



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월12일
(11) 등록번호 10-1694879
(24) 등록일자 2017년01월04일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/4025 (2006.01) A61K 31/401 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-0099210</p> <p>(22) 출원일자 2014년08월01일 심사청구일자 2014년08월01일</p> <p>(65) 공개번호 10-2016-0017267</p> <p>(43) 공개일자 2016년02월16일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌 Journal of natural products, 2013, 76(6), 1091-1098 The Journal of antibiotics, 1997, 50(5), 418-423 Journal of bacteriology, 1996, 178(17), 5243-5248 KR101261131 B1</p> | <p>(73) 특허권자 주식회사 인트론바이오테크놀로지 경기도 성남시 중원구 사기막골로 137, 중앙인더스피아 701~704호 (상대원동)</p> <p>(72) 발명자 윤여준 서울특별시 강남구 압구정로 151 126동 202호 (압구정동, 신현대아파트) 권호정 서울특별시 서초구 신반포로 45 주공아파트 110동 302호 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 손민</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 9 항

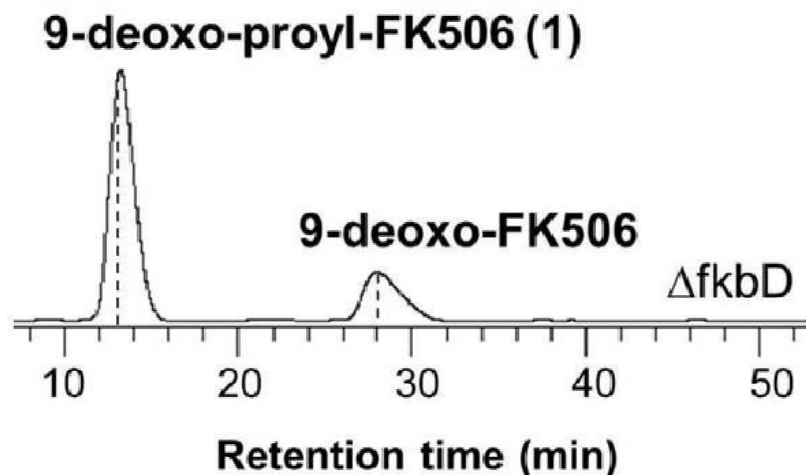
심사관 : 민경남

(54) 발명의 명칭 면역억제활성 없이 신경재생활성이 유지되는 FK506 유도체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 면역억제활성이 없고 신경재생활성은 유지되는 FK506 유도체, 이의 제조방법, 이를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 9-데옥소-프로틸-FK506, 31-O-디메틸-FK506, 또는 9-데옥소-31-O-디메틸FK506을 포함하는 조성물은 신경 재생을 촉진할 수 있으며 면역억제활성이 없어, 신경계 질환 치료에 있어 부작용을 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
반연희
 서울특별시 강동구 상암로23길 15-16 (암사동)
프라모드 비 신데
 서울특별시 서대문구 봉원사길 52 201호 (대신동,
 해맞이타운)

조유미
 서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교, 연세
 대학교 공학2호관 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711000101
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2013)-중견연구자지원사업-도약연구지원사업(도전)
 연구과제명 미생물 유래 천연물의 생합성경로 규명 및 재설계
 기 여 율 1/2
 주관기관 이화여자대학교 산학협력단
 연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711002649
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 원천기술개발사업-글로벌프론티어사업
 연구과제명 (지능형바이오시스템)거대 인공 이차대사산물 생합성 유전자집단의 방선균 발현시스템 개

발

기 여 율 1/2
 주관기관 이화여자대학교 산학협력단
 연구기간 2011.09.29 ~ 2020.08.31

명세서

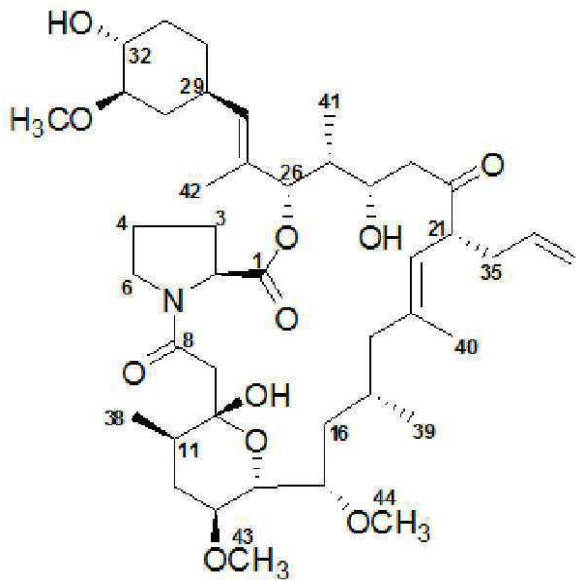
청구범위

청구항 1

면역억제활성이 없으며, 하기의 화학식 2로 표시되는 9-데옥소-프로릴-FK506 (9-deoxo-prolyl-FK506)을 포함하는, 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로,

상기 신경계 질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 병, 진행성 핵상마비, 다계통 위축증, 감람핵-뇌교-소뇌 위축증, 샤이-드래거 증후군, 선조체-흑질 퇴행증, 헌팅톤병, 근위축성 측색 경화증, 본태성 진전증, 피질-기저핵 퇴행증, 미만성 루이 소체 질환, 파킨스-ALS-치매 복합증, 및 픽병으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 약학 조성물.

[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 신경 재생을 촉진하는 것인, 약학 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

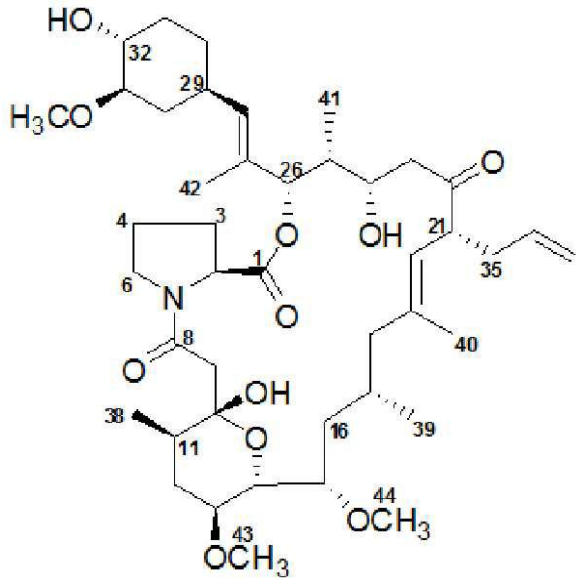
상기 조성물은 FK506에 비하여 인터루킨-2의 분비를 증가시키는 것인, 약학 조성물.

청구항 5

fkbd 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, FK506 유도체의 제조방법으로,

상기 FK506 유도체는 하기 화학식 2로 표시되는 9-데옥소-프로틸-FK506인 것인, 제조방법.

[화학식 2]



청구항 6

제5항에 있어서,

상기 균주는 FK506를 생산하는 균주인 것인, 제조방법.

청구항 7

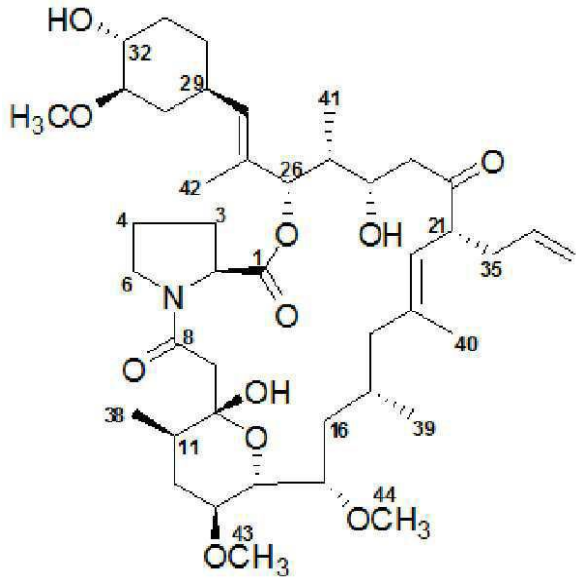
제5항에 있어서,

상기 균주는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) KCTC 11604BP, 스트렙토마이세스 카나마이세티쿠스 (*Streptomyces kanamyceticus*) KCTC 9225 스트렙토마이세스 속 ATCC 55098, 방선균 No. 9993(*Streptomyces tsukubaensis* No. 9993), 스트렙토마이세스 속 ATCC 53770, 스트렙토마이세스 속 6260, 스트렙토마이세스 속 49A, 스트렙토마이세스 속 94128, 스트렙토마이세스 글라우세센스(*Streptomyces glaucescens*) MTCC 5115 및 스트렙토마이세스 속 BICC7522로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인, 9-데옥소-프로틸-FK506의 제조방법.

청구항 8

하기 화학식 2로 표시되는 9-데옥소-프로틸-FK506, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염.

[화학식 2]



청구항 9

제8항에 있어서,

상기 9-데옥소-프로틸-FK506는 하기의 이화적 특성을 가진 것인, 9-데옥소-프로틸-FK506, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염:

- (a) 비정형 흰색 분말;
- (b) 비선광도(Specific Rotation): $[\alpha]_D^{23} = 1.64$ (c=0.1, 메탄올);
- (c) UV 흡수 스펙트럼(메탄올): λ_{max} 가 (log e) 227 nm (2.0);
- (d) IR 흡수 스펙트럼(film): ν_{max} 가 3450, 2960, 1750, 1640, 1170, 1050 cm^{-1} ;

(e) ^1H , ^{13}C -NMR: 표 2로 표시; 표 2

| 위치 | δ_c | δ_H , m (J in Hz) | ^1H - ^1H COSY | HMBC |
|----|------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 169.9 | | | |
| 2 | 58.9 | 4.35, dd (8, 3) | H-3a, H-3b | C-1, C-3, C-4, C-6 |
| 3 | 29.2 | 2.19, m 1.98, m | H-2, H-4 H-2 | C-1, C-2, C-4, C-6 C-1, C-2, C-6 |
| 4 | 24.7 | 1.96, m | H-6a, H-6b, H-3a | C-3, C-6 |
| 5 | | | | |
| 6 | 47.4 | 3.63, m 3.54, m | H-4 H-4 | C-2, C-3, C-4 C-2, C-3, C-4 |
| 7 | | | | |
| 8 | 171.8 | | | |
| 9 | 39.2 | 2.64, d (15) 2.56, d (15) | H-9b H-9a | C-8, C-10 C-8, C-10 |
| 10 | 98.6 | | | |
| 11 | 38.6 | 1.61, m | H-12a, H-38 | C-10 |

