



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월23일

(11) 등록번호 10-2126038

(24) 등록일자 2020년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07J 9/00 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)

A23L 33/10 (2016.01) A61P 3/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07J 9/00 (2013.01)

A23L 29/035 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0144436

(22) 출원일자 2018년11월21일

심사청구일자 2018년11월21일

(65) 공개번호 10-2020-0059562

(43) 공개일자 2020년05월29일

(56) 선행기술조사문헌

US05840938 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

중앙대학교 산학협력단

서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

민경훈

서울특별시 강남구 역삼로 314, 303동 601호 (역삼동, 개나리 푸르지오)

장지호

서울특별시 용산구 효창원로 17, 104동 1301호 (산천동, 리버힐삼성아파트)

이정욱

서울특별시 동작구 흑석로7길 5, 2층 (흑석동)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 4 항

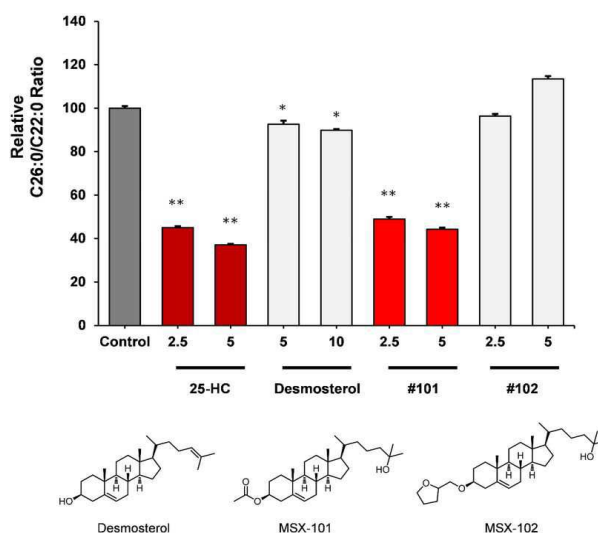
심사관 : 김지은

(54) 발명의 명칭 25-하이드로콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 25-하이드로콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 25-하이드록시콜레스테롤(25-HC) 또는 이의 유사체가 처리된 CCALD 세포, AMN 세포와 X-ALD 환자의 iPS 세포로부터 분화된 희돌기교세포에서 C26:0의 수준이 효과적으로 감소되는 것이 확인됨에 따라, 상기 25-하이드록시콜레스테롤(25-HC) 또는 이의 유사체를 유효성분으로 함유하는 조성물을 X-연관 부신백질이영양증(X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강식품으로 제공하고자 한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2016.08)

A61P 3/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017081543

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 KRAS 변이에 의한 폐암의 신규 치료 표적에 대한 조절 물질 발굴 연구

기 여 율 50/100

주관기관 중앙대학교 산학협력단

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018014110

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 메타리셉터 제어 연구 센터

기 여 율 50/100

주관기관 중앙대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

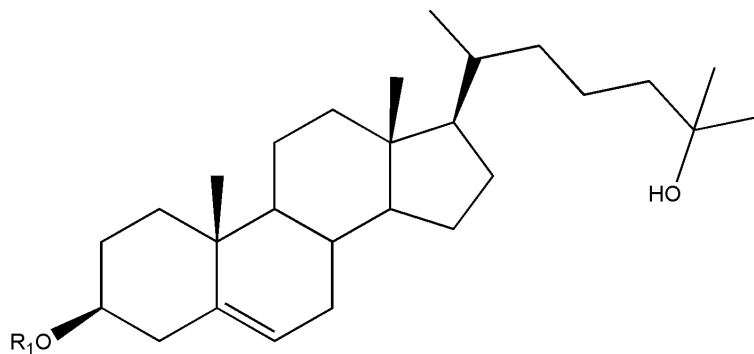
청구항 1

삭제

청구항 2

하기 화학식 1로 표시되는 25-하이드록시콜레스테롤을 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



상기 R₁은 수소 및 아세틸로 이루어진 군에서 선택됨.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 X-연관 부신백질이영양증(X-ALD)는 소아 대뇌형 부신백질이영양증(CCALD), 성인 부신척수신경병증 (AMN, adult adrenomyeloneuropathy) 및 뇌 부신척수신경병증(cAMN, cerebral adrenomyeloneuropathy)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증(X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물.

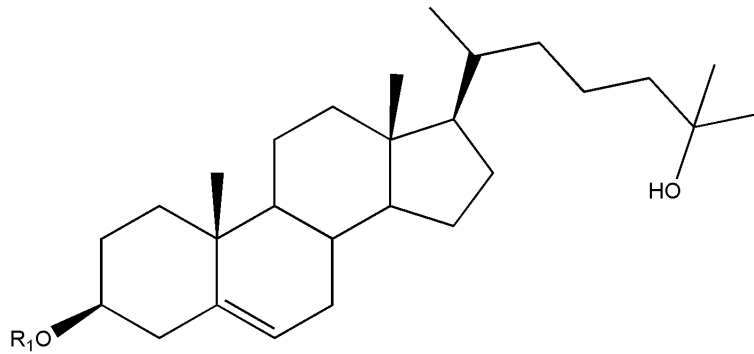
청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 25-하이드록시콜레스테롤은 세포 내 긴사슬지방산(VLCFAs)의 수준을 감소시키는 것을 특징으로 하는 X-연관 부신백질이영양증(X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 25-하이드록시콜레스테롤을 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD) 예방 또는 개선용 건강식품.

