(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0171774
(43) 공개일자 2024년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 231/56 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/416 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 231/56 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0070134
(22) 출원일자 2023년05월31일
심사청구일자 2023년05월31일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
서영호
대구광역시 수성구 청수로 261, 1410동 1301호 (황금동, 캐슬골드파크 4단지)
(74) 대리인
특허법인태백

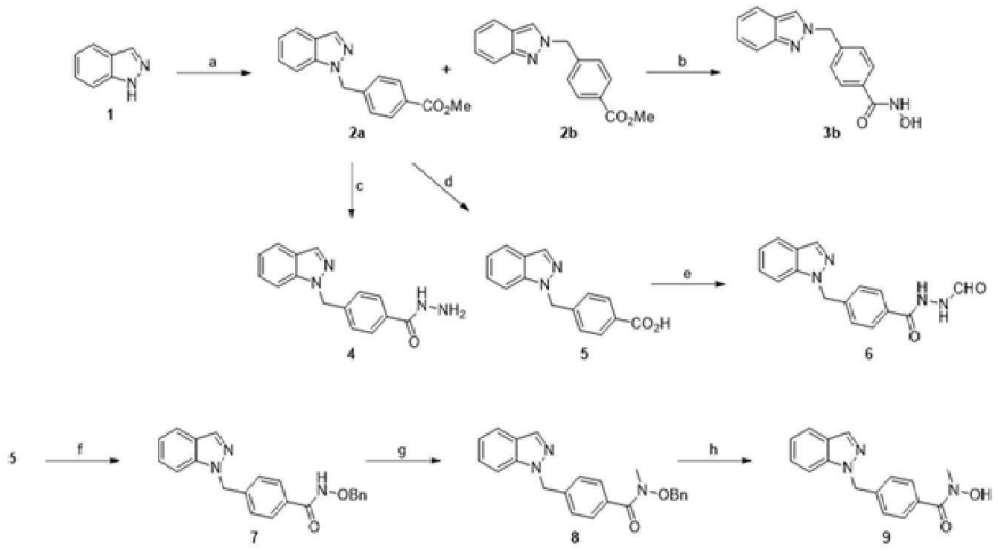
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 인다졸 유도체 화합물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물 및 이의 신경계 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, HDAC6의 활성을 억제시키므로써, α-튜불린 및 히스톤 H3의 아세틸화를 유의적으로 증가시켜 암세포 증식을 억제하는 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, HDAC 억제제로 제공되어 HDAC과 관련된 신경계 질환에 효과적인 치료제로 제공될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/416 (2013.01)
A61P 25/16 (2018.01)
A61P 25/24 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 25/30 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345347183
과제번호 2016R1A6A1A03011325
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 약학연구소
기 여 율 50/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711192511
과제번호 2022R1A2C1010771
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 후생유전조절인자 저해제 및 단백질 분해제 개발에 관한 연구
기 여 율 50/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

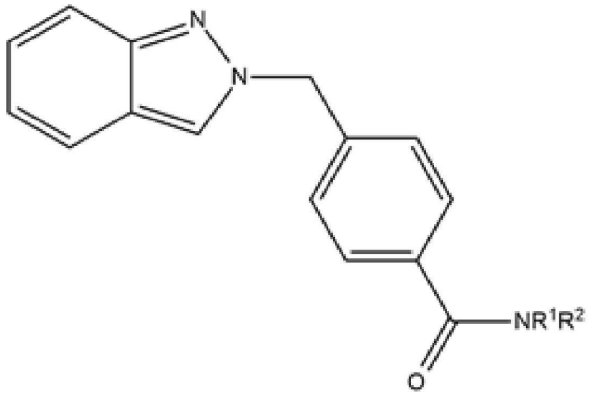
명 세 서

청구범위

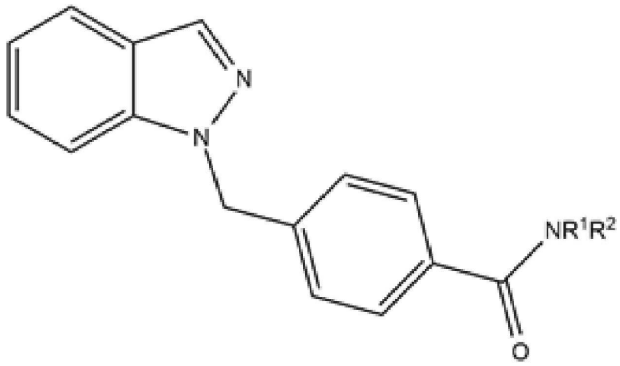
청구항 1

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물:

[화학식 1]



[화학식 2]



상기 화학식 1 또는 화학식 2에서,

R^1은 수소 또는 (C1-C5)알킬이고, R^2는 하이드록시 또는 -NHR^3이고, 상기 R^3은 수소 또는 -CHO임.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 R^1은 수소 또는 메틸인 것을 특징으로 하는 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 인다졸 유도체 화합물은 4-((2H-인다졸-2-일)메틸)-N-하이드록시벤즈아마이드 (4-((2H-indazol-2-yl)methyl)-N-hydroxybenzamide)인 것을 특징으로 하는 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 인다졸 유도체 화합물은 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)벤조하이드라자이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)benzohydrazide), 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)-N'-포르밀벤조하리드라자이드 (4-((1H-

indazol-1-yl)methyl)-N'-formylbenzohydrazide) 및 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)-N-하이드록시-N-메틸벤드아마이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)-N-hydroxy-N-methylbenzamide)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물.

청구항 5

청구항 1의 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경보호용 (neuroprotective) 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1의 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 인다졸 유도체 화합물은 4-((2H-인다졸-2-일)메틸)-N-하이드록시벤즈아마이드 (4-((2H-indazol-2-yl)methyl)-N-hydroxybenzamide)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 신경계 질환은 알츠하이머, 루게릭병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 약물 중독 및 우울증으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 약학 조성물은 HDAC6 (Histone deacetylase 6)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

청구항 1의 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

청구항 1의 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 HDAC6 (Histone deacetylase 6) 활성 억제용 시약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 인다졸 유도체 화합물 및 이의 용도를 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 히스톤 탈아세틸효소 (Histone deacetylases; HDACs)는 보조억제자(corepressors)나 다중-단백질 전사복합체(multi-protein transcriptional complexes)들에 의해 유전자 프로모터에 붙을 수 있으며, 그곳에서 DNA에 직접 결합하지 않고 크로마틴 (chromatin) 변형을 통해 전사를 조절한다.

[0003] 이러한 HDAC 효소는 다수의 세포 과정의 조절에 관여하는 데, 히스톤 아세틸전환효소(HAT) 및 HDAC 효소는 히스톤 단백질의 N-말단에서 라이신 잔기를 아세틸화하거나 탈아세틸화하여 전사 활성에 영향을 미치며, α-튜불린, Hsp90, p53, c-Myc, NF-κB 및 E2P와 같은 최소 50개의 비히스톤 단백질의 전사 후 아세틸화를 조절하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 최근에는 히스톤 탈아세틸효소 (Histone deacetylases; HDACs)가 신경계 질환을 야기할 수 있다고 보고되어 짐에 따라, 다양한 질병들에 대한 중요한 약제학적 타겟으로 주목받고 있다.

[0005] 이와 같은 대부분의 HDAC 억제제는 주로 혈액 악성종양 치료제로 개발되었으나, 알츠하이머 질환, 우울증 및 약물 중독 질환을 포함한 신경계 질환 치료제로서 HDAC 억제제 사용에 대한 연구가 보고되어 짐에 따라, 항암 치료 이외에 보다 넓은 질환에 효과적으로 적용될 수 있는 HDAC 억제제의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 1. Chemistry - A European Journal Volume24, Issue36 Pages 9090-9100.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 신규한 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 제공하는 데에 있다.