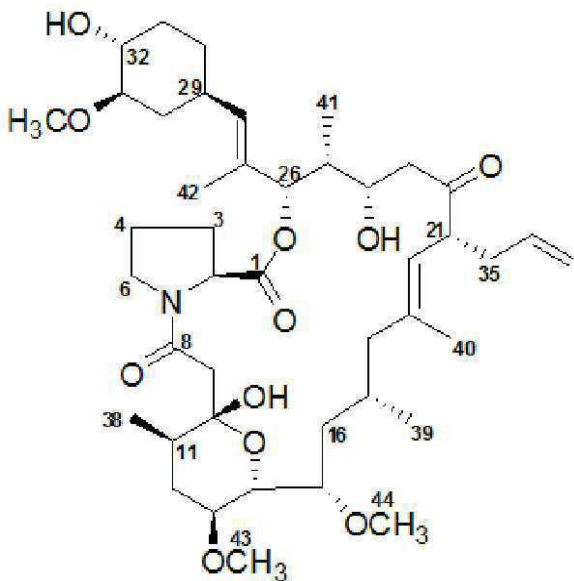
| | | | | |
|-------|--------------------|--------------------------------------|--|--|
| 12 | 32.7 | 1.99, m 1.55, m | H-11, H-13 H-13 | C-10, C-13, C-14, C-38 C-10, C-13, C-38 |
| 13 | 74.6 | 3.40, (overlapped) | H-12a, H-12b, H-14 | C-14, C-43 |
| 14 | 71.0 | 3.84, dd (10, 2.5) | H-13, H-15 | C-10, C-12, C-13 |
| 15 | 77.1 | 3.53, m | H-14, H-16a, H-16b | |
| 16 | 36.4 | 1.46, m 1.35, m | H-15 H-15, H-17 | C-17, C-19 C-17, C-19 |
| 17 | 25.6 | 1.61, (overlapped) | H-39, H-16b, H-18a | |
| 18 | 49.0 | 2.33, m 1.69, m | H-17 | C-17, C-19, C-20, C-39 |
| 19 | 141.1 | | | |
| 20 | 121.9 | 5.01, (overlapped) | H-21 | C-18, C-21, C-22, C-40 |
| 21 | 53.4 | 3.36, (overlapped) | H-20, H-35a, H-35b | C-22, C-20, C-35, C-36 |
| 22 | 214.0 ^a | | | |
| 23 | 44.0 | 2.69, dd (17, 2) 2.34, dd (17, 7) | H-23b H-23a, H-24 | C-22, C-24 C-22, C-24, C-25 |
| 24 | 69.1 | 4.02, dd (7, 3) | H-23b, H-25 | C-22, C-26, C-41 |
| 25 | 41.2 | 1.81, m (3) | H-24, H-26, H-41 | |
| 26 | 78.0 | 5.17, d (2.5) | H-25 | C-1, C-24, C-25, C-27, C-28, C-41, C-42 |
| 27 | 132.4 | | | |
| 28 | 129.7 | 4.98, (overlapped) | H-29 | C-26, C-27, C-29, C-30, C-34, C-42 |
| 29 | 35.0 | 2.27, m | H-28, H-30a, H-30b, H-34a, H-34b | C-30 |
| 30 | 34.9 | 2.05, m 0.97, (overlapped) | H-29, H-30b, H-31 H-29, H-30a, H-31 | C-31 C-31 |
| 31 | 84.4 | 2.99, ddd (8.5, 4.5, 2.5) | H-30a, H-30b, H-32 | C-32, C-45 |
| 32 | 73.7 | 3.40, (overlapped) | H-31, H-33a, H-33b | |
| 33 | 31.4 | 1.98, m 1.35, m | H-32, H-33b, H-34a, H-34b H-32, H-33a, H-34a, H-34b | |
| 34 | 30.8 | 1.61, m 1.04, m | H-29, H-33a, H-33b, H-34b H-29, H-33a, H-33b, H-34a | |
| 35 | 35.7 | 2.45, m (7) 2.25, m | H-36, H-21 H-36, H-21 | C-20, C-21, C-22, C-36, C-37 C-20, C-21, C-22, C-36, C-37 |
| 36 | 135.6 | 5.70, ddt (17, 10, 7) | H-35a, H-35b, H-37 | C-21, C-35 |
| 37 | 116.7 | 5.00, br s | H-36 | C-35, C-36 |
| 38 | 17.1 | 0.95, d (6.5) | H-11 | C-10, C-11, C-12 |
| 39 | 19.0 | 0.75, d (6.5) | H-17 | C-16, C-17, C-18 |
| 40 | 15.7 | 1.67 ^b , s | | C-19, C-20 |
| 41 | 10.0 | 0.90, d (6.5) | H-25 | C-24, C-25, C-26 |
| 42 | 14.4 | 1.66 ^b , s | | C-27, C-28 |
| 43 | 56.3 | 3.37 ^b , s | | C-13 |
| 44 | 57.8 | 3.36 ^b , s | | C-15 |
| 45 | 56.7 | 3.40, s | | C-31 |
| 10-OH | | 6.76, s | | C-8, C-9 |

- (f) (+)-ESI-MS: m/z 793.1 $[M + NH_4]^+$;
 (+)-MS/MS: m/z 776.1, 758.1, 740.1, 547.9;
 (+)-HR-ESI-MS: m/z 776.4940 $[M + H]^+$; 및
 (g) 분자식 및 분자량: $C_{43}H_{70}NO_{11}$, 776.4949.

청구항 10

면역억제활성이 없으며, 하기의 화학식 2로 표시되는 9-데옥소-프로릴-FK506 (9-deoxo-prolyl-FK506)을 포함하는, 인비트로(in vitro) 신경 재생 촉진용 조성물.

[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역억제활성이 없고 신경재생활성은 유지되는 FK506 유도체, 이의 제조방법, 이를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 타크롤리무스(tacrolimus) 또는 푸지마이신(fujimycin)으로 알려진 FK506는 23원자의 대환식 락탐(23-member macrocyclic lactam)으로, 스트렙토마이시스 쯔꾸바엔시스(*Streptomyces tsukubaensis*)에서 분리될 수 있다. FK506 및 이와 유사한 약물은, FK506-결합 단백질(FK506-binding protein; FKBP)로 일컬어지는 세포질 이뮤노필린 단백질(cytoplasmic immunophilin proteins)과 상호작용하여 여러 생화학 반응을 변형시킨다고 알려져 있다(Kang, C. B. et al., Neurosignals 2008).

[0003] 특히 FK506는 임상적으로 동종이식편 거부반응을 방지하고(Kino, H. et al., J. Antibiot. 1987; Kino, H. et al., J. Antibiot. 1987; Fung, J. J. et al., Transplantation 2004), 아토피와 같은 자가면역질환을 치료하기 위한(Parsons, W. H. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 1993) 면역억제제로 사용되고 있다. FK506는 T 세포 수용체의 신호전달에 있어 핵심효소이며 T 림프구 활성을 억제하는 칼시뉴린(calcineurin)의 활성을 억제한다.

- [0004] FK506의 면역억제 활성의 기작에 대한 구체적인 연구를 살펴보면, FK506의 화학구조는 칼시뉴린에 결합하는 작용 부위(effector region)와(Goulet, M. T. et al., *Perspect. Drug Discov.* 1994; Parsons, W. H. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993; Griffith, J. P. et al., *Cell* 1995), FKBP와 복합체를 형성하는 결합 부위의 2가지로 나누어 질 수 있다. FKBP 결합 부위는 피페콜레이트 결사슬(pipecolate moiety), 트리카르보닐 그룹(tricarbonyl group), 사이클로헥산 링을 포함하며, FKBP12 단백질과의 복합체 형성에 중요한 역할을 한다. 이는 나머지 부분인 작용 부위가 자유롭게 칼시뉴린과 결합할 수 있도록 함으로써 3부위로 된 결합체를 형성하도록 한다.
- [0005] 상기 면역억제 작용을 나타내기 위하여, 제일 처음으로 FK506이 FKBP12 단백질과 결합하는 것이 중요하다. 상기 2 부분으로 이루어진 복합체가 형성되면, 상기 복합체는 칼시뉴린과 상호작용할 수 있다(Goulet, M. T. et al., *Perspect. Drug Discov.* 1994; Parsons, W. H. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993). 따라서, FK506-FKBP 복합체의 칼시뉴린과의 상호 작용으로 인하여 T 세포 증식에 의해 매개된 인터루킨 2가 억제되어 면역억제 작용이 일어난다.
- [0006] 한편, FK506은 PKS/NRPS(polyketide synthase/nonribosomal peptide synthetase) 복합 시스템에 의해 합성된다. 상기 생합성 과정은 코리스메이트(chorismate)에서 유래한 DHCHC (4,5-dihydroxycyclohex-1-ene carboxylic acid)를 시작물질로 하여 진행되며, 상기 DHCHC는 2분자의 말로닐-CoA(malonyl-CoA), 2분자의 메톡시말로닐-아실 운반 단백질(methoxymalonyl-acyl carrier proteins; ACP), 5분자의 메틸말로닐-CoA(methylmalonyl-CoA), 및 알릴말로닐-CoA (allylmalonyl-CoA)를 이용한 10 단계의 축합과정을 거쳐 연장된다(Andexer, J. N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; Mo, S. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011). 상기 연장된 물질은, FfbL의 작용에 의해 라이신에서 유래한 피페콜레이트와, NRPS인 FkbP에 의해 선형 폴리케타이드 체인으로 축합되고, 매크롤라이드 고리를 생산하기 위하여 고리화 된다. 상기 고리는 PKS 변형 이후 과정에 의해 더욱 수정된다. 예를 들어 FkbM (S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferase)에 의해 31번 탄소에 0-메틸화(0-methylation)가 일어나거나, FkbD (P450 hydroxylase)에 의해 9번 탄소에 산화(oxidation)가 일어날 수 있다(Motamedi, H. et al., *J. Bacteriol.* 1996; Shafiee, A. et al., *J. Antibiot.* 1997).
- [0007] 최근, 본 발명자들은 모든 FK506 생합성 중간체의 특성을 고려하여, PKS 변형 이후의 경로(post-PKS modification)가 2개의 독립적인 병렬적 경로를 포함하는 것으로 정립한바 있다(Ban, Y. H. et al., *J. Nat. Prod.* 2013).
- [0008] 한편, FK506 또는 그의 유도체는 상기 면역억제 활성 외에도, 항진균(Nakagawa, H. et al., *Clin. Drug Invest.* 1996), 항염증(Migita, K. et al., *Curr. Med. Chem.* 2003), 신경보호 및 신경재생 효과(Gold, B. G. *Expert Opin. Invest. Drugs* 2000; Gold, B. G. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999)가 보고된 바 있다. 그러나 상기 약리활성에도 불구하고 면역억제활성이 나타나므로 면역 반응을 필요로 하는 일반 환자에게는 사용하기 어렵다는 문제가 있었다.
- [0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 PKS 변형 이후의 경로에 관여하는 여러 가지 FK506의 특성을 확인하고자 예의 연구 노력한 결과, FK506 생합성 유전자의 결손을 통해 신규한 FK506 유도체인 9-데옥소-프로틸-FK506 (9-deoxo-prolyl-FK506)을 생산하는 방법을 확인하였으며, FK506 유도체인 9-데옥소-프로틸-FK506, 31-0-디메틸-FK506(31-0-demethyl-FK506), 또는 9-데옥소-31-0-디메틸FK506(9-deoxo-31-0-demethylFK506)이 면역억제활성을 나타내지 않으면서도 신경 재생 및 신경보호 효과가 있어 이를 신경질환 치료 용도로 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 주된 목적은 면역억제활성이 없으며, 31-0-디메틸-FK506, 9-데옥소-31-0-디메틸FK506, 또는 9-데옥

소-프로틸-FK506으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나의 FK506 유도체를 포함하는, 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 *fkbD* 유전자가 결손된 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 9-데옥소-프로틸-FK506의 제조방법을 제공하는 것이다.

