

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2024년 4월 18일 (18.04.2024) WIPO | PCT

WO 2024/080708 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/4745 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 25/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/015548

(22) 국제출원일:

2023년 10월 10일 (10.10.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0129937 2022년 10월 11일 (11.10.2022) KR

(71) 출원인: 주식회사 알트메디칼 (ALTMEDICAL CO., LTD.) [KR/KR]; 02792 서울특별시 성북구 화랑로14길 5, H-1동 934C호, Seoul (KR). 동아대학교 산학협력단 (DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) [KR/KR]; 49315 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, Busan (KR).

(72) 발명자: 윤진호 (YUN, Jeanho); 47863 부산광역시 동래구 사직로 80, 123동 2004호, Busan (KR). 조종현 (CHO, Jong Hyun); 51003 경상남도 김해시 변화1로19번길 10, 2층, Gyeongsangnam-do (KR). 엄지현

(UM, Jee-Hyun); 49446 부산광역시 사하구 사하로 80, 204동 2402호, Busan (KR). 신동진 (SHIN, Dong Jin); 46512 부산광역시 북구 효열로220번길 23, 310동 201호, Busan (KR). 김영연 (KIM, Young Yeon); 49319 부산광역시 사하구 사리로 106, 105동 1104호, Busan (KR). 최세명 (CHOI, Se Myeong); 47581 부산광역시 연제구 대리로22번길 2, Busan (KR).

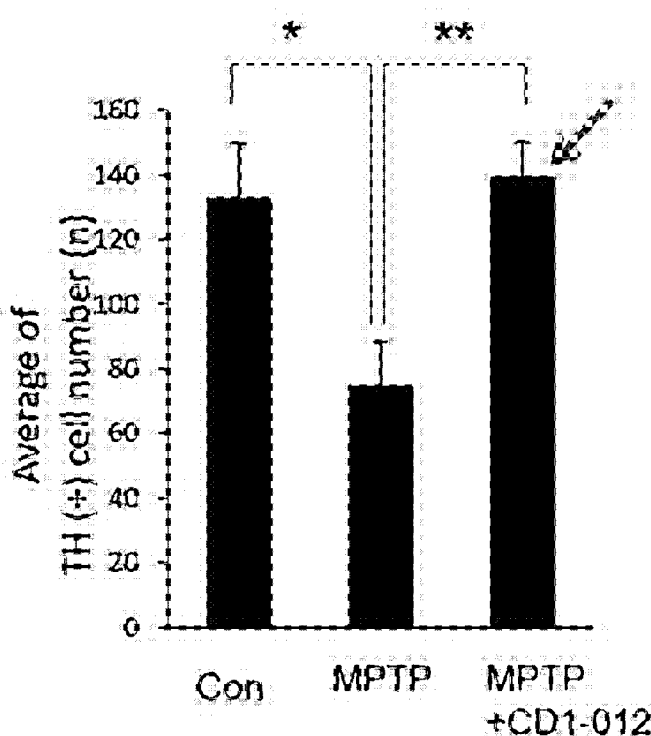
(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING ISOQUINOLINE DERIVATIVE AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE

(54) 발명의 명칭: 이소퀴놀린 유도체를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of Parkinson's disease. Leading to the present invention, an isoquinoline derivative, identified through screening based on mitophagy activation, was found to exhibit an excellent effect in promoting mitophagy and proved to be a fundamental therapeutic agent for Parkinson's disease. Specifically, the isoquinoline derivative according to the present invention not only reduces mitochondrial dysfunction closely associated with Parkinson's disease in a Parkinson's disease animal model but also ameliorates motor function impairment in the Parkinson's disease animal model. Particularly, in the Parkinson's disease animal model treated with the isoquinoline derivative according to the present invention, the demise of dopaminergic neurons, a primary cause of Parkinson's disease, was effectively inhibited. Thus, the isoquinoline derivative according to the present invention is expected to be advantageously utilized as a fundamental therapeutic agent in the field of prevention, alleviation, and/or treatment of Parkinson's disease.



KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 미토파지 활성화에 기반한 스크리닝을 통해 발굴된 이소퀴놀린 유도체가 우수한 미토파지 촉진 효과를 발휘하며, 이를 통해 파킨슨병의 근본적인 치료제로 활용될 수 있음을 확인하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체는 파킨슨병 동물모델에서 파킨슨병과 밀접한 연관이 있는 미토콘드리아 기능 이상을 개선할 뿐만 아니라, 파킨슨병 동물모델의 운동기능장애를 개선할 수 있음이 확인되었다. 특히, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체가 처리된 파킨슨병 동물모델은 파킨슨병의 주요 발병 원인인 도파민성 신경세포의 사멸이 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체는 파킨슨병의 근본적인 치료제로서 상기 질병의 예방, 개선, 및/또는 치료 분야에서 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 이소퀴놀린 유도체를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 이소퀴놀린 유도체의 파킨슨 병의 예방, 개선, 및/또는 치료 용도에 관한 것이다.
- [2] 본 출원은 2022년 10월 11일에 출원된 한국특허출원 제10-2022-0129937호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

배경기술

- [3] 파킨슨병 (Parkinson's disease)은 3대 노인성 신경퇴행성질환의 하나로, 중뇌의 흑질 (substantia nigra)에 존재하는 도파민 신경세포의 사멸로 인한 도파민의 생성 및 작용 감소로 인해 발생하며, 중증인 경우 치매로 진행되기도 한다. 전 세계적으로 파킨슨병의 발생률은 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 고령층의 발생률 증가가 뚜렷하므로, 발병 원인을 표적으로 한 치료제 개발이 시급하다. 특히, 근본적인 질병의 치료가 가능한 치료제의 개발이 필요하다. 그러나, 현재까지 파킨슨병의 치료제로는 질병 초기에 사용 가능한 증상 완화제들 (레보도파 (levodopa), 도파민 작용제, MAO-B 등) 외에는 효과적인 치료법이나 치료제가 없는 실정이다. 레보도파는 감소된 도파민을 보충할 수 있어 증상을 완화할 수 있으나, 파킨슨병의 근본적인 원인을 해결할 수 없고, 시간이 지남에 따라 필요한 복용량이 증가하며, 일부 환자들에서 이상운동증, 환각 등 심각한 부작용을 초래하는 문제가 있다. 최근에는 줄기세포, 유전자, 항체 등에 기반한 파킨슨병 치료제의 개발 시도가 이루어지고 있으나, 아직까지 성공적인 치료 효과가 확인된 치료제는 발굴되지 않고 있다.
- [4] 한편, 미토파지 (mitophagy)는 손상되었거나 불필요한 미토콘드리아를 제거하는 세포 내 분해기전으로서, 미토콘드리아 손상이 발생하였을 때 막으로 둘러싸 오토파고솜 (autophagosome)을 형성하고 이를 리소솜 (lysosome)과 융합함으로써 손상된 미토콘드리아를 선택적으로 제거한다. 이러한 미토파지의 활성화는 신경세포를 비롯한 여러 세포들에서 미토콘드리아 기능을 조절하고 조직의 기능을 유지하는데 중요하다는 것이 알려져 있다. 뿐만 아니라, 신경세포에서 미토파지는 여러 스트레스에 대해 보호 효과를 나타내며 신경 퇴행에 대한 저항성에 중요하다는 것이 보고되고 있다. 최근에는, 미토콘드리아의 기능 이상과 도파민 신경세포의 사멸의 연관성에 대한 관심이 높아지고 있다. 예를 들어, 유전성 및 산발성 파킨슨병에서 미토파지의 활성화 감소가 관찰되고 있다. 또한, 파킨슨병을 일으키는 로테논 (Rotenone), 파라콰트 (Paraquat)등의 신경 독성물질들은 미토콘드리아 저해제로 작용하며, PINK1, Parkin을 비롯한 파킨슨병 연관 유전자들의 변

이도 미토콘드리아 기능이상을 초래할 수 있다는 것이 알려졌다. 또한, 파킨슨병의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 알파시누클린이 미토콘드리아 내부에 축적되며 미토콘드리아 기능 이상을 유발함이 밝혀졌다. 실제 파킨슨병 환자의 도파민 신경세포에서도 다양한 미토콘드리아 기능 이상들이 확인되고 있다. 이러한 결과들은 미토콘드리아 기능 이상이 파킨슨병의 발생과 진행에 중요한 요인임을 의미한다. 그러나, 아직까지 미토콘드리아 기능 이상 개선을 표적으로 한 파킨슨병 치료제 개발은 이루어지지 않고 있다.

- [5] 미토파지의 활성 촉진을 통해 질병 치료 효과를 발휘할 수 있는 미토파지 조절제를 발굴하기 위해서는 세포 및 생체 내에서 미토파지 변화를 손쉽게 측정할 수 있는 연구시스템이 필수적으로 필요하다. 그러나, 미토파지 활성을 민감하고 정량적으로 측정할 수 있는 실험적 방법의 부재로 인해, 미토파지 활성 자체를 판독 지표 (read-out)로 하는 미토파지 조절 화합물의 탐색은 수행된 적이 없었다. 지금까지 널리 사용되고 있는 LC3 기반 검출 방법은 미토파지의 초기단계인 오토파고솜 형성단계만을 측정할 수 있기 때문에 측정감도가 낮고 정량적 측정이 어려운 한계를 지니고 있다. 또한, 몇몇 연구그룹에서 시도된 제어물질 발굴시도도 대부분 PINK-Parkin의 미토콘드리아 이동이나, 미토파지 과정에서 일어나는 미토콘드리아의 분열 (fission) 등 간접적 판독지표들을 사용하여 실제 생리적 조건에서 미토파지 활성을 제어할 수 있는 물질을 발굴하지 못하고 있다.

- [6] 현재 실험적으로 미토파지 활성을 유도하는 방법은 CCCP, FCCP, rotenone 등과 같이 미토콘드리아의 기능 이상을 유도하는 소위 '미토콘드리아 독소들 (mitochondrial toxins)'을 처리하는 것이다. 그러나, 상기 CCCP와 FCCP는 미토콘드리아 막전위 저해제 (uncoupler)로서 미토콘드리아 막전위를 탈분극시키며, rotenone은 Complex I 저해제로 작용한다. 상기 미토콘드리아 독소들은 직접적으로 미토콘드리아 손상을 유도함으로써 손상된 미토콘드리아의 제거기전인 미토파지 활성을 유도하지만, 세포에 대한 독성이 강하기 때문에 미토파지 활성 촉진을 위한 약물로는 사용할 수 없는 제한이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 미토파지 활성에 기반한 스크리닝을 통해 발굴된 이소퀴놀린 유도체가 우수한 미토파지 촉진 효과를 발휘하며, 이를 통해 파킨슨병의 근본적인 치료제로 활용될 수 있음을 확인하여 완성된 것이다.
- [8] 따라서, 본 발명은 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

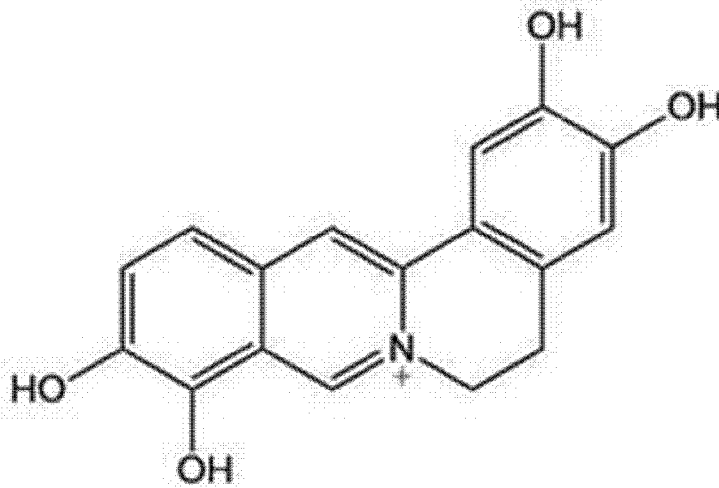
[11] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[12] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[13] [화학식 1]

[14]



[15] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[16] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 파킨슨병의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[17] 뿐만 아니라, 본 발명은 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 상기 조성물을 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[19] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

- [20] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토파지의 활성을 촉진할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [21] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:
- [22] (a) 미토콘드리아의 막전위를 감소시킴;
- [23] (b) 미토콘드리아의 활성산소종 수준을 감소시킴; 및
- [24] (c) 미토콘드리아의 ATP 합성능을 증가시킴.
- [25] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 도파민성 신경세포의 수 또는 활성을 증가시킬 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [26] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 파킨슨병은 유전성 파킨슨병 또는 산발성 파킨슨병일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

발명의 효과

- [27] 본 발명은 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 미토파지 활성화에 기반한 스크리닝을 통해 발굴된 이소퀴놀린 유도체가 우수한 미토파지 촉진 효과를 발휘하며, 이를 통해 파킨슨병의 근본적인 치료제로 활용될 수 있음을 확인하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체는 파킨슨병 동물모델에서 파킨슨병과 밀접한 연관이 있는 미토콘드리아 기능이상을 개선할 뿐만 아니라, 파킨슨병 동물모델의 운동기능장애를 개선할 수 있음이 확인되었다. 특히, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체가 처리된 파킨슨병 동물모델은 파킨슨병의 주요 발병 원인인 도파민성 신경세포의 사멸이 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체는 파킨슨병의 근본적인 치료제로서 상기 질병의 예방, 개선, 및/또는 치료 분야에서 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1a 내지 1c는 본 발명의 일 구현예에 따른 이소퀴놀린 유도체 화합물 (“CD1-012”로 지칭함, 이하 동일)의 인간 정상 폐세포주에서의 미토파지 활성 촉진 효과를 분석한 결과이다 (도 1a, FACS 결과; 도 1b, 공초점현미경 관찰 결과; 및 도 1c, mito-YFP 형광단백질을 이용한 미토콘드리아의 양적변화 측정 결과).
- [29] 도 2a 및 2b는 CD1-012의 SH-SY5Y 세포주에서의 미토파지 활성 촉진효과를 분석한 결과 (도 2a) 및 Hela-Parkin 세포주에서의 미토파지 활성 촉진효과를 분석한 결과 (도 2b)이다.
- [30] 도 3a 및 3b는 CD1-012의 처리 농도 (도 3a) 및 처리 시간 (도 3b)에 따른 BEAS-2B 세포의 미토파지 활성을 분석한 결과이다.
- [31] 도 4a 및 4b는 CD1-012의 처리에 따른 세포의 미토파지 활성 변화 (도 4a) 및 미토파지 활성 변화 (도 4b)를 확인한 결과이다.

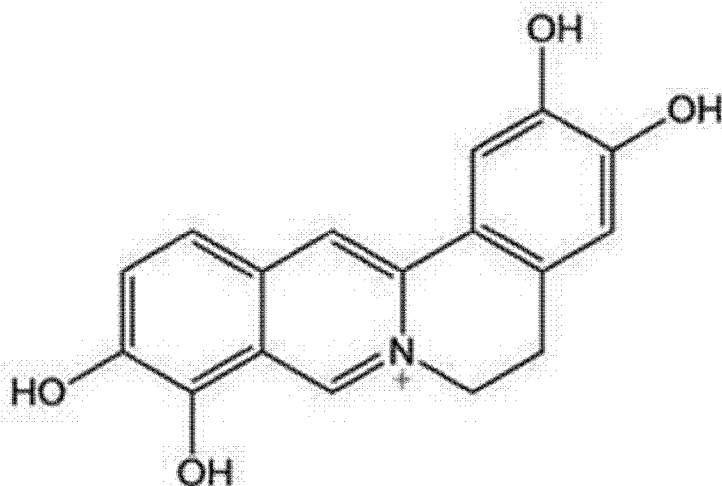
- [32] 도 5는 CD1-012와 비교예인 팔미트 및 베르베린의 농도별 미토파지 활성 촉진 효과를 비교한 결과이다.
- [33] 도 6은 CD1-012 또는 비교예인 CCCP를 세포에 처리한 후 미토콘드리아 막전위 및 미토콘드리아 활성산소의 수준을 분석한 결과를 나타낸다.
- [34] 도 7은 CD1-012 및 비교예인 CCCP의 PINK1 knockdown 세포주 (shPINK1)에서의 미토파지 촉진 활성을 분석한 결과이다.
- [35] 도 8a는 CD1-012의 미토파지 촉진 활성을 검증하기 위해 야생형 (WT) 및 PINK1 결손(PINK1^{-/-}) 마우스 섬유아세포주에 CD1-012를 농도별로 처리한 후 미토콘드리아 단백질인 Cox2의 수준을 측정된 결과를 나타낸다.
- [36] 도 8b는 CD1-012의 미토파지 촉진 활성이 PINK1 유전자에 의존하는 것인지 확인하기 위해 인간 폐세포주에서 PINK1의 발현을 억제한 후 (shPINK1) CD1-012를 처리하여 미토파지 활성을 분석한 결과를 나타낸다.
- [37] 도 8c는 PINK1 결손 세포에서 감소했던 미토콘드리아의 막전위가 CD1-012 처리에 의해 회복된 결과를 나타낸다.
- [38] 도 8d는 PINK1 결손 세포에서 증가했던 미토콘드리아의 활성산소 수준이 CD1-012 처리에 의해 감소한 결과를 나타낸다.
- [39] 도 8e는 PINK1 결손 세포에서 감소했던 미토콘드리아의 ATP 생산량이 CD1-012 처리에 의해 회복된 결과를 나타낸다.
- [40] 도 9a는 CD1-012의 미토콘드리아 기능 개선 효과를 확인하기 위해 파킨슨병 초파리 모델 (B9)에 CD1-012를 처리한 후 뇌조직의 도파민 신경세포에서 미토콘드리아 형태를 분석한 결과(좌측) 및 비정상적 미토콘드리아의 수를 측정된 결과(우측)를 나타낸다.
- [41] 도 9b 및 9c는 파킨슨병 초파리 모델에 CD1-012를 처리한 후 뇌조직 내 미토콘드리아의 활성산소 수준 (도 9b) 및 ATP 생성능 (도 9c)을 확인한 결과를 나타낸다.
- [42] 도 10a 내지 10d는 MPP⁺ (도 10a 및 10c) 또는 6OHDA (도 10b 및 10d)을 처리하여 제작한 산발성 파킨슨병 세포 모델에 CD1-012를 처리한 후 미토콘드리아의 막전위 (도 10a 및 10b) 및 ATP 생성능 (도 10c 및 10d)을 측정된 결과를 나타낸다.
- [43] 도 11a는 파킨슨병에 의한 운동능력 장애에 대한 CD1-012의 치료 효과를 확인하기 위한 동물실험 스케줄이다 (MPTP, 파킨슨병 유도 물질).
- [44] 도 11b 및 11c는 파킨슨병 동물모델에서 CD1-012 처리에 따른 마우스의 운동능력을 Pole test (도 11b) 및 Rota-rod test (도 11c)를 이용하여 확인한 결과를 나타낸다.
- [45] 도 12a 및 12b는 파킨슨병 동물모델에서 CD1-012 처리에 따른 마우스의 뇌흑질 미토콘드리아의 막전위 (도 12a) 및 ATP 생성능 (도 12b)을 측정된 결과를 나타낸다.

- [46] 도 13a 및 13b는 파킨슨병 동물모델에 CD1-012 처리 후 마우스의 뇌흑질 내 도파민성 신경세포를 염색하여 관찰한 결과 (도 13a) 및 도파민성 신경세포의 수를 측정한 결과 (도 13b)이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [47] 본 발명은 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 미토파지 활성화에 기반한 스크리닝을 통해 발굴된 이소퀴놀린 유도체가 우수한 미토파지 촉진 효과를 발휘하며, 이를 통해 파킨슨병의 근본적인 치료제로 활용될 수 있음을 확인하여 완성된 것이다.
- [48] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물은 미토파지 특이적 촉진기능이 규명된 이소퀴놀린 유도체로서, 미토콘드리아 및 세포독성이 없음이 확인되었으며, 선행 연구를 통해 알츠하이머성 치매모델의 미토콘드리아 기능이상을 개선할 수 있음이 확인되었다.
- [49] 본 발명자들은 상기 이소퀴놀린 유도체의 파킨슨병 치료 효과를 분석하기 위해 파킨슨병 유전자인 PINK1 결손 세포주 및 PINK1 결손 초파리에 상기 화합물을 처리하였으며, 그 결과 미토콘드리아 기능이 개선되는 것을 확인하였다 (실시에 5 및 6).
- [50] 뿐만 아니라, 파킨슨병 유발 신경독성물질인 MPP⁺ (1-Methyl-4-phenylpyridinium) 또는 6-OHDA (6-Hydroxydopamine)가 처리된 신경세포주에 본 발명의 화합물 처리시 미토콘드리아 기능 이상이 개선된 바, 본 발명의 화합물의 산발성 파킨슨병에 대한 치료 효과를 검증하였다 (실시에 7).
- [51] 또한, 신경독성물질 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)를 주입하여 제작한 파킨슨병 동물모델에 본 발명의 화합물을 처리한 결과 운동능력장애가 개선되는 것을 확인하였으며 (실시에 8), 상기 마우스 모델의 뇌 흑질 조직의 미토콘드리아 기능 이상이 개선될 뿐만 아니라 파킨슨병의 도파민 신경 사멸이 억제되는 것을 확인하였다 (실시에 9).
- [52] 따라서, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체는 미토파지의 촉진을 통해 파킨슨병의 주요 증상 (미토콘드리아의 기능 이상 및 운동기능장애 등)을 개선할 뿐만 아니라 근본적인 발병 매커니즘을 억제할 수 있는 바, 파킨슨병의 효과적인 치료제로 활용될 수 있다.
- [53]
- [54] 이하, 본 발명에 대해 구체적으로 서술한다.
- [55] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [56] [화학식 1]

[57]

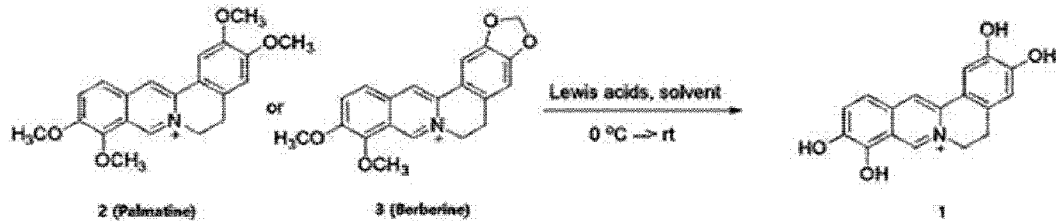


- [58] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.
- [59] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점이나 합병증 없이 이득/위험 비가 합리적이어서 대상체 (예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 건전한 의학적 판단의 범위 이내인 화합물 또는 조성물을 의미한다.
- [60] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.
- [61] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [62] 본 발명의 화합물의 범위에는 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 이성질체, 수화물 및 용매화물이 모두 포함될 수 있다.

[63] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 이소퀴놀린 유도체는 하기 반응식 1과 같이, 유기용매에 화학식 2로 표시되는 팔마틴 (palmatine) 또는 화학식 3으로 표시되는 베르베린 (berberine)과 루이스산 (Lewis acid) 촉매를 첨가하고 반응시켜, 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 화합물을 제조하는 단계 (단계 1);를 포함하는 제조방법을 통해 제조될 수 있다.

