상기 A_1은 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로시클로알킬, 또는 피리딘을 제외한 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로아릴이고;

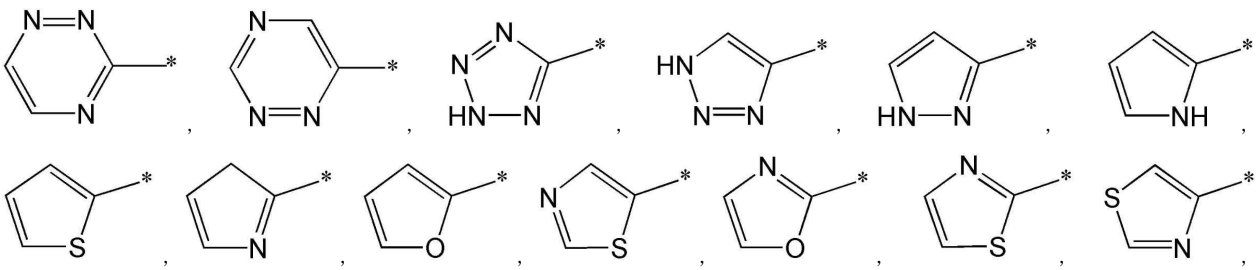
A_2는 할로겐, 히드록시, $-NH_2$, $-NHR_4$, $-SR_4$, 또는 $-OR_4$이고;

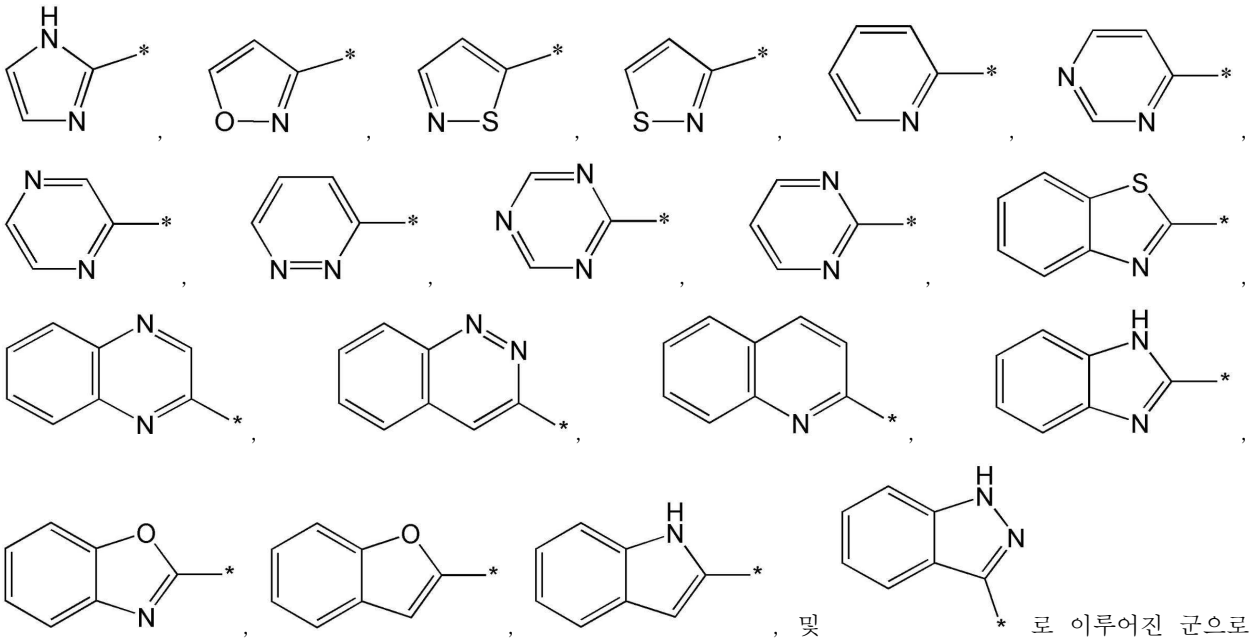
R_4는 수소, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬이고;

상기 치환기는 할로겐, C_1~C_6의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_1~C_6의 알콕시, 히드록시, 아민, C_1~C_6 알킬아민, 니트로, 아미드, C_1~C_6 알킬아미드, 우레아 및 아세틸로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 헤테로시클로알킬 또는 헤테로아릴은,



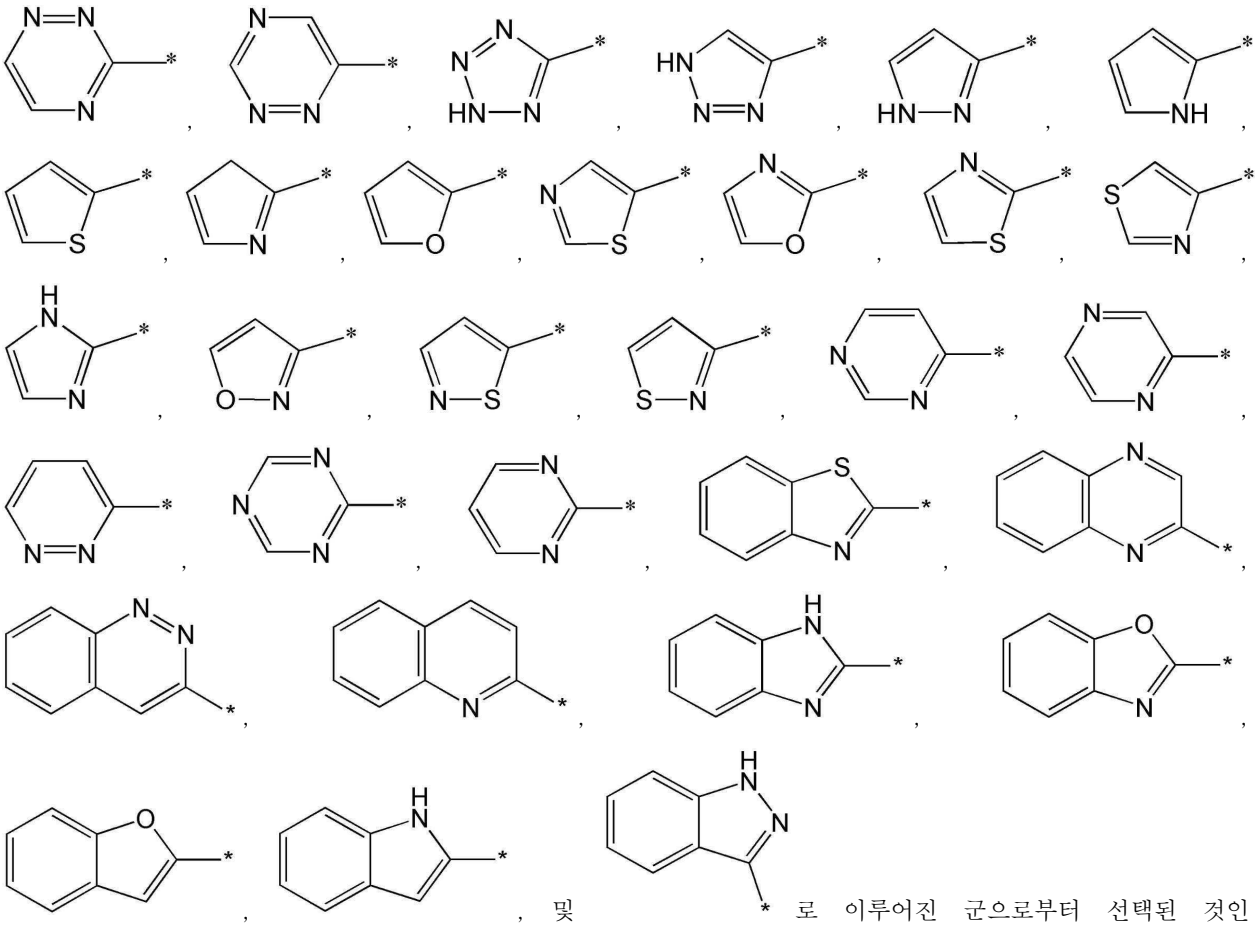


로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:

*는 이웃한 원자와의 결합 위치를 나타낸다.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 R_1 및 R_2가 모두 알킬인 경우, 상기 헤테로시클로알킬 또는 헤테로아릴은,

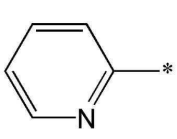


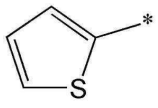
로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:

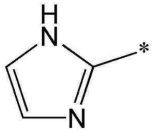
*는 이웃한 원자와의 결합 위치를 나타낸다.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 헤테로아릴은,



,


, 및


으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:

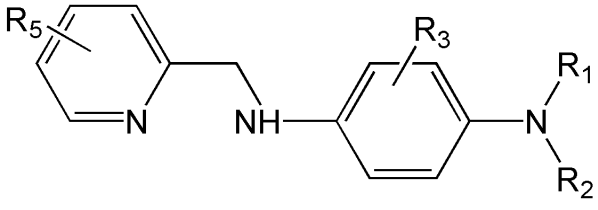
*는 이웃한 원자와의 결합 위치를 나타낸다.

청구항 5

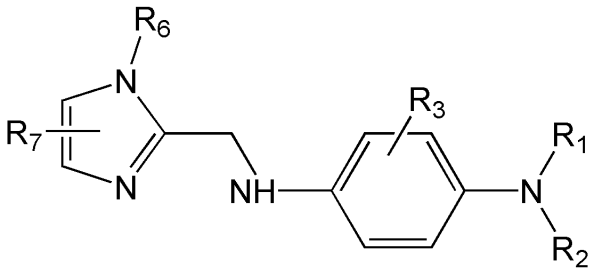
청구항 1에 있어서, 상기 A_2는 $-SR_4$인 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 6

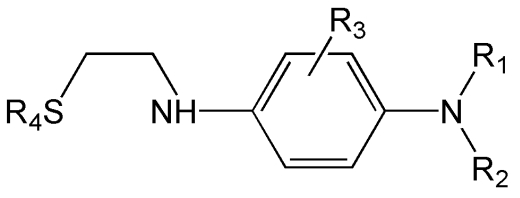
청구항 1에 있어서, 하기의 화학식 Ⅱ 내지 Ⅳ 중 선택된 화학식으로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:



[화학식 Ⅱ]



[화학식 Ⅲ]



[화학식 Ⅳ]

상기 화학식 Ⅱ 내지 Ⅳ에서,

R_1, R_2, R_3, 및 R_4는 상기와 같고;

R_5 및 R_7은 선택적이고 독립적으로 수소, 할로겐, 히드록시, 치환 또는 비치환된 아민, 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알콕시이고;

R_6은 수소, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬이고;

상기 치환기는 할로겐, C_1~C_6의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_1~C_6의 알콕시, 히드록시, 아민, C_1~C_6 알킬아민, 니트로, 아미드, C_1~C_6 알킬아미드, 우레아 및 아세틸로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다.

청구항 7

청구항 6에 있어서, R_5는 수소 또는 할로겐인 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 8

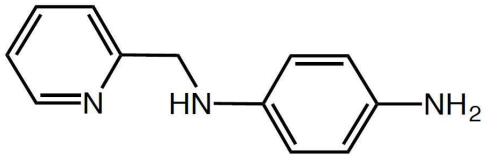
청구항 6에 있어서, 상기 화학식 Ⅱ에서, R_1, 및 R_2는 수소인 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

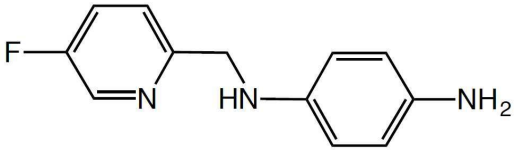
청구항 9

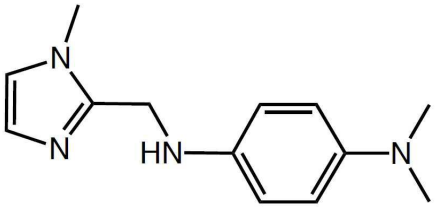
청구항 6에 있어서, 상기 화학식 Ⅲ 및 Ⅳ에서, R_1, 및 R_2는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬인 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

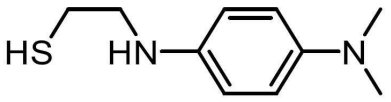
청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 하기의 화학식 중 하나의 화학식을 갖는 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:



,


,


, 및


.

청구항 11

청구항 1의 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 파킨슨병, 또는 전측두엽 퇴행병인 것인 조성물.

청구항 13

청구항 1의 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 건강기능식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 증상완화용 건강기능식품.

