(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0024570
(43) 공개일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/44 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/44 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0104186
(22) 출원일자 2023년08월09일
심사청구일자 2023년08월09일

(71) 출원인
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)
동아대학교 산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
(72) 발명자
이태훈
광주광역시 북구 설죽로 585-1, 101동 1303호 (일곡동, 쌍용아파트)
조종현
경상남도 김해시 번화1로19번길 10, 2층 (대청동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

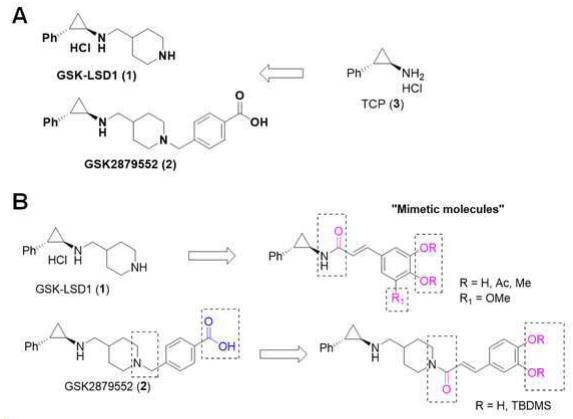
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체를 포함함으로써 파골세포 분화 및/또는 생성을 억제하고, 골다공증 등을 포함하는 다양한 골질환에 대해 우수한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 19/08 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
(72) 발명자
이선우
광주광역시 북구 양산택지소로 20, 107동 1501호 (본촌동,양산지구현진에버빌)
김근중
광주광역시 북구 서강로54번길 55, 107동 1703호 (운암동,벽산 블루밍 메가씨티)
김정선
광주광역시 북구 우치로537번길 10, 106동 1602호 (일곡동,동아아파트)
김은애
광주광역시 서구 풍암2로 36, 102동 1502호 (풍암동, 주은모아아파트)
최은랑
부산광역시 사하구 낙동대로457번안길 34-2 (하단동)
첸 지하오
광주광역시 북구 호동로 21-10, 213호 (중흥동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711141590
과제번호	2021C200
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)과학기술일자리진흥원
연구사업명	공공연구성과활용촉진(R&D)
연구과제명	천연 소재 및 저분자 화합물 기반 골다공증 제어 소재기술개발 및 실용화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	전남대학교 산학협력단
연구기간	2021.07.01 ~ 2023.12.31

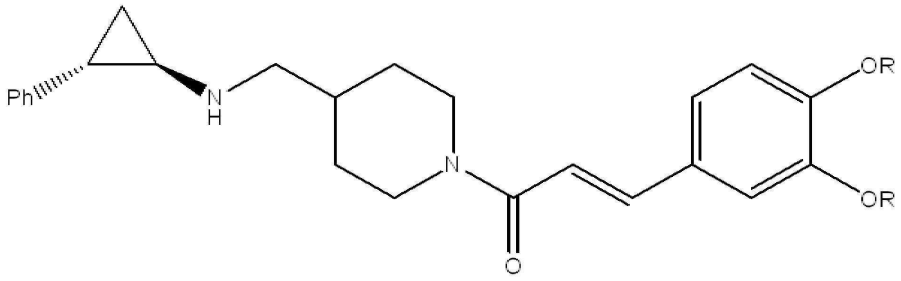
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:

[화학식 1]

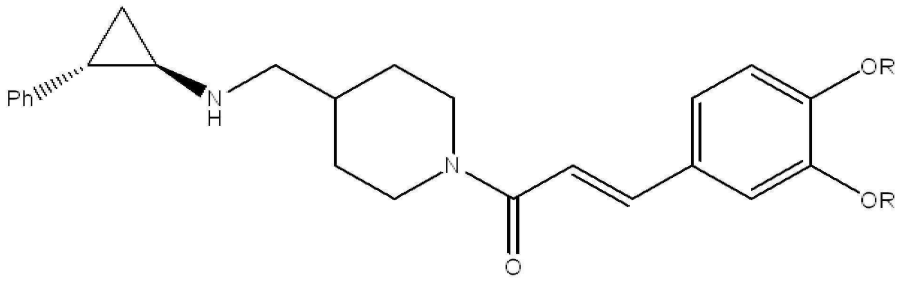


(식 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 임).

청구항 2

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



(식 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 임).

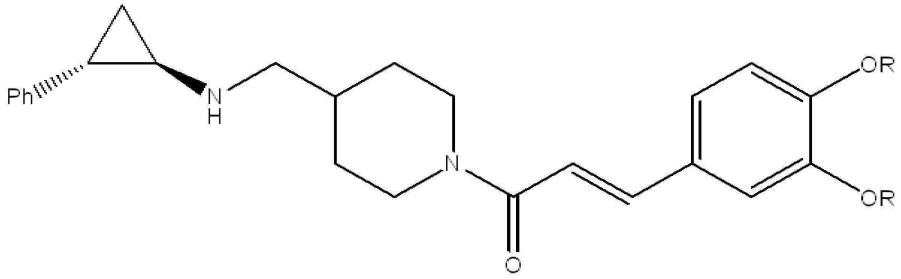
청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 골질환은 골절, 골다공증, 류마티스성 관절염, 치주염, 파제트병, 골연화증, 골감소증, 골위축, 골관절염 및 무혈성대퇴골괴사로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골 건강 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



(식 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 임).

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골조직은 파골세포(osteoclast)에 의한 골흡수와 조골세포(osteoblast)에 의한 골형성 과정이 지속적으로 유지되는 조직이다. 조골세포는 골 형태 발생 단백질 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2) 등의 신호인자에 의해 분화가 촉진된다. 조골세포 분화단계에서 생성되는 RANKL(Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-β Ligand) 신호전달물질에 의해 파골세포의 분화가 촉진되며, 분화가 완료되면 세포사멸(apoptosis)이 일어난다. 따라서, 정상적인 골 재생 과정에서 조골세포와 파골세포의 분화 및 활성이 조화롭게 이루어지는 것이 중요하다.

[0003] 이러한 조골세포와 파골세포의 평형이 무너져 골 흡수가 골 형성보다 항진되면 골 조직의 석회가 감소되어 골의 치밀질이 엷어지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지게 되며, 증세가 진전됨에 따라 골이 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다. 이런 증상으로 유발되는 질환이 골다공증이다.

[0004] 골다공증은 골 기질이 병적으로 희박해져 골 밀도가 감소되고 골 강도가 약화되어 골절의 위험성이 증가된 상태를 말한다. 골격의 강도는 일차적으로 골 기질과 골 기질 내부의 무기질의 침착에 의해 형성되고 유지되는데 이는 임상적으로 골 밀도에 반영된다. 골다공증은 발생 원인에 따라 원발성 골다공증(primary osteoporosis)과 속발성 골다공증(secondary osteoporosis)으로 구분한다.

[0005] 파골세포는 골다공증을 비롯한 골막염 및 류마티스 관절염과 같은 골 질환에서 골흡수를 유발하는데 매우 중요한 역할을 한다. 따라서, 파골세포의 분화를 억제하여 골 질환을 치료할 수 있는 대체 약물을 발굴하려는 많은 노력이 수행되어 왔다

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 2466564호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 파골세포의 과분화를 억제할 수 있는 신규 화합물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

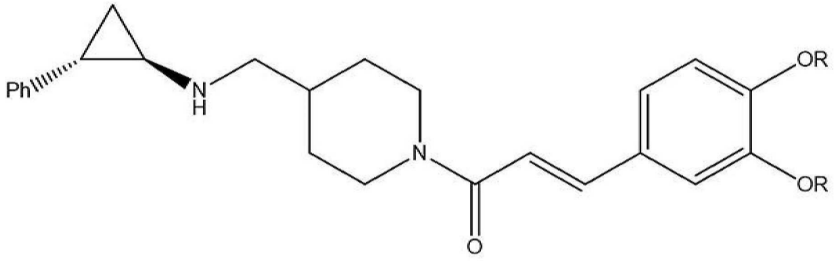
[0008] 본 발명은 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 골질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 1. 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:

[0011] [화학식 1]

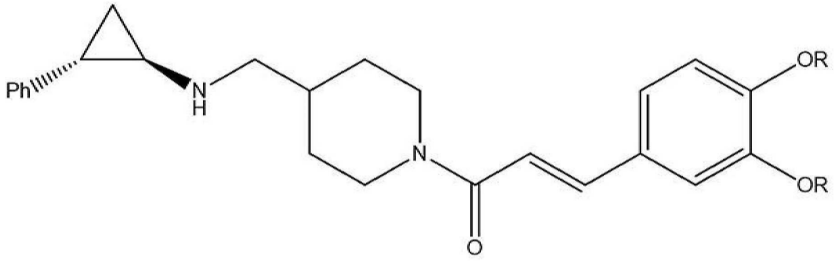


[0012]

[0013] (식 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 임).

[0014] 2. 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[0015] [화학식 1]



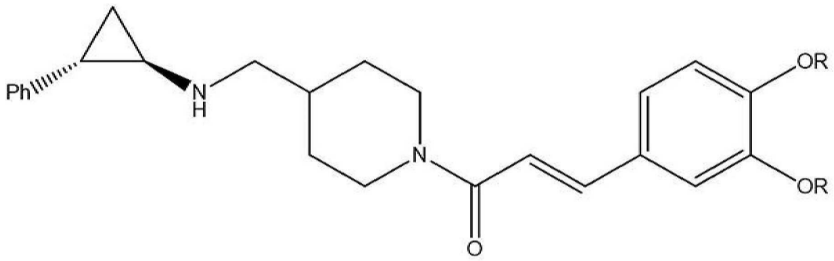
[0016]

[0017] (식 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 임).

[0018] 3. 위 2에 있어서, 상기 골질환은 골절, 골다공증, 류마티스성 관절염, 치주염, 파제트병, 골연화증, 골감소증, 골위축, 골관절염 및 무혈성대퇴골괴사로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[0019] 4. 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 골 건강 개선용 건강기능식품:

[0020] [화학식 1]



[0021]

[0022] (식 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 임).

발명의 효과

[0023] 본 발명의 신규 화합물 및 이를 포함하는 약학 조성물은 파골세포 분화 및/또는 생성을 억제함으로써 골다공증 등을 포함하는 다양한 골질환에 대해 우수한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0024] 본 발명의 신규 화합물을 포함하는 건강기능식품은 파골세포 분화 및/또는 생성을 억제함으로써 골다공증 등을 포함하는 다양한 골질환에 대해 우수한 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 TCP-(MP)-카페인산(Tranylcypromine-Methylpiperidine-Caffeic acid) 유사체의 합성과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 화학식 1 화합물에 해당하는 TCP-(MP)-카페인산 유사체(CD-I-448 및 478) 및 TCP-카페인산 유사체 3종(CD-I-389, CD-I-439, CD-I-442)의 파골세포 형성 억제 효과(in vitro)에 관한 것이다. A 및 B는 M-CSF(Macrophage-colony stimulating factor)(30ng/mL) 및 RANKL(50ng/mL)이 공급된 유도 배지에서 골수 유래 대식세포(BMDM)에 4일 동안 각각의 신규 LSD1 억제제(CD-I-389, CD-I-439, CD-I-442, CD-I-448 및 CD-I-478)를 처리하여 배양한 후 TRAP(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) 염색 키트(Staining Kit)를 이용하여 성숙한 파골세포를 고정 및 염색한 결과(A), 그리고 TRAP 양성 다핵 파골세포의 면적을 계산한 결과를 나타낸다(B). M+R+D(M-CSF, RANKL 및 DMSO(Dimethyl sulfoxide)로 처리된 그룹)은 대조군이다. C는 시험관 내 LSD1(Lysine-specific histone demethylase 1) 활성 분석 결과를 나타낸다. CTRL(DMSO 처리)는 대조군이다. D 및 E는 LSD1 활성 x-in vivo 검정을 사용하여 BMDM(Bone-marrow derived macrophage)에서 단백질 메틸화에 대한 화학식 1 화합물에 해당하는 CD-I-448 및 CD-I-478의 효과를 나타낸다. MR((M-CSF 및 RANKL로 처리된 그룹)과 GSK-LSD1(GSK-LSD1 Dihydrochloride로 처리된 그룹)는 대조군이다. F 및 G는 1차 두개골 세포(Primary calvarial cells)를 BMP2 (100ng/mL)로 처리하고, DMSO 또는 표지된 신규 LSD1 억제제(2μM)와 함께 9일 동안 배양한 후 알칼리성 포스파타제(Alkaline phosphatase(ALP 염색)) 분석 키트를 사용하여 세포를 염색한 결과(F) 및 Image J로 측정한 조골세포 분화를 표현하는 ALP 양성 밀도(%)(G)를 나타낸다. BMP2는 대조군이다. 데이터는 3개의 독립적인 실험이 반영되었다(눈금 막대: 100 μm. 대조군 DMSO 대비 * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.05$).

도 3 TCP-(MP)-카페인산 유사체의 용량 의존적인 파골세포 형성 억제 효과(in vitro)에 관한 것이다. A 내지 D는 BMDM을 M-CSF(30 ng/mL) 및 RANKL(50 ng/mL)이 공급된 유도 배지에서 표시된 용량의 CD-I-448을 첨가하거나 첨가하지 않고 4일 동안 배양한 후, 형성된 성숙한 파골세포를 고정하고 TRAP 염색 키트를 사용하여 염색한 결과(A), 그리고 TRAP 양성 다핵 파골세포의 면적(B), 핵 종류별 세포수(C) 및 웰당 총세포수(D)를 계산한 결과를 나타낸다. MR(M-CSF 및 RANKL로 처리된 그룹)은 대조군이다. E 내지 G는 CD-I-448의 효과를 평가하는 파골세포 골 흡수 분석 효과(in vitro)(E), 표시된 그룹의 상등액 형광 분석 결과(F), Image J 소프트웨어를 사용하여 표시된 그룹의 재흡수된 구멍 면적(%)(G)을 계산한 결과를 나타낸다. MR(M-CSF 및 RANKL로 처리된 그룹)은 대조군이다. H는 표시된 용량에서 CD-I-448의 세포 생존력 분석 결과를 나타낸다. 데이터는 최소 3개의 독립적인 실험을 대표한다. (눈금 막대: 200μm. 0 μM - 대조군 MR(M-CSF 및 RANKL로 처리된 그룹) 대비 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$; G는 GSK-LSD1로 표시된다.)

도 4는 CD-I-448은 F-액틴 벨트의 형성을 억제한다는 결과를 나타낸다(in vitro). A는 RANKL로 유도된 F-액틴 벨트 형성에 대한 CD-I-448의 효과를 평가를 위해, F-액틴 염색 분석한 결과를 나타낸다. B는 표시된 그룹의 F-액틴 고리의 크기(%)는 Image J를 사용하여 계산한 결과를 나타낸다. CTRL(M-CSF + RANKL 처리 그룹)으로 대조군이다.

도 5는 CD-I-478은 파골세포 골 흡수를 억제한다는 결과를 나타낸다(in vitro). A는 CD-I-478의 표시된 용량의 차이에 따른 파골세포 골 흡수 정도를 평가하기 위해 골 흡수 검정을 수행한 결과를 나타낸다. B는 Image J를 사용하여 표시된 그룹의 재흡수 피트(pit) 면적(%)을 계산한 결과를 나타낸다. MR(M-CSF 및 RANKL로 처리된 그룹)은 대조군이다.

도 6은 OVX(Ovariectomized rat) 유발 골다공증 마우스에서 CDI-448의 골 손실 예방 효과를 나타낸다. A는 대조군(Sham)(n=10), OVX(n=7), 저용량-5mg/kg(n=7) 및 고용량-10mg/kg(n=7)처리 마우스 그룹의 대표적인 마이크로-CT 3D 재구성 이미지를 나타낸다. B는 각 샘플의 BMD(Bone Mineral Density), Tb-V(Trabecular Volume), BS(Bone Surface), TV(Total Volume)를 측정하고 계산했다. C는 생체 내 분석(in vivo analysis)을 위한 각 그룹의 마우스 체중을 나타낸다. D는 OVX에 의한 골 손실에 대한 CDI-448(5 또는 10 mg/kg)의 효과에 대한 조직학적 평가와 TRAP 및 H&E(Hematoxylin and eosin)로 염색된 탈회된 골의 대표적인 이미지를 나타낸다. E는 골 표면당 파골세포 표면 백분율의 정량 분석(OC. S/BS(OsteoClast Surface per Bone Surface))을 나타낸다. (OVX 그룹 대비 * $p<0.05$, "ns"는 중요하지 않음을 나타낸다(흉터 막대 = 200μm)).

도 7는 LSD1/ CoREST(Corepressor for RE1-Silencing Transcription factor) 복합체(complex)를 정제한 결과를 나타낸다.

