



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월17일
 (11) 등록번호 10-1604434
 (24) 등록일자 2016년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/497 (2006.01) **A61K 31/495** (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0168849
 (22) 출원일자 2013년12월31일
 심사청구일자 2013년12월31일
 (65) 공개번호 10-2015-0078960
 (43) 공개일자 2015년07월08일
 (56) 선행기술조사문헌
 US20100015127 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 (72) 발명자
김동욱
 서울 마포구 신수로 107, 102동 702호 (신수동, 신촌삼익아파트)
박철용
 서울 서대문구 이화여대8길 62, 106동 805호 (북아현동, 두산아파트)
 (74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 윤동준

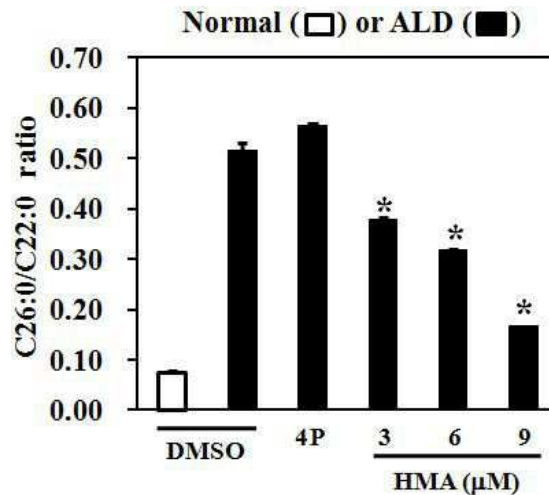
(54) 발명의 명칭 **X-연관 부신백질이영양증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 긴사슬지방산 과다질환, 특히 X-연관 부신백질이영양증에 대한 효율적인 치료제 조성물로서 아밀로라이드(amiloride) 유도체 화합물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 긴사슬지방산 분해에 관여하는 ABCD1 단백질에 대한 보상효과(compensatory effect)가 있는 ABCD2 유전자 프로모터 활성을 유의하게 증가시키고, C26:0 및 C24:0 긴사슬지방산의 수준을 농도 의존적으로 감소시키면서, 아울러 C26:0/C22:0의 비율도 유의하게 낮추어 난치성 질환인 X-연관 부신백질이영양증 등의 근본적인 치료방법을 제공한다.

대표도 - 도2a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9B4028631

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단

연구사업명 바이오 의료기술개발사업

연구과제명 전분화능 줄기세포로부터 중뇌 흑질부 특이적 도파민 신경세포의 효율적 분화법 개발을 통한 신경계 질환 세포치료 원천기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.06.01 ~ 2017.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120254

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 배아줄기세포의 고효율 신경세포분화법을 통한 파킨슨병과 척수손상 임상적용 핵심기술 개발(역분화줄기세포 유래 세포를 대조군으로한 안전성 유효성 비교 평가)

기 여 율 1/3

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.08.01 ~ 2015.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C7050126

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단

연구사업명 바이오 의료기술개발사업

연구과제명 환자유래 역분화 줄기세포 이용 질병 모델 개발 및 신경계 분화세포로 약효 독성 평가 플랫폼 개발

기 여 율 1/3

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

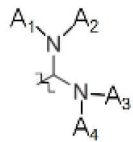
청구항 1

다음 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

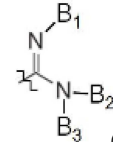
화학식 1



상기 화학식에서, --- 는 단일결합 또는 이중결합을 나타내며; --- 가 이중결합일 때 Z는 N이고 Y는



(A₁-A₄는 수소)이며; --- 가 단일결합일 때 Z는 NH이고 Y는



(B₁-B₃는 수소)이고; R₁

및 R₂는 수소이며; X는 할로젠이고; R₃은 이소프로필이고, R₄는 에틸이며, 또는 R₃ 및 R₄는 서로 연결되어 R₃ 및 R₄이 결합하는 N과 함께 N-사이클로헥사메틸렌을 이룬다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1의 X는 Cl인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

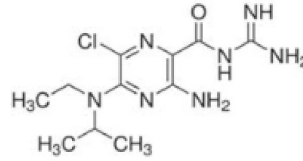
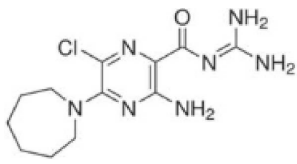
삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기의 화학식 2 또는 3으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 2

화학식 3



청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD)은 소아형 대뇌형(Childhood Cerebral form ALD, CCALD) X-ALD 또는 부신척추 신경병형(adrenomyeloneuropathy, AMN) X-ALD인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 *ABCD2* 유전자의 프로모터 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 아밀로라이드(amiloride) 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 X-연관 부신백질이영양증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD)은 열성 유전질환으로, 17,000-20,000명의 남성중 1명 꼴로 발병하는 낮은 유병률을 보이는 과산화소체(peroxisom)와 관련된 질환이다(Singh I. et al., *Brain Pathol*, 20:838-844(2010)). X-ALD는 Xq28에 위치한 *ABCD1* 유전자 내 위치한 다양한 유전적 변이 또는 하나 또는 둘 이상의 엑손의 대량 소실을 원인으로 한다(Kemp S. et al., *Hum Mutat*, 18:499-515(2001)). *ABCD1* 유전자는 ALDP(adrenoleukodystrophy protein)라고도 불리는 ABCD1(ATP-binding cassette(ABC) transporter subfamily D member 1)을 인코딩한다(Mosser J. et al., *Nature*, 361:726-730(1993)). X-ALD 환자의 임상적인 증상으로 볼 때 치명적인 소아형 대뇌형(Childhood Cerebral form ALD, CCALD)과 상대적으로 온화한 성인형인 부신척추 신경병형(adrenomyeloneuropathy, AMN)이 가장 흔한 표현형들이며(70% 이상), 소수 다른 표현형들도 있다(Berger J. et al., *BBA*, 1763: 1721-1732(2006); Moser HW et al., *Nat Clin Pract Neurol*, 3:140-151(2007)). 그 중 CCALD 타입은 일찍(3-10세) 발병하는 타입으로 대개 뇌에서 빠르게 진행되는 염증성 탈수초화(demyelination)를 보여 2-5년 내에 식물인간 상태가 되어 죽음에 이른다(Kemp S. et al., *Bri J Pharm*, 164:1753-1766(2011)). 임상적인 표현형과 *ABCD1* 유전자 내 변이된 유전자형 간의 일관된 상관관계는 없다고 알려져 있다(Smith KD. et al., *Neurochem Res*, 24:521-535(1999)). X-ALD의 생화학적인 특성은 ABCD1 단백질(ALD 단백질이라고도 불리는)의 기능 이상으로 인한 혈장 및 조직, 특히 뇌 및 부신피질 내 긴 사슬지방산(또는 긴포리지방산, very long chain fatty acids, VLCFAs)의 과다축적이다(Kemp S. et al., *brain pathol*, 20:831-837(2010)).