[64] [반응식 1]

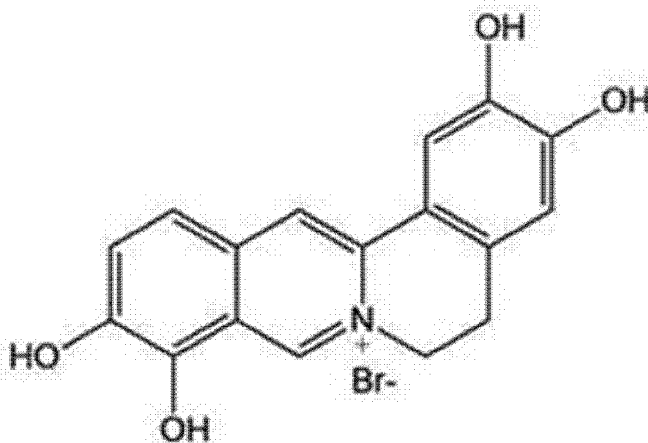
[65]



[66] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 형태는 팔마틴 또는 베르베린의 코어 구조의 소수성 (hydrophobic) 치환기 (메톡시기)가 친수성 (hydrophilic) 치환기 또는 분자간 수소결합을 제공할 수 있는 작용기 (하이드록시기)로 치환된 유도체일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체는 하기 화학식 1a 내지 1c로 각각 표시되는 2,3,5,10-테트라하이드록시-5,6-다이하이드로아이소퀴놀리노[3,2-a]아이소퀴놀린-7-이움브로마이드(2,3,9,10-Tetrahydroxy-5,6-dihydroisoquinolino[3,2-a]isoquinolin-7-ium bromide), 2,3,5,10-테트라하이드록시-5,6-다이하이드로아이소퀴놀리노[3,2-a]아이소퀴놀린-7-이움하이드록사이드(2,3,9,10-Tetrahydroxy-5,6-dihydroisoquinolino[3,2-a]isoquinolin-7-ium hydroxide), 및 2,3,5,10-테트라하이드록시-5,6-다이하이드로아이소퀴놀리노[3,2-a]아이소퀴놀린-7-이움클로라이드(2,3,9,10-Tetrahydroxy-5,6-dihydroisoquinolino[3,2-a]isoquinolin-7-ium chloride) 중에서 선택될 수 있다. 본 명세서에서, 상기 2,3,5,10-테트라하이드록시-5,6-다이하이드로아이소퀴놀리노[3,2-a]아이소퀴놀린-7-이움브로마이드는 “CD1-012”로 지칭될 수 있다.

[67] [화학식 1a]

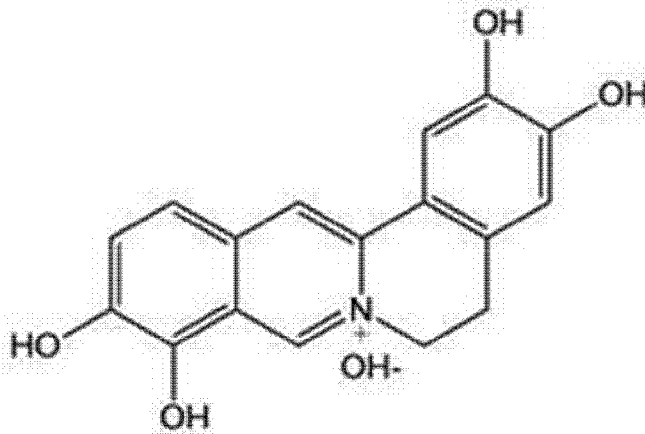
[68]



[69]

[70] [화학식 1b]

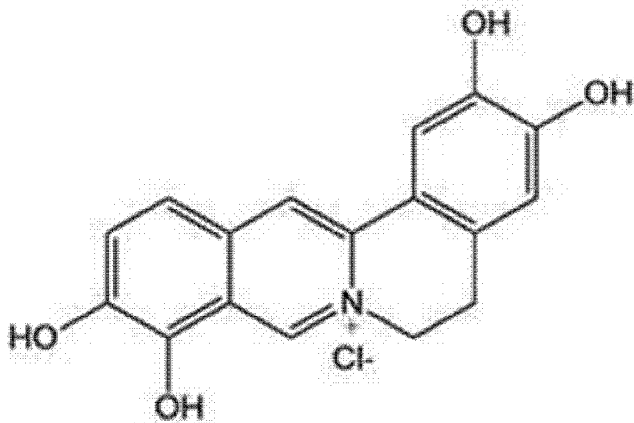
[71]



[72]

[73] [화학식 1c]

[74]



[75]

[76] 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토파지의 활성을 촉진하는 것 (즉, 미토파지의 활성화)을 특징으로 한다.

[77] 본 발명에 있어서, 용어 "미토파지 (mitophagy)"는 손상되었거나 불필요한 미토콘드리아를 제거하는 세포 내 분해기전을 지칭한다. 미토파지는 미토콘드리아의 손상이 발생한 경우 오토파고솜 (autophagosome)을 형성하고 리소솜과 융합하여 손상된 미토콘드리아를 선택적으로 분해하여 제거하는 역할을 한다. 미토파지는 세포가 영양결핍상태 등에 놓였을 때 거대분자 (macromolecular) 전구체를 생성하고 에너지를 생성하기 위해 세포 내의 불필요한 성분 (오래된 단백질, 단백질 집합체, 세포소기관, 세포에 침투한 병원균 등)을 분해 및 재활용하는 기작인 오토파지 (autophagy)와는 구별되는 기전이다. 미토파지는 오토파지를 조절하는 영양소, 에너지, 및 스트레스 등의 조절 신호와는 독립적으로 조절된다.

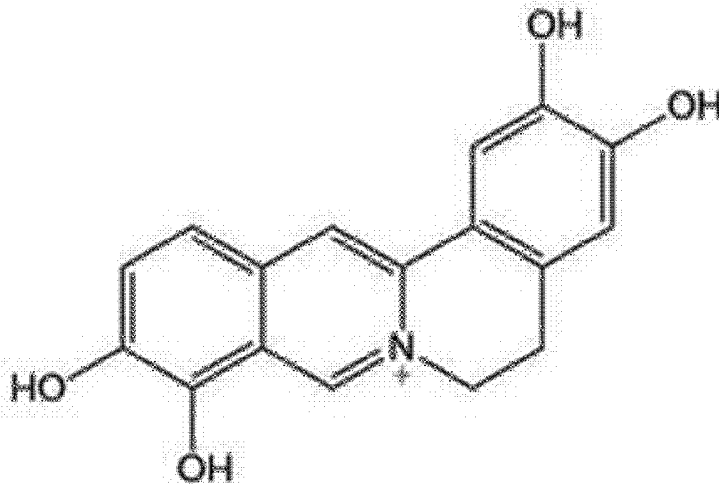
- [78] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체가 기타 공지된 미토파지 촉진제에 비해 더욱 우수한 미토파지 활성화 효과를 발휘하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 파킨슨병 치료 효과를 달성하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토파지 수준 (예컨대, 신경세포의 미토파지 수준)이 감소한 파킨슨병 환자에서 특히 우수한 치료 효과를 발휘할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 화합물은 PINK1 유전자 및/또는 단백질의 돌연변이를 수반한 파킨슨병 환자에서 특히 우수한 치료 효과를 발휘할 수 있다. 상기 돌연변이는 PINK1 단백질의 수준 및/또는 활성 감소를 포함한다. 그러나 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 상기 화합물이 PINK1-Parkin 경로에 비의존적으로 미토파지를 촉진시킬 수 있음을 확인한 바, 본 발명의 화합물의 파킨슨병 예방 및/또는 치료 효과가 상기 돌연변이를 수반한 환자에게만 국한되는 것은 아님이 자명하다.
- [79] 또한, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있다:
- [80] (a) 미토콘드리아의 막전위를 감소시킴;
- [81] (b) 미토콘드리아의 활성산소종 수준을 감소시킴; 및
- [82] (c) 미토콘드리아의 ATP 합성능을 증가시킴.
- [83] 즉, 본 발명의 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토콘드리아의 수준 및/또는 활성 (기능)을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 따른 화합물의 미토콘드리아의 수준 및/또는 활성의 개선 효과는 상기 화합물의 미토파지 활성화 효과를 통해 달성되는 것일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토콘드리아의 수준 및/또는 기능 (예컨대, 신경세포의 미토콘드리아의 수준 및/또는 기능)이 감소한 파킨슨병 환자에서 특히 우수한 치료 효과를 발휘할 수 있다.
- [84] 또한, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 도파민성 신경세포의 수 및/또는 기능을 증가시킬 수 있다.
- [85] 본 발명에 있어서, “도파민 (dopamine)”은 카테콜아민 계열의 유기 화합물로, 다양한 동물의 중추신경계에서 발견되는 신경전달물질이다. 도파민은 흑색질 (substantia nigra)과 척추 피개부를 포함한 뇌의 여러 영역에서 생산된다. “도파민성 신경세포 (dopaminergic neurons)”은 도파민의 주요 공급원으로서, 자발적인 운동 (voluntary movement), 기분, 중독, 스트레스 등의 다양한 뇌 기능을 제어하는데 중요한 역할을 하는 세포이다. 특히, 도파민성 신경세포의 사멸로 인한 수의 감소는 파킨슨병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 화합물이 뇌 흑색질에서의 도파민성 신경세포의 사멸을 억제하여 도파민성 신경세포의 수적 감소를 회복하는데 기여함을 확인하였다.
- [86] 본 발명에 있어서, “파킨슨병 (Parkinson’s disease)”은 느린 운동, 정지시 떨림, 근육 강직, 질질 끌며 걷기, 굽은 자세와 같은 파킨슨 증상들을 특징으로 하는 진

행형 신경 퇴행성 질환이다. 주로 흑질 (substantia nigra)의 불완전한 도파민의 생성 및 작용으로 운동신경 피질의 자극이 감소되어 일어난다. 본 발명에 있어서 파킨슨병은 유전적 요인 (예를 들어, 특정 돌연변이 유전자의 유전 등)에 의해 발생하는 유전성 파킨슨병 및 다양한 유전자의 돌연변이 및 이밖에 규명되지 않은 다양한 원인으로 발생하는 산발성 (sporadic) 파킨슨병을 모두 포함한다. 산발성 파킨슨병은 파킨슨병 환자의 80 내지 90%의 비율을 차지하지만, 이의 발병기전은 아직까지 밝혀지지 않았다. 다만, 산발성 파킨슨병 및 유전성 파킨슨병 모두 미토파지의 활성 감소가 관찰되고 있다.

- [87] 본 발명의 조성물 내의 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [88] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [89] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[90] [화학식 1]

[91]

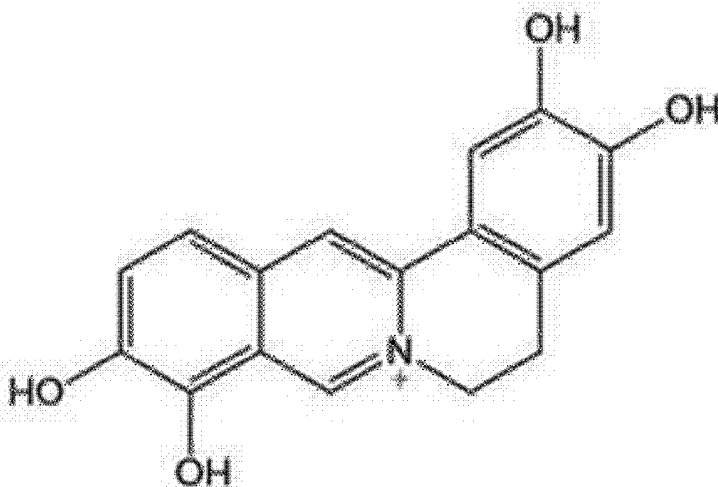


- [92] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토파지의 활성을 특이적으로 촉진할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [93] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미토파지의 활성은 PINK1에 비의존적일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [94] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 도파민성 신경세포의 수 또는 활성을 증가시킬 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [95] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 파킨슨병은 유전성 파킨슨병 또는 산발성 파킨슨병일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [96] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 0 초과 40 μ M일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [97] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토콘드리아 기능이상을 개선시킬 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [98] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능이상의 개선은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다:
- [99] (a) 미토콘드리아의 정상 막전위의 수준을 유지시킴;
- [100] (b) 미토콘드리아의 활성산소종 수준을 감소시킴; 및
- [101] (c) 미토콘드리아의 ATP 합성능을 증가시킴.
- [102] 본 발명은 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물, 및 설명서를 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [103] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[104] [화학식 1]

[105]



- [106] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 파킨슨병은 유전성 파킨슨병 또는 산발성 파킨슨병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [107] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [108] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 파킨슨병의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [109] 본 발명은 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.
- [110] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [111] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [112] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [113] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수 전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제이나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메

칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 젤화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리코유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

- [114] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.
- [115] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [116] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [117] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [118] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이

산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설펍실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

- [119] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 워텡솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buetyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.
- [120] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [121] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [122] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

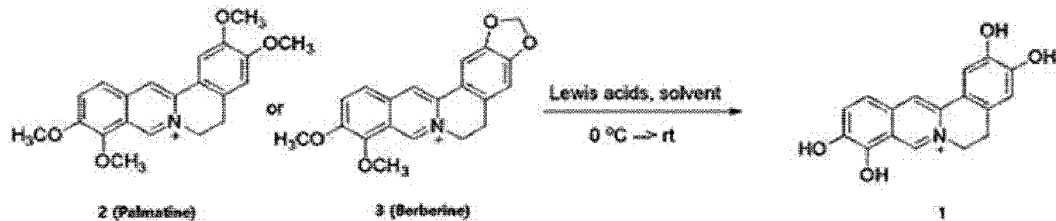
- [123] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [124] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [125] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [126] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [127] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [128] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [129] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [130] 본 발명에 있어서 “키트 (kit)”는 본 발명의 이소퀴놀린 유도체, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이를 포함하는 조성물을 포함하여 파킨슨병의 예방 또는 치료 목적으로 사용되는 도구를 의미한다. 상기 키트에는 상기 화합물 또는 조성물 외에도 상기 물질들의 제조, 보관, 투여 등에 통상적으로 필요한 다른 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있다. 예컨대, 상기 키트에는 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 특성, 이들의 적합한 사용 및 보관 등을 지시하는 설명서 등을 포함할 수 있다.

[131] 또한, 본 발명은 유기용매에 팔마틴 또는 베르베린에 루이스산 촉매를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공한다.

[132] 구체적으로, 상기 제조방법은 유기용매에 상기 화학식 2로 표시되는 팔마틴 또는 상기 화학식 3으로 표시되는 베르베린에 루이스산 촉매를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하며, 이는 하기 반응식 1과 같이 나타낼 수 있다.

[133] [반응식 1]

[134]



[135]

[136] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 루이스산 촉매는 BF_3 , BBr_3 , AlF_3 , AlCl_3 , AlBr_3 , TiCl_4 , TiBr_4 , TiI_4 , FeCl_3 , FeCl_2 , SnCl_2 , SnCl_4 , WCl_6 , MoCl_5 , SbCl_5 , TeCl_2 , 및 ZnCl_2 등의 금속 할로젠화물; Et_3Al , Et_2AlCl , EtAlCl_2 , $\text{Et}_3\text{Al}_2\text{Cl}_3$, $(i\text{-Bu})_3\text{Al}$, $(i\text{-Bu})_2\text{AlCl}$, $(i\text{-Bu})\text{AlCl}_2$, Me_4Sn , Et_4Sn , Bu_4Sn , 및 Bu_3SnCl 등의 금속 알킬 화합물; $\text{Al}(\text{OR})_{3-x}\text{Cl}_x$ 또는 $\text{Ti}(\text{OR})_{4-y}\text{Cl}_y$ (이때, 상기 R은 알킬기 혹은 아릴기를 나타내고, x는 1 또는 2, y는 1 내지 3의 정수임) 등의 금속 알콕시 화합물 중 1 종 이상, 예를 들면, 금속 할로젠화물, 예를 들면, BBr_3 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[137] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 유기용매는 다이메틸 설펑사이드, 다이메틸 포름아마이드, 아세톤, 테트라하이드로퓨란, 벤젠, 톨루엔, 에테르, 메탄올, 헥산, 시클로 헥산, 피리딘, 아세트산, 사염화탄소, 클로로포름, 디클로로 메탄 및 물로 구성되는 군으로부터 선택되는 1 종 이상, 예를 들면, 디클로로 메탄일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[138] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 루이스산 촉매는 불활성 기체 중에서 첨가되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 루이스산 촉매는 상기 유기용매에 용해된 팔마틴 또는 베르베린에 약 0°C 에서, 불활성 기체 분위기, 예를 들면, 질소기류 하에서, 적가 하는 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[139] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 루이스산 촉매를 첨가한 후, 상온, 예를 들면, 20°C 내지 28°C , 예를 들면, 24°C 내지 26°C 에서 10 시간 내지 14 시간, 예를 들면, 11 시간 내지 13 시간, 예를 들면, 12 시간동안 교반하여 반응시킬 수 있고, 상기 반응의 종료는 예를 들면, TLC(thin-layer Chromatography)를 이용하여 확인할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[140] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 식품학적으로 허용 되는 염을 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물을 포함한다.

- [141] 본 발명에서 용어, “식품학적으로 허용 가능한 염”이란 식품학적으로 허용되는 유기산, 무기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.
- [142] 본 발명의 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 화합물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [143] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [144] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 덱스트린 및 시클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g 이다.
- [145] 상기 외에 본 발명의 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, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [146] 본 명세서에 있어서, “건강기능식품”이란 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 파킨슨병의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.

- [147] 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [148] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[149]

[150] [실시예]

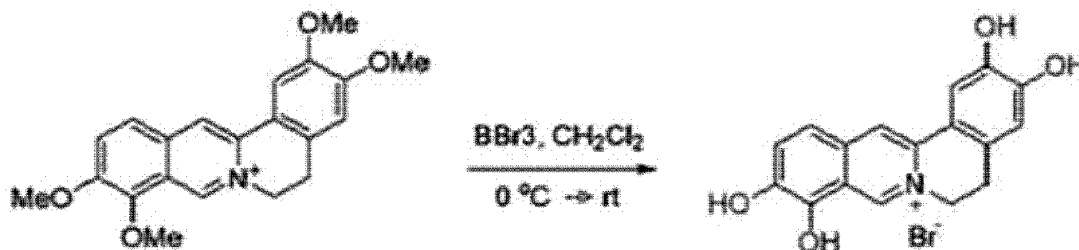
[151] 실시예 1. 이소퀴놀린 유도체 화합물 CD1-012의 합성

- [152] 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체 화합물 2,3,5,10-테트라하이드록시-5,6-다이하이드로아이소퀴놀리노[3,2-a]아이소퀴놀린-7-이염브로마이드 (2,3,9,10-Tetrahydroxy-5,6-dihydroisoquinolino[3,2-a]isoquinolin-7-iumbromide; CD1-012)는 하기 과정을 통해 합성하였다: 건조된 250 mL 둥근 플라스크에 팔마틴(palmatine; 1.0 g, 2.92 mmol)을 40 mL의 무수 CH_2Cl_2 에 녹이고, BBr_3 용액(12.80 mL, 12.80 mmol)을 0 °C에서 질소 기류 하에 첨가하여 반응용액을 제조하고, 상기 반응용액을 상온에서 12 시간 동안 교반 시킨 후, TLC를 이용하여 반응이 종결된 것을 확인하였다. 상기 반응이 종결된 반응용액에 10 mL의 MeOH를 첨가하여 30 분간 교반하고, 진공 농축기를 통해 농축시킨 후, CH_2Cl_2 (100 mL x 5)을 이용하여 세척하고, 감압 하에서 건조하여, 고체 형태의 이소퀴놀린 유도체 화합물(2,3,9,10-Tetrahydroxy-5,6-dihydroisoquinolino[3,2-a]isoquinolin-7-iumbromide; CD1-012)을 99% (1.09 g, 2.98 mmol)의 수득률로 수득하였고, 반응을 하기의 반응식 1a에 도시하였다:

- [153] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.71 (s, 1H), 10.62 (s, 1H) 9.98 (br, 1H), 9.74 (s, 1H), 9.23 (br, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.75 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) 7.61 (d, $J = 8.8$ Hz 1H), 7.46 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.82 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.06 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H)

[154] [반응식 1a]

[155]



[156]

[157] 비교예 1. 카르보닐 시아니드 3-클로로페닐하이drazone (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; CCCP)

[158] 대표적인 미토파지 촉진화합물인 CCCP를 비교예 1로 하였다.

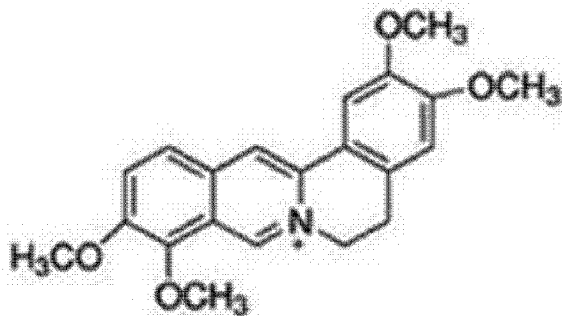
[159]

[160] 비교예 2. 팔마틴 (Palmatine)

[161] 하기의 화학식 2로 표시되는 팔마틴 (Palmatine, CAS Number: 3486-67-7)을 비교예 2로 하였다.

[162] [화학식 2]

[163]



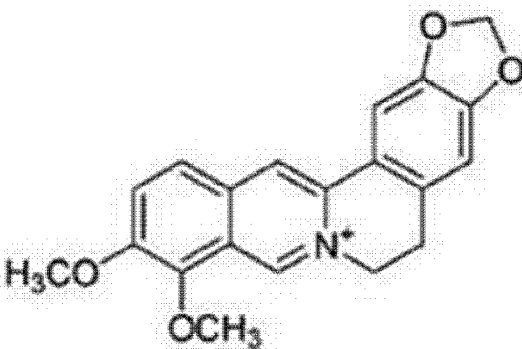
[164]

[165] 비교예 3. 베르베린 (Berberine)

[166] 하기의 화학식 3으로 표시되는 베르베린 (Berberine, CAS Number: 633-65-8(Berberine-HCl) 또는 CAS Number: 2086-83-1(Berberine-HCl-2H₂O))을 비교예 3으로 하였다.

[167] [화학식 3]

[168]



[169]

[170] 실시예 2. CD1-012의 미토파지 활성 촉진 효과 분석

[171] 실시예 2-1. 미토파지 활성 촉진 효과 분석

[172] 실시예 1에서 합성된 CD1-012의 미토파지 촉진 활성효과를 분석하기 위하여, 인간 정상폐세포주인 BEAS-2B 세포주에 미토케이마 형광단백질을 발현시키고, 본 발명의 화합물 CD1-012 (15 μ M) 및 비교예 1의 CCCP (10 μ M)를 각각 24 시간

처리한 후, 각각의 샘플의 미토파지 활성을 측정하고, 결과를 도 1a 내지 1c에 도시하였다.

- [173] 구체적으로, 도 1a는 유세포분석기(FACS)를 이용한 분석 결과이고 (CD1-012를 15 μ M로 24h 처리함), 도 1b는 공초점현미경(confocal microscope)를 이용한 분석 결과이며 (CD1-012를 15 μ M로 18h 처리함), 도 1c는 미토콘드리아로 단백질을 이동시키는 표적서열(targeting sequence)를 포함한 mito-YFP 형광단백질을 사용하여 미토콘드리아의 양적변화를 측정한 결과이다 (CD1-012를 20 μ M로 24h 처리함). 상기 결과들에 의하면 CD1-012가 처리된 그룹은 미처리 대조군 (con)에 비해 미토파지 활성이 현저하게 증가하였으며, 특히 도 1a에 나타난 바와 같이, CD1-012를 처리한 샘플의 미토파지 활성이 대표적인 미토파지 촉진 화합물인 CCCP를 처리한 샘플만큼 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[174]

[175] 실시예 2-2. 다양한 세포주들에서의 미토파지 활성 촉진효과 분석

- [176] 실시예 1에서 합성된 CD1-012가 다양한 세포주들에서 미토파지 활성을 증가시키는지 확인하였다. 이를 위해, 미토케이마 형광단백질을 발현하는 인간 신경모세포종 세포주인 SH-SY5Y 세포주 및 Parkin (E3 ligase)을 발현하는 자궁경부암 HeLa 세포주 (Hela-Parkin)에 CD1-012 및 비교예 1의 CCCP를 처리한 후, 유세포분석기 (FACS)를 사용하여 각 샘플의 미토파지 활성을 분석하고, 그 결과를 도 2a 내지 2b에 도시하였다.

