극지 유전자원 활용기술 개발사업

BSPM24010-077-3
R&D / RS-2021-KS211513

극지 지의류 유래 치매치료제 실용화 연구
최종보고서

Development of new Alzhamer's anti-dementia medicine using polar lichen-delived metabolites

(I / II)

KOPRI
극지연구소

2025. 05. 21

한국해양과학기술원
부설극지연구소

해양수산부
한국해양과학기술진흥원

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 지의류 유래 치매치료제 실용화 연구” 에 관한 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2025. 05. 21

주관기관 연구책임자/연구원 (극지연구소) : 임정한 / 김일찬, 한세종, 김태경, 홍주미

공동연구기관 연구책임자/연구원 (원광대학교) : 오현철 / 윤치수, 누엔꾹투안, 레바빈, 가오타오쿠엔

공동연구기관 연구책임자/연구원 (성균관대학교) : 조동규 / 김학균, 조윤석, 설재훈, 한지훈, 이정미, 김은애, 김준식, 박선영, 조용은, Leon Filipe Palomera, 천상현, 임정형, 유희진, 임지인, 주혜진, 정가영

공동연구기관 연구책임자/연구원 (전남대학교) : 임형준 / 탄링첸, 첸린첸

공동연구기관 연구책임자/연구원 (경희대학교) : 김성현 / 이원경, 한석민

공동연구기관 연구책임자/연구원 (경북대학교) : 지준구

공동연구기관 연구책임자/연구원 (안국약품) : 김현욱 / 임창기, 황현환, 이지수, 박상윤, 장준성, 김서호, 박보영, 박종찬, 한동오, 위가람, 김경훈, 박영진, 김강태, 정성엽, 정인혜, 최의영, 최윤배, 이준석, 최윤정, 방효주, 이철기, 장수임, 김나영, 고창곤, 조은지, 강석찬, 이승현, 박태준, 오문환, 김민균, 최용준, 반성환, 원영은, 조희원, 최형주, 박수호, 남동연

위탁연구기관 연구책임자/연구원 (차의과대학) : 안홍찬 / 김소영, 강성은, 이수정, 김진아, 권수경, 황지선, 장민아, 최예린, 정민선

KOPRI 극지연구소

[별지 17] 최종보고서 표준 서식

최종보고서

보안등급: 일반[√], 보안[ ]

중앙행정기관명	해양수산부	사업명	사업명	극지 유전자원 활용기술 개발사업	
전문기관명(해당 시 작성)	해양수산과학기술진흥원		내역사업명 (해당 시 작성)	-	
공고번호	20210633		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	-	
			연구개발과제번호	RS-2021-KS211513	

기술분류								
국가과학기술표준분류	LA0904	70%	LA0903	20%	NC0602	10%		
해양수산과학기술분류	POS0201	50%	POS0102	30%	MBT0302	20%		

총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	-			
	영문	-			
연구개발과제명	국문	극지 지의류 유래 치매치료제 실용화 연구			
	영문	Development of new Alzheimer's anti-dementia medicine using polar lichen-derived metabolites			
주관연구개발기관	기관명	극지연구소	사업자등록번호	134-82-06870	
	주소	(우)21990 인천시 연수구 송도미래로 26	법인등록번호	-	
연구책임자	성명	임정한	직위	책임연구원	
	연락처 직장전화	032-760-5540	휴대전화	-	
	연락처 전자우편	jhyim@kopri.re.kr	국가연구자번호	1013 0740	
연구개발기간	전체	2021. 04. 01 - 2024. 12. 31 (3년 9개월)			
	단계 (해당 시 작성) 1단계	2021. 04. 01 - 2024. 12. 31 (3년 9개월)			
	n단계	YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)			

연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발비 외 지원금
					지방자치단체		기타( )					
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계	
총계		8,270,000	173,000	1,135,000	-	-	-	-	8,443,000	1,135,000	9,578,000	-
1단계	1년차	2,404,000	60,000	386,000	-	-	-	-	2,464,000	386,000	2,850,000	-
	2년차	3,000,000	62,000	410,000	-	-	-	-	3,062,000	410,000	3,472,000	-
	3년차	2,612,000	51,000	339,000	-	-	-	-	2,663,000	339,000	3,002,000	-
	4년차	254,000	-	-	-	-	-	-	254,000	-	254,000	-
해당 연도		254,000	-	-	-	-	-	-	254,000	-	254,000	-

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
						역할	기관유형
공동연구개발기관	성균관대학교	조동규	교수	-	jodg@skku.edu	공동	대학
	원광대학교	오현철	교수	-	hch@wku.ac.kr	공동	대학
	전남대학교	임영준	교수	-	imyoungjun@nu.ac.kr	공동	대학
	경북대학교	김성현	부교수	-	sunghyunkim@knu.ac.kr	공동	대학
	경북대학교	지준구	부교수	-	jjee@knu.ac.kr	공동	대학
	안국약품(주)	김한욱	총괄팀장	-	kimhw@ahn-gook.com	공동	중견기업
위탁연구개발기관	차의과대학	안홍찬	부교수	-	hongchanan@cha.ac.kr	위탁	대학
연구개발기관 외 기관	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-

연구개발담당자 실무담당자				
성명	홍주미	직위	연구원	
연락처 직장전화	032-770-8623	휴대전화	010-5184-6424	
연락처 전자우편	wnal5555@kopri.re.kr	국가연구자번호	1127 3404	

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2025년 02월 28일

연구책임자: 임정한 (서명)

주관연구개발기관의 장: 신형철 (직인)

해양수산과학기술진흥원장 귀하

<보고서 초록>

<table>
<tr><td>과제관리번호</td><td>RS-2021-KS211513</td><td>해당단계
연구기간</td><td>2021.04.01. ~
2024.12.31</td><td>단계 구분</td><td>(해당단계) / (총단계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구사업명</td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4">극지 유전자원 활용기술 개발사업</td></tr>
<tr><td>세부사업명</td><td colspan="4">-</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구과제명</td><td>중 과 제 명</td><td colspan="4">극지 지의류 유래 치매치료제 실용화 사업</td></tr>
<tr><td>세부(단위)과제명</td><td colspan="4">-</td></tr>
<tr><td>연구책임자</td><td>임정한</td><td>해당단계
참여연구원수</td><td>총 : 83 명
내부 : 5 명
외부 : 78 명</td><td>해당단계
연구비</td><td>정부: 8,270,000천원
기업: 1,308,000천원
계: 9,578,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소속부서명</td><td colspan="2">극지연구소, 원광대학교,
성균관대학교, 전남대학교,
경희대학교, 경북대학교</td><td>참여기업명</td><td colspan="2">㈜안국약품</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="2">상대국명 : -</td><td colspan="3">상대국연구기관명 : -</td></tr>
<tr><td>위탁연구</td><td colspan="5">차의과대학</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td>요 약</td><td>보고서
면수</td><td>1,633</td></tr>
</table>

○ 극지 지의류 유래 신규 항산화 물질 라말린 및 그의 유도체를 활용하여 알츠하이머성 치매 치료를 위한 약물개발 및 상용화 자료 확보함

- 남극 지의류 유래 신규 항산화제 라말린 및 라말린 유도체의 신규 합성을 통해 190종의 화합물을 도출하였으며, 이 중 130종의 라말린 유도체의 구조를 규명함

- 합성된 라말린 유도체의 항염증 효능을 확인하기 위하여 라말린 유도체 158종을 대상으로 *in vitro*에서 세포독성을 보이지 않으면서 Nitric oxide 생성을 감소시킨 시료 44종을 확보하였고 이 중 13종은 NLRP3 단백질 감소시켜 신경염증에 효과가 있는 것을 확인함

- 라말린 및 선별된 후보물질 3종의 대량합성 공정을 위하여 기존의 소량 합성 공정을 확장하여 고수율, 고순도의 생산공정을 개발하였으며, 이를 기반으로 후보물질의 안정적 공급 체계를 구축함

- 라말린 및 라말린 유도체가 아밀로이드 베타 올리고머에 의한 시냅스 기능과 시냅스 소낭 재활용의 손상이 라말린에 의해 회복되는 것을 밝혔으며, 전사체 분석을 통해 라말린이 MAPK 신호전달 체계를 조절하여 타우 병증을 조절함을 밝힘. 추가적으로 GPScreen을 통해 히스톤 탈아세틸화효소6 (Histone deacetylase 6, HDAC6)을 라말린의 타겟으로 규명함

- 합성한 라말린 유도체로부터 BACE1 발현 감소, Tau 단백질 응집 억제, 신경염증 조절 및 BBB 통과, 인지기능 개선 등의 핵심 기전을 통해 알츠하이머 치료제가 될 수 있는 가능성을 확인하여 후보물질로 RA-PF, RA-058HM 및 RA-PR058 3종을 제시하였고, 이중 최종 후보물질로 RA-PF를 선정함

○ RA-PF는 신경염증 조절, BACE-1 저해, Tau 응집 억제, 항산화 효과, 시냅스 병증 회복을 기반으로 한 알츠하이머 치료제 개발 가능성이 있어 다중타겟 치료제 개발이 가능하며, 이를 통해 알츠하이머 치료제의 기존 한계를 극복할 수 있는 가능성을 확인함. 이외 현재 신약 후보물질은 임상 중 예기치 못한 독성으로 인한 실패 가능성이 높아 RA-PF는 유전독성 및 안전성 약리 시험을 통해 안정성을 확보하여 상용화 가능성이 높음

<table>
<tr><td rowspan="2">색 인 어
(각 5개 이상)</td><td>한 글</td><td>라말린, 라말린 유도체, 알츠하이머성 치매, 작용기작, 극지 지의류</td></tr>
<tr><td>영 어</td><td>Ramalin, Ramalin derivatives, Alzheimer's disease, Mode of action, Polar lichen</td></tr>
</table>

< 요 약 문 >

<table>
<tr><td colspan="2">사업명</td><td colspan="3">극지 유전자원 활용기술 개발사업</td><td>총괄연구개발 식별번호
(해당 시 작성)</td><td colspan="3">-</td></tr>
<tr><td colspan="2">내역사업명
(해당 시 작성)</td><td colspan="3">-</td><td>연구개발과제번호</td><td colspan="3">RS-2021-KS211513</td></tr>
<tr><td rowspan="2">기술분류</td><td>국가과학기술 표준분류</td><td>LA0904 (70)</td><td>%</td><td>LA0903 (20)</td><td>%</td><td>NC0602 (10)</td><td>%</td></tr>
<tr><td>부처기술분류
(해당 시 작성)</td><td>POS0201(50)</td><td>%</td><td>POS0102 (30)</td><td>%</td><td>MBT0302 (20)</td><td>%</td></tr>
<tr><td colspan="2">총괄연구개발명
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">-</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제명</td><td colspan="6">극지 지의류 유래 치매치료제 실용화 연구</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 연구개발기간</td><td colspan="6">2021.04.01 - 2024.12.31 (3년 9개월)</td></tr>
<tr><td colspan="2">총 연구개발비</td><td colspan="6">총 9,578,000천원
(정부지원연구개발비: 8,270,000천원, 기관부담연구개발비 : 1,308,000천원,
지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발단계</td><td colspan="2">기초[ ] 응용[ ] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]</td><td>기술성숙도
(해당 시 기재)</td><td colspan="3">착수시점 기준( )
종료시점 목표( )</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 유형
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">실용화(○), 비실용화( )</td></tr>
<tr><td colspan="2">연구개발과제 특성
(해당 시 작성)</td><td colspan="6">극지 지의류 유래 신규 항산화 물질 라말린 및 그의 유도체를 활용하여
알츠하이머성 치매 치료를 위한 약물개발 및 상용화 자료 확보</td></tr>
<tr><td rowspan="4">연구개발
목표 및 내용</td><td colspan="2">최종 목표</td><td colspan="5">극지 지의류 유래 대사체를 활용한 신규 알츠하이머성
항치매 치료제 개발</td></tr>
<tr><td colspan="2">전체 내용</td><td colspan="5">극지 지의류 유래 라말린을 활용하여 항치매 치료제 개발을 위한
유도체 합성, 약물기작 규명 및 상용화 자료 확보</td></tr>
<tr><td rowspan="2">1단계[1]
(해당 시 작성)</td><td rowspan="2">목표</td><td colspan="5">□ 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴
ㅇ 라말린 유도체 합성 (30종 이상)
ㅇ 항치매 후보물질 도출 (3종 이상)
ㅇ 뇌보호용 물질 라이브러리 확보 및 구조분석

□ 후보물질의 약물기작 (Mode of action) 규명
ㅇ 라말린 및 후보물질 유도체 타겟 자료 확보
ㅇ 후보물질 항치매 약물기전(MOA) 규명
ㅇ AD 모델 기반 약물 효력 평가
ㅇ 약물-타겟 공결정 구조 및 약물 결합부위 규명

□ 항치매 치료제 상용화 자료 확보 및 상용화
ㅇ 라말린 및 후보물질 안정성 자료 확보</td></tr>
</table>

			ㅇ 후보물질 약물 동태 자료 확보(PK/PD분석)
		내용	▪ 알츠하이머성 항치매 치료제 후보물질(라말린 유도체) 3건 확보 ▪ 논문 발표: SCI(E) 8건 이상(JCR 10% 2건 포함) ▪ 특허 출원/등록 : 국내 2건/0건 ※ [참고] 4차년도 과제 연구비 조정으로 연구내용 조정에 따른 연구목표 조정 반영[1)]

연구개발성과	▪ 극지 지의류 유래 신규 화합물 라말린으로부터 항알츠하이머 치료용 후보물질 3종 (RA-PF, RA-058HM, RA-PR058) 도출 (4차년도 R&D 연구과제 조정안 반영)[1)]
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	▪ 기존 알츠하이머성 치매치료제의 한계점을 극복할 수 있는 극지 지의류 유래 라말린 유도체 유래 후보물질 치료제 개발함 ▪ 극지 지의류 유래 라말린 유도체 치료제는 알츠하이머성 치매치료제 시장에서 독보적 위치를 선점하고 있는 신경전달물질 분해효소 저해제 및 아밀로이드베타 항체를 대체 혹은 보완하여 막대한 경제적·산업적 가치를 창출할 것으로 기대함 ▪ 후보물질 대량합성, 효력평가, 안정성 자료 확보 기술은 본 과제의 사업화뿐만 아니라 추후 극지 천연물 유래 유도체를 기반으로 하는 연구 및 사업의 핵심기술이 될 것으로 기대되며, 다양한 분야의 융합 연구로서 학문 및 산업 발전에 기여할 수 있음 ▪ 높은 성장 가능성을 가지고 있는 알츠하이머성 치매치료제 시장에서 천연물 기반 유도체의 사업화를 위한 중요 자료로 활용될 수 있음 ▪ 극한환경에 적응한 고유생물의 대사체를 활용하여 국내기업 및 외국 제약사와의 공동개발 또는 기술이전을 통한 실용화 추진으로 관련 산업 개발에 기여하고, 신약 개발을 위한 기반 사업으로 극지생명과학 분야 기초연구, 의료 R&D 분야 및 실용화 연구 단계를 연계시켜 주는 매개적인 역할 수행함
연구개발성과의 비공개여부 및 사유	▪ 최초 연구성과에 대한 보안등급에 지정되지 않았으나, 지식재산권 방어를 위하여 화합물 구조, 항치매 활성 및 물질 특성 내용이 포함되어 있는 최종보고서의 비공개가 필요함 (2025.04.22. '극지 유전자원 활용기술 개발사업 최종평가 결과' 관련)

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명정보	생물자원		정보	실물
	28	11	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격(모델명)	수량	구입연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)	ZEUS 등록번호
	-	-	-	-	-	-	-	-	-

국문핵심어 (5개 이내)	라말린	라말린 유도체	알츠하이머성 치매	작용기작	극지 지의류
영문핵심어 (5개 이내)	Ramalin	Ramalin derivatives	Alzheimer's disease	Mode of action	Polar lichen

1) 4차년도 과제 연구비 조정으로 20240322. '극지 유전자원 활용 기술 개발 사업 심의위원회 결과에 따른 연구내용 조정안을 반영함

목 차

1. 연구개발과제의 개요 ····· 1

1-1. 연구개발 목적 ····· 1

1-2. 연구개발의 필요성 ····· 7

1-3. 연구개발 범위 ····· 17

1-4. 국내외 기술 개발 현황 ····· 23

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 ····· 47

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 ····· 1,025

3-1. 연구개발과제의 대표적 연구 실적 ····· 1,025

3-2. 연구수행 결과 ····· 1,036

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성) ····· 1,069

4-1. 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용 ····· 1,069

4-2. 자체 보완활동 ····· 1,069

4-3. 연구개발 과정의 성실성 ····· 1,069

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도 ····· 1,073

5-1. 목표 달성도 ····· 1,073

5-2. 관련 분야 기여도 ····· 1,073

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 ····· 1,074

6-1. 연구개발성과의 관리 계획 ····· 1,074

6-2. 연구개발성과의 활용 계획 ····· 1,074

6-3. 연구개발성과의 보안등급 ····· 1,075

7. 기타 사항 ····· 1,075

7-1. 연구시설 · 장비종합정보시스템 등록한 연구시설 장비 현황 ····· 1,075

7-2. 연구시설 · 장비종합정보시스템 등록한 연구시설 장비 현황 ····· 1,075

기타 1. 참고문헌 ····· 1,076

기타 2. 별첨자료 1 ····· 1,080

기타 3. 별첨자료 2 ····· 1,432

KOPRI 극지연구소

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

알츠하미머성 치매(Alzheimer's disease : AD)의 치료약물 개발을 위하여 극지연구소에서 원천특허를 확보한 남극 지의류 *Ramalina terebrata* 유래 신규 항산화제 라말린(Ramalin)[2] 유도체를 활용하여 항알츠하이머 치료용 후보물질을 확보함

□ 연구개발 개요

○ 연구개발 목표

극지 지의류 유래 신규 항산화제 라말린(Ramalin)을 활용하여 항알츠하이머 치료용 후보물질 탐색을 위하여 라말린 유도체 합성, 후보물질 작용기전(Mode of action : MOA) 규명, 후보물질 상용화 자료 확보 및 기업이전을 목표로 함(그림 1-1, 1-2)

구분	내용
최종목표	<최종목표> 극지 지의류 유래 대사체를 활용한 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 개발 ▪ 알츠하이머성 항치매 치료제 후보물질 (라말린 유도체) 3건 확보 ▪ 논문 발표: SCI(E) 8건 이상 (JCR 10% 2건 포함) ▪ 특허 출원/등록 : 국내 2건/0건 ▪ 보고서 : 4편 **※ [참고] 4차년도 과제 연구비 조정으로 연구내용 조정에 따른 연구목표 조정 반영[1]**
최종목표 설정근거	<설정근거> ▪ 극지 지의류 유래 라말린 유도체 합성 30종 이상 확보 ▪ 항치매 후보물질 확보 : 라말린 합성 유도체에 대한 항치매 효과 검증 후 후보물질 3종 확보 ▪ 논문 발표 : SCI(E)급 논문 8건 이상 (JCR 10% 2건 포함) ▪ 특허 출원 : 특허출원/등록 (2건/0건) 이상 - 특허출원이 가능한 라말린 유도체 합성 물질 3종 (국내특허 2건 이상) **※ [참고] 4차년도 과제 연구비 조정으로 연구내용 조정에 따른 연구목표 조정 반영[1]**
세부목표	<주요 기능> ▪ 알츠하이머 항치매 치료제 후보물질 3종 확보 - 라말린 유도체로부터 BBB 통과, 약물 독성 검증, 플라그 제거(Aβ 및 tau), 항염증 검증, 항치매 MOA 확증, 동물 치매모델에서 인지능력 향상이 검증된 최종 약물 1종 확보

KOPRI 극지연구소

<주요 성능치>

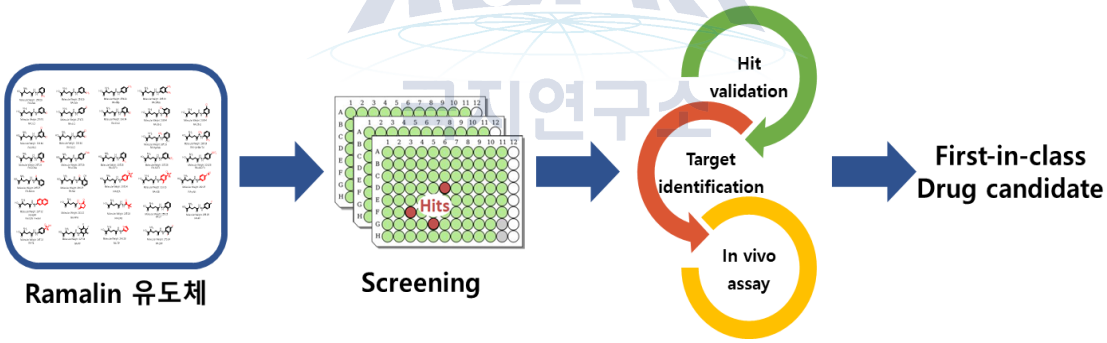
- 치매 동물모델을 기반으로 항알츠하이머 후보물질의 유효성 및 안전성 평가
- 분자 모델링을 활용한 최적화된 유도체 생산
  - 타겟 단백질의 크리스탈 구조를 분석하여 최적화된 결합력을 갖는 유도체 디자인

<핵심 기술>

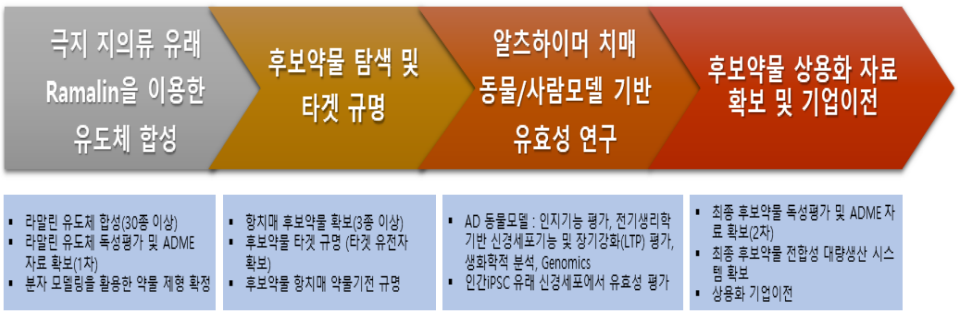
- 유도체 합성기술을 통한 라말린 유도체 합성 및 뇌보호 약물라이브러리 확보
- BACE1, Aβ42, p-Tau 및 전파조절 물질의 세포 기반 스크리닝 시스템 구축
- AI기반 머신러닝을 이용한 타겟 후보군 규명 기술
- 타겟 단백질 구조분석을 통한 유도체 디자인 최적화 기술
  - 표적 분자 구조 기반 항치매 활성 물질 검증 및 신약 설계
- 제약용 약물평가를 위한 상용화 제반 기술
  - CMC 자료 확보
  - 약물 안정성 규명 기술, 약물 제형 및 대사체 검증기술

<적용범위>

- 알츠하이머성 항치매 치료에 활용 가능
- 항치매 치료제 후보 물질 상용화 및 기업 이전
- 뇌세포 보호, 항섬유화, 항염증 등의 질환에 대한 선도물질로 활용이 가능



[그림 1-1. 라말린을 활용한 알츠하이머성 항치매 치료제 약물 탐색]

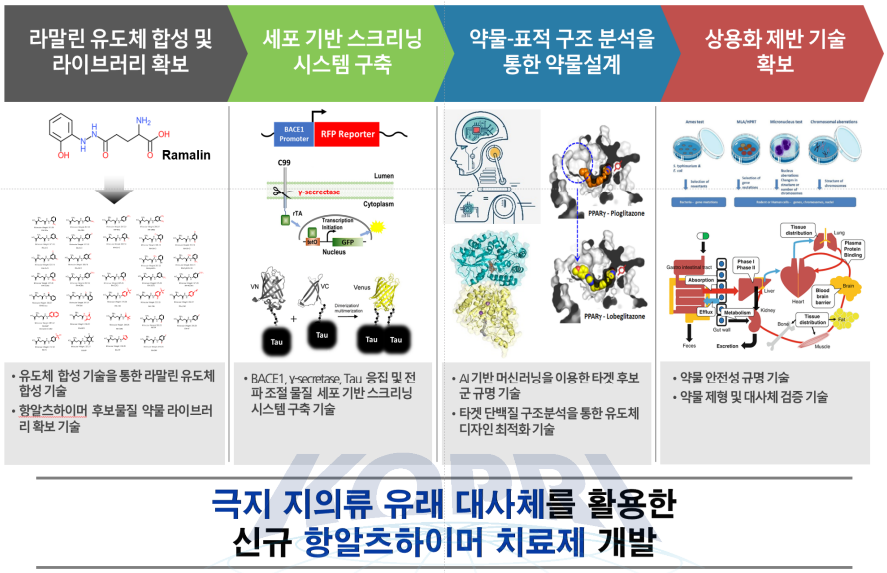


[그림 1-2. 알츠하이머성 항치매 치료제 상용화 전략]

□ 연구개발 내용

○ 세부별 연구내용

본 연구과제는 남극 지의류 유래 심규 항산화제인 라말린의 유도체를 활용하여 항알츠하이머 후보물질 개발을 위한 3개 세부과제로 구성이 되었고 ① 라말린 유조체 합성, ② 후보물질의 약물기작 규명 및 ③ 후보물질의 상용화를 위한 물질 평가 등임(그림 1-3)



[그림 1-3. 라말린 유도체를 이용한 항알츠하이머 후보물질 개발]

1) 세부 1 : 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴
   가. 라말린 및 유도체 합성 및 구조 규명
   나. 항알츠하이머 후보물질 스크리닝
   다. 후보물질 대량생산 공정 확보
   라. 라말린 유도체의 뇌신경 보호작용 분석

2) 세부 2 : 후보물질의 약물기작 (Mode of action) 규명
   가. 후보물질 발굴 및 작용기전 규명
   나. 알츠하이머 동물모델 및 인간모델에서 유효성 평가
   다. 신규 타겟 및 약물 기전 규명
   라. 라말린 및 유도체들의 타겟 단백질 예측 및 결합 평가
   마. AD 동물모델 및 인간모델 기반 최종 후보물질 유효성 평가
   바. 최종 후보물질 3종 도출

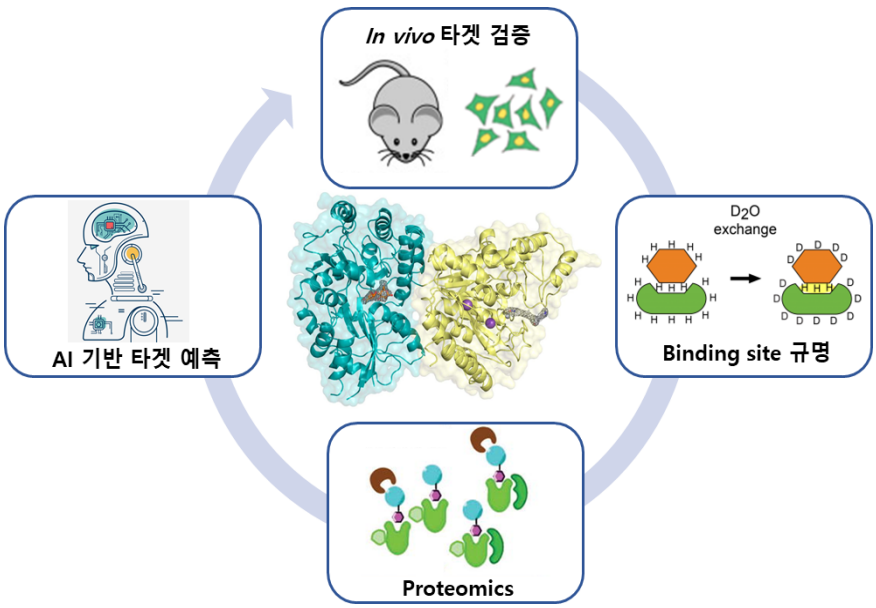
3) 세부 3 : 항치매 치료제 상용화 자료 확보 및 상용화
   가. 라말린의 Drug-like properties 자료 확보

나. 라말린의 in vitro ADME 자료 확보
다. 라말린의 설치류 PK/Brain PK data 확보
라. 라말린의 in vivo ADME 및 대사체 연구
마. 라말린의 초기 안전성 자료 확보
바. 라말린의 설치류 및 비설치류 단회투여 및 DRF 자료 확보
사. 라말린의 설치류 및 비설치류 반복투여 독성자료 확보
아. 라말린 유도체의 Drug-like properties 자료 확보
자. 라말린 유도체의 in vitro ADME 자료 확보
차. 라말린 유도체의 설치류 PK/Brain PK data 확보
카. 라말린 유도체의 초기 안전성 자료 확보

※ [참고] 4차년도 과제 연구비 조정으로 연구내용 조정에 따른 연구목표 조정 반영함[1)]

○ 연구수행 요약

1) 연구 수행을 위한 핵심기술은 유도체 합성기술을 통한 라말린 유도체 합성 및 평가, 뇌보호 약물 라이브러리 확보, BACE1, Aβ42, p-Tau 및 전파조절 물질의 세포기반 스크리닝 시스템 구축 기술, AI 기반 머신러닝을 이용한 타겟 후보군 규명 기술, 타겟 단백질 구조분석을 통한 유도체 디자인 최적화 기술(표적 분자 구조 기반 항치매 활성 물질 검증 및 신약 설계) 및 제약용 약물 평가를 위한 상용화 제반 기술(CMC 자료 확보, 약물 안정성 규명 기술 및 약물 제형 및 대사체 검증 기술) 등을 활용하여 항알츠하이머 후보물질 발굴을 진행함(그림 1-4)



[그림 1-4. 후보약물 스크리닝을 위한 탐색 연구]

2) 라말린 유도체의 항알츠하이머 약물 후보물질 발굴을 위하여 AI 등을 활용하여 라

말린 유도체 합성, BBB 통과 검증, 약물 독성 검증, 뇌내 플라그 제거(Aβ 및 tau), 항염증 검증, 항치매 MOA 확증 및 동물 치매모델에서 인지능력 변화에 대한 자료를 확보하여 라말린 기원의 알츠하이머성 항치매 후보물질 3종 확보함(그림 1-5)[3)]

가. 후보물질 탐색을 위하여 라말린 target 구조의 선정을 위한 시료 및 합성법을 고려하여 핵심 중간체를 확보하고 유도체 합성 효율성을 고려한 합성 및 정제 난이도를 평가함(글루탐산 유도체의 설계; 보호기 및 정제 용이성 예측 물질 선정) 및 라말린 유도체 구조를 규명함

나. 라말린 유도체의 BBB(Blood-Brain Barrie, 혈뇌 장벽) 통과를 위하여 극성인 라말린 유도체의 수동 확산을 위한 물질의 지용성 확보, 분자량 400~500 Da 유지, 극성 표면적 감소, 효과적인 반감기 유지 및 중성 pka 등을 고려함

다. 후보물질의 IND (Investigational New Drug, 임상시험용 신약) 승인 신청을 위하여 기초 약물독성 검증 자료를 확보함. 이를 위하여 세포 배양시스템을 이용해 특정 세포나 조직에 대한 약물 독성을 평가, 실험동물을 이용한 약물 독성, 특정 기관 독성 영향 평가 및 동물실험을 대체하기 위해 컴퓨터 모델링 등을 활용하여 약물 효과 및 독성을 평가함(약물독성, 유전독성, 대사체분석 및 다중 오믹스 분석 등). 그러나 4차년도 R&D 연구과제 조정안 반영에 따라 비임상 연구 (Nonclinical Studies) 자료 중 일부, 약물 정보(CMC, Chemistry, Manufacturing, and Controls), 임상시험 계획(Clinical Protocols & Investigator I) 등은 제외함[1)]

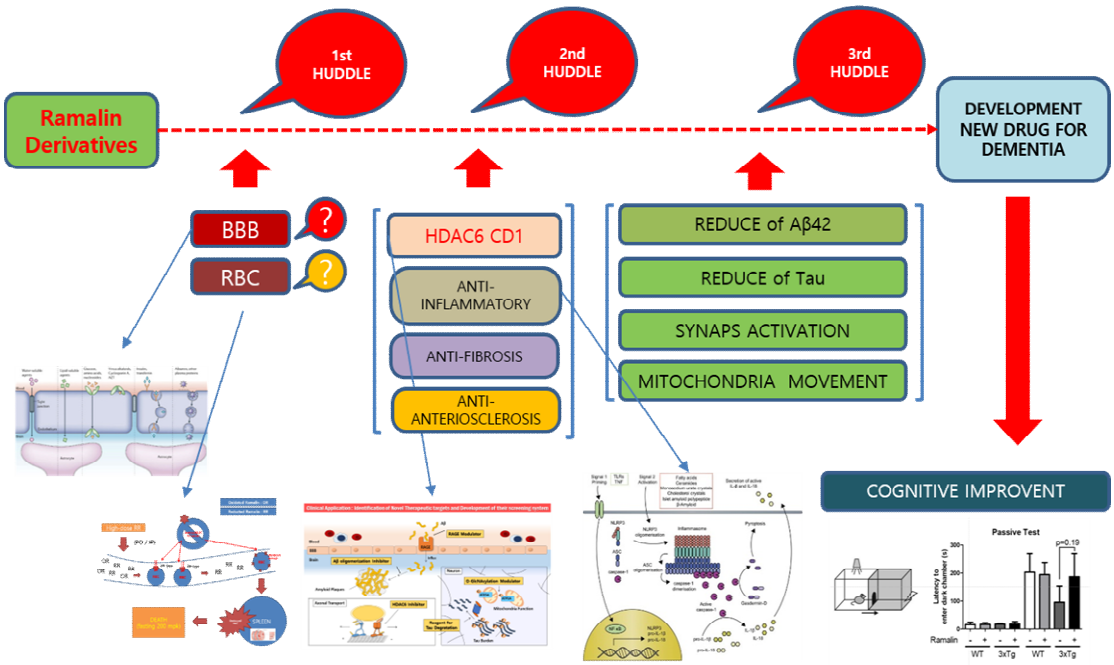
KOPRI 극지연구소

라. 라말린 유도체의 뇌 내 플라그 제거(Aβ / tau) 평가를 위하여 치매 모델동물(5xFAD 및 3xTg mouse)를 활용하여 합성된 라말린 유도체를 투여한 후 뇌에 형성된 Aβ 및 tau 플라그 형성에 대한 평가함

마. 라말린 유도체의 알츠하이머 기원 신경염증(neuroinflammation) 활성 평가를 위하여 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6) 변동성, Tau 과인산화 평가, 및 미세아교세포(Microglia) 및 성상세포(Astrocyte)가 과활성화 등을 평가함

바. 라말린 유도체의 항알츠하이머 작용기작(mode of action) 규명을 위하여 화합물과 단백질 간 상호작용 분석, 뇌세포를 이용한 세포모델 분석, 치매 동물모델 마우스를 이용하여 알츠하이머 동물모델 및 인간모델에서의 유효성 평가, 신규 타겟 및 약물 기전 규명, 라말린 및 유도체들의 타겟 단백질 예측 및 결합 평가 및 AD 동물모델과 인간모델 기반 최종 후보물질 유효성 등을 평가함

사. 라말린 유도체에 의한 치매 동물모델의 인지능력 변화를 평가하기 위하여 5xFAD 및 3xTg mouse에 라말린 유도체를 투여한 후 모리스 수중미로, 공포 조건화, T-maze 및 Y-미로 테스트 등의 행동 시험을 실시, 인지 개선을 평가함



[그림 1-5. 라말린 유효성 및 후보물질 도출을 위한 추진 방향]

KOPRI 극지연구소

2) 극지 지의류 *R. terebrata* 유래 신규 항산화제로 치매 관련 특허 :'라말린을 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물(대한민국, 특허등록번호 : 10-1637240)

3) 라말린을 활용한 항알츠하이머 치매 후보물질 발굴을 위하여 라말린 유도체의 약물개발에 고려되는 항목

1-2. 연구개발의 필요성

□ 기술적 측면

○ 전 세계적으로 치매 환자의 수가 급격히 증가하여 선진국을 중심으로 치매 치료가 중요한 사회적 이슈로 떠오르고 있지만, 현재까지 확실한 알츠하이머 치료법은 개발되지 않은 상태로 치매치료제는 증상을 완화시키는 정도의 치료제라는 한계가 있어 이를 극복하기 위하여 질병 변형치료제(disease-modifying therapy) 개발 및 연구가 진행 중임

○ 2014년 미국에서는 총 64개의 치매치료제가 개발되고 있음. 주로 아밀로이드베타(Aβ)와 타우 단백질(Tau)을 작용점으로 하고 있으며 초기 치매 환자의 치료를 위하여 비강 내로 분무하여 뇌혈관장벽(BBB)을 통과할 수 있는 약물 혹은 유전자 치료제 등이 개발되고 있었으나 모두 실패하였음

○ 현재까지 미국 FDA 승인을 받은 치료제는 도네페질(Donepezil, 상품명 : Aricept) 등 5개 제품만이 존재 하나, 최근 글로벌 제약회사들은 치매치료제 개발을 시도하였지만 약물 유효성 입증이 실패하였고, 부작용 발생 등의 문제로 인해 치료제 개발에 잇달아 실패하였음

○ 현재 사용 중인 알츠하이머 약물은 단기적 증상 완화제로 ① ARICEPT : AChE1 관련 ($3,757m) Eisai/Pfizer, ② EXELON : AChE1 & BuChE1 관련 ($1,003m) Nocvartis, ③ Razadyne : AChE1 & nAChR agonist ($443m) 및 Namenda : NMDA recepter antagonist ($1.69m) 등이 있음(그림 1-6)

Current Treatments for AD

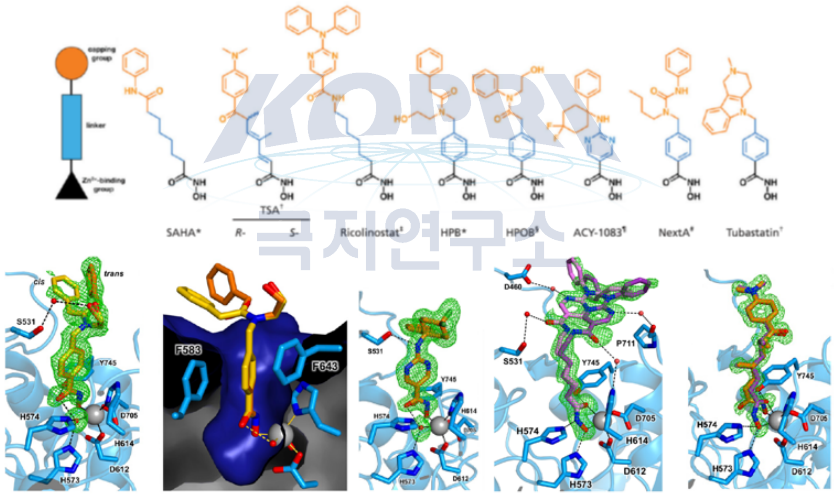
AD 치료제	ARICEPT (donepezil HCl)	EXELON (rivastigmine tartrate)	Razadyne ER (galantamine ER)	Namenda (memantine HCl)
회사	Eisai/Pfizer	Novartis	J&J/Shire	Forest/Merz/Lundbeck
작용기전	AChEI	AChEI and BuChEI	AChEI and nAChR agonist	NMDA receptor antagonist
FDA 적응증	Mild, moderate, and severe AD	Mild to moderate AD, PD	Mild to moderate AD	Moderate to severe AD
일반적 처료용도	First-line all disease severities	First- or second-line mild to moderate	First or second line mild to moderate	Monotherapy or adjunct to Aricept moderate to severe
제형	Oral	Oral or transdermal	Oral	Oral
복용	Once daily	Twice daily capsules or once daily patch	Once daily	Twice daily
2010 판매	$3,757m	$1,003m	$443m	$1,694m
비고	Gold-standard AD 약물	Patch - Greater tolerability profile	A common second-line alternative to Aricept	Severe AD patients

[그림 1-6. 현재 사용 중인 알츠하이머 약물은 단기적 증상 완화제]

○ 선진국에서는 거대 제약사를 중심으로 퇴행성 신경질환 치료제 개발에 막대한 투자와 연구를 진행하였지만, 현재 국내에서는 퇴행성 신경질환 치료제에 대한 원천적이고 독자적인 기술과 전략이 부족함

○ 생체 단백질의 기능을 연구하는 효과적인 방법의 하나는 표적 단백질의 3차 고해상도 구조를 규명하는 것임. 구조 정보는 기능에 대한 확실한 증거나 단서를 제공하므로 단백질 x-선 결정학은 현대 분자생명과학의 핵심적인 연구 수단으로 활용되고 있음. HDAC6 효소의 주요 도메인들의 3차 분자구조가 알려졌으며, 이것들과 신규 저해제들의 복합체 구조분석으로 작용 메커니즘 및 활성 검증, 신약 설계에 활발히 이용되고 있음

○ HDAC6는 신규 표적으로 현재 10개 이하 저해제가 임상시험 단계에 있는 의학적 응용 가능성이 높은 표적임. HDAC6가 질병(치매, 무도병 등 신경질환) 치료 표적으로 밝혀졌고, 저해제 개발이 초기인 점을 고려할 때, 앞으로 본연구로 연구개발 및 기술 선점의 가치가 높음. 히스톤 탈아세틸화를 조절하여 염색체 구조를 변화시키고, 전사 인자의 DNA 접근을 영향을 줌, 비히스톤 기질인 α-튜블린, 코락틴, 열충격단백질 90(HSP90) 등을 표적으로 함, 유비퀴틴과 결합하여 단백질을 분해하는 autophagy-lysosome 경로에 관여함, 바이러스 감염의 다양한 단계에서 바이러스를 억제함 및 NLRP3 및 피린 인플라마좀의 활성화와 조립을 매개함(그림 1-7)



[그림 1-7. 개발된 여러 HDAC 저해제 유도체들 표적 결합 구조 분석 예]

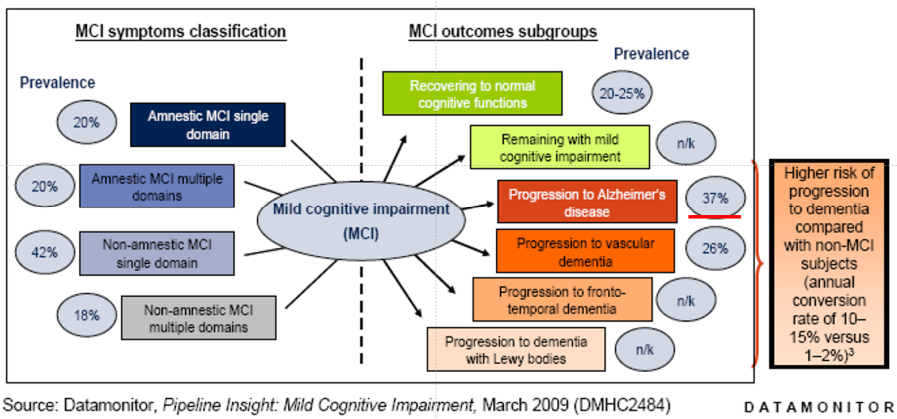
○ 단백질 3차 구조기반 연구로 약물 표적에 대한 선도물질의 유효성을 직접 검증할 수 있으며, 표적 단백질-활성 물질 고해상도 3차 구조는 단백질의 기능을 조절할 수 있는 물질을 탐색하는 데 유용한 정보를 제공하여 구조기반 약물 설계에 응용한 신약 개발의 원천기술을 확보할 수 있음

○ 치매 치료는 기존의'증상 개선' 중심에서 베타 아밀로이드·타우 단백질 등 발병 기전을 직접 겨냥하는 질병 수정형 신약 시대로 전환하고 있음. 레카네맙, 도나네맙 등 아밀로이드 표적 항체들이 연달아 긍정적 임상 결과를 내면서 FDA 가속 승인·조건부 승인 사례가 늘고 있으며, 타우 단백질 표적, 다중 기전, 유전자 편집 등 차세대 접근에 대한 연구도 더욱

활발해질 전망임. 그러나 여전히 장기적 안전성, 부작용 관리, 치료 비용, 조기 진단 체계 등의 과제가 남아 있어, 임상 적용이 확대되는 데는 다각도의 노력이 요구됨. 궁극적으로 조기진단 및 맞춤형 복합 요법(Combination therapy)이 치매 치료의 핵심 전략이 될 것으로 예측됨

○ 치매 치료에 다중 기전(Multi-target) 및 혁신 접근을 위하여 다중치료제(베타 아밀로이드 제거뿐만 아니라 신경염증 억제, 시냅스 보호, 미토콘드리아 기능 개선 등 복합 작용 기전을 동시에 노리는 약물이 연구 중 항체 치료제와 소분자 약물(항염증제, 항산화제 등)의 병용요법 임상시험 사례 증가하고 있음), 유전자 편집(CRISPR/Cas9 등으로 가족성 알츠하이머병(FAD) 유발 유전자를 직접 교정하려는 시도가 연구 단계에서 진행되고 있으나, 안전성·효율성 등 해결 과제가 많아 상용화까지는 추가 연구 필요함) 및 나노약물 전달 / 뇌자극, 뇌혈관장벽(BBB)을 통과하기 위한 나노입자 기반 약물 전달 플랫폼 연구 및 광유전학(Optogens)을 이용한 치료효과 확보) 등이 있음

○ 알츠하이머병은 다요인성 질환으로 여러 가지 유전적, 환경적, 생물학적 요인이 관여하여 발병 기전이 완전히 규명되지 않았기 때문에 치료제 개발이 어려움. 대표적인 병리학적 특징(아밀로이드 플라크, 타우 단백질 축적 등)의 기여도와 상호작용이 명확히 규명되지 못함. 또한 치매는 초기에는 경미한 증상으로 시작되어 명확한 진단이 어렵고 환자들이 임상적으로 진단될 때는 이미 뇌 손상이 심각하게 진행된 경우가 많아 조기 진단 기술이 부족하면 임상시험에서 질병의 진행을 늦추거나 예방하기가 어려움. 현재 잠재적 알츠하이머병 환자 수(Prodromal AD patient number)는 최소 인지장애 환자(Mild Cognitive impairment)에서 알츠하이머병(progress to AD)으로 진전되고 있음(그림 1-8)



[그림 1-8. 알츠하이머병(progress to AD)으로 진전]

○ 알츠하이머 치료제는 병리학적 이해, 치료 가능성, 삶의 질 향상, 그리고 사회적 영향을 포함하는 여러 측면에서 의미가 있으며, 인간의 뇌와 신경계에 대한 이해를 바탕으로 한 과학적 성취의 집약체로 질병 기전의 탐구, 신약 개발, 삶의 질 개선, 그리고 사회적 비용 감소라는 여러 측면에서 중요한 의의를 지니며, 지속적인 연구와 개발이 필요한 분야임

○ 항산화제는 활성산소와 자유 라디칼을 중화하거나 제거하여 산화 스트레스를 감소시킬 수 있어 치매 진행을 억제하거나 예방하는 데 도움이 될 가능성이 제기됨. 특히 일부 연구에서 알츠하이머병 진행을 지연시킬 수 있는 비타민 E, 수용성 항산화제로, 신경세포를 산화 손상으로부터 보호하는 비타민 C, 뇌 염증과 산화 스트레스를 억제하는 데 효과적인 커큐민 및 미토콘드리아 기능을 보호하고 에너지 생성을 촉진하는 항산화제로 알츠하이머 환자의 뇌에서 감소된 미토콘드리아 효율을 개선할 가능성이 있는 코엔자임 Q10 등이 있음

○ 알츠하이머와 시냅스의 관련된 인지기능 저하와 기억력 손상은 뇌 신경세포(synapse)의 구조적 및 기능적 변화와 밀접하게 연관되어 있음. 알츠하이머병 초기 단계부터 시냅스 손실이 주요 병리학적 특징이며 질병 진행과 직접적인 상관관계를 보임. 시냅스는 알츠하이머병의 병리학적 변화와 임상 증상 사이의 핵심 연결고리입니다. 시냅스 손실 및 기능 저하를 막고 복구하는 치료 전략은 알츠하이머병 치료에서 중요한 역할을 할 것으로 기대됨

□ 경제.산업적 측면

○ 알츠하이머병 치료제는 단순한 신약 개발을 넘어 경제 및 산업 전반에 걸쳐 막대한 영향을 미치는 분야임. 치료제가 효과적으로 개발되면 제약회사뿐만 아니라 의료 시스템, 환자 가족, 정부 경제까지 큰 영향을 받음. 특히 알츠하이머 치료제의 경제적 부담은 지속해서 증가하고 있으며, 신약 개발과 보험 정책이 환자의 치료 접근성에 큰 영향을 미친다. 고가의 치료제 도입과 함께 효율적인 비용 관리 전략이 필요하며, 조기 진단 및 예방 전략을 강화하는 것이 경제적 부담을 줄이는 핵심 요소임

○ 글로벌 시장규모 및 성장 전망으로 알츠하이머 치료제 시장 규모는 지속적으로 증가하고 있으며, 2030년까지 수백억 달러에 이를 것으로 전망됨. 2023년 기준, 알츠하이머 치료제 시장은 약 50~60억 달러 규모였으며, 신약 출시 및 치료법 개선에 따라 연평균 10% 이상 성장할 것으로 예상됨. 미국, 유럽, 일본을 포함한 고령화 사회가 확대되면서 치료제에 대한 수요가 급증할 전망임

○ 제약 및 바이오산업의 경제적 이익으로 신약이 개발되면 블록버스터(연 매출 10억 달러 이상) 치료제가 될 가능성이 크며, 현재 레카네맙(에자이 & 바이오젠), 도나네맙(릴리) 등의 최근 신약도 시장에서 큰 기대를 받고 있음. 또한 기업의 수익성 증대를 위한 측면에서 알츠하이머 치료제는 만성질환 치료제이므로 장기간 복용이 필요해 지속적인 매출이 기대되며, 바이오·제약기업들은 특허 보호를 통해 10~20년간 시장을 독점할 수 있고 기술 라이선스를 통한 추가 수익 창출이 가능함

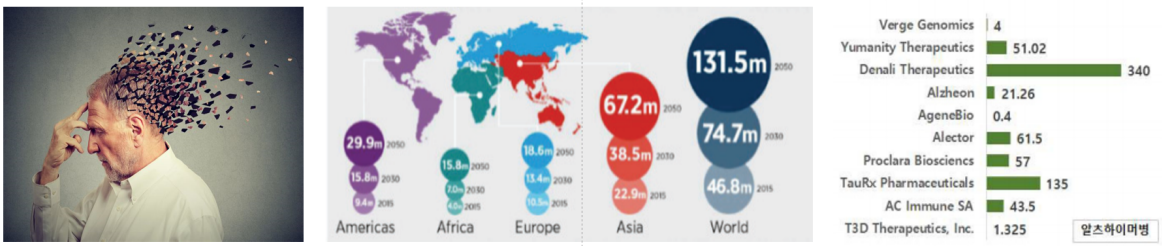
○ M&A 및 벤처 투자 활성화를 위하여 유망한 신약 후보 물질을 보유한 바이오 기업들은 대

형 제약사의 투자 및 인수합병(M&A) 대상이 되며, 신약 개발 성공 가능성이 높아지면 벤처캐피털(VC) 및 기관투자자들의 투자가 활발해짐

○ 사회경제적 비용 절감 효과 측면에서 ① 의료비 절감 (현재 알츠하이머병으로 인한 전 세계 의료비 지출은 1조 달러 이상으로 추정됨. 효과적인 치료제가 개발되면 입원 및 돌봄 비용이 감소하여 의료 시스템 부담이 경감될 것이며 정부의 건강보험 재정 부담 감소 기대됨), ② 생산성 증대(알츠하이머병 환자는 65세 이상 노인층에서 주로 발생하지만, 초기 환자(조기 알츠하이머)는 경제활동 연령대(50~60대)에서도 증가하는 추세로 효과적인 치료가 가능해지면 노동력 유지 및 경제 생산성 증가에 기여할 수 있음), ③ 가족 및 보호자의 경제적 부담 완화(알츠하이머 환자의 가족들은 간병으로 인해 경제활동을 포기하는 경우가 많음. 치료제가 발전하면 간병 부담이 줄어들고, 보호자가 다시 경제활동에 참여할 수 있어 사회 전체적인 생산성 향상 가능) 등이 있음

○ 국가 및 정부 차원의 경제적 효과에서 ① 헬스케어 산업 성장 및 고용 창출(알츠하이머 치료제 개발은 R&D, 임상시험, 제조, 유통 등 다양한 분야에서 새로운 일자리를 창출하고 신약 개발이 성공하면 국가의 바이오·제약 산업 경쟁력 강화로 이어짐), ② 글로벌 시장에서의 선점 효과(알츠하이머 신약을 개발한 기업과 국가는 글로벌 시장에서 지배적 지위를 차지할 가능성이 높으며 특히 한국, 미국, 유럽, 일본 등에서 바이오산업 육성 정책을 강화하고 있음) 등이 있음

○ 우리나라의 치매·알츠하이머병 환자도 급격하게 증가할 전망. 2014년 61만 명으로 이미 60만 명을 돌파했음. 2020년 84만 명, 2050년 217만 명으로 급등할 것임). 한국 내 치매 관련 경제/사회적 비용은 2013년 11조7000억 원(GDP의 1.0%)에서 2050년 43조2000억 원(1.5%)으로 증가할 것임(그림 1-9)



〈퇴행성 신경 질환〉 〈'2015~2050' 예상되는 치매 환자 수〉 〈'글로벌 벤처 투자현황(2015-2016)〉

[그림 1-9. 치매 환자의 급격한 증가]

○ 환자 수만 전 세계 약 4,000만 명으로 추정되는 치매의 시장 규모는 최소 5,000억 달러(한화 약 550조 원)가 넘는 것으로 알려져 있음. 세계 인구 고령화로 환자가 점점 늘어 시장 규모는 5년 내 1조 달러를 넘어설 전망임. 이에 따라 치매치료제 시장을 선도하기 위한 각국의 경쟁도 치열함

○ 현재 뇌졸중, AD, PD 등 퇴행성 뇌질환의 시장 규모는 미국이 약 200조 원(국내 약 10조 원)이나, 2000년 이후 20% 이상 고성장할 것으로 전망되며 이러한 현상은 AD에서 특히 두드러질 것임

○ 우리나라 건강보험심사평가원 진료통계에 따르면 치매 환자는 관련 진료비도 같은 기간(2009-2013) 5,567억 원에서 2.29배인 1조 2,740억 원으로 많이 늘어나고 있음

○ 미국 FDA에서 허가받아 현재 시판 중인 알츠하이머병 치료제는 에자이의 '아리셉트', 노바티스의 '엑셀론', 머크의 '나멘다', 존슨앤드존슨의 '라자딘'등 4개에 불과하고 진행 속도를 다소 늦출 뿐, 진정한 치매치료제로서는 역부족임. 글로벌 치매 치료제 시장 규모는 지난 2015년 기준 3조5000억 원에서 오는 2024년 13조 5000억 원으로 성장할 전망

○ 치매 예방 및 치료를 위한 약물 개발은 잠재적 치매치료제 시장에서 막대한 파급력을 지니며 세계 시장으로 진입이 가능하여 극지 고유생물 유래 대사체를 활용하여 항치매 치료 및 뇌 보호용 약물을 도출하여 근원적 치료법 개발 성공 시 약물개발 시장의 선점 가능함

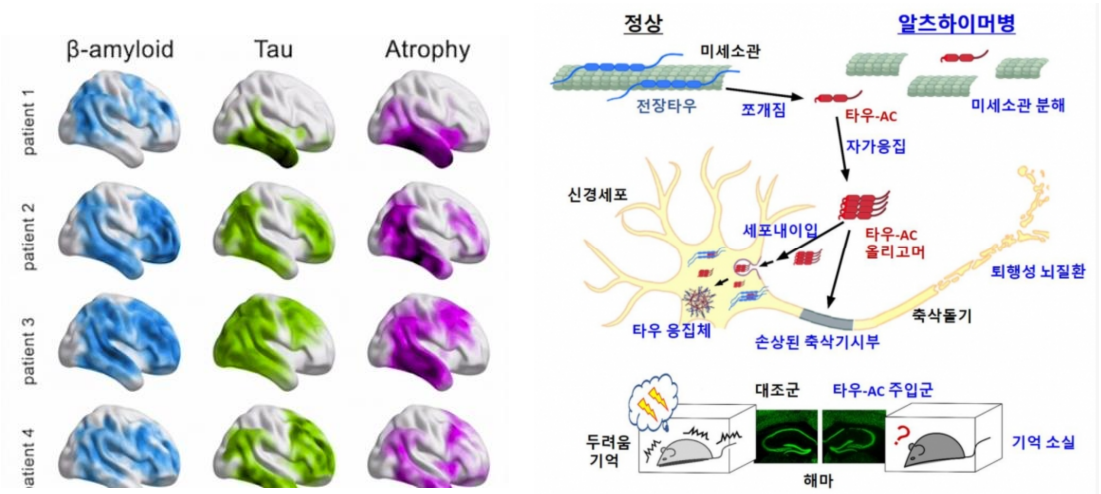
○ 극지 생물자원 유래 대사체 분석, 바이오신소재, 합성물 확보 및 활성물질의 응용성 규명을 통하여 생물공학적 이용기술 확보 및 보존가치를 규명함

KOPRI 극지연구소

□ 과학적 측면

○ 알츠하이머 질환(AD)은 치매의 가장 일반적인 형태로서, 환자 뇌조직의 퇴행으로 인해 인지능력 및 기억력 손상이 점진적으로 진행되어 발병 후 10년 정도 진행되면 완전한 뇌기능의 상실로 사망에 이르게 됨. 현재 상용되는 치매치료제는 단순히 증상을 경감시킬 뿐 근본적인 치료제가 아님. 치매는 매우 복합적이고 원인이 다양한 난치성 질환으로서 기존의 연구방법과는 다른 독창적 개념의 접근방법이 요구됨

○ 알츠하이머 증상은 뇌 신경세포의 퇴행성 손상으로 인해 기억력, 인지기능, 일상생활 능력 등이 점차적으로 악화되는 질환으로 주요 병리적 특징은 신경세포 사이에 축적되는 단백질인 아밀로이드 플라크(β-amyloid plaques) 및 타우 단백질(Tau protein)의 비정상적 인산화로 인한 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles)을 형성 등임(그림 1-10)



[그림 1-10. 알츠하이머병 환자의 베타-아밀로이드와 타우 단백질에 의한 뇌 위축 MRI 비교 및 타우 단백질의 뇌 세포 내 침투]

○ 치매 모델과 치매 환자의 뇌 조직에서 증가하는 산화스트레스(oxidative stress) 및 베타아밀로이드(Aβ) 플라그는 신경세포의 사멸을 유도함. Aβ 플라그는 노화과정 중에 증가하며, 알츠하이머 질환(AD) 환자들에서 더욱 급격하게 증가 됨. AD 환자의 2% 이내의 경우는 특정 유전자의 돌연변이에 의해서 유발되고, 나머지 대부분은 아직 그 원인이 불확실하지만, 산화스트레스가 가장 중요한 원인으로 추정함

○ 뇌세포 표면 단백질인 Aβ 플라그와 타우 단백질 엉킴이 치매를 유발하며, 이 중 Aβ플라그는 '주범'이고 tau 단백질 엉킴은 '공범'으로 믿어져 왔음. 얼마 전부터 tau 단백질과 결합하는 새로운 조영제(T807)가 개발돼 tau 단백질도 PET로 관찰할 수 있게 되면서 tau 단백질에 관한 연구가 활발해짐. 미국 워싱턴대 신경과 전문의 보안세스 박사는 치매 초기에는 Aβ 플라그가 증가하지만, 막상 치매 증상을 촉발하는 것은 tau 단백질 엉킴의 확산이라는 새로운 연구결과를 2016년 Science Translational Medicine에서 보고함

○ 치매 치료용 약물개발을 위해서 알츠하이머성 치매 원인인 Aβ 및 tau의 동시 제거, 미세아교세포 활성, 미토콘드리아 운동성 회복, 항산화, 항염증, 항섬유화 등 다양한 작용점을 가지는 복합적 기능을 가지는 약물의 실용화가 필요함

○ 알츠하이머 치료제는 증상 완화제와 질병 진행 억제제로 나뉘며, 증상 완화제로 신경전달물질(예: 아세틸콜린) 균형을 조절하여 기억력 및 인지능력을 일시적으로 향상 시키는 도네페질(Donepezil), 리바스티그민(Rivastigmine) 등 이며, 질병 진행 억제제인 병리적 원인을 억제하거나 제거하는 약물로 아밀로이드 플라크 제거제(아두카누맙, Aducanumab) 등이 있음

○ '생물다양성협약(CBD)', '세계생물다양성정보기구(GBIF)', 'OECD 세계 생물자원센터 네트워크(GBRCN)' 등을 통한 자원의 국가 전략화 강화 추세 속에서 극지 고유생물의 유용 유전자

원확보 및 적응기작 규명을 위한 생리 연구는 극지연구소가 중점적으로 투자할 수 있는 분야이며, 오믹스(유전체, 단백질체 등) 기술을 활용한 신 생물자원 발굴 및 확보에 활용 가능한 극지 인프라를 활용하여 "극지 유래 바이오소재 실용화" 연구시스템을 확보함

○ 극한 환경에 적응한 극지생물 유래 대사체는 신규 의약, 산업소재 개발에 필수적으로 21세기 국가 성장동력인 생물공학산업의 새로운 패러다임으로 그 역할이 가능하므로 극지로부터 새로운 바이오소재 및 정보탐색을 위하여 지속해서 극지 고유생물을 탐색하고 관리시스템을 구축하여 바이오 신소재를 실용화 연구 활성화함

□ 사회.문화적 측면

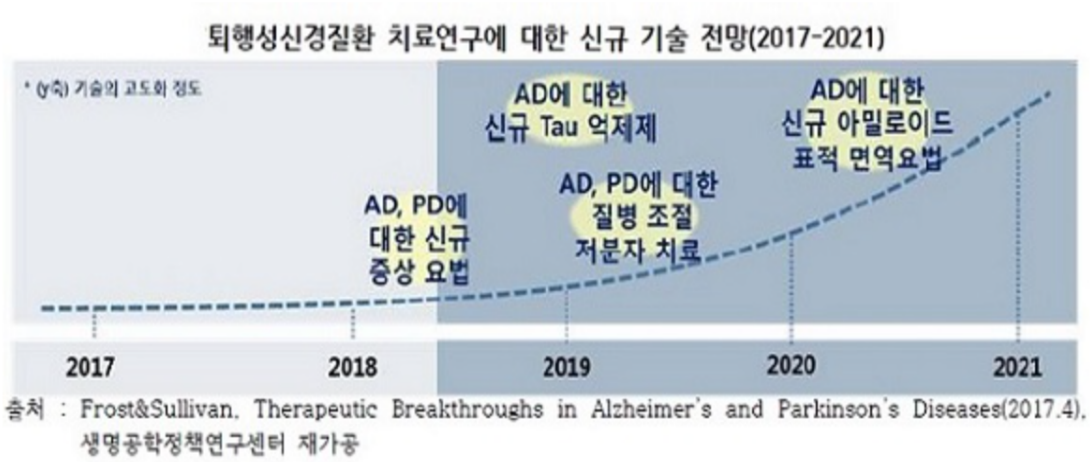
○ 치매는 환자 개인과 가족, 그리고 사회 전반에 걸쳐 심각한 영향을 미치며 다양한 사회적 문제를 야기함. 기억력, 판단력, 언어 능력, 일상생활 수행 능력 등이 점차적으로 저하되며, 환자의 자율성과 독립성을 매우 감소시키며, 초기 단계에 불안, 우울, 혼란을 경험하며, 점진적으로 자아 인식과 정체성을 상실함

○ '국제알츠하이머병협회(ADI)'에 따르면 제3세계의 경제적 성장으로 인한 인구 증가와 서방국가들의 고령화 현상이 뚜렷해지면서 2015년 4,678만 명이던 전 세계 치매 환자 수는 2018년 5,000만 명으로 3년 새 300만 명가량 증가했음. 앞으로 고령화가 가속화되면서 2050년에 이르러 전 세계 치매 환자는 1억 5,200만 명을 넘길 것으로 예측되며, 우리나라도 고령화로 인해 치매 환자가 늘어나는 추세임. 중앙치매센터에서 매년 발간하는 '대한민국 치매 현황 2022'에 따르면 65세 이상 추정 치매 환자 수는 93만 5,000명이고 추정 치매 유병률은 10.38%로 매년 상승하고 있으며 인구 10명 중 1명이 치매 환자임.

○ 전 세계적으로 치매 환자의 수가 급격히 증가하여 선진국을 중심으로 치매 치료가 중요한 사회적 이슈로 떠오르고 있음. 그러나 아직 확실한 치료법은 개발되지 않은 상태임

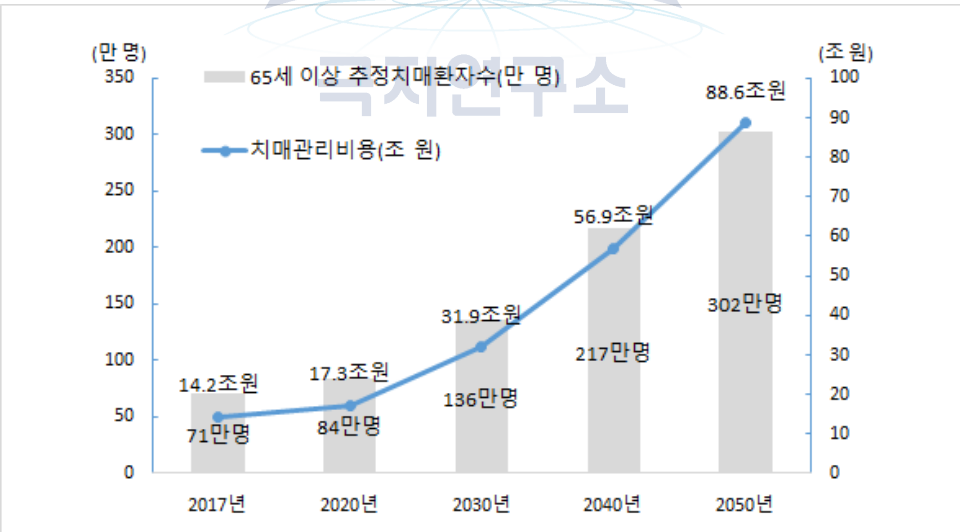
○ 국민은 치매를 가장 우선으로 극복해야 할 질병으로 인식하고 있으며, 인구 고령화에 따른 치매 환자 및 사회적 비용 급증으로 국가 재정 부담이 심화함에 따라 적극적인 치매 치료에 대응함 (국민은 치매를 의료비 지출(34.3%), 환자·가족의 고통(54.8%), 발병원인과 치료대안(26.4%) 측면에서 최우선 해결 대상 질병으로 인식)

○ 알츠하이머 질환(AD)은 급속한 노령인구의 증가와 수명 연장 및 환경문제로 인해 현재 그 발병률이 가파른 상승세를 보이며, 앞으로도 매우 급격하게 증가할 것으로 예상함(그림 1-11)



[그림 1-11. 퇴행성신경질환 치료연구에 대한 신규 기술전망]

○ 건강보험심사평가원이 최근 5년간(2009~2013년) 우리나라 건강보험 및 의료급여 심사 결정자료를 토대로 치매에 대해 분석한 결과, 진료 인원은 지난 2009년 약 21만7,000명에서 2013년 약 40만5,000명으로 5년간 약 18만 9,000명(87.2%)이 증가하였으며, 연평균 증가율이 17%에 달했으며, 이미 2010년 치매 질환과 관련된 세계적으로 소요 비용은 전 세계 GDP의 1%를 넘어서는 미화 6,040억 달러에 달함(그림 1-12)



[그림 1-12. 건강보험심사평가원 2021년 추정치 치매 환자 수 및 치매 관리비용 장래 추계]

○ 미국 국립보건원(NIH)에서는 2015~2016년 동안 알츠하이머병 치료연구에 3.6억 달러 이상, 파킨슨병 연구에 2.5억 달러 이상의 연구비를 지원하고 있음

○ 극한 환경에 적응한 고유생물의 대사체를 활용하여 국내기업 및 외국 제약사와의 공동개발 또는 기술이전을 통한 실용화 추진으로 관련 산업 개발에 기여하고, 신약 개발을 위한 기

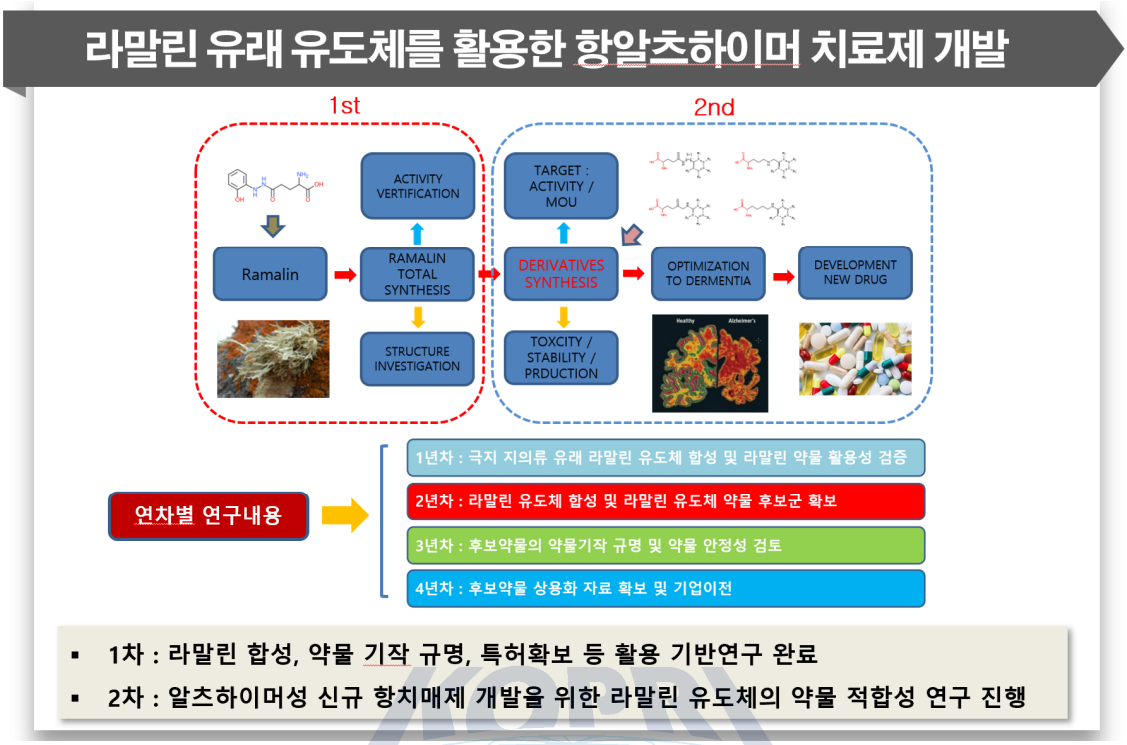
반사업으로 "극지 생명과학'분야의 기초연구, 의료 R&D 분야 및 실용화 연구 단계를 연계시켜 주는 매개적인 역할 수행함

○ 치매는 가족과 간병인은 지속적인 간호와 환자의 점진적 악화로 인해 극심한 스트레스를 받으며, 간병 비용, 의료비, 간호 시설 이용 비용 등이 높아 경제적 어려움이 가중되어 혼자의 경제적 부담을 이야기시키며, 간병으로 인해 가족 구성원이 사회적 활동이나 직업 활동에서 멀어지는 경우가 많아 사회적 고립을 일으킴

KOPRI
극지연구소

1-3. 연구개발 범위

□ 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴



[그림 1-13. 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴]

KOPRI 극지연구소

○ 연차별 세부 연구내용[4)]

세부 1 : 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴
세부 2 : 후보물질의 약물기작(Mode of action) 규명
세부 3 : 항치매 치료제 상용화 자료 확보 및 상용화

[1차년도]

세부 연구개발 목표	세부 연구개발 내용 및 범위	수행기관
ㅇ 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴	ㅇ 라말린 유도체 합성 및 구조 규명 ㅇ 항치매 후보약물 스크리닝 ㅇ 라말린 유도체의 뇌신경 보호 작용 분석	극지연구소 ㈜케이에스랩 원광대학교
ㅇ 후보약물의 약물기작 (MOA) 규명	ㅇ 라말린 유도체 작용기전 규명 ㅇ 라말린 신규 타겟 규명 ㅇ AD 동물 모델기반 유효성 평가 ㅇ AD 인간 모델에서 라말린 유효성 평가 ㅇ 타겟 단백질 및 라말린 유도체와의 결합원리 측정 ㅇ 라말린 유도체에 의한 시냅스 활성 조절	성균관대학교 경희대학교 경북대학교 전남대학교

	관찰 및 미토콘드리아 이동 조절 확인 o 활성 라말린 및 라말린 유도체의 생체 내 표적 예측 o 라말린 유도체-표적 단백질 복합체의 x-선 분자 구조 규명	
o 항치매 치료제 상용화 자료 확보	o GLP 독성시험: 설치류에서 라말린 반복투여 독성자료 확보 o 라말린 in vivo ADME 시험자료 확보 및 대사체 연구(BBB 통과 결과 확보) o 라말린 유도체의 초기 안전성 자료 확보 o 라말린 유도체의 Drug-like properties 자료 확보 o 라말린 유도체의 in vitro ADME-PK 자료 확보 o 기초 제형 연구	안국약품㈜

[2차년도]

세부 연구개발 목표	세부 연구개발 내용 및 범위	수행기관
o 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴	▪ 라말린 유도체 합성 및 구조 규명 ▪ 항치매 후보 물질 스크리닝 ▪ 라말린 유도체 및 극지 대사체(추가)의 뇌신경 보호작용 분석	극지연구소 대구경북첨단의료산업진흥재단 원광대학교
o 후보물질의 약물기작(MOA) 규명	▪ 라말린 유도체 작용기전 규명 ▪ 라말린 신규 타겟 규명 ▪ AD 동물 모델기반 유효성 평가 ▪ AD 인간 모델에서 라말린 유효성 평가 ▪ 타겟 단백질 및 라말린 유도체와의 결합 원리 측정 ▪ 라말린 유도체에 의한 시냅스 활성 조절 관찰 및 미토콘드리아 이동 조절 확인 ▪ 라말린 및 라말린 유도체의 생체 내 표적 예측 ▪ 라말린 유도체-표적 단백질 복합체의 x-선 분자 구조 규명	성균관대학교 경희대학교 경북대학교 전남대학교
o 항치매 치료제 상용화 자료 확보	▪ 설치류에서 라말린 반복투여 독성자료 확보 ▪ 라말린에 대한 in vivo ADME 및 대사체 연구 ▪ 라말린 유도체의 초기 안정성 자료 ▪ 라말린 유도체의 Drug-like properties data 확보 ▪ 라말린 유도체의 in vitro ADME-PK	안국약품㈜

[3차년도]

세부 연구개발 목표	세부 연구개발 내용 및 범위	수행기관
ㅇ 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴	ㅇ 후보물질의 대량생산 공정 확보 ㅇ 극지 대사체 유래 뇌보호용 약물 라이브러리 확보 및 효력 규명	극지연구소 차의과대학교 원광대학교
ㅇ 후보물질의 약물기작 (MOA) 규명	ㅇ 후보물질 작용기전 규명 ㅇ 후보물질 타겟 규명 ㅇ AD 동물 모델기반 유효성 평가 및 타겟 규명 ㅇ AD 인간 모델에서 라말린 유도체 유효성 평가 ㅇ 신규 타겟 단백질 및 후보물질과의 결합원리 측정 ㅇ 신경세포 시냅스에 후보약물에 의한 타겟 후보 인자 발굴 및 작용기전 규명 ㅇ 신규 활성 저분자 발굴 및 최적화 ㅇ 후보물질의 표적 결합/저해 기전 검증, 신규 표적 구조 연구	성균관대학교 경희대학교 경북대학교 전남대학교
ㅇ 항치매 치료제 상용화 자료 확보	ㅇ 라말린 유도체 및 후보물질의 초기 안전성 자료 확보 ㅇ 후보물질의 약물동태 자료 확보(라말린 유도체의 in vitro ADME 및 설치류에서 뇌 약물 분포) ㅇ 라말린 유도체 및 후보물질의 Drug-like properties 자료 확보	안국약품㈜

KOPRI 극지연구소

[4차년도]

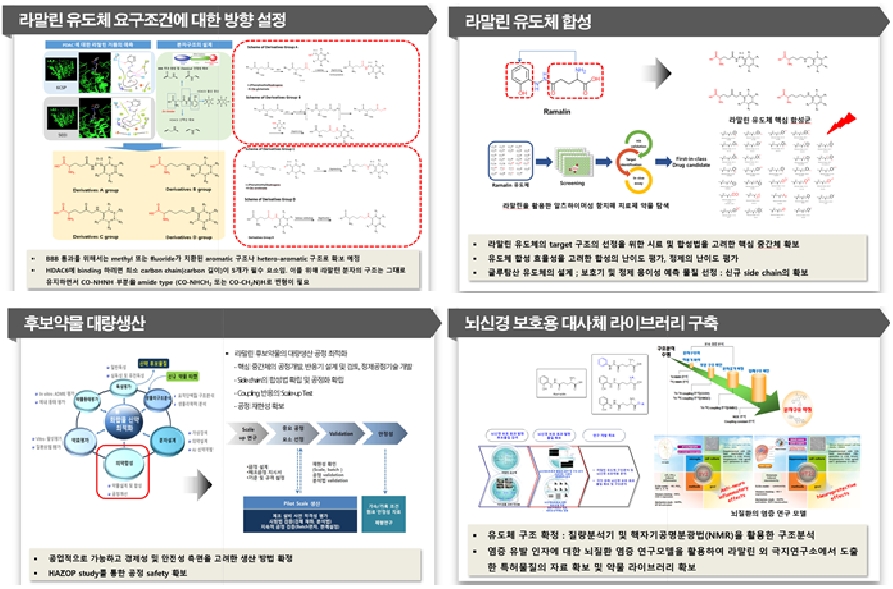
세부 연구개발 목표	세부 연구개발 내용 및 범위	수행기관
ㅇ 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴	-	-
ㅇ 후보물질의 약물기작 (MOA) 규명	ㅇ AD 인간 모델에서 라말린 유도체 유효성 평가	성균관대학교
ㅇ 항치매 치료제 상용화 자료 확보	-	-

1) 세부 연구개발 내용 및 범위

가. 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴(그림 1-14)

- 라말린 유도체 합성 및 구조분석 (30종 이상)
- 항치매 후보 물질 스크리닝
- 라말린 유도체 및 극지 대사체의 뇌신경 보호작용 분석(추가 사항)
- 극지 대사체 유래 뇌보호용 약물 라이브러리 확보 및 효력 규명
- 후보물질의 대량생산 공정 확보(3종)

- 라말린 유도체의 뇌신경 보호작용 분석



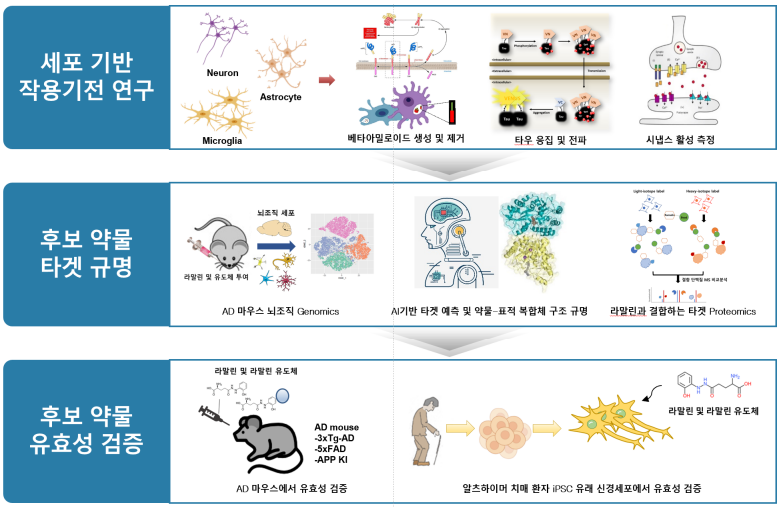
[그림 1-14. 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴]

나. 후보물질의 약물기작(Mode of action) 규명(그림 1-15, 1-16)

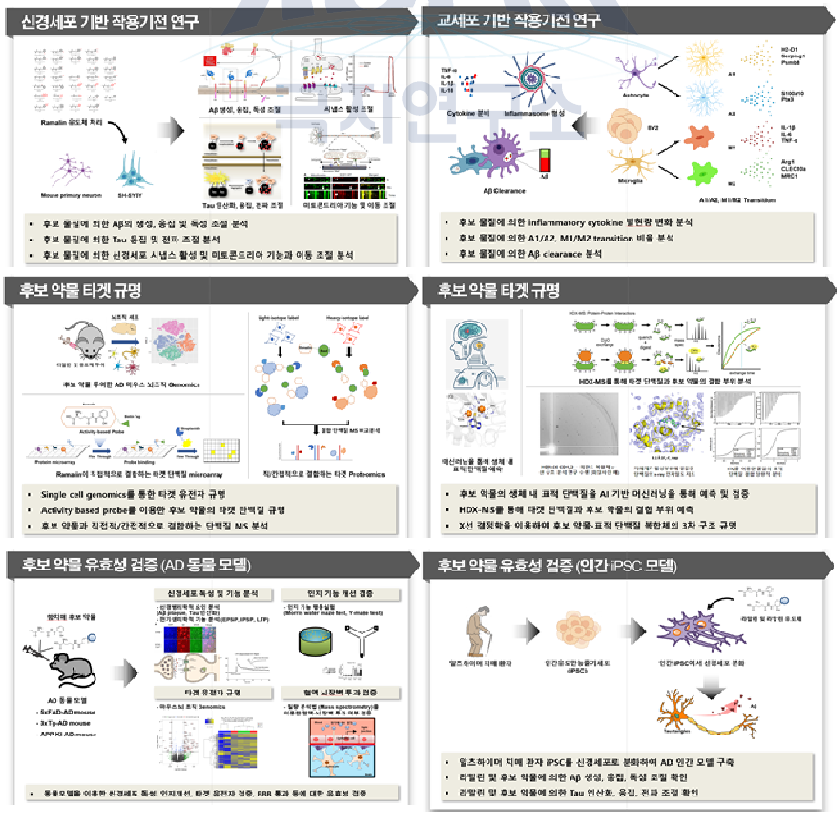
- 라말린 작용기전 규명
- 라말린 타겟 규명
- AD 동물 모델기반 유효성 평가
- AD 인간 모델 구축
- 타겟 단백질 및 라말린과의 결합원리 측정
- 신경세포 시냅스 활성 조절 및 미토콘드리아 이동 조절 규명
- 라말린 및 라말린 유도체의 생체 내 표적예측
- x-선 구조분석을 위한 표적 단백질 결정화 컨스트럭트 제작
- 라말린 유도체 작용기전 규명
- 라말린 신규 타겟 규명
- AD 동물 모델기반 유효성 평가
- AD 인간 모델에서 라말린 유효성 평가
- 타겟 단백질 및 라말린 유도체와의 결합원리 측정
- 라말린 유도체에 의한 시냅스 활성 조절 관찰 및 미토콘드리아 이동 조절 확인
- 라말린 및 라말린 유도체의 생체 내 표적 예측
- 라말린 유도체-표적 단백질 복합체의 x-선 분자 구조 규명
- 후보물질 작용기전 규명
- 후보물질 타겟 규명
- AD 동물 모델기반 라말린 유도체 유효성 평가 및 타겟 규명
- AD 인간 모델에서 라말린 유도체 유효성 평가
- 신규 타겟 단백질 및 후보물질과의 결합원리 측정

KOPRI 극지연구소

- 신경세포 시냅스에 후보물질에 의한 타겟 후보 인자 발굴 및 작용기전 규명
- 신규 활성 저분자 발굴 및 최적화
- 후보물질의 표적 결합/저해 기전 검증, 신규 표적 구조 연구
- 최종 후보물질의 AD 동물 모델기반 유효성 평가



[그림 1-15. 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴 연구]



[그림 1-16. 후보물질의 약물기작(Mode of action) 규명]

다. 항치매 치료제 상용화 자료 확보 및 상용화(그림 1-17)

- 라말린 및 라말린 유도체의 초기 안전성 자료 확보
- 라말린 및 라말린 유도체의 Drug-like properties 자료 확보
- 라말린 및 라말린 유도체의 in vitro-ADME/PK 자료 확보
- 라말린의 설치류 및 비설치류 PK 자료 확보
- 라말린의 설치류 GLP 독성시험: 단회 및 DRF 자료 확보
- 라말린의 in vivo ADME 자료 확보(50 %)
- 설치류에서 라말린 반복투여 독성자료 확보
- 라말린에 대한 in vivo ADME 및 대사체 연구
- 라말린 유도체의 초기 안정성 자료
- 라말린 유도체의 Drug-like properties data 확보
- 라말린 유도체의 in vitro ADME-PK
- 라말린 유도체 및 후보물질의 초기 안전성 자료 확보
- 후보물질의 약물동태 자료 확보(라말린 유도체의 in vitro ADME 및 설치류에서 뇌 약물 분포)
- 라말린 유도체 및 후보물질의 Drug-like properties 자료 확보

[그림 1-17. 후보물질의 약물기작(Mode of action) 규명]

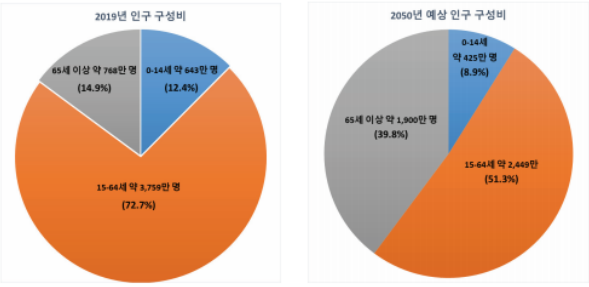
※ [참고] 4차년도 과제 연구비 조정으로 연구내용 조정에 따른 연구목표 조정 반영[1)]

4) 20240322. '극지 유전자원 활용 기술 개발 사업 심의위원회 개최 결과"에 따라 4차년도 과제 연구비 조정으로 연구내용 조정에 따른 연구목표 조정안을 반영함

1-4. 국내외 기술 개발 현황

□ 퇴행성 뇌질환 개요

○ 노령화 및 퇴행성 질환의 증가 : 노인 인구 증가 : OECD에 따르면, 우리나라는 2000년에 노인인구 비율이 7 % 이상인 고령화 사회에 도달했고, 2019년에는 노인 인구 비율이 14 % 이상인 고령사회에 도달하게 됨. 빠른 속도로 진행되는 고령화에 따라 치매 노인 수도 지속적으로 증가하여, 전체 인구 중 치매 노인의 비중이 2013년 1.1 %에서 2050년 5.6 %로 증가할 전망임(그림 1-18)



[그림 1-18. 한국의 인구 구성비]

○ 퇴행성 질환 : 노화가 진행됨에 따라 뇌 및 척수에서 발생하는 퇴행성 질환으로 특정 세포의 기능상실, 뇌세포 수의 감소, 신경세포 사멸, 시냅스의 기능 이상 및 뇌신경의 전기신호 이상 발생 등으로 요약됨(그림 1-19)

주요 증상	주요 질환
진행성 인지기능 장애	알츠하이머병, 전두측두치매, 루이치매, 피질기저퇴행증 등
진행성 운동실조	파킨슨병, 다계통위축병, 헌팅턴병, 진핵성핵상마비
근력저하 및 근위축	루게릭병, 원발성측삭경화증, 척수근육위축병

[그림 1-19. 퇴행성 신경질환의 종류]

□ 치매 종류 및 관련 질병

○ 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease)

1) 치매의 가장 흔한 형태이며 75%의 치매 환자가 기억과 인지기능의 진행성 상실로 특징 지어지는 퇴행성 신경질환임

2) 질병 원인은 신경전달물질인 아세틸콜린의 합성이 감소하여 발병의 원인이 된다는 콜리네르크 가설, 뇌에 아밀로이드가 과도하게 축적되어 발병의 원인이 된다는 가설 및 초인산화 타우가 다른 타우와 짝을 이루어 엉김이 형성되고 신경세포가 몸 안에서 신경 정맥이 형성되고 미세관(micro tube)이 분해되어 세포의 세포골격 구조가 파괴되고 뉴런의 운반체계가 붕괴되어 질병의 원인이 된다는 가설이 있음

○ 혈관성 치매(Vascular dementia)

치매의 10% 정도는 뇌졸중, 뇌경색, 뇌출혈 등으로 뇌에 공급되는 혈류량이 감소하면서 나타나는 혈관성 치매로 혈관성 치매는 증상이 급격히 나빠지고 안면마비, 시력 손실, 보행장애 등의 신경학적 증상이 초창기부터 나타나는 경우가 많음

○ 루이소체 치매 (Dementia with Lewy body)

1) 루이소체는 알파시누클레인이라고 불리는 단백질 무리가 뇌의 피질 영역에 쌓이면서 기억력 손상으로 파킨슨병 환자들의 뇌 부검에서 흔히 볼 수 있는 단백질 응집체의 구성물질인 α-Syn 단백질이 루이소체(Lewy body)를 형성하며 파킨슨병 환자의 α-Syn 포함체(inclusion body)의 병리는 뇌간(brain stem) 쪽에서 먼저 생성되고 피질 쪽으로 전파(spreading)된다는 가설을 제시함

2) 뇌의 흑질(Substantia Nigra)에서 도파민 분비를 담당하는 신경세포가 기능을 잃거나 사멸하게 되면 도파민 분비의 부족으로 운동이상 증상이 나타나며, 파킨슨병에 걸려 움직임이 느려지고 불수의적인 떨림이 나타나면 결국 치매로 이어질 수 있음.

3) 파킨슨 환자의 50~80%가 파킨슨 치매를 겪음. 만약 인지 변화가 나타나기 전 파킨슨병이 몇 년간 지속됐다면 파킨슨 치매로 진단될 확률이 높고, 파킨슨으로 인한 신체징후가 나타난 지 1년 이내에 인지감퇴가 나타나면 루이소체 치매로 진단될 가능성이 높음

○ 전두측두엽 치매(Pick disease)

전두엽이나 측두엽의 신경세포가 퇴보했을 때 나타나는데, 전두측두엽 치매는 전체 치매 환자의 10% 정도에 해당하며 성격이 변하는 유형, 행동이 달라지는 유형, 의사소통 능력이 떨어지는 유형으로 나뉨

○ 기타 진행성(퇴행성, 비가역성) 치매

진행성(퇴행성, 비가역성) 치매에는 알코올과 연관된 치매, 인간 면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency Virus)에 의한 치매, 헌팅톤병, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob Disease)과 같은 프리온 질환 등이 있음

○ 관련 질병

1) 파킨슨병(Parkinson's disease)은 노년기에 기저핵 신경세포의 변성으로 인하여 일어나는 떨림, 느린 움직임, 근육 약화 및 언어장애 증세이며, 신경전달물질인 도파민이 결핍되어 손이 떨리고 웅크린 자세, 발을 질질 끄는 걸음, 근육 경직과 같은 운동 장애가 나타나며, 병이 지속하면 치매로 이어지는 경우가 많이 발생함

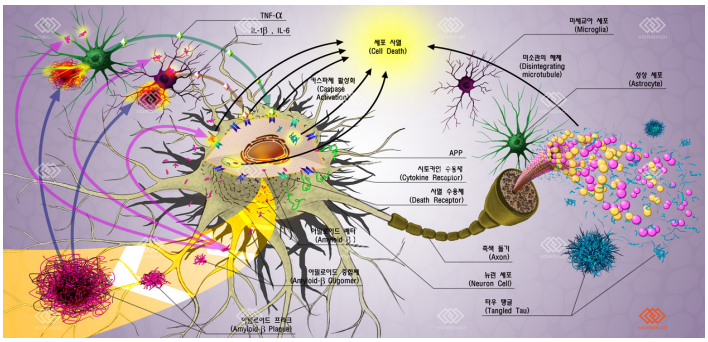
2) 헌팅턴병(Huntington's disease)은 유전적 질병으로 팔, 다리, 얼굴 근육의 움직임이 부자연스러움이 점진적으로 일어나면서 성격의 변화를 동반하며 사고력의 감퇴를 초래하는 질병으로 예기치 못한 사고로 인하여 뇌가 충격에 의한 뇌의 신경세포가 파괴되거나 손상을 입어 나타나는 치매와 뇌종양, 알코올 중독, 일산화탄소 중독 등으로 뇌 질환이 치매 증상으로 이어지는 경우가 있음

□ 알츠하이머성 치매

○ 알츠하이머성 치매(Alzheimer's dementia : AD)

1) 알츠하이머 증상은 뇌 신경세포의 퇴행성 손상으로 인해 기억력, 인지기능, 일상생활 능력 등이 점차 악화하는 질환으로 주요 병리적 특징은 신경세포 사이에 축적되는 단백질인 아밀로이드 플라크(β-amyloid plaques 및 타우 단백질의 비정상적 인산화로 인한 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles)을 형성 등임(그림 1-20)

2) 치매 증상의 대표적인 신경퇴행성 질환으로 대개 65세 이후에 발병함. 알츠하이머성 치매는 기억과 인지기능의 진행성 상실로 특징지어지는 퇴행성 신경질환으로 전 세계적으로 고령자에서 치매를 일으키는 가장 흔한 원인임. 현재 전 세계적으로 치매를 앓고 있는 환자의 수는 3,560만 명에 달하며 2030년에는 6,570만 명에 달할 것으로 추정됨



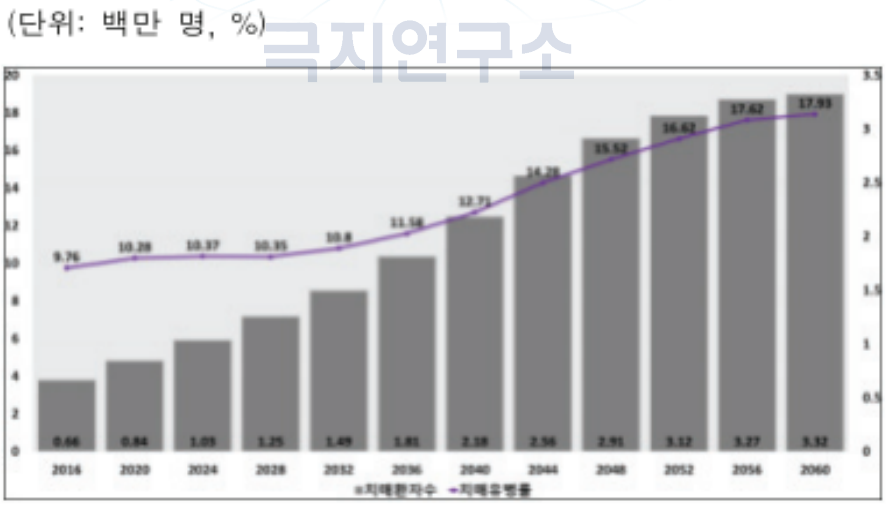
[그림 1-20. 알츠하이머 병증 개요]

3) 국외 치매환자 현황에 따르면 치매 유병률은 급격히 증가하고 있으며, 매년 990만 건의 치매가 새롭게 진단되고 있음. 아프리카 345%, 미국 248%, 아시아 226% 및 유럽 90%가 증가할 것으로 예상됨(그림 1-21)

[그림 1-21. '2015~2050' 예상되는 치매 환자 수]

4) 국내 치매 환자는 16년 66만 명으로 65세 인구의 10%를 차지하였으며, 지속적으로 환자 수 및 유병율이 증가하고 있음. 24년 100만명, 39년 200만명, 50년에 300만 명을 넘어설 것으로 추정됨(그림 1-22)

KOPRI 극지연구소



[그림 1-22. 국내 연도별 치매환자 수 및 유병율 추이]

5) 알츠하이머성 치매 환자는 일상생활의 활동에서 도움을 받기 위해 가족이나 전문 간병인에게 점점 많이 의존하게 되며 결국 요양원이나 다른 장기 간호 시설에 들어가야 함. 질병의 진행 기간으로 10년 이상 걸리는 경우가 많으므로, 사회에 막대한 사회적 및 재정적 부담을 끼치며 가족 구성원에게 심각한 정서적 고통을 주고 있음

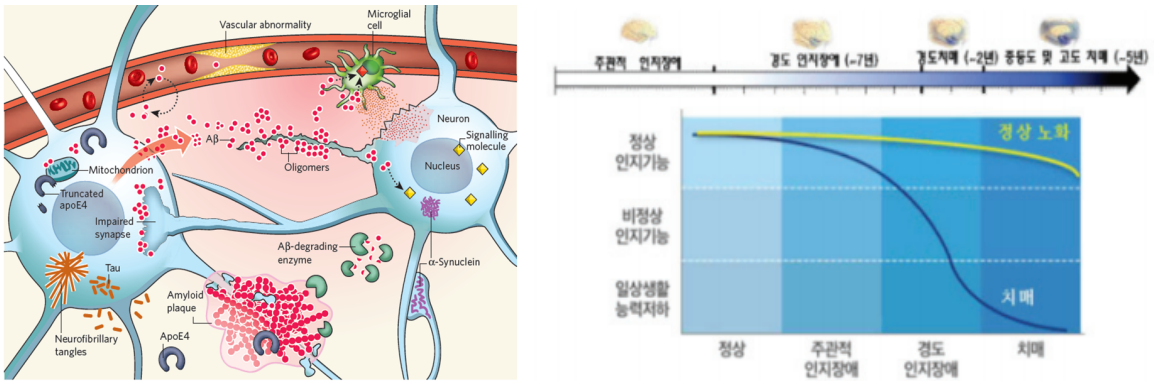
○ 알츠하이머성 치매의 원인

1) 알츠하이머성 치매의 발병 기전과 원인에 대해서는 지금까지 정확히 알려지지 않고 있음. 신경전달물질인 아세틸콜린 합성 감소, 베타아밀로이드(beta-amyloid)의 침착, 타우(Tau)의 과인산화로 인한 신경세포의 손상이 주된 원인으로 알려져 있으며 그 외 apoE 유전자, α-synuclein 단백질 변화, 산화스트레스, 노화에 따른 미엘린(myelin) 파괴 등도 뇌세포 손상에 요인으로 치매 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있음

2) 치매의 전단계[경도인지장애(Mild Cognitive Impairment: MCI)]는 노화로 인한 정상적인 인지기능 저하와는 다른 병적인 인지기능 저하를 말하며, 우리나라 65세 이상 인구의 25% 정도는 경도인지장애를 겪고 있음. 경도인지장애는 원인질환에 따라 그 양상이 매우 다양하며, 경과 또한 다양하여 대개 서서히 치매로 진행하지만, 일부는 진행되지 않고 경도인지장애 단계에 머무르기도 하는데, 경도인지장애 중에서 가장 흔한 형태인 기억장애성 경도인지장애는 알츠하이머병의 전 단계임

3) 베타아밀로이드가 쌓여서 나타나는 plaque와 인산화된 Tau가 만든 neurofibrillary tangle은 알츠하이머를 앓고 있는 환자의 뇌에서 나타나는 특징임. Aβ plaque는 주로 Aβ가 fibril form으로 뭉친 것이 대부분으로 불용성 덩어리인 Aβ peptide는 Amyloid precursor protein(APP)을 BACE(β-secretase)와 γ-secretase가 분해하여 만들어짐. Aβ 중에는 Aβ1-40과 Aβ1-42가 대부분이고, 이 둘이 쌓여서 긴 섬유를 형성한 것이 AD의 병변에서 나타나는 주요 특징임. 이렇게 Aβ가 쌓이는 동시에 cell death가 일어나서 뉴런을 잃게 됨(그림 1-23)

KBRI 뇌치연구소



[그림 1-23. 알츠하이머성 치매의 주요 요인 및 치매의 진행 단계]

○ 알츠하이머 치료제 개발 전략

1) 알츠하이머 치료제는 증상 완화제와 질병 진행 억제제로 나뉘며, 증상 완화제로 신경전달물질(예: 아세틸콜린) 균형을 조절하여 기억력 및 인지능력을 일시적으로 향상시키는 도네페질(Donepezil), 리바스티그민(Rivastigmine)이 있으며, 질병 진행 억제제인 병리적 원인을 억제하거나 제거하는 약물로 아밀로이드 플라크 제거제(아두카누맙, Aducanumab) 등이 있음

2) 알츠하이머병(AD)의 주요 병리는 아밀로이드-β(Aβ) 침착, 타우(tau) 단백질의 인산화 및 응집, 신경염증, 신경세포 사멸로 구성되며, 이를 기반으로 주요 치료 전략이 구성됨

가. 아밀로이드-β 타겟 치료제 : Aβ 생성을 억제하는 접근법으로 β-secretase(BACE) 및 γ-secretase 저해제: Aβ 생성을 억제하는 화합물로 BACE1 저해제가 대표적임 (Verubecestat, Lanabecestat (임상 3상에서 실패), Aβ 제거 및 응집 방지 : 항체 기반 면역치료제: Aβ 플라크를 제거하는 항체기반 치료제임(FDA 승인 치료제로 Aducanumab(Aduhelm), Lecanemab(Leqembi), Donanemab 등)

나. 타우 단백질 표적 치료제 : 타우 단백질 응집 억제제로 타우 단백질의 과인산화를 억제하거나 응집을 차단하는 화합물(Methylene blue 유도체 (Hydromethylthionine), 타우 항체 기반 치료제로 타우 응집체를 제거하는 항체 기반 치료제로 Semorinemab 및 Zagotenemab (임상 진행 중)

다. 신경염증 조절 치료제 : 알츠하이머의 또 다른 주요 기전인 미세아교세포 (microglia) 활성 및 염증 반응 조절, TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2) 활성화 치료제로 TREM2는 미세아교세포의 기능을 조절하는 단백질로, 이를 활성화하면 Aβ 제거 능력 향상(AL002 (Alector), BIIB092 (Biogen), 항염증제로 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs) 또는 사이토카인 억제제를 통한 염증 반응 조절제로 Pioglitazone은 PPAR-γ 작용제로 실패함

라. 시냅스 보호 및 신경세포 회복 촉진 : Neurotrophic factors (신경영양인자) 활용으로 신경세포 성장 및 생존 촉진 [BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), NGF (Nerve Growth Factor)], 콜린성 신경 보호로 콜린에스테라제 억제제(ChEI) 기반 치료제는 현재 유일한 증상 완화 치료법(Donepezil (Aricept), Rivastigmine (Exelon), Galantamine (Razadyne)

마. 유전자 치료 및 CRISPR 활용 : APOE4 유전형 보유자는 알츠하이머 위험이 높은데, 이를 유전자 조작으로 교정, CRISPR-Cas9 시스템을 활용하여 타우 단백질의 과발현을 억제하거나, 신경세포 보호 유전자 삽입 연구 진행 중

바. 줄기세포 치료 : 중간엽 줄기세포(MSC) 및 신경줄기세포(NSC) 이식하여 손상된 신경세포 재생 및 시냅스 연결 강화하는 치료 [Longeveron사의 줄기세포 치료제 (임상 진행 중)]

사. 인공지능(AI) 및 약물 재창출(Drug Repurposing) : AI 기반 분석을 통해 기존 FDA 승인 약물 중 알츠하이머 치료 효과가 있을 가능성이 있는 약물 탐색하는 치료 [Metformin(당뇨병 치료제), Lithium(기분 안정제)]

KOPRI 극지연구소

아. 마이크로바이옴 및 장-뇌 축 연구 : 장내 미생물이 알츠하이머와 관련된 염증 반응 및 신경세포 대사를 조절하는 치료로 장내 미생물 조절을 통한 치료 가능성 탐색 (프로바이오틱스 등)

3) 치료제 개발 시 고려해야 할 전략

가. 조기 진단 및 예방 전략으로 알츠하이머 치료제의 효과가 조기 단계에서 더 효과적이므로, 조기 진단 기술과 병행하여 개발 필요(AI 기반 뇌 MRI 분석, 혈액 바이오마커 개발)

나. 바이오마커 기반 환자 선별을 위하여 PET 영상, CSF 바이오마커(Aβ42, p-tau), 혈액 검사 등을 활용하여 특정 바이오마커가 높은 환자군을 선별하여 임상시험 진행

○ 알츠하이머와 BACE 1과의 관련성

1) 아밀로이드 베타(Aβ) 생성 : BACE1(Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1)은 알츠하이머의 발병과 진행에서 아밀로이드 플라크(amyloid plaques) 형성의 핵심적인 단계인 아밀로이드 전구 단백질(APP)을 절단하여 β-절단(beta-cleavage)을 수행하는 효소이며, 이후 γ-세크레타아제(γ-secretase)에 의해 추가 처리되어 Aβ 단백질을 생성함. β 단백질이 비정상적으로 축적되면 독성이 증가하고, 이는 신경세포 손상과 염증 반응을 유발해 알츠하이머병의 주요 병리 현상을 촉진함

2) BACE1 활성 증가에 따른 병증 발전 : 알츠하이머에서 BACE1 발현 및 활성이 증가로 인하여 APP의 처리량이 늘어나고, 이는 Aβ 단백질의 축적과 플라크 형성을 가속함에 따라 알츠하이머 초기 단계에서 BACE1 활성 증가는 병리적 과정의 시작점이 될 수 있음

3) 축적된 Aβ 단백질에 의한 신경독성과 염증 유발 : ① 시냅스 손상: 신경세포 간의 신호 전달이 방해받아 인지기능 저하, ② 염증 반응: Aβ 단백질은 미세아교세포와 천문세포를 활성화하여 염증 반응을 일으키고, 신경세포를 추가로 손상, ③ 미토콘드리아 기능 장애: 세포 에너지 생산이 감소하여 신경세포 생존에 영향을 미침

4) BACE1 억제제의 치료 가능성 : ① Aβ 생성 억제: BACE1을 억제하면 APP가 β-절단을 받지 않으므로 Aβ 생성이 감소, ② 플라크 형성 감소: Aβ 축적을 줄여 신경세포 손상을 예방, ③ 인지 기능 개선: BACE1 억제가 인지기능 개선의 가능성이 있음

5) BACE1은 APP 외에도 여러 단백질에 관여하므로 신경세포 생존과 연관된 단백질 처리 방해, 말초 조직에서의 부작용 등의 부작용 가능성이 있음. erubecestat과 lanabecestat 등의 BACE1 억제제가 평가되었으며, 초기 연구에서는 BACE1 억제가 Aβ 축적을 줄이는 데 성공했으나, 고령 환자에서 인지 저하 및 부작용으로 인해 일부 임상시험이 중단됨

○ 알츠하이머와 타루(Tau) 단백질과의 관련성

1) 베타 아밀로이드 단백질을 타깃으로 한 다국적 제약사들의 알츠하이머병 신약 개발이 실패하면서 '알츠하이머병 치매의 베타 아밀로이드 주 원인설'에 의문이 제기었고 타우 단백질이 알츠하이머 병리의 주요 특징 중 하나로, 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles, NFT)을 형성하며 질병의 진행과 밀접하게 관련됨을 보고

2) 타우 단백질은 주로 신경세포 내에서 발견되는 단백질로 미세소관(microtubule)의 안정화에 중요한 역할을 함. 미세소관은 신경세포 내에서 물질과 신호를 운반하는 '세포골격'으로 정상적인 타우 단백질은 미세소관과 결합하여 안정성을 유지하지만, 병리적 상태에서는 비정상적으로 변화됨

3) 타우의 병리적 변화는 알츠하이머에서 타우 단백질의 과인산화(hyperphosphorylation)로 과인산화된 타우는 미세소관과의 결합력을 잃고, 세포질에서 축적되어 불용성 섬유를 형성함. 이러한 타우 단백질의 과인산화는 타우 단백질이 응집되면서 신경섬유 엉킴(NFT)이 형성되며, 이는 신경세포 기능장애와 사멸을 유도함

4) 타우 단백질 조각이 뇌신경 세포 내부로 침투하는 과정과 시냅스 기능 억제 기전과 인지기능 감소, 뇌 조직 사멸에 영향을 미치는 타우 단백질의 섬유화 현상에 대한 체제가 보고됨

가) 내부 절단된 타우 단백질이 생리적 환경조건에서 자발적으로 신경 독성물질을 형성하며, 정상 타우 단백질까지 신경 독성물질로 전환 시킬 수 있는 능력이 있음을 확인하였고 이는 단백질의 절단으로 특정 부위가 노출되기 때문으로 보고됨

나) 타우의 절단으로 생성된 신경독성 물질이 신경세포에 침투하고 추가적인 응집을 유도하여 신경세포의 시냅스 가소성을 감소시키는 병리 유도기전이 보고됨

다) 동물모델 시험을 통해 타우 응집 코어를 생쥐의 뇌실 내 해마에 주입 시 신경세포 사멸과 신경염증 반응 및 기억력 감퇴 등 알츠하이머성 치매와 유사한 행동학적 변화가 일어남

○ 알츠하이머 치료와 항산화와의 연관성

1) 항산화와 치매치료 간의 연관성은 주로 산화스트레스(Oxidative Stress)가 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질환의 주요 병리학적 요인 중 하나라는 이론에 기반을 두고 있음. 산화스트레스는 뇌세포의 손상을 유발하며, 이는 치매 진행에 중요한 역할을 할 수 있음

2) 산화스트레스는 활성산소(ROS, Reactive Oxygen Species)와 활성질소(RNS, reactive nitrogen species) 가 과도하게 생성되어 세포를 훼손하는 상태로 자유 라디칼로 인해 세포가 손상되는 상태를 의미하며, 알츠하이머는 아밀로이드 베타(Aβ) 플라크와 타우 단백질 응집체 축적이 ROS 생성을 촉진, ROS는 미토콘드리아 기능 저하와 뇌

세포 손상을 가속화 및 뇌세포 사멸(apoptosis)과 염증 반응이 유발되며, 이는 인지 기능 저하로 이어짐

가) 미토콘드리아 손상: 알츠하이머 환자의 뇌에서는 미토콘드리아 기능 이상으로 인해 에너지가 부족하고 ROS 생성이 증가

나) DNA 및 단백질 산화: 활성산소는 DNA, 단백질, 지질을 공격하여 신경세포 기능을 저하

다) 염증 반응 촉진: 산화 스트레스는 신경 염증 반응을 촉진하여 알츠하이머 진행을 가속화)

3) 항산화제는 치매 예방 및 진행 억제에 잠재적인 효과가 있지만, 단독 치료로는 한계가 있음. 따라서 항산화제는 생활습관 개선, 인지훈련, 그리고 다른 약물 치료와 함께 통합적인 관리전략의 일부로 사용되는 것이 이상적으로 추가 연구와 임상시험을 통해 항산화제의 치매 치료 가능성을 더 구체적으로 평가해야 할 필요가 있음.

4) 항산화제는 활성산소와 자유 라디칼을 중화하거나 제거하여 산화 스트레스를 감소시킬 수 있어 치매 진행을 억제하거나 예방하는 데 도움이 될 가능성이 제기됨. 특히 일부 연구에서 알츠하이머병 진행을 지연시킬 수 있는 비타민 E, 수용성 항산화제로, 신경세포를 산화 손상으로부터 보호하는 비타민 C, 뇌 염증과 산화스트레스를 억제하는 데 효과적인 커큐민 및 미토콘드리아 기능을 보호하고 에너지 생성을 촉진하는 항산화제로 알츠하이머 환자의 뇌에서 감소된 미토콘드리아 효율을 개선할 가능성이 있는 코엔자임 Q10 등이 있음

5) 알츠하이머병 예방 위한 잠재적 해법으로의 항산화제가 항산화제는 산화 스트레스를 억제하는 역할을 하며, 이를 통해 알츠하이머 예방 및 진행 속도를 늦출 가능성이 연구되고 있음

가. 비타민 E: 강력한 지용성 항산화제로, 세포막을 보호하고 신경세포 손상을 줄이는 역할을 합니다. 일부 연구에서는 비타민 E가 알츠하이머 진행을 늦출 수 있다고 보고됨

나. 비타민 C: 수용성 항산화제로, 활성산소를 제거하고 면역 기능을 강화, 비타민 E와 함께 섭취할 경우 효과가 상승

다. 베타카로틴: 항산화 효과를 지닌 프로비타민 A로, 뇌세포 보호 기능이 있음

라. 커큐민(강황 성분): 항산화 및 항염증 효과가 뛰어나며, 베타아밀로이드 응집을 억제하는 효과가 보고

마. 레스베라트롤(포도, 와인 성분): 항산화 및 신경보호 효과가 있으며, 신경 염증을 감

소시키는 것으로 연구

바. 카테킨(녹차 성분) : 뇌 신경세포 보호 및 산화 스트레스 감소 효과가 보고

사. DHA(도코사헥사엔산): 신경 세포막을 보호하고 염증을 줄이며, 인지기능을 향상시키는 효과

○ 알츠하이머 치료와 시냅스와의 연관성

1) 알츠하이머와 시냅스의 관련된 인지기능 저하와 기억력 손상은 뇌 신경세포(synapse)의 구조적 및 기능적 변화와 밀접하게 연관되어 있음. 알츠하이머병 초기 단계부터 시냅스 손실이 주요 병리학적 특징이며 질병 진행과 직접적인 상관관계를 보임. 시냅스는 알츠하이머병의 병리학적 변화와 임상 증상 사이의 핵심 연결고리입니다. 시냅스 손실 및 기능 저하를 막고 복구하는 치료 전략은 알츠하이머병 치료에서 중요한 역할을 할 것으로 기대됨

2) 아밀로이드 베타(Aβ)는 ① 아밀로이드 베타 올리고머(Aβ oligomers)는 시냅스에 축적되어 신경전달을 방해 및 NMDA 수용체와 상호작용하여 과도한 칼슘(Ca^{2+}) 유입을 유발하여 시냅스 손상을 초래하여 시냅스 독성을 발생, ② 시냅스 가소성(새로운 기억과 학습능력을 위한 시냅스 재구성) 저해 및 ③ 장기강화(LTP, Long-Term Potentiation)를 방해하여 학습과 기억을 약화 등의 시냅스 가소성을 저해함

3) 타우 단백질은 ① 비정상적으로 인산화된 타우 단백질은 세포 골격을 손상시켜 시냅스 이동성과 구조를 방해하는 시냅스 이동성을 감소하고, ② 미토콘드리아 손상을 통해 에너지 공급 부족을 유발하여 시냅스 기능을 저하하는 미토콘드리아 기능 장애를 유발함.

4) 염증을 통하여 알츠하이머병에서 활성화된 미세아교세포(microglia)는 염증 반응을 유발하고, 신경염증이 시냅스를 파괴하고 산화 스트레스는 시냅스 단백질과 수용체를 손상시켜 시냅스 연결을 약화함

5) 시냅스 활성화를 위하여 ① 아밀로이드 베타 올리고머 제거 또는 축적 방지, ② 타우 단백질의 비정상적 인산화를 억제하여 시냅스 손실 감소, ② 신경 염증 조절을 통한 미세아교세포 활성 조절을 통해 염증 감소, ③ 시냅스 가소성 촉진을 위하여 BDNF를 증가시키는 약물 또는 NMDA 수용체 조절제(예: 메만틴) 활용, ④ 산화 스트레스 억제를 위하여 항산화제를 이용한 활성산소종 제거, ⑤ 시냅스 복구를 위한 유전자 치료 등이 있을 수 있음

○ 알츠하이머 치료와 미토콘드리아의 연관성

1) 미토콘드리아 기반 치료 전략으로 ① ROS 감소를 목표로, 활성산소를 제거하는 항산화제가 연구[코엔자임 Q10(CoQ10), N-아세틸시스테인(NAC), 비타민 E), ② 미토콘드리아의 분열과 융합 과정을 조절하여 정상 기능을 회복[미토필린(Mitofilin), OPA1 활성화)] ③ 미토콘드리아의 생성을 촉진하여 손상된 기능을 보완(PGC-1α 활성화), ④ 미토콘드리아의 ATP 생산을 지원하거나 효율을 높이는 약물(메트포민 및 니코틴아마이드 리보사이드), ⑤ 미토콘드리아-표적 약물 전달 등이 있음

2) 미토콘드리아의 기능장애가 알츠하이머병의 병리학적 메커니즘에서 중요한 역할을 한다는 증거가 늘어나고 있음. 미토콘드리아는 세포의 에너지 생산과 대사 조절을 담당하는 핵심 소기관으로, 특히 뇌와 같은 에너지 소모량이 높은 조직에서 중요한 역할을 하여 미토콘드리아 기반 치료제가 치매 치료에 효과를 보일 가능성이 높음

가. 미토콘드리아 기능 장애 : 알츠하이머병 환자의 뇌에서는 미토콘드리아의 기능 저하가 관찰되며, ATP 생산 감소에 따른 에너지 대사 저하로 인해 신경세포 기능 손상, 활성산소종(ROS) 생성 증가에 따른 미토콘드리아에서 ROS가 과도하게 생성되며, 산화 스트레스를 유발 및 미토콘드리아 막전위 감소: 에너지 생산 효율 감소와 세포 사멸 촉진함

나. 아밀로이드 베타(Aβ)와 미토콘드리아 관련성 : 아밀로이드 베타(Aβ)는 미토콘드리아 내부로 이동하여 독성을 유발할 수 있음. 미토콘드리아 내 단백질 복합체 억제에 따른 아밀로이드 베타는 ATP 합성효소와 결합하여 에너지 생성 억제, 미토콘드리아 유래 ROS 증가에 따라 아밀로이드 베타는 미토콘드리아 내 ROS 생성을 촉진하여 산화 스트레스를 증가시킴 및 미토콘드리아 네트워크 파괴에 따른 아밀로이드 베타는 미토콘드리아의 역동성을 저하시켜, 분열(fission)과 융합(fusion) 과정에 영향을 줌

다. 타우 단백질과 미토콘드리아의 관련성 : 비정상적인 타우 단백질 축적은 미토콘드리아 이동성을 방해하고, 신경세포의 에너지 요구를 충족시키지 못하게 하여 시냅스 기능 저하와 신경세포 퇴행으로 이어짐

라. 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 손상 : 알츠하이머병 환자에서 미토콘드리아 DNA 손상이 빈번하게 관찰됨. mtDNA 손상은 미토콘드리아 효소 기능의 저하를 유발하며, 에너지 생산 감소 및 ROS 축적을 초래함

3) 미토콘드리아가 정상적으로 작동하지 않을 경우 ATP의 야이 감소하고 시냅스 구조에 영향을 미침. 특히 감소된 시냅스 밀도, 손상된 시냅스 전달 및 시냅스 가소성 결함은 AD와 관련된 전형적인 시냅스 병리임

4) 미토콘드리아 Ca^{2+} 농도와 칼슘 항상성 유지는 세포 수준에서 매우 중요함. ATP가 부족하면 Ca^{2+} 제거가 안 되고 그러면 과도한 ROS 생성으로 인해 신경 독성이 발생할 수 있음

5) 미토콘드리아는 산화적 인산화의 중요한 부위로 OXPHOS 결핍과 ATP 결핍은 AD 뇌의 특징적인 병리학적 요인임. 미토콘드리아 복합체 IV의 활성 감소로 인한 PINK1 발현 감소가 AD의 병리와 관련이 있음. PINK1는 autophagy 수용체(OPTN NDP52)를 활성화해 autophagy 신호를 향상시키고, 손상된 미토콘드리아를 최종적으로 제거하여 아밀로이드 단백질로 인한 시냅스 손실과 AD 마우스의 인지기능 저하를 완화함

□ 현재 사용 중인 알츠하이머성 치매 치료제

○ 알츠하이머성 치매를 근본적으로 치료할 수 있는 약물은 현재 없으며, 인지 개선을 위한 약물을 이용하여 증상을 완화하고 진행을 지연시키는 약물이 현재 치매치료제로 사용되고 있음

○ 알츠하이머성 치매 약물로 사용되고 있는 아세틸콜린 분해효소 억제제와 NMDA 수용체 길항제는 일시적으로 증상만 완화하고 병의 진행을 일부 지연시키는 효과만 있음(그림 1-24)

병증 진행 상태	성분	국외	국내 허가 품목수
경증에서 중등도	도네페질 (donepezil)	'96 ~ '26	230
	리바스티그민 (rivastigmine)	'00 ~ '19	109
	갈란타민 (galantamine)	'01 ~ '17	15
중등도에서 중증	메만틴 (memantine)	'04 ~ '15	39

[그림 1-24. 현재 사용 중인 알츠하이머성 치매 치료제]

○ 콜린성 신경계 조절물질

1) 알츠하이머병 환자의 뇌에서는 아세틸콜린 합성과 대사가 감소하며 콜린 분해효소 억제제인 '타크린'이 최초로 개발된 이후, 간 독성을 줄인 약제들(도네페질, 리바스티그민, 갈란타민)이 잇따라 개발되어 사용되고 있음. 콜린 분해효소를 억제함으로써 시냅스에서 가용한 아세틸콜린의 양을 증가시키는 기전으로 작용하는데 환자의 인지 증상 호전에 어느 정도 도움이 되는 것으로 알려져 있음

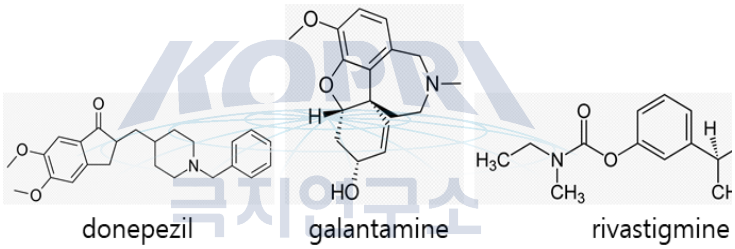
2) 콜린 분해효소 억제제가 경도인지장애의 치매 진행을 억제한다는 명확한 근거는 없음. 전두측두엽 치매나 헌팅턴병, 다발성 경화증에서 인지 저하에 콜린 분해효소 억제제는 큰 도움이 안 되는 것으로 알려져 있음(그림 1-25)

가. 도네페질(donepezil)은 콜린에스테라제에 결합하고 가역적으로 불활성화하여 아세틸콜린

의 가수분해를 억제하여 콜린성 시냅스에서 아세틸콜린 농도를 증가시킴. 위장 장애, 오심, 복통, 설사, 식욕부진 등이 흔히 알려진 도네페질의 부작용이며 환자들의 20~30 %에서 나타남. 콜린성 부작용으로 인해 서맥(徐脈)이 발생할 수 있어 주의를 요함

나. 갈란타민(galantamine)은 아세틸콜린에스테라아제를 억제함으로써 뇌의 특정 부분에서 아세틸콜린의 농도와 작용을 증가시키는데, nAChR 및 상보적 아세틸콜린에스테라제 억제에 대한 갈란타민의 효과는 이중 작용기전을 구성함. 위장 소화기 계통의 부작용, 즉 오심, 구토, 설사와 식욕부진, 체중 감소 등이 나타나며, 말기 신장병 환자나 간 질환이 있는 경우에는 사용에 주의해야 함

다. 리바스티그민(rivastigmine)은 콜린에스테라제 억제제로써 부티릴콜린에스테라제와 아세틸콜린에스테라제를 모두 억제하며, 도네페질과 달리 아세틸콜린에스테라제를 선택적으로 억제함. 경구 투약과 경피 투약이 가능하며, 경피용 패치 제제는 효능은 비슷하면서도 내약성이 좋아 위장계통 부작용에 민감한 환자들에게 선호함. 경구용으로 사용한다면 오심과 구토, 식욕부진, 두통 등의 부작용을 줄이기 위해 음식과 함께 복용하기도 함

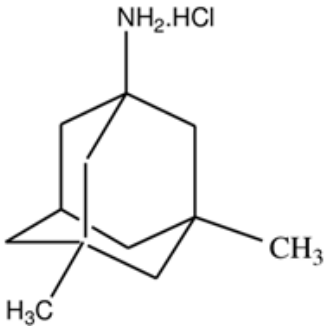


[그림 1-25. 콜린성 신경계 조절 약물]

○ NMDA 수용체 길항제

1) 정상적 기억회로에서 NMDA는 tau-FYN과 결합하여 기억형성에 관여하나 알츠하이머병에서는 NMDA 수용체는 glutamate에 의하여 활성화되고 흥분 독성과 신경 퇴행을 유도함. 비정상적인 과활성은 Aβ와 tau 생성을 증가시킴.

가. 메만틴(memantine)은 NMDA 수용체 길항제로서 콜린성 약제와는 다른 작용기전을 갖고 있고 신경보호 역할도 하는 것으로 알려져 있음. 뇌 피질과 해마 기원 신경세포의 주된 흥분성 아미노산 신경전달물질인 글루타메이트는 NMDA 수용체를 활성화시키며, 학습과 기억 기능에 관여함. 경증보다는 중등도, 혹은 중증의 알츠하이머성 치매에서 효능을 보임. 중등도-중증 치매치료제로 사용되고 있으며, 항산화 작용과 더불어 BDNF 생성 증가 등이 보고되어 치매 치료에 부가적 작용을 발현함(그림 1-26)



[그림 1-26. 메만틴(memantine)]

○ 항산화 물질

1) 노화와 세포 사멸의 과정에는 산화 현상이 일어나며, 단가아민 산화효소 억제제인 '셀레길린'이나 '비타민 E'의 항산화 효과가 알츠하이머 치매 환자의 악화를 막는 데에 도움이 되는가를 보기 위한 연구들이 수행됨(그림 1-27)

가. 비타민 E(tocopherol)는 2,000 IU을 매일 복용할 경우, 인지기능 개선 효과는 기대할 수 없지만, 일상생활의 기능 저하는 경감되어 별다른 부작용이나 내약성 문제만 없다면 경도에서 중등도 알츠하이머 환자에 도움이 가능하다고 보고됨

나. 셀레길린(selegiline)은 비형 모노아민 산화효소를 선택적으로 저해하여 선조체 내의 도파민 분해를 억제하는 물질로 우울증, 파킨스병, 치매에 사용 중이나, 임상연구 12개를 종합한 메타분석 결과, 일부 인지기능, 행동증상 등에 도움이 되나 효과는 별로 크지 않음

Drug (molecule)	Dosing	Strengths	Weaknesses	FDA approval
Acetylcholinesterase inhibitors				
Aricept (donepezil)	Oral once daily	Well tolerated, indicated for all severities, range of oral formulations available	Does not affect Alzheimer's pathology	Mild, moderate, and severe Alzheimer's disease
Exelon (rivastigmine)	Oral twice daily or transdermal once daily	Transdermal formulation offers greater dosing convenience and tolerability	Not indicated for severe disease, does not affect Alzheimer's pathology	Mild to moderate Alzheimer's disease; Parkinson's disease dementia
Razadyne (galantamine)	Oral once daily	No clear advantages over Aricept and Exelon	Not indicated for severe disease, does not affect Alzheimer's pathology	Mild to moderate Alzheimer's disease
NMDA receptor antagonists				
Namenda (memantine)	Oral twice daily	Well tolerated, suitable for adjunctive use due to novel mode of action	Ineffective in mild Alzheimer's disease, does not affect Alzheimer's pathology	Moderate to severe Alzheimer's disease

FDA = US Food and Drug Administration; NMDA = N-methyl-D-aspartate

[그림 1-27. 사용 중인 알츠하이머성 치매 약물]

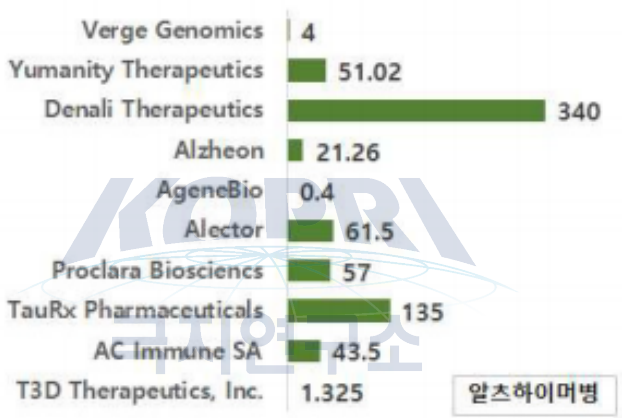
□ 국외 개발 사례

○ 글로벌 R&D 투자 동향

1) 글로벌 기업 위주의 투자는 치매 등 시장성이 큰 뇌질환 치료제 개발에 집중되어 있으며, 최근 조기진단 디바이스 시장으로 확대됨(그림 1-28)

2) 글로벌 제약사는 치매보다 알츠하이머성 치매치료제 중심으로 연구하고 있으며, 다양한 약물 치료 기전에 대한 임상의 실패로 어려움을 겪고 있음

3) 글로벌 민간 바이오벤처 중 알츠하이머 관련 가장 많은 투자를 하는 기업은 디날리테라퓨틱스사로 3억 달러 이상을 투자하였고 이외에도 다수의 신규 벤처가 존재함



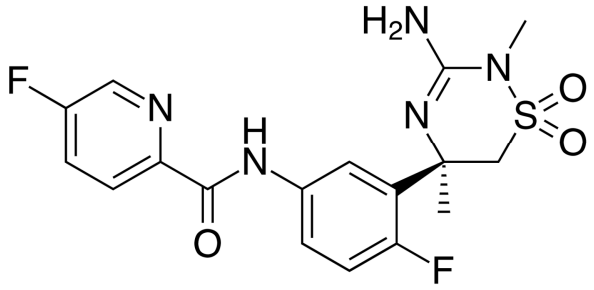
[그림 1-28. 알츠하이머 및 파킨슨병 관련 글로벌 벤처 투자현황(2015-2016)]

○ 합성약물을 이용한 치료제 개발

1) verubecestat (MK-8931)

가. 머크(MSD)의 BACE 저해제로 사용한 경도-중증도 AD에 대한 임상시험인 EPOCH을 중단한다고 발표. AD로 인한 경도 인지 장애자를 대상으로 시행 중인 3상 임상시험인 APECS는 2021년에 종결되며 2년이 지난 후에 그 결과를 기다리는 중임(그림 1-29)

나. MK-8931은 BACE1 및 BACE2 억제제로 BACE1은 APP 단백질을 절단하여 APP의 C99 단편을 방출하는 β-secretase이며, 이는 γ-secretase에 의한 다양한 종의 Aβ 펩티드를 발생함. BACE 억제의 이론적 근거는 Aβ 응집 상태가 뇌에 독성을 미치는지에 관계없이 아밀로이드 캐시케이드와의 상류 간섭을 진행한다는 것임



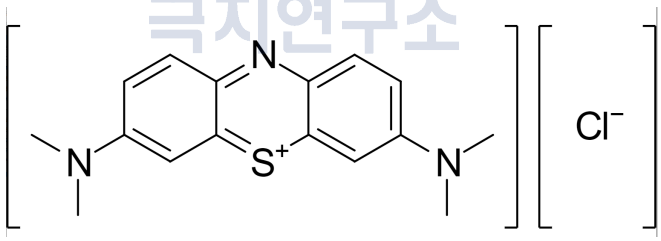
[그림 1-29. Verubecestat]

2) TRx0237(methylene blue)

가. 알츠하이머병(AD) 및 전두측두엽 치매의 치료를 위한 2세대 타우 단백질 응집억제제로, Methylene Blue의 정제된 형태이며 말라리아 치료뿐만 아니라 메트헤모글로빈 혈증 및 기타 증상에도 널리 사용됨. TRx0237는 타우 응집을 방지하거나 기존 응집체를 용해시켜 알츠하이머 및 기타 신경 퇴행성 질환을 포함한 타우 병증에서 비정상 타우의 다운 스트림 병리학적 결과를 방해함(그림 1-30)

나. 차세대 tau aggregation 저해제로 2상을 마쳤고 3상 임상시험이 2017년 9월에 발표한 결과로 시험에 참여한 환자는 LMTX를 받는 것에서 큰 이점을 보이지 않았음.

KDRA 극지연구소

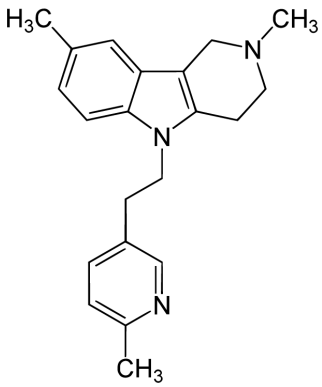


[그림 1-30. TRx0237:methylene blue]

3) Dimebon

가. 알레르기 비염을 치료하기 위해 1980년대부터 러시아에서 사용된 항히스타민제임. 근거는 H1 히스타민 수용체를 차단하는 활성을 가진 약물로 인지적 행동 메커니즘은 확립된 적이 없으나, 다양한 세포 및 동물기반 연구에 기초하여 신경학적으로 관련된 표적에 대한 광범위한 효과가 있음(그림 1-31)

나. 그러나, 화이자 제약에서 7억5천만 달러(약 8천억 원)를 들여 개발한 치매치료제로 유효성을 입증하는 데 실패함



[그림 1-31. Dimebon]

○ 항체를 이용한 치료제 개발

1) AD 환자의 뇌에 축적된 Aβ의 배출을 타겟하는 Aβ 항체형 AD 치료제로 BACE 저해제뿐만 아니라 AD 환자의 뇌에 축적된 Aβ의 배출을 타겟하는 Aβ 항체형 AD 치료제 뇌세포 물질인 존슨앤드존슨사의 bapineuzumab과 일라이릴리의 solanezumab 또한 경증(mild-to-moderate) AD 환자를 대상으로 한 3상 임상시험에서 약물효력 부족과 같이 괄목할만한 임상 결과를 얻지 못하여 치매치료제로의 승인에 실패함(표 1-1)

2) 바피뉴주맙(bapineuzumab)은 단일클론 항체 3D6이며, Aβ의 N- 말단 영역을 표적함. 근거는 항체 결합이 과량의 Aβ를 제거함. 바피뉴주맙은 원 섬유 및 가용성 Aβ에 결합하고 미세아교식세포 작용 및 사이토카인 생성을 활성화하는 IgG1 항체임

3) 솔라네주맙(solanezumab)은 Aβ 펩티드의 중간 도메인에 대한 인간화 된 단일 클론 IgG1 항체로 원 섬유가 아닌 가용성 단량체 Aβ를 인식. Aβ를 격리시키고, 상이한 종의 Aβ 사이에서 평형을 이동시키고, 시냅스 기능에 직접적으로 독성인 작은 가용성 종의 Aβ를 제거함.

4) huperzine A은 세스퀴터펜 알칼로이드 화합물로 후퍼진 A는 효소 아세틸콜린에스테라제에 의한 신경전달물질 아세틸콜린의 분해를 억제함. 경증(mild-to moderate) AD 대상으로 한 2상 임상시험도 인지기능의 향상 효과를 나타내지 않아 실패함

5) Gantenerumab은 Roche/Genentech에서 개발한 약물로 Aβ의 N-terminus의 epitope에 결합하는 단일클론 항체 (monoclonal antibody)로 microglia에 매개한 plaque의 phagocytic clearance를 유도함. 또한 간테네루맙은 아나노몰라 친화성과 Aβ 피브릴의 입체 형태인 에피토프에 결합하도록 설계된 완전 인간 IgG1 항체로 Aβ의 N-말단 및 중심 아미노산을 포함함. 근거는 미세아교세포를 동원하고 식균작용을 활성화시켜 아밀로이드 플라그를 분해하고 분해하도록 중심적으로 작용함. 경증-중증도 AD 환자에 대한 3상 임상시험에서 실패함

6) Crenezumab은 Roche/Genentech/AC immune에서 개발한 약물로 monomer, oligomer,

fibril과 같은 Aβ의 여러 형태에 결합하는 단일클론항체(monoclonal antibody)로 2014년의 2상 임상시험에서는 인지기능 감소를 서서히 낮추어 실패함.

7) CAD106은 2b상 시험에서는 능동 Aβ 면역치료제(active Aβ immunotherapy) 후보약물로 450 μg에서 항체반응과 내성 사이에서 최적의 균형을 나타내었고, 향후 초기 단계의 환자를 대상으로 대규모 임상시험의 필요성을 피력함

[표 1-1. 항치매 치료제 합성약물을 이용한 치료제 개발]

약물명	임상단계	기전	참가자	기간
E2609	2 상	BACE1 inhibitor	700명, 경증 인지장애/AD 전조상태, 경증 AD	18개월 (~2018)
AZD3293 혹은 LY3314814, AMARANTH	2/3 상	BACE1 inhibitor	2202명, AD로 인한 경증 인지장애 혹은 경증 AD	2년 (~2021)
Verubecestat, APECS	3상	BACE1, 2 inhibitor	1500명, AD로 인한 경증 인지장애	2년 (~2021)
Bryostatin-1	2상	α-Secretase modulator	150명, 경증-중증도 AD	7개월 (~2017)
Solanezumab, EXPEDITION 3	3상	Anti-Aβ monoclonal antibody	2100명, 경증 AD	18개월 (~2018)
Gantenerumab	3상	Anti-Aβ monoclonal antibody	799명, AD 전조상태 389명, 경증 AD	2년 (~2018)
Aducanumab, EMERGE, ENGAGE	3상	Anti-Aβ monoclonal antibody, Aβ plaque에 결합	1700명, AD로 인한 경증 인지장애 혹은 경증 AD	18개월 (~2022)
BAN2401	2상	Anti-Aβ monoclonal antibody	800명, AD로 인한 경증 인지장애 혹은 경증 AD	18개월 (~2018)
Crenezumab	3상	Anti-Aβ monoclonal antibody	750명, 경증 인지장애/AD 전조상태 혹은 경증 AD	2년 (~2021)
Azeliragon, STEADFAST	3상	RAGE inhibitor, 염증 조절제	800명, 경증 AD	18개월 (~2018)
Nilvadipine, NILVAD	3상	Calcium channel blocker	500명, 경증 AD	18 개월 (~2017)
Insulin, SNIFF	2/3상	Glucose 대사 조절제	240명, 경증인지장애 혹은 경증 AD	18개월 (~2017)

○ 줄기세포치료제는 전능성을 이용한 치료제 개발

1) mesenchymal stem cell (MSCs)을 임상에서 면역에 매개하는 다양한 질병을 치료하는 치료 방법으로 메디프론에서는 aggregation과 독성 차단제인 MDR-1339, RAGE 길항제인 MDR-066, glutaminyl cyclase inhibitor인 MDR-1703이 각각 1상, 전임상 단계에 있음

2) MSC 이식이 MSC와 host cell 간의 상호작용을 통해 단기간에 치료 가능한 효과를 나타내었음을 보고함

○ 다국적 제약사 개발 중단 사례(그림 1-32)

1) 엘란사와 화이자사 및 미국의 다국적 제약사인 존슨앤드존슨사 공동개발

가. 바피뉴주밥(bapineuzumab)은 고용량을 투여받은 환자에서 뇌 조직 (ARIA-E)에 체액의 축적을 포함하여 아밀로이드 관련 영상 이상을 유발하는 최초의 항체임.

나. 신경계에 작용하고 알츠하이머병 및 녹내장 의 치료에 잠재적인 치료적 가치를 가질 수 있는 인간화 된 단일클론항체도 그 유효성을 입증하는데 실패함.

2) 일라이 릴리(Eli Lilly)사

가. 솔라네주맙(solanezumab)은 뇌에서 알츠하이머병의 초기 병리학적 특징인 응집체 및 플라그를 형성하는 아밀로이드베타 펩티드에 결합하여 아밀로이드 Aβ-42가 용해되어 뇌척수액에서 평형을 회복시켰으나, 3상 임상실험에서 실패함

나. 세마가세스테트(semagacestat)는 β-secretase 와 함께 APP 단백질 분해를 담당하는 효소 γ-secretase를 차단하여 개발이 이루어졌으나, semagacestat가 위약보다 더 나쁘게 진행되는 실망스러운 중간 분석으로 시험이 중단함. 또한, 복용그룹은 피부감염이나 피부암이 나타나는 등 심각한 부작용을 경험했음

치매 치료제 개발 중단 현황

제조사	제품명	중단 시기
화이자-존슨앤드존슨	바피뉴주맙	2012년 7월
로슈	간테네루맙	2014년 12월
일라이릴리	솔라네주맙	2016년 11월
MSD	베루베세스타트	2017년 2월
액소반트 사이언스	인테피르딘	2018년 1월

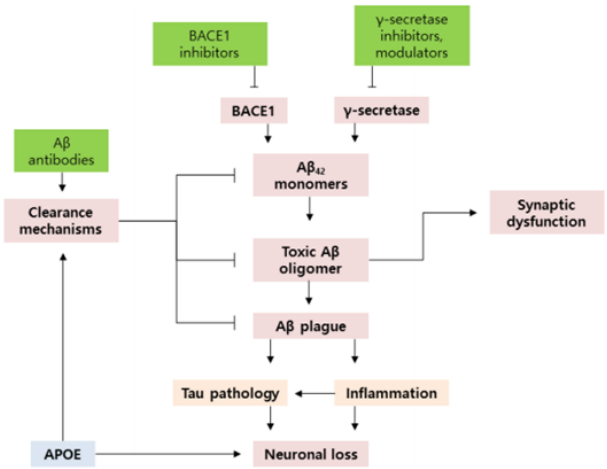
[그림 1-32. 항치매 치료제 약물 개발 중단 사례]

○ 아밀로이드 가설에 근거한 치료제 개발

1) 알츠하이머병 환자의 뇌에 축적된 노인반을 구성하는 주요 성분으로 신경세포에 대한 독성이 주요한 원인임. amyloid precursor protein (APP)의 일부가 β-secratases 및 γ-secratases에 의하여 비정상적으로 생성되면 신경세포 외부에 침착하여 자유 라디칼을 생성하고 염증반응을 유발, 칼슘대사 손상에 의한 아세틸콜린 수치 감소로 신경세포의 손상 및 사멸을 유도함

2) 뇌조직에서 Aβ 농도를 감소시키기 위하여 Aβ의 생성을 감소시키거나 Aβ aggregation 억제, Aβ의 분해 및 배설을 촉진하는 기전임

3) Aβ의 생성을 감소시키기 위하여 Aβ의 생성에 관여하는 효소인 α-secretase의 강화, β-secretase의 억제, γ-secretase의 조절을 기반으로 후보 치료물질이 연구되고 있고, Aβ aggregation 억제제는 Aβ monomer 및 oligomer가 fibril로 응집을 저해시키는 것을 목표로 함(그림 1-33)



[그림 1-33. Aβ cascade와 주요 치료 방향> 출처: BRIC View 2017-T28]

4) 아두카누맙(aducanumab)은 알츠하이머병 치료제로 개발된 단클론 항체 약물임. 알츠하이머병의 주요 병리적 특징인 아밀로이드 베타(Aβ) 단백질 축적을 표적으로 하며, 미국 바이오젠(Biogen)과 일본 에자이(Eisai)가 공동 개발한 신약으로 알츠하이머병 초기 단계에서 아밀로이드 베타 축적이 신경세포 손상을 일으키고, 질병을 진행한다는 병리학적 가설을 기반으로 설계됨. 그러나 ARIA(Amyloid-Related Imaging Abnormalities)**가 주요 부작용이 있어 제한적 약물로 유럽 의약품청(EMA)은 2022년에 아두카누맙의 승인을 거부하였음

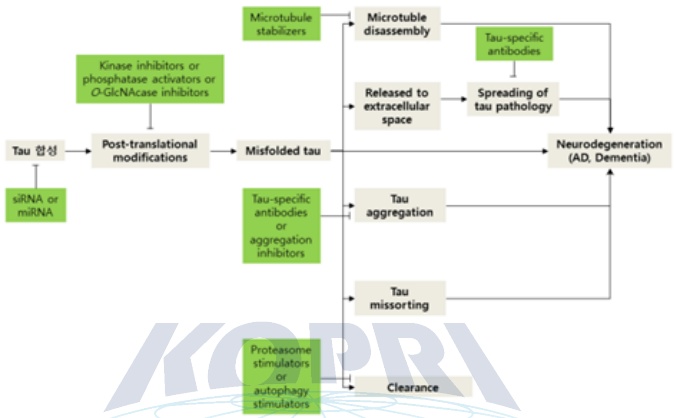
5) 레카네맙(lecanemab)은 알츠하이머병 치료제로, 병의 병리적 특징 중 하나인 아밀로이드 베타(Aβ) 단백질 축적을 표적으로 하는 단클론 항체임. 초기 단계에서 응집된 아밀로이드 베타 올리고머(oligomers)**와 가용성 프리피브릴(pre-fibrillar aggregates)**에 선택적으로 결합되며 결합된 복합체는 미세아교세포(microglia)와 같은 면역 세포에 의해 인식되고 제거됨. 임상시험 결과, 레카네맙은 아밀로이드 베타 플라크를 감소시키고, 인지기능 저하를 유의미하게 지연시키는 것으로 보이며 아밀로이드 베타 축적 초기 단계에 작용해 병리적 진행을 늦추는 데 특화되어 있어, 초기 알츠하이머 환자에게 더 적합함

○ Tau 가설에 의한 치료제 개발

1) 타우 단백질은 미소 섬유관(microtubule)이 엉키지 않도록 역할을 함. 타우 단백질이 과도하게 인산화되면 미소섬유관이 엉켜 신경섬유 농축체(Neurofibrillary tangle)를 형성하여 미소 섬유관이 불규칙적으로 엉키고 신경세포 돌기에 의한 원활한 영양분 및 신경전달물질 수송이 이루어지지 않아 신경세포 손상 및 사멸이 유발됨(그림 1-34, 표 1-2)

2) 타우병증(tauopathy)에 직접적으로 작용하는 물질로 SRN-033-556, CHIR-98014, SB216763, alsterpaullone, AR-A014418과 같은 tau kinase inhibitor와 paclitaxel과 같은 microtubule stabilizer, Thimet-G와 같은 O-GlcNAcase inhibitor 등이 있음

3) 타우병증을 치료하는 질병변형치료제(disease-modifying therapy)는 현존하지 않지만 임상시험에서 tau-기반 면역치료를 진행하고 있고, tau-표적 antisense oligonucleotides를 처음 보고하였음. PET-기반 생체 내 tau 이미징의 개발과 병인성 tau에 의한 신경세포의 사멸 및 오작동을 중재하는 핵과 유전체의 유의적 파괴를 포함하는 세포 내 기전을 확인하는 방법 등이 관심이 있음



[그림 1-34. Tau 관련 주요 치료 방향]

[표 1-2. 임상시험 단계의 기타 치료제]

약물명	기전	임상시험 단계	비고
Saracatinab	Tyrosine kinase Fyn inhibitor	2상	기존
Liraglutide	Neuronal activity promoter	2상	기존
Exendin	Neuronal activity promoter	2상	기존
Iosartan	Angiotensin receptor 차단제	2상	기존
Telmisartan	Angiotensin receptor 차단제	2상	기존
Minocyclin	항생제	2상	기존
VX-745	p38 MAPK inhibitor	2상	기존
Ladostigil	Monoamine oxidase B inhibitor	2상	신규
Idalopirdine	serotonin receptor 길항제	3상	신규
RVT-101	serotonin receptor 길항제	3상	신규
GLN-1062 (memogain)	Cholinergic system	1상	신규
NEUROSTEM®	신경세포재생 (neuronal regeneration)	1/2상	신규
umbilical cord MSCs	신경세포재생 (neuronal regeneration)	1/2상	신규
GC 021109	Microglia 활성화	1상	신규
BI 409306	Posphodisterase 9A (PDE9A)	2상	신규
Leukine® (GM-CSF, sargramostim)	Microglia 활성화	2상	기존
ABT-957	Calpain inhibitor	1상	신규

□ 국내 개발 사례

○ 국내 치매치료제 개발 동향

1) 우리나라는 2008년부터 치매 문제 해결을 위한 국가정책을 수립하고 관련 지원을 수행하고 있으며, 2019년부터 '치매극복연구개발사업'을 통하여 치매 발병을 5년 지연하고 연간 치매 환자 증가 속도를 50% 감소시킴으로써 치매로 인한 사회 경제적 비용을 획기적으로 경감을 목표로 연구 사업을 진행하고 있음

2) 알츠하이머 치료제 개발 성공 확률이 매우 낮아서 국내 제약사들은 해외 글로벌기업 및 바이오벤처 등과 협력을 통해 개발을 진행하는 사례가 많음(표 1-3)

[표 1-3. 알츠하이머 치료제 개발을 위한 협력 사례]

제약사	협력 내용
젬백스앤카엘	글로벌 CRO 및 제조업체와의 계약을 통해 글로벌 임상 추진
CJ헬스케어	'바이오 헬스케어 펀드'를 통해 치매치료제 개발 바이오벤처에 투자
보령제약	바이오벤처 라파스와 도네페질 패치 공동 연구개발 및 공급 계약
대웅제약	메디프론의 신약 후보물질 'DBT-1339'공동 연구개발 계약
동화약품	울산과학기술원(UNIST)과 치매치료제 산업 육성을 위한 MOU체결
메디프론	스위스 로슈(Roche)사와 RAGE억제제 신약후보물질 공동연구 및 기술이전 계약 체결

○ 국내 치매치료제 개발 사례

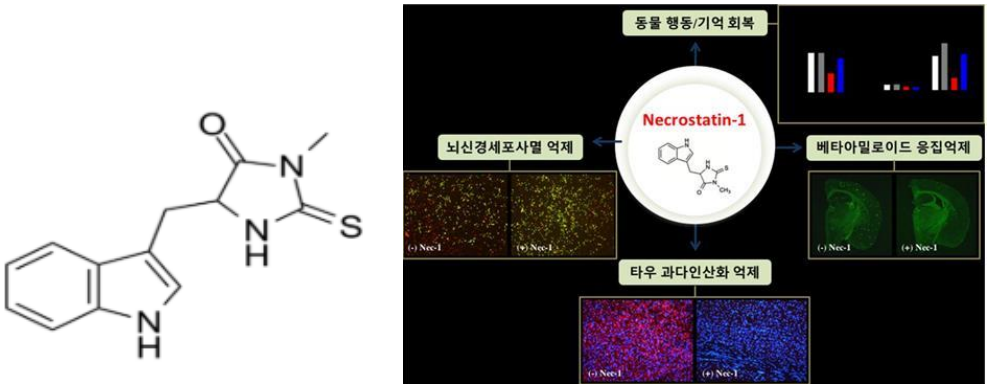
1) 대규모 임상에 필요한 막대한 연구개발비와 높은 실패율로 인한 어려움이 있으나, 최근에 여러 국내기업이 임상을 진행하고 있으며, 국내기업이 세계에서 4번째로 알츠하이머 진단용 조영제를 개발하는 등 다소 성과를 얻고 있음

2) 국내 약물 개발 사항

가. necrostatin-1은 한국과학기술연구원'치매 DTC융합연구단'에서는 아밀로이드 가설과 타우병증을 동반 표적하는 치료제 후보약물의 개발을 위하여 Aβ와 타우 단백질의 비정상적인 신경세포 사멸 현상을 동반 억제하는 신약 후보약물을 개발하고 있음(그림 1-35)

나. 아밀로이드 응집억제제 신약물질(파이프라인)을 보유하고 있는 메디프론, 베타 아밀로이드 타깃 줄기세포치료제를 개발 중인 차바이오텍 등이 선두에 있음

다. 이외 줄기세포를 기반으로 한 메디포스트, 차바이오텍, 패치제 형태의 아이큐어, 보령제약, 대웅제약, 천연물 신약을 기반으로 한 동아에스티, 일동제약, 환인제약, 대화제약, 펩타이드 기반 젬백스 등이 연구를 진행하고 있음



[그림 1-35. Necrostatin-1 및 Aβ & tau 및 기억회복 효과]

라. ㈜종근당에서 개발한 HDAC6 저해제(CDK-504, CDK-506)가 신경질환(치매, 헌팅턴병, 샤르코마리투스병) 치료제로 현재 유럽에서 임상시험을 진행 중임. 현재 HDAC6를 표적으로 FDA 허가된 치료제는 극소수이며, HDAC6는 탈아세틸화 효소로 해외의 선두 연구단에서 신규 저해제와 표적 복합체 구조 규명을 통한 저해제 검증/기전 분석 연구를 진행 중임

3) 항치매 치료제 개발을 위한 국내 연구전략 변화

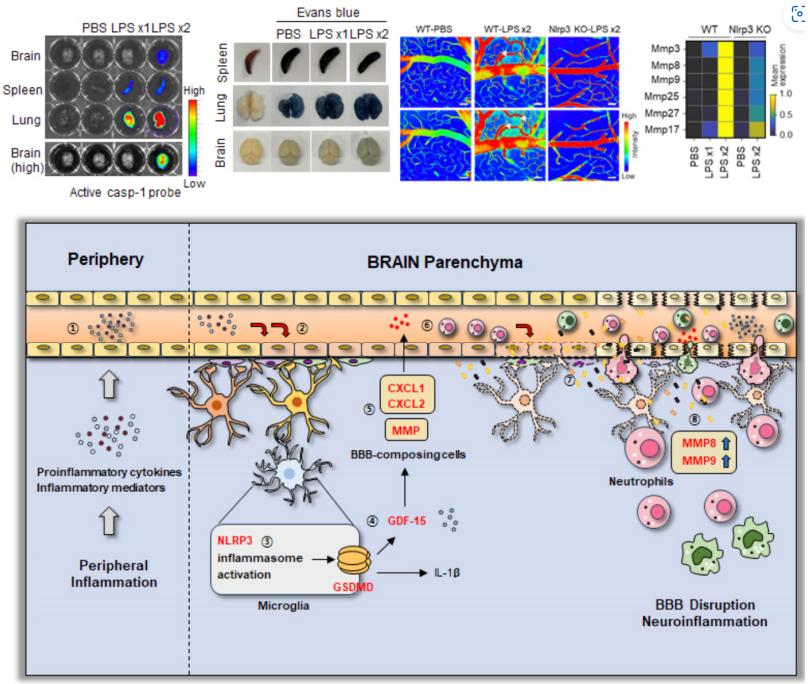
가. 치매치료제 연구에는 아밀로이드 가설과 tau, 줄기세포치료제 이외의 다양한 접근방법이 시도되고 있고 이에 대한 임상시험도 진행 중임으로 N-methyl D-aspartate receptor antagonism, GABAergic 조절, serotonin receptor 조절, histaminergic 조절, adenosine receptor 조절과 같은 신경전달(neurotransmission), 세포 내 신호전달체계의 조절, 항산화 보충제의 섭취 및 내생적 방어시스템 활성화를 통한 산화적스트레스의 감소, 미토콘드리아 표적 치료, 세포 내 칼슘 항상성 조절, 항염증 치료, gonadotropin 보충, statin과 같은 지질 변화, 성장인자 보충, 후성학적 변화, caspase 저해제, nitric oxide 생합성 조절, 핵산 치료제 등을 고려하여 연구를 진행하고 있음

나. 최근 뇌과학원천기술개발사업이 일몰되고 '치매극복연구개발사업'이 예타를 통과하는 등 관련 사업들이 개편되고 있어 현재의 기술·산업 동향을 바탕으로 한 합리적인 목표설정과 추진으로 결과가 기재되고 있음

다. 알츠하이머의 발병기전 관련 기존의 아밀로이드 베타에 기반한 약물이 연이어 실패하는 등 성공 가능성이 높은 타겟이나 접근법을 예단하기 어려움

3) 연세대학교에서 뇌 외부 조직에서 반복적인 염증이 발생할 경우, 뇌 내 미세아교세포의 'NLRP3 인플라마좀(염증복합체)' 경로가 활성화되면서 뇌혈관장벽이 손상되고, 면역세포가 뇌로 유입돼 뇌염증이 생성되는 과정이 보고. 세포 특이적 유전자 결손 마우스를 활용해

미세아교세포의 'NLRP3-GSDMD 인플라마좀' 활성화가 뇌혈관장벽 붕괴의 초기 핵심 현상임을 제시함(그림 1-36)



[그림 1-36. 뇌 미세아교세포의 인플라마좀 활성기반 뇌염증 생성 원인과 치료 표적 제시]

4) 기초과학연구원(IBS) IBS 연구진은 알츠하이머병 환자의 뇌에서 과생성되는 억제성 신호전달물질인 가바(GABA)의 양을 줄일 수 있는 물질을 개발하여, 기존 치료제의 한계를 극복할 수 있는 새로운 후보 약물을 제시함

5) IST의 창업기업인 큐어버스는 알츠하이머병 치료제 'CV-01'을 개발하여, 2024년에 이탈리아 제약사 안젤리니파마와 약 5,000억 원 규모의 기술이전 계약을 체결. CV-01은 경구 복용이 가능한 치료제로, 간편한 투약 방식과 부작용 감소에 대한 기대를 모으고 있음

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

(가) 세부연구목표 1. 극지 지의류 유래 신규 알츠하이머성 항치매 치료제 발굴

□ 연구내용 1-1. 라말린 유도체 합성 및 구조 규명

○ 라말린 유도체 합성

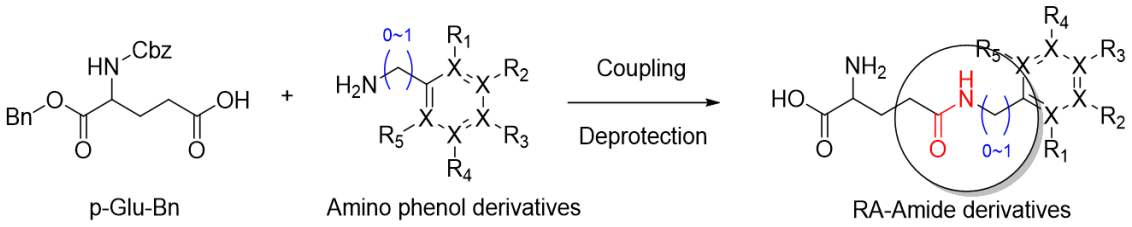
1) 라말린 유도체 합성 계획 수립

가. Amide 또는 Aniline이 연결된 라말린 유도체 합성 계획

- HDAC6 억제활성 및 BBB 투과에 초점을 둔 유도체 합성계획

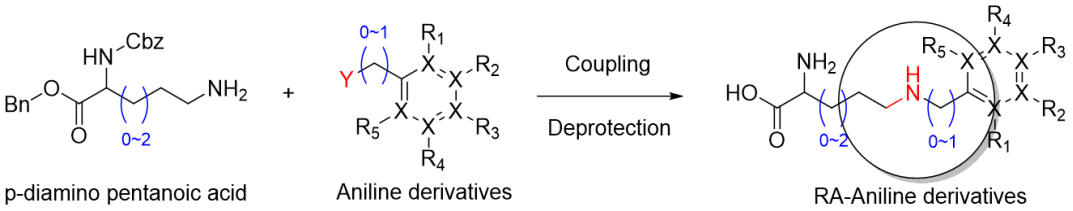
- 라말린 분자 내 CO-NHNH 부분은 뇌에 들어갈 가능성이 낮고(BBB 통과 가능성 낮음), 특히 chemical stability가 낮아 체내 흡수를 위해서 hydroysis를 통한 aldehyde 등의 부산물의 독성 유발이 예상됨. 독성 예방을 위해 아마이드 형태의 연결 도입 계획

- HDAC6에 binding 하려면 최소 carbon chain(carbon 길이)이 5개가 필수 요소임. 이를 위해 라말린 분자의 구조는 그대로 유지하면서 CO-NHNH 부분을 amide type (CO-$NHCH_2$) 또는 CO-CH_2NH로 변형이 필요하며, phenol도 분자의 독성을 유발할 수 있으므로 이를 고려하여 여러 가지 aromatic 부분으로 변형이 필요함. 특히 BBB 통과를 위해서는 methyl 또는 fluoride가 치환된 aromatic 구조나 hetero-aromatic 구조로 확보



[그림 2-1. Amide 결합 유도체 합성 방안]

- 일반적으로 carbon chain의 길이가 길어지면, 분자구조의 변형으로 HDAC6에 binding이 어려움, 따라서 상기 CO-NHNH 그룹을 alkyl amine으로 변형한 상태로 유도하는 방법과 phenol을 여러 methyl 또는 fluoride가 치환된 aromatic 구조나 hetero-aromatic 구조로 확보

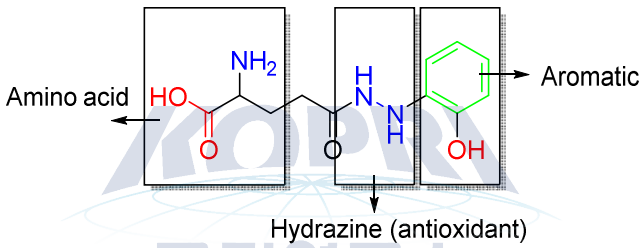


[그림 2-2. Ketone이 제외된 Aniline 결합 유도체 합성 방안]

- 1차 합성계획 수립 후 Amide 형태의 유도체를 소량 합성하여 활성을 확인하였으나, 중요한 항치매 억제 기능인 항산화 및 항염증 활성이 사라짐을 확인. 라말린의 중요 구조를 최대한 유지하여 유도체를 합성하고 활성 및 독성을 확인하는 과정으로 수정됨

나. 라말린 구조 기반 유도체 합성 계획

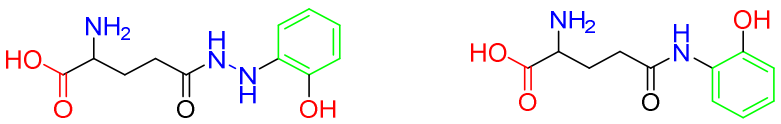
- 라말린의 Pharmacophore 분석에 따른 합성계획 수립



[그림 2-3. Ramalin의 Pharmacophore 분석]

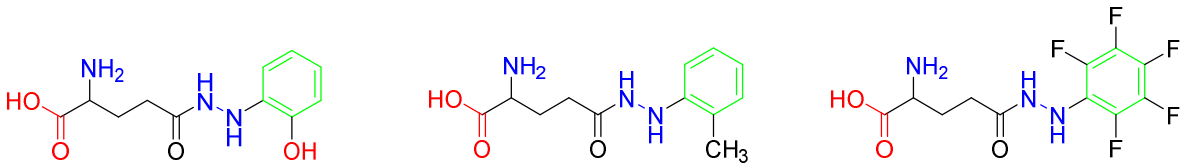
- Amino acid part: 아미노산 구조인 L-Glutamic acid를 기본으로하는 라말린의 기본 구조. 양쪽성 이온형태를 가지며 다양한 수용체 결합 가능. 라말린의 수용성 특징과 연관됨. 아미노산을 L-Glutamic acid나 L-Arspartic acid로 변형하여 탄소 길이 조절 구상

- Hydrazine part: 항산화 효과의 핵심 구조. 하이드리진이 아닌 아마이드 형태의 유도체는 항산화 효과가 없음 확인됨. 1차, 2차 분자구조 변형 방안에서 제시한 구조는 항산화 능력이 없거나 저해될 가능성이 높음. 항산화와 깊은 연관이 있는 하이드라진 구조는 고정하여 유도체 변형 구상을 진행



[그림 2-4. Hydrazine part의 유무에 따른 항산화 능력 비교]

- Aromatic part: 라말린의 항산화 효과 및 안정성에 영향을 줄 수 있는 부분. 라말린의 ortho위치에 hydroxyl기를 methyl기로 변경할 경우 비슷한 항산화력을 가지면서 안정성이 증대됨. 다만 ortho위치에 모두 치환된 경우에는 항산화력이 급격히 저하됨. hetero-aromatic 구조 적용 예정 (Pyridine 등)



[그림 2-5. Aromatic part의 작용기에 따른 항산화 변화]

- 유도체 합성 효율성을 고려한 합성 및 정제의 난이도 평가를 통해 글루탐산 유도체 설계

- Pharmacophore 정보를 기초로 라말린의 기본 골격인 Glutamic acid part와 Hydrazine은 변경을 최소화 하여 유도체 기본 구조 결정

- Aromatic part에 작용기들의 변경하면서 항산화 효과, 안정성 및 항치매 효과 확인

- HDAC6 억제활성을 가지기 위한 구조적 방향성 확인 : HDAC6 리간드는 Zn-binder, Linker, CAP 3 부분으로 나뉘며, 효소에 binding 하기 위해서는 유도체 구조에서 Zn-binder라는 phamacopore가 있어야 하며 일반적으로 hydroxamate CONHOH 구조가 있어야 활성을 보임. L-Glutamic acid나 L-Arspartic acid 구조가 유리함

- [참고] PDB 단백질 : 6CSP (N-hydroxycyclohex-1-ene-1-carboxamide), 5EEI (SAHA) / 사용 모듈 : Prepare Protein, Receptor Grid Generation, Ligprep, Ligand Docking / Docking 방법 : XP, Flexible. 이를 통한 라말린 유도체의 구조에서는 Amino-acid moiety가 Zn-binder로 예상되며, 분자 모델링을 통해 예측 결과도 이 부분이 Zn-binder임

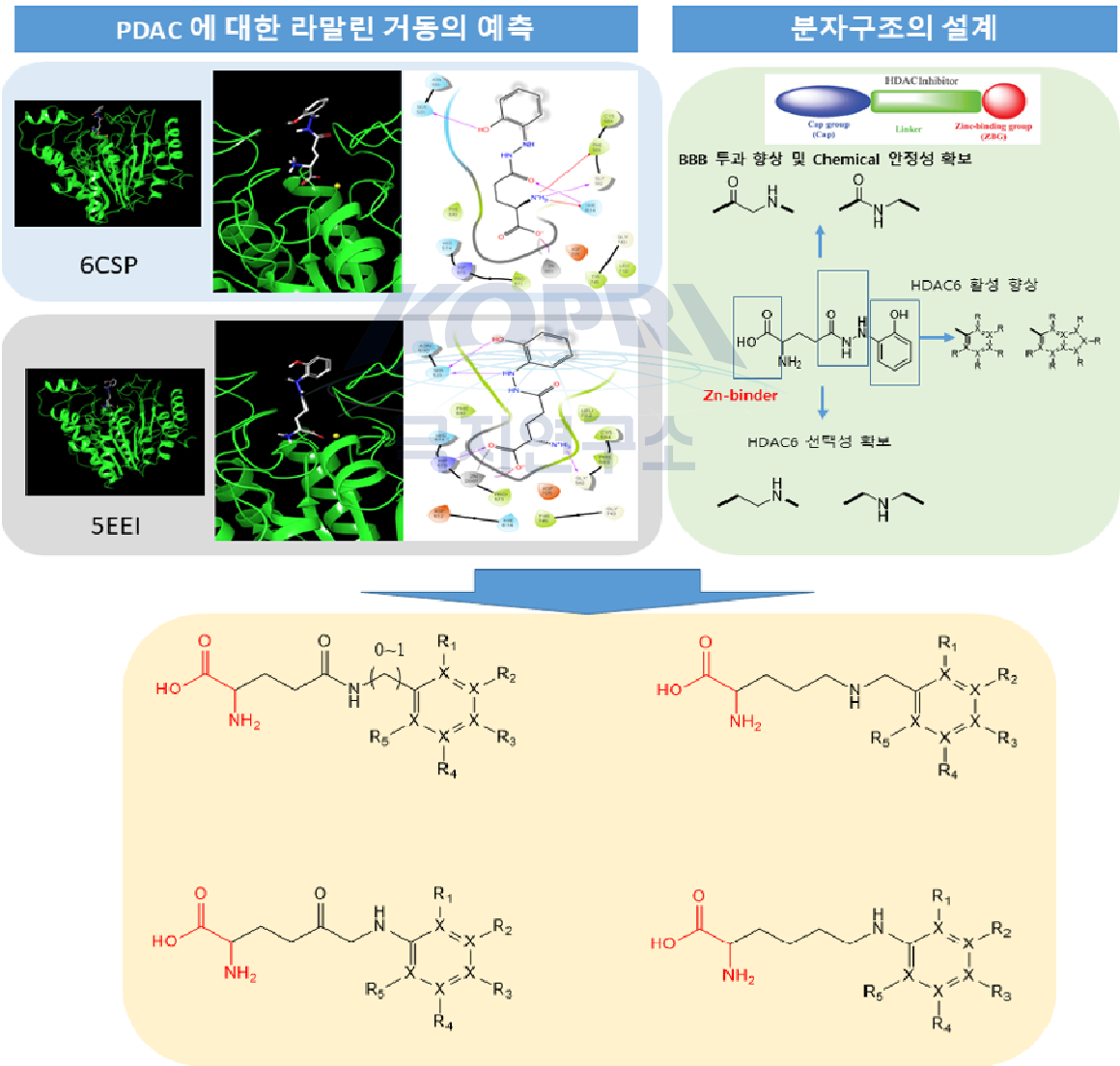
- Zn-binder를 유지하면서 linker와 CAP을 변경하여 활성을 향상하는 것이 중요할 것으로 예측하여 합성전략을 도출함

KOPRI 극지연구소

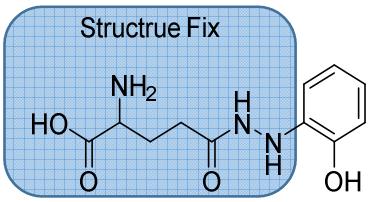
- 기존 라말린의 세포 실험 등 *in vitro* 실험 결과, 분자구조에서 hydrazine 구조를 가지고 있으며, acid와 hydrazine이 결합된 형태인 hydrazide의 구조를 가지고 있을 때 좋은 결과를 나타내는 것으로 확인이 되었음. 이것을 바탕으로 하여 Glutamic acid에 결합되는 hydrazine을 다양화하여 다양한 치환구조의 결합형태의 제품을 얻도록 함

- Glutamic acid와 hydrazine의 구조는 유지하며 aromatic part의 작용기가 변경된 라말린 유도체 합성

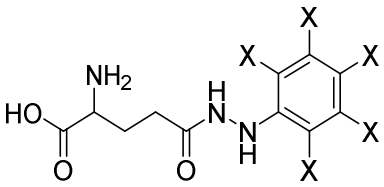
- 다양한 작용기 도입을 통해 작용기의 종류, 위치, 작용기의 수에 따른 유도체의 활성 변화 확인 목적. 유도체의 활성 및 독성결과 분석을 통해 추가 유도체 합성 계획 수립



[그림 2-6. 라말린 유도체 요구조건에 대한 방향 설정]



Ramalin



Ramalin derivatives structure

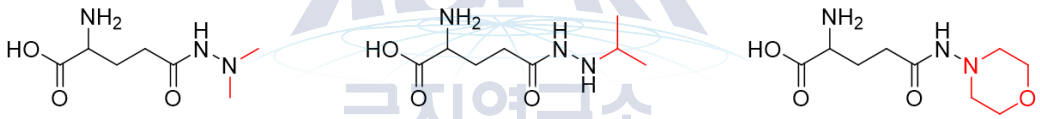
[그림 2-7. 라말린 구조기반 유도체 합성 전략]

다. 페닐기 대신 알킬기를 도입한 라말린 유도체 합성

- 고정된 글루탐산 및 하이드라진에 페닐기를 대체할 알킬기를 추가하여 라말린 유도체 합성. 분자량을 조절하고 안정성 증대 목적으로 합성계획 수립. 라말린의 Aromatic 작용기의 역할 확인

- Aromatic 작용기 합성법과 동일한 합성 조건으로 다양하게 합성 가능

- BBB 통과에 유리하며 분자량 조절이 가능함



KOPRI 극지연구소

[그림 2-8. 알킬기가 도입된 라말린 유도체 예시]

라. BBB (Blood-Brain Barrier) 투과에 유리한 라말린 유도체 합성 설계

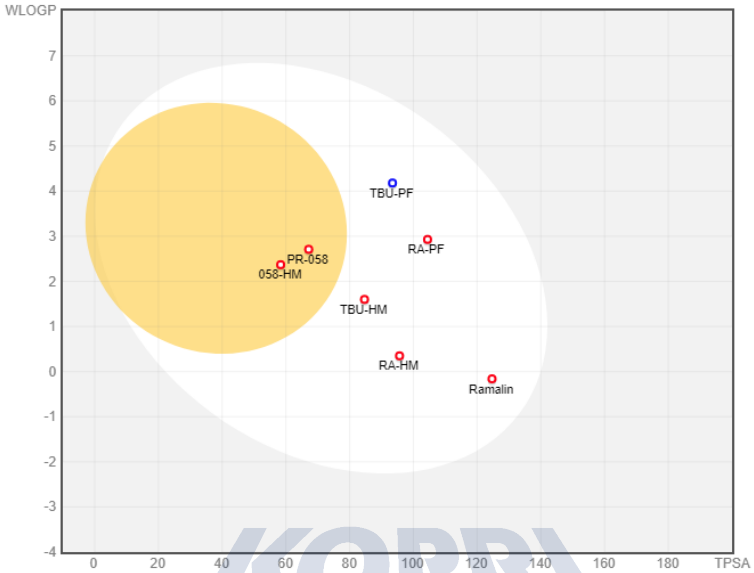
- 1번 위치 카복실산 작용기에 메틸 및 티부틸기를 도입하여 물질 안정성 및 비극성 정도 증대 목적. 비극성 정도의 증대로 BBB 통과에 유리할 것으로 예상됨

- 우선 합성된 유도체 중 활성이 우수하나 비장종대 독성을 보인 유도체 선별하여 구조적 개선을 목적으로 함. 활성을 보인 유도체들의 물성 및 BBB 통과 가능성을 높이기 위해 구조적 변화를 시도함. 물질의 독성, 안정성, 용해도, BBB 통과 가능성 등의 개선을 진행하고 변화된 활성의 결과를 확인하여 추후 유도체 구조 선정에 자료로 활용

- BBB 통과율을 높이기 위해선 물질의 극성정도 및 PSA (polar surface area) 값을 고려해야 하며 BOILED-Egg 모델을 적용하여 예측 가능함. 극성 및 PSA가 BBB통과에 적정한 비율은 노란색으로 표시되며 가까울수록 유리하다 판단 가능

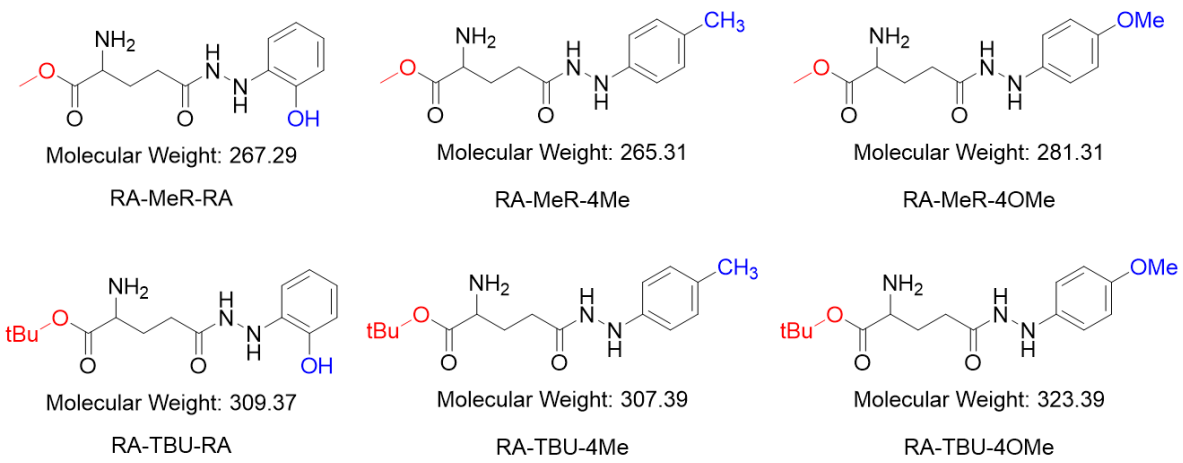
- 유도체 RA-Hyd-Me (HM) 보다 TBU (tert-Butyl)을 연결한 TBU-HM의 경우 BBB 통과에 유리할 것으로 예상되며 실제 PAMPA 결과에서도 적용됨을 확인

- 라말린의 BOILED-Egg 모델 적용값을 보면 BBB통과 가능성이 낮으나 낮은 분자량을 가지는 Small molecule (MW 253.26)로 일정량 통과가 가능한 것으로 보임



[그림 2-9. BBB 통과 가능성을 계산하여 보여주는 BOILED-Egg 모델 예시]

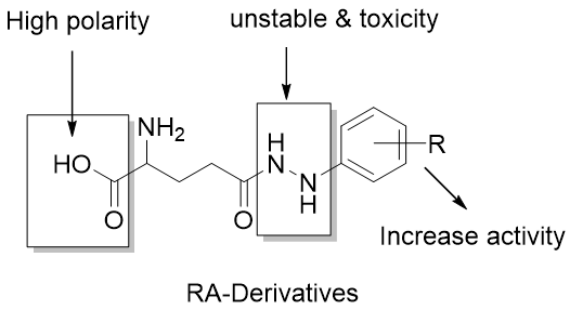
KOPRI 극지연구소



[그림 2-10. Glutamic acid가 변형된 라말린 유도체 예시]

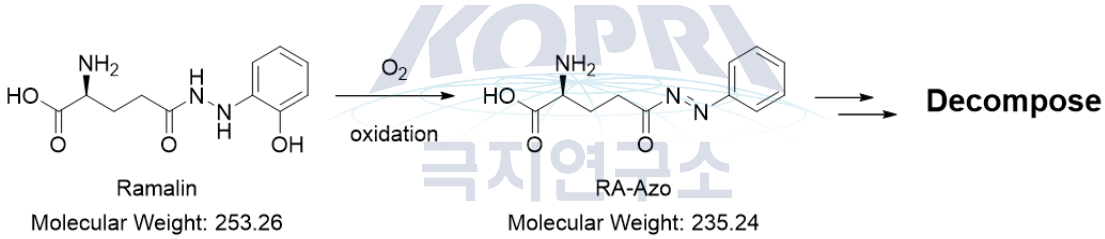
마. 안정성 및 독성 개선을 위한 하이드라진의 산화 방지 모델 합성 설계

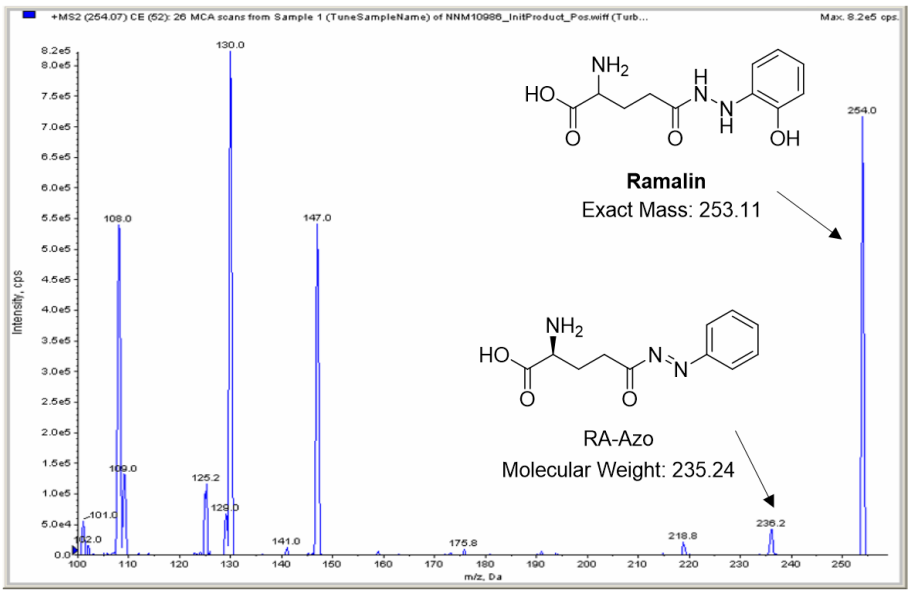
- 안정성과 독성에 관여되어 있다고 판단되는 하이드라진의 산화를 방지하여 안적성 극대화 및 독성 제거 전략



[그림 2-11. 라말린 유도체 구조변경 전략]

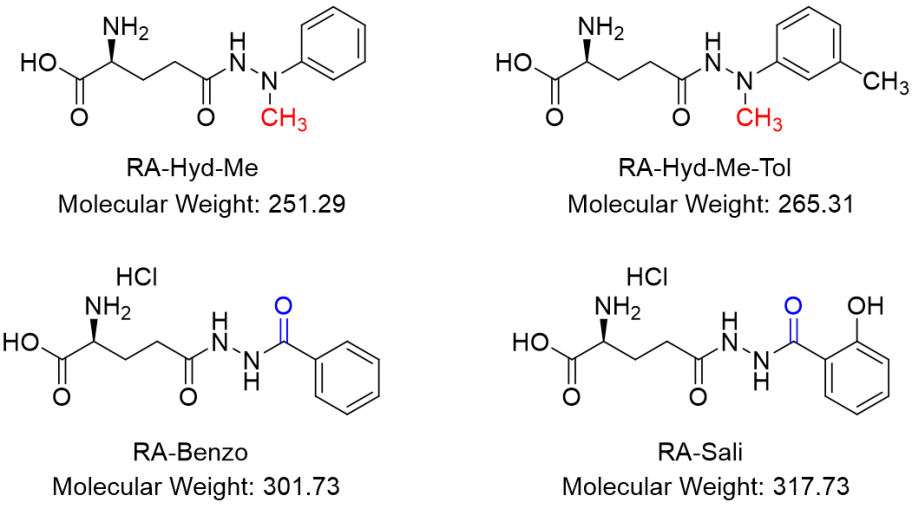
- 라말린의 불안정성은 산소에 의한 하이드라진의 산화로 Azo 형태로 변화되고 그 과정에서 하이드록실기가 이탈되어 RA-Azo로 변형되면서 시작됨. RA-Azo로 변형된 라말린은 이후 빠르게 저분자 물질로 분해됨





[그림 2-12. 라말린의 산화에 의한 분해경고 예측]

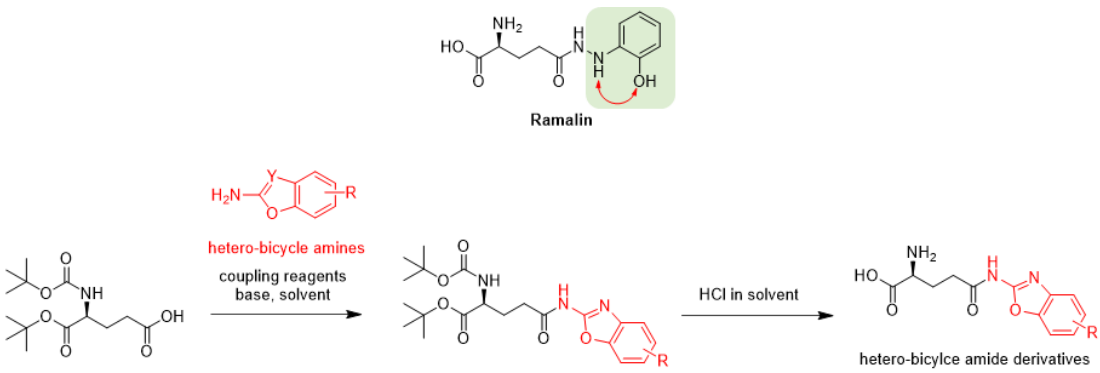
- Aromatic ring과 연결된 하이드라진의 불안정성 개선을 위해 메틸기 등의 알킬기를 도입하거나 Bridge을 추가하여 전자공유 흐름을 억제하여 안정성 및 독성 개선에 유리할 것으로 예측함



[그림 2-13. 안정성 및 독성 개선을 위한 유도체 합성 예시]

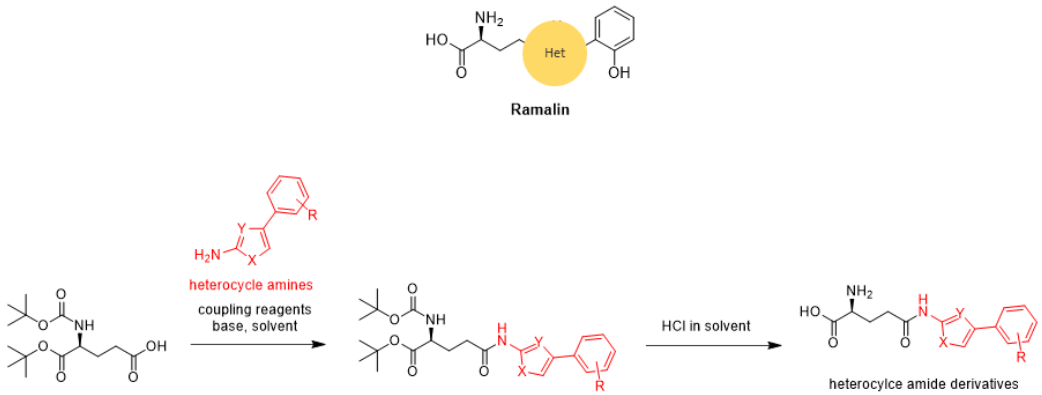
바. 헤테로 이중고리 연결을 통한 라말린 유도체 합성

- 유도체 전략 1 : 라말린의 hydrazide의 bioisostere로서 헤테로 이중고리내에 질소 원자 하나를 포함시키고, 헤테로 이중고리에 연결된 질소 원자를 아미드결합에 참여하도록 함



[그림 2-14. 헤테로 이중고리를 이용한 라말린 유도체 합성전략]

- 유도체 전략 2 : 라말린의 hydrazide의 bioisostere로서 헤테로 단일고리내에 질소 원자 하나를 포함시키고, 오른편으로 벤젠고리를 연결시킴. 헤테로 단일고리에 연결된 질소 원자를 아미드결합에 참여하도록 함



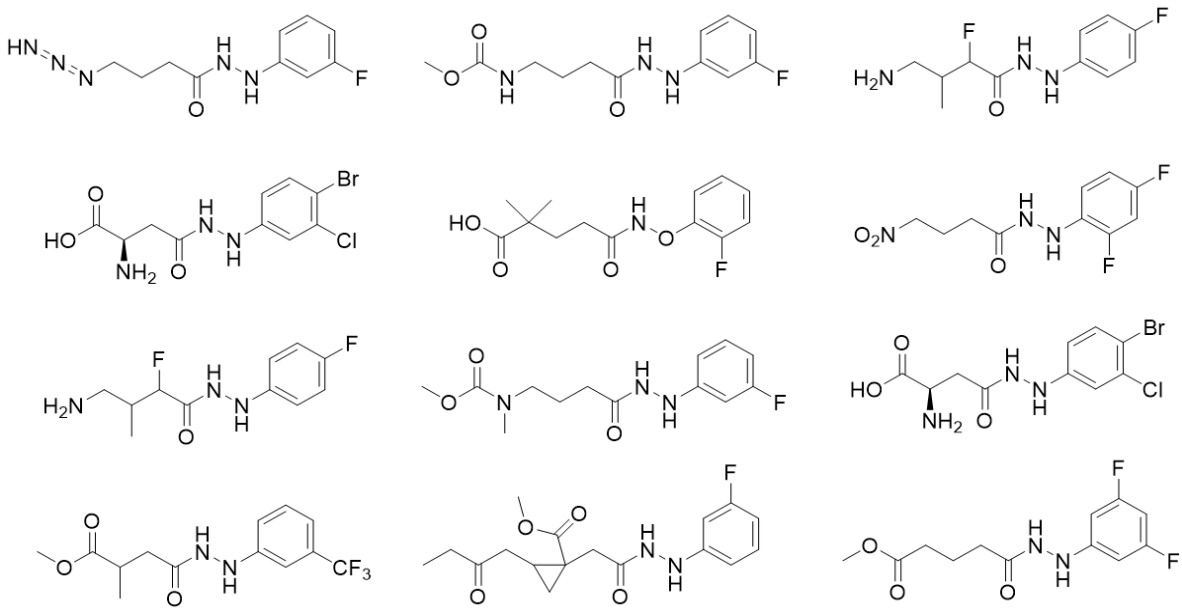
[그림 2-15. 헤테로 단일 고리 연결을 통한 라말린 유도체 합성전략]

사. 화학정보학 및 머신러닝 기반 라말린 유도체 구조 예측

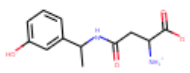
- 라말린과 유사한 구조를 가지는 유도체 라이브러리 검색 후 후보물질 도출하고 합성 및 구매가 가능한 유도체를 선별하여 합성 및 구매를 진행

- AI로 예측된 유도체 구조를 라이브러리 검색을 통해 약 400종의 라말린과 유사한 신규 유도체 구조식을 확보하였고, 구매 가능 여부 확인

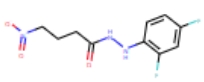
- AI를 통해 2233종의 합성 가능 유도체 조합에서 구조적 안정성, 합성 가능성, 라말린과 유사성, 비용 및 합성 복잡성 여부등을 판단하여 신규 유도체 합성 수행



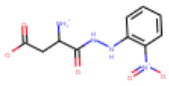
[그림 2-16. AI 예측모델로 결과로 도출된 유도체 예시]



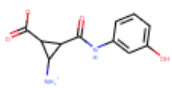
m_240600bbc___17024756___14156160



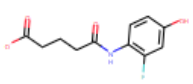
m_22bbb___7639362___13948226



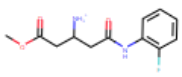
m_269946bbc___11698022___17120308



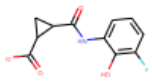
m_269946bbc___11711582___19716684



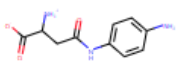
m_269946bbc___17011298___11578156



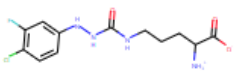
m_240600bbc___7350878___13468704



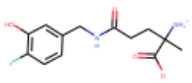
m_269946bbc___17020176___11578260



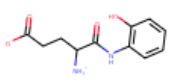
m_240600bbb___7347336___14156160



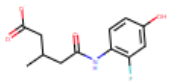
m_273392bxb___20634346___11016824



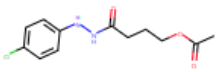
m_269946bbc___19178118___19716716



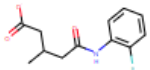
m_240600bbc___7365130___14156158



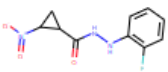
m_188690bbb___13232628___11757916



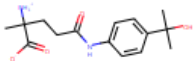
m_527dbb___7639210___14052638



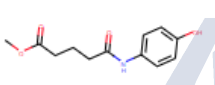
m_188690bbb___7318830___11757916



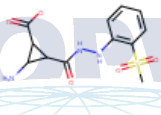
m_22bbb___7639330___10974684



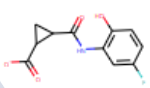
m_269946bbc___16532218___19716716



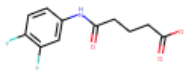
m_22bbb___7114728___8583748



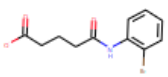
m_269946bbc___11703586___19716684



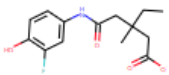
m_269946bbc___11655766___11578260



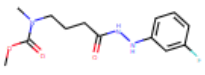
m_269946bbc___10851920___11578156



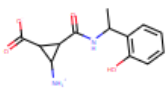
m_58baa___97535___131260



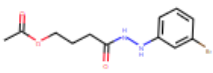
m_58baa___2162370___136030



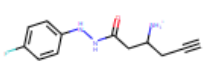
m_527dbb___7639198___3490944



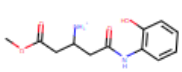
m_269946bbc___12634474___19716684



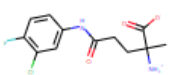
m_22bbb___7639326___14052636



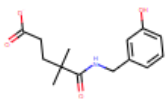
m_240600bbc___7355856___16712210



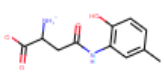
m_240600bcc___7365130___13468704



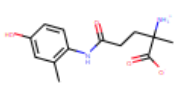
m_269946bbc___10851928___19716716



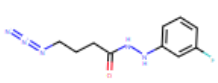
m_188690bbb___13234094___12297686



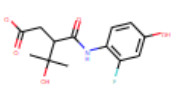
m_240600bbc___9200050___14156160



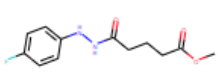
m_269946bbc___16914476___19716716



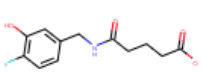
m_22dbb___7639342___15789284



m_188690bbb___13232628___20319230

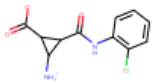


m_22bbb___396510___8583748

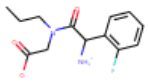


m_269946bbc___19178118___11578156

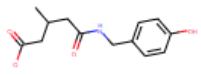
KOBRI
극지연구소



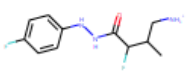
m_269946bbc___10851876___19716684



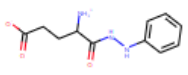
m_273450bcb___11050622___13601052



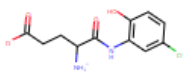
m_188690bbb___13233334___11757916



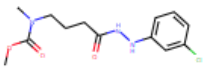
m_240690bbc___7355856___15768980



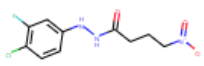
m_240690bbc___10944522___14156158



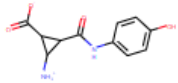
m_240690bbc___10870868___14156158



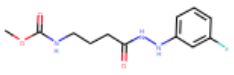
m_22bbb___397634___3490942



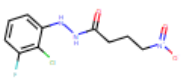
m_22bbb___7639480___13948226



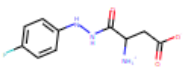
m_269946bbc___11711584___19716684



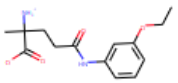
m_22dbb___7639342___4146202



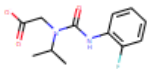
m_22bbb___12214312___13948226



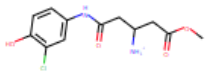
m_269946bbc___11702790___17120398



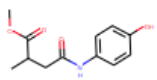
m_269946bbc___11697748___19716716



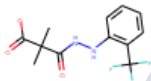
m_272230aaa___9453572___9453072



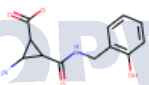
m_240690bbc___17025060___13468704



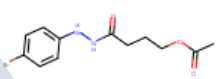
m_22cbb___7114728___7105018



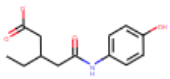
m_269946bbc___11702786___11556000



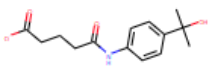
m_269946bbc___10876334___19716684



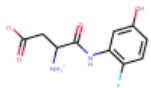
m_527bbb___334126___14052638



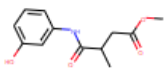
m_58bxa___219418___14045168



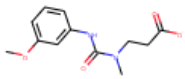
m_269946bbc___16532218___11578156



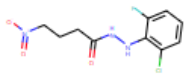
m_269946bbc___17021626___17120398



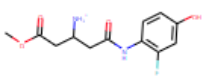
m_22bbb___57741___7049424



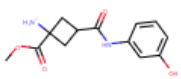
m_273390bxc___10996190___10996108



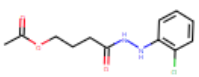
m_11dbb___8931274___13948224



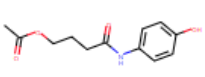
m_240690bbc___17026376___13468704



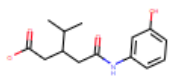
m_240690bbc___8876078___14581402



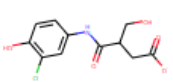
m_22bbb___7639364___14052636



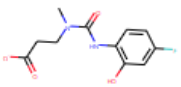
m_22bbb___7114728___14052636



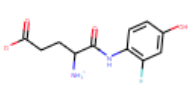
m_58bxa___219385___15149536



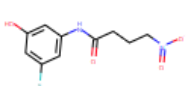
m_188690bbb___13232422___16811458



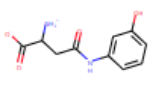
m_273390bxc___11000840___10996108



m_240690bbc___17026376___14156158

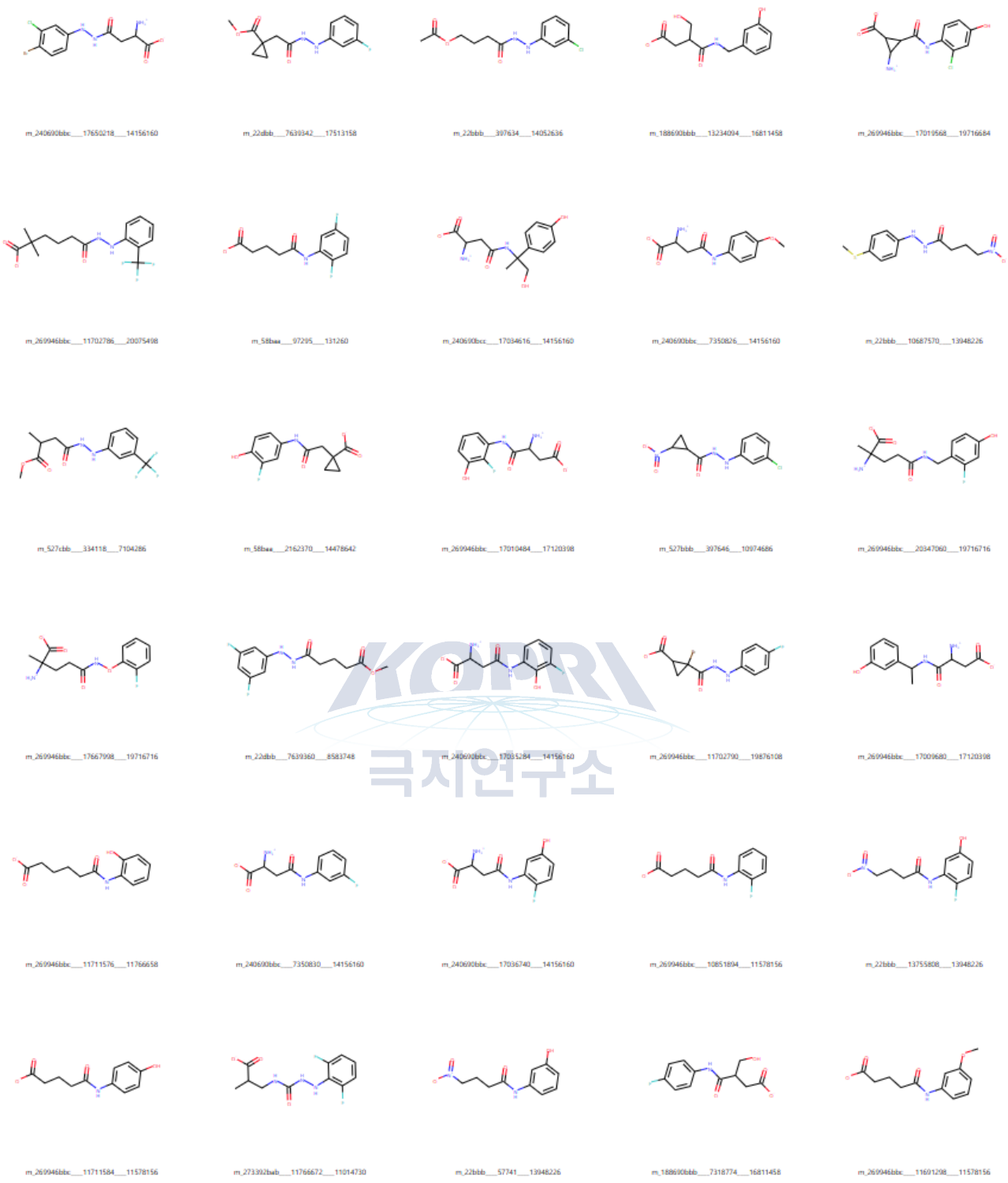


m_22bbb___15139950___13948226

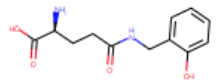


m_240690bbc___8876078___14156160

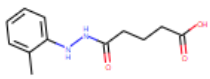
KOPRI
극지연구소



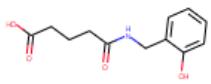
[그림 2-17. AI를 통해 ZINC database에서 검색된 유도체 구조]



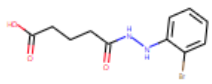
ZINC000083391528



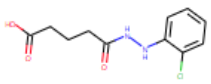
ZINC001600584547



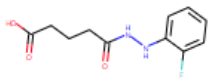
ZINC000169816963



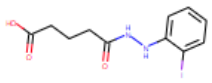
ZINC000004357318



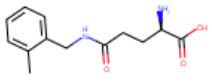
ZINC001608708746



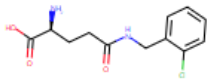
ZINC001595027906



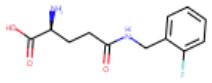
ZINC001595027679



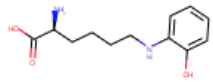
ZINC000203833956



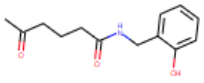
ZINC001866017306



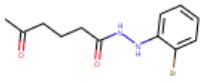
ZINC000083397982



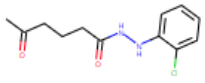
ZINC001999212944



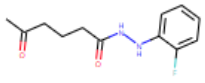
ZINC000274939240



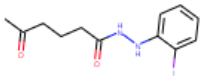
ZINC000185396011



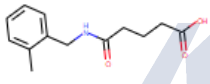
ZINC000275074585



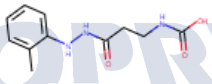
ZINC000274836112



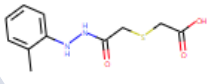
ZINC000882140101



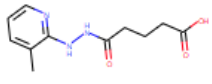
ZINC000035135554



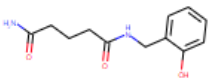
ZINC000738777534



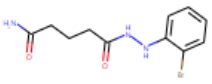
ZINC000740196484



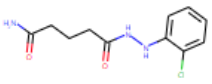
ZINC001594421139



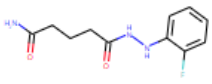
ZINC000279808474



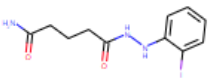
ZINC000279763874



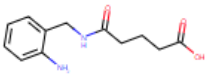
ZINC000279846070



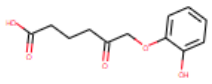
ZINC000279810225



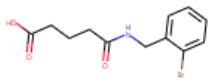
ZINC000882140060



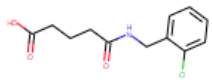
ZINC000169816958



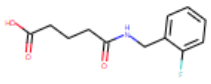
ZINC001951976106



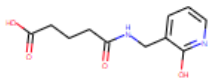
ZINC000042419297



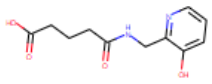
ZINC000009259522



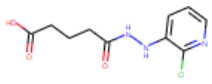
ZINC000033420718



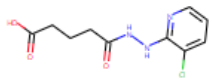
ZINC000714966301



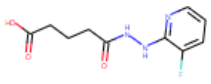
ZINC001601978861



ZINC001601978853

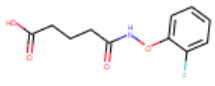


ZINC001595027786

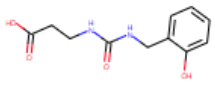


ZINC001601979076

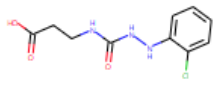
KOPRI
극지연구소



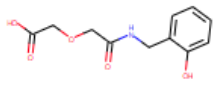
ZINC001601978889



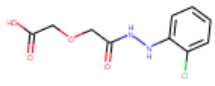
ZINC000258072155



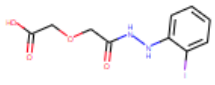
ZINC000819492360



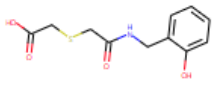
ZINC000169817382



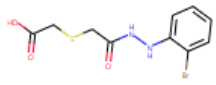
ZINC001595106926



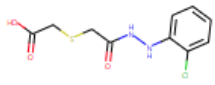
ZINC001602078257



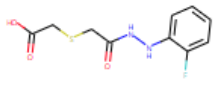
ZINC000228402511



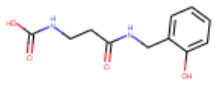
ZINC000821536360



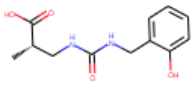
ZINC000821536342



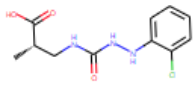
ZINC000821536261



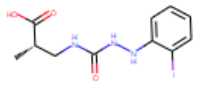
ZINC000739938645



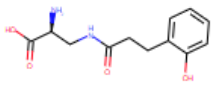
ZINC000848585246



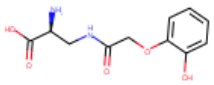
ZINC000848585629



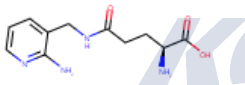
ZINC001589056893



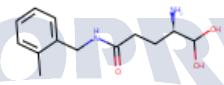
ZINC000701368718



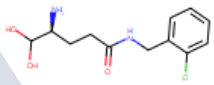
ZINC000700348692



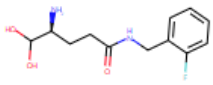
ZINC000083391674



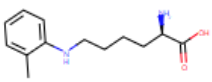
ZINC001865960473



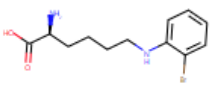
ZINC001865960032



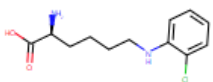
ZINC001865960019



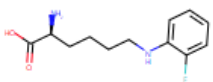
ZINC001999210343



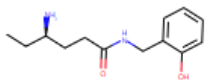
ZINC002021353437



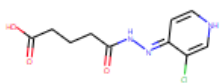
ZINC001999209182



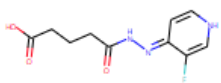
ZINC001999209172



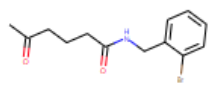
ZINC000391605404



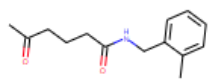
ZINC001610767007



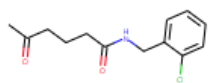
ZINC001595027718



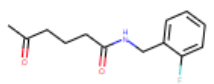
ZINC000194598350



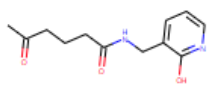
ZINC000177109047



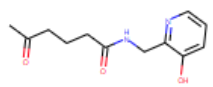
ZINC000176865350



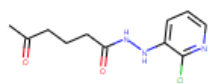
ZINC000194434242



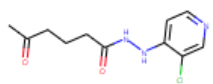
ZINC001261835664



ZINC000352506114

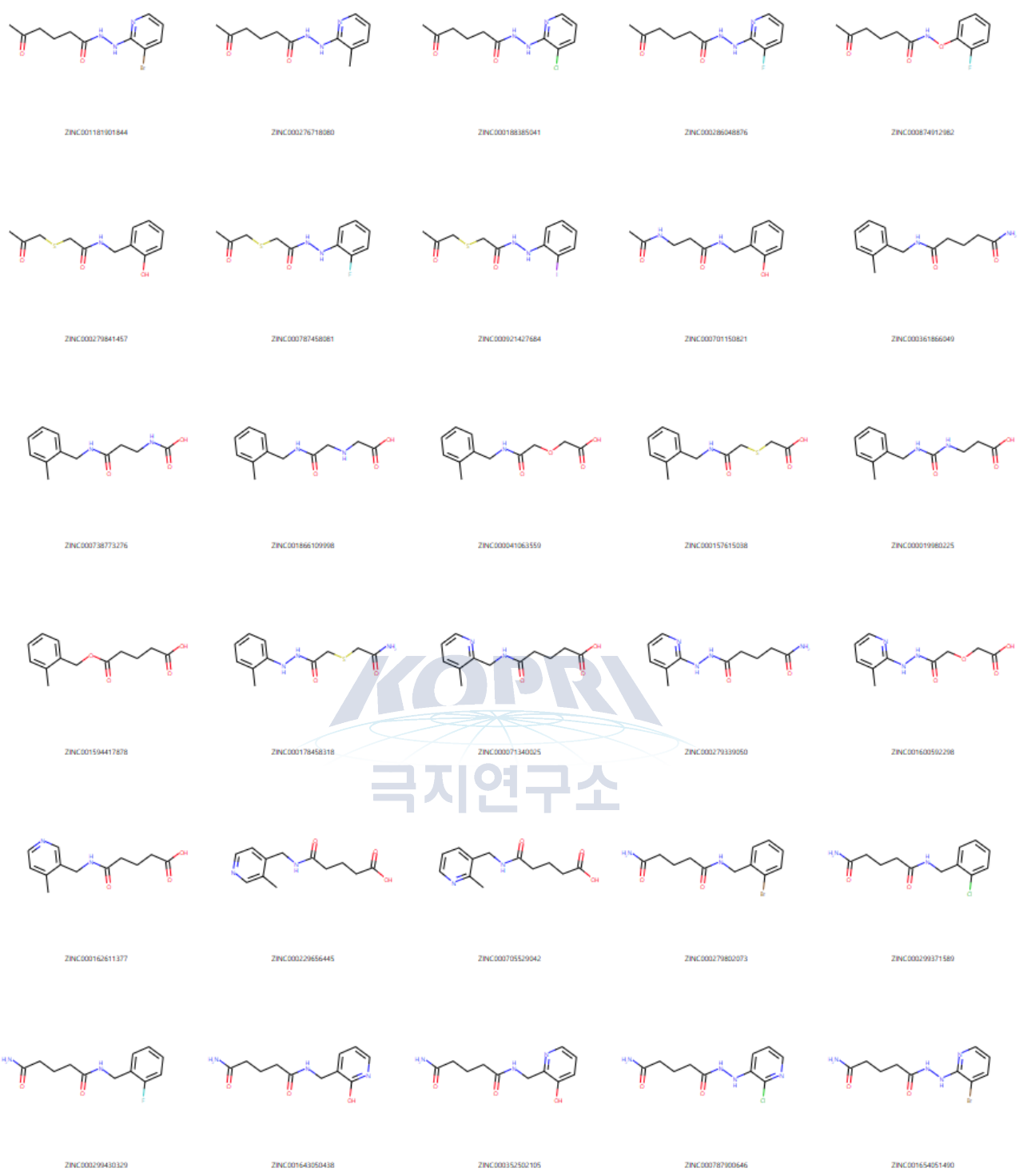


ZINC000188406960



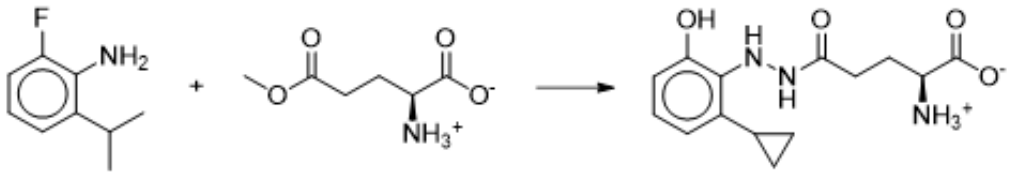
ZINC000125480872

KOPRI
극지연구소

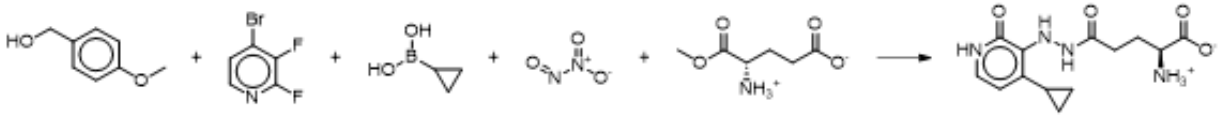


[그림 2-18. AI를 통해 Enamine의 make-on-demand 에서 검색된 유도체 구조]

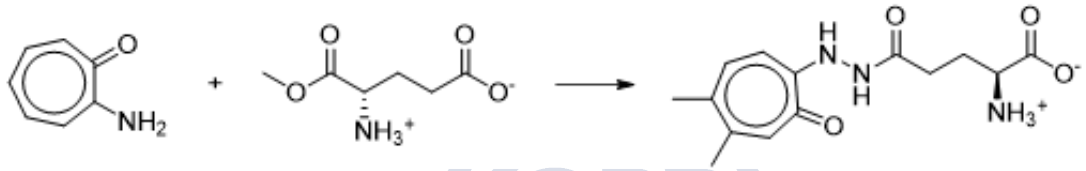
1. Cluster_10_1_2



2. Cluster_10_2_2

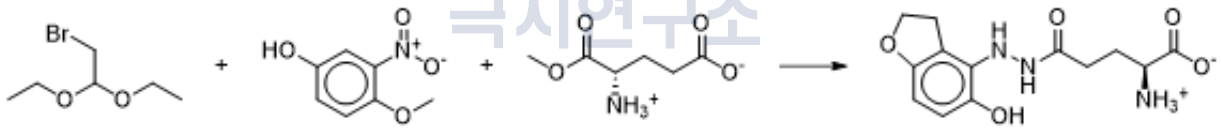


3. Cluster_107_1_1

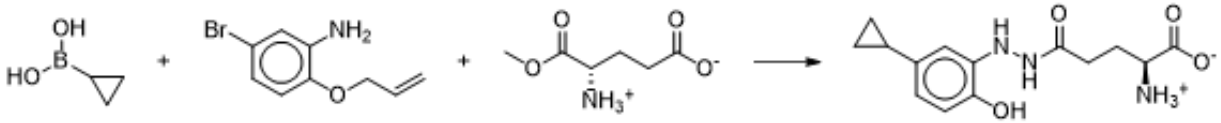


KOPRI
극지연구소

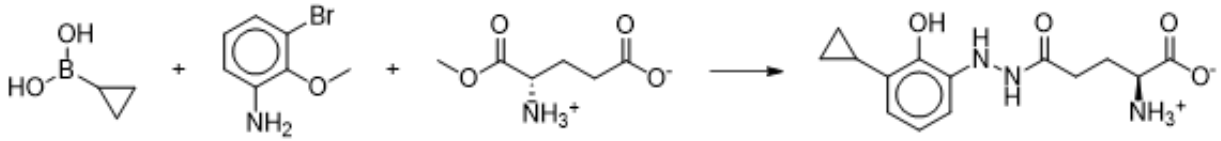
4. Cluster_1_10_13



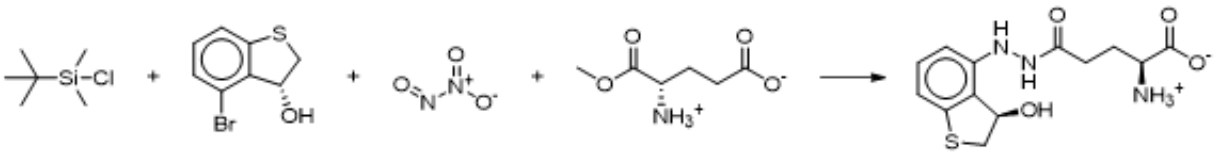
5. Cluster_11_1_9



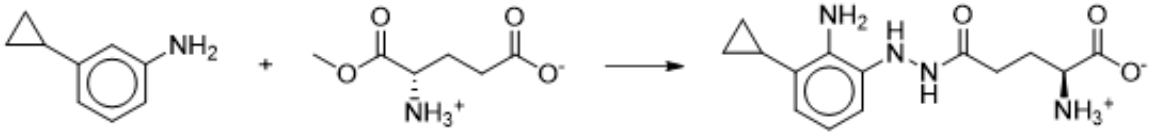
6. Cluster_11_2_9



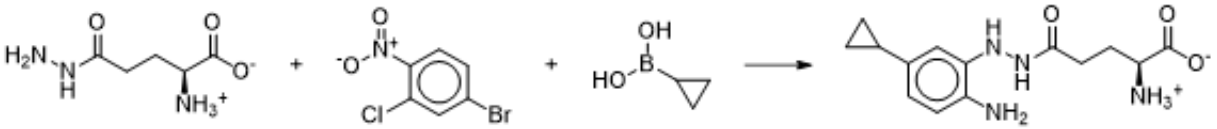
7. Cluster_1_13_13



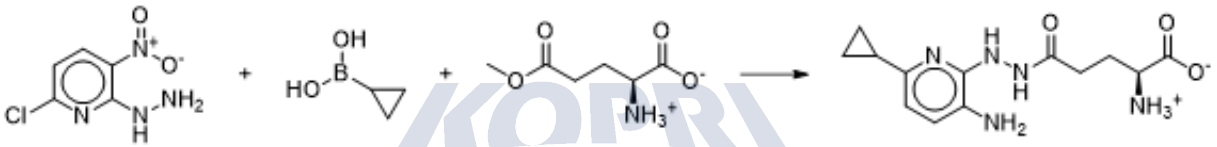
8. Cluster_11_3_9



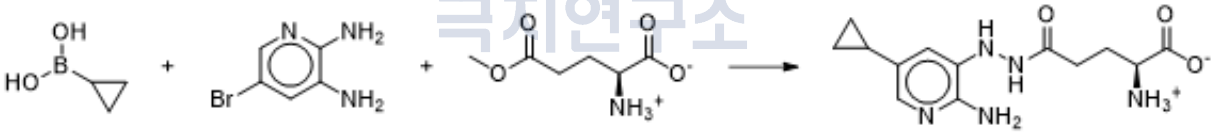
9. Cluster_11_4_9



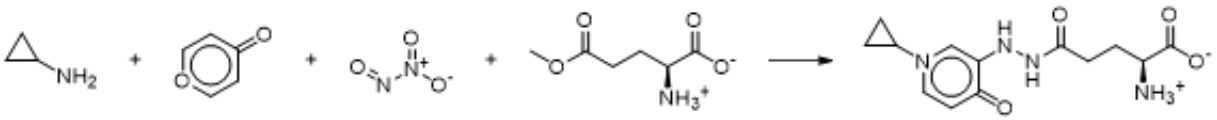
10. Cluster_11_5_9



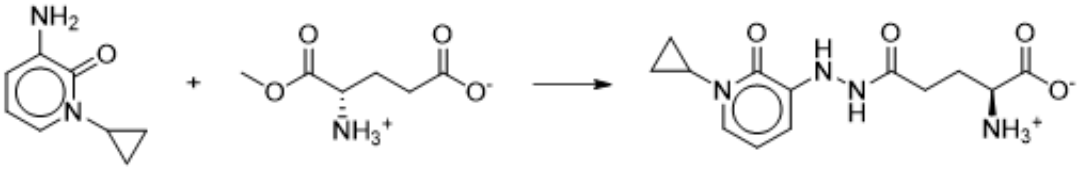
11. Cluster_11_6_9



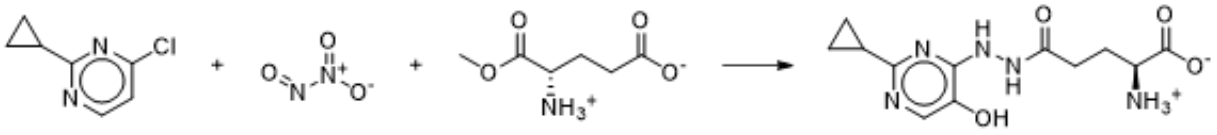
12. Cluster_11_7_9



13. Cluster_11_8_9

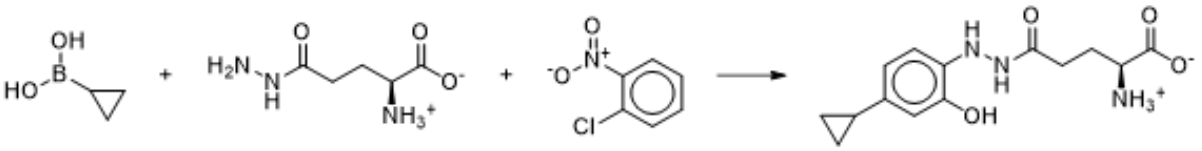


14. Cluster_11_9_9

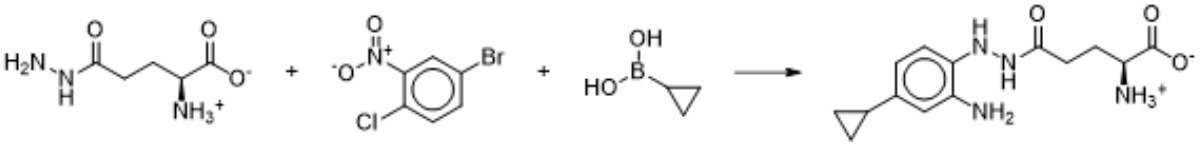


KOPRI 극지연구소

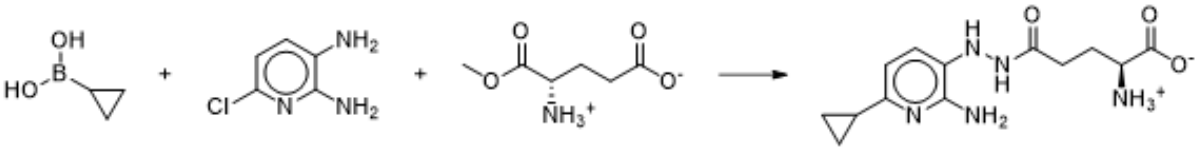
15. Cluster_12_1_4



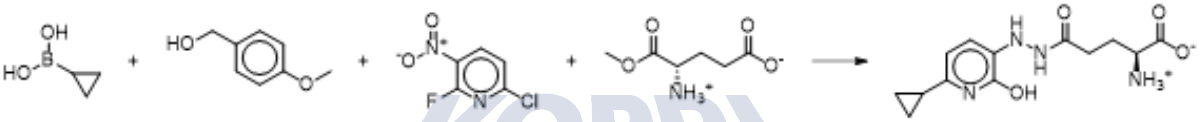
16. Cluster_12_2_4



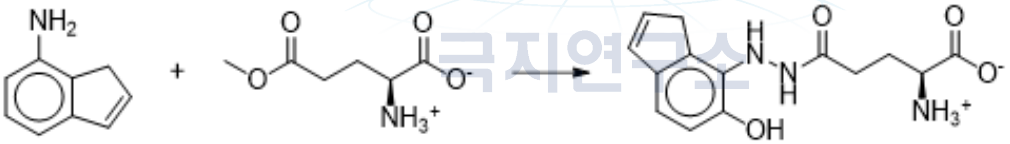
17. Cluster_12_3_4



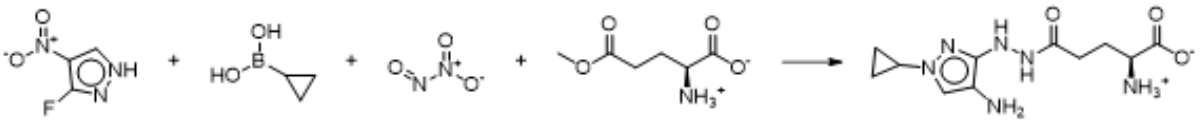
18. Cluster_12_4_4



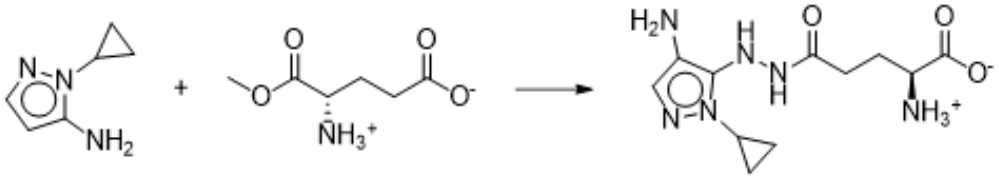
19. Cluster_1_3_13



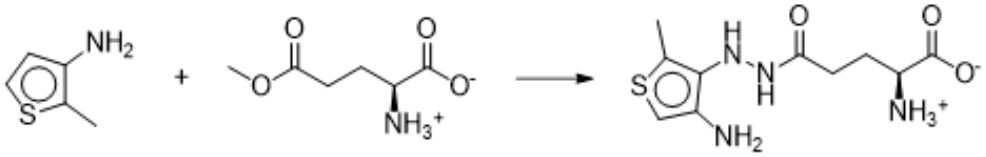
20. Cluster_13_3_3



21. Cluster_14_3_3

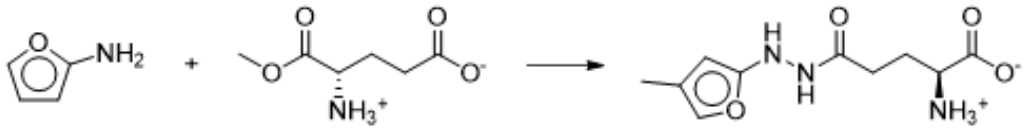


22. Cluster_15_10_137

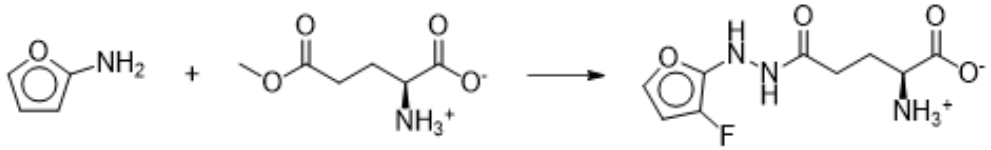


KOPRI 극지연구소

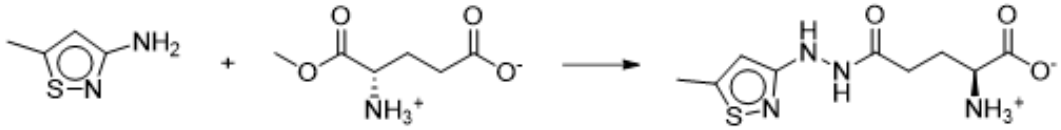
23. Cluster_15_102_137



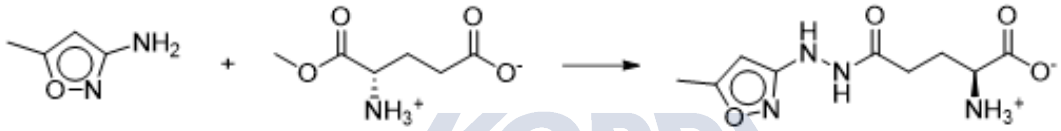
24. Cluster_15_104_137



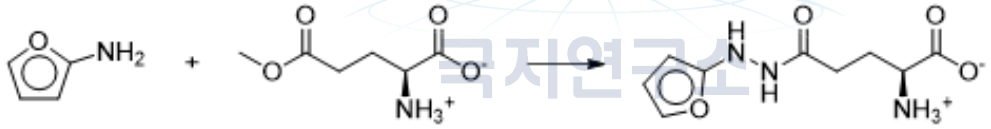
25. Cluster_15_107_137



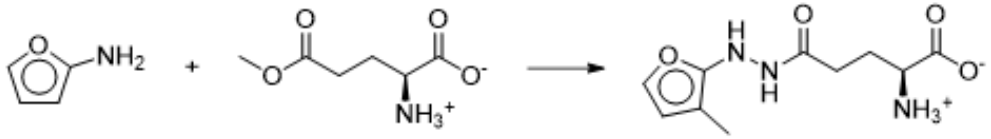
26. Cluster_15_108_137



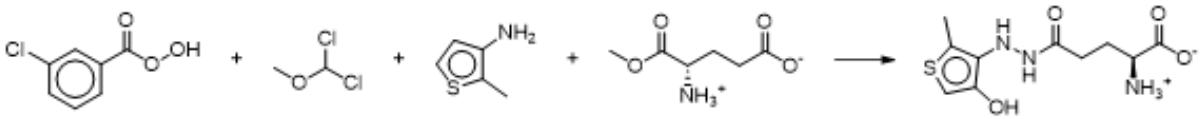
27. Cluster_15_109_137



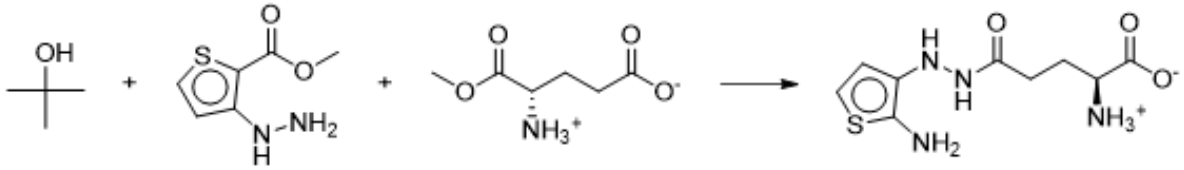
28. Cluster_15_111_137



29. Cluster_15_11_137

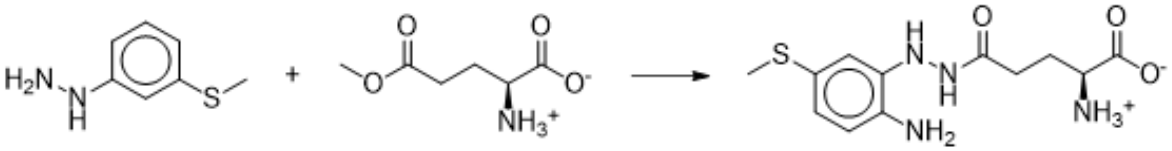


30. Cluster_15_1_137

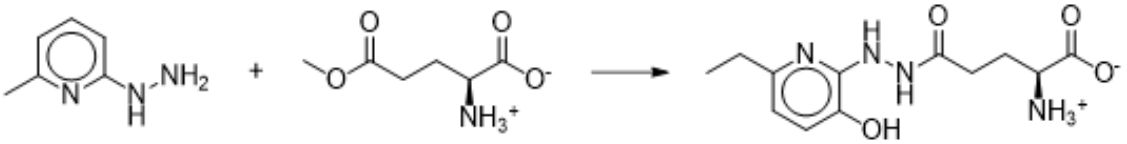


KOPRI 극지연구소

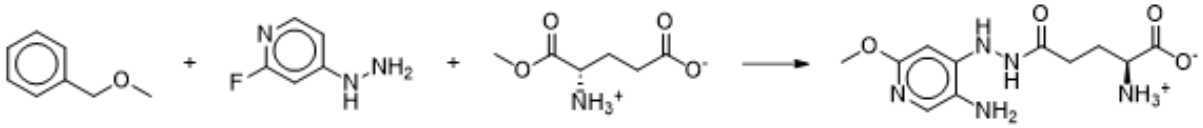
31. Cluster_17_12_126



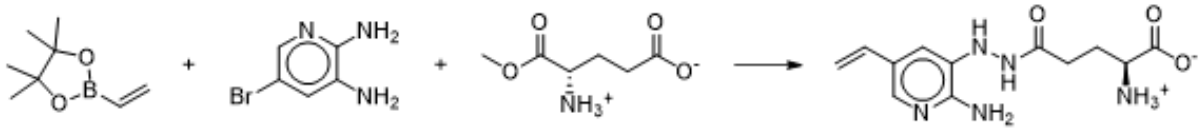
32. Cluster_17_60_126



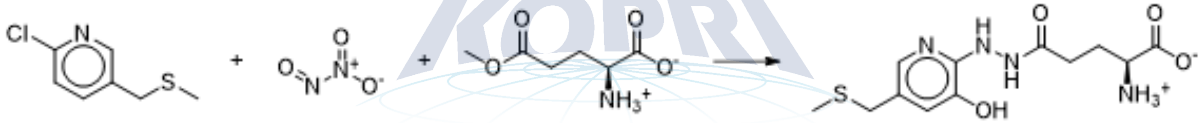
33. Cluster_17_77_126



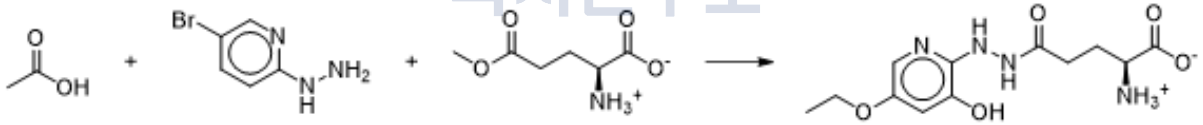
34. Cluster_17_83_126



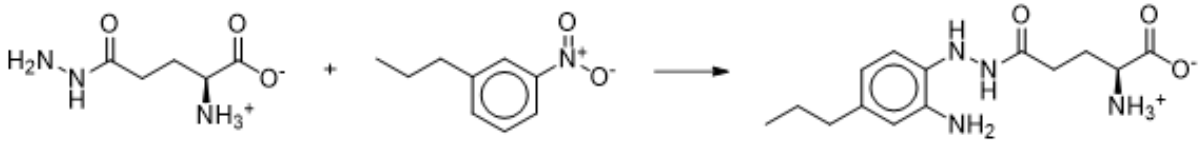
35. Cluster_18_100_148



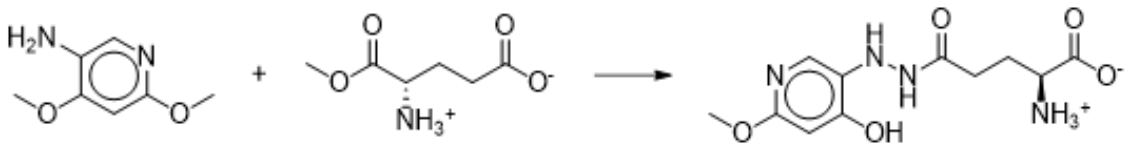
36. Cluster_18_119_148



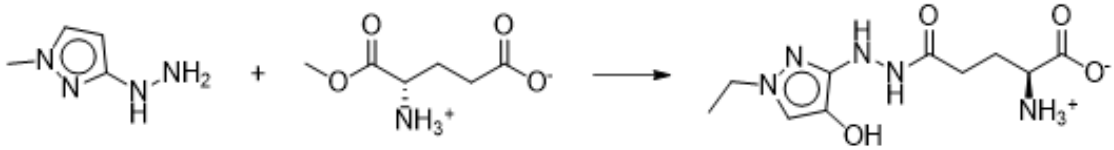
37. Cluster_18_31_148



38. Cluster_18_74_148

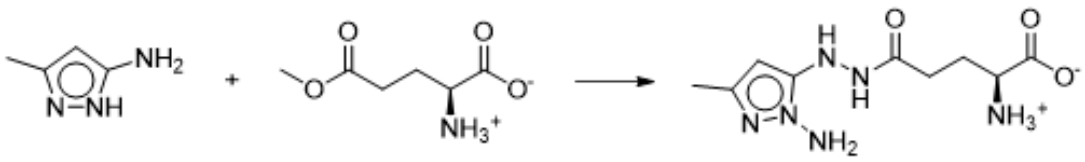


39. Cluster_19_107_226

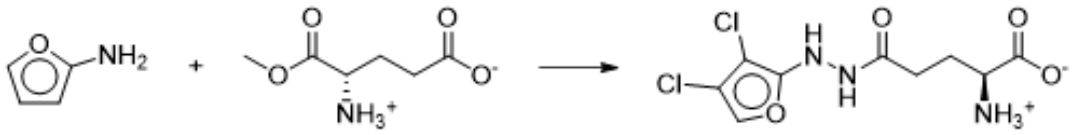


KORRI
극지연구소

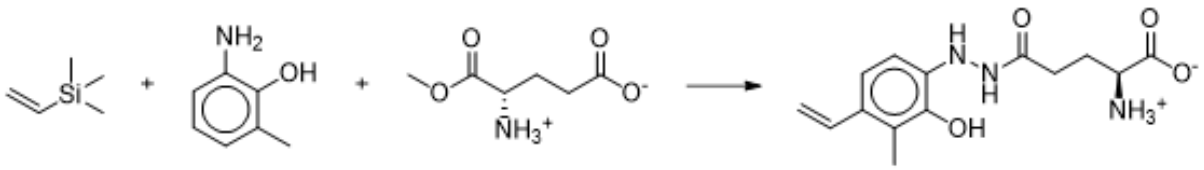
40. Cluster_19_167_226



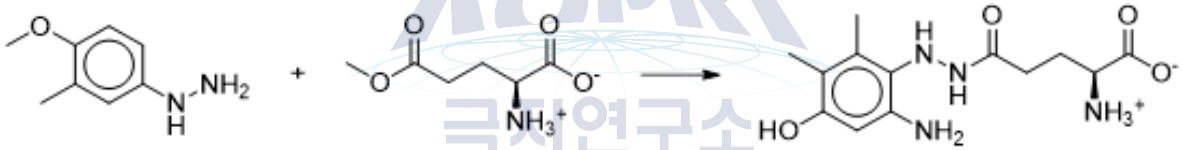
41. Cluster_19_222_226



42. Cluster_21_106_251

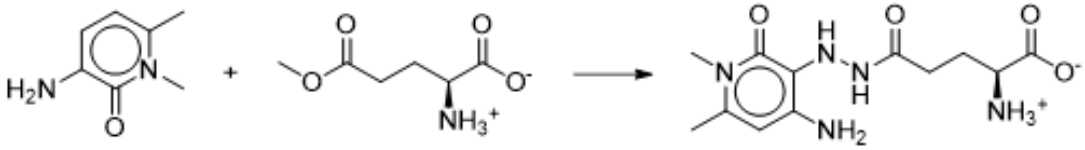


43. Cluster_21_147_251

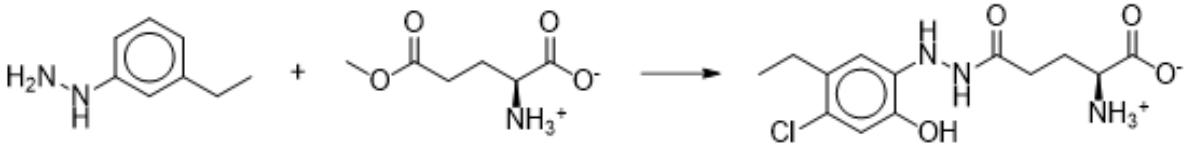


KOPRI
극지연구소

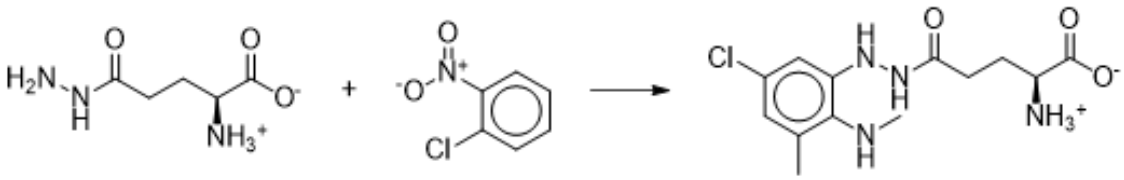
44. Cluster_21_40_251



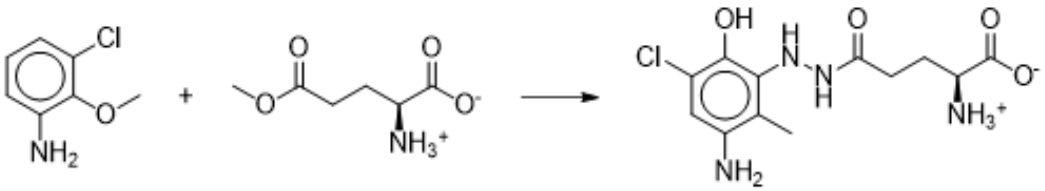
45. Cluster_21_60_251



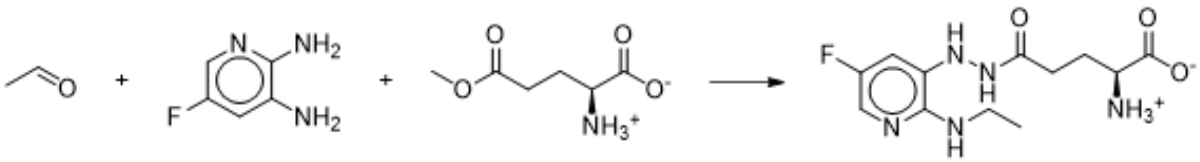
46. Cluster_22_100_271



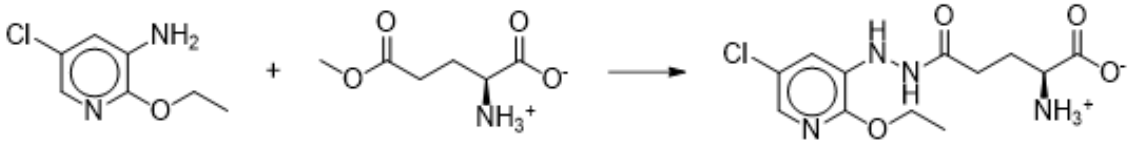
47. Cluster_22_158_271



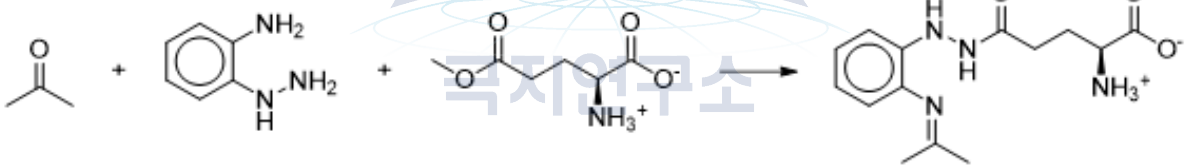
48. Cluster_22_198_271



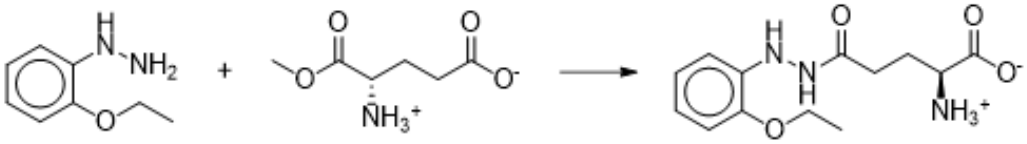
49. Cluster_22_206_271



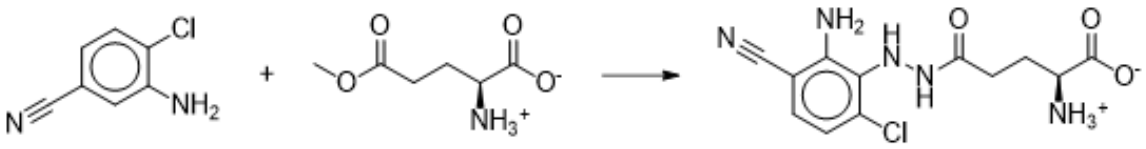
50. Cluster_23_26_49



51. Cluster_23_6_49

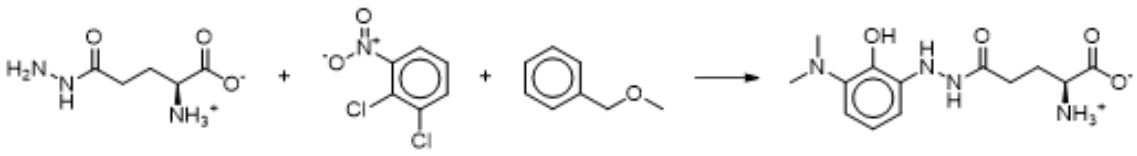


52. Cluster_24_103_318

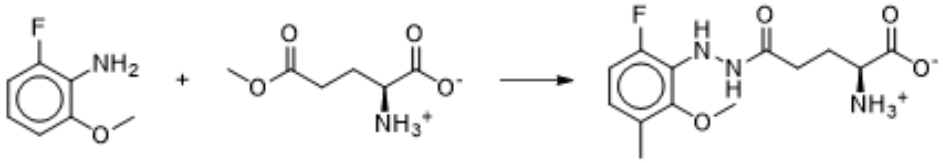


KOPRI 극지연구소

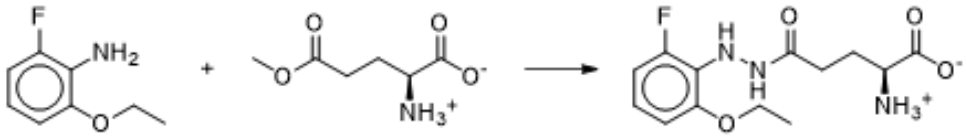
53. Cluster_24_1_318



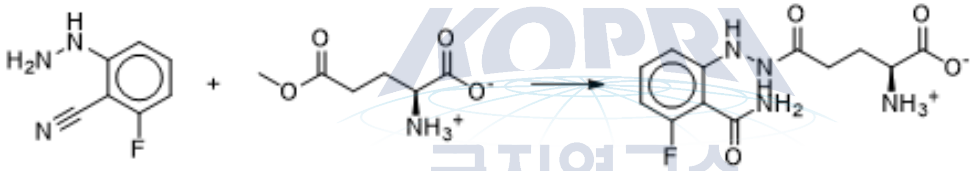
54. Cluster_25_106_346



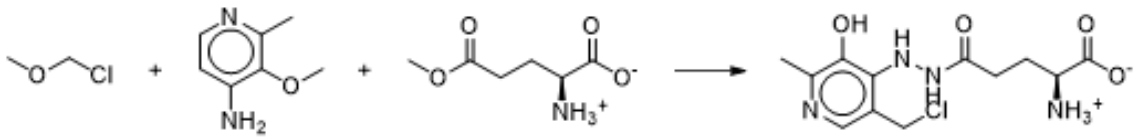
55. Cluster_25_142_346



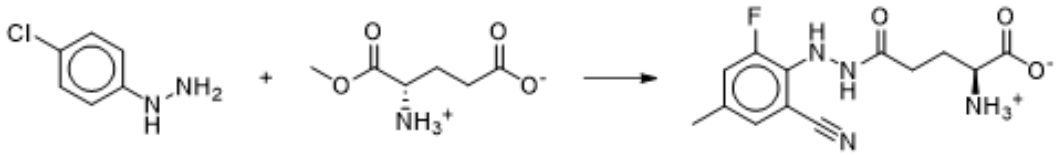
56. Cluster_25_153_346



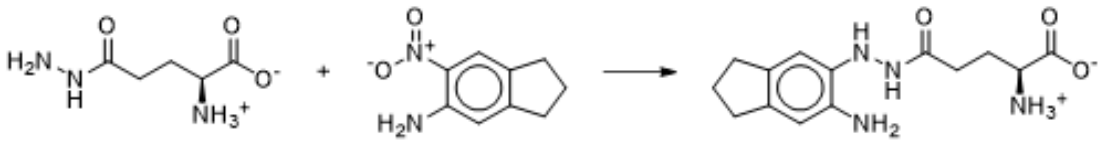
57. Cluster_25_28_346



58. Cluster_25_332_346

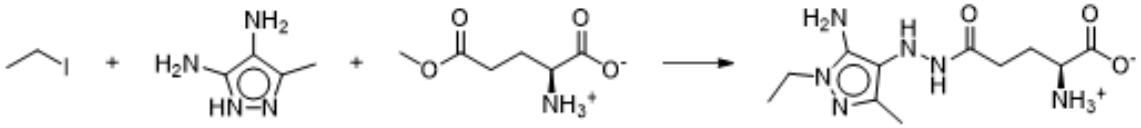


59. Cluster_2_6_24

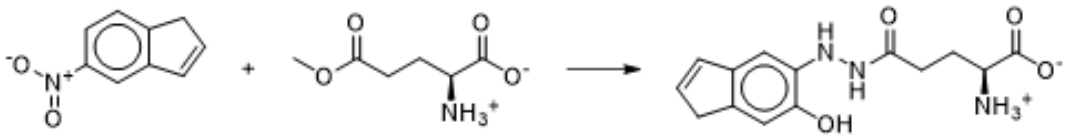


KOPRI 극지연구소

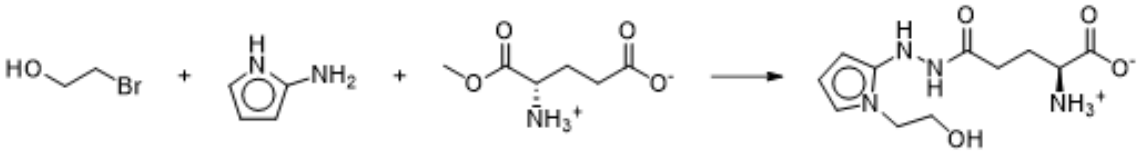
60. Cluster_27_21_65



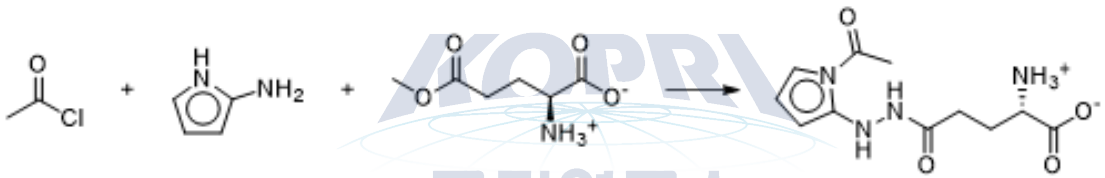
61. Cluster_2_7_24



62. Cluster_28_101_342

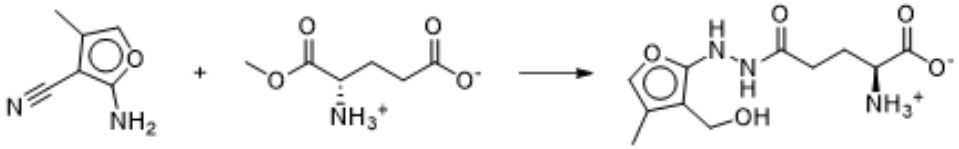


63. Cluster_28_157_342

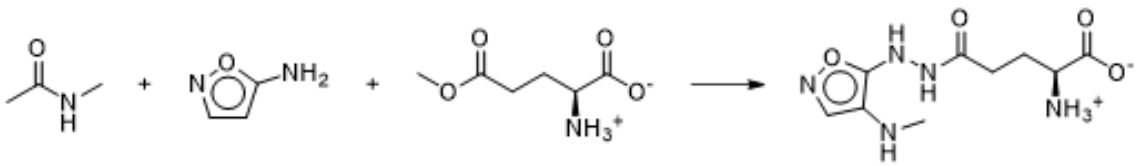


KOPRI
극지연구소

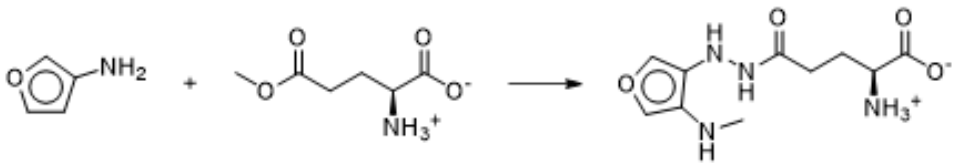
64. Cluster_28_199_342



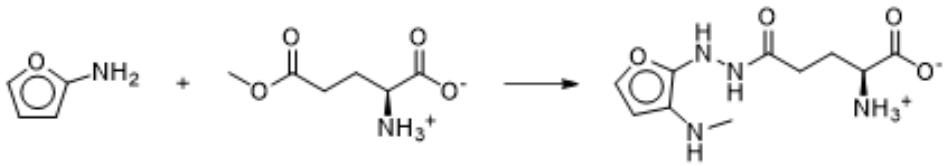
65. Cluster_28_247_342



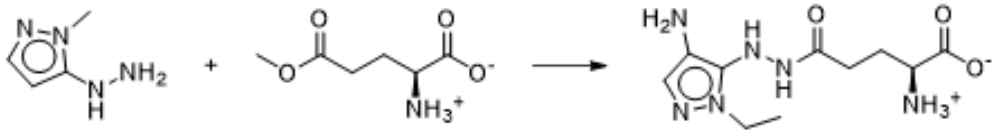
66. Cluster_28_286_342



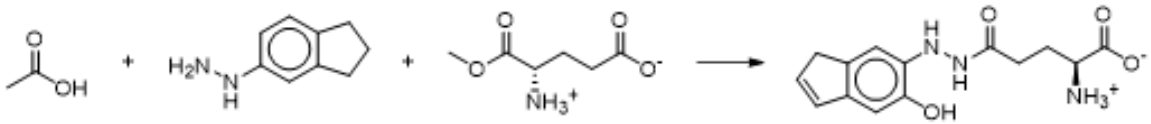
67. Cluster_28_312_342



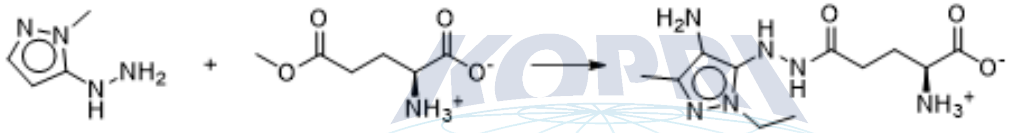
68. Cluster_28_64_342



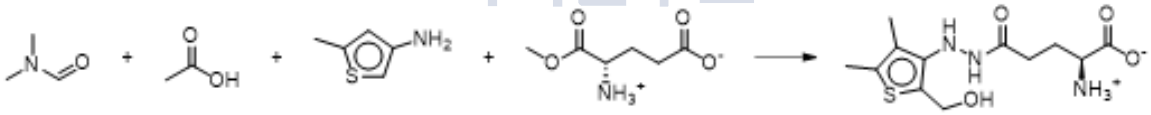
69. Cluster_2_9_24



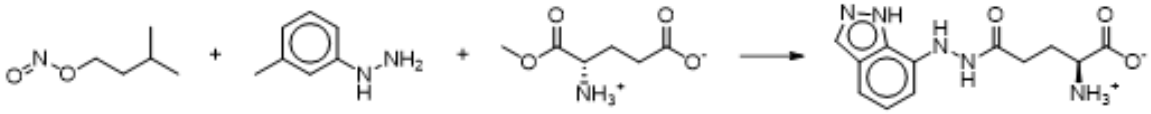
70. Cluster_30_15_53



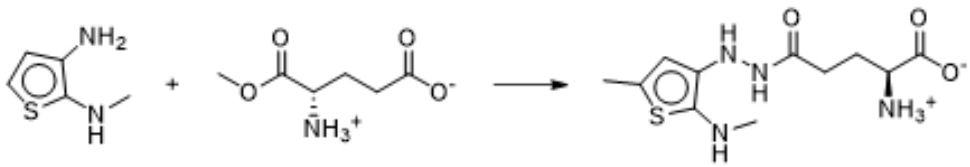
71. Cluster_30_9_53



72. Cluster_3_24_25

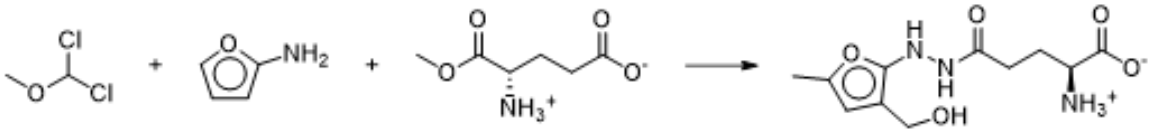


73. Cluster_37_2_110

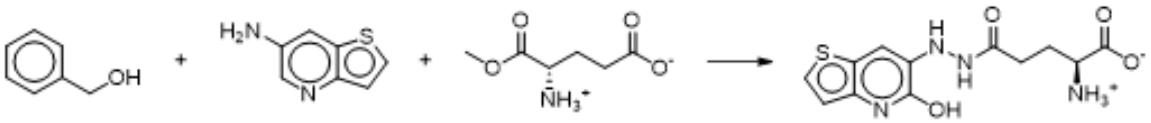


KOPRI
극지연구소

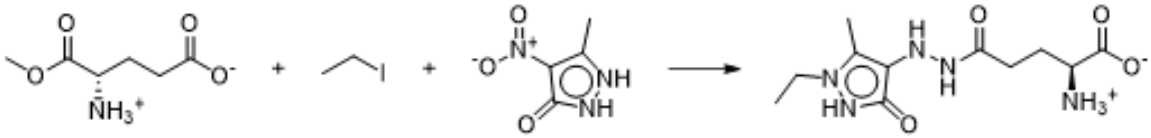
74. Cluster_37_80_110



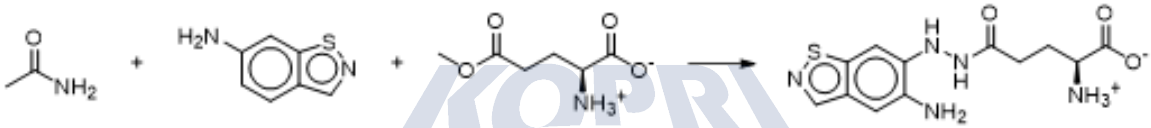
75. Cluster_4_14_52



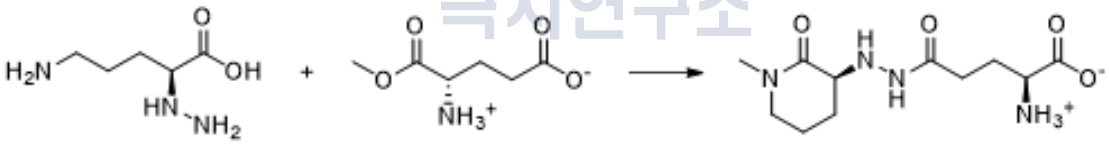
76. Cluster_44_13_40



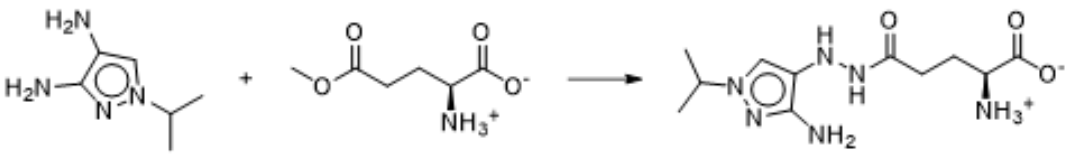
77. Cluster_4_43_52



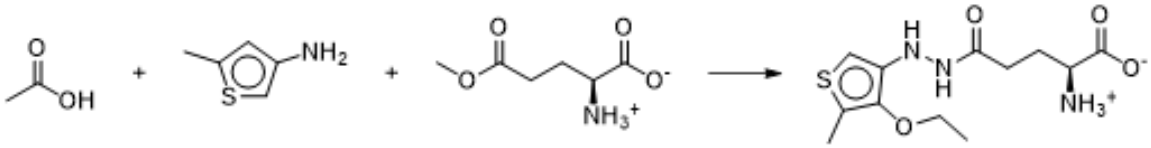
78. Cluster_46_5_385



79. Cluster_47_11_25

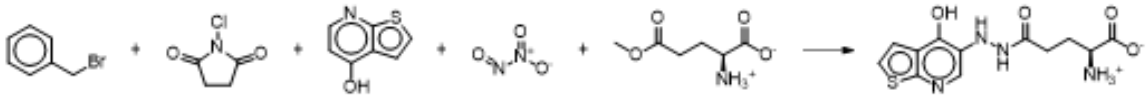


80. Cluster_48_15_68

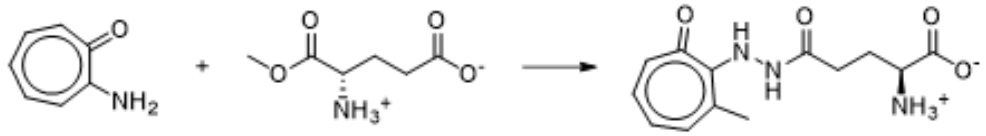


KOPRI 극지연구소

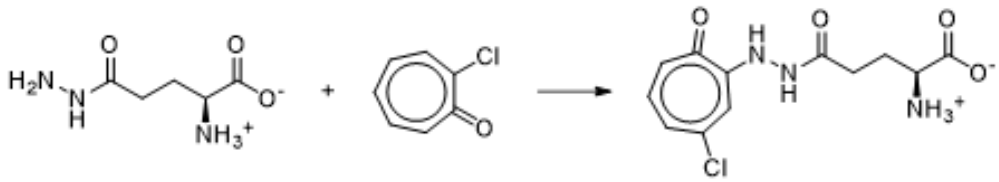
81. Cluster_4_9_52



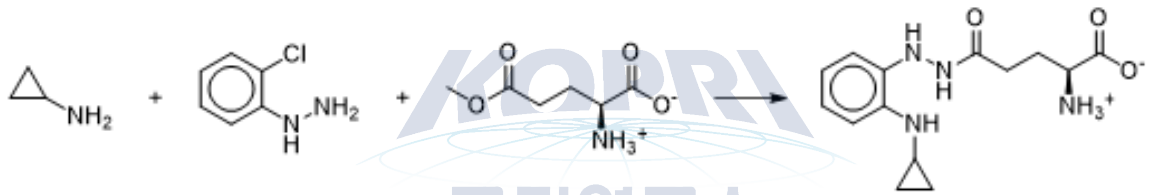
82. Cluster_59_14_18



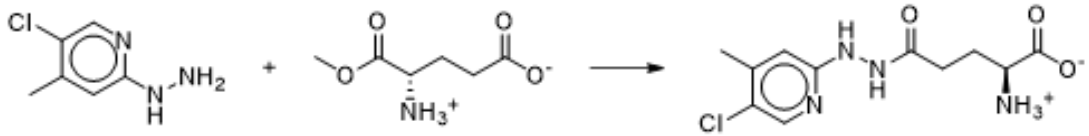
83. Cluster_63_4_11



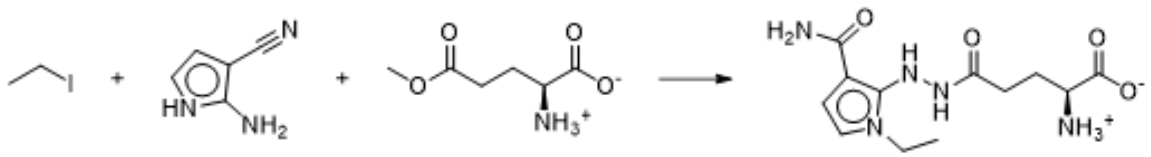
84. Cluster_76_2_2



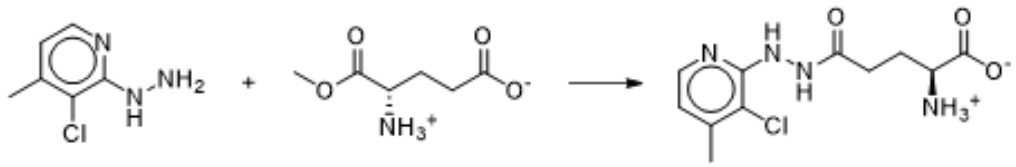
85. Cluster_81_8_10



86. Cluster_87_1_6

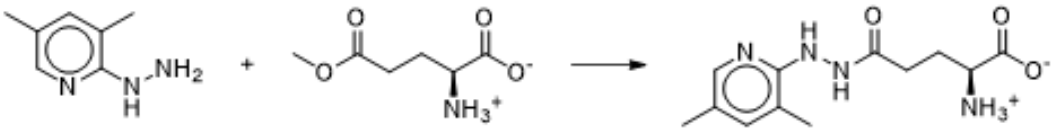


87. Cquery_1025_1156

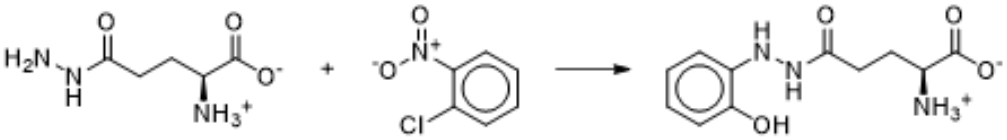


KOPRI 극지연구소

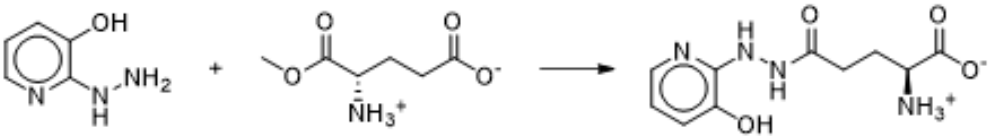
88. Cquery_1076_1156



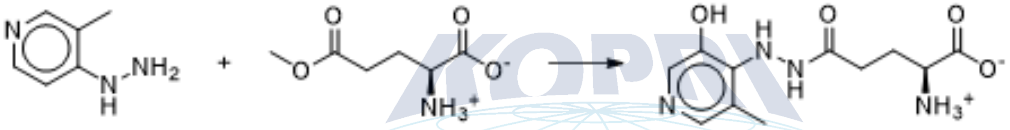
89. Cquery_1_1156



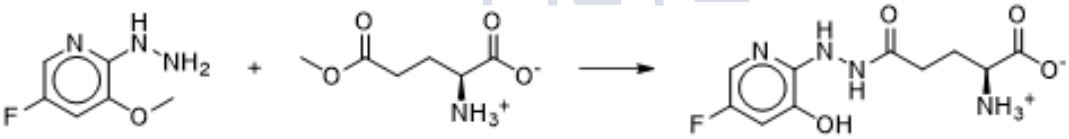
90. Cquery_119_1156



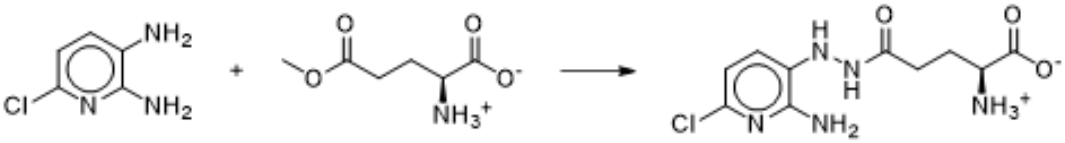
91. Cquery_133_1156



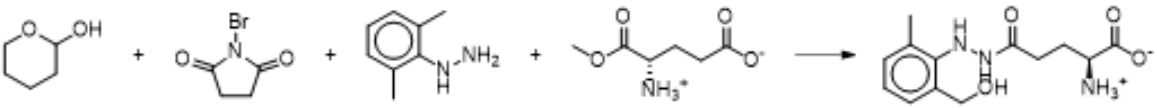
92. Cquery_151_1156



93. Cquery_195_1156

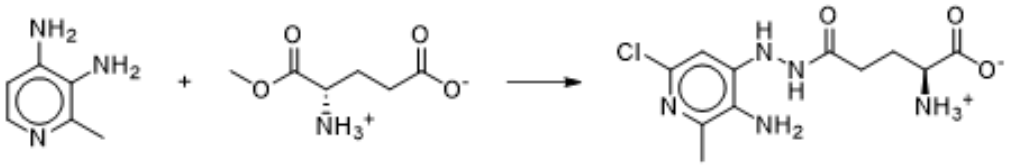


94. Cquery_220_1156

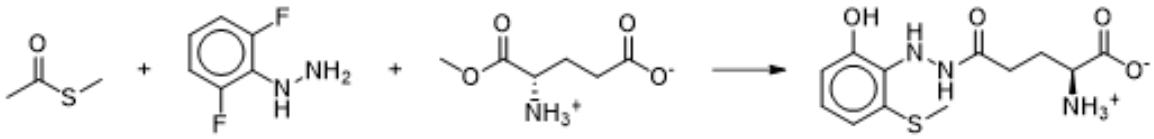


KOPRI 극지연구소

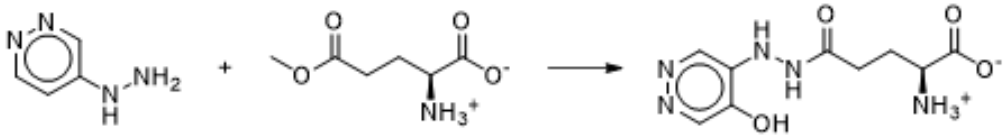
95. Cquery_268_1156



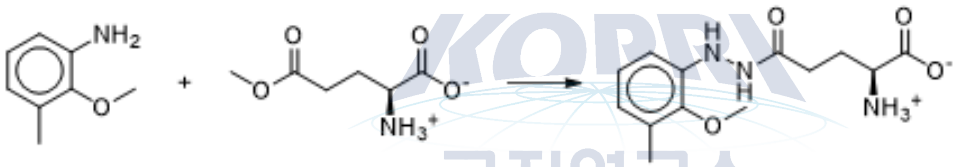
96. Cquery_311_1156



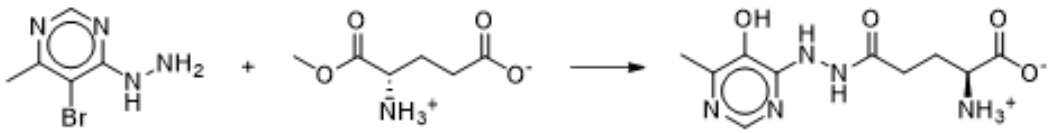
97. Cquery_323_1156



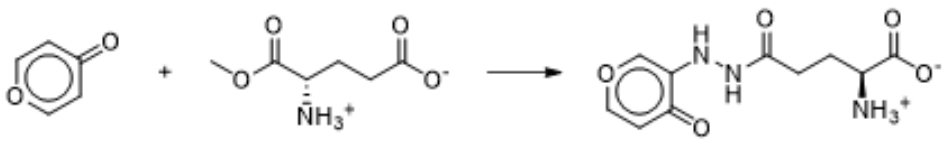
98. Cquery_356_1156



99. Cquery_410_1156



100. Cquery_498_1156

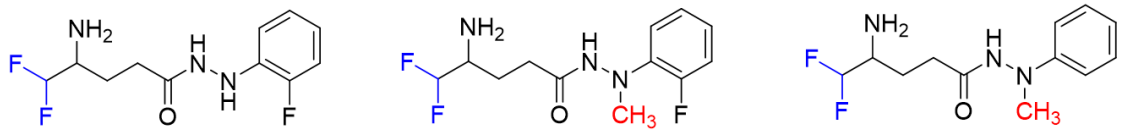


KORRI 극지연구소

[그림 2-19. AI가 제시한 신규 라말린 유도체 합성방법 예시]

