



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월21일
(11) 등록번호 10-2080151
(24) 등록일자 2020년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/56 (2006.01) A61K 31/565 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7027657
(22) 출원일자(국제) 2012년03월21일
심사청구일자 2017년03월20일
(85) 번역문제출일자 2013년10월21일
(65) 공개번호 10-2014-0074253
(43) 공개일자 2014년06월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/029973
(87) 국제공개번호 WO 2012/129324
국제공개일자 2012년09월27일
(30) 우선권주장
61/454,873 2011년03월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20100130463 A1
Brain., 2010., Vol.133, No.10., pp 2999-3016

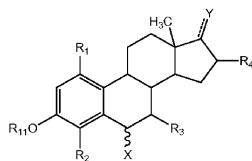
(73) 특허권자
엔디씨, 엘엘씨
미국 위스콘신 53092 메콘 웨스트 글렌 오크스 래
인 1001 스위트 105비
(72) 발명자
야저, 제임스, 지.
미국 위스콘신 53012 시더버그 시더 포인트 애비
뉴 더블유71 엔391
나이, 스티브
미국 위스콘신 53092 메콘 노쓰 리버뷰 코트
10404
(74) 대리인
특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 고일영

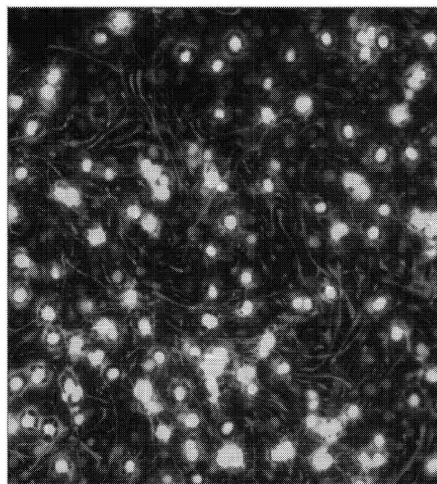
(54) 발명의 명칭 신경 축색들의 재수초화에 사용하기 위한 6-치환 에스트라디올 유도체들

(57) 요약



식 의 6-치환 에스트라디올 화합물들에 의해 축색들을 재수초화는 방법이 개시된다. 상기 방법은 다양한 탈수초성 질환들을 치료하는데 사용할 수 있다.

대표도 - 도2c

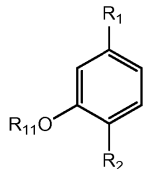
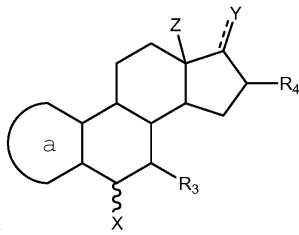


명세서

청구범위

청구항 1

하기식의 화합물, 또는 상기 화합물들의 개별적인 거울상이성질체들, 여타의 입체화학적 이성질체들, 수화물들, 용매화물들, 호변이성질체들 및 약제학적으로 허용가능한 염들을 포함하는 탈수초성 질환(demyelinating disease)의 치료용 약학적 조성물:



여기서, 고리 "a"는

R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 독립적으로 H, C_1 - C_6 알킬, 할로(halo), 설페이트, 글루쿠로나이드, -OH, 아릴, $-NH(CH_2)_nCH_3$, 포스페이트(phosphate)기 및 포스피네이트(phosphinate)기로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;

R_{11} 은 H, C_1 - C_6 알킬, 글루쿠로나이드, $-SO_2NH_2$, $-COOH$, $-CN$, $-CHO$, $-COO$ 염, $-OSO_2$ 알킬, $-NH_2$ 및 $-NHCO(CH_2)_n$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

X는 $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$, $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-NH-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-OH$, $-(CH_2)_m-NH_2$, $-(CH_2)_m-O-NH_2$, $-(CH_2)_m-S-NH_2$, $-NH(CH_2)_mCH_3$, $-NH(CH_2)_mOCH_3$, $-NH(CH_2)_mCHOH-COOH$, $-N(CH_3)_2$, $-(CH_2)_m(NH)CH_2OH$, $-NHCOOH$, $-(CH_2)_mNHCOOH$, $-NO_2$, $-SCN$, $-SO_2$ 알킬, $-B(OH)_2$, $-(CH_2)_m N(CH_3)-SO_2-NH_3$, $-(CH_2)_m-NH-SO_2-NH_2$, $-NHC(=S)CH_3$ 및 $-NHNH_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;

Y는 $-OCO(C_1-C_{20})$ 알킬 및 -OH로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

Z는 H 및 메틸로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;

m은 0 내지 20의 정수이고;

n은 0 내지 8의 정수이며;

각각의 \equiv 기호는 단일 결합을 나타내고;

\sim 기호는 입체화학에 상관없이 여하한 결합의 종류를 나타내며,

상기 질환이 다발성 경화증, 중심성 뇌교 수초용해증, 실험적 자가면역 뇌수막염, 급성 산재성 척수염, 횡단성 척수염, 진행성 다소성 백질뇌증; 알츠하이머병, 아급성 경화성 범뇌염, 감염-후 뇌척수염, 만성 염증성 탈수초성 다발성신경병증, 진행성 핵상 마비, 다소성 운동신경병증, 길랑-바레 증후군, 진행성 다소성 백색질뇌증(progressive multifocal leucoencephalopathy), 데빅병(Devic's Disease), 발로씨 동심성 경화증, 크라베병, 부신백질이영양증(ALD), 펠리제우스-메르츠바하병(Pelizaeus-Merzbacher disease), 카나반병, 중추 저수초형성에 의한 아동기 운동실조(childhood ataxia with central hypomyelination), 알렉산더병, 코케인 증후군, 반테르 냅(Van der Knapp) 증후군, 켈웨거 증후군(Zellweger syndrom) 및 레프섬병(Refsum disease)로 이루어진

그룹으로부터 선택됨.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 Y가 -OH이며;

상기 Z가 메틸이고;

상기 R₁₁이 H이며;

상기 R₄가 H, 할로 및 C₁-C₆ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

상기 R₁ 및 R₂가 독립적으로 H, -OH 및 할로로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;

상기 R₃이 H, 할로 및 -OH로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

상기 m이 1 내지 12의 정수이며;

상기 n이 0 내지 4의 정수인 탈수초성 질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 X가 -(CH₂)_m-O-CH₃, -(CH₂)_m-O-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-S-CH₃ 및 -(CH₂)_m-S-(CH₂)_nCH₃로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 탈수초성 질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 화합물이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 탈수초성 질환의 치료용 약학적 조성물:

(6S,8R,9S,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6S,8R,9S,13S,14S)-6-(하이드록시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-(하이드록시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-((아미노옥시)메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6S,8R,9S,13S,14S)-6-((아미노옥시)메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-메톡시-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6S,8R,9S,13S,14S)-6-(2-메톡시에틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-(4-메톡시부틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-(6-메톡시헥실)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]

페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-(6-메톡시옥틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-3-하이드록시-6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-17-일 스테아레이트;

(6R,8R,9S,13S,14S)-13-메틸-6-(4-프로폭시부틸)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올;

(6R,8R,9S,13S,14S)-13-메틸-6-(5-에톡시펜틸)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올; 및

(6R,8S,9S,14S,17S)-6-(메톡시메틸)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 화합물이

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올 및

(6R,8R,9S,13S,14S)-6-(6-메톡시헥실)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올로 구성된 그룹으로부터 선택되는 탈수초성 질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 질환이 다발성 경화증인 탈수초성 질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 출원은 2011년 3월 21일자로 출원된 가출원 제 61/454,873호의 우선권 이익을 주장하며, 이는 본 명세서에 전문이 참조병합된다.
- [0002] 본원 발명은 6-치환 에스트라디올 화합물들 및 이들의 약제학적으로 허용가능한 염(salt)들 또는 프로드러그(prodru)들에 의한 축색(axon)들의 재수초화 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 다발성 경화증과 같은 탈수초성 질환(demyelinating disease)들의 치료에 유용하다.

배경 기술

- [0003] 미엘린(Myelin)은 전기 절연체이며, 이는 수초(myelin sheath)로 알려진 층을 형성하는 뉴런들의 축색들을 감싼다. 미엘린의 주된 목적은 신경 자극들이 신경 축색 하부로 전달될 때의 속도를 증가시키는데 있다. 세포막 전반에 걸쳐 전기 저항을 증가시킴으로써, 미엘린은 전류가 축색으로부터 누출되는 것을 방지한다.
- [0004] 신경의 탈수초화(Neural demyelination)는 신경계에 있어서 미엘린 단백질의 감소를 특징으로 하는 상태이며, 다수의 신경퇴행성(neurodegenerative) 자가면역 질환들, 이를 테면 다발성 경화증, 실험적 자가면역 뇌수막염, 만성 염증성 탈수초성 다발성신경병증, 진행성 다소성 백질뇌증(progressive multifocal leukoencephalopathy), 횡단성 척수염(transverse myelitis), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre Syndrome), 중심성 뇌교 수초용해증(central pontine myelinosis), 알츠하이머병, 진행성 핵상 마비, 다초점성 운동신경병증, 그리고 백질이영양증(leukodystrophy)들, 이를 테면 부신백질이영양증(Adrenoleukodystrophy: ALD), 알렉산더 병(Alexander's Disease), 카나반병(Canavan Disease), 크라베병(Krabbe Disease), 이염성 백질이영양증(Metachromatic Leukodystrophy: MLD), 펠리제우스-메르츠바하병(Pelizaeus-Merzbacher Disease), 레프섬병(Refsum Disease), 코케인 증후군(Cockayne Syndrome), 반 데르 넵 증후군(Van der Knapp Syndrome) 및 젤웨거 증후군(Zellweger Syndrome)의 원인(basis)이다.
- [0005] 특히, 다발성 경화증은 가장 흔한 탈수초성 질환이며, 이는 많은 청소년들에 있어서 장애(disability)를 야기한다. 탈수초화 및 손상(scarring)로 인해, 다발성 경화증은 서로를 연결(communicate)시키는 뇌와 척수 내의 신경 세포들의 능력에 영향을 미친다. 이처럼, 다발성 경화증을 앓고 있는 사람은, 자극 반응성(sensitivity)의 손실이나 아린감(tingling), 근력 저하, 조정력(coordination)의 손실 및 마비와 같은 감각의 변화들을 포함하는 다양한 신경학적 증상들을 나타낼 수 있다. 일반적으로, 이런 질환은 두 단계, 재발 단계(relapsing stage)와 만성적 진행 단계(chronic progressive phase)로 발생한다.
- [0006] 다발성 경화증에 대한 현재의 치료법들은 항-염증 접근법들과 면역-조절(immuno-modulatory) 접근법들을 포함한다. 그러나, 양자 모두는 상기 질환의 재발 단계에서 부분적으로만 효과가 있고, 상기 질환의 2차 진행 단계에서는 거의 효과가 없었다. 최근, 에스트로젠 수용체-β 조절체(modulator)들이 이러한 신경퇴화를 늦추는 것으로 나타났다. Carswell, H.V.O. et al., *AJP-Heart Circ. Physiol.*, **2004**, vol. 287, 1501-04; Crawford, D.K. et al., *Brain*, **2010**, vol. 133, 2999-3016; Donzelli, A. et al., *J. Pharmacol. Sci.*, **2010**, vol. 114, 158-167.
- [0007] 그러므로, 탈수초성 질환들에 효과적인 치료법이 여전히 필요하다. 특히, 내인성 수초화(endogenous myelination)를 활성화시키고 축색을 퇴화시키지 않는 화합물이 바람직하다.

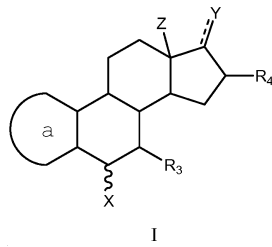
발명의 내용

해결하려는 과제

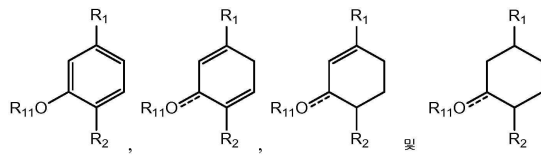
- [0008] 상기에 비취보면, 본원 발명의 목적은 신경 세포의 축색의 재수초화를 강화 및/또는 탈수초화를 방지하는 방법을 제공하는 것이며, 신경 세포를 유효량(effective amount)의 6-치환 에스트라디올 유도체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 기술분야의 전문가들은, 본 발명의 하나 이상의 측면들이 여하한 목적들을 충족할 수 있으며 동시에 하나 이상의 여타 측면들이 여하한 여타의 목적들을 충족할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 모든 측면들에서, 각각의 목적은 본 발명의 모든 측면에 동등하게 적용되지 않을 수 있다. 이처럼, 하기의 목적들은 본

발명의 어느 한 측면에 대한 대안으로 보여질 수 있다.

