



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월04일  
(11) 등록번호 10-2776570  
(24) 등록일자 2025년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/542 (2006.01) A61K 31/27 (2006.01)  
A61K 31/445 (2006.01) A61K 31/473 (2006.01)  
A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 31/542 (2013.01)  
A61K 31/27 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7000444

(22) 출원일자(국제) 2016년06월03일

심사청구일자 2021년06월01일

(85) 번역문제출일자 2018년01월05일

(65) 공개번호 10-2018-0014432

(43) 공개일자 2018년02월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/035764

(87) 국제공개번호 WO 2016/200690

국제공개일자 2016년12월15일

(30) 우선권주장  
62/172,690 2015년06월08일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌  
Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism,  
2015, Vol. 35, pp. 1640-1647  
(doi:10.1038/jcbfm.2015.99)\*  
US20120101147 A1  
WO2015081166 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
더 리첸츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아  
미국 캘리포니아 94607-5200 오클랜드 12층 프랭  
클린 스트리트 1111

(72) 발명자  
코트만, 칼  
미국 92705 캘리포니아주 산타아나 폭스 스프링스  
로드 10021

오버맨, 래리  
미국 92625 캘리포니아주 코로나 델 마르 샌드캐  
슬 드라이브 1300

스니그다, 시카  
미국 90802 캘리포니아주 롱 비치 이스트 시사이  
드 웨이 525 #1504

(74) 대리인  
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 10 항

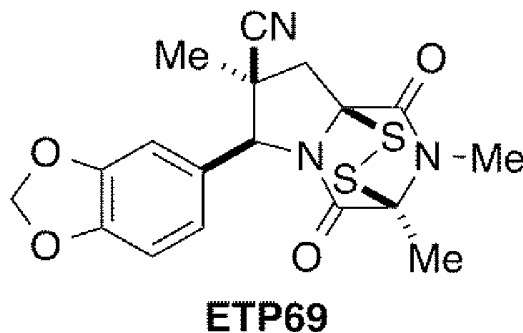
심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 인지 기능을 향상시키기 위한 H3K9me3 조절의 용도

(57) 요약

인지 기능을 향상시키고 불안 관련 장애를 치료하기 위한 H3K9me3 조절의 용도가 제시된다. ETP69의 유사체를 포함하는 치료적 유효량의 SUV39H1 억제제를 포함하는 조성물이 대상체에 투여된다. 치료적 유효량은 노화 및 연령-관련 장애에서 인지 기능장애를 치료하는데 효과적이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 31/445* (2013.01)

*A61K 31/473* (2013.01)

*A61P 25/00* (2018.01)

*A61P 25/28* (2018.01)

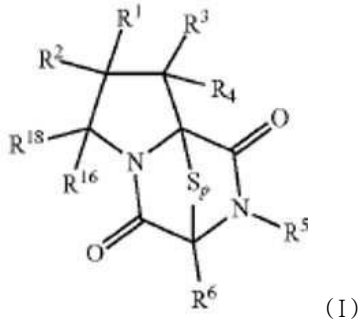
---

명세서

청구범위

청구항 1

인지 손실(cognition loss)을 가진 대상체에서 인지 손실을 역전시키기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 치료적 유효량의 SUV39H1 억제제 화합물을 포함하는 조성물로서, 상기 치료적 유효량이 급성 치료를 위한 단일 투약 및 만성 치료를 위한 반복 투약을 포함하고, 상기 SUV39H1 억제제 화합물이 하기 화학식 (I)의 화합물인 조성물:



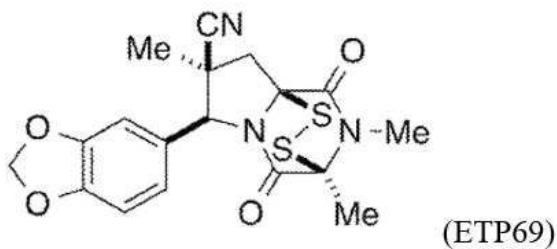
상기 식에서,

p는 2, 3 또는 4이고;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>16</sup>, 및 R<sup>18</sup>은 독립적으로 수소, 할로젠, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -CHO, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SH, -SO<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴이다.

청구항 2

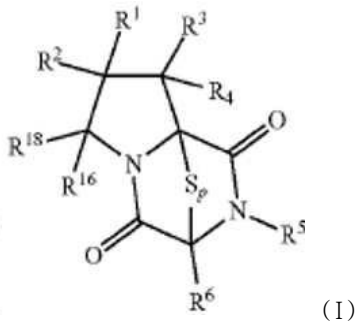
제1항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물이 하기인 조성물:



(Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-2,3,7-트리메틸-1,4-디옥소헥사하이드로-6H-3,8a-에피디티오피롤로[1,2-a]피라진-7-카르보니트릴).

청구항 3

인지 손실을 역전시킬 필요가 있는 환자에서 인지 손실을 역전시키기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 치료적 유효량의 SUV39H1 억제제 화합물을 포함하는 조성물로서, 상기 치료적 유효량의 SUV39H1 억제제 화합물은 약학적 인지 개선제와 함께 투여되고, 상기 치료적 유효량이 급성 치료를 위한 단일 투약 및 만성 치료를 위한 반복 투약을 포함하고, 상기 SUV39H1 억제제 화합물이 하기 화학식 (I)의 화합물이며, 상기 인지 개선제는 타크린, 도네페질, 리바스티그민 및 갈란타민을 포함하는 군으로부터 선택되는, 조성물:



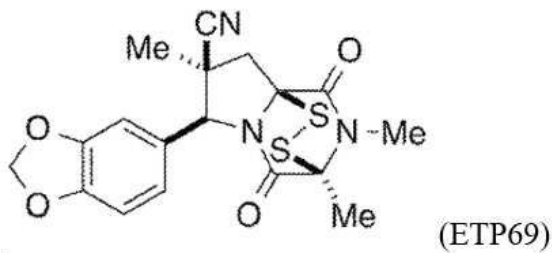
상기 식에서,

p는 2, 3 또는 4이고;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>16</sup>, 및 R<sup>18</sup>은 독립적으로 수소, 할로젠, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -CHO, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SH, -SO<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>4</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴이다.

#### 청구항 4

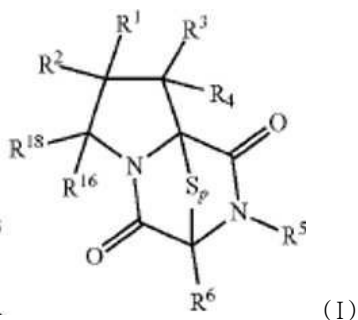
제3항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물이 하기인 조성물:



(Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-2,3,7-트리메틸-1,4-디옥소헥사하이드로-6H-3,8a-에피디티오피롤로[1,2-a]피라진-7-카르보니트릴).

#### 청구항 5

인지 손실을 개선시킬 필요가 있는 환자에서 인지 손실을 개선시키는 방법에 사용하기 위한 조성물로서, 상기 방법이 치료적 유효량의 SUV39H1 억제제 화합물을 생활습관 인지 개선제와 함께 환자에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 SUV39H1 억제제 화합물이 하기 화학식 (I)의 화합물이고, 상기 인지 개선제는 신체적 운동, 정신적 운동, 식이 보충제, 항산화제, 미토콘드리아 기능 개선제, 카페인, 오메가-3 또는 도코사헥사엔산(DHA)인, 조성물:



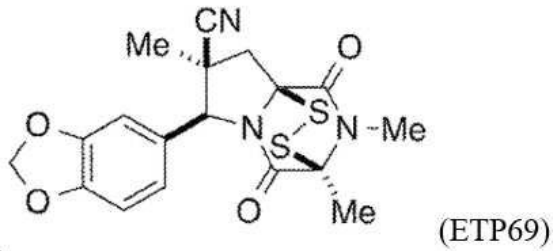
상기 식에서,

p는 2, 3 또는 4이고;

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^{16}$ , 및  $R^{18}$ 은 독립적으로 수소, 할로젠,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-CHO$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2$ ,  $-SO_2Cl$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ , 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴이다.

**청구항 6**

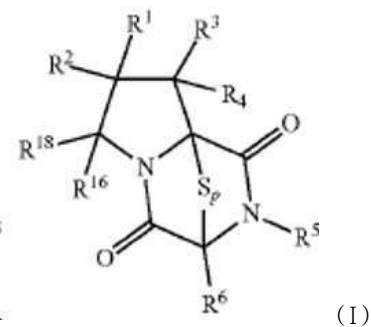
제5항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물이 하기인 조성물:



(Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-2,3,7-트리메틸-1,4-디옥소헥사하이드로-6H-3,8a-에피디티오피롤로[1,2-a]피라진-7-카르보니트릴).

**청구항 7**

인지 손실의 징후가 있는 살아있는 동물 대상체의 인지 기능장애를 치료, 예방 또는 완화시키기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 치료적 유효량의 SUV39H1 억제제 화합물을 포함하는 조성물로서, 상기 SUV39H1 억제제 화합물이 하기 화학식 (I)의 화합물인, 조성물:



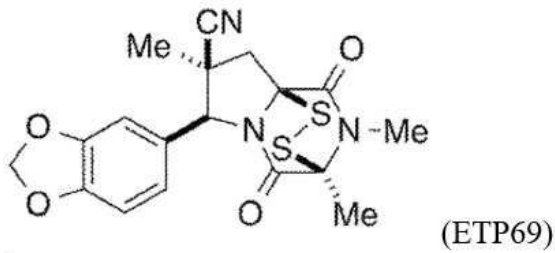
상기 식에서,

p는 2, 3 또는 4이고;

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^{16}$ , 및  $R^{18}$ 은 독립적으로 수소, 할로젠,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-CHO$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2$ ,  $-SO_2Cl$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ , 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴이다.

청구항 8

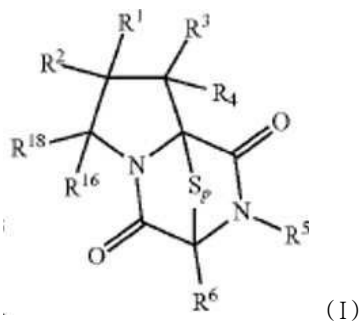
제7항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물이 하기인 조성물:



(Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-2,3,7-트리메틸-1,4-디옥소헥사하이드로-6H-3,8a-에피디티오피롤로[1,2-a]피라진-7-카르보니트릴).

청구항 9

불안 관련 장애가 있는 동물 대상체에서 불안 관련 장애를 치료 및 완화시키기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 치료적 유효량의 SUV39H1 억제제 화합물을 포함하는 조성물로서, 상기 치료적 유효량이 급성 치료를 위한 단일 투약 및 만성 치료를 위한 반복 투약을 포함하고, 상기 SUV39H1 억제제 화합물이 하기 화학식 (I)의 화합물인 조성물:



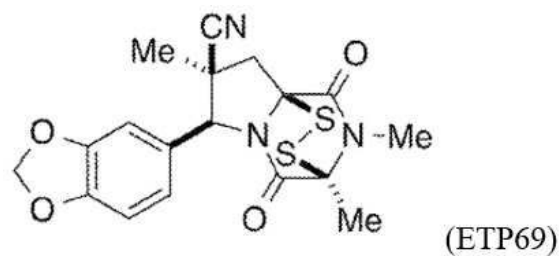
상기 식에서,

p는 2, 3 또는 4이고;

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^{16}$ , 및  $R^{18}$ 은 독립적으로 수소, 할로젠,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-CHO$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2$ ,  $-SO_2Cl$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ , 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴이다.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물이 하기인 조성물:



(Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-2,3,7-트리메틸-1,4-디옥소헥사하이드로-6H-3,8a-에피디티오피롤로[1,2-a]피라진-7-카르보니트릴).

- 청구항 11
- 삭제
- 청구항 12
- 삭제
- 청구항 13
- 삭제
- 청구항 14
- 삭제
- 청구항 15
- 삭제
- 청구항 16
- 삭제
- 청구항 17
- 삭제
- 청구항 18
- 삭제
- 청구항 19
- 삭제
- 청구항 20
- 삭제
- 청구항 21
- 삭제
- 청구항 22
- 삭제
- 청구항 23
- 삭제
- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제

**청구항 27**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원의 전후 참조**

[0002] 본 출원은 설명의 완성을 위해 본원에 참조로서 포함된 2015년 6월 8일 출원된 미국 가특허 출원 일련번호 62/172,690호의 이익을 주장한다.

[0003] **연방 후원된 연구 및 개발 하에 이루어진 발명의 권리에 관한 진술**

[0004] 본 발명은 NIH 국립 노화 연구소가 부여한 보조금 AG012694 및 AG000538 하에서 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

**배경 기술**

[0005] **발명의 배경**

[0006] **발명의 분야**

[0007] 본 발명의 구체에는 노화, 연령-관련 및 뇌 유래된 신경영양 인자(BDNF)-의존성 장애의 인지 기능장애를 치료하는 것에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 ETP69(Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-2,3,7-트리메틸-1,4-디옥소헥사하이드로-6H-3,8a-에피디티오피롤로[1,2-a]피라진-7-카르보니트릴)로서 지칭되는 SUV39H1 억제제의 투여를 통해, 단독으로 또는 다른 인지 개선제와 함께, 인지 기능장애를 치료하는 것에 관한 것이다.