[0003]

Abcd1 변이 마우스는 VLCFA β 산화가 감소하고 섬유아세포 및 뇌, 척수 및 부신피질 등의 조직에서 VLCFAs가 축적되는 것으로 알려져 있다(Yamada T. et al., *Cell Bio Bio*, 32: 239-246(2000); Forss-Petter S. et al., *J*

Neu Res 50:829(1997); Kobayashi T. et al., *BBRC*, 232: 631(1997); Lu JF. et al., *PNAS* 94:9366(1997)). 최근, 본 발명자들은 X-ALD 모델에서 수득한 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)로부터 분화된 뉴런 및 희돌기교세포(또는 희소돌기아교세포, oligodendrocytes)에 VLCFAs가 누적되어 있음을 확인하였다(Jang J. et al., *Ann Neurol* 70:402-409(2011)). 현재, 로렌조 오일(Lorenzo's oil)은 뇌 MRI 사진 결과가 정상인, 증세가 발견되기 전의 소년 환자에게서 보존적 효과를 보이기는 하지만 현재로서 X-ALD에 대한 성공적인 치료제는 개발되어 있지 않다(Moser HW. et al., *J Mol Neu*, 33:105-113(2007)). *ABCD2*는 ALDRP(ALD-related protein)라고도 불리는 *ABCD2* 단백질을 인코딩하며, *ABCD2* 단백질은 *ABCD1*과 높은 상동성을 보인다(Holzinger A. et al., *BBRC*, 239:261-264(1997)). 아울러, ALDRP는 ALDP와 기능적 유사성을 가진다. 이런 면에서, *ABCD2* 단백질의 인위적 발현은 *ABCD1* 결핍을 대체하여 생체 외(Kemp S. et al., *Nat Med* 4:1261-1268(1998)) 뿐 아니라 생체내(Pujol A. et al., *Hum Mol Genet* 13:2997-3006(2004)) VLCFAs 수준을 정상화시킬 수 있다. 따라서, *ABCD2* 유도는 X-ALD 치료의 유망한 타겟으로 보고된 바 있다(Berger J. et al., *Brain Pathol* 20:845-856(2010)). 사실, 몇몇 화합물들이 *ABCD2* 유전자의 발현을 다소 유도하는 것으로 조사되기는 하였으나(Kemp S. et al., *Nat Med* 4:1261-1268(1998); Singh J. et al., *J Lipid Res* 52:2056-2069 (2011)), X-ALD의 임상적인 치료를 담보할 만큼 효율적인 의약은 아직 동정된 바가 없다.

[0004] HTS(High-throughput screening) 분석은 다양한 세포 기능 및 경로를 조절하는 화합물을 동정하기 위한 도구로 사용되어 왔다(Inglese J. et al., *Nat Che Bio* 3:466-479(2007)). 루시페라아제(Luciferase) 리포터(Reporter)는 민감성과 검출의 편리성으로 인하여 HTS에서 널리 사용된다(Michelini E. et al., *Anal Bioanal Chem* 398:227(2010)). 본 발명자들은 루시페라아제 리포터 시스템을 이용하여 X-ALD 환자의 섬유아세포에서 *ABCD2* 유전자의 프로모터 활성을 조절하는 화합물을 탐색한 결과 특정 구조의 아밀로라이드(amiloride) 유도체 화합물을 발굴하였다. 나아가, 본 발명의 화합물을 X-ALD 환자의 섬유아세포에 투여하자 VLCFA 수준이 농도 및 시간 의존적으로 정상으로 회복됨을 관찰함으로써, 본 발명의 화합물이 X-ALD 치료에 매우 효율적인 신규 치료제 조성물임이 확인되었다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 X-연관 부신백질이영양증을 비롯한 긴사슬지방산(Very long chain fatty acids, VLCFAs)의 세포내 과다 축적을 원인으로 하는 다양한 질환의 효과적인 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 하기 화학식 1 화합물이 VLCFAs를 분해하는 데에 연관된 *ABCD1* 단백질의 기능을 대체할 수 있는 *ABCD2* 유전자 발현을 증가시키고, 이에 따라 VLCFAs의 분해가 촉진되어 결과적으로 긴사슬지방산의 축적을 크게 개선시킨다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

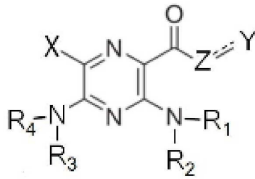
[0007] 따라서 본 발명의 목적은 긴사슬지방산 과다질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

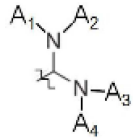
[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 긴사슬지방산 과다질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다:

[0010] **화학식 1**

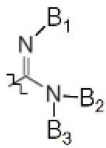


[0011]

[0012] 상기 화학식에서, ---Z--- 는 단일결합 또는 이중결합을 나타내며; ---Z--- 가 이중결합일 때 Z는 N이고 Y는



(A_1 - A_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_3 알킬)이며; ---Z--- 가 단일결합일 때 Z는 NH이고 Y는



(B_1 - B_3 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_3 알킬)이고; R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_3 알킬이며; X는 할로젠이고; R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_4 알킬이거나, 또는 R_3 및 R_4 는 서로 연결되어 R_3 및 R_4 이 결합하는 N과 함께 5각-7각 고리의 N-포함 헤테로사이클로알킬을 이룬다.