아. Diflouro pentanoic acid 형태 유도체 합성계획

- 라말린의 기본 골격인 Glutamic acid를 대체한 Difluoro pentanoic acid 형태로 변경된 유도체 합성계획으로 극성이 조절되어 BBB 통과에 유리할 것으로 예측됨
- 생체 내 표적 예측을 통해 설계된 라말린 유도체 골격 구조 도입
- 1차 활성 스크리닝 도중 우수한 활성을 보인 RA-PR058의 구조를 기반으로 설계된 유도체로 RA-058- 로 명명됨



RA-PR058
Molecular Weight: 261.25

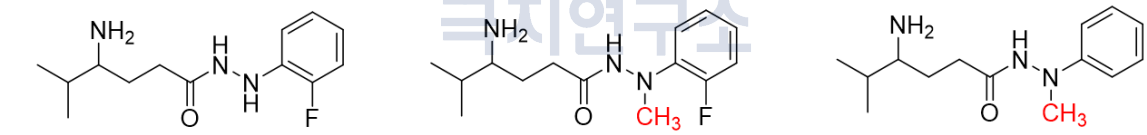
RA-PR058-HM
Molecular Weight: 275.28

RA-058-HM
Molecular Weight: 257.28

[그림 2-20. Diflouro pentanoic acid 기본골격의 신규 라말린 유도체 예시]

자. Isopropyl기가 도왑된 형태의 유도체 합성계획

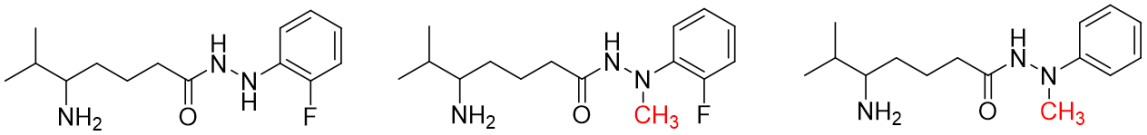
- Glutamic acid의 carboxylic acid를 알킬기로 도체시켜 BBB 통과에 유리한 구조로 변경
- 생체 내 표적 예측을 통해 설계된 라말린 유도체 기본 골격 구조 도입
- RA-PR070, RA-PR076 유도체 구조를 기반으로 하여 RA-070, RA-076으로 명명함



RA-PR070
Molecular Weight: 253.32

RA-PR070-HM
Molecular Weight: 267.35

RA-070-HM
Molecular Weight: 249.36



RA-PR076
Molecular Weight: 267.35

RA-PR076-HM
Molecular Weight: 281.38

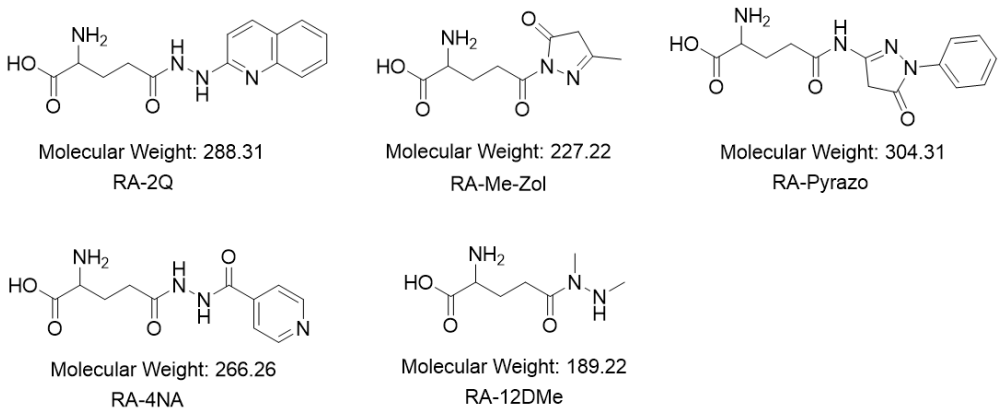
RA-076-HM
Molecular Weight: 263.39

[그림 2-21. 기본골격에 Isopropyl기가 도입된 유도체 예시]

차. 추가 작용기를 가지는 라말린 유도체 합성

- 벤젠고리 이외의 적용 가능성이 있는 유도체 구조를 디자인 하여 안정성 및 독성의 변화 여부를 관찰하기위해 구조를 디자인하여 합성 시도

- 벤젠고리를 quinoline으로 변형, 하이드라진을 고리 안으로 포함, nicotinic amide 도입 또는 메틸기로 하이들라진을 보호화 하는 등의 합성 전략 수립



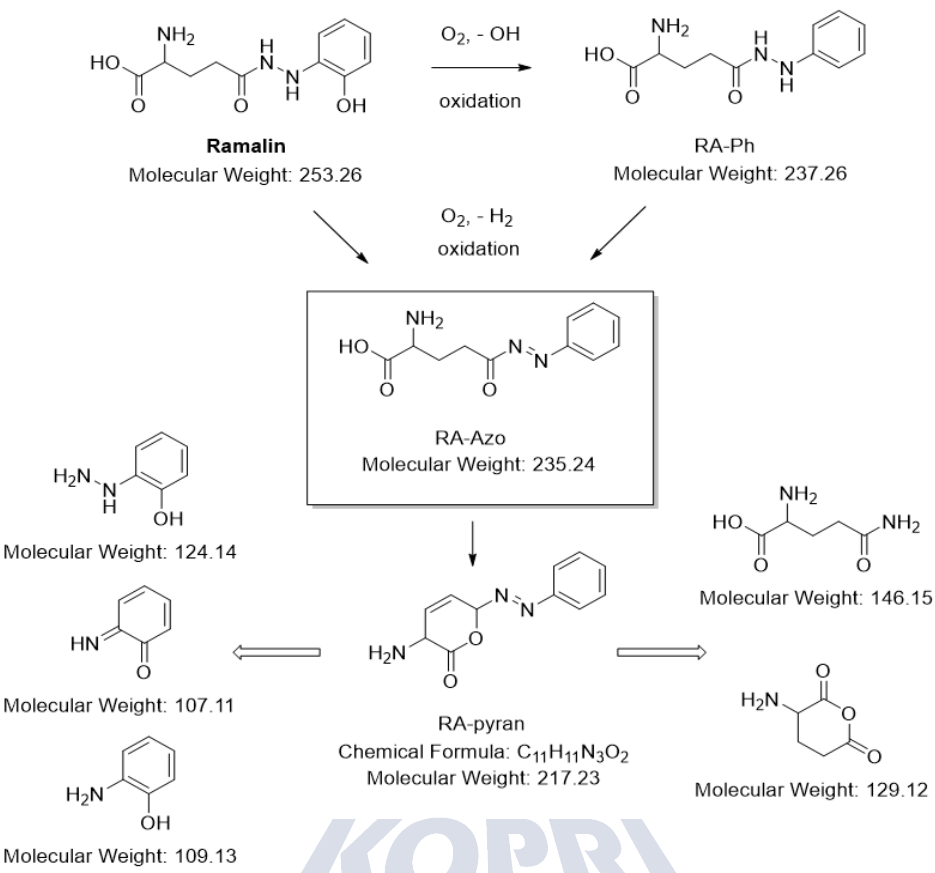
[그림 2-22. 신규 작용기가 도입된 라말린 유도체 합성 예시]

카. 라말린 분해산물 연구를 통한 활성분자 확인

- 라말린은 불안정한 물질이나 다양한 활성을 가지는 점을 감안하여 라말린이 분해경로를 예측하여 분해된 물질들의 활성을 확인하기 위한 합성 전략

- 라말린의 분해경로를 보면 우선 산소에 의한 산화로 하이드록실기가 이탈된 RA-Ph 또는 RA-Azo로 분해됨 확인. RA-Azo는 라말린에서 바로 산화되어 생성되기도 하지만 RA-Ph에서 한번 더 산화되면 RA-Azo로 변형됨

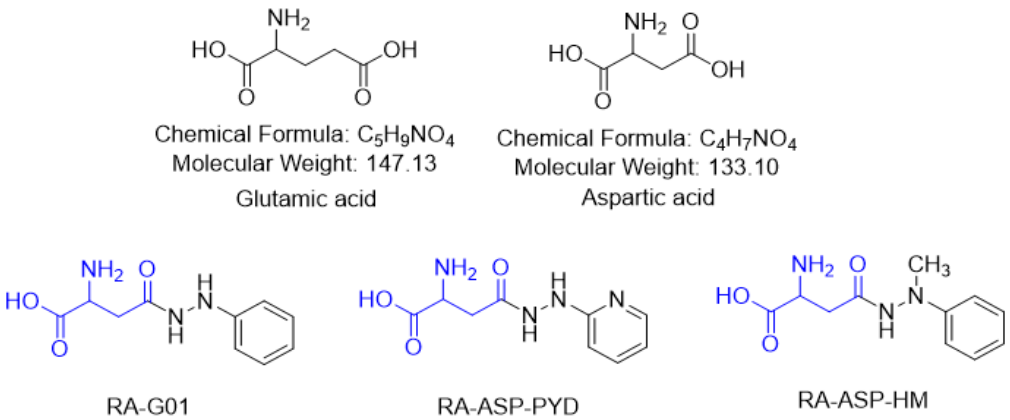
- 라말린 분해경로를 메스 분석값을 이용하여 예측한 결과 라말린의 페닐기의 2번 위치 OH기의 이탈로 물분자가 제거되고 azo형태로 변환됨. 이후 추가 분해과정을 거쳐 분자량 약 129를 가지는 분해산물로 변화됨. 분해도중 생성되는 하이드라진으로 인한 독성이 예상됨



[그림 2-23. 라말린의 분해경로 예측 모델]

타. Aspartic acid를 출발물질로 하는 유도체 합성

- Glutamic acid의 탄소 길이보다 하나 작은 아미노산인 Aspartic acid를 기본 구조로 하는 유도체 합성 계획. 분자량이 작아 BBB 통과에 유리할 것으로 예측되며 하이드라진을 포함하여 Glutamic acid와 비슷한 효과를 보일 것으로 예상됨

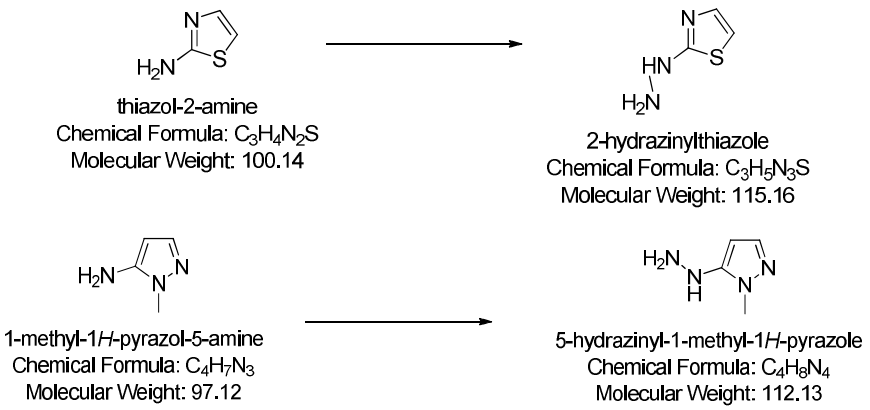


[그림 2-24. Aspartic acid를 기본 구조로 적용한 라말린 유도체 예시]

파. 다양한 형태의 유도체 확보를 위한 하이드라진 합성 계획

- 작용기의 효과를 확인 하기 위해 다양한 형태의 하이드라진 그룹을 합성하여 커플링 반응으로 연결하고 활성 확인 목적

- Thizole, pyrazole, tetrazole aniline, oxadiazole, benzothiazole, multifunction phenyl, methylsulfonyl, benzofuran, isoxazole 형태의 하이드라진을 합성을 계획함



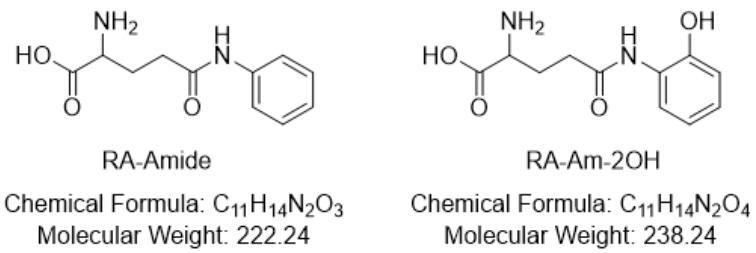
[그림 2-25. 신규 라말린 유도체 합성을 위한 신규 하이드라진 합성 계획 예시]

2) 합성된 라말린 유도체 유도체 구조

가. Amide 또는 Aniline이 연결된 라말린 유도체

- HDAC6 억제에 유리한 구조로 예상되는 Amide나 Aniline 형태의 유도체 합성 계획대로 예비 실험을 위해 합성을 진행함

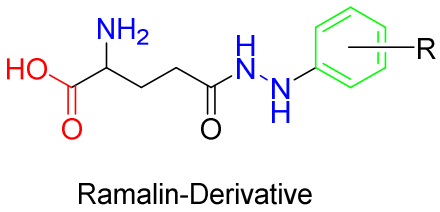
- 합성된 Amide 유도체의 예비 활성을 확인 한 결과 항산화 효능인 DPPH가 낮아짐 확인. Hydrazine의 유무에 따른 결과로 확인되며 라말린의 pharmacopore인 Hydrazine이 유지된 유도체의 합성이 필요하다 판단하여 Amide 또는 Aniline 형태의 유도체 합성 계획은 변경됨. 이 후 라말린의 기본 pharmacopore인 Carboxyl acid, Hydrazine, Phenyl기가 유지된 형태의 유도체 합성 계획으로 수정하여 유도체 합성 수행



[그림 2-26. 합성된 Amide 형태 유도체]

나. 라말린 구조 기반 유도체 합성

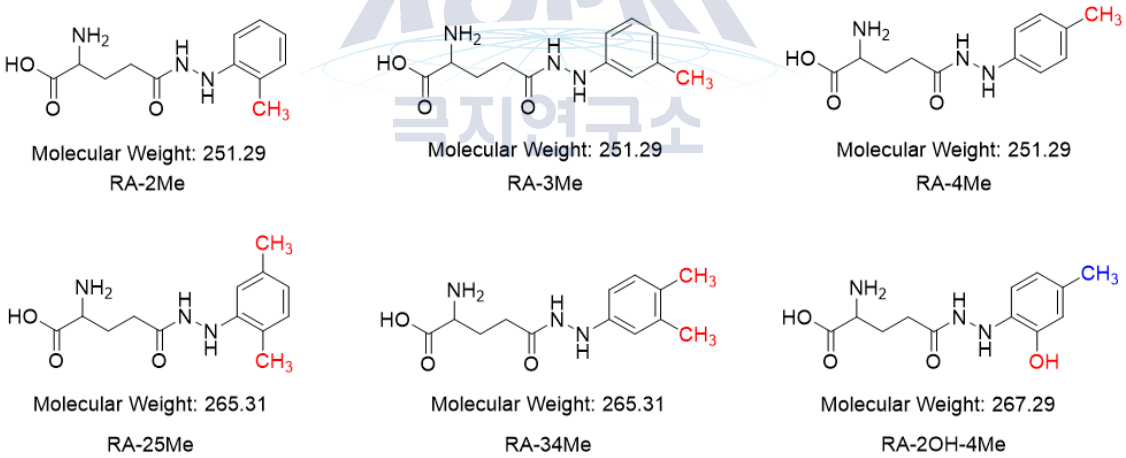
- L-Glutamic acid와 연결된 hydrazine 작용기는 유지하면서 aromatic의 작용기를 변형하며 유도체를 합성. 항산화 효과, HDAC6 억제활성, BACE-1 억제활성, Tau 억제활성, 항염증 효과, BBB 투과 가능성등의 활성을 확인
- Aromitic part의 작용기를 OH기 대신에 methyl, methoxyl, chloro, flouoro, amino, trifluoromethyl, methyl sulfonyl 기 등으로 변경하거나 작용기 위치 변경을 통해 다양한 유도체 합성 구상



Ramalin-Derivative

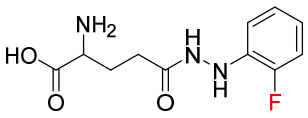
[그림 2-27. 라말린 구조 기반 유도체 기본 구조]

- Methyl version (5 analogues)



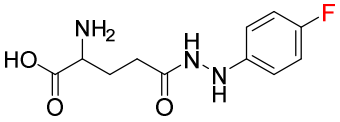
[그림 2-28. Methyl 작용기가 부착된 라말린 유도체들의 구조]

- Fluoride version (5 analogues)



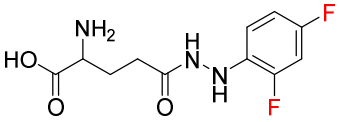
Molecular Weight: 255.25

RA-2F



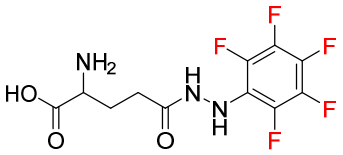
Molecular Weight: 255.25

RA-4F



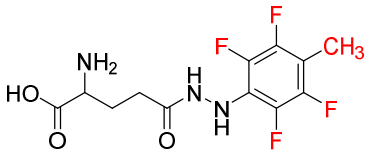
Molecular Weight: 273.24

RA-24F



Molecular Weight: 327.21

RA-PF

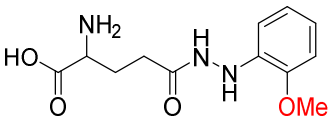


Molecular Weight: 323.25

RA-HFT

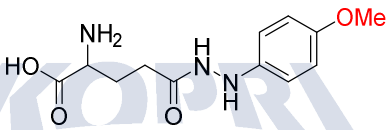
[그림 2-29. Fluoride 작용기가 부착된 라말린 유도체들의 구조]

- Methoxy & fluoro methyl version (5 analogues)



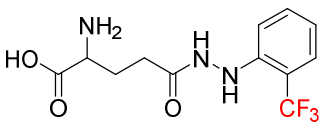
Molecular Weight: 267.29

RA-2OMe



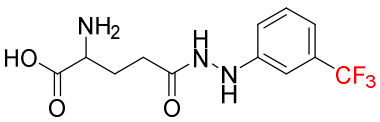
Molecular Weight: 267.29

RA-4OMe



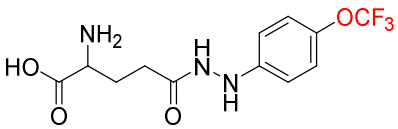
Molecular Weight: 305.26

RA-2CF3



Molecular Weight: 305.26

RA-3CF3

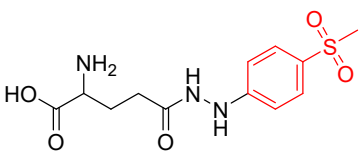


Molecular Weight: 321.26

RA-4OCF3

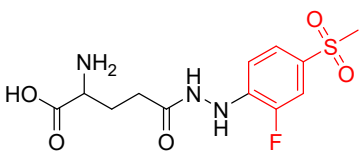
[그림 2-30. Methoxy 및 fluoro methyl 작용기가 부착된 라말린 유도체들의 구조]

- Methyl sulfonyl version (2 analogues)



Molecular Weight: 315.34

RA-12A



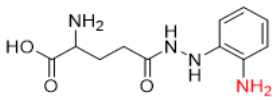
Molecular Weight: 333.33

RA-12B

[그림 2-31. Methyl sulfonyl기가 부착된 라말린 유도체들의 구조]

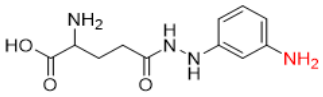
KOPRI 극지연구소

- Amino version (4 analogues)



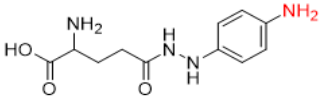
Molecular Weight: 252.27

RA-2N



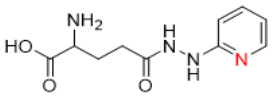
Molecular Weight: 252.27

RA-3N



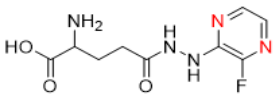
Molecular Weight: 252.27

RA-4N



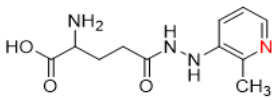
Molecular Weight: 238.25

RA-PYD



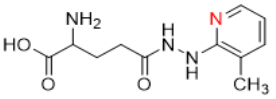
Molecular Weight: 257.23

RA-PR048



Molecular Weight: 252.27

RA-PR049

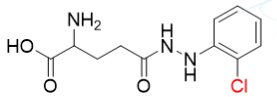


Molecular Weight: 252.27

RA-PR050

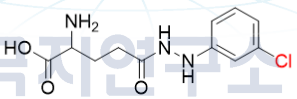
[그림 2-32. Amine 또는 Pyridine이 부착된 라말린 유도체들의 구조]

- Chloride version (10 analogues)



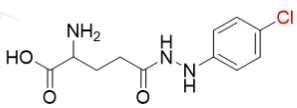
Molecular Weight: 271.70

RA-2Cl



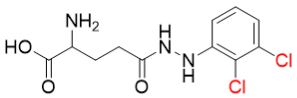
Molecular Weight: 271.70

RA-3Cl



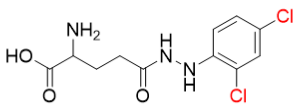
Molecular Weight: 271.70

RA-4Cl



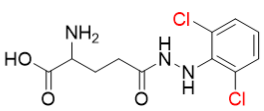
Molecular Weight: 306.14

RA-23Cl



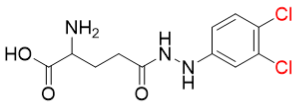
Molecular Weight: 306.14

RA-24Cl



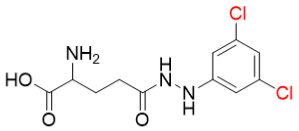
Molecular Weight: 306.14

RA-26Cl



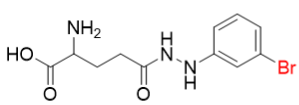
Molecular Weight: 306.14

RA-34Cl



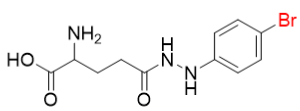
Molecular Weight: 306.14

RA-35Cl



Molecular Weight: 316.16

RA-3Br

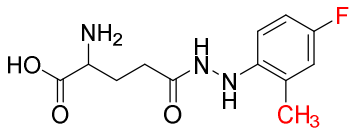


Molecular Weight: 316.16

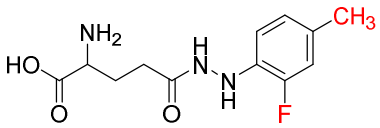
RA-4Br

[그림 2-33. Chloride가 부착된 라말린 유도체들의 구조]

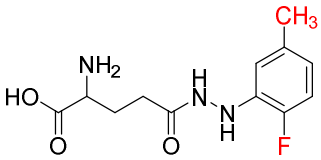
- Fluoro-Methyl version (3 analogues)



Molecular Weight: 269.28
RA-E02



Molecular Weight: 269.28
RA-E04



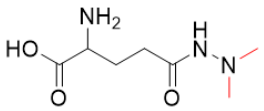
Molecular Weight: 269.28
RA-E05

[그림 2-34. Fluoro-Methyl 기가 부착된 라말린 유도체들의 구조]

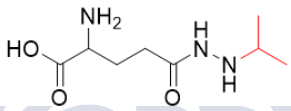
다. 알킬기를 도입한 라말린 유도체 합성 (6 analogues)

- 페닐기를 대신하는 알킬기가 도입된 유도체를 합성하여 페닐기 및 작용기의 역할 확인

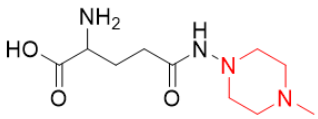
- 알킬 및 헤테로 cycle이 도입된 라말린 유도체



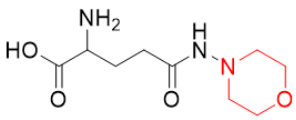
Molecular Weight: 189.22
RA-DMe



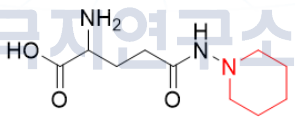
Molecular Weight: 203.24
RA-IPr



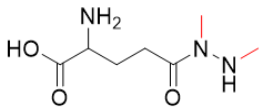
Molecular Weight: 244.30
RA-AMP



Molecular Weight: 231.25
RA-Morp



Molecular Weight: 229.28
RA-Pip



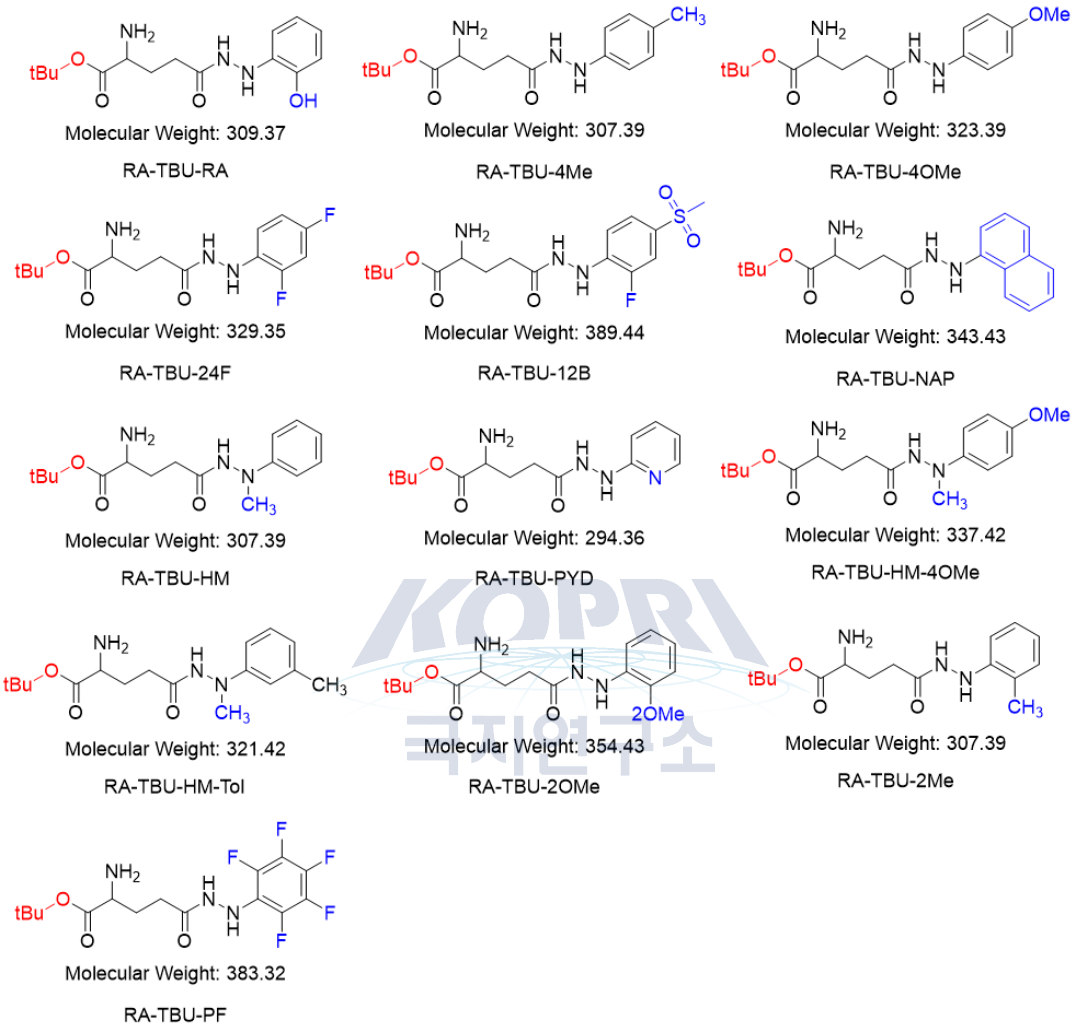
Molecular Weight: 189.22
RA-12DMe

[그림 2-35. 알킬기가 도입된 라말린 유도체들의 구조식]

라. BBB 투과에 유리한 라말린 유도체 합성

- TBU 또는 MeR로 1번 위치에 알킬기를 도입하여 카복실산으로 인한 극성을 줄여주어 BBB 투과에 유리한 조건으로 구조 수정 및 보완

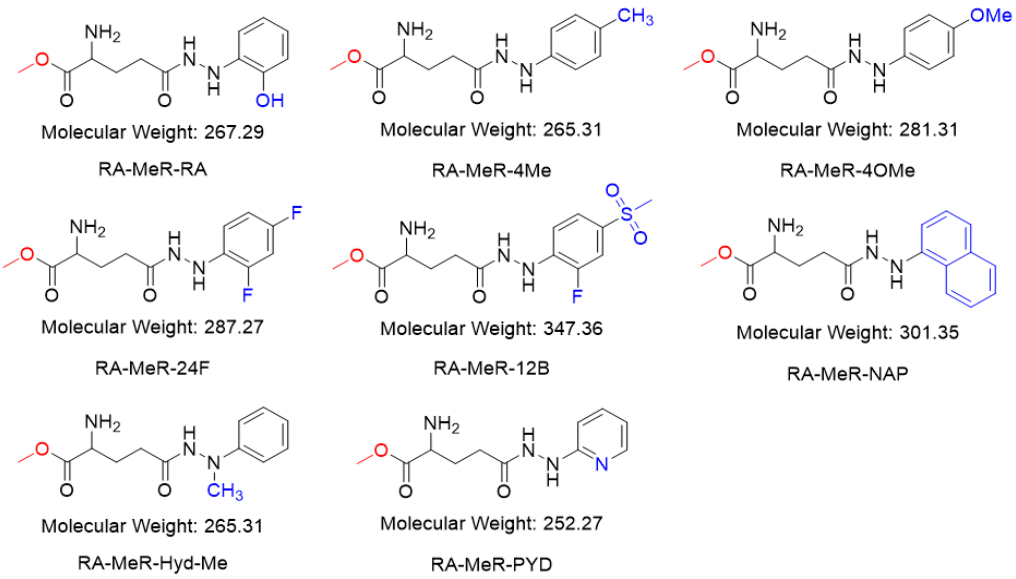
- TBU (tert-butyl ester) 도입 유도체 (13 analogues)



[그림 2-36. TBU가 도입된 라말린 유도체 구조식]

KOPRI 극지연구소

- MeR (methyl ester) 도입 유도체 (8 analogues)

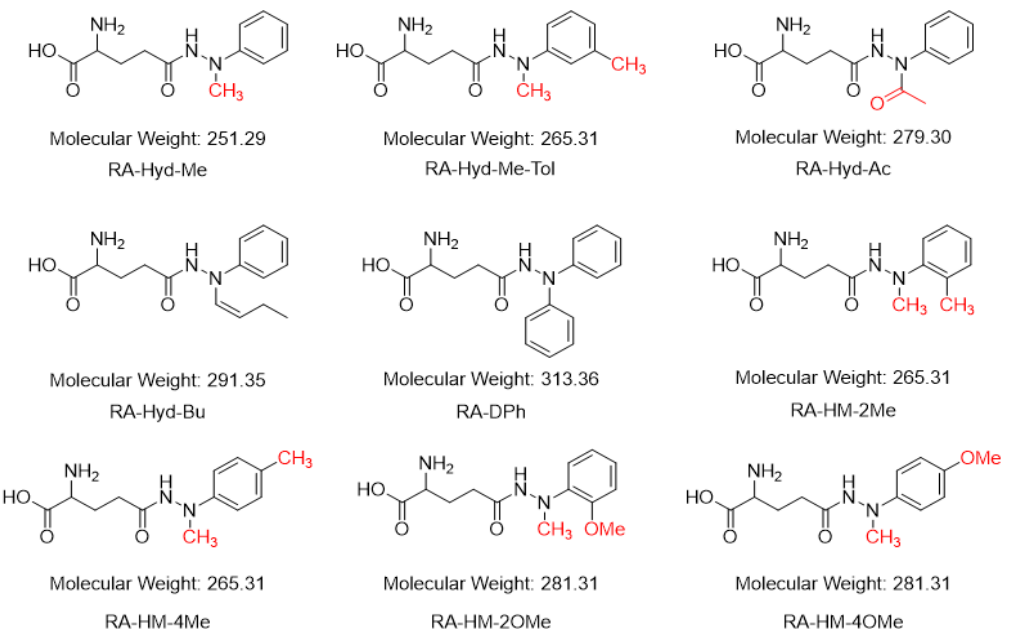


[그림 2-37. Methyl ester가 도입된 유도체 구조식]

마. 안정성 및 독성 개선을 위한 하이드라진의 산화 방지 모델 합성

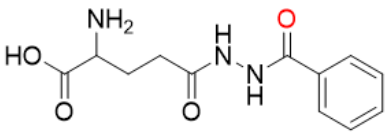
- 라말린의 주요 pharmacopore인 하이드라진의 산화를 막기 위한 유도체 합성

- Hydrazino alkyl or phenyl 유도체 (9 analogues)

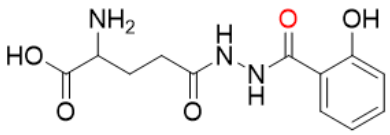


[그림 2-38. Hydrazino methyl 형태의 라말린 유도체 구조]

- Hydrazine과 phenyl 사이에 Bridge 연결하여 산화 방지 모델 (2 analogues)



Molecular Weight: 265.27
RA-Benzo

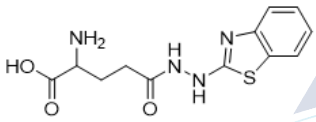


Molecular Weight: 281.27
RA-Sali

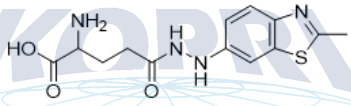
[그림 2-39. Benzoyl 기를 도입하여 산화를 방지한 유도체 합성]

바. 헤테로 이중고리 연결을 통한 라말린 유도체 합성

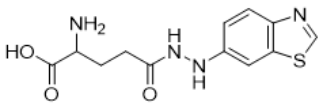
- 헤테로 이중고리 연결 반응을 통해 얻어진 유도체의 활성 변화 관측. Benzothiazole, benzooxazole, phenylthiazole, phenylthiadizole, indazole, imidazole 형태의 헤테로 이중고리를 적용 (52 analogues)



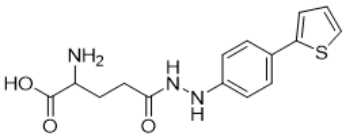
Molecular Weight: 294.33
RA-E13



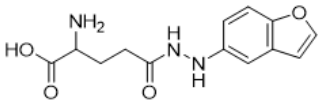
Molecular Weight: 308.36
RA-E15



Molecular Weight: 294.33
RA-E16



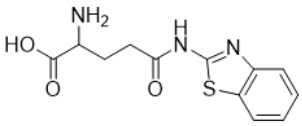
Molecular Weight: 319.38
RA-E25



Molecular Weight: 277.28
RA-E26

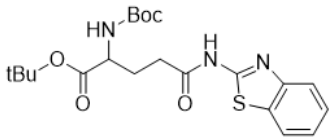
KORRI 극지연구소

[그림 2-40. 헤테로 이중고리가 적용된 라말린 유도체 1]



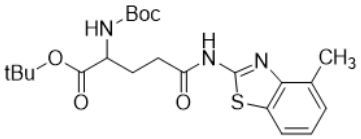
Molecular Weight: 279.31

RA-PR001



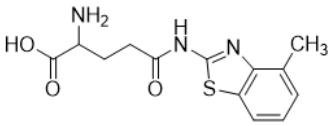
Molecular Weight: 435.54

RA-PR002



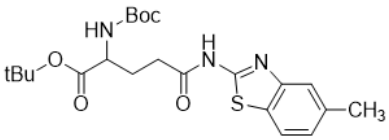
Molecular Weight: 449.57

RA-PR003



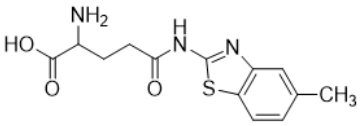
Molecular Weight: 293.34

RA-PR004



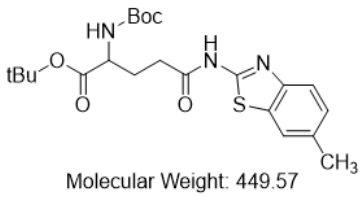
Molecular Weight: 449.57

RA-PR005



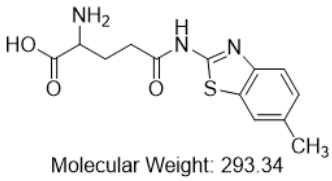
Molecular Weight: 293.34

RA-PR006



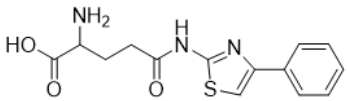
Molecular Weight: 449.57

RA-PR007



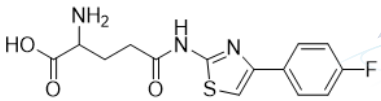
Molecular Weight: 293.34

RA-PR008



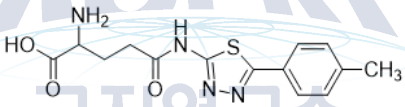
Molecular Weight: 305.35

RA-PR009



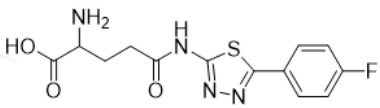
Molecular Weight: 323.34

RA-PR010



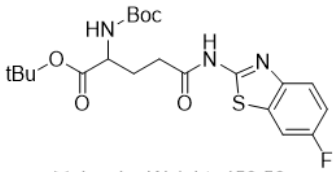
Molecular Weight: 320.37

RA-PR011



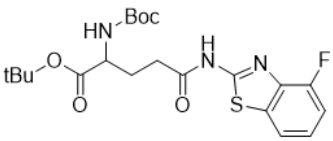
Molecular Weight: 324.33

RA-PR012



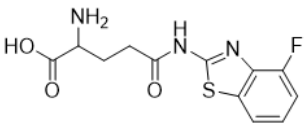
Molecular Weight: 453.53

RA-PR013



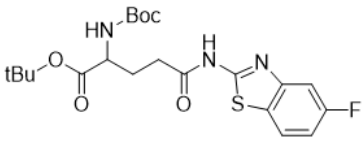
Molecular Weight: 453.53

RA-PR014



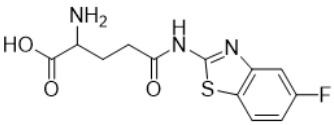
Molecular Weight: 297.30

RA-PR015



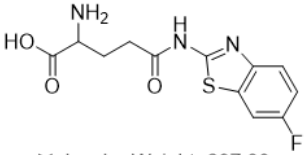
Molecular Weight: 453.53

RA-PR016



Molecular Weight: 297.30

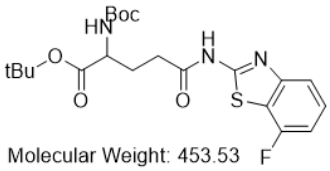
RA-PR017



Molecular Weight: 297.30

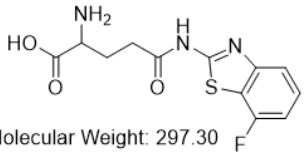
RA-PR018

KOPRI
극지연구소



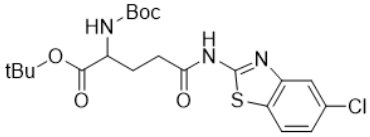
Molecular Weight: 453.53

RA-PR019



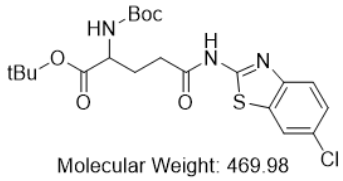
Molecular Weight: 297.30

RA-PR020



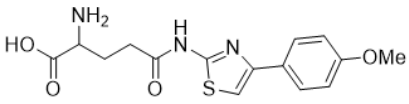
Molecular Weight: 469.98

RA-PR021



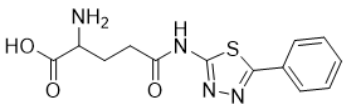
Molecular Weight: 469.98

RA-PR022



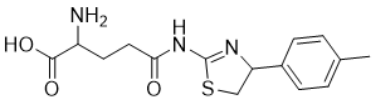
Molecular Weight: 335.38

RA-PR023



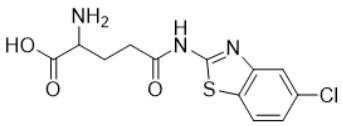
Molecular Weight: 306.34

RA-PR024



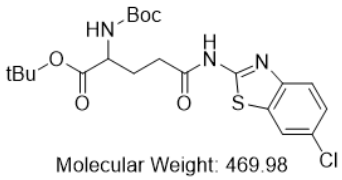
Molecular Weight: 321.40

RA-PR025



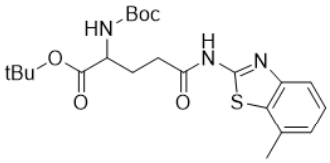
Molecular Weight: 313.76

RA-PR026



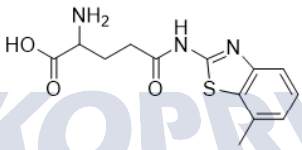
Molecular Weight: 469.98

RA-PR027



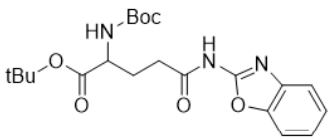
Molecular Weight: 449.57

RA-PR028



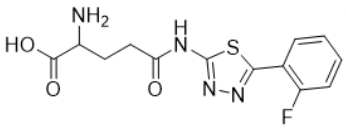
Molecular Weight: 293.34

RA-PR029



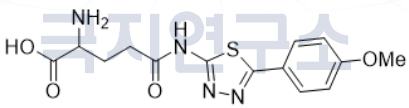
Molecular Weight: 419.48

RA-PR030



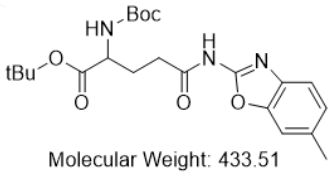
Molecular Weight: 324.33

RA-PR031



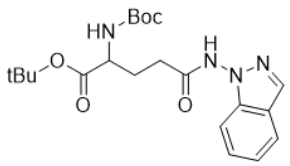
Molecular Weight: 336.37

RA-PR032



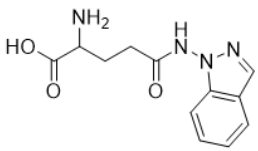
Molecular Weight: 433.51

RA-PR033



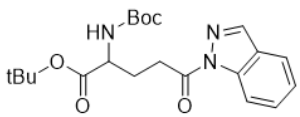
Molecular Weight: 418.49

RA-PR034



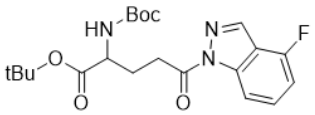
Molecular Weight: 262.27

RA-PR035



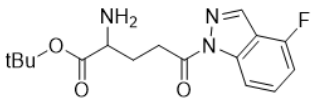
Molecular Weight: 403.48

RA-PR036



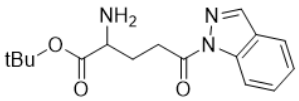
Molecular Weight: 421.47

RA-PR037



Molecular Weight: 321.35

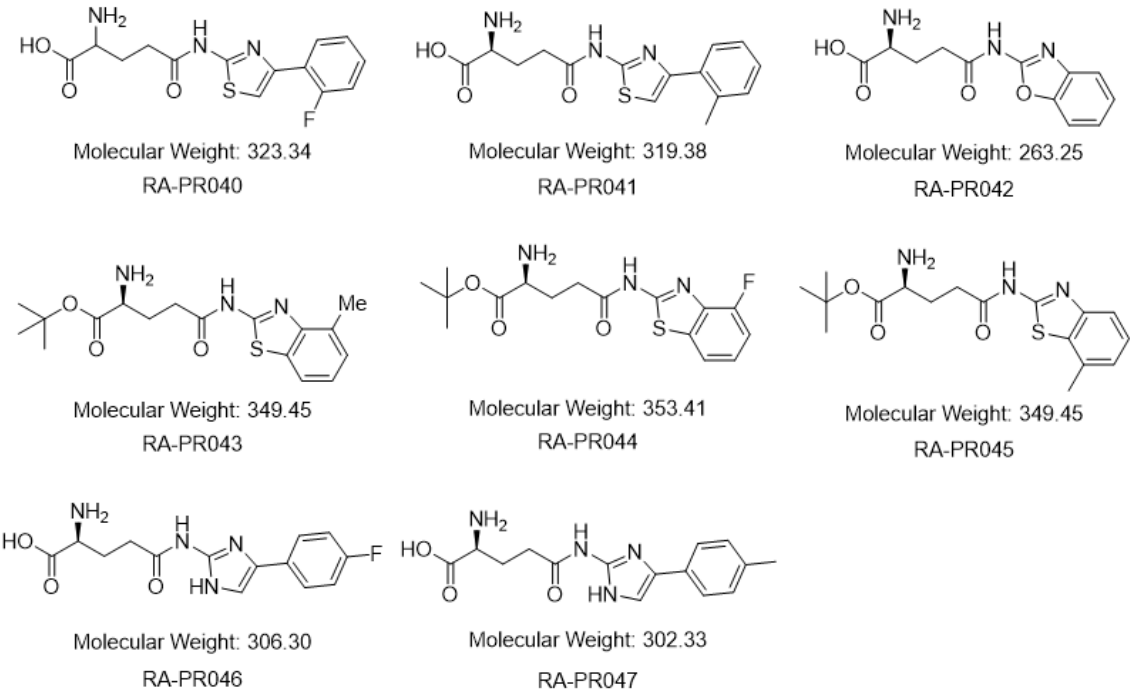
RA-PR038



Molecular Weight: 303.36

RA-PR039

KOPRI 극지연구소

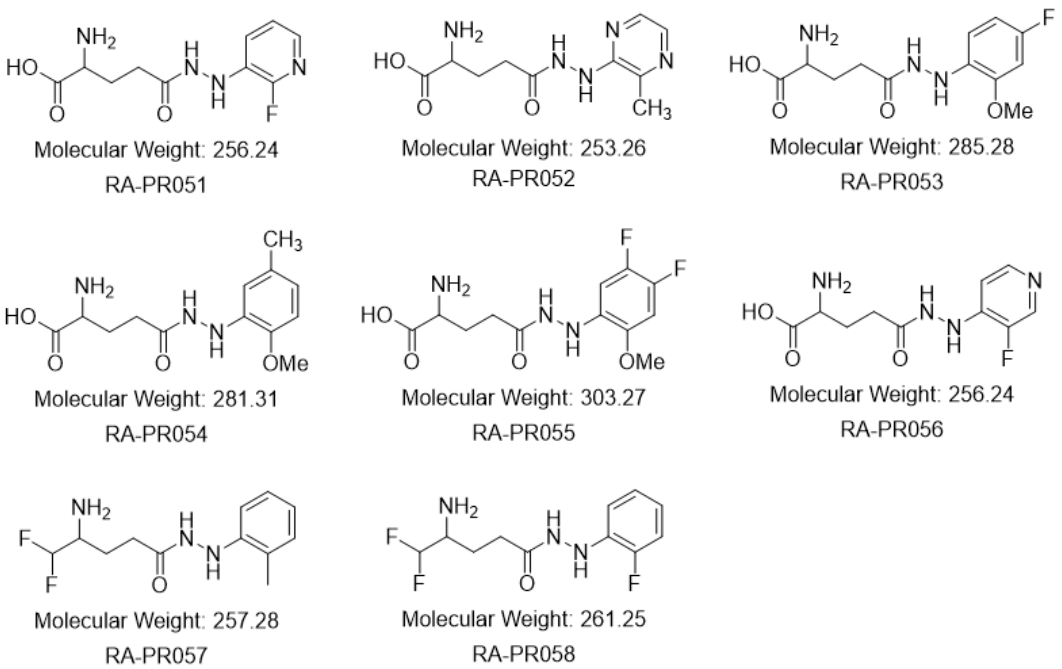


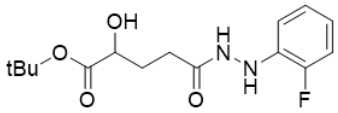
[그림 2-41. 헤테로 이중고리가 적용된 라말린 유도체 2]

KOPRI 극지연구소

사. 화학정보학 및 머신러닝 기반 라말린 유도체 구조 예측

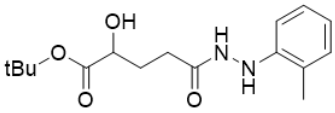
- 예측된 유도체 구조를 기반으로 합성된 신규 라말린 유도체 합성 결과 (30 analogues)





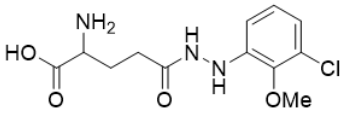
Molecular Weight: 312.34

RA-PR059



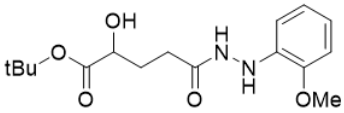
Molecular Weight: 308.38

RA-PR060



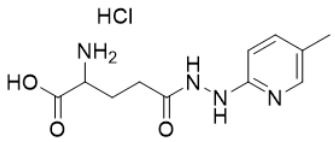
Molecular Weight: 301.73

RA-PR061



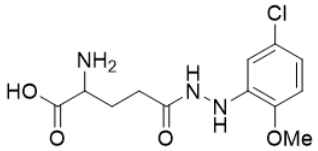
Molecular Weight: 324.38

RA-PR062



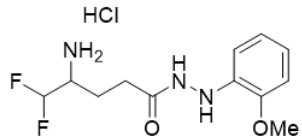
Molecular Weight: 288.73

RA-PR063



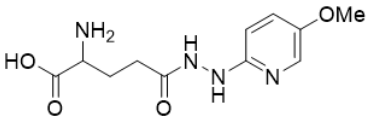
Molecular Weight: 301.73

RA-PR064



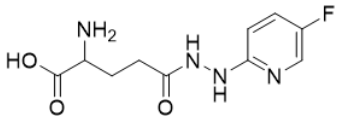
Molecular Weight: 309.74

RA-PR065



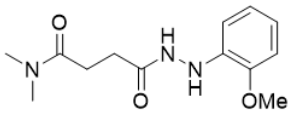
Molecular Weight: 268.27

RA-PR066



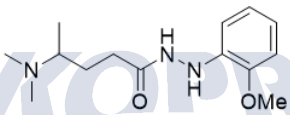
Molecular Weight: 256.24

RA-PR067



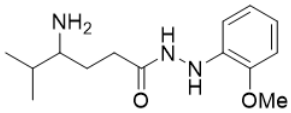
Molecular Weight: 265.31

RA-PR068



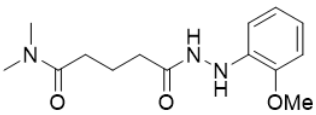
Molecular Weight: 265.36

RA-PR069



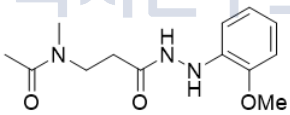
Molecular Weight: 265.36

RA-PR070



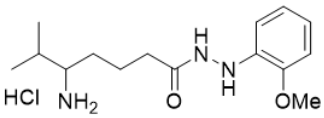
Molecular Weight: 279.34

RA-PR071



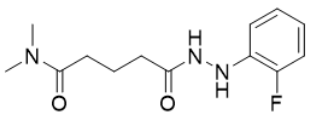
Molecular Weight: 265.31

RA-PR072



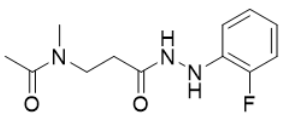
Molecular Weight: 315.84

RA-PR073



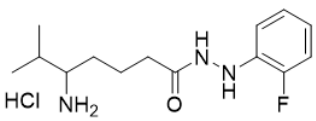
Molecular Weight: 267.30

RA-PR074



Molecular Weight: 253.28

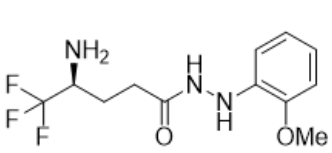
RA-PR075



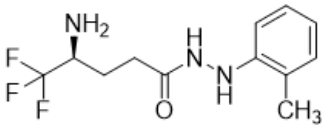
Molecular Weight: 303.81

RA-PR076

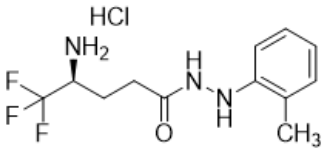
KOPRI
극지연구소



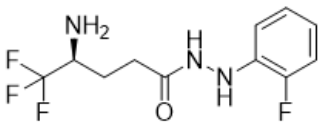
Molecular Weight: 291.27
RA-PR077



Molecular Weight: 275.28
RA-PR078



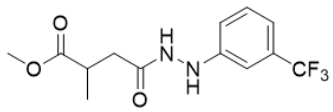
Molecular Weight: 311.73
RA-PR079



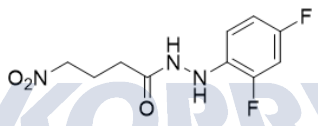
Molecular Weight: 279.24
RA-PR080

[그림 2-42. AI로 예측된 라말린 유도체 합성 결과]

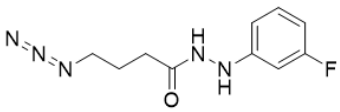
- AI로 예측된 구조중 구매 가능한 유도체 (11 analogues)



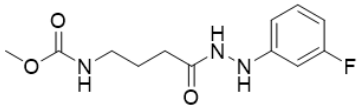
Molecular Weight: 304.27
RA-ENA-1-638



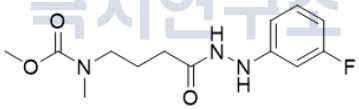
Molecular Weight: 259.21
RA-ENA-2-584



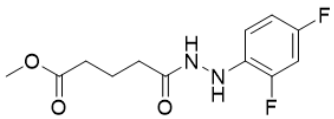
Molecular Weight: 237.24
RA-ENA-3-306



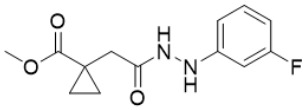
Molecular Weight: 269.28
RA-ENA-4-066



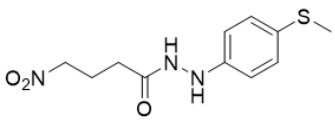
Molecular Weight: 283.30
RA-ENA-5-343



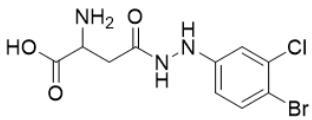
Molecular Weight: 272.25
RA-ENA-6-966



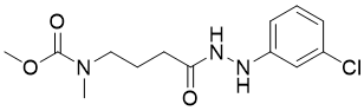
Molecular Weight: 266.27
RA-ENA-7-420



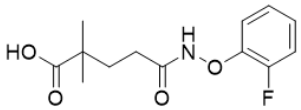
Molecular Weight: 269.32
RA-ENA-8-047



Molecular Weight: 336.57
RA-ENA-9-116



Molecular Weight: 299.76
RA-ENA-10-276



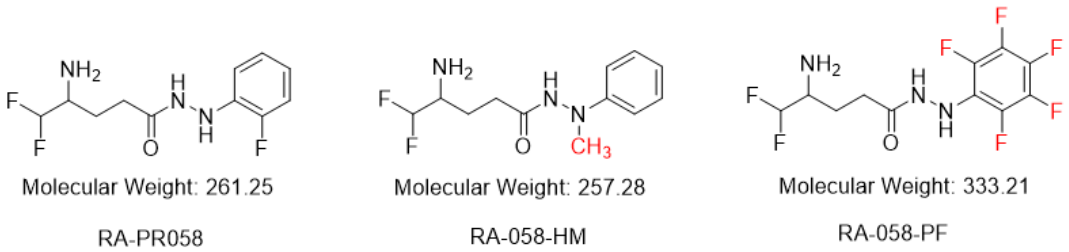
Molecular Weight: 269.27
RA-ENA-11-114

[그림 2-43. AI로 예측된 구조중 구매한 유도체 구조식]

아. Difluoro pentanoic acid 형태 유도체 합성 결과

- RA-PR058의 활성 확인 후 우수한 항치매 효과가 확인되어 관련된 유도체 합성 수행

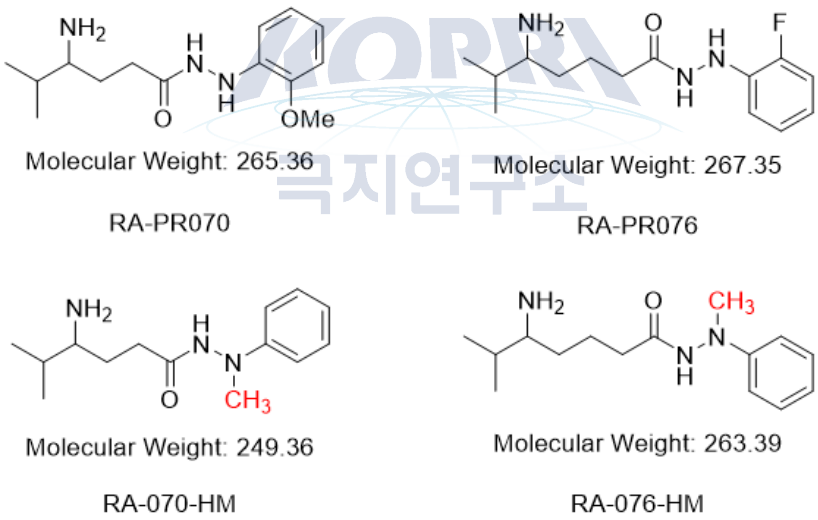
- Hydrazino methyl (HM)이 적용된 RA-058HM을 합성하여 안정성을 증가시킴



[그림 2-44. Difluoro pentanoic acid 형태의 유도체 합성 결과]

자. Isopropyl기가 도입된 형태의 유도체 합성 결과

- RA-PR070, RA-PR076 유도체의 우수한 항염증 활성을 확인 후 유도체 합성 수행

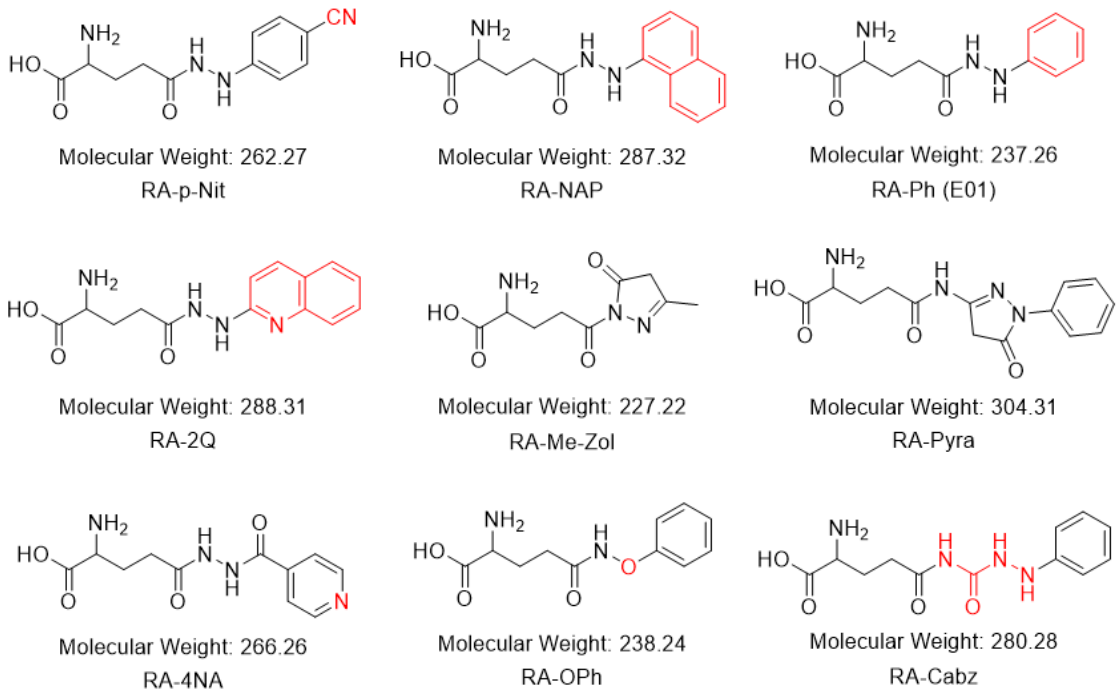


[그림 2-45. Isopropyl이 도입된 유도체 합성 결과]

차. 추가 작용기를 가지는 라말린 유도체 합성

- 페닐기, 메틸기 또는 헤테로 이중고리를 제외한 다양한 형태의 유도체를 합성함

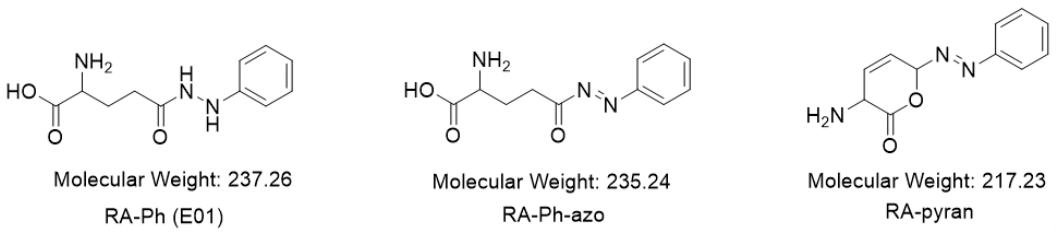
- Nitrile, napthalene, quinoline, nitotinic amide등의 작용기를 가진 유도체 합성 완료



< 그림 2-46. Heterocycle-ring 등이 포함된 라말린 유도체들의 구조 >

카. 라말린 분해산물 연구를 통한 활성분자 확인

- 산화된 형태의 라말린 분해산물 활성 분자 합성을 시도하였으나 분해가 빠르게 진행되어 RA-Ph를 제외한 분해산물은 합성 실패함

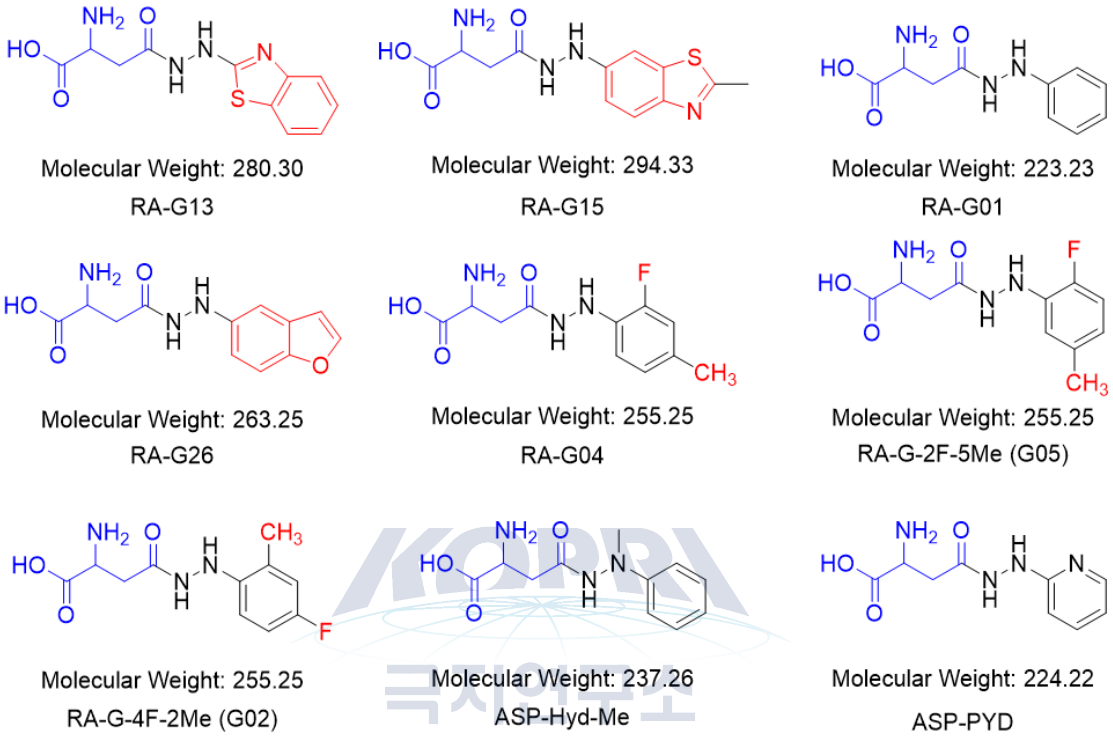


[그림 2-47. 라말린 분해산물 합성 시도]

타. Arspartic acid를 기본 골격으로 하는 라말린 유도체

- Glutamic acid 대신 Arspartic acid를 적용하여 다양한 유도체 합성 시도

- RA-G13, RA-G15, RA-G26 유도체는 합성에 실패함



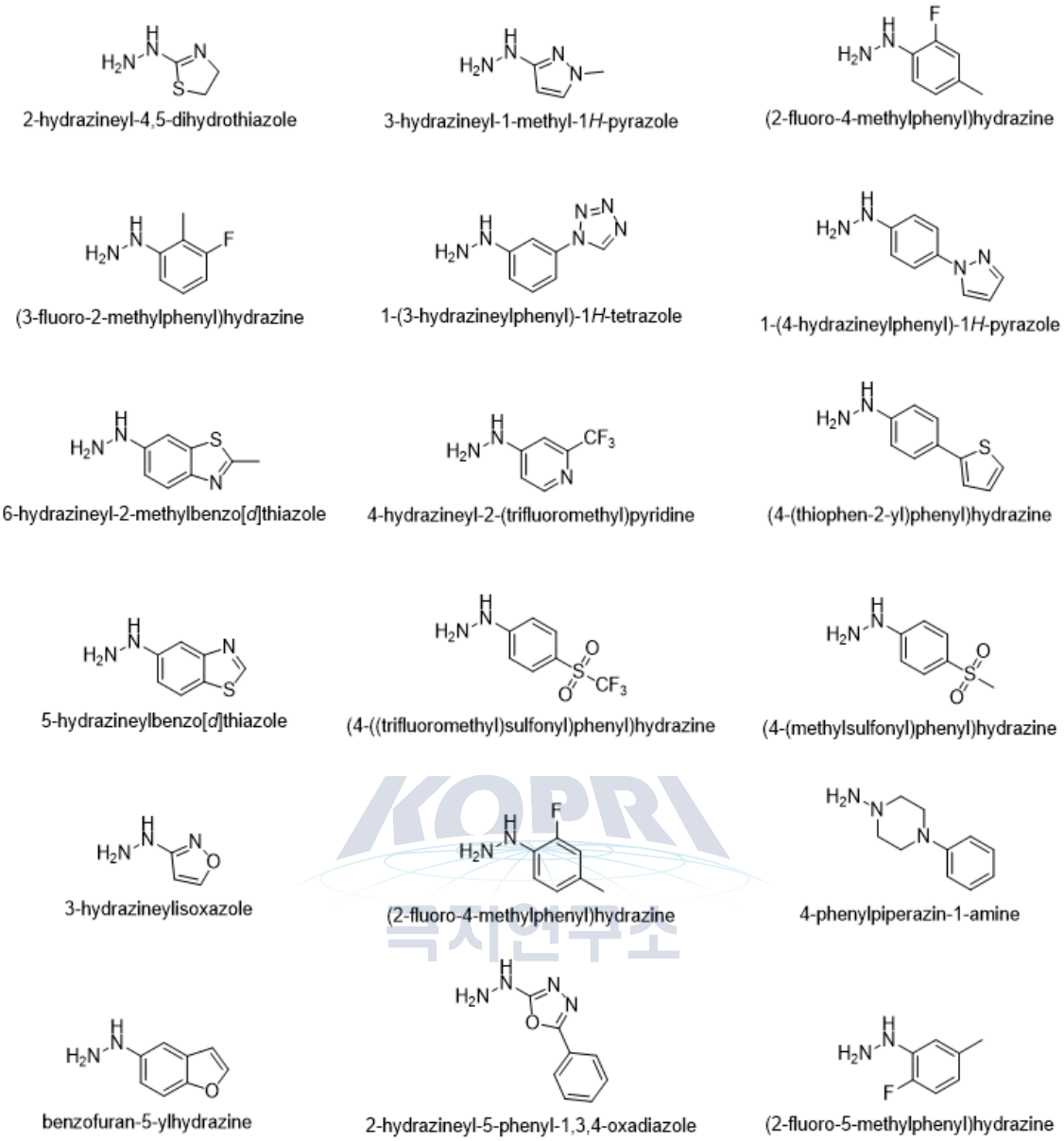
[그림 2-48. Arspartic acid를 기본 골격으로 하는 라말린 유도체들의 구조]

파. 다양한 형태의 유도체 확보를 위한 하이드라진 합성

- 유도체의 작용기의 역할을 확인하고 활성과의 연관성을 확인하기 위해 다양한 형태의 하이드라진 유도체를 합성하였고, 연결반응을 통해 유도체 합성 진행

- 합성된 하이드라진을 통해 RA-E02, RA-E04, RA-E05, RA-G02, RA-G04, RA-G05등을 합성함. 합성도중 연결반응 및 탈보호화 반응에 실패한 유도체 다수 발생

- 3-hydrazinyl-1-methyl-1H-pyrazole hydrochloride, 5-hydrazinyl-1-methyl- 1H-pyrazole hydrochloride, 2-hydrazinyl-5-phenyl- 1,3,4-oxadiazole hydrochloride, 4-hydrazinyl-2-(trifluoromethyl)pyridine hydrochloride, 4-((trifluoromethyl)sulfonyl) phenyl)hydrazine hydrochloride, 3-hydrazinylisoxazole hydrochloride 하이드라진 합성 실패

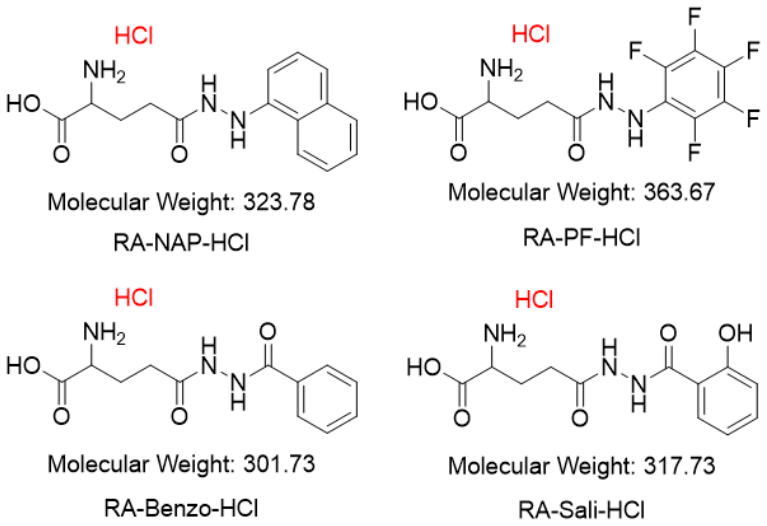


[그림 2-49. 다양한 유도체 합성을 위한 하이드라진 합성 결과]

KOPRI 극지연구소

하. 용해도 개선을 위한 HCl 염화물 합성

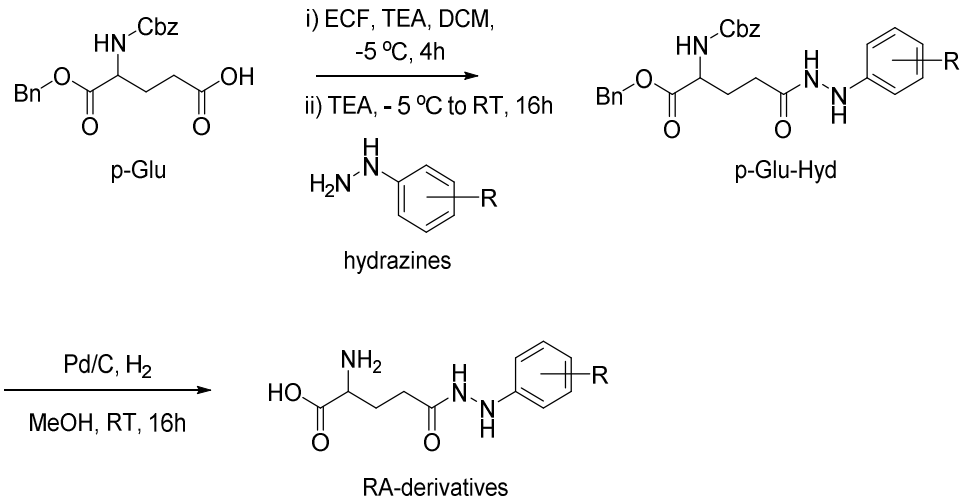
- 일부 유도체들이 물에 대한 낮은 용해도를 가져 용해도 개선을 위한 유도체를 합성함 HCl 염화물 형태로 합성한 결과 물에 대한 용해도가 대폭 증가함 확인



[그림 2-50. HCl 염화물 형태로 물성이 개선된 유도체]

3) 라말린 유도체 합성 scheme

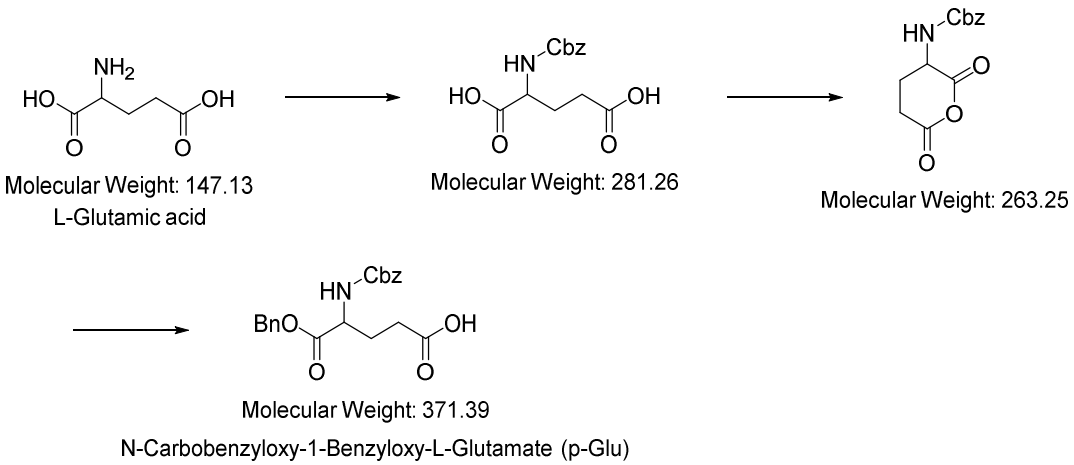
가. 라말린 유도체 합성 Scheme : N-Carbobenzyloxy-1-Benzyl-L-Glutamate (p-Glu) 출발물질에 합성 또는 구매한 Hydrazine을 ECF, TEA를 이용하여 연결하고 보호화된 N-Carbobenzyloxy (Cbz) 및 Benzyloxy (Bn) 기를 Palladium on carbon (Pd/C)와 수소가스를 이용하여 제거하면 라말린 유도체 합성이 완료됨



[그림 2-51. 라말린 유도체 합성 전체 scheme]

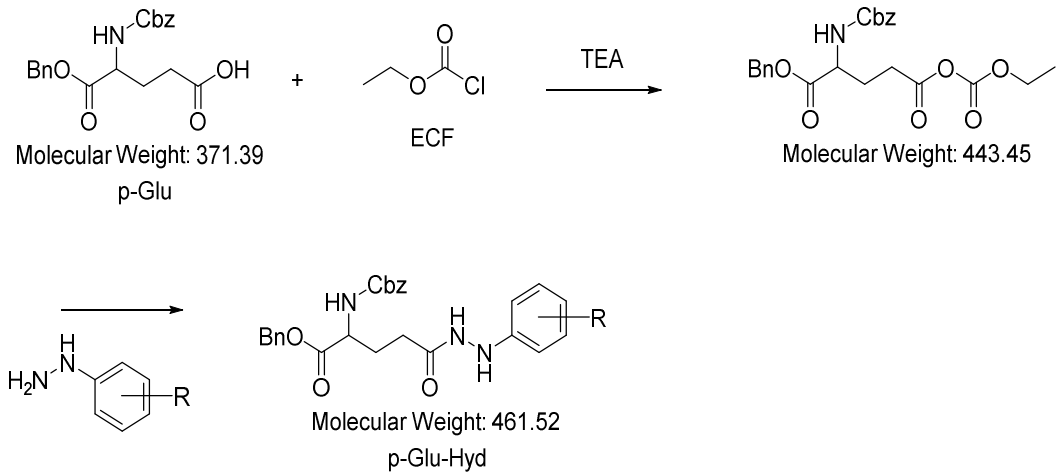
나. 세부 합성 scheme

- p-Glu 합성 scheme : p-Glu를 합성하기 위해 L-Glutamic acid의 amine기에 Cbz를 부착시킨 후 5각링을 형성한 후 Bn기를 연결하면서 링을 오픈하여 p-Glu를 합성. 위와 같은 합성법으로 합성이 가능하나, 시판중인 p-Glu를 이용하여 다음 반응을 진행



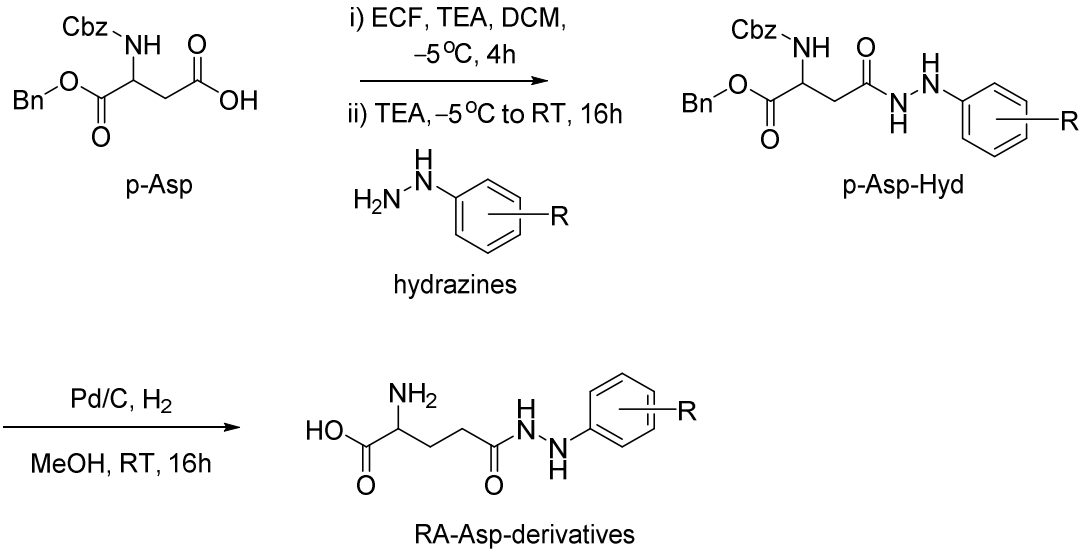
[그림 2-52. p-Glu 합성 scheme]

- p-Glu-Hyd 합성 scheme : 출발물질을 보호화 된 1-Benzyl- N-benzyloxycarbonyl glutamate (p-Glu)로 하여 준비된 hydrazine 유도체와 연결반응을 수행. 연결반응은 p-Glu를 dichloro methane (DCM)에 녹인 후 반응온도를 0 ℃로 낮추고 triethyl amine (TEA)과 chloro formate (ECF)를 순차적으로 첨가함. hydrazine을 DCM에 녹인 후 반응중인 반응용액에 천천히 첨가함. 반응 종료 후 농축하여 용매를 제거하고 Ethyl acetate (EA)와 n-Hexane (Hex)을 이용하여 재결정하여 p-Glu-hyd를 수득함



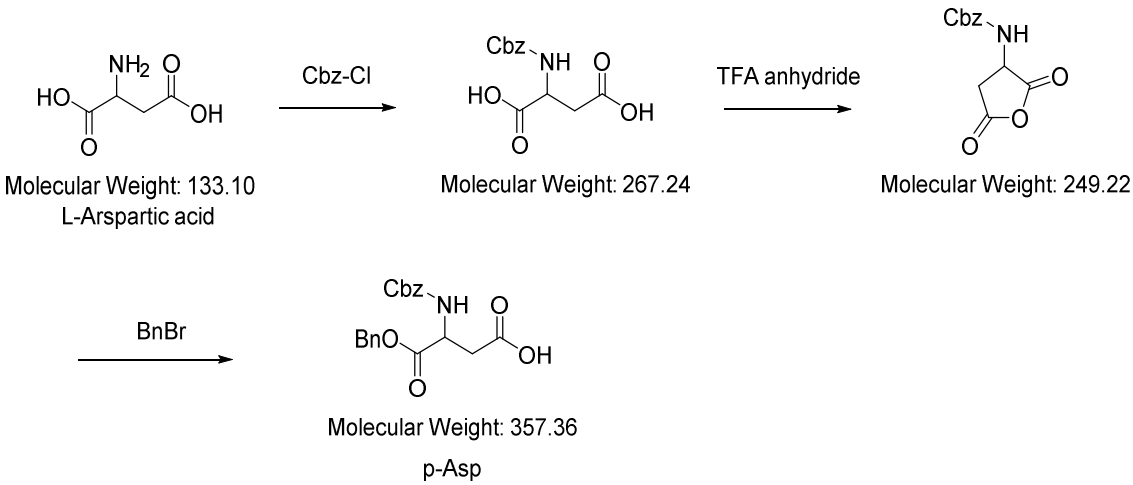
[그림 2-53. p-Glu-Hyd 합성 scheme]

다. Arspartic acid 라말린 유도체 합성 : N-Carbobenzyloxy-1-Benzyl-L-Aspartate (p-Asp) 출발물질에 합성 또는 구매한 Hydrazine을 ECF, TEA를 이용하여 연결하고 보호화된 N-Carbobenzyloxy (Cbz) 및 Benzyloxy (Bn) 기를 Palladium on carbon (Pd/C)와 수소가스를 이용하여 제거하여 합성 완료



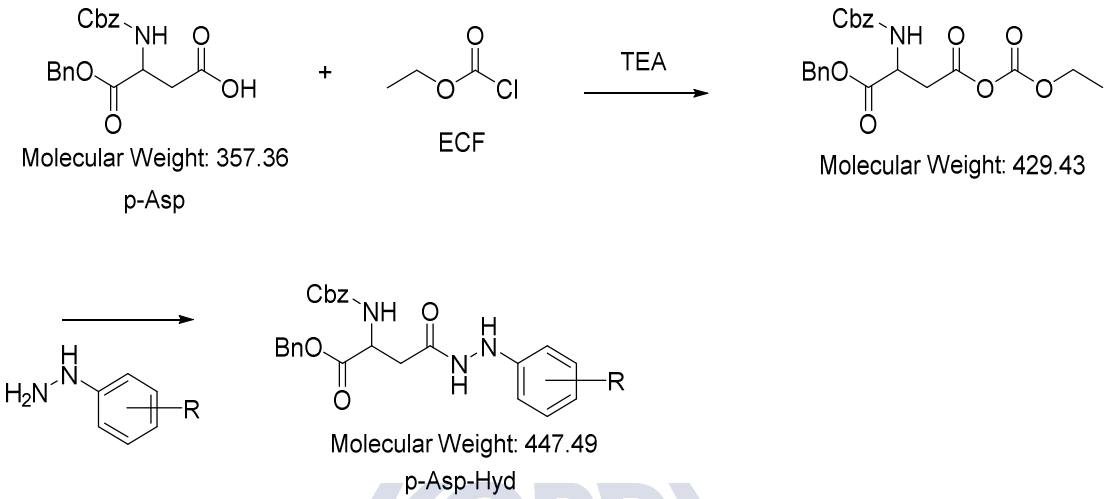
[그림 2-54. RA-Asp-derivatives 합성 전체 scheme]

- p-Asp 합성 scheme : L-Aspartic acid의 아민기를 Cbz로 보호화 한 후 Trifluoro acetic anhydride를 사용하여 5각링 형태로 변경 후 Benzyl기를 부착하여 p-Asp를 합성함



[그림 2-55. p-Asp 합성 scheme]

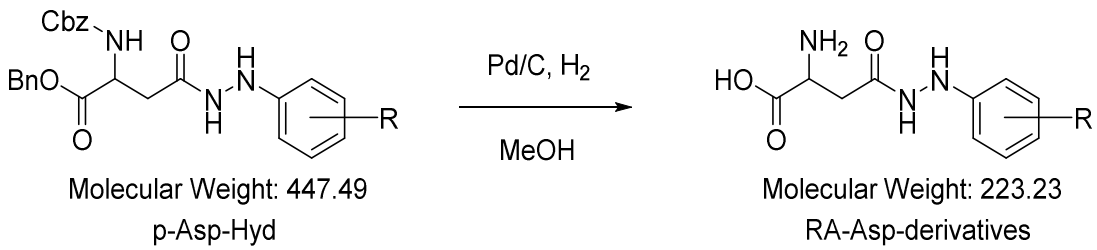
- p-Asp-Hyd 합성 scheme : 출발물질을 보호화 된 1-Benzyl- N-benzyloxycarbonyl aspartate (p-Asp)로 하여 준비된 hydrazine 유도체와 연결반응을 수행. 연결반응은 p-Asp를 DCM에 녹인 후 반응온도를 0 ℃로 낮추고 TEA과 ECF를 순차적으로 첨가함. hydrazine을 DCM에 녹인 후 반응 중인 반응용액에 천천히 첨가함. 반응 종료 후 농축하여 용매를 제거하고 Ethyl acetate (EA)와 n-Hexane (Hex)을 이용하여 재결정하여 p-Asp-hyd를 수득함



[그림 2-56. p-Asp-Hyd 합성 scheme]

KOPRI 극지연구소

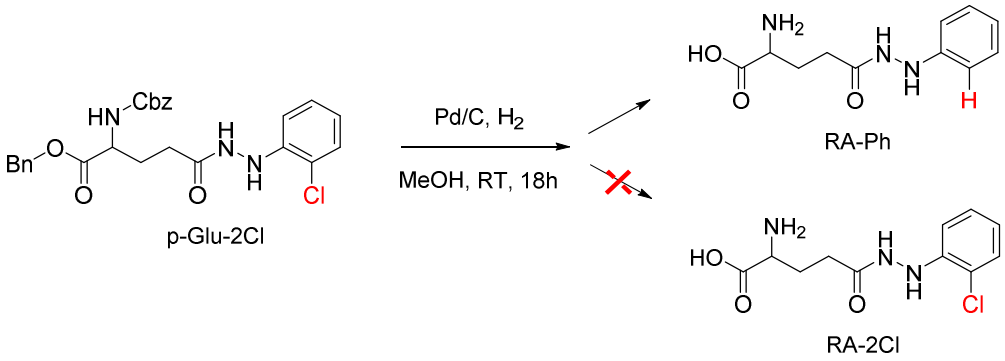
- RA-Asp-derivatives 합성 scheme : Hydrazine이 연결된 p-Asp-Hyd를 MeOH에 녹인 후 Pd/C를 첨가하고 수소가스를 추가하셔 반응시킨 후 여과 및 농축을 진행함. 재결정과정을 거쳐 최종 RA-Asp-derivatives를 수득함



[그림 2-57. RA-Asp-derivatives 합성 scheme]

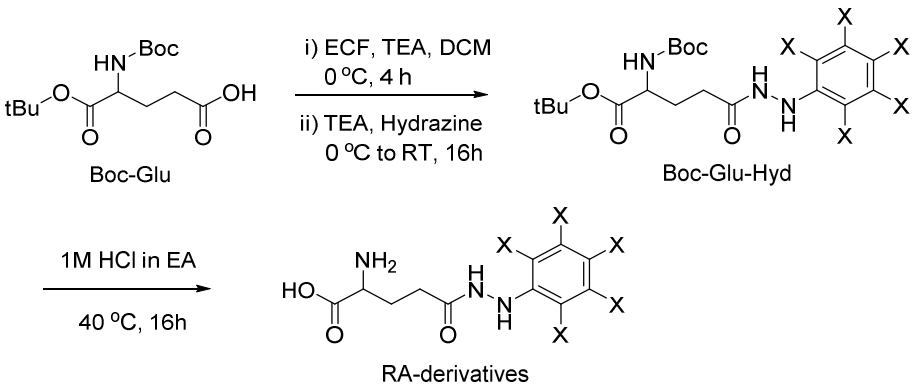
라. RA-Chloride 유도체 합성 방법

- Chloride 작용기를 가지는 유도체 합성시 최종 탈 보호화 반응에서 chloride 작용기가 이탈됨을 확인함. Palladium과 chloride와의 수소 교환반응이 일어남을 확인하여 원하는 구조의 유도체 합성이 불가능함. 이에 보호기를 Benzyl기에서 Boc기로 변형하여 탈보호화 반응조건을 변형하는 전략을 이용하여 chloride 유도체 합성 완료



[그림 2-58. Chloride 유도체 합성 실패 반응조건]

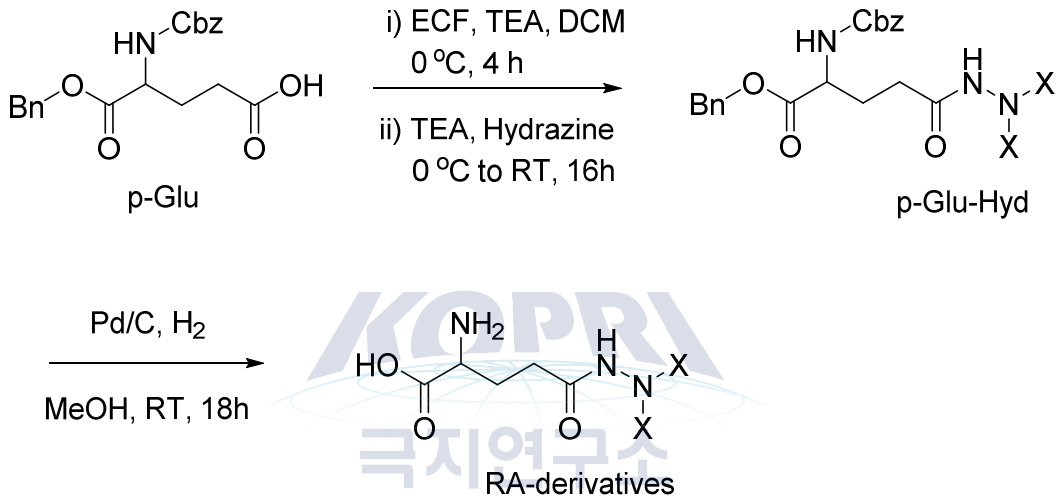
- 출발물질 1-tert-Butyl N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-glutamate를 DCM에 용해하고 온도를 0 ℃로 낮춘 후 TEA 및 ECF를 투입하고 약 4시간 교반 반응을 수행함. 이후 Hydrazine 유도체를 DCM에 녹인후 TEA를 첨가하여 반응물 준비 후 교반중인 출발물질에 천천히 투입함. 반응 완료 후 재결정화하여 Boc-Glu-Hyd를 수득함. 수득물을 1M HCl이 녹아있는 EA용매에 녹인 후 40 ℃ 온도에서 약 16시간 교반 반응을 수행하면 결정이 생성됨. 결정을 여과하고 EA로 씻어주어 최종물질 라말린 유도체를 수득함



[그림 2-59. Boc으로 보호화된 Glutamic acid를 이용한 라말린 유도체 합성 scheme]

마. 알킬기가 도입된 라말린 유도체 합성 전체 scheme

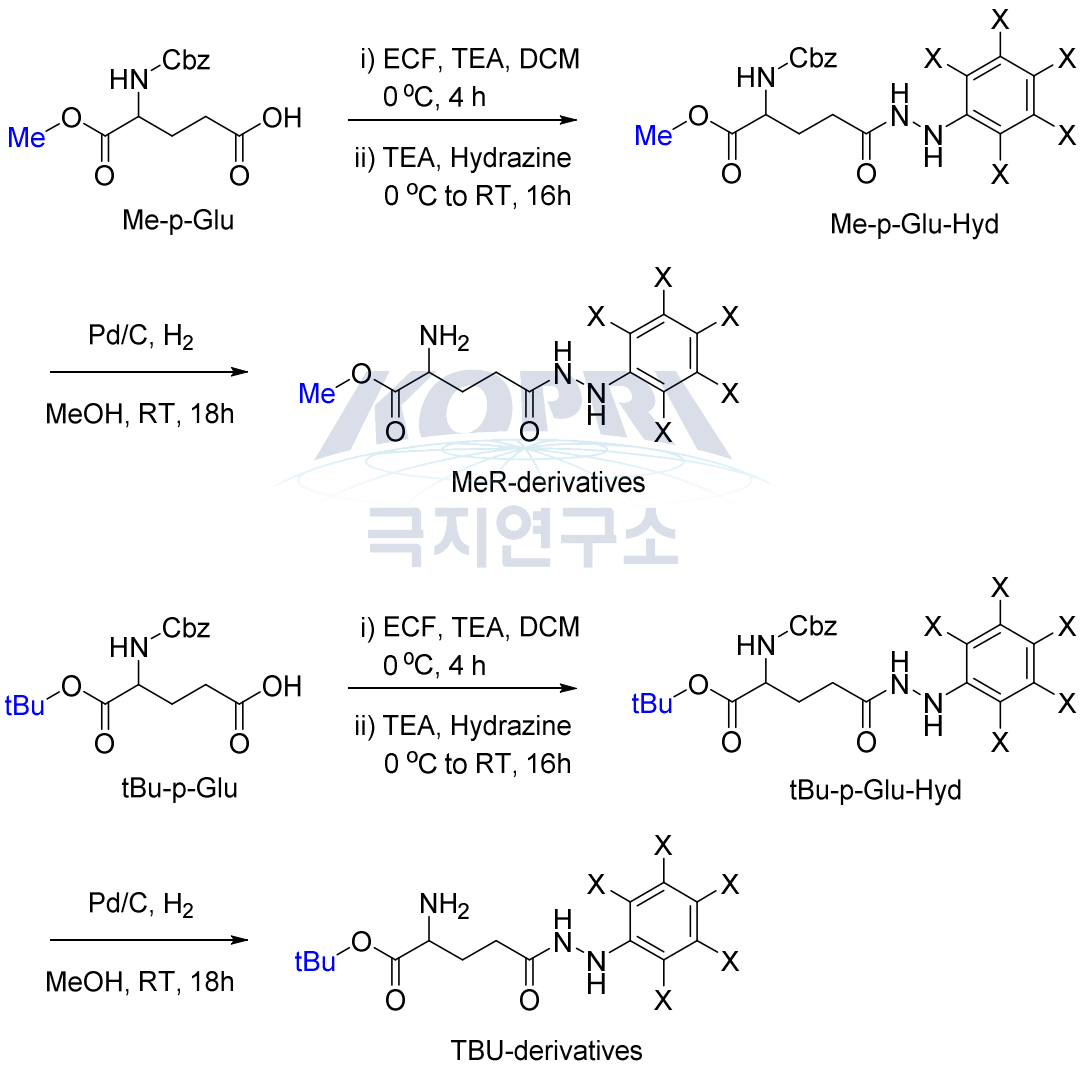
- DCM 용매에 출발물질 N-Carbobenzyloxy-1-benzyl-L-glutamic acid를 녹인 후 온도를 0 ℃로 낮춘 후 TEA 및 ECF를 투입하고 약 4시간 교반 반응을 수행함. 이후 알킬 Hydrazine 유도체를 DCM에 녹인후 TEA를 첨가하여 반응물 준비 후 교반중인 출발물질에 천천히 투입함. 반응 완료 후 재결정화하여 p-Glu-Hyd를 수득함. 이후 p-Glu-Hyd를 MeOH에 녹인 후 Pd/C를 무게대비 10% 양을 투입하고 수소가스 풍선을 이용하여 약 18 시간 교반 반응시킴. 여과 및 농축 후 재결정하여 라말린 유도체 (RA-derivatives)를 수득함



[그림 2-60. Alkyl hydrazine이 도입된 라말린 유도체 합성 scheme]

바. Glutamic acid가 변형된 유도체 합성 전체 scheme

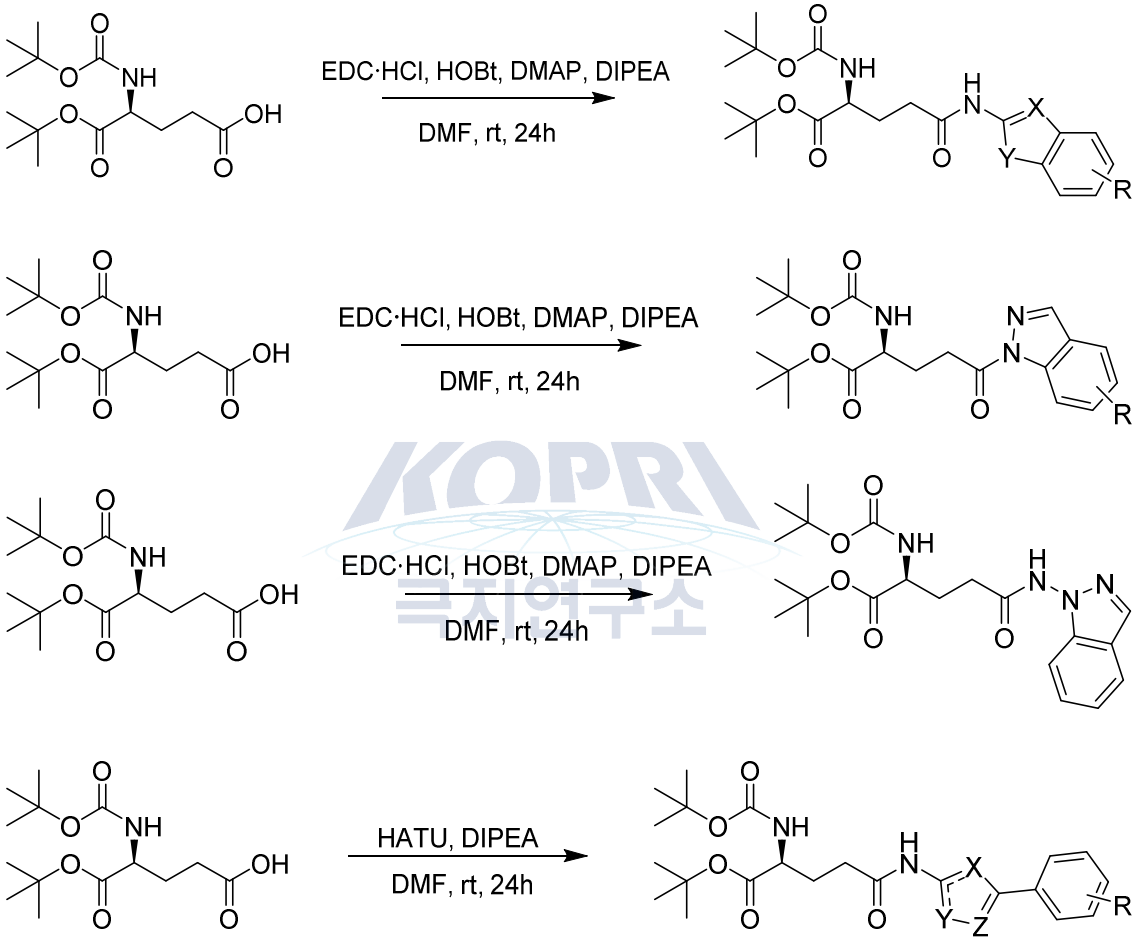
- N-Carbobenzyloxy-1-methyl-L-glutamic acid 또는 N-Carbobenzyloxy-1-tert-butyl-L-glutamic acid를 DCM 용매에 용해시킴. 온도를 0 ℃로 낮춘 후 TEA 및 ECF를 투입하고 약 4시간 교반 반응을 수행함. 이후 알킬 Hydrazine 유도체를 DCM에 녹인후 TEA를 첨가하여 반응물 준비 후 교반중인 출발물질에 천천히 투입함. 반응 완료 후 재결정화하여 p-Glu-Hyd를 수득함. 이후 p-Glu-Hyd를 MeOH에 녹인 후 Pd/C를 무게대비 10% 양을 투입하고 수소가스 풍선을 이용하여 약 18시간 교반 반응시킴. 여과 및 농축 후 재결정하여 라말린 유도체 (RA-derivatives)를 수득함



[그림 2-61. Glutamic acid가 변형된 라말린 유도체 합성 scheme]

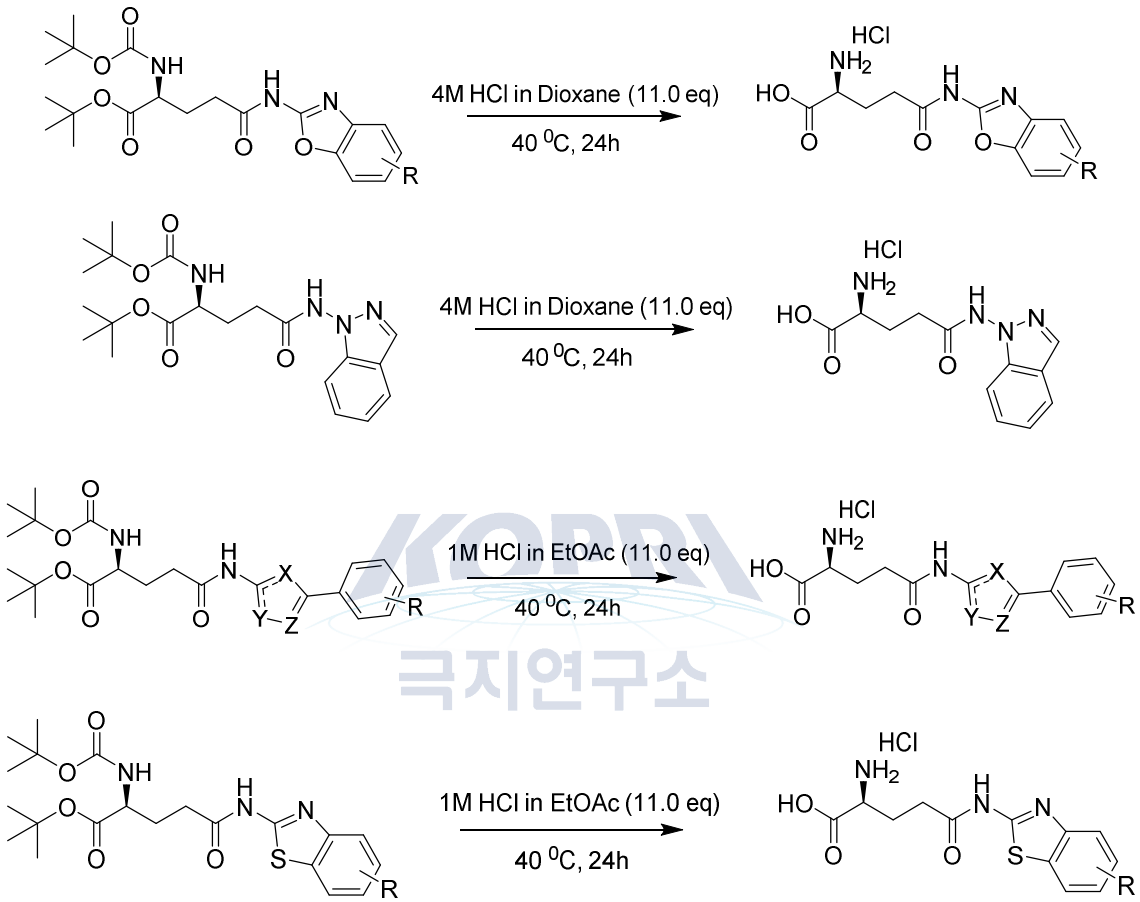
사. 헤테로 고리로 연결된 라말린 유도체 합성 전체 scheme

- 연결반응 : Boc으로 보호화된 출발물질에 EDC, HCl, HOBt, DMAP, DIPEA를 넣고 DMF 용매로 용해시킴. 이후 상온에서 약 24시간 반응을 수행함. 이후 물을 첨가하여 반응을 종결시키고 EA를 이용하여 추출, 수분제거, 농축을 거쳐 반응물을 얻고 silica gel을 이용하여 정제 수행하여 목적 화합물 수득함



[그림 2-62. 헤테로 고리로 연결된 라말린 유도체 연결반응 scheme]

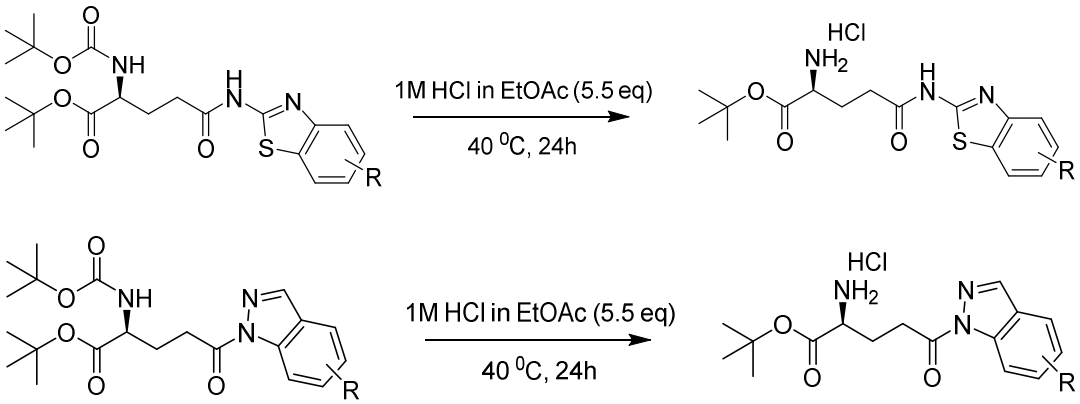
- 탈보호화 반응 : 연결반응을 통해 얻어준 물질을 HCl을 이용하여 탈보호화 반응을 수행함. 4M HCl in Dioxane 또는 1M HCl in EA 용매를 이용하여 40 ℃ 온도에서 약 24시간 반응을 수행하여 최종 목적물인 라말린 유도체를 수득함. 반응이 완료된 후, 감압농축하여 용매를 제거하고 EA를 이용하여 재결정하여 HCl 염으로서 화합물을 수득함



[그림 2-63. 헤테로 고리로 연결된 라말린 유도체 탈보호화 반응 scheme]

KRICT 극지연구소

- 선택적 Boc 그룹 탈보호화 반응 : 반응기에 Boc group과 *tert*-butyl group으로 보호화된 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (5.5 당량) 을 가하고 40 ℃에서 밤새워 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 감압농축하여 용매를 제거하고 EA을 이용하여 재결정한 뒤, dichloromethane에 살짝 녹여 MPLC on silica gel로 tBu 보호화기가 남아있는 목적 화합물을 수득함

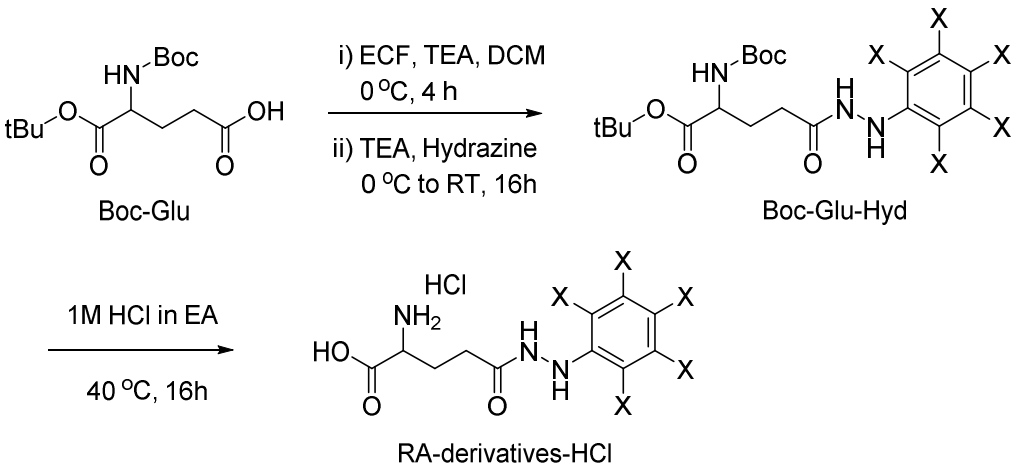


[그림 2-64. 헤테로 고리로 연결된 라말린 유도체의 선택적 탈보호화 반응 scheme]

KOPRI 극지연구소

아. 용해도 증가를 위한 HCl 염 형태 라말린 유도체 전체 합성 scheme

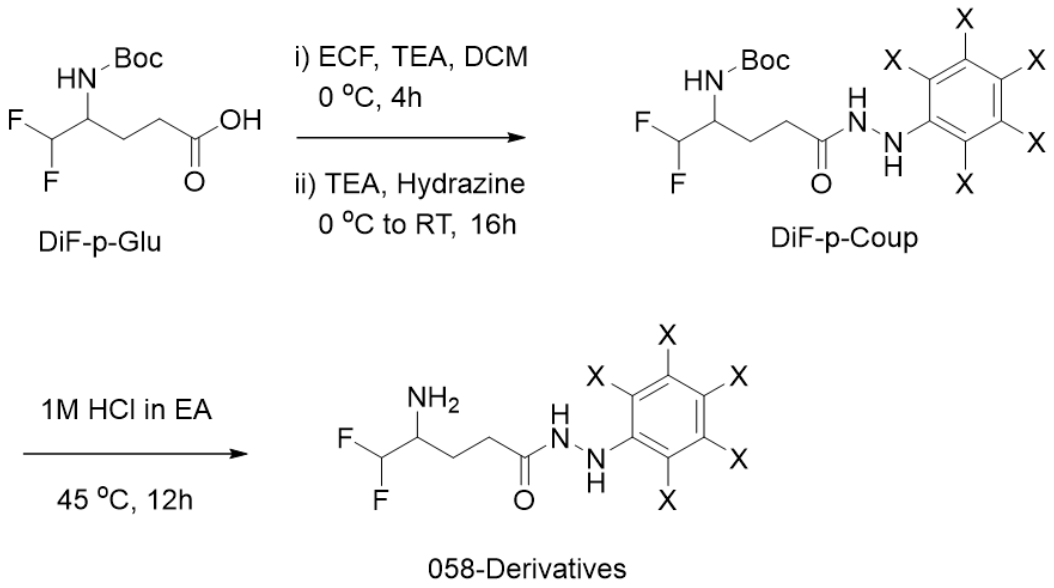
- Chloride 치환 라말린 유도체 합성법과 동일한 조건으로 합성 수행. 출발물질 1-tert-Butyl N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-glutamate를 DCM에 용해하고 온도를 0 °C로 낮춘 후 TEA 및 ECF를 투입하고 약 4시간 교반 반응을 수행함. 이후 Hydrazine 유도체를 DCM에 녹인 후 TEA를 첨가하여 반응물 준비 후 교반중인 출발물질에 천천히 투입함. 반응 완료 후 재결정화하여 Boc-Glu-Hyd를 수득함. 수득물을 1M HCl이 녹아있는 EA에 녹인 후 40 °C 온도에서 약 16시간 교반 반응을 수행하면 결정이 생성됨. 결정을 여과하고 EA로 씻어주어 최종물질 라말린 유도체를 수득함



[그림 2-65. HCl 염 형태 라말린 유도체 합성 scheme]

자. Difluoro pentanoic acid가 도입된 라말린 유도체 합성 scheme

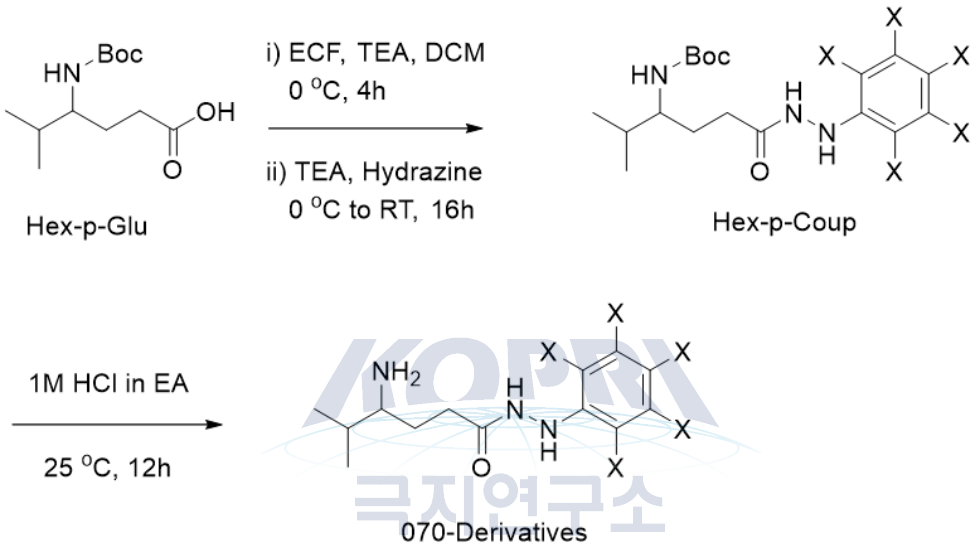
- Boc으로 보호화된 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid을 용매 DCM에 용해시키고 온도를 0 ℃로 낮춘 후 TEA 및 ECF를 투입하고 약 4시간 교반반응을 수행함. 이후 Hydrazine 유도체를 DCM에 녹인후 TEA를 첨가하고 0 ℃의 출발물질 용액에 천천히 투입함. 투입 완료 후 상온에서 약 16시간 교반을 수행함. 반응 종결 후 물과 1 M HCl을 이용하여 층분리를 수행하고 유기물층을 건조 농축시키고 MPLC를 이용한 정제를 수행하여 DiF-p-COUP를 수득함. 수득한 DiF-p-COUP를 1M HCl in EA 용매에 용해시키고 온도 45 ℃에서 약 12시간 교반을 수행함. 반응이 완료되면 결정이 생성되며 생성된 결정을 여과 건조하여 058-analogue를 수득함



[그림 2-66. Di-fluoride가 도입된 라말린 유도체 합성 scheme]

차. Hexanoic acid 골격을 가진 라말린 유도체 합성 scheme

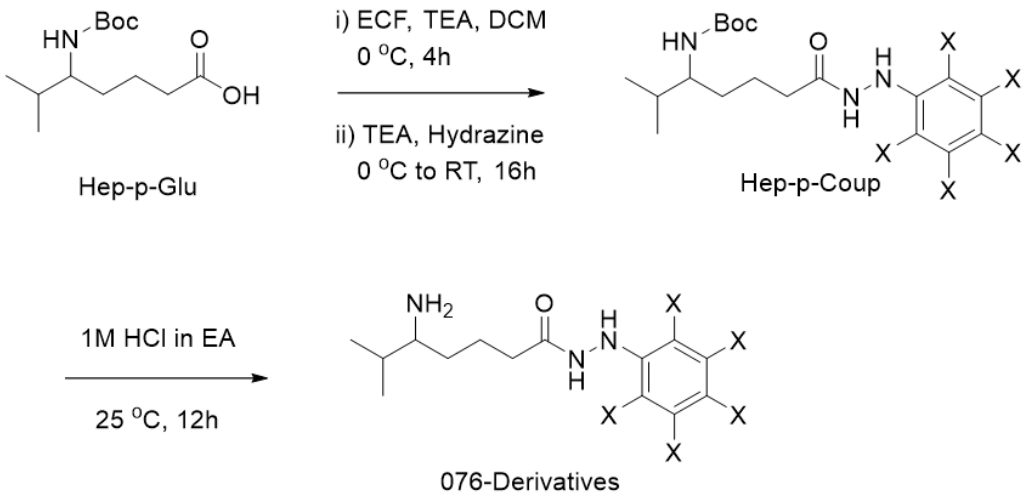
- Boc으로 보호화된 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-methylhexanoic acid 을 용매 DCM에 용해시키고 온도를 0 ℃로 낮춘 후 TEA 및 ECF를 투입하고 약 4시간 교반반응을 수행함. 이후 Hydrazine 유도체를 DCM에 녹인후 TEA를 첨가하고 0 ℃의 출발물질 용액에 천천히 투입함. 투입 완료 후 상온에서 약 16시간 교반을 수행함. 반응 종결 후 물과 1 M HCl을 이용하여 층분리를 수행하고 유기물층을 건조 농축시키고 MPLC를 이용한 정제를 수행하여 Hex-p-COUP를 수득함. 수득한 Hex-p-COUP를 1M HCl in EA 용매에 용해시키고 온도 25 ℃에서 약 18시간 교반을 수행함. 반응이 완료되면 결정이 생성되며 생성된 결정을 여과 건조하여 076-analogue를 수득함



[그림 2-67. Hexanoic acid를 도입한 라말린 유도체 합성 scheme]

카. Heptanoic acid 골격을 가진 라말린 유도체 합성 scheme

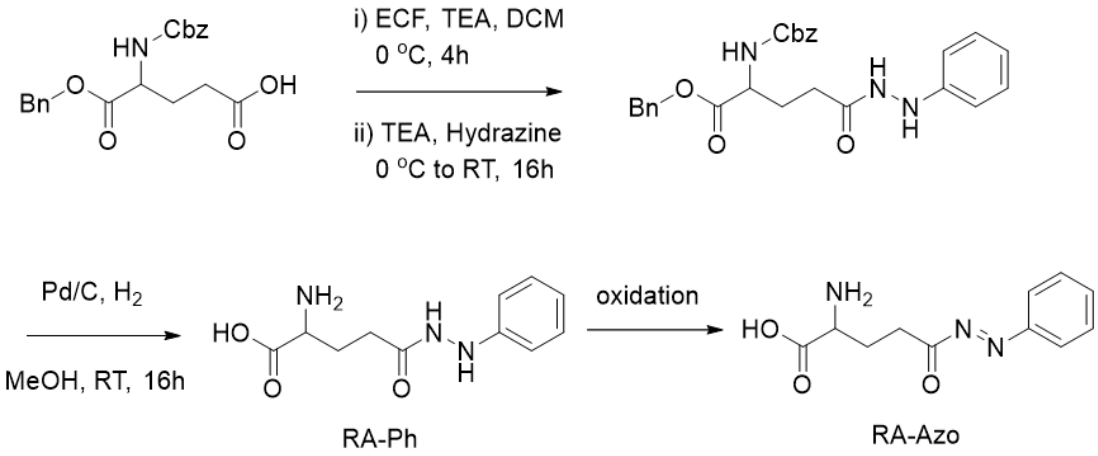
- Boc으로 보호화된 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-methylheptanoic acid 을 용매 DCM에 용해시키고 온도를 0 ℃로 낮춘 후 TEA 및 ECF를 투입하고 약 4시간 교반반응을 수행함. 이후 Hydrazine 유도체를 DCM에 녹인후 TEA를 첨가하고 0 ℃의 출발물질 용액에 천천히 투입함. 투입 완료 후 상온에서 약 16시간 교반을 수행함. 반응 종결 후 물과 1 M HCl을 이용하여 층분리를 수행하고 유기물층을 건조 농축시키고 MPLC를 이용한 정제를 수행하여 Hep-p-COUP를 수득함. 수득한 Hep-p-COUP를 1M HCl in EA 용매에 용해시키고 온도 25 ℃에서 약 18시간 교반을 수행함. 반응이 완료되면 결정이 생성되며 생성된 결정을 여과 건조하여 078-analogue를 수득함



[그림 2-68. Heptanoic acid를 도입한 라말린 유도체 합성 scheme]

타. 라말린 분해산물 합성 RA-Azo 합성 scheme

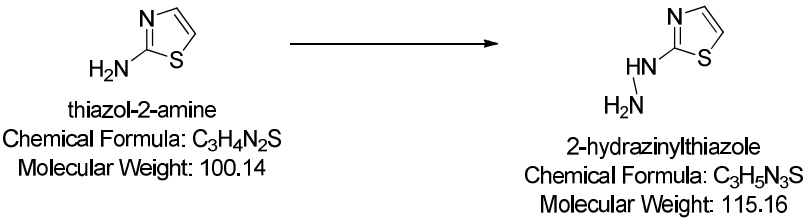
- N-Carbobenzyloxy-1-benzyl-L-glutamic acid를 DCM 용매에 용해시킴. 온도를 0 ℃로 낮춘 후 TEA 및 ECF를 투입하고 약 4시간 교반 반응을 수행함. 이후 phenyl hydrazine를 DCM에 녹인후 TEA를 첨가하여 반응물 준비 후 교반중인 출발물질에 천천히 투입함. 반응 완료 후 재결정화하여 p-Glu-Hyd를 수득함. 이후 p-Glu-Hyd를 MeOH에 녹인 후 Pd/C를 무게대비 10% 양을 투입하고 수소가스 풍선을 이용하여 약 18시간 교반 반응시킴. 여과 및 농축 후 재결정하여 라말린 유도체 RA-Ph를 수득함. 수득한 RA-Ph를 EtOH 용매에 녹인 후 TBN (tert-butyl nitrite)를 첨가한 후 상온에서 약 12시간 교반을 수행함. 반응 종결 이후 완전 농축하여 RA-Azo를 수득함



[그림 2-69. RA-Azo 합성 scheme]

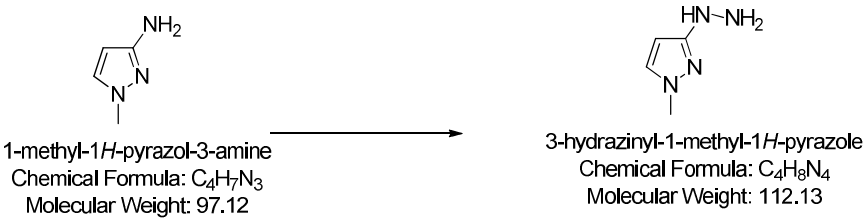
4) 라말린 유도체 합성방법

가. 신규 하이드라진 유도체 합성

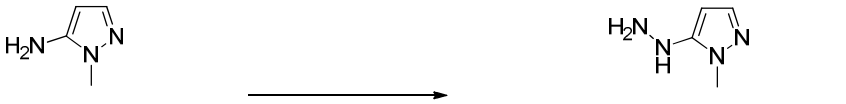


- 2-hydrazinylthiazole hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 2-aminothiazole (M.W 100.14) 4g (0.040 mol, 1.0당량)과 물 40 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 3당량인 12.3 mL를 천천히 적가함. 적가 후 2시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 4.4 g (0.064 mol, 1.6당량)을 물 35.5 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 76 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 25.0 g (0.132 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되지 않아 농축을 실시하고, 다시 diethyl ether와 methanol을 사용하여 결정화를 진행하였으나 고체가 잘 생성되지 않아 농축을 실시하여 수율 24.8%로 제품을 얻었음

극지연구소



- 3-hydrazinyl-1-methyl-1H-pyrazole hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 3-amino-1-methylpyrazole (M.W 97.12) 4 g (0.041 mol, 1.0당량)과 물 40 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 5당량인 21 mL를 천천히 적가함. 적가 후 1.5시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 4.55 g (0.066mol, 1.6당량)을 물 36.7 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 78 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 25.8 g (0.136 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되지 않아 농축을 실시하였음. NMR로 제품이 있음을 확인하였으나, 깨끗하게 정제가 되질 않아 다음 반응을 진행하지 않았음



1-methyl-1*H*-pyrazol-5-amine
Chemical Formula: $C_4H_7N_3$
Molecular Weight: 97.12

5-hydrazinyl-1-methyl-1*H*-pyrazole
Chemical Formula: $C_4H_8N_4$
Molecular Weight: 112.13

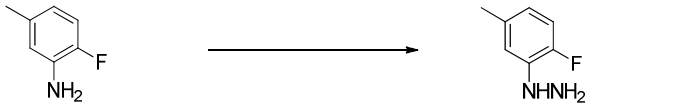
- 5-hydrazinyl-1-methyl-1H-pyrazole hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 5-amino-1-methylpyrazole (M.W 97.12) 4 g (0.041 mol, 1.0당량)과 물 40 mL를 넣음. -1℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 5당량인 21 mL를 천천히 적가함. 적가 후 1.5시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 4.55 g (0.066mol, 1.6당량)을 물 36.7mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 78 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 25.8 g (0.136mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되지 않아 농축을 실시하여 4.75 g의 오일상태의 crude 화합물을 얻었음. NMR로 제품이 있음을 확인하였으나, 깨끗하게 정제가 되질 않아 다음 반응을 진행하지 않았음

KOPRI 극지연구소

2-fluoro-4-methylaniline
Chemical Formula: C_7H_8FN
Molecular Weight: 125.14

(2-fluoro-4-methylphenyl)hydrazine
Chemical Formula: $C_7H_9FN_2$
Molecular Weight: 140.16

- 2-fluoro-4-methylphenylhydrazine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 2-fluoro-4-methylaniline (M.W 125.14) 15.34 g (0.123mol, 1.0당량)과 물 150 mL를 넣음. -1℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 5당량인 62.7 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 2시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 13.53 g (0.196mol, 1.6당량)을 물 109 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 230mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 76.7 g (0.405mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 56.1%의 수율로 12.18 g을 얻었음



2-fluoro-5-methylaniline
Chemical Formula: C_7H_8FN
Molecular Weight: 125.14

(2-fluoro-5-methylphenyl)hydrazine
Chemical Formula: $C_7H_9FN_2$
Molecular Weight: 140.16

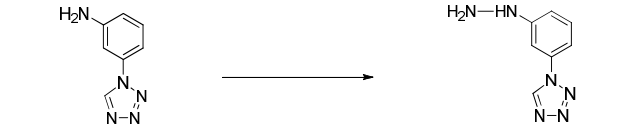
- 2-fluoro-5-methylphenylhydrazine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 2-fluoro- 5-methylaniline (M.W 125.14) 17.79 g (0.142 mol, 1.0당량)과 물 180 mL를 넣음. -1℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 5당량인 72.7 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 2시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 15.7g (0.227 mol, 1.6당량)을 물 126mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 270 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 89 g (0.469mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 60.5 %의 수율로 15.17g을 얻었음

KOPRI 극지연구소

3-fluoro-2-methylaniline
Chemical Formula: C_7H_8FN
Molecular Weight: 125.14

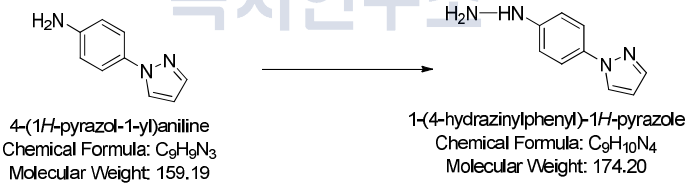
(3-fluoro-2-methylphenyl)hydrazine
Chemical Formula: $C_7H_9FN_2$
Molecular Weight: 140.16

- 3-fluoro-2-methylphenylhydrazine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 3-fluoro- 2-methylaniline (M.W 125.14) 2 g (0.016mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 6.5 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 2시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 1.76 g (0.026 mol, 1.6당량)을 물 14.2 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 30 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 10 g (0.053 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 30.4 %의 수율로 0.86 g을 얻었음

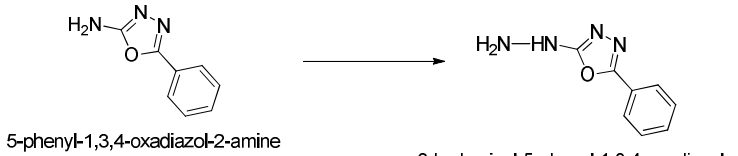


- 1-(3-hydrazinylphenyl)-1H-tetrazole hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 3-(1H- tetrazol-1-yl)aniline (M.W 161.16) 2 g (0.012mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 5.08 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 2시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 1.37 g (0.020 mol, 1.6당량)을 물 11 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 23.6 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 7.77 g (0.041 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 다른 반응과 다르게 고체가 생성되어 물로 세척을 실시하면서 여과를 실시하였음. 얻어진 고체를 NMR 측정하였으나 product가 아닌 것으로 확인되었으며, 여액을 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 제품을 얻었음

KOPRI 극지연구소



- 1-(4-hydrazinylphenyl)-1H-pyrazole hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 4-(1H-tetrazol-1-yl)aniline hydrochloride (M.W 195.58) 2 g (0.010 mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 3당량인 3.14 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 1시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 1.13 g (0.016 mol, 1.6당량)을 물 9.11 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 19.4 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 6.40 g (0.041mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 다른 반응과 다르게 고체가 생성되어 물로 세척을 실시하면서 여과를 실시하였음. 얻어진 고체를 NMR 측정하였으나 product가 아닌 것으로 확인되었으며, 여액을 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 78.3 %로 제품 1.62 g을 얻었음

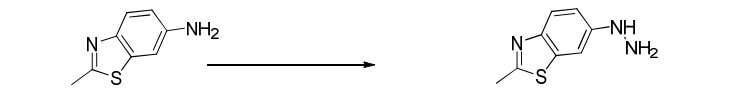


5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-amine
Chemical Formula: $C_8H_7N_3O$
Molecular Weight: 161.16

2-hydrazinyl-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole
Chemical Formula: $C_8H_8N_4O$
Molecular Weight: 176.18

- 2-hydrazinyl-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 2-amino-5-phenyl -1,3,4-oxadiazole (M.W 161.16) 2 g (0.012 mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 5.08 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 1시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 1.37 g (0.020 mol, 1.6당량)을 물 11mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6N HCl 23.6 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 7.77 g (0.041 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 이전 반응과 달라 가열을 실시하여 완전히 고체를 용해시킴. 실온으로 냉각한 후, 50 % NaOH solution으로 basify를 실시하였고 고체가 생성되어 여과를 실시하여 건조 후 NMR 측정을 하였으나 반응이 진행되지 않은 2-amino-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole로 확인됨. 여액을 dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하였으나 고체가 생성되지 않았고, 이전 반응에서 미반응 원료가 많이 남아 반응 중지를 하였음

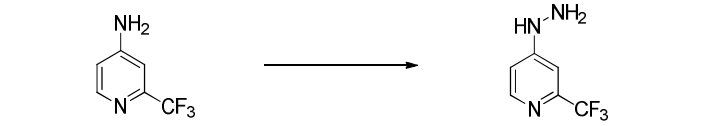
KOPRA
극지연구소



2-methylbenzo[*d*]thiazol-6-amine
Chemical Formula: $C_8H_8N_2S$
Molecular Weight: 164.23

6-hydrazinyl-2-methylbenzo[*d*]thiazole
Chemical Formula: $C_8H_9N_3S$
Molecular Weight: 179.24

- 6-hydrazinyl-2-methylbenzo[*d*]thiazole hydrochloride 합성 : 500mL jacket reactor에 2-methyl-1,3-benzothiazole-6-amine (M.W 164.23) 2g (0.012 mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 4.98 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 2시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 1.34g (0.019 mol, 1.6당량)을 물 10.8 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 23.1 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 7.62 g (0.040mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 제품을 얻었음



2-(trifluoromethyl)pyridin-4-amine
Chemical Formula: $C_6H_5F_3N_2$
Molecular Weight: 162.11

4-hydrazinyl-2-(trifluoromethyl)pyridine
Chemical Formula: $C_6H_6F_3N_3$
Molecular Weight: 177.13

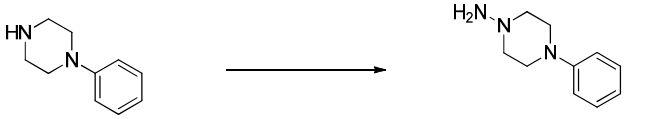
- 4-hydrazinyl-2-(trifluoromethyl)pyridine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 4-amino-2-(trifluoromethyl)pyridine (M.W 162.11) 3 g (0.019 mol, 1.0당량)과 물 30 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 7.6 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 2시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 2.04g (0.030 mol, 1.6당량)을 물 16.45 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 35.2 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 11.6 g (0.061 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 5 0% NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되지 않아 농축을 실시하여 1.5 g을 얻었음. NMR 측정을 실시하여 제품을 확인하였으나 고체화 되지 않고 깨끗하지 않아서 다음 반응으로 진행하지 않았음

KOPRI 극지연구소

4-(thiophen-2-yl)aniline
Chemical Formula: $C_{10}H_9NS$
Molecular Weight: 175.25

(4-(thiophen-2-yl)phenyl)hydrazine
Chemical Formula: $C_{10}H_{10}N_2S$
Molecular Weight: 190.26

- 4-(thiophene-2-yl)phenyl)hydrazine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 4-(thiophene-2-yl)aniline (M.W 175.25) 2 g (0.011 mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 4.67 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 1시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 1.26 g (0.018 mol, 1.6당량)을 물 10.2 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6N HCl 22.6 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 7.14 g (0.038 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 65.9%로 제품 1.64 g을 얻었음

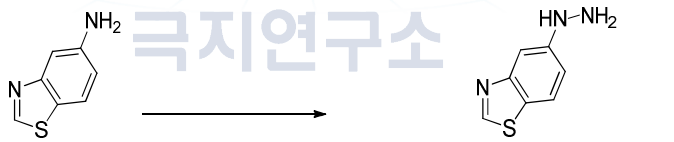


1-phenylpiperazine
Chemical Formula: $C_{10}H_{14}N_2$
Molecular Weight: 162.23

4-phenylpiperazin-1-amine
Chemical Formula: $C_{10}H_{15}N_3$
Molecular Weight: 177.25

- 4-phenylpiperazin-1-amine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 1-phenyl piperazine (M.W 162.23) 5 g (0.031 mol, 1.0당량)과 물 50 mL를 넣음. -1℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 12.6 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 1시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 3.4 g (0.049 mol, 1.6당량)을 물 27.4 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 58.5 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 19.3 g (0.102 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, 고체가 생성되어 여과를 실시하여 NMR 구조 확인을 하였으나 제품이 아닌 것으로 확인됨. Dichlromethane으로 추출을 실시하여 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 20.4 %로 제품 1.35 g을 얻었음

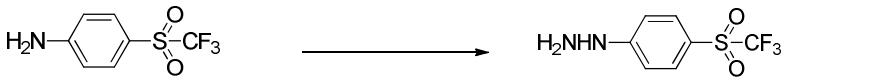
KOPRI 극지연구소



benzo[*d*]thiazol-5-amine
Chemical Formula: $C_7H_6N_2S$
Molecular Weight: 150.20

5-hydrazinylbenzo[*d*]thiazole
Chemical Formula: $C_7H_7N_3S$
Molecular Weight: 165.22

- 5-hydrazinylbenzo[*d*]thiazole hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 benzo[d] thiazol-5-amine (M.W 150.2) 2 g (0.013 mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 5.45 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 1.5시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 1.47 g (0.021 mol, 1.6당량)을 물 11.9 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 26 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 8.33 g (0.043 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 78.2 %로 제품 2.05 g을 얻었음



4-((trifluoromethyl)sulfonyl)aniline
Chemical Formula: $C_7H_6F_3NO_2S$
Molecular Weight: 225.19

(4-((trifluoromethyl)sulfonyl)phenyl)hydrazine
Chemical Formula: $C_7H_7F_3N_2O_2S$
Molecular Weight: 240.20

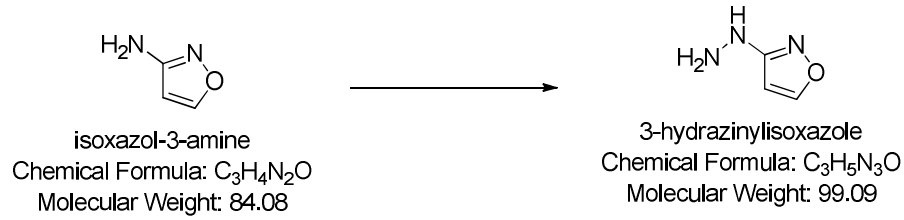
- 4-((trifluoromethyl)sulfonyl)phenyl)hydrazine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 4-trifluoromethylsulfonylaniline (M.W 225.19) 2 g (0.009 mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 3.63 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 1.5시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 0.98 g (0.014 mol, 1.6당량)을 물 7.9 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 17mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 5.56 g (0.029 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 0.8 g을 얻었으나, NMR을 확인한 결과 제품이 제대로 합성이 되지 않은 것으로 확인됨

KOPRI 극지연구소

benzofuran-5-amine
Chemical Formula: C_8H_7NO
Molecular Weight: 133.15

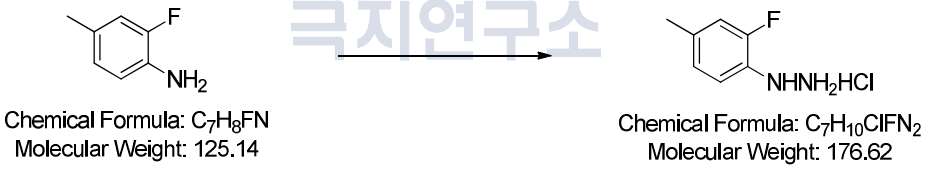
benzofuran-5-ylhydrazine
Chemical Formula: $C_8H_8N_2O$
Molecular Weight: 148.16

- benzofuran-5-yl)hydrazine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 benzofuran -5-amine (M.W 133.15) 2 g (0.015 mol, 1.0당량)과 물 20 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 6.14 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 1시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 1.66 g (0.024 mol, 1.6당량)을 물 13.4 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6N HCl 28.5mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 9.4 g (0.050 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 50.5%로 제품 1.4 g을 얻었고, 여액을 농축하여 수율 25.3 %로 0.7 g을 얻었음



- 3-hydrazinylisoxazole hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 Isoxazole-3-amine (M.W 84.08) 4 g (0.048 mol, 1.0당량)과 물 40 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 4당량인 19.5 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 1시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 5.25 g (0.076 mol, 1.6당량)을 물 42.5 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 90mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 29.8 g (0.157 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되질 않아 농축을 실시하였음. NMR을 확인한 결과 원료 : 제품 = 1 : 3의 비율로 crude 1.69 g을 얻었으며, 정제가 잘 이뤄지지 않아 다음 반응으로 진행하지 않았음

KOPRI 극지연구소



- 2-fluoro-4-methylphenylhydrazine hydrochloride 합성 : 500 mL jacket reactor에 4-fluoro- 2-methylaniline (M.W 125.14) 5 g (0.040 mol, 1.0당량)과 물 50 mL를 넣음. -1 ℃로 냉각을 실시함. conc. HCl 5당량인 20.4 mL를 천천히 적가함. 적가 후 약 2시간 교반 후, $NaNO_2$ (M.W 69.00) 4.41 g (0.064 mol, 1.6당량)을 물 36 mL에 녹여 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 6 N HCl 76 mL에 anhydrous $SnCl_2$ (M.W 189.61) 25 g (0.132 mol, 3.3당량)을 녹인 후, 반응 용기에 천천히 적가함. 적가 완료 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 교반을 실시함. 0 ℃로 냉각을 실시한 후, 50 % NaOH solution으로 basify, dichloromethane으로 추출을 실시함. 유기층을 모은 후 anhydrous $MgSO_4$로 dry 후 여과를 실시함. 얻어진 유기층에 HCl (g)을 bubbling을 실시하여 hydrochloride salt를 만듦. 고체가 생성되어 여과를 실시하여 수율 70.2 %의 수율로 4.96 g을 얻었음

나. 라말린 유도체 합성방법

- 라말린 유도체 일반 합성 방법

- EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)를 이용한 아마이드 커플링 : 반응기에 carboxylic acid (1.0 당량), Amine or hydrazine (1.1 당량), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (2.0 당량), Hydroxybenzotriazole (1.3 당량), 4-Dimethylaminopyridine (0.1 당량), Dimethylformamide (0.3 M)을 넣고, *N,N*-Diisopropylethylamine (M.W 129.25, d=0.742) (0.1 당량)을 적가함. 적가가 완료된 후, 상온에서 overnight 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, H_2O 로 반응을 종결시킴. 반응 혼합물을 EtOAc를 사용하여 추출한 후 얻은 유기층을 염수로 세척한 다음 무수 $MgSO_4$ 으로 건조하여 여과함. 여과한 용액의 용매를 감압증류하여 농축한 뒤 얻은 잔류물을 중압 액체 크로마토그래피로 분리정제하여 화합물을 얻었음

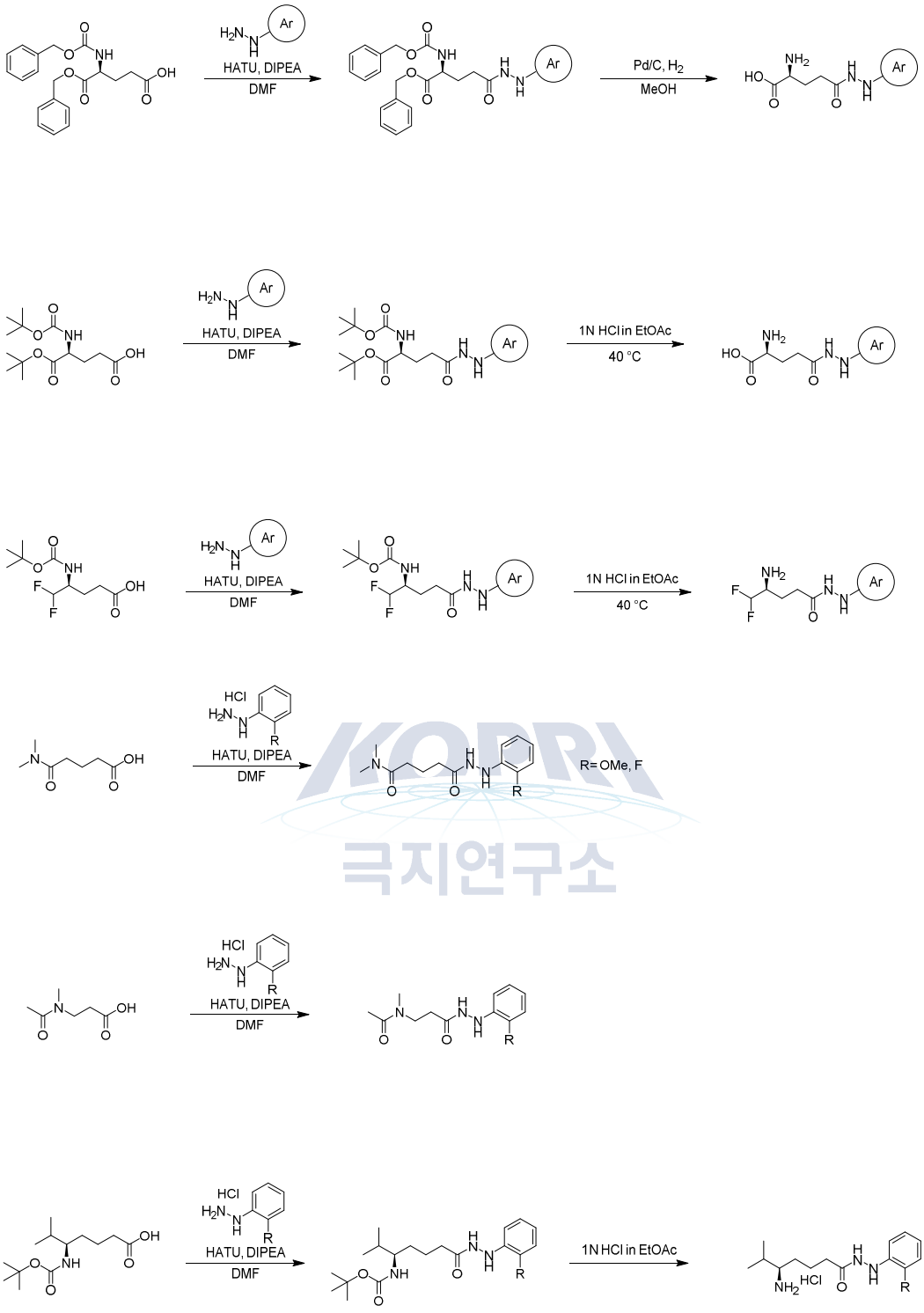
- HATU (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo [4,5-b] pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate)를 이용한 아마이드 커플링 : dimethylformamide (0.1 M) 용매 내 carboxylic acid (1.0 당량), amine or hydrazine (1.1 당량), 1-[Bis(dimethylamino)methylene]- 1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU, 2.0 당량)를 가하고 *N,N*-diisopropylethylamine (M.W 129.25, d=0.742) (3.0 당량)를 적가함. 반응 혼합물은 상온에서 밤새워 교반하고 ethyl acetate를 사용하여 추출함. Brine으로 세정(washing), $MgSO_4$로 수분제거(drying) 및 감압 농축함. MPLC on silica gel로 목적 화합물을 얻었음

- HCl을 이용한 Boc기의 탈보호화 반응 (Deprotection of Boc with HCl) : 출발물질을 BOC group과 tert-butyl group으로 보호화 된 화합물 (1.0 당량) 으로 하여 반응 용기에 1M hydrogen chloride in ethyl acetate (4.0 당량)을 넣고 상온에서 3시간 동안 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 감압 증류하여 농축한 뒤 용매를 제거하고 Ethyl acetate (EA)를 이용하여 재결정 또는 MPLC on silica gel로 목적 화합물을 수득함

- HCl을 이용한 Boc기와 tert-butyl기의 탈보호화 반응 (Deprotection of Boc and *t*-butyl group with HCl) : 반응기에 BOC group과 tert-butyl group으로 보호 화된 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in ethyl acetate (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃ 에서 밤새워 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 감압 농축하여 용매를 제거하고 ethyl acetate (EA)를 이용하여 재결정하여 HCl 염으로서 화합물을 수득함

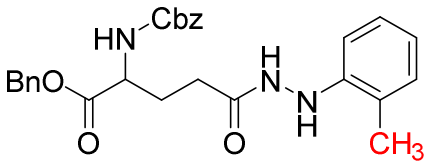
- H_2와 Pd/C을 이용한 Cbz기와 benzyl기의 탈보호화 반응 (Deprotection of Cbz and benzyl group with H_2 and Pd/C) : Cbz와 Benzyl기로 보호화된 화합물 (1.0 당량)을 methanol에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon (0.5 당량)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 화합물을 수득함

KOPRI 극지연구소



[그림 2-70. 라말린 유도체 일반 합성법 scheme 예시]

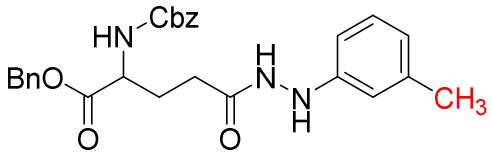
- 연결반응을 통한 보호화된 유도체별 합성 방법



Molecular Weight: 475.55

p-RA-2Me

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(o-tolylamino)glutaminate (p-RA-2Me) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5.0 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-methylphenyl hydrazine HCl (M.W. 158.63) 2.56 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 74.8 %로 4.78 g의 제품 수득함

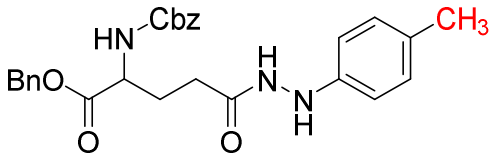


Molecular Weight: 475.55

p-RA-3Me

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(m-tolylamino)glutaminate (p-RA-3Me) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 3-methylphenyl

hydrazine HCl (M.W 158.63) 2.56 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 78.0 %로 4.99 g의 제품을 수득함

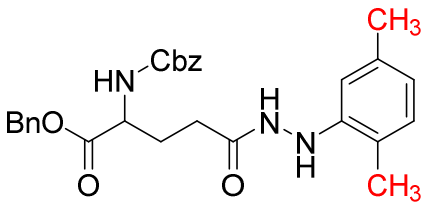


Molecular Weight: 475.55

p-RA-4Me

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(p-tolylamino)glutaminate (p-RA-4Me) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-methylphenyl hydrazine HCl (M.W 158.63) 2.56 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 72.5 %로 4.64 g의 제품을 수득함

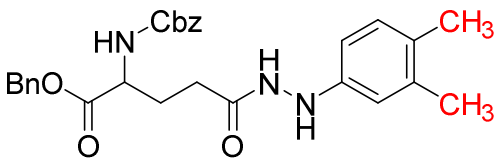
KOPRI 극지연구소



Molecular Weight: 489.57

p-RA-25Me

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((2,5-dimethylphenyl)amino)glutaminate (p-RA-25Me) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2,5-dimethylphenyl hydrazine HCl (M.W 172.66) 2.79 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 72.5 %로 4.78 g의 제품을 수득함

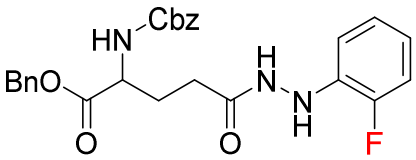


Molecular Weight: 489.57

p-RA-34Me

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((3,4-dimethylphenyl)amino)glutaminate (p-RA-34Me) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시한다. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한다. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시한다. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가한다. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지하며 반응을 진행시킨다. 또 다른 반응 용기에

3,4-dimethylphenyl hydrazine HCl (M.W 172.66) 2.79 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 70.1 %로 4.61 g의 제품을 수득함

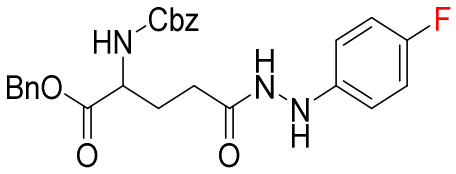


Molecular Weight: 479.51

p-RA-2F

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((2-fluorophenyl)amino)glutaminate (p-RA-2F) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-fluorophenyl hydrazine HCl (M.W 162.59) 2.63 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 85.0 %로 5.48 g의 제품을 수득함

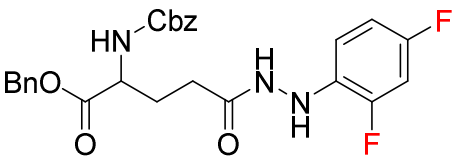
KOPRI 극지연구소



Molecular Weight: 479.51

p-RA-4F

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((4-fluorophenyl)amino)glutaminate (p-RA-4F) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시한다. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한다. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시한다. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가한다. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지하며 반응을 진행시킨다. 또 다른 반응 용기에 4-fluorophenyl hydrazine HCl (M.W 162.59) 2.63 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 65.0 %로 4.20 g의 제품을 수득함

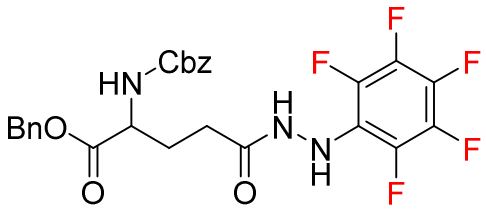


Molecular Weight: 497.50

p-RA-24F

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((2,4-difluorophenyl)amino)glutaminate (p-RA-24F) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응

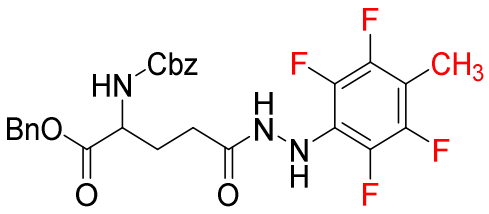
용기에 2,4-difluorophenyl hydrazine HCl (M.W. 180.58) 3.0 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 82.3 %로 5.51 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 551.47

p-RA-PF

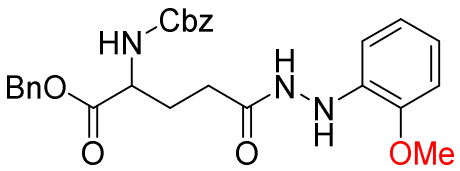
- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((pentafluorophenyl)amino)glutaminate (p-RA-PF) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 pentafluorophenyl hydrazine HCl (M.W. 234.55) 3.79 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 86.3 %로 6.26 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 547.51

p-RA-HFT

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((2,3,5,6-heptafluoro-p-tolylphenyl)amino)glutaminate (p-RA-HFT) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2,3,5,6-heptafluoro-p-tolylphenyl hydrazine HCl (M.W. 230.59) 3.73 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 88.0 %로 6.3 g의 제품을 수득함

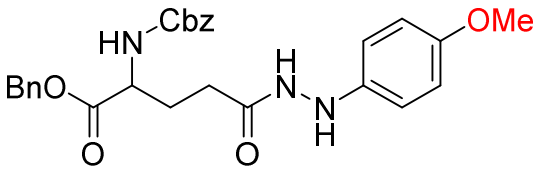


Molecular Weight: 491.54

p-RA-2OMe

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((2-methoxyphenyl)amino)glutaminate (p-RA-2OMe) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-methoxyphenyl hydrazine HCl (M.W. 174.63) 2.82 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과

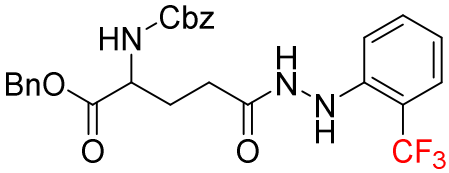
dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 75 %로 4.96 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 491.54

p-RA-4OMe

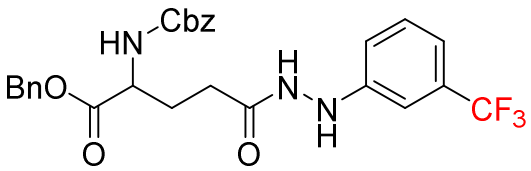
- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((4-methoxyphenyl)amino)glutaminate (p-RA-4OMe) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-methoxyphenyl hydrazine HCl (M.W. 174.63) 2.82 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 77.2 %로 5.11 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 529.52

p-RA-2CF3

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((2-trifluoromethylphenyl)amino)glutaminate (p-RA-2CF3) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-trifluoromethylphenyl hydrazine HCl (M.W. 212.6) 3.44 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 84 %로 5.99 g의 제품을 수득함

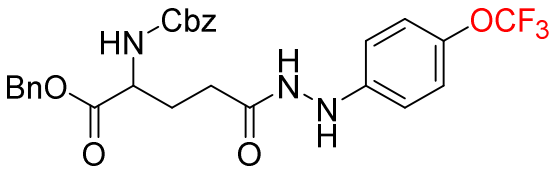


Molecular Weight: 529.52

p-RA-3CF3

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((3-trifluoromethylphenyl)amino)glutaminate (p-RA-3CF3) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기

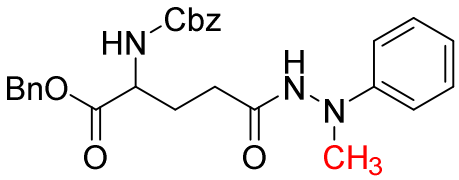
에 3-trifluoromethylphenyl hydrazine HCl (M.W. 212.6) 3.44 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 61.2 %로 4.36 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 545.52

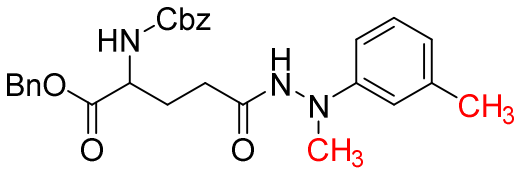
p-RA-4OCF3

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((4-trifluoromethoxyphenyl)amino)glutaminate (p-RA-4OCF3) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-trifluoromethyoxyphenyl hydrazine HCl (M.W. 228.6) 3.69 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 75.2 %로 5.52 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 475.55
p-RA-Hyd-Me

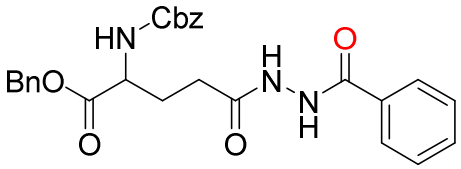
- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(methyl(phenyl)amino)glutaminate (p-RA-Hyd-Me) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1-methyl-1-phenyl hydrazine (M.W. 122.17) 1.97 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 57.3 %로 3.67 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 489.57
p-RA-Hyd-Me-Tol

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(methyl(m-tolyl)amino)glutaminate (p-RA-Hyd-Me-tol) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기

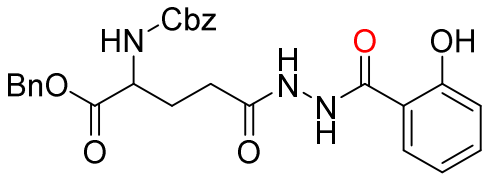
에 1-methyl-1-m-tolyl hydrazine (M.W. 136.20) 2.20 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 43 %로 2.83 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 489.53

p-RA-Benzo

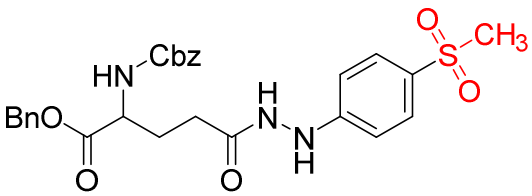
- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(2-hydroxylbenzamido) glutaminate (p-RA-Sali) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 benzohydrizide HCl (M.W. 172.61) 2.79 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 92 %로 6.06 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 505.53

p-RA-Sali

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-benzamido glutaminate (p-RA-sali) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 benzohydrizide HCl (M.W. 172.61) 2.79 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 92 %로 6.06 g의 제품을 수득함

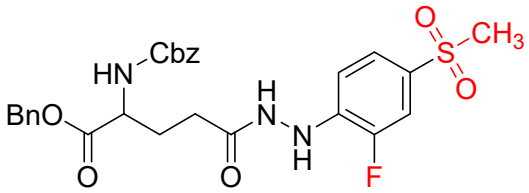


Molecular Weight: 539.60

p-RA-12A

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((4-(methylsulfonyl) phenyl) amino) glutaminate (p-RA- 12A) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-(methansulfonyl)phenyl hydrazine (M.W. 186.23) 3.01 g (16.16

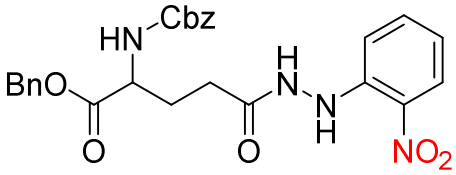
mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 74.3 %로 5.40 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 557.59

p-RA-12B

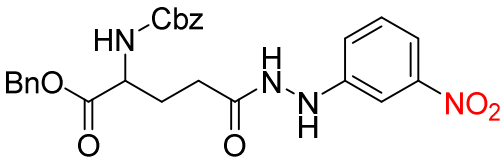
- Benzyl N2-((benzyloxy) carbonyl) -N5-((4-(methylsulfonyl)-2-fluorophenyl) amino glutaminate (p-RA-12B) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-(methansulfonyl)-2-fluorophenyl hydrazine (M.W. 204.22) 3.30 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 81.2 %로 6.09 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 506.52

p-RA-2N

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(2-nirtophenyl)amino glutaminate (p-RA-2N) 의 합성 : 냉각을 할수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-nirtophenyl hydrazine HCl (M.W. 189.60) 3.06 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 72.3 %로 4.93 g의 제품을 수득함

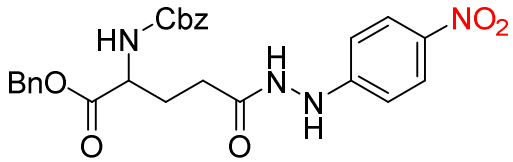


Molecular Weight: 506.52

p-RA-3N

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(3-nirtophenyl)amino glutaminate (p-RA-3N) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기

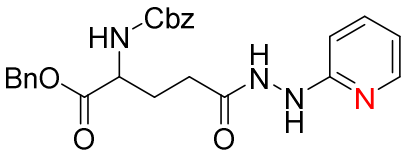
에 3-nirtophenyl hydrazine HCl (M.W. 189.60) 3.06 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 83.0 %로 5.67 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 506.52

p-RA-4N

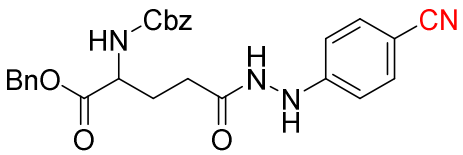
- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(4-nirtophenyl)amino glutaminate (p-RA-4N) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-nirtophenyl hydrazine HCl (M.W. 189.60) 3.06 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 78.7 %로 5.36 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 462.51

p-RA-PYD

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-(pyridin2-ylamino)glutaminate (p-RA-PYD) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-hydrazinylpyridine HCl (M.W. 145.59) 2.35 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 72.5 %로 4.51 g의 제품을 수득함

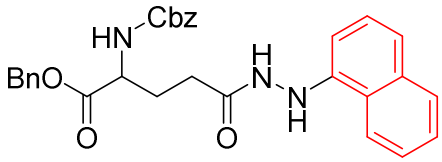


Molecular Weight: 486.53

p-RA-p-Nit

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((4-cyanophenyl)amino)glutaminate (p-RA-PYD) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-cyanophenyl hydrazine HCl (M.W. 169.61) 2.74 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과

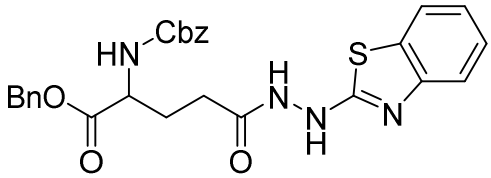
dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 63.1 %로 4.13 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 511.58

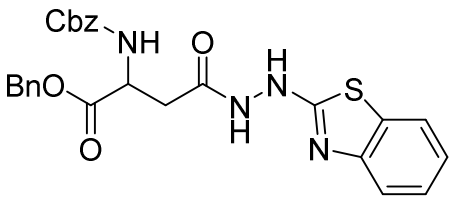
p-RA-NAP

- Benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((naphthalen-1-ylamino)glutaminate (p-RA-NAP) 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethnane 50 mL를 넣고, -2 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가. 적가가 완료된 후 -2 ℃에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 naphthalen-1-yl hydrazine HCl (M.W. 194.66) 3.15 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. Ethyl acetate를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 43.1 %로 2.97 g의 제품을 수득함



Molecular Weight: 518.59

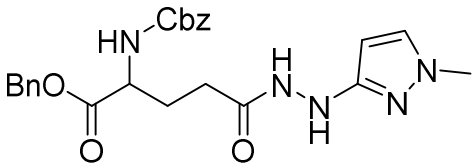
- Benzyl 5-(2-(benzo[d] thiazol-2-yl) hydrazinyl) -2-(((benzyloxy) carbonyl) amino)-5-oxopentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 3.75 g (0.010 mol, 1.0 당량), dichloromethane 38 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.22 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 1.31 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 2-hydrazinylbenzo[d]thiazole (M.W 165.22) 2 g (0.012 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 20 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.22 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1N HCl 100 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether를 사용하여 고체를 slurry 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 27.2 %로 1.41 g (0.003 mol)의 제품을 얻었음



Molecular Weight: 504.56

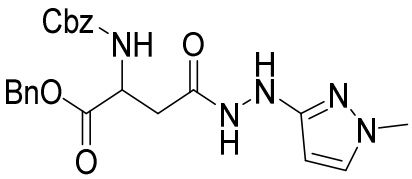
- Benzyl 4-(2-(benzo[d] thiazol-2-yl) hydrazinyl) -2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -4-oxobutanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 3.60 g (0.010 mol, 1.0 당량), dichloromethane 36 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.22 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 1.31 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 2-hydrazinylbenzo[d]thiazole (M.W 165.22) 2 g (0.012 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 20 mL를 가함. 여기에

triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.22 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1N HCl 100 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether를 사용하여 고체를 slurry 시킨 후, 여과 건조를 실시하여 수율 31.7 %로 1.60 g (0.003mol)의 제품을 얻었음



Molecular Weight: 465.51

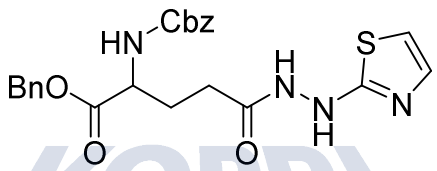
- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -5-(2-(1-methyl-1H-pyrazol-3-yl) hydrazinyl) -5-oxopent anoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 4.69 g (0.013 mol, 1.0 당량), dichloromethane 47 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.53 g (0.015 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 1.64 g (0.015 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 3-hydrazinyl-1-methyl-1H-pyrazole hydrochloride (M.W 148.59) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-052) 2.25 g (0.015 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 23 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.53 g (0.015 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 130 mL → 1N HCl 130 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 130 mL → H_2O 130 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 결정화를 진행하였으나 결정이 석출되지 않고 끈적이는 상태로 물질을 얻었음



Molecular Weight: 451.48

- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino)-4-(2-(1-methyl –1H-pyrazol-3-yl) hydrazinyl) -4-oxobuta noate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 4.51 g (0.013

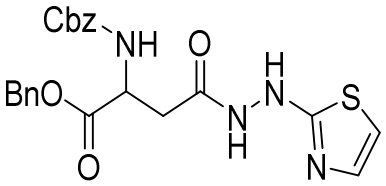
mol, 1.0 당량), dichloromethane 45 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.53 g (0.015 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 1.64 g (0.015mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 3-hydrazinyl-1-methyl-1H-pyrazole hydrochloride (M.W 148.59) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-052) 2.25 g (0.015 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 23 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.53 g (0.015 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 130 mL → 1N HCl 130 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 130 mL → H_2O 130 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 결정화를 진행하였으나 결정이 석출되지 않고 끈적이는 상태로 물질을 얻었음



Molecular Weight: 468.53

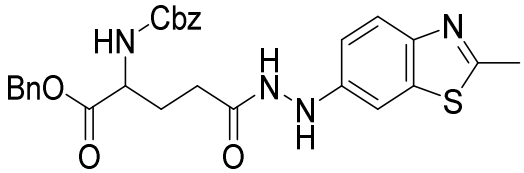
KOPRI 극지연구소

- Benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxo-5-(2-(thiazol-2-yl)hydrazinyl)pentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 1.02 g (0.003 mol, 1.0 당량), dichloromethane 10 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.33 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.36 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 2-hydrazinylthiazole hydrochloride (M.W 151.62) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-049) 0.5 g (0.003 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 5mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.33 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 30mL → 1N HCl 30 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 30 mL → H_2O 30 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 24.2 %로 제품 0.34 g (0.001mol)을 얻었음



Molecular Weight: 454.50

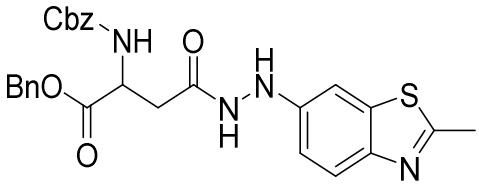
- Benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-oxo-4-(2-(thiazol-2-yl)hydrazinyl)butanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 0.98 g (0.003 mol, 1.0 당량), dichloromethane 10 mL를 넣고, -1℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.33 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.36 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 2-hydrazinylthiazole hydrochloride (M.W 151.62) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-049) 0. 5g (0.003mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 5 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.33 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 30 mL → 1N HCl 30 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 30 mL → H_2O 30 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시하였음. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하였으나 NMR 확인 결과 깨끗하지 않아 다음 반응으로 진행하지 않았음



Molecular Weight: 532.62

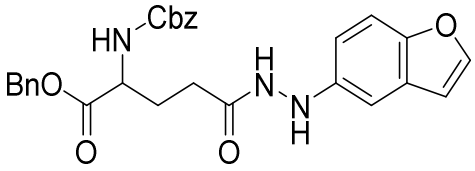
- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino)-5-(2-(2-methylbenzo[d] thiazol-6-yl)hydrazinyl) -5-oxopentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 2.15 g (0.006 mol, 1.0 당량), dichloromethane 22 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.70 g (0.007 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.75 g (0.007 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 6-hydrazinyl-2-methylbenzo[d]thiazole hydrochloride (M.W 215.70) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-081) 1.5 g (0.007 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 15 mL를 가

함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.70 g (0.007 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 59.5 %로 제품 1.90 g (0.004 mol)을 얻었음



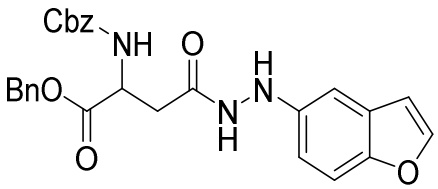
Molecular Weight: 518.59

- Benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino) -4-(2-(2-methylbenzo[d]thiazol-6-yl) hydrazinyl) -4-oxob utanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 2.07 g (0.006 mol, 1.0 당량), dichloromethane 21 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.70 g (0.007 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.75 g (0.007 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 6-hydrazinyl-2-methylbenzo[d]thiazole hydrochloride (M.W 215.70) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-081) 1.5 g (0.007 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 15 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.70 g (0.007 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 39.5 %로 제품 1.23 g (0.002 mol)을 얻었음 (분석 결과 깨끗하지 않아 다음 반응으로 진행하지 않았음)



Molecular Weight: 501.54

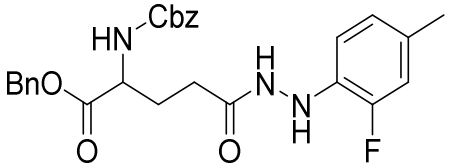
- Benzyl 5-(2-(benzofuran-5-yl)hydrazinyl)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 1.68 g (0.005 mol, 1.0 당량), dichloromethane 17 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.55 g (0.005 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.59 g (0.005 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 benzofuran-5-ylhydrazine hydrochloride (M.W 184.62) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-098) 1.0 g (0.005 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 10 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.55 g (0.005 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 73.0 %로 제품 1.83 g (0.004 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 487.51

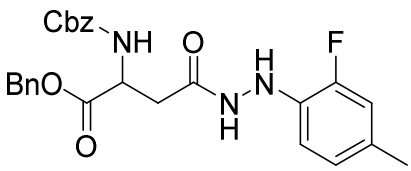
- Benzyl 4-(2-(benzofuran-5-yl)hydrazinyl)-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-oxobutanoate 합성 (Exp. 126-KSO-21-hik12-GPH-031) : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 1.61 g (0.005 mol, 1.0 당량), dichloromethane 16 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.55 g (0.005 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.59 g (0.005mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 benzofuran-5-ylhydrazine hydrochloride (M.W 184.62) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-098) 1.0 g (0.005 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 10 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.55 g

(0.005 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 41.4 %로 제품 1.01 g (0.002 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 493.54

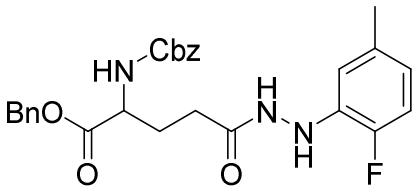
- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -5-(2-(2-fluoro-4-methylphenyl) hydrazinyl) -5-oxopentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 10.2 g (0.028mol, 1.0 당량), dichloromethane 102 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 3.35 g (0.033 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 3.59 g (0.033 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 (2-fluoro-4-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (M.W 176.62) (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-009) 5.8 4g (0.033 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 58.4 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 3.35 g (0.033 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 300 mL → 1N HCl 300 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 300 mL → H_2O 300 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 63.6 %로 제품 8.79 g (0.018 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 479.51

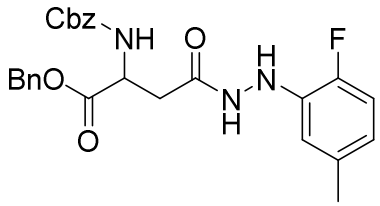
- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -5-(2-(2-fluoro-4-methylphenyl) hydrazinyl) -5-oxopentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 9.85 g (0.028 mol, 1.0 당량), dichloromethane 99 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면

Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 3.35 g (0.010 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 3.59 g (0.033mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 (2-fluoro-4-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (M.W 176.62) (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-009) 5.84 g (0.010 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 58 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.99 g (0.010 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 300 mL → 1N HCl 300 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 300 mL → H_2O 300 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 55.3 %로 제품 7.42 g (0.015 mol)을 얻었음



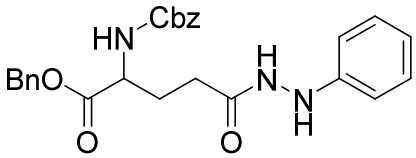
Molecular Weight: 493.54

- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -5-(2-(2-fluoro-5-methylphenyl) hydrazinyl) -5-oxopentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 12.9 g (0.035 mol, 1.0 당량), dichloromethane 129 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 4.2 g (0.042 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 4.51 g (0.042mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 (2-fluoro-5-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (M.W 176.62) (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-012) 7.34 g (0.042 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 73 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 4.2 g (0.042 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 400 mL → 1N HCl 400 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 400 mL → H_2O 400 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 66.8 %로 제품 11.54 g (0.023 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 479.51

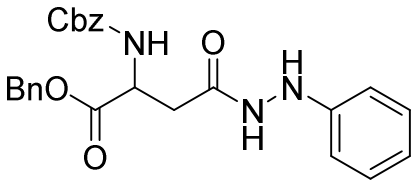
- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -4-(2-(2-fluoro-5-methylphenyl) hydrazinyl) -4-oxobutanoate 합성 (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-040) : Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-036) : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 12.4 g (0.035 mol, 1.0 당량), dichloromethane 124 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 4.2 g (0.042 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 4.51 g (0.042mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 (2-fluoro-5-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (M.W 176.62) (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-012) 7.34 g (0.042 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 73 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 4.2 g (0.042 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 400 mL → 1N HCl 400 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 400 mL → H_2O 400 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 41.8 %로 제품 7.02 g (0.015 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 461.52

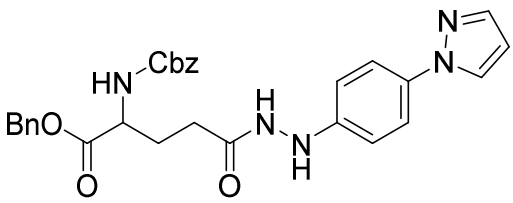
- Benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxo-5-(2-phenylhydrazinyl)pentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 7.15 g (0.019mol, 1.0 당량), dichloromethane 72 mL를 넣고, -1℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 2.34 g (0.023 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 2.51 g (0.023 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 phenylhydrazine (M.W 108.14) 2.5 g (0.023 mol, 1.2 당량)과

dichloromethane 25mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 2.34 g (0.023 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 67.3 %로 제품 5.9 g (0.013 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 447.49

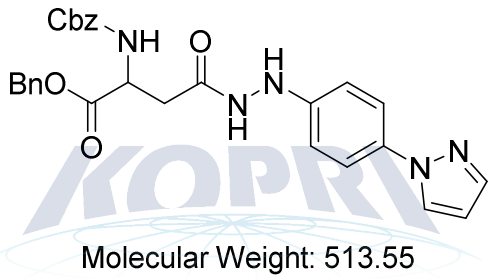
- Benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-oxo-4-(2-phenylhydrazinyl)butanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 6.88 g (0.019 mol, 1.0 당량), dichloromethane 69 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 2.34 g (0.023 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 2.51 g (0.023 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15℃에서 1시간, -2℃에서 3시간 유지 후, -15℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 phenylhydrazine (M.W 108.14) 2.5 g (0.023 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 25 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 2.34 g (0.023 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 slurry 시킨 후, 고체 여과를 실시하여 수율 17.2 %로 제품 1.46 g (0.003 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 527.58

- Benzyl 5-(2-(4-(1H-pyrazol-1-yl) phenyl) hydrazinyl)-2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -5-oxopentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 1.03 g (0.003 mol, 1.0 당량), dichloromethane 10 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면

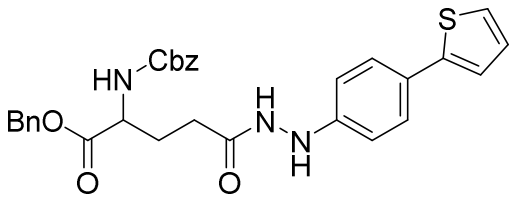
Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.34 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.36 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 1-(4-hydrazinylphenyl)-1H-pyrazole hydrochloride (M.W 210.66) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-073) 0.7 g (0.003 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 7 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.34 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 생성시키고 (시간이 오래 걸림), 여과를 실시하여 수율 18.95 %로 제품 0.3 g (0.001 mol)을 얻었음(양이 적어 다음 반응으로 진행하지 않음)



Molecular Weight: 513.55

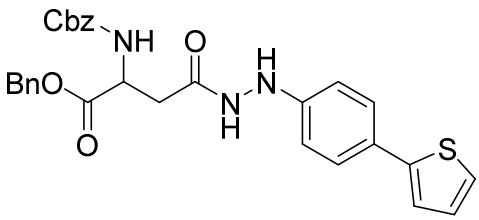
KOPRI 극지연구소

- Benzyl 4-(2-(4-(1H-pyrazol-1-yl) phenyl) hydrazinyl)-2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -4-oxobutanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 0.99g (0.003 mol, 1.0 당량), dichloromethane 10 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.34 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.36 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 1-(4-hydrazinylphenyl)-1H-pyrazole hydrochloride (M.W 210.66) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-073) 0.7 g (0.003 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 7 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.34 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 생성시키고, 생성된 고체를 여과하여 수율 10.4 %로 제품 0.16 g (0.0003 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 543.64

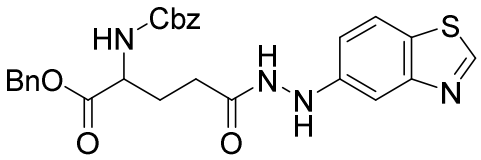
- Benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino) -5-oxo-5-(2-(4-(thiophen-2-yl) phenyl) hydrazinyl) pentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 0.96 g (0.003 mol, 1.0 당량), dichloromethane 10 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.31 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.34 g (0.003mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 (4-(thiophen-2-yl)phenyl)hydrazine hydrochloride (M.W 226.73) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-087) 0.7 g (0.003 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 7 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.31 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 생성시키고, 여과를 실시하여 수율 61.6 %로 제품 0.87 g (0.0016 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 529.61

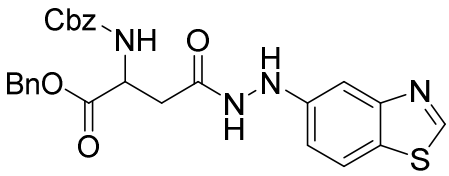
- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl)amino)-4-oxo-4-(2-(4-(thiophen-2-yl) phenyl) hydrazinyl) butanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 0.92 g (0.003mol, 1.0 당량), dichloromethane 9 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.31 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.34 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 (4-(thiophen-2-yl)phenyl)hydrazine hydrochloride

(M.W 226.73) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-087) 0.7 g (0.003 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 7 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.31 g (0.003 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 생성시키고, 여과를 실시하여 수율 21.8 %로 제품 0.3 g (0.0016 mol)을 얻었으나 HPLC 측정 결과 깨끗하지 않아 다음 반응으로 진행하지 않았음



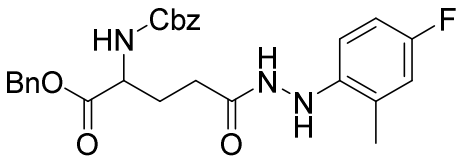
Molecular Weight: 518.59

- Benzyl 5-(2-(benzo[d] thiazol-5-yl) hydrazinyl) -2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -5-oxopentanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 1.38 g (0.0037 mol, 1.0 당량), dichloromethane 14 mL를 넣고, -1℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.45 g (0.0045 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.48 g (0.0045mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 5-hydrazinylbenzo[d]thiazole hydrochloride (M.W 201.68) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-092) 0.9 g (0.0045 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 9 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.45 g (0.0045 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 생성시키고, 여과를 실시하여 수율 32.3 %로 제품 0.62 g (0.0012 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 504.56

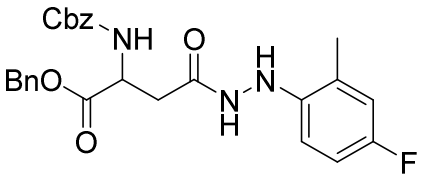
- Benzyl 4-(2-(benzo[d] thiazol-5-yl) hydrazinyl) -2-(((benzyloxy) carbonyl) amino)-4-oxobutanoate 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp-OBnl 1.33 g (0.0037 mol, 1.0 당량), dichloromethane 13 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.45 g (0.0045 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 0.48 g (0.0045mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 5-hydrazinylbenzo[d]thiazole hydrochloride (M.W 201.68) (Exp. 113-KSO-21-hik08-GPH-092) 0.9 g (0.0045 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 9 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 0.45 g (0.0045 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 200 mL → 1N HCl 200 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 200 mL → H_2O 200 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시하여 끈적이는 물질 1.68 g을 얻었음



Molecular Weight: 493.54

- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino)-5-(2-(4-fluoro-2-methyl phenyl) hydrazinyl) -5-oxopentanoate 합성 (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-020) : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Glu-OBnl 3.85 g (0.010 mol, 1.0 당량), dichloromethane 38.5 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.26 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 1.35g (0.012 mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 (4-fluoro-2-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (M.W 176.62) (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-015) 2.2 g (0.012 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 22 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.26 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료

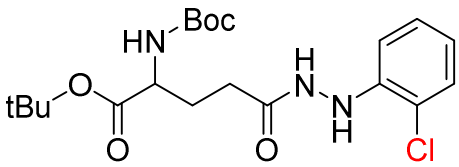
되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1N HCl 100 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 생성시키고, 여과를 실시하여 수율 71.1 %로 제품 3.51 g (0.007 mol)을 얻었음



Molecular Weight: 479.51

- Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino)-4-(2-(4-fluoro-2-methylphenyl) hydrazinyl) -4-oxobutan oate 합성 (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-024) : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Z-Asp –OBnl 3.71 g (0.010 mol, 1.0 당량), dichloromethane 37 mL를 넣고, -1 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.26 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 적가함. 적가 후 –15 ℃로 냉각을 실시함. 온도가 유지된 후 ethyl chloroformate (M.W 108.52) 1.35 g (0.012mol, 1.2 당량)을 반응 용기에 천천히 적가함. 적가가 완료된 후, -15 ℃에서 1시간, -2 ℃에서 3시간 유지 후, -15 ℃로 냉각함. 또 다른 반응 용기에 (4-fluoro-2-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (M.W 176.62) (Exp. 134-KSO-21-hik14-GPH-015) 2.2 g (0.012 mol, 1.2 당량)과 dichloromethane 22 mL를 가함. 여기에 triethylamine (M.W 101.19, d=0.726) 1.26 g (0.012 mol, 1.2 당량)을 천천히 적가한 후, 여기서 제조된 -hydrazine solution을 main 반응기에 천천히 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 올라가도록 하여 20 ℃ 근처로 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1N HCl 100 mL → 0.5N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 dry, 여과, 농축을 실시함. diethyl ether로 고체를 생성시키고, 여과를 실시하여 수율 36.3 %로 제품 1.74 g (0.004 mol)을 얻었음

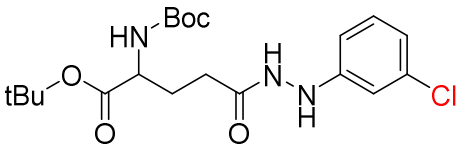
KOPRI 극지연구소



Molecular Weight: 427.93

Boc-Glu-2Cl

- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((2-chlorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-chlorophenyl hydrazine HCl (M.W. 179.04) 3.54 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

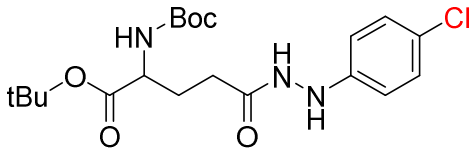


Molecular Weight: 427.93

Boc-Glu-3Cl

- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((3-chlorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 3-chlorophenyl hydrazine HCl (M.W. 179.04) 3.54 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)

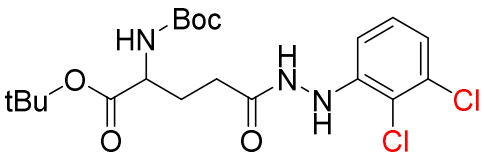
을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 427.93

Boc-Glu-4Cl

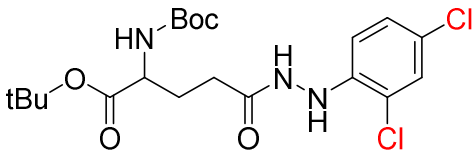
- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((4-chlorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-chlorophenyl hydrazine HCl (M.W. 179.04) 3.54 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 462.37

Boc-Glu-23Cl

- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((2,3-dichlorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2,3-dichlorophenyl hydrazine HCl (M.W. 213.49) 4.22 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

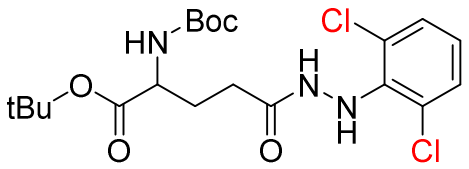


Molecular Weight: 462.37

Boc-Glu-24Cl

- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((2,4-dichlorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2,4-dichlorophenyl hydrazine HCl (M.W. 213.49) 4.22 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과

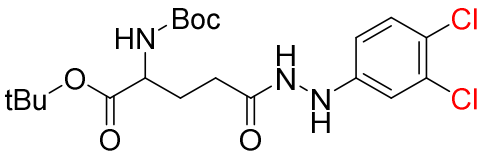
dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 462.37

Boc-Glu-26Cl

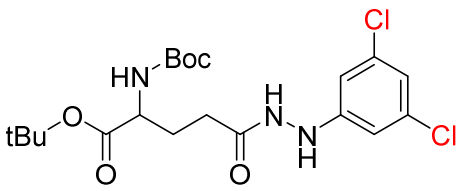
- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((2,6-dichlorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2,6-dichlorophenyl hydrazine HCl (M.W. 213.49) 4.22 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 462.37

Boc-Glu-34Cl

- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((3,4-dichlorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 3,4-dichlorophenyl hydrazine HCl (M.W. 213.49) 4.22 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

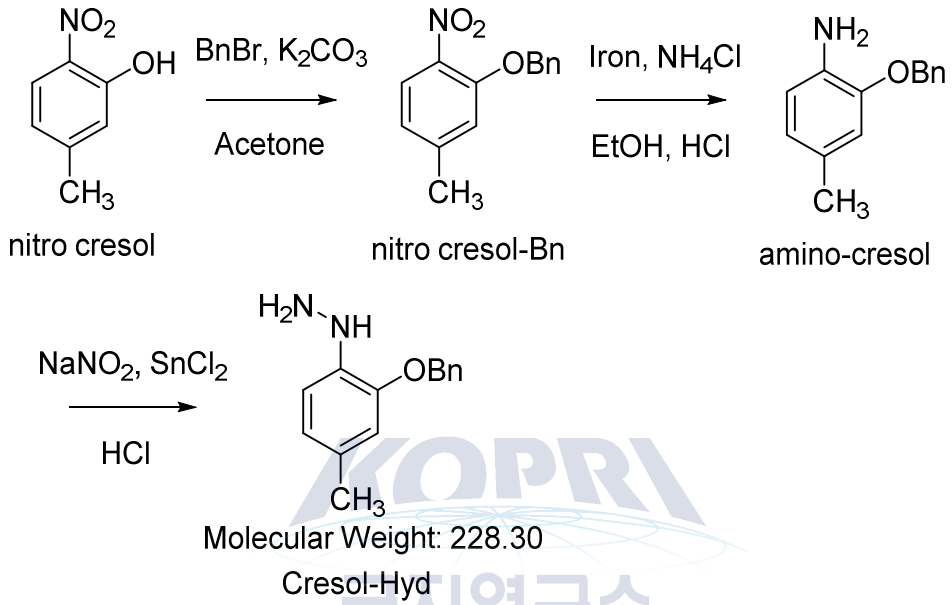


Molecular Weight: 462.37

Boc-Glu-35Cl

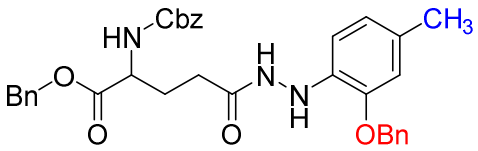
- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((3,4-dichlorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응용기에 3,4-dichlorophenyl hydrazine HCl (M.W. 213.49) 4.22 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과

dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



- (2-(benzyloxy)-4-methylphenyl)hydrazine의 합성 : 가열교반이 가능한 반응기에 Nitro cresol 3.7 g (24.19 mmol, 1.0 당량), Acetone 100 mL를 넣고 용해시킴. 반응기에 Benzyl bromide 3.48 mL (29.03 mmol, 1.2 당량), potassium carbonate 5.0 g (36.29 mmol, 1.5 당량) 첨가 후 80 ℃ 온도로 reflux 반응을 16시간 진행시킨 후 농축하여 nitro cresol-Bn을 수득함. 건조된 nitro cresol-Bn 5.8g (24.19 mmol, 1.0 당량)을 EtOH 30 mL에 용해시킨 후 포화 ammonium chloride 30 mL, Iron 6.2 g (55.84 mmol, 4.6 당량), HCl 원액 약 100 uL를 첨가한 후 90 ℃ 온도에서 reflux 반응 수행함. celite 여과 후 DCM 용액으로 추출 수행함. 농축물에 HCl 첨가 후 결정을 MeOH로 씻어준 후 amino cresol을 수득함. 1 L 반응기에 amino cresol 3.3 g (15.49 mmol 1.0 당량)을 넣고 물 10V 을 첨가함. -1 ℃로 냉각을 실시하고 온도가 유지가 되면 conc. HCl 3당량을 반응용액에 1시간 가량 적가함. 적가가 완료가 되면 동온도에서 45~60분동안 교반을 실시함. Sodium nitrite (M.W 69.00) 1.6당량을 물 8V (sodium nitrite 대비)에 녹여 main 반응기에 천천히 약 2시간 동안 적가함. 적가 완료 후 약 2시간 교반을 실시함. Tin chloride anhydrous (M.W 189.61) 3.3당량을 6N HCl 3V (tin chloride 대비)에 녹여 main 반응기에 천천히 4시간 동안 적가함. 적가 후 냉각을 멈추고 자연스럽게 온도가 올라가도록 하면서 overnight 교반을 실시함. 반응 전환 여부를 확인한 다음 0 ℃로 냉각을 실시한 후,

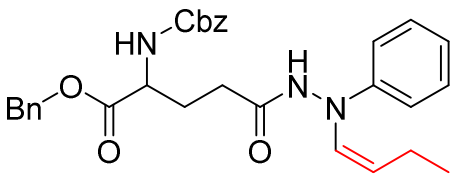
50 % NaOH solution을 사용하여 반응액의 pH를 11이상으로 조절함. DCM을 사용하여 추출을 실시하고, 유기층을 모은 다음 건조 및 여과 농축을 실시함. Diethyl ether에 농축물을 녹이고 0 ℃로 냉각을 실시하고 교반을 실시한 다음 HCl (g) bubbling을 실시하여 고체를 생성시킴. 생성된 고체를 여과하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 581.67

p-Glu-2OH-4Me

- Benzyl N^5-((2-(benzyloxy)-4-methylphenyl)amino)-N^2-((benzyloxy)carbonyl)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-OBn-4-methylphenyl hydrazine HCl (M.W. 228.30) 3.69 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

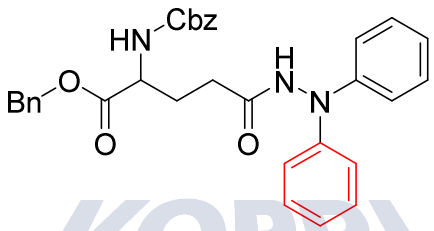


Molecular Weight: 515.61

p-Glu-Hyd-Bu

- Benzyl (Z)-N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(but-1-en-1-yl(phenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane

250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 n-Butyl hydrazine HCl (M.W. 164.25) 2.65 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

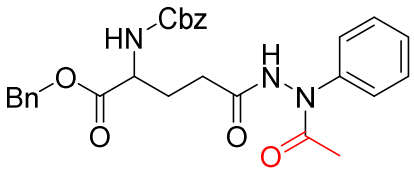


Molecular Weight: 537.62

p-Glu-DPh

KOPRI
극지연구소

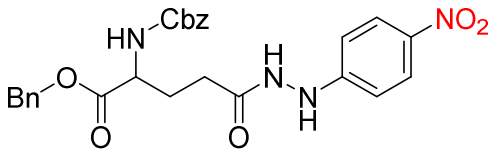
- Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(diphenylamino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1,1-diphenyl hydrazine HCl (M.W. 220.70) 3.6 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 503.56

p-Glu-Hyd-Ac

- Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(N-phenylacetamido)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1-Acetyl-1-phenyl hydrazine (M.W. 150.15) 2.43 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

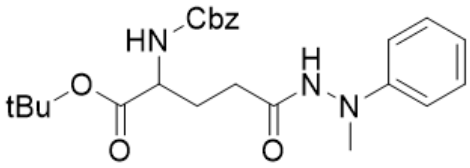


Molecular Weight: 506.52

p-Glu-4N

- Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4-nitrophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-nitrophenyl hydrazine HCl (M.W. 189.60) 3.06 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에

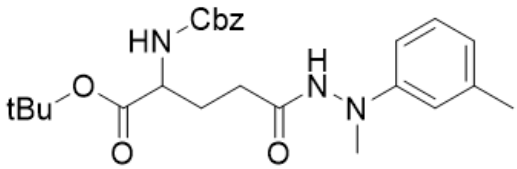
triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 441.53

p-Glu-Hyd-Me

- p-Glu-Hyd-Me의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3.0 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1-methyl-1-phenylhydrazine (M.W. 122.17) 1.30 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. MPLC C18 resin column을 이용하여 정제하여 수득함

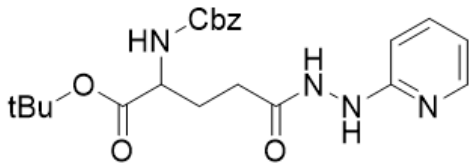


Molecular Weight: 455.56

p-Glu-Hyd-Me-tol

- p-Glu-Hyd-Me-tol의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3.0 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면

Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1-methyl-1-(m-tolyl)hydrazine (M.W. 136.20) 1.45 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. MPLC C18 resin column을 이용하여 정제하여 수득함

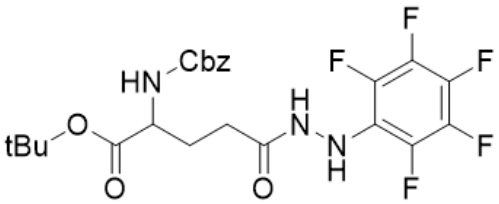


Molecular Weight: 428.49

p-Glu-PYD

- p-Glu-PYD의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3.0 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2-hydrazineylpyridine (M.W. 109.13) 1.20 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. MPLC C18 resin column을 이용하여 정제하여 수득함

KOPRI 극지연구소

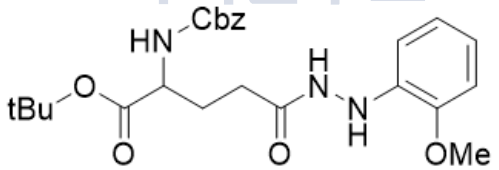


Molecular Weight: 517.45

p-Glu-PF

- p-Glu-PF의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3.0 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 (perfluorophenyl)hydrazine (M.W. 198.10) 2.11 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. MPLC C18 resin column을 이용하여 정제하여 수득함

KOPRI 극지연구소

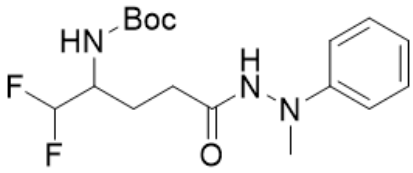


Molecular Weight: 457.53

p-Glu-2OMe

- p-Glu-2OMe의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3.0 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 (2-methoxyphenyl)hydrazine (M.W. 138.17) 1.47 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N

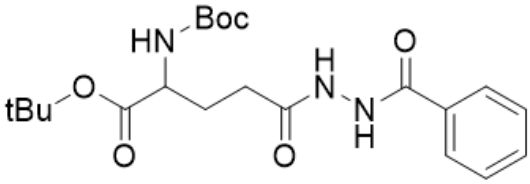
$NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. MPLC C18 resin column을 이용하여 정제하여 수득함



Molecular Weight: 357.40

Boc-058-HM

- Boc-058HM의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 DiF-p-Glu 5 g (19.74 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 3.30 mL (23.69 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52, d=1.1408) 12.57 mL (23.69 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1-methyl-1-phenylhydrazine (M.W. 122.17) 2.89 g (23.69 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 3.30 mL (23.69 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

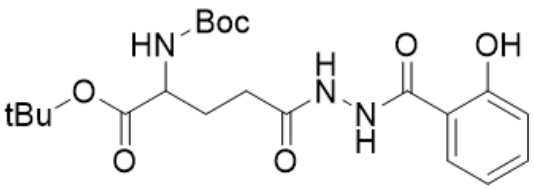


Molecular Weight: 421.49

Boc-Glu-Benzo

- Boc-Glu-Benzo의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응용기에 benzohydrazide (M.W. 136.15) 2.69 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가

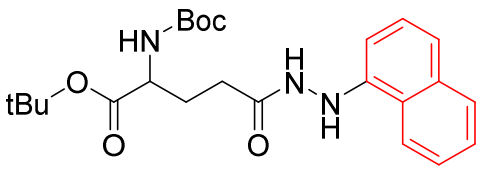
완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 437.49

Boc-Glu-Sali

- Boc-Glu-Sali의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응용기에 2-hydroxybenzohydrazide (M.W. 152.15) 3.01 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

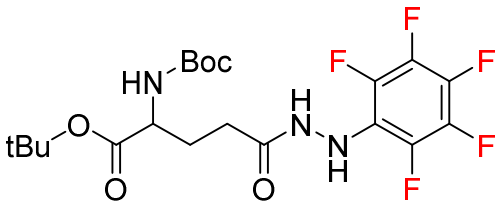


Molecular Weight: 443.54

Boc-Glu-NAP

- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-(naphthalen-1-ylamino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726)

2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1-hydrazino naphthalene HCl (M.W. 194.66) 3.85 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

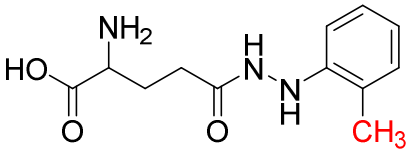


Molecular Weight: 483.44

Boc-Glu-PF

- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((perfluorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Boc-Glu 5 g (16.48 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.85 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 pentafluorophenyl hydrazine (M.W. 198.10) 3.92 g (19.78 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.76 mL (19.78 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

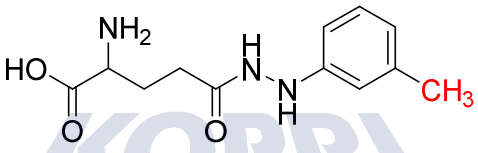
- 최종 라말린 유도체 합성방법



Molecular Weight: 251.29

RA-2Me

- RA-2Me 합성 : p-RA-2Me 2.0 g (4.2 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 88 %로 0.92 g 제품을 수득함

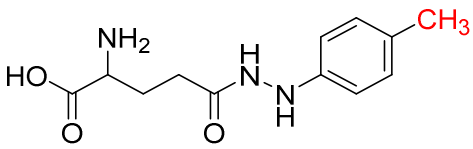


Molecular Weight: 251.29

RA-3Me

KOPRI 극지연구소

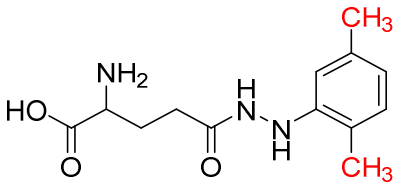
- RA-3Me 합성 : p-RA-3Me 2.0 g (4.2 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 85 %로 0.90 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 251.29

RA-4Me

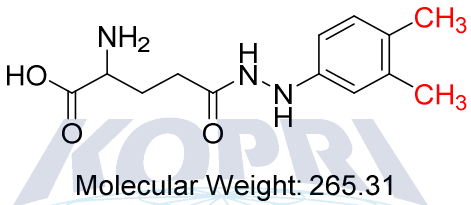
- RA-4Me 합성 : p-RA-4Me 2.0 g (4.2 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 86 %로 0.91 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 265.31

RA-25Me

- RA-25Me 합성 : p-RA-25Me 2.0 g (4.0 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 88 %로 0.95 g 제품을 수득함

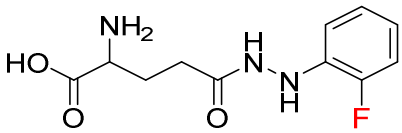


Molecular Weight: 265.31

RA-34Me

KOPRI 극지연구소

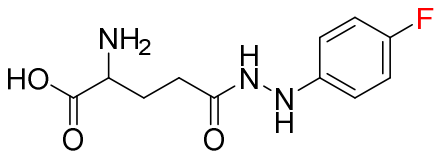
- RA-34Me 합성 : p-RA-34Me 2.0 g (4.0 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 91 %로 0.99 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 255.25

RA-2F

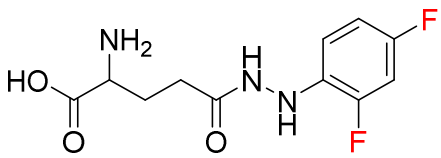
- RA-2F 합성 : p-RA-2F 2.0 g (4.17 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 84 %로 0.89 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 255.25

RA-4F

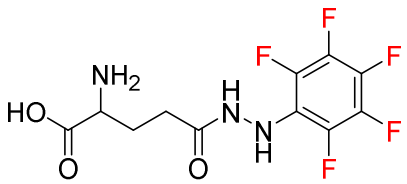
- RA-4F 합성 : p-RA-4F 2.0 g (4.17 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 86 %로 0.92 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 273.24

RA-24F

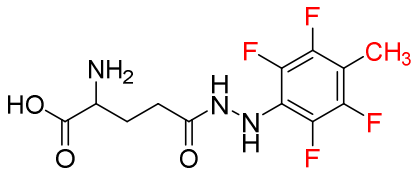
- RA-24F 합성 : p-RA-24F 2.0 g (4.0 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 80 %로 0.88 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 327.21

RA-PF

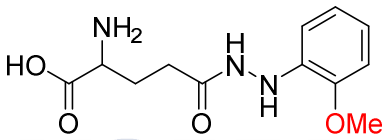
- RA-PF 합성 : p-RA-PF 2.0 g (3.63 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 89 %로 1.06 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 323.25

RA-HFT

- RA-HFT 합성 : p-RA-HFT 2.0 g (3.65 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 90 %로 1.06 g 제품을 수득함

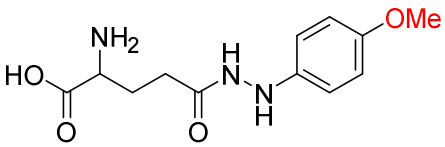


Molecular Weight: 267.29

RA-2OMe

KOPRI 극지연구소

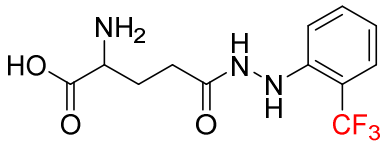
- RA-2OMe 합성 : p-RA-2OMe 2.0 g (4.07 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 86 %로 0.94 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 267.29

RA-4OMe

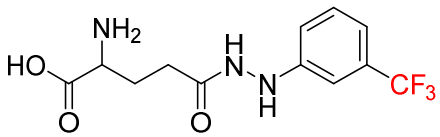
- RA-4OMe 합성 : p-RA-4OMe 2.0 g (4.07 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 88 %로 0.96 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 305.26

RA-2CF3

- RA-2CF3 합성 : p-RA-2CF3 2.0 g (3.78 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 90 %로 1.04 g 제품을 수득함

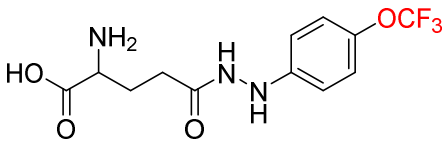


Molecular Weight: 305.26

RA-3CF3

KOPRI 극지연구소

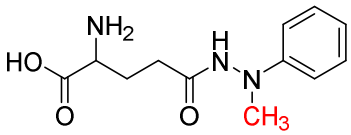
- RA-3CF3 합성 : p-RA-3CF3 2.0 g (3.78 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 42 %로 0.48 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 321.26

RA-4OCF3

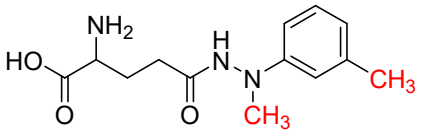
- RA-4OCF3 합성 : p-RA-4OCF3 2.0 g (3.67 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 79 %로 0.93 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 251.29

RA-Hyd-Me

- RA-Hyd-Me 합성 : p-RA-Hyd-Me 2.0 g (4.2 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 79 %로 0.93 g 제품을 수득함

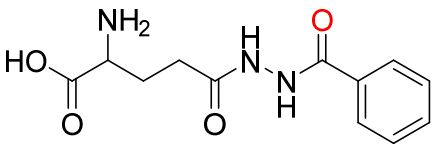


Molecular Weight: 265.31

RA-Hyd-Me-Tol

KOPRI 극지연구소

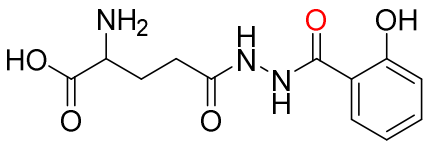
- RA-Hyd-Me-tol 합성 : p-RA-Hyd-Me-tol 2.0 g (4.09 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 72 %로 0.78 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 265.27

RA-Benzo

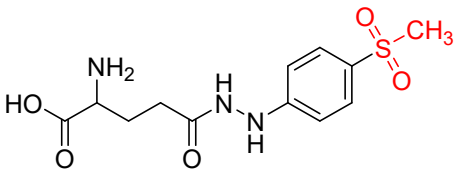
- RA-Benzo 합성 : p-RA-Benzo 2.0 g (4.09 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 90 %로 0.98 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 281.27

RA-Sali

- RA-Sali 합성 : p-RA-Sali 2.0 g (3.96 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 88 %로 0.98 g 제품을 수득함

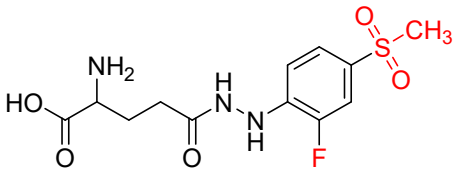


Molecular Weight: 315.34

RA-12A

KOPRI 극지연구소

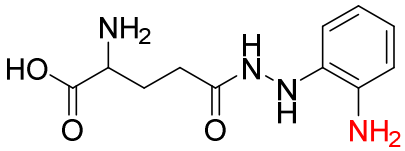
- RA-12A 합성 : p-RA-12A 2.0 g (3.71 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 84 %로 0.98 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 333.33

RA-12B

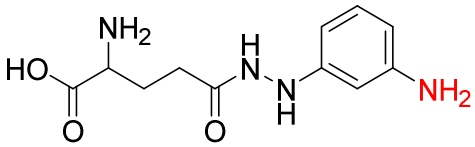
- RA-12B 합성 : p-RA-12B 2.0 g (3.59 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 84 %로 1.01 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 252.27

RA-2N

- RA-2N 합성 : p-RA-2N 2.0 g (3.95 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 87 %로 0.87 g 제품을 수득함

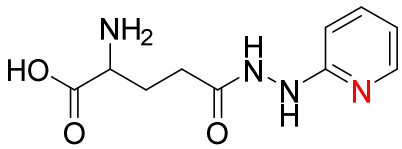


Molecular Weight: 252.27

RA-3N

KOPRI 극지연구소

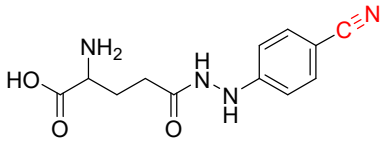
- RA-3N 합성 : p-RA-3N 2.0 g (3.95 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 90 %로 0.90 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 238.25

RA-PYD

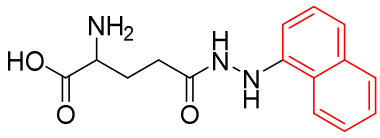
- RA-PYD 합성 : p-RA-PYD 2.0 g (4.32 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 91 %로 0.94 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 262.27

RA-p-Nit

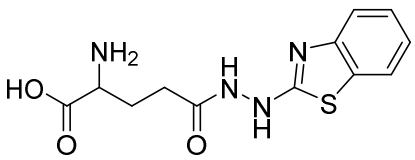
- RA-p-Nit 합성 : p-RA-p-Nit 2.0 g (4.11 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 72 %로 0.77 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 287.32

RA-NAP

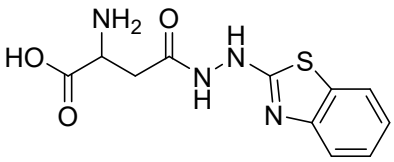
- RA-NAP 합성 : p-RA-NAP 2.0 g (3.91 mmol)을 methanol 200 mL에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)을 첨가 후 H_2 gas 하에서 deprotection 반응 수행. 상온 (20 ~22 ℃)에서 약 16시간 교반 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 methanol과 ethyl acetate를 이용하여 재결정 후 여과하여 수율 63 %로 0.71 g 제품을 수득함



Molecular Weight: 294.33

RA-E13

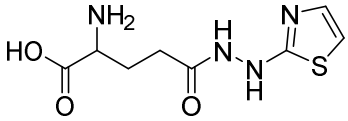
- RA-E13 합성 : benzyl 5-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl) hydrazinyl) -2-(((benzyloxy) carbonyl)amino)-5-oxopentanoate (Exp. 126-KSO-21-hik12-GPH-004) 1.41 g (0.003 mol, 1.0 당량)을 methanol 85 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.1 g (8wt %를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 반응이 잘 진행되지 않아 추가로 촉매를 더 넣어 진행을 하였으나, deprotection이 잘 이뤄지지 않았음. 반응을 멈추고 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, NMR 구조 확인을 하였으나 반응이 제대로 진행이 되지 않았음을 확인함



Molecular Weight: 280.30

RA-G13

- RA-G13 합성 : benzyl 4-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl) hydrazinyl)-2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -4- oxobutanoate 1.60 g (0.003 mol, 1.0 당량)을 methanol 96 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.13 g (8wt %를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 반응이 잘 진행되지 않아 추가로 촉매를 더 넣어 진행을 하였으나, deprotection이 잘 이뤄지지 않았음. 반응을 멈추고 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, NMR 구조 확인을 하였으나 반응이 제대로 진행이 되지 않았음을 확인함

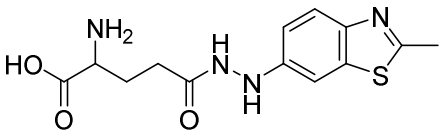


Molecular Weight: 244.27

RA-E14

KOPRI 극지연구소

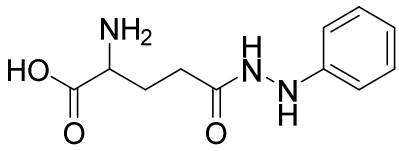
- RA-E14 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl) amino) -5-oxo-5-(2-(thiazol-2-yl)hydrazinyl) pentanoate 0.34 g (0.001 mol, 1.0 당량)을 methanol 20 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.03 g (8wt %를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 반응이 잘 진행되지 않아 추가로 촉매와 formic acid를 더 넣어 진행을 하였으나, deprotection이 잘 이뤄지지 않았음. 반응을 멈추고 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, NMR 구조 확인을 하였으나 반응이 제대로 진행이 되지 않았음을 확인함



Molecular Weight: 308.36

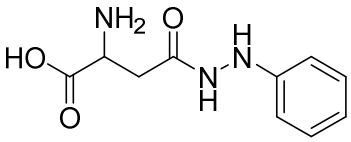
RA-E15

- RA-E15 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(2-(2-methylbenzo[d] thiazol -6-yl) hydrazinyl)-5-oxopentanoate 1.9 g (0.004 mol, 1.0 당량)을 methanol 114 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.15 g (8wt %를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 반응이 잘 진행되지 않아 추가로 촉매를 더 넣어 진행을 하였으나, deprotection이 잘 이뤄지지 않았음. 반응을 멈추고 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, NMR 구조 확인을 하였으나 반응이 제대로 진행이 되지 않았음을 확인함



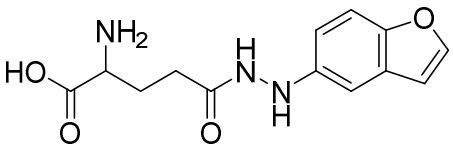
Molecular Weight: 237.26
RA-E01

- RA-E01 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl)amino)-5-oxo-5-(2-phenyl hydrazinyl) pentanoate 2.83 g (0.006 mol, 1.0 당량)을 methanol 180 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 1.0 g (35wt %를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, methanol, ethyl acetate로 결정화를 진행하고, 생성된 고체를 여과하여 제품을 얻었음



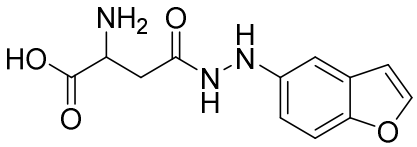
Molecular Weight: 223.23
RA-G01

- RA-G01 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl)amino)-4-oxo-4-(2-phenyl hydrazinyl) butanoate 1.44 g (0.003 mol, 1.0 당량)을 methanol 86 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.15 g (8wt %를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 반응이 잘 진행되지 않아 추가로 촉매를 더 넣어 반응을 종결시키고 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, NMR 구조 확인을 하였으나 제품이 깨끗하지 않았음



Molecular Weight: 277.28
RA-E26

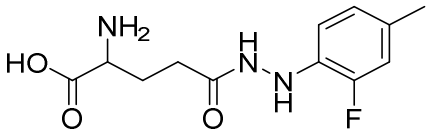
- RA-E26 합성 : benzyl 5-(2- (benzofuran-5-yl)hydrazinyl) -2-(((benzyloxy) carbonyl)amino) -5-oxopentanoate 1.79 g (0.004 mol, 1.0 당량)을 methanol 107 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.4 g (22wt %를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, methanol, diethyl ether를 사용하여 결정화를 진행하였고, 생성된 고체를 여과를 실시하여 0.1 g을 얻었으나 깨끗한 제품을 얻지 못하였음



Molecular Weight: 263.25

RA-G26

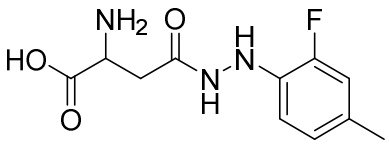
- RA-G26 합성 : benzyl 4-(2- (benzofuran-5-yl)hydrazinyl)-2-(((benzyloxy) carbonyl)amino) -4-oxobutanoate 0.95 g (0.0019 mol, 1.0 당량)을 methanol 57 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.4 g (42wt %)를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, methanol, ethyl acetate, diethyl ether를 사용하여 결정화를 진행하였고, 생성된 고체를 여과를 실시하여 0.04 g을 얻었으나 깨끗한 제품을 얻지 못하였음



Molecular Weight: 269.28

RA-E04

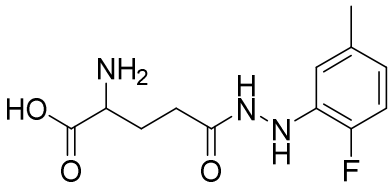
- RA-E04 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl) amino)-5-(2-(2-fluoro-4- methylphenyl) hydrazinyl)-5-oxopentanoate 2.11 g (0.0043 mol, 1.0 당량)을 methanol 127 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.4 g (19wt %)를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행하여 crude 0.82 g을 얻었음. methanol, ethyl acetate, diethyl ether를 사용하여 결정화를 진행하였고, 생성된 고체를 여과를 실시하여 0.07 g을 얻었으나 깨끗한 제품을 얻지 못하였음



Molecular Weight: 255.25

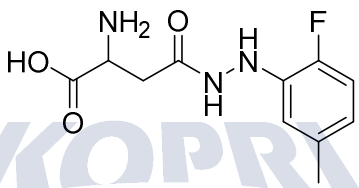
RA-G04

- RA-G04 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino) -4-(2-(2-fluoro-4-methylphenyl) hydrazinyl)-4-oxobutanoate 1.82 g (0.0038 mol, 1.0 당량)을 methanol 109 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.4 g (22wt %를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행하여 crude 0.82 g을 얻었음. methanol, ethyl acetate, diethyl ether를 사용하여 결정화를 진행하였고, 생성된 고체를 여과를 실시하여 0.1 g을 얻었으나 깨끗한 제품을 얻지 못하였음



Molecular Weight: 269.28
RA-E05

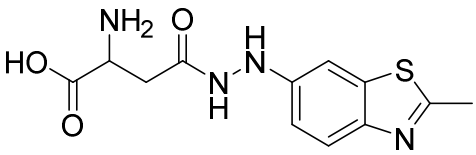
- RA-E05 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(2-(2-fluoro-5-methylphenyl) hydrazinyl)-5-oxopentanoate 2.21 g (0.0045 mol, 1.0 당량)을 methanol 133 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.4 g (18wt %)를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행하여 crude 0.84 g을 얻었음. methanol, ethyl acetate, diethyl ether를 사용하여 결정화를 진행하였고, 생성된 고체를 여과를 실시하여 0.13 g을 얻었으며, mass를 측정한 결과 깨끗한 제품을 얻었음



Molecular Weight: 255.25
RA-G05

KOPRI
극지연구소

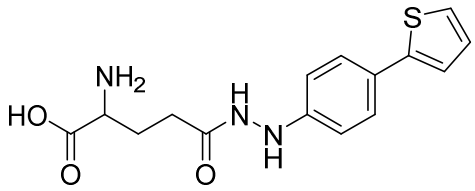
- RA-G05 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-(2-(2-fluoro-5-methylphenyl) hydrazinyl)-4-oxobutanoate 1.72 g (0.0036 mol, 1.0 당량)을 methanol 103 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.4 g (23wt %)를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행하여 crude 0.82 g을 얻었음. methanol, ethyl acetate, diethyl ether를 사용하여 결정화를 진행하였으나 결정이 잘 생성되지 않았으며, mass를 측정한 결과 깨끗한 제품이 얻어지지 않았음



Molecular Weight: 294.33
RA-G15

- RA-G15 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl) amino) -4-(2-(2-methylbenzo[d] thiazol-6-yl) hydrazinyl)-4-oxobutanoate 1.19 g (0.0023 mol, 1.0 당량)을 methanol 72 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.24 g (20wt %)를 넣고, H_2 하에서

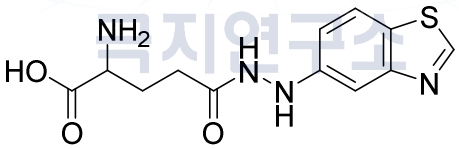
deprotection을 하였음. 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행하여 crude 0.82 g을 얻었음. methanol, ethyl acetate, diethyl ether를 사용하여 결정화를 진행하였으나 결정이 잘 생성되지 않았으며, mass를 측정한 결과 깨끗한 제품이 얻어지지 않았음



Molecular Weight: 319.38
RA-E25

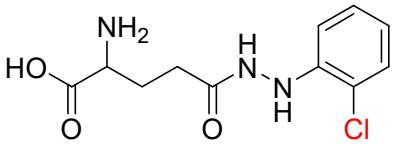
- RA-E25 합성 : benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxo-5-(2-(4- (thiophen-2-yl) phenyl) hydrazinyl)pentanoate (Exp. 126-KSO-21-hik12-GPH-058) 1.0 g (0.0018 mol, 1.0 당량)을 methanol 60 mL (60V), THF 18 mL (18V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.2 g (20wt %)를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 반응이 잘 진행되지 않아 추가로 촉매와 formic acid를 더 넣어 진행을 하였으나, deprotection이 잘 이뤄지지 않았음. 반응을 멈추고 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, NMR 구조 확인을 하였으나 반응이 진행되지 않았음을 확인함

KOPRI 한국원자력연구원



Molecular Weight: 294.33
RA-E16

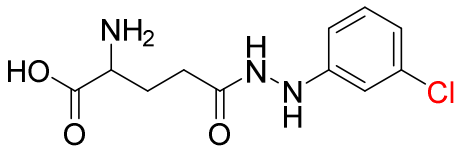
- RA-E16 합성 : benzyl 5-(2-(benzo[d]thiazol-5-yl)hydrazinyl)-2- (((benzyloxy)carbonyl) amino)-5-oxopentanoate 1.5 g (0.0029 mol, 1.0 당량)을 methanol 90 mL (60V)에 넣음. 10 % Pd/C (50 % wet) 0.3 g (20wt %)를 넣고, H_2 하에서 deprotection을 하였음. 반응이 잘 진행되지 않아 추가로 촉매와 formic acid를 더 넣어 진행을 하였으나, deprotection이 잘 이뤄지지 않았음. 반응을 멈추고 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축을 진행한 후, NMR 구조 확인을 하여 반응이 진행되지 않았음을 확인함



Molecular Weight: 271.70

RA-2Cl

- N^5-((2-chlorophenyl)amino)glutamine (RA-2Cl)의 합성 : 반응기에 보호화된 *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((2-chlorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함

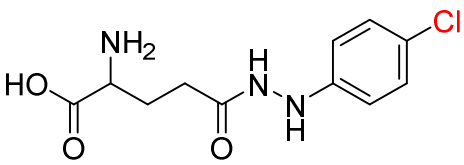


Molecular Weight: 271.70

RA-3Cl

KOPRI 극지연구소

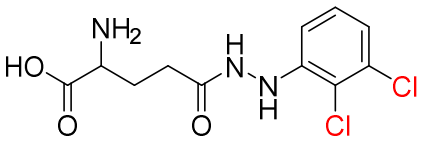
- N^5-((3-chlorophenyl)amino)glutamine (RA-3Cl)의 합성 : 반응기에 보호화된 *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((3-chlorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 271.70

RA-4Cl

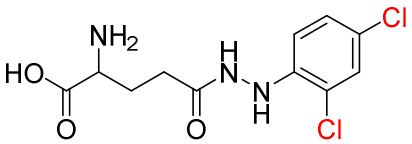
- N^5-((2-chlorophenyl)amino)glutamine (RA-4Cl)의 합성 : 반응기에 보호화된 *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((4-chlorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 306.14

RA-23Cl

- N^5-((2,3-dichlorophenyl)amino)glutamine (RA-23Cl)의 합성 : 반응기에 보호화된 *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((2,3-dichlorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함

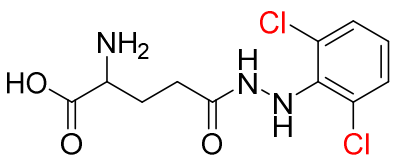


Molecular Weight: 306.14

RA-24Cl

KOPRI 극지연구소

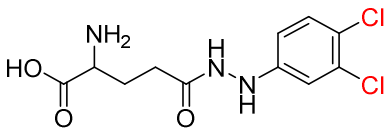
- N^5-((2,4-dichlorophenyl)amino)glutamine (RA-24Cl)의 합성 : 반응기에 보호화된 *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((2,4-dichlorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 306.14

RA-26Cl

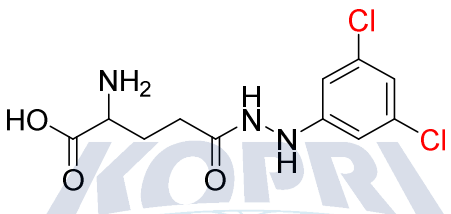
- N^5-((2,6-dichlorophenyl)amino)glutamine (RA-26Cl)의 합성 : 반응기에 보호화된 *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((2,6-dichlorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 306.14

RA-34Cl

- N^5-((3,4-dichlorophenyl)amino)glutamine (RA-34Cl)의 합성 : 반응기에 보호화된 *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((3,4-dichlorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함

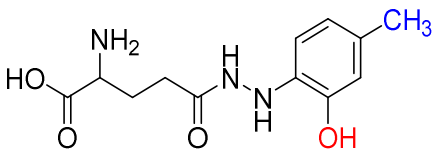


Molecular Weight: 306.14

RA-35Cl

KCPRI 극지연구소

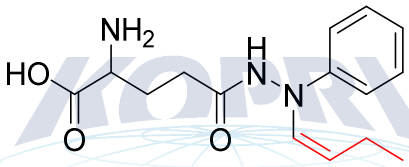
- N^5-((3,5-dichlorophenyl)amino)glutamine (RA-35Cl)의 합성 : 반응기에 보호화된 *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((3,5-dichlorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 267.29

RA-2OH-4Me

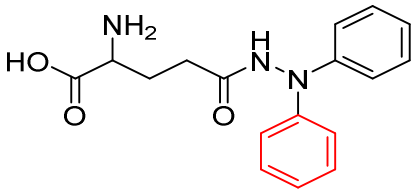
- N^5-((2-hydroxy-4-methylphenyl)amino)glutamine (RA-2OH-4Me)의 합성 : 출발물질 Benzyl N^5-((2-(benzyloxy)-4-methylphenyl)amino)-N^2-((benzyloxy)carbonyl)glutaminate 화합물 1.8 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 180 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 291.35

RA-Hyd-Bu

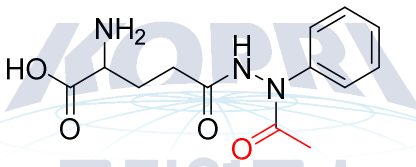
- (Z)-N^5-(but-1-en-1-yl(phenyl)amino)glutamine (RA-Hyd-Bu)의 합성 : 출발물질 Benzyl (Z)-N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(but-1-en-1-yl(phenyl)amino)glutaminate 화합물 2.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 250 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정을 수행하였으나 재결정 진행안됨. MPLC를 이용한 정제를 시도하였으나 분석 결과 원하는 구조의 화합물이 아님을 확인함



Molecular Weight: 313.36

RA-DPh

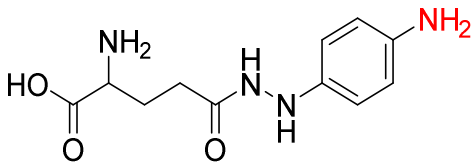
- N^5-(diphenylamino)glutamine (RA-DPh)의 합성 : 출발물질 Benzyl N^2-((benzyloxy) carbonyl)-N^5-(diphenylamino)glutaminate화합물 2.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 250 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 279.30

RA-Hyd-Ac

- N^5-(N-phenylacetamido)glutamine (RA-Hyd-Ac)의 합성 : 출발물질 Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(N-phenylacetamido)glutaminate 화합물 2.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 250 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

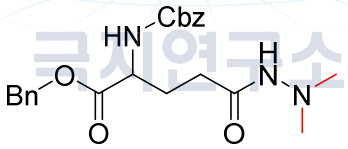


Molecular Weight: 252.27

RA-4N

- N^5-((4-aminophenyl)amino)glutamine (RA-4N)의 합성 : 출발물질 benzyl N^2-((benzyloxy) carbonyl)-N^5-((4-nitrophenyl)amino)glutaminate 화합물 2.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 250 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

나. 알킬기가 도입된 라말린 유도체 합성 방법

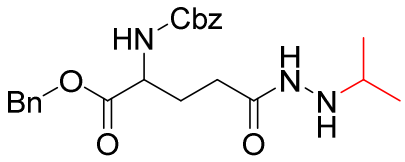


Molecular Weight: 413.47

p-Glu-DMe

- Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(dimethylamino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 Dimethyl hydrazine HCl (M.W. 96.56) 1.56 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반

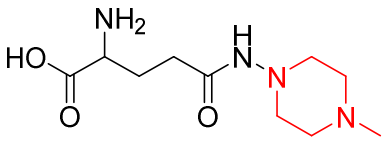
응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 427.50

p-Glu-IPr

- Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(isopropylamino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 Isopropyl hydrazine HCl (M.W. 110.59) 1.78 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

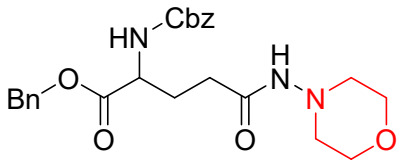


Molecular Weight: 244.30

RA-AMP

- Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(4-methylpiperazin-1-yl)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 amino methyl piperazine (M.W. 115.18) 1.86 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여

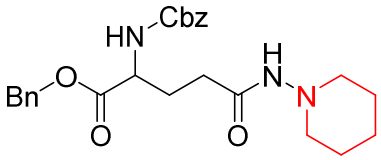
기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 455.51

p-Glu-Morp

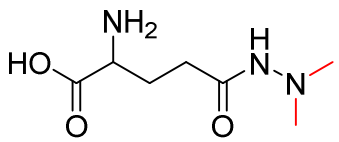
- Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-morpholinoglutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 Amino morpholine (M.W. 102.14) 1.65 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 453.54

p-Glu-Pip

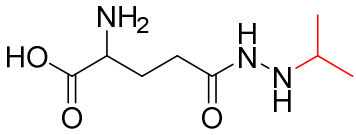
- Benzyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxo-5-(piperidin-1-ylamino)pentaneperoxoate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 p-Glu 5 g (13.46 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 250 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.54 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 반응용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른반응 용기에 Amino piperidine (M.W. 100.17) 1.62 g (16.16 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 2.25 mL (16.16 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 189.22

RA-DMe

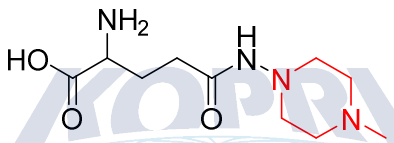
- N^5-(dimethylamino)glutamine (RA-DMe)의 합성 : 출발물질 Benzyl N^2-((benzyloxy) carbonyl)-N^5-(dimethylamino)glutaminate 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 203.24

RA-IPr

- N^5-(isopropylamino)glutamine (RA-IPr)의 합성 : 출발물질 Benzyl N^2-((benzyloxy) carbonyl)-N^5-(isopropylamino)glutaminate 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

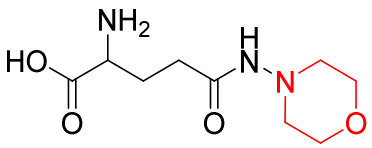


Molecular Weight: 244.30

RA-AMP

KOPRA 극지연구소

- N^5-(4-methylpiperazin-1-yl)glutamine (RA-AMP)의 합성 : 출발물질 Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(4-methylpiperazin-1-yl)glutaminate 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

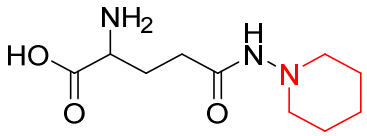


Molecular Weight: 231.25

RA-Morp

- N^5-morpholinoglutamine (RA-Morp)의 합성 : 출발물질 Benzyl N^2-((benzyloxy)

carbonyl)-N^5-morpholinoglutaminate 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함



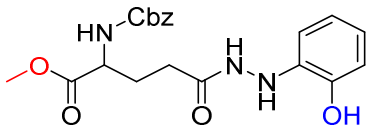
Molecular Weight: 229.28

RA-Pip

- N^5-(piperidin-1-yl)glutamine (RA-Pip)의 합성 : 출발물질 Benzyl 2-(((benzyloxy) carbonyl)amino)-5-oxo-5-(piperidin-1-ylamino)pentaneperoxoate 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

KRICT 극지연구소

다. Glutamic acid가 변형된 라말린 유도체 합성 방법

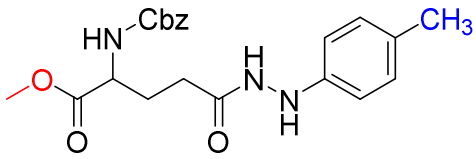


Molecular Weight: 401.42

Me-p-Glu-RA

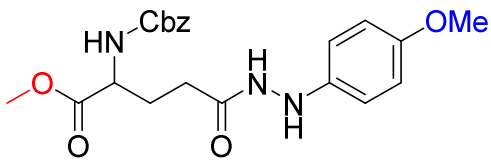
- Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Me-p-Glu 1.72 g (5.83 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 150 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 0.97 mL (7.0 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 0.67 mL (7.0 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 OBn phenyl hydrazine (M.W. 214.17) 1.5 g (7.0 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 0.97 mL (7.0 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈

춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 399.45
Me-p-Glu-4Me

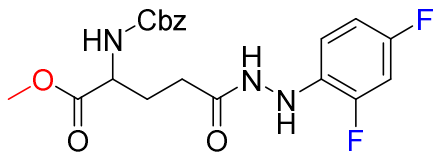
- Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(p-tolylamino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Me-p-Glu 3.0 g (10.2 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.2 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-methyl phenyl hydrazine (M.W. 158.63) 1.94 g (12.24 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 415.45
Me-p-Glu-4OMe

- Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4-methoxyphenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Me-p-Glu 3.0 g (10.2 mmol, 1.0 당량), dichloromethane

200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.2 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-methoxy phenyl hydrazine (M.W. 174.63) 2.14 g (12.24 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

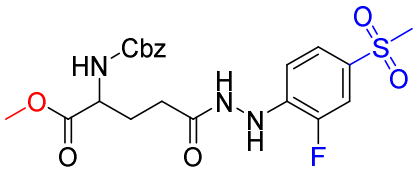


Molecular Weight: 421.40

Me-p-Glu-24F

KOPRI 극지연구소

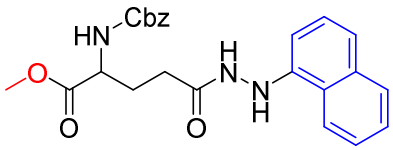
- Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2,4-difluorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Me-p-Glu 3.0 g (10.2 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.2 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2,4-difluoro phenyl hydrazine (M.W. 180.58) 2.21 g (12.24 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 481.50

Me-p-Glu-12B

- Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)glutaminate 의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Me-p-Glu 3.0 g (10.2 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.2 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 12B hydrazine (M.W. 204.22) 2.50 g (12.24 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

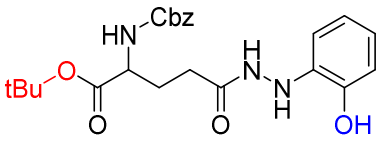


Molecular Weight: 435.48

Me-p-Glu-NAP

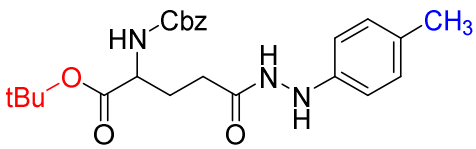
- Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(naphthalen-1-ylamino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Me-p-Glu 3.0 g (10.2 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.2 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1-Hydrazino naphthalene (M.W. 194.66) 2.38 g (12.24 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (12.24 mmol, 1.2 당량)을

적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 443.50
tBu-p-Glu-RA

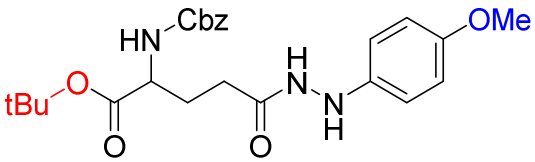
- *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 Me-p-Glu 1.97 g (5.83 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 150 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 0.97 mL (7.0 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 0.67 mL (7.0 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 OBn phenyl hydrazine (M.W. 214.17) 1.5 g (7.0 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 50 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 0.97 mL (7.0 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 441.53
tBu-p-Glu-4Me

- *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(p-tolylamino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를

넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-methylphenyl hydrazine (M.W. 158.63) 1.69 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

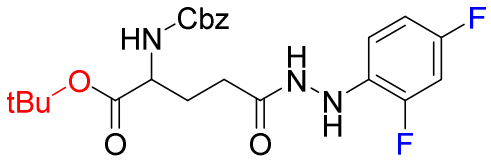


Molecular Weight: 457.53

tBu-p-Glu-4OMe

KOBRI 금지연구소

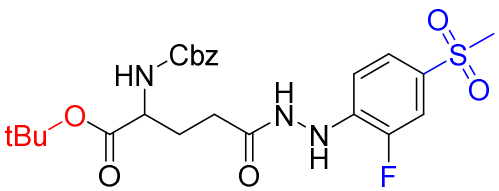
- *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4-methoxyphenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 4-methoxyphenyl hydrazine (M.W. 174.63) 1.86 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 463.48

tBu-p-Glu-24F

- *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2,4-fluorophenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 2,4-fluorophenyl hydrazine (M.W. 180.58) 1.92 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함

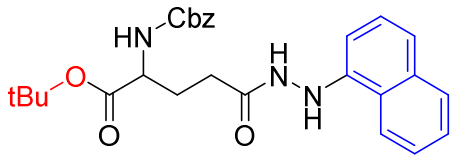


Molecular Weight: 523.58

tBu-p-Glu-12B

- *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 12B hydrazine (M.W. 204.22) 2.59 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를

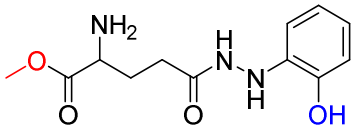
첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 477.56

tBu-p-Glu-NAP

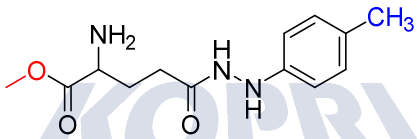
- *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(naphthalen-1-ylamino)glutaminate의 합성 : 냉각을 할 수 있는 jacket 반응기에 tBu-p-Glu 3 g (8.89 mmol, 1.0 당량), dichloromethane 200 mL를 넣고, 0 ℃로 냉각을 실시. 온도가 유지되면 Triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.5 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 온도가 유지된 상태에서 ethyl chloroformate (M.W. 108.52) 1.0 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 반응 용기에 적가. 적가가 완료된 후 0 ℃ 에서 4시간 유지하며 반응수행. 또 다른 반응 용기에 1-hydrazino naphthalene (M.W. 190.44) 2.03 g (10.67 mmol, 1.2 당량)과 dichloromethane 100 mL를 첨가. 여기에 triethylamine (M.W. 101.19, d=0.726) 1.71 mL (10.67 mmol, 1.2 당량)을 적가한 후, 여기서 제조된 hydrazine solution을 main 반응기에 적가함. 적가가 완료되면 냉각을 멈춘 후, 자연스럽게 온도가 20 ℃ 근처로 올라가도록 하면서 overnight 교반을 수행. 반응 종료 후, H_2O 100 mL → 1 N HCl 100 mL → 0.5 N $NaHCO_3$ 100 mL → H_2O 100 mL로 세척을 실시한 후, 유기층을 모으고 anhydrous $MgSO_4$로 건조, 여과, 농축을 실시함. EA를 이용해 반응물을 녹인 후 Hexane을 이용하여 재결정화를 진행 시킨 후, 여과 및 건조를 실시하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 267.29

MeR-RA

- Methyl N^5-((2-hydroxyphenyl)amino)glutaminate (MeR-RA)의 합성 : 출발물질 Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

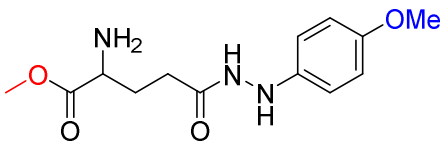


Molecular Weight: 265.31

MeR-4Me

KOPRI 극지연구소

- Methyl N^5-(p-tolylamino)glutaminate (MeR-4Me)의 합성 : 출발물질 Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(p-tolylamino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

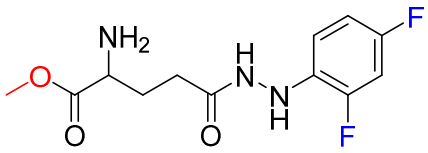


Molecular Weight: 281.31

MeR-4OMe

- Methyl N^5-((4-methoxyphenyl)amino)glutaminate (MeR-4OMe)의 합성 : 출발물질 Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4-methoxyphenyl)amino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당

량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

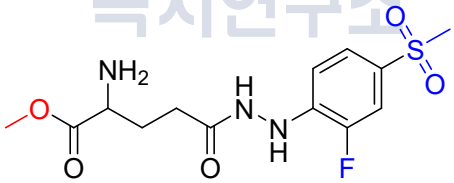


Molecular Weight: 287.27

MeR-24F

- Methyl N^5-((2,4-difluorophenyl)amino)glutaminate (MeR-24F)의 합성 : 출발물질 Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2,4-difluorophenyl)amino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

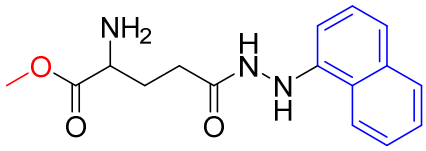
KOPRI 극지연구소



Molecular Weight: 347.36

MeR-12B

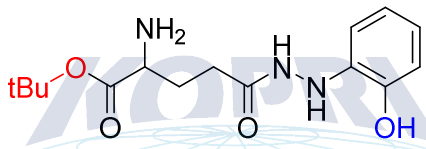
- Methyl N^5-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)glutaminate (MeR-12B)의 합성 : 출발물질 Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino) glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 301.35

MeR-NAP

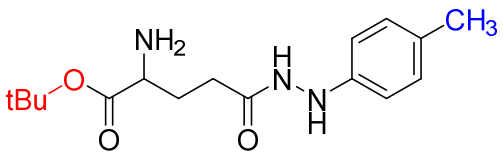
- Methyl N^5-(naphthalen-1-ylamino)glutaminate (MeR-NAP)의 합성 : 출발물질 Methyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(naphthalen-1-ylamino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 309.37

TBU-RA

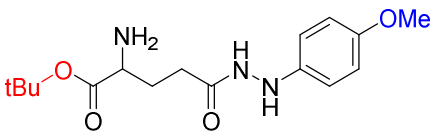
- *tert*-butyl N^5-((2-hydroxyphenyl)amino)glutaminate (TBU-RA)의 합성 : 출발물질 *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 307.39

TBU-4Me

- *tert*-butyl N^5-(p-tolylamino)glutaminate (TBU-4Me)의 합성 : 출발물질 *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-(p-tolylphenyl)amino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

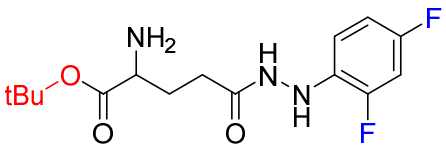


Molecular Weight: 323.39

TBU-4OMe

- *tert*-butyl N^5-((4-methoxy)amino)glutaminate (TBU-4OMe)의 합성 : 출발물질 *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4-methoxy)phenyl)amino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

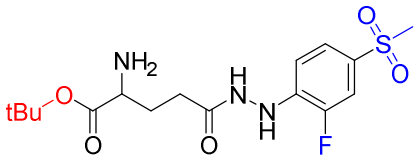
KOPRI 극지연구소



Molecular Weight: 329.35

TBU-24F

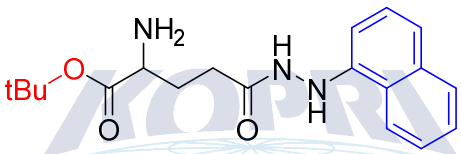
- *tert*-butyl N^5-((2,4-difluoro)amino)glutaminate (TBU-24F)의 합성 : 출발물질 *tert*-butyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2,4-difluoro)phenyl)amino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 389.44

TBU-12B

- *tert*-butyl N^{δ}-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)glutaminate (TBU-12B)의 합성 : 출발물질 *tert*-butyl N^{δ}-((2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)amino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

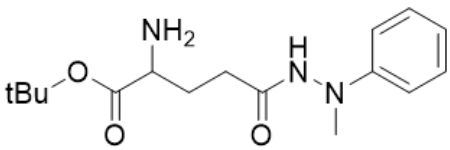


Molecular Weight: 343.43

TBU-NAP

KOPRI 극지연구소

- *tert*-butyl N^{δ}-(naphthalen-1-ylamino)glutaminate (TBU-NAP)의 합성 : 출발물질 *tert*-butyl N^{δ}-(naphthalen-1-ylamino)glutaminate 화합물 3.5 g (1.0 당량)을 MeOH (10V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 350 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 18시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 진행하여 제품을 수득함

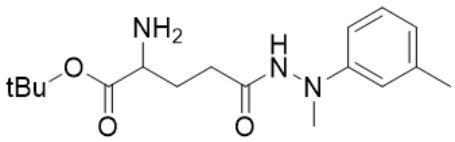


Molecular Weight: 307.39

TBU-Hyd-Me

- TBU-Hyd-Me의 합성 : 출발물질 p-Glu-Hyd-Me 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10 V)

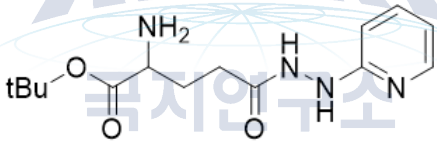
에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 16시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 수행. 농축된 반응물을 MPLC C18 정제를 통해 수득함



Molecular Weight: 321.42

TBU-Hyd-Me-tol

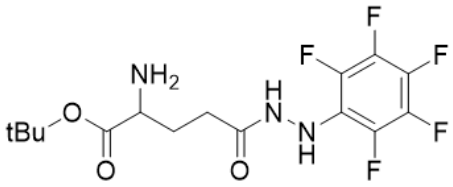
- TBU-Hyd-Me-tol의 합성 : 출발물질 p-Glu-Hyd-Me 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10 V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 16시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 수행. 농축된 반응물을 MPLC C18 정제를 통해 수득함