[화학식 1]



상기 R₁은 수소 및 아세틸로 이루어진 군에서 선택됨.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 25-하이드로콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD)은 포화된 매우 긴사슬지방산의 증가 수준과 연관된 선천성 대사장애이다 (VLCFAs, $\geq C22:0$).

[0003] ABCD1(ATP-binding cassette sub-family D member 1) 유전자의 변형에 따른 X-ALD 질환 환자의 피부 섬유아세포에서는 헥사코사노믹 산(hexacosanoic acid; C26:0)의 β -산화가 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있으며, 헥사코사노믹 산을 포함하여 VLCFAs의 비정상적인 축적은 척수병증(myelopathy), 부신백질이영양증 및 대뇌 탈수초 질환을 포함한 다양한 병리학적 증후들과 연관된다.

[0004] 그러나 X-ALD에서 VLCFAs의 축적을 이루는 분자 매커니즘은 아직까지 완전히 이해되지 않았으며, 몇몇의 연구가 X-ALD에 대한 다양한 치료법을 설명하고 있더라도 현재 이 질병의 진행을 멈추기 위한 임상적인 치료방법은 존재하지 않는다.

[0005] 다만, 몇 가지 연구에서는 하이드록시메틸글루타릴 효소 A(HMG-CoA) 환원의 잠재적 억제제인 로바스타틴 처리가 적은 수의 환자와 동물모델에서 섬유아세포 내 VLCFAs의 수준이 HMG-CoA 환원효소의 억제와 상관없이 효과적으로 정상화되었다.

[0006] 그러나 다수의 X-ALD 환자에 대한 로바스타틴의 임상 연구에서는 유의적인 VLCFAs의 플라즈마 수준 감소가 나타나지 않았다.

[0007] 현재까지는 식이 보조제로서의 로렌조 오일의 식이 제한 및 투여가 혈장 내 VLCFA의 축적을 감소시키기 위한 방법이나, 로렌조 오일 역시 X-ALD의 진행을 억제하지 못하는 것으로 확인되었다.

[0008] 이에 따라, X-ALD의 진행을 효과적으로 억제하기 위한 방법으로 VLCFAs의 수준을 조절할 수 있는 신규한 화합물의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0078960호(2015.07.08. 공개)

발명의 내용

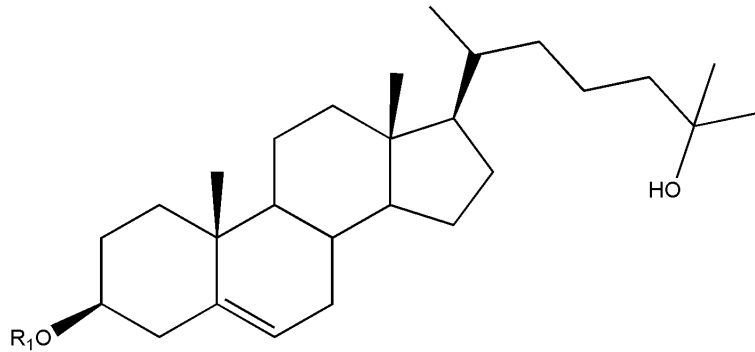
해결하려는 과제

[0010] 상기 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 X-연관 부신백질이영양증을 유발시키는 건사슬지방산(VLCFA)의 수준을 효과적으로 감소시키기 위한 조성물로 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol; 25-HC) 또는 이의 유사체를 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 25-하이드록시콜레스테롤 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공할 수 있다.

[0012] [화학식 1]

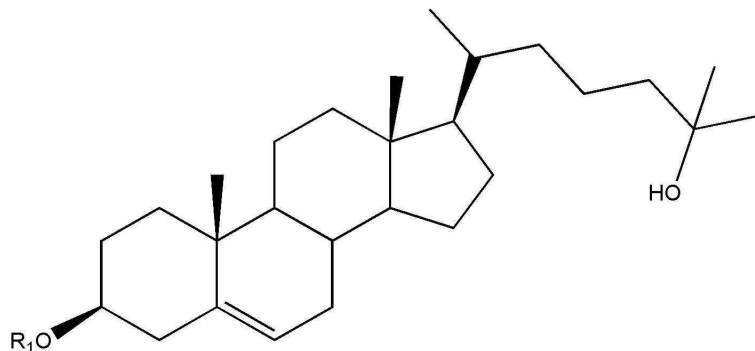


[0013]

[0015] 상기 R₁은 아세틸기 및 (테트라하이드로푸란-2-일)(C1-C4)알킬로 이루어진 군에서 선택됨.

[0016] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 25-하이드록시콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 상기 R₁은 수소 및 아세틸기로 이루어진 군에서 선택됨.