[0013]

본 발명자들은 X-연관 부신백질이영양증을 비롯한 긴사슬지방산(very long chain fatty acids, VLCFAs)의 세포 내 과다 축적을 원인으로 하는 다양한 질환의 효과적인 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1 화합물이 VLCFAs를 분해하는 데에 연관된 ABCD1 단백질의 기능을 대체할 수 있는 ABCD2 유전자 발현을 증가시키고, 이에 따라 VLCFAs의 분해가 촉진되어 결과적으로 긴사슬지방산의 축적을 크게 개선시킨다는 사실을 발견하였다.

[0014]

본 명세서에서 용어 “긴사슬지방산 과다질환”은 C26:0 및 C24:0인 긴사슬 지방산(VLCFAs)의 수송 및 분해를 돕는 기능을 하는 부신백질이영양증 단백질(ALDP)의 결핍 또는 기능 이상으로 인하여 비정상적으로 높은 수준의 VLCFA가 생성 및 축적되고, 이에 의해 신경계 백질 및 부신피질이 손상되어 시각, 청각 및 운동장애가 오고, 부신기능부전이 발생하며, 아드레날린과 코티솔과 같은 부신 호르몬 감소가 일어나 혈압, 심박수, 성적 발달 및 생식능력의 이상을 유발하는 모든 질환을 의미한다

[0015]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 긴사슬지방산 과다질환은 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy, X-ALD), 켈웨거 증후군(Zellweger syndrome) 및 레프섬병(Refsum's disease)으로 구성된 군으로부터 선택된다

[0016]

본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 긴사슬지방산 과다질환은 X-연관 부신백질이영양증이다. 보다 구체적으로는, 상기 X-연관 부신백질이영양증은 소아형 대뇌형 X-ALD(Childhood Cerebral form ALD, CCALD) 또는 부신척추신경병형(adrenomyeloneuropathy, AMN) X-ALD 이다.

[0017]

본 명세서에서 용어 “치료”는 (a)질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b)질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c)질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 긴사슬지방산 과다질환의 증상을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 하며, 이에 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.

[0018]

본 명세서에서, 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.

[0019]

본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 등을 포함한다. C_1 - C_3 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛를 가지는 알킬기를 의미하며, C_1 - C_3 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0020]

본 명세서에서 용어 “할로젠”은 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, F, Cl, Br 및 I를 포함한다.

[0021]

본 명세서에서 용어 “N-포함 헤테로사이클로알킬”은 헤테로 원자로서 질소를 포함하는 환형의 알킬분자를 의미

한다. 5각-7각 고리의 N-포함 헤테로사이클로알킬은 환형 고리를 이루는 질소 및 탄소 원자의 수가 5개 내지 7개인 경우이다.

[0022] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 A₁-A₄는 수소이다.

[0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 B₁-B₃는 수소이다.

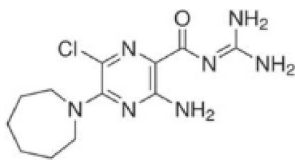
[0024] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 R₁ 및 R₂는 수소이다.

[0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 X는 Cl이다.

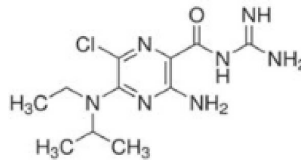
[0026] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 N-포함 헤테로사이클로알킬은 N-사이클로헥사메틸렌이다.

[0027] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기의 화학식 2 또는 3으로 표시되는 화합물이다

[0028] **화학식 2**



화학식 3



[0029]

[0030]

[0031] 본 발명의 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다.

[0032] 바람직하게는, 본 발명의 화합물의 약제학적 허용 가능한 염은 염산염, 브롬산염, 황산염, 인산염, 구연산염, 아세트산염, 트리플루오로아세트산염, 젖산염, 주석산염, 말레인산염, 푸마린산염, 글루콘산염, 메탄설폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔설폰산염, 글루투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 또는 아스파르트산염으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함된다. 또한, 본 발명의 화합물은 용매화물(예를 들면 수화물)의 형태로도 존재할 수 있다.

[0033] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 ABCD2 유전자의 프로모터 활성을 증가시킨다.

[0034] 본 발명의 조성물은 긴사슬지방산 과다질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물의 형태로 제공될 수 있으며, (a) 상술한 본 발명의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 본 발명의 조성물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0036] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 및 뇌실투여 등으로 투여할 수 있고, 구체적으로는, 예를 들어 뇌실 투여 (intracerebroventricular injection)에 의해 투여할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-1000 mg/kg이다.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캡셀제 또는 젤(예컨대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0041] (a) 본 발명은 긴사슬지방산 과다질환, 특히 X-연관 부신백질이영양증에 대한 효율적인 치료제 조성물로서 아밀로라이드(amiloride) 유도체 화합물을 제공한다.

[0042] (b) 본 발명의 조성물은 긴사슬지방산 분해에 관여하는 ABCD1 단백질에 대한 보상효과(compensatory effect)가 있는 ABCD2 유전자 프로모터 활성을 유의하게 증가시키고, C26:0 및 C24:0 긴사슬지방산의 수준을 농도 의존적으로 감소시키면서, 아울러 C26:0/C22:0의 비율도 유의하게 낮추어 난치성 질환인 X-연관 부신백질이영양증 등의 근본적인 치료방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 HTS(High-throughput screening) 분석 및 스크리닝 결과를 나타낸 그림이다. 도 1a는 CCALD 섬유아세포를 지시된 리포터 플라스미드(800 luc 또는 800 x 2luc) 및 Renilla 루시페라아제 플라스미드로 마이크로포레이터를 이용하여 전기천공(electroporation)한 결과를 나타낸 그림이다. 전기천공 2일 후, 세포에 지시된 농도의 로바스타틴(Lova) 또는 4-PBA를 기준 화합물로 처리하였다. 24시간 후 루시페라아제 활성을 측정하고 Renilla 루시페라아제 활성으로 표준화하였다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)으로 나타내었다. 도 1b는 CCALD 섬유아세포를 800 x 2luc 및 Renilla 루시페라아제 플라스미드로 전기천공한 뒤 96-웰-플레이트에 씨딩하고 24시간 후 1차 히트 화합물(64개)을 5 μM의 최종농도로 처리한 결과를 나타낸 그림이다. 24시간 후, 세포를 채집하여 발광신호를 측정하였다. 데이터는 9개의 2차 히트 화합물의 상대적 루시페라아제 활성을 나타내는 것으로, 각 데이터는 3개의 독립된 실험 중 하나의 결과를 보여준다. 4-PBA (4P; 1mM) 화합물이 기준 화합물로 이용되었다. 도 1c는 세포를 6-웰 플레이트에 씨딩하고 9개의 2차 히트 화합물을 3 μM 농도로 4일간 처리한 후 VLCFA 농도를 측정하여 결과를 나타낸 그림이다. 각 데이터는 3개의 독립된 실험 중 하나의 결과를 보여준다. 도 1d는 Sigma-Aldrich에서 구입한 HMA의 화학구조를 나타낸 그림이다.