도 8은 CD-I-448 및 CD-I-478의 LSD1/CoREST 복합체와의 상호작용을 확인하고, CD-I-478의 LSD1/CoREST 복합체 내 구조를 나타낸 결과이다. A는 CD-I-448 및 CD-I-478과 LSD1/CoREST 복합체의 SPR(Surface Plasmon Resonance) 분석 결과를 나타낸다. B는 CD-I-478과 LSD1/CoREST 복합체의 ITC(Isothermal Titration

Calorimetry) 분석결과를 나타낸다. 그리고 C는 복합된 LSD1/CoREST의 결정 구조를 나타내고, LSD1과 CoREST의 두 단백질 사슬은 리본으로 나타내어지며 색상에 따라 구별하여 나타냈다 (LSD1은 녹색, CoREST는 청록색). 여기서 원통과 화살표는 각각 알파-헬릭스와 베타-스트랜드를 나타낸다. LSD1의 활성 부위 내의 FAD 보조인자는 CD-1-478로 유도되었으며, 왼쪽 하단 패널에서 확대했다. 2Fo-Fc 전자 밀도에서 다른 원자 색상의 스틱 모델로 표시되며 노란색으로 등고선이 1.5 s 수준으로 그려서 나타냈다. D는 LSD1의 활성 부위에 결합된 억제제를 비교하기 위해 나타냈다. 단백질 백본(backbones)과 결합된 저해제를 서로 다른 색상으로 표시했다. 퀴나졸린 유래 가역적 저해제(quinazoline-derived reversible inhibitor)는 5L3E로, 트라닐시프로민 유래 비가역적 저해제(tranylcypromine-derived irreversible inhibitors)는 7VQT로, GSK2879552 유래 비가역적 저해제는 6NQU로, CD-I -478 유래 비가역적 억제제는 CDI으로 나타냈다. E는 (B)에서 비교했던 억제제를 확대하여 나타냈으며, 각 억제제에서 FAD가 유도체화되거나 가역적 억제제에 가깝게 위치하는 경우를 나타낸다.

도 9a 내지 e은 LSD1/CoREST 복합체(complex)를 사용한 TCP-(MP)-카페인 산 유사체의 SPR 및 DSF(differential scanning fluorimetry) 분석 결과를 나타낸다. GSK-LSD1 및 GSK2879552의 SPR 동역학 분석(a 및 b), GSK2879552, CD-I-448 및 CD-I-478의 DSF 분석(c~e) 결과를 나타낸다.

도 10는 CD-I-448은 TBS(t-butyldimethylsilyl) 등을 방출하여 CD-I-478로 변환됨을 나타낸다. 빈(Blank) 쥐 혈장(a), 마우스 혈장 내 CD-I-448(b), 마우스 혈장 내 CD-I-478(c) 및 CD-I-448의 정맥 주사 후 마우스 혈장(d)을 나타낸다. 샘플 (b) 및 (c)는 5 μg/ml 농도로 제조하고 쥐 혈장에서 0.5시간 동안 배양했고, 혈장 샘플(d)는 20 mg/kg의 용량으로 정맥 투여 후 5분에 얻었으며, 각 샘플의 크로마토그램은 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과를 나타낸다.

도 11은 CDI-448의 파골세포 특이 유전자와 단백질 발현을 억제하는 효과를 나타낸다. A 내지 F는 CDI-448의 RANKL을 통해 유도된 파골세포 특이적 마커의 발현을 억제하는 효과를 나타낸다. CD-I-448(2μM) 처리하거나 처리하지 않고, 파골세포 특이 유전자 Acp5(Acid Phosphatase 5), NFATc1(Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1), DC-STAMP(Dendritic cell-specific transmembrane protein), ATP6v0d2(ATPase H+ Transporting V0 Subunit D2), Oscar, CtsK의 상대적인 mRNA 발현을 0, 1, 2, 4일 동안 qRT-PCR로 분석한 결과를 나타냈다. 검정색 막대는 대조군(Con)을, 회색 막대는 CD-I-448 처리 그룹을 나타낸다. 전사체 수준(Transcript levels)은 0일째 대조군의 발현에 대해 정규화되어 나타낸다. G는 CD-I-448은 RANKL에 의해 유도된 주요 파골세포 단백질 발현, 예를 들어 NFATc1, c-fos 및 Ctsk의 발현을 억제함을 나타낸다. β-액틴은 로딩 대조군으로 사용되어 나타낸다. (비히클 처리된(vehicle-treated) "Con"(0 μM) 대비 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

도 12는 CD-I-448 또는 CD-I-448+MG132(Z-Leu-leu-leu-al)를 2 μM 첨가 또는 첨가하지 않고 BMDM을 배양하고, 마지막 6시간 동안 10 μM의 MG132를 처리한 후 NFATc1의 단백질 발현을 분석하여 나타낸다(A). B는 파골세포 성숙 특이 단백질인 CtsK의 단백질 발현을 분석하고, 0, 1, 2, 4일 동안 CBL(Casitas B-lineage Lymphoma), p-LSD1 및 메틸 라이신의 발현을 분석하여 나타낸다. C는 표시된 그룹에서 CBL 단백질의 라이신 메틸화를 분석하고, CBL과 p-LSD1 및 NFATc1의 상호 작용을 분석하여 나타낸다. CBL 단백질을 입력 대조군으로 사용된다. D는 표시된 용량의 CD-I-448 및 GSK-LSD1이 NFATc1 라이신 48 연결된 Ub에 미치는 영향을 분석하여 나타낸다. (0 μM - "Con"으로 처리, "M"은 'M-CSF'로 표시하여 나타낸다.)

도 13는 IP 메틸 라이신(IP Methyl lysine) 및 웨스턴 블롯 CBL을 통해 CBL 메틸화를 검사하기 위한 CO-IP 분석 결과(A) 및 IP p-LSD1 및 웨스턴 블롯 CBL을 통해 p-LSD1과 CBL의 상호작용을 확인하기 위한 CO-IP 분석 결과(B)를 나타낸다.

도 14은 파골세포 골 손실 치료에서 제안된 TCP-(MP)-카페인산 유사체의 메커니즘 다이어그램을 나타낸다. (BioRender.com으로 생성)

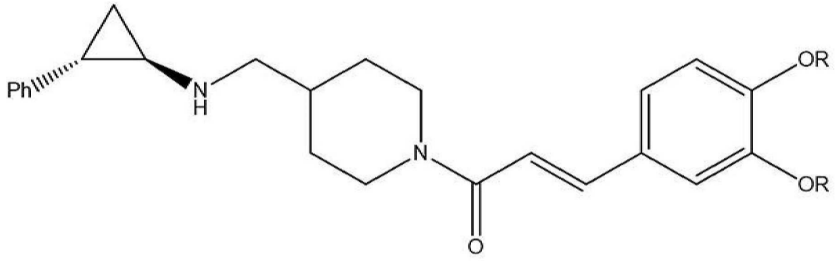
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0027] 본 발명의 화학식(구조식)에서 치환기가 필요한 자리이나, 어떠한 치환기도 기재되지 않은 경우, 수소 치환기를 생략한 것이며, 이는 본 발명의 모든 화학식(구조식)에서 동일하게 적용된다.

[0028] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공한다:

[0029] [화학식 1]

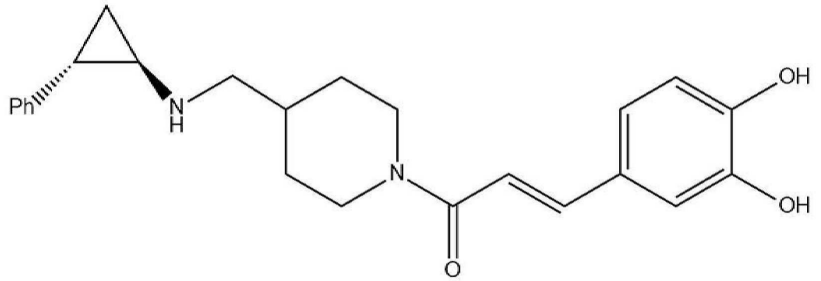


[0030]

[0031] 화학식 1 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 (t-butyldimethylsilyl, TBS)이다.

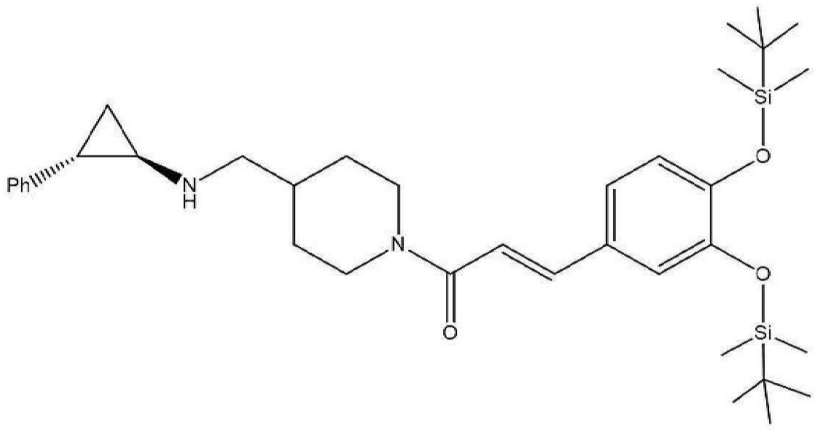
[0032] 예를 들어, 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물이다.

[0033] [화학식 2]



[0034]

[0035] [화학식 3]



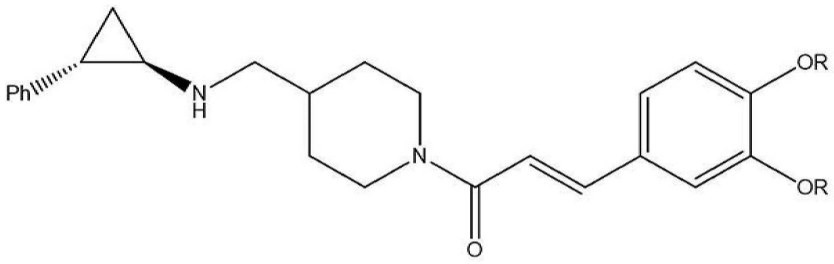
[0037]

[0038] 화학식 1로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 파골세포 분화 억제 효과를 나타낼 수 있다. 보다 구체적으로 화학식 1로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 LSD1의 탈메틸화 활성을 억제하고, LSD1과 CBL의 직접적인 상호작용을 감소시킴으로써, CBL 단백질을 안정화시킬 수 있고, 이를 통해 파골세포의 분화를 억제할 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서, OVX-유도 골다공증 마우스 모델에서 상기 화학식 1 화합물에 해당하는 CD-I-448을 처리한 후 파골세포 골손실이 억제됨을 확인하였다.

[0040] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[0041] [화학식 1]



[0042]

[0043] 화학식 1 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 (t-butyldimethylsilyl, TBS)다.

[0044] 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 화합물 또는 조성물이 투여되는 개체, 세포, 조직 등에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0045] 약학적으로 허용 가능한 염은 예를 들어 산 부가염, 염기 부가염 또는 금속염일 수 있다.

[0046] 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 형성될 수 있다. 이러한 약학적으로 무독한 염은 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴- 1,4-디오에이트, 핵산-1, 6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 를투엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함할 수 있다. 예를 들어, 화학식 1로 표시되는 화합물의 산 부가염은 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 염을 수화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜 수득할 수 있다.

[0047] 금속염은 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염일 수 있다. 금속염은 염기를 사용하여 제조할 수 있으며, 예를 들어, 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고 여액을 증발 및/또는 건조시켜 수득할 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 골질환은 조골세포와 파골세포의 활성 불균형에 의해 유발되는 것 일 수 있으며, 보다 구체적으로 골질환은 파골세포 과분화 또는 조골세포 활성 감소에 의한 것일 수 있다.

[0049] 파골세포가 과분화되면 파골세포가 비정상적으로 증가하여 과도한 골 흡수가 나타나, 골 밀도가 낮아질 수 있으며, 예를 들어, 골다공증, 골연화증, 골감소증, 골위축, 치주염 등 다양한 질환이 나타날 수 있다

[0050] 상기 골질환은 골절, 골다공증, 류마티스성 관절염, 치주염, 파제트병, 골연화증, 골감소증, 골위축, 골관절염 또는 무혈성대퇴골괴사, 골결손, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합 골절, 골형성 부전증, 골연화증 성 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환, 부정교합, 골 유합장애, 가관절증, 골 괴사, 골 관절염, 골종양, 골암 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 골질환은 골절, 골다공증, 류마티스성 관절염, 치주염, 파제트병, 골연화증, 골감소증, 골위축, 골관절염 및 무혈성대퇴골괴사로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0051] 치주염은 치근단 세균감염에 대한 면역세포의 방어작용에 의한 염증반응이다. 치주염에 주로 관여하는 호중구는 염증매개물질인 프로스타글란딘을 분비한다. 프로스타글란딘 등의 세포신호전달 물질에 의해 골조직을 흡수하는 파골세포가 활성화되어 염증부위 주변의 치조골 소실이 관찰된다. 또한, 만성 치주염은 지속적인 치주근단 부분의 염증 및 치조골 부식을 나타내는데, 치주염이 악화되어 치아를 살릴 수 없는 경우 발치를 하고 임플란트를 시행한다. 이를 예방하기 위해 치주염 초기단계에서 감염을 일으키는 세포수 감소를 위한 항생제 투여 및 염증

매개물질에 의한 파골세포 활성화를 극복할 수 있는 파골세포 억제제를 투여하여 만성치주염의 완화 및 치료를 기대할 수 있다. 따라서, 본 발명 의 약학 조성물은 파골세포의 분화를 억제하여 골 흡수를 방지함으로써 치주염의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 용어 "예방"은 골질환의 발생을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 포함한다.

[0053] 용어 "치료"는 골질환이 발병된 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 포함한다.

[0054] 본 발명 약학 조성물은 공지된 골질환의 예방 또는 치료 물질과 병용 투여될 수 있다. 예를 들어 본 발명 약학 조성물은 신코닌, 갈색거저리 추출물, 알로에-이모딘 및 오메가-3 지방산, 아르테아뉴인 B, 인돌-2-카르복실레이트 유도체, 유포비아 인자 L1, 스컬캅플라본 유도체, 프락시넬론 등과 병용 투여될 수 있다.

[0055] 본 명세서에서 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, "개체"란 골질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0056] 본 발명 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태일 수 있다.

[0057] 본 발명 약학 조성물은 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 주사제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0058] 본 발명 약학 조성물은 유효성분을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등일 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[0060] 본 발명 약학 조성물의 제형은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있으며, 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조될 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조될 수 있다. 또한, 본 발명 약학 조성물의 제형은 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제조될 수 있다.

[0061] 제제화를 위한 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등일 수 있다.

[0062] 본 발명 약학 조성물의 투여 경로는 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

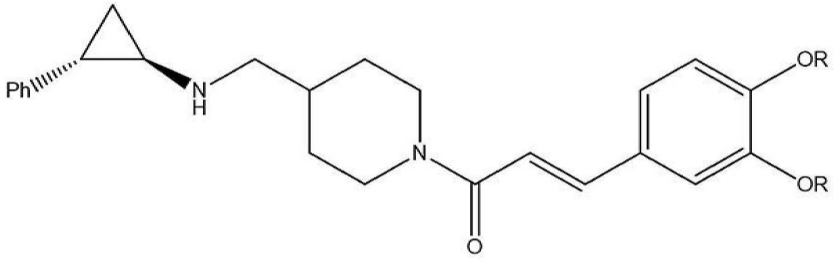
[0063] 본 발명 본 발명 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식이 선택될 수 있다.

[0064] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다

[0065] 예를 들어, 본 발명 약학 조성물은 1일 0.0001 mg 내지 1000mg/kg 또는 0.001mg 내지 500mg/kg으로 투여될 수 있다. 본 발명 약학 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0066] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 골 건강 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0067] [화학식 1]



[0068]

[0069] 화학식 1 중, R은 수소 또는 t-부틸디메틸실릴 (t-butyldimethylsilyl, TBS)이다.

[0070] 화학식 1로 표시되는 화합물은 앞서 설명한 것과 동일하다.

[0071] 본 명세서에서 용어 "골 건강 개선"은 골의 분해와 재형성의 균형이 유지되도록 하는 모든 효과를 포함한다.

[0072] 본 발명의 건강기능식품은 골 분해 및 골 재형성의 균형 유지를 도와줌으로써, 골 건강을 개선시킬 수 있다.

[0073] 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있다.

[0074] 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다.

[0075] 건강기능식품은 예를 들어, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건 강기능성 식품류일 수 있다

[0076] 건강기능식품에 포함될 수 있는 첨가제는 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충진제(치즈, 초콜렛 등), 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0077] 천연 탄수화물은 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0078] 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, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제, 천연 과일 쥬스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 등을 더 포함할 수 있다.

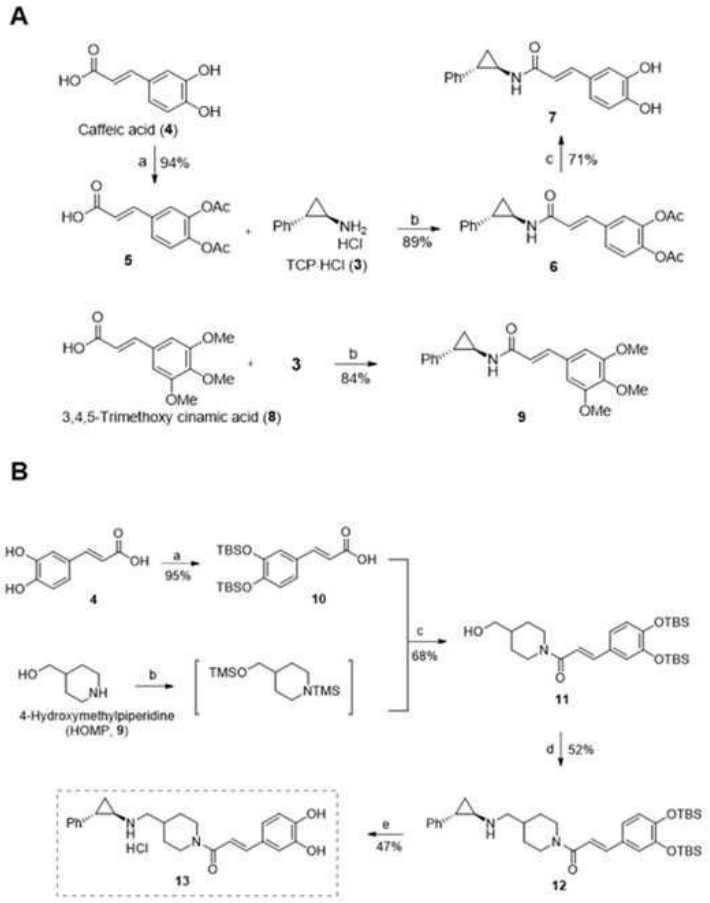
[0079] 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제는 이에 한정되는 것은 아니나, 락토즈, 덱스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군에서 선택될 수 있다

[0080] 본 발명 건강기능식품을 제제화할 경우에는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0082] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하기 설명한다.