- [177] 구체적으로, 도 2a는 SH-SY5Y 세포주에 대한 분석 결과이고, 도 2b는 Hela-Parkin 세포주에 대한 분석 결과이다. 도 2a 내지 2b에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물 CD1-012가 처리된 세포는 대조군 (Con)과 비교하여 미토파지 활성이 현저히 증가하였다. 상기 결과는 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체가 다양한 세포주들에서 미토파지 활성을 촉진할 수 있음을 보여준다.

[178]

[179] 실시예 2-3. 처리 농도 및 처리 시간에 따른 미토파지 활성 촉진효과 분석

- [180] 실시예 1에서 합성된 CD1-012가 농도 및 시간 의존적으로 미토파지 활성을 촉진하는지 확인하였다. 이를 위해, 미토케이마를 발현하는 BEAS-2B 세포주에 상기 CD1-012를 다양한 농도 또는 일정한 농도 (15 μ M)로 시간을 달리하여 처리한 후, 유세포분석기를 이용하여 미토파지 활성을 측정하였다.

- [181] CD1-012의 처리 농도에 따른 미토파지 활성 측정 결과는 도 3a에, 시간별 미토파지 활성 측정 결과는 도 3b에 도시하였다. 도 3a에 나타난 바와 같이, CD1-012를 7.5 μ M 이상의 농도로 처리한 그룹부터 미토파지 활성이 미처리 대조군 대비 유의미하게 증가하기 시작하였으며, 최대 처리 농도 17.5 μ M까지 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 3b에 나타난 바와 같이, CD1-012를 처리하고 3시간 후부터 유의미하게 미토파지 활성이 증가하기 시작하여 18 시간 후에는 미토파지 활성이 최대인 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 미토파지 증

가 양상은 CD1-012가 간접적인 방식이 아닌 직접적으로 미토파지 활성을 농도, 시간 의존적인 방식으로 증가시킴을 의미한다.

[182]

[183] 실시예 2-4. 미토파지 특이적 촉진 활성 확인

[184] 실시예 1에서 합성된 CD1-012가 미토파지 활성만을 특이적으로 증가시키는지 확인하였다. 이를 위해, 미토키야마를 발현하는 BEAS-2B 세포주에 CD1-012 (15 μ M) 또는 비교예 1의 CCCP (10 μ M)를 18 시간 동안 처리한 후, 공초점 현미경으로 미토파지 활성을 분석하였다. 또한, 케미카 형광단백질을 발현하는 BEAS-2B 세포주를 HBSS (Hanks' balanced salts solution)에서 3시간 동안 배양하여 영양결핍상태 (starvation, starv.)를 유도하고, 공초점현미경을 이용해 CD1-012 (15 μ M)를 18시간 동안 처리한 샘플과 비교하여 미토파지 활성을 측정하였다.

[185] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, CD1-012를 처리한 샘플은 CCCP를 처리한 샘플과 동일하게 미토파지의 활성을 촉진하는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4b에 나타난 바와 같이, 영양결핍상태가 유도된 그룹은 높은 수준의 미토파지가 유도되었으나, CD1-012가 처리된 그룹은 미처리 대조군과 비교하여 미토파지 활성의 유의미한 차이가 없었다. 상기 결과는 본 발명의 화합물 CD1-012가 미토파지의 활성만을 특이적으로 증가시키는 물질임을 시사한다.

[186]

[187] 실시예 2-5. 베르베린 및 팔미트와의 미토파지 촉진효과 비교

[188] 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체가 미토파지 촉진제인 팔미트 및 베르베린과 비교하여 미토파지 촉진 효과가 더욱 높은지 확인하였다. 이를 위해, 미토키야마 형광단백질을 발현하는 인간 정상폐세포주인 BEAS-2B 세포주에 CD1-012, 비교예 2의 팔미트, 또는 비교예 3의 베르베린을 다양한 농도로 처리하고, 각 샘플의 미토파지 촉진활성을 비교하였다.

[189] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 팔미트는 400 μ M, 베르베린은 80 μ M의 농도로 처리되었을 때 BEAS-2B의 미토파지 활성이 최대치에 도달하였으나, CD1-012 처리군은 10 μ M의 CD1-012가 처리되었을 때 이와 동등한 수준의 미토파지 활성을 보였다. 결과적으로, CD1-012의 미토파지 촉진활성은 베르베린의 약 8배, 팔미트의 약 40배 가량 높은 것으로 나타났다.

[190]

[191] 실시예 3. CD1-012의 미토콘드리아 기능이상 유도 여부 확인

[192] 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체가 CCCP와 같이 미토콘드리아의 기능 이상을 유도하는지 확인하였다. 이를 위해, 상기 CD1-012 (10 μ M 또는 15 μ M) 및 CCCP (10 μ M)를 24시간 동안 처리한 후, 각 샘플의 미토콘드리아 막전위 (mitochondrial membrane potential) 및 미토콘드리아 활성산소의 수준을 분석하였다. 미토콘드리아의 막전위는 TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester) 어세이를 분석되었고, 미토콘드리아의 활성산소 (ROS)는 MitoSOX 어세이를 통해 분석되었다.

[193] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, CCCP가 처리된 그룹은 미토콘드리아의 막전위가 현저히 감소된 반면, CD1-012가 처리된 그룹은 미토콘드리아 막전위의 감소가 관찰되지 않았다. 또한, CCCP가 처리된 그룹은 미토콘드리아 활성산소 수준이 현저히 증가한 반면, CD1-012가 처리된 그룹은 미토콘드리아 활성산소가 증가하지 않은 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 미토콘드리아 막전위를 감소시켜 미토콘드리아 기능 이상을 유도함으로써 미토파지 활성을 증가시키는 CCCP와 달리, CD1-012는 미토콘드리아 기능 이상을 유도하지 않는 화합물임을 보여준다.

[194]

[195] 실시예 4. CD1-012의 PINK1-Parkin 경로 비의존적 미토파지 활성화 확인

[196] 본 실시예에서는 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체의 미토파지 활성화 기능이 PINK1-Parkin 경로 의존적인지 확인하였다. 이를 위해, short hairpin RNA(shRNA)를 사용하여 PINK1을 knockdown시킨 BEAS-2B 세포주에 비교예 1의 CCCP (10 μ M) 또는 CD1-012 (15 μ M)를 18시간 동안 처리한 후, 각각의 샘플의 미토파지 활성을 유세포분석기 (FACS)를 사용하여 분석하였다.

[197] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, PINK1 knockdown 세포주 (shPINK1)에서 CCCP에 의한 미토파지 활성화는 대조군 세포주 (shNT)에 비해 현저히 감소하였으나, CD1-012에 의한 미토파지 활성화는 미처리 대조군과 비교하여 유의미한 차이를 보이지 않았다. 상기 결과는 본 발명에 다른 화합물이 스트레스성 미토파지를 매개하는 PINK1-Parkin 경로에 비의존적으로 미토파지를 활성화시키는 것임을 입증한다.

[198]

[199] 실시예 5. 파킨슨병 세포 모델에서의 CD1-012의 미토콘드리아 기능 이상 개선 효과 확인

[200] 이하의 실시예에서는 본 발명에 따른 신규 이소퀴놀린 유도체가 파킨슨병의 예방 또는 개선 치료 효과를 갖는지 확인하였다. 가장 먼저, 상기 이소퀴놀린 유도체의 처리가 파킨슨병 세포모델의 미토콘드리아 기능 이상을 개선하는지 확인하였다. 이를 위해, 먼저 CD1-012에 의한 미토파지 유도를 검증하였다. 야생형 (WT) 및 PINK1 결손 (PINK1^{-/-}) 마우스 섬유아세포주 (mouse embryonic fibroblasts: MEFs)에 CD1-012를 농도별로 24 시간 동안 처리하고, 미토콘드리아 단백질인 Cox2 양을 웨스턴블롯 분석으로 측정한 결과, CD1-012를 40 μ M의 농도로 처리한 그룹에서 Cox2 단백질 수준이 현저히 감소한 것을 확인하였다 (도 8a). 또한, CD1-012의 미토파지 촉진 활성이 PINK1에 의존하는 것인지 분석하기 위해, 미토키라마 형광단백질을 발현하는 인간 정상 폐세포주인 BEAS-2B 세포주에서 PINK1 발현을 억제하고 (shPINK1를 사용함), 미토파지 활성을 유세포분석기(FACS)로 분석하였다. 그 결과, CD1-012 (20 μ M)는 대표적인 미토파지 촉진 화합물인 CCCP (10 μ M)와 유사한 수준의 미토파지 촉진 활성을 나타냈으며, CCCP와는 달리 PINK1 유전자의 발현이 억제된 경우에도 미토파지 촉진 활성이

저해되지 않은 것으로 나타났다 (도 8b). 상기 결과는 본 발명에 따른 화합물의 미토콘드리아 촉진 활성은 PINK1에 의존하는 것이 아님을 보여준다.

[201] 이어서, PINK1 결손된 MEF에 CD1-012를 40 μ M 농도로 24시간 동안 처리한 후, 4일 후에 미토콘드리아 기능을 분석하였다. 미토콘드리아의 막전위는 TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester) 어세이로 분석되었고, 미토콘드리아의 활성산소 (ROS)는 MitoSOX-Red 어세이를 통해 분석되었다. 그 결과, PINK1이 결손된 세포는 야생형 세포에 비해 미토콘드리아 막전위가 감소하였으나, CD1-012 처리 후 회복되었으며 (도 8c), 반대로 야생형 세포에 비해 증가했던 미토콘드리아 활성산소 수준은 CD1-012 처리에 따라 감소하였다 (도 8d). 또한, PINK1 결손된 세포에서 감소했던 미토콘드리아의 ATP 생산량 역시 CD1-012에 의해 회복된 것을 확인하였다 (도 8e). 상기 결과들은 본 발명에 따른 화합물 CD1-012가 PINK1 결손세포주의 미토콘드리아 기능이상을 개선하는 효과를 발휘한다는 것을 보여준다.

[202]

[203] 실시예 6. 파킨슨병 초파리 모델에서의 CD1-012의 미토콘드리아 기능이상 개선효과 확인

[204] 본 실시예에서는 본 발명의 화합물 CD1-012의 미토콘드리아 기능이상 개선 효과를 추가로 검증하기 위해, 파킨슨병 초파리 모델을 사용하였다. 이를 위해, PINK1 유전자가 결손된 초파리에 CD1-012를 투여한 후 미토콘드리아의 기능을 분석했다. 구체적으로, PINK1 결손초파리 (B9)에 CD1-012 (1mM)를 2주간 투여하고, 뇌조직의 도파민 신경세포에서 미토콘드리아 형태를 관찰하였다. 그 결과, PINK1 결손 초파리에서 관찰되는 손상된 미토콘드리아 (비정상적으로 부풀어 오른 형태를 가짐)의 수가 대조군 미처리 대조군 대비 CD1-012 처리군에서 감소하였다 (도 9a). 또한, DCF-DA 염색 결과 PINK1 결손 초파리의 뇌조직은 미토콘드리아 활성산소가 증가하였으나, CD1-012 처리군에서는 활성산소의 증가가 유의하게 억제된 것을 확인할 수 있었다 (도 9b). 또한, CD1-012를 3주간 투여한 후부터는 PINK1 결손 초파리 뇌조직의 ATP 생산능도 회복되는 것을 관찰할 수 있었다 (도 9c). 상기 결과들은 CD1-012 처리가 파킨슨병 초파리 모델의 미토콘드리아 기능 이상을 개선하였음을 증명한다.

[205]

[206] 실시예 7. 산발성 파킨슨병 세포 모델에서의 CD1-012의 미토콘드리아 기능이상 개선효과 확인

[207] 산발성 파킨슨병 (sporadic Parkinson's disease)은 진행성의 운동/비운동 기능장애 증상을 특징으로 하며, 파킨슨병 환자의 대부분을 차지한다. 본 실시예에서는 CD1-012의 산발성 파킨슨병 치료 효과를 확인하였다. 이를 위해, 신경독성 물질인 MPP+(62.5 μ M)와 6-OHDA (40 μ M)를 인간 신경세포주 H-SY5Y에 2일간 처리하여 산발성 파킨슨병 세포 모델을 제작하였으며, 상기 세포 모델에 CD1-012 (20 μ M)를 1일간 처리하고 2일 후에 미토콘드리아의 막전위 및 ATP 생산능을 분석

하였다. 그 결과, 산발성 파킨슨병 세포 모델은 MPP⁺ 및 6-OHDA에 의해 미토콘드리아 막전위가 크게 감소하였으나 본 발명의 화합물 처리 후 막전위가 회복되었으며 (도 10a 및 10b), 미토콘드리아의 ATP 합성능 역시 CD1-012 처리 후에 현저히 회복되었다 (도 10c 및 10d). 상기 결과들은 본 발명에 따른 화합물 CD1-012가 미토파지 촉진 활성을 통해 산발성 파킨슨병에 의한 미토콘드리아의 기능 이상도 회복시킬 수 있음을 보여준다.

[208]

[209] 실시예 8. CD1-012에 의한 파킨슨병 동물모델의 행동이상 치료 효과 확인

[210] 본 실시예에서는 파킨슨병 마우스 모델을 이용하여 본 발명의 화합물 CD1-012의 파킨슨병 치료 효과를 확인하였다. 이를 위해 신경독성 물질인 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)를 주입하여 수립한 파킨슨병 마우스 모델을 사용하였다. 상기 마우스 모델에 CD1-012를 1 mg/kg 농도로 2주간 매일 비강투여 (nasal administration)한 후, 운동능력을 Pole test와 Rota-rod test로 분석하였다(도 11a). 먼저 Pole test 결과, 정상 대조군 대비 MPTP가 주입된 파킨슨병 모델은 바닥까지 내려오는 시간이 크게 증가하였으나, CD1-012가 투여된 마우스는 운동 능력이 정상 대조군에 상응하는 수준으로 회복된 것으로 나타났다 (도 11b). 또한, Rota-rod test 결과 원통 위에서 머무는 시간이 정상 대조군 대비 파킨슨병 모델에서 크게 감소하였으나, CD1-012가 투여된 마우스에서는 눈에 띄게 회복된 것을 확인할 수 있었다 (도 11c). 특히, CD1-012가 단독투여된 정상 마우스들은 미처리 정상 대조군과 비교하여 운동능력에 유의한 차이가 관찰되지 않은 바, CD1-012 자체의 독성은 없는 것을 알 수 있었다. 상기 결과들은 본 발명의 화합물 CD1-012가 파킨슨병에 의한 운동능력의 저하를 개선 및 치료할 수 있음을 입증한다.

[211]

[212] 실시예 9. CD1-012에 의한 파킨슨병 동물모델의 미토콘드리아 기능 이상 개선 효과 및 도파민성 신경세포 사멸 억제 효과 확인

[213] 이어서, 파킨슨병 동물모델을 이용하여 본 발명의 화합물 CD1-012가 미토콘드리아의 기능 이상을 개선하는 효과를 갖는지 확인하였다. 이를 위해, 실시예 4에서 행동실험을 실시한 마우스들의 뇌흑질 (substantia nigra)로부터 미토콘드리아를 분리한 후, TMRM (100nM, 37°C, 30 min) 형광염색을 통해 미토콘드리아의 막전위를 분석하고 ATP 생성량을 측정하여 미토콘드리아의 기능을 분석했다 (그룹당 5마리에 대해 분석을 실시함). 그 결과, 대조군과 비교하여 신경독성물질인 MPTP가 투여된 파킨슨병 모델 마우스 그룹은 미토콘드리아의 막전위가 감소하고 ATP 합성능 또한 크게 감소하였으나, CD1-012를 병행투여한 그룹은 미토콘드리아의 막전위 및 ATP 합성능이 정상 대조군의 수준으로 회복되었다 (도 12a 및 12b). 상기 결과들은 본 발명의 화합물 CD1-012이 파킨슨병 동물모델에서도 미토콘드리아의 기능 이상을 개선할 수 있음을 뒷받침한다.

[214] 이어서, CD1-012의 투여가 파킨슨병 동물모델의 뇌흑질에서 도파민성 신경세포의 사멸을 억제할 수 있는지 확인하였다. 이를 위해 실시예 4에서 행동실험을 실시한 마우스들의 뇌흑질에 대해 TH 면역화학염색을 실시하여 도파민성 신경세포의 갯수를 측정하였다. 그 결과, 파킨슨병 동물모델의 경우 MPTP에 의해 도파민성 신경세포의 수가 정상 대조군의 절반 가까운 수준으로 감소하였으나, CD1-012 투여 그룹에서는 도파민성 신경세포의 수가 대조군과 유사한 수준으로 회복된 것으로 나타났다 (도 13a 및 13b). 이러한 결과는 본 발명의 화합물 CD1-012가 미토콘드리아 기능회복을 통해 파킨슨병의 근본적인 원인인 도파민성 신경의 사멸을 억제할 수 있음을 보여준다.

[215]

[216] 이상의 실시예에서 살펴본 바와 같이, 본 발명자들은 미토파지-특이적 촉진 활성이 있는 이소퀴놀린 화합물 CD1-012가 유전성 및 산발성 파킨슨병 모델에서 미토콘드리아 기능 이상을 개선할 수 있음을 확인하였다. CD1-012의 미토콘드리아 기능 개선 효과는 파킨슨병 마우스 모델에서도 검증되었으며, 특히, 상기 화합물이 파킨슨병에 의한 행동이상을 개선하고 도파민성 신경세포의 사멸을 억제할 수 있음이 구체적인 실험을 통해 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 파킨슨병의 근본적인 치료가 가능한 물질로서, 파킨슨병의 예방 및 치료에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

[217]

[218] [약제의 제조예]

[219] 본 발명에 따른 유효물질은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 유효물질을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[220]

[221] <약제 제조예 1> 산제의 제조

[222] 유효물질 2 g

[223] 유당 1 g

[224] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[225]

[226] <약제 제조예 2> 정제의 제조

[227] 유효물질 100 mg

[228] 옥수수전분 100 mg

[229] 유당 100 mg

[230] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[231] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[232]

[233] <약제 제조예 3> 캡슐제의 제조

- [234] 유효물질 100 mg
- [235] 옥수수전분 100 mg
- [236] 유 당 100 mg
- [237] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [238] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [239]
- [240] <약제 제조예 4> 주사제의 제조
- [241] 유효물질 10 $\mu\text{g/ml}$
- [242] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지
- [243] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ml
- [244] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명에 따른 유효물질을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120 °C에서 15 분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액을 제조하였다.
- [245]
- [246] <약제 제조예 5> 경비흡수제 (Nasal spray)의 제조
- [247] 유효물질 1.0 g
- [248] 아세트산나트륨 0.3 g
- [249] 메틸파라벤 0.1 g
- [250] 프로필파라벤 0.02 g
- [251] 염화나트륨 적량
- [252] HCl 또는 NaOH pH 조정 적량
- [253] 정제수 적량
- [254] 통상의 경비흡수제의 제조방법에 따라, 염수 (0.9% NaCl, w/v, 용매는 정제수) 1 mL당 유효물질 3 mg이 포함되도록 제조하고, 이를 불투명한 스프레이 용기에 충전하고 멸균시켜 경비흡수제를 제조하였다.
- [255]
- [256] <약제 제조예 6> 액제의 제조
- [257] 유효물질 100 mg
- [258] 이성화당 10 g
- [259] 만니톨 5 g
- [260] 정제수 적량
- [261] 통상의 액제의 제조방법에 따라, 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체 100 mL로 조절한 후 갈색 병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[262]

[263] 건강식품의 제조예

[264] 본 발명에 따른 유효물질은 목적에 따라 여러 형태의 건강식품으로 제조 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 유효물질을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 건강식품의 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[265]

[266] <건강식품 제조예 1> 유제품(dairy products)의 제조

[267] 본 발명의 유효물질 0.01-1 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[268]

[269] <건강식품 제조예 2> 선식의 제조

[270] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 본 발명의 유효물질을 진공 농축기에서 감압농축하고 건조분말을 얻었다. 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 유효물질의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[271] 곡물류(현미 34 중량부, 율무 19 중량부, 보리 20 중량부),

[272] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[273] 유효물질 (2 중량부),

[274] 영지(1.5 중량부), 및

[275] 지황(1.5 중량부).

[276]

[277] 건강기능식품의 제조예

[278] 본 발명에 따른 유효물질은 목적에 따라 여러 형태의 건강기능식품으로 제조 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 유효물질을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 건강기능식품의 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[279]

[280] <건강기능식품 제조예 1> 건강기능식품의 제조

[281] 유효물질 100 mg

[282] 비타민 혼합물 적량

[283] 비타민 A 아세테이트 70 µg

[284] 비타민 E 1.0 mg

[285] 비타민 B1 0.13 mg

[286] 비타민 B2 0.15 mg

[287] 비타민 B6 0.5 mg

[288] 비타민 B12 0.2 µg

[289] 비타민 C 10 mg

- [290] 비오틴 10 μg
- [291] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [292] 엽산 50 μg
- [293] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [294] 무기질 혼합물 적량
- [295] 황산제1철 1.75 mg
- [296] 산화아연 0.82 mg
- [297] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [298] 제1인산칼륨 15 mg
- [299] 제2인산칼슘 55 mg
- [300] 구연산칼륨 90 mg
- [301] 탄산칼슘 100 mg
- [302] 염화마그네슘 24.8 mg
- [303] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능성 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능성 식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능성 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [304]
- [305] <건강기능식품 제조예 2> 건강 기능 음료의 제조
- [306] 유효물질 100 mg
- [307] 구연산 100 mg
- [308] 올리고당 100 mg
- [309] 매실농축액 2 mg
- [310] 타우린 100 mg
- [311] 정제수를 가하여 전체 500 mL
- [312] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [313]
- [314] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이지 아닌 것으로 이해해야 한다.