[0008] **관련 기술의 설명**

[0009] 후성 조절곤란은 연령 관련 기억 결핍의 여러 측면에 기여하는 것으로 알려져 있다. 지난 몇 년 동안 많은 연구는 노화에서 히스톤 메틸화 상태의 변화를 확인하였다. 히스톤 테일의 메틸화는 전형적으로 H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 및 H4K20과 같은 특정 리신 잔기에서 일어나며, 이는 전사를 활성화하거나 억제할 수 있다. 특히, H3K9의 트리메틸화(H3K9me3)는 중요한 억제성 히스톤 표시이며, 유전자 침묵에 관여한다. H3K9me3의 확립은 헵동원체(pericentric) 뭉친염색질에서 H3K9 트리메틸화를 조절하는 히스톤 메틸 트랜스퍼라제 SUV39H1의 활성화에 의존한다.

[0010] H3K9 메틸화에서의 변이가 지속적인 혈관 염증, 당뇨병, 및 대사 기억과 같은 여러 연령-관련 변화에 대한 근본적인 후성 메커니즘인 것으로 제안되었지만, 뇌에서 히스톤 리신 메틸화의 조절에 대한 노화의 직접적인 효과는 이전에 연구된 적이 없다. SUV39H1 억제, 및 기억 및 인지 기능에 대한 H3K9me3의 상응하는 하향조절의 효과를 직접적으로 다룬 어떠한 연구도 없었다. 따라서 히스톤 메틸화에 기여하는 효소의 기능을 조절하는 메틸트랜스퍼라제 및 데메틸라제의 소분자 억제제 개발에서의 최근 발전은 연령-관련 결핍을 상쇄시키는 강력한 수단이 될 수 있다.

[0011] 인지 기능장애, 예컨대, 노화와 관련된 인지 결핍, 연령-관련 장애 및 알츠하이머병에 대한 치료제 및 치료 요법을 확인하는 것이 시급하게 요구된다.

**발명의 내용**

[0012] **발명의 간단한 개요**

[0013] 본 발명의 하나 이상의 구체에는 노화의 인지 기능을 향상시키고 연령-관련 장애, 예컨대, 치매 및 뇌 및 신경 기능과 관련된 다른 결함을 치료하기 위한 H3K9me3 조절의 용도에 관한 것이다.

[0014] 최근의 일부 연구로부터 히스톤 메틸트랜스퍼라제 및 데메틸라제는 노화 및 장수와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 메틸트랜스퍼라제는 특정 유전체 유전자자리의 히스톤 메틸화를 촉매화한다. 그럼에도 불구하고, 히스톤 메틸화가 노화의 학습 및 기억에 어떻게 기여하는지는 아직 연구된 적이 없다. H3K9의 트리메틸화(H3K9me3)는 중요한 억제성 히스톤 표시이며, 전형적으로 유전자 침묵에 관여한다. 본 발명의 구체에는 해마의 기억 기능을 매

개함에 있어서 히스톤 H3K9me3 및 이의 히스톤 메틸 트랜스퍼라제(SUV39H1)에 대한 본질적인 역할을 최초로 확인한다. 신규하고 선택적인 억제제를 이용한 SUV39H1의 약리학적 억제는 노화된 동물의 해마에서 H3K9me3의 수준을 감소시키고, 물체 위치 기억 과제, 공포 조절 과제 및 복잡한 공간 환경 학습 과제에서의 성능을 개선시켰다. SUV39H1의 억제는 노화된 동물의 해마에서 썬(thin) 및 스텐비(stubby)의 가시(spine) 밀도의 증가를 유도하였지만 머쉬룸 가시는 증가시키지 않았고 가시 표면에서 장기 증강(LTP)의 핵심 지표인 GluR1-함유 AMPA 수용체 수준을 증가시켰다.

[0015] 또한, 대조군 동물에 비해 약물 처리된 동물의 해마에서 전체 BDNF 단백질 수준과 일치하는, BDNF 유전자 프로모터 영역의 변화가 있었다. BDNF는 뉴로트로핀 패밀리의 핵심 구성원이며, 노화 외에도, 기분 장애, 우울증, 양극성 장애 및 신경정신병적 상태, 예컨대, 정신분열병을 포함하는 광범한 범위의 신경퇴행성 질환에 관여한다. 수상돌기 분지(arborization), 시냅스 공고화(consolidation), 및 TrkB 신호 전달 강화와 같은 다양한 과정을 통해, BDNF는 뇌의 신경세포 조성, 신경세포 건강 및 생존을 제공한다. 여기에 제시된 데이터는 SUV39H1 억제가 뇌에서의 BDNF 조절을 매개함을 보여준다. 따라서, 본 화합물은 BDNF 수준이 정상적인 성능을 유지하기에 부적합한 연령-관련 인지 결핍과 관련된 것들 외에 우울증, 정신분열병, 기분 장애 등을 포함하는 장애에서 유용할 수 있다. 아울러, 이러한 데이터는 SUV39H1 억제 및 수반되는 H3K9me3 하향조절이 해마에서 유전자 전사를 매개하고 해마의 메모리에서 연령-의존성 결핍을 역전시키며, 상기의 것들에 한정되는 것은 아니지만 상기 언급된 바와 같은 다른 BDNF-의존성 장애를 역전시키는데 유용할 수 있음을 입증한다.

[0016] 해마 의존성인 것으로 알려진, 물체 위치 기억(OLM)으로 명명된 공간 기억 과제를 이용하여 노화된 동물에서 H3K9me3 조작의 효과를 평가하였다. 이는 ETP69 처리가 임상-전 대 임상-후 투여 패러다임에서 OLM 과제의 수행 정확도에 차별적으로 영향을 미치는지를 확인하기 위해 수행되었다. OLM 과제에 대한 임상-전 대 임상-후 패러다임은 공간 기억 형성의 두 별개의 구성요소에 대한 시험을 가능하게 한다. 구체적으로, 훈련-전 약물 투여는 기억의 습득 및 회상을 평가하는 한편, 훈련-후 약물 투여는 기억 공고화 및 회상을 목표로 한다. 습득 단계 약 30분 전(임상-전) 또는 습득 직후(임상-후)에 투여된 10mg/kg의 약물의 복강내 주입("i.p.")은 OLM 과제의 성능을 개선시킨 것으로 밝혀졌다.

[0017] 학습 및 기억에 대한 화합물의 효과에 대한 또 다른 시험은 자율적 학습 과제(USL)라고 불리는 과제의 사용을 활용하였다. USL 과제는 마우스가 지정된 시간의 기간 동안 4개-구획 환경을 자유롭게 탐색하도록 하는 거동 패러다임이다. 이 시간 동안 전반적인 활동 및 시험장 탐색의 감소는 학습 및 단기 기억의 척도로 간주된다. 이것이 이 두 그룹에서 유사한 비율로 발생하면, 이는 단기 학습 및 기억에 유의한 차이가 없음을 나타낸다. 본 발명자들은 ETP 69(10mg/kg; i.p.)로 처리된 동물이 처리한지 24시간 후에 습관화/탐색의 현저한 감소(이동한 거리에 의해 측정됨)를 나타내었음을 발견하였다. 일원 ANOVA는 유의한 그룹 차이를 나타내었고( $F_{3,19}=4.05$ ,  $p<0.05$ ) post hoc 검증은 ETP 69 처리된 동물에서 1일 및 2일에 대한 성능 사이의 차이를 확인시켜 주었지만( $p<0.05$ ) 연령 일치 대조군에서는 그렇지 않았다.

[0018] 또 다른 시험에서, 전후관계상 공포 조절 시험 이용시, 본 화합물은 해마 의존성 학습 및 기억을 개선시키는데 효과적이었다. 본 발명자들은 ETP69로 처리된 노화된 동물( $n=7$ /그룹)이 노화된 대조군에 비해 개선된 과제 수행을 나타내었음을 발견하였다( $p\leq 0.01$ ).

[0019] 전체적으로, 이러한 거동 데이터는 ETP69 투여가 일련의 시험을 통해 해마-의존성 학습 및 기억을 개선시킴을 제안한다. 상기 데이터는 또한 기억 및 인지 성능을 측정하는 다른 과제가 또한 ETP69의 투여에 의해 긍정적인 영향을 받을 수 있음을 제안한다.

[0020] OLM, 공포 조절 및 USL이 모두 해마 특이적 과제이기 때문에, 노화된 동물로부터의 해마 조직 샘플에서 약물 처리 후 해마의 H3K9me3의 총 수준을 또한 시험하였다. 이 결과는 약물 처리된 동물의 해마로부터 수득된 히스톤 추출물에서 약물 처리의 유의한 효과를 보여주었다. T-검증 분석은 ETP69로 치료된 동물에서 H3K9me3 수준의 감소를 보여주었다(임상-전,  $p<0.05$ ).

[0021] 본 발명의 구체예는 기억 및 인지 기능을 향상시킴에 있어서 H3K9me3의 역할에 대한 최초 증거를 제공하고 이 히스톤 메틸화 표시가 약리학적 개입에 의해 역전될 수 있음을 보여준다. 이 연구는 또한 히스톤 메틸화를 조절하는 효소를 조작함으로써, 노화 뇌에서 대상체의 염색질 상태를 바꾸고 기억 기능을 복구할 수 있다는 증거를 제공한다. 마지막으로, 이 화합물은 단독으로 또는 다양한 생활습관 또는 약리학적 개입과 함께 사용되어 인지 성능을 향상시킬 수 있다. 인지 기능은 서브도메인으로 세분될 수 있고 기억(작업 및 일화 기억 포함), 학습, 집행 기능, 주의력, 처리 속도, 및 전반적인 인지 기능, 예컨대, 일상 생활의 활동 등과 같은 서브도메인을 포

함할 수 있다. 조합 개입을 이용한 접근법은 단독의 개입을 증가하여 인지능을 향상시킬 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

**도면의 간단한 설명**

본 발명의 상기 및 다른 양태, 특징, 및 이점은 하기의 도면들과 함께 제시되는 이하의 더욱 상세한 설명으로부터 더욱 명백해질 것이다:

**도 1**은 ETP69(Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-2,3,7-트리메틸-1,4-디옥소헥사하이드로-6H-3,8a-에피디티오피롤로[1,2-a]피라진-7-카르보니트릴)의 구조를 예시한다.

**도 2**는 마우스에서 신규한 장소 위치 과제의 습득 단계 30분 전에 투여된 10mg/kg 및 20mg/kg(i.p.)의 약물 효과를 나타내는 그래프이다.

**도 3**은 비히클, 또는 10 mg/kg의 ETP69로 처리된 마우스 사이의 탐색의 차이를 보여주는 OLM 시험 결과를 그래프로 표현한 것이다.

**도 4A-B**는 노화된 마우스에서 신규한 물체 위치 과제의 습득 단계 30분 전(임상-전) 또는 습득 직후(임상-후)에 투여된 10mg/kg(i.p.)의 약물의 효과를 그래프로 예시한 것이다.

**도 5A-B**는 어린 마우스에서 신규한 물체 위치 과제의 습득 단계 30분 전(임상-전) 또는 습득 직후(임상-후)에 투여된 10mg/kg(i.p.)의 약물의 효과를 그래프로 예시한 것이다.

**도 6A**는 자율적 학습 과제에서 ETP69의 효과를 그래프로 표현한 것이다.

**도 6B**는 자율적 학습 과제에서 ETP69의 효과를 그래프로 표현한 것이다.

**도 7**은 공포 조절 과제에서 ETP69의 효과를 그래프로 표현한 것이다.

**도 8A**는 어린 vs 노화된 마우스에서 해마 추출물 중 H3K9의 트리메틸화 수준을 그래프로 예시한 것이다.

**도 8B**는 어린 vs 노화된 마우스의 소뇌 추출물 중 H3K9의 트리메틸화 수준을 그래프로 예시한 것이다, n=3/그룹, p<0.05.

**도 8C**는 약물 투여 24시간 후 10mg/kg의 약물(i.p.) 또는 비히클을 수용한 노화된 마우스에서 H3K9의 트리메틸화 수준을 그래프로 표현한 것이다, n=7/그룹, \*p<0.05.

**도 9A-C**는 해마의 CA1 영역에서 가시 수(썬, 머쉬룸 및 스테르비)에 대한 ETP69 처리의 효과를 그래프로 예시한 것이다 \*p<0.05, 연령-일치 대조군에 비해 유의한 차이(스튜던트 t 검증). \*\*p<0.01, 연령-일치 대조군에 비해 유의한 차이(스튜던트 t 검증).

**도 10**는 해마의 CA1에서 가시에 대한 ETP69의 효과를 보여주는 대표적인 이미지를 나타낸다.

**도 11 (A)** 크기-관문 시냅토포솜을 보여주는 대표적인 밀도 플롯; **(B)** ETP69 처리 후 시냅토포솜의 PSD-95 양성 시브집단의 증가를 보여주는 대표적인 히스토그램; **(C)** 노화된 마우스에서 수득된 시냅토포솜에서 ETP 69 처리 후 PSD-95 양성 사건 증가; **(D)** 크기-관문 시냅토포솜에서 표면 GluR1 및 PSD-95 발현을 보여주는 대표적인 밀도 플롯; **(E)** 노화된 마우스로부터 수득된 시냅토포솜에서 ETP 69 처리 후 GluR1 및 PSD-95 이중-양성 사건(우측-상부 사분면) 증가(p=0.05 vs. 노화된 대조군 마우스); **(F)** 크기-관문 시냅토포솜에서 pAkt 및 PSD-95를 보여주는 대표적인 밀도 플롯. ETP69 처리 후 pAkt 및 PSD-95 이중-양성 사건(우측-상부 사분면) 증가; **(G)** 노화된 마우스로부터 수득된 시냅토포솜에서 ETP 69 처리 후 pAkt 및 PSD-95 이중-양성 사건 증가(p<0.05 vs. 노화된 대조군 마우스).