[0084] **제조예**

[0085] 다음과 같은 Scheme으로 본 발명의 화학식 1 화합물에 해당하는 TCP-(MP)-카페인산 유사체(CD-I-448(하기 화합물 12) 및 478(하기 화합물 13)) 및 TCP-카페인산 유사체(CD-I-389(하기 화합물 6), CD-I-439(하기 화합물 7), CD-I-442(하기 화합물 9))을 합성하였다.



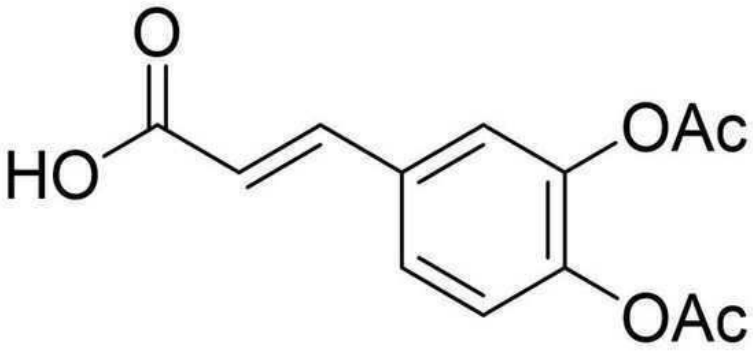
[0086]

[0087] (A) a) Ac_2O, 피리딘, 상온, 24시간; b) EDC·HCl, HOBt·H_2O, DIEA, CH_2Cl_2, 0℃이후 상온, 12시간; c) LiOH·H_2O, THF/MeOH/H_2O(3:1:1 v/v), 0℃, 20분. (B) a) (i) TBDMSCl, DIEA, CH_2Cl_2, 25℃, 14시간; (ii) K_2CO_3, THF/H_2O(5:1 v/v), 상온, 2시간; b) TMSCl, Et_3N, CH_2Cl_2, 0℃ 이후 상온, 3시간; c) EDC·HCl, HOBt·H_2O, DIEA, CH_2Cl_2, 상온, 12시간; d) (i) Dess-Martin periodinane, CH_2Cl_2, 0℃ 이후 상온, 3시간; (ii) TCP·HCl(**3**), $NaBH(OAc)_3$, DCE, 0℃ 이후 상온, 12시간; e) 6N HCl 프로판올 용액, MeOH, 0℃, 3시간

[0088] **제조예 1. 트랜스-(±)-트라닐시프로민-카페인산 유사체(TCP-CA, 7) 및 TCP-3,4,5-트리메톡시 신남산 유도체(CD-I-442, 9) 제조**

[0089] 트랜스-(±)-트라닐시프로민-염산염(trans-(±)-TCP-HCl)(3)과 카페인산(4)으로부터 4단계를 거쳐 트랜스-(±)-트라닐시프로민-카페인산 유사체(TCP-CA, 7) 및 TCP-3,4,5-트리메톡시 신남산 유도체(**9**)를 제조했다.

[0090] **(1) 단계 1: (*E*)-3-(3,4- 디아세톡시페닐)아크릴산(디아세틸화 된 카페산 유도체)(5) 제조**

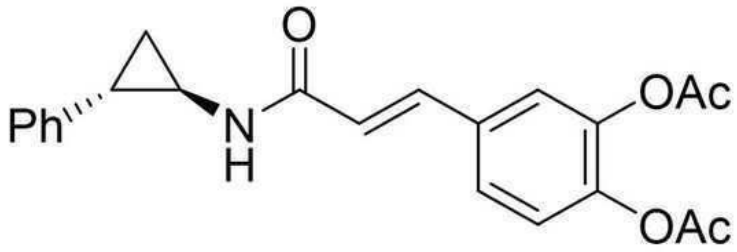


[0091]

[0092] 피리딘 4.5 mL의 카페산(4) 용액(10 g, 55.5 mmol)에 아세트산 무수물 45 mL를 첨가하고 상온에서 교반했다. 24시간 후, 혼합물에 얼음과 찬물 100 mL를 첨가하고 충분히 고체가 형성될 때까지 냉장 보관하였다. 생성된 흰색 침전물을 여과하고 얼음 냉수로 4회(40 mL) 세척한 후, 50 ℃에서 건조하여 백색 고체 생성물(13.1 g, 49.4 mmol)을 94% 수득율로 얻었다.

[0093] ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 12.47 (br, 1H), 7.66 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 3H).

[0094] **(2) 단계 2: 4-((*E*)-3-옥소-3-(((1S,2R)-2-페닐사이클로프로필)아미노)프로프-1-엔-1-일)-1,2-페닐렌 디아세테이트(디아실화된 TCP-CA 유도체)(6) 제조**

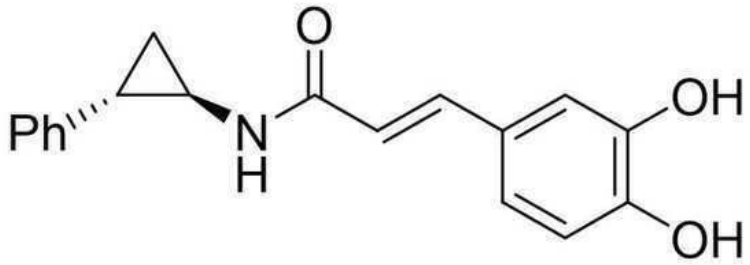


[0095]

[0096] 무수(anhydrous) CH_2Cl_2 25 mL에 녹인 화합물 5(0.2 g, 0.75 mmol)의 용액에 EDC 염산염(0.118 g, 0.75 mmol), 1-히드록시벤조트리아졸 수화물(1-hydroxybenzotriazole hydrate)(0.1 g, 0.75 mmol), DIEA(0.195 g, 1.52 mmol) 및 트라닐시프로민 염산염(tranylcypromine hydrochloride) (0.086 g, 0.50 mmol)을 아르곤 대기 하에서 0 ℃에서 첨가했다. 생성된 용액을 상온에서 12시간 동안 교반한 다음 얼음-EtOAc(4:1 v/v)에 부었다. 유기층을 분리하고, 수용액을 EtOAc(25 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 모아서 Na_2SO_4로 건조 후 감압 하에 농축하였다. 농축액을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산:EtOAc = 5:1 에서 3:1 v/v)로 정제하여 화합물 6(0.25 g, 0.66 mmol)를 89% 수득율로 얻었다.

[0097] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.59 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.34-7.22 (m, 5H), 7.18 (d, J = 8.4 MHz, 3H), 6.30 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.14 (br, 1H), 3.03-2.98 (m, 1H), 2.29 (s, 6H), 2.14-2.09 (m, 1H), 1.32-1.20 (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 168.13, 168.11, 166.47, 142.97, 142.34, 140.30, 139.42, 133.76, 128.39, 126.58, 126.20, 126.18, 123.82, 122.35, 121.40, 32.31, 24.98, 20.66, 20.64, 16.22; HRMS-ESI^{+}: $C_{22}H_{21}NO_5$ ($M+H^{+}$)에 대한 m/z 계산치 380.1498, 실측치 380.1496.

[0099] **(3) 단계 3: (*E*)-3-(3,4-디히드록시페닐)-*N*-((1S,2R)-2-페닐시클로프로필)아크릴아미드(TCP-카페인산)(7) 제조**

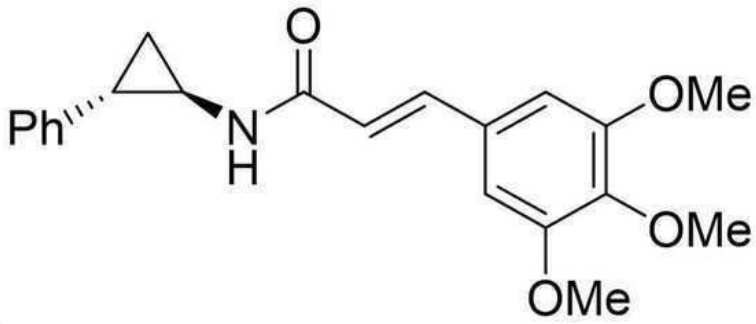


[0100]

[0101] 화합물 6 (0.037 g, 0.10 mmol)의 용액에 1.6 mL의 THF/MeOH/H_2O (3:1:1 v/v)에 수산화 리튬 일 수화물 (lithium hydroxide monohydrate)(0.012 g, 0.3 mmol)을 아르곤 하에서 0 ℃에서 첨가했다. 동일한 온도에서 20분 동안 교반한 후 반응 혼합물을 얼음물(5 mL)에 부은 후 pH 2에 도달할 때까지 5% HCl 용액으로 처리했다. 수용액을 EtOAc (10 mL x 3)로 추출했다. 유기층을 모아서 Na_2SO_4로 건조 후 감압 하에서 화합물7(0.02 g, 0.07 mmol)를 71% 수득율로 얻었다.

[0102] ^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 7.42 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.26-7.21 (m, 2H), 7.15-7.09 (m, 3H), 7.00 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 2.0 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 2.99-2.95 (m, 1H), 2.09-2.04 (m, 1H), 1.28-1.20 (m, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz) δ 169.03, 147.44, 145.33, 140.99, 140.86, 127.93, 126.81, 125.80, 125.57, 120.78, 116.52, 115.04, 113.64, 32.16, 24.06, 14.82; HRMS-ESI$^+$: $C_{18}H_{17}NO_3$ ($M+H^+$)에 대한 m/z 계산치 296.1287, 실측치 296.1287.

[0103] **(4) 단계 4: (*E*)-*N*-((1S,2R)-2-페닐사이클로프로필)-3-(3,4,5-트리메톡시페닐)아크릴아미(TCP-3,4,5-트리메톡시 신남산 유도체)(9) 제조**



[0104]

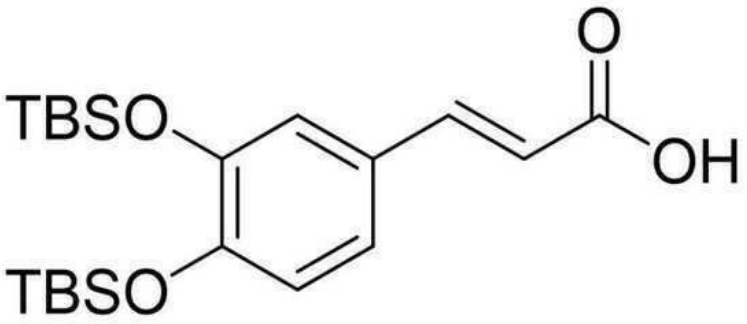
[0106] 화합물 9은 화합물 6와 동일한 합성과정에 따라 84% 수득율로 제조하였다.

[0107] ^{1}H NMR (acetone-d_6, 400 MHz) δ 7.62 (br, 1H), 7.48 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.28-7.25 (m, 2H), 7.19-7.14 (m, 3H), 6.87 (s, 2H), 6.59 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.85 (s, 6H), 3.74 (s, 3H), 3.08-3.03 (m, 1H), 2.11-2.07 (m, 1H), 1.28-1.21 (m, 2H); ^{13}C NMR (acetone-d_6, 100 MHz) δ 166.00, 165.91, 153.67, 141.49, 139.61, 139.43, 130.81, 128.19, 126.16, 125.69, 120.87, 120.83, 105.04, 59.70, 55.50, 32.69, 32.56, 24.54, 24.52, 15.11, 15.08; HRMS-ESI$^+$: $C_{21}H_{23}NO_4$ ($M+H^+$)에 대한 m/z 계산치 354.1705, 실측치 354.1704.

[0109] **제조예 2. 본 발명 화학식 1에 해당하는 디실릴화된 TCP-MP-CA유도체(CD-I-448, 12) 및 TCP-MP-CA 유도체(CD-I-478, 13) 제조**

[0110] 트랜스-(±)-TCP-HCl(TCP-HCl)(3)으로부터 5단계를 거쳐 GSK-2879552 (TCP-MP-BzOH 구조)의 유사체로서 TCP-MP-CA(13)를 제조했다.

[0111] **(1) 단계 1: (*E*)-3-(3,4-비스((티르-부틸디메틸실릴)옥시)페닐)아크릴산(비실릴화 카페산 유도체)(10) 제조**



[0112]

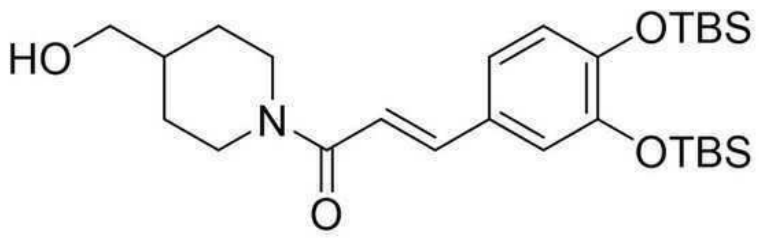
[0113] 무수(anhydrous) CH_2Cl_2 14 mL에 녹인 카페산(4)(2 g, 11.10 mmol) 용액에 DIEA(7.89 g, 61.05 mmol) 및 TBSCl(8.37 g, 55.50 mmol)을 0℃에서 아르곤 하에 첨가했다. 생성된 용액을 상온에서 14시간 동안 교반한 다음 얼음-에테르(1:1 v/v)에 부었다. 유기층을 분리하고 수용액을 에테르(15 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 모아서 Na_2SO_4 로 건조 후 감압 하에서 농축하였다. 농축액을 THF/H_2O(5:1 v/v) 18 mL에 용해하고 0℃에서 K_2CO_3 1.6 g으로 처리했다. 생성된 용액을 상온에서 2시간 동안 교반한 후 얼음-에테르(1:1 v/v)에 부었다. 유기층을 분리하고 수용액을 에테르(20 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 모아서 Na_2SO_4 로 건조 후 감압 하여 농축하였다. 농축액을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산:EtOAc = 5:1 에서 1:1 v/v)로 정제하여 화합물 10(4.31 g, 10.54 mmol)을 95% 수득율로 얻었다.

[0114] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.70 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.06-7.03 (m, 2H), 6.85 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 1.00 (d, J = 4.4 Hz, 18H), 0.22 (d, J = 3.2 Hz, 12H).

[0115] **(2) 단계 2: 퍼실릴화된 4-(히드록시메틸)피페리딘(4-HOMP, 9) 제조**

[0116] 트리에틸아민(Et_3N)의 존재 하에 트리메틸실릴 클로라이드(TMSCl)를 첨가하여 제조했다(in situ).

[0117] **(3) 단계 3: (*E*)-3-(3,4-비스((티르-부틸디메틸실릴)옥시)페닐)-1-(4-(히드록시메틸)피페리딘-1-일)프로프-2-엔-1-온(one)(디실릴화된 4-HOMP-CA 유도체)(11) 제조**



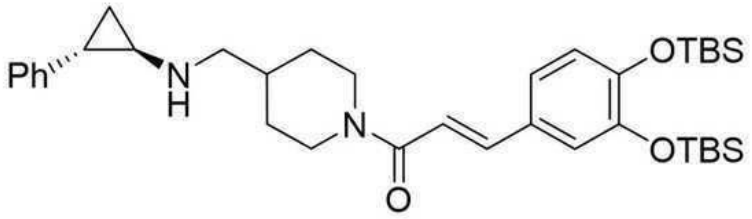
[0118]

[0119] 4.4 mL의 무수(anhydrous) CH_2Cl_2에 녹인 4-피페리딘메탄올 (piperidinemethanol)(9)(0.3 g, 2.60 mmol)의 용액에 Et_3N(0.29 g, 2.86 mmol) 및 TMSCl(0.31 g, 2.86 mmol)을 0℃에서 아르곤 하에 첨가한 후 생성된 용액을 3시간 동안 교반하였다. 화합물 10(1.27 g, 3.12 mmol)의 용액을 14 ml의 무수(anhydrous) CH_2Cl_2에 넣고 EDC 염산염(hydrochloride)(0.52 g, 3.38 mmol), 1-하이드록시벤조트리아졸 수화물(hydroxybenzotriazole hydrate)(0.45 g, 3.38 mmol), DIEA(0.87 g, 1.52 mmol)를 첨가하여 0℃에서 1분 동안 반응 혼합물에 천천히 첨가했다. 생성된 용액을 상온에서 12시간 동안 교반 후 얼음-에테르(4:1 v/v)에 부었다. 유기층을 분리하고 수용액을 에테르(20 mL x 3)로 추출하였다. 유기층을 모아서 Na_2SO_4로 건조 후 감압 하여 농축하였다. 농축액을 실

리카겔 컬럼 크로마토그래피(헥산:EtOAc = 1:1 에서 1:10 v/v)로 정제하여 화합물 11(0.91 g, 1.78 mmol)을 68% 수득율로 얻었다.

