



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0038225
(43) 공개일자 2018년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/136 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/167 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/136 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0129061
(22) 출원일자 2016년10월06일
심사청구일자 2018년02월13일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
임미희
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과
학기술원
김정범
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과
학기술원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 9 항

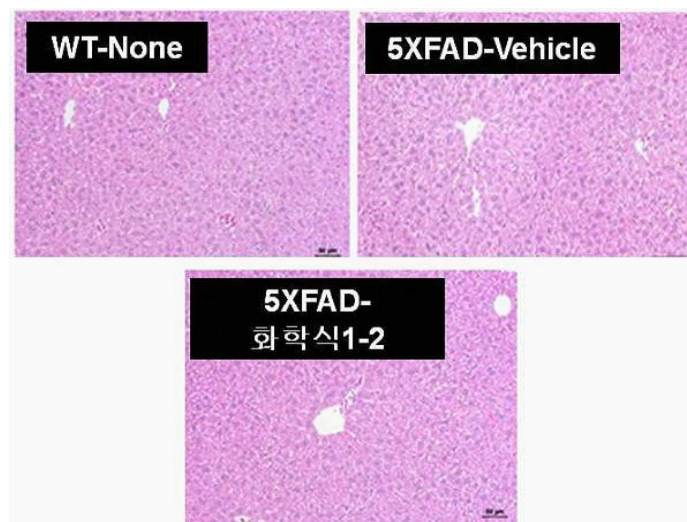
(54) 발명의 명칭 **디아민 유도체를 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치
료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 약제학적 조성물 또는 식품 조성물은 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 개선 또는 예방에 효과적이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/167 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자

이주영

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 아산생명과학
 연구원 의생명연구소 (풍납동)

정수월

울산광역시 남구 대공원로99번길 19, 101동 101호
 (옥동, 울산 옥동 대공원 한신희플러스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711035883
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인연구지원
 연구과제명 알츠하이머 질환에서 금속-아밀로이드 착물들을 연구할 수 있는 화학도구 개발
 기 여 율 70/100
 주관기관 울산과학기술원
 연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345250334
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 글로벌연구 네트워크지원
 연구과제명 이상 접힌 단백질을 타깃할 수 있는 저분자 화합물의 다각적 연구
 기 여 율 30/100
 주관기관 울산과학기술원
 연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

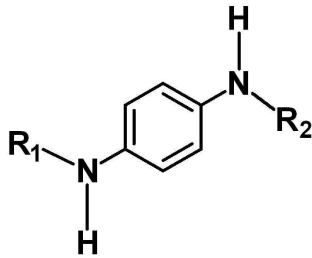
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



화학식 1에 있어서,

R_1 및 R_2 는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소; $-C(=O)-(C_1-C_4\text{알킬})$; 또는 $-C(=O)-O-(C_1-C_4\text{알킬})$ 이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

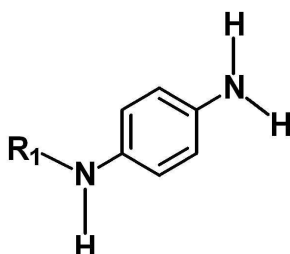
상기 R_1 및 R_2 중 적어도 하나는 수소인 것인 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

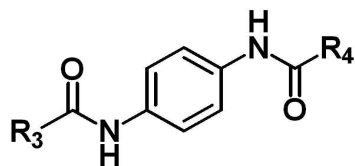
제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 것인 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 2]



[화학식 3]



화학식 2 및 3에 있어서,

R₁은 수소; -C(=O)-(C₁-C₄알킬); 또는 -C(=O)-O-(C₁-C₄알킬)이고,

R₃ 및 R₄는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 C₁-C₄알킬이다.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 하기 화학식 1-1 내지 1-6 중 어느 하나로 표시되는 것인 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

화학식 1-1	화학식 1-2	화학식 1-3
화학식 1-4	화학식 1-5	화학식 1-6

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 디아민 유도체의 약제학적으로 허용가능한 염은 염산염인 것인 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

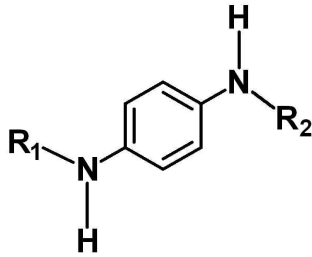
제1항에 있어서,

상기 신경 손상은 외상성 뇌 손상 또는 척수 손상인 것인 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



화학식 1에 있어서,

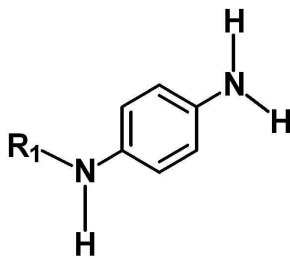
R_1 및 R_2 는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소; $-C(=O)-(C_1-C_4\text{알킬})$; 또는 $-C(=O)-O-(C_1-C_4\text{알킬})$ 이다.

청구항 8

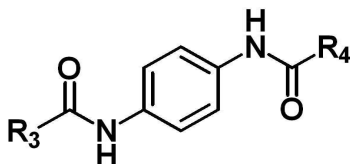
제7항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 것인 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

[화학식 2]



[화학식 3]



화학식 2 및 3에 있어서,

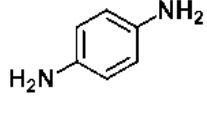
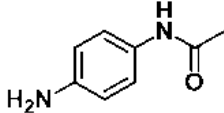
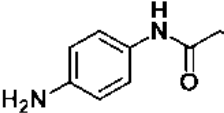
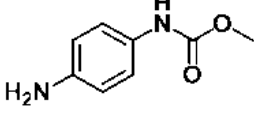
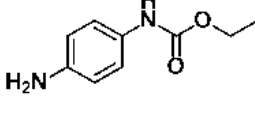
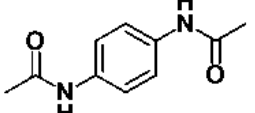
R_1 은 수소; $-C(=O)-(C_1-C_4\text{알킬})$; 또는 $-C(=O)-O-(C_1-C_4\text{알킬})$ 이고,

R_3 및 R_4 는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 $C_1-C_4\text{알킬}$ 이다.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 하기 화학식 1-1 내지 1-6 중 어느 하나로 표시되는 것인 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

화학식 1-1	화학식 1-2	화학식 1-3
		
화학식 1-4	화학식 1-5	화학식 1-6
		

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 성체 포유동물 중추신경계(CNS) 뉴런의 축삭(axon)은 손상 후 재생하는 능력이 매우 제한되는 반면, 말초신경계(PNS)의 축삭은 빠르게 재생하는 것으로 알려져 있다. CNS 뉴런의 제한된 재생 능력은 부분적으로는 CNS 축삭의 고유한 특성이지만, 또한 허용되지 않는 환경으로 인한 것이기도 하다. CNS 수초는 신경돌기 성장의 억제 기능의 유일한 원인은 아니지만, 축삭 성장을 활발하게 차단하고, 따라서 재생에 대한 중요한 장벽을 구성하는 수많은 억제성 분자를 함유한다.