**도 12A**는 OLM 과제의 습득 단계 30분 전 또는 직후에 10mg/kg의 약물을 수용한(i.p.) 그룹의 BDNF 단백질 수준이 대조군에 비해 해마에서 증가함을 보여주는 그래프를 예시한다. p<0.01, 대조군에 비해 유의한 차이.

**도 12B**는 BDNF의 엑손 1에서의 H3K9me3 수준이 대조군에 비해 ETP69 처리된 동물에서 현저하게 낮았음을 보여주는 그래프를 표시한다(p=0.056). 대조군의 경우 n=7 및 ETP 69 처리된 동물의 경우 n=9.

**도 13**은 산소-글루코스 박탈(OGD) 후 신경세포 생존에 대한 ETP69의 효과를 그래프로 예시한 것이다.

**도 14A-B**는 14DIV 해마 신경세포에서 H3K9me3 수준에 대한 ETP69 효과의 예시이다(A, 젤 이미지; B, 정량,

n=3, \*, p<0.05).

**도 15A**는 ETP69 처리(20 nM, 24시간)가 PSD-95 면역반응성 14 DIV 해마 신경세포를 증가시켰음을 보여주는 이미지이다.

**도 15B**는 ETP69 처리(20 nM, 24시간)가 수상돌기 F-액틴 염색(수상돌기 가시의 마커)을 증가시켰음을 보여주는 이미지이다.

**도 16**은 ETP69가 웨스턴 블롯팅에 의해 측정되는 Ser133에서의 CREB 포스포틸화를 증가시켰음을 예시하는 이미지이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**[0023] 상세한 설명**

**[0024]** 인지 기능을 향상시키기 위해 H3K9me3 조절의 사용을 포함하는 본 발명이 이제 개시될 것이다. 이하의 예시적인 설명에서, 본 발명의 구체예에 대한 보다 완전한 이해를 제공하기 위해 수많은 특정 세부사항이 제시된다. 그러나, 본 발명이 본원에 설명된 특정 세부사항의 모든 양태를 포함하지 않고 실시될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 단계 또는 공정이 하나 이상의 시스템 및 방법의 이해를 제공하기 위해 예시적인 순서로 설명되지만, 예시적인 순서로 제한하려는 것이 아니다. 당업자는 단계들 또는 공정들이 상이한 순서로 수행될 수 있고, 하나 이상의 단계들 또는 공정들이 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으며 동시에 또는 다수의 공정 흐름으로 수행될 수 있음을 인지할 것이다. 다른 예에서, 당업자에게 잘 알려진 특수한 특징, 양, 또는 측정 은 본 발명을 모호하게 하지 않기 위해 상세하게 설명되지 않았다. 구독자는 본 발명의 실시예들이 본원에 기술되지만, 청구 범위, 및 임의의 등가물의 전체 범위가 본 발명의 범위 및 경계를 정의하는 것임에 유의해야 한다.

**[0025]** 기재된 구체예, 이의 운용 이점, 및 이의 이용에 의해 달성되는 특정 목적을 더 잘 이해하기 위해, 예시적인 기재된 구체예가 설명되어 있는 첨부된 도면 및 설명을 참조해야 한다. 기재된 구체예는 본원에 설명된 특정 형태로 제한하려는 의도가 아니다. 상황에 따라 방식이 제안되거나 적절해질 수 있으므로 등가물의 다양한 생략 및 치환이 고려되나, 이들은 적용 또는 구현을 망라하기 위한 것임이 이해된다.

**[0026]** 본원에서 용어 "제1", "제2" 등은 임의의 순서, 양 또는 중요성을 나타내지 않고, 오히려 한 요소를 다른 요소와 구별하기 위해 사용된 것이고, 본원에서 단수를 나타내는 용어는 양의 제한을 나타내지 않고, 오히려 언급된 항목 중 적어도 하나의 존재를 나타낸다.

**[0027]** 본원에서 사용된 용어 "투여량 단위"는 동물에 대한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 나타내며, 각 단위는 담체 또는 비히클과 같은 요구되는 희석제와 함께 요망되는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정 양의 활성 물질을 함유한다. 본 발명의 단위 용량에 대한 명세는 (a) 활성 물질의 고유한 특성 및 (b) 동물에서 치료용으로 그러한 활성 물질을 배합하는 분야에 고유한 한계에 의해 결정되고 이에 직접적으로 의존적이다.

**[0028]** 본원에서 사용된 용어 "치료적 유효량"은 투여된 조성물에 함유된 본 발명의 SUV39H1 억제제 화합물의 양이 의도된 목적을 달성하기에, 예컨대, 이 경우에, 노화, 알츠하이머병, 및 다른 BDNF 의존성 장애와 연관된 인지 결핍을 개선시키는데 충분한 양임을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해, 연령 관련된 인지 결핍의 치료는 히스톤 메틸화 표시의 역전 또는 제거에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 히스톤 메틸화에 기여하는 효소의 기능을 효과적으로 조절함으로써, 연령-관련 인지 결핍이 역전될 수 있다.

**[0029]** 이에 따라, 환자에서 회상의 증가를 결정함으로써, 본 발명의 화합물의 양이 치료적으로 유효한지를 용이하게 결정할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 화합물 ETP69의 치료적 유효량은, 예를 들어, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg 및 다른 적합한 값일 수 있다.

**[0030]** 본 발명의 하나 이상의 구체예는 히스톤 메틸 트랜스퍼라제 SUV39H1의 생체내 억제 및 노화 뇌에서 결과적인 히스톤 H3K9의 트리메틸화(H3K9me3)의 하향 조절을 이용하여 노화, 알츠하이머병, 및 다른 BDNF 의존성 장애와 연관된 인지 결핍을 효과적으로 개선시키는 방법을 제공한다. H3K9me3은 중요한 억제성 히스톤 표시이며, 유전자 침묵에 관여한다. H3K9me3의 확립은 험동원체 문헌염색질에서 H3K9 트리메틸화를 조절하는 히스톤 메틸 트랜스퍼라제 SUV39H1의 활성에 의존한다. 따라서, 히스톤 메틸화에 기여하는 효소의 기능을 조절하는 것은 연령-관련 결핍을 상쇄시키는 강력한 수단이 될 수 있다. 노화, BDNF 조절곤란, 및 다른 연령 관련된 장애와 관련된 인지 결핍은 감각 정보, 주의력, 기억의 습득 및 공고화, 정보의 회상, 및 집행 기능, 예컨대, 계획, 문제 해결, 억

제 제어, 자기-점검 및 그 중에서도 전반적인 기능과 관련될 인지의 다른 측면을 처리함에 있어서의 결핍을 포함한다.

[0031] 본 발명의 하나 이상의 구체예에 따르면, 도 1에 예시된, ETP69라 불리는 새로 개발된 에피디티오디케토피페라진 알칼로이드 케토신(chaetocin) A의 유사체를 이용한 노화의 동물 모델에서 학습 및 기억에서의 H3K9me3의 역할이 연구된다. 이 화합물, 즉, 히스톤 메틸트랜스퍼라제 SUV39H1의 선택적인 억제제인 ETP69는 SUV39H1의 최초 보고된 억제제인 케토신 A보다 17개의 인간 히스톤 메틸트랜스퍼라제의 패널에 대해 현저하게 더 큰 선택성을 보여준다. 또한, ETP69는 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 p300 및 DNA 메틸트랜스퍼라제 DNMT1에 대해 억제 활성을 나타내지 않는다.

[0032] 해마는 포유동물의 기억에 매우 중요하며 노화 뇌에서는 손상되는 것으로 알려져 있다. 데이터는 해마 손상이 공간 기억에서 심각한 결핍을 발생시킴을 분명히 보여준다. 이러한 결과는 공간 기억이 해마 기능과 관련하여 특이한 상태를 지님을 의미할 수 있다고 또한 제안되어 왔다. 따라서 본 발명에 대한 연구는 노화된 동물에서 H3K9me3 조작의 효과를 평가하기 위해 공간 기억 과제를 이용하였다. 또한, 상기 연구는 자율적 학습 과제라고 불리는 자발적 활동 과제를 사용하여 이러한 결과를 확장하고 확인한다. 이 과제는 해마-의존성 학습을 측정하며, 해마의 시냅스 변화와 높은 상관 관계가 있는 것으로 알려져 있고, 연령 관련된 결핍에 영향을 받기 쉽다. 또한, 화합물의 효능을 측정하기 위해 사용된 또 다른 시험은 공포 조절 과제이다. 이 과제는 혐오 자극(예컨대, 전기 쇼크)을 특정 중립 상황(예컨대, 방)과 관련시켜 원래의 중립적 자극 또는 상황에 대한 공포 반응을 나타내는 학습 및 기억의 형성을 측정한다. 또한 학습 및 기억을 탐구하는 그러한 다른 과제도 약물로부터 이익을 얻을 것으로 기대된다.

[0033] 그 후 H3K9me3 억제에 의한 기억 개선의 근원이 되는 다운스트림 세포/분자 사건을 확인하기 위해, 상기 연구는 골지 염색 및 유동 시냅스측정법(flow synaptometry)을 이용하여 해마 가지 형성에 대한 ETP69의 효과를 평가하였다. 활성-의존성 가지 재구축에 대한 BDNF의 필수적인 역할, 시냅스에서 Akt 활성화 - BDNF 하향조절 이펙터-와 함께, 해마에서 *bdnf* 엑손의 H3K9 트리메틸화 및 단백질 수준에 대한 ETP69의 효과에 대한 연구에 따라, 데이터는 기억 기능에서 H3K9me3의 신규한 역할을 드러내고 해마 의존성 기억 및 학습에서 특수한 역할을 제안한다.

[0034] **물질 및 방법**

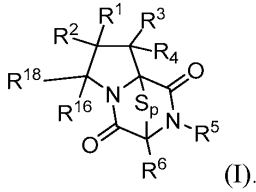
[0035] **동물:**

[0036] 노화되거나(18-20개월령, n=34) 어린(3-4개월령, n=18) C57Bl/6J 수컷 마우스를 원하는 대로 사료 및 물을 주며 그룹으로 수용하고, 실험 절차 전 1주일 동안 사육장에 순응시켰다. 빛은 12:12 명/암 주기로 유지되었고, 모든 거동 시험은 사이클의 명 주기 동안 수행되었다.

[0037] **화합물:**

[0038] 케토신 A와 같은 에피디티오디케토피페라진 알칼로이드의 라세미 유사체인 ETP69(Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-2,3,7-트리메틸-1,4-디옥소헥사하이드로-6H-3,8a-에피디티오피롤로[1,2-a]피라진-7-카르보닐)을 문헌[Overman LE, Baumann M, S., Nam D, Horne R, Jove LJ, Xie C, Kwolik (2014) "Preparation of Epipolythiodioxopiperazine ETP Derivatives for Treatment of Cancer," PCT Int., vol. 2014066435, (Int, P., ed), USA [now also published in: M. Baumann, A. P. Dieskau, B. M. Loertscher, M. C. Walton, S. Nam, J. Xie, D. Horne, and Larry E. Overman "Tricyclic Analogues of Epidithiodioxopiperazine Alkaloids with Promising *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activity," *Chemical Science*, 2015, 6, DOI: 10.1039/C5SC01536G, 전문이 본원에 참조로서 포함됨]에 기재된 대로 제조하고, 메탄올로부터 재결정화시켰다. 또한 전문이 본원에 참조로서 포함되는 Overman 등에 의한 PCT 특허 출원 PCT/US2013/066252호, 명칭 "ETP Derivatives"도 참조하라. 화합물을 50% DMSO 기반 염수 용액의 혼합물에 용해시켰다. 대조군 대상체는 DMSO 기반 염수 용액을 투여받았다.

[0039] ETP69의 유사체는 하기 화학식을 갖는 화합물을 포함할 것이다:



[0040]

[0041]

부호 p는 2, 3 또는 4이다. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>16</sup>, 및 R<sup>18</sup>은 독립적으로 수소, 할로젠, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -CI<sub>3</sub>, -CN, -CHO, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SH, -SO<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>4</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클로알킬, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 또는 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴이다.

[0042]

시험:

[0043]

**물체 위치 기억(OLM):** 훈련 및 시험 절차는 표준 OLM 프로토콜을 이용하여 수행되었다. 간단히 말해, 22마리의 노화된 마우스와 18마리의 어린 마우스를 하루에 약 2-3분 동안 5일 동안 처리한 다음, 훈련 전 연속 5일 동안 하루에 5분 동안 실험 장치(30 × 23 × 21.5 cm로 측정되는 백색 직사각형 오픈 필드)에 습관화시켰다.

[0044]

**OLM에서의 용량 반응:** 시험 당일에 마우스에 3분의 습관화(빈 시험장에서)를 제공한 다음 ETP69(10mg/kg(n=8) 또는 20mg/kg(n=7)) 또는 비히클(n=7)을 i.p. 주입하였다. 이어서 약물 또는 비히클의 i.p. 주입 30분 후에 마우스에 3분 습득 임상을 제공하였고(서로 마주 보는 경기장에 2개의 유사한 물체가 놓여 있음) 모든 동물은 그 후 24시간의 임상-간 간격 동안 그들의 우리로 돌려 보냈다. 24시간 후에, 3분의 유지 검사(retention test)를 실시하였는데, 여기서 하나의 물체를 새로운 위치로 이동시키고 동물이 익숙한 위치에 비해 새로운 위치를 탐색하는데 소비한 시간의 양을 기록하여 OLM 과제에서의 용량 반응을 평가하였다. 10mg/kg을 투여받은 동물이 OLM 과제를 다른 그룹보다 더 잘 수행하였으므로, 나머지 연구에서는 10mg/kg을 이용하였다. 이 OLM 패러다임은 이전에 학습에 대해 임계 이하로 나타났다.