[0020] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 25-하이드록시콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD) 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면, 25-하이드록시콜레스테롤(25-HC) 또는 이의 유사체가 처리된 CCALD 세포, AMN 세포와 X-ALD 환자의 iPS 세포로부터 분화된 희돌기교세포에서 C26:0의 수준이 효과적으로 감소되는 것이 확인됨에 따라, 상기 25-하이드록시콜레스테롤(25-HC) 또는 이의 유사체를 유효성분으로 함유하는 조성물을 X-연관 부신백질이영양증(X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강식품으로 제공하고자 한다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 25-HC 처리에 따른 C26:0/C22:0 변화를 확인한 결과로, 도 1(a)는 CCALD 및 AMN 섬유아세포에 첨가된 25-HC의 농도의존적으로 C26:0/C22:0 비율 감소를 확인한 결과이며, 도 1(b)는 환자 유래 iPS 세포로부터 얻은

회돌기교세포(Oligodendrocytes)에서 25-HC 처리에 따른 C26:0/C22:0 비율 감소를 확인한 결과이다. *p < 0.05, **p < 0.01

도 2 CCALD 세포에서 CH25H 발현 수준에 따른 C26:0/C22:0 비율 변화를 확인한 결과로, 도 2(a)는 CH25H-EGFP의 형질주입에 의한 CH25H의 mRNA 발현 수준을 확인한 정량적 실시간 PCR 분석결과이며, 도 2(b)는 CH25H의 이소성 발현하에서 C26:0/C22:0 비율을 확인한 결과이며, 도 2(c)는 CH25H siRNA 형질주입에 따른 CH25H의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과로, CH25H에 대한 siRNAs 형질주입 후 CH25H의 발현이 약 60% 감소한 것을 확인한 결과이며, 도 2(d)는 CH25H의 억대운에 의한 C26:0/C22:0 비율의 유의적 감소를 확인한 결과이다. **p < 0.01

도 3은 CH25H 억대운과 5 및 10 μ M 25-HC 조건하에서 ELOVL1의 상대적 mRNA 발현 수준을 확인한 결과로, 도 3(a)는 25-HC 5 μ M 첨가에 의한 ELOVL1 발현 수준 감소를 확인한 결과이며, 도 3(b)는 CH25H 억대운에 의한 ELOVL1 발현 수준 증가를 확인한 결과로, 모든 mRNA 발현 수준은 정량적 실시간 PCR 분석으로 확인되었다. *p < 0.05

도 4는 CCALD 세포에서 25-HC 유사체가 C26:0/C22:0 비율에 미치는 영향을 확인한 결과로, 데스모스테롤(Desmosterol)이 C26:0/C22:0 비율의 약10% 유의적으로 감소시켰으며, MSX101의 활성은 25-HC와 유사한 것을 확인된 반면, MSX012는 활성이 나타나지 않은 것을 확인한 결과이다. *p < 0.05, **p < 0.01

도 5는 T0901317가 VLCFAs의 수준 변화에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 5(a)는 CCALD 섬유아세포에서 T0901317에 의한 C26:0/C22:0 비율 감소를 확인한 결과이며, 도 5(b)는 AMN 섬유아세포에서 T0901317에 의한 C26:0/C22:0 비율 감소를 확인한 결과이며, 도 5(c)는 정상 사람 피부 섬유아세포에서 T0901317에 의한 C26:0/C22:0 비율 감소를 확인한 결과이다. *p < 0.05, **p < 0.01.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

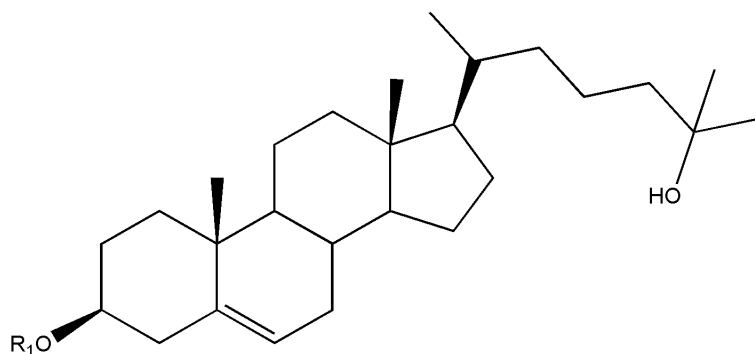
이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0024]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 25-하이드록시콜레스테롤 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공할 수 있다.

[0025]

[화학식 1]



[0026]

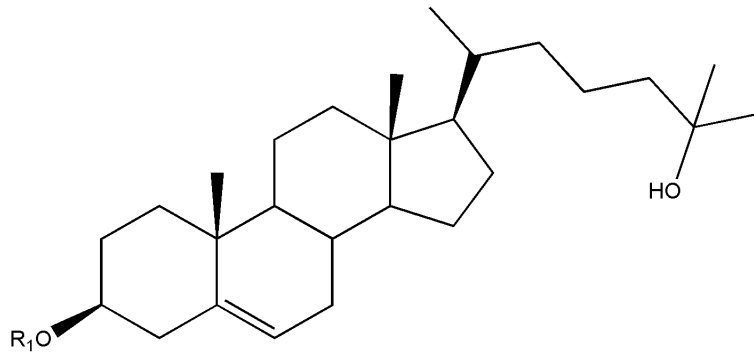
상기 R₁은 아세틸 및 (테트라하이드로퓨란-2-일)(C1-C4)알킬로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0028]

[0029]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 25-하이드록시콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0030] [화학식 1]



[0031]

[0033]

상기 R₁은 수소 및 아세틸로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0034]

상기 X-연관 부신백질이영양증(X-ALD)는 소아 대뇌형 부신백질이영양증(CCALD), 성인 부신척수신경병증 (AMN, adult adrenomyeloneuropathy) 및 뇌 부신척수신경병증(cAMN, cerebral adrenomyeloneuropathy)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0035]

상기 25-하이드록시콜레스테롤 또는 이의 유도체는 세포 내 긴사슬지방산(VLCFAs)의 수준을 감소시키는 것일 수 있다.