도 2는 HMA가 ALD 섬유아세포에서 용량 의존적으로 VLCFA를 감소시킴을 보여주는 그림이다. 도 2a는 정상인간 피부 섬유아세포 또는 CCALD 섬유아세포에 4-PBA(4P; 2mM) 또는 HMA를 처리한 결과를 나타낸 그림이다. 처리 4일 후, 세포를 채집하여 VLCFA 농도를 측정하였다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다. **p* < 0.001; DMSO 처리된 ALD 섬유아세포 vs HMA 처리된 ALD 섬유아세포. 도 2b는 CCALD 섬유아세포를 4-PBA (4P, 2mM) 또는 HMA로 처리하고 2일 후 qPCR로 ABCD2 mRNA 발현량을 측정하여 결과를 나타낸 그림이다. 표준화를 위해 GAPDH mRNA가 사용되었다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다. 모든 실험은 독립적으로 3번 반복되었다.

도 3은 HMA가 ALD 섬유아세포에서 시간 경과에 따라 VLCFA를 감소시킴을 보여주는 그림이다. 도 3a는 CCALD 섬유아세포에 DMSO 또는 HMA를 처리한 결과를 나타낸 그림이다. 처리 후, 세포를 채집하여 VLCFA 농도를 측정하였다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다. **p* < 0.001; DMSO 처리된 ALD 섬유아세포 vs HMA 처리된 ALD 섬유아세포. 도 3b는 CCALD 섬유아세포를 DMSO 또는 HMA로 처리하고 qPCR로 ABCD2 mRNA 발현량을 측정하여 결과를 나타낸 그림이다. 표준화를 위해 GAPDH mRNA가 사용되었다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다. 모든 실험은 독립적으로 3번 반복되었다.

도 4는 HMA가 세포의 생존성에 미치는 영향을 보여주는 그림이다. CCALD 섬유아세포를 96-웰 플레이트에 씨딩하고 24시간 후 DMSO 또는 HMA를 처리한 뒤 1-2일간 배양하였다. 이후 세포 내 MTT에 의해 생성되는 포르마잔을 정량화하였다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다. * $p < 0.05$; DMSO 처리된 세포 vs HMA 처리된 세포.

도 5는 EIPA가 VLCFA 농도의 감소에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. 도 5a는 CCALD 섬유아세포에 DMSO(DM) 또는 EIPA를 처리한 뒤 VLCFA 농도를 측정된 결과를 나타낸 그림이다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다. * $p < 0.001$; DMSO 처리된 세포 vs EIPA 처리된 세포. 도 5b는 Sigma-Aldrich에서 구입한 EIPA의 화학구조를 나타낸 그림이다.

도 6은 1280개 화합물에 대한 HTS(High-Throughput screening)의 플로우차트를 나타낸 그림이다. 전기천공된 세포를 96-웰-플레이트에 씨딩하고 24시간 동안 배양한 뒤 화합물을 처리한 후 다시 24시간을 배양하였다. 채집한 세포의 파쇄물로부터 루시퍼라아제 활성을 측정하였다. 2차 스크리닝은 64개 1차 히트 화합물을 대상으로 실시하였으며, 2차 히트 화합물은 4-PBA와의 활성비교를 통해 선정하였다.

도 7은 9개 히트 화합물 처리에 의한 ABCD2 mRNA 유도를 보여주는 그림이다. CCALD 섬유아세포에 DMSO(DM), 4-PBA(4P, 2mM) 또는 9개 2차 히트 화합물을 처리하고 2일 뒤 mRNA를 분리하였다. qPCR로 ABCD2 mRNA 발현량을 측정하였으며, 표준화를 위해 GAPDH mRNA가 사용되었다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다.

도 8은 HMA가 AMN형 섬유아세포에서도 VLCFA 농도 및 ABCD2 mRNA 발현량을 조절함을 보여주는 그림이다. 도 8a는 AMN형 섬유아세포에 DMSO(DM) 또는 HMA를 처리하고 4일 뒤 VLCFA 농도를 측정된 결과를 나타낸 그림이다. 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다. * $p < 0.001$; DMSO 처리된 세포 vs HMA 처리된 세포. 도 8b는 AMN형 섬유아세포 DMSO(DM), 4-PBA(4P, 2mM) 또는 HMA를 처리하고 2일 뒤 qPCR로 ABCD2 mRNA 발현량을 측정된 결과를 나타낸 그림이다. 표준화를 위해 GAPDH mRNA가 사용되었으며, 데이터 값은 3번의 실험값에 대한 평균(±표준오차)로 나타내었다. 모든 실험은 독립적으로 3번 반복되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0045] **실시예**

[0046] **실험 방법**

[0047] **실험재료**

[0048] ABCD2 유도 스크리닝을 위한 약리학적 활성물질의 라이브러리(Lopac^{1280TM} library)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 로바스타틴은 Calbiochem에서 구입하였으며, 4-PBA(4-phenylbutyrate), HMA(5-(*N,N*-hexamethylene)amiloride), EIPA(5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amiloride), 아밀로라이드 하이드로클로라이드 수화물 및 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. MEM(Eagle's minimumessential medium) 및 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)은 Gibco-BRL Life Technologies에서 구입하였다. FBS(Fetal bovine serum; HyCloneTM)은 Thermo Scientific에서 구입하였으며, 이중-루시퍼라아제 리포터 어세이 시스템은 Promega에서 구입하였다. TRIzol 및 LipofectamineTM RNAiMAX 시약은 Invitrogen에서 구입하였다.