Molecular Weight: 294.36

TBU-PYD

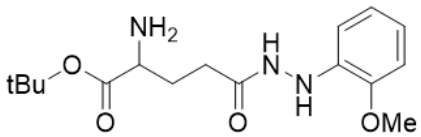
- TBU-PYD의 합성 : 출발물질 p-Glu-Hyd-Me 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10 V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 16시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 수행. 농축된 반응물을 MPLC C18 정제를 통해 수득함



Molecular Weight: 383.32

TBU-PF

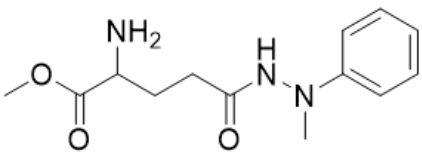
- TBU-PF의 합성 : 출발물질 p-Glu-Hyd-Me 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10 V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 16시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 수행. 농축된 반응물을 MPLC C18 정제를 통해 수득함



Molecular Weight: 323.39

TBU-2OMe

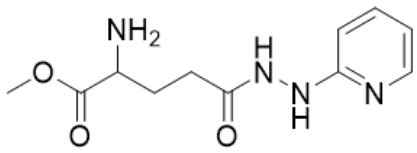
- TBU-2OMe의 합성 : 출발물질 p-Glu-Hyd-Me 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10 V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 16시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 수행. 농축된 반응물을 MPLC C18 정제를 통해 수득함



Molecular Weight: 265.31

MeR-Hyd-Me

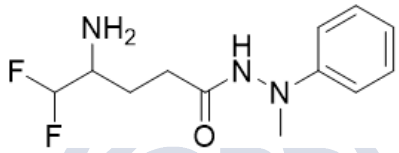
- MeR-Hyd-Me의 합성 : 출발물질 Me-p-Glu-Hyd-Me 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10 V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 16시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 수행. 농축된 반응물을 MPLC C18 정제를 통해 수득함



Molecular Weight: 252.27

MeR-PYD

- MeR-PYD의 합성 : 출발물질 Me-p-Glu-PYD 화합물 2.0 g (1.0 당량)을 MeOH (10 V)에 녹임. 10 % weight % palladium on carbon 200 mg (10 wt %)를 투입하고 H_2 gas 하에서 교반하며 약 16시간 동안 반응수행. 반응 종료 후 여과를 실시하여 촉매를 제거하고 농축 진행. 농축된 반응물을 MeOH와 EA를 이용하여 재결정 후 여과 및 건조를 수행. 농축된 반응물을 MPLC C18 정제를 통해 수득함

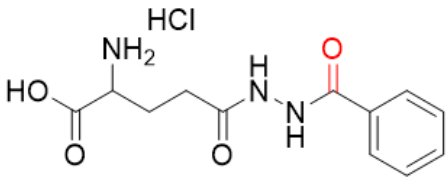


Molecular Weight: 257.28

058-HM

KOPRI 금지연구소

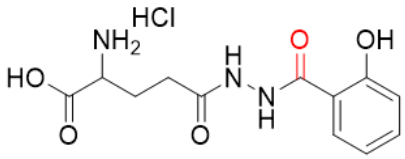
- RA-058HM의 합성 : 반응기에 보호화된 Boc-058HM 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 25 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 301.73

RA-Benzo-HCl

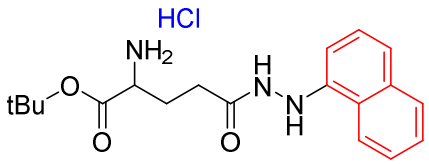
- RA-Benzo-Hcl의 합성 : 반응기에 보호화된 Boc-Glu-Benzo 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 317.73

RA-Sali-HCl

- RA-Sali-Hcl의 합성 : 반응기에 보호화된 Boc-Glu-Sali 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함

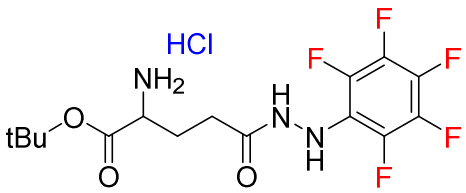


Molecular Weight: 379.89

RA-NAP-HCl

KOPRI 극지연구소

- N^5-(naphthalen-1-ylamino)glutamine (RA-NAP-HCl)의 합성 : 반응기에 보호화된 tert-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-(naphthalen-1-ylamino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함



Molecular Weight: 419.78

RA-PF-HCl

- N^5-((perfluorophenyl)amino)glutamine (RA-PF-HCl)의 합성 : 반응기에 보호화된 tert-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((perfluorophenyl)amino)glutaminate 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 약 16시간 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 생성된 결정을 여과하고 EA로 (약 30V) 충분히 씻어주고 건조하여 제품을 수득함

다. 헤테로 고리, 작용기가 변경 및 기본구조가 변경된 PR버전 라말린 유도체 합성방법

- 일반방법 A : EDC를 이용한 아마이드 커플링

반응기에 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (1.0 당량), heterocyclic amine (1.1 당량), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC, 2.0 당량), hydroxybenzotriazole (1.3 당량), 4-dimethylaminopyridine (0.1 당량), dimethylformamide (0.3 molar) 을 넣고, *N,N*-diisopropylethylamine (M.W 129.25, d=0.742) (0.1 당량)을 적가함. 적가가 완료된 후, 상온에서 밤새워 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, H_2O 로 반응을 종결시키고 EA를 사용하여 추출함. Brine으로 세정(washing), $MgSO_4$로 수분제거(drying) 및 감압농축함. MPLC on silica gel로 목적 화합물을 수득함

- 일반방법 B : HATU를 이용한 아마이드 커플링

dimethylformamide (0.1 M) 용매 내 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (1.0 당량), 아민 화합물 (1.5 당량), 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU, 2.0 당량)을 가하고 *N,N*-diisopropylethylamine (M.W 129.25, d=0.742) (3.0 당량)을 적가함. 반응 혼합물은 상온에서 밤새워 교반하고 EA를 사용하여 추출함. Brine으로 세정(washing), $MgSO_4$로 수분제거(drying) 및 감압농축함. MPLC on silica gel로 목적 화합물을 수득함

KCPRI 극지연구소

- 일반방법 C : HCl을 이용한 Boc기와 *tert*-butyl기의 탈보호화 반응

반응기에 Boc group과 *tert*-butyl group으로 보호화된 화합물 (1.0 당량)에 4M hydrogen chloride in dioxane (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 밤새워 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 감압농축하여 용매를 제거하고 EA을 이용하여 재결정하여 HCl 염으로서 화합물을 수득함

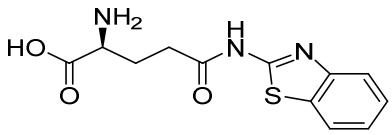
- 일반방법 D : HCl을 이용한 Boc기와 *tert*-butyl기의 탈보호화 반응

반응기에 Boc group과 *tert*-butyl group으로 보호화된 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (11.0 당량) 을 가하고 40 ℃에서 밤새워 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 감압농축하여 용매를 제거하고 EA을 이용하여 재결정하여 HCl 염으로서 화합물을 수득함

- 일반방법 E : HCl을 이용한 Boc기의 탈보호화 반응 (Deprotection of Boc with HCl)

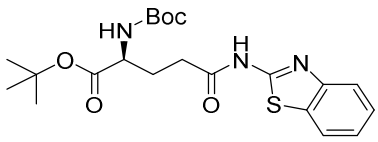
반응기에 Boc group과 *tert*-butyl group으로 보호화된 화합물 (1.0 당량)에 1M hydrogen chloride in EA (5.5 당량) 을 가하고 40 ℃에서 밤새워 교반을 실시함. 반응이 완료된 후, 감압농축하여 용매를 제거하고 EA을 이용하여 재결정 한 뒤, dichloromethane에 살짝 녹

여 MPLC on silica gel로 목적 화합물을 수득함



PR-001
Molecular Weight: 279.3140

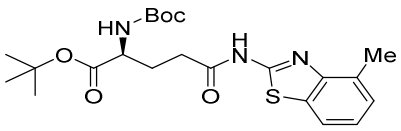
- N^5-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염)의 합성 : *tert*-butyl-N^5- (benzo[*d*] thiazol-2-yl)-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-glutaminate (20 mg, 0.046 mmol)의 일반방법 C를 수행하여 화합물 11.6 mg (78 %)의 흰색 고체를 HCl 염으로서 수득함



PR-002
Molecular Weight: 435.5390

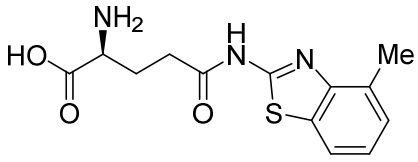
KOPRI 극지연구소

- *tert*-butyl-N^5-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-glutaminate 합성 : benzo [*d*]thiazol-2-amine (45 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4- ((*tert*-butoxy carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (30 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 112 mg (78 %)의 흰색 고체를 수득함



PR-003
Molecular Weight: 449.5660

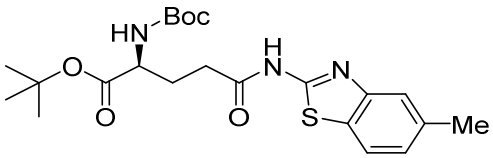
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-methylbenzo[*d*]thiazol-2-amine (48.7 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 118 mg (77 %)의 흰색 고체를 수득함



PR-004

Molecular Weight: 293.3410

- N^5-(4-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl) -*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.089 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 29 mg (89 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함

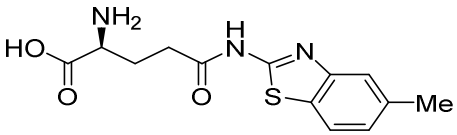


PR-005

Molecular Weight: 449.5660

KOPRI 극지연구소

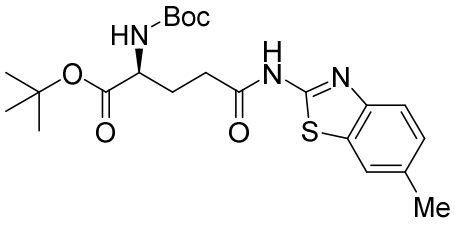
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-methylbenzo[*d*]thiazol-2-amine (48.7 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy) -4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 114 mg (76 %)을 흰색 고체를 수득함



PR-006

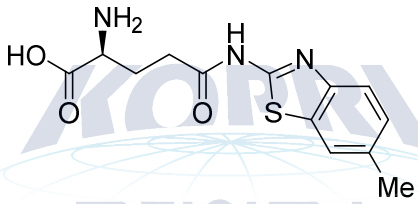
Molecular Weight: 293.3410

- N^5-(5-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(5-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (15 mg, 0.033 mmol)의 일반 방법 D를 수행하여 화합물 6.6 mg (59 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



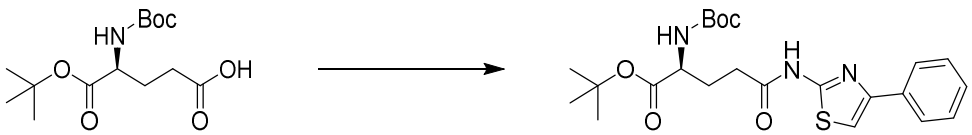
PR-007
Molecular Weight: 449.5660

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(6-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 6-methylbenzo[*d*]thiazol-2-amine (48.7 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 126 mg (83 %)을 흰색 고체를 수득함



PR-008
Molecular Weight: 293.3410

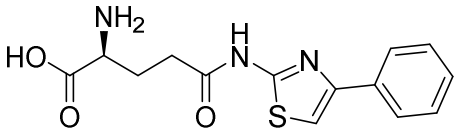
- N^5-(6-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(6-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (20 mg, 0.046 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 11.6 mg (78 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

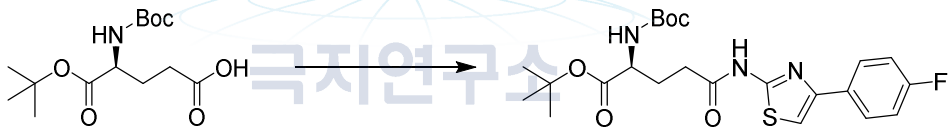
tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-phenylthiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{23}H_{31}N_3O_5S$
Molecular Weight: 461.5770

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-phenylthiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-phenylthiazol-2-amine (87 mg, 0.494 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (30 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 106 mg (70 %)을 흰색 고체로 수득함



PR-009
Molecular Weight: 305.3520

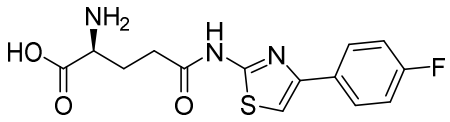
- N^5-(4-phenylthiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(4-phenylthiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.087 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 29.3 mg (97 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

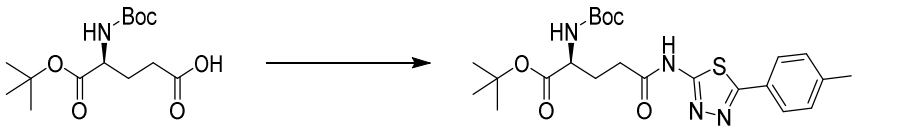
tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{23}H_{30}FN_3O_5S$
Molecular Weight: 479.5674

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-amine (70.4 mg, 0.363 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy) -4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (30 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 82.5 mg (52 %)을 흰색 고체로 수득함



PR-010
Molecular Weight: 323.3424

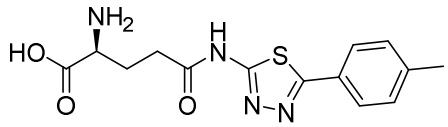
- N^5-(4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-fluorophenylthiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (50 mg, 0.104 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 35.7 mg (95 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

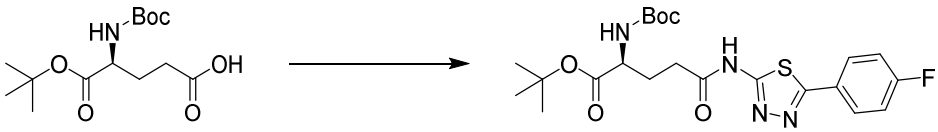
tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(*p*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{23}H_{32}N_4O_5S$
Molecular Weight: 476.5920

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(*p*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-(*p*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (69.4 mg, 0.363 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (45 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 49.9 mg (32 %)을 오프화이트 고체로 수득함



PR-011
Molecular Weight: 320.3670

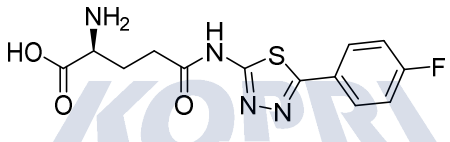
- N^5-(5-(*p*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(5-(*p*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (30 mg, 0.063 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 14.5 mg (62 %)을 아이보리 고체인 HCl 염으로 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{22}H_{29}FN_4O_5S$
Molecular Weight: 480.5554

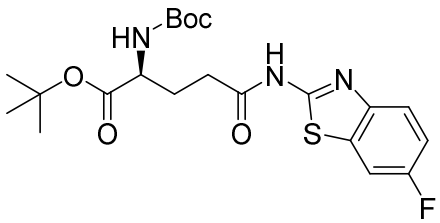
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (70.8 mg, 0.363 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (30 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 52 mg (33 %)을 흰색 고체로 수득함



PR-012
Molecular Weight: 324.3304

KOPRI
극지연구소

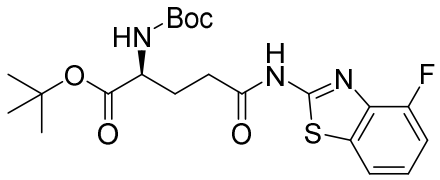
- N^5-(5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(4-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (29.2 mg, 0.061 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 16 mg (71 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-013
Molecular Weight: 453.5294

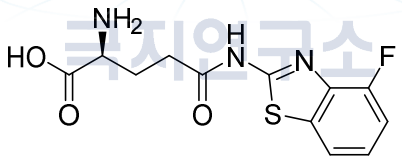
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (49.9 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)

-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 112 mg (73 %)의 흰색 고체를 수득함



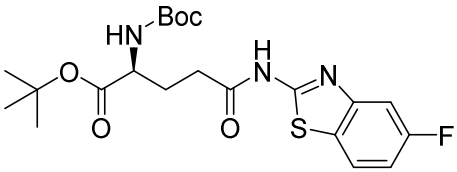
PR-014
Molecular Weight: 453.5294

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (48.7 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 64.9 mg (42 %)를 흰색 고체로 수득함



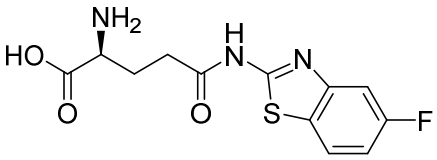
PR-015
Molecular Weight: 297.3044

- N^5-(4-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5(4-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (20 mg, 0.046 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 19.0 mg (82 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



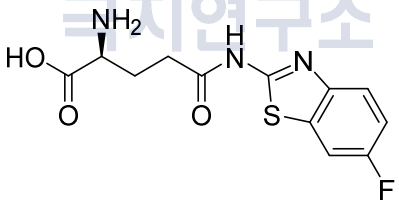
PR-016
Molecular Weight: 453.5294

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (49.9 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 95.8 mg (64 %)을 흰색 고체로 수득함



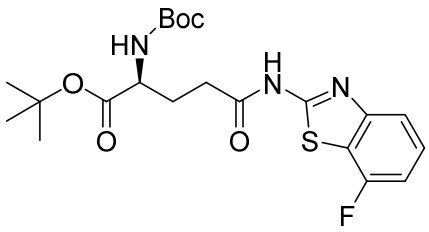
PR-017
Molecular Weight: 297.3044

- N^5-(5-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.088 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 27.4 mg (91 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로서 수득함



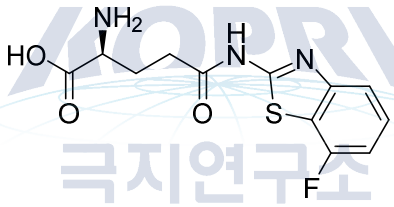
PR-018
Molecular Weight: 297.3044

- N^5-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(6-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.088 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 25.3 mg (84 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



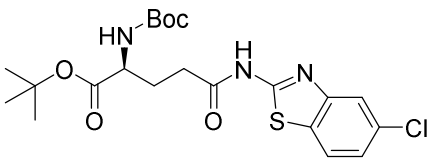
PR-019
Molecular Weight: 453.5294

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(7-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 7-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (49.9 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 75.8 mg (50 %)의 흰색 고체를 수득함



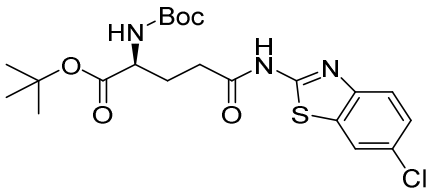
PR-020
Molecular Weight: 297.3044

- N^5-(7-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(7-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (43 mg, 0.088 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 8.5 mg (27 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-021
Molecular Weight: 469.9810

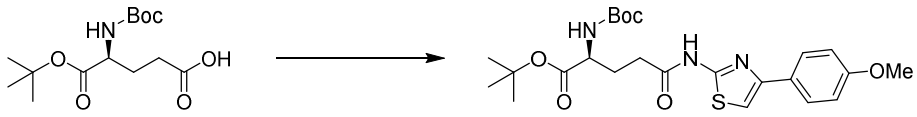
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (54.8 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 93.7 mg (60 %)의 흰색 고체를 수득함



PR-022
Molecular Weight: 469.9810

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(6-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 6-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-amine (54.8 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 109 mg (67 %)의 흰색 고체를 수득함

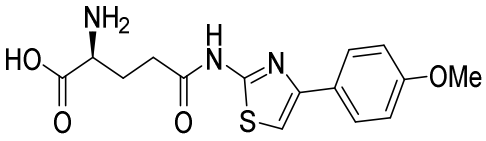
KOPRI 극지연구소



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

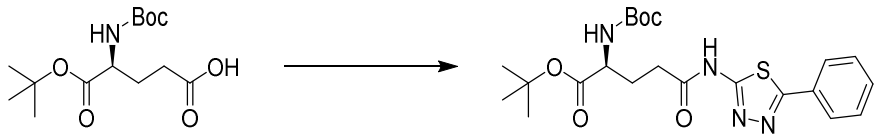
tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{24}H_{33}N_3O_6S$
Molecular Weight: 491.6030

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-amine (29.9 mg, 0.145 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (40 mg, 0.132 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (35 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 33.1 mg (51 %)을 오프화이트 고체로 수득함



PR-023
Molecular Weight: 335.3780

- N^5-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.081 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 28.8 mg (93 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함

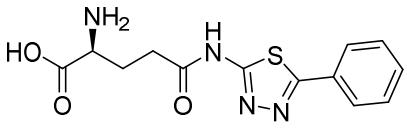


(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-phenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{22}H_{30}N_4O_5S$
Molecular Weight: 462.5650

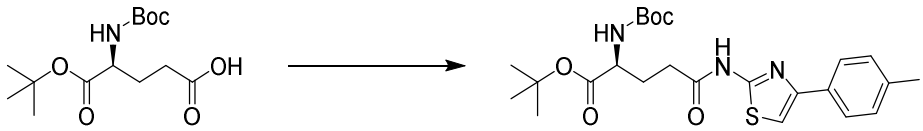
KOPRI 극지연구소

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-phenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-phenyl-1,3,4-thiadiazol-2-amine (25.7 mg, 0.145 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (40 mg, 0.132 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (30 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 38.1 mg (63 %)을 흰색 고체로 수득함



PR-024
Molecular Weight: 306.3400

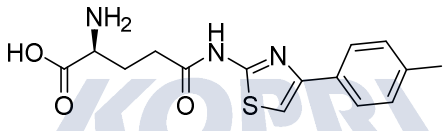
- N^5-(5-phenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(5-phenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (35.6 mg, 0.077 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 20.5 mg (76 %)을 아이보리 고체인 HCl 염으로 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(*p*-tolyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{24}H_{33}N_3O_5S$
Molecular Weight: 475.6040

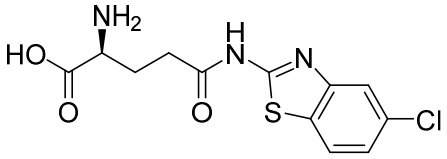
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(*p*-tolyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-(*p*-tolyl)thiazol-2-amine (69.0 mg, 0.363 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (25 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 111 mg (71 %)을 오프화이트 고체로 수득함



PR-025
Molecular Weight: 319.3790

KOPRI
극지연구소

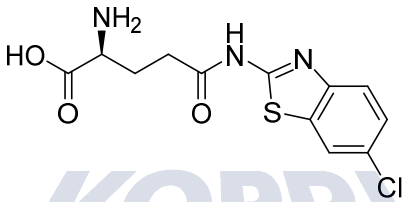
- N^5-(4-(*p*-tolyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(4-(*p*-tolyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.084 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 25.0 mg (81 %)을 아이보리 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-026

Molecular Weight: 313.7560

- N^5-(5-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(5-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.088 mmol)의 일반 방법 D를 수행하여 화합물 23.6 mg (76 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함

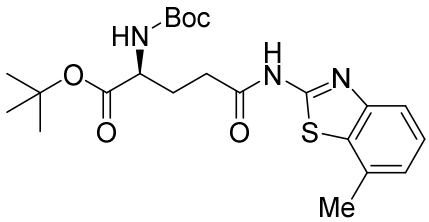


PR-027

Molecular Weight: 313.7560

KOPRI 극지연구소

- N^5-(6-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(6-chlorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.088 mmol)의 일반 방법 D를 수행하여 화합물 26.4 mg (86 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함

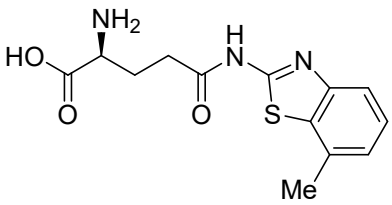


PR-028

Molecular Weight: 449.5660

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(7-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 7-methylbenzo[*d*]thiazol-2-amine (48.7 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A

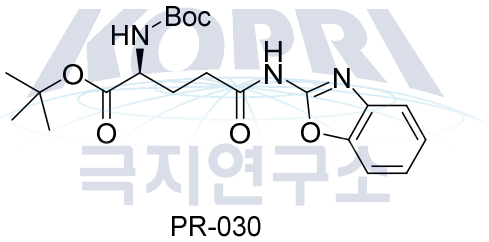
를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 117 mg (78 %)의 흰색 고체를 수득함



PR-029

Molecular Weight: 293.3410

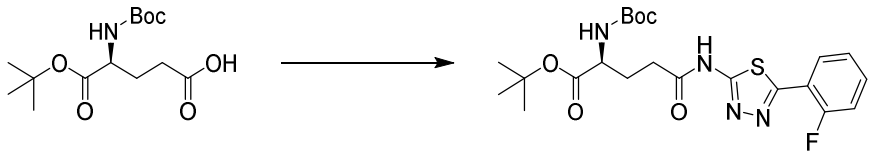
- N^5-(7-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(7-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.089 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 28.3 mg (94 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-030

Molecular Weight: 419.4780

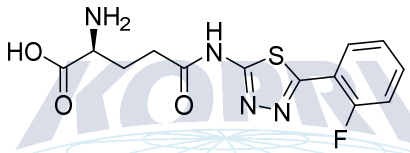
- *tert*-butyl N^5-(benzo[*d*]oxazol-2-yl)-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-glutaminate 합성 : benzo[*d*]oxazol-2-amine (39.8 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 80.6 mg (56 %)의 흰색 고체를 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

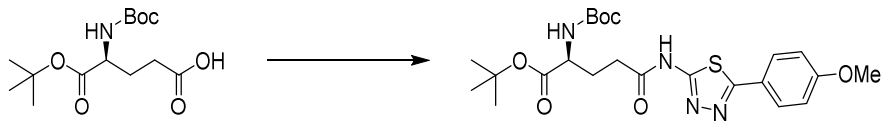
tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(2-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{22}H_{29}FN_4O_5S$
Molecular Weight: 480.5554

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(2-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-(2-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (70.8 mg, 0.363 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (45 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 68.5 mg (43 %)을 흰색 고체로 수득함



PR-031
Molecular Weight: 324.3304

- N^5-(5-(2-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(2-fluorophenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.083 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 22.3 mg (72 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로서 수득함

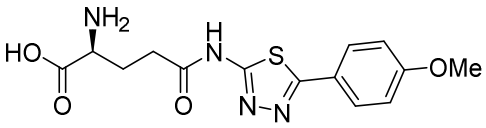


(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{23}H_{32}N_4O_6S$
Molecular Weight: 492.5910

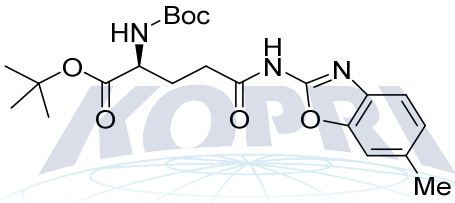
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (30.1 mg, 0.145 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (40 mg, 0.132 mmol)의

일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (40 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 35.1 mg (53 %)을 오프화이트 고체로 수득함



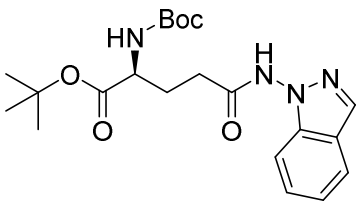
PR-032
Molecular Weight: 336.3660

- N^5-(5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.081 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 22.7 mg (73 %)을 아이보리 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-033
Molecular Weight: 433.5050

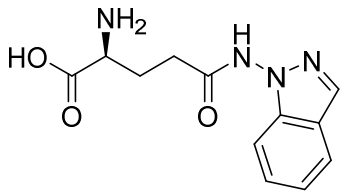
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(6-methylbenzo[*d*]oxazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 6-methylbenzo[*d*]thiazol-2-amine (44.0 mg, 0.297 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 74.3 mg (51 %)의 주황색 고체를 수득함



PR-034

Molecular Weight: 418.4940

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(1*H*-indazol-1-yl)-*L*-glutaminate 의 합성 : (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol) 과 1*H*-indazol-1-amine (48.3 mg, 0.363 mmol) 의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (100 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 92 mg (66 %)을 흰색 고체로 수득함

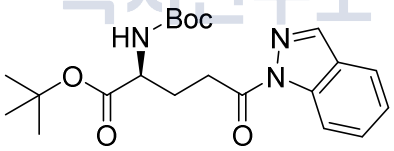


PR -035

Molecular Weight: 262.2690

- N^5-(1*H*-indazol-1-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(1*H*-indazol-1-yl)-*L*-glutaminate (30 mg, 0.072 mmol) 의 일반방법 D를 수행하여 상온에서 밤새워 교반을 실시함. 화합물 18.6 mg (96 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함

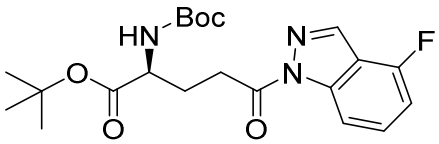
KOPRI 극지연구소



PR-036

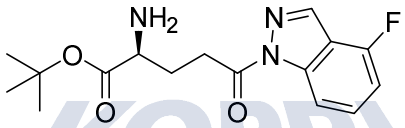
Molecular Weight: 403.4790

- *tert*-butyl (S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-(1*H*-indazol-1-yl)-5-oxopentanoate 의 합성 : (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (150 mg, 0.494 mmol) 과 1*H*-indazole (64.3 mg, 0.544 mmol) 의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (15 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 81.9 mg (41 %)을 투명한 액체로 수득함



PR-037
Molecular Weight: 421.4694

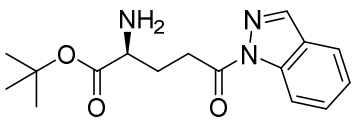
- *tert*-butyl (S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-(4-fluoro-1*H*-indazol-1-yl)-5-oxopentanoate 의 합성 : (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (150 mg, 0.494 mmol) 과 4-fluoro-1*H*-indazole (74 mg, 0.544 mmol) 의 일반방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (15 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 175.9 mg (84 %)을 투명한 액체로 수득함



PR-038
Molecular Weight: 321.3524

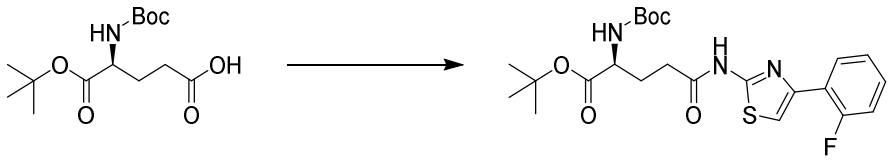
KOPRI
극지연구소

- *tert*-butyl (S)-2-amino-5-(4-fluoro-1*H*-indazol-1-yl)-5-oxopentanoate (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl (S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-(4-fluoro-1*H*-indazol-1-yl)-5-oxopentanoate (48.5 mg, 0.104 mmol) 의 일반방법 E를 수행하여 상온에서 밤새워 교반을 실시함. 화합물 27.9 mg (79 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로서 수득함



PR-039
Molecular Weight: 303.3620

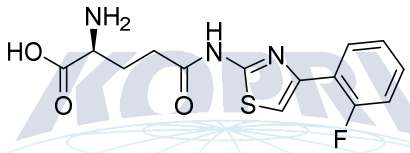
- *tert*-butyl (S)-2-amino-5-(1*H*-indazol-1-yl)-5-oxopentanoate (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl (S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-(1*H*-indazol-1-yl)-5-oxopentanoate (30 mg, 0.074 mmol) 의 일반방법 E를 수행하여 상온에서 1시간동안 교반을 실시함. 화합물 13.4 mg (56 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로서 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

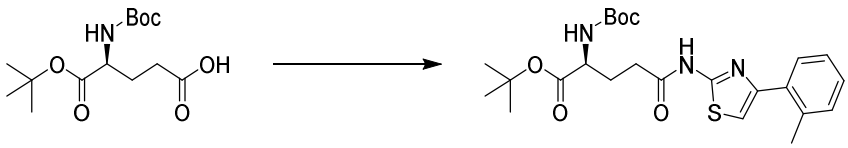
tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(2-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{23}H_{30}FN_3O_5S$
Molecular Weight: 479.5674

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(2-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-(2-fluorophenyl)thiazol-2-amine (70.4 mg, 0.363 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (20 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 73.1 mg (46 %)을 오프화이트 고체로 수득함



PR-040
Molecular Weight: 323.3424

- N^5-(4-(2-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(2-fluorophenyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (27.9 mg, 0.058 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 13.0 mg (59 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로서 수득함

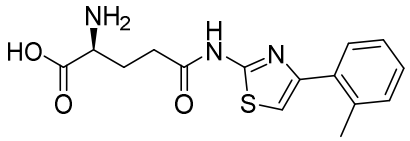


(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(*o*-tolyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{24}H_{33}N_3O_5S$
Molecular Weight: 475.6040

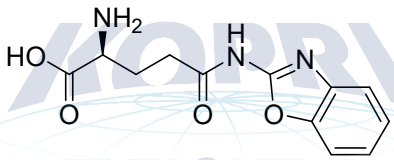
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(*o*-tolyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-(*o*-tolyl)thiazol-2-amine (62.7 mg, 0.330 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-

((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (30 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 121 mg (75 %)을 아이보리 고체로 수득함



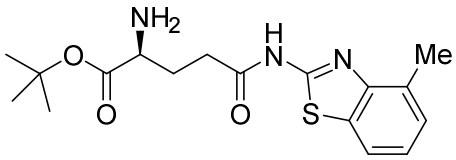
PR-041
Molecular Weight: 319.3790

- N^5-(4-(*o*-tolyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(*o*-tolyl)thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.084 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 14.0 mg (46 %)을 아이보리 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-042
Molecular Weight: 263.2530

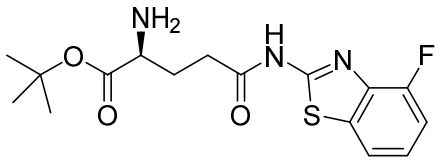
- N^5-(benzo[*d*]oxazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(5-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.088 mmol)의 일반방법 C를 수행하여 화합물 13.4 mg (61 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-043
Molecular Weight: 349.4490

- *tert*-butyl-N^5-(4-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-

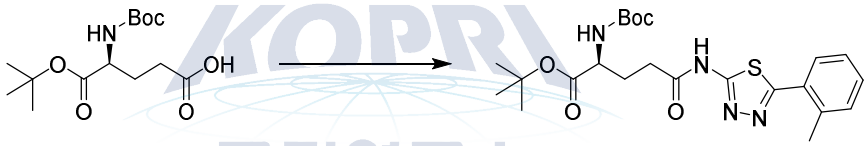
butoxycarbonyl)-N^5-(4-methylbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (29.3 mg, 0.065 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 6.4 mg (28 %)의 흰색 고체를 수득함



PR-044

Molecular Weight: 353.4124

- *tert*-butyl-N^5-(4-fluorolbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : *tert*-butyl-N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-fluorobenzo[*d*]thiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (38.5 mg, 0.085 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 7.5 mg (25 %)의 무색의 오일을 수득함

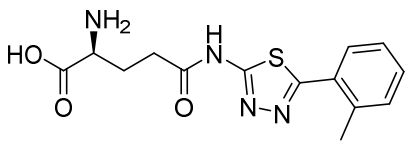


(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(*o*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{23}H_{32}N_4O_5S$
Molecular Weight: 476.5920

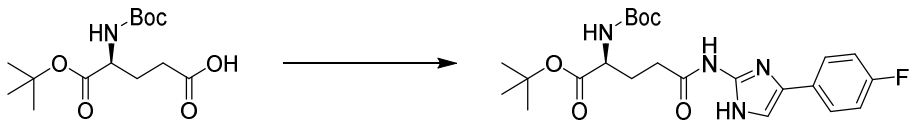
KOPRI 극지연구소

- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(5-(*o*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 5-(*o*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-amine (63.0 mg, 0.330 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 128 mg (81 %)을 아이보리 고체로 수득함



PR-045
Molecular Weight: 320.3670

- N^5-(5-(*o*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(5-(*o*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.084 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 10.4 mg (33 %)을 연한 노란색 고체인 HCl 염으로 수득함

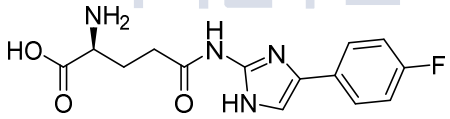


(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-fluorophenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{23}H_{31}FN_4O_5$
Molecular Weight: 462.5224

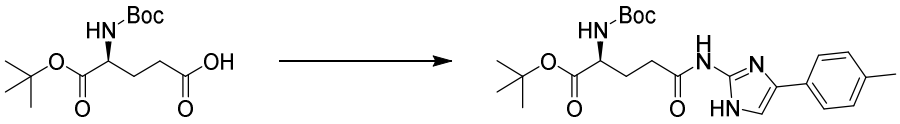
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-fluorophenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-(4-fluorophenyl)-1*H*-imidazol-2-amine (117 mg, 0.659 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (200 mg, 0.659 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (45 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 61.6 mg (20 %)을 노란색 고체로 수득함

KIPRI 극지연구소



PR-046
Molecular Weight: 306.2974

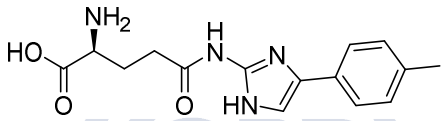
- N^5-(4-(4-fluorophenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(4-fluorophenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)-*L*-glutaminate (57.2 mg, 0.124 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 39.6 mg (90 %)을 아이보리 고체인 HCl 염으로 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(*p*-tolyl)-1*H*-imidazol-2-yl)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{24}H_{34}N_4O_5$
Molecular Weight: 458.5590

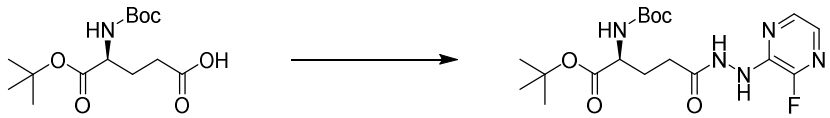
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-(4-(*p*-tolyl)-1*H*-imidazol-2-yl)-*L*-glutaminate 합성 : 4-(*p*-tolyl)-1*H*-imidazol-2-amine (114 mg, 0.659 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (200 mg, 0.659 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (45 % EA/Hexane)를 통해서 화합물 52 mg (17 %)을 연한 노란색 고체로 수득함



PR-047
Molecular Weight: 302.3340

KCRI
극지연구소

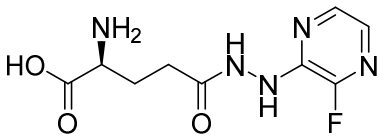
- N^5-(4-(*p*-tolyl)-1*H*-imidazol-2-yl)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-(4-(*p*-tolyl)-1*H*-imidazol-2-yl)-*L*-glutaminate (46.5 mg, 0.101 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 30.4 mg (86 %)을 아이보리 고체인 HCl 염으로서 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

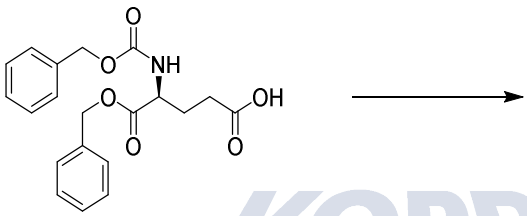
tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-((3-fluoropyrazin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{18}H_{28}FN_5O_5$
Molecular Weight: 413.4504

- tert-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((3-fluoropyrazin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : 4(*S*)-5-(tert-butoxy)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)과 2-fluoro-3-hydrazineylpyrazine dihydrochloride (66 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 105 mg (77 %)의 노란색 오일을 수득함



PR-048
Molecular Weight: 257.2254

- N^5-((3-fluoropyrazin-2-yl)amino)-*L*-glutamine (HCl 염) 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy) carbonyl)-N^5-((3-fluoropyrazin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.083 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 11.9 mg (55 %)의 흰색 고체를 HCl 염으로서 수득함

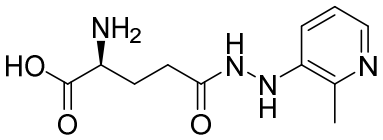


(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)
-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.3890

benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-
((2-methylpyridin-3-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{26}H_{28}N_4O_5$
Molecular Weight: 476.5330

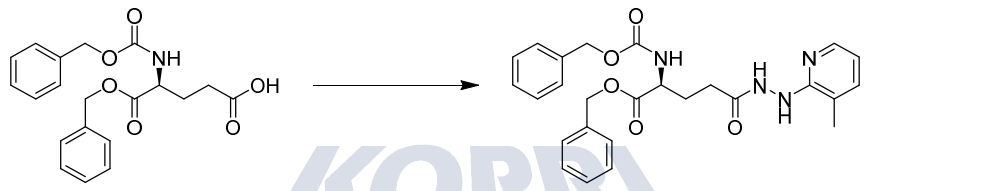
KOPRI 극지연구소

- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-methylpyridin-3-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : (*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)과 3-hydrazineyl-2-methylpyridine dihydrochloride (58 mg, 0.296 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (10 % CH_2Cl_2/Methanol)를 통해서 화합물 86.5 mg (67 %)의 노란색 고체를 수득함



PR-049
Molecular Weight: 252.2740

- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-methylpyridin-3-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-methylpyridin-3-yl)amino)-*L*-glutaminate (40 mg, 0.084 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 7 mg (31 %)의 연한 노란색 고체를 수득함

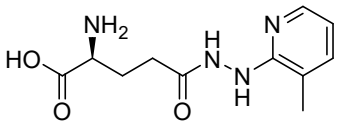


(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.39

benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((3-methylpyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{26}H_{28}N_4O_5$
Molecular Weight: 476.53

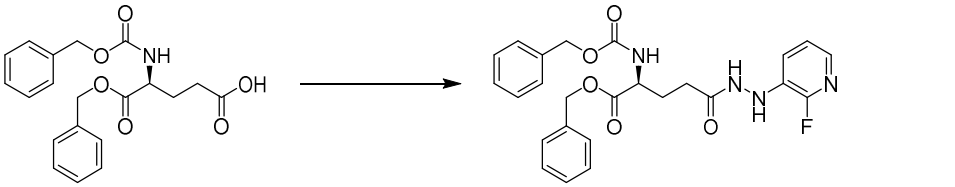
KOPRI 극지연구소

- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((3-methylpyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : 2-hydrazineyl-3-methylpyridine (33.2 mg, 0.269 mmol)과 (*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (95 % EtOAc/Hexane)와 재결정을 통해서 화합물 108 mg (84 %)을 흰색 고체로 수득함



Molecular Weight: 252.27
PR-050

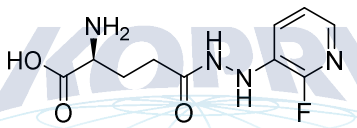
- N^5-((3-methylpyridin-2-yl)amino)-*L*-glutamine 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((3-methylpyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate (32 mg, 0.067 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 13.5 mg (76 %)을 베이지색 고체로 수득함



(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.39

benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-fluoropyridin-3-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{25}H_{25}FN_4O_5$
Molecular Weight: 480.50

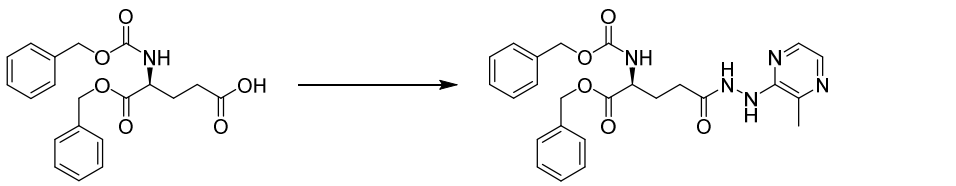
- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-fluoropyridin-3-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : 2-fluoro-3-hydrazineylpyridine dihydrochloride (53.9 mg, 0.269 mmol)과 (*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (80 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 81.7 mg (63 %)을 연한 분홍색 고체로 수득함



Molecular Weight: 256.24
PR-051

KOPRI 극지연구소

- N^5-((2-fluoropyridin-3-yl)amino)-*L*-glutamine 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-fluoropyridin-3-yl)amino)-*L*-glutaminate (50 mg, 0.104 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 17 mg (61 %)을 상아색 고체로 수득함

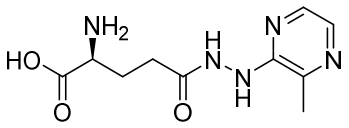


(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.39

benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((3-methylpyrazin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{25}H_{27}N_5O_5$
Molecular Weight: 477.52

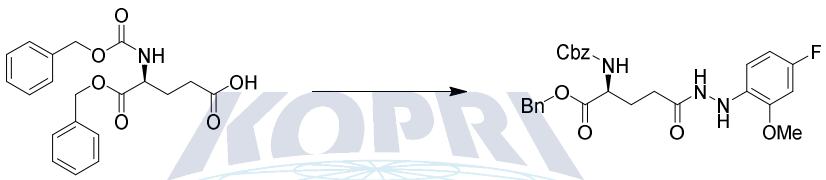
- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((3-methylpyrazin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : 2-hydrazineyl-3-methylpyrazine (33.4 mg, 0.269 mmol)과 (S)-5-(benzyloxy)-4-(

((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (10 % MeOH/DCM)를 통해서 화합물 75.8 mg (59 %)을 오프 화이트 고체로 수득함



Molecular Weight: 253.26
PR-052

- N^5-((3-methylpyrazin-2-yl)amino)-*L*-glutamine 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((3-methylpyrazin-2-yl)amino)-L-glutaminate (47.6 mg, 0.100 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 20.5 mg (80 %)을 상아색 고체로 수득함

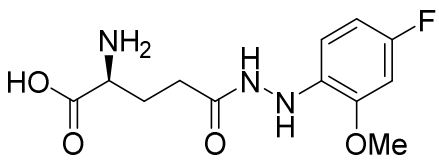


(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)
-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.3890

benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5
-((4-fluoro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{27}H_{28}FN_3O_6$
Molecular Weight: 509.5344

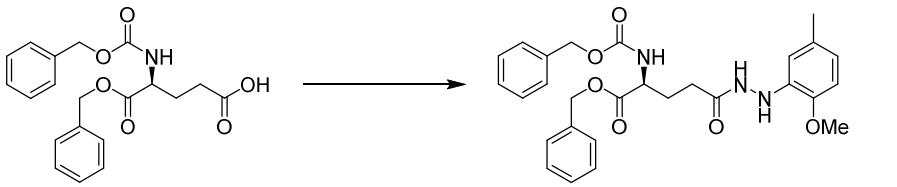
KOPRI 극지연구소

- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4-fluoro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate합성 : (*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)과 (4-fluoro-2-methoxyphenyl)hydrazine dihydrochloride (67.8 mg, 0.296 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 72.8 mg (52 %)의 연갈색 고체로 수득함



PR-053
Molecular Weight: 285.2754

- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4-fluoro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4-fluoro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate (50 mg, 0.098 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 14.4 mg (51 %)의 베이지 고체를 수득함

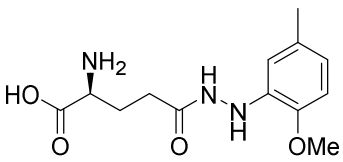


(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.39

benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-methoxy-5-methylphenyl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{28}H_{31}N_3O_6$
Molecular Weight: 505.57

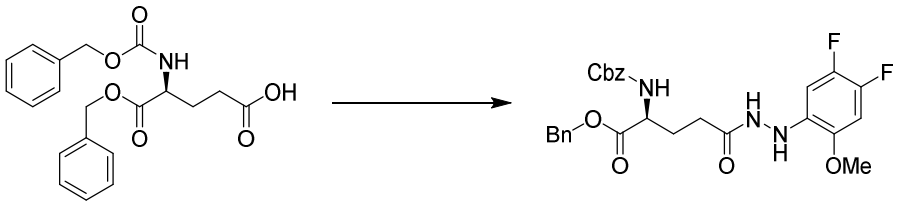
- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-methoxy-5-methylphenyl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : (2-methoxy-5-methylphenyl)hydrazine hydrochloride (50.8 mg, 0.269 mmol)과 (S)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (60 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 80.6 mg (59 %)을 상아색 고체로 수득함

KOPRI 극지연구소



Molecular Weight: 281.31
PR-054

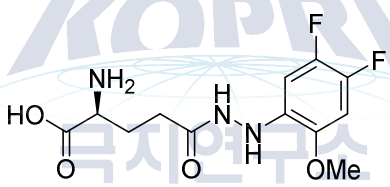
- N^5-((2-methoxy-5-methylphenyl)amino)-*L*-glutamine 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-methoxy-5-methylphenyl)amino)-*L*-glutaminate (50 mg, 0.099 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 11.5 mg (40 %)을 베이지색 고체로 수득함



(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)
-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.3890

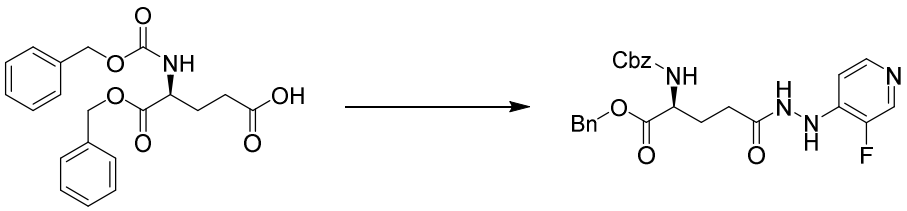
benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5
-((4,5-difluoro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{27}H_{27}F_2N_3O_6$
Molecular Weight: 527.5248

- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((4,5-difluoro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : (*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)과 (4,5-difluoro-2-methoxyphenyl)hydrazine dihydrochloride (73.2 mg, 0.296 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 69.8 mg (49 %)의 흰색 고체를 수득함



PR-055
Molecular Weight: 303.2658

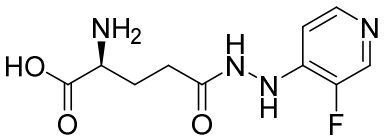
- N^5-((4,5-difluoro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutamine 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy) carbonyl)-N^5-((4,5-difluoro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate (50 mg, 0.095 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 7.3 mg (25 %)의 갈색 고체를 수득함



(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)
-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.3890

benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-
((3-fluoropyridin-4-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{25}H_{25}FN_4O_5$
Molecular Weight: 480.4964

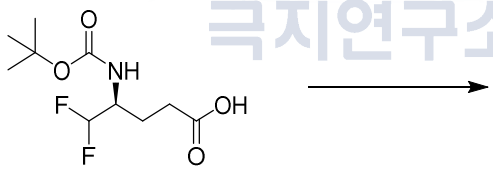
- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((3-fluoropyridin-4-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : (*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)과 3-fluoro-4-hydrazineylpyridine dihydrochloride (59.2 mg, 0.296 mmol)의 일반 방법 A를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (20 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 106 mg (81 %)의 연노란색 고체를 수득함



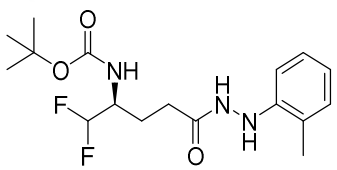
PR-056
Molecular Weight: 256.2374

- N^5-((3-fluoropyridin-4-yl)amino)-*L*-glutamine 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((3-fluoropyridin-4-yl)amino)-*L*-glutaminate (64 mg, 0.133 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 6.2 mg (17 %)의 흰색 고체를 수득함

KOPRI 극지연구소

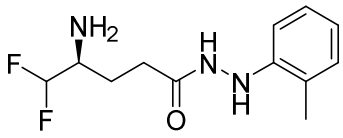


(*S*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid
Chemical Formula: $C_{10}H_{17}F_2NO_4$
Molecular Weight: 253.25



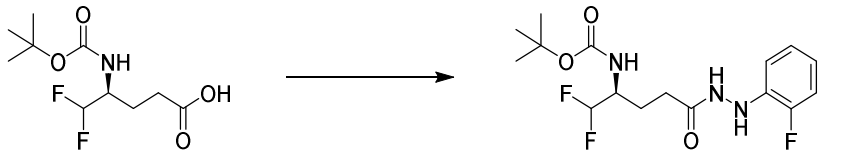
tert-butyl (*S*)-(1,1-difluoro-5-oxo-5-(2-(*o*-tolyl)hydrazineyl)pentan-2-yl)carbamate
Chemical Formula: $C_{17}H_{25}F_2N_3O_3$
Molecular Weight: 357.40

- *tert*-butyl (S)-(1,1-difluoro-5-oxo-5-(2-(o-tolyl)hydrazineyl)pentan-2-yl)carbamate 합성 : *o*-tolylhydrazine hydrochloride (62.6 mg, 0.395 mmol)과 (S)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid (100 mg, 0.395 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 재결정 (MeOH/EtOAc/Hexane)을 통해서 화합물 101.2 mg (72 %)을 오프 화이트 고체로 수득함



Molecular Weight: 257.28
PR-057

- (*S*)-4-amino-5,5-difluoro-*N'*-(*o*-tolyl)pentanehydrazide (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl (*S*)-(1,1-difluoro-5-oxo-5-(2-(*o*-tolyl)hydrazineyl)pentan-2-yl)carbamate (40 mg, 0.112 mmol) 의 일반방법 D를 수행하여 화합물 5.3 mg (15 %)을 오프 화이트 고체인 HCl염으로 수득함

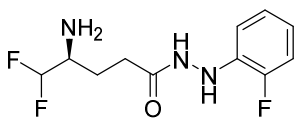


(*S*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid
Chemical Formula: $C_{10}H_{17}F_2NO_4$
Molecular Weight: 253.25

tert-butyl (*S*)-(1,1-difluoro-5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate
Chemical Formula: $C_{16}H_{22}F_3N_3O_3$
Molecular Weight: 361.37

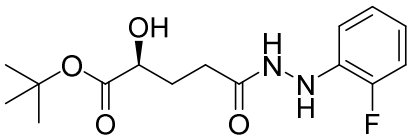
KOPRI 극지연구소

- *tert*-butyl (S)-(1,1-difluoro-5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate 합성 : (2-fluorophenyl)hydrazine hydrochloride (64.2 mg, 0.395 mmol)과 (S)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid (100 mg, 0.395 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 재결정 (EtOAc/Hexane)과 실리카겔 상의 MPLC (75 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 83.2 mg (58 %)을 상아색 고체로 수득함



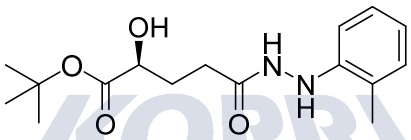
Molecular Weight: 261.25
PR-058

- (*S*)-4-amino-5,5-difluoro-*N'*-(2-fluorophenyl)pentanehydrazide (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl (*S*)-(1,1-difluoro-5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate (50 mg, 0.138 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 23.9 mg (57 %)을 상아색 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-059
Molecular Weight: 312.3414

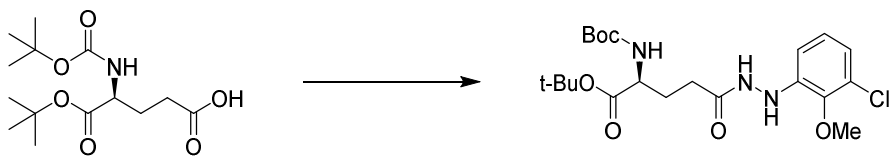
- *tert*-butyl (*S*)-5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-2-hydroxy-5-oxopentanoate 합성 : (*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-hydroxy-5-oxopentanoic acid (50 mg, 0.245 mmol)와 (2-fluorophenyl)hydrazine hydrochloride (43.8 mg, 0.269 mmol)의 일반방법 B를 수행하여 실리카겔 상의 MPLC (50 % EtOAc/Hexane)를 통해 화합물 26.8 mg (34 %)의 노란색 오일을 수득함



PR-060
Molecular Weight: 308.3780

KOPRI 극지연구소

- *tert*-butyl (*S*)-2-hydroxy-5-oxo-5-(2-(o-tolyl)hydrazineyl)pentanoate 합성 : (*S*)-5-(tert-butoxy)-4-hydroxy-5-oxopentanoic acid (50 mg, 0.245 mmol)와 *o*-tolylhydrazine hydrochloride (42.7 mg, 0.269 mmol)의 일반방법 B를 수행하여 실리카겔 상의 MPLC (60 % EtOAc/Hexane)를 통해 화합물 21.1 mg (27 %)의 주황색 오일을 수득함

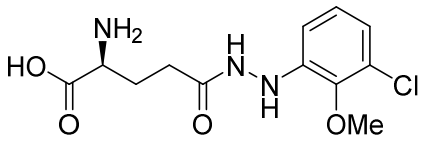


(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)
-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-
((3-chloro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{21}H_{32}ClN_3O_6$
Molecular Weight: 457.9520

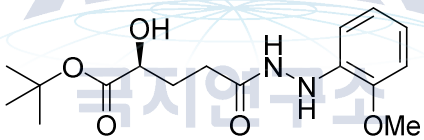
- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((3-chloro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate

합성 : (*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)과 (3-chloro-2-methoxyphenyl)hydrazine dihydrochloride (89 mg, 0.363 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 115 mg (72 %)의 연노랑 고체를 수득함



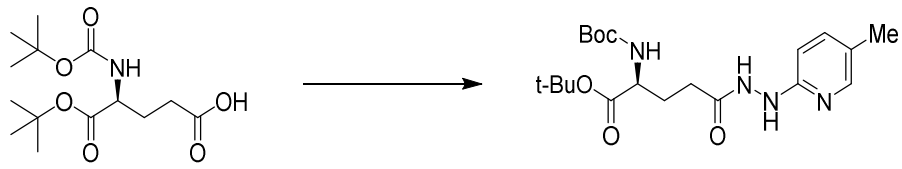
PR-061
Molecular Weight: 301.7270

- N^5-((3-chloro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutamine 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-((3-chloro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate (45.3 mg, 0.099 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 실리카겔 상의 MPLC (60 % EtOAc/Hexane)를 통해 화합물 8.2 mg (25 %)의 아이보리 고체를 수득함



PR-062
Molecular Weight: 324.3770

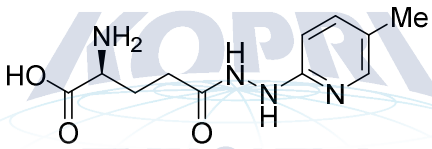
- *tert*-butyl (*S*)-2-hydroxy-5-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-5-oxopentanoate 합성 : (*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-hydroxy-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.490 mmol) 와 (2-methoxyphenyl)hydrazine hydrochloride (94 mg, 0.539 mmol) 의 일반방법 B를 수행하여 실리카겔 상의 MPLC (60 % EtOAc/Hexane)를 통해 화합물 45.6 mg (28 %)의 주황색 오일을 수득함



(*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)
-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{14}H_{25}NO_6$
Molecular Weight: 303.3550

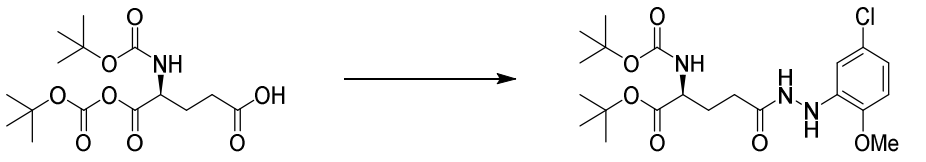
tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-
((5-methylpyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{20}H_{32}N_4O_5$
Molecular Weight: 408.4990

- *tert*-butyl N^2-(tert-butoxycarbonyl)-N^5-((5-methylpyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate합성 : (*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)과 2-hydrazineyl-5-methylpyridine (44.7 mg, 0.363 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (80 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 65.8 mg (46 %)의 노란색 오일을 수득함



PR-063
Molecular Weight: 252.2740

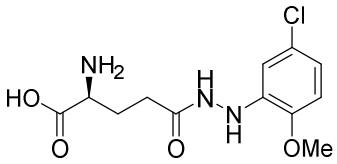
- N^5-((5-methylpyridin-2-yl)amino)-*L*-glutamine hydrochloride 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-((5-methylpyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate (60 mg, 0.147 mmol) 의 일반방법 D를 수행하여 화합물 45 mg (100 %)의 흰색 고체를 수득함



(*S*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*tert*-
butoxycarbonyl)oxy)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{15}H_{25}NO_8$
Molecular Weight: 347.36

tert-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-((5-
chloro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-
glutaminate
Chemical Formula: $C_{21}H_{32}ClN_3O_6$
Molecular Weight: 457.95

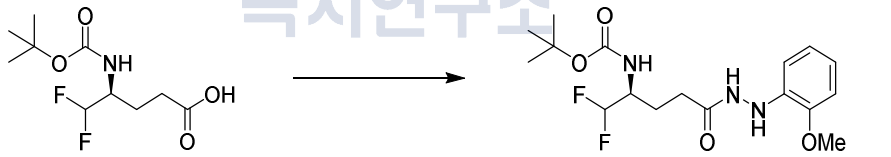
- *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxycarbonyl)-N^5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : (5-chloro-2-methoxyphenyl)hydrazine hydrochloride (68.9 mg, 0.330 mmol)과 (S)-5-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.330 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (35 % EtOAc/Hexane)과 재결정 (EtOAc/Hexane)을 통해서 화합물 78.9 mg (52 %)을 흰색 고체로 수득함



Molecular Weight: 301.73
PR-064

- N^5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutamine 합성 : *tert*-butyl N^2-(*tert*-butoxy carbonyl)-N^5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)amino)-*L*-glutaminate (50 mg, 0.109 mmol)의 일반방법 D를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (20 % MeOH/DCM)를 통해서 화합물 9.1 mg (27 %)을 베이지색 고체로 수득함

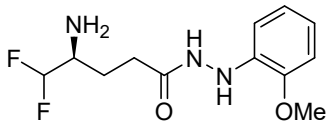
KOPRI 극지연구소



(*S*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid
Chemical Formula: $C_{10}H_{17}F_2NO_4$
Molecular Weight: 253.25

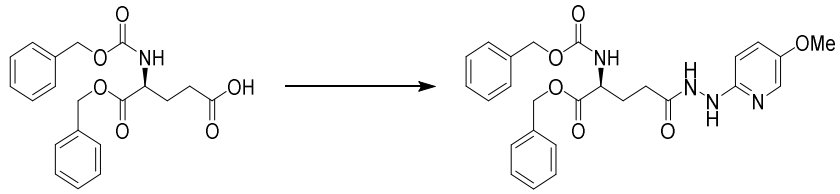
tert-butyl (*S*)-(1,1-difluoro-5-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate
Chemical Formula: $C_{17}H_{25}F_2N_3O_4$
Molecular Weight: 373.40

- *tert*-butyl (*S*)-(1,1-difluoro-5-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate 합성 : (2-methoxyphenyl)hydrazine hydrochloride (69.0 mg, 0.395 mmol)과 (*S*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid (100 mg, 0.395 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 45 mg (31 %)을 상아색 고체로 수득함



Molecular Weight: 273.28
PR-065

- (*S*)-4-amino-5,5-difluoro-*N*'-(2-methoxyphenyl)pentanehydrazide (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl (*S*)-(1,1-difluoro-5-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate (40 mg, 0.107 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 19.4 mg (57 %)을 베이지색 고체인 HCl 염으로서 수득함

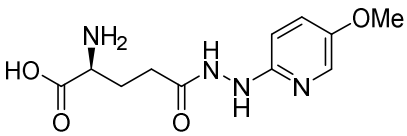


(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.39

benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((5-methoxypyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{26}H_{28}N_4O_6$
Molecular Weight: 492.53

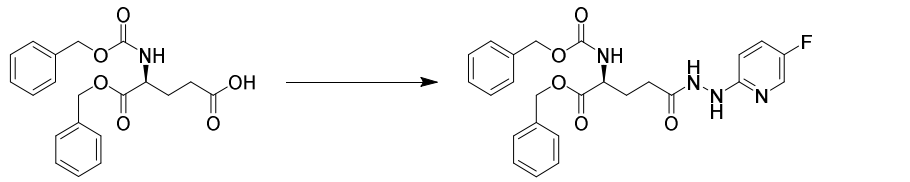
KOPRI 극지연구소

- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((5-methoxypyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : 2-hydrazineyl-5-methoxypyridine (56.2 mg, 0.404 mmol)과 (*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (100 % EtOAc → 5 % MeOH/DCM)를 통해서 화합물 65.1 mg (49 %)을 오프 화이트 고체로 수득함



Molecular Weight: 268.27
PR-066

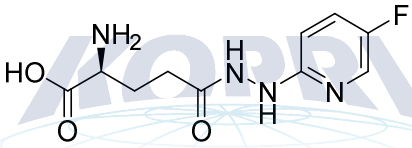
- N^5-((5-methoxypyridin-2-yl)amino)-*L*-glutamine 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((5-methoxypyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate (53.8 mg, 0.109 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 13.4 mg (46 %)을 연한 노란색 고체로 수득함



(*S*)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid
Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6$
Molecular Weight: 371.39

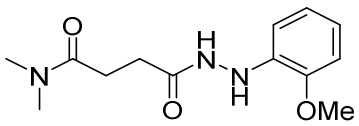
benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((5-fluoropyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate
Chemical Formula: $C_{25}H_{25}FN_4O_5$
Molecular Weight: 480.50

- benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((5-fluoropyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate 합성 : 5-fluoro-2-hydrazineylpyridine (51.3 mg, 0.404 mmol)과 (S)-5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy) carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid (100 mg, 0.269 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (85 % EtOAc → 5 % MeOH/DCM)를 통해서 화합물 68.7 mg (67 %)을 오프 화이트 고체로 수득함



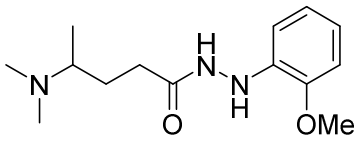
Molecular Weight: 256.24
PR-067

- N^5-((5-fluoropyridin-2-yl)amino)-*L*-glutamine 합성 : benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((5-fluoropyridin-2-yl)amino)-*L*-glutaminate (50 mg, 0.104 mmol)의 일반방법 E를 수행하여 화합물 12.8 mg (45 %)을 연한 노란색 고체로 수득함



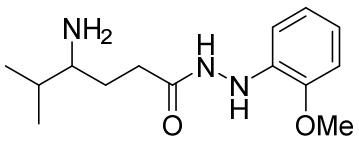
PR-068
Molecular Weight: 265.3130

- 4-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-*N*,*N*-dimethyl-4-oxobutanamide 합성 : 4-(dimethyl amino)-4-oxobutanoic acid (100 mg, 0.689 mmol)와 (2-methoxyphenyl) hydrazine (190 mg, 1.378 mmol)의 일반방법 B를 수행하여 아민 실리카겔 상의 MPLC (70 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 24.2 mg (13 %)의 아이보리 고체를 수득함



PR-069
Molecular Weight: 265.3570

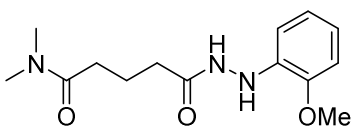
- 4-(dimethylamino)-*N*'-(2-methoxyphenyl)pentanehydrazide 합성 : 4-(dimethylamino) pentanoic acid (100 mg, 0.689 mmol)와 (2-methoxyphenyl)hydrazine (190 mg, 1.377 mmol)의 일반방법 B를 수행하여 아민 실리카겔 상의 MPLC (70 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 9 mg (5 %)의 연갈색 고체를 수득함



PR-070
Molecular Weight: 265.3570

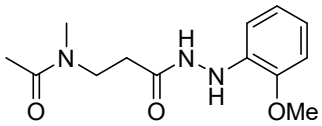
KOPRI
극지연구소

- (*S*)-4-amino-*N*'-(2-methoxyphenyl)-5-methylhexanehydrazide 합성 : tert-butyl (*S*)-(6-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-2-methyl-6-oxohexan-3-yl)carbamate (30.8 mg, 0.084 mmol)의 일반방법 B를 수행하여 아민 실리카겔 상의 MPLC (10 % CH_2Cl_2/Methanol)를 통해서 화합물 8.8 mg (37 %)의 아이보리 고체를 수득함



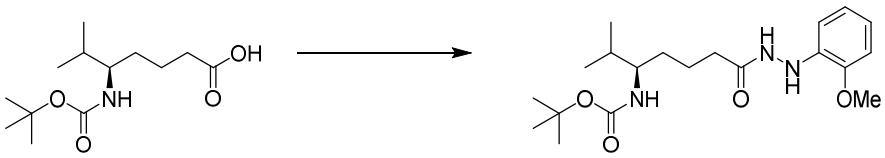
Molecular Weight: 279.34
PR-071

- 5-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-*N*,*N*-dimethyl-5-oxopentanamide 합성 : (2-methoxy phenyl)hydrazine hydrochloride (65.8 mg, 0.377 mmol)과 5-(dimethylamino)-5-oxopentanoic acid (30 mg, 0.188 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (100 % EtOAc → 15 % MeOH/DCM)를 통해서 화합물 12.1 mg (22 %)을 갈색 오일로 수득함



Molecular Weight: 265.31
PR-072

- *N*-(3-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-3-oxopropyl)-*N*-methylacetamide 합성 : (2-methoxyphenyl)hydrazine hydrochloride (72.2 mg, 0.413 mmol)과 3-(*N*-methylacetamido)propanoic acid (30 mg, 0.207 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (100 % EtOAc → 15 % MeOH/DCM)를 통해서 화합물 8.2 mg (14 %)을 갈색 gum으로 수득함

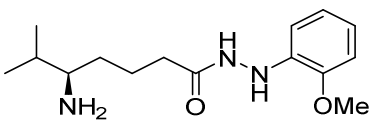


(*R*)-5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid
Chemical Formula: $C_{13}H_{25}NO_4$
Molecular Weight: 259.35

tert-butyl (*R*)-(7-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-2-methyl-7-oxoheptan-3-yl)carbamate
Chemical Formula: $C_{20}H_{33}N_3O_4$
Molecular Weight: 379.50

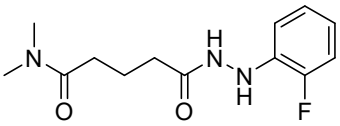
KOPRI
극지연구소

- *tert*-butyl (R)-(7-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-2-methyl-7-oxoheptan-3-yl)carbamate 합성 : (2-methoxyphenyl)hydrazine hydrochloride (135 mg, 0.771 mmol)과 (R)-5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid (100 mg, 0.386 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (45 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 81.6 mg (56 %)을 베이지색 고체로 수득함



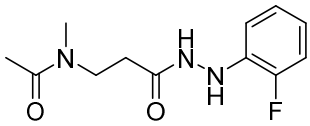
Molecular Weight: 279.38
PR-073

- (*R*)-5-amino-*N'*-(2-methoxyphenyl)-6-methylheptanehydrazide (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl (*R*)-(7-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-2-methyl-7-oxoheptan-3-yl)carbamate (50 mg, 0.132 mmol)의 일반방법 C를 수행하여 화합물 36.5 mg (84 %)을 베이지색 고체인 HCl 염으로 수득함



Molecular Weight: 267.30
PR-074

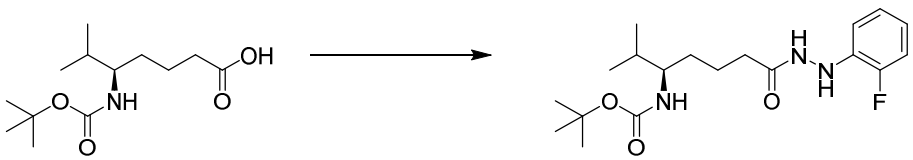
- 5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-*N*,*N*-dimethyl-5-oxopentanamide 합성 : (2-fluorophenyl) hydrazine hydrochloride (102 mg, 0.628 mmol)과 5-(dimethylamino)-5-oxopentanoic acid (50 mg, 0.314 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (100 % EtOAc → 15 % MeOH/DCM)를 통해서 화합물 5 mg (5 %)을 상아색 고체로 수득함



Molecular Weight: 253.28
PR-075

KOPRI
극지연구소

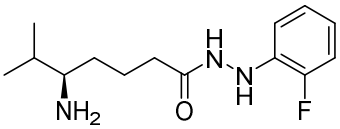
- *N*-(3-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-3-oxopropyl)-*N*-methylacetamide 합성 : (2-fluoro phenyl)hydrazine hydrochloride (84 mg, 0.517 mmol)과 3-(*N*-methylacetamido)propanoic acid (50 mg, 0.344 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (100 % EtOAc → 10 % MeOH/DCM)를 통해서 화합물 7.2 mg (8 %)을 상아색 고체로 수득함



(*R*)-5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid
Chemical Formula: $C_{13}H_{25}NO_4$
Molecular Weight: 259.35

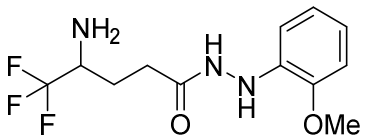
tert-butyl (*R*)-(7-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-2-methyl-7-oxoheptan-3-yl)carbamate
Chemical Formula: $C_{19}H_{30}FN_3O_3$
Molecular Weight: 367.47

- *tert*-butyl (R)-(7-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-2-methyl-7-oxoheptan-3-yl)carbamate 합성 : (2-fluorophenyl)hydrazine hydrochloride (94 mg, 0.578 mmol)과 (R)-5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-methylheptanoic acid (100 mg, 0.386 mmol)의 일반방법 B를 수행한 후 실리카겔 상의 MPLC (50 % EtOAc/Hexane)를 통해서 화합물 126.5 mg (89 %)을 상아색 고체로 수득함



Molecular Weight: 267.35
PR-076

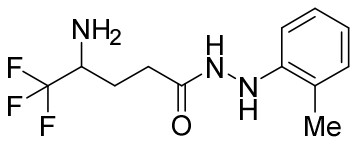
- (*R*)-5-amino-*N*'-(2-fluorophenyl)-6-methylheptanehydrazide (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl (*R*)-(7-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-2-methyl-7-oxoheptan-3-yl)carbamate (50 mg, 0.136 mmol)의 일반방법 C를 수행하여 화합물 10.6 mg (24 %)을 흰색 고체인 HCl 염으로 수득함



PR-077
Molecular Weight: 291.2742

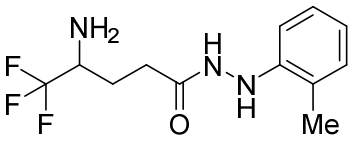
KOPRI 극지연구소

- (*S*)-4-amino-5,5,5-trifluoro-*N*'-(2-methoxyphenyl)pentanehydrazide 합성 : *tert*-butyl (*S*)-(1,1,1-trifluoro-5-(2-(2-methoxyphenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate (23.9 mg, 0.061 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 아민 실리카겔 상의 MPLC (5 % CH_2Cl_2/Methanol)를 통해서 화합물 4.8 mg (26 %)의 흰색 고체를 수득함



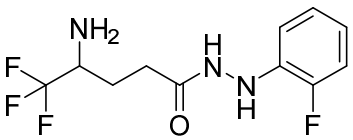
PR-078
Molecular Weight: 275.2752

- (*S*)-4-amino-5,5,5-trifluoro-*N*'-(*o*-tolyl)pentanehydrazide 합성 : *tert*-butyl (*S*)-(1,1,1-trifluoro-5-oxo-5-(2-(*o*-tolyl)hydrazineyl)pentan-2-yl)carbamate (112.4 mg, 0.299 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 실리카겔 상의 MPLC (90 % EtOAc/Hexance)를 통해서 화합물 18.7 mg (22 %)의 흰색 고체를 수득함



PR-079
Molecular Weight: 275.2752

- (*S*)-4-amino-5,5,5-trifluoro-*N*'-(*o*-tolyl)pentanehydrazide (HCl 염) 합성 : *tert*-butyl (*S*)-(1,1,1-trifluoro-5-oxo-5-(2-(*o*-tolyl)hydrazineyl)pentan-2-yl)carbamate (112.4 mg, 0.299 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 26.3 mg (27 %)의 아이보리 고체를 HCl 염으로 수득함



PR-080
Molecular Weight: 279.2386

KOPRI
극지연구소

- (*S*)-4-amino-5,5,5-trifluoro-*N*'-(2-fluorophenyl)pentanehydrazide 합성 : *tert*-butyl (*S*)-(1,1,1 -trifluoro-5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate (84.4 mg, 0.222 mmol)의 일반방법 D를 수행하여 화합물 17 mg (26 %)의 흰색 고체를 수득함

○ 라말린 유도체 구조규명

1) 라말린 유도체들의 구조규명 방법

가. HPLC 분석을 통한 순도 확인

- HPLC 분석조건
  ① 분석 Column : Phenomenex / Kinetex 5 ㎛, C18, 250 x 4.6 mm, 100 Å
  ② Mobile phase : A (Water + 0.1 % formic acid) / B (ACN + 0.1 % formic acid)
  ③ Detection : UV 254 nm
  ④ HPLC 장비 : Agilent 1200 series
  ⑤ Analysis time : Stop time 25 min / post time 5 min
  ⑥ Mobile phase gradient

Time (min)	A (Water)	B (ACN)	Flow (mL/min)
0	90	10	0.5
10	75	15	0.5
20	20	80	0.5

[표 2-1. HPLC mobile phase 분석조건]

KOPRI 극지연구소

- 분석방법 : 라말린 유도체를 정제수나 methanol에 녹인 후 분석용 바이알에 넣어 시료를 준비함. 위 분석 조건으로 시료 5 μL injection 하여 약 30분간 분석 진행함

나. High resolution Mass spectrometry (HRMS) 분석
- TOF-MS 분석장비 : AB sciex Triple TOF

- 분석조건

Method	Parameter
Scan type	TOF-MS
Accumulation time	0.25 sec
IDA experiment	on
TOF masses	100 ~ 1000
Duration	10 min
cycles	857
Source gas (1) & (2)	(1) : 30 / (2): 30
Curtain gas	20
Source temp	400℃
Ion Spray Voltage Floating (ISVF)	5500
Collision Energy (CE)	10
Declustering potential	80

[표 2-2. TOF-MS 분석조건표]

- 분석방법 : 정제수 또는 methanol에 녹아있는 라말린 유도체 시료를 0.1 % formic acid 가 함유된 methanol 용액에 희석 후 direct injection 방법으로 장비에 투입하여 분석

KOPRI 극지연구소

다. NMR 분석

- 분석조건

① 분석장비 : Jeol JNM ECP-400 spectrometer (Jeol Ltd., Tokyo, Japan)

② NMR solvent : D_2O (with 0.01 mg/mL of DSS)-acetone-d_6 (6:1 *v/v*)의 혼합용매 또는 DMSO-d_6 (dimethyl sulfoxide-d_6)

③ Reference 또는 residual solvent signals : D_2O (with DSS)-acetone-d_6: δH 0.00/δC 29.8, DMSO-d_6: δH 2.50/δC 39.5

④ Peak splitting patterns : m (multiplet), s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet of doublets), and td (triplet of doublets)

2) 라말린 유도체 구조 규명 결과

- 합성완료 190종의 유도체 중 130종의 유도체 구조 분석 완료
- 분석 데이터는 Appendix 1 참고

□ 연구내용 1-2. 항치매 후보약물 스크리닝

○ 독성 분석

1) *in vitro* 세포 독성 평가

가. 세포배양

- 설치류 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1 % penicilin/streptomycin, 10 mM HEPES, 2mL L-glutamine, 0.2 % NaHCO3, 그리고 1 mM sodium pyruvate이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medieum (DMEM) 배지로 5 % CO_2(95 %), 37°C에서 배양하였으며, 배지는 2~3일 간격으로 교체하고 배양용기에 70 % 이상이 자라게 되면 계대 배양하여 실험에 사용함

나. 세포생존율 분석

- 라말린 및 라말린 유도체들은 멸균된 증류수(DW)에 완전히 녹인 후 20mM의 농도로 준비하고 DPBS에 희석하여 실험에 이용하였고 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 사용하여 분석함

- MTT cytotoxicity 분석은 세포배양에서 생존하는 세포의 수를 측정하는 방법으로 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 함. 흡광도(OD; optical density)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영하므로 세포생존 지수는 다음의 산출식에 따라 %로 나타내었음

- 세포생존지수(%)=(실험군의 흡광도/대조군의 흡광도)×100

- RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/mL 농도로 접종한 후 4시간 뒤 세포가 plate에 부착하면 추출물을 농도에 맞게 처리하여 20시간 배양함. 각 well에 5 mg/mL의 MTT 용액을 5 μL 처리한 뒤 빛에 노출되지 않게 차단하여 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하고 발색정도를 확인하기 위해 plate에 있는 배양액 모두 제거하여 각 well에 DMSO을 100 μL 처리하여 세포를 용해시켜 microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였음. 모든 실험은 3회 반복하였고 세포독성(cell toxicity)은 세포만 배양한 비처리군의 생존도 100 %를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포 생존률을 계산하였음

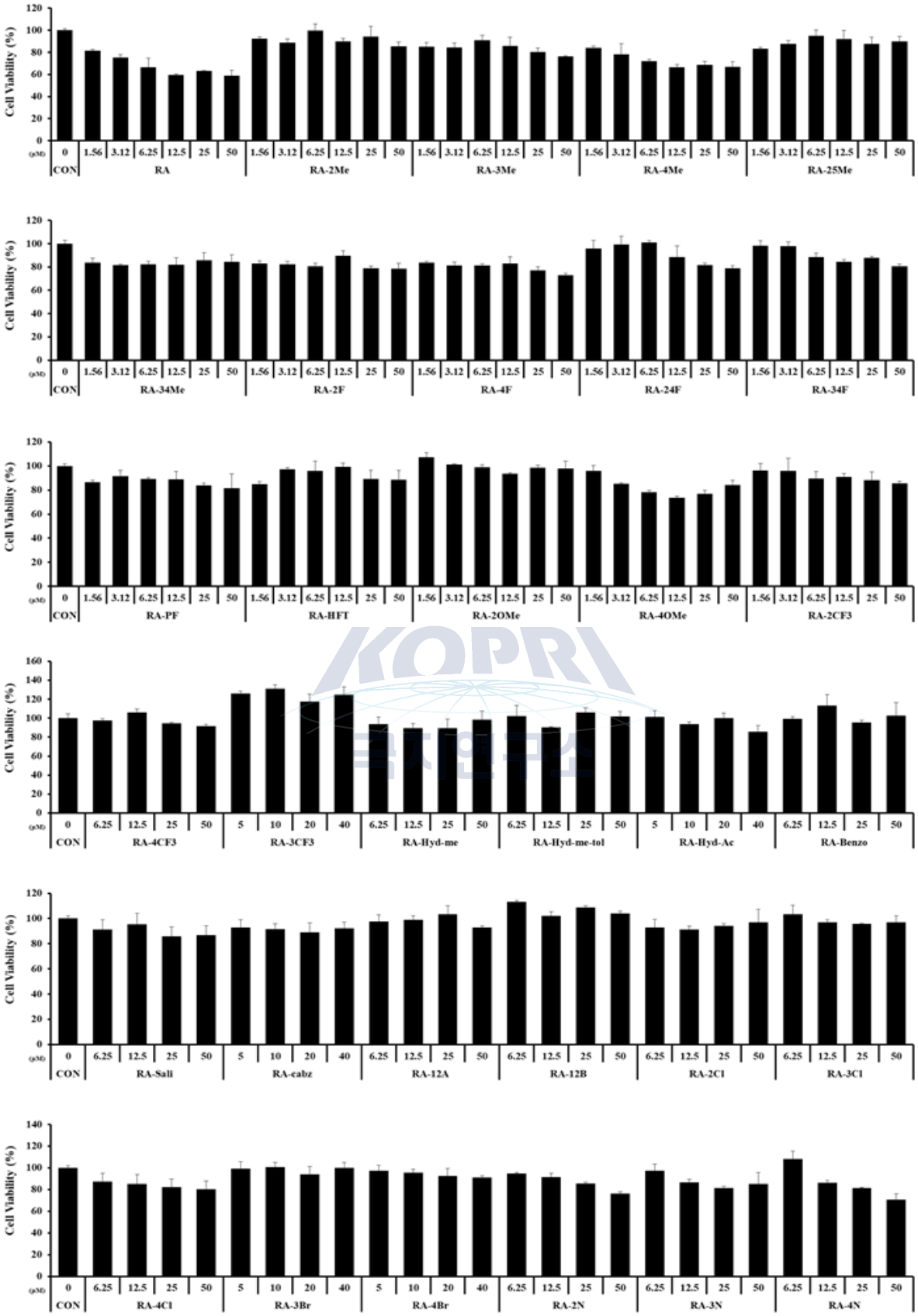
다. 연구결과

- 라말린 및 라말린유도체 158종의 세포생존율 결과

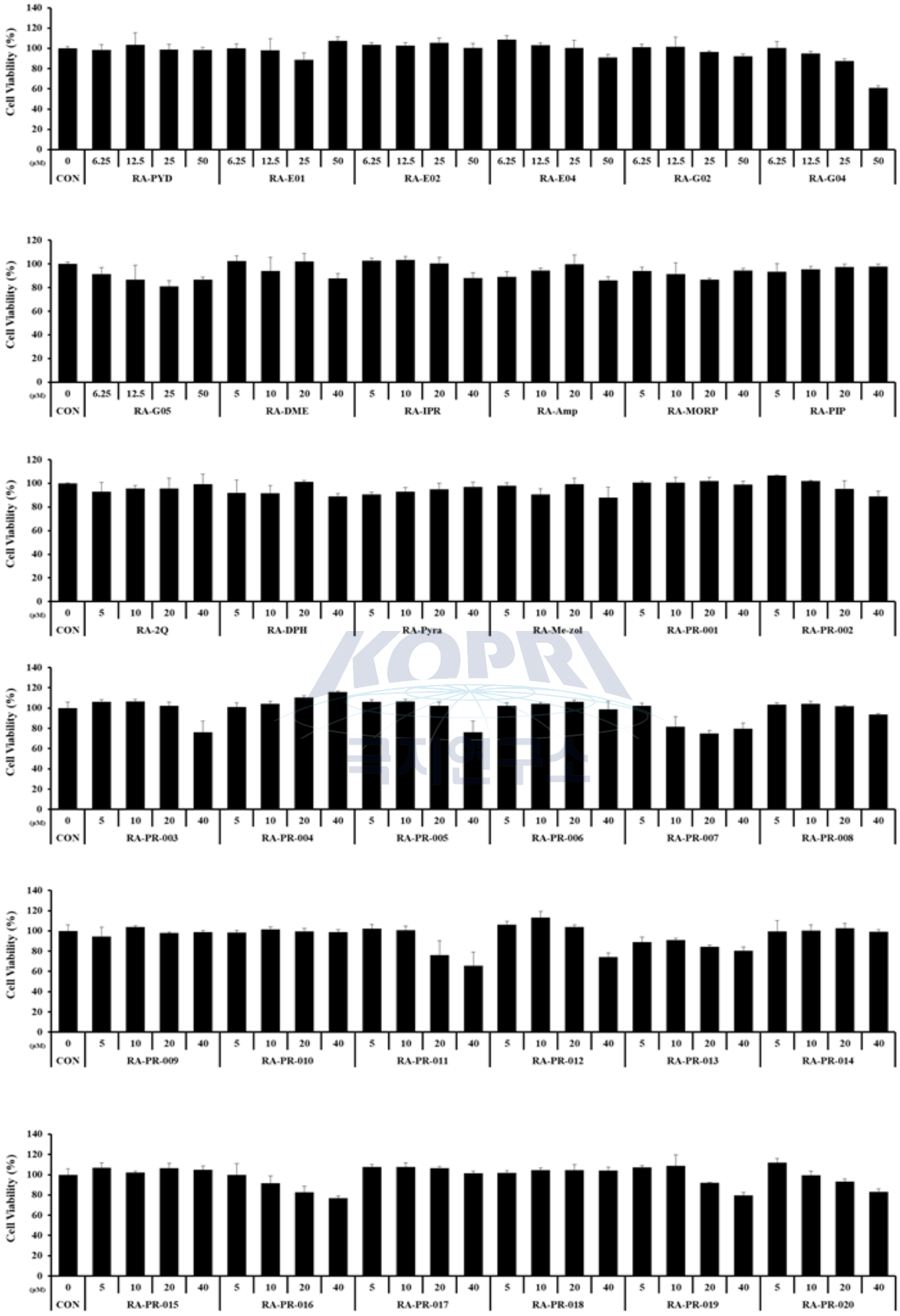
① 라말린 및 라말린 유도체 158종을 가지고 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포를 사용하여 시료의 다양한 농도별(0, 1~50 μM) 세포독성을 확인함. 라말린 및 라말린 유도체 136종 중 농도의존적으로 세포생존율이 감소되는 시료는 라말린, RA-4Me, RA-4F, RA-24F, RA-34F, RA-4OMe, RA-4Cl, RA-2N, RA-3N, RA-4N, RA-E04, RA-G04, RA-PR002, RA-PR005, RA-PR007, RA-PR011, RA-PR012, RA-PR016, RA-PR019, RA-PR020, RA-PR021, RA-PR022, RA-PR023, RA-PR024, RA-PR025, RA-PR026, RA-PR027, RA-PR028, RA-PR030, RA-PR031, RA-PR032, RA-PR039, RA-PR040, RA-MER-RA, RA-MER-4OME, RA-MER-RA, RA-MER-4OME, RA-MER-24F, RA-TBU-4OME, RA-TBU-4ME, RA-TBU-24F, RA-2OH-4ME, RA-TBU-PYD, RA-Hyd-ME-4OME, RA-Hyd-ME-4ME 시료로 확인됨. 세포생존율이 40-50 μM 농도에서 50 % 이하로 감소한 시료는 RA-PR005, RA-PR021, RA-PR022, RA-PR024, RA-PR031, RA-PR032, RA-MER-RA, RA-MER-4OME, RA-TBU-4OME, RA-TBU-4ME, RA-2OH-4ME, RA-TBU-PYD이며 나머지 유도체는 낮은 농도에서 세포독성이 80 % 이상으로 세포독성을 보이지 않음(그림 2-71~76)

② 세포생존율 결과를 기반으로 추후 라말린 및 라말린 유도체의 농도 설정하여 활성 연구를 진행하면 될 것으로 사료됨

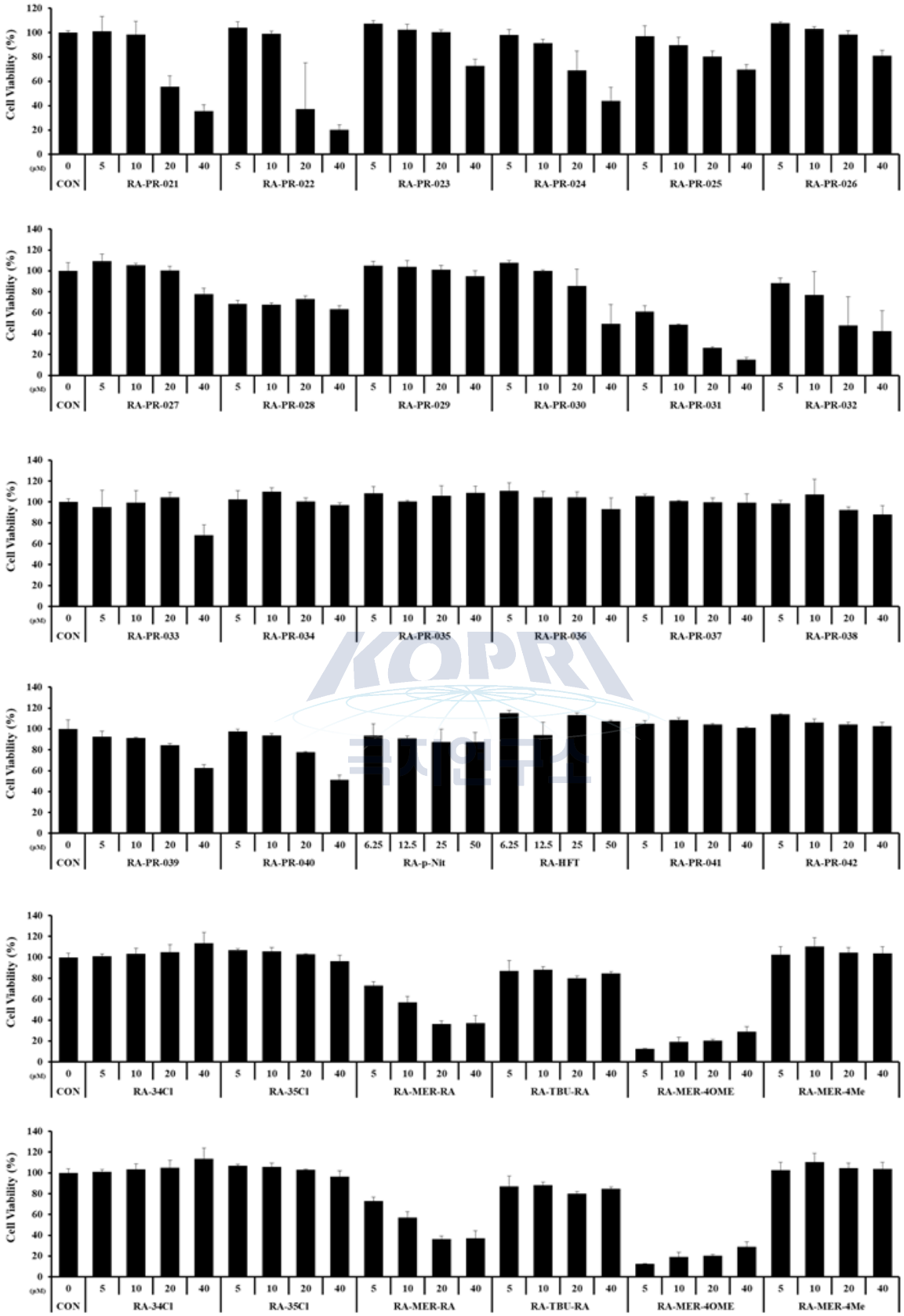
KOPRI
극지연구소



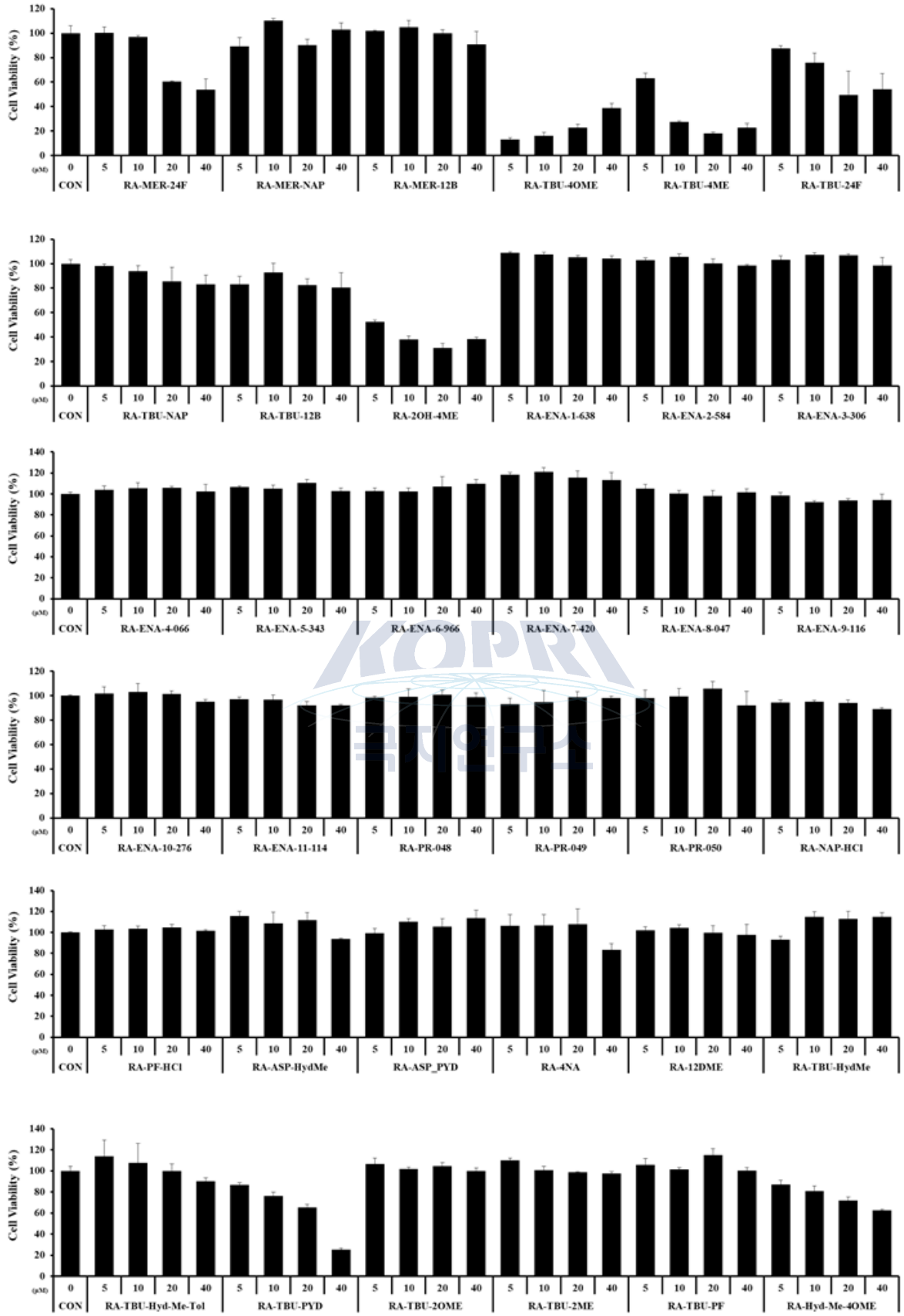
[그림 2-71. 라말린 및 라말린 158종 유도체의 세포생존률 결과-1]



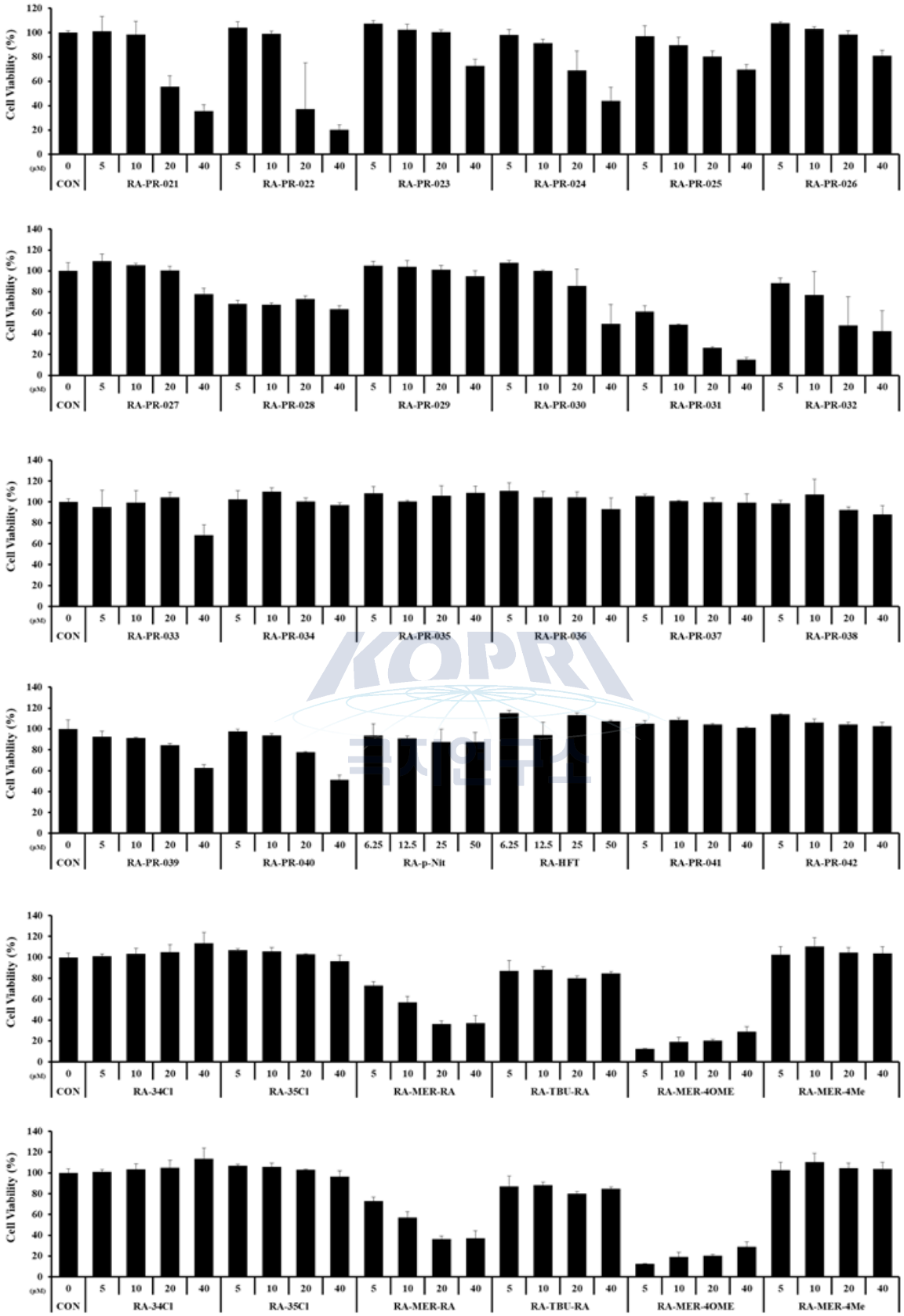
[그림 2-72. 라말린 및 라말린 158종 유도체의 세포생존률 결과-2]



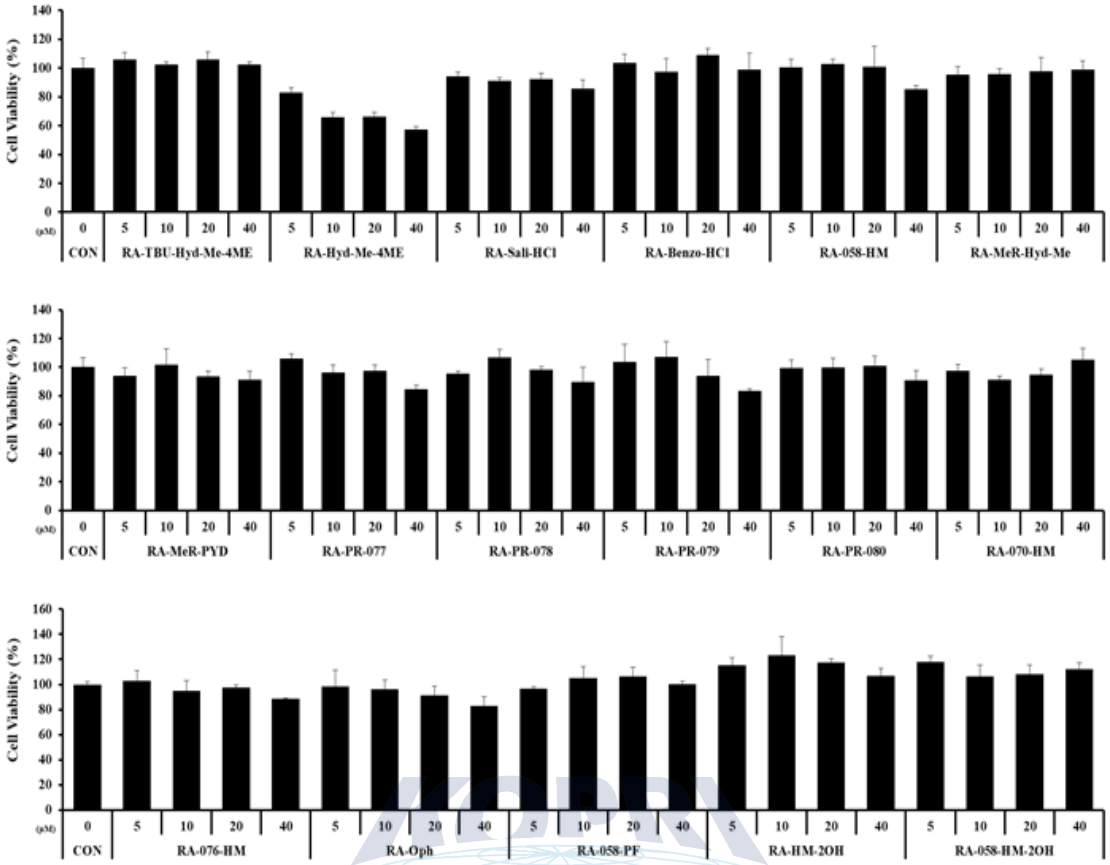
[그림 2-73. 라말린 및 라말린 158종 유도체의 세포생존률 결과-3]



[그림 2-74. 라말린 및 라말린 158종 유도체의 세포생존률 결과-4]



[그림 2-75. 라말린 및 라말린 158종 유도체의 세포생존률 결과-5]



KCDRN 금지연구소

[그림 2-76. 라말린 및 라말린 158종 유도체의 세포생존률 결과-6]

2) *in vivo* 동물 독성 평가

가. 1차 동물실험(단회투여 독성)

- 동물 준비

① 7주령 수컷의 ICR 마우스를 준비하여 1주일간 실험실 내 환경에 적응할 수 있는 순화 과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도(20-24℃)와 습도(48-52 %)가 조절된 사육실에서 마우스용 케이지에 2마리씩 수용하여 사육함. 명함 주기(light:dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(DBL, Korea)와 음수는 자유롭게 공급함. 모든 실험은 투여일 및 최종 부검일 18시간 전 절식을 실시하였으며(이 기간에도 음수는 자유롭게 공급함) 실험이 시작될 때 동물의 무게는 30~35 g이 되도록 하였음. 실험군 당 반복 수는 2 마리로 진행하고 경구투여를 위한 실험 동물군은 15시간 절식시킴

- 군분리 및 약물의 투여

① 실험동물은 군당 2마리씩 13그룹으로 구분함. 최고 용량은 250 mg/kg(=250 mpk)으로 설정하였으며, 25, 50 및 100 mg/kg을 저용량 및 중간 투여군으로 설정함. 또한 수컷에 대한 매체 대조군(vehicle)을 추가함

② 라말린 유도체 2OMe, 4OMe, 24F를 멸균생리식염수에 용해시켜 존데가 부착된 1mL 주사기를 이용하여 경구투여하였으며, 매체 대조군에서는 동일한 용량의 멸균생리식염수만 공급함. 식이와 음수에 따른 약물의 흡수 변화를 최소화하기 위해 투여 후 대략 4시간 동안 사료와 음수 공급을 제한함

- 임상 증상 관찰

① 모든 실험동물의 임상증상을 투여 전후에 각각 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에 관한 일반증상을 관찰, 기록하였으며 투여일 이후에도 하루에 최소한 3번씩 모든 실험동물의 임상증상을 관찰, 기록함

- 체중 측정

① 모든 실험동물의 체중을 투여 전 1일, 투여 직전, 투여 후 1, 2, 3일(최종 희생일)에 각각 측정하였으며 실험 시작 시 개체 차이에 따른 체중의 변화를 최소화하기 위하여 투여일~투여 후 3일간의 체중 증가량을 각각의 체중을 이용하여 산출함

- 육안 부검

① 투여 3일 후 모든 실험동물은 18시간 동안 절식하였고 음수는 제한하지 않았으며 아이프란액(isoflurane) 마취하에 부검을 실시함. 육안 부검 시 관찰한 주요 장기로는 비장, 간, 장 위주로 이상 육안소견을 각각 관찰, 기록함

나. 1차 동물실험(반복투여 독성)

- 동물 준비

① 단회 투여 독성시험 준비방법과 동일함. 단, 최초 투여 전 모든 동물은 12시간의 절식을 하였으나 장기간 반복적으로 투여하여야 하므로 지속적으로 먹이를 공급함

- 약물 투여

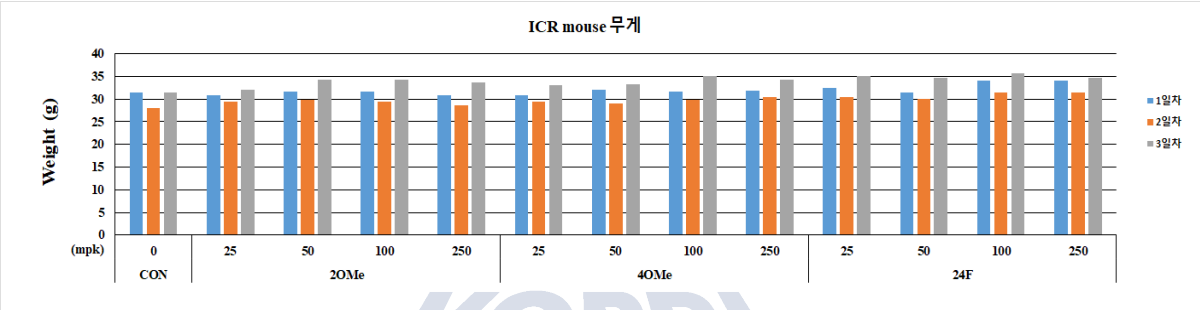
① 경구 투여만으로 진행하였으며 단회투여 독성검사 결과를 반영하여 농도를 설정함. 투여 방법은 오직 경구 투여만으로 하였으며, 가장 높은 농도인 250 mpk의 시료를 투여하였을 때 모든 처리군에서 특이점이 있는 행동이 없으며 모두 생존하였으므로 중간 농도인 100 mpk로 총 5일간 1일 1회 반복투여 진행함

다. 1차 동물실험 연구결과

- 단회 투여 독성

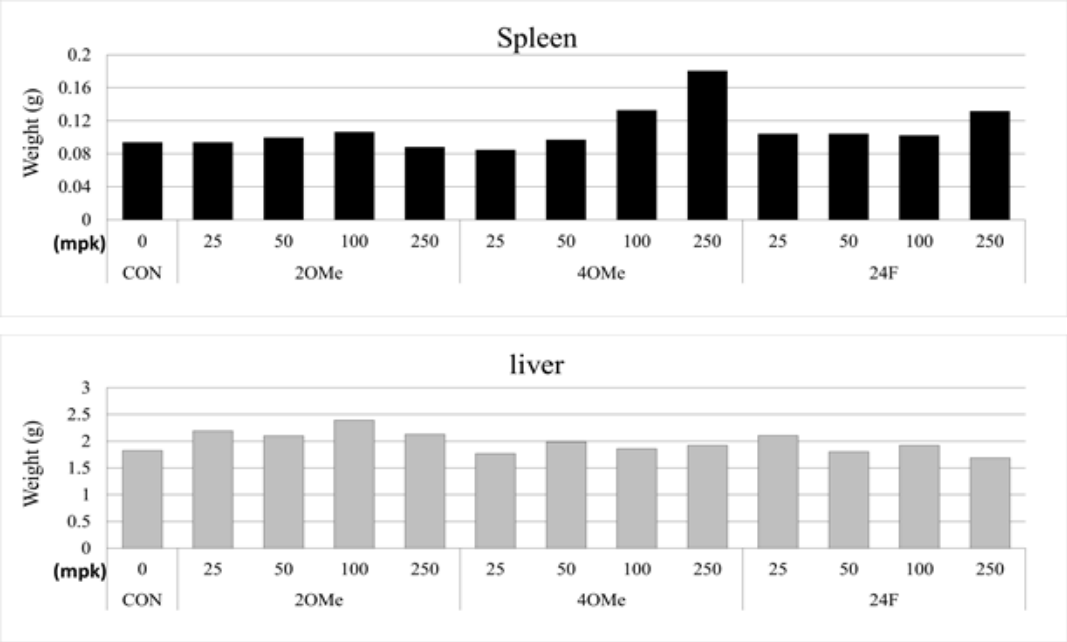
① 다양한 농도(25, 50, 100, 250 mpk)의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간 동안 관찰되지 않았으며 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함. 투여 직후 2OMe의 100 mpk 처리 동물 중 한 마리는 대략 10분가량 발바닥을 계속 핥는 행동을 보였지만 약물 흡수에 의한 간지러움 증상으로 보였으며 시간이 지난 후 안정을 찾은 것으로 보임

② 라말린 유도체 2OMe, 4OMe, 24F 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않았음(그림 2-77)



[그림 2-77. 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

③ 라말린 유도체 2OME, 4OME, 24F 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)과 간(liver)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 4OMe의 50, 100, 250 mpk 약물 처리군에서 농도의존적으로 비장의 중량이 유의성 있게 증가가 관찰되었고, 24F의 250 mpk 약물 처리군에서 비장의 무게가 증가되었음을 확인함. 간(liver)의 경우 대조군에 비해 의미 있는 장기중량 변화는 모든 투여군에서 관찰되지 않음(그림 2-78)



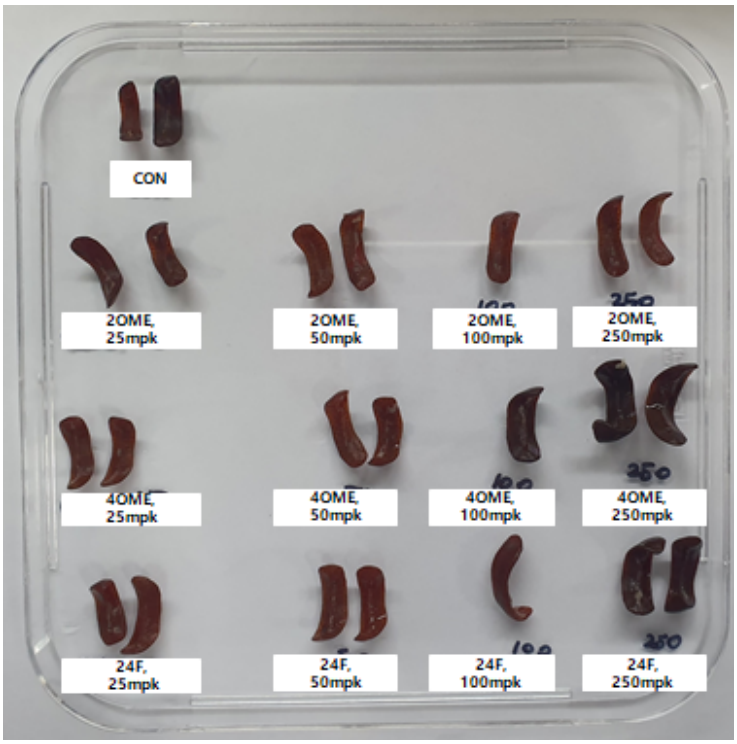
[그림 2-78. 비장(spleen) 및 간(liver)의 무게 측정 결과]

④ 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화 확인한 결과 간의 색 변화는 없었으나 4OMe와 24F의 약물처리군은 비장의 크기가 비대해지고(최대 2배) 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 보임(표2-3, 그림 2-79, 2-80)

KOBRI 극지연구소

번호	시료	농도 (mpk)	꼬리색(번호)	비장무게(g)	중량 평균값	색깔	크기	간 무게(g)	간 중량 평균값
1	CON	0	빨(1번)	0.0587	0.09405	이상무	이상무	1.3401	1.82295
2			파(2번)	0.1294		이상무	이상무	2.3058	
3	2OMe	25	빨(1번)	0.0993	0.09385	이상무	이상무	2.2574	2.1936
4			파(2번)	0.0884		이상무	이상무	2.1298	
5		50	빨(1번)	0.1037	0.0997	이상무	이상무	2.1726	2.0975
6			파(2번)	0.0957		이상무	이상무	2.0224	
7		100	빨(1번)	0.1066	0.1066	이상무	이상무	2.3905	2.3905
9		250	빨(1번)	0.0953	0.0884	이상무	이상무	2.0667	2.12655
10			파(2번)	0.0815		이상무	이상무	2.1864	
11	4OMe	25	빨(1번)	0.0911	0.08495	이상무	이상무	1.821	1.7707
12			파(2번)	0.0788		이상무	이상무	1.7204	
13		50	빨(1번)	0.0964	0.097	이상무	이상무	1.8219	1.98735
14			파(2번)	0.0976		이상무	이상무	2.1528	
15		100	빨(1번)	0.1327	0.1327	검붉은색	약간 좋대	1.8584	1.8584
17		250	빨(1번)	0.1916	0.18075	검붉은색	비장좋대	1.9382	1.92355
18			파(2번)	0.1699		검붉은색	비장좋대	1.9089	
19	24F	25	빨(1번)	0.0994	0.1042	이상무	이상무	2.1622	2.1031
20			파(2번)	0.109		이상무	이상무	2.044	
21		50	빨(1번)	0.1034	0.1042	이상무	이상무	1.8044	1.7997
22			파(2번)	0.105		이상무	이상무	1.795	
23		100	빨(1번)	0.1022	0.1022	이상무	이상무	1.9208	1.9208
25		250	빨(1번)	0.1294	0.1319	검붉은색	약간 좋대	1.6941	1.6873
26			파(2번)	0.1344		검붉은색	비장좋대	1.6805	

[표 2-3. 라말린 유도체 2OME, 4OME, 24F의 단회투여 후 장기 무게 및 색깔 변화]



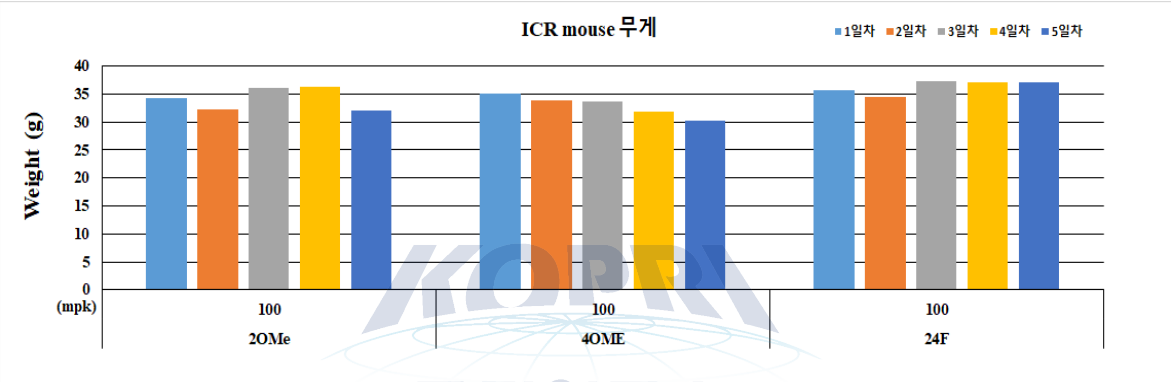
[그림 2-79. 라말린 유도체 2OME, 4OME, 24F의 단회투여 후 비장(spleen) 종대, 색깔 및 손상 확인]

[그림 2-80. 라말린 유도체 2OME, 4OME, 24F의 단회투여 후 간(liver) 색깔, 크기 및 손상 확인]

- 반복투여 독성

① 약물의 반복투여 시 독성을 확인하기 위하여 각 라말린 유도체의 중간 농도인 100 mpk를 5일간 경구 투여함. 5일간 1일 1회 반복투여 동안 사망례는 실험 전 기간 동안 관찰되지 않았으며, 투여 5일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함. 약물 투여 직후, 발바닥, 배를 핥고 자주 기도를 세워 자주 서 있는 행동을 보이는 동물이 있었으나 시간이 지난 후 안정을 찾은 것으로 확인함

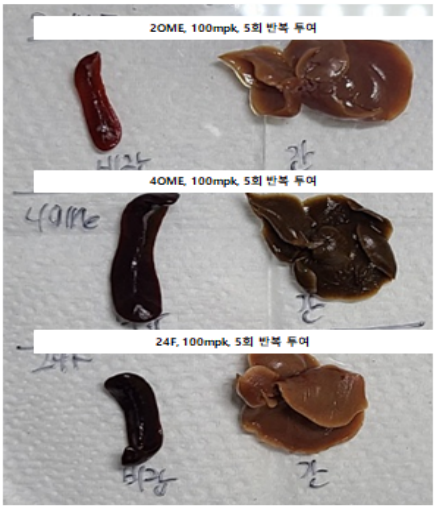
② 라말린 유도체 2OMe의 경우 5일 차 투여 시 체중감소가 일어남. 4OMe 약물의 투여군은 3일차부터 확연하게 식욕저하를 보였으며, 체중감소는 1일 차 이후로 지속적으로 일어났음을 확인할 수 있었음. 24F 처리군의 경우 체중 변화는 관찰되지 않았음(그림 2-81)



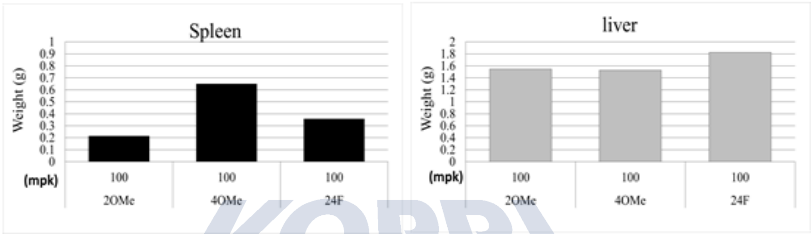
[그림 2-81. 5일간(1일1회) 반복투여시 일차별 ICR mouse 무게 변화 측정]

③ 라말린 유도체 2OME, 4OME, 24F 약물을 5일간의 반복 경구투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)과 간(liver)의 무게변화를 확인한 결과, 2OMe 약물처리군의 경우 약간의 비장종대는 일어났으나 비장의 색이 대조군과 크게 다르지 않았음을 확인함. 4OMe의 경우 비장의 중량이 매우 증가되었고 검붉은색을 띄었으며 간(liver)의 경우에도 중량의 변화는 없었으나 장기의 색이 진한 갈색을 띠었음. 24F의 반복 투여 결과, 비장종대와 검붉게 변화된 상태를 관찰함(그림 2-82)

(A)



(B)



[그림 2-82. 라말린 유도체 2OME, 4OME, 24F의 반복투여 후 모양, 변화 및 무게 변화]

KOPRI 극지연구소

- 결론 및 제언

① 라말린 유도체 2OMe, 4OMe, 24F의 단회경구투여 및 반복경구투여 독성을 확인하기 위하여 실험동안의 사망례, 임상증상, 체중변화, 장기중량의 변화, 육안부검소견 등을 종합적으로 관찰함. 부검을 통해 육안으로 확연하게 변화를 관찰할 수 있었던 비장종대는 노화나 손상된 적혈구를 파괴하는 비장의 기능이 과도하게 발생하는 것으로 혈액질환이나 간 기능 이상으로 인한 빈혈, 출혈 등으로 인해 용혈된 적혈구 및 세포막이 단단해진 적혈구가 비장 내 좁은 모세혈관(직경 4 μm)을 통과하지 못하고 축적되거나 통과하는 동안 용혈되어 비장 내에 축적되어 발생함(Motulsky AG *et al*, 1958)

② 본 연구에서는 라말린 유도체 4OMe, 24F 반복투여 후 적혈구 성숙 혹은 세포막에 영향이 가해져 그로 인해 비장 내 적혈구가 축적되어 비장종대가 생겨난 것으로 판단되어짐. 따라서 라말린 유도체 4OMe, 24F 유효농도 50 mpk의 10배 이상의 독성평가농도에서 동물이 사망하거나 사망하지 않더라도 적혈구에 직접적으로 손상을 일으켜 비장종대를 유발하고 빈혈이 발생하게 하며 결국 사망에 이르게 하므로 동물에 강한 독성을 나타낸다고 할 수 있음. 따라서 4OMe, 24F는 동물에 투여하였을 때 분명한 독성이 있다고 판단되므로 유효활성은 유지하고 독성은 최소화한 다른 라말린 유도체가 필요할 것으로 판단됨

③ 라말린 유도체 2OMe 단회투여 시 장기의 크기 변화나 체중변화 등 정상적이였으며, 반복투여 시에 비장종대가 약간 일어났으나 비장의 색이나 다른 증상들이 양호하였음. 2OMe 유도체를 활용하여 추후 독성 실험을 더 진행하여 활성 연구를 진행해볼 필요가 있다고 사료됨

라. 2차 동물실험(단회투여 독성)

- 동물 준비

① 7주령 수컷의 ICR 마우스를 준비하여 1주일간 실험실 내 환경에 적응할 수 있는 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도(20-24 ℃)와 습도(48-52 %)가 조절된 사육실에서 마우스용 케이지에 2마리씩 수용하여 사육함

② 명함주기(light:dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(DBL, Korea)와 음수는 자유롭게 공급함. 모든 실험은 투여일 및 최종 부검일 18시간 전 절식을 실시하였으며(이 기간에도 음수는 자유롭게 공급함) 실험이 시작될 때 동물의 무게는 30~35 g이 되도록 하였음. 실험군 당 반복 수는 2 마리로 진행하고 경구투여를 위한 실험 동물군은 15시간 절식시킴

- 군분리 및 약물의 투여

① 실험동물은 군당 2마리씩 1군으로 구분함. 최고 용량은 250 mg/kg(=250 mpk)으로 설정하였음. 50 및 100 mg/kg을 저용량 및 중간 투여군으로 설정함. 또한 수컷에 대한 매체 대조군(vehicle)을 추가함

② 라말린 유도체를 멸균생리식염수와 용해도가 좋지 않은 시료에 대해서는 DMSO에 용해시켜 존데가 부착된 1 mL 주사기를 이용하여 경구투여하였으며, 매체 대조군에서는 동일한 용량의 멸균생리식염수만 공급함. 식이와 음수에 따른 약물의 흡수 변화를 최소화하기 위해 투여 후 대략 4시간 동안 사료와 음수 공급을 제한함

- 임상 증상 관찰

① 모든 실험동물의 임상증상을 투여 전후에 각각 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에 관한 일반증상을 관찰, 기록하였으며 투여일 이후에도 하루에 최소한 3번씩 모든 실험동물의 임상증상을 관찰, 기록함

- 체중 측정

① 모든 실험동물의 체중을 투여 전 1일, 투여 직전, 투여 후 1, 2, 3일(최종 희생일)에 각각 측정하였으며 실험 시작 시 개체 차이에 따른 체중의 변화를 최소화하기 위하여 투여일~투여 후 3일간의 체중 증가량을 각각의 체중을 이용하여 산출함

- 육안 부검

① 투여 3일 후 모든 실험동물은 18시간 동안 절식하였고 음수는 제한하지 않았으며 아이프란액(isoflurane) 마취하에 부검을 실시함. 육안 부검 시 관찰한 주요 장기로는 비장, 간, 장 위주로 이상 육안소견을 각각 관찰, 기록함

마. 2차 동물실험(반복투여 독성)

- 동물 준비

① 단회 투여 독성시험 준비방법과 동일함. 단, 최초 투여 전 모든 동물은 12시간의 절식을 하였으나 장기간 반복적으로 투여하여야 하므로 지속적으로 먹이를 공급함

- 약물 투여

① 경구 투여만으로 진행하였으며 단회투여 독성검사 결과를 반영하여 농도를 설정함. 투여 방법은 오직 경구 투여만으로 하였으며, 가장 높은 농도인 250 mpk의 시료를 투여하였을 때 모든 처리군에서 특이점이 있는 행동이 없으며 모두 생존하였으므로 중간 농도인 100 mpk로 총 5일간 1일 1회 반복투여 진행함

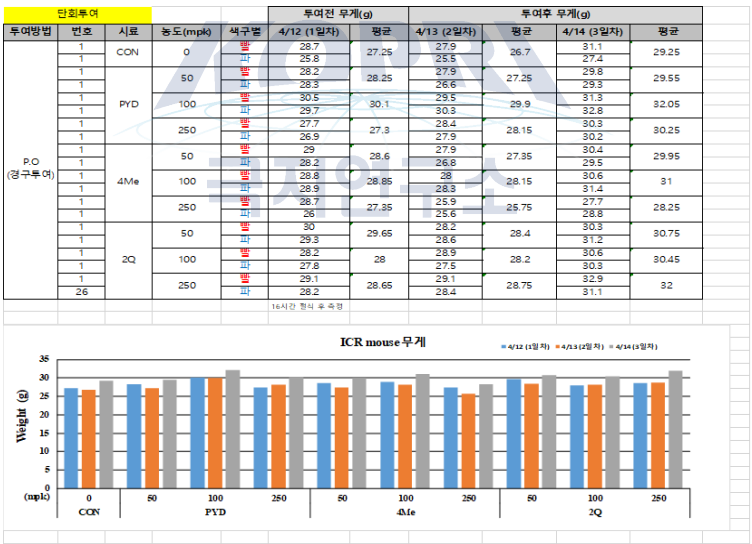
바. 2차 동물실험 연구결과

- 단회 투여 독성

① PYD, 4ME, 2Q 단회투여 독성 확인

ⅰ) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 PYD, 4Me, 2Q 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-83)



단회투여

투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	투여전 무게(g) 4/12 (1일차)	투여전 무게(g) 평균	투여후 무게(g) 4/13 (2일차)	투여후 무게(g) 평균	투여후 무게(g) 4/14 (3일차)	투여후 무게(g) 평균
P.O (경구투여)	1	CON	0	빨	28.7	27.25	27.9	26.7	31.1	29.25
	1			파	25.8		25.5		27.4	
	1	PYD	50	빨	28.2	28.25	27.9	27.25	29.8	29.55
	1			파	28.3		26.6		29.3	
	1		100	빨	30.5	30.1	29.5	29.9	31.3	32.05
	1			파	29.7		30.3		32.8	
	1		250	빨	27.7	27.3	28.4	28.15	30.3	30.25
	1			파	26.9		27.9		30.2	
	1	4Me	50	빨	29	28.6	27.9	27.35	30.4	29.95
	1			파	28.2		26.8		29.5	
	1		100	빨	28.8	28.85	28	28.15	30.6	31
	1			파	28.9		28.3		31.4	
	1		250	빨	28.7	27.35	25.9	25.75	27.7	28.25
	1			파	26		25.6		28.8	
	1	2Q	50	빨	30	29.65	28.2	28.4	30.3	30.75
	1			파	29.3		28.6		31.2	
	1		100	빨	28.2	28	28.9	28.2	30.6	30.45
	1			파	27.8		27.5		30.3	
	1		250	빨	29.1	28.65	29.1	28.75	32.9	32
	26			파	28.2		28.4		31.1	

16시간 절식 후 측정

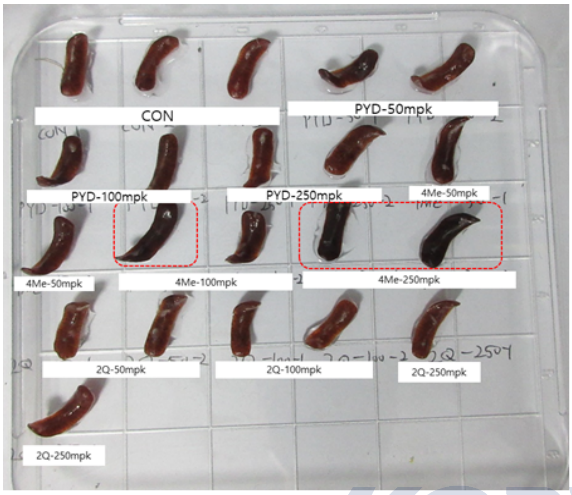
[그림 2-83. PYD, 4Me, 2Q 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ⅱ) 비장 관찰

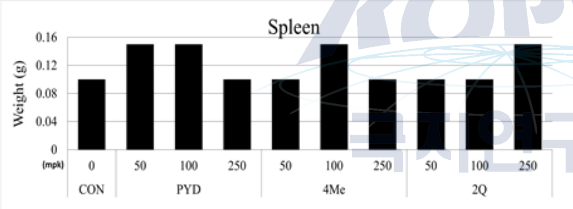
a) 다양한 농도(50, 100, 250 mpk)의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함. 투여 후 PYD의 100 mpk 처리 동물 중 한 마리는 대략 5분가량 계속 배를 긁는 행동을 보였고, PYD 250 mpk 처리 동물 중 한 마리는 30시간 투여 경과했을 시점에 걸음걸이가 부자연스러우며 가끔 발작증상을 보였으나 시간이 지난 후 안정을 찾은 것으로 보임

b) 라말린 유도체 PYD, 4Me, 2Q 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 PYD 50, 100 mpk와 4Me 100 mpk, 2Q 250 mpk 약물 처리군에서 비장의 중량이 증가가 관찰되었음

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 4Me 100, 250 mpk 약물 처리군에서 비장이 비대해지고 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 보였음(그림 2-84)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	색(번호)	비장무게(g)	중량 평균값	색깔	크기
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	빨(1번)	0.1	0.1		
	2			파(2번)	0.1			
	3			3번	0.1			
	4	PYD	50	빨(1번)	0.2	0.15		
	5			파(2번)	0.1			
	6		100	빨(1번)	0.1	0.15		
	7			파(2번)	0.2			
	8		250	빨(1번)	0.1	0.1		
	9			파(2번)	0.1			
	10	4Me	50	빨(1번)	0.1	0.1		
	11			파(2번)	0.1			
	12		100	빨(1번)	0.2	0.15	검붉은색	비장종대
	13			파(2번)	0.1		검붉은색	비장종대
	14		250	빨(1번)	0.1	0.1	검붉은색	비장종대
	15			파(2번)	0.1		검붉은색	비장종대
	16	2Q	50	빨(1번)	0.1	0.1		
	17			파(2번)	0.1			
	18		100	빨(1번)	0.1	0.1		
	19			파(2번)	0.1			
	20		250	빨(1번)	0.2	0.15		
	21			파(2번)	0.1			



[그림 2-84. PYD, 4Me, 2Q의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) 대부분 혈액 응고가 진행되어 결과의 신뢰성이 떨어지지만 혈액분석 진행하였고 추후 재실험을 통해 혈액분석 다시 진행함(그림 2-85)

Sample Name	백혈구 수치 WBC (White blood cell count)	적혈구 수치 RBC (Red blood cell Count)	헤모글로빈 수치 HGB (Hemoglobin)	적혈구 용적 백분율 HCT (Hematocrit)	평균 적혈구 용적 MCV (Mean Corpuscular Volume)	평균 적혈구 혈색소량 MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin)	평균 적혈구 혈색소 농도 MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)	혈소판 수 PLT (Platelet Count)	적혈구 크기 분포 RDW (Red blood Distribution Width)	혈소판 의 자분포 PDW (Platelet Distribution Width)	평균 혈소 판 용적 MPV (Mean Platelet Volume)	호중구 비율 NEU% (Neutrophil %)	림프구 비율 LYM% (Lymphocyte %)	단핵구 비율 MON% (Monocyte %)
CON #1	3.4	6.2	9.3	31.2	50.3	15.0	29.8	250.0	14.0	16.0	5.6	22.3	77.7	0.0
CON #2	1.8	7.6	11.3	38.5	50.7	14.9	29.4	549.0	14.5	17.6	5.6	43.8	55.9	0.3
CON #3	7.0	8.5	13.0	43.9	51.4	15.2	29.6	676.0	15.0	16.0	5.4	17.7	82.3	0.0
Mean	4.1	7.4	11.2	37.9	50.8	15.0	29.6	491.7	14.5	16.5	5.5	27.9	72.0	0.1
SD	2.7	1.2	1.9	6.4	0.6	0.2	0.2	218.7	0.5	0.9	0.1	13.9	14.1	0.2
4Me-50 #1	5.2	8.7	13.0	43.5	49.9	14.9	29.9	764.0	13.6	15.0	5.4	15.2	84.8	0.0
4Me-50 #2	1.8	4.1	6.5	20.8	50.9	15.9	31.3	247.0	14.0	16.0	5.6	47.6	51.4	1.0
Mean	3.5	6.4	9.8	32.2	50.4	15.4	30.6	505.5	13.8	15.5	5.5	31.4	68.1	0.5
SD	2.4	3.3	4.6	16.1	0.7	0.7	1.0	365.6	0.3	0.7	0.1	22.9	23.6	0.7
4Me-100 #1	2.0	4.3	7.5	21.6	49.8	17.3	34.7	142.0	14.6	14.7	5.8	38.6	60.9	0.5
4Me-100 #2	5.8	6.7	11.3	33.4	49.9	16.9	33.8	608.0	13.3	15.4	5.6	25.9	74.1	0.0
Mean	3.9	5.5	9.4	27.5	49.9	17.1	34.3	375.0	14.0	15.1	5.7	32.3	67.5	0.3
SD	2.7	1.7	2.7	8.3	0.1	0.3	0.6	329.5	0.9	0.5	0.1	9.0	9.3	0.4
4Me-250 #1	2.9	8.2	14.9	39.9	48.7	18.2	37.3	632.0	14.7	15.0	5.4	12.0	88.0	0.0
4Me-250 #2	6.9	7.0	13.8	36.0	51.4	19.7	38.3	627.0	14.0	16.5	5.3	19.2	80.8	0.0
Mean	4.9	7.6	14.4	38.0	50.1	19.0	37.8	629.5	14.4	15.8	5.4	15.6	84.4	0.0
SD	2.8	0.8	0.8	2.8	1.9	1.1	0.7	3.5	0.5	1.1	0.1	5.1	5.1	0.0
2Q-50 #1	4.4	7.7	12.2	41.0	53.2	15.8	29.8	692.0	13.3	15.9	5.4	17.5	82.5	0.0
2Q-50 #2	2.7	9.7	13.8	48.4	49.7	14.2	28.5	733.0	13.9	16.5	5.3	21.5	78.5	0.0
Mean	3.6	8.7	13.0	44.7	51.5	15.0	29.2	712.5	13.6	16.2	5.4	19.5	80.5	0.0
SD	1.2	1.4	1.1	5.2	2.5	1.1	0.9	29.0	0.4	0.4	0.1	2.8	2.8	0.0
2Q-100 #1	4.7	8.6	12.6	44.4	51.8	14.7	28.4	450.0	13.4	17.5	5.6	22.6	77.4	0.0
2Q-100 #2	3.0	6.8	9.3	33.9	49.9	13.7	27.4	500.0	14.6	15.0	5.4	19.8	80.2	0.0
Mean	3.9	7.7	11.0	39.2	50.9	14.2	27.9	475.0	14.0	16.3	5.5	21.2	78.8	0.0
SD	1.2	1.3	2.3	7.4	1.3	0.7	0.7	35.4	0.8	1.8	0.1	2.0	2.0	0.0
2Q-250 #1	3.0	8.1	10.6	41.0	50.7	13.1	25.9	701.0	14.7	16.5	5.4	22.8	77.2	0.0
2Q-250 #2	2.4	8.7	11.3	45.2	52.2	13.0	25.0	704.0	13.9	16.0	5.4	21.1	78.9	0.0
Mean	2.7	8.4	11.0	43.1	51.5	13.1	25.5	702.5	14.3	16.3	5.4	22.0	78.1	0.0
SD	0.4	0.4	0.5	3.0	1.1	0.1	0.6	2.1	0.6	0.4	0.0	1.2	1.2	0.0
PYD-50 #1	4.4	8.6	10.4	43.0	49.8	12.1	24.2	585.0	13.0	17.4	5.4	24.3	75.7	0.0
PYD-50 #2	4.2	8.6	9.6	43.1	49.9	11.1	22.3	773.0	14.5	16.0	5.6	23.2	76.8	0.0
Mean	4.3	8.6	10.0	43.1	49.9	11.6	23.3	679.0	13.8	16.7	5.5	23.8	76.3	0.0
SD	0.1	0.0	0.6	0.1	0.1	0.7	1.3	132.9	1.1	1.0	0.1	0.8	0.8	0.0
PYD-100 #1	3.1	8.9	9.6	45.0	50.4	10.8	21.3	642.0	13.6	17.4	5.4	23.9	76.1	0.0
PYD-100 #2	1.9	8.0	7.8	40.7	50.7	9.7	19.2	579.0	13.6	16.0	5.4	22.6	77.4	0.0
Mean	2.5	8.5	8.7	42.9	50.6	10.3	20.3	610.5	13.6	16.7	5.4	23.3	76.8	0.0
SD	0.8	0.6	1.3	3.0	0.2	0.8	1.5	44.5	0.0	1.0	0.0	0.9	0.9	0.0
PYD-250 #1	1.5	7.6	7.2	35.9	47.4	9.5	20.1	58.0	13.1	15.7	7.3	13.7	86.3	0.0
PYD-250 #2	2.2	7.9	7.0	39.5	50.3	8.9	17.7	533.0	14.5	17.5	5.6	33.3	66.7	0.0
Mean	1.9	7.7	7.1	37.7	48.9	9.2	18.9	295.5	13.8	16.6	6.5	23.5	76.5	0.0
SD	0.5	0.2	0.1	2.5	2.1	0.4	1.7	335.9	1.0	1.3	1.2	13.9	13.9	0.0

[그림 2-85. PYD, 4Me, 2Q의 혈액분석 결과]

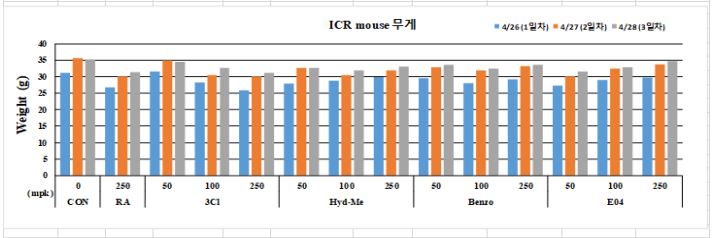
② 3Cl, Hyd-Me, Benzo, E04 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 3Cl, Hyd-Me, Benzo, E04 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-86)

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	4/26 (1일차)	평균	4/27 (2일차)	평균	4/28 (3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	0	핑	31.1	31.1	35.6	35.6	35	35
	2	RA	250		26.7	26.7	30.1	30.1	31.3	31.3
	3	3Cl	50	파	31.6	31.6	34.8	34.8	34.5	34.5
	4		100	핑	28.3	28.3	30.4	30.4	32.6	32.6
	5		250	핑	25.9	25.9	30.1	30.1	31.1	31.1
	6	Hyd-Me	50	파	27.9	27.9	32.6	32.6	32.6	32.6
	7		100	파	28.8	28.8	30.5	30.5	31.9	31.9
	8		250	파	29.8	29.8	31.9	31.9	33.1	33.1
	9	Benzo	50	핑	28.8	29.6	32.7	32.75	34.2	33.65
	10			파	30.4		32.8		33.1	
	11		100	핑	27.6	28.1	30.9	31.95	32.3	32.4
	12			파	28.6		33		32.5	
	13		250	핑	28.5	29.1	32.5	33.25	32.8	33.6
	14			파	29.7		34		34.4	
	15	E04	50	핑	26.1	27.35	28.2	30.1	29.8	31.45
	16			파	28.6		32		33.1	
	17		100	핑	27.5	28.95	30.5	32.5	31.5	32.9
	18			파	30.4		34.5		34.3	
	19		250	핑	29.6	29.7	34.5	33.8	35.4	34.6
	20			파	29.8		33.1		33.8	

20시간 절식 후 측정



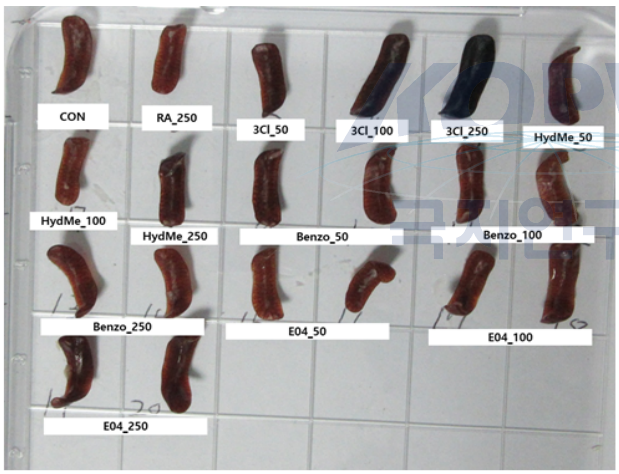
[그림 2-86. 3Cl, Hyd-Me, Benzo, E04 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

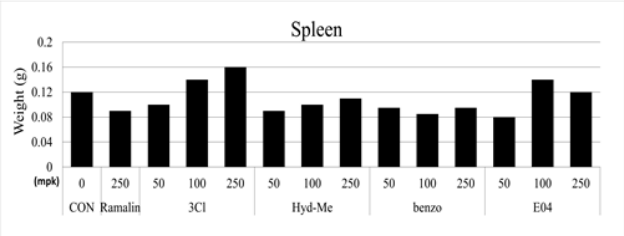
a) 다양한 농도(50, 100, 250 mpk)의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함. 투여 후 Benzo의 100 mpk 약물 처리 동물 모두 대략 15분 이상을 뱅뱅 도는 증상을 보였으며, Benzo 250 mpk 약물처리 후 숨쉬기 힘들어했으나 시간이 지난 후 안정을 찾은 것으로 보임

b) 라말린 유도체 3Cl, Hyd-Me, Benzo, E04 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 3Cl은 농도의존적으로 비장의 중량이 증가하였고 Hyd-Me 처리군도 농도의존적으로 증가하였으나 대조군에 비해 비장의 크기는 작았으며 E04 100 mpk 한 마리에서 비장의 중량이 증가된 것을 관찰되었음

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 3Cl 50, 100, 250 mpk 약물 처리군에서 비장이 비대해지고 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 보였고 E04 250 mpk 처리군에서 비장의 색이 약간 검붉은색으로 변한 것을 확인함(그림 2-87)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	색(변화)	비장무게(g)	중량 평균값	색깔	크기
경구투여 (PO)	1	CON	0	빨	0.12	0.12		
	2	Ramalin	250		0.09	0.09		
	3	3Cl	50	파	0.1	0.1		
	4		100	빨	0.14	0.14	검붉은색	비장종대
	5		250	빨	0.16	0.16	검붉은색	비장종대
	6	Hyd-Me	50	파	0.09	0.09		
	7		100	파	0.1	0.1		
	8		250	파	0.11	0.11		
	9	benzo	50	빨	0.09	0.095		
	10			파	0.1			
	11		100	빨	0.08	0.085		
	12			파	0.09			
	13		250	빨	0.1	0.095		
	14			파	0.09			
	15	E04	50	빨	0.09	0.08		
	16			파	0.07			
	17		100	빨	0.09	0.14		
	18			파	0.14			
	19		250	빨	0.11	0.12	약간 검붉은색	
	20			파	0.13		약간 검붉은색	



[그림 2-87. 3Cl, Hyd-Me, Benzo, E04의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) 3Cl 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)가 농도의존적으로 증가하였으며 이는 염증 반응으로 인하여 백혈구 수치가 증가되었다고 예상되어짐(그림 2-88)

Sample Name	백혈구 수치 WBC (White blood cell count)	적혈구 수치 RBC (Red blood cell Count)	헤모글로빈 수치 HGB (Hemoglobin)	적혈구 용적 백분율 HCT (Hematocrit)	평균 적혈구 용적 MCV (Mean Corpuscular Volume)	평균 적혈구 혈색소량 MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin)	평균 적혈구 혈색소 농도 MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)	혈소판 수 PLT (Platelet Count)	적혈구 크기 분포 RDW (Red blood Distribution Width)	혈소판 입자 분포 PDW (Platelet Distribution Width)	평균 혈소판 용적 MPV (Mean Platelet Volume)	호중구 비율 NEU% (Neutrophil %)	림프구 비율 LYM% (Lymphocyte %)	단핵구 비율 MON% (Monocyte %)
CON	2.9	7.95	12.8	44.3	55.7	16.1	28.9	75	15.7	15.9	6.7	25.2	74.8	0
RA250	5.3	8.85	14.4	48.5	54.8	16.3	29.7	774	14.4	16.6	5.4	46.6	53.4	0
Hyd-Me 100	LEVE	0	12.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyd-Me 200	4.7	7.79	12.8	43.6	56	16.4	29.4	702	15.3	16	5.4	40.6	56	3.4
3Cl-50	4.2	7.68	12.9	44.2	57.6	16.8	29.2	657	17.1	15.4	5.8	33.2	66.8	0
3Cl-100	5.9	7.64	13.4	40.5	53	17.5	33.1	829	16.1	16	5.6	32.8	67.2	0
3Cl-250	10.8	3.13	6.3	16.4	52.4	20.1	38.4	301	16.8	15.9	5.4	18.2	81.8	0
Benzo-50#1	4.8	8.88	13.9	52.2	58.8	15.7	26.6	728	15.4	17.5	5.6	26	74	0
Benzo-50#2	5.7	8.09	13	46.5	57.5	16.1	28	688	15.5	15.9	5.6	39.7	60.3	0
Mean	5.3	8.5	13.5	49.4	58.2	15.9	27.3	708.0	15.5	16.7	5.6	32.9	67.2	0.0
SD	0.6	0.6	0.6	4.0	0.9	0.3	1.0	28.3	0.1	1.1	0.0	9.7	9.7	0.0
Benzo-100#1	4.6	7.72	12.7	45.7	59.2	16.5	27.8	618	15.9	15.1	5.6	41.8	55.3	2.9
Benzo-100#2	3.2	8.02	11.9	44.9	56	14.8	26.5	445	16.3	17.5	5.6	30.1	69.9	0
Mean	3.9	7.9	12.3	45.3	57.6	15.7	27.2	531.5	16.1	16.3	5.6	36.0	62.6	1.5
SD	1.0	0.2	0.6	0.6	2.3	1.2	0.9	122.3	0.3	1.7	0.0	8.3	10.3	2.1
Benzo-250#1	3.4	7.5	11.6	42.7	56.9	15.5	27.2	635	15.1	16.6	5.4	24.4	75.6	0
Benzo-250#2	3.2	8.33	13.3	48.3	58	16	27.5	632	16.3	16.5	5.4	35.2	64.8	0
Mean	3.3	7.9	12.5	45.5	57.5	15.8	27.4	633.5	15.7	16.6	5.4	29.8	70.2	0.0
SD	0.1	0.6	1.2	4.0	0.8	0.4	0.2	2.1	0.8	0.1	0.0	7.6	7.6	0.0
E04-50#1	3.3	7.77	12.4	43.3	55.7	16	28.6	583	14.8	17.4	5.4	39.3	57.2	3.5
E04-50#2	4.9	7.31	11.9	42.7	58.4	16.3	27.9	719	15.7	16	5.6	30.2	69.8	0
Mean	4.1	7.5	12.2	43.0	57.1	16.2	28.3	651.0	15.3	16.7	5.5	34.8	63.5	1.8
SD	1.1	0.3	0.4	0.4	1.9	0.2	0.5	96.2	0.6	1.0	0.1	6.4	8.9	2.5
E04-100#1	3.9	7.66	12.6	43.8	57.2	16.4	28.8	505	15.1	16	5.6	40.2	55.9	3.9
E04-100#2	6.2	7.38	12.4	44	59.6	16.8	28.2	653	15.5	16.5	5.4	47.9	47.9	4.2
Mean	5.1	7.5	12.5	43.9	58.4	16.6	28.5	579.0	15.3	16.3	5.5	44.1	51.9	4.1
SD	1.6	0.2	0.1	0.1	1.7	0.3	0.4	104.7	0.3	0.4	0.1	5.4	5.7	0.2
E04-250#1	4.3	7.55	12	41.3	54.7	15.9	29.1	596	15.6	16.5	5.4	35.2	61.5	3.3
E04-250#2	3.6	7.73	11.5	41.7	53.9	14.9	27.6	724	15.2	16.5	5.4	36.5	63.5	0
Mean	4.0	7.6	11.8	41.5	54.3	15.4	28.4	660.0	15.4	16.5	5.4	35.9	62.5	1.7
SD	0.5	0.1	0.4	0.3	0.6	0.7	1.1	90.5	0.3	0.0	0.0	0.9	1.4	2.3

[그림 2-88. 3Cl, Hyd-Me, Benzo, E04의 혈액분석 결과]

KOPRI 극지연구소

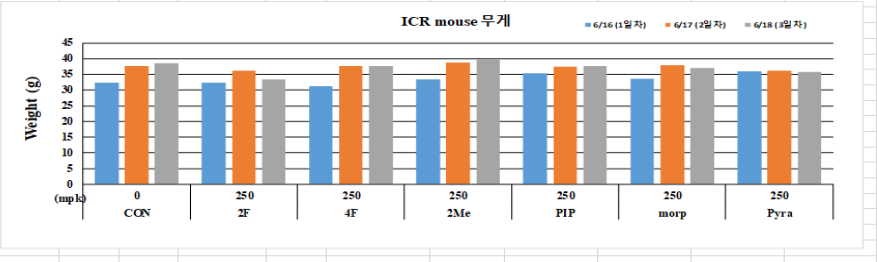
③ 2F, 4F, 2Me, PIP, MORP, Pyra 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 2F, 4F, 2Me, PIP, MORP, Pyra 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-89)

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	6/16 (1일차)	평균	6/17 (2일차)	평균	6/18 (3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	0	빨	29.8	32.25	35	37.75	35.6	38.65
	2			파	34.7		40.5		41.7	
	3	2F	250	빨	33.2	32.25	37.5	36.2	39.3	33.3
	4			파	31.3		34.9		27.3	
	5	4F	250	빨	29.4	31.15	35.8	37.65	35.9	37.8
	6			파	32.9		39.5		39.7	
	7	2Me	250	빨	33.6	33.4	39.1	38.7	40.6	39.85
	8			파	33.2		38.3		39.1	
	9	PIP	250	빨	38.3	35.3	38.7	37.55	38.4	37.6
	10			파	32.3		36.4		36.8	
	11	morp	250	빨	33.6	33.7	36.3	38	36.2	37
	12			파	33.8		39.7		37.8	
	13	Pyra	250	빨	36.5	36	36.3	36.3	36.4	35.8
	14			파	35.5		36.3		35.2	

16시간 절식 후 측정



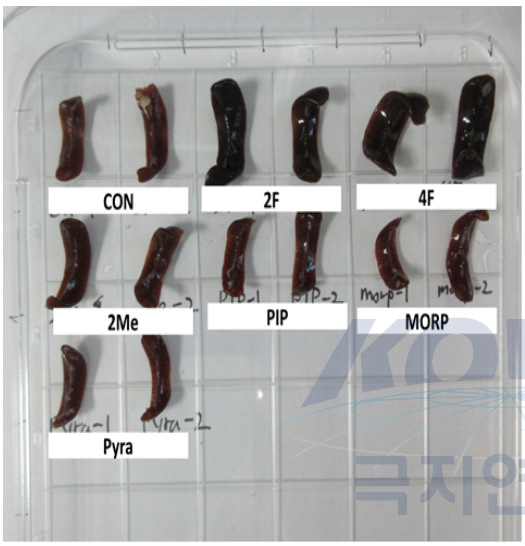
[그림 2-89. 2F, 4F, 2Me, PIP, MORP, Pyra 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 2F, 4F, 2Me, PIP, MORP, Pyra 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 2F, 4F 약물 처리군은 비장 중량이 증가 된 것을 관찰함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 2F, 4F 250 mpk 약물 처리군에서 비장이 비대해지고 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 확인함(그림 2-90)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	색변화	색깔	크기	부검 소견
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	별			
	2		250	과			
	3	2F	250	별	검붉은색	비장종대	
	4		250	과	검붉은색	비장종대	
	5	4F	250	별	검붉은색	비장종대	
	6		250	과	검붉은색	비장종대	
	7	2Me	250	별			
	8		250	과			
	9	PIP	250	별			
	10		250	과			
	11	MORP	250	별			
	12		250	과			
	13	MORP	250	별			
	14		250	과			

*비장 무게 측정 안함.

KOPRI 극지연구소

[그림 2-90. 2F, 4F, 2Me, PIP, MORP, Pyra의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) 2F 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)가 농도의존적으로 증가하였으며 이는 염증반응으로 인하여 백혈구 수치가 증가되었다고 예상되어지며, 2Me 처리군 중 한 마리에서 백혈구 수치가 증가됨을 확인함(그림 2-91)

	백혈구 수치	적혈구 수치	헤모글로빈 수치	적혈구 용적 백분율	평균 적혈구 용적	평균 적혈구 혈색소량	평균 적혈구 혈색소 농도	cellular hemoglobin concentration mean	적혈구 크기 분포	혈색소 차이 분석도	혈소판 수	혈색소 차이 분석도	혈소판 차이 분석도	혈소판 용적의 백분율			망상적혈구
Identifier	WBC(x10E03	RBC(x10E06 c	measHGB(g/	HCT(%)	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/dL	CHCM(g/dL)	RDW(%)	HDW(g/dL)	PLT(x10E03	MPV(fL)	PDW(%)	PCT(%)	MN_peak(	MN_y_peak(	%Retic(%)
CONTROL/1	1.36	6.58	10.6	36.2	55.0	16.1	29.3	28.4	14.5	2.57	9	6.9	20.9	0.01	17.0	12.5	6.71
CONTROL/2	2.28	8.22	13.3	46.2	56.3	16.2	28.7	28.0	14.6	2.27	637	6.5	42.0	0.42	18.0	12.5	7.37
PIP/1	1.39	8.33	12.9	45.8	54.9	15.5	28.2	28.0	13.4	2.18	1187	6.0	37.1	0.71	17.0	12.5	5.04
PIP/2	1.78	10.30	16.2	58.0	56.3	15.7	27.9	26.8	12.7	2.25	86	11.3	88.9	0.10	20.5	13.5	5.14
2F/1	5.02	8.20	15.2	41.9	51.1	18.5	36.3	31.4	29.0	5.47	413	8.4	51.1	0.35	19.0	12.5	10.90
2F/2	4.49	7.88	15.0	37.9	48.2	19.0	39.5	36.2	27.1	7.20	1125	6.8	42.7	0.77	20.0	12.5	8.28
PTRN/1	2.17	8.22	13.2	44.9	54.6	16.1	29.5	29.2	13.2	2.28	1164	6.3	39.3	0.73	18.5	12.5	4.54
PYRN/2	1.01	5.40	8.3	27.8	51.5	15.3	29.7	30.1	12.5	2.29	271	6.6	43.0	0.18	17.0	12.5	4.17
4F/1	3.23	5.22	11.2	25.5	48.9	21.4	43.8	36.6	37.1	7.80	1881	9.8	61.7	1.84	24.0	10.5	11.97
4F/2	2.13	6.82	13.5	33.0	48.4	19.7	40.8	33.9	32.3	6.92	1386	7.7	40.7	1.07	18.0	12.5	15.89
MORP/1	1.59	8.22	13.2	43.9	53.4	16.0	30.0	30.0	13.7	2.54	1098	7.5	75.1	0.83	17.0	12.5	5.81
MORP/2	0.96	7.57	11.9	40.5	53.6	15.7	29.4	29.8	14.5	2.59	1010	6.1	35.4	0.62	16.0	12.5	6.90
2ME/1	4.07	7.88	13.1	46.6	59.2	16.7	28.2	28.0	16.0	2.64	1051	6.7	39.2	0.70	17.0	12.5	8.91
2ME/2	0.67	4.46	6.8	23.4	52.4	15.2	28.9	29.2	14.8	2.45	33	10.1	82.1	0.03	15.0	12.5	8.19
해당 번호는 옹고집어리 제거 후 측정																	

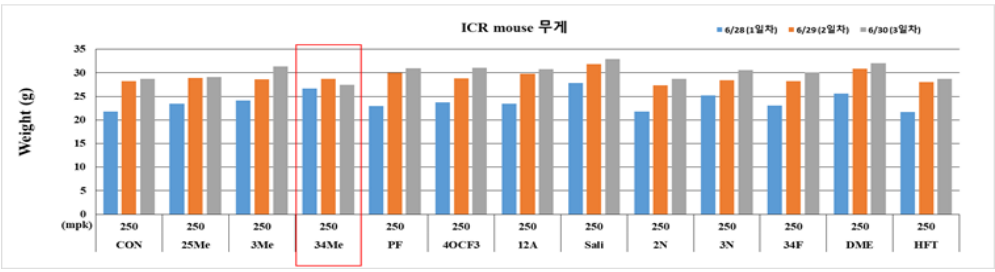
[그림 2-91. 2F, 4F, 2Me, PIP, MORP, Pyra의 혈액분석 결과]

④ 25Me, 3Me, 34Me, PF, 4OCF3, 12A, Sali, 2N, 3N, 34F, DMe, HFT 단회투여 독성 확인

ⅰ) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 25Me, 3Me, 34Me, PF, 4OCF3, 12A, Sali, 2N, 3N, 34F, DMe, HFT 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-92)

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)				
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	6/28 (1일차)	평균	6/29 (2일차)	평균	6/30 (3일차)	평균	
P.O (경구투여)	1	CON	250	핑	20.6	21.8	26.5	28.25	27.2	28.7	
	2			파	23		30		30.2		
	3	25Me	250	핑	23.1	23.4	28.6	28.9	28.8	29.15	
	4			파	23.7		29.2		29.5		
	5	3Me	250	핑	25.2	24.15	30.1	28.6	32.9	31.35	
	6			파	23.1		27.1		29.8		
	7	34Me	250	핑	28.1	26.65	30.1	28.7	27.3	27.4	무게 감소
	8			파	25.2		27.3		27.5		
	9	PF	250	핑	22.8	23	29.5	30	30.4	31	
	10			파	23.2		30.5		31.6		
	11	4OCF3	250	핑	22.8	23.7	27.5	28.85	29.3	31.1	
	12			파	24.6		30.2		32.9		
	13	12A	250	핑	24	23.45	29.3	29.8	31.5	30.8	
	14			파	22.9		30.3		30.1		
	15	Sali	250	핑	28.4	27.8	32.4	31.8	33.3	32.9	
	16			파	27.2		31.2		32.5		
	17	2N	250	핑	22.5	21.8	27.9	27.35	29.1	28.7	
	18			파	21.1		26.8		28.3		
	19	3N	250	핑	24.9	25.2	28.4	28.4	30.6	30.6	
	20			파	25.5		사망		사망		
	21	34F	250	핑	22.6	23.05	26.9	28.2	28.6	30.1	
	22			파	23.5		29.5		31.6		
	23	DME	250	핑	26.4	25.6	31.7	30.85	32.7	32.05	
	24			파	24.8		30		31.4		
	25	HFT	250	핑	20.6	21.65	26.6	28.05	26.9	28.7	
	26			파	22.7		29.5		30.5		



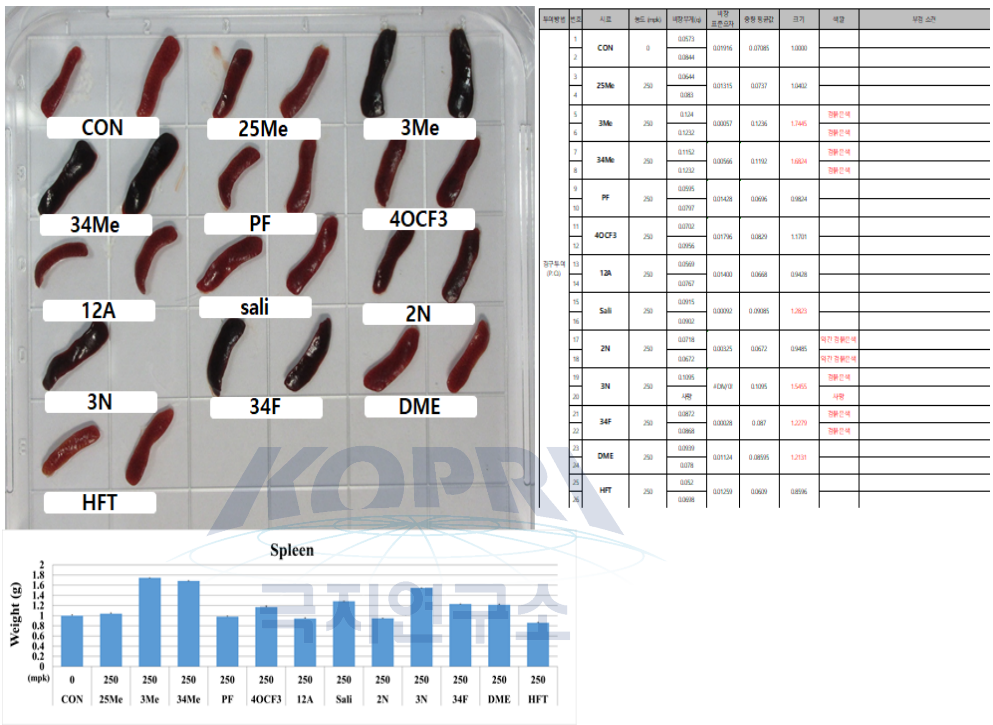
[그림 2-92. 25Me, 3Me, 34Me, PF, 4OCF3, 12A, Sali, 2N, 3N, 34F, DMe, HFT 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ⅱ) 비장 관찰

a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 25Me, 3Me, 34Me, PF, 4OCF3, 12A, Sali, 2N, 3N, 34F, DMe, HFT 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 3Me, 34Me, Sali, 3N, 34F, DME 약물 처리군은 비장 중량이 증가된 것을 관찰함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 3Me, 34Me, 2N, 3N, 34F 250 mpk 약물 처리군에서 비장이 비대해지고 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 확인함(그림 2-93)



[그림 2-93. 25Me, 3Me, 34Me, PF, 4OCF3, 12A, Sali, 2N, 3N, 34F, DMe, HFT의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) 34F, 2N, 34Me 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)가 대조군에 비해 크게 증가하였으며 이는 염증반응으로 인하여 백혈구 수치가 증가되었다고 예상됨(그림 2-94)

Sample Name		백혈구 수치 WBC (White blood cell count)	적혈구 수치 RBC (Red blood cell Count)	적혈구 헤모글로빈 수치 HGB (Hemoglobin)	적혈구 용적 비율 HCT (Hematocrit)	평균 적혈구 용적 MCV (Mean Corpuscular Volume)	평균 적혈구 혈색소량 MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin)	평균적혈구 혈색소 농도 MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)	혈소판 수 PLT (Platelet Count)	적혈구 크기 분포 RDW (Red blood Distribution Width)	혈소판 크기 분포 PDW (Platelet Distribution Width)	평균 혈소판 용적 MPV (Mean Platelet Volume)	호중구 비율 NEU% (Neutrophil %)	림프구 비율 LYM% (Lymphocyte %)	단핵구 비율 MON% (Monocyte %)
CON	1	2.2	8.38	12.7	46.1	55	15.2	27.5	456	15.5	17	5.8	30.9	69.1	0
	2	1.8	7.77	6.2	45.4	58.4	8	13.7	986	14.9	16.9	5.8	25.3	74.7	0
	Mean	1.9	8.1	9.5	45.8	56.7	11.6	20.6	521.0	15.2	17.0	5.8	28.1	71.9	0.0
	SD	0.4	0.4	4.6	0.5	2.4	5.1	9.9	91.9	0.4	0.1	0.0	4.0	4.0	0.0
HFT	1	2.6	9.05	13.6	49	54.1	15	27.8	600	15.1	17.3	6.2	74.5	20.6	0
	2	2.8	9.65	13.9	51.6	53.5	14.4	26.9	654	14.9	15	6	39.2	60.8	0
	Mean	2.7	9.4	13.8	50.3	53.8	14.7	27.4	627.0	15.0	16.2	6.1	57.1	40.7	0.0
	SD	0.1	0.4	0.2	1.8	0.4	0.4	0.6	39.2	0.1	1.8	0.1	25.2	28.4	0.0
DME	1	4.4	8.79	13.2	48.4	55.1	15	27.3	644	15.1	16.9	5.6	26.1	73.9	0
	2	3	8.15	11.7	46.6	57.2	14.4	25.1	702	14.4	16.9	5.6	28.3	71.7	0
	Mean	3.7	8.5	12.5	47.5	56.2	14.7	26.2	673.0	14.8	16.9	5.6	27.2	72.8	0.0
	SD	1.0	0.5	1.1	1.3	1.5	0.4	1.6	41.0	0.5	0.0	0.0	1.6	1.6	0.0
34F	1	32.4	7.08	12.5	38.5	54.4	17.7	32.5	713	14.7	15.9	6.2	4.9	95.1	0
	2	41.4	7.44	12.3	41.2	55.4	16.5	29.9	346	14.8	16.3	5.8	3.6	96.4	0
	Mean	36.9	7.3	12.4	39.9	54.9	17.1	31.2	529.5	14.8	16.1	6.0	4.3	95.8	0.0
	SD	6.4	0.3	0.1	1.9	0.7	0.8	1.8	259.5	0.1	0.3	0.3	0.9	0.9	0.0
3N	1	17	7.54	10.7	39.1	51.9	14.2	27.4	800	14.4	15.5	5.8	5.7	94.3	0
2N	1	13.7	8.45	10	45.5	53.8	11.8	22	257	14.5	16.3	6.5	5.9	94.1	0
	2	0.8	5.09	6.3	26.3	51.5	12.4	24	53	15.6	16	7.4	22.1	77.9	0
	Mean	7.3	6.8	8.2	35.9	52.7	12.1	23.0	194.5	15.1	16.2	7.0	14.0	86.0	0.0
	SD	9.1	2.4	2.8	13.1	1.6	0.4	1.4	145.6	0.8	0.2	0.8	11.5	11.5	0.0
SALI	1	3	7.96	6.3	46.1	57.9	7.9	13.7	675	15.3	15.2	6.2	36.3	63.7	0
	2	3.3	7.73	6.9	41.7	53.9	8.9	16.5	637	14.3	16.3	5.8	41.6	58.4	0
	Mean	3.2	7.8	6.6	43.9	55.9	8.4	15.1	656.0	14.8	15.8	6.0	39.0	61.1	0.0
	SD	0.2	0.2	0.4	3.1	2.8	0.7	2.0	26.9	0.7	0.8	0.3	3.7	3.7	0.0
12A	1	2.8	7.8	6.7	43.5	55.8	8.6	15.4	395	13.9	16.5	6	41.4	58.6	0
	2	2.5	8.28	6.3	44.1	53.3	7.6	14.3	676	14.2	17.3	6.2	42.9	57.1	0
	Mean	2.7	8.0	6.5	43.8	54.6	8.1	14.9	535.5	14.1	16.9	6.1	42.2	57.9	0.0
	SD	0.2	0.3	0.3	0.4	1.8	0.7	0.8	198.7	0.2	0.6	0.1	1.1	1.1	0.0
4OCF3	1	2.8	7.71	6.6	42.2	54.7	8.6	15.6	551	14.1	16.3	5.8	46.6	53.4	0
	2	2.3	8.29	7.6	46	55.5	9.2	16.5	616	14.7	16.9	6	37.4	62.6	0
	Mean	2.6	8.0	7.1	44.1	55.1	8.9	16.1	583.5	14.4	16.4	5.9	42.0	58.0	0.0
	SD	0.4	0.4	0.7	2.7	0.6	0.4	0.6	46.0	0.4	0.1	0.1	6.5	6.5	0.0
PF	1	2.4	8.98	7.6	48.8	54.3	8.5	15.6	590	14.7	15.9	6.2	39.1	60.9	0
	2	2.7	8.46	12.6	46.6	55.1	14.9	27	641	14.6	16	5.6	32.3	67.7	0
	Mean	2.6	8.7	10.1	47.7	54.7	11.7	21.3	585.5	14.7	16.0	5.9	35.7	64.3	0.0
	SD	0.2	0.4	3.5	1.6	0.6	4.2	8.1	76.5	0.1	0.1	0.4	4.8	4.8	0.0
34ME	1	7	7.87	12	42.2	53.6	15.2	28.4	974	14.8	15.4	5.8	14.2	85.8	0
	2	23.3	6.89	8	36.1	52.4	11.6	22.2	799	14.8	15.5	5.8	4.2	95.8	0
	Mean	15.2	7.4	10.0	39.2	53.0	13.4	25.3	886.5	14.8	15.5	5.8	9.2	90.8	0.0
	SD	11.5	0.7	2.8	4.3	0.8	2.5	4.4	123.7	0.0	0.1	0.0	7.1	7.1	0.0
3ME	1	12.1	6.13	7.8	33.2	54.2	12.7	23.5	728	13.4	15	6	6.3	93.7	0
	2	12.8	4.31	6.8	23.7	55	15.8	28.7	144	14.9	16.3	6.4	3.9	96.1	0
	Mean	12.5	5.2	7.3	28.5	54.6	14.3	26.1	436.0	14.2	15.6	6.2	5.1	94.9	0.0
	SD	0.5	1.3	0.7	6.7	0.6	2.2	3.7	410.0	1.1	1.3	0.3	1.7	1.7	0.0
25ME	1	9.9	8.26	6.4	45.9	55.6	7.7	13.9	515	15.2	17	5.8	38.7	61.3	0
	2	3.3	8.14	9.8	42.6	52.3	12	23	481	14.6	17	5.8	70.4	26.9	2.7
	Mean	6.6	8.2	8.1	44.3	54.0	9.9	18.5	498.0	14.9	17.0	5.8	54.6	44.1	1.4
	SD	4.7	0.1	2.4	2.3	2.3	3.0	6.4	24.0	0.4	0.0	0.0	22.4	24.3	1.9

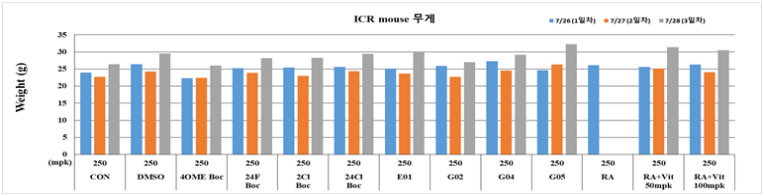
[그림 2-94. 25Me, 3Me, 34Me, PF, 4OCF3, 12A, Sali, 2N, 3N, 34F, DMe, HFT의 혈액분석 결과]

⑤ 4OME_Boc, 24F_Boc, 2Cl_Boc, 24Cl_Boc, E01, G02, G04, G05, RA+vit C 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 4OME_Boc, 24F_Boc, 2Cl_Boc, 24Cl_Boc, E01, G02, G04, G05, RA+vit C 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-95)

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	7/26 (1일차)	평균	7/27 (2일차)	평균	7/28 (3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	250	빨	22.4	23.95	20.6	22.7	22.9	26.45
	2			파	25.5		24.8		30	
	3	DMSO	250	빨	26	26.45	23	24.3	27.6	29.5
	4			파	26.9		25.6		31.4	
	5	4OME	250	빨	20.9	22.85	20.3	22.4	23.5	26.05
	6	Boc		파	23.8		24.5		28.6	
	7	24F	250	빨	24.3	25.25	23.4	23.85	28.2	28.2
	8	Boc		파	26.2		24.3		28.2	
	9	2Cl	250	빨	25.3	25.4	24	23	29	28.25
	10	Boc		파	25.5		22		27.5	
	11	24Cl	250	빨	26.7	25.6	24.6	24.35	29.7	29.45
	12	Boc		파	24.5		24.1		29.2	
	13	E01	250	빨	26	25.1	24.4	23.65	31.7	29.85
	14			파	24.2		22.9		28	
	15	G02	250	빨	25.7	25.9	22.4	22.65	26.8	27
	16			파	26.1		22.9		27.2	
	17	G04	250	빨	28.5	27.3	24.6	24.55	29.1	29.15
	18			파	26.1		24.5		29.2	
	19	G05	250	빨	25.2	24.65	26.8	26.3	33.2	32.25
	20			파	24.1		25.8		31.3	
	21	RA	250	빨	26.1	26.1	사망	#DIV/0!	사망	#DIV/0!
	22			파	26.1					
	23	RA+Vit 50mpk	250	빨	24.6	25.65	25.1	25.1	31.4	31.4
	24			파	26.7		사망		사망	
	25	RA+Vit 100mpk	250	빨	26	26.35	사망	24.1	사망	30.5
	26			파	26.7		24.1		30.5	



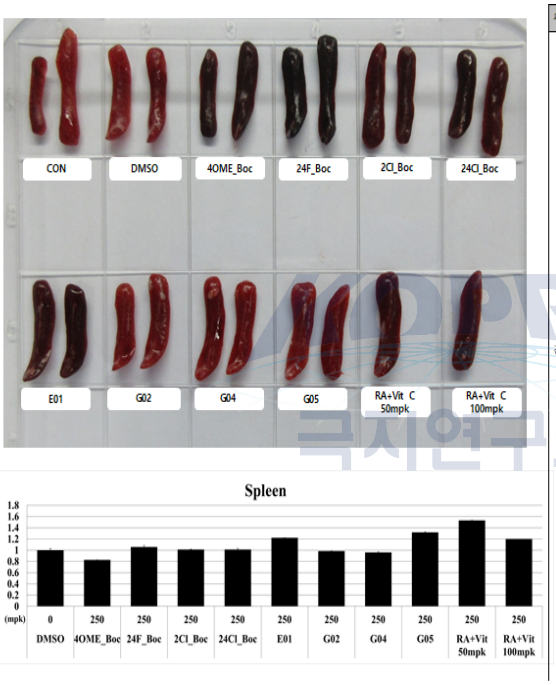
[그림 2-95. 4OME_Boc, 24F_Boc, 2Cl_Boc, 24Cl_Boc, E01, G02, G04, G05, RA+vit C 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 라말린과 라말린+비타민이 섞인 개체는 투여 후 2-3시간 경 사망하였으며 다른 약물투여군은 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 4OME_Boc, 24F_Boc, 2Cl_Boc, 24Cl_Boc, E01, G02, G04, G05, RA+vit C 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 E01, G05, RA+Vit 50 mpk, RA+Vit 100 mpk 약물 처리군은 비장 중량이 증가 된 것을 관찰함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 4OME_Boc, 24F_Boc, 2Cl_Boc, 24Cl_boc, E01, RA+Vit 50 mpk, RA+Vit 100 mpk 약물 처리군에서 비장의 색이 검붉은색으로 변한 것을 확인함(그림 2-96)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	중량 평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	0.032	0.02963	0.05295	0.696252465	
	2			0.0739				
	3	DMSO	0	0.0744	0.00233	0.07605	1	
	4			0.0777				
	5	4OME_Boc	250	0.0428	0.02857	0.063	0.8284	검붉은색
	6			0.0832				검붉은색
	7	24F_Boc	250	0.085	0.00658	0.08035	1.0565	검붉은색
	8			0.0757				검붉은색
	9	2Cl_Boc	250	0.0915	0.02036	0.0771	1.0138	검붉은색
	10			0.0627				검붉은색
	11	24Cl_Boc	250	0.0783	0.00184	0.077	1.0125	검붉은색
	12			0.0757				검붉은색
	13	E01	250	0.0916	0.00198	0.093	1.2229	검붉은색
	14			0.0944				검붉은색
	15	G02	250	0.0671	0.01124	0.07505	0.9869	
	16			0.083				
	17	G04	250	0.0877	0.01039	0.073	0.9599	
	18			0.073				
	19	G05	250	0.0977	0.00375	0.10035	1.3195	
	20			0.103				
	21	RA	250	사망				
	22							
	23	RA+Vit 50mpk	250	0.1165	#DIV/0!	0.1165	1.5319	약간 검붉은색
	24			사망				
	25	RA+Vit 100mpk	250	사망	#DIV/0!	0.0914	1.2018	
	26			0.0914				약간 검붉은색

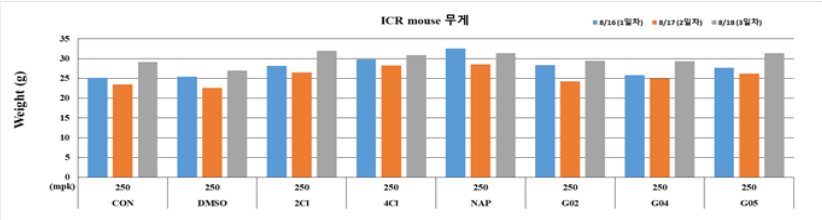
[그림 2-96. 4OME_Boc, 24F_Boc, 2Cl_Boc, 24Cl_Boc, E01, G02, G04, G05, RA+vit C의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

⑥ 2Cl, 4Cl, NAP, G02, G04, G05 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 2Cl, 4Cl, NAP, G02, G04, G05 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-97)

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	8/16 (1일차)	평균	8/17 (2일차)	평균	8/18 (3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	250	빨	25.3	25.1	23.4	23.45	28.4	29.1
	2			파	24.9		23.5		29.8	
	3	DMSO	250	빨	24.5	25.4	22.1	22.55	26.6	26.95
	4			파	26.3		23		27.3	
	5	2Cl	250	빨	28.7	28.2	26.8	26.5	31.5	32
	6			파	27.7		26.2		32.5	
	7	4Cl	250	빨	29	29.85	27.7	28.3	30.4	30.85
	8			파	30.7		28.9		31.3	
	9	NAP	250	빨	33.2	32.6	28.1	28.6	32.2	31.35
	10			파	32		29.1		30.5	
	11	G02	250	빨	32.1	28.4	27.4	24.25	32.3	29.4
	12			파	24.7		21.1		26.5	
	13	G04	250	빨	25.5	25.85	24.4	24.95	29	29.3
	14			파	26.2		25.5		29.6	
	15	G05	250	빨	25.9	27.7	24.4	26.2	30.1	31.4
	16			파	29.5		28		32.7	



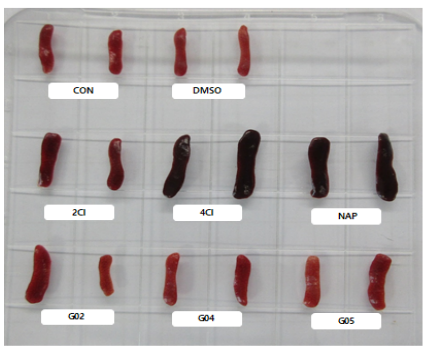
[그림 2-97. 2Cl, 4Cl, NAP, G02, G04, G05 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 2Cl, 4Cl, NAP, G02, G04, G05 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 2Cl, 4Cl, NAP, G02, G05 약물 처리군은 비장 중량이 증가 된 것을 관찰함

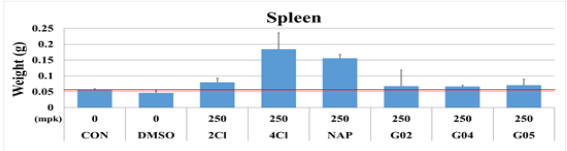
c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 2Cl, 4Cl, NAP 약물 처리군에서 비장이 비대해지고 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 확인함(그림 2-98)



*G02(2) : 체중 적게 나갔던 마우스임.

라말린(Ramalin) 합성 특성 테스트_ 경구투여(P.O)

투여방법	번호	시료	농도(mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	중량 평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O)	1	CON	0	0.0584	0.00283	0.0564		
	2			0.0544				
	3	DMSO	0	0.0509	0.00679	0.0461		
	4			0.0413				
	5	2Cl	250	0.0885	0.01280	0.07945	비장종대	약간 검붉은색
	6			0.0704				
	7	4Cl	250	0.1474	0.05218	0.1843	비장종대	검붉은색
	8			0.2212				검붉은색
	9	NAP	250	0.164	0.01195	0.35555	비장종대	검붉은색
	10			0.1471				검붉은색
	11	G02	250	0.1034	0.05093	0.0674		비장종대
	12			0.0314				
	13	G04	250	0.0643	0.00346	0.06675		
	14			0.0692				
	15	G05	250	0.0572	0.01888	0.07055		
	16			0.0839				



[그림 2-98. 2Cl, 4Cl, NAP, G02, G04, G05의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) 4Cl, NAP 약물 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)가 대조군에 비해 크게 증가하였으며 이는 염증반응으로 인하여 백혈구 수치가 증가되었다고 예상됨(그림 2-99)

	백혈구 수치	적혈구 수치	헤모글로빈 수치	적혈구 용적 백분율	평균 적혈구 용적	평균 적혈구 혈색소량	평균 적혈구 혈색소 농도	혈소판 수	적혈구 크기 분포	혈소판 입자 분포	평균 혈소판 용적	호중구 비율	림프구 비율	단핵구 비율
Sample Name	WBC (White blood cell count)	RBC (Red blood cell Count)	HGB (Hemoglobin)	HCT (Hematocrit)	MCV (Mean Corpuscular Volume)	MCH (Mean Corpuscular Hemoglob	MCHC (Mean Corpuscular Hemoglob	PLT (Platelet Count)	RDW (Red blood Distributio n Width)	PDW (Platelet Distributio n Width)	MPV (Mean Platelet Volume)	NEU% (Neutrophil %)	LYM% (Lymphocyte %)	MON% (Monocyte %)
CON #1	1.9	9.82	9.1	54.4	55.4	9.3	16.7	481	15.5	17	5.8	50.7	45	4.3
CON #2	2.8	8.37	7.8	50.3	60.1	9.3	15.5	595	14.6	17.2	6	37.8	62.2	0
CON #3	2	7.93	7.6	46.5	58.6	9.6	16.3	572	15.3	16.5	5.4	33.5	66.5	0
CON #4	1.5	8.4	7.8	45.8	54.5	9.3	17	647	15.3	16.9	5.6	26.3	73.7	0
CON #5	1.8	6.77	6.5	36.4	53.8	9.6	17.9	408	15.1	17.9	6.2	45.4	54.6	0
Mean	2.0	8.3	7.8	46.7	56.5	9.4	16.7	540.6	15.2	17.1	5.8	38.7	60.4	0.9
SD	0.5	1.1	0.9	6.7	2.7	0.2	0.9	95.4	0.3	0.5	0.3	9.6	11.0	1.9
DMSO #1	2.3	8.89	7	50.2	56.5	7.9	13.9	807	15.4	17.5	5.6	46.7	53.3	0
DMSO #2	2	9.19	8.8	52.1	56.7	9.6	16.9	446	14.9	16.5	5.4	48.2	46.8	5
Mean	2.2	9.0	7.9	51.2	56.6	8.8	15.4	626.5	15.2	17.0	5.5	47.5	50.1	2.5
SD	0.2	0.2	1.3	1.3	0.1	1.2	2.1	255.3	0.4	0.7	0.1	1.1	4.6	3.5
2Cl #1	2	8.43	8.2	44.2	52.4	9.7	18.6	603	13.3	17.5	5.6	28.4	71.6	0
2Cl #2	2.2	7.75	7.7	43	55.5	9.9	17.9	710	13.7	14.5	5.6	31.3	68.7	0
Mean	2.1	8.1	8.0	43.6	54.0	9.8	18.3	656.5	13.5	16.0	5.6	29.9	70.2	0.0
SD	0.1	0.5	0.4	0.8	2.2	0.1	0.5	75.7	0.3	2.1	0.0	2.1	2.1	0.0
4Cl #1	18.2	6.51	8.7	35.4	54.4	13.4	24.6	1345	15.1	15.9	6	6	94	0
4Cl #2	13.3	7.01	8	37.4	53.4	11.4	21.4	463	14.9	14.7	5.6	3.7	96.3	0
Mean	15.8	6.8	8.4	36.4	53.9	12.4	23.0	904.0	15.0	15.3	5.8	4.9	95.2	0.0
SD	3.5	0.4	0.5	1.4	0.7	1.4	2.3	623.7	0.1	0.8	0.3	1.6	1.6	0.0
NAP #1	17.7	6.5	8.3	36.8	56.6	12.8	22.6	728	14.6	16.8	5.6	2.5	97.5	0
NAP #2	11	6.47	7.9	35.2	54.4	12.2	22.4	879	15.6	15.9	5.4	1.5	98.5	0
Mean	14.4	6.5	8.1	36.0	55.5	12.5	22.5	803.5	15.1	16.4	5.5	2.0	98.0	0.0
SD	4.7	0.0	0.3	1.1	1.6	0.4	0.1	106.8	0.7	0.6	0.1	0.7	0.7	0.0
GO2 #1	1.3	8.89	7.5	48.6	54.7	8.4	15.4	728	15	15.4	5.8	38.5	61.5	0
GO2 #2	1	7.73	7.1	44.9	58.1	9.2	15.8	523	14.7	16.6	5.4	36.9	63.1	0
Mean	1.2	8.3	7.3	46.8	56.4	8.8	15.6	625.5	14.9	16.0	5.6	37.7	62.3	0.0
SD	0.2	0.8	0.3	2.6	2.4	0.6	0.3	145.0	0.2	0.8	0.3	1.1	1.1	0.0
GO4 #1	1.2	8.79	7.7	48.9	55.6	8.8	15.7	567	14.9	16	5.6	31.8	68.2	0
GO4 #2	1.2	9.05	7.8	50.2	55.5	8.6	15.5	645	14.5	16	5.6	43.2	53.7	3.1
Mean	1.2	8.9	7.8	49.6	55.6	8.7	15.6	606.0	14.7	16.0	5.6	37.5	61.0	1.6
SD	0.0	0.2	0.1	0.9	0.1	0.1	0.1	55.2	0.3	0.0	0.0	8.1	10.3	2.2
GO5 #1	1.1	8.79	14.5	49.6	56.4	16.5	29.2	571	14.4	17.5	5.6	41.4	57	1.6
GO5 #2	1.6	8.74	8.1	51.4	58.8	9.3	15.8	818	15.1	16.4	5.8	34.6	65.4	0
Mean	1.4	8.8	11.3	50.5	57.6	12.9	22.5	694.5	14.8	17.0	5.7	38.0	61.2	0.8
SD	0.4	0.0	4.5	1.3	1.7	5.1	9.5	174.7	0.5	0.8	0.1	4.8	5.9	1.1

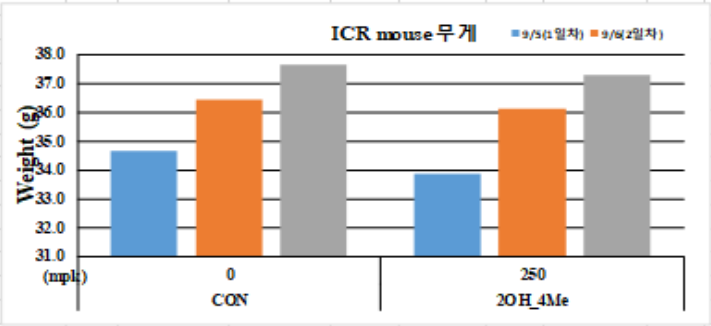
[그림 2-99. 2Cl, 4Cl, NAP, G02, G04, G05의 혈액분석 결과]

⑦ 2OH-4Me 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 2OH-4Me 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-100)

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	9/5(1일차)	평균	9/6(2일차)	평균	9/7 (3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	0	빨	35.2	34.7	37.7	36.4	38.9	37.7
	2			파	35.4		38.1		38.5	
	3			빨	33.4		33.5		35.6	
	4	2OH_4Me	250	파	33.4	33.9	37.1	36.1	39.1	37.3
	5			빨	34.7		35.7		36.5	
	6			파	33.5		35.6		36.3	



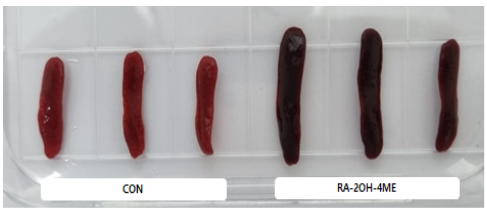
[그림 2-100. 2OH-4Me 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

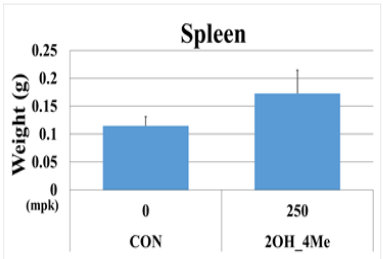
a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 2OH-4Me 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 2OH-4Me 약물 처리군은 비장 중량이 증가 된 것을 관찰함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 2OH-4Me 약물 처리군에서 비장이 비대해지고 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 확인함(그림 2-101)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	중량 평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	0.1321	0.01640	0.114433333		
	2			0.1115				
	3			0.0997				
	4	2OH_4Me	250	0.1949	0.04163	0.172633333		검붉은색
	5			0.1984			비장종대	검붉은색
	6			0.1246				검붉은색



[그림 2-101. 2OH-4Me의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) 2OH-4Me 약물 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)가 대조군에 비해 증가하였으며 이는 염증반응으로 인하여 백혈구 수치가 증가되었다고 예상됨(그림 2-102)

Sample Name	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW	PDW	MPV	NEU%	LYM%	MON%
CON #1	1.7	8.11	5.3	48.5	59.8	6.5	10.9	724	14.3	16.9	5.6	18	82	0
CON #2	1.7	9.35	7.1	51.3	54.9	7.6	13.8	485	13.6	17	5.8	33.1	66.9	0
CON #3	1.9	8.3	7.4	47.4	57.1	8.9	15.6	783	14.7	16	5.6	32.7	67.3	0
Mean	1.8	8.6	8.9	48.7	56.6	10.3	18.1	644.1	14.1	17.3	5.6	25.9	74.1	0.0
SD	0.3	0.6	3.7	2.6	2.2	4.1	6.9	145.4	0.4	1.0	0.1	5.5	5.5	0.0
2OH-4ME #1	2	6.85	7	36.2	52.8	10.2	19.3	708	14.1	16.9	5.6	15	85	0
2OH-4ME #2	6.2	7.23	7.9	37	51.2	10.9	21.4	752	14	16	5.6	5.6	94.4	0
2OH-4ME #3	2.5	8.17	8.6	43.1	52.8	10.5	20	634	14.4	16	5.4	11.3	88.7	0
Mean	3.6	7.4	7.8	38.8	52.3	10.5	20.2	698.0	14.2	16.3	5.5	10.6	89.4	0.0
SD	2.3	0.7	0.8	3.8	0.9	0.4	1.1	59.6	0.2	0.5	0.1	4.7	4.7	0.0

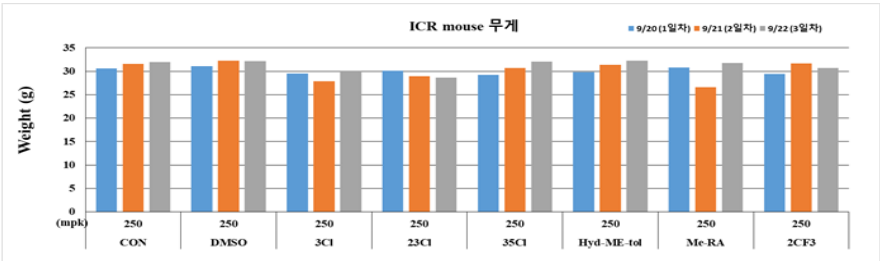
[그림 2-102. 2OH-4Me의 혈액분석 결과]

⑧ 3Cl, 23Cl, 35Cl, Hyd-Me-tol, MER-RA, 2CF3 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 3Cl, 23Cl, 35Cl, Hyd-Me-tol, MER-RA, 2CF3 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-103)

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	9/20 (1일차)	평균	9/21 (2일차)	평균	9/22 (3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	250		30.6	30.6	31.6	31.6	32	32
	2	DMSO	250	빨	30.9	31.05	32	32.25	32.2	32.15
	3			파	31.2		32.5		32.1	
	4	3Cl	250	빨	29.4	29.55	29.5	27.85	30.3	30.15
	5			파	29.7		26.2		30	
	6	23Cl	250	빨	31.2	30.1	32.3	28.9	33.1	28.6
	7			파	29		25.5		24.1	
	8	35Cl	250	빨	29	29.2	30	30.7	31.6	32.1
	9			파	29.4		31.4		32.6	
	10	Hyd-ME-tol	250	빨	30.1	29.85	31.5	31.35	32.9	32.3
	11			파	29.6		31.2		31.7	
	12	Me-RA	250	빨	31.2	30.8	26.8	26.55	31.9	31.75
	13			파	30.4		26.3		31.6	
	14	2CF3	250	빨	28.7	29.4	30.6	31.65	29.6	30.65
	15			파	30.1		32.7		31.7	



[그림 2-103. 3Cl, 23Cl, 35Cl, Hyd-Me-tol, MER-RA, 2CF3 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

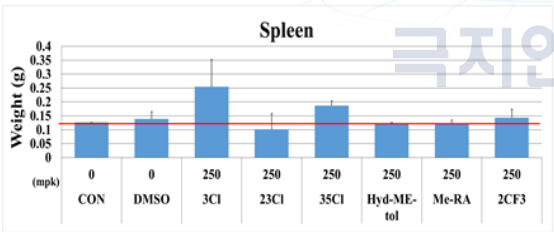
ii) 비장 관찰

a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 3Cl, 23Cl, 35Cl, Hyd-Me-tol, MER-RA, 2CF3 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 3Cl, 35Cl 약물 처리군은 비장 중량이 증가된 것을 관찰함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 3Cl, 35Cl, MER-RA 약물 처리군에서 비장의 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 확인함(그림 2-104)

투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	중량 평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	0.1267	#DIV/0!	0.1267		
	2	DMSO	0	0.1567	0.02574	0.1385		
	3			0.1203				
	4	3Cl	250	0.3231	0.09716	0.2544	비장종대	검붉은색
	5			0.1857				검붉은색
	6	23Cl	250	0.1412	0.05523	0.10215		
	7			0.0631				
	8	35Cl	250	0.1748	0.01662	0.18655	약간 비장종대	약간 검붉은색
	9			0.1983				약간 검붉은색
	10	Hyd-ME-tol	250	0.125	0.00113	0.1242		
	11			0.1234				
	12	Me-RA	250	0.1311	0.01280	0.12205		약간 검붉은색
	13			0.113				약간 검붉은색
	14	2CF3	250	0.1221	0.03019	0.14345		
	15			0.1648				



KOPRI 극지연구소

[그림 2-104. 3Cl, 23Cl, 35Cl, Hyd-Me-tol, MER-RA, 2CF3의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) 3Cl 약물 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)가 대조군에 비해 크게 증가하였으며 이는 염증반응으로 인하여 백혈구 수치가 증가되었다고 예상됨(그림 2-105)

No.	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW	PDW	MPV	NEU%	LYM%	MON%
CON	2.9	7.65	12.7	45.1	59	16.6	28.2	560	16.5	17.8	6	26.7	73.3	0
Mean	2.9	7.7	12.7	45.1	59.0	16.6	28.2	560.0	16.5	17.8	6.0	26.7	73.3	0.0
SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
DMSO #1	3	7.35	12.5	43.2	58.8	17	28.9	425	16.6	16	5.6	28.9	71.1	0
DMSO #2	1.2	7.41	12.3	44.3	59.8	16.6	27.8	584	15.1	16.3	5.8	22.9	77.1	0
Mean	2.1	7.4	12.4	43.8	59.3	16.8	28.4	504.5	15.9	16.2	5.7	25.9	74.1	0.0
SD	1.3	0.0	0.1	0.8	0.7	0.3	0.8	112.4	1.1	0.2	0.1	4.2	4.2	0.0
23Cl #1	1.3	8.36	13	47.1	56.3	15.6	27.6	693	15.5	16.9	5.8	27.9	72.1	0
23Cl #2	1.3	9.43	14.9	50.9	54	15.8	29.3	628	14.2	15.7	5.4	52.8	47.2	0
Mean	1.3	8.9	14.0	49.0	55.2	15.7	28.5	660.5	14.9	16.3	5.6	40.4	59.7	0.0
SD	0.0	0.8	1.3	2.7	1.6	0.1	1.2	46.0	0.9	0.8	0.3	17.6	17.6	0.0
3Cl #1	17.9	6.98	13.6	37.5	53.7	19.5	36.3	534	17.2	17	5.8	4.3	95.7	0
3Cl #2	44.2	4.61	10.8	27.3	59.2	23.4	39.6	557	17.1	18.4	5.8	6.1	93.9	0
Mean	31.1	5.8	12.2	32.4	56.5	21.5	38.0	545.5	17.2	17.7	5.8	5.2	94.8	0.0
SD	18.6	1.7	2.0	7.2	3.9	2.8	2.3	16.3	0.1	1.0	0.0	1.3	1.3	0.0
Hyd METOl #1	0.4	7.1	12	42	59.2	16.9	28.6	647	17.3	16	5.6	38.5	61.5	0
Hyd METOl #2	0.3	8.27	13.8	48	58	16.7	28.8	479	15.2	15.2	5.6	33.7	66.3	0
Mean	0.4	7.7	12.9	45.0	58.6	16.8	28.7	563.0	16.3	15.6	5.6	36.1	63.9	0.0
SD	0.1	0.8	1.3	4.2	0.8	0.1	0.1	118.8	1.5	0.6	0.0	3.4	3.4	0.0
Me_RA #1	1.5	7.96	12.9	45.4	57	16.2	28.4	551	17	16.9	5.8	29.6	70.4	0
Me_RA #2	3.3	8.24	13.1	46.3	56.2	15.9	28.3	514	15.2	16.8	5.6	39.9	57.4	2.7
Mean	2.4	8.1	13.0	45.9	56.6	16.1	28.4	532.5	16.1	16.9	5.7	34.8	63.9	1.4
SD	1.3	0.2	0.1	0.6	0.6	0.2	0.1	26.2	1.3	0.1	0.1	7.3	9.2	1.9
2CF3 #1	1.4	8.37	13.3	48	57.3	15.9	27.7	634	15.5	17	5.6	32.9	67.1	0
2CF3 #2	0.5	7.4	12.5	45	60.8	16.9	27.8	549	17.6	17	5.8	43.3	56.7	0
Mean	1.0	7.9	12.9	46.5	59.1	16.4	27.8	591.5	16.6	17.0	5.7	38.1	61.9	0.0
SD	0.6	0.7	0.6	2.1	2.5	0.7	0.1	60.1	1.5	0.0	0.1	7.4	7.4	0.0
35Cl #1	4	7.38	13.4	42.8	58	18.2	31.3	516	16.3	16.9	5.6	31.3	68.7	0
35Cl #2	0.6	6.9	13	40.6	58.8	18.8	32	626	15.7	17.4	5.4	20.7	79.3	0
Mean	2.3	7.1	13.2	41.7	58.4	18.5	31.7	571.0	16.0	17.2	5.5	26.0	74.0	0.0
SD	2.4	0.3	0.3	1.6	0.6	0.4	0.5	77.8	0.4	0.4	0.1	7.5	7.5	0.0

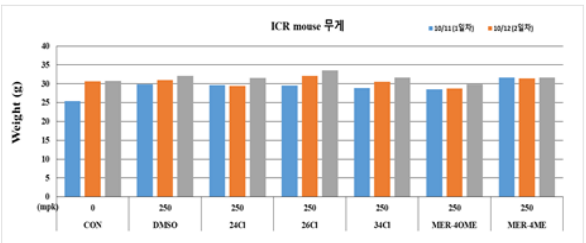
[그림 2-105. 3Cl, 23Cl, 35Cl, Hyd-Me-tol, MER-RA, 2CF3의 혈액분석 결과]

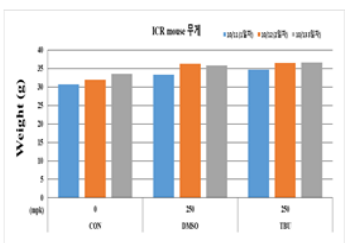
⑨ 24cl, 26cl, 34cl, MER-4OME, MER-4Me, TBU-RA 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 24cl, 26cl, 34cl, MER-4OME, MER-4Me, TBU-RA 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-106)

단회투여				투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	10/11 (1일차)	평균	10/12 (2일차)	평균	10/13 3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	0	24.9	25.45	30.6	30.65	30.3	30.8
	2			26		30.7		31.3	
	3	DMSO	250	30	29.9	30.8	31	32.1	32.05
	4			29.8		31.2		32	
	5	24Cl	250	30	29.6	30.3	29.45	31.6	31.5
	6			29.2		28.6		31.4	
	7	26Cl	250	29	29.55	31.6	32.1	32.3	33.55
	8			30.1		32.6		34.8	
	9	34Cl	250	28.5	28.85	30	30.55	31.4	31.7
	10			29.2		31.1		32	
	11	MER-4OME	250	27.4	28.5	27	28.8	31	29.85
	12			29.6		30.6		28.7	
	13	MER-4ME	250	31.4	31.6	30.9	31.4	31.1	31.7
	14			31.8		31.9		32.3	
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	10/11 (1일차)	평균	10/12 (2일차)	평균	10/13 3일차)	평균
P.O (경구투여)	15	CON	0	29.1	30.65	30.5	32	31.8	33.55
	16			32.2		33.5		35.3	
	17	DMSO	250	34.7	33.35	37.5	36.25	37.4	35.8
	18			32		35		34.2	
	19	TBU	250	35	34.65	37	36.45	36.9	36.65
	20			34.3		35.9		36.4	





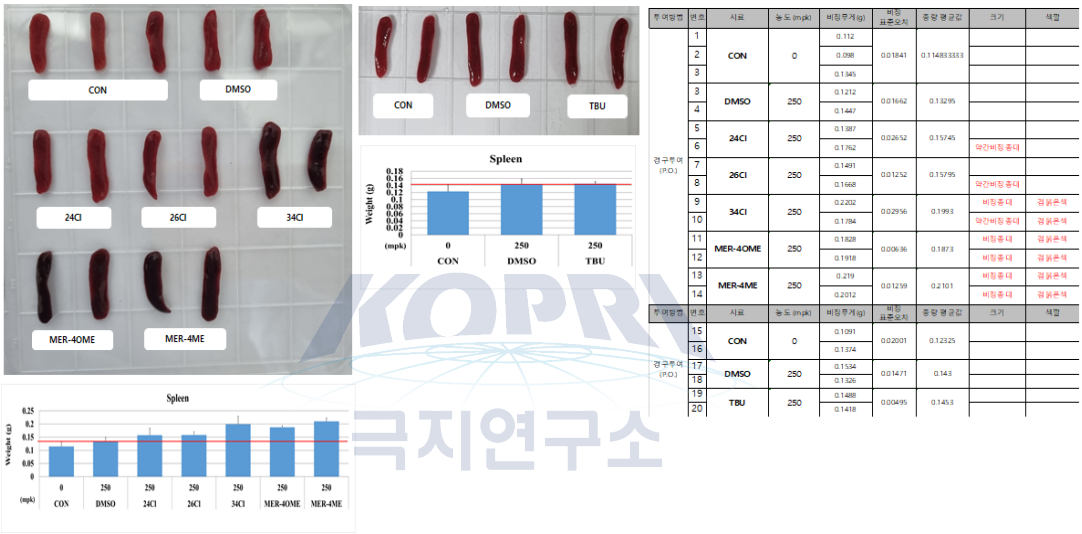
[그림 2-106. 24cl, 26cl, 34cl, MER-4OME, MER-4Me, TBU-RA 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 24cl, 26cl, 34cl, MER-4OME, MER-4Me, TBU-RA 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 24Cl, 26Cl, 34Cl, MER-4OME, MER-4Me 약물 처리군은 비장 중량이 증가 된 것을 관찰함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 34Cl, MER-4OME, MER-4Me 약물 처리군에서 비장의 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 확인함(그림 2-107)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	중량 평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	0.112	0.01841	0.11483333		
	2			0.098				
	3			0.1345				
	3	DMSO	250	0.1212	0.01662	0.13295		
	4			0.1447				
	5	24Cl	250	0.1387	0.02652	0.15745		
	6			0.1762			약간비장종대	
	7	26Cl	250	0.1491	0.01252	0.15795		
	8			0.1668			약간비장종대	
	9	34Cl	250	0.2202	0.02956	0.1993	비장종대	검붉은색
	10			0.1784			약간비장종대	검붉은색
	11	MER-4OME	250	0.1828	0.00636	0.1873	비장종대	검붉은색
	12			0.1918			비장종대	검붉은색
	13	MER-4ME	250	0.219	0.01259	0.2101	비장종대	검붉은색
	14			0.2012			비장종대	검붉은색
투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	중량 평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O.)	15	CON	0	0.1091	0.02001	0.12325		
	16			0.1374				
	17	DMSO	250	0.1534	0.01471	0.143		
	18			0.1326				
	19	TBU	250	0.1488	0.00495	0.1453		
	20			0.1418				

[그림 2-107. 24cl, 26cl, 34cl, MER-4OME, MER-4Me, TBU-RA의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) 34Cl, MER-4OME, MER-4Me 약물 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)가 대조군에 비해 크게 증가하였으며 이는 염증반응으로 인하여 백혈구 수치가 증가되었다고 예상됨(그림 2-108)

	No.	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW	PDW	MPV	NEU%	LYM%	MON%
con	1	2.3	8.62	13.3	48	55.7	15.4	27.7	779	14.8	15.5	5.8	28.8	71.2	0
	2	3.5	7.91	12.9	45.7	57.8	16.3	28.2	803	15.1	15	6	35.8	64.2	0
	3	1	8.65	13.7	47.9	55.4	15.8	28.6	644	14.9	15.8	6	35.5	64.5	0
	4	1.4	8.66	13.5	47.8	55.2	15.6	28.2	738	15	15.5	5.8	43.8	52.3	3.9
	5	1.8	8.59	13.7	48.7	56.7	15.9	28.1	927	13.4	16.3	5.8	38.6	58.5	2.9
	Mean	2.0	8.5	13.4	47.6	56.2	15.6	28.2	778.2	14.6	15.6	5.9	36.5	62.1	1.4
	SD	1.0	0.3	0.3	1.1	1.1	0.3	0.3	102.9	0.7	0.5	0.1	5.4	7.1	1.9
DMSO	1	2.3	7.79	12.4	43.4	55.7	15.9	28.6	907	15.4	16.3	5.8	41.3	58.7	0
	2	2.6	7.79	12.5	43.5	55.8	16	28.7	770	15.6	15.4	5.6	43.2	53.8	3
	3	0.6	7.95	13	44.9	56.5	16.4	29	676	13.6	15	6	26	74	0
	4	2.7	8.03	12.9	45.3	56.4	16.1	28.5	606	14.4	15.9	5.6	43.1	52.5	4.4
	Mean	2.1	7.9	12.7	44.3	56.1	16.1	28.7	739.8	14.8	15.7	5.8	38.4	59.8	1.9
	SD	1.0	0.1	0.3	1.0	0.4	0.2	0.2	130.2	0.9	0.6	0.2	8.3	9.9	2.2
24Cl	1	2.5	7.47	11.9	41.8	56	15.9	28.5	992	14.1	14.5	5.6	36.7	63.3	0
	2	0.8	7.63	12.2	43.3	56.7	16	28.2	867	14.9	15.9	6.2	30.2	69.8	0
	Mean	1.7	7.6	12.1	42.6	56.4	16.0	28.4	929.5	14.5	15.2	5.9	33.5	66.6	0.0
	SD	1.2	0.1	0.2	1.1	0.5	0.1	0.2	88.4	0.6	1.0	0.4	4.6	4.6	0.0
26Cl	1	0.4	7.65	11.8	41.3	54	15.4	28.6	847	15.7	15.1	5.4	30.2	69.8	0
	2	2.5	7.96	12.6	44.6	56	15.8	28.3	436	14.4	16.4	6	48.2	51.8	0
	Mean	1.5	7.8	12.2	43.0	55.0	15.6	28.5	641.5	15.1	15.8	5.7	39.2	60.8	0.0
	SD	1.5	0.2	0.8	2.3	1.4	0.3	0.2	290.6	0.9	0.9	0.4	12.7	12.7	0.0
34Cl	1	5.9	7.24	13.4	38.8	53.6	18.5	34.5	832	15.3	15.5	5.8	28.3	70.9	0.8
	2	15.6	6.72	13.9	38.1	56.7	20.7	36.5	725	15.1	16	5.6	2.9	97.1	0
	Mean	10.8	7.0	13.7	38.5	55.2	19.6	35.5	778.5	15.2	15.8	5.7	15.6	84.0	0.4
	SD	6.9	0.4	0.4	0.5	2.2	1.6	1.4	75.7	0.1	0.4	0.1	18.0	18.5	0.6
MER-4OME	1	22.1	6.65	15.5	35	51.1	22.6	44.3	646	15.7	15.5	5.8	1.5	98.5	0
	2	4.2	7.38	14.3	40.3	54.6	19.4	35.5	866	15.9	15.5	5.8	6.3	93.7	0
	Mean	13.2	7.1	14.9	37.7	52.9	21.0	39.9	756.0	15.8	15.5	5.8	3.9	96.1	0.0
	SD	12.7	0.4	0.8	3.7	2.5	2.3	6.2	155.6	0.1	0.0	0.0	3.4	3.4	0.0
MER-4ME	1	11.7	6.14	13.2	34.5	56.2	21.5	38.3	659	15.1	16	5.6	6.8	93.2	0
	2	5.5	6.22	12.6	35.2	56.6	20.3	35.8	666	15.4	16.9	5.8	3.9	96.1	0
	Mean	8.6	6.2	12.9	34.9	56.4	20.9	37.1	662.5	15.3	16.5	5.7	5.4	94.7	0.0
	SD	4.4	0.1	0.4	0.5	0.3	0.8	1.8	4.9	0.2	0.6	0.1	2.1	2.1	0.0
TBU	1	1.5	8.58	13.3	45.8	53.4	15.5	29	690	14.2	15.2	5.4	33.6	66.4	0
	2	1.5	8.66	13.9	47.6	55.2	16.1	29.1	726	13.9	15.5	5.6	36.4	63.6	0
	Mean	1.5	8.6	13.6	46.6	54.3	15.8	29.1	708.0	14.1	15.4	5.5	35.0	65.0	0.0
	SD	0.0	0.1	0.4	1.4	1.3	0.4	0.1	25.5	0.2	0.2	0.1	2.0	2.0	0.0

[그림 2-108. 24cl, 26cl, 34cl, MER-4OME, MER-4Me, TBU-RA의 혈액분석 결과]

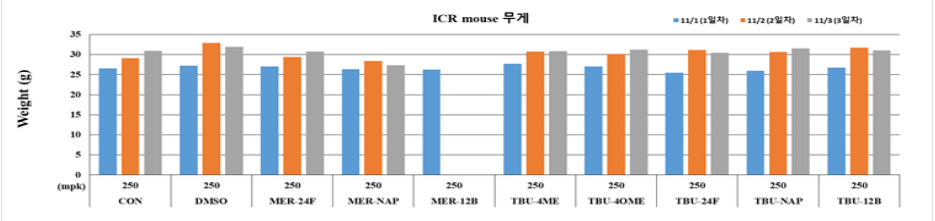
⑩ MER-24F, MER-NAP, TBU-24F, TBU-NAP, TBU-12B, TBU-4ME, TBU-4OME 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 MER-24F, MER-NAP, TBU-24F, TBU-NAP, TBU-12B, TBU-4ME, TBU-4OME 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-109)

KOPRI 극지연구소

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	11/1 (1일차)	평균	11/2 (2일차)	평균	11/3 (3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	250	빨	26.8	26.5	29.5	29.1	32.1	30.9
	2			파	25.3		29		29.8	
	3				27.4		28.8		30.8	
	4	DMSO	250	빨	26.4	27.2	33.5	32.85	32	31.95
	5			파	28		32.2		31.9	
	6	MER-24F	250	빨	27.9	27	30.1	29.35	31.5	30.75
	7			파	26.1		28.6		30	
	8	MER-NAP	250	빨	27	26.35	30.3	28.4	29.5	27.35
	9			파	25.7		26.5		25.2	
	10	MER-12B	250	빨	26	26.3	사망	#DIV/0!	사망	#DIV/0!
	11			파	26.6		사망		사망	
	12	TBU-4ME	250	빨	27.2	27.7	31.3	30.75	30.7	30.85
	13			파	28.2		30.2		31	
	14	TBU-4OME	250	빨	27.7	27.05	30.5	30.15	31.4	31.2
	15			파	26.4		29.8		31	
	16	TBU-24F	250	빨	25.2	25.45	31.7	31.1	30.2	30.45
	17			파	25.7		30.5		30.7	
	18	TBU-NAP	250	빨	25.8	25.95	31	30.6	32	31.5
	19			파	26.1		30.2		31	
	20	TBU-12B	250	빨	26.6	26.7	32.2	31.7	31.1	31
	21			파	26.8		31.2		30.9	



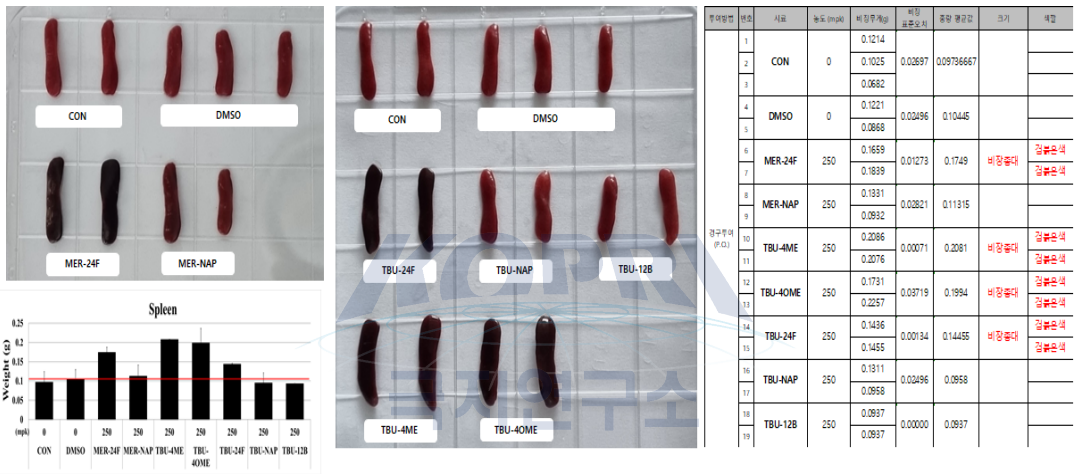
[그림 2-109. MER-24F, MER-NAP, TBU-24F, TBU-NAP, TBU-12B, TBU-4ME, TBU-4OME 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 MER-12B 약물 처리군은 투여 후 3시간 경 모두 사망함. 다른 약물 처리군은 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 MER-24F, MER-NAP, TBU-24F, TBU-NAP, TBU-12B, TBU-4ME, TBU-4OME 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 MER-24F, TBU-4ME, TBU-4OME, TBU-24F 약물 처리군은 비장 중량이 증가 된 것을 관찰함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 MER-24F, TBU-4ME, TBU-4OME, TBU-24F 약물 처리군에서 비장의 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 확인함(그림 2-110)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	종평 평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	0.1214	0.02697	0.09736667		
	2			0.1025				
	3			0.0682				
	4	DMSO	0	0.1221	0.02496	0.10445		
	5			0.0868				
	6	MER-24F	250	0.1659	0.01273	0.1749	비장종대	검붉은색
	7			0.1839				검붉은색
	8	MER-NAP	250	0.1331	0.02821	0.11315		
	9			0.0932				
	10	TBU-4ME	250	0.2086	0.00071	0.2081	비장종대	검붉은색
	11			0.2076				검붉은색
	12	TBU-4OME	250	0.1731	0.03719	0.1994	비장종대	검붉은색
	13			0.2257				검붉은색
	14	TBU-24F	250	0.1436	0.00134	0.14455	비장종대	검붉은색
	15			0.1455				검붉은색
	16	TBU-NAP	250	0.1311	0.02496	0.0958		
	17			0.0958				
	18	TBU-12B	250	0.0937	0.00000	0.0937		
	19			0.0937				

[그림 2-110. MER-24F, MER-NAP, TBU-24F, TBU-NAP, TBU-12B, TBU-4ME, TBU-4OME의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) MER-24F, MER-4OME, TBU-24F, TBU-4ME 약물 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)와 혈소판 수치(PLT)가 대조군에 비해 크게 증가하였고 호중구 비율(NEU %)이 감소하는 것을 확인함. 이는 염증반응으로 인한 증상으로 비장종대의 현상과 연관지어볼 수 있음(그림 2-111)

No.		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW	PDW	MPV	NEU%	LYM%	MON%
Control	CON_1	2.40	8.13	12.50	45.40	55.80	15.40	27.50	205.00	13.90	16.00	6.20	48.90	50.50	0.60
	CON_2	1.40	7.69	12.50	43.80	57.00	16.30	28.50	842.00	15.30	15.50	5.60	45.70	51.90	2.40
	CON_3	9.70	7.15	13.30	41.70	58.30	18.60	31.90	1066.00	16.00	15.50	5.80	7.00	93.00	0.00
	Mean	4.50	7.66	12.77	43.63	57.03	16.77	29.30	704.33	15.07	15.67	5.87	33.87	65.13	1.00
DMSO	DMSO_1	1.50	6.76	10.60	38.10	56.40	15.70	27.80	1091.00	14.70	15.40	5.80	48.10	51.10	0.80
	DMSO_2	1.70	5.44	8.90	30.90	56.80	16.40	28.80	489.00	14.70	15.40	5.60	22.40	77.60	0.00
	Mean	1.60	6.10	9.75	34.50	56.60	16.05	28.30	790.00	14.70	15.40	5.70	35.25	64.35	0.40
MER_NAP	MER_NAP_1	2.00	4.76	8.20	26.00	54.60	17.20	31.50	674.00	13.20	14.90	5.80	35.60	64.40	0.00
	MER_NAP_2	1.50	8.47	14.10	46.30	54.70	16.60	30.50	543.00	14.30	14.90	6.00	58.20	41.80	0.00
	Mean	1.75	6.62	11.15	36.15	54.65	16.90	31.00	608.50	13.75	14.90	5.90	46.90	53.10	0.00
MER_24F	MER_24F_1	46.40	6.62	15.10	35.60	53.80	22.80	42.40	749.00	14.60	15.90	6.20	3.20	96.80	0.00
	MER_24F_2	40.00	6.16	14.00	33.40	54.20	22.70	41.90	872.00	14.50	15.00	6.00	8.10	91.90	0.00
	Mean	43.20	6.39	14.55	34.50	54.00	22.75	42.15	810.50	14.55	15.45	6.10	5.65	94.35	0.00
TBU_4OME	TBV_40ME_1	9.90	6.07	13.10	33.90	55.80	21.60	38.60	831.00	13.60	15.40	6.20	12.30	87.70	0.00
	TBV_40ME_2	11.80	6.17	13.20	33.20	53.80	21.40	39.80	1271.00	15.10	14.20	5.80	11.30	88.70	0.00
	Mean	10.85	6.12	13.15	33.55	54.80	21.50	39.20	1051.00	14.35	14.80	6.00	11.80	88.20	0.00
TBU_24F	TBV_24F_1	38.60	5.50	12.70	29.60	53.80	23.10	42.90	774.00	13.80	15.40	5.80	3.70	96.30	0.00
	TBV_24F_2	23.30	5.04	11.20	27.10	53.80	22.20	41.30	1222.00	16.70	15.40	5.80	5.40	94.60	0.00
	Mean	30.95	5.27	11.95	28.35	53.80	22.65	42.10	998.00	15.25	15.40	5.80	4.55	95.45	0.00
TBU_4ME	TBV_4ME_1	15.40	5.20	11.30	29.20	56.20	21.70	38.70	920.00	16.40	14.20	5.80	5.80	94.20	0.00
	TBV_4ME_2	17.60	7.02	14.60	38.20	54.40	20.80	38.20	593.00	14.60	15.90	6.00	5.20	94.80	0.00
	Mean	16.50	6.11	12.95	33.70	55.30	21.25	38.45	756.50	15.50	15.05	5.90	5.50	94.50	0.00
TBU_12B	TBV_12V_1	3.30	7.60	12.10	42.30	55.70	15.90	28.60	416.00	14.40	16.80	5.60	39.60	60.40	0.00
	TBV_12V_2	0.90	7.98	12.60	43.90	55.00	15.80	28.70	703.00	14.60	14.60	5.80	49.20	46.90	3.90
	Mean	2.10	7.79	12.35	43.10	55.35	15.85	28.65	559.50	14.50	15.70	5.70	44.40	53.65	1.95
TBU_NAP	TBV_NAP_1	3.80	9.57	15.20	53.00	55.40	15.90	28.70	725.00	15.90	16.30	5.80	29.90	70.10	0.00
	TBV_NAP_2	2.10	6.54	10.30	35.40	54.10	15.70	29.10	821.00	15.50	15.00	6.00	29.10	70.90	0.00
	Mean	2.95	8.06	12.75	44.20	54.75	15.80	28.90	773.00	15.70	15.65	5.90	29.50	70.50	0.00

[그림 2-111. MER-24F, MER-NAP, TBU-24F, TBU-NAP, TBU-12B, TBU-4ME, TBU-4OME의 혈액분석 결과]

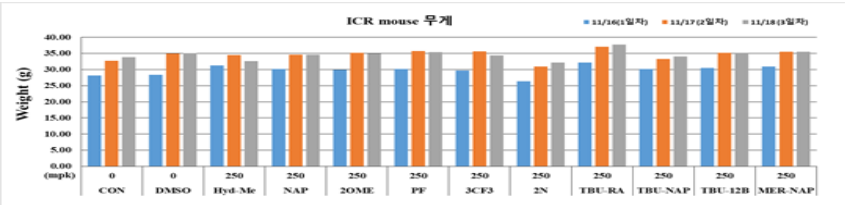
⑪ Hyd-ME, NAP, TBU-RA, TBU-12B, TBU-NAP, PF, 2OME, MER-NAP, $3CF_3$, 2N 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 Hyd-ME, NAP, TBU-RA, TBU-12B, TBU-NAP, PF, 2OME, MER-NAP, $3CF_3$, 2N 단회 투여와 관련된 체중 및 체중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-112)

KOPRI 극지연구소

단회투여					투여전 무게(g)		투여후 무게(g)			
투여방법	번호	시료	농도(mpk)	색구별	11/16(1일차)	평균	11/17 (2일차)	평균	11/18 (3일차)	평균
P.O (경구투여)	1	CON	0	검	27.2	28.17	32	32.77	34.8	33.83
	2			뱀	29.8		34.4		35	
	3			파	27.5		31.9		31.7	
	4	DMSO	0	검	30.1	28.4	35.5	34.9333	35.8	35.133
	5			뱀	28.2		34.6		33.6	
	6			파	26.9		34.7		36	
	7	Hyd-Me	250	뱀	31.2	31.25	32.5	34.5	31.5	32.6
	8			파	31.3		36.5		33.7	
	9	NAP	250	뱀	30.3	30.2	35.2	34.65	34.8	34.6
	10			파	30.1		34.1		34.4	
	11	2OME	250	뱀	30.6	29.95	35.8	35.2	36	35
	12			파	29.3		34.6		34	
	13	PF	250	뱀	30	30.15	35.6	35.8	34.8	35.4
	14			파	30.3		36		36	
	15	3CF3	250	뱀	29.2	29.7	36	35.65	33	34.4
	16			파	30.2		35.3		35.8	
	17	2N	250	뱀	27.2	26.4	31.7	31	32.9	32.2
	18			파	25.6		30.3		31.5	
	19	TBU-RA	250	뱀	32.8	32.15	37.1	37.05	38.6	37.8
	20			파	31.5		37		37	
	21	TBU-NAP	250	뱀	29.5	30.15	30.5	33.3	32.1	34.05
	22			파	30.8		36.1		36	
	23	TBU-12B	250	뱀	30.8	30.45	35.4	35.2	35.5	35.2
	24			파	30.1		35		34.9	
	25	MER-NAP	250	뱀	30.6	31	36.1	35.55	35.5	35.55
	26			파	31.4		35		35.6	



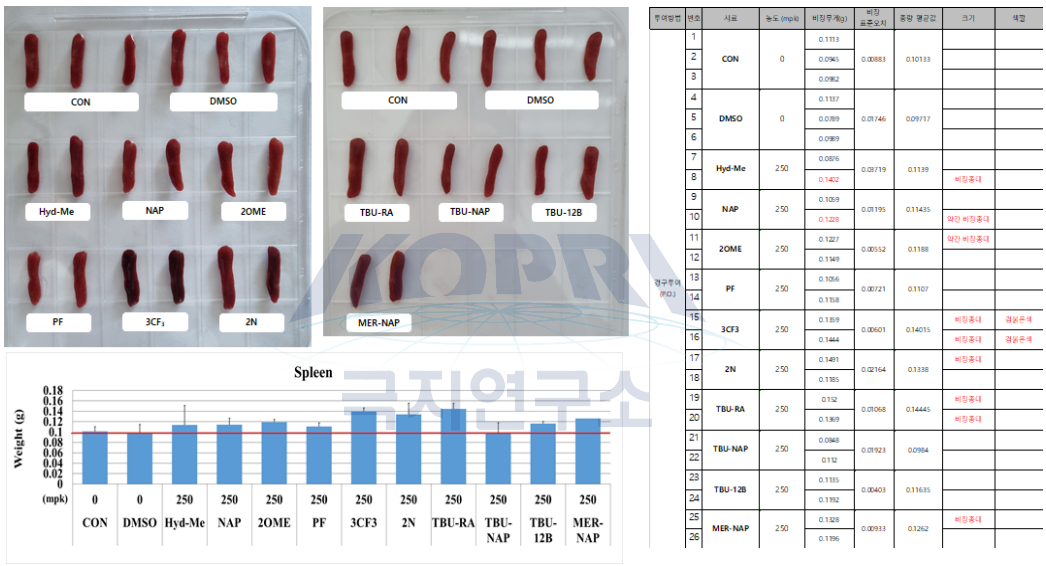
[그림 2-112. Hyd-ME, NAP, TBU-RA, TBU-12B, TBU-NAP, PF, 2OME, MER-NAP, $3CF_3$, 2N 약물처리 후 3일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

a) 250 mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 없었으며, 투여 3일 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) 라말린 유도체 Hyd-ME, NAP, TBU-RA, TBU-12B, TBU-NAP, PF, 2OME, MER-NAP, $3CF_3$, 2N 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 Hyd-Me, NAP, 2OME, 2N, MER-NAP 약물 처리군은 한 마리씩 비장 중량이 증가 된 것을 관찰되었으나 개체의 특성에 의한 비장 종대인지는 추후 확인해봐야 할 것으로 사료됨

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았으며 $3CF_3$ 약물 처리군에서 비장의 색이 검붉은색으로 변하는 비장종대의 모습을 확인함(그림 2-113)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	0.1113	0.00883	0.10133		
	2			0.0945				
	3			0.0982				
	4	DMSO	0	0.1197	0.01746	0.09717		
	5			0.0789				
	6			0.0989				
	7	Hyd-Me	250	0.0876	0.08719	0.1139		
	8			0.1402			비장종대	
	9	NAP	250	0.1059	0.01195	0.11435		
	10			0.1228			약간 비장종대	
	11	2OME	250	0.1227	0.00552	0.1188	약간 비장종대	
	12			0.1149				
	13	PF	250	0.1086	0.00721	0.1107		
	14			0.1158				
	15	3CF3	250	0.1859	0.00601	0.14015	비장종대	검붉은색
	16			0.1444			비장종대	검붉은색
	17	2N	250	0.1491	0.02164	0.1338	비장종대	
	18			0.1185				
	19	TBU-RA	250	0.152	0.01068	0.14445	비장종대	
	20			0.1369			비장종대	
	21	TBU-NAP	250	0.0948	0.01923	0.0984		
	22			0.112				
	23	TBU-12B	250	0.1335	0.00401	0.11635		
	24			0.1192				
	25	MER-NAP	250	0.1328	0.00933	0.1262	비장종대	
	26			0.1196				

[그림 2-113. Hyd-ME, NAP, TBU-RA, TBU-12B, TBU-NAP, PF, 2OME, MER-NAP, $3CF_3$, 2N의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) PF, 2N 약물 처리군의 혈액에서 백혈구 수치(WBC)가 대조군에 비해 약간 증가하였고 이는 염증반응으로 인하여 백혈구 수치가 증가되었다고 예상됨(그림 2-114)

	No.	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW	PDW	MPV	NEU%	LYM%	MON%
CON	1	2.2	8.61	13.5	47.9	55.6	15.7	28.2	174	13.5	16.7	6.4	47.8	48.3	3.9
	2	1.9	8.21	13	46	56	15.8	28.3	716	14	14.5	6.2	49.3	48.3	2.4
	3	3.1	8.29	13.2	45.5	54.9	15.9	29	181	12.9	15.8	6.5	63.1	35.6	1.3
	Mean	2.4	8.4	13.2	46.5	55.5	15.8	28.5	357.0	13.5	15.7	6.4	53.4	44.1	2.5
	SD	0.6	0.2	0.3	1.3	0.6	0.1	0.4	310.9	0.6	1.1	0.2	8.4	7.3	1.3
DMSO	1	3.6	8.27	12.6	45.1	54.5	15.2	27.9	471	12.6	16.4	5.8	26.8	73.2	0
	2	1.8	7.4	11.6	41.4	55.9	15.7	28	92	13.2	17.3	6.2	25.7	74.3	0
	3	5	9.48	14.6	53.2	56.1	15.4	27.4	270	13.3	17.3	6.2	36.4	63.6	0
	Mean	3.5	8.4	12.9	46.6	55.5	15.4	27.8	277.7	13.0	17.0	6.1	29.6	70.4	0.0
	SD	1.8	1.0	1.5	6.0	0.9	0.3	0.3	189.6	0.4	0.5	0.2	5.9	5.9	0.0
HYD-ME	1	3.6	11.2	17.5	61	54.6	15.7	28.7	715	13.5	15.4	5.8	48.1	48.7	3.2
	2	2.7	7.89	12.6	44.9	56.9	16	28.1	701	13	15.4	5.6	20	80	0
	Mean	3.2	9.5	15.1	53.0	55.8	15.9	28.4	708.0	13.3	15.4	5.7	34.1	64.4	1.6
	SD	1.0	5.2	8.2	28.3	31.7	9.0	16.2	299.4	7.4	8.6	3.2	21.5	37.2	1.8
NAP	1	1.3	8.03	12.3	43.4	54	15.3	28.3	727	12.9	16.3	5.8	24	76	0
	2	0.9	8.07	12.7	44.2	54.8	15.7	28.7	651	13.6	15.9	6	46.4	50	3.6
	Mean	1.1	8.1	12.5	43.8	54.4	15.5	28.5	689.0	13.3	16.1	5.9	35.2	63.0	1.8
	SD	0.2	1.7	2.5	9.0	13.1	3.8	7.1	226.1	3.4	4.3	1.6	13.7	19.8	1.8
2OME	1	2.7	6.57	10.2	35.6	54.2	15.5	28.7	715	12.8	14.2	5.8	45.4	52.3	2.3
	2	3.8	9.22	14.1	49.9	54.1	15.3	28.3	396	13.2	15	6	33.8	66.2	0
	Mean	3.3	7.9	12.2	42.8	54.2	15.4	28.5	555.5	13.0	14.6	5.9	39.6	59.3	1.2
	SD	1.8	3.8	5.9	20.8	23.7	6.7	12.4	247.3	5.8	5.9	2.5	16.0	23.8	1.2
PF	1	9.7	5.75	9.3	32.5	56.5	16.2	28.6	1286	13	15.9	6	37.7	62.3	0
	2	3.7	7.45	11.8	41.4	55.6	15.8	28.5	1025	12.6	15	5.8	42.4	54.7	2.9
	Mean	6.7	6.6	10.6	37.0	56.1	16.0	28.6	1155.5	12.8	15.5	5.9	40.1	58.5	1.5
	SD	4.1	1.8	3.0	10.3	18.7	5.4	9.3	540.3	4.2	5.5	2.0	14.1	20.4	1.5
3CF3	1	2.2	7.85	13.6	40.1	51.1	17.3	33.9	688	13.4	14.9	5.8	28.4	71.6	0
	2	2.7	6.77	12.3	36.1	53.3	18.2	34.1	678	13.2	15	6	27.7	72.3	0
	Mean	2.5	7.3	13.0	38.1	52.2	17.8	34.0	683.0	13.3	15.0	5.9	28.1	72.0	0.0
	SD	1.0	3.2	5.8	16.1	19.4	7.2	14.2	82.5	5.3	5.5	2.3	8.1	29.8	0.8
2N	1	3.8	9.44	15.6	50.6	53.6	16.5	30.8	260	14.6	15.4	6.4	41.4	58.6	0
	2	4.1	6.93	12.8	38.7	55.8	18.5	33.1	179	14	16.7	6.2	39	61	0
	Mean	4.0	8.2	14.2	44.7	54.7	17.5	32.0	219.5	14.3	16.1	6.3	40.2	59.8	0.0
	SD	1.7	3.1	5.0	17.5	20.4	6.0	10.3	88.9	5.2	6.2	2.3	18.6	17.4	0.5
TBU-RA	1	2.9	6.22	9.8	34.5	55.5	15.8	28.4	925	13	14.9	5.8	24.6	75.4	0
	2	2.1	10.8	16.6	59.9	55.4	15.3	27.7	415	13.3	15.4	6.2	47.7	47.8	4.5
	Mean	2.5	8.5	13.2	47.2	55.5	15.6	28.1	670.0	13.2	15.2	6.0	36.2	61.6	2.3
	SD	0.6	3.9	5.8	21.3	20.2	5.5	10.3	421.4	4.6	5.2	2.1	15.4	29.0	2.5
TBU_NAP	1	4.5	9.42	15.5	53.3	56.6	16.5	29.1	547	13.5	15.9	5.6	63.7	33.2	3.1
	2	2.4	8.28	12.7	45.4	54.8	15.3	28	725	13.1	15	6	27.6	72.4	0
	Mean	3.5	8.9	14.1	49.4	55.7	15.9	28.6	636.0	13.3	15.5	5.8	45.7	52.8	1.6
	SD	1.9	2.9	5.0	16.6	20.5	6.0	10.6	152.5	5.0	5.9	2.1	25.1	23.9	1.6
TBU_12B	1	1.1	8.1	12.6	45.8	56.5	15.6	27.5	859	12.8	15.8	6.2	35.9	64.1	0
	2	1.7	8.31	13	47.1	56.7	15.6	27.6	656	14.2	14.9	6	47.7	51.6	0.7
	Mean	1.4	8.2	12.8	46.5	56.6	15.6	27.6	757.5	13.5	15.4	6.1	41.8	57.9	0.4
	SD	0.4	3.0	4.5	17.2	20.8	5.5	9.8	363.7	4.9	5.5	2.3	11.3	20.6	0.8
MER_NAP	1	2.3	8.04	13.6	45	56	16.9	30.2	613	13.5	15.4	5.6	23.8	76.2	0
	2	8.3	9.15	15.1	52	56.8	16.5	29	475	13.6	15	6.5	32.4	67.6	0
	Mean	5.3	8.6	14.4	48.5	56.4	16.7	29.6	544.0	13.6	15.2	6.1	28.1	71.9	0.0
	SD	4.1	3.3	5.7	18.4	20.5	6.5	11.4	124.9	5.0	5.6	2.2	10.6	30.0	0.5

[그림 2-114. Hyd-ME, NAP, TBU-RA, TBU-12B, TBU-NAP, PF, 2OME, MER-NAP, $3CF_3$, 2N의 혈액분석 결과]

KOPRI 극지연구소

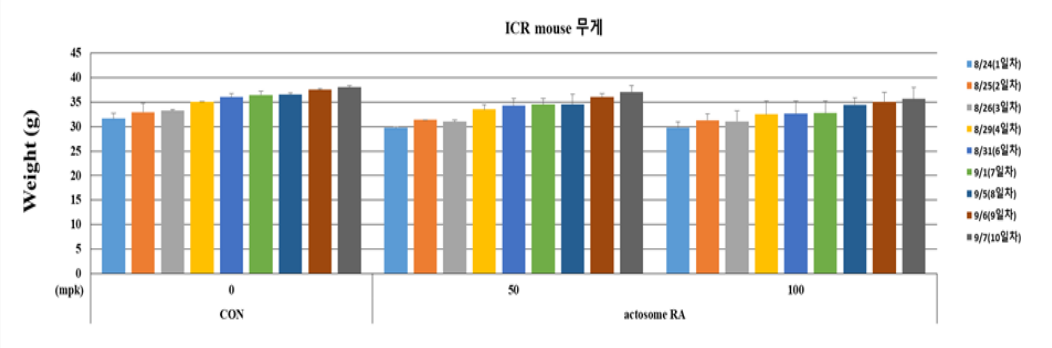
- 반복 투여 독성

① Actosome ramalin 반복투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 약물의 반복투여 시 독성을 확인하기 위하여 50, 100 mpk의 농도로 5일간 경구 투여함

b) actosome ramalin 50, 100 mpk 약물 처리시 약물에 의한 체중 감소는 보이지 않았으며 대조군과 비슷한 양상으로 체중 증가량 보였음(그림 2-115)

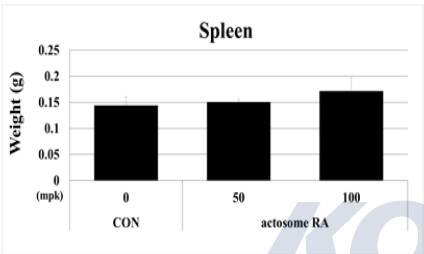


[그림 2-115. Actosome ramalin 약물처리 후 10일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

a) 총 5회 1일 1회 반복투여 동안 사망례는 실험 전 기간 동안 관찰되지 않았으며, 최종 투여 5회차 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) Actosome ramalin 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 actosome ramalin 100 mpk 약물 처리군은 비장 중량이 약간 증가 된 것을 관찰되었으나 개체의 특성에 의한 비장 종대인지는 추후 확인해봐야 할 것으로 사료됨(그림 2-116)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	색(원호)	비장무게(g)	비장 표준오차	중량 평균값	색깔	크기
경구투여 (P.O.)	1	CON	0	빨(1번)	0.1317	0.01697	0.1437		
	2			파(2번)	0.1557				
	3	actosome RA	50	빨(1번)	0.1546	0.00552	0.1507		
	4			파(2번)	0.1468				
	5		100	빨(1번)	0.1536	0.02553	0.17165		약간 비장 종대
	6			파(2번)	0.1897				

[그림 2-116. Actosome ramalin의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

KOPRI 극지연구소

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) Actosome ramalin 약물 처리군의 혈액 분석 결과 대조군과 거의 흡사한 수치로 분석되었음(그림 2-117)

Sample Name	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW	PDW	MPV	NEU%	LYM%	MON%
CON #1	1.7	8.11	5.3	48.5	59.8	6.5	10.9	724	14.3	16.9	5.6	18	82	0
CON #2	1.7	9.35	7.1	51.3	54.9	7.6	13.8	485	13.6	17	5.8	33.1	66.9	0
Mean	1.7	8.7	6.2	49.9	57.4	7.1	12.4	604.5	14.0	17.0	5.7	25.6	74.5	0.0
SD	0.0	0.9	1.3	2.0	3.5	0.8	2.1	169.0	0.5	0.1	0.1	10.7	10.7	0.0
A-RA-50 #1	1.4	8.71	7.6	45.8	52.6	8.7	16.6	700	15.9	15.9	5.4	20.5	79.5	0
A-RA-50 #2	1.4	8.54	16.4	46.7	54.7	19.2	35.1	535	14.4	17.5	5.6	31.5	67.3	1.2
Mean	1.4	8.6	12.0	46.3	53.7	14.0	25.9	617.5	15.2	16.7	5.5	26.0	73.4	0.6
SD	0.0	0.1	6.2	0.6	1.5	7.4	13.1	116.7	1.1	1.1	0.1	7.8	8.6	0.8
A-RA-100 #1	1.1	8.57	14.4	46.5	54.3	16.8	31	300	14.1	16.4	6	43.4	54.5	2.1
A-RA-100 #2	1.4	7.55	7.4	41.6	55.1	9.8	17.8	737	14.4	17.4	5.6	18.7	81.3	0
Mean	1.3	8.1	10.9	44.1	54.7	13.3	24.4	518.5	14.3	16.9	5.8	31.1	67.9	1.1
SD	0.2	0.7	4.9	3.5	0.6	4.9	9.3	309.0	0.2	0.7	0.3	17.5	19.0	1.5

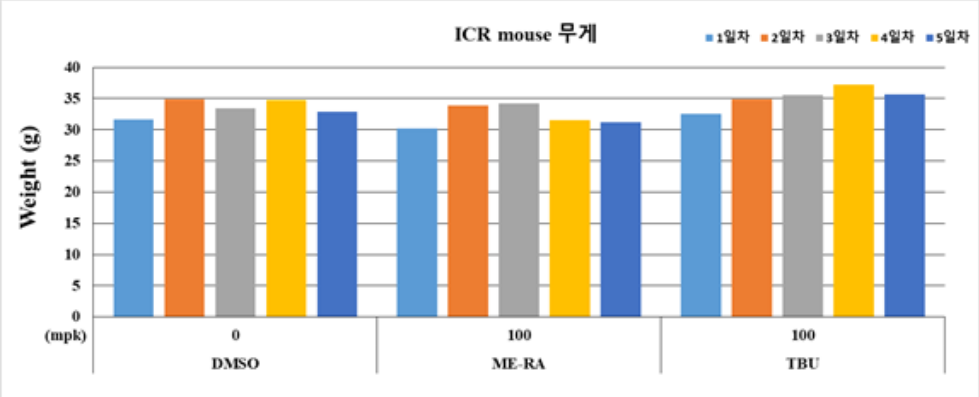
[그림 2-117. Actosome ramalin 50, 100 mpk의 혈액분석 결과]

② MER-RA, TBU-RA 반복투여 독성 확인

ⅰ) 무게(Body) 측정

a) 약물의 반복투여 시 독성을 확인하기 위하여 100 mpk의 농도로 5일간 경구 투여함

b) MER-RA, TBU-RA 100 mpk 약물 처리시 약물에 의한 체중 감소는 보이지 않았으며 대조군과 비슷한 양상으로 체중 증가량 보였음(그림 2-118)

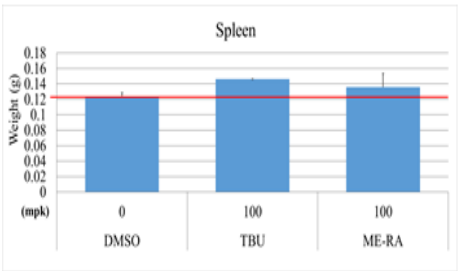


[그림 2-118. MER-RA, TBU-RA 약물처리 후 5일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ⅱ) 비장 관찰

a) 총 5회 1일 1회 반복투여 동안 사망례는 실험 전 기간 동안 관찰되지 않았으며, 최종 투여 5회차 후 최종 부검일에 모든 실험동물을 희생함

b) MER-RA, TBU-RA 경구 투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과, 대체 대조군(vehicle)에 비해 TBU-RA, MER-RA 처리군 한 마리씩 비장의 중량이 약간 증가 된 것을 관찰되었으나 개체의 특성에 의한 비장 종대인지는 추후 확인해봐야 할 것으로 사료됨(그림 2-119)



투여방법	번호	시료	농도 (mpk)	비장무게(g)	비장 표준오차	중량 평균값	크기	색깔
경구투여 (P.O.)	1	DMSO	0	0.1202	0.00481	0.1236		
	2			0.127				
	3	TBU	100	0.1464	#DIV/0!	0.1464	약간 비장종대	
	4							
	5	ME-RA	100	0.1234	0.01761	0.13585		
	6			0.1483			약간 비장종대	

[그림 2-119. MER-RA, TBU-RA의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함

b) MER-RA, TBU-RA 약물 처리군의 혈액 분석 결과 대조군과 거의 흡사한 수치로 분석되었음(그림 2-120)

	No.	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW	PDW	MPV	NEU%	LYM%	MON%
DMSO-Re	1	2.3	8.57	14	49.2	57.4	16.3	28.5	669	14.8	16.9	5.6	33.7	66.3	0
	2	2.5	9.24	14.3	48.9	52.9	15.5	29.2	532	14.3	16.6	5.4	44.8	53.8	1.4
	Mean	2.4	8.9	14.2	49.1	55.2	15.9	28.9	600.5	14.6	16.8	5.5	39.3	60.1	0.7
	SD	0.1	0.5	0.2	0.2	3.2	0.6	0.5	96.9	0.4	0.2	0.1	7.8	8.8	1.0
ME-RA-Re	1	2	8.46	13.5	46.8	55.3	16	28.8	581	14.6	16	5.4	40.2	59.8	0
	2	0.9	9.82	15.2	53.1	54.1	15.5	28.6	598	14.3	16	5.4	29.3	70.7	0
	Mean	1.5	9.1	14.4	50.0	54.7	15.8	28.7	589.5	14.5	16.0	5.4	34.8	65.3	0.0
	SD	0.8	1.0	1.2	4.5	0.8	0.4	0.1	12.0	0.2	0.0	0.0	7.7	7.7	0.0
TBU-Re	1	1.2	8.17	13.1	45.6	55.8	16	28.7	813	14.5	16	5.4	38.6	61.4	0
	2	1.4	8.88	13.5	47.7	53.7	15.2	28.3	791	14.8	15.1	5.4	26.2	73.8	0
	Mean	1.3	8.5	13.3	46.7	54.8	15.6	28.5	802.0	14.7	15.6	5.4	32.4	67.6	0.0
	SD	0.1	0.5	0.3	1.5	1.5	0.6	0.3	15.6	0.2	0.6	0.0	8.8	8.8	0.0

[그림 2-120. Actosome ramalin 50, 100 mpk의 혈액분석 결과]

- 결론 및 제언

① 라말린 및 라말린 유도체의 단회경구투여 및 반복경구투여 독성을 확인하기 위하여 실험동안의 사망례, 임상증상, 체중변화, 장기중량의 변화, 육안부검소견 등을 종합적으로 관찰함. 부검을 통해 육안으로 확연하게 변화를 관찰할 수 있었던 비장종대는 노화나 손상된 적혈구를 파괴하는 비장의 기능이 과도하게 발생하는 것으로 혈액질환이나 간기능 이상으로 인한 빈혈, 출혈 등으로 인해 용혈된 적혈구 및 세포막이 단단해진 적혈구가 비장 내 좁은 모세혈관(직경 4 μM)을 통과하지 못하고 축적되거나 통과하는 동안 용혈되어 비장 내에 축적되어 발생함(Motulsky AG *et al*, 1958)

② 라말린 유도체 PYD, 2Q, 2N, Sali, G02, G04, G05, 24Cl, 26Cl 단회투여시 장기의 크기 변화나 체중변화 등 정상적이였으며, 비장종대가 약간 일어났으나 비장의 색이나 다른 증상들이 양호하였음

③ 본 연구에서는 라말린 유도체 4Me, 3Cl, 2F, 4F, 3Me, 34Me, 3N, 34F, 4OME_boc, 24F_boc, 2Cl_boc, 24Cl_boc, E01, Ra+Vit, 2Cl, 4Cl, NAP, 2OH-4Me, MER-RA, 3Cl, 34Cl, 35Cl, MER-4OME, MER-4ME, MER-24F, TBU-4ME, TBU-4OME, TBU-24F, $3CF_3$ 단회투여 후 적혈구 성숙 혹은 세포막에 영향이 가해져 그로 인한 비장 내 적혈구가 축적되어 비장종대가 생겨나며 용혈로 인한 비장의 색이 검붉은색으로 변한 것으로 판단됨

④ 따라서 라말린 유도체 4Me, 3Cl, 2F, 4F, 3Me, 34Me, 3N, 34F, 4OME_boc, 24F_boc, 2Cl_boc, 24Cl_boc, E01, Ra+Vit, 2Cl, 4Cl, NAP, 2OH-4Me, MER-RA, 3Cl, 34Cl, 35Cl, MER-4OME, MER-4ME, MER-24F, TBU-4ME, TBU-4OME, TBU-24F, $3CF_3$ 시료에 대해서는 동물이 사망하거나 사망하지 않더라도 적혈구에 직접적으로 손상을 일으켜 비장종

대를 유발하고 빈혈이 발생하게 하며 결국 사망에 이르게 하므로 동물에 강한 독성을 나타낸다고 할 수 있음. 따라서 독성을 나타낸 시료 외의 라말린 유도체 중 알츠하이머 활성을 나타낸 라말린 유도체에 대한 선별이 필요하다고 판단됨

사. 3차 동물실험(단회투여 독성)

- 동물 준비

① 4주령 수컷의 ICR 마우스를 준비하여 1주일간 실험실 내 환경에 적응할 수 있는 순화 과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도(20-24 ℃)와 습도(48-52 %)가 조절된 사육실에서 마우스용 케이지에 4마리씩 수용하여 사육함. 명암주기(light:dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(DBL, Korea)와 음수는 자유롭게 공급함. 실험이 ㅣ작될 때 동물의 무게는 29~35 g이 되도록 하였음. 실험군 당 반복수는 3마리로 진행하고, 경구투여를 위한 실험동물군은 15시간 절식시킴

- 군분리 및 약물의 투여

① 실험동물은 군당 3마리씩 1군으로 구분함. 최고 용량은 250mg/kg(250mpk)으로 설정하였음. 수컷에 대한 매체 대조군(vehicle)을 추가함

② 라말린 유도체를 멸균생리식염수와 용해도가 좋지 않은 시료에 대해서는 DMSO에 용해시켜 스테인리스 존데와 1 mL 주사기를 이용하여 경구투여하였으며, 매체 대조군에는 동일한 용량의 멸균생리식염수만 공급함. 식이와 음수에 따른 약물의 흡수 변화를 최소화하기 위해 투여 후 대략 4시간 동안 사료와 음수 공급을 제한함

- 임상 증상 관찰

① 모든 실험동물의 임상증상을 투여 전후에 각각 동물의 행동, 자극에 대한 반응성, 각성도 및 경계성, 자세 및 보행 이상 등에 관한 일반증상을 관찰, 기록하였으며 투여일 이후에도 하루에 최소한 3번씩 모든 실험동물의 임상증상을 관찰, 기록함

- 체중 측정

① 모든 실험동물의 체중을 투여전 1일, 투여 후에 각각 측정하였으며 실험 시작 시 개체 차이에 따른 체중의 변화를 기록함

② 투여 1일 후 모든 실험동물은 18시간 동안 절식하였고 음수는 제한하지 않았으며, 아이프란액(isoflurane) 마취하에 부검을 실시함. 육안 부검 시 관찰한 주요 장기로는 비장, 간, 장 위주로 이상 육안소견을 각각 관찰, 기록함

아. 3차 동물실험(반복투여 독성)

- 동물 준비

① 7주령 수컷의 ICR 마우스를 준비하여 1주일간 실험실 내 환경에 적응할 수 있는 순화 과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도(20-24 ℃)와 습도(48-52 %)가 조절된 사육실에서 마우스용 케이지에 4마리씩 수용하여 사육함. 명암주기(light:dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료(DBL, Korea)와 음수는 자유롭게 공급함. 실험이 ㅣ작될 때 동물의 무게는 35~43 g이 되도록 하였음. 실험군 당 반복수는 5마리로 진행하고, 경구투여를 위한 실험동물군은 장기간 반복적으로 투여하여야 하므로 지속적으로 먹이를 공급함

- 약물 투여

① 경구 투여만으로 진행하였으며 단회투여 독성검사 결과를 반영하여 농도를 설정함. 투여 방법은 오직 경구 투여만으로 하였으며, 가장 높은 농도인 250mpk의 시료를 투여하였을 때 모든 처리군에서 특이점이 있는 행동이 없으며 모두 생존하였으므로 낮은 농도인 50mpk로 총 21일간 주당 5회 반복투여를 진행함

자. 3차 동물실험 연구결과

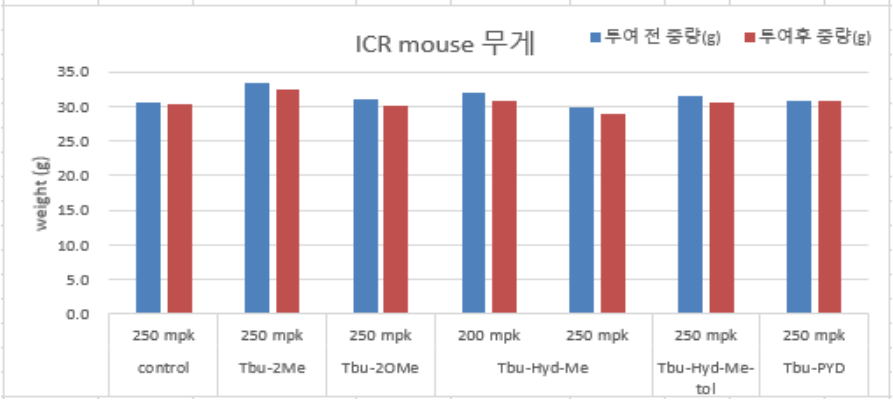
- 단회 투여 독성

① TBU-2Me, TBU-2OMe, TBU-Hyd-Me, TBU-PYD 단회투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 TBU-2Me, TBU-2OMe, TBU-Hyd-Me, TBU-PYD 단회 투여와 관련된 체중 및 제중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-121)