[0009] 따라서, 본 발명의 한 측면에서, 본 명세서에 개시된 방법들에 사용되는 6-치환 에스트라디올 유도체들은 식 I의 화합물, 그리고 상기 화합물들의 개별적인 거울상 이성질체(enantiomer)들, 여타의 입체화학적 이성질체들, 수화물들, 용매화물들, 호변이성질체들 및 약제학적으로 허용가능한 염들이다:



[0010]



[0011] 여기서, 고리 "a"는 으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0012] R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 독립적으로 수소, C₁-C₆ 알킬, 할로(halo), 설페이트, 글루쿠로나이드, -OH, 거대기(bulky group), 아릴, 사이클로알킬, 헤테로아릴, 헤테로사이클로알킬, -N(CH₂)_n, 포스페이트(phosphate)기 및 포스피네이트(phosphinate)기이며; R₁₁은 H, C₁-C₆ 알킬, 할로젠, 설페이트, 글루쿠로나이드, -SO₂NH₂, -COOH, -CN, -CH₂CN-, -NHCN-, -CHO, =CHOCH₃, -COO 염, -OSO₂알킬, -NH₂ 및 -NHCO(CH₂)_n으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; X는 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, C₂-C₁₂ 알키닐, 할로젠, 글루쿠로나이드, -NH₂, -SO₂NH₂, -COOH, -CN, -CH₂CN, -NHCN, -CHO, -COO 염, -OSO₂알킬, -SH, -SCH₃, -CH[(CH₂)_nCH₃]COOCH₃, -(CH₂)_mCOOCH₃, -(CH₂)_m-O-CH₃, -(CH₂)_m-O-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-S-CH₃, -(CH₂)_m-S-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-NH-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알케닐-O-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알케닐-S-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알케닐-N-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알키닐-O-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알키닐-S-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알키닐-N-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-OH, -(CH₂)_m-NH₂, -(CH₂)_m-O-NH₂, -(CH₂)_m-S-NH₂, -NH(CH₂)_mCH₃, -NH(CH₂)_mOCH₃, -NH(CH₂)_mCHOH-COOH, -N(CH₃)₂, -(CH₂)_m(NH)CH₂OH, -NHCOOH, -(CH₂)_mNHCOOH, -NO₂, -SCN, -SO₂알킬, -B(OH)₂, -(CH₂)_mN(CH₃)-SO₂-NH₃, -(CH₂)_m-NH-SO₂-NH₂, -NHC(=S)CH₃ 및 -NHNH₂로 이루어진 그룹으로부터 선택되며; Y는 수소, =O, -OCO(C₁-C₂₀ 알킬) 및 -OH로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 그리고 Z는 H 또는 메틸이며; 여기서, m은 0 내지 20의 정수이고, n은 0 내지 8의 정수이며, 기호는 3 및/또는 17 위치에 케토기를 형성할 수 있는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타내고; 그리고 기호는 입체화학에 상관없이 여하한 결합의 종류를 나타낸다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 방법은 특히 에스트로겐 수용체-α(ER-α) 및 에스트로겐 수용체-β(ER-β) 둘 모두, 또는 이들 중 하나와 결합하는 화합물들을 제공한다. 이러한 방법은, 전구체 또는 전구 세포(progenitor cell)들이 미엘린을 형성하는 세포들로의 분화에 대한 주요한 신호 경로들에 관련된 유전자들을 인코딩(encoding)하는 RNA에 대한 유전자 전사를 개시하는 단계, 증진시키는 단계(enhancing) 또는 증가시키는 단계를 포함할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본원 발명의 여타 목적들, 특징들, 이익들 및 이점들은 하기의 여하한 실시형태들에 대한 자세한 설명 및 이의 개요로부터 명백할 것이며, 다양한 스테로이드 화합물들 및 관련된 치료 방법들에 대한 지식을 갖고 있는 본 기술분야의 전문가들에게 이미 잘 알려져 있을 것이다. 이러한 목적들, 특징들, 이익들 및 이점들이 첨부된 실시예들, 테이블, 도면들 또는 본 명세서에 병합된 참조문헌의 고려 사항과 함께 고려된다는 것은 상기로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0015] **도 1**은 다양한 6-치환 에스트라디올 유도체들로 처리되어 96 시간 후의 쥐의 배양물 내의 분화된 회돌기교세포의 전구세포들(oligodendrocyte precursor cells: OPCs)의 총 개수를 나타낸다.
- 도 2**는 10 μ M의 화합물 **21**로 처리; **a)** 음성 대조군(DMSO)으로 처리; **b)** 양성 대조군(MEKi)으로 처리; **c)** 화합물 **21**로 처리하고 96시간 후의 쥐의 배양물 내에서의 회돌기교세포 성숙을 나타낸다.
- 도 3**은 OPCs가 성숙한 회돌기교세포들로 분화하는데 다양한 6-치환 에스트라디올 유도체들의 능력과, OPCs가 성숙한 회돌기교세포들로 분화하는데 대조군 약물들인 T3, CNTF 및 MEKi의 능력의 비교를 나타낸다.
- 도 4**는 화합물 **8**로 처리된 후의 회돌기교세포들의 대표적인 확장 과정을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 만약 다르게 정의되지 않는다면, 본 명세서에 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 본 발명에 관한 본 기술분야의 전문가에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같은 동일한 의미를 가지며, 하기에 설명되는 의미들을 가지는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에 언급되는 모든 출판물들과 특허들은 이들의 전문이 참조병합된다. 만약 다르게 명시되지 않는다면, 특정 화합물에 대한 언급은 이의 라세미 혼합물들 및 여타 혼합물들을 포함하는 모든 이성질성(isomeric) 형태들을 포함한다. 만약 달리 명시되지 않는다면, 또한 특정 화합물에 대한 언급은, 예를 들어 본 명세서에 설명되는 바와 같이, 이의 이온(ionic), 염, 용매화물(예를 들어, 수화물), 보호된 형태(protected form)들, 프로드러그들 및 여타 입체이성질체들을 포함한다.
- [0017] 이는 활성 화합물의 대응하는 염, 예를 들어 약제학적으로-허용가능한 염을 제조, 정제 및/또는 다루는데 편리하거나 바람직할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염들의 예시들은 Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," *J. Pharm. Sci.*, Vol. 66, pp. 1-19에 논의되며, 본 명세서에 논의된다.
- [0018] 본 명세서에서 질병(condition)의 치료에 관한 문맥에서 사용되는 "치료" 또는 "치료법"이란 용어는 일반적으로, 다소의 원하는 치료 효과 예를 들어, 질병 진행의 억제가 얻어지고, 진행 속도의 감소, 진행 속도의 정지(halt), 질병의 개선 및/또는 질병의 치유를 포함하는 경우, 사람이든 사람이 아닌 동물이든(예를 들어, 수의학적 적용) 포유류인 대상의 치료 및 치료법과 관계가 있다. 예방 조치로서의 치료도 포함된다. 예를 들어, 두 개 이상의 치료들 또는 치료법들이 연속적으로 또는 동시에 조합되는 경우, 치료는 조합 치료들 및 치료법들을 포함한다. 치료들 및 치료법들의 예시들은 화학요법[예를 들어, 약물들, (예를 들어, 면역 치료의 경우) 항체들, 항-염증제, (예를 들어, 3 또는 17 위치와 같이 적합한 위치들에 인산염 유도체들 및 포스포네이트들을 포함하는 보호기를 적용하는) 프로드러그들, 광역동 요법, GDEPT, ADEPT 등에 사용되는 여타 화합물들을 포함하는, 활성제들의 투여], 수술, 방사선 요법 및 유전자 요법을 포함하나, 이로 제한되지 않는다. 바람직한 조합 치료들은, 예를 들어 항-염증 치료법 또는 면역-조절 치료법과 같은 근육 경화증(muscular sclerosis)에 대한 존재하는 치료법들과 조합된 본 발명의 방법들을 포함한다.
- [0019] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "입체화학적 이성질체"라는 용어는, 서로 간의 원자들이 공간에 배향되는 방식만 상이한 이성질체들을 지칭한다. 본 발명에 있어서 특히 중요한 두 개의 입체이성질체들은, 두 개의 이성질체들이 서로 거울상들이나 아닌가에 따른 거울상이성질체들 및 부분입체이성질체들이다. 바람직한 실시형태에서, 청구된 제제(formulation)들은, 분리되고 분해된 이러한 화합물들을 포함하며, "실질적으로 여타 이성질체들을 포함하지 않는다".
- [0020] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "치료학적 유효량"이라는 용어는, 활성 화합물, 또는 물질, 조성물 또는 활성 화합물을 포함하는 투여 형태(dosage form)의 양과 관계가 있고, 이는 다소의 원하는 치료학적 효과를 생산하는데 효과적이며, 적당한 이익/위험 비율에 비례한다. 일반적으로, "유효량"이라는 용어는 대략 감지할 수 있는 효과를 가져올 수 있는 양을 의미한다.
- [0021] "환자" 또는 "대상"이라는 용어는 포유류, 바람직하게는 사람을 포함하는 동물들을 지칭한다.
- [0022] 일반적으로, "조직"이라는 용어는 특정한 작용을 수행할 수 있는 특성화된 세포들을 지칭한다. "조직"이라는 용어는 개개의 세포 또는 복수의 세포들이나 세포들의 응집체(aggregate), 예를 들어 세포막들, 혈액 또는 기관들을 지칭할 수 있다. 또한, "조직"이라는 용어는 비정상적인 세포 또는 복수의 비정상적인 세포들을 지칭한다. 예시적인 조직들에는 가슴 세포들을 포함하는 가슴 조직, 내피와 외피, 박막(laminae)을 포함하는 막을 구성하는 조직들, 세포간 조직(interstitial tissue)을 포함하는 결합 조직, 및 종양이 포함된다.

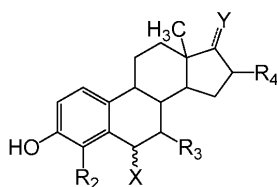
- [0023] 본원 발명에 있어서, "알킬"은 1 내지 20개, 바람직하게는 1 내지 12개의 탄소 원자들을 포함하는 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬 라디칼을 의미한다. 예시들에는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, *n*-부틸, *sec*-부틸, *tert*-부틸, 펜틸, 2-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 2-헥실, 3-헥실 및 3-메틸펜틸이 포함되나, 이로 제한되지 않는다. 각각의 알킬기는 선택적으로, 예를 들어 할로, 사이클로알킬, 아릴, 알케닐 또는 알콕시 및 이와 유사한 것들과 같은 하나, 둘 또는 세 개의 치환기들로 치환될 수 있다.
- [0024] "아릴"은 단일 고리(예를 들어, 페닐), 다중 고리들(예를 들어, 바이페닐) 또는 하나 이상이 방향족인 다중 융합된 고리들(예를 들어, 1,2,3,4-테트라하이드로나프틸)을 갖는 방향족 탄소고리 라디칼을 의미한다. 또한, 아릴기는 선택적으로, 예를 들어 할로, 알킬, 알케닐, 사이클로알킬 또는 알콕시 및 이와 유사한 것들로 1(mono)-, 2(di)- 또는 3치환(trisubstituted)될 수 있다.
- [0025] "헤테로아릴"은 질소, 산소 또는 황으로부터 선택되는 헤테로원자들 중 최소 한 개 내지 네 개까지를 함유하는, 5-, 6- 또는 7-원자(membered) 고리들 중의 하나 또는 다중 융합된 방향족 고리계들을 의미한다. 예시들에는 푸라닐, 티에닐, 피리디닐, 피리미디닐, 벤즈이미다졸릴 및 벤즈옥사졸릴이 포함되나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 헤테로아릴기는 선택적으로, 예를 들어 할로, 알킬, 알케닐, 사이클로알킬 또는 알콕시 및 이와 유사한 것들로 1-, 2- 또는 3치환될 수 있다.
- [0026] "사이클로알킬"은 단일 고리(예를 들어, 사이클로헥실), 다중 고리들(예를 들어, 바이사이클로헥실) 또는 다중 융합된 고리들을 갖는 탄소고리 라디칼을 의미한다. 사이클로알킬기는 선택적으로 1 내지 4개의 헤테로원자들을 함유할 수 있다. 게다가, 사이클로알킬기는 하나 이상의 이중 결합들을 가질 수 있다. 또한, 사이클로알킬기는 선택적으로, 예를 들어 할로, 알킬, 알케닐, 아릴 또는 알콕시 및 이와 유사한 것들로 1-, 2- 또는 3치환될 수 있다.
- [0027] "알콕시"는 알킬 부분(portion)을 갖는 산소-함유 라디칼을 의미한다. 예시들에는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시 및 *tert*-부톡시가 포함되나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 알콕시기는 선택적으로, 예를 들어 할로, 아릴, 사이클로알킬 또는 알콕시 및 이와 유사한 것들로 1-, 2- 또는 3치환될 수 있다.
- [0028] "알케닐"은 2 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 6개의 탄소 원자들 및 하나 내지 세 개의 이중 결합들을 갖는 선형 또는 분지형 탄화수소 라디칼을 의미하며, 예를 들어 에테닐, 프로페닐, 1-부-3-테닐, 1-펜-3-테닐, 1-헥-5-세닐을 포함한다. 또한, 알케닐기는 선택적으로, 예를 들어 할로, 아릴, 사이클로알킬 또는 알콕시 및 이와 유사한 것들로 1-, 2- 또는 3치환될 수 있다.
- [0029] "할로" 또는 "할로젠"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드의 할로젠 라디칼이다.
- [0030] "글루쿠로나이드"는 글루쿠론산의 글리코시드 라디칼을 의미한다.
- [0031] "설페이트"란 용어는 일반식 $-OS(O)_2-OR'$ 를 갖는 라디칼을 지칭하며, 여기서 상기 R'는 수소, 금속 또는 알킬기이다.
- [0032] "포스페이트"란 용어는 일반식 $-OP(O)(OR')_2$ 를 갖는 라디칼을 지칭하며, 여기서 각각의 R'는 독립적으로 수소, 금속 또는 알킬기이다.
- [0033] "포스피네이트"란 용어는 일반식 $-OP(O)(R')_2$ 를 갖는 라디칼을 지칭하며, 여기서 각각의 R'는 독립적으로 수소, 금속 또는 알킬기이다.
- [0034] "거대기(bulky group)"는 치환기가 부착되는 공간에 대하여 입체 장애를 생성하는 치환기이며, 예를 들어 *t*-부틸기이다.
- [0035] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "아미노 알킬"이라는 용어는 알킬기 상에 아미노기를 갖는 알킬기를 지칭하고, 예를 들어 H_2N-CH_2- , $H_2N-CH_2CH_2-$, Me_2NCH_2- 등이며, 여기서 부착 지점은 알킬 사슬의 탄소이고; 그리고 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "알킬 아미노"라는 용어는 질소 원자가 부착된 알킬기를 갖는 아미노기를 지칭하며, 예를 들어 CH_3NH- , $EtNH-$, $iPr-NH-$ 등이고, 여기서 부착 지점은 아미노기의 질소 원자를 통한다. 연속적인 라디칼들이 이용되는 경우의 모든 여타 용어들은 유사한 규칙을 충실히 지킨다.
- [0036] 본 발명의 실시형태에서, 식 I의 6-치환 에스트라디올 유도체의 유효량과 신경 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 신경 세포의 축색의 재수초화를 활성화/강화 및/또는 탈수초화를 예방하는 방법이 설명된다. 바람직하게, 내인성 수초화(수초의 생산)활성화시키고 축색을 퇴화시키지 않는 화합물이 이용된다. 비-제한적

인 실시예에서, 수초화는, 예를 들어 슈만 세포(Schwann cell) 전구체들 또는 회돌기교세포의 간세포들(oligodendrocyte progenitor cells: OPCs)과 같은 전구체 세포들이 각각 슈만 세포들 또는 회돌기교세포들로 분화되는 것을 활성화시킨다.