[0049] **세포배양**

[0050] 인간 X-ALD 섬유아세포(CCALD 형, GM04496; AMN 형, GM17819)은 Coriell Institute(ccr.corieell.org/)에서 구입하였고, 인간 피부 섬유아세포(HDF)는 Invitrogen(Cat #, C-004-5C)에서 구입하였다. X-ALD 섬유아세포는 15 % FBS와 1 % 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 MEM에서 배양하였으며, HDF는 10 % FBS와 1 % 페니실린

및 스트랩토마이신을 함유하는 DMEM에서 배양하였다.

[0051]

[0052]

플라스미드

[0053]

ABCD2 프로모터의 800bp 업스트림을 포함하는 phABCD2-800-luc 플라스미드는 본 발명자들에 의해 보고된 방법으로 제작하였다(Park CY et al., 2013, *PLOS One*, vol8, e56242). *ABCD2* 프로모터의 800 bp 업스트림 부위를 두 카피 포함하는 phABCD2-800 x 2-luc 플라스미드를 제작하기 위하여, 추가적인 800bp 절편을 HDF 지놈 DNA를 주형으로 하여 증폭하고, PCR 산물을 phABCD2-800-luc 벡터의 *XhoI* 사이트에 서브클로닝하였다. 리포터 컨스트럭트의 서열은 DNA 시퀀싱(Solgent, Korea)을 통해 확인하였다

[0054]

[0055]

약물 스크리닝 및 루시퍼라아제 리포터 어세이

[0056]

미세천공기 형질전환 시스템(Neon™, Invitrogen)을 이용하여 종래에 보고된 방법(Park CY et al., 2013, *PLOS One*, vol8, e56242)으로 CCALD 섬유아세포(2×10^6)를 3 μg의 phABCD2-800 x 2-luc 플라스미드 및 Simianvirus 40 프로모터로 조절되는 *Renilla* 루시퍼라아제 유전자를 포함하는 1 μg의 pRL-SV40 플라스미드로 일시적 형질전환하였다. 형질전환시킨 세포를 96-웰 플레이트에 씨딩하고 24시간 동안 배양하였다. 이후, 1차 스크리닝을 위해 라이브러리 플레이트의 각각의 화합물을 10 μM의 최종 농도로 처리하였다. 처리 1일 후, 세포에 대한 *Firefly* 및 *Renilla* 루시퍼라아제 활성 분석을 실시하였다. 대조군인 비이클(DMSO)에 비해 2.5배 이상의 활성 유도를 보이는 1차 히트 화합물(64개)을 선정하고, 2차 스크리닝을 위하여 5 μM의 최종농도에서 스크리닝을 반복하였다. 9개 화합물이 4-PBA(1 mM 농도)와 유사하거나 더 높은 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 발광 신호를 마이크로플레이트 발광분석기(Berthold Technologies)를 이용하여 측정하였고, 표준화를 위해 *Renilla* 루시퍼라아제 활성을 이용하였다.

표 1

[0057]

LOPAC 스크리닝으로 동정된 9개 화합물.

화합물 번호	명칭	분자량	설명(선택성 및 작용)
1	5-(N,N-hexamethylene)amiloride	311.7766	Na ⁺ / H ⁺ 안티포터 억제자
2	Rhodblock 6	215.2569	Rho 카이네이즈 경로 억제자
3	Daidzein	254.2446	미토콘드리아 알데하이드 디하이드로게나아제 억제자
4	N-Methylhistaprodifen dioxalate salt	499.5252	H1 히스타민 수용체 아고니스트
5	Mibefradil dihydrochloride	568.5649	T-형 Ca ²⁺ 채널 블로커
6	T0070907	277.6689	PPAR γ 길항제인 GW9662와 구조 및 활성이 매우 유사.
7	Resveratrol	228.2499	COX 억제자
8	BIX 01294 trihydrochloride hydrate	600.037	선택적 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제자
9	SIB 1893	195.2664	mGlu5 대사성 글루타메이트 수용체의 선택적/비경쟁적 길항제

[0058]

[0059]

정량적 PCR (qPCR) 분석

[0060]

qPCR 분석을 위해, 제조사의 설명서에 따라 TRIzol 시약을 이용하여 총 RNA를 분리하였다. cDNA는 1mg 총 RNA로부터 DiaStar™ cDNA 합성 키트(SolGent, Korea)으로 합성하였다. 합성된 cDNA를 제조사의 설명서에 따라 SYBRPremixExTaq(Takara) 및 CFXConnect™ 실시간 PCR 시스템(Bio-Rad)을 이용하여 qPCR 증폭을 하였다. 사용된 프라이머 서열은 표 2에 나타내었다.

표 2

실시간 PCR에 사용된 프라이머 서열.

프라이머	서열
ABCD2 정방향	5' -GAACTGCTGTCATTCAAGAATCTG-3'
ABCD2 역방향	5' -TGCCAATGTGTCAGTACTGAGAGG-3'
GAPDH 정방향	5' -CCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTA-3'
GAPDH 역방향	5' -GAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

[0061]

[0062]

긴사슬지방산 (VLCFAs) 분석

[0063]

트립신 처리를 통해 X-ALD 섬유아세포를 채집하고, 세포 침전물(2 x 10⁵ cells)을 PBS에 용해시켰다. VLCFA 분석은 이전에 보고된 방법(Paik MJ et al., 2001, *J chromatogr B Biomed Sci Appl*, vol 760, 149-157)으로 서울임상연구소에서 수행하였다. VLCFA는 종래에 보고된 방법대로 메틸 에스터 형성을 통해 측정하였다(Moser HW et al., 1980, *Ann Neurol*. Vol 7, 542-549). 간단히 기술하면, 헵타코산산(heptacosanoic acid, C27:0)을 내부 표준물질로서 각 시료에 첨가하였다. 이후 메탄올에 용해된 메틸렌 클로라이드 및 아세틸 클로라이드를 첨가하고 시료를 1시간 동안 75℃에서 가열하여 메틸 에스터가 형성되도록 하였다. 이를 냉각한 후, 탄산칼륨 용액을 첨가함으로써 중화를 통해 반응을 억제하였다. 수득한 지방산 메틸 에스터를 헥산 용액으로 추출하고, 이후 극성 화합물을 제거하기 위하여 아세토니트릴로 추출하였다. 헥산 층을 취하여 온화한 질소 기체 하에서 건조될 때까지 기화시켰다. 건조된 잔기는 기체 크로마토그래피 분석을 위해 헥산에서 복원시켰다.