[0036]

보다 상세하게는 CCALD(Childhood Cerebral Adrenoleukodystrophy) 환자에서 유래된 세포 및 생체 내에서 콜레스테롤 대사, 25-HC 및 이의 합성 효소인 콜레스테롤 25-하이드록실라아제(CH25H)의 증가가 확인되었고, ABCD1의 기능장애가 CH25H 발현 유도과 관련 있음이 확인되었으며, 25-HC는 X-ALD에서 신경 염증을 유발시키는 인자인 것으로 보고되어 짐에 따라, 25-HC의 병리 생리학적 역할을 확인하기 위해, CCALD 및 AMN 섬유아세포에 1, 5 및 10 μ M 농도로 25-HC를 첨가한 결과, 도 1과 같이 25-HC의 외인성 첨가는 25-HC의 농도의존적으로 CCALD 환자 유래 세포에서 VLCFA의 수준을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다.

[0037]

또한, 25-하이드록시콜레스테롤의 주요 작용기인 하이드록시기를 변화시킨 25-HC의 유도체의 VLCFA 수준 변화를 확인한 결과, 도 4와 같이 탈수된 25-HC인 데스모스테롤은 25-HC보다 매우 적은 활성이 나타난 반면, 아세틸화된 25-HC (MSX101)는 25-HC와 유사한 활성을 나타내었으나 용해도에 대한 테트라하이드로퓨란 잔기를 가진 MSX-102는 C26:0을 감소시키지 못하였다.

[0038]

상기 결과로부터 VLCFA 수준 변화에 있어, 아세틸화된 25-HC의 유사체의 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었으며, 25-HC의 유사체라 하여도 모두 동일하게 VLCFA 수준을 감소시키는 것은 아님이 확인되었다.

[0039]

본 발명의 한 구체예에서, 상기 25-하이드록시콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증(X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0040]

본 발명의 다른 구체예에서, 프로피오닐 에스테르 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증(X-ALD) 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0041]

구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제,

유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

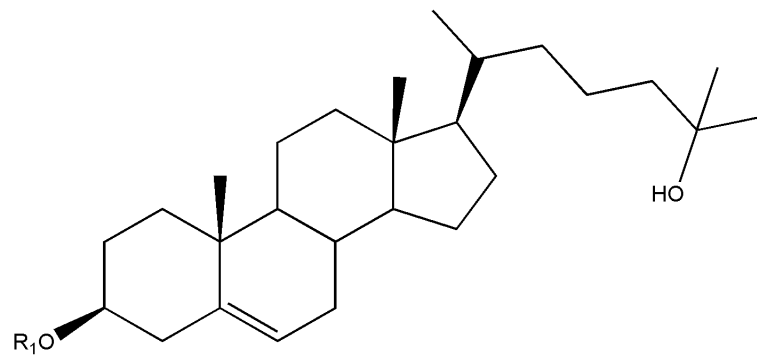
[0042] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0043] 상기 25-하이드록시콜레스테롤 또는 이의 유도체의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 001 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 01 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 01 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 25-하이드록시콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증(X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD) 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0046] [화학식 1]



[0047] 상기 R₁은 수소 및 아세틸로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0050] 상기 건강식품은 상기 25-하이드록시콜레스테롤 또는 이의 유도체 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0051] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0052] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0056] <실험예>

[0057] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0058]

1. 세포배양 및 약물 처리

[0060] 사람 X-ALD 섬유아세포 (GM04904, GM17819; Coriell Institute), 사람 진피 섬유아세포 (HDF, C-004-5C, Invitrogen) 및 CCALD-희돌기교세포를 이전에 보고된 방법에 따라 배양하였다(Jang, J. et. al., *Nat. Commun.*

2016). 25-하이드록시콜레스테롤(sigma), 데스모스테롤(desmosterol; sigma), T0901317 (TOCRIS), 후보 물질 (MSX 101 및 MSX 102) 및 DMSO (대조군)을 3일 연속으로 세포 배양배지에 첨가하였다.

[0062] 2. 배양된 X-ALD 세포내 VLCFA 확인

[0063] 앞서 보고된 방법에 따라 VLCFAs를 확인하였다.

[0064] 간략하게 세포 펠렛을 인산염완충식염수(PBS)로 채부유한 후, 내부 표준으로 헵타코사노익산(C27:0, 20 µg/ml)을 각각 처리하였다.

[0065] 헥산으로 메틸 에스테르를 추출하고 가스 크로마토그래피로 측정하였다.

[0067] 3. CH25H 발현 확인

[0068] CH25H 발현을 억제하기 위해 LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라, 세포에서 스크램블 siRNA (4390843, Ambion) 또는 CH25H 타겟 siRNAs (5-CCUACAUCACUCCAGUUU-3)를 형질주입하였다.

[0069] CH25H의 이소성 발현을 위해, Fugene6 transfection reagent (Roche)를 이용하여 세포에 빈 벡터 또는 CH25H-EGFP 구조물을 형질주입하였다.

[0070] 형질주입 2일 후 세포를 수집하여 mRNA 및 VLCFA 수준을 확인하였다.

[0072] 4. 정량적 실시간 PCR

[0073] TRIzol reagent (Invitrogen)를 이용하여 세포로부터 전체 RNA를 추출하였다. iScriptTM cDNA synthesis kit (Bio-Rad)를 이용하여 전체 RNA 1 µg으로 부터 cDNAs를 생성하였다.