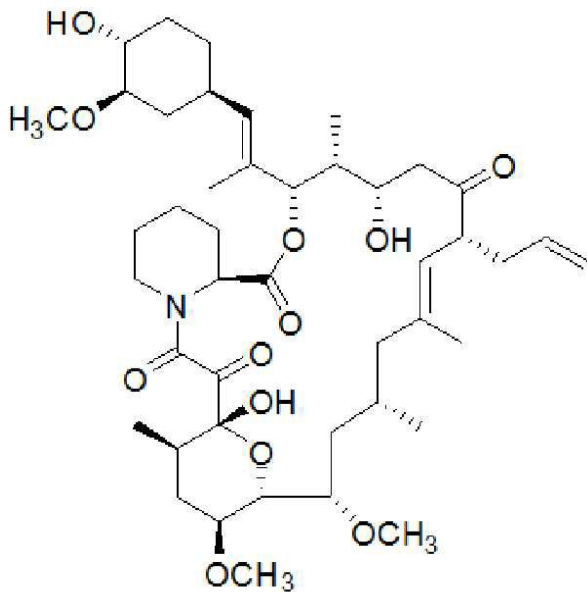
[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 9-데옥소-프로틸-FK506, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 면역억제활성이 없으며, 31-O-디메틸-FK506, 9-데옥소-31-O-디메틸FK506, 또는 9-데옥소-프로틸-FK506으로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나의 FK506 유도체를 포함하는, 신경 재생 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 FK506의 신규한 유도체인, 하기 화학식 2로 표시되는 9-데옥소-프로틸-FK506, 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0015] [화학식 1]

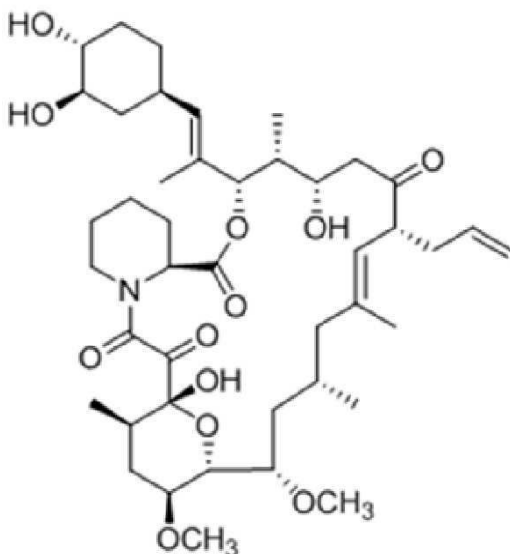


[0016]

표시; (f) (+)-ESI-MS: m/z 793.1 $[M + NH_4]^+$; (+)-MS/MS: m/z 776.1, 758.1, 740.1, 547.9; (+)-HR-ESI-MS: m/z 776.4940 $[M + H]^+$; 및 (g) 분자식 및 분자량: $C_{43}H_{70}NO_{11}$, 776.4949.

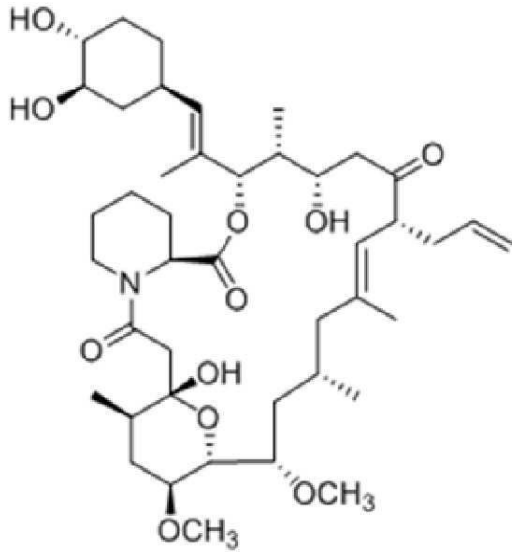
- [0026] 하나의 구체예로서, 본 발명의 화합물은 그의 이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다.
- [0027] 이성질체란 화학식은 같으나 동일하지는 않은 화합물의 관계를 의미하며, 예를 들어 9-데옥소-프로틸-FK506의 구조 이성질체, 기하 이성질체, 광학 이성질체(거울상이성질체), 입체이성질체, 부분 입체이성질체를 포함할 수 있다.
- [0028] 약제학적으로 허용가능한 염은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서, 이 염에 기인한 부작용이 9-데옥소-프로틸-FK506의 이로운 효능을 저하시키지 않는 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미할 수 있다. 예를 들어 상기 염은 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염일 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동 몰량의 화합물 및 물중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조된 것일 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 염은 염기를 사용하여 제조된 약학적으로 허용가능한 금속염일 수 있다.
- [0029] 또 하나의 구체예로서, 본 발명의 화합물은 용매화물 또는 전구약물(pro-drug) 형태일 수 있으며, 이는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 용매화물은 바람직하게는 수화물 및 에탄올화물을 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 화합물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 합성할 수 있으며, 일 예로 본 발명의 제조방법을 사용하여 변이주로부터 생산할 수 있다.
- [0031] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 9-데옥소-프로틸-FK506, 하기 화학식 3으로 표시되는 31-O-디메틸-FK506, 또는 하기 화학식 4로 표시되는 9-데옥소-31-O-디메틸FK506으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 FK506 유도체를 포함하는, 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] [화학식 3]



[0033]

[0034] [화학식 4]



[0035]

[0036] FK506는 T 세포 수용체의 신호전달에 있어 핵심효소이며 T 림프구 활성을 억제하는 칼시뉴린(calcineurin)의 활성을 억제하므로, 임상적으로 동종이식편 거부반응을 방지하고 아토피와 같은 자가면역질환을 치료하기 위한 면역억제제로 사용되고 있다. 또한 면역억제 활성 외에도, 항진균, 항염증, 신경보호 및 신경재생 효과가 있다고 보고된 바 있다. 그러나 상기 약리활성에도 불구하고 면역억제활성이 나타나므로 면역 반응을 필요로 하는 일반 환자에게는 사용하기 어렵다는 문제가 있었다.

[0037] 본 발명자들은 CD3/CD28-활성화한 인간 T-세포에 9-데옥소-프로틸-FK506, 31-O-디메틸-FK506, 또는 9-데옥소-31-O-디메틸FK506를 처리한 결과, 정상군에 이를 정도로 인터루킨-2의 분비가 현저히 증가한 것을 확인하였다. 또한 상기 FK506 유도체가 우수한 신경 재생 활성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 약학 조성물은 면역 반응을 억제하지 않으면서도 원하는 신경계 질환 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0038] 일 예로 상기 신경계 질환은 퇴행성 신경질환일 수 있다. 퇴행성 신경 질환은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질환을 의미하는 것으로, 예를 들어 치매, 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨 병(Parkinson's disease), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 다계통 위축증(Multiple system atrophy), 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(Olivopontocerebellar atrophy: OPCA), 샤이-드래거 증후군(Shy-Drager syndrome); 선조체-흑질 퇴행증 (Striatonigral degeneration), 헌팅턴병 (Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis:ALS), 본태성 진전증 (Essential tremor), 피질-기저핵 퇴행증(Corticobasal ganglionic degeneration), 미만성 루이 소체 질환 (Diffuse Lewy body disease), 파킨슨-ALS-치매 복합증(Parkinson-ALS-dementia complex of Guam) 또는 픽병 (Pick's disease)일 수 있다.

[0039] 다른 일 예로 상기 신경계 질환은 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 척수 손상 질환, 말초신경질환, 행동 장애, 발달장애, 정신 지체, 다운증후군 또는 정신분열증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 또 다른 일 예로 상기 신경계 질환은 신경세포 손상 또는 세포 사멸 등을 원인으로 하는 질환일 수 있다.

[0041] 본 발명자들은 9-데옥소-프로틸-FK506, 31-O-디메틸-FK506, 또는 9-데옥소-31-O-디메틸FK506가 PC12 세포에서 신경돌기의 증식을 촉진하여 신경의 재생을 유도하므로, 이를 신경 재생 촉진 용도 또는 신경계 질환 예방 또는 치료 용도로 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명에 따른 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하여 신경계 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 신경계 질환 발병 의심 개체에 투여하여 신경계 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

- [0044] 본 발명의 약학 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 공인된 신경 관련 질환 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0046] 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 9-데옥소-프로필-FK506, 31-O-디메틸-FK506, 또는 9-데옥소-31-O-디메틸FK506을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0050] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 1 내지 20 /, 보다 바람직하게는 1 내지 10/으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0052] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 면역억제활성이 없으며, 상기 9-데옥소-프로필-FK506, 31-O-디메틸-FK506, 또는 9-데옥소-31-O-디메틸FK506으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 FK506 유도체를 포함하는, 신경 재생 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0053] 일 예로 상기 조성물은 인 비트로(in vitro)에서 신경세포의 돌기 생성을 촉진하는 조성물로 사용될 수 있다.
- [0054] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학 조성물 또는 신경 재생 촉진용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 신경계 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0056] 본 발명의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 신경계 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명에 따른 9-데옥소-프로틸-FK506, 31-O-디메틸-FK506, 또는 9-데옥소-31-O-디메틸FK506을 포함하는 조성물은 신경 재생을 촉진할 수 있으며 면역억제활성이 없어, 신경계 질환 치료에 있어 부작용을 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 *fkbd* 유전자를 인-프레임 결실을 통하여 비활성화시킨 균주(Δ *fkbd*_{in-frame} 균주)에서 얻은 9-데옥소-프로틸-FK506의 HPLC ESI-MS 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 9-데옥소-프로틸-FK506의 ESI-MS/MS 분석결과를 나타낸 것으로, (A)는 ESI-MS/MS 조각 패턴을, (B)는 MS/MS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3a 및 도 3b는 CDC1₃에 용해된 9-데옥소-프로틸-FK506에 대한 NMR 스펙트럼 결과로, 도 3a는 ¹H NMR 스펙트럼, 도 3b는 ¹³C NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 CDC1₃에 용해된 9-데옥소-프로틸-FK506에 대한 HSQC 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5a 내지 도 5c는 9-데옥소-프로틸-FK506의 COSY 및 HMBC 분석 결과를 나타낸 것으로, 도 5a는 상기 화합물의 COSY 및 주요 HMBC 상관관계를 도시한 것이고, 도 5b는 CDC1₃에 용해된 9-데옥소-프로틸-FK506에 대한 COSY 스펙트럼을, 도 5c는 CDC1₃에 용해된 9-데옥소-프로틸-FK506에 대한 HMBC 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 6은 FK506과 비교한 9-데옥소-프로틸-FK506의 면역억제활성을 나타낸 것이다.