단회투여					투여 전 중량(g)		투여후 중량(g)	
투여방법	반복수	시료	농도	투여량(ul)	무게	평균	무게	평균
IP	1	control	250 mpk	200.0	29.7	30.7	29.5	30.2
IP	2				33.0		31.5	
IP	3				29.3		29.7	
IP	1	Tbu-2Me	250 mpk	200.0	33.6	33.3	32.7	32.4
IP	2				33.5		32.6	
IP	3				32.9		32.0	
IP	1	Tbu-2OMe	250 mpk	200.0	32.4	31.0	31.7	30.2
IP	2				30.3		29.4	
IP	3				30.3		29.4	
IP	1	Tbu-Hyd-Me	200 mpk	200.0	32.3	32.1	31.5	30.9
IP	2				31.8		30.2	
IP	3		250 mpk	200.0	31.3	29.9	30.4	29.0
IP	4				29.3		28.4	
IP	5				29.1		28.1	
IP	1	Tbu-Hyd-Me-tol	250 mpk	200.0	31.6	31.6	30.9	30.5
IP	2				32.1		31.3	
IP	3				31.0		29.4	
IP	1	Tbu-PYD	250 mpk	200.0	31.2	30.9	31.5	30.8
IP	2				31.2		30.6	
IP	3				30.4		30.4	



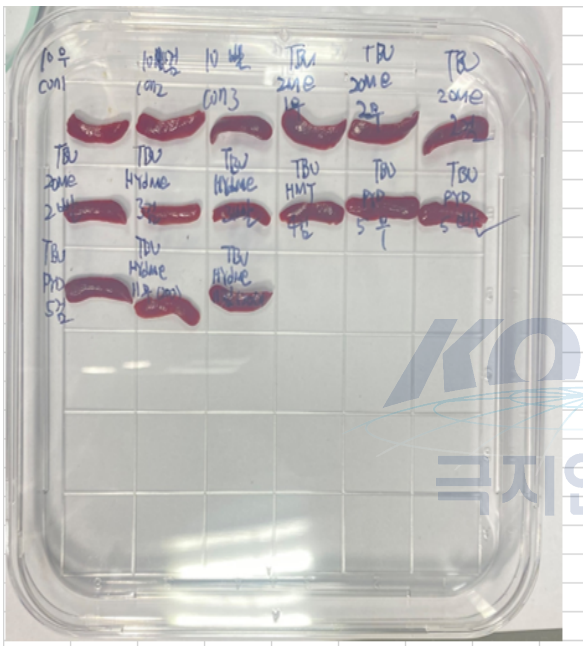
[그림 2-121. TBU-2Me, TBU-2OMe, TBU-Hyd-Me, TBU-PYD 약물처리 후 1일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

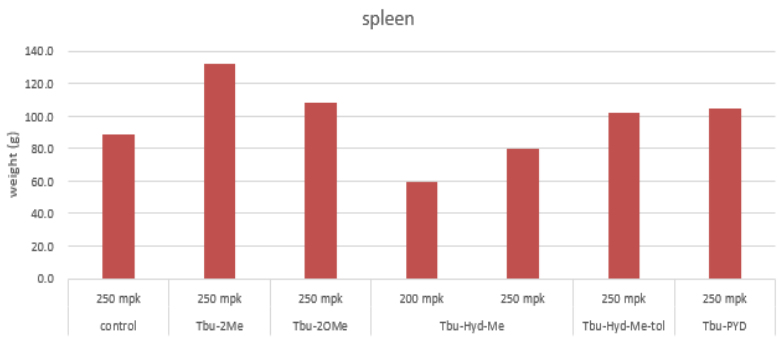
a) 250mpk 농도의 약물을 단회 복강투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체가 TBU-2Me에서 2마리, TBU-Hyd-Me에서 1마리, TBU-Hyd-Me에서 2마리가 존재함. 죽은 개체들은 모두 투여10분 이내에 발작증상을 보인 뒤 사망함

b) 라말린 유도체 TBU-2Me, TBU-2OMe, TBU-Hyd-Me, TBU-PYD 복강투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과 대조군 (vehicle)에 비해 체중비율을 감안했을시 TBU-2Me 250mpk 약물 처리군에서 비장의 중량이 증가함을 확인함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았음(그림 2-122)



단회투여						
투여방법	반복수	시료	농도	투여량(ul)	비장무게 (mg)	평균
IP	1	control	250 mpk	200.0	75.5	88.9
IP	2				83.0	
IP	3				108.2	
IP	1	Tbu-2Me	250 mpk	200.0		132.4
IP	2					
IP	3				132.4	
IP	1	Tbu-2OMe	250 mpk	200.0	113.7	108.4
IP	2				123.1	
IP	3				88.3	
IP	1	Tbu-Hyd-Me	200 mpk	200.0	57.0	59.9
IP	2				62.8	
IP	3		250 mpk	200.0		79.8
IP	4				70.4	
IP	5				89.2	
IP	1	Tbu-Hyd-Me-tol	250 mpk	200.0		102.2
IP	2				102.2	
IP	3					
IP	1	Tbu-PYD	250 mpk	200.0	103.4	104.8
IP	2				100.2	
IP	3				110.8	



[그림 2-122. TBU-2Me, TBU-2OMe, TBU-Hyd-Me, TBU-PYD의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구

수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함(그림 2-123)

Hematological parameters (Individual)

Group	Animal ID	Sample Quality	RBC ($\times10^6$ cells/μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices			PLT ($\times10^3$ cells/μL)	WBC ($\times10^3$ cells/μL)	WBC Differential Counting (%)				
						MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)			NEU	LYM	MONO	EOS	BASO
G1	control(무)		7.26	12.4	41.4	57.0	17.1	30.0	1198	1.56	53.9	41.0	4.5	0.6	0.0
	control(검)		8.13	13.7	46.8	57.6	16.9	29.3	1378	3.77	44.8	52.0	1.3	1.9	0.0
	control(빨)		7.12	12.2	41.9	58.8	17.1	29.1	1306	1.65	26.7	69.1	1.2	3.0	0.0
	Tbu-2Me(파)		7.88	13.1	45.7	58.0	16.6	28.7	1778	0.85	27.0	71.8	1.2	0.0	0.0
	Tbu-2OMe(무)		8.18	12.6	43.5	53.2	15.4	29.0	1577	2.90	55.9	43.1	0.7	0.3	0.0
	Tbu-2OMe(검)		8.51	13.5	46.8	55.0	15.9	28.8	1332	1.65	37.6	60.6	0.6	1.2	0.0
	Tbu-2OMe(빨)		8.80	13.5	46.2	52.5	15.3	29.2	903	2.72	59.6	38.2	0.7	1.5	0.0
	Tbu-Hyd-Me(검)		9.54	16.5	52.8	55.3	17.3	31.3	2712	2.02	98.5	0.0	1.0	0.5	0.0
	Tbu-Hyd-Me(빨)		8.21	13.7	46.0	56.0	16.7	29.8	1460	1.92	77.6	18.8	1.0	2.6	0.0
	Tbu-Hyd-Me 200(무)		9.12	14.5	49.5	54.3	15.9	29.3	1920	5.48	63.5	35.8	0.5	0.2	0.0
	Tbu-Hyd-Me 200(검)		8.52	13.3	47.1	55.3	15.6	28.2	1501	2.19	57.9	41.6	0.5	0.0	0.0
	Tbu-Hyd-Me-tol(검)		8.21	13.7	46.6	56.8	16.7	29.4	1389	1.18	58.6	38.1	2.5	0.8	0.0
	Tbu-PYD(무)		8.12	13.0	46.3	57.0	16.0	28.1	862	3.90	56.6	39.0	1.8	2.6	0.0
	Tbu-PYD(검)		7.26	12.4	42.9	59.1	17.1	28.9	1433	3.69	58.0	39.3	1.6	1.1	0.0
	Tbu-PYD(빨)		7.35	11.5	41.1	55.9	15.6	28.0	1722	4.87	96.8	0.8	1.6	0.8	0.0

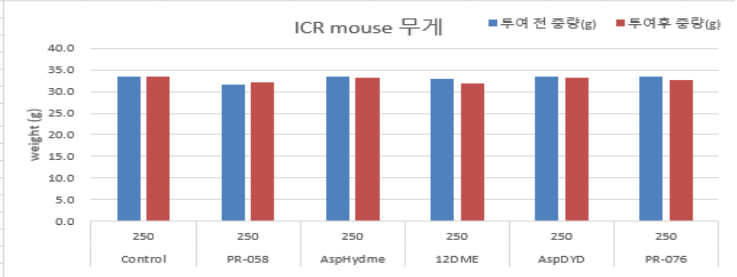
[그림 2-123. TBU-2Me, TBU-2OMe, TBU-Hyd-Me, TBU-PYD의 혈액분석 결과]

② RA-PR058, Asp-Hyd-Me, 12DME, Asp-DYD, PR076 단회 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 RA-PR058, Asp-Hyd-Me, 12DME, Asp-DYD, RA-PR076 단회 투여와 관련된 체중 및 제중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-124)

단회투여					투여 전 중량(g)		투여후 중량(g)	
투여방법	반복수	시료	농도	투여량(ul)	무게	평균	무게	평균
PO	1	Control	250	200.0	34		33.8	
PO	2				32.6	33.4	32.9	33.4
PO	3				33.5		33.6	
PO	1	PR-058	250	200.0	31.6		32	
PO	2				31.7	31.7	32.1	32.1
PO								
PO	1	AspHydme	250	200.0	33.6		33.2	
PO	2				33.6	33.6	33.3	33.2
PO	3				33.5		33.2	
PO	1	12DME	250	200.0	32.7		32.3	
PO	2				33.2	32.9	31.7	31.8
PO	3				32.7		31.5	
PO	1	AspDYD	250	200.0	33.4		33.2	
PO	2				33.8	33.4	33.4	33.1
PO	3				33.1		32.6	
PO	1	PR-076	250	200.0	33.3		32	
PO	2				33.4	33.4	33.3	32.7
PO	3				33.5		32.8	



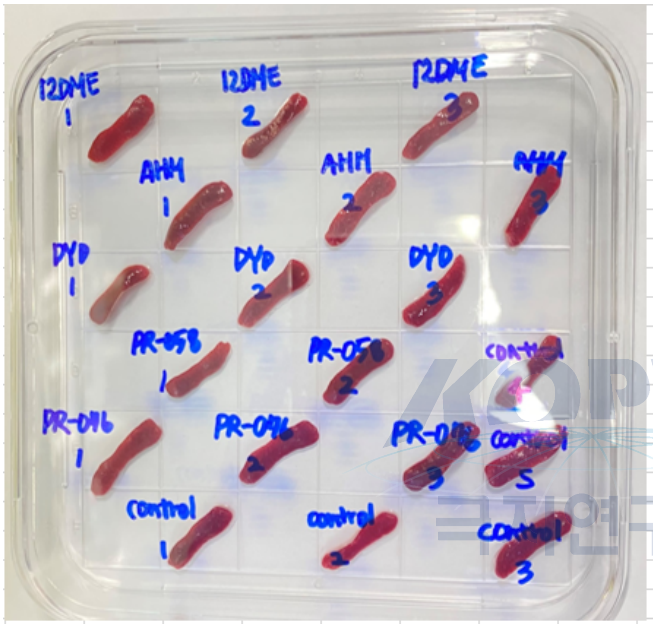
[그림 2-124. PR058, Asp-Hyd-Me, 12DME, Asp-DYD, PR076 약물처리 후 1일간의 ICR mouse 무게 변화 측정]

ii) 비장 관찰

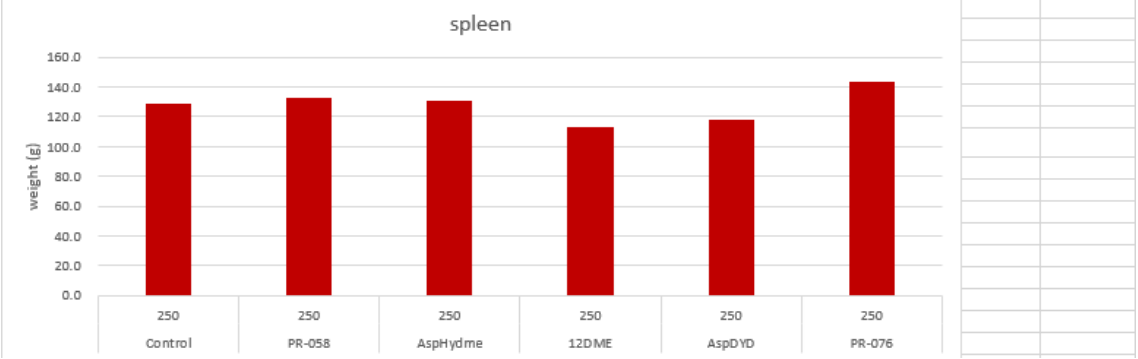
a) 250mpk 농도의 약물을 단회 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 존재하지 않았으며 RA-PR058의 경우 시료가 모자라 2마리로 실험을 진행함

b) 라말린 유도체 R-058, Asp-Hyd-Me, 12DME, Asp-DYD, RA-PR076 경구투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과 대조군 (vehicle)에 비해 비장의 중량이 크게 증가한 실험군은 없었음

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았음(그림 2-125)



단회투여				
투여방법	반복수	시료	비장무게	평균
PO	1	Control	137.6	128.7
PO	2		117.3	
PO	3		131.2	
PO	1	PR-058	100.9	132.3
PO	2		163.6	
PO				
PO	1	AspHydme	148.8	130.5
PO	2		115.9	
PO	3		126.7	
PO	1	12DME	115.3	112.2
PO	2		108.1	
PO	3		113.2	
PO	1	AspDYD	102.8	117.5
PO	2		130.8	
PO	3		118.9	
PO	1	PR-076	127.1	142.6
PO	2		149.2	
PO	3		151.6	



[그림 2-125. RA-PR058, Asp-Hyd-Me, 12DME, Asp-DYD, RA-PR076의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함(그림 2-126)

b) 몇몇의 혈액샘플에서 시료 배송중 혹은 혈액 채취중 Clot이 형성되어 일부 결과의 신뢰성이 떨어지지게 됨(그림 2-126)

Group	Animal ID	Sample Qulity	RBC ($\times10^6$ cells/μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC Indices MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT ($\times10^3$ cells/μL)	WBC ($\times10^3$ cells/μL)	MPV (fL)	Retic (x10^9 cells/L)	Retic (%)
	Control 1		9.00	14.5	53.5	59.5	16.1	27.1	1432	2.00	6.8	317.6	3.53
	Control 2		6.30	10.9	37.9	60.2	17.4	28.9	32	0.92	19.3	298.6	4.74
	Control 3		8.44	14.5	53.0	62.8	17.1	27.3	779	1.96	8.5	469.2	5.56
	PR-058 1		8.15	14.0	48.8	59.8	17.2	28.8	1462	1.27	6.5	395.7	4.85
	PR-058 2		8.87	14.4	52.2	58.9	16.3	27.7	1372	1.51	6.2	1002.6	11.31
	AspHydme 1		8.68	14.5	51.9	59.8	16.7	28.0	1496	2.09	6.5	388.3	4.47
	AspHydme 2		8.61	13.5	49.6	57.6	15.7	27.3	937	2.45	6.9	416.6	4.84
	AspHydme 3		9.12	14.5	51.9	57.0	16.0	28.0	1019	2.20	6.4	440.4	4.83
	12DME 1		8.10	13.4	46.9	57.9	16.6	28.7	1085	1.21	5.9	363.8	4.49
	12DME 2		5.88	10.3	35.6	60.5	17.5	28.9	20	0.89	13.9	272.2	4.63
	12DME 3		7.76	12.6	43.1	55.6	16.3	29.3	1098	2.41	6.1	382.7	4.93
	AspDYD 1		9.62	15.7	54.9	57.0	16.3	28.6	1255	2.76	6.3	385.5	4.01
	AspDYD 2		8.60	15.2	51.7	60.1	17.6	29.3	1398	2.43	6.8	388.8	4.52
	AspDYD 3		7.65	12.8	43.9	57.5	16.7	29.1	1262	1.25	6.1	394.6	5.16
	PR-076 1		8.19	13.1	46.7	57.0	16.0	28.0	1029	1.23	6.6	494.7	6.04
	PR-076 2		8.21	13.4	47.3	57.7	16.4	28.4	154	0.90	7.9	352.8	4.30
	PR-076 3		7.89	13.0	45.0	57.0	16.5	29.0	1387	1.99	7.4	533.2	6.76

노란색 = Clot 제거후 측정

KOPRI 극지연구소

[그림 2-126. RA-PR058, Asp-Hyd-Me, 12DME, Asp-DYD, RA-PR076의 혈액분석 결과]

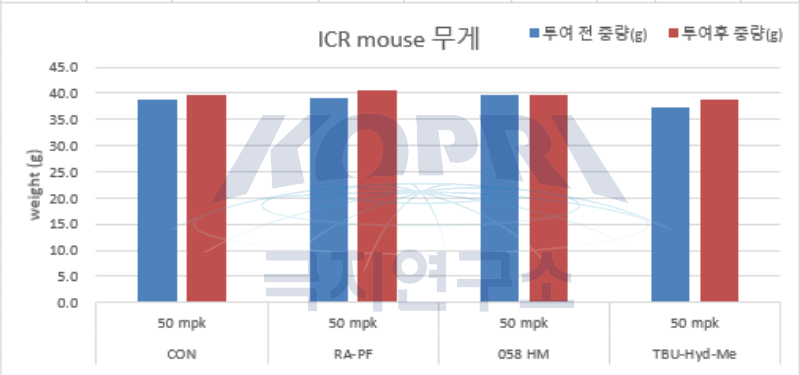
- 장기 투여 독성

① RA-PF, RA-058HM, TBU-Hyd-Me 장기투여 독성 확인

i) 무게(Body) 측정

a) 라말린 유도체 RA-PF, RA-058HM, TBU-Hyd-Me 장기 투여직전과 장기투여 종료에 관련된 체중 및 제중 증가량 변화는 관찰되지 않음(그림 2-127)

장기투여					투여 전 중량(g)		투여후 중량(g)	
투여방법	반복수	시료	농도	투여량(ul)	무게	평균	무게	평균
PO	1	CON	50 mpk	200.0	42.9	38.8	42.5	39.6
PO	2				40.9		41.2	
PO	3				36.6		36.2	
PO	4				35.5		38.2	
PO	5				38		40.1	
PO	1	RA-PF	50 mpk	200.0	42.2	39.2	43.4	40.5
PO	2				38.1		40.5	
PO	3				38.2		40	
PO	4				37.9		39	
PO	5				39.7		39.8	
PO	1	058 HM	50 mpk	200.0	42.1	39.6	43.2	39.8
PO	2				37		38.7	
PO	3				43.1		36.8	
PO	4				39.6		42.3	
PO	5				36.1		38.1	
PO	1	TBU-Hyd-Me	50 mpk	200.0	34.1	37.3	34.8	38.9
PO	2				38.7		42.3	
PO	3				39.6		41.1	
PO	4				36.4		38.3	
PO	5				37.9		38	



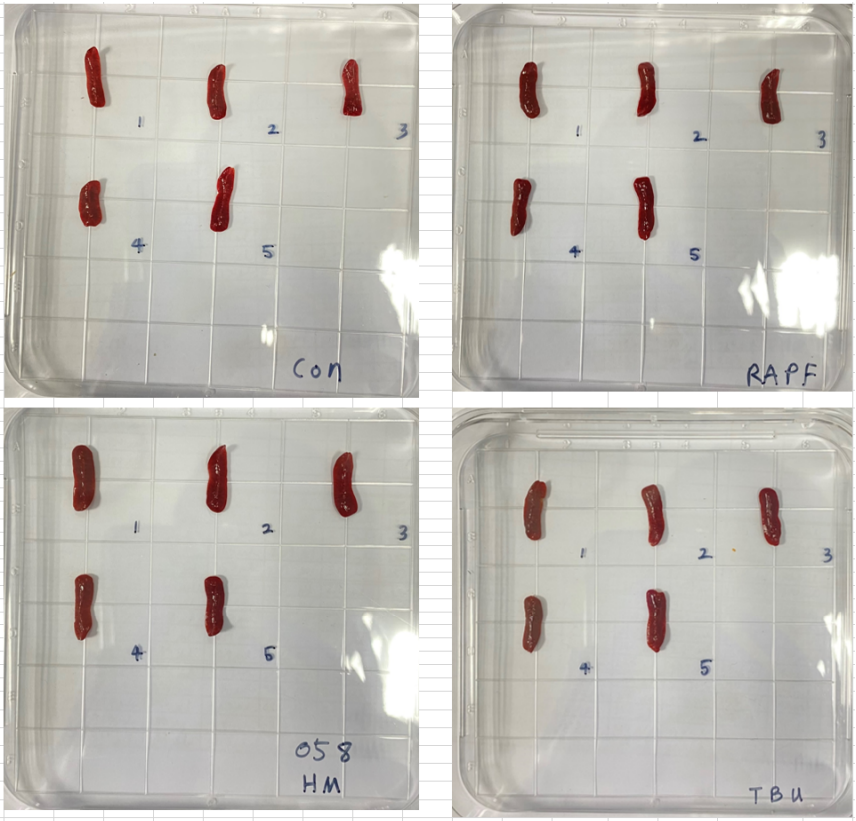
[그림 2-127. RA-PF, RA-058HM, TBU-Hyd-Me 약물처리 3주후의 ICR mouse 무게 변화 측정]

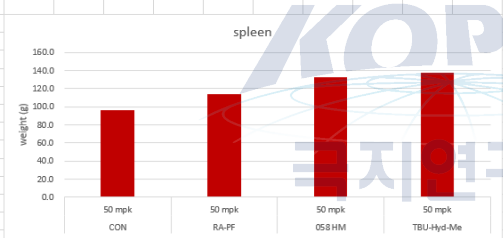
ii) 비장 관찰

a) 50mpk 농도의 약물을 장기 경구투여한 ICR 마우스는 실험 기간동안 사망한 개체는 존재하지 않았음

b) 라말린 유도체 RA-PF, RA-058HM, TBU-Hyd-Me 경구투여 후 실험을 종료하고 체내 비장(spleen)의 무게변화를 확인한 결과 대조군 (vehicle)에 비해 RA-PF, RA-058HM, TBU-Hyd-Me 비장의 중량이 증가함

c) 부검을 진행한 후 체내 장기 크기·모양·색 변화를 확인한 결과 이상 증상은 발견되지 않았음(그림 2-128)





장기투여				
투여방법	반복수	시료	비장무게 (mg)	평균
PO	1	CON	90.8	96.7
PO	2		100.9	
PO	3		87.3	
PO	4		99.2	
PO	5		105.2	
PO	1	RA-PF	125.6	113.7
PO	2		111	
PO	3		105.6	
PO	4		101.4	
PO	5		125	
PO	1	058 HM	157	132.4
PO	2		130.7	
PO	3		140.1	
PO	4		104.7	
PO	5		129.5	
PO	1	TBU-Hyd-M	117	137.4
PO	2		130.5	
PO	3		143.1	
PO	4		131.4	
PO	5		165	

[그림 2-128. RA-PF, RA-058HM, TBU-Hyd-Me의 비장(spleen)의 무게 측정 및 관찰 결과]

iii) 혈액 분석

a) 혈구 분석은 항응고제(EDTA-3K)가 담긴 채혈 튜브에 담겨 응고된 혈액을 제외한 안정화된 혈액을 이용하여 혈구 검사를 수행함. 혈구검사는 백혈구 수치(WBC), 적혈구 수치(RBC), 헤모글로빈 수치(Hb), 적혈구 용적 백분율(Hct), 혈소판 수치(PLT), 적혈구 지수(RBC indices: MCV, MCH, MCHC, RDW, PDW, MPV), 백혈구 지수(NEU, LYM, MON)를 측정함(그림 2-129)

No.		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW	PDW	MPV	NEU%	LYM%	MON%
1	CON_1	0.6	5.0	7.1	26.1	52.7	14.3	27.2	464.0	13.3	15.4	5.6	34.9	65.1	0.0
2	CON_2	1.9	9.1	13.2	48.8	53.9	14.6	27.0	576.0	13.2	16.3	5.8	35.8	64.2	0.0
3	CON_3	1.9	8.2	12.4	45.6	55.3	15.0	27.2	848.0	13.9	17.2	6.0	47.8	51.9	0.3
4	CON_4	5.8	8.8	13.1	48.4	55.2	14.9	27.1	669.0	14.1	18.1	6.2	26.6	73.4	0.0
5	CON_5	2.1	8.3	12.2	44.7	54.2	14.8	27.3	722.0	13.2	15.5	5.8	33.4	66.6	0.0
Mean		**2.5**	**7.9**	**11.6**	**42.7**	**54.3**	**14.7**	**27.2**	**655.8**	**13.5**	**16.5**	**5.9**	**35.7**	**64.2**	**0.1**
SD		**2.0**	**1.7**	**2.6**	**9.5**	**1.1**	**0.3**	**0.1**	**145.5**	**0.4**	**1.2**	**0.2**	**7.7**	**7.8**	**0.1**
6	RA_1	2.8	9.1	12.6	47.6	52.2	13.8	26.5	923.0	13.5	15.0	6.0	16.3	83.7	0.0
7	RA_2	1.7	7.8	11.8	43.2	55.2	15.1	27.3	735.0	13.1	15.4	5.6	46.6	49.3	4.1
8	RA_3	2.6	9.9	14.4	53.0	53.5	14.5	27.2	1000.0	13.4	15.5	5.8	27.2	72.8	0.0
9	RA_4	1.8	8.8	12.7	47.2	53.7	14.4	26.9	968.0	13.4	14.9	6.0	26.6	73.4	0.0
10	RA_5	1.3	8.4	12.0	44.9	53.5	14.3	26.7	840.0	13.4	15.1	5.6	24.0	76.0	0.0
Mean		**2.0**	**8.8**	**12.7**	**47.2**	**53.6**	**14.4**	**26.9**	**893.2**	**13.4**	**15.2**	**5.8**	**28.1**	**71.0**	**0.8**
SD		**0.6**	**0.8**	**1.0**	**3.7**	**1.1**	**0.5**	**0.3**	**106.9**	**0.2**	**0.3**	**0.2**	**11.2**	**12.9**	**1.8**
11	058_1	2.4	8.9	12.9	47.0	53.0	14.5	27.4	824.0	14.2	15.4	5.6	36.3	63.7	0.0
12	058_2	3.2	8.9	12.2	45.4	51.2	13.8	26.9	867.0	13.7	15.0	6.0	53.1	46.0	0.9
13	058_3	2.0	9.1	13.3	49.0	54.0	14.6	27.1	945.0	13.8	15.9	6.0	30.4	69.6	0.0
14	058_4	1.7	8.5	12.9	46.2	54.1	15.1	27.9	620.0	13.4	15.4	5.8	37.5	62.5	0.0
15	058_5	3.0	9.2	13.5	50.3	54.6	14.6	26.8	864.0	13.8	15.0	6.0	30.8	69.2	0.0
Mean		**2.5**	**8.9**	**13.0**	**47.6**	**53.4**	**14.5**	**27.2**	**824.0**	**13.8**	**15.3**	**5.9**	**37.6**	**62.2**	**0.2**
SD		**0.6**	**0.3**	**0.5**	**2.0**	**1.3**	**0.5**	**0.4**	**122.2**	**0.3**	**0.4**	**0.2**	**9.2**	**9.6**	**0.4**
16	TBU_1	1.6	8.4	12.1	44.7	53.3	14.4	27.1	817.0	13.3	15.4	5.6	36.8	63.2	0.0
17	TBU_2	2.6	8.1	12.0	43.6	53.6	14.8	27.5	615.0	13.4	16.3	5.8	29.1	70.9	0.0
18	TBU_3	2.6	8.6	12.4	45.6	53.0	14.4	27.2	904.0	13.8	15.0	6.0	19.9	80.1	0.0
19	TBU_4	2.7	8.1	12.2	44.1	54.5	15.1	27.7	886.0	14.0	16.3	5.8	45.7	53.2	1.1
20	TBU_5	2.0	9.1	12.8	47.2	51.6	14.0	27.1	1023.0	15.3	16.3	5.8	37.7	62.3	0.0
Mean		**2.3**	**8.5**	**12.3**	**45.0**	**53.2**	**14.5**	**27.3**	**849.0**	**14.0**	**15.9**	**5.8**	**33.8**	**65.9**	**0.2**
SD		**0.5**	**0.4**	**0.3**	**1.4**	**1.1**	**0.4**	**0.3**	**150.4**	**0.8**	**0.6**	**0.1**	**9.8**	**10.1**	**0.5**

[그림 2-129. RA-PF, RA-058HM, TBU-Hyd-Me의 혈액분석 결과]

- 결론 및 제언

① 라말린 및 라말린 유도체의 단회경구투여 및 반복경구투여 독성을 확인하기 위하여 실험동안의 사망례, 임상증상, 체중변화, 장기중량의 변화, 육안부검소견 등을 종합적으로 관찰함. 부검을 통해 육안으로 확연하게 변화를 관찰할 수 있었던 비장종대는 노화나 손상된 적혈구를 파괴하는 비장의 기능이 과도하게 발생하는 것으로 혈액질환이나 간기능 이상으로 인한 빈혈, 출혈 등으로 인해 용혈된 적혈구 및 세포막이 단단해진 적혈구가 비장 내 좁은 모세혈관(직경 4 μM)을 통과하지 못하고 축적되거나 통과하는 동안 용혈되어 비장 내에 축적되어 발생함(Motulsky AG *et al*, 1958)

② 라말린 유도체 TBU-2Me, TBU-2OME, TBU-Hyd-Me, TBU-hyd-Me-tol, TBU-PYD, RA-PR058, ASP-Hyd-Me, 12DME, ASP-DYD, RA-PR076 단회투여시 장기의 크기 변화나 체중변화 등 정상적이였으며, 특별하게 비장종대가 일어난 것이 없으며, 비장의 색이나 다른 증상들이 양호하였음. 단회투여중 죽은 쥐들의 경우, 급성 독성에 의한 사망으로 판단되지는 않음

③ 본 연구에서는 라말린 유도체 RA-PF, 058HM, TBU-Hyd-Me 장기투여후 약간의 비장무게의 증가가 일어남을 확인함. 하지만 라말린 유도체 RA-PF, 058HM, TBU-Hyd-Me에서 비장의 색이나 다른 증상들이 양호하였음

○ 항염증 스크리닝

1) Nitric oxide (NO) 생성량 분석

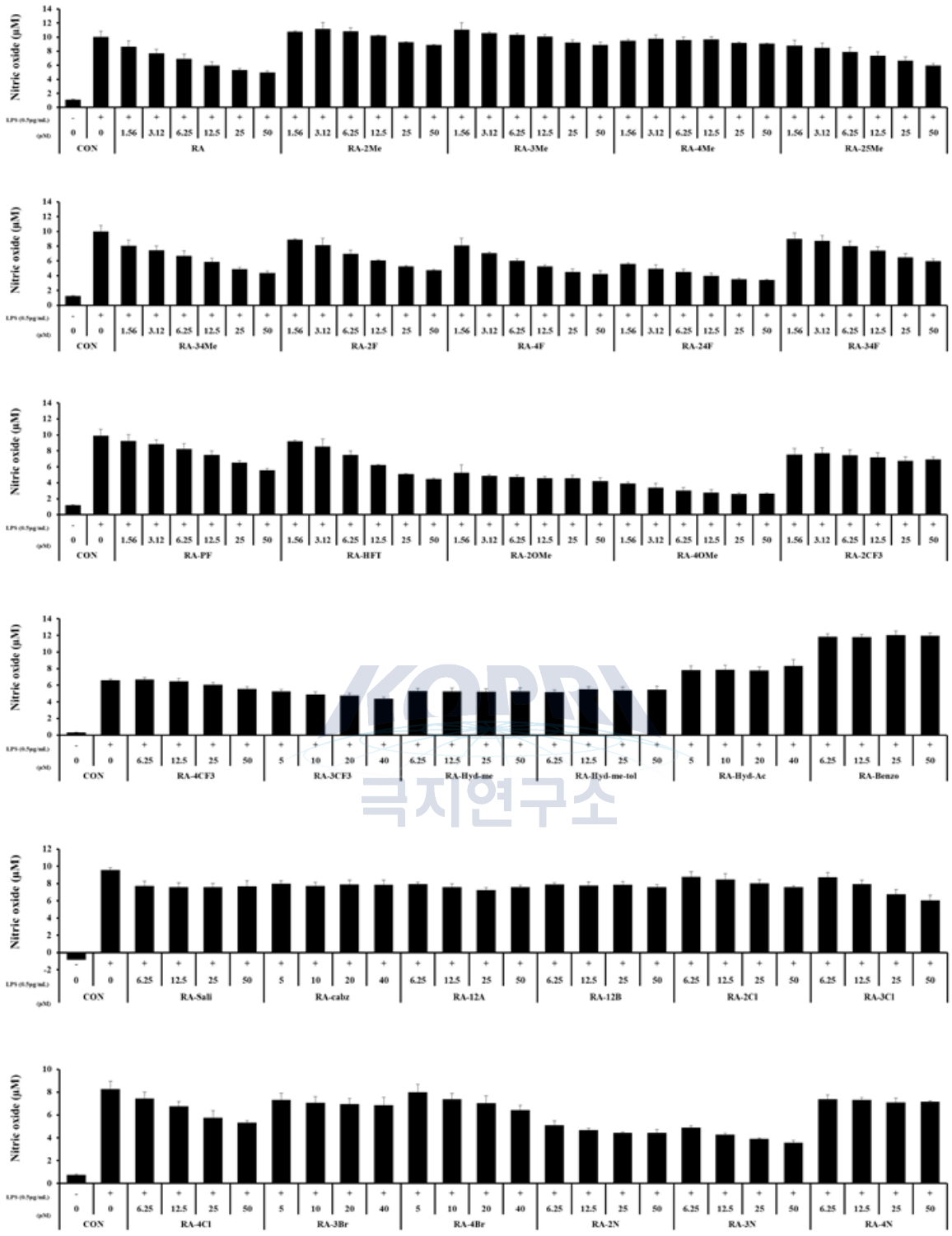
가. 실험방법

- Griess 반응을 이용하여 배양액 내에 존재하는 nitrite 농도를 측정함. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^6 cells/mL 농도로 접종한 뒤 세포가 부착하면 시료를 농도에 맞게 처리하여 5 % CO_2 incubator에서 1시간 전처리 후 0.5 μg/mL의 LPS를 처리하여 24시간 재배양함. 배양액의 상층액을 얻은 후 상층액과 griess 시약(1 % sulfanilamide, 0.1 % N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride in 2.5 % phosphoric acid solution, 1:1)을 실온에서 5분간 반응시키고 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정함. 모든 실험은 3회 반복하였고 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite ($NaNO_2$)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출함

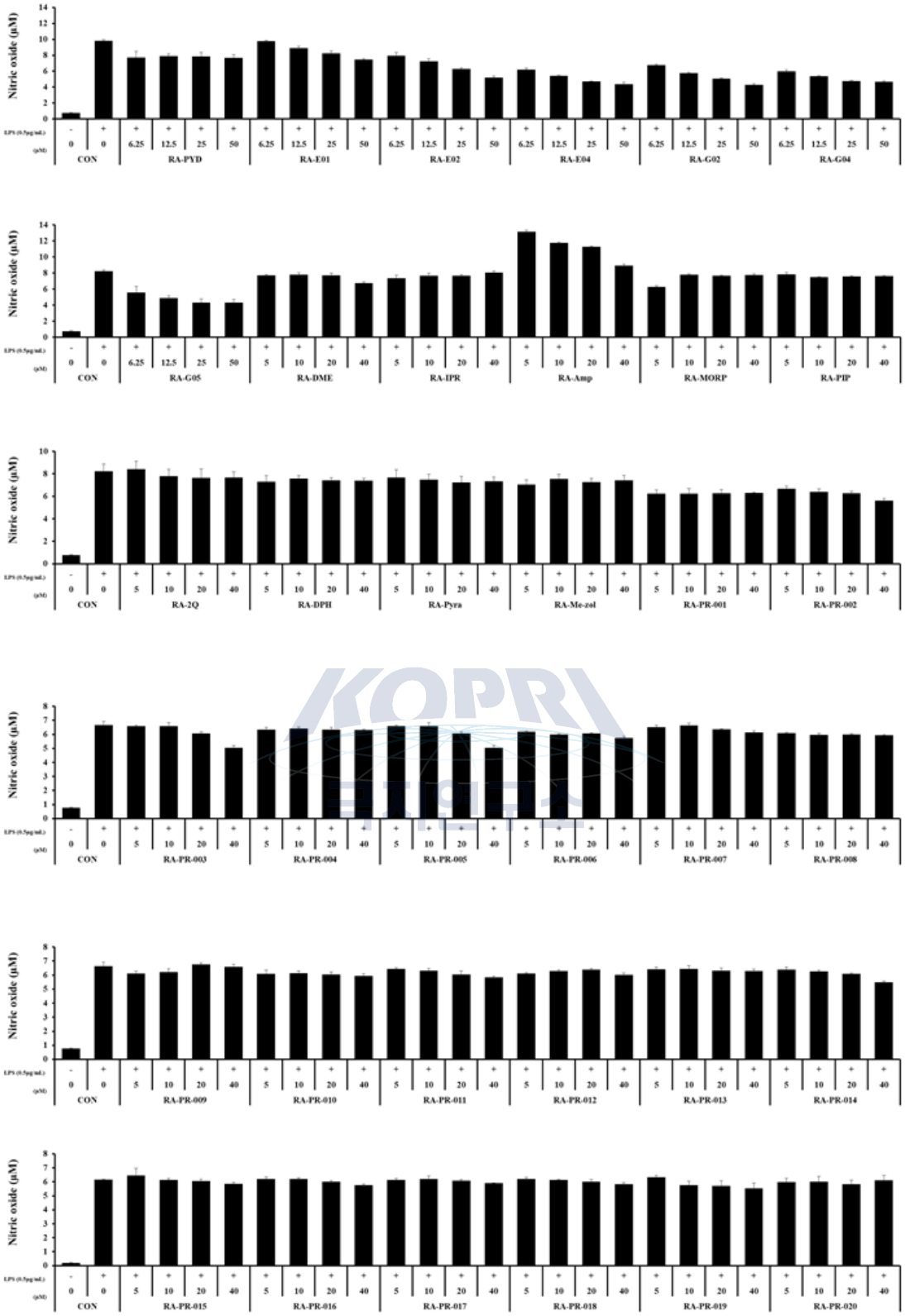
나. 연구 결과

- 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 급성 염증반응 상태로 유도한 후 NO 생성량 분석 결과 라말린 및 라말린 유도체 136종 중 처리농도에 의존적으로 감소하는 51종(라말린, RA-25Me, RA-34Me, RA-2F, RA-4F, RA-24F, RA-PF, RA-HFT, RA-2OME, RA-4OMe, RA-3Cl, RA-4Cl, RA-2N, RA-3N, RA-E02, RA-E04, RA-G02, RA-G04, RA-G05, RA-PR021, RA-PR022, RA-PR033, RA-p-Nit, RA-23Cl, RA-24Cl, RA-34Cl, RA-35Cl, RA-MER-RA, RA-TBU-RA, RA-MER-4OME, RA-MER-4ME, RA-MER-24F, RA-MER-NAP, RA-TBU-4OME, RA-TBU-4ME, RA-TBU-24F, RA-TBU-NAP, RA-2OH-4ME, RA-ENA-4-066, RA-ENA-9-116, RA-PR049, RA-NAP-HCl, RA-TBU-PYD, RA-TBU-2OME, RA-TBU-2ME, RA-Hyd-Me-4OME, RA-Hyd-Me-4ME, RA-PR077, RA-PR078, RA-PR079, RA-PR080)의 시료를 선정함

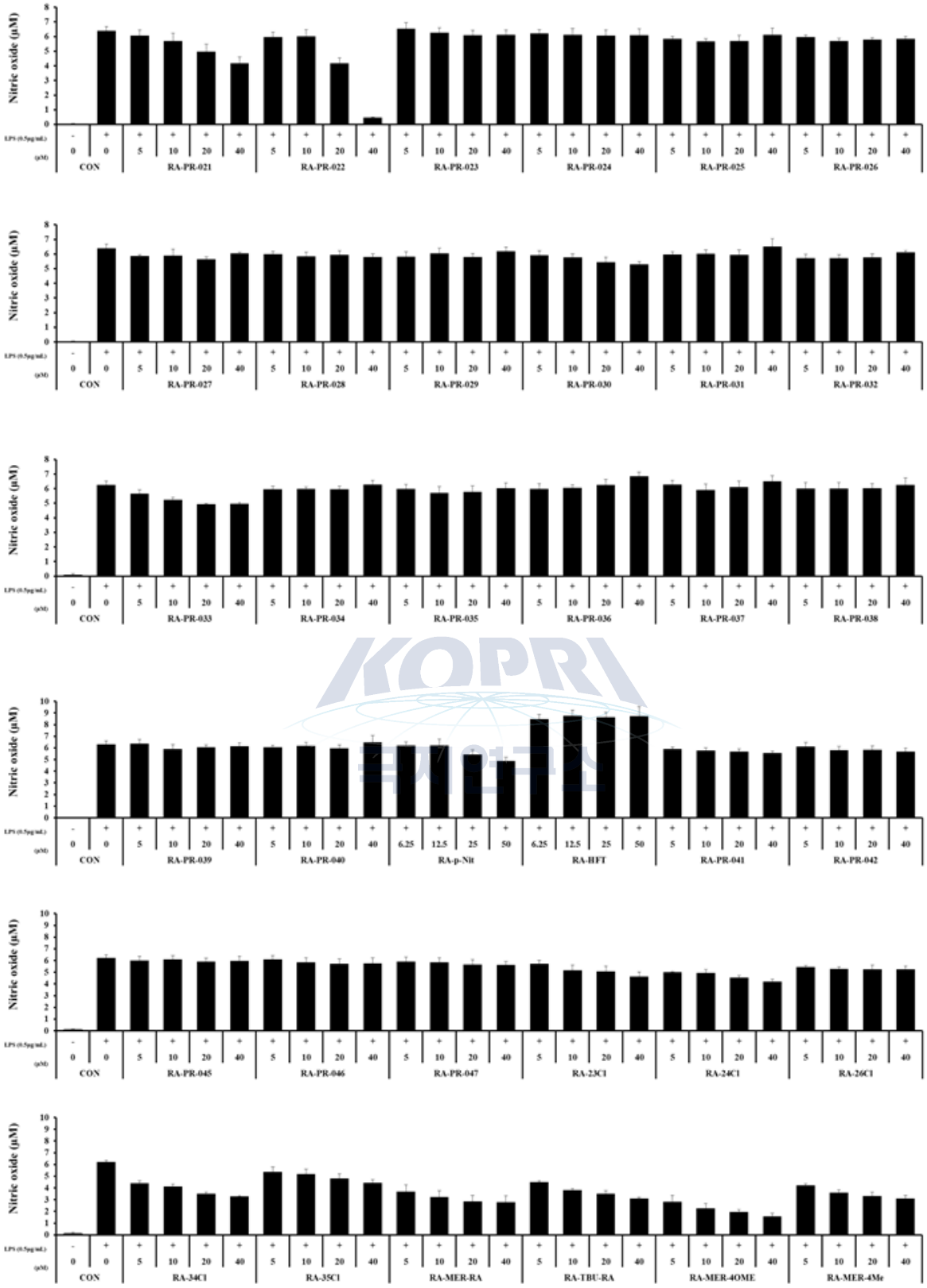
- 이 중 RAW 264.7 세포의 독성을 나타내지 않으면서 NO 생성량을 감소시키는 시료를 선별한 결과 33종(라말린, RA-25Me, RA-34Me, RA-2F, RA-4F, RA-24F, RA-PF, RA-HFT, RA-2OME, RA-4OMe, RA-3Cl, RA-4Cl, RA-2N, RA-3N, RA-E02, RA-G02, RA-G04, RA-G05, RA-p-Nit, RA-24Cl, RA-34Cl, RA-TBU-RA, RA-MER-4ME, RA-MER-NAP, RA-TBU-NAP, RA-ENA-4-066, RA-ENA-9-116, RA-TBU-2OME, RA-TBU-2ME, RA-PR077, RA-PR078, RA-PR079, RA-PR080)의 라말린 유도체가 선별되었고 염증기작에 대한 연구 분야에 활용할 수 있을 것이라 사료됨(그림 2-130~134)



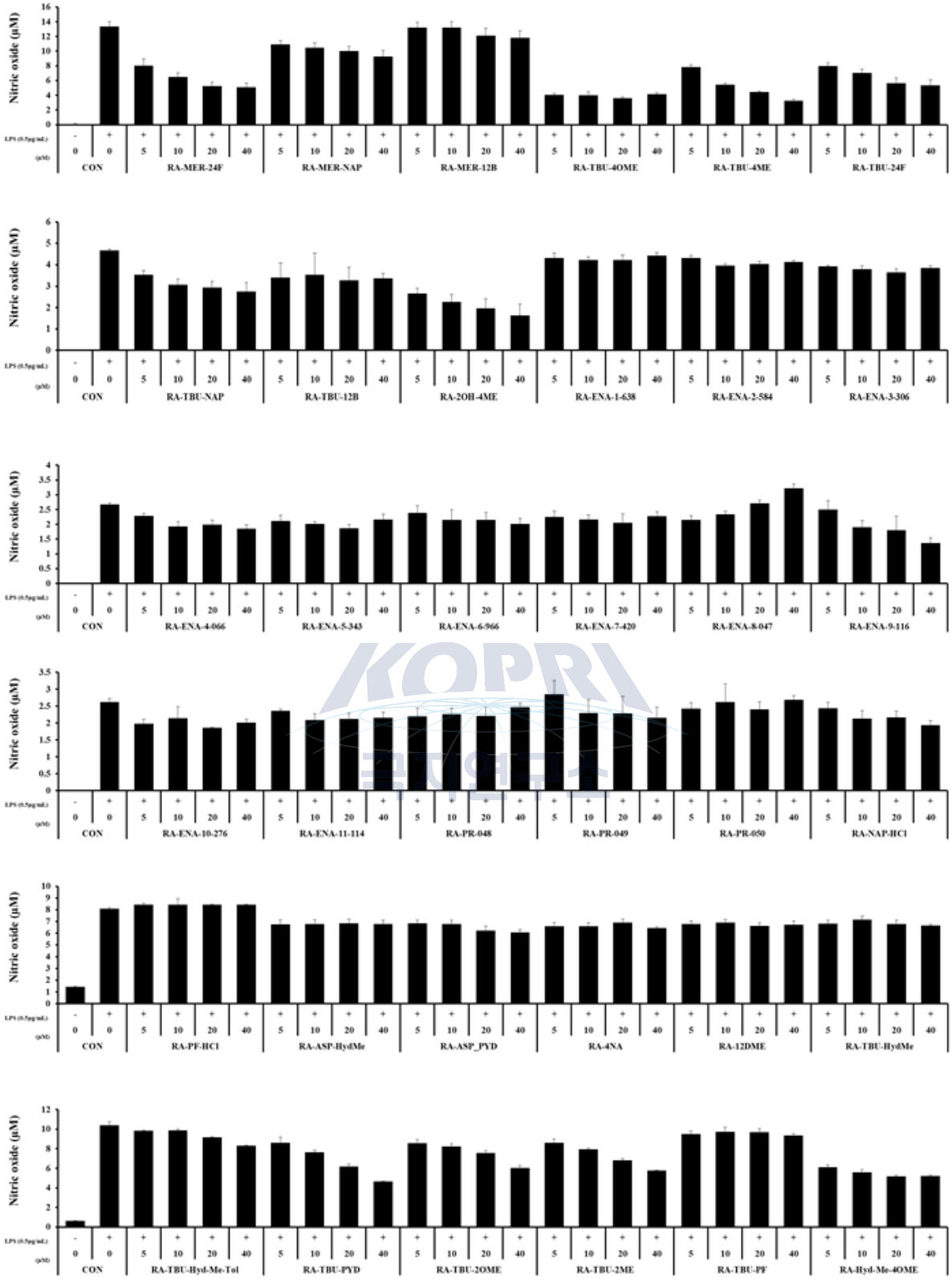
[그림 2-130. 라말린 및 라말린 유도체의 Nitric oxide(NO) 생성량 결과-1]



[그림 2-131. 라말린 및 라말린 유도체의 Nitric oxide(NO) 생성량 결과-2]



[그림 2-132. 라말린 및 라말린 유도체의 Nitric oxide(NO) 생성량 결과-3]



[그림 2-133. 라말린 및 라말린 유도체의 Nitric oxide(NO) 생성량 결과-4]

[그림 2-134. 라말린 및 라말린 유도체의 Nitric oxide(NO) 생성량 결과-5]

KOBRI 극지연구소

2) NLRP3 생성량 분석

가. 실험방법

- NLRP3 생성량을 확인하기 위하여 샌드위치 ELISA 기법을 이용하여 확인함. RAW 264.7 세포에서 라말린 및 라말린 유도체 133종을 농도별(5, 10, 20, 40 μM)로 처리 후 1시간 뒤 LPS로 염증 유발시킨 뒤 24시간 배양한 상등액으로 NLRP3 생성량 측정을 진행함

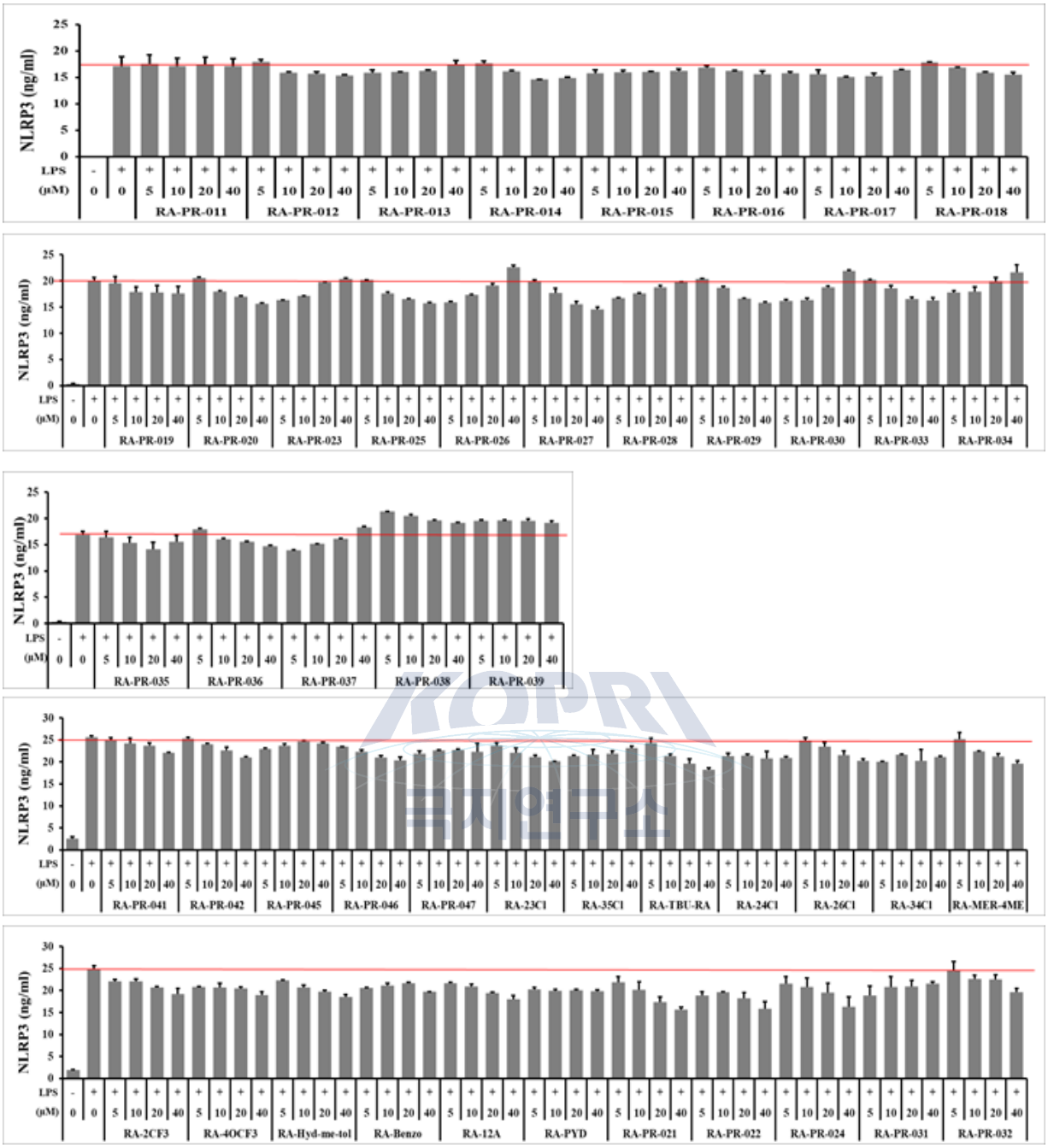
- ELISA Kit에 제공된 microelisa stripplate에 NLRP3 항체가 미리 분포되어 있고 라말린 및 라말린 유도체 133종의 상등액과 standard 처리 후 37 ℃에서 90분간 배양함. 1xWash buffer로 2회 세척 후 1x Biotinylated Detection Antibody를 100 μL 넣고 37 ℃에서 60 분 배양함. 배양이 끝난 후, 1xWash buffer로 2회 세척 진행하여 HRP-Streptavidin Conjection working solution 100 μL를 각 well에 넣고 새로운 plate sealer로 덮어 37 ℃에서 30분간 배양한 후 1xWash buffer로 5회 세척 진행함. TMB substrate 용약을 모든 well에 90 μL 넣고 37 ℃에서 10~20분간 배양하면서 최적의 색이 develop 될 때까지 빛을 차단하였고 적정 색이 발색되었을 때 stop buffer 50 μL 넣은 후 450 nm로 설정된 microplate reader를 사용하여 각 well의 광학밀도(OD 값)를 측정함

나. 연구결과

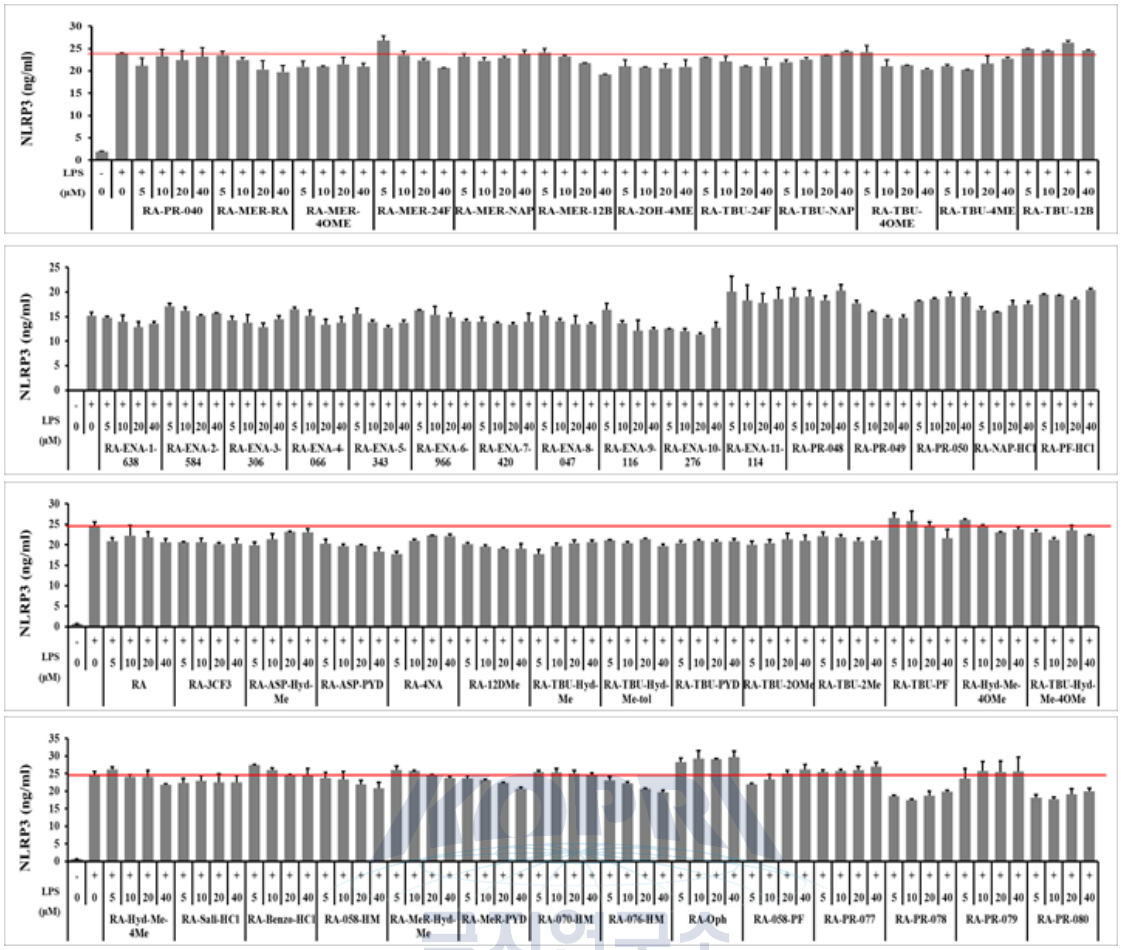
- RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 NLRP3가 유발된 상등액을 positive control로 대조하여 라말린 및 라말린 유도체 156종에 대한 NLRP3 발현 정도를 확인함

- 라말린 및 라말린 유도체 40 μM 처리농도에서 NLRP3 저해율이 20~40 % 되는 시료는 라말린, RA-25ME, RA-34ME, RA-2F, RA-34F, RA-2OME, RA-4OME, RA-2CF3, RA-4OCF3, RA-Hyd-Me-Tol, RA-Hyd-Ac, RA-Benzo, RA-sali, RA-Cabz, RA-12A, RA-3Br, RA-2N, RA-E04, RA-G05, RA-MORP, RA-PIP, RA-2Q, RA-Me-Zol, RA-PR020, RA-PR021, RA-PR022, RA-PR024, RA-PR025, RA-PR027, RA-PR029, RA-PR032, RA-p-Nit, RA-PR046, RA-23Cl, RA-26Cl, RA-TBU-RA, RA-MER-4ME, RA-ASP-PYD, RA-12DME로 39개 시료가 NLRP3 발현을 농도의존적으로 감소시킴(그림 2-135~137)

[그림 2-135. 라말린 및 라말린 유도체의 NLPR3 생성량 결과-1]



[그림 2-136. 라말린 및 라말린 유도체의 NLPR3 생성량 결과-2]



[그림 2-137. 라말린 및 라말린 유도체의 NLPR3 생성량 결과-3]

○ BACE1 효소 활성 스크리닝

1) β-secretase (BACE1) 활성 저해효과 측정

가. 실험방법

- β-세크레타제(β-secretase, BACE1)는 작용기전이 확실하고 부작용이 없는 새로운 치매 치료제 개발하기 위한 목표 효소(target enzyme) 중 하나로, 알츠하이머병은 사람의 21번 염색체상에 존재하는 아밀로이드 유전자의 이상으로 발생하는데, 주로 β-아밀로이드라는 유전자 독성물질 때문이라고 알려져 있음. β-아밀로이드는 정상적인 뇌에 존재하는 아밀로이드 전구 단백질(amyloid percursor protein, APP)이 β-secretase (BACE1)에 의해 C-말단 펩티드(C-terminal peptide) 및 β-아밀로이드로 분해됨으로써 생성됨. 정상인의 뇌에는 소량으로 존재하지만, 알츠하이머 환자의 뇌에는 다량으로 생성되어 노인성 신경반(senile plaque)을 형성하는 것으로 알려져 있어 β-secretase (BACE1)의 활성을 저해할 경우, 아밀로이드 전구단백질(APP)의 분해에 의한 β-아밀로이드 및 C-말단 펩티드의 증가를 방지함으로써 치매를 치료할 수 있음

- 라말린 및 라말린 유도체의 β-secretase (BACE1) 활성 저해효과를 측정하기 위해 BACE1 FRET assay kit, Red (P2985, Thermo fisher scientific)를 사용하였고, 양성대조군으로는 non-peptidic BACE1 저해제인 LY2811376 제품(MedChemExpress)을 이용함. non-peptidic BACE1 inhibitor인 LY2811376 제품은 239-249 nM에서 약 50 %의 BACE1 inhibitory activity를 갖는 것으로 알려져 있음

- 750 nM의 BACE1 substrate (Rh-EVNLDAEFK-Quencher) 10 μL, BACE1 enzyme (1.0 U/mL) 10 μL, assay buffer (50 mM sodium acetate, pH4.5)와 1.25 μM, 25 μM, 5 μM, 10 μM로 희석한 라말린 유도체 시료들을 black 96 well-plate에 각각 40 μL를 넣고 25℃에서 60분간 반응시킨 후, fluorescence microplate reader를 이용하여 Ex:530nm, Em:580nm에서 형광을 측정하여 BACE1의 활성을 분석함

나. 연구결과

- β-secretase (BACE1)는 β-아밀로이드 생성을 개시하는 효소로서 β-secretase (BACE1)의 활성을 억제함으로써 β-아밀로이드의 감소는 물론이고 그 이후의 해로운 모든 단계를 방지할 수 있음. 라말린 및 라말린 유도체 총 158종 중 10 μM 처리시 β-secretase (BACE1)의 활성을 20 % 이상 저해한 시료는 RA-4F, RA-PF, RA-2OME, RA-2CF3, RA-3Br, RA-E02, RA-E04, RA-DME, RA-IPR, RA-MORP, RA-DPh, RA-PR004, RA-PR008, RA-PR010, RA-PR013, RA-PR018, RA-PR019, RA-PR026, RA-PR033, RA-PR035, RA-NAP, RA-PR041, RA-TBU-RA, RA-MER-4ME, RA-MER-NAP, RA-TBU-24F, RA-TBU-12B로 총 27개로 확인됨. 또한 2.5 μM 처리시 β-secretase (BACE1)의 활성을 10 % 이상 저해한 시료는 RA-Benzo-HCl, RA-PR058로 2개의 시료로 확인됨

- 라말린 및 라말린 유도체 총 158종 중 10 μM 처리시 β-secretase (BACE1)의 활성을 30 % 이상 저해한 시료는 라말린, RA-3N, RA-PIP, RA-PR001, RA-PR002, RA-PR003, RA-PR005, RA-PR007, RA-PR0012, RA-PR014, RA-PR016, RA-PR020, RA-PR024, RA-PR031, RA-PR037, RA-PR077, RA-PR078, RA-PR079, RA-OPh로 19개의 시료로 확인됨(표2-4)

	Sample Name	BACE1 저해율(%) (농도 10μM기준)		Sample Name	BACE1 저해율(%) (농도 10μM기준)		Sample Name	BACE1 저해율(%) (농도 10μM기준)		Sample Name	BACE1 저해율(%) (농도 10μM기준)
1	Ramalin (=RA)	38.6	41	RA-DME	28.61	81	RA-PR-032	0	121	RA-ENA-7-420	0
2	RA-2Me	16.91	42	RA-IPR	22.41	82	RA-PR-033	29.49	122	RA-ENA-8-047	0
3	RA-3Me	0	43	RA-Amp	0.16	83	RA-PR-034	0	123	RA-ENA-9-116	0
4	RA-4Me	13.62	44	RA-MORP	20.25	84	RA-PR-035	27.37	124	RA-ENA-10-276	0
5	RA-25Me	0	45	RA-PIP	35.1	85	RA-PR-036	0	125	RA-ENA-11-114	0
6	RA-34Me	3.78	46	RA-2Q	0	86	RA-PR-037	39.45	126	RA-PR-048	0
7	RA-2F	0	47	RA-DPh	26.26	87	RA-PR-038	0	127	RA-PR-049	0
8	RA-4F	22.23	48	RA-Pyra	9.35	88	RA-PR-039	0	128	RA-PR-050	0
9	RA-24F	0	49	RA-Me-zol	0	89	RA-PR-040	0	129	RA-NAP-HCl	0
10	RA-34F	8.57	50	RA-PR-001	35.32	90	RA-p-Nit	0	130	RA-PF-HCl	0
11	RA-PF	25.59	51	RA-PR-002	50.14	91	RA-NAP	21.36	131	RA-ASP-Hyd-Me	6.78(2.5μM 기준)
12	RA-HFT	0.92	52	RA-PR-003	53.5	92	RA-PR-041	21.79	132	RA-ASP-PYD	8.12(2.5μM 기준)
13	RA-2OMe	26.01	53	RA-PR-004	29.52	93	RA-PR-042	0	133	RA-4NA	2.24(2.5μM 기준)
14	RA-4OMe	0	54	RA-PR-005	61.41	94	RA-PR-045	18.9	134	RA-12DMe	2.15(2.5μM 기준)
15	RA-2CF3	23.98	55	RA-PR-006	15.56	95	RA-PR-046	0	135	RA-TBU-Hyd-Me	11.31(2.5μM 기준)
16	RA-4OCF3(=OCF3)	0	56	RA-PR-007	47.45	96	RA-PR-047	18.35	136	RA-TBU-Hyd-Me-tol	0
17	RA-3CF3	9.08	57	RA-PR-008	21.64	97	RA-23Cl	0	137	RA-TBU-PYD	20.54(2.5μM 기준)
18	RA-Hyd-Me	0	58	RA-PR-009	19.55	98	RA-24Cl	11.94	138	RA-TBU-2OMe	24.41(2.5μM 기준)
19	RA-Hyd-Me-Tol	0	59	RA-PR-010	29.98	99	RA-26Cl	0	139	RA-TBU-2Me	8.88
20	RA-Hyd-Ac	0	60	RA-PR-011	0	100	RA-34Cl	0	140	RA-TBU-PF	28.01(2.5μM 기준)
21	RA-Benzo	17.14	61	RA-PR-012	82.13	101	RA-35Cl	0	141	RA-Hyd-Me-4OMe	7.29
22	RA-Sali	0	62	RA-PR-013	28.2	102	RA-MER-RA	0	142	RA-TBU-Hyd-Me-4OMe	1.96(2.5μM 기준)
23	RA-Cabz	2.2	63	RA-PR-014	63.45	103	RA-TBU-RA	22.73	143	RA-Hyd-Me-4Me	0
24	RA-12A	14.62	64	RA-PR-015	10.69	104	RA-MER-4OME	0	144	RA-Sali-HCl	8.67(2.5μM 기준)
25	RA-12B	0	65	RA-PR-016	37.9	105	RA-MER-4Me	25.45	145	RA-Benzo-HCl	14.67(2.5)
26	RA-2Cl	11.55	66	RA-PR-017	19.62	106	RA-MER-24F	0	146	RA-058-HM	0.93(2.5μM 기준)
27	RA-3Cl	14.43	67	RA-PR-018	22.57	107	RA-MER-NAP	26.31	147	RA-MeR-Hyd-Me	7.64(2.5μM 기준)
28	RA-4Cl	13.1	68	RA-PR-019	24.12	108	RA-MER-12B	0	148	RA-MeR-PYD	9.47(2.5μM 기준)
29	RA-3Br	20.14	69	RA-PR-020	31.07	109	RA-TBU-4OME	41.85	149	RA-PR-058	11.74(2.5μM 기준)
30	RA-4Br	11.99	70	RA-PR-021	0	110	RA-TBU-4ME	0	150	RA-PR-076	5.87(2.5μM 기준)
31	RA-2N	0	71	RA-PR-022	0	111	RA-TBU-24F	22.22	151	RA-PR-077	38.18
32	RA-3N	30.07	72	RA-PR-023	0	112	RA-TBU-NAP	0	152	RA-PR-078	34.83
33	RA-4N	14.72	73	RA-PR-024	35.69	113	RA-TBU-12B	20.45	153	RA-PR-079	33.3
34	RA-PYD	9.92	74	RA-PR-025	0	114	RA-2OH-4Me	0	154	RA-PR-080	26.23
35	RA-E01	0	75	RA-PR-026	26.11	115	RA-ENA-1-638	0	155	RA-070-HM	18.85
36	RA-E02	27.75	76	RA-PR-027	0	116	RA-ENA-2-584	0	156	RA-076-HM	22.9
37	RA-E04	21.78	77	RA-PR-028	4.83	117	RA-ENA-3-306	0	157	RA-Oph	30.06
38	RA-G02	0	78	RA-PR-029	0	118	RA-ENA-4-066	0	158	RA-058-PF	24.04
39	RA-G04	0	79	RA-PR-030	0	119	RA-ENA-5-343	0			
40	RA-G05	0	80	RA-PR-031	41.75	120	RA-ENA-6-966	0			

[표 2-4. 라말린 및 라말린 유도체의 BACE 1 활성 결과]

○ 라말린 유도체의 Tau 단백질 활성 스크리닝

1) Tau 활성 저해효과 측정

가. 실험방법

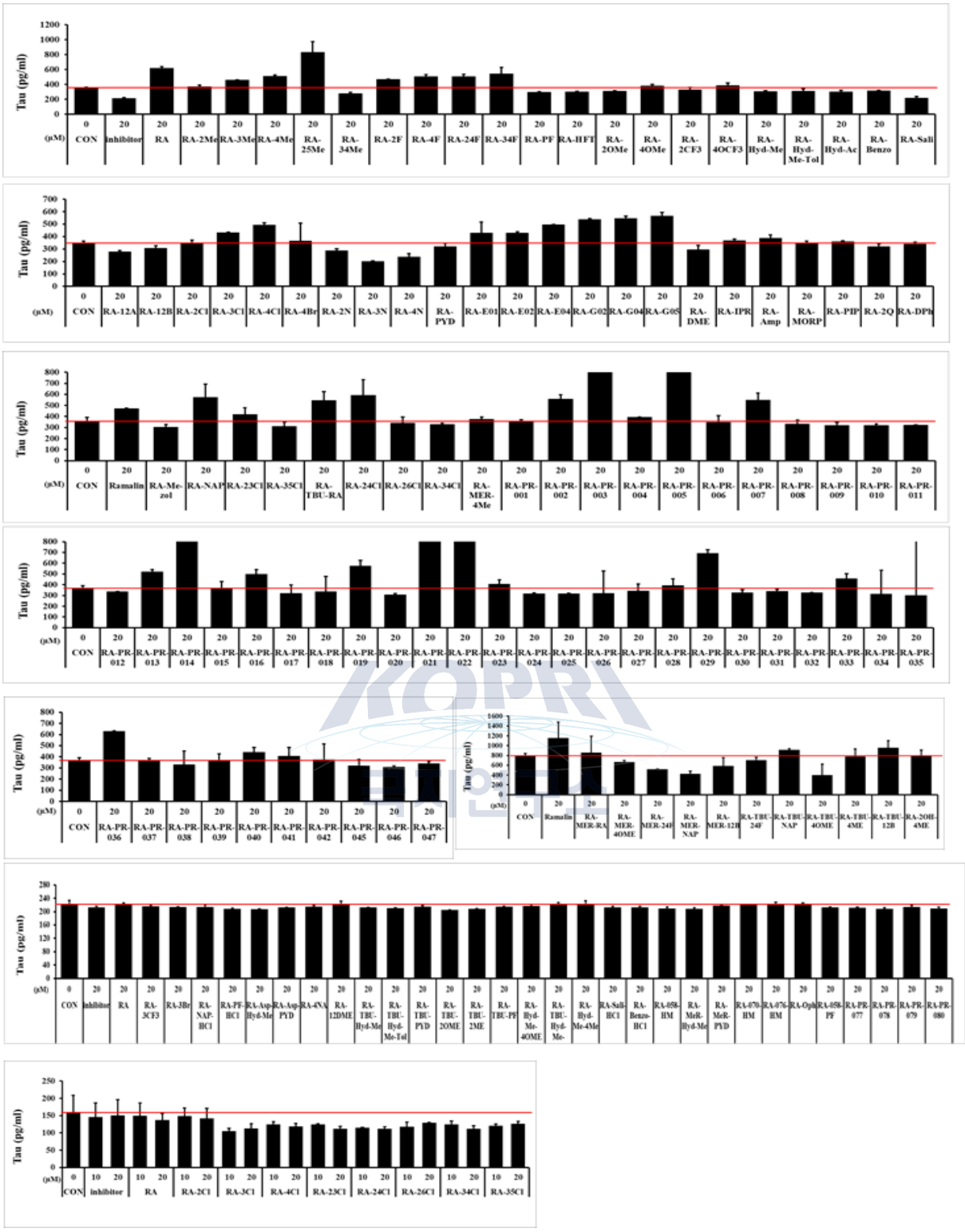
- Tau 단백질 ELISA는 혈청, 플라즈마 등의 tau 수준을 분석하기 위한 것으로 키트에 제공된 microelisa stripplate에 tau에 특정한 항체를 미리 분포되었고 라말린과 라말린 유도체 133종의 물질에 대해서 Tau 단백질이 활성화되어있는 BiFC-Tau-SHSY5Y 세포에 20 μM 처리 24시간 뒤 상등액 확보 후 각 well에 첨가함

- Sample과 standard를 첨가 후 antibody cocktail 50 μL를 모든 well에 넣어 반응시키고 1시간동안 상온에서 배양함. 1xWash buffer로 3번 세척 후 TMB development solution을 100 μL 넣고 shaker에서 암실 상태로 10분간 배양 후 stop buffer 100 μL 넣고 반응을 중지시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 OD 값 측정함

나. 연구결과

- Tau가 활성화 된 BiFC-Tau-SHSY5Y 세포에서 비처리군에 대해서 대조군으로 설정하여 라말린 및 라말린 유도체 139종에 대하여 처리농도 20 μM 기준으로 Tau 단백질 발현 정도를 확인함

- 라말린은 Tau 발현을 억제시키지 못했으며, Tau 단백질을 10~30 % 저해시킨 물질은 RA-34Me, RA-PF, RA-HFT, RA-2OME, RA-Hyd-ME, RA-Hyd-Me-Tol, RA-Hyd-Ac, RA-Benzo, RA-12A, RA-12B, RA-2N, RA-3N, RA-4N, RA-DME, RA-Me-zol, RA-PR009, RA-PR010, RA-PR011, RA-PR012, RA-PR017, RA-PR020, RA-PR024, RA-PR025, RA-PR026, RA-PR034, RA-PR035, RA-PR045, RA-PR046, RA-35Cl, RA-MER-24F, RA-MER-NAP, RA-MER-12B, RA-TBU-4OME, RA-TBU-24F, RA-ASP-Hyd-Me로 총 35개 시료에서 Tau 단백질 저해를 나타남(그림 2-138)



[그림 2-138. 라말린 및 라말린 유도체의 Tau 활성 결과]

○ HDAC6 효소 활성 스크리닝

1) Histone Deacetylase 6(HDAC6) 활성 저해효과 측정

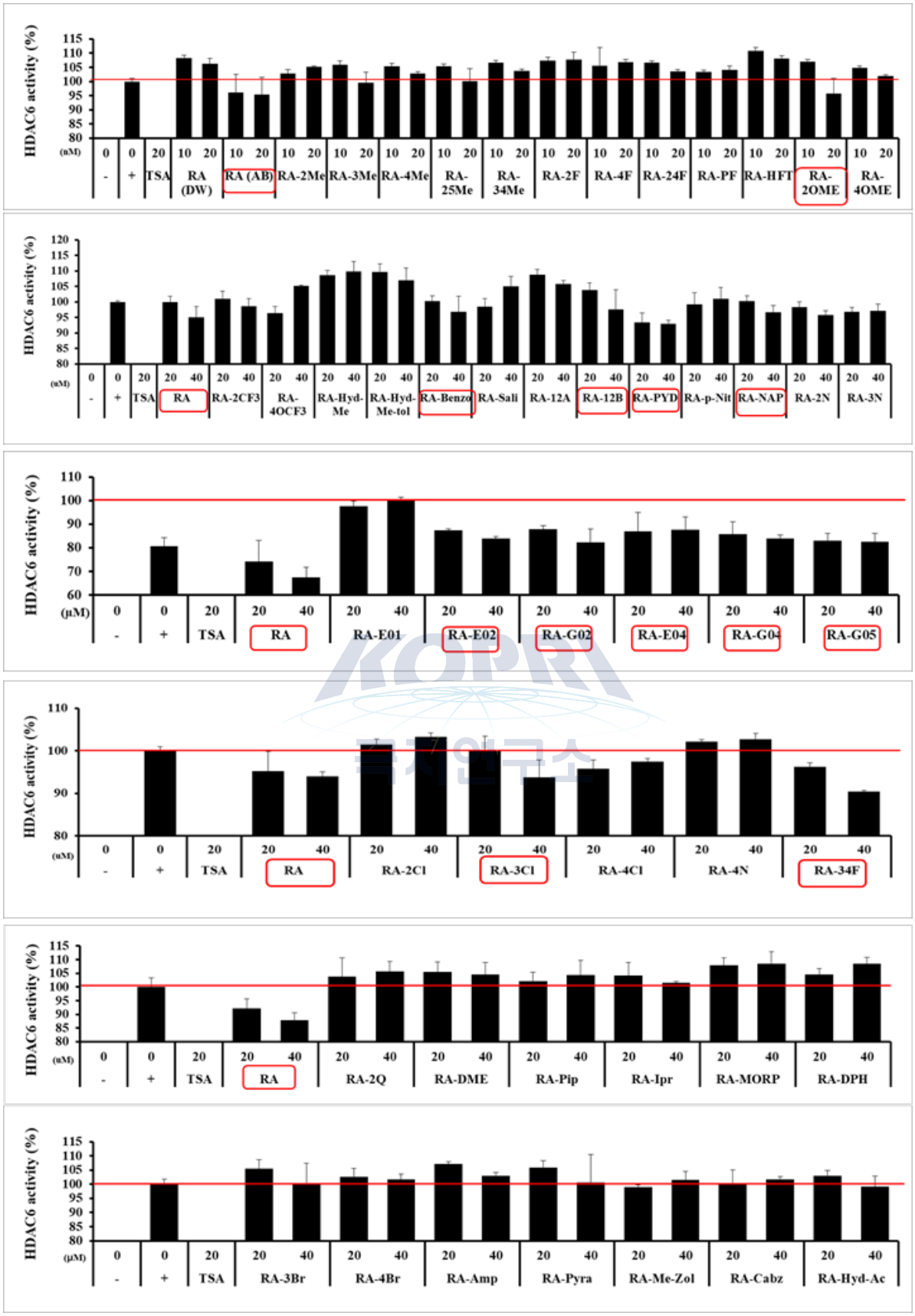
가. 실험방법

- 라말린 및 라말린 유도체의 HDAC6 효소 활성 저해효과를 측정하기 위해 fluorogenic HDAC6 assay kit(50076-1, BPS bioscience)를 사용하였고 양성대조군으로는 HDAC6 저해제인 trichostatin A(TSA)를 실험에 사용함. HDAC6가 50 % 정도 활성을 갖는 TSA의 농도는 0.003 μM로 kit 회사의 manual에 나와있음

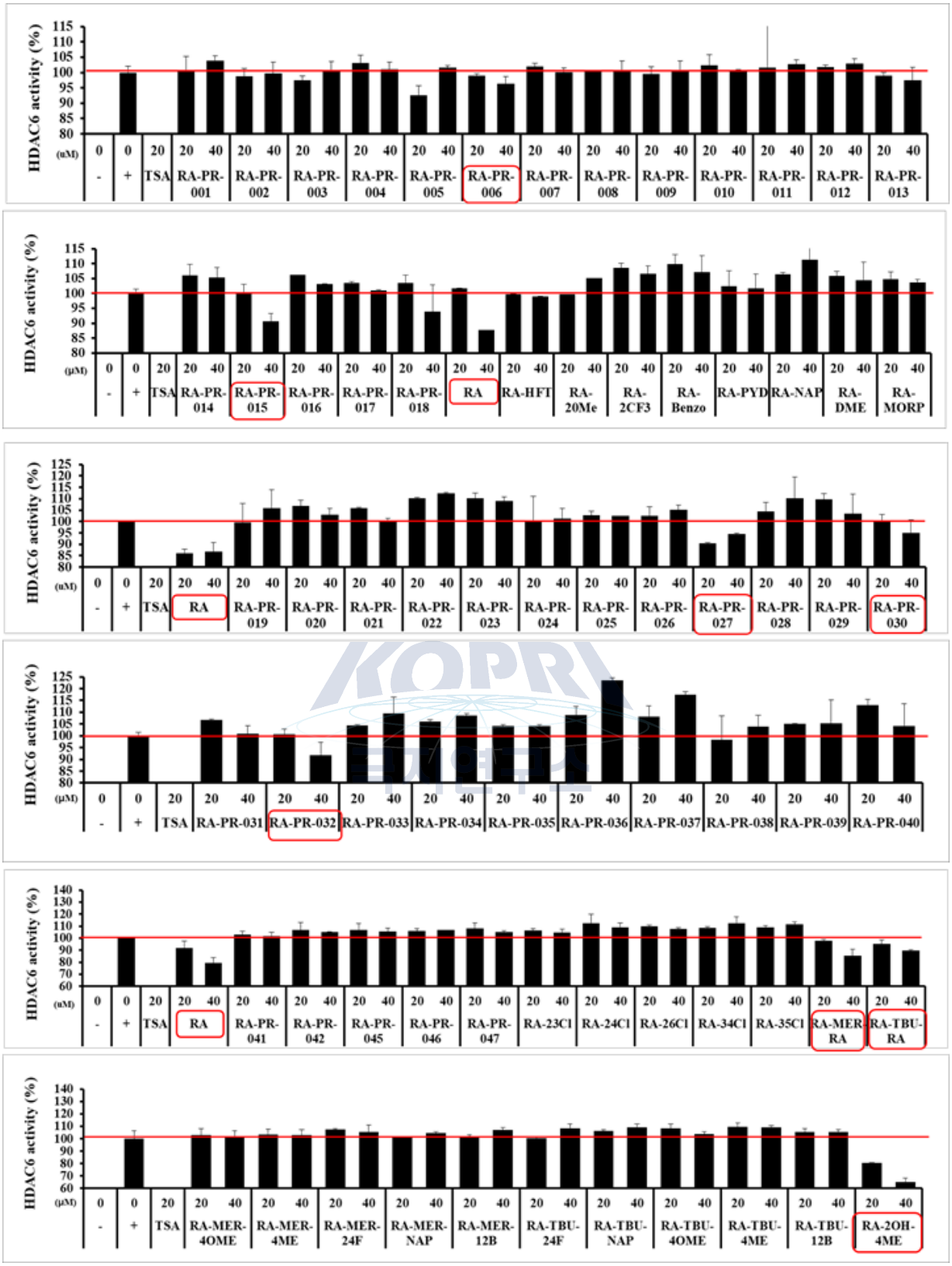
- 200 μM의 HDAC6 substrate 5 μL, 1 mg/mL의 bovine serum albumin(BSA) 5 μL, HDAC assay buffer 30 μL, 7 ng/μL HDAC6 human recombinant enzyme 5 μL와 20 μM, 40 μM로 희석한 라말린 및 유도체 시료들을 black 384 well-plate에 각각 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 2xHDAC developer 50 μL 첨가하여 RT에서 15분 반응시킴. Fluorescence microplate reader를 이용하여 Ex:350-380 nm, Em:440-460 nm에서 형광을 측정하여 HDAC6의 효소 활성을 분석함

나. 연구결과

- 라말린 및 라말린 유도체들의 HDAC6 활성 조절 여부를 확인한 결과 HDAC6 활성을 10 % 이상 감소한 시료는 없었음. HDAC6의 활성감소가 미미하지만 농도에 따른 HDAC6 감소 경향을 확인하기 위해 y축의 범위를 60~140 %로 지정하여 경향성 확인함. HDAC6 활성이 감소 경향을 보인 시료는 라말린, RA-4Me, RA-2F, RA-24F, RA-HFT, RA-2OMe, RA-2CF3, RA-Benzo, RA-3Cl, RA-2N, RA-3N, RA-PYD, RA-DME, RA-MORP, RA-PR006, RA-PR013, RA-PR015, RA-PR018, RA-PR027, RA-PR030, RA-PR032, RA-NAP, RA-MER-RA, RA-TBU-RA, RA-2OH-4Me, RA-TBU-Hyd-Me, RA-TBU-Hyde-Me-Tol, RA-TBU-PYD, RA-TBU-2OMe, RA-TBU-PF, RA-Benzo-HCl, RA-RA-058HM, RA-PR058, RA-PR076로 총 34개의 시료로 확인함(그림 2-139~140)



[그림 2-139. 라말린 및 라말린 유도체의 HDAC6 효소 활성 결과-1]



[그림 2-140. 라말린 및 라말린 유도체의 HDAC6 효소 활성 결과-2]

○ 라말린 유도체의 항산화 활성

1) DPPH를 이용한 항산화 효과 확인

가. 실험방법

- DPPH법은 천연물의 수용성 혹은 유기용매 추출물의 항산화 활성 측정법으로 널리 사용하는 방법임. 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate(DPPH)는 radical 상태에서 보라색을 띄고, 환원이 되면 노란색의 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazine(DPPH-H)로 변환됨. 안정한 라디칼인 DPPH는 산화방지물질로부터 전자 혹은 수소를 제공받으면 non-radical로 전환됨. 이때 반응 전후의 화학물질 농도를 측정하여 화학반응에 참여한 이온 등의 정도를 파악함

- 라말린 및 라말린 유도체 150종을 1, 2.5, 5, 10 μM 농도로 MeOH에 녹인 후 150 μL씩 96 well-plate에 넣음. 여기에 0.1 mM DPPH를 50 μL 추가하여 섞어준 후 빛을 차단한 상태로 상온에서 약 30분간 반응 진행함. 이후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 평가함

나. 연구결과

- 라말린 및 라말린 유도체 150종에 대한 DPPH 활성 소거능 확인해본 결과, 라말린의 IC_{50} 값은 1.4 μM로 강한 저해효과를 나타남. 라말린 유도체 중에서 IC_{50}이 10 μM 이하로 DPPH 저해효과를 나타내는 시료는 RA-2Me, RA-25ME, RA-34ME, RA-34F, RA-4OME, RA-2CF3, RA-Hyd-Ac, RA-4Cl, RA-3N, RA-G05, RA-p-Nit, RA-NAP, RA-TBU-RA, RA-TBU-NAP, RA-TBU-12B, RA-PR077, RA-PR078, RA-3Me, RA-4Me, RA-2F, RA-4F, RA-24F, RA-2OMe, RA-4OCF3, RA-12B, RA-2N, RA-4N, RA-PYD, RA-E04, RA-G04, RA-2Q, RA-PR010, RA-MER-RA, RA-MER-4OME, RA-MER-4Me, RA-MER-24F, RA-MER-NAP, RA-MER-12B, RA-TBU-4OME, RA-TBU-4Me, RA-TBU-24F, RA-2OH-4Me, RA-TBU-2OMe, RA-Hyd-Me-4OMe, RA-Hyd-Me-4Me, RA-MER-PYD, RA-PR058, RA-PR076 시료로 확인되었음 (표 2-5)

2) 라말린 및 유도체의 물성 확인

가. 실험방법

- Biovia draw 2021 프로그램을 이용하여 라말린 및 라말린 유도체의 구조를 입력 후 기초 물성에 대한 정보를 획득함. 물질의 극성 정도를 확인하는 Polar surface area (PSA), 친유성 (Lipophilicity) 정도를 확인하는 AlogP 값, 그리고 수소결합의 수를 나타내는 hydrogen bond accepter (HBA)와 hydrogen bond donor (HBD) 및 분자량을 확인함 (표 2-5)

Sample Name	PSA	ALogP	HBA	HBD	M.W.	DPPH
Ramalin (=RA)	128	-2.52	5	5	253.26	1.4
RA-2Me	104.45	-1.79	4	4	251.29	2.79
RA-3Me	104.45	1.79	4	4	251.29	5.30
RA-4Me	104.45	-1.31	4	4	251.29	3.91
RA-25Me	104.45	-1.31	4	4	265.31	4.5
RA-34Me	104.45	-2.07	4	4	265.31	4.46
RA-2F	104.45	-2.07	4	4	255.25	4.42
RA-4F	104.45	-1.87	4	4	255.25	4.16
RA-24F	104.45	-1.25	4	4	273.24	5.32
RA-34F	104.45	-0.97	4	4	327.21	5.85
RA-PF	113.68	-2.3	5	4	267.28	116
RA-HFT	113.68	-2.3	5	4	267.28	611.79
RA-2OMe	104.45	-1.34	4	4	305.25	3.79
RA-4OMe	104.45	-1.34	4	4	305.25	2.64
RA-2CF3	113.68	-0.16	5	4	321.25	4.18
RA-4OCF3(=OCF3)	95.66	-2.07	4	3	251.28	3.77
RA-3CF3	95.66	-1.59	4	3	265.31	13.91
RA-Hyd-Me	128.24	-2.4	5	4	262.26	14.38
RA-Hyd-Me-Tol	104.45	-1.37	4	4	287.31	12.37
RA-Hyd-Ac	146.97	-2.76	6	4	315.34	1.15
RA-Benzo	146.97	-2.55	6	4	333.33	3862.5
RA-Sali	117.23	-2.89	5	4	238.24	12111.67
RA-Cabz	133.55	-2.5	5	5	280.27	시료부족
RA-12A	146.97	-2.76	6	4	315.34	12.01
RA-12B	146.97	-2.54	6	4	333.33	5.98
RA-2Cl	104.44	-1.617	4	4	271.7	10.11
RA-3Cl	104.44	-1.617	4	4	271.7	20.77
RA-4Cl	104.44	-1.617	4	4	271.7	7.57
RA-3Br	104.44	-1.533	4	4	316.15	19.69
RA-4Br	104.44	-1.533	4	4	315.02	14.13
RA-2N	130.47	-3.03	4	5	252.27	1.1
RA-3N	130.47	-3.03	4	5	252.27	2.5
RA-4N	130.47	-3.03	4	5	252.27	4.8
RA-PYD	117.33	-2.89	5	4	238.24	8.27
RA-E01	104.45	-2.28	4	4	237.25	35.81
RA-E02	104.45	-1.59	4	4	269.27	18.53
RA-E04	104.45	-1.59	4	4	269.27	6.78
RA-E05	104.45	-1.59	4	4	269.27	36.96
RA-G02	104.45	-1.91	4	4	255.24	18.05
RA-G04	104.45	-1.91	4	4	255.24	3.04
RA-G05	104.45	-1.91	4	4	255.24	4.34
RA-DME	95.66	-4.16	5	3	189.21	598.35
RA-IPR	104.45	-3.64	5	4	203.23	2580.01

KOPRI 극지연구소

RA-Amp	98.9	-4.76	6	3	244.29	3416.68
RA-MORP	104.89	-4.48	6	3	231.25	13404.78
RA-PIP	95.66	-3.24	5	3	229.28	4776.68
RA-2Q	117.34	-1.56	5	4	288.3	4.6
RA-DPh	95.66	-0.5	4	3	313.35	31.38
RA-Pyra	125.09	-2.86	6	3	304.3	시료부족
RA-Me-zol	113.06	-3.92	6	2	227.22	13.25
RA-PR-001	133.54	-1.68	5	3	279.31	12.8
RA-PR-002	134.85	3.55	6	2	435.53	12213.33
RA-PR-003	134.85	4.04	6	2	449.56	ND
RA-PR-004	133.54	-1.19	5	3	293.34	19.28
RA-PR-005	134.85	4.03	6	2	449.56	시료부족
RA-PR-006	293.34	-1.19	5	3	293.34	879.58
RA-PR-007	134.85	4.04	6	2	449.56	4890.48
RA-PR-008	133.54	-1.19	5	3	293.34	860.42
RA-PR-009	133.54	-1.36	5	3	305.35	1135.44
RA-PR-010	133.54	-1.15	5	3	323.34	7.8
RA-PR-011	146.44	-1.42	6	3	320.37	1511.17
RA-PR-012	146.44	-1.7	6	3	324.33	4317.25
RA-PR-013	134.85	3.76	6	2	453.53	8680.56
RA-PR-014	134.85	3.76	6	2	453.53	시료부족
RA-PR-015	133.54	-1.47	5	3	297.31	4503.63
RA-PR-016	134.85	3.76	6	2	453.53	5156.19
RA-PR-017	133.54	-1.47	5	3	297.31	1141.56
RA-PR-018	133.54	-1.47	5	3	297.31	1064.5
RA-PR-019	134.85	3.76	6	2	453.53	ND
RA-PR-020	133.54	-1.47	5	3	297.31	1531.75
RA-PR-021	134.86	4.22	6	2	469.98	13345
RA-PR-022	134.86	4.22	6	2	469.98	ND
RA-PR-023	142.78	-1.37	6	3	355.38	1947.5
RA-PR-024	146.43	-1.9	6	3	306.34	5835
RA-PR-025	130.08	-0.72	6	3	321.39	2816.48
RA-PR-026	135.55	-1.01	5	3	313.75	2204
RA-PR-027	134.86	4.21	6	2	469.98	3126
RA-PR-028	134.86	4.03	6	2	449.56	6955.56
RA-PR-029	133.55	-1.192	5	3	293.34	4451.9
RA-PR-030	119.76	2.99	6	2	419.47	3013.67
RA-PR-031	146.43	-1.7	6	3	324.33	3095.46
RA-PR-032	155.66	-1.92	7	3	336.37	4258.51
RA-PR-033	119.76	3.48	6	2	433.49	5308.61
RA-PR-034	111.55	2.82	6	2	418.48	31820.6
RA-PR-035	110.24	-2.4	5	3	262.26	2761
RA-PR-036	99.52	3.44	6	1	403.47	ND
RA-PR-037	99.52	3.64	6	1	421.46	ND
RA-PR-038	87.21	2.05	5	1	321.34	1632.92
RA-PR-039	87.21	1.84	5	1	303.35	2434.39
RA-PR-040	133.55	-1.15	5	3	323.34	3500.93

KOPRI 극지연구소

RA-p-Nit	128.24	-2.4	5	4	262.26	6.72
RA-NAP	104.44	-1.37	4	4	287.31	7.83
RA-PR-041	133.54	-0.87	5	3	319.38	2576.75
RA-PR-042	118.44	-2.23	5	3	263.25	2048.95
RA-PR-043	122.54	2.44	5	2	349.45	시료부족
RA-PR-044	122.54	2.16	5	2	353.41	시료부족
RA-PR-045	122.54	2.44	5	2	349.45	5546.83
RA-PR-046	121.1	-1.72	5	4	306.29	37000.37
RA-PR-047	121	-1.44	5	4	302.33	2890.61
RA-23Cl	104.44	-0.95	4	4	306.14	51.17
RA-24Cl	104.44	-0.95	4	4	306.14	46.01
RA-26Cl	104.44	-0.95	4	4	306.14	135.16
RA-34Cl	104.44	-0.95	4	4	306.14	32.84
RA-35Cl	104.44	-0.95	4	4	306.14	57.51
RA-MER-RA	113.68	0.18	5	4	267.28	7.14
RA-TBU-RA	113.68	1.11	5	4	309.36	4.66
RA-MER-4OME	102.68	0.41	5	3	281.31	6.09
RA-MER-4Me	93.45	0.91	4	3	265.31	8.17
RA-MER-24F	93.45	0.84	4	3	287.26	4.83
RA-MER-NAP	93.45	1.33	4	3	301.34	2.73
RA-MER-12B	135.97	0.15	6	3	347.36	5.06
RA-TBU-4OME	102.68	1.34	5	3	323.38	4.86
RA-TBU-4ME	93.45	1.84	4	3	307.39	4.28
RA-TBU-24F	93.45	1.77	4	3	329.34	5.43
RA-TBU-NAP	93.45	2.26	4	3	343.42	2.75
RA-TBU-12B	135.97	1.08	6	3	389.44	4.3
RA-2OH-4Me	124.68	-2.03	5	5	267.28	2.16
RA-ENA-1-638	67.43	2.45	3	2	304.26	14.22
RA-ENA-2-584	86.95	1.93	3	2	259.21	20.82
RA-ENA-3-306	91.44	2.27	3	3	238.24	15.34
RA-ENA-4-066	75.45	1.45	3	3	269.27	19.36
RA-ENA-5-343	70.67	1.65	3	2	283.29	ND
RA-ENA-6-966	67.43	1.91	3	2	272.24	24.59
RA-ENA-7-420	67.43	1.76	3	2	266.27	13.95
RA-ENA-8-047	112.25	2.06	4	2	269.32	시료부족
RA-ENA-9-116	104.45	-1.19	4	4	336.57	시료부족
RA-ENA-10-276	70.67	2.16	3	2	299.75	시료부족
RA-ENA-11-114	75.63	2.37	4	2	269.27	시료부족
RA-PR-048	130.23	-3.45	6	4	257.22	시료부족
RA-PR-049	117.33	-3.15	5	4	252.27	시료부족
RA-PR-050	117.33	-3.15	5	4	252.27	시료부족
RA-NAP-HCl	104.45	-0.99	4	4	323.77	5.06
RA-PF-HCl	104.45	-0.87	4	4	363.67	55.11
RA-ASP-Hyd-Me	95.66	-2.39	4	3	237.26	49.68
RA-ASP-PYD	117.34	-3.21	5	4	224.22	22.93
RA-4NA	134.41	-4.2	6	4	266.25	ND
RA-12DMe	95.66	-4.16	5	3	189.21	41.22

KOPRI 극지연구소

RA-TBU-Hyd-Me	84.66	1.56	4	2	307.39	43.72
RA-TBU-Hyd-Me-tol	84.66	2.05	4	2	321.41	77.13
RA-TBU-PYD	106.34	0.72	5	3	294.35	104.74
RA-TBU-2OMe	102.68	1.33	5	3	323.38	5.52
RA-TBU-2Me	113.68	1.11	5	4	309.36	11.7
RA-TBU-PF	93.45	2.38	4	3	383.31	53.67
RA-Hyd-Me-4OMe	104.89	-2.09	5	3	281.31	6.25
RA-TBU-Hyd-Me-4OMe	93.89	1.54	5	2	337.41	ND
RA-Hyd-Me-4Me	95.66	-1.59	4	3	265.31	3.14
RA-Sali-HCl	141.75	-2.9	6	5	317.73	78.32
RA-Benzo-HCl	121.52	-2.66	5	4	301.72	88.44
RA-058-HM	58.36	1.32	2	2	257.28	32.1
RA-MeR-Hyd-Me	84.66	0.63	4	2	265.31	260.25
RA-MeR-PYD	106.33	-0.19	5	3	252.27	4.46
RA-PR-051	117.33	-2.84	5	4	256.23	시료부족
RA-PR-052	130.23	-3.76	6	4	253.25	시료부족
RA-PR-053	113.68	-2.09	5	4	285.27	시료부족
RA-PR-054	113.68	-1.81	5	4	281.31	시료부족
RA-PR-055	113.68	-1.88	5	4	303.26	시료부족
RA-PR-056	117.33	-2.84	5	4	256.23	시료부족
RA-PR-057	67.15	1.61	2	3	257.28	시료부족
RA-PR-058	67.15	1.33	2	3	261.24	3.81
RA-PR-059	87.66	1.85	4	3	312.33	시료부족
RA-PR-060	87.66	2.13	4	3	308.37	시료부족
RA-PR-061	113.68	-1.63	5	4	301.72	시료부족
RA-PR-062	96.89	1.63	5	3	324.37	시료부족
RA-PR-063	117.34	-2.02	5	4	288.73	시료부족
RA-PR-064	113.68	-1.63	5	4	301.72	시료부족
RA-PR-065	76.38	1.49	3	3	309.74	시료부족
RA-PR-066	126.57	-2.9	6	4	268.27	시료부족
RA-PR-067	117.34	-2.68	5	4	256.23	시료부족
RA-PR-068	70.67	0.59	3	2	265.3	시료부족
RA-PR-069	53.6	1.91	3	2	265.35	시료부족
RA-PR-070	76.38	1.78	3	3	265.35	시료부족
RA-PR-071	70.67	1.04	3	2	279.33	시료부족
RA-PR-072	70.66	0.47	3	2	265.31	시료부족
RA-PR-073	76.38	2.62	3	3	315.84	시료부족
RA-PR-074	61.44	1.26	2	2	267.3	시료부족
RA-PR-075	61.44	0.69	2	2	253.27	시료부족

KOPRI 극지연구소

RA-PR-076	67.14	2.84	2	3	303.8	4.81
RA-PR-077	76.38	1.6	3	3	291.27	0.56
RA-PR-078	67.15	2.1	2	3	275.27	2.73
RA-PR-079	67.15	2.48	2	3	311.73	16.95
RA-PR-080	67.15	1.82	2	3	279.23	24.29
RA-070-HM	58.36	2.01	2	2	249.35	82.76
RA-076-HM	58.36	2.46	2	2	263.38	ND
RA-Oph	101.65	-2.27	5	3	238.24	ND
RA-058-PF	67.15	2.15	2	3	333.21	ND
RA-TBU-Hyd-Me-2OH	104.89	1.32	5	3	323.38	시료부족
RA-Actosome RA	-	-	-	-	-	시료부족
RA-Liposome RA	-	-	-	-	-	시료부족
RA-HM-2OH	115.88	-2.32	5	4	267.28	11.55
RA-058-HM-2OH	78.59	1.09	3	3	273.27	22.45

[표 2-5. 라말린 유도체의 물성 확인 및 항산화 효과 (DPPH) 정리표]

KOPRI
극지연구소

□ 연구내용 1-3. 후보물질의 대량생산 공정 확보

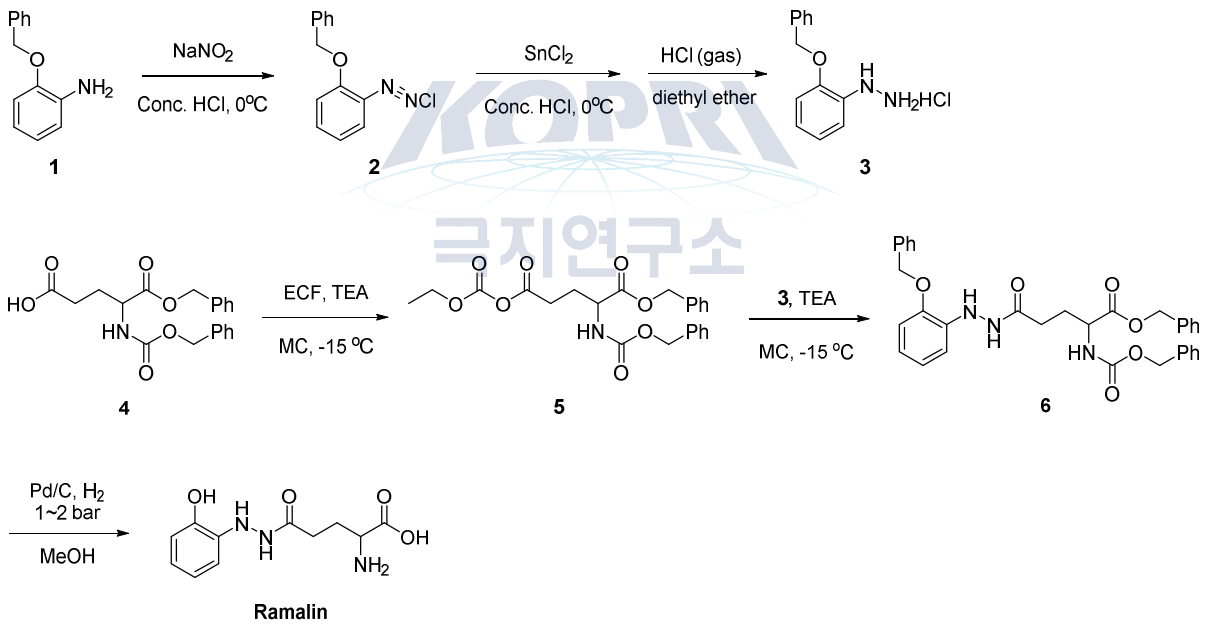
○ 라말린의 대량합성

1) 라말린의 대량 합성 방법 수립

가. 라말린 합성 전체 scheme

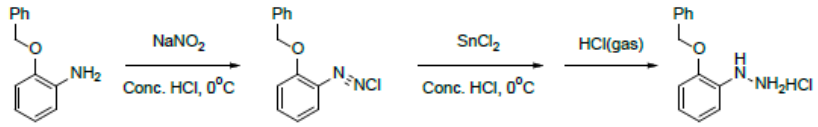
- 안국약품 주도하에 ㈜ 아이티캠에서 대량 합성 진행

- 합성 수행 방향 : 2-(Benzyloxy)aniline으로부터 (2-(benzyloxy)phenyl)hydrazine hydrochloride을 합성. 1-Benzyl *N*-Benzyloxycarbonyl-L-glutamate와 (2-(benzyloxy) phenyl)hydrazine hydrochloride의 연결반응을 통해 N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)glutaminate를 합성. N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)glutaminate를 hydrogenation하여 라말린을 합성



[그림 2-141. 라말린의 대량 합성 전체 scheme]

나. (2-(Benzyloxy)phenyl)hydrazine HCl의 합성 방법



Name	MW	density	equiv	mol	사용량	CAS RN
2-(Benzyloxy)aniline	199.25		1	2.342	466.66 g	20012-63-9
$NaNO_2$	68.99		1.6	3.747	258.53 g	7632-00-0
Conc. HCl		1.18	6 vol		2,800 mL	
$SnCl_2$(anhy)	189.61		3.6	8.431	1,600 g	7772-99-8
Conc. HCl		1.18	1 vol		1,600 mL	

[그림 2-142. (2-(Benzyloxy)phenyl)hydrazine HCl의 합성 방법]

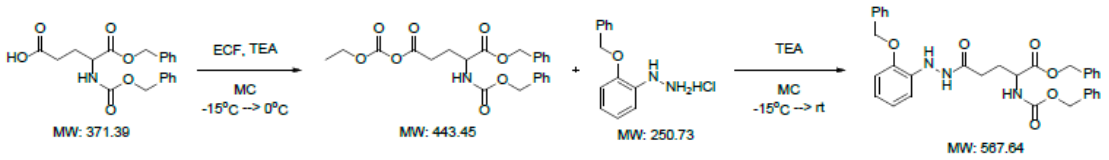
- 20 L Round bottomed flask에Conc. HCl 2,800 mL를 넣고 10 ℃로 냉각. 2-(Benzyloxy)aniline 466.66 g을 천천히 첨가함. 이때 가스발생 및 온도상승 발생. 적가 후 30분 교반 수행

- Sodium nitrite 258.53 g을 정제수 390 mL에 녹여 4 ℃에서 적가함. 4~7 ℃ 유지시킴. 2시간 추가 교반 수행. Stannous chloride 1,600 g을 Conc. HCl 1,600 mL에 녹여 적가함. 발열이 발생하며 주황색의 현탁액으로 변함

- 상온으로 올리면서overnight 교반. 반응물을 여과하고 여과물을 정제수 7 L에 녹이고 50 % NaOH 950 mL를 적가하여 pH 11 이하로 조절. Diethyl ether 4 L로 2회 추출하고 유기층을 $MgSO_4$로 건조하고 20 L Round bottomed flask에 투입함. 4 ℃에서 HCl gas를 bubbling. 갈색의solution → 주황색의 현탁액 → 보라색의 현탁액으로 색 변화 관찰. 고체를 여과하고 diethyl ether 1 L로 2회 씻어줌

- 오븐에서 건조하여 Pale brown solid 410 g, yield=69.8 %로 수득함

다. Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl-N^5-((2-benzyloxy)phenyl)amino) glutamate의 합성 방법



Name	MW	density	equiv	mol	사용량	CAS RN
L-glutamate	371.39		1	1.639	608.54 g	3705-42-8
ECF	108.52	1.14	1.2	1.966	187.2 mL	541-41-3
TEA	101.19	0.726	1.2	1.966	274.1mL	121-44-8
CH_2Cl_2			10 vol		6,085 mL	75-09-2
Hydrazine	250.73		1.2	1.966	493 g	
TEA	101.19	0.726	1.2	1.966	274.1 mL	121-44-8
CH_2Cl_2			10 vol		4,900 mL	75-09-2

[그림 2-143. 라말린 전구체 합성 방법]

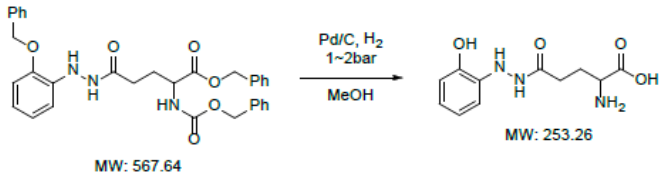
- 20 L Round bottomed flask, L-glutamate 608.54 g을 CH_2Cl_2 6,085 mL에 녹이고 0 ℃로 냉각. Triethylamine 274.1 mL를 넣고 30분 교반하고 -15 ℃로 냉각하여 ethyl chloroformate를 적가함. -15 ℃에서 1시간 교반하고 -2 ℃로 올려 2시간 교반 수행. 10 L Round bottomed flask에 hydrazine과 CH_2Cl_2 4,900 mL를 넣고 10 ℃로 냉각

- Triethylamine 274.1 mL를 적가 후 20 L RBF를 -15 ℃로 냉각. 10 L RBF의 solution을 적가하며 적가가 완료되면 상온으로 올리며 overnight 교반 수행

- 반응액에 정제수 4,800 mL를 넣고 교반 후 층분리 하고 유기층을 1 N HCl, 0.5 N $NaHCO_3$,정제수 순으로 4,800 mL씩 씻어주고 건조 및 농축을 수행함

- EA와 Hexane으로 재결정 수행하고 생성된 고체를 여과하고 hexane으로 씻어줌. 오븐에서 건조 후 Ivory solid 636 g, yield=68.7 %으로 수득함

라. 라말린의 합성 방법



Name	MW	density	equiv	mol	사용량	CAS RN
RN-20013-48	467.64			1.62	920 g	
10% Pd/C			8 wt%		72 g	7440-05-3
MeOH			50 vol		45 L	67-56-1

[그림 2-144. 라말린 최종 합성 방법]

- Benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl-N^5-((2-benzyloxy)phenyl)amino) glutamate을 200 L 반응 용기에 넣고 MeOH에 녹임

- 10 % Pd/C를 첨가하고 25 ℃에서 2.5 atm H_2 가스를 첨가하고 약 7시간 교반 반응 수행

- 반응액을 여과하고 여액을 약 7.2 L 남을 때까지 농축하고 질소 충진 및 교반을 10 ℃에서 2시간 수행

- MeOH를 7.2 L 넣고 2시간 교반 후 여과 및 건조하여 316 g의 라말린을 yield=77.2 %로 수득함

KOPRI 극지연구소

2) 대량합성 라말린의 분석결과

가. 분석방법

- NMR 분석 : 한국기초과학지원연구원 Bruker 400 MHz NMR

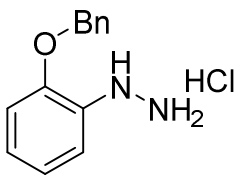
- HPLC 분석

Equipment		SHIMADZU LC-2030C-Plus
Column		Luna 5 ㎛, C18 (250 mm × 4.6 mm, 100 Å)
Mobile Phase	A (Water)	Water + 0.1% formic acid
	B (ACN)	ACN + 0.1% formic acid
Gradient (A : B)	0 min	90 : 10
	10 min	85 : 15
	20 min	20 : 80
Column Temp.		25 ℃
Flow Rate		0.5 mL/min
Detection		254 nm
Injection Volume		5 ㎕
Run Time		Stop time 25 min / Post time 5 min
Retention Time		7.8 min
Sampling		1 mg/mL (H_2O)

[표 2-6. 대량합성 라말린의 HPLC 분석조건]

나. 라말린 및 전구체의 분석결과

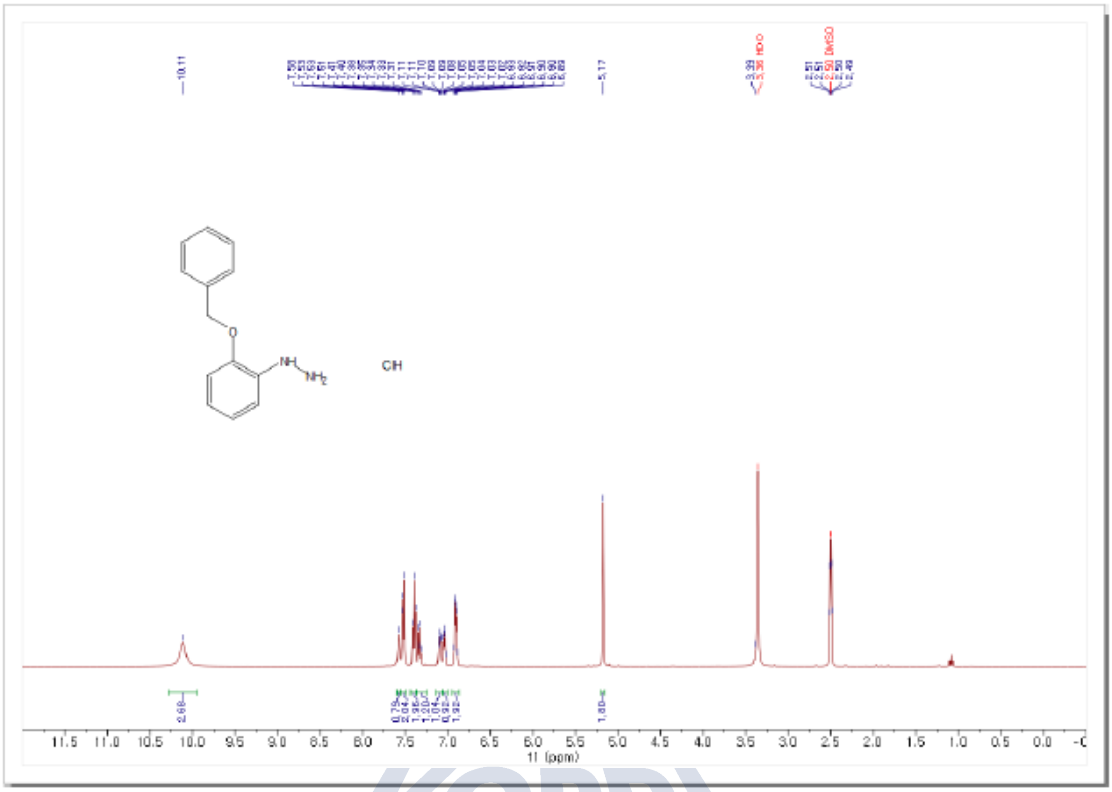
- Hydrazine HCl (3)의 분석결과



Molecular Weight: 250.73

3. Hydrazine HCl

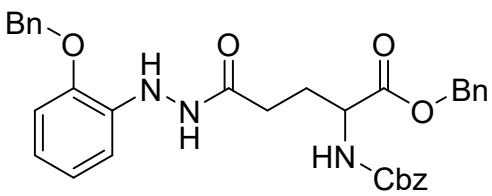
[그림 2-145. Hydrazine HCl (3)의 구조]



[그림 2-146. Hydrazine HCl (3)의 ^{1}H NMR (400 MHz) spectrum]

KOPRI
극지연구소

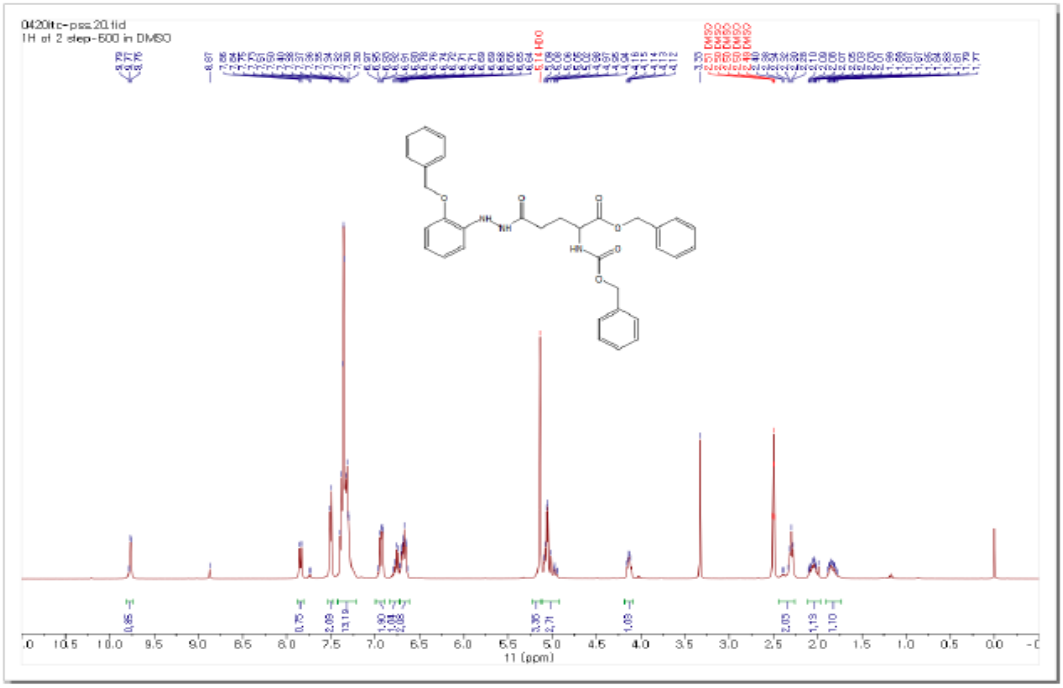
- Coup-RA (6)의 분석결과



Molecular Weight: 567.64

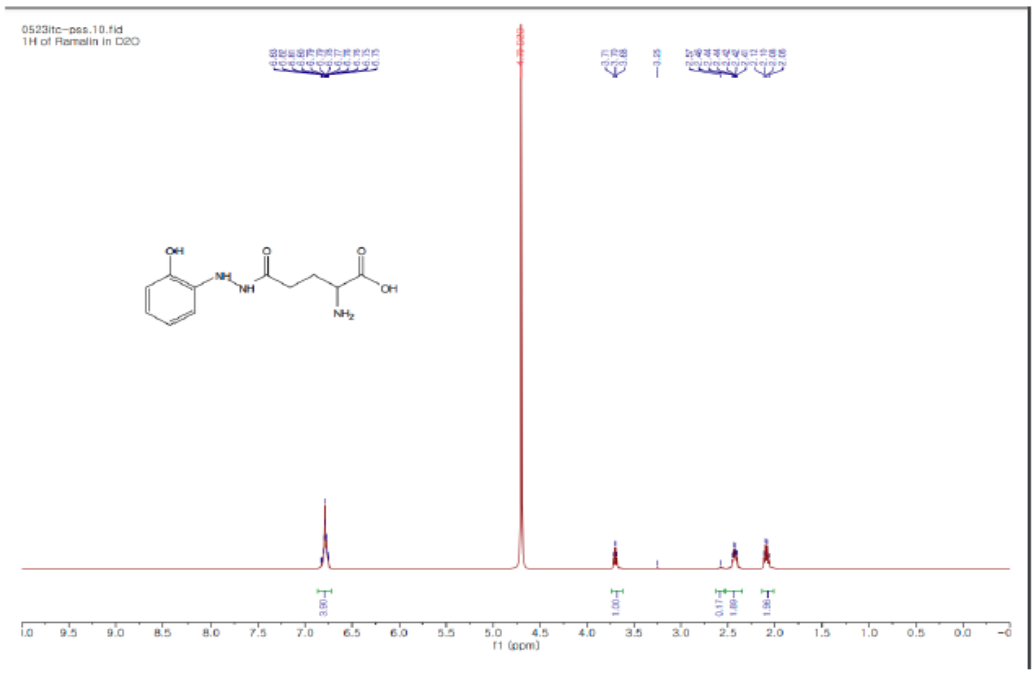
6. Coup-RA

[그림 2-147. Coup-RA (6)의 구조]



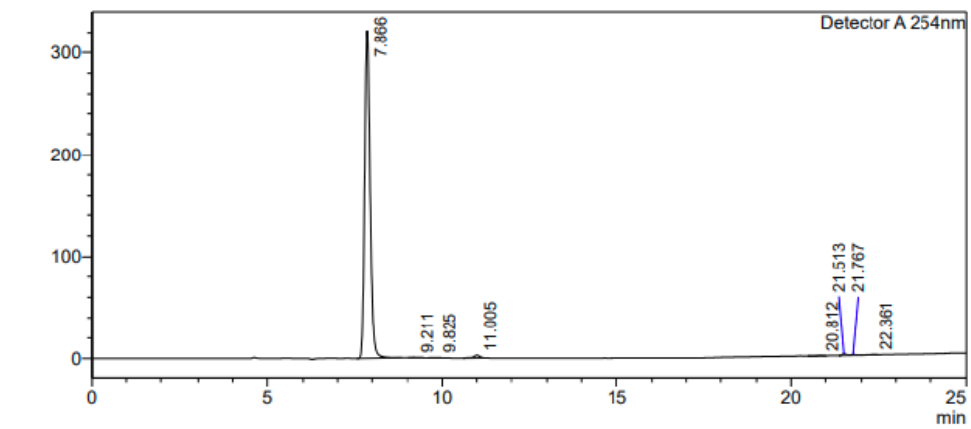
[그림 2-148. Coup-RA (6)의 ^{1}H NMR (400 MHz) spectrum]

- 라말린의 분석결과



[그림 2-149. 라말린의 ^{1}H NMR (400 MHz) spectrum]

<Chromatogram>



<Peak Table>

Detector A 254nm

Peak#	Rel. Time	Area	Height	Area%	Unit	Mark	Name
1	7.866	3402299	321725	98.237		M	
2	9.211	2404	173	0.069		M	
3	9.825	4309	267	0.124		M	
4	11.005	32251	2671	0.931		M	
5	20.812	2779	260	0.080			
6	21.513	11735	1497	0.339			
7	21.767	4700	542	0.136		V	
8	22.361	2877	302	0.083		V	
Total		3463354	327437	100.000			

[그림 2-150. 라말린의 HPLC 분석결과]

KOPRI 극지연구소

3) 라말린의 대량 합성 결과

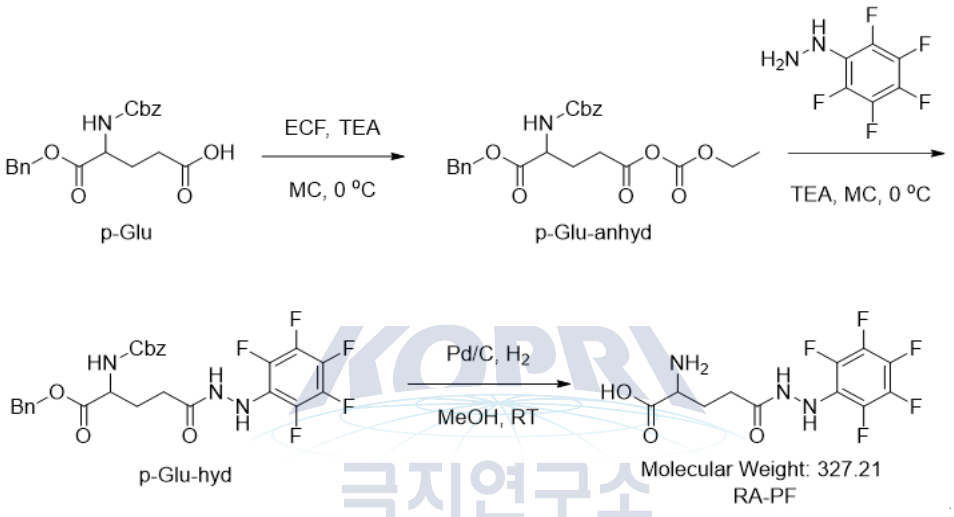
- 총 수율은 53.1 %이며, 최종 제품 순도는 98.2 %로 확인됨
- 합성 경로 상 주요 전구체인 (2-(benzyloxy)phenyl)hydrazine HCl 및 N2-((benzyloxy) carbonyl)-N5-((2-(benzyloxy)phenyl)amino)glutaminate의 단계별 수율도 각각 69.8 % 및 68.7 %로 확보되었으며, 이는 공정의 반복 생산 가능성과 원료 확보의 효율성 측면에서 양호한 수준으로 판단됨
- Hydrogenation 공정에서는 Pd/C 촉매 조건과 반응 시간 최적화를 통해 라말린의 결정성을 확보하였고, 공정 규모 확대 시에도 안정적인 수득률과 정제 효율을 확보할 수 있음을 확인
- 분석 결과(1H NMR, HPLC)는 기존 문헌 스펙트럼과의 비교 분석을 통해 정체성과 순도 모두 적합함이 검증되었음

○ 라말린 유도체 RA-PF의 대량합성

1) RA-PF의 대량 합성 방법 수립

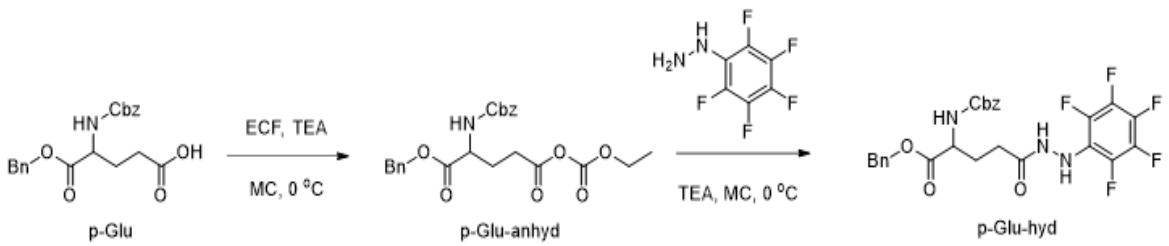
가. RA-PF 합성 전체 scheme

- 합성 수행 방향 : 5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid와 (perfluorophenyl)hydrazine의 연결반응을 통해 benzyl N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((perfluorophenyl)amino)glutaminate를 합성. N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((perfluorophenyl)amino)glutaminate를 hydrogenation하여 N^5-((perfluorophenyl)amino)glutamine (RA-PF) 합성



[그림 2-151. RA-PF 합성 전체 scheme]

나. N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((perfluorophenyl)amino)glutaminate의 합성



[그림 2-152. p-Glu-Hyd의 합성 scheme]

KOPRI 극지연구소

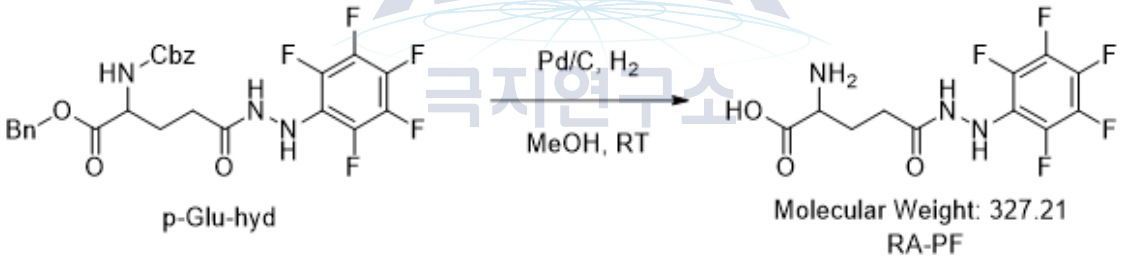
- 3 L Round bottomed flask, p-Glu 50 g (0.135mol)을 CH_2Cl_2 1000 mL 에 녹이고 0 ℃로 냉각. Triethylamine (1.2 eq, 0.162 mol) 22.6 mL 를 넣고 30 분 교반하고 0 ℃로 냉각하여 ethyl chloroformate (1.2 eq, 0.162 mol) 15.4 mL 를 적가함. 0 ℃에서 4 시간 교반 수행함

- 1 L Round bottomed flask 에 PF hydrazine (1.2 eq, 32.1 g)과 CH_2Cl_2 200 mL 를 넣고 0 ℃로 냉각. PF hydrazine solution 을 적가하며 적가가 완료되면 상온으로 올리며 overnight 교반 수행함

- 반응액에 정제수 500 mL 를 넣고 교반 후 층분리 하고 유기층을 1 N HCl, 0.5 N $NaHCO_3$,정제수 순으로 500 mL 씩 씻어주고 건조 및 농축을 수행함

- EA 와 Hexane 으로 재결정 수행하고 생성된 고체를 여과하고 hexane 으로 씻어줌. 오븐에서 건조 후 white solid, 54.1 g, yield=73.2 %으로 수득함

다. RA-PF 합성 방법



[그림 2-153. RA-PF 의 대량합성 scheme]

- N^2-((benzyloxy)carbonyl)-N^5-((perfluorophenyl)amino)glutaminate 5 g (9.07 mmol)을 2 L 반응용기에 넣고 MeOH 1L에 녹임

- 10 % Pd/C (500 mg)를 첨가하고 25 ℃에서 2.5 atm H_2 가스를 첨가하고 약 16시간 교반 반응 수행함

- 반응액을 여과하고 여액을 농축하여 고체를 수득하고 MeOH와 ethylacetate를 이용하여 재결정을 수행후 건조하여 white solid RA-PF 2.52 g, yield=85 %로 수득함

2) 대량합성 RA-PF 의 분석결과

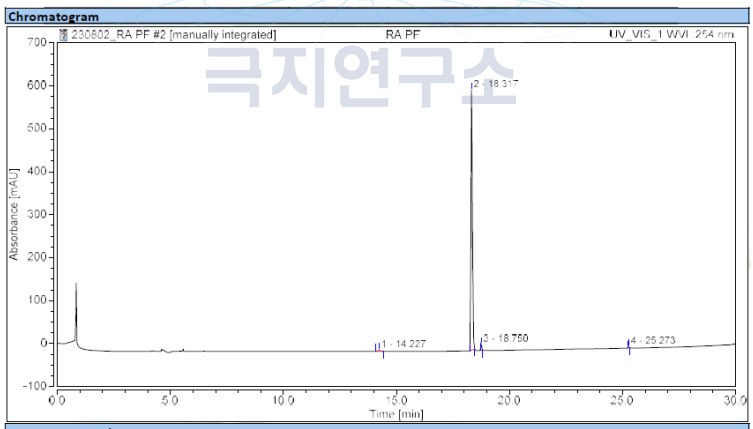
가. HPLC 분석결과

- 분석조건
- Column : Dikma / Inspire 5 μm C18 (100 x 4.6mm)
- Mobile phase
  A: Water + 0.1 % (v/v) fomic acid : Merck Lichrosolve
  B: ACN + 0.1 % (v/v) fomic acid : Merck Lichrosolve
- Gradient

Time (min)	A (water)	B (ACN)	Flow (ml/min)
0	95	5	0.7
8	70	30	0.7
10	0	100	0.7

- Stop Time : 15min / Post Time : 5min
- Detection : UV 254nm

- 대량합성된 RA-PF 의 HPLC 분석결과 순도 97.05 %로 확인됨



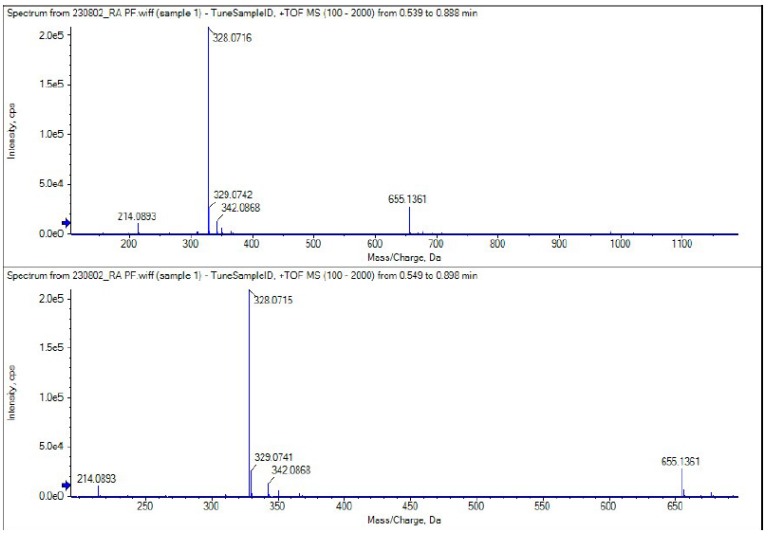
Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		14.227	0.358	2.318	0.79	0.37	n.a.
2		18.317	44.411	605.602	97.60	97.05	n.a.
3		18.750	0.586	13.280	1.29	2.13	n.a.
4		25.273	0.148	2.805	0.33	0.45	n.a.
Total:			45.504	624.004	100.00	100.00	

[그림 2-154. 대량합성된 RA-PF의 HPLC 분석결과]

나. RA-PF의 Mass 분석결과

- HRMS 측정 결과 계산값 $C_{11}H_{10}F_5N_3O_3$=328.0720, 측정값 328.0715 로 측정완료



[그림 2-155. 대량합성된 RA-PF의 Mass 분석결과]

3) RA-PF 대량합성 결과

- 5-(Benzyloxy)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-oxopentanoic acid와 (perfluorophenyl) hydrazine을 이용한 coupling 반응 및 hydrogenation 2단계 합성을 통해 총 수율 62.1 %, 순도 97.05 % RA-PF를 확보
- 합성 중간체인 benzyl N2-((benzyloxy)carbonyl)-N5-((perfluorophenyl)amino)glutaminate는 재결정 공정을 통해 높은 결정성을 확보하였고, 이를 기반으로 후속 정제 과정이 간소화됨
- HRMS 분석 결과, 이론값과 측정값이 거의 일치(Calc. 328.0720 / Found 328.0715)하여 합성물의 분자량 정체성이 명확히 증명됨
- HPLC 분석 결과, 순도 97.05 %로 확인됨

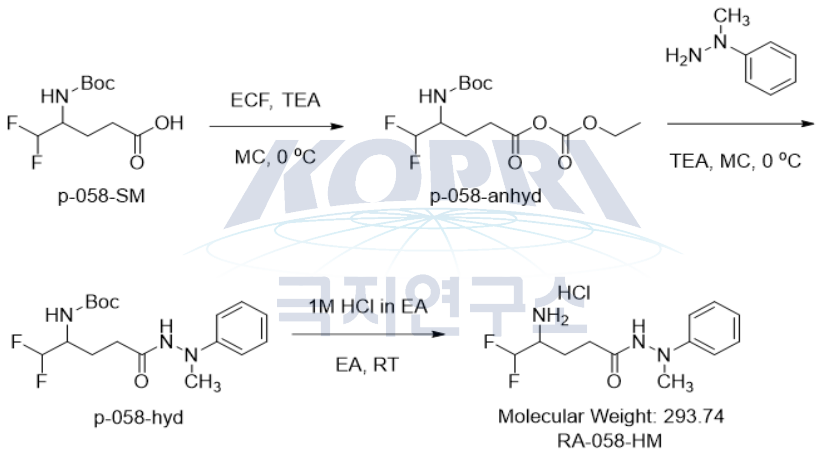
KOPRI 극지연구소

○ 라말린 유도체 RA-058HM의 대량합성

1) RA-058HM의 대량 합성 방법 수립

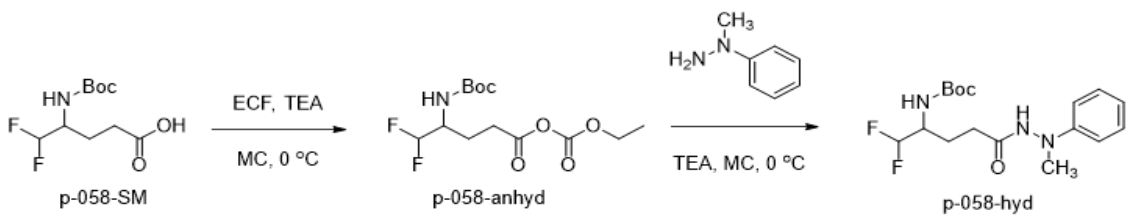
가. RA-058HM 합성 전체 scheme

- 합성 수행 방향 : 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid와 1-methyl-1-phenylhydrazine의 연결반응을 통해 *tert*-butyl (1,1-difluoro-5-(2-methyl-2-phenylhydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate를 합성. *tert*-butyl (1,1-difluoro-5-(2-methyl-2-phenylhydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate를 hydrogenation하여 4-amino-5,5-difluoro-*N'*-phenylpentanehydrazide hydrogen chloride (RA-058HM) 합성



[그림 2-156. RA-058HM 합성 전체 scheme]

나. *tert*-butyl (1,1-difluoro-5-(2-methyl-2-phenylhydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate의 합성



[그림 2-157. p-058-hyd의 합성 scheme]

- 3 L Round bottomed flask, p-Glu 50 g (0.197mol)을 CH_2Cl_2 1000 mL에 녹이고 0 ℃로 냉각. Triethylamine (1.2 eq, 0.236 mol) 32.9 mL를 넣고 30분 교반하고 0 ℃로 냉각하여 ethyl chloroformate (1.2 eq, 0.236 mol) 22.4 mL를 적가함. 0 ℃에서 4시간 교반 수행

- 1 L Round bottomed flask에 1-methyl-1-phenylhydrazine(1.2 eq, 24.1 g)과 CH_2Cl_2 200 mL를 넣고 0 ℃로 냉각. PF hydrazine solution을 적가하며 적가가 완료되면 상온으로 올리며 overnight 교반 수행

- 반응액에 정제수 500 mL를 넣고 교반 후 층분리 하고 유기층을 1 N HCl, 0.5 N $NaHCO_3$,정제수 순으로 500 mL씩 씻어주고 건조 및 농축을 수행함

- EA와 Hexane으로 재결정 수행하고 생성된 고체를 여과하고 hexane으로 씻어줌. 오븐에서 건조 후 white solid, 64.1 g, yield=91 %으로 수득함

다. RA-058HM 합성 방법

[그림 2-158. RA-058HM의 최종 합성 scheme]

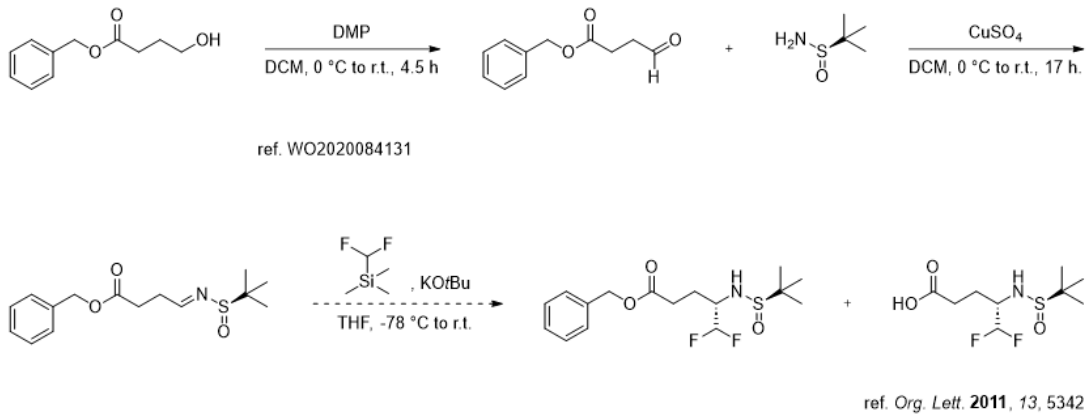
- *tert*-butyl (1,1-difluoro-5-(2-methyl-2-phenylhydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate 10 g (0.028 mmol)을 1 L 반응용기에 넣고 1M HCl이 포함된 ethyl acetate 500 mL에 녹임

- 반응물을 상온에서 약 16시간 교반 수행. 교반도중 RA-058HM이 HCl 염화 되면서 고체로 결정화됨

- 염화된 RA-058HM을 여과하고 여과물을 ethyl acetate 500 mL로 충분히 씻어주고 건조하여 최종 합성 완료. 건조된 white solid, 7.44 g, yield=95 %으로 수득함

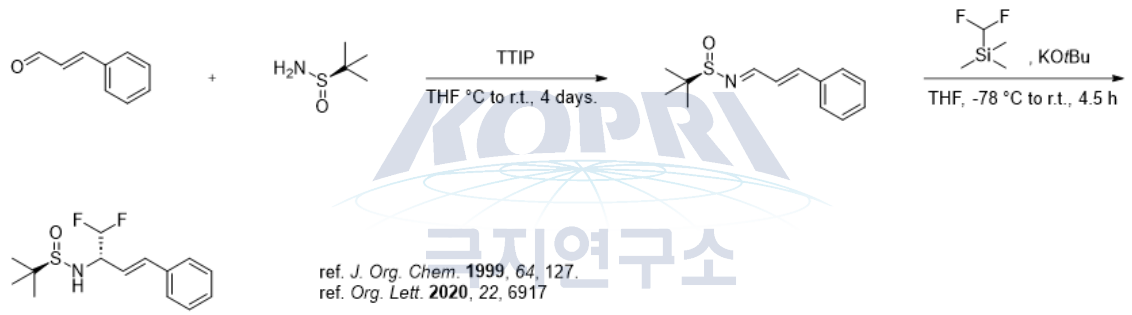
라. 출발물질 p-058-SM 합성 시도

- 대량 합성을 위한 출발물질 확보를 위해 대량 합성 공정법 연구



[그림 2-159. p-058-SM 대량 합성 scheme 1]

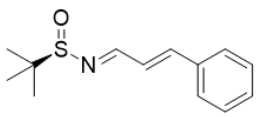
- (difluoromethyl)trimethylsilan 의 사용조건을 최적하하기 위하여 cinnamaladehyde 로부터 확보한 기질을 이용한 모델스터지 진행



KOPRI 극지연구소

[그림 2-160. p-058-SM 대량 합성을 위한 모델 스터디 scheme 2]

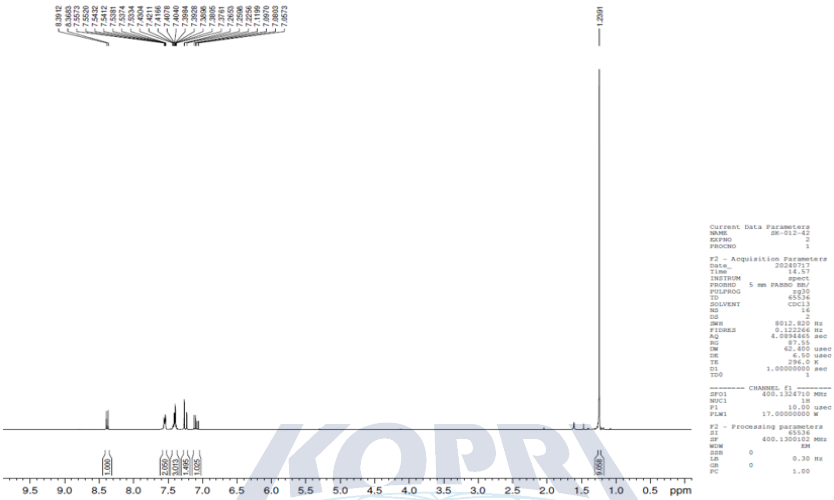
마. 합성결과



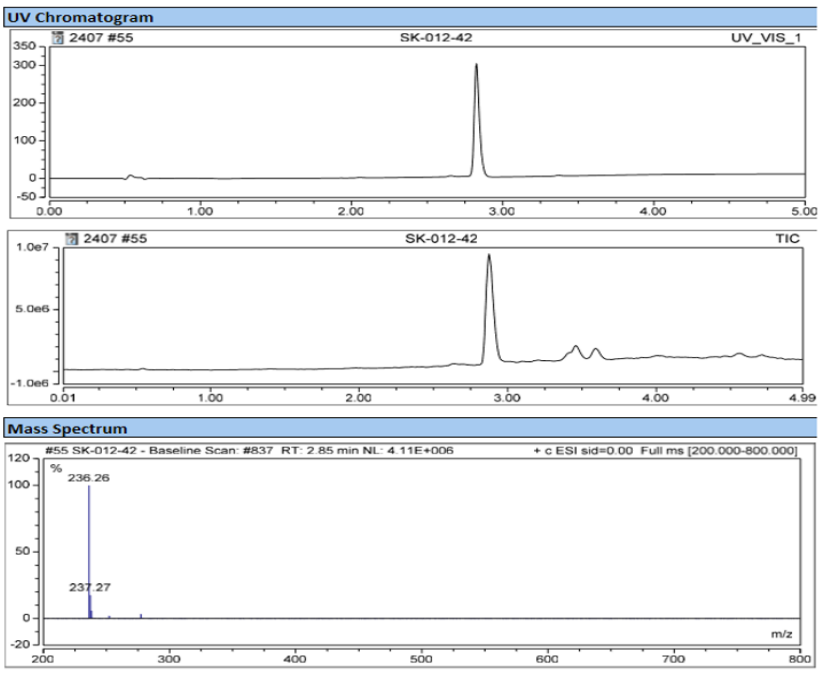
(*R*)-2-methyl-*N*-((1*E*,2*E*)-3-phenylallylidene)propane-2-sulfinamide
Chemical Formula: $C_{13}H_{17}NOS$
Molecular Weight: 235.3450

- 0.5 M Titanium(IV) isopropoxide(443 µl, 1.513 mmol) 용액과 Cinnamaldehyde(9.52 µl, 0.757 mmol)를 Tetrahydrofuran(THF)(1513 µl)에 녹여 질소(N_2) 분위기 하에서 준비함. 이후, (R)-2-methylpropane-2-sulfinamide(101 mg, 0.832 mmol)를 첨가한 후 플라스크를 가열. 반응의 진행 여부는 TLC(thin-layer chromatography)로 확인하였으며, 반응이 완료되자 즉시 혼합물을 냉각. 실온에 도달한 후, 반응 혼합물을 같은 부피의 염수(brine)에 빠르게 저어주며 부었음. 생성된 현탁액(suspension)은 Celite 필터를 통과시키면서 여과하

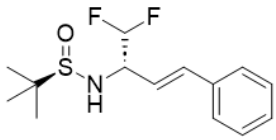
였으며, 필터 케이크는 EtOAc(ethyl acetate)로 세척. 이후, 여과된 용액을 분액 깔때기(separatory funnel)로 옮겨 유기층을 염수로 세척하였고, 남은 염수층은 소량의 EtOAc 로 한 번 더 추출. 이렇게 얻어진 유기층들을 합친 후, Na_2SO_4(황산나트륨)로 건조시킨 뒤 여과하고, 용매를 농축. 최종적으로, MPLC(중압 액체 크로마토그래피, 25 % EtOAc/Hexane)를 이용해 정제하여 (R)-2-methyl-N-((1E,2E)-3-phenylallylidene)propane-2-sulfinamide 를 노란색 고체(yellow solid) 형태로 87 % 수율로 획득. 질량분석(MS, ESI^+) 결과: 계산값(calcd) $C_{13}H_{18}NOS$ [M + H]$^+$ = 236.1,,0 측정값(found) 236.26



[그림 2-161. propan sulfinamide 의 NMR 분석결과]



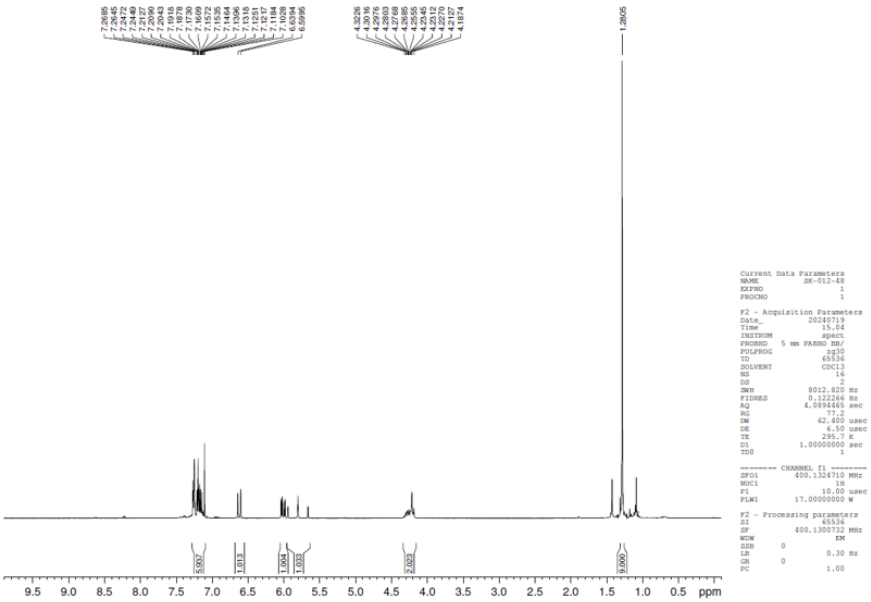
[그림 2-162. propan sulfinamide 의 Mass 분석결과]



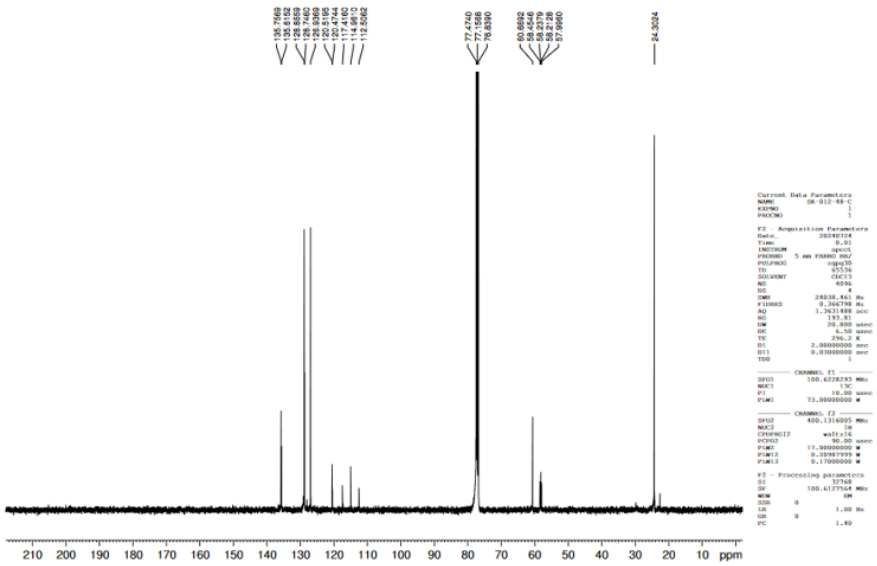
(*R*)-*N*-((*S*,*E*)-1,1-difluoro-4-phenylbut-3-en-2-yl)-2-methylpropane-2-sulfinamide
Chemical Formula: $C_{14}H_{19}F_2NOS$
Molecular Weight: 287.3688

- 질소(N_2) 분위기 하에서, THF(906 μl)에 용해된 Potassium tert-butoxide(55.0 mg, 0.490 mmol) 용액을 (R)-2-methyl-N-((1E,2E)-3-phenylallylidene)propane-2-sulfinamide(39.8 mg, 0.169 mmol) 및 (difluoromethyl)trimethylsilane(69.5 μl, 0.490 mmol)이 포함된 THF(1208 μl) 용액에 -78 °C 에서 첨가. 그 후, 혼합물을 서서히 실온까지 상승. 반응이 완료된 후, 생성물을 Et_2O(디에틸에테르) 및 H_2O(물)로 추출한 뒤, 유기층을 무수 $MgSO_4$(황산마그네슘)로 건조시켰다. 용액을 여과한 후, 용매를 감압하여 제거하였으며, 남은 잔여물을 MPLC(중압 액체 크로마토그래피)를 이용해 정제하여 (R)-N-((S,E)-1,1-difluoro-4-phenylbut-3-en-2-yl)-2-methylpropane-2-sulfinamide (5 mg, 0.017 mmol)를 10.29 % 수율로 얻었음. 질량분석(MS, ESI^+) 결과: 계산값(calcd) $C_{14}H_{20}F_2NOS$ $[M + H]^+$ = 288.12, 측정값(found) 288.22

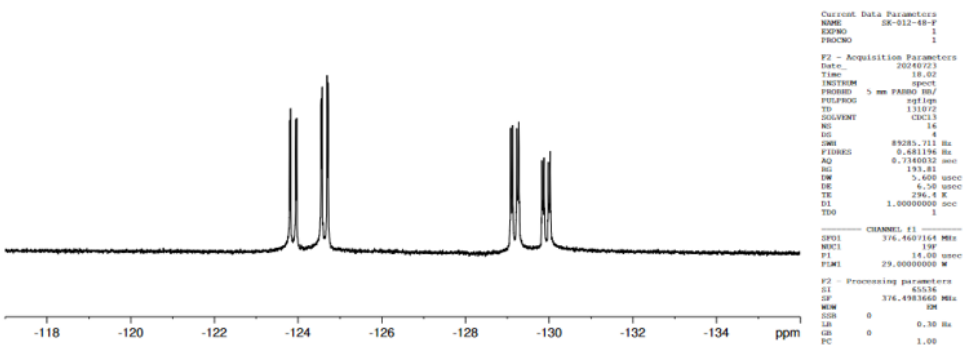
KOPRI
극지연구소



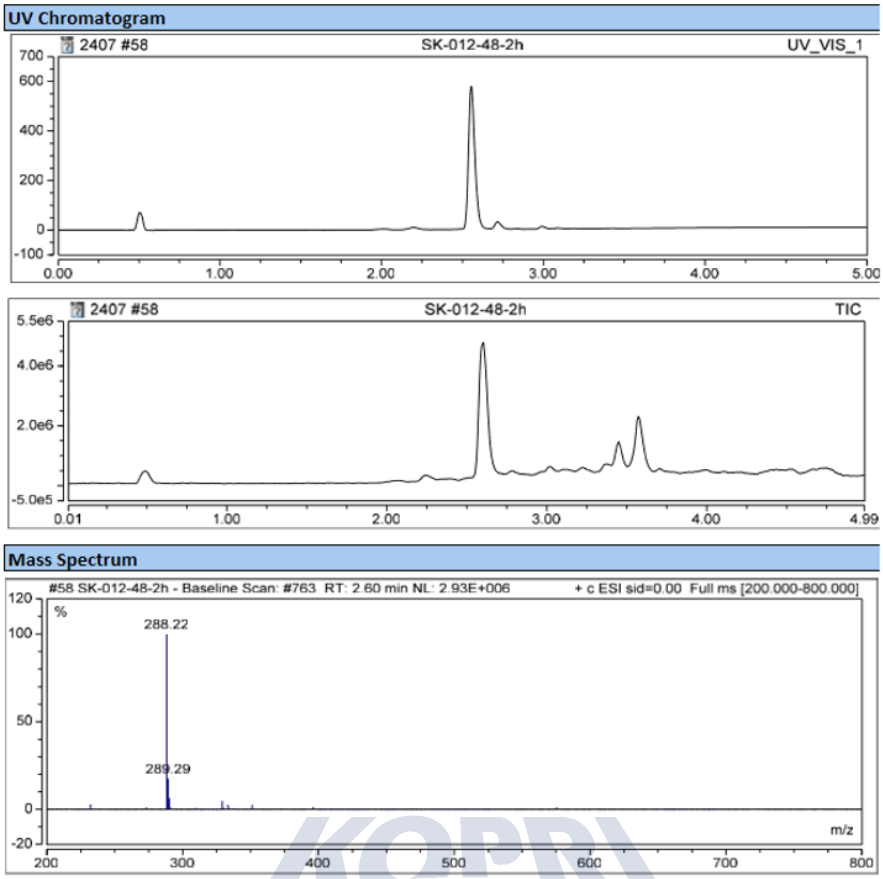
[그림 2-163. 2-methylpropane-2-sulfinamide 의 ^1H NMR 분석결과]



[그림 2-164. 2-methylpropane-2-sulfinamide 의 ^{13}C NMR 분석결과]



[그림 2-165. 2-methylpropane-2-sulfinamide 의 ^{19}F NMR 분석결과]



[그림 2-166. 2-methylpropane-2-sulfinamide 의 Mass 분석결과

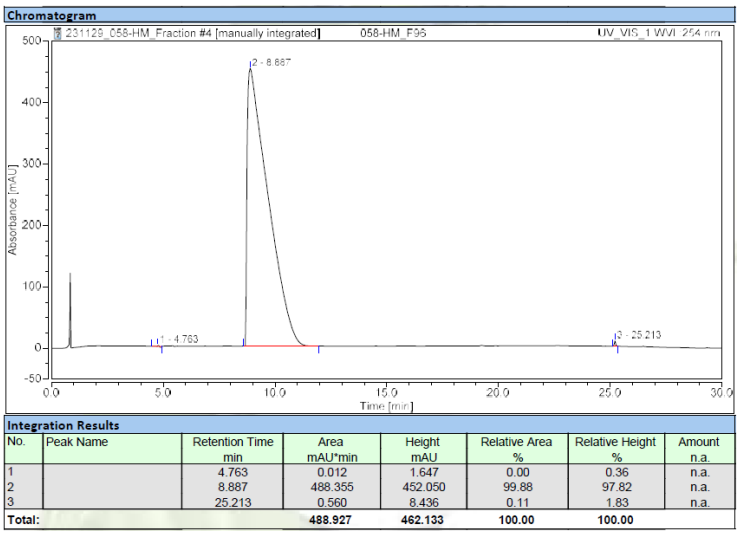
2) 대량합성 RA-058HM 의 분석결과

가. HPLC 분석결과

- 분석조건
- Column : Dikma / Inspire 5 μm C18 (100 x 4.6mm)
- Mobile phase
  A: Water + 0.1 % (v/v) fomic acid : Merck Lichrosolve
  B: ACN + 0.1 % (v/v) fomic acid : Merck Lichrosolve
- Gradient

Time (min)	A (water)	B (ACN)	Flow (ml/min)
0	95	5	0.7
8	70	30	0.7
10	0	100	0.7

- Stop Time : 15min / Post Time : 5min
- Detection : UV 254nm
- 대량합성된 RA-058HM 의 HPLC 분석결과 순도 97.82 %로 확인됨



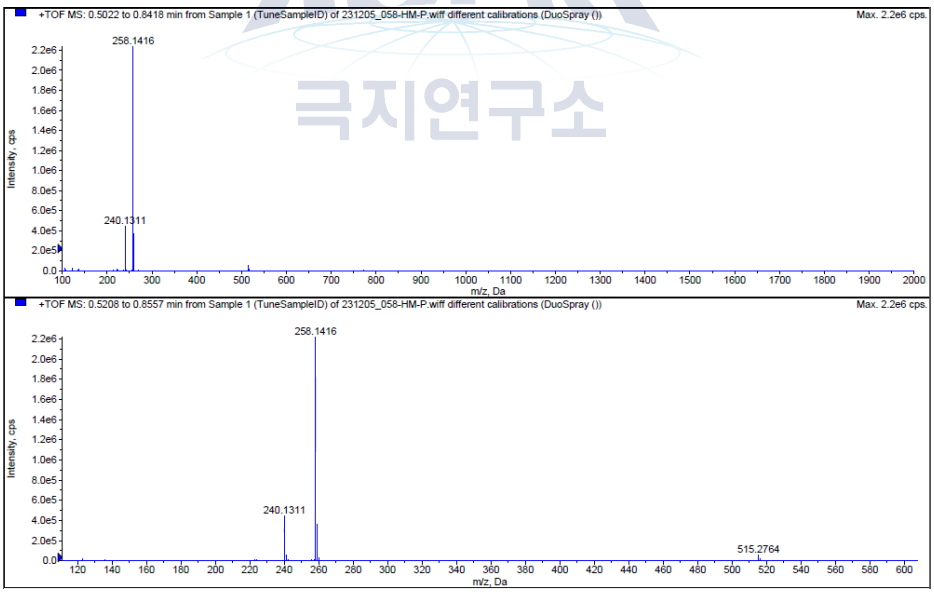
Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		4.763	0.012	1.647	0.00	0.36	n.a.
2		8.887	488.355	452.050	99.88	97.82	n.a.
3		25.213	0.560	8.436	0.11	1.83	n.a.
Total:			**488.927**	**462.133**	**100.00**	**100.00**	

[그림 2-167. 대량합성된 RA-058HM의 HPLC 분석결과]

나. RA-058HM의 Mass 분석결과

- HRMS 측정 결과 계산값 $C_{12}H_{17}F_2N_3O$=258.1417, 측정값 258.1416 로 측정완료



KOPRI 극지연구소

[그림 2-168. 대량합성된 RA-058HM의 Mass 분석결과]

3) RA-058HM 대량합성 결과

- 출발물질인 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid와 1-methyl-1-phenylhydrazine의 결합을 통해 중간체를 합성하고, 산 처리 반응을 통해 RA-058HM 염 형태로 확보함

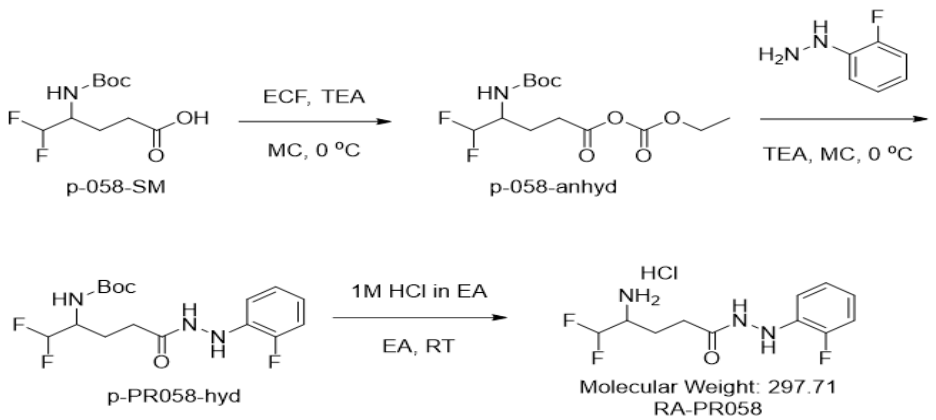
- 총 수율은 86.4 %, 순도는 97.82 %로 우수한 결과를 보였으며, 대량생산 시 생산 효율성이 매우 높음
- HPLC 분석에서 순도 97.82 %를 확보하였고, HRMS 결과(Calc. 258.1417 / Found 258.1416)도 고신뢰도의 정체성 확보를 뒷받침함
- 중간체 합성 수율이 91 %에 달해 공정의 재현성과 반응 선택성 측면에서 매우 우수한 조건으로 판단됨
- 전구체 확보를 위한 p-058-SM 대량합성에 대한 모델 스터디 결과, 필요한 비대칭성 및 불소 도입 반응을 정량적으로 확보할 수 있는 기반 기술이 마련되었음

○ 라말린 유도체 RA-PR058의 대량합성

1) RA-PR058의 대량 합성 방법 수립

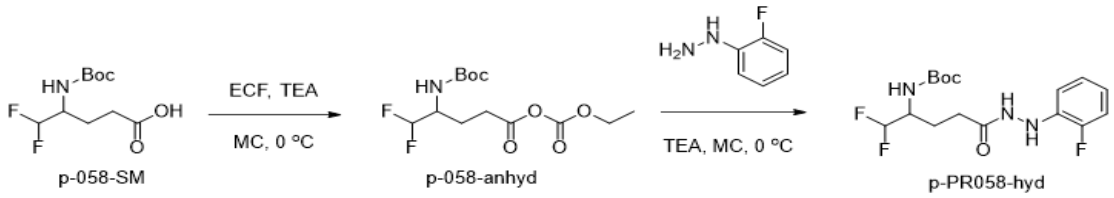
가. RA-PR058 합성 전체 scheme

- 합성 수행 방향 : 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-5,5-difluoropentanoic acid와 2-fluorophenylhydrazin의 연결반응을 통해 *tert*-butyl (1,1-difluoro-5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate를 합성. *tert*-butyl (1,1-difluoro-5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate를 hydrogenation하여 4-amino-5,5-difluoro-N'-(2-fluorophenyl)pentanehydrazide hydrogenchloride (RA-PR058) 합성



[그림 2-169. RA-PR058 합성 전체 scheme]

나. *tert*-butyl (1,1-difluoro-5-(2-(2-fluorophenyl)hydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate의 합성



[그림 2-170. p-PR058-hyd의 합성 scheme]

- 3 L Round bottomed flask, p-Glu 50 g (0.197mol)을 CH_2Cl_2 1000 mL 에 녹이고 0 ℃로 냉각. Triethylamine (1.2 eq, 0.236 mol) 32.9 mL 를 넣고 30 분 교반하고 0 ℃로 냉각하여 ethyl chloroformate (1.2 eq, 0.236 mol) 22.4 mL 를 적가함. 0 ℃에서 4 시간 교반 수행

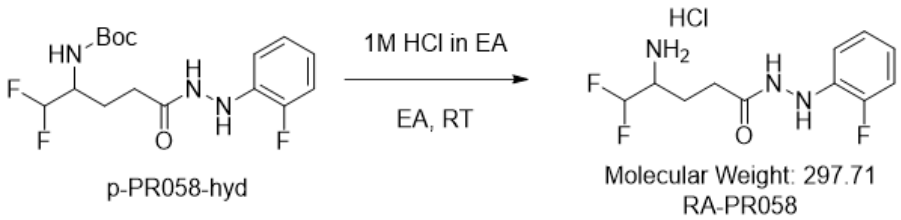
- 1 L Round bottomed flask 에 2-fluorophenylhydrazine(1.2 eq, 29.8 g)과 CH_2Cl_2 200 mL 를 넣고 0 ℃로 냉각. PF hydrazine solution 을 적가하며 적가가 완료되면 상온으로 올리며 overnight 교반 수행

KOPRI 극지연구소

- 반응액에 정제수 500 mL 를 넣고 교반 후 층분리 하고 유기층을 1 N HCl, 0.5 N $NaHCO_3$,정제수 순으로 500 mL 씩 씻어주고 건조 및 농축을 수행함

- EA 와 Hexane 으로 재결정 수행하고 생성된 고체를 여과하고 hexane 으로 씻어줌. 오븐에서 건조 후 white solid, 62.6 g, yield=88 %으로 수득함

다. RA-PR058 합성 방법



[그림 2-171. RA-058-HM 의 최종 합성 scheme]

- *tert*-butyl (1,1-difluoro-5-(2-methyl-2-phenylhydrazineyl)-5-oxopentan-2-yl)carbamate 10

g (0.028 mmol)을 1 L 반응용기에 넣고 1M HCl이 포함된 ethyl acetate 500 mL에 녹임

- 반응물을 상온에서 약 16시간 교반 수행. 교반도중 RA-058-HM이 HCl 염화 되면서 고체로 결정화됨

- 염화된 RA-058-HM을 여과하고 여과물을 ethyl acetate 500 mL로 충분히 씻어주고 건조하여 최종 합성 완료. 건조된 white solid, 7.75 g, yield=93 %으로 수득함

2) 대량합성 RA-PR058 의 분석결과

가. HPLC 분석결과

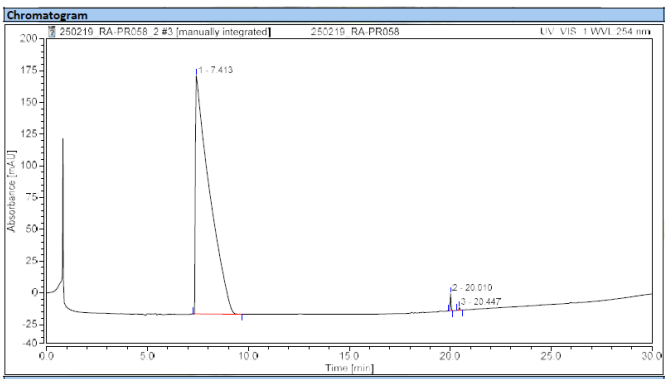
- 분석조건
- Column : Dikma / Inspire 5 μm C18 (100 x 4.6mm)
- Mobile phase
  A: Water + 0.1 % (v/v) fomic acid : Merck Lichrosolve
  B: ACN + 0.1 % (v/v) fomic acid : Merck Lichrosolve

- Gradient

Time (min)	A (water)	B (ACN)	Flow (ml/min)
0	95	5	0.7
8	70	30	0.7
10	0	100	0.7

- Stop Time : 15min / Post Time : 5min
- Detection : UV 254nm

- 대량합성된 RA-PR058 의 HPLC 분석결과 순도 99.6 %로 확인됨



Integration Results

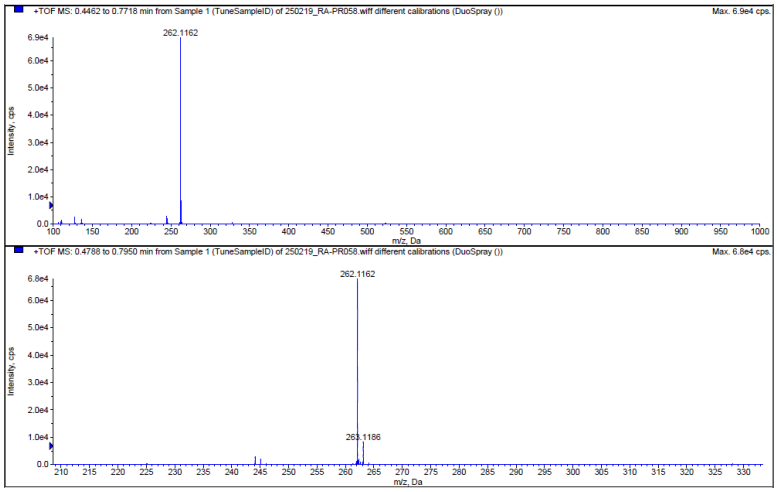
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount n.a.
1		7.413	150.894	187.605	99.55	92.27	n.a.
2		20.010	0.594	13.549	0.39	6.66	n.a.
3		20.447	0.087	2.174	0.06	1.07	n.a.
Total:			151.575	203.328	100.00	100.00	

[그림 2-172. 대량합성된 RA-PR058의 HPLC 분석결과]

KOPRI 극지연구소

나. RA-PR058의 Mass 분석결과

- HRMS 측정 결과 계산값 $C_{11}H_{15}F_3N_3O$=262.1167, 측정값 262.1162 로 측정완료



[그림 2-173. 대량합성된 RA-PR058의 Mass 분석결과]

3) RA-PR058 대량합성 결과

- 2-fluorophenylhydrazine을 이용한 coupling 반응과 염화 과정을 거쳐 RA-PR058 염을 2 단계로 합성하였으며, 총 수율은 81.8 %, 순도는 99.6 %로 매우 우수함

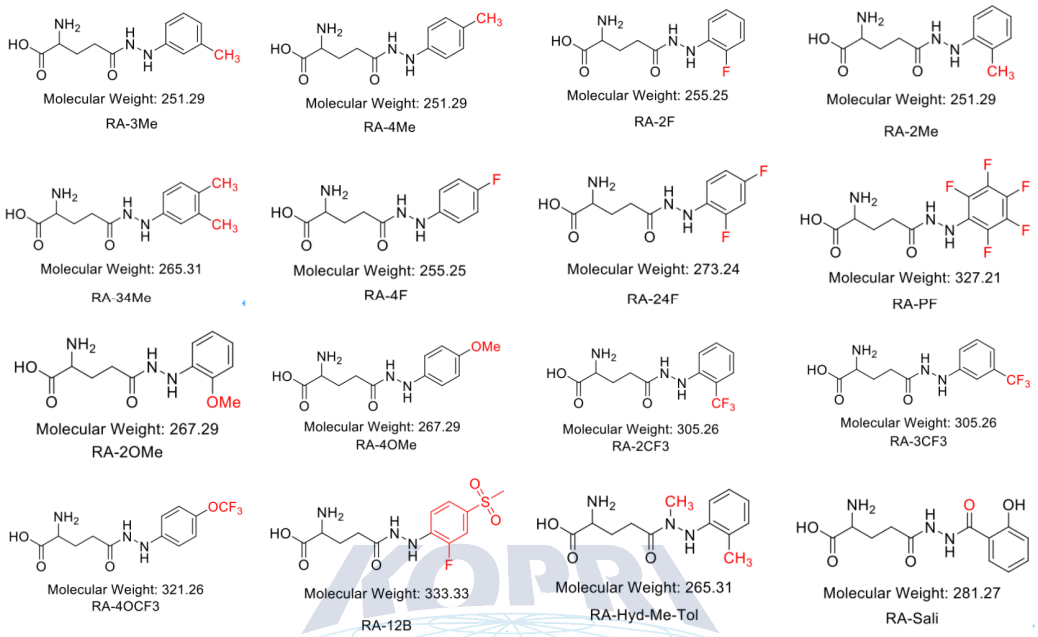
- HPLC 분석 결과, 4종 후보물질 중 가장 높은 순도를 보였으며 이는 최종 생물학적 활성 평가 시 불순물에 의한 간섭 가능성이 거의 없음을 의미함

- HRMS 분석 결과(Calc. 262.1167 / Found 262.1162)는 고정밀 장비 분석을 통해 화학적 신뢰도를 확보함

- 정제 공정이 간단하며, 반응 후 생성물 결정화가 용이하여 산업적 확장성 측면에서도 매우 유리한 후보물질로 평가됨

□ 연구내용 1-4. 라말린 유도체의 뇌신경 보호작용 분석

○ 실험 개요 : 아래 그림에 제시된 총 16종의 합성된 라말린 유도체를 대상으로 LPS 처리 시 미세아교세포(BV2 Cell)에서 진행되는 염증억제 효과와 마우스의 해마 유래 세포주인 HT22 세포에서 glutamate로 유발한 산화적 스트레스로 인한 세포 손상 억제능을 검정함



< 그림 2-174. 뇌신경 보호작용 검색대상 라말린 유도체의 구조 >

1) BV2 미세아교세포에서 LPS로 유발한 뇌신경 염증반응 조절효과 검색

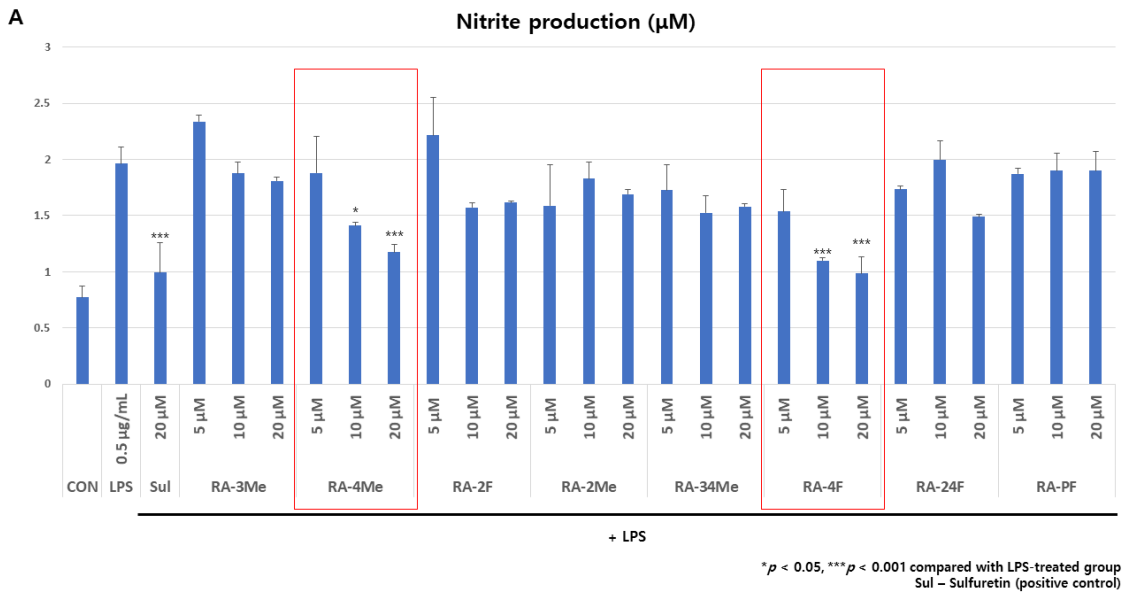
가. 라말린 유도체 16종의 BV2 미세아교세포에서 nitirite 생성억제 효과

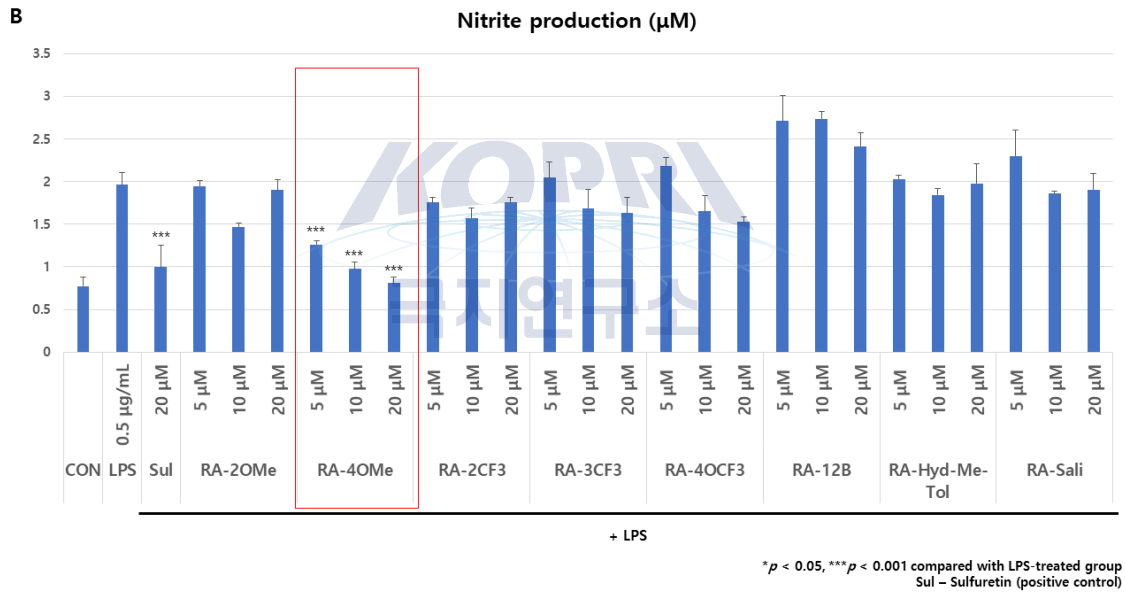
- 합성된 라말린 유도체 16개를 대상으로 BV2 미세아교세포에서 항염증 작용을 확인하고자 하였음

- BV2 미세아교세포에 합성 라말린 유도체 16종을 5, 10, 20 μM 농도로 각각 처리한 후 48시간 동안 배양하여 세포독성을 확인함. 16종 모두에서 세포독성이 없었음

- BV2 미세아교세포에 합성 라말린 유도체 16종을 5, 10, 20 μM 농도로 각각 처리한 후 3시간 뒤 LPS 염증반응을 유발하였음. 24시간 뒤 상등액을 가지고 nitirite 생성량을 확인하였음. 양성대조군으로 sulfuretin 20 μM을 사용하여 비교하였음

- LPS로 유발한 nitirite 생성량 확인 결과 RA-4Me, RA-4F, RA-4OMe 3가지 유도체가 nitirite 생성억제 효과가 우수하였음





[그림 2-175. 합성 라말린 유도체 16종의 BV2 미세아교세포에서 nitirite 생성억제 효과]

2) BV2 미세아교세포에서 heme oxygenase(HO)-1 단백질 발현

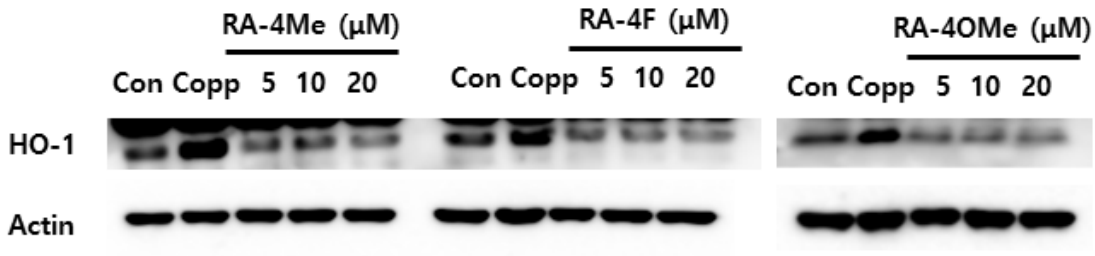
가. 합성 라말린 유도체 16종의 HT22 해마세포에서 glutamate로 유발한 뇌세포 손상에 대한 보호효과 분석

- 합성된 라말린 유도체 중 nitirite 생성 억제효과가 우수한 RA-4Me (IC_{50} = 12.8 uM), RA-4F (IC_{50} = 6.6 uM), RA-4OMe (IC_{50} = 4.2 uM) 3가지 유도체를 대상으로 BV2 미세아교세포에서 HO-1 단백질 발현을 확인함

- HO-1 단백질은 항산화, 항염증, 세포보호 역할을 하는 단백질로 잘 알려져 있음

- BV2 미세아교세포에 합성 라말린 유도체 3종(RA-4Me, RA-4F, RA-4OMe)을 5, 10, 20 μM 농도로 각각 처리한 후 12시간 뒤 세포를 걷어 Western Blotting 실험을 진행하였음. 양성대조군으로 CoPP (HO-1 inducer)를 사용하였음

- BV2 미세아교세포에 합성 라말린 유도체 3종(RA-4Me, RA-4F, RA-4OMe)은 HO-1 발현에 영향을 주지 않았음(그림 2-910). 이에 향후 후속연구에서 HO-1 기전이 아닌 다른 기전 연구를 진행할 계획임



[그림 2-176. 합성 라말린 유도체 3종(RA-4Me, RA-4F, RA-4OMe)의 BV2 미세아교세포에서 HO-1 단백질 발현 효과]

3) HT22 해마세포에서 glutamate로 유발한 뇌세포 손상에 대한 보호효과

가. 라말린 유도체 16종의 HT22 해마세포에서 glutamate로 유발한 뇌세포 손상에 대한 보호효과

- 합성된 라말린 유도체 16개를 대상으로 HT22 해마세포에서 glutamate로 유발한 뇌세포 손상에 대한 보호효과를 확인하고자 함

- HT22 해마세포에 합성 라말린 유도체 16종을 5, 10, 20 μM 농도로 각각 처리한 후 48시간 동안 배양하여 세포독성을 확인함. 16종 모두에서 세포독성이 없었음

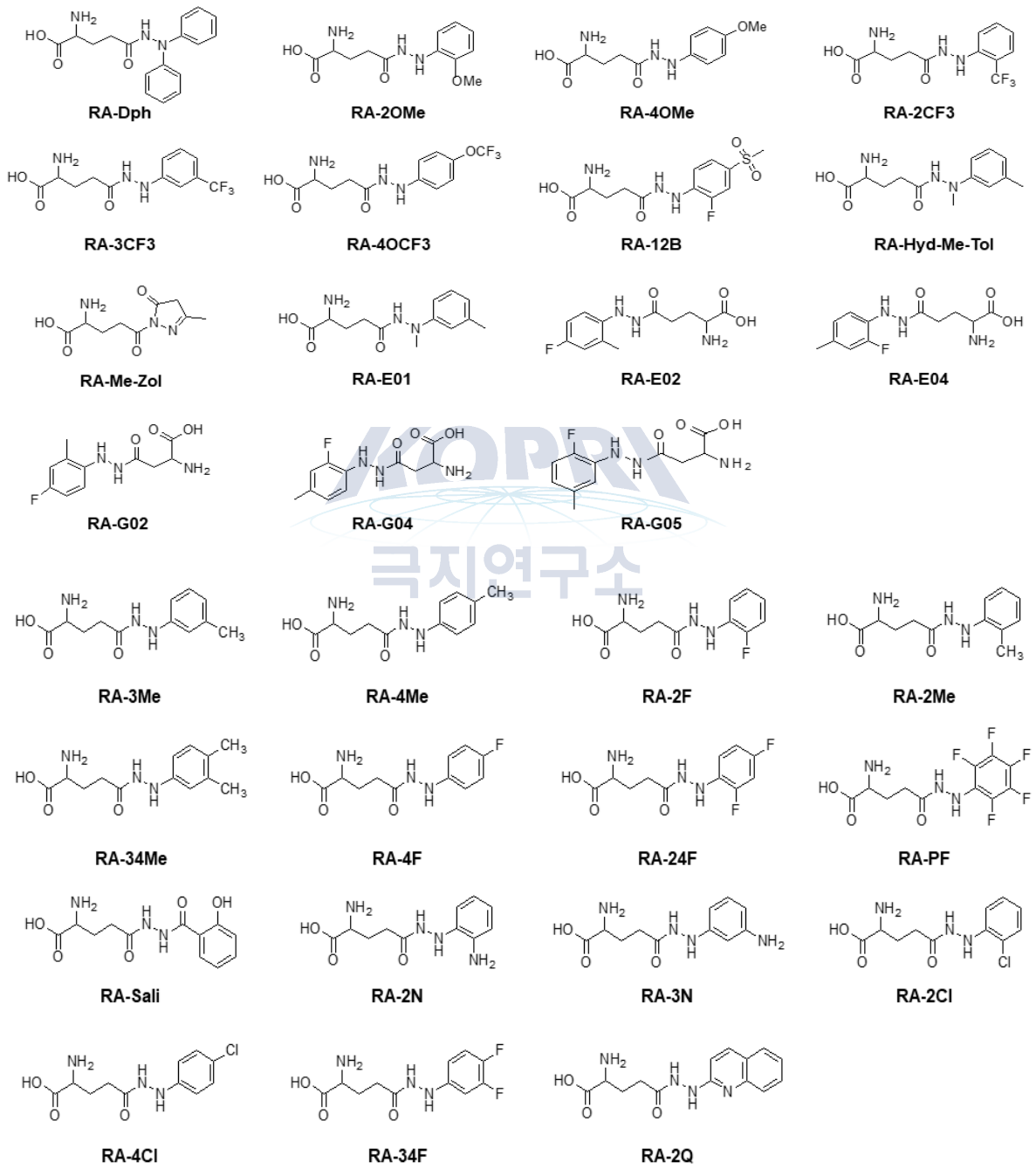
- HT22 해마세포에 합성 라말린 유도체 16종을 5, 10, 20 μM 농도로 각각 처리한 후 3시간 뒤 glutamate를 처리하여 세포독성을 유발하였음. 24시간 뒤 CCK-8 시약을 사용하여 세포생존률을 확인하였음. 양성대조군으로 화합물 N-acetyl cysteine (NAC) 1 mM을 사용하여 비교하였음

- Glutamate로 유발한 HT22 해마세포 손상에 대한 세포생존률 확인실험에서 RA-4F, RA-4OMe 2가지 유도체가 glutamate 유발로 감소하는 세포생존률을 증가시키는 것을 확인하였음

○ 라말린 유도체의 뇌신경 보호작용 분석

1) 라말린 유도체의 BV2 미세아교세포, HT22 해마세포에서의 효과

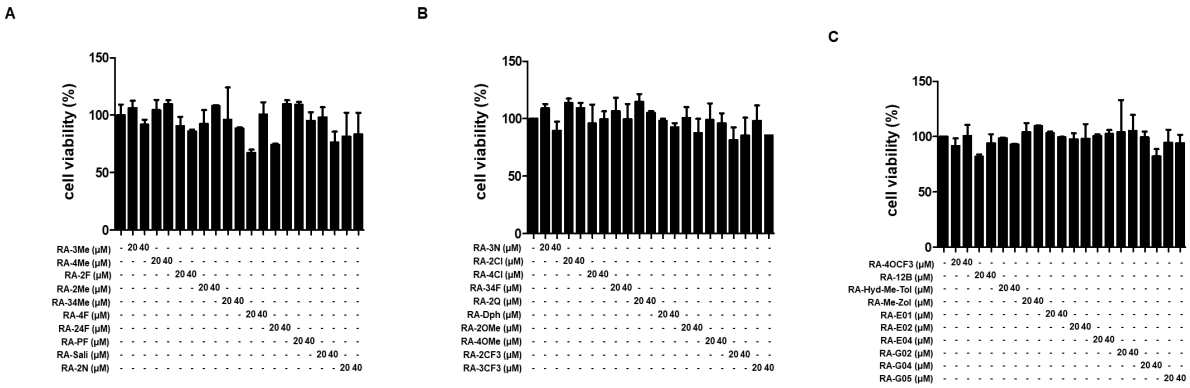
가. RA 골격 유래 합성화합물 30종을 이용하여 BV2 미세아교세포, HT22 해마세포, HaCaT 각질형성세포에서의 효과를 확인하고자 하였음(그림 2-911)



[그림. 2-177. The effects of RA 30 derivatives on nitrite content]

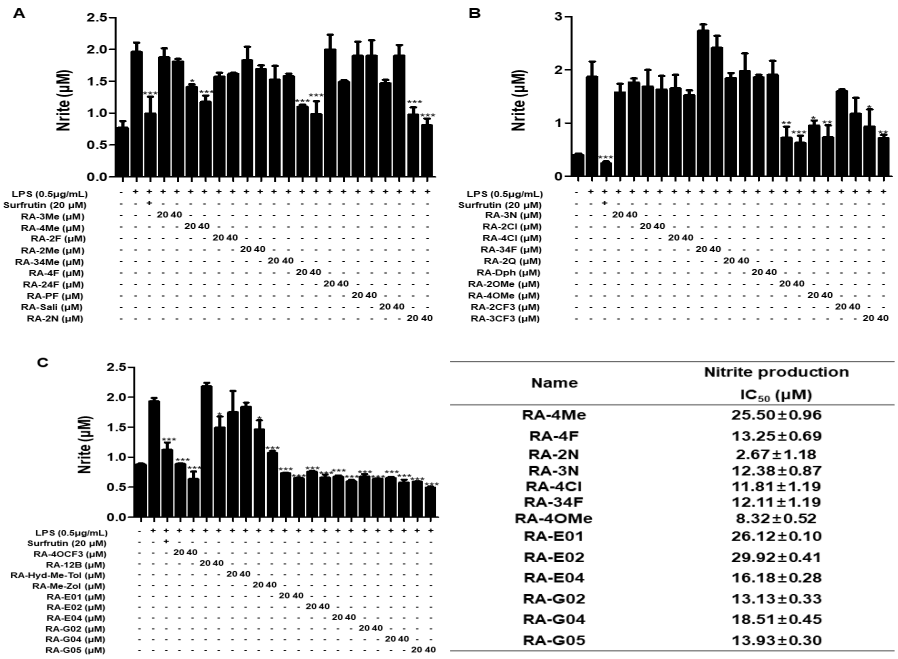
KOPRI 극지연구소

나. 먼저, BV2 미세아교세포에서 뇌염증 억제 효과를 확인하고자 하였음. BV2 세포에 화합물 30종을 24시간 처리한 뒤 각 화합물의 세포독성을 측정하였음(그림 2-178). 모든 실험은 세포독성이 없는 농도에서 모든 실험을 진행하였음



[그림 2-178. Cytotoxicity of RA 30 derivatives on BV2 cell (A, B, C). Cytotoxicity was assessed after treatment with the RA 1-30 for 24 h. Data are presented as the mean ± standard deviation values of three independent experiments]

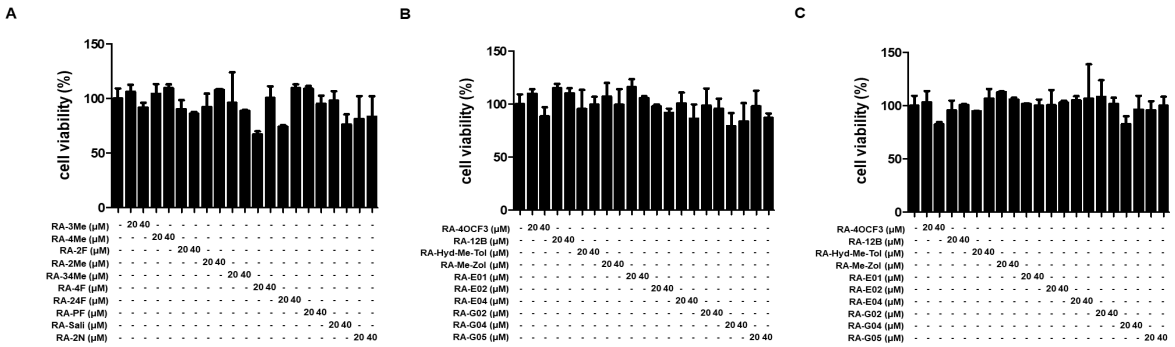
다. RA 골격 유래 합성화합물 30종을 LPS에 의해 nitric oxide (NO)가 과생성된 미세아교세포 BV2에 전처리하였을 때 화합물 16종에서 NO 생성이 유의적으로 감소하는 효과를 확인하였음. 우수한 NO 생성 억제효과에 대하여 IC_{50}을 확인함(그림 2-179)



Name	Nitrite production IC_{50} (μM)
RA-4Me	25.50±0.96
RA-4F	13.25±0.69
RA-2N	2.67±1.18
RA-3N	12.38±0.87
RA-4Cl	11.81±1.19
RA-34F	12.11±1.19
RA-4OMe	8.32±0.52
RA-E01	26.12±0.10
RA-E02	29.92±0.41
RA-E04	16.18±0.28
RA-G02	13.13±0.33
RA-G04	18.51±0.45
RA-G05	13.93±0.30

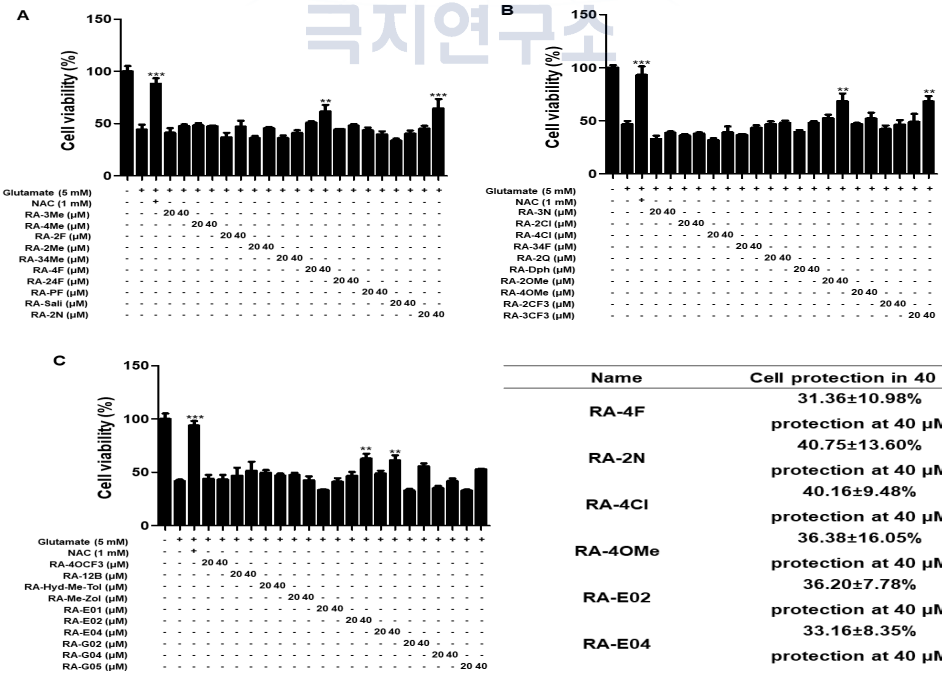
[그림 2-179. Inhibitory effects of the RA 30 derivatives on nitrite content production in LPS-treated BV2 cells (A, B, C). IC50 of 30 RA derivatives on nitrite production in BV2 cell]

라. HT22 세포에 RA 골격 유래 합성화합물 30종을 24시간 처리한 뒤 세포독성을 측정하였음(그림 2-180). 이후 모든 실험은 세포독성이 없는 농도에서 진행하였음



[그림 2-180. Cytotoxicity of 30 RA derivatives on HT22 cell (A). Cytotoxicity was assessed after treatment with the RA 1–30 for 24 h. Data are presented as the mean ± standard deviation values of three independent experiments]

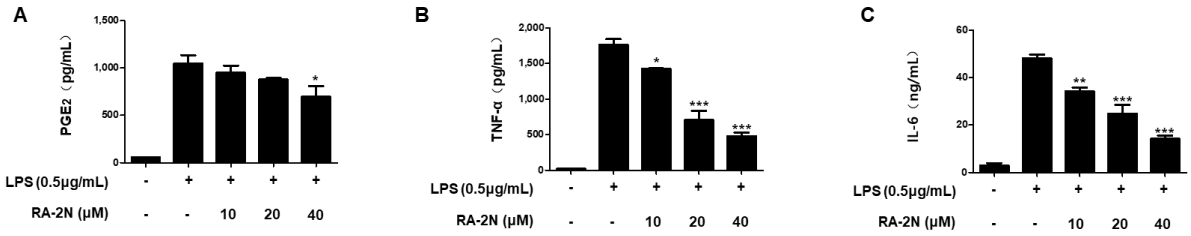
마. RA 골격 유래 합성화합물 30종을 glutamate에 의해 유발된 산화적 스트레스로 세포 사멸이 유도된 해마세포 HT22에 전처리하였을 때 화합물 6종에서 세포 사멸을 보호하는 효과를 확인하였음. 우수한 신경세포 보호효과를 나타내는 화합물들에 대하여 보호율을 확인함(그림 2-181)



Name	Cell protection in 40 μM
RA-4F	31.36±10.98% protection at 40 μM
RA-2N	40.75±13.60% protection at 40 μM
RA-4Cl	40.16±9.48% protection at 40 μM
RA-4OMe	36.38±16.05% protection at 40 μM
RA-E02	36.20±7.78% protection at 40 μM
RA-E04	33.16±8.35% protection at 40 μM

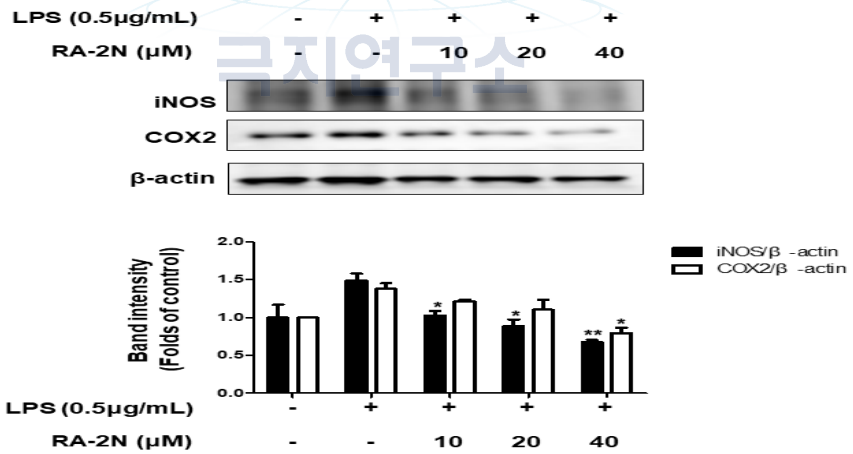
[그림 2-181. Protective effects of the 30 RA derivatives on cell viability in glutamate-treated HT22 cells (A, B, C). Protective rate of 30 RA derivatives at high concentration on cell viability in HT22 cell]

바. RA 골격 유래 합성화합물 30종 중 가장 효과가 우수한 RA-2N을 LPS에 의해 PGE_2, TNF-α, 및 IL-6가 과생성된 미세아교세포 BV2에 전처리하였을 때의 효과를 확인하였음. 그 결과, RA-2N이 BV2 세포에서 LPS로 유도된 PGE_2, TNF-α, 및 IL-6의 생성을 효과적으로 감소시켰음(그림 2-182)



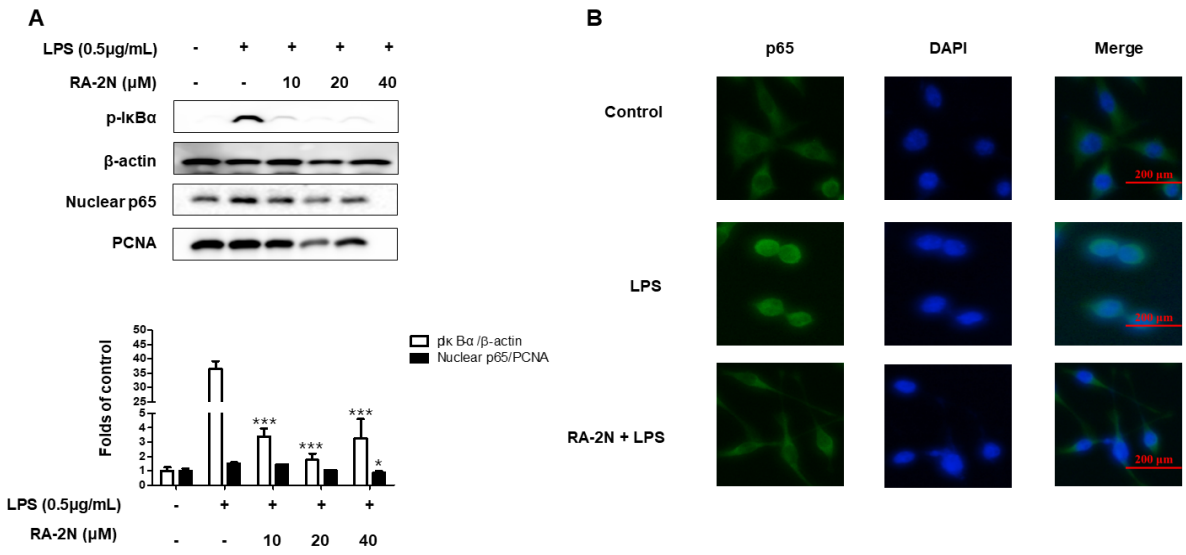
[그림 2-182. Effects of RA-2N on inflammation in BV2 cell. The inhibitory effect on PGE_2(A), TNF-α(B), and IL-6(C) production in BV2 cells was induced for 24 hours by treatment with LPS after pretreatment with RA-2N]

사. 웨스턴 블롯 분석을 통해 RA-2N이 주요 염증 단백질인 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, LPS 처리 그룹과 비교했을 때 RA-2N이 BV2 세포에서 이 두 단백질의 발현도 유의적으로 감소시키는 것을 확인함(그림 2-183)



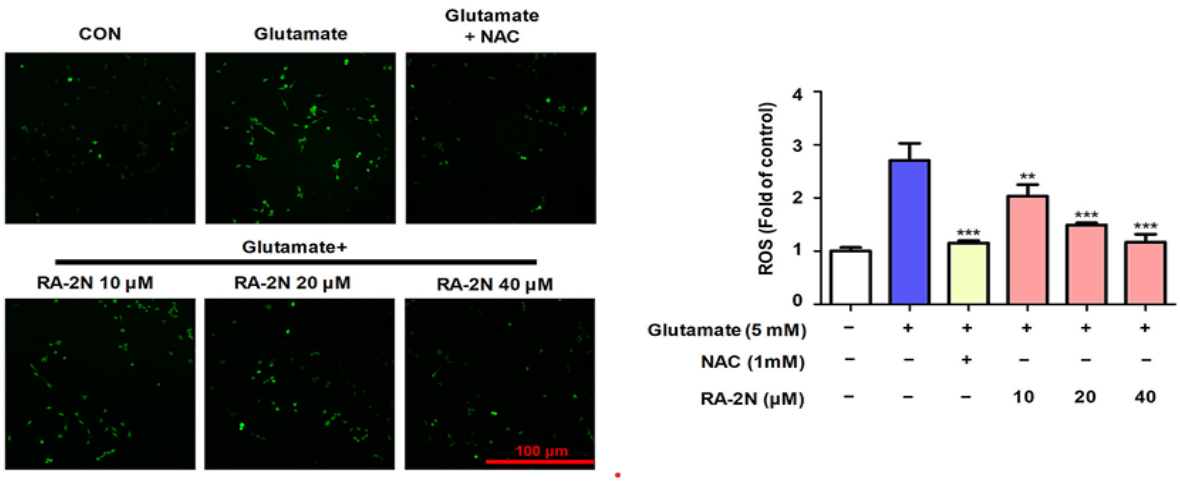
[그림 2-183. Protein expression levels of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated BV2 cells. The inhibitory effect on iNOS and COX-2 was induced in cells for 24 hours by LPS treatment after pretreatment with RA-2N]

아. 미세아교세포 BV2에 RA-2N을 전처리하였을 때 염증 관련 신호전달 경로인 NF-κB의 활성화를 억제하는 효과가 매우 우수하였음(그림 2-184)



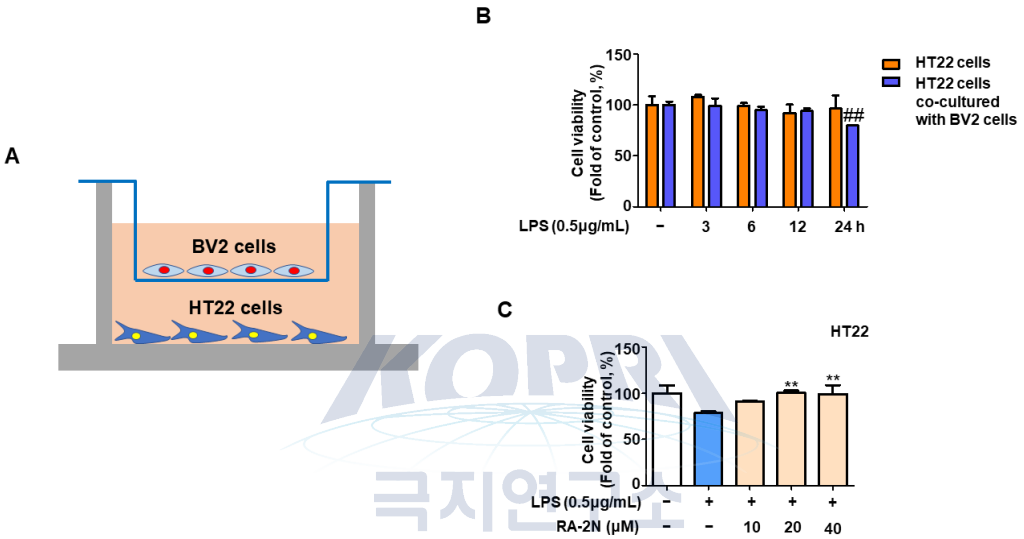
[그림 2-184. Effects of RA-2N on NF-κB pathway localization in BV2 cells. Cells were pretreated with RA-2N for 3 h and stimulated with LPS for 1 h. Western blotting was performed (A). The Immunofluorescence was detected using fluorescence microscope (B)]

자. RA-2N이 글루타메이트로 유도된 HT22 세포 사멸에 대해 강력한 보호 효과를 가진다는 사실과, 이러한 효과가 항산화 활성에 기인한다고 추정되는 점에 기반하여, RA-2N의 ROS 생성 억제 효과를 평가했음. 그 결과 HT22 세포에 RA-2N을 전처리하였을때 10, 20, 40 μM 모든 농도에서 글루타메이트로 유도된 ROS 생성을 유의미하게 억제함을 확인함(그림 2-185)



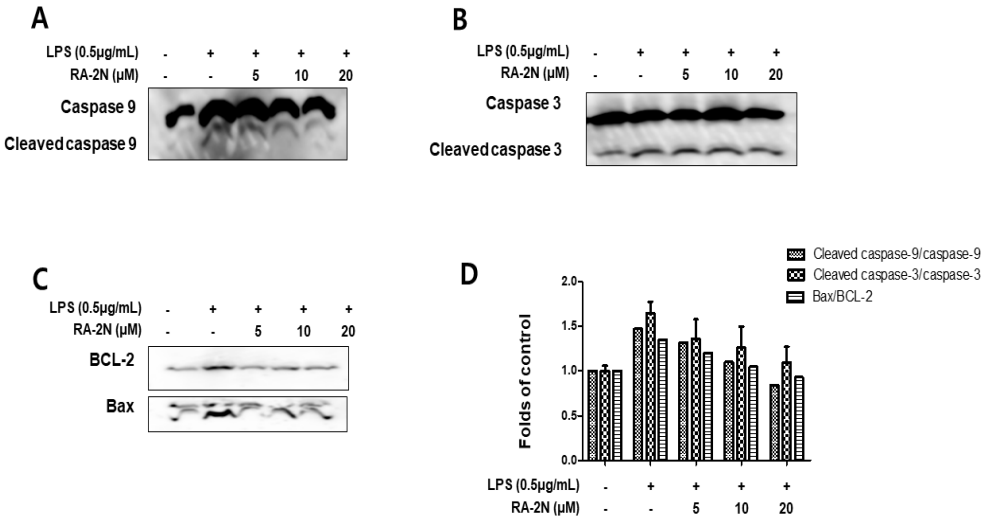
[그림 2-185. The effects of RA-2N on reactive oxygen species (ROS) production in HT22 cells. HT22 cells pre-treated with RA-2N for 2 h were subsequently treated with glutamate for 8h. ROS production was determined using DCFDA, examined under a fluorescence microscope and analyzed using ImageJ software. Data are presented as the means ± standard deviation of three independent experiments. ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. glutamate group]

차. RA-2N이 BV2 세포의 LPS로 유도된 신경염증을 억제할 수 있다는 발견을 바탕으로, RA-2N이 신경염증에 의한 신경세포 사멸을 억제할 수 있는지 추가적으로 확인하고자 했음. RA-2N이 글루타메이트로 유도된 HT22 세포 사멸과 관련하여 항산화 능력을 가진다는 점을 확인했지만, 만성 염증으로 유도된 신경세포 사멸은 신경퇴행성 질환의 중요한 원인임. 이러한 맥락에서, BV2 세포와 HT22해마 세포의 공존을 기반으로 한 평가가 중추신경계 환경을 보다 현실적으로 시뮬레이션할 수 있다고 판단하여, BV2와 HT22 세포의 co-culture 시스템을 구축했음. 초기 실험에서 LPS로 BV2 세포를 자극한 후, BV2 세포와 co-culture 배양된 HT22 세포의 세포 생존율이 감소하는 것을 관찰했음. 그러나 RA-2N 처리 후 감소된 세포 생존율이 유의미하게 증가했음(그림 2-186)



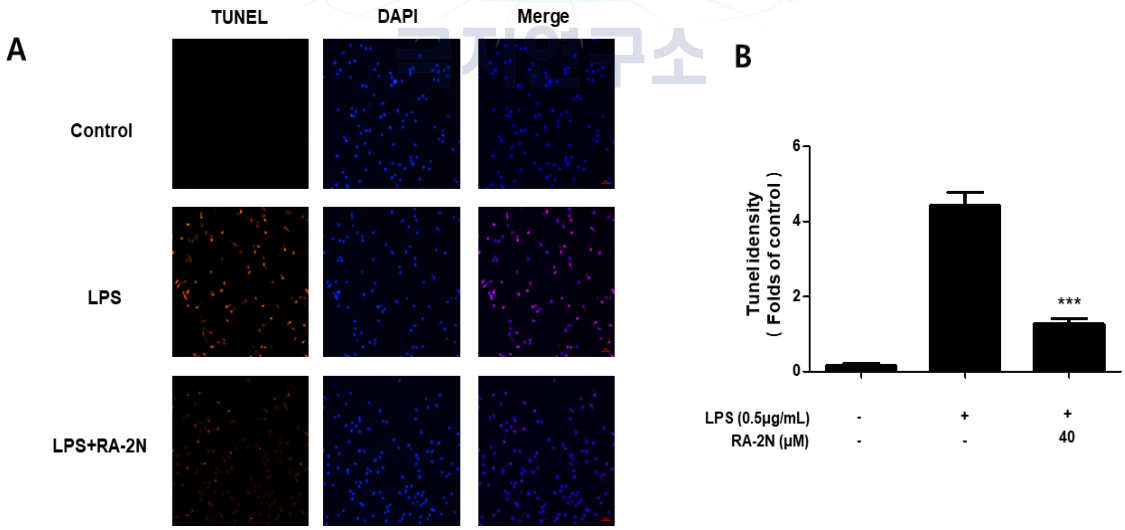
[그림 2-186. The effects of RA-2N on a BV2–HT22 cell co-culture system. (A) A BV2–HT22 cell co-culture system was established using a filter membrane barrier (B) An MTT assay revealed that lipopolysaccharide (LPS) has no direct cytotoxic effects on HT22 cells. (C) The co-culture system pre-treated with RA-2N for 2 h was subsequently treated with LPS for 24 h, and the protective effect of RA-2N on HT22 cell viability was determined using an MTT assay]

카. LPS로 자극된 BV2 세포에 의해 HT22 세포에서 세포사멸 관련 단백질인 caspase-9과 effector protein인 caspase-3이 모두 활성화되었으며, cleaved caspase-9과 cleaved caspase-3의 단백질 발현이 증가하였음. proapoptotic protein인 Bax와 anti-apoptotic protein인 BCL-2의 비율도 유의하게 증가하여 세포사멸이 유도된 것을 확인하였으나, RA-2N의 전처리에 의해 이들 단백질의 발현이 감소한 것을 확인하여 RA-2N의 세포 사멸 억제 효과를 확인하였음(그림 2-187)



[그림 2-187. Effects of RA-2N on apoptosis in HT22 cells. The effect on apoptosis of HT22 cell co-cultured with BV2 cell was induced by LPS after pretreatment with RA-2N]

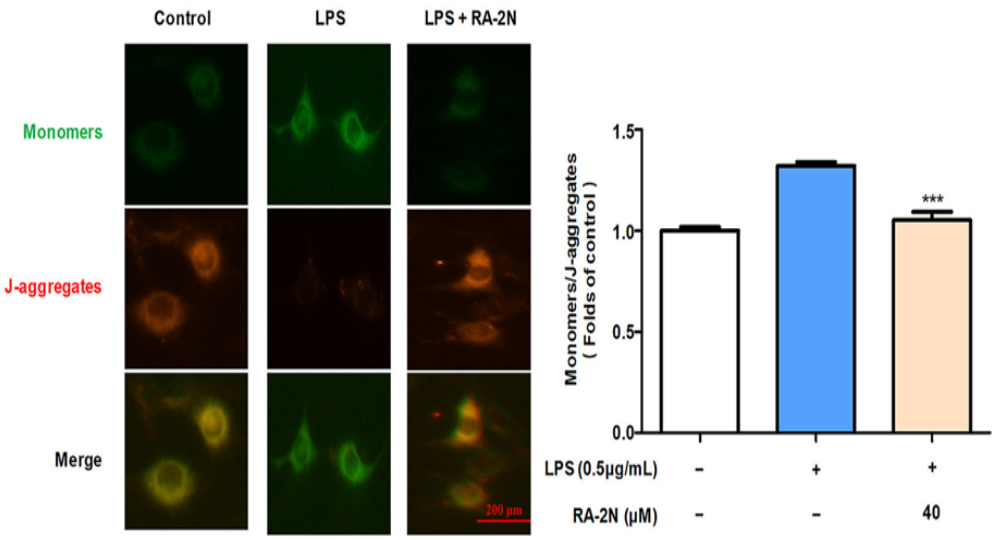
타. TUNEL 분석은 세포자멸사(apoptosis) 세포에 특이적으로 결합하는 세포 염료를 사용하는데, 이는 적색 형광으로 확인됨. 본 연구 Tunel staining 결과 RA-2N이 신경염증으로 인한 세포사멸을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인함(그림 2-188)



[그림 2-188. Tunel staining of HT22 cell. The tunel staining of HT22 cell co-cultured with BV2 cell was induced by LPS after pretreatment with RA-2N]

파. 세포자멸사의 특징적인 특성 중 하나는 세포 소기관의 기능 장애임. 중요한 에너지 조절 소기관인 미토콘드리아는 신경세포자멸사에서 중요한 역할을 함. 이에 따라, HT22 세포의 미토콘드리아 기능을 평가하기 위해 JC-1 방법을 사용했음. 정상적인 생리 조건에서 미토콘드리아는 일반적으로 높은 막 전위(MTP)를 유지하며, 이러한 조건에서는 JC-1이

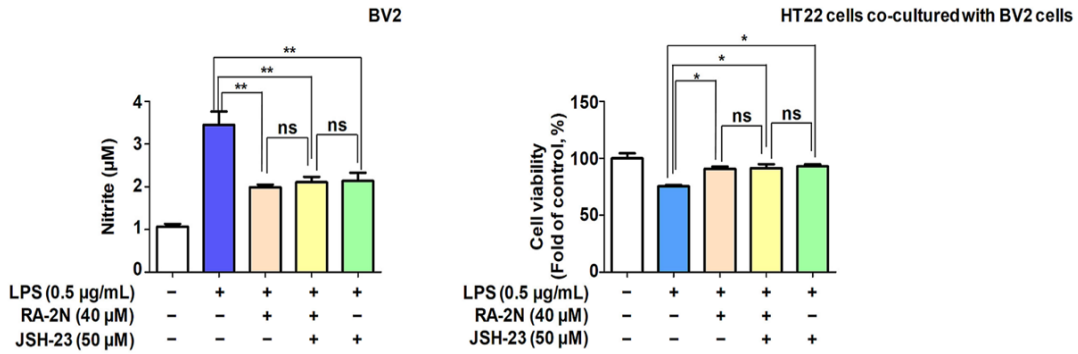
선택적으로 미토콘드리아에 들어가 적색 형광을 방출함. 그러나 낮은 MTP 상태에서는 JC-1이 녹색 형광을 방출함. 본 연구에서 얻은 JC-1 결과는 LPS로 유도된 BV2세포에 의해 HT22세포의 미토콘드리아 막전위가 변화되었고 RA-2N의 처리가 미토콘드리아 막전위의 감소를 효과적으로 역전시킬 수 있음을 확인함(그림 2-189)



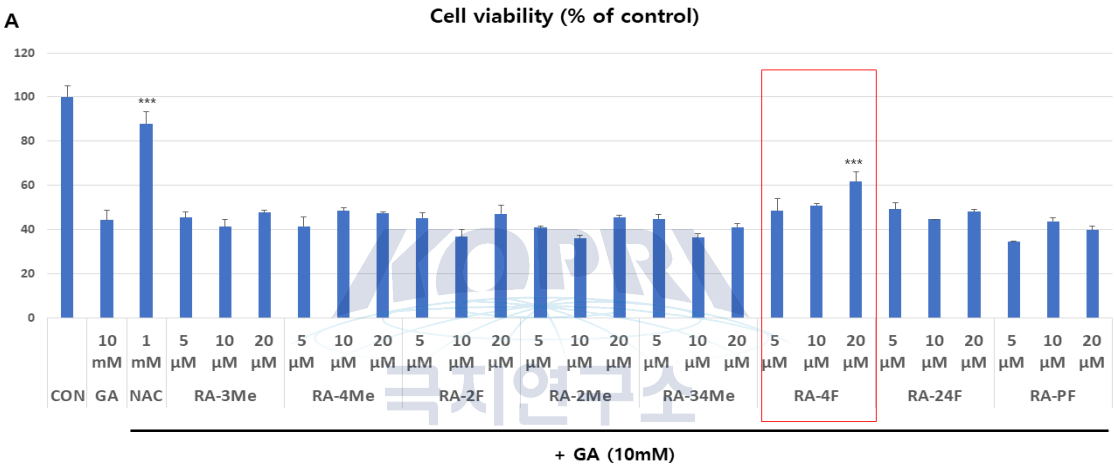
[그림 2-189. JC-1 staining of HT22 cell. JC-1 staining of HT22 cell co-cultured with BV2 cell was induced by LPS after pretreatment with RA-2N]

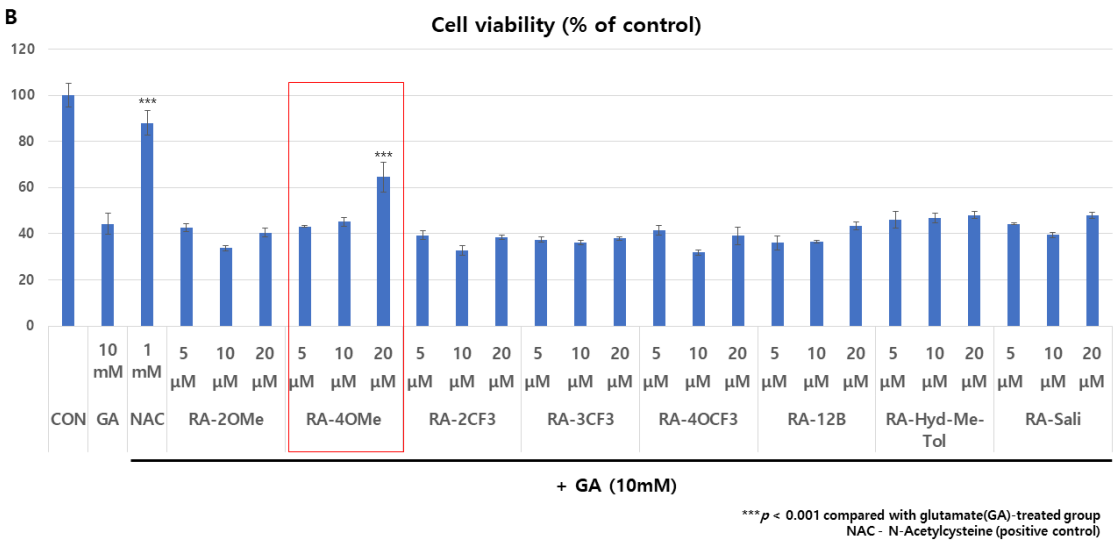
하. 종합적으로, 본 연구 결과는 RA-2N 라말린 유도체가 NF-κB 신호전달에 대한 조절 효과를 가지며, 또한 RA-2N이 신경염증과 관련된 HT22 세포의 자멸사를 억제할 수 있음을 입증했음. 이러한 결과를 바탕으로 RA-2N이 NF-κB 신호전달 활성화를 억제함으로써 신경염증을 억제하며, 이를 통해 HT22 세포를 보호하는 역할을 한다고 추정했음. RA-2N의 신경세포 사멸 억제 효과에 대해 NF-κB inhibitor인 JSH-23을 사용하여 NF-κB 신호전달 경로의 영향을 확인하였음. RA-2N이 LPS로 유도된 BV2 세포에서 NO 생성을 유의미하게 억제할 수 있음을 확인했으나, JSH-23과 RA-2N의 병용 처리에 의한 유의미한 상승 효과는 관찰되지 않았음(그림 2-190)

거. 이와 유사하게, BV2-HT22 세포 co-culture 시스템에서도 RA-2N이 신경염증으로 유도된 HT22 세포의 자멸사에 대해 유의미한 보호 효과를 가지는 것을 발견했으나, RA-2N과 JSH-23의 병용 처리가 이 보호 효과를 강화하지는 않았음(그림 2-191)



[그림 2-190. Effect of JSH-23 on BV2 and HT22 cells. Cells were pretreated with JSH-23 or RA-2N and then stimulated for 24 h with LPS or glutamate]





[그림 2-191. 합성 라말린 유도체 16종의 HT22 해마세포에서 glutamate로 유발한 뇌세포 손상에 대한 보호효과]

2) HT22 해마세포에서 HO-1 단백질 발현

가. 합성 라말린 유도체 2종(RA-4F, RA-4OMe)의 HT22 해마세포에서 HO-1 단백질 발현 효과 확인

- 합성된 라말린 유도체 중 HT22 해마세포에서 glutamate로 유발한 뇌세포 손상에 대한 보호효과 RA-4F, RA-4OMe 2가지 유도체를 대상으로 HT22 해마세포에서 HO-1 단백질 발현을 확인

- HO-1 단백질은 항산화, 항염증, 세포보호 역할을 하는 단백질로 잘 알려져 있음

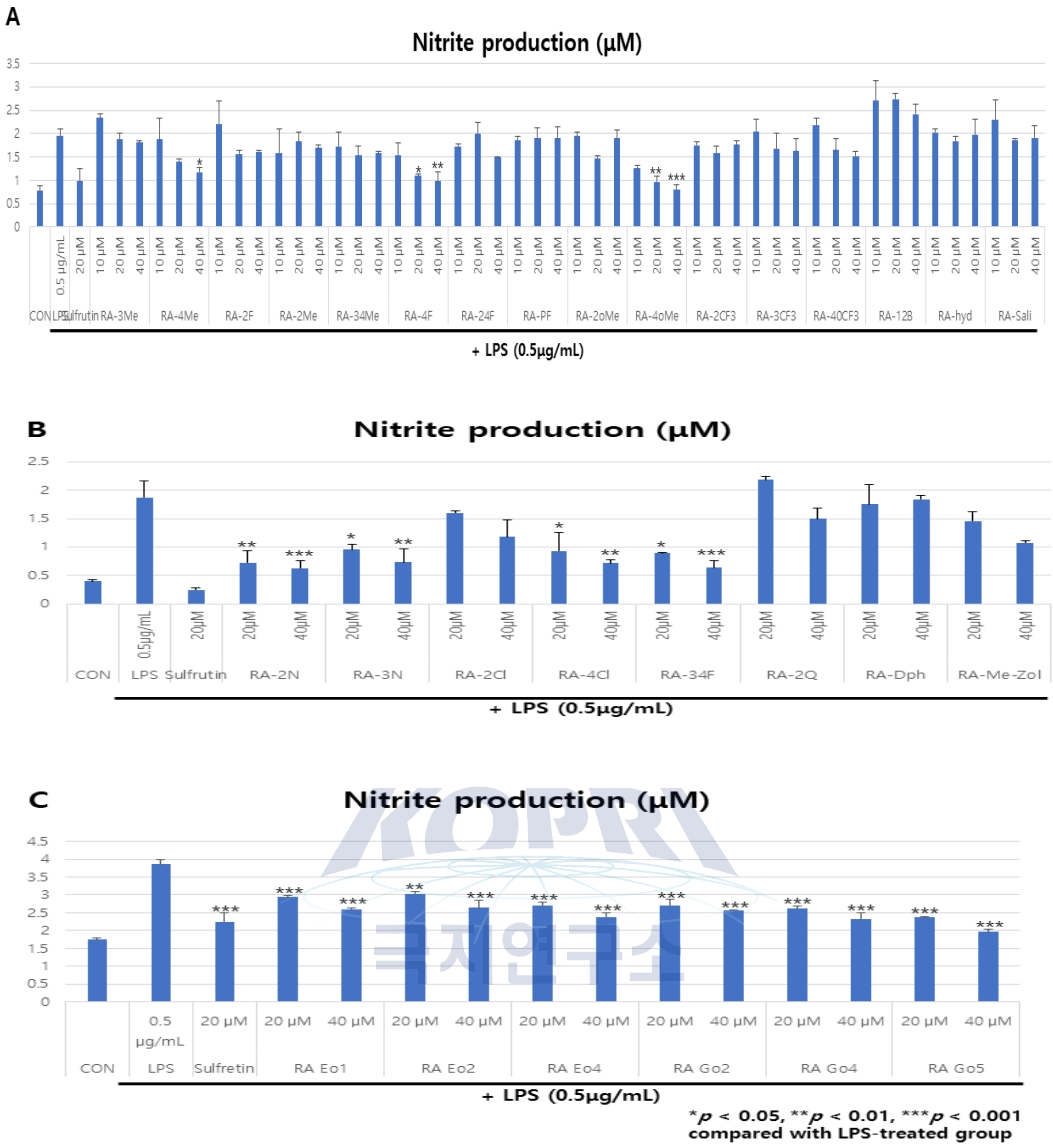
- HT22 해마세포에 합성 라말린 유도체 2종(RA-4F, RA-4OMe)을 5, 10, 20 μM 농도로 각각 처리한 후 12시간 뒤 세포를 걷어 Western Blotting 실험을 진행하였음. 양성대조군으로 CoPP (HO-1 inducer)를 사용하였음

- HT22 해마세포에 합성 라말린 유도체 2종(RA-4F, RA-4OMe)은 HO-1 발현에 영향을 주지 않았음. 이에 향후 후속연구에서 HO-1 기전이 아닌 다른 기전 연구를 진행할 계획임

[그림 2-192. 합성 라말린 유도체 2종(RA-4F, RA-4OMe)의 HT22 해마세포에서 HO-1 단백질 발현 효과]

3) BV2 미세아교세포에서 LPS로 유발한 뇌신경 염증반응 조절효과 검색

가. RA 골격 유래 합성화합물 30종을 LPS에 의해 nitric oxide (NO)가 과생성된 미세아교세포 BV2에 전처리하였을 때 화합물 16종에서 NO 생성이 유의적으로 감소하는 효과를 확인하였음(그림 2-193)



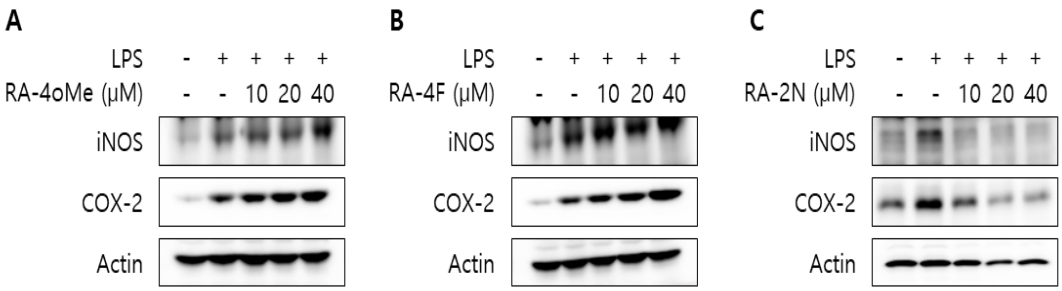
[그림 2-193. The effects of compounds on nitrite content]

나. NO가 과생성된 BV2 세포에 화합물 30종을 전처리 시 NO 생성이 감소하는 효과를 확인하였고, 우수한 NO 생성 억제효과에 대하여 IC_{50}을 확인함(표 2-7)

Name	Nitrite production IC_{50} (μM)	Name	Nitrite production IC_{50} (μM)
RA-3Me	-	RA-Sali	-
RA-4Me	25.50±0.96	RA-2N	2.67±1.18
RA-2F	-	RA-3N	12.38±0.87
RA-2Me	-	RA-2Cl	-
RA-34Me	-	RA-4Cl	11.81±1.19
RA-4F	13.25±0.69	RA-34F	12.11±1.19
RA-24F	-	RA-2Q	-
RA-PF	-	RA-Dph	-
RA-2oMe	-	RA-Me-Zol	-
RA-4oMe	8.32±0.52	RA Eo1	26.12±0.10
RA-2CF3	-	RA Eo2	29.92±0.41
RA-3CF3	-	RA Eo4	16.18±0.28
RA-4oCF3	-	RA Go2	13.13±0.33
RA-12B	-	RA Go4	18.51±0.45
RA-hyd	-	RA Go5	13.93±0.30

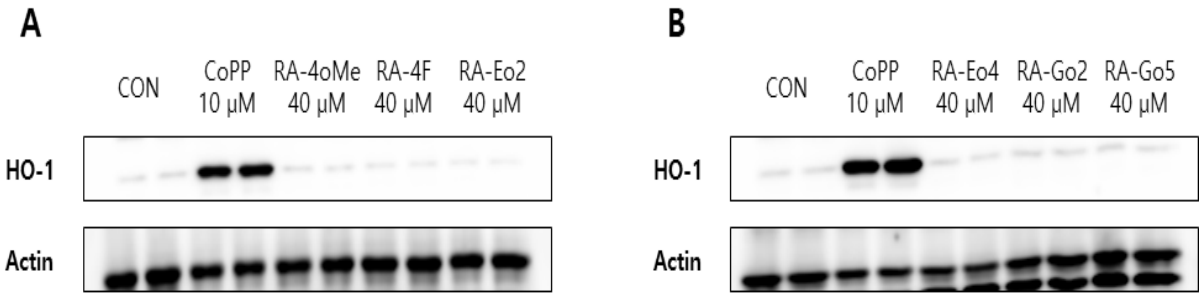
[표 2-7. Inhibitory effects of the 30 compounds on nitrite content production in LPS-treated BV2 cells]

다. NO 생성이 감소하는 효과가 우수한 16종 중 가장 우수한 억제효과를 보이는 3종을 선정하여 전염증성 매개인자인 iNOS와 COX-2가 과발현된 BV2세포에서의 효과를 확인하였음. 화합물 RA-4OMe, RA-4F 처리 시 두 화합물 모두 iNOS 및 COX-2의 발현을 감소시키지 않았으나, RA-2N 처리 시 iNOS 및 COX-2의 발현을 감소시키는 것을 확인함(그림 2-194). 향후 RA-2N을 대상으로 후속연구 진행 예정임



[그림 2-194. Protein expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 cells]

라. BV2세포에서 화합물 RA-4oMe, RA-4F, RA-E02, RA-E04, RA-G02, 및 RA-G05, 처리 시 화합물 모두 항산화 단백질인 HO-1가 발현되지 않았음(그림 2-195)

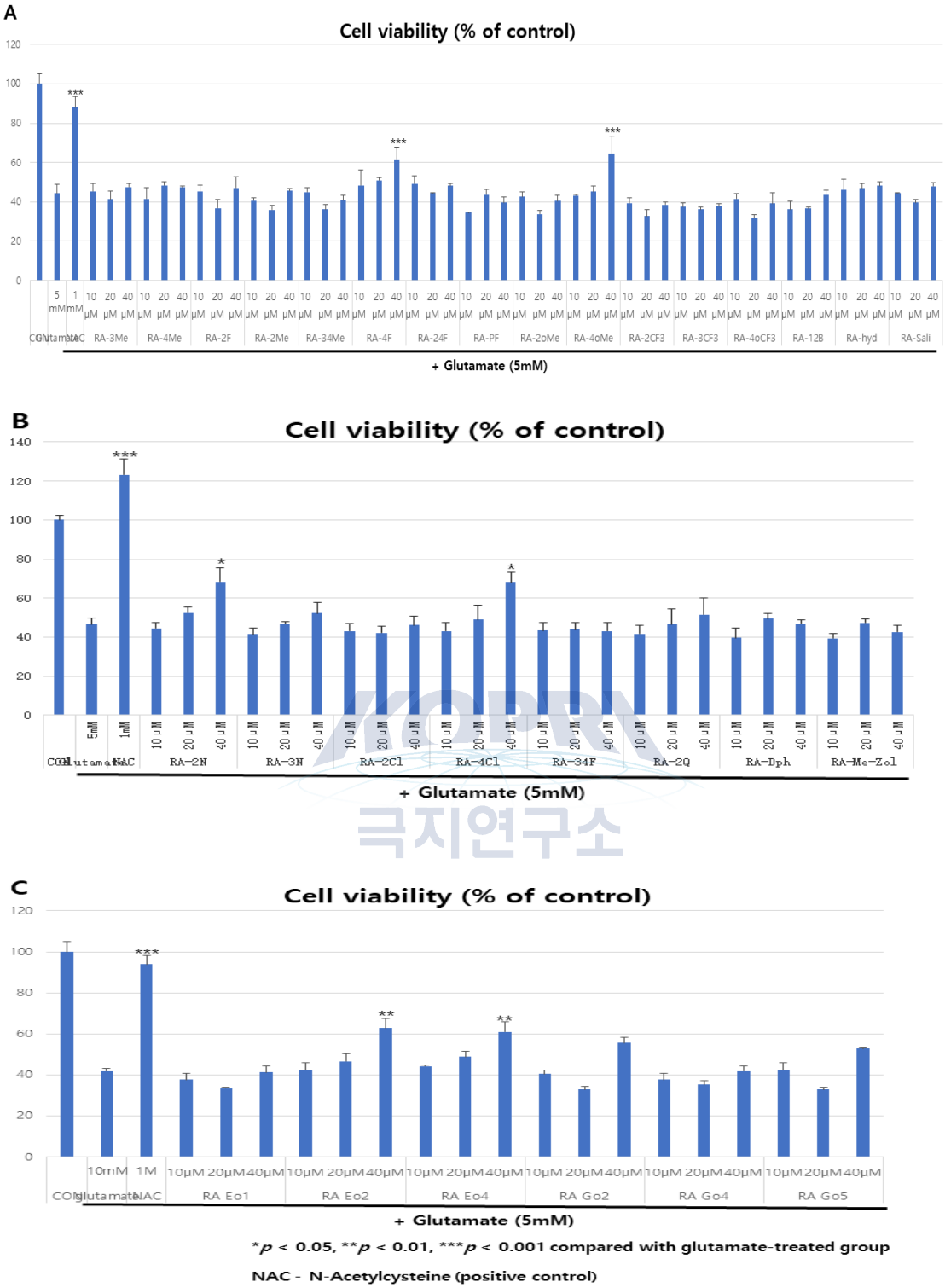


[그림 2-195. Protein expression levels of heme oxygenase-1 (HO-1) in BV2 cells]

4) HT22 해마세포에서 glutamate로 유발한 뇌세포 손상에 대한 보호효과 검토

가. RA 골격 유래 합성화합물 30종을 해마세포인 HT22세포에 전처리 하였을 때 glutamate에 의한 산화적 스트레스에 대해 화합물 RA-4F, RA-4OMe, RA-2N, RA-4Cl, RA-E02, 및 RA-E04 처리 시 유의적으로 세포 보호 효과가 나타나는 것을 확인하였음(그림 2-196)

KOPRI 극지연구소



[그림 2-196. The effects of 30 compounds on glutamate-induced oxidative neurotoxicity in HT22 cells]

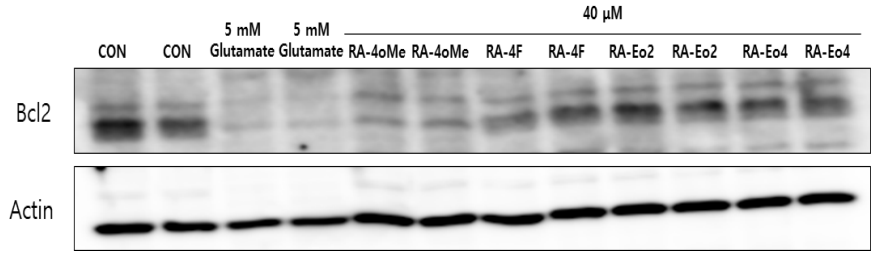
나. Glutamate로 유도된 산화적 스트레스에 대해 HT22 세포에 화합물 30종을 전처리 시 세포 보호 효과를 확인하였고, 우수한 효과에 대하여 보호율을 확인함(표2-8)

Name	Cell protection at 40 μM	Name	Cell protection at 40 μM
RA-3Me	-	RA-Sali	-
RA-4Me		RA-2N	40.75±13.60% protection at 40 μM
RA-2F	-	RA-3N	-
RA-2Me	-	RA-2Cl	-
RA-34Me	-	RA-4Cl	40.16±9.48% protection at 40 μM
RA-4F	31.36±10.98% protection at 40 μM	RA-34F	-
RA-24F	-	RA-2Q	-
RA-PF	-	RA-Dph	-
RA-2oMe	-	RA-Me-Zol	-
RA-4oMe	36.38±16.05% protection at 40 μM	RA-Eo1	-
RA-2CF3	-	RA-Eo2	36.20±7.78% protection at 40 μM
RA-3CF3	-	RA-Eo4	33.16±8.35% protection at 40 μM
RA-4oCF3	-	RA-Go2	-
RA-12B	-	RA-Go4	-
RA-hyd	-	RA-Go5	-

[표 2-8. Protective effects of the 30 compounds on glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells]

다. 해마세포 HT22에서 glutamate로 유발된 세포사멸 증가로 인한 Bcl2발현 감소를 화합물 RA-4oMe, RA-4F, RA-Eo2, 및 RA-Eo4 처리 시 모두 Bcl2가 발현되는 것을 확인하였음. 추후 HT22세포에서 세포사멸 억제 효과에 대하여 추가 기전 연구를 수행할 예정임(그림 2-197)

KOPRI 극지연구소

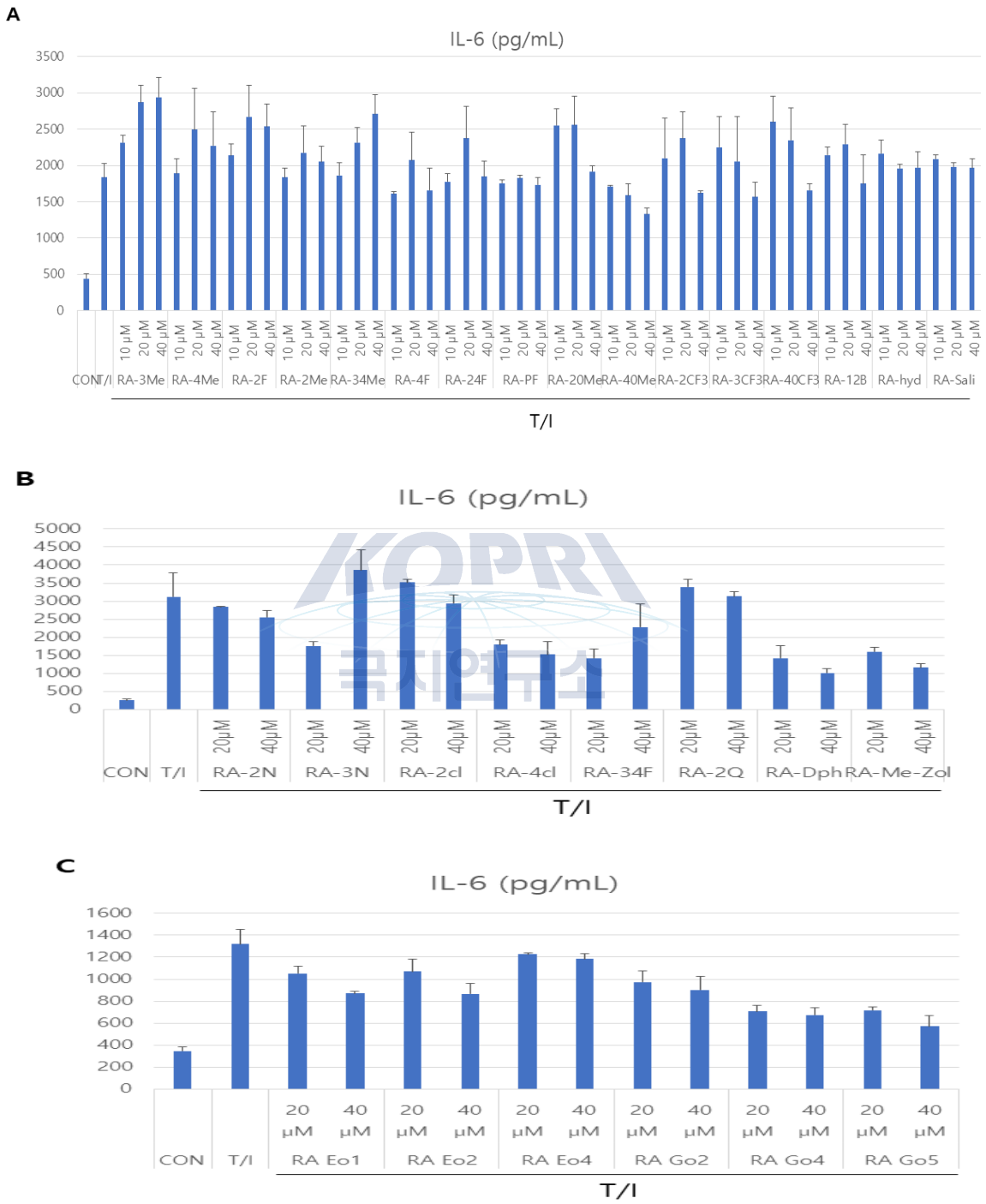


[그림 2-197. Protein expression levels of Bcl2 in glutamate-induced HT22 cells]

5) Keratinocyte(각질형성세포)를 활용한 RA 유도체의 피부염증억제 기능성 평가

가. Keratinocyte(각질형성세포)는 각질층 구성에 필수적인 세포로 피부에서 발생하는 면역반응의 일차적인 유도체와 표적으로 작용함. Keratinocyte는 여러 자극에 의해 IL-4, TNF-α, IFN-ɤ 등 다양한 사이토카인을 분비하기도 하고, TGF-β, KGF (Keratinocyte growth factor)의 수용체를 갖고 있어 이러한 사이토카인에 의해 영향을 받기도 함. 또한, 민감성피부 환자의 각질형성세포에는 고농도의 TSLP (Thymic stromal lymphopoietin)와 MDC (macrophage-derived chemokine)가 존재함

나. RA 골격 유래 합성화합물 30종을 싸이토카인 IL-6이 과생성된 사람각질형성세포 HaCaT에 화합물 전처리 시 IL-6 생성이 감소하는 효과를 확인하였고, RA-Dph, RA-Me-Zol, 및 RA-G05이 가장 우수한 감소효과가 나타나는 것을 확인함(그림 2-198)



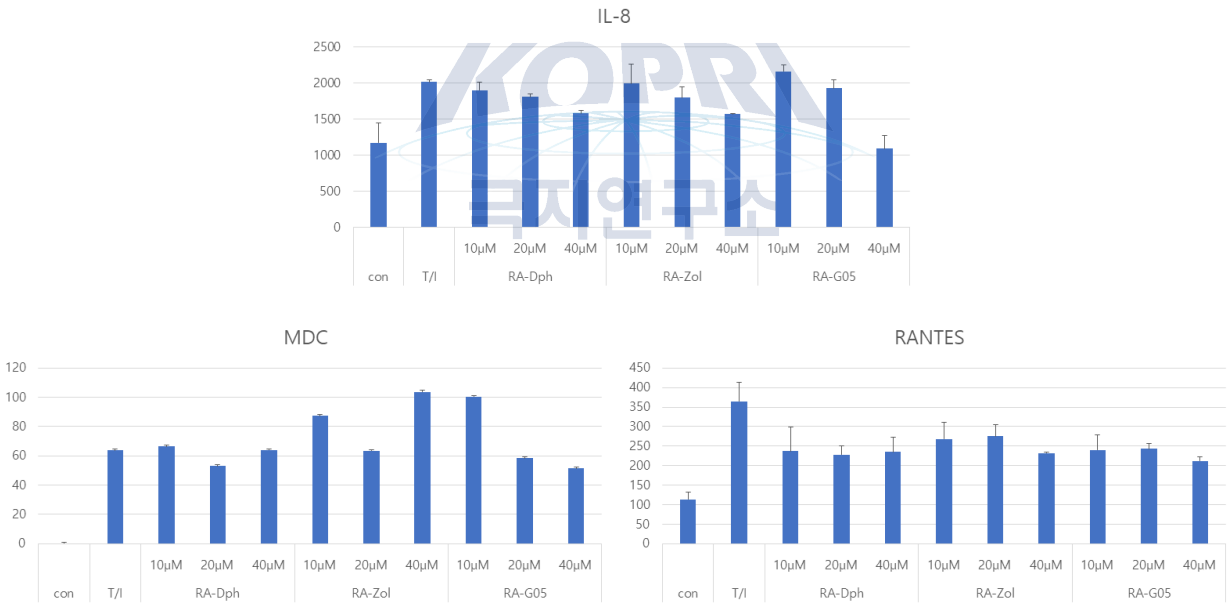
[그림 2-198. Inhibitory effects of the 30 compounds on IL-6 production in TNF-α/IFN-γ-treated HaCaT cells]

다. 사이토카인 IL-6가 과생성된 HaCaT 세포에 화합물 30종을 전처리 시 IL-6 생성이 감소하는 효과를 확인하였고, 우수한 억제효과를 나타낸 3종에 대하여 IC_{50}을 확인함(그림2-199)

Name	IL-6（IC_{50}）
RA-Dph	20.24±2.68
RA-Me-Zol	25.64±1.49
RA Go5	30.68±5.36

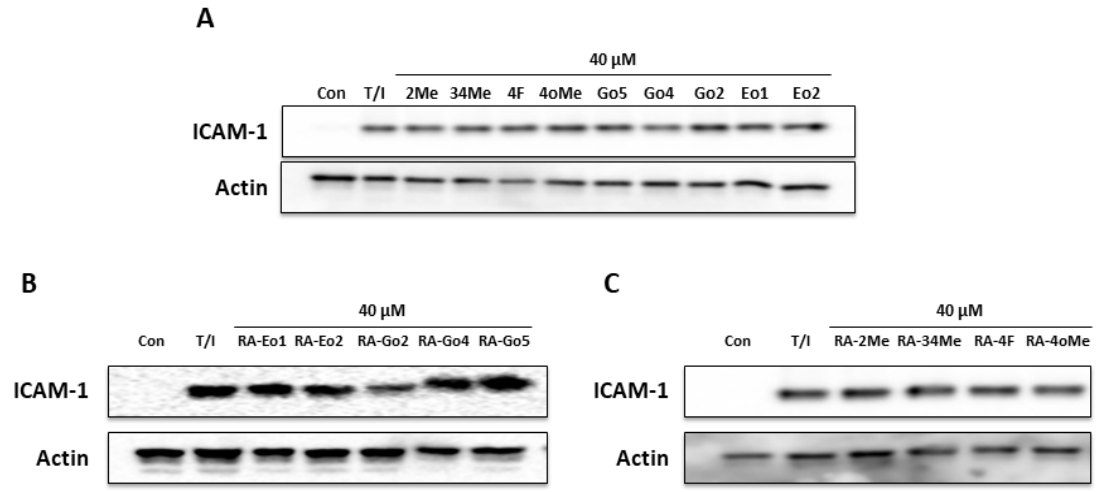
[그림 2-199. Inhibitory effects of the 3 compounds on IL-6 production in TNF-α/IFN-γ-treated HaCaT cells]

라. RA 골격 유래 합성화합물 3종을 싸이토카인 IL-8과 케모카인 RANTES, MDC가 과생성된 사람각질형성세포 HaCaT에 화합물 전처리 시, RA-G05이 가장 우수한 사이토카인 및 케모카인 감소효과가 나타나는 것을 확인함(그림2-200)



[그림 2-200. Effects of 3 compounds on IL-8. MDC, and RANTES secretion in TNF-α/IFN-γ-stimulated HaCaT cells]

마. RA 골격 유래 합성화합물 중 유의적으로 IL-6 생성 억제하는 효과를 보이는 화합물 18종을 이용하여 ICAM-1이 과발현된 사람각질형성세포 HaCaT에 전처리하였을 때 18종 화합물 모두 ICAM-1의 발현을 억제하지 못하는 것을 확인하였음(그림 2-201). 이에 추가적인 기전연구를 수행 중에 있음



[그림 2-201. Effects of 18 compounds on TNF-α/IFN-γ-induced ICAM-1 in HaCaT cells]

○ 극지 대사체 유래 뇌보호용 약물 라이브러리 확보 및 효력 규명

: 극지 대사체 유래 뇌보호 활성 물질의 확보 연구는 추가로 진행함

1) 극지 유래 진균 SF7402의 배양, 대사체 추출 및 분리

가. 진균 균주 SF7402 는 PDA 배지 조건에서 (25 ℃ for 14 days) 20개의 fernbach 플라스크 (각 플라스크 당 650 mL의 배지 포함)에서 배양되었음. 배양이 완료된 균주는 20 L의 에틸아세테이트 (EtOAc)를 이용하여 추출 되었으며 농축 과정을 거쳐 진균 추출물 4.8 g 이 얻었음. 다음으로 추출물에 대한 분획과정으로서 역상 컬럼 크로마토그래피 [reversed-phase (RP) C_{18} flash column chromatography (4.5 × 30 cm)]가 수행 되었으며 이때 이동상은 메탄올-물 혼합 단계별 기울기 용리과정으로 적용되었음 [20 %, 40 %, 60 %, 80 %, and 100 % (v/v) MeOH in H_2O (500 mL each)]. 각 단계의 컬럼 용출물은 농축과정을 거쳐 최종 적으로 5개의 분획물 시료가 획득되었음 (SF7402-1 ~ SF7402-5)

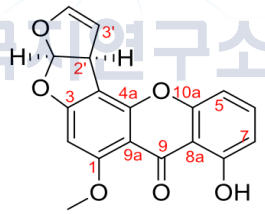
나. 다음 정제 단계로서 분획물 SF7402-5 (568.8 mg)에 대한 Sephadex 컬럼 (33 cm × 3 cm) 크로마토그래피가 CHCl3-MeOH (3:1) 혼합 이동상 조건에서 수행되었으며 그 결과로서 4 개의 시료가 도출 되었음 (SF7402-51 ~ SF7402-54). 이들 분획물 중에서 시료 SF7402-52 (521.6 mg) 에 대한 n-hexane-acetone (7:1, v/v) 혼합용매를 이동상으로 사용하는 실리카젤 크로마토그래피 (33 cm × 2 cm) 단계를 통하여 10 개의 분획물이 얻어졌음. 다음의 정제 단계로서 SF7402-527 (153.9 mg)에 대한 C_{18} prep HPLC (45 %-65 % CH_3CN in H_2O, over 45 min)가 수행되어 순수 진균 대사체인 SF7402-527-2 (45.3 mg, t_R = 30 min), SF7402-527-3 (25.8 mg, t_R = 34 min), SF7402-527-4 (9.5 mg, t_R = 39 min), 및 SF7402-527-5 (1.1 mg, t_R = 43 min)가 얻어졌음

2) 진균 SF7402 유래 대사체의 구조분석

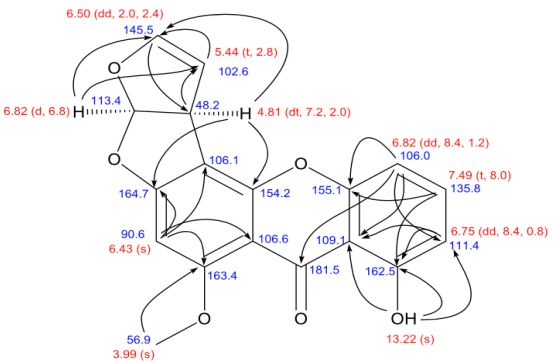
가. SF7402-527-3 (=SF7402-528-3)의 구조분석

- SF7402-527-3는 노란색 고체로 분리 되었으며 분자식은 HRESIMS 스펙트럼에서 관측되는 m/z 347.0509 $[M+Na]^+$ [calcd. for $C_{18}H_{12}O_6Na$, 347.0526] 피크에 의해서 $C_{18}H_{12}O_6$로 결정되었음. SF7402-527-3 의 ^{13}C NMR 및 DEPT spectra 의 분석을 통하여 이 분자는 하나의 methoxy, 6 개의 sp2 methines, 2 개의 sp3 methines, 및 9 개의 sp2 quaternary (1 개의 carbonyl 포함) 탄소들로 구성된 18 개의 탄소를 함유하고 있음이 확인 되었음. SF7402-527-3 의 ^1H NMR 스펙트럼에서는 hydroxy기에 해당하는 피크가 δ_H 13.22 (s, 1H)에서 관찰 되었고 이외에도 ABX 스핀 system [δ_H 7.49 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-6), 6.82 (1H, dd, J = 8.4, 1.2 Hz, H-5), 6.75 (1H, dd, J = 8.4, 0.8 Hz, H-7)], acetal signal [δH 6.82 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-1')], 방향족 methine proton [δ_H 6.43 (1H, s, H-2)], 1 쌍의 cis-olefinic protons [δH 6.50 (1H, dd, J = 2.0, 2.4 Hz, H-4'), 5.44 (1H, t, J = 2.8 Hz, H-3')], 1 개의 sp3 -혼성 methine proton [δ_H 4.80 (1H, dt, J = 7.2, 2.0 Hz, H-2')], 및 1 개의 methoxy 기 [δ_H 3.99 (3H, s, 1-OCH3)]에 대응하는 피크들이 확인되었음. 최종적으로 SF7402-527-3 의 NMR data 해석과 문헌에 보고된 진균대사체인 sterigmatocystin 의 NMR data 와의 비교분석을 통하여 그 구조가 확인되었음