[0074] SYBRH Premix Ex Taq (Takara)를 이용하여 실시간 PCR로 CH25H, ELOVL1 및 GAPDH의 발현을 확인하였다. 제조사의 설명서에 따라 CFX96 Real-Time System (Bio-Rad)를 이용하여 모든 반응을 수행하였다.

[0075] 상대적 발현은 세 번의 독립적인 실험을 통하여 평균±표준편차로 나타내었다.

[0076] 다음과 같은 특이적 프라이머 서열을 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다: (human CH25H) forward, ATCACCACATACGTGGGCTTT; reverse, GTCAGGTGGATCTGTAGCG and (human ELOVL1) forward, ACTCAGGGCTGGCCCCACAA; reverse, CGCCACCCTGACCTTTGGC 및 (human GAPDH) forward, CCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTA; reverse, GAGGTCCACCCTGTGTGCTGA.

[0078] <실시예 1> 25-하이드로콜레스테롤(25-HC)이 VLCFA(very long-chain fatty acids)에 미치는 영향 확인

[0079] 최근 CCALD(Childhood Cerebral Adrenoleukodystrophy) 환자에서 유래된 세포 및 생체 내에서 콜레스테롤 대사, 25-HC 및 이의 합성 효소인 콜레스테롤 25-하이드록실라아제(CH25H)의 증가가 확인되었다. 또한, ABCD1의 기능장애가 CH25H 발현 유도과 관련 있음이 확인되었으며, 25-HC는 X-ALD에서 신경 염증을 유발시키는 인자인 것으로 보고되어 이에 따라, 25-HC의 병리 생리학적 역할을 확인하였다.

[0080] 그 결과, 도 1과 같이 25-HC의 외인성 첨가는 CCALD 환자 유래 세포에서 VLCFA의 수준을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다. 보다 상세하게 25-HC 1 µ를 세포에 처리한 경우, C26:0/C22:0 비율의 현저한 감소가 확인되었으며, 25-HC 농도의존적으로 VLCFA 수준감소가 나타나는 것이 확인되었다.

[0081] 상기 25-HC 첨가에 의한 VLCFA 감소는 부신척수신경병증(adrenomyeloneuropathy; AMN) 환자 유래 세포 및 CCALD 환자에서 유도된 다능성 줄기 세포와 구별되는 희돌기교세포에서도 일관성 있게 확인되었다.

[0082] 한편, CH25H 과발현 및 억제된 모델에서 내재성 25-HC의 변화 수준에 따른 영향을 확인하였다.

[0083] 그 결과, 도 2와 같이 CH25H의 이소성 발현은 약간의 VLCFA 감소를 유도하는 것을 확인되었으며, 보다 상세하게 CH25H의 과발현과 1 µM 25-HC의 외인성 첨가에 따른 VLCFA 감소 효과를 비교한 결과, 각각 약 10% 및 30% 감소를 나타내었으며, CH25H의 과발현은 VLCFA 수준의 큰 변화를 나타내지 못함에 따라, 25-HC는 그것 자체로 CH25H보다 VLCFA 생성에 더 큰 영향을 미치는 것이 확인되었다.

[0084] 이와 대조적으로 siRNA를 이용한 CH25H의 발현억제는 VLCFA의 유의한 증가를 유도하였으며, 상기 결과로부터 내인성 25-HC는 VLCFA 축적 억제에 기여할 것으로 예상되었으나, 25-HC가 증가된 X-ALD 세포에서 VLCFA의 증가 수준이 확인되었다.

[0085] 이러한 결과는 25-HC 농도가 VLCFA 수준을 감소시킬 수 있을 정도로 충분히 증가되지 못하였기 때문으로, 내인성 25-HC의 일부는 VLCFA의 감소와 관련된 표적과 결합할 수 없는 불활성화 형태인 5-콜레스텐-3 β , 25-디올 3-설페이트(25HC3S), 25-HC와 대조적인 활성을 나타내는 25-HC의 설페이트 대사산물로 존재할 수 있다.

[0086] 이에 따라, 25-HC의 활성 모드를 확인하기 위해, 25-HC의 외인성 첨가가 C26:0 및 26:1 지방산 합성에 관여하는 VLCFA 특이적 신장효소 1(ELOVL1)의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

[0087] 이미 ELOVL1을 억제시키거나 억제시킨 X-ALD 섬유아세포에서 C26:0 수준을 감소시키는 것으로 보고(Ofman, R. et. al., EMBO Mol. Med. 2010; Schackmann, M. J. A. et. al., Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids 2015)되어 짐에 따라, CCALD 환자의 세포에 25-HC를 처리한 결과, 도 3과 같이 25-HC 처리에 의해 ELOVL1 발현 감소가 확인되었다.

[0088] 상기 결과로부터 VLCFA 수준에 대한 25-HC의 영향은 ELOVL1의 하향 조절에 의한 것으로 확인되었으며, 내인성 25-HC의 감소와 연관성이 있는 CH25H의 억제는 ELOVL1의 발현을 증가시키는 것으로 확인됨에 따라, CH25H의 하향조절은 내인성 25-HC의 감소를 유도할 수 있으며, 이로 인해 C26:0 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0090] <실시예 2> 25-HC 유사체 및 이의 VLCFA(very long-chain fatty acids) 억제 효과 확인

[0091] 주요 작용기와 수산기의 변화에 따른 VLCFA 수준 변화를 확인하기 위해, 25-HC 유사체를 합성하고 이의 활성을 확인하였다.