[0003] 뇌졸중은 뇌로의 정상적 혈류가 손상되고 뇌가 너무 많은 또는 너무 적은 혈액을 받아들인 경우 일어나는 뇌혈관 질환으로서, 뇌졸중 후 기능적인 회복은 뇌 혈관형성 및 신경형성을 포함하는, 손상된 뇌의 리모델링과 관련될 수 있다. 뇌 동맥의 갑작스런 폐색은 심각한 신경학적 장애를 유도하는 한편, 다발 경화증으로부터 축삭(axon)의 탈미엘린화(demyelination)는 신경학적 기능의 서서히 퍼지고 고통스러운 장애를 유발한다. 따라서, 뇌졸중 치료에 있어서 축삭 형성력 및 신경교세포 생성을 유도하고 신경 손상 후 기능적인 회복을 촉진하는 방법은 아주 중요하다.

[0004] 척수손상은 주로 외상으로 인한 척추의 변위에 의하여 척수가 압박되면서 발생한다. 기계적인 일차적인 손상과 함께 손상 즉시 세포괴사(necrosis)가 일어나고 서행적으로 일어나는 세포자멸사(apoptosis)에 의해 회백질의 신경 세포와 백질의 회돌기교세포의 세포사멸을 유발하게 되고 축삭의 미엘린제거(demyelination)를 일으켜 궁극적으로 영구적인 기능장애를 발생하게 된다. 그 병태생리학적 분석을 보면 척수 손상 이후 손상 부위에 초기 다량으로 유리되는 글루타메이트(glutamate)에 의한 흥분세포독성, 활성산소(ROS)에 의한 산화적 스트레스, ATP 고갈(depletion), 무산소상태(anaerobic condition) 등에 의한 허혈손상, 그리고 TNF- α , IL-1 β 등과 같은 염증유발 사이토카인(proinflammatory cytokines)이나 iNOS 등과 같은 염증성 매개자(inflammatory mediators)에 의한 염증반응 등이 세포사멸의 주요 원인으로 알려져 있다. 그 중에서도 염증반응은 병변 초기뿐만 아니라 장 시기에 걸쳐 지속되며 특히 서행적으로 일어나는 세포 사멸이나 축삭 퇴화에서의 소교세포에 의한 염증반응은 척수 손상뿐만 아니라 대부분의 신경 질환에서 공통적으로 나타나는 병리학적 특징으로, 이의 조절은 신경계 질환의 확장을 막는데 중요하다고 알려져 있다.

[0005] 한편, 지금까지 알려진 신경성장인자를 신경질환 치료에 이용하는 방법으로는 줄기세포에 직접 처리하여 이식하거나 유전자 전달 벡터로 바이러스를 이용하여 치료 유전자를 전달하는 유전자 치료 방법이 공지되었다. 예를 들어, 한국특허공개공보 제2007-0060721호에는 재조합 아데노바이러스(recombinant adenovirus)는 E1B 부위가 삭제된 복제결손 바이러스 매개체(replication defective viral vector)로써 최근 신경계 질환에 치료 유전자의 주입으로서 질환부위에 대한 치료 효과를 거두기 위해 연구된 바 있으며, 이를 이용하여 신경손상 질환의 예방

및 치료에 유용하다는 것이 개시되어 있다.

[0006] 그러나, 동물실험에서의 효과가 입증됨에도 불구하고 현재까지 연구되어 온 신경손상의 유전자 치료는 임상적으로 획기적인 치료효과를 보여주지 못하였으며, 바이러스를 이용한 유전자 전달기술은 유전자 전달 효율이 비교적 높음에도 불구하고 바이러스 벡터의 안전성 문제로 인하여 임상적용이 매우 어려운 상태이다. 추가로, 유전자 치료 방법은 그 물질의 반복 생산 공정이 어려우며 고가의 비용이 필요하다는 단점이 있다. 또한, 기존의 비바이러스 유전자 치료법은 유전자가 봉입되어 있는 고분자를 세포 내로 전달하는 수송과정 및 효율적인 유전자 전달의 문제가 발생하여 임상에 적용하기 어려움이 있다.

[0007] 따라서, 본 발명은 유전자 치료로 신경 세포의 손상이나 뇌졸중의 치료하는 문제점을 극복하기 위하여 디아민 유도체를 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병을 예방 또는 치료하는데 디아민 유도체를 사용함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 이하, 본 명세서에 대하여 더욱 상세하게 설명한다.

[0012] 본 명세서에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0013] 본 명세서에서 상기 "예방"이란 상기 약제학적 조성물의 투여로 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 상기 "치료"란 상기 약제학적 조성물의 투여로 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병에 따른 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0014] 본 발명의 상기 뇌졸중(stroke 또는 cerebrovascular accident)은 흔히 중풍이라고 하며, 뇌에 혈액을 공급하고 있는 혈관이 막히거나 터져서 손상 받은 부위의 뇌세포가 죽게 되어 그에 따른 의식소실, 언어장애, 반신마비 등 신체장애가 나타나는 신경학적 증상이다. 본 명세서에서 상기 뇌졸중은 뇌혈관이 막히는 허혈성뇌졸중 (뇌경색)과 뇌혈관이 터지는 출혈성뇌졸중 (뇌출혈)을 포함한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 신경 세포 손상은 외상성 뇌 손상 또는 척수 손상을 의미할 수 있다.

[0016] 본 발명의 상기 척수 손상(spinal cord injury; SCI)에는 외상성 척수 손상 또는 비외상성 척수 손상을 포함한다. 상기 외상성 손상에는 굴곡손상, 수직압박손상, 파신전손상, 굴곡회전손상 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 외상성 척수손상은 교통사고, 추락, 스포츠손상, 폭행 등으로 인한 것일 수 있다. 상기 비외상성 손상에는 혈관기능장애, 관절염, 퇴행성관절질환, 척추아탈구, 척수염, 횡단성 척수염, 척수공동증, 또는 척수 결핵 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 상기 외상성 뇌 손상은 (Traumatic brain injury, TBI)은, 갑작스러운 외상으로 뇌가 손상을 입을 때 발생한다. TBI는 머리가 물체에 갑작스럽고 격렬하게 부딪히거나, 물체가 두개골을 뚫고 뇌조직으로 들어갈 때 발생할 수 있다. TBI의 증상은 뇌에 대한 손상의 정도에 따라, 경도 (mild), 중등도 (moderate), 또는 중증 (severe)일 수 있다. 경도 TBI를 갖는 사람은 의식을 유지할 수 있거나, 수 초 또는 수 분 동안 의식의 상실을 경험할 수 있다. 경도 TBI의 다른 증상은 두통, 혼돈, 현기증 (lightheadedness), 어지러움 (dizziness), 흐릿한 시야 또는 눈의 피로, 귀 울림, 쓴 맛 (bad taste in the mouth), 피로 또는 졸음증, 수면 패턴의 변화, 행동 또는 기분 변화, 및 기억, 집중, 주의, 또는 사고의 곤란을 포함한다. 중등도 또는 중증 TBI를 갖는 사람은

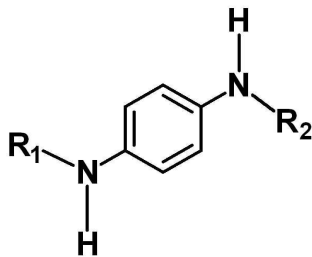
이와 동일한 증상을 나타낼 수 있다. 또한 악화되거나 사라지지 않는 두통, 반복된 구토 또는 오심, 경련 또는 발작, 잠에서 깨어날 수 없음, 한쪽 또는 양쪽 동공의 확장, 불명료 언어, 사지의 약화 또는 마비, 조정의 상실, 및 증가된 혼돈, 안절부절, 또는 초조함을 가질 수 있다.