[0064]

[0065]

인 비트로 세포 생존성 분석

[0066]

인 비트로 세포 생존성은 MTT 분석을 통해 측정하였다. 웰당 5000개의 CCALD 섬유아세포를 96-웰 조직배양 플레이트에 씨딩하였다. 24시간 뒤 세포에 DMSO 또는 HMA를 처리하고, 살아있는 세포의 미토콘드리아 활성을 보여주는 MTT 정량 비색분석(colorimetric assay)으로 세포 생존성을 조사하였다. 처리 후 1-2일 동안 세포 내 MTT에 의해 생성되는 포르마잔을 Molecular Devices 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540 nm에서의 OD값을 측정함으로써 정량화하였다.

[0067]

[0068]

통계적 분석

[0069]

데이터는 평균(±표준오차)로 나타났다. 통계 분석을 위해 스튜던트의 *t*-검정을 이용하였으며, *p*<0.05 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[0070]

실험 결과

[0071]

HTS 분석 및 스크리닝 결과

[0072]

ABCD2 유도는 X-ALD 치료에 있어 유망한 접근으로 여겨지고 있어, 본 발명자들은 치료 조성물의 스크리닝에 이러한 개념을 적용하였다. 리포터 기반 세포 스크리닝 시스템을 구축하기 위하여, 우선 인간 ABCD2 프로모터의 800bp 업스트림 부위를 1카피 또는 2카피 포함하는 루시퍼라아제 리포터 플라스미드를 제작하였다. 본 발명자들은 X-ALD 치료약물인 로바스타틴 및 4-PBA가 두 개의 루시퍼라아제 리포터 시스템에서 모두 ABCD2 프로모터 활성을 유도함을 확인하였다(도 1a). 또한 예상했던 바와 같이, X-ALD 치료약물을 처리하였을 때 800bp 부위를 두개를 가지고 있는 리포터 플라스미드를 형질전환한 실험군에서 800bp 부위 하나를 가지는 경우와 비교해 리포터 활성이 더 큰 것을 확인할 수 있었다(도 1a).

[0073]

다음으로, 본 발명자들은 ABCD2 유전자의 유도 활성을 가지는 저분자 화합물을 동정하기 위하여 CCALD 섬유아세포에서 HTS를 수행하였다. 먼저 10 μM 농도로 처리한 1차 스크리닝을 통해 총 64개의 후보 화합물을 확인하였고, 이들을 이용하여 5 μM 농도에서 2차 스크리닝을 수행한 결과 4-PBA 1mM 농도에서 확인되는 루시퍼라아제

활성과 같거나 높은 활성을 보이는 9개의 히트 화합물을 동정하였다(도 1b 및 도 6).

[0074]

이렇게 탐색한 9개의 히트 화합물들에 대한 VLCFA 감소 효과를 확인한 결과, 1번 약물과 8번 약물을 처리하였을 때 VLCFA 감소 효과가 가장 큰 것을 확인하였다(도 1c). 이들 두 약물 중에 1번 약물은 DMSO 처리군에 비해 C22 값에는 큰 영향을 미치지 않았고, C24값과 C26 값만 감소시킴을 확인하였다. 하지만 8번 약물은 DMSO 처리군과 비교해 C22, C24 및 C26 값을 약 3배 가량 증가시키는 것이 확인되어 이후 실험에서 1번 약물에 집중하여 실험을 하였다. 뿐만 아니라, 9개 히트 화합물을 CCALD 섬유아세포에 처리한 후 세포 내(endogeneous) *ABCD2* mRNA 수준을 확인한 결과 약물에 따라 정도의 차이는 있지만 *ABCD2* mRNA를 증가시킴을 확인하였다(도 7). 이러한 결과를 통해 *ABCD2* 프로모터 활성을 통한 약물 검색법이 실제 mRNA 수준을 간접적으로 신뢰도 있게 반영하고 있음을 알 수 있었다. 1번 화합물 해당하는 HMA 화합물의 화학구조는 도 1d에 나타내었으며, 검색된 9개의 약물에 대한 정보는 하기의 표 3에 표시하였다.

표 3

[0075]

LOPAC 스크리닝으로 동정된 9개 화합물.

화합물 번호	명칭	분자량	설명(선택성 및 작용)
1	5-(N,N-hexamethylene)amiloride	311.7766	Nat/ H+ 안티포터 억제자
2	Rhodblock 6	215.2569	Rho 카이네이즈 경로 억제자
3	Daidzein	254.2446	미토콘드리아 알데하이드 디하이드로게나아제 억제자
4	N-Methylhistaprodifen dioxalate salt	499.5252	H1 히스타민 수용체 아고니스트
5	Mibefradil dihydrochloride	568.5649	T-형 Ca ²⁺ 채널 블로커
6	T0070907	277.6689	PPAR γ 길항제인 GW9662와 구조 및 활성이 매우 유사.
7	Resveratrol	228.2499	COX 억제자
8	BIX 01294 trihydrochloride hydrate	600.037	선택적 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제자
9	SIB 1893	195.2664	mGlu5 대사성 글루타메이트 수용체의 선택적/비경쟁적 길항제

[0076]

HMA는 ALD 섬유아세포의 VLCFA 수준을 용량 의존적으로 감소시킨다.