[0093] 1. 25-HC 유사체 MSX-101 및 102 합성

[0094] 모든 시약 및 용매를 상업적 공급업체(Alfa Aesar, Ark Pharm, Combi-Blocks, Samchun Chemicals, Sigma-Aldrich 또는 TCI)에서 구입하였으며, 추가 정제 없이 사용하였다.

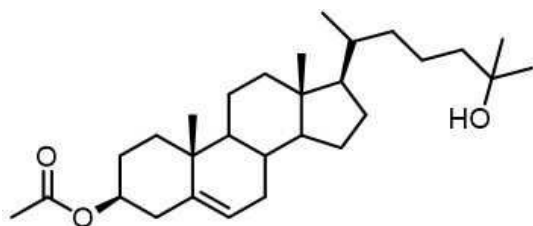
[0095] Merck TLC Silica gel 60 F254 250 μ m 플레이트를 이용한 얇은 층 크로마토그래피를 수행하여 반응을 관찰하였으며, 실리카 겔(ZEOCHEM, ZEOprep 60, 40-63 μ m) 및 플래쉬 컬럼 카트리지가 장착된 Teledyne ISCO CombiFlash를 이용하여 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

[0096] JEOL RESONANCE ECZ 600R (1 H, 600 MHz; 13 C, 150 MHz)에서 1 H 및 13 C NMR 스펙트럼을 얻었다. 화학 이동은 짝지음 상수 J가 헤르츠(Hz)인 테트라메틸실란(TMS, 내부 표준) 분당 백만 분의 1(ppm, δ)로 확인되었다.

[0097] 분역 패턴은 다음과 같은 약어로 나타내었다: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; p, pentet; dd, doublet of doublets; dt, doublet of triplets; td, triplet of doublets; m, multiplet; br, broad signal.

[0098] 고해상도 질량 스펙트럼(High resolution mass spectra; HRMS) 분석은 DIONEX Ultimate 3000 system (LC) 및 Thermo Scientific Hypersil GOLD C18 (2.1 mm \times 50 mm, 1.9 μ m)를 이용한 Thermo Scientific Q-Exactive system (MS)에서 수행되었다.

[0100] 1-1. (3S,10R,13R,17R)-17-((R)-6-하이드록시-6-메틸헵탄-2-일)-10,13-디메틸-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-1H-사이클로펜타[a]페난트렌-3-일 아세테이트
[(3S,10R,13R,17R)-17-((R)-6-hydroxy-6-methylheptan-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl acetate; MSX_101]
 합성.



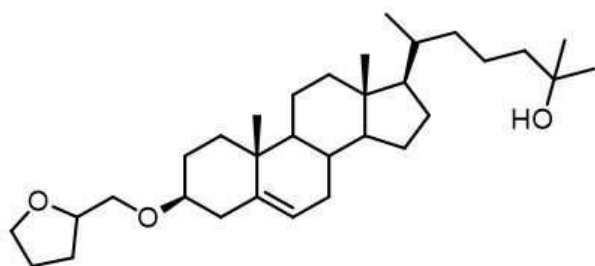
[0102]

[0104] 25-하이드록시콜레스테롤 (20 mg, 0.05 mmol) 용액에 피리딘(pyridine, 0.5 ml), 아세트산 무수물(acetic anhydride, 165 μ L, 1.75 mmol)을 첨가하고 실온에서 4시간 동안 교반시켜 혼합하였다. 물로 상기 용액의 반응

을 억제시키고 DCM으로 추출하였다. 유기층을 소금물로 세척한 후 Na_2SO_4 로 건조시켰다.

[0105] 농축된 유기 혼합물을 MPLC로 정제하여 흰색 결정의 MSX 101 (12 mg, 54%)을 얻었다. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5.37 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.66-4.55 (m, 1H), 2.37-2.26 (m, 2H), 2.08-1.92 (m, 5H), 1.92-1.77 (m, 3H), 1.66-0.88 (m, 34H), 0.68 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 170.55, 139.67, 122.63, 73.99, 71.12, 56.68, 56.07, 50.02, 44.43, 42.34, 39.73, 38.12, 37.00, 36.59, 36.45, 35.76, 31.90, 31.86, 29.35, 29.23, 28.25, 27.78, 24.28, 21.45, 21.03, 20.79, 19.32, 18.69, 11.87; HRMS (ESI): m/z calcd for $[(\text{M-AcOH})^+]$ 384.3392, found 384.33737.

[0107] 1-2. (6R)-6-((3S,10R,13R,17R)-10,13-디메틸-3-((테트라하이드로퓨란-2-일)메톡시)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카하이드로-1H-사이클로펜타[a]페난트렌-17-일)-2-메틸헵탄-2-올 [(6R)-6-((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimethyl-3-((tetrahydrofuran-2-yl)methoxy)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)-2-methylheptan-2-ol; MSX 102].



[0109]

[0111] N_2 가스하에서 무수 DMF에 용해시킨 NaH (44 mg, 1.1 mmol) 용액에 무수 DMF 내 25-하이드록시콜레스테롤 (40 mg, 0.1 mmol)를 첨가하고 30분 동안 교반한 후 테트라하이드로퓨릴 브로마이드(tetrahydrofuryl bromide; 0.1mL, 0.9 mmol)을 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물에 물을 넣어 반응억제 후 DCM으로 추출하고 Na_2SO_4 로 건조시켰다.