[0037] 탈수초화에 대응하여, 전구체 세포들/간세포들은 기본적으로 휴면(quiescent) 상태에서 재생적 표현형(regenerative phenotype)으로의 전환을 거쳐야한다. 이러한 활성화는 재수초화 과정에 있어서 첫번째 단계이고, 몇몇의 유전자들의 상향-조절(up-regulation)의 주요한 단계를 수반하며, 이의 대부분은 예를 들어, 발생 동안 회돌기교세포들의 발생과 관련된다. 회돌기교세포 분화에 대한 주요한 신호전달 경로(signaling pathway)들 내에서 상이하게 발현되는 유전자들($p < 0.0001$)의 여하한 비-제한적인 실시예들은 델타/노치-형 EFG 반복형(delta/notch-like EFG repeat: DNER), 회돌기교세포 계통 전사 인자 2(OLIG2), 수초염기성 단백질(MBP), 미엘린 회돌기교세포 당단백질(MOG), 인터류킨 23 수용체(IL23R), 막관통 단백질 108(TMEM108), 코넥신(AF251047), 인터류킨 20 수용체 알파(IL20RA), 인터류킨 28A(IL28A), 호메오박스 단백질(homeobox protein)[NKX2.2], 미엘린 전사 인자 1-형 단백질(MYT1) 및 성 결정 영역 Y-박스 2(sex determining region Y-box 2: SOX2), 그리고 이와 유사한 것들을 포함한다. 분화기(differentiation phase)는 세 개의 별개의 단계들을 포괄한다: 재수초화하기 위하여 축색과 접촉하는 단계, 미엘린 유전자들이 발현되고 미엘린 막이 발생하는 단계, 및 마지막으로 수초(sheath)을 형성하기 위하여 막을 감싸고 압축되는 단계. 재수초화가 일어날 수 있도록, 식 I의 6-치환 에스트라디올 유도체들은 OPCs의 증식 및 분화와 관련된 신호전달 경로들 내에서 이러한 유전자들을 상향-조절한다. 이처럼, 식 I의 화합물들은 탈수초화를 방지 및/또는 재수초화를 강화/활성화시키는 조건들로 처리하는데 사용될 수 있다. 또한, 이러한 방법은 재수초화를 모니터링하는 단계들을 포함한다.

[0038] 따라서, 식 I의 화합물들에 의해 치료될 수 있는 탈수초성 장애들에는, 예를 들어 다발성 경화증(예를 들어, 다발성 경화증, 이차 진행형 다발성 경화증, 진행성 재발형 다발성 경화증, 일차 진행형 다발성 경화증, 및 급성 전격성 다발성 경화증의 재발/완화), 중심성 뇌교 수초용해증, 실험적 자가면역 뇌수막염, 급성 산재성 척수염, 횡단성 척수염, 진행성 다소성 백질뇌증; 알츠하이머병, 아급성 경화성 범뇌염, 감염-후 뇌척수염(post-infectious encephalomyelitis), 만성 염증성 탈수초성 다발성신경병증, 진행성 핵상 마비, 다소성 운동신경병증, 길랑-바레 증후군, 진행성 다소성 백색질뇌증(progressive multifocal leucoencephalopathy), 데빅병(Devic's Disease), 발로씨 동심성 경화증, 그리고 백질이영양증 이를 테면 이염성 백질이영양증, 크라베병, 부신백질이영양증(ALD), 펠리제우스-메르츠바하병(Pelizaeus-Merzbacher disease), 카나반병, 중추 저수초형성에 의한 아동기 운동실조(childhood ataxia with central hypomyelination), 알렉산더병, 코케인 증후군, 반 데르 냘(Van der Knapp) 증후군, 젤웨거 증후군(Zellweger syndrom) 및 레프섬병(Refsum disease)이 포함되나, 이로 제한되지 않는다. 탈수초성 장애를 가진 환자는 탈수초성 장애에 대한 하나 이상의 증상들, 이를 테면 시력의 손상, 무감각(numbness), 사지(extremities)의 약화, 미진(tremors) 또는 경직, 열 과민증, 언어 장애(speech impairment), 실금(incontinence), 어지럼증 또는 고유 수용성 감각(proprioception)[예를 들어, 균형, 조정력, 하지의 감각]의 손상을 가질 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 탈수초성 장애의 가족력(예를 들어, 탈수초성 장애의 유전적 소인)을 가지거나, 상기에 설명된 탈수초성 장애에 대한 가벼운 또는 드문 증상들을 나타내는 사람(예를 들어, 환자)은, 상기 방법의 목적에 대하여, 탈수초성 장애(예를 들어, 다발성 경화증)의 발생 위험에 처한 것으로 고려될 수 있다. 사람은 결과, 예를 들어 탈수초성 장애에 대한 하나 이상의 증상들, 예를 들어 본 명세서에 설명된 탈수초성 장애들의 여하한 증상들의 개선(이를 테면, 재수초화의 증가)에 대하여 모니터링될 수 있다.

[0039] 본원 발명의 실시형태에서, 상기 방법들의 화합물들은 하기의 식 (Ia)로 나타내는 일반 구조를 갖는다:

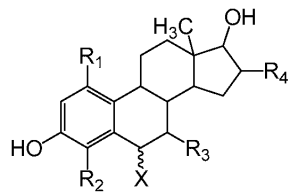


(Ia)

[0040] 여기서 R₂, R₃, R₄, X 및 Y는 상기 식 (I)에서 정의된 바와 같다. 더욱 바람직하게, Y는 =O 및 -OH로부터 선택되고; R₄는 수소, 할로 및 C₁-C₆ 알킬로부터 선택되며; R₂는 수소, -OH 및 할로로부터 선택되고; R₃은 수소, 할로 및 -OH로부터 선택되며; X는 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, -(CH₂)_mCOOCH₃, -(CH₂)_m-O-CH₃, -(CH₂)_m-O-(CH₂)_nCH₃,

$-(CH_2)_m-S-CH_3$, $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-OH$, $-(CH_2)_m-O-NH_2$, $-(CH_2)_m-S-NH_2$, $-NH(CH_2)_mCH_3$, $-NH(CH_2)_mOCH_3$, $-NH(CH_2)_mCHOH-COOH$, $-(CH_2)_m(NH)CH_2OH$, $-(CH_2)_mNHCOOH$, $-(CH_2)_mN(CH_3)-SO_2-NH_3$ 및 $-(CH_2)_m-NH-SO_2-NH_2$ 로부터 선택되고; m 은 1 내지 20의 정수이며; n 은 0 내지 8의 정수이고; 그리고 $\overset{\text{---}}{\text{---}}$ 기호는 단일 결합 또는 이중 결합을 나타낸다. 더욱더 바람직하게, Y 는 (S) -OH 이고; R_1 는 수소 또는 알킬로부터 선택되며; R_2 는 수소이고; R_3 은 수소이며; X 는 C_1-C_{12} 알킬, C_2-C_{12} 알케닐, $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$ 및 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$ 로부터 선택되고; m 은 1 내지 12의 정수이며; n 은 0 내지 4의 정수이고; 그리고 C-13 메틸은 (S) 입체배치(configuration)로 존재한다.

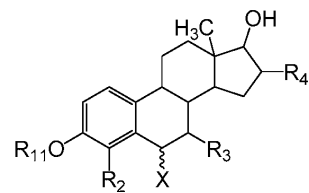
[0042] 본원 발명의 또 다른 실시형태는 식 (Ib)의 화합물들을 사용하는 방법들에 관한 것이다:



(Ib)

[0043] 여기서 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 및 X 는 상기 식 (I)에서 정의된 바와 같다. 더욱 바람직하게, R_1 은 수소, $-OH$ 및 할로로부터 선택되고; R_4 는 수소, 할로 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되며; R_2 는 수소 및 할로로부터 선택되고; R_3 은 수소, 할로 및 $-OH$ 로부터 선택되며; X 는 C_1-C_{12} 알킬, C_2-C_{12} 알케닐, $-(CH_2)_mCOOCH_3$, $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$, $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-OH$, $-(CH_2)_m-O-NH_2$, $-(CH_2)_m-S-NH_2$, $-NH(CH_2)_mCH_3$, $-NH(CH_2)_mOCH_3$, $-NH(CH_2)_mCHOH-COOH$, $-(CH_2)_m(NH)CH_2OH$, $-(CH_2)_mNHCOOH$, $-(CH_2)_mN(CH_3)-SO_2-NH_3$ 및 $-(CH_2)_m-NH-SO_2-NH_2$ 로부터 선택되고; m 은 1 내지 20의 정수이며; 그리고 n 은 0 내지 8의 정수이다. 더욱더 바람직하게, R_1 은 수소이고; R_4 는 수소 또는 알킬로부터 선택되며; R_2 는 수소이고; R_3 은 수소이며; X 는 C_1-C_{12} 알킬, C_2-C_{12} 알케닐, $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$ 및 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$ 로부터 선택되고; m 은 1 내지 12의 정수이며; n 은 0 내지 4의 정수이고; 그리고 C-13 메틸 및 C-17 하이드록실 둘 모두는 (S) 입체배치로 존재한다.

[0045] 계속해서, 본 발명의 또 다른 실시형태는 식 (Ic)의 화합물들을 사용하는 방법들에 관한 것이다:

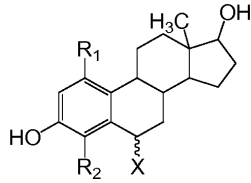


(Ic)

[0046] 여기서 R_{11} , R_2 , R_3 , R_4 및 X 는 상기 식 (I)에서 정의된 바와 같다. 더욱 바람직하게, R_{11} 은 수소 또는 C_1-C_6 알킬이고; R_4 는 수소, 할로 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택되며; R_2 는 수소 및 할로로부터 선택되고; R_3 은 수소, 할로 및 $-OH$ 로부터 선택되며; X 는 C_1-C_{12} 알킬, C_2-C_{12} 알케닐, $-(CH_2)_mCOOCH_3$, $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$, $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-OH$, $-(CH_2)_m-O-NH_2$, $-(CH_2)_m-S-NH_2$, $-NH(CH_2)_mCH_3$, $-NH(CH_2)_mOCH_3$, $-NH(CH_2)_mCHOH-COOH$, $-(CH_2)_m(NH)CH_2OH$, $-(CH_2)_mNHCOOH$, $-(CH_2)_mN(CH_3)-SO_2-NH_3$ 및 $-(CH_2)_m-NH-SO_2-NH_2$ 로부터 선택되고; m 은 1 내지 20의 정수이며; 그리고

n은 0 내지 8의 정수이다. 더욱더 바람직하게, R₁₁은 수소이고; R₁는 수소 또는 알킬로부터 선택되며; R₂는 수소이고; R₃은 수소이며; X는 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, -(CH₂)_m-O-CH₃, -(CH₂)_m-O-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-S-CH₃ 및 -(CH₂)_m-S-(CH₂)_nCH₃로부터 선택되고; m은 1 내지 12의 정수이며; n은 0 내지 4의 정수이고; 그리고 C-13 메틸 및 C-17 하이드록실 둘 모두는 (S) 입체배치로 존재한다.

[0048] 본원 발명의 또 다른 실시형태는 식 (Id)의 화합물을 사용하는 방법들에 관한 것이다:

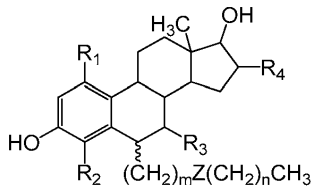


(Id)

[0049]

[0050] 여기서 R₁, R₂ 및 X는 상기 식 (I)에서 정의된 바와 같다. 더욱 바람직하게, R₁은 수소, -OH 및 할로로부터 선택되고; R₂는 수소 또는 할로로부터 선택되며; X는 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, -(CH₂)_mCOOCH₃, -(CH₂)_m-O-CH₃, -(CH₂)_m-O-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-S-CH₃, -(CH₂)_m-S-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-N-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알케닐-O-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알케닐-S-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알케닐-N-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알키닐-O-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알키닐-S-(CH₂)_nCH₃, -C₂-C₈ 알키닐-N-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-OH, -(CH₂)_m-O-NH₂, -(CH₂)_m-S-NH₂, -NH(CH₂)_mCH₃, -NH(CH₂)_mOCH₃, -NH(CH₂)_mCHOH-COOH, -(CH₂)_m(NH)CH₂OH, -(CH₂)_mNHCOOH, -(CH₂)_mN(CH₃)-SO₂-NH₃ 및 -(CH₂)_m-NH-SO₂-NH₂로부터 선택되고; X는 C₁-C₁₂ 알킬, C₂-C₁₂ 알케닐, -(CH₂)_m-O-CH₃, -(CH₂)_m-O-(CH₂)_nCH₃, -(CH₂)_m-S-CH₃ 및 -(CH₂)_m-S-(CH₂)_nCH₃으로부터 선택되며; m은 1 내지 20의 정수이고; 그리고 n은 0 내지 8의 정수이다. 더욱더 바람직하게, R₁ 및 R₂는 수소이고; m은 1 내지 12의 정수이며; n은 0 내지 4의 정수이고; 그리고 C-13 메틸 및 C-17 하이드록실 둘 모두는 (S) 입체배치로 존재한다.

[0051] 본원 발명의 또 다른 실시형태는 식 (Ie)의 화합물을 사용하는 방법들에 관한 것이다:

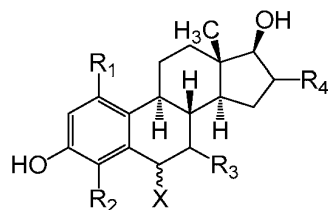


(Ie)

[0052]

[0053] 여기서 m, n, R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 상기 식 (I)에서 정의된 바와 같으며, Z는 -O-, -S- 및 -NH-로부터 선택된다. 더욱 바람직하게, m은 1 내지 12이고; n은 0 내지 4이며; R₁은 수소, -OH 및 할로로부터 선택되고; R₄는 수소, 할로 및 C₁-C₆ 알킬로부터 선택되며; R₂는 수소 및 할로로부터 선택되고; R₃은 수소, 할로 및 -OH로부터 선택되며; Z는 -O- 및 -S-로부터 선택되고; 그리고 C-13 메틸 및 C-17 하이드록실 둘 모두는 (S) 입체배치로 존재한다.

[0054] 계속해서, 본원 발명의 또 다른 실시형태는 식 (If)의 화합물을 사용하는 방법들에 관한 것이다:



(If)

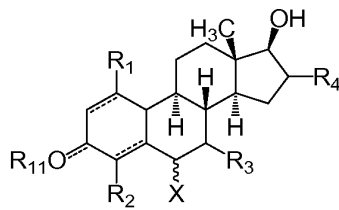
[0055]

[0056]

여기서 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 및 X 는 상기 식 (I)에서 정의된 바와 같다. 더욱 바람직하게, R_1 은 수소, -OH 및 할로로부터 선택되고; R_4 는 수소, 할로 및 C_1 - C_6 알킬로부터 선택되며; R_2 는 수소 및 할로로부터 선택되고; R_3 은 수소, 할로 및 -OH로부터 선택되며; X 는 C_1 - C_{12} 알킬, C_2 - C_{12} 알케닐, $-(CH_2)_mCOOCH_3$, $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$, $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-OH$, $-(CH_2)_m-O-NH_2$, $-(CH_2)_m-S-NH_2$, $-NH(CH_2)_mCH_3$, $-NH(CH_2)_mOCH_3$, $-NH(CH_2)_mCHOH-COOH$, $-(CH_2)_m(NH)CH_2OH$, $-(CH_2)_mNHCOOH$, $-(CH_2)_mN(CH_3)-SO_2-NH_3$ 및 $-(CH_2)_m-NH-SO_2-NH_2$ 로부터 선택되고; X 는 C_1 - C_{12} 알킬, C_2 - C_{12} 알케닐, $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$ 및 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$ 으로부터 선택되며; m 은 1 내지 20의 정수이고; 그리고 n 은 0 내지 8의 정수이다. 더욱더 바람직하게, R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 수소이고; m 은 1 내지 12의 정수이며; 그리고 n 은 0 내지 4의 정수이다.