청구항 14

청구항 11의 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 15

청구항 1의 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염; 및 하나 이상의 프로브를 포함하는 Aβ 단백질 검출용 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 Aβ 단백질은 Aβ40 또는 Aβ42인 것인 조성물.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 Aβ 단백질은 금속이 없는 Aβ(metal-free Aβ), Cu(II)-Aβ, Zn(II)-Aβ, 또는 이들의 조합인 것인 조성물.

청구항 18

청구항 15의 Aβ 단백질 검출용 조성물 및 개체로부터 수득된 체액과 접촉시키는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환을 진단하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 벤젠 디아민 유도체, 그의 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염, 및 이를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 퇴행성 뇌질환은 다양한 원인에 의해 뇌신경에 일시적 또는 지속적인 손상이 발생하여, 점차적으로 정신 또는 운동 기능의 전반적인 장애가 나타나는 것을 특징으로 한다. 퇴행성 뇌질환으로 보고된 질환은 약 70 여 가지 이상이 있으나, 그 중 대표적으로 치매, 알츠하이머, 파킨슨병, 또는 전측두엽 퇴행병 등이 대표적으로 잘 알려져 있다.

[0003] 그 중 치매(dementia)는 유발률이 높은 질환 중 하나로, 기억력, 주의력, 언어기능, 시공간 능력 등에서 대뇌피질 기능장애가 발생하여 치매 환자들은 일상, 사회생활을 영위하는데 큰 어려움을 겪게 된다(Kumar V et el., Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Saunders., 7 (2004): 1386-1388).

[0004] 치매는 발병 원인이 정확히 밝혀진 바 없으나, 노화 과정에서 베타 아밀로이드(β-amyloid; Aβ) 단백질이 뇌에 축적되어 엉키게 됨으로써 발병하는 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 뇌동맥의 경화에서 오는 혈관성 치매, 알코올성 치매 등이 그 원인으로 제기되고 있다. 그 중 알츠하이머병에 의한 치매가 60 % 이상으로 가장 많은데, 알츠하이머 병은 대뇌 피질(cortex) 또는 해마(hippocampus)에 발생하는 뇌위축, 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성(granulovacuolar degeneration), 히라노체(Hirano body) 등의 조직학적 소견을 특징으로 한다. Aβ는 노인반의 주요 구성성분으로서, Aβ의 침착은 알츠하이머병이 발생하는 중요한 원인으로 추정되고 있다.

[0005] 알츠하이머병 (AD) 증상은 베타-아밀로이드 (Aβ)의 침착에 의한 세포독성뿐만 아니라 콜린신경계통의 시냅스 장애와도 관련이 깊다(PM et el., Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurochem Int., 53 (2008): 103-111). 콜린신경계통의 기능장애는 알츠하이머 환자의 기억과 인지 기능 장애에 기여하는 것으로 알려져 있다. 전뇌의 Meynert 기저핵(basal nucleus of Meynert) 콜린성 뉴런은 측두엽, 해마, 및 편도체(amygdala)와 함께 기억 및 인지 능력에 연관되는데, 알츠하이머 환자의 뇌에서는 측두엽에서 78%, 해마에서 60%, Meynert 기저핵에서는 67%까지 신경세포가 감소하는 것으로 알려져 있다(대한치매학회, 치매, 임상적 접근 (2006): p.168; 대한정신의학회, 신경정신의학 (2007): 507-509). 뇌세포가 세포독성에 의해 손상을 입게 되면 정보의 전달, 즉 신경전달물질 대사에 장애가 발생하게 되며 이는 기억인지장애를 일으키는 원인이 된다. 이미 많은 연구자들이 아세틸콜린(acetylcholine; ACh)과 이의 합성에 관계되는 효소(choline acetyltransferase)가 알츠하이머병에서 선택적인 감소가 관찰됨을 꾸준히 보고하여 왔다. 더욱이, 알츠하이머병 환자의 뇌에서는 정상적인 사람의 뇌기능에 비해 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor) 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체(muscarinic acetylcholine receptor)의 감소 뿐 아니라, 콜린의 재흡수와 아세틸콜린의 분비 기능이 저하되어 있는 것으로 알려져 있다(PM et el., Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurochem Int., 53 (2008): 103-111; Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Mechanisms of Ageing and Development., 122 (2001): 1961-1969; Kasa P et el., The cholinergic system in Alzheimer's disease. Progress in neurobiology. 52 (1997): 511-535).

[0006] 상기 언급된 원인 외에, Aβ가 플라그를 형성하면 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생시키고, 이것이 신경 조직에 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발시켜 신경세포가 사멸하여 알츠하이머병이 발병

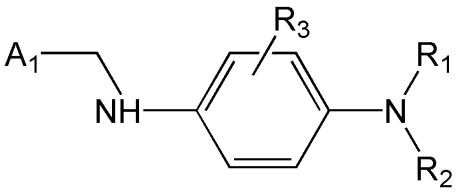
된다고도 알려져 있다.

[0007] 현재까지 FDA등을 통해 공식적으로 치매 치료제로 허가된 약물은 대부분 알츠하이머에 의한 치매를 대상으로 하고 있는데, 그 약물 작용점이 아세틸콜린에스터라제(acetylcholinesterase)에 제한되어 있다. 하지만, 이 효소를 억제하는 것은 아세틸콜린 저하 현상을 억제하여 정상적인 생활이 가능하도록 유도하는 역할만을 할 뿐, 치매를 일으키는 근본적인 원인을 치료하는 방법이 아니다. 그 외에 N-메틸-D-아스파테이트(N-methyl-D-aspartate; NMDA) 수용체 길항제를 이용하는 약물요법이 있으나, 이 또한 알츠하이머병 환자에서 ACh의 감소에 근거한 것으로서, 마찬가지로 근본적인 치료 방법이 아니다. 즉, 아직까지는 치매의 발병 원인을 근본적으로 되돌려 정상 상태로 만들어주는 약물은 없는 실정이다.

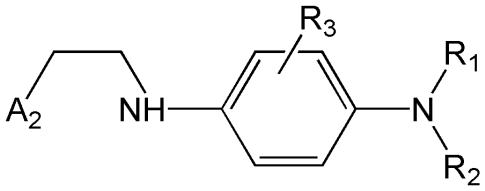
발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 하기의 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다:



[0009] [화학식 Ⅰ-1], 및



[0010] [화학식 Ⅰ-2].

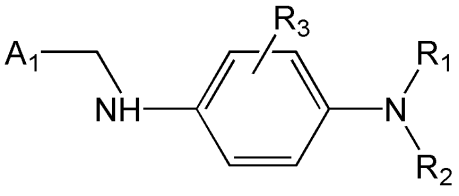
[0011] 다른 양상은 상기 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 상기 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 신경질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

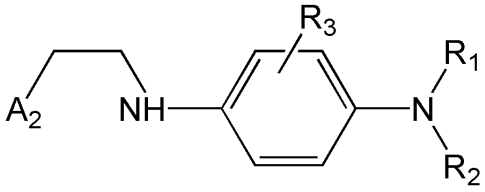
[0013] 또 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 Aβ 단백질 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 일 양상은 하기의 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:



[0015] [화학식 Ⅰ-1], 및



[0016] [화학식 Ⅰ-2].

[0017] 상기 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2에서,

[0018] R_1 및 R_2는 서로 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬, 또는 함께 치환 또는 비치환된 C_3~C_{10} 시클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로시클로알킬을 이루는 것이고;

[0019] R_3은 선택적이고 독립적으로 수소, 할로겐, 히드록시, 치환 또는 비치환된 아민, 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알콕시이고;

[0020] A_1은 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로시클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로아릴이고,

[0021] R_1 및 R_2가 모두 알킬인 경우, 상기 A_1은 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로시클로알킬, 또는 피리딘을 제외한 치환 또는 비치환된 C_2~C_{10} 헤테로아릴이고;

[0022] A_2는 할로겐, 히드록시, $-NH_2$, $-NHR_4$, $-SR_4$, 또는 $-OR_4$이고;

[0023] R_4는 수소, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬이고;

[0024] 상기 치환기는 할로겐, C_1~C_6의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_1~C_6의 알콕시, 히드록시, 아민, C_1~C_6 알킬아민, 니트로, 아미드, C_1~C_6 알킬아미드, 우레아 및 아세틸로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0025] 상기 '할로겐'은 F, Cl, Br, 또는 I일 수 있다.

[0026] 상기 '알콕시'는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시 또는 t-부톡시일 수 있다.

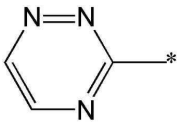
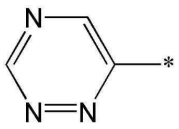
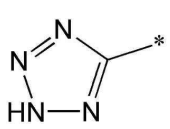
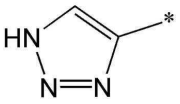
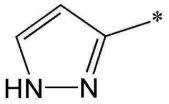
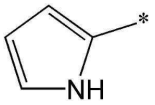
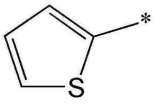
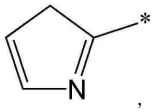
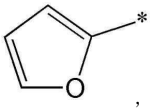
[0027] 상기 '알킬'은 탄소 원자의 특정 수를 갖는 직쇄 또는 분지된 지방족 탄화수소 그룹을 의미하는 것으로서 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 t-부틸일 수 있다.

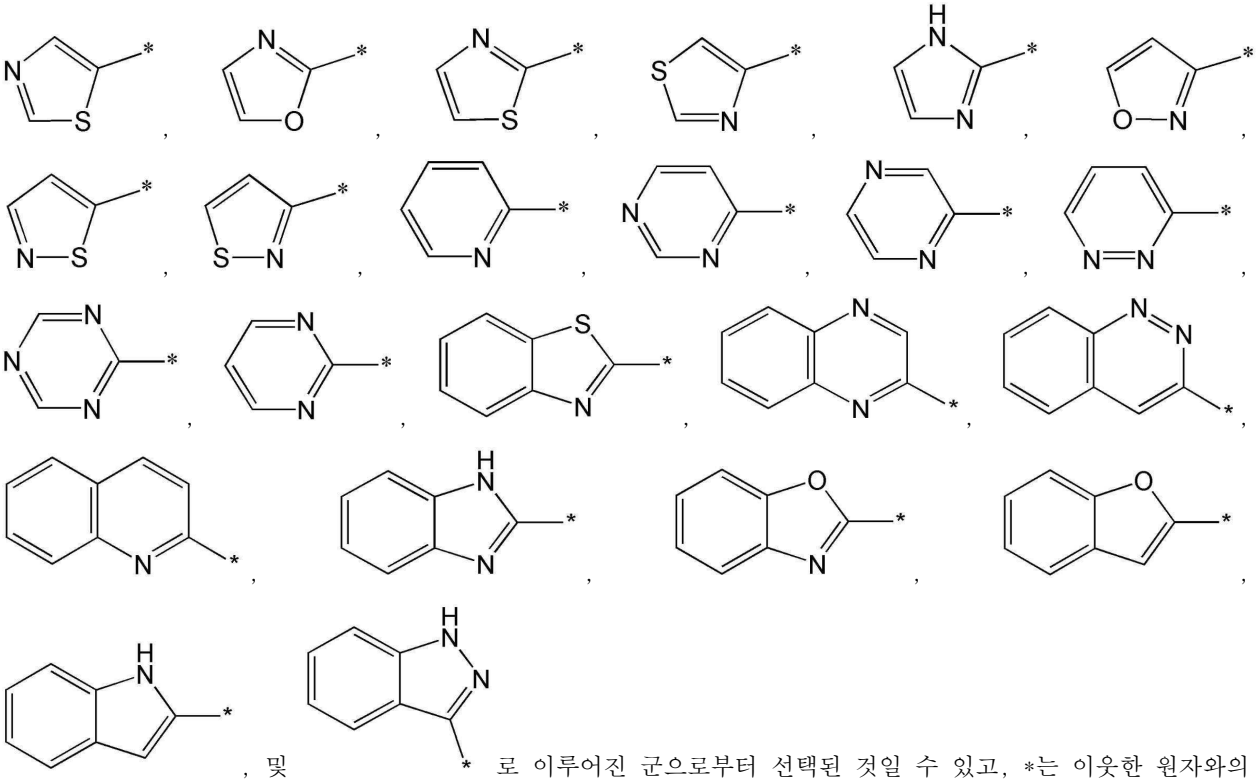
[0028] 상기 '헤테로아릴' 또는 '헤테로시클로알킬'은 B, N, O, S, P(=O), Si 및 P로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로, 퓨릴, 티오펜일, 티아졸릴, 티아디아졸릴, 이소티아졸릴, 옥사디아졸릴, 테트라진일, 퓨라잔일, 피리딜, 아제티디닐, 아크리디닐, 벤조디옥솔릴, 벤조디옥사닐, 벤조푸라닐, 카바졸릴, 시놀리닐, 디옥솔라닐, 피리딜, 프테리디닐, 푸리닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 테트라졸릴, 이미다졸릴, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 피롤릴, 피페로닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 피라졸릴, 옥사졸릴, 옥사졸리닐, 트리아졸릴, 인다닐, 이속사졸릴, 이속사졸리디닐, 데카히드로이소퀴놀릴, 벤조퓨란일, 이소벤조퓨란일, 벤즈이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조이소티아졸릴, 벤조옥사졸릴, 이소인돌릴, 인돌릴, 인다졸릴, 인다졸릴, 퀴놀릴, 신놀리닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 카바졸릴, 페난트리닐, 벤조디옥솔릴, 페닐피페리디닐, 테트라히드로푸릴, 테트라히드로피라닐, 피페라지닐, 호모피페라지닐, 피페리딜, 피페리도피페리딜, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 피페리도닐, 2-옥소피레라지닐, 2-옥소피페리디닐, 피롤리디닐, 2-옥소피롤리디닐 또는 옥사졸리디닐일 수 있다.