도 7a는 FK506과 비교한 9-데옥소-프로틸-FK506의 신경 재생 활성을 나타낸 것이며, 도 7b는 9-데옥소-프로틸-FK506을 처리한 PC12 세포에서 자라난 신경 돌기를 나타낸 것이다.

도 8은 FK506과 비교한 31-O-디메틸-FK506의 면역억제활성을 나타낸 것이다.

도 9a는 FK506과 비교한 31-O-디메틸-FK506의 신경 재생 활성을 나타낸 것이며, 도 9b는 31-O-디메틸-FK506을 처리한 PC12 세포에서 자라난 신경 돌기를 나타낸 것이다.

도 10은 FK506과 비교한 9-deoxo-31-O-디메틸FK506의 면역억제활성을 나타낸 것이다.

도 11a는 FK506과 비교한 9-deoxo-31-O-디메틸FK506의 신경 재생 활성을 나타낸 것이며, 도 11b는 9-deoxo-31-O-디메틸FK506을 처리한 PC12 세포에서 자라난 신경 돌기를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0061] 실시예 1. 재료의 준비 방법 및 조건

[0062] (1) 변이체의 제조 및 배양 조건

[0063] Ban, Y. H. 외(J. Nat. Prod. 2013, 76, 1091-1098)에 기재된 방법에 따라 FK506를 생산하는 균주인 스트렙토마이시스 속 KCTC11604BP의 *fkbd* 유전자를 이중교차 상동 재조합(double cross-over homologous recombination)에 의한 인프레임(inframe) 결실을 통하여 비활성화하여 Δ fkbd_{in-frame} 균주를 제조하였다.

[0064] KCTC 11604BP 균주의 포자와 상기 유전자 결실된 Δ fkbd_{in-frame}의 포자를 ISP4 아가 플레이트에서 계대배양하였고 씨드(seed) 배양은 R2YE 배양액에서 준비하였다. 씨드(seed) 배양에서 성장한 영양 세포(vegetative cell) 50mg를 250ml 바플드 플라스크(baffled flask)에 들어있는 50ml R2YE 배지에 접종하고, 오르비탈 셰이커(orbital shaker, 180 rpm 고정)에서 28℃로 6일 동안 배양하였다.

[0065] (2) 추출 및 분리

[0066] 상기 Δ fkbd_{in-frame} 균주의 배양액 4L를 원심분리하고, 상등액을 에틸아세테이트를 이용하여 2회 용매-용매 분배(solvent-solvent partition) 하였다. 에틸아세테이트에 용해된 층을 분리하고, 감압 하에서 증발시켜 어두운 붉은 색의 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 유속 2 mL/min으로 하고 이동상으로는 60% 수성 메탄올을 사용하여, 프레퍼레티브 역상 크로마토그래피(preparative reversed-phase HPLC)에 의해 분획하고 HPLC-ESI-MS 분석을 진행하였다.

[0067] HPLC-ESI-MS/MS 스펙트럼은 ACQUITY UPLC BEH C18 컬럼 (50 2.1 mm, 1.7 μm; Waters) 을 이용하였으며, Micromass Quattro micro MS와 직접 연결된 Waters 2695 분리 모듈로 구성되는 Waters/Micromass Quattro 마이크로 MS 인터페이스로 기록하였다.

[0068] MS/MS에 의한 추적은, 암모늄 부가물(ammonium adduct)과 같은 선구이온(parent ion)으로부터의 생성이온(product ion)으로의 변이를 감지하기 위하여, 선택된 분석체에 특이적인 질량 짝을 선택하는 다양한 반응 모니터링 모드에서 수행되었다.

[0069] 이후 상기 분획물을 2개의 소분획물로 분리하기 위하여, 유속 2 mL/min, 이동상 50% 수성 아세토니트릴(acetonitrile)로 반-프레퍼레티브 역상 크로마토그래피(semipreparative reversed-phase HPLC)를 진행하였다. 동일한 컬럼 및 동일한 HPLC 조건 하에서 상기 소분획물을 정제한 결과, 비정형의 흰색 분말이 나타났다(7.4 mg, t_R 90 min).

[0070] (3) 데이터 측정 방법

[0071] 광학 회전은 0.1 dm 경로 길이 셀을 이용하여 Jasco P-1010 polarimeter로 측정하였다.

[0072] UV 스펙트럼은 Scinco S-3100 분광계(spectrophotometer)로 기록하였고, IR 스펙트럼은 Varian FTS-800 FTIR 분광계로 얻었다.

[0073] NMR 스펙트럼은 Varian INOVA 500 분광계(¹³C, 125 MHz)를 이용하여 1시간 동안 500 MHz로 하여 기록하였다. 화학 시프트는(Chemical shifts)은 테트라메틸실란(TMS)를 내부 레퍼런스로 하여 ppm으로 나타내었다. 모든 NMR 데이터의 가공은 Mnova 소프트웨어(Mestrelab Research S.L.)를 이용하였다. NMR 분석을 위한 샘플은 CDC13 (Sigma) 250 μL에 순수 화합물을 용해시켜 준비한 후, 용매와 부합하는 5-mm Shigemi 어드밴스드 NMR 마이크로 튜브(Sigma)에 위치시켰다.

[0074] HR-ESI-MS 데이터는 UPLC와 결합된 Waters SYNAPT G2 질량분석기를 이용하여 수집하였다. HPLC 정제는 UV730D UV 디텍터 세트(205nm)와 CTS30 컬럼 오븐 세트(50℃)가 연결된 SP930D 기울기용리 펌프(gradient pump)로 이루어진 Acme 9000 HPLC 시스템 (YL Instrument Co. Ltd., Korea) 상의 준-예비분리 Watchers 120 ODS-BP (250

10 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 수행하였다. 실험에 사용한 HPLC grade 용매는 J. T. Baker 사에서 구매하였다.

[0075] 실시예 2. 상기 실시예 1에 대한 관측 결과

[0076] 상기 비정형의 흰색 고체에 대한 분석 결과는 하기와 같다.

[0077] (1) HPLC-ESI-MS

[0078]

[0079] 도 1은 $\Delta f_{kbD_{in-frame}}$ 균주의 배양 추출물의 HPLC-ESI-MS 분석 결과로, m/z 793.1, 13분과 m/z 807.1, 28분에서 암모늄 부가물 이온 피크가 나타났다. 따라서 도 2에 도시된 776.1, 758.1, 740.1, 547.9에서 나타난 토막 이온 (fragment ion)을 볼 때, m/z 793.1, 13분에서 나타나는 피크는 9-데옥소-프로틸-FK506에 의한 것으로 예측하였다. 각 토막 이온 간의 간격이 14Da이라는 점에서 9-데옥소-프로틸-FK506의 토막 패턴은 9-deoxo-FK506과 유사하다. 그러나 9-deoxo-FK506에서 특유의 C-1-C-24 토막 이온은 m/z 561.9에서 나타난 반면, 본 발명의 9-데옥소-프로틸-FK506의 경우 m/z 547.9에서 나타났다. 이는 9-데옥소-프로틸-FK506이 9-deoxo-FK506 및 다른 9-deoxo-FK506 유도체에 비해 특유의 C-1-C-24 토막에서 메틸렌 기를 1개 적게 갖고 있음을 암시하는 것이다.

[0080] 따라서, 상기 비정형의 흰색 고체, 즉 9-데옥소-프로틸-FK506이 프롤린을 포함하는 것으로 판단하였다.

[0081] (2) 1D- 및 2D-NMR

표 1

1D- 및 2D-NMR 데이터

[0082]

| 위치 | δ_c | $\delta_H, m (J \text{ in Hz})$ | $^1H-^1H \text{ COSY}$ | HMBC |
|----|------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 169.9 | | | |
| 2 | 58.9 | 4.35, dd (8, 3) | H-3a, H-3b | C-1, C-3, C-4, C-6 |
| 3 | 29.2 | 2.19, m | H-2, H-4 | C-1, C-2, C-4, C-6 |
| | | 1.98, m | H-2 | C-1, C-2, C-6 |
| 4 | 24.7 | 1.96, m | H-6a, H-6b, H-3a | C-3, C-6 |
| 5 | | | | |
| 6 | 47.4 | 3.63, m | H-4 | C-2, C-3, C-4 |
| | | 3.54, m | H-4 | C-2, C-3, C-4 |
| 7 | | | | |
| 8 | 171.8 | | | |
| 9 | 39.2 | 2.64, d (15) | H-9b | C-8, C-10 |
| | | 2.56, d (15) | H-9a | C-8, C-10 |
| 10 | 98.6 | | | |
| 11 | 38.6 | 1.61, m | H-12a, H-38 | C-10 |
| 12 | 32.7 | 1.99, m | H-11, H-13 | C-10, C-13, C-14, C-38 |
| | | 1.55, m | H-13 | C-10, C-13, C-38 |
| 13 | 74.6 | 3.40, (overlapped) | H-12a, H-12b, H-14 | C-14, C-43 |
| 14 | 71.0 | 3.84, dd (10, 2.5) | H-13, H-15 | C-10, C-12, C-13 |
| 15 | 77.1 | 3.53, m | H-14, H-16a, H-16b | |