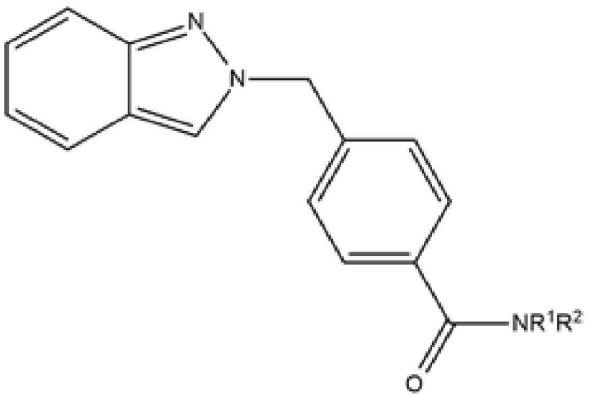
[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경보호 (neuroprotective) 및 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

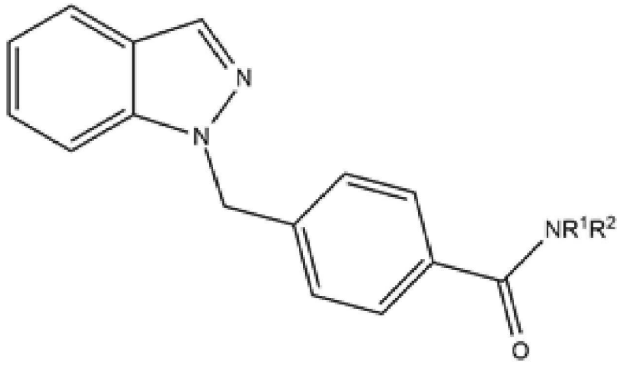
과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 제공한다.

[0011] [화학식 1]

[0012] 

[0013] [화학식 2]



[0014]

[0015] 상기 화학식 1 또는 화학식 2에서, R^1은 수소 또는 (C1-C5)알킬이고, R^2는 하이드록시 또는 $-NHR^3$이고, 상기 R^3은 수소 또는 -CHO일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경보호용 (neuroprotective) 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 신규한 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물 및 이의 신경계 질환 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, HDAC6의 활성을 억제시키므로써, HDAC6와 관련된 신경계 질환에 효과적인 치료제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 인다졸 유도체 화합물의 합성모식도를 나타낸다.

도 2는 인다졸 유도체 화합물 농도별 처리별 세포 생존 능력을 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 인다졸 유도체 화합물의 α-튜불린과 Histone H3의 아세틸화에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 α-튜불린 아세틸화 상태의 공초점 현미경 이미지를 나타낸다.

도 5는 필로폰 (methamphetamine; 이하, MET라함)에 의해 야기된 SH-SY5Y 세포에서 인다졸 유도체 화합물 처리 효과를 나타낸다.

도 6은 MET에 의한 SH-SY5Y 세포의 형태 변화를 역전시키는 인다졸 유도체 화합물의 효과를 나타낸다.

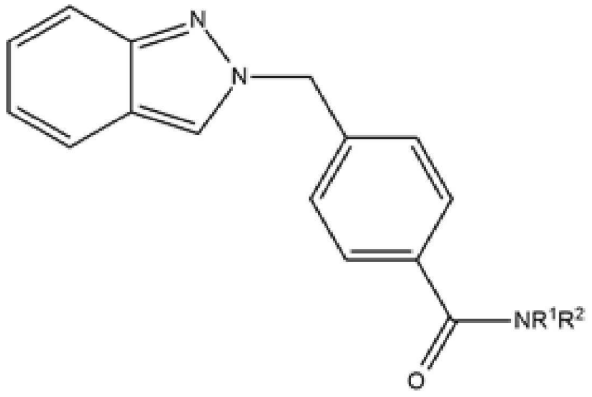
도 7a 및 7b는 HDAC6의 기질 결합 포켓에 결합된 인다졸 유도체 화합물의 분자 도킹 포즈(PDB 코드: 5EF7)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

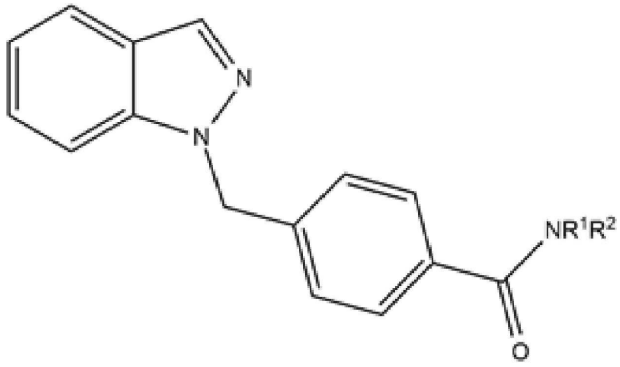
[0023] 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 제공한다.

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] [화학식 2]



[0027]

[0028] 상기 화학식 1 또는 화학식 2에서, R^1은 수소 또는 (C1-C5)알킬이고, R^2는 하이드록시 또는 $-NHR^3$이고, 상기 R^3은 수소 또는 -CHO일 수 있다.

[0029] 상기 R^1은 수소 또는 메틸일 수 있다.

[0030] 상기 화학식 1의 인다졸 유도체 화합물은 4-((2H-인다졸-2-일)메틸)-N-하이드록시벤즈아마이드 (4-((2H-indazol-2-yl)methyl)-N-hydroxybenzamide)일 수 있다.

[0031] 상기 화학식 2의 인다졸 유도체 화합물은 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)벤조하이드라자이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)benzohydrazide), 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)-N'-포르밀벤조하리드라자이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)-N'-formylbenzohydrazide) 및 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)-N-하이드록시-N-메틸벤드아마이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)-N-hydroxy-N-methylbenzamide)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경보호용 (neuroprotective) 약학 조성물을 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0035] 상기 인다졸 유도체 화합물은 4-((2H-인다졸-2-일)메틸)-N-하이드록시벤즈아마이드 (4-((2H-indazol-2-yl)methyl)-N-hydroxybenzamide)일 수 있다.

[0036] 상기 신경계 질환은 알츠하이머, 루게릭병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 약물 중독 및 우울증으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 약학 조성물은 HDAC6 (Histone deacetylase 6)의 활성을 억제할 수 있다.

[0038] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활

성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0039] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 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, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 인다졸 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 이의 입체이성질체에서 선택된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0045] 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0046] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0047] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0048] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0050] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0053] **[실시예 1] 일반 방법 및 재료**

[0054] 모든 시약과 용매는 상업적 공급업체에서 구입했으며 추가 정제 없이 사용했다. 수분에 민감한 물질과 관련된 실험은 아르곤을 사용하는 불활성 분위기에서 수행되었으며 회전식 증발기는 증발 및 농축 목적으로 사용되었다. 분석 박층 크로마토그래피 (TLC)는 미리 코팅된 실리카 겔 F254 TLC 플레이트 (Merck)에서 수행되었고 UV 램프 (254nm) 또는 요오드 염색 하에서 가시화되었다. 칼럼 크로마토그래피는 중압 하에서 헥산 및 에틸 아세테이트 이동상과 함께 실리카겔 (Merck Silica Gel 40-63 μm)을 사용하여 수행되었다. MPLC (Medium pressure liquid chromatography)는 254 nm 및 280 nm UV 검출기와 실리카겔 카트리지 (Biotage SNAP HP-Sil)가 장착된 Biotage Isolera One 장비를 사용하여 수행되었다. NMR (Nuclear Magnetic Resonance) 분석은 JEOL (JNM-ECZ500R, 500MHz) 장비를 사용하여 수행되었다. 화학적 이동은 참조로 사용된 샘플 용매의 중수소 잠금 신호와 함께 백만분율 (δ)로 보고되었다. 커플링 상수 (J)는 헤르츠 (Hz) 단위로 제공되었다. 분할 패턴 약어는 다음과 같다: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; dd, doublet of doublet; td, triplet of doublet; m, multiplet. Agilent 1290 Infinity LC(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)와 함께 Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (Q-TOF LC/MS) 시스템을 사용하여 질량 분석을 수행했다.