[0018] 본 발명의 파킨슨병(Parkinson's disease)은 중뇌의 흑색질에 있는 도파민성 신경세포들이 선택적으로 소실됨으로써 운동 기능 조직에 관여하는 기저핵의 기능 이상을 초래하여 지속적인 떨림, 경직, 서동, 자세 불안정 등의 운동 기능의 장애를 유발하는 병이다.

[0019] 본 발명의 루게릭병(Lou Gehrig's disease)은 근위축성측삭경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS)라고도 불리며, 상위 운동 뉴런(UMN) 및 하위 운동 뉴런(LMN) 모두의 축퇴를 동반하는 질병이다.

[0020] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 화학식 1에 있어서,

[0024] 상기 R₁ 및 R₂는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소; -C(=O)-(C₁-C₄알킬); 또는 -C(=O)-O-(C₁-C₄알킬)이다.

[0025] 본 발명의 하나의 실시상태에 있어서, 상기 R₁ 및 R₂ 중 적어도 하나는 수소이다.

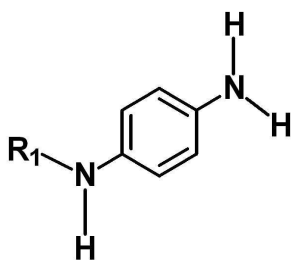
[0026] 본 발명의 또 다른 실시상태에 있어서, 상기 R₁ 및 R₂는 모두 수소이다.

[0027] 본 발명의 하나의 실시상태에 있어서, R₁ 및 R₂ 중 하나는 수소이고, 다른 하나는 -C(=O)-(C₁-C₄알킬); 또는 -C(=O)-O-(C₁-C₄알킬)이다.

[0028] 본 발명의 또 하나의 실시상태에 있어서, R₁ 및 R₂ 중 하나는 -C(=O)-(C₁-C₄알킬)이고, 다른 하나는 -C(=O)-(C₁-C₄알킬)이다.

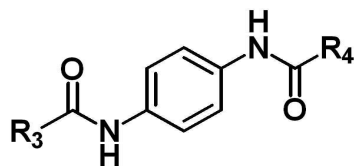
[0029] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 하기 화학식 2 또는 하기 화학식 3으로 표시된다.

[0030] [화학식 2]



[0031]

[0032] [화학식 3]



[0033]

[0034] 화학식 2 및 3에 있어서,

[0035] R₁은 수소; -C(=O)-(C₁-C₄알킬); 또는 -C(=O)-O-(C₁-C₄알킬)이고,

[0036] R₃ 및 R₄는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 C₁-C₄알킬이다.

[0037] 본 명세서에서 "알킬"은 직쇄 또는 분지쇄의 일가 탄화수소를 지칭할 수 있으며, 알킬의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필 및 부틸을 포함할 수 있으며, 본 발명에서는 메틸, 에틸이 바람직할 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 하기 화학식 1-1 내지 1-6 중 어느 하나로 표시된다.

화학식 1-1	화학식 1-2	화학식 1-3
화학식 1-4	화학식 1-5	화학식 1-6

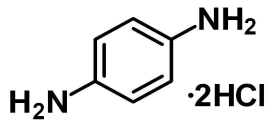
[0039]

[0040] 본 발명에서 디아민 유도체의 입체이성질체(stereoisomer)는 광학이성질체, 라세미체, 라세믹 혼합물, 단일의 이네티오머, 부분입체이성체 혼합물 및 각각의 부분입체이성체로서 존재할 수 있다. 이러한 이성질체는 종래기술, 예를 들어 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 관 크로마토그래피 또는 HPLC 등의 분할에 의해 분리가 가능하다. 또는, 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체 각각의 입체이성질체는 공지된 배열의 광학적으로 순수한 출발 물질 및/또는 시약을 사용하여 입체 특이적으로 합성할 수 있다.

[0041] 본 발명에서, 약제학적으로 허용가능한 염은 의약품계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 칼슘, 포타슘, 소듐 및 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염, 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산 및 황산 등으로 제조된 무기산염; 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 하이드로 아이오딕산 등으로 제조된 유기산염; 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 및 나프탈렌설폰산 등으로 제조된 설폰산염; 글리신, 아르기닌, 라이신 등으로 제조된 아미노산염; 및 트리메틸아민, 트라이에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민염 등이 있으나, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다.

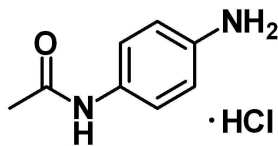
[0042] 본 발명에 있어서 바람직한 염은 염산염, 인산염, 황산염, 트라이플루오로아세트산염, 시트르산염, 브롬산염, 말레인산염 또는 타르타르산염을 포함하며, 본원 발명의 화합물의 바람직한 염은 하기 화학식 1-7 또는 1-8로 표시되는 염산염을 들 수 있다.

[0043] [화학식 1-7]



[0044]

[0045] [화학식 1-8]



[0046]

[0047] 일반적으로 활성 산소는 신경 세포의 손상, 퇴행의 주요 원인 중 하나라는 것이 공지되어 있다. 활성 산소란 호흡 과정에서 체내로 들어간 산소가 산화 과정에 이용되면서 여러 대사과정에서 생성되어, 생체 조직을 공격하고, 세포를 손상시키는 산화력이 강한 산소를 의미한다. 이러한 활성 산소는 생체 세포 내 DNA, 세포 구성 단백질, 지질 등에 비가역적인 손상을 준다. 특히 뇌세포에서 활성 산소가 다량 생성되면 그로 인한 산화적 스트레스가 세포 내 미토콘드리아 구조와 기능에 변화를 일으킴으로써, 뇌졸중, 신경 세포의 손상, 파킨슨병, 루게릭병 등의 원인이 될 수 있다.

[0048] 본 발명의 디아민 유도체는 항산화 효과를 가지고 있어, 별도의 항산화물의 처리 없이도 신경 세포에 영향을 주는 산화적 스트레스로 인하여 신경 세포 사멸을 억제하여 신경 세포 손상이나, 신경 퇴행을 예방하고, 개선 시키는 데에 우수한 효과를 갖는다.

[0049] 또한, 최근에는 염증 반응이 신경의 손상, 퇴행을 유발하는 주요 기전의 하나라는 사실이 밝혀지고 있다. 중추 신경계에 존재하는 면역세포인 소신경교세포는 다양한 외인성, 내인성 물질로 인해 활성화될 수 있으며, 활성화된 소신경교세포는 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-1 β , 일산화질소, 프로스타글란딘, 초과산화물 등의 물질을 생산, 방출한다. 이러한 물질들의 생성은 단기적으로는 면역반응을 유발하지만, 그 과도한 생산이나 지속적인 생산은 근접한 신경세포들의 사멸을 유도하여 결국 신경 세포의 손상이나, 신경 퇴행을 유발하는 것이다. 또 사멸 중인 신경세포가 방출하는 물질들이 소신경교세포의 활성을 다시 유발하게 되므로, 신경 세포의 손상이나 퇴행이 악화될 수 있다.