| | | | | |
|-------|--------------------|--------------------------------------|--|--|
| 16 | 36.4 | 1.46, m 1.35, m | H-15 H-15, H-17 | C-17, C-19 C-17, C-19 |
| 17 | 25.6 | 1.61, (overlapped) | H-39, H-16b, H-18a | |
| 18 | 49.0 | 2.33, m 1.69, m | H-17 | C-17, C-19, C-20, C-39 |
| 19 | 141.1 | | | |
| 20 | 121.9 | 5.01, overlapped | H-21 | C-18, C-21, C-22, C-40 |
| 21 | 53.4 | 3.36, overlapped | H-20, H-35a, H-35b | C-22, C-20, C-35, C-36 |
| 22 | 214.0 ^a | | | |
| 23 | 44.0 | 2.69, dd (17, 2) 2.34, dd (17, 7) | H-23b H-23a, H-24 | C-22, C-24 C-22, C-24, C-25 |
| 24 | 69.1 | 4.02, dd (7, 3) | H-23b, H-25 | C-22, C-26, C-41 |
| 25 | 41.2 | 1.81, m (3) | H-24, H-26, H-41 | |
| 26 | 78.0 | 5.17, d (2.5) | H-25 | C-1, C-24, C-25, C-27, C-28, C-41, C-42 |
| 27 | 132.4 | | | |
| 28 | 129.7 | 4.98, (overlapped) | H-29 | C-26, C-27, C-29, C-30, C-34, C-42 |
| 29 | 35.0 | 2.27, m | H-28, H-30a, H-30b, H-34a, H-34b | C-30 |
| 30 | 34.9 | 2.05, m 0.97, (overlapped) | H-29, H-30b, H-31 H-29, H-30a, H-31 | C-31 C-31 |
| 31 | 84.4 | 2.99, ddd (8.5, 4.5, 2.5) | H-30a, H-30b, H-32 | C-32, C-45 |
| 32 | 73.7 | 3.40, (overlapped) | H-31, H-33a, H-33b | |
| 33 | 31.4 | 1.98, m 1.35, m | H-32, H-33b, H-34a, H-34b H-32, H-33a, H-34a, H-34b | |
| 34 | 30.8 | 1.61, m 1.04, m | H-29, H-33a, H-33b, H-34b H-29, H-33a, H-33b, H-34a | |
| 35 | 35.7 | 2.45, m (7) 2.25, m | H-36, H-21 H-36, H-21 | C-20, C-21, C-22, C-36, C-37 C-20, C-21, C-22, C-36, C-37 |
| 36 | 135.6 | 5.70, ddt (17, 10, 7) | H-35a, H-35b, H-37 | C-21, C-35 |
| 37 | 116.7 | 5.00, br s | H-36 | C-35, C-36 |
| 38 | 17.1 | 0.95, d (6.5) | H-11 | C-10, C-11, C-12 |
| 39 | 19.0 | 0.75, d (6.5) | H-17 | C-16, C-17, C-18 |
| 40 | 15.7 | 1.67 ^b , s | | C-19, C-20 |
| 41 | 10.0 | 0.90, d (6.5) | H-25 | C-24, C-25, C-26 |
| 42 | 14.4 | 1.66 ^b , s | | C-27, C-28 |
| 43 | 56.3 | 3.37 ^b , s | | C-13 |
| 44 | 57.8 | 3.36 ^b , s | | C-15 |
| 45 | 56.7 | 3.40, s | | C-31 |
| 10-OH | | 6.76, s | | C-8, C-9 |

[0083] 상기 표 1 및 도 3a에 도시된 것과 같이, ¹H NMR 스펙트럼 분석결과, FK506 골격의 특징적인 신호가 관찰되었

다. 구체적으로 메틸기에 상응하는 3개의 더블렛(δ_H 0.95/H₃-38, 0.90/H₃-41, 0.75/H₃-39), 2개의 메틸 싱글렛(δ_H 1.67/H₃-40, 1.66/H₃-42), 3개의 메톡시 싱글렛(δ_H 3.40/H₃-45, 3.37/H₃-43, 3.36/H₃-44), 올레핀 프로톤의 멀티플렛(δ_H 5.70/H-36)이 관찰되었다.

[0084] 또한 도 3b에 도시된 것과 같이, ¹³C NMR 스펙트럼 분석결과, ¹³C NMR 스펙트럼의 42개의 탄소 신호 및 HMBC 스펙트럼의 1개의 카보닐 탄소를 볼 때, 모두 43개의 탄소가 있는 것으로 예상된다. 그러나 상기 화합물(9-데옥소-프로틸-FK506)과 9-데옥소-FK506의 NMR 데이터를 주의 깊게 비교하여 보면, 9-데옥소-FK506의 피페콜레이트 결가지(C-2-C-6)에 대응하는 상기 화합물의 신호가 이동한 것을 알 수 있다.

[0085] 또한 상기 ¹H, ¹³C, 및 도 4에 도시된 HSQC 스펙트럼 분석 결과, 상기 화합물은 δ_C 58.9/C-2(δ_H 4.35/H-2), 47.4/C-6(δ_H 3.63/H-6a, 3.54/H-6b), 29.2/C-3(δ_H 2.19/H-3a, 1.98/H-3b), 24.7/C-4(δ_H 1.96/H-4), 즉, 단지 5개의 탄소 신호를 나타내고 있으므로, 피페콜레이트 대신 상기 화합물은 프롤린 잔기를 갖고 있는 것을 확인할 수 있다.

[0086] 상기 화합물의 프롤린 잔기의 존재는 도 5a 내지 도 5c에 도시된 COSY 및 HMBC 분석을 통해서도 확인할 수 있다. δ_H 4.35 내지 δ_H 3.54 에서의 COSY의 크로스피크는 H-2/H-3/H-4/H-6 연결을 제공하였다. 나아가, δ_H 4.35/H-2, 2.19/H-3a, 1.98/H-3b 에서의 프로톤 신호와 δ_C 169.9/C-1 에서의 카보닐 에스테르 탄소 신호 사이에서, 그리고 δ_H 3.63/H-6a, 3.54/H-6b 에서의 프로톤 신호와 δ_C 58.9/C-2, 29.2/C-3 에서의 탄소 신호 사이에서 주요한 HMBC 상관관계가 나타났다.

[0087] 도 4에 나타난 것과 같이, HSQC 스펙트럼은 δ_H 2.64 (d, J = 15 Hz), 2.56 (d, J = 15 Hz)에서의 프로톤 신호들이 δ_C 39.2에서의 탄소 신호와 상관관계가 있음을 보여준다. 이러한 프로톤 신호들은 C-8 (δ_C 171.8)과 C-10 (δ_C 98.6)에 대한 HMBC 상관관계를 보여주는 것이며(도 5a 및 도 5c), 상기 화합물이 9-데옥소-FK506과 유사한 9-데옥소-프로틸-FK506 유도체임을 보여주는 것이다.

[0088] 한편, 상기 화합물에 대한 COSY 스펙트럼은 잔여 4 스핀 시스템(remaining 4 spin systems)을 보여주며, HMBC 상관관계를 토대로 연결된다(도 5a 내지 도 5c). 메틸 및 메톡시기의 위치는 상대적인 HMBC 상관관계를 기초로 하여 도 5a와 같이 결정되었다.

[0089] 따라서, 상기 화합물을 9-데옥소-프로틸-FK506으로 결정하였다. 본 발명자들은 9-데옥소-FK506 유도체 중 최초로, 일반적인 피페콜레이트 고리 대신 프롤린 결가지를 포함하는 유도체를 확인한 것이다. 또한 상기 화합물의 입체화학구조는 모 화합물인 FK506와 동일하다.

[0090] (3) HR-ESI-MS

[0091] 상기 비정형의 흰색 고체에 대하여 HR-ESI-MS 분석한 결과, m/z 776.4940에서 [M + H]⁺ 이온을 얻었으며, 이는 분자식인 C₄₃H₇₀NO₁₁(calcd m/z 776.4949)과 일치하게 나타났다.

[0092] (+)-ESI-MS

[0093] m/z 793.1 [M + NH₄]⁺; (+)-MS/MS: m/z 776.1, 758.1, 740.1, 547.9

- [0094] (+)-HR-ESI-MS
- [0095] m/z 776.4940 [M + H]⁺ (calcd for C₄₃H₇₀NO₁₁, 776.4949).
- [0096] 상기 결과를 바탕으로, 스트렙토마이시스 속 균주 KCTC11604BP로부터 *fkfD* 유전자를 인-프레임 결실을 통하여 비활성화시킨 균주의 배양액에서 분리된 비정형의 흰색 분말은 하기와 같은 이화적 특성을 지녀 9-데옥소-프로틸-FK506으로 결정하였다.
- [0097] (a) 비정형 흰색 분말;
- [0098] (b) 비선광도(Specific Rotation): $[\alpha]_D^{23} = 1.64$ (c=0.1, 메탄올);
- [0099] (c) UV 흡수 스펙트럼(메탄올): λ_{max} 가 (log e) 227 nm (2.0);
- [0100] (d) IR 흡수 스펙트럼(film): ν_{max} 가 3450, 2960, 1750, 1640, 1170, 1050 cm⁻¹;
- [0101] (e) 표 1로 표시되는 ¹H, ¹³C-NMR
- [0102] (f) (+)-ESI-MS: m/z 793.1 [M + NH₄]⁺;
- [0103] (+)-MS/MS: m/z 776.1, 758.1, 740.1, 547.9;
- [0104] (+)-HR-ESI-MS: m/z 776.4940 [M + H]⁺ ;
- [0105] (g) 분자식 및 분자량: C₄₃H₇₀NO₁₁, 776.4949.

[0106] **실시예 3. 9-데옥소-프로틸-FK506의 활성 분석**

[0107] **(1) 인비트로(In vitro) T-세포 활성 분석**

[0108] 실제 FK506와 비교한 상기 화합물 9-데옥소-프로틸-FK506의 상대적인 면역억제 특성은 T 림프구(lymphocytes)을 사용하여 Mo, S. J. 외(J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 976-985)에 기재된 방법으로 결정하였다. 간략하게는, CD3/CD28-활성화한 인간 T-세포에 상기 화합물을 0.1 nM 농도로 16에서 20시간 동안 처리한 후 인터루킨-2의 분비를 정량하였다.

[0109] 그 결과, 도 6에 도시된 것과 같이, CD3/CD28-활성화한 인간 T-세포에 FK506를 처리한 경우 인터루킨-2의 분비가 CD3/CD28-활성화 하지 않은 세포만큼 감소하여 면역억제 활성이 높게 나타나는 반면, 본 발명에 따른 9-데옥소-프로틸-FK506 (1로 표시)을 CD3/CD28-활성화한 인간 T-세포에 처리한 경우 정상군에 이를 정도로 인터루킨-2의 분비가 현저히 증가한 것을 확인하였다. 즉, 모체인 FK506와 그의 유도체가 면역억제 활성을 나타내는 것과 정반대의 결과를 나타낸 것이다.