[0056] **[실시예 2] 인다졸 유도체의 합성**

[0057] (1) 메틸 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((1H-indazol-1-yl)methyl)benzoate; 이하, 화합물 2a라함) 및 메틸 4-((2H-인다졸-2-일)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((2H-indazol-2-yl)methyl)benzoate; 이하, 화합물 2b라함)의 제조

[0058] 인다졸 (indazole; 1.00 g, 8.46 mmol) 및 K_2CO_3 (1.76 g, 12.70 mmol)을 아르곤 분위기 하에서 DMF에 용해시켰다. 실온에서 20분 동안 교반한 후, 메틸 4-(브로모메틸)벤조에이트 (methyl 4-(bromomethyl)benzoate ; 2.13 g, 9.31 mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 16시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트 (3 x 20 mL)로 추출하고 염수로 세척한 다음 무수 Na_2SO_4로 건조시켰다. 용매를 증발시켜 미정제 생성물을 얻었고, 이를 MPLC로 정제하여 주요 이성체로서 화합물 2a 및 화합물 2b를 얻었다.

[0059] 화합물 2a : 54% yield. R_f = 0.53 (3: 7 ethyl acetate: hexane). ^{1}HNMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.07(s,1H),7.96(d,*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.30-7.37 (m, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.18-7.15 (m, 1H), 5.66 (s, 2H), 3.88 (s, 3H); ^{13}CNMR(125MHz,$CDCl_3$)δ 166.7,141.9,139.6,133.7,130.0,129.6,127.0,126.6,124.3,121.3,120.9,109.0,52.5,52.1.

[0060] 화합물 2b : 37% yield. R_f = 0.33 (3: 7 ethyl acetate: hexane). ^{1}HNMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.01(d,*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.33-7.30 (m, 3H), 7.11 (dd, *J* = 8.0, 6.9 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.90 (s, 3H); ^{13}CNMR(125MHz,$CDCl_3$)δ 166.5,149.1,140.8,130.1,130.0,127.5,126.1,123.1,122.1,121.9,120.1,117.5,56.9,52.1.

[0062] (2) 4-((2H-indazol-2-yl)methyl)-N-hydroxybenzamide (4-((2H-indazol-2-yl)methyl)-N-hydroxybenzamide; 이하, 화합물 3b라함)의 제조

[0063] 하이드록실아민 하이드로클로라이드 (hydroxylamine hydrochloride; 4.67 g, 67 mmol)가 용해된 MeOH (24mL) 교반 용액에, 수산화칼륨 (5.61 g, 100 mmol)이 용해된 MeOH (12mL) 용액을 0 ℃에서 적가하였다. 그 후, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 침전물을 여과하고, 여액은 MeOH 중 유리 하이드록실아민 (hydroxylamine) 용액이었다. 그 다음, 화합물 2b (0.38mmol)를 위에서 새로 준비한 하이드록실아민이 용해된 MeOH (5 mL) 용액에 용해시켰다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 반응 혼합물을 농축하고, 잔류물을 3

N HCl로 산성화 (pH 5-6)하고, 에틸 아세테이트 (3 X 15 mL)로 추출하고, 염수로 세척한 다음 무수 Na_2SO_4 위에서 건조시켰다. 용매를 감압 하에서 증발시켜 미정제 생성물을 얻었고, 이를 MPLC로 정제하여 원하는 화합물 3b를 좋은 수율로 얻었다.

[0064] 54% yield. R_f = 0.20 (100 % ethyl acetate). ^{1}HNMR(500MHz,DMSO-d_6) δ 11.20(s,1H),9.05(s,1H),8.51(s,1H),7.72(d,*J* = 8.0 Hz, 3H), 7.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.39-7.35 (m, 2H), 7.23 (td, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 7.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.69 (s, 2H); ^{13}CNMR(125MHz,DMSO-d_6) δ 163.9,148.4,140.0,132.3,129.6,127.8,127.2,125.6,124.3,121.6,121.1,120.7,117.0,55.8.ESI MS (*m/z*) XXX $[M+H]^+$.

[0065] (3) 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)벤조하이드라자이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)benzohydrazide; 이하, 화합물 4라함)

[0066] 화합물 2a (0.10g, 0.38mmol) 및 히드라진 수화물(0.06g, 1.14mmol)이 용해된 EtOH (1mL) 용액을 10시간 동안 환류시켰다. 감압 하에서 용매를 제거하고 조생성물을 MPLC로 정제하여 원하는 화합물 4를 백색 고체 (0.84 g, 84%)로 얻었다.

[0067] R_f = 0.18 (100 % ethyl acetate). ^{1}HNMR(500MHz,DMSO-d_6) δ 9.71(s,1H),8.13(d,*J* = 1.1 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.75-7.72 (m, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.39-7.36 (m, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 4.46 (s, 2H); ^{13}CNMR(125MHz,DMSO-d_6) δ 165.6,140.6,139.4,133.3,132.6,127.2,127.2,126.3,123.8,121.0,120.6,109.7,51.4.ESI MS (*m/z*) XXX $[M+H]^+$.

[0069] (4) 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)벤조산 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)benzoic acid; 이하, 화합물 5라함)의 제조

[0070] 화합물 2a (0.20g, 0.75mmol)를 MeOH:THF (1:2) (3 mL)에 용해시켰다. H_2O (1mL)에 용해된 LiOH·H_2O (0.05 g, 1.13 mmol)를 상기 용액에 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 이어서 용매를 감압하에 제거하고 1 N HCl (pH = 5)로 산성화한 다음 에틸 아세테이트 (3 X 20 mL)로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척한 다음 Na_2SO_4로 건조하여 화합물 5를 백색 고체로 얻었다 (0.18 g, 94 %).

[0071] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8.14(s,1H),7.87(d,*J* = 8.6 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.38 (td, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.76 (s, 2H); ^{13}CNMR(125MHz,DMSO-d_6) δ 167.0,142.6,139.4,133.4,130.0,129.6,127.3,126.4,123.8,121.0,120.7,109.7,51.4.

[0073] (5) 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)-N'-포르밀벤조하이드라자이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)-N'-formylbenzohydrazide; 이하, 화합물 6이라함)

[0074] 화합물 5 (0.10 g, 0.40 mmol), EDCI (0.10 g, 0.52 mmol) 및 HOBt (0.07 g, 0.52 mmol)를 아르곤 분위기 하에서 건조 DMF (2mL)에 용해시켰다. 그 후, 포르밀 히드라진 (0.03 g, 0.44 mmol)을 첨가한 다음 DIPEA (0.21mL, 1.19mmol)를 0 ℃에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 물 몇 방울로 반응을 켄칭하고, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트 (3 X 20 mL)로 추출하고 물로 세척한 다음 Na_2SO_4로 건조시켰다. 용매를 제거하여 조생성물을 얻었고, 이를 MPLC로 정제하여 원하는 화합물 6을 흰색 고체 (0.07 g, 61 %)로 얻었다.

[0075] R_f = 0.30 (100 % ethyl acetate). ^{1}HNMR(500MHz,DMSO-d_6) δ 10.37(s,1H),10.04(s,1H),8.14(d,*J* = 1.1 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.79 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 3H), 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.38 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.15 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.75 (s, 2H); ^{13}CNMR(125MHz,DMSO-d_6) δ

167.3,166.9,164.9,159.9,141.8,141.5,139.4,133.4,131.5,131.2,127.8,127.4,127.3,126.4,123.8,121.0,120.7,109.7,51.4.ESI MS (*m/z*) XXX $[M+H]^+$.

[0077] (6) 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)-N-(벤질옥시)벤즈아마이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)-N-(benzyloxy)benzamide; 이하, 화합물 7이라함)

[0078] 화합물 5 (0.30 g, 1.19 mmol), EDCI (0.30 g, 1.55 mmol) 및 HOBt (0.21 g, 1.55 mmol)를 아르곤 분위기 하에서 건조 DMF (4mL)에 용해시켰다. 그 후, DIPEA (0.64 mL, 3.57mmol)를 0 ℃에서 첨가하고, 실온에서 30분 동안 교반한 다음 O-벤질하이드록실아민 하이드로클로라이드 (O-benzylhydroxylamine hydrochloride; 0.21 g, 1.31 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 물 몇 방울로 반응을 켄칭하고, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트 (3 X 20 mL)로 추출하고 물로 세척한 다음 Na_2SO_4로 건조시켰다. 용매를 제거하여 조생성물을 얻고 이를 MPLC로 정제하여 원하는 화합물 7 (0.36 g, 84 %)을 얻었다.