[0029] 상기 '시클로알킬'은 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로옥틸, 시클로헵틸, 퍼히드로나프틸, 아다만틸, 가교된 시클릭 그룹들 및 스피로비시클릭 그룹들(spirobicyclic groups)에서 선택될 수 있다.

[0030] 상기 '용매화물(solvate)"은 비공유적 분자간력에 의해 결합된 화학양론적 또는 비화학양론적 량의 용매를 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미할 수 있다. 그에 관한 바람직한 용매들로는 휘발성, 비독성, 및/또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들일 수 있다.

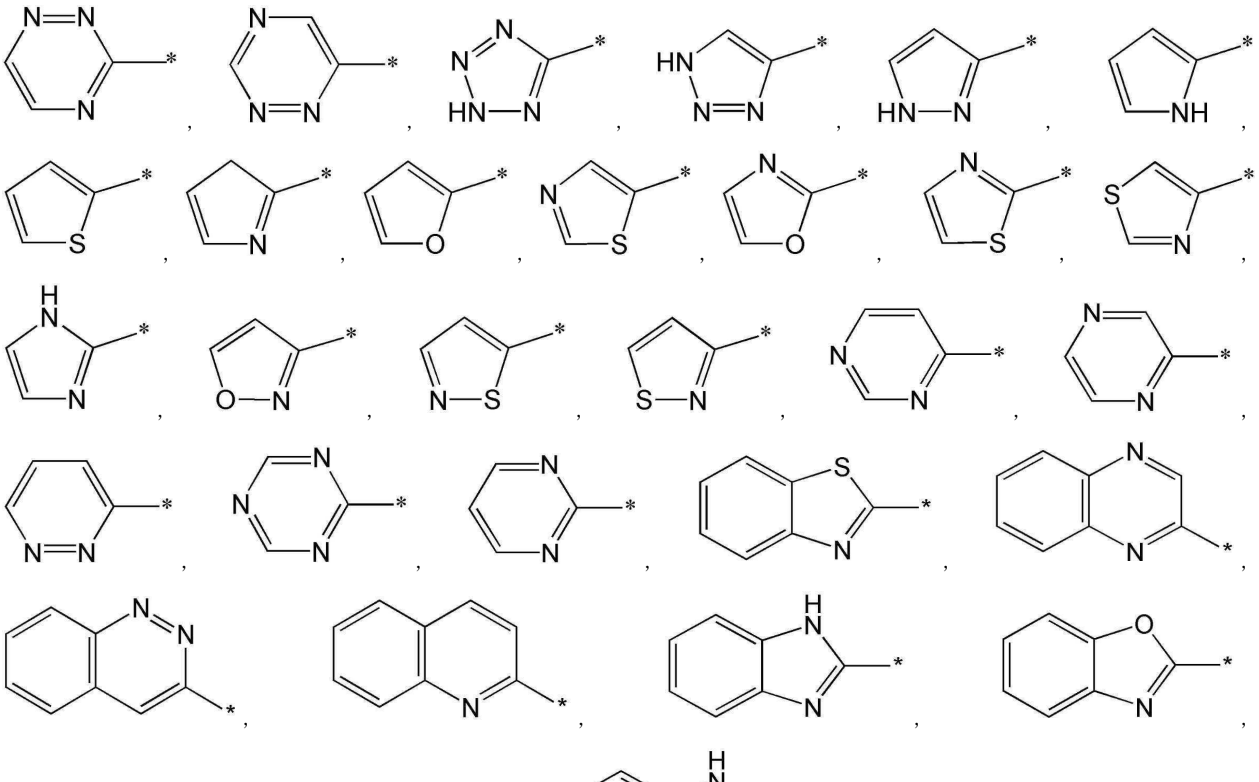
[0031] 상기 '입체 이성질체'는 동일한 화학식 또는 분자식을 가지지만 광학적 또는 입체적으로 다른 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미할 수 있고, 구체적으로, 부분입체이성질체, 거울상이성질체, 기하이성질체, 또는 형상이성질체일 수 있다.

[0032] 일 구체예에서, 상기 헤테로시클로알킬 또는 헤테로아릴은 , , , , , , , , ,



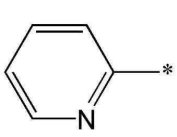
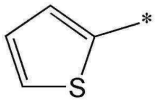
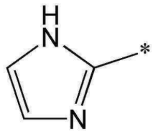
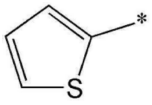
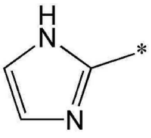
, 및 로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있고, *는 이웃한 원자와의 결합 위치를 나타낸다. 상기 헤테로시클로알킬 또는 헤테로아릴은 치환 또는 비치환된 것일 수 있다.

[0033] 일 구체예에서, 상기 R_1 및 R_2가 모두 알킬인 경우 상기 A_1은 피리딘을 제외한 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬, 또는 치환 또는 비치환된 헤테로아릴이므로, 이 때의 헤테로시클로알킬 또는 헤테로아릴은



, 및 로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 헤테로시클로알킬 또는 헤테로아릴은 치환 또는 비치환된 것일 수 있다.

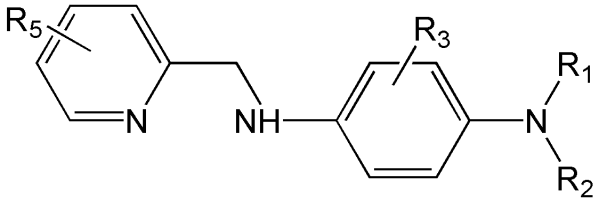
[0034] 일 구체예에서, 상기 헤테로아릴은,

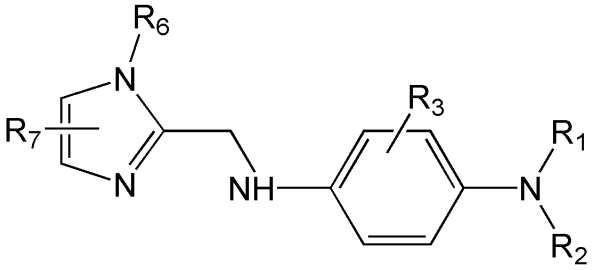
[0035] , , 및 으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 상기 R_1 및 R_2가 모두 알킬인 경우 상기 A_1은 피리딘을 제외한 치환 또는 비치환된 헤테로아릴이므로, 이 때의 헤테로아릴은 , 또는 일 수 있다. 상기 헤테로아릴은 치환 또는 비치환된 것일 수 있다.

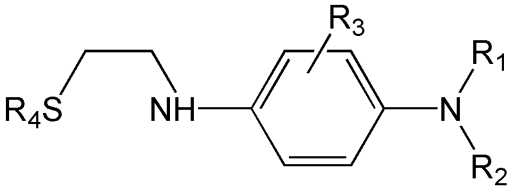
[0036] 일 구체예에서, 상기 A_2는 $-SR_4$일 수 있고, 상기 R_4는 수소, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬일 수 있다.

[0037] 일 구체예에서, 상기 A_2에서 상기 R_4는 수소일 수 있다.

[0038] 일 구체예에서, 상기 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2로 표시되는 화합물은 하기의 화학식 Ⅱ 내지 Ⅳ 중 선택된 화학식으로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0039] 
[화학식 Ⅱ],

[0040] 
[화학식 Ⅲ], 및

[0041] 
[화학식 Ⅳ].

[0042] 상기 화학식 Ⅱ 내지 Ⅳ에서,

[0043] R_1, R_2, R_3, 및 R_4는 상기와 같고;

[0044] R_5 및 R_7은 선택적이고 독립적으로 수소, 할로겐, 히드록시, 치환 또는 비치환된 아민, 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알콕시이고;

[0045] R_6은 수소, 또는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬이고;

[0046] 상기 치환기는 할로겐, C_1~C_6의 직쇄 또는 측쇄 알킬, C_1~C_6의 알콕시, 히드록시, 아민, C_1~C_6 알킬아민, 니트로, 아미드, C_1~C_6 알킬아미드, 우레아 및 아세틸로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0047] 일 구체예에서, 상기 R_5는 수소 또는 할로겐일 수 있다.

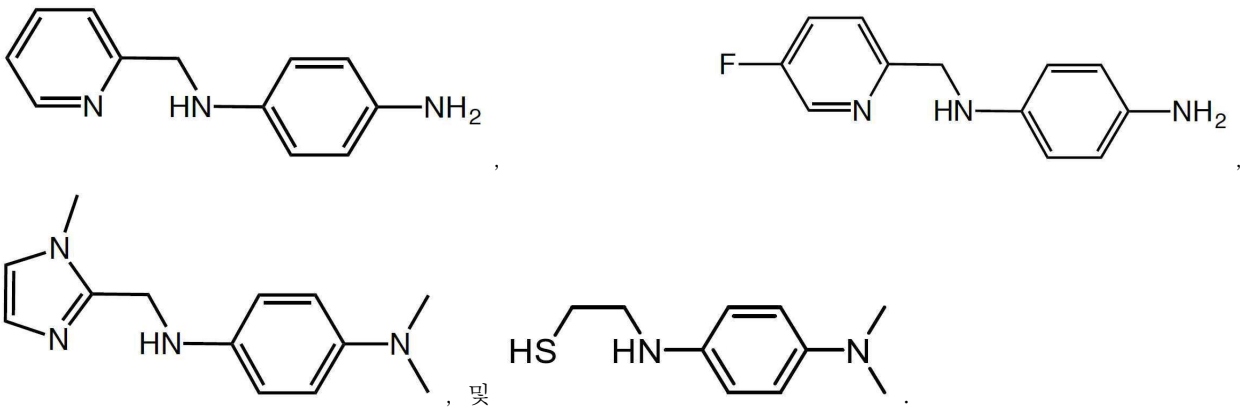
[0048] 일 구체예에서, 상기 R_5는 수소 또는 플루오르일 수 있다.

[0049] 일 구체예에서, 상기 화학식 Ⅱ에서, R_1, 및 R_2는 수소일 수 있다.

[0050] 일 구체예에서, 상기 화학식 Ⅲ 및 Ⅳ에서, R_1, 및 R_2는 치환 또는 비치환된 C_1~C_6 알킬일 수 있다.

[0051] 일 구체예에서, 상기 화학식 Ⅲ 및 Ⅳ에서, R_1, 및 R_2는 메틸일 수 있다.

[0052] 일 구체예에서, 상기 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2로 표시되는 화합물은 화학식 중 하나의 화학식을 갖는 것인 화합물일 수 있다:

[0053] 

[0054] 다른 양상은 상기에 기재된 화합물 중 하나의 화합물, 이의 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0055] 상기 '약학적으로 허용가능한 염'은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 염으로서, 이 염에 기인한 부작용이 본 발명의 조성물 내 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 것을 의미한다. 상기 약학적으로 허용가능한 염으로는 화합물의 임의의 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 상기 염으로는 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔술폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트일 수 있다.

[0056] 본 발명의 화합물은 다양한 Aβ 단백질 및 금속 없이 또는 존재 하에 Aβ 응집을 억제하는 효과, 및 활성 산소에 대한 뇌신경세포의 산화적 스트레스를 감소시키는 효과를 갖는다. Aβ 단백질의 치매 및 알츠하이머에 대해서는 매우 잘 알려져 있고, 파킨슨병에서도 Aβ 침적 또는 응집이 높게 나타나며 이는 곧 파킨슨병에서 흔히 관찰되는 파킨슨성 치매와도 연관이 깊다고 보고되어 왔다 (Mov Disord. Nov;11(6) (1996): 647-53 등). 또한, 과도한 Aβ는 타우 단백질의 과인산화를 촉진시킬 수 있어, 전측두엽 퇴행병에 수반되는 신경세포 줄기의 엉킴 형성과 관련성이 있다고 보고된 바 있다 (Curr Alzheimer Res. 2010 Dec; 7(8): 656-664).