[0045]

**습득(훈련-전) 또는 공고화(훈련-후):** 훈련 전 및 후 패러다임에서 화합물의 효능을 결정하는 것을 목표로 하는 또 다른 시험에서, 동일한 그룹의 22마리의 노화된 동물을 제1 시험 3주 후에 OLM 과제에 대해 재시험하였다. 약물이 습득 또는 공고화 메커니즘에 영향을 주었는지를 결정하기 위해, 마우스에 10mg/kg 화합물(i.p. n=7) 또는 비히클(n=8)을 주입하였다. 동물을 유지 검사 직후(즉, 주입 24시간 후)에 희생시키고, 해마를 제거하고, 드라이 아이스 상에서 급속 동결시키고, 트리메틸화 수준 및 BDNF 검정을 위한 처리시까지 -80°C에서 저장하였다. 도 2는 마우스에서 신규한 장소 위치 과제의 습득 단계 30분 전에 투여된 10mg/kg 및 20mg/kg(i.p.)의 약물 효과를 나타내는 그래프이다. 이는 OLM에서 습득 단계 30분 전에 투여되는 10 mg/kg 및 20 mg/kg(i.p.)의 ETP69로 처리된 마우스가 습득 단계에서 물체 탐색(초 단위로 측정됨)에 어떤 차이도 나타내지 않았음을 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM이다; n=7 또는 8/그룹.

[0046]

18마리의 어린 마우스를 또한 상기 기재된 바와 같은 동일한 OLM 패러다임으로 시험하였다. 약물이 습득 또는 공고화 메커니즘에 영향을 주었는지를 결정하기 위해, 습득 임상 직전 또는 직후에 어린 마우스에 10mg/kg 화합물 또는 비히클을 주입하고(i.p. n=6/그룹), 습득 24시간 후에 시험하였다. 도 3은 비히클, 또는 10 mg/kg의 ETP69로 처리된 마우스 사이의 탐색의 차이를 보여주는 OLM 시험 결과를 그래프로 표현한 것이다. 이 데이터는 과제의 유지 단계에서(약물 투여 24시간 후), 10 mg/kg의 ETP69(i.p.)로 처리된 마우스가 익숙한 물체보다 새로운 물체를 현저하게(초 단위로 측정됨) 더 많이 탐색하였음을 나타낸다(\*\*p≤0.01, Bonferroni t 검증). 20 mg/kg의 ETP69로 처리된 마우스는 노화된 대조군과 유사하게 수행되었다. 데이터는 평균 ± SEM이다; n=7 또는 8/그룹.

[0047]

**자율적 학습 과제:** 새로운 그룹의 12마리의 노화된 동물을 자율적 학습 과제에 이용하였다. 절차는 공개된 작업으로부터 채택되었다. 자율적 학습(USL) 거동 장치는 벽에 의해 4개의 챔버로 나누어진 넓은 오픈 필드로 구성되었고, 4개의 챔버 모두는 각각의 분할 벽에 있는 작은 입구로 접근 가능하다. 동물들은 또한 열린 입구를 통해 붙어있는 더 작은 에워싸인 어두운 구획에 접근할 수 있다. 처리 5일 후, 동물에 ETP69(10mg/kg, i.p.) 또는 비히클을 주입하고, 30분 동안 비디오-모니터되는 USL 박스에 넣고, 우리로 돌려 보냈다. 24시간 후, 동물을 다

시 USL 박스에 넣고 즉시 안락사시켰다. 이들의 뇌를 빠르게 제거하고, 해마를 신속하게 해부하고, 드라이 아이스 상에서 동결시키고, 추가 처리시까지 -80℃에 저장하였다.

- [0048] **공포 조절:** 14마리의 노화된(18-20개월) 수컷 마우스를 공포-조절 챔버에 두어 2분 동안 탐색하게 한 다음 한번의 전기 발 충격(2초, 0.2 mA)을 주었다. 동물을 발 충격 2분 후에 우리로 돌려 보냈다. 24시간 후, 조절 챔버에서의 거동을 5분 동안 관찰하고 이어서 호흡을 제외한 모든 움직임의 부재로서 정의되는 부동 거동을 분석하였다.
- [0049] **히스톤 트리메틸화:** 총 히스톤을 3마리의 어린 마우스 및 3마리의 고령 마우스의 동결된 해마로부터 EpiQuik 추출 키트(OP-0006-100)를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라서 추출하였다. 간단히 말해, 조직을 칭량하고, 작은 조각으로 절단하여 1× 예비용해 완충제에서 균질화시키고, 2 ml 튜브로 옮기고, 10,000g에서 1분 동안 4℃에서 원심분리시켰다. 상청액을 제거하고; 조직 펠릿을 3 부피의 용해 완충제에 재현탁시키고, 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션시키고, 12,000g에서 5분 동안 4℃에서 원심분리시켰다. 평형(Balance)-디티오트레이톨(DTT) 완충제(0.3 부피)를 상청액에 첨가하고, 이것을 -80℃에 저장하였다. 용리된 히스톤의 단백질 농도를 Bradford 단백질 검출 키트(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 표준으로서 BSA를 이용하여 추정하였다. 히스톤(H3K9) 트리메틸화 분석을 제조업체의 정보에 따라 수행하였다(ab115064). 간단히 말해, 트리메틸화된 히스톤을 특이적 항체를 이용하여 포집하고 표지된 검출 항체에 이어 발색 시약으로 검출하였다. 흡광도를 450 nm에서 판독하고, 결과를 표준 곡선을 이용하여 제조업체의 지시에 따라 계산하였다.
- [0050] **가시 계수:** 또 다른 일련의 실험에서 10마리의 노화된 마우스(20-22개월)에 ETP69(10mg/kg; i.p) 또는 비히칼(i.p)을 주입하고, 24시간 후에 동물을 안락사시키고, 뇌를 2개의 반구로 분리시켰다. 우측 반구를 골지 염색에 이용하고 좌측을 유동 시냅스측정법을 위해 처리하였다. 염색을 제조업체의 정보에 따라 수행하였다(Golgi-Cox, Bioenna).
- [0051] **유동 시냅스측정법:** 신선한 시냅토솜 P2 분획을 본 발명자들의 오래 유지된 프로토콜을 이용하여 전체 마우스 해마로부터 획득하였다. 간단히 말해, 조직(1:10 w/v)을 빙-냉 수크로스 320 mM에서 균질화시킴에 의해 분획을 해마로부터 획득하였다. 모든 단계는 4℃에서 수행되었다; 수크로스 완충제, 분쇄기, 유봉 및 마이크로퓨즈 튜브는 모두 얼음 위에서 미리 냉각되었다. 해마를 단일 마우스로부터 신속하게 해부하고 HEPES[10mM] 및 프로테아제/포스파타제 억제제 콕테일(pH 7.4)을 함유하는 320mM 수크로스(1.5 ml)에서 균질화시켰다. 균질화는 유리-테플론 분쇄기에서 6-8회의 수동 스트로크로 구성되었다, 간격(플런저와 유리 사이): 0.15-0.25mm. 분쇄기를 얼음 위에 유지하면서 스트로크 중에 플런저를 부드럽게 회전시켰다. 균질액을 1200g에서 10분 동안 원심분리시켰다. 상청액(S1, 미토콘드리아 및 시냅토솜 함유)을 2개의 깨끗한 마이크로퓨즈 튜브에 옮기고, 12,000 g에서 20분 동안 원심분리시켰다. 상청액(S2)을 플라스틱 팁과 진공을 사용하여 신중하게 제거하였다. 펠릿(P2, 미정제 시냅토솜 분획에 상응함)을 1.5 ml의 PBS에서 부드럽게 상하로 피펫팅하여 재현탁시켰다. 단백질 농도는 소혈청 알부민(BSA)을 표준으로서 사용하여 BCA 검정을 이용하여 결정되었다. 면역표지화 전에, 모든 샘플을 희석제로서 PBS를 사용하여 동일한 단백질 농도로 조정하였다. 유동 시냅스측정법 분석을 위한 면역표지화를 200 μl의 시냅토솜 분획(50-100 μg 단백질)을 이용하여 세포외/세포내 항원을 염색하는 방법에 따라 수행하였다. 항체: GluR1(세포외)(Millipore, ABN241, DIL= 1:400), p-Akt-ser473(Cell Signaling, 4060, DIL= 1:400), PSD-95 (Millipore, MAB1598, DIL= 1:400), 항-토끼 IgG Alexa-488 ad 항-마우스 IgG Alexa 647(Life Science, DIL= 1:400). 아르곤 488 nm 및 헬륨-네온 635 nm 레이저가 장착된 FACS Calibur 유동 세포계측기(BD Biosciences)를 사용하여 데이터를 획득하였다. 상대적 크기 및 입도(granularity)는 정방향(FSC) 및 측면 산란(SSC) 특성에 의해 결정되었다. FSC, SSC, FL1 및 FL4 신호를 로그 증폭을 이용하여 수집하였다. Alexa 488 및 Alexa 647 형광색소는 각각 FL1 및 FL4 검출기에 의해 검출되었다. FSC-SSC 플롯을 보정된 비드를 이용하여 시냅토솜의 크기(0.5-3.0 μm)에 일치하는 입자를 선택하는데 사용하였다(도 6A). 비드 표준 및 샘플에 대한 데이터를 획득하는데 동일한 FSC 설정이 사용되었다. FSC-H 임계(325)를 확립함에 의해 작은 단편 및 파편을 배제시켰다. 1만 개의 크기-관문 입자가 수집되었고 각 샘플에 대해 분석되었다. 분석은 CellQuest Pro 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 수행되었다.
- [0052] **BDNF에 대한 ELISA**
- [0053] ELISA를 BDNF Emax 면역검정 시스템(G7610, Promega)을 이용하여 제조업체의 지시에 따라 수행하였다. 두 세트의 샘플을 각 동물의 해마로부터 준비하고, 모든 반응을 이중으로 수행하였다.
- [0054] 첫 번째 일련의 실험은 BDNF가 ETP69의 표적이었음을 확인하였고, 그 후 두 번째 세트의 실험(USL 과제)에서 얻은 뇌를 사용하여 BDNF 엑손이 메틸화되었는지 그리고 BDNF의 다운스트림 표적이 ETP69 처리 후 변화를 나타내

있는지를 검출하였다.

**[0055] BDNF 프로모터 영역에 대한 ChIP:** 1% 포름알데하이드와 가교시킨 후, 염색질을 200-500 bp의 단편으로 전단시켰다. 면역침전은 히스톤 H3K9me3(H3K9me3; Millipore)에 대해 유도된 항체로 4°C에서 밤새 수행되었다. 세척, 비드로부터 용리, 및 가교의 역전 후, 면역침전된 DNA를 정제하고, qRT-PCR에 의해 풀링된 투입 샘플로부터 제조된 내부 표준 곡선으로 삼중으로 분석하였다. 각 샘플을 각각의 입력 값으로 표준화시켰다. 엑손 I, IV 및 VI에 대한 *bdnf* 프로모터에 대한 프라이머는 각각의 고유 엑손 서열에 상응한다. RT-qPCR 프라이머 세트는 Roche Universal Probe Library Assay Design Center를 이용하여 설계되었고 Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)로부터 입수하였다. RT-qPCR 반응을 Stratagene MX3005P 서모사이클러에서 95°C에서 3분 동안, 이어서 45회 사이클의 95°C에서 10초, 및 58°C에서 15초 동안 진행시켰다. 각각의 RT-qPCR 진행은 삼중으로 진행되는 모든 샘플 및 표준 곡선을 포함하였다. 데이터를  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법에 의해 분석하고 앞서 설명한 대로 투입 샘플로 표준화시킨 후 대조군에 비해 배수 변화로서 표시하였다.

**[0056] 통계 분석**

**[0057]** Mann-Whitney 검증을 각각 대응 및 비대응 데이터에 대한 비-모수적 t-검증으로서 이용하였고, Student 검증을 모수적 데이터에 이용하였다. 3개 이상의 그룹의 평균 비교를 위해 일원 ANOVA에 이어 post hoc Tukey 검증이 뒤따랐다; 반면 이원 ANOVA 이후에는 Bonferroni post hoc 검증이 왔다. 도 6B의 모든 통계 검증 및 비선형 적합도(fit)는 GraphPad Prism 6을 이용하여 수행되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로 제시된다. p 값 < 0.05는 유의한 것으로 간주되었다.

**[0058] 결과**

**[0059] 물체 위치 기억(OLM) 과제에서 ETP69**

**[0060]** 공간적 OLM 과제에서 복강내 투여된 ETP69의 급성 효과에 대한 용량-반응 연구가 수행되었다. 용량 범위는 마우스에서 잘 용인되는 것으로 알려진 양을 포함하였다. 본 발명자들의 결과는 노화된 쥐에서 20mg/kg이 아닌 10mg/kg이 OLM 과제에서 기억 개선을 유도하였음을 나타내었다. 이는 이원 ANOVA(상호작용 효과, (F(2,19)=10.25, p<0.01, n=7-8/그룹))를 이용하여 확인되었고, post-hoc 검증은 10mg/kg의 약물을 투여받은 그룹이 대조군에 비해 현저하게 더 잘 수행하였음을 보여준다(p<0.05, Bonferroni t-검증). 이것은 또한 습득 임상 분석에 반영된다. 시험의 습득 단계는 유의한 상호작용 효과(F(2,19)=0.139, p=NS, n=7-8/그룹) 또는 물체 위치의 주요 효과(F(1,19)=0.19, p=NS)를 나타내지 않았다. 그러나, 총 탐색 시간의 감소를 보이는 높은 용량의 약물(20mg/kg)이 제공된 동물에서 현저한 치료 효과(F(2,19)=3.18, p<0.05)가 있었다(p<0.05, Bonferroni t-검증). 이는 높은 용량의 H3K9me3이 노화된 동물에서 전반적인 탐색능을 손상시키고 운동 활성을 손상시킬 수 있으므로, 최적 용량을 신중하게 확인해야 함을 시사한다.