[0077]

CCALD 섬유아세포에서 HMA 약물에 의한 VLCFA 감소 효과를 확인하기 위해 HMA 용량을 달리하여 처리해 본 결과, 약물의 농도 의존적으로 VLCFA가 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 2a). 흥미롭게도 2mM 농도로 처리한 4-PBA 실험군에서는 VLCFA가 DMSO 처리군과 비교해 차이를 보이지 않았지만, HMA는 3 μ M 농도로 처리하여도 VLCFA 감소 효과가 있음을 확인하였다(도 2a). 다음으로 HMA 처리에 의한 *ABCD2* mRNA 수준을 조사한 결과, HMA 농도 의존적으로 *ABCD2* mRNA 수준이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 2b). 뿐만 아니라 ALD 환자의 또 다른 타입인 AMN형 환자세포에서 HMA에 의한 VLCFA 감소 효과 및 *ABCD2* mRNA 발현증가 효과를 확인하고자 배양된 AMN형 세포에 HMA를 용량별로 처리하였다. 그 결과 모든 HMA 농도에서 VLCFA가 감소하고 *ABCD2* mRNA 수준이 증가함을 확인할 수 있었다(도 8). HMA의 *ABCD2* mRNA 발현 증가 효과는 ALD 환자 세포에서 뿐만 아니라 정상 섬유아 세포에서도 확인되었다.

[0078]

HMA는 ALD 섬유아세포의 VLCFA 수준을 시간의 경과에 따라 감소시킨다.

[0079]

CCALD 섬유아세포에서 HMA 약물에 의한 VLCFA 감소 효과가 처리시간 의존적으로 나타나는지를 확인하기 위해 3 μ M 농도의 HMA를 처리한 후 시간별로 세포내 VLCFA 수준을 확인하였다. 그 결과 HMA 처리 시간에 비례하여 VLCFA가 유의적으로 감소됨을 확인할 수 있었다(도 3a). 뿐만 아니라 *ABCD2* mRNA 수준도 HMA 처리 시간에 비례하여 증가하는 것이 확인되었다(도 3b). 이러한 결과를 통해 HMA가 CCALD 섬유아세포 세포에 처리 농도와 시간에 비례하여 효과적으로 VLCFA를 감소시키는 것을 알 수 있었다.

[0080]

[0081]

HMA가 세포 독성에 미치는 영향

[0082] 다음으로 HMA 약물에 의한 세포독성여부를 확인하기 위해 MTT 분석을 수행하였다. CCALD 섬유아세포에 HMA를 용량별로 처리한 후 2일째까지 24시간 단위로 살아있는 세포의 상대적인 양을 확인한 결과, 1 μ M, 3 μ M 및 6 μ M 농도에서는 2일째까지 세포의 생존에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 4).

[0083]

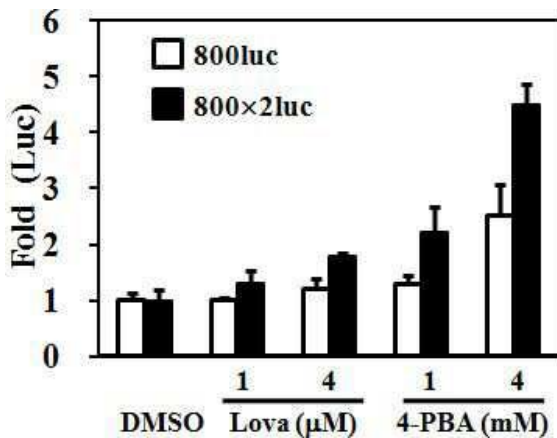
[0084] EIPA가 VLCFA 농도 감소에 미치는 영향

[0085] 마지막으로 HMA와 유사한 구조를 가지면서 약물의 작용점이 같은 EIPA 약물에 의한 VLCFA 감소 효과를 조사하였다. 도 5a에서 확인할 수 있는 바와 같이, EIPA 약물을 처리할 경우 농도 증가와 비례하여 VLCFA가 감소함이 확인되었다(도 5a). EIPA의 화학구조는 도 5b에 표시하였다.

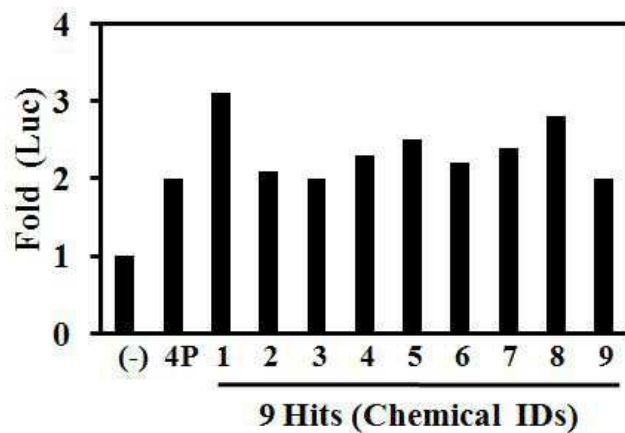
[0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