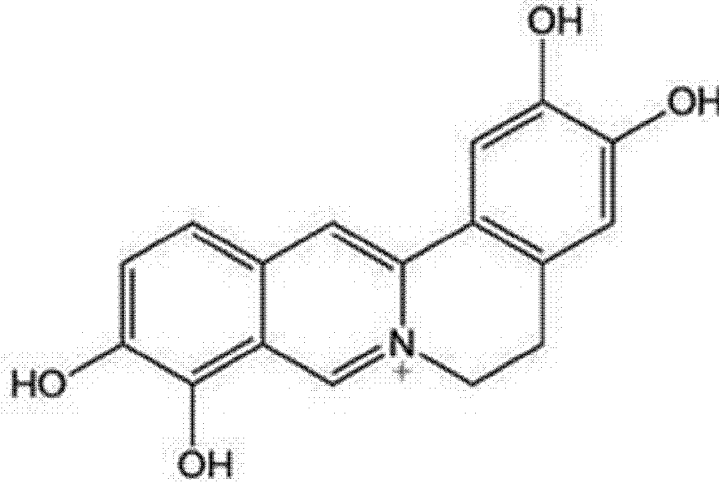
산업상 이용가능성

- [315] 본 발명은 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 미토파지 활성화에 기반한 스크리닝을 통해 발굴된 이소퀴놀린 유도체가 우수한 미토파지 촉진 효과를 발휘하며, 이를 통해 파킨슨병의 근본적인 치료제로 활용될 수 있음을 확인하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체는 파킨슨병 동물모델에서 파킨슨병과 밀접한 연관이 있는 미토콘드리아 기능이상을 개선할 뿐만 아니라, 파킨슨병 동물모델의 운동기능장애를 개선할 수 있음이 확인되었다. 특히, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체가 처리된 파킨슨병 동물모델은 파킨슨병의 주요 발병 원인인 도파민성 신경세포의 사멸이 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명에 따른 이소퀴놀린 유도체는 파킨슨병의 근본적인 치료제로서 상기 질병의 예방, 개선, 및/또는 치료 분야에서 유용하게 활용될 것으로 기대되는 바, 산업상 이용가능성이 인정된다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토파지의 활성을 특이적으로 촉진하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 미토파지의 활성은 PINK1에 비의존적인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 도파민성 신경세포의 수 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 파킨슨병은 유전성 파킨슨병 또는 산발성 파킨슨병인, 약학적 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 0 초과 40 μ M인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 미토콘드리아 기능이상을 개선시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서,

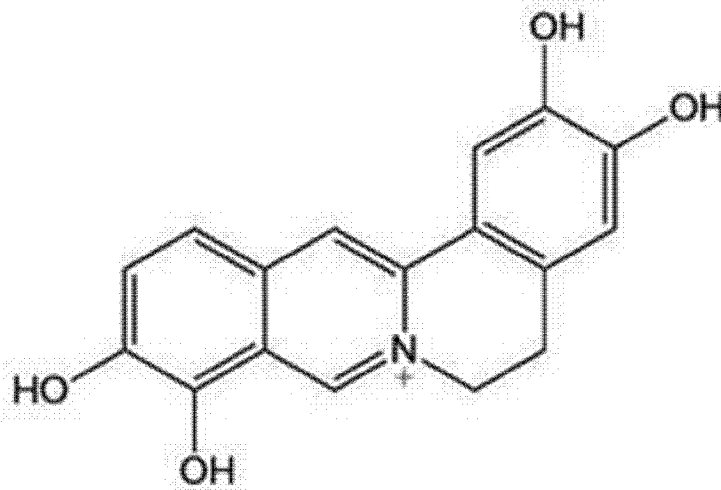
상기 미토콘드리아 기능이상 개선은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물:

- (a) 미토콘드리아의 정상 막전위의 수준을 유지시킴;
- (b) 미토콘드리아의 활성산소종 수준을 감소시킴; 및
- (c) 미토콘드리아의 ATP 합성능을 증가시킴.

[청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 약학적 조성물, 및 설명서를 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 키트.

[청구항 10] 하기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



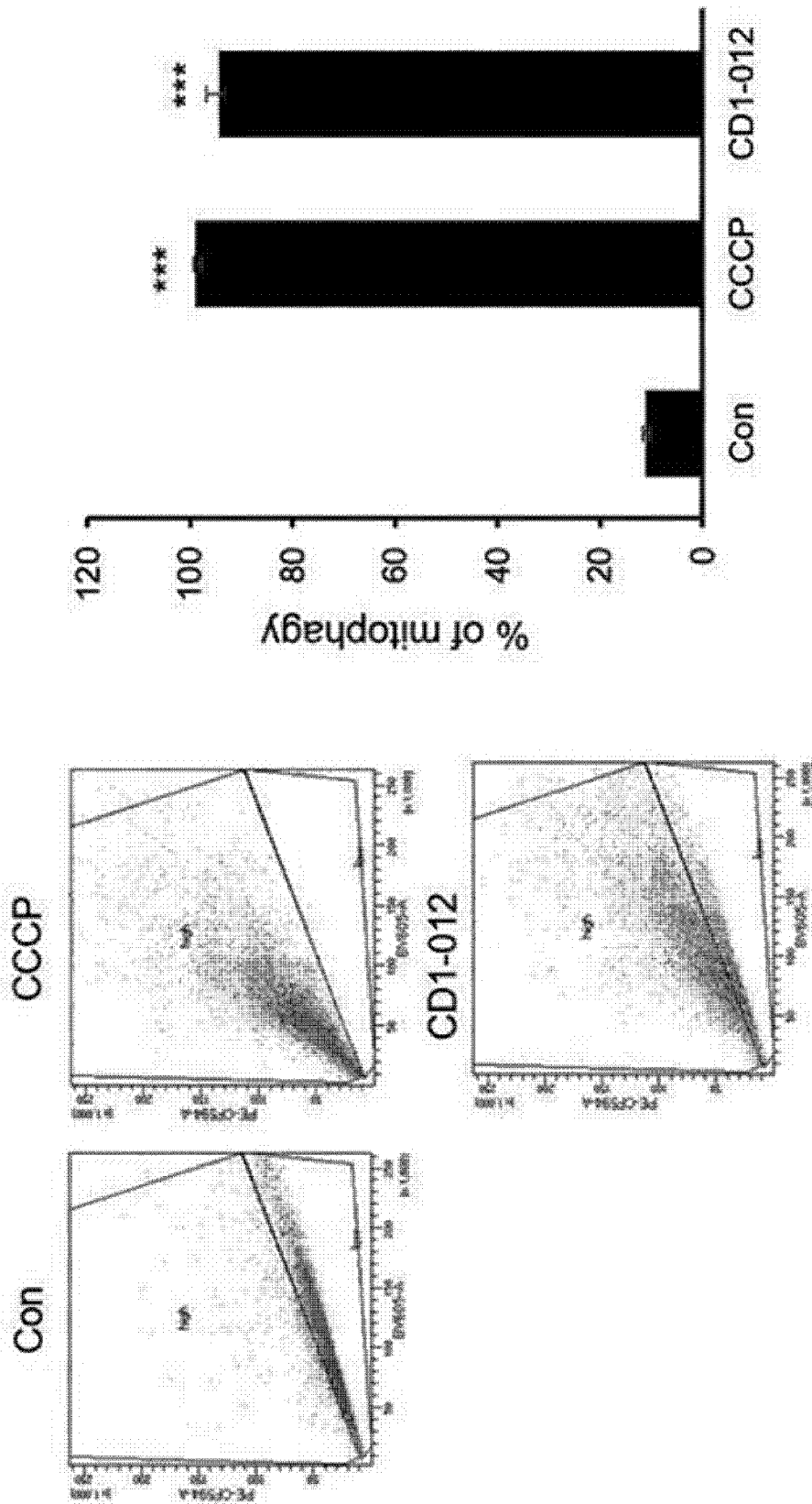
[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 파킨슨병은 유전성 파킨슨병 또는 산발성 파킨슨병인, 식품 조성물.

[청구항 12] 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료방법.

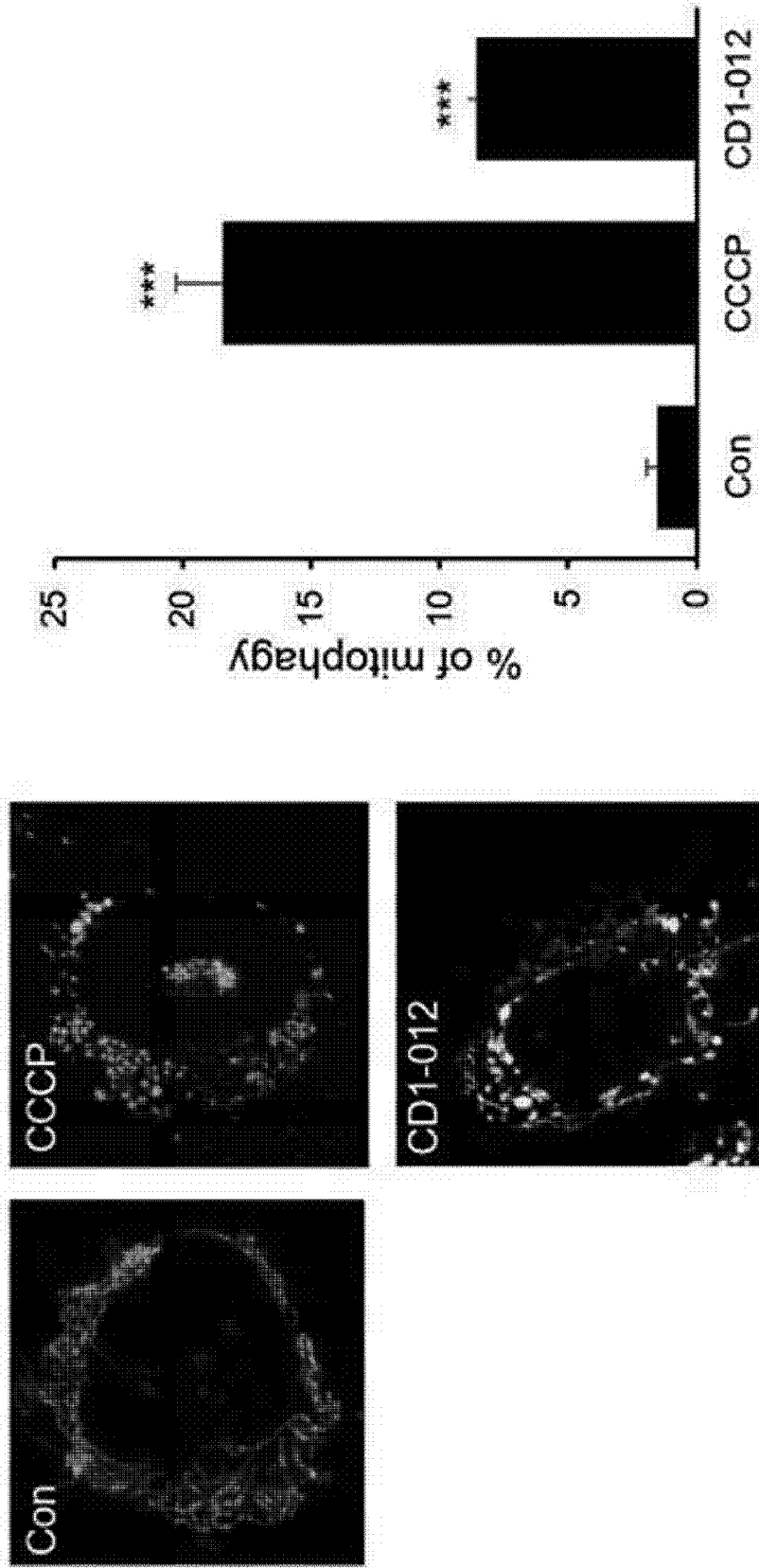
[청구항 13] 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 파킨슨병의 예방 또는 치료 용도.

[청구항 14] 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 이소퀴놀린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

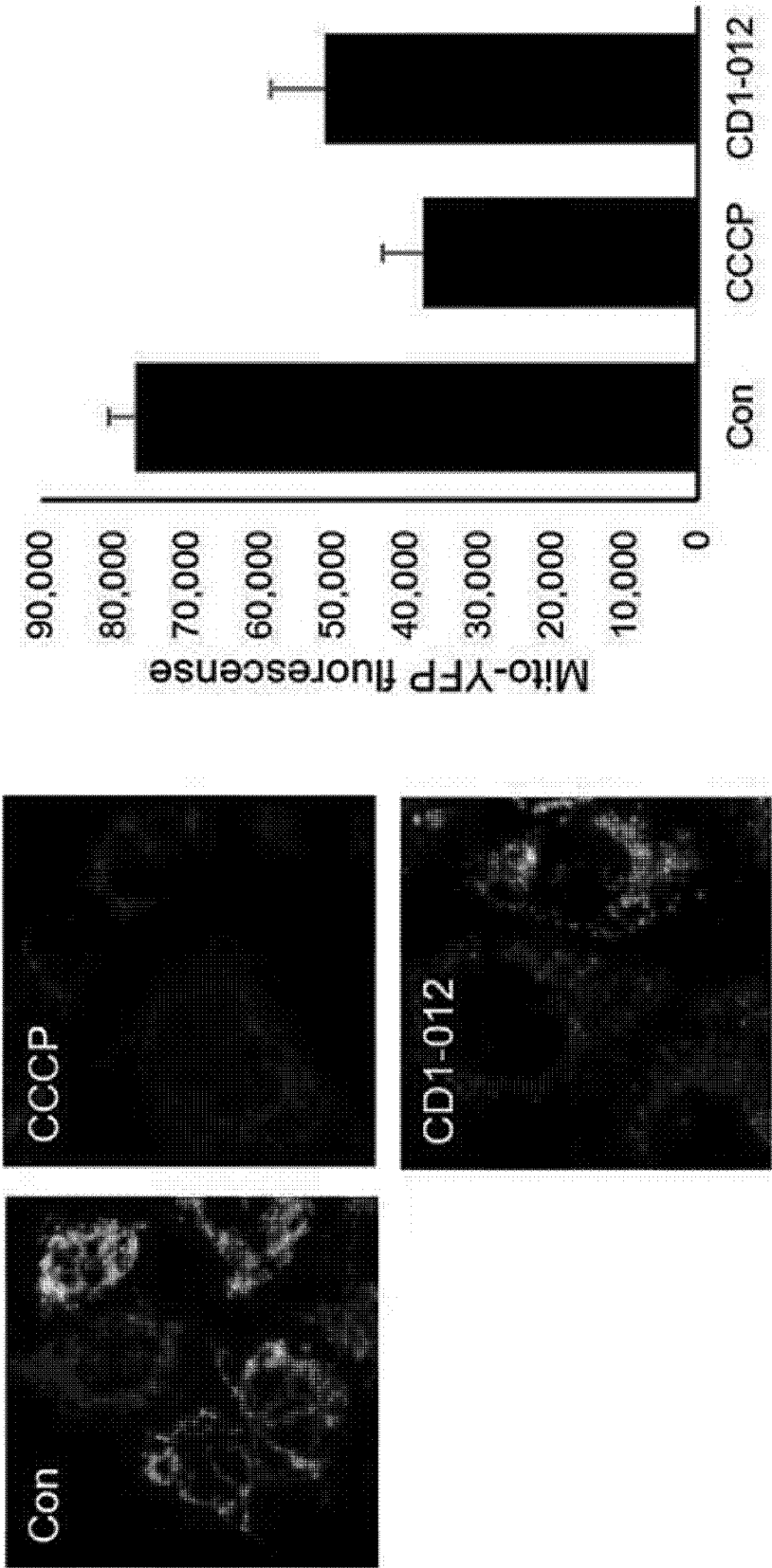
[도 1a]



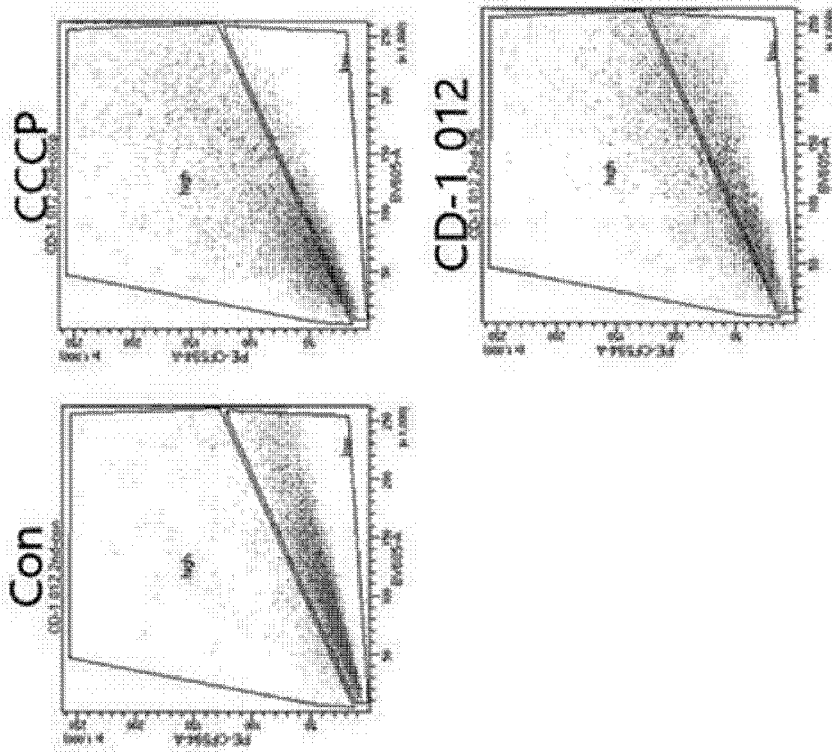
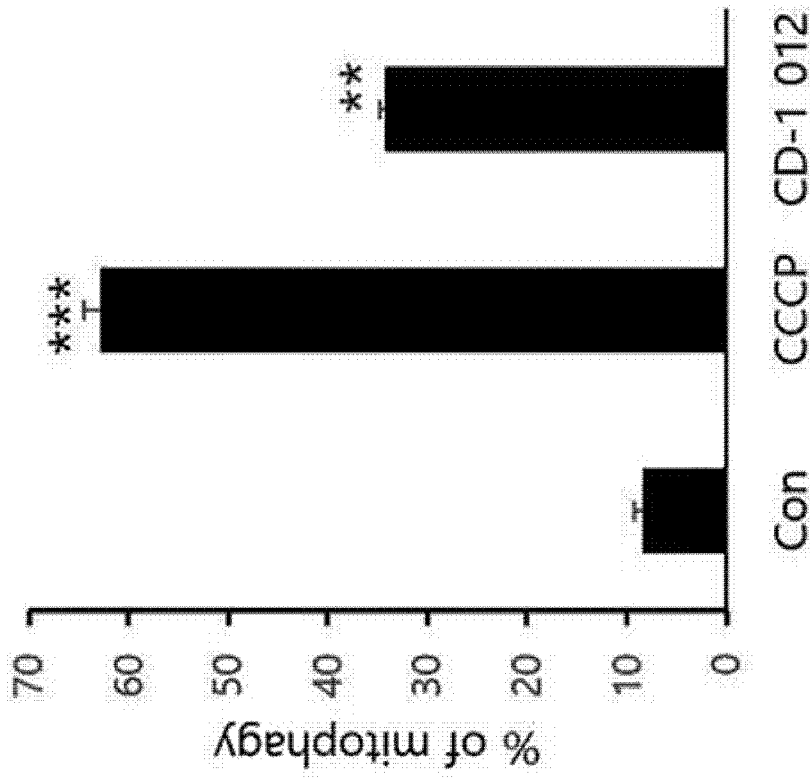
[도 1b]



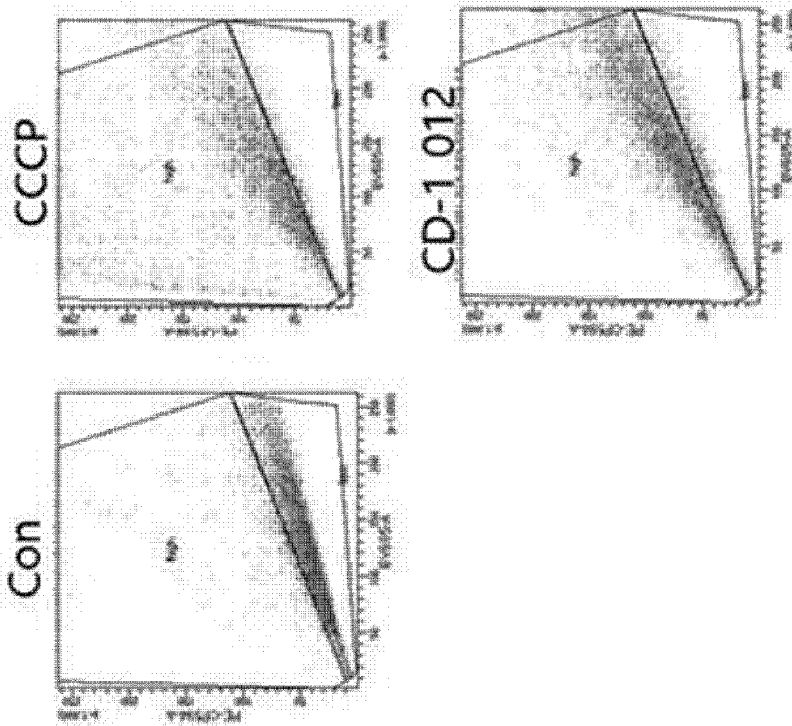
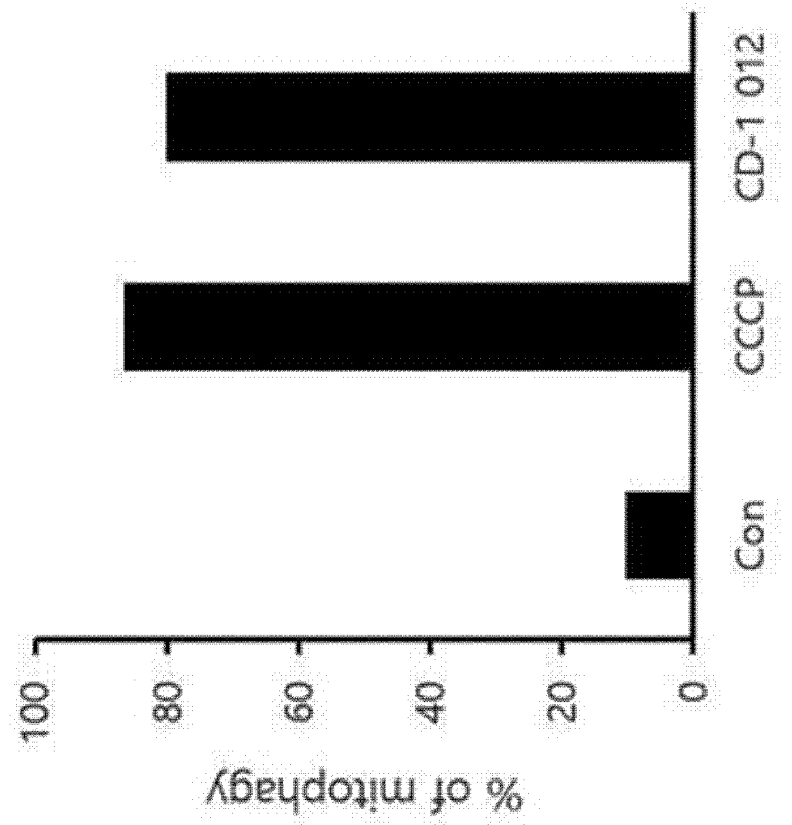
[도 1c]



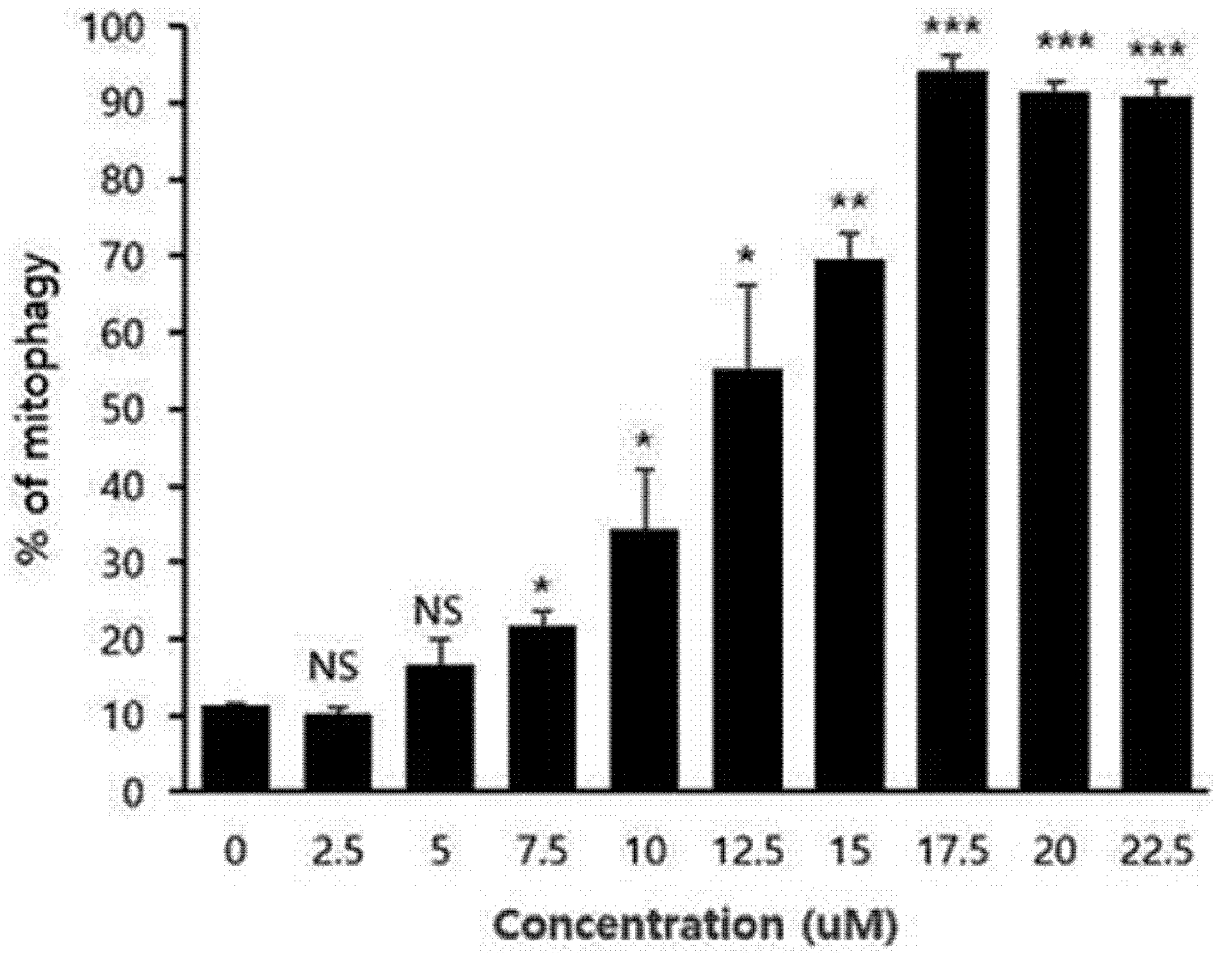
[도2a]