[0120] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.54 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.04 (dd, J = 2.4 Hz, 8.4 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 4.73 (br, 1H), 4.12 (br, 1H), 3.53 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.07 (br, 1H), 2.70 (br, 1H), 1.85-1.74 (m, 2H), 1.50 (br, 2H), 1.27 (qd, J = 4.0 Hz, 12.0 Hz, 2H), 0.98 (d, J = 3.2 Hz, 18H), 0.20 (d, J = 2.8 Hz, 12H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 206.98, 165.73, 148.55, 147.00, 142.37, 129.05, 121.16, 120.93, 120.90, 115.29, 67.39, 38.94, 30.94, 25.92, 25.88, 18.48, 18.45, -0.01, -4.08, -4.10; HRMS-ESI^{+}: $C_{27}H_{47}NO_4Si_2$ ($M+H^{+}$)에 대한 m/z 계산치 506.3122, 실측치 506.3116

[0121] **(4) 단계 4: (*E*)-3-(3,4-비스((티르-부틸디메틸실릴)옥시)페닐)-1-(4-((((1R,2S)-2-페닐사이클로프로필)아미노)메틸)피페라이드n-1-yl)프로프-2-엔-1-온(디실릴화된 TCP-MP-CA 유도체)(12) 제조**

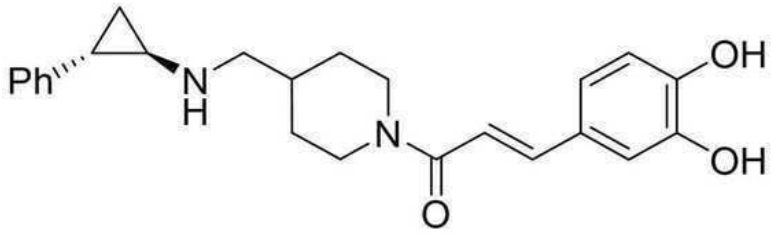


[0122]

[0123] 화합물 11(0.91 g, 1.78 mmol)의 용액에 12 mL의 무수(anhydrous) CH_2Cl_2를 넣고 아르곤 하에 0℃로 데스-마틴 피르마니난(Dess-Martin periodinane)(0.43 g, 1.02 mmol)을 첨가했다. 생성된 용액을 상온에서 3시간 동안 교반한 후 얼음물(25 mL)에 부었다. 결과 수용액을 에테르(15 mL x 3)로 추출하고, 포화 수성 $NaHCO_3$(10 mL) 및 포화 수성 $Na_2S_2O_3$(10 mL)로 세척한 다음 Na_2SO_4로 건조시켰다. 과량의 Na_2SO_4를 여과하고 여과액을 감압 하에서 농축하였다. 농축액을 무수 DCE 6.5 mL에 용해시키고 트라닐시프로민 염산염(tranylcypromine hydrochloride)(0.6 g, 3.56 mmol) 및 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드(sodium triacetoxyborohydride)(1.5 g, 7.12 mmol)로 0℃에서 처리하였다. 반응 용액을 상온에서 12시간 동안 교반 후 얼음-에테르(1:1 v/v)에 부었다. 유기층을 분리하고 포화 $NaHCO_3$(10mL)로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조 후 감압 농축하였다. 농축액을 모아서 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH_2Cl_2:CH_3OH = 70:1 에서 10:1 v/v)로 정제하여 화합물 12 (0.57 g, 0.92 mmol)을 52% 수득율로 얻었다.

[0124] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.54 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 7.26 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.16 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.04 (dd, J = 1.6, 8.4 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 4.71 (br, 1H), 4.09 (br, 1H), 3.08 (br, 1H), 2.65 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 2.35-2.31 (m, 1H), 1.92-1.97 (m, 1H), 1.81-1.72 (m, 3H), 1.25 (s, 1H), 1.23 (qd, J = 4.0, 12.4 Hz, 2H), 1.09-1.05 (m, 1H), 0.99 (d, J = 3.6 Hz, 18H), 0.20 (d, J = 2.0 Hz, 12H); ^{13}C NMR (acetone-d_6, 100 MHz) δ 164.57, 163.59, 163.53, 148.14, 146.87, 141.27, 141.15, 140.44, 129,73, 128.40, 128.15, 126.57, 126.11, 125.89, 121.32, 121.30, 121.23, 121.21, 120.89, 120.84, 116.51, 116.40, 52.69, 48.91, 45.19, 41.66, 38.96, 35.26, 35.07, 34.39, 25.45, 25.42, 23.99, 18.21, 18.17, 15.04; HRMS-ESI^{+}: $C_{36}H_{57}N_2O_3Si_2$ ($M+H^{+}$)에 대한 m/z 계산치 621.3908, 실측치 621.3893.

[0125] **(5) 단계 5: (*E*)-3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-(4-((((1R,2S)-2-페닐사이클로프로필)아미노)메틸)피페리딘-1-일)프로피-2-엔-1-온(TCP-MP-CA 유도체)(13) 제조**



[0126]

[0127] 화합물 12을 5 mL의 MeOH에 용해시키고 0℃에서 6N HCl 프로판올 용액 2 mL로 처리하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 시간 동안 교반 후 감압하여 농축하였다. 농축액을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH_2Cl_2:CH_3OH = 10:1 v/v)로 정제하여 화합물 13(0.03 g, 0.07 mmol)를 47% 수득율로 얻었다.

[0128] ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.47 (d, J = 15.2 Hz), 7.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.24 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.98 (dd, J = 2.0, 8.0 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.67 (br, 1H), 4.33 (br, 1H), 3.20-3.17 (m, 1H), 31.15 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 3.02-2.98 (m, 1H), 2.77 (br, 1H), 2.57-2.52 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.91 (m, 2H), 1.59-1.53 (m, 1H), 1.42-1.36 (m, 1H), 1.29 (br, 2H); ^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz) δ 166.81, 147.53, 145.30, 143.67, 137.91, 128.35, 127.06, 126.63, 126.02, 120.87, 115.05, 113.94, 113.08, 53.40, 52.88, 45.09, 41.61, 38.30, 33.35, 30.01, 29.02, 21.06, 12.05; HRMS-ESI$^+$: $C_{24}H_{29}N_2O_3$ (M+H$^+$)에 대한 m/z 계산치 393.2178, 실측치 393.2180.

[0129] **실험예**

[0130] **1. 방법**

[0131] **1.1. 재료 및 시약**

[0132] GSK-LSD1 이염산염(GSK-LSD1 Dihydrochloride)(PubChem CID: 91663353, 분자식: $C_{14}H_{22}Cl_2N_2$, 분자량: 289.24)는 메드켐익스프레스(MedChemExpress)에서 구입하여 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich))에 용해했다. 소태아 혈청(FBS)과 Eagle 최소 필수 배지(α-MEM)의 알파 변형은 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)에서 구입했다. 마우스 M-CSF 및 RANKL은 페프로텍(PeproTech)에서 구입했다. 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입한 항-β-액틴(A5441); 산타 크루즈 생명공학(Santa Cruz Biotechnology)에서 구입한 항-카텝신 K(sc-48353), 항-cbl(sc-1651); 항-K48-연결 특이적 폴리유비퀴틴(8081s), 항-c-fos(4384s), 항-NFATc1(8032s) 및 두 번째 항체(7074s 및 7076s)는 세포 신호 기술(Cell Signaling Technology)에서 구입했다. 안티-메틸-라이신(Anti-Methyl-Lysine(nb500-824))은 노부스(Novus)에서 구입하였고, Anti-p-LSD1(ABE1462)은 머크 밀리포어(Merck Millipore)에서 구입했다. 화학 발광 신호 검출을 위한 ECL 시스템(RPN2106)은 인트론(iNtRON)에서 구입했다. 타르타르산염 저항성 산 포스파타제(Tartrate-resistant acid phosphatase) 염색 키트는 코스모바이오(CosmoBio)에서 구입했다.

[0134] **1.2. 골수 유래 대식세포 분리 및 배양**

[0135] 8주 된 C57/BL6 암컷 마우스의 골수 세포 (BMCs)는 α-MEM를 사용하여 대퇴골과 경골을 헹구거나 세척하여 분리했다. 그런 다음 BMC를 10% FBS, 100 U/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 포함하는 α-MEM에 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24~36시간 동안 배양했다. 상등액의 세포를 수집하고 30 ng/mL M-CSF를 공급하면서 3일 동안 배양했다. 그 후 부착 세포를 수집하여 파골세포 유도를 위한 BMDM으로 사용했다. 동물을 이용한 모든 실험은 전남대학교 IACUC의 승인을 받았다(승인번호: CNU IACUC-YB-2022-123).

[0137] **1.3. 파골세포 형성(in vitro), TRAP 염색 및 세포 생존력 분석**

[0138] 파골세포 형성에 대한 세포 분석 모델을 확립하기 위해, 부착 세포(BMDM)을 수확하고, 10% FBS, 100 U/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신, 30 ng/mL M-CSF 및 50 ng/mL RANKL을 함유한 α-MEM에서 약 4일 동안 TCP-

(MP)-Caffeic acid 유사체를 포함하거나 또는 포함하지 않고 배양했다. 양성 그룹이 성숙한 파골세포를 형성하면, 모든 파골세포는 약 20분 동안 4% 포르말린을 사용하여 고정했다. 그리고 PBS로 1회 세척한 후 TRAP 염색 키트를 이용하여 세포를 염색했다. 퍼진 파골세포 영역은 현미경을 사용하여 볼 수 있었고 imageJ를 사용하여 계산했다. BMDM(1 x 10^4개 세포/웰)의 생존력은 이전에 기술된 바와 같이 세포 생존능 분석 키트를 사용하여 96-웰 플레이트에서 평가했다.

[0140] **1.4. 골 형성 및 ALP(Alkaline Phosphatase) 염색 분석**

[0141] 원시 골아세포(Primary osteoblasts)는 3-4일 마우스의 두개골(calvarias)에서 분리했다. 세포를 BMP2(100 ng/mL)의 존재 하에 TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체가 있거나 없는 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액을 함유하는 α-MEM에서 9일 동안 37℃에서 5 % CO_2 인큐베이터에서 9일 동안, 배지는 격일로 교체했다. 세포를 PBS로 세척하고; 그런 다음 70% 얼음처럼 차가운 에탄올로 1시간 동안 고정하고 이중 증류된 H_2O로 두 번 헹구었다. 그 후, BCIP®/NBT 액체 기판 시스템(Liquid Substrate System)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 실온에서 5-15분 동안 세포를 염색했다. 이미지는 현미경으로 캡처하거나 직접 스캔했다. ALP 양성의 강도는 Image J를 사용하여 계산됐다.

[0143] **1.5. 골 재흡수 및 F-액틴 벨트 염색 분석**

[0144] 골 흡수 분석은 이전에 설명한 대로 수행됐다. 2 × 10^4개 세포/웰 BMDM을 키트로 제공된 코팅 처리된 48-웰 플레이트(CSR-BRA-48X2KIT)에서 배양했다. 이어서, 성숙한 파골세포가 관찰될 때까지 지시된 용량의 CD-I-448 및 CD-I-478과 함께 또는 없이 배양했다. 각 웰에 100 μL의 상층액이 검정색 폴리프로필렌 96 웰 마이크로플레이트(black polypropylene 96-well microplate)로 채취되었고, 스펙트라맥스(SpectraMax) i3x 형광 플레이트 리더를 사용하여 흥분 파장(excitation wavelength) 485 nm과 방출 파장(emission wavelength) 535 nm에서 형광 강도를 측정했다. 재흡수된 구덩이 영역(resorbed pit areas)은 현미경을 사용하여 볼 수 있었고 ImageJ에 의해 계산됐다. F-액틴 링 분석의 경우, 이전에 설명한 바와 같이 로다민 결합 팔로이딘 염색 키트 (rhodamine-conjugated phalloidin staining kit (abcam))를 사용하여 벨트가 시각적으로 확인됐다.

[0146] **1.6. RNA 분리 및 정량적 실시간 PCR**

[0147] TRIzol 시약을 사용하여 세포에서 총 RNA를 추출했다. RNA 농도를 정량화한 후 프라인스크립트 RT 리젠트 키트(PrimeScript RT Reagent Kit(Takara))를 사용하여 cDNA로 역전사했다. 다음으로 cDNA는 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(Power SYBR Green PCR Master Mix)를 이용하여 Real-time PCR 증폭 반응에 사용했다. 마우스의 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 참조 유전자로 사용했다.

[0148] 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0149]

유전자 명칭	프라이머 서열 (5'→3')	
Acp5	Forward	CAGCTGTCCTGGCTCAAAA (서열번호 1)
	Reverse	ACATAGCCCACACCGTTCTC (서열번호 2)
Nfatc1	Forward	ACCACCTTTCCGCAACCA (서열번호 3)
	Reverse	GGTACTGGCTTCTCTTCCGTTTC (서열번호 4)
Dc-stamp	Forward	CGCACGATGCTTCATTCTTC (서열번호 5)
	Reverse	CAGTGCCAGCCGCAATC (서열번호 6)
Atp6v0d2	Forward	ACTATGGCCACCCGGGAAT (서열번호 7)
	Reverse	GGCCCAAGGGAGTCATGTG (서열번호 8)
Oscar	Forward	TGGCGGTTTGCACTCTTCA (서열번호 9)
	Reverse	GGAAGAACTCAGCCAGCTCA (서열번호 10)
Cathepsin k	Forward	GGACGCAGCGATGCTAACTAA (서열번호 11)
	Reverse	CAGAGAGAAGGGAA (서열번호 12)
Gapdh	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA (서열번호 13)

Reverse	GATGCCTGCTTCACCACCTT (서열번호 14)

[0150] **1.7. 웨스턴 블로팅 분석**

[0151] 얼음 위에서 30분 동안 차가운 RIPA 완충액을 사용하여, CD-I-448가 처리되었거나 처리되지 않은 파골세포로부터 총 단백질을 추출됐다. 골드 BCA 단백질 어세이 키트(gold BCA protein assay kit)로 단백질 농도를 정량한 후, 8% 또는 12% SDS-PAGE를 사용하여 단백질을 로딩하고 분리했다. 그런 다음 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride (PVDF)) 멤브레인으로 옮겼다. 다음으로, PVDF 멤브레인을 5% 탈지유를 사용하여 1시간 동안 차단하고, 표적 단백질의 분자량을 기준으로 멤브레인을 절개하고 1:2,000배로 희석한 1차 항체와 밤샘 배양시켰다. 1 × TBST로 세척하고 실온(RT)에서 2시간 동안 1:2,000배로 희석한 2차 항체와 반응시켰다. 마지막으로, 막을 세척하고 노출 및 영상화를 위해 수퍼 플러스 화학발광(ECL) 완충액을 사용하여 현상했다.

[0153] **1.8. LSD1 활동 분석**

[0154] LSD1 활성에 대한 TCP-(MP)-카페인산 유사체의 효과는 제조업체의 지침(Caymanchem, Michigan, USA)에 따라 LSD1 억제제 스크리닝 키트를 사용하여 분석됐다. 먼저, 혼합물 샘플, 분석 완충액, LSD1 인간 재조합 분석 시약, LSD1 분석 형광 측정 기질, LSD1 분석 홀스래디시 과산화효소(LSD1 assay horseradish peroxidase) 및 LSD1 분석 펩티드를 96-웰 플레이트(검은색)에 첨가했다. 배경 웰은 LSD1 분석 펩티드를 첨가하지 않았고, 초기 활성으로 사용된 LSD1 분석 펩티드 그룹 및 억제제를 첨가하지 않았다. 엑제제 활성 그룹은 다양한 종류나 농도의 TCP-(MP)-카페인산(Caffeic acid) 유사체를 첨가한 웰들을 의미한다. 스펙트라맥스 i3x (SpectraMax i3x) 다중 모드 마이크로플레이트 검출 플랫폼(Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA)을 사용하여 흥분 파장 530-540 nm 및 방출 파장 585-595 nm로 형광을 측정한 후 억제율을 계산했다. (억제율(inhibition)(%) = [(초기 활동 - 억제제 활동) / 초기 활동] x 100)

[0156] **1.9. OVX-유도 파골세포 골소실 마우스 모델**

[0157] C57BL/6 마우스의 성장을 위해 특정 병원균이 없는 시설을 사용했다. 그리고 생체 내에서 GSK-LSD1 및 CD-I-448의 효과를 확인하기 위해 앞서 설명한 바와 같이 OVX-유도 골다공증 마우스 모델을 확립했다. 7주 된 C57BL/6 암컷 마우스는 두 개의 집단으로 분류됐다. 한 집단은 대조군(Sham), OVX, CD-I-448 (5 mg/kg), (10 mg/kg) 네 그룹으로 구성되었고, 다른 집단은 대조군(Sham), OVX 및 GSK-LSD1 (10 mg/kg)로 구성됐다.