[0110] **(2) 신경 재생 활성 분석**

[0111] 실제 FK506와 비교한 상기 화합물의 상대적인 신경 재생 활성은 래트 PC12 세포(pheochromocytoma cell)를 이용하여 Mo, S. J. 외(J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 976-985)에 기재된 방법으로 결정하였다. 상기 PC12 세포에 신경돌기 증식을 유도하는 신경 성장 인자(NGF; KOMA Biotech; 10 ng/ml)를 96시간 동안 처리하였다. 이 때 10 nM FK506 또는 9-데옥소-프로틸-FK506을 함께 처리 또는 제외하였다. 신경돌기의 길이는 인화된 사진을 이용

하여 Revill, W. P. 외(J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002, 302, 1278-1285)에 기재된 방법으로 측정하였다.

[0112] 그 결과, 도 7a 및 도 7b에 도시된 것과 같이, 본 발명에 따른 9-테옥소-프로틸-FK506(1로 표시)은 우수한 신경 돌기 증식 촉진 효과를 나타냄을 확인하였다. 도 7b에서 A는 무처리 세포, B는 신경 성장 인자만을 처리한 세포, C는 FK506 존재 하에 신경 성장 인자를 처리한 세포, D는 9-테옥소-프로틸-FK506 존재 하에 신경 성장 인자를 처리한 세포를 나타낸 것이다.

[0113] 한편, 면역 억제와 신경재생 활성은 각각 다른 기작, 즉 FKBP12의 결합체 또는 FKBP52의 결합체를 통하여 발생하게 된다(Gold, B. G. Expert Opin. Invest. Drugs 2000, 9, 2331-42). 따라서 FKBP12와 결합체를 형성하는 능력이 감소되어 면역억제 활성이 감소되어도, FKBP52의 결합을 억제하지는 않으므로, 신경재생 활성은 유지될 수 있다. 이는 하기의 31-O-디메틸-FK506 및 9-테옥소-31-O-디메틸FK506에 대해서도 동일하게 적용됨을 확인하였다.

[0114] **실시예 4. 31-O-디메틸-FK506 에 대한 활성 분석**

[0115] **(1) 인비트로(In vitro) T-세포 활성 분석**

[0116] 실제 FK506와 비교한 31-O-디메틸-FK506의 상대적인 면역억제 특성은 상기 실시예 3. (1)과 동일한 방법으로 결정하였다.

[0117] 그 결과, 도 8에 도시된 것과 같이, CD3/CD28-활성화한 인간 T-세포에 FK506를 처리한 경우 인터루킨-2의 분비가 CD3/CD28-활성화 하지 않은 세포만큼 감소하여 면역억제 활성이 높게 나타나는 반면, 본 발명에 따른 31-O-디메틸-FK506 (2로 표시)을 CD3/CD28-활성화한 인간 T-세포에 처리한 경우 정상군에 이를 정도로 인터루킨-2의 분비가 현저히 증가한 것을 확인하였다. 즉, 모체인 FK506와 그의 유도체가 면역억제 활성을 나타내는 것과 정반대의 결과를 나타낸 것이다.

[0118] **(2) 신경 재생 활성 분석**

[0119] 실제 FK506와 비교한 31-O-디메틸-FK506의 상대적인 신경 재생 활성의 결정 및 측정은 상기 실시예 3. (2)과 동일하게 진행하였다.

[0120] 그 결과, 도 9a 및 도 9b에 도시된 것과 같이, 본 발명에 따른 31-O-디메틸-FK506 (2로 표시)은 우수한 신경 돌기 증식 촉진 효과를 나타냄을 확인하였다. 도 9b에서 A는 무처리 세포, B는 신경 성장 인자만을 처리한 세포, C는 FK506 존재 하에 신경 성장 인자를 처리한 세포, D는 31-O-디메틸-FK506 존재 하에 신경 성장 인자를 처리한 세포를 나타낸 것이다.

[0121] **실시예 5. 9-테옥소-31-O-디메틸FK506 에 대한 활성 분석**

[0122] **(1) 인비트로(In vitro) T-세포 활성 분석**

[0123] 실제 FK506와 비교한 상기 화합물 9-테옥소-31-O-디메틸FK506의 상대적인 면역억제 특성은 상기 실시예 3. (1)

과 동일한 방법으로 결정하였다.

[0124] 그 결과, 도 10에 도시된 것과 같이, CD3/CD28-활성화한 인간 T-세포에 FK506를 처리한 경우 인터루킨-2의 분비가 CD3/CD28-활성화 하지 않은 세포만큼 감소하여 면역억제 활성이 높게 나타나는 반면, 본 발명에 따른 9-데옥소-31-0-디메틸-FK506 (3으로 표시)을 CD3/CD28-활성화한 인간 T-세포에 처리한 경우 정상군에 이를 정도로 인터루킨-2의 분비가 현저히 증가한 것을 확인하였다. 즉, 모체인 FK506와 그의 유도체가 면역억제 활성을 나타내는 것과 정반대의 결과를 나타낸 것이다.

[0125] **(2) 신경 재생 활성 분석**

[0126] 실제 FK506와 비교한 9-데옥소-31-0-디메틸FK506의 상대적인 신경 재생 활성의 결정 및 측정은 상기 실시예 3. (2)과 동일하게 진행하였다.

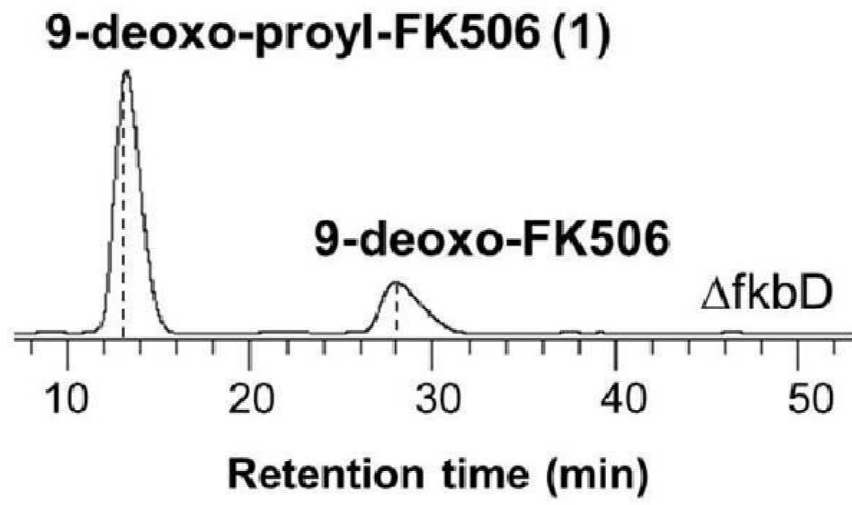
[0127] 그 결과, 도 11a 및 도 11b에 도시된 것과 같이, 본 발명에 따른 9-데옥소-31-0-디메틸-FK506 (3으로 표시)은 우수한 신경 돌기 증식 촉진 효과를 나타냄을 확인하였다. 도 11b에서 A는 무처리 세포, B는 신경 성장 인자만을 처리한 세포, C는 FK506 존재 하에 신경 성장 인자를 처리한 세포, D는 9-데옥소-31-0-디메틸-FK506 존재 하에 신경 성장 인자를 처리한 세포를 나타낸 것이다.

[0128] 따라서, 본 발명에 따른 9-데옥소-프로필-FK506, 31-0-디메틸-FK506, 또는 9-데옥소-31-0-디메틸FK506을 포함하는 조성물은 신경 재생을 촉진할 수 있으며 면역억제활성이 없어, 신경계 질환 치료에 있어 부작용을 감소시킬 수 있다.