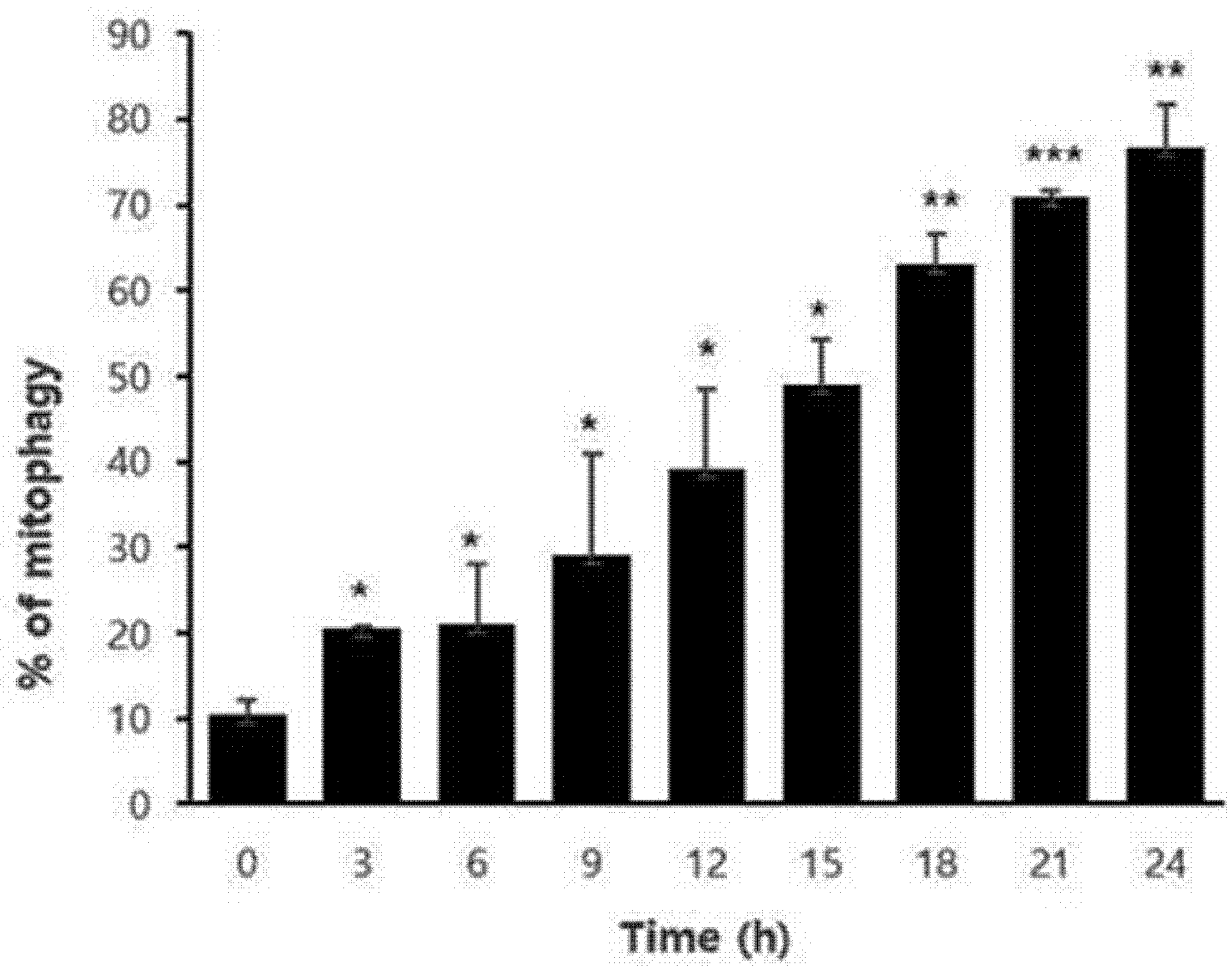
[도2b]



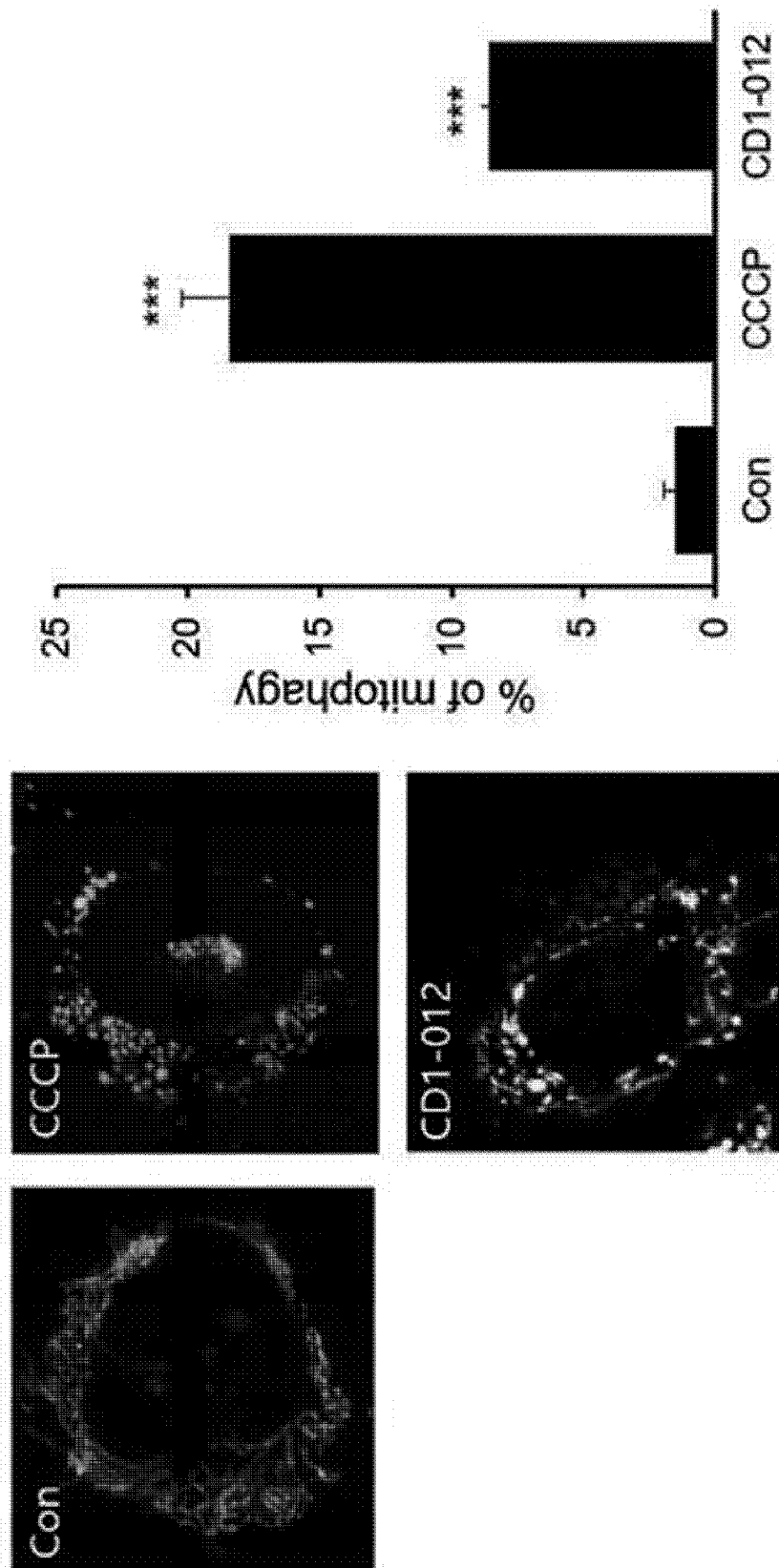
[도3a]



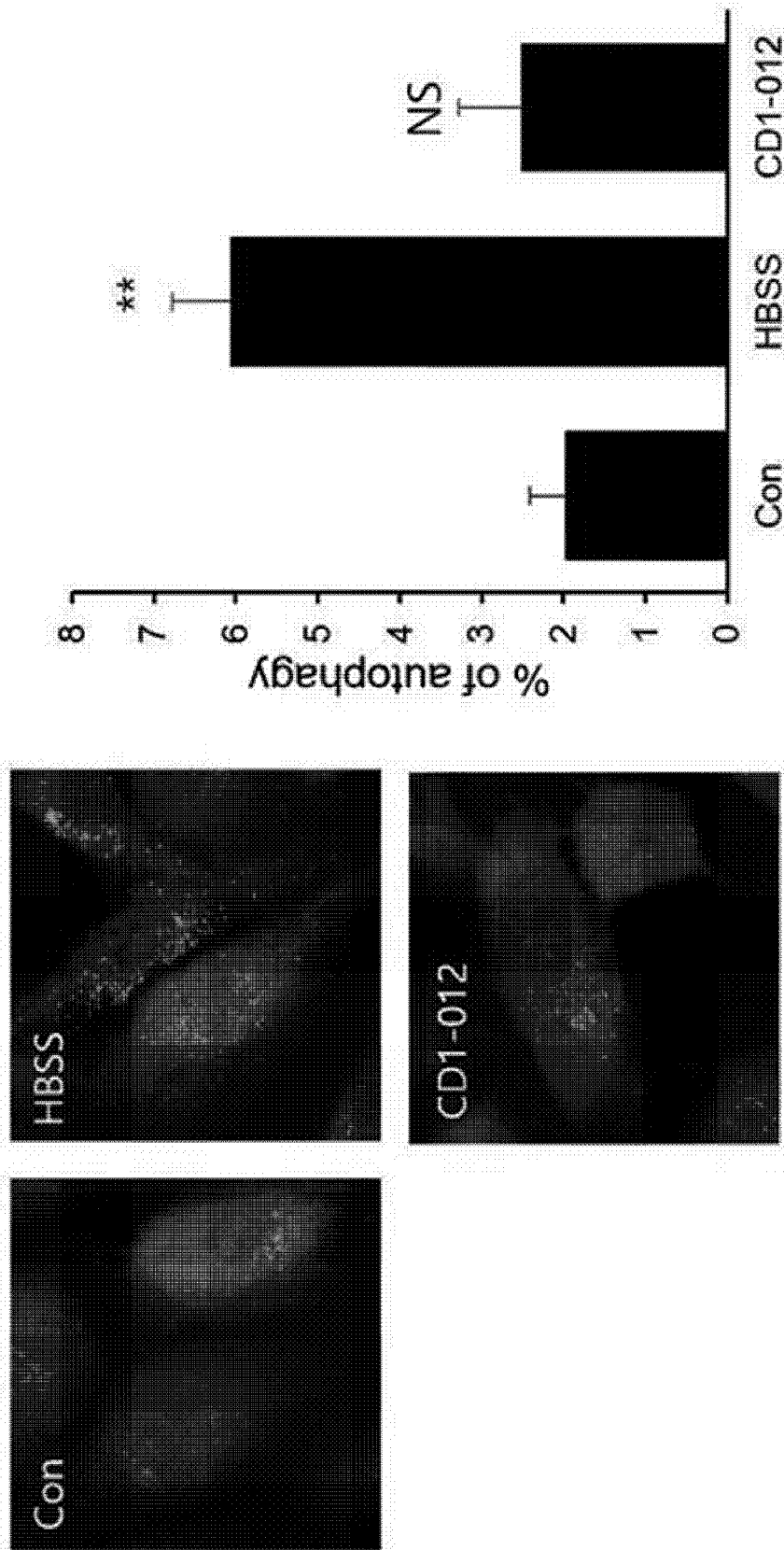
[도3b]



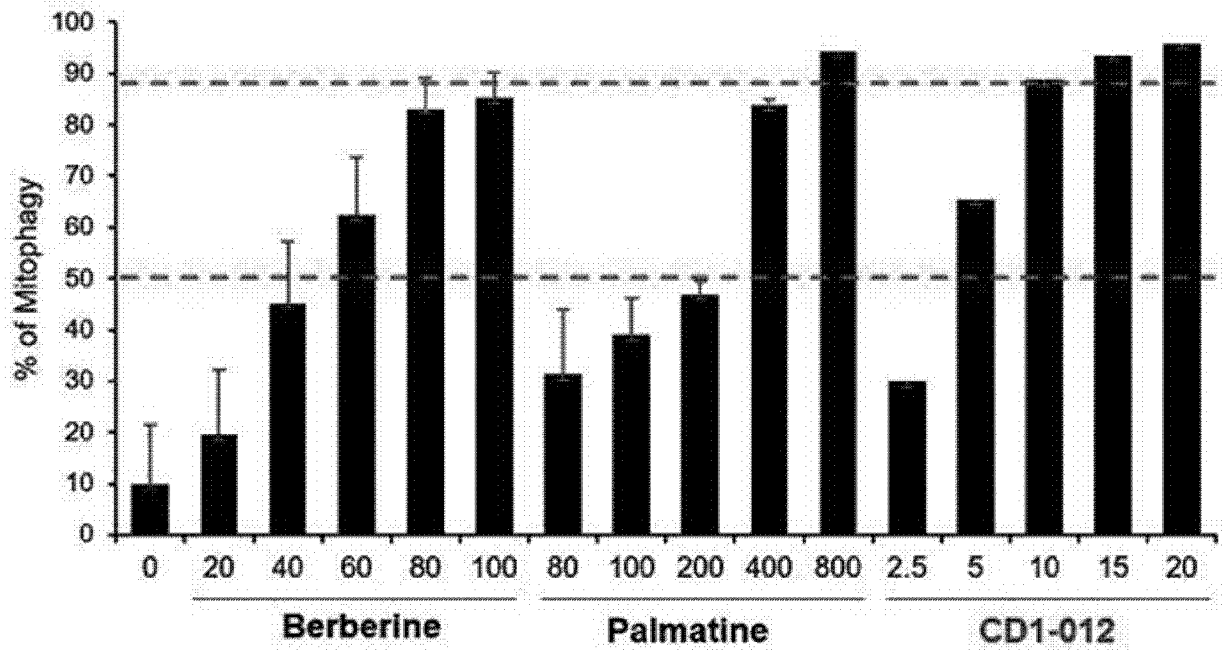
[도4a]



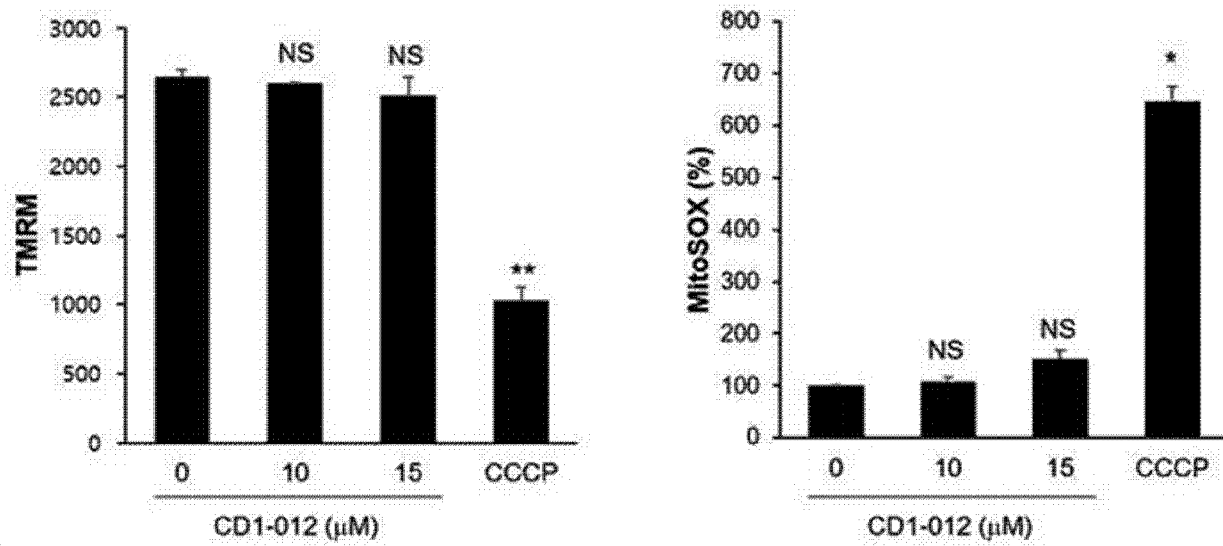
[도4b]



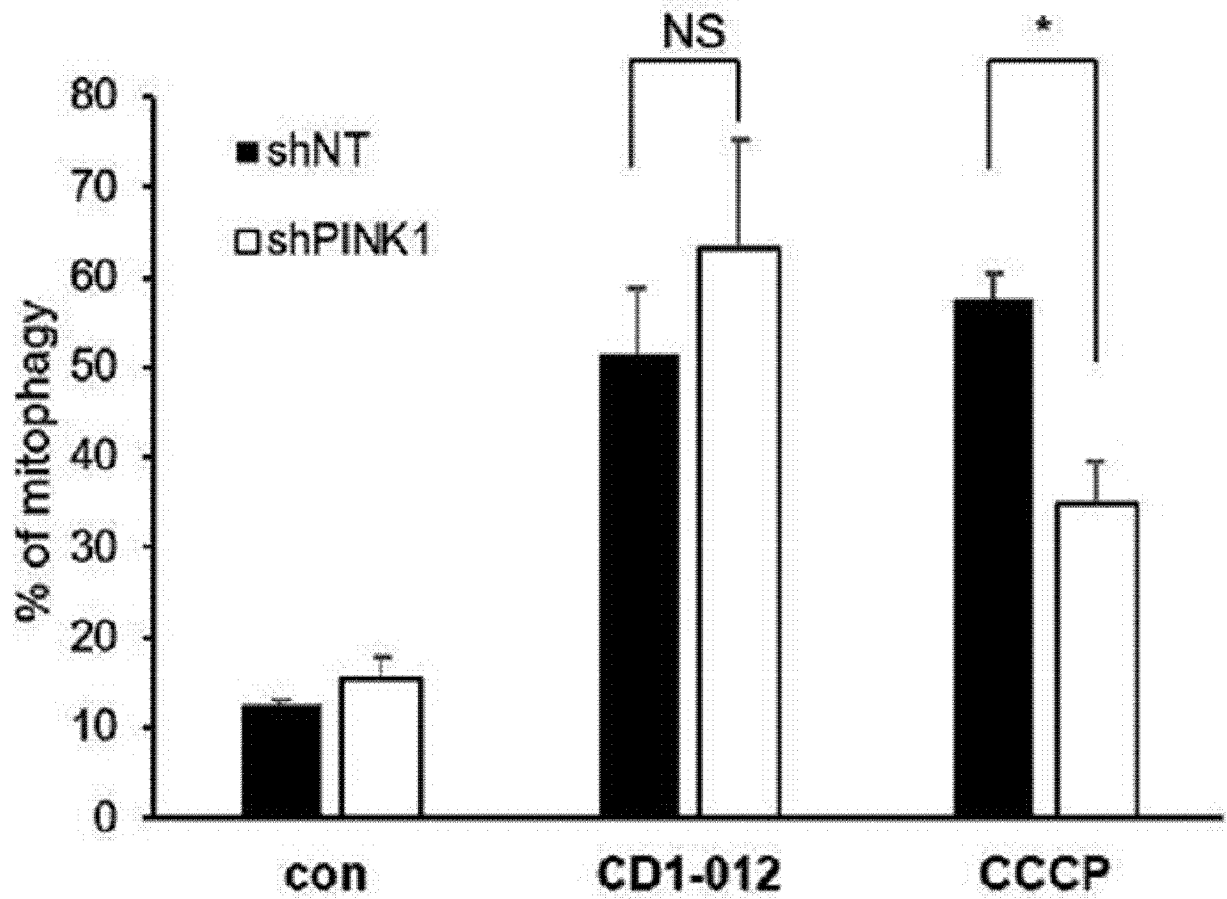
[도5]



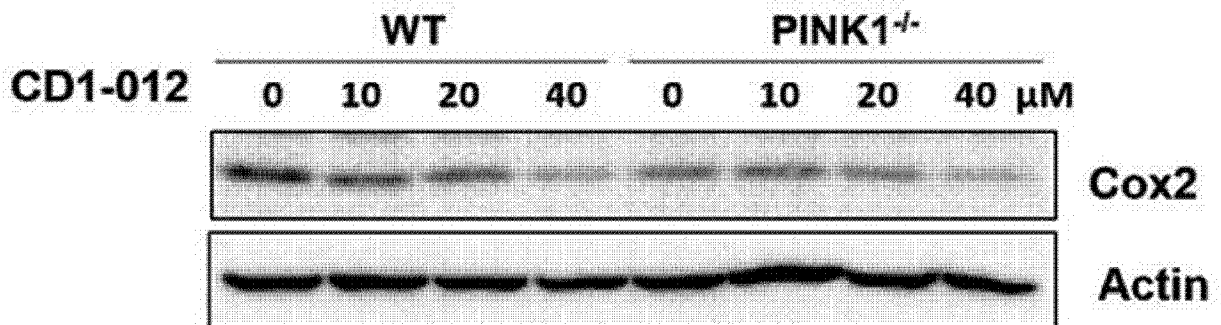
[도6]