[0057] 따라서, 일 구체예에서, 상기 퇴행성 뇌질환은 구체적으로 치매, 알츠하이머, 파킨슨병, 또는 전측두엽 퇴행병(또는 픽병(pick's disease))일 수 있다. 상기 치매는 뇌혈관성 치매, 알츠하이머성 치매, 파킨슨성 치매, 당뇨성 치매, 노인성 치매, 또는 루이체 치매일 수 있다.

[0058] 다른 양상은 상기에 기재된 화합물 중 하나의 화합물, 이의 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 건강기능식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 증상완화용 건강기능식품을 제공한다.

[0059] 본 발명의 화합물을 건강기능식품에 포함하여 사용할 경우, 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 또는 건강기능식품 성분과 함께 사용하는 등, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 조성물을 구성하는 유효 성분을 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.2 내지 10 중량%로 포함할 수 있으며, 음료로서 제조될 경우 100 mL를 기준으로 0.1 내지 30g, 바람직하게는 0.2 내지 5g의 비율로 함유할 수도 있고, 음료 전체가 천연물 성분으로 구성될 수도 있다. 그러나, 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 건강기능식품용 조성물은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 건강기능식품은 예를 들어 산제, 과립제, 정제, 환제, 캅셀제, 현탁액, 에멀젼, 시럽제, 침제, 액제, 엑스제, 종합영양제, 껌, 차, 젤리, 또는 음료 등으로 제조될 수 있으며, 바람직하게는 음료의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제로는 제조하고자 하는 제형의 제조에 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다. 상기 건강기능식품은 목적 또는 기호에 따라 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 향미제(예를 들어, 스테비아, 레바우디오시드 A, 글리시르히진, 타우마틴, 사카린, 아스파탐 등), 중진제 (예를 들어, 치즈, 초콜릿 등)착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 당류(예를 들어, 포도당, 과당, 말토스, 슈크로스, 덱스트린, 시클로덱스트린, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등), 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 과한 규격 및 기준에 의하여 판정할 수 있다.

[0061] 또 다른 양상은 상기에 기재된 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0062] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있으며, 상기 포유동물은 인간일 수 있다. 본 발명의 화합물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0063] 상기 투여는 경구 투여, 또는 정맥, 복강, 경피, 피내, 피하, 상피, 직장, 흡입, 비강, 설하, 또는 근육투여 등과 같은 비경구 투여를 위해 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0064] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 세립제, 캡슐제, 현탁액, 구강제, 속붕해성정제, 시럽, 츄잉제, 트로키제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 사용될 수 있는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0065] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 주사제, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 에어로졸, 비강투여, 에멀젼, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0066] 특히 피부에 적용하기 위한 피부외용제는 패취, 밴드, 유액, 연고, 팩, 젤, 크림, 로션, 액제 또는 분말제의 형태로 적용될 수 있고, 화장품으로서 유연화장수, 영양화장수, 마사지 크림, 영양크림, 보습크림, 기능성 로션, 미스트, 팩, 젤 또는 피부 점착타입 제형으로서 적용될 수 있다. 따라서 상기 피부외용제로 사용되기 위하여 통

상 화장품이나 의약품 등의 피부외용제에 사용되는 성분, 예컨대 수성성분, 유성성분, 분말성분, 알코올류, 보습제, 증점제, 자외선흡수제, 미백제, 방부제, 산화방지제, 계면활성제, 향료, 색제, 각종 피부 영양제등이 조성물에 필요에 따라서 적절하게 배합될 수 있다. 상기 피부외용제는, 에데트산이나트륨, 에데트산삼나트륨, 시트르산나트륨, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨, 글루콘산 등의 금속봉쇄제, 카페인, 탄닌, 벨라파밀, 감초추출물, 글라블리딘, 칼린의 과실의 열수추출물, 각종생약, 아세트산토코페롤, 글리틸리틴산, 트라넥삼산 및 그 유도체 또는 그 염등의 약제, 비타민 C, 아스코르브산인산마그네슘, 아스코르브산글루코시드, 알부틴, 코지산, 글루코스, 프룩토스, 트레할로스 등의 당류등도 적절하게 배합할 수 있다.

[0067] 또 다른 양상은 본 발명의 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염; 및 하나 이상의 프로브를 포함하는 Aβ 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[0068] 벤젠 디아민 유도체는 화합물 내 적절한 위치에 질소 원자와 같은 전자 제공 원자가 있어 Aβ 단백질과 결합할 수 있고 (Nature communications 7, 13115(2016), PNAS (2010); 107; 51), 그러한 성질에 따라서 Aβ 응집체 또는 플라그 형성을 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물에 프로브 (예를 들어, 형광 프로브)를 결합시켜 상기 화합물이 Aβ 단백질과 결합하는 성질을 이용하여 Aβ 단백질 검출용 조성물로 이용할 수 있다.

[0069] 일 구체예에서, 상기 Aβ 단백질은 Aβ40 또는 Aβ42일 수 있다.

[0070] 일 구체예에서, 상기 Aβ 단백질은 금속이 없는 Aβ(metal-free Aβ), Cu(II)-Aβ, Zn(II)-Aβ, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0071] 또 다른 양상은 상기 Aβ 단백질 검출용 조성물 및 개체로부터 수득된 체액과 접촉시키는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환을 진단하는 방법을 제공한다.

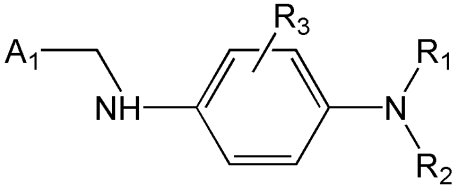
[0072] 상기 체액은 혈액, 혈장, 혈청, 땀, 침, 소변, 척수액 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0073] 상기 퇴행성 뇌질환을 진단하는 방법은 Aβ 단백질 검출용 조성물 및 Aβ 단백질의 복합체를 검출하기 위해 상기 복합체를 시각화하기 위한 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 시각화하는 단계는 예를 들어 Aβ 단백질 검출용 조성물의 프로브에 UV와 같은 일정 파장의 광선을 조사하여 흡광도를 측정, 또는 여기되는 형광량의 측정을 이용하는 것일 수 있다.

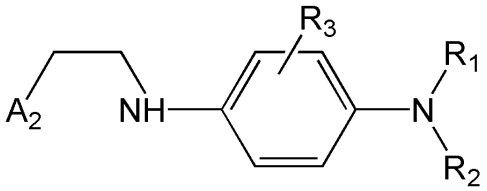
[0074] 상기 Aβ 단백질 검출용 조성물 및 퇴행성 뇌질환을 진단하는 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 청구된 화합물 또는 이를 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료용 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 상기 청구된 Aβ 단백질 검출용 조성물 및 퇴행성 뇌질환을 진단하는 방법에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.

발명의 효과

[0075] 일 양상에 따른 하기의 화학식 Ⅰ-1 또는 Ⅰ-2로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 알츠하이머 위험인자, 즉, 금속이 없는 Aβ, 금속-Aβ, 및 활성 산소종을 조절하여 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0076] 

[화학식 Ⅰ-1]

[0077] 

[화학식 Ⅰ-2]

[0078] 다른 양상에 따른 상기 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 이용하여 개체의 퇴행성 뇌질환, 구체적으로 치매, 알츠하이머, 파킨슨병, 또는 전측두엽 퇴행병의 원인을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0079] 또 다른 양상에 따른 상기 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들이 염; 및 하나 이상의 프로브를 포함하는 Aβ 단백질 검출용 조성물을 이용하여, 퇴행성 뇌질환, 구체적으로 치매, 알츠하이머, 파킨슨병, 또는 전측두엽 퇴행병을 진단하기 위해 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 금속이 있거나 또는 없는 조건에서 화합물 1 내지 5의 Aβ의 응집 억제 효과를 면역블롯으로 나타낸 것이다.

도 2는 금속이 있거나 또는 없는 조건에서 화합물 2의 Aβ의 응집 억제 효과를 이미지로 나타낸 것이다.

도 3은 화합물 1 내지 5의 항산화 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 금속이 있거나 또는 없는 조건에서 Aβ 응집체에 의한 세포 독성에 대한 화합물 1 내지 5의 세포 보호 효과를 나타낸 것이다.

도 5는 치매 모델 마우스의 수조 미로 시험(water maze test)에서 행동적 변화를 탈출잠복기(escape latency)로 나타낸 것이다.

도 6은 치매 모델 마우스에서 뇌의 형태학적 변화를 이미지로 나타낸 것이다.

도 7은 치매 모델 마우스의 뇌에서 모노머 Aβ(mAβ) 분포를 공초점 현미경으로 관찰한 이미지를 나타낸 것이다.

도 8은 치매 모델 마우스의 뇌에서 올리고머 Aβ(oAβ) 분포를 공초점 현미경으로 관찰한 이미지를 나타낸 것이다.

도 9는 치매 모델 마우스의 뇌에서 Aβ 응집체(ThT)의 분포를 공초점 현미경으로 관찰한 이미지를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

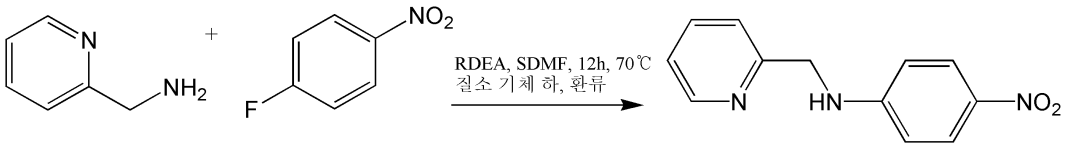
[0081] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0082] **1. 실시예 1: 벤젠 디아민 유도체의 합성**

[0083] 벤젠 디아민 유도체를 하기와 같이 합성하였다.

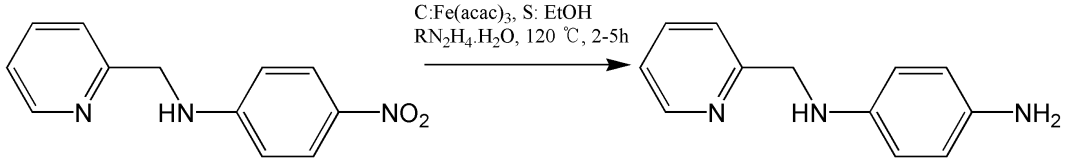
[0084] **1-1. N^1-(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 2)의 합성**

[0085] (1) 단계 1

[0086] 

[0087] 질소 기체 하에서, 환류 콘덴서와 환류 콘덴서와 자석 교반자를 갖춘 잘 마른 플라스크에 1-플루오로-4-니트로벤젠 (231 ㎕, 2.2 mmol)과 N,N-디이소프로필에틸아민 (836 ㎕, 4.8 mmol), 및 DMF(25 mL)를 넣고 2-(아미노에틸)피리딘 (247 ㎕, 2.4 mmol)을 상온에서 첨가한 후, 혼합액을 70 ℃로 가열하였다. 12 시간 후, 생성된 갈색의 용액에 물(75 mL)를 넣고 EtOAc(3 x 75 mL)로 추출하였다. 추출한 유기용액은 물(2 x 75 mL)과 염수(75 mL)로 세척하였다. 그 후 $MgSO_4$를 넣고 여과한 후, 여과액을 농축하였다. 상기 농축한 용액을 실리카 칼럼 크로마토그래피(25% 에서 100% *n*-헥산 중 EtOAc)로 정제하여 노란색 고체의 화합물을 얻는다(0.29 g, 수득률: 58%). [TLC 조건(EtOAc:*n*-헥산 = 50:50 (v/v)): R_f = 0.25].