[0057]

계속해서, 본원 발명의 또 다른 실시형태는 식 (Ig)의 화합물을 사용하는 방법들에 관한 것이다:



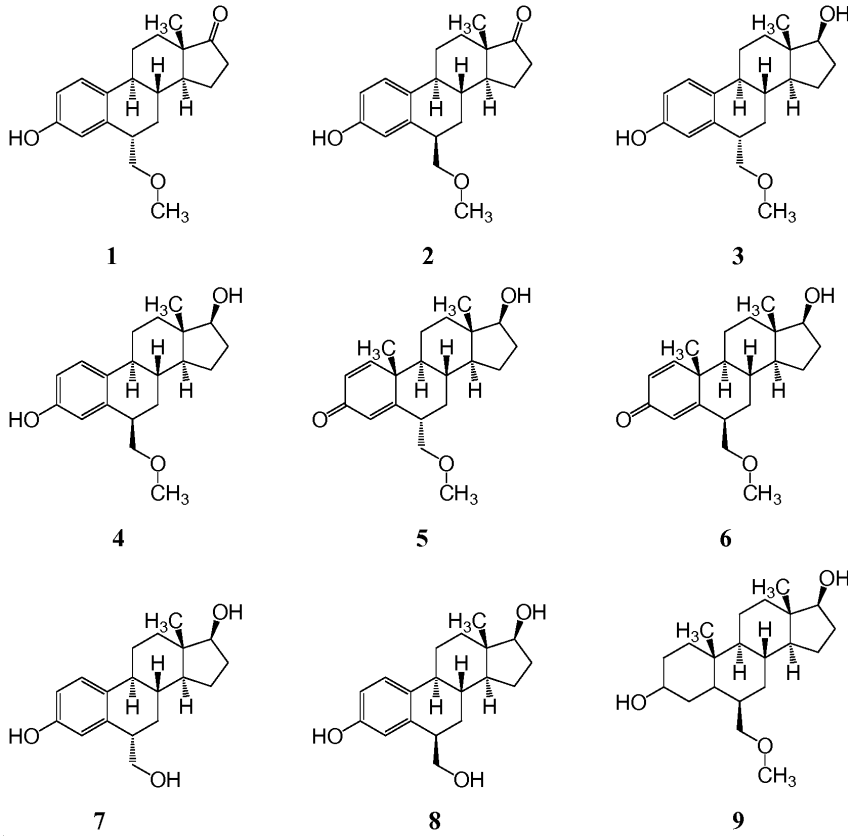
(Ig)

[0058]

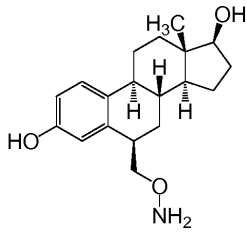
[0059]

여기서 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_{11} 및 X 는 상기 식 (I)에서 정의된 바와 같다. 더욱 바람직하게, R_1 은 수소, -OH 및 할로로부터 선택되고; R_4 는 수소, 할로 및 C_1 - C_6 알킬로부터 선택되며; R_2 는 수소 및 할로로부터 선택되고; R_3 은 수소, 할로 및 -OH로부터 선택되며; X 는 C_1 - C_{12} 알킬, C_2 - C_{12} 알케닐, $-(CH_2)_mCOOCH_3$, $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$, $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알케닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $O-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $S-(CH_2)_nCH_3$, $-C_2-C_8$ 알키닐- $N-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-OH$, $-(CH_2)_m-O-NH_2$, $-(CH_2)_m-S-NH_2$, $-NH(CH_2)_mCH_3$, $-NH(CH_2)_mOCH_3$, $-NH(CH_2)_mCHOH-COOH$, $-(CH_2)_m(NH)CH_2OH$, $-(CH_2)_mNHCOOH$, $-(CH_2)_mN(CH_3)-SO_2-NH_3$ 및 $-(CH_2)_m-NH-SO_2-NH_2$ 로부터 선택되고; X 는 C_1 - C_{12} 알킬, C_2 - C_{12} 알케닐, $-(CH_2)_m-O-CH_3$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_nCH_3$, $-(CH_2)_m-S-CH_3$ 및 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_nCH_3$ 으로부터 선택되며; m 은 1 내지 20의 정수이고; OR_{11} 은 =O 또는 -OH이며; 그리고 n 은 0 내지 8의 정수이다. 더욱더 바람직하게, R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 수소이고; m 은 1 내지 12의 정수이며; n 은 0 내지 4의 정수이다.

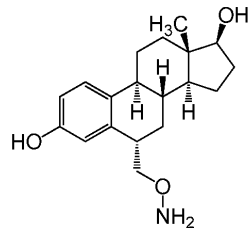
[0060] 식 (I) 및 식 (Ia) 내지 식 (If)의 화합물들의 특정 예시들을 하기에 나타낸다:



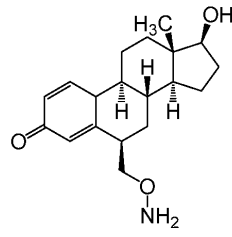
[0061]



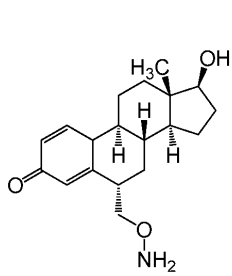
10



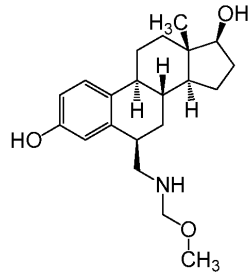
11



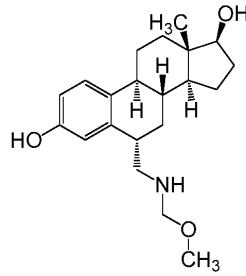
12



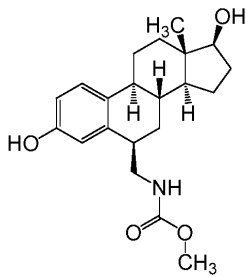
13



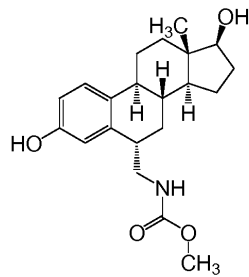
14



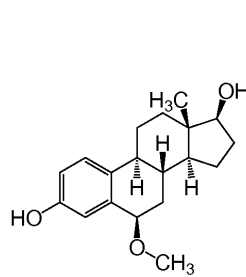
15



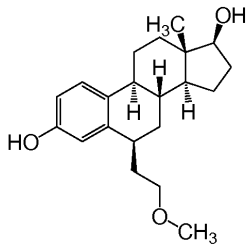
16



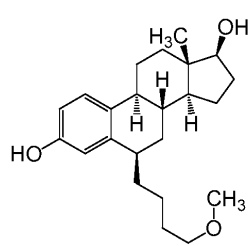
17



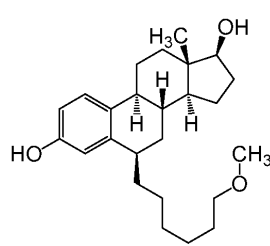
18



19

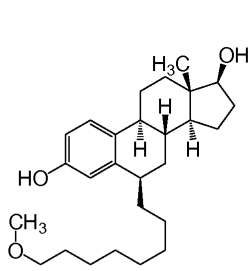


20

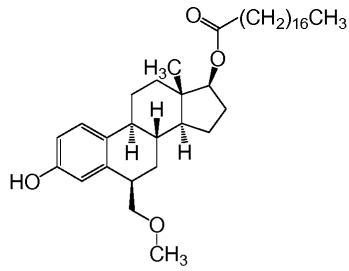


21

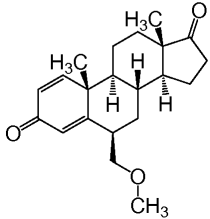
[0062]



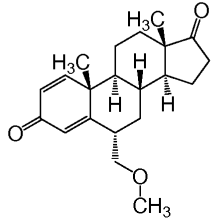
22



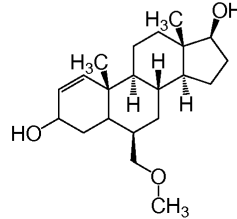
23



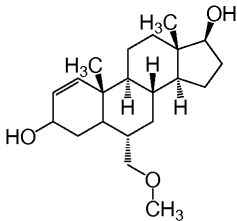
24



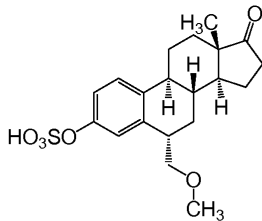
25



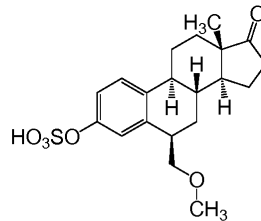
26



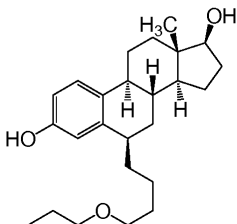
27



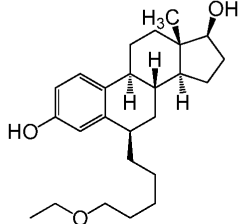
28



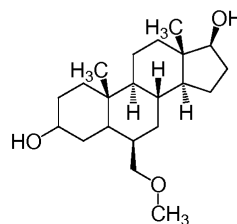
29



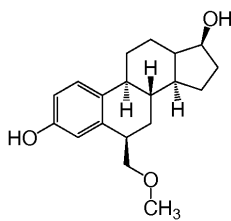
30



31



32



33

[0063]

[0064]

[0065]

[0066]

본원 발명의 실시형태의 화합물들은 약제학적 조성물 내에 사용될 수 있다. 이러한 조성물은, 하기에 도시되거나 만약 그렇지 않으면 본 명세서로부터 추정되는, 상기에 개시된 것들, 및 이들의 조합물들로부터 선택되는 하나 이상의 화합물들을 포함할 수 있다. 여하한 실시형태들에서, 이러한 조성물은 약제학적으로-허용가능한 담체(carrier) 성분을 포함할 수 있다. 제한 없이, 이러한 조성물은 화합물들의 라세미 혼합물을 포함할 수 있다. 여하한 실시형태들에서, 이러한 화합물은 S 및 R 거울상이성질체, 바람직하게는 여타 이성질체가 실질적으로 존재하지 않는 이들의 분리 및 정제된 형태로 존재할 수 있다.

본원 발명의 화합물들은 비대칭 중심들을 가질 수 있고, 라세미체, 라세미 혼합물 또는 [ChemDraw Ultra, Version 11.0(3) or 12.0에 의해 명명되는] 각각의 정제된 부분입체이성질체들이나 거울상이성질체들, 이를 테면 (6S,8R,9S,13S,14S)-3-하이드록시-6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,15,16-옥타하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-17(14H)-온(화합물 1); (6R,8R,9S,13S,14S)-3-하이드록시-6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,15,16-옥타하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-17(14H)-온(화합물 2); (6S,8R,9S,13S,14S)-

6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 3); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 4); (6S,8R,9S,10R,13S,14S)-17-하이드록시-6-(메톡시메틸)-10,13-디메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-온(화합물 5); (6R,8R,9S,10R,13S,14S)-17-하이드록시-6-(메톡시메틸)-10,13-디메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-온(화합물 6); (6S,8R,9S,13S,14S)-6-(하이드록시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 7); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-(하이드록시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 8); (6R,8R,9S,10R,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-10,13-디메틸헥사데카하이드로-1H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 9); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-((아미노옥시)메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 10); (6S,8R,9S,13S,14S)-6-((아미노옥시)메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 11); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-((아미노옥시)메틸)-17-하이드록시-13-메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-온(화합물 12); (6S,8R,9S,13S,14S)-6-((아미노옥시)메틸)-17-하이드록시-13-메틸-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-도데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-온(화합물 13); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-(((메톡시메틸)아미노)메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 14); (6S,8R,9S,13S,14S)-6-(((메톡시메틸)아미노)메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 15); 1-(((6R,8R,9S,13S,14S)-3,17-디하이드록시-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-일)메틸)아미노)프로판-2-온(화합물 16); 1-(((6S,8R,9S,13S,14S)-3,17-디하이드록시-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-일)메틸)아미노)프로판-2-온(화합물 17); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-메톡시-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 18); (6S,8R,9S,13S,14S)-6-(2-메톡시에틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 19); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-(4-메톡시부틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 20); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-(6-메톡시헥실)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 21); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-(6-메톡시옥틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 22); (6R,8R,9S,13S,14S)-3-하이드록시-6-(메톡시메틸)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-17-일 스테아레이트(화합물 23); (6R,8R,9S,10R,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-10,13-디메틸-7,8,9,10,11,12,13,14,15,16-데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17(6H)-디온(화합물 24); (6S,8R,9S,10R,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-10,13-디메틸-7,8,9,10,11,12,13,14,15,16-데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17(6H)-디온(화합물 25); (6R,8R,9S,10R,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-10,13-디메틸-4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 26); (6S,8R,9S,10R,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-10,13-디메틸-4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-3H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 27); (6S,8R,9S,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-13-메틸-17-옥소-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-일 하이드로젠 설페이트(화합물 28); (6R,8R,9S,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-13-메틸-17-옥소-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-일 하이드로젠 설페이트(화합물 29); (6R,8R,9S,13S,14S)-13-메틸-6-(4-프로폭시부틸)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 30); (6R,8R,9S,13S,14S)-13-메틸-6-(5-에톡시펜틸)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 31); (6R,8R,9S,10R,13S,14S)-6-(메톡시메틸)-10,13-디메틸헥사데카하이드로-1H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 32); 및 (6R,8S,9S,14S,17S)-6-(메톡시메틸)-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올(화합물 33)로 존재할 수 있다.