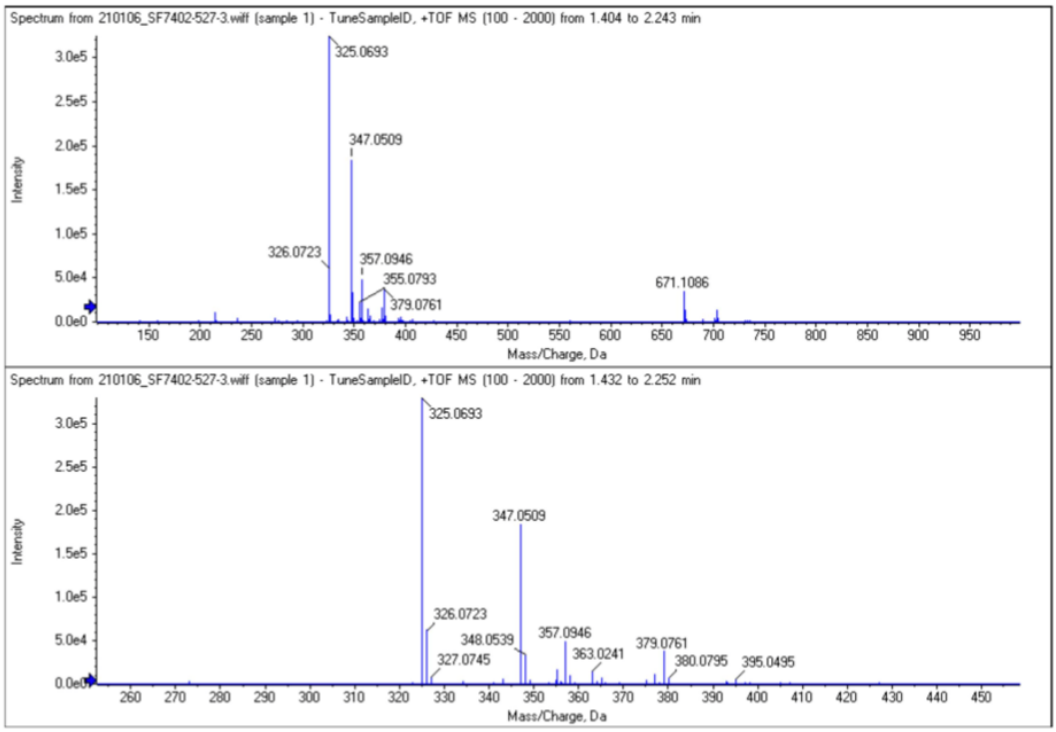
KOPRI 극지연구소



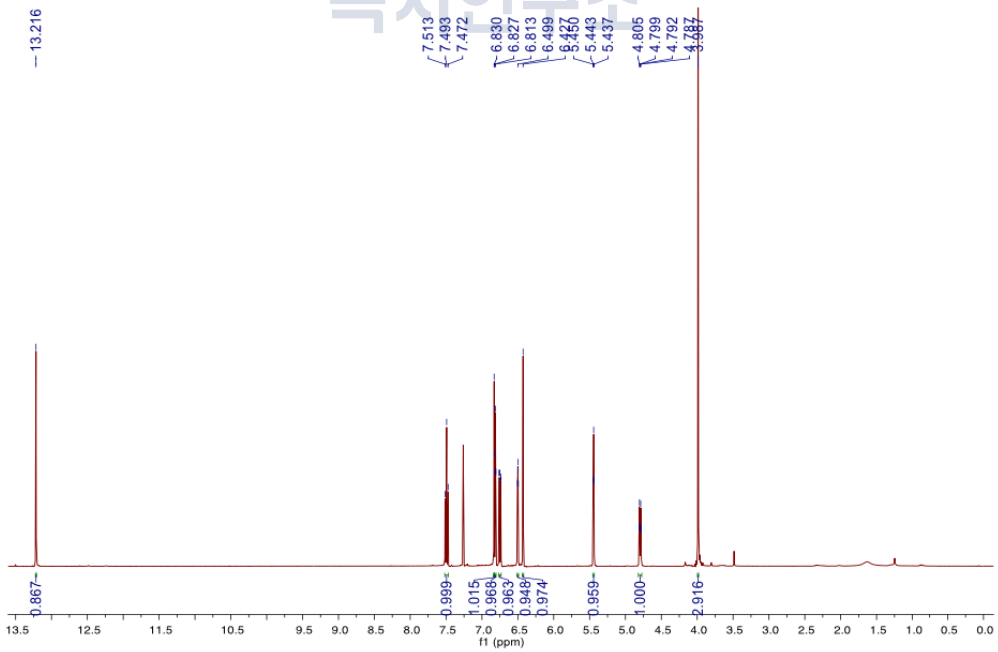
[그림 2-202. Chemical structure of SF7402-527-3]



[그림 2-203. Key HMBC correlations for SF7402-527-3]



[그림 2-204. SF7402-527-3의 HRESIMS spectrum]



[그림 2-205. SF7402-527-3의 ^{1}H NMR spectrum]

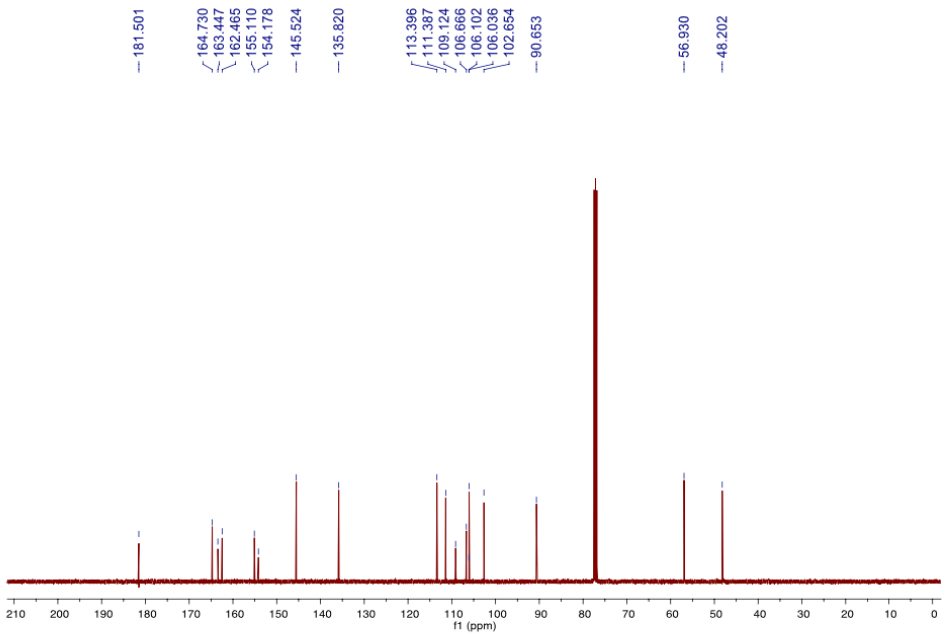
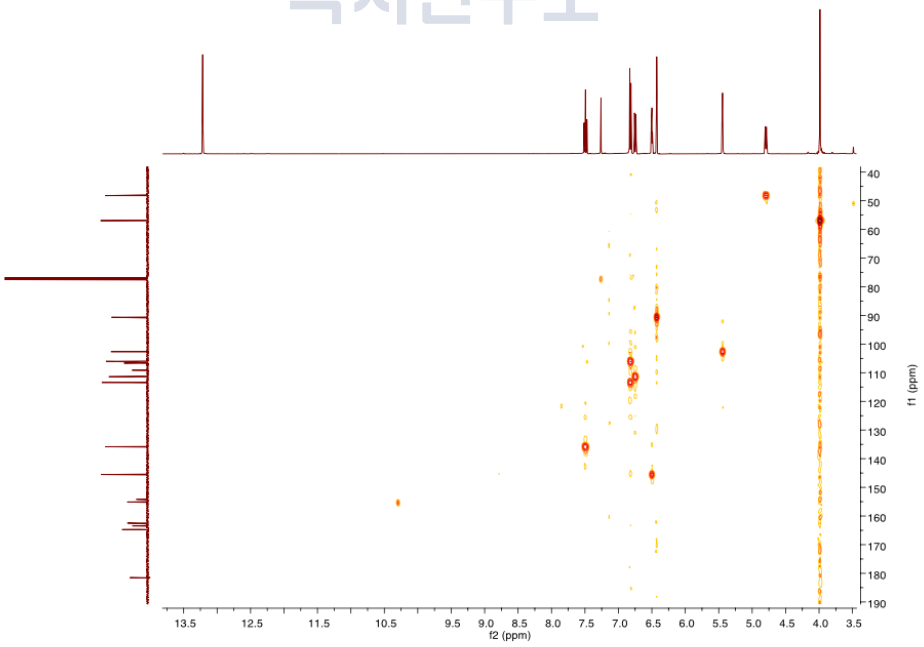


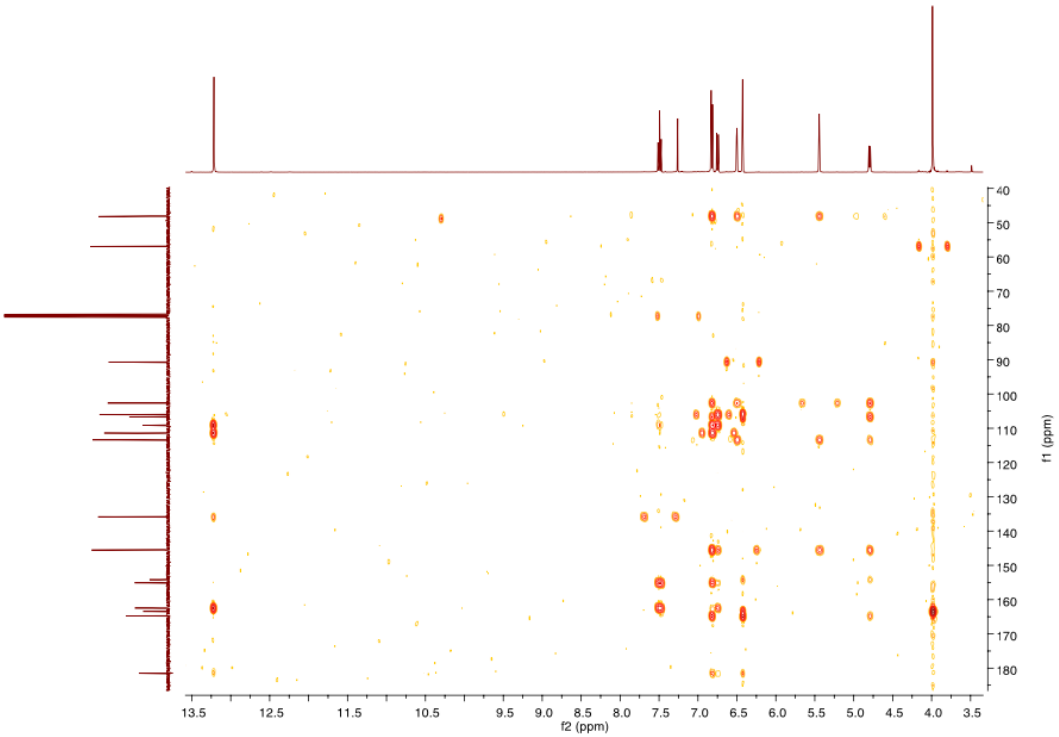
Figure. ^{13}C NMR spectrum of **SF7402-527-3** (Recorded in chloroform-*d*)

[그림 2-206. SF7402-527-3의 ^{13}C NMR]

KOPRI
극지연구소

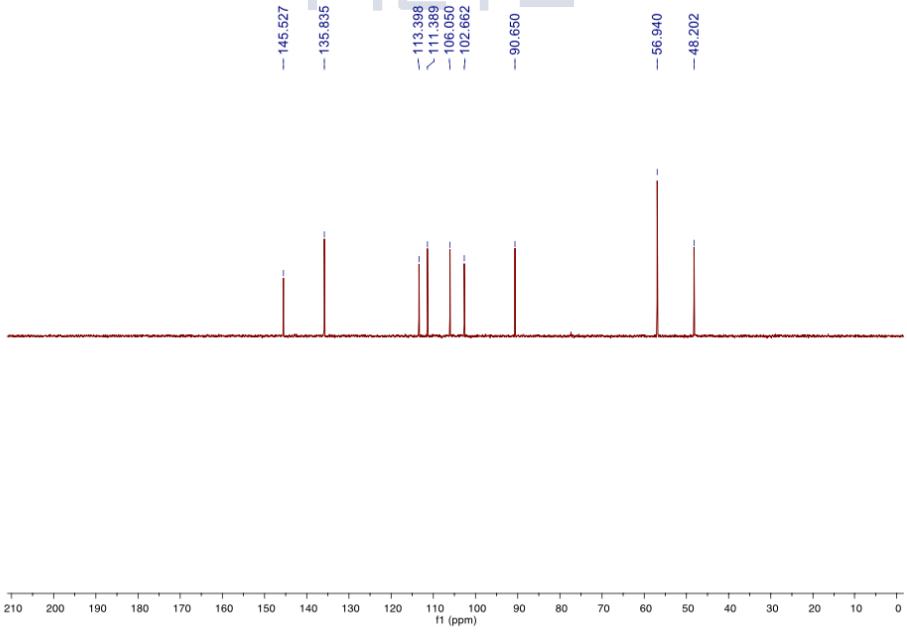


[그림 2-207. SF7402-527-3의 HMQC spectrum]



[그림 2-208. SF7402-527-3의 HMBC spectrum]

KOPRI
극지연구소



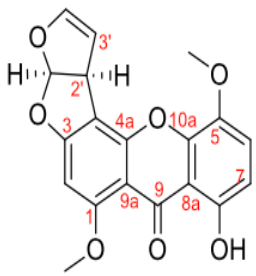
[그림 2-209. SF7402-527-3의 DEPT spectrum]

나. SF7402-527-2 (=SF7402-528-2)의 구조분석

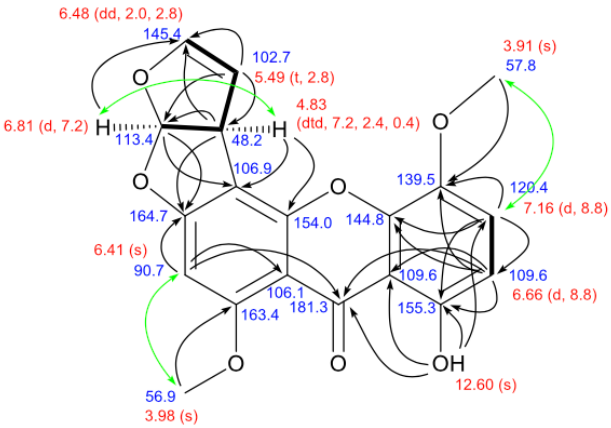
- SF7402-527-2는 노란색 고체로 분리 되었으며 분자식은 HRESIMS 스펙트럼에서 관측되는 m/z 355.0814 $[M+H]^+$ [calcd. for $C_{19}H_{15}O_7$, 355.0812] 피크에 의해서 $C_{19}H_{14}O_7$로 결정되었음. SF7402-527-2의 ^{13}C NMR 및 DEPT spectra 의 분석을 통하여 이 분자는 2 개의 methoxy, 5 개의 sp2 methines, 2 개의 sp3 methines, 및 10 개의 sp2 quaternary (1 개의 carbonyl 포함) 탄소들로 구성된 19 개의 탄소를 함유하고 있음이 확인되었음. SF7402-527-2 의 ^1H NMR 스펙트럼에서는 hydroxy 기에 대응하는 피크가 δ_H 12.60 (s, 1H)에서 관찰 되었고, 2 개의 ortho-커플링이 일어나는 방향족 proton signal 이 δ_H 7.16 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6) 과 6.66 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5)에서 관찰되었음

- 또한, 1개의 acetal 기 [δ_H 6.81 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1')], 1 개의 aromatic proton [δ_H 6.41 (1H, s, H-2)], 및 1 쌍의 cis-olefinic proton [δ_H 6.48 (1H, dd, J = 2.0, 2.8 Hz, H-4'), 5.49 (1H, t, J = 2.8 Hz, H-3')], 1개의 sp3 -혼성 methine proton [δ_H 4.83 (1H, dtd, J = 7.2, 2.4, 0.4 Hz, H-2')], 2 개의 methoxy 기 [δ_H 3.98 (3H, s, 1-OCH3), 3.91 (3H, s, 7-OCH_3)]의 존재를 예측하게 하는 피크들이 관측되었음. SF7402-527-2 의 1D 및 2D NMR data 는 문헌에 보고된 , 5-methoxysterigmatocystin의 NMR data 와 유사한 양상을 보였으며 최종적인 SF7402-527-2 의 구조는 HMQC, HMBC, COSY, 및 NOESY spectra 의 분석을 통하여 결정되었음

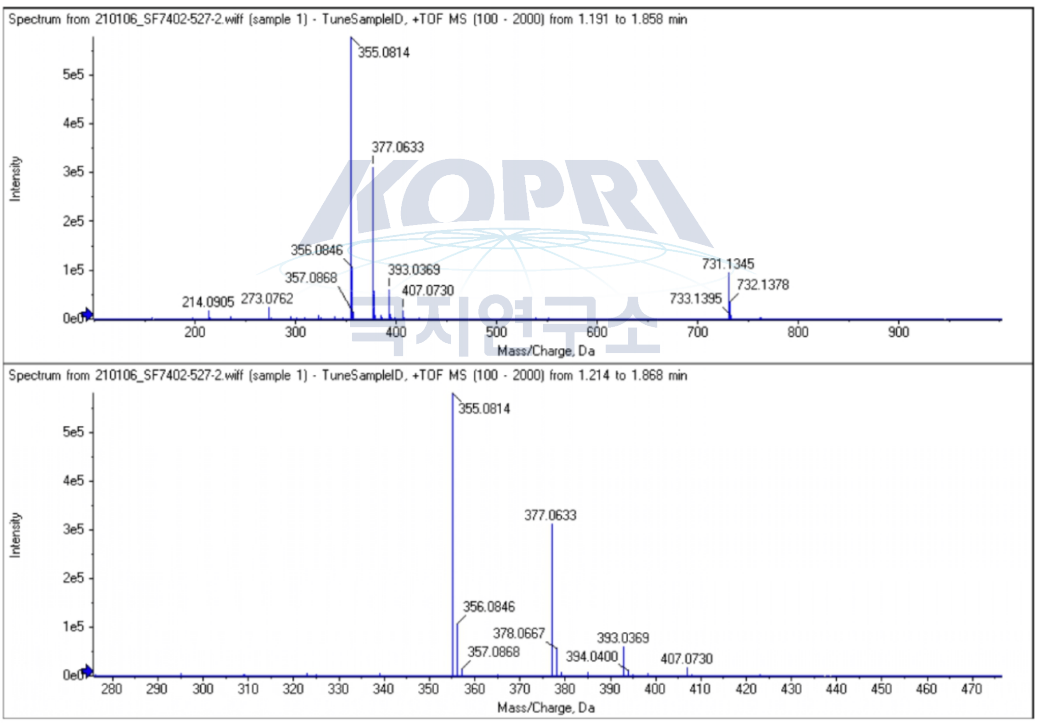
KOPRI 극지연구소



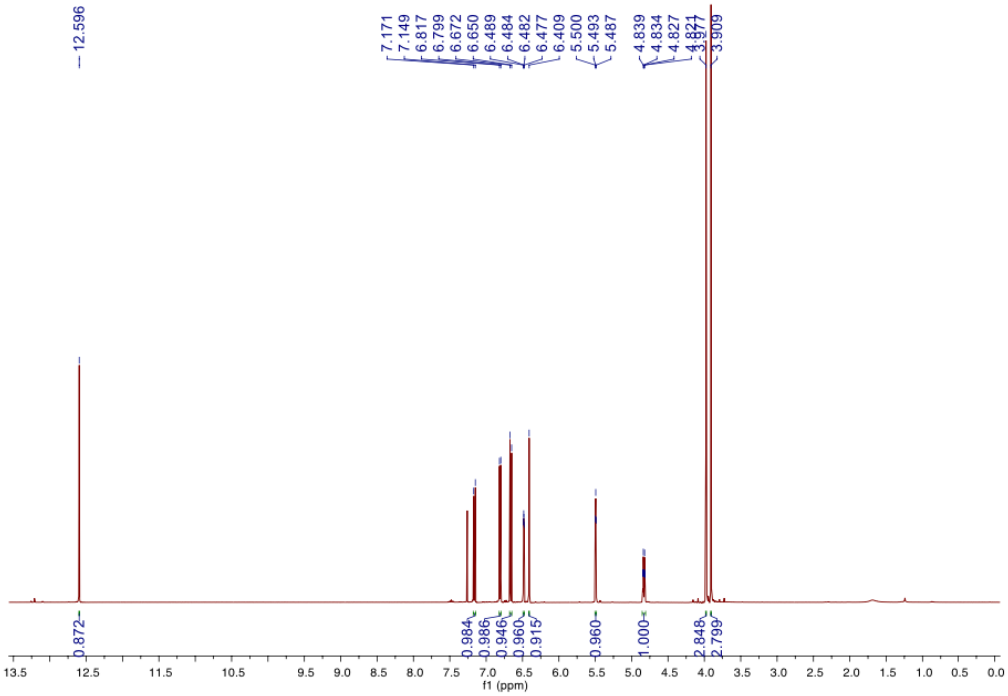
[그림 2-210. SF7402-527-2의 Chemical structure]



[그림 2-211. Key COSY, NOESY and HMBC correlations for SF7402-527-2]

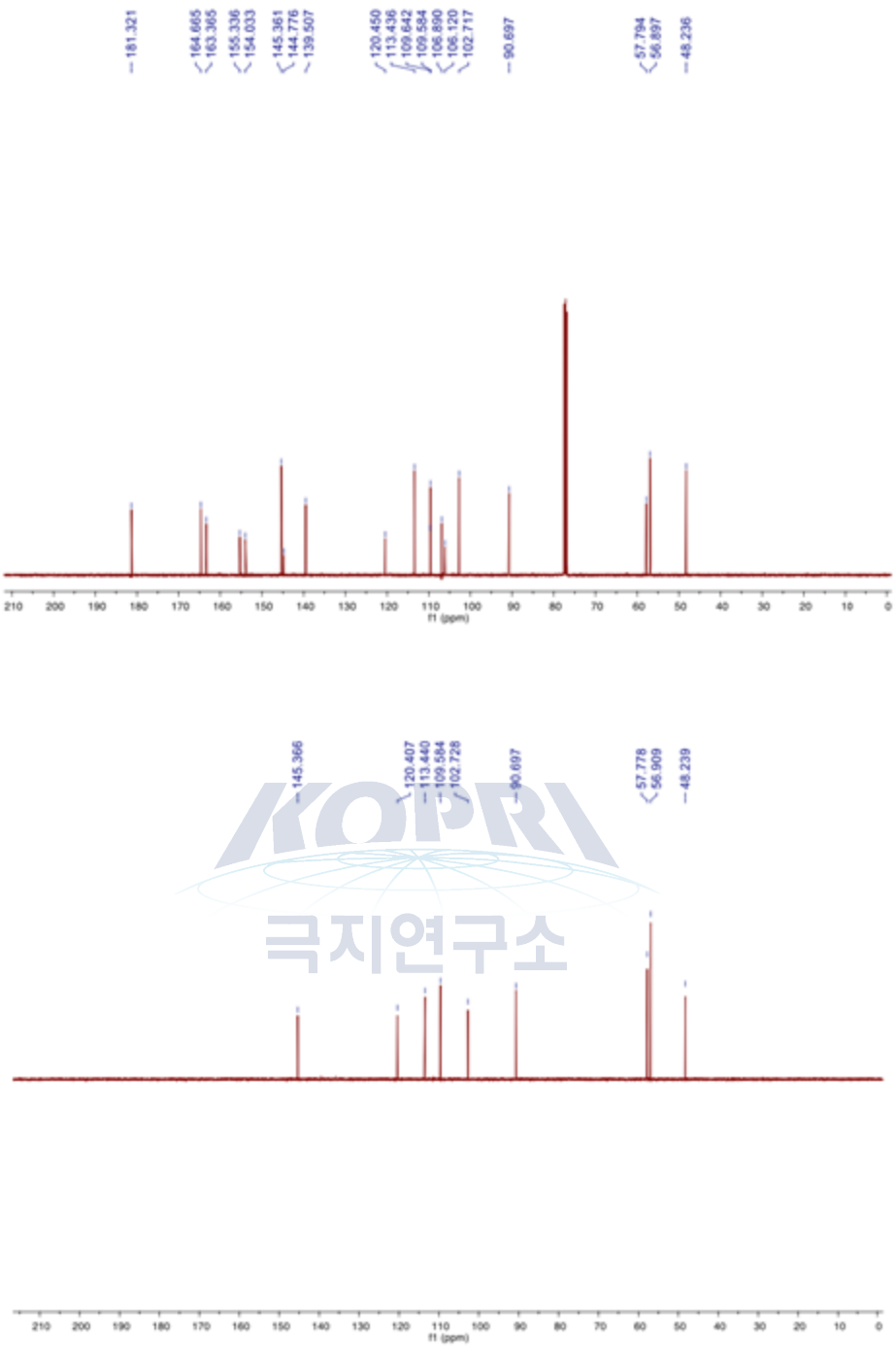


[그림 2-212. HRESIMS spectrum of SF7402-527-2]



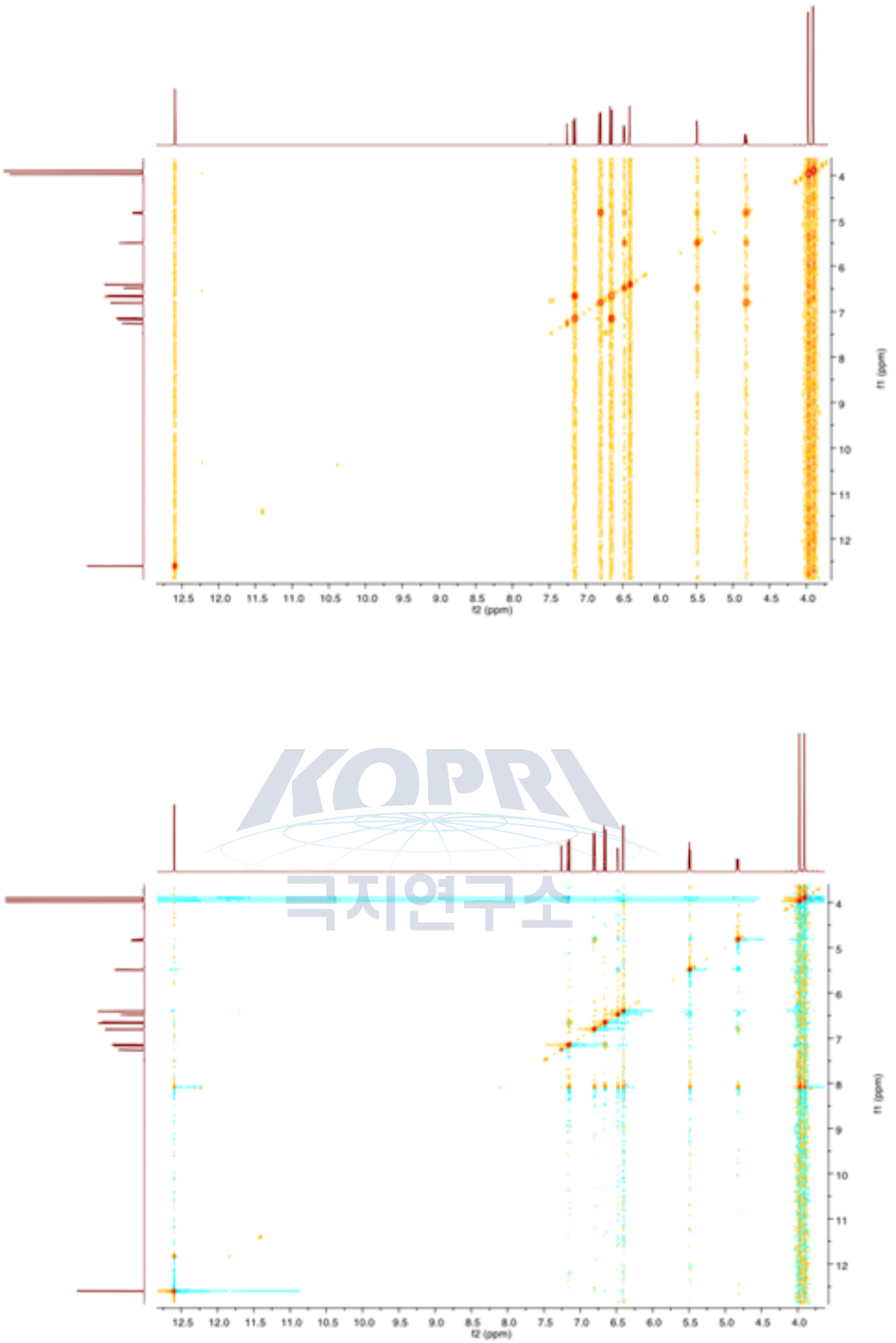
[그림 2-213. ^{1}H NMR spectrum of SF7402-527-2]

KOPRI
극지연구소

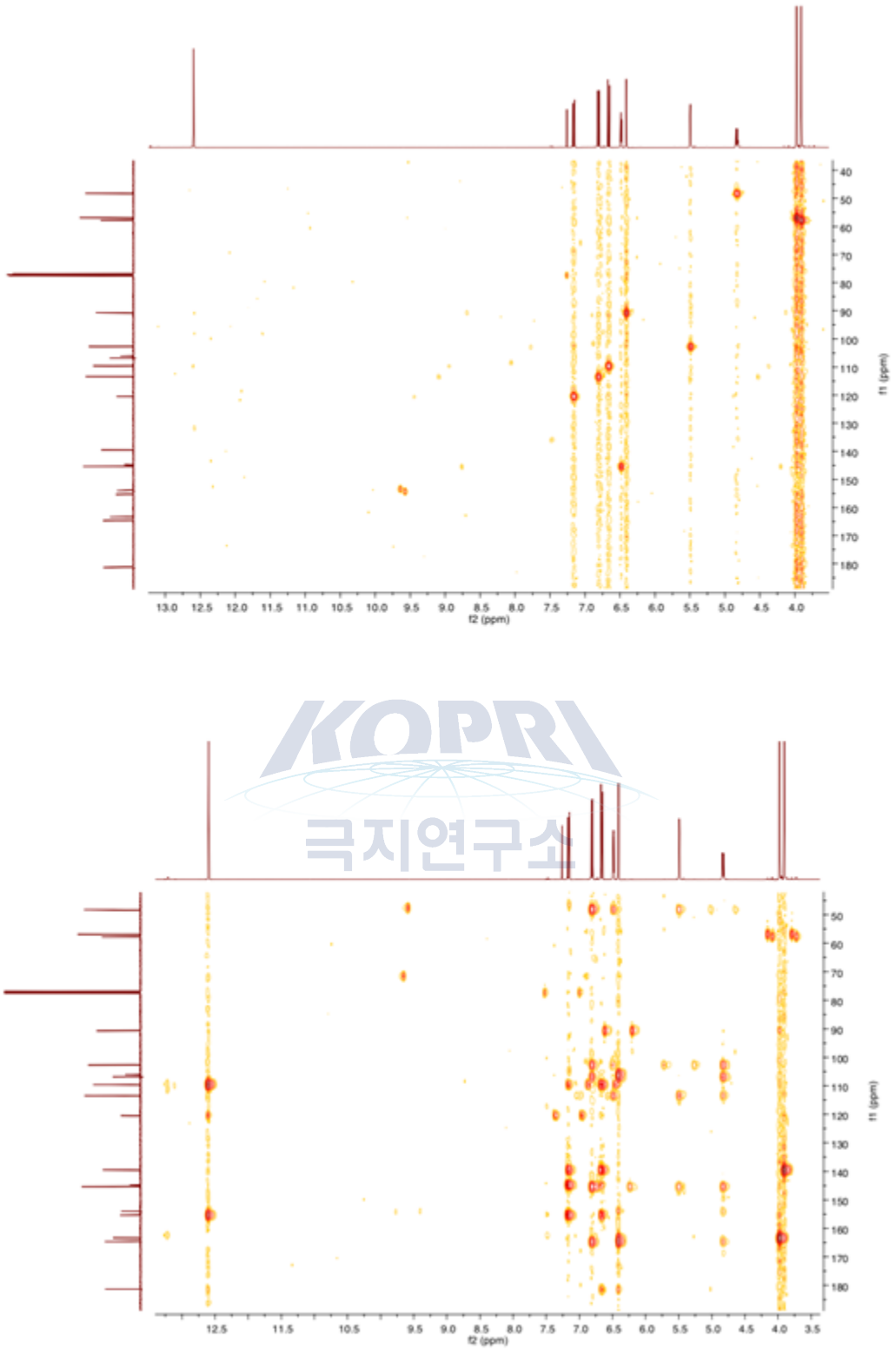


KOPRI
극지연구소

[그림 2-214. SF7402-527-2의 ^{13}C NMR 및 DEPT NMR sepctrum]



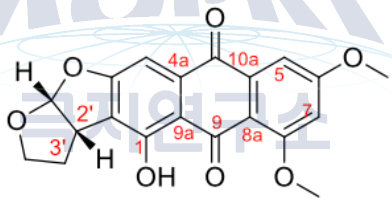
[그림 2-215. SF7402-527-2의 COSY 및 NOESY NMR spectrum]



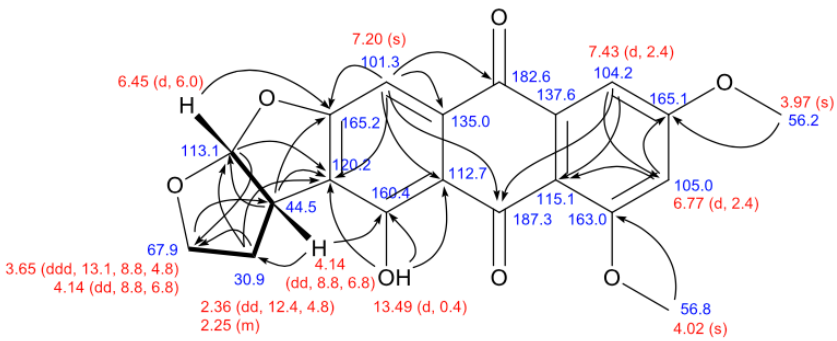
[그림 2-216. SF7402-527-2의 HMQC 및 HMBC NMR sepctrum]

다. SF7402-527-4 (=SF7402-528-4)의 구조분석

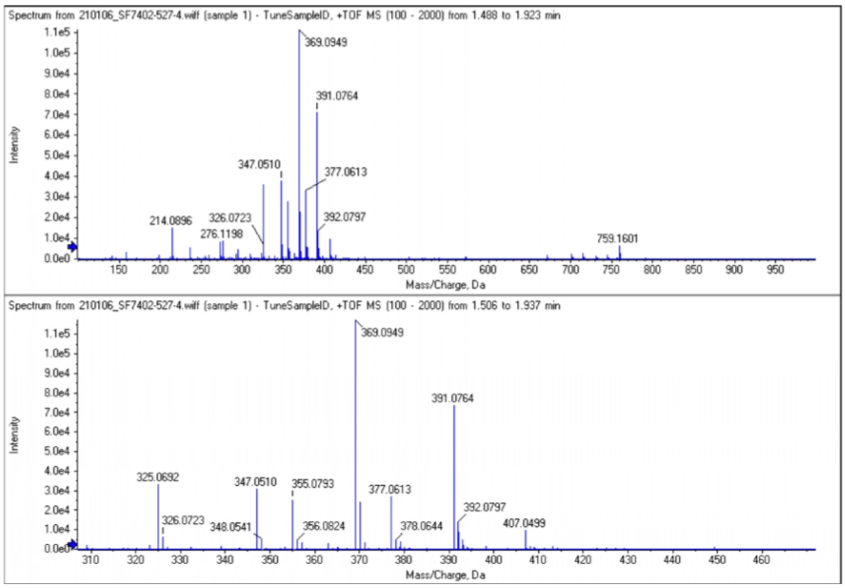
- SF7402-527-4는 노란색 고체로 분리 되었으며 분자식은 HRESIMS 스펙트럼에서 관측되는 m/z 369.0949 $[M+H]^+$ [calcd. for $C_{20}H_{17}O_7$, 369.0969] 피크에 의해서 $C_{20}H_{16}O_7$로 결정되었음. SF7402-527-4의 ^{13}C NMR 및 DEPT spectra 의 분석을 통하여 이 분자는 2 개의 methoxy, 2 개의 methylene 기, 3 개의 sp2 methines, 2 개의 sp3 methines, 및 11 개의 sp2 quaternary (2 개의 carbonyl 포함) 탄소들로 구성된 20 개의 탄소를 함유하고 있음이 확인되었음. SF7402-527-4의 ^1H NMR 스펙트럼은 1개의 hydroxy signal [δ_H 13.49 (d, J = 0.4 Hz, 1H)], 2 개의 meta-coupled aromatic protons [δ_H 7.43 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 6.77 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7)], 1 개의 acetal signal [δ_H 6.45 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-1')], 1개의 단일선 형태의 aromatic proton [δ_H 7.20 (1H, s, H-4)], 1 개의 sp3 - 혼성 methine proton [δ_H 4.14 (1H, dd, J = 8.8, 6.8 Hz, H-2')], 1 개의 hydroxyl methylene group [δ_H 4.14 (1H, dd, J = 8.8, 6.8 Hz, H-4'), 3.65 (1H, ddd, J = 13.1, 8.8, 4.8 Hz, H-4'), 1 개의 methylene group [δ_H 2.36 (1H, dd, J = 12.4, 4.8 Hz, H-3'), 2.25 (1H, m, H-3')], 및 2개의 methoxy groups [δ_H 4.02 (3H, s, 8-OCH_3) 및 3.97 (3H, s, 6-OCH_3)]에 대응하는 피크들을 보였음. 최종적으로 SF7402-527-4 의 구조는 추가적인 ^1H-^1H COSY, HMQC, 및 HMBC spectra 의 분석을 통하여 aversin으로 확인되었음 [1, 3]



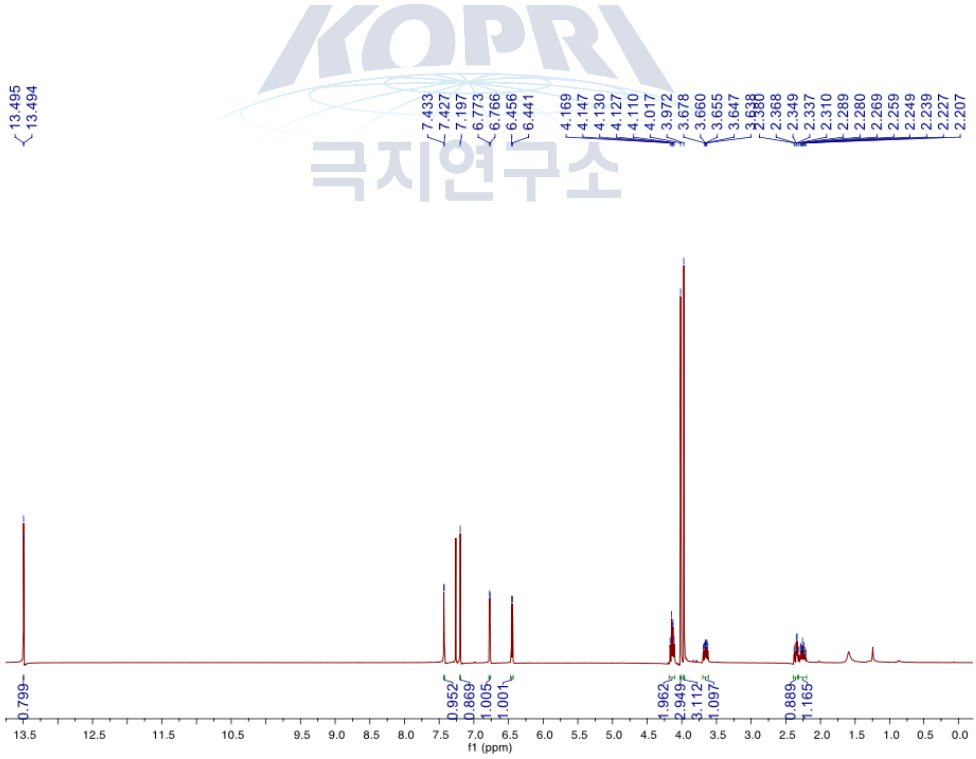
[그림 2-217. Chemical structure of SF7402-527-4]



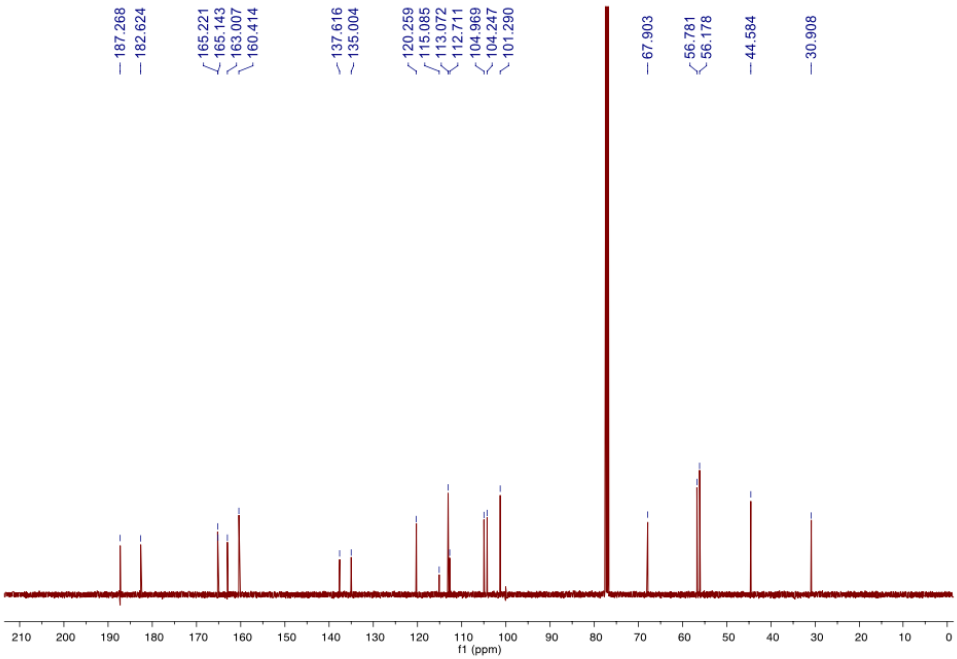
[그림 2-218. Key COSY and HMBC correlations for SF7402-527-4]



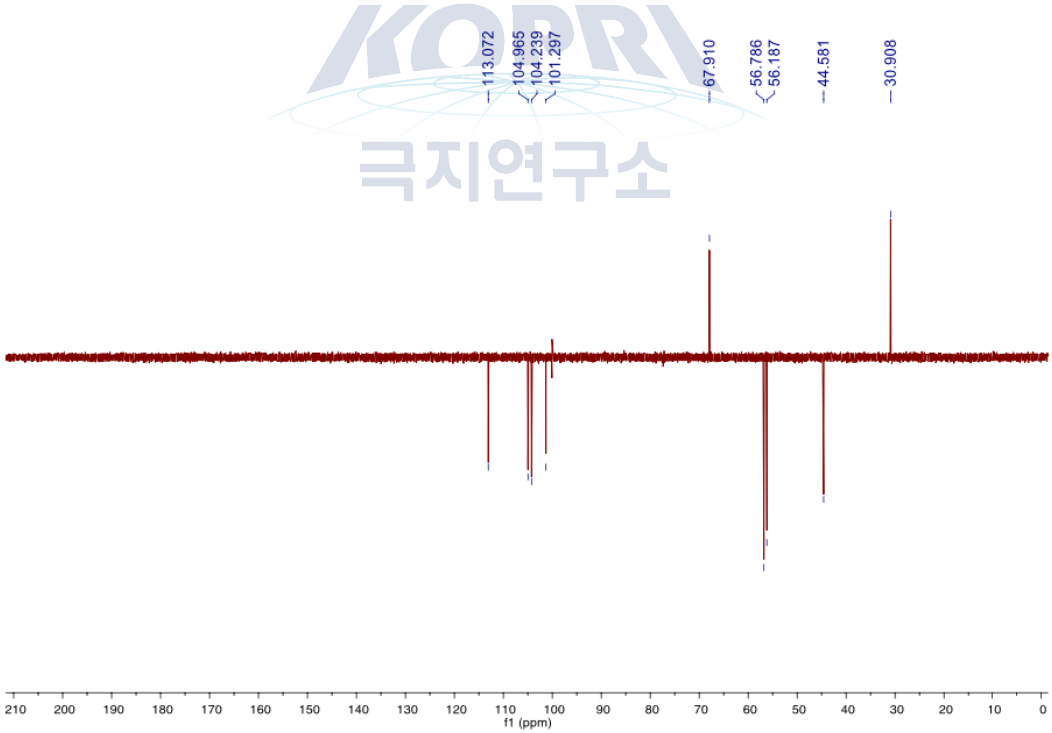
[그림 2-219. HRESIMS spectrum of SF7402-527-4]



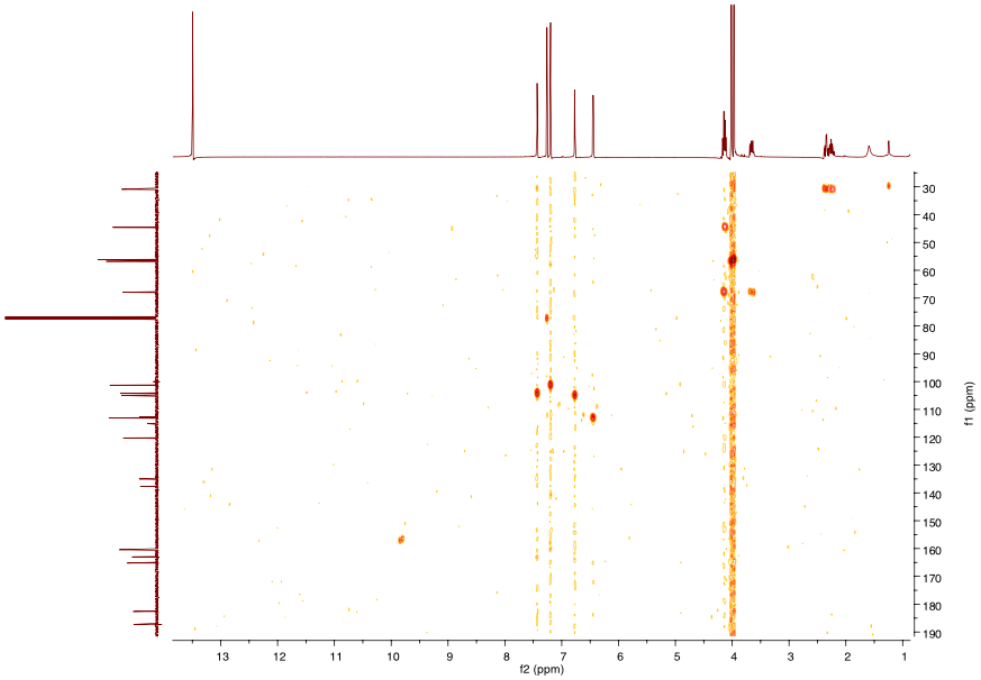
[그림 2-220. ^{1}H NMR spectrum of SF7402-527-4]



[그림 2-221. ^{13}C NMR spectrum of SF7402-527-4]

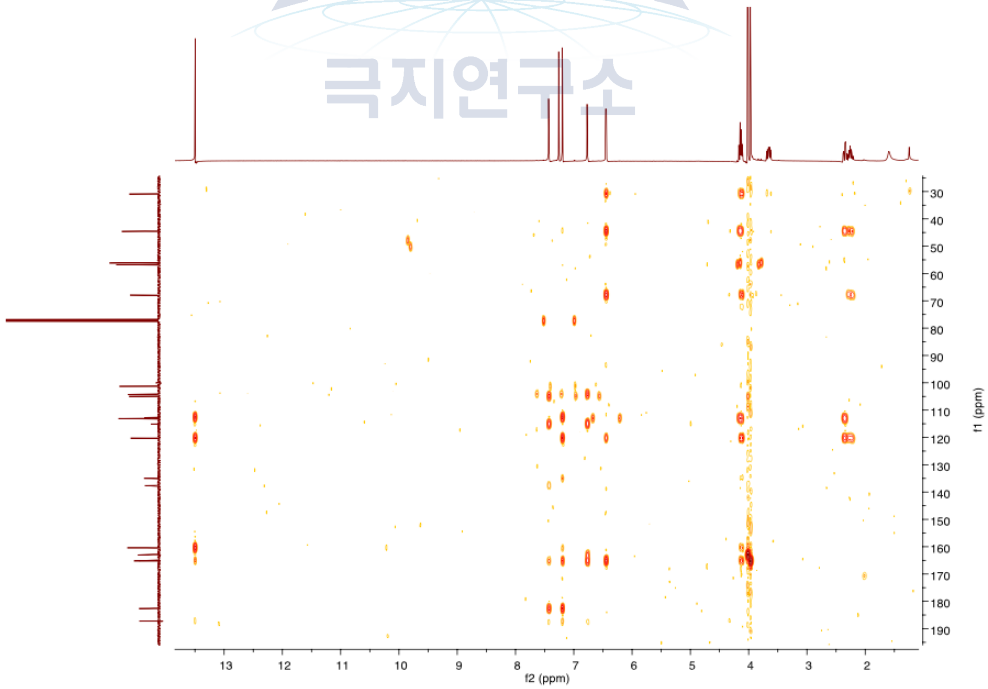


[그림 2-222. DEPT spectrum of SF7402-527-4]

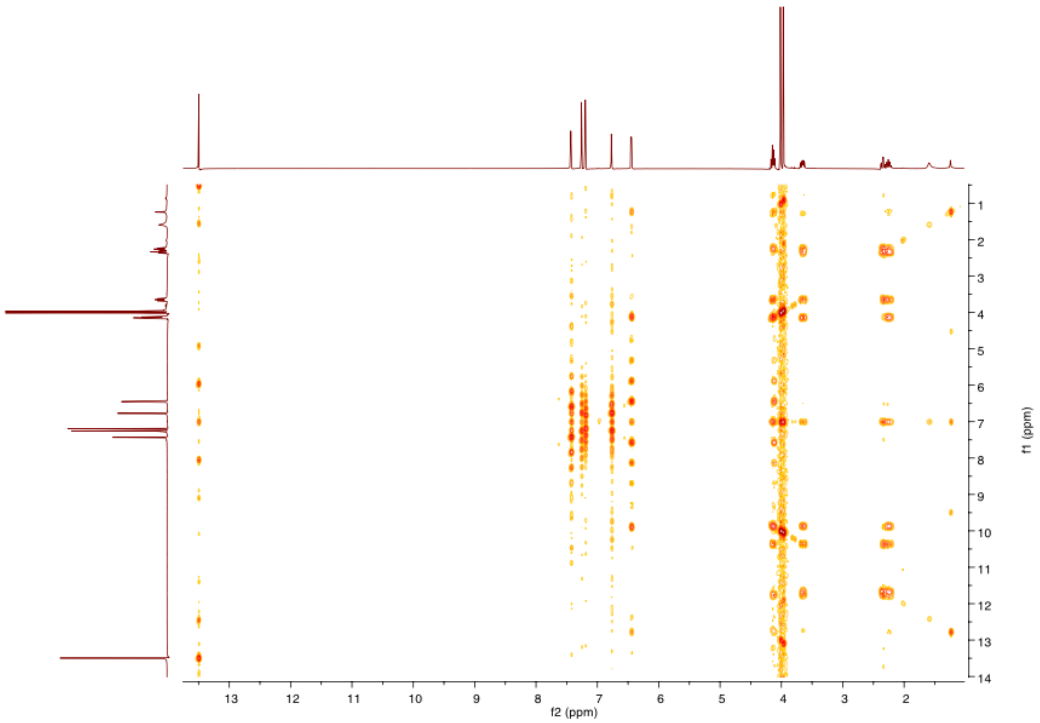


[그림 2-223. HMQC spectrum of SF7402-527-4]

KOPRI
극지연구소



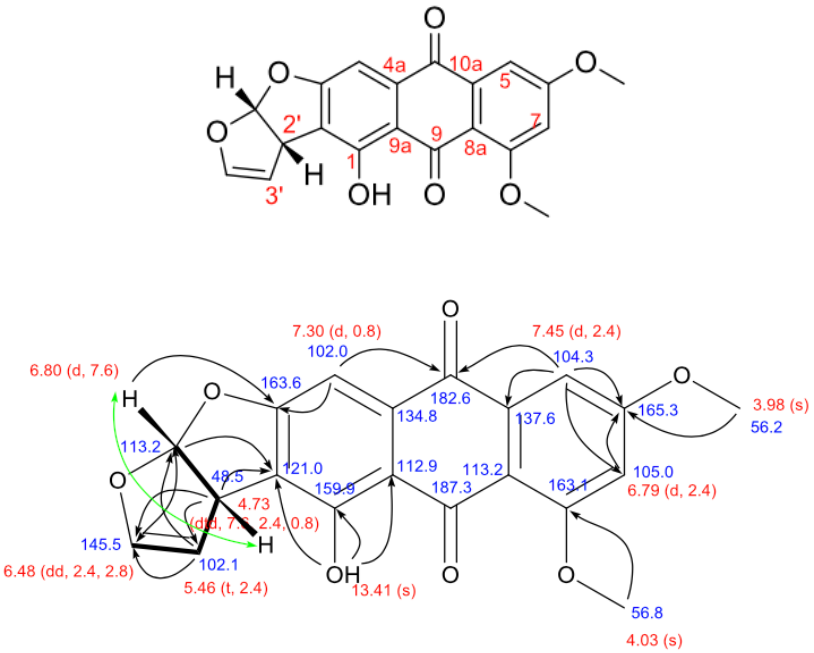
[그림 2-224. HMBC spectrum of SF7402-527-4]



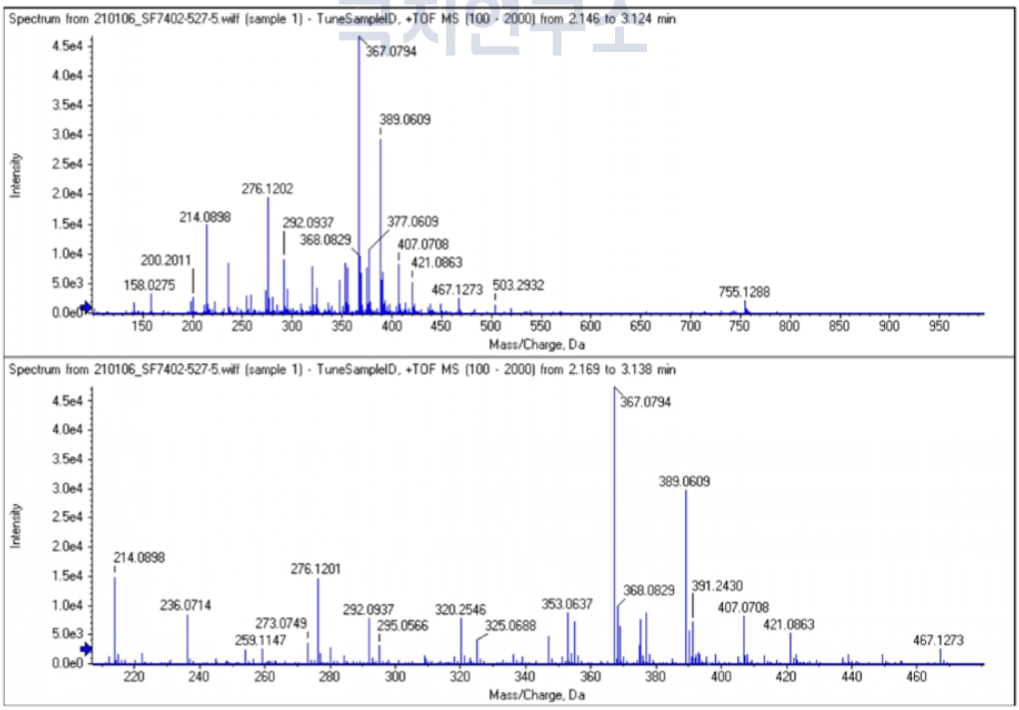
[그림 2-225. COSY spectrum of SF7402-527-4]

라. SF7402-527-5의 구조분석

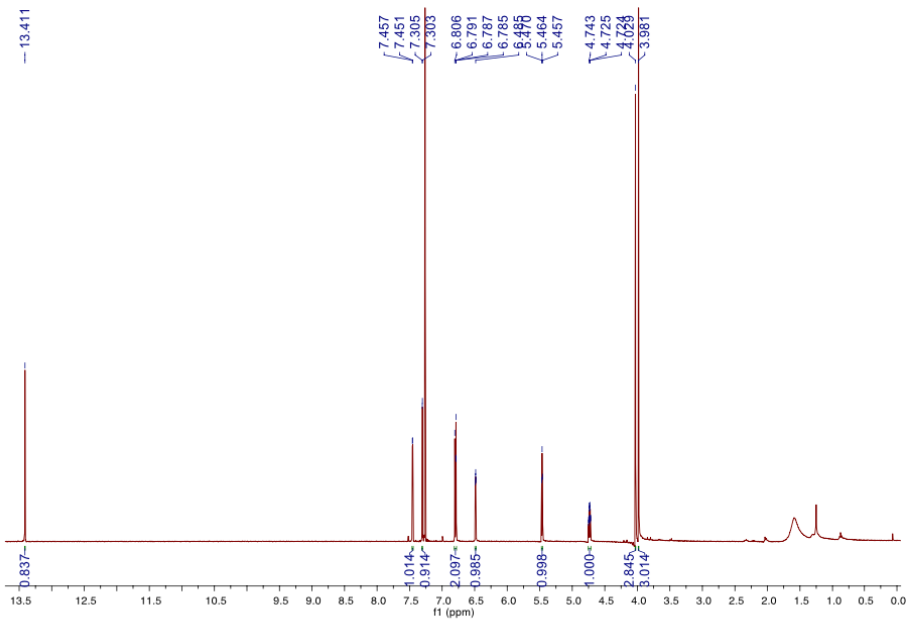
- SF7402-527-5는 노란색 고체로 분리 되었으며 분자식은 HRESIMS 스펙트럼에서 관측되는 m/z 389.0609 $[M + Na]^+$ [calcd. for $C_{20}H_{14}O_7Na$,389.0632] 피크에 의해서 $C_{20}H_{14}O_7$로 결정되었음. SF7402-527-5의 ^{13}C NMR 및 DEPT spectra 의 분석을 통하여 이 분자는 2 개의 methoxy, 5 개의 sp2 methines, 2 개의 sp3 methines, 및 11 개의 sp2 quaternary (2 개의 carbonyl 포함) 탄소들로 구성된 20 개의 탄소를 함유하고 있음이 확인되었음. SF7402-527-5의 ^1H NMR 스펙트럼에서는 1 개의 hydroxy signal [δ_H 13.41 (s, 1H)], 2 개의 meta-coupled aromatic protons [δ_H 7.45 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 6.79 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7)], 1 개의 acetal signal [δ_H 6.80 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1')], 1개의 단일선 형태의 aromatic proton [δ_H 7.30 (1H, d, J = 0.8 Hz, H-2)], 1 쌍의 cis-olefinic protons [δ_H 6.48 (1H, dd, J = 2.4, 2.8 Hz, H-4'), 5.46 (1H, t, J = 2.4 Hz, H-3')], 1 개의 sp3-혼성 methine proton [δ_H 4.73 (1H, dtd, J = 7.6, 2.4, 0.8 Hz, H-2')], 과 2 개의 methoxy groups [δ_H 4.03 (3H, s, 8-OCH_3), 3.98 (3H, s, 6-OCH_3)]에 대응하는 피크들이 관찰되었음. 최종적으로 SF7402-527-5 의 구조는 추가적인 ^1H-^1H COSY, NOESY, HMQC, 및 HMBC spectra 의 분석을 통하여 6,8-O-dimethylversicolorin A 으로 확정되었음



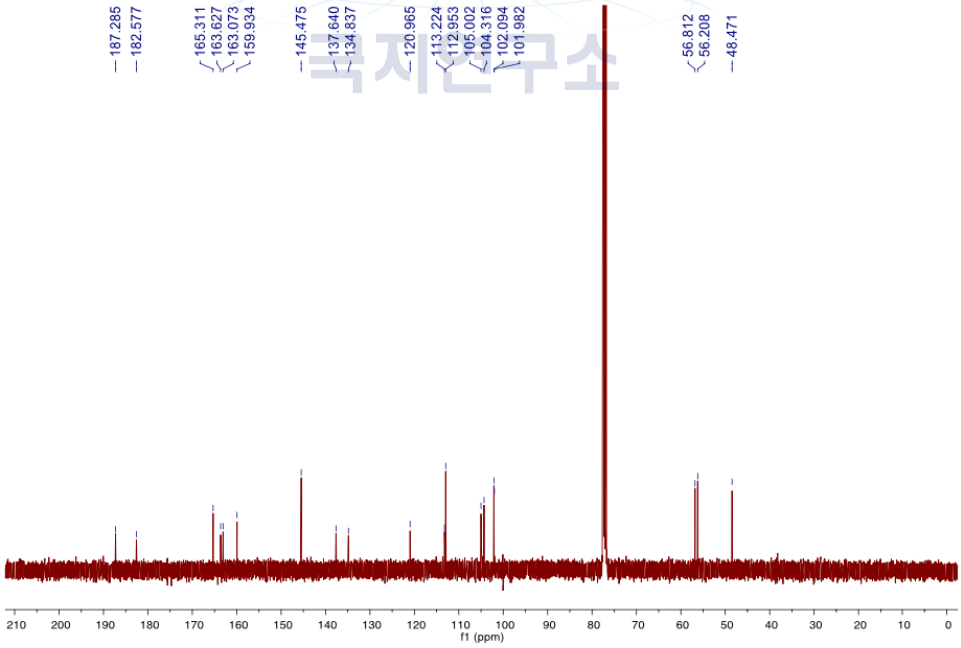
[그림 2-226. SF7402-527-5의 Chemical structure, key COSY, NOESY and HMBC correlations]



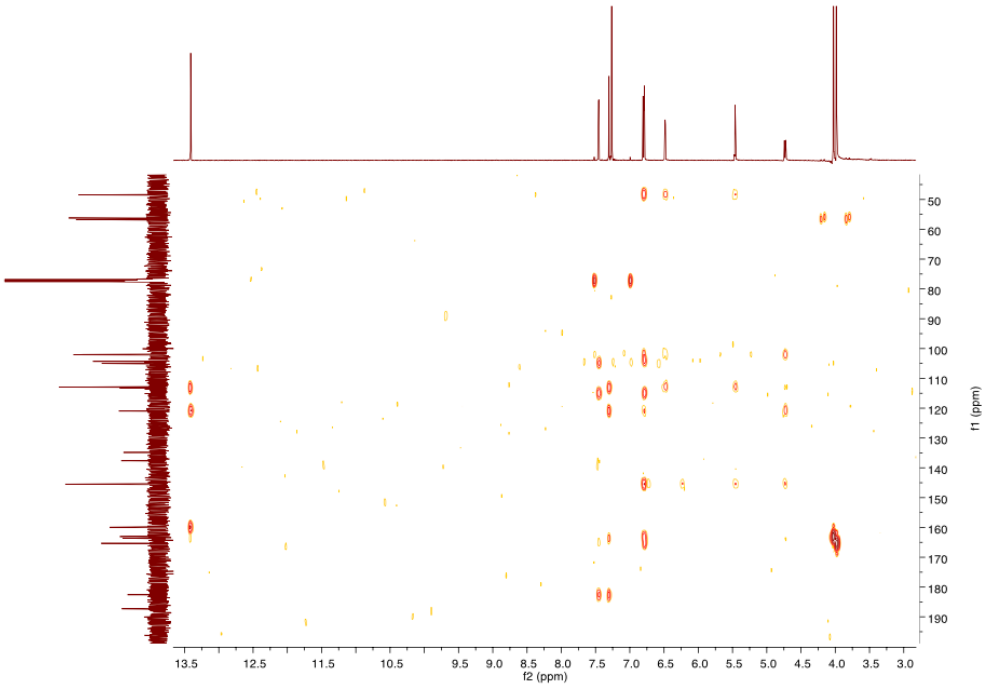
[그림 2-227. HRESIMS spectrum of SF7402-527-5]



[그림 2-228. ^{1}H NMR spectrum of SF7402-527-5]

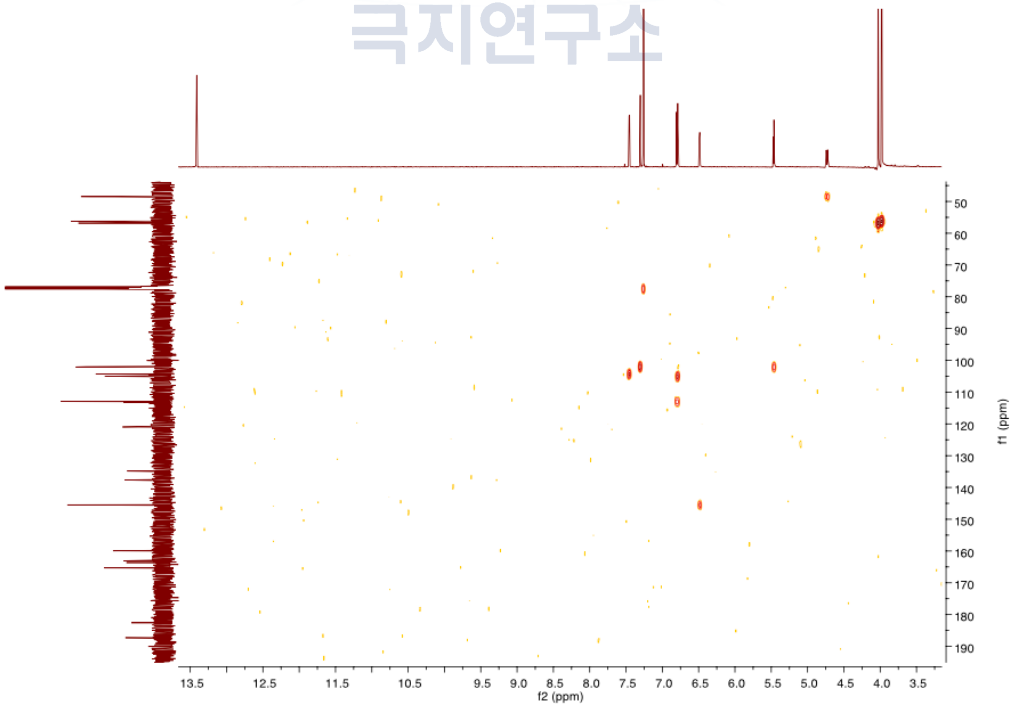


[그림 2-229. ^{13}C NMR spectrum of SF7402-527-5]

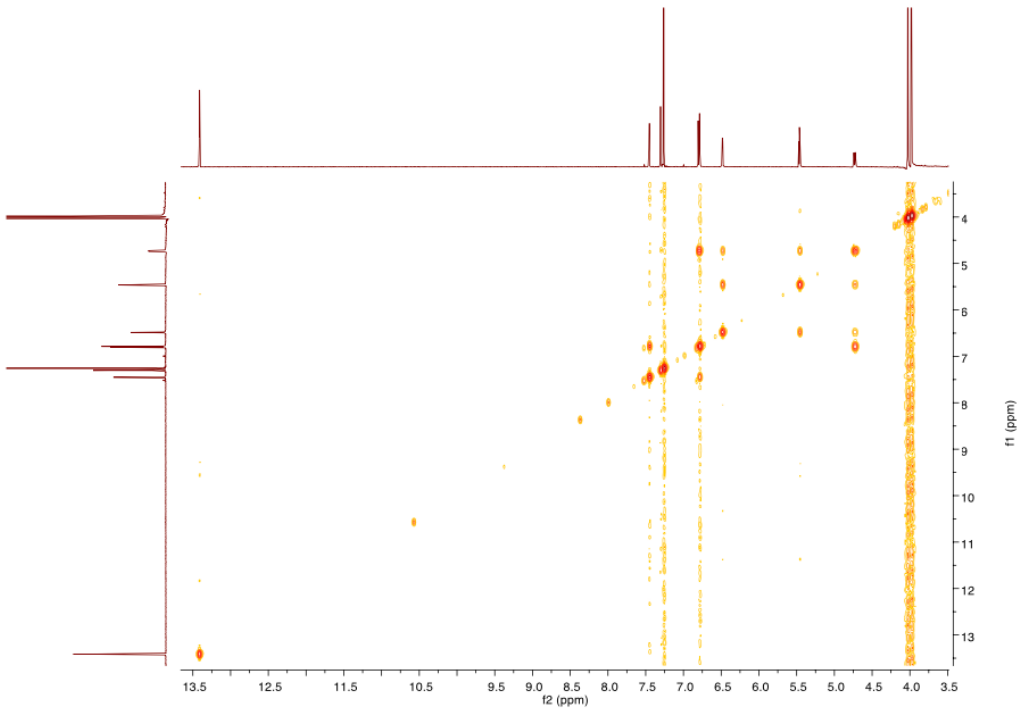


[그림 2-230. HMBC spectrum of SF7402-527-5]

KOPRI
극지연구소

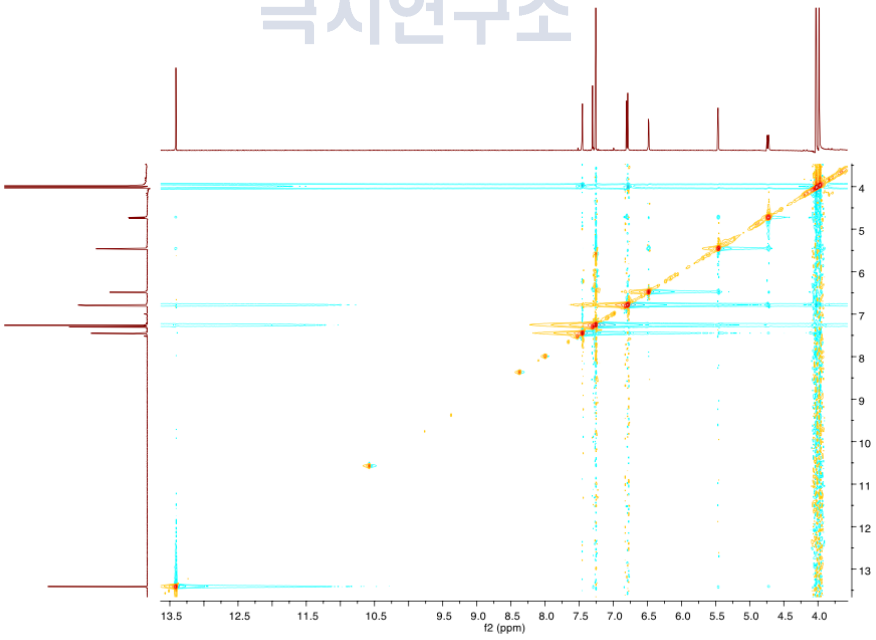


[그림 2-231. HMQC spectrum of SF7402-527-5]



[그림 2-232. COSY spectrum of SF7402-527-5]

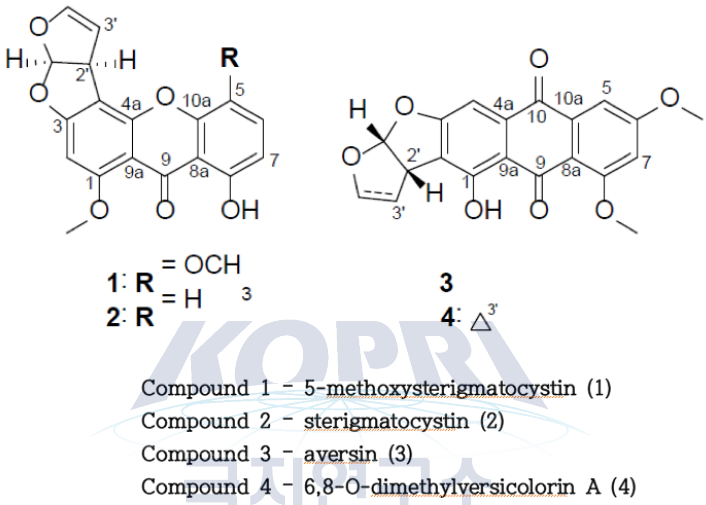
KOPRI
극지연구소

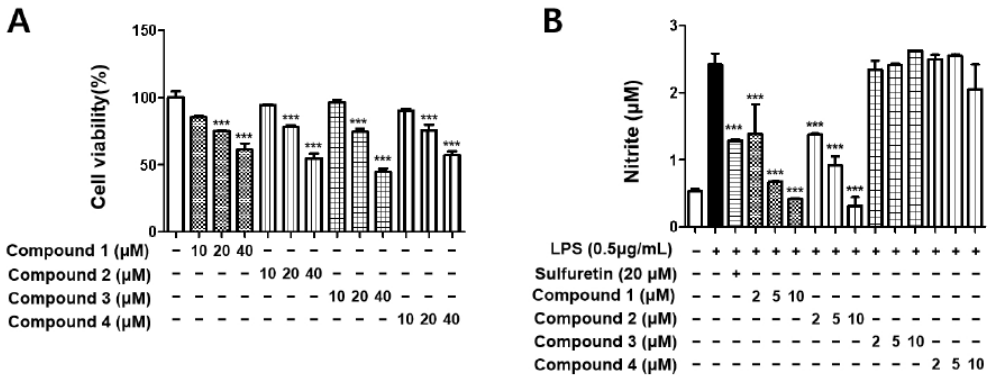


[그림 2-233. NOESY spectrum of SF7402-527-5]

3) SF7402 유래 대사체의 BV2 미세아교세포에서 LPS로 유발한 뇌신경 염증반응 조절효과 검색

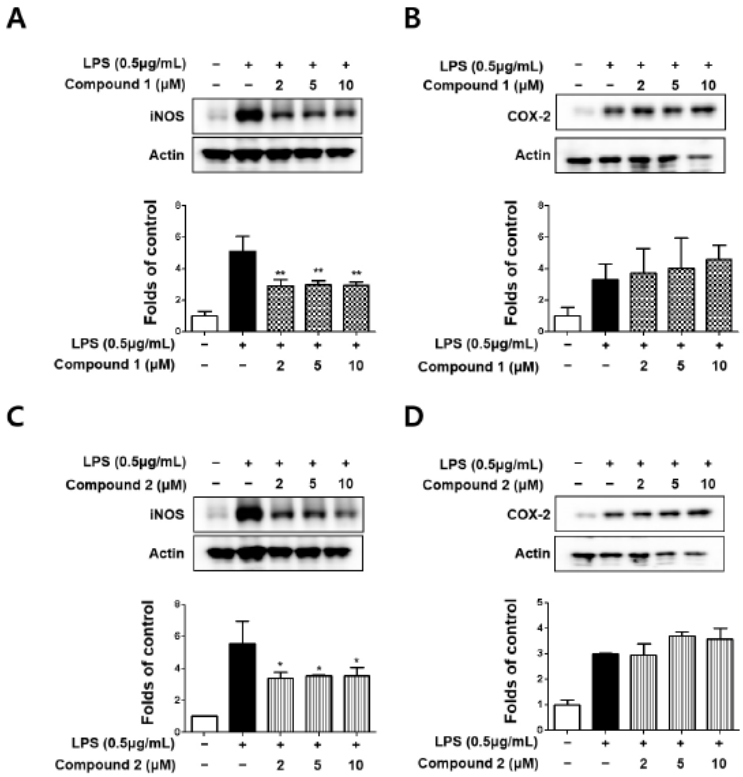
가. 극지생물 유래 진균 *Aspergillus* sp. SF-7402부터 분리한 이차대사 물질인 화합물 1-4 [5-methoxysterigmatocystin (1), sterigmatocystin (2), aversin (3), 6,8-O-dimethylversicolorin A (4)]를 미세아교세포 BV2에 단독 처리 시 나타나는 세포 독성을 확인하였고, 추후 실험은 독성이 나타나지 않는 범위의 농도로 진행함(그림 1A). 또한 LPS에 의해 nitric oxide (NO)가 과생성된 BV2 세포에서 화합물 1-4 처리 시 NO 생성이 감소하는 효과를 확인하였고, 5-methoxysterigmatocystin (1)과 sterigmatocystin (2)이 우수한 감소효과가 나타나는 것을 확인함(그림 2-234)





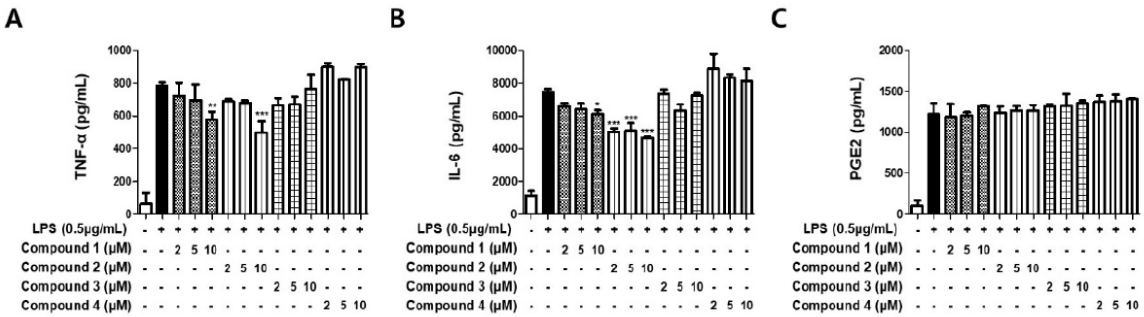
[그림 2-234. The effects of compounds on cell viability (A) and nitrite content (B)]

나. 전염증성 매개인자인 iNOS와 COX-2가 과발현된 미세아교세포 BV2에 화합물 1,2 처리 시 두 화합물 모두 iNOS 발현이 감소하는 효과를 확인하였으나, COX-2의 발현은 감소시키지 않았음(그림 2-235)



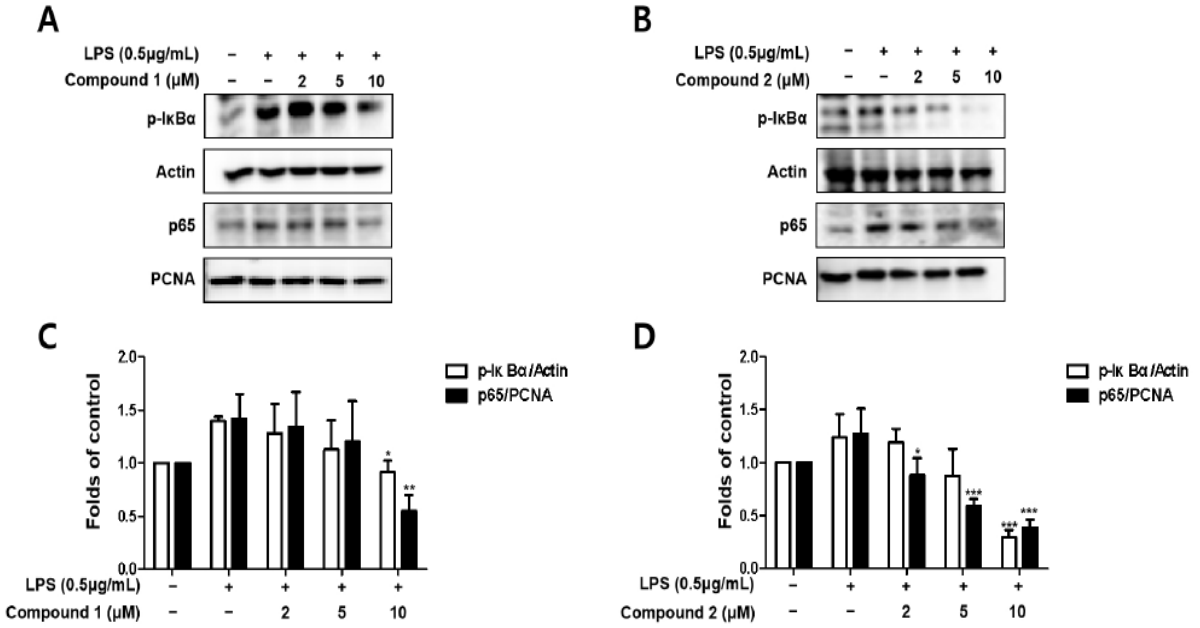
[그림 2-235. Protein expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) (A,C) and cyclooxygenase-2 (COX-2) (B,D) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 cells]

다. 싸이토카인 TNF-α와 IL-6, 전염증성 매개인자인 PGE_2가 과생성된 미세아교세포 BV2에 화합물 1-4를 전처리하였을 때 5-methoxysterigmatocystin (1)과 sterigmatocystin (2)에서 TNF-α와 IL-6 생성의 현저한 감소효과를 확인함(그림. 그러나 PGE_2의 생성은 화합물 1-4 모두 억제시키지 않았음(그림 2-236)



[그림 2-236. Effects of the isolated compounds on TNF-α (A), IL-6 (B), and PGE_2 (C) in LPS-stimulated BV2 cells]

라. 미세아교세포 BV2에 5-methoxysterigmatocystin (1)과 sterigmatocystin (2)을 전처리하였을 때 뇌세포염증 관련 신호전달 경로인 NF-κB의 활성화를 억제하는 효과가 매우 우수하였음(그림 2-237)

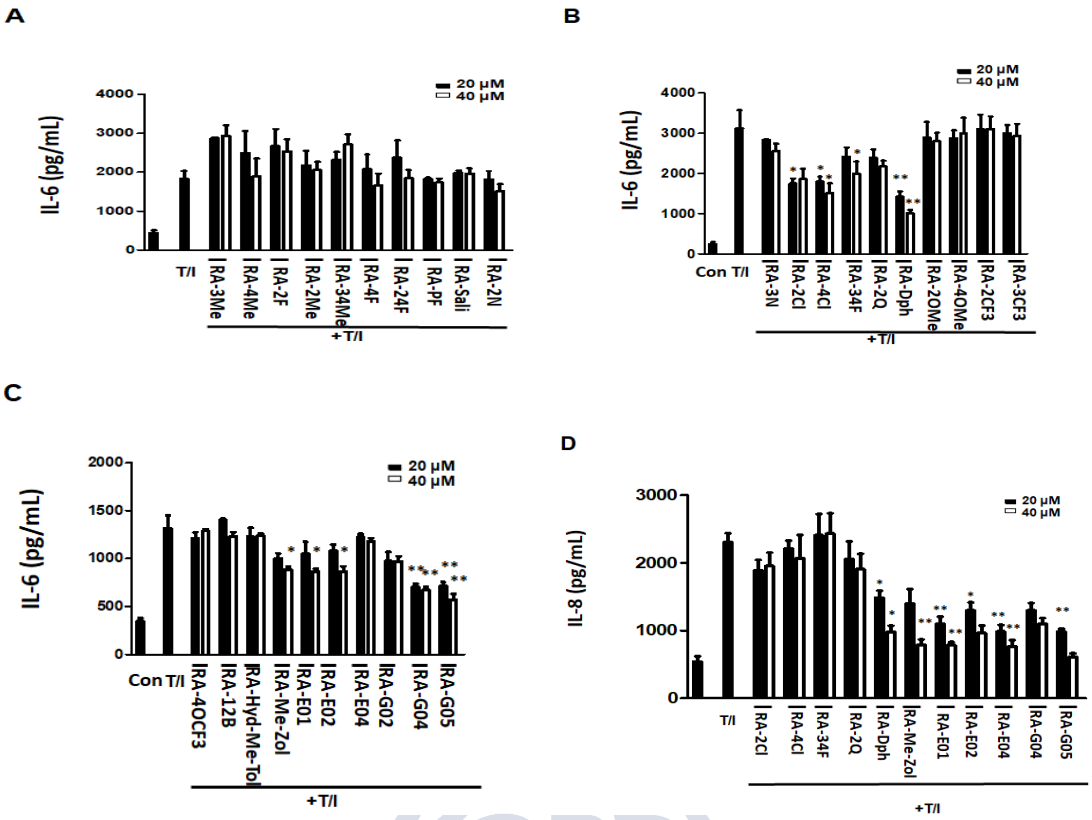


[그림 2-237. Effects of the compounds 1 and 2 on the NF-κB(p65) pathway in BV2 cells (A-D)]

KOPRI
금지연구소

4) 라말린 유도체의 Keratinocyte(각질형성세포)에서의 피부염증억제 효과

가. RA 골격 유래 합성화합물 30종의 피부염증 억제 효과를 확인하기 위해 TNF-α/IFN-γ에 의해 유도된 HaCaT 각질형성세포에 전처리하였을 때 화합물 11종이 IL-6의 과생성을 억제하는 효과를 확인하였음. 또한 IL-8이 과생성된 HaCaT세포에서 이 11종에 대한 전처리 시 감소효과를 측정하여 RA-Dph, RA-Me-Zol, 및 RA-G05이 우수한 감소 효과가 나타난 것을 확인함(그림 2-238)



[그림 2-238. IL-6 secretion of 30 RA compounds. The HaCaT cells were pre-treated with RA compound 1-30 (20, 40 μM) for 3 h, and then stimulated with TNF-α/IFN-γ (5 ng/mL each) for 24 h (A, B, C). IL-8 secretion of 11 RA Compounds. The HaCaT cells were pre-treated with 11 selected RA compounds for 3 h, and then stimulated with TNF-α/IFN-γ (5 ng/mL each) for 24 h (D)]

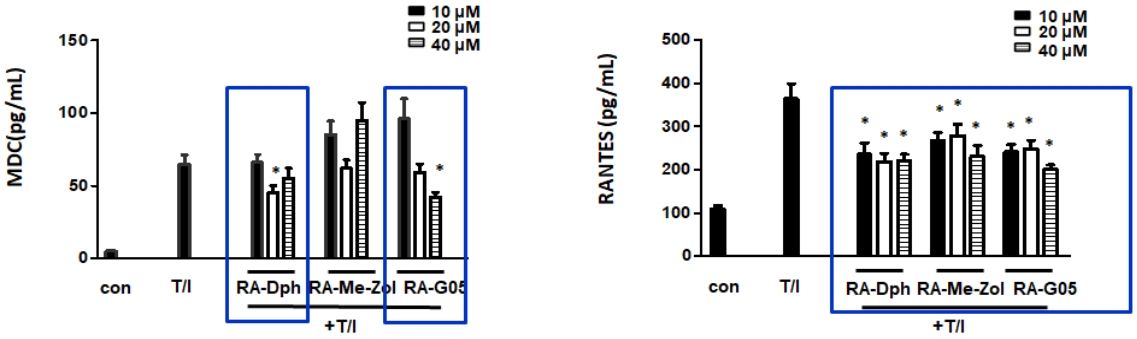
나. 우수한 IL-6 및 IL-8 억제효과가 나타난 RA-Dph, RA-Me-Zol, 및 RA-G05에 대하여 IC_{50}을 확인함(그림 2-239)

Compound name	IL-6(IC_{50})	IL-8(IC_{50})
RA-Dph	20.24±2.64	33.05±2.62
RA-Me-Zol	25.64±3.32	27.93±1.63
RA-G05	30.68±1.68	11.01±2.36

[그림 2-239. IL-6 / IL-8 (IC50) of RA compounds]

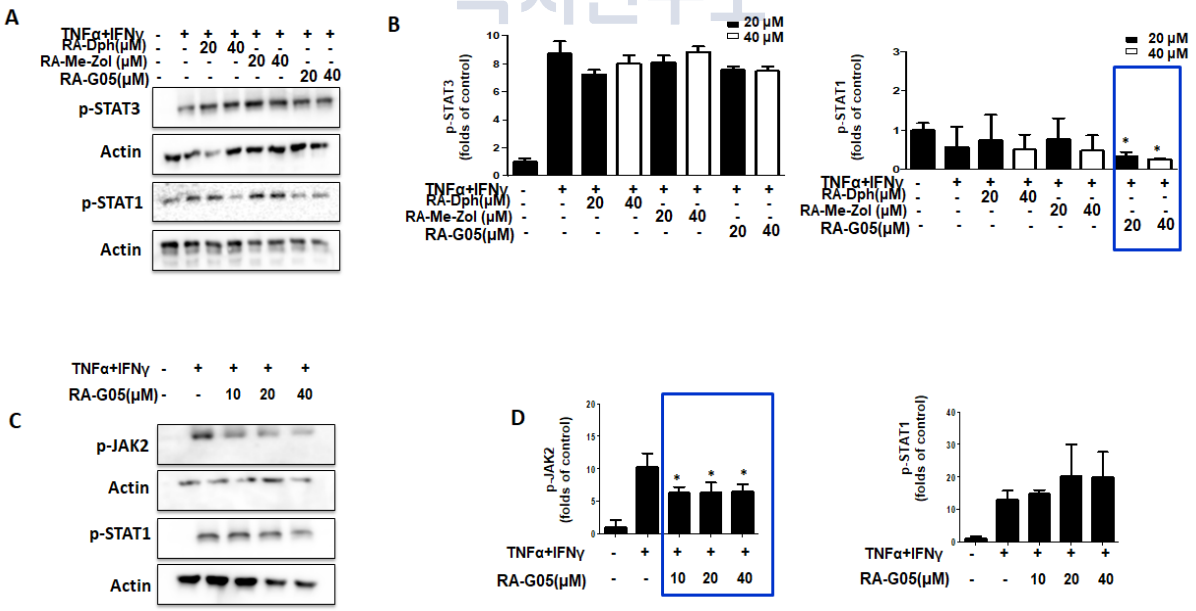
다. 우수한 IL-6 및 IL-8 억제효과가 나타난 RA-Dph, RA-Me-Zol, 및 RA-G05에 대하여 피부 염증에 관여하는 chemokine인 MDC와 RANTES가 과생성된 HaCaT세포에서 3종의 화합

물 모두 전처리 시 RANTES의 생성을 억제하는 것을 확인하였으나, RA-Dph 및 RA-G05만 MDC의 과생성을 억제하는 것을 확인함(그림 2-240)



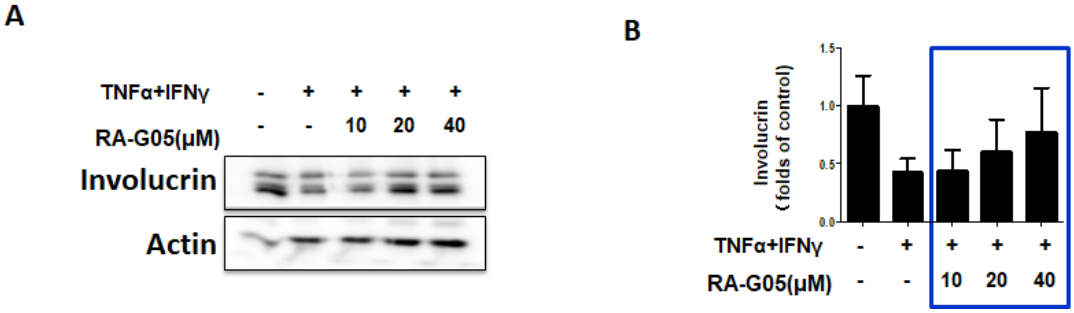
[그림 2-240. RANTES and MDC secretion of RA-Dph, RA-Me-Zol, and RA-G05. The HaCaT cells were pre-treated with RA-Dph, RA-Me-Zol, and RA-G05 (20, 40 μM) for 3h, and then stimulated with TNF-α/IFN-γ (5 ng/mL each) for 24 h]

라. HaCaT세포에서 RA-Dph, RA-Me-Zol, 및 RA-G05의 염증성 피부 질환의 주요 조절 경로인 JAK/STAT 기전에 대한 영향을 확인하였을 때 3종 화합물 모두 p-STAT3의 인산화를 억제하지 못했으나, RA-G05가 p-STAT1을 억제하는 것을 확인하였음. 또한 RA-G05는 p-JAK2의 인산화도 억제하였음(그림 2-241)



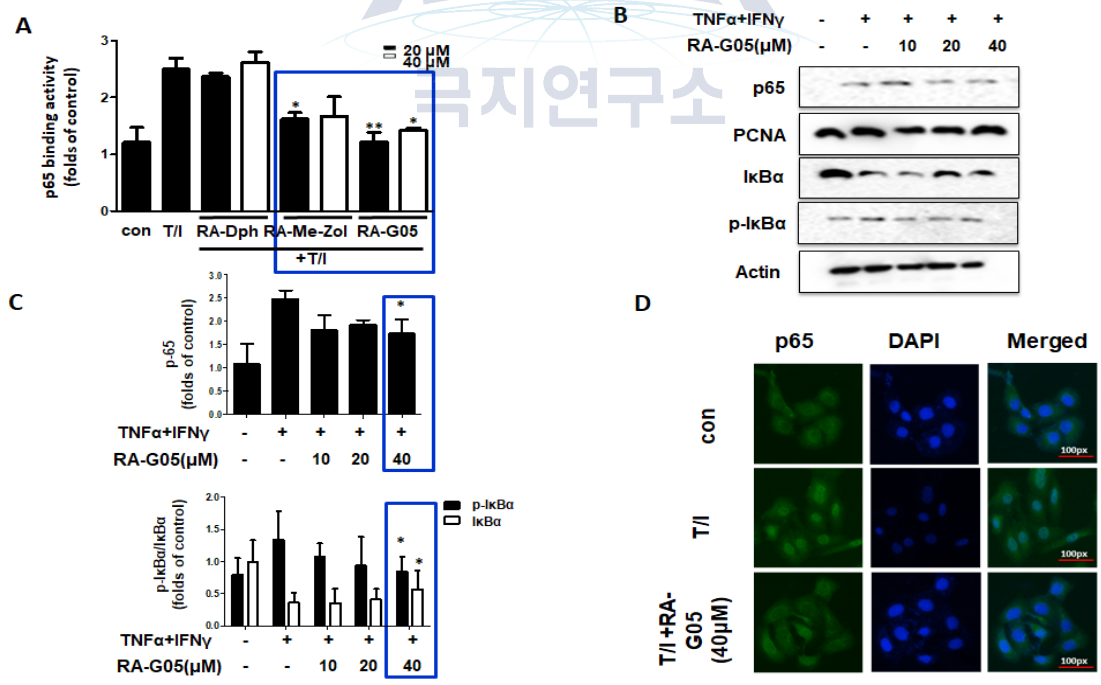
[그림 2-241. Effects of RA-Dph, RA-Me-Zol, and RA-G05 on p-STAT1 and p-STAT3. The expression of p-STAT1 and p-STAT3 were detected by Western blotting (A and B). Effects of compound RA-G05 in JAK2/STAT1. The expression of p-STAT1 and p-JAK2 were detected by Western blotting (C and D)]

마. 피부장벽 보호의 주요한 단백질 중에 하나인 involucrin에 대한 RA-G05의 영향을 확인하기 위해 TNF-α/IFN-γ에 의해 유도된 HaCaT세포에서 RA-G05를 전처리하였을 때 감소했던 involucrin의 발현이 다시 증가하는 것을 확인함(그림 2-242)



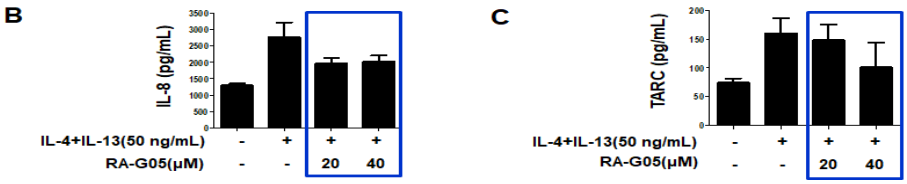
[그림 2-242. Effects of compound RA-G05 in Involucrin. The expression of involucrin was detected by western blotting. The cells were pre-treated with RA-G05 for 3h, and then stimulated with TNF-α/IFN-γ for 24h]

바. HaCaT 세포에서 RA-G05를 전처리하였을 때, 피부염증 질환의 주요한 염증 관련 신호전달 경로인 NF-κB의 활성화를 억제하는 효과가 우수하였음(그림 2-243)



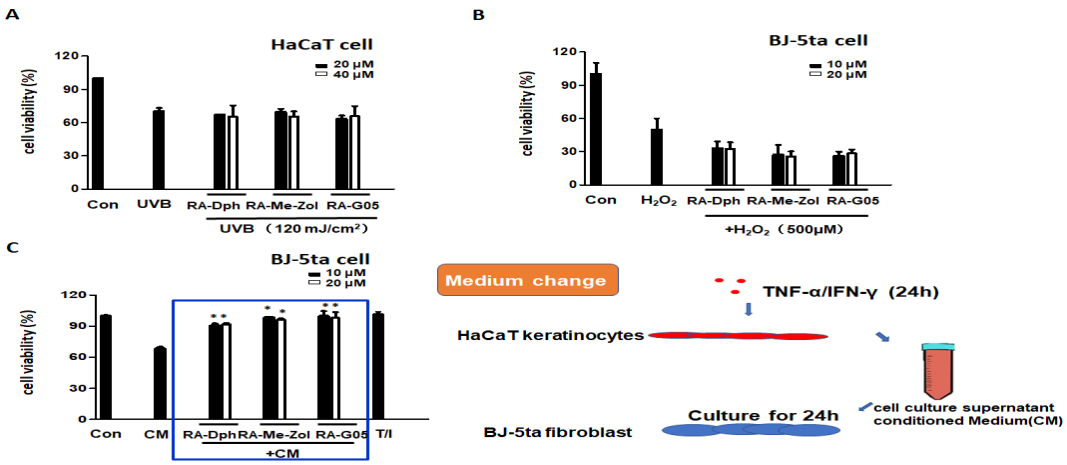
[그림 2-243. Effects of Compound RA-G05 in NF-κB signaling pathway. p65 binding activity of RA-Dph, RA-Me-Zol, and RA-G05(A), the expression of p65 in nuclear and p-IκBα, IκBα (B and C). p65 translocation(D). The cells were pre-treated with the indicated concentrations of RA-G05 for 3 h and then stimulated with TNF-α/IFN-γ (each 5 ng/mL) for 15 min]

사. 3D-reconstructed human skin model을 이용하여 인체피부와 유사한 상태에서의 효과를 확인하고자 하였음. 3D-reconstructed human skin model에서 알러지 염증의 여러 요소를 조절하는 cytokine인 IL-4와 IL-13로 유도된 IL-8 및 TARC의 과생성에 대하여 RA-G05의 전처리하였을 때 유의적인 염증 억제 효과를 확인하였음(그림 2-244)



[그림 2-244. Effects of RA-G05 on IL-8 and TARC secretion in the 3D-reconstructed human skin model. The 3D-reconstructed human skin model were pre-treated with RA-G05 for 2 h, and then stimulated with IL-4/IL-13(per 50 ng/mL) for 48 h, the TARC and IL-8 were detected by ELISA kit using culture media from 3D-reconstructed human skin model]

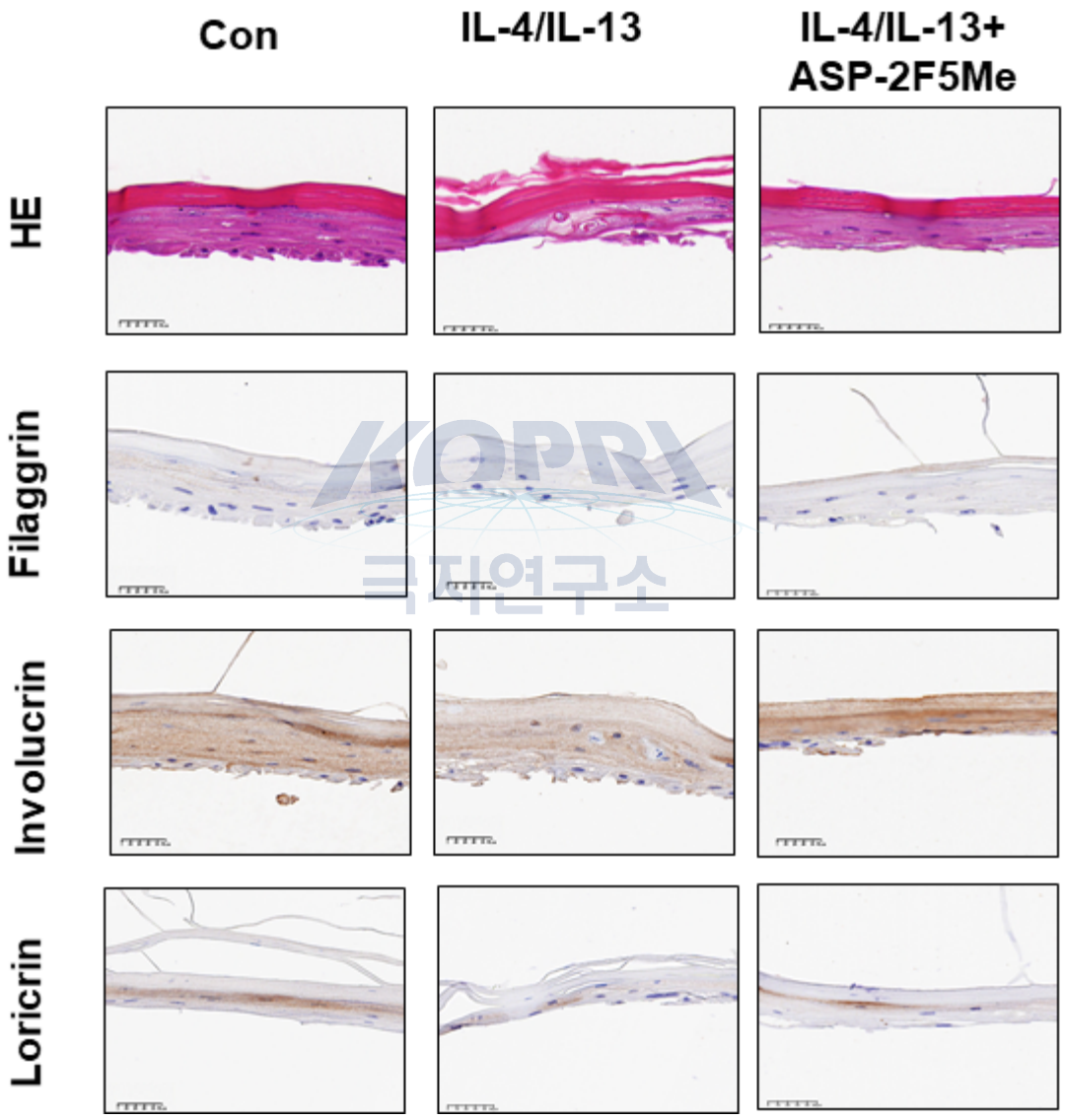
아. 추가적으로 BJ-5ta 섬유아세포에서의 보호효과를 확인하고자 하였음. UVB로 유도된 HaCaT 세포 및 H_2O_2로 유도된 BJ-5ta 섬유아세포에서 RA-Dph, RA-Me-Zol, 및 RA-G05를 전처리하였을 때, 모두 세포 보호 효과가 나타나지 않았음. 그러나 medium change model을 이용한 연구를 통해 피부각질형성세포에서 심화된 염증이 섬유아세포에 미치는 효과를 확인하고자 하였음. TNF-α/IFN-γ에 의해 유도된 HaCaT세포의 배지가 처리된 BJ-5ta 섬유아세포에서 RA-Dph, RA-Me-Zol, 및 RA-G05의 전처리가 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인함(그림 2-245)



[그림 2-245. Effects of compounds RA-Dph, RA-Me-Zol, and RA-G05 on other skin models in HaCaT and BJ-5ta cells. The HaCaT cells were pre-treated with RA-Dph, RA-Me-Zol, and RA-G05 for 3h, and then treated UVB light total 120 mJ/cm^2, and then culture for another 24h, The BJ-5ta cells were pre-treated with RA-Dph, RA-Me-Zol, and RA-G05 for 3 h, and then treated H_2O_2 500 μM for 24 h. BJ-5ta cells were treated with RA-Dph, RA-Me-Zol, and RA-G05, and condition medium (CM) for 24 h]

KOPRI 극지연구소

자. 3D 재구성 인간 피부 조직으로 H&E 염색 및 Filaggrin, involucrin과 loricrin 단백질의 면역조직화학(IHC) 분석에 대한 ASP-2F5Me 화합물의 효과를 확인하고자 하였음. IL-4/IL-13 유도한 결과 표피 세포의 배열혼란, 진피의 과도한 층화, 염증 세포의 침윤, 세포 형태의 변형을 초래하였음. ASP-2F5Me 화합물은 세포 형태를 보호하는 효과를 확인함. 더불어 IL-4와 IL-13 자극으로 인해 Filaggrin, Involucrin, Loricrin 발현이 감소했으나, ASP-2F5Me 화합물은 단백질의 발현을 증가시켜 피부 장벽 기능의 보호 효과를 나타내는 것을 확인함(그림 2-246)



[그림 2-246. Effects of ASP-2F5Me Compound on H&E staining and Filaggrin, involucrin and loricrin immunohisto-chemical analyses in a 3D-reconstructed human skin model. The 3D skin model slices were dyed with H&E and immunohistochemical staining of Filaggrin, involucrin and loricrin. was performed]

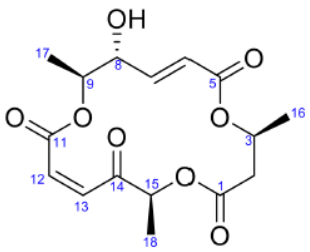
5) 진균 SF7351 유래 대사체의 구조분석

가. 진균대사체 SF7351-3-1-4-2의 구조분석: New (Macrosphelide N)

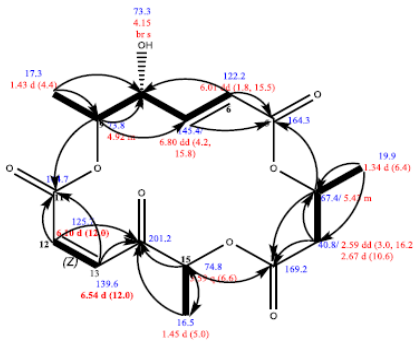
- SF7351-3-1-4-2 는 흰색 고체로 분리 되었으며 비선광도 값은 = - 6.24 (MeOH, *c* 0.05)로 측정되었음. SF7351-3-1-4-2 의 분자식은 HR-ESI-MS 분석에서 관찰되는 *m/z* 341.1217 [M + H]$^+$(calcdfor$C_{16}H_{21}O_8^+$, 341.1236) 피크와 *m/z* 363.1041 [M + Na]$^+$(calcdfor$C_{16}H_{20}NaO_8^+$, 363.1056)피크의 존재에 근거하여 $C_{16}H_{20}O_8$ 로 결정되었음. $CDCl_3$용매조건에서 측정된 이 분자의 ^{1}H-NMR 스펙트럼에서는 3개의 methyl 기에 해당되는 singlet 피크 [(δ_H 1.34, 1.43, and 1.45, each 3H)], 2 개의 이중결합 작용기에 해당하는 피크 [δ_H (6.01 dd, *J* = 1.8, 15.5 Hz, H-6), (6.80 dd, *J* = 4.2, 15.8 Hz, H-7), (6.10 d, *J* = 12.0 Hz, H-12), (6.54 d, *J* = 12.0 Hz, H-13)]등이 명확하게 관찰되었음

- 또한 SF7351-3-1-4-2 의 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT및 HMQC data 의 분석을 통하여 이 분자는 3개의methyl기 (C-17, C-18, and C-19), 하나의 sp^3-혼성화 methylene (C-2)기, 4 개의 산소와 결합된 sp^3-methine기 (C-3, C-8, C-9, C-15), 2 개의 1,2-치환 이중결합기 (C-6, C-7, C-12, and C-13) 및 4 개의 ester/lactone carbonyl 기 (C-1, C-5, C-11, and C-14)의 존재가 제시되었음. SF7351-3-1-4-2 의 구조에 존재하는 3 개의 스핀 system은 ^{1}H–^{1}HCOSY및 HMBC data의 해석을 통하여 확인되었음. SF7351-3-1-4-2 의 NMR data 는 기지 물질인 macrosphdelide B 의 문헌 자료와 거의 유사한 양상을 보였음. 그러나 C-12 와 C-13 위치에 존재하는 이중결합은 Z-배향을 하고 있음이 차이점으로 확인되었음. SF7351-3-1-4-2 의 분자구조에 존재하는 $\triangle^{12}$ *Z*-geometry 는 커플링 상수의 측정 ($J_{12,13}$ = 12.0Hz)을 통하여 확인되었음. 반면에, *E*-배향을 가진 macrosphdelide B 에 존재하는 동일한 피크들의 커플링 상수 값은 ($J_{12,13}$ = 15.8Hz)로 측정되었음

- 앞서 확인된 3 개의 스핀 system과 eater 작용기들의 연결은 HMBC data 의 해석을 통하여 완성 되었으며(그림 2 참고), 따라서 SF7351-3-1-4-2 의 평면 구조가 확정되었음. SF7351-3-1-5-6-2의 입체구조는 macrosphdelide계열 화합물의 생합성 경로를 감안하여 8*R*, 9*S*, 15*S* 로 예측되었음.[1]. SF7351-3-1-5-6-2의 구조의 남아있는 3번 위치의 절대 배향을 결정하기 위하여 GIAO NMR chemical shift calculation 의 방법을 통한 DP4+ 분석이 수행 되었으며 그 결과로서, 3R 절대 배향을 가진 분자의 계산된 ^{1}H and ^{13}CNMR화학적 이동값 자료와 3S 절대 배향을 가진 분자의 계산된 ^{1}H 및 ^{13}C NMR화학적 이동값 자료가 SF7351-3-1-5-6-2 의 실험적 화학적 이동값 자료와 비교되었음. 그 결과 실험적 자료는 3S 절대 배향을 가진 분자의 계산된 ^{1}H and ^{13}C NMR화학적 이동값 자료와 100 % 일치함을 확인 하였고 이를 통하여 SF7351-3-1-5-6-2 구조의 절대 배향을 확정 하였으며(그림 참고), 신규대사체인 이분자는 macrosphelide N로 명명되었음



[그림 2-247. Chemical structure of SF7351-3-1-4-2]



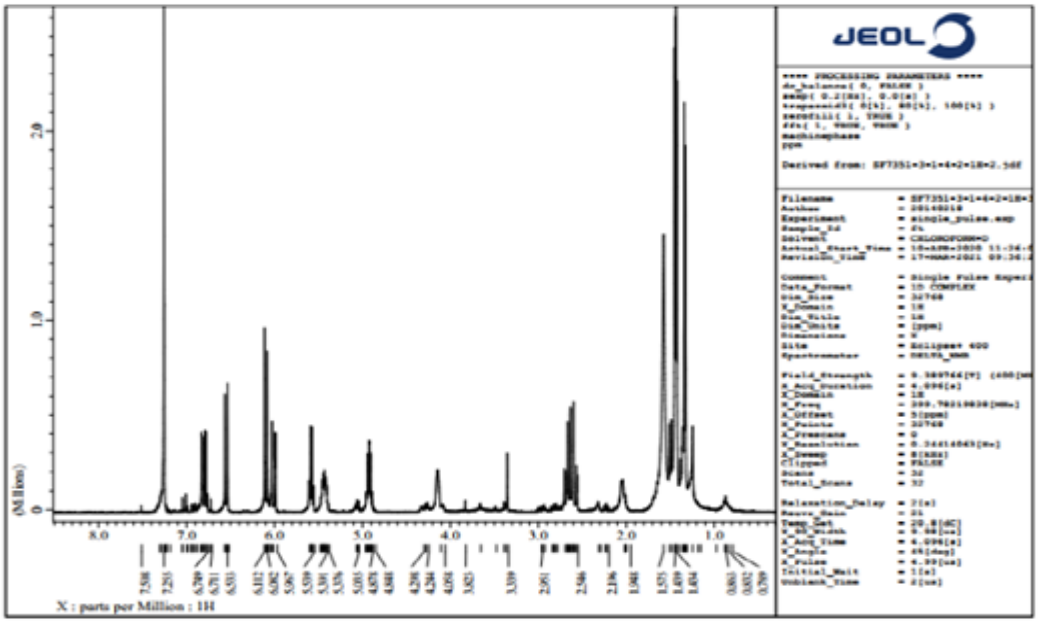
[그림 2-248. COSY (bold) and HMBC (arrow) correlations in SF7351-3-1-4-2]

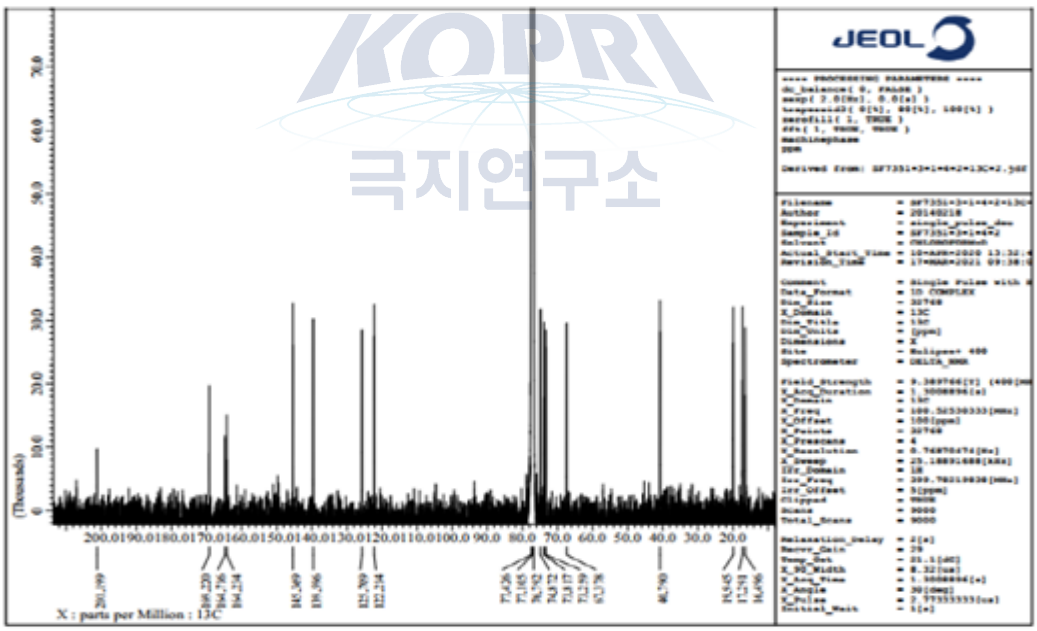
KORRI 극지연구소

Position	$^{a}\delta_C$	$\delta_C{}^{b,c}$	$\delta_H{}^{b,d}$ mult. (*J* in Hz)	COSY (H→H)	HMBC (H→C)	NOESY (H→H)
1	170.2	169.2	-			
2	40.6	40.8	2.59 dd (16.2, 3.0)/2.67 d (10.6)	3	1, 3	9 *Me*
3	67.7	67.4	5.43 m	2	1, 5	2
5	164.3	164.3	-			
6	122.4	122.2	6.01 dd (15.5, 1.8)	7	5, 8	7
7	144.5	145.4	6.80 dd (15.8, 4.2)	6, 8	5	6
8	74.6	73.3	4.15 brs	7, 9		
9	75.7	73.8	4.92 m	8	7, 8, 11	
11	165.2	164.7	-			
12	132.1	125.7	6.10 d (12.0)	13	11, 14	13
13	132.6	139.6	6.54 d (12.0)	12	11, 14	12
14	196.2	201.2	-			
15	76.5	74.8	5.59 q (6.6)		1, 14, 15 *Me*	
3 *Me*	19.7	19.9	1.34 d (6.4)	3	2, 3	3
9 *Me*	17.8	17.3	1.43 d (4.4)	9	8, 9	8, 9
15 *Me*	16.0	16.5	1.45 d (5.0)	15	14, 15	15

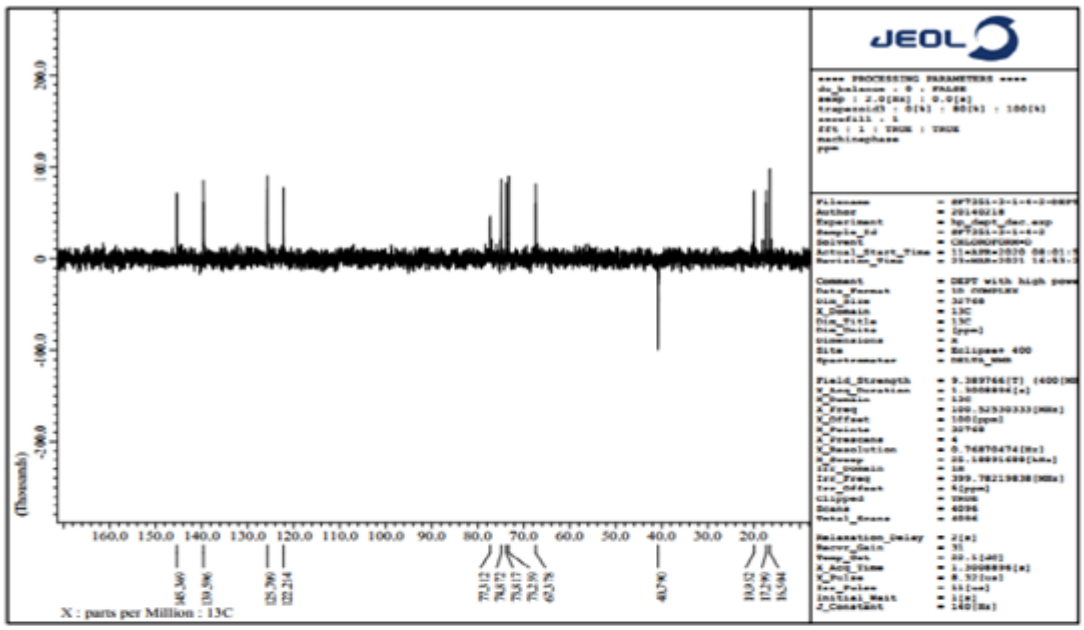
[a]δ_C of macrosphelide B [2], [b]recorded in $CDCl_3$, [c]100 MHz, [d]400 MHz.

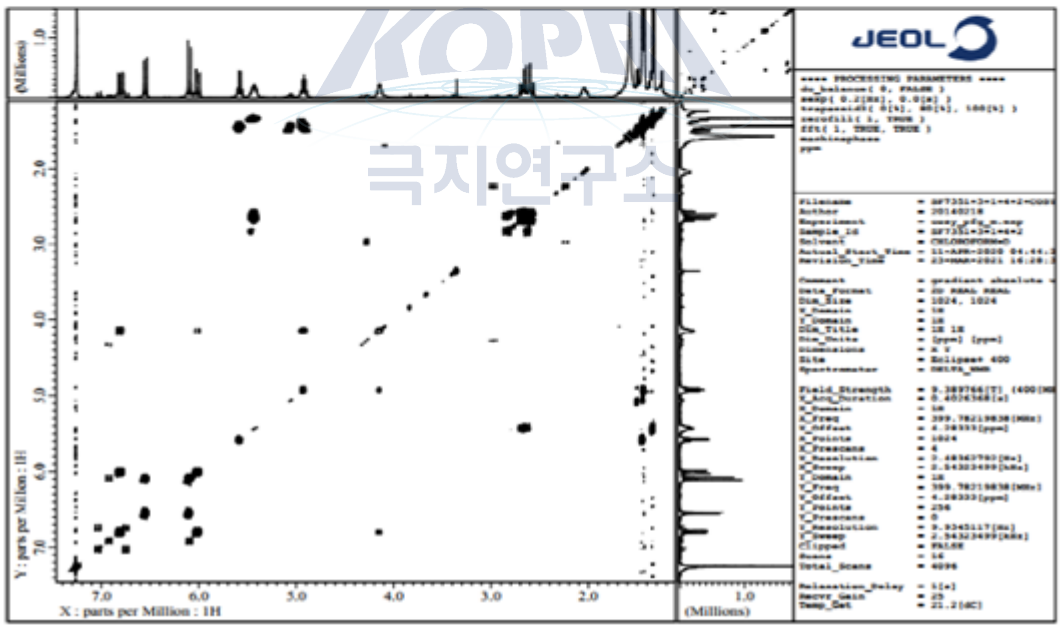
[표 2-9. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of SF7351-3-1-4-2]



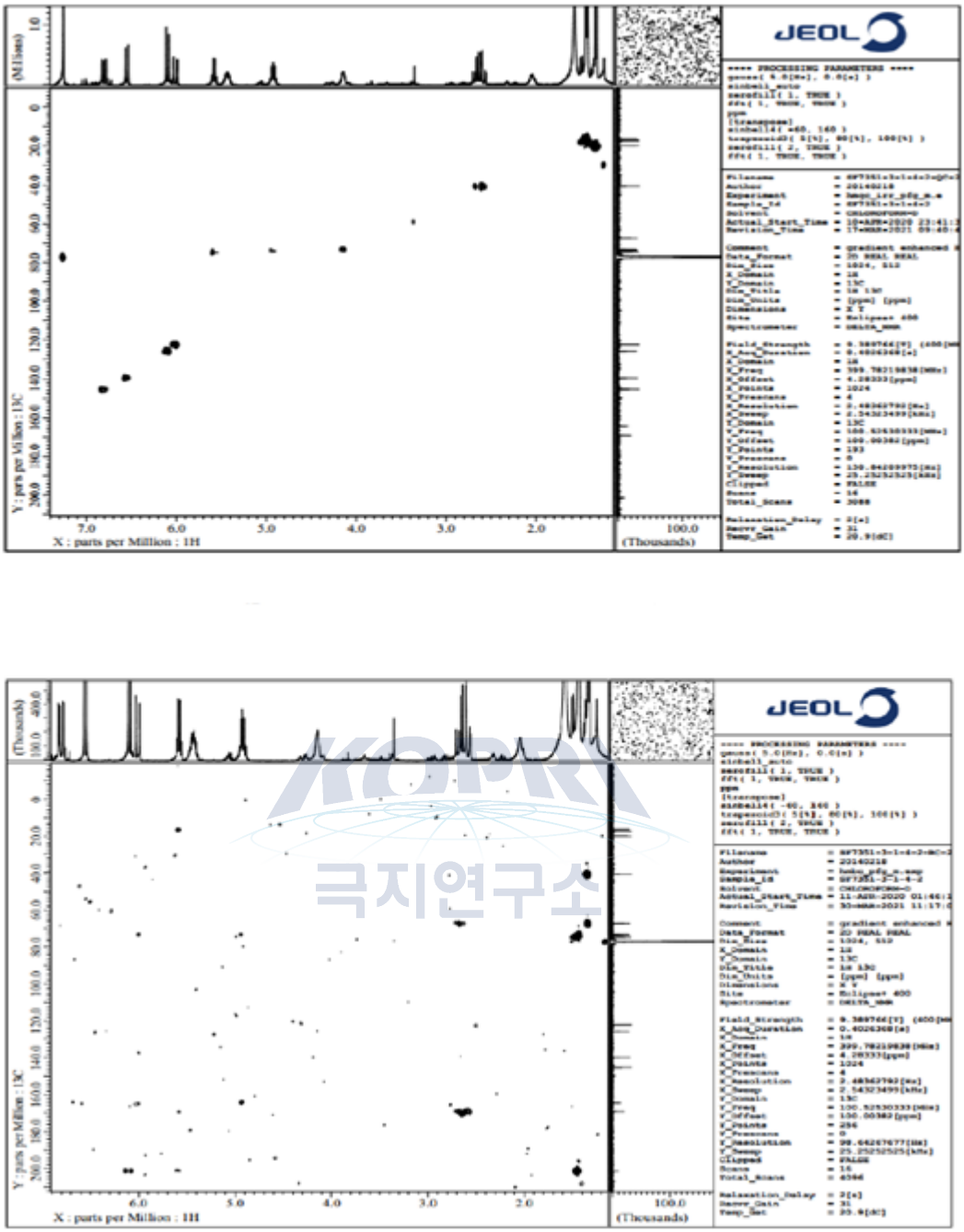


[그림 2-249. SF7351-3-1-4-2의 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR spectrum]

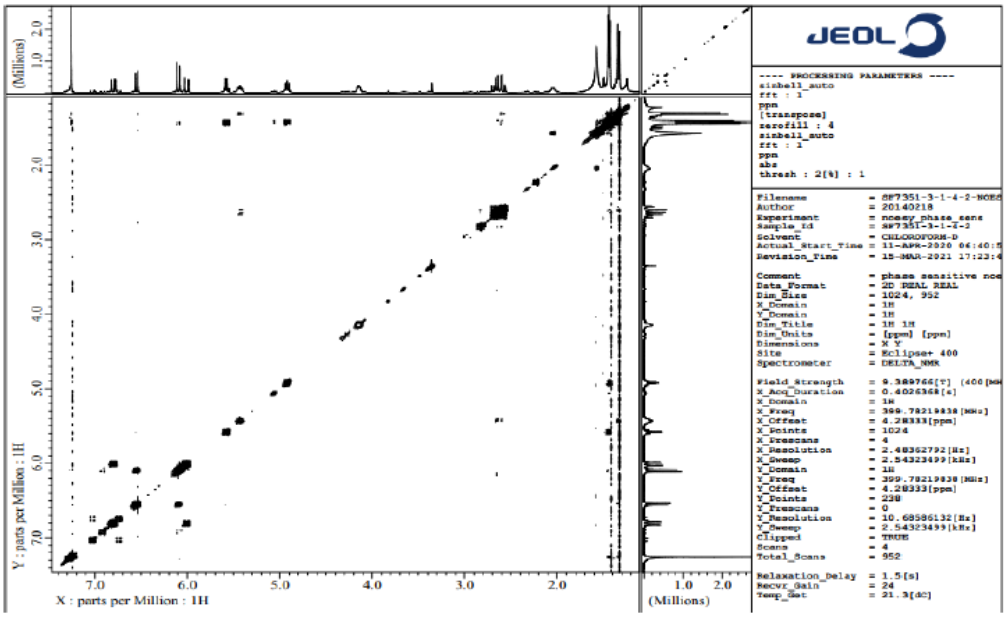


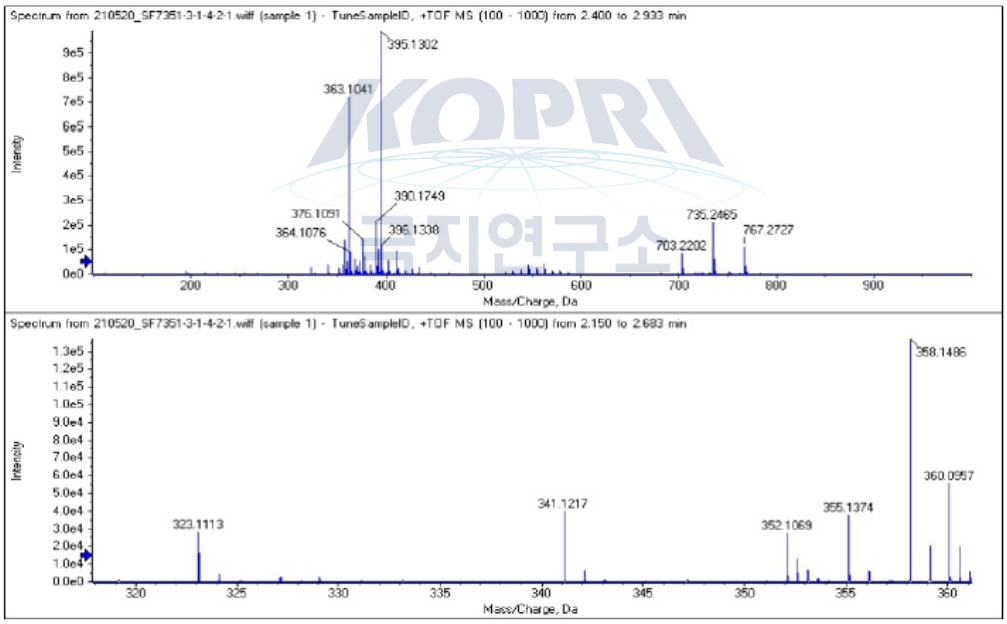


[그림 2-250. SF7351-3-1-4-2의 DEPT, COSY spectrum]



[그림 2-251. SF7351-3-1-4-2의 HMQC, HMBC spectrum]





[그림 2-252. SF7351-3-1-4-2의 NOESY, HR-ESI-MS]

나. 진균대사체 SF7351-3-1-5-6-2의 구조분석

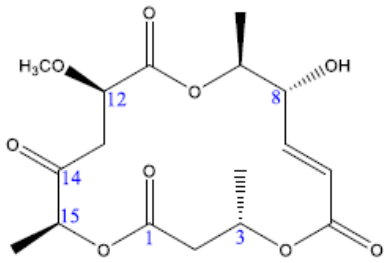
- SF7351-3-1-5-6-2 는 무색의 고체로 분리 되었으며 비선광도는 - 10.6 (c 0.06, MeOH)로 측정되었음. 분자식은 HR-ESI-MS 자료에서 관찰되는 *m/z* 373.1482 $[M + H]^+$(calcd for $C_{17}H_{25}O_9$, 373.1499), 피크 및 *m/z* 395.1302 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{17}H_{24}NaO_9$, 395.1318) 피크에 의해서 $C_{17}H_{24}O_9$으로 결정되었음. SF7351-3-1-5-6-2 의 ^{1}H NMR data는 1 개의 이중결합이 존재함을 제시하는 피크 [δ_H6.03 (1H,dd,*J* = 1.5, 15.8 Hz, H-6), 6.88 (1H, dd, *J* = 5.7, 15.8 Hz, H-7)], 1 개의 methoxy 기 [δ_H3.34(3H,s)], 3개의 methyl 기 [δ_H1.34(3H,d,*J* = 6.5 Hz, H-16), 1.37 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-18), 1.49 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-17)]에 대응하는 피크 등을 보였음. SF7351-3-1-5-6-2 의 ^{13}C NMR 및 DEPT data는 이 분자가 17개의 탄소를 함유하고 있으며 이들 탄소는 3 개의 methyl기 (δ_C15.8,17.8,and20.1),1개의 carbonyl 기 (δ_C 204.4),3개의 ester 형 carbonyl 기 (δ_C164.4,170.9,172.0),2개의 olefinic 탄소 (δ_C123.2,145.7),1개의 oxymethine (δ_C74.3),2개의 methylene 기 (δ_C40.1,40.9),및 하나의 methoxy 탄소 (δ_C 58.8)로 구성되어 있음이 확인되었음(표2-10)

- 추가하여 4 개의four methine기 (δ_C 68.6, 74.8, 76.2, 76.3)에 해당되는 피크가 관찰되었음. SF7351-3-1-5-6-2 의 구조는 추가적인 ^{1}H-^{1}HCOSY,andHMBC등 2차 NMR data의 분석을 통하여 확인되었음. 예를 들면, methoxy 기 피크와 (δ_H3.34)andC-12(δ_C76.2)간의 HMBC correlation은 이 methoxy 기가 분자의 C-12번 탄소에 연결되어 있음을 확인해 주었음. 또한 C-16에 methyl 기가 결합되어 있음은 methyl기 proton 피크로부터 C-1 (δ_C170.9),C-2 (δ_C40.9),C-3(δ_C68.6),및 C-5 (δ_C164.4)로의 HMBC correlation의 관찰에 의해서 확인되었음. SF7351-3-1-5-6-2의 평면구조의 확정에 필요한 주요 ^{1}H–^{1}HCOSY및 HMBC correlation은 아래 그림 2 에 제시되어 있음. 전체적인 SF7351-3-1-5-6-2 의 NMR data는 알려진 진균 대사체인 macrosphelides J와 K의 NMR data와 유사함이 문헌 조사를 통하여 확인되었음

- 다만, C-13, and C-14 위치의 화학적 이동값의 차이가 확인되었으며 이는 SF7351-3-1-5-6-2 의 C-12 위치의 입체 배열이 앞선 2개의 화합물과 다를 것 이라는 예측이 가능하게 하였음. 다음 단계로서 SF7351-3-1-5-6-2 의 절대 배향에 대한 분석이 진행되었음. 우선 macrosphelides 형태 대사체의 알려진 생합성 경로를 고려하여 8*R*, 9*S*, 15*S*,의 배열은 고정 되어 있을 것으로 가정하였음[4]

- 다음 단계로서 3*R* 또는 3*S* 배열을 가지는 가상의 SF7351-3-1-5-6-2 분자 구조를 대상으로 quantum-mechanical NMR chemical shifts 의 계산이B3LYP/6-31* level에서 수행 되었으며 [5], 이 계산 과정을 통하여 얻어진 3*R* 또는 3*S* 배열을 가지는 분자의 ^{1}H 과^{13}C NMR chemical shift를 SF7351-3-1-5-6-2 의 실험적 DP4+ computational 분석을 통하여 비교 하였음. 이러한 분석의 결과는 실험적 NMR data 가 3*S* 배열을 가지는 가상의 SF7351-3-1-5-6-2 분자 구조의 계산적 NMR data 와 93.97 % 일치 함이 확인되었음. 최

종적으로 위와 같은 계산 과정을 통하여 제안된 SF7351-3-1-5-6-2 분자구조의 절대 배향 결정은 메탄올 용매 증발 과정을 통해 얻어지는 결정에 대한 single-crystal X-ray crystallographic diffraction analysis를 통해서 얻어진 결정 구조와의 비교를 통하여 확정되었음. 따라서 SF7351-3-1-5-6-2 는 macrosphelide J 의 입체 이성질체인 화합물로 결정되었으며 *epi*-macrosphelide J로 명명되었음. 이 분자는 합성 화합물로 보고된 바는 있는 천연물로는 아직 보고된 바가 없는 것으로 확인되었음



[그림 2-253. Chemical structure of SF7351-3-1-5-6-2]

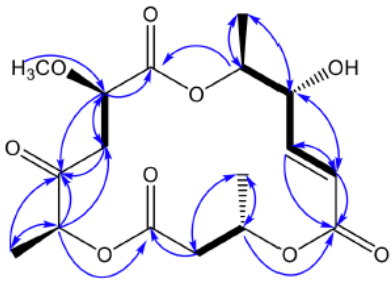
No	SF7351-3-1-5-6-2	
	δ_C[a,b]	δ_H[a,c] mult. (*J* in Hz)
1	170.9	-
2	40.9	2.57 dd (2.4, 15.3), 2.77 dd (11.2, 15.4)
3	68.6	5.42 m
5	164.4	-
6	123.2	6.03 dd (1.5, 15.8)
7	145.7	6.88 dd (5.7, 15.8)
8	74.3	4.25 d (2.0)
9	74.8	4.88 t (6.5)
11	172.0	-
12	76.2	4.27 d (2.0)
13	40.1	2.22 dd (2.0, 17.6), 2.96 dd (10.2, 17.6)
14	204.4	-
15	76.3	4.94 d (7.2)
16 (3-CH_3)	20.1	1.34 d (6.5)
17 (9-CH_3)	17.8	1.49 d (6.5)
18 (15-CH_3)	15.8	1.37 d (7.0)
12-OCH_3	58.8	3.34 s

All assignments were done by HMQC, HMBC, COSY and NOESY experiments

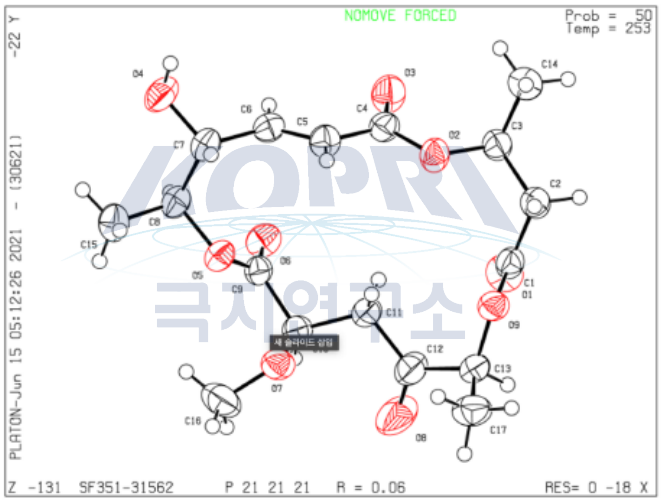
[a] Measured in $CDCl_3$, [b] 100 MHz, [c] 400 MHz

[표 2-10. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of SF7351-3-1-5-6-2]

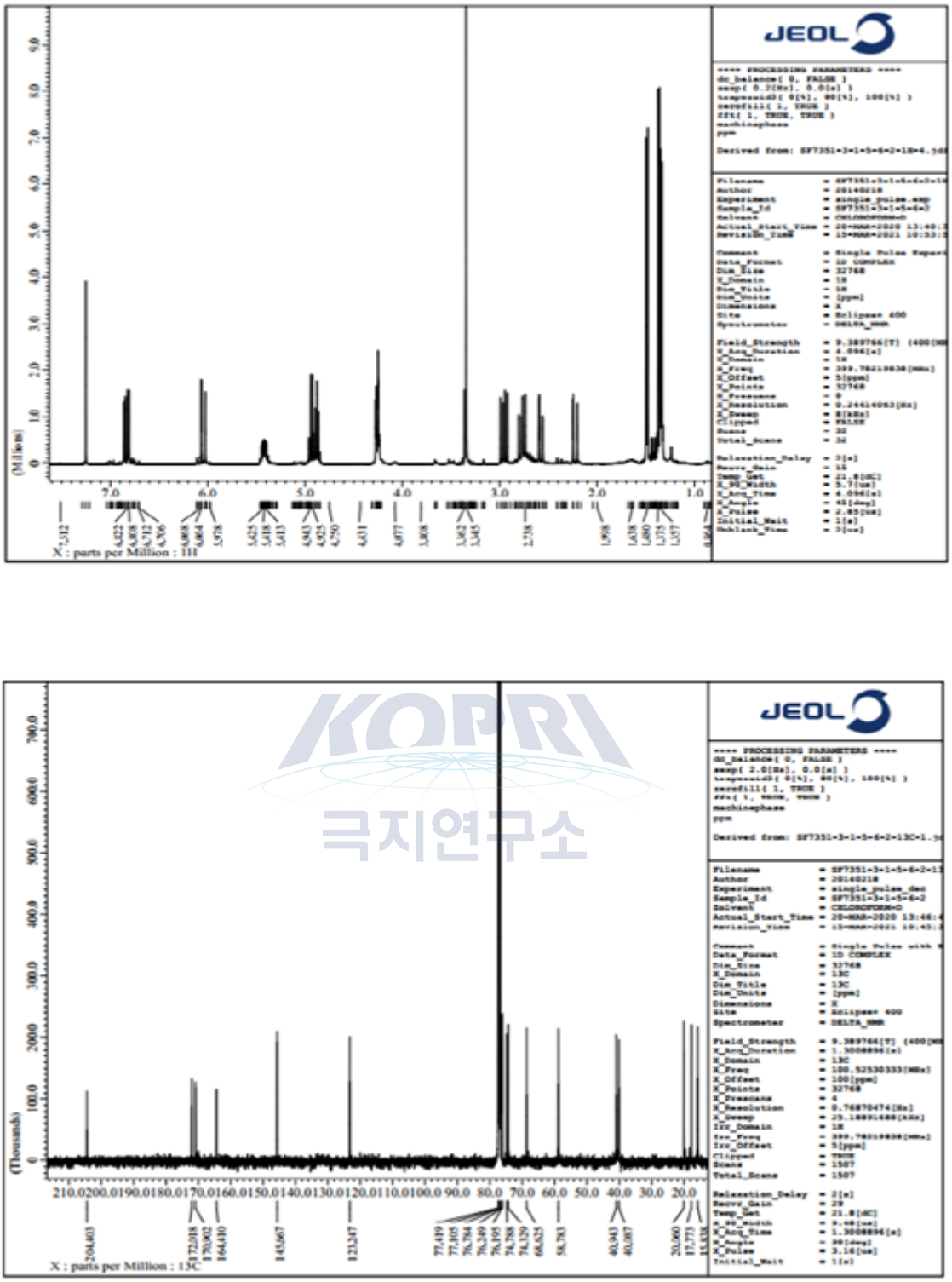
KOPRI 극지연구소



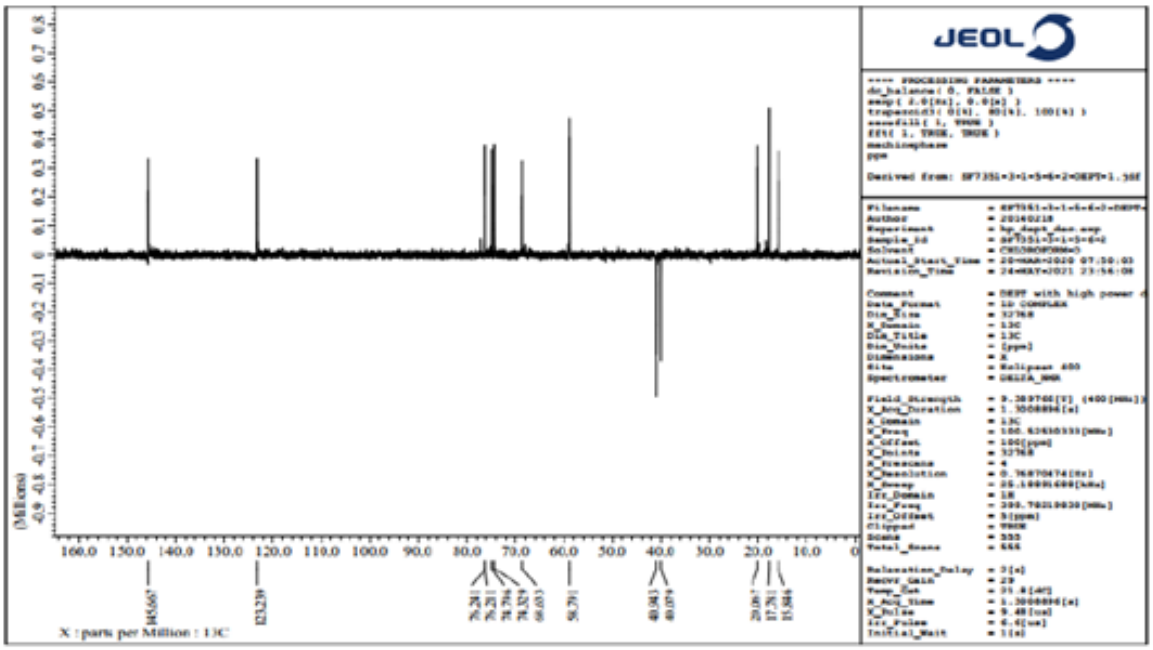
[그림 2-254. COSY (bold) and HMBC (arrow) correlations in SF7351-3-1-5-6-2]

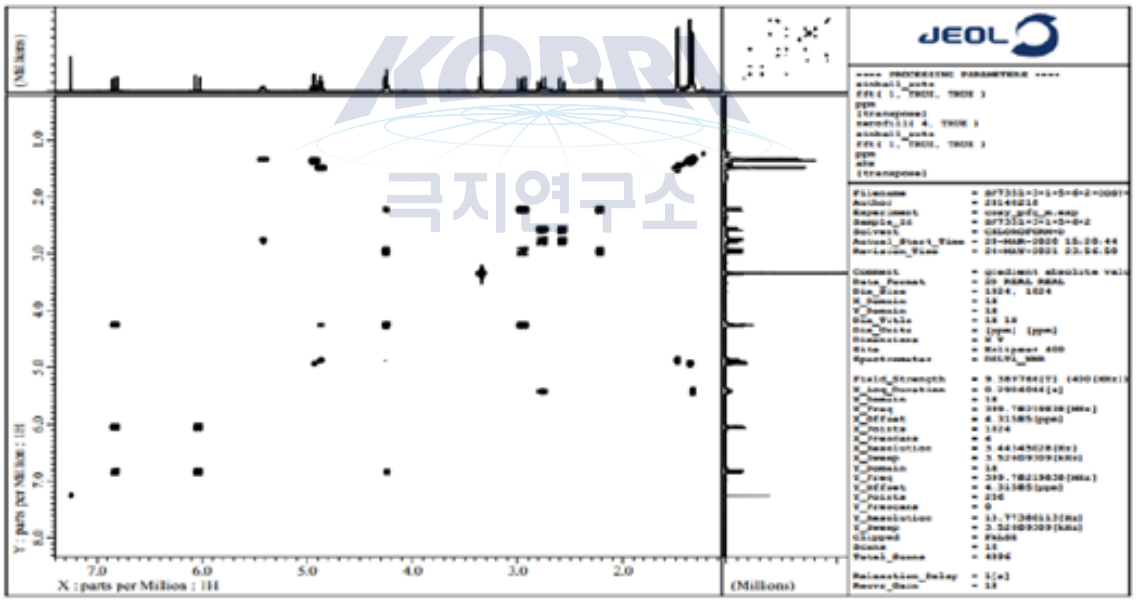


[그림 2-255. X-ray ORTEP plot for the molecular structure of SF7351-3-1-5-6-2 drawn with 50 % probability displacement ellipsoids]

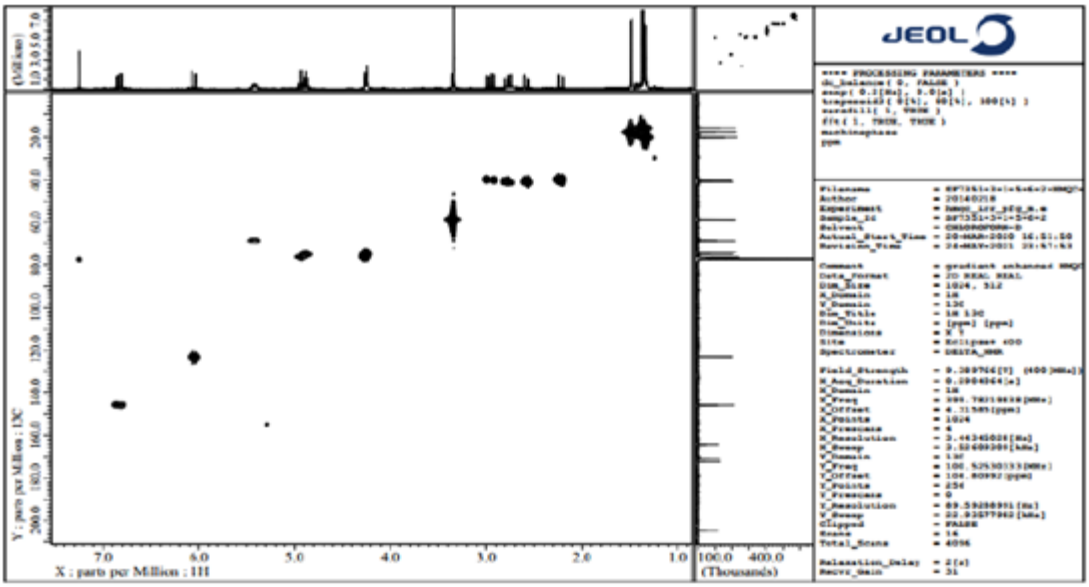


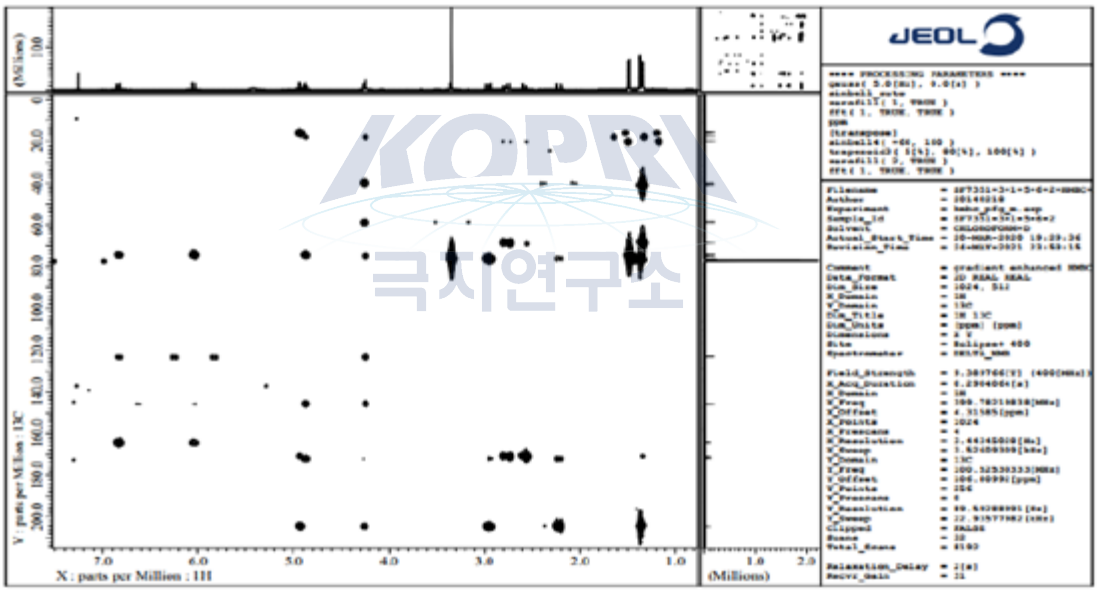
[그림 2-256. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of SF7351-3-1-5-6-2]





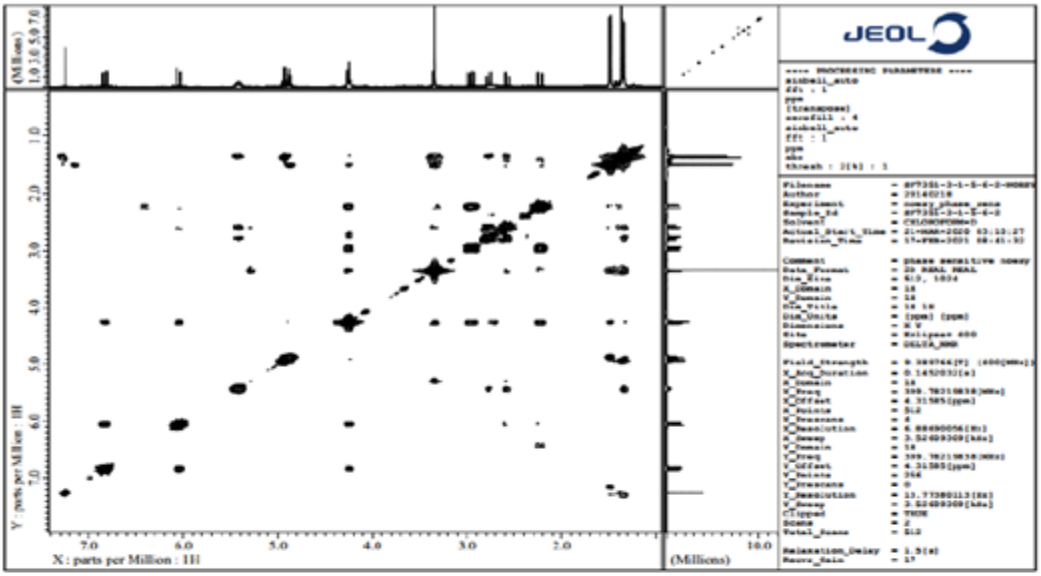
[그림 2-257. DEPT, COSY spectrum of SF7351-3-1-5-6-2]

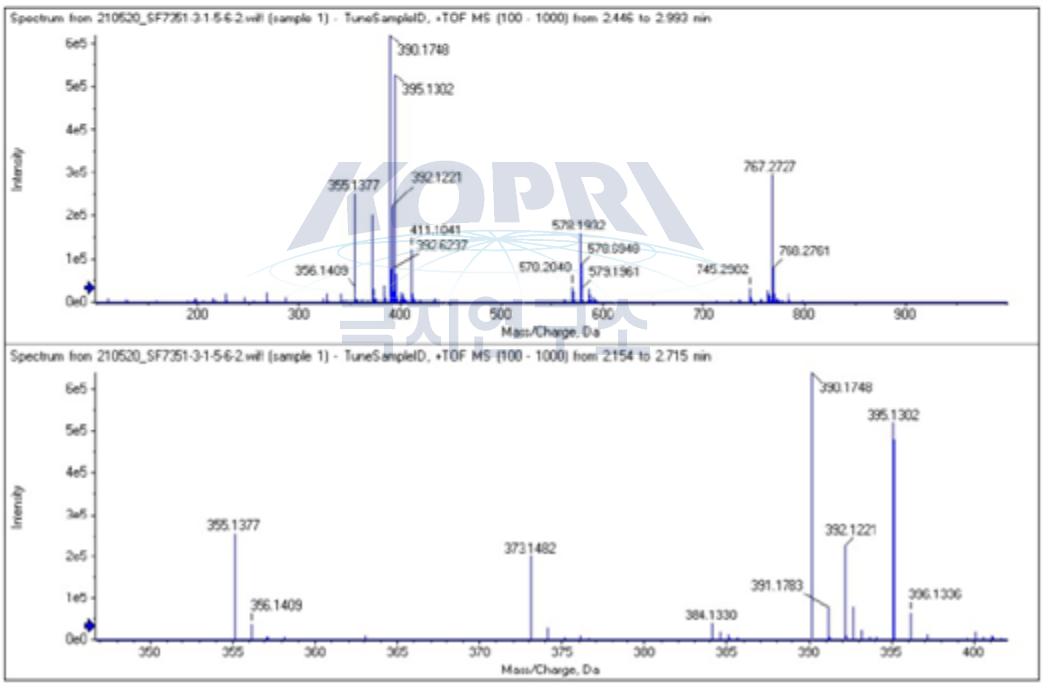




KOPRI
극지연구소

[그림 2-258. HMQC, HMBC spectrum of SF7351-3-1-5-6-2]



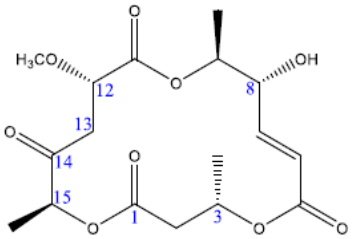


[그림 2-259. NOESY, HR-ESI-MS of SF7351-3-1-5-6-2]

다. 진균대사체 SF7351-3-1-5-6-3의 구조분석

- SF7351-3-1-5-6-3 의 비선광도는 - 3.26 (MeOH, *c* 0.16)로 측정 되었으며 분자식은 HRESIMS 측정 결과 [*m/z* 373.1484, $[M + H]^+$(calcd for $C_{17}H_{25}O_9$,373.1499]를 토대로 $C_{17}H_{24}O_9$으로 결정되었음. SF7351-3-1-5-6-3 의 ^{1}H NMR 스펙트럼에서는 2 개의 *trans*-olefinic proton 피크 [δ_H6.80(1H, dd, *J* = 15.7, 1.8 Hz, H-7), 6.11 (1H, dd, *J* = 15.7, 4.0 Hz, H-6)], 5 개의 oxygenated methine proton 피크 [δ_H5.45(1H, m,

H-3),5.20(1H, q, J = 6.7, H-15), 4.95 (1H, dd, J = 6.7, 3.8, H-9), 4.26 (1H, dd, J = 3.0, 9.7, H-12), 4.21 (1H, br s, H-8)], 2 개의 methylene proton 피크 [δ_H2.80(2H, m, H-13), 2.68(2H, m, H-2)],와 3 개의 methyl기 피크 [δ_H1.36(3H, d, J = 6.4 Hz), 1.39 (3H, d, J = 7.2 Hz), 1.44 (3H, d, J = 6.4 Hz)]가 관찰되었음. 또한 ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HMQC, HMBC data의 분석을 통하여 SF7351-3-1-5-6-3 는 macrosphelide J 와 동일한 구조를 가지는 것으로 확인 되었으며 문헌에 보고된 data와 일치함을 확인 하였음

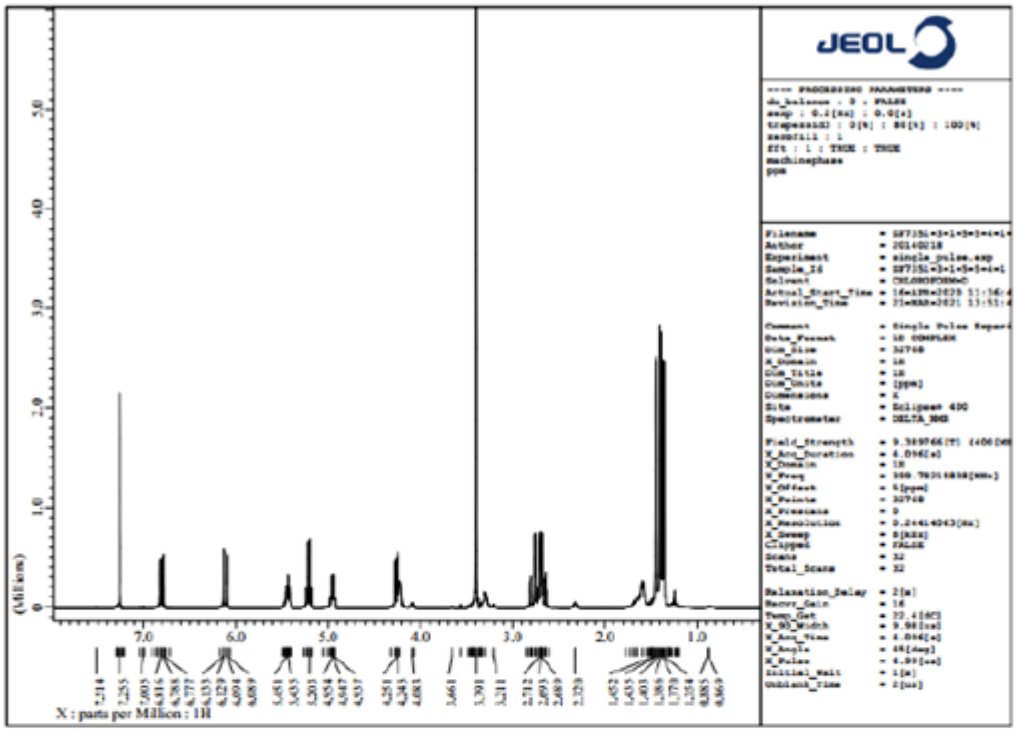


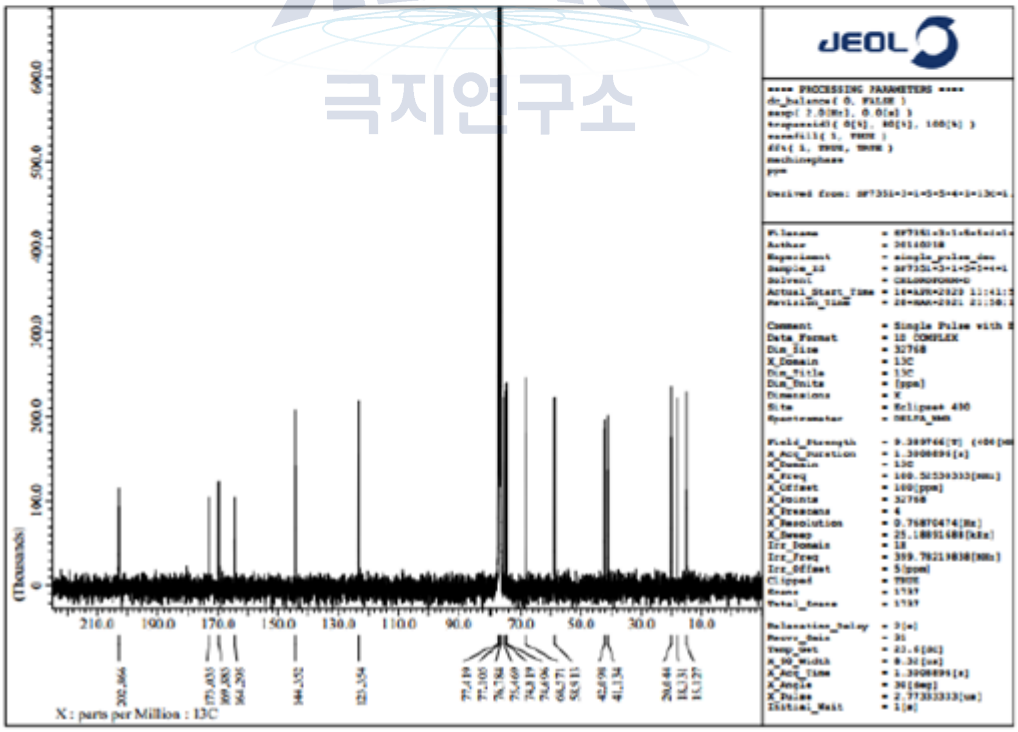
[그림 2-260. Chemical structure of SF7351-3-1-5-6-3]

C	[a]δ_C	δ_C[b,c]	δ_H[b,d] mult. (J in Hz)
1	169.75	169.9	-
2	41.00	41.1	2.68 m
3	68.47	68.6	5.45 m
5	164.21	164.3	-
6	123.30	123.4	6.11 dd (1.8, 15.7)
7	144.32	144.3	6.80 dd (4.0, 15.7)
8	74.70	74.8	4.21 brs
9	76.70	77.3	4.95 dd (3.8, 6.7)
11	172.81	173.1	-
12	74.70	74.7	4.26 dd (3.0, 9.7)
13	42.01	42.1	2.80 m
14	202.73	202.9	-
15	75.38	75.5	5.20 q (6.7)
12-OCH_3	58.79	58.9	3.39 s
3 *Me*	19.95	20.0	1.36 d (6.4)
9 *Me*	18.21	18.4	1.44 d (6.4)
15 *Me*	15.05	15.1	1.39 d (7.2)

[a]δ_C of macrosphelide J [4, 6], [b]recorded in $CDCl_3$, [c]100 MHz, [d]400 MHz.

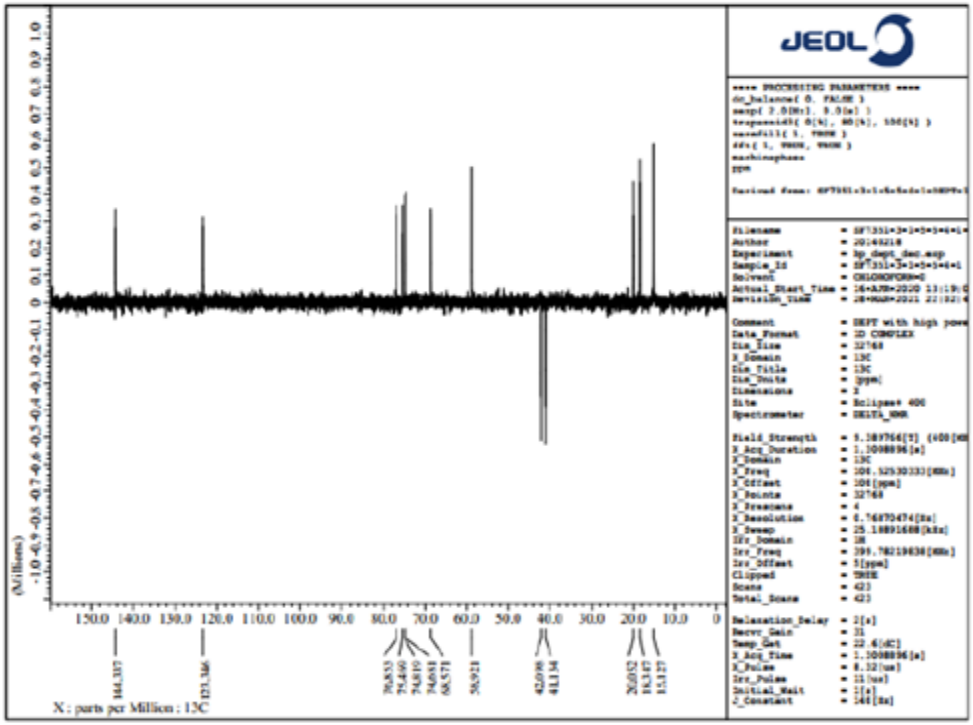
[표 2-11. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of SF7351-3-1-5-6-3]

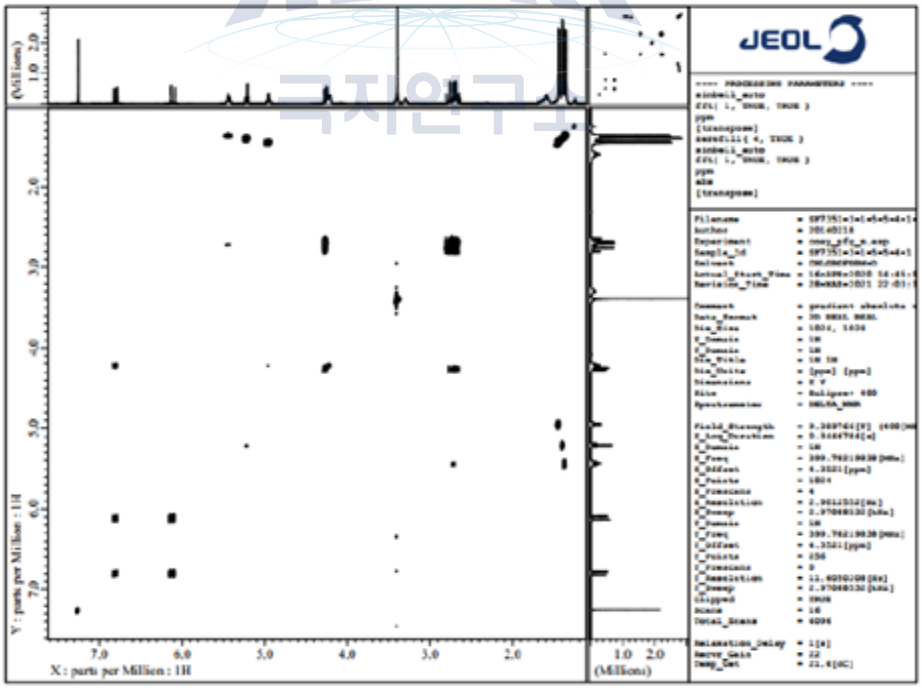




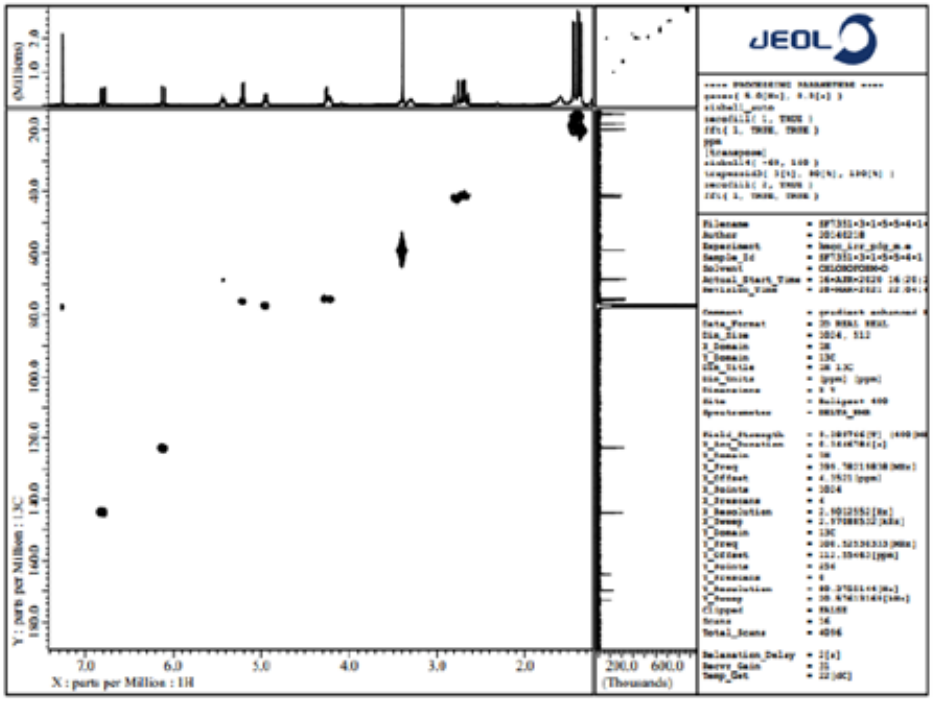
KOPRI
극지연구소

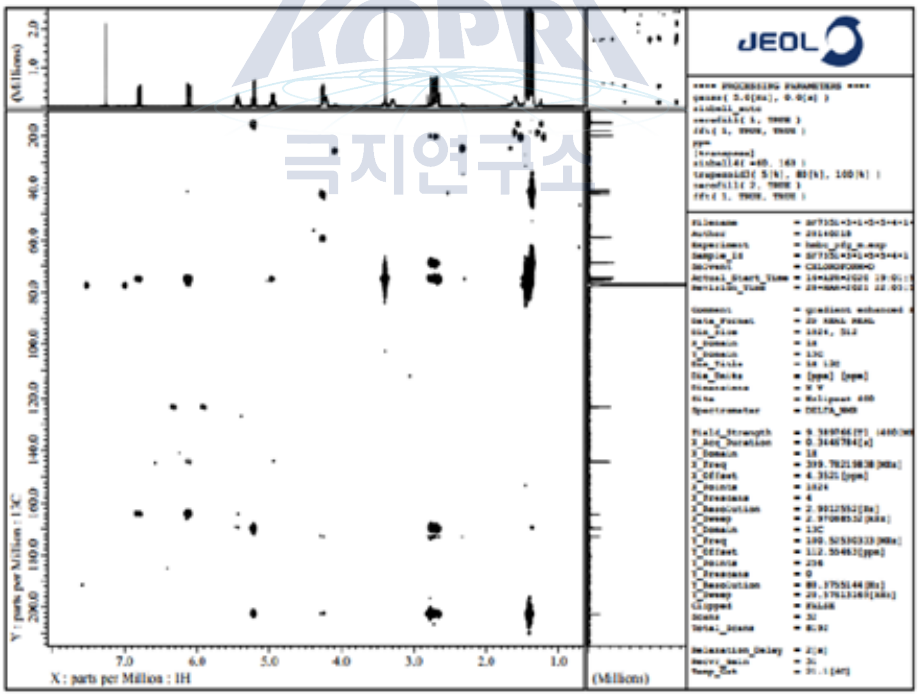
[그림 2-261. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of SF7351-3-1-5-6-3]





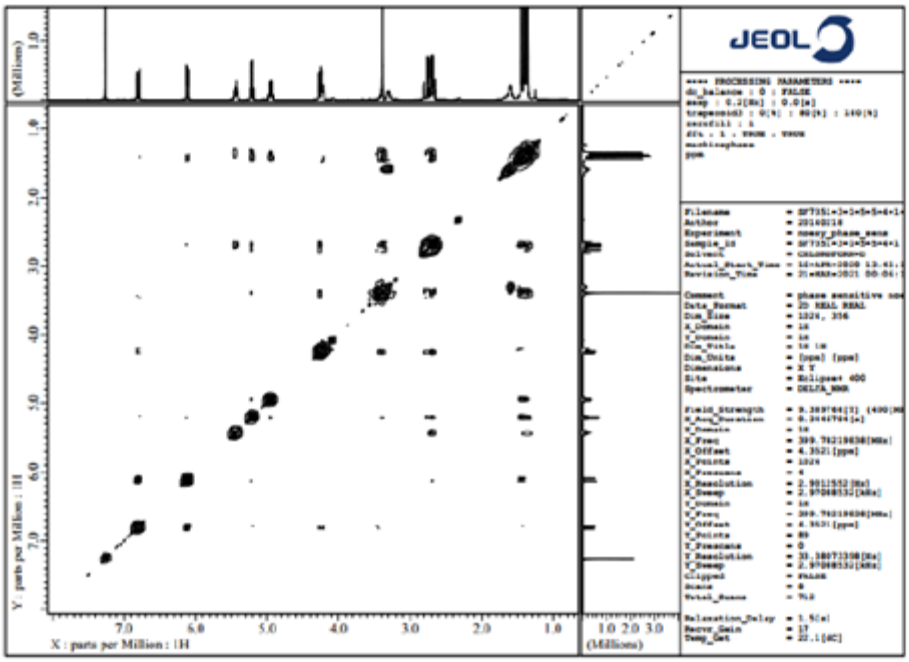
[그림 2-262. DEPT, COSY spectrum of SF7351-3-1-5-6-3]

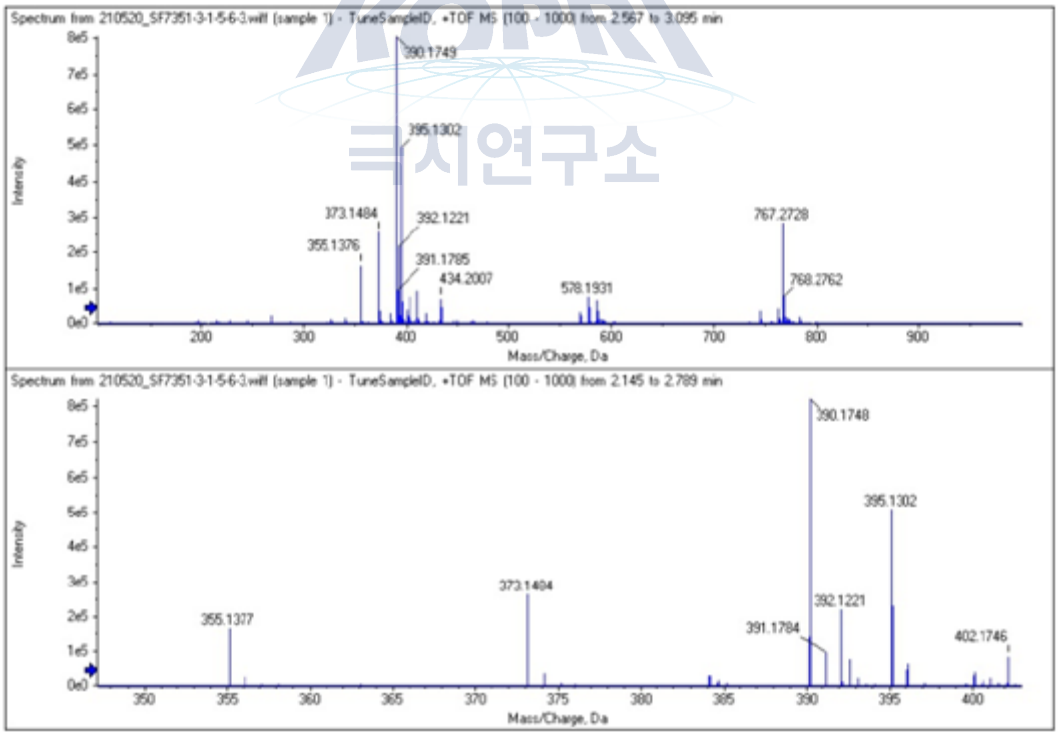




KOPRI
극지연구소

[그림 2-263. HMQC, HMBC spectrum of SF7351-3-1-5-6-3]

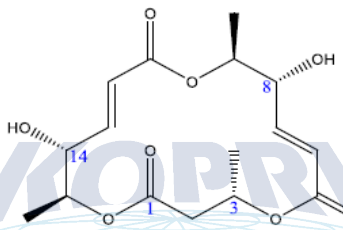




[그림 2-264. NOESY, HR-ESI-MS of SF7351-3-1-5-6-3]

라. 진균대사체 SF7351-3-3의 구조분석

- SF7351-3-3 의 비선광도는 + 68.8 (in MeOH, *c* 0.6)로 측정 되었으며 분자식은 HRESIMS 측정 결과 [*m/z* 343.1377 [M + H]$^+$(calcd for $C_{16}H_{23}O_8$, 343.1393)]를 토대로 $C_{16}H_{22}O_8$으로 결정되었음. SF7351-3-3 의 ^{1}H NMR 스펙트럼에서는 2 개의 *trans*-olefinic 기의 존재를 의미하는 proton 피크 [δ_H6.04 dd (J =15.6, 1.7), 6.88 dd (J =15.6, 0.9), 6.05 dd (J =15.9, 1.7), 6.86 dd (J =15.9, 0.9)], 5 개의 oxygenated methine proton 피크 [δ_H5.38(1H, m, H-3),4.25(1H, brs, H-8),4.94(1H, td, J = 6.6, 4.5, H-9), 4.13 (1H, d, J = 6.0, H-14), 4.85 (1H, d, J = 6.4, H-15)], 1 개의 methylene proton 피크 [δ_H2.58(2H, m),와 3 개의 methyl 기 피크 [δ_H1.32(3H, d, J = 6.3 Hz), 1.36 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.45 (3H, d, J = 6.6 Hz)]가 관찰되었음. 또한 ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HMQC, HMBC data의 분석을 통하여 SF7351-3-3 는 macrosphelide A 와 동일한 구조를 가지는 것으로 확인 되었으며 문헌에 보고된 data와 일치함을 확인하였음

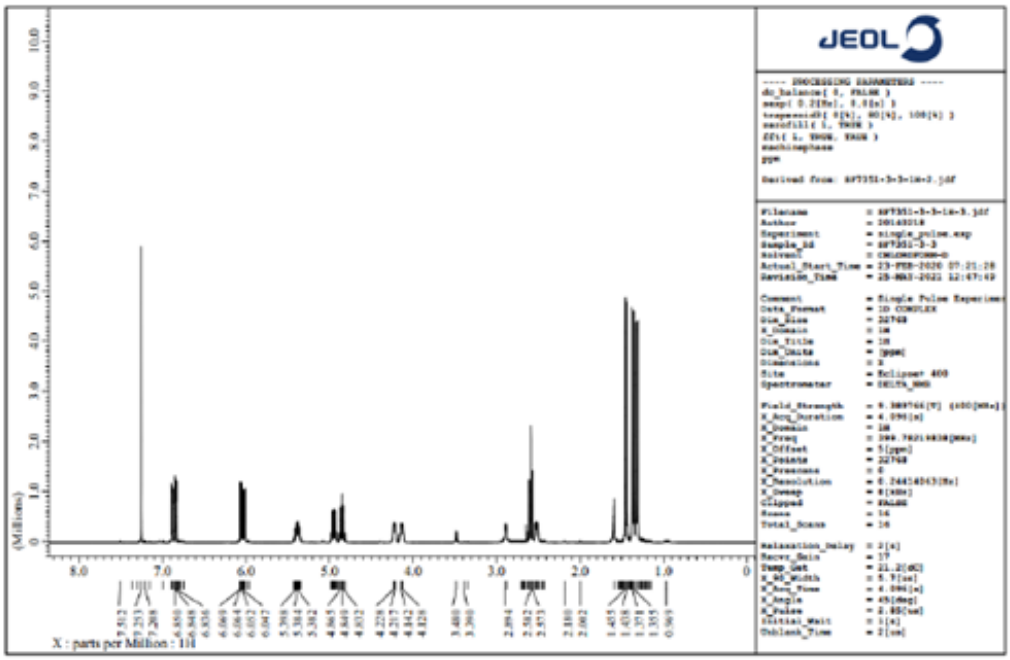


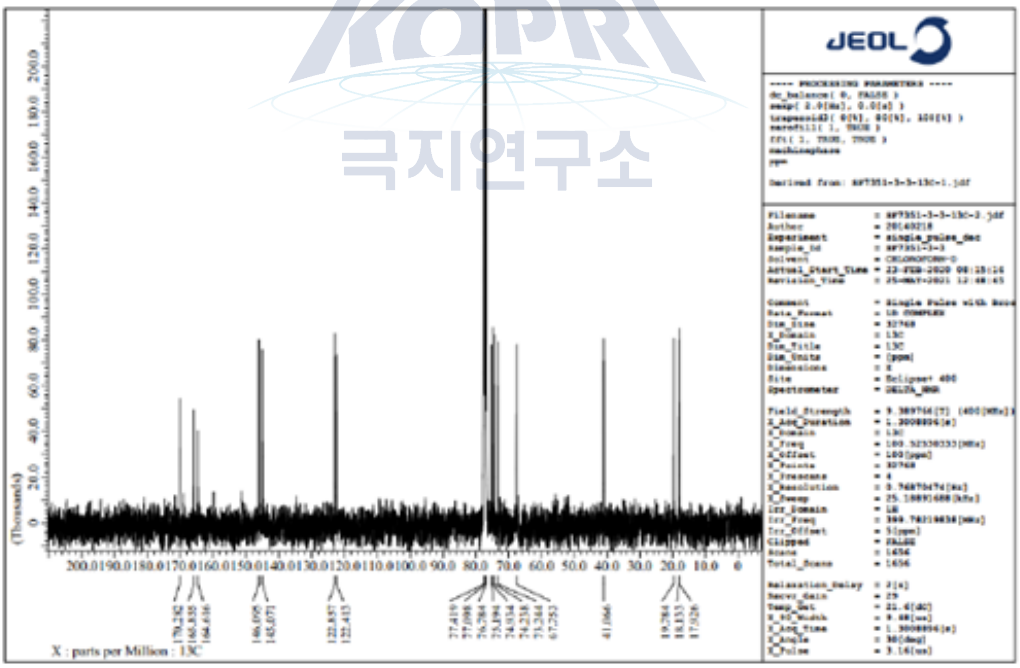
[그림 2-265. Chemical structure of SF7351-3-3]

Position	$^a\delta_C$	δ_C ^{b,c}	δ_H ^{b,d} mult. (J in Hz)
1	170.2	170.3	-
2	40.9	41.0	2.58 m
3	67.7	67.7	5.38 m
5	164.7	164.6	-
6	122.7	122.8	6.04 dd (15.6, 1.7)
7	145.2	145.1	6.88 dd (15.6, 0.9)
8	74.7	74.9	4.25 brs
9	74.8	75.2	4.94 td (6.6, 4.5)
11	165.8	165.8	-
12	122.2	122.4	6.05 dd (15.9, 1.7)
13	146.2	146.1	6.86 dd (15.9, 0.9)
14	73.0	73.2	4.13 d (6.0)
15	73.9	74.2	4.85 d (6.4)
3 *Me*	19.6	19.8	1.32 d (6.3)
9 *Me*	17.9	18.1	1.45 d (6.6)
15 *Me*	17.8	17.9	1.36 d (6.4)

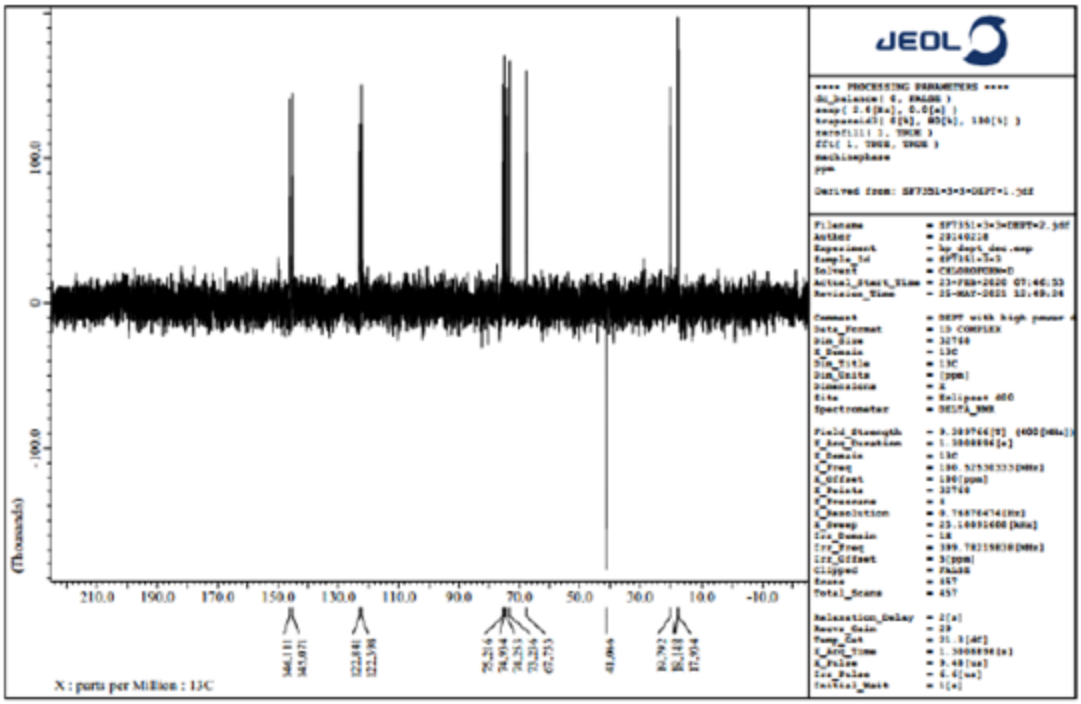
$^a\delta_C$ of macrosphelide A [2], ^{b}recorded in $CDCl_3$, ^{c}100 MHz, ^{d}400 MHz.

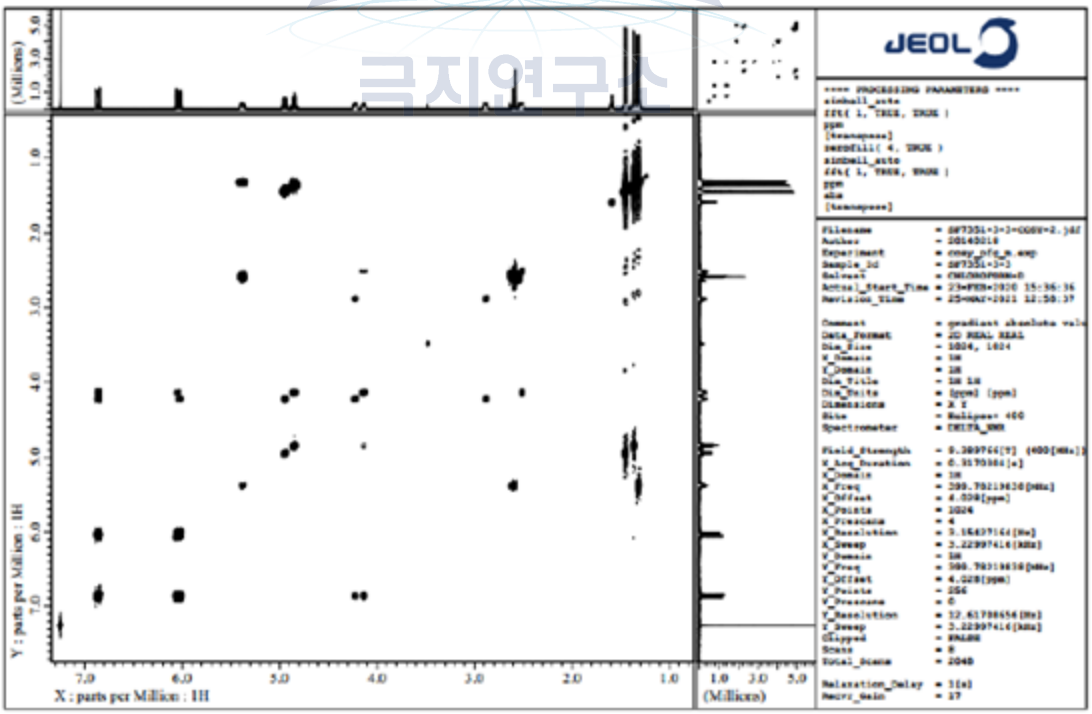
[표 2-12. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of SF7351-3-3]



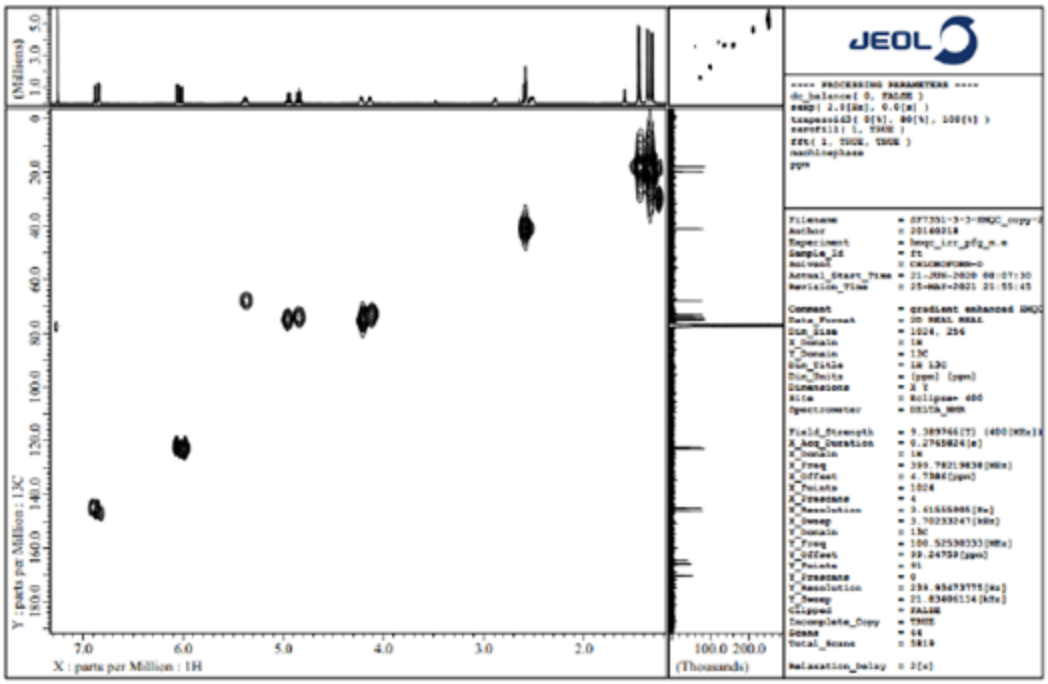


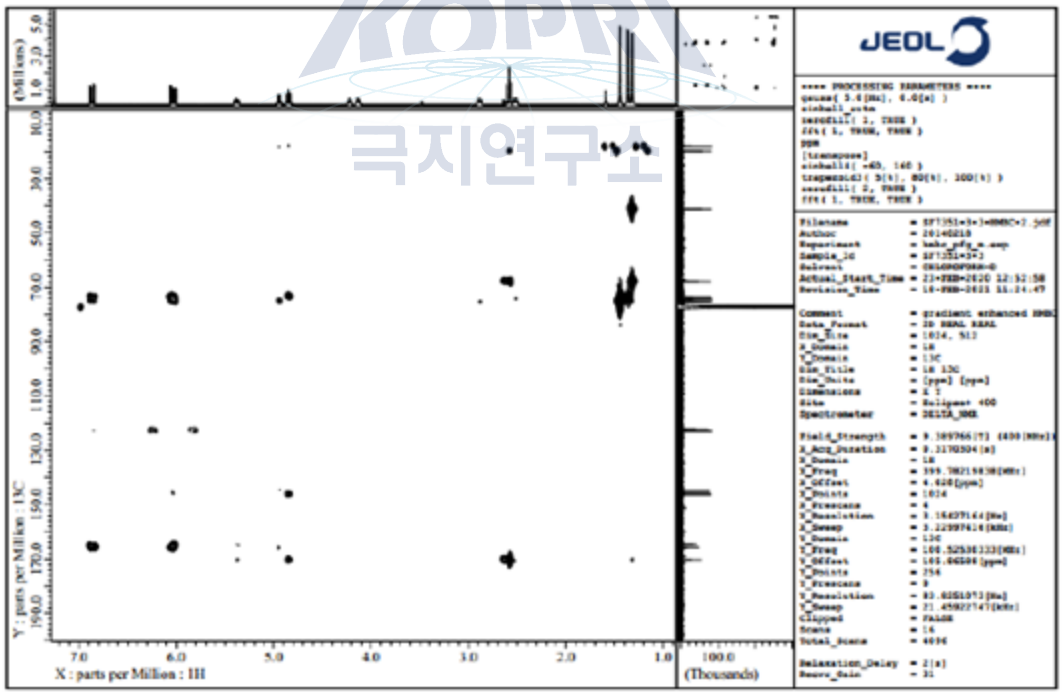
[그림 2-266. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of SF7351-3-3]





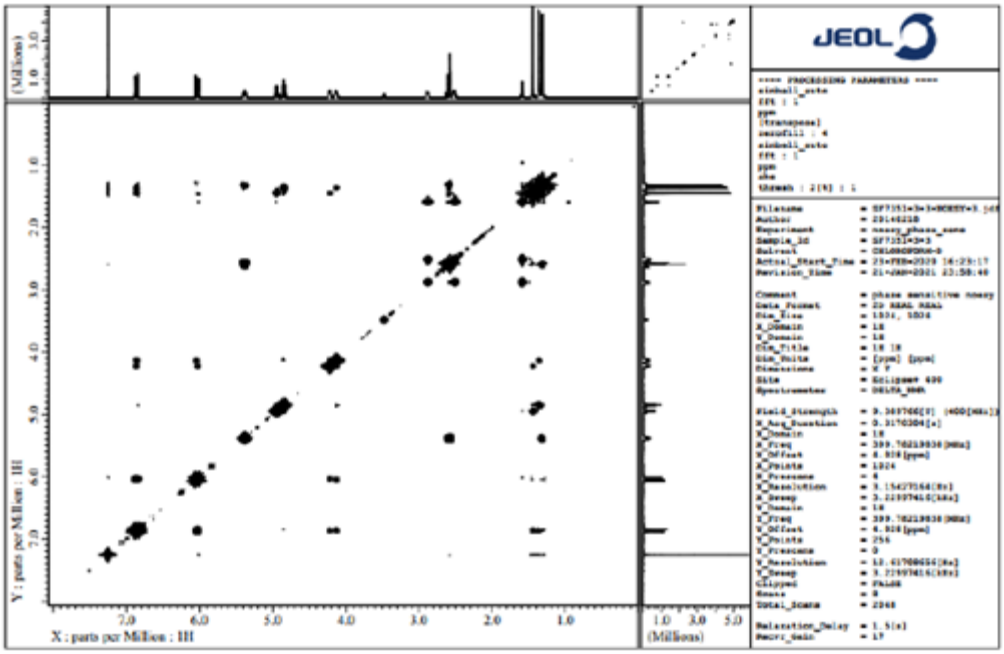
[그림 2-267. DEPT, COSY spectrum of SF7351-3-3]

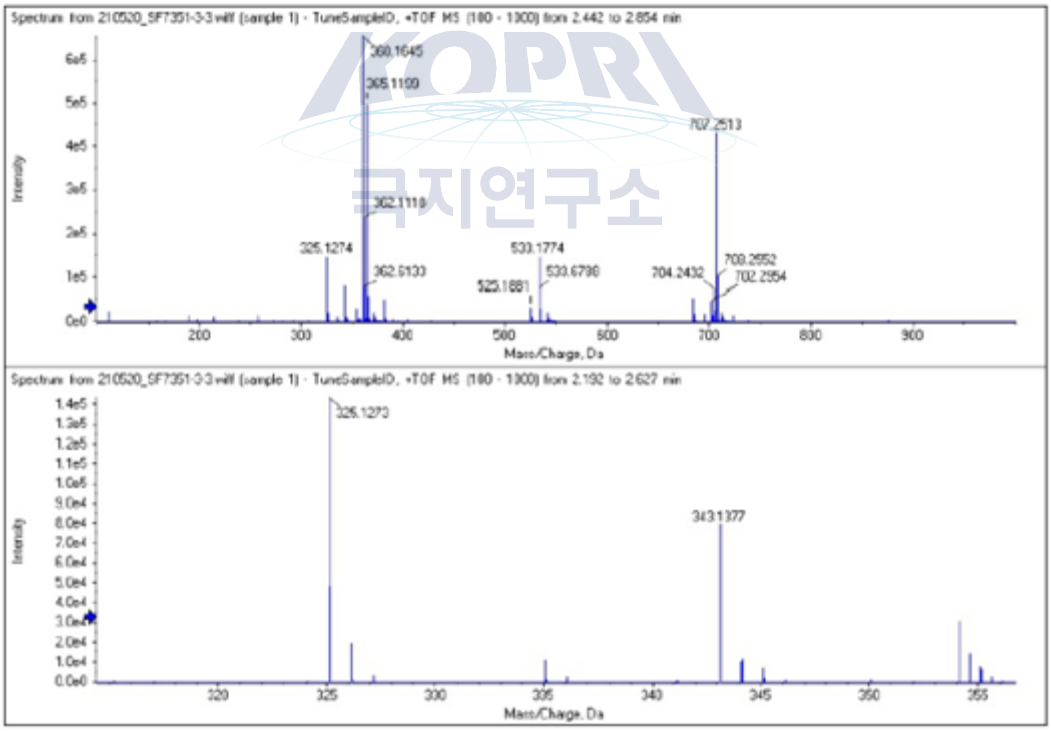




KOPRI
극지연구소

[그림 2-268. HMQC, HMBC spectrum of SF7351-3-3]

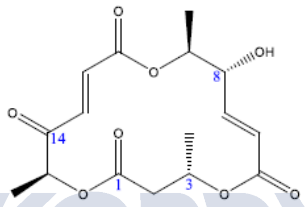




[그림 2-269. HMQC, HMBC spectrum of SF7351-3-3]

마. 진균대사체 SF7351-3-1-6의 구조분석

- SF7351-3-1-6 의 비선광도는 + 4.1 (MeOH, *c* 1.0)로 측정 되었으며 분자식은 HRESIMS 측정 결과 [*m/z* 341.1221 [M + H]$^+$(calcd for $C_{16}H_{21}O_8$, 343.1236)]를 토대로 $C_{16}H_{20}O_8$으로 결정되었음. SF7351-3-1-6의 NMR data는 SF7351-3-3 의 NMR data와 유사한 형태를 보였기 때문에 SF7351-3-1-6의 구조 역시 macrosphelide와 유사한 대사체임이 예상되었음. (Table 1). 단지 ^{13}C-NMR spectrum of SF7351-3-1-6 의 ^{13}C-NMR 스펙트럼에서는 SF7351-3-3의 경우와 달리 C-14 (δ_C 196.3) 의 화학적 이동값이 매우 저자장 영역에서 관찰되었음. 다른 ^{13}C-NMR 스펙트럼에서의 화학적 이동값은 SF7351-3-3의 ^{13}C-NMR 스펙트럼에서의 화학적 이동값과 유사하게 관찰되었음. 최종적으로 ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HMQC, HMBC data의 분석을 통하여 SF7351-3-1-6의 구조는 macrosphelide B 와 동일한 구조를 가지는 것으로 확인 되었으며 문헌에 보고된 data와 일치함을 확인 하였음



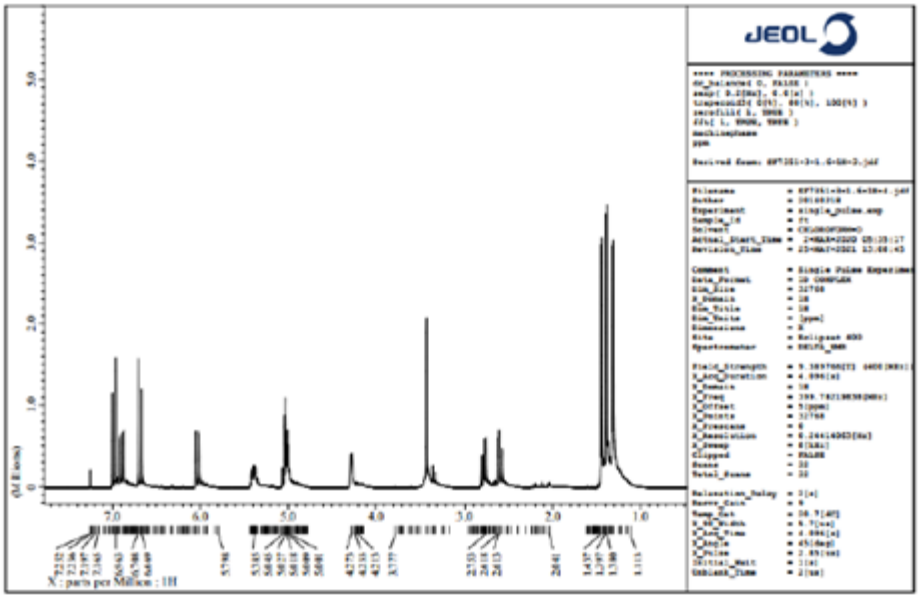
[그림 2-270. Chemical structure of SF7351-3-1-6]

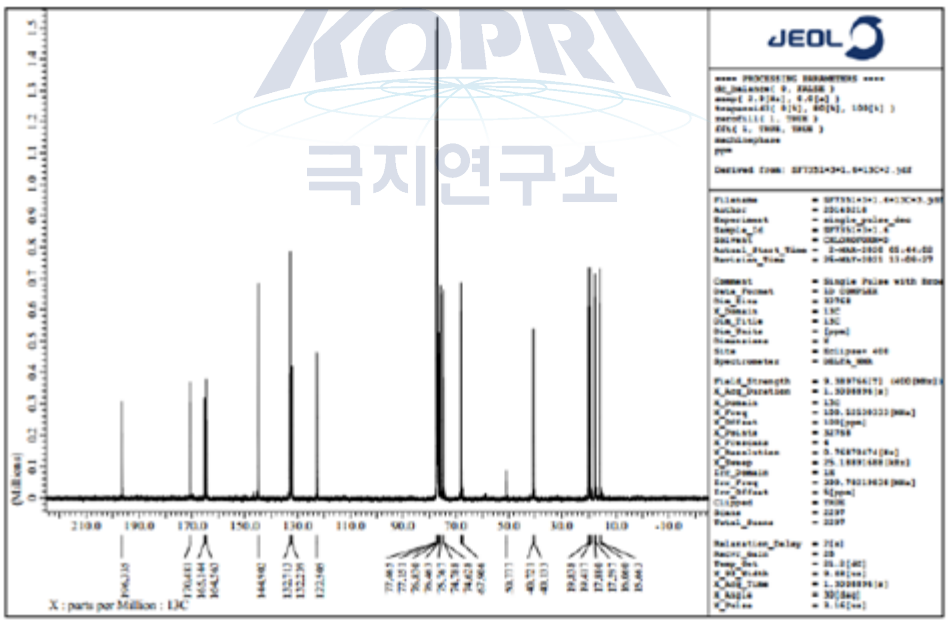
KOPRI
극지연구소

Position	$^a\delta_C$	$\delta_C{}^{b,c}$	$\delta_H{}^{b,d}$ mult. (*J* in Hz)
1	170.2	170.5	-
2	40.6	40.7	2.60 dd (16.1, 2.2) 2.79 dd (16.1, 11.0)
3	67.7	67.9	5.38 m
5	164.3	164.5	-
6	122.4	122.5	6.03 dd (15.5, 1.8)
7	144.5	144.9	6.88 dd (15.5, 3.3)
8	74.6	74.6	4.25 brs
9	75.7	75.7	4.97 q (6.6)
11	165.2	165.1	-
12	132.1	132.2	6.98 d (15.5)
13	132.6	132.7	6.68 d (15.5)
14	196.2	196.3	-
15	76.5	76.4	4.86 q (6.6)
3 *Me*	19.7	19.8	1.33 d (6.3)
9 *Me*	17.8	17.9	1.45 d (6.6)
15 *Me*	16.0	16.0	1.37 d (6.6)

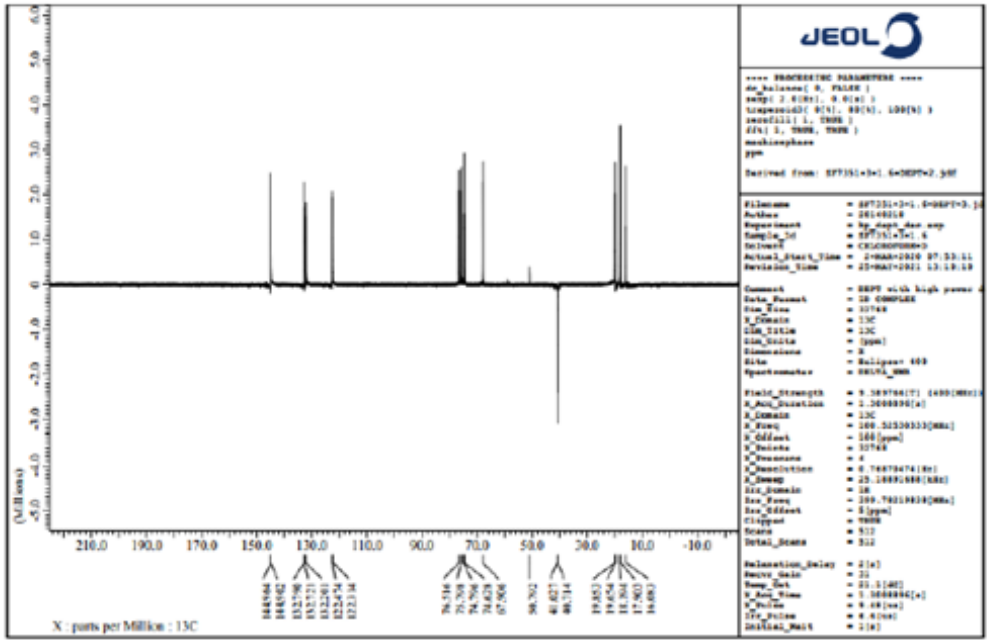
$^a\delta_C$ of macrosphelide B [2], ^{b}recorded in $CDCl_3$, ^{c}100 MHz, ^{d}400 MHz.

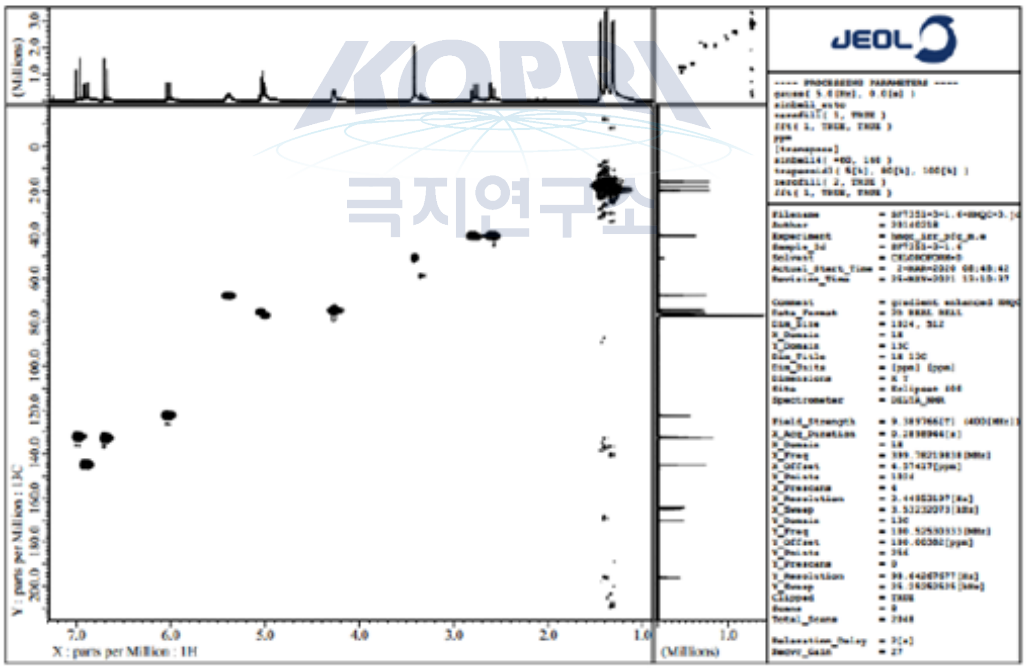
[표 2-13. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of of SF7351-3-1-6]



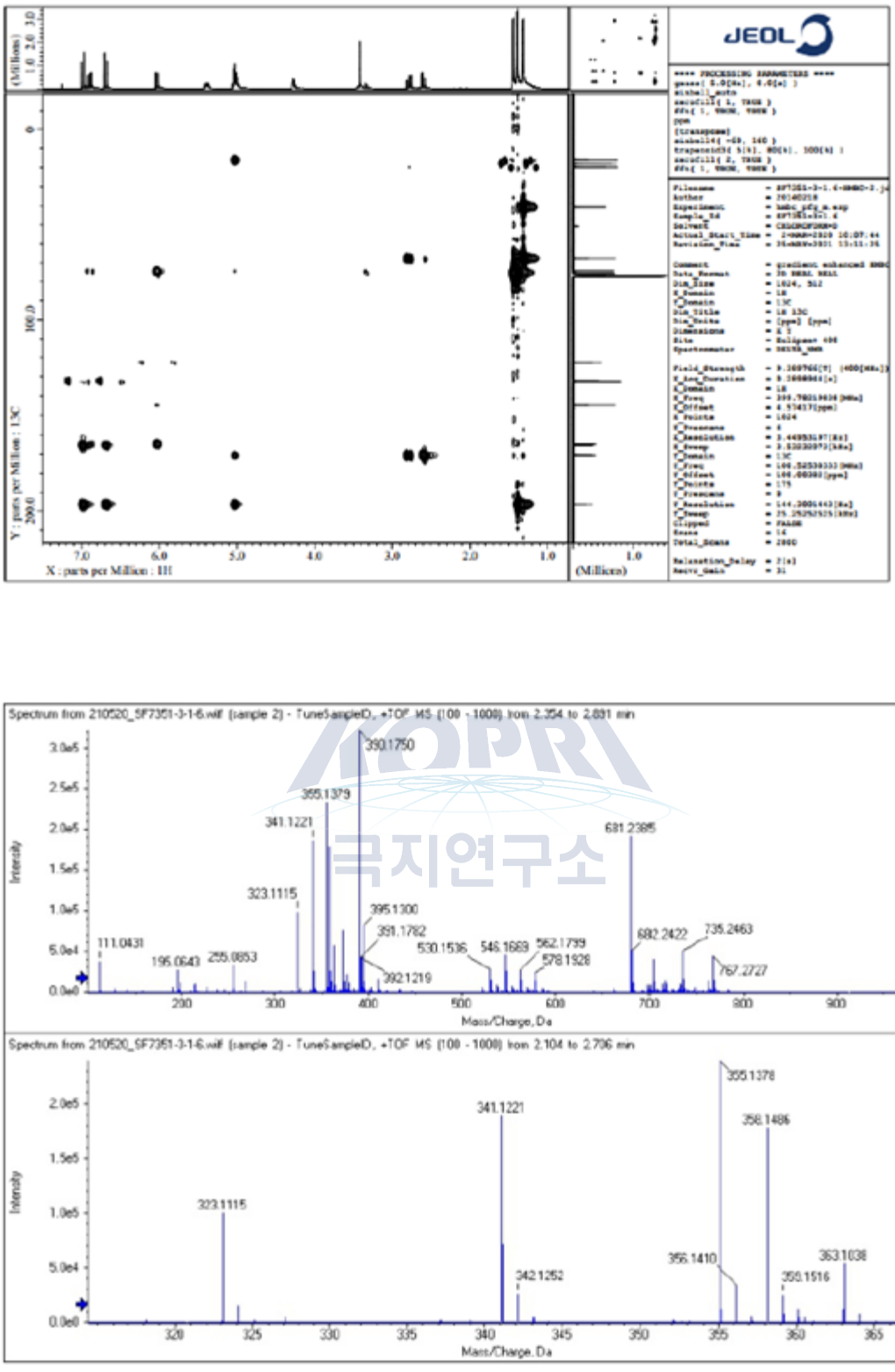


[그림 2-271. ^{1}H and ^{13}C-NMR data of SF7351-3-1-6]



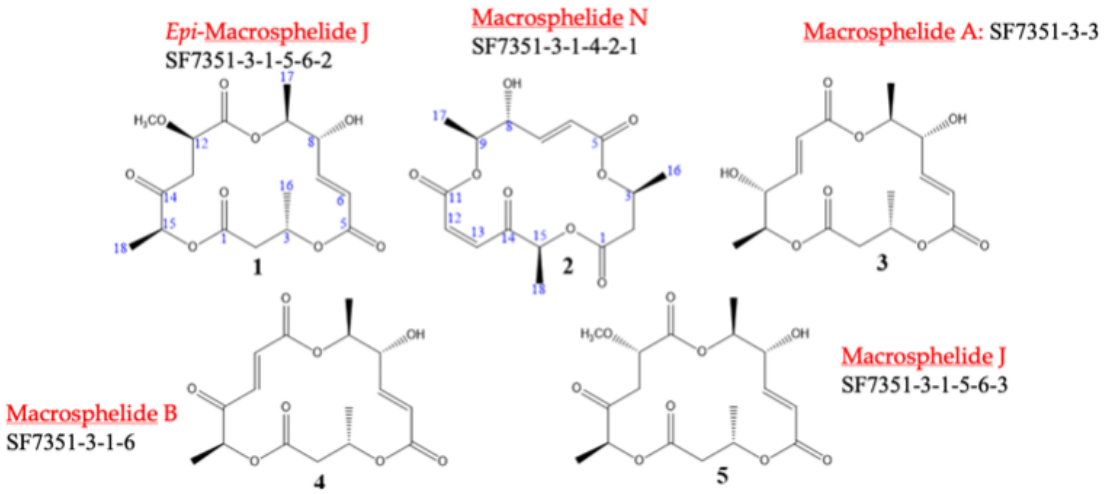


[그림 2-272. DEPT, HMQC spectrum of SF7351-3-1-6]



[그림 2-273. HMBC spectrum, HR-ESI-MS of SF7351-3-1-6]

6) SF7351 유래 대사체의 BV2 미세아교세포에서 LPS로 유발한 뇌신경 염증반응 조절효과 검색

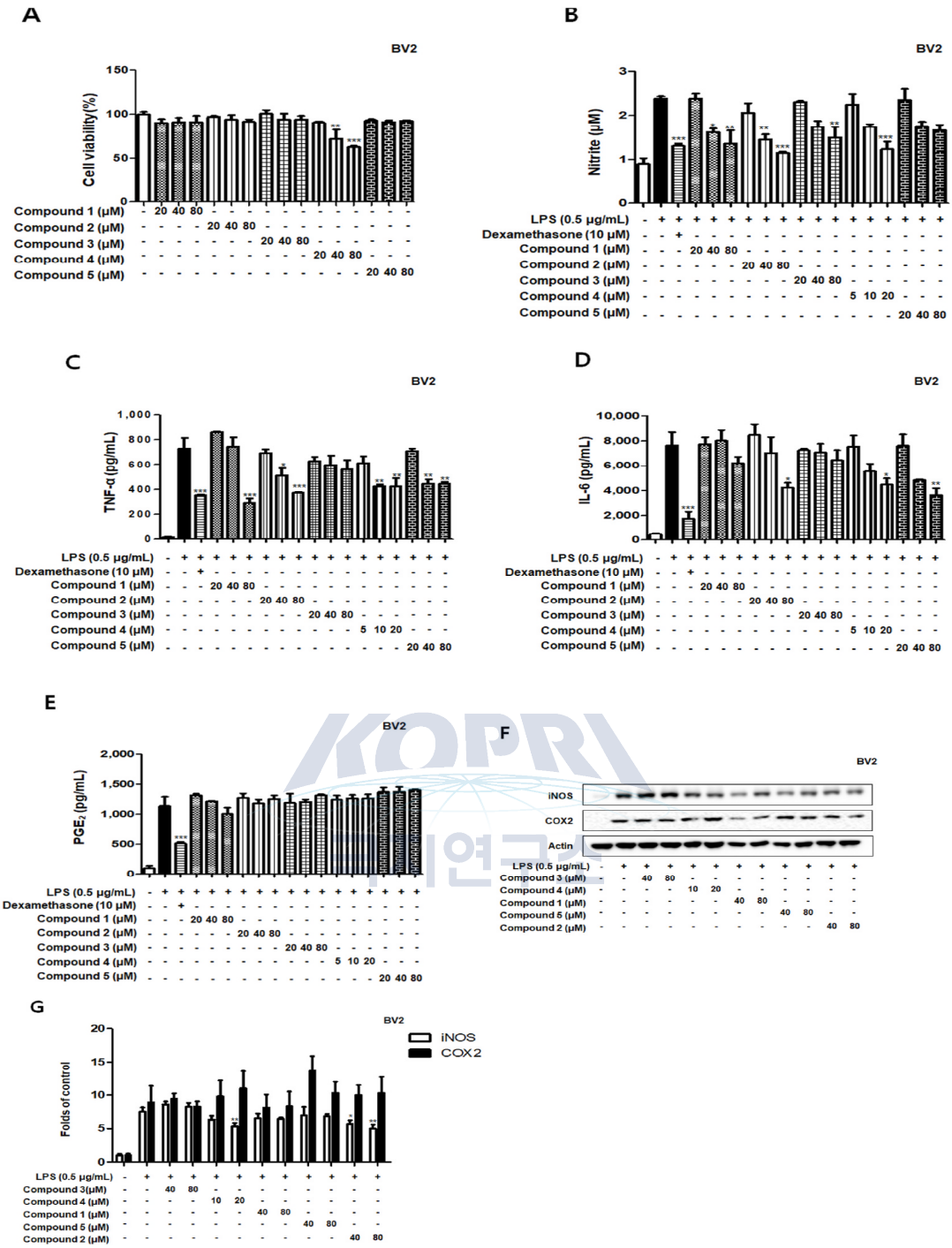


[그림 2-274. SF 7351 유래 5개 화합물]

가. SF 7351 유래 5개 화합물의 항신경염증 효능 평가를 하기 전 BV2 세포에서 화합물의 세포독성을 MTT방법으로 평가함. 그 중 compound 4가 40μM에서 세포독성을 보여 최대 처리 농도를 20μM로 설정하였고 나머지 4개 화합물은 80μM로 설정하였음(그림 2-275A)

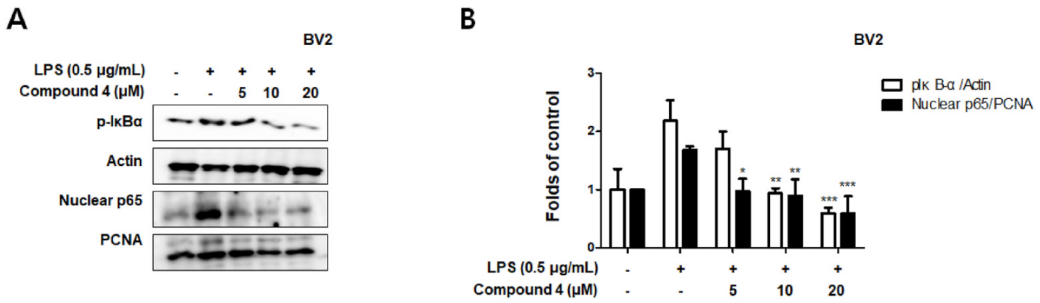
나. 이후 세포독성이 없는 농도에서 화합물 1-5가 LPS로 유도된 BV2 세포에서 nitrite, TNF-α 및 IL-6, PGE_2 생성억제 효과를 나타내는지 확인하였음. 그 결과 nitrite억제는 compound 1, 2, 3, 4가 유의적이었고, TNF-α 억제 효과는 compound 1, 2, 4, 5가, IL-6 억제 효과는 compound 2, 4, 5가 우수했음. PGE_2 억제 효과는 모든 화합물에서 없었음(그림 2-275B~E)

다. 5개 화합물의 LPS 자극된 BV2 세포에서 iNOS, COX-2 발현 억제효과를 살펴보았음. 그 결과 compound 2, 4가 iNOS 억제효과가 유의적으로 나타났으며, COX-2 발현 억제는 모든 화합물에서 나타나지 않았음(그림 2-275F, 2-275G)



[그림 2-275. The effects of compounds 1–5 on inflammatory factors in BV2 cells. Cell viability (A) was determined MTT assay after cells were incubated for 24 h with various concentrations of compounds 1–5. The effects of the compounds on nitrite (B), tumor necrosis factor (TNF)-α (C), interleukin (IL)-6 (D), and PGE2 (E) in LPS-stimulated BV2 cells were examined. Protein expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated BV2 cells (F). Representative blots from three independent experiments are shown. Immunoblots were quantified using ImageJ software (G)]

라. BV2 세포에서 NF-κB 활성화를 평가하기 위해 compound 4의 효과를 웨스턴 블랏으로 조사함. compound 4는 세포질 분획에서 IκB-α의 인산화와 p65의 핵 전위를 농도 의존적으로 억제하여, NF-κB의 활성화를 억제하는 효과를 나타냄. 이 결과는 compound 4가 LPS 유발된 NF-κB(p65)의 핵 전위를 억제하는데 기여한다는 것을 시사함(그림 2-276)



[그림 2-276. Effects of compound 4 on nuclear factor-kappa B (NF-κB) p65 activation in BV2 cells]

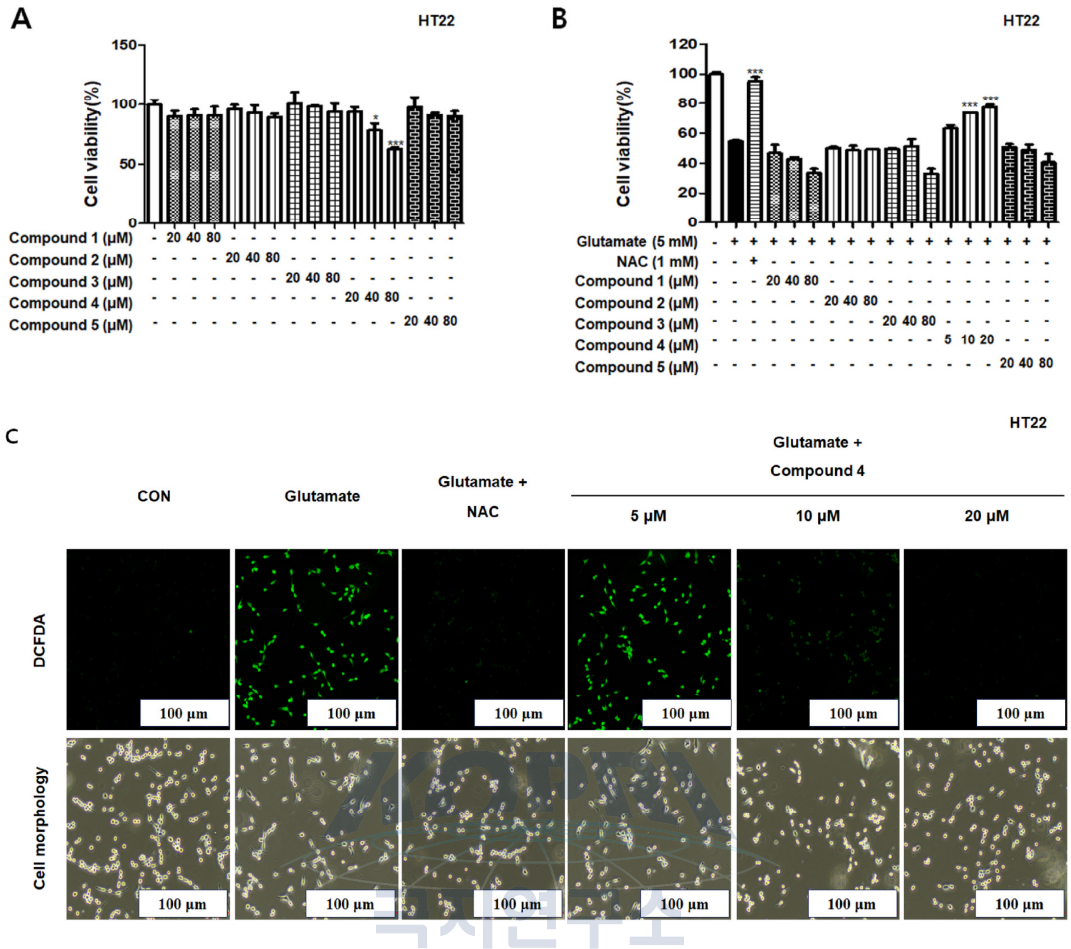
마. 고농도 글루타메이트로 HT22 세포 사멸 유도 후, 5가지 화합물로 세포 보호 능력을 MTT 방법으로 평가함

바. 5개 화합물의 세포보호 효능평가를 하기 전 HT22 세포에서 화합물의 세포독성을 MTT방법으로 평가함. 그 중 compound 4가 40μM에서 세포독성을 보여 최대 처리 농도를 20μM로 설정하였고 나머지 4개 화합물은 80μM로 설정하였음(그림 2-277A)

사. 글루타메이트 처리된 HT22 해마 세포 사멸이 compound 4를 처리한 그룹에서 유의미한 보호효과를 보였음(그림 2-277B)

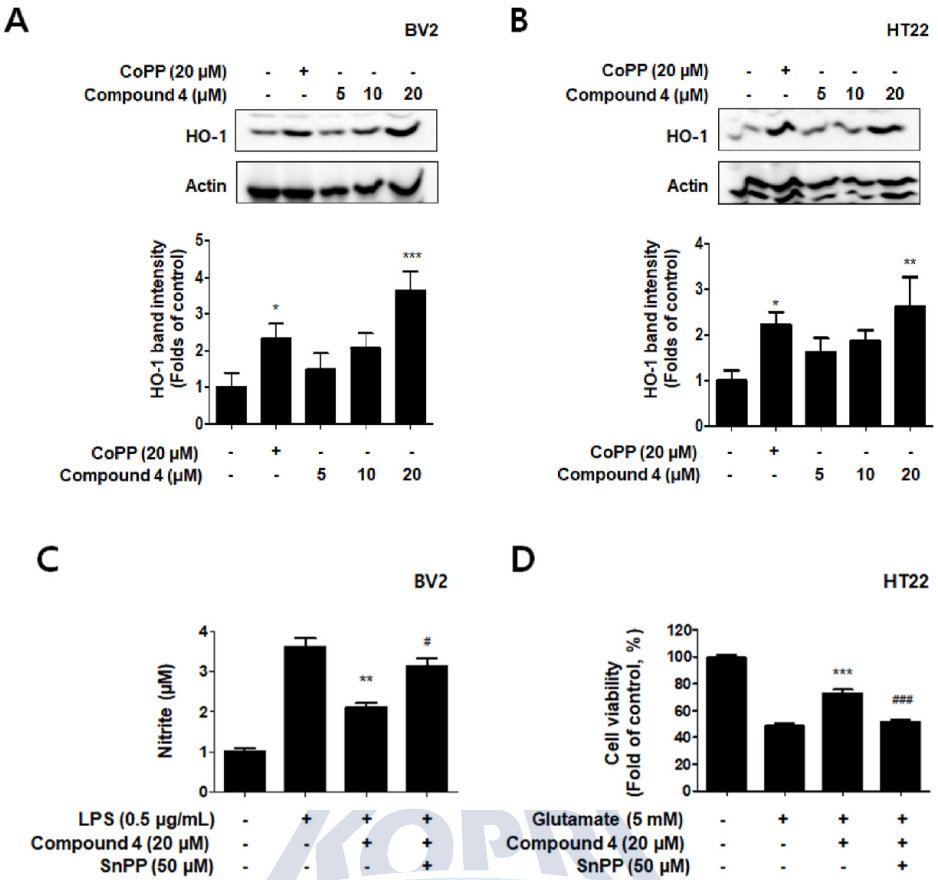
아. 또한 글루타메이트 처리에 의해 증가한 ROS 생성은 compound 4에 의해 억제되었음, 이는 compound 4의 글루타메이트 유도된 HT22 세포에서의 세포보호 효과는 산화 스트레스 억제에 의한 것임을 시사함(그림 2-277C)

KOPRI 극지연구소



[그림 2-277. Neuroprotective effect of compounds 1–5 on glutamate-induced HT22 hippocampal cells]

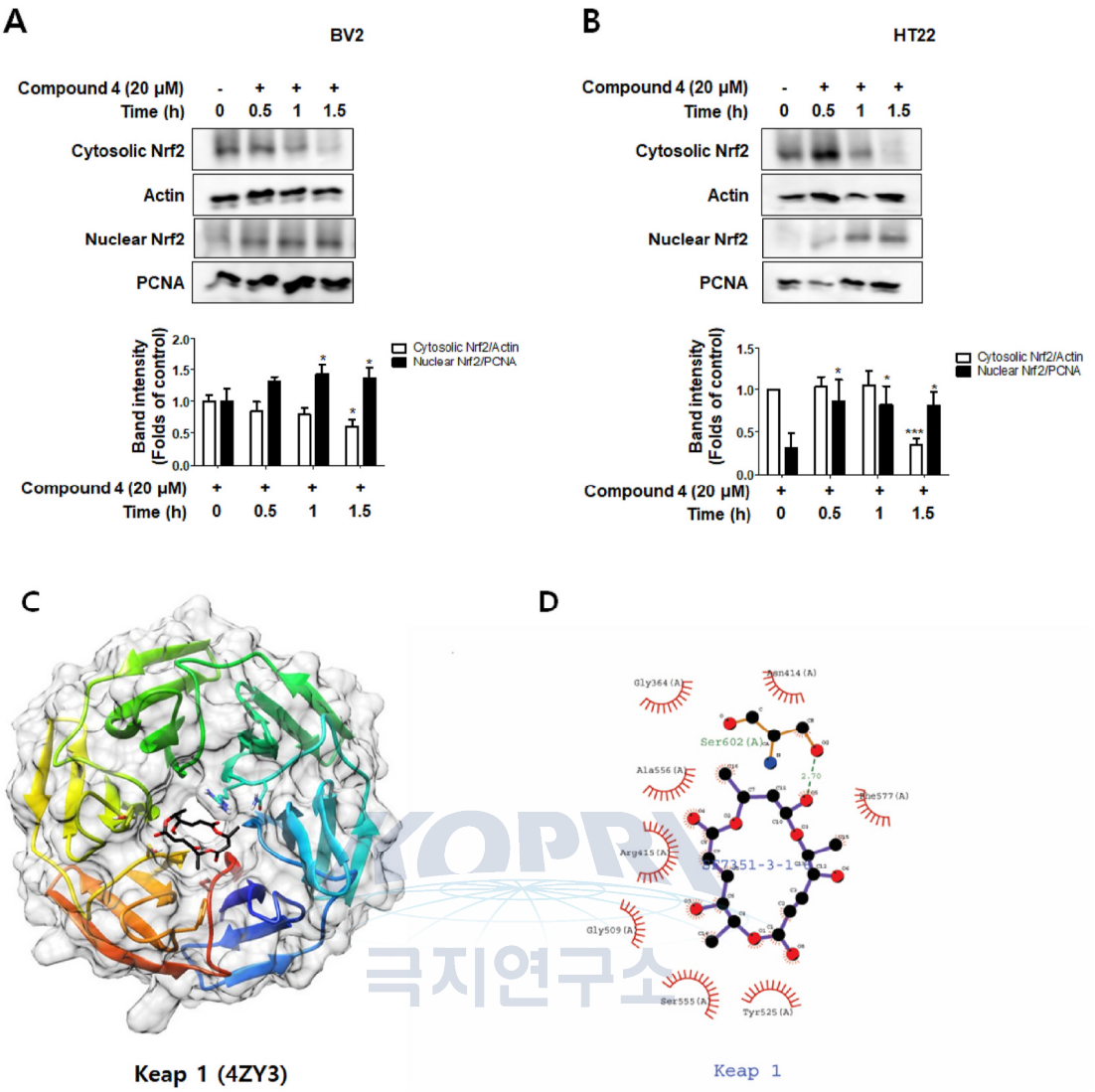
자. Compound 4가 HO-1 발현을 유도하여 BV2 미세아교세포에서의 염증억제와 HT22 해마세포 보호효과에 영향을 주는지 확인하기 위해 BV2 미세아교세포와 HT22 세포에 compound 4를 12시간 동안 처리함. 그 결과 compound 4 처리는 BV2 및 HT22 세포에서 HO-1 발현을 증가하며(그림 2-278A, 2-278B), HO-1 억제제인 SnPP를 사용한 실험에서 BV2세포에서 nitrite 억제효과와 HT22 세포보호효과가 사라짐을 확인함. 이를 통해 compound 4의 BV2 미세아교세포에서의 염증억제와 HT22 해마세포 보호효과는 HO-1 발현 기전을 통해 나타남을 알 수 있음(그림 2-278C, 2-278D)



[그림 2-278. Effect of compound 4 on heme oxygenase (HO)-1 protein expression in BV2 and HT22 cells]

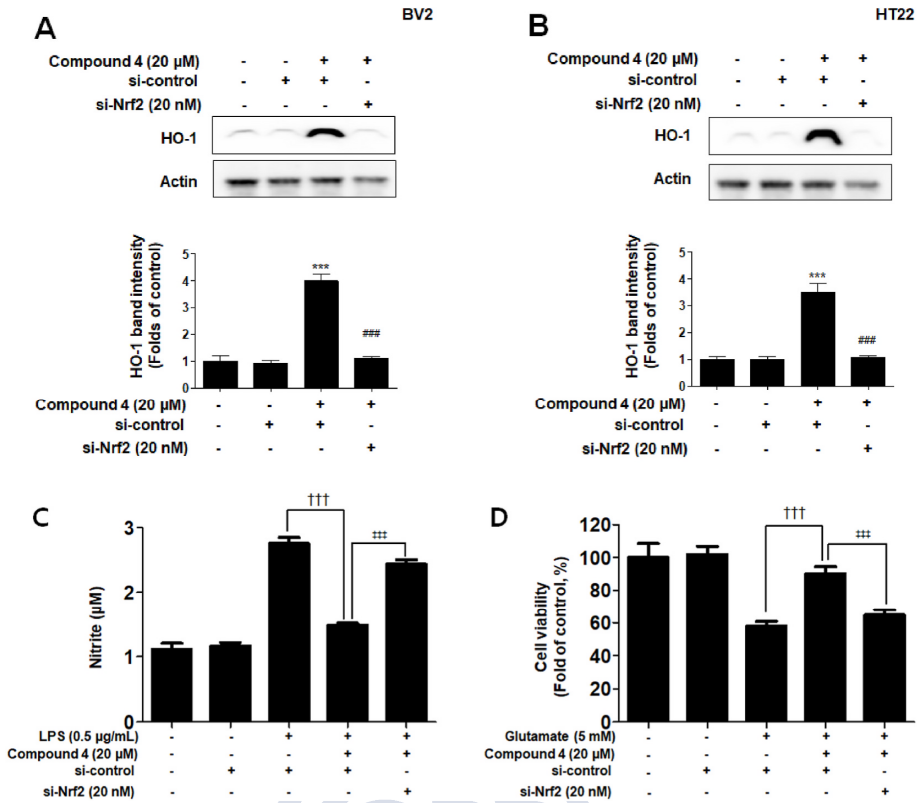
자. HO-1 단백질 발현을 조절하는 상위 기전인 Nrf2의 핵 내로 전사여부를 확인하기 위하여 BV2 및 HT22 세포를 compound 4로 처리한 후 웨스톤 블롯을 사용하여 실험을 하였음. 그 결과 compound 4는 Nrf2의 핵 내로 이동을 증가시킴을 확인함(그림 2-279A, 2-279B)

차. 또한, compound 4와 keap1 사이의 상호작용을 연구하기 위해 분자 도킹 시뮬레이션을 사용한 결과, compound 4는 Keap1 하위 단위(Arg415, Ala556 및 Phe577)의 드롭호빅 영역에 위치하며, Keap1의 Ser602 사이트와 수소 결합을 형성할 수 있다는 것을 확인함. 이러한 상호 작용은 compound 4가 Keap1-kelch 도메인에 결합하여 Nrf2의 발현을 유도함을 시사함(그림 2-279C, 2-279D)



[그림 2-279. Effect of compound 4 on nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) expression in BV2 and HT22 cells]

카. Nrf2가 compound 4의 BV2 및 HT22 세포에 주요한 역할을 하는 기전인지 확인하기 위해 Nrf2의 siRNA를 추가로 사용하여 실험을 진행함. 그 결과 compound 4에 의해 유도된 HO-1 발현이 si-Nrf2로 처리된 BV2 및 HT22 세포에서 억제됨(그림 2-280A, 2-180B), 또한, BV2세포에서 nitrite 억제효과와 HT22 세포보호효과가 si-Nrf2처리된 그룹에서 compound 4의 효과가 사라졌음(그림 2-280C, 2-280D). 이를 통해 compound 4의 효과는 Nrf2 경로의 조절과 밀접하게 관련이 있다는 것을 시사함



[그림 2-280. Role of Nrf2 activation in BV2 and HT22 cells treated with compound 4]

KOPRI
극지연구소

(나) 세부연구목표 2. 후보약물의 약물기작 (Mode of action, MOA) 규명

□ 연구내용 2-1. 라말린 작용기전 규명

○ 신경세포를 기반으로 하는 라말린의 작용기전 규명

1) 인간 신경모세포종 세포 (Human neuroblastoma cell line)인 SH-SY5Y와 쥐 1차 배양 신경세포(Mouse primary cultured neuron)에 라말린을 처리했을 때, BACE1 단백질의 발현량이 감소하는 것을 확인하였고(그림 2-281 A, B) 라말린 처리에 의한 BACE1 mRNA 발현량에는 차이가 없었음(그림 2-281C). BACE1 promoter에 luciferase를 연결한 construct를 제작하여 세포에 과발현시킨 후, 라말린에 의한 BACE1 promoter activity 조절을 확인했으나 라말린에 의한 BACE1 promoter activity에는 차이가 없었음(그림 2-281D-F)

2) 다음으로 라말린에 의한 BACE1 enzymatic activity 조절 여부를 확인하기 위해, fluorescence resonance energy transfer (FRET)을 이용한 실험을 진행함(그림 2-281G). 그 결과, 라말린에 의해 BACE1의 enzymatic activity가 유의하게 감소하는 것을 확인함(그림 2-281H)

3) 이를 종합했을 때, 라말린은 BACE1의 전사 단계가 아닌 BACE1 단백질의 발현량과 enzymatic 활성도를 조절하는 것으로 여겨짐

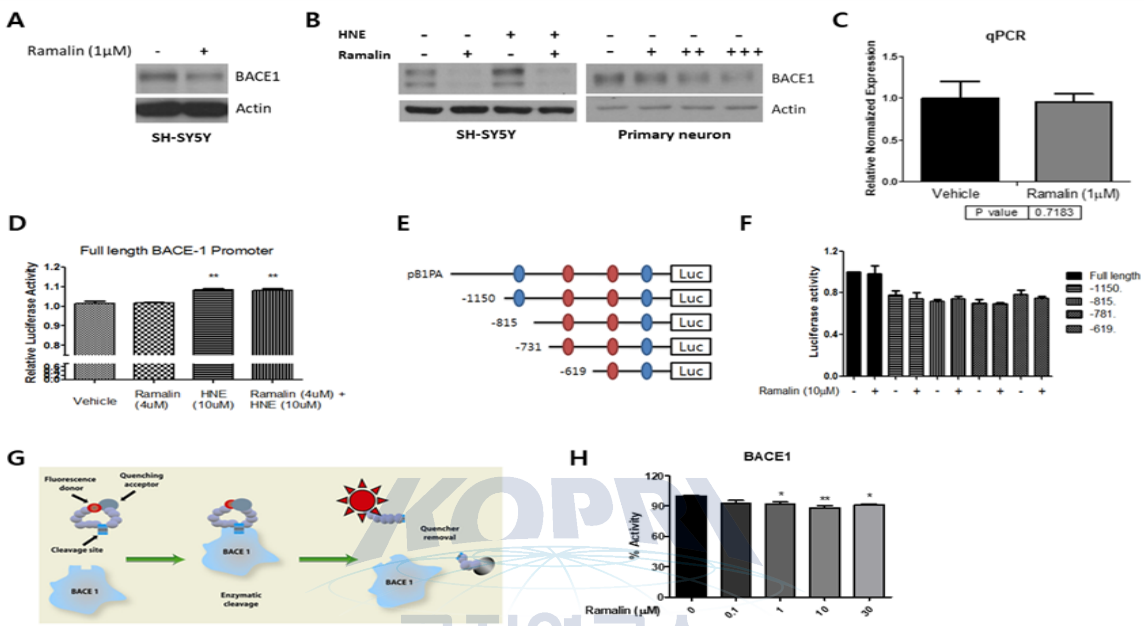
4) BACE1 조절 외 다른 기전을 찾기 위해 SH-SY5Y에 라말린을 농도별로 처리한 후 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) 단백질 발현량을 확인함(그림 2-282 A, B). BDNF는 뇌조직에서 발현하는 신경영양인자로서 신경세포 생존과 분화, 시냅스 전달 및 가소성 조절에 필수적인 역할을 함. 라말린을 처리한 군에서 BDNF 단백질 발현량이 증가했으며, SAHA (pan-HDAC inhibitor), Tubastatin A (Tub.A, HDAC6 inhibitor)를 처리한 군에서도 BDNF 단백질 발현량이 증가한 것을 확인함(그림 2-282A, B)

5) AD의 또 다른 병리학적 특징인 tau 단백질의 응집에 대한 라말린의 효과를 확인하기 위해 SH-SY5Y 세포에 VN-Tau와 VC-Tau를 과발현시켜 Tau-BiFC SH-SY5Y stable cell line을 만듦. Tau-BiFC SH-SY5Y 세포주에 라말린을 처리한 후 형광값을 측정한 결과, 라말린을 처리한 군에서 tau 단백질의 응집이 대조군 대비 유의하게 감소하는 것을 확인함(그림 2-282C)

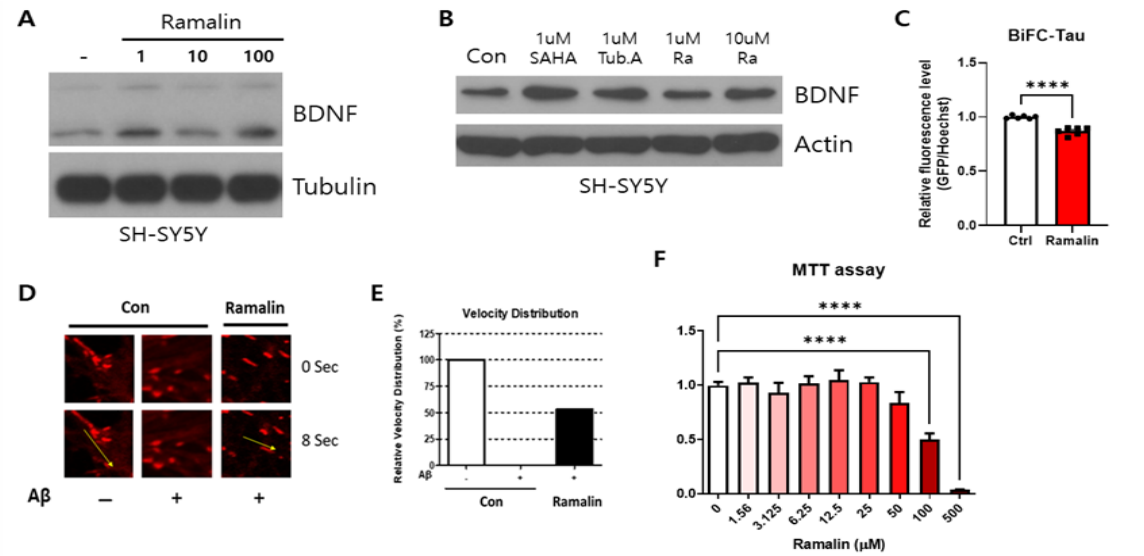
6) Mouse primary cultured neuron에서 라말린에 의해 미토콘드리아 수송이 조절되는지를 확인함. Mouse primary cultured neuron에 β-amyloid 올리고머를 처리했을 때 축삭을 통한 미토콘드리아의 수송이 현저히 떨어졌는데 이러한 현상이 라말린을 처리한 군에서 회복되는 것을 확인함(그림 2-282D, E)

7) 라말린의 세포독성을 확인하기 위해 SH-SY5Y에 라말린을 다양한 농도로 처리한 후 MTT assay를 진행함. 그 결과, 라말린을 100 μM 이상으로 처리했을 때 세포가 유의하게 죽는 것을 확인함(그림 2-282F)

8) 4)~7) 내용을 종합했을 때, 라말린은 세포독성이 없는 농도 범위에서 BDNF의 발현량을 증가시키고, tau 단백질의 응집을 저해하며, β-amyloid 올리고머에 의한 미토콘드리아 수송 저해를 회복시키는 것으로 보임



[그림 2-281. 라말린에 의한 신경세포에서의 BACE1 발현량 조절 확인]



[그림 2-282. 라말린에 의한 신경세포에서의 BDNF 발현량, Tau 응집, 미토콘드리아 수송 및 세포독성 측정]

○ 미세교세포를 기반으로 하는 라말린의 작용기전 규명

1) 쥐 미세교세포주 (Mouse microglial cell line)인 BV-2에 라말린을 처리한 후, LPS로 염증 반응을 유도함. LPS 처리에 의해 발현이 증가한 NLRP3, COX2가 라말린을 처리한 군에서 감소한 것을 확인함(그림 283A-C). 또한, Mouse primary cultured-microglia에 라말린을 처리하고 LPS와 nigericin을 처리하여 미세교세포를 활성화시켰을 때, 대조군에 비해 NLRP3, p-p65, Pro-IL-1β, IL-1β, Caspase1의 단백질 발현량이 감소한 것을 확인함(그림 2-283D). 그러나, 같은 조건에서 라말린에 의한 NLRP3와 IL-1β mRNA 발현량에는 차이가 없었음(그림 2-283E)

2) 인간 단핵구 세포주인 THP-1에 라말린을 처리한 후, LPS로 염증 반응을 유도하고 세포 배양액에서 TNF-α의 양을 ELISA로 확인함(그림 2-283F). LPS에 의하 증가한 TNF-α의 양이 라말린에 의해 감소하는 것을 확인함(그림 2-283F)

3) Mouse primary cultured-microglia에 라말린을 처리하고 LPS와 nigericin을 처리한 뒤, 세포 배양액에서 IL-1β의 양을 ELISA로 확인함. 그 결과, 유의한 차이는 없었으나 라말린을 처리한 군에서 IL-1β의 양이 감소하는 경향을 보임(그림 2-283G)

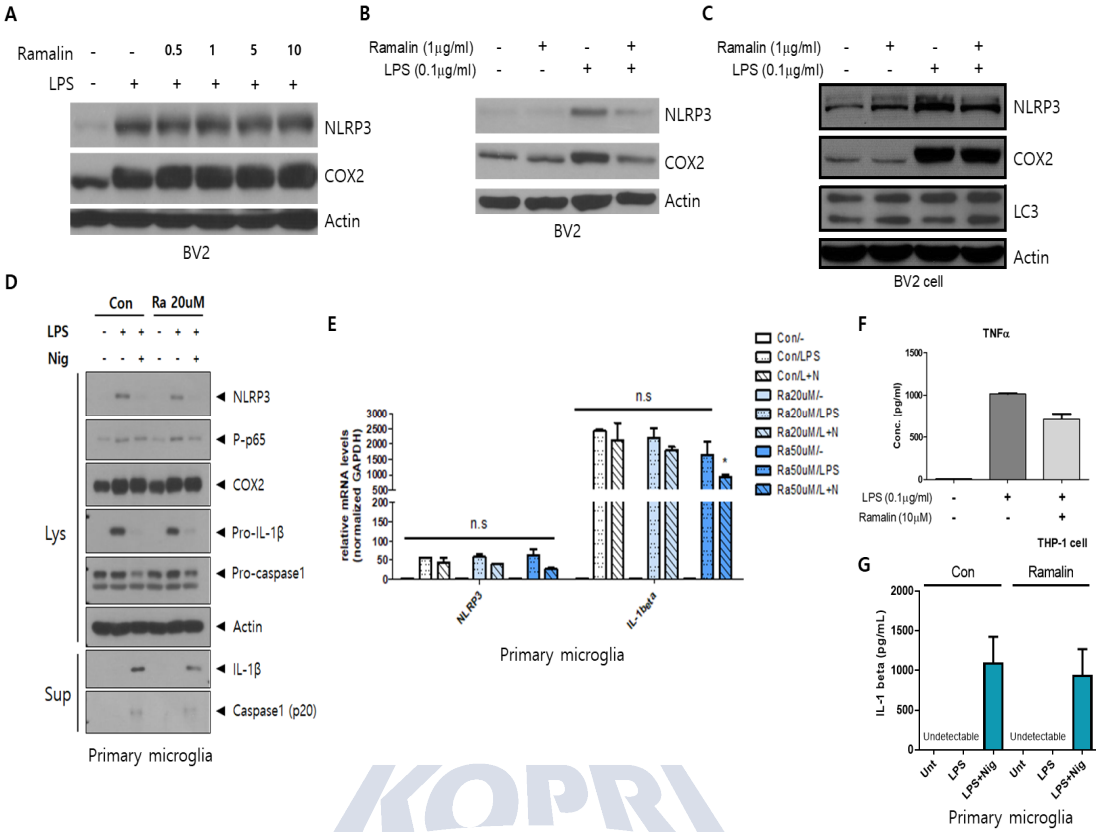
4) 위 내용을 종합했을 때, 라말린이 NLRP3, COX2, IL-1β, Caspase1 등 염증 인자들의 단백질 발현을 조절하는 것으로 보임

5) Mouse primary cultured-microglia에서 라말린에 의해 β-amyloid에 대한 식세포 작용이 조절되는 지를 확인함. Mouse primary cultured-microglia에 라말린을 처리한 후, TAMRA 형광 표지된 β-amyloid를 처리하고 배양액을 교체한 후 형광을 측정함. 그 결과, 라말린 처리에 의한 식세포작용에는 변화가 없었음(그림 2-284A, B)

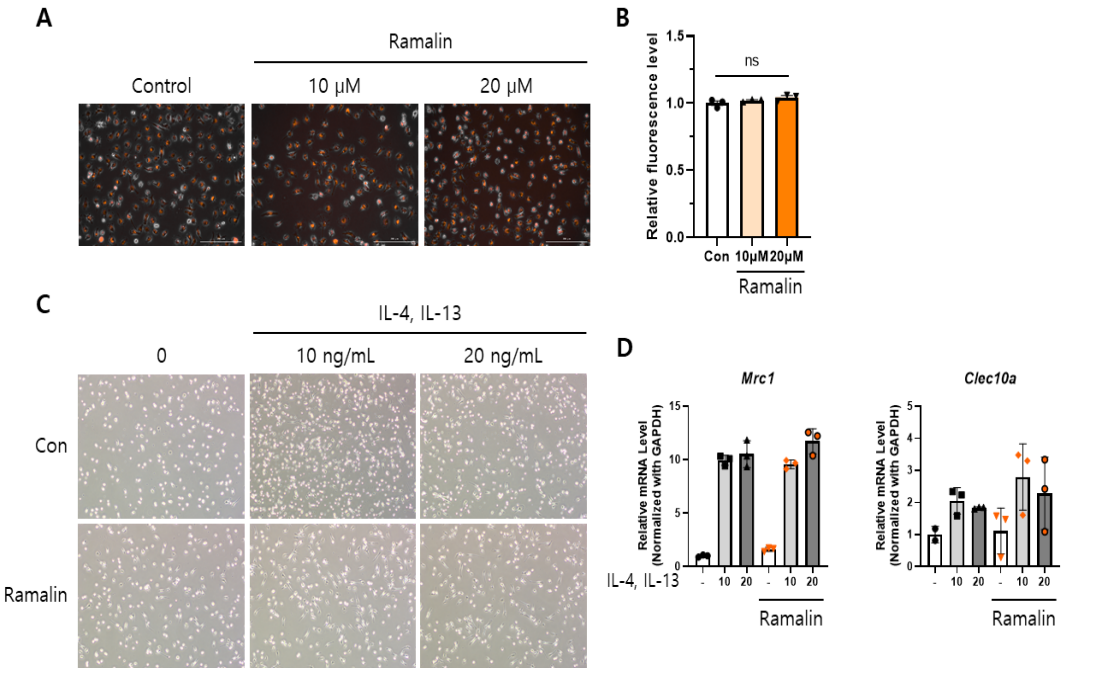
6) Mouse primary cultured-microglia에 라말린을 처리한 후, IL-4와 IL-13을 처리한 다음 세포에서 RNA를 추출함. 미세교세포 M2 마커인 Mrc1, Clec10a mRNA 발현량을 확인한 결과, 라말린을 처리한 군에서 Mrc1, Clec10a mRNA 발현량이 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었음(그림 2-284C, D)

7) (5)~(6)의 내용을 종합했을 때, 라말린이 미세교세포의 식세포작용이나 M1/M2 polarization에는 크게 관여하지 않는 것으로 보임

KOPRI 극지연구소



[그림 2-283. 미세교세포에서 라말린에 의한 항염증 효과 확인]



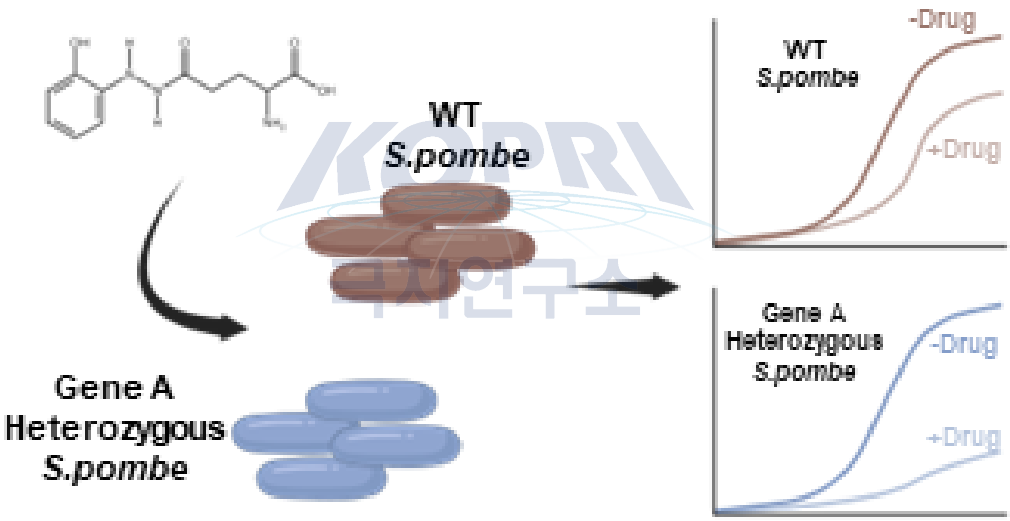
[그림 2-284. 미세교세포에서 라말린에 의한 식세포작용 및 M1/M2 polarization 확인]

□ 연구내용 2-2. 라말린 타겟 규명

○ 라말린의 타겟으로서 HDAC6의 역할 규명

1) 라말린의 타겟 단백질을 찾기 위해, GPScreen을 진행함. GPScreen은 분열효모 (*S.pombe*)의 게놈 적중 라이브러리를 lygkdu 효모 유전체 수준에서 약물의 작용점을 탐색하는 시스템임

2) 필수 유전자 1,276개를 대상으로 한 1차 GPScreen 단계에서는 모든 약물 작용점으로서의 가능성이 있는 후보 유전자들이 충분히 포함되도록 하기 위해 상위 10% (전체 144개) 수준의 유전자들을 selection함

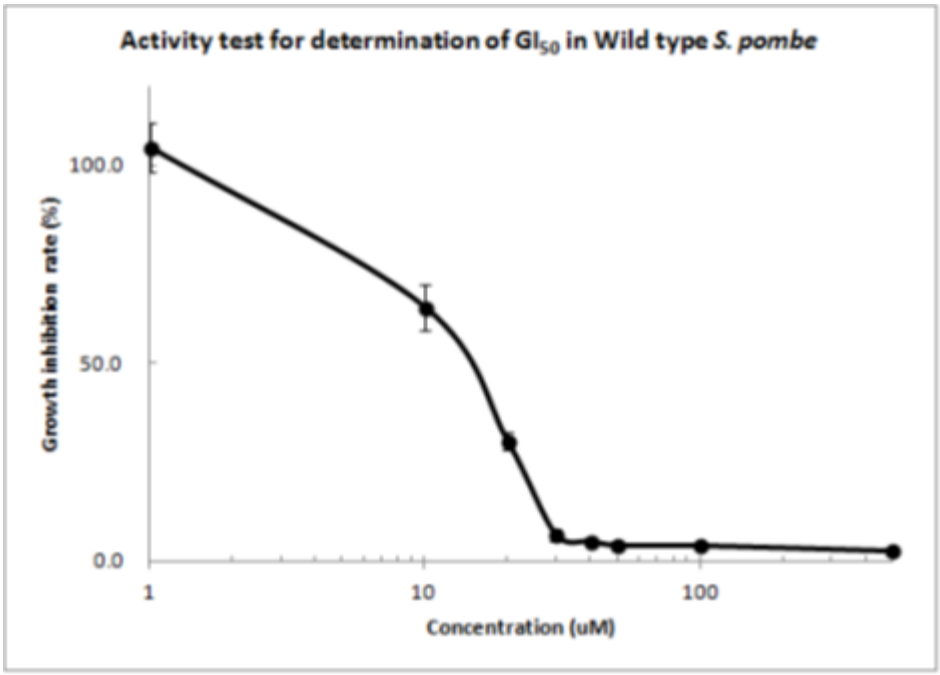


[그림 2-285. GPScreen 개요]

3) 라말린의 wild type *S.pombe*에 대한 GI_{50}을 설정하기 위한 실험을 진행함(그림 2-286, 287). GI_{50}은 15-20 μM 정도로 측정됨

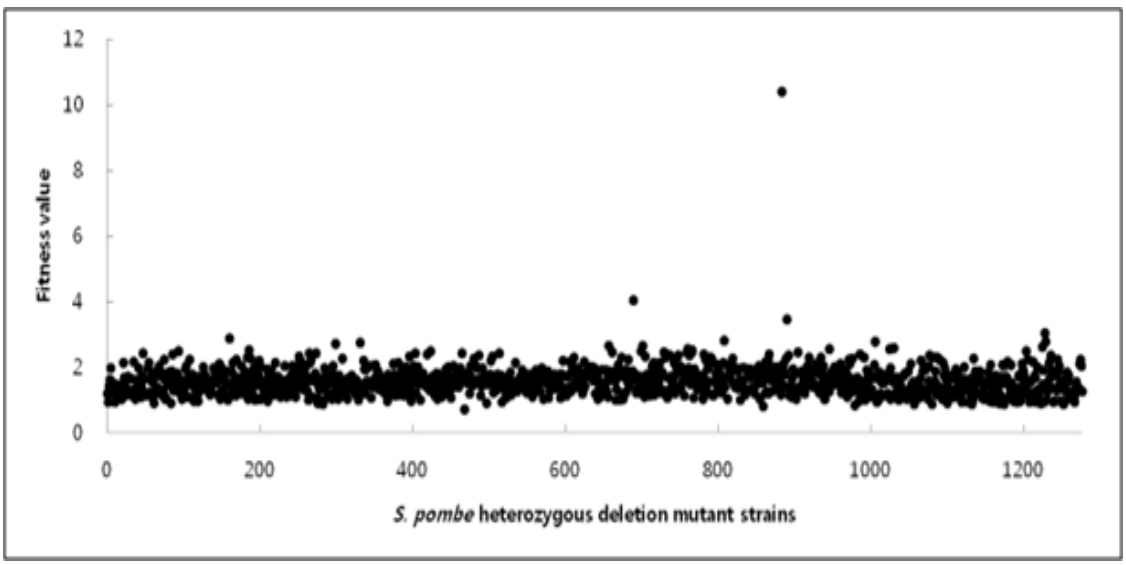
	concentration (uM)	0	1	10	20	30	40	50	100	500
Cell mass	Average (n=3)	0.2297	0.2404	0.1475	0.0697	0.0151	0.0113	0.0088	0.0086	0.0056
	STDEV (n=3)	0.0194	0.0141	0.0130	0.0048	0.0041	0.0021	0.0028	0.0009	0.0022
Cell mass (%)	Average (n=3)	100.00	104.66	64.19	30.34	6.56	4.93	3.85	3.76	2.42
	STDEV (n=3)	8.459	6.157	5.662	2.093	1.763	0.915	1.216	0.390	0.938