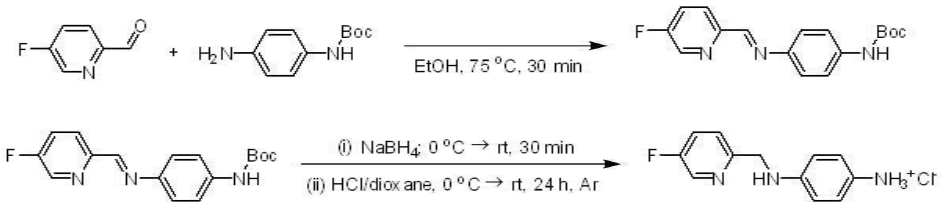
[0088] (2) 단계 2



[0089]

[0090] 환류 콘덴서와 자석 교반자를 갖춘 잘 마른 플라스크에 상기 단계 1에서 수득된 화합물(0.52 g, 2.3 mmol)과 트리스(아세틸아세토나토)철(III) (0.024 g, 3 mol%), 및 에탄올(20 mL)을 첨가한 후, 히드라진 히드레이트(581 ㎕, 11 mmol)와 혼합하였다. 상기 혼합물을 2 시간 동안 120 ℃에서 환류하며 가열시켰다. 2 시간 후, 반응물이 남았을 경우, 매 시간마다 추가로 4 당량의 히드라진 히드레이트를 첨가하였다. 생성된 갈색 오일은 농축한 후에 실리카 칼럼 크로마토그래피[EtOAc (100%)에서 EtOAc:Et_3N(99%:1%); TLC조건: (EtOAc:Et_3N=99:1(v/v)),R_f = 0.20]로 정제하였다. 상기 정제된 화합물을 최소량의 MeOH에 녹인 후, 과량의 5 M HCl을 첨가하여 염 형태의 화합물을 생성하였다. 생성물을 진공 조건에서 농축한 후 Et_2O(3x5mL)로 세척하였다. 수득된 화합물을 물(20 mL)에 녹여 수용액 층을 생성시키고 그 수용액 층을 Et_2O(3x20mL)로 세척하고 다시 농축하였다. 물을 진공 조건에서 제거한 후, MeOH와 Et_2O를 이용하여 재결정화하였다. 생성물은 엷은 노랑색 고체이다 (0.45 g. 수득률: 85%).

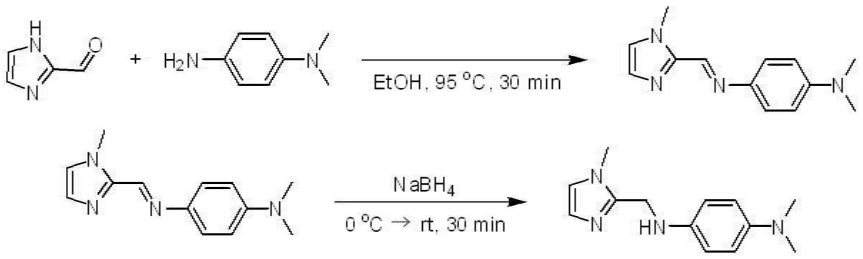
[0091] **1-2. *N*^{1}-((5-플루오로피리딘-2-일)메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 3)의 합성**



[0092]

[0093] 5-플루오로피리딘-2-카르복살데히드 (20 mg, 0.152 mmol)를 *N*-(*tert*-부톡시카르보닐)-1,4-페닐렌디아민 (33.3 mg, 0.152 mmol)을 함유하는 에탄올 용액 (EtOH; 1.5 mL)에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 75 ℃에서 24 시간 동안 교반하였다. 용매를 다른 정제 없이 진공 하에 농축시켜 황색 고체 생성물 (50.4 mg, 0.152 mmol)을 수득하였다. 소듐 보로히드리드 ($NaBH_4$, 34.5 mg, 0.911 mmol)를 메탄올 (2 mL, 0 ℃로 냉각된 것)에 첨가하여 이민 생성물의 용액을 얻었다. 상기 용액을 0 ℃에서 5 분간 교반하였다. 실온에서 30 분 후, 상기 반응을 H_2O로 중단(quench)시키고 에틸 아세테이트 (EtOAc, 3x)로 추출하였다. 상기 혼합된 유기 상을 염수(1x)로 세척하고 무수 마그네슘 설페이트 ($MgSO_4$) 상에서 건조시켰다. 상기 조 화합물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2, EtOAc: hexanes = 1:6 to 1:2)로 정제하여, 백색 고체 생성물 (33.9 mg, 0.107 mmol, 70.4%)을 수득하였다. 마그네틱 교반바가 장치된 둥근 플라스크에서 HCl/디옥산 (4 mL, 4.0 M) 용액을 Ar (g) 하에 0 ℃에서 냉각시켰다. Boc-보호된 화합물을 첨가한 다음, 반응물을 실온에서 교반하였다. 24 시간 후, 용매를 진공 하에 농축하였다. 그 잔여물을 디에틸 에테르 (Et_2O)로 세척하고 여과하여 수집하여, 황색 고체 생성물(10.2 mg, 0.04 mmol, 37.6%)을 얻었다. ^{1}H NMR [400 MHz, DMSO-d_6, δ (ppm)]: 10.0 (3H, s), 8.63 (1H, d, J = 3.2 Hz), 7.83 (1H, td, J = 2.8 Hz, J = 12.4), 7.55 (1H, m), 7.14 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.77 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.47 (6H, s). ^{13}C NMR [100 MHz, DMSO-d_6, δ (ppm)]: 160.1, 157.6, 154.7, 146.5, 136.4, 126.01, 124.2, 122,1, 114.7, 48.2. ESI-MS (*m/z*): $[M + H]^+$ Calcd. for $C_{12}H_{13}FN_3^+$, 218.1; found, 218.0.

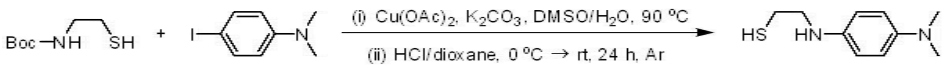
[0094] **1-3. N^1,N^1-디메틸-N^4-((1-메틸-1H-이미다졸-2-일)메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 4)의 합성**



[0095]

[0096] 1*H*-이미다졸-2-카르발데히드 (84.7 ㎕, 0.88 mmol) 및 N^1,N^1-디메틸벤젠-1,4-디아민 (115 ㎕, 0.88 mmol)을 마그네틱 교반바가 있는 EtOH (1.2 mL)을 포함하는 시험 튜브에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 95 ℃에서 30 분간 N_2 (g) 하에 교반하였다. 0 ℃로 상기 용액을 냉각시킨 후, MeOH (3 mL, cooled to 0 °C) 중에 용해된 $NaBH_4$ (222 mg, 5.87 mmol)를 상기 이민 생성물 용액에 직접적으로 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 상기 반응을 H_2O로 중단시키고, Et_2O (3x)로 추출하였다. 생성물 (갈색 고체; 89.1 mg, 0.39 mmol, 44%)을 Et_2O 및 헥산으로부터 재결정화함으로써 얻었다. ^{1}H NMR [400 MHz, DMSO-d_6, δ (ppm)]: 8.51 (1H, s), 7.36 (1H, s), 7.27 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.10 (1H, s), 6.77 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.05 (3H, s), 2.93 (6H, s). ^{13}C NMR [100 MHz, DMSO-d_6, δ (ppm)]: 146.2, 143.6, 141.3, 126.4, 122.1, 115.8, 114.1, 42.2, 41.3, 32.8. ESI-MS (*m/z*): $[M + H]^+$ Calcd. for $C_{13}H_{19}N_4^+$, 231.2; found, 231.3.

[0097] **1-4. 2-((4-(디메틸아미노)페닐)아미노)에탄-1-티올 (화합물 5)의 합성**



[0098]

[0099] 4-이오도-*N*,*N*-디메틸아닐린 (490 mg, 2.0 mmol), 2-(Boc-아미노)에탄티올 (680 ㎕, 4.0 mmol), 구리 아세테이트 디히드레이트 [$Cu(OAc)_2.2H_2O$; 40 mg, 0.2 mmol], 및 포타슘 카르보네이트 (K_2CO_3; 1.1 g, 8.0 mmol)를 마그네틱 교반바가 있는 DMSO/H_2O (3 mL/1 mL)을 포함하는 시험 튜브에 첨가하였다. Ar (g)로 플러싱한 후, 상기 혼합물을 90 ℃에서 24 시간 동안 미리 가열된 오일 조(bath) 중에 교반하였다. 상기 용액을 실온에서 냉각시킨 후, 상기 반응을 EtOAc로 중단시켰다. 사익 반응 용액을 H_2O (3x)로 세척하고 염수 (1x)로 세척하였다. 상기 유기 층을 무수 $MgSO_4$ 상에 건조시키고 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2; EtOAc:헥산 = 1:10)로 정제하여 생성물 (백색 고체; 210 mg, 0.71 mmol, 34%)를 얻었다. *tert*-부틸 2-(4-(디메틸아미노)페닐티오)에틸카바메이트 (400 mg, 1.4 mmol)를 Ar (g) 하에 0 ℃에서 HCl/디옥산 (4.0 M, 10 mL) 용액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하고 그 잔여물을 디에틸 에테르 (Et_2O)로 세척하였다. 끈적거리는 화합물을 1 N NaOH (aq)로 염기성화 하고 EtOAc (3x)로 추출하였다. 결합된 유기 층을 염수(1x)로 세척하고, 무수 $MgSO_4$ 상에 건조시키고, 진공 하에 농축하였다. 조 화합물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2; CH_2Cl_2:CH_3OH = 7:1)로 정제하였다. 생성물 (백색 분말; 50 mg, 0.25 mmol, 18%)을 황색 액체 생성물에 Et_2O를 첨가함으로써 얻었다. ^{1}H NMR [400 MHz, CD_3OD, δ (ppm)]: 7.35 (2H, m), 6.72 (2H, d, J = 8.8 Hz), 2.94 (10H, m), 1.90 (2H, s). ^{13}C NMR [100 MHz, CD_3OD, δ (ppm)]: 152.2, 136.0, 119.2, 114.2, 40.6. 39.8, 35.5. HRMS (*m/z*): $[M + H]^+$ Calcd. for $C_{10}H_{17}N_2S^+$, 197.1107; found, 197.1103.

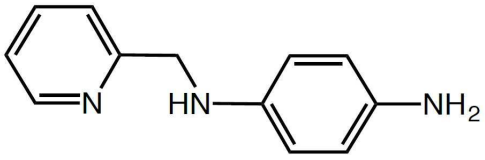
[0100] 상기 수득된 화합물 2 내지 5를 동결 건조하여 건조 분말을 얻었다. 상기 수득된 화합물 2 내지 5를 단순히 수용액으로 추출하여 건조시켜 건조 분말을 얻을 수 있다.

[0101] 상기 개시된 화합물 2 내지 5에 제한되지 않고 본 발명의 다양한 벤젠 디아민 유도체가 통상의 기술자에게 잘 알려진 방법에 의하여 제조될 수 있다.

[0102] **2. 실시예 2: Aβ 응집 억제 효과의 확인**

[0103] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 Aβ의 응집을 억제시키는 효과를 갖는지 확인하였다. Aβ는 두 가지 이소형(isoform)을 가지므로 Aβ40 및 Aβ42 각각에 대한 효과를 확인하였다. 단백질의 폴딩(floding)에서 금속이 동반되는 경우 비정상적인 폴딩이 발생할 확률이 높으며, 이 경우 Aβ가 응집체를 형성하게 될 확률이 더욱 높아진다. 따라서, 금속의 존재 여부에 대해서도 각 화합물의 Aβ 응집 억제 효과를 갖는지 확인하였다.

[0104] **2-1. Aβ 응집 억제 효과의 분자적 확인**

[0105] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체의 Aβ의 응집 억제 효과에 대해 분자적으로 확인하기 위해 겔 전기영동(gel electrophoresis) 및 웨스턴 블롯 (Western blotting)을 항-Aβ 항체 (6E10)를 이용하여 수행하였다. 대조군으로 화합물 1 ()을 사용하였다(Nature communications 7, 13115(2016)).

[0106] 구체적으로, 각 시료 (10 ㎕)를 10-20% Tris-트리신 겔 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 상에 분리시켰다. 분리 후, 단백질을 니트로셀루로스 막 상에 트랜스퍼하고 0.1% Tween-20 (TBS-T)을 포함하는 Tris-완충된 염수 (Tris-buffered saline; TBS)) 중에 소 혈청 알부민 (BSA, 3% w/v, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)으로 실온에서 2 시간 또는 4 ℃에서 밤새 블로킹하였다. 상기 막을 2% BSA (w/v in TBS-T) 용액에 항-Aβ 항체 (6E10, 1:2,000, Covance, Princeton, NJ, USA)와 실온에서 4 시간 동안 또는 4 ℃에서 밤새 인큐베이션하였다. TBS-T (3x, 10 분)로 세척하고, 2차 마우스 항체 (1:5,000 in 2% BSA w/v in TBS-T; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)를 첨가하여 실온에서 한 시간 동안 인큐베이션하엿다. Thermo Scientific SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), Biosesang ECL Plus kit (Biosesang, Gyeonggi-do, Republic of Korea), 또는 homemade ECL kit53이 결과를 시각화하기 위해 사용되었고 ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 검출하였다.