[0158] 그 중 OVX, CD-I-448 및 GSK-LSD1 그룹의 마우스는 OVX 수술을 받았다. 대조군은 복부 절개를 받았다. 1주 동안의 회복 기간 후, CD-I-448 및 GSK-LSD1 그룹은 10% Tween 80과 10% DMSO로 이루어진 혼합물에 5 또는 10 mg/kg을 녹여 복강 내 주사를 받았다. Sham 및 OVX 그룹의 마우스들은 복강 내 주사로 매일 동일한 용량의 10% Tween 80과 10% DMSO 혼합물을 투여했다. 주사 용량은 마우스 당 200 μL이며, 4주 동안 진행됐다. 주간마다 마우스의 체중이 측정됐다. 실험의 마지막 날에는 마우스들이 안락사되고, 허벅지골이 분리되어 4.0% 파라포름알데하이드로 고정되었으며, 이후 마이크로 컴퓨터 단층촬영 (마이크로-CT) 분석을 위해 사용됐다.

[0160] **1.10. SD 마우스의 혈장에서 CD-I-448의 안정성 확인**

[0161] 마우스 혈장 내 CD-I-448의 안정성과 대사산물을 조사하기 위해 다양한 시간대(0.5시간, 2시간, 6시간, 24시간)에 마우스 혈장이 존재하는 상태에서 질량분석기(MASS)를 사용하여 이 약물의 크로마토그래피 분석을 수행하였고, 그 결과 크로마토그램을 마우스에게 CD-I-448을 정맥 투여한 후 혈장으로부터 얻은 크로마토그램과 비교했다. 또한, CD-I-448과 CD-I-448의 대사산물로 간주되는 CD-I-478의 상관관계를 조사하기 위해 크로마토그램을 CD-I-478과 비교하여 그 관계를 조사했다.

[0163] **1.11. 안정성 테스트를 위한 생체 내 실험**

[0164] 스프래그-도울리(Sprague-Dawley) 마우스(수컷 6-7주, 체중 200-230g)는 오리엔트바이오(Orient Bio)(대한민국 성남)에서 구입했다. 모든 동물 실험은 케이메디허브 동물실험윤리위원회(Kmedihub Animal Care and Use

Committee)의 승인을 받아 케이메디허브(Kmedihub) 실험 동물의 복지 및 윤리에 대한 지침에 따라 수행됐다. CD-I-448에 대한 혈장 시료 분석의 크로마토그래피 분석은 케이메디허브(Kmedi-Hub) 전임상 연구 센터에서 LC-MS/MS를 통해 수행된다. 서로 다른 시점에서 수집된 크로마토그램은 애질런트(Agilent) 6400 삼중 사중극자(triple quadrupole) 기기(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)를 사용하여 LC-MS/MS 스캐닝 방법으로 분석된다. 이동상은 아세토니트릴(Acetonitrile): 물 (80:20)에 암모늄 포름산(ammonium formate)이 포함된 것이었으며, 유속은 0.2 ml/min으로 설정됐다. 컬럼 용출액은 양이온 모드에서 ESI가 장착된 질량 분석기로 모니터링했다.

[0166] **1.12. 등온 적정 열량계(ITC) 분석**

[0168] *ITC 실험은 NanoITC(TA Instruments, New Castle, DE, USA)에 의해 수행됐다. LSD1/CoREST는 20mM HEPES, 100mM NaCl, 0.5mM TCEP를 포함하는 완충액에서 50μM로 농축되었고 CD-I-478은 희석 열을 최소화하기 위해 동일한 완충액에 용해됐다. 1% DMSO 내 500 μM CD-I-478을 250 rpm으로 회전하는 주사기에서 200℃의 1% DMSO 내 50 μM LSD1/CoREST가 포함된 셀에 2 μL 간격으로 주입했다(주입 간격 200초 유지). TA 장비에서 제공하는 NanoAnalyze 소프트웨어를 사용하여 결합 등온선을 분석했다. 기준선 컨트롤은 완충액에서 얻었고 CD-I-478 용액은 동일한 완충액에서 측정했다. 피팅은 단일 사이트 독립 바인딩 모델을 사용하여 수행됐다.

[0170] **1.13. 결정화 및 구조 결정**

[0171] 정제된 단백질은 결정화를 위해 20mM Tris-HCl(pH 7.5), 200mM NaCl 및 10mM 머캅토에탄올 (mercaptoethanol)로 구성된 완충액에서 8mg/mL^{-1}로 농축됐다. 정제된 LSD1/CoREST 단백질 복합체의 농도는 280 nm에서의 흡광도 측정 및 280 nm에서의 이론적 흡광 계수를 사용하여 결정했다. 정제된 LSD1/CoREST는 VDX 플레이트(Hampton Research)에서 행잉 드롭 증기 확산 방법(hanging-drop vapor-diffusion method)을 사용하여 결정화됐다. 8 mg/mL^{-1} 농도의 단백질 용액(1 μL)을 295 K에서 동량의 저장 용액과 혼합했다. 최상의 결정은 32~38 %(v/v) 탁산염(Tacsimate)(pH 7.0)의 존재하여 성장했다. 데이터 수집을 위해 단결정을 15%(v/v) 에틸렌 글리콜(ethylene glycol)이 보충된 저장소 용액으로 동결 보호하고 나일론 루프를 사용하여 100K 질소 스트림에서 직접 급속 동결했다. 180개의 프레임으로 구성된 X-선 회절 데이터 세트는 포항 가속기 연구소(PAL, 포항, 대한민국)의 포항 광원 Ⅲ(Pohang Light Source Ⅲ)(PLS Ⅲ) 빔라인 11C에서 필라투스(Pilatus) 6M 검출기를 사용하고 파장 0.9793Å에서 1° 진동을 사용하여 수집됐다. 데이터는 HKL-2000 소프트웨어 패키지로 인덱싱되고 스케일링됐다. 인간 LSD1/CoREST 복합체 (PDB ID 6K3E)를 검색 모델로 사용하여, PHENIX 패키지의 분자 대체 방법을 사용하여 3.5Å의 해상도로 구조를 결정했다. 비대칭 유닛에서 LSD1 및 CoREST 복합체의 한 사본을 식별하고 PHENIX 패키지를 사용하여 정제 한 다음 수동으로 재구축했다. 최종 모델은 각각 Coot17 및 PHENIX 패키지로 반복적인 수동 모델 구축 및 개선 후 3.0Å의 해상도로 얻었다. 분자 모델 그림은 PyMol Molecular 그래픽 프로그램(Schrφdinger, LLC)을 사용하여 작성됐다.

[0173] **1.14. 마이크로 CT 스캐닝**

[0174] Micro-CT 스캐닝은 한국기초과학지원연구원(광주, 한국)에서 퀀텀 GX 마이크로-CT(Quantum GX Micro-CT) 이미징 시스템을 사용하여 수행했다.

[0176] **1.15. 통계 분석**

[0177] 두 그룹 간의 차이를 비교하기 위해 Unpaired Student's t-test를 사용했다. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 8.3.0을 이용하여 여러 그룹 간의 차이를 비교하기 위해 일원분산분석(ANOVA)과 더넷(Dunnett)의 다중 비교 검정을 사용했다. (*$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$; NS, 유의하지 않음) 모든 오차 분석은 평균 ± 표준편차로 표시된다.

[0179] 2. 결과

[0180] 2.1. [화학식 1] 화합물에 해당하는 CD-I-448 및 478의 파골세포 형성 억제 효과(in vitro)

[0181] CD-I-389 (6), CD-I-439 (7), CD-I-442 (9), CD-I-448(12), CD-I-478 (13)). 파골세포형성(osteoclatogenesis)에 대한 화합물들의 억제 효과는 1 μM을 사용하여 평가됐다. 결과는 화합물들 중 CD-I-389, 448 및 478이 파골세포의 분화를 크게 억제함을 확인했다(도 2의 A 및 B). 다음으로, 화합물들을 사용한 LSD1 효소 활성의 억제를 분석한 결과, CD-I-448 및 CD-I-478이 시험관 내에서 투여량 의존적 방식으로 LSD1 탈메틸화 활성에 대한 상당한 억제를 나타냄을 확인했다(도 2의 C). 일반적으로 알려진 LSD1 탈메틸화 억제제인 GSK-LSD1을 대조군으로 사용했다(도 2의 C). LSD1 탈메틸화에 대한 현저히 억제(in vitro)를 확인했고, 파골세포 분화 동안 LSD1 관련 메틸화에 대한 화합물들의 효과를 LSD1 활성 키트를 사용하여 확인했다. 도 2의 D 및 E에서 볼 수 있듯이 파골세포 분화 중(48시간 처리) 단백질 메틸화 수준은 용량 의존적으로 증가했으며, 이는 CD-I-448 및 CD-I-478 처리가 파골세포 분화를 억제하고 LSD1 효소 활성을 감소시켜 파골세포 형성 중 메틸화를 증가시켰음을 확인할 수 있다. 마지막으로, 골 형성 분석도 수행되었으며, 결과는 CD-I-448이 in vitro에서 2μM 처리에서 골 형성에 대한 유의한 억제를 나타내지 않았기 때문에 리드 화합물로 선택될 수 있었다(도 2의 F 및 G). 그러나 고용량(2 μM 이상)으로 처리했을 때 골 형성이 감소했다. 이를 통해 [화학식 1] 화합물이 파골세포 형성을 억제함을 확인하였다.

[0183] 2.2. [화학식 1] 화합물에 해당하는 CD-I-448의 RANKL에 의해 유도된 파골세포 분화, F-액틴 벨트 형성 및 골흡수 억제 효과(in vitro)

[0184] 파골세포 형성에 대한 CD-I-448의 억제 효과를 추가로 조사하기 위해 TRAP 염색(파골세포의 특정 특성) 분석을 채택하여 표시된 농도 범위에서 RANKL에 의해 유도된 파골세포 형성에 대한 CD-I-448의 억제 효과를 확인했다(도 3의 A 내지 D). 도 3에 나타낸 바와 같이, BMDM의 분화는 CD-I-448에 의해 상당히 억제됐다. 또한, 로다민 표지 팔로이딘(rhodamine-labeled phalloidin)은 성숙한 파골세포의 형성된 F-액틴 벨트를 표시하는 데 사용되는데, 도 4에서 볼 수 있듯이 대조군(CTRL) 그룹은 고리가 잘 형성된 반면 CD-I-448은 1μM의 CD-I-448에서 F-액틴 고리 형성을 억제했다. 골 재흡수는 골 재형성 과정에서 파골세포의 중요한 기능이다. 따라서 CD-I-448의 파골세포 골흡수 억제능을 플루오레세인아민 표지 인산칼슘 플레이트(fluoresceinamine-labeled calcium phosphate plate)를 이용하여 골흡수 분석법을 수행했다(in vitro). 도 3의 E 내지 G에 나타낸 바와 같이, M-CSF 및 RANKL로 처리된 그룹(MR 그룹)에서 명백한 골 흡수 구덩이가 나타났다; 흡수 피트 면적은 CD-I-448 처리(1, 2, 4 μM)로 현저하게 감소했다. 또한, 도 3의 F 및 G는 CD-I-448이 용량 의존적 방식으로 형광 강도 및 피트 영역 형성을 감소시켰음을 확인했다(GSK-LSD1(G)는 대조군 억제제로 사용됐다). 또한, CD-I-478은 시험관 내에서 파골세포 골 흡수를 크게 억제했다(도 5). 마지막으로, CD-I-448은 적어도 10 μM 미만의 BMDM의 세포 생존율에 유의한 영향을 미치지 않은 반면, 4 μM에서 처리할 때 다핵 성숙 파골세포의 형성을 완전히 차단했다(도 3의 A 및 B). 이는 CD-I-448이 용량 의존적으로 RANKL 매개 파골세포 형성을 억제함을 나타낸다. 이러한 결과들을 바탕으로 CD-I-448이 파골세포의 형성을 감소시킴으로써 RANKL 매개 파골세포 분화 및 파골세포 관련 골흡수 활성을 유의하게 억제할 수 있음을 확인했다. 즉, [화학식 1] 화합물은 RANKL에 의해 유도된 파골세포 분화, F-액틴 벨트 형성 및 골 흡수를 억제함을 확인하였다.

[0186] 2.3. [화학식 1] 화합물에 해당하는 CD-I-448 처리 후 OVX-유도 파골세포에 의한 골 손실의 억제 효과(In vivo).

[0187] 파골세포 골 흡수 질환에 대한 CD-I-448의 전략 치료를 확인하기 위해 OVX 유도 골다공증 마우스 모델(도 6의 A 및 B)을 확립했다(in vivo). 각 그룹의 마우스 체중을 매주 기록했다(도 6의 C). 대퇴골의 관심 부위에 대한 마이크로 컴퓨터 단층촬영(micro-CT) 분석 결과, OVX 마우스는 섬유주 골량(trabecular bone mass)을 광범위하게 상실한 반면, CD-I-448 처리군에서는 도 6의 A 및 B에서와 같이 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 또한 5 mg/kg 또는 10 mg/kg 처리에서 섬유주 부피, 골 표면 밀도 및 총 골 부피는 OVX 군에 비해 CD-I-448 처리 후 더 강한 회복을 확인했다(도 6의 A 및 B). TRAP 또는 H&E 염색을 사용한 조직학적 분석(도 6의 D 및 E)은 파골세포에 의한 골 손실이 OVX 후 크게 증가한 반면 5mg/kg 또는 10mg/kg 처리 후 감소했음을 보여줬다. 이러한 결과는 GSK-LSD1과 달리 CD-I-448이 생체 내에서 OVX에 의한 골 손실을 방지했음을 확인했다. 즉, [화학식 1] 화합물이 OVX-유도 파골세포에 의한 골 손실을 억제함을 확인하였다.

[0189] **2.4. TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체의 LSD1 탈메틸화 효소 활성감소 효과**

[0190] 현재 데이터로 TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체인 CD-I-448 및 CD-I-478은 LSD1의 탈메틸화를 용량 의존적으로 억제함을 확인했다(in vitro, ex in vivo). 또한 CoREST(RCOR1)은 LSD1이 탈메틸화 활동을 수행하는 데 중요했다. TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체가 FAD 관련 LSD1/CoREST 복합체를 통해 LSD1 탈메틸화 효소 활성을 억제하는지 확인하기 위해, LSD1/CoREST 복합체 단백질을 준비하고(도 7 및 표 2) LSD1/CoREST 복합체를 포함하는 TCP-(MP)-Caffeic acid analogs(CD-I-448 및 CD-I-478)의 SPR 및 DSF 분석을 수행했다(도 8의 A 및 도 9a 내지 e).

표 2

[0192]

데이터값	**LSD1/CoREST/CD-1-478**
공간그룹(Space group)	I222
단위 셀 치수(Unit cell dimensions) a, b, c (Å), α, β, γ (°)	 120.3, 181.3, 235.9 90, 90, 90
파장(Wavelength) (Å)	0.97930
분해능(Resolution) (Å)	50-3.0 (3.05-3.0)
R_{pim} (%)	8.4 (131.9)
$I/\sigma(I)$	3.9 (0.44)
완성도(Completeness) (%)	98.6 (99.2)
중복성(Redundancy)	6.1 (5.0)
정제(Refinement)	
분해능(Resolution) (Å)	50-3.0 (3.07-3.0)
반사 횟수(No. of reflections)	50543
R_{work} / R_{free} (%)	20.3 (41.7) / 22.4 (41.3)
원사 번호(No. atoms) 단백질/비단백질	 6287 / 62
RMSD 결합길이 (Å) / 각도 (°)	 0.003 / 0.593
평균 B-벨류(Average *B*-value) ($Å^2$)	100.4
라마찬드란 플롯(Ramachandran plot) (%) 선호(favored)/허용(allowed)/특이(outliers)	 96.6 / 3.3 / 0.1
(괄호 안의 값은 가장 높은 해상도의 셸(shell)에 대한 값이다. 무작위로 선택된 리플렉션의 4%가 Rfree 값 계산에 사용됐다.)	

[0193] 도 8의 A에 나타낸 바와 같이, 결과는 CD-I-448 및 CD-I-478 모두가 LSD1/CoREST 복합체에 직접적으로 결합함을 확인했다. 또한 CD-I-448이 곧 CD-I-478로 변환되어 기능할 것이라는 사실을 발견했기 때문에(도 10), CD-I-478를 선택하여 LSD1/CoREST를 사용한 등온 열량 적정 분석(ICT) 및 결정 구조 분석을 했다(도 8의 B 내지 E). 20℃에서 50μM LSD1-CoREST와 500μM CD-I-478의 ICT 곡선은 도 8의 B와 같다. 위쪽 패널에는 원시 ITC 데이터가 표시된다. 하단 패널은 LSD1/CoREST에 대한 CD-I-478의 주입에 대해 플롯된 백그라운드에 대해 보정된 주입당 통합 열(실선 원)을 나타낸다. 실선은 화학량론 1.1, 몰 엔탈피 변화(ΔH) -20.44 kJmol-1, 결합 친화도(Kd) 2.331×10^{-7} M을 산출한 단일 부위 독립 결합 모델에 대한 적합도이다(도 8의 B). 결정 구조 분석을 위해, CD-I-478을 함유한 LSD1/CoREST의 복합 결정 구조는 아포-결정(apo-crystals)을 CD-I-478이 보충된 저장 용액에 담가서 결정했다. 밝혀진 구조는 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드의 플라빈 고리(flavin ring of flavin adenine dinucleotide)에 연속적이지만 CD-I-478의 전체 화학물질을 허용하지 않는 부가물을 보여준다(도 8의 C). 대신, 부가물은 CD-I-478의 일부인 페닐 고리보다 약간 더 큰 부분이 될 수 있다. 정제된 구조에서는 전체 화학물질에 대해 여분의 부피가 큰 전자 밀도가 관찰되지 않기 때문에 억제제의 고활성 사이클로프로필 고리가 열려 FAD의 플라빈 고리 원자와 함께 여분의 오원자 고리(five-membered ring)를 형성한 것으로 보인다. 이러한 종류의 플라빈 고리의 N5 원자와의 공유 결합 형성은 여러 LSD1 억제제에서 보고됐다(도 8의 D).