[0112] 농축된 유기 혼합물을 MPLC로 정제하여 흰색 결정의 MSX 102 (3 mg, 6%)를 얻었다. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 5.39-5.29 (m, 1H), 4.07-3.96 (m, 1H), 3.88 (dd, J = 14.6, 6.9 Hz, 1H), 3.82-3.70 (m, 1H), 3.53-3.42 (m, 2H), 3.25-3.12 (1H), 2.38 (q, J = 2.2 Hz, 1H), 2.29-2.18 (m, 1H), 2.07-1.76 (9H), 1.66-0.76 (m, 53H), 0.73-0.63 (3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 141.07, 121.46, 79.64, 78.17 (d, J = 3.1 Hz), 71.12, 70.82 (d, J = 2.3 Hz), 68.34, 56.79, 56.09, 50.19, 44.44, 42.35, 39.80, 39.05, 37.27, 36.90, 36.46, 35.76, 31.96, 31.91, 29.37, 29.21, 28.38, 28.34, 28.26, 25.57, 24.29, 21.07, 20.78, 19.40, 18.69, 11.89;

[0114] 2. 25-HC의 유사체인 MSX-101 및 MSX-102의 활성 확인

[0115] 25-HC의 주요 작용기인 하이드록시기의 변화에 따른 VLCFA 수준의 변화를 확인하였다.

[0116] 그 결과, 도 4와 같이 탈수된 25-HC인 데스모스테롤은 25-HC 보다 매우 적은 활성이 나타났으며, 아세틸화된 25-HC (MSX101)는 25-HC와 유사한 활성을 나타낸 반면, 용해도에 대한 테트라하이드로퓨란 잔기를 가진 MSX-102는 C26:0을 감소시키지 못하였다.

[0117] 두 개의 알콜 잔기 또는 이들의 바이오아이소스티어(bioisosteres)가 VLCFAs의 감소와 관련된 결합 표적에 참여할 수 있을 것으로 예상됨에 따라, 25-HC의 구조-활성 관계에 대한 추가 조사가 필요하다.

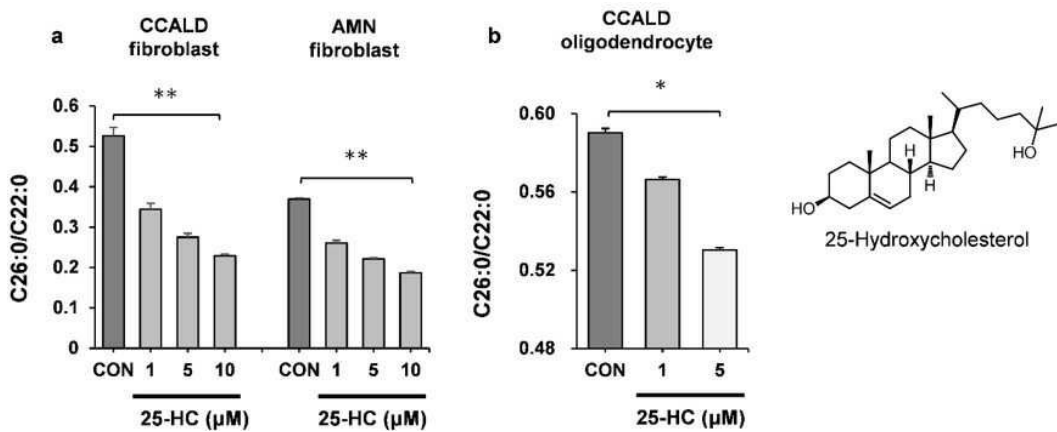
[0118] 한편, 콜레스테롤과 데스모스테롤 및 25-HC를 포함한 콜레스테롤의 많은 대사물질들은 간 X 수용체(liver X receptor; LXR) 리간드로 알려져 있으며, 최근 Liu et al의 연구(Ying Liu, et. al., J. Lipid Res. 2018)에서 25-HC가 LXR의 활성화를 통하여 CH25H의 발현을 유도하는 것이 확인되었다.

[0119] 이에 따라, 광범위하게 사용되고 있으며 가장 강력한 LXR 작용제인 T0901317이 VLCFA 수준을 감소시킬 수 있는지 확인하였다.