[0107] 그 결과, 화합물 1은 어떠한 조건에서도 Aβ의 응집을 억제하는 효과를 보이지 않았다. 반면, 화합물 2는 두 종류의 Aβ에 대해 Cu(II)-Aβ 응집 효과가 매우 뛰어난 것으로 보였다. 화합물 3 및 5는 금속의 종류 및 존재 여부와 관계 없이 두 종류의 Aβ 모두에 대해 응집 억제 효과를 보였으며, 화합물 4는 특히 금속이 있는 Aβ에서 응집 억제효과를 보였다. 따라서, 약간의 경향성 차이가 있으나 본 발명의 벤젠 디아민 유도체들이 Aβ의 응집 억제 효과를 가짐을 알 수 있다 (도 1).

[0108] **2-2. Aβ 응집 억제 효과의 형태학적 확인**

[0109] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체 (화합물 2)의 Aβ의 응집 억제 효과에 대해 전자 현미경을 이용해 관찰하여 그 형태학적 변화를 확인하였다.

[0110] 구체적으로, TEM을 위한 시료를 이전에 알려진 방법에 따라 준비하고, Glow-discharged grids (Formvar/Carbon 300-mesh, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)를 Aβ 시료 (25 μM, 5 ㎕)로 처리하여 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 잔여 시료를 필터 페이퍼로 제거하고 ddH_2O로 두 번 세척하였다. 각 그리드는 우라닐 아세테이트 (1%, ddH_2O, 5 ㎕)로 1 분간 인큐베이션된 것이었고, 얼룩을 제거하고 (blotted off) 실온에서 15 분간 건조시켰다. 각 시료의 이미지를 JEOL JEM-2100 투과형 전자 현미경(transmission electron microscope) (UNIST Central Research Facilities, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea)으로 얻었다.

[0111] 그 결과, 벤젠 디아민 유도체가 Aβ 응집 억제 효과를 가짐을 이미지로 확인할 수 있었다.

[0112] **3. 실시예 3: 항산화 효과의 확인**

[0113] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 항산화 효과를 갖는지 확인하였다. 활성 산소는 신경세포에 산화적 스트레스를 유발하여 신경세포 사멸을 일으킬 수 있고, 단백질의 미스폴딩을 유발하여 Aβ의 응집체 형성을 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 항산화 효과를 갖는 화합물은 치매 예방 또는 치료를 위한 후보 물질이 될 수 있다.

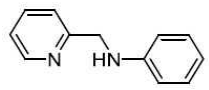
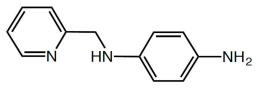
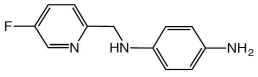
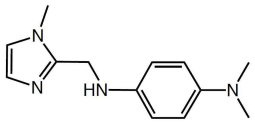
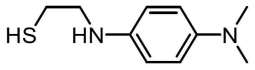
[0114] 화합물의 자유 유기 라디칼을 제거하는 능력을 결정하기 위해 Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)의 프로토콜에 따라 약간의 변형을 가하여 수행하였다. 세포 용해물을 이용하는 항산화 분석을 위해, 세포를 6 웰 플레이트에 씨딩하고 80-90% 콘플루언스로 배양하였다. 세포 용해물을 기존에 알려진 방법에 따라 준비하고, 차가운 인산 완충액 염수 (PBS; pH 7.4, GIBCO)로 세척하고 수확하였다. 세포 펠렛을 원심분리하여 생성하였다 (2,000 g, 4 ℃에서 10 분). 이 펠렛을 2 ml의 차가운 분석 완충액 S13 (5 mM 인산칼륨, pH 7.4; 0.9% NaCl; 0.1% glucose) 중에 얼음에서 소니케이션 (5 초 펄스, 20 초 인터벌로 3 회)하였다. 세포 용해물을 4 ℃에서 10 분간 5,000 g에서 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 사용할 때까지 얼음 위에 두었다. 세포 용해물 상등액 (10 ㎕)에 화합물, 메트미오글로빈(metmyoglobin), ABTS(2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), 및 과산화수소를 순차적으로 첨가하였다. 실온에서 쉐이크 상에 5 분간 인큐베이션한 후, 750 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 최종 농도(45, 90, 135, 180, 225, 및 330 μM)의 화합물 및 트록스(Trolox) (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, EtOH 용해된 것)를 사용하였다. 항산화 농도를 측정된 흡광도에 따라 계산하였다 [% 저해 = 100 x (A_0 - A)/A_0, A_0는 세포 용해물의 상등액의 흡광도이다]. 각 측정은 3 회 반복하였다.

[0115] 그 결과, 화합물 1을 제외하고, 화합물 2 내지 5 모두 활성 산소종 중 하나인 유리기를 억제하는 것으로 보였으며, 항산화 물질로 잘 알려진 트로록스(Trolox; 비타민 E 유사체)와 비교하여서도 현저한 효과를 갖는 것으로 보였다 (도 3). 따라서, 화합물 2 내지 5의 화합물은 신경세포에 발생하는 산화 스트레스를 충분히 상쇄시켜, 신경세포 사멸을 예방할 수 있고 나아가 치매 또는 알츠하이머병 예방 또는 치료를 위한 약물로서 우수한 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0116] 하기의 표 1은 실시예 2 및 3의 결과를 간략하게 정리한 것이다.

표 1

[0117]

화합물	비금속 Aβ	Cu(Ⅱ)-Aβ	Zn(Ⅱ)-Aβ	활성산소
 화합물 1	-	-	-	효과 없음
 화합물 2	-	0	-	0 (TEAC 보다 효과 좋음)
 화합물 3	0	0	0	0
 화합물 4	-	0	0	0
 화합물 5	0	0	0	0

[0118] **4. 실시예 4: 세포 독성 억제 효과의 확인**

[0119] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 세포 독성 억제 효과를 갖는지 확인하였다. Aβ의 응집 및 활성 산소는 뇌신경세포에 독성을 가져 결과적으로 뇌신경세포의 사멸을 일으킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 Aβ 응집 억제 및 항산화 효과를 넘어 실질적으로 세포 독성을 억제하여 세포 생존률(cell viability)을 증가시킬 수 있는지 확인하였다.

[0120] 구체적으로 인간 신경아세포종 SK-N-BE(2)-M17 (M17) 세포 (ATCC, Manassa, VA, USA)를 1:1 최소 필수 배지 (MEM; GIBCO, Grand Island, NY, USA), Ham's F12K Kaighn's Modification Media (F12K; GIBCO), 10% (v/v) 소 태아 혈청 (FBS; Atlanta Biologicals, Flowery Branch, GA, USA), 100 U/mL 페니실린 (GIBCO), 및 100

mg/mL 스트렙토미신 (GIBCO)을 포함하는 배지에서 배양하였다. M17 세포를 96 웰 플레이트에 시딩 (웰 당 100 ㎕에 150,000)하고 다양한 농도의 화합물 (0-50 μM, 1% v/v DMSO), $CuCl_2$ 또는 $ZnCl_2$ (1:1 or 1:2 금속/리간드 비율) 유무, 및 Aβ 40 (Aβ:금속:화합물 = 10:10:20 μM) 유무에 따라 처리하였다. 37 ℃에서 24 시간 인큐베이션한 후, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (PBS 중 5 mg/mL, pH 7.4) (GIBCO) 25 ㎕를 각 웰에 첨가하고, 각 플레이트를 37 ℃에서 4 시간 동안 인큐베이션 하였다. 세포로부터 생산된 포르마잔(Formazan)을 *N,N*-디메틸포르미드 (DMF, 50% v/v aq) 및 소듐 도데실 설페이트 (SDS, 20% w/v)를 포함하는 용액에 용해시키고 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 600 nm에서의 흡광도를 미크로플레이트 리더로 측정하였다.

[0121] 그 결과, 화합물 1은 어떠한 Aβ 이소형 및 금속의 존재 여부와 관계 없이 Aβ 응집 억제 효과가 탁월하진 않은 것으로 관찰되었다. 화합물 2 내지 5는 Aβ 이소형 및 금속의 종류에 따라 각 화합물이 다양한 경향성을 보였으나, 대부분이 금속이 존재하거나 또는 존재하지 않는 Aβ에 의해 발생된 세포 독성을 대략 15 내지 30 % 감소시킬 수 있음을 알 수 있다 (도 4). 따라서, 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 Aβ 응집 억제 및 항산화 효과를 넘어 실질적으로 세포 독성을 억제하여 뇌신경세포 생존률을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0122] **5. 실시예 5: 화합물 2 내지 5를 포함하는 제제의 제조**

[0123] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체를 포함하는 제제는 하기와 같이 제조될 수 있다. 하기의 제제예는 단지 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 화합물을 유효성분으로 하는 제제가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0124] **5-1. 제제예 1: 주사제의 제조**

[0125] 실시예 1의 화합물 2 내지 5 (1 mg)를 각각 주사용 증류수에 용해하고, pH조절제로 pH 약 6.8로 조절한 다음, 총 부피 2 ml로 한 후 2 ml 용량의 앰플에 충진하고 멸균하여 주사제를 제조할 수 있다.

[0126] **5-2. 제제예 2: 정제의 제조**

[0127] 실시예 1의 화합물 2 내지 5 (1 mg) 각각을 유당 100 mg, 전분 100 mg 또는 50mg, 및 스테아린산 마그레슘 적량과 혼합하여 통상의 정제의 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조할 수 있다.

[0128] **5-3. 제제예 3: 산제의 제조**

[0129] 실시예 1의 화합물 2 내지 5 (1 mg) 각각을 유당 100 mg, 및 스테아린산 마그레슘 2 mg과 혼합하여 내부가 폴리에틸렌클로라이드로 코팅된 지포에 충진하고 실링(sealing)하여 산제를 제조할 수 있다.

[0130] **5-4. 제제예 4: 캡슐제의 제조**

[0131] 실시예 1의 화합물 2 내지 5 (1 mg) 각각을 유당 50 mg, 전분 50 mg 또는 93 mg, 탈크 2 mg, 및 스테아린산 마그레슘 적량을 혼합하여 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충진하여 캡슐제를 제조할 수 있다.

[0132] **6. 시험예 1: 치매 모델 마우스에서 뇌의 형태학적 변화**

[0133] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체의 치매 치료 효과를 확인하기 위해 치매 모델 마우스를 도입하여 경구 투여한 후 뇌의 형태학적 변화를 관찰하였다.

[0134] 구체적으로, 치매 모델 마우스로 APP/PS/Tau를 젝슨랩 (BAR HARBOR, USA)에서 구입하고 APP/Tau 암놈과 타고닉 (Hudson, USA) 에서 구입한 APP/PSen1de9을 6세대 교차 교배시켜 F1으로부터 4개월 된 치매 모델 마우스를 얻었다. 상기 치매 모델 마우스를 대상으로 각 그룹당 6마리로 하여 2개월 간 치매 모델 마우스 중 대조군에는 담체 (PBS)를 경구 투여하고, 실험군에는 N1-(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민 (화합물 2)을 100 ㎍/kg/0.1 ml으로 일주일에 2회 투여하였다. 그 후, 마우스를 희생시키고 뇌를 적출하고 종단부를 절개하여 그 형태학적 변화를 관찰하였다. 비교를 위하여 정상 마우스를 희생시켜 마찬가지로 뇌를 적출하고 종단부를 절개하여 그 형태학적 변화를 비교하였다.

[0135] 그 결과, 대조군(치매쥐)에서는 뇌의 형태나 종단부를 절개시 출혈이 관찰된 반면 화합물 2를 2개월 간 경구 투여한 실험군에서는 정상군과 거의 유사한 뇌의 형태를 보이는 것으로 관찰되었다 (도 6). 이러한 결과는 아마도 화합물 2가 염증을 억제하고 치매인자에 의해 혈관신생을 억제하므로 뇌조직과 피부출혈이 억제된 결과라 사료된다.

[0136] **7. 시험예 2: 치매 모델 마우스의 기억능력 변화**

[0137] 본 발명의 벤젠 디아민 유도체에 의한 치매 모델 마우스에서 공간 인지력 및 기억력 향상 여부를 검증하기 위해 수조 미로 (water morris maze, Harvard Apparatus, USA) 실험을 수행하였다.