[0050] 소신경교세포(microglia)는 중추신경계에서 일차적인 면역 기능을 수행하는 세포로서, 가늘고 긴 가지와 얇은 세포체의 모양을 유지하고 있다가 외부에서 유입되거나 내부에서 발생되는 독소들이 존재하게 되면 이들 독소로부터 신경 세포를 보호하기 위해 굵고 짧은 가지와 뚱뚱한 세포체를 가지는 활성화된 모양으로 변화하게 된다.

[0051] 활성화된 소신경교세포는 정상 상태의 소신경교세포와는 달리 포식작용을 활발히 하고, 세포증식을 하며, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 등과 같은 사이토카인, 케모카인, iNOS(inducible nitric oxide synthase), COX-2(cyclooxygenase-2) 등의 유전자를 발현시켜 염증매개물질들을 생성한다.

[0052] 소신경교세포의 활성화는 손상된 세포를 제거하고 외부에서 침입하는 박테리아나 바이러스로부터 신경세포를 보호하는 일면이 있으나 iNOS에 의해 생성되는 일산화질소와 COX-2에 의해 생성되는 프로스타글란딘들, TNF- α 등은 신경세포에도 독성을 나타내기 때문에 결과적으로 소신경교세포의 활성화는 신경세포의 손상을 악화시키게 된다.

[0053] 도 7은 염증인자인 인터루킨-1베타 (IL-1 β), 인터루킨-6 및 종양괴사인자 알파(TNF- α)의 활성을 나타낸 도이다. 상기 도면을 검토하여 보면, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 경우에는 염증 인자들의 활성을 감소시키는 효과를 갖는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 신경 세포 손상이나, 신경 퇴행을 예방하고, 개선 시키는 데에 우수한 효과를 갖는다.

[0054] 나아가, 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물은 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료 용도로 사용되며, 상기의 질환은 신경 세포의 사멸 또는 손상과 관련되어 나타나는 질환이다.

[0055] 예컨대, 흑질에 있는 도파민 작용성 신경원의 손실은 파킨슨병의 원인이고, 신경 세포 손상 예컨대, 척수 손상을 입은 환자의 경우 막대한 신경 세포의 사멸이 관찰된다.

- [0056] 상기와 같은 질환의 치료 방법으로 신경 세포의 사멸을 억제할 수 있는 약물을 사용하여 왔었으며, 최근에는 신경 돌기의 성장을 촉진하여 신경 세포를 재생하는 방법이 연구되고 있다.
- [0057] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물은 전술한 바와 같이, 항산화 효과 및 항염증 반응을 이용하여 신경 세포의 손상이나 사멸을 억제함과 동시에 수상 돌기의 성장을 촉진하여 신경 세포의 발현을 증진시키는 효과를 갖는다.
- [0058] 도 4 및 도 6은 각각 대뇌피질층 II/III과 해마 CA1 영역(CA1 of hippocampus)에서의 수상 돌기의 A0 및 BS를 분석한 것을 나타낸 도이다. 상기의 도면의 결과를 검토하면, 본 발명에 따른 디아민 유도체는 생체 내에서 수상 돌기의 발현을 촉진하는 것을 확인할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 약제학적 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약제학적 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 예컨대, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 있으나, 이를 한정하지 않는다. 추가로, 상기 약제학적 조성물은 단독 사용하거나 기존에 사용된 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병에 따른 질환의 예방 또는 치료 활성을 가지는 물질을 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하고 경구 또는 비경구용의 인체 또는 수의용으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물을 제제화하는 경우 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제를 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수용용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.
- [0062] 본 발명의 상기 약제학적 조성물은 개체에 투여하여 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병을 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어, "개체"는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병에 따른 질환 또는 이의 직, 간접적 원인에 의해 유발된 질환을 가지고 있으며, 본 발명의 상기 약제학적 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 말, 양, 돼지, 염소, 개 등의 포유동물을 의미하나, 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0063] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 본 발명의 약제학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있도록 하는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 체중, 성별, 연령, 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될

수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0065] 본 발명의 상기 약제학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 외에 동일 또는 유사한 약효를 나타내는 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0067] 본 발명에 사용되는 "치료학적으로 유효한 양"이라는 용어는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료에 유효한 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 양을 나타낸다.

[0068] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 인간을 포함하는 포유류에 투여하여 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0069] 상기 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료하는 방법은 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 투여함으로써 징후의 발현 전에 질병 그 자체를 다룰 뿐만 아니라, 이의 징후를 저해하거나 피하는 것을 또한 포함한다. 질환의 관리에 있어서, 특정 활성 성분의 예방적 또는 치료학적 용량은 질병 또는 상태의 본성(nature)과 심각도, 그리고 활성 성분이 투여되는 경로에 따라 다양할 것이다. 용량 및 용량의 빈도는 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 다양할 것이다. 적합한 용량 용법은 이러한 인자를 당연히 고려하는 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 쉽게 선택될 수 있다.

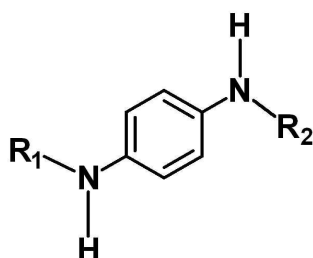
[0070] 또한, 본 발명의 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료하는 방법은 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물과 함께 질환 치료에 도움이 되는 추가적인 활성 제제의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 더 포함할 수 있으며, 추가적인 활성 제제는 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물과 함께 시너지 효과 또는 보조적 효과를 나타낼 수 있다.

[0071] 본 발명은 또한 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 치료용 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물의 용도를 제공하고자 한다. 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체는 허용되는 보조제, 희석제, 담체 등을 혼합할 수 있으며, 기타 활성제제와 함께 복합 제제로 제조되어 활성 성분들의 상승 작용을 가질 수 있다.

[0072] 본 발명의 용도, 조성물, 치료 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

[0073] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0074] [화학식 1]



[0075]

[0076] 화학식 1에 있어서,

[0077] 상기 R₁ 및 R₂는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소; -C(=O)-(C₁-C₄알킬); 또는 -C(=O)-O-(C₁-C₄알

킬)이다.

- [0078] 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 전술한 약제학적 조성물에서 설명한 바가 모두 적용될 수 있다.
- [0079] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0080] 본 명세서에서 상기 "식품 조성물"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미한다.
- [0081] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물에 첨가할 수 있는 식품의 예로는 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0082] 본 발명에 따른 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 항산화 효과가 있어, 신경 세포에 영향을 주는 산화적 스트레스로 인한 신경 세포의 사멸을 억제할 수 있고, 염증 인자의 활성을 억제하여 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료에 효과적이다.
- [0083] 또한, 본 발명에 따른 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 수상 돌기의 성장을 촉진시켜, 신경 세포의 발현을 증진시킬 수 있어, 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료에 효과적이다.