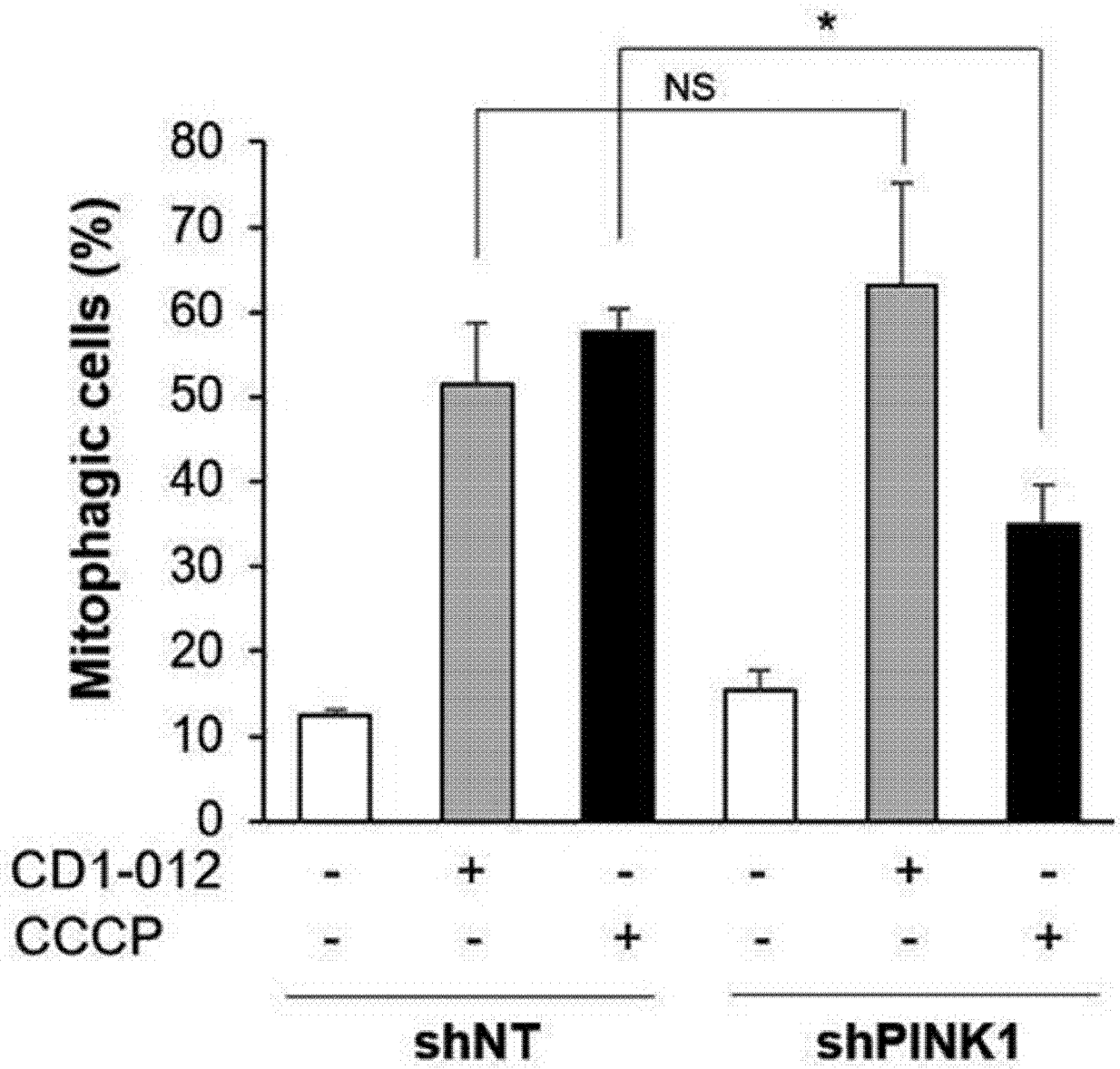
[도7]



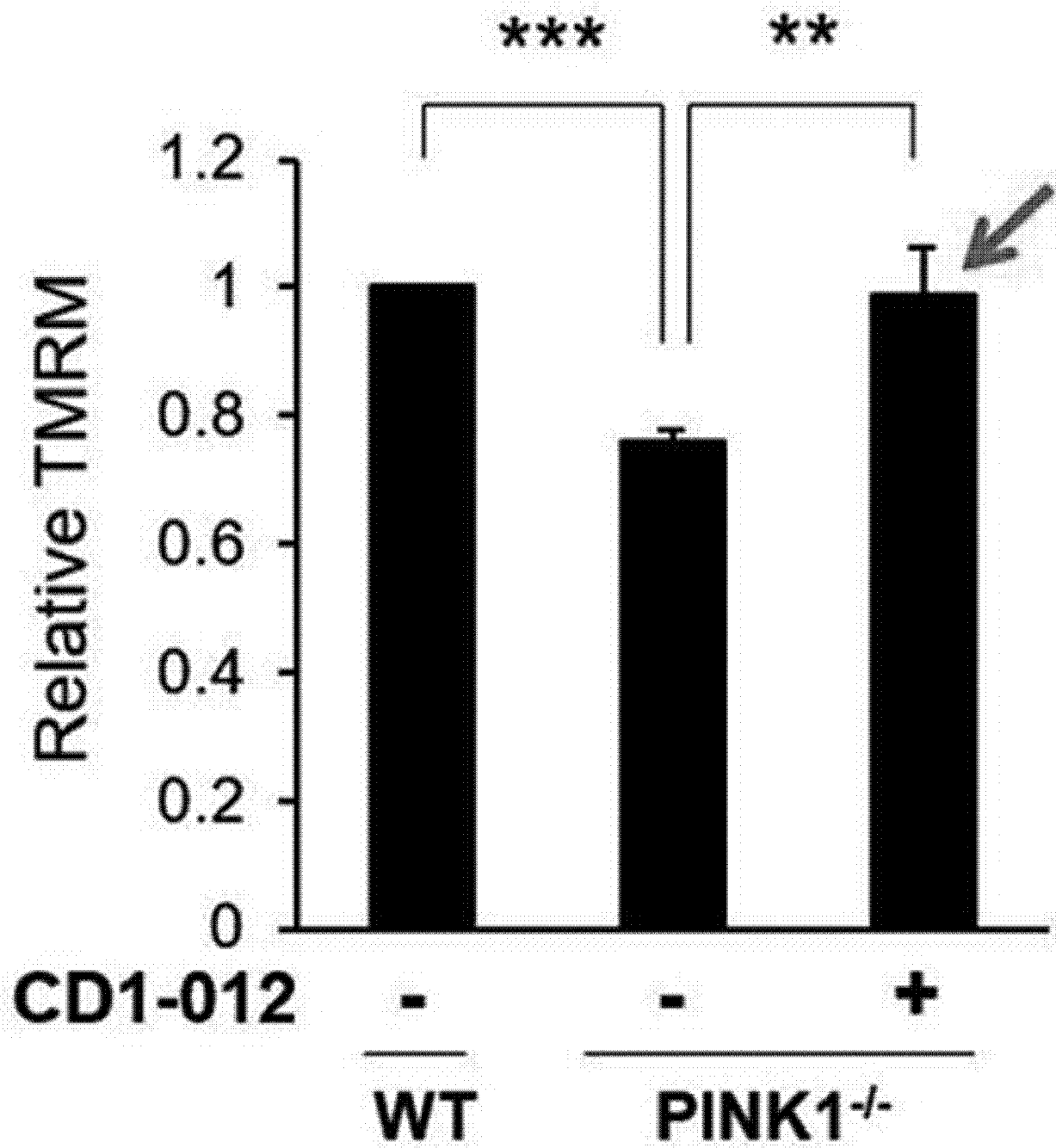
[도8a]



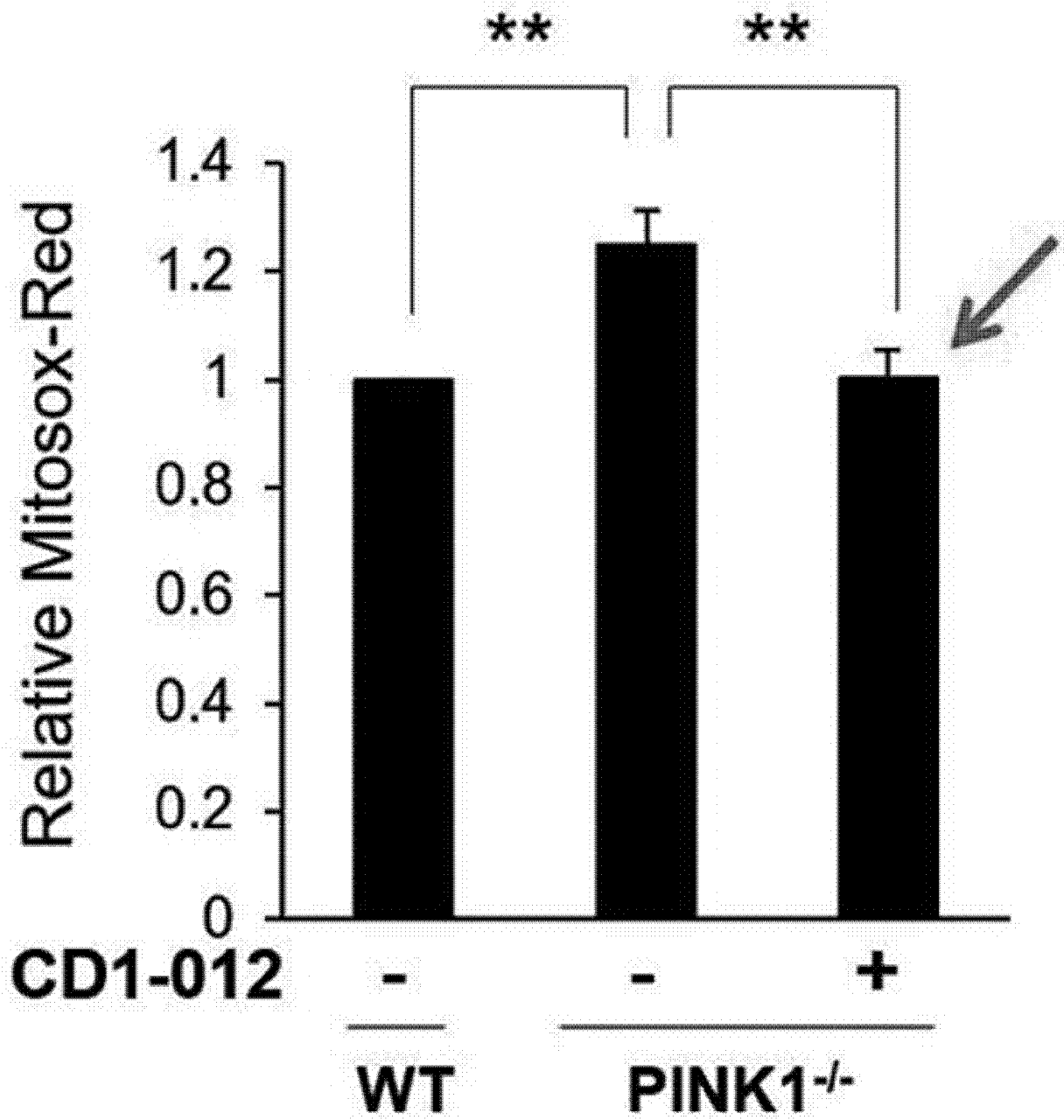
[도8b]



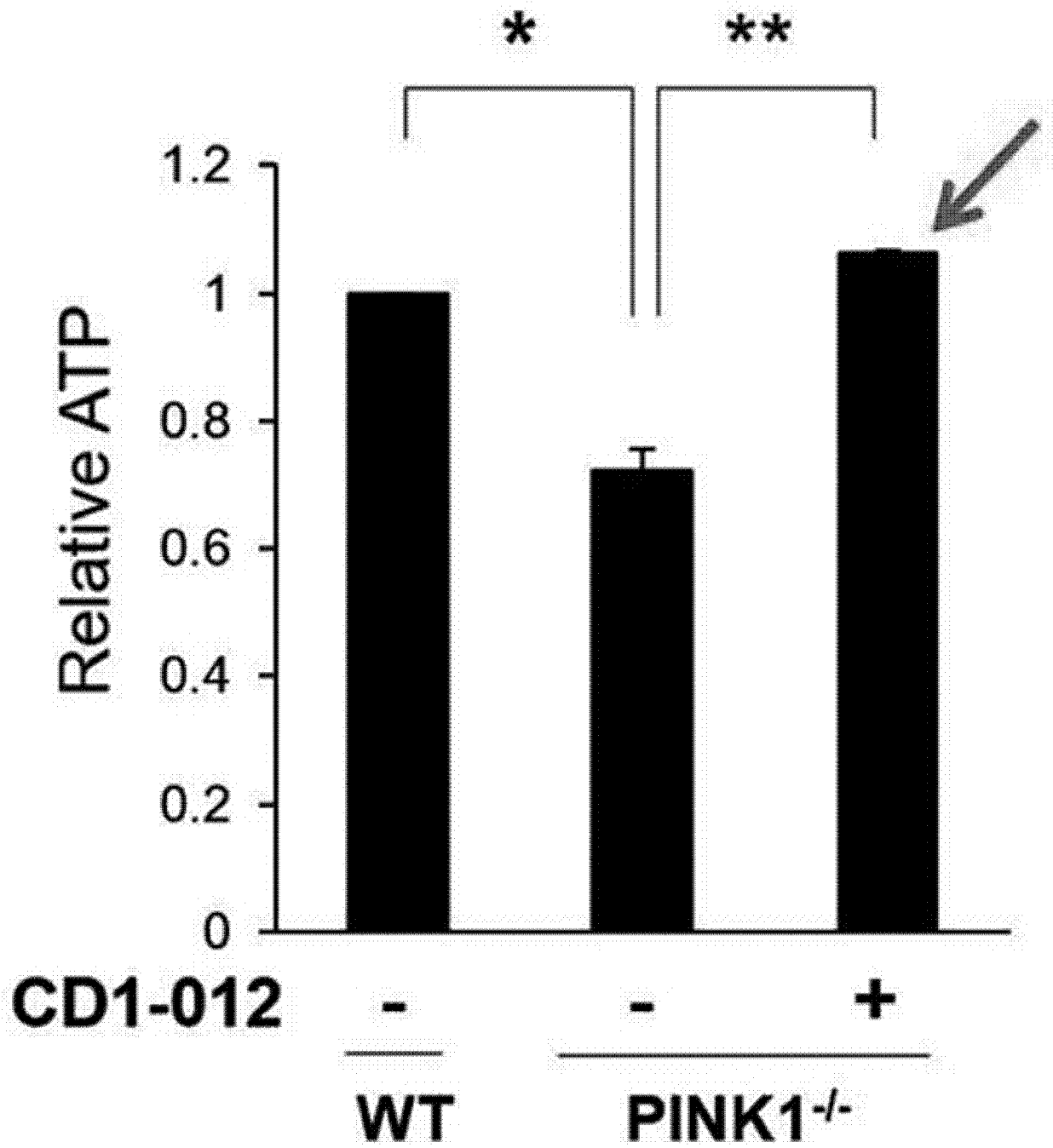
[도8c]



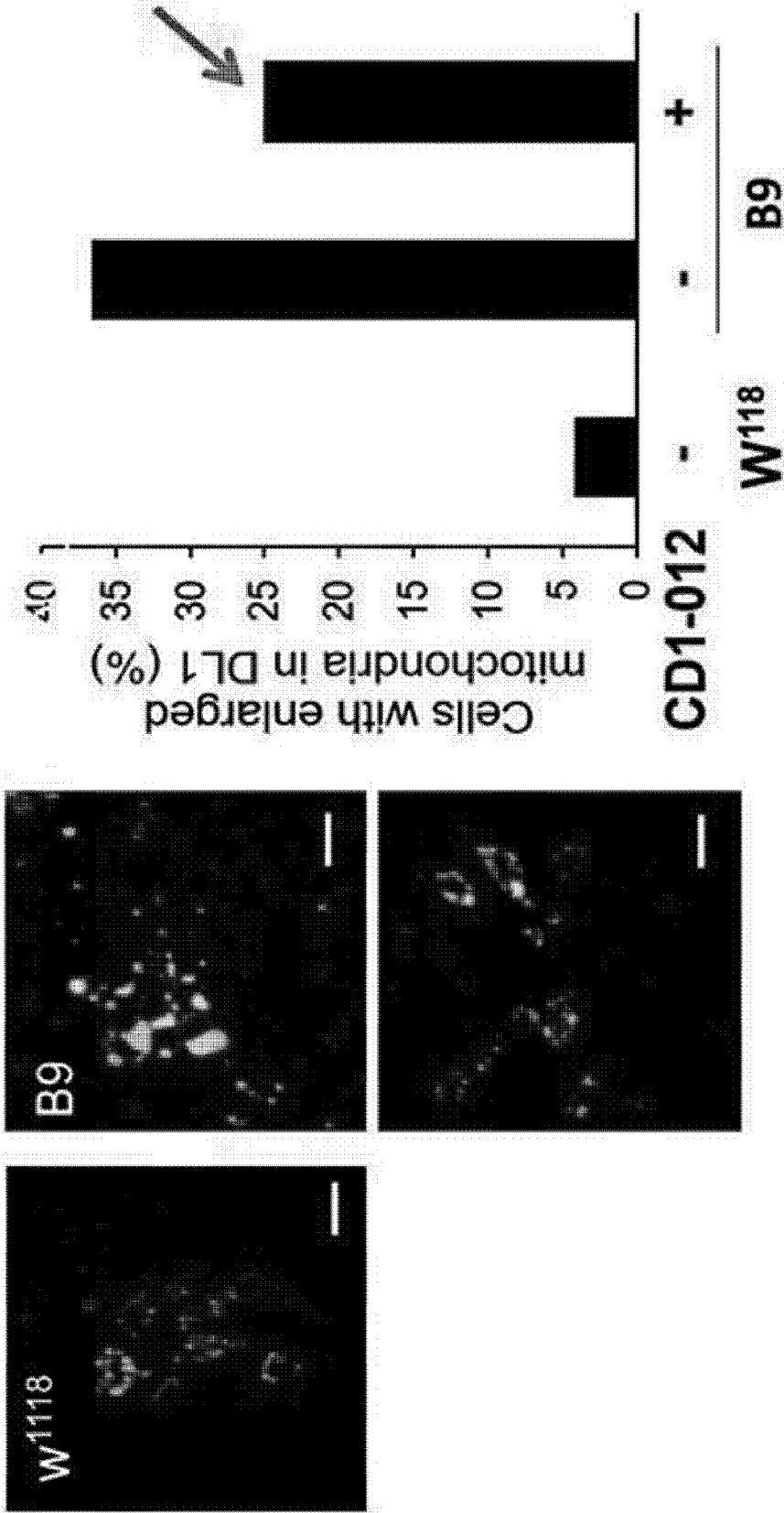
[도8d]



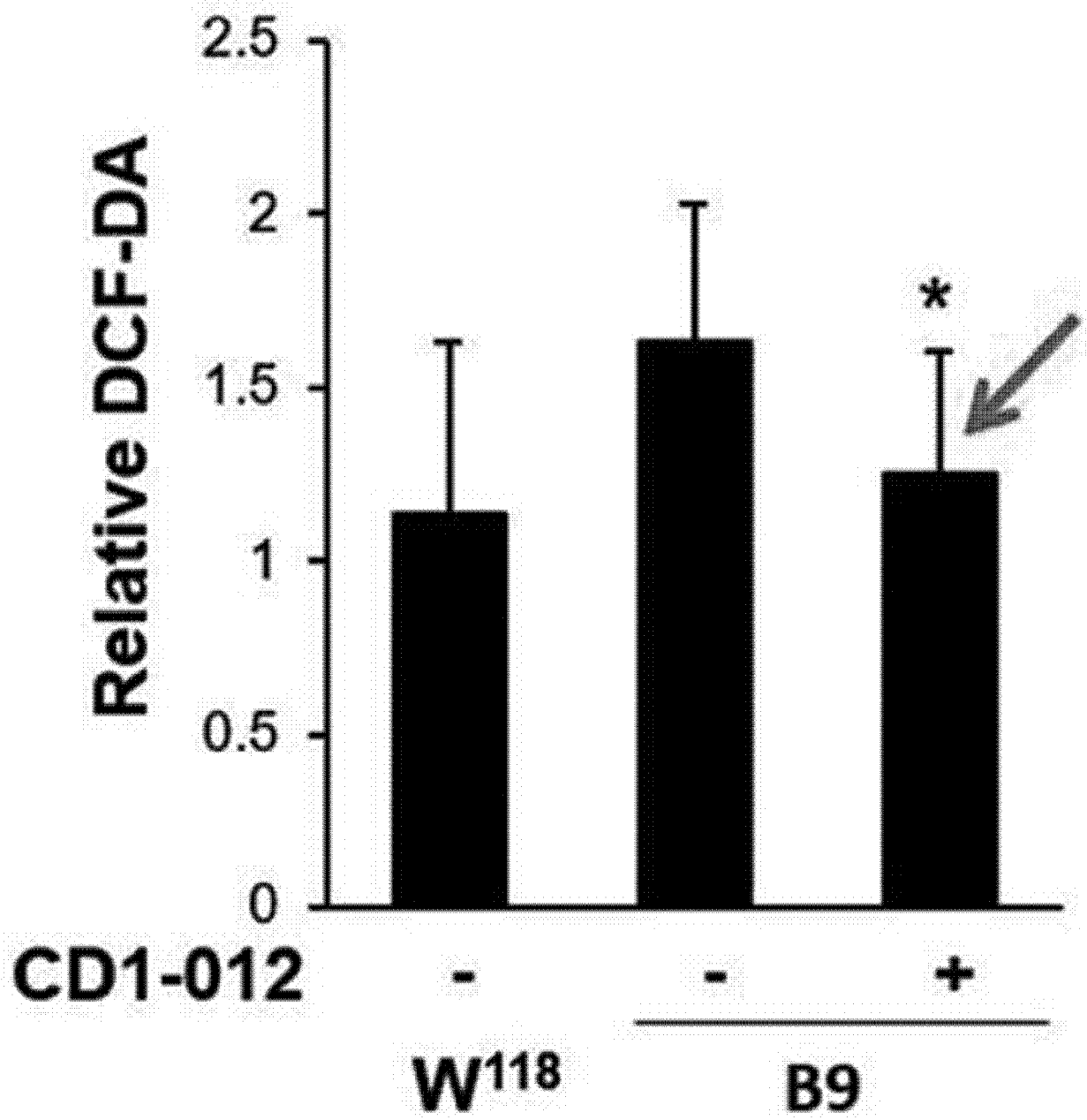
[도8e]



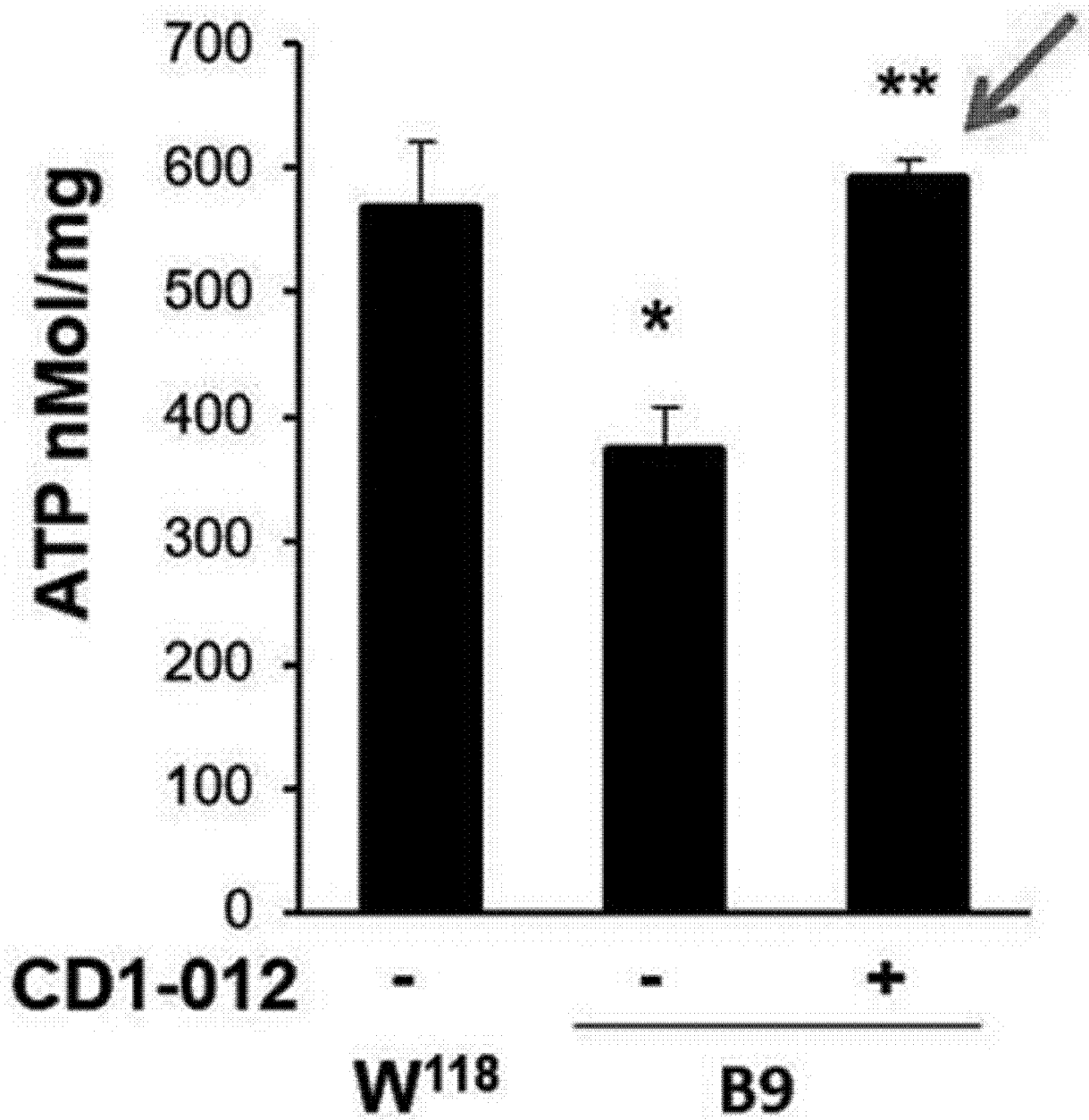
[도9a]