[0138] 구체적으로, 직경 150cmx 높이 60cm의 스테인레스 원통과 도피대(지름 10cm, 높이 30cm)로 이루어진 수조 미로에 22±2℃의 물을 채우고, 높이는 플렛폼 위 2cm로 마우스가 도피대에 앉으면 몸이 물 밖으로 나올 수 있도록 하였다. 마우스는 수조 표면 상의 수조 주변의 표지물을 이용하여 도피대를 찾아가기 때문에 주변의 환경 변화가 없도록 표지물을 실험기간동안 일정하게 유지하였다. 실험동물이 도피대를 찾아가 20초 이상 머무르면 찾아갈 때까지 걸린 시간을 탈출잠복기 (escape latency)로 하였으며 이를 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출잠복기로 하였다. 탈출 잠복기는 수조 위 천정에 카메라를 설치하여 컴퓨터프로그램 (스마트 비디오 추적시스템 V3.0, PanLab SL, Barcelona, Spain)을 통해 관찰된 것을 기록하였다. 실험은 6일 동안 매일 3회 실시하였으며 이 때 실험동물을 수조에 넣은 위치를 순차적으로 달리하여 우연히 도피대를 찾아가게 되는 가능성을 최소화하였다. 상기 실험에는 시험예 1에서와 같이 정상 마우스, 및 각각 담체 및 N^1-(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민(화합물 2) 100 ㎍/kg/0.1 ml을 2 개월 간 일주일에 2회 투여한 대조군 및 실험군 치매 모델 마우스를 투여가 끝난 후 적용하였다.

[0139] 그 결과, 도 5에 나타내는 바와 같이 화합물 2 처리군은 치매 대조군에 비하여 평균탈출시간이 3일째부터 유의하게 짧아져 정상군(non-Tg mice)과 유사한 수준으로 감소되었다. 대조군(AD mice)과 실험군(AD mice+화합물 2)의 평균탈출시간은 4일 째 각각 42±1초와 26±1초로 16초의 차이를 보였다. 5일 째에는 치매군과 화합물 2 처리군이 각각 43±1초와 24±1초로 19초의 차이를 보여 통계적으로 유의성 있는 공간 인지력 및 기억력 회복 효과가 나타났다. 특히, 정상군과 화합물 2 처리군의 경우 4일 째 이후 안정화된 감소 그래프를 보여 실험기간 동안 장기 기억을 형성함이 분명하게 나타났다.

[0140] **8. 시험예 3: 뇌조직 해부학적 변화**

[0141] 치매 모델 마우스에서 본 발명의 벤젠 디아민 유도체에 의해 치매 증상 회복 효과를 뇌조직 해부학적 측면에서 분석하였다.

[0142] **8-1. 모노머 Aβ 형성 억제 효과 확인**

[0143] 모노머 Aβ가 과발현하게 되면 올리고머 Aβ, Aβ 응집체, 및 아밀로이드 플라그 형성하여 뇌신경 독성을 유발할 가능성이 높아진다. 따라서, 치매 모델 마우스에서 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 모노머 Aβ의 생성을 억제시킬 수 있는지 뇌조직 해부학적 측면에서 분석하였다.

[0144] 시험예 1에서와 같이 대조군 및 실험군 치매 모델 마우스에 각각 담체 및 N^1-(피리딘-2-일메틸)벤젠-1,4-디아민(화합물 2) 100 ㎍/kg/0.1 ml을 2 개월 간 일주일에 2회 투여하고, 투여를 하지 않은 치매 모델 마우스 (4개월)의 뇌를 취하고, 나머지 대조군 및 실험군 또한 투여가 끝난 후 뇌를 취하였다. 각 마우스들은 케타민으로 마취한 다음 두개골을 절개한 후 뇌부분을 파라핀 포매(Embedding)하고 면역조직형광염색을 하였다. 뇌 조직 부위는 포르말린으로 고정한 후 50 ㎛ 두께로 비브로톰(vibrotome)으로 절단하고 각각의 조직을 유리 슬라이드에 올려놓고 모노머 Aβ를 비교해하기 위해 BAM-10 단클론 항-Aβ 일차항체를 QD525 프로브로 표지한 항체(녹색형광)로 모노머 Aβ42의 양적 변화를 관찰하였다. 또한, 플라그의 변화를 측정하기 위해 형광염색시약인 MX04 (청색)으로 표지하여 4℃에서 12시간 동안 인큐베이션 하였다. 그 후, 공초점현미경으로 0.5X10 현미경 하에서 관찰하였다.

[0145] 그 결과 도면 7에 나타낸 바와 같이 치료를 받지 못한 치매 모델인 대조군(치매쥐)에서 전체 뇌 부분 중에 특히 대뇌피질 (cortex) 및 해마(Hippocampus)에서 많은 플라그가 형성됨을 관찰하였으나, 화합물 2 처리군에서는 플라그 형성이 거의 관찰되지 않았다. 또한 모노머 Aβ의 경우에도 대조군에서의 많은 양의 모노머 Aβ가 관찰되었지만, 화합물 2 처리군에서는 대뇌피질과 해마영역에서 모노머 Aβ 형성이 거의 관찰되지 않았다. 따라서, 벤젠 디아민 유도체, 특히 화합물 2는 과도한 모노머 Aβ 생성을 억제하거나 플라그의 생성증가를 억제함을 알 수 있다.

[0146] **8-2. 올리고머 Aβ 형성 억제 효과 확인**

[0147] 올리고머 Aβ는 뇌 조직에서 형성되는 경우 뇌신경 독성에 의한 뇌신경세포 사멸을 일으켜 치매의 원인이 될 수 있다. 따라서, 치매 모델 마우스에서 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 올리고머 Aβ에 의한 뇌신경조직 독성을 억제시킬 수 있는지 뇌조직 해부학적 측면에서 분석하였다.

[0148] 구체적으로, 시험예 7-1에서와 같이 치매 모델 마우스를 처리하고, 뇌 조직을 염색하였다. 올리고머 Aβ를 항-올리고머 Aβ 일차항체 (ab126892, Abcam, Eugene, USA)를 QD565 프로브로 표지한 항체(적색형광)로 올리고머 Aβ42의 양적 변화를 관찰하였다. 또한, 플라그의 변화를 측정하기 위해 형광염색시약인 MX04 (청색)으로 표지하여 4℃에서 12시간 동안 인큐베이션 하였다. 그 후, 공초점현미경으로 0.5X10 현미경 하에서 관찰하였다.

[0149] 그 결과 도 8에 나타낸 바와 같이 치료를 받지 못한 치매 모델인 대조군(치매쥐)에서 뇌 부분 중에 특히 대뇌피질 및 해마에서 많은 올리고머 Aβ가 형성됨을 관찰하였으나, 화합물 2 처리군에서는 올리고머 Aβ의 형성이 거의 관찰되지 않았다. 따라서, 벤젠 디아민 유도체, 특히 화합물 2는 과도한 올리고머 Aβ 생성을 억제시키거나 감소시킴으로 뇌신경세포의 사멸을 억제하여 뇌신경 독성을 억제함을 알 수 있다.

[0150] **8-3. Aβ 응집체 형성 억제 효과 확인**

[0151] 뇌신경조직내의 응집체는 올리고머 Aβ와 마찬가지로 뇌신경 독성에 의한 뇌신경세포 사멸을 일으켜 치매의 원인이 될 수 있다. 따라서, 치매 모델 마우스에서 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 Aβ 응집체에 의한 뇌신경조직 독성을 억제시킬 수 있는지 뇌조직 해부학적 측면에서 분석하였다.

[0152] 구체적으로, 시험예 7-1에서와 같이 치매 모델 마우스를 처리하고, 뇌 조직을 염색하였다. 뇌조직의 Aβ 응집체를 티헤이티 (ThT; Thioflavin T, 시그마-알드리취사) (녹색 형광)로 표지하였고, 플라그를 형광염색시약인 MX04 (청색)로 표지하여 4℃에서 12시간 동안 인큐베이션 하였다. 그 후, 공초점현미경으로 0.5X10 현미경하에서 관찰하였다.

[0153] 그 결과 도 9 에 나타낸 바와 같이 치료를 받지 못한 치매 모델인 대조군(치매쥐)에서 뇌 부분 중에 특히 대뇌피질 및 해마에서 많은 Aβ 응집체가 형성됨을 관찰하였으나, 화합물 2 처리군에서는 Aβ 응집체의 형성이 거의 관찰되지 않았다. 따라서, 벤젠 디아민 유도체, 특히 화합물 2는 과도한 Aβ 응집체의 생성을 억제하거나 플라그의 생성 또한 억제함을 알 수 있다.

[0154] **9. 시험예 4: 뇌혈관 투여성 검증**

[0155] 뇌질환 치료를 위한 후보 물질를 선택하는데 있어, 뇌-혈관 벽 (brain-blood barrier; BBB)을 통과할 수 있는지 여부가 중요하다. 따라서, 본 발명의 벤젠 디아민 유도체가 실제로 BBB를 통과하여 뇌 내에 흡수되는지 분석하였다.

[0156] 마우스 (CD1 female)에서 경구로 100 ㎍/kg/0.1 ml, PAMPA-BBB 분석을 PAMPA Explorer kit (pION, Inc. Billerica, MA, USA)를 이용하여 약간의 변형을 가해 판매자의 지침에 따라 수행하였다. 각 스톡 용액을 Prisma HT 완충액 (pH 7.4, pION)로 희석시키고 최종 농도를 25 μM (1% v/v 최종 DMSO 농도)로 하였다. 생성된 용액을 기여(donor) 플레이트 (200 ㎕, 12 회 반복)의 웰에 넣었다. BBB-1 지질 제형 (5 ㎕, pION)을 수여(acceptor) 플레이트 상의 폴리비닐리덴 플루오리드 (PVDF, 0.45 μM) 여과 막으로 코팅시키기 위해 사용하였다. 상기 수여 플레이트를 기여 플레이트 위에 샌드위치 모양으로 올려두었다. 뇌 침전 완충액(Brain sink buffer) (BSB, 200 ㎕, pION)을 상기 수여 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 상기 샌드위치 모양의 플레이트를 실온에서 교반 없이 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 참조군, 수여, 및 기여 플레이트의 UV-가시광선을 미크로플레이트 리드로 측정하였다. PAMPA Explorer software [v. 3.8 (pION)]를 이용하여 각 화합물의 -logPe 값을 계산하였다. CNS± 표시를 이전에 보고된 바에서 확인된 화합물과 비교하여 배열하였다.

[0157] 그 결과를 하기의 표 2 및 3에 나타내었다.

표 2

[0158]

투여량 (㎍/kg)	투여방법	시간 (h)	매트릭스	농도 (ng/ml 또는 ng/g)			평균	SD		CV(%)
				개별적						
100	PO	0.083 (5 분)	혈장	1076	92.8	2304	1158	1108		95.7
			뇌	44.3	34.0	200	92.8	93.0		100
			CSF	146	205	594	315	243		77.3

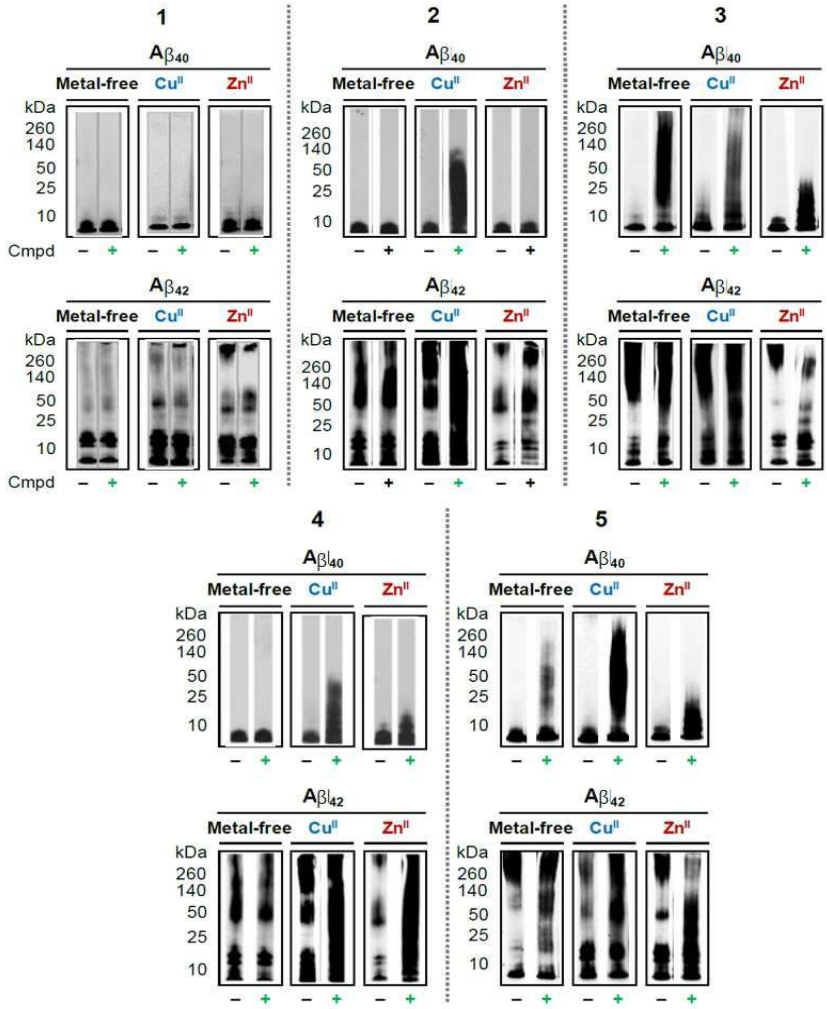
표 3

[0159]