[0079] R_f = 0.45 (5 : 5 ethyl acetate : hexane). ^{1}HNMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.02(s,1H),7.75(d,*J* = 8.0 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 3.4 Hz, 2H), 7.37-7.34 (m, 4H), 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.58 (s, 2H), 4.99 (s, 2H); ^{13}CNMR(125MHz,$CDCl_3$)δ165.4,140.8,139.5,135.3,133.6,131.3,129.3,128.8,128.6,127.5,127.3,126.9,124.2,121.4,121.0,109.0,78.2,52.33.

[0081] (7) 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)-N-(벤질옥시)-N-메틸벤즈아마이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)-N-(benzyloxy)-N-methylbenzamide; 이하, 화합물 7이라함)

[0082] 화합물 7 (0.20 g, 0.56 mmol)을 아르곤 분위기 하에서 건조 DMF (2 mL)에 용해시켰다. NaH (0.03 g, 0.67 mmol)를 0 ℃에서 용액에 첨가하고 실온에서 30분 동안 교반했다. 그 후, MeI (0.09 g, 0.62 mmol)를 용액에 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 몇 방울의 포화 NH_4Cl 수용액으로 반응을 켄칭하고, 용매를 감압하에 증발시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트 (3 X 20 mL)로 추출하고 물로 세척한 다음 Na_2SO_4로 건조시켰다. 용매를 제거하여 조 생성물을 얻었고, 이를 MPLC로 정제하여 원하는 화합물 8 (0.18 g, 87 %)을 얻었다.

[0083] R_f = 0.30 (4 : 6 ethyl acetate : hexane). ^{1}HNMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.08(s,1H),7.77(d,*J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.37-7.33 (m, 2H), 7.27-7.24 (m, 2H), 7.21-7.15 (m, 5H), 6.98 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 5.65 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.33 (s, 3H); ^{13}CNMR(125MHz,$CDCl_3$)δ169.6,139.5,139.3,133.8,133.7,133.5,129.4,128.8,128.8,128.4,126.6,126.6,124.4,121.2,120.8,109.2,76.1,52.7,34.9.

[0085] (8) 4-((1H-인다졸-1-일)메틸)-N-하이드록시-N-메틸벤즈아마이드 (4-((1H-indazol-1-yl)methyl)-N-hydroxy-N-methylbenzamide; 이하, 화합물 9라함)

[0086] 화합물 8 (0.12 g, 0.32 mmol)을 MeOH (5 mL)에 용해시켰다. 10 % Pd/C (0.04 g, 0.03 mmol)를 상기 용액에 첨가하고 H_2 분위기 하에 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 혼합물을 셀라이트로 여과하고 용매를 감압 증발시켜 조생성물을 얻었고, 이를 MPLC로 정제하여 원하는 화합물 9 (0.06 g, 68 %)을 얻었다.

[0087] R_f = 0.15 (5 : 5 ethyl acetate : hexane). ^{1}HNMR(500MHz,CD_3OD)δ8.07(s,1H),7.77(d,*J* = 8.6 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.16 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 3.31 (s, 3H); ^{13}CNMR(125MHz,CD_3OD)δ171.0,141.0,141.0,134.9,134.6,129.7,128.0,127.7,125.5,122.2,122.1,110.5,52.9,37.9.ESI MS (*m/z*) XXX

$[M+H]^+$.

[0089] **[실시예 3] 도킹 연구 (Docking studies)**

[0090] 상기 합성된 화합물 3b의 *in silico* 도킹 연구는 Scripps 연구소의 분자 그래픽 연구소에서 다운로드한 AutoDock 4.2 프로그램을 사용하여 HDAC6 (PDB 코드: 5EF7)의 X선 결정 구조의 3D 좌표로 수행되었다. 유전 알고리즘의 Lamarckian 버전을 사용하여 알려진 또는 예측된 결합 부위 내에서 리간드의 포즈를 생성했다. 도킹 실험에서 AutoDock 도구를 사용하여 리간드(화합물 3b)와 함께 HDAC6의 X선 구조에 Gasteiger 전하를 할당했다. 리간드 도킹 실험을 위해 크기가 50 x 50 x 50 포인트이고 간격이 0.375 Å인 격자 상자가 정의되었다. 도킹 파라미터는 인구 크기를 150명, 세대 수를 27,000명, 평가 수를 2,500,000명으로 설정하는 것으로 구성되었으며, 도킹 실행 수는 각 도킹 실행의 그룹화에 대한 루트 평균 제곱 공차를 1 Å으로 차단하여 100개로 설정되었다. HDAC6과 화합물 3b의 도킹 포즈는 PyMol (DeLanoScientific, South San Francisco, CA, USA)을 사용하였다.

[0092] **[실시예 4] 생물학 자료**

[0093] L-글루타민이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)은 GenDEPOT (Barker, TX, USA)에서 구입했고, 태아 소 혈청 (FBS)은 HyClone에서 구입했으며, 페니실린과 스트렙토마이신은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입했다. α-튜불린, Ac-α-튜불린(Lys40), Histone H3, Ac-Histone H3(Lys9), HDAC1, HDAC6 및 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Boston, MA, 미국). 염소 항-토끼 IgG 양고추냉이 과산화효소 접합체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입했다. HDAC1 (Catalog #50061) 및 HDAC6 (Catalog #50076) Fluorogenic Assay Kit는 BPS Bioscience (San Diego, CA, USA)에서 구입했다. Cell Titer 96 Aqueous One Solution 세포 증식 분석 키트는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입했다. Amersham ECL Select western blotting Detection Reagent는 GE Healthcare에서 구입했다. Prolong Gold 변색 방지 시약 (Lot# 2162690; REF# P36930)은 Thermo Fisher Scientific Life Technologies Corporation (USA)의 invitrogen에서 구입했다. Alexa Fluor® 555 염소 항토끼 IgG[H+L]는 Life Technologies (USA)에서 구입했다.

[0095] **[실시예 5] 세포 배양**

[0096] SH-SY5Y 신경모세포종 세포는 10 % 태아 소 혈청 (FBS), 100 units/mL 페니실린 및 10 mg/mL 스트렙토마이신이 보충된 L-글루타민이 있는 DMEM에서 배양되었다. 그런 다음 세포를 가습 대기 (37 ℃, 5 % CO_2)에서 배양했다.

[0098] **[실시예 6] HDAC 분석**

[0099] 효소 HDAC 분석은 제조업체의 프로토콜 (HDAC1의 경우 카탈로그 #50061, HDAC6의 경우 카탈로그 #50076, BPS Bioscience)에 따라 수행되었다. 간략하게 설명하면, 35 μL의 HDAC 분석 완충액을 5 μL의 소 혈청 알부민 (BSA)(1 mg/mL) 및 5 μL의 HDAC 기질 (200 mM)이 포함된 96웰 블랙 플레이트 (키트에 제공됨)에 첨가했다. 그런 다음 5 μL의 HDAC 효소 (7 ng/mL)를 다양한 농도의 화합물 3b, 4, 6 및 9 (5μL), SAHA (5μL) 및 Tubastatin A (5 μL), Trichostatin A를 양성 대조군으로 사용했다. 그런 다음 플레이트를 37 ℃에서 30분 동안 배양했다. 배양 후, 50 μL의 희석되지 않은 HDAC 현상액을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 실온에서 25 rpm으로 15분 동안 배양하였다. 형광 강도는 각각 360 nm 및 460 nm의 여기 및 방출 파장에서 Tecan Infinite F200 Pro 플레이트 판독기를 사용하여 측정되었다. Prism 소프트웨어 (GraphPad 소프트웨어)를 사용하여 IC_{50} 값과 곡선 맞춤을 얻었다.