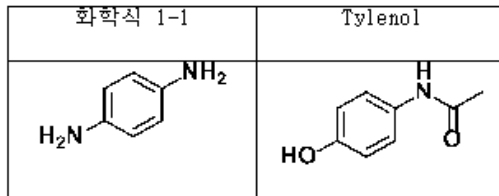
도면의 간단한 설명

- [0084] 도 1은 약물 비처리군(WT-None), vehicle 투여군(5xFAD- vehicle) 및 화학식 1-2의 화합물 투여군(5xFAD-화학식 1-2)의 간조직을 현미경(40 배율)으로 촬영한 도이다.
- 도 2는 약물 비처리군(WT-None), vehicle 투여군(5xFAD-vehicle) 및 화학식 1-2의 화합물 투여군(5xFAD-화학식 1-2)의 AST(Aspartate Aminotransferase) 및 ALT (Alanine Aminotransferase)를 나타낸 도이다.
- 도 3은 대뇌피질층 II/III의 수상 돌기와 대뇌피질층 II/III의 수상 돌기를 대조군 (DMSO) 및 화학식 1-1로 4주간 처리한 후 광학 현미경을 이용하여 100X 배율로 측정된 도이다.
- 도 4는 대뇌피질층 II/III의 수상 돌기의 AO 및 BS를 분석한 것을 나타낸 도이다.
- 도 5는 해마 CA1 영역(CA1 of hippocampus)에서의 수상 돌기를 대조군 (DMSO) 및 화학식 1-1로 4주간 처리한 후 광학 현미경을 이용하여 100X 배율로 측정된 도이다.
- 도 6은 해마 CA1 영역(CA1 of hippocampus)에서의 수상 돌기의 AO 및 BS를 분석한 것을 나타낸 도이다.
- 도 7은 염증인자인 인터루킨-1베타 (IL-1 β), 인터루킨-6 및 종양괴사인자 알파(TNF- α)의 활성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0085] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 기술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

- [0087] **제조예. 디아민 유도체의 제조**
- [0088] **제조예 1. 화학식 1-1의 합성**
- [0089] 4-나이트로아닐린을 에탄올에 용해시킨 용액에 팔라듐/탄소 촉매를 첨가하고, 하루밤동안 환류시키며 교반하였다. 반응물을 셀라이트에 통과시켜 여과한 후 관-크로마토그래피를 이용해 화합물을 분리하였다. 약 95 %의 수득물로 흰색 가루를 얻었다.
- [0091] **제조예 2. 화학식 1-2의 합성**
- [0092] 4-나이트로아세트아닐라이드를 메탄올에 용해시킨 용액에 팔라듐/탄소 촉매를 첨가하고, 8시간동안 환류시키며 교반하였다. 반응물을 셀라이트에 통과시켜 여과한 후 관-크로마토그래피를 이용해 화합물을 분리하였다. 약 90 %의 수득물로 갈색 가루를 얻었다.
- [0094] **실시예 1. 항산화 능력 평가**
- [0095] 화학식 1-1의 화합물 및 화학식 1-1의 화합물과 구조적으로 유사한 타이레놀의 항산화 능력을 평가하기 위하여, 트롤록스 동등물 산화방지제 수용력(Trolox equivalent antioxidant capacity: TEAC) 분석을 수행하였다.
- [0096] 화합물의 항산화 능력은 (a) 에탄올 또는 (b) M17 세포 용해물에서 TEAC 분석으로 수행되었다.
- [0097] (a) 블루 ABTS 양이온 라디칼($ABTS^{\cdot+}$; $ABTS = 2,2'$ -아지노 비스 (3- 에틸벤조싸이아졸린-6-술폰산)디 암모늄 염; Sigma)을 생성하기 위하여, $ABTS$ (7.0 mM, Sigma)를 과황화칼륨(2.5 mM)을 물에 용해시키고, 실온에서 어두운 곳에서 16 시간 동안 배양하였다. 수득된 $ABTS$ 양이온 라디칼을 에탄올에 희석시키고, 734 nm 에서 흡광도를 측정하였다. $ABTS$ 양이온 라디칼 용액(200L)을 96 well plate에 첨가하고, plate reader에서 5분 동안 실온에서 배양하였다. 화합물 또는 트롤록스(에탄올에 용해시킨 6-하이드록시-2,5,7,8-테트라메틸-크로만-2-카르복실산)를 $ABTS$ 양이온 라디칼 용액과 함께 10분동안 실온에서 배양하였다.
- [0098] 억제율(억제율 (%)) = $100 \times (A_0 - A) / A_0$ 은 734 nm에서 흡광도로 계산되었고, 리간드 농도의 함수로서 플롯팅하였다. 화합물의 TEAC 값은 트롤 록스와 화합물의 기울기의 비율로 계산하였으며, 측정은 3중으로 수행하였다.
- [0099] (B) 세포용해물을 사용한 항산화 분석을 하기 위하여, 세포를 6 well plate에 시딩하고, 약 80% 내지 90%를 성장시켰다. 세포 용해물은 종래의 방법으로 변경(modifications)시켰다.
- [0100] M17 cells을 차가운 PBS (pH 7.4, GIBCO)로 한번 세척하고, 부드럽게 피펫으로 부착세포(adherent cells)을 수거하였다. 세포 펠릿은 원심분리(2,000 g으로 4 ℃에서 10분)로 생성하였고, 펠릿을 얼음 위에서 2 ml의 차가운 분석 버퍼(5 mM 인산 칼륨(potassium phosphate), pH 7.4; 0.9% 염화 나트륨(NaCl); 0.1% 글루코스(glucose)) 내에서 초음파 처리(5 초 펄스, 펄스 사이에 20초 간격으로 3회 수행) 하였다. 세포 용해물을 5,000 g으로 10분 동안 4 ℃에서 원심분리 하였다.
- [0101] 상등액을 제거하고, 사용할 때까지 얼음 상에 보관하였다. 96 well plates의 표준 및 샘플은, 세포 용해물의 상등액(10L)을 위하여 화합물, 메트미오글로빈, $ABTS$ 및 적절한 양의 과산화수소를 첨가하여 전달하였다.
- [0102] 진동기에서 상온에서 5분간 배양한 후, 750 nm 에서 흡광도를 기록하였다. 항산화제의 농도(% inhibition = $100 \times (A_0 - A) / A_0$, A_0 는 세포 용해물 상등액의 흡광도)는 흡광도로 계산하였으며, 3중으로 수행하였다.
- [0103] 상기에서 실험된 트롤록스 동등물 산화방지제 수용력(Trolox equivalent antioxidant capacity: TEAC)시험을 수행한 결과는 하기 표 1과 같다.



[0104]

표 1

[0105]

	Trolox	화학식 1-1	타이레놀
in Cell Lysates	1.00	1.11 ± 0.05	n.d.

[0106]

상기 표 1에서 n.d. 는 not determined를 의미한 것으로 항산화 능력이 측정 되지 않았음을 의미할 수 있다. 즉, 본원 발명과 유사한 타이레놀의 구조에서는 항산화 능력을 측정할 수 없었음을 확인할 수 있다.

[0107]

또한, 본원 발명의 디아민 유도체는 트롤록스와 유사한 항산화 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 이는 별도의 항산화물의 처리 없이도 신경 세포에 영향을 주는 산화적 스트레스로 인하여 신경 세포 사멸을 억제할 수 있음을 의미할 수 있다.

[0109]

실시예 2. 뇌 흡수율 평가

[0110]

실시예 2-1. 화학식 1-1, 화학식 1-2 및 화학식 1-6에 대한 뇌흡수율 평가

[0111]

화합물의 뇌 흡수율을 평가하기 위하여, CD1 수컷 쥐(Vital River Laboratory Animal Technology Co. Ltd. (Beijing, China))를 이용하였으며, 국제실험동물관리평가인증협회(AAALAC, Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)의 원칙을 준수하였다.