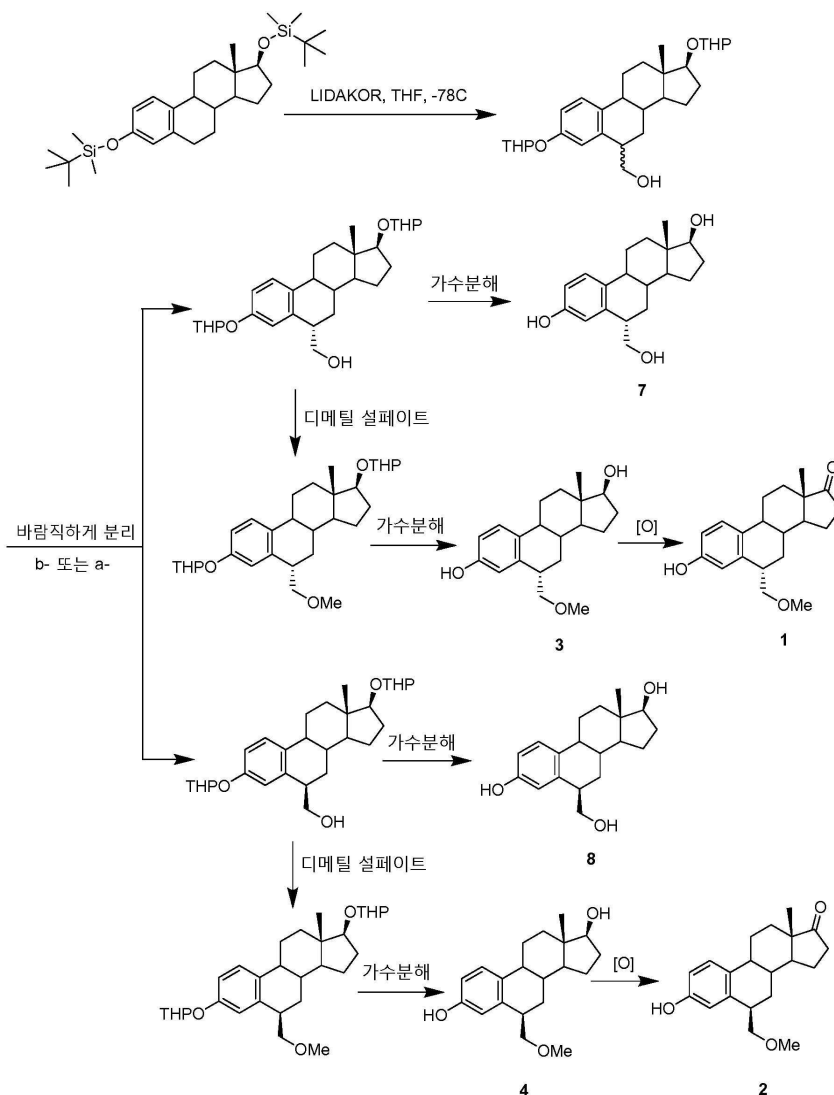
[0067] 본 발명의 방법들에 대한 화합물들은 (본 명세서에 참조문헌으로 병합된) U.S.S.N. 12/627,874에 설명된 바와 같이 제조되며, 에스트라디올의 6-하이드록시메틸, 6-알콕시알킬, 6-알킬티오알킬, 6-아미노메톡시, 6-메틸아미노메톡시 또는 6-메톡시아민 유도체들을 제조하는 방법과 관계가 있다. 에스트라디올 유도체들 제조에 대한 반응 도식들은 하기 도식 1 내지 3으로 제공된다. 이러한 방법들은 6-수산화된(hydroxylated) 화합물이 얻어지는

에스트라디올의 *t*-부틸디메틸실릴 유도체와 LIDAKOR/THF/포름알데히드와의 반응을 포함하며, 하기와 같은 단계들이 뒤따른다: (i) 에스트라디올의 6-하이드록시메틸 유도체를 얻기 위한 가수분해; 및/또는 (ii) 디메틸설페이트로 처리하고, 뒤이어 가수분해하여 에스트라디올의 6-메틸옥시메틸 유도체를 얻음. 화합물 1은 C-17 하이드록실 위치에서 화합물 3의 추가적인 산화에 의해 얻어질 수 있다. 화합물 33 및 여타 디메틸 화합물들은 (본 명세서에 참조문헌으로 병합된) U.S.S.N. 13/232,798에 따라 제조될 수 있다.

[0068] 대안적인 접근법으로, 본원 발명의 화합물들은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해서 제조될 수도 있다: (i) 에스트라디올 화합물을 보호화(protecting)하는 단계, (ii) LIDAKOR/부틸-리튬/디이소프로필아민/칼륨 *tert*-아밀레이트에 의해 상기 보호화된 에스트라디올 화합물을 벤질릭(benzylic) 6-위치에서 아실화(acylating)하는 단계, (iii) 수소화 알루미늄리튬에 의해 6 위치의 알데히드를 환원시키는 단계, 및 (iv) 상기 에스트라디올 화합물의 보호화된 영역들을 탈보호화(deprotecting)시키는 단계. 에스트라디올 유도체들 제조에 대한 반응 도식은 하기 도식 2에 제공된다.

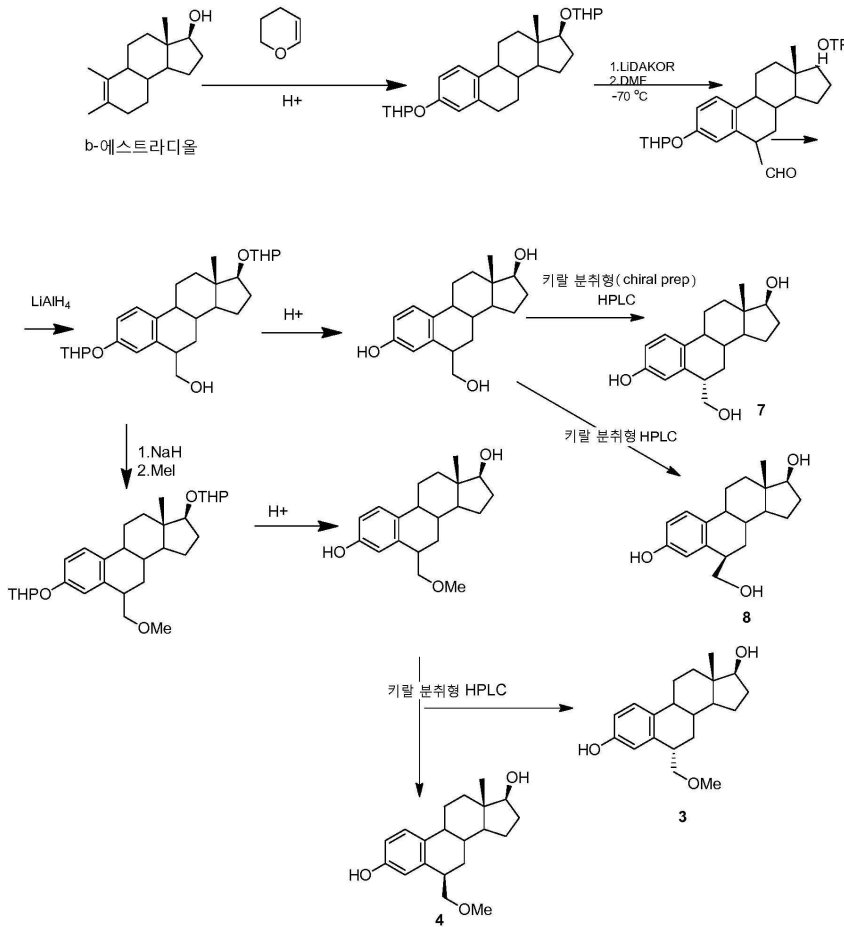
[0069] 본원 발명의 화합물들은 하기 도식들에 나타난 바와 같은 방법들을 따라서 합성될 수 있다.

[0070] 도식 1



[0071]

[0072] 도식 2

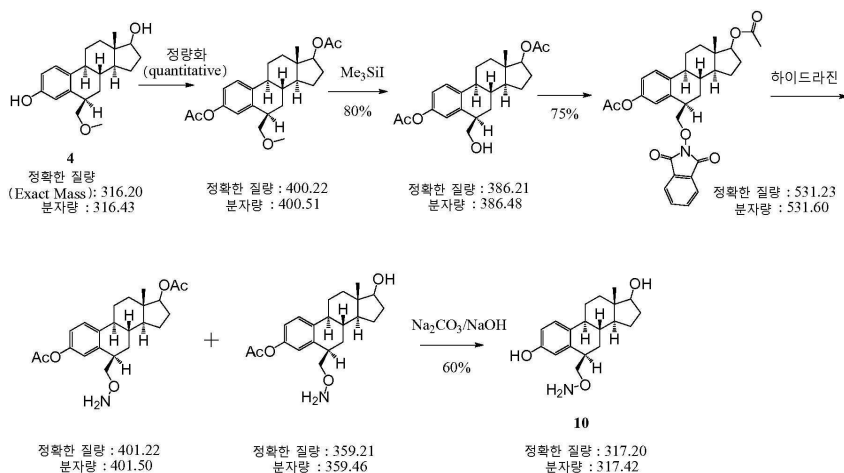


[0073]

[0074] 본 발명에 따라서, 다양한 알킬옥시알킬 유도체들은 알킬화제(alkylating agent)들의 선택을 수반한다. 이러한 유도체들은 본 발명을 알고 있는 본 기술분야의 전문가들에 의해 이해될 것이며, 본 명세서에 설명되는 종류의 합성 절차들을 통하여 이용될 수 있다. 따라서, 제한 없이, 다양한 C₁ 내지 C₆ 알킬 및 치환된 알킬 반응물들은 대응하는 알킬옥시알킬 유도체들을 제조하기 위하여 본 명세서에 설명된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0075] 본 발명의 또 다른 측면에서, 에스트라디올의 6-아미노 유도체들의 제조 방법들이 하기의 반응 도식들에 개시된다. 따라서, 도식 1 내지 2에 개시된 6-메톡시화된 에스트라디올들이 이용되며, 이들의 개별적인 아미노 유도체들로 전환된다.

[0076] 도식 3



[0077]

[0078] 탈수초화 방지 및/또는 재수초화 강화를 위한 화합물들 및 방법들이 제공된다. 본 발명의 측면에서, 세포 내에

서 미엘린 희돌기교세포 당단백질 유전자 및/또는 수초염기성 단백질 유전자를 인코딩하는 RNA에 대한 유전자 전사를 개시, 증진 또는 증가시키는 방법이 제공되며, 식 (I) 및 식 (Ia) 내지 (If)로부터 선택되는 6-치환 에스트라디올 유도체의 유효량과 상기 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 이러한 유전자 전사의 개시, 증진 또는 증가는 하나 이상의 유전자들에 대하여 발생할 수 있다는 것으로 이해될 것이다.

[0079] 본 명세서에 언급된 바와 같이, 본 발명의 화합물들의 염들은 비독성 "약제학적으로 허용가능한 염들"을 지칭한다. 그러나, 여타 염들은 본 발명에 따른 화합물들 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염들의 제조에 유용할 수 있다. 본원 발명의 화합물들이 염기성 기를 포함하는 경우, 일반적으로 유리(free) 염기를 적합한 유기산 또는 무기산과 반응시킴으로써 제조되는 비-독성 염들로 지칭되는 "약제학적으로 허용가능한 염들"이라는 용어 내에 염들이 포괄된다. 대표적인 염들은 본 기술분야에 알려진 여하한 이런 염을 포함한다. 본원 발명의 화합물들이 산성 잔기(acidic moiety)를 수반하는 경우, 이들의 적합한 약제학적으로 허용가능한 염들은 알칼리 금속 염들, 예를 들어 나트륨 또는 칼륨 염들; 알칼리 토금속 염들, 예를 들어 칼슘 또는 마그네슘 염들; 및 적합한 유기 리간드들로 형성되는 염들, 예를 들어 사차 암모늄염들을 포함할 수 있다.

[0080] 본 명세서에 언급된 바와 같이, 본원 발명의 화합물들은 여타 제제(agent)들, 또는 포유류인 대상에 대한 치료 요법(treatment regime)을 향상시키는 여타 제제들과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 방법들의 화합물들은 여타 에스트로겐 수용체-β 조절제(modulator)들과 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 조합물들의 개별적인 구성요소들은, 이러한 치료가 필요한 환자들이나 상기 환자들의 부위들에 분리된(divided) 또는 단일 조합 형태들로 동시적으로 또는 치료 과정 동안 상이한 시간들로 개별적으로 투여될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 이러한 동시적 또는 교차 치료 요법들 모두를 포괄하는 것으로 이해되며, 따라서 "투여"라는 용어가 이해된다. 표적화된 탈수소성 질환을 치료하는데 유용한 여타 제제들과 본 발명의 화합물들의 조합들의 범위는 원칙적으로 에스트로겐 작용과 관련된 장애들을 치료하는데 유용한 여하한 약제학적 조성물과의 여하한 조합을 포함한다.

[0081] 하기의 비-제한적 실시예들 및 데이터는 6-치환 에스트라디올 유도체들의 합성을 포함하는, 본원 발명의 화합물들, 조성물들 및/또는 방법들과 관련된 다양한 측면들과 특징들을 설명하는 동시에, 본 명세서에 설명된 방법론들을 통해 이용가능하다. 이전 기술과 비교하여, 본원 화합물들 및 방법들은 이에 대한 놀랍고, 예상치 않은 그리고 대조적인 결과들 및 데이터를 제공한다. 본 발명의 유용성은 몇몇의 화합물들, 이들의 잔기들 및/또는 치환기들의 사용 및 제조를 통하여 설명되는 동시에, 본 발명의 범위에 적합한, 비슷한 결과들이 여타 다양한 화합물들, 잔기들 및/또는 치환기들에 의해 얻어질 수 있다는 점이 본 기술분야의 전문가에 의해 이해될 것이다.

[0082] 상기에 언급된 바와 같이, 상기 방법들의 화합물들은 U.S.S.N. 12/627,874 및 U.S.S.N. 13/232,798에 개시된 절차들에 따라 제조된다. 상기에 설명되고 U.S.S.N. 12/627,874에 상세하게 설명되는 합성 도식들을 예시하기 위하여, 화합물 21의 제조가 실시예 1에 제공된다.

[0083] **실시예 1**

[0084] 화합물 21의 제조 방법들

[0085] a) (8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌

[0086] - 클로로메틸 메틸 에테르(7.0 mL, 92.0 mmol)가 100 mL의 THF 내의 디소프로필에틸아민(16.0 mL, 92 mmol) 및 β-에스트라디올(5 g, 18.4 mmol)의 용액에 첨가된다. 반응 혼합물은 가열하여 환류되고, 18시간 동안 교반된다. THF가 진공 하에서 제거되고, 황색/갈색 오일이 물과 CH₂Cl₂ 사이에서 분할된다. 유기층(organic layer)이 분리되고, 브라인(brine)으로 세정되며, 건조되고(Na₂SO₄), 여과되며, 진공 하에서 증발되어, 황금색 오일이 얻어진다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(10 % EtOAc/Hex)에 의한 정제로, 점성이 있는 투명한 오일로서 제목의 화합물(5.7 g, 86 %)을 얻었다.