[0101] **[실시예 7] 세포 증식 분석**

[0102] SH-SY5Y 세포 (1×10^3개 cells/well)를 투명한 96-웰 플레이트에 시딩하였다. DMEM 배지 부피는 웰당 최대 100 μL로 만들고 세포를 밤새 부착하도록 두었다. 다양한 농도의 화합물 3b를 웰에 첨가하고, 세포를 37 ℃에서 1,

2 및 3일 동안 (METH 실험의 경우 단 1일) 배양하였다. Promega Cell Titer 96 Aqueous One Solution 세포 증식 분석을 사용하여 세포 생존력을 결정했다. 흡광도 값은 96-웰 플레이트 판독기로 490 nm에서 기록되었고 DMSO 단독에서 배양된 세포로부터의 흡광도의 백분율로 표시되었다.

[0104] **[실시예 8] 웨스턴 블랏**

[0105] SH-SY5Y 세포를 100 mm 배양 접시에 시딩한 후, 밤새 배양하고 일정 농도의 METH (4시간 사전 배양 및 화합물 3b로 24시간 동안 처리했다. 그런 다음 프로테아제 및 포스파타아제 억제제 칵테일로 보충된 RIPA (Radio-Imunopcipation Assay) 버퍼 (23 mM Tris-HCl pH 7.6, 130 mM NaCl, 1% NP-40, 1% 디옥시콜레이트 나트륨, 0.1% SDS)를 사용하여 세포를 수확하고 얼음 위에서 용해시켰다. 다음으로 레인 (lane) 당 30 μg의 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 사용하여 분리하고 PVDF (polyvinylidene fluoride) 멤브레인 (Bio-Rad, Hercules, USA)으로 옮겼다. 막은 Tween® (TBST)로 Tris 완충 식염수에 5% 탈지 우유로 차단한 후 밤새 해당 1차 항체 (α-튜불린, Ac-α-튜불린, Histone H3, Ac-Histone H3, HDAC1, HDAC6 또는 GAPDH)로 배양했다. 그런 다음 양고추냉이 퍼옥시다아제와 결합된 적절한 2차 항체 (Santa Cruz, CA, USA)로 처리했다. 단백질로 블롯팅된 생성된 멤브레인을 제조업체의 지침 (GE Healthcare, USA)에 따라 ECL 화학발광을 사용하여 가시화했다.

[0107] **[실시예 9] 공초점 현미경을 이용한 α-튜브린의 아세틸화를 위한 면역형광**

[0108] 멸균 원형 커버 유리 (두께 0.17 mm)를 24-웰 세포 배양 플레이트에 조심스럽게 놓고 SH-SY5Y 세포 (5×10^3 cells/well)를 시딩하고 37 ℃의 CO_2 인큐베이터에서 72시간 동안 배양했다. 그런 다음 동일한 조건에서 다양한 농도 (0.1, 0.5, 1 및 3 μM)의 3b와 Tubastatin A (3μM)로 24시간 동안 처리했다. 그 후, 세포를 예열된 DPBS로 2회 세척하고 DPBS 중 3.7 % 포름알데히드로 3분 동안 고정시켰다. 다시 한 번 세포를 DPBS로 2회 세척한 다음, 세포 투과성을 위해 0.1 % Triton-X-100 (in PBS)을 25 rpm에서 15분 동안 적용했다. 세포를 다시 DPBS로 세척한 다음 PBS-T 중 5 % 소 혈청 알부민으로 25 rpm에서 30분 동안 차단했다. 차단이 완료되면 세포를 PBS-T로 5회 세척하였다. 그 후, 세포를 PBS-T에서 1차 항체 (1:100의 Ac-α-tubulin)로 밤새 4 ℃에서 처리했다. 그 후, 세포를 PBS-T로 5회 세척한 다음 암실에서 25 rpm을 사용하여 실온에서 2시간 동안 이차 항체 (Alexa Fluor 555)로 처리했다. 그런 다음 세포를 다시 PBS-T로 5회 세척하고 어두운 곳에서 10분 동안 Hoechst 용액 (1X PBS-T에서 100μg/mL)으로 처리했다. 세포를 다시 PBS-T로 50rpm에서 5회 세척하였다. 그 후, 둥근 커버 유리를 조심스럽게 제거하고 현미경 슬라이드 (Prolong Gold antifade mountant의 5μL 액적 포함) 위에 거꾸로 놓았다. 슬라이드를 실온에서 암실에서 24시간 동안 안정화시킨 다음 공초점 현미경으로 이미지를 확인했다.

[0110] **[실시예 10] 세포형태학적 평가**

[0111] SH-SY5Y 세포 (1 x 10 cells/well)를 6-웰 플레이트에 시딩하였다. 24시간 후, 배양 배지를 METH를 함유하는 신선한 배지로 교체하고 (4시간), 화합물 3b로 24시간 동안 처리하였다. 세포 형태를 관찰하고 광학 현미경을 사용하여 200X 배율로 이미지를 캡처했다.

[0113] **[실시예 11] 통계 분석**

[0114] 결과는 여러 개별 실험(n=3 또는 4)의 데이터를 사용하여 정량화되었으며 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시되었다.

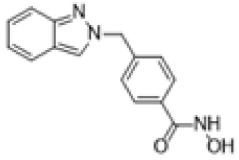
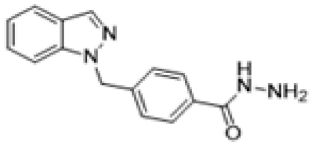
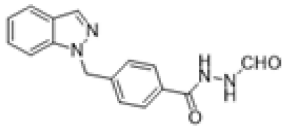
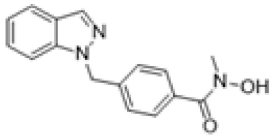
[0116] **[실험예 1] HDAC1 및 HDAC6 isoform에 대한 인다졸 유도체 화합물의 억제 가능성 평가**

[0117] HDAC1 및 HDAC6 아형을 억제할 수 있는 가능성에 대해 화합물을 비교했다. 그 결과, 표 1에 따를 때, 화합물 3b는 HDAC6에 대해 유망한 억제 가능성을 보였다 (각각 IC50 = 8.7 nM 및 8.4 nM). 전자는 후자에 비해 HDAC1보다 HDAC6에 대해 약간 더 높은 선택성을 나타냈다. 인다졸 유도체 화합물과 함께 참조 화합물 (pan-HDAC 억제제로서의 SAHA, HDAC6-선택적 억제제로서의 tubastatin A)을 테스트했고, 화합물 3b 모두 시험관 내 효소 억제

속성, 즉 HDAC6 선택적 방식 측면에서 투바스타틴 A와 매우 유사했다.

표 1

[0118]

화합물	구조	IC_{50} (nM)± SD [a]		Selectivity Index[b]
		HDAC1	HDAC6	
3b		172.7 ± 41.2	8.4 ± 1.8	20.6
4		43246 ± 1302.5	14239 ± 1425.5	3.0
6		> 100,000	> 100,000	NA
9		> 100,000	10,000.6 ± 1200.2	> 10.0
SAHA	-	66.6 ± 2.6	53.9 ± 4.8	1.2
Tubastatin A	-	464.5 ± 25.2	8.98 ± 1.4	51.7

[0120] **[실험예 2] 독성 평가 (*in vitro*)**

[0121] 화합물 3b가 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y의 세포 생존력에 미치는 영향을 조사했다. 세포를 다양한 농도(0, 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 μM)의 화합물 3b로 1, 2 및 3일 동안 처리하였다. 매일 마지막에 MTS 비색 분석을 사용하여 세포 생존력을 측정했다. 그 결과, 도 2에 따를 때, 화합물 3b은 SH-SY5Y 세포 증식에 매우 유사한 효과가 있음을 나타냈으며, 이는 상기 표 1에 표시된 효소 억제 분석과 일치했다. 이러한 유사성은 두 화합물 간의 구조적 유사성에 기인할 수 있었고, 화합물 3b는 SH-SY5Y 세포에서 최대 10 μM의 용량으로 24시간 처리한 후 치명적인 세포 독성 효과를 나타내지 않았으며 (약 75% 세포 생존) 이는 중추 신경계에서 안전한 사용에 적합함을 알 수 있었다.