[그림 2-286. 활성 테스트 결과]



[그림 2-287. GI_{50} curve of ramalin in wild type *S.pombe*]

4) *S.pombe* essential gene deletion mutant library (1,276 mutants)로부터 잠재적인 약물 타겟 후보 유전자를 선정하기 위한 첫 번째 스크리닝을 진행함. GI_{50} 농도인 20μM의 농도의 라말린을 15시간동안 처리함. 많은 mutants에서 라말린에 의한 drug-induced haploinsufficiency (DIH)를 확인함. 해당 결과에서 상위 10%인 144개의 유전자들을 선정함



[그림 2-288. Essential genes GPScreen plot pattern]

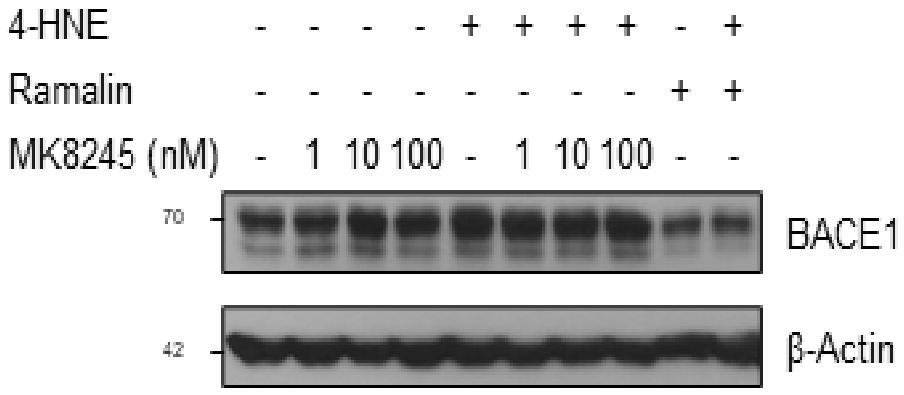
4) GPScreen 결과 라말린의 타겟 유전자로 예상되는 목록을 얻을 수 있었음(그림 2-289)

S. pombe Gene name	Human ortholog Ensembl ID	Human ortholog Gene name
-	ENSG00000099194	*SCD*
vps16	ENSG00000215305	*VPS16*
cwf15	ENSG00000150316	*CWC15*
-	ENSG00000135097 ENSG00000153944	*MSI1* *MSI2*
tif45	ENSG00000151247	*EIF4E*
clr6	ENSG00000116478 ENSG00000196591	*HDAC1* *HDAC2*
⋮	⋮	⋮

[그림 2-289. 예상되는 타겟 유전자 목록]

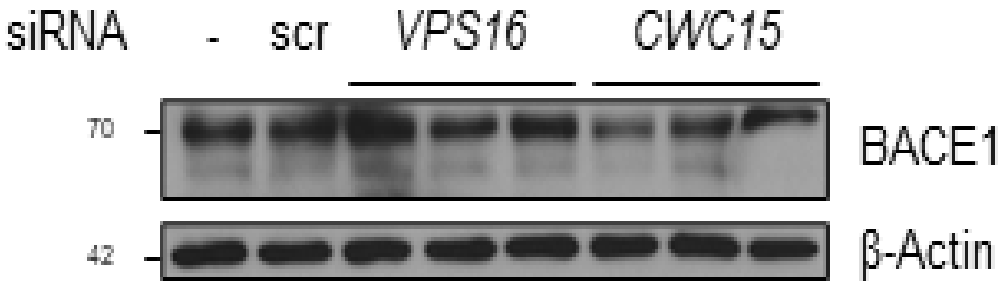
KOPRI 극지연구소

5) SCD inhibitor인 MK8245를 처리한 결과, BACE1의 발현량에는 차이가 없었음(그림 2-290)

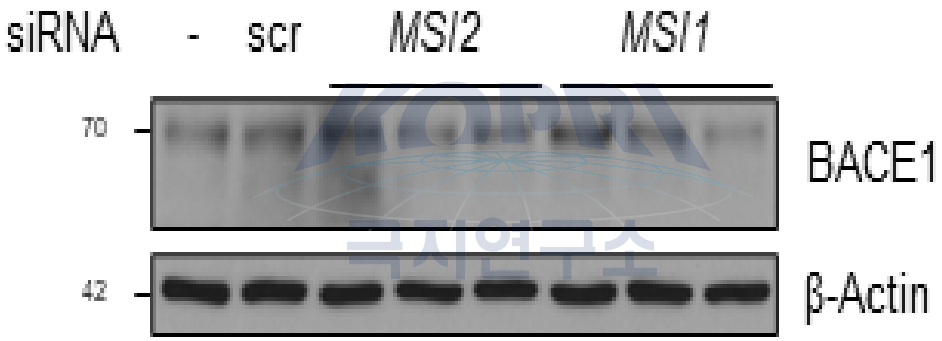


[그림 2-290. SCD inhibitor 처리 결과]

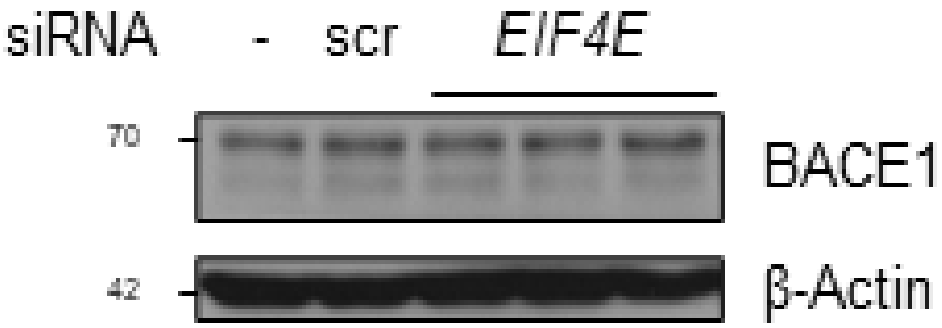
6) 또한, 다른 예상 유전자들인 VPS16, CWC15, MSI1, MSI2, EIF4E를 knock-down했을 경우에도 BACE1 단백질의 발현량에는 차이가 없었음(그림 2-291~293)



[그림 2-291. VPS16, CWC15 knock-down 결과]

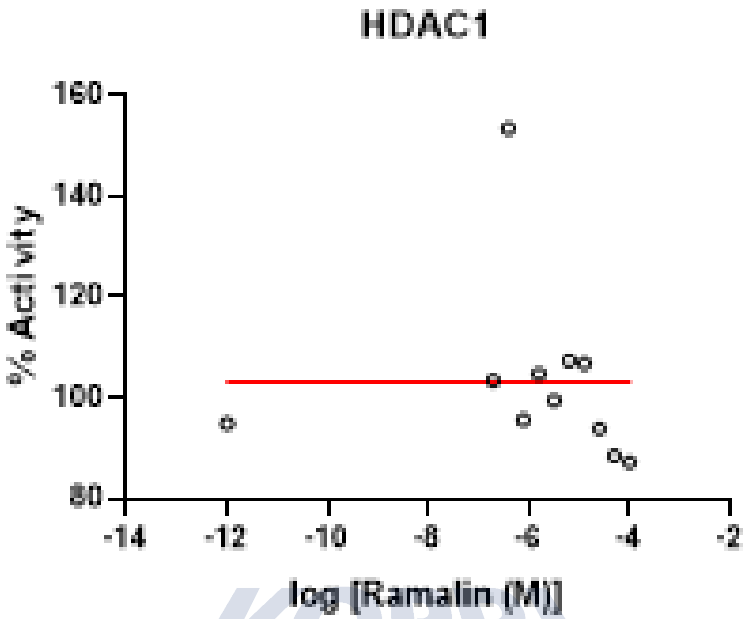


[그림 2-292. MSI knock-down 결과]



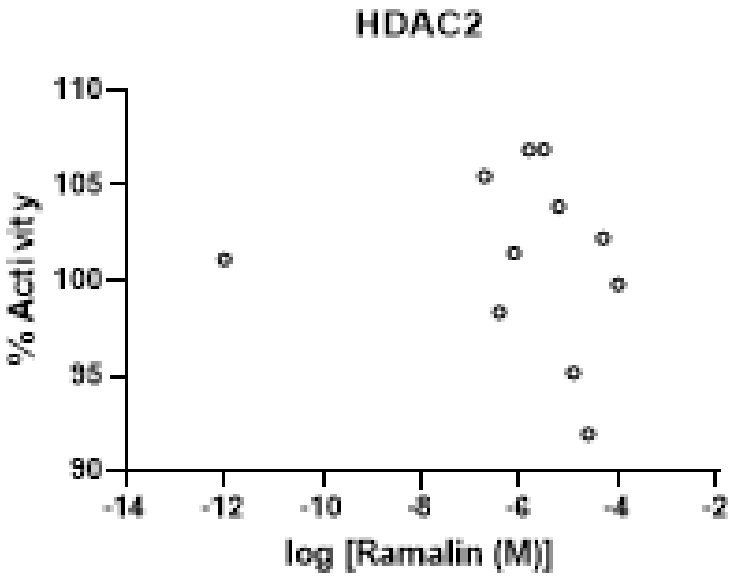
[그림 2-293. EIF4E knock-down 결과]

7) 라말린의 HDACs에 대한 inhibitory assay를 진행함(그림 2-294~305). 그 결과, HDAC6에 대한 IC_{50}값이 다른 HDACs에 비해 현저히 낮음을 확인함



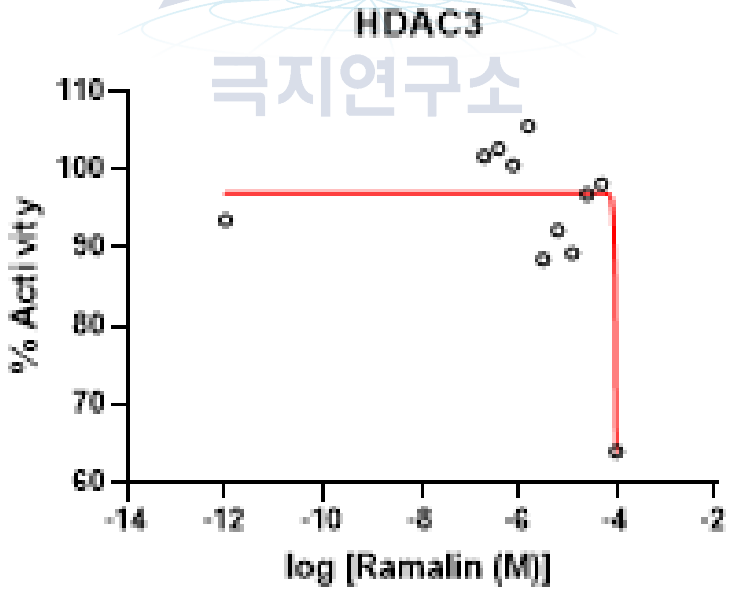
[그림 2-294. HDAC1 inhibitory assay]

KIOM 한의학연구소

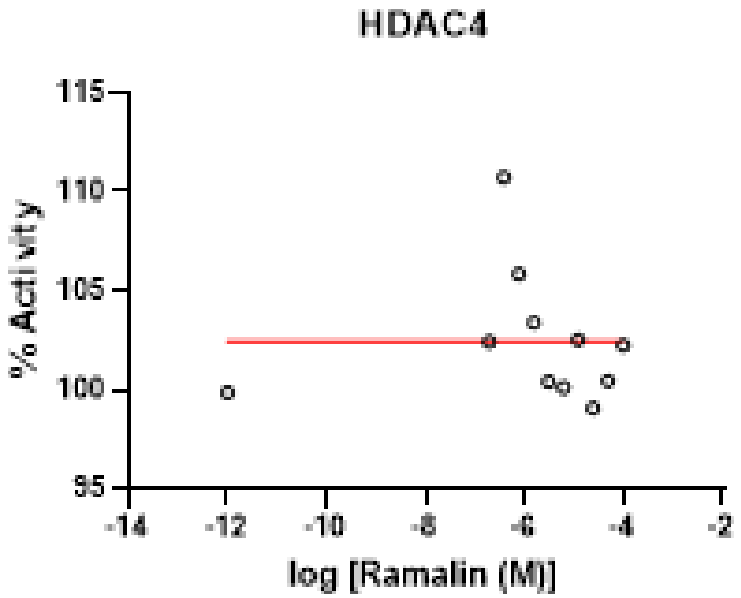


[그림 2-295. HDAC2 inhibitory assay]

KOPRI
극지연구소

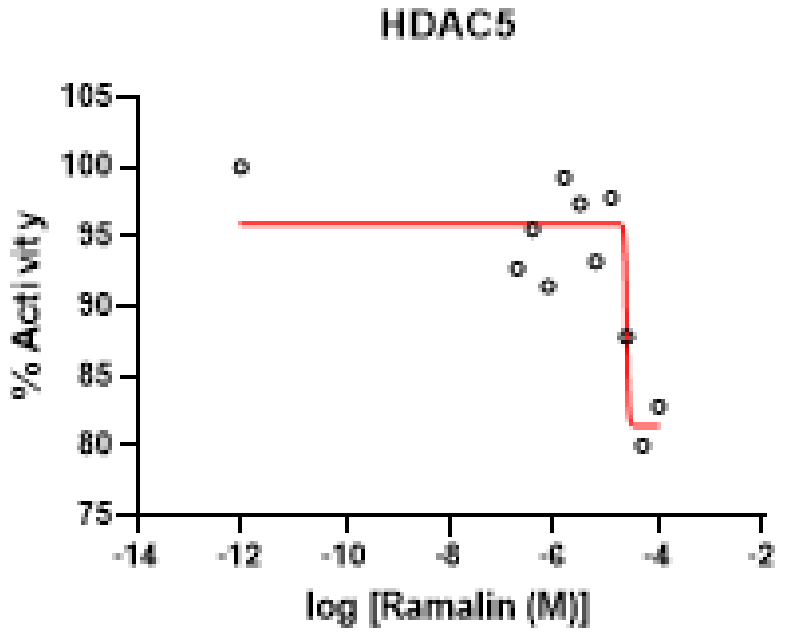


[그림 2-296. HDAC3 inhibitory assay]

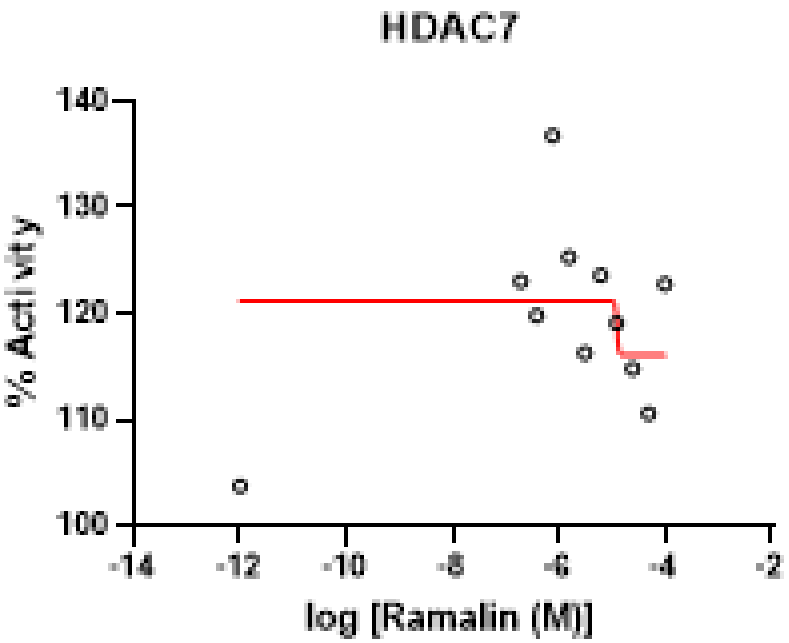


[그림 2-297. HDAC4 inhibitory assay]

KOPRI
극지연구소

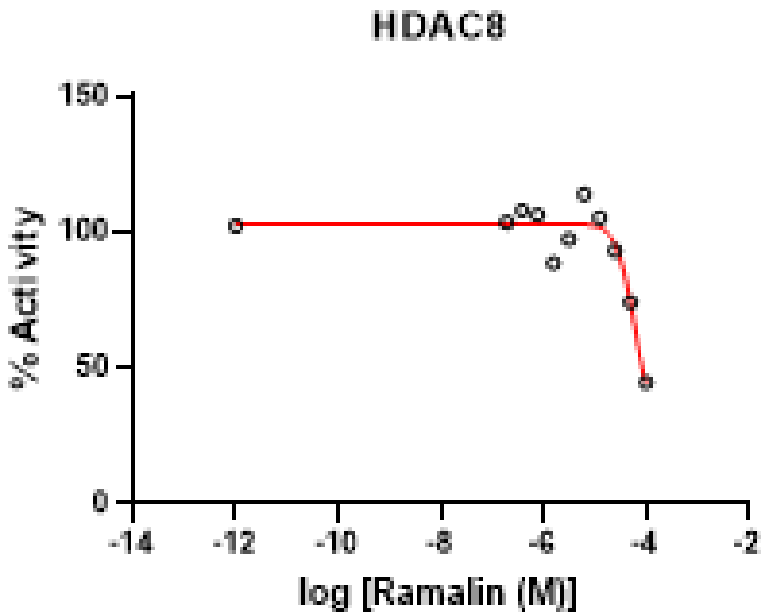


[그림 2-298. HDAC5 inhibitory assay]



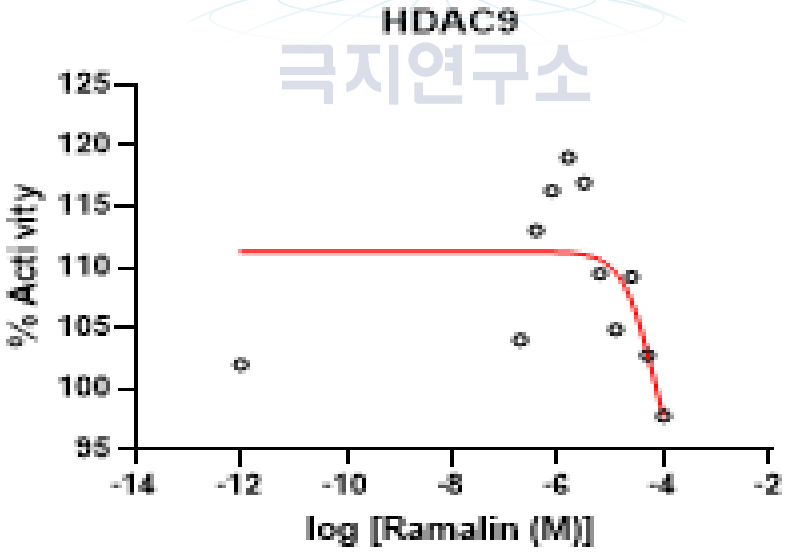
[그림 2-299. HDAC7 inhibitory assay]

KOPRI
극지연구소

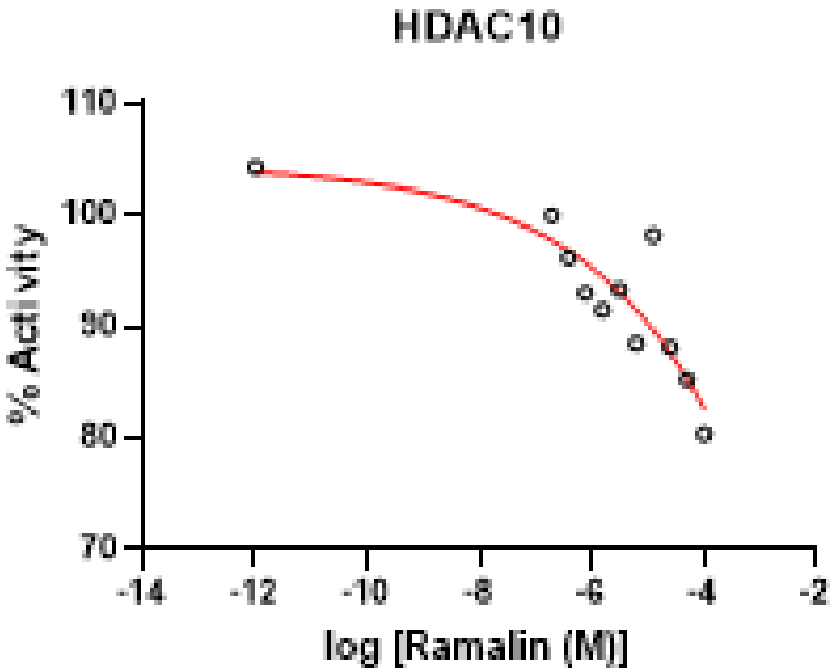


[그림 2-300. HDAC8 inhibitory assay]

KOPRI
극지연구소

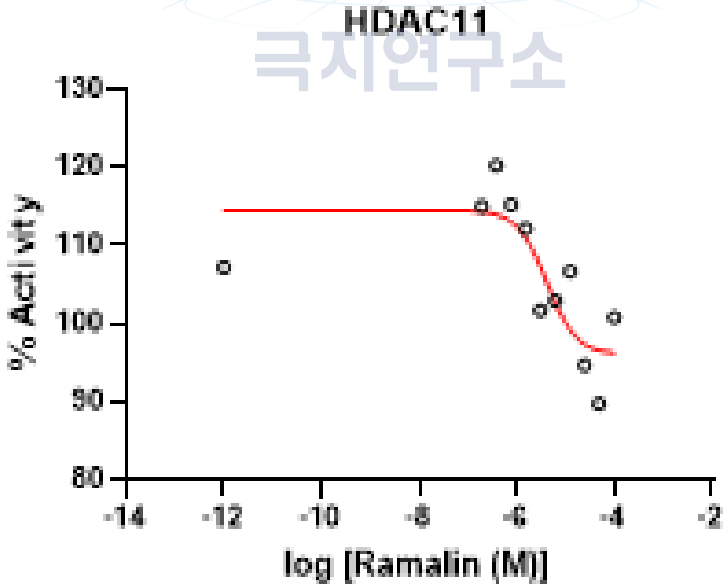


[그림 2-301. HDAC9 inhibitory assay]



[그림 2-302. HDAC10 inhibitory assay]

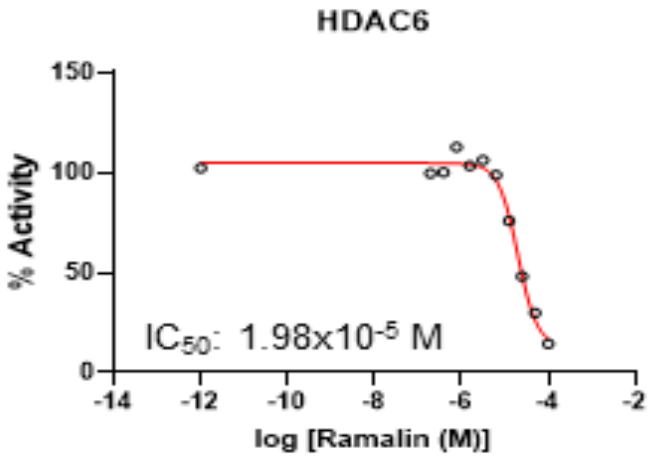
KOPRI
극지연구소



[그림 2-303. HDAC11 inhibitory assay]

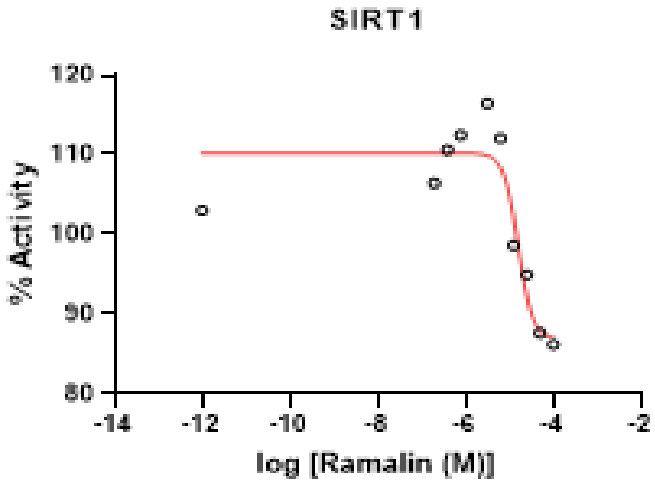
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5
IC_{50}	-	-	-	-	-
	HDAC7	**HDAC8**	**HDAC9**	**HDAC10**	**HDAC11**
IC_{50}	-	$5.75x10^{-5}$ M	$6.37x10^{-5}$ M	-	$4.23x10^{-5}$ M

[그림 2-304. HDACs IC_{50}]

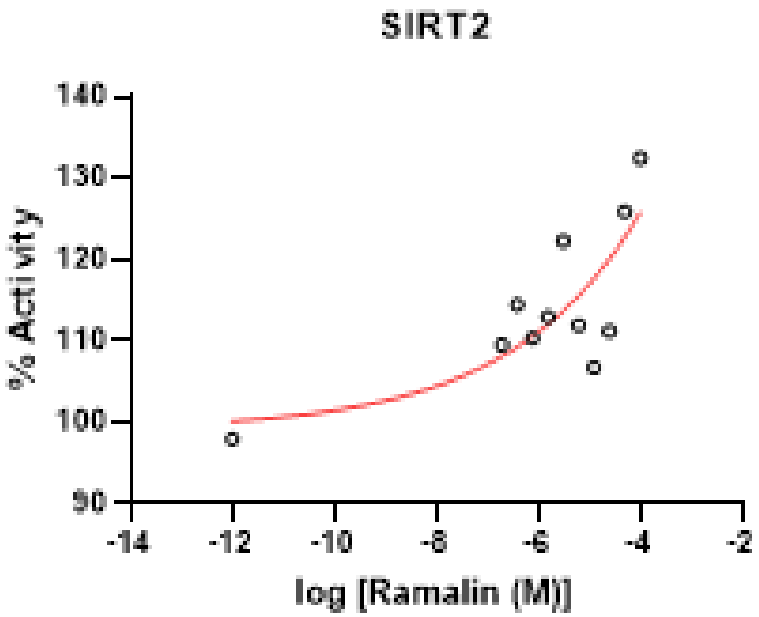


[그림 2-305. HDAC6 inhibitory assay]

8) NAD+ 의존적인 HDAC에 대한 inhibitory assay도 진행함(그림 2-306~310). 그 결과, 라말린이 SIRT1과 SIRT5도 inhibition하는 것을 확인함

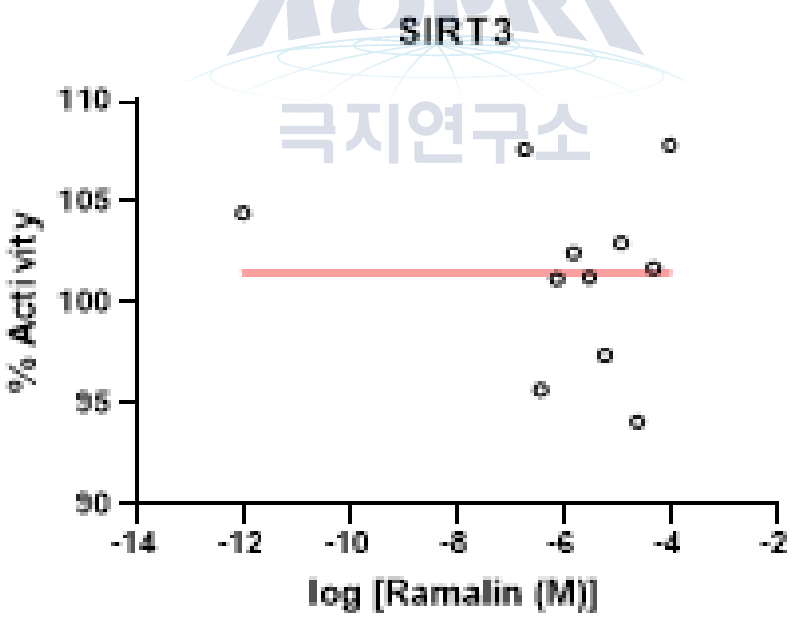


[그림 2-306. SIRT1 inhibitory assay]

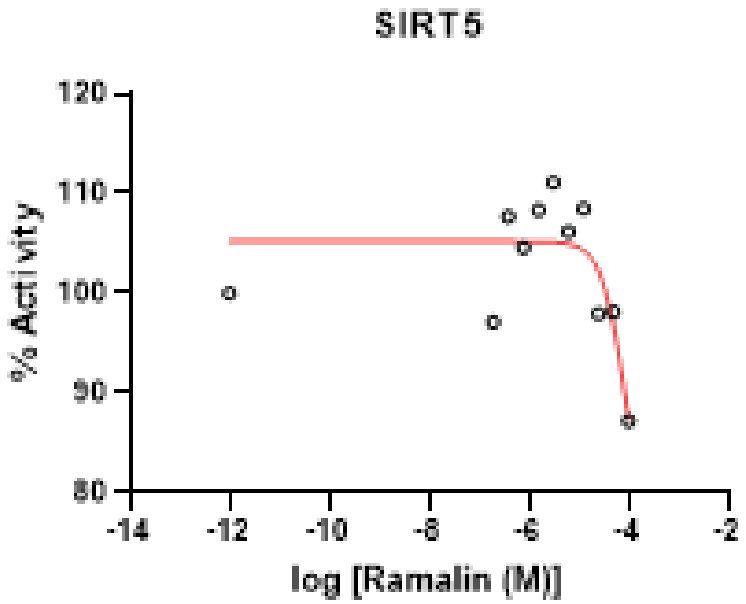


[그림 2-307. SIRT2 inhibitory assay]

KOPRI
극지연구소



[그림 2-308. SIRT3 inhibitory assay]



[그림 2-309. SIRT5 inhibitory assay]

	SIRT1	SIRT2	SIRT3	SIRT5
IC_{50}	$1.59x10^{-5}$ M	-	-	$8.32x10^{-5}$ M

KOPRI 극지연구소

[그림 2-310. SIRT inhibitory assay]

○ 신경세포를 기반으로 하는 라말린의 HDAC6 작용기전 규명

1) SH-SY5Y에서 HDAC6에 의해 BACE1 단백질 발현량이 조절되는지를 확인하기 위해 HDAC6를 과발현 또는 knock-down시킴. HDAC6를 과발현했을 경우, BACE1 단백질 발현량이 증가했으며, HDAC6를 knock-down한 경우에는 BACE1 단백질 발현량이 감소하는 것을 확인함(그림 2-311A, B). 그러나, HDAC6를 knock-down시켰을 때 *BACE1* mRNA의 발현량 차이는 없었음(그림 2-311C)

2) HDAC6가 BACE1 단백질의 안정성을 조절하는지를 확인함. MEF HDAC6 WT과 MEF HDAC6 knock-out 세포주에 단백질 합성 저해제인 cycloheximide를 처리한 후 0, 2, 4, 6, 8시간 뒤에 단백질을 확인함(그림 2-311D, E). MEF HDAC6 WT 세포주에서는 cycloheximide를 처리하고 6시간이 지난 뒤, BACE1 단백질 발현량이 절반 이하로 감소했으나, MEF HDAC6 knock-out 세포주에서는 cycloheximide를 처리하고 2시간이 지난 뒤, BACE1 단백질 발현량이 절반으로 감소함. MEF HDAC6 knock-out 세포주에 lentivirus로

HDAC6를 reconstitution시켰을 때, BACE1 단백질의 안정성이 증가하는 것을 확인함

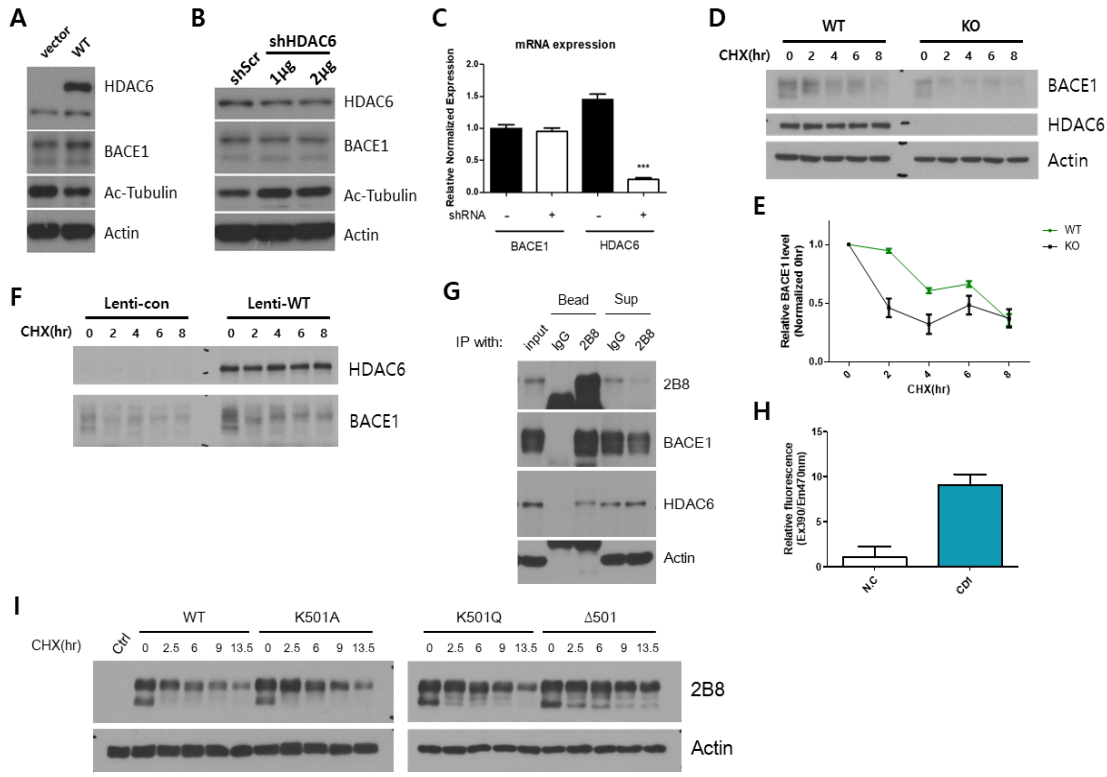
3) HDAC6가 BACE1에 직접적으로 binding하여 발현을 조절하는지 알아보기 위해 co-immunoprecipitation을 진행함. BACE1에 2B8 tag를 붙인 construct를 HEK293T 세포주에 과발현시킨 후, anti-2B8 항체를 이용하여 immunoprecipitation을 진행함. 그 결과, HDAC6가 BACE1과 직접적으로 binding하는 것을 확인함(그림 2-311G). 또한, HDAC6가 BACE1 lysine기의 아세틸기를 탈아세틸화시키는지를 확인하기 위해 BACE1 c-terminal peptide를 제작했으며, recombinant HDAC6 단백질과 incubation했을 때 BACE1 lysine기의 아세틸기가 떨어지는 것을 확인함(그림 2-1044H)

4) 또한, HDAC6가 BACE1 lysine기의 아세틸기를 탈아세틸화시키는지를 확인하기 위해 BACE1 c-terminal peptide를 제작했으며, recombinant HDAC6 단백질과 incubation했을 때 BACE1 lysine기의 아세틸기가 떨어지는 것을 확인함(그림 2-311H)

5) BACE1 C-terminal lysine기에 의해 BACE1 안정성이 조절되는지 확인하기 위해 BACE1 WT, K501A, K501Q, △501 construct를 HEK293T 세포에 과발현시킨 후 cycloheximide를 처리하고 BACE1 단백질 양을 확인함(그림 2-311I). BACE1 WT에 비해 C-terminal lysine이 alanine으로 치환되었을 때(K501A), BACE1의 안정성이 증가하는 것을 확인함. 또한 C-terminal lysine기가 없을 때 (△501), WT에 비해 BACE1의 안정성이 현저히 증가함

6) 이를 통해, BACE1의 C-terminal lysine기가 BACE1 단백질 안정성 조절에 매우 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있음. 따라서, HDAC6가 BACE1에 직접적으로 binding하여 단백질 안정성을 조절하는 것을 확인함

KOPRI 극지연구소

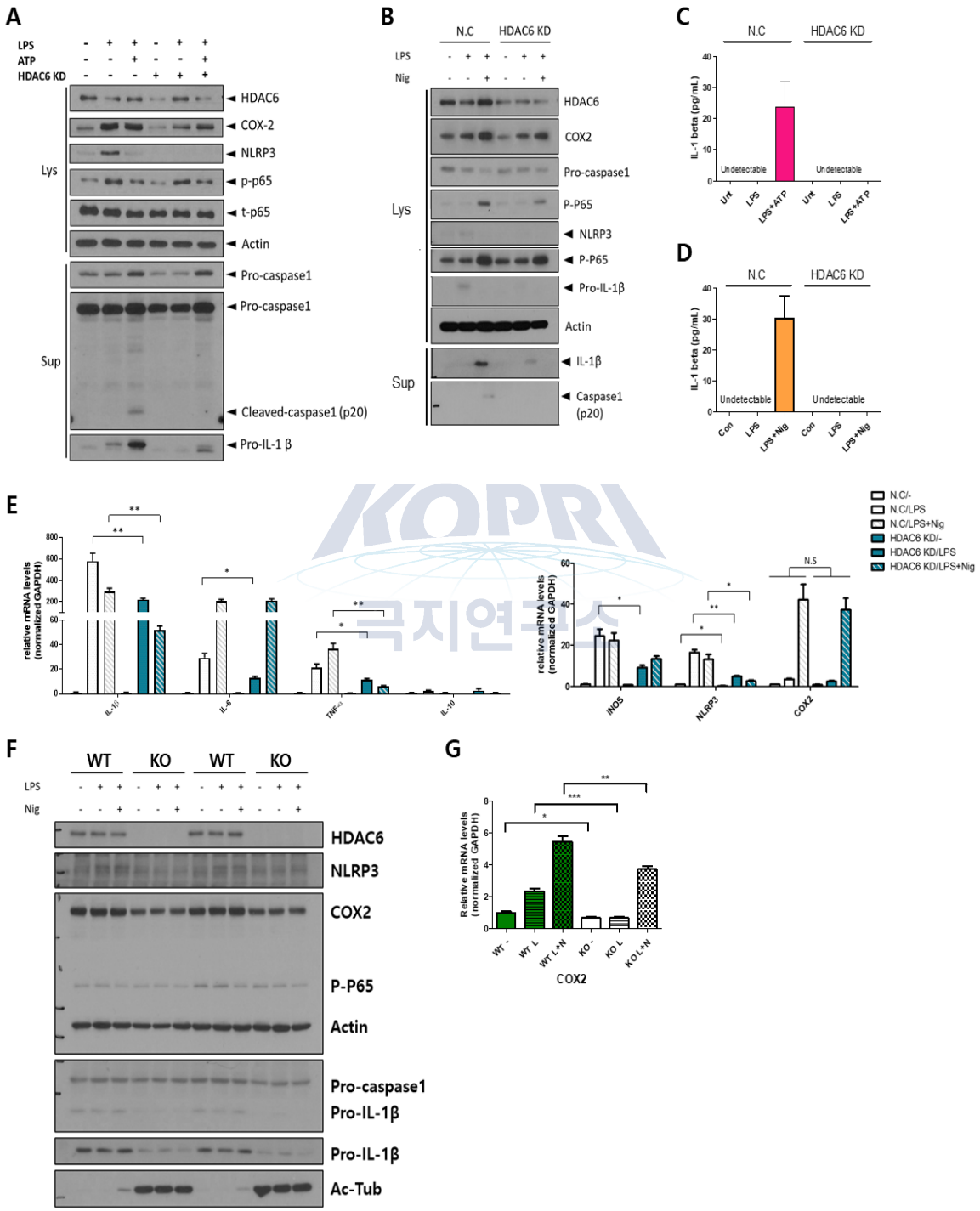


[그림 2-311. 신경세포에서 HDAC6의 BACE1 발현량 조절 확인]

5) Mouse primary cultured-microglia에서 HDAC6에 의해 염증인자들의 발현량이 조절되는지 확인하기 위해 HDAC6를 knock-down시킴. 세포에 LPS 1 μg/mL, ATP 5 mM을 차례로 처리한 후 세포 lysate 및 세포 배양액을 샘플링함(그림 2-312A, C). HDAC6가 knock-down 되어있는 세포에서 LPS, ATP에 의한 염증인자 단백질 발현의 증가 정도가 감소됨. 또한, NLRP3 inflammasome 활성화에 따른 IL-1β의 활성화 및 세포배양액으로의 분비량이 감소된 것을 Western blot 및 ELISA로 확인함

6) 세포에 LPS 0.2 μg/mL, Nigericin 20 μM을 차례로 처리하여 세포의 염증반응 및 NLRP3 inflammasome을 활성화시킴(그림 2-312B, D, E). 앞선 결과와 마찬가지로, HDAC6가 knock-down 되어있는 세포에서 LPS, nigericin에 의한 염증반응 활성 정도가 감소되고, NLRP3 inflammasome 활성화에 따른 활성 IL-1β의 분비량이 감소된 것을 확인함(그림 2-312B, D). HDAC6 발현량 감소에 따른 염증인자의 mRNA 발현량을 대조군과 비교함(그림 2-312E). HDAC6 발현이 감소되었을 때 모든 조건에서 NLRP3의 mRNA 발현량이 감소하였고, IL-1β와 TNF-α는 LPS 및 nigericin으로 염증반응을 유도했을 때 HDAC6 knock-down 세포에서 발현량이 감소함. IL-6와 iNOS는 LPS로 염증반응을 유도한 조건에서만 HDAC6 knock-down 세포에서 mRNA 발현량이 감소하였으며, IL-10과 COX2의 mRNA 발현량은 HDAC6 knock-down에 의한 차이가 없었음

7) MEF HDAC6 WT과 MEF HDAC6 KO 세포주에서 염증인자의 발현량을 비교함(그림 2-312F, G). MEF HDAC6 KO 세포에서 NLRP3, COX2, p-p65, pro-IL-1β의 단백질 발현량이 현저히 감소하였으며, COX2 mRNA 발현량이 유의미하게 감소함. 따라서, HDAC6의 발현량이 감소할 경우, 염증인자의 mRNA 및 단백질 발현량이 현저히 감소하며, NLRP3 inflammasome 활성화도 감소하는 것을 확인함



[그림 2-312. 미세교세포에서 HDAC6의 염증반응 조절 확인]

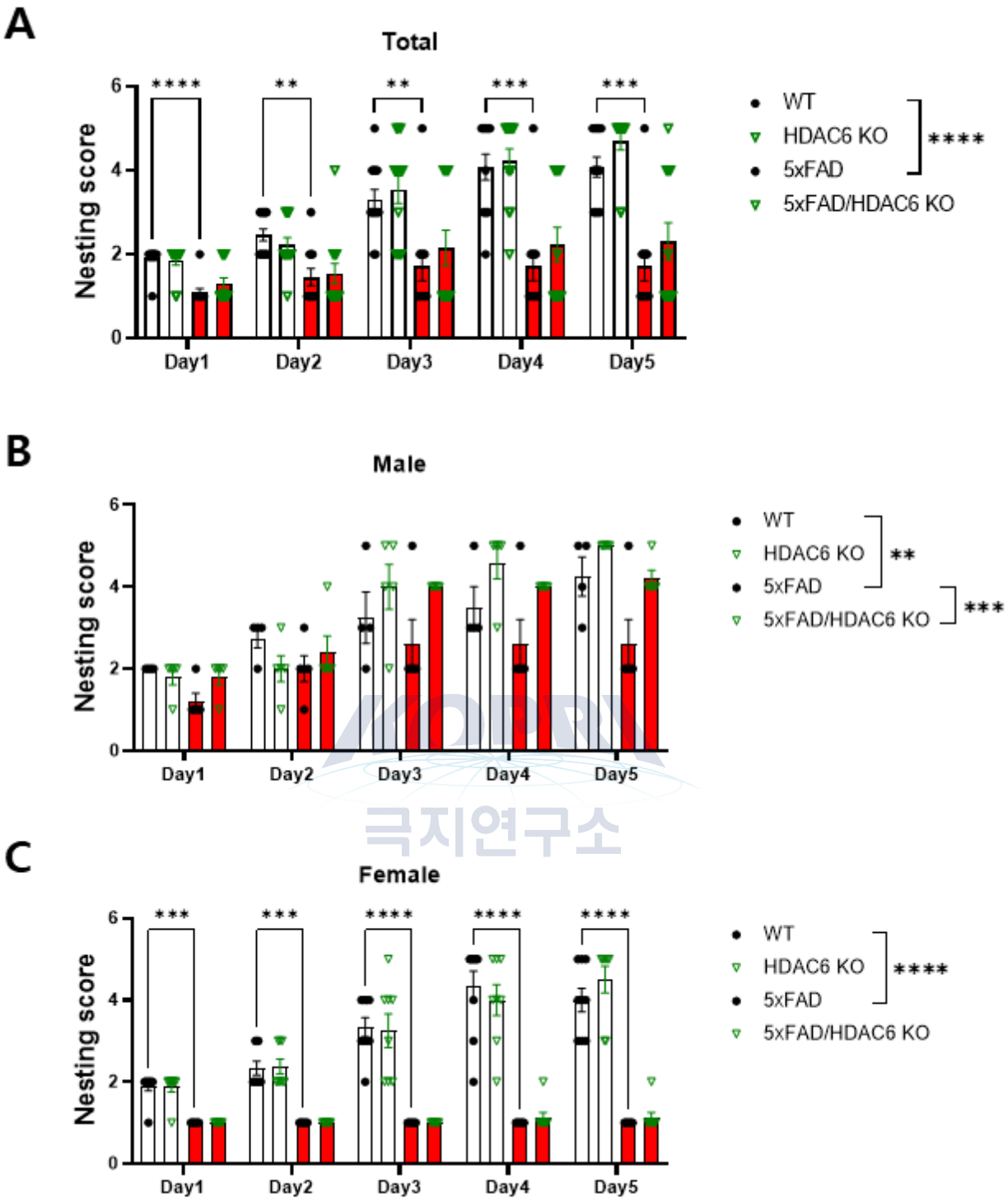
○ 알츠하이머 치매 동물모델에서의 HDAC6 역할 규명

1) HDAC6 knock-out 마우스와 알츠하이머 치매 5xFAD 마우스를 교배하여, 알츠하이머 치매 동물모델에서 HDAC6의 역할을 확인함. 행동실험은 9개월령일 때 시작했으며, nest building test, open field test, Morris water maze test, Y-maze test, passive avoidance test, elevated plus maze test를 진행함. 행동실험이 끝난 후 10개월령에 sacrifice하였으며, 좌반구 대뇌로부터 단백질과 RNA를 샘플링함

2) 각각의 케이지에 Diamond nest를 1개씩 넣어주고 5일 동안 nest 형성 정도를 확인함. Apathy (무감각증) 증상은 알츠하이머 치매에서 가장 일반적인 신경정신학적 증상임. Nest building test는 마우스에서 Apathetic-like behavior를 평가하는 행동실험으로, WT 마우스가 알츠하이머 치매 마우스에 비해 Nest를 더 잘 형성하려는 습성을 이용함. Diamond nest를 넣어준 다음 날부터 WT 마우스와 5xFAD 마우스 간에 유의미한 차이를 보임(그림 2-313). 시간이 지날수록 WT 마우스와 5xFAD 마우스 사이의 nesting 점수 격차가 더욱 벌어졌으며, 5일 동안 WT와 5xFAD의 nesting 점수에 유의미한 차이가 있었음(그림 2-313A)

3) 암수를 나누어 분석했을 때, 수컷의 경우 5xFAD에서 감소했던 nesting 점수가 5xFAD/HDAC6 KO 그룹에서 유의미하게 증가하는 것을 관찰함(그림 2-313B). 반면, 암컷의 경우 5xFAD와 WT간에 nesting 점수 차이가 극명했지만, 5xFAD와 5xFAD/HDAC6 KO 그룹 간에 차이가 없었음(그림 2-313C). 이를 통해, 수컷에서만 치매 마우스에서 HDAC6가 knock-out 됐을 때 welfare가 회복되는 것을 확인함

KOREA 극지연구소



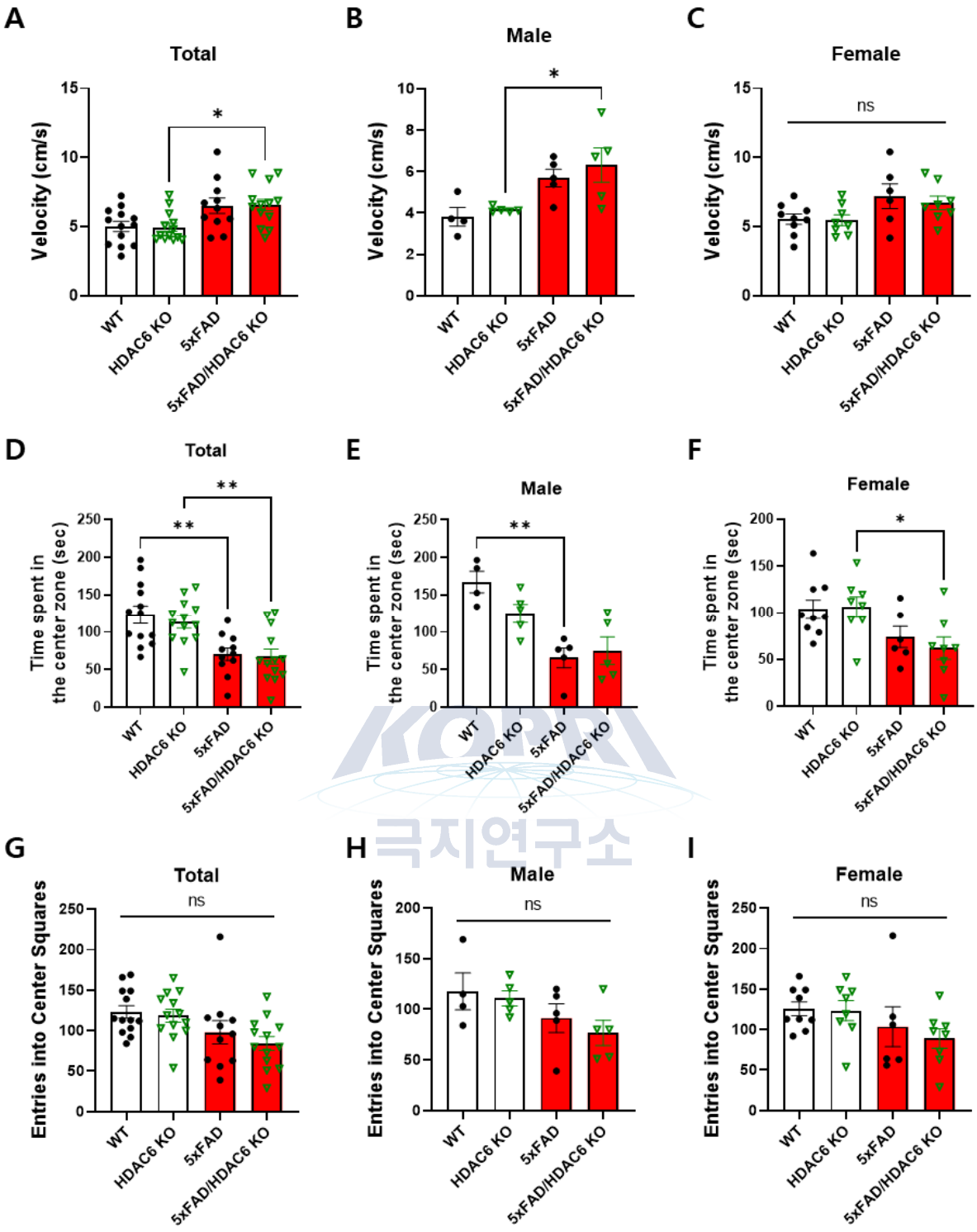
[그림 2-313. 5xFAD/HDAC6 KO 마우스의 Nest building test 점수]

4) 두 번째로, 가로와 세로 길이가 30 cm인 상자 안에서 open field test를 10분 동안 진행함(그림 2-314). Open field test는 마우스를 정육면체 maze의 가운데에 넣은 후 움직임을 측정하는 간단한 행동실험으로, 마우스의 행동성과 탐험을 하려는 의지를 측정하는 실험임. 일반적으로 WT 마우스보다 알츠하이머 치매 마우스에서 더 불안함을 느껴 행동성이 감소하고, maze의 벽에 가깝게 머무르려는 성향이 강함. 각 그룹의 이동속도를 비교했을 때, 5xFAD/HDAC6 KO 마우스 그룹이 HDAC6 KO 마우스 그룹보다 유의미하게 이동속도가 빨랐음(그림 2-314A). 특히 이러한 속도 차이는 수컷에서 두드러지게 나타남(그림 2-314B). 반면, 암컷에서는 그룹 간에 유의미한 이동속도 차이는 없었음(그림 2-314C)

5) Center zone에 머무르는 시간을 비교했을 때, 알츠하이머 치매 마우스가 대조군에 비해 center zone에 머무르는 시간이 유의미하게 감소하는 것을 확인함(그림 2-314D). 수컷의 경우, 5xFAD가 WT에 비해 center zone에 머무르는 시간이 유의미하게 감소했지만, HDAC6가 knock-out 된 경우 유의미한 차이가 없었음(그림 2-314E). 반면 암컷의 경우, WT와 5xFAD 그룹 간에 유의미한 차이가 없었지만, HDAC6가 knock-out 된 경우 차이가 더욱 심해짐(그림 2-314F)

6) Center zone에 들어가는 횟수를 비교했을 때 그룹 간에 유의미한 차이가 없었음(그림 2-314G-I). 따라서, 알츠하이머 치매 마우스의 경우 대조군에 비해 탐험하려는 의지가 감소하고 anxiety가 증가하는 것을 확인함. 또한, 수컷의 경우 HDAC6가 knock-out 됐을 때 anxiety 차이가 감소하지만, 암컷의 경우 anxiety 차이가 증가하는 것을 확인함

KOBRA
극지연구소



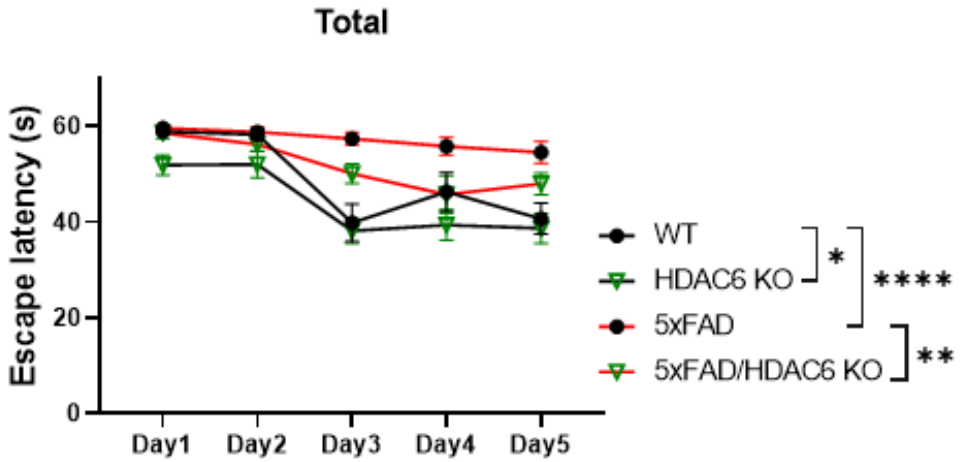
[그림 2-314. 5xFAD/HDAC6 KO 마우스의 Open field test]

7) Morris water maze test를 하루에 3번 1분씩 trial, 5일간 training을 진행함(그림 2-315~323). Morris water maze test는 마우스의 공간지각 능력과 기억력을 평가하는 실험으로, 원형의 수조에 마우스를 놓고 제한 시간 동안 플랫폼의 위치를 주변 시각적 힌트를 이용해 찾는 실험임. Trial이 반복될수록 알츠하이머 치매 마우스의 경우 WT 마우스보다 플랫폼을 찾는 학습 시간이 느림. Training 기간 동안 플랫폼을 찾아가는 데 걸리는 시간을 비교했을 때, 5xFAD 알츠하이머 치매 그룹이 WT 그룹에 비해 유의미하게 찾는 속도가 느렸음. 그러나 알츠하이머 치매 그룹에서 HDAC6가 knock-out 되었을 때 플랫폼을 찾는 속도가 유의미하게 증가하는 것을 확인함. 또한, WT에 비해 HDAC6 KO 그룹이 플랫폼을 더 빨리 찾았음

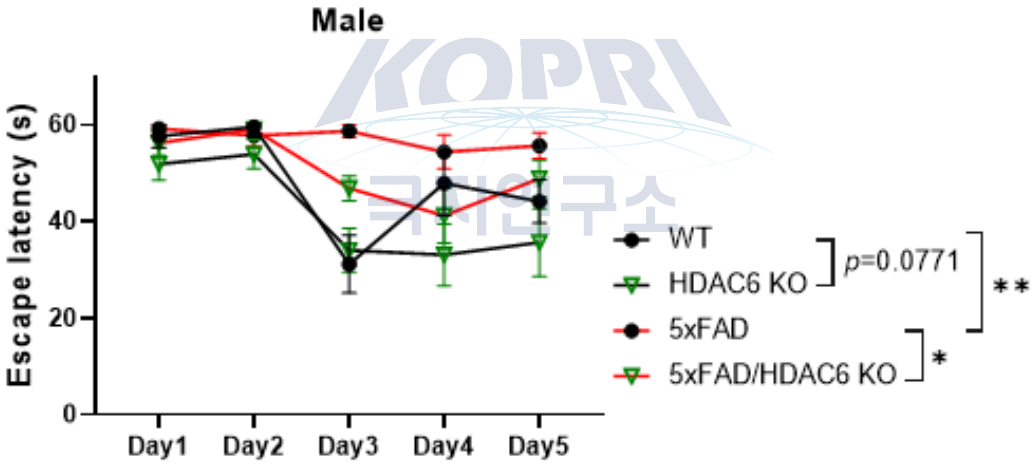
8) 날짜별로 그룹 간에 비교했을 때, 첫째 날에 HDAC6 KO 그룹이 WT 그룹보다 빨리 플랫폼을 찾았으며, 셋째 날에는 5xFAD 그룹이 WT 그룹보다 플랫폼에 도달하는 시간이 늦었고, 이에 비해 5xFAD/HDAC6 KO 그룹에서 플랫폼을 찾는 속도가 더 빨라졌. 다섯째 날에는 WT 그룹과 5xFAD 그룹 사이에 유의미한 차이가 있었지만, HDAC6 knock-out에 의한 차이는 없었음. 같은 그룹에서 training 시간에 따른 학습 정도를 비교했을 때, WT, HDAC6 KO, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹은 셋째 날부터 유의미하게 플랫폼에 도달하는 시간이 빨라졌지만, 5xFAD 그룹의 경우 다섯째 날까지 유의미한 차이가 없었음

9) 다음으로, 수컷과 암컷을 분리하여 비교함. 수컷의 경우 5xFAD 그룹에서 학습능력이 WT 그룹에 비해 현저히 떨어졌고, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹에서 학습능력 회복되는 것을 확인함. 날짜별로 그룹 간 비교를 했을 때, 셋째 날에 5xFAD/HDAC6 KO 그룹이 5xFAD 그룹보다 유의미하게 빠른 속도록 플랫폼을 찾았음. 같은 그룹에서 training 시간에 따른 학습 정도를 비교했을 때, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹만 셋째 날 유의미하게 플랫폼에 도달하는 시간이 빨라졌지만, 다른 그룹의 경우 다섯째 날까지 유의미한 차이가 없었음. 암컷의 경우, WT 그룹과 5xFAD 그룹 간에 유의미한 학습 차이가 있었지만, HDAC6 knock-out에 의한 효과는 없었음. 날짜별로 비교했을 때, training 기간 동안 그룹 간에 유의미한 차이는 없었음

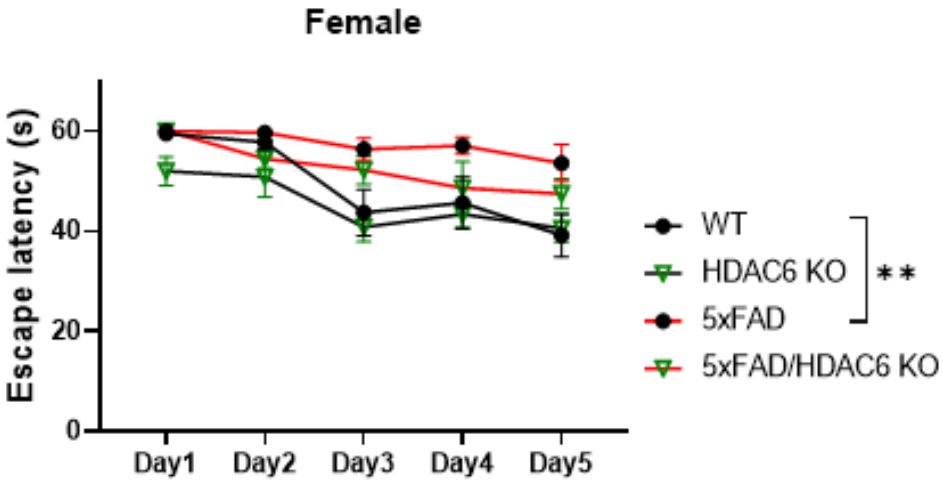
10) 같은 그룹에서 training 시간에 따른 학습정도를 비교했을 때, WT, HDAC6 KO 그룹은 셋째 날부터 유의미하게 플랫폼에 도달하는 시간이 빨라졌고, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹은 다섯째 날 유의미하게 차이가 났지만, 5xFAD 그룹의 경우 다섯째 날까지 유의미한 차이가 없었음. 따라서, 5xFAD의 경우 WT에 비해 공간 지각 능력 및 기억력이 감소하였고, HDAC6가 knock-out 될 경우 기억력이 회복되는 것을 확인함



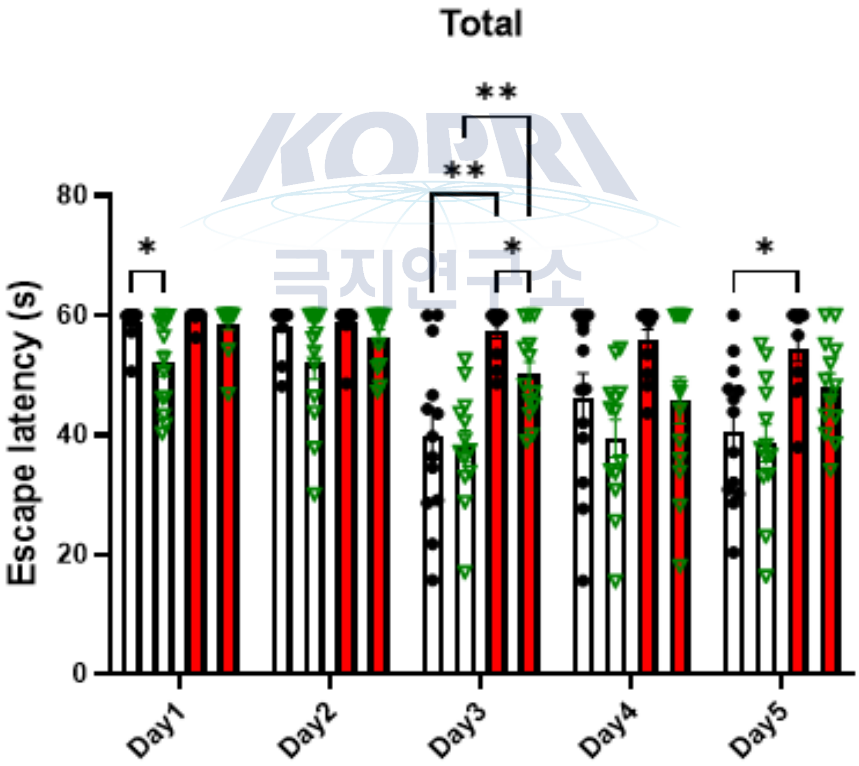
[그림 2-315. Morris water maze 실험결과: Total, Escape latency]



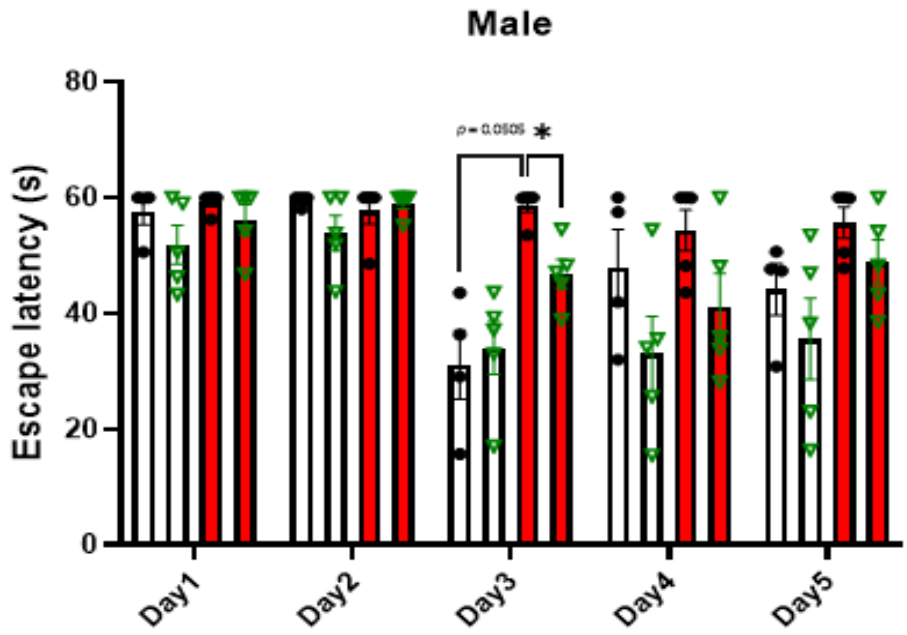
[그림 2-316. Morris water maze 실험결과: Male, Escape latency]



[그림 2-317. Morris water maze 실험결과: Female, Escape latency]

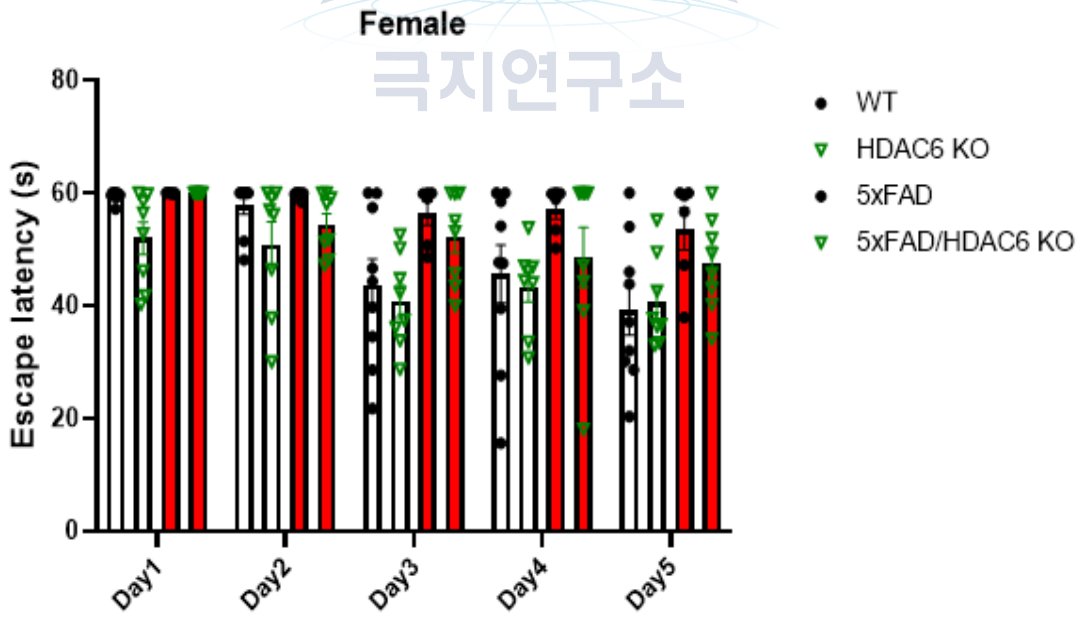


[그림 2-318. Morris water maze 실험결과: Total, Escape latency]

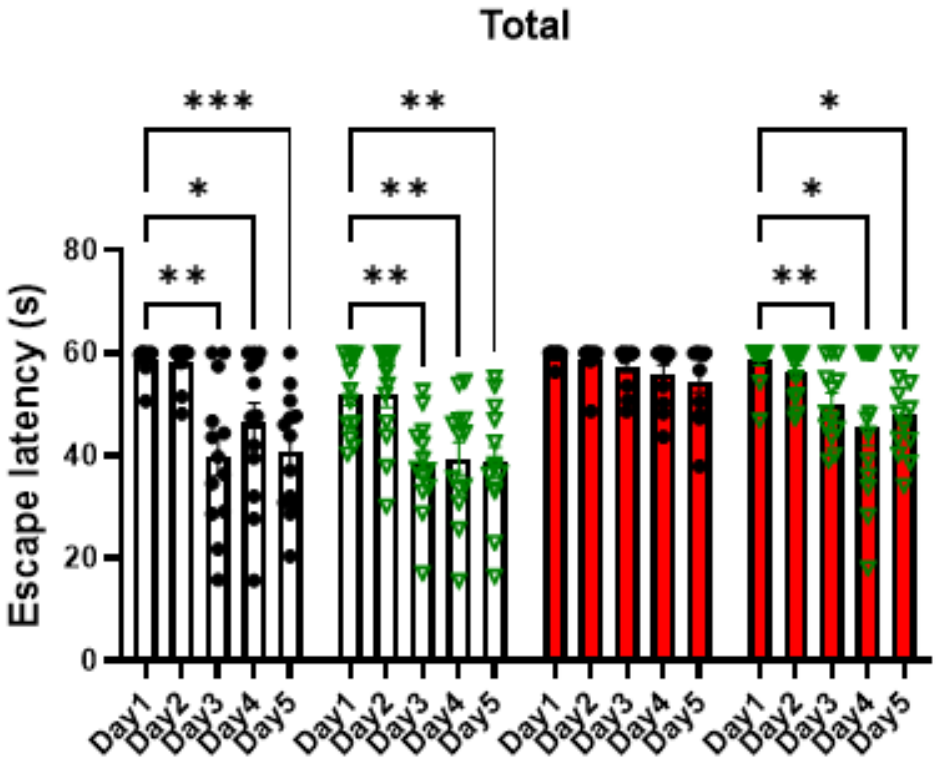


[그림 2-319. Morris water maze 실험결과: Male, Escape latency]

KOPRI
극지연구소

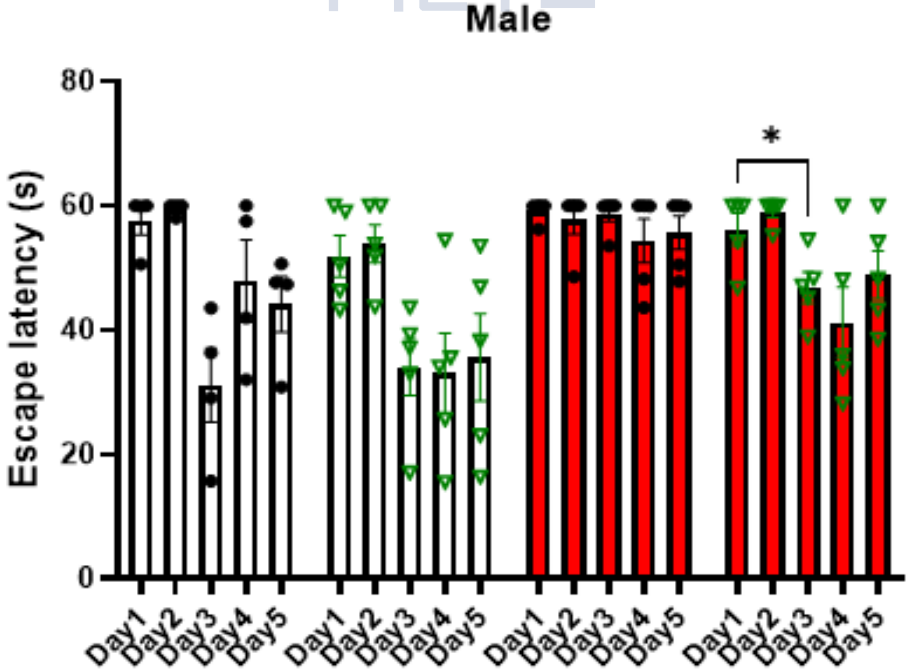


[그림 2-320. Morris water maze 실험결과: Female, Escape latency]

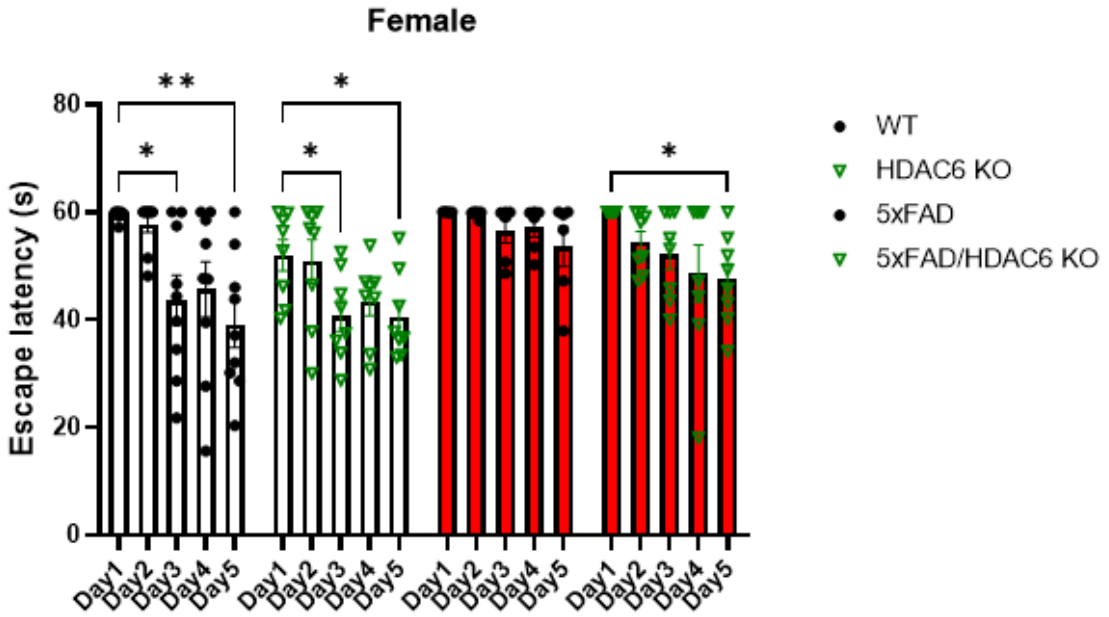


[그림 2-321. Morris water maze 실험결과: Total, Escape latency]

KOPRI
극지연구소



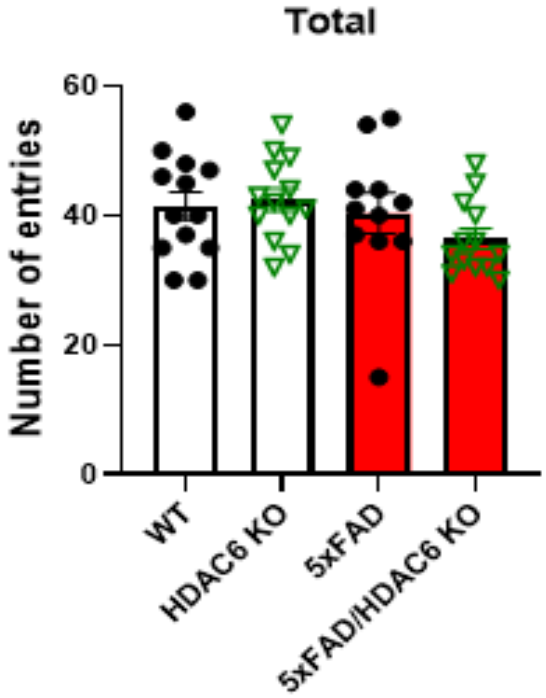
[그림 2-322. Morris water maze 실험결과: Male, Escape latency]



[그림 2-323. Morris water maze 실험결과: Female, Escape latency]

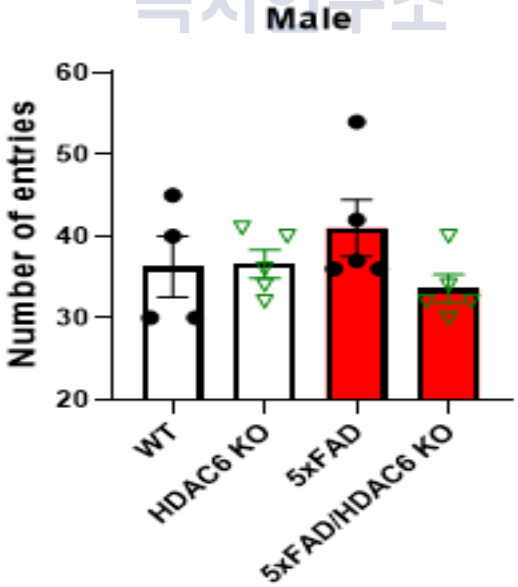
11) 120°의 세 팔에, 팔 길이 35 cm, 폭 8 cm, 높이 15 cm인 Y-maze를 이용하여 8분 동안 테스트를 진행함(그림 2-1057~1068). Y-maze spontaneous alternation test는 쥐의 공간 지각능력을 테스트하는 실험으로, WT 마우스가 알츠하이머 치매 마우스보다 처음 있던 팔 (arm)보다는 새로운 팔로 가려는 습성을 이용한 실험임. Spontaneous alternation은 처음 있던 팔에서 새로운 팔로 연속 두 번 들어간 경우를 1회로 카운트함 (ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA). 팔에 들어간 총횟수를 비교했을 때, 그룹 간에 차이는 없었음(그림 2-1057-1059). Spontaneous alternation 비율을 비교했을 때, 모든 그룹 간에 차이가 없었음(그림 2-324-335)

12) 5xFAD와 5xFAD/HDAC6 KO 두 그룹만 비교했을 때, 팔에 들어간 총횟수는 변화가 없었음. 그러나 Spontaneous alternation 비율을 비교했을 때, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹이 5xFAD 그룹보다 유의미하게 증가함. 암컷과 수컷을 나누어 분석했을 때는 5xFAD/HDAC6 KO 그룹이 5xFAD 그룹보다 증가하는 경향을 보였지만 유의미한 차이는 없었음. 따라서, 알츠하이머 치매에서 HDAC6가 knock-out 될 경우 공간 기억력이 회복되는 것을 확인함

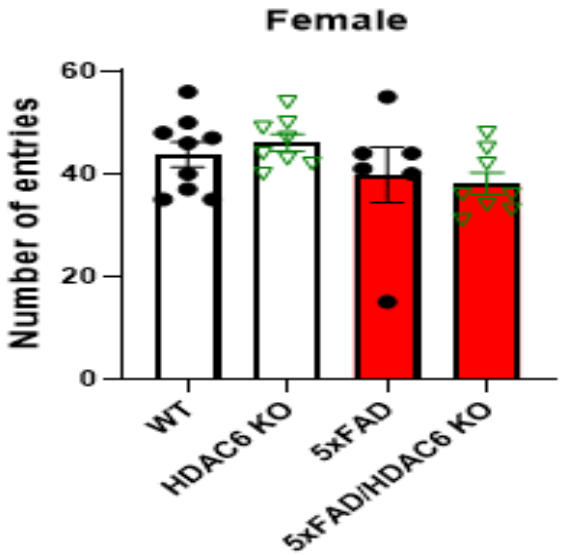


[그림 2-324. Y-maze 결과: Total, number of entries]

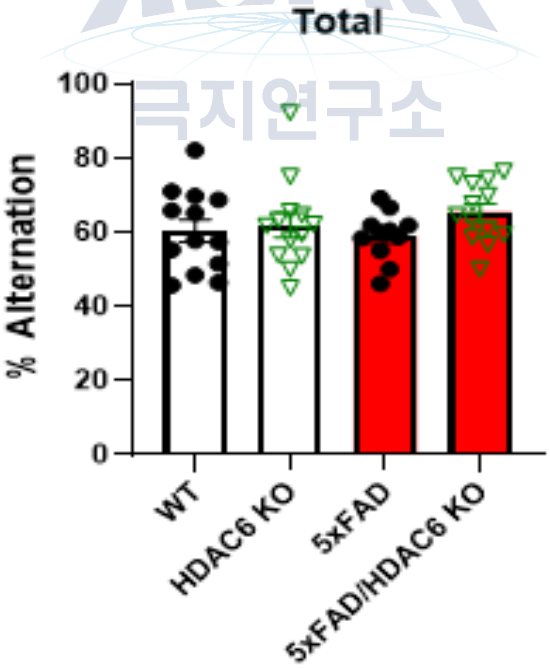
KOPRI 극지연구소



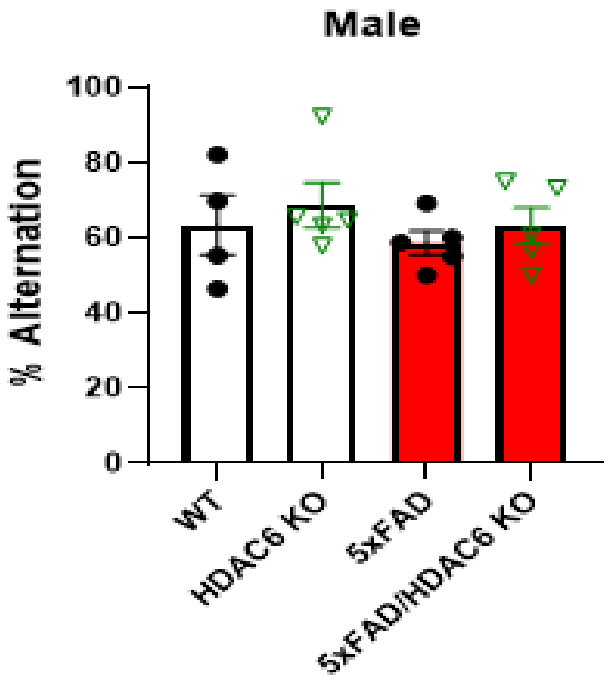
[그림 2-325. Y-maze 결과: Male, number of entries]



[그림 2-326. Y-maze 결과: Female, number of entries]

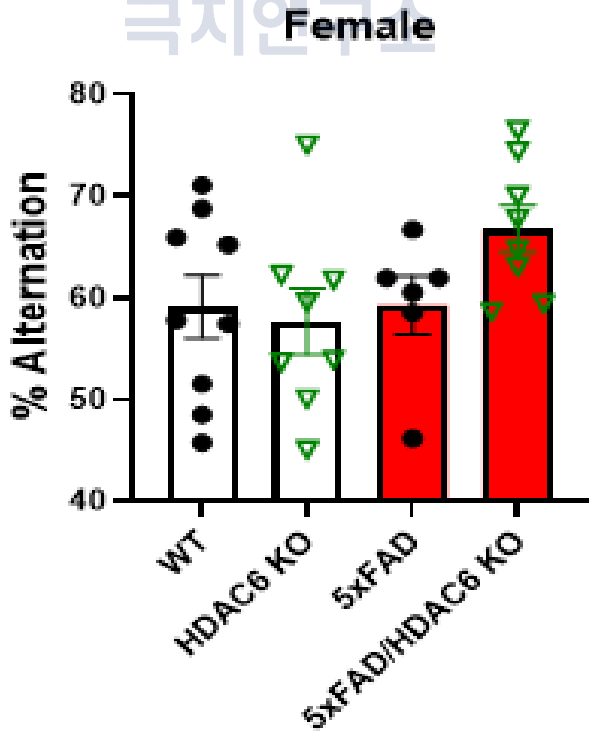


[그림 2-327. Y-maze 결과: Total, % Alternation]

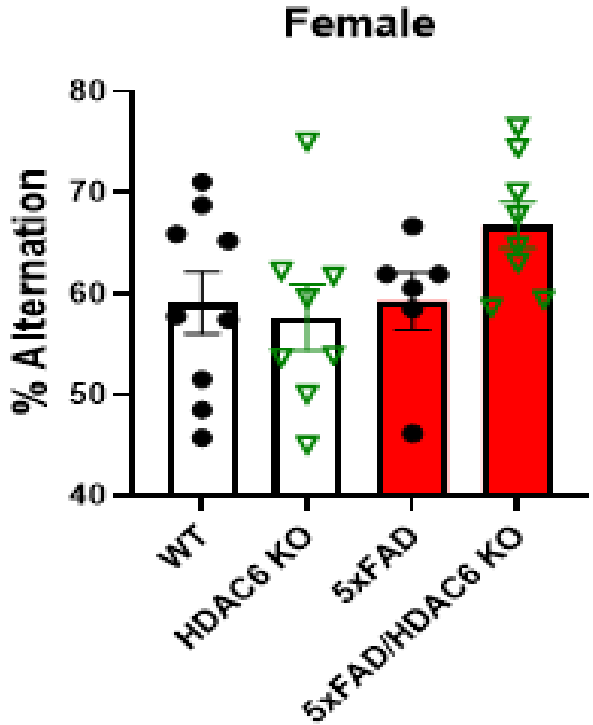


[그림 2-328. Y-maze 결과: Male, % Alternation]

KOPRI
극지연구소

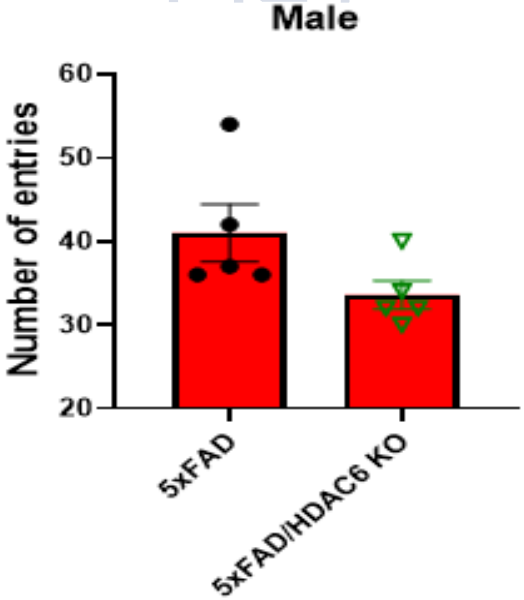


[그림 2-329. Y-maze 결과: Female, % Alternation]

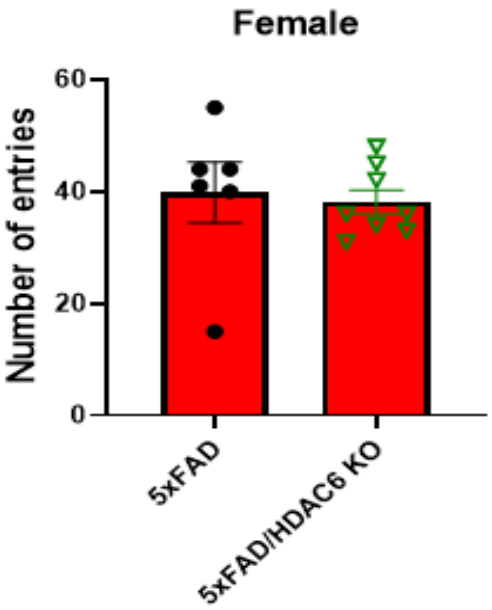


[그림 2-330. Y-maze 결과: Female, % Alternation]

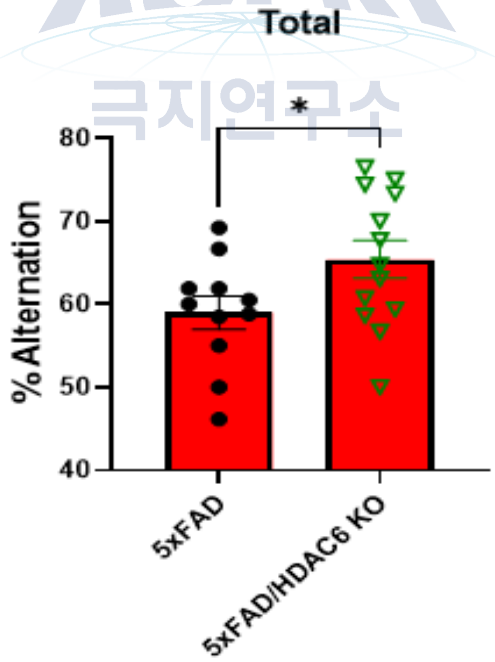
KBRI
극지연구소



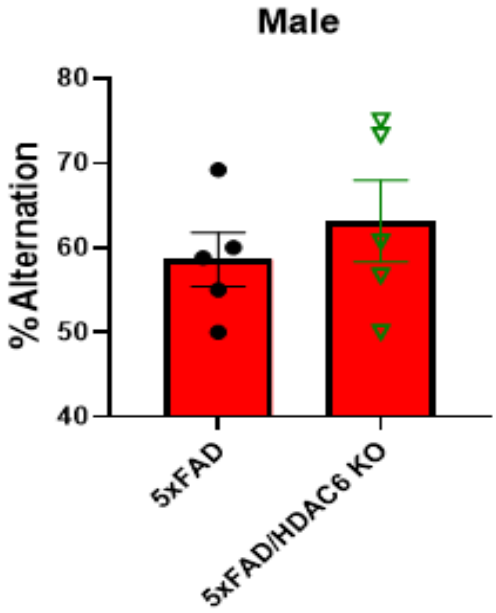
[그림 2-331. Y-maze 결과: Male, number of entries, FAD vs FAD/KO]



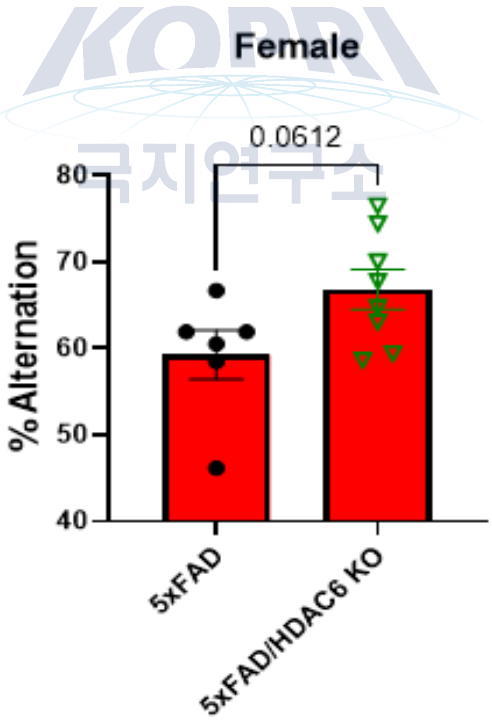
[그림 2-332. Y-maze 결과: Female, number of entries, FAD vs FAD/KO]



[그림 2-333. Y-maze 결과: Total, % Alternation, FAD vs FAD/KO]



[그림 2-334. Y-maze 결과: Male, % Alternation, FAD vs FAD/KO]



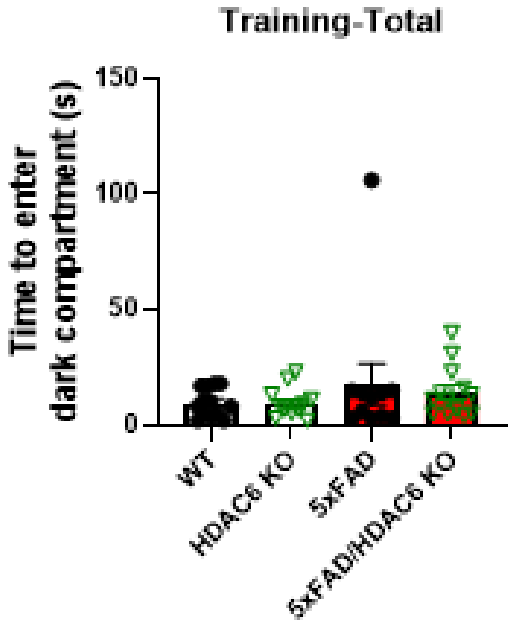
[그림 2-335. Y-maze 결과: Female, % Alternation, FAD vs FAD/KO]

13) 다음 실험으로 Passive avoidance test를 진행함(그림 2-336~353). Passive avoidance test는 공간 및 상황에 대한 기억력을 확인하는 실험으로, 마우스가 어두운 곳을 좋아하는 습성을 이용한 실험으로 training 날에 마우스가 강한 빛을 피해 어두운 방으로 들어가면 강한 전기 자극을 주어 어두운 방에 들어가면 위험하다는 것을 교육함. 24시간 뒤에 마우스를 같은 상황에 놓아, 어두운 방으로 들어가는 데 걸리는 시간을 측정함. 알츠하이머 치매 마우스의 경우 전기 쇼크에 대한 기억력이 감소하여 어두운 방으로 들어가는 데 걸리는 시간이 WT 마우스보다 짧음. Training 날에 마우스가 암실에 들어가는 데까지 걸리는 시간을 측정하고, 암실에 들어간 지 3초 뒤 0.3 mA의 전기 충격을 3초 동안 주었음

14) Training 날에 암실에 들어가는 데 걸리는 시간은 그룹 간에 차이가 없었고 전기 충격을 준 후 24시간 뒤에 암실에 들어가는 데까지 걸리는 시간을 측정함. 5xFAD 그룹이 WT 그룹보다 암실에 빨리 들어가는 경향을 보였고, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹에서 5xFAD 그룹보다 암실에 늦게 들어가는 경향을 보임. 그러나 그룹 간에 유의미한 차이는 없음. 또한, 전기 충격을 준 지 일주일 뒤에 암실에 들어가는 데 걸리는 시간을 측정함(그림 2-1075-1077). 5xFAD 그룹이 WT 그룹보다 암실에 빨리 들어가고, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹이 5xFAD 그룹보다 암실에 늦게 들어가는 경향을 보였지만, 그룹 간에 유의미한 차이는 없음

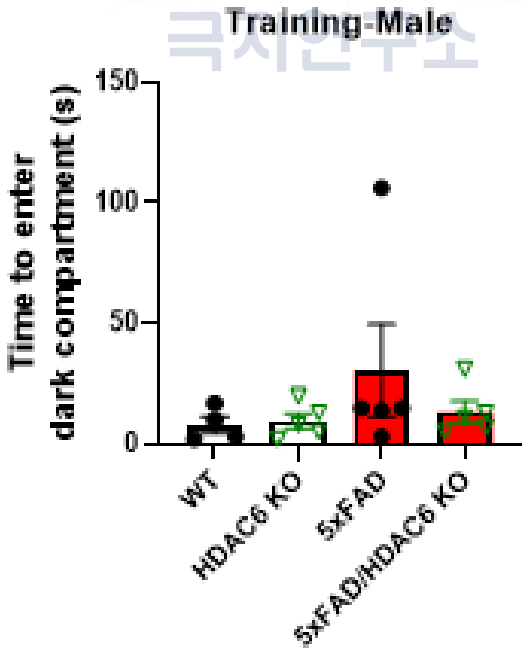
15) 5xFAD와 5xFAD/HDAC6 KO 두 그룹만 비교했을 때, training 날에 암실에 들어가는 데 걸리는 시간은 그룹 간에 차이가 없음(그림 2-1078-1080). 전기 충격을 준 후 24시간 뒤에 암실에 들어가는 데까지 걸리는 시간을 비교했을 때, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹이 5xFAD 그룹보다 암실에 늦게 들어가는 경향을 보였지만 유의미한 차이는 없음

16) 또한, 전기 충격을 준 지 일주일 뒤에 암실에 들어가는 데 걸리는 시간을 비교했을 때, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹이 5xFAD 그룹보다 암실에 유의미하게 늦게 들어감. 암컷과 수컷을 나누어 비교했을 때, 수컷에서는 그룹 간에 차이가 없었고 암컷에서는 5xFAD/HDAC6 KO과 5xFAD 그룹 간에 유의미한 차이가 있음. 따라서, 알츠하이머 치매에서 HDAC6가 knock-out 될 경우 상황에 대한 기억력이 회복되는 것을 확인함

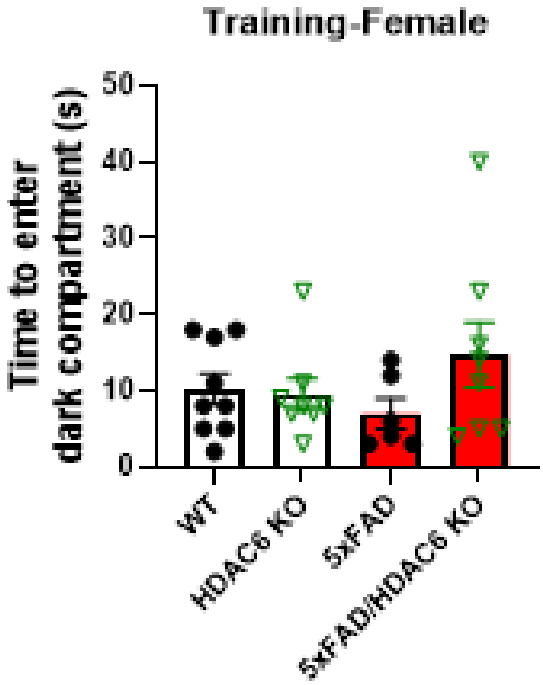


[그림 2-336. Passive avoidance test 결과: Training, total]

KOPRI 극지연구소

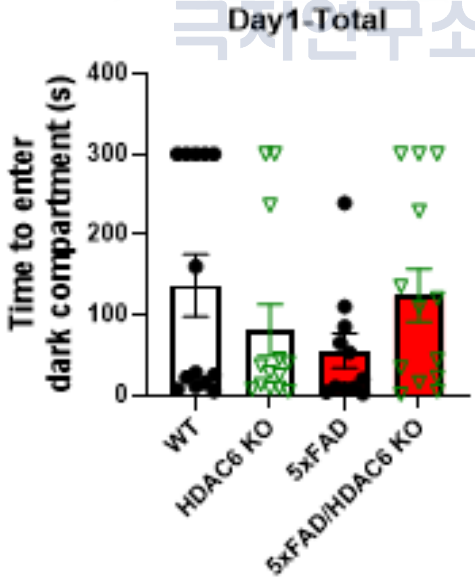


[그림 2-337. Passive avoidance test 결과: Training, Male]

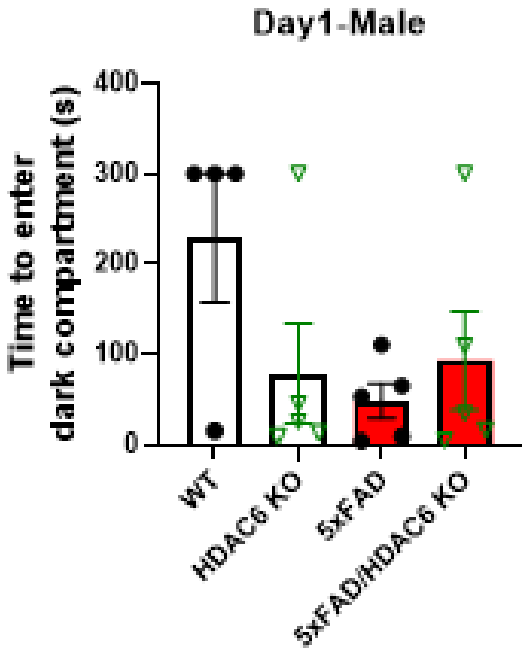


[그림 2-338. Passive avoidance test 결과: Training, Female]

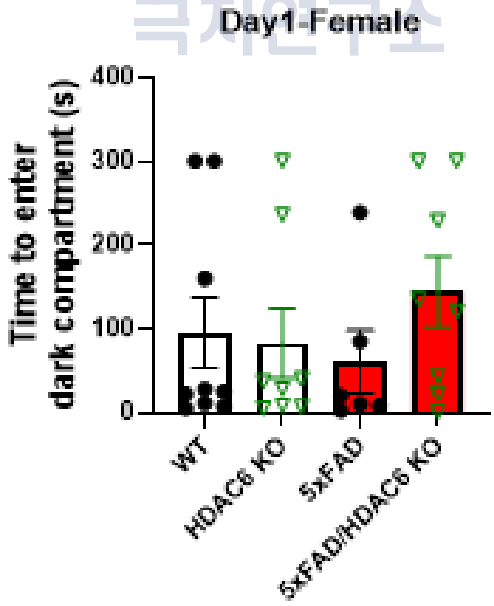
KOPRI 극지연구소



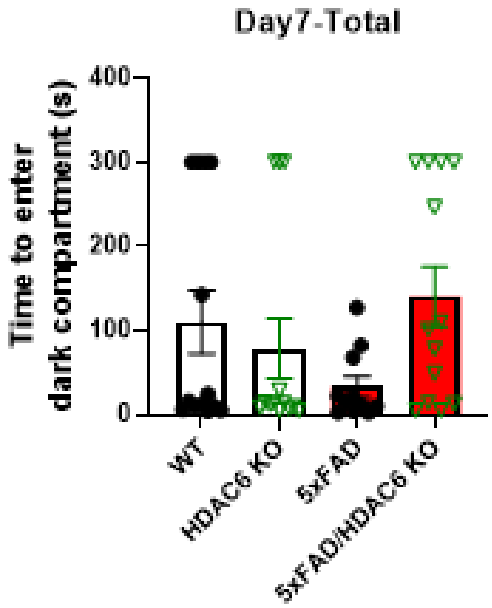
[그림 2-339. Passive avoidance test 결과: Day1, total]



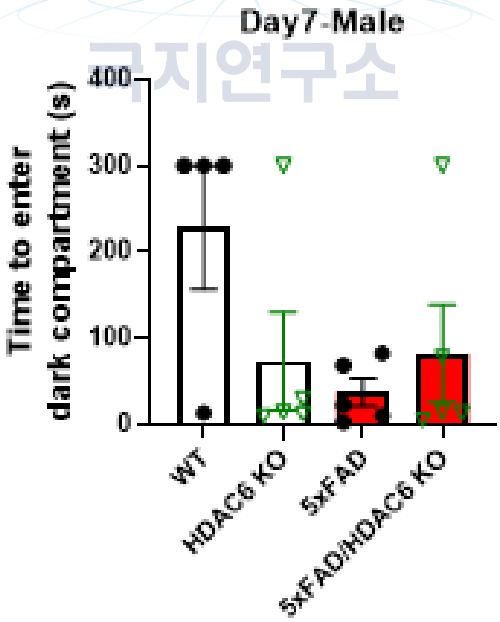
[그림 2-340. Passive avoidance test 결과: Day1, Male]



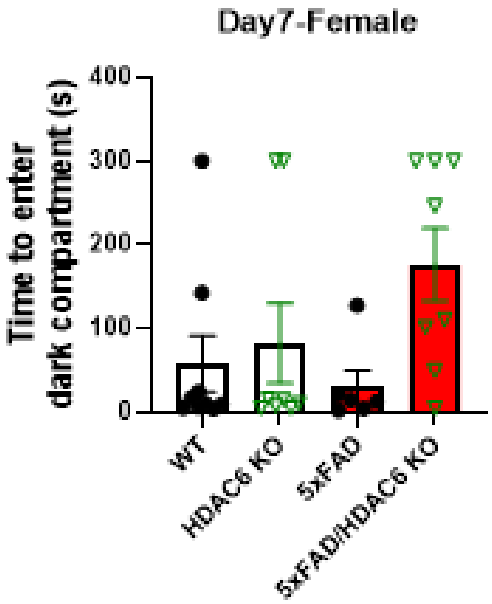
[그림 2-341. Passive avoidance test 결과: Day1, Female]



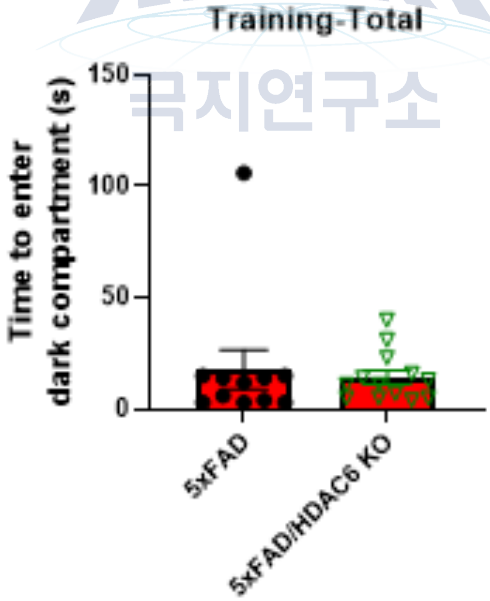
[그림 2-342. Passive avoidance test 결과: Day7, total]



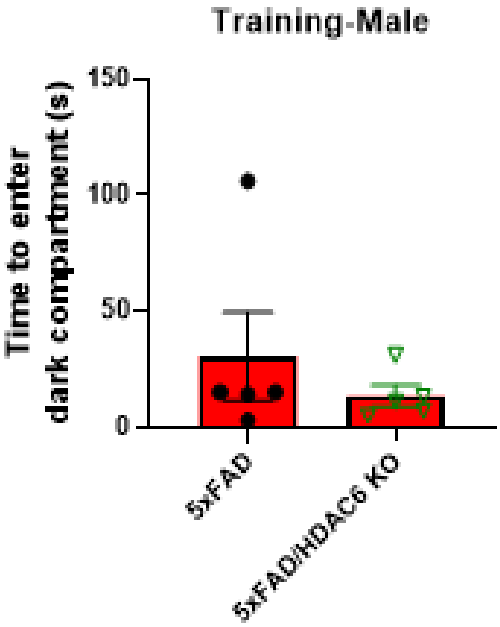
[그림 2-343. Passive avoidance test 결과: Day7, Male]



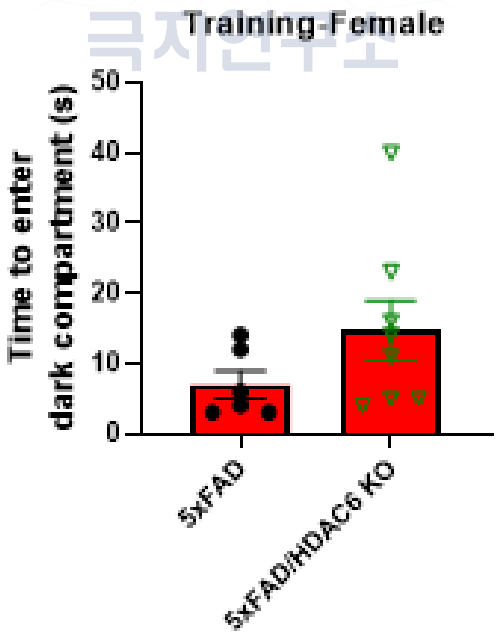
[그림 2-344. Passive avoidance test 결과: Day7, Female]



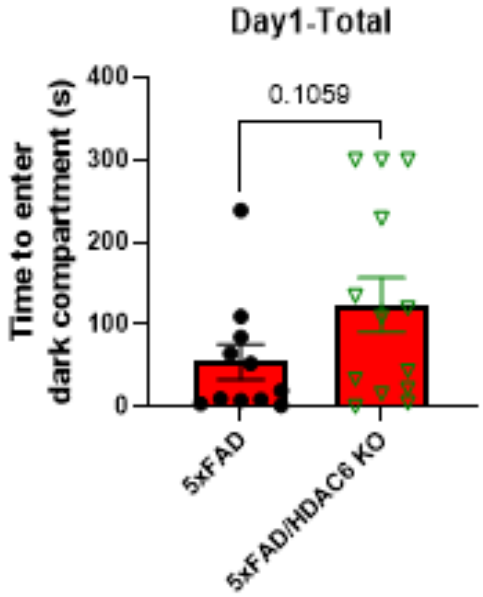
[그림 2-345. Passive avoidance test 결과: Training, total, FAD vs FAD/KO]



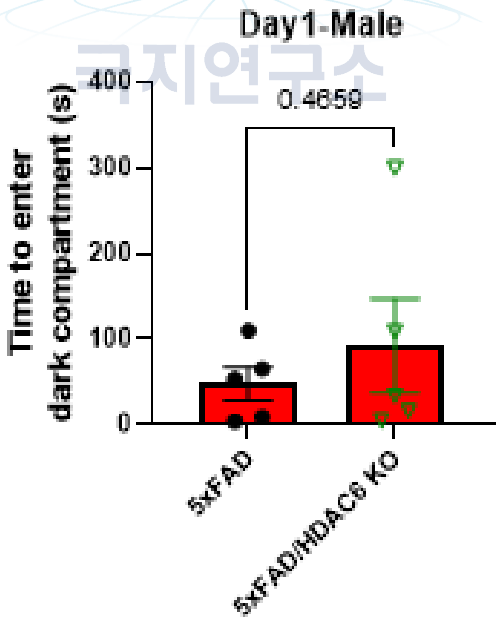
[그림 2-346. Passive avoidance test 결과: Training, Male, FAD vs FAD/KO]



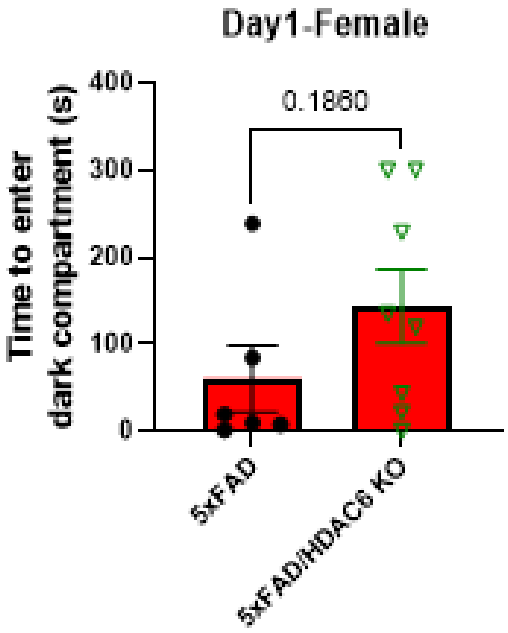
[그림 2-347. Passive avoidance test 결과: Training, Female, FAD vs FAD/KO]



[그림 2-348. Passive avoidance test 결과: Day1, total, FAD vs FAD/KO]

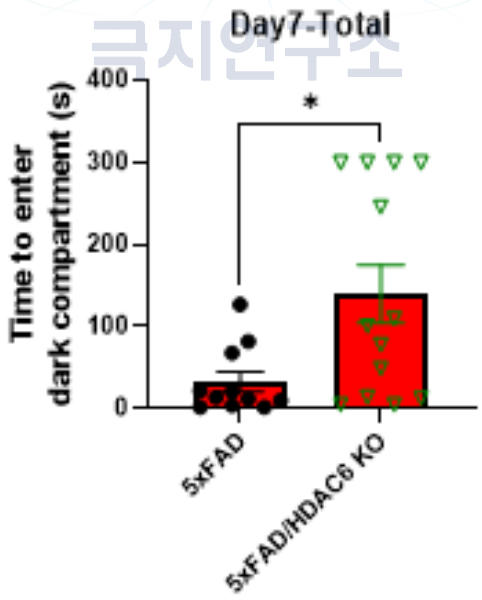


[그림 2-349. Passive avoidance test 결과: Day1, Male, FAD vs FAD/KO]

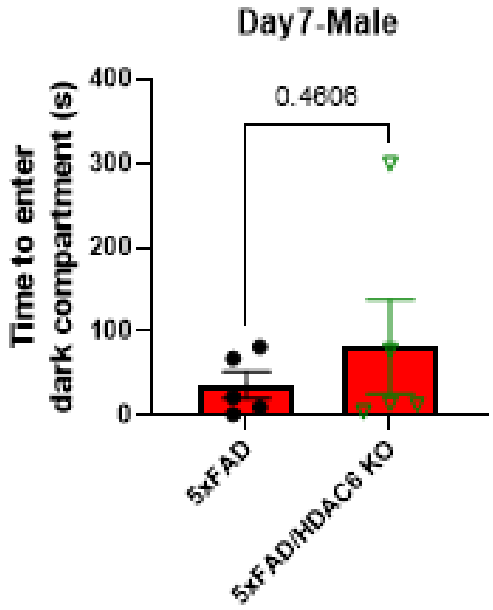


[그림 2-350. Passive avoidance test 결과: Day1, Female, FAD vs FAD/KO]

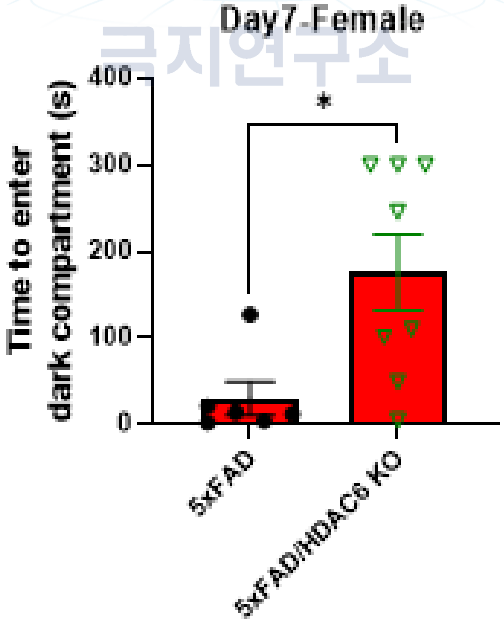
KOPRI 금지연구소



[그림 2-351. Passive avoidance test 결과: Day7, total, FAD vs FAD/KO]



[그림 2-352. Passive avoidance test 결과: Day7, Male, FAD vs FAD/KO]



[그림 2-353. Passive avoidance test 결과: Day7, Female, FAD vs FAD/KO]

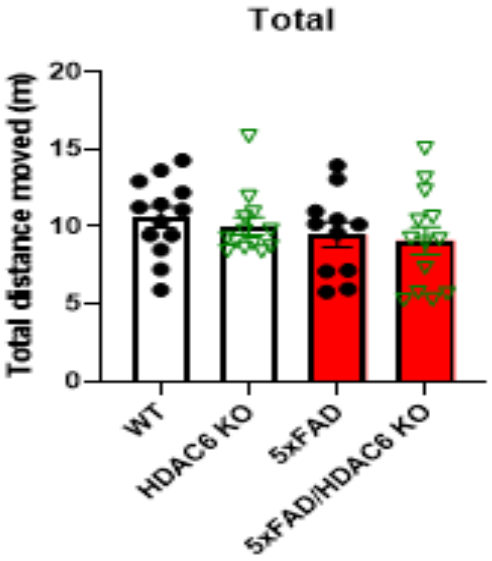
17) 마지막으로, elevated plus maze test를 5분 동안 진행함. 5xFAD 마우스의 경우 elevated plus maze test에서 open arm 쪽을 탐험하려는 성질이 높게 나타나며, 이것은 뇌 조직에서 아밀로이드 베타의 축적과 연관되어 있음 (Svensson *et al*. *Scientific Reports*. 2020). 마우스의 전체 이동 거리와 움직인 총 시간은 그룹 간에 차이가 없음(그림 2-354~371)

18) 닫힌 팔에 들어간 횟수를 비교했을 때, 알츠하이머 치매 마우스가 대조군에 비해 닫힌 팔에 들어가는 횟수가 유의미하게 감소함. 암컷과 수컷을 나누어 비교했을 때, 수컷의 경우 HDAC6 KO 그룹이 WT 그룹보다 닫힌 팔에 더 자주 방문하였으나, 암컷에서는 HDAC6 knock-out에 의한 차이가 없었음. 닫힌 팔에 머문 시간을 비교했을 때, 알츠하이머 치매 마우스가 대조군에 비해 닫힌 팔에 머무는 시간이 유의미하게 감소. 암컷과 수컷을 나누어 비교했을 때, 수컷의 경우 그룹 간에 차이가 없었으나, 암컷에서는 알츠하이머 치매 마우스가 대조군에 비해 닫힌 팔에 머무는 시간이 유의미하게 감소함

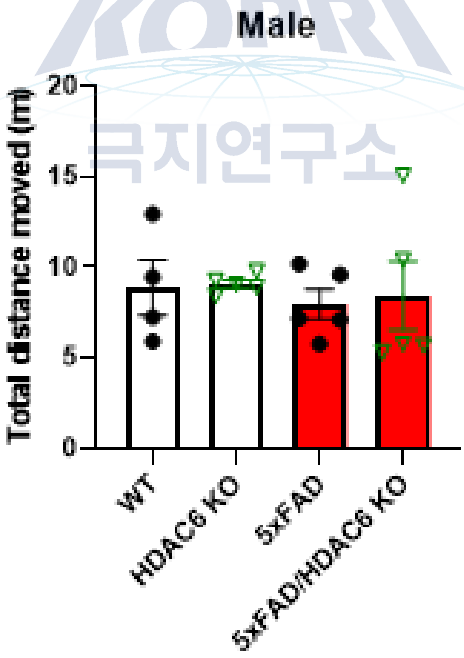
19) 다음으로, 열린 팔에 들어가는 횟수를 비교하였을 때 그룹 간에 유의미한 차이는 없음. 열린 팔에 머무는 시간을 비교했을 때, 알츠하이머 치매 마우스가 대조군에 비해 열린 팔에 머무는 시간이 유의미하게 증가함. 따라서 알츠하이머 치매 그룹이 open arm 탐험시간이 유의미하게 증가했지만, HDAC6 knock-out에 의한 차이는 없음

20) 행동실험 결과를 종합하면, 마우스의 welfare를 보여주는 nest building test에서 수컷 치매 쥐만 HDAC6가 knock-out 되었을 때 welfare가 회복됨. 또한, anxiety 정도를 보여주는 open field test와 elevated plus maze test에서 HDAC6 knock-out에 의한 효과는 없었으며, 인지기능을 보여주는 Morris water maze test, Y-maze test, passive avoidance test에서 HDAC6가 knock-out 되었을 때 인지기능이 회복되는 것을 확인할 수 있었음

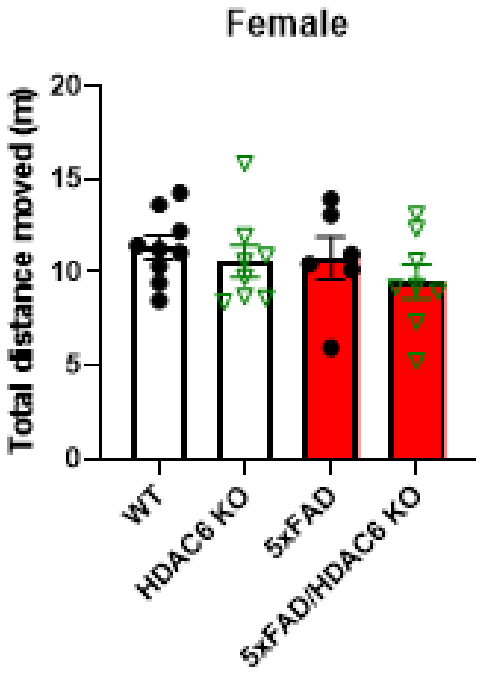
KORRA 극지연구소



[그림 2-354. Elevated plus maze 결과: Total, 총 이동거리]

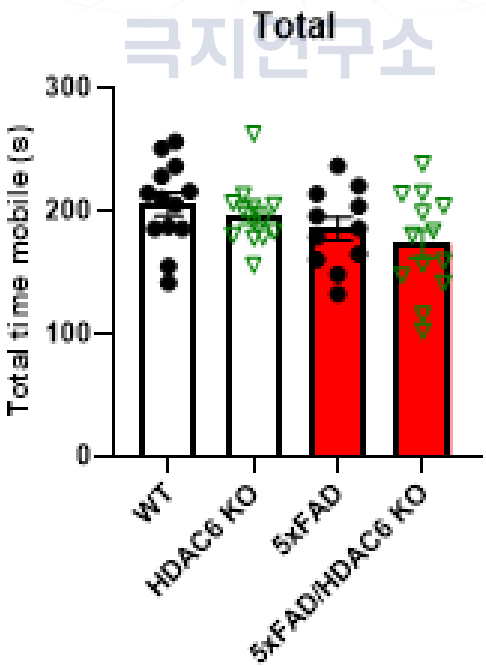


[그림 2-355. Elevated plus maze 결과: Male, 총 이동거리]

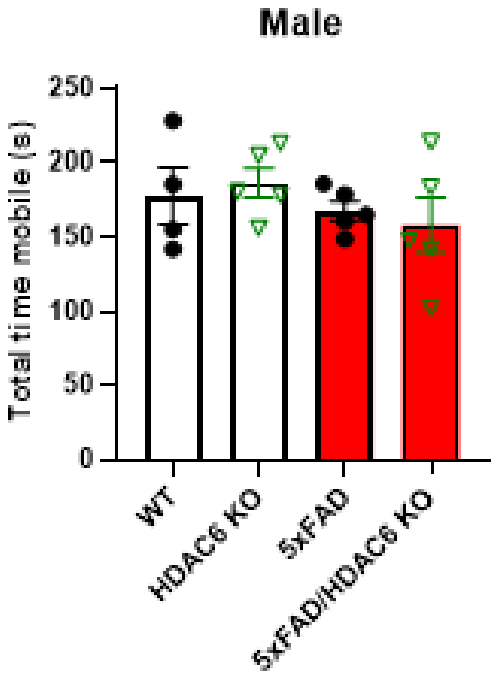


[그림 2-356. Elevated plus maze 결과: Female, 총 이동거리]

KOPRI
극지연구소

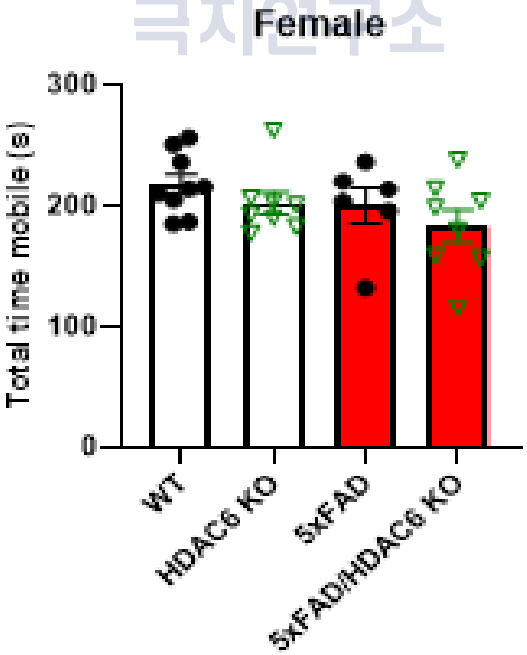


[그림 2-357. Elevated plus maze 결과: Total, 움직인 시간]

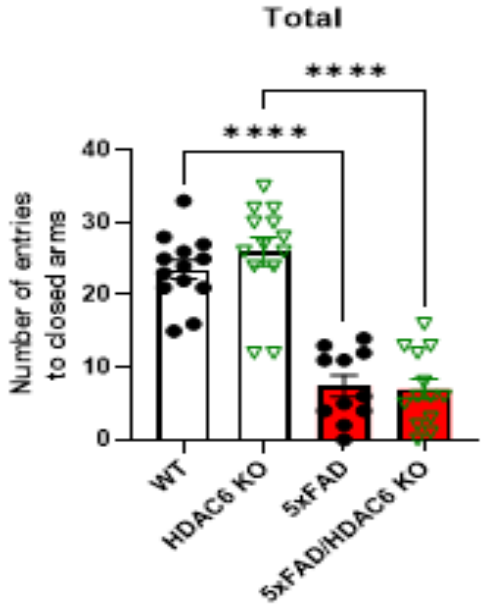


[그림 2-358. Elevated plus maze 결과: Male, 총 이동거리]

KOPRI 극지연구소

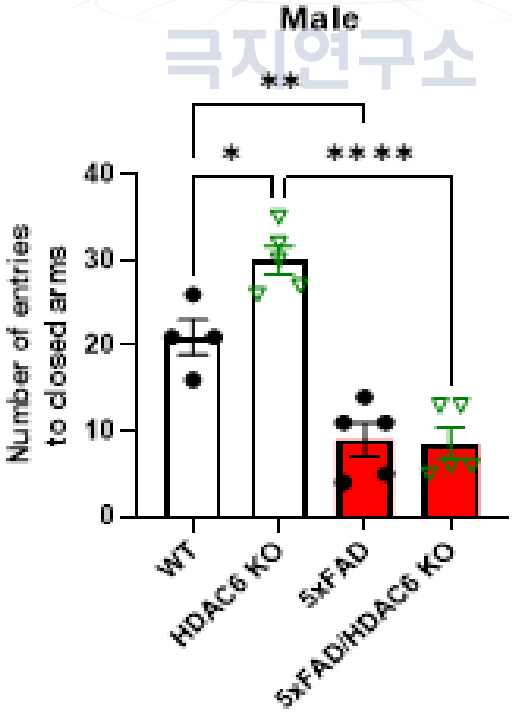


[그림 2-359. Elevated plus maze 결과: Female, 총 이동거리]

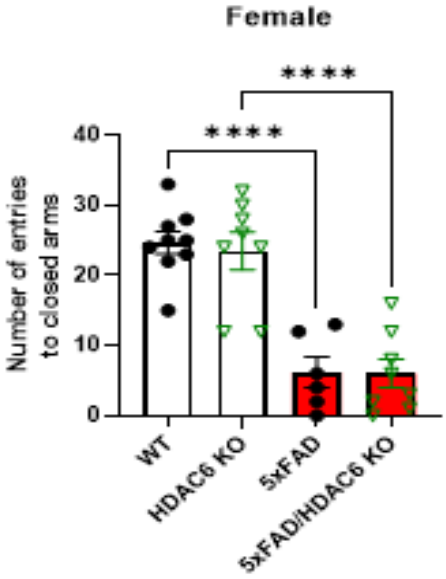


[그림 2-360. Elevated plus maze 결과: Total, 닫힌 구역에 이동한 횟수]

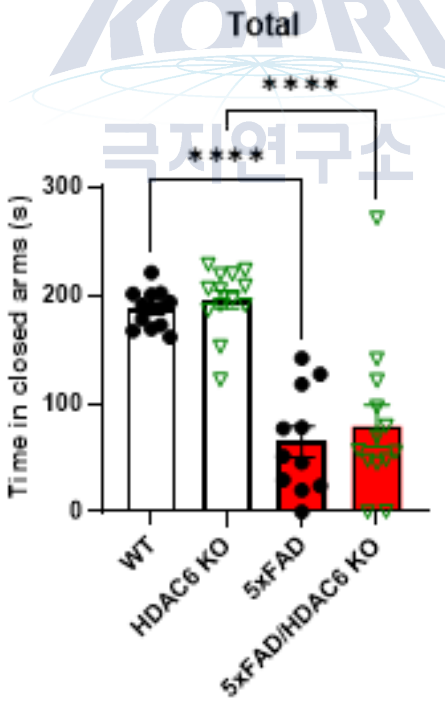
KOPRI
극지연구소



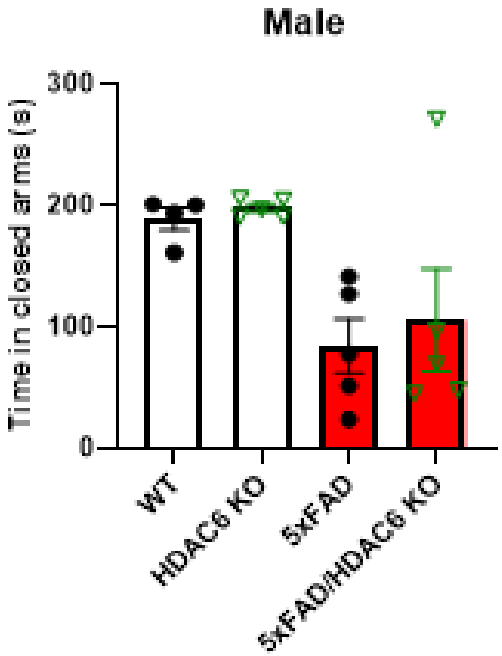
[그림 2-261. Elevated plus maze 결과: Male, 닫힌 구역에 이동한 횟수]



[그림 2-362. Elevated plus maze 결과: Female, 닫힌 구역에 이동한 횟수]

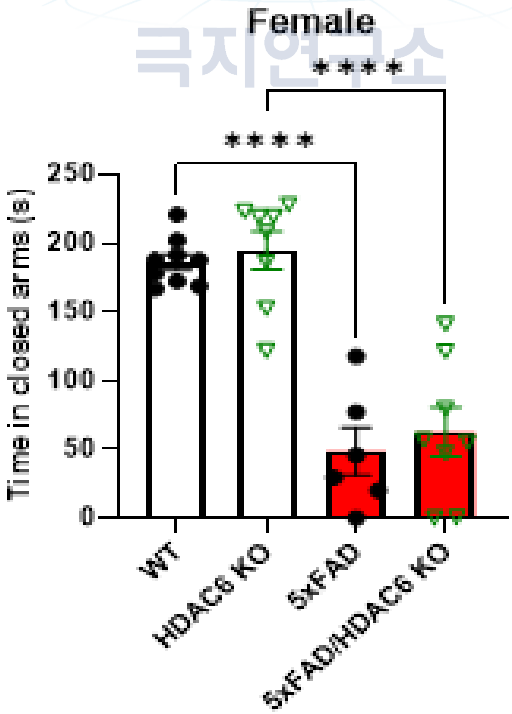


[그림 2-363. Elevated plus maze 결과: Total, 닫힌 구역에 머문 시간]

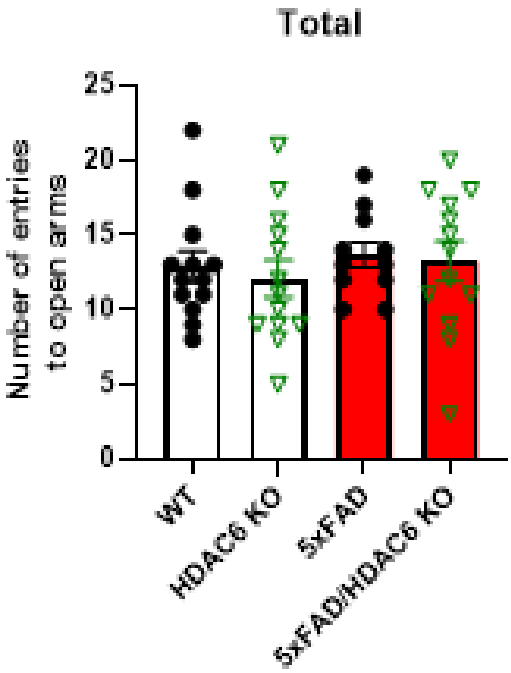


[그림 2-364. Elevated plus maze 결과: Male, 닫힌 구역에 머문 시간]

KOPRI
극지연구소

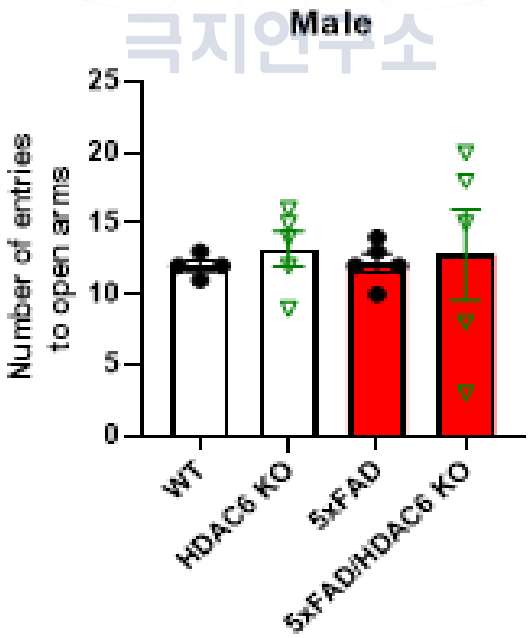


[그림 2-365. Elevated plus maze 결과: Female, 닫힌 구역에 머문 시간]

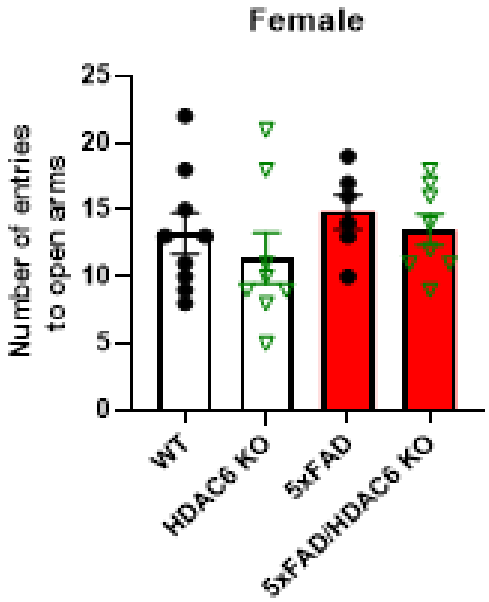


[그림 2-366. Elevated plus maze 결과: Total, 열린 구역에 이동한 횟수]

KOPRI 극지연구소

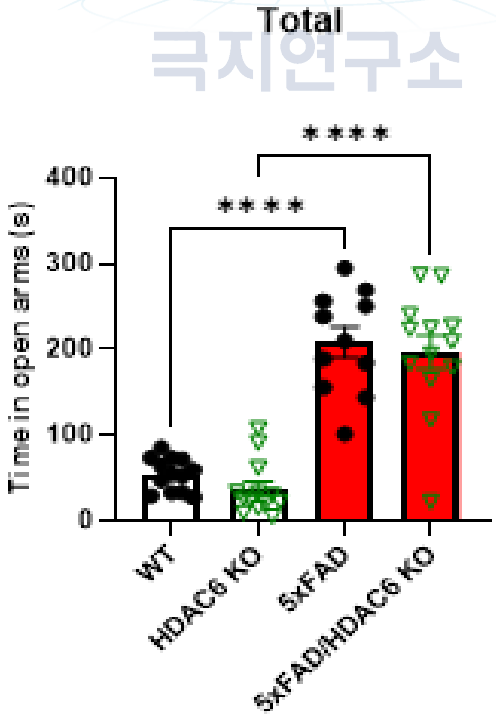


[그림 2-367. Elevated plus maze 결과: Male, 열린 구역에 이동한 횟수]

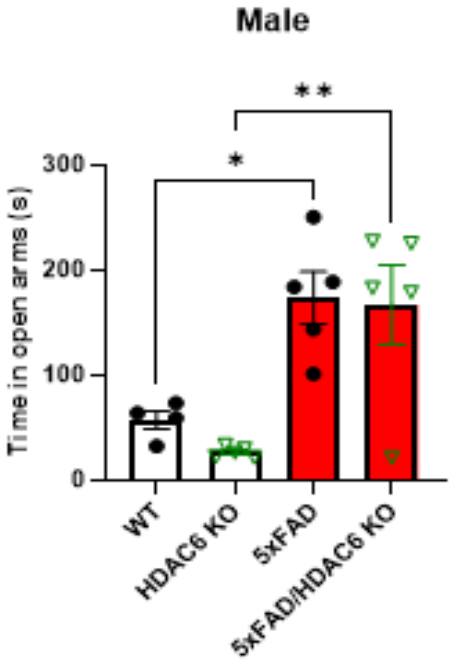


[그림 2-368. Elevated plus maze 결과: Female, 열린 구역에 이동한 횟수]

KOPRI
극지연구소

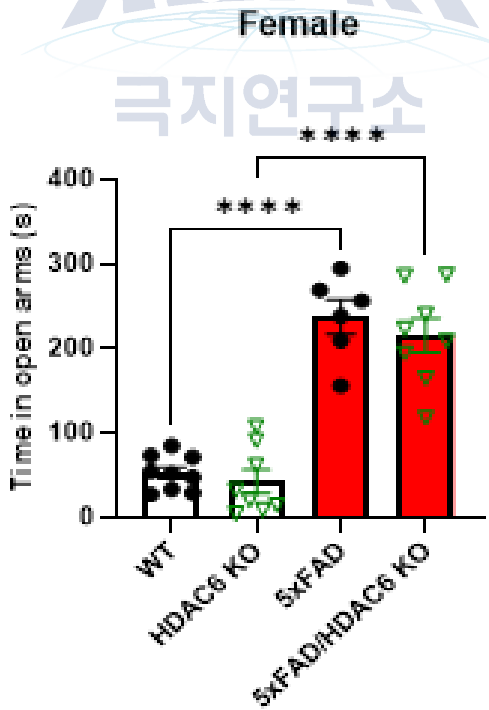


[그림 2-369. Elevated plus maze 결과: Total, 열린 구역에 머문 시간]



[그림 2-370. Elevated plus maze 결과: Male, 열린 구역에 머문 시간]

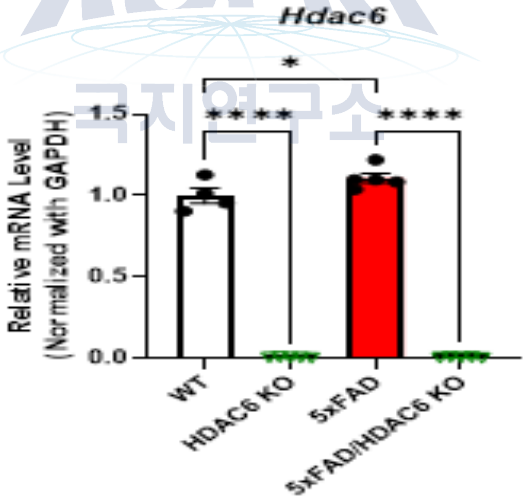
KOPRI
극지연구소



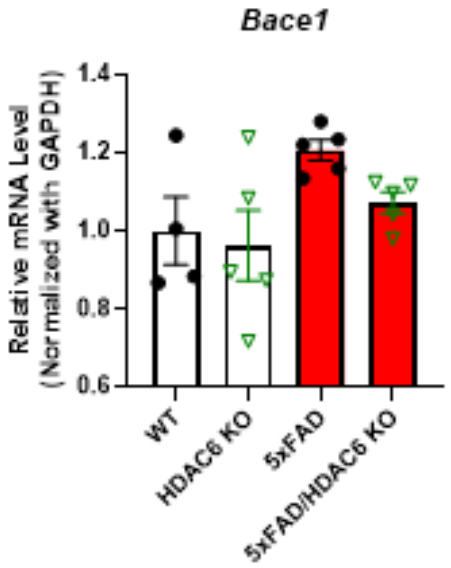
[그림 2-371. Elevated plus maze 결과: Female, 열린 구역에 머문 시간]

21) 먼저, 마우스의 대뇌에서 mRNA 발현량을 분석함(그림 2-372~395). 수컷의 mRNA 발현량을 분석하였을 때, *Hdac6* mRNA 발현량이 5xFAD 그룹에서 WT 그룹에 비해 유의미하게 증가한 것을 확인함. *Bace1*, *Cox2*의 mRNA 발현량은 그룹 간에 유의미한 차이가 없었으나, 5xFAD/HDAC6 KO 그룹에서 5xFAD 그룹에 비해 감소한 경향을 보임. 미세교세포 M2 마커인 *Mrc1*, *Clec10a*와 미세교세포 M1 마커인 *C3*의 mRNA 발현량에는 그룹 간에 차이가 없음. 염증 인자 또는 M1 마커들의 mRNA 발현량을 비교했을 때, 알츠하이머 치매 그룹에서 각각의 대조군에 비해 발현량이 유의미하게 증가했지만 HDAC6 knock-out에 의한 변화는 없음

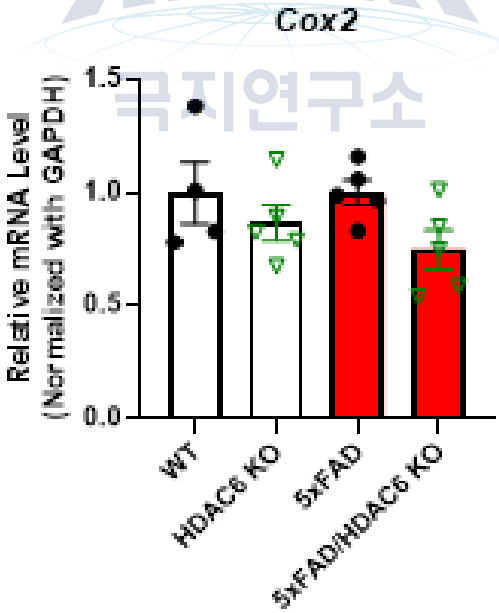
22) 암컷의 경우, *Hdac6* mRNA 발현량에서 WT 그룹과 5xFAD 그룹 간에 차이가 없음. 또한, *Bace1*, *Cox2*, *Mrc1*, *Clec10a*의 mRNA 발현량은 모든 그룹 간에 차이가 없음. 암컷 뇌 조직에서 염증 인자들의 mRNA 발현량을 비교했을 때, 알츠하이머 치매 그룹에서 각각의 대조군에 비해 발현량이 유의미하게 증가했지만 HDAC6 knock-out에 의한 변화는 없음. 따라서 암컷과 수컷에서 *Hdac6*과 *Bace1* mRNA 발현량의 패턴이 다르게 나타났고, 알츠하이머 치매 마우스에서 염증인자들의 발현이 유의미하게 높았지만 HDAC6 knock-out에 의해 조절되지 않음



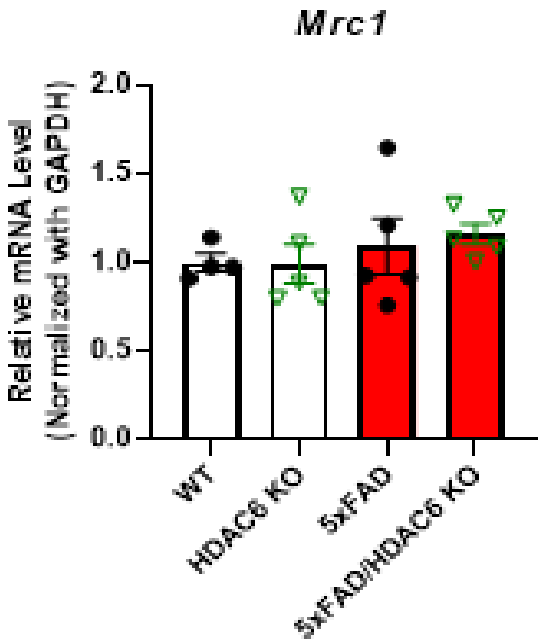
[그림 2-372. RT-qPCR 결과: Male, *Hdac6*]



[그림 2-373. RT-qPCR 결과: Male, *Bace1*]

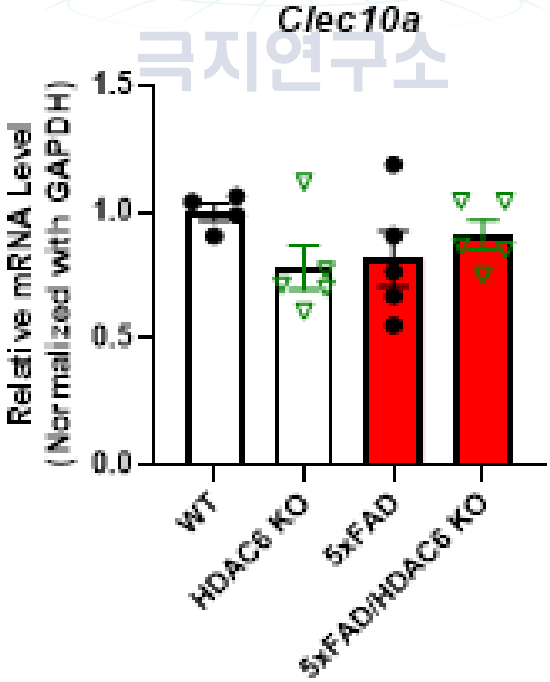


[그림 2-374. RT-qPCR 결과: Male, *Cox2*]

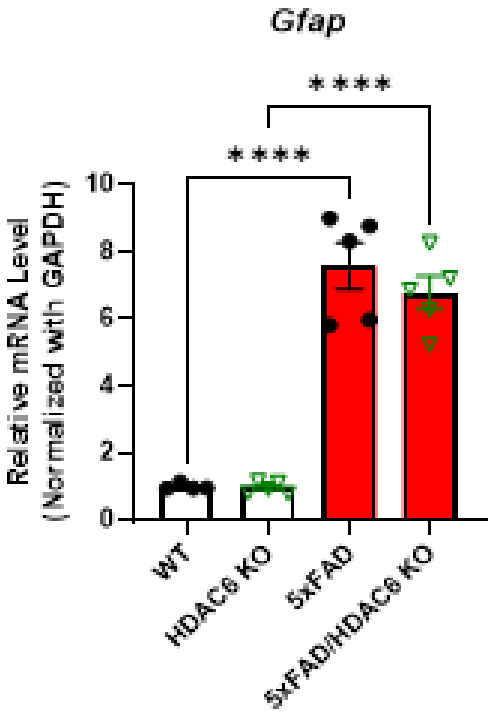


[그림 2-375. RT-qPCR 결과: Male, *Mrc1*]

KOPRI
극지연구소

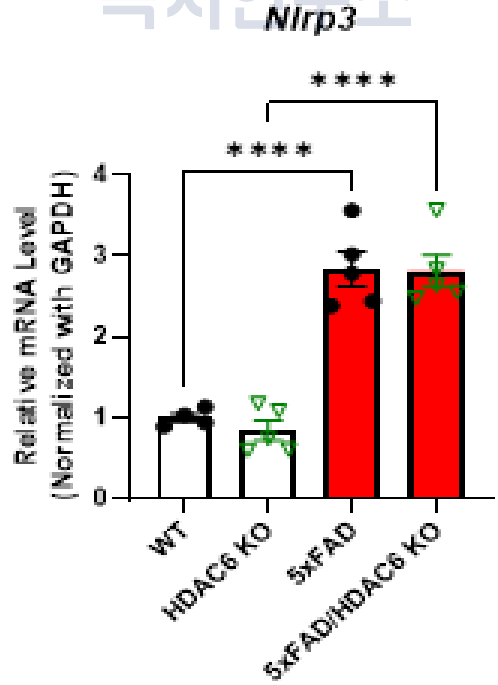


[그림 2-376. RT-qPCR 결과: Male, *Clec10a*]

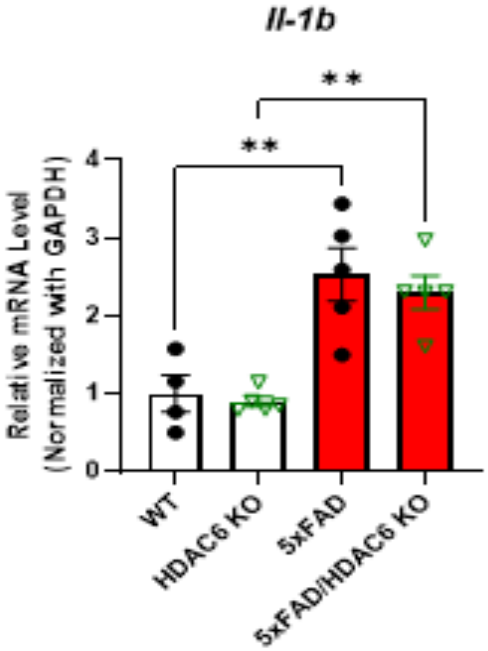


[그림 2-377. RT-qPCR 결과: Male, *Gfap*]

KBRI 극지연구소

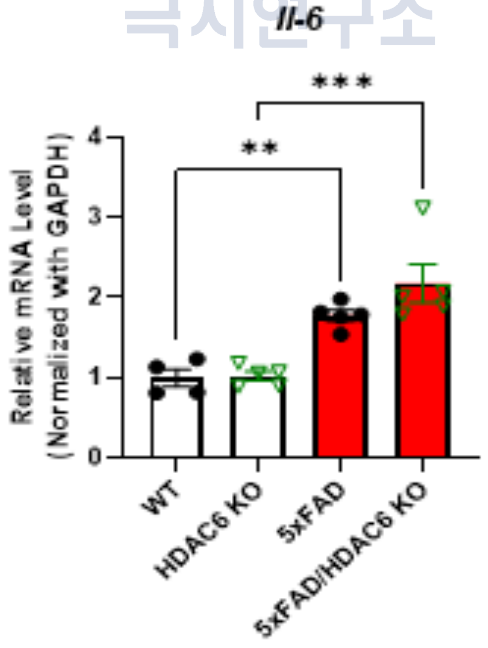


[그림 2-378. RT-qPCR 결과: Male, *Nlrp3*]

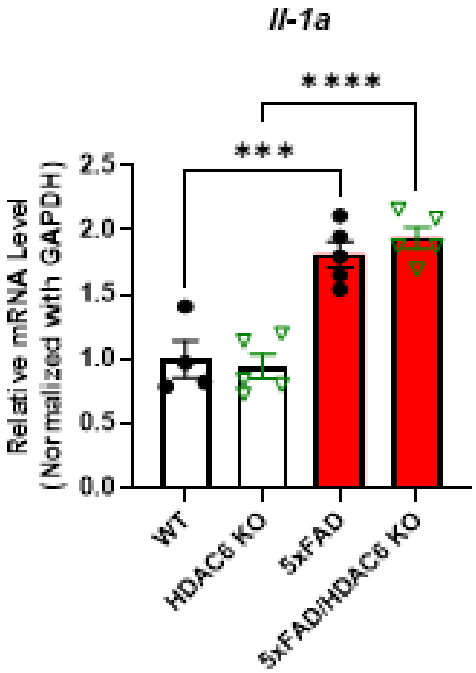


[그림 2-379. RT-qPCR 결과: Male, *Il1b*]

KOPRI
극지연구소

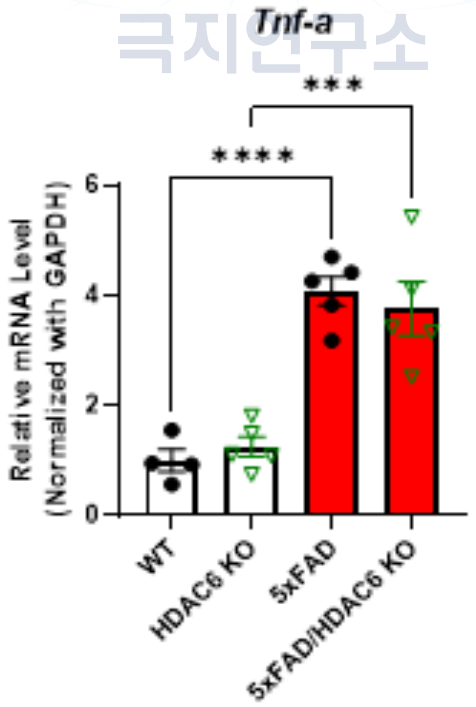


[그림 2-380. RT-qPCR 결과: Male, *Il6*]

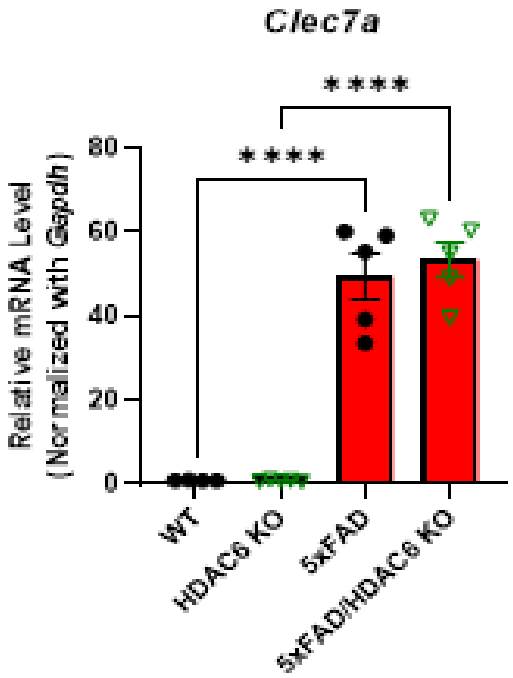


[그림 2-381. RT-qPCR 결과: Male, *Il1a*]

KOPRI
극지연구소

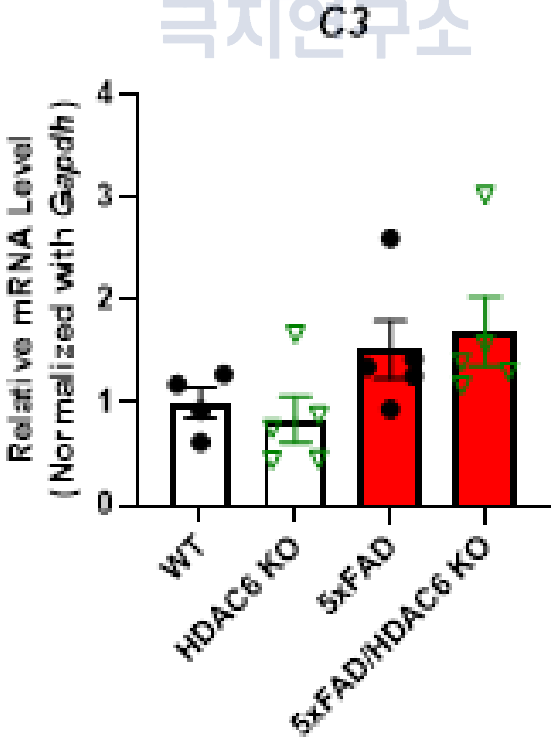


[그림 2-382. RT-qPCR 결과: Male, *Tnfa*]

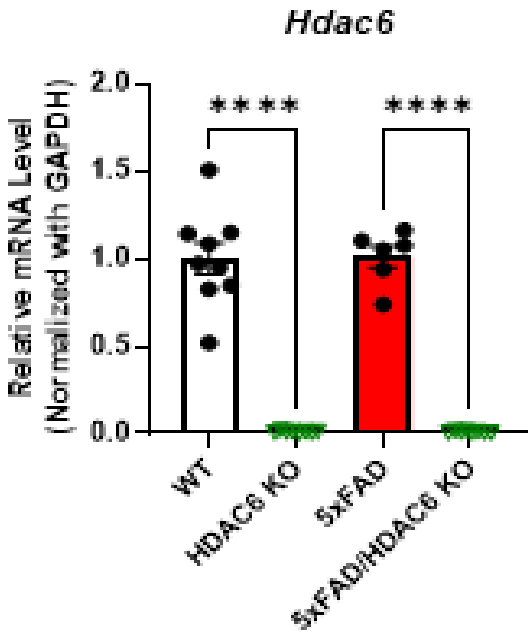


[그림 2-383. RT-qPCR 결과: Male, *Clec7a*]

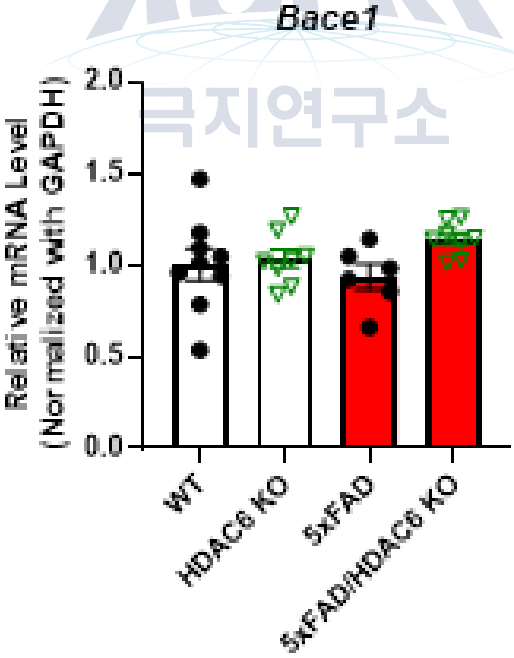
KOPRI
극지연구소



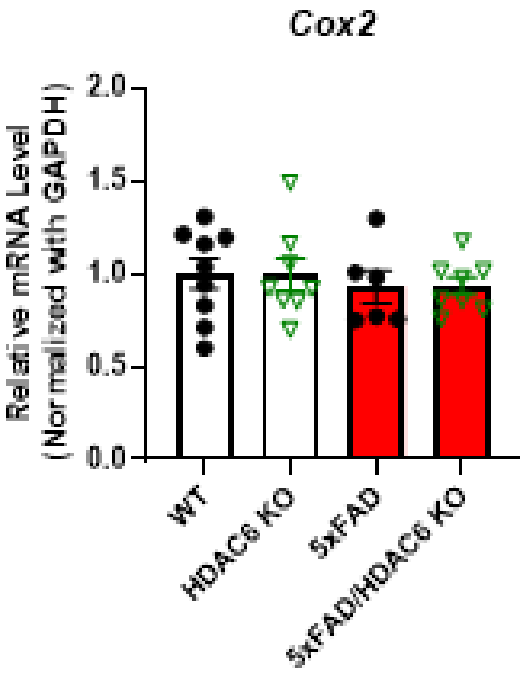
[그림 2-384. RT-qPCR 결과: Male, *C3*]



[그림 2-385. RT-qPCR 결과: Female, *Hdac6*]

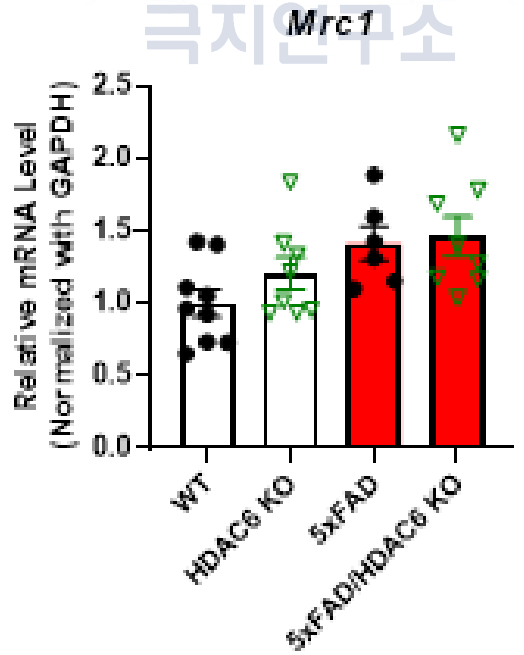


[그림 2-386. RT-qPCR 결과: Female, *Bace1*]

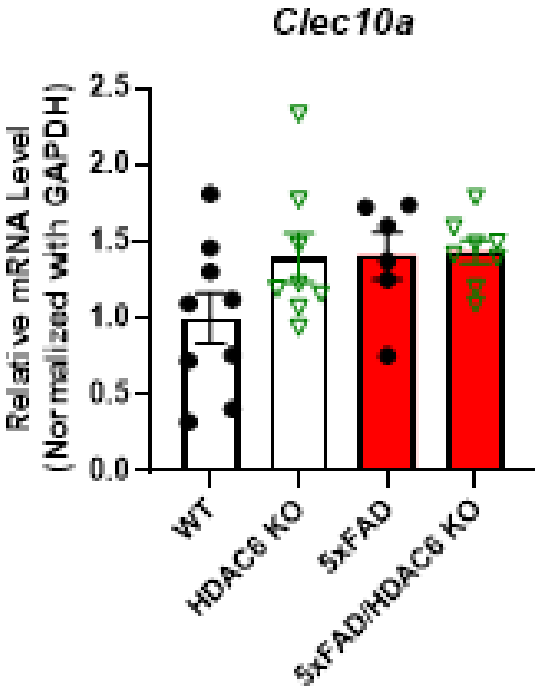


[그림 2-387. RT-qPCR 결과: Female, *Cox2*]

KOPRI 극지연구소

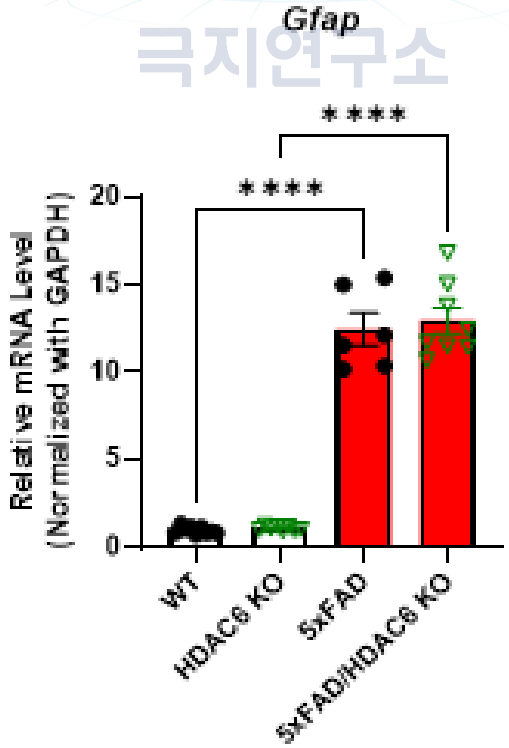


[그림 2-388. RT-qPCR 결과: Female, *Mrc1*]

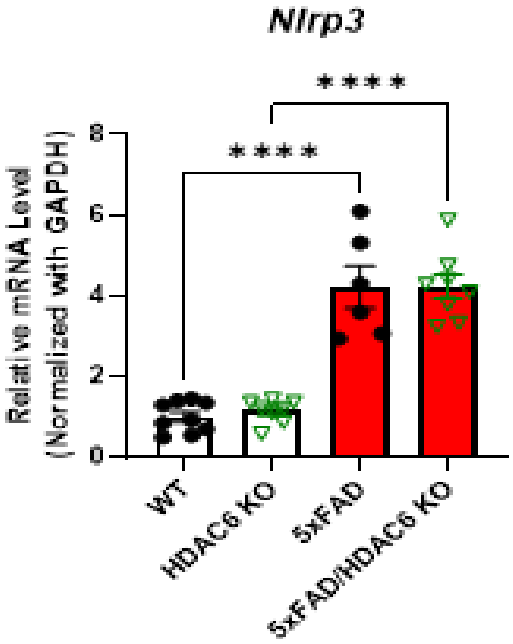


[그림 2-389. RT-qPCR 결과: Female, *Clec10a*]

KOPRI 극지연구소

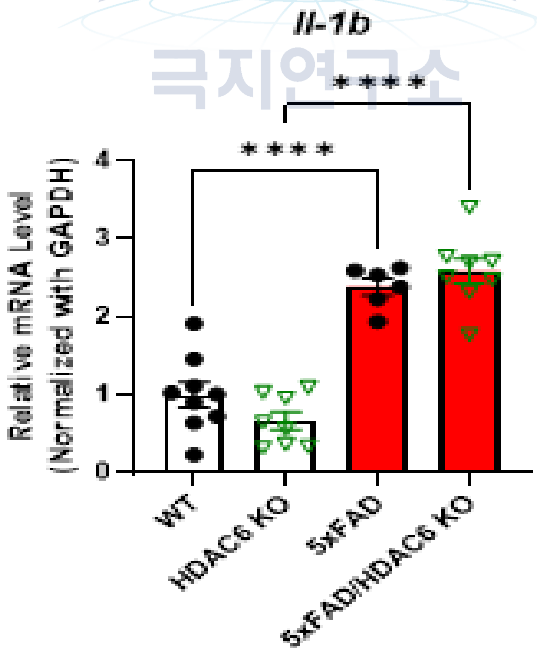


[그림 2-390. RT-qPCR 결과: Female, *Gfap*]

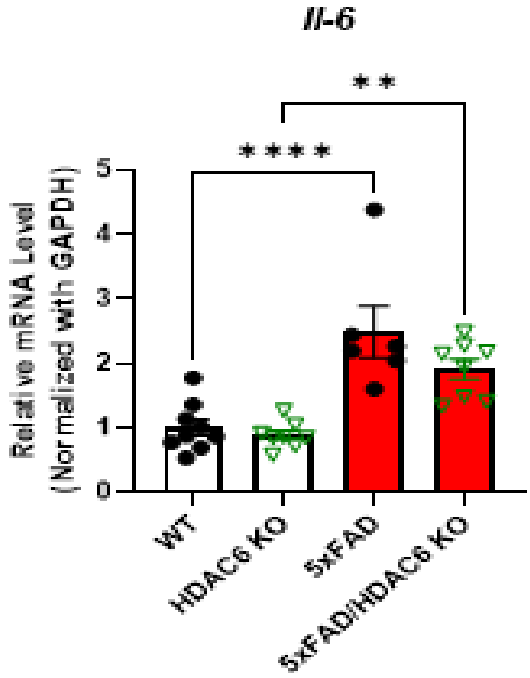


[그림 2-391. RT-qPCR 결과: Female, *Nlrp3*]

KOPRI
극지연구소

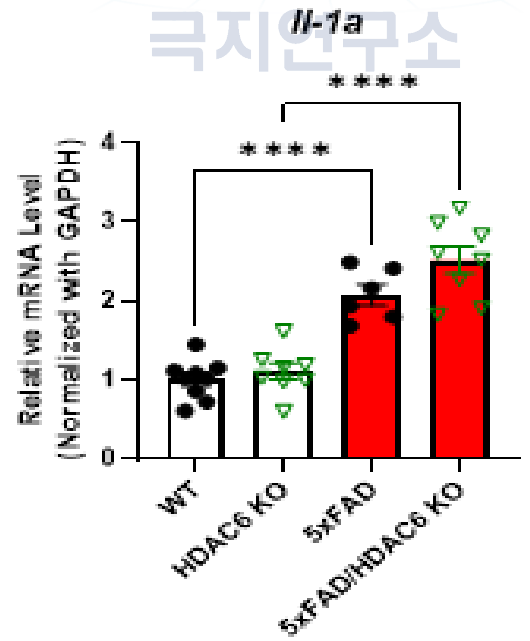


[그림 2-392. RT-qPCR 결과: Female, *Il1b*]

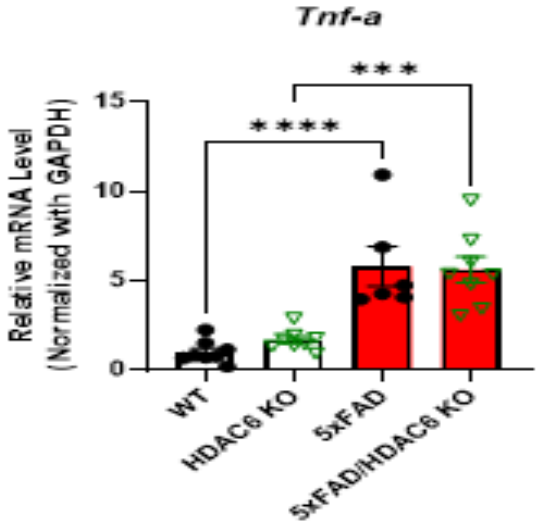


[그림 2-393. RT-qPCR 결과: Female, *Il6*]

KOPRI
극지연구소

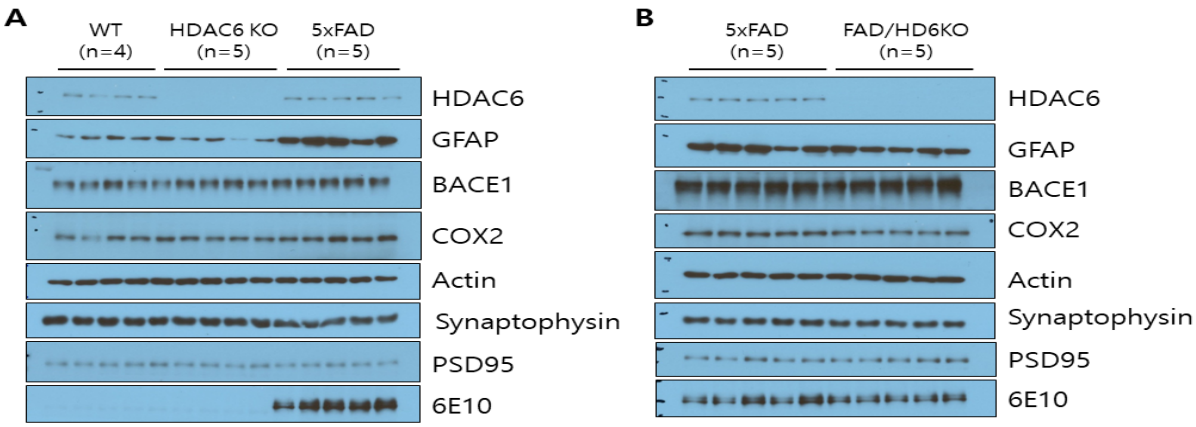


[그림 2-394. RT-qPCR 결과: Female, *Il1a*]



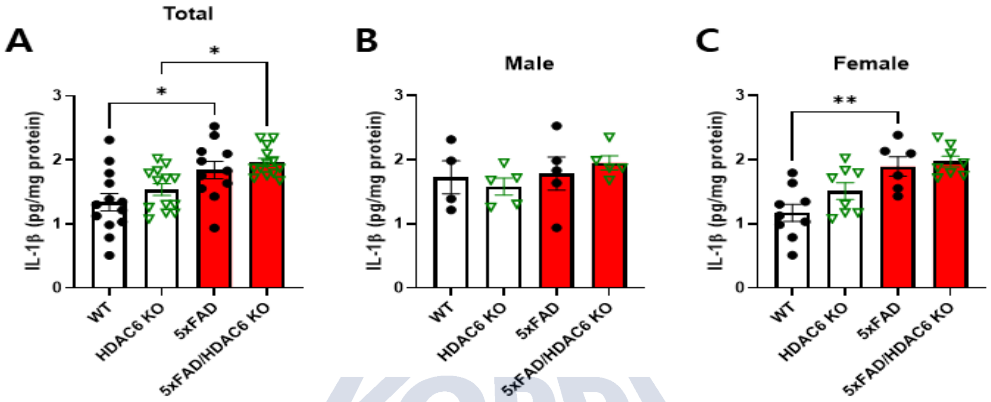
[그림 2-395. RT-qPCR 결과: Female, *Tnfa*]

23) 다음으로, 마우스의 대뇌에서 단백질 발현량을 분석함(그림 2-396). 수컷의 단백질 발현량을 분석하였을 때, HDAC6, GFAP, BACE1, COX2 단백질 발현량이 WT 그룹에 비해 5xFAD 그룹에서 증가했으며, Synaptophysin, PSD95 단백질 발현량은 WT 그룹에 비해 5xFAD 그룹에서 감소함(그림 2-396A). WT 그룹과 HDAC6 KO 그룹을 비교했을 때, 모든 단백질에서 큰 차이가 없음. 5xFAD와 5xFAD/HDAC6 KO 그룹을 비교했을 때, GFAP과 COX2 단백질 발현량이 감소했으며, BACE1, Synaptophysin, PSD95, APP 발현량에는 그룹 간에 큰 차이가 없음(그림 2-396B). 따라서 수컷 마우스의 경우, 알츠하이머 치매에서 증가한 GFAP, COX2의 발현량이 HDAC6가 knock-out 되었을 때 감소하는 것을 확인함



[그림 2-396. 5xFAD/HDAC6 KO 수컷 마우스의 단백질 발현량 비교]

24) 다음으로, 대뇌조직 RIPA-soluble 샘플에서 NLRP3 inflammasome의 활성정도 및 염증 반응을 보여주는 IL-1β 양을 측정함(그림 2-397). 알츠하이머 치매 그룹에서 그에 대응하는 각각의 대조군에 비해 IL-1β의 양이 유의미하게 증가한 것을 확인함(그림 2-397A). 그러나, HDAC6 knock-out에 의한 IL-1β의 생산량에는 차이가 없었음. 암컷과 수컷을 나누어 비교했을 때 수컷에서는 모든 그룹 간에 유의미한 차이가 없었으나, 암컷의 경우 5xFAD 그룹이 WT 그룹보다 유의미하게 IL-1β의 분비량이 증가함(그림 2-397B, C). 이를 통해 알츠하이머 치매에서 염증성 사이토카인의 생성량이 대조군에 비해 유의미하게 증가하지만 HDAC6에 의한 효과 차이는 나타나지 않음을 알 수 있음



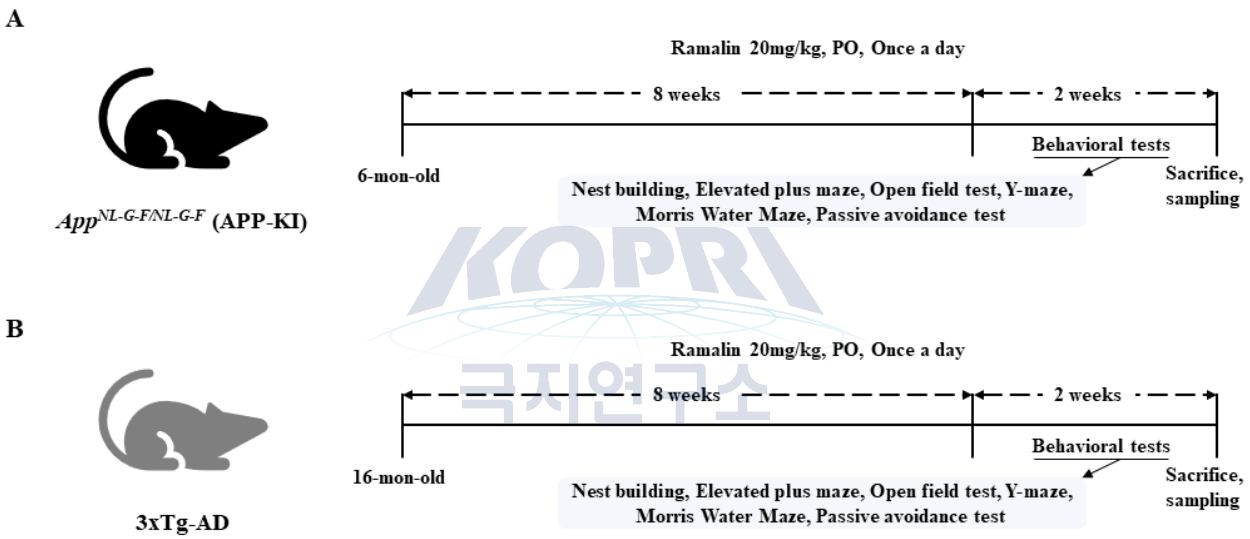
[그림 2-397. 5xFAD/HDAC6 KO 마우스의 IL-1β 양 측정]

KBRI 극지연구소

□ 연구내용 2-3. AD 동물 모델기반 유효성 평가

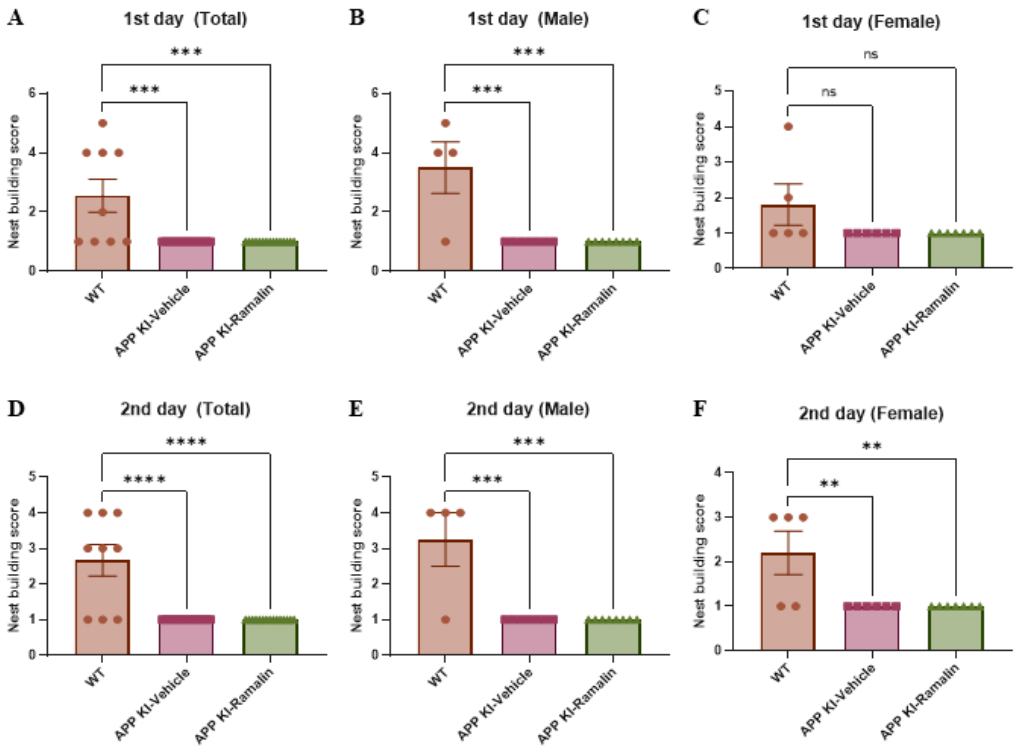
○ 3xTg-AD와 APP-KI 알츠하이머성 치매 동물모델 기반 라말린 유효성 평가

1) 본 연구진은 AD 동물모델에서의 라말린의 유효성을 평가하기 위하여 $App^{NL-G-F/NL-G-F}$ (APP-KI) AD 동물모델과 3xTg-AD 동물모델을 사용함. 6개월령의 APP-KI 동물모델과 16개월령의 3xTg-AD 동물모델에 하루 한 번 라말린 (20 mg/kg)을 8주간 경구투여한 뒤, 2주간 불안감 (anxiety)을 측정하는 행동실험(Elevated plus maze test, open field test)들과 인지능력, 공간학습력과 기억력(cognition, spatial learning and memory)을 측정하는 행동실험 (Y-maze test, Morris water maze test, passive avoidance test)들을 진행함(그림 2-398A, B)

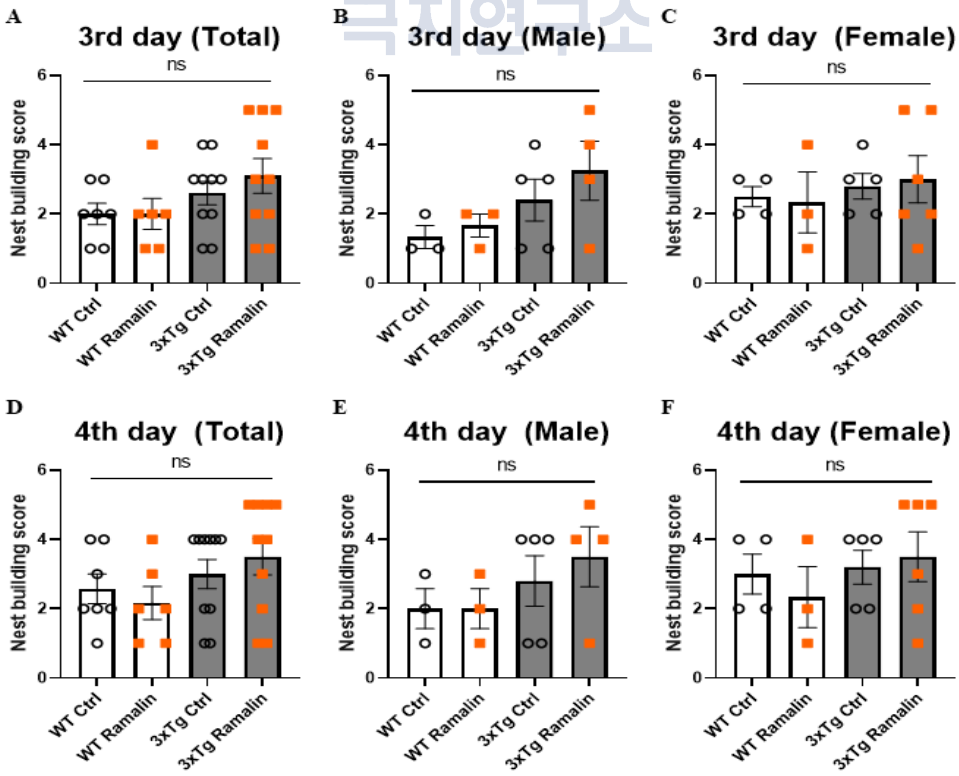


[그림 2-398. 라말린 *in vivo* 실험 계획]

2) 마우스의 general welfare를 측정할 수 있는 nest building test를 진행함(그림 2-399~400). APP-KI 마우스의 경우 vehicle군과 라말린군 모두 WT 마우스에 비해 nest building score가 유의미하게 낮아 welfare 정도가 낮은 것으로 해석될 수 있음(그림 2-399). 또한, APP KI-Vehicle군과 라말린군 간 차이가 없는 것으로 보아 라말린에 의한 welfare 개선 효과는 없는 것으로 판단됨(그림 2-399). 3xTg-AD 마우스의 경우 WT 마우스에 비해 nest building score가 높은 경향을 보였으나 유의미하지는 않음(그림 2-400)



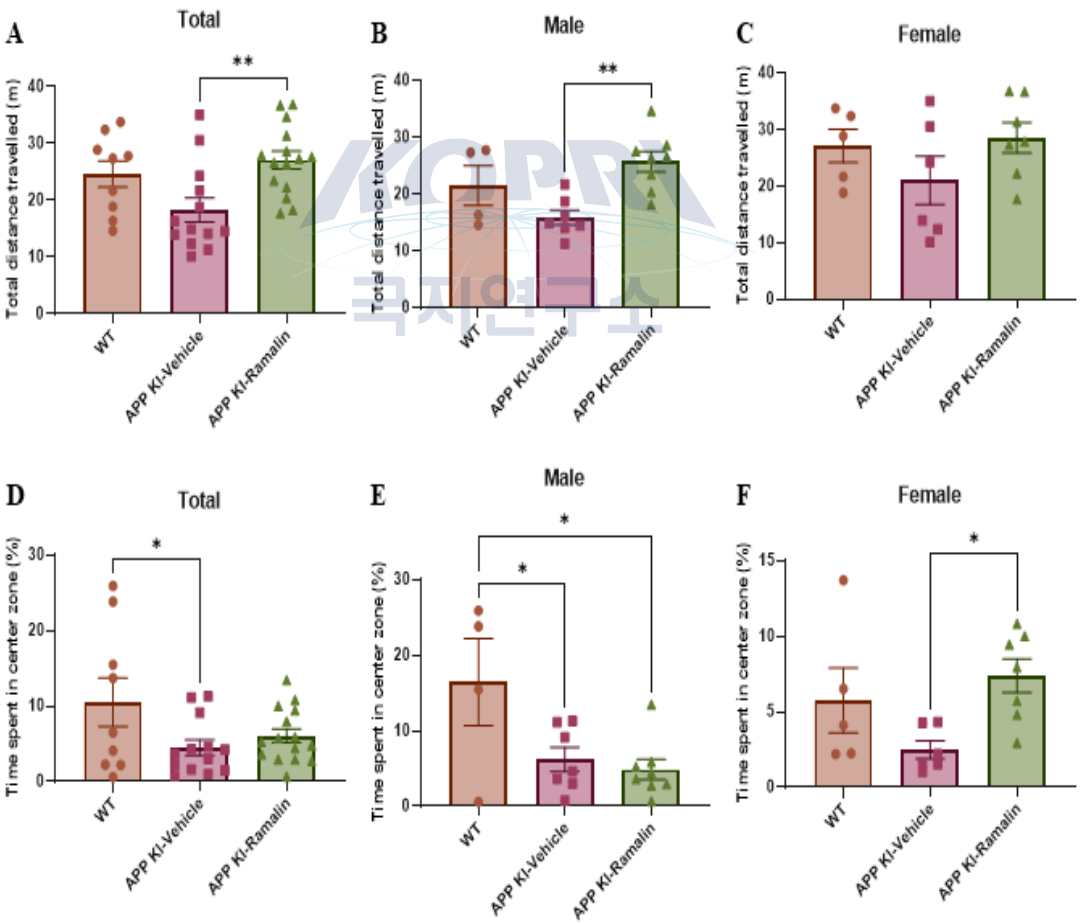
[그림 2-399. Nest building test 결과 (APP-KI)]



[그림 2-400. Nest building test 결과 (3xTg-AD)]

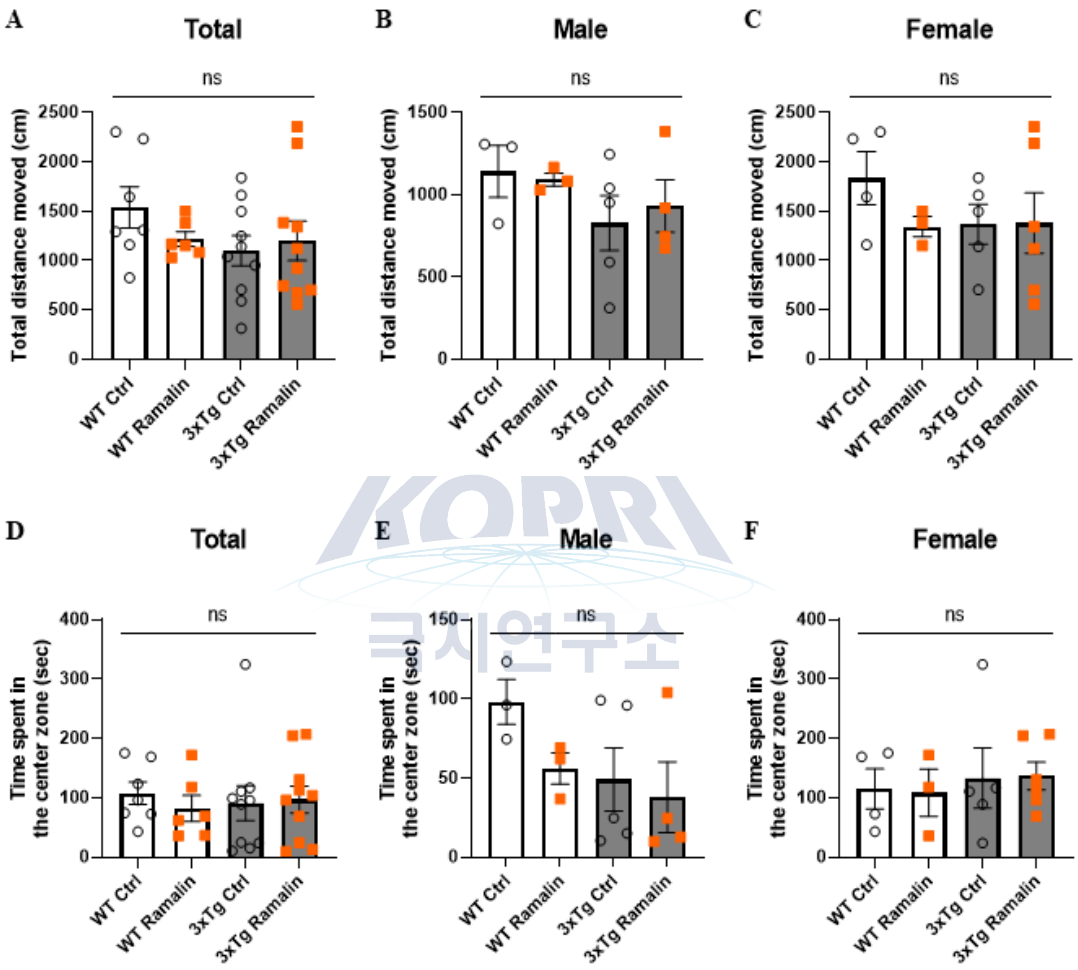
3) 마우스의 anxiety 정도를 비교할 수 있는 open field test를 진행함. APP-KI 마우스의 경우 vehicle군이 다른 군들에 비해 행동성이 떨어지는 경향을 보였으며 라말린을 투여한 군의 경우 male에서 vehicle을 투여한 군에 비해 유의미하게 행동성이 증가하였고 female에선 유의미하지는 않지만 증가하는 경향을 보임(그림 2-401A-C). Total로 비교했을 땐, APP KI-Vehicle, 라말린군 모두 WT군에 비해 center zone에 머무는 시간의 비율이 낮음(그림 2-401D)

4) 이를 성별을 나눠 분석을 진행하게 되면 male에서는 APP KI-Vehicle, 라말린군 모두 WT군에 비해 유의미하게 center zone에 머무른 시간의 비율이 낮았고, female에서는 APP KI-Vehicle군이 WT에 비해 center zone에 머문 시간의 비율이 낮았으나 라말린을 투여한 APP-KI군에서는 vehicle을 투여한 군에 비해 유의미하게 center zone에 머문 시간의 비율이 증가한 것을 확인할 수 있었음(그림 2-401E, F). 따라서 APP-KI female에서는 라말린에 의해 anxiety가 회복된 것으로 해석할 수 있음



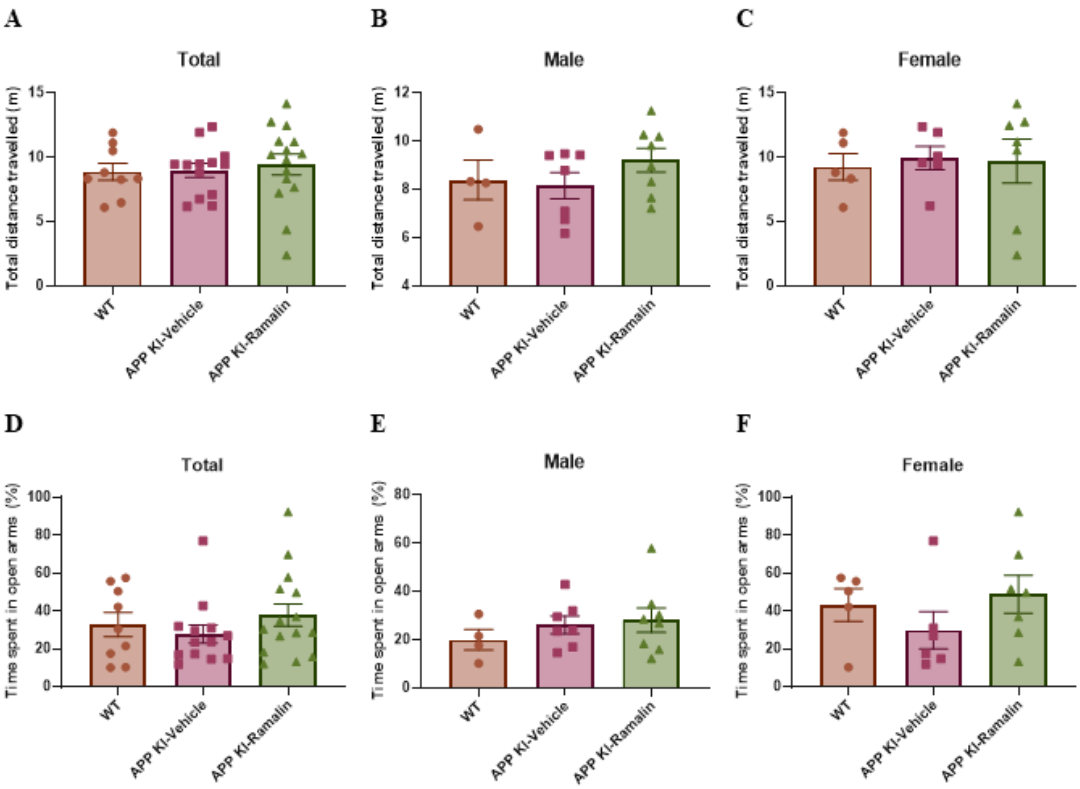
[그림 2-401. Open field test 결과 (APP-KI)]

5) 3xTg-AD 마우스의 경우 3xTg-AD군이 WT군에 비해 행동력이 떨어지는 경향을 보였지만 유의미하지는 않음(그림 2-402A-C). Total로 분석했을 때 center zone에 머문 시간은 각 군들 간에 유의미한 차이가 없음(그림 2-402D). 성별을 나눠 분석했을 땐, male에서 WT 라말린군, 3xTg Ctrl군, 3xTg 라말린군 모두 WT Ctrl군보다 center zone에 머문 시간이 낮은 경향을 보였으나 유의미하지는 않았고, female의 경우 군들간 유의미한 차이가 없음(그림 2-402E, F)



[그림 2-402. Open field test 결과 (3xTg-AD)]

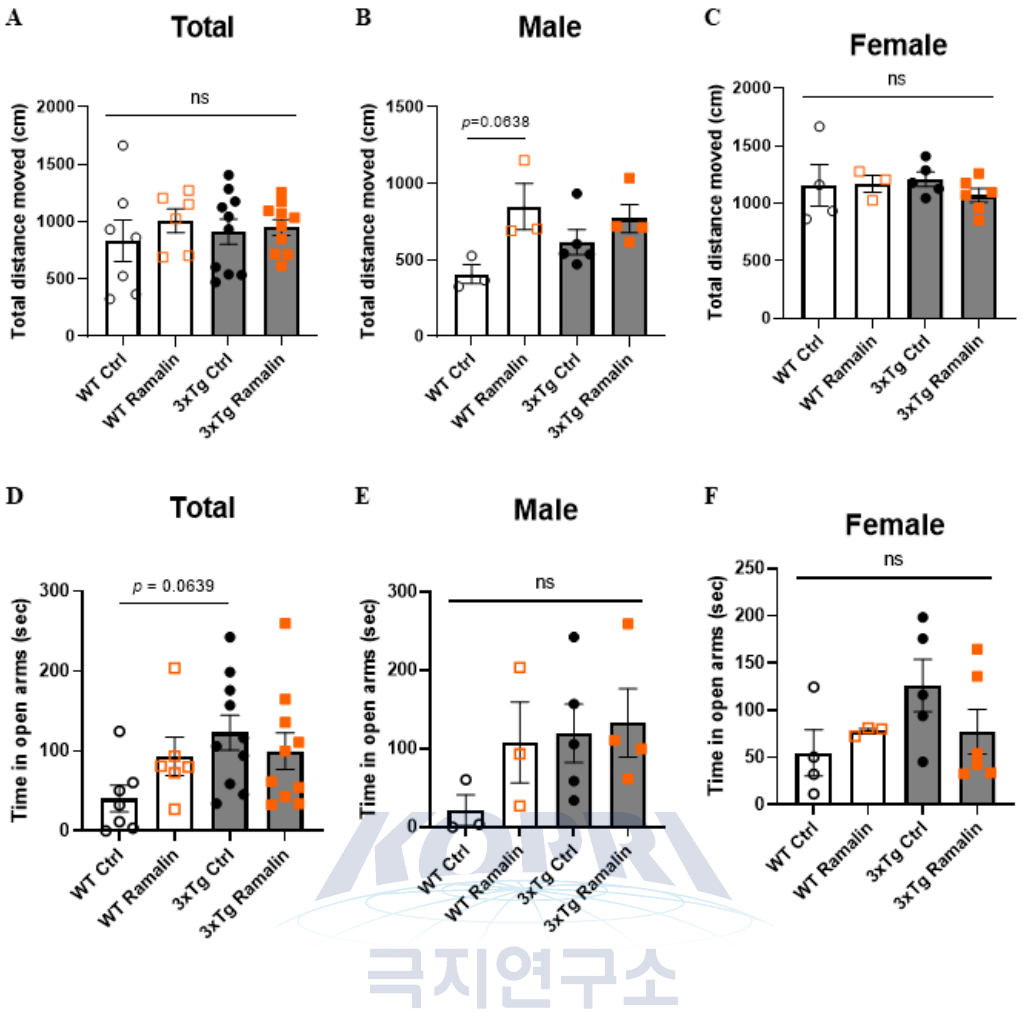
6) Open field test 이외에 마우스의 anxiety를 측정하는 실험으로 elevated plus maze test를 진행함. APP-KI의 경우 male군 중 APP KI-라말린군이 다른 군들에 비해 행동력이 높은 경향을 보였으나 유의미하지는 않았으며, 전반적으로 군들 간의 행동력 차이는 유의미하지 않음(그림 2-403A-C). Open arm에 머무른 시간의 비율을 female에서 분석했을 때, APP KI-Vehicle군이 WT군에 비해 낮았으며 APP KI-라말린군이 vehicle군에 비해 open arm에 머문 시간의 비율이 높은 경향을 보였으나 유의미하지는 않음(그림 2-403D-F)



[그림 2-403. Elevated plus maze test 결과 (APP-KI)]

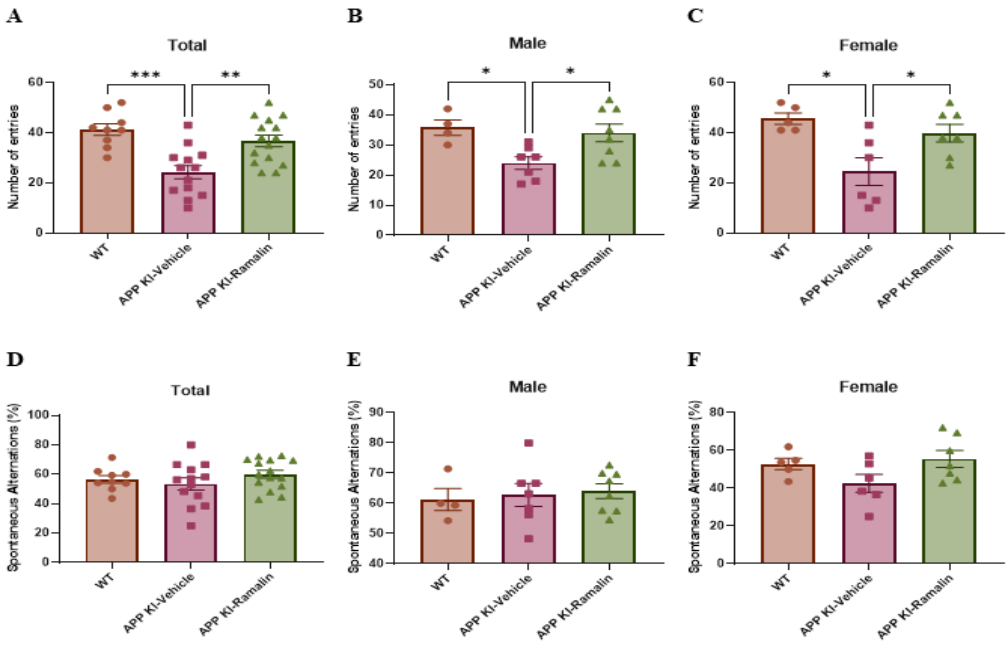
KOPRI
극지연구소

7) 3xTg-AD 마우스의 실험 결과를 분석했을 때, male에서 라말린을 투여한 군들 (WT 라말린, 3xTg 라말린)이 WT Ctrl군, 3xTg Ctrl군들에 비해 행동력이 높은 경향을 보였으나 유의미하지는 않았고, female에서는 각 군들 간의 행동력 차이가 미미함(그림 2-404A-C). Open arm에 머문 시간을 분석했을 때 total, male, female 모두에서 WT Ctrl군이 나머지 군들에 비해 open arm에 머문 시간이 낮은 경향을 보였는데 이는 WT Ctrl군이 다른 군들에 비해 상대적으로 anxiety가 높다고 해석할 수 있음(그림 2-404D-F). 앞선 open field test와 elevated plus maze test의 결과를 종합해봤을 때 라말린에 의한 anxiety 개선 효과는 없는 것으로 생각됨

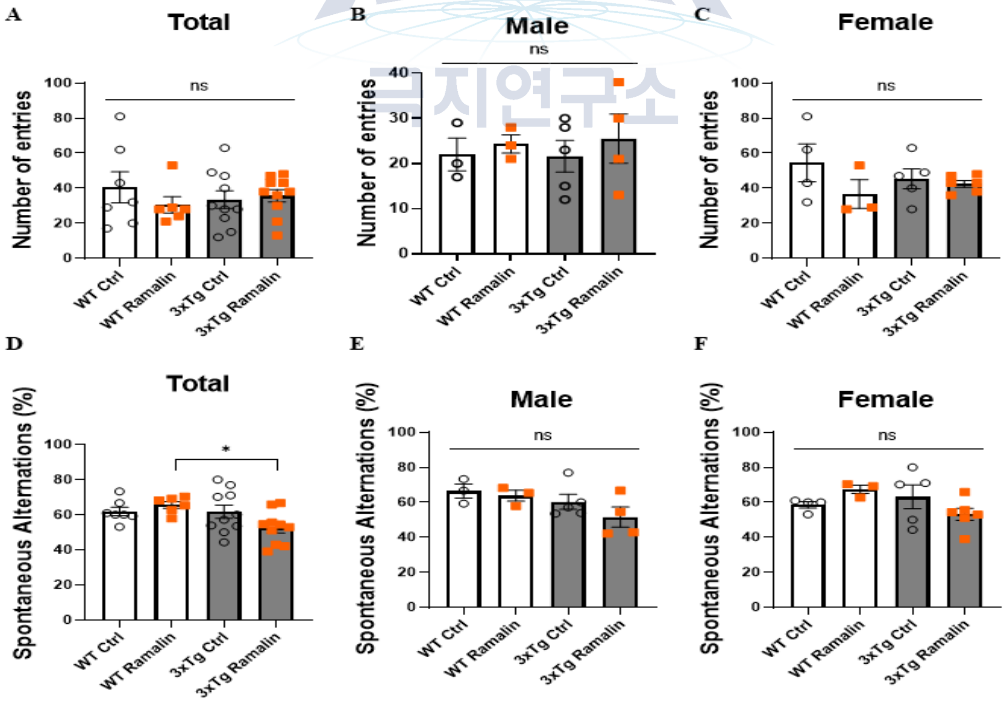


[그림 2-404. Elevated plus maze test 결과 (3xTg-AD)]

8) 단기 기억력과 공간지각능력을 평가할 수 있는 Y-maze test을 진행함. APP-KI의 경우 male과 female 모두에서 APP KI-vehicle군이 다른 두 군들에 비해 각 arm에 들어가는 entry 수가 유의미하게 적음(그림 2-405A-C). Spontaneous alternation 값은 total, male, female 모두에서 각 군들간 유의미한 차이가 없음(그림 2-405D-F). 3xTg-AD 마우스의 경우 각 arm에 들어가는 entry 수가 각 군들간 유의미한 차이가 없음(그림 2-406A-C). Spontaneous alternation 값의 경우 total에서 3xTg 라말린군이 WT 라말린군에 비해 유의미하게 낮은 값을 보였으나 성별을 나눠 분석하였을 땐 각 군들 간 유의미한 차이를 보이지 않음(그림 2-406D-F)

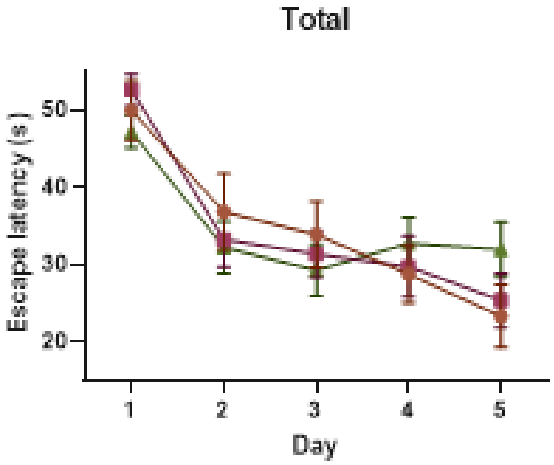


[그림 2-405. Y-maze test 결과 (APP-KI)]



[그림 2-406. Y-maze test 결과 (3xTg-AD)]

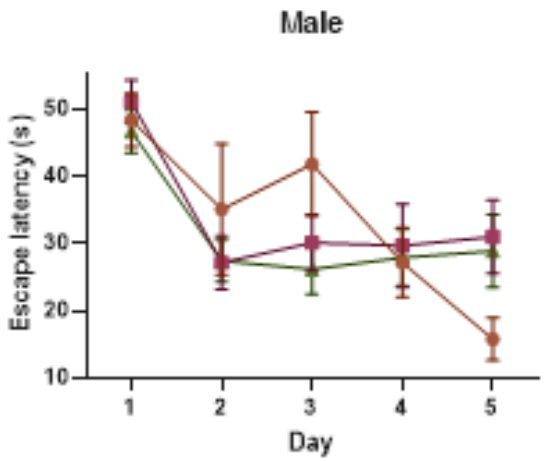
9) 공간 학습능력과 기억력 (spatial learning and memory)을 평가할 수 있는 Morris water maze test를 진행함. APP-KI의 경우 total에서 분석했을 때 5일간 이어지는 training기간 동안 각 군들 간 escape latency 차이가 유의미하지 않음(그림 2-407)



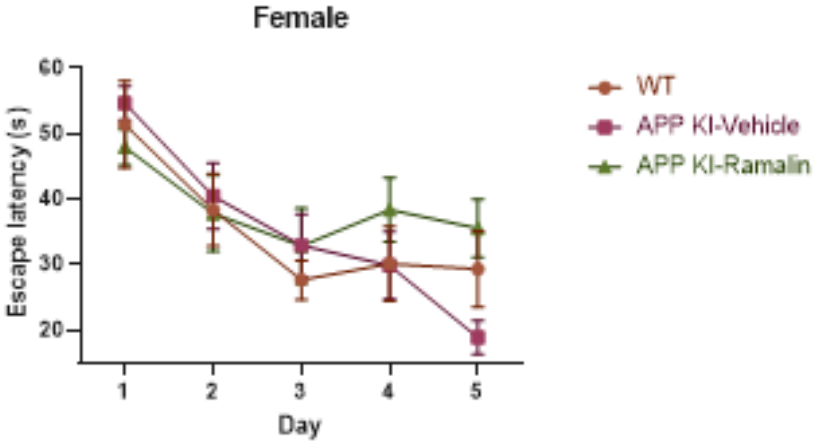
[그림 2-407. Morris water maze 결과: Total, escape latency, APP-KI]

KOPRI 극지연구소

10) 성별을 나눠 분석했을 때 male에서는 5일 차에 WT군의 escape latency가 APP-KI군들보다 빨랐으나 유의미하지는 않았고 female에서는 오히려 APP KI-vehicle군이 다른 두 군들에 비해 escape latency가 빠름(그림 408~409)



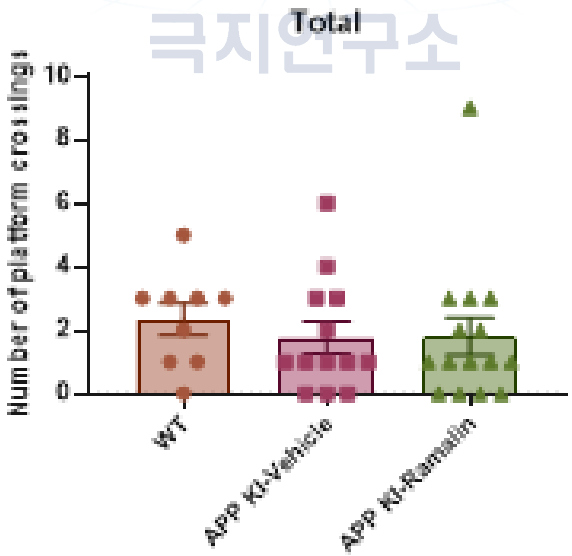
[그림 2-408. Morris water maze 결과: Male, escape latency, APP-KI]



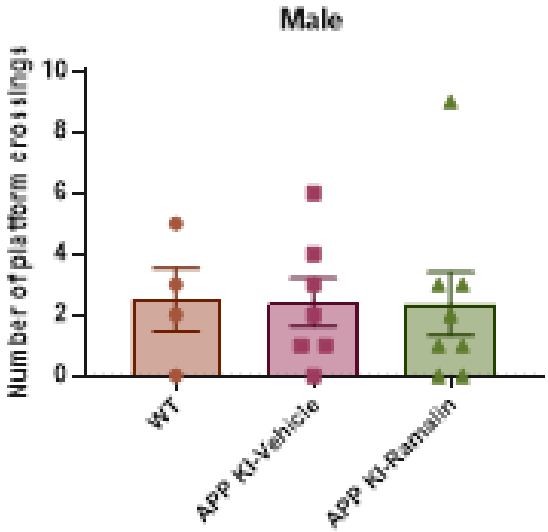
[그림 2-409. Morris water maze 결과: Female, escape latency, APP-KI]

11) 6일 차 probe day의 결과를 분석했을 때 total과 male에서는 각 군들 간 platform crossing 수에는 유의미한 차이를 보이지 않음(그림 2-410~411)

KOPRI 극지연구소



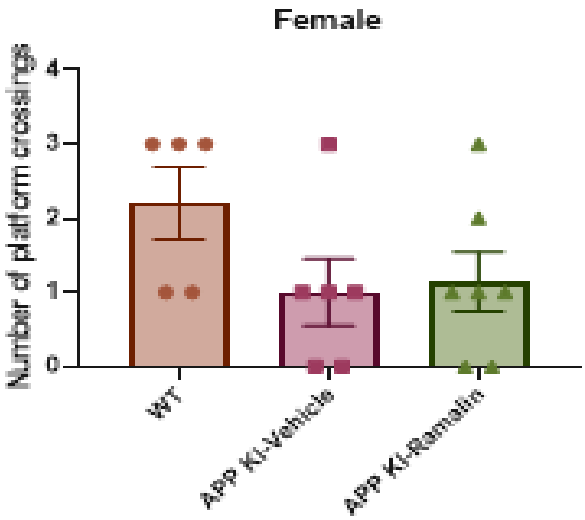
[그림 2-410. Morris water maze 결과: Total, number of platform crossings, APP-KI]



[그림 2-411. Morris water maze 결과: Male, number of platform crossings, APP-KI]

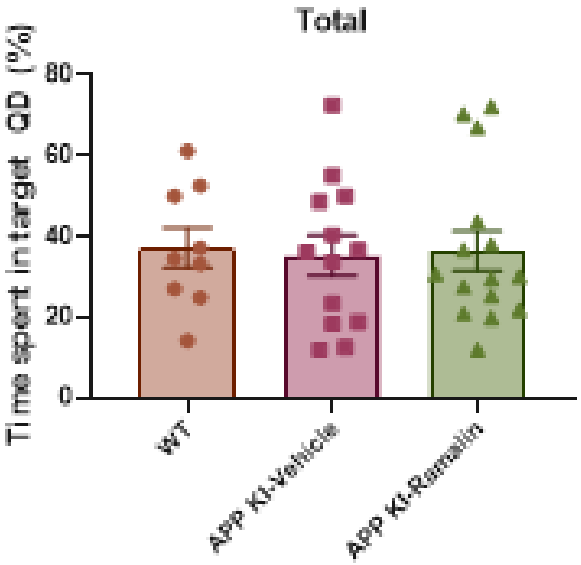
12) Female의 경우 WT군이 다른 APP-KI군들에 비해 platform crossing 수가 높은 경향을 보였으나 유의미하지는 않음(그림 2-412)

KOBRI 극지연구소



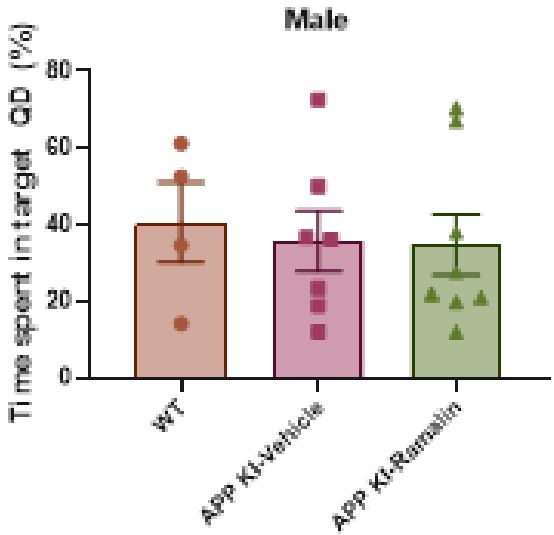
[그림 2-412. Morris water maze 결과: Female, number of platform crossings, APP-KI]

13) Platform이 존재하는 사분면 (Target quadrant (QD))에 머무른 시간의 비율을 비교했을 때 total, male, female 모두에서 각 군들 간 유의미한 차이를 보이진 않음(그림 2-413, ~415)

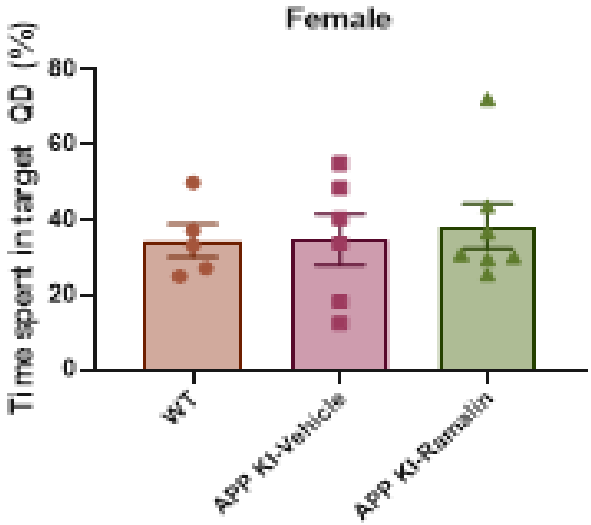


[그림 2-413. Morris water maze 결과: Total, time spent in target QD, APP-KI]

KBRI
극지연구소

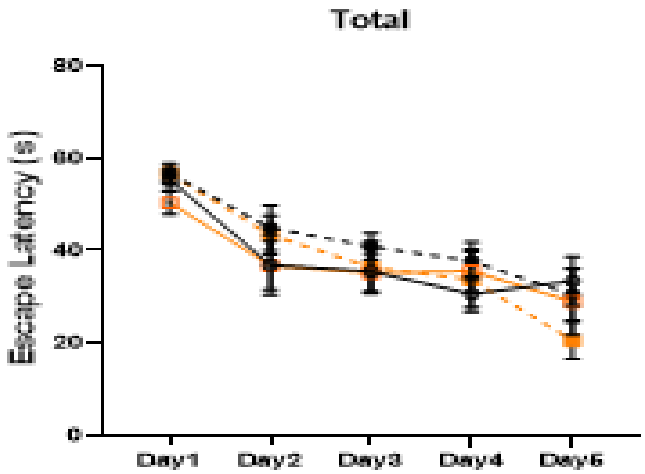


[그림 2-414. Morris water maze 결과: Male, number of platform crossings, APP-KI]

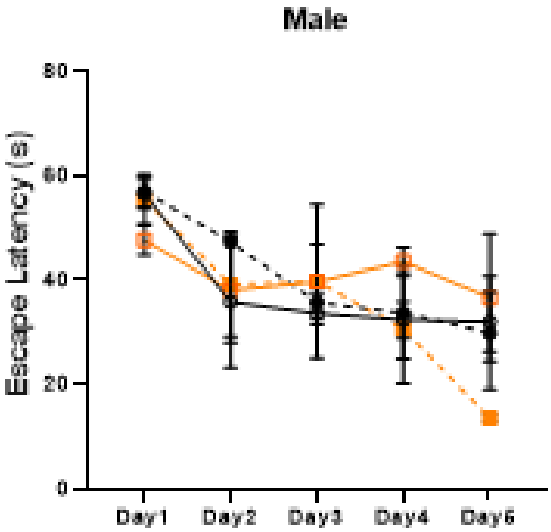


[그림 2-415. Morris water maze 결과: Female, number of platform crossings, APP-KI]

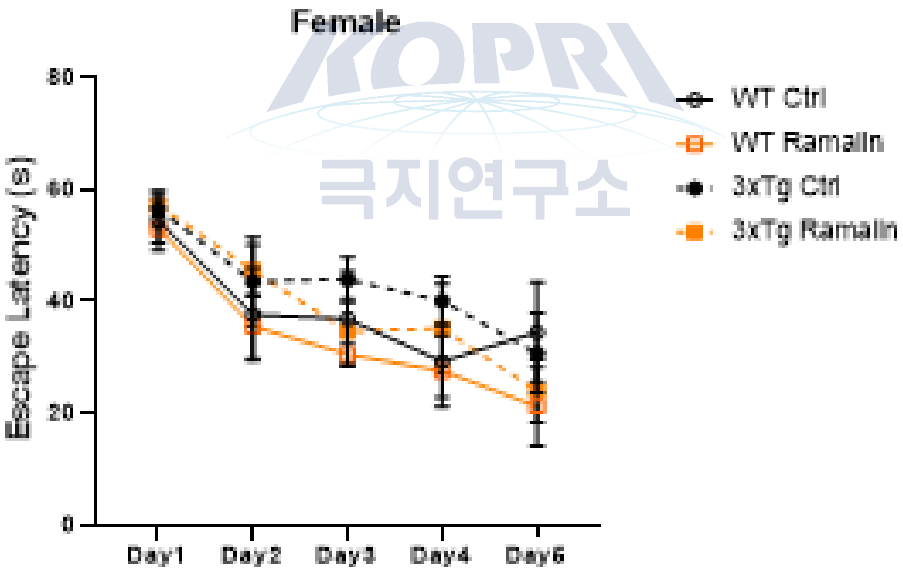
14) 3xTg-AD 마우스의 경우 5일간 이어진 training기간 동안 escape latency가 유의미한 차이를 보이지는 않았으나 3xTg 라말린군이 training 5일 차에서 가장 빠른 escape latency를 보임(그림 2-416). 성별을 나눠 분석하면 male에서도 training 5일 차에서 3xTg 라말린군이 가장 빠른 escape latency를 보였으며, female의 경우엔 3xTg 라말린군이 3xTg Ctrl군보다 빠른 escape latency를 보임(그림 2-417~418). 이후 시행된 6일 차 probe day의 결과를 분석했을 때 3xTg 라말린군이 3xTg Ctrl군보다 유의미하게 높은 platform crossing 수를 기록함(그림 2-419)



[그림 2-416. Morris water maze 결과: Total, escape latency, 3xTg-AD]

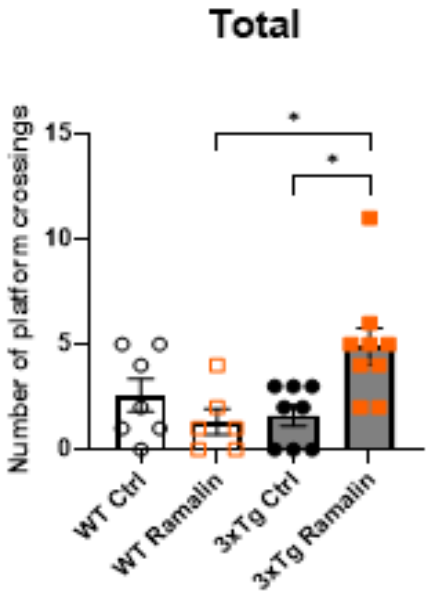


[그림 2-417. Morris water maze 결과: Male, escape latency, 3xTg-AD]



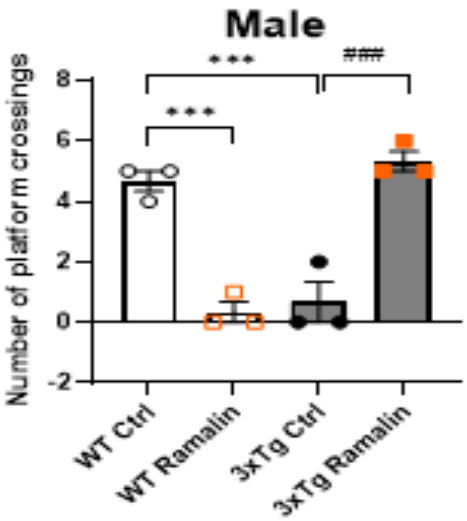
KOPRI 극지연구소

[그림 2-418. Morris water maze 결과: Female, escape latency, 3xTg-AD]



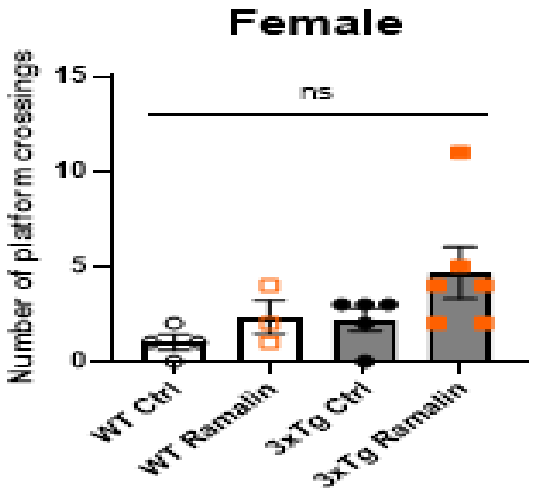
[그림 2-419. Morris water maze 결과: Total, number of platform crossings, 3xTg-AD]

15) 성별을 나눠 분석했을 때, male에서는 WT Ctrl군이 WT 라말린군과 3xTg Ctrl군보다 유의하게 높은 platform crossing 수를 기록했으며, 3xTg 라말린군은 3xTg Ctrl군보다 유의하게 높은 platform crossing 수를 기록함(그림 2-420)



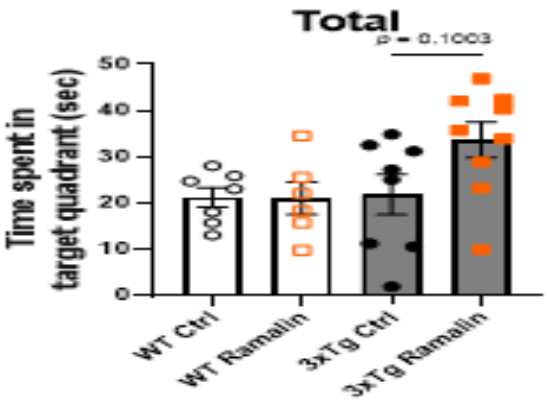
[그림 2-420. Morris water maze 결과: Male, number of platform crossings, 3xTg-AD]

16) Female에서는 유의하지는 않지만 3xTg 라말린군이 3xTg Ctrl군보다 platform crossing 수가 높은 경향을 보임(그림 2-421)

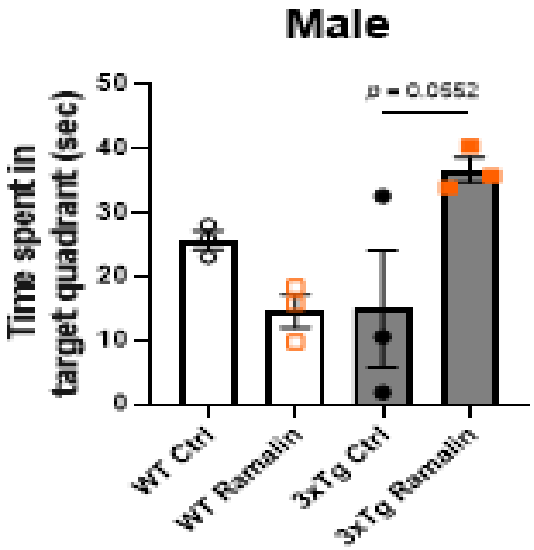


[그림 2-421. Morris water maze 결과: Female, number of platform crossings, 3xTg-AD]

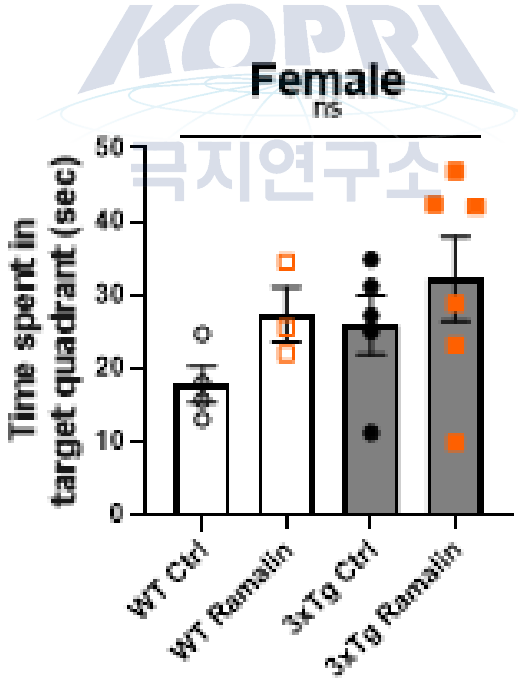
17) Platform이 있는 사분면 (Target quadrant)에 머무른 시간을 비교했을 때 유의하지는 않지만 3xTg 라말린군이 다른 군들에 비해 target quadrant에 머무른 시간이 긴 경향을 보였으며, 이러한 경향은 male과 female 모두에서 나타남(그림 2-422-424). Morris water maze 결과를 종합해봤을 때, 라말린이 APP-KI 동물모델에는 효과가 없는 것처럼 나타났으나 3xTg-AD 동물 모델에 대해서는 어느 정도 공간 학습력과 기억력의 개선을 가져온 것처럼 보임



[그림 2-422. Morris water maze 결과: Total, time spent in target QD, 3xTg-AD]

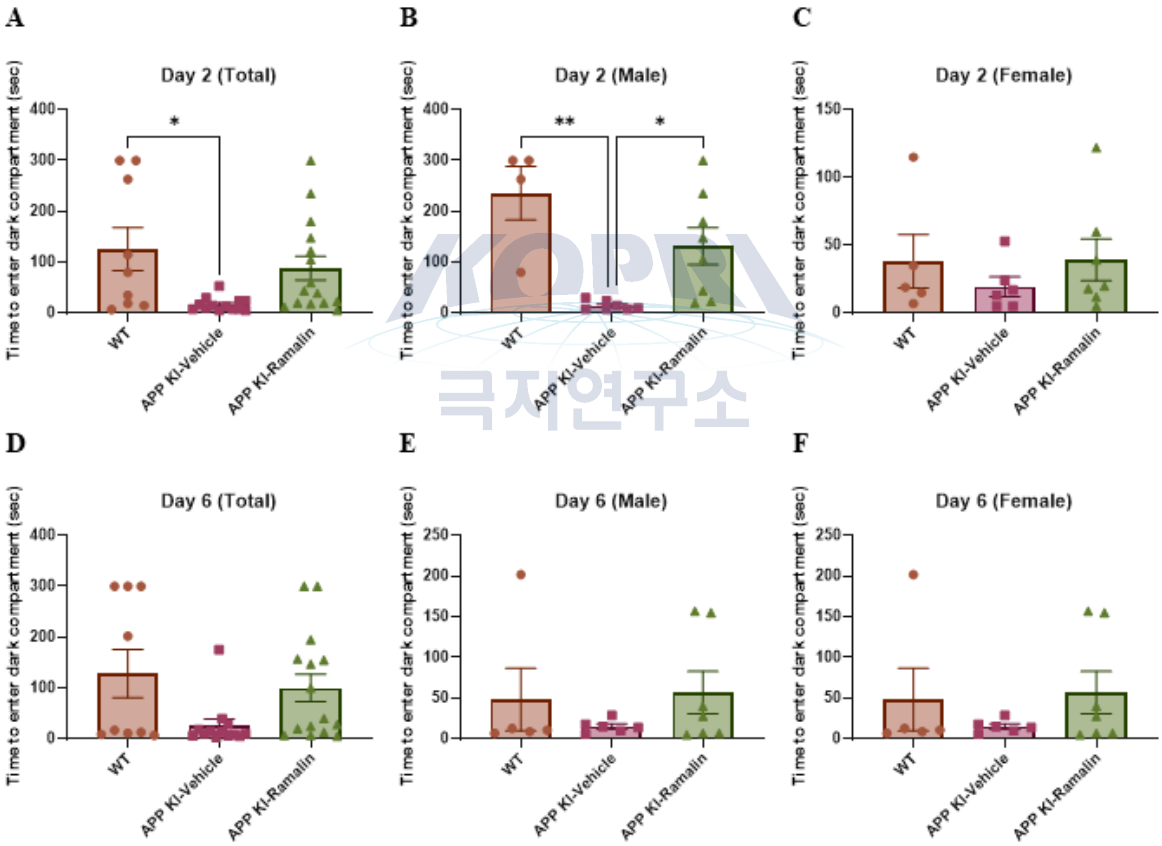


[그림 2-423. Morris water maze 결과: Male, number of platform crossings, 3xTg-AD]



[그림 2-424. Morris water maze 결과: Female, number of platform crossings, 3xTg-AD]

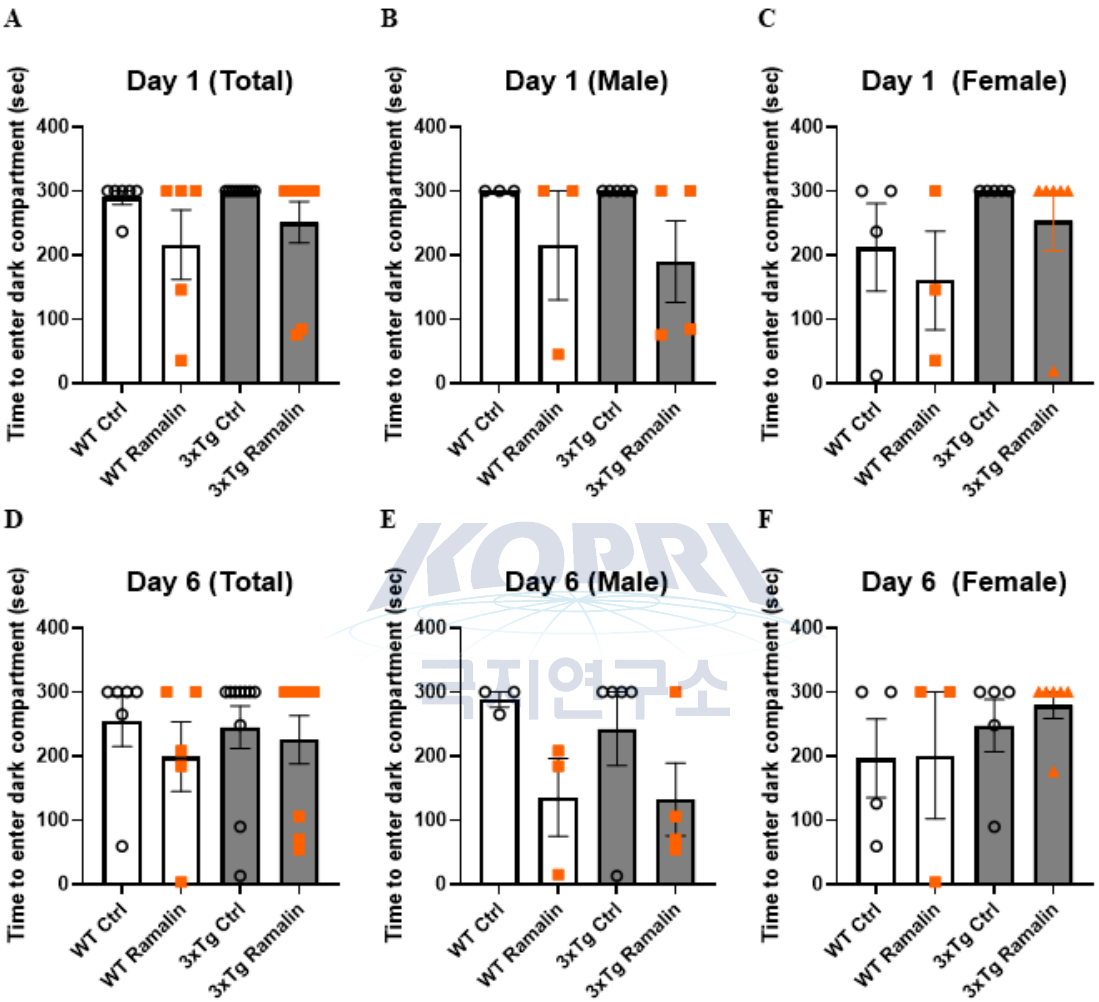
11) 마지막으로 자극이나 공포에서 비롯된 (fear-motivated) 단기, 장기 기억력을 측정할 수 있는 passive avoidance test를 진행함. APP-KI 동물 모델의 경우 전기 충격을 주고 2일이 되는 시점에 실험을 진행했을 때 APP KI-vehicle군이 WT군에 비해 유의하게 암실로 들어가는 데 걸리는 시간이 짧음(그림 2-425A). Total에서 비교했을 때 APP KI-라말린군이 유의하지는 않지만 APP KI-vehicle군에 비해 암실로 들어가는 데 걸리는 시간이 오래 걸렸으며 이를 성별을 나눠 분석하게 되면 male에서는 APP KI-라말린군이 APP KI-vehicle군에 비해 유의하게 암실로 늦게 들어갔으며, female에서는 유의하지는 않았지만 늦게 들어가는 경향을 보임(그림 2-425B, C). 전기 자극을 주고 6일이 지난 시점에서 암실로 들어가는 데 걸리는 시간을 다시 측정하였을 때 유의하지는 않았지만 2일 차에서 나왔던 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었음(그림 2-425D-F)



[그림 2-425. Passive avoidance test 결과 (APP-KI)]

12) 3xTg-AD 마우스의 경우 전기 자극을 주고 1일이 지난 시점과 6일이 지난 시점에서 암실로 들어가는 데 걸리는 시간을 측정함. 그 결과, 1일 차에서 라말린을 투여한 군들 (WT 라말린, 3xTg 라말린)이 유의하지는 않지만, 각각 WT Ctrl군과 3xTg Ctrl군보다 암실로 빠르게 들어감(그림 2-426A-C). 전기 자극을 주고 6일이 지난 시점에서도 1일 차와 유사하게 total과 male에서 라말린을 투여한 군들 (WT 라말린, 3xTg 라말린)이 WT Ctrl군과

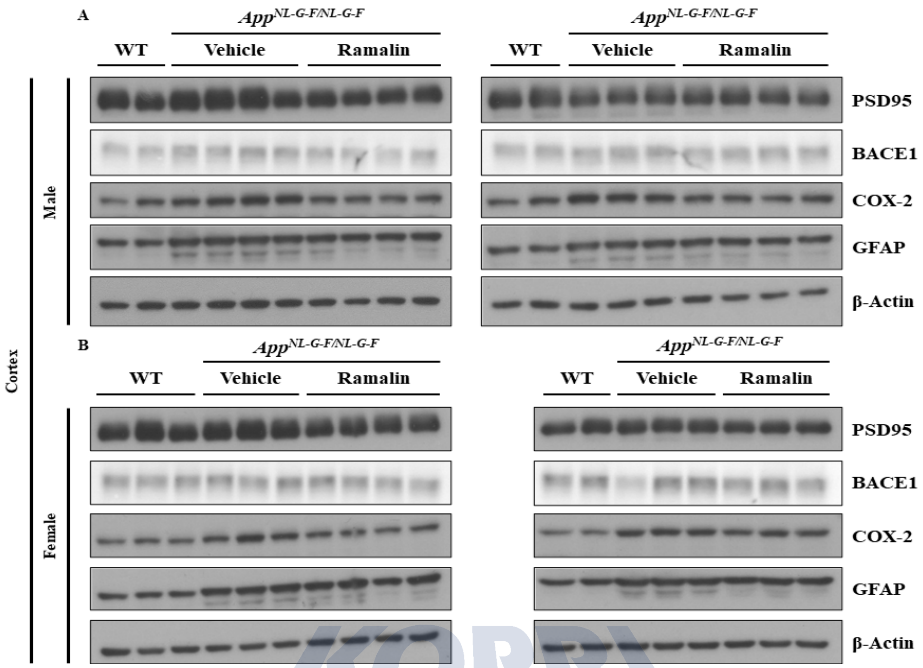
3xTg Ctrl군에 비해 암실로 빠르게 들어가는 경향을 보였고, female의 경우 3xTg 라말린군의 경우 3xTg Ctrl군보다 암실로 늦게 들어간 경향이 있으나 유의하지는 않음(그림 2-426D-F). Passive avoidance test의 결과를 종합해봤을 때, APP-KI 동물 모델에서는 라말린이 공포에 의한 단기, 장기 기억에는 어느 정도 효과를 보이는 듯 하지만 3xTg-AD 동물 모델에 대해서는 효과가 미미함



[그림 2-426. Passive avoidance test 결과 (3xTg-AD)]

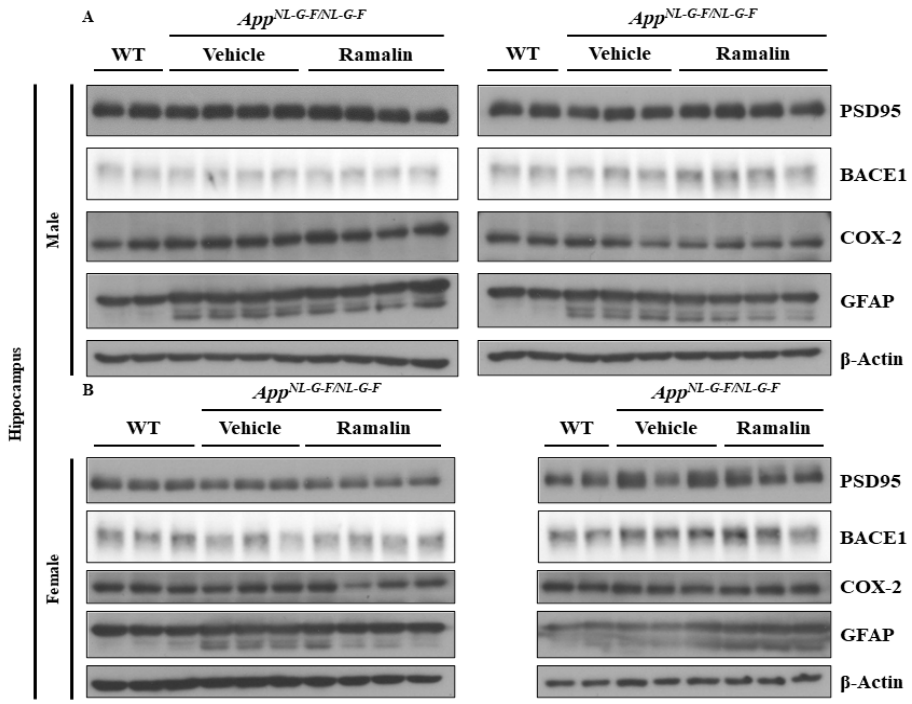
13) 행동실험이 모두 끝난 후 마우스를 모두 sacrifice하여 피질(Cortex, CTX) 부분과 해마(Hippocampus) 부분을 분리하여 추출함. 이후 각각의 뇌 조직을 homogenize하여 알츠하이머성 치매와 관련이 있는 단백질 및 mRNA의 발현 정도를 확인함. 먼저, PSD95와 BACE1의 경우 단백질 발현 정도가 각 군들 사이에서 유의한 차이가 있지는 않음(그림 147, 148). COX-2 단백질의 경우 cortex에서 WT군 대비 APP KI-vehicle군에서 유의하게 발현이 증가해있으며 APP KI-vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 발현량이 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않음(그림 2-427, 428, 429A-C). Hippocampus에서의 COX-2

단백질 발현량은 각 군들 사이에 유의한 차이가 없음(그림 2-427, 428, 429D-F). GFAP 단백질의 경우 male CTX에서 APP KI-vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 유의하게 발현량이 증가하기는 했지만 total에서는 라말린에 의한 유의한 차이를 보이진 않음(그림 2-427)

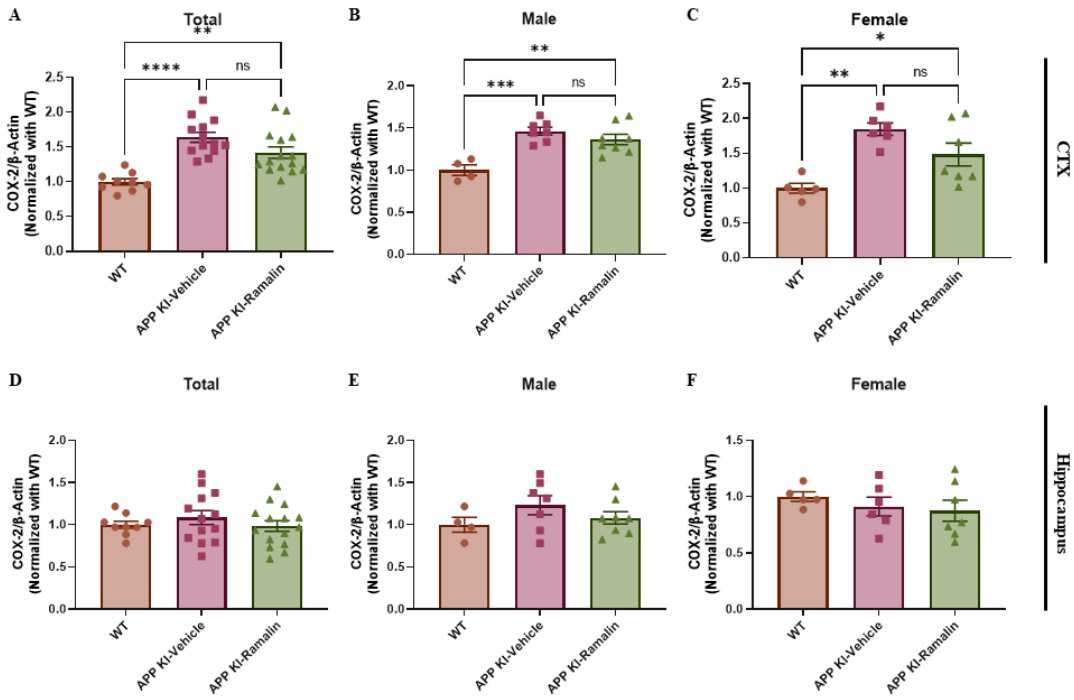


[그림 2-427. Western blot 결과 (APP-KI, Cortex)]

KBRI 극지연구소



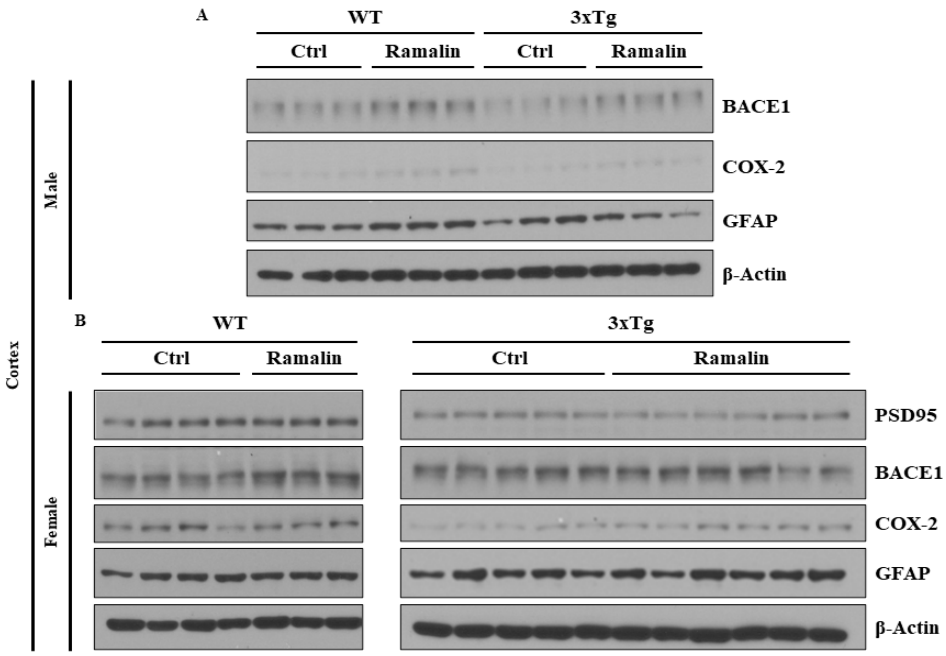
[그림 2-428. Western blot 결과 (APP-KI, Hippocampus)]



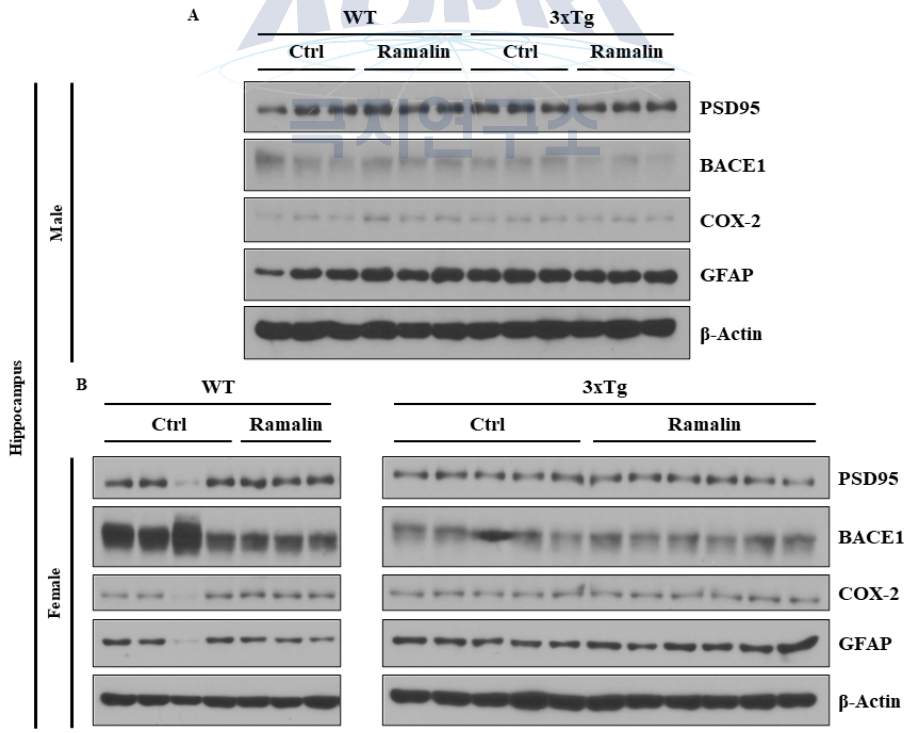
[그림 2-429. 단백질 정량 결과 (APP-KI)]

14) 3xTg-AD 마우스의 경우 male cortex에서 라말린에 의해 BACE1의 발현량이 유의하게 증가함(그림 2-430A, 2-432B). Female cortex에서는 라말린에 의해 BACE1의 발현량이 유의하지는 않지만 감소하는 경향을 보였고 이를 total로 분석하여 3xTg Ctrl군과 3xTg 라말린군 사이의 유의한 차이가 없는 것을 확인함(그림 2-430B, 2-432A, C). Hippocampus의 경우 male에서 라말린에 의해 3xTg Ctrl 대비 유의하게 BACE1의 발현량이 감소한 것을 확인했으며 female군에서는 유의하지는 않지만 감소한 경향을 확인했고, total로 분석하게 되면 라말린에 의해 3xTg Ctrl군 대비 유의하게 BACE1의 발현량이 감소한 것을 확인함 (그림 2-431, 2-433A-C)

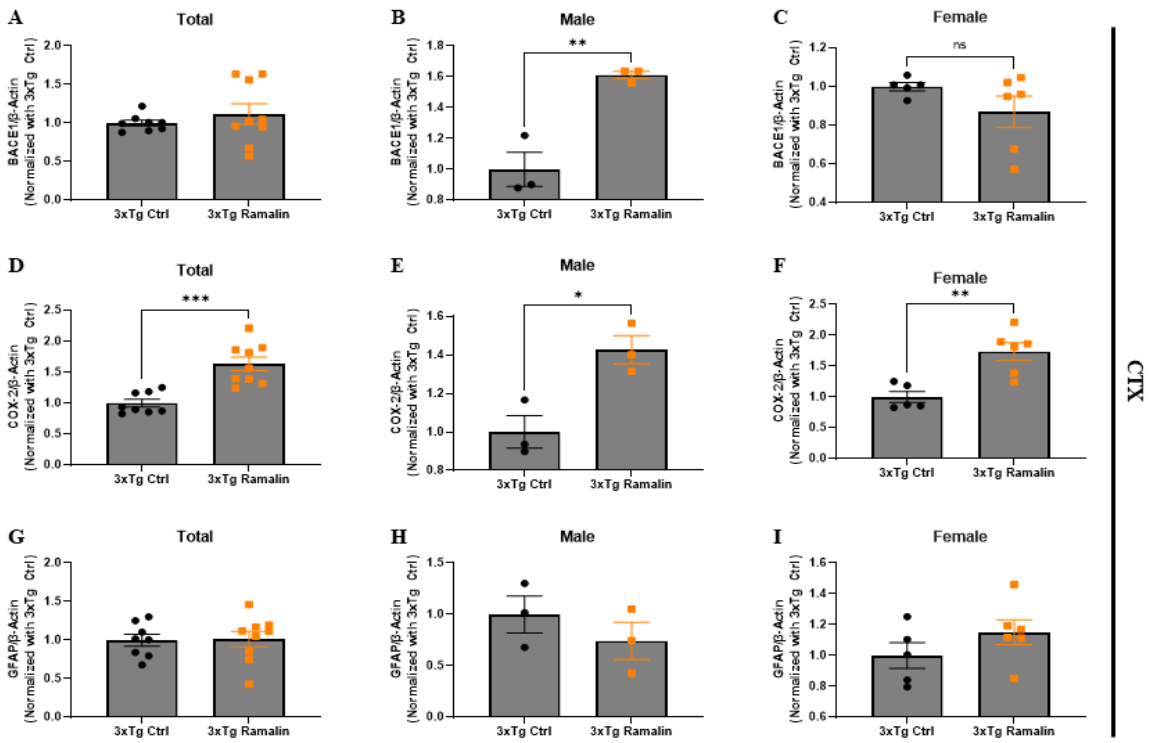
15) COX-2의 경우 CTX에서 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 유의하게 발현이 증가했으며(그림 2-430, 432D-F), male hippocampus에서 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 유의하지는 않지만 감소하는 경향을 확인함(그림 2-431A, 2-433E). GFAP의 경우 male CTX, hippocampus 모두에서 라말린에 의해 3xTg Ctrl군 대비 유의하지는 않지만 감소하는 경향을 확인했으나 female CTX, hippocampus에서는 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 늘어나는 경향을 보아 GFAP 단백질의 발현에는 영향을 미쳤다고 보기 힘들다고 해석됨 (그림 2-430B, 2-431B, 2-432G, I, 2-433G, I)



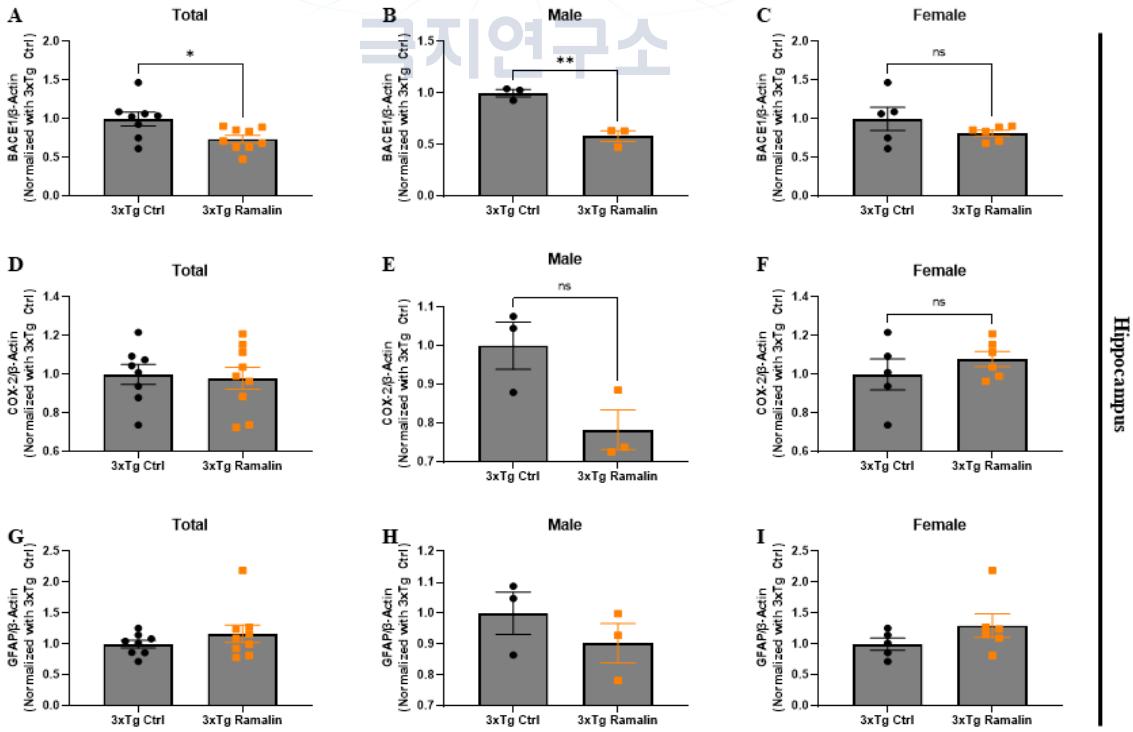
[그림 2-430. Western blot 결과 (3xTg-AD, Cortex)]



[그림 2-431. Western blot 결과 (3xTg-AD, Hippocampus)]



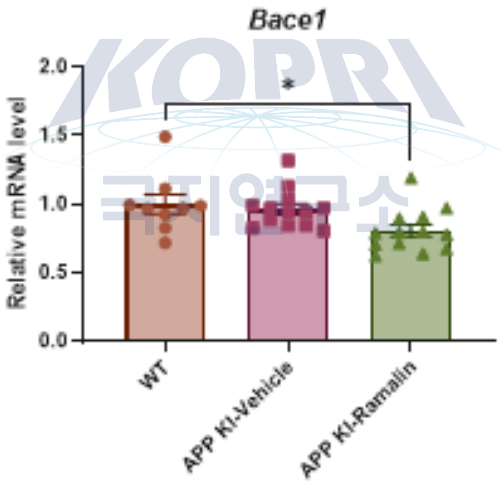
[그림 2-432. 단백질 정량 결과 (3xTg-AD, CTX)]



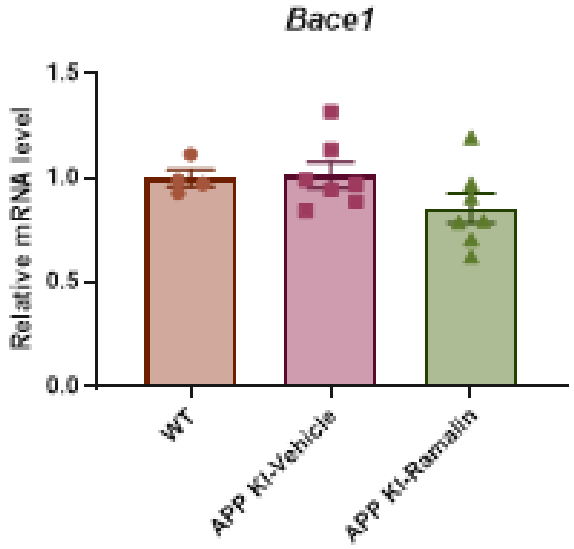
[그림 2-433. 단백질 정량 결과 (3xTg-AD, Hippocampus)]

16) Cortex에서 mRNA를 추출하여 RT-qPCR을 통해 알츠하이머성 치매와 관련된 유전자들의 발현 정도를 비교함. 우선 APP-KI 마우스 실험 세트 내에서 분석한 결과, *Bace1* 유전자의 경우 WT군과 APP KI-vehicle군 사이에는 유의미한 차이가 없었으나 total에서 WT군 대비 APP KI-라말린군에서 유의미하게 발현이 줄어든 것을 확인함(그림 2-434~457). *Cox2* 유전자의 경우 total에서 APP KI-Vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 발현 정도가 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았고, male에서는 APP KI-vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 유의하게 감소함

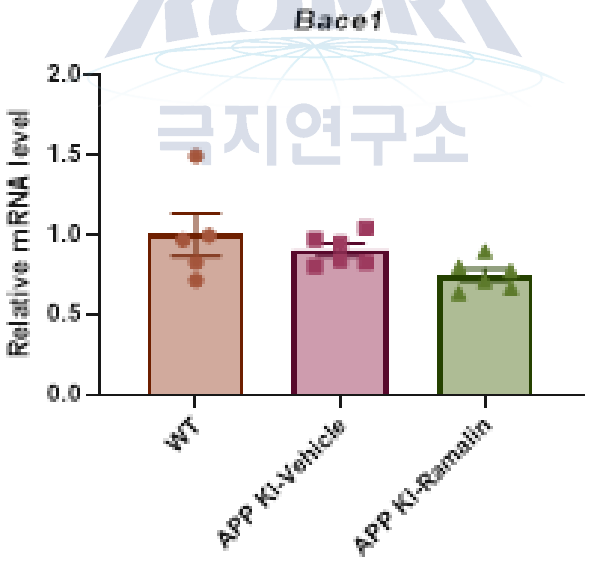
17) *Iba1* 유전자는 WT군 대비 APP KI-라말린군에서 유의하게 발현이 증가했으며, *Gfap* 유전자는 APP KI-vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 발현이 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않음. *Il1a*은 total에서 APP KI군들이 WT군에 비해 유의하게 발현이 증가해있었으며 male에서는 APP KI-vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 유의하게 발현이 감소했지만 female에서는 오히려 증가하는 경향을 보임. 나머지 유전자 중에서는 female군에서 APP KI-라말린군이 APP KI-vehicle군 대비 *Tnfa*의 발현이 유의하게 감소한 점 외에 라말린에 의한 유의한 발현량 차이는 보이지 않음