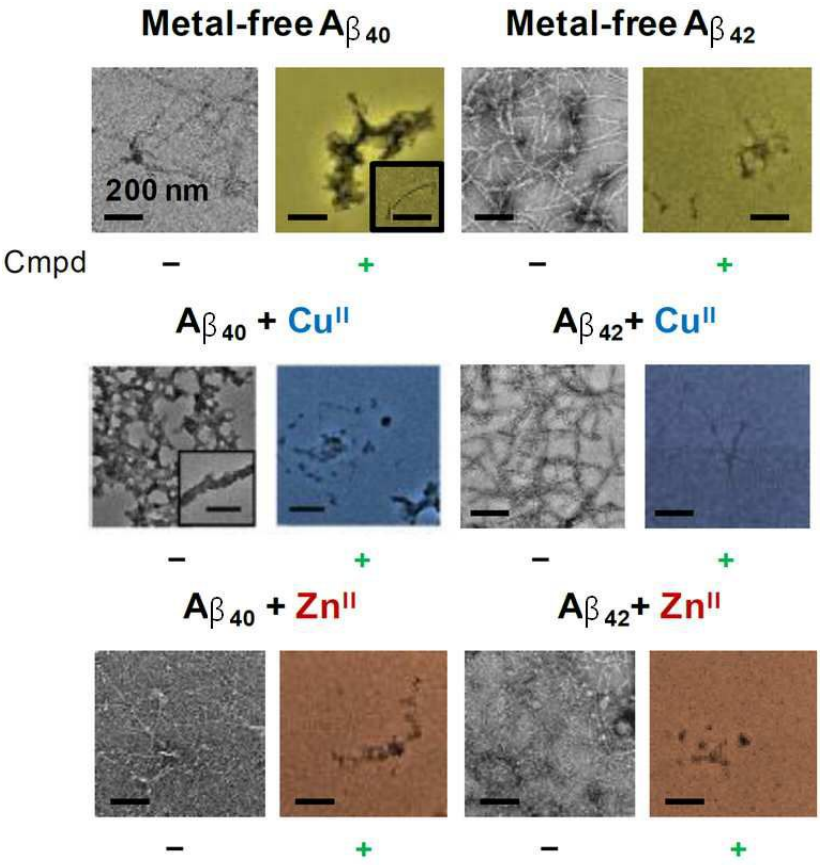
테스트	농도	인큐베이션 시간	Pe (10^{-6}cm/초)	BCS 코드	방법
프로게스테론	50 μM	4 시간	46.699	High (CNS+)	U.V
리도카인	50 μM	4 시간	24.698	High (CNS+)	U.V
테오필린	50 μM	4 시간	0.174	Low (CNS-)	U.V
화합물 2	50 μM	4 시간	12.471	High (CNS+)	U.V

도면

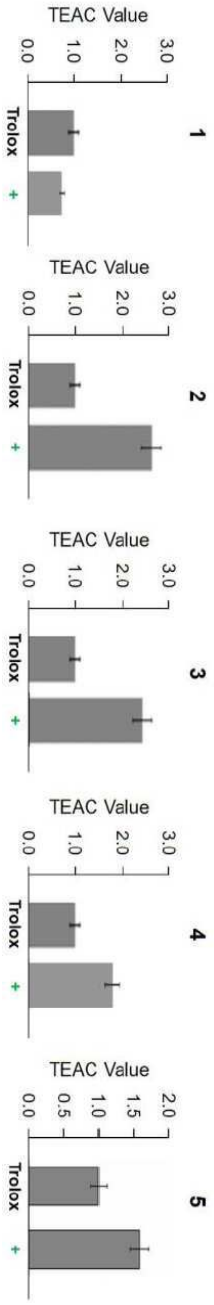
도면1



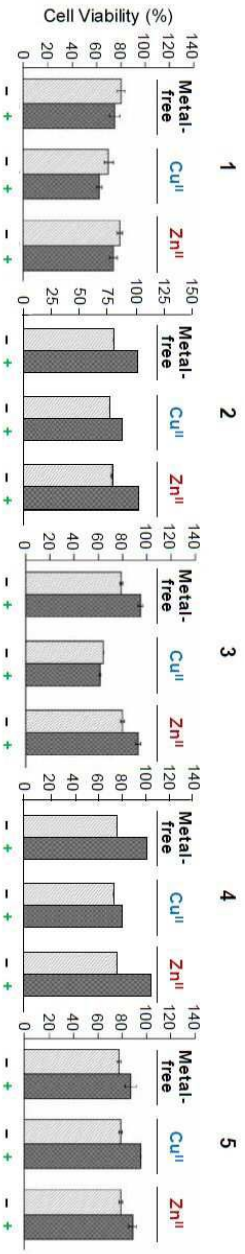
도면2


Metal-free Aβ 40
Metal-free Aβ 42
200 nm
Cmpd
–
+
–
+
Aβ 40 + CuII
Aβ 42+ CuII
–
+
–
+
Aβ 40 + ZnII
Aβ 42+ ZnII
–
+
–
+

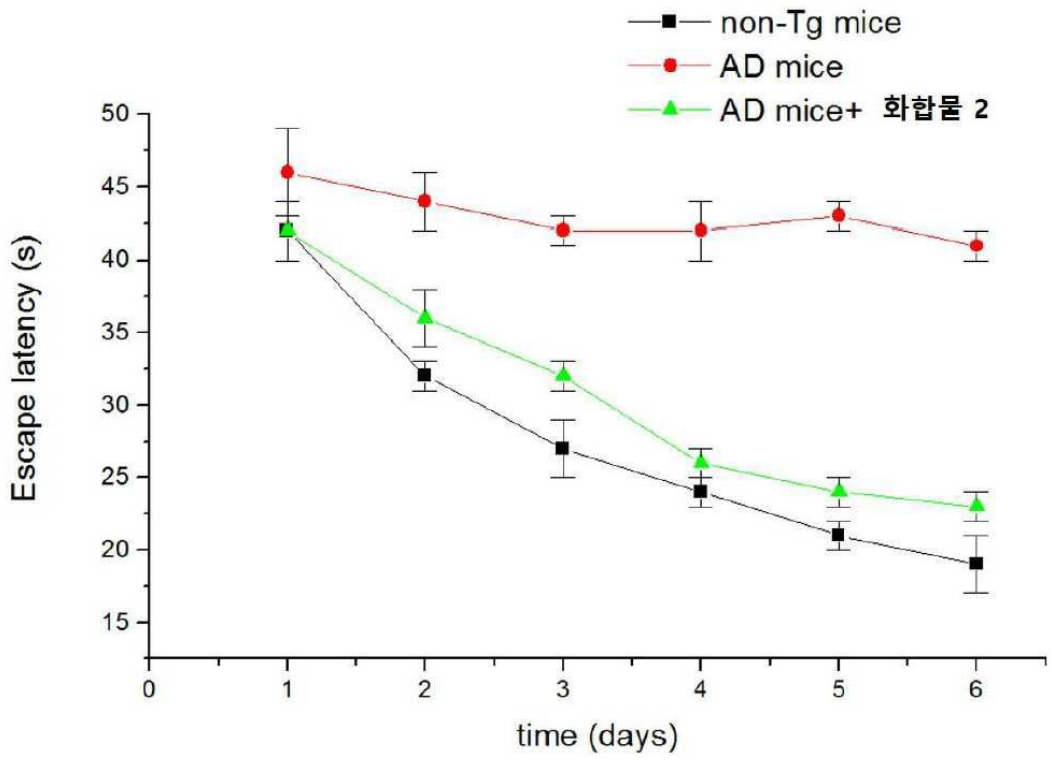
도면3


TEAC Value
0.0
1.0
2.0
3.0
Trolox
+
1
TEAC Value
0.0
1.0
2.0
3.0
Trolox
+
2
TEAC Value
0.0
1.0
2.0
3.0
Trolox
+
3
TEAC Value
0.0
1.0
2.0
3.0
Trolox
+
4
TEAC Value
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
Trolox
+
5

도면4



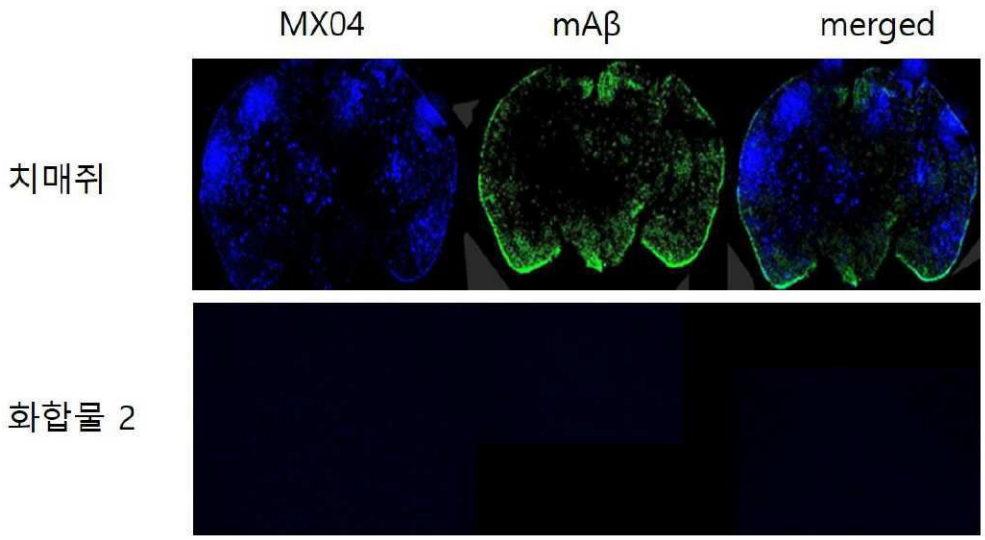
도면5


non-Tg mice
AD mice
AD mice+ 화합물 2
Escape latency (s)
50
45
40
35
30
25
20
15
0
1
2
3
4
5
6
time (days)

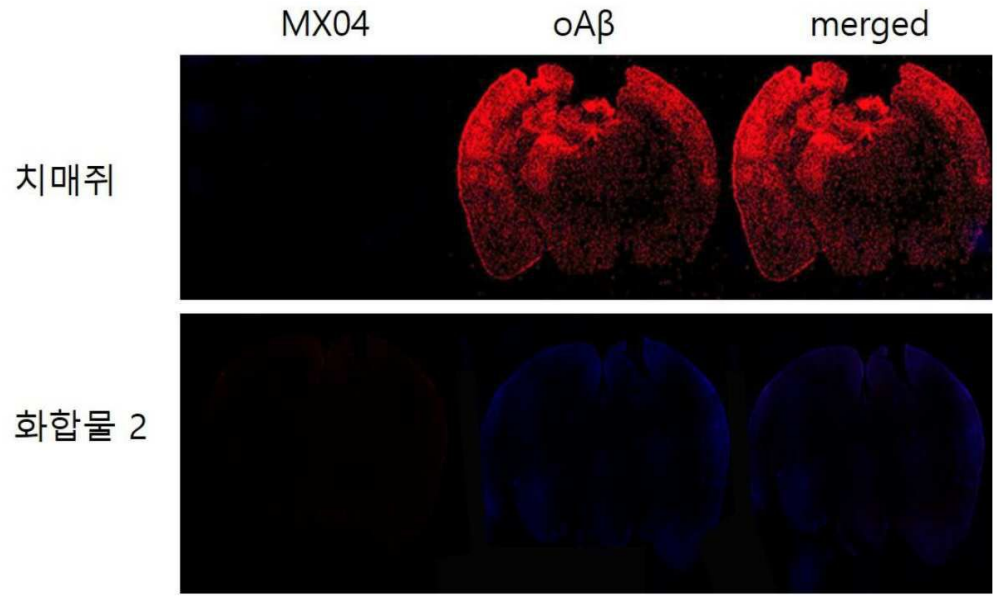
도면6


정상군
치매쥐
치매쥐/화합물 2
뇌전반부
뇌종단부

도면7



도면8



도면9