[0087] b) (8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-올

[0088] - 아르곤 하에서 -78 °C까지 냉각된 80 mL의 무수 THF 내의 디소프로필아민(11.2 mL, 79.0 mmol) 및 칼륨 tert-부톡사이드(8.87 g, 79.0 mmol)의 용액에 n-부틸리튬(49.4 mL, 79.0 mmol, 헥산 내에서 1.6 M)이 한 방울씩(dropwise) 첨가되었다. 반응 혼합물은 -78 °C에서 30 내지 45분간 교반된다. 이후에, 45 mL의 THF 내의

a)로부터의 화합물(5.7 g, 15.8 mmol)의 용액이 한 방울씩 첨가되고, 반응 혼합물은 -78 °C에서 3시간 동안 교반된다. a)로부터의 화합물이 첨가되는 동안, 반응물(reaction)이 진홍색으로 변한다. 이후에, 트리메틸 보레이트(10.6 mL, 94.8 mmol)가 천천히 첨가되고, 혼합물이 0 °C까지 데워지며, 2시간 동안 교반된다. 이후에, 과산화수소(24 mL의 30 % 수용액)가 첨가되고, 반응 혼합물은 실온까지 데워지며, 1시간 더 교반된다. 반응물은 다시 0 °C까지 냉각되고, 10 % aq. Na₂S₂O₃ 용액(70 ml)으로 조심스럽게 퀀칭(quenched)된다. 얻어진 혼합물은 EtOAc(2x)로 추출되고, 조합된 유기 추출물들은 건조되며(Na₂SO₄), 여과되고, 진공 하에서 증발되어, 황색/갈색 오일이 얻어졌다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(25 % EtOAc/Hex)에 의한 정제로, 흰색 고체로서 제목의 화합물(3.5 g, 59 %)을 얻었다.

[0089] c) (8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-온

[0090] - 데스-마틴 페리오디난(Dess-Martin Periodinane)[9.46 g, 22.3 mmol]이 300 mL의 CH₂Cl₂ 내의 b)로부터의 화합물(7.0 g, 18.6 mmol)의 용액에 일부분씩(portionwise) 첨가된다. 얻어진 반응 혼합물은 실온에서 3시간 동안 교반된다. 혼합물이 물 내로 부어지고, 층들이 분리된다. 수성 층(aqueous layer)은 CH₂Cl₂로 추출되고, 조합된 유기 추출물들은 브라인으로 세정되며, 건조되고(Na₂SO₄), 여과되며, 진공 하에서 증발되어, 끈적거리는(gooey) 갈색 고체가 얻어졌다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(15 % EtOAc/Hex)에 의한 정제로, 옅은 황색의 점성이 있는 오일(6.0 g, 86 %)이 얻어졌다.

[0091] d) 에틸 2-((8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-일리덴)아세테이트

[0092] - 트리에틸 포스포노아세테이트(4.1 mL, 20.8 mmol)가 실온에서 25 mL의 THF 내의 수소화나트륨(832 mg, 20.8 mmol)의 혼합물에 첨가된다. 대략 10분 후, 10 mL의 THF 내의 c)로부터의 화합물(3.9 g, 10.4 mmol)의 용액이 한 방울씩 첨가된다. 얻어진 반응 혼합물은 밀봉된 튜브(tube) 내에서 72시간 동안 가열하여 환류된다. 혼합물은 진공 하에서 농축되고, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(구배: 5 % EtOAc/Hex 내지 40 % EtOAc/Hex)에 의해 정제되어, 투명한 점성이 있는 오일로서 제목의 화합물(3.4 g, 74 %)이 얻어졌다.

[0093] e) 2-((8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-일리덴)에탄올

[0094] - 65 mL의 THF 내의 d)로부터의 화합물(3.1 g, 6.97 mmol)의 용액은 0 °C에서 수소화 알루미늄리튬(5.2 mL, 10.46 mmol, THF 내에서 2 M) 한 방울씩으로 처리된다. 냉각 수조(cold bath)가 제거되고, 반응 혼합물은 실온에서 15분 동안 교반된다. 반응물은 다시 0 °C까지 냉각되고, 1.3 mL의 물, 뒤이어 2.6 mL의 2 N NaOH, 이후에 1.3 mL의 물의 조심스런 첨가에 의해 퀀칭된다. 혼합물은 흰색 고체가 형성될 때까지 힘차게 교반된다. 혼합물은 여과되고, 여과액이 진공 하에서 농축되어, 투명한 오일로서 제목의 화합물(2.8 g, 99 %)이 얻어졌다.

[0095] f) 2-((6S,8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-일)아세트알데히드

[0096] - 100 mL의 에틸아세테이트 내의 10 % Pd/C(500 mg) 및 e)로부터의 화합물(3.09 g, 7.68 mmol)의 혼합물은 실온에서 5시간 동안 40 psi의 H₂(g) 하에서 교반된다. 혼합물은 셀라이트를 통하여 여과되고, 셀라이트는 에틸아세테이트로 잘 세정된다. 여과액이 진공 하에서 농축되어, 옅은 황색 오일(3.1 g)을 얻었다. 오일은 100 mL의 디클로로메탄 내에 용해되고, 데스-마틴 페리오디난(Dess-Martin Periodinane)[3.9 g, 9.22 mmol]이 일부분씩 첨가된다. 얻어진 반응 혼합물은 실온에서 30분 동안 교반된다. 혼합물은 물 내로 부어지고, CH₂Cl₂로 추출된다. 조합된 유기 추출물들은 브라인으로 세정되고, 건조되며(Na₂SO₄), 여과되고, 진공 하에서 증발되어, 갈색 고체가 얻어졌다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(15 % EtOAc/Hex)에 의한 정제로, 투명한 오일로서 제목의 화합물(2.0 g, 65 %)을 얻었다.

[0097] g) 4-((6R,8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-일)부-2-텐-1-올

[0098] - 리튬 비스(트리메틸실릴)아미드(18.4 mL, 18.4 mmol, THF 내에서 1.0 M)이 0 °C에서 60 mL의 THF 내의 (2-하이드록시에틸)트리페닐포스포늄 브로마이드(3.37 g, 8.70 mmol)의 현탁액에 한 방울씩 첨가된다. 1시간 후, 황

갈색 용액은 10 mL의 THF 내의 f)로부터의 화합물 용액 한 방울씩으로 처리된다. 얻어진 반응 혼합물은 0 °C에서 40분 동안 교반되고, 이후에 수성 포화 NH₄Cl로 퀀칭된다. 얻어진 혼합물은 EtOAc(2x)로 추출되고, 조합된 유기 추출물들은 건조되고(Na₂SO₄), 여과되며, 증발되어, 갈색 오일이 얻어졌다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(구배: 20 % EtOAc/Hex 내지 75 % EtOAc/Hex)에 의한 정제로, 황색의 점성이 있는 오일로 제목의 화합물(680 mg, 45 %)을 얻었다.

[0099] h) 4-((6R,8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-일)부-2-텐알

[0100] - 데스-마틴 페리오디난(Dess-Martin Periodinane)[437 mg, 1.03 mmol]이 실온에서 15 mL의 CH₂Cl₂ 내의 g)로부터의 화합물(370 mg, 0.86 mmol)의 용액에 첨가된다. 얻어진 반응 혼합물은 10분 동안 교반되고, 이후에 물 내로 부어진다. 층들이 분리되고, 수성 층은 CH₂Cl₂(2x)로 추출된다. 조합된 유기 추출물들은 브라인으로 세정되고, 건조되며(Na₂SO₄), 여과되고, 진공 하에서 증발되어, 갈색 오일이 얻어졌다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(구배: 5 % EtOAc/CH₂Cl₂ 내지 10 % EtOAc/CH₂Cl₂)에 의한 정제로, 옅은 황색의 점성이 있는 오일로서 제목의 화합물(358 mg, 86 %)을 얻었다.

[0101] i) 6-((6R,8R,9S,13S,14S,17S)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-6-일)헥사-2,4-디엔-1-올

[0102] - 리튬 비스(트리메틸실릴)아미드(4.3 mL, 4.29 mmol, THF 내에서 1.0 M)가 0 °C에서 14 mL의 THF 내의 (2-하이드록시에틸)트리페닐포스포늄 브로마이드(786 mg, 2.03 mmol)의 현탁액에 한 방울씩 첨가된다. 30분 후, 황갈색 용액은 2 mL의 THF 내의 h)로부터의 화합물(345 mg, 0.81 mmol)의 용액 한 방울씩으로 처리된다. 얻어진 반응 혼합물은 0 °C에서 20분 동안 교반되고, 수성 포화 NH₄Cl로 퀀칭된다. 얻어진 혼합물은 EtOAc(2x)로 추출되고, 조합된 유기 추출물들은 건조되며(Na₂SO₄), 여과되고, 증발되어, 갈색 오일이 얻어졌다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(구배: 5 % EtOAc/CH₂Cl₂ 내지 40 % EtOAc/CH₂Cl₂)에 의한 정제로, 황색의 점성이 있는 오일로서 제목의 화합물(140 mg, 38 %)을 얻었다.

[0103] j) (6R,8R,9S,13S,14S,17S)-6-(6-메톡시헥사-2,4-디엔-1-일)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌

[0104] - i)의 화합물(135 mg, 0.3 mmol)의 용액은 0 °C까지 냉각되고, 수소화나트륨(120 mg, 3.0 mmol)이 일부분씩 첨가된다. 5 내지 10분 후, 아이오도메탄(0.19 mL, 3.0 mmol)이 한 방울씩 첨가되고, 얻어진 반응 혼합물은 실온까지 데워지며, 4시간 동안 교반된다. EtOAc가 첨가되고, 반응물이 물로 조심스럽게 퀀칭된다. 층들이 분리되고, 유기층이 건조되며(Na₂SO₄), 여과되고, 증발되어, 갈색의 유성(oily) 잔여물(residue)이 얻어졌다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(구배: 5 % EtOAc/Hex 내지 20 % EtOAc/Hex)에 의한 정제로, 투명한 오일로서 제목의 화합물(92 mg, 65 %)을 얻었다.

[0105] k) (6R,8R,9S,13S,14S,17S)-6-(6-메톡시헥실)-3,17-비스(메톡시메톡시)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌

[0106] - 5 내지 10 mL의 에틸아세테이트 내의 10 % Pd/C(100 mg) 및 j)의 화합물(90 mg, 0.19 mmol)의 혼합물은 실온에서 16시간 동안 H₂(g)의 벌룬(ballon) 하에서 교반된다. 혼합물은 셀라이트를 통하여 여과되고, 셀라이트는 에틸아세테이트로 잘 세정된다. 여과액이 진공 하에서 농축되어, 투명한 오일로서 제목의 화합물(90 mg, 99 %)이 얻어졌다.

[0107] l) (6R,8R,9S,13S,14S)-6-(6-메톡시헥실)-13-메틸-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-데카하이드로-6H-사이클로펜타[a]페난트렌-3,17-디올 (화합물 21)

[0108] - 각각 6 N HCl 및 THF의 1.5 mL 내의 k)로부터의 화합물(90 mg, 0.19 mmol)의 용액이 5시간 동안 실온에서 교반된다. 반응 혼합물은 물로 희석되고, EtOAc(2x)로 추출된다. 조합된 유기 추출물들은 건조되고(Na₂SO₄), 여과되며, 진공 하에서 증발되어, 투명한 유성 잔여물이 얻어졌다. 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(구배: CH₂Cl₂ 내지 30 % EtOAc/CH₂Cl₂)에 의한 정제로, 흰색 고형의 폼(solid foam)으로서 화합물 21(38 mg, 52 %)을 얻었다.

[0109] **실시예 2**

[0110] 화합물 3 및 4의 제조 방법들

[0111] 도식 2에 개략적으로 나타낸 바와 같이, 에스트라디올 유도체들인 화합물들 3 및 4는 하기의 방식으로 합성된다. 보호화된 에스트라디올 화합물은 촉매로서 톨루엔술폰산 또는 캄포술폰산을 사용하여, THF 내에서 디하이드로피란과 β-에스트라디올을 반응시킴으로써 제조된다. 본 기술분야의 전문가가 인식할 수 있는 바와 같이, 이 반응은 평형 반응이며, 이러한 조건들 하에서 완료되지 않는다. 따라서, 단일-보호화된(mono-protected) 에스트라디올 둘 모두가 반응 혼합물 내에서 발견될 수 있다. 이러한 미정제 반응 혼합물은 아세트 니트릴에 의한 배산(trituration) 단계를 거쳐, 결정화하여 대략 70 % 수율로 원하는 비스-THP 에스트라디올을 얻는다.

[0112] 도식 2에 나타낸 바와 같이, 중요한 중간체는 LiDAKOR: 부틸 리튬, 디이소프로필아민 및 칼륨 tert-아밀레이트로 지칭되는 강염기 혼합물에 의한 벤질릭 6-위치에서의 아실화를 통해 얻어진다. -70 °C에서의 이러한 조건들 하에서, 본 기술분야의 전문가는 벤질릭 위치에서의 양성자 제거를 인식할 수 있다. 이후에, 중간체가 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어, 대략 50 % 수율로 시럽(syrup)을 얻었으나, 여전히 소량의(minor) 불순물들 및 컬럼 용매들을 함유한다. 과량의 수소화 알루미늄리튬에 의한 알데히드의 환원은 고 수율로 라세믹 하이드록시 메틸 에스트라디올 화합물을 야기한다.

[0113] 화합물들 3 및 4를 제조하기 위한 목적으로, 메톡시메틸 화합물이 수소화나트륨 및 메틸아이오다이드에 의한 하이드록시메틸 에스트라디올 화합물의 메틸화에 의해 제조된다. 메톡시메틸 화합물이 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어, 유리 같은 폼(glassy foam)을 얻었다. 보호화된 기들을 탈보호화함으로써, 라세믹 6-메톡시메틸 에스트라디올 화합물을 얻었다. 거울상이성질체들의 분리는 키랄 분취형(chiral preparative) HPLC를 사용하여 실시되어, 화합물들 3 및 4가 얻어졌다. 화합물 4의 경우, >95:5 R:S의 키랄 순도(chiral purity)를 가지는 것으로 파악된다. 화합물 3의 경우, 86:14 S:R의 키랄 순도를 가지는 것으로 파악된다. 4-양성자 및 6-양성자가 특징적(diagnostic)인 경우, 6-위치의 절대 입체화학을 결정하기 위하여 NMR을 이용하는 것은 본 기술분야의 전문가의 수준 내에서 충분하다.