[0195] **2.5. [화학식 1] 화합물에 해당하는 CD-I-448의 파골세포 분화 관련 유전자 및 단백질 발현 억제효과**

[0196] 위의 데이터는 CD-I-448이 파골세포 분화 및 골 흡수를 차단했음을 나타내고, CD-I-448은 LSD1/CoREST 복합체와 상호작용하며 시험관 내에서 LSD1 탈메틸화 활성을 감소시켰음을 나타낸다. 따라서 CD-I-448이 파골세포의 형성과 기능을 억제하는 기작을 이해하기 위해 파골세포의 형성과 분화에 필요한 파골세포 특이 유전자와 단백질의 발현을 분석했다. 도 11의 A 내지 F에 나타낸 바와 같이, M-CSF 및 RANKL(Con)을 사용한 자극은 지시된 파골세포 특이적 유전자(검은색 막대)의 전사를 현저하게 유도한 반면, CD-I-448 처리는 Acp5, Nfatc1, Dc-stamp, Atp6v0d2, Mmp9 및 Ctsk(회색 막대)를 포함하여 RANKL에 의해 유도된 파골세포 형성 관련 유전자의 상대적인 mRNA 발현 수준을 분명히 감소시켰다. RANKL-유도 파골세포 단백질의 웨스턴 블로팅 분석은 NFATc1, c-fos 및 주요 재흡수 프로테아제 CtsK의 단백질 수준이 M-CSF 및 RANKL(Con) 그룹과 비교할 때 CD-I-448과 함께 배양한 후 감소했음을 확인할 수 있었다(도 11의 G). 종합적으로, 이러한 결과는 CD-I-448이 RANKL 매개 파골세포 분화 요청 유전자 및 단백질 발현을 차단함으로써 파골세포 분화를 억제함을 나타낸다.

[0199] **2.6. [화학식 1] 화합물에 해당하는 CD-I-448의 CBL 단백질 안정화 효과.**

[0200] CD-I-448이 파골세포 생성을 억제(in vitro)하고 파골세포 골 손실을 억제(in vivo)함을 확인했다(도 3 및 4). 또한 CD-I-448은 파골세포 형성 동안 탈메틸화 활성을 감소시키기 위해 LSD1/CoREST 복합체를 직접 표적으로 삼았다(도 8, 도 2의 C 및 D). CD-I-448에 의한 LSD1 탈메틸화 활성의 억제가 파골세포 형성을 차단하는 기전을 조사하기 위해 파골세포 요청 유전자 및 단백질의 발현을 분석했다. NFATc1의 mRNA 발현이 CD-I-448 처리 후 4일 동안 약간 감소했음을 발견했다(도 11의 B). 그러나 극적으로 감소된 NFATc1 단백질은 2일과 4일 동안 나타났다(도 11의 G). 이 발견을 통해 CD-I-448이 NFATc1 분해 조절에 관여하는지 분석할 수 있었다. 결과는 CD-I-448 처리 후 NFATc1의 발현이 상당히 감소한 반면, MG132(10uM) 처리 6시간 후 급격히 축적되는 것을 확인했다. 따라서 CD-I-448 처리 유무에 따른 파골세포 형성 과정 중 CBL 단백질의 발현을 분석하였고, 일치하는 CtsK 발현을 통해 CD-I-448 처리 후 파골세포 분화가 억제됨을 확인했다(도 12의 B). RANKL 처리가 CBL 단백질 발현을 크게 유도하는 반면 파골세포 분화 후 단백질 수준이 감소하는 결과를 확인했다. 그러나 CD-I-448 처리 후, 파골세포 분화 후 CBL 단백질의 감소율은 분명히 지연되었는데, 이는 CD-I-448 매개 파골세포형성 억제가 대조군(Con 그룹)과 비교하여 NFATc1 단백질 분해의 증가와 일치하는 CBL 단백질의 지연된 감소로 인한 것일 수 있음을 확인했다.

[0201] CD-I-448 처리 후 파골세포 형성 동안 CBL 단백질의 지연된 감소가 CBL 라이신 메틸화의 증가에 의해 매개되는지 조사하기 위해, 파골세포 형성 동안 단백질의 모든 메틸 라이신을 분석했다. 도 12의 B에 나타낸 바와 같이, 메틸 라이신 수준은 CD-I-448 처리 후에 분명히 증가했다. 한편, p-LSD1 발현은 변화되지 않았으며, 심지어 약간의 증가를 보였다(유의하지는 않았다). TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체 처리에 의한 LSD1 탈메틸화 활성의 억제가 CBL 단백질을 안정화시키기 위해 CBL 단백질 라이신 메틸화를 매개하는지 추가로 확인하기 위해 CO-IP 분석을 수행했다. 도 12의 C에 도시된 바와 같이, 파골세포 형성 과정에서 CD-I-448 처리 후 CBL의 라이신 메틸화는 대조군(Con 그룹)에 비해 TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체 처리 후 증가했으며, 대조군으로 GSK-LSD1을 사용했다(대중적으로 사용되는 LSD1 억제제). 또한, p-LSD1과 CBL 간의 상호 작용이 감소했다(convert CO-IP 분석은 도 13에 표시됨). 또한, CBL과 NFATc1 단백질의 상호작용은 TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체의 처리에 따라 증가했다. 투입된 CBL 단백질과의 관계에서, TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체 처리 후 p-LSD1과 CBL 사이의 상호작용만 방해받았다는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 CD-I-448 처리가 p-LSD1과 CBL 단백질 사이의 상호작용을 방해하여 CBL 단백질의 라이신 메틸화를 증가시켜 CBL 단백질을 안정화시키고, 이후 증가된 CBL 단백질은 NFATc1 단백질의 분해를 증가시켜 파골세포 생성 억제에 기여했음을 의미했다.

[0203] **2.7. [화학식 1] 화합물에 해당하는 CD-I-448의 NFATc1 단백질의 라이신 48 유비퀴틴화 유도 및 이를 통한 파골세포 형성 억제 효과**

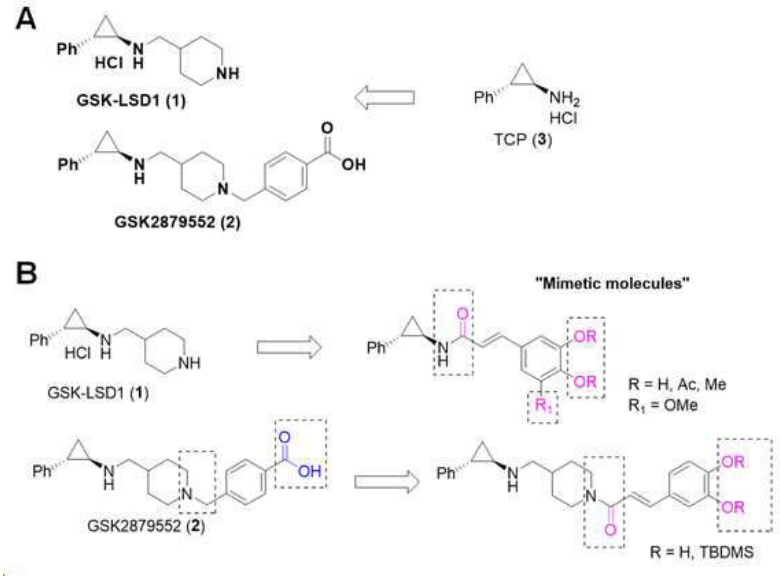
[0204] CBL 단백질은 라이신 48 연결 유비퀴틴화를 통해 단백질 분해를 매개하는 E3 리가아제이다. 따라서 CD-I-448 처리 유무에 따라 NFATc1의 라이신 48 연결 유비퀴틴화 단백질 수준을 분석했다(도 12의 D). GSK-LSD1은 LSD1 억

제를 위한 대조군 억제제로 사용했다.

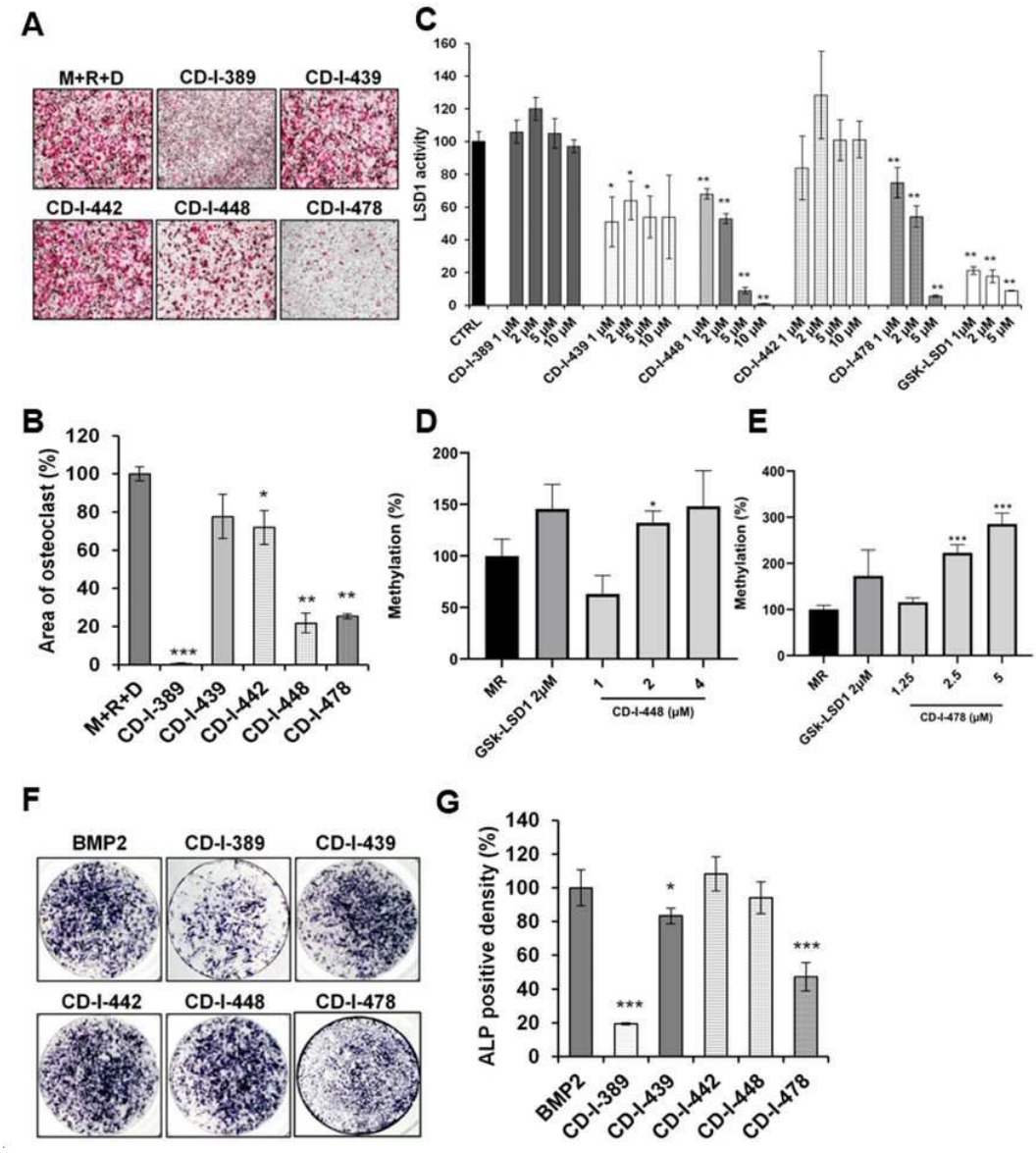
[0205] 그 결과 TCP-(MP)-Caffeic acid 유사체 처리 후 NFATc1의 라이신 48 유비퀴틴화가 대조군(Con 그룹)에 비해 유의미하게 증가했으며, 이를 통해 CD-I-448이 라이신 48 유비퀴틴화를 매개로 NFATc1 단백질의 분해를 증가시킴으로써 RANKL에 의한 파골세포 생성이 억제됨을 확인하였다.

도면

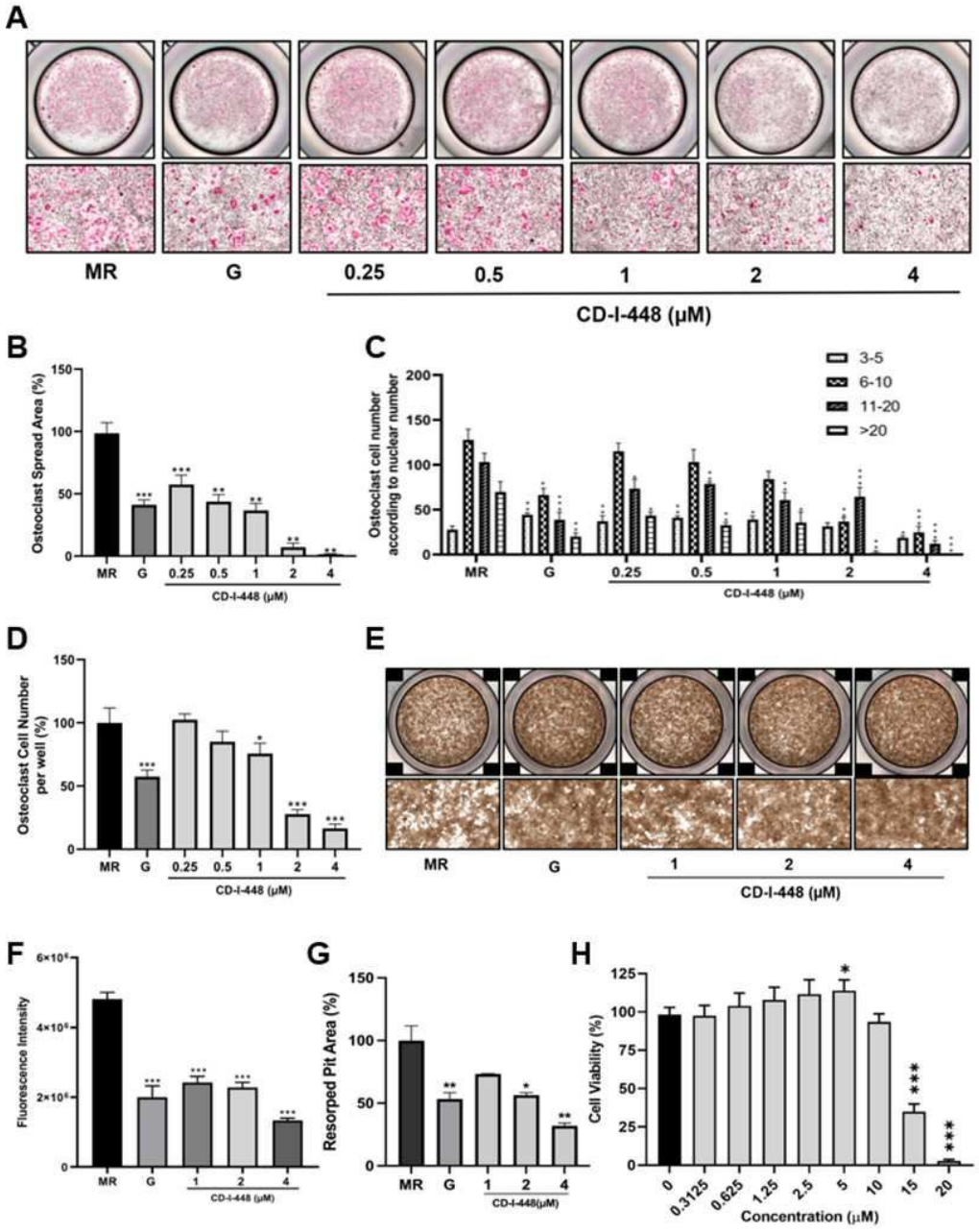
도면1



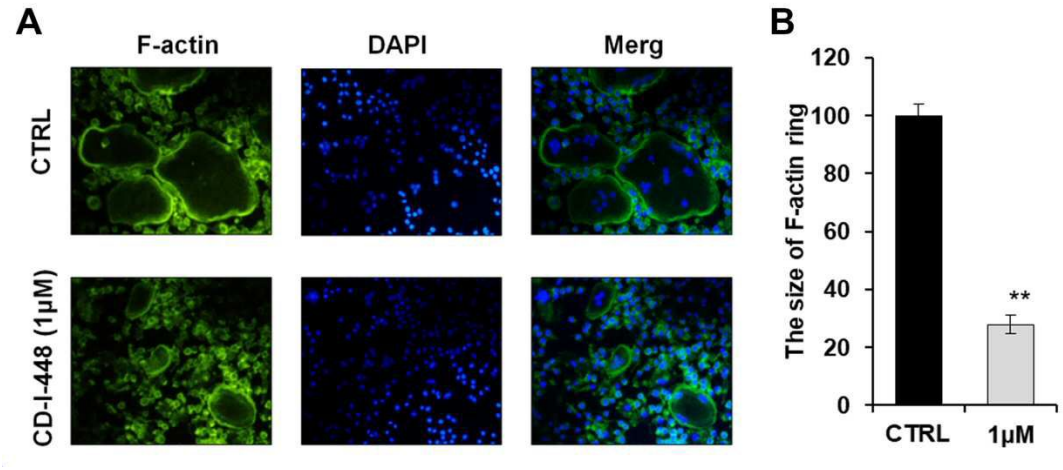
도면2


A
M+R+D
CD-I-389
CD-I-439
CD-I-442
CD-I-448
CD-I-478
C
LSD1 activity
CTRL
CD-I-389 1 μM
2 μM
5 μM
10 μM
CD-I-439 1 μM
CD-I-448 1 μM
CD-I-442 1 μM
CD-I-478 1 μM
GSK-LSD1 1μM
B
Area of osteoclast (%)
D
Methylation (%)
MR
GSk-LSD1 2μM
CD-I-448 (μM)
E
Methylation (%)
1.25
2.5
5
CD-I-478 (μM)
F
BMP2
G
ALP positive density (%)