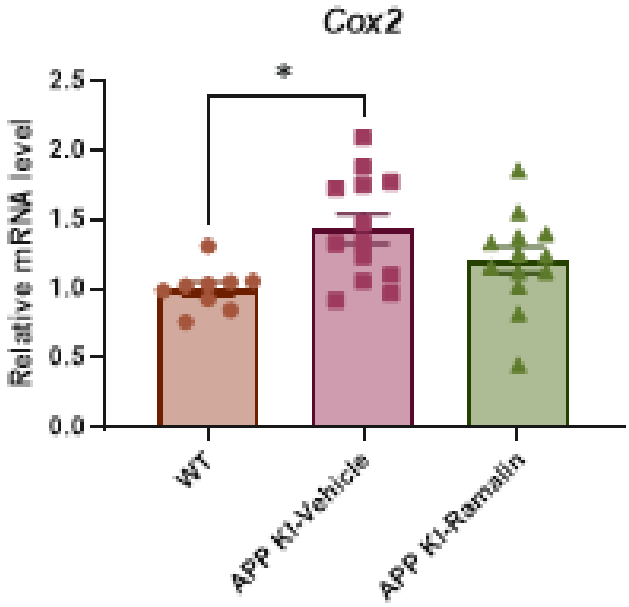
[그림 2-434. RT-qPCR 결과: Total, APP-KI, *Bace1*]



[그림 2-435. RT-qPCR 결과: Male, APP-KI, *Bace1*]

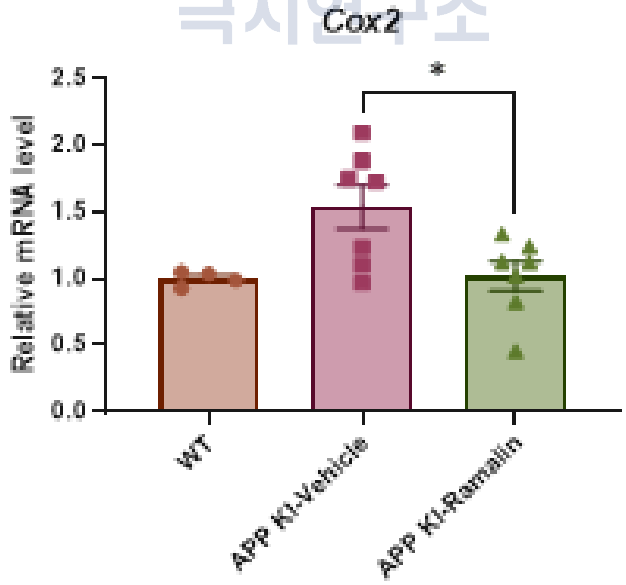


[그림 2-436. RT-qPCR 결과: Female, APP-KI, *Bace1*]

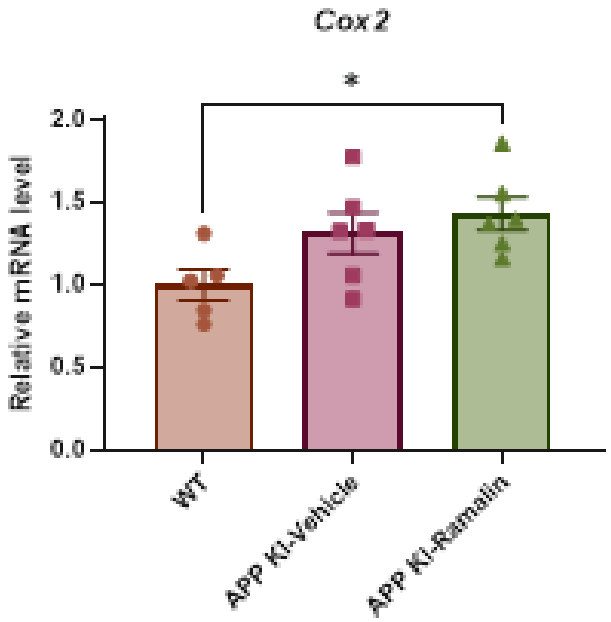


[그림 2-437. RT-qPCR 결과: Total, APP-KI, *Cox2*]

KOPRI
극지연구소

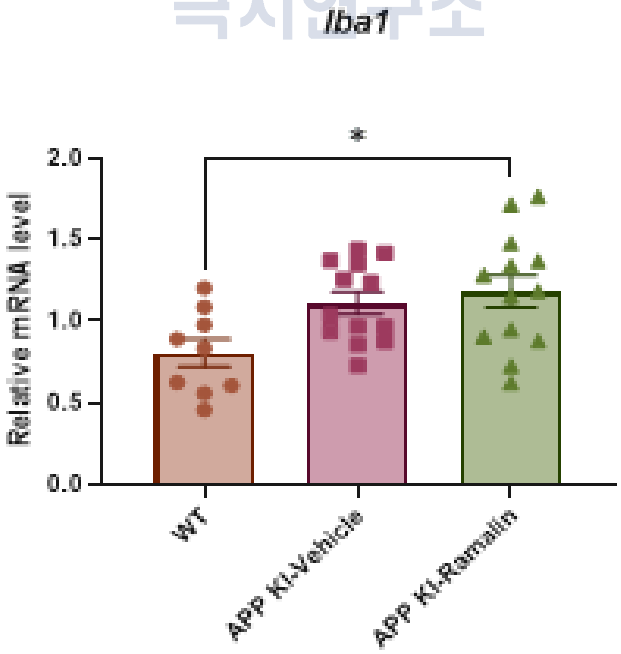


[그림 2-438. RT-qPCR 결과: Male, APP-KI, *Cox2*]

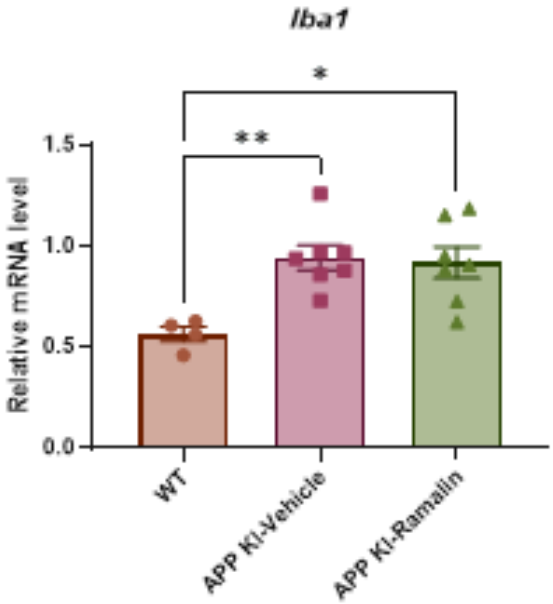


[그림 2-439. RT-qPCR 결과: Female, APP-KI, *Cox2*]

KOPRI 극지연구소

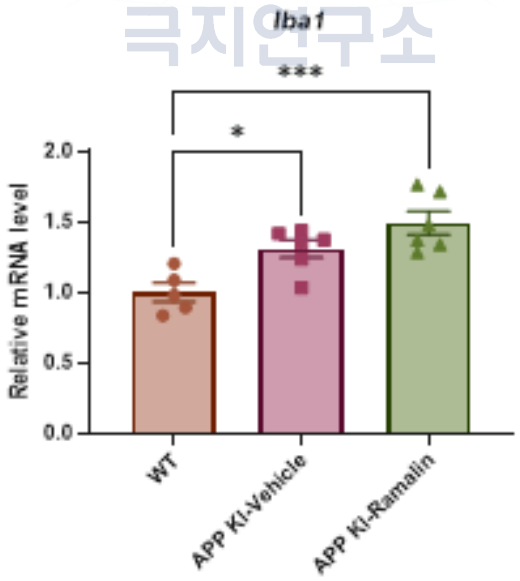


[그림 2-440. RT-qPCR 결과: Total, APP-KI, *Iba1*]

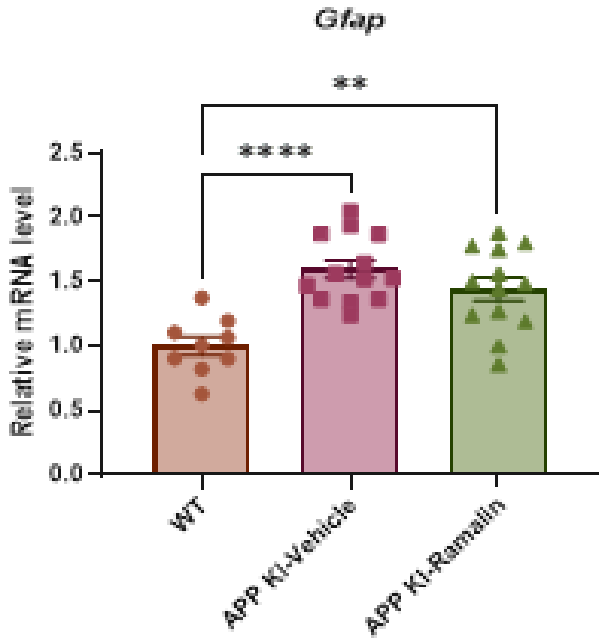


[그림 2-441. RT-qPCR 결과: Male, APP-KI, *Iba1*]

KOPRI 극지연구소

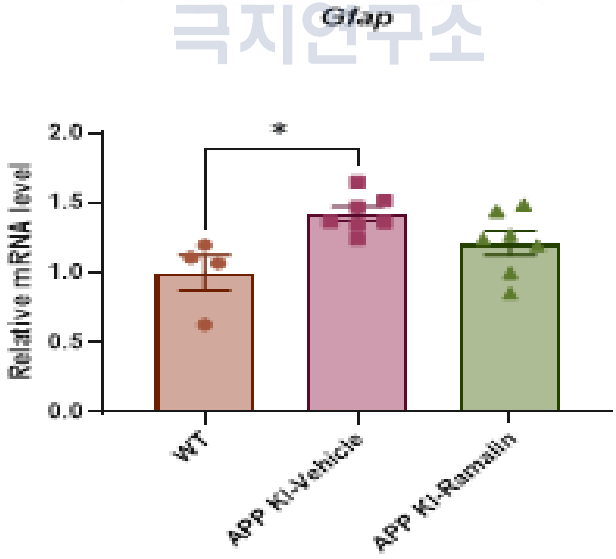


[그림 2-442. RT-qPCR 결과: Female, APP-KI, *Iba1*]

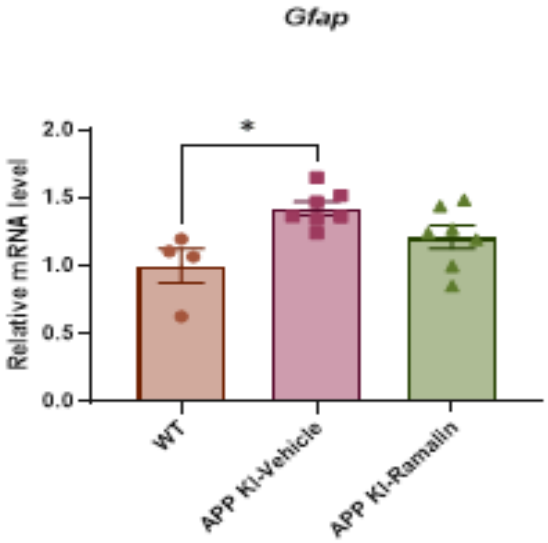


[그림 2-443. RT-qPCR 결과: Total, APP-KI, *Gfap*]

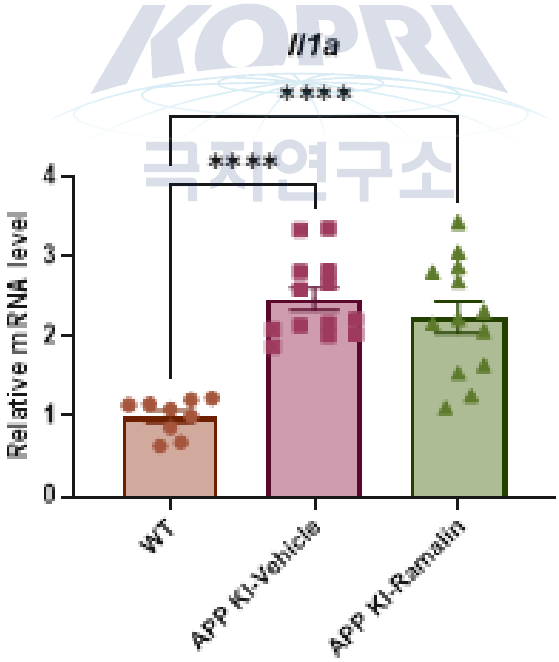
KOPRI
극지연구소



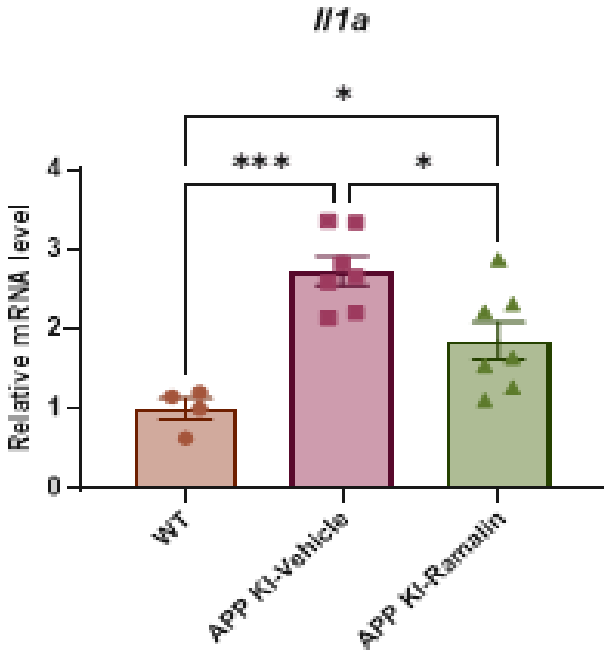
[그림 2-444. RT-qPCR 결과: Male, APP-KI, *Gfap*]



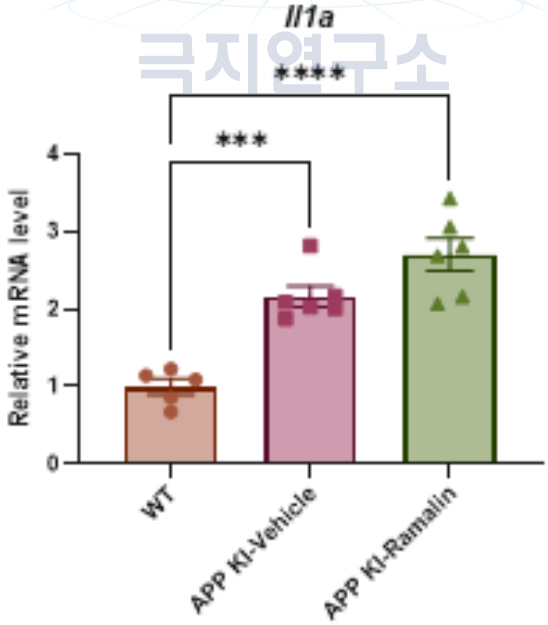
[그림 2-445. RT-qPCR 결과: Female, APP-KI, *Gfap*]



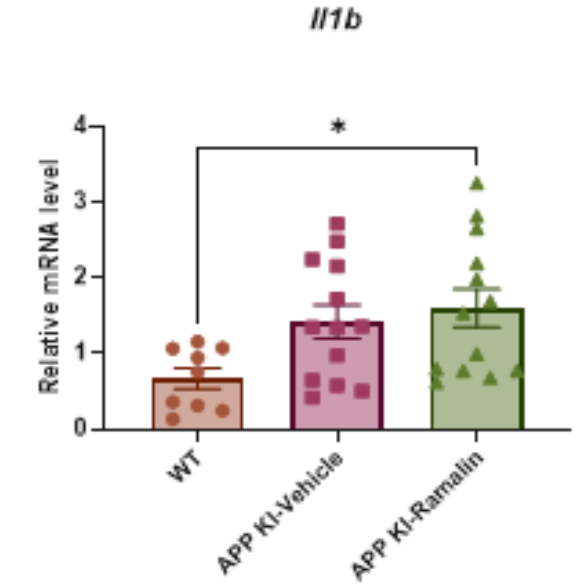
[그림 2-446. RT-qPCR 결과: Total, APP-KI, *Il1a*]



[그림 2-447. RT-qPCR 결과: Male, APP-KI, *Il1a*]

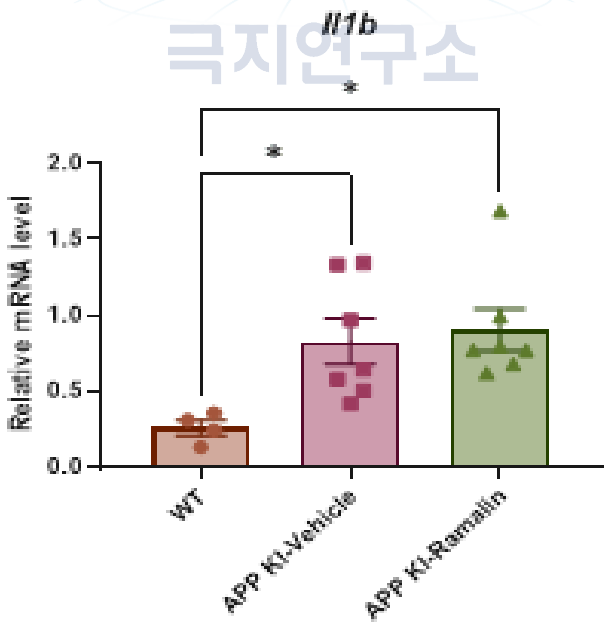


[그림 2-448. RT-qPCR 결과: Female, APP-KI, *Il1a*]

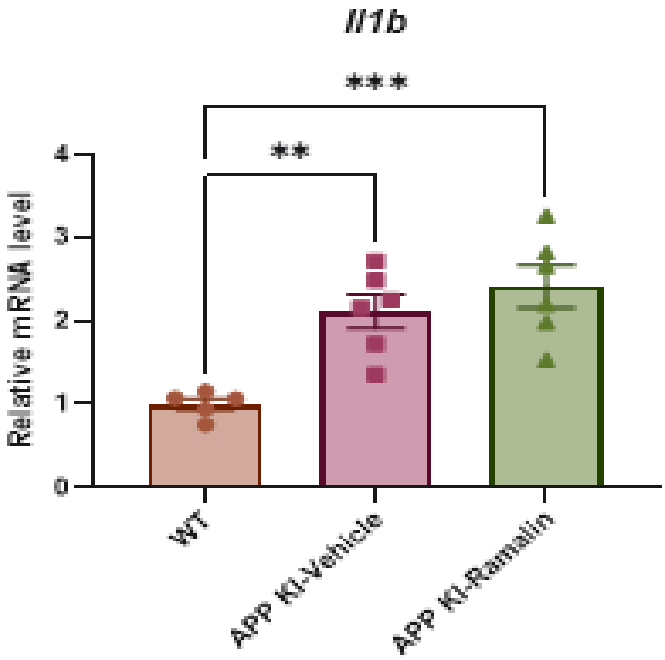


[그림 2-449. RT-qPCR 결과: Total, APP-KI, *Il1b*]

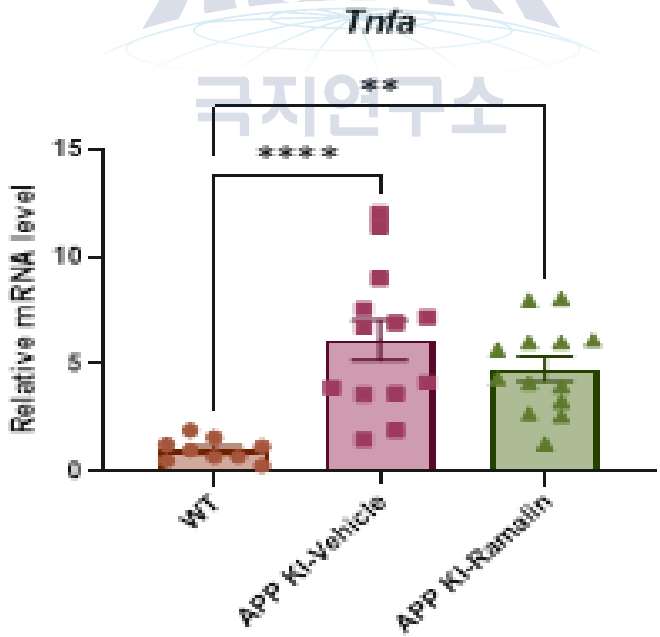
KOPRI
극지연구소



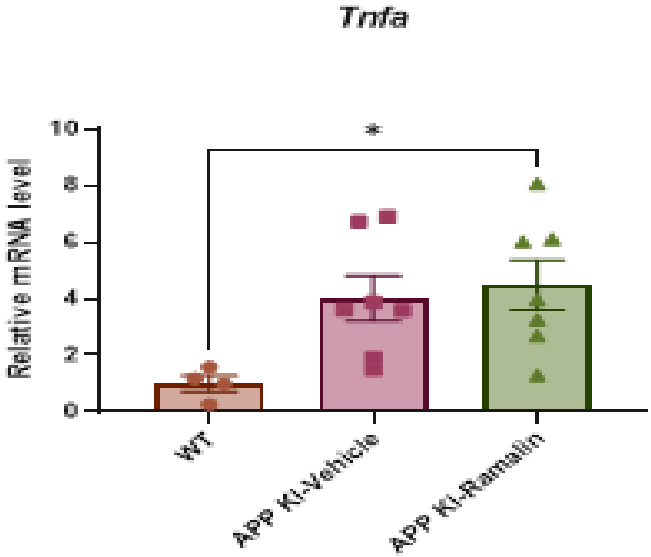
[그림 2-450. RT-qPCR 결과: Male, APP-KI, *Il1b*]



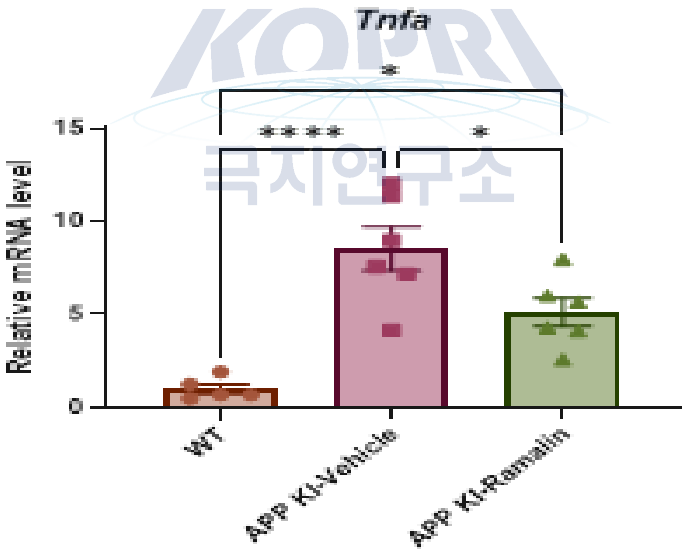
[그림 2-451. RT-qPCR 결과: Female, APP-KI, *Il1b*]



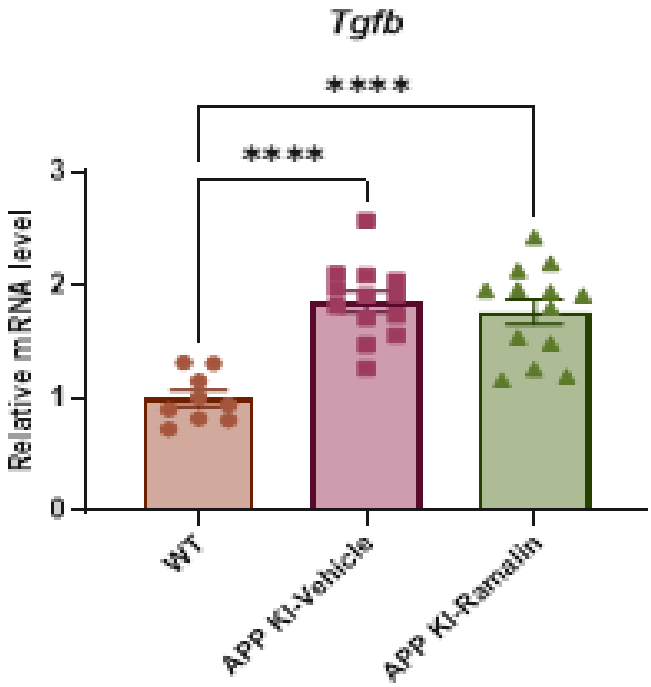
[그림 2-452. RT-qPCR 결과: Total, APP-KI, *Tnfa*]



[그림 2-453. RT-qPCR 결과: Male, APP-KI, *Tnfa*]

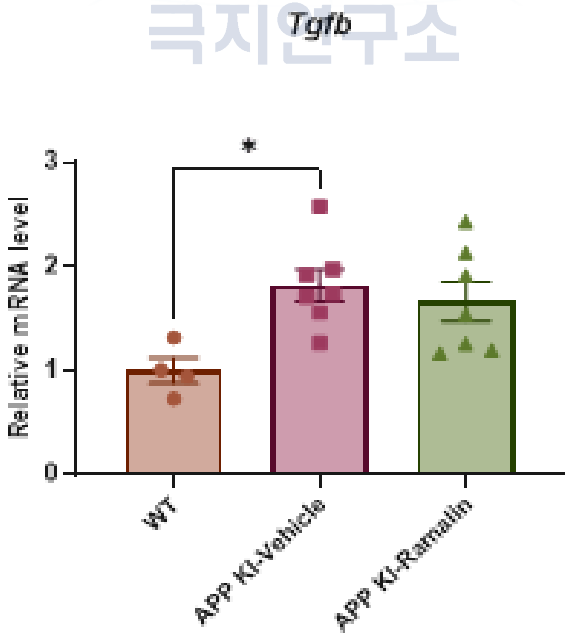


[그림 2-454. RT-qPCR 결과: Female, APP-KI, *Tnfa*]

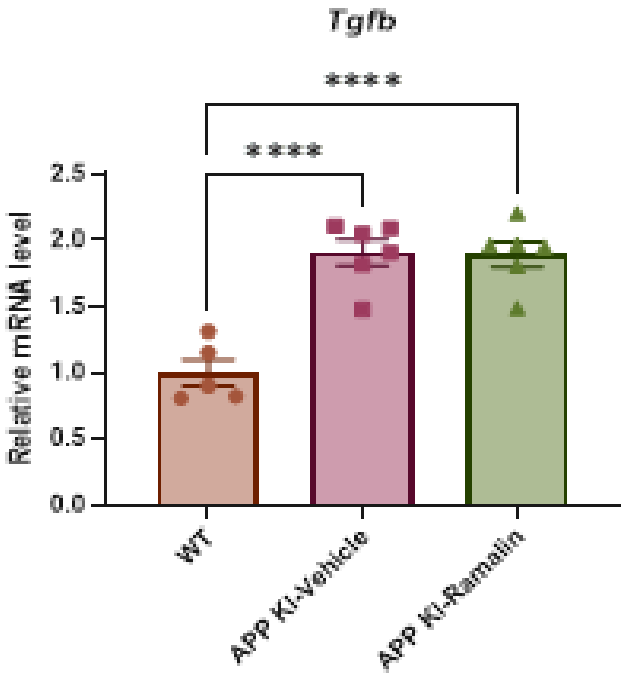


[그림 2-455. RT-qPCR 결과: Total, APP-KI, *Tgfb*]

KOPRI
극지연구소



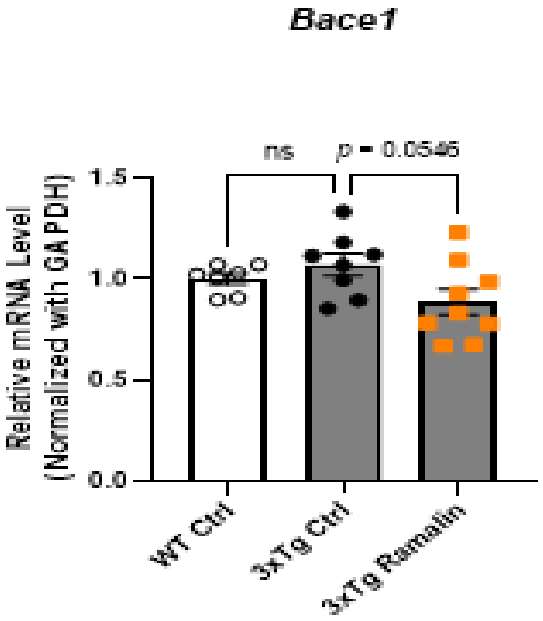
[그림 2-456. RT-qPCR 결과: Male, APP-KI, *Tgfb*]



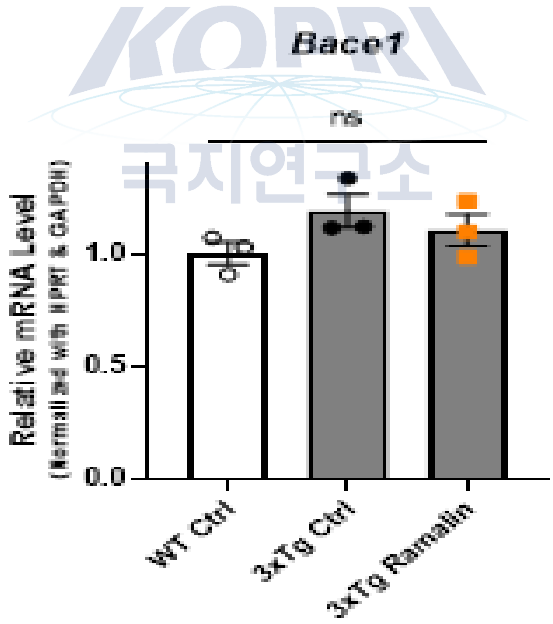
[그림 2-457. RT-qPCR 결과: Female, APP-KI, *Tgfb*]

18) 다음으로 3xTg-AD mouse 실험군들을 분석함. *Bace1*의 경우 total에서 유의성을 보이지는 않았지만 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 발현량이 감소하는 경향을 보였으며, female에서는 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 유의하게 발현량이 감소함. *Cox2*의 경우 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 발현량이 감소하는 경향은 보였으나 유의하지는 않았으며, *Nlrp3*의 경우에도 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 발현량이 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않음

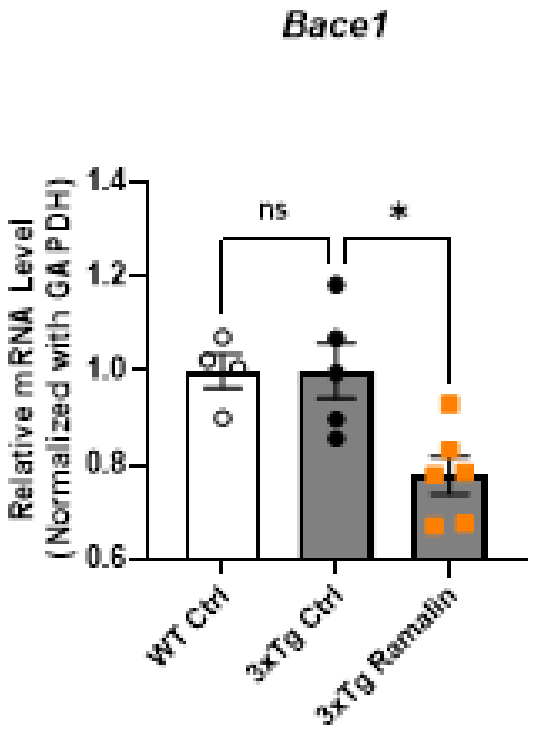
19) *Iba1*의 경우 3xTg군이 WT Ctrl군에 비해 발현량이 감소하는 경향을 보였으나 3xTg Ctrl군과 3xTg 라말린군 사이의 유의한 차이는 보이지 않았으며, *Gfap*의 경우 3xTg 라말린군이 3xTg Ctrl군 대비 발현량이 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이를 보이진 않음. 이외의 유전자는 female군에서 3xTg 라말린군이 3xTg Ctrl군 대비 *Il1a*의 발현량이 유의하게 감소했다는 점 외에는 라말린에 의한 유의한 발현량 차이를 보이지 않음



[그림 2-458. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Bace1*]

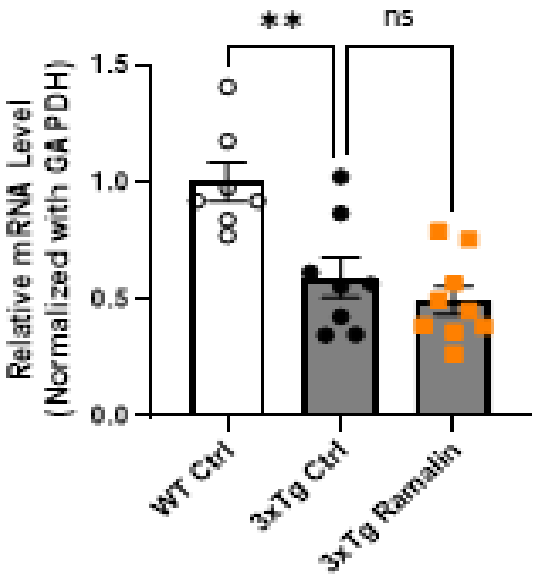


[그림 2-459. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Bace1*]

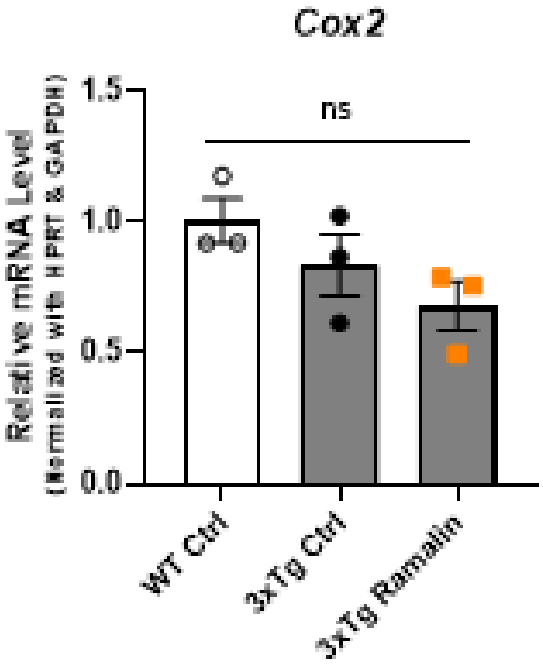


[그림 2-460. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Bace1*]

KBRI 극지연구소

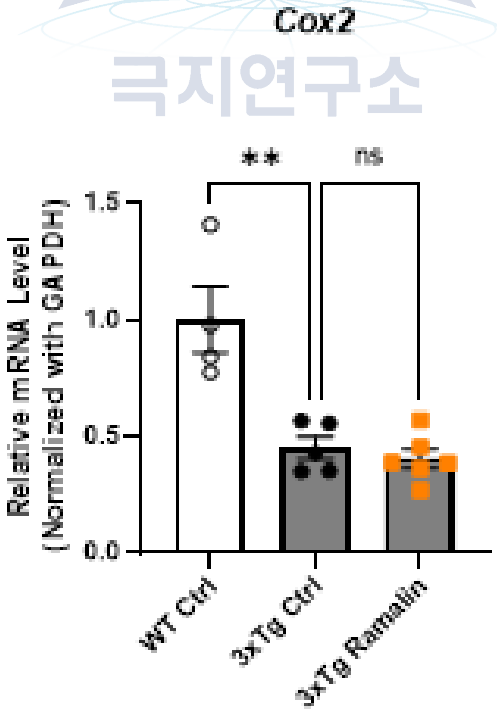


[그림 2-461. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Cox2*]

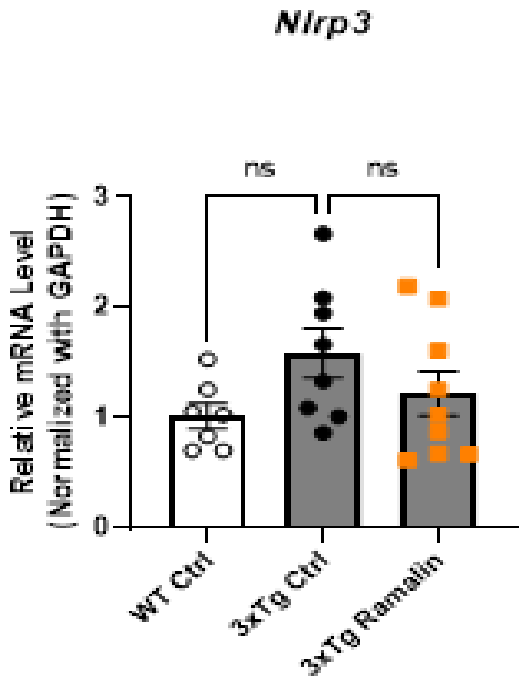


[그림 2-462. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Cox2*]

KOPRI
극지연구소

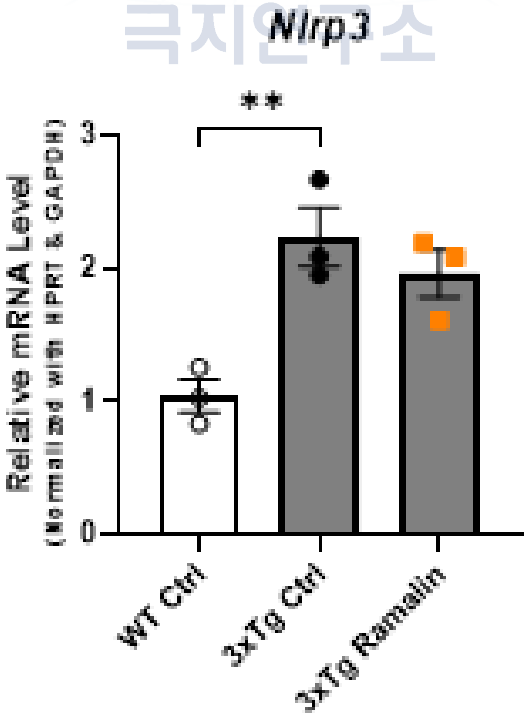


[그림 2-463. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Cox2*]

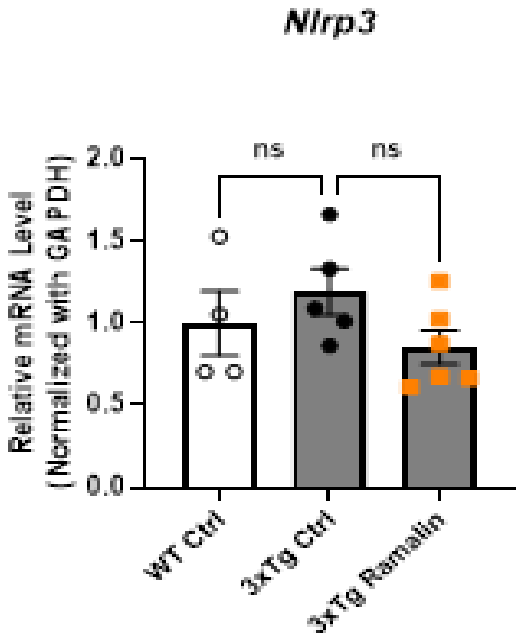


[그림 2-464. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Nlrp3*]

KOPRI
극지연구소

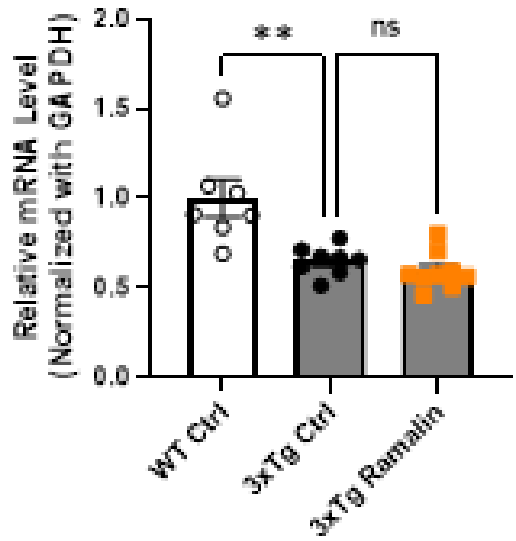


[그림 2-465. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Nlrp3*]

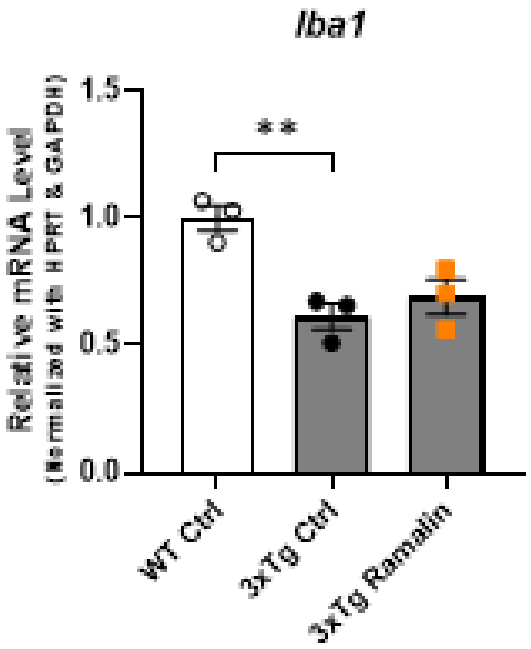


[그림 2-466. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Nlrp3*]

KBRI
극지연구소

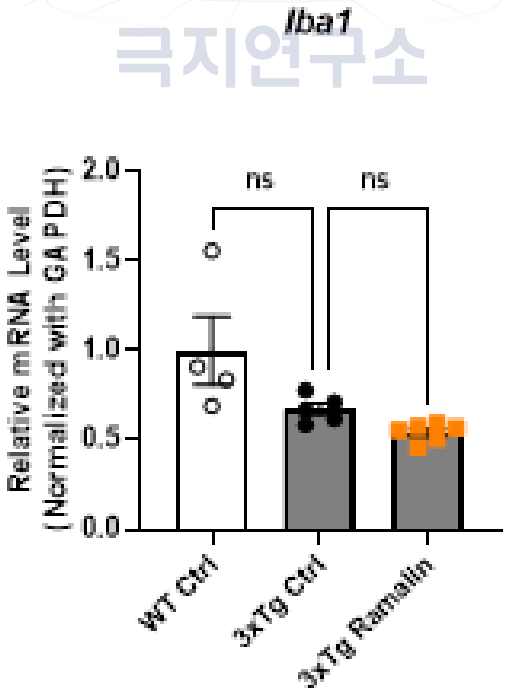


[그림 2-467. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Iba1*]

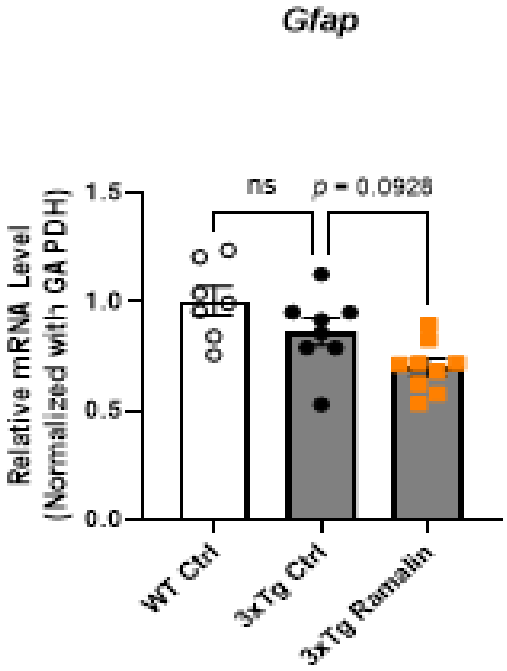


[그림 2-468. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Iba1*]

KOPRI
극지연구소

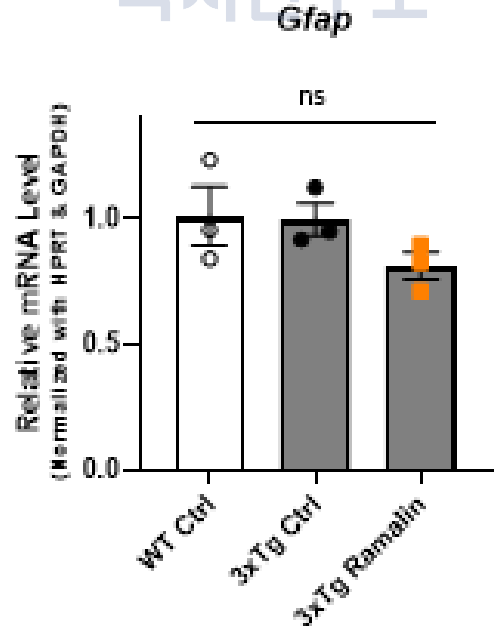


[그림 2-469. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Iba1*]

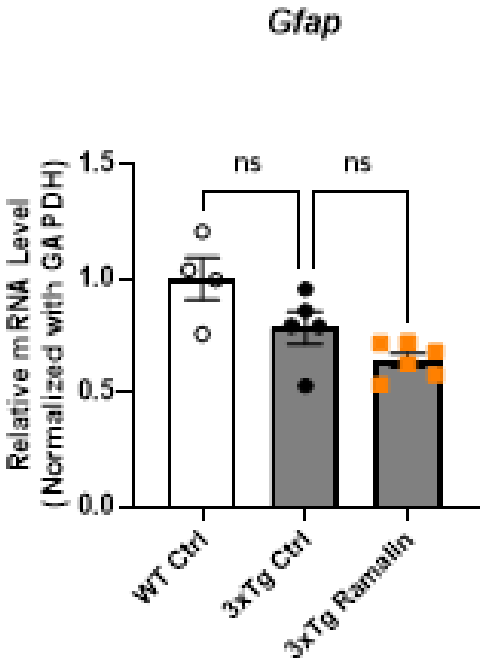


[그림 2-470. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Gfap*]

KOPRI 극지연구소

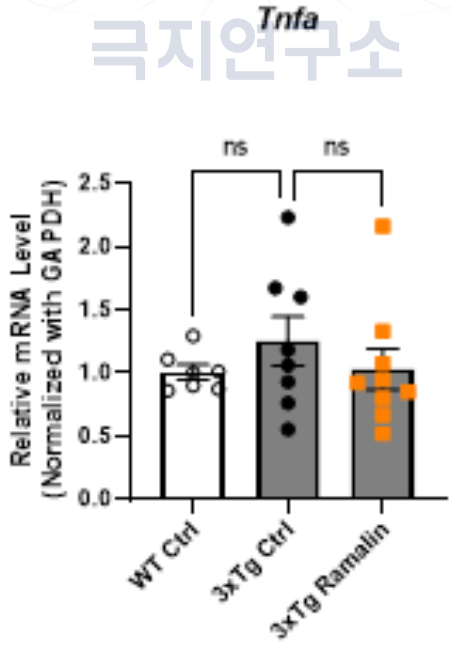


[그림 2-471. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Gfap*]

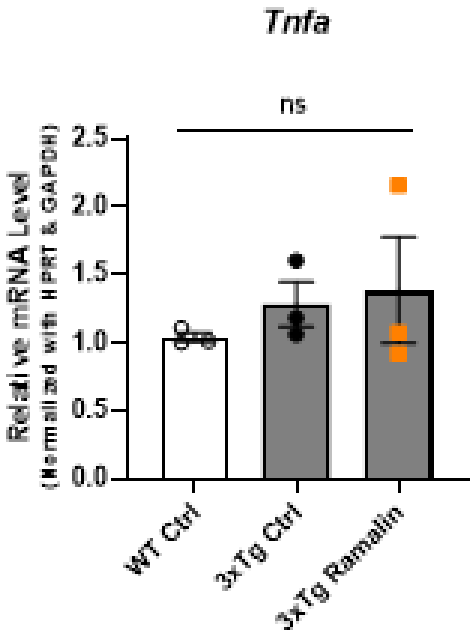


[그림 2-472. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Gfap*]

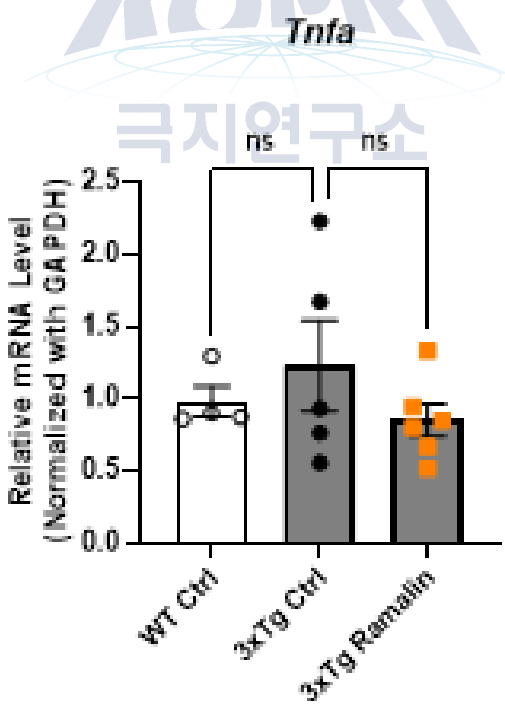
KOPRI
극지연구소



[그림 2-473. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Tnfa*]

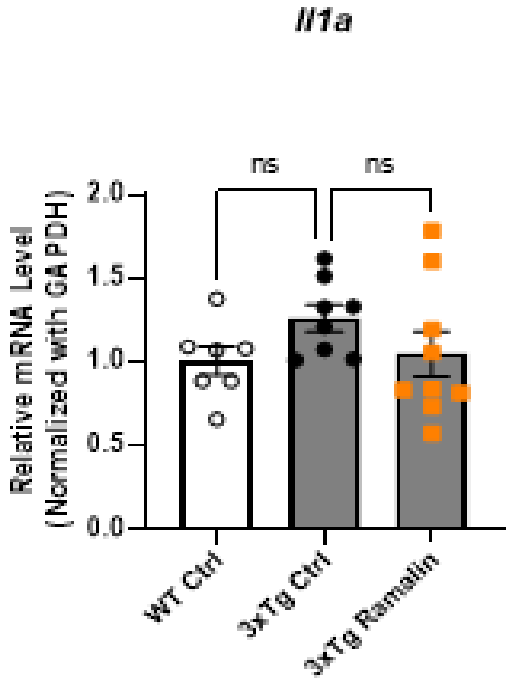


[그림 2-474. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Tnfa*]



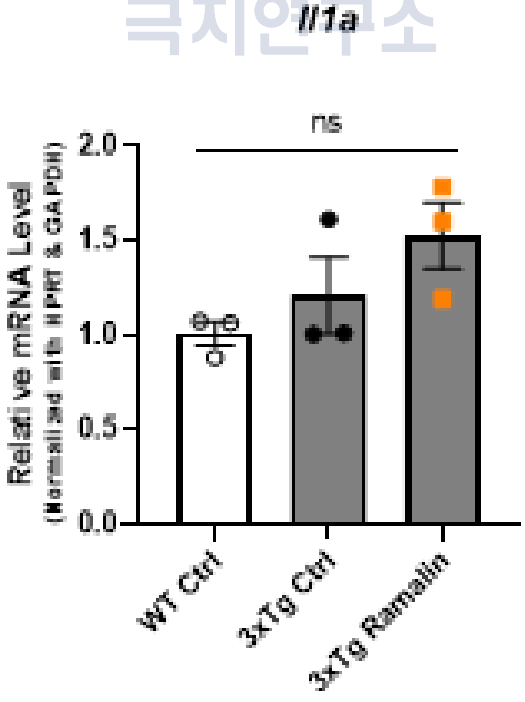
[그림 2-475. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Tnfa*]

KBRI 극지연구소

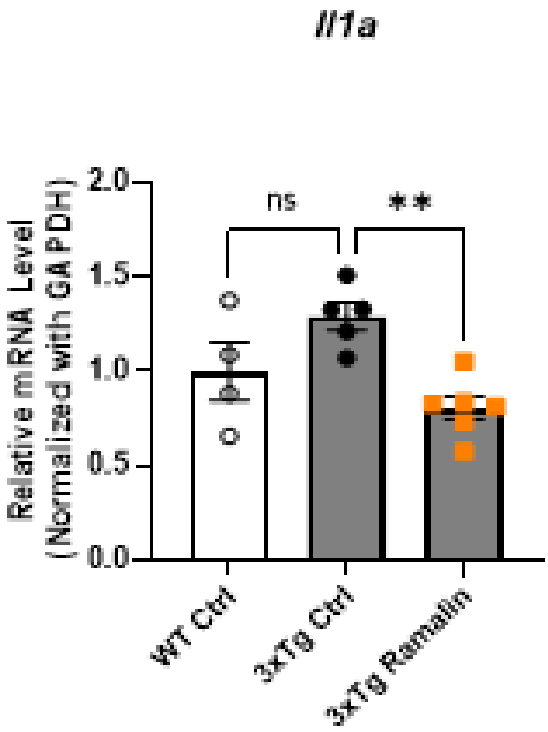


[그림 2-476. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Il1a*]

KOPRI
극지연구소

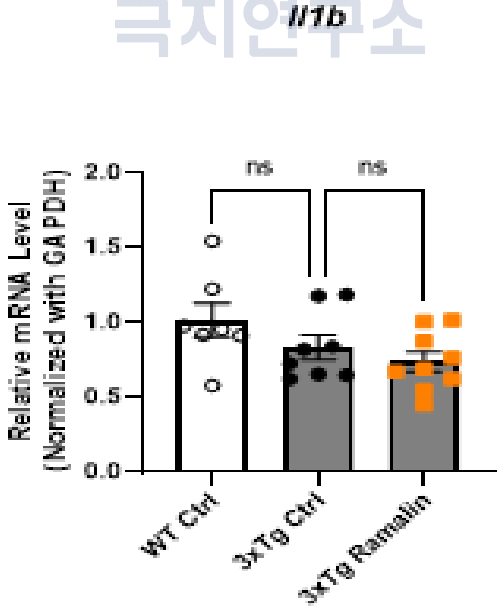


[그림 2-477. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Il1a*]

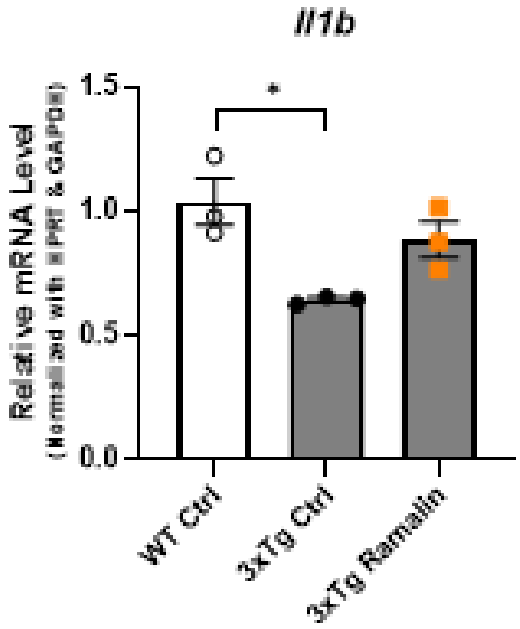


[그림 2-478. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Il1a*]

KBRI 극지연구소

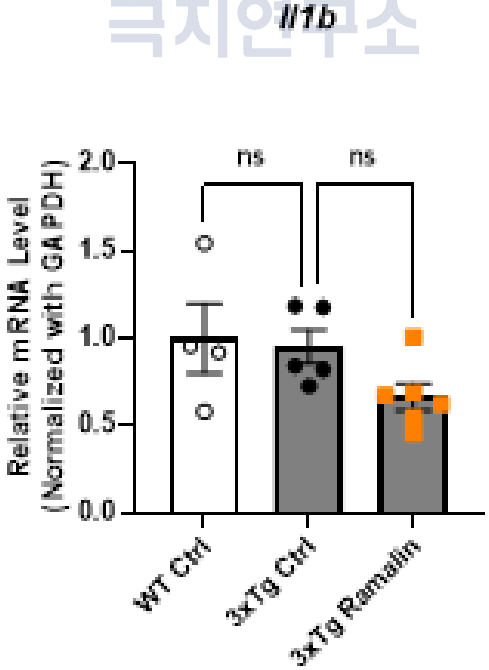


[그림 2-479. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Il1b*]



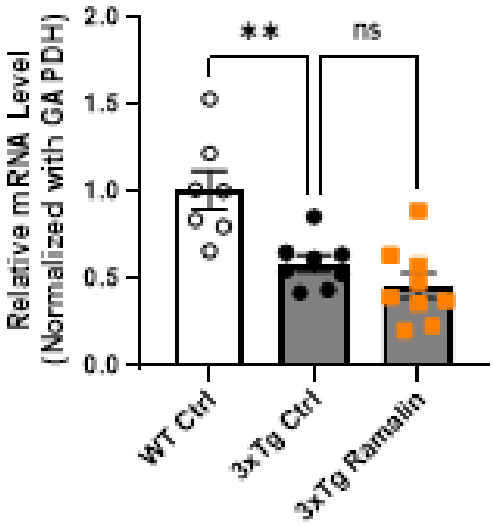
[그림 2-480. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Il1b*]

KOPRI
극지연구소



[그림 2-481. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Il1b*]

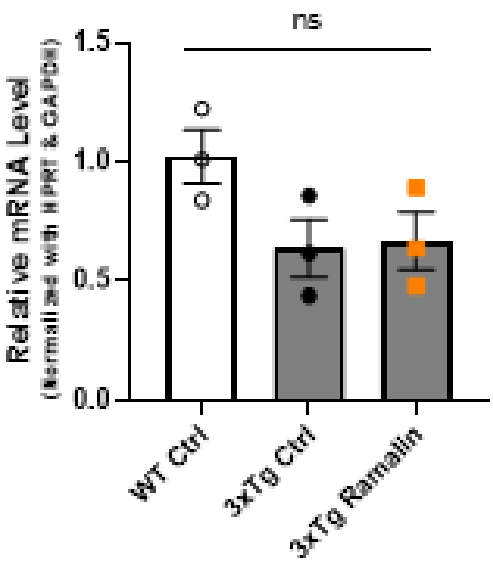
Il6



[그림 2-482. RT-qPCR 결과: Total, 3xTg-AD, *Il6*]

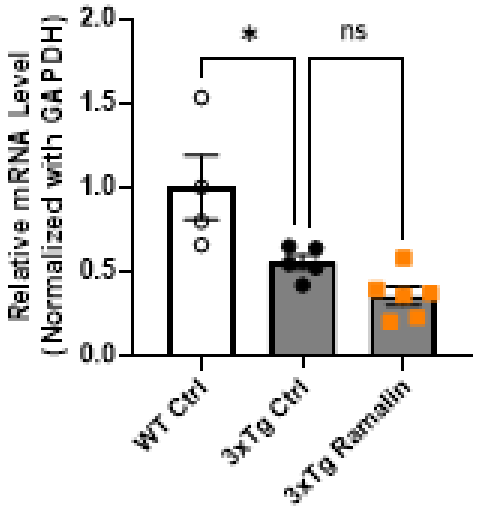
KOPRI
극지연구소

Il6



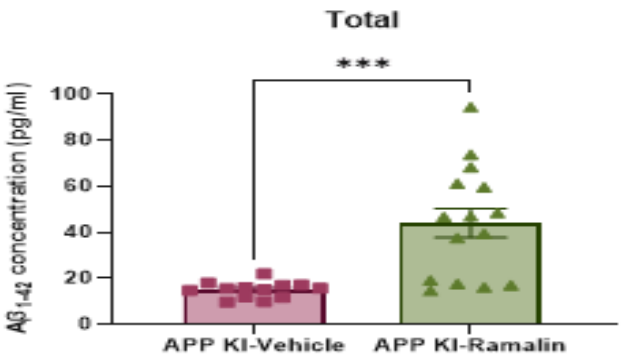
[그림 2-483. RT-qPCR 결과: Male, 3xTg-AD, *Il6*]

Il6

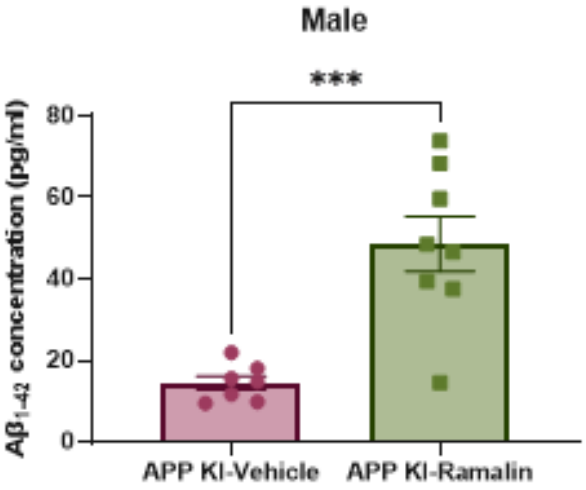


[그림 2-484. RT-qPCR 결과: Female, 3xTg-AD, *Il6*]

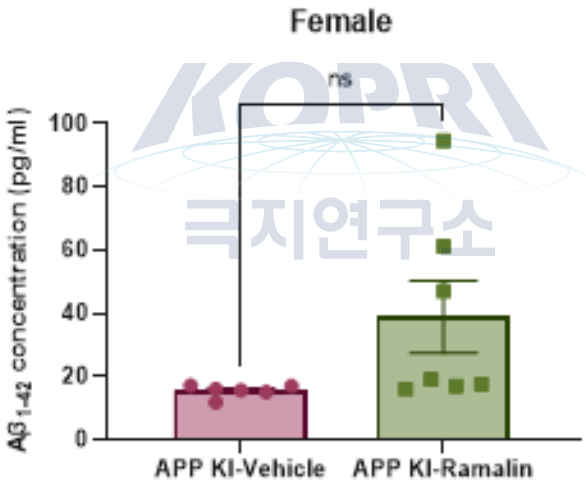
20) ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 효소결합면역흡착반응)를 통하여 각 마우스에서 아밀로이드 베타 (Amyloid beta, Aβ)의 양을 측정함. APP-KI 마우스와 3xTg-AD 마우스 실험군들에서 각각 amyloid beta$_{1-40}$과 amyloid beta$_{1-42}$의 양을 측정한 결과, APP-KI 마우스군의 경우 male APP KI-vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 유의하게 Aβ$_{1-42}$의 양이 증가했고 female에서는 라말린에 의해 유의하지는 않지만 증가하는 경향을 보임. 반면 Aβ$_{1-40}$의 경우 total, male, female 모두에서 APP KI-vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 유의하게 감소하였으며 Aβ$_{1-42}$/Aβ$_{1-40}$ 비율의 경우 male에서는 APP KI-vehicle군 대비 APP KI-라말린군에서 유의하게 증가하였고 female에서는 유의하지는 않지만 증가하는 경향을 보임



[그림 2-485. Aβ$_{1-42}$ ELISA: APP-KI, CTX, Total]

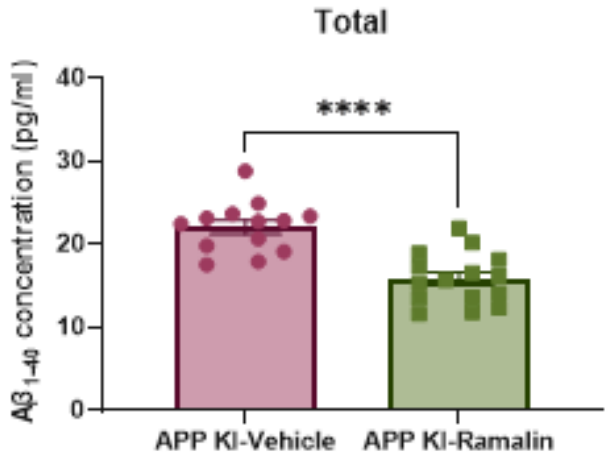


[그림 2-486. $A\beta_{1-42}$ ELISA: APP-KI, CTX, Male]



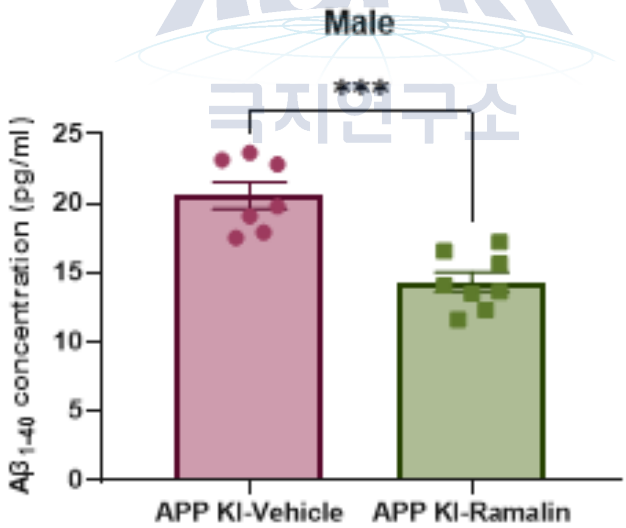
[그림 2-487. $A\beta_{1-42}$ ELISA: APP-KI, CTX, Female]

KBRI 뇌지연구소

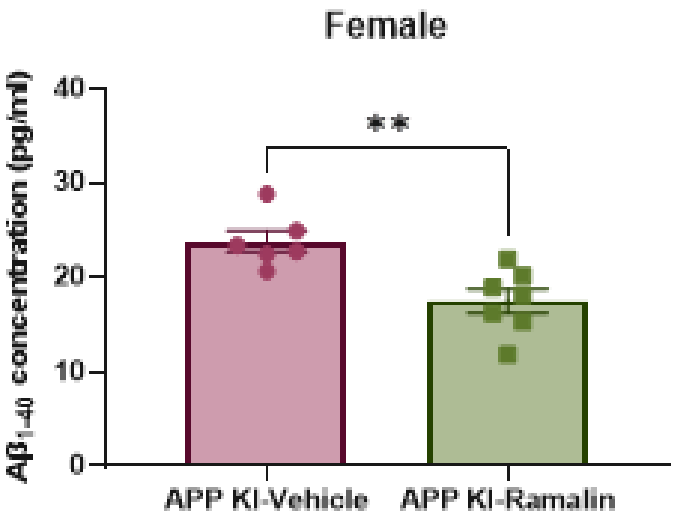


[그림 2-488. $A\beta_{1-40}$ ELISA: APP-KI, CTX, Total]

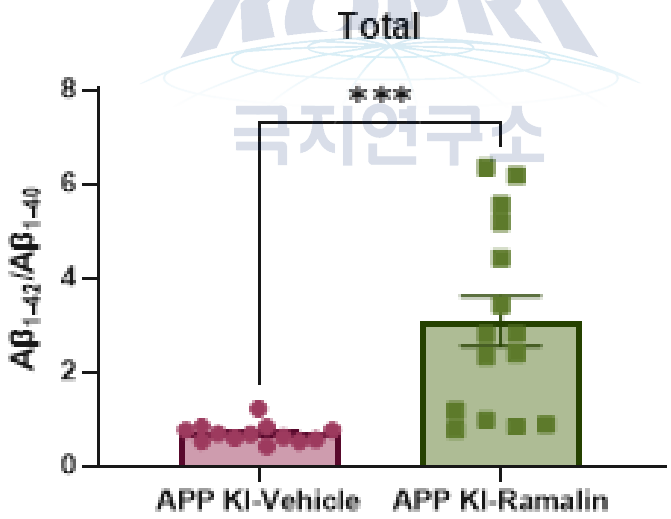
KOPRI
극지연구소



[그림 2-489. $A\beta_{1-40}$ ELISA: APP-KI, CTX, Male]

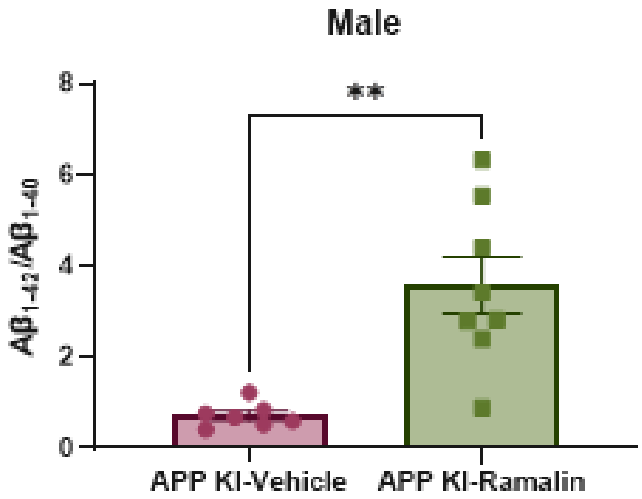


[그림 2-490. $A\beta_{1-40}$ ELISA: APP-KI, CTX, Female]

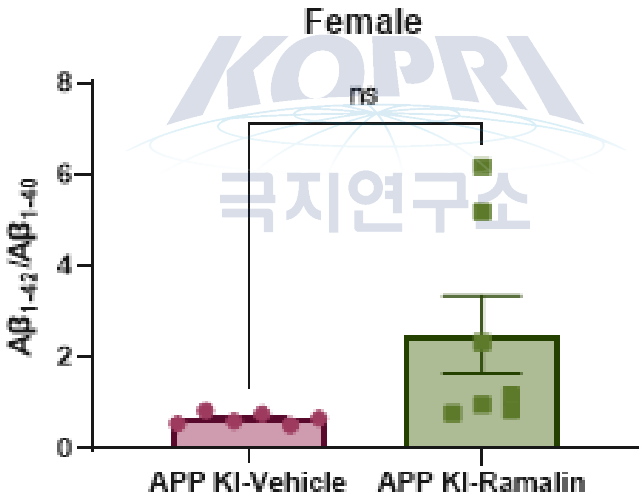


[그림 2-491. $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$: APP-KI, CTX, Total]

KOPRI 극지연구소

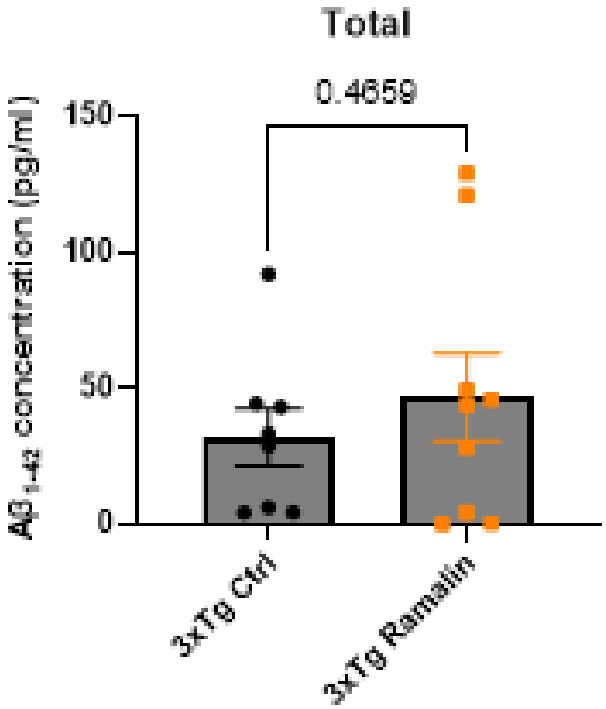


[그림 2-492. $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$: APP-KI, CTX, Male]

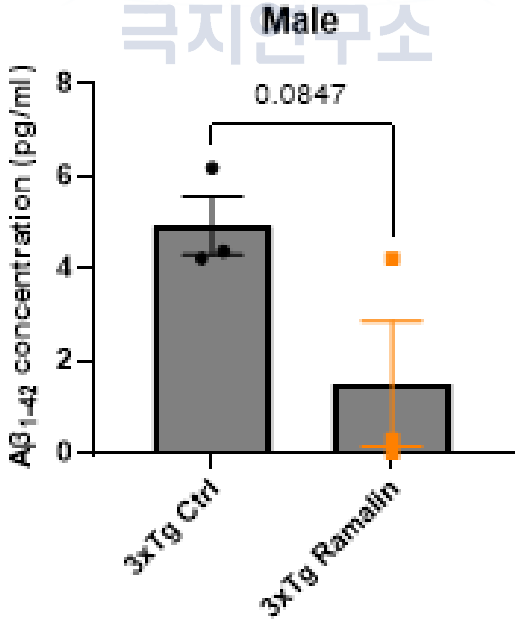


[그림 2-493. $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$: APP-KI, CTX, Female]

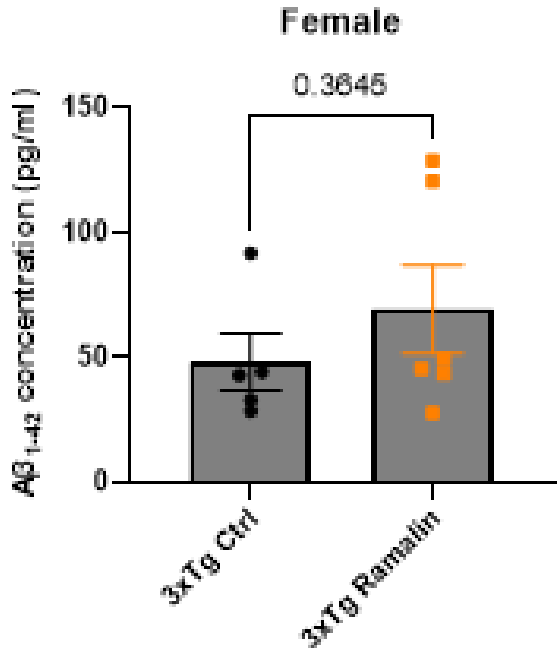
21) 3xTg-AD 마우스 실험군들의 경우 male에서 유의하지는 않지만 3xTg Ctrl 대비 3xTg 라말린군에서 $A\beta_{1-42}$의 양이 감소하는 경향을 보인 반면 female에서는 증가하는 경향을 보임. $A\beta_{1-40}$의 경우 male에서는 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 유의하지는 않지만 감소하는 경향을 보인 반면, female에서는 증가하는 경향을 보임. $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ 비율의 경우 male에서는 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 유의하게 감소하였으며, female에서는 유의하지는 않지만 3xTg Ctrl군 대비 3xTg 라말린군에서 감소하는 경향을 보임



[그림 2-494. $A\beta_{1-42}$ ELISA: 3xTg-AD, CTX, Total]

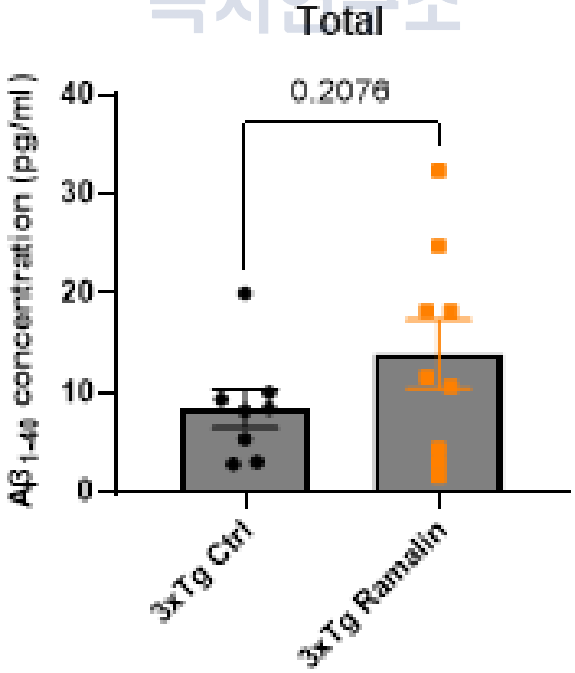


[그림 2-495. $A\beta_{1-42}$ ELISA: 3xTg-AD, CTX, Male]

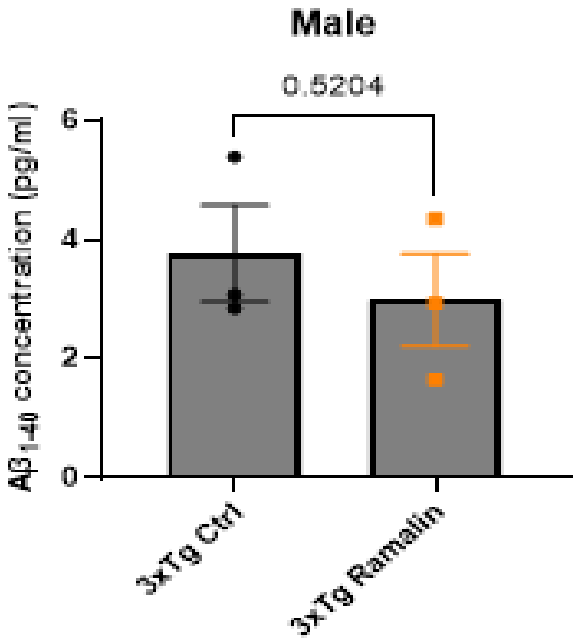


[그림 2-496. $A\beta_{1-42}$ ELISA: 3xTg-AD, CTX, Female]

KOPRI
극지연구소

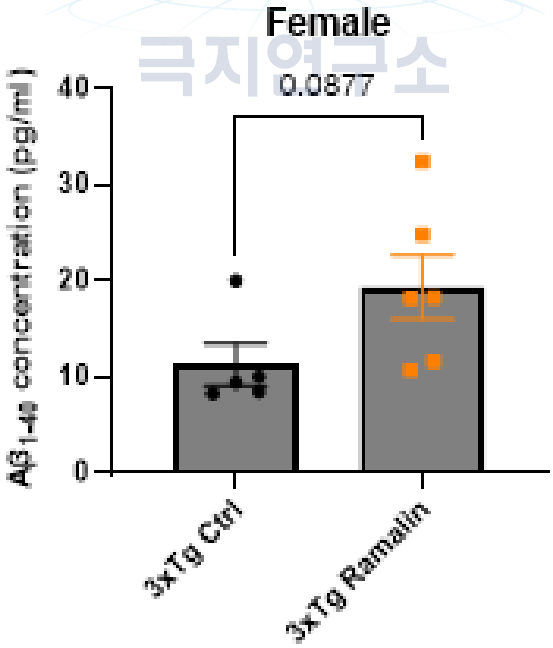


[그림 2-497. $A\beta_{1-40}$ ELISA: 3xTg-AD, CTX, Total]

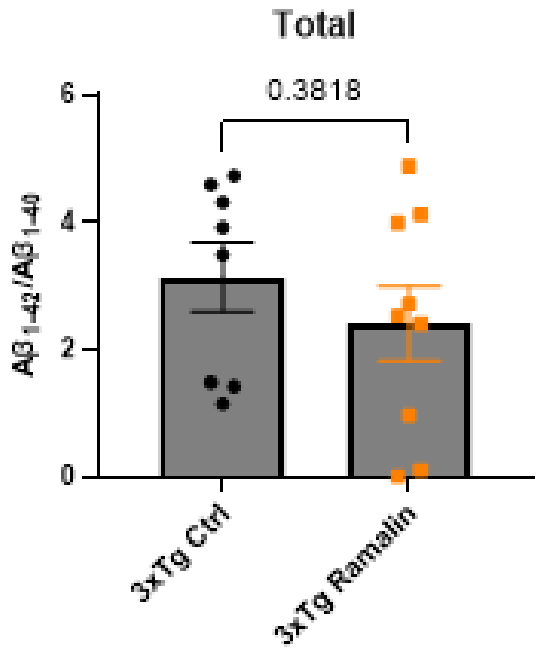


[그림 2-498. $A\beta_{1-40}$ ELISA: 3xTg-AD, CTX, Male]

KOPRI
극지연구소

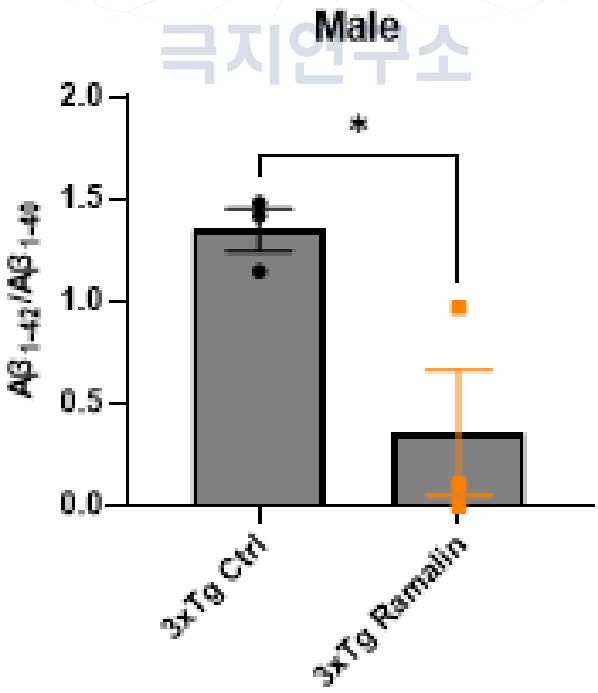


[그림 2-499. $A\beta_{1-40}$ ELISA: 3xTg-AD, CTX, Female]

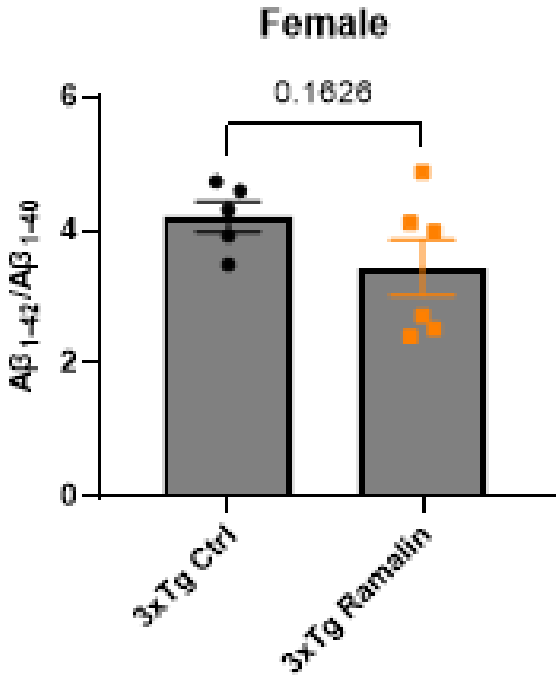


[그림 2-500. $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$: 3xTg-AD, CTX, Total]

KOPRI 극지연구소



[그림 2-501. $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$: 3xTg-AD, CTX, Male]



[그림 2-502. $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$: 3xTg-AD, CTX, Female]

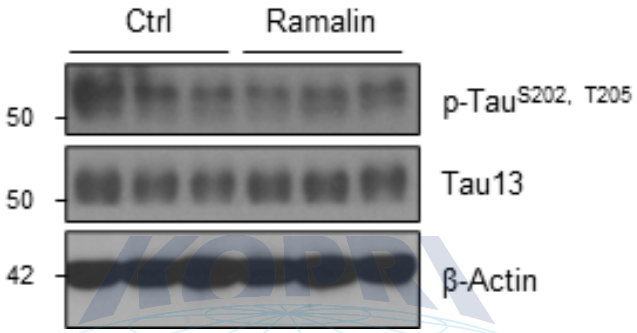
22) 본 연구진은 APP-KI 6개월령 마우스와 3xTg-AD 16개월령 마우스 두 종류의 알츠하이머성 치매 동물 모델을 이용하여 라말린의 효능/효과를 확인하는 *in vivo* 실험을 진행함. 20 mg/kg에 해당하는 용량으로 라말린을 2개월간 경구투여한 후 행동실험을 통해 알츠하이머성 치매와 관련된 증상의 개선여부를 확인하였으며 이후에는 마우스의 뇌 조직 분석을 통하여 알츠하이머성 치매와 관련된 유전자, 단백질 등의 발현량 변화를 확인함

23) 행동실험 결과, APP-KI와 3xTg-AD 실험군 모두에서 라말린에 의한 유의미한 welfare나 anxiety 개선 효과는 없음. APP-KI의 경우 라말린에 의해 행동력이 유의하게 올라갔으나 (Open field test) 3xTg-AD에서는 개선 효과가 없음. Morris water maze를 통한 공간학습능력과 기억력 평가의 경우 APP-KI에서는 라말린에 의한 학습능력이나 기억력의 유의한 개선 효과를 볼 수 없었으며 3xTg-AD의 경우 공간학습능력과 기억력이 개선되는 경향을 확인함. 마지막으로 공포자극에서 비롯된 단기, 장기 기억력을 확인할 수 있는 passive avoidance test의 경우 APP-KI에서 라말린에 의한 기억력 개선 효과를 확인 할 수 있었으나 3xTg-AD의 경우 효과가 미미했음

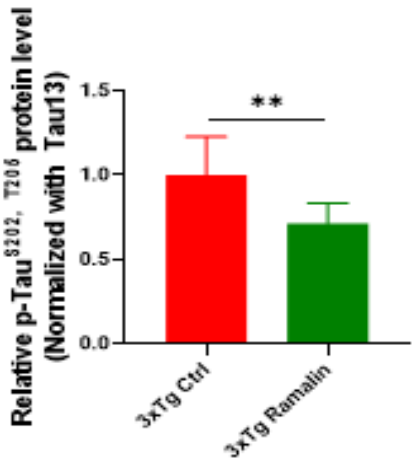
24) 뇌 조직 (Cortex, hippocampus) 분석을 통해 알츠하이머성 치매와 관련된 유전자 및 단백질의 발현 정도를 확인하였을 때, APP-KI의 경우 CTX에서 라말린에 의해 COX2 mRNA와 단백질의 발현 정도가 vehicle군 대비 감소하는 경향을 확인할 수 있었으나 3xTg-AD에서는 앞선 현상을 확인할 수 없음. Aβ를 생성하는데 관여하는 BACE1의 경우 APP-KI,

3xTg-AD 모두 CTX에서 라말린에 의해 mRNA 발현 정도가 감소하는 경향을 확인할 수 있었으며 3xTg-AD의 경우 hippocampus에서는 BACE1 단백질의 발현 정도가 라말린에 의해 감소하는 경향을 확인함. GFAP의 경우 APP-KI, 3xTg-AD의 CTX에서 유의하지는 않지만 라말린에 의해 mRNA 발현 정도가 감소하는 경향을 확인함. ELISA를 통한 $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$의 양을 확인한 결과 APP-KI의 경우 라말린에 의해 $A\beta_{1-42}$의 양은 증가, $A\beta_{1-40}$의 양은 감소하여 $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$의 비율은 증가함. 3xTg-AD의 경우 라말린에 의해 $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$의 양이 증가했으나 $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$의 비율은 감소한 것을 확인함

25) 3xTg-AD vehicle (3xTg Ctrl)군과 3xTg-AD 라말린 투여군 (3xTg Ramalin)의 hippocampus 조직 내에서 tau 단백질의 인산화 정도를 western blot을 통해 분석함. 그 결과, 3xTg Ramalin군에서 3xTg Ctrl군 대비 인산화된 tau 단백질의 양이 유의하게 감소한 것을 확인함(그림 2-1235, 1236)

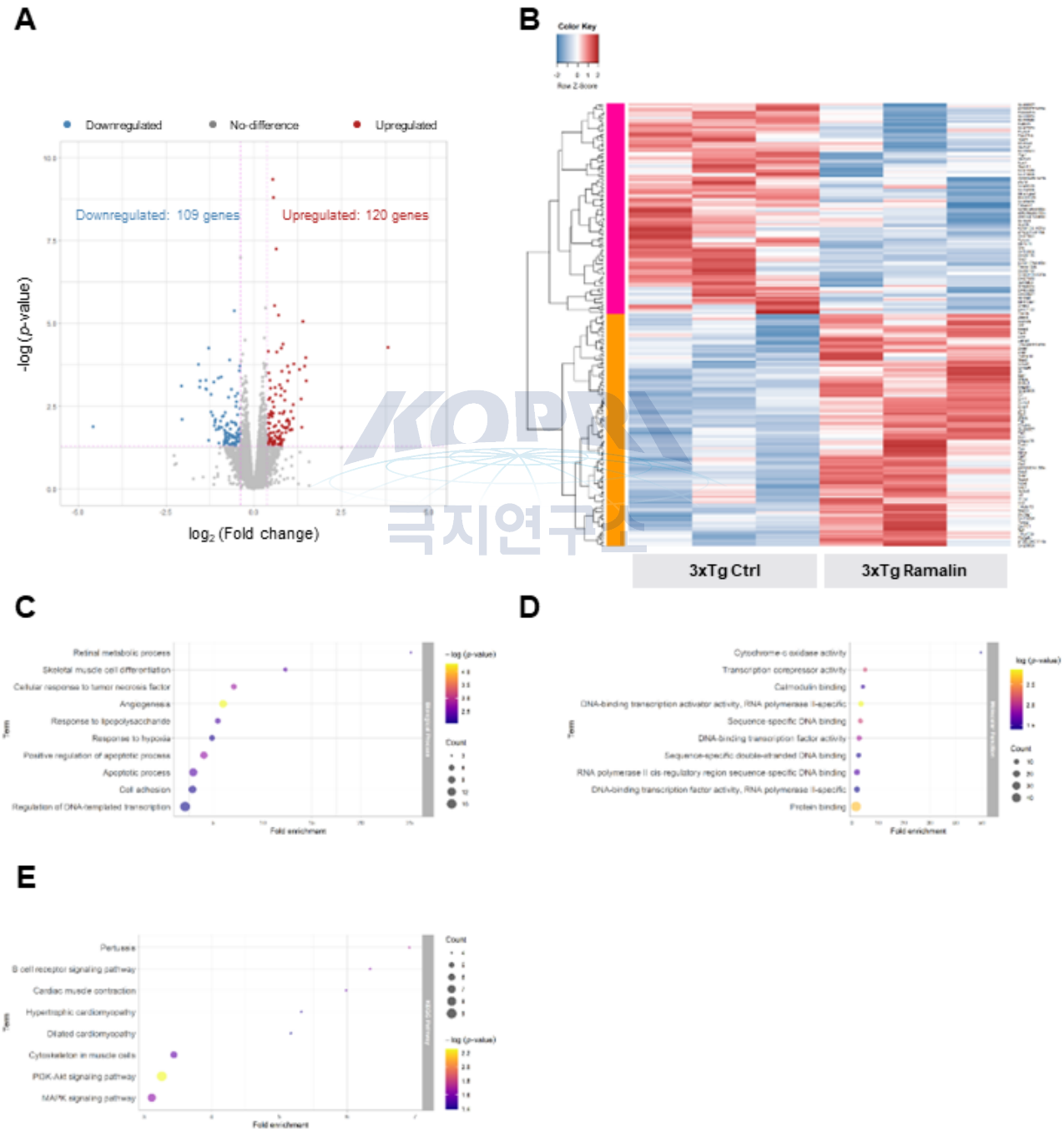


[그림 2-503. 라말린에 의한 tau 인산화 조절: 3xTg-AD, hippocampus]



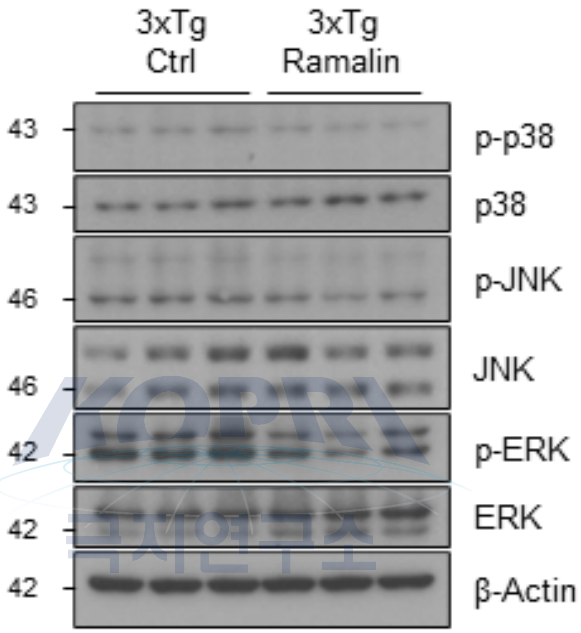
[그림 2-504. 그림 2-1235 정량 분석]

26) 다음으로 3xTg-AD의 cortex RNA를 이용하여 mRNA sequencing을 진행함(그림 2-505). Fold change ≥ 1.3 이면서 *p*-value 0.05인 경우 유의하게 변화했다고 기준을 세우고 분석한 결과, 3xTg Ctrl군 대비 3xTg Ramalin군에서 유의하게 증가한 유전자가 120개, 유의하게 감소한 유전자가 109개 발굴됨(그림 2-505A, B). 이들 유전자를 이용하여 gene ontology (GO)와 KEGG pathway 분석을 진행함(그림 2-505C-E). 그 결과, KEGG pathway에서 MAPK singaling pathway와 관련된 유전자가 많이 enrich되어있는 것을 확인함(그림 2-505E)

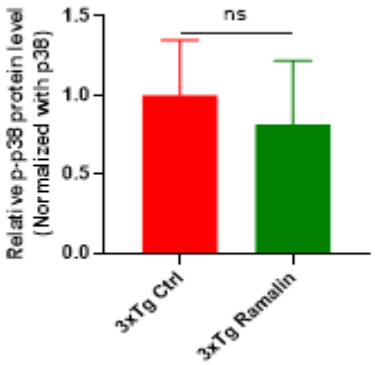


[그림 2-505. 3xTg-AD cortex RNA를 이용한 mRNA-sequencing 결과]

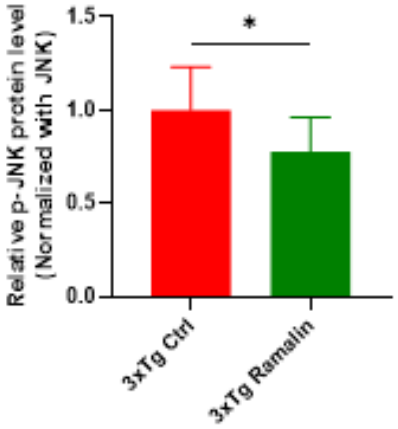
27) 라말린에 의한 tau 인산화 감소에 대한 메커니즘 분석을 위해, RNA-sequencing 결과를 참고하여 실험을 진행함. KEGG pathway 분석에서 MAPK signaling pathway가 enrich되어있는 것을 확인한 후, 3xTg-AD 뇌 조직에서 관련 단백질들의 발현량을 western blot을 통해 분석함. MAPK들의 활성화 정도는 tau의 인산화와 밀접한 관련이 있음이 이미 보고된 바 있음. 그 결과, 3xTg Ctrl군 대비 3xTg Ramalin군에서 p-JNK와 p-ERK의 발현량이 유의하게 감소되어있으며, p-p38도 유의하지는 않지만 감소한 경향을 보임(그림 2-506~509). 이를 통해 라말린이 MAPK signaling을 조절하여 tau의 인산화를 조절한다고 생각할 수 있음



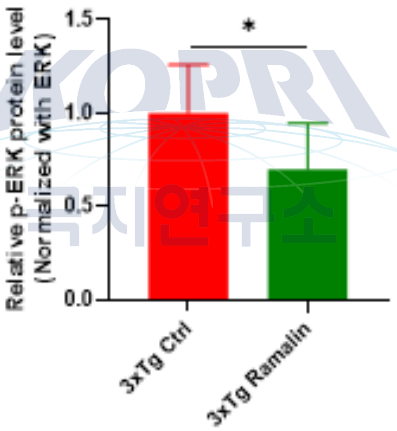
[그림 2-506. MAPK signaling pathway에 속하는 단백질 발현량 확인]



[그림 2-507. p-p38 단백질 정량 분석]



[그림 2-508. p-JNK 단백질 정량 분석]



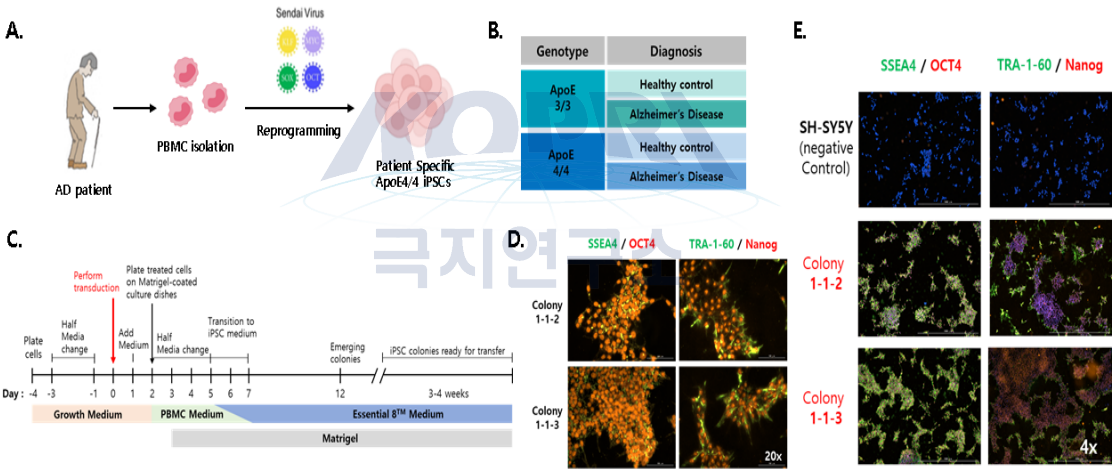
[그림 2-509. p-ERK 단백질 정량 분석]

□ 연구내용 2-4. AD 인간 모델 구축

○ 인간 유래 ESC 또는 iPSC를 신경세포로 분화하여 AD 인간모델 구축

1) 라말린과 라말린 derivatives의 iPSC 기반 효능검증을 위하여 알츠하이머 치매 환자 유래 PBMC를 분양받아 iPSC로 분화하는 프로토콜을 구축함(그림 2-510A). 알츠하이머 치매 환자를 ApoE isotype에 따라 grouping하여 각 그룹 환자로부터 PBMC를 확보함(그림 2-510B). 본 연구진은 Sendai virus를 이용한 역분화 프로토콜을 구축함(그림 2-510C)

2) 본 프로토콜을 토대로 ApoE4/4 carrier인 환자 유래 PBMC로부터 역분화시킨 iPSC에서 전분화능 표지인자 (NANOG, TRA-1-60, OCT4, SSEA4)가 발현함을 확인함(그림 2-510D). 또한 일반 세포주(SH-SY5Y)와 비교했을 때, 역분화된 iPSC에서만 전분화능 표지 인자가 발현되는 것을 확인함(그림 2-510E)

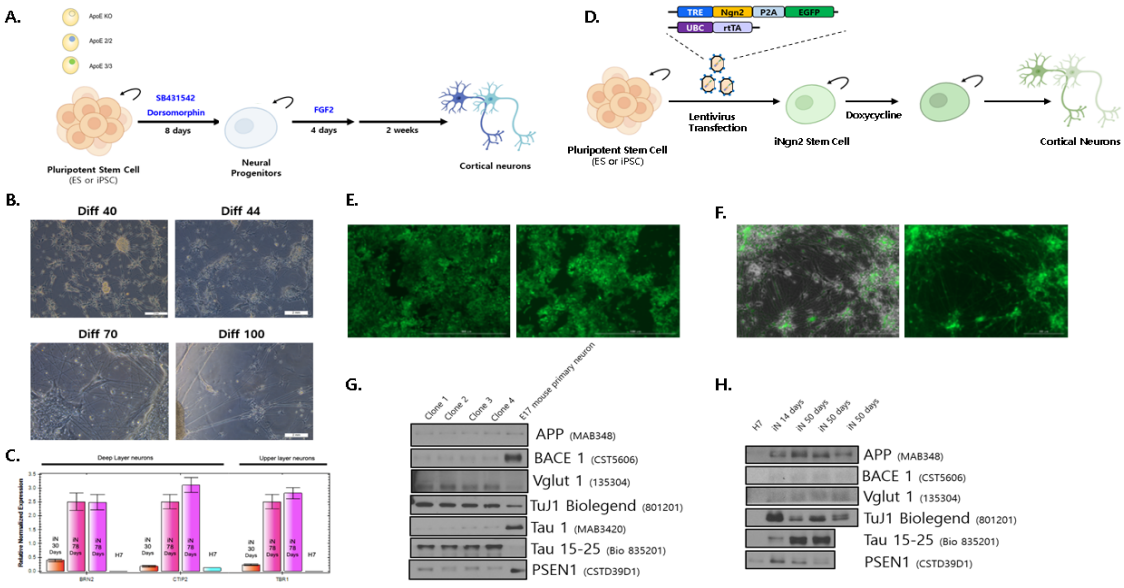


[그림 2-510. 알츠하이머 치매 환자 유래 PBMC로부터 역분화줄기세포(iPSC)로 역분화하는 프로토콜 구축]

3) 또한 배아줄기세포 (ESC) 및 iPSC를 cortical neuron으로 분화하는 두 가지의 프로토콜을 구축함(그림 2-511A, 2-511D). Chemical을 이용한 프로토콜을 통해 분화시킨 세포에서 분화 일자에 따라 morphology를 관찰하였을 때, 분화 40일부터 neuronal morphology의 주요 특징 중의 하나인 neurite가 뻗어 나오는 모습을 확인하였고, 분화 70일에는 neurite가 더 길어지는 것을 확인함(그림 2-511B)

4) 또한, 분화 진행 30일과 78일 뒤부터, deep layer neuronal marker인 BRN2와 CTIP2, uppper layer neuronal marker인 TBR1이 발현되는 것을 확인함(그림 2-511C). Ngn2를 이용한 프로토콜에서는 EGFP의 발현을 통해 Ngn2 construct를 가진 lentivirus가 ESC에 transduction 되었음을 확인함(그림 2-511E). Ngn2를 이용한 프로토콜 또한 분화 14일부

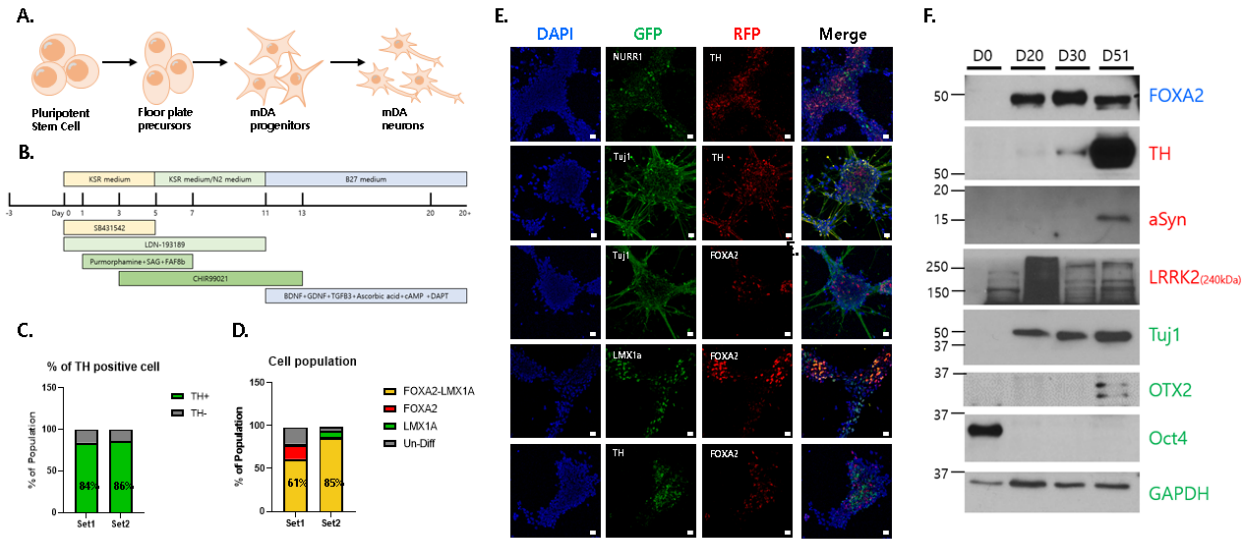
터 neuronal morphology의 주요 특징 중 하나인 neurite가 뻗어 나오는 모습을 확인하였고, neuronal marke인 Tuj1, Vglut이 발현함을 확인함(그림 2-511F, 2-511G). AD pathology 관련 마커인 APP, Tau, PSEN1의 발현 또한 확인하였으며, 추후 더 성숙된 뉴런에서 BACE1 발현의 확인이 요구됨



[그림 2-511. 배아줄기세포 (ESC)로부터 cortical neuron으로 분화하는 프로토콜 구축]

5) 배아줄기세포 (ESC)로부터 dopaminergic neuron으로 분화하는 프로토콜 또한 구축함(그림 2-512A). Matrigel이 코팅된 12 well cell culture plate에 3.6 X 10^4 cells/cm^2의 density로 ESC 혹은 iPSC를 seeding하고 2일간 culture medium으로 세포를 유지하였으며, seeding 2일 후부터 날짜에 해당하는 medium으로 media change를 진행함. 이후 분화 20일 차에 accutase를 사용하여, Poly-L-ornithine/Laminin/Fibronectin으로 코팅된 6 well cell culture plate에 2 X 10^5 cells/cm^2 의 density로 계대함(그림 2-512B)

6) Floor plate 분화 마커로 알려진 LMX1A, FOXA2와 dopaminergic neuron 마커로 알려진 TH를 발현하는 세포의 비율을 측정했을 때, 60~80%의 세포가 분화되는 것을 확인함(그림 2-512C, D). 또한, 분화 시작 후 30일경부터, neurite가 뻗어 나오는 모습을 확인할 수 있었고, dopaminergic neuronal 마커인 tyrosine hydroxylase와 Nurr1이 발현되는 것을 확인함(그림 2-512C-E)



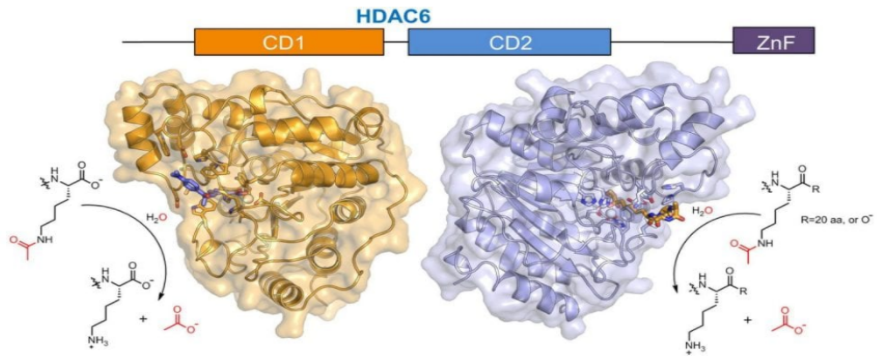
[그림 2-512. 배아줄기세포 (ESC)로부터 Dopaminergic neuron으로 분화하는 프로토콜 구축]

KOPRI
극지연구소

□ 연구내용 2-5. 타겟 단백질 및 라말린과의 결합원리 측정

○ HDAC6와 라말린의 결합 원리 연구

1) HDAC6는 여러 domain이 연결된 거대 단백질로 특히 catalytic domain이 2개가 존재함 (CD1과 CD2)(그림 2-513)



[그림 2-513. HDAC6 효소 활성 도메인 구조]

2) 활성물질이 CD1과 CD2 중 어느 부분에 작용하는지 정확히 알아보기 위해 CD1-CD2가 연결된 상태의 construct를 제작함(그림 2-514). 이 construct는 향후 Insect cell에서 발현/정제 예정임

HDAC6 (CD1-CD2)_pVL1392 sequencing

SAC1 - Nde1 - HDAC6 (CD1-CD2) - Xba1

GREEN means: HDAC6 (CD1-CD2)

RED means: start/stop codon

BLUE means: Restrict Enzyme site

(Nde1□□CATATG / Sac1□□GAGCTC / Xba1□□TCTAGA)

Highlight means: His-tag region

Italic means: pET28a_vector site

Underline means: pVL1392_vector site

GCCGCTCCAGAATTCGAGCTC

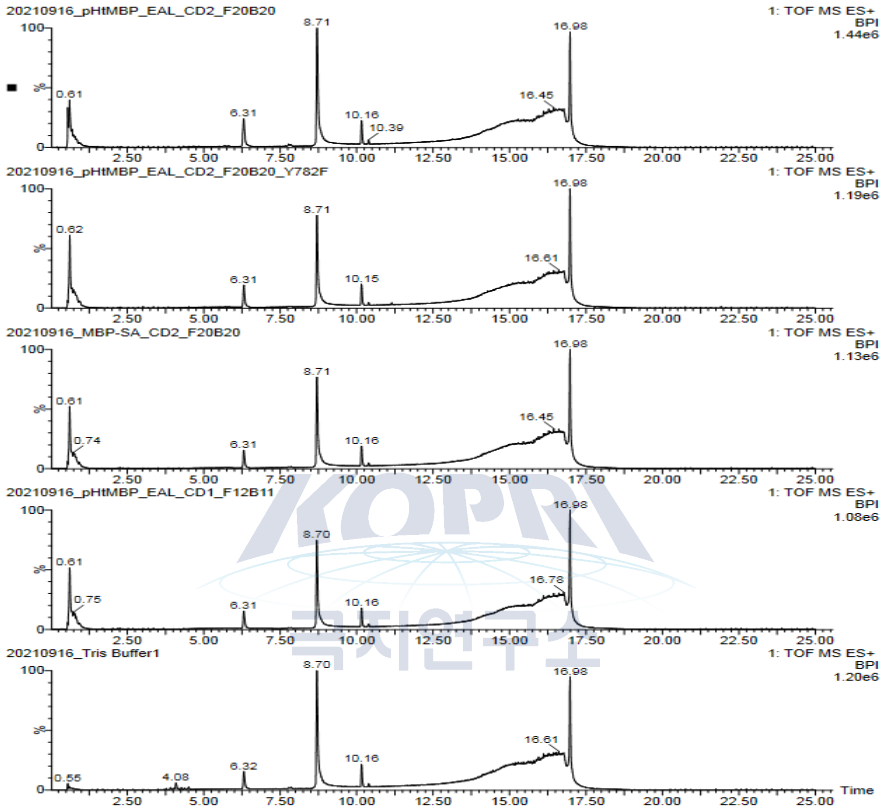
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC

CATATGGCTGGCACTGGCTTGGTGTTGGATGAGCAATTAAATGAATTTCATTGCTTGTGGGATGACAGCTTTCCGGAAGGCCCTGAACGGCTCCATGCCATCAAGGAGCAATTGATACAGG
AAGGGCTCCTAGATCGCTGCGTGTCCTTTCAGGCCCGGTTTGCTGAAAAGGAAGAACTGATGTTGGTTCATAGCCTTGAATACATTGATCTGATGGAAACAACCCAGTACATGAATGAAGG
AGAACTCCGTGTTTTGGCAGACACATACGACTCAGTTTATCTGCATCCGAACTCATACTCCTGTGCCTGTCTGGCCTCAGGCTCTGTCCTCAGGCTGGTGGATGCGGTCCTGGGGGCTGAAAT
CCGGAATGGCATGGCCATCATTAGGCCTCCTGGACATCACGCCCAGCATAGTCTATGGATGGCTATTGTATGTTCAATCACGTGGCTGTGGCAGCCCGCTATGCTCAACAGAAACACCGCAT
ACGGAGGGTTCTTATCGTAGATTGGGATGTGCATCATGGTCAAGGAACACAGTTCACCTTCGACCAGGACCCCAGTGTCCTCTACTTCTCCATCCACCGCTACGAGCAAGGTAGGTTCTGGCC
ACACCTGAAGGCATCTAACTGGTCCACCACAGGTTTCGGCCAAGGCCAAGGATATACCATCAATGTTCCTTGGAACCAGGTGGGGATGAGGGATGCTGACTACATTGCTGCTTTCCTGCACG
TACTGCTGCCAGTCGCCCTCGAATTCCAGCCTCAGCTGGTCCTGGTGGCTGCAGGATTTGATGCCTTACAGGGGGACCCCAAGGGTGAGATGGCAGCCACTCCGGCAGGGTTCGCCCAGCT
AACCCACCTTCTCATGGGTCTGGCAGGAGGCAAGCTGATTCTGTCTCTCGAGGGTGGCTACAACCTCAGAGCCCTGGCTGAAGGCGTCTCTGCTTCGCTCCATACCCTTCTGGGAGACCCTT
GCCCTATGCTGGAGTCACCTGGTGCCCCCTGCCGGAGTGCCCAGGCTTCAGTTTCCTGTGCTCTGGAAGCACTTGAGCCCTTCTGGGAAGTTCTTGTGAGATCAACTGAGACGGTGGAGAG
GGACAACATGGAGGAAGACAATGTAGAGGAAAGCGAGGAGGAAGGACCATGGGAACCCCCTGTGCTCCCAATCCTGACATGGCCAGTGTTACAGAGCCGCACAGGGCTGGTTTATGACC
AAAATATGATGAATCACTGCAATTTGTGGGACTCCCACCACCCTGAGGTACCCCAGCGCATCTTGCGAATTATGTGCCGTCTCGAGGAGCTGGGCCTTGCTGGGAGATGCTTAACCCTGACA
CCGCGCCCTGCGACAGAGGCTGAGCTGCTTACCTGTCACAGTGCTGAGTACGTGGGTCATCTCCGGGCCACAGAGAAAATGAAGACCCGGGAGCTGCACAGAGAGAGTTCCAACTTTGAC
TCCATCTATATCTGCCCCAGTACATTCGCCTGTGCACAGCTTGCAACTGGCGCTGCCTGCCGACTGGTGGAGGCAGTGTTATCAGGAGAGGTTCTGAATGGTGCTGCTGTGGTGCGTCCACCA
GGACACCACGCAGAACAGGATGCGGCTTGCGGTTTTTGCTTTTTCAACTCTGTGGCTGTTGCTGCTAGGCATGCCCAGACTATCAGCGGGCATGCGCTACGGATCCTGATTGTGGATTGGGA
TGTCCACCACGGTAACGGAACTCAGCACATGTTTGAGGACGACCCCAGCGTGCTATATGTGTCCCTTCACCGCTATGATCATGGCACCTTCTTCCCCATGGGGGATGAGGGCGCCAGCAGCC
AAATCGGTAGAGCTGCGGGCACAGGCTTCACGGTCAACGTGGCATGGAACGGGCCCCGCATGGGTGATGCTGACTACTTGGCTGCCTGGCATCGACTGGTGCTTCCCATTGCCTACGAGTT
TAACCCAGAACTGGTGCTGGTCTCAGCTGGCTTTGATGCTGCACGGGGGGATCCGCTGGGGGGCTGCCAGGTGTCACCTGAGGGTTATGCCCACCTCACCCACCTGCTGATGGGCCTTGCC
AGTGGCCGCATTATTCTTATCCTAGAGGGTGGCTATAACCTCACATCCATCTCCGAGAGCATGGCTGCCTGCACTAGATCCCTCCTTGGAGATCCACCACCGTTACTGACGCTGCCACGGCCTC
CACTATCAGGAGCCCTGGCCTCAATTACGGAGACTATCCAAGTCCATAGAAGATACTGGAGAAGCTTAAGATAA

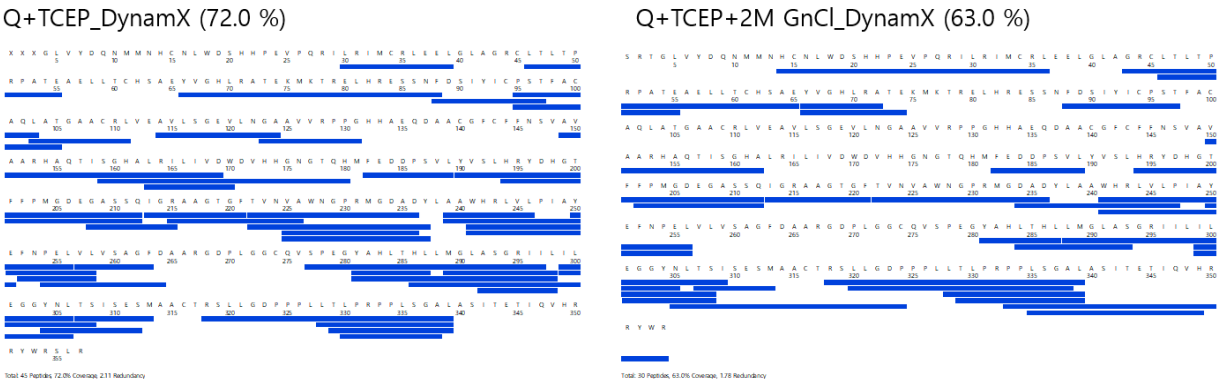
TCTAGAAGGTACCCG

[그림 2-514. HDAC6의 CD1과 CD2 도메인이 연결된 상태의 컨스트럭트 제작]

3) 다음으로, HDAC6와 라말린의 결합원리를 HDX-MS로 연구하기 위한 질량분석 조건 실험을 진행함. 전남대 임영준 교수 연구팀에서 제작한 CD1과 CD2의 intact MS 측정하여 각 CD의 적절성을 측정하였으나, 단백질이 거대하고 지용성이 강해 결과를 얻지 못함(그림 2-515). 이에, pepsin으로 자른 후 잘린 peptide를 분석하는 bottom-up mass spectrometry를 시행함. 그 결과, 제작된 CD2가 적절한 construct임을 확인하였으며, 향후 CD1도 같은 방법으로 확인하고, HDX-MS를 수행할 예정임



[그림 2-515. CD1과 CD2의 intact MS 측정]



[그림 2-516. HDX-MS]

□ 연구내용 2-6. 신경세포 시냅스 활성 조절 및 미토콘드리아 이동 조절 규명

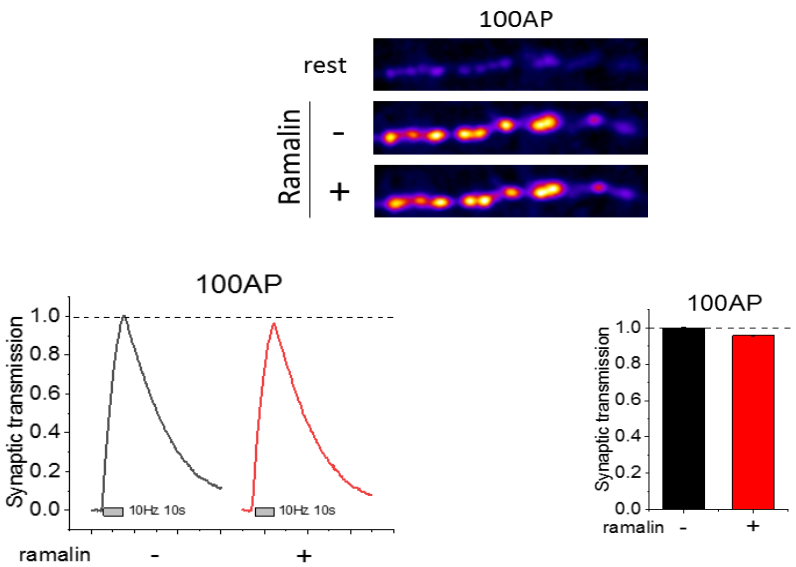
○ 라말린에 의한 신경세포 시냅스의 활성 기능 조절 규명

1) 시냅스는 신경정보전달에 대한 기본 기능이 이루어지는 부분으로 그 기능의 보존이 정상적 뇌 기능에 중요하고, 최근 신경 시냅스 기능이상 (synaptopathy; 시냅스병증)이 신경질환의 중요한 초기 증상으로 보고되고 있음. 특히 치매에서도 시냅스의 기능이상이 그 초기 증상으로 보고되고 있고, 치매와 시냅스 병증에 대한 관계, 그리고 라말린에 의한 시냅스 병증의 영향 관계를 확인했음

2) 우선 신경세포 시냅스에서의 라말린에 의한 영향을 확인하기 위하여 정상 해마신경세포를 일차 배양하고 시냅스의 기능을 모니터링할 수 있는 센서를 발현시켰음

3) 신경세포가 성체까지 분화되도록 성장시킨 후 라말린을 처리한 후 시냅스의 기능 변화를 확인함. 쥐 (Rat) 해마 신경세포는 태아 (출산 후 1~2일)의 뇌에서 적출하여 여러 화학적 물리적 처리를 통하여 개별 신경세포로 분리해 내고 적절한 조건을 갖춘 세포 배양기에서 약 2주간 배양을 통하여 분화와 신경 네트워크를 형성한 후 시냅스 기능을 확인하였음

4) 우선 정상 신경세포 시냅스에 신경활성 (100 action potential: 100AP)을 주어지고 시냅스 트랜스미션을 확인함. 그 후 동일 신경세포에 라말린을 처리하고 시냅스 트랜스미션의 변화를 관찰함. 그 결과, 라말린 처리 후에도 유사한 시냅스 트랜스미션을 보여주고 있음. 이는 라말린에 의한 정상 신경세포에 독성 작용이나 기타 유해 현상이 나타나지 않음을 보여줌

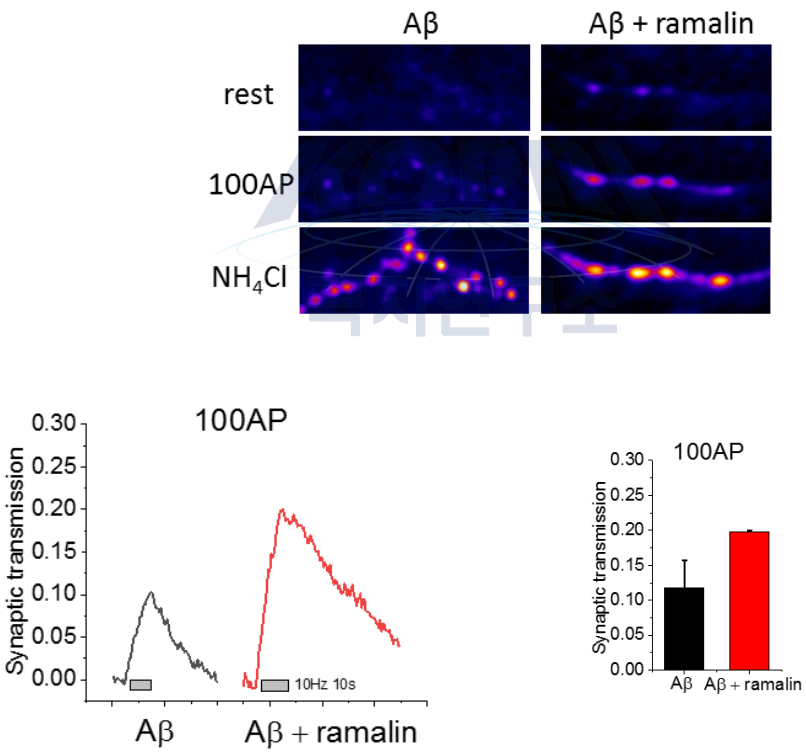


[그림 2-517. 일차 배양 해마 신경세포에서 라말린에 의한 시냅스 영향 관찰]

5) 다음으로 일반 정상 해마 신경세포에 치매유발물질로 알려진 Aβ 올리고머를 처리하여 신경시냅스를 치매환경으로 유도한 후 시냅스의 기능 변화를 확인함. 또한, 일반 정상 해마 신경세포에 Aβ 올리고머를 처리한 조건에 라말린을 함께 처리하여 신경시냅스의 기능이 어떻게 변화되었는가를 확인함

6) 첫 번째로, 일반 정상 해마 신경세포에 Aβ 올리고머를 처리 후 신경시냅스의 기능을 확인해본 결과, 시냅스 트랜스미션이 매우 저하되었거나 일부 신경세포에서는 거의 반응이 보이지 않았음 (평균적으로 약 50% 기능 저하가 보여짐)

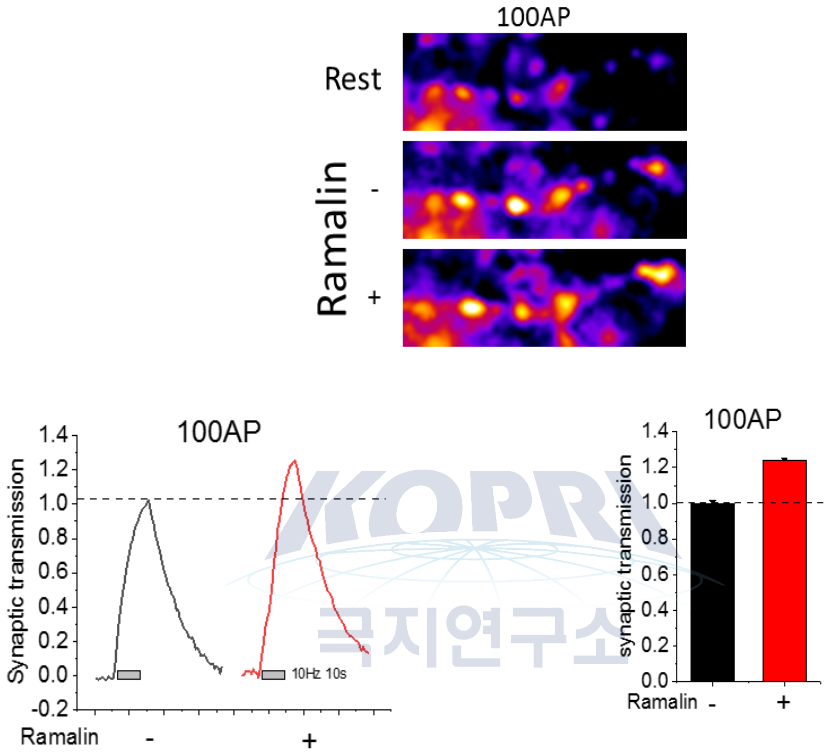
7) 두 번째로, 일반 정상 해마 신경세포에 Aβ 올리고머 처리와 라말린 처리를 동시에 하고 시냅스의 기능을 확인하였음. 그 결과, 시냅스 트랜스미션이 정상 수준과 유사하게 회복되었음. 이는 라말린에 의한 시냅스 병태생리적 환경에서 시냅스의 기능이 회복되거나, 혹은 시냅스 병태생리적 조건에서 방어적인 역할이 있음을 알 수 있음



[그림 2-518. 일차 배양 해마 신경세포에서 치매환경과 라말린 처리에 의한 시냅스 기능 관찰]

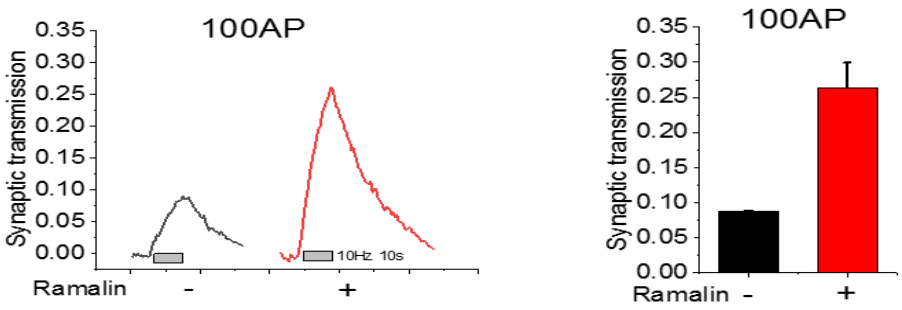
8) 5xFAD는 현재 많이 이용되고 있는 치매 모델 마우스로써, 아밀로이드 베타 (Aβ)의 생산이 많이 발생되도록 유전변이를 집어넣은 유전자 조작 치매 모델임. 이 치매모델 마우스의 신경세포를 앞선 상태와 같이 일차 배양 후 시냅스 병태생리를 확인하고 그 후 라말린 처리를 통한 시냅스 기능의 변화를 확인함

9) 첫 번째로 5xFAD 해마 신경세포를 배양하고 기본 시냅스 기능을 확인하였음, 그 후 동일 신경세포에 짧은 간격 (short-term; 30분 이내)으로 고농도의 라말린 (40 μM)을 처리하고 시냅스 기능의 변화를 확인함. 그 결과 먼저 5xFAD 치매 모델 마우스의 시냅스 기능이 저하 되어있는 것을 확인함. 그 후, 라말린을 단기간 처리하고 동일 신경세포 시냅스의 기능을 확인해 본 결과 시냅스의 기능이 약 20% 향상되는 것을 확인할 수 있었음. 이는 라말린에 의해 저해된 치매 시냅스의 기능이 다시 회복 될 수 있다는 것을 보여주는 결과임



[그림 2-519. 치매 모델 마우스 (5xFAD) 일차 배양 해마 신경세포에서 시냅스 기능 저하 확인과 단기간 라말린 처리에 의한 시냅스 기능 회복 관찰]

10) 동일한 치매 모델 마우스 (5xFAD)의 신경세포에 라말린을 저농도 (0.25 μM)로 중/장기간 (4hr-overnight) 처리한 후 시냅스의 기능 변화를 확인함. 실험 결과, 라말린 처리가 되지 않은 치매 모델 신경세포 시냅스는 앞선 바와 같이 시냅스 기능이 매우 저하되어 있음이 확인되었음. 또한, 치매 모델 신경세포에 저농도의 라말린이 중/장기적으로 처리된 신경세포는 시냅스 기능이 매우 향상되어 있음을 확인하였음. 이는 라말린에 의해서 저해되어 있는 시냅스 기능이 회복될 수 있음을 보여주는 단서임

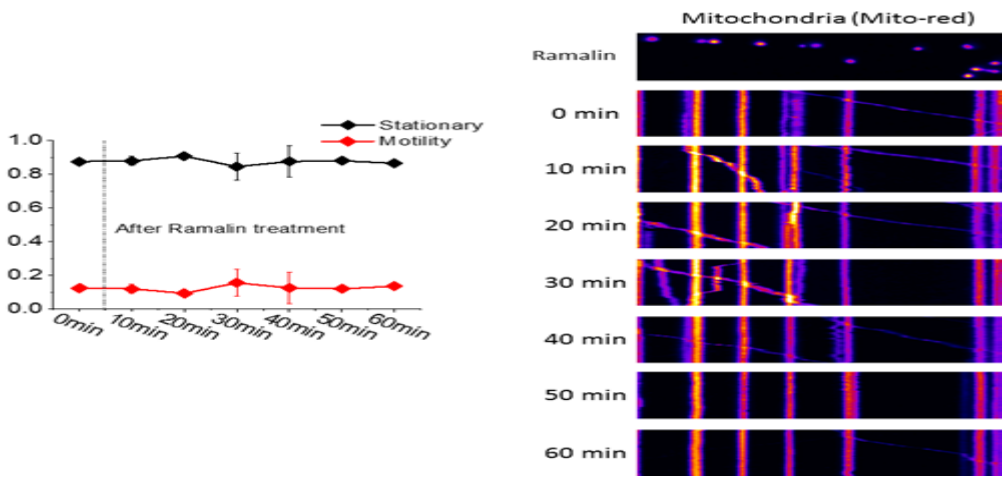


[그림 2-520. 치매 모델 마우스 (5xFAD) 일차 배양 해마 신경세포에서 시냅스 기능저하 확인과 중/장기간 라말린 처리에 의한 시냅스 기능 회복 관찰]

○ 신경세포 미토콘드리아의 활동성과 라말린에 의한 영향 관찰

1) 미토콘드리아는 신경세포의 대사와 그 에너지 생성을 위해 매우 중요한 기능을 하고 있음. 특히 신경 축삭과 시냅스에 분포하고 상황에 따라 왕성하게 이동도 하는 것으로 알려짐. 본 연구에서 우선 일반 해마 신경세포에서 라말린 처리에 의한 축삭과 시냅스에 존재하는 미토콘드리아의 움직임을 관찰하였음

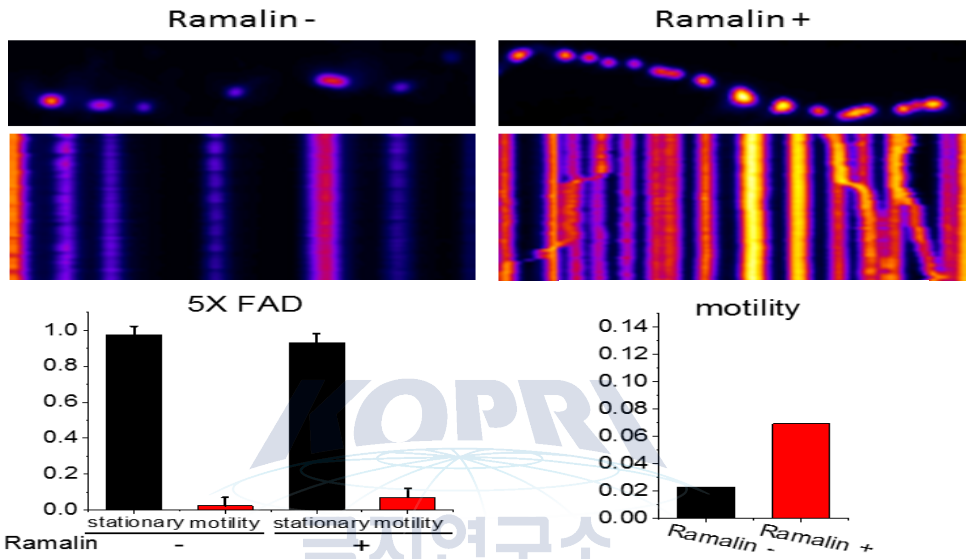
2) 일차 배양 해마 신경세포에 미토콘드리아 마커 (Mito-red)를 발현시키고 라말린을 처리하기 전부터 라말린을 단기간 처리하면서 미토콘드리아의 움직임을 관찰한 결과, 이동하는 미토콘드리아 (motility)와 제자리의 미토콘드리아 (stationary)가 크게 변화하는 것이 없음을 확인함



[그림 2-521. 일차 배양 해마 신경세포에서 라말린 처리에 의한 미토콘드리아의 이동 관찰]

3) 다음으로 치매 모델 마우스 신경세포에서 미토콘드리아의 움직임과 라말린 처리에 의한 움직임의 변화를 관찰함. 치매 모델 마우스 (5xFAD) 신경세포에 미토콘드리아의 마커 (Mito-red)를 발현시키고 그 움직임을 관찰함. 일반적으로 미토콘드리아의 움직임이 매우 많이 저해되어 있음을 확인함. 또한 미토콘드리아의 분포도 줄어들어 있어 보임

4) 치매 모델 마우스 (5xFAD) 신경세포에 라말린을 저농도로 중/장기 처리하고 미토콘드리아의 움직임을 확인해 본 결과, 그 움직임이 증가되어 있음을 확인하였음. 또한 미토콘드리아의 분포도 증가되어 보임



[그림 2-522. 치매 모델 마우스 (5xFAD) 해마 신경세포에서 라말린 처리에 의한 미토콘드리아의 이동 관찰]

□ 연구내용 2-7. 라말린 및 라말린 유도체의 생체 내 표적 예측

○ 화학정보학 및 머신러닝 기반 라말린 및 라말린 유도체 타겟 단백질 예측 연구

1) 본 연구팀은 자체 개발한 cheminformatics 방법인 ALIS-SEA 및 ALIS-mL을 활용하여 라말린의 생체내 표적에 대해서 연구함

2) ALIS-SEA는 각 단백질에서 미지의 query 저분자 물질과 기존에 직접 결합한다고 알려진 저분자 물질군이 우연에 의해서 유사한 골격을 가질 확률을 계산함. 확률값이 낮을수록 우연이 아닌 필연으로 유사 골격을 갖게 됨, 즉, 표적일 가능성이 높음을 의미함

3) ALIS-SEA는 UCSF의 Brian Shoichet 그룹이 개발한 SEA를, 본 연구자가 자체적으로 구연한 것으로 필요에 따라서 다양한 형식으로 확장 가능함. 예를 들면 high throughput screening에도 활용할 수 있음

4) 또한, 수치에 의한 단순 비교의 단점을 극복하기 위해서, 표적 단백질 결합 저분자 물질 중 query와 화학 구조적으로 가장 근접한 저분자 물질의 유사성을 Tanimoto coefficient (TC)로 정량화하여 표시하고, TC가 가장 큰 화합물과 query 화합물의 화학구조를 직접 비교하여 판별함

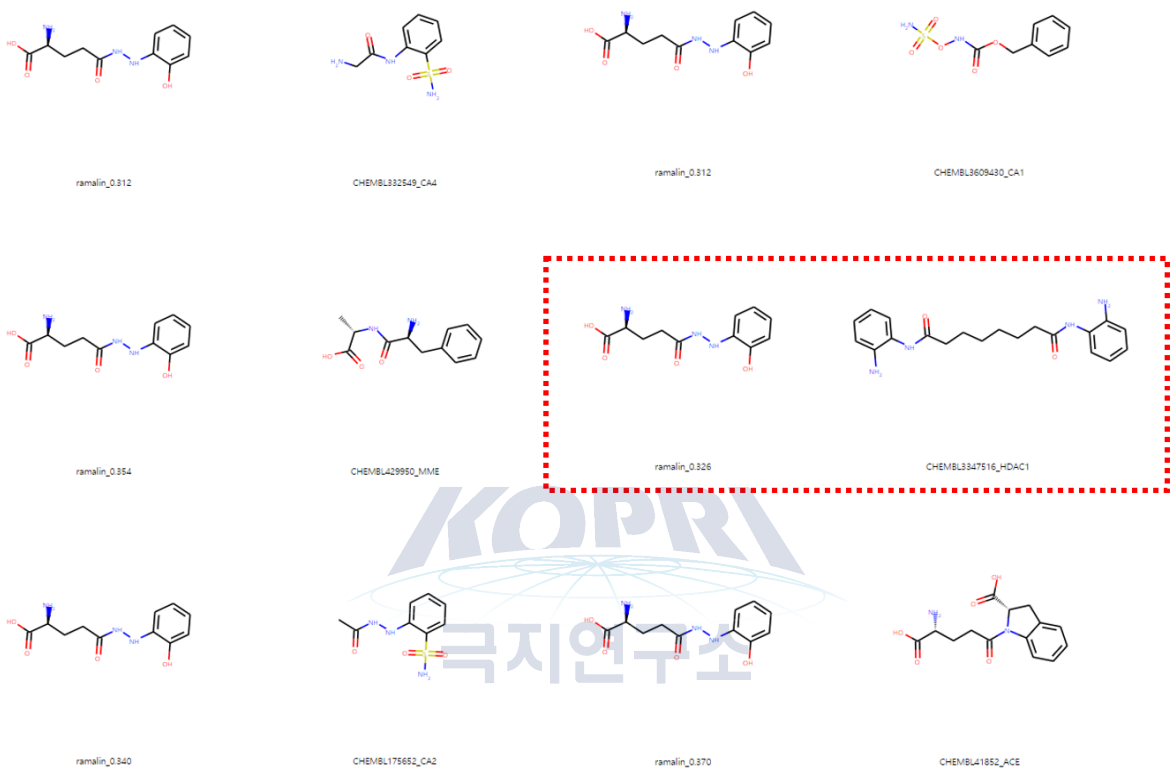
5) ALIS-SEA를 활용하여 라말린의 생체표적을 위와 같이 예측함(그림 2-1255)

ramalin	CA4	7.27e-21	0.312	CHEMBL332549
ramalin	MME	2.39e-20	0.354	CHEMBL429950
ramalin	CA2	2.70e-18	0.340	CHEMBL175652
ramalin	CA1	3.45e-16	0.312	CHEMBL3609430
ramalin	HDAC1	1.00e-15	0.326	CHEMBL3347516
ramalin	ACE	1.49e-15	0.370	CHEMBL41852
ramalin	MMP2	1.60e-15	0.327	CHEMBL442587
ramalin	SLC1A1	2.43e-14	0.429	CHEMBL518313
ramalin	TPH1	8.66e-14	0.322	CHEMBL3800600
ramalin	ANPEP	9.10e-14	0.340	CHEMBL2332529
ramalin	HCAR2	3.57e-13	0.352	CHEMBL1770171
ramalin	SLC1A2	1.92e-12	0.385	CHEMBL424838
ramalin	CAPN1	1.98e-12	0.314	CHEMBL8486
ramalin	CA9	5.23e-12	0.340	CHEMBL175652
ramalin	MMP9	2.60e-11	0.319	CHEMBL2336353
ramalin	GRIK1	4.06e-11	0.429	CHEMBL518313
ramalin	HDAC3	5.24e-11	0.326	CHEMBL3347516
ramalin	GRIK3	8.43e-11	0.556	CHEMBL2312680

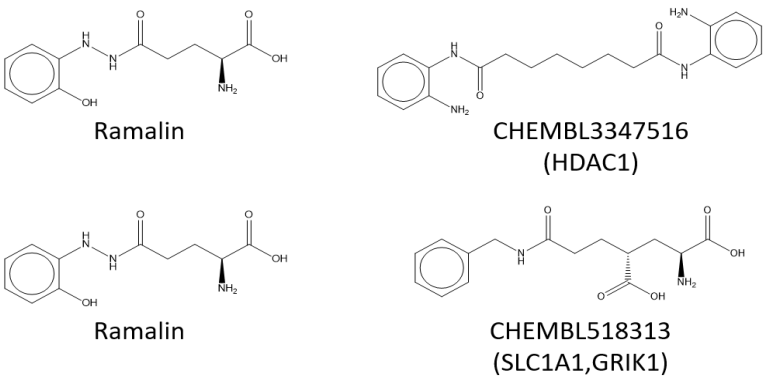
[그림 2-523. ALIS-SEA에 의한 라말린 생체 내 표적 예측 결과]

6) HDAC1 등은 예측한 표적 단백질의 이름이고, 1.00e-15는 우연에 의해서 유사성이 발견될 확률, CHEMBL3347516는 알려진 HDAC1의 저해제 중에서 라말린과 가장 큰 TC 값을 갖는 저분자 물질임

7) 이 결과를 바탕으로 query 화합물과 각 단백질 직접결합 화합물 중에서 TC 값이 query와 가장 높은 화합물을 비교한 예가 다음과 같음(그림 2-1256, 2-1257)



[그림 2-524. 라말린과 ALIS-SEA 예측 단백질에 직접 결합하는 가장 유사한 저분자 물질의 비교]



[그림 2-525. ALIS-SEA에 의해 예측한 라말린과 결합 가능성 큰 생체표적과 알려진 결합 저분자의 비교]

8) 라말린에 대해서 HDAC1, SLC1A1, GRIK1 등이 생체표적이 될 가능성을 발견함. 만약 CHEMBL3347516과 CHEMBL518313을 이용한 실험에서 라말린에서 관찰한 활성과 비슷한 활성을 보인다면 HDAC1 과 SLC1A1, GRIK1 및 유사표적이 라말린의 on-target 또는 off-target임을 추측할 수 있음

9) ALIS-mL은 ALIS-SEA과 같은 데이터베이스를 사용하나 통계적인 방법이 아닌 기계학습(machine learning)을 이용하여 결합 가능한 저분자 물질을 예측함. ALIS-mL에서는 query 저분자 물질과 직접 결합하여 기능을 저해하는 저분자 물질 군과 비슷한 정도를 확률로 표시하기 때문에 확률값이 높을수록 표적일 가능성이 높음을 의미함

10) 역시 확률값과 더불어 TC값이 가장 큰 화합물과 query 화합물을 직접 비교하여 판단함. ALIS-SEA와 다른 알고리듬이기에 상보적으로 사용할 수 있음. 자체 개발하였기에 high throughput screening 등 다양한 용도로 확장 가능함

11) ALIS-mL은 ALIS-SEA에서 예측한 SLC1A1 및 GRIK1외에 LTA4H가 결합 가능한 표적으로 예측하였음. 마찬가지로 CHEMBL517211을 이용한 실험에서 라말린에서 관찰한 활성과 비슷한 활성을 보인다면 LTA4H가 라말린의 on-target 또는 off-target임을 추측할 수 있음(그림 2-1258)

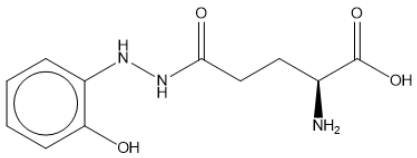
KOPRI 극지연구소

ramalin	LTA4H	0.979	0.535	CHEMBL517211
ramalin	CA4	0.749	0.312	CHEMBL332549
ramalin	SLC1A1	0.739	0.429	CHEMBL518313
ramalin	CACNA2D1	0.738	0.450	CHEMBL203873
ramalin	GRIK1	0.648	0.429	CHEMBL518313

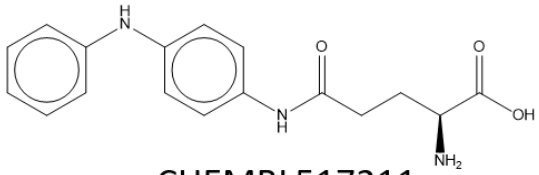
[그림 2-526. ALIS-mL에 의한 라말린 생체 내 표적 예측 결과]

12) ALIS-SEA 및 ALIS-mL을 위해서는 단백질에 직접 결합하여 기능을 조절하는 저분자 물질의 정확하게 annotation된 데이터베이스가 필요함. 최신의 ChEMBL database를 활용하여 성능을 향상시킴

13) High throughput screen용 라이브러리를 수백억 개의 ultra-large make-on-demand 라이브러리를 활용할 수 있도록 확장하였음. 이는 향후 potent한 활성 저분자를 탐색하는 실험에 활용할 수 있음



Ramalin



CHEMBL517211
(LTA4H)

[그림 2-527. ALIS-mL에 의해 추가로 예측한 라말린과 결합 가능성 큰 생체표적 (LTA4H)과 알려진 결합 저분자의 비교]

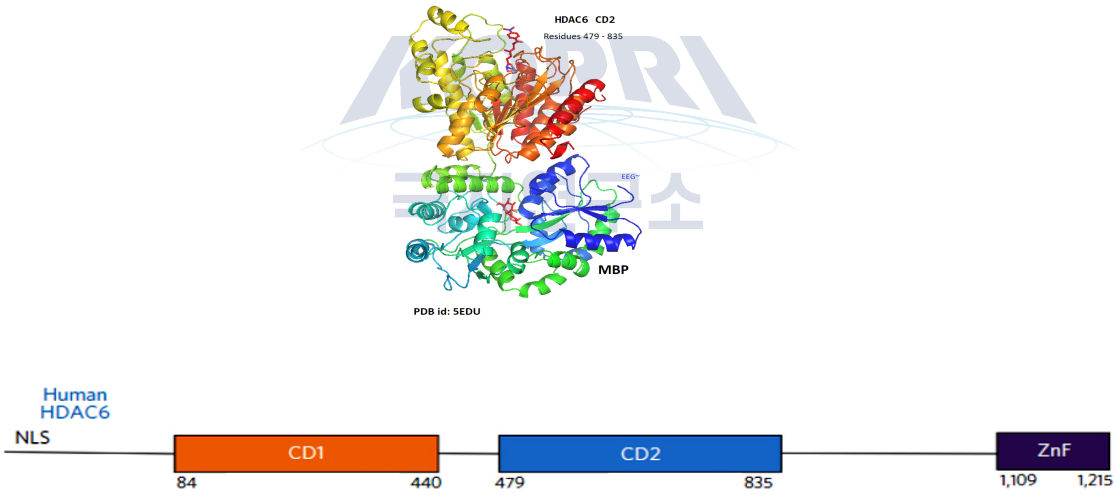
KOPRI
극지연구소

□ 연구내용 2-8. X-선 구조분석을 위한 표적 단백질 결정화 컨스트럭트 제작

○ 구조분석 연구에 적합한 여러 human HDAC6 활성 도메인 발현 컨스트럭트 제작

1) Human HDAC6의 주요 활성 도메인 catalytic domain 1, 2 (CD1, 2)의 DNA를 대장균에서 발현할 수 있는 여러 종류의 plasmid vector에 클로닝함 (표 2-14). 클로닝한 모든 컨스트럭트는 DNA sequencing을 통해 정확성을 확인하였음. Zebrafish HDAC6는 human 단백질의 발현정제에 실패할 경우에 대안으로 동시 진행을 계획하였으나, human HDAC6 construct가 잘 진행되어 보류함

2) 여러 종류의 fusion (MBP, GST, T4 lysozyme 등)을 시도하였고, Maltose-binding protein (MBP) fusion이 수용성 단백질 발현 정제에 적절함을 확인함. 기존에 보고 (Hai & Christianson, 2016 Nature Chem Biol)된 MBP가 fusion된 human HDAC6 CD2를 유사하게 제작하였고 구조분석 연구에 이용할 것임(그림 2-1260)



[그림 2-528. (Hai & Christianson, 2016 Nature Chem Biol)된 MBP가 fusion된 human HDAC6 CD2]

Construct No.	Gene	아미노산 서열 번호, 개수	Plasmid vector	Restriction enzyme sites	Molecular weight (KDa)	결과
1	human HDAC6 CD1	479-835, 357 a.a	pHtMBP-EAL	BamHI/SalI	82.4	수용성 발현
2	human HDAC6 CD2 Y782F	479-835, 357 a.a	pHtMBP-EAL	BamHI/SalI	82.4	수용성 발현
3	human HDAC6 CD2	479-835, 357 a.a	pHtMBP-SA	BamHI/SalI	82.5	수용성 발현
4	human HDAC6 CD1	81-454 374 a.a.	pHtMBP-EAL	EcoRI/XhoI	83.3	수용성 발현
5	human HDAC6 CD1	81-454 374 a.a.	pHis-Thr	EcoRI/XhoI	41.1	비수용성
6	human HDAC6 CD2	479-835, 357 a.a	pHis-Thr	BamHI/SalI	39.3	비수용성
7	human HDAC6 CD1-CD2	81-835 755	pHis-Thr	EcoRI/SalI	83.1	발현 안됨

[표 2-14. Human HDAC6의 주요 활성 도메인 catalytic domain 1, 2 (CD1, 2)를 여러 종류의 plasmid vector에 클로닝]

KOPRI 극지연구소

○ 표적 단백질 human HDAC6 활성 도메인 대량 발현 조건 확립

1) 대장균을 이용하여 클로닝된 human HDAC6 construct들의 단백질 발현을 테스트하고, 수용성 과발현이 되어 정제가 가능한 construct를 선별하였음. 아래와 같이 발현 조건을 확립함

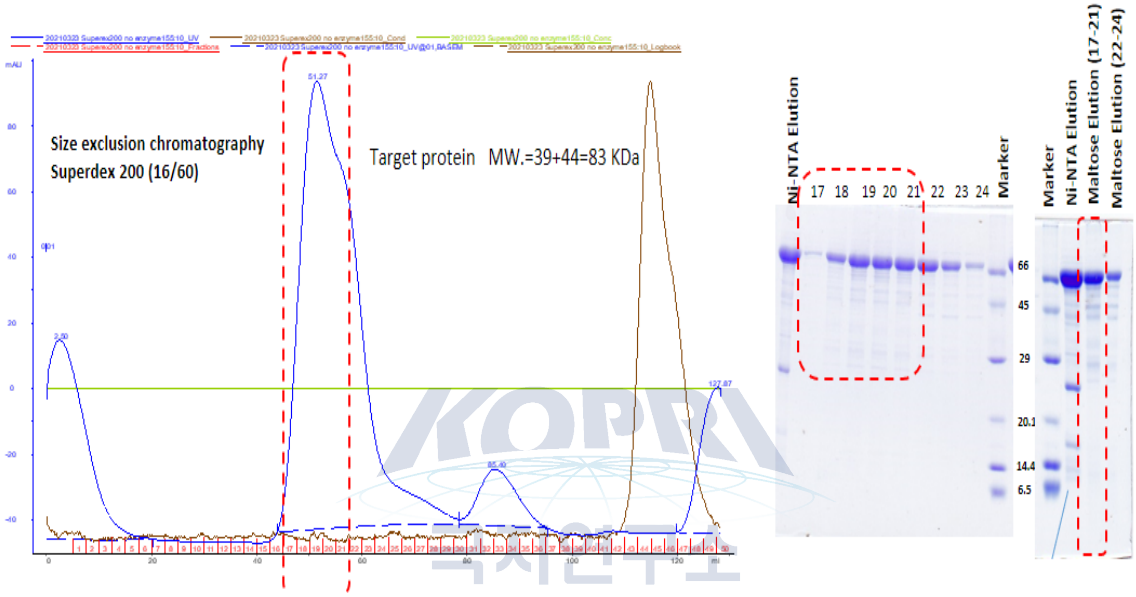
가. HDAC6 단백질 발현 숙주: *E. coli* BL21(DE3)
나. 발현 방식: plasmid (pHtMBP-EAL, N-terminal his-tagged maltose binding protein), Ampicillin marker
다. 배지: LB broth, 용량 3.2 L/per batch
라. 대장균 배양 온도: optical density가 1이 될 때까지 37℃에서 배양
마. 단백질 induction: 0.5 mM IPTG 첨가 후 18℃에서 overnight 배양/ 단백질 발현

2) HDAC6 단백질의 고순도 대량 정제 방법 구축

가. 90% 순도 이상의 단백질을 각 construct 당 10~50 mg 이상 확보할 수 있는 정제 방법을 3 단계의 크로마토그래피를 이용하여 아래와 같이 구축하였음. 다양한 조건 하에서 단백질 대량 발현 정제를 테스트하여 효소 활성 및 결정화 시도에 필요한 단백질 시료를 확보함

나. 정제 순서

- Cell harvesting: 세포 배양액 원심분리
- 초음파를 이용한 세포 파괴(Lysis buffer: 1X PBS + 30 mM imidazole)
- 원심분리 13,000 g로 수용성 물질과 비수용성 부분 분리
- Ni-NTA affinity chromatography
- Eluent를 농축하고 thrombin 처리하여 His-tag를 제거함.
- Size exclusion chromatogrpahy
- Maltose-resin affinity chromtography
- Concentration



[그림 2-529. MBP-fusion HDAC6 CD2의 단백질 정제]

3) HDAC6 도메인 초기 결정화 조건 탐색 및 구조 분석용 단백질 설계 최적화 수행함

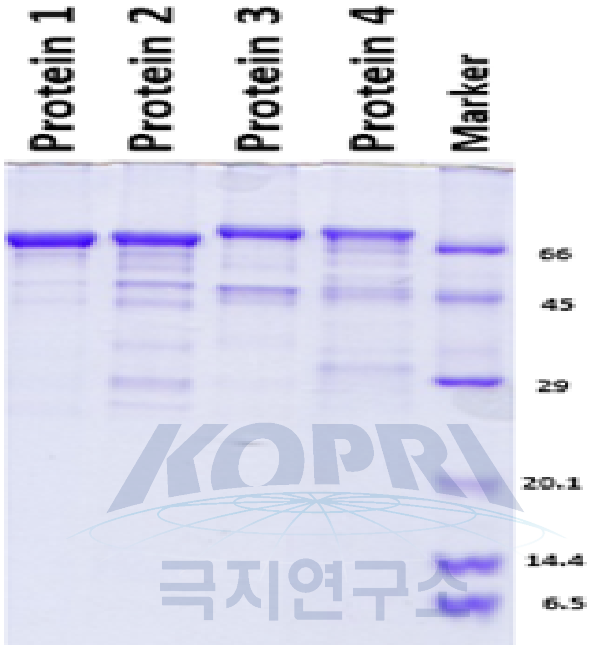
가. 양질의 단백질 결정을 생성할 수 있도록 construct를 유전적 변형을 통해 최적화 수행함. 이를 통하여 고해상도 3차원 X-선 회절 데이터를 제공하는 결정을 얻고자 함. 수용성 발현 정제가 확인된 construct들을 surface entropy reduction 전략으로 여러 point mutant를 아래와 같이 제작하였고, 결정화 조건을 탐색하고 있음. 현재 크기가 0.05 mm 정도의 tetragonal crystal을 얻었고, 구조분석에 적합한 결정의 최적화 과정을 진행하고 있음

나. 고순도 정제되고 결정화 시도된 construct는 아래와 같음

- Protein 1: His-thrombin-MBP-EALHDAC6 CD2 (Construct no: F20B20)
- Protein 2: His-thrombin-MBP-EALHDAC6 CD2 Y782F (Construct no: F20B20)
- Protein 3: His-MBP-SAHDAC6 CD2 (Construct no: F20B20)
- Protein 4: His-Thrombin-MBP-EALHDAC6 CD1 (Construct no: F12B11)

다. 결정화 및 구조분석을 위하여 최적화 construct를 아래와 같이 제작함

- pHT-MBP-SA HDAC6 CD2 479-835 LP808G
- pHT-MBP-SA HDAC6 CD2 479-835 C512S
- pHT-MBP-EAL HDAC6 479-835 LP808G
- pHT-MBP-EAL HDAC6 CD2 479-835 C493S
- pHT-MBP-EAL HDAC6 CD2 479-835 C512S



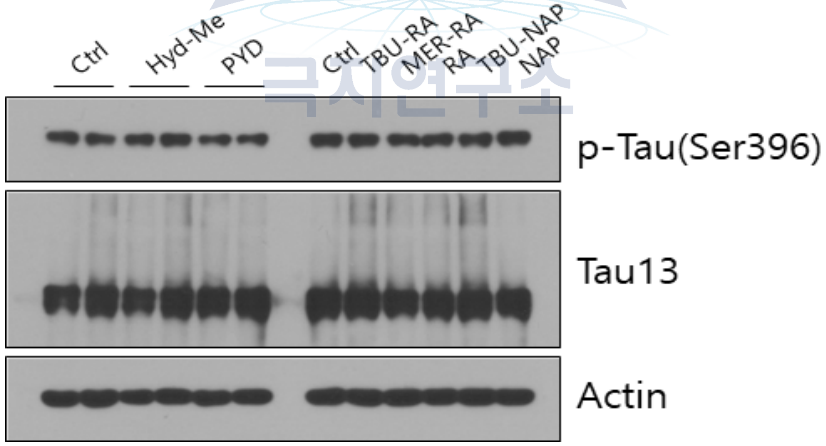
[그림 2-530. 고순도 정제 및 결정된 단백질]

□ 연구내용 2-9. 라말린 유도체 작용기전 규명

○ 라말린 유도체 작용기전 규명

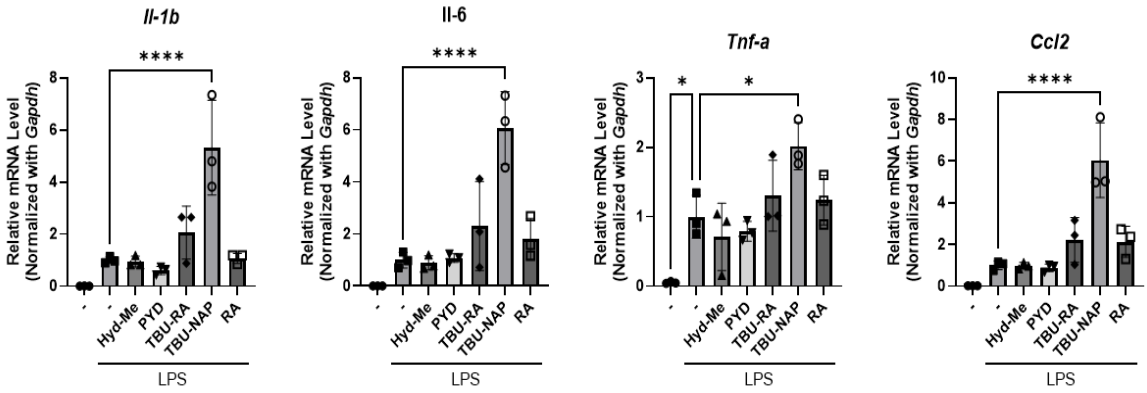
1) 라말린 유도체 스크리닝 수행 결과, Hyd-Me가 N2a, SH-SY5Y 신경세포에서 BACE1 단백질 발현을 낮추고, Tau-BiFC 시스템에서 타우 단백질의 응집을 줄였으며, BV-2 미세교세포에서 염증반응을 감소시킴. 또한, PYD는 N2a 신경세포에서 BACE1 단백질 발현을 감소시키고, Tau-BiFC 시스템에서 타우 단백질의 응집을 낮춤. 추가 라말린 유도체 스크리닝 결과, TBU-RA와 TBU-NAP가 마우스에서 비장 독성이 없었으며, BACE1 발현, Tau 단백질 응집, 염증반응을 줄이는 것을 확인함. 따라서 본 연구팀은 스크리닝에서 확인한 기전 이외에 다른 작용기전을 찾기 위해 다음의 실험을 수행함

2) 먼저 Tau-BiFC SH-SY5Y 세포에 Hyd-Me, PYD, TBU-RA, MER-RA, 라말린 (RA), TBU-NAP, NAP를 20 μM로 24시간 처리한 뒤 타우 인산화와 타우 응집을 확인함(그림 2-1263). PYD, MER-RA, 라말린을 처리한 샘플에서 타우 인산화가 감소함. 또한, NAP를 처리한 샘플에서 타우 응집이 대조군에 비해 감소한 것을 확인하였으며, MER-RA, 라말린을 처리한 그룹은 대조군에 비해 전체 타우 단백질 양이 감소함



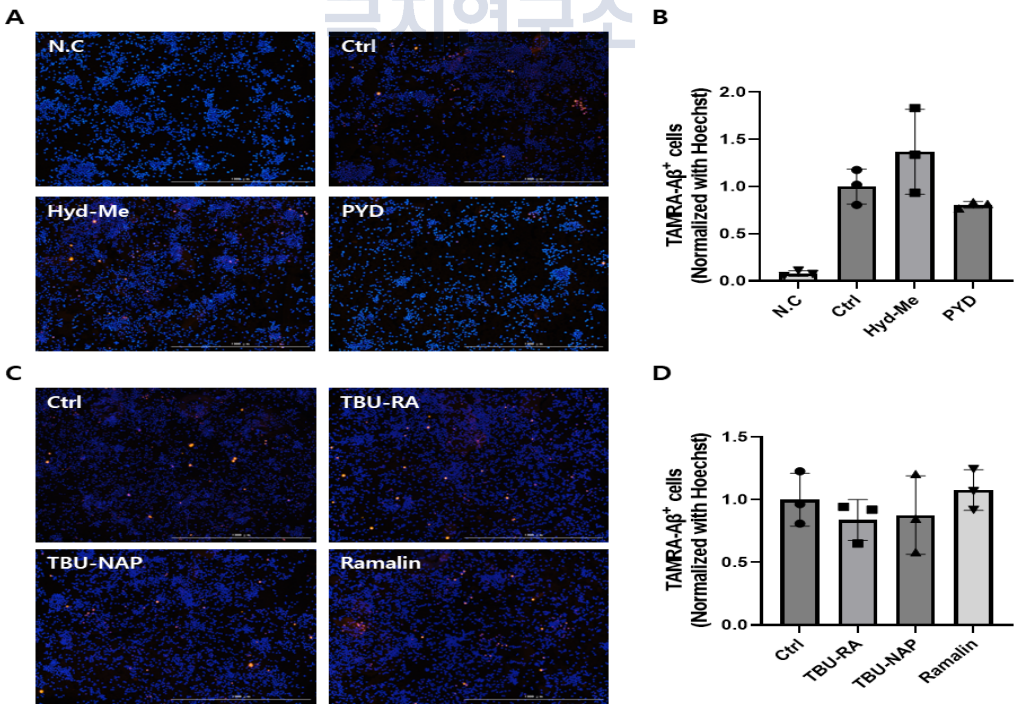
[그림 2-531. 라말린 유도체에 의한 타우 단백질 인산화 및 응집 조절 확인]

3) 다음으로, 미세교세포에서 라말린 유도체가 M1 전환을 조절하는지 확인함. BV-2 세포에 Hyd-Me, PYD, TBU-RA, TBU-NAP, 라말린을 20 μM로 24시간 처리한 뒤 LPS를 0.2 μg/mL로 2시간 처리하여 미세교세포의 염증반응을 유도함(그림 2-1264). 그 후 RNA를 추출하여 M1 바이오 마커인 *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Ccl2*의 mRNA 발현량을 분석하였으며, 모든 M1 바이오 마커들이 LPS 처리에 의해 증가함. TBU-NAP를 처리했을 때, M1 미세교세포로 전환되는 정도가 대조군에 비해 유의미하게 증가함. 하지만 다른 유도체의 경우 대조군과 비교했을 때 차이가 없었음



[그림 2-532. 라말린 유도체에 의한 미세교세포 M1/M2 전환 조절 확인]

4) 다음으로, 라말린 유도체가 미세교세포의 베타아밀로이드 섭식을 조절하는지 확인함. BV-2 세포에 Hyd-Me, PYD, TBU-RA, TBU-NAP, 라말린을 20 μM로 24시간 처리한 뒤 TAMRA 형광 표지된 아밀로이드 베타를 100 nM로 1시간 처리함(그림 2-533). 이후 2 μM Hoechst 33342로 핵을 염색한 뒤 섭식한 아밀로이드 베타의 양을 Hoechst로 normalization함. Hyd-Me와 라말린을 처리한 그룹에서 아밀로이드 베타를 섭식하는 정도가 대조군에 비해 증가하는 경향이 보였지만, 유의미한 차이는 없었음. PYD, TBU-RA, TBU-NAP를 처리한 그룹에서도 대조군과 비교했을 때 아밀로이드 베타를 섭식한 양에서 유의미한 차이는 보이지 않았음

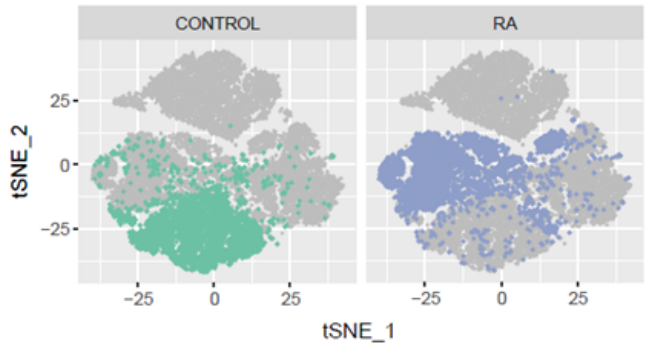


[그림 2-533. 라말린 유도체에 의한 미세교세포의 아밀로이드 베타 uptake 조절 확인]

□ 연구내용 2-10. 라말린 신규 타겟 규명

○ Single cell genomics를 통한 타겟 유전자 분석

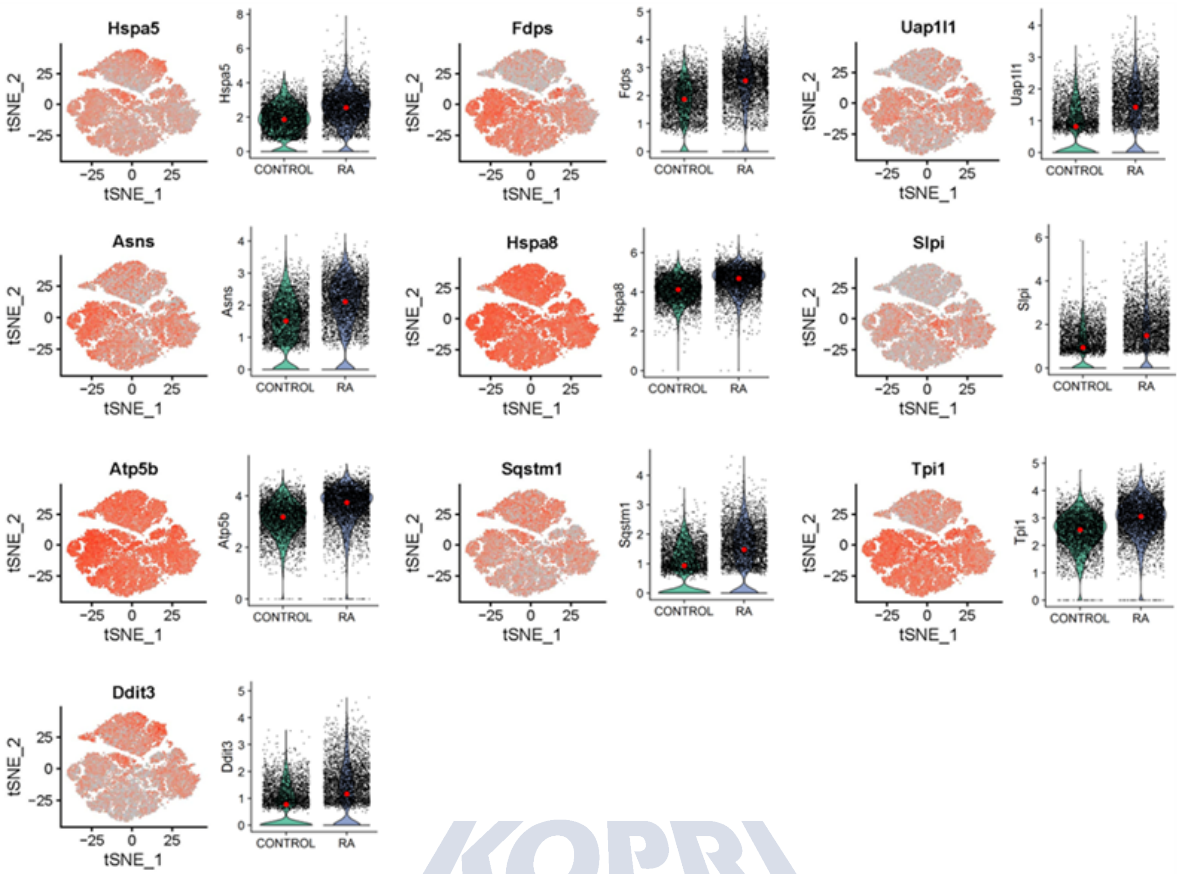
1) 마우스 신경세포에 DMSO와 라말린을 각각 처리하고 single cell RNA sequencing (scRNA-seq)을 진행함. t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) 방법을 통해 대조군과 라말린 처리군(RA)의 유전자 발현양상을 분석함(그림 2-1266). 대조군과 라말린 처리군이 다른 군집을 이루고 있는 것을 확인함



[그림 2-534. 대조군과 라말린을 처리한 세포의 분포]

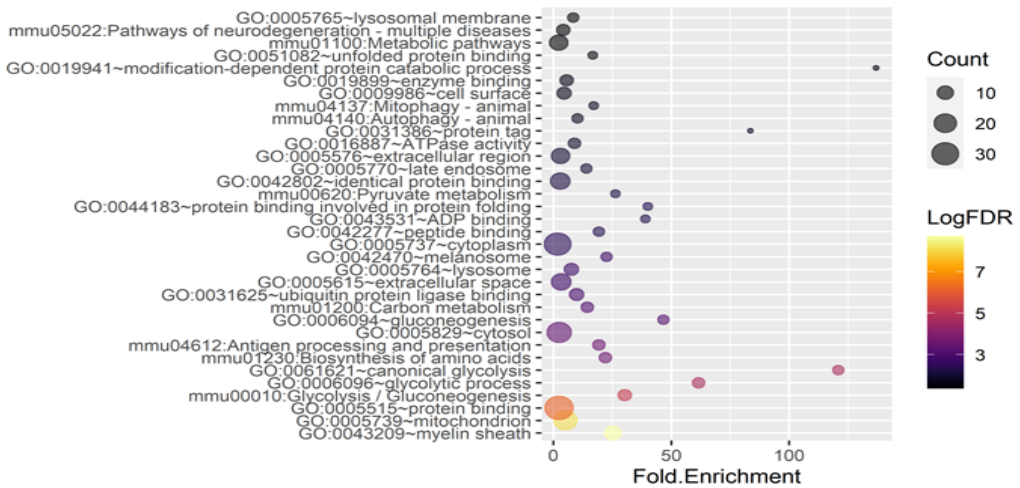
KOPRI 극지연구소

2) 다음으로, 라말린 처리군에서 대조군에 비해 발현이 증가되어 있는 유전자들을 분석함. Log2 (Fold change)가 0.3보다 크고, *p*-value가 0.01보다 작을 때 유의미하게 차이가 있다고 판단하였고, 라말린을 처리했을 때 50개의 유전자 발현이 유의미하게 증가함. 상위 10개 유전자로는 *Hspa5* (Heat shock protein A5), *Fdps* (Farnesyl diphosphate synthase), *Uap1l1* (UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase 1 Like 1), *Asns* (Asparagine Synthetase), *Hspa8* (Heat shock protein A8), *Slpi* (Secretory leukocyte peptidase inhibitor), *Atp5b* (ATP synthase subunit beta), *Sqstm1* (Sequestosome 1), *Tpi1* (Triosephosphate Isomerase 1), *Ddit3* (DNA Damage Inducible Transcript 3)가 있었음(그림 2-536)



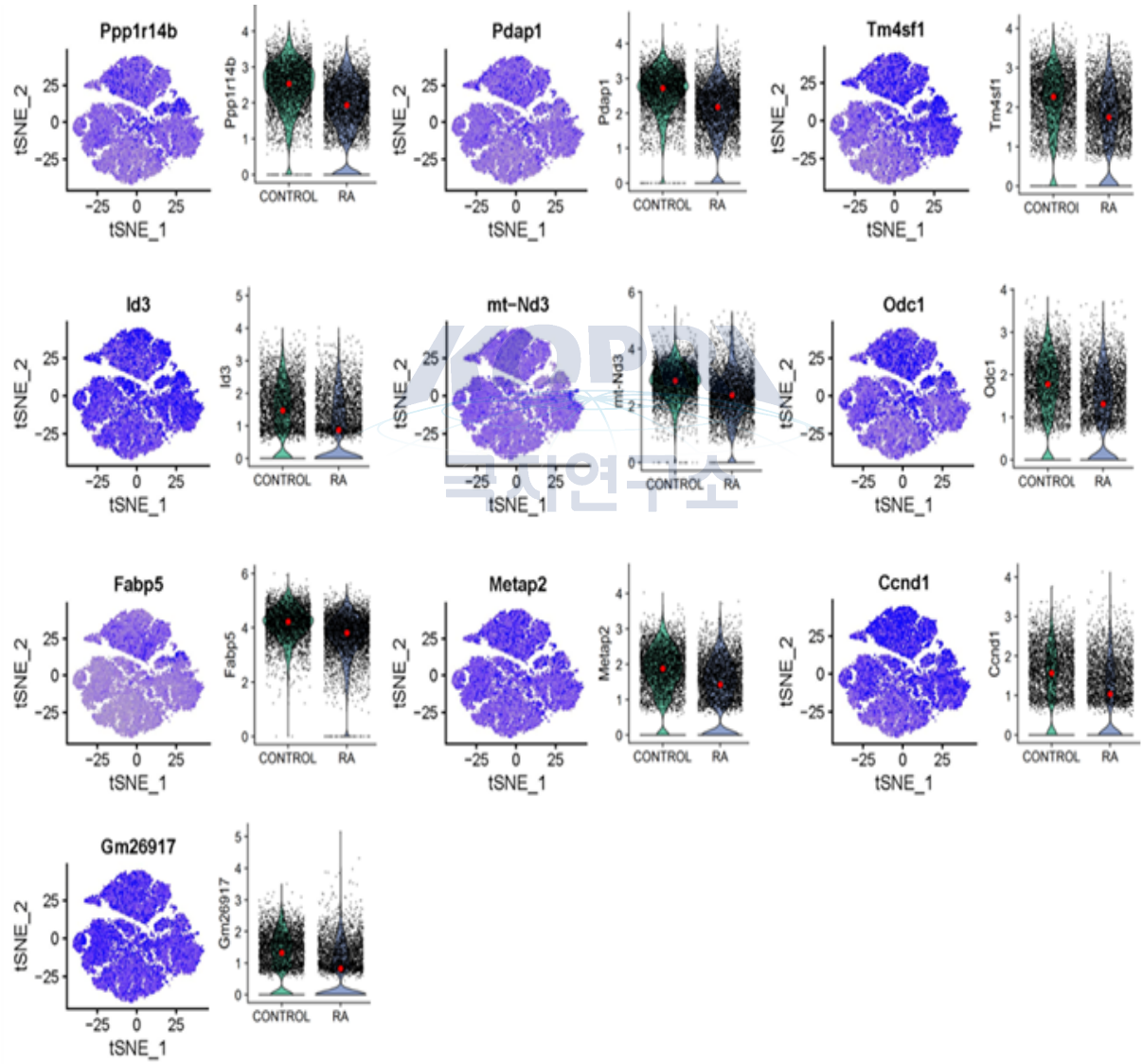
[그림 2-536. 라말린을 처리한 그룹에서 상향조절 되어있는 상위 10개 유전자]

3) 라말린에 의해 상향 조절된 50개의 유전자에 대하여 gene ontology (GO) 및 KEGG pathway 분석을 진행함(그림 2-537). 주로 포도당 대사, Lysosome, Autophagy, 단백질 결합 등에 관련된 GO 및 KEGG pathway가 관련되어있음을 확인함



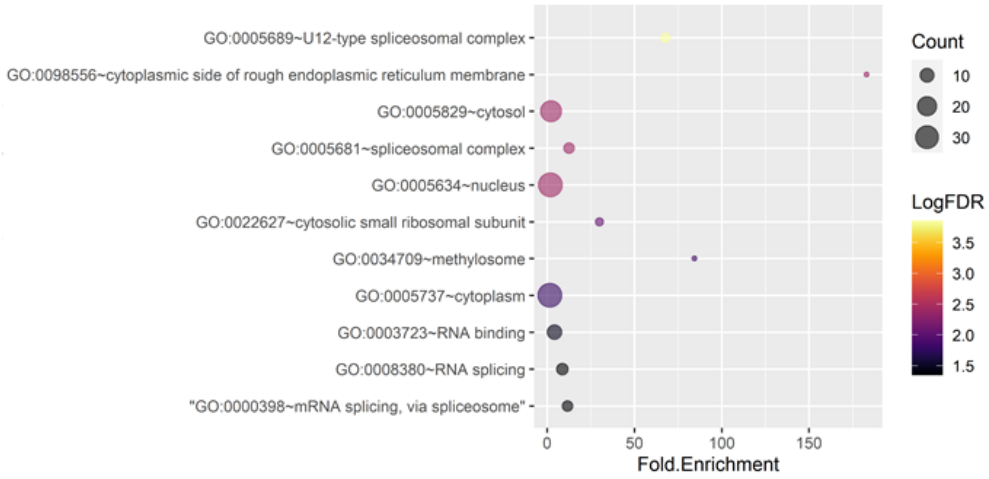
[그림 2-537. 라말린에 의해 상향조절된 유전자들의 gene ontology 분석]

4) 반대로, 라말린 처리군에서 대조군에 비해 발현이 감소되어 있는 유전자들을 분석함. Log2 (Fold change)가 –0.3보다 작고, *p*-value가 0.01보다 작을 때 유의미하게 차이가 있다고 판단하였고, 라말린을 처리했을 때 65개의 유전자 발현이 유의미하게 감소함. 상위 10개 유전자로는 *Ppp1r14b* (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B), *Pdap1* (PDGFA associated protein 1), *Tm4sf1* (Transmembrane 4 L six family member 1), *Id3* (Inhibitor of DNA binding 3), *mt-Nd3* (Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 3), *Odc1* (Ornithine decarboxylase 1), *Fabp5* (Fatty acid binding protein 5), *Metap2* (Methionine aminopeptidase 2), *Ccnd1* (Cyclin D1), *Gm26917*가 있었음(그림 2-538)



[그림 2-539. 라말린을 처리한 그룹에서 하향조절 되어있는 상위 10개 유전자]

5) 라말린에 의해 하향 조절된 65개의 유전자에 대하여 gene ontology 및 KEGG pathway 분석을 진행하였으며, 주로 RNA splicing과 관련된 GO가 관련되어있음을 확인함(그림 2-540)



[그림 2-540. 라말린에 의해 하향조절된 유전자들의 gene ontology 분석]

○ Dear-DTI 기반 타겟 분석

1) Dear-DTI 프로그램을 통해 분석한 라말린의 타겟 단백질 중 예상 Kd값이 50 nM 이하인 타겟 단백질이 628개로 분석됨. 예상 Kd값이 가장 낮은 상위 20개 단백질에 대하여 문헌조사를 통해 알츠하이머 치매와 관련이 있는 단백질 10개에 대해 목록을 작성함(그림 2-541)

알츠하이머 치매 관련 타겟 단백질
Methione aminopeptidase 2(METAP2)
Melatonin receptor type 1B(MTNR1B)
Melatonin receptor type 1A(MTNR1A)
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase(HMGCR)
7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase(NUDT1; MTH1)
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17(ADAM17)
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10(ADAM10)
Angiotensin-converting enzyme 2(ACE2)
Sphingosine 1-phosphate receptor 1(S1PR1)
Tyrosine-protein kinase(JAK2)

[그림 2-541. Dear-DTI 기반 타겟 단백질 분석]

○ 화학정보학 기반 타겟 분석

1) ChEMBL 데이터베이스를 이용하여 ligand 구조의 유사성을 분석한 뒤 타겟 단백질을 예측하는 Similarity ensemble approach (SEA)로 라말린의 타겟 단백질을 분석함. 타겟 단백질 후보군으로 총 98개의 단백질이 분석되었음(그림 2-542)

타겟 단백질 목록	
3-oxoacyl-ACP synthase	Glutathione S-transferase A1
Asc-type amino acid transporter 1	Glutathione S-transferase A2
Neutral amino acid transporter B(0)	Glutathione S-transferase kappa 1
Angiotensin-converting enzyme 2	Glutathione S-transferase Mu 1
Angiotensin-converting enzyme	Glutathione S-transferase P
Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	Hydroxycarboxylic acid receptor 2
Aminopeptidase B	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
Cytosol aminopeptidase	Interleukin-8
Aminopeptidase N	Kinesin-like protein KIF11
Bacterial leucyl aminopeptidase	Kynureninase
Arginase-1	Large neutral amino acids transporter small subunit 1
Arginase-2, mitochondrial	Leucyl-cystinyl aminopeptidase
Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	Lactoylglutathione lyase
S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase BHMT2	Leukotriene A-4 hydrolase
Voltage-dependent calciμM channel subunit alpha-2/delta-1	Lymphocyte antigen 96
Carbonic anhydrase 4	L-selectin
ExtracelμLar calciμM-sensing receptor	Methionine aminopeptidase 2
Carboxypeptidase A1	Protein Mdm4
Mast cell carboxypeptidase A	CanaliculμLar mμLtispecific organic anion transporter 1
Carboxypeptidase B	Glutamate racemase
Calpain small subunit 1	N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B	Neprilysin
Aspartyl aminopeptidase	Substance-P receptor
Excitatory amino acid transporter 1	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A
Excitatory amino acid transporter 2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
Excitatory amino acid transporter 3	Nitric oxide synthase, brain
Excitatory amino acid transporter 4	Nitric oxide synthase, inducible
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	Nitric oxide synthase, endothelial
Endoplasmic reticμLμM aminopeptidase 2	Neuropeptide FF receptor 2
DNA excision repair protein ERCC-1	Delta-type opioid receptor

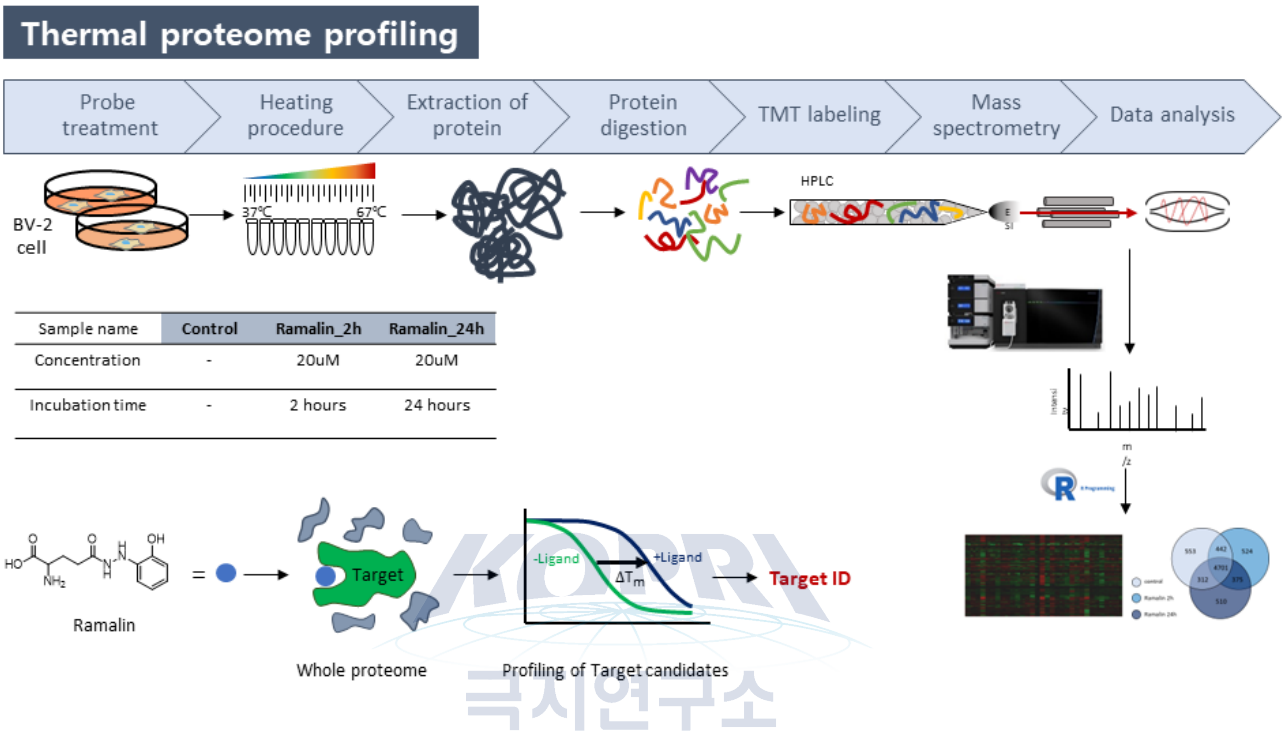
[그림 2-542. 라말린 타겟 단백질 후보군]

○ Thermal proteome profiling (TPP) 기반 타겟 분석

1) Thermal proteome profiling (TPP) 기법은 세포 안에서 약물과 단백질의 상호작용을 확인하는 방법으로써, 약물과의 상호작용에 의해 변화한 단백질의 열 안정성을 mass spectrometry로 정량화하는 기술임. 단백질 샘플에 열을 점점 가하면 단백질 침전이 발생하는데, ligand가 타겟 단백질에 결합하면 열에 대한 안정성이 높아져 더욱 높은 온도에서 침전이 일어남

2) 본 연구팀은 BV-2 미세교세포에 라말린 20 μM을 처리하고 2시간, 24시간 뒤에 세포를 harvest 하였음(그림 2-543). 대조군과 라말린 처리 그룹을 각각 aliquot한 뒤 37℃에서 67℃까지 다양한 온도로 heating한 후 cell lysis하여 단백질을 추출함. 각 샘플을 trypsin으

로 digestion한 후 tandem mass tag (TMT)로 labeling 함. Mass spectrometry 분석을 통해 각 샘플에서 단백질의 양을 분석하고, heating 온도에 따른 단백질의 양으로 melting temperature (Tm)를 그림. 대조군과 비교했을 때 라말린과의 결합으로 인해 Tm이 변화한 타겟 단백질을 분석함. 라말린을 2시간 처리했을 때 50개 단백질의 Tm이 증가했으며, 라말린을 24시간 처리했을 때에는 54개 단백질의 Tm이 증가함 (표 2-15). 두 가지 조건에서 모두 Tm이 증가한 단백질은 12개임 (표 2-15)



[그림 2-543. Thermal proteome profiling을 통한 타겟 단백질 분석]

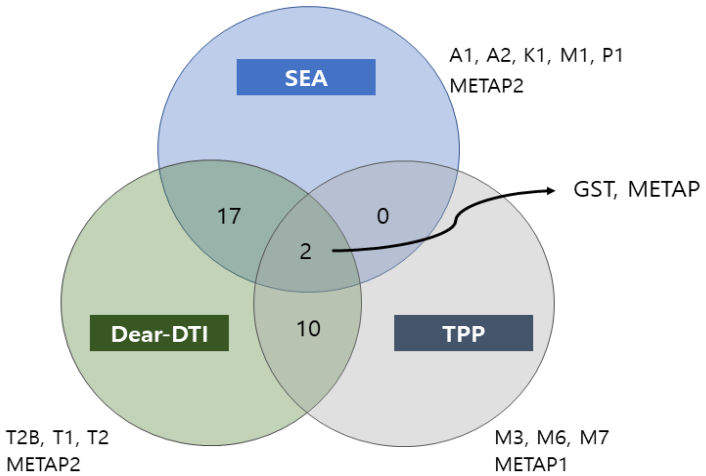
라말린 2시간		라말린 24시간		교집합
Psmd2	Kpna6	Prps2	Srsf2	Pgk2
Ywhae	Kpna1	Rps9	Trmt1	Gcat
Actr3	Dck	Supt16	Sms	Arid1a
Fabp5	Cherp	Pgk2	Dck	Ccdc43
Adsl	Arrb1	Apobr	Rps20	Pls1
Cops4	Ndrg1	Anln	Ndrg1	Dck
Akr1b3	Vps33b	Rps13	Ssrp1	Ndrg1
Twf2	Lypla2	Rpl32	Vps33b	Vps33b
Ppp4c	Cops7a	Rps18	Pip4k2a	Cops7a
Anxa11	Polr2d	Gcat	Cops7a	Polr2d
Pgk2	Gtf3c4	Surf2	Rps27	Gstm3
Ctbp1	Leo1	Rps12	Rpusd2	Gstm6
Hat1	Gstm3	Rpl23a	Polr2d	
Anp32a	Mta1	Eif2b5	Nhlrc2	
Pgls	Ccdc132	Mrps35	Gstm3	

Myh14	**Rab13**	Denr	**Wipi2**	
Gcat	**Rab8a**	Arid1a	**Pold2**	
Bola2	**Rps29**	Naa10	**Trip12**	
Nudcd1	**Lhpp**	Ccdc43	**Trp53bp1**	
Ddx39	**Ints1**	Rpl11	**Myh3**	
Arid1a	**Rpl32-ps**	Ep300	**Myh7b**	
Ccdc43	**Gtf3c4**	Ankzf1	**Myh8**	
Gstm7	**Gstm6**	Rpl14	**Myh4**	
Mapk14	**Fxn**	Metap1	**Myh1**	
Pls1	**Aldob**	Rps27l	**Aarsd1**	
		Pls1	**Gstm6**	
		Rpl36a	Nmral1	

[표 2-15. TPP 기반 라말린의 타겟 단백질]

○ 신규 라말린 타겟 후보들에 대한 작용기전 규명

1) Dear-DTI, SEA, TPP로 찾은 라말린의 타겟 단백질 중, Glutathione S-transferase (GST)와 Methionine aminopeptidase (METAP)가 공통적으로 나타남(그림 2-544). GST의 경우 알츠하이머 치매에서 활성이 낮아져있으며, GST variant에 따라 알츠하이머 치매에 대한 민감도가 달라짐 (*Neurology*. 1998, *Clin Chem Lab Med*. 2008). GSTM1과 GSTT1이 없을 경우 late-onset 알츠하이머 치매 발병률이 높아졌으며 (*Neurological research*. 2017), GSTM3에 나타나는 gene variation은 알츠하이머 치매에서 risk factor로 작용함 (*Neurobiology of Aging*, 2009). METAP는 새로 합성된 단백질의 아미노 말단 methionine을 제거하는 효소로써, cell cycle 진입에서 중요한 역할을 함. 알츠하이머 치매 환자에서 METAP1과 METAP2의 발현이 낮아져 있으며 (*Sci Adv*. 2021, *Int J Mol Sci*. 2020), METAP1 억제제를 세포에 처리했을 때 세포의 apoptosis가 증가함 (*PNAS*. 2006)

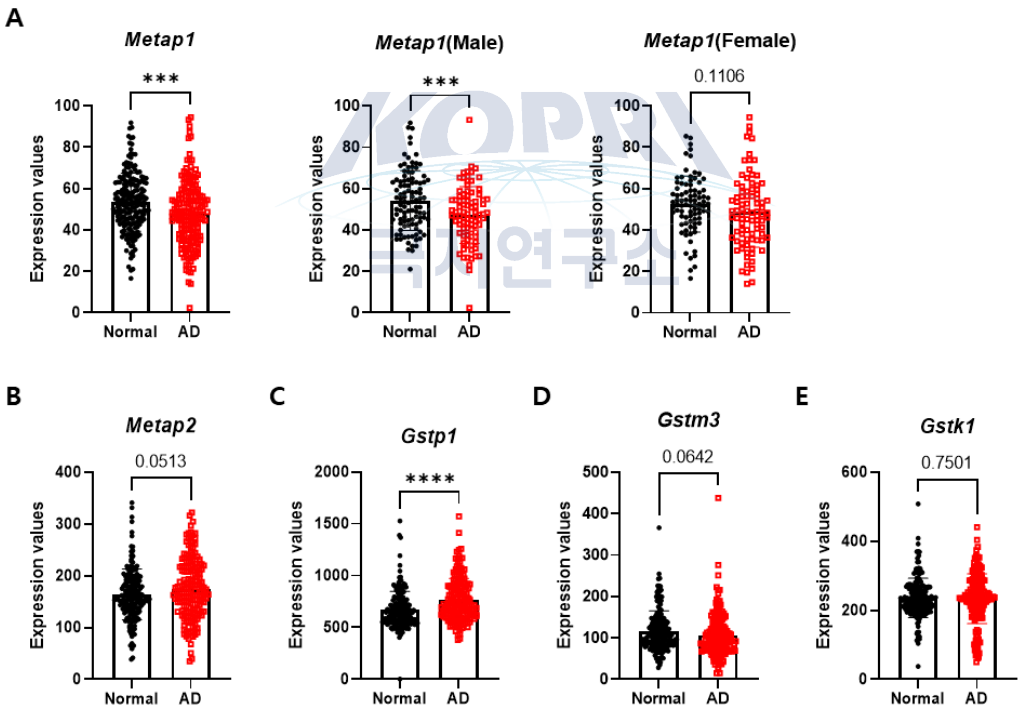


[그림 2-544. Dear-DTI, SEA, TPP에 기반한 타겟 단백질]

2) 본 연구팀은 Late-onset 알츠하이머 치매 환자 뇌조직 (GSE15222, 대조군 187명, 알츠하이머 치매 환자 176명)에서 라말린의 타겟 단백질로 찾은 *Metap*와 *Gst*의 RNA 발현량을 확인함(그림 2-545)

3) *Metap1*의 경우 알츠하이머 치매 환자에서 발현이 유의미하게 감소하였으며, 남녀를 나누어 분석했을 때 남성에서는 *Metap1* 유전자 발현이 치매 환자군에서 유의미하게 감소하였고, 여성에서는 유의미하지는 않았지만 치매 환자군에서 감소하는 경향을 보였음(그림 2-545A)

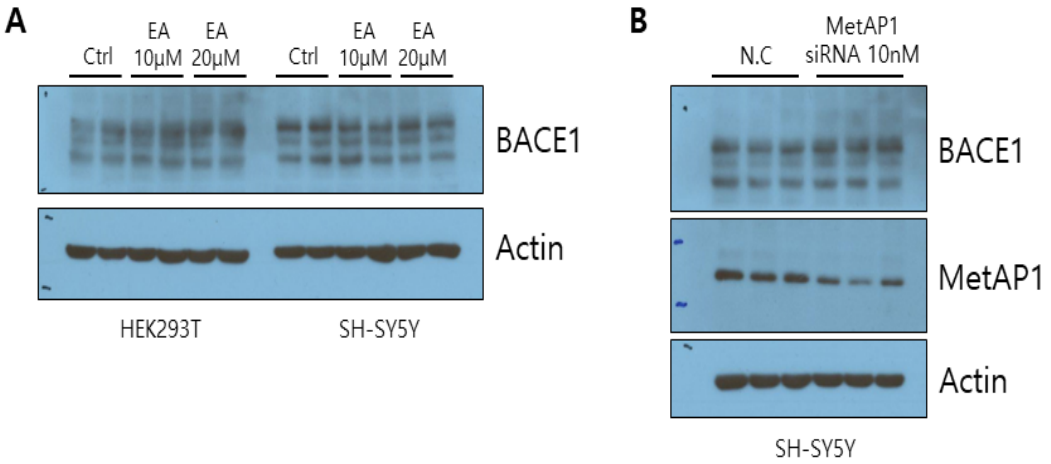
4) *Metap2*는 유의미하진 않았지만 알츠하이머 치매에서 증가하는 경향을 보였고, *Gstp1*은 알츠하이머 치매에서 유의미하게 증가함(그림 2-545B, 2-545C). 반대로, *Gstm3*는 유의미하진 않았지만 알츠하이머 치매에서 감소하는 경향을 보였으며, *Gstk1*은 대조군과 알츠하이머 치매군 사이에 변화가 없었음(그림 2-545D, 2-545E)



[그림 2-545. Late-onset 알츠하이머 치매 환자에서 유전자 발현 확인]

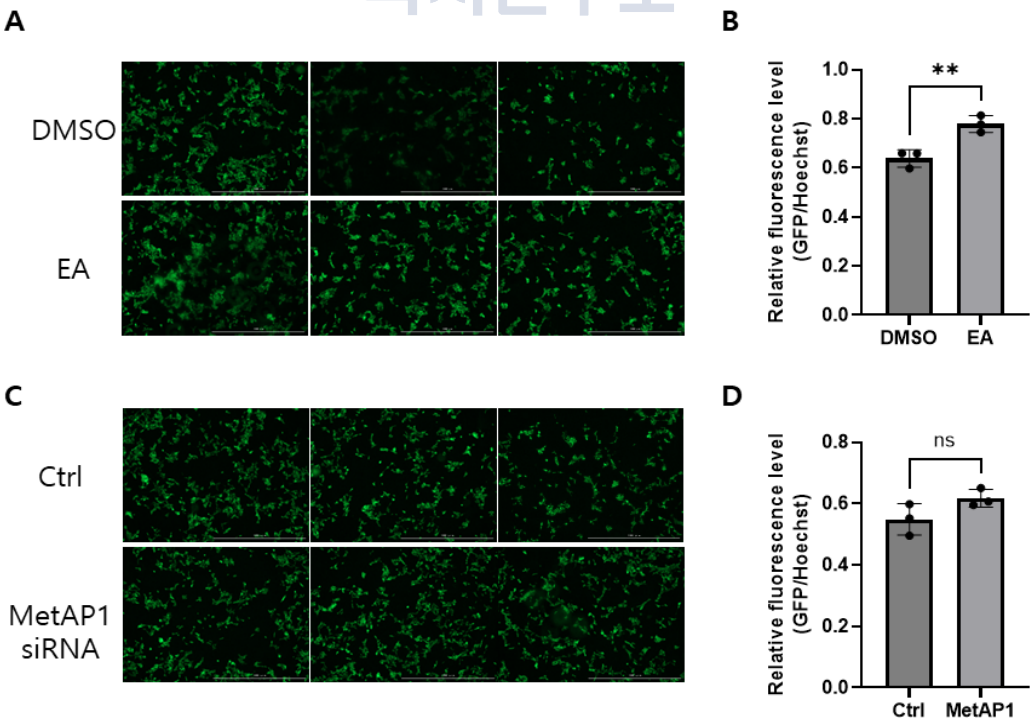
5) 다음으로, GST 억제제인 Ethacrynic acid (EA)를 처리하여 BACE1의 단백질 양을 확인함(그림 2-546A). HEK293T 세포에 10, 20 μM EA를 처리했을 때 BACE1 단백질 발현량이 증가함. 그러나 SH-SY5Y에선 EA 처리에 따른 BACE1의 변화가 없었음. 또한, SH-SY5Y 세포에 음성대조군 siRNA (N.C)와 Metap1 siRNA를 transfection하여 BACE1 단백질 발현량을 확인함(그림 2-546B). METAP1의 발현이 효과적으로 감소했으며, 이에 따라 BACE1의 단백질

발현량도 증가함



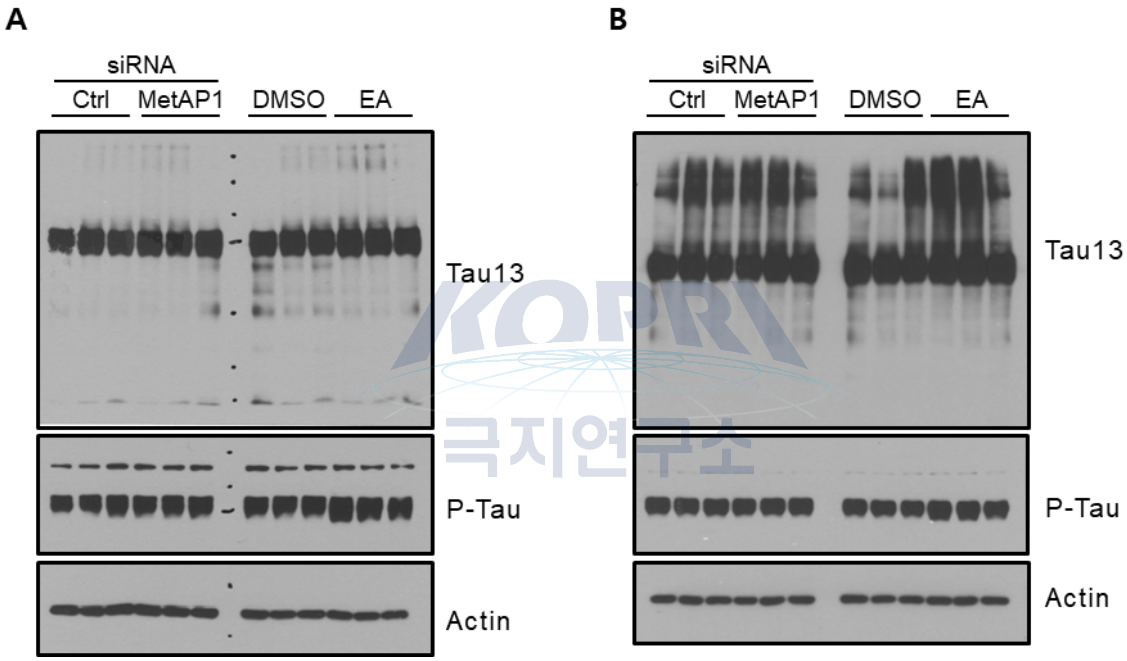
[그림 2-546. GST 비활성화 또는 MetAP1 발현 저해에 따른 BACE1 단백질 발현 확인]

6) 다음으로, tau-BiFC 세포에 GST 억제제 EA를 20 μM로 처리한 후 형광 세기를 측정함(그림 2-547A, 2-547B). GST 활성을 억제한 그룹에서 형광 세기가 유의미하게 증가하였으며, 이는 tau aggregation이 증가했음을 의미함. 또한, METAP1 siRNA를 transfection시켜 METAP1의 발현을 감소시킨 뒤 형광 세기를 측정함(그림 2-547C, 2-547D). METAP1의 발현이 감소했을 때 형광 세기가 증가한 경향을 보였지만 유의미한 차이는 없었음



[그림 2-547. Tau-BiFC 세포에서 MetAP1 발현 저해 및 GST 비활성화에 따른 형광 측정]

7) Tau-BiFC 세포에 GST 억제제 EA를 20 μM로 처리하거나 METAP1 siRNA를 transfection 시킨 후 샘플링하여 western blot으로 tau aggregation과 타우 인산화를 확인함(그림 2-548). EA를 처리한 그룹에서 tau aggregation과 타우 인산화가 확연히 증가함. METAP1 발현을 저해했을 때 tau aggregation이 증가하는 경향을 보였지만, 타우 인산화의 변화 정도는 크지 않았음. 이는 tau-BiFC 세포에서 METAP1 siRNA의 transfection 효율이 다소 떨어지기 때문으로 보임. 따라서 본 연구팀은 GST 억제제 처리 및 METAP1 발현 저해를 통해 BACE1이 증가하고 타우 인산화 및 응집이 증가하는 것을 확인함. 이를 통해 라말린의 새로운 타겟 단백질인 GST와 METAP1이 억제될 경우 알츠하이머 치매 증상이 악화될 수 있음을 제시함

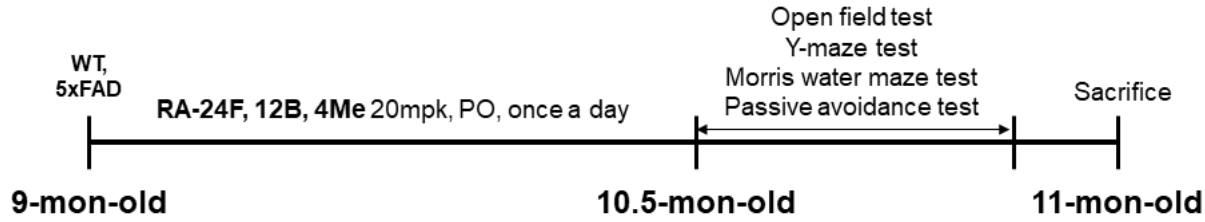


[그림 2-548. MetAP1 발현 저해 및 GST 비활성화에 따른 타우 인산화 변화 확인]

□ 연구내용 2-11. AD 동물모델기반 유효성 평가 및 타겟 규명

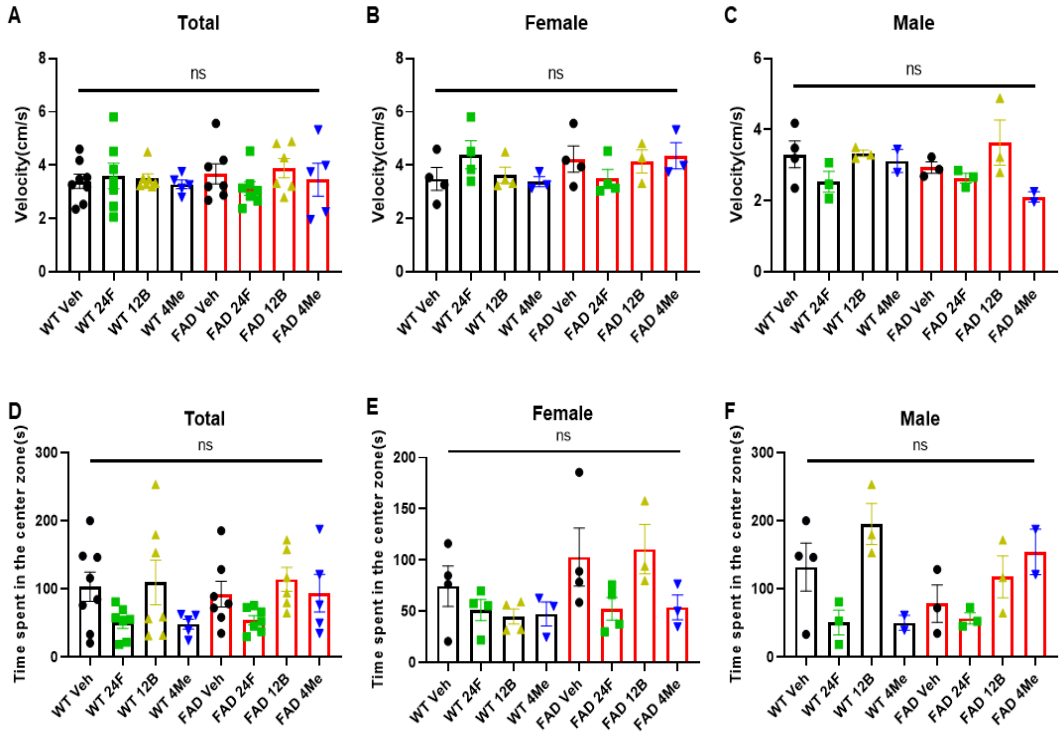
○ 1차 동물실험: 5xFAD 알츠하이머 치매 동물모델에서 라말린 유도체 유효성 확인

1) 본 연구진은 앞선 [세부 1]에서 스크리닝된 항치매 후보물질인 RA-24F, RA-12B, RA-4Me의 효과를 평가하기 위하여 5xFAD 알츠하이머성 치매 동물모델을 사용함(그림 2-549). 9개월령의 5xFAD 마우스와 WT 마우스에 RA-24F, RA-12B, RA-4Me 약물을 하루 한 번 20 mg/kg의 용량으로 10주간 경구투여한 뒤, 2주간 불안감 (anxiety)를 비교할 수 있는 실험 (open field test)과 인지능력, 공간학습력 및 기억력을 확인할 수 있는 실험들 (Y-maze test, Morris water maze test, passive avoidance test)을 진행함



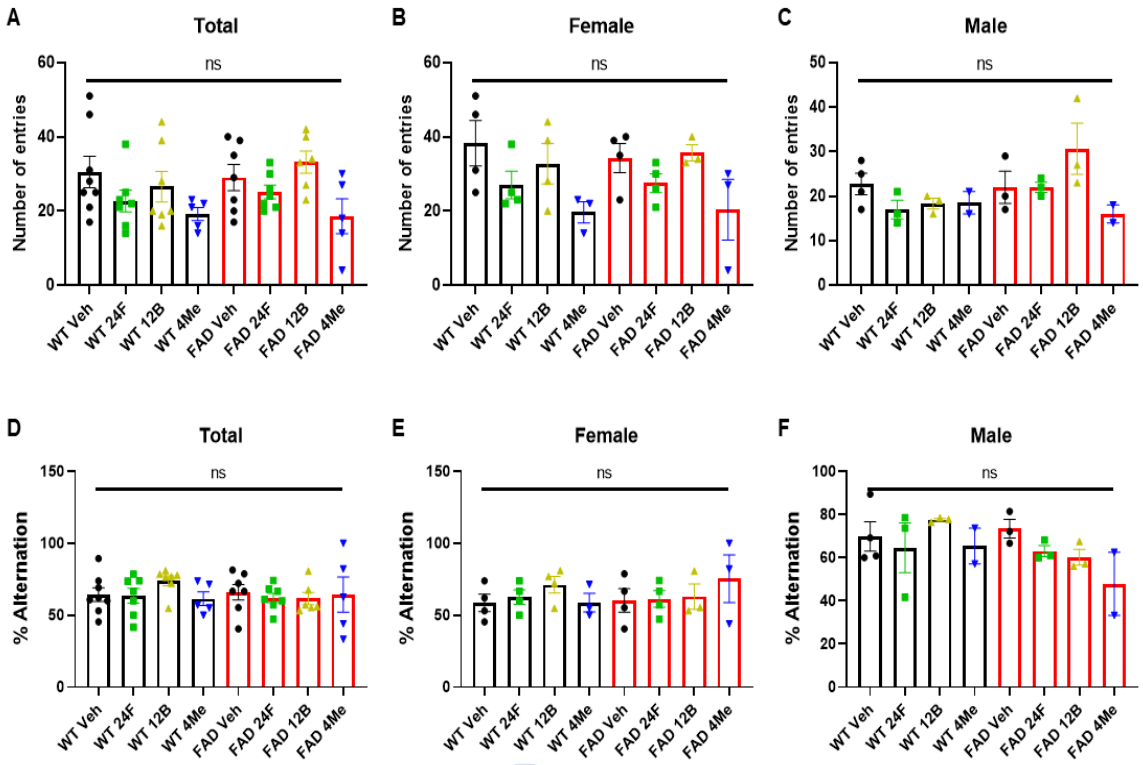
[그림 2-549. 라말린 유도체 *in vivo* 실험 계획 (5xFAD)]

2) 10주간 약물 경구투여 후 실험동물의 불안감 정도를 비교할 수 있는 open field test를 진행함(그림 2-1280). Open field 내에서의 실험동물들의 움직임 속도를 비교해봤을 때 유의한 차이를 보이지 않았으며(그림 2-550A), 이를 성별로 나누어 분석했을 때도 속도에 있어 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-550B, 2-550C). 실험동물이 open field 중앙에 머문 시간을 비교 및 분석했을 때 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았으며(그림 2-550D), 이를 성별로 나누어 분석했을 때도 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-550E, 2-550F). Open field 결과를 종합해보면, 라말린 유도체에 의한 운동성 변화나 불안감 정도의 개선에는 효과를 보이지 않았다고 할 수 있음



[그림 2-550. Open field test 결과]

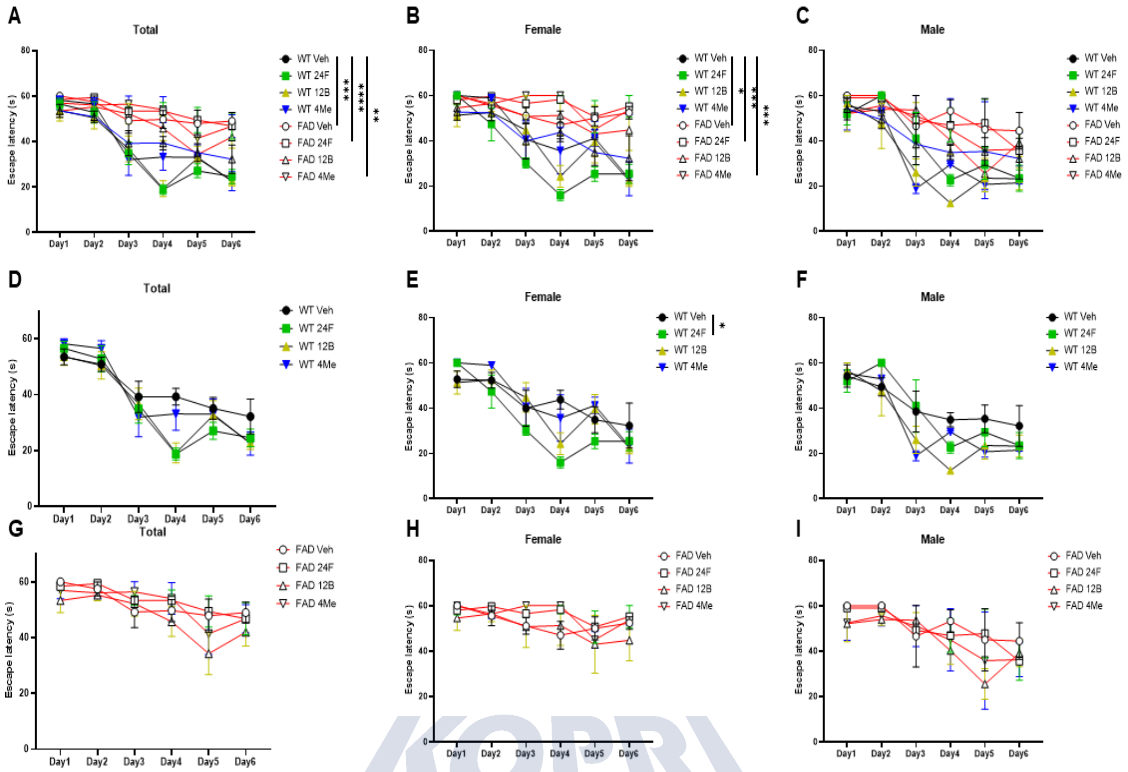
3) Open field test 이후 실험으로는 단기 기억력과 공간지각능력을 평가하는 Y-maze test를 진행함(그림 2-551). 각 arm에 들어간 횟수를 비교해봤을 때, 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았으며(그림 2-551A), 이는 성별을 나눠 분석했을 때도 마찬가지로 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-551B, 2-551C). 단기 기억력과 공간지각능력을 평가할 수 있는 지표인 spontaneous alternation (% Alternation) 값을 비교, 분석했을 때 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았으며(그림 2-551D), 성별을 나눠 분석했을 때도 마찬가지로 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-551E, 2-551F). Y-maze 결과, 약물에 의한 단기 기억력 및 공간지각능력의 향상 효과는 없었다고 할 수 있음



[그림 2-551. Y-maze 결과]

4) 다음으로 실험동물들의 학습능력과 공간지각능력을 비교 및 분석할 수 있는 Morris water maze 실험을 진행함(그림 2-552, 2-553). 실험은 6일간의 training을 거친 후 7일 차에 platform을 제거하고 probe test를 진행함. Day 1부터 Day 6까지의 escape latency를 종합하여 비교해봤을 때, WT Veh군의 곡선하면적 (Area under curve, AUC)과 FAD Veh군의 AUC, WT Veh군의 AUC와 FAD 24F의 AUC 그리고 WT Veh군의 AUC와 FAD 4Me의 AUC가 유의하게 차이가 났음(그림 2-552A). 이는 WT Veh군이 training 기간 동안 platform을 찾는데 걸리는 시간이 FAD Veh군, FAD 24F군, FAD 4Me군에 비해 유의하게 짧아 WT Veh군이 FAD Veh군, FAD 24F군, FAD 4Me군에 비해 학습 능력 및 공간지각능력이 뛰어나다고 해석될 수 있음

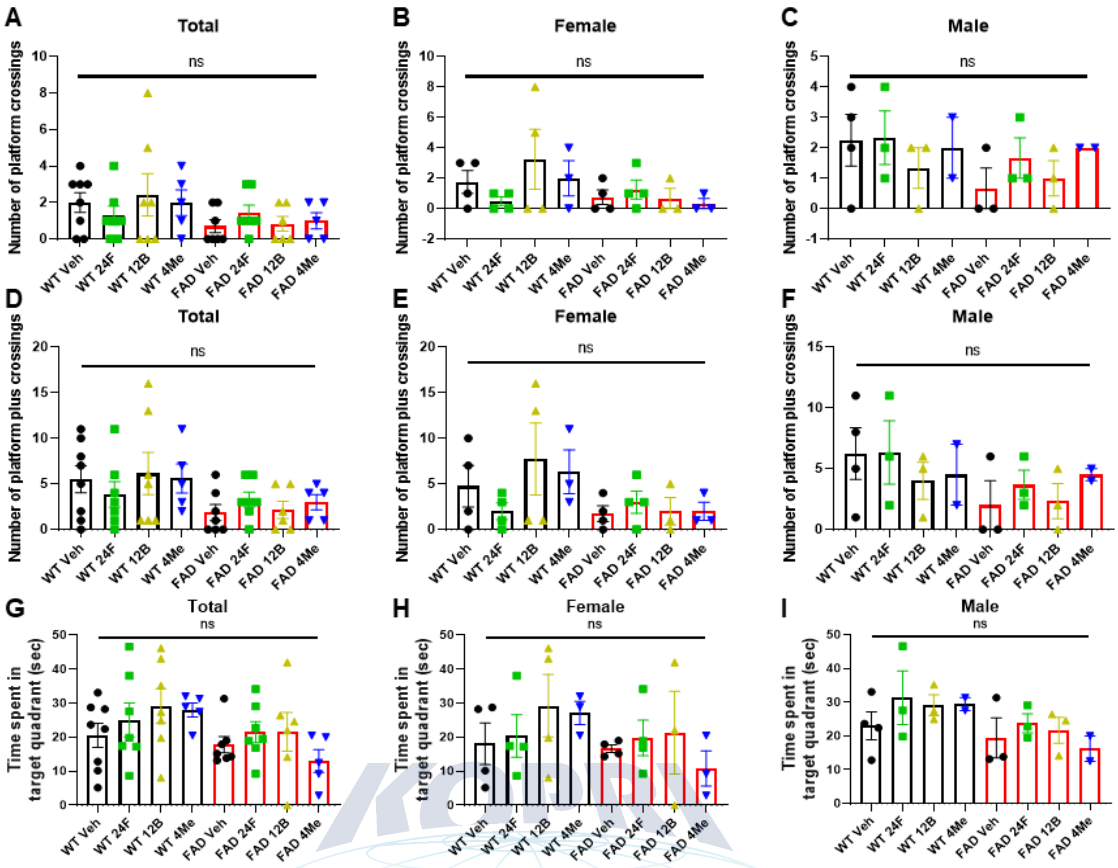
5) 이를 성별을 나눠 분석하게 되면 female군은 total과 비슷한 경향을 보였고, male군은 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-552B, C). WT군 내에서만 비교 및 분석을 하면 total과 male군에서는 그룹간 유의한 차이가 나지는 않았으나, female군에서 WT Veh군의 AUC보다 WT 24F의 AUC가 유의하게 적었음(그림 2-552D-F). FAD군 내에서만 비교 및 분석을 했을 땐 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았으며, 이는 성별을 나눠 분석했을 때도 마찬가지로 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-552G-I)



[그림 2-552. Morris water maze 결과 1]

6) 다음으로 6일간의 training이 끝난 후 진행된 probe test의 결과를 분석함(그림 2-553). Platform을 지나친 횟수 및 platform을 포함하는 넓은 범위의 platform plus를 지나친 횟수를 비교해봤을 때, total과 female, male 모두에서 그룹간 유의한 차이가 발견되지는 않았음(그림 2-553A-F). 다만, male에서 FAD 24F군과 FAD 4Me군이 FAD Veh군에 비해 platform이나 platform plus를 지나친 횟수가 많은 경향을 보임(그림 2-553C, 2-553F)

7) Platform이 포함되어있는 사분면인 target quadrant에 머문 시간을 비교하면, total에서 WT 12B군과 WT 4Me군이 다른 군들에 비해 높은 경향을 보였으나 유의하지는 않았으며(그림 2-553G), male에서는 FAD 24F와 FAD 12B군이 FAD Veh군과 FAD 4Me군에 비해 target quadrant에 머문 시간이 긴 경향을 보였으나 유의하지는 않았음(그림 2-553I). Morris water maze 실험 결과, 약물에 의한 유의한 학습 능력 및 공간지각능력 향상은 없었음

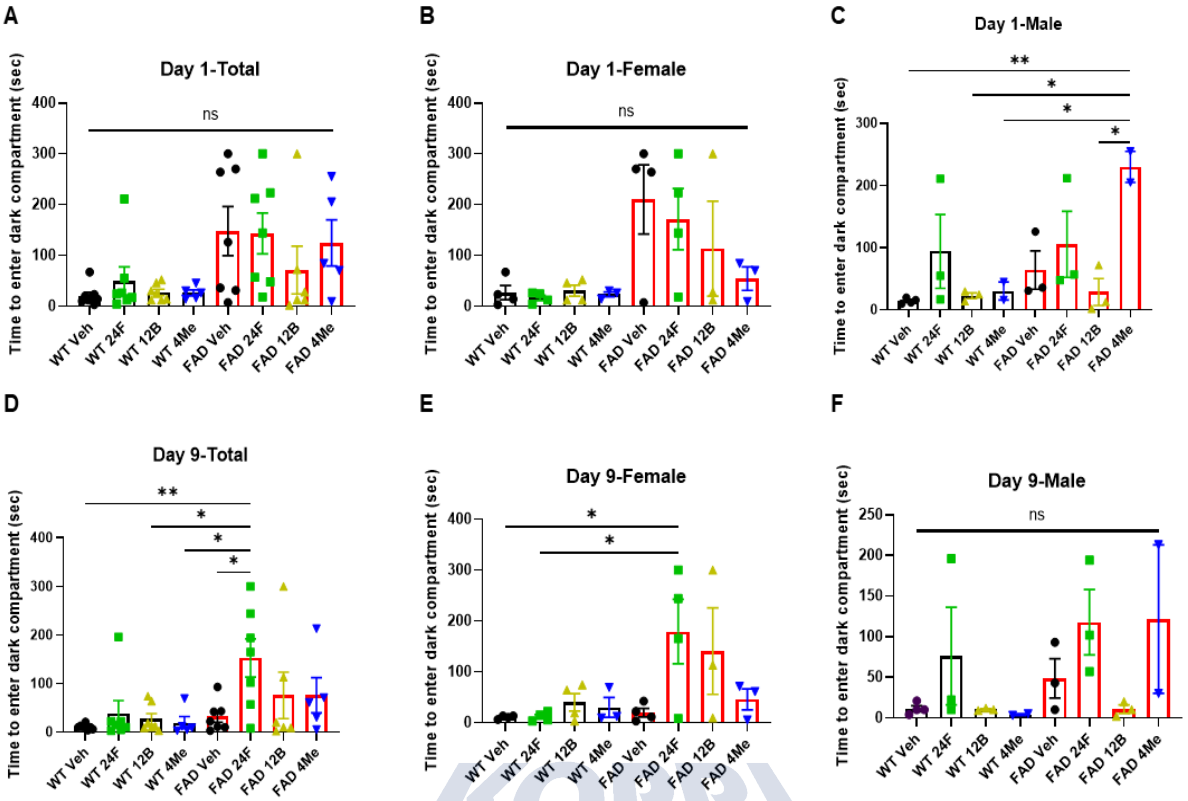


[그림 2-553. Morris water maze 결과 2]

8) 마지막으로 공포에서 비롯된 단기 및 장기 기억력을 측정할 수 있는 passive avoidance test를 진행함(그림 2-554). 실험동물들에 전기 자극을 주고 하루가 지난 시점(그림 2-554A-C), 9일이 지난 시점(그림 2-554D-F)에서 실험동물이 암실로 들어가는 데 걸리는 시간을 측정함. Total에서 분석했을 때 FAD군들이 WT군들에 비해 암실에 들어가는 데 걸리는 시간이 긴 경향을 보였으나 유의하지는 않았음(그림 2-554A)

9) 성별을 나눠 분석했을 때, male에서 FAD 4Me군이 WT Veh군, WT 12B군, WT 4Me군 그리고 FAD 12B군에 비해 암실에 들어가는 데 걸리는 시간이 유의하게 길었음(그림 2-554C). 전기 자극을 주고 9일째 된 날 한 번 더 실험을 진행한 뒤 결과를 분석함(그림 2-554D-F). 그 결과, total에서 FAD 24F군이 WT Veh군, WT 12B군, WT 4Me, FAD Veh군에 비해 암실에 들어가는 시간이 유의하게 길었음(그림 2-554D)

10) 성별을 나눠 분석했을 때, female군에서 FAD 24F군이 WT Veh군과 WT 24F군에 비해 암실에 들어가는데 걸리는 시간이 유의하게 길었음(그림 2-554E). Male군에서 FAD 24F군과 FAD 4Me군이 다른 군에 비해 암실에 들어가는데 걸리는 시간이 긴 경향을 보였으나 유의하지는 않았음(그림 2-554F). Passive avoidance test 실험 결과, 일부 약물 (RA-24F, RA-4Me)이 실험동물의 기억력 향상에 영향을 줌

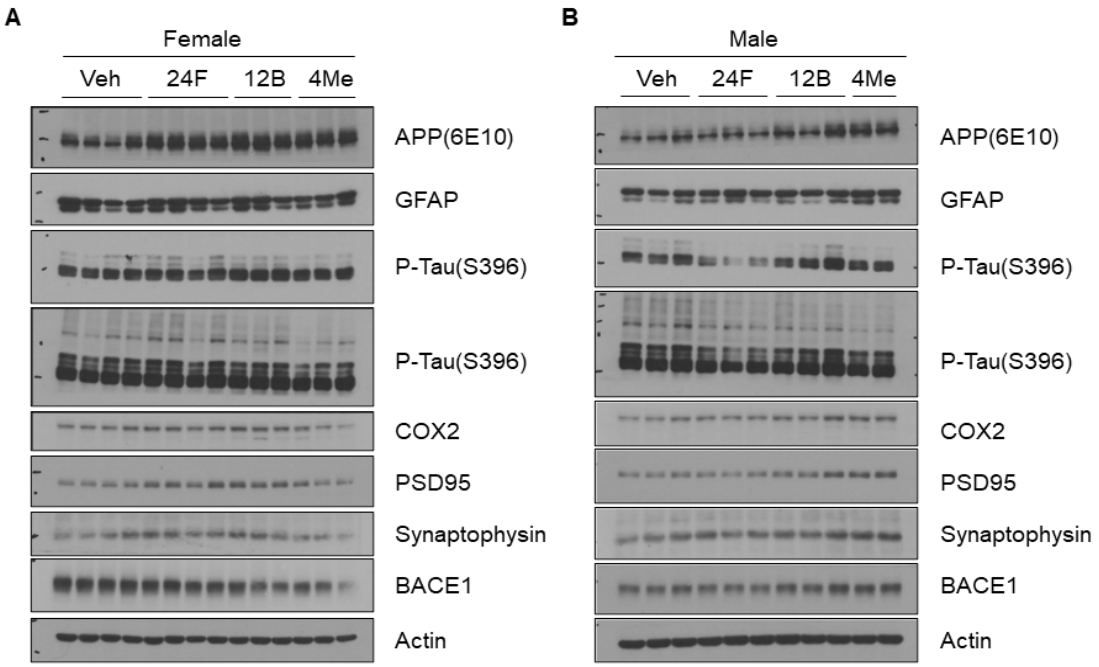


[그림 2-554. Passive avoidance test 결과]

KOPRI 극지연구소

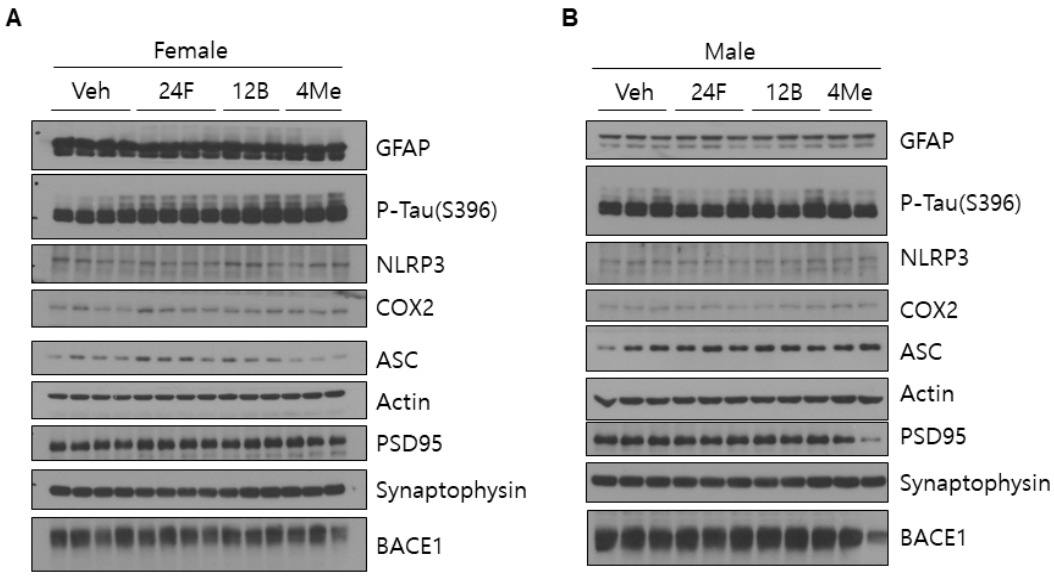
11) 행동실험이 끝난 직후, 실험동물들을 sacrifice하여 뇌조직 추출을 진행함. 이후, 5xFAD군의 cortex 부분을 RIPA lysis buffer로 homogenize한 뒤 western blotting을 진행함(그림 2-1285). 그 결과, FAD 4Me군의 female과 male 모두에서 P-Tau(S396)의 발현량이 Veh군 대비 감소하는 양상을 보임(그림 2-555A, B)

12) 또한, female군 내에서는 24F 약물과 12B 약물에 의해서 synaptic marker인 PSD95와 Synaptophysin의 발현량이 Veh군 대비 증가하는 양상을 보임(그림 2-555A). 또한, Veh군에서 증가하여있던 BACE1의 발현량이 12B와 4Me에 의해 감소하는 것을 확인함(그림 2-555A). Male군 내에서는 24F에 의해 P-Tau(S396)의 발현량이 Veh군 대비 감소한 경향을 보였으며, 12B와 4Me에 의해 PSD95의 발현량이 Veh군 대비 증가한 것을 확인함. 추가적으로 4Me의 경우, 또 다른 synaptic marker인 Synaptophysin의 발현량을 Veh군 대비 증가시킨 것을 확인함(그림 2-555B)



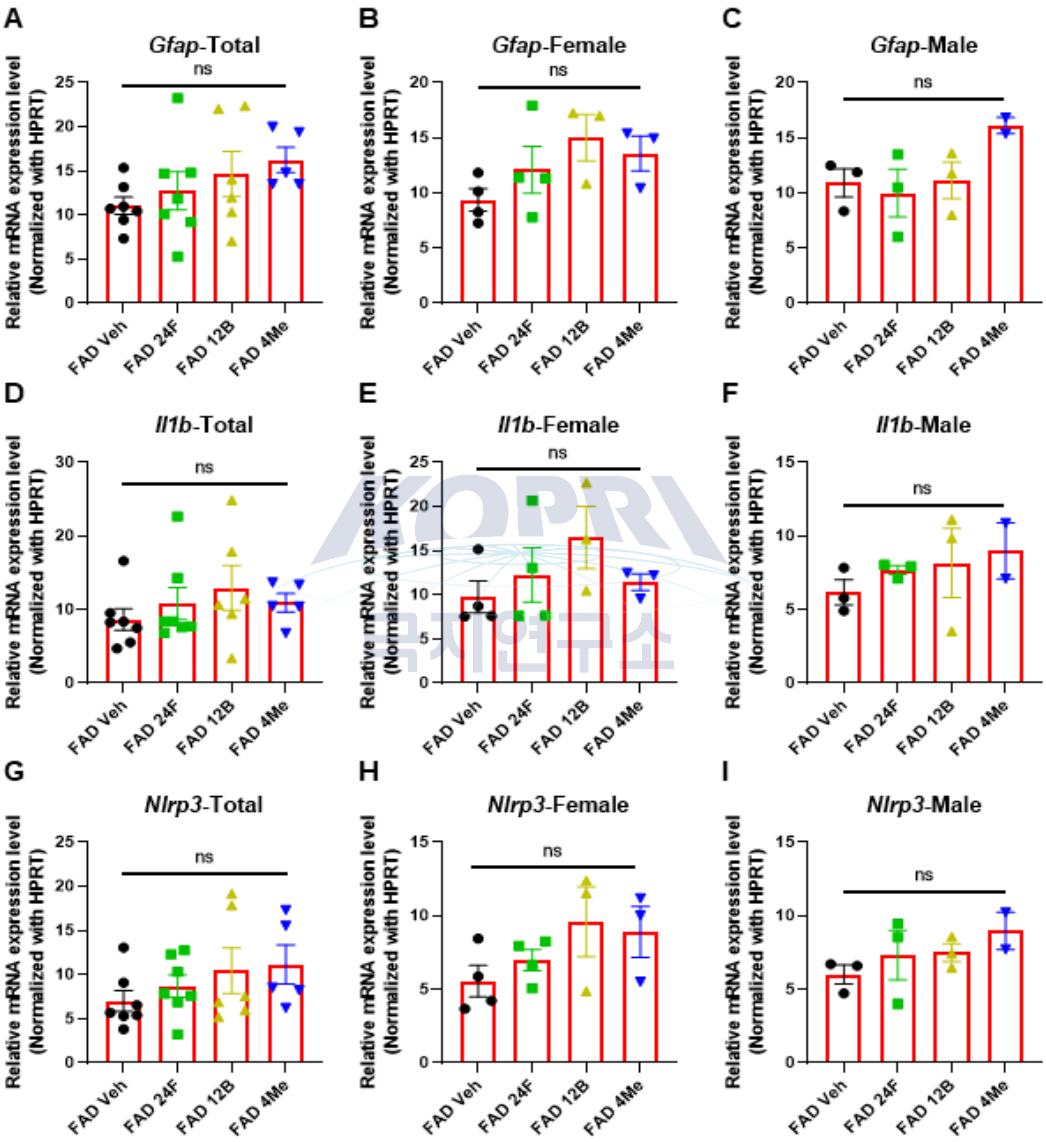
[그림 2-555. Western blot 결과: Cortex]

13) 5xFAD를 sacrifice하여 얻은 hippocampus 조직을 RIPA lysis buffer를 이용해 homogenize한 뒤 western blotting을 진행함. 앞선 cortex 분석 결과와는 다르게 약물에 의한 P-Tau(S396)의 발현량이나 PSD95, Synaptophysin의 발현량에 변화는 없었음(그림 2-556). 하지만 NLRP3 inflammasome 복합체의 구성 성분 중 하나인 ASC의 발현량이 4Me 약물에 의해 Veh군 대비 감소하는 것을 확인함(그림 2-556A)



[그림 2-556. Western blot 결과: Hippocampus]

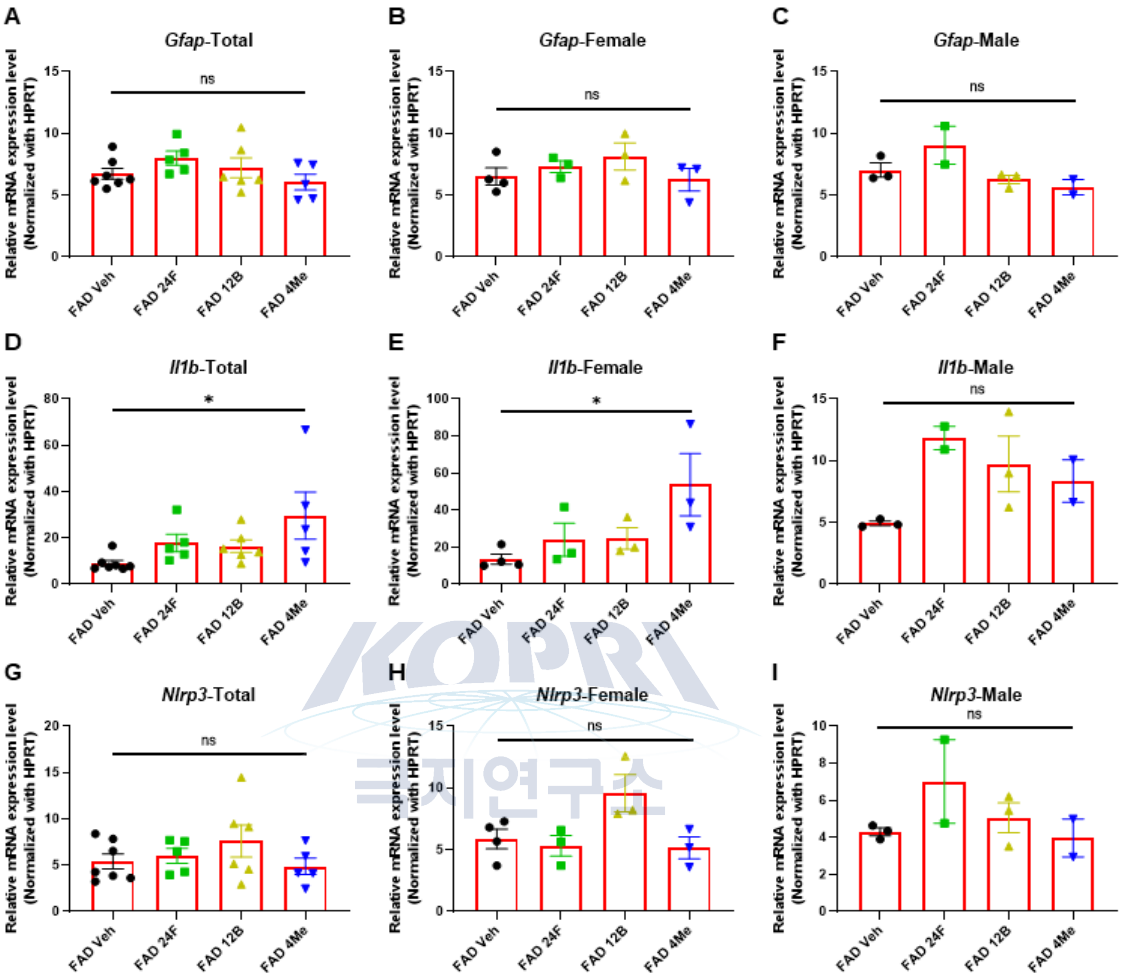
14) 이후에는 실험동물의 cortex 샘플에서 mRNA를 추출하여 RT-qPCR을 진행함. 실험 결과, FAD군 내 약물에 의한 유의한 차이는 발견되지 않았음(그림 2-557). Female군에서 FAD 24F, FAD 12B, FAD 4Me군의 염증인자들 (*Gfap*, *Il1b*, *Nlrp3*)의 발현이 FAD Veh군 대비 발현량이 높은 경향이 있었으나 유의하지는 않았으며(그림 2-557B, E, H), male군에서는 FAD 4Me군이 다른 군들에 비해 염증인자들(*Gfap*, *Il1b*, *Nlrp3*)의 발현이 높은 경향이 있었으나 유의하지는 않았음(그림 2-557C, F, I)



[그림 2-557. RT-qPCR 결과: Cortex]

15) 다음으로 hippocampus 조직에서의 염증 인자들의 발현양상을 살펴봄(그림 2-558). 실험 결과, *Gfap*와 *Nlrp3*의 경우, Veh군 대비 약물군에서의 유의한 발현량 차이는 보이지 않았으나(그림 2-558A, G), FAD 4Me군의 경우 *Il1b*의 발현량이 FAD Veh군 대비 유의하게 높아져 있었음(그림 2-558D). Female군의 경우 12B 약물에 의해 *Gfap*와 *Nlrp3* mRNA의

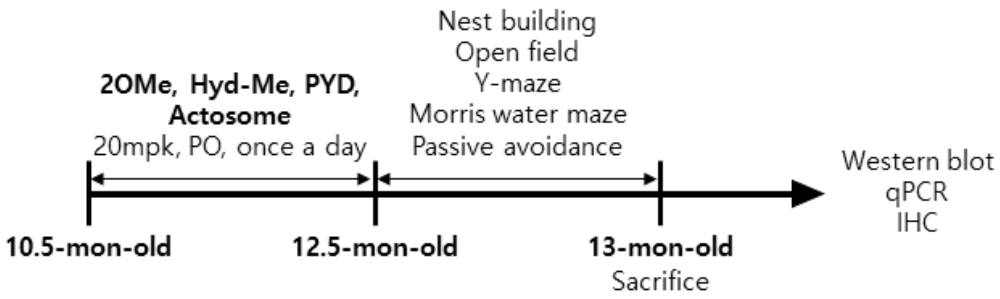
발현량이 FAD Vehicle군 대비 증가한 경향을 보였으나 유의하지는 않았고(그림 2-1288B, H), 4Me 약물에 의해 *Il1b* mRNA 발현량이 Veh군 대비 유의하게 증가해있었음(그림 2-558E). Male군의 경우 FAD 24F군의 염증 인자들 (*Gfap*, *Il1b*, *Nlrp3*)의 발현량이 FAD Vehicle군 대비 증가한 경향이 있었으나 유의하지는 않았음(그림 2-558C, F, I)



[그림 2-558. RT-qPCR 결과: Hippocampus]

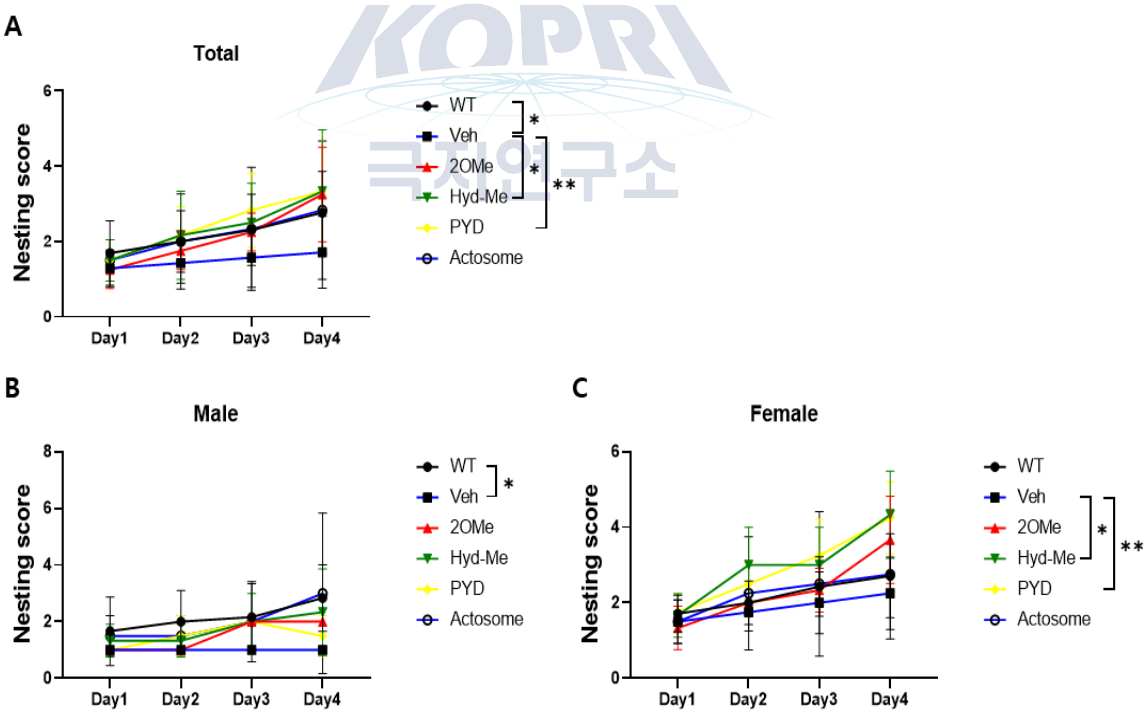
○ 2차 동물실험: P301S 알츠하이머 치매 동물모델에서 라말린 유도체 유효성 확인

1) 본 연구진은 앞선 [세부 1]에서 스크리닝된 항치매 후보물질인 RA-2OMe, RA-Hyd-Me, RA-PYD, Actosome (라말린의 liposome 형태)의 효과를 평가하기 위해 P301S 알츠하이머성 치매 동물모델을 사용함(그림 2-559). 10.5개월령의 P301S 치매 모델과 WT 마우스에 RA-2OMe, RA-Hyd-Me, RA-PYD, Actosome 약물을 하루 한 번 20 mg/kg의 용량으로 8주간 경구투여한 뒤, 3주간 무기력증을 비교할 수 있는 실험 (Nest building test)과 anxiety를 확인하는 open field test, 인지능력, 공간학습력 및 기억력을 확인할 수 있는 실험들 (Y-maze test, Morris water maze test, passive avoidance test)을 진행함



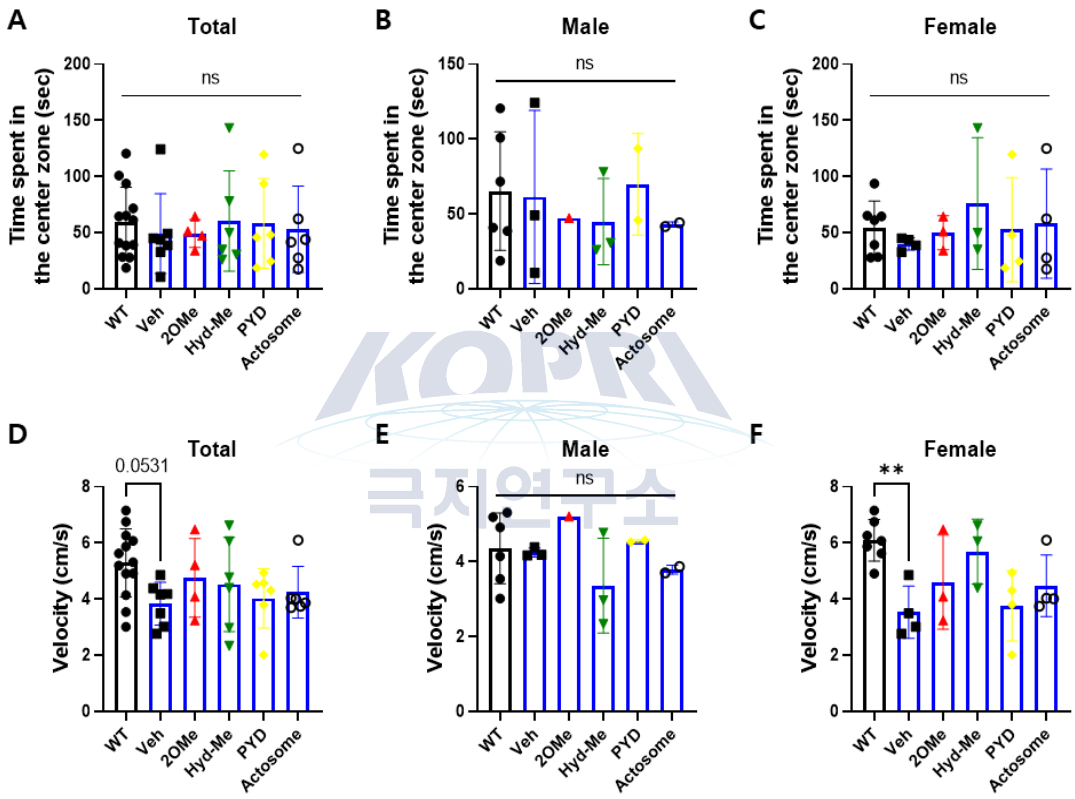
[그림 2-559. 라말린 유도체 *in vivo* 실험 계획 (P301S)]

2) 8주간 약물 경구투여 후 실험동물의 무기력 정도를 비교할 수 있는 Nest building test를 진행함(그림 2-560). P301S Veh 마우스의 경우 WT 마우스에 비해 nest building score가 유의미하게 낮아 welfare 정도가 낮은 것으로 해석될 수 있음(그림 2-560A, 2-560B). 이때, Hyd-Me와 PYD를 투여한 그룹에서 nest building score가 유의미하게 증가한 것을 확인함(그림 2-560A, 2-560C). 이를 통해 Hyd-Me와 PYD가 알츠하이머 치매 마우스에서 나타나는 무기력증을 개선함을 알 수 있음



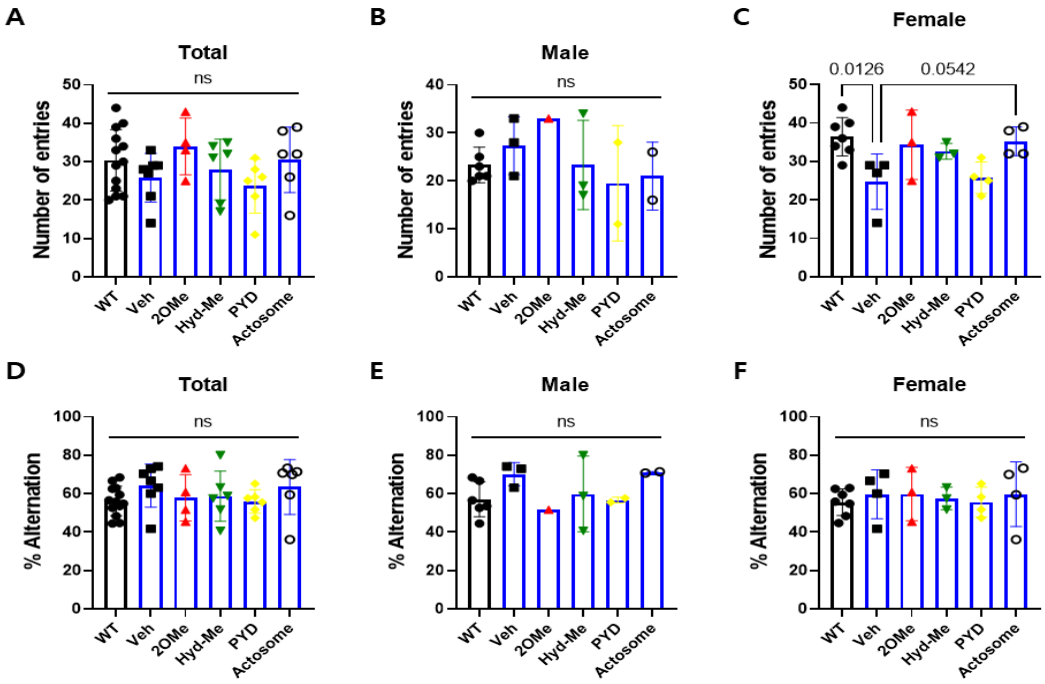
[그림 2-560. Nest building test 결과]

3) 다음으로, 실험동물의 불안감 정도를 비교할 수 있는 open field test를 진행함(그림 2-561). Open field 내에서의 실험동물들의 움직임 속도를 비교해봤을 때 전체적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나(그림 2-561D, E), 이를 성별로 나누어 분석했을 때 암컷에서 WT와 P301S Veh간에 유의한 차이를 보였음(그림 2-561F). 실험동물이 open field 중앙에 머문 시간을 비교 및 분석했을 때 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았으며(그림 2-561A), 이를 성별로 나누어 분석했을 때도 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-561B, C). Open field test 결과를 종합해보면, 라말린 유도체에 의한 운동성 변화나 불안감 정도의 개선에는 효과를 보이지 않았다고 할 수 있음



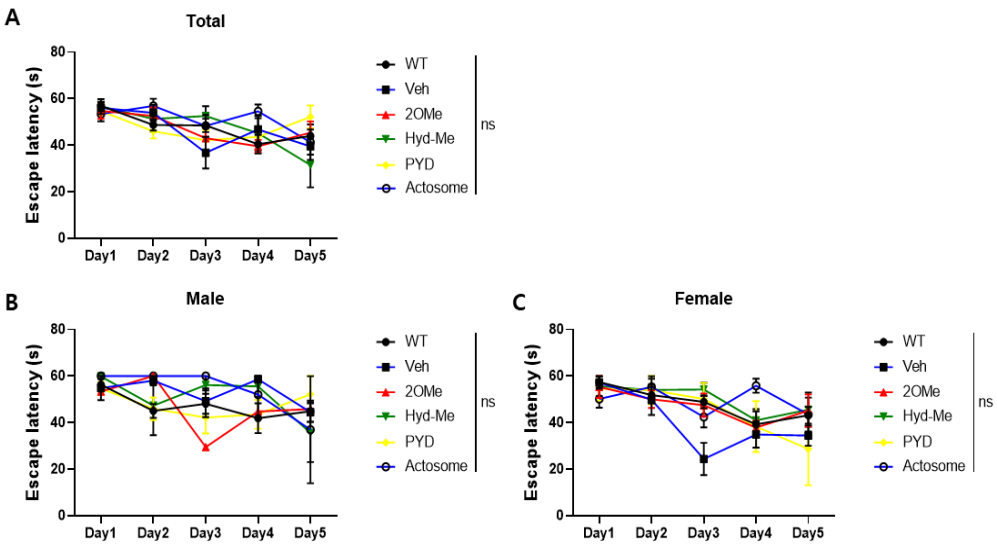
[그림 2-561. Open field test 결과]

4) 다음으로, 단기 기억력과 공간지각능력을 평가하는 Y-maze test를 진행함(그림 2-562). 각 arm에 들어간 횟수를 비교했을 때, 전체적으로 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았으나(그림 2-562A, B), 성별을 나눠 분석했을 때 암컷에서 WT 마우스와 P301S Veh 그룹 간에 유의한 차이를 보임(그림 2-562C). 단기 기억력과 공간지각능력을 평가할 수 있는 지표인 spontaneous alternation (% Alternation) 값을 비교 및 분석했을 때 그룹 간 유의한 차이를 보이지 않았으며(그림 2-562D), 성별을 나눠 분석했을 때도 마찬가지로 그룹 간 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-562E, F). Y-maze 결과, 라말린 유도체에 의한 단기 기억력 및 공간지각능력의 향상 효과는 없었음



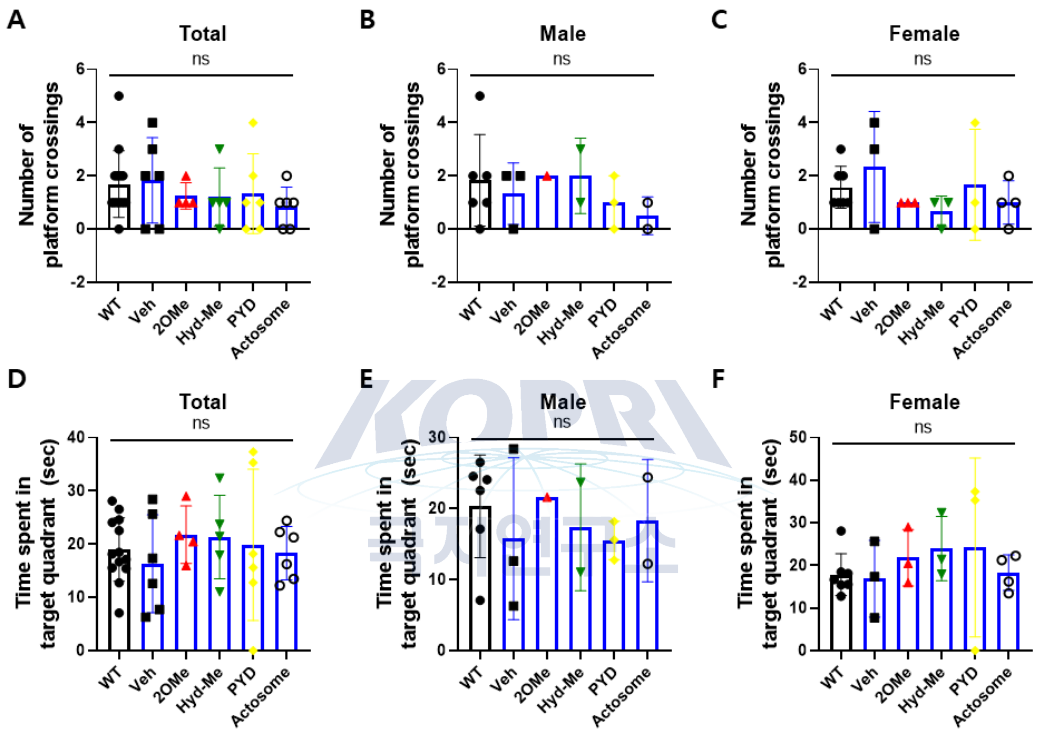
[그림 2-562. Y-maze test 결과]