[0112]

화합물(10 mg/kg; 단일 투여; 멸균된 물)을 경구 위관 영양법에 의하여 투입하였다. 5 분 후까지는 혈액 150 μ L 레트로오비탈 천자(retro orbital puncture) 또는 심장 천자(cardiac puncture)를 통해 배출하고, 항응고제로 분무하여 피복된 K2EDTA 튜브에 옮겼다.

[0113]

혈액 샘플을 얼음에 넣고, 혈장 샘플 (2,000g, 5 분, 4 $^{\circ}$ C)를 원심 분리 하여 수득하였다. 즉시 채혈한 다음, CO₂ 흡입으로 쥐를 안락사시키고, 뇌 전체를 여과지상에서 건조 차가운 생리 식염수로 세정하여, 수집하고, 계량하였다. 뇌 샘플 은 즉시 3배(v/w)의 균질화 용액(PBS)으로 균질화하였다.

[0114]

혈장 샘플과 뇌 샘플에 아세토니트릴(CH₃CN; 단백질 침전물(protein precipitation))에 내부표준물질(프로프라놀롤(propranolol))을 첨가하였다. 혼합물을 2분 동안 볼텍스(vortex)시키고, 5분 동안 14,000 rpm에서 원심분리하며, 정제된 상등액은 1 ng/mL (혈장) 및 4 ng/mL (뇌)에서의 화합물의 최저 정량 한계(LLOQ, lower limit of quantitation) 값과 LC-MS/MS(UPLC/MS-MS API-5500, Framingham, MA, U.S.A.)에 의하여 화합물의 농도에 대하여 분석하였다. 상등액을 분석 전에 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0115]

화학식 1-1, 화학식 1-2 및 화학식 1-6에 대한 뇌에서의 흡수율을 측정한 결과를 표 2에 기재하였다.

표 2

[0116]

화합물	Matrix	농도 (Concentration) (ng/mL or ng/g)			평균 (Mean)	표준편차 (SD)	변동 계수 (CV(%))
		Individual					
화학식 1-1	Plasma	1611	1051	2014	1559	484	31.0
	Brain	1365	1487	2175	1676	437	26.1
	CSF	1695	2708	5282	3228	1849	57.3
화학식 1-2	Plasma	86.0	22.2	351	153	174	113.9
	Brain	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A
	CSF	129	27.9	353	170	166	97.7

화학식 1-6	Plasma	3104	2925	2310	2780	416	15.0
	Brain	212	153	161	175	32.2	18.4
	CSF	876	563	556	665	183	27.5

[0118] 실시예 2-2. 화학식 1-1, 화학식 1-2 및 화학식 1-6의 대사 산물에 대한 뇌흡수율 평가

[0119] 실시예 2-1과 동일한 방법으로, 화학식 1-1, 화학식 1-2 및 화학식 1-6의 대사 산물(metabolite)의 뇌에서의 흡수율을 측정한 결과를 표 3에 기재하였다.

표 3

[0120]

화합물	대사산물	Matrix	농도 (Concentration) (ng/mL or ng/g)			평균 (Mean)	표준편차 (SD)	변동 계수 (CV(%))
			Individual					
화학식 1-1	화학식 1-2	Plasma	1002	930	1297	1076	195	18.1
		Brain	760	881	1123	921	185	20.1
		CSF	824	1101	1479	1135	329	29.0
	화학식 1-6	Plasma	5203	5994	5479	5559	401	7.22
		Brain	721	890	711	774	101	13.0
		CSF	1002	1669	1341	1337	334	24.9
화학식 1-2	화학식 1-1	Plasma	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A
		Brain	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A
		CSF	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A
	화학식 1-6	Plasma	5980	4639	5955	5525	767	13.9
		Brain	1275	487	1230	997	443	44.4
		CSF	2725	1045	2578	2116	930	44.0
화학식 1-6	화학식 1-1	Plasma	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A
		Brain	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A
		CSF	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A
	화학식 1-2	Plasma	17.5	BQL	8.64	13.1	N/A	N/A
		Brain	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A
		CSF	BQL	BQL	BQL	BQL	N/A	N/A

[0122] 상기 표 2 및 3 중 BQL은 정량 한계 이하(below the quantifiable limit)을 의미하고, N/A는 측정 불가(not available)를 의미한다.

[0123] 상기 표 3의 결과를 보면, 본원 발명의 화학식 1-1로 표시되는 디아민 유도체는 투여 이후에 생체 내에서 화학식 1-2 및 1-6으로 표시되는 디아민 유도체의 대사물질로 변화하여 뇌 또는 척수액에 흡수되는 것을 확인할 수 있으며, 화학식 1-2로 표시되는 디아민 유도체는 투여 이후에 생체 내에서 화학식 1-6으로 표시되는 디아민 유도체의 대사물질로 변화하여 뇌 또는 척수액에 흡수되는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명의 디아민 유도체는 디아민 유도체 자체 또는 디아민 유도체의 대사 산물로서 뇌 또는 뇌척수액에 흡수되는 것을 확인할 수 있다.

[0124] 즉, 상기 표 2 및 3의 결과로 본원 발명에 따른 디아민 유도체는 뇌 또는 뇌척수액(CSF: Cerebrospinal Fluid)에 원활하게 흡수되는 것을 확인할 수 있다. 이는 본원 발명에 따른 디아민 유도체는 뇌 또는 척수액에 원활하게 흡수되어 본 발명에 따른 약학적 조성물 또는 식품 조성물이 신경 세포에 용이하게 도달할 수 있어, 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료에 적절하게 사용될 수 있음을 확인할 수 있다.

[0126] 실시예 3. 단일 투여 독성 측정

[0127] 화학식 1-1, 화학식 1-2에 대한 단일 투여 독성(Single-dose Toxicity)을 SD 쥐(SD rat), 암컷 10마리, 수컷 10마리 및 암컷 5마리와 수컷 5마리로 구성된 3군에 1일 1회 경구투여용 존데를 장착한 시링 튜브 (syring

tube)를 이용하여 위 내에 직접 화학식 1-1의 화합물 (25, 50, 100, 200, 400 mg)을 투여하고, 화학식 1-2의 화합물 2000 mg을 DMSO/PEC400/D.W. = 1/5/4에 희석하여 경구투여 하여 투여일을 1일로 설정하여, 15일까지 실시하여 반수치사량을 측정한 값(LD₅₀)을 하기 표 4에 기재하였다.

표 4

[0128]

화합물	반수치사량 (LD ₅₀ : mg/kg)
화학식 1-1	80 mg/kg
화학식 1-2	>2,000 mg/kg

[0129]

상기 반수치사량의 결과를 보면 본원 발명의 디아민 유도체는 낮은 독성으로 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 뇌졸중, 신경 세포 손상, 파킨슨병 또는 루게릭병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 식품 조성물로서 적용이 적합함을 확인할 수 있다.

[0131]

실시예 4. 간독성 실험 (Hepatotoxicity Studies)

[0132]

본원 발명의 화학식 1-2의 디아민 유도체를 2mg/kg씩 매일 한 달이상(35일) 장기간 5xFAD 동물모델 생쥐 복강으로 주사, 투여했을 때의 간독성 실험을 통하여, 본원 발명의 화합물에 대한 간독성 여부를 확인하였다.

[0133]

화학식 1-2 투여 후 5xFAD 동물모델 생쥐에서 뇌에 생기는 유익한 치료 효능 외에 간독성(hepatotoxicity) 발현 유무를 대표적인 평가 방법인 간 조직 내 병리형태 변형과 혈액 내 AST(Aspartate Aminotransferase), ALT (Alanine Aminotransferase) 함량 변화를 이용하여 조사하였다.