**[0061]** 다음으로, 이 연구는 ETP69 처리가 임상-전 대 임상-후 투여 패러다임에서 OLM 과제의 수행 정확도에 차별적인 영향을 미치는지를 판단하고자 하였다. OLM 과제에 대한 임상-전 대 임상-후 패러다임은 기억 형성의 두 별개의 구성요소를 시험할 수 있게 한다. 구체적으로, 훈련-전 약물 투여는 기억의 습득 및 회상을 평가하는 한편, 훈련-후 약물 투여는 기억 공고화 및 회상을 목표로 한다. 따라서, 본 발명자들은 OLM 시험의 습득 단계 30분 전, 또는 직후에 약물을 투여하였다. 본 발명자들은 습득 단계 30분 전(임상-전, n=6/그룹) 또는 습득 직후(임상-후, n=8/그룹)에 투여된 10mg/kg(i.p)의 약물이 OLM 과제에서 성능을 개선시켰음을 발견하였다(상호작용 효과(F(2,19)=9.81, p<0.01, 도 4B). 추가로 post-hoc 검증은 임상-전 및 임상-후 그룹 둘 모두에서 현저한 효과를 보여주었다(p<0.001, Bonferroni t-검증). 시험의 습득 단계는 유의한 그룹 차이를 나타내지 않았다(상호작용F(2,19)=0.26, 약물의 주요 효과 F2,19=0.01, 물체 위치의 주요 효과 F(1,19)=0.01, p=NS, 도 4A).

**[0062]** 도 4A-B는 노화된 마우스에서 신규한 물체 위치 과제의 습득 단계 30분 전(임상-전) 또는 습득 직후(임상-후)에 투여된 10mg/kg(i.p)의 약물의 효과를 그래프로 예시한 것이다. 습득 단계(A)에서 대상 탐색에 차이 없음. 과제의 유지 단계에서(24시간 ± 30분, 약물 투여 후), 약물 처리된 동물은 새로운 물체를 익숙한 물체보다 현저하게 더 많이 탐색하였다 (B) p<0.001, 익숙한 물체에 비해 새로운 물체를 탐색하는데 소비한 시간에서의 유의한 차이.

**[0063]** H3K9me3 억제제가 어린 마우스 및 노화된 마우스에서 기억에 긍정적인 영향을 미친다는 가설을 시험하기 위해, 거동 시험을 어린 마우스까지 연장시켰다. 노화된 동물과 달리, ETP69의 투여는 어린 마우스에서 OLM 성능을 개선시키지 않았다. 습득 단계 30분 전(임상-전) 또는 습득 직후(임상-후)에 투여된 10mg/kg(i.p)의 약물은 어린 대조군에 비해 임의의 통계적 차이를 보이지 않았다(상호작용 효과 (F(2,15)=0.32, p=NS, 약물의 주요 효과

F2,15=2.21, 물체 위치의 주요 효과 F(2,15)=6.02,  $p<0.05$ , 도 5B,  $n=6$ /그룹). 시험의 습득 단계도 유의한 그룹 차이를 보이지 않았고(상호작용 F(2,15)=0.44, 약물의 주요 효과 F(2,15)=25.01,  $p<0.01$ ,  $n=6$ /그룹) 위치 1 대 위치 2의 탐색 사이에도 차이가 없었다(Bonferroni t-검증에 의해 측정됨,  $p=NS$ , 물체 위치의 주요 효과 F(2,15)=1.56, 도 5A). 이는 H3K9me3 조작이 어린 뇌 대 노화된 뇌에서 매우 다른 효과를 지닐 수 있음을 시사한다.

[0064] 도 5A-B는 어린 마우스에서 신규한 물체 위치 과제의 습득 단계 30분 전(임상-전) 또는 습득 직후(임상-후)에 투여된 10mg/kg(i.p)의 약물의 효과를 그래프로 예시한 것이다. 과제의 습득 단계(A) 또는 유지 단계(B)(24시간  $\pm$  30분, 약물 투여 후)에서 물체 탐색에 차이 없음.

[0065] **자율적 학습 과제(USL)에서 ETP69**

[0066] H3K9me3이 공간 학습의 척도에 관련되는지를 평가하고 분자 종말점을 평가하기 위해, USL 과제가 거동 종말점이 되는 두 번째 일련의 실험을 수행하였다. USL 과제는 마우스가 지정된 시간의 기간 동안 4구획 환경을 자유롭게 탐색하도록 하는 단순한 거동 패러다임이다. 이 시간 동안의 전반적인 활동 및 시험장 탐색의 감소는 학습과 단기 기억의 척도로 간주된다. 이것이 두 그룹에서 유사한 비율로 발생한다면, 단기 학습과 기억에 유의한 차이가 없음을 나타낸다. 마우스의 운동 패턴은 이들이 보여주는 습관화 및 학습을 반영하며, 해마의 시냅스 변화와 높은 상관 관계가 있다.

[0067] 도 6A는 자율적 학습 과제에서 ETP69의 효과를 그래프로 표현한 것이다. 노화된 마우스는 양일간 시험장을 계속해서 탐색한 반면, ETP69(10 mg/kg, i.p.)로 처리된 노화된 마우스는 1일에 비해 2일에 습관화/탐색에서의 현저한 감소를 나타내었다(이동한 거리에 의해 측정됨). 노화된 대조군 마우스는 1일과 2일 양일에 시험장을 탐색하는데 같은 시간(들)을 보냈다. 습관화는 30분 동안 측정되었고 도시된 데이터는 5분의 빈스(bins)에 있다 \* $p<0.05$ , 1일과 2일의 지정된 시점에 습관화/탐색 사이의 유의한 차이(Tukey t 검증).  $n=5$  또는 6/그룹.

[0068] 도 6B는 자율적 학습 과제에서 ETP69의 효과를 그래프로 표현한 것이다. 그래프는 1일 및 2일에 ETP69(10mg/kg, i.p.) 또는 비히클의 투여 후에 30분 동안 이동한 총 거리를 보여준다. \* $p<0.05$ , 1일 및 2일에 30분 동안 이동한 총 거리에서의 유의한 차이(Tukey t 검증). 데이터는 평균  $\pm$  SEM이다;  $n=5$  또는 6/그룹.

[0069] 이 시험 동안, 잘-취급된 마우스를 4 구획 시험 박스에 넣고, 이들의 움직임은 1일에 30분 동안 모니터한 다음 다시 24시간 후에 2일에 모니터하였다. ETP69(10mg/kg; i.p.)로 처리된 동물은 1일의 처음 30분이 아니라 처리 24시간 후에 습관화/탐색에서의 현저한 감소(이동한 거리에 의해 측정됨)를 나타낸 것으로 확인되었다(도 6A). 일원 ANOVA는 유의한 그룹 차이를 보였고(F3,19=4.05,  $p<0.05$ ) post hoc 검증은 ETP69 처리된 동물에서 1일 및 2일의 성능 사이의 차이를 확인시켜 주었으나( $p<0.05$ ) 연령 일치 대조군에서는 그렇지 않았다(도 6B,  $n=5$ /그룹). 1일의 30분의 탐색은 마우스에서 시험장의 일부 장기 기억을 유도하기에 충분하고 이는 시험 2일차에 측정될 수 있다. 본 발명자들은 2일에 활동 수준의 차이를 발견하였고, 이는 학습이 그룹 사이에 동일하게 유지될 때에도 ETP69 처리된 동물에서 개선된 유지 및 회상으로 해석된다.

[0070] **공포 조절 과제에서 ETP69**

[0071] 또 다른 시험에서, 전후관계상 공포 조절 시험 이용시, 본 화합물은 해마 의존성 학습 및 기억을 개선시키는데 효과적이었다. 본 발명자들은 ETP69로 처리된 노화된 동물( $n=7$ /그룹)이 노화된 대조군에 비해 과제에 대한 개선된 성능을 보였음을 발견하였다( $p\leq 0.01$ ). 공포 조절은 수많은 종에서 연구되어 왔으며 흔히 부동(freezing)(지켜보는 부동의 기간)으로 측정된다. 많은 연구는 조절된 공포가 임상 불안 장애의 메커니즘과 실질적으로 일치함을 밝혀내었다. 조절된 공포의 습득, 공고화 및 소멸에 대한 연구는 이것이 학습 및 기억 외에 분리, 공황 발작 장애, 공포증 및 심지어 외상 후 스트레스 장애와 같은 일련의 병리학적 상태를 치료하는 수단이 될 수 있음을 시사한다. 또한, 복내측 전두 피질(mPFC)-기저내측 편도체(BMA) 투사(projection)는 기준선 및 스트레스-유도된 불안 둘 모두에서, 불안 상태 및 학습된 부동의 하향식(top-down) 제어를 시행하여, 상기 언급된 모든 조건과 관련된 광범하게 관련된 새로운 하향식 거동 조절 경로를 정의한다고 알려져 있다.

[0072] OLM 및 USL 과제로부터의 본 발명자들의 결과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 해마 의존성 학습 및 기억에 대한 H3K9me3 하향조절의 효과를 시험하는 전후관계상 공포 조절을 이용하였다. 공포 조절은 또한 편도체 및 관련 기능도 조절되는지를 나타낸다. 본 발명자들은 ETP69로 처리된 노화된 동물( $n=7$ /그룹)이 노화된 대조군에 비해 과제에 대한 개선된 성능을 나타내었음을 발견하였다( $p\leq 0.01$ ). 전반적으로, 이러한 거동 데이터는 ETP69 투여가 일련의 시험에서 해마 의존성 학습 및 기억을 개선시킴을 시사한다.

[0073] 도 7은 공포 조절 과제에서 ETP6의 효과를 그래프로 표현한 것이다. ETP69(10mg/kg, i.p.)로 처리된 노화된 마

우스는 전후관계상 공포 조절을 평가했을 때 개선된 성능을 보여주었다. \*p=0.01, Bonferroni t-검증, 데이터는 평균 ± SEM으로서 제시된다. 그룹 당 n = 7.

**[0074] 해마에서 H3K9me3 수준**

**[0075]** 본 발명자들은 먼저 어린 마우스 대 고령 마우스의 해마 및 소뇌에서 H3K9me3 수준을 비교하였고 노화된 마우스의 해마에서 유의하게 높은 수준의 H3K9me3을 발견했지만 소뇌에서는 그렇지 않았다(도 8A, p<0.05, n=3/그룹). OLM과 USL은 둘 모두 해마 특이적 과제이고 본 발명자들은 어린 마우스 대 고령 마우스의 해마에서 H3K9me3 수준의 차이를 발견했기 때문에, 본 발명자들은 OLM 과제에서 상기 설명된 동물의 코호트로부터의 해마 조직 샘플에서 약물 처리 후 해마에서의 H3K9me3의 총 수준을 시험하였다. 본 발명자들의 결과는 약물 처리된 동물의 해마로부터의 히스톤 추출물에서 약물의 현저한 효과를 나타내었다. t-검증 분석은 ETP69로 처리된 동물에서 H3K9me3 수준의 감소를 나타내었다(p<0.05, n=7/그룹, 도 8B). 대조적으로 ETP69-처리된 마우스 대 미처리된 마우스의 소뇌에서 H3K9me3의 수준 사이에는 유의한 차이가 없었다.

**[0076] H3K9me3 억제제 해마 시냅소솜에서 가지 밀도 및 GluR1 수용체 표면 발현을 증가시킨다**

**[0077]** 새로운 기억 형성은 해마에서 가지 밀도의 일시적인 증가와 관련될 수 있다고 보고되어 왔다. 특히, OLM 및 USL 과제에서의 개선된 성능은 흥분 글루타메타ergic 시냅스의 구조적 및/또는 기능적 변화와 연관된다. 따라서, 본 발명자들은 히스톤 메틸 트랜스퍼라제(SUV39H1)의 약리학적 억제제 해마에서 수상돌기 가지 형성의 증가를 유도하기에 충분하였는지를 조사하였다.

**[0078]** 특히, 본 발명자들은 CA1 피라미드 신경세포에서 가시를 계수하고 분류하였다. 해마의 CA1에서 신경세포로부터의 수상돌기 세그먼트를 공초점 현미경에 의해 영상화하고 맵검 연구자가 수상돌기 가시를 이들의 형태에 따라 계수하고 분류하였다. 가시는 수동으로 계수되었고 앞서 설명된 기준에 따라, 썬, 머쉬룸, 또는 스테르비로서 분류되었다.

**[0079]** 각 동물에 대해, 적어도 3개의 피라미드 신경세포 및 200 μm의 총 수상돌기 길이 및 250-500개 가시가 분석되었다(그룹 당 n=5마리 동물). 모든 신경세포는 CA1 해마 영역의 등쪽 부분으로부터 선택되었고(이것이 공간 기억에 필수적인 역할을 함에 따라) 기저 및 정점 수상돌기를 따라 완전히 염색되었다. 도 10은 해마의 CA1에서 가시에 대한 ETP69 처리의 효과를 보여주는 대표적인 이미지를 나타낸다. 이러한 예시에서, 상부 패널은 대조군 동물로부터의 해마 신경세포를 나타내고 하부 패널은 ETP69 처리된 동물에서 관찰된 가시를 나타낸다.