5) 다음으로 실험동물들의 학습 능력과 공간지각능력을 비교 및 분석할 수 있는 Morris water maze 실험을 진행함(그림 2-563, 2-564). 실험은 5일간의 training을 거친 후 6일 차에 platform을 제거하고 probe test를 진행함. Day 1부터 Day 5까지의 escape latency를 종합하여 비교해봤을 때, 모든 그룹 간에 유의미한 차이를 보이지 않았음(그림 563A). 성별을 나눠 분석했을 때도 그룹 간 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 2-563B, C)



[그림 2-563. Morris water maze 결과 (Training days)]

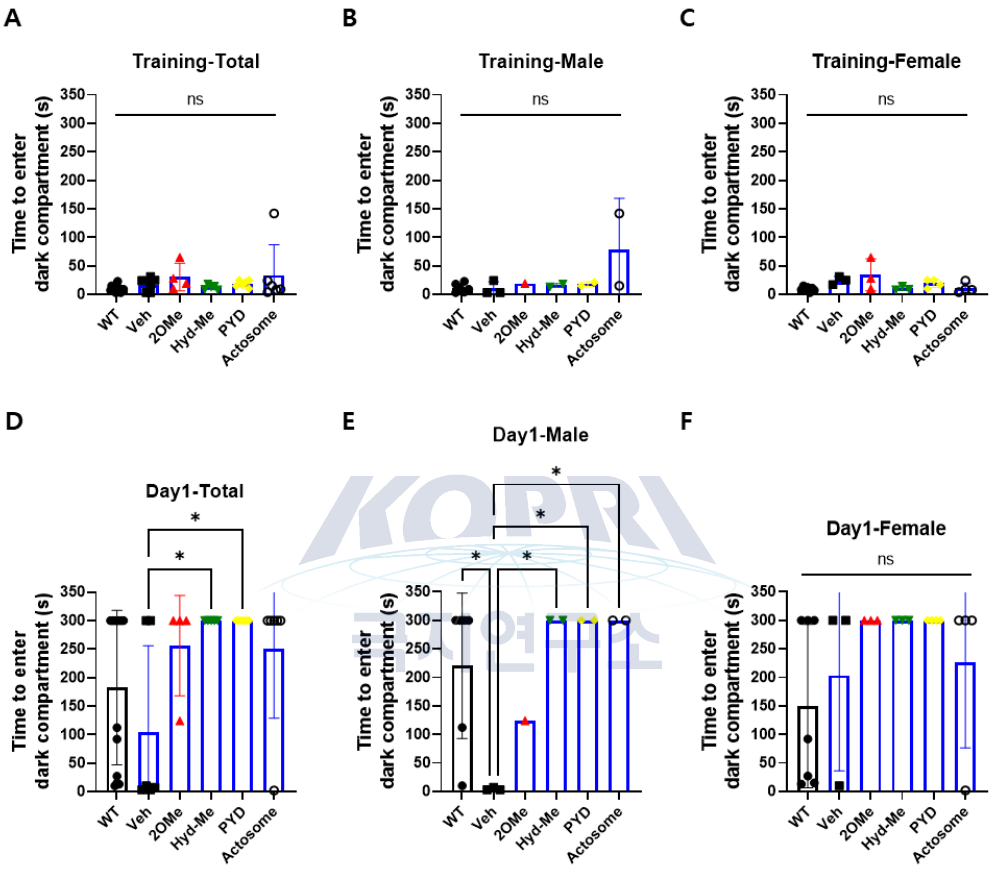
6) 5일간의 training이 끝난 후 진행된 probe test의 결과를 분석함(그림 2-564). Platform을 지나친 횟수를 비교해봤을 때, total과 female, male 모두에서 그룹 간 유의한 차이가 발견되지는 않았음(그림 2-564A-C). Platform이 포함되어있는 사분면인 target quadrant에 머문 시간을 비교하면, total에서 2OMe와 Hyd-Me 투여군이 Veh 군에 비해 높은 경향을 보였으나 유의하지는 않았음(그림 2-564D). 성별을 나누어 비교했을 때도 모든 그룹에서 유의미한 차이는 없었음(그림 2-564E, F). Morris water maze 실험 결과, 라말린 유도체에 의한 유의 한 학습 능력 및 공간지각능력 향상은 없었음



[그림 2-564. Morris water maze 결과 (Probe test)]

7) 마지막으로 공포에서 비롯된 학습 및 기억력을 측정할 수 있는 Passive avoidance test를 진행함(그림 2-565). 실험동물들에 전기 자극을 주기 전과(그림 2-565A-C), 전기 자극을 준 후 24시간이 지난 시점(그림 2-565D-F)에서 실험동물이 암실로 들어가는 데 걸리는 시간을 측정함. Training day에서 모든 그룹 간에 유의미한 차이는 없었음(그림 2-565A). 성별을 나눠 분석했을 때도 모든 그룹 간에 차이는 없었음(그림 2-565B, C). 전기 자극을 주고 24시간 뒤 암실에 들어가는 시간을 측정하였을 때, total에서 Hyd-Me와 PYD 투여군이 Veh군에 비해 암실에 들어가는 시간이 유의하게 길었음(그림 2-565D)

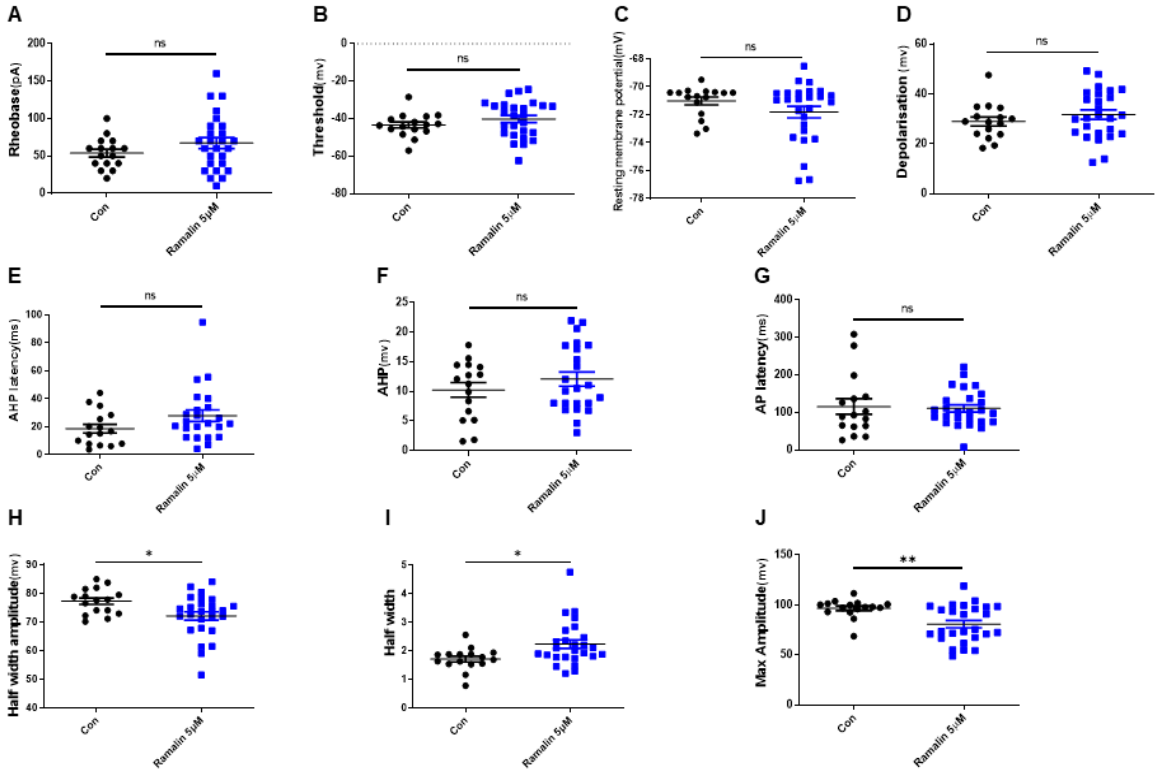
8) 성별을 나눠 분석했을 때, 수컷에서 P301S Veh 그룹이 WT에 비해 매우 빠르게 암실로 들어갔으며, Hyd-Me, PYD, Actosome을 투여한 그룹이 P301S Veh 그룹에 비해 암실에 들어가는 데 걸리는 시간이 유의하게 길었음(그림 2-565E). 반면 암컷에서는 모든 그룹 간에 유의미한 차이가 없었음(그림 2-565F). Passive avoidance test 실험 결과, Hyd-Me, PYD, Actosome이 알츠하이머 치매 마우스의 기억력 향상에 도움을 주었음



[그림 2-565. Passive avoidance test 결과]

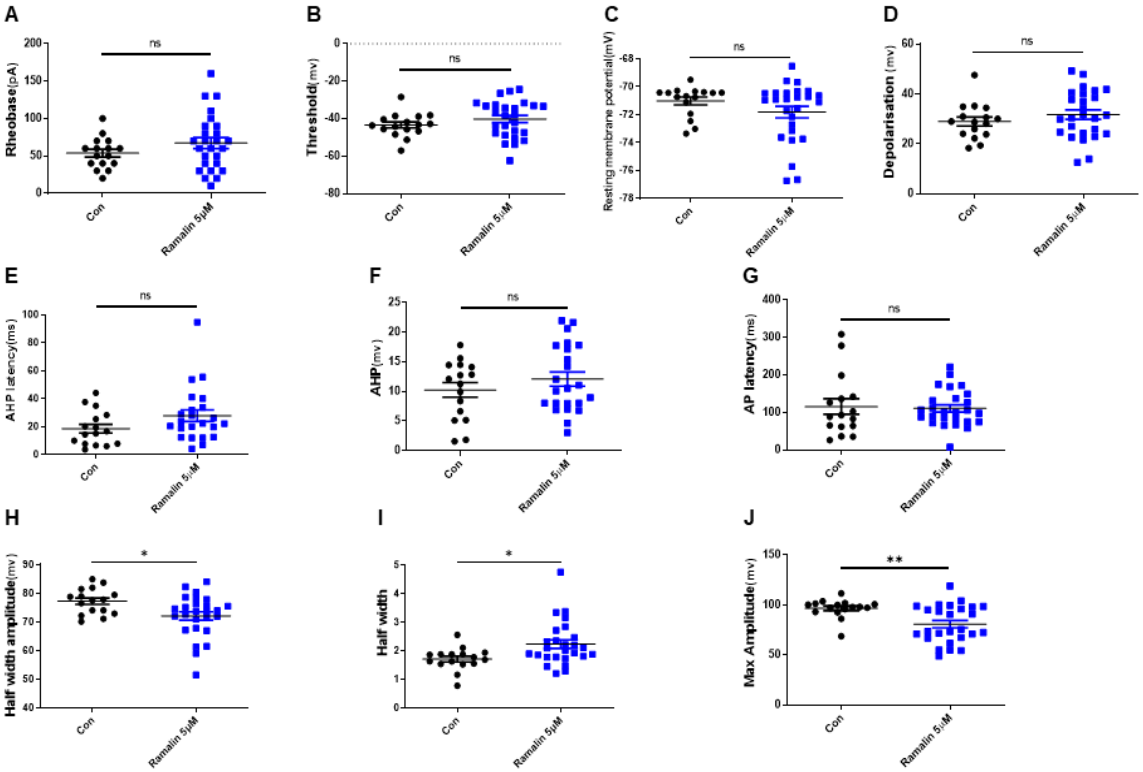
○ 전기생리학 기반 라말린에 의한 신경세포 기능 평가

1) 본 연구진은 라말린에 의한 신경세포의 기능 변화 여부를 알아보기 위하여 전기생리학 기반 분석 (Electrophysiological analysis)를 진행함(그림 2-566). WT mouse (C57BL6)로부터 primary cortical neuron을 배양한 다음 라말린 5 μM을 24시간 처리한 후 patch clamp를 진행함(그림 2-566). Patch clamp 결과를 분석한 결과 대조군 (Con)과 라말린 5 μM 처리군 (Ra 5 μM)에는 유의한 차이가 발생하지 않았음(그림 2-566)



[그림 2-566. 라말린 patch clamp 분석 결과: Mouse primary cortical neuron 2]

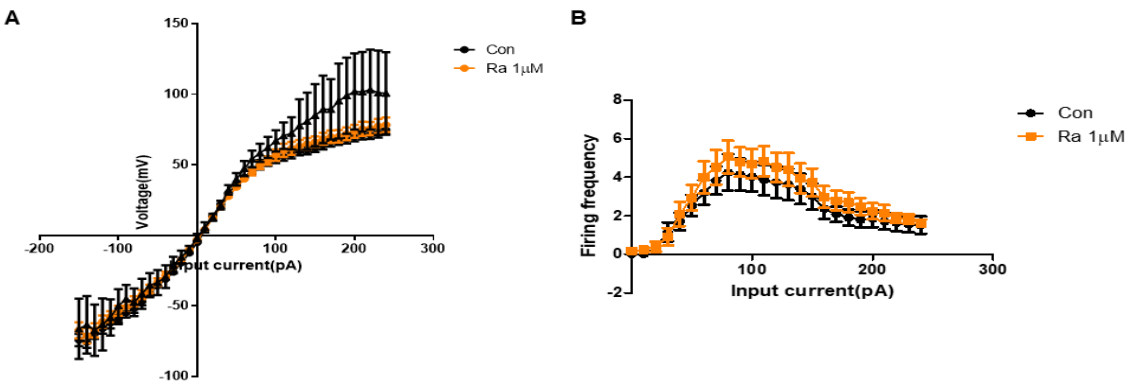
2) 이후 얻어진 데이터를 추가 분석한 결과, 라말린을 처리한 군과 대조군 사이에서 기전류 (rheobase), 역치 (threshold), 휴지 막전위 (resting membrane potential), 탈분극 (depolarisation), 후과분극 (afterhyperpolarisation)과 관련된 수치들 (AHP, AHP latency) 및 활동전위 (Action potential, AP)와 관련된 수치 (AP latency)들에는 유의한 차이가 발견되지 않았음(그림 2-567A-G). 라말린을 처리한 군에서는 half width amplitude 및 max amplitude가 대조군 대비 유의하게 감소하였으며(그림 2-567H, J), Half width의 경우 대조군 대비 유의하게 증가한 결과를 보임(그림 2-567I)



[그림 2-567. 라말린 patch clamp 분석 결과: Mouse primary cortical neuron 2]

3) 또한, 인간배아줄기세포 유래 신경세포 (human ESC-derived neuron)에 라말린 1 μM을 24 시간 처리한 후 patch clamp를 진행함(그림 2-568). 그 결과, 대조군 (Con)과 라말린 1 μM 처리군 (Ra 1 μM)사이에 유의한 차이는 없었음(그림 2-568A, 2-568B)

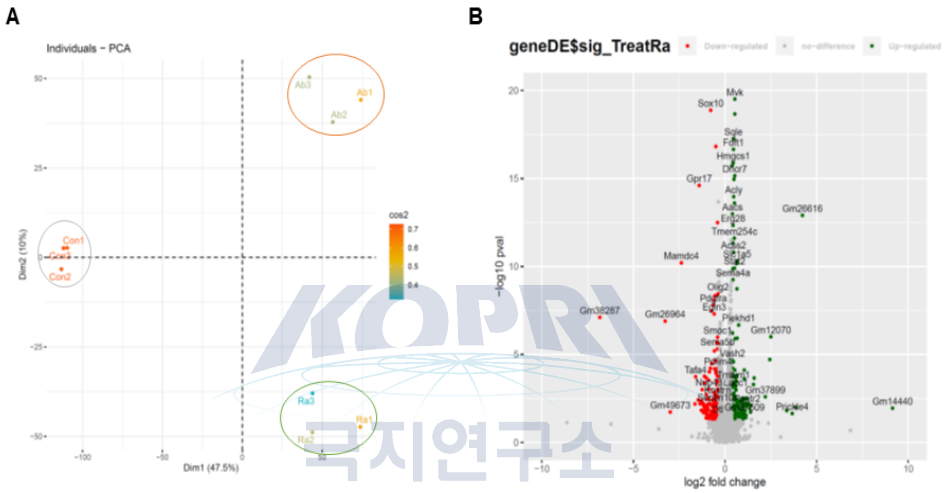
4) 앞서 얻은 patch clamp 결과를 추가 분석한 결과, 라말린 1 μM을 24시간 처리할 경우 기전류 (rheobase)가 유의하게 증가했으나, 다른 결과들에서는 대조군 대비 유의한 차이가 발견되지는 않았음



[그림 2-568. 라말린 patch clamp 분석 결과: human ESC-derived neuron 1]

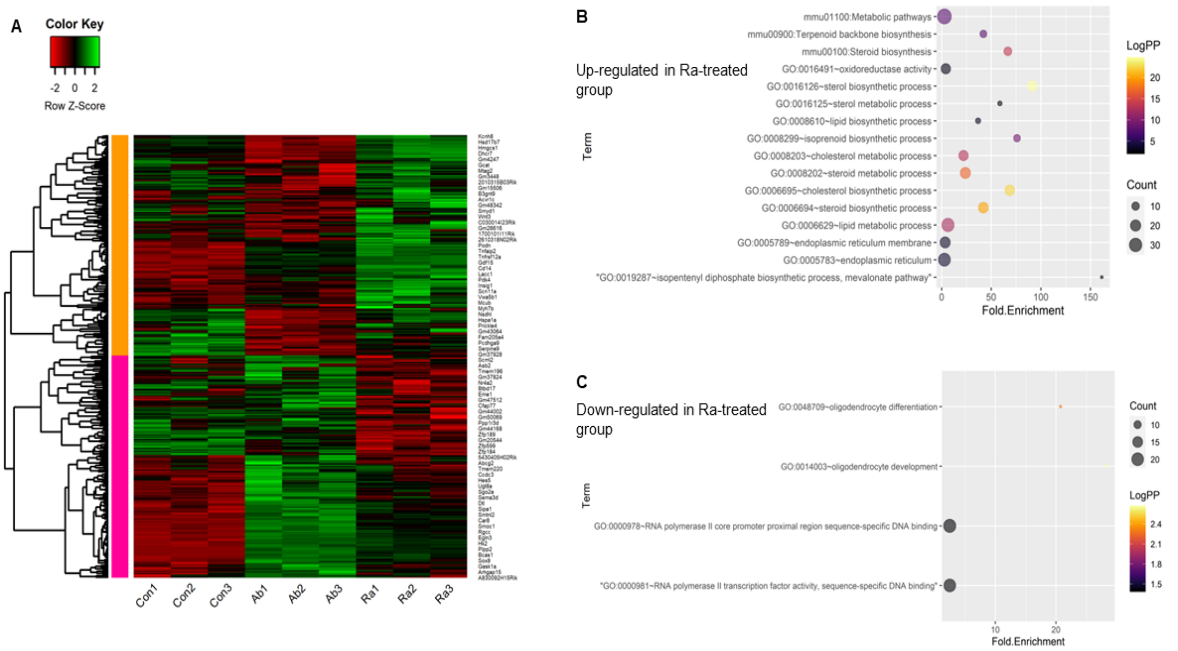
○ 알츠하이머 치매모델에서 라말린에 의한 유전자 발현 변화 분석

1) 라말린에 의한 RNA의 발현 양상을 분석하고자 WT 마우스로부터 primary neuronal culture를 진행한 후, amyloid beta oligomer 1 μM와 라말린 5 μM을 처리한 뒤 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석을 진행함(그림 2-569 Con: control군, Ab: amyloid beta oligomer 1 μM 처리군, Ra: amyloid beta oligomer 1 μM+라말린 5 μM 처리군). 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA)을 통해 그룹내 샘플간 유사성이 높은 것을 확인함 (그림 2-569A). 이후 volcano plot을 통해 amyloid beta oligomer를 처리한 군 대비 라말린을 처리한 군에서 변화한 유전자 목록을 확인함(그림 2-569B, Fold change] 1.3, p-value [0.05)



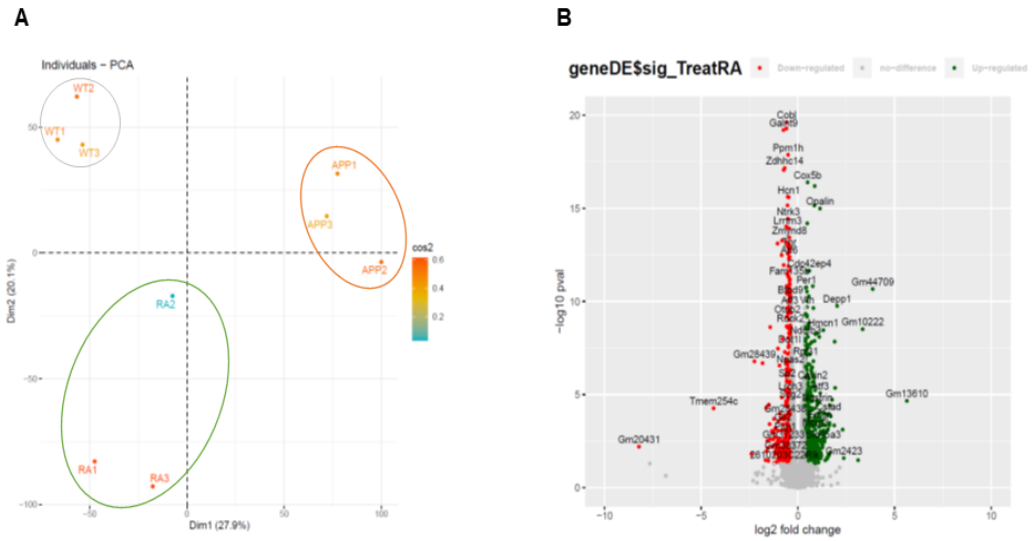
[그림 2-569. RNA-seq 분석 결과: Mouse primary neuron 1]

2) 이후 추가 분석을 통해 각 그룹간 유의하게 변화량의 차이가 있는 유전자 목록을 heatmap으로 확인함(그림 2-570A). 또한, gene ontology 분석을 통해 라말린에 의해 발현량의 유의한 변화가 있었던 유전자들의 분자 기능 (molecular function), 세포 내외 위치 (cellular component), 세포 기작 (biological process)를 확인함(그림 2-570B, 2-570C)



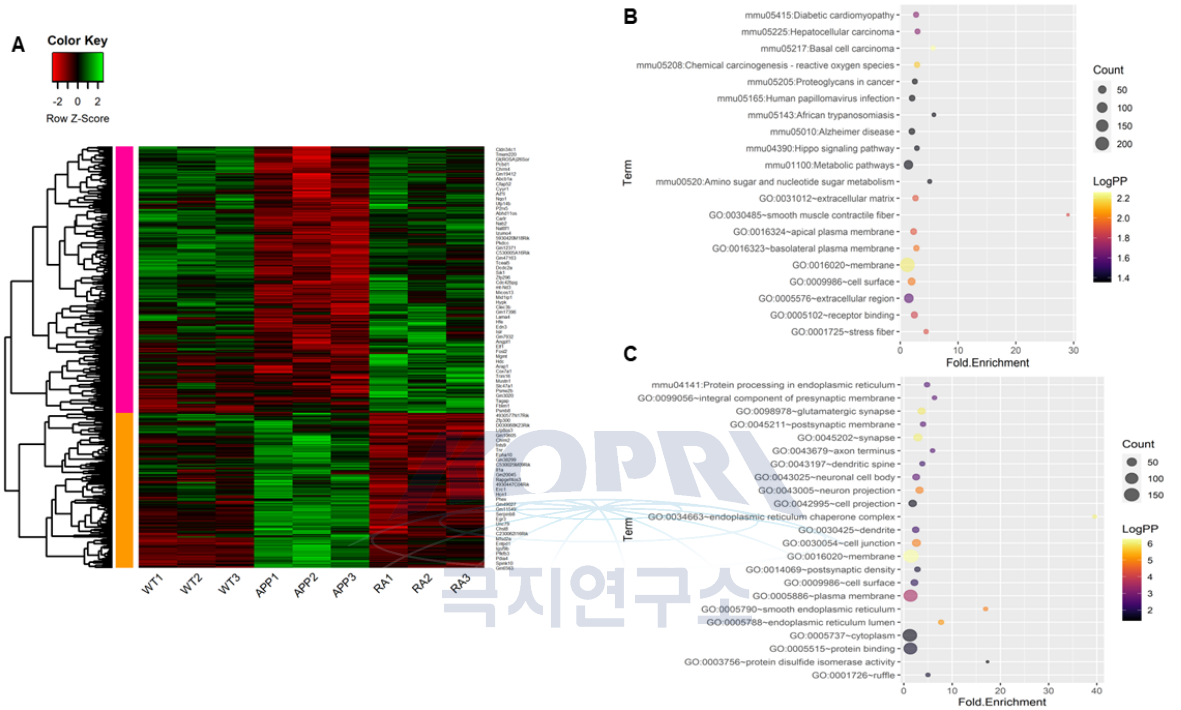
[그림 2-570. RNA-seq 분석 결과: Mouse primary neuron 2]

3) 또한, APP-KI 실험동물에 라말린을 투여한 후 8.5개월령에서 sacrifice한 뒤 RNA를 추출하여 RNA-seq 분석을 진행함(그림 2-571). 주성분 분석을 통하여 각 그룹내 샘플간의 유사성이 높은 것을 확인함(그림 2-571A, WT: wild type mouse군, APP: APP-KI Vehicle군, RA: APP-KI 라말린 처리군). 추가 분석을 통하여 APP-KI Vehicle 투여군 대비 APP-KI 라말린 투여군에서 발현량이 유의하게 변화한 유전자 목록을 volcano plot을 통하여 확인함(그림 2-571B, Fold change] 1.3, p-value [0.05)



[그림 2-571. RNA-seq 분석 결과: APP-KI 1]

4) 추가 분석을 통하여 각 그룹간 유의하게 발현량 변화가 있었던 유전자 목록을 heatmap 그래프를 통하여 확인함(그림 2-572A, Fold change] 1.3, p-value [0.05). 또한, 라말린을 투여한 군에서 유의하게 발현량의 변화가 있었던 유전자들의 gene ontology 분석을 진행함(그림 2-572B: Up-regulated genes, C: Down-regulated genes, Fold change] 1.3, p-value [0.05). 라말린에 의해 발현량이 유의하게 감소된 유전자들의 경우 시냅스와 관련된 경우가 많았음(그림 2-572C, integral component of presynaptic membrane, glutamatergic synapse, postsynaptic membrane, synapse, postsynaptic density)



[그림 2-572. RNA-seq 분석 결과: APP-KI 2]

5) 라말린에 의해 유의하게 발현량이 변화한 유전자들 중 앞선 mouse primary neuron의 RNA-seq 결과와 APP-KI의 RNA-seq 결과에서 공통된 유전자들을 분석함(그림 2-573, 2-574). 그 결과, 총 24개의 유전자가 도출되었고 5개의 유전자 (*Frem3*, *Ldlr*, *Nmnat3*, *Wnt3*, *Knstrn*)가 알츠하이머성 치매 혹은 퇴행성 뇌질환과 관련된 연구가 존재함

6) 결론적으로, 본 연구진은 새로 선정된 항치매 후보 약물들 (RA-24F, RA-12B, RA-4Me)의 효과를 확인하기 위해 9개월령의 5xFAD 알츠하이머성 치매 동물모델을 이용하여 실험을 진행함. 해당 약물들을 20 mg/kg의 용량으로 10주간 투여한 후 2주간의 행동실험들 (open field test, Y-maze test, Morris water maze test)을 진행 및 분석함. 그 결과, 약물에 의한 운동성이나 불안감 개선에 유의한 효과는 없었으며 (open field test 결과), 인지능력 및 학습능력 향상에서 RA-24F가 유의미한 효과를 보였으며 RA-12B도 일부 효과를 보였음 (Morris water maze test, passive avoidance test 결과)

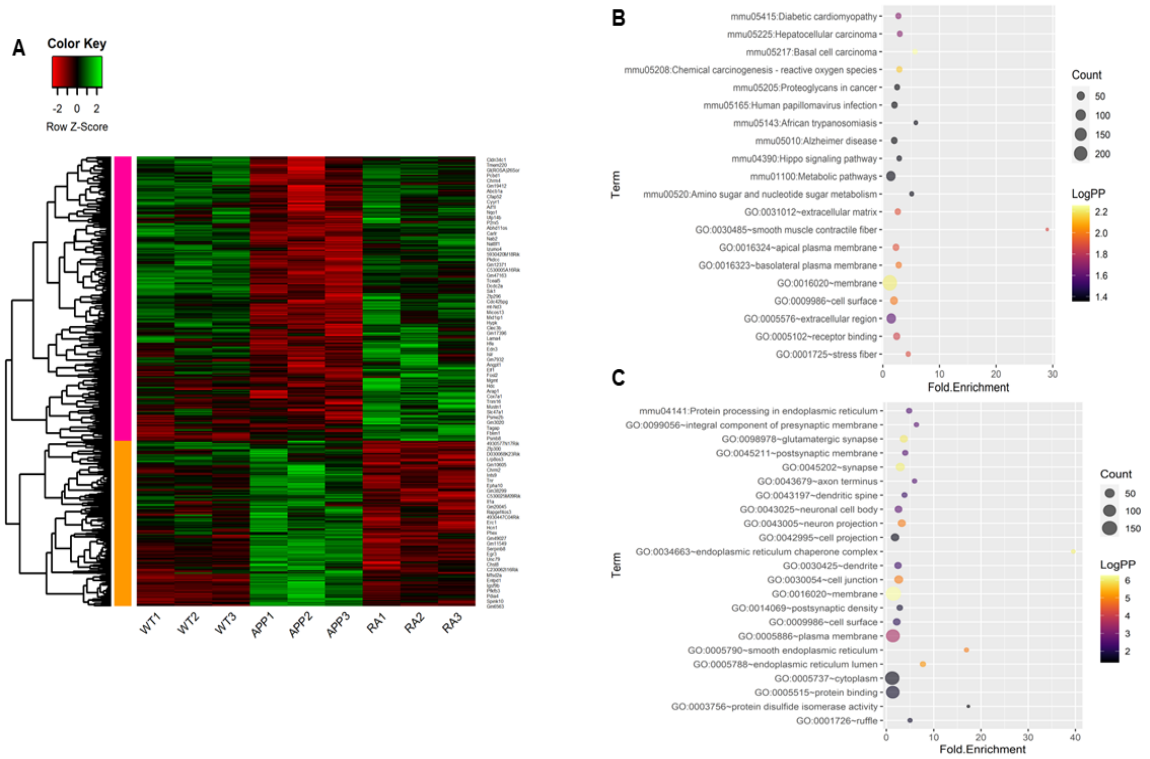
7) 뇌 조직 분석 (western blotting, RT-qPCR)을 진행하였을 때 western blotting 결과, RA-4Me가 cortex에서 Tau 단백질의 phosphorylation (P-Tau)과 BACE1의 발현량을 FAD Veh군 대비 감소시켰으며, hippocampus에서는 NLRP3 inflammasome의 구성 성분인 ASC의 발현량을 FAD Veh군 대비 감소시킴. 또한, cortex에서 synaptic marker인 PSD95와 Synaptophysin의 발현량을 FAD Veh군 대비 증가시킴

8) 다른 약물인 RA-24F의 경우 cortex에서 FAD Veh군 대비 P-Tau의 발현량을 감소시켰으며, PSD95와 Synaptophysin의 발현량을 증가시킴. RA-12B의 경우 cortex에서 PSD95와 Synaptophysin의 발현량을 증가시켰으며 BACE1의 발현량을 감소시켰음. RT-qPCR을 진행하여 후보 약물들에 의한 염증인자들 (*Gfap*, *Il1b*, *Nlrp3*)의 mRNA 발현량 변화를 확인했으나 후보 약물들에 의한 유의한 염증인자 개선 효과는 없었음

9) *In vivo* 실험 결과를 종합해봤을 때, RA-24F가 알츠하이머성 치매와 관련된 인자들의 개선 효과를 보였다고 할 수 있으며, RA-12B의 경우 행동실험에서 유의한 결과를 나타내지는 않았지만 뇌 조직 분석결과에서 일부 치매 관련 인자들의 개선 효과를 보였음

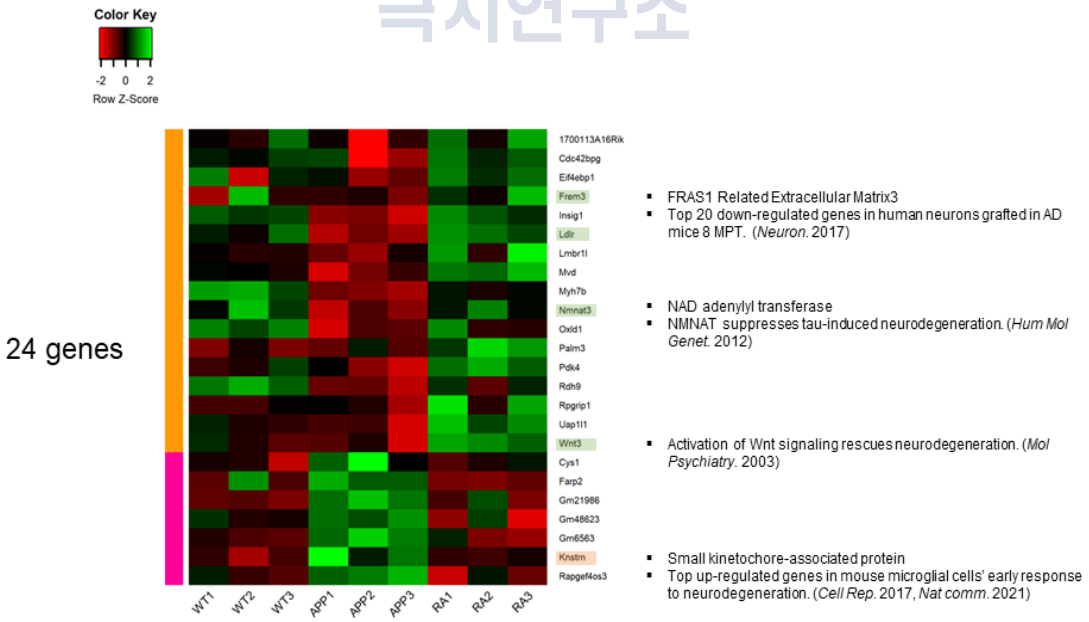
10) 또한, 2차 항치매 후보 약물들 (RA-2OMe, RA-Hyd-Me, RA-PYD, RA-Actosome)의 효과를 P301S 알츠하이머 치매 동물모델에서 확인했음. RA-Hyd-Me와 RA-PYD가 무기력증을 개선시켰고 (nest building test 결과), 학습 및 기억력 개선에서 유의미한 효과를 보임 (passive avoidance test 결과)

11) 라말린에 의한 신경 세포 기능 변화 여부를 알아보기 위해 patch clamp를 진행하여 전기생리학 기반 분석을 진행함. Mouse primary cortical neuron에서 patch clamp를 진행하였을 때, 라말린 처리군에서 half width가 유의하게 증가했으며, max amplitude와 half width amplitude는 유의하게 감소함. 또한, 인간배아줄기세포 유래 신경세포 (hESC-derived neuron)에서 patch clamp를 진행한 결과, 라말린 처리군에서 기전류 (rheobase)가 유의하게 증가함



[그림 2-573. RNA-seq 분석 결과: APP-KI 2]

KBRI
극지연구소

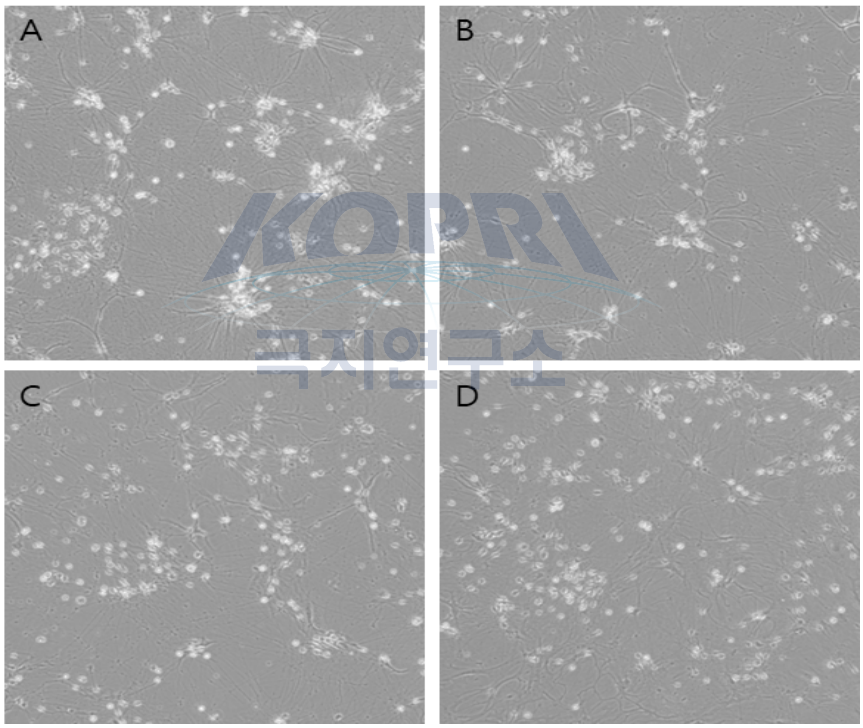


[그림 2-574. RNA-seq 분석: 그림 108A와 110A의 교집합]

□ 연구내용 2-12. AD 동물 모델기반 유효성 평가

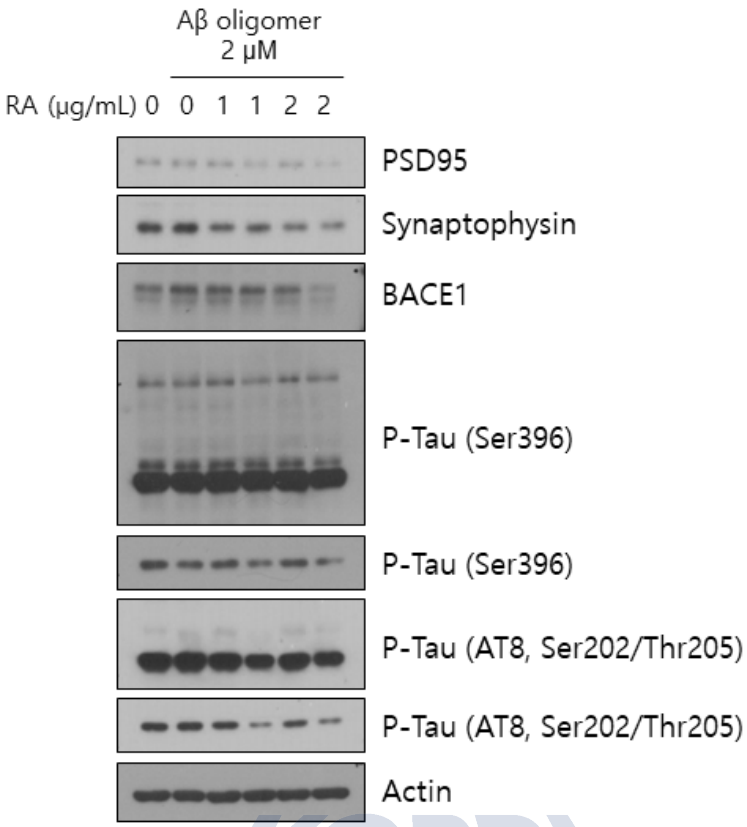
○ 인간 유래 iPSC에서 분화시킨 신경세포를 이용한 라말린 유효성 분석

1) 인간 유래 APOE4 역분화줄기세포 (induced pluripotent stem cell, iPSC)에 lentivirus를 이용하여 rtTA와 Ngn2를 발현시킴. 그 후, 항생제를 5일 동안 처리하여 rtTA와 Ngn2를 모두 발현하는 iPSC만 선택적으로 배양함. 6-well plate에 seeding 한 뒤 doxycycline을 포함한 배양액에 키워 신경세포로 분화를 시작함. 분화 3일차에 마우스 astrocyte를 추가로 넣고 배양하였으며, 이틀에 한 번씩 배양액을 교체하며 분화시켰음. 신경세포 분화 16일 차에 라말린을 1 또는 2 μg/mL 처리했으며, 24시간 뒤 아밀로이드베타 올리고머를 2 μM로 24시간 처리함. 세포의 상태를 현미경으로 확인했을 때, 아밀로이드베타 올리고머 또는 라말린 처리에 따른 모양 변화는 크게 없었음(그림 2-575)



[그림 2-575. APOE4 역분화줄기세포에서 신경세포로 분화
A) 대조군. B) 아밀로이드베타 올리고머 2 μM 처리.
C) 라말린 1 μg/mL+아밀로이드베타 올리고머 2 μM 처리.
D) 라말린 2 μg/mL+아밀로이드베타 올리고머 2 μM 처리]

2) 그 후, 세포로부터 단백질을 추출하여 western blot으로 단백질 발현량을 비교함. 아밀로이드베타 올리고머 처리했을 때 BACE1 단백질 발현량이 증가하였으며, 라말린 (RA) 처리에 의해 BACE1 단백질 발현량이 감소함(그림 2-576). 또한, 라말린을 처리하였을 때 타우 인산화 (Ser202/Thr205)된 정도가 감소한 것을 확인함



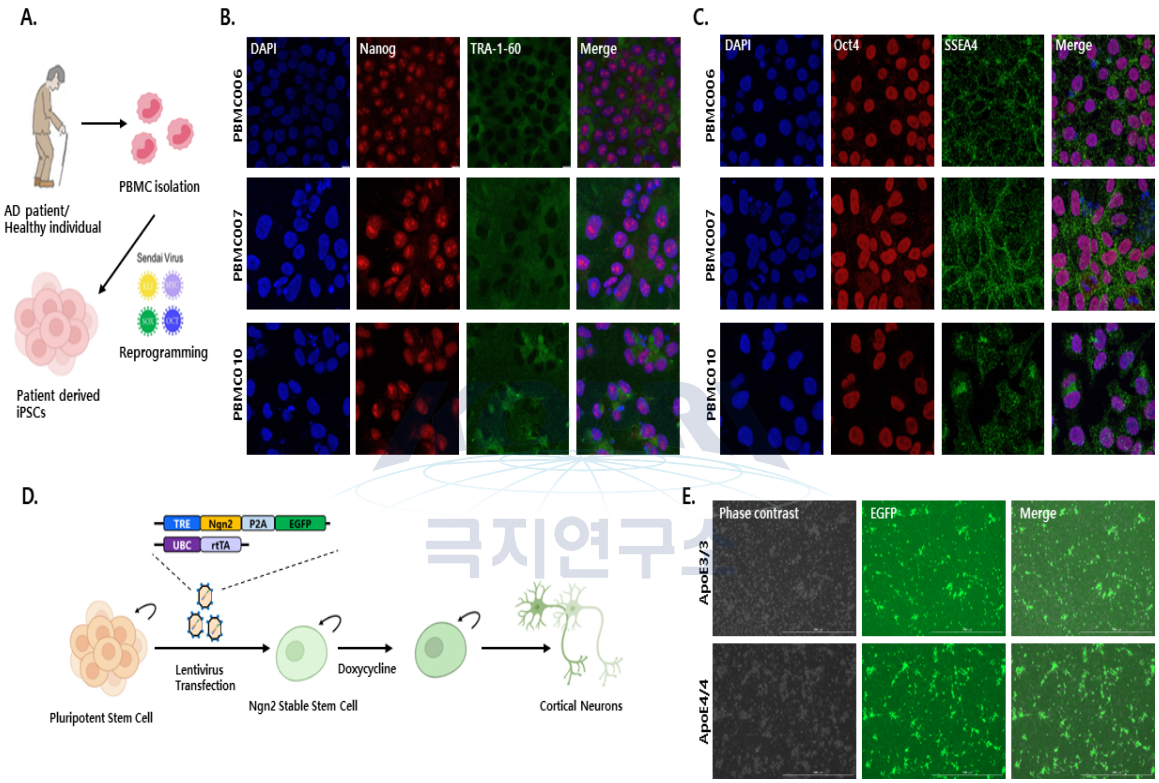
[그림 2-576. APOE4 역분화줄기세포 유래 신경세포에서 라말린 효과 확인]

KOPRI 극지연구소

○ 알츠하이머 치매 환자 유래 iPSC 구축 및 신경세포 분화

1) 알츠하이머 치매 환자 및 건강한 사람의 혈액에서 추출한 말초 혈액 단핵세포 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 Sendai Reprogramming Kit를 이용하여 역분화시켜 iPSC 세포 라인 3개를 구축함(그림 2-577A). PBMC로부터 역분화된 세포에서 전분화능을 나타내는 표지인자 (Nanog, TRA-1-60, OCT4, SSEA4)의 발현을 확인하였으며, 이를 통해 알츠하이머 치매 환자로부터 얻은 PBMC가 iPSC로 역분화되었음을 확인함(그림 2-577B, C). 또한, 배치간 일정한 분화효율을 확보하기 위하여, TRE-Ngn2 construct를 안정하게 발현하는 iPSC 라인을 구축함

2) 모델 구축에 사용된 세포 라인은 건강한 사람에서 유래한 ApoE 3/3 iPSC, 그리고 isogenic 하게 ApoE 4/4로 치환된 iPSC 두 가지 라인을 사용함. Stable cell line 모델은 원하는 때에 cortical neuron으로의 분화를 switch-ON 할 수 있는 시스템임. Ngn2를 안정적으로 발현하는 상태의 iPSC에 doxycycline을 처리함으로써 cortical neuron으로의 분화를 시작함(그림 2-1307D). 구축한 iPSC 라인에서 doxycycline을 처리한 지 10일 이후에 neuron의 형태(soma, dendrite)가 잘 형성됨을 확인했으며 reporter인 EGFP가 고르게 발현하는 것을 확인함(그림 2-577E)

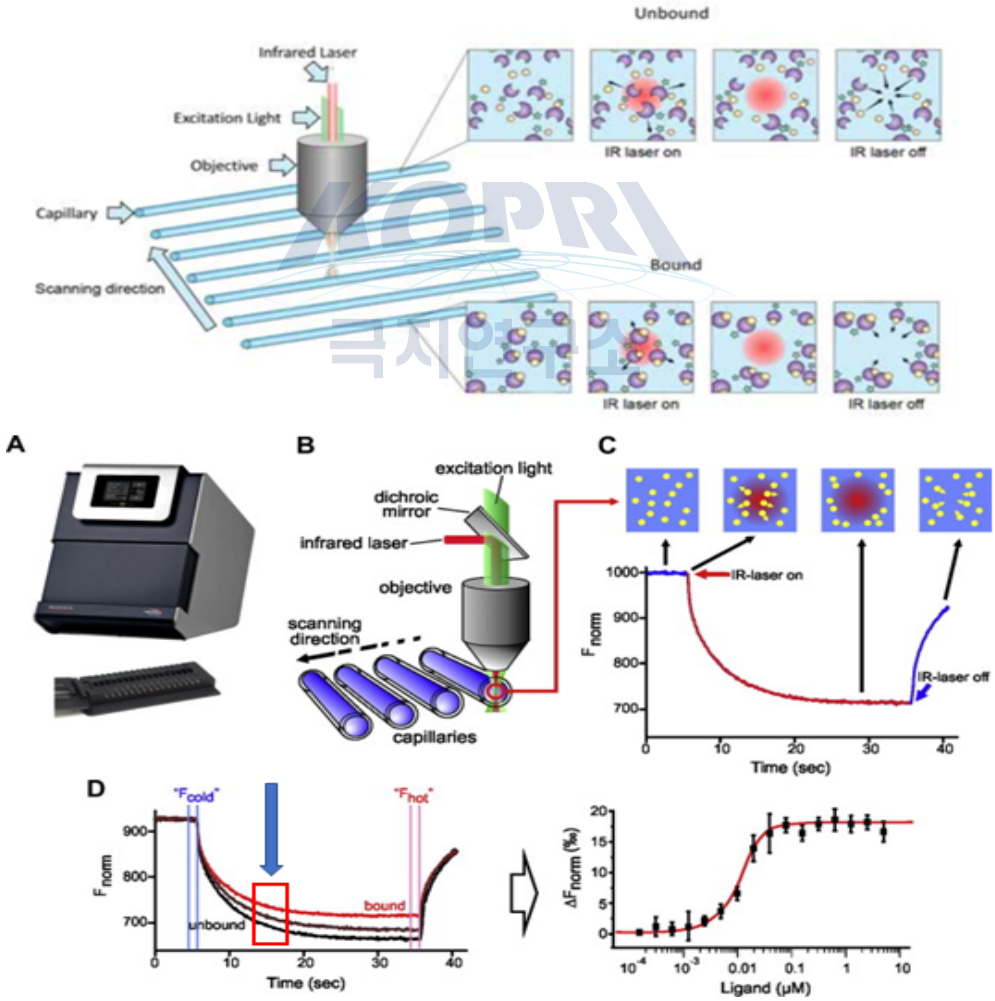


[그림 2-577. 알츠하이머 치매 환자 유래 iPSC 구축 및 신경세포 분화]

□ 연구내용 2-13. 타겟 단백질 밀 라말린 유도체와의 결합원리 측정

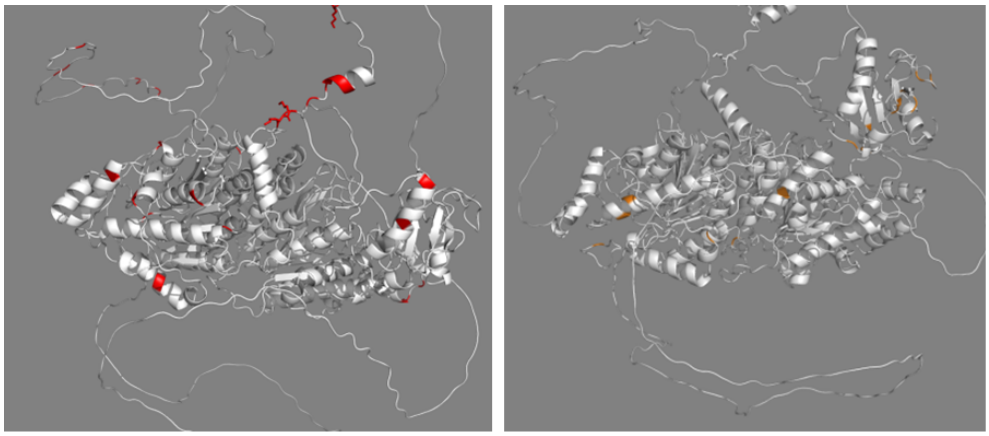
○ HDAC6와 라말린의 결합원리 측정

1) MST기법은 단백질과 ligand를 결합시키는데, 이때 ligand를 농도별로 나눠서 결합시킴. 반응시킨 후에 IR 빛을 조사하게 되면 열에 의해 단백질 분자들이 이동하게 되고, fluorescence 값이 감소하게 됨. Unbound된 단백질과 bound된 단백질의 이동하는 속도 차이에 따라 ligand가 단백질에 얼마나 결합 되었는지 확인할 수 있음(그림 2-578). Fluorescence 물질은 Lysine, Cystein에 붙여서 관찰할 수가 있는데, 기존 reference들이 Lysine에 결합을 시켜 실험을 진행하였기 때문에, 본 실험에서 Lysine에 fluorescence를 부착하여 affinity를 측정함. Ligand의 농도는 최소 0.01 μM에서 최고 350 μM로 실험을 진행함



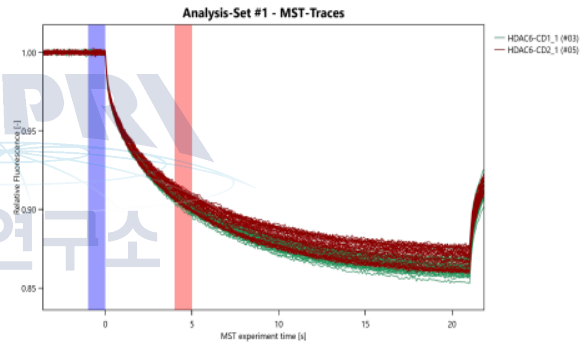
[그림 2-578. 단백질과 ligand의 결합을 확인하기 위한 MST 기법]

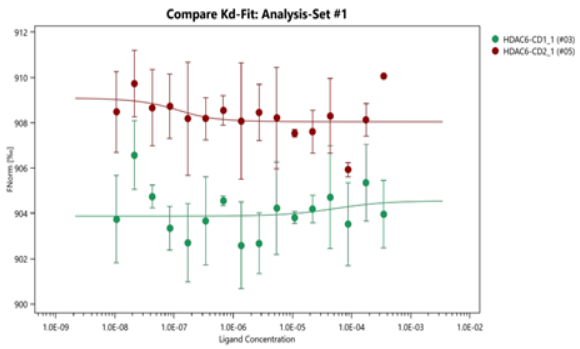
2) Lysine기에 형광 표지한 HDAC6 CD1과 CD2 도메인 100 nM에 라말린을 0.01 μM에서 350 μM까지 각각 처리함(그림 2-579, 580)

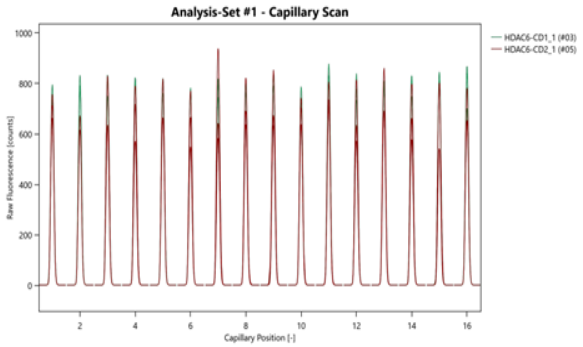


[그림 2-579. HDAC6 단백질의 Lysine과 Cysteine기 표시]

Name:	HDAC6-CD1_1 (#03)	HDAC6-CD2_1 (#05)
Graph Color:		
Target Name:	HDAC6_CD1	HDAC6_CD2
Target Concentration:	100 nM	100 nM
Ligand Name:	Ramalin	Ramalin
Ligand Concentration:	350 μM to 0.0107 μM	350 μM to 0.0107 μM
n:	3	3
Comments:		
Excitation Power:	20%	20%
MST Power:	40%	40%
Temperature:	24.2°C	24.3°C
Kd:	5.2962E-05	6.2763E-08
Kd Confidence:	± 0.00037114	± 2.3816E-07
Response Amplitude:	0.67027286	1.0465801
TargetConc:	1E-07[Fixed]	1E-07[Fixed]
Unbound:	903.88	909.09
Bound:	904.55	908.05
Std. Error of Regression:	1.095426	0.8930975
Reduced χ^2:	1.4249097	33.377745
Signal to Noise:	0.65726809	1.2587734

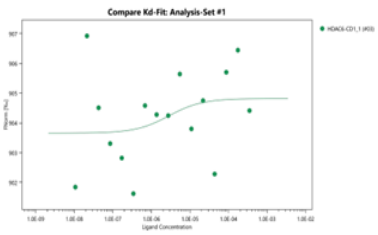




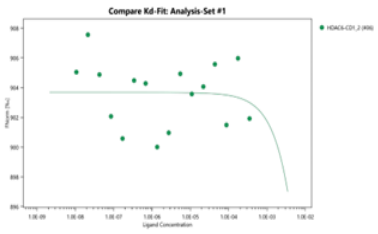


[그림 2-580. HDAC6 CD1과 CD2 도메인 각각의 라말린과의 결합력]

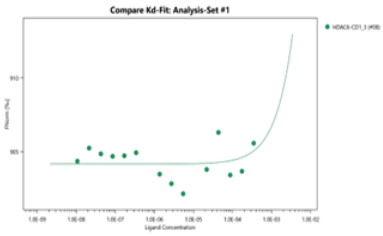
3) 분석 결과, HDAC6 CD1과 CD2 도메인에 라말린의 결합이 잘 이루어지지 않았음. 추가적으로 2,3차 분석을 재진행하였지만, 모든 결과에서 HDAC6 CD1과 CD2 도메인이 라말린의 농도 증가에 따라 결합하는 정도가 증가하지 않았음(그림 2-581). 라말린의 경우 산화가 매우 잘되고 불안정함. MST의 경우 IR 레이저를 시료에 조사하기 때문에 순간적으로 라말린이 산화되면서 실험값이 제대로 나오지 않을 가능성이 있음. 따라서 MST 기법보다는 ITC 방법이 라말린과 HDAC6 단백질의 결합을 확인하기에 적절할 것으로 판단됨



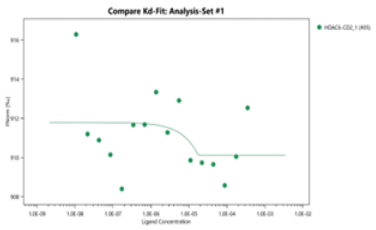
HDAC6 CD1-Ramalin (set #1)



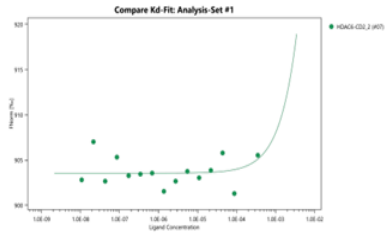
HDAC6 CD1-Ramalin (set #2)



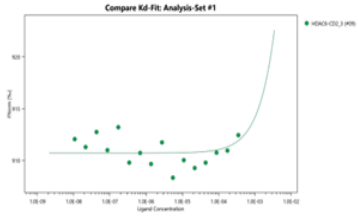
HDAC6 CD1-Ramalin (set #3)



HDAC6 CD2-Ramalin (set #1)



HDAC6 CD2-Ramalin (set #2)



HDAC6 CD2-Ramalin (set #3)

[그림 2-581. HDAC6 CD1과 CD2 도메인 각각의 라말린과의 결합력 (1-3차 분석 결과)]

KOPRI
극지연구소

□ 연구내용 2-14. 라말린 유도체에 의한 시냅스 활성 조절 관찰 및 미토콘드리아 이동 조절 확인

○ 라말린에 의한 신경세포 시냅스의 활성 기능조절 규명

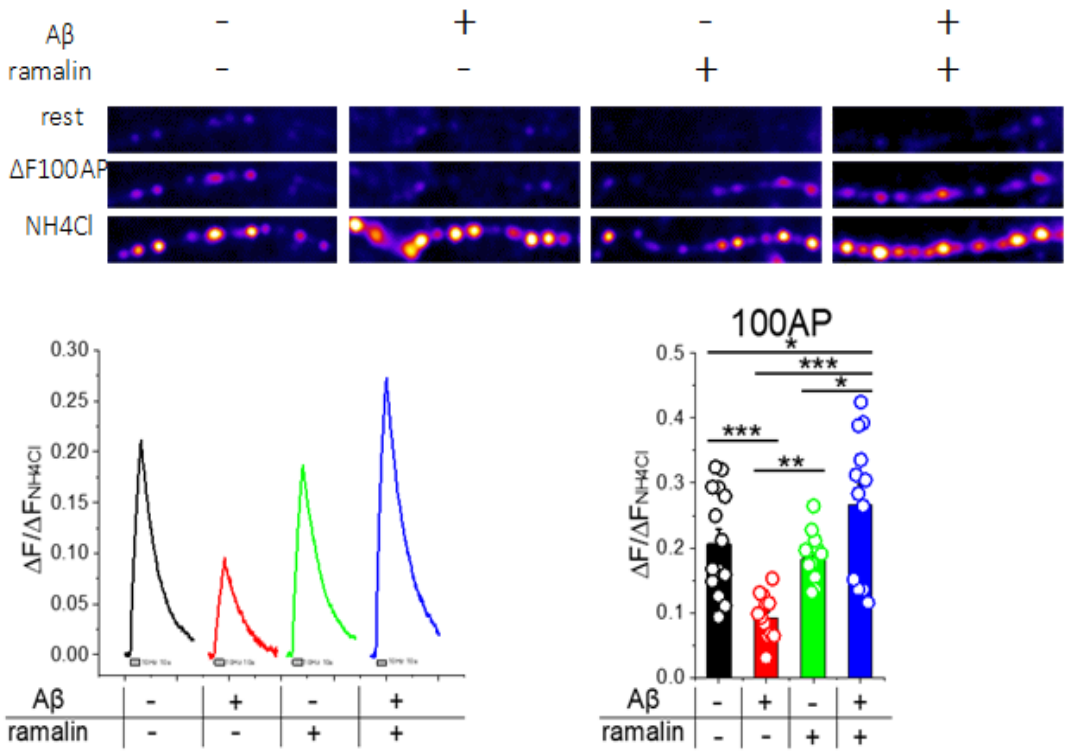
1) 시냅스는 신경정보전달에 대한 기본 기능이 이루어지는 부분으로 그 기능의 보존이 정상적 뇌 기능에 중요하고, 최근 신경 시냅스 기능 이상 (synaptopathy: 시냅스병증)이 신경질환의 중요한 초기 증상으로 보고되고 있음. 특히 치매에서도 시냅스의 기능 이상이 그 초기 증상으로 보고되고 있고, 치매와 시냅스 병증에 대한 관계, 그리고 라말린에 의한 시냅스 병증의 영향 관계를 확인했음

2) 일반 정상 신경세포 시냅스에서의 라말린에 의한 영향과 치매 유발물질로 알려진 Aβ 올리고머를 처리하여 신경 시냅스를 치매 환경으로 유도한 후의 라말린의 시냅스 기능 변화를 확인함. 라말린의 시냅스 기능 변화를 확인하기 위해 정상 해마 신경세포를 일차 배양하고 일주일이 지난 후에 센서를 발현시켰으며 신경세포가 성체까지 분화되도록 성장시킨 후 라말린과 Aβ 올리고머를 12-16시간 동안 처리한 후 시냅스의 기능 변화를 확인했음

3) 쥐 (Rat) 해마 신경세포는 태아 (출산 후 1~2일)의 뇌에서 적출하여 여러 화학적, 물리적 처리를 통하여 개별 신경세포로 분리해내고 적절한 조건을 갖춘 세포 배양기에서 약 2주간 배양을 통하여 분화와 신경 네트워크를 형성한 후 시냅스 기능을 확인했음. 정상 신경세포 시냅스에 신경활성 (100 Action Potential: 100AP)이 주어지고 시냅스 트랜스미션을 확인함

4) Aβ 올리고머와 라말린의 신경 시냅스 기능의 기준이 될 수 있는 조건으로 Aβ와 라말린을 처리하지 않은 신경 시냅스의 기능도 확인했음 (컨트롤). 각각의 조건에서 신경 시냅스의 기능을 확인해본 결과, 시냅스 트랜스미션이 컨트롤에서는 일반 신경세포의 기능과 유사하게 보임

5) 일반 정상 신경세포에 Aβ 올리고머를 처리한 신경 시냅스의 기능은 트랜스미션이 매우 저하되었거나 일부 신경세포에서는 거의 반응이 보이지 않았음 (평균적으로 약 50% 기능 저하가 보여짐). 일반 정상 해마 신경세포에 라말린을 처리한 신경 시냅스의 트랜스미션은 컨트롤과 유사하였으며 Aβ 올리고머와 라말린을 동시에 처리한 신경 시냅스의 기능은 정상 수준과 유사하게 회복되었음. 이는 라말린에 의한 시냅스 병태생리적 환경에서 시냅스의 기능이 회복되거나, 혹은 시냅스 병태생리적 조건에서 방어적인 역할이 있음을 알 수 있음

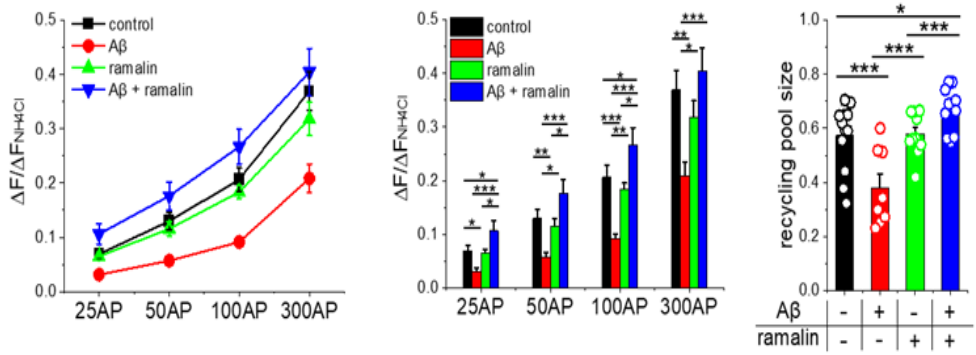


[그림 2-582. 일차배양 신경세포에서 치매환경 (Aβ 올리고머 처리)과 라말린 처리에 의한 시냅스 기능 관찰]

6) 정상 신경세포 시냅스에 100AP 외에도 여러 신경활성 (25, 50, 300 Action Potential: 25, 50, 300AP)을 주어지고 시냅스 트랜스미션을 확인함. 신경 시냅스의 세포외방출과 세포내 이입이 되는 시냅스 소낭들의 recycling size를 확인함

7) 시냅스 트랜스미션에서는 100AP와 동일한 결과의 Aβ 올리고머와 라말린을 처리한 신경 시냅스의 기능이 보임. Synaptic vesicle recycling pool size를 비교해본 결과 Aβ 올리고머를 처리한 신경 시냅스에서의 recycling pool size가 가장 적었으며 Aβ 올리고머와 라말린을 동시에 처리한 신경 시냅스의 recycling pool size는 정상 수준과 유사했음. 시냅스 소낭의 recycling pool size에서도 역시 라말린에 의해 시냅스의 기능이 회복됨을 알 수 있음

8) 여러 신경활성 조건에서의 정상 해마 신경세포에 Aβ 올리고머를 처리하여 치매 환경을 시냅스의 기능을 확인하고, Aβ 올리고머와 라말린을 동시에 처리한 신경 시냅스의 기능과 recycling pool size를 확인하여 라말린이 시냅스기능 회복 혹은 방어에 역할을 할 수 있다는 것을 확인했음



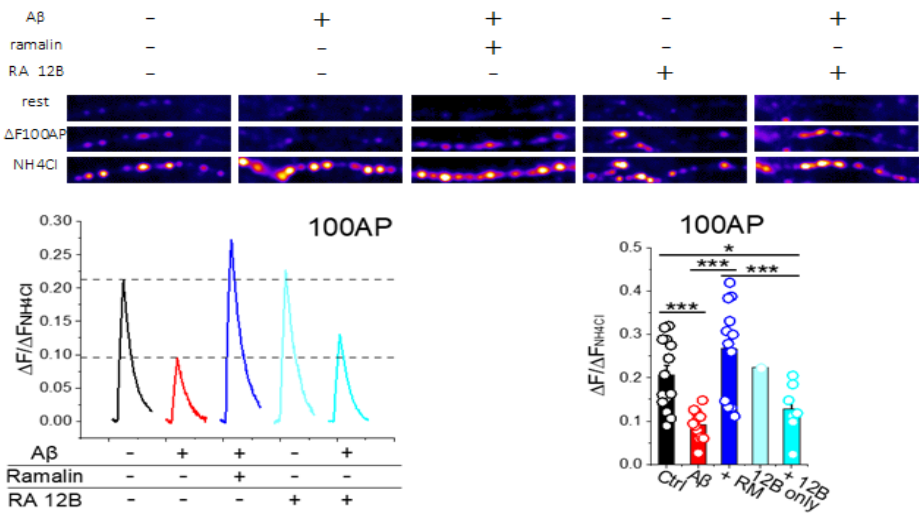
[그림 2-583. 여러 신경활성 조건에서의 일차배양 신경세포에서 치매환경(Aβ 올리고머 처리)과 라말린 처리에 의한 시냅스 기능 관찰과 recycling pool size 비교]

○ 라말린 유도체 12B, 24F, 4Me에 의한 신경세포 시냅스 기능 영향 확인

1) 라말린 유도체 12B를 처리한 신경 시냅스의 기능 변화를 확인하였고 라말린과 동일한 회복 효과가 나타나는지를 확인함. 앞선 연구와 동일하게 일차 배양 후 시냅스의 기능을 모니터링할 수 있는 센서를 발현시킴

2) 신경세포가 성체까지 분화되도록 성장시킨 후 세포에 Aβ 올리고머와 라말린 유도체 12B를 12-16시간 동안 동시에 처리하였고 이 세포에 신경활성 (25, 50, 100, 300AP)을 주고 시냅스 트랜스미션을 확인함. 라말린 유도체 12B만 처리된 신경세포의 시냅스에서는 정상 수준과 동일한 시냅스 트랜스미션을 보여 라말린 유도체 12B에 의한 독성 작용이 나타나지 않음을 보여줌

3) Aβ 올리고머와 라말린 유도체 12B를 동시에 처리한 신경세포에서는 치매 환경의 신경세포 시냅스 (Aβ 올리고머 처리한 세포)보다는 시냅스 트랜스미션이 향상된 경향을 보였으나 유의성은 없음. 그러나 라말린과 Aβ 올리고머를 동시에 처리한 신경세포보다는 낮은 트랜스미션을 보였음 (약 10% 기능 저하). 이를 보아 라말린 유도체 12B는 라말린보다 낮은 회복 효과를 보였음. 정상 해마 신경세포에 라말린을 대체한 라말린 유도체 12B와 Aβ올리고머를 처리하여 시냅스 기능 변화를 확인했고 라말린 수준의 회복 효과와 비교하였을 때 라말린 유도체 12B는 라말린에 비해 약 10%정도 낮은 효과를 보임

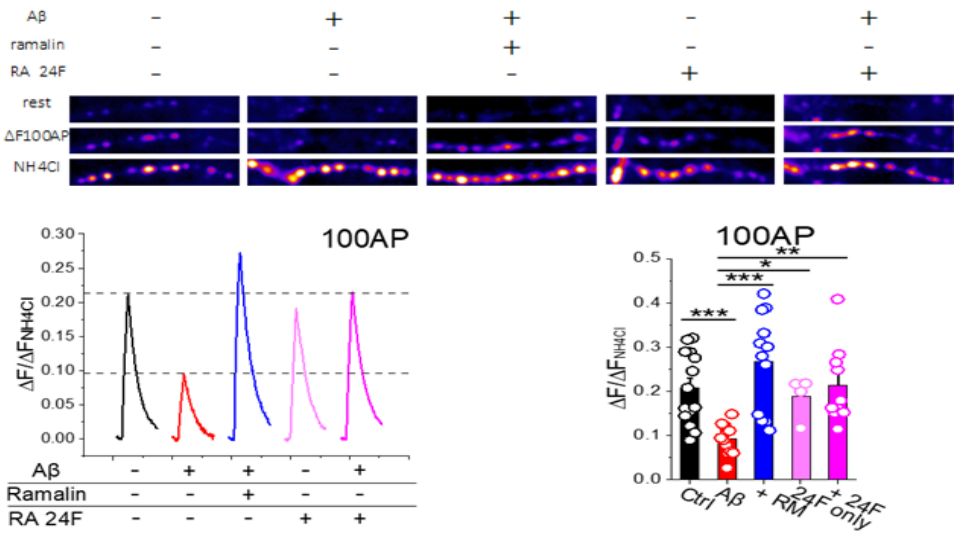


[그림 2-584. 일차배양 신경세포에서 치매환경 (Aβ 올리고머 처리)과 라말린 유도체 12B 처리에 의한 시냅스 기능 회복 관찰]

4) 라말린 유도체 24F를 처리하여 시냅스 기능 변화를 확인함. 라밀린 유도체 24F 역시 이전 연구들과 동일한 방법으로 진행됨. 정상 해마 신경세포에 라말린 유도체 24F만 처리된 경우, 신경세포의 시냅스에서 역시 정상 수준과 비슷한 시냅스 트랜스미션을 보여 라말린 유도체 24F에 의한 독성 작용이 나타나지 않음을 보임

5) Aβ 올리고머와 라말린 유도체 24F를 12-16시간 동안 동시에 처리한 신경세포의 시냅스 트랜스 미션은 Aβ 올리고머만 처리한, 치매 환경의 신경세포와 비교하였을 때 약 10% 이상 향상되어 있음을 확인했음 (정상 수준의 세포와 차이가 없음). 이를 바탕으로 라말린 유도체 24F는 효과적인 시냅스 기능 회복을 보임

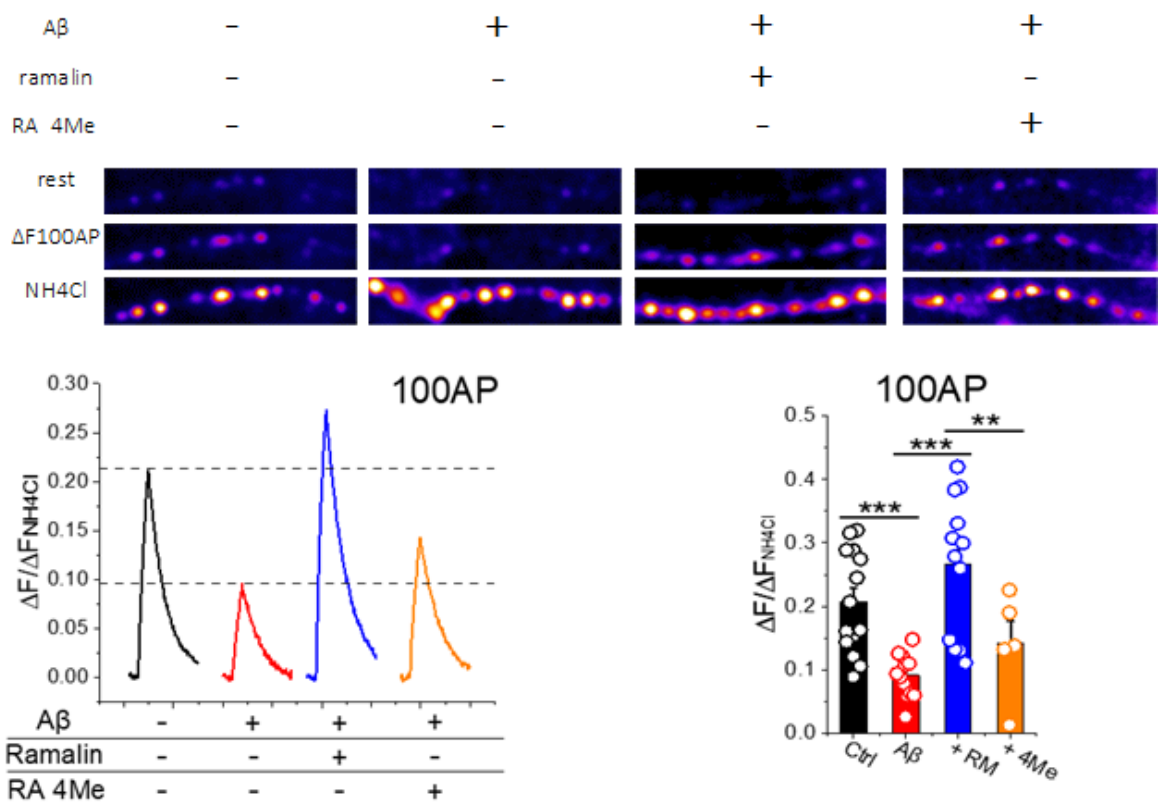
KORRA 극지연구소



[그림 2-585. 일차배양 신경세포에서 치매환경 (Aβ 올리고머 처리)과 라말린 유도체 24F 처리에 의한 시냅스 기능 회복 관찰]

6) 라말린 유도체 4Me를 처리하여 시냅스 기능 변화를 확인함. 라밀린 유도체 4Me 역시 이전 연구들과 동일한 방법으로 진행됨. 정상 해마 신경세포에 Aβ 올리고머와 라말린 유도체 4Me를 동시에 처리하여 시냅스 트랜스미션을 확인한 결과, Aβ 올리고머와 라말린을 처리한 신경세포의 시냅스 트랜스미션보다 약 10% 정도 시냅스 기능이 저하된 것이 확인됨. 라말린 유도체 4Me는 라말린에 의한 시냅스 기능 회복 효과보다 낮은 효과를 보임

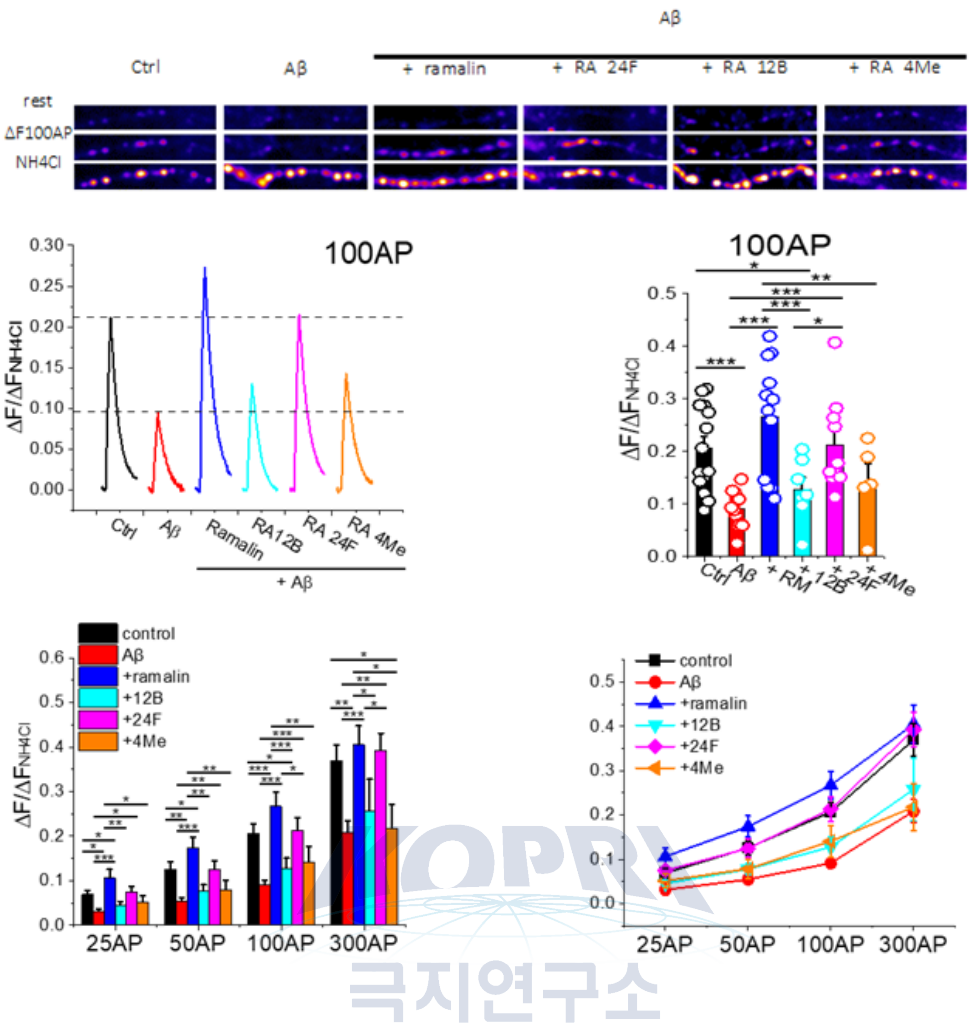
KORA 극지연구소



[그림 2-586. 일차배양 신경세포에서 치매환경(Aβ 올리고머 처리)과 라말린 유도체 4Me 처리에 의한 시냅스 기능 회복 관찰]

7) Aβ 올리고머와 라말린, 라말린 유도체 12B, 24F, 4Me를 처리한 각각의 신경세포의 시냅스 트랜스미션을 비교함. Aβ 올리고머를 처리하여 유도한 치매 환경의 신경세포의 시냅스 트랜스미션은 라말린과 라말린 유도체 24F를 동시에 처리한 경우에 가장 좋은 효과가 나타났음

8) 신경활성 100AP 외의 여러 조건의 신경활성 (25, 50, 300AP)를 주어진 경우에도 마찬가지로 동일한 결과가 보여짐. Aβ 올리고머와 라말린 그리고 라말린 유도체 24F가 동시에 처리된 신경세포의 시냅스에서 가장 높은 회복 효과를 보였음. 라말린을 대체한 라말린 유도체 중에서 라말린 유도체 24F가 가장 높은 시냅스 기능 회복 효과를 보임



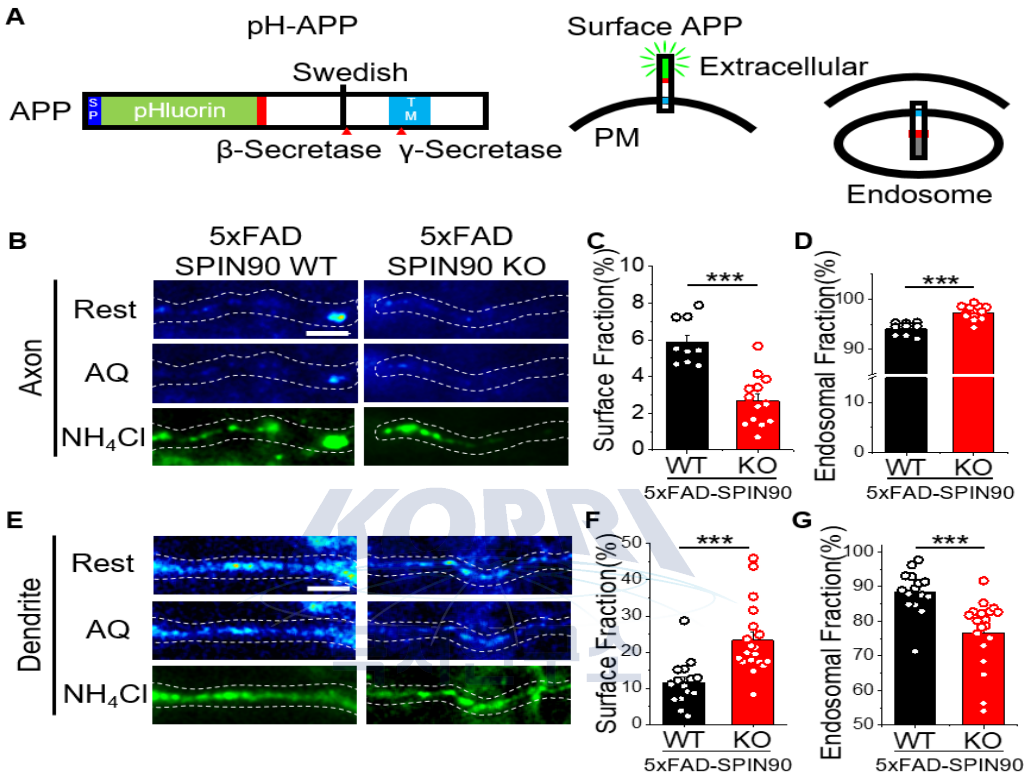
[그림 2-587. 일차배양 신경세포에서 치매환경 (Aβ 올리고머 처리)과 라말린, 라말린 유도체 12B, 24F, 4Me 처리에 의한 세부적인 시냅스 기능 회복 관찰: 종합]

○ APP 수송 조절 및 시냅스의 활성 기능조절 규명

1) APP는 치매 유발 물질인 Aβ의 전구체 단백질로, APP가 BACE 1과 γ-secretase에 의해 잘리는 과정을 통해 Aβ가 형성됨. 특히 APP는 세포 내에서 잘리므로 APP의 세포내이입와 리사이클링 과정이 중요함. SPIN90은 소낭의 이동을 조절하는 단백질로 알려져 있음. 따라서 치매 모델 쥐에서 SPIN90에 의한 APP 수송 영향 관계를 확인했음

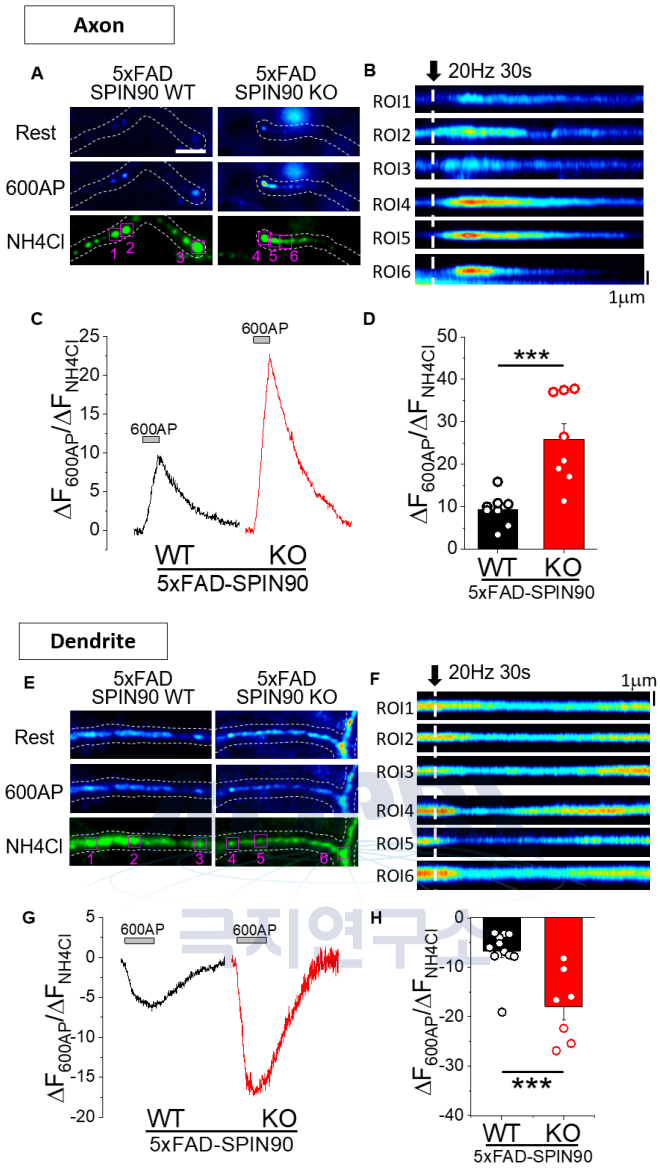
2) 5xFAD는 현재 많이 이용되고 있는 치매 모델 마우스로써, 아밀로이드 베타 (Aβ)의 생산이 많이 발생되도록 유전변이를 집어넣은 유전자 조작 치매 모델임. SPIN90의 기능을 확인하기 위해서 SPIN90을 없애는 유전자 조작 마우스를 만든 후, 5xFAD 마우스와 SPIN90이 없는 마우스를 교배하여 실험을 진행함. 우선 치매 모델의 신경세포에서 SPIN90에 의한 APP 분포 영향을 확인하기 위하여 치매 모델과 SPIN90을 없앤 치매 모델에서 해마신경세포를 각각 일차 배양하고 APP 분포를 확인할 수 있는 센서를 발현시켰음

3) 쥐(Mice) 해마 신경세포는 태아 (출산 후 2~3일)의 뇌에서 적출하여 여러 화학적, 물리적 처리를 통해 개별 신경세포로 분리해내고 적절한 조건을 갖춘 세포 배양기에서 약 2주간 배양을 통하여 분화와 신경 네트워크를 형성한 후 APP 분포를 확인했음. 우선 산성 버퍼를 신경세포에 처리하여 세포막에 위치한 APP 양을 측정함. 그 결과 SPIN90이 없는 신경세포의 축삭(Axon)에서 세포막에 위치한 APP 양이 적었음. 반대로 수상돌기(Dendrite)에서는 세포막에 위치한 APP 양이 더 많았음



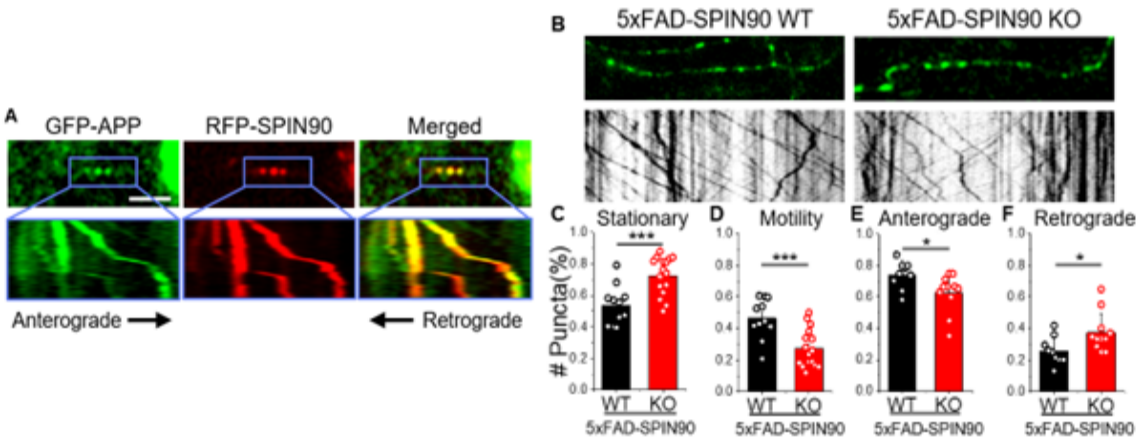
[그림 2-588. 치매 모델 쥐의 SPIN90에 의한 세포막에 위치한 APP 양 변화 확인]

4) 다음으로 치매 모델 신경세포와 SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포에 신경활성을 주고 세포막에 위치한 APP 양 변화를 확인함. 첫 번째로, 치매 모델 신경세포에 신경활성이 주어지면 축삭에서 세포막에 위치한 APP 양이 증가함. 이와 반대로 수상돌기에서는 감소하는 결과가 나타남. 두 번째로, SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포에서 위와 같은 실험을 진행한 결과, 치매 모델 신경세포보다 축삭에서는 더 많은 양의 APP가 세포막으로 증가하였고, 수상돌기에서 더 많은 양의 APP가 세포막으로부터 감소하였음. 이는 SPIN90에 의해 APP의 세포막으로의 이동이 조절됨을 알 수 있음



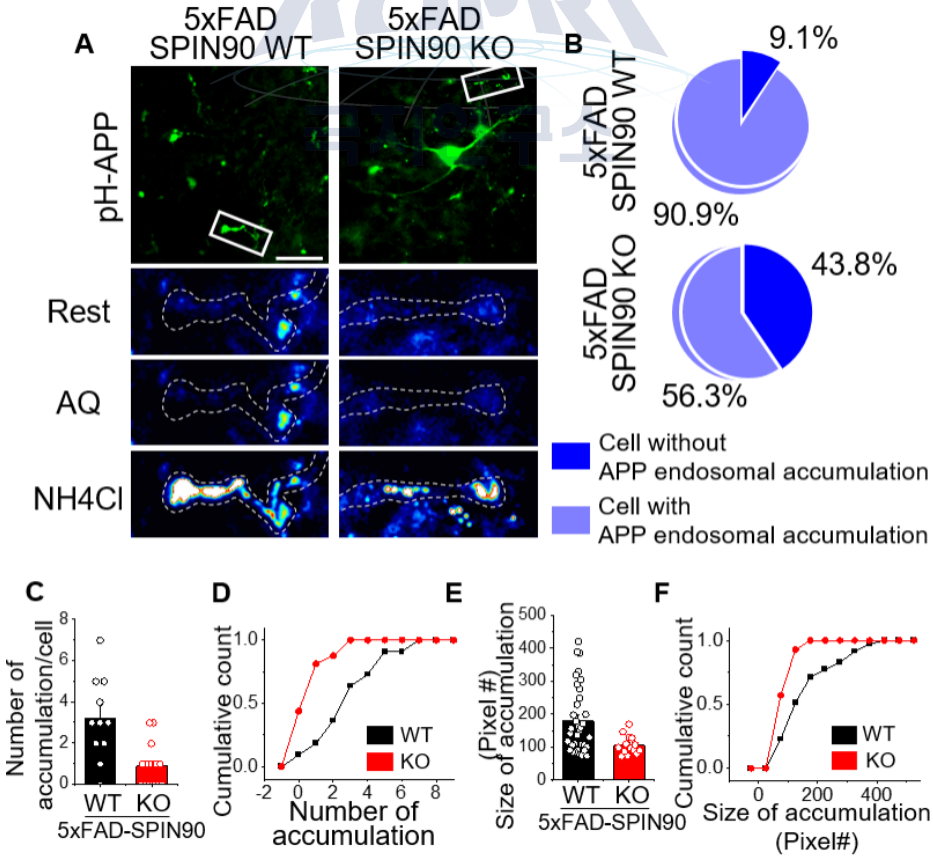
[그림 2-589. 치매 모델 쥐에서 SPIN90에 의해
신경활성동안 세포막에 위치한 APP 양 변화 확인]

5) 다음으로 SPIN90이 APP의 이동을 조절하는지 확인하기 위해서 정상 신경세포에 SPIN90과 APP를 발현하여 같은 위치에 존재하는지 확인 후, 치매 모델 신경세포와 SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포에서 축삭을 따라 이동하는 APP를 관찰함. 첫 번째로, 정상 신경세포에서 SPIN90과 APP가 같이 위치하고 함께 이동하는 것을 확인함. 두 번째로, SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포에서 움직이지 않는 APP의 양이 많았고, 시냅스 말단에서 세포체로 이동하는 APP의 양이 치매 모델 신경세포보다 많았음. 이는 SPIN90이 축삭을 따라 이동하는 APP를 조절함을 알 수 있음



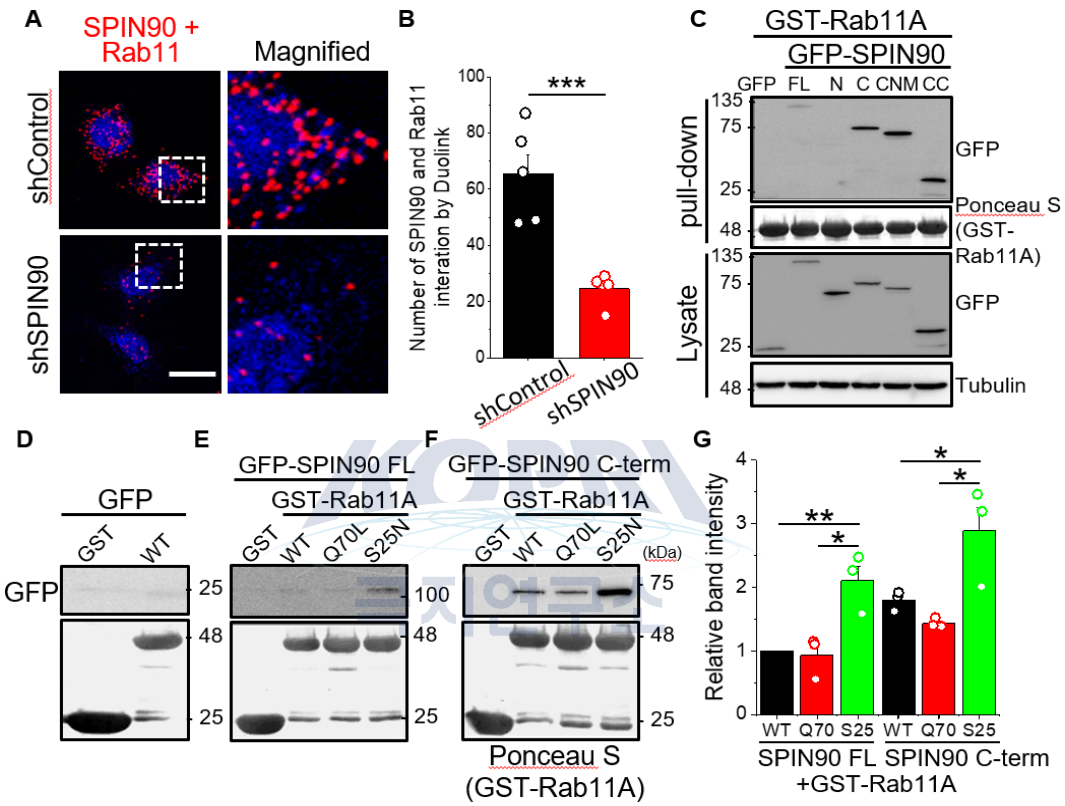
[그림 2-590. 치매 모델 쥐에서 SPIN90에 의한 축삭에서 APP 이동 조절 확인]

6) 다음으로 SPIN90이 APP의 축적을 조절하는지 확인하기 위해서 치매 모델 신경세포와 SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포의 축삭에서 APP 양을 측정함. 그 결과, SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포에서 APP의 축적이 감소함을 확인함. 이는 SPIN90이 APP 이동을 조절함으로써 축삭에 APP 축적에 영향을 줄 수 있음을 알 수 있음



[그림 2-591. 치매 모델 마우스에서 SPIN90에 의한 축삭에서의 APP 축적 양 확인]

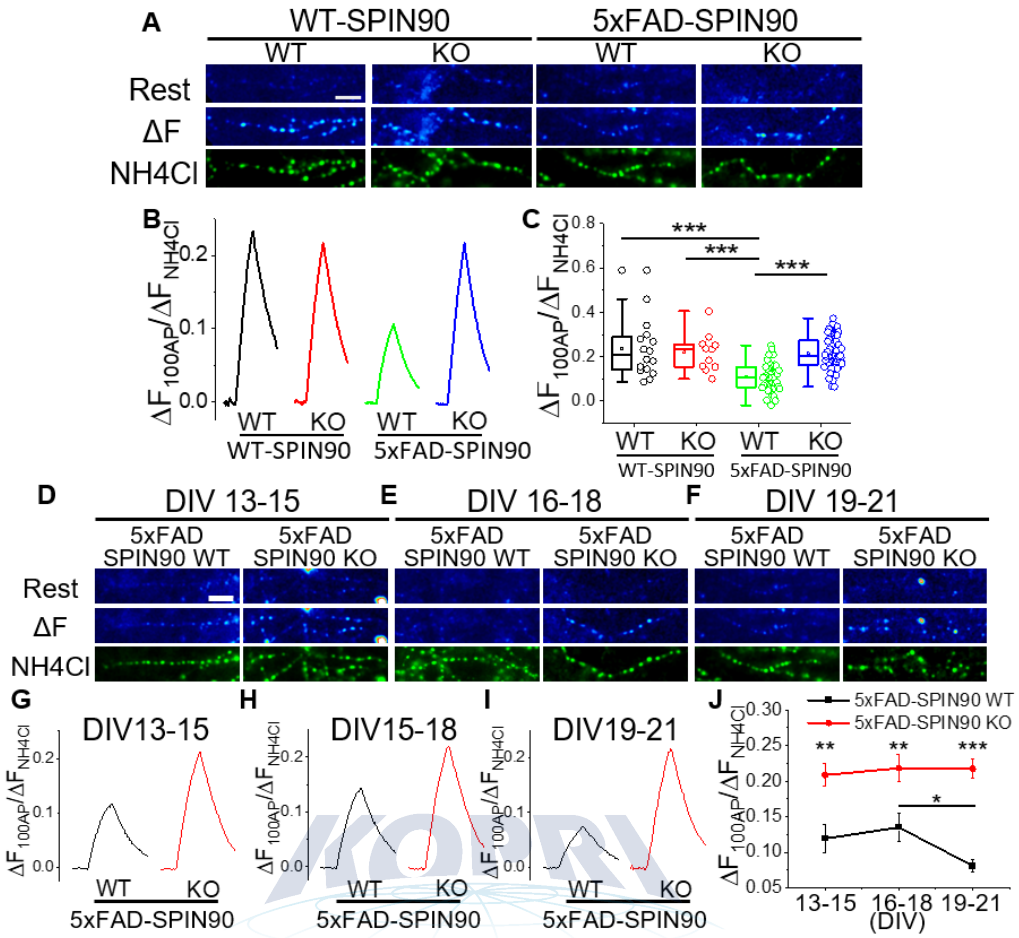
7) Rab11A은 리사이클링 엔도솜에 위치하여 세포막 이동을 조절하는 단백질로 알려짐. 연구 결과, APP는 SPIN90에 의해 리사이클링 과정이 조절되는 것으로 확인되었으므로, SPIN90의 APP 이동 조절 메커니즘을 자세히 규명하기 위해 Rab11A와 SPIN90의 상호 작용을 확인함. 이를 위해, GST-Rab11A 단백질을 정제하고 GFP-SPIN90을 발현한 HeLa 세포를 용해한 후, 정제한 GST-Rab11A 단백질과 세포 용해액을 섞어 SPIN90과 Rab11A와의 상호 작용을 확인함. 그 결과, SPIN90과 Rab11A가 상호 작용 하는 것을 확인함



[그림 2-592. SPIN90과 Rab11A의 상호작용 확인]

8) 치매 모델 신경세포와 SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포에서 시냅스의 기능을 모니터링 할 수 있는 센서를 발현시킨 후, 시냅스 기능 저하를 확인하였음

9) 정상 신경세포, SPIN90이 없는 정상 신경세포, 치매 모델 신경세포와 SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포 각각에 신경활성 (100 action potential:100AP)을 주고 시냅스 트랜스미션을 확인함. 첫 번째로, 치매 모델 신경세포가 정상 신경세포보다 시냅스 트랜스미션이 감소함. 두 번째로, SPIN90이 없는 치매 모델 신경세포는 정상 신경세포만큼 시냅스 트랜스미션이 회복되었음. 이는 SPIN90이 APP 이동 조절을 통하여 시냅스 기능에 영향을 줄 수 있음을 시사함



[그림 2-593. SPIN90의 시냅스 기능 영향 확인]

KORRY 금지연구소

□ 연구내용 2-15. 라말린 및 라말린 유도체의 생체 내 표적 예측

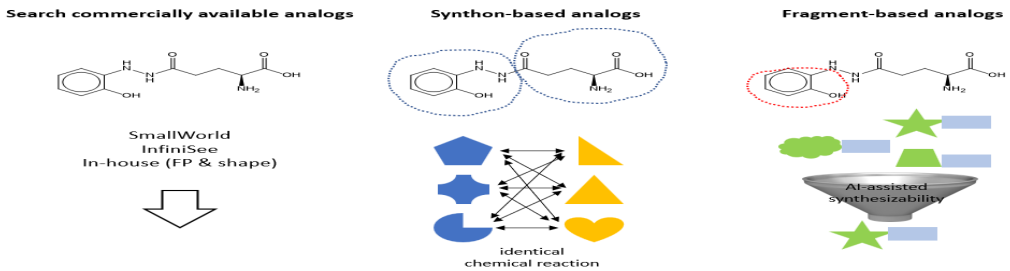
○ Make-on-demand 라말린 유도체 설계 연구

1) 활성 저분자 물질의 유도체를 만들어 활성을 증가시키고 독성을 줄이고 약제학적인 파라미터를 개선하는 작업은 저분자 물질 신약 개발에서 필수 불가결함. 의약화학자가 유도체를 만드는 일은 활성 조절 및 합성 가능 여부를 동시에 고려해야 하고 결과를 다시 피드백해야 하는 많은 시간이 필요한 단계임

2) 최근에는 현재 존재하지는 않으나 주문으로 쉽게 (5주 정도의 시간에 80% 이상의 성공률) 만들 수 있는 make-on-demand 라이브러리가 등장하여 다양한 유도체 확보에 도움을 주고 있음

3) Make-on-demand 화합물 라이브러리는 building block을 retrosynthesis의 기본인 synthon으로 나누고 synthon을 연결하여 만든 화합물 집합임. 예를 들어 1000개의 building block을 100개의 단일 화학반응으로 이론적으로는 최대 1억개 (=1000x1000x100)의 화합물을 만들 수 있음. Building block이 늘어나고 화학반응이 늘어나면 천문학적으로 화합물의 개수가 늘어남. 실제 Enamine, Otava, WuXi 등이 다양한 골격을 가진 수십~수백억 개 이상의 make-on-demand 화합물리스트를 제공하고 있음. 예를 들어 Enamine REAL화합물은 55억개의 drug-like 화합물 (MW≤500, cLogP≤5) 리스트를 제공함

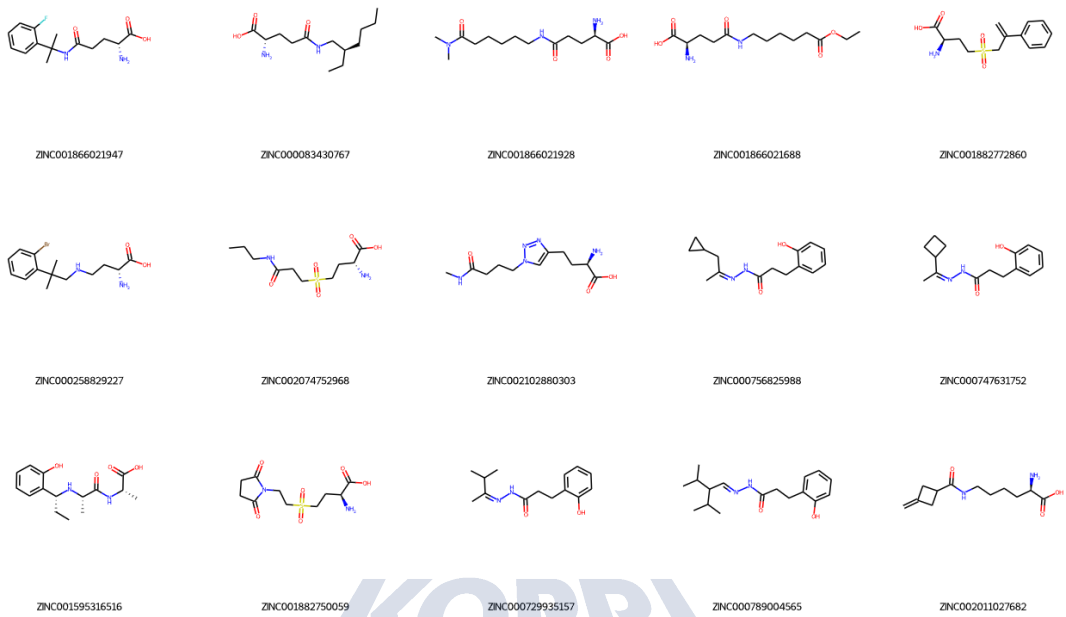
4) 본 연구자는, (가). 수십억 개의 ultra-large make-on-demand 라이브러리를 효과적으로 탐색하는 방법, (나). 자체적으로 make-on-demand 라이브러리를 구축할 수 있는 방법, (다). (나)를 확장하여 화합물의 특정 부위만을 변화시킨 합성 가능한 라이브러리 구축법을 연구하고 있음. 본 과제에서는 본 연구자가 개발하고 있는 방법을 활용하여, (1) 상업적으로 구매 가능한 Enamine의 make-on-demand 라이브러리 중 라말린 analogs를 탐색 제안하고, (2) hydrazine synthon기반 라말린 make-on-demand analogs 화합물을 생성 제안하고, (3) 라말린의 2-hydroxyphenyl 부분을 변화시킨 fragment기반 make-on-demand analogs 화합물을 생성 제안함



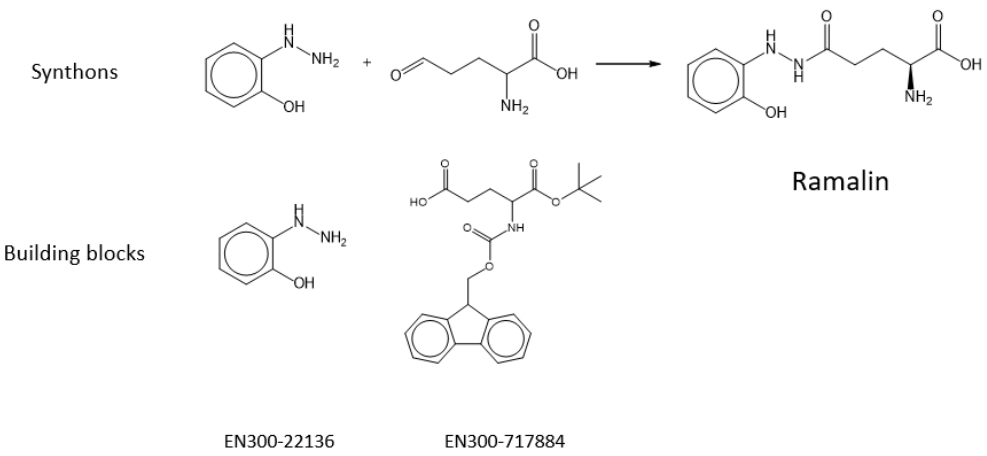
[그림 2-594. 본 연구에서 구입 또는 합성가능 analogs를 찾고 설계하기 위한 컴퓨테이션 방법]

KOPRI 극지연구소

5) (2) 합성 가능한 라말린의 make-on-demand 유도체를 설계 제안함. 상대적으로 빨리 구입 가능한 Enamine의 building block 이용하여 hydrazine을 유지가지고 있는 라말린의 유도체를 제안함. 이때 화합물 이름은 사용한 building block의 이름으로 이루어져서 합성방법을 쉽게 알 수 있음



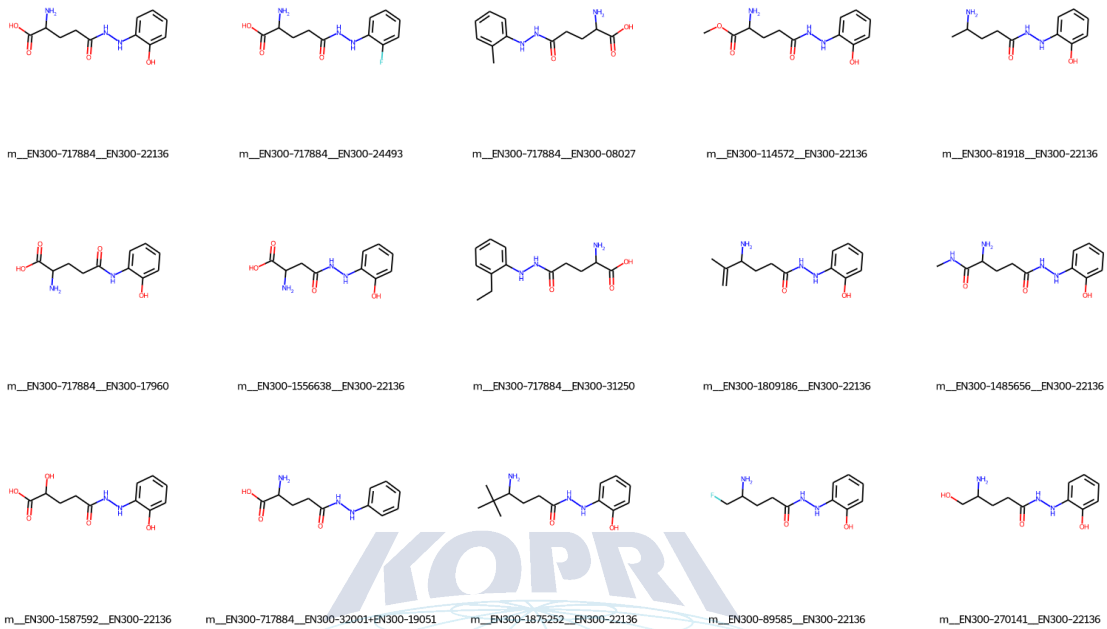
[그림 2-595. SmallWorld로 탐색한 상업적으로 구입 가능한 라말린 analogs 예]



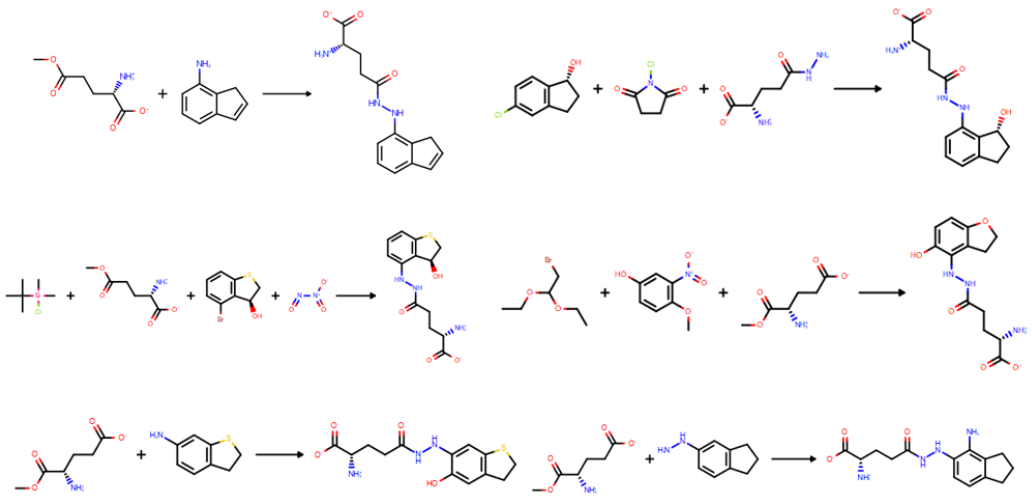
[그림 2-596. Synthon기반 building block을 활용한 retrosynthesis 예]

KOPRI 극지연구소

6) (3) 라말린의 2-hydroxyphenyl 부분만을 다른 fragment로 변화시킨 make-on-demand analogs 화합물을 생성 제안함. ChEMBL에서 유래한 6백만개 fragments 중 2-hydroxyphenyl를 치환할 수 있는 9000여개의 fragments를 선별하고 치환하여 라말린 analogs를 생성함. 이중 상업적으로 구입할 수 있는 building block을 활용한 합성가능 여부를 AI기반 계산으로 판단 최종 2200여 물질과 각 화합물의 합성법을 제안함



[그림 2-597. synthon기반 라말린 make-on-demand analogs 예]

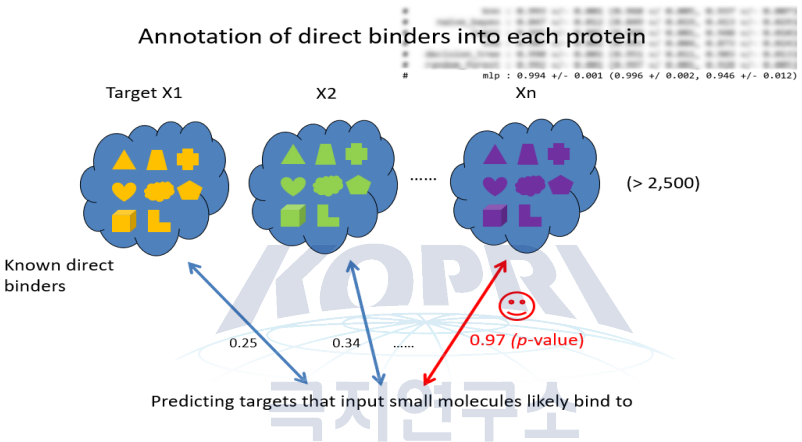


[그림 2-598. Fragment기반 라말린의 2-hydroxyphenyl 부분 치환 make-on-demand analogs 및 합성법 예]

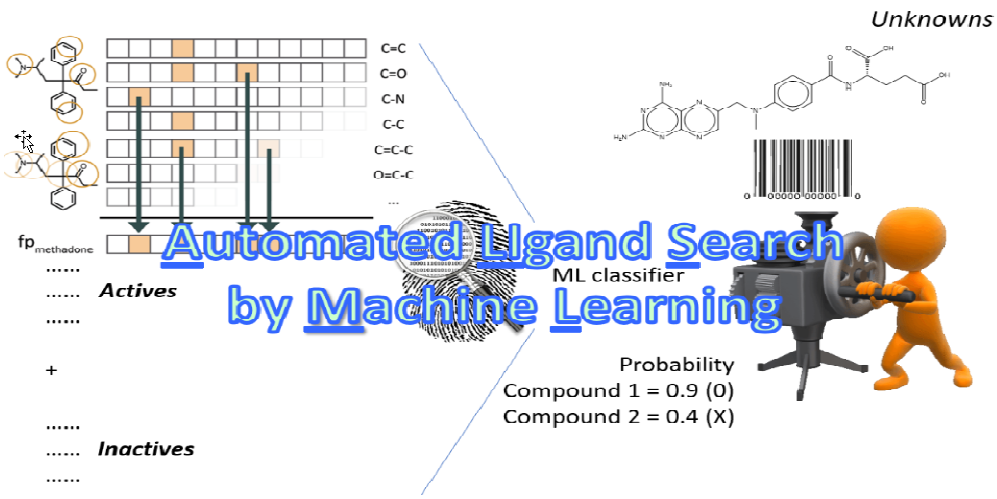
○ 화학정보학 기반 on-/off-target 예측

1) ChEMBL, BindingDB, ZINC, PDBbind의 데이터 베이스는 단백질에 직접 결합하여 단백질의 기능을 조절하는 저분자물질에 대한 정보를 제공함. 데이터양이 계속 증가하고 있음. 이를 활용하면 표적 미지의 물질 X가 결합할 것 같은 on-/off-target을 기존에 알려진 저분자물질과의 유사성을 확률적으로 비교하여 예측할 수 있음

2) 본 연구자는 2,500종 이상의 단백질 별로 직접 결합하여 기능을 조절하는 저분자물질 데이터베이스를 기구축하고 있음. 정량적 비교가 가능한 여러 화학정보학 방법 중 3가지 방법을 (Similarity Ensemble Approach, Machine learning, Ligand-shape-based approach) 자체 확립하고 있음

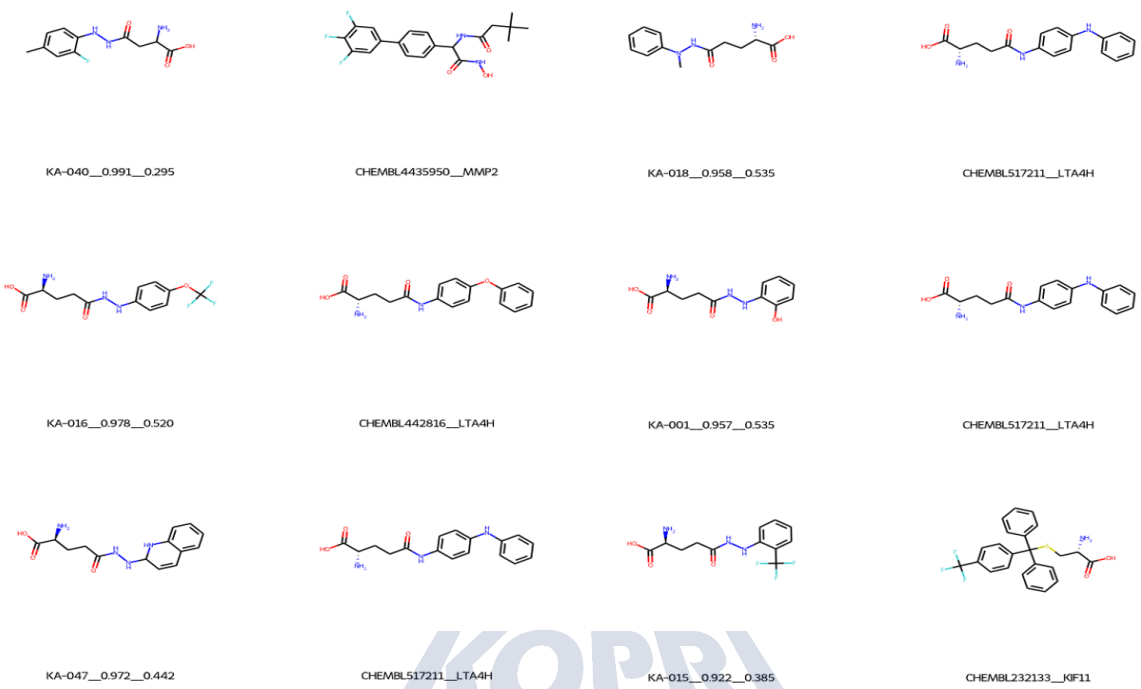


[그림 2-599. 기 구축한 단백질 선택적 저분자물질과의 비교를 통한 on-/off-target 예측 모식도]



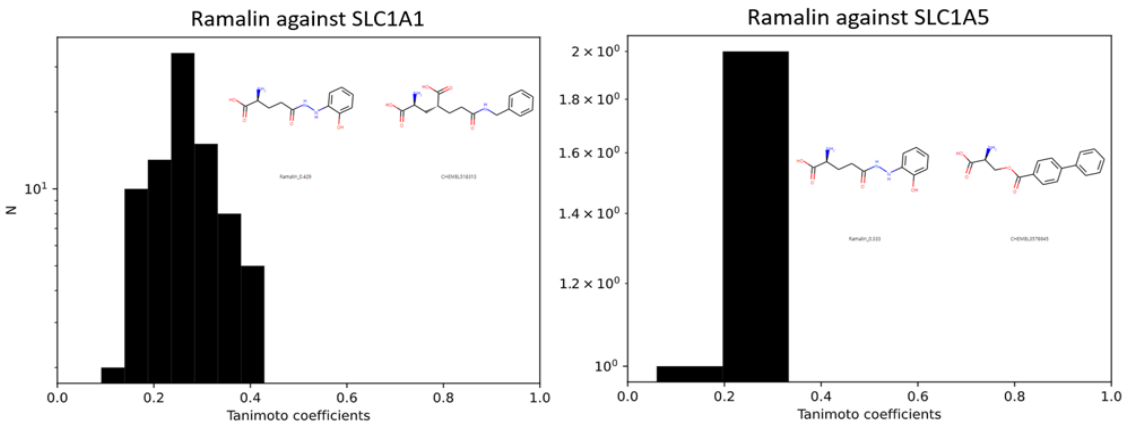
[그림 2-600. Machine learning 기반으로 미지화합물 X의 특정 단백질을 결합가능 여부를 확률적으로 예측하는 모식도]

3) 라말린과 합성한 여러 라말린 유도체의 잠재적인 on-/off-target을 예측하였음. 이중 machine learning의 결과를 비교하면 라말린 analogs의 일부가 LTA4H의 알려진 결합 저분자물질과 화학구조적 유사성을 가지고 있음을 알 수 있음



[그림 2-601. 라말린 유도체(왼쪽)와 기계학습으로 예측한 잠재적 off-target에 결합하는 가장 유사화합물(오른쪽) 예]

4) 아미노산인 라말린의 아미노산 transporter와의 결합 가능성도 similarity ensemble approach로 탐색하였음. 문헌에 알려진 SLC1A1와 SLC1A5 바인더와 라말린이 일정 정도 골격의 유사성을 가지고 있음을 확인했음



[그림 2-602. Similarity ensemble approach로 계산한 라말린과 SLC1A1와 SLC1A5의 결합 물질과의 유사성. 라말린과 가장 근접한 화합물을 같이 표시함]

□ 연구내용 2-16. 라말린 유도체-표적 단백질 복합체의 x-선 분자 구조 규명

○ 구조분석 및 저해 기전 연구를 위한 HDAC6 단백질 대량 정제

1) 1차년도에 제작한 여러 HDAC6 construct 중 위 construct는 단백질 고순도 대량 정제가 가능함을 확인하였고, 2차년도에는 이 단백질들의 정제를 진행함

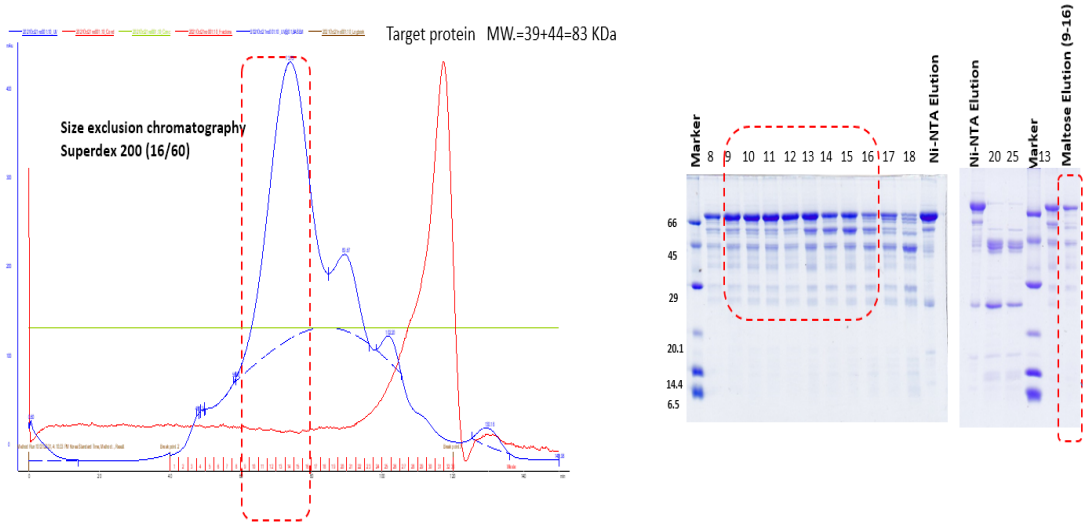
Construct No.	Gene	아미노산 서열 번호, 개수	Plasmid vector	Restriction enzyme sites	Molecular weight(KDa)	결과
1 F20B20	human HDAC6 CD2	479-835, 357 a.a	pHtMBP-EAL	BamHI/SalI	82.4	수용성 발현 및 대량정제
2 F20B20	human HDAC6 CD2 Y782F	479-835, 357 a.a	pHtMBP-EAL	BamHI/SalI	82.4	수용성 발현 및 대량정제
3 F20B20	human HDAC6 CD2	479-835, 357 a.a	pHtMBP-SA	BamHI/SalI	82.5	수용성 발현 및 대량정제
4 F12B11	human HDAC6 CD1	81-454 374 a.a.	pHtMBP-EAL	EcoRI/XhoI	83.3	수용성 발현 및 대량정제

[그림 2-603. HDAC 컨스트럭트]

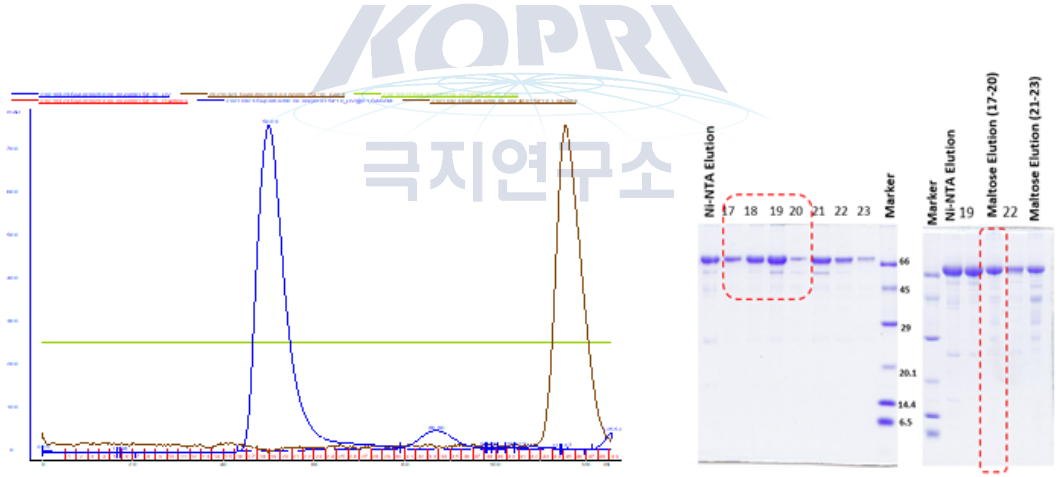
2) x-선 회절실험에 적합한 양질의 단백질 결정을 생성할 수 있도록 construct를 유전적 변형을 통해 최적화 수행함. 수용성 발현정제가 확인된 아래의 construct들을 대량 정제하고 결정화 조건을 탐색하였음. 결정화 및 구조 분석 최적화를 위해 아래 construct에 대하여 결정화, x-선 회절 실험을 진행함

pHT-MBP-SA HDAC6 CD2 479-835 LP808G [결정화
pHT-MBP-SA HDAC6 CD2 479-835 C512S [결정화
pHT-MBP-EAL HDAC6 479-835 LP808G
pHT-MBP-EAL HDAC6 CD2 479-835 C493S
pHT-MBP-EAL HDAC6 CD2 479-835 C512S [결정화, 3Å회절

3) MBP-HDAC6 CD1과 CD2에 대하여 크기가 0.05 mm 정도의 tetragonal crystal을 얻었고, 포항가속기연구소에서 3차 구조 규명을 위한 x-선 회절 분석 실험을 수행하였음. MBP-HDAC6 CD1은 결정의 크기가 매우 작아 회절실험에 적합하지 않았고, MBP-HDAC6 CD2의 결정은 아래와 같이 3Å이상의 x-선 회절을 보여, 적합한 수준의 회절능에 근접함. 그러나 단백질 결정의 twinning 문제로 저해제 복합체의 구조 규명은 성공하지 못하였음



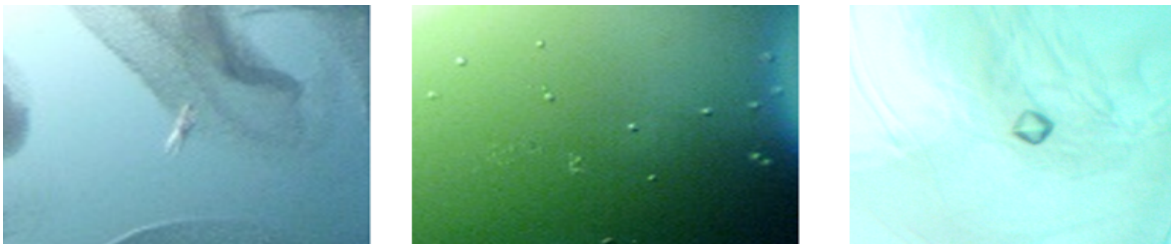
[그림 2-604. pHT-MBP-SA HDAC6 CD2 C512S의 정제과정. (좌) Size exclusion chromatography profile. Homogeneous한 단백질 샘플peak를 확인함. (우) SDS-PAGE로 단백질의 순도를 확인함]



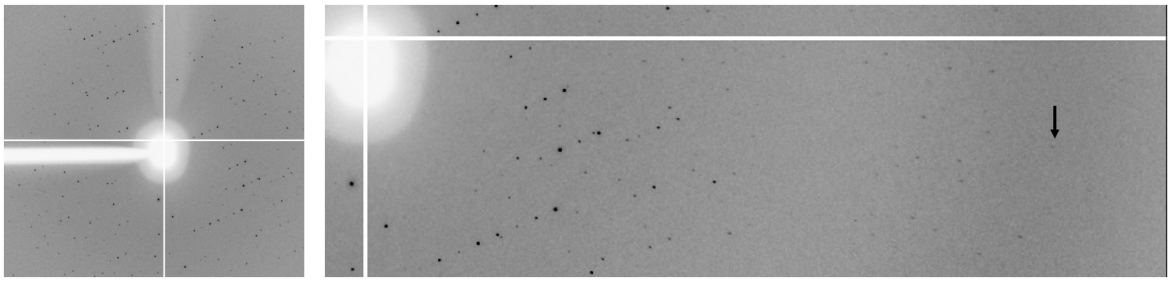
KOPRI 극지연구소

[그림 2-605. pHT-MBP-SA HDAC6 CD2 479-835 LP808G의 정제과정.(좌) Size exclusion chromatography profile. Homogeneous한 단백질 샘플을 single peak로 확인함.(우) SDS-PAGE로 단백질의 순도를 확인함]

4) 현재 구조 분석에 적합한 결정을 얻기 위해 construct의 최적화 과정을 다시 진행하고 있음. 2차년도에 계획하였던 연구내용을 수행하였으나, 목표하였던 구조규명 성과를 달성하지는 못하였음. 세부 목표 달성에 지연이 있으나, construct 최적화 과정을 계속 진행하고 있으므로 차년도에는 성과를 보일 수 있을 것으로 예상함



[그림 2-606. HDAC6 단백질 결정화.(좌) MBP-SA-HDAC6 CD2 F20B20 C512S,(중) MBP-SA-HDAC6 CD2 F20B20 LP808G.(우) MBP-EAL HDAC6 CD2 C512S 결정]

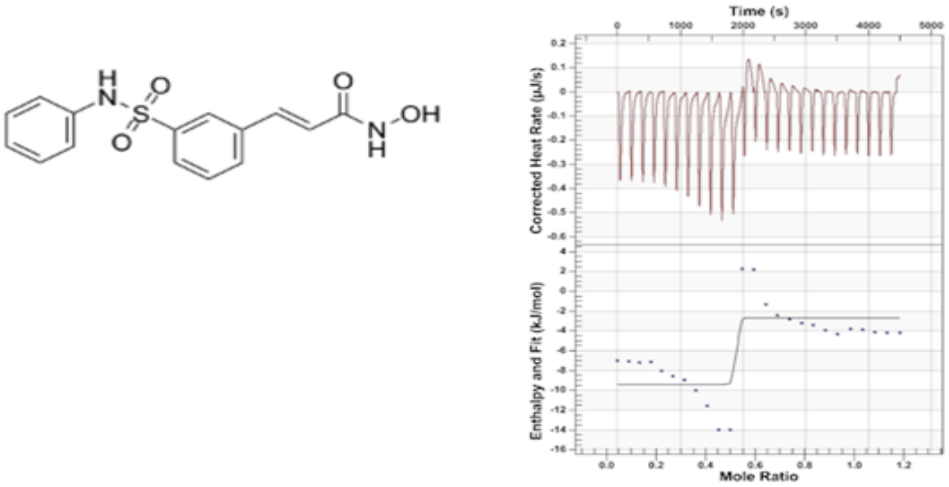


[그림 2-607. MBP-EAL-HDAC6 CD2 F20B20 C512S의 x-선 회절사진. 3Å 이상의 회절능을 보임. twinning문제를 construct redesign으로 해결하면 구조규명이 가능할 것으로 예상함]

5) 또한, 결정 및 단백질의 성질개선을 위한 CD1 CD2 domain interface의 돌연변이체 제작을 하였고, MBP-tag이 없는 CD1, CD2 각각의 수용성 발현을 시도하였으나, 수용성 개선에 효과는 없었음

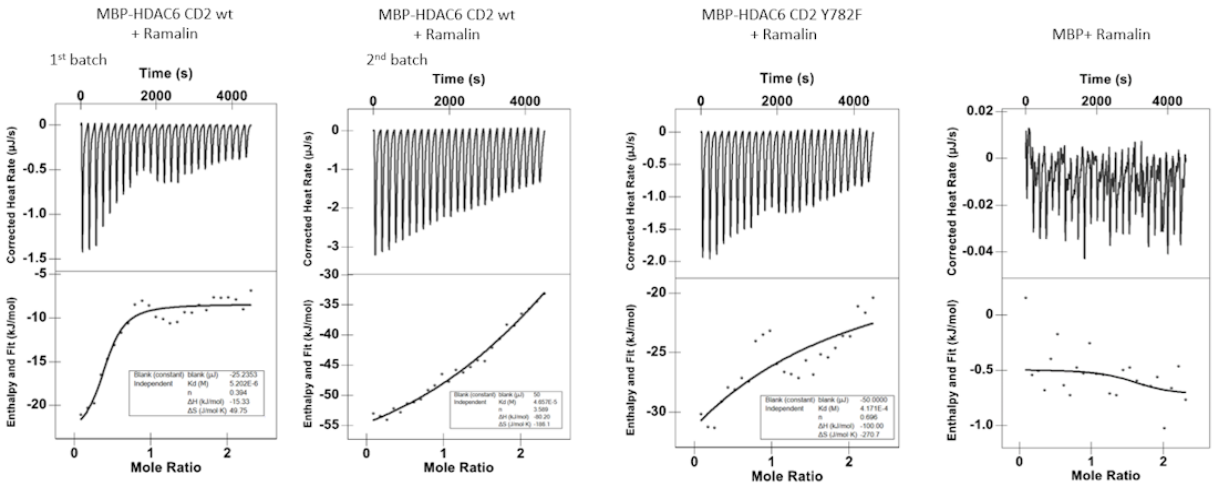
]HDAC6-CD1_L324E, HDAC6-CD1_L332E, HDAC6-CD1_L369R
]HDAC6-CD1 double mutant L324E/L369R or L324E/L332E
]HDAC6-CD2 L599S,]HDAC6-CD2 Y728E, HDAC6-CD2 L765E
]HDAC6-CD2 double mutant L599S/Y728E, or L599S/L765E

6) ITC를 이용한 리간드 표적 상호작용 정량적 분석을 진행함. 라말린은 HDAC6 deacetylase 활성 저해시험을 통해 초기 lead compound로서의 가능성이 확인되었고, 본 세부 과제에서는 ITC (Isothermal Titration Calorimetry)를 통하여 라말린의 표적 결합능 (Kd)를 확인하고자 하였음. 활성저해 실험으로 확인된 다양한 유도체들의 결합저해 활성을 ITC 분석을 통하여 정량적으로 검증하고자 하였음



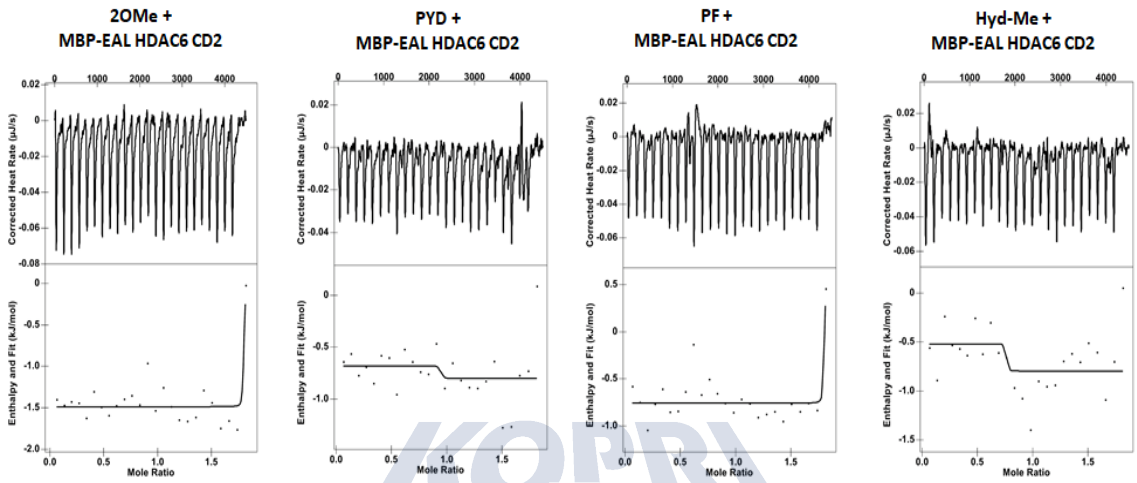
[그림 2-608. 양성대조군으로 기 알려진 HDAC6 저해제인 Belinostat과의 MBP-HDAC6 CD2의 결합 분석. 중간에 sharp한 titration을 보임으로 강한 결합력(sub-microM 이하 Kd)을 가진 것으로 확인함]

7) 라말린은 아래의 실험과 같이 HDAC6 CD2에 대하여 수 micromolar Kd를 가진 것을 보임. 이 결과는 타 세부과제에서 확인된 HDAC6 효소의 저해 활성과 일관된 결과를 보임. 그러나 기존에 HDAC6의 선택적 저해제로 개발된 Reference 저해제 (Belinostat)에 비해서 결합력이 낮음. 라말린 자체는 HDAC6 저해 lead compound로서 가능성이 있으나, 저해활성이 개선된 라말린 유도체들의 개발이 필요함을 확인함. 라말린이 활성부위 Y782F 돌연변이체에도 결합능을 보이므로, hydroxyamide를 기본골격으로 활성부위 Zn^{2+} 이온과 결합하는 기존의 HDAC6 specific inhibitors와는 다른 방식의 결합 기전을 가질 수도 있음



[그림 2-609. ITC를 이용한 라말린과 HDAC6 결함시험. Syringe: 라말린 1.5mM, Cell: 0.1 mM HT-MBP-EAL HDAC CD2 WT 또는 Y782F. 음성 대조군인 MBP와는 라말린이 결합하지 않음(우)]

8) 4종의 라말린 유도체 (2OMe, PYD, PF, Hyd-Me)에 대하여 HDAC6 CD2에 대한 결합 활성을 ITC로 시험함. 라말린 유도체들은 아래의 실험조건 하에서 유의미한 결합능을 보이지 않음. ITC 실험으로는 유도체들이 HDAC6에 대하여 결합능을 보이지 않아 HDAC6 특이적 저해제로의 추가 증거를 제공하지 못하였으나, ITC의 negative data는 다양한 원인 (ITC 측정 조건에서의 단백질의 비활성, 낮은 Kd로 인한 단백질 농도 부족, 비최적인 buffer 조건등)으로 발생할 수 있으므로, 라말린 유도체들의 HDAC6 저해 활성 자체를 부정하지는 않음



[그림 2-610. ITC를 이용한 라말린유도체와 HDAC6 결합시험. Syringe: 라말린 derivative 1.0mM, Cell: 0.1 mM HT-MBP-EAL HDAC CD2 WT]

□ 연구내용 2-17. 후보약물의 작용기전 규명

○ 신경세포 기반 작용기전 규명

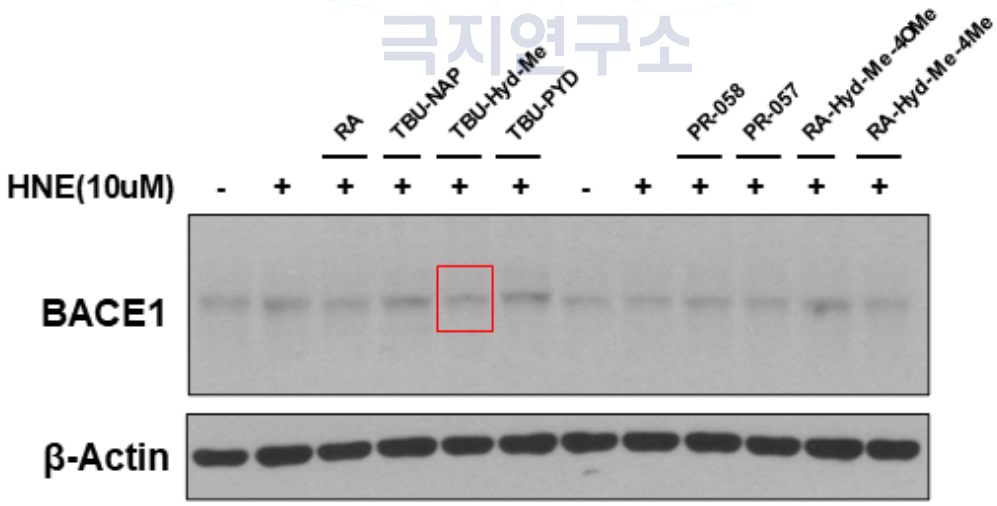
1) Mouse neuroblastoma cell line (N2a) 또는 Human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y)를 이용하여 후보물질들의 약물기작을 확인했음(그림 2-611~620)

2) N2a에 라말린 유도체 10 μM을 24 시간 처리한 후 HNE 10 μM을 처리하여 BACE1 단백질 발현량 변화를 관측함. 그 결과, RA-PR058, RA-PR061, RA-PR064, RA-PR066, RA-PR068, RA-PR069, RA-PR070, RA-PR072, RA-PR074, RA-PR075, RA-PR076, TBU-Hyd-Me, TBU-PF에 의해 BACE1 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었음

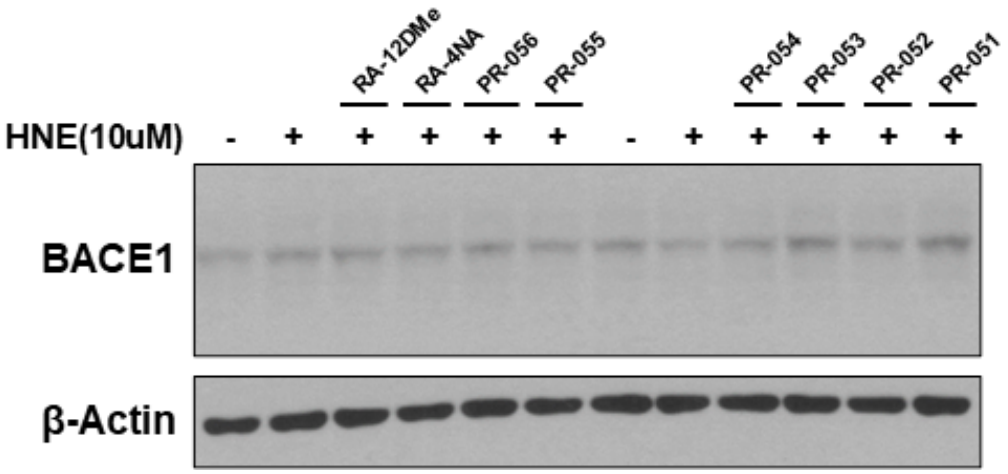
3) SH-SY5Y에 라말린 유도체 20 μM을 24시간 처리한 후 BACE1 단백질 발현량 변화를 관찰했을 때, TBU-Hyd-Me에 의해 BACE1의 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었음

4) 라말린 유도체 20 μM을 24시간 처리한 후 HNE 10 μM을 처리하여 BACE1 단백질 발현량을 관측했을 때, RA-S-Cabz, TBU-2OMe, RA-PR071, RA-PR058, RA-PR076, RA-PR075, TBU-HM-2OH, RA-HM-2OH, RA-058HM에 의해 BACE1의 발현량이 감소한 것을 확인했음

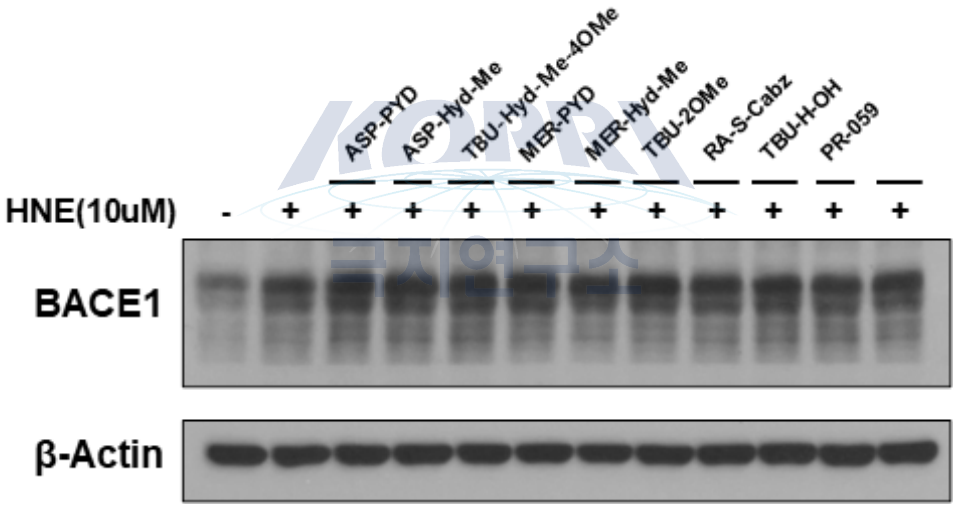
KBRI 극지연구소



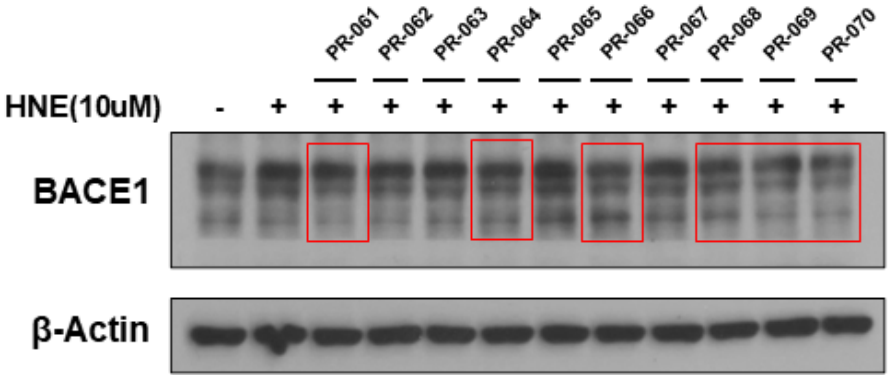
[그림 2-611. N2a에서 후보 약물 효과 확인 1]



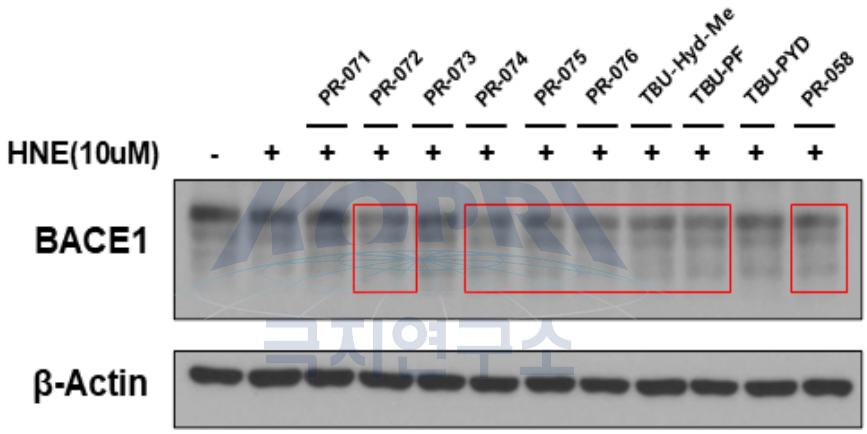
[그림 2-612. N2a에서 후보 약물 효과 확인 2]



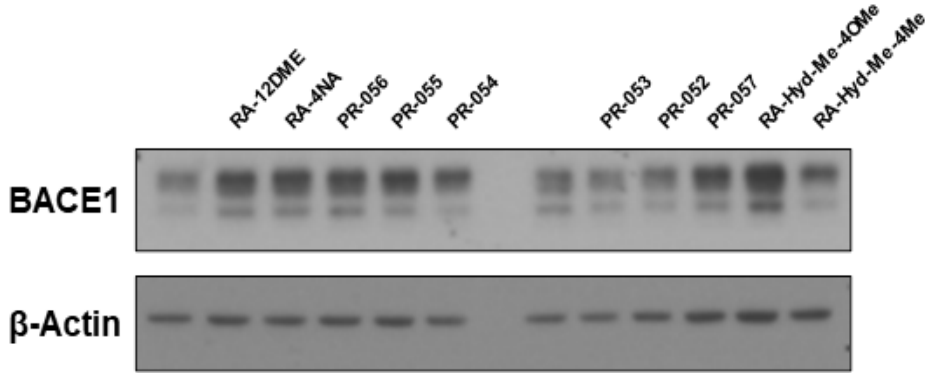
[그림 2-613. N2a에서 후보 약물 효과 확인 3]



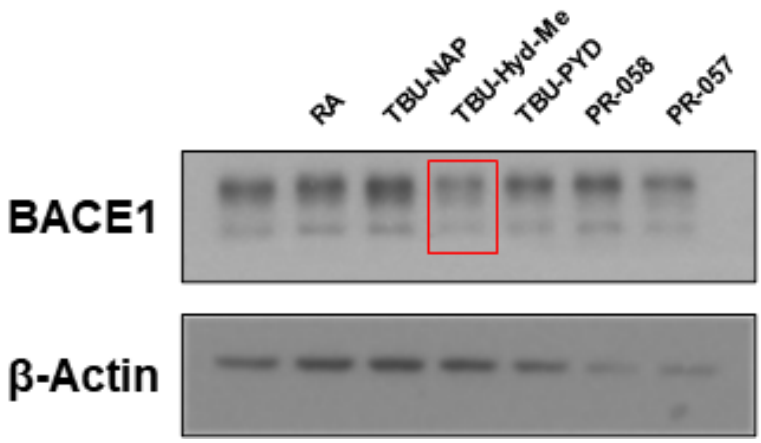
[그림 2-614. N2a에서 후보 약물 효과 확인 4]



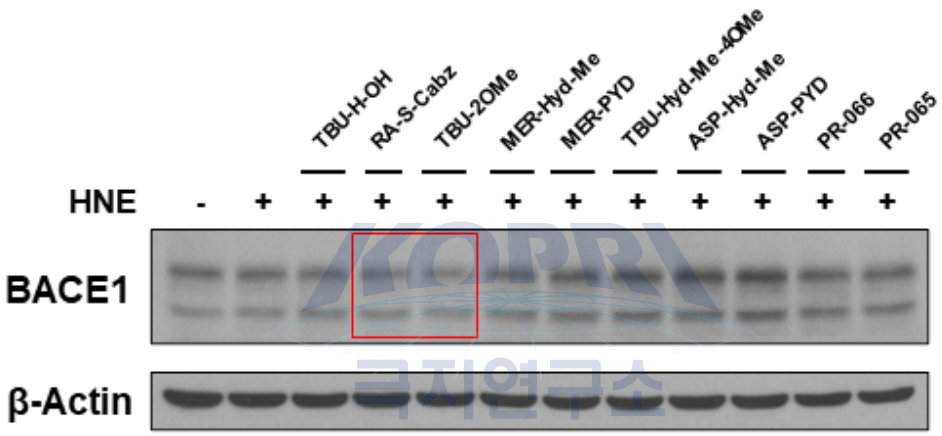
[그림 2-615. N2a에서 후보 약물 효과 확인 5]



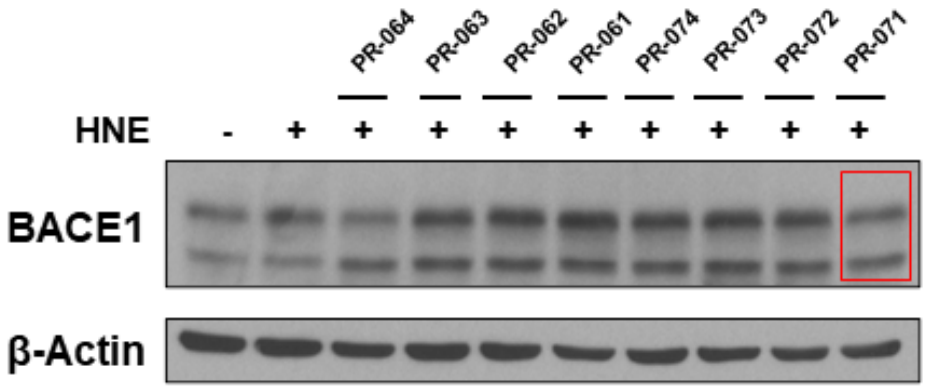
[그림 2-616. SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 1]



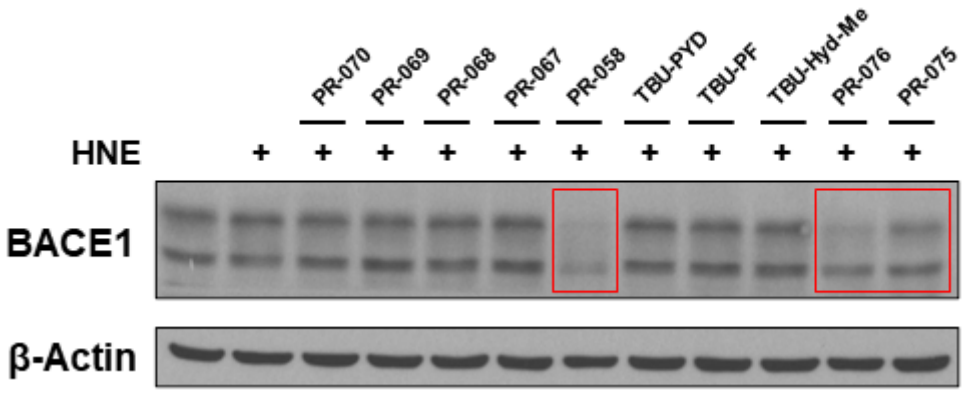
[그림 2-617. SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 2]



[그림 2-618. SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 3]



[그림 2-619. SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 4]



[그림 2-620. SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 5]

5) 아밀로이드 베타 생성기작에 관련된 BACE1의 발현량 변화 외에도 Tau-BiFC SH-SY5Y 세포주를 통해 후보물질들의 Tau 응집 조절 능력을 관측함(그림 2-621~636)

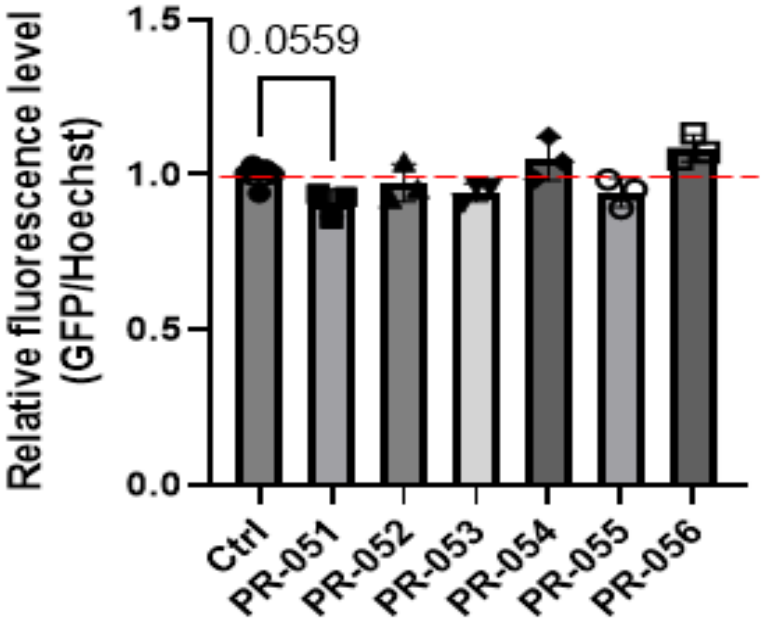
6) 라말린 유도체 20 μM을 24 시간 처리한 후 Hoechst 2 μM으로 핵을 염색한 뒤 Cytation 5을 통해 GFP를 측정함 (Ex 485 nm / Em 528 nm & Ex 361 nm / Em 486 nm). 그 결과, RA-PR058과 TBU-Hyd-Me 약물이 반복적으로 Relative fluorescence level을 대조군 대비 감소시키는 경향을 보였으며, 이는 해당 약물들이 Tau의 응집을 감소시킬 수 있음을 시사함

KBRI 극지연구소

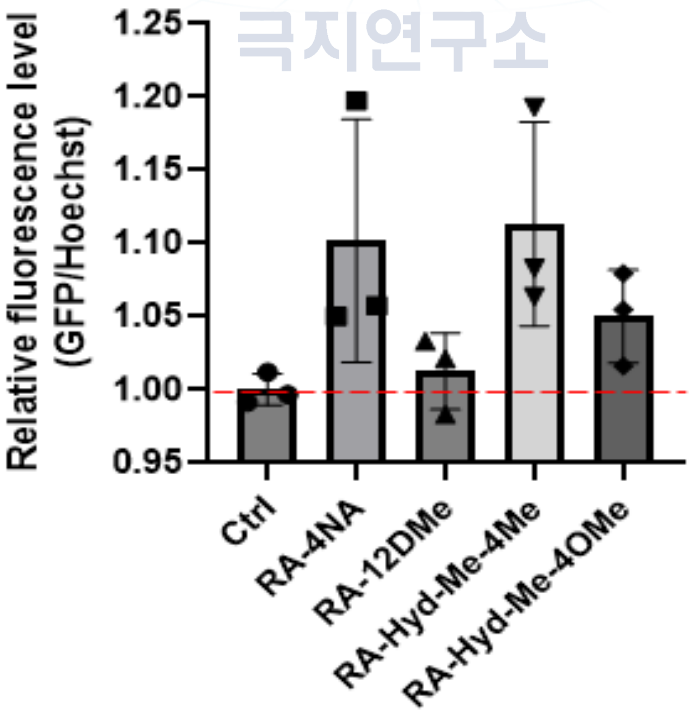
7) 이외에도 TBU-2OMe, RA-PR065, RA-PR067이 Relative fluorescence level을 대조군 대비 감소시키는 경향을 보였음

8) 4번의 반복 실험이 이뤄진 약물에 대해 분석을 진행했을 때, RA-PR053, RA-PR054, RA-PR058, TBU-Hyd-Me 약물이 대조군 대비 Tau의 응집을 감소시키는 경향을 보였으나 유의하지는 않았음

9) 후보물질 중 RA-058HM이 Tau의 응집을 조절할 수 있는지를 확인함. RA-058HM 10 μM, 20 μM을 Tau-BiFC SH-SY5Y에 24시간 처리 후 Hoechst 2 μM으로 핵을 염색하여 Cytation 5를 이용하여 GFP를 측정함 (Ex 485 nm / Em 528 nm & Ex 361 nm / Em 486 nm). 10 μM을 처리한 군에서 대조군 대비 10% 정도 Relative fluorescence level이 감소하는 경향을 보였음

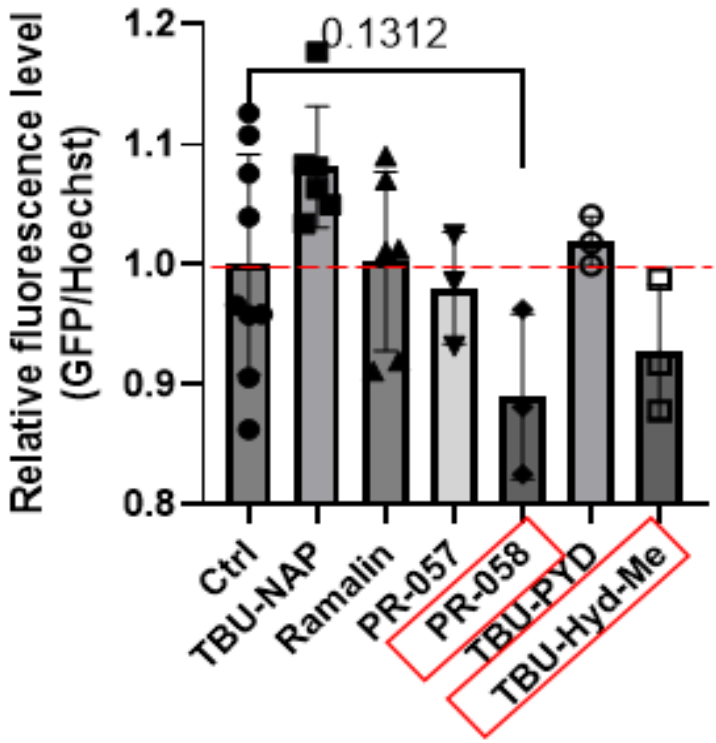


[그림 2-621. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 1]



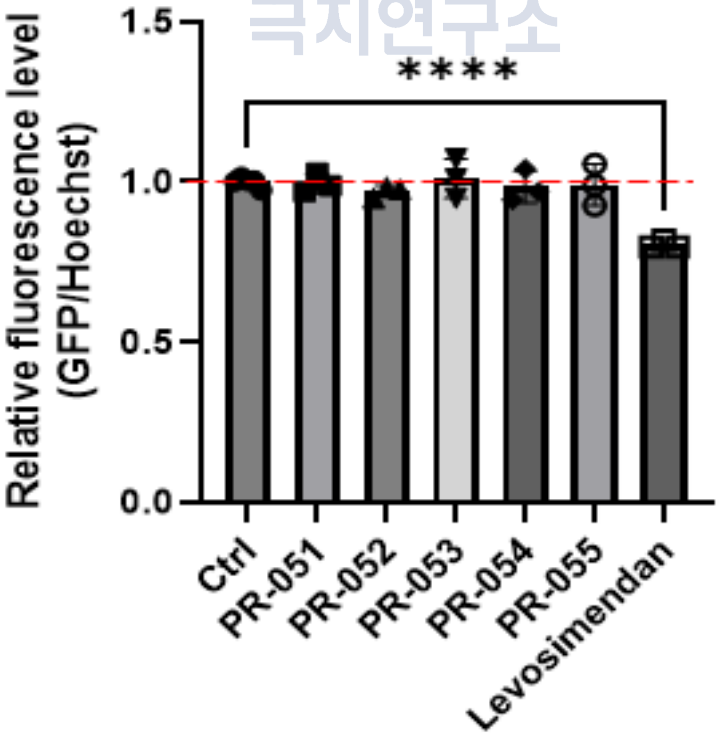
[그림 2-622. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 2]

KOPRI 극지연구소

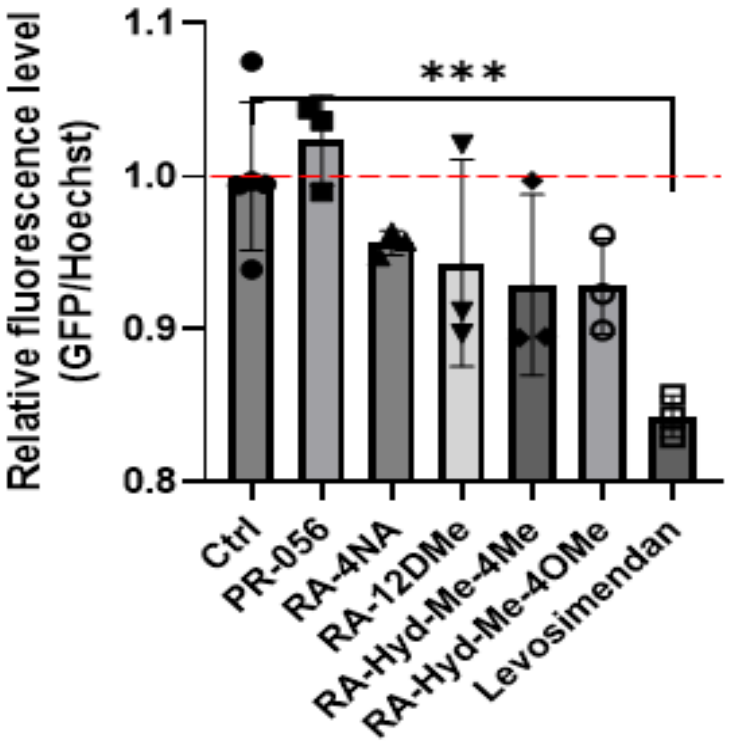


[그림 2-623. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 3]

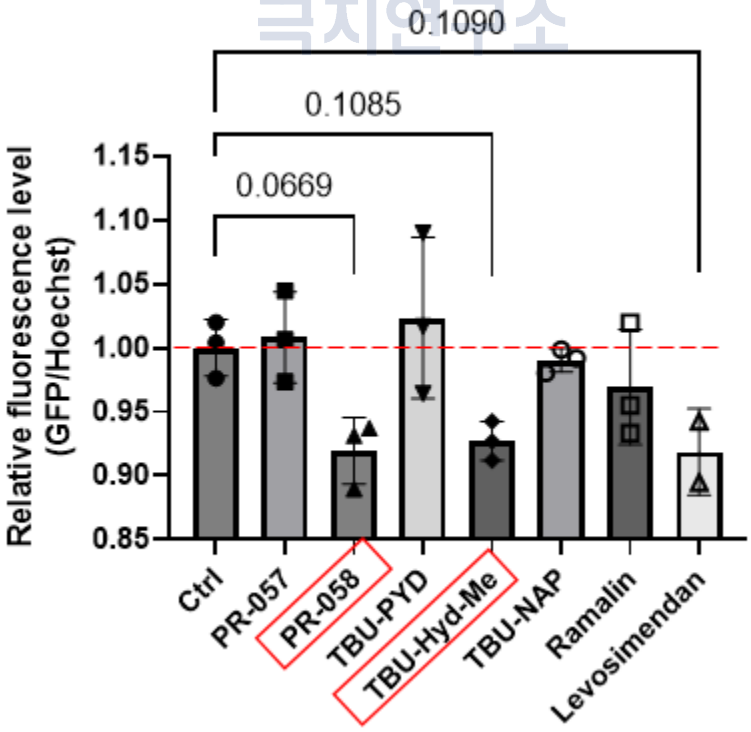
KBSRI 극지연구소



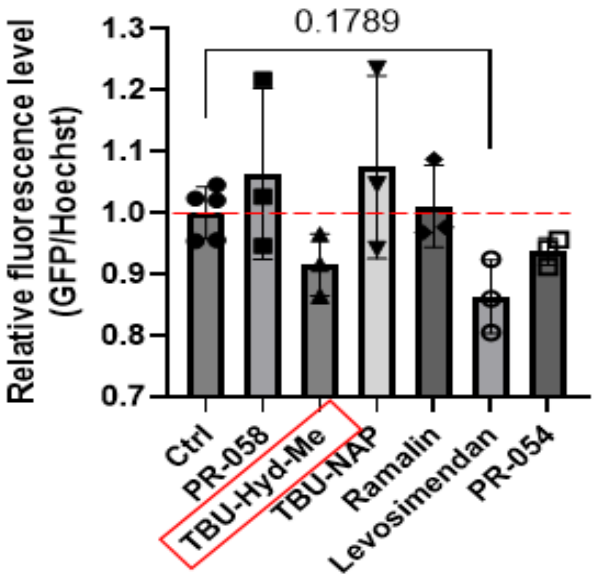
[그림 2-624. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 4]



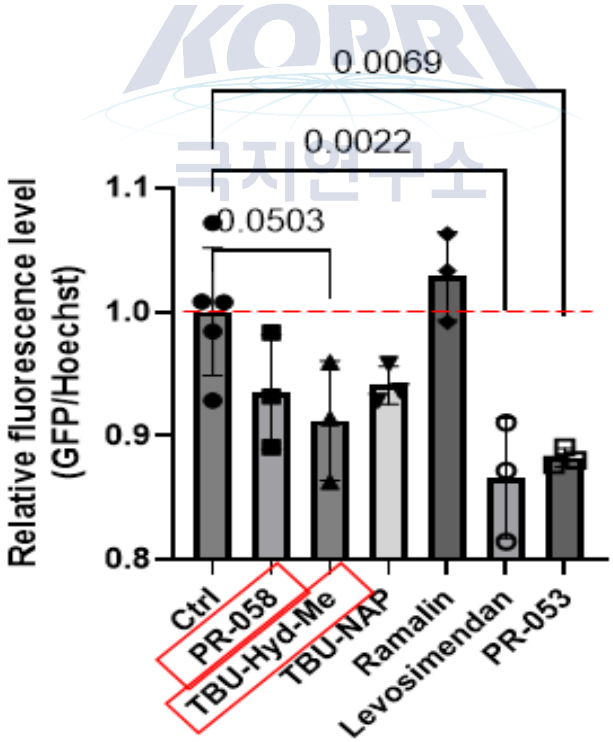
[그림 2-625. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 5]



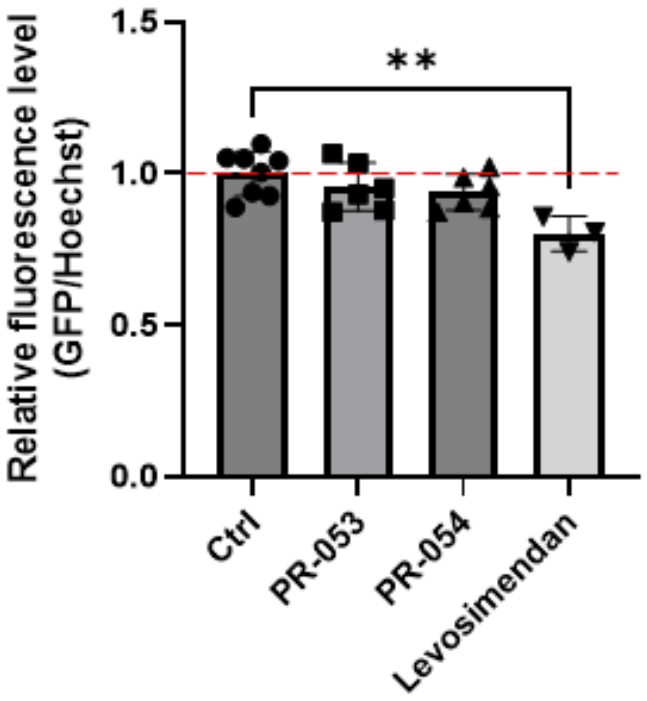
[그림 2-626. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 6]



[그림 2-627. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 7]

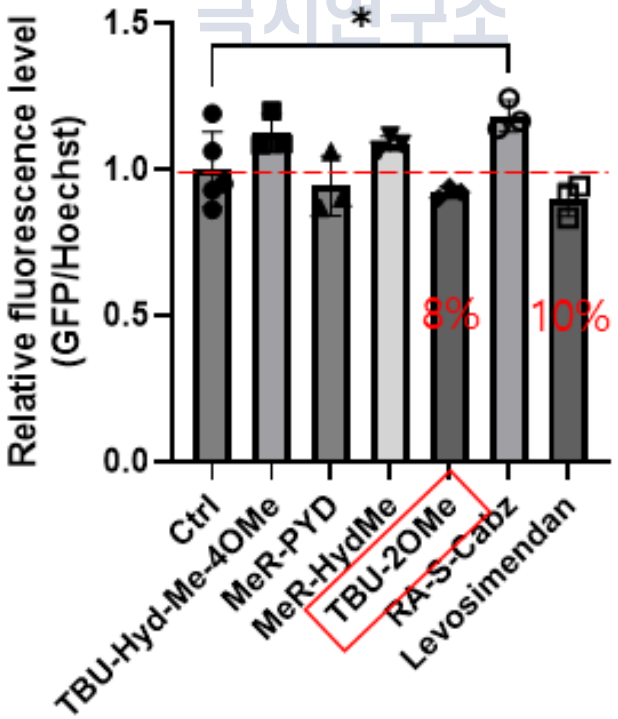


[그림 2-628. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 8]

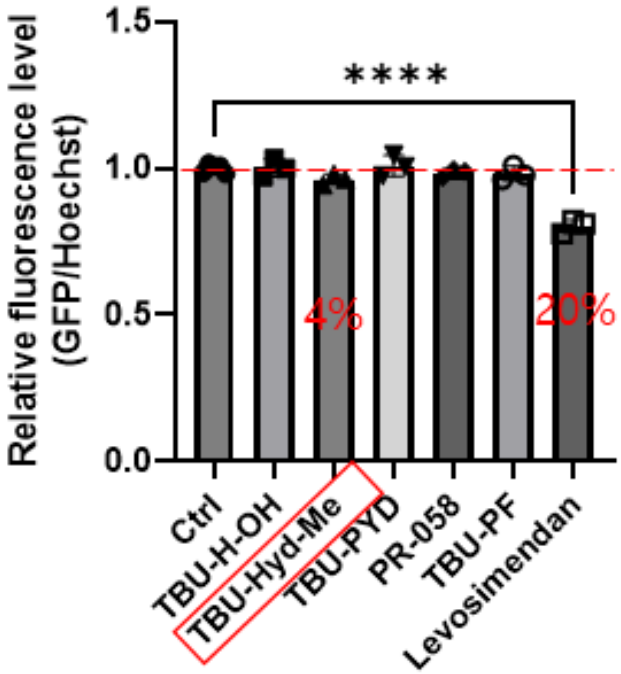


[그림 2-629. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 9]

KOPRI 극지연구소

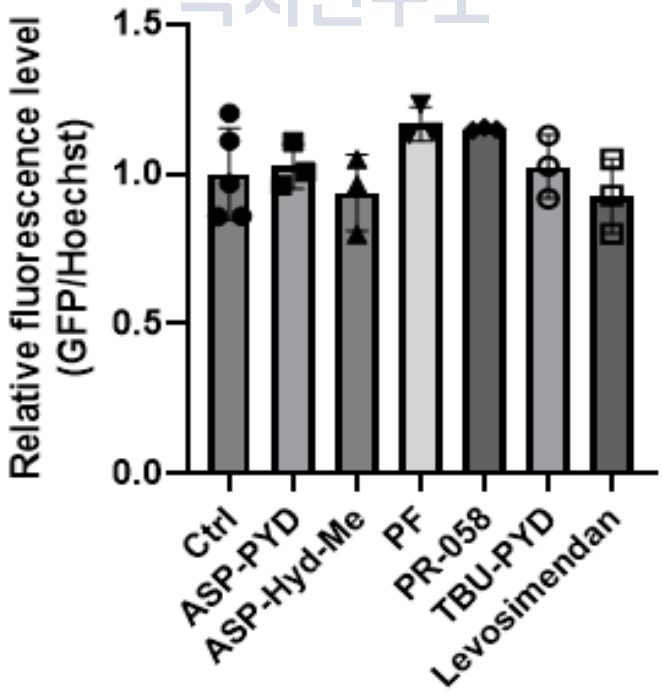


[그림 2-630. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 10]

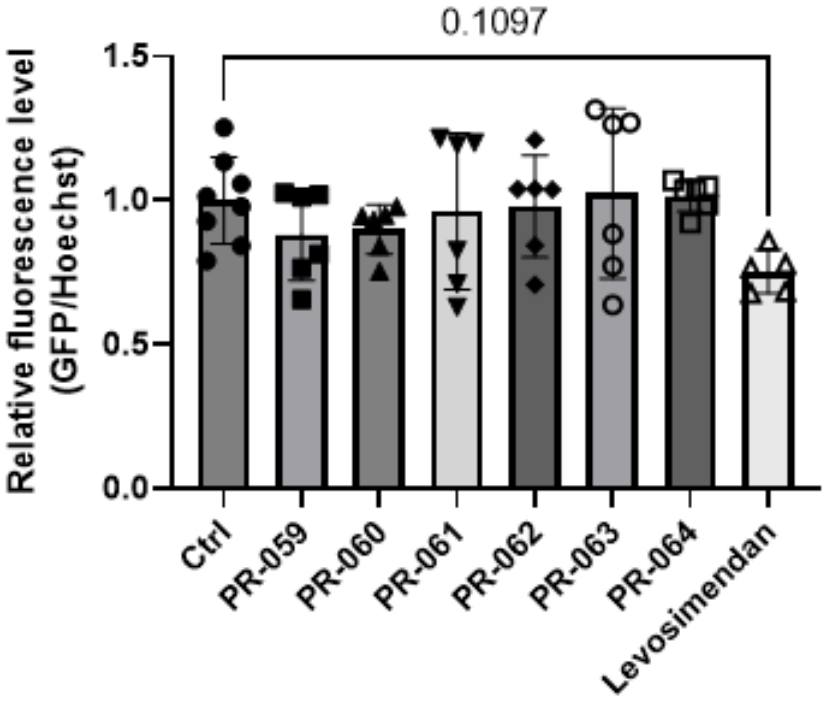


[그림 2-631. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 11]

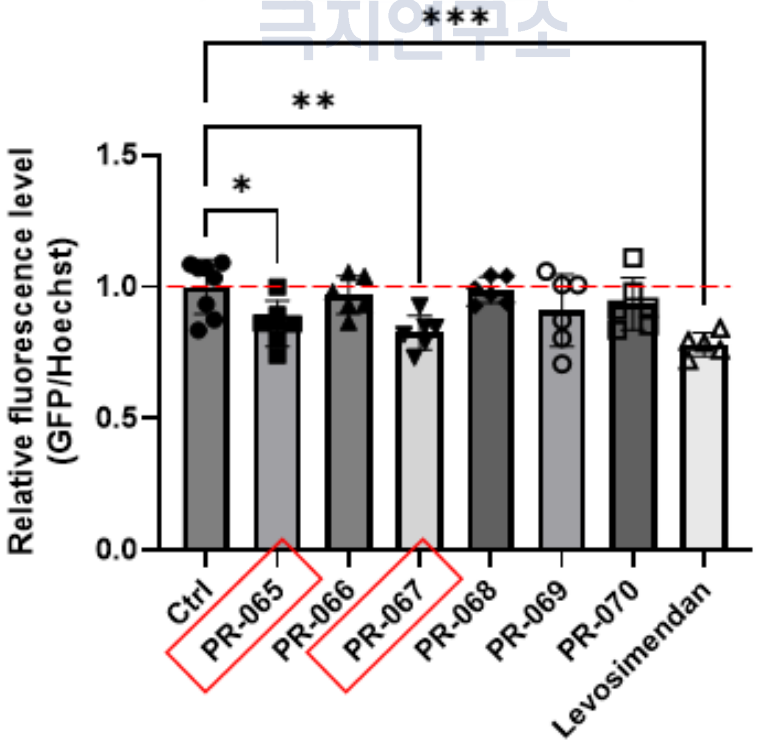
KOPRI
극지연구소



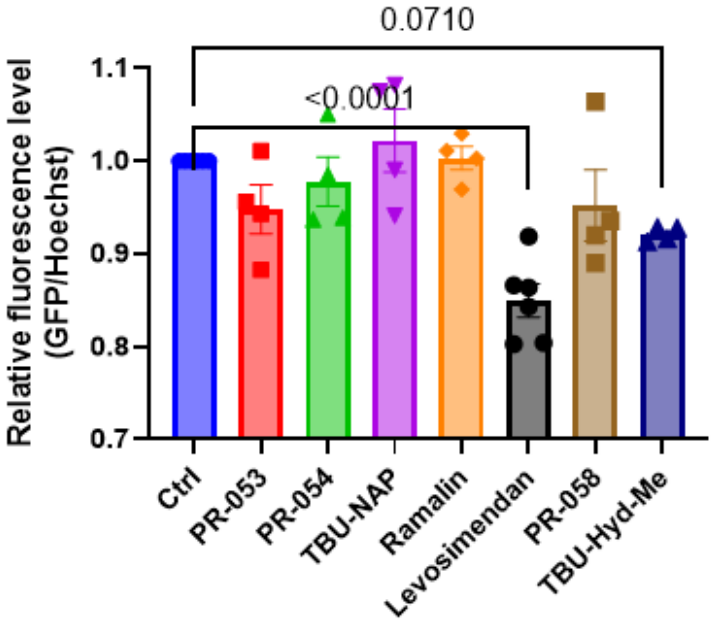
[그림 2-632. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 12]



[그림 2-633. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 13]

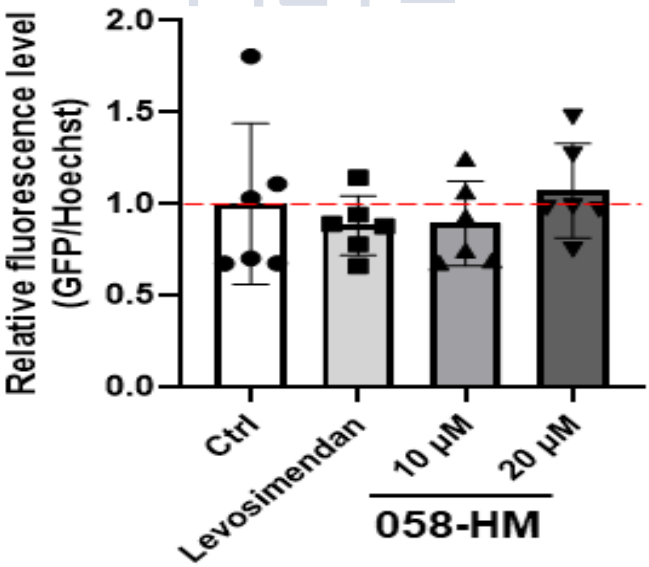


[그림 2-634. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보 약물 효과 확인 14]



[그림 2-635. Tau-BiFC SH-SY5Y에서 후보물질에 의한 Tau 응집 조절 확인 3]

KOPRI
극지연구소

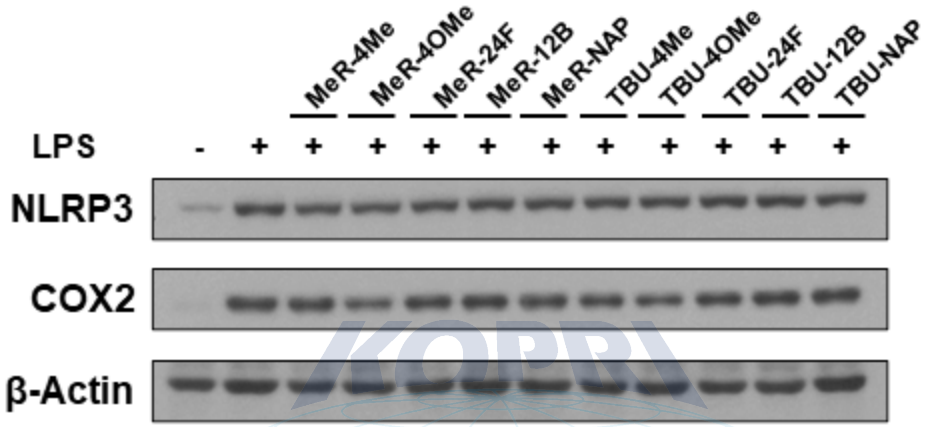


[그림 2-636. RA-058HM에 의한 Tau 응집 조절 확인]

○ 미세교세포 기반 작용기전 규명

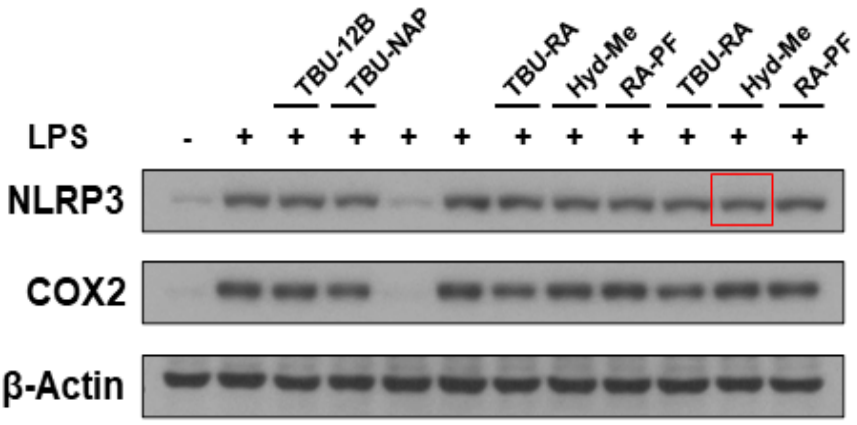
1) 신경세포 기반 작용기전 규명에 이어 mouse microglial cell line (BV-2)을 통해 미세교세포 기반 작용기전에 대해 규명했음(그림 2-637~642)

2) 라말린 유도체 20 μM을 24시간 처리한 후 LPS 0.1 μg/mL을 4시간 처리하여 염증 인자 (NLRP3, COX2)의 발현량 변화를 관측한 결과, Hyd-Me, RA-PF, TBU-Hyd-Me, RA-PR058, RA-058HM에 의해 NLRP3의 발현량이 LPS 처리군에 비해 감소하는 경향을 확인함

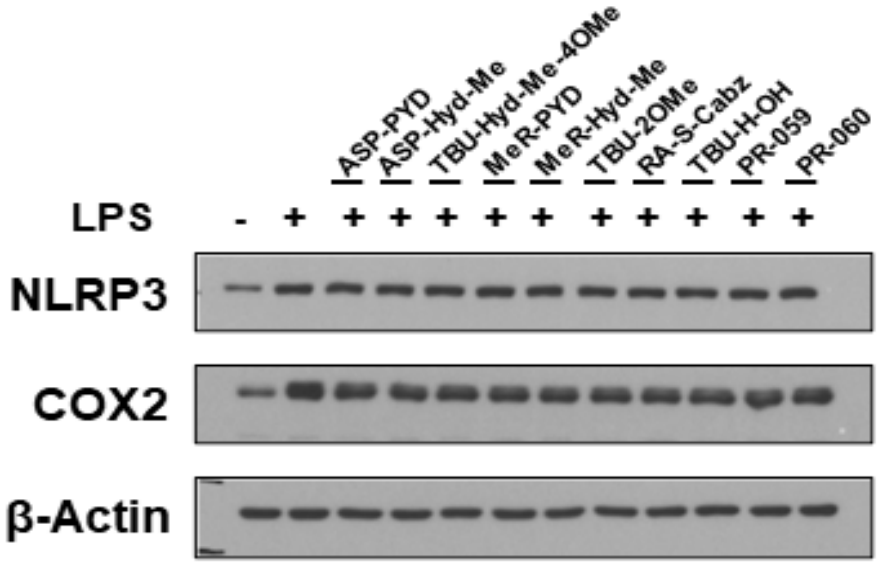


KOPRI
금지연구소

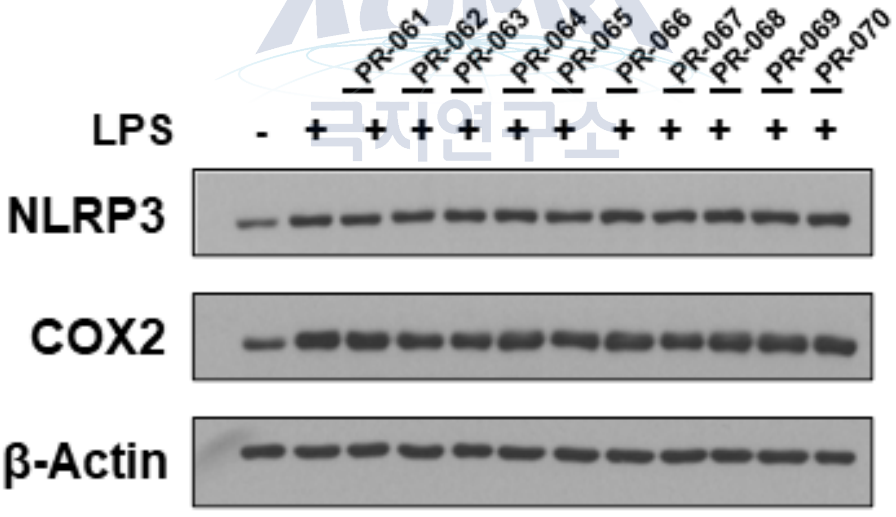
[그림 2-637. BV-2에서 후보물질에 의한 염증 인자 조절 확인 1]



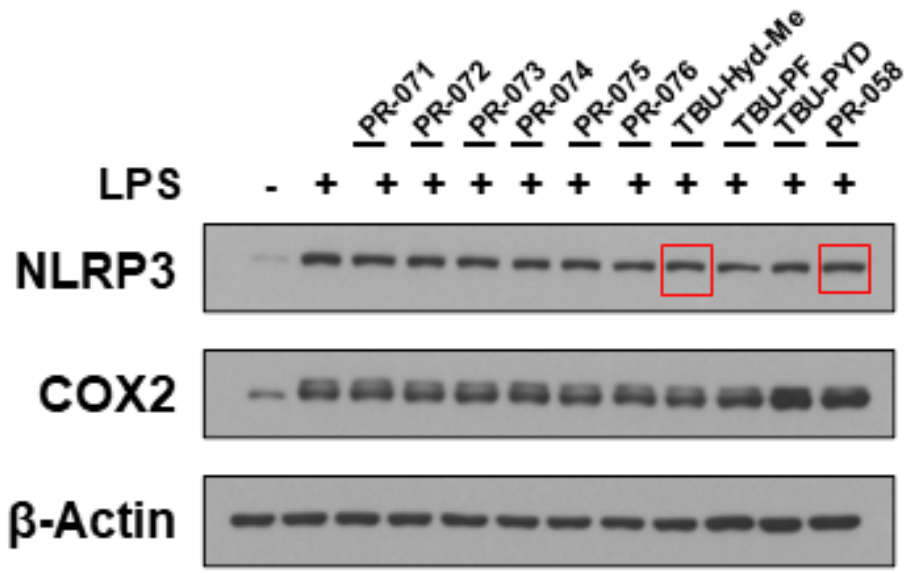
[그림 2-638. BV-2에서 후보물질에 의한 염증 인자 조절 확인 2]



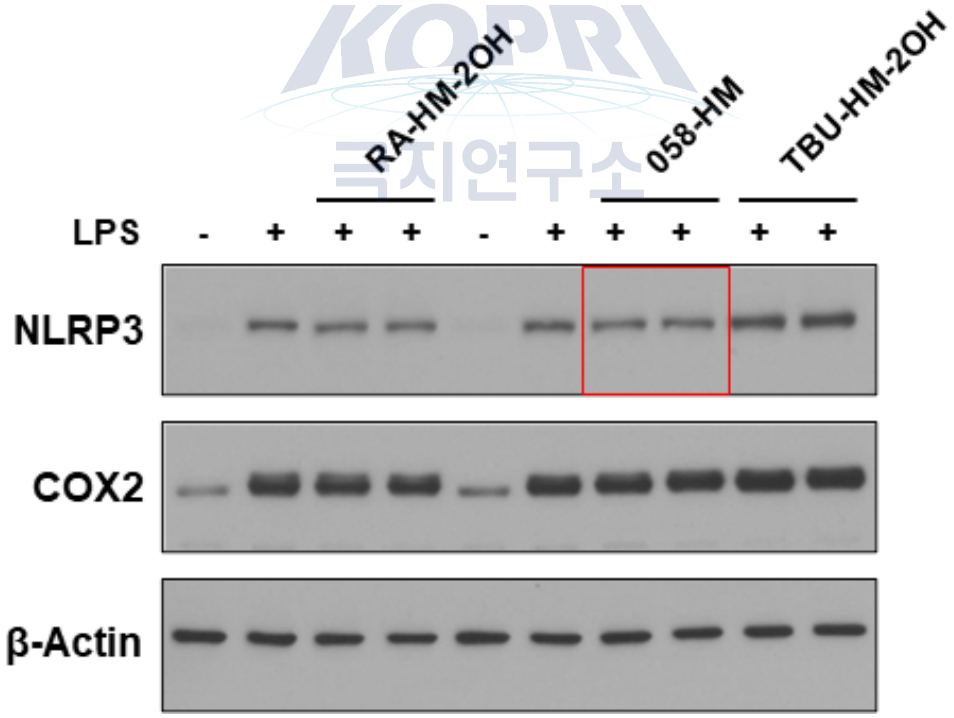
[그림 2-639. BV-2에서 후보물질에 의한 염증 인자 조절 확인 3]



[그림 2-640. BV-2에서 후보물질에 의한 염증 인자 조절 확인 4]

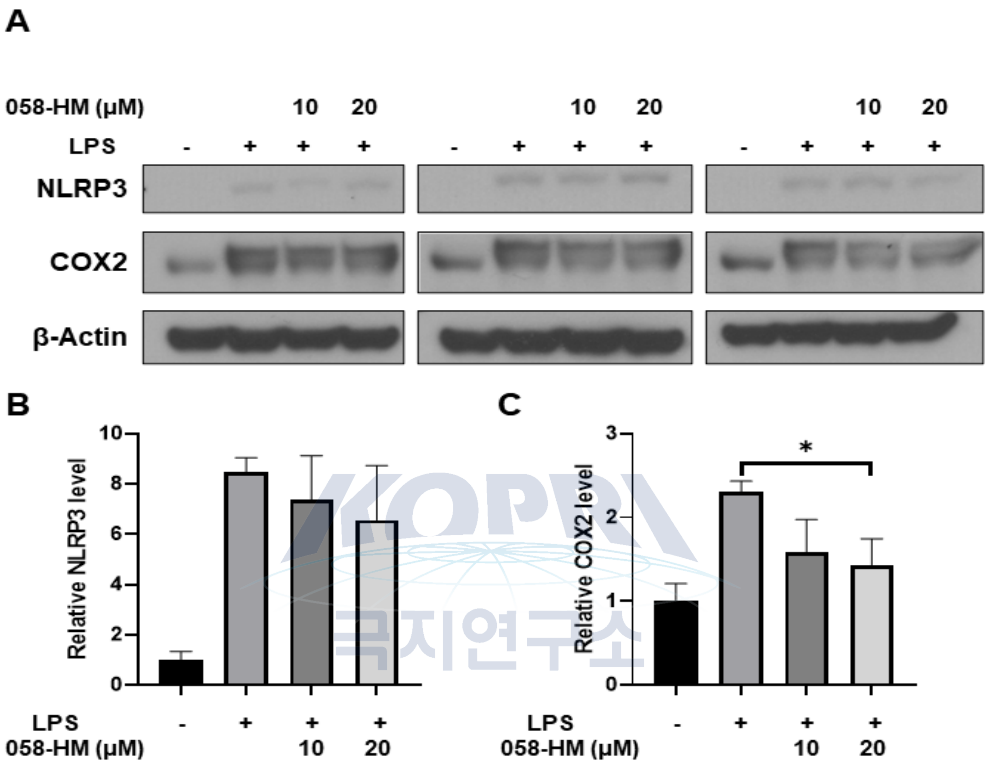


[그림 2-641. BV-2에서 후보물질에 의한 염증인자 조절 확인 5]



[그림 2-642. BV-2에서 후보물질에 의한 염증인자 조절 확인 6]

3) 후보물질 중 RA-058HM에 대해 반복실험을 진행함(그림 2-643). RA-058HM 10 μM, 20 μM을 BV-2에 24시간 처리한 후 LPS 0.1 μg/mL을 4시간 처리하여 NLRP3와 COX2의 발현량 변화를 관측한 결과, RA-058HM 10 μM, 20 μM 모두에서 NLRP3의 발현량이 LPS 처리군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았으며(그림 2-643A, 2-1643B), COX2의 발현량의 경우 RA-058HM 20 μM을 처리한 군에서 LPS 처리군 대비 유의하게 감소한 것을 확인함(그림 2-643A, 2-643C)



[그림 2-643. BV-2에서 RA-058HM에 의한 염증인자 조절 확인]

○ *In vitro* 실험기반 후보물질 도출

1) 앞선 신경세포주 기반 후보물질들의 약효 검증 결과와 미세교세포주 기반 후보물질들의 약효 검증 결과들을 종합하여 정리함(그림 2-644)

2) 라말린 (RA) 외 56개의 유도체들의 Tau 응집, 염증인자 (NLRP3, COX2), 아밀로이드 베타 생성에 관여하는 단백질인 BACE1에 대한 효과를 검증했고, 이를 종합했을 때 TBU-Hyd-Me 물질이 총 9번, RA-058HM이 9번, RA-PR058이 6번의 효과를 보였음. TBU-Hyd-Me의 경우 Tau 응집 억제에 특히 효과적이었으며, NLRP3와 BACE1의 발현을 감소시키는 것에도 어느 정도 효과를 보임

3) RA-058HM의 경우 Tau 응집 억제와 BACE1 발현량 감소에도 효과를 보였으며 특히 염증 인자인 NLRP3와 COX2 발현량 감소에 효과적이었음

4) RA-PR058은 Tau 응집 억제에 효과를 보였으며 NLRP3 및 BACE1 발현량 조절에도 효과를 보였음

5) 이를 바탕으로 3차년도 *in vitro* 실험에서는 TBU-Hyd-Me, RA-058HM, RA-PR058이 최종 후보물질로 좁혀짐

	MeR-4Me	MeR-4OMe	MeR-24F	MeR-12B	MeR-NAP	TBU-4Me	TBU-4OMe	TBU-24F	TBU-12B	TBU-NAP	TBU-RA	Hyd-Me	RA-PF
Tau-BiFC													
NLRP3 (BV-2)												2	2
COX2 (BV-2)													
BACE1 (N2a)													
BACE1 (SH-SY5Y)													
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	RA-12DMe	RA-4NA	PR-056	PR-055	PR-054	PR-053	PR-052	PR-057	Hyd-Me-4OMe	Hyd-Me-4Me	RA	TBU-Hyd-Me	TBU-PYD
Tau-BiFC												5	
NLRP3 (BV-2)												1	
COX2 (BV-2)													
BACE1 (N2a)												2	
BACE1 (SH-SY5Y)												1	
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0
	PR-058	TBU-H-OH	RA-S-Cabz	TBU-2OMe	MeR-Hyd-Me	MeR-PYD	TBU-Hyd-Me-4OMe	ASP-Hyd-Me	ASP-PYD	PR-066	PR-065	PR-064	PR-063
Tau-BiFC	3			1							1		
NLRP3 (BV-2)	1												
COX2 (BV-2)													
BACE1 (N2a)	1									1		1	
BACE1 (SH-SY5Y)	1		1	1									
Total	6	0	1	2	0	0	0	0	0	1	1	1	0
	PR-062	PR-061	PR-074	PR-073	PR-072	PR-071	PR-070	PR-069	PR-068	PR-067	TBU-PF	PR-076	PR-075
Tau-BiFC										1			
NLRP3 (BV-2)													
COX2 (BV-2)													
BACE1 (N2a)		1	1		1		1	1	1		1	1	1
BACE1 (SH-SY5Y)						1						1	1
Total	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2
	PR-059	PR-060	058-HM	TBU-HM-2OH	RA-HM-2OH								
Tau-BiFC			1										
NLRP3 (BV-2)			3										
COX2 (BV-2)			3										
BACE1 (N2a)													
BACE1 (SH-SY5Y)			2	2	2								
Total	0	0	9	2	2								

KOPRI 극지연구소

[그림 2-644. *In vitro* 실험 결과 요약]

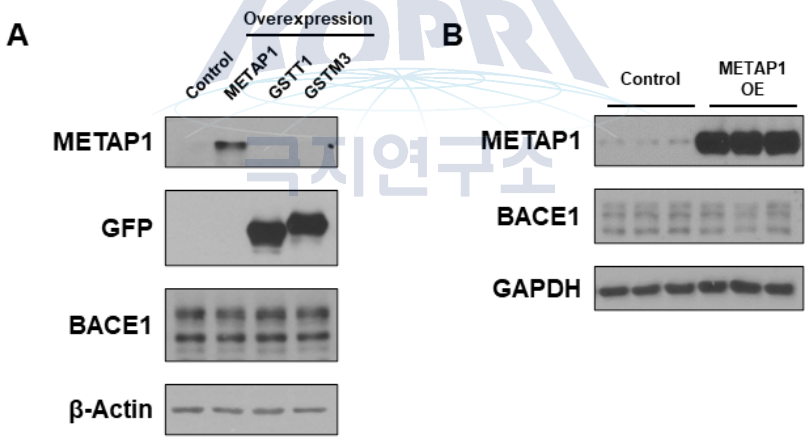
□ 연구내용 2-18. 후보약물 타겟 규명

○ 신경세포 기반 후보물질 타겟 규명

1) 2차년도 연구 결과 Dear-DTI, SEA, TPP 방법으로 찾은 라말린의 타겟 단백질 중 Methionine aminopeptidase (METAP)와 Glutathione S-transferase (GST)가 공통적으로 나타남

2) METAP와 GST가 아밀로이드 베타 생성 기작에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 SH-SY5Y에 METAP1, GSTT1, GSTM3 (GSTT1와 GSTM3는 GST family임)을 transient transfection시킴. METAP1 항체와 GFP (GSTT1, GSTM3 DNA에 GFP tag가 달려있음) 항체를 이용하여 해당 단백질들이 과발현 (overexpression) 되었음을 확인함(그림 2-645)

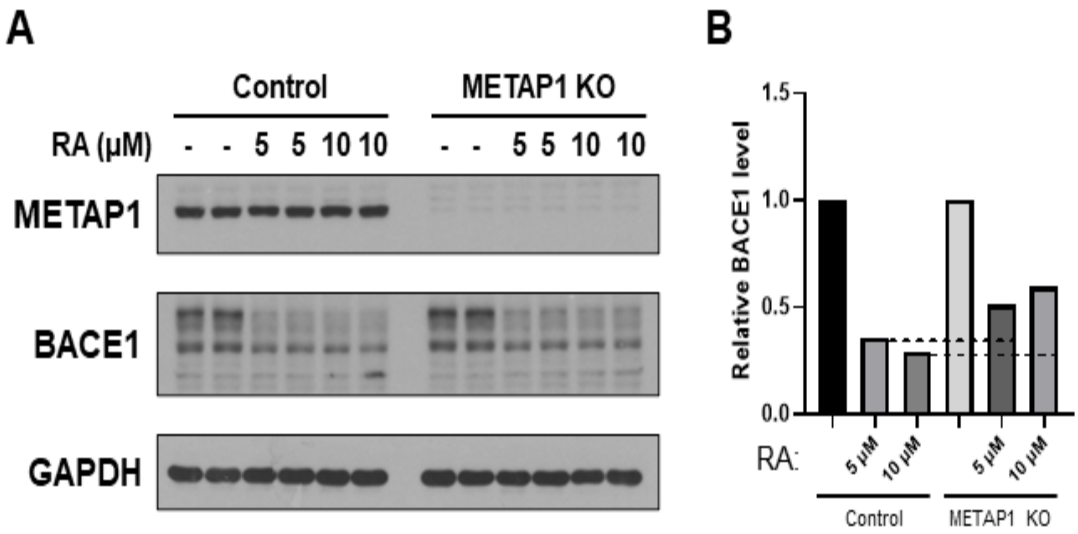
3) GSTT1이나 GSTM3가 과발현되었을 때 BACE1의 발현량은 Control 대비 차이가 없었으나 METAP1이 과발현되었을 때 BACE1의 발현량이 Control 대비 감소하는 경향을 확인할 수 있음



[그림 2-645. 타겟 단백질 후보의 BACE1 발현 조절 확인]

4) METAP1 Knock-out (KO) SH-SY5Y 세포주를 제작하고 Control SH-SY5Y와 METAP1 KO SH-SY5Y에 라말린 5 μM, 10 μM을 24시간 처리한 후, BACE1의 발현량을 확인함(그림 2-646)

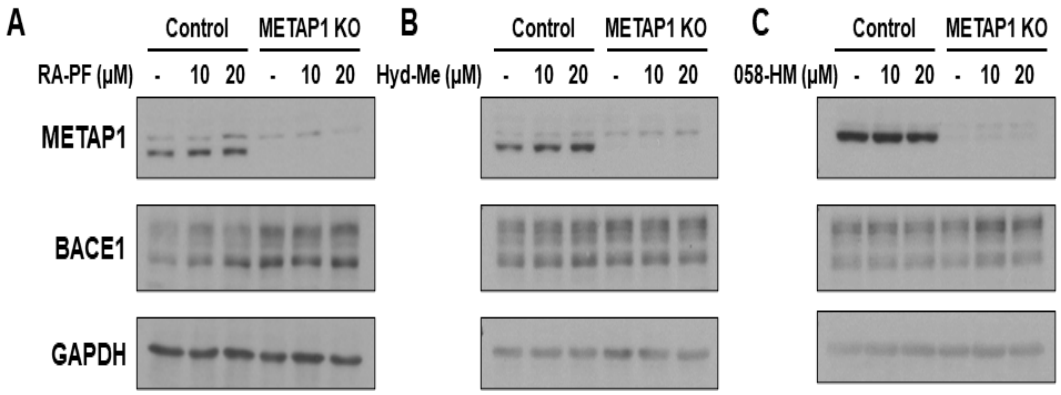
5) Control SH-SY5Y의 경우 라말린에 의해 BACE1의 발현량이 대조군 대비 65% 이상 감소한 것을 확인할 수 있음. METAP1 KO SH-SY5Y의 경우 Control SH-SY5Y 결과 대비 라말린에 의한 BACE1 발현량 감소 정도가 적은 것을 확인할 수 있음. 이를 통해 라말린이 BACE1의 발현량을 감소하는데 METAP1이 관여함을 알 수 있음



[그림 2-646. METAP1 KO SH-SY5Y에서의 라말린에 의한 BACE1 조절 확인]

6) 앞선 스크리닝을 통해 얻은 후보물질 중 RA-PF, Hyd-Me, RA-058HM 10 μM, 20 μM을 Control SH-SY5Y와 METAP1 KO SH-SY5Y에 24시간 처리한 후 BACE1의 발현량을 관측함 (그림 2-647)

7) Control SH-SY5Y에서 RA-058HM 20 μM이 BACE1의 발현량을 조금 감소시키는 경향을 보였으며 이러한 현상은 METAP1 KO SH-SY5Y에서는 관측되지 않았음(그림 2-647C)



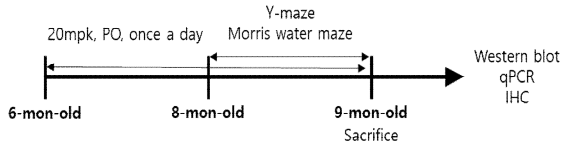
[그림 2-647. METAP1 KO SH-SY5Y에서의 후보물질에 의한 BACE1 조절 확인]

□ 연구내용 2-19. AD 동물 모델기반 유효성 평가 및 타겟 규명

○ 3차 동물실험: 5xFAD 동물모델에서 라말린 유도체의 유효성 평가

1) Amyloidogenic 병변을 관찰할 수 있는 5xFAD 동물모델을 활용하여 라말린 유도체의 유효성을 평가함. 6개월령 5xFAD 마우스에 TBU-12B, TBU-NAP, TBU-RA, RA-PF, RA-24F 약물을 20 mg/kg 용량으로 2개월간 경구투여함

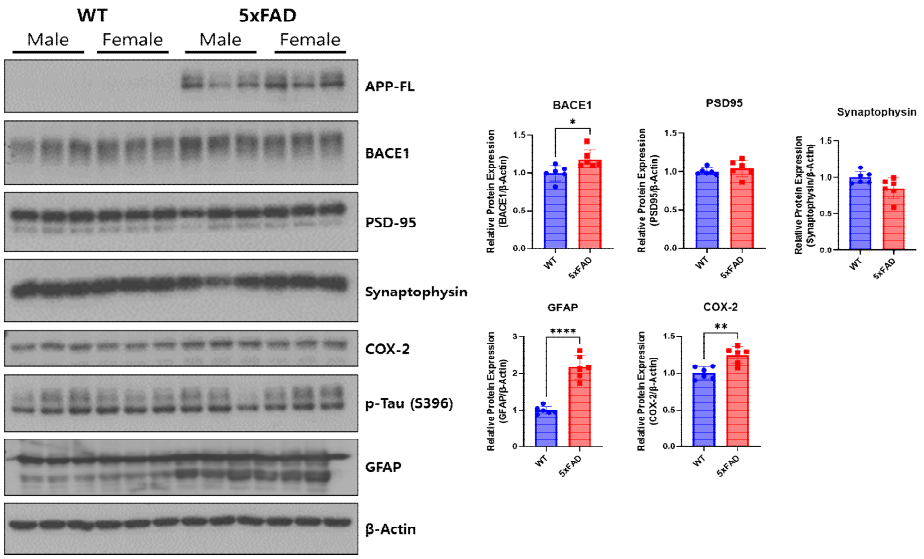
2) 인지기능 평가를 위해 Y-maze 및 Morris water maze (MWM)를 수행하였으며, 생화학적 분석을 위해 단백질 및 mRNA 발현을 western blot, qPCR, IHC를 활용하여 평가함(그림 2-648)



Group	Male	Female
WT	5	4
Veh	3	3
TBU-12B	4	4
TBU-NAP	4	4
TBU-RA	4	4
RA-PF	4	4
RA-24F	4	4

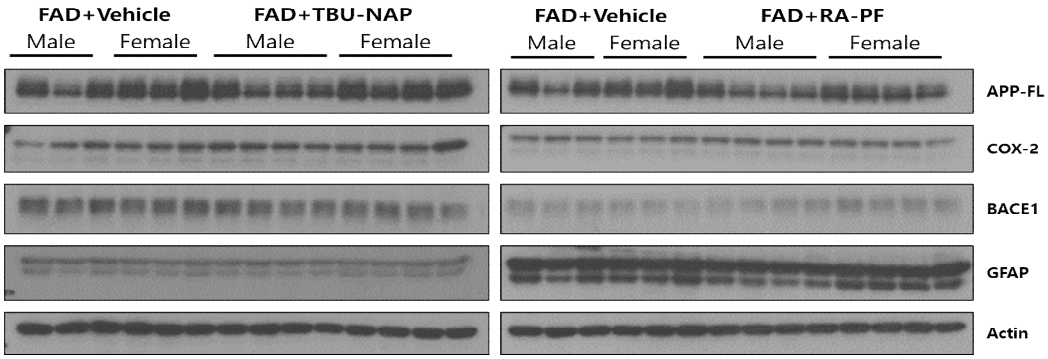
[그림 2-648. 5xFAD 동물모델에서 라말린 유도체 효능평가 일정]

3) Western blot을 활용한 조직분석을 진행함. 5xFAD 마우스에서 amyloidogenic 병변 및 염증반응을 확인하기 위해 western blot을 활용하여 단백질 발현을 평가함. 그 결과, 5xFAD 마우스의 cortex에서 BACE1, COX-2, GFAP의 증가를 확인함(그림 2-649)



[그림 2-649. 5xFAD 마우스에서 western blot을 통한 조직 분석 1]

4) 5xFAD 마우스에서 TBU-NAP, RA-PF의 약효를 단백질 수준에서 평가함. Cortex에서 후보물질 투여에 의한 BACE1, COX-2, GFAP의 감소를 확인하지 못함(그림 2-650)

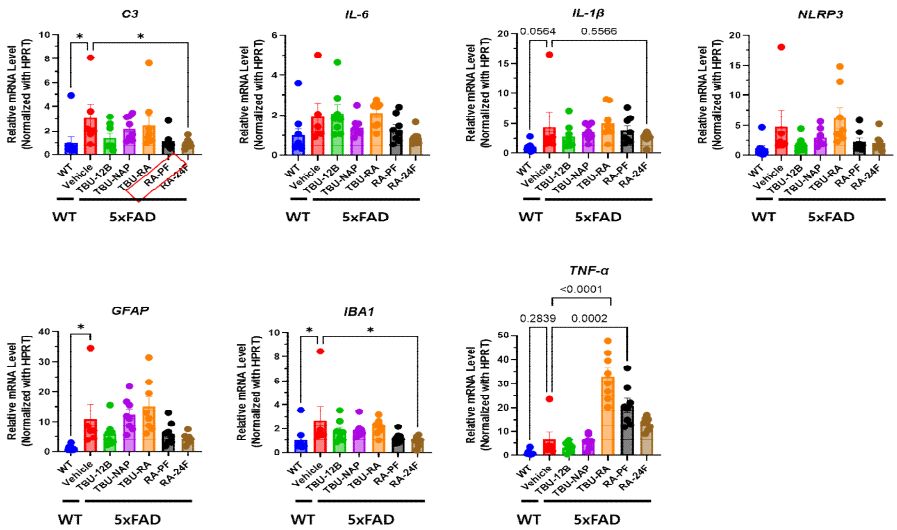


[그림 2-650. 5xFAD 마우스에서 western blot을 통한 조직 분석 2]

5) RT-qPCR을 활용한 mRNA 발현분석을 진행함. 5xFAD 마우스 cortex에서 후보물질 투여에 의한 염증인자의 mRNA 발현을 평가함(그림 2-651)

6) TBU-12B 투여에 의해 *C3*, *Nlrp3*, *Iba1*, *Gfap* 발현의 감소 경향을 확인함. TBU-NAP 투여에 의해 *Nlrp3*, *Iba1* 발현의 감소 경향을 확인함. TBU-RA 투여에 의해 *Tnfa* 발현이 증가하는 것을 확인함

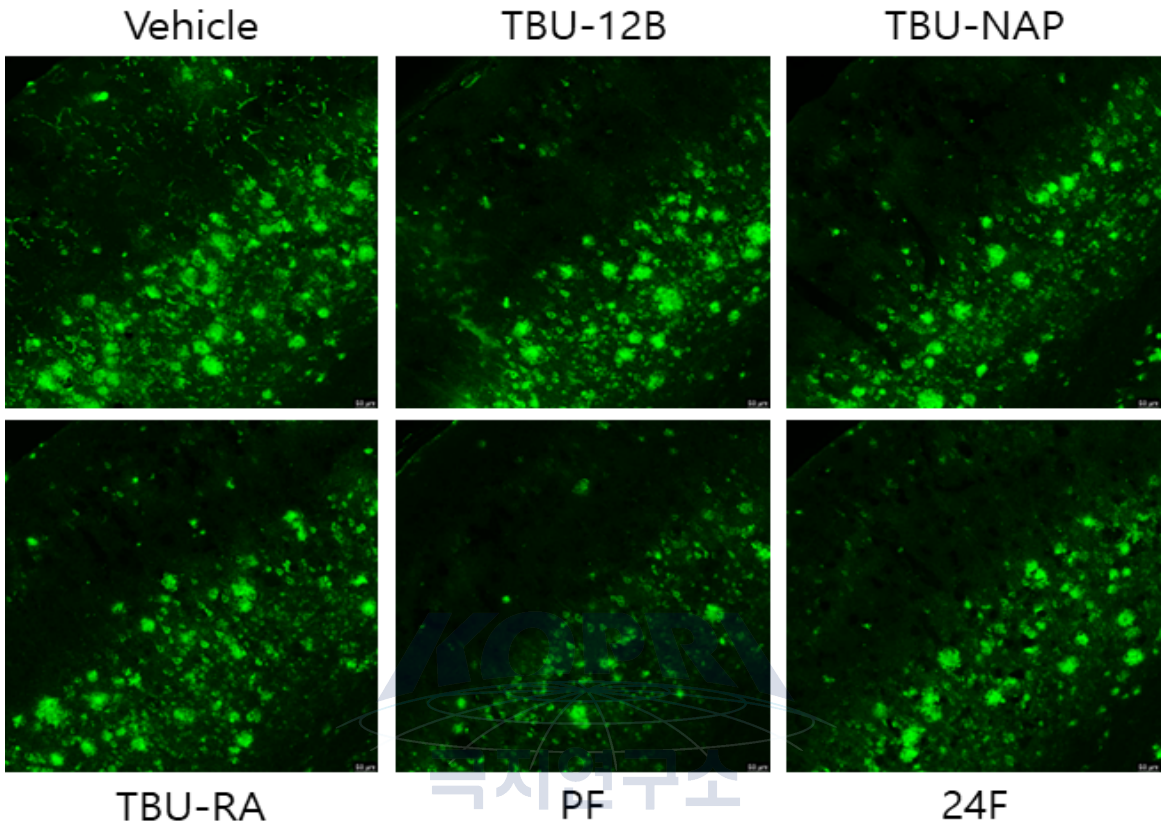
7) RA-PF 투여에 의해 *C3*, *Il6*, *Nlrp3*, *Gfap*, *Iba1* 발현이 감소하였으나, *Tnfa*의 발현이 증가하는 것을 확인함. RA-24F 투여에 의해 *C3*, *Il6*, *Nlrp3*, *Gfap*, *Iba1*의 발현이 감소하는 것을 확인했고, *Tnfa*의 발현이 증가하는 것을 확인함



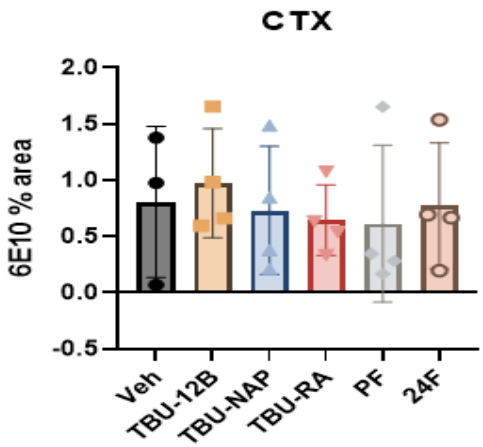
[그림 2-651. 5xFAD 마우스에서 RT-qPCR을 통한 조직 분석]

KCPBA 금지연구소

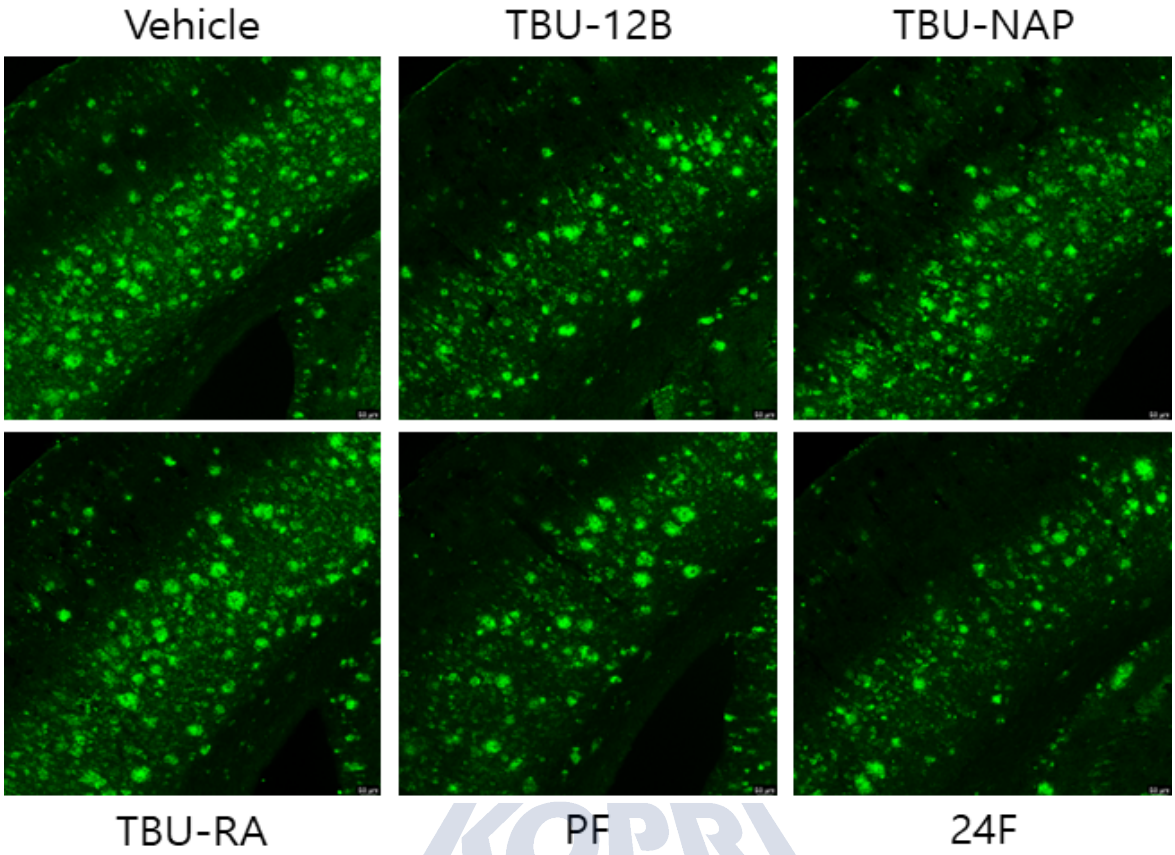
8) IHC를 활용한 약효 평가를 진행함. 6E10 항체를 활용하여 Aβ 분포를 확인함. Cortex에서 RA-PF 투약에 의한 Aβ plaque 분포의 감소 경향을 확인함. 또한, hippocampus에서 RA-PF, RA-24F 투약에 의한 Aβ plaque 분포의 감소 경향을 확인함(그림 2-652~659)



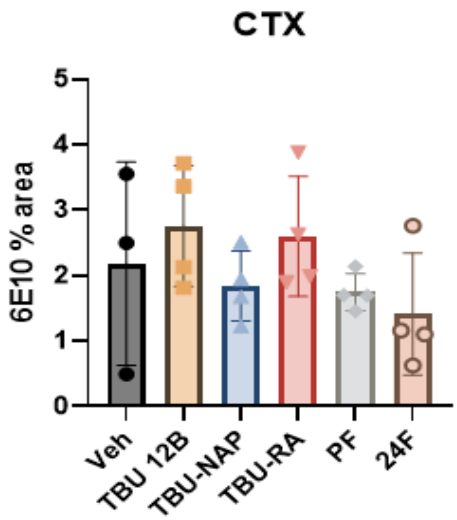
[그림 2-652. IHC를 통한 6E10 분포 평가: Male, Cortex]



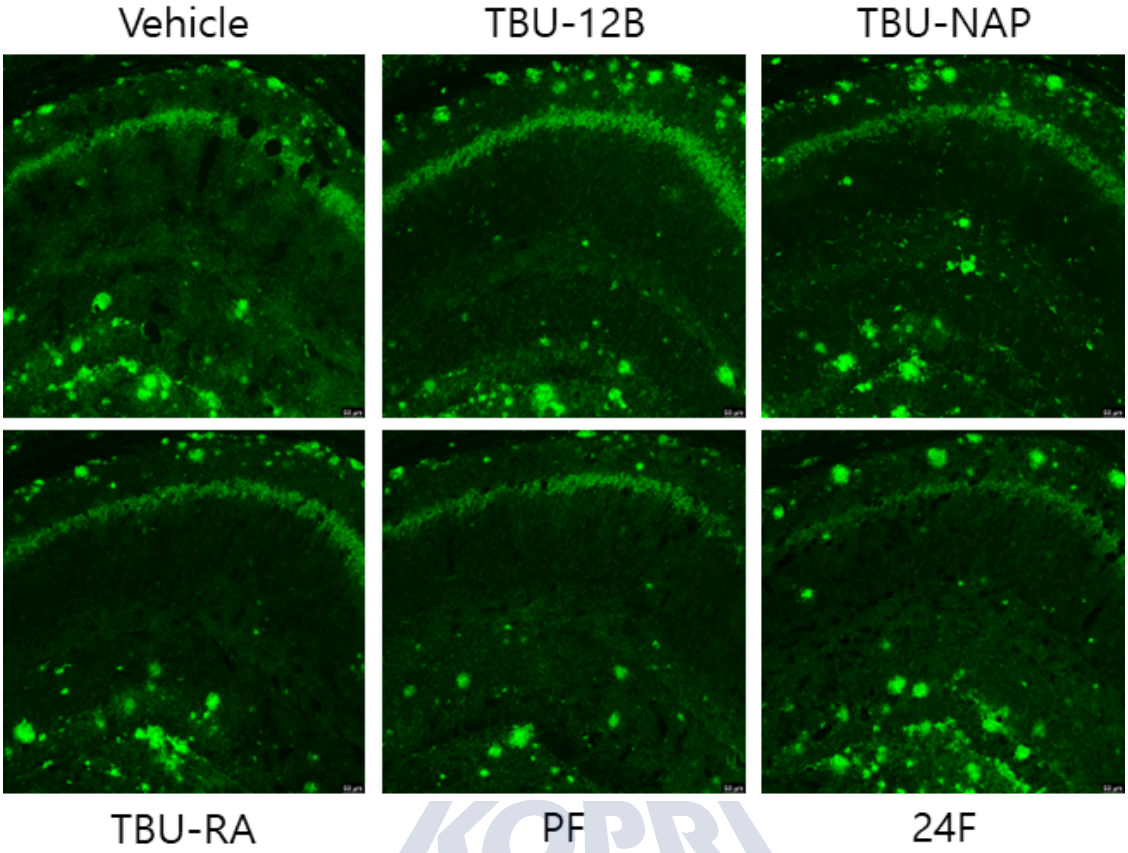
[그림 2-653. 그림 2-1382 정량 분석]



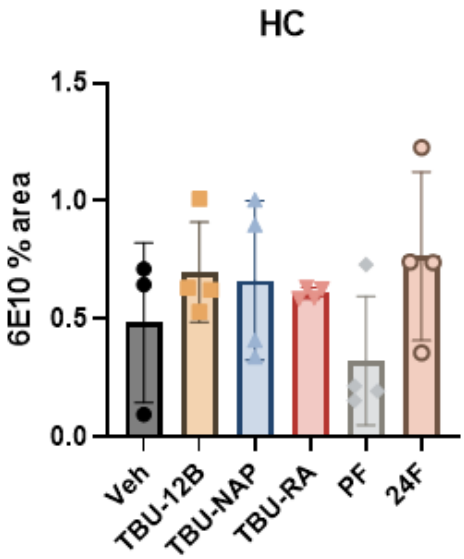
[그림 2-654. IHC를 통한 6E10 분포 평가: Female, Cortex]



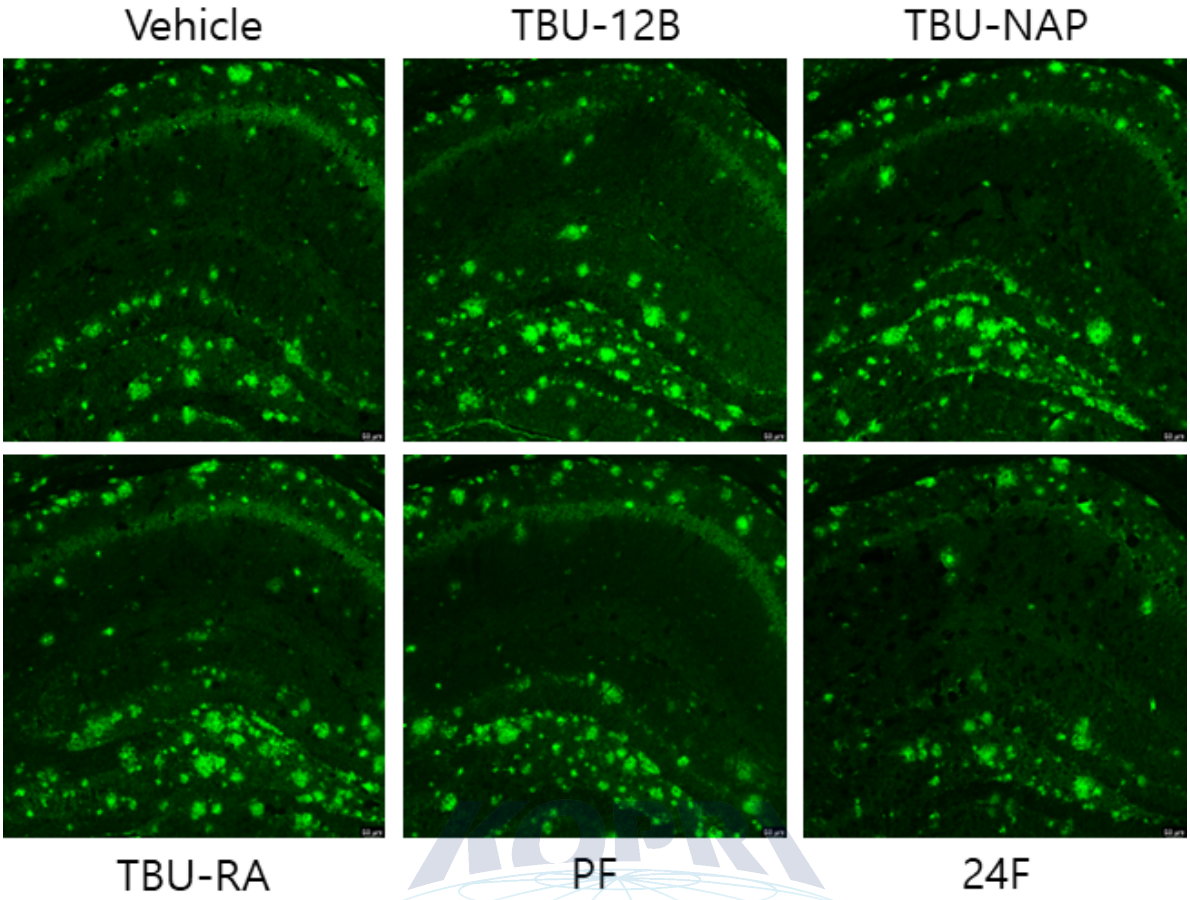
[그림 2-655. 그림 2-1384 정량 분석]



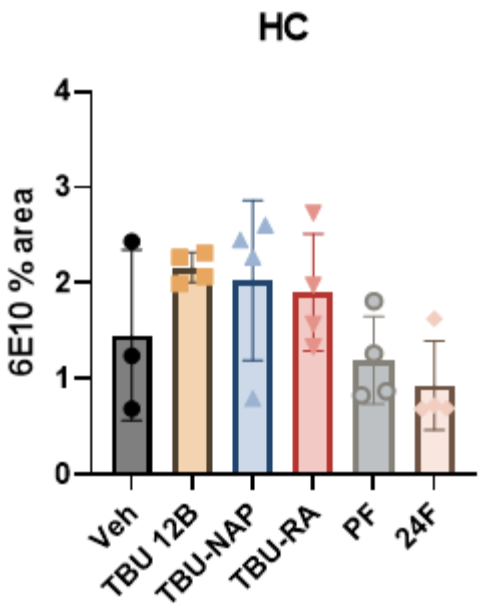
[그림 2-656 IHC를 통한 6E10 분포 평가: Male, Hippocampus]



[그림 2-657. 그림 2-1386 정량 분석]

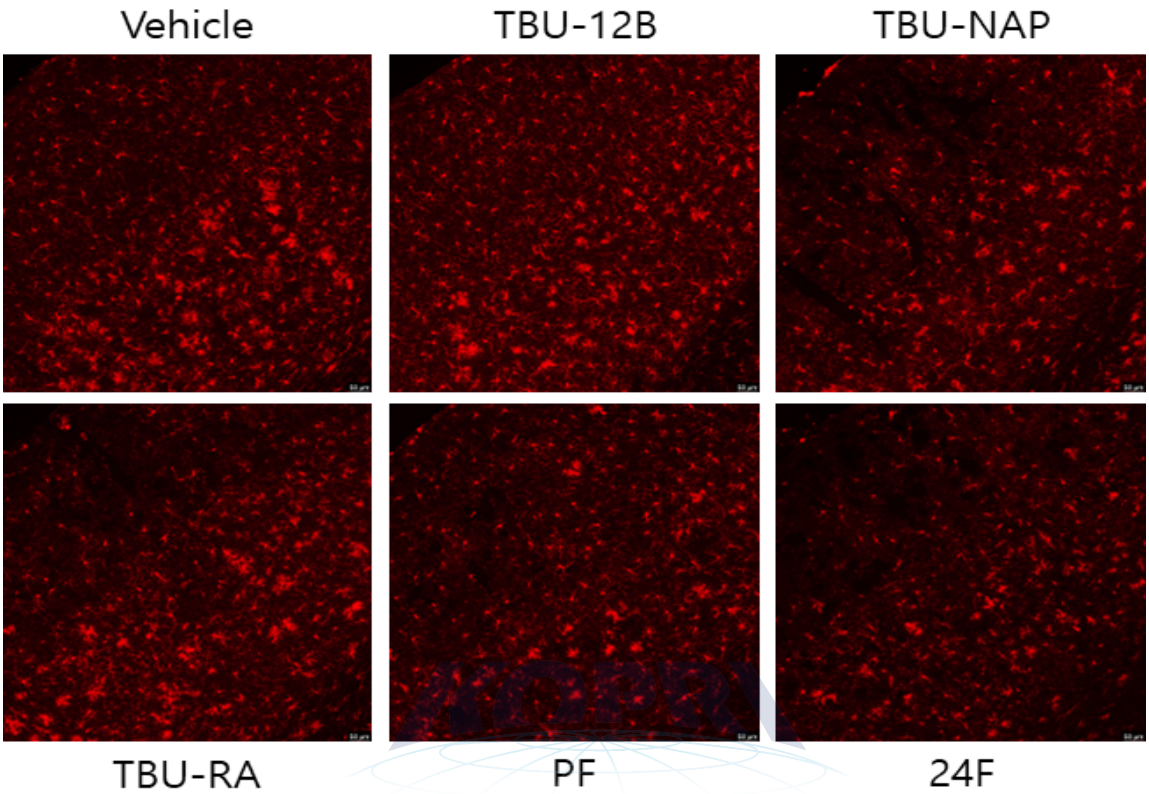


[그림 2-658. IHC를 통한 6E10 분포 평가: Female, Hippocampus]

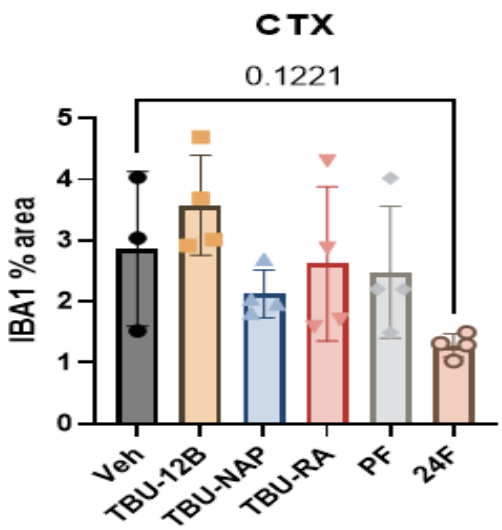


[그림 2-659. 그림 2-1388 정량 분석]

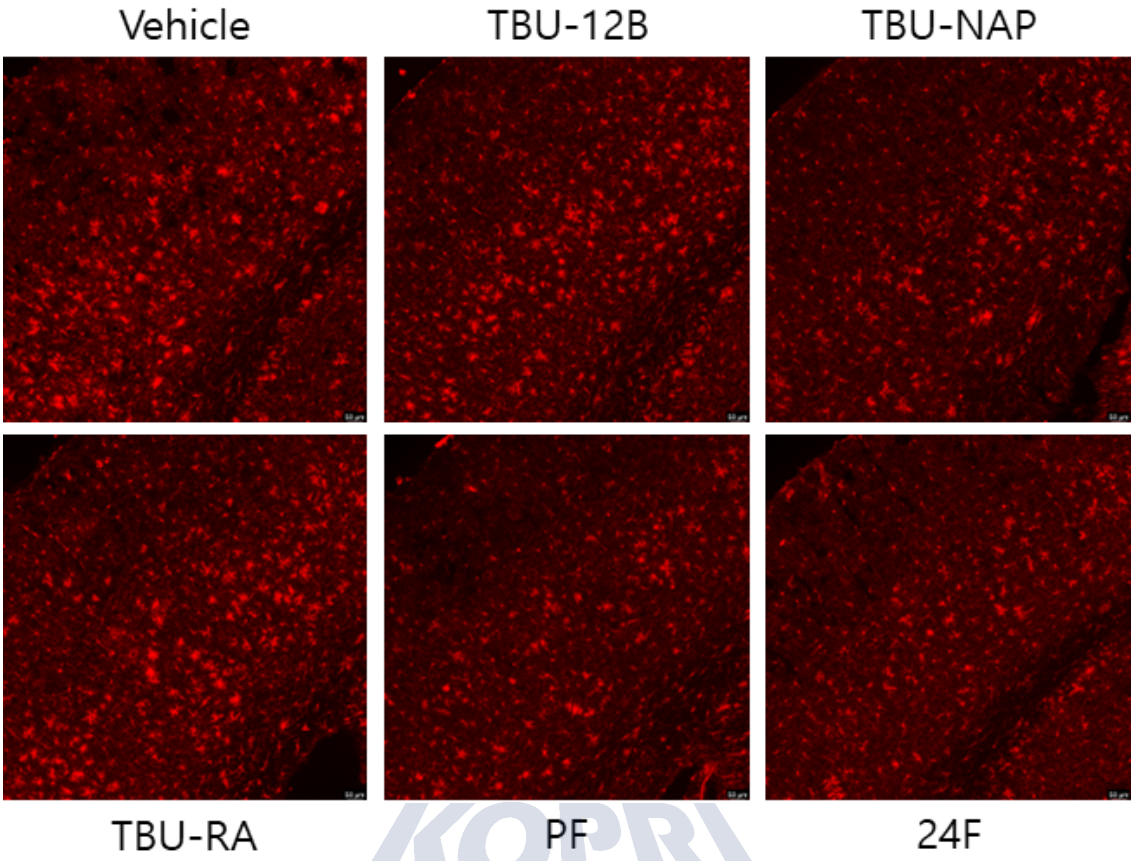
9) IBA1 항체를 활용한 microglia 활성화 평가를 진행함. Cortex에서 TBU-NAP, RA-PF, RA-24F 투약에 의해 형광 강도가 감소하는 경황을 확인함. Hippocampus에서 RA-PF, RA-24F 투약에 의해 형광 강도가 감소하는 경향을 확인함(그림 2-660~667)



[그림 2-660. IHC를 통한 IBA1 분포 평가: Male, Cortex]

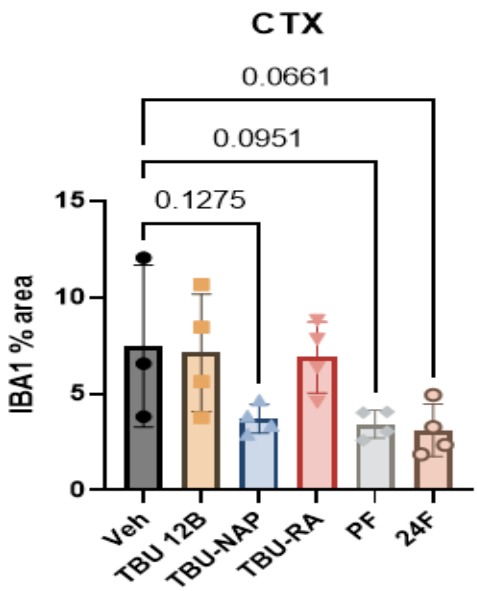


[그림 2-661. 그림 2-1390 정량 분석]

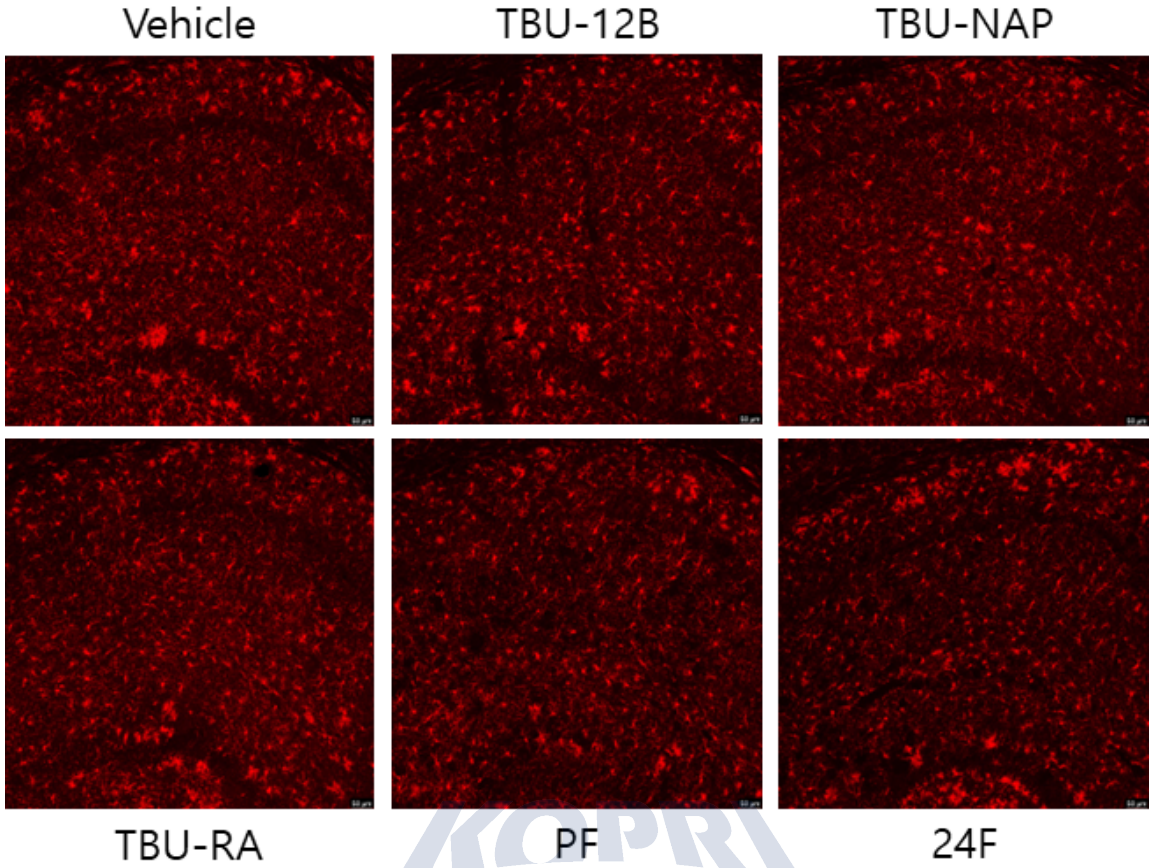


[그림 2-662. IHC를 통한 IBA1 분포 평가: Female, Cortex]

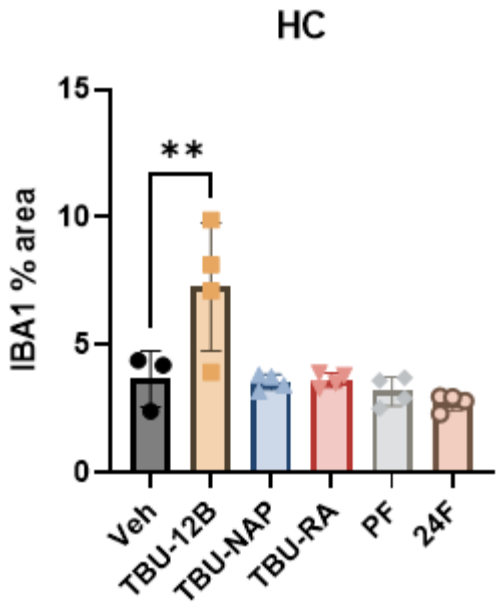
KBRI 극지연구소



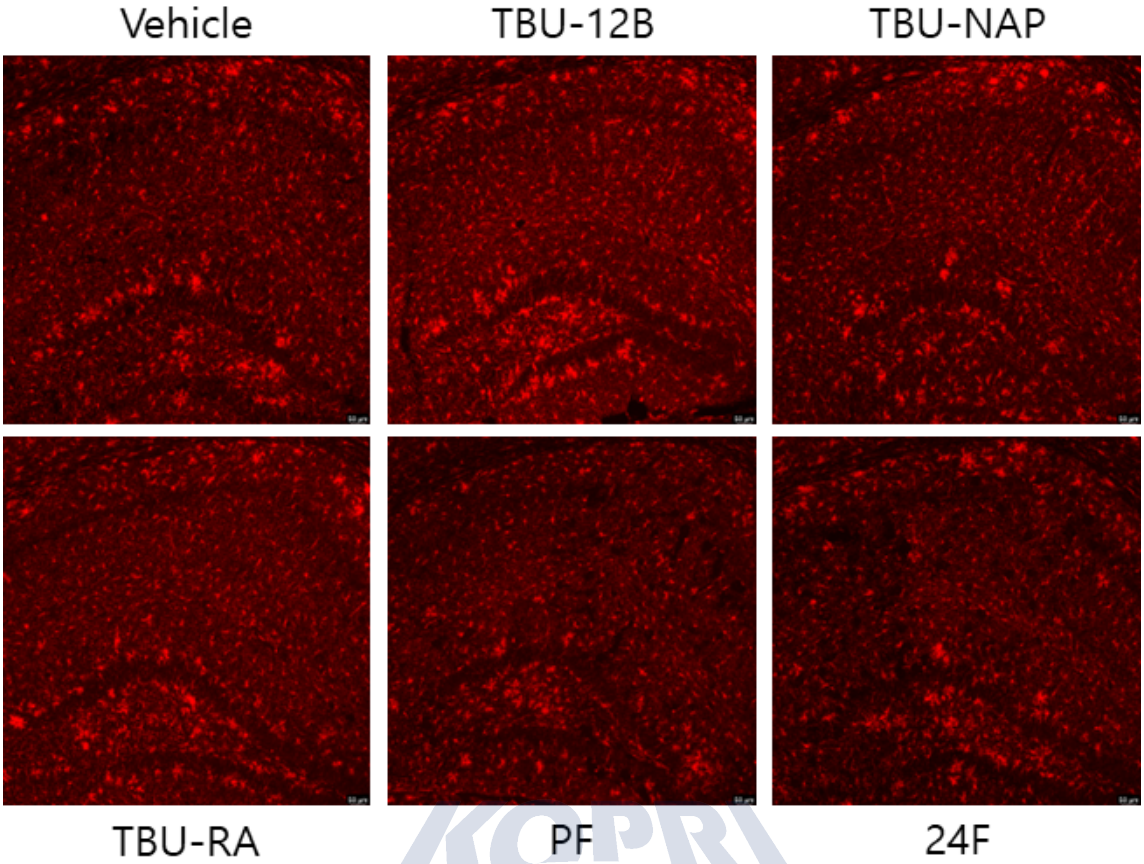
[그림 2-663. 그림 2-1392 정량 분석]



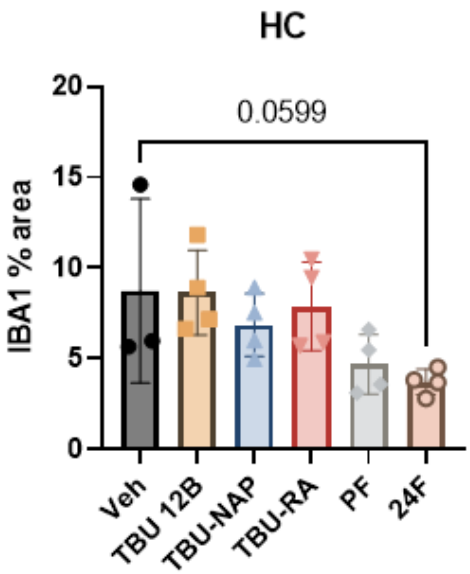
[그림 2-664. IHC를 통한 IBA1 분포 평가: Male, Hippocampus]



[그림 2-665. 그림 2-1394 정량 분석]

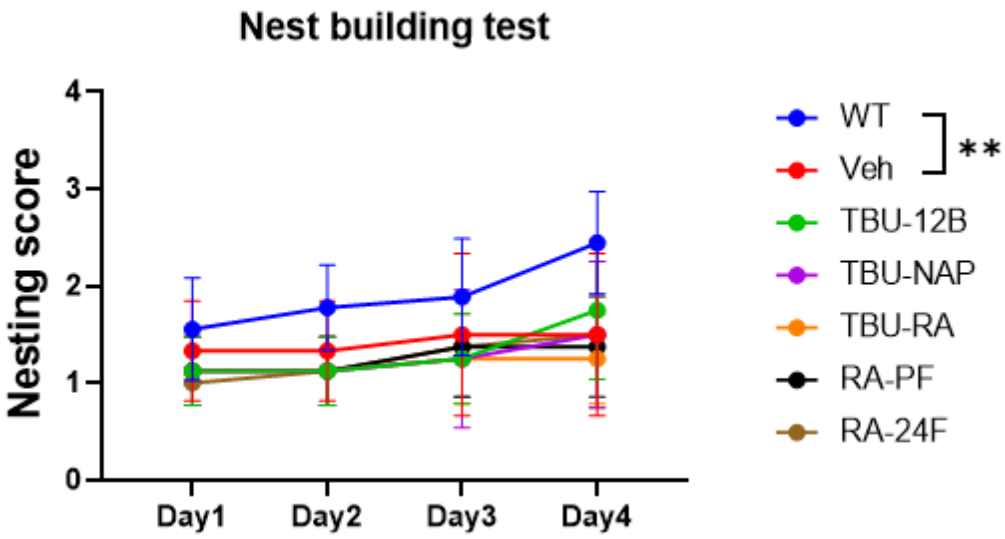


[그림 2-666. IHC를 통한 IBA1 분포 평가: Female, Hippocampus]



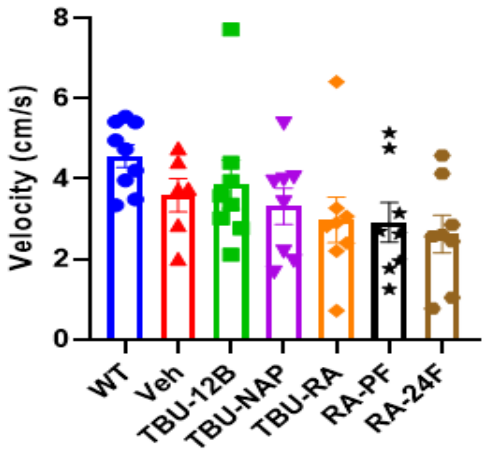
[그림 2-667. 그림 2-1396 정량 분석]

10) 실험동물의 전반적인 안정 상태를 확인하는 실험인 nest buiilding test를 4일간 진행함. 그 결과, 5xFAD군들이 WT군에 비해 nesting score가 낮음을 확인함. 이는 5xFAD군들이 WT군에 비해 조금 불안정하다고 할 수 있음

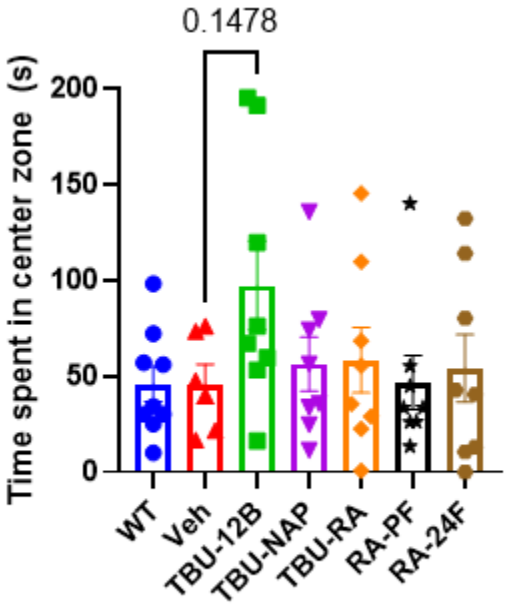


[그림 2-668. Nest building test 결과]

11) 실험동물의 운동성 및 불안 정도를 측정하는 실험인 open field test를 진행함. 군간 평균 속도에 있어 유의한 차이가 나지 않는 것으로 보아 실험동물간 운동성의 차이는 없음. TBU-12B 투여군의 경우 안쪽 구역에서 머문 시간과 이동 거리가 다른 군들에 비해 높은 것으로 보아 불안 정도가 약물 투여에 의해 개선되었다고 볼 수 있음

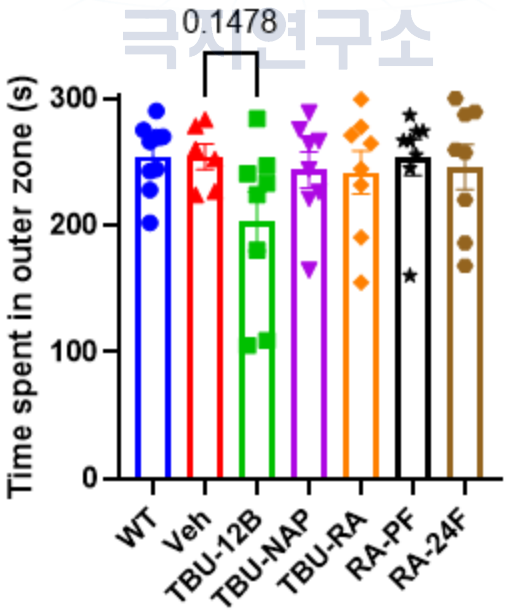


[그림 2-669. Open field test 결과: 평균 속도]

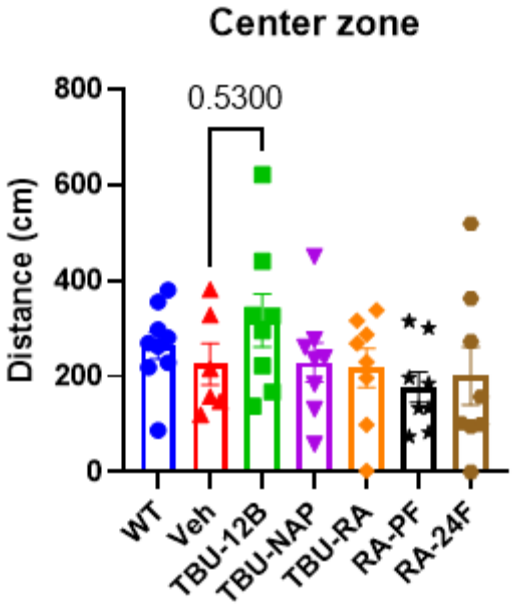


[그림 2-670. Open field test 결과: 안쪽 구역에 머문 시간]

KOPRI
극지연구소

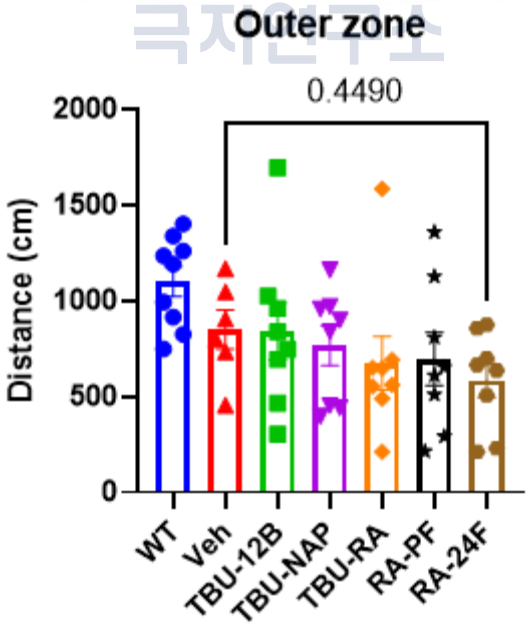


[그림 2-671. Open field test