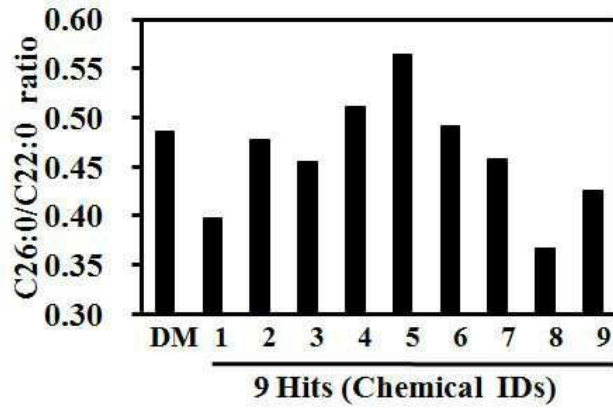
도면1a



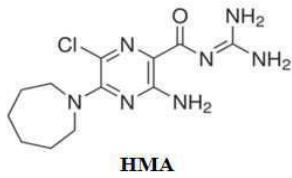
도면1b



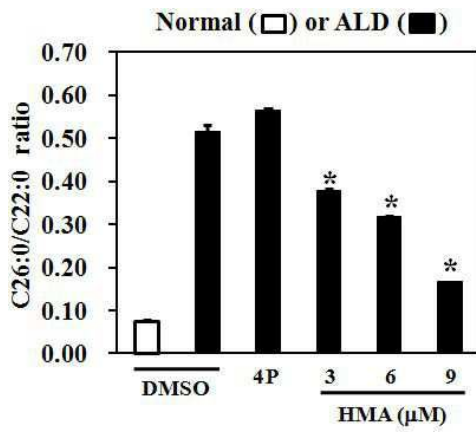
도면1c



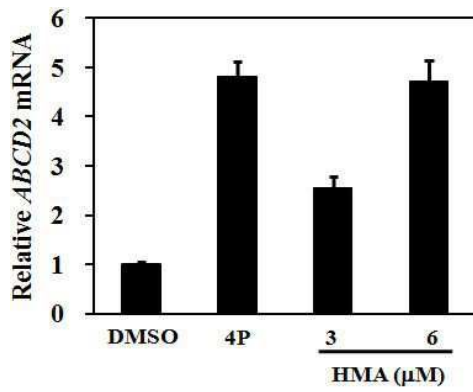
도면1d



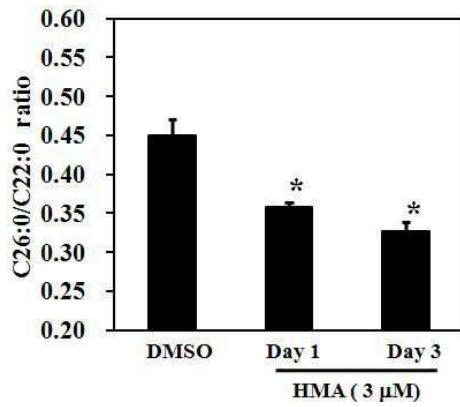
도면2a



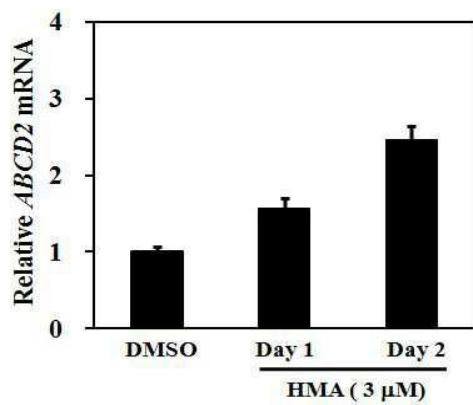
도면2b



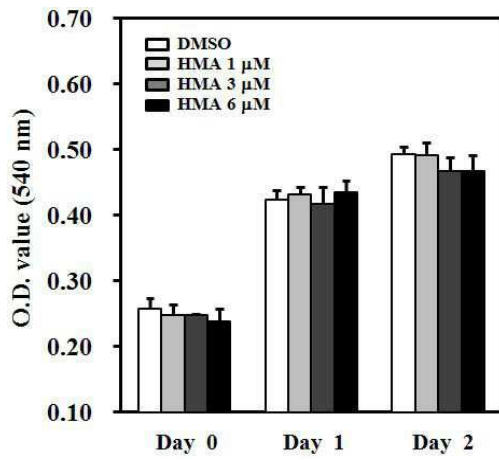
도면3a



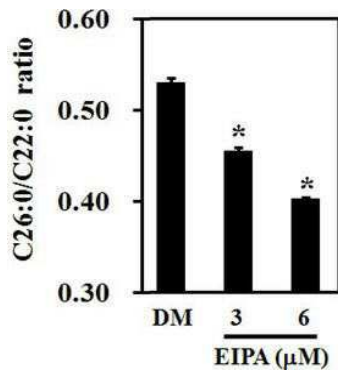
도면3b



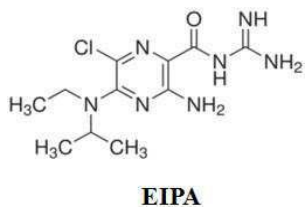
도면4



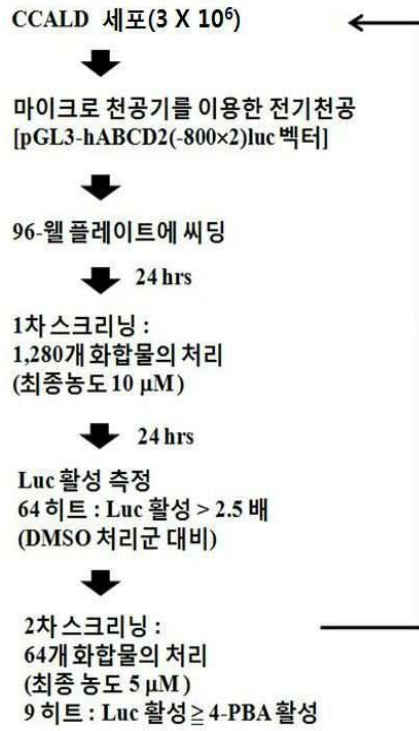
도면5a



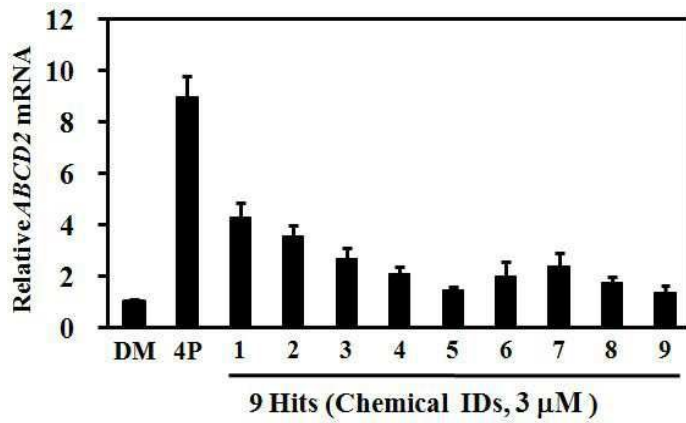
도면5b



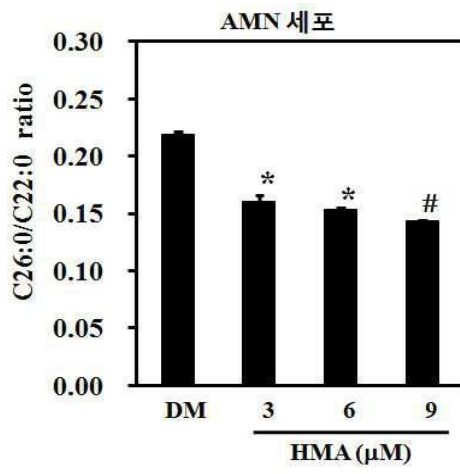
도면6



도면7



도면8a



도면8b