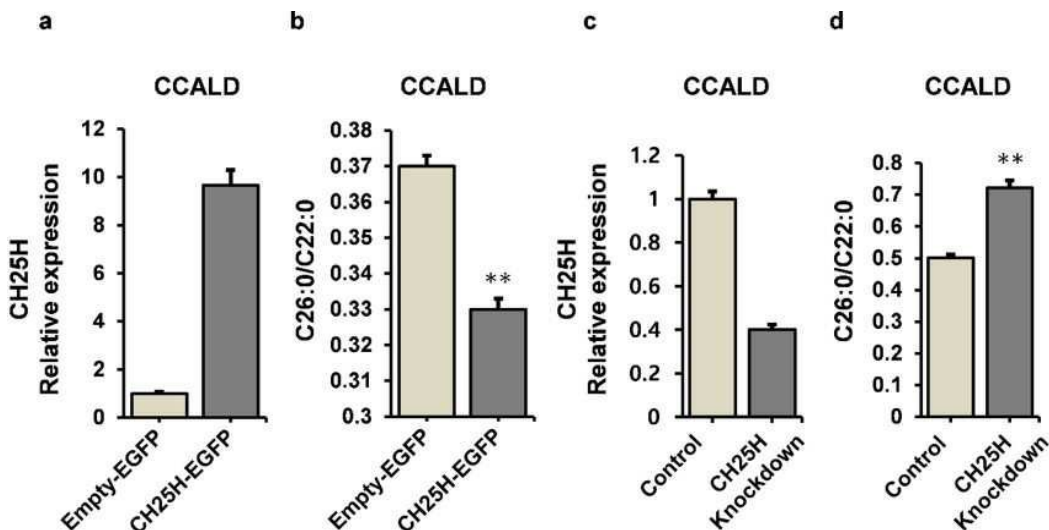
- [0120] 그 결과, 도 5와 같이 T0901317은 CCALD 및 AMN 세포에서 VLCFA 수준을 유의하게 감소시켰다. 또한, LXR 작용제는 비교적 낮은 수준의 C26 : 0을 함유하는 정상 사람 피부 섬유아세포에서도 VLCFA 수준을 감소시켰다.
- [0121] 지금까지 LXR가 C26:0 생합성에 관여하는 바에 대해서는 보고되어 있지 않으며, LXR이 지질대사의 주요 조절 인자로 알려져 있다. LXR 작용제인 T0901317은 ELOVL1의 발현에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.
- [0122] 상기 결과들로부터 25-HC는 VLCFA 수준을 감소시키기 위해, LXR 뿐만 아니라 다양한 타겟에 작용할 수 있음이 확인되었다.
- [0124] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

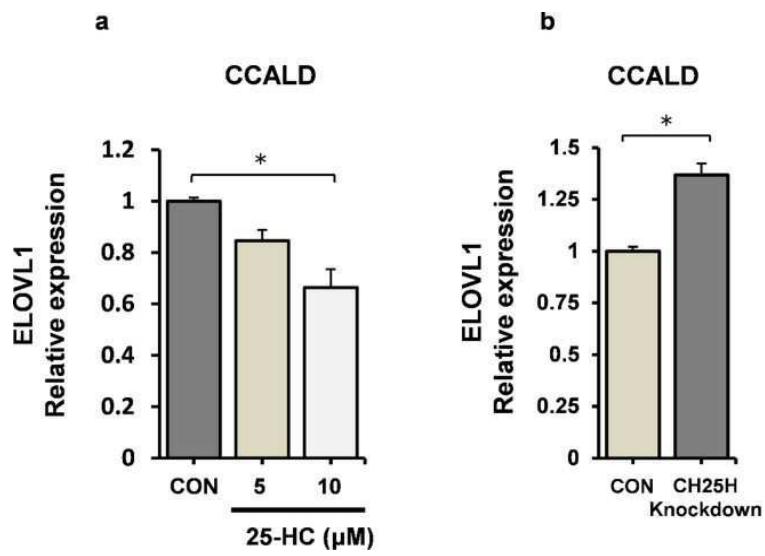
도면1



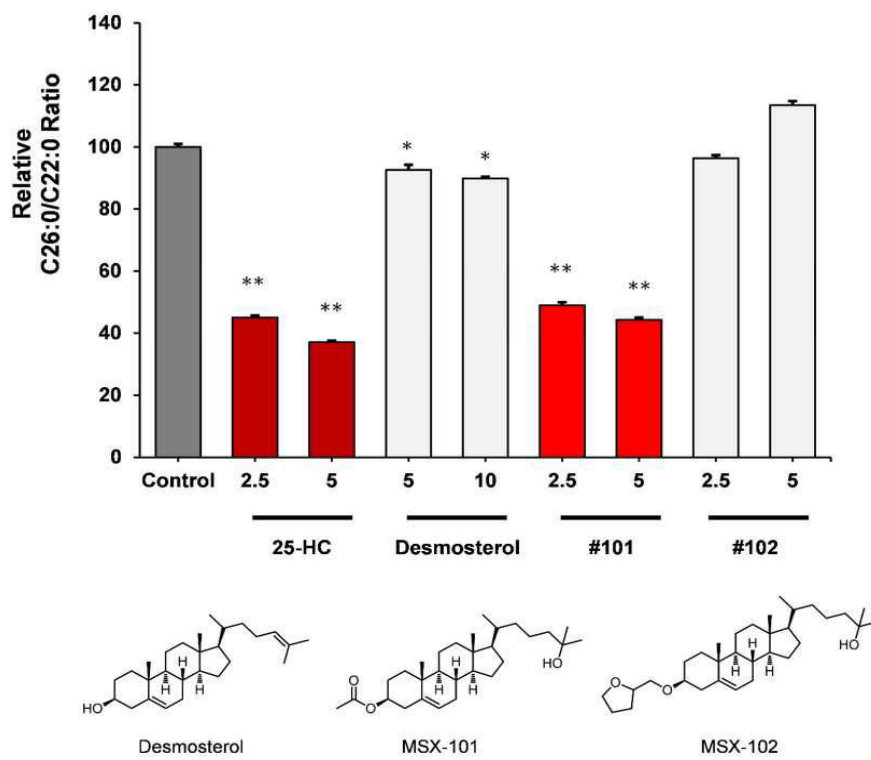
도면2



도면3



도면4



도면5