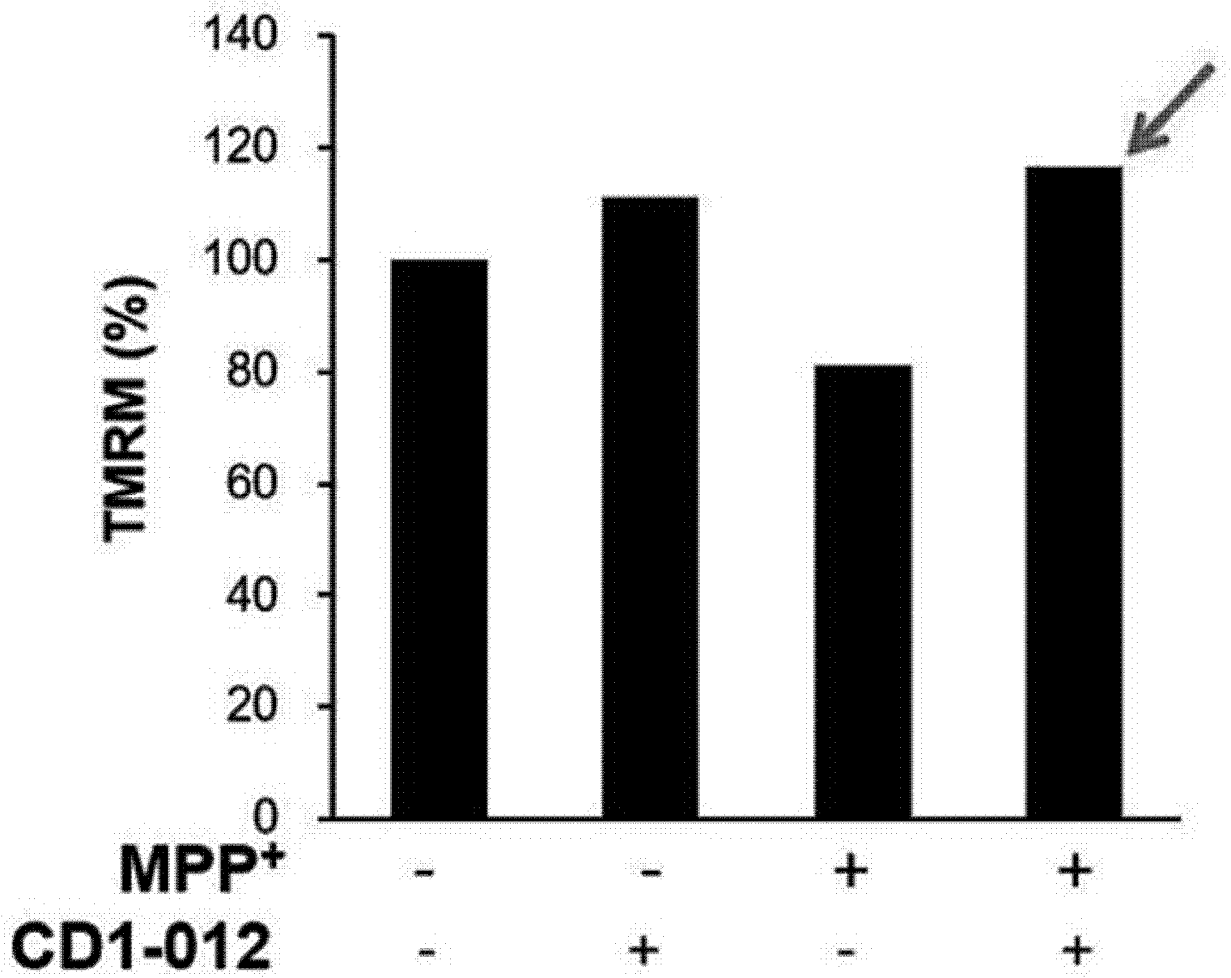
[도9b]



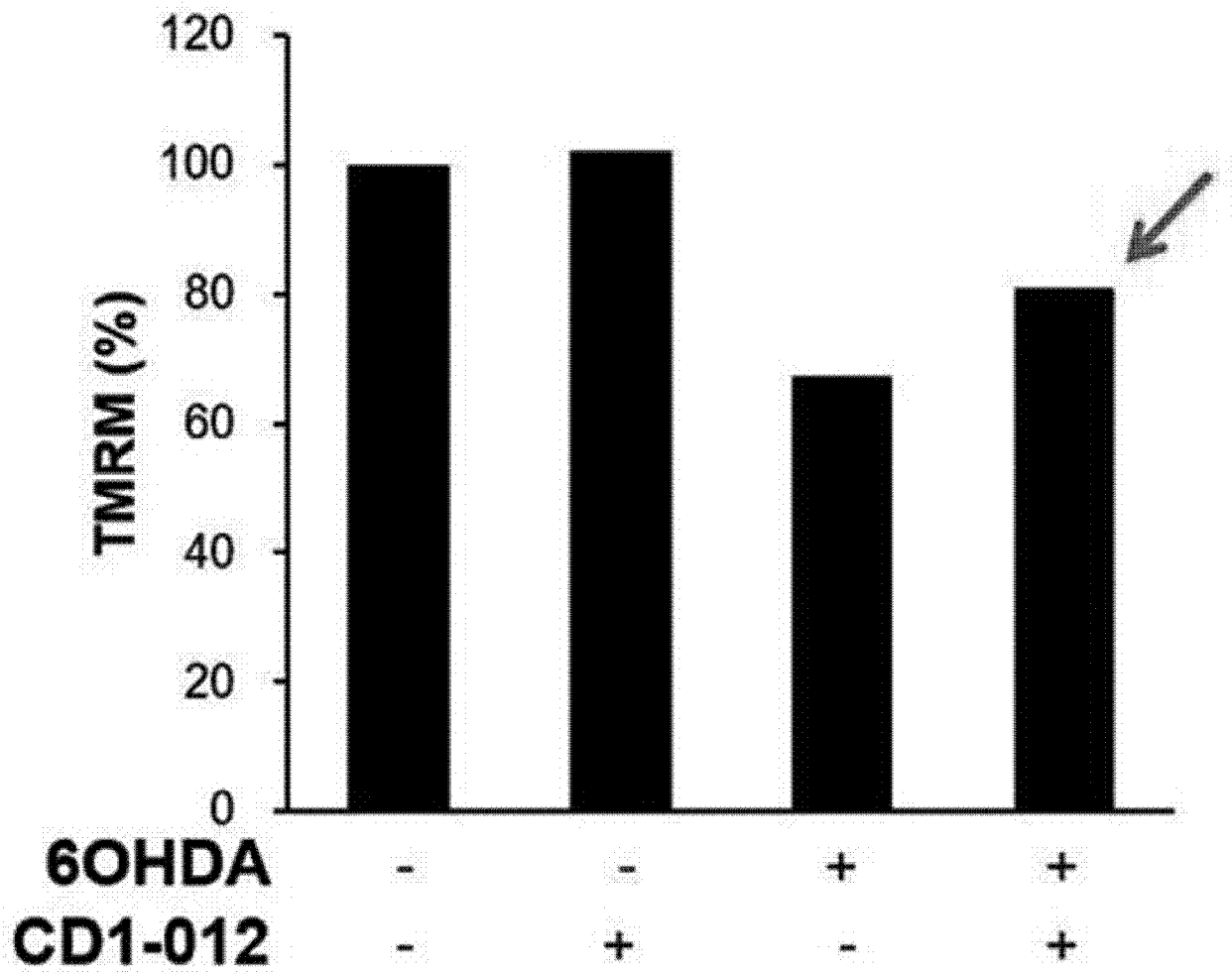
[도9c]



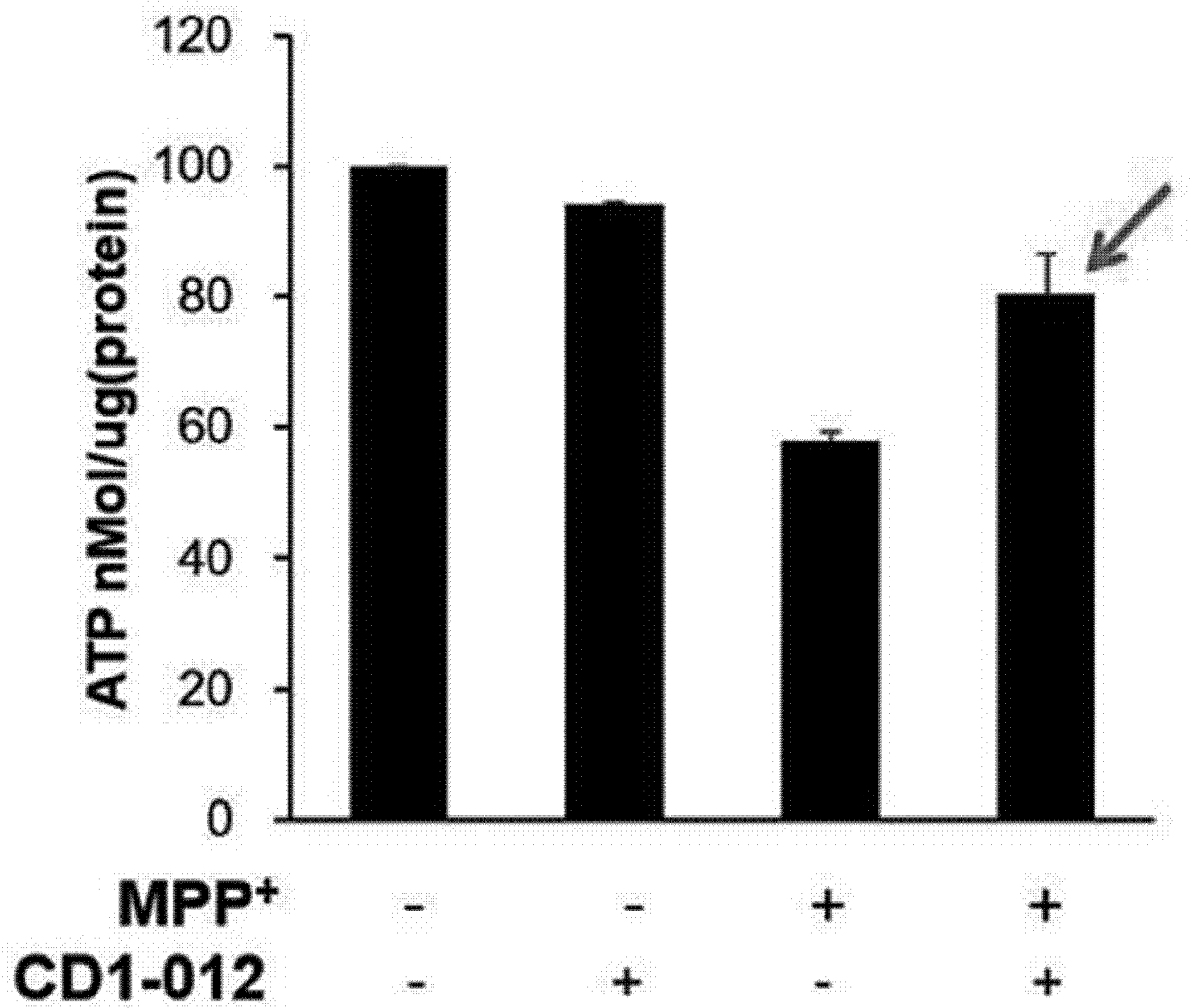
[도 10a]



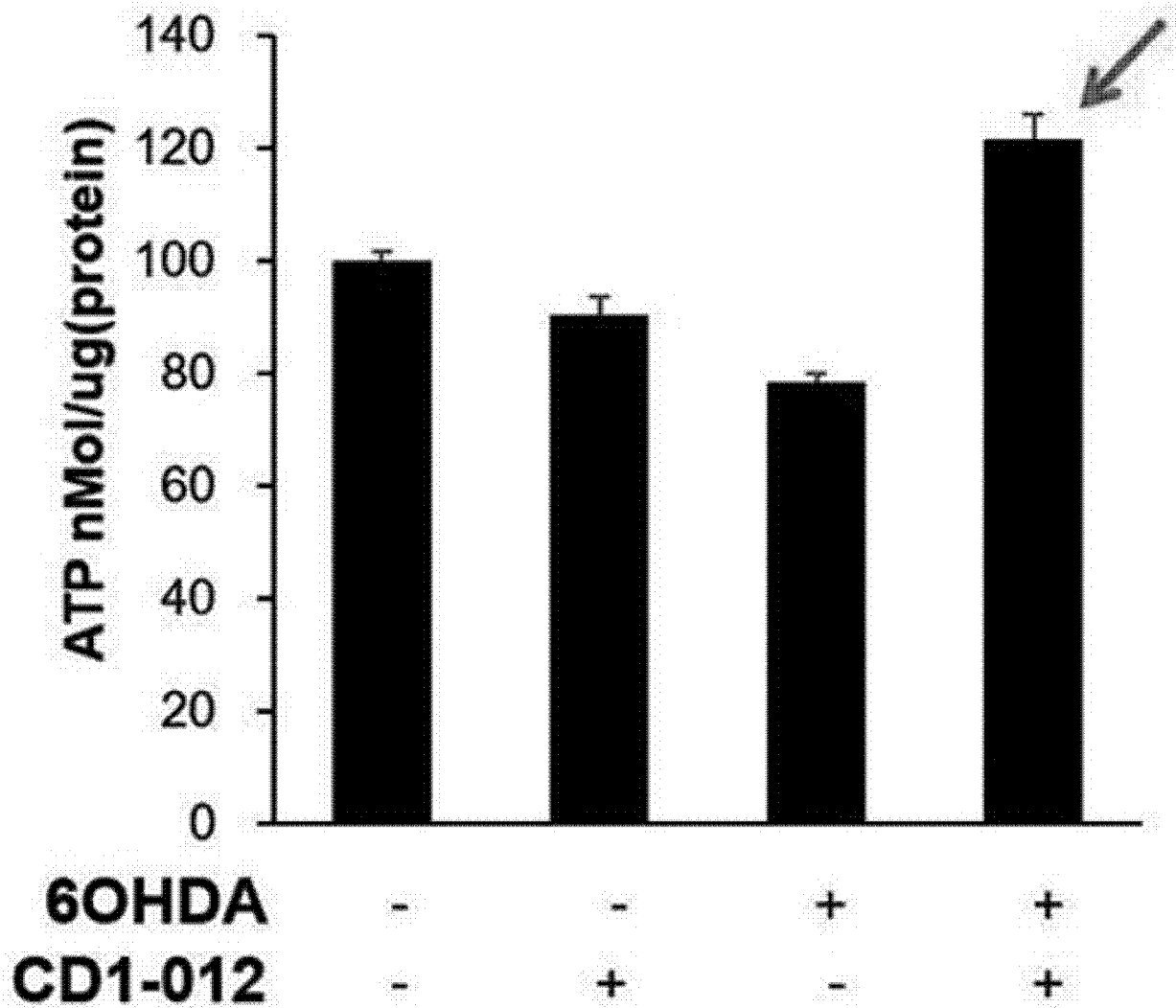
[도 10b]



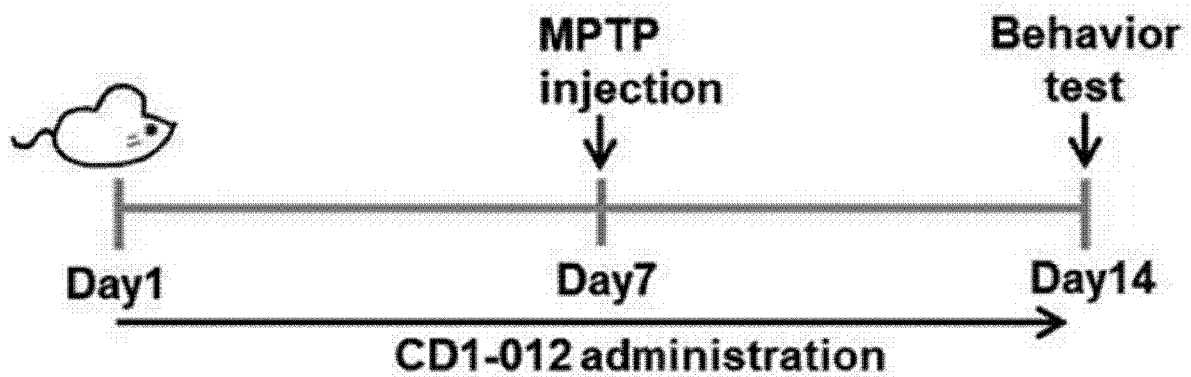
[도 10c]



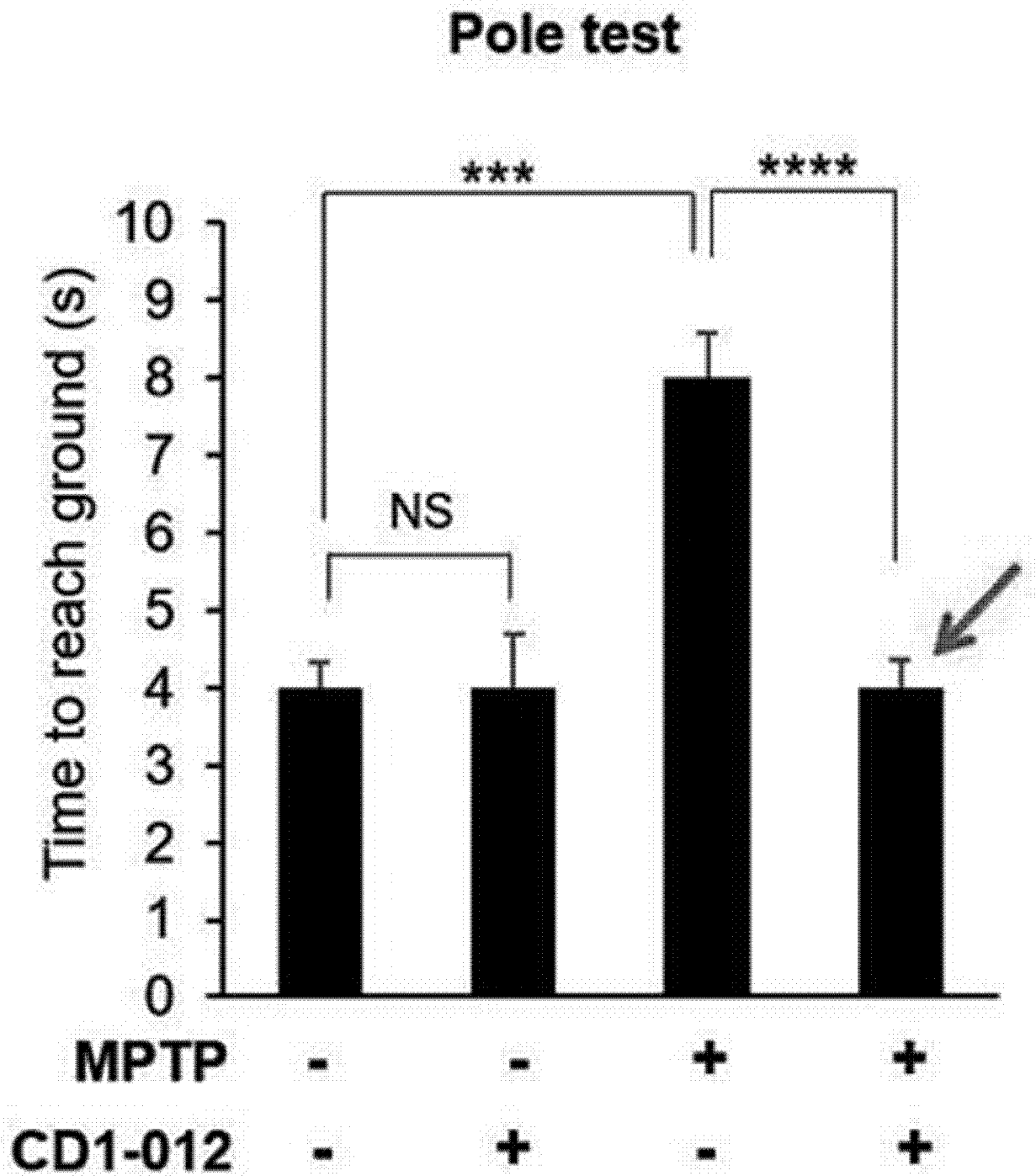
[도10d]