[0123] **[실험예 3] SH-SY5Y 세포에서 HDAC6 억제를 통해 α-튜불린의 아세틸화 유도 확인**

[0124] 화합물 3b에 의한 HDAC1에 대한 HDAC6의 선택적 억제를 추가로 확인하기 위해 웨스턴 블롯 실험을 수행했다. SH-SY5Y 세포는 용량 의존 방식으로 화합물 3b로 24시간 동안 0.1 내지 10 μM 범위의 용량으로 처리되었다. SAHA (1 μM)와 tubastatin A (5 μM)를 참조 약물로 사용했다. Histone H3, acetylated Histone H3, α-튜불린 및 아세틸화된 α-튜불린의 수준에 대한 용해물 분석 시, 화합물 3b에 의한 전형적인 HDAC6 선택적 거동을 관찰했다. 그 결과, 도 3에 따를 때, 화합물 3b 모두 0.1 μM의 낮은 농도에서 α-튜불린의 아세틸화를 유도했지만 10 μM까지의 히스톤 H3의 두드러진 아세틸화를 촉진하지 못했다. pan-HDAC 억제제인 SAHA(1 μM)는 Histone H3를 효율적으로 아세틸화하지만 α-튜불린은 아세틸화하지 않는 반면, HDAC6 억제제인 tubastatin A (5 μM)는 α-튜불린의 아세틸화를 유도하지만 Histone H3는 유도하지 않았다. 이러한 결과는 종합적으로 화합물 3b가 HDAC6를 선택적으로 억제하고 HDAC6의 기질인 α-튜불린의 아세틸화를 효율적으로 촉진한다는 것을 알 수 있었다.

[0125] 웨스턴 블롯 실험에서 얻은 결과를 보완하기 위해 공초점 현미경 검사를 수행했다. SH-SY5Y 세포를 24시간 동안

용량 의존적으로 화합물 3b로 처리하고 참조 약물로서 tubastatin A (3 μM)를 처리하였다. 그 결과, 도 4에 따를 때, α-튜불린의 아세틸화 (적색 형광)는 핵 주위의 세포질 전체에서 용량 의존적으로 점차 증가(청색 형광)하는데, 이는 웨스턴 블롯팅에서 얻은 결과와 일치했다. 0.1 μM의 저용량에서도 α-튜불린 아세틸화의 증거가 관찰되었으며 이는 웨스턴 블랏에서 얻은 결과를 뒷받침함을 알 수 있었다. 더욱이, 화합물 3b (3 μM)와 투바스타틴 A (3 μM)에 의한 아세틸화 사이의 비교는 화합물 3b가 tubastatin A보다 약간 더 우수한 아세틸화 특성을 가짐을 확인했다.

[0127] **[실험예 4] SH-SY5Y 세포에서 α-튜불린의 탈아세틸화를 야기한 METH을 역전시키는 인다졸 유도체의 효과 확인**

[0128] SH-SY5Y 세포에서 METH 처리가 강화된 탈아세틸화를 유발한다는 것으로 알려져 있다. METH 처리로 인한 탈아세틸화 촉진과 화합물 3b 처리에 의한 HDAC6 억제로 인한 이러한 효과의 역전을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 실험을 수행했다. 그 결과, 도 5에 따를 때, METH가 단독으로 사용될 때, 탈아세틸화의 촉진된 것을 확인했으나, 이러한 효과는 화합물 3b 처리에 따라 상당히 역전되었다. 이것은 HDAC6 억제제인 화합물 3b가 세포질 HDAC6 억제를 통해 SH-SY5Y 세포에서 METH에 의해 유발된 탈아세틸화를 역전시켰을 수 있으며, METH 사용으로 인한 BBB (Blood-Brain-Barrier) 분해를 역전시킬 것으로 예상된다는 것을 예측할 수 있었다.

[0129] 세포 골격 구조의 변화와 연관시키기 위해 세포 형태를 분석하고 비교했다. 그 결과, 도 6에 따를 때, METH로 처리하면 세포가 길쭉한 모양을 잃고 타원형 모양을 나타냈으나, 화합물 3b 처리는 세포 모양을 타원형에서 길쭉한 모양으로 복원되었으며, 이는 HDAC6 억제와 직접적으로 관련된 아세틸화의 결과로 해석될 수 있었다.

[0131] **[실험예 5] 인다졸 유도체 화합물의 분자 도킹 연구**

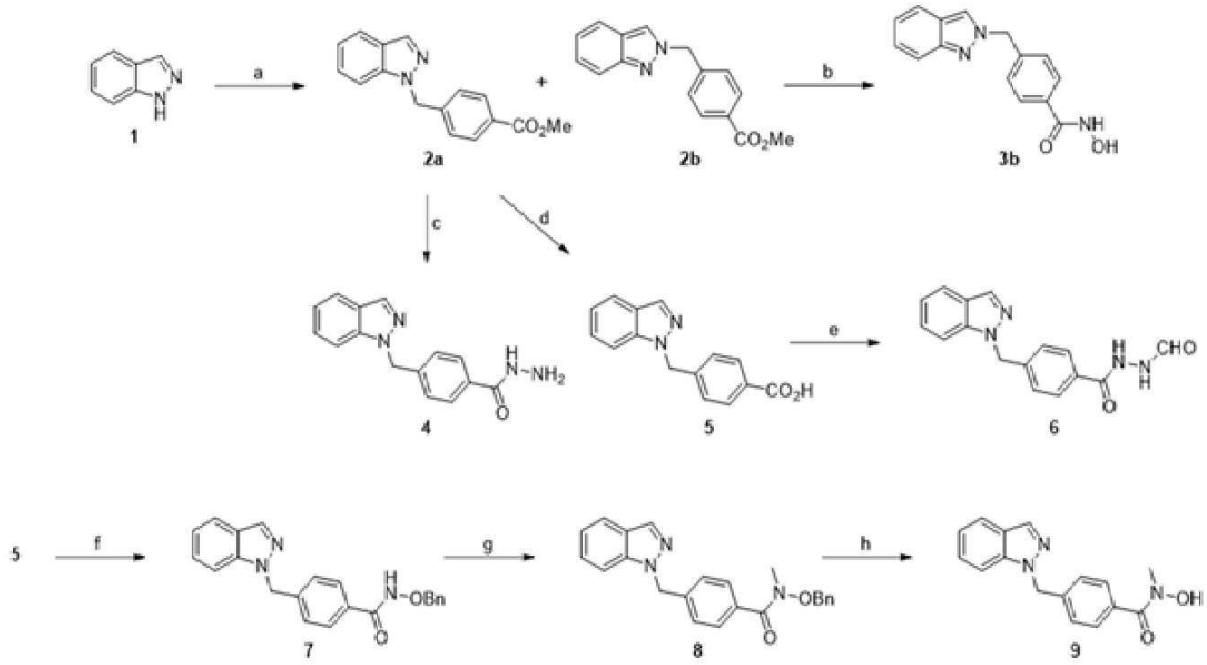
[0132] HDAC6 효소 (PDB 코드: 5EF7)에 대한 정확한 결합 포즈를 조사하기 위해 HDAC6의 활성 부위에 대한 화합물 3b의 분자 도킹 연구를 수행했다. 그 결과, 도 7에 따를 때, 도킹 시뮬레이션은 화합물 3b가 HDAC6의 기질 결합 포켓에 강하게 결합되었음을 보여주었다. 화합물 3b의 인다졸 (Indazole) 질소는 Ser531 잔기의 하이드록시기(OH)와 수소 결합을 형성했고, 이는 모든 종에 걸쳐 HDAC6 오르톨로그 (orthologue)의 촉매 영역에서 보존되었다. 이러한 결과는 Ser531이 고유한 HDAC6 아형이며 다양한 분자간 상호작용을 통해 HDAC6 기질을 활성 부위에 결합하는 중요한 잔기임을 확인시켜줬다. 또한, 화합물 3b는 Zn^{2+} 이온을 하이드록사메이트 그룹으로 킬레이트화하여 카르보닐 산소 (C=O) 및 하이드록실 산소 (OH)와 두자리 상호작용을 형성했다. 또한, 화합물 3b의 하이드록사메이트의 아민 (NH) 그룹은 유사한 방식으로 Gly582 잔기의 백본 아미드 산소 (C=O)와 수소 결합을 형성했다. 이러한 상호 작용을 기반으로 도킹 연구는 두 화합물이 여러 분자간 상호 작용을 통해 HDAC6의 활성 부위에 유사하게 결합하여 HDAC6에 대한 효능 및 선택성에 기여할 수 있음을 명확하게 입증했다.