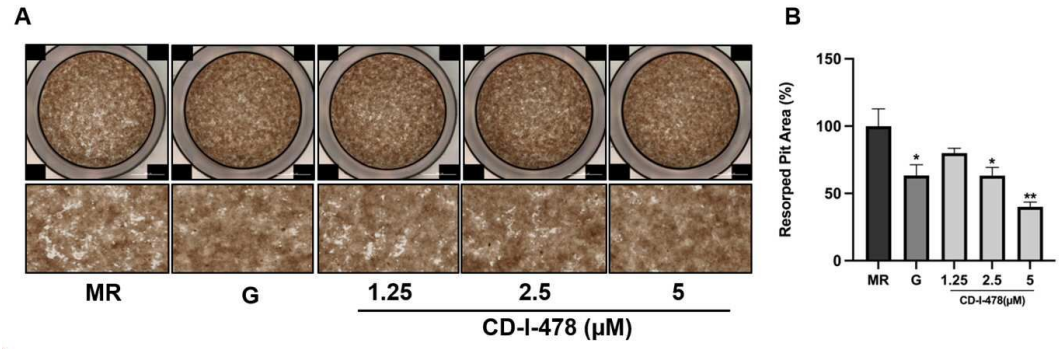
도면3


A
MR
G
0.25
0.5
1
2
4
CD-I-448 (μM)
B
Osteoclast Spread Area (%)
C
Osteoclast cell number according to nuclear number
3-5
6-10
11-20
>20
D
Osteoclast Cell Number per well (%)
E
F
Fluorescence Intensity
G
Resorped Pit Area (%)
CD-I-448(μM)
H
Cell Viability (%)
0
0.3125
0.625
1.25
2.5
5
10
15
20
Concentration (μM)

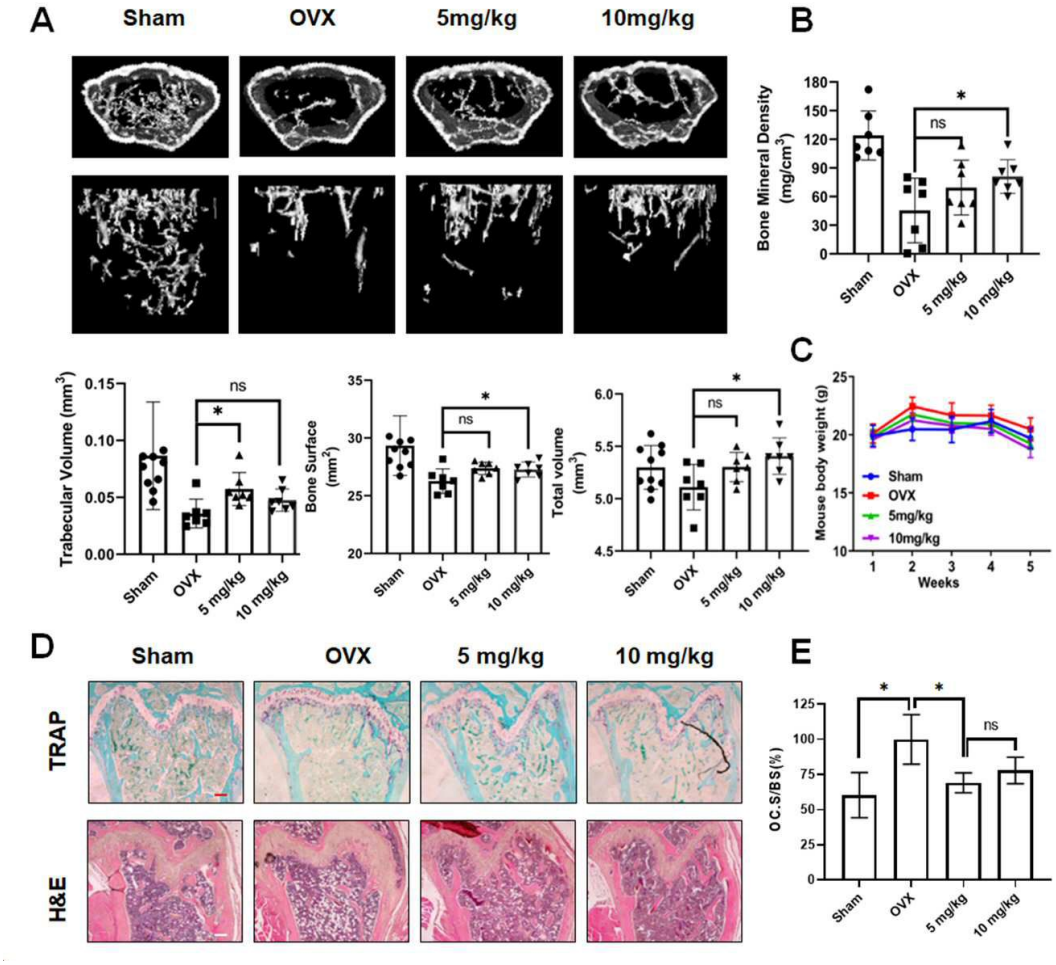
도면4


A
F-actin
DAPI
Merg
CTRL
CD-I-448 (1μM)
B
The size of F-actin ring
120
100
80
60
40
20
0
**
CTRL
1μM

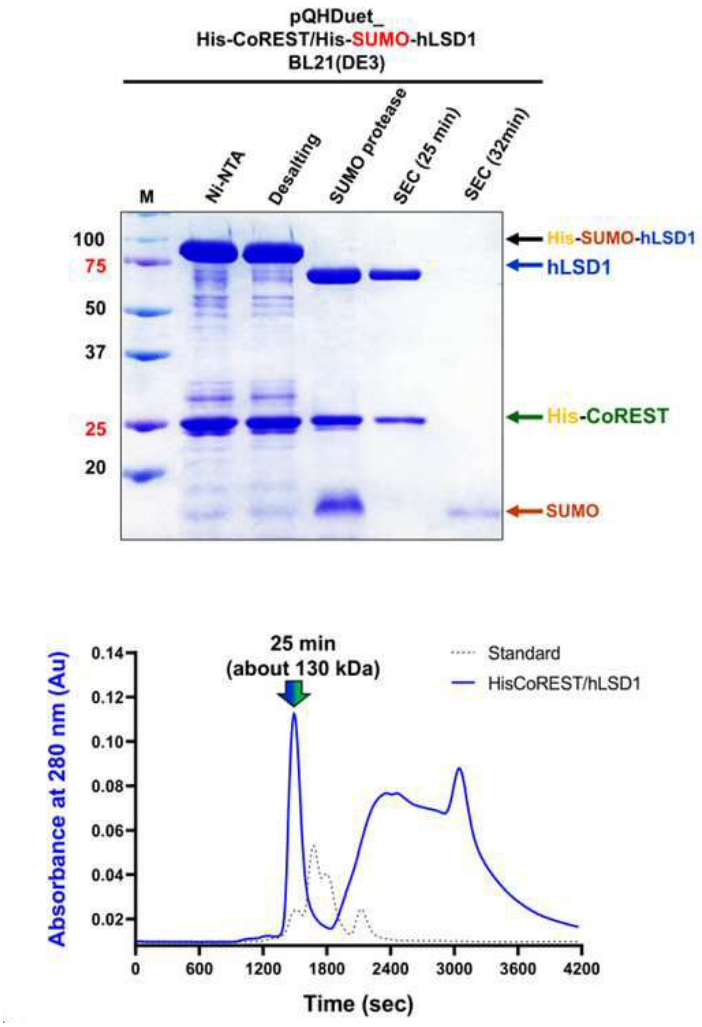
도면5


A
MR
G
1.25
2.5
5
CD-I-478 (μM)
B
Resorped Pit Area (%)
150
100
50
0
*
*
**
MR
G
1.25
2.5
5
CD-I-478(μM)

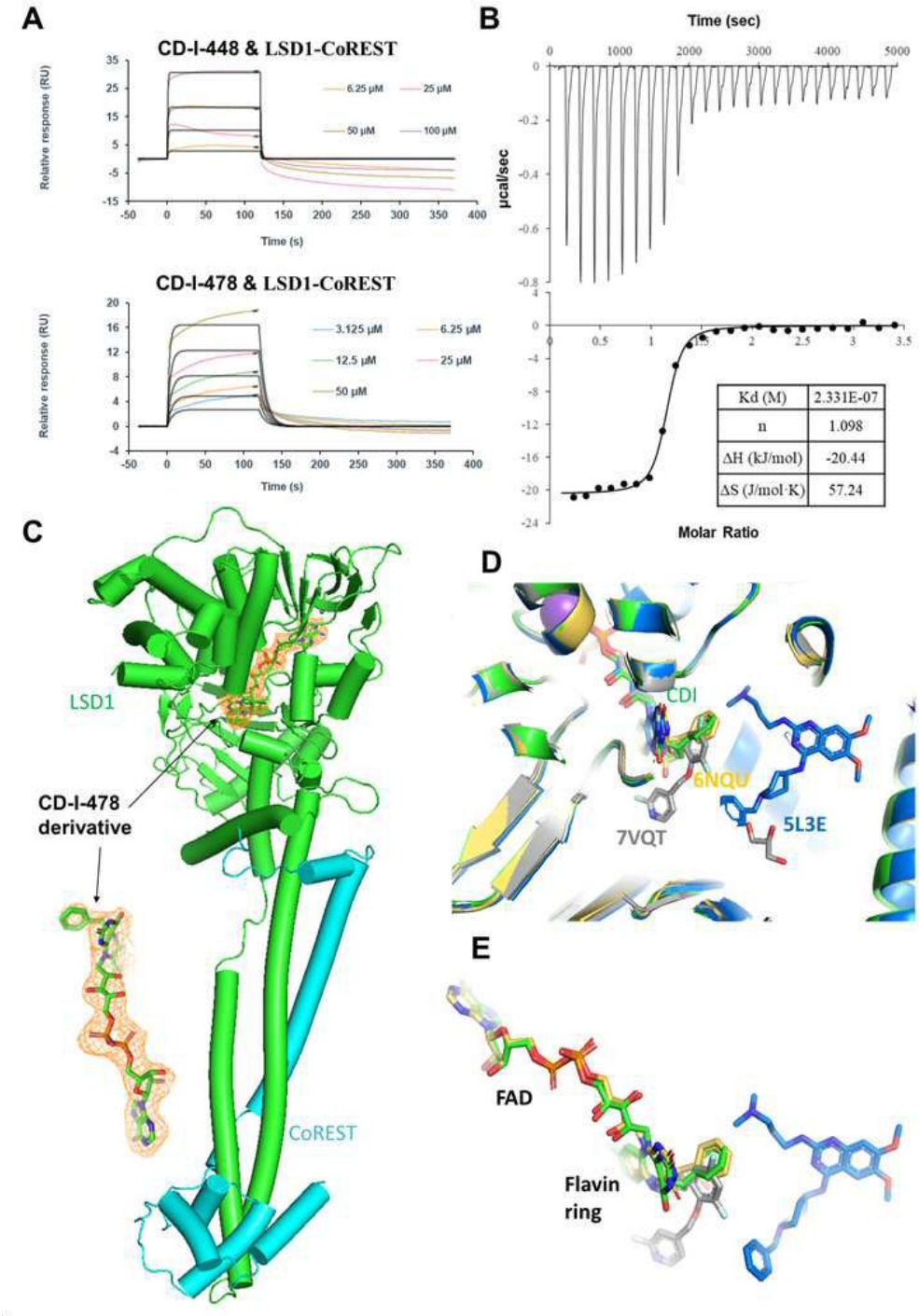
도면6


A
Sham
OVX
5mg/kg
10mg/kg
B
Bone Mineral Density (mg/cm3)
C
Mouse body weight (g)
Weeks
Sham
OVX
5mg/kg
10mg/kg
Trabecular Volume (mm3)
Bone Surface (mm2)
Total volume (mm3)
D
Sham
OVX
5 mg/kg
10 mg/kg
TRAP
H&E
E
OC.S/BS (%)
ns

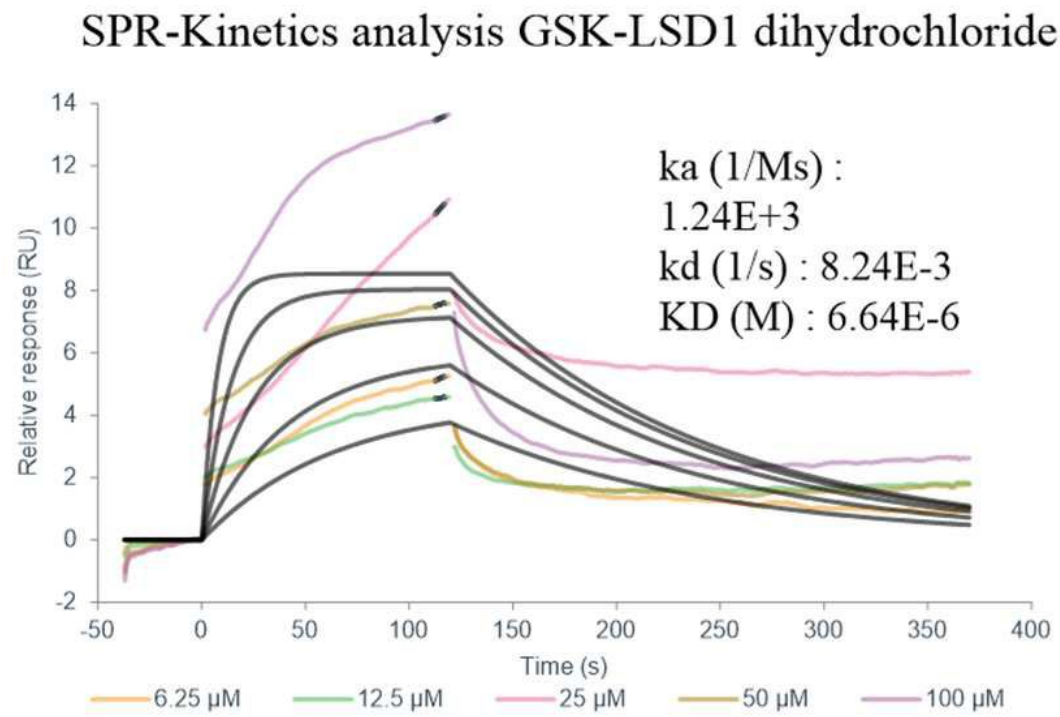
도면7


pQHDuet_
His-CoREST/His-SUMO-hLSD1
BL21(DE3)
M
Ni-NTA
Desalting
SUMO protease
SEC (25 min)
SEC (32min)
100
75
50
37
25
20
His-SUMO-hLSD1
hLSD1
His-CoREST
SUMO
25 min
(about 130 kDa)
Standard
HisCoREST/hLSD1
Absorbance at 280 nm (Au)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0
600
1200
1800
2400
3000
3600
4200
Time (sec)

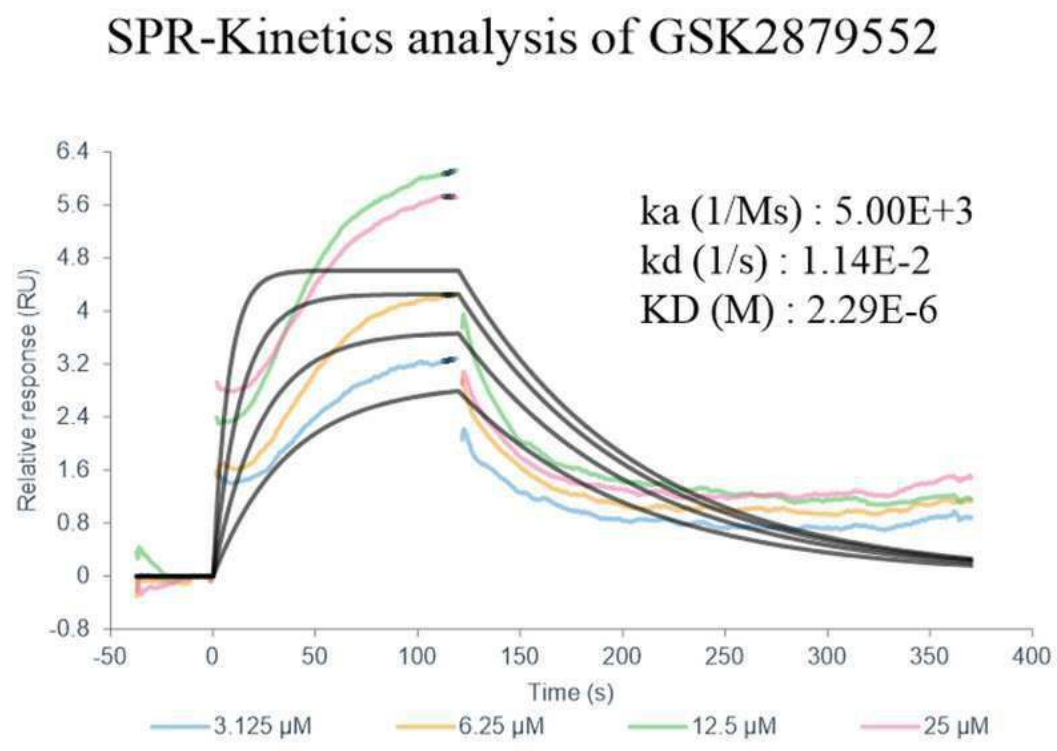
도면8


A
CD-I-448 & LSD1-CoREST
Relative response (RU)
Time (s)
6.25 μM
25 μM
50 μM
100 μM
CD-I-478 & LSD1-CoREST
3.125 μM
6.25 μM
12.5 μM
25 μM
50 μM
B
Time (sec)
μcal/sec
Molar Ratio
Kd (M) 2.331E-07
n 1.098
ΔH (kJ/mol) -20.44
ΔS (J/mol·K) 57.24
C
LSD1
CD-I-478 derivative
CoREST
D
CDI
6NQU
7VQT
5L3E
E
FAD
Flavin ring