[0129] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

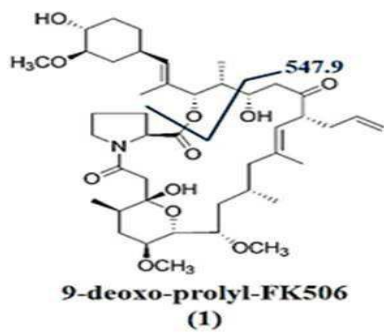
도면

도면1

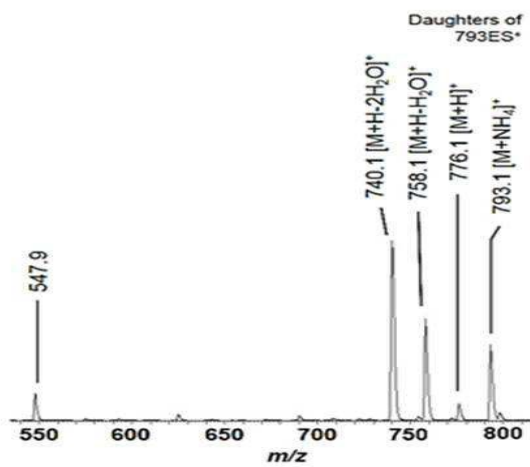


도면2

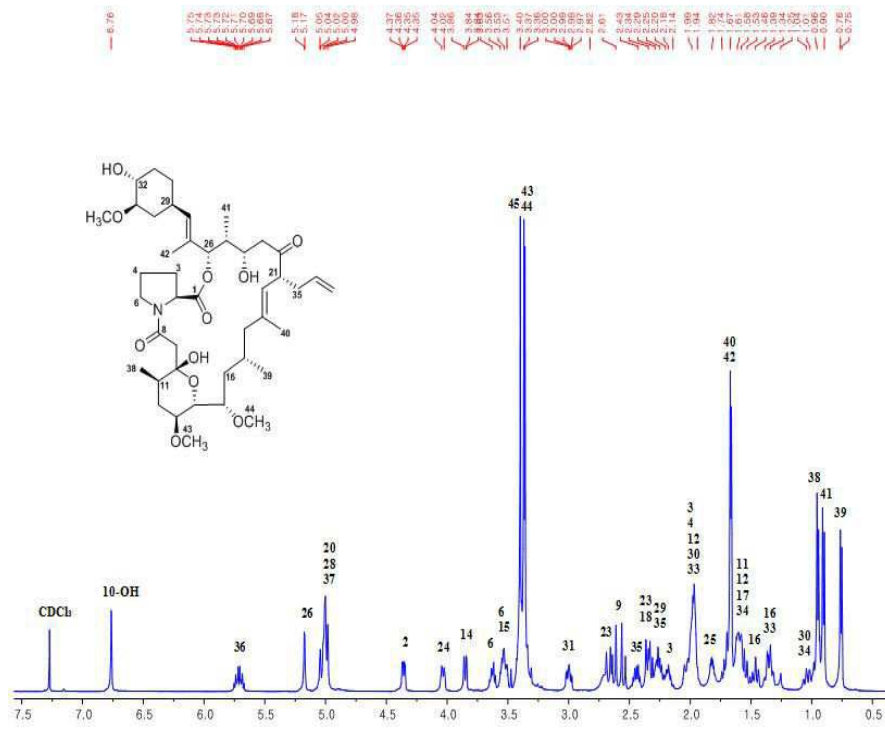
A



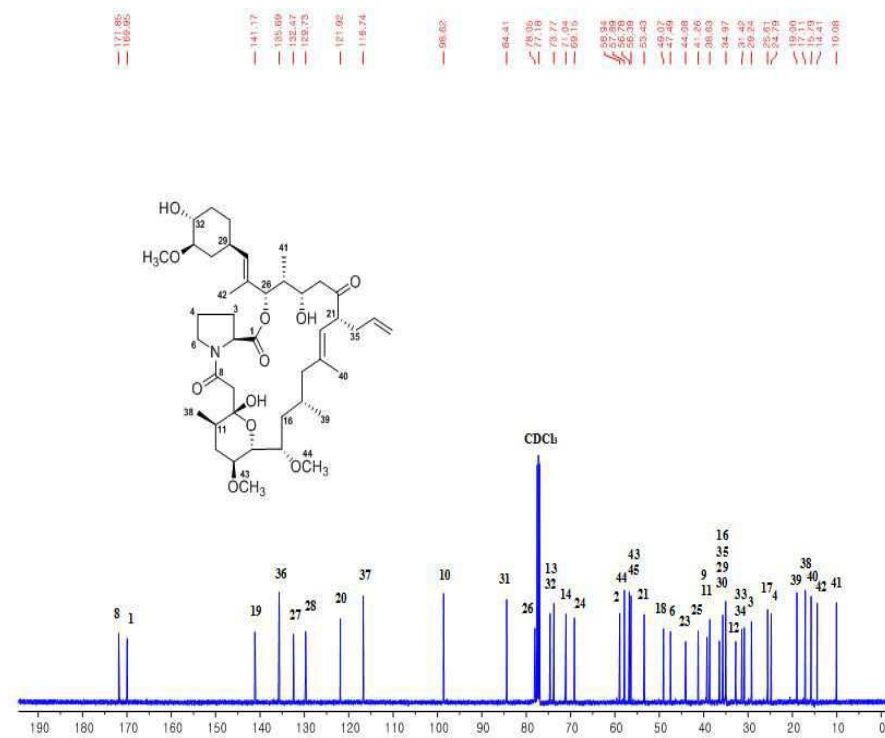
B



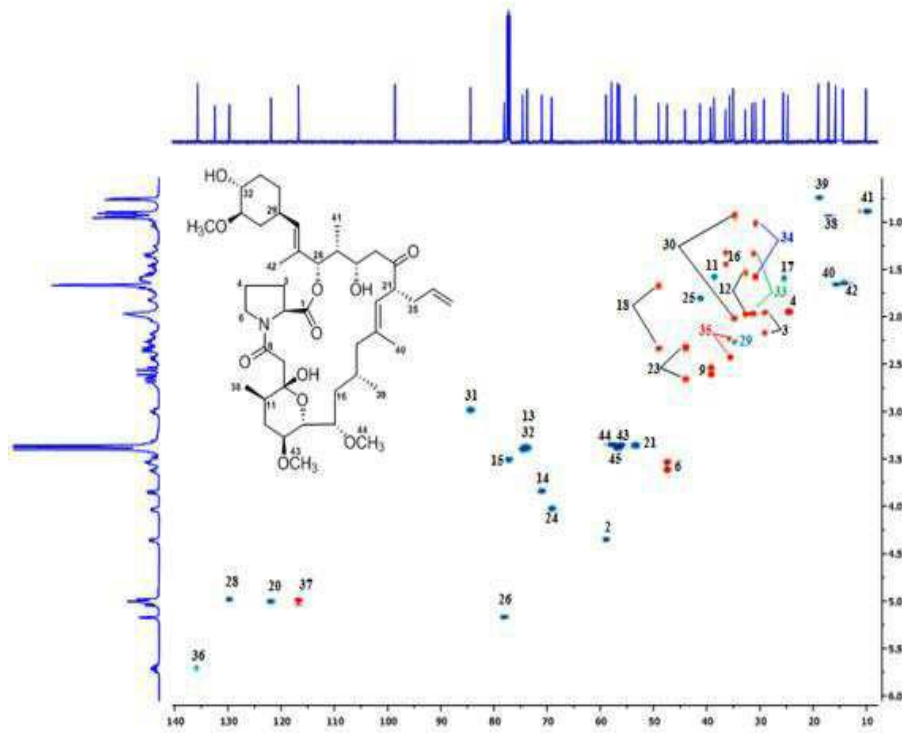
도면3a



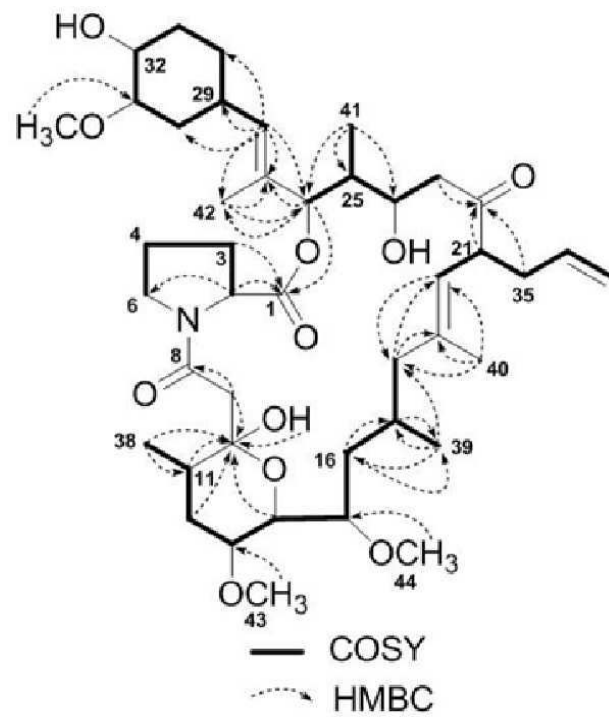
도면3b



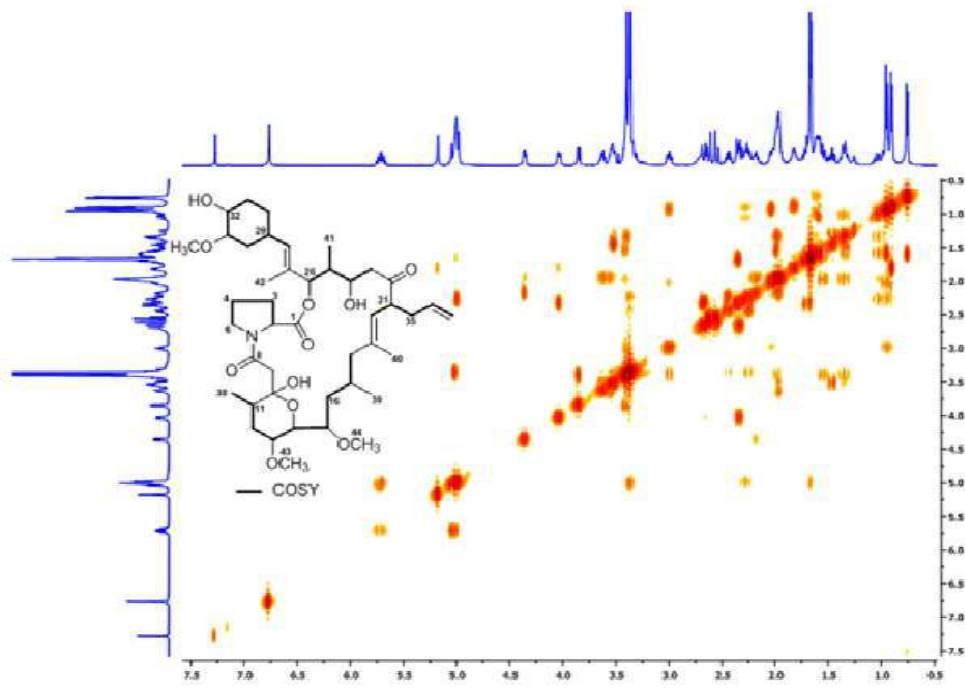
도면4



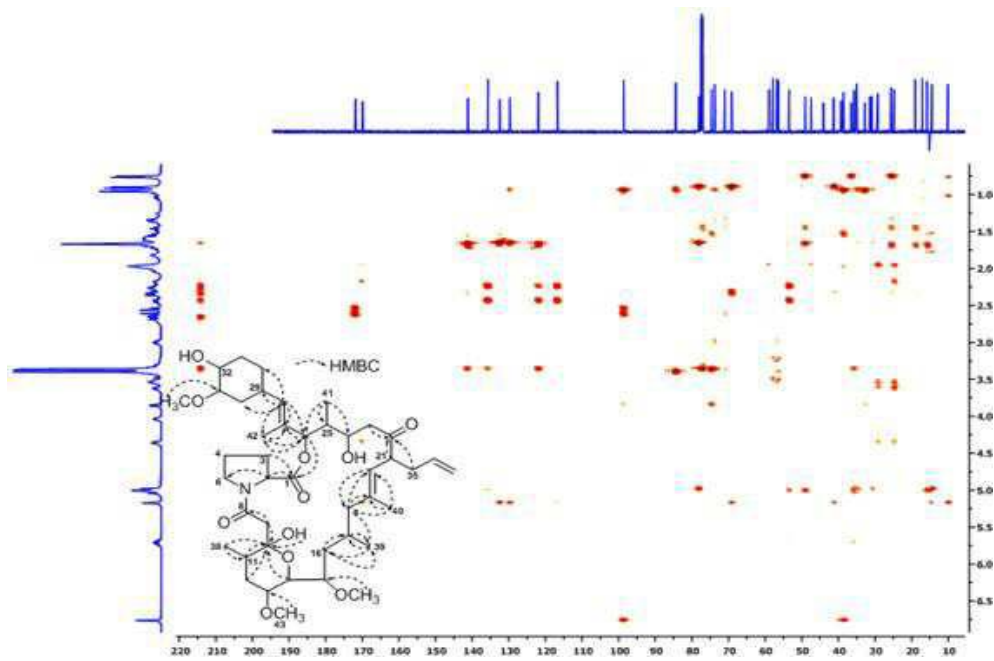