[0134] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 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 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

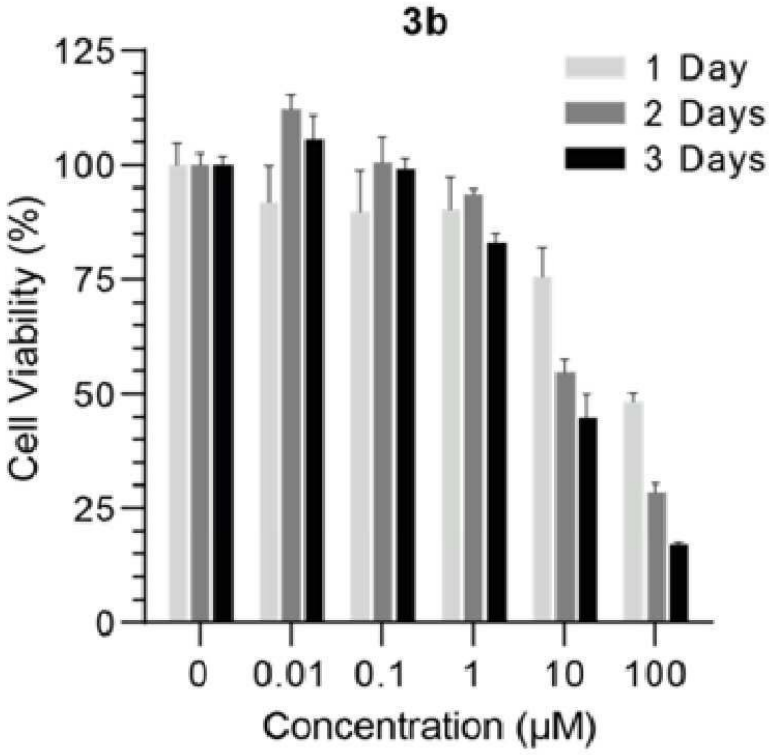
[0135] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

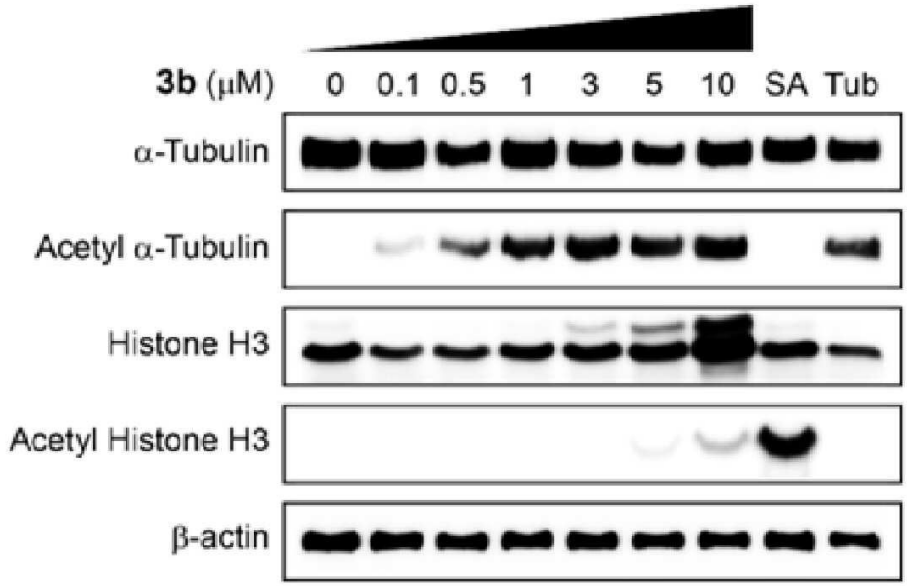
도면1


1
a
2a
+
2b
CO2Me
b
3b
NH
OH
c
d
4
NH2
5
CO2H
e
6
CHO
5
f
7
OBn
g
8
OBn
h
9
OH

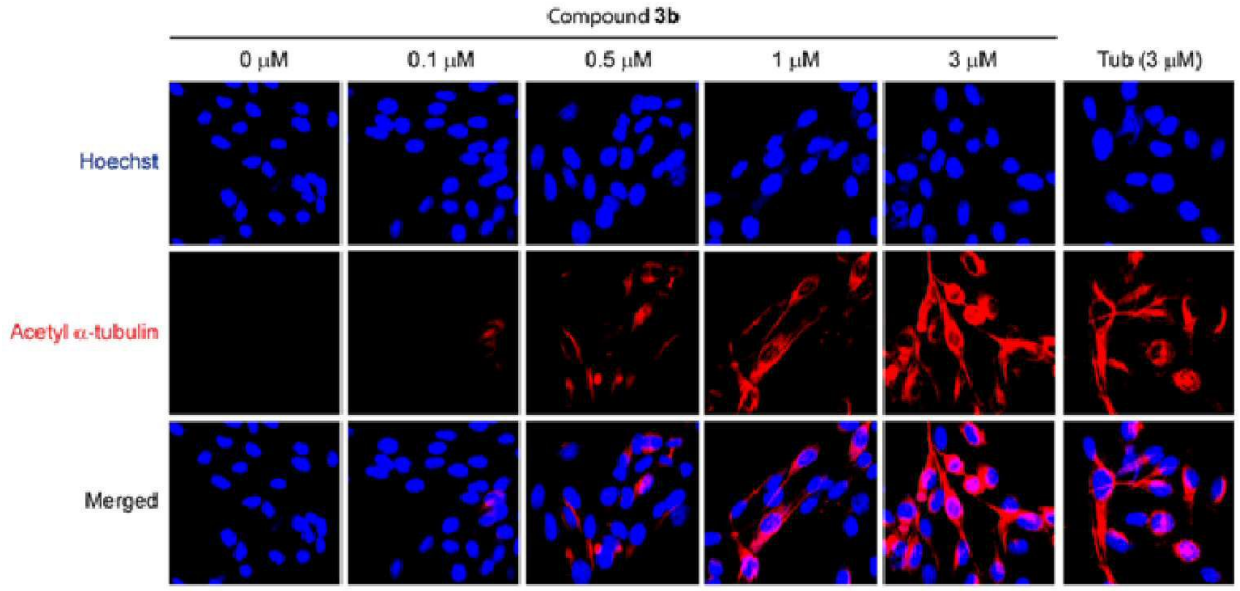
도면2


3b
1 Day
2 Days
3 Days
Cell Viability (%)
125
100
75
50
25
0
0
0.01
0.1
1
10
100
Concentration (μM)

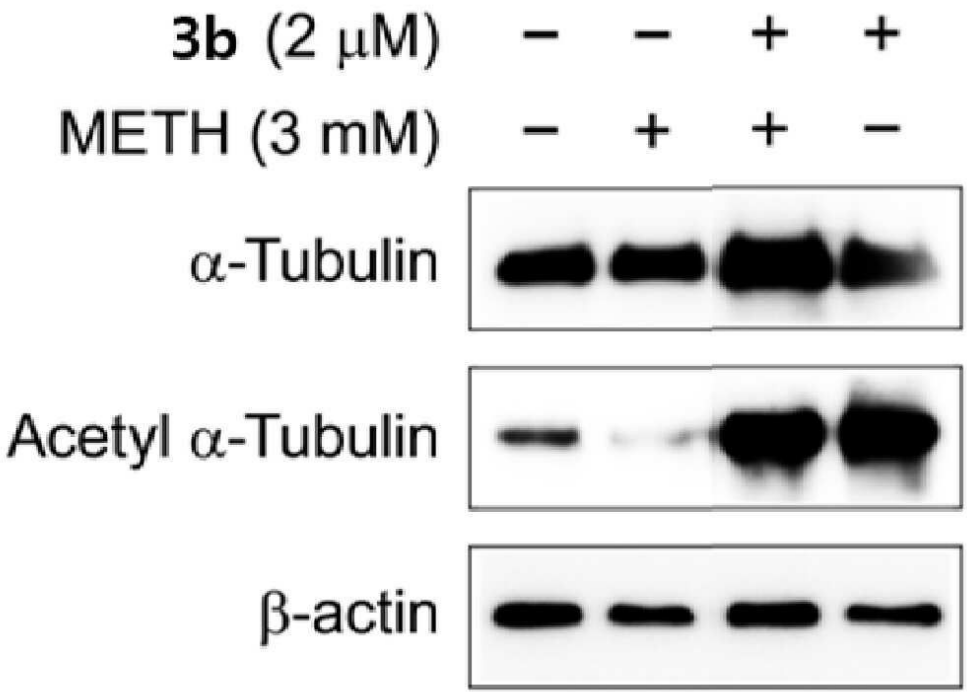
도면3


3b (μM)
0
0.1
0.5
1
3
5
10
SA
Tub
α-Tubulin
Acetyl α-Tubulin
Histone H3
Acetyl Histone H3
β-actin