[0114] **실시예 3**

[0115] 폐, 췌장 및 난소 종양 세포주(Cell Line)들에 대한 화합물들의 발현 프로파일링(Expression Profiling)

[0116] 연구는 세 가지의 인간 종양 세포주들: A549, Panc-1 및 SK-OV-3을 포함한다. 상기 세포주들은 각각 두 개의 플라스크들 내에 대략 40 % 밀집도(confluence)로 배양되어 성장했다. 플라스크들 중 하나는 배양 배지에 다양한 농도들, 즉 10 μM, 20 μM, 50 μM, 100 μM 또는 200 μM의 화합물을 첨가시켜 처리된다. 다른 한 플라스크는 화합물들로 처리되지 않고(mock treated), 약물을 용해시키고 전달하는데 사용되는 전달체(vehicle)만으로 처리된다. 처리된 샘플들과 미처리된 샘플들의 쌍(pair)들로부터 추출된 RNA는 Agilent Whole Human Genome Microarrays(G4112F)에 의해 마이크로어레이(microarray) 분석되었다. 각각의 분석은 어레이에 대한 각각의 41,000 특이적 mRNA 검출기들로 메신저(messenger) RNAs의 존재비(abundance)를 기록한다. 각각의 세포주에 대한 처리된 샘플들 대 미처리된 샘플들의 직접 비교는, 약물 처리로 인한 mRNA 존재비의 변화에 대한 극도로 민감한 검출을 제공한다. 각각의 세포주 비교는 자기-정규화(self-normalized)되므로, 결과들은 높은 신뢰를 가지면서 샘플들 전반에 걸쳐 비교될 수 있다.

[0117] 세포 제조

[0118] 세 가지의 인간 종양 세포주들인 A549, Panc-1 및 SK-OV-3은 각각 두 개의 플라스크들 내에 대략 40 % 밀집도(confluence)로 배양되어 성장했다. 플라스크들 중 하나는 배양 배지에 10 μM, 50 μM 및 100 μM의 농도들의 화합물을 첨가시켜 처리된다. 다른 한 플라스크는 화합물들로 처리되지 않고(mock treated), 약물을 용해시키고 전달하는데 사용되는 전달체만으로 처리된다. 모든 플라스크들은 24시간 더 배양되고, 이후에 세포들은 마음대로 스크랩(scraped)되며, 얼음처럼 차가운(ice-cold) PBS 내에서 세정되고, 이후에 원심분리에 의해 수집된다. 채취된 세포들은 즉시 동결되고, -80 °C 또는 더 차갑게 저장된다.

[0119] RNA 정제

[0120] 전체 RNA는 트리졸계(Trizol-based) 세포 용해(cell lysis) 뒤이어 65 °C의 뜨거운 페놀 추출 및 RNeasy 크로마토그래피 정제를 사용하여 동결된 조직 샘플들로부터 준비된다. 정제된 RNA 샘플들은 분광광도법적으로 분석된다. RNA의 농도는 260 nm에서의 흡광도(A260)를 측정함으로써 결정된다. pH 11에서 측정되는 경우, 260 nm

에서의 정해진 흡광도의 1 단위는 35 μg 의 RNA/ml와 대응한다.

- [0121] RNA 품질 평가 - A260/A280 흡광도 비율들
- [0122] 260 nm 및 280 nm에서의 관독결과(reading)들의 비율(A260/A280)은 단백질과 같은, UV를 흡수하는 오염물질들에 대한 RNA 순도의 추정치(estimate)를 제공한다. RNA는 대략 2.1의 이론적인 A260/A280 비율(10 mM Tris \cdot Cl, pH 7.5)을 갖는다. 1.8 이상의 A260/A280 비율을 갖는 추출된 RNAs는 이 어레이에서 우수한 결과들을 제공한다.
- [0123] RNA 품질 평가 - 모세관 전기이동
- [0124] RNA는 모세관 전기이동(Agilent BioAnalyzer)을 사용하여, 온전한(intact) 28S 및 18S 리보솜 RNAs의 비율을 결정함으로써 상대적 동일성(relative integrity)에 대하여 시험된다. 완전히 온전한 RNA는 2.2의 28S/18S 비율을 갖는다. 어레이 분석에 수용된 모든 RNAs는, 다양한 28S/18S 비율들을 갖는 샘플들 사이에서 내재적 재현성(internal reproducibility)의 검토에 의해 결정되므로, 신뢰할 수 있는 재현가능한 마이크로어레이 결과들에 대한 최소한의 28S/18S 비율로 1 초과와 비율들을 갖는다.
- [0125] 프로브(Probe) 생산 및 칩 혼성화(Chip Hybridization)
- [0126] 모든 RNAs는 Agilent Low Input Labeling 반응에 입력(input)으로서 1 mg의 RNA를 사용하여 라벨링(labeled)된다.
- [0127] 시험군(Test) RNA는 Cy5[650 nm 방사체(emitter)]로 라벨링되고, 대조군(reference) RNA는 Cy3(550 nm 방사체) 뉴클레오티드들로 라벨링된다. 라벨링, 혼성화 및 후속적인 세정들은 Agilent사의 H1Av2 인간 발현 칩(human expression chip)들 상에서 수행된다. 얻어진 혼성화된 칩들은 Agilent microarray scanner에 의해 스캔되며, 각각의 검출 지점(detector spot)에 대한 세기 정보는 Agilent feature extraction software를 사용하여 스캔된 이미지로부터 추출된다.
- [0128] 혼성화의 품질을 가장 잘 드러내는 시험은 칩들 상에 프린트(printed)된 유전자들의 다수의 중복들로부터 기록되는 비율들의 분산값(level of variance)이다. 한 세트(set)의 유전자 프로브들은 어레이 전반에 걸쳐 임의의 위치들에서 각각 열번씩 프린트된다. 모든 세트들에 대한 \log_2 비율의 표준 편차의 중간값이, 전체 어레이에 대한 전반적인 표준 편차의 추정치(estimator)로서 사용된다.
- [0129] 데이터 및 분석
- [0130] 세 개의 모든 혼성화에 대한 중요한 데이터는, 특정한 전사 패턴들을 나타내는 유전자들을 식별할 수 있는 검색을 쉽게 하는 형태(formulation)인 FileMaker Pro relational database로 수집된다. 보고되는 데이터는 (처리되면) 붉은색의 배경-제거(background-subtracted) 신호들 및 (미처리되면) 녹색의 배경-제거 신호들이다. 이는 데이터의 가장 최소한의 변형 형태이다. 배경인 "표면"은 인간 DNA에 상보적이지 않은 수많은 프로브들을 기반으로 하는, 슬라이드 전반으로 추정된다. 이들은 어레이 표면들에 라벨링된 cRNA의 비특이적 결합, 및 고정화된(immobilized) DNA 올리고머들에 라벨링된 cRNA의 비-특이적 결합 둘 모두의 추정치로 여겨진다. 이러한 정보를 사용하여, 각각의 프로브 주위의 국부 노이즈(local noise)가 추정되고, 이는 어레이 상의 각각의 특정 프로브 특성에 대한 올리고뉴클레오티드 침착(deposition) 부분에서 발견되는 신호에서 제외된다(gBGSubSignal, rBGSubSignal). 처리된 세포의 RNA로부터의 신호와 미처리된 세포의 RNA로부터의 신호의 비율은 직접적인 비율 및 \log_2 비율 둘 모두(비율, \log_2 비율) 보고된다. 비율들은 각각의 채널에서의 세기들을 정규화하는 반복 과정으로 결정되며, 그 결과 스칼라(scalar)는 거의 동일한 전사 단계들을 갖는 다수의 유전자들의 세기들의 유사성을 극대화하는 하는 것으로 밝혀졌으며, 따라서 1에 매우 가까운 비율들을 갖게 된다.
- [0131] 비율들이 정규화된 데이터를 위하여 계산된 후에, 다양한 대조군 및 이중(duplicate) 샘플들은 결과들이 얼마만큼 재현가능한지, 그리고 이러한 재현성이 신호 강도 및 노이즈에 따라서 얼마만큼 다양한지에 대한 모델을 확립하기 위하여 분석된다. 이러한 파라미터(parameter)들에 의해, 만약 붉은색과 녹색의 세기들이 동일한 세기들의 분포를 생산하는 단일 공정으로부터 임의로 얻어진다면 각각의 비율이 발생할 수 있는, 가능성(likelihood)의 추정치가 생성된다. 이러한 가능성은 각각의 샘플에 대하여 보고되고, 처리된 신호 세기들과 미처리된 신호 세기들 간의 차이를 나타내는 비율(PValLogRatio)이라는 가능성의 측정이다. 이러한 가능성은 결과들을 변화된 유전자들과 변화되지 않은 유전자들로 나누는 한계치(threshold)로 사용될 수 있다. 데이터베이스 내에서, $p \leq 0.001$ 의 한계치는 처리된 샘플과 미처리된 샘플 간의 mRNA의 존재비에 있어서 상당한 변화에 대한 구분점(cut point)[Sig0.001]으로 사용된다. 이러한 한계치는 예상되는 긍정 오류(false positive)의 수

자를 각각의 어세이에서 조사되는 합리적인 수준으로 정해진 ~40,000 비율들로 감소된다. 미처리된 샘플에 관한 변화의 방향 및 상당한 변화를 나타내는 필드(field)는, 어세이의 결과를 세 개의 범주(trinary categorical)로 줄인다: 1, 미처리된 샘플(untreated)에 비해 상향 조절; 0, 미처리된 샘플에 비해 변함없음; -1, 미처리된 샘플에 비해 하향 조절(Tri). 이러한 표현을 사용하면, 여하한 단일 또는 다중 세트들의 실험들에 있어서 변화되는 유전자들을 식별하는 조사들을 쉽게 구성한다.

[0132] 하기의 표 1에 기반을 둔 유전자 발현 데이터는, 화합물 4 및 화합물 21이 OPCs의 증식 및 분화, 그리고 궁극적으로 신경 축색들의 수초들의 합성에 관련된 신호전달 경로들에 있어서 유전자들을 상향-조절하는 것을 나타낸다. 표 1에 나타난 유전자 발현 수치들은 세 가지의 인간 종양 세포주들(SKOV-3, A549 및 Panc-1)로부터 얻어지는 데이터의 평균값 및 log₂값들이다. 유전자 발현에 대한 상당한 변화는 p≤0.0001이다. 유전자 IDs는 Entrez Gene database에 대하여 미국 국립생물정보센터(NCBI)에서 개발된 표준규격(standards)에 따른다.

[0133] 표 1

유전자	기호	Entrez Gene Database ID	화합물 4 (50 μM)	화합물 4 (100 μM)	화합물 21 (10 μM)	화합물 21 (50 μM)
텔타/노치-형 EFG 반복형	DNER	92737	5.16	5.51	6.20	4.79
희돌기교세포 계통 전사 인자 2	OLIG2	10215	4.98	4.59	6.16	5.32
미엘린 염기성 단백질 변이체(variant) 7	MBP	4155	4.72	4.80	6.07	5.04
미엘린 희돌기교세포 당단백질 (변이체 알파 4)	MOG	4340	3.99	4.28	5.23	5.55
인터류킨 23 수용체	IL23R	149233	3.62	4.86	5.31	5.46
막관통 단백질 108	TMEM108	66000	3.59	3.62	3.92	3.96
코넥신(Connexin)	AF251047	100128922	3.38	3.56	2.74	3.08
인터류킨 20 수용체 알파	IL20RA	53832	3.17	3.38	4.42	4.39
인터류킨 28A	IL28A	282616	1.35	1.96	1.44	2.59

[0134]

[0135] 실시예 4

[0136] 희돌기교세포 분화 어세이

[0137] OPC 배양물들은 Pedraza, C.E. et al., *Glia* 56(12), 1339-52(2008)에 설명된 바와 같이 제조되며, 이는 본 명세서에 참조병합된다. 뇌는 E14.5 C57B16/J(PLP-EGFP 발현) 쥐들로부터 제거되고[Mallon, B.S. et al., *J. Neurosci* 22(3), 876-85(2002)], 세정되며, 외피 반구(cortical hemispheres)가 분리된다. 이후에, 조직은 분쇄(triturated)되고, 플라스크 당 1개의 뇌(2개의 외피 반구)의 밀도로 T-25 cm² 플라스크들 내에 파종된다. 신경구(Neurospheres)가 3일 후 한번 가로질렀다(passaged). 관(passage) 2로부터의 세포들이 일차 스크린(screen)을 위하여 두 개의 96-홈판 플레이트(well plate)을 제조하는데 사용된다. 처음 OPC 배지 내에서 48시간 배양 이후, OPCs는 10 μM 섬모 신경영양 인자(ciliary neurotrophic factor: CNTF) 및 1 μM 세포외-신호-조절(ERK) 키나아제 억제제(MEKi)를 포함하는 양성 대조군 화합물들 및 매개체 대조군 DMSO와 함께, 10 μM의 17β-에스트라디올, 화합물 4 및 화합물 21로 처리된다. 세포들은 총 4일간 처리되며, 배지는 새로운 화합물들로 48시간 정도(mark)에서 한번 교체된다. 4일간 처리한 후, 세포들은 4% 파라포름알데히드로 고정되며, 핵들을 가시화하기 위하여 Hoechst 33342로 착색된다. 또한, 세포들은 성장교세포(astrocyte)들을 식별하기 위하여 항-GFAP[GFAP = 신경교 섬유질 산성 단백질(glial fibrillary acidic protein)] 항체들로 착색된다. 세포들은 3% 일반적인 염소 혈청(normal goat serum)으로 차단되고, 뒤이어 항-토끼 GFAP 항체(1:500)로 하룻밤 배양된다. 세포들은 1:1000 농도의 이차 염소 항-토끼 Alexa 647 형광색소 항체로 라벨링된다. 이미지들은 Cellomics Arrayscan VTI를 사용하여 얻어진다. 10x 확대에서 홈(well) 당 20개의 시야(field)들을 포착하고, EGFP[증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein); 성숙한 희돌기교세포들] 및 GFAP(성장교세포들)가 발현된 세포들은 뉴런 프로파일링 알고리즘(neuronal profiling algorithm)에 의해 평가된다.

[0138] 희돌기교세포 성숙의 정도는 형성 과정(process formation)의 정도와 함께 PLP-EGFP 리포터(reporter) 신호의 수치(level)에 의해 측정된다(도 1 내지 4; 도 1 및 3에 대한 범례는 하기 표 2에 나타냄). 단백질질 단백질(Proteolipid protein: PLP)은 생체지표로서 사용되는데, 이는 성숙한 희돌기교세포들 내에서 발현하는 것으로 알려져 있고 수초의 구성요소이기 때문이다. 도 1 및 3에 나타난 바와 같이, 화합물 4 및 21 둘 모두는 강력한

6-치환 유사체(analog)들이고, 화합물 21은 DMSO와 비교하여 희돌기교세포들을 분화시키는데 3-배 이상의 활성을 가지며, 각각 양성 대조군인 CNTF[Stankoff, B. et al., *J Neurosci* **22**(21), 9221-27 (2002)] 및 MEKi[Younes-Rapoza, V. et al., *Int J Dev Neurosci*, **27**(8), 757-68 (2009)]보다 1.5 내지 2.0-배 이상의 활성을 갖는다. DMSO, 및 CNTF를 포함하는 시험된 여타 모든 화합물들과 비교하여, 또한 형성 과정의 정도가 화합물 21인 경우 가장 두드러졌다(도 2 및 4).