[0134]

도 1은 화학식 1-2의 화합물 투여군(5xFAD-화학식 1-2)을 2mg/kg씩 35일 간 5xFAD 생쥐의 복강에 매일 주사한 후 간조직을 채취하여 파라포름알데하이드 고정액으로 고정한 후 파라핀으로 고정화하여 20 μm의 절편으로 자르고 헤마톡실린(Hematoxylin)과 에오신(Eosin) (H&E) 염색하여 병리형태를 40배 현미경 촬영한 도이다.

[0135]

도 1의 결과를 보면, 대조군인 5xFAD 생쥐 vehicle 투여군(5xFAD-vehicle)의 간은 정상 생쥐인 약물 비치리군인 WT-None의 간에 비해 전혀 형태적 차이가 없어 사람 아밀로이드 단백질(human Aβ)의 과생산이나 축적은 간에 형태적 손상을 끼치지 않는 것으로 보였다.

[0136]

마찬가지로 화학식 1-2의 화합물 투여군 (5xFAD-화학식 1-2) 투여군의 간도 5xFAD 생쥐 vehicle 투여군(5xFAD-vehicle)이나 약물 비치리 정상 생쥐군(WT-None)에 비해 어떤 변형도 나타나지 않았다. 비교한 모든 군에서 간 조직의 괴사(hepatic necrosis)는 물론 간문맥(portal tracts), 섬유화(fibrosis), 또는 어떤 염증 반응(inflammation)도 관찰되지 않았으며 정상적 형태를 유지하는 것을 확인할 수 있다.

[0137]

한편 본원 발명인 화학식 1-2의 디아민 유도체가 치매 모델 생쥐에 꾸준히 투여할 때 간의 기능에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 대표적인 간기능 검사인 혈중 아스파르트산염 아미노기 전달 효소(Aspartate Aminotransferase, AST), 알라닌 아미노기 전달 효소(Alanine Aminotransferase, ALT) 함량 검사를 실시하였다.

[0138]

도 2는 약물 비치리군(WT-None), vehicle 투여군(5xFAD-vehicle) 및 화학식 1-2의 화합물 투여군(5xFAD-화학식 1-2)의 AST(Aspartate Aminotransferase) 및 ALT (Alanine Aminotransferase)를 나타낸 도이다.

[0139]

위의 각종 시험에 사용된 화학식 1-2의 화합물 투여군(5xFAD-화학식 1-2) 생쥐를 죽인 직후 간문맥에서 혈액을 채취하여 아스파르트산염 아미노기 전달 효소(Aspartate Aminotransferase, AST), 알라닌 아미노기 전달 효소(Alanine Aminotransferase, ALT)를 생화학적으로 분석하였다. 그 결과 비교 분석한 모든 실험군(WT-None, 5xFAD-vehicle, 5xFAD-화학식 1-2)에서 유의한 수치 변화를 관찰할 수 없었다.

[0140]

상기 도 1 및 도 2의 결과를 보면, 2 mg/kg 용량으로 30일 이상 복강 주사할 때 본원 발명의 화합물은 아무런 간독성이나 간 기능 이상을 초래하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0142]

실시예 5. 신경 세포의 발현 증진 효과 실험

[0143]

(1) 동물 및 약물 투여

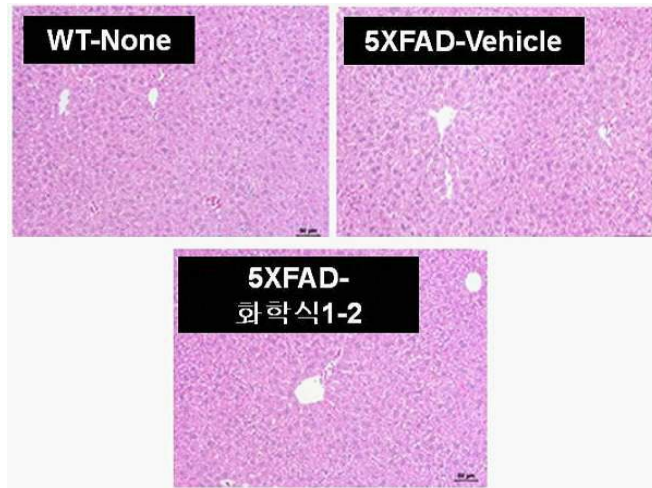
- [0144] 야생형 C57BL/6J 쥐는 효창 사이언스로 분양받아 사용하였으며, UNIST 의 동물 복지 및 사용 위원회(Animal Welfare and Use Committee)에서 승인된 프로토콜에 따라 유지하였다. 신경 세포의 돌기(spinogenesis)의 실험을 수행하기 위하여 야생쥐에게 대조군 (DMSO), 화학식 1-1 (1 mg/kg)를 4주간 매일 주사하였다.
- [0145] (2) 골지 염색과 수상 돌기의 형태학적 분석
- [0146] 뇌의 수상 돌기 밀도 및 형태를 분석하기 위하여, FD Rapid GolgiStain Kit(FD NeuroTechnologies, Ellicott City, MD, USA)를 사용하였다. 해부된 쥐의 뇌를 실온의 암실에서 2주간 A 용액 및 B 용액에 침지하고, 용액 C로 옮겨 4℃에서 24시간 동안 두었다. 뇌는 Microm HM560 (Thermo Scientific, USA) 를 이용하여 100 μ m의 두께로 슬라이스 하였다. 수지상 이미지는 BX53 (Olympus, Japan) 광학현미경을 이용하여 습득하였다. 대뇌피질층 II/III (Cortical Layers II/III) 및 해마 CA1 영역(CA1 of hippocampus)의 밀도는 Cellsens software(Olympus, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이미지는 코드화하고, 수상 돌기는 맵검 방식으로 계산되었다. 수상 돌기는 0.2 내지 2 μ m의 길이가 분석에 포함되었다. 모든 형태학적 분석은 맵검 방식으로 이루어졌다.
- [0147] (3) 실험 결과
- [0148] 화학식 1-1의 생체 내에서 수상 돌기의 복잡성(dendritic complexity)의 변경 여부를 조사하였다. 야생형 쥐에게 대조군(DMSO) 및 화학식 1-1 (1 mg/kg)를 4주간 주입하였다. 4주 후, 골지 염색과 대뇌피질층 II/III 및 해마 CA1 영역(CA1 of hippocampus)에서의 수상 돌기 밀도의 정점 경사 (apical oblique, AO) 및 기저의 샤프트(basal shaft, BS)를 분석하였다.
- [0149] 도 3은 대뇌피질층 II/III의 수상 돌기와 대뇌피질층 II/III의 수상 돌기를 대조군 (DMSO) 및 화학식 1-1로 4주간 처리한 후 광학 현미경을 이용하여 100X 배율로 측정한 도이다.
- [0150] 도 5는 해마 CA1 영역(CA1 of hippocampus)에서의 수상 돌기를 대조군 (DMSO) 및 화학식 1-1로 4주간 처리한 후 광학 현미경을 이용하여 100X 배율로 측정한 도이다.
- [0151] 도 4는 대뇌피질층 II/III의 수상 돌기의 AO 및 BS를 분석한 것을 나타낸 도이다.
- [0152] 도 6은 해마 CA1 영역(CA1 of hippocampus)에서의 수상 돌기의 AO 및 BS를 분석한 것을 나타낸 도이다.
- [0153] 도 4 및 6을 분석한 결과, 화학식 1-1을 처리한 쥐는 대뇌피질층 II/III의 수상 돌기 밀도((n=14; by 17%, *P<0.05)와 해마 CA1 영역의 수상 돌기 밀도(n=14; by 37%, **P<0.001)가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과로 본 발명에 따른 디아민 유도체는 생체 내에서 수상 돌기의 발현을 촉진하는 것을 확인할 수 있다. 즉, 상기와 같은 수상 돌기의 발현이 촉진 되는 것은 신경 세포의 발현이 촉진되는 것을 의미할 수 있으며, 이 경우 신경 세포의 손상이나 신경 퇴행을 예방하고 개선하는데 효과를 기대할 수 있다.
- [0155] **실시예 6. 항 염증 능력 실험**
- [0156] 대식세포(macrophages) 세포 주(RAW264.7 cells)에서 화학식 1-1의 화합물과 B1-Ac에 의한 항염증 효과 검증을 위한 염증성 사이토카인(cytokines: IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)을 분석하였다.
- [0157] 세포 배양액 내의 사이토카인(cytokines)의 양을 측정하기 위해 효소면역측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)를 수행하였다. 세포에 화학식 1-1 및 화학식 1-2을 각각 1M, 10M, 20M 및 50M의 농도별로 처리하고 100 ng/mL의 LPS를 처리하였다. 12시간 후 세포배양액을 수거하여 사이토카인(cytokines), IL-1 β (DY401, R&D systems), IL-6(DY406, R&D systems), 그리고 TNF- α (DY410, R&D systems)를 측정에 이용하였다.
- [0158] 각 사이토카인(cytokines)의 포획 항체(capture antibody)로 코팅(coating)된 96 well plate(32296, SPL Life Sciences)에 배양액 50 μ l씩 첨가하여 상온에서 3 시간동안 반응시켰다.
- [0159] 세척 완충액(Washing buffer)으로 3회 세척하고 100 μ l의 2차 항체 시약(biotinylated antibody reagent)을 각각의 well에 처리하여 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 3회 세척한 다음, 100 μ l의 streptavidine-HRP solution을 각각의 well에 처리하여 20분 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate (TMB) substrate(00-4201, eBioscience)를 100 μ l씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 50 μ l의 stop solution을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0160] 도 7은 염증인자인 인터루킨-1베타 (IL-1 β), 인터루킨-6 및 종양괴사인자 알파(TNF- α)의 활성을 나타낸 도이