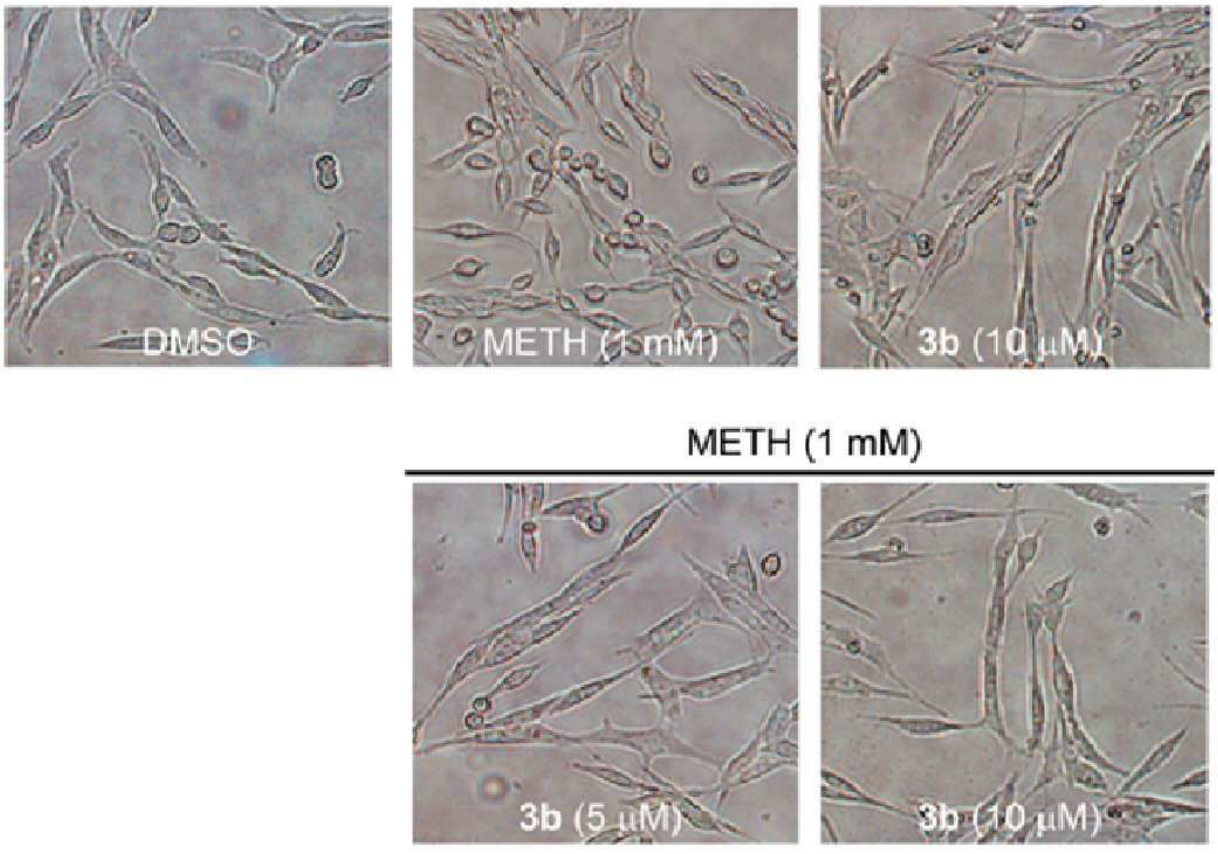
도면4


Compound 3b
0 μM
0.1 μM
0.5 μM
1 μM
3 μM
Tub (3 μM)
Hoechst
Acetyl α-tubulin
Merged

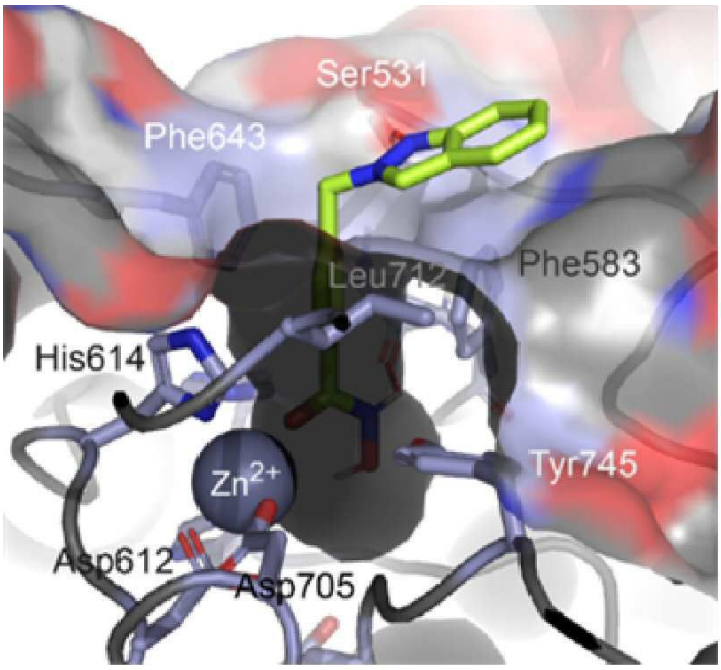
도면5


3b (2 μM) − − + +
METH (3 mM) − + + −
α-Tubulin
Acetyl α-Tubulin
β-actin

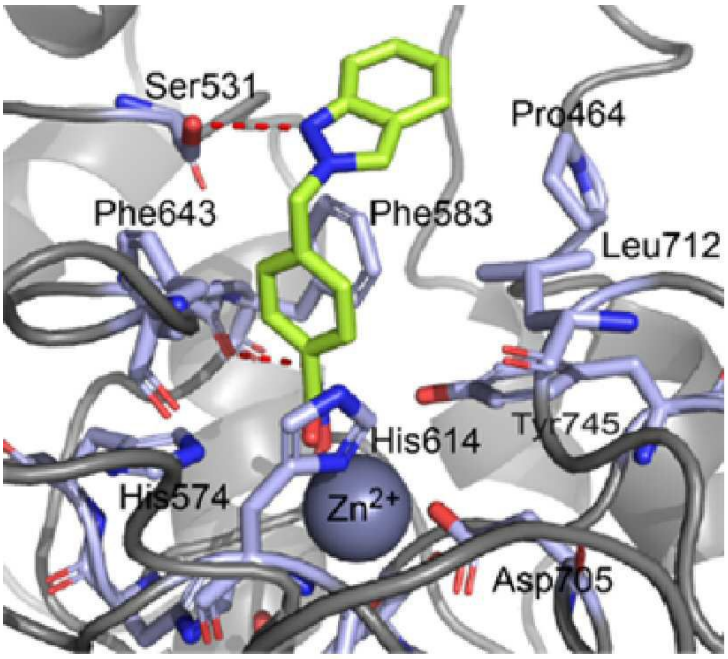
도면6


DMSO
METH (1 mM)
3b (10 μM)
METH (1 mM)
3b (5 μM)
3b (10 μM)

도면7a


Ser531
Phe643
Leu712
Phe583
His614
Zn2+
Tyr745
Asp612
Asp705

도면7b


Ser531
Pro464
Phe643
Phe583
Leu712
Tyr745
His614
His574
Zn2+
Asp705