도면9a

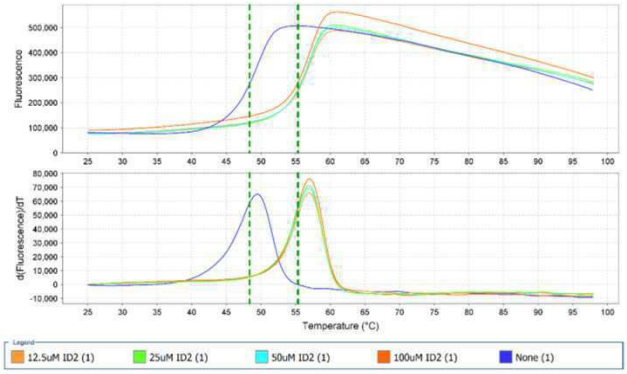

SPR-Kinetics analysis GSK-LSD1 dihydrochloride
ka (1/Ms) : 1.24E+3
kd (1/s) : 8.24E-3
KD (M) : 6.64E-6
Relative response (RU)
Time (s)
6.25 μM
12.5 μM
25 μM
50 μM
100 μM

도면9b


SPR-Kinetics analysis of GSK2879552
ka (1/Ms) : 5.00E+3
kd (1/s) : 1.14E-2
KD (M) : 2.29E-6
Relative response (RU)
Time (s)
3.125 μM
6.25 μM
12.5 μM
25 μM

도면9c

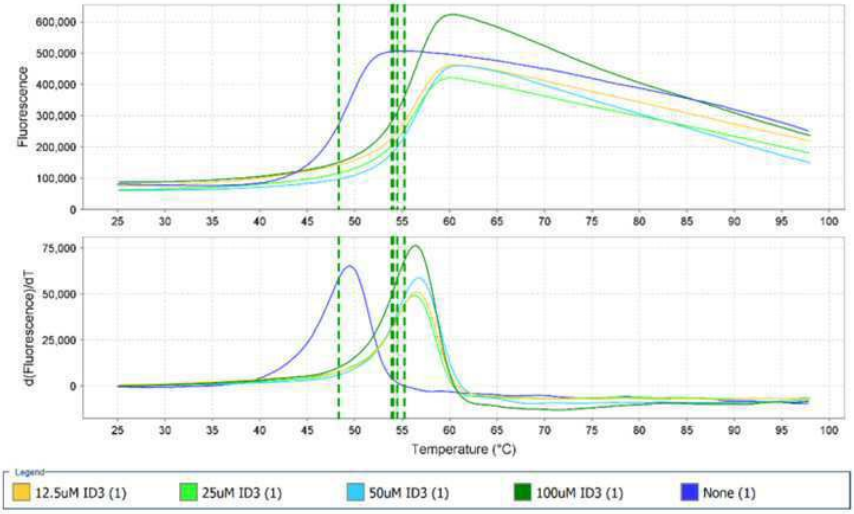
DSF analysis : 5ug LSD1-CoREST, 12.5~100uM compounds



Ligand	Tm B (°C)	Δ Tm B (°C)
-	48.32	-
12.5uM	55.35	7.03
25uM	55.38	7.06
50uM	55.31	6.99
100uM	55.4	7.08

도면9d

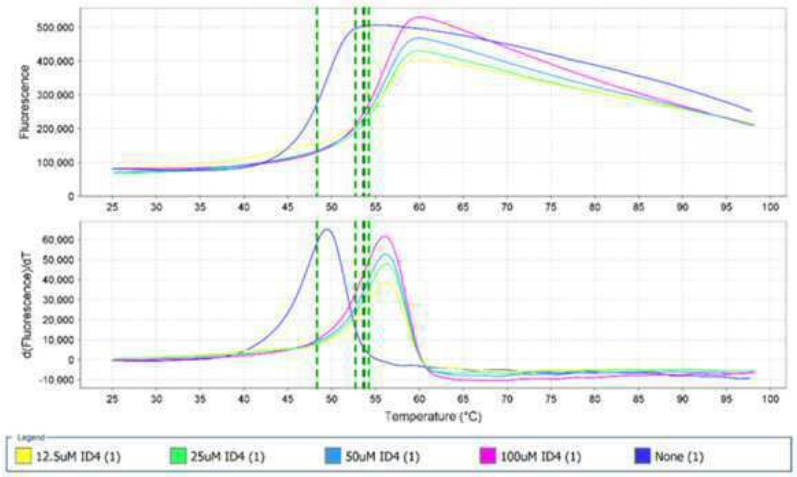
DSF analysis: 5ug LSD1-CoREST, 12.5~100uM compounds



Ligand	Tm B (°C)	Δ Tm B (°C)
-	48.32	-
12.5uM	55.88	7.56
25uM	54.06	5.74
50uM	55.23	6.91
100uM	54.49	6.17

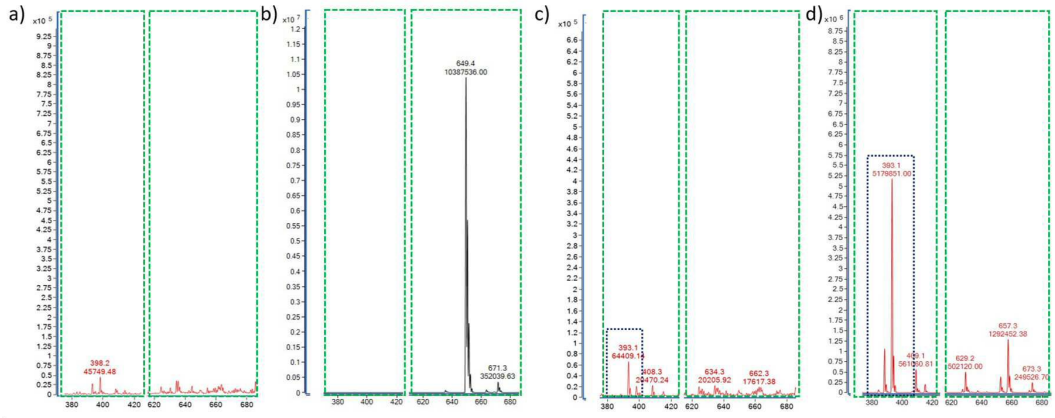
도면9e

DSF analysis: 5ug LSD1-CoREST, 12.5~100uM compounds

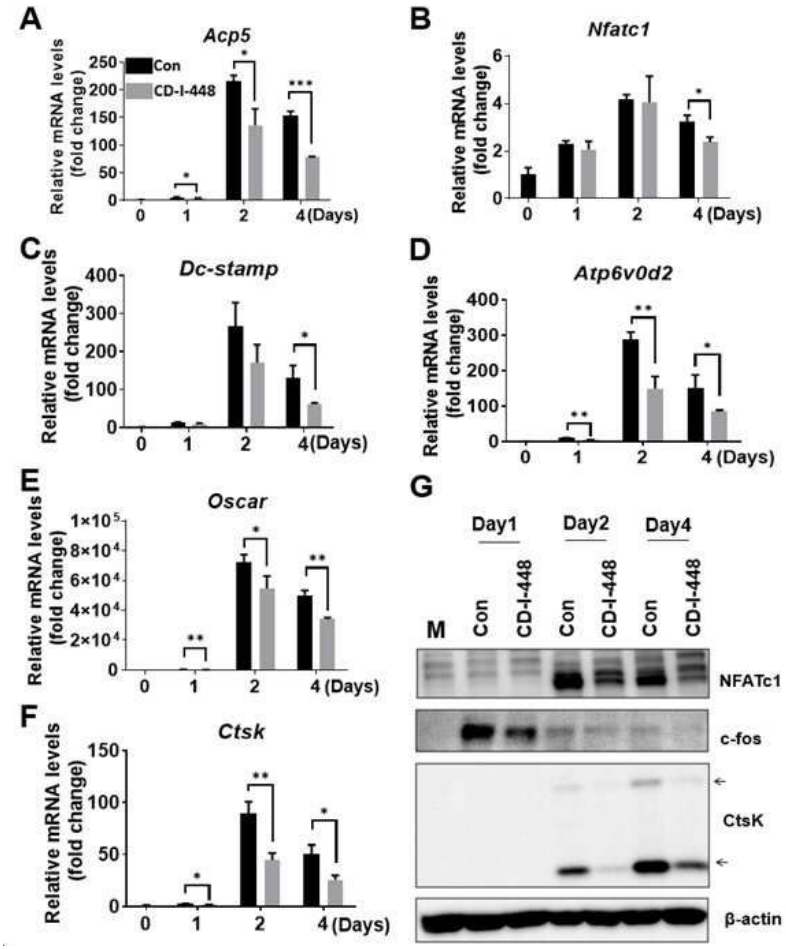


Ligand	Tm B (°C)	Δ Tm B (°C)
-	48.32	-
12.5uM	52.74	4.42
25uM	53.59	5.27
50uM	53.74	5.42
100uM	54.25	5.93

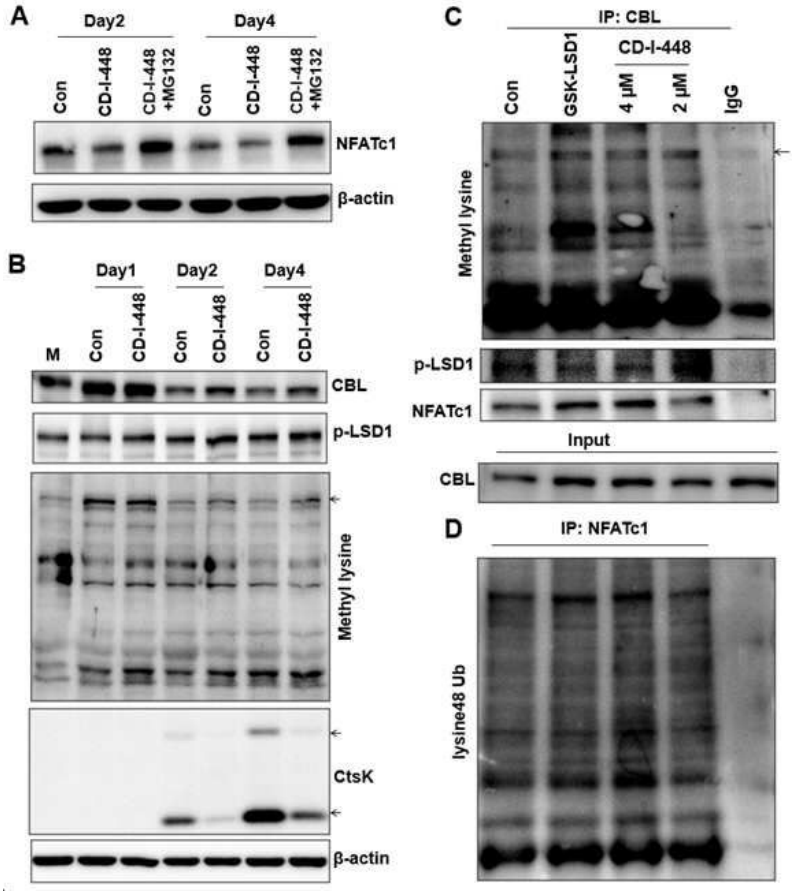
도면10



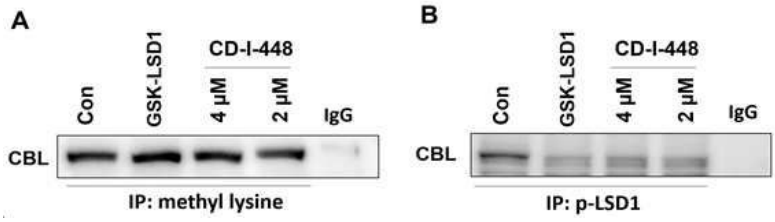
도면11


A
Acp5
Relative mRNA levels (fold change)
Con
CD-I-448
0 1 2 4(Days)
B
Nfatc1
Relative mRNA levels (fold change)
0 1 2 4 (Days)
C
Dc-stamp
Relative mRNA levels (fold change)
0 1 2 4(Days)
D
Atp6v0d2
Relative mRNA levels (fold change)
0 1 2 4 (Days)
E
Oscar
Relative mRNA levels (fold change)
0 1 2 4 (Days)
F
Ctsk
Relative mRNA levels (fold change)
0 1 2 4 (Days)
G
Day1
Day2
Day4
M
Con
CD-I-448
NFATc1
c-fos
CtsK
β-actin

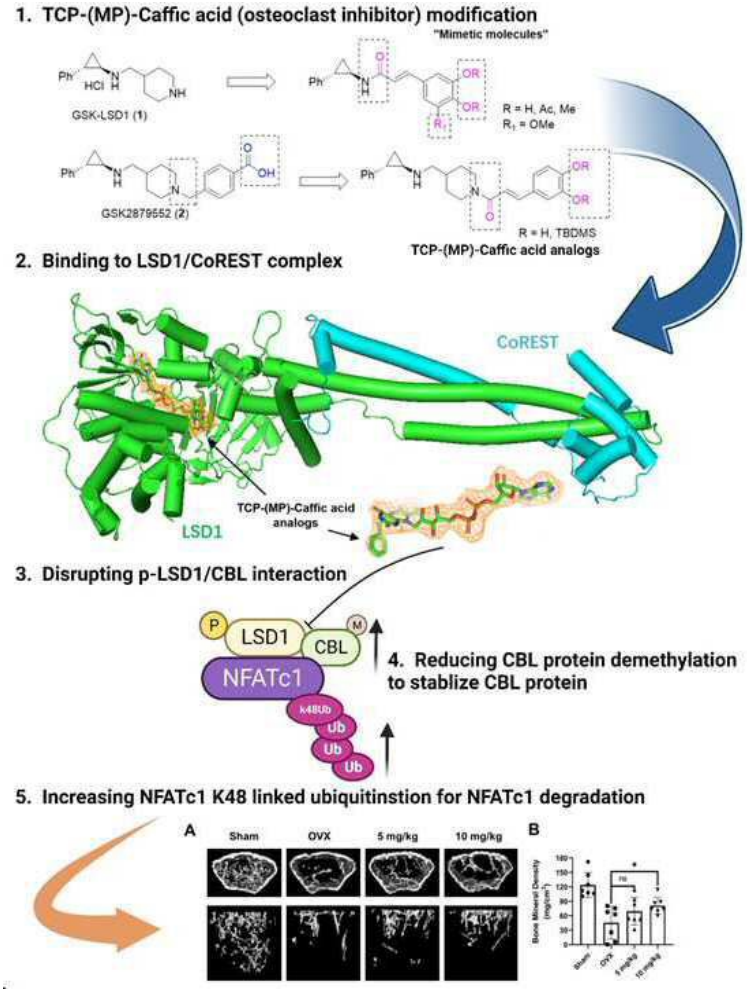
도면12


A
Day2
Day4
Con
CD-I-448
CD-I-448 +MG132
Con
CD-I-448
CD-I-448 +MG132
NFATc1
β-actin
B
Day1
Day2
Day4
M
Con
CD-I-448
Con
CD-I-448
Con
CD-I-448
CBL
p-LSD1
Methyl lysine
CtsK
β-actin
C
IP: CBL
Con
GSK-LSD1
CD-I-448
4 μM
2 μM
IgG
Methyl lysine
p-LSD1
NFATc1
Input
CBL
D
IP: NFATc1
lysine48 Ub

도면13


A
Con
GSK-LSD1
CD-I-448
4 μM
2 μM
IgG
CBL
IP: methyl lysine
B
Con
GSK-LSD1
CD-I-448
4 μM
2 μM
IgG
CBL
IP: p-LSD1

도면14


1. TCP-(MP)-Caffic acid (osteoclast inhibitor) modification
"Mimetic molecules"
GSK-LSD1 (1)
R = H, Ac, Me
R1 = OMe
GSK2879552 (2)
R = H, TBDMS
TCP-(MP)-Caffic acid analogs
2. Binding to LSD1/CoREST complex
CoREST
TCP-(MP)-Caffic acid analogs
LSD1
3. Disrupting p-LSD1/CBL interaction
P
LSD1
CBL
M
NFATc1
k48Ub
Ub
Ub
Ub
4. Reducing CBL protein demethylation to stablize CBL protein
5. Increasing NFATc1 K48 linked ubiquitinstion for NFATc1 degradation
A
Sham
OVX
5 mg/kg
10 mg/kg
B

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.