다.

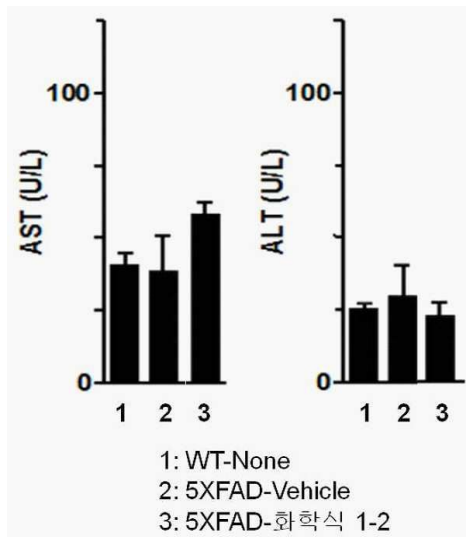
[0161] 도 7의 결과를 보면, 본 발명의 디아민 유도체를 처리한 경우에 염증 인자의 활성이 감소함을 확인할 수 있다. 상기의 결과로 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 디아민 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 경우에는 염증 인자들의 활성으로 인하여 신경 세포의 손상이나 신경 퇴행을 예방하고 개선하는데 효과를 갖는 것을 확인할 수 있다.

도면

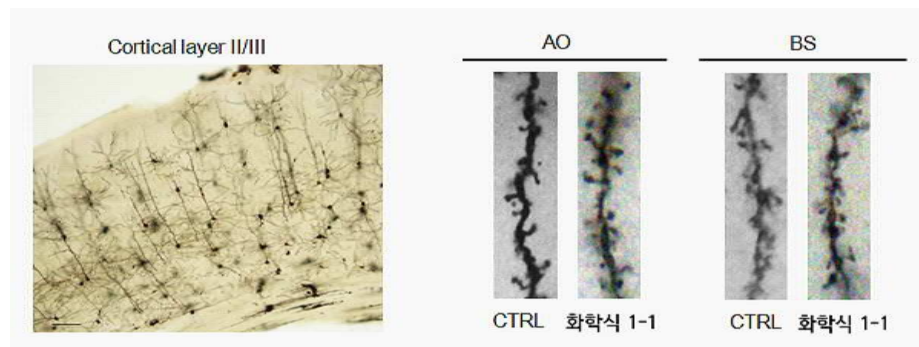
도면1



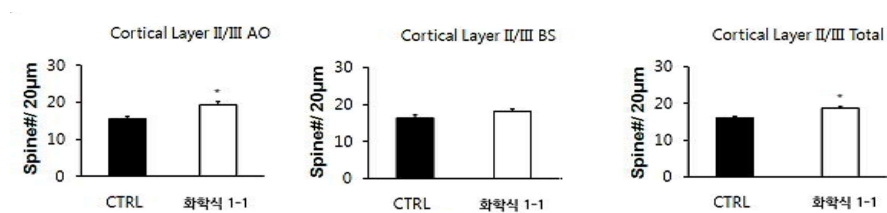
도면2



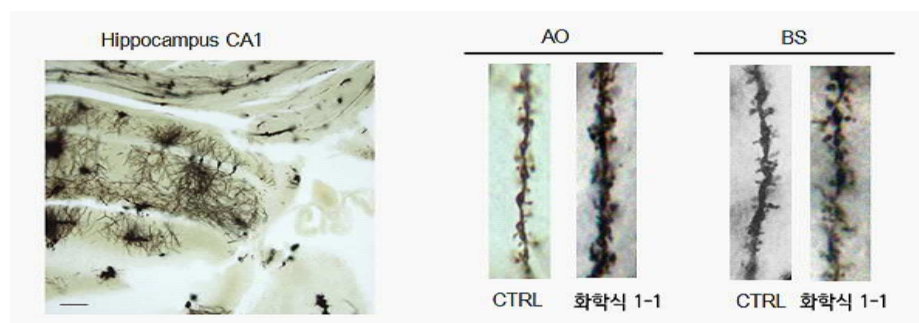
도면3



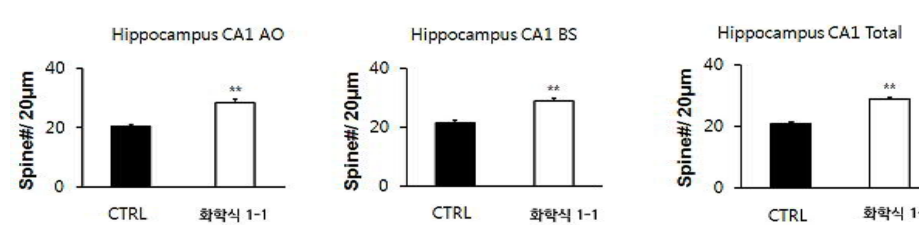
도면4



도면5



도면6



도면7