**[0080]** 동일한 신경세포에서 정점 수상돌기로부터 기저부를 구별하기 위해 분리 분석을 수행하였다. 평균적으로, ETP69 처리된 마우스는 대조군에 비해 수상돌기의 길이(μm) 당 45% 더 많은 가시의 총 수를 지녔고 형태학에 의한 가지 밀도의 분석은 대조 마우스에 비해 ETP69 처리된 마우스에서, 현저하게 높은 밀도의 썬 (p<0.001, 스튜던트 t-검증), 및 스테르비 가시를 나타내었다(p<0.05, 스튜던트 t-검증)(도 9A-C). 머쉬룸 가시의 수/측정된 수상돌기의 길이에서는 차이가 없었다(도 9A-C).

**[0081]** 다음으로, 본 발명자들은 분리된 시냅소솜(시냅스 후 수상돌기 가시에 부착된 시냅스 전 말단)을 분자적으로 특성화하는 혁신적인 접근법인 유동 시냅스측정법을 사용하여 시냅스에 대한 ETP69의 영향을 연구하였다. 활성-의존성 가지 성장이 PSD-풍부 영역에서의 AMPA 수용체의 혼입에 의존하고 이 과정이 가지 성장을 증가된 시냅스 전송 효율과 연결시키므로, 본 발명자들은 PSD95(스캐폴딩 단백질) 및 GluR1(AMPA 수용체의 서브유닛)의 발현에 초점을 맞추었다. 약물 처리 후, 해마 시냅소솜 분획을 면역염색하고, 유동 시냅스측정법에 의해 분석하였다. 유동 시냅스측정법에 의한 샘플 획득은 앞서 설명한 대로 먼저 보정된 비드를 이용하여 시냅소솜을 크기에 의해 식별한다. 0.5-3.0 μm 사이의 입자의 서브세트는 대부분의(>70%) 크기-관문 입자에서 높은 수준의 시냅토파이신 및 PSD95에 의해 표시되는 바와 같이 시냅소솜에서 매우 풍부한 것으로 나타났다. ETP69-유도된 가지 수의 증가와 일관되게(도 9A-C), 크기-관문 입자에 대한 본 발명자들의 분석에 따르면 ETP69는 PSD95를 발현시키는 시냅소솜의 비율을 증가시켜(p<0.05, 도 11C), 시냅스 수의 증가를 반영하는 것으로 나타났다. 평균 형광성 세기에 의해 결정되는 바와 같이, 입자 당 PSD95 수준에서는 검출 가능한 변화가 관찰되지 않았다. 다음으로, 본 발명자들은 ETP69가 표면 GluR1-AMPA 수용체를 발현시키는 가시의 상대적 수준을 증가시키는지를 시험하였다. 본 발명자들은 세포외(투과성 없음) 및 세포내 면역검출을 조합시킨 이중 표지화에 의해 표면의 GluR1 및 세포내 PSD95를 공동-발현시키는 크기-관문 시냅소솜의 비율을 정량하였다. 본 발명자들은 비히클-처리된 대조군에 비해 ETP69-처리된 마우스에서 표면 GluR1을 공동-발현시키는 PSD95-양성(PSD95+) 사건의 양의 증가를 확인하였다(p=0.05, 도 11E). 다음으로, 본 발명자들은 NMDA 수용체 활성화 후 수상돌기로 PSD95의 활성-의존성 수송을 위한 필수적인 단계인 Akt 활성화(세린-473에서 Akt 인산화, p-Akt)에 대한 ETP69의 효과를 분석하였다. ETP69

처리 후 PSD95+GluR1+ 사건의 증가된 비율에 따라서, ETP69에 의한 SUV39H1 억제제는 또한 비히클-처리된 마우스로부터의 샘플에 비해, p-Akt 및 PSD-95 둘 모두를 발현시키는 사건(p-Akt+PSD95+)의 비율을 증가시켰다 ( $p < 0.05$ , 도 11G). 전반적으로, 이러한 결과는 H3K9me3 억제제가, 적어도 부분적으로, 가시 생성 및 소성을 촉진하는 분자 과정을 적극적으로 조절함으로써 작용함을 시사한다.

**[0082] ETP69는 노화된 마우스의 해마에서 BDNF 프로모터의 H3K9me3 수준 및 BDNF 단백질 수준을 증가시킨다**

**[0083]** SUV39H1 억제제로의 처리가 해마에서 가시 형성을 자극한다면, 이것은 또한 기억에 해당하는 독특한 신호전달 캐스케이드에서 유전자 특이적 변화를 일으켜야 하는 것이 당연하다. 성체 뇌에서 BDNF는 시냅스 형성 및 소성에 중요한 역할을 하며, 시냅스 전 및 시냅스 후 부위 둘 모두에서 작용한다. 따라서, 본 발명자들은 해마 의존성 학습 및 기억의 공고화에 중요한, BDNF에 대한 H3K9me3 하향조절의 효과를 시험하였다. *bdnf* 유전자는 여러 비코딩 엑손으로 구성되며, 각각은 자체 프로모터에 의해 조절되고 상이한 자극에 반응한다. 따라서 본 발명자들은 ETP69 처리가 *bdnf* 프로모터 I, IV, 및 VI에서 H3K9의 트리메틸화를 감소시키는지 평가하였다. 처리의 유의한 효과는 *bdnf* I에서 H3K9me3에 대해 나타났다( $p = 0.05$ , Mann-Whitney t-검증, 대조군에 대해  $n = 7$ , ETP69에 대해 9, 도 12B). 중요하게는, BDNF 프로모터에서 ETP69-유도된 후성 변화는 해마에서 BDNF 단백질 수준의 증가와 관련되었다. 본 발명자들은 대조군에 비해 ETP69 처리된 마우스의 해마에서 BDNF의 현저하게 상승된 수준을 발견하였다( $p < 0.01$  F(2,16)=8.09, ANOVA에 이어 post hoc Bonferroni t-검증; 도 12A).

**[0084]** 본 연구에서 본 발명자들은 노화에서 학습 및 기억 결핍을 약화시키기 위한 급성 생체내 SUV39H1 억제 및 결과적인 H3K9me3 하향 조절의 잠재력을 시험하였다. 본 발명자들은 H3K9me3 조작 후 관찰된 인지 이점에 기여할 수 있는 잠재적인 메커니즘을 추가로 평가하였다. H3K9me3 하향조절 이후 물체 위치 기억 과제, 공포 조절 및 자율적 학습 과제에서의 성능이 개선되었다. 이것은 피라미드 신경세포의 수상돌기 가시 밀도의 증가 및 해마에서 표면 GluR1-함유 AMPA 수용체를 발현하는 시냅스의 증가와 일치하였다. BDNF의 수준은 또한 SUV39H1 억제제를 투여한 동물의 해마에서 상향조절되었고, 이러한 동물의 해마로부터 얻어진 시냅톰 추출물은 포스포릴화된 Akt의 증가된 수준을 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 인지 결핍의 개선에 대한 지지를 제공하고 H3K9me3 하향조절이 BDNF, 가시 리모델링 및 성장과 관련된 사건의 캐스케이드를 유발함을 시사한다.

**[0085]** 본 발명자들이 아는 한, H3K9me3 억제제가 학습 및/또는 기억 기능에 미치는 영향을 평가한 연구는 없었다. 여기서 본 발명자들은 해마에서 H3K9me3의 감소가 노화된 마우스의 공간 기억을 개선시킨다는 첫 번째 증거를 제시한다. OLM 과제의 훈련-전 및 훈련-후 패러다임 둘 모두에서, ETP69-처리된 동물은 시험 중에, 습득 임상 24시간 후에 동등하게 잘 수행하였다. 이는 ETP69에 의한 급성 처리가 노화된 동물에서 H3K9me3 수준의 해마 특이적 변화를 유도한다는 결론을 이끌어 내었다. USL 과제로부터의 데이터는, 학습이 그룹 사이에 동일하게 유지되었을 때, ETP69로 처리된 동물이 약물 처리 24시간 후에 개선된 유지 및 회상을 나타내었으나 30분 후에는 그렇지 않았음을 확인시켜 주었다. H3K9me3에 의해 동원된 억제물질 및 보조인자는 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 및 뭉친 염색질 단백질-1 $\alpha$ (HP1 $\alpha$ )를 포함한다. 실제로, HP1은 SUV39H1과 직접 연관되어 자립적인 억제 주기를 유도하며, 임의의 행동 소견을 나타내는데 30분 이상 소요될 수 있다. 따라서 상기 결과는 분자에서의 변화(및 이에 따른 행동 수준)가 빠르게 연동되지 않지만, 개선된 유지 및 회상을 지지하는 메커니즘을 발달시키는데 시간을 필요로 한다는 가설과 일치한다.

**[0086]** 가시 밀도의 일시적인 증가는 특히 노화된 쥐의 해마에서 개선된 학습 및 기억과 관련이 있었지만, 시냅스 기능 및 가시에 대한 H3K9me3 조작의 효과는 현재 연구되어 있지 않다. 여기서 본 발명자들은 ETP69가 ETP69 처리된 동물의 CA1 영역에서 썬 및 스테리 가시 둘 모두의 수를 증가시켰다고 보고한다. 썬 가시는 가요성이고 새로운 시냅스 형성에 중요하며, 이는 이들을 ETP69-처리에서 관찰된 인지능의 급성 개선을 촉진하는데 매우 적합하게 만든다. H3K9me3 차단 이후 관찰된 행동 변화는 부분적으로 가시 밀도의 변화로 인해 유래된 것이 당연하다. 또한, 리모델링 가시는 PSD-풍부 영역에서 AMPA 수용체의 혼입을 필요로 한다(Park et al., 2004). 시냅스에 AMPA 수용체를 첨가함으로써 시냅스 연결이 강화될 수 있고 실제로 가시를 리모델링하는 것은 시냅스 표면에 AMPA 수용체의 혼입을 필요로 한다는 것이 종래에 확인되었다. 본 발명자들의 데이터는 ETP69 처리된 동물의 해마 샘플에서 시냅스 말단의 표면 GluR1을 발현시키는 PSD+ 시냅톰 및 PSD95+ 시냅톰 둘 모두의 수준이 증가하였고, 이에 따라 H3K9me3가 노화에서 개선된 인지 기능으로 이어지는 해마의 시냅스 네트워크/신호전달의 변화를 매개한다는 가설을 뒷받침함을 보여준다. 해마에 대한 효과 외에도, H3K9me3의 길항작용은 또한 해마로부터의 크기-관문 PSD95-함유 시냅톰에서 p-AKT의 상향조절을 발생시킨다. BDNF는 시냅스 소성 및 신경세포 활성을 제공하는 주요 분자이다. 본 발명자들은 노화된 뇌에서의 HDAC 억제제가 BDNF 의존적 방식으로 공간 기억을 개선시킴을 이전에 확인하였다. HDAC가 H3K9me3에 의해 동원되는 보조인자 중 하나이기 때문에, 본 발명자들은 노화된 뇌에서 BDNF 단백질 수준에 대한 SUV39H1 억제의 역할을 시험하였다. 본 발명자들의 데이터는 H3K9me3가

학습과 기억을 조절하며 이 효과는 BDNF 의존성 메커니즘에 의해 매개될 가능성이 높음을 보여준다. 또한, 본 발명자들의 결과는 EXON 1만이 노화 된 마우스에서 ETP69 처리 후 BDNF 상향조절을 유도한다는 것을 시사한다. BDNF 전사체의 차별적 생산은 단백질의 기능에 영향을 미칠 수 있거나, 여러 뇌 영역에서 BDNF를 생산함에 있어서 특이적인 조절 메커니즘을 위한 수단을 제공할 수 있다고 제안되어 왔다. H3K9me3 억제가 BDNF 전사체 1의 조절에 선택적으로 관여할 것으로 보이지만, 이 선택성의 다운스트림 결과는 알려지지 않았다. 그러나, 본 발명자들은 Arc의 변화를 관찰하지 않았다(데이터는 제시되지 않음). Arc가 빠르게 유도되고 붕괴되기 때문에 본 발명자들이 Arc의 변화를 관찰하지 않았을 가능성을 완전히 배제할 수는 없지만, H3K9me3 하향조절 후 시냅스에 여러 변화가 있으며 Arc 유도가 그 중 하나가 아닐 수도 있을 가능성이 똑같이 높다. 본 연구는 유일하게 H3K9me3 억제에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 조절되는 가능성의 캐스케이드에 대한 첫 번째 관심을 제공한다. H3K9me3 억제 표지를 제거한 후 특정 분자 경로의 활성화는 결과적으로 노화된 동물에서 개선된 기억 기능의 유지에 필요한 추가 전사 및 번역을 발생시킬 수 있는 해마-기억 경로(들)를 활성화시킬 수 있다.

[0087] **신경세포 생존 및 기능에 대한 SUV39H1 억제제 ETP69의 효과**

[0088] 본 발명자들은 ETP69가 신경세포에 직접적으로 작용할 수 있음을 확증하고자 하였다. 암 세포와 달리 신경세포는 비분열 세포이므로 명확한 세포 표적이다. 본 발명자들은 다른 세포 유형이 없고 약물 농도가 엄격하게 제어될 수 있는 일차 신경세포 세포 배양액을 사용하였다. 신경세포 생존 및 시냅스 성장은 화합물을 평가하는 일반적인 방법이다.