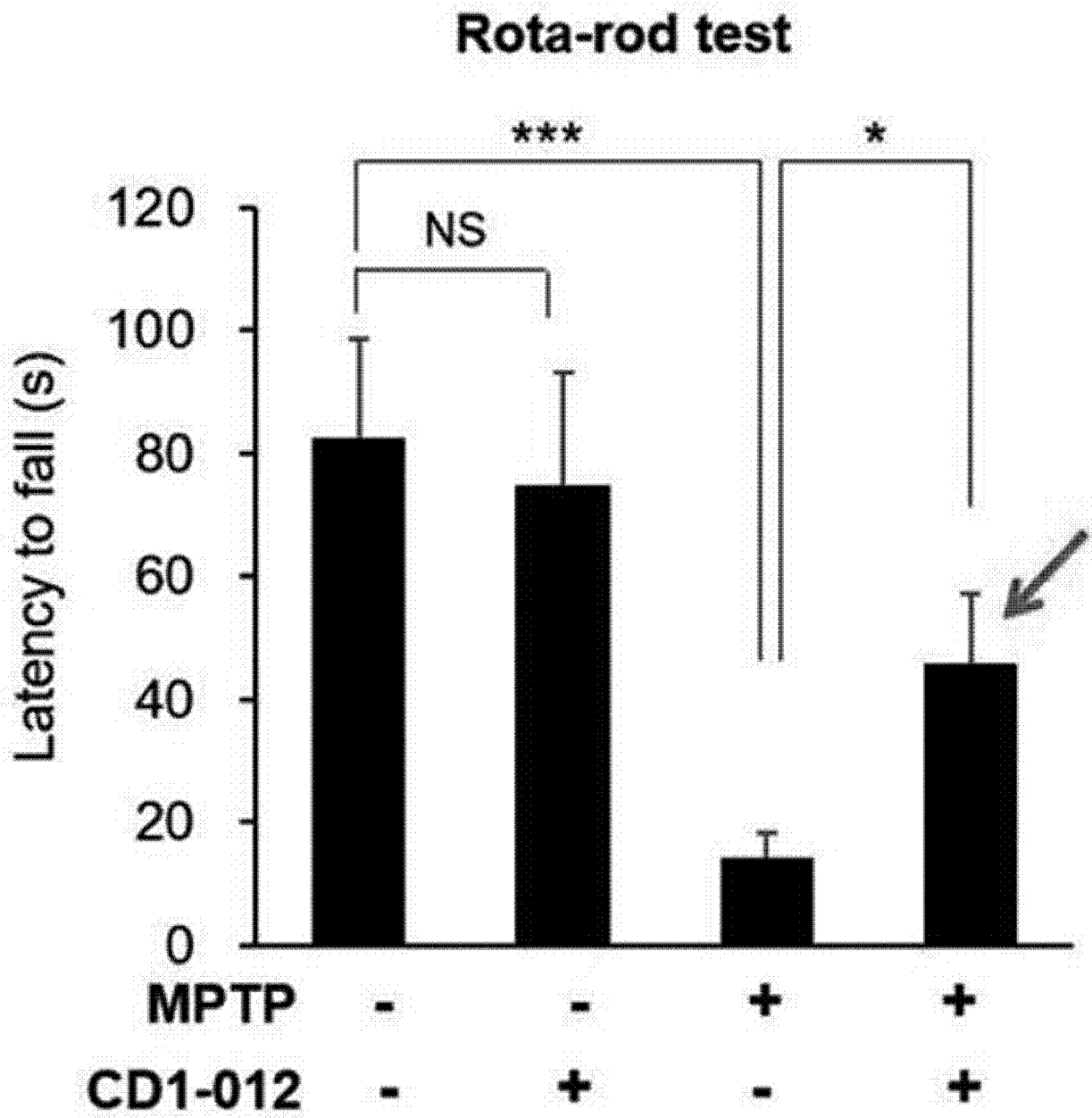
[도11a]



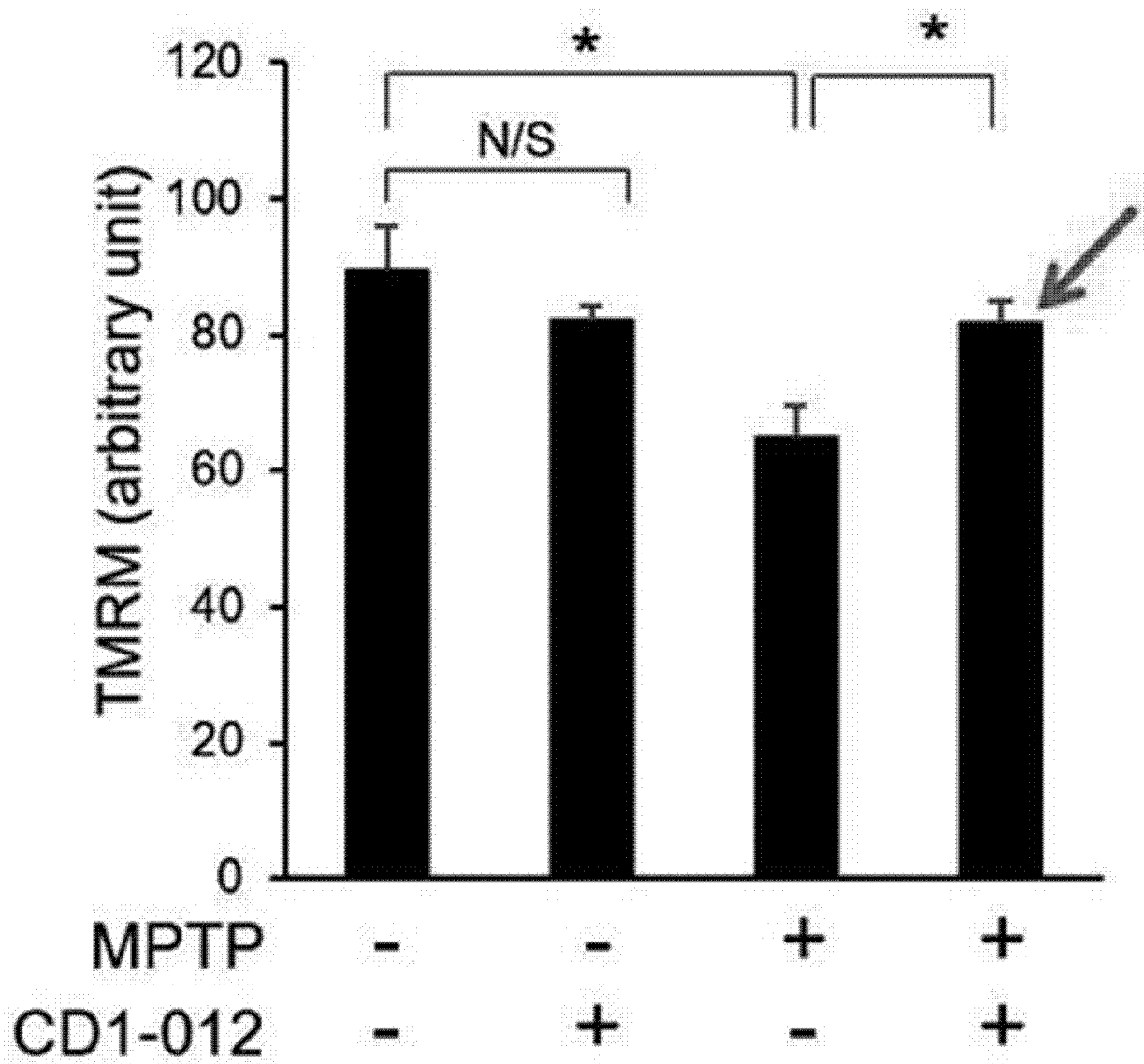
[도11b]



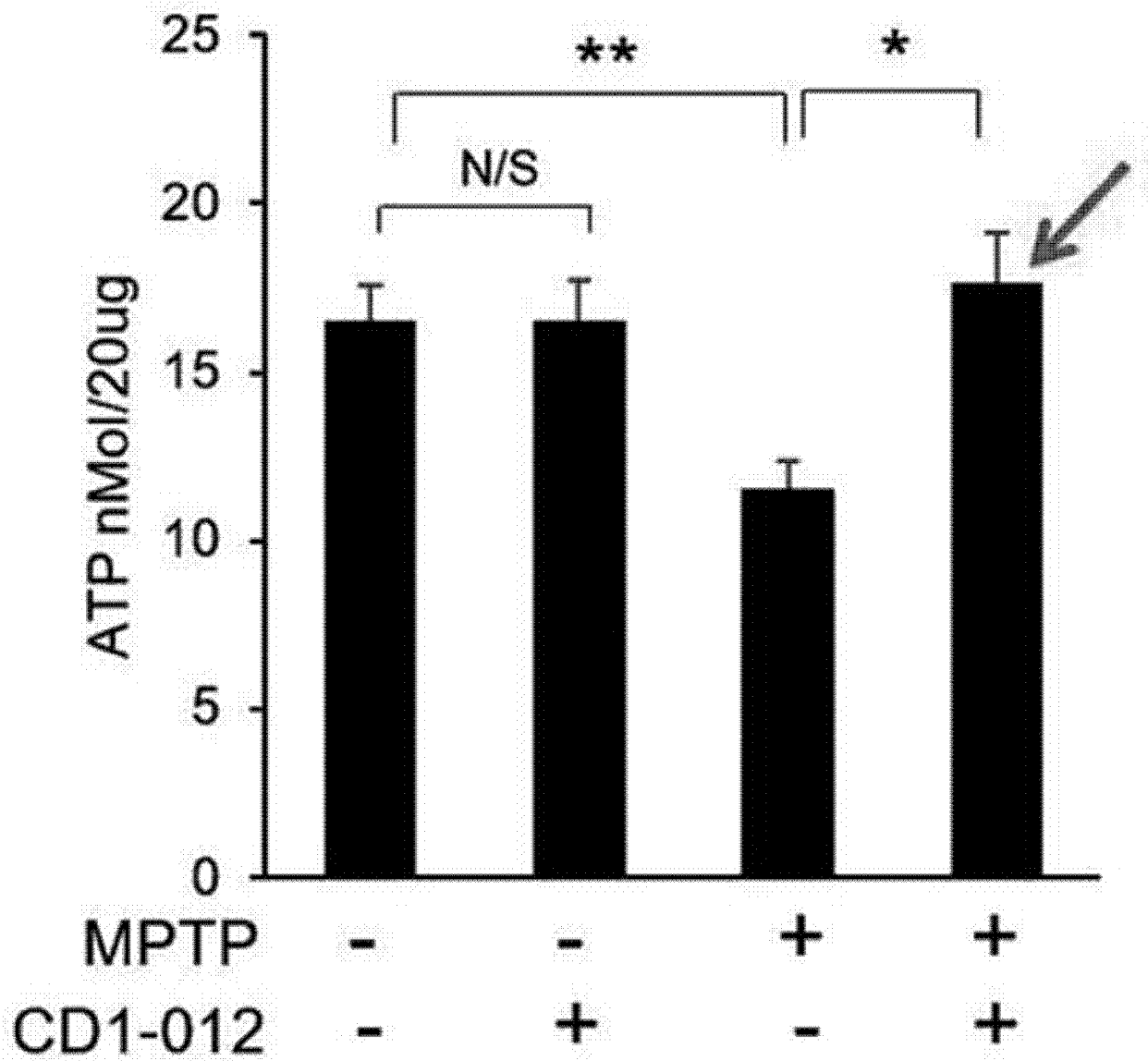
[도11c]



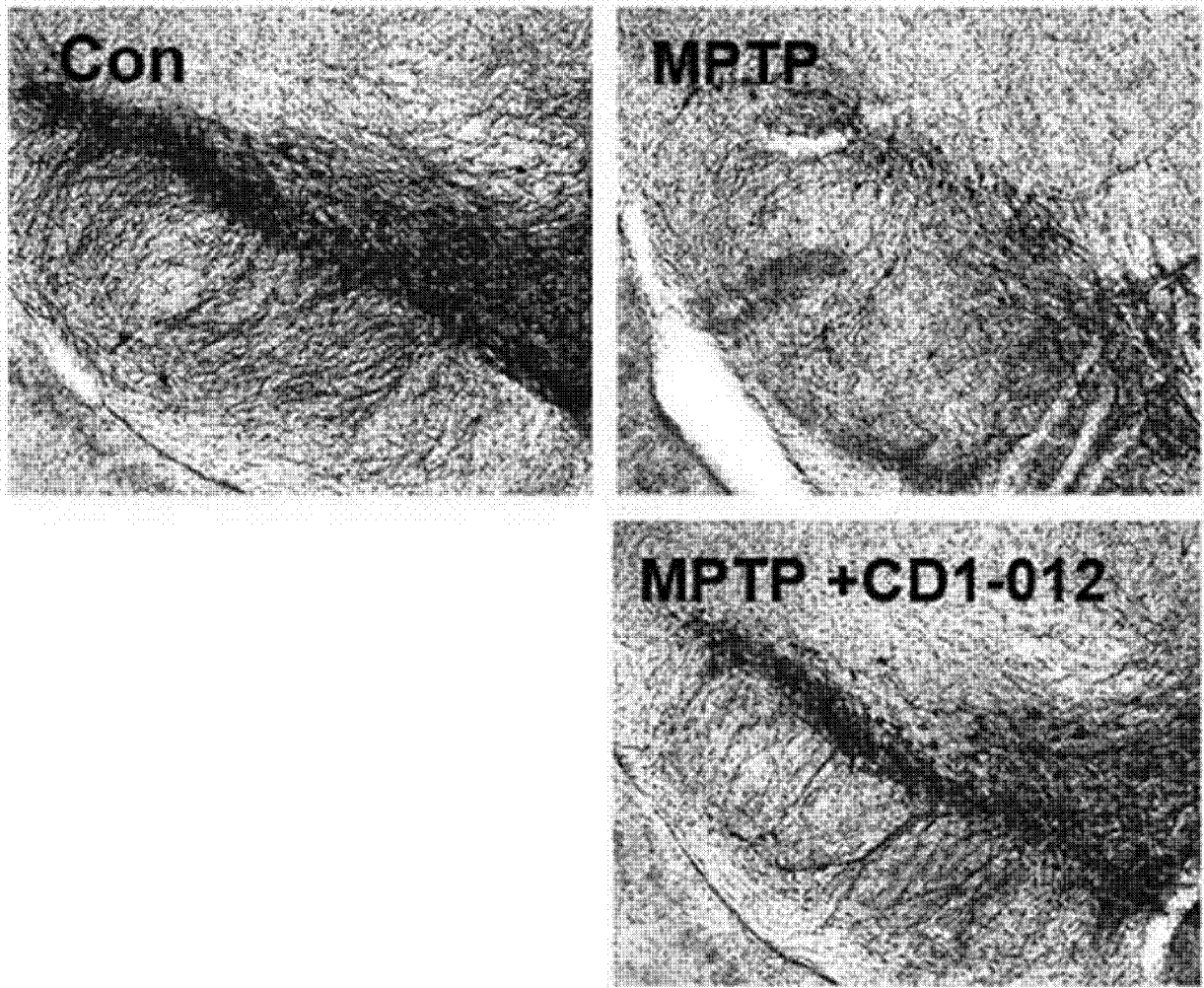
[도 12a]



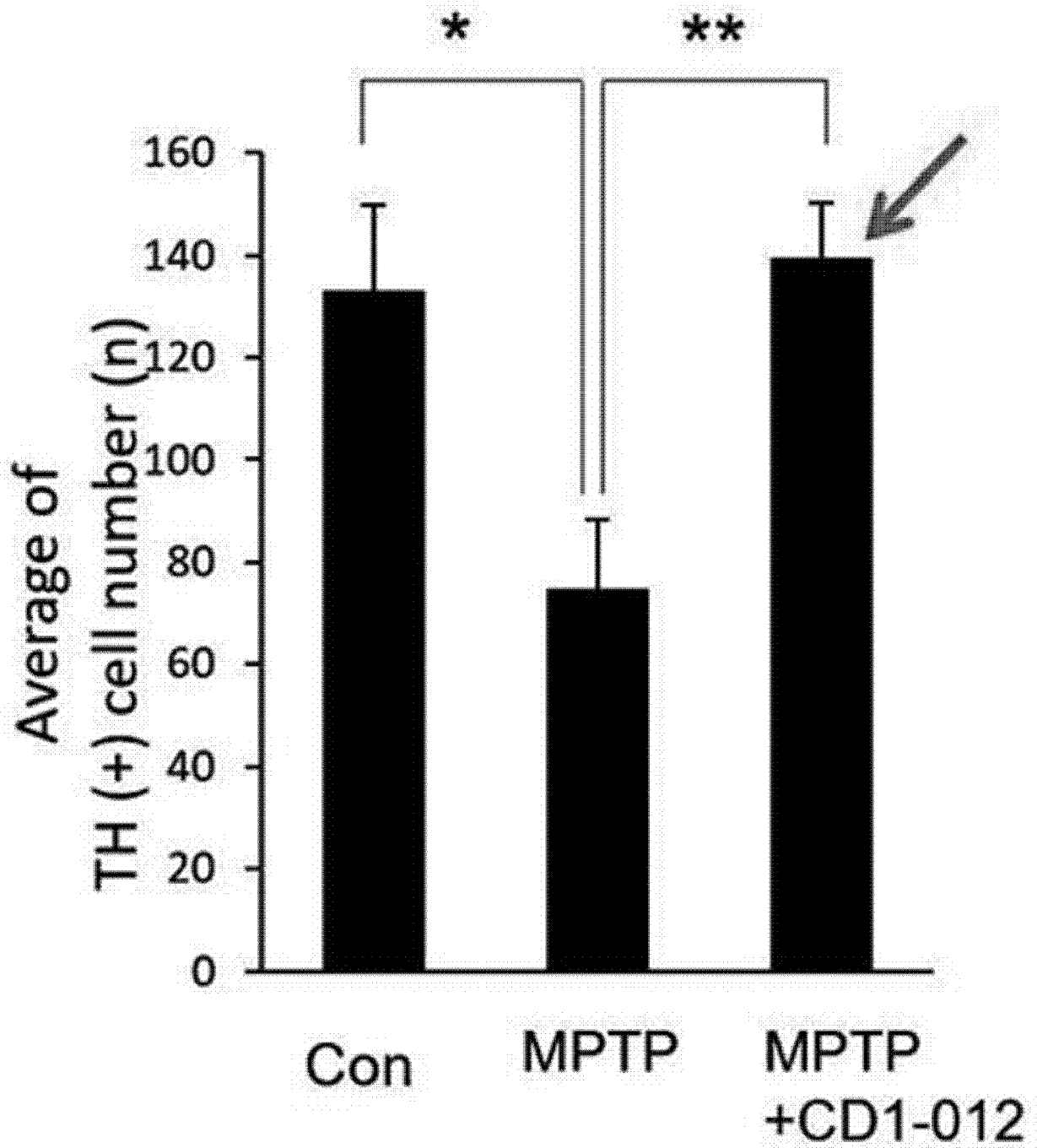
[도 12b]



[도 13a]



[도 13b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/015548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/4745(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/4745(2006.01); A61K 31/19(2006.01); A61K 31/4375(2006.01); A61K 31/7084(2006.01); A61P 25/16(2006.01); A61P 3/00(2006.01); C07D 455/03(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus) & keywords: 5,6-디히드로-2,3,9,10-테트라히드록시-디벤조鯨, g]퀴놀리진늄(5,6-dihydro-2,3,9,10-tetrahydroxy-dibenzo鯨,g]quinolizinium), 파킨슨병(parkinson's disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016-015634 A1 (SHENZHEN HIGHTIDE BIOPHARMACEUTICAL, LTD.) 04 February 2016 (2016-02-04) See claims 1, 3, 9, 39, 101, 106, 107 and 112; table 2; paragraphs [0012] and [0468]; and page 23.	1-11,13,14
A	RAJASEKHAR, K. et al. Antioxidant berberine-derivative inhibits multifaceted amyloid toxicity. Iscience. 2020, vol. 23, article no. 101005, pp. 1-17. See entire document.	1-11,13,14
A	KR 10-2021-0000682 A (DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) 05 January 2021 (2021-01-05) See entire document.	1-11,13,14
A	WO 2011-006000 A1 (LIU, Haiyan et al.) 13 January 2011 (2011-01-13) See entire document.	1-11,13,14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2024

Date of mailing of the international search report

15 January 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/015548

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010-0150895 A1 (MAZZIO, E. et al.) 17 June 2010 (2010-06-17) See entire document.	1-11,13,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/015548

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 12 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy (PCT Article 17(2)(a) (i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/015548

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016-015634	A1	04 February 2016	CA	2945609	A1	04 February 2016
				CA	2945609	C	23 May 2023
				CA	3194562	A1	04 February 2016
				CN	106687460	A	17 May 2017
				CN	106687460	B	17 May 2019
				CN	110179792	A	30 August 2019
				EP	3174874	A1	07 June 2017
				EP	3174874	A4	13 March 2019
				EP	3174874	B1	02 September 2020
				JP	2017-522264	A	10 August 2017
				JP	2020-073546	A	14 May 2020
				JP	2022-020854	A	01 February 2022
				JP	2023-099689	A	13 July 2023
				JP	6917144	B2	11 August 2021
				JP	7285903	B2	02 June 2023
				KR	10-2023-0019267	A	08 February 2023
				KR	10-2023-0134598	A	21 September 2023
				KR	10-2573865	B1	05 September 2023
				US	10301303	B2	28 May 2019
				US	10988471	B2	27 April 2021
				US	11685735	B2	27 June 2023
				US	2017-0037043	A1	09 February 2017
				US	2019-0211007	A1	11 July 2019
				US	2021-0300915	A1	30 September 2021
				US	2023-0295151	A1	21 September 2023
KR	10-2021-0000682	A	05 January 2021	KR	10-2383207	B1	06 April 2022
				WO	2020-262970	A1	30 December 2020
WO	2011-006000	A1	13 January 2011	US	2011-0009628	A1	13 January 2011
US	2010-0150895	A1	17 June 2010	US	2007-0116779	A1	24 May 2007
				US	2008-0292607	A1	27 November 2008
				US	2009-0027739	A1	29 January 2009
				US	7940433	B2	10 May 2011
				US	8367121	B2	05 February 2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/4745(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/4745(2006.01); A61K 31/19(2006.01); A61K 31/4375(2006.01); A61K 31/7084(2006.01); A61P 25/16(2006.01); A61P 3/00(2006.01); C07D 455/03(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드, STN(Registry, Caplus): 5,6-디히드로-2,3,9,10-테트라히드록시-디벤조
[g]퀴놀리진륨(5,6-dihydro-2,3,9,10-tetrahydroxy-dibenzo[a,g]quinolizinium), 파킨슨병(parkinson's disease)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2016-015634 A1 (SHENZHEN HIGHTIDE BIOPHARMACEUTICAL, LTD.) 2016.02.04 청구항 1, 3, 9, 39, 101, 106, 107, 112; 표 2; 단락 [0012], [0468]; 페이지 23	1-11,13,14
A	RAJASEKHAR, K. 등, "Antioxidant berberine-derivative inhibits multifaceted amyloid toxicity", Iscience, 2020, 제23권, 아티클 넘버 101005, 페이지 1-17 전체 문헌	1-11,13,14
A	KR 10-2021-0000682 A (동아대학교 산학협력단) 2021.01.05 전체 문헌	1-11,13,14
A	WO 2011-006000 A1 (LIU, HAIYAN 등) 2011.01.13 전체 문헌	1-11,13,14
A	US 2010-0150895 A1 (MAZZIO, E. 등) 2010.06.17 전체 문헌	1-11,13,14

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년01월15일(15.01.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년01월15일(15.01.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **12**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12는 수술 또는 치료에 의한 사람의 치치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2016-015634 A1	2016/02/04	CA 2945609 A1	2016/02/04
		CA 2945609 C	2023/05/23
		CA 3194562 A1	2016/02/04
		CN 106687460 A	2017/05/17
		CN 106687460 B	2019/05/17
		CN 110179792 A	2019/08/30
		EP 3174874 A1	2017/06/07
		EP 3174874 A4	2019/03/13
		EP 3174874 B1	2020/09/02
		JP 2017-522264 A	2017/08/10
		JP 2020-073546 A	2020/05/14
		JP 2022-020854 A	2022/02/01
		JP 2023-099689 A	2023/07/13
		JP 6917144 B2	2021/08/11
		JP 7285903 B2	2023/06/02
		KR 10-2023-0019267 A	2023/02/08
		KR 10-2023-0134598 A	2023/09/21
		KR 10-2573865 B1	2023/09/05
		US 10301303 B2	2019/05/28
		US 10988471 B2	2021/04/27
		US 11685735 B2	2023/06/27
		US 2017-0037043 A1	2017/02/09
		US 2019-0211007 A1	2019/07/11
		US 2021-0300915 A1	2021/09/30
		US 2023-0295151 A1	2023/09/21
KR 10-2021-0000682 A	2021/01/05	KR 10-2383207 B1	2022/04/06
		WO 2020-262970 A1	2020/12/30
WO 2011-006000 A1	2011/01/13	US 2011-0009628 A1	2011/01/13
US 2010-0150895 A1	2010/06/17	US 2007-0116779 A1	2007/05/24
		US 2008-0292607 A1	2008/11/27
		US 2009-0027739 A1	2009/01/29
		US 7940433 B2	2011/05/10
		US 8367121 B2	2013/02/05