도면5a



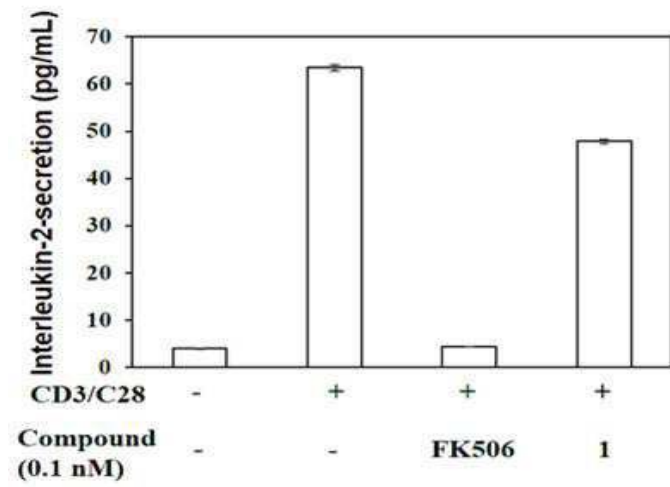
도면5b



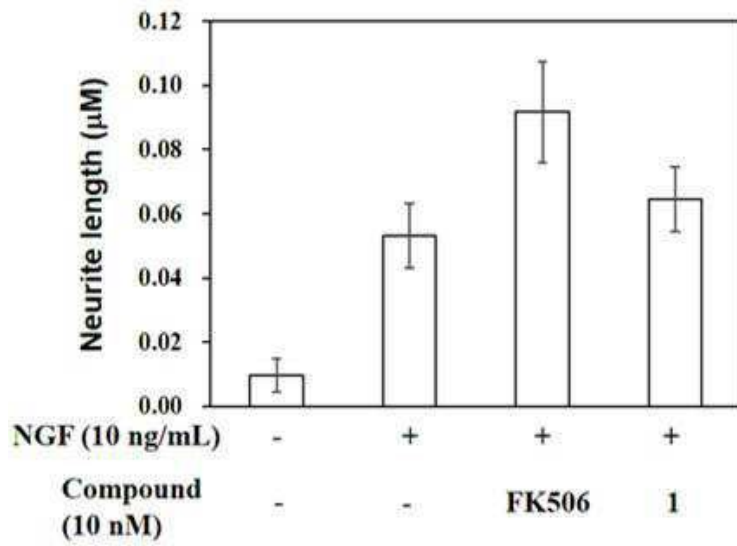
도면5c



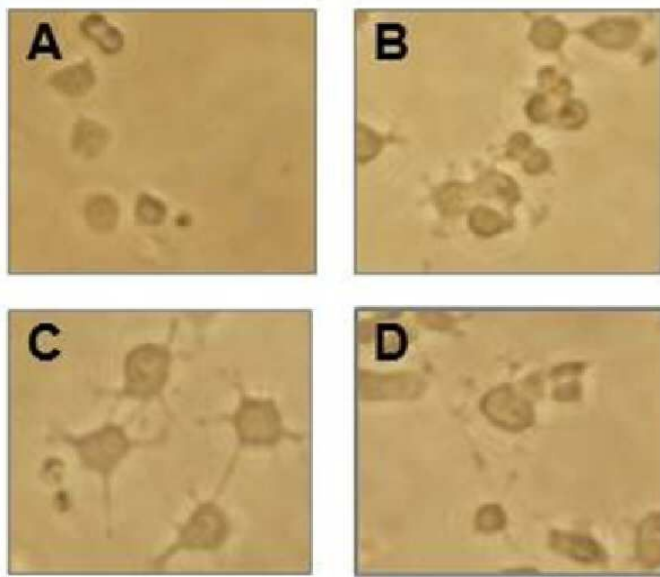
도면6



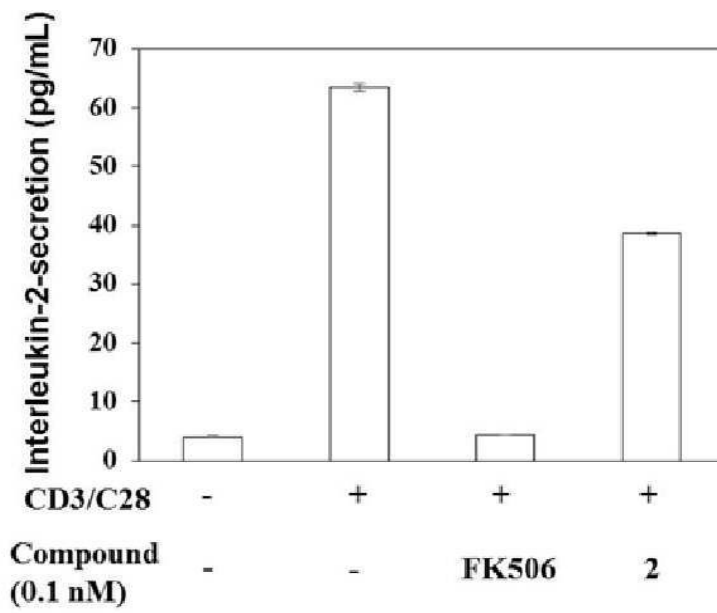
도면7a



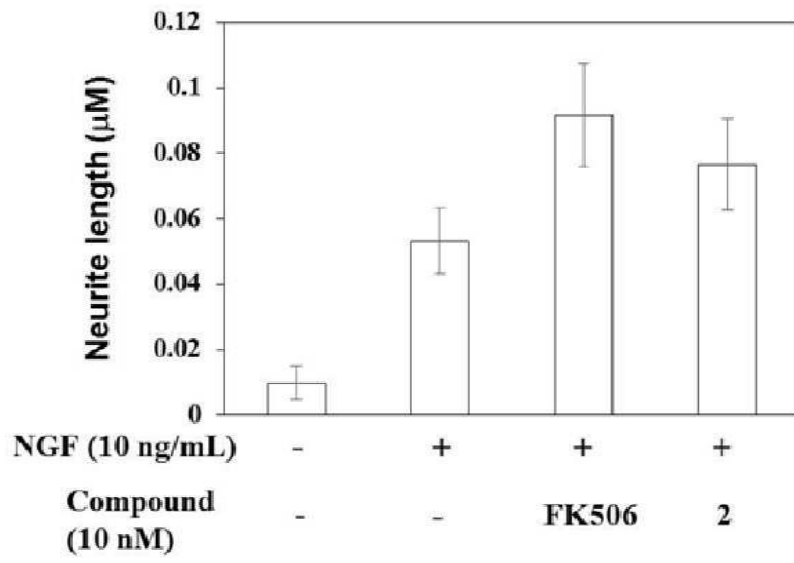
도면7b



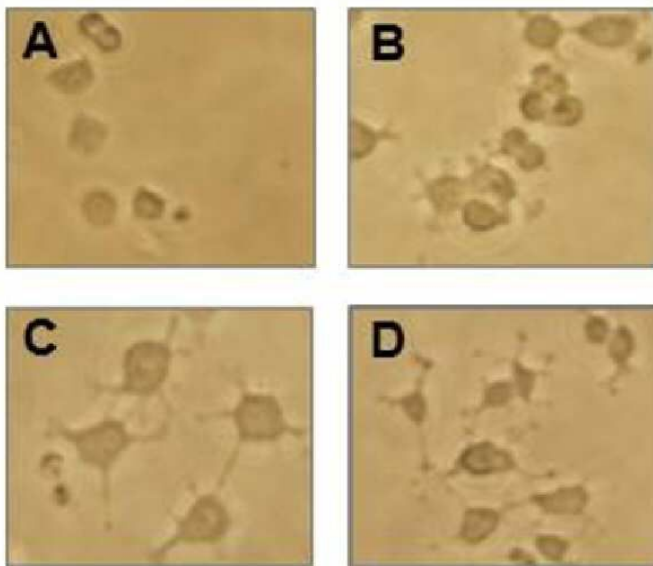
도면8



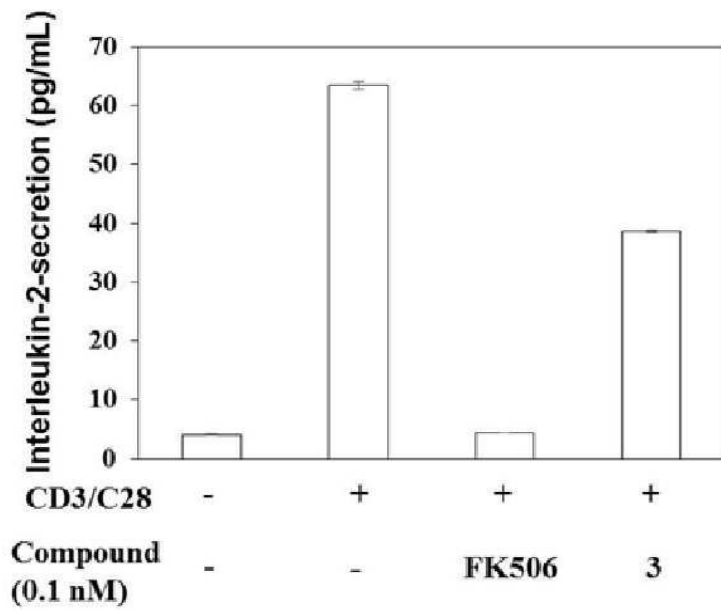
도면9a



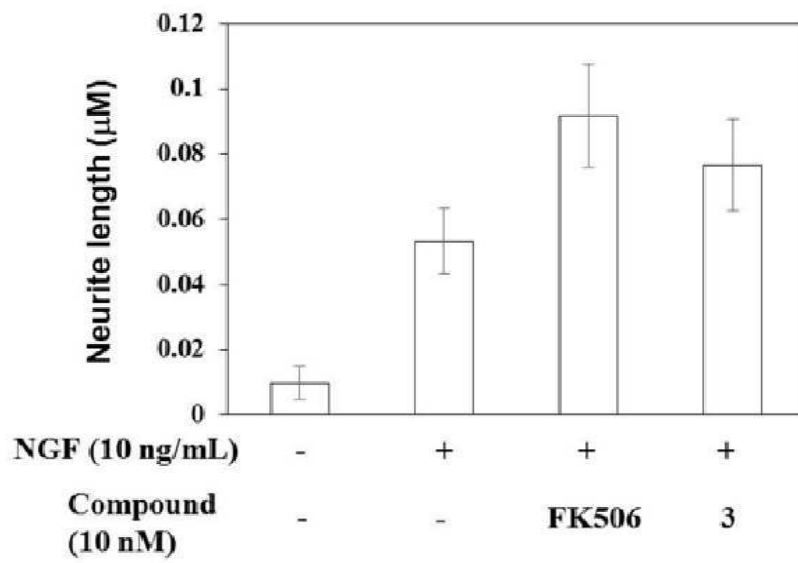
도면9b



도면10



도면11a



도면11b