[0089] 14 DIV 해마 신경세포의 OGD는 문헌[Newcomb-Fernandez et al (2001)]에 기술된 것과 유사한 접근법에 의해 유도되었다. 정상 배지를 PBS로 대체하고 배양 플레이트를 밀폐 챔버에 두었다. 챔버를 N<sub>2</sub> 및 CO<sub>2</sub>로 3분 동안 플러싱하고, 밀봉하고, 37°C 인큐베이터에 2시간 동안 두었다. PBS를 DMEM(혈청-비함유)으로 대체하고 배양액을 정상 산소 환경으로 돌려 보냈다. 배양 배지는 배양액을 정상 환경으로 돌려 보낸지 48시간 후에 수집되었다. 세포독성은 LDH 검정(Thermo-Fisher)에 의해 측정되었다. % 세포독성을 계산하기 위해, 화학-처리된 샘플 LDH 활성으로부터 자발적 LDH, 방출 대조군(수-처리됨)의 LDH 활성을 빼고, 총 LDH 활성[(최대 LDH 방출 대조군 활성)-(자발적 LDH 방출 대조군 활성)]으로 나누고, 100을 곱한다:

[0090] 
$$\% \text{ 세포독성} = \frac{\text{화합물-처리된 LDH 활성} - \text{자발적 LDH 활성}}{\text{최대 LDH 활성} - \text{자발적 LDH 활성}} \times 100$$

[0091] 처음에 본 발명자들은 ETP69가 산소-글루코스 박탈(OGD)-유도된 세포독성에 미치는 효과를 시험하였다. 성숙한 해마 신경세포(14 DIV)를 ETP69의 존재 또는 부재 하에서 2시간 동안 OGD로 처리하였다. 세포독성은 OGD 48시간 후에 LDH 검정으로 측정되었다. 100 nM이 아닌 4 nM의 ETP69가 OGD-유도된 세포독성으로부터 신경 세포를 구제하였다. 도 13은 산소-글루코스 박탈(OGD) 후 신경세포 생존에 대한 ETP69의 효과를 그래프로 예시한 것이다. 14 DIV 해마 신경세포를 ETP의 존재 또는 부재 하에서 2시간 동안 OGD로 처리하였다. 세포독성은 OGD 48시간 후에 LDH 검정으로 측정되었다. 결과는 4개 샘플의 평균 ± SEM이다. \*, p < 0.05.

[0092] 다음으로, 본 발명자들은 배양된 해마 신경세포에서 H3K9me3 수준에 대한 ETP69의 효과를 조사하였다. 24시간의 ETP69 처리는 신경세포 H3K9me3 수준의 용량-의존성 감소를 발생시켰다. 도 14A-B는 14DIV 해마 신경세포에서 H3K9me3 수준에 대한 ETP69 효과의 예시이다(도 14A - Zell 이미지; 도 14B - 정량, n=3, \*, p<0.05). 예시가 보여주는 것처럼, ETP69 처리(24시간)는 웨스턴 블롯팅에 의해 측정되는 H3K9me3 수준을 감소시켰다.

[0093] 20 nM의 ETP69가 H3K9me3 수준의 가장 큰 감소를 발생시켰으므로, 본 발명자들은 시냅스 단백질 PSD-95 발현 및 수상돌기 가시의 형태에 대한 20 nM의 ETP69의 효과를 조사하였다. ETP69 처리는 PSD-95 면역반응성을 증가시켰다. 도 15A는 ETP69 처리(20 nM, 24시간)가 PSD-95 면역반응성(시냅스가 제조되는 수상돌기 가시의 마커) 14 DIV 해마 신경세포를 증가시켰음을 보여주는 이미지이다. 신경세포는 PSD-95(적색) 및 MAP2(녹색)에 대한 항체로 염색되었다. 스케일 바: 10 μm, 상부 패널; 2 μm, 하부 패널.

[0094] 도 15B는 ETP69 처리(20 nM, 24시간)가 수상돌기 F-액틴 염색(수상돌기 가시의 마커)을 증가시켰음을 보여주는 이미지이다. 많은 가시의 존재를 표시하는 수많은 반점의 존재에 주목하라. 상부 패널: 대조군, 하부 패널: ETP 처리된 신경세포. 스케일 바: 2 μm. 이 예시는 ETP69가 F-액틴 염색-표지된 수상돌기 가시도 증가시켰음을 보여준다.

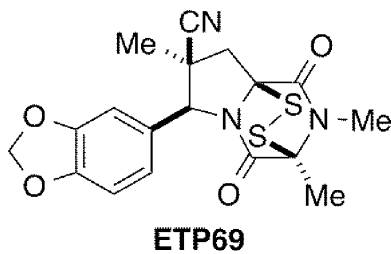
[0095] 또한, ETP69 처리는 Ser133에서 전사 인자 CREB의 포스포릴화를 증가시켰다. 도 16은 ETP69가 웨스턴 블롯팅에 의해 측정되는 Ser133에서의 CREB 포스포릴화를 증가시켰음을 예시하는 이미지이다. CREB는 전사 인자이며, 이

의 활성화는 시냅스 소성 및 기억 형성에 관여한다.

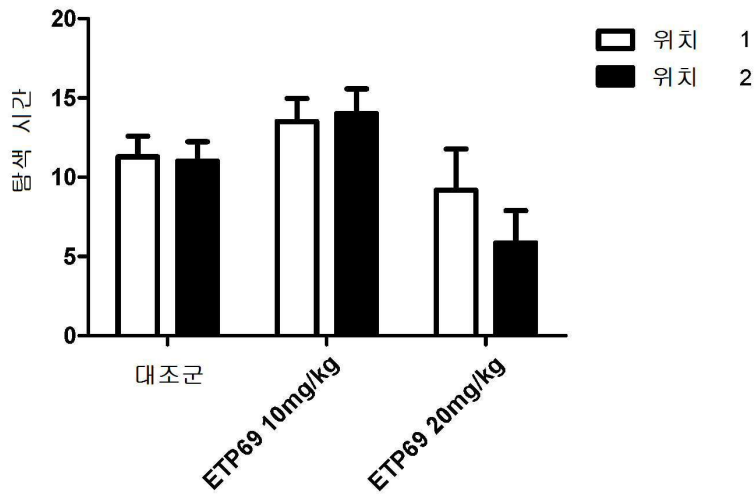
- [0096] 이러한 데이터는 ETP69가 신경세포의 생존, 성장 및 시냅스 소성을 촉진하기 위해 비분열 세포 유형인 신경세포에 작용함을 입증하므로, 상기 데이터는 신경계 및 암 적용으로부터의 신경세포에 대한 ETP의 용도를 구별한다.
- [0097] 이 연구는 기억 및 인지 기능, 예컨대, 연령-관련 기억 감퇴를 향상시킴에 있어서 H3K9me3의 역할에 대한 증거를 제공하고, 이러한 히스톤 메틸화 표시가 약리학적 개입에 의해 역전될 수 있음을 보여준다. 이 연구는 또한 히스톤 메틸화를 조절하는 효소를 조작함으로써, 노화 뇌에서 대상체의 염색질 상태를 바꾸고 기억 기능을 복구할 수 있다는 증거를 제공한다. 마지막으로, 이 화합물은 단독으로 또는 다양한 생활습관 개입, 또는 인지 성능(즉, 인지 개선제), 예컨대, 기억, 학습, 집행 기능, 주의력, 처리 속도, 전반적인 인지 기능, 일상 생활의 활동 등을 향상시키는 약리학적 개입과 함께 사용될 수 있다. 이러한 이중 접근법은 단독의 개입을 증가하여 인지능을 향상시킬 수 있다. 이것은 또한 수면, 통증, 및 삶의 질과 같은 개선된 기능적 결과로 이어질 것이다.
- [0098] 하나 이상의 구체예에서, 약리학적 인지 개선제는, 예를 들어, 타크린, 도네페질, 리바스티그민, 및 갈란타민과 같은 콜린에스테라제 억제제를 포함할 수 있다. 약리학적 인지 개선제는 또한 NMDA 길항제 또는 NMDA 효능제, 암파킨, BZD/GABA 수용체 복합 조절제, 세로토닌 길항제, 니코틴 부류 화합물, 무스카린 부류 화합물, PDE 억제제, G 단백질 부류 화합물, 채널 조절제, 면역요법 부류 화합물, 항-아밀로이드 또는 아밀로이드 저하제, 스타틴 또는 PPARs 조절제일 수 있다.
- [0099] 하나 이상의 구체예에서, 생활습관 인지 개선제는 신체적 및 정신적 운동, 식이 보충제, 예컨대, 항산화제, 미토콘드리아 기능 개선제, 카페인, 오메가-3, 및 도코사헥사엔산(DHA)을 포함할 수 있다.
- [0100] 하나 이상의 구체예에서, 인지 개선제는 생활습관 및 약리학적 개입의 조합을 포함할 수 있다.
- [0101] 본원에 개시된 본 발명이 특정 구체예 및 그 응용에 의해 기술되었지만, 청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 벗어나지 않으며 당업자에 의해 다양한 수정 및 변형이 이루어질 수 있었다.