[0139] 표 2 - 도 1 및 3에 대한 범례

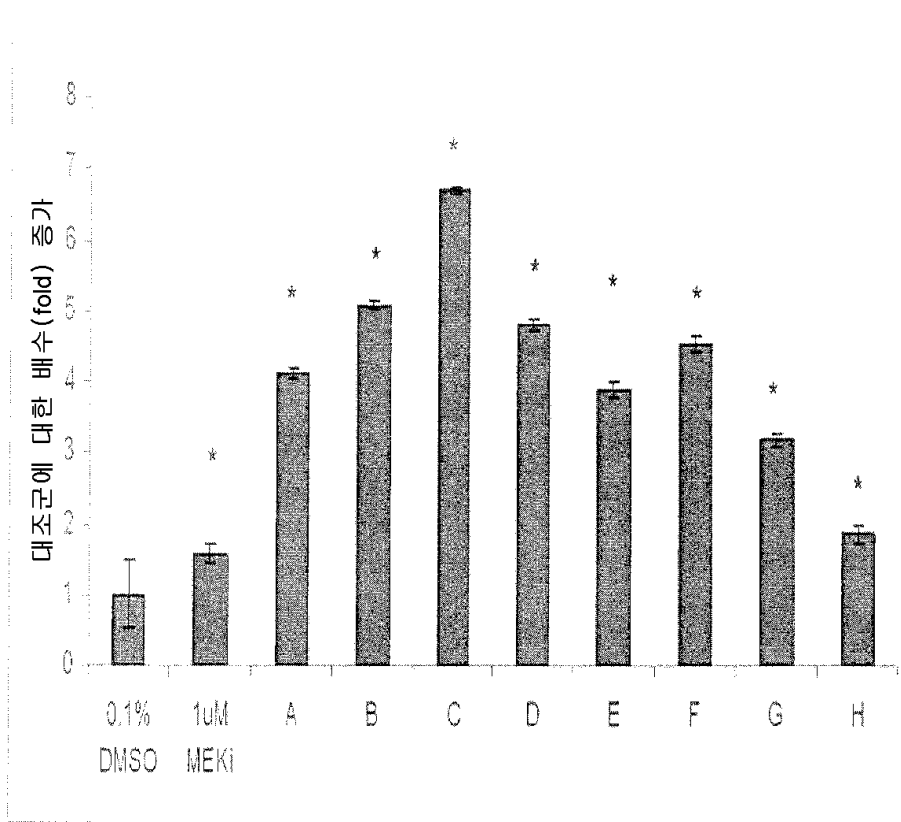
도 1 및 도 3에서의 문자	화합물 #
A	24
B, O	4
C	8
D	에스트라디올
E, M	21
F	32
G	23
H	에스트리올(Estriol)
I	10
J	18
K	20
L	엑스메스탄(Exemestane)
N	33

[0140]

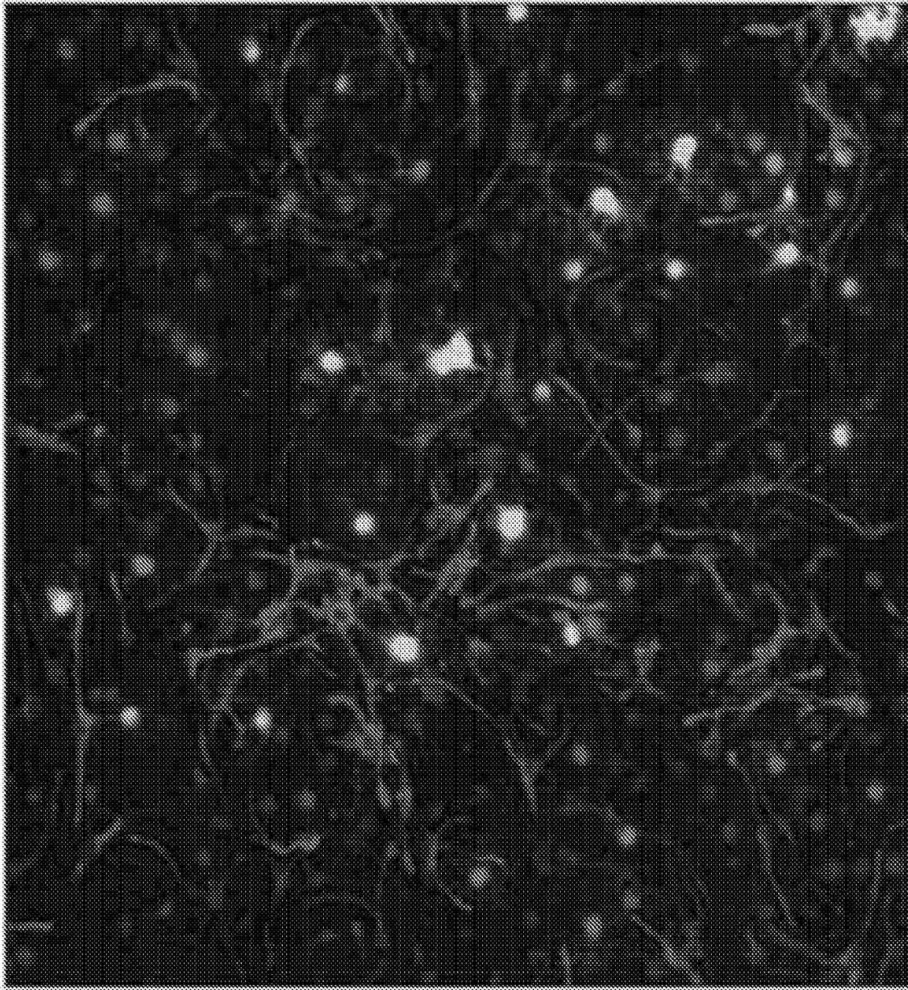
[0141] 특허들을 포함하여, 모든 논문(article)들 및 참고문헌들의 개시 내용들은 본 명세서에 참조병합된다. 현재, 본 발명 및 이를 사용하고 구성하는 방식 및 공정은 본 기술분야와 관련이 있는 여하한 전문가가 동일하게 사용하고 구성할 수 있도록 완전하고, 명백하고, 간결하고 정확한 용어들로 설명된다. 본 명세서에 인용되는 모든 참고문헌들은 본 명세서에 참조병합된다. 상기 설명된 본원 발명의 바람직한 실시형태들 및 본 명세서 내에서 만들어질 수 있는 변형(modification)들은 본원 발명의 범위 또는 정신으로부터 벗어나지 않음을 이해한다.

도면

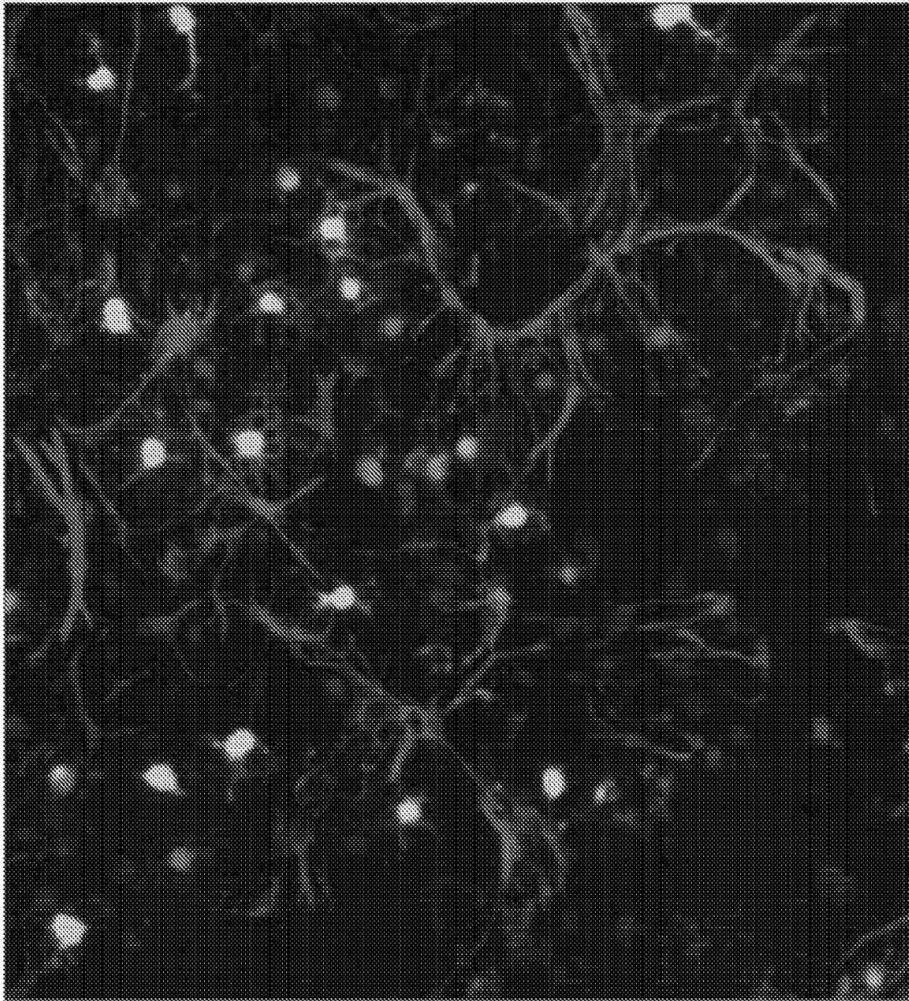
도면1



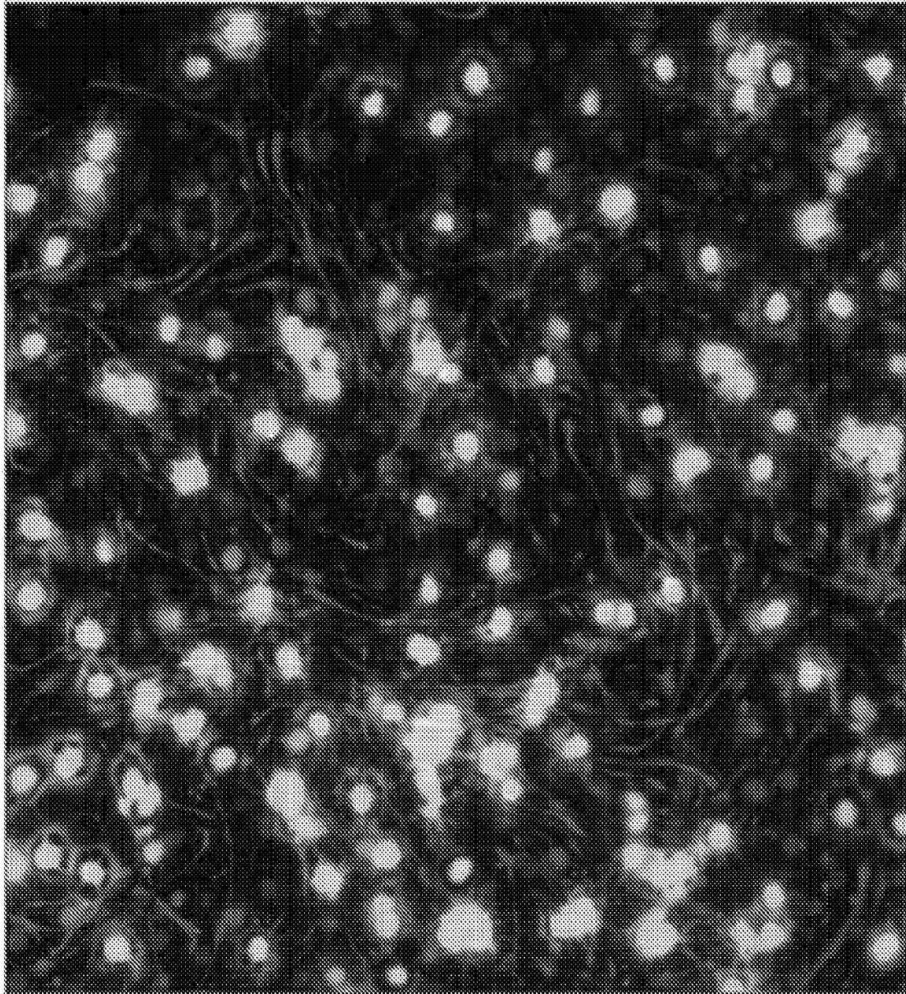
도면2a



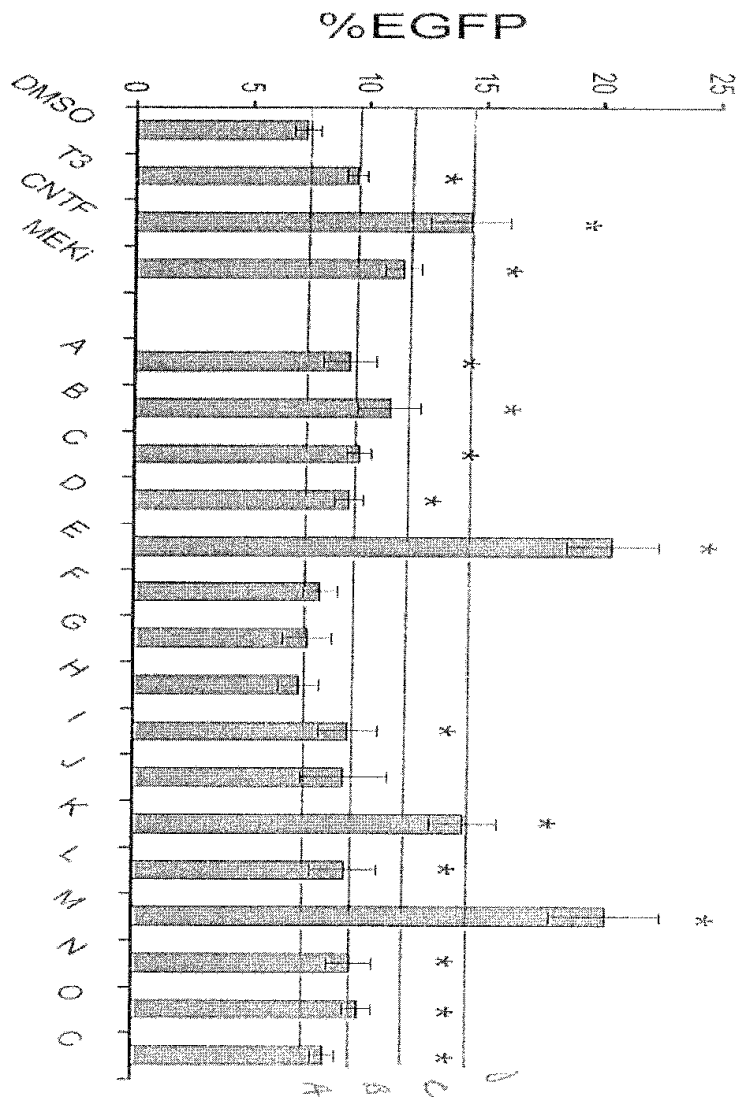
도면2b



도면2c



도면3



도면4