**도면**

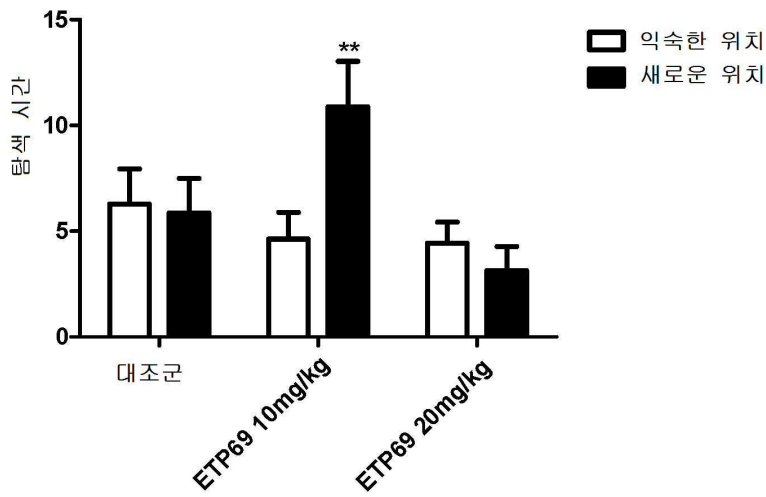
**도면1**



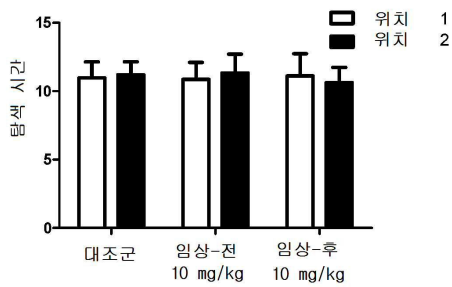
도면2



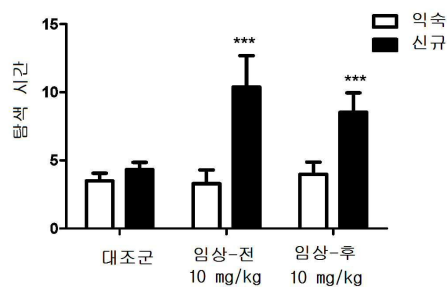
도면3



도면4

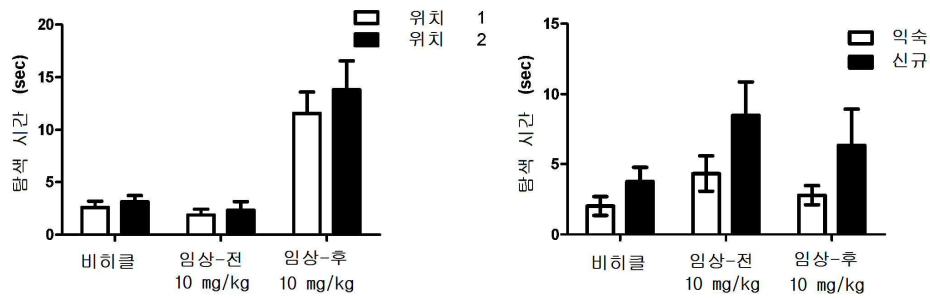


도 4A



도 4B

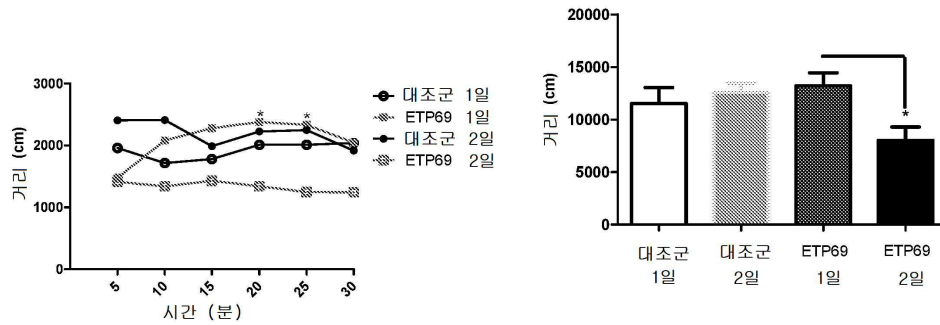
도면5



도 5A

도 5B

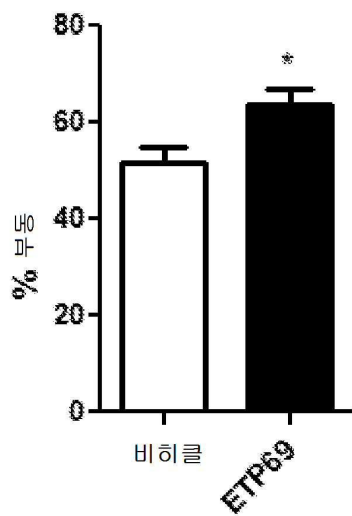
도면6



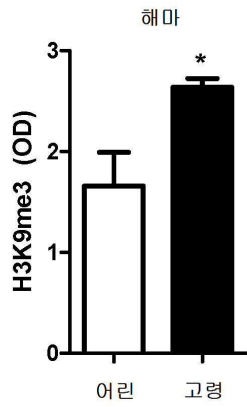
도 6A

도 6B

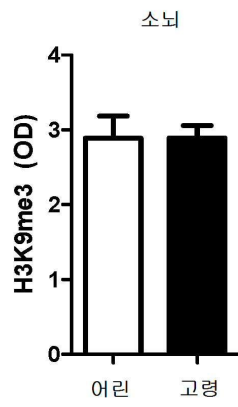
도면7



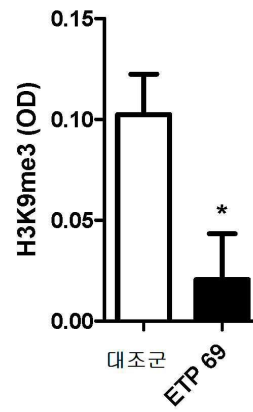
도면8



도 8A

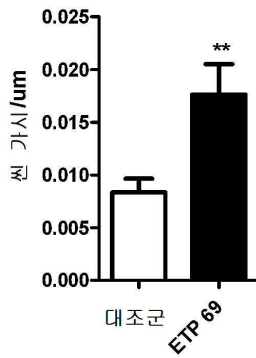


도 8B

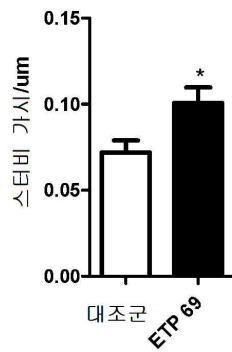


도 8C

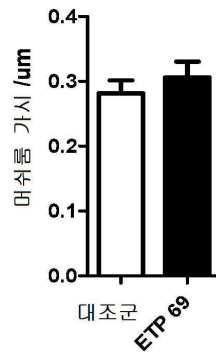
도면9



도 9A

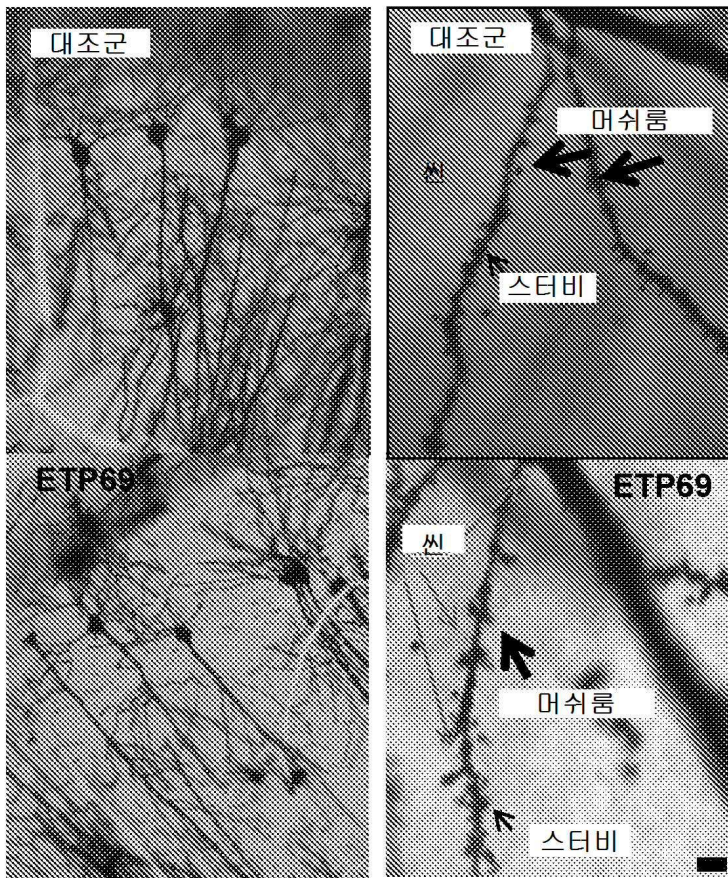


도 9B

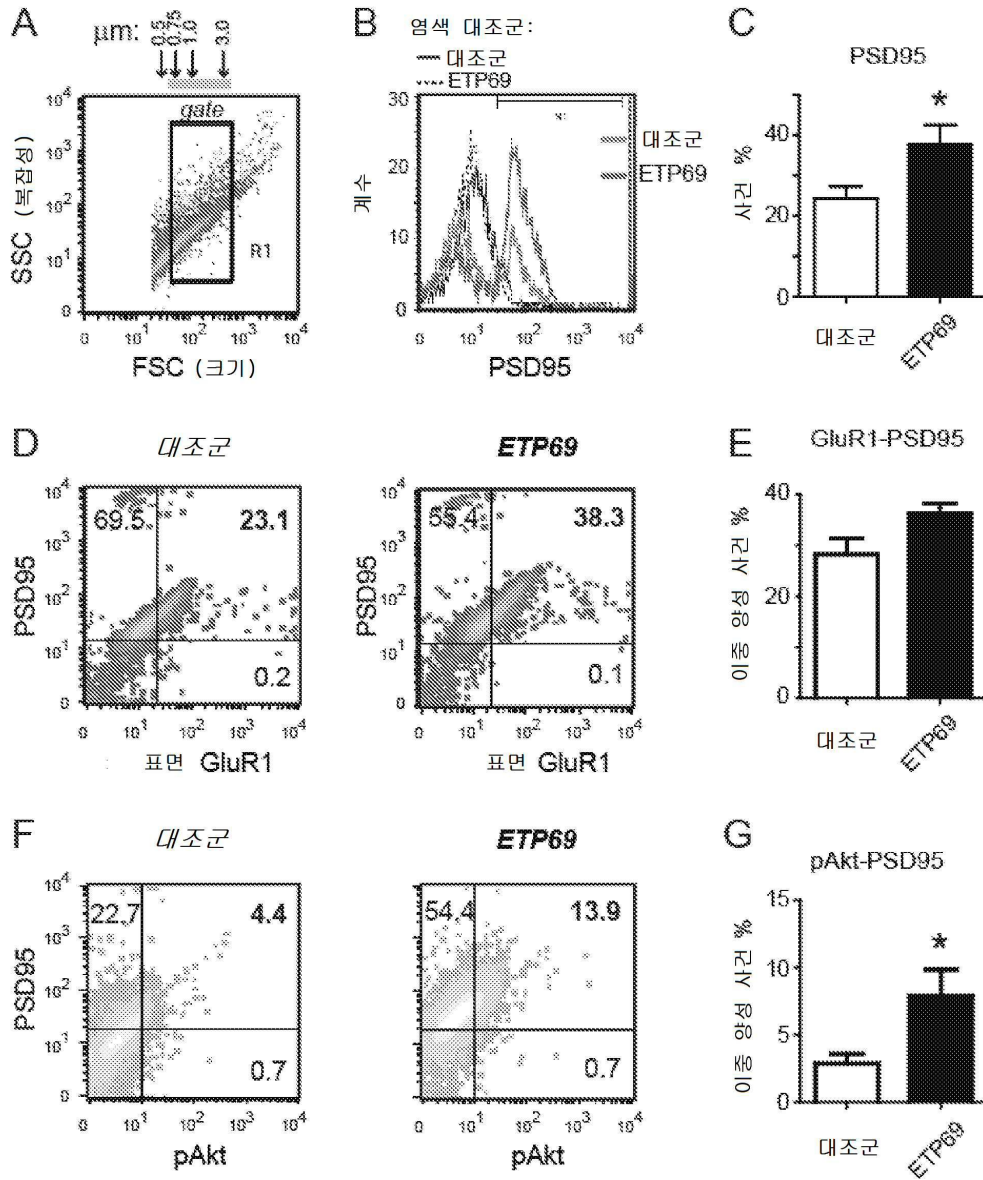


도 9C

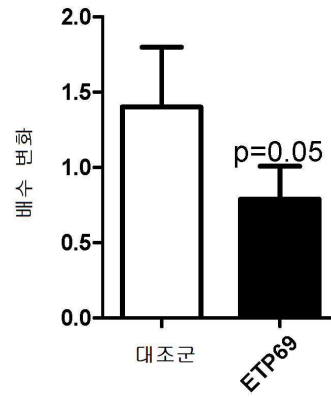
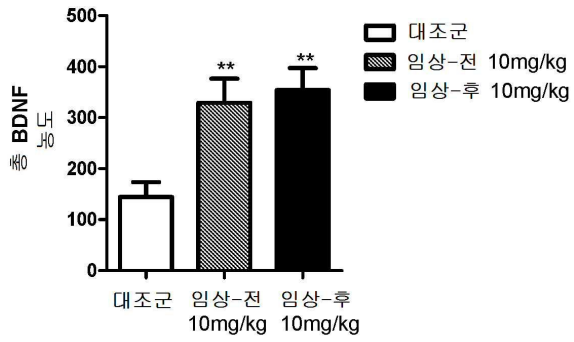
도면10



도면11



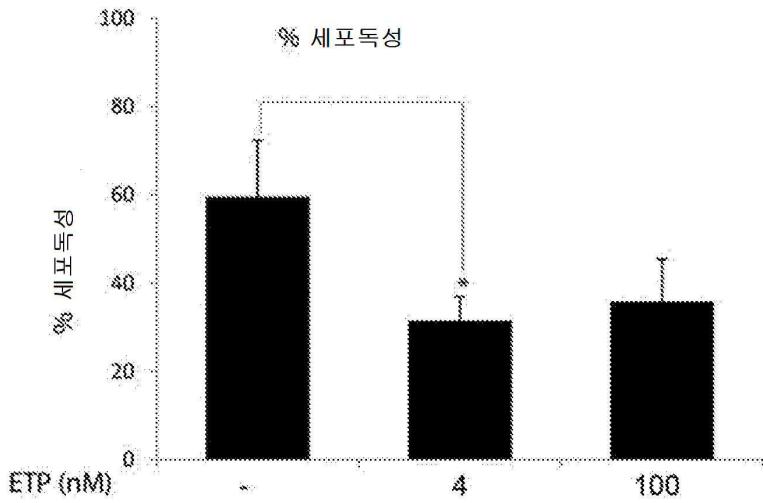
도면12



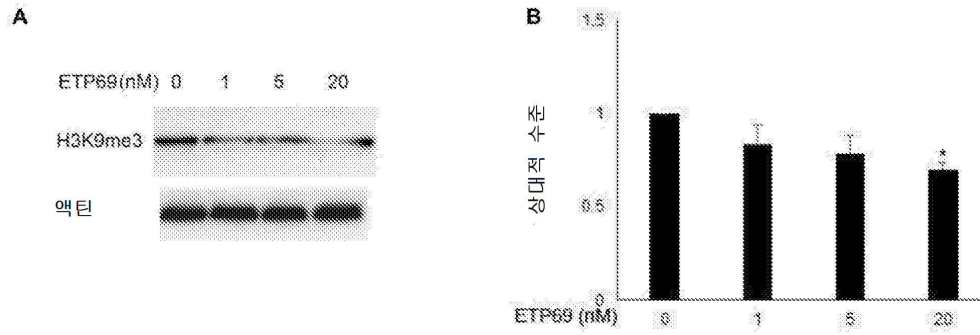
도 12A

도 12B

도면13



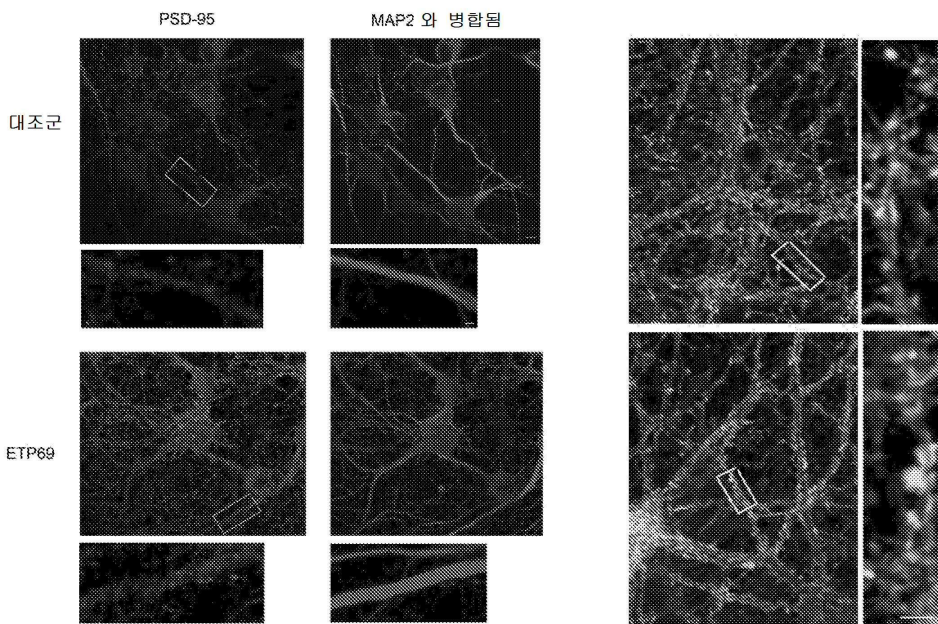
도면14



도 14A

도 14B

도면15



도 15A

도 15B

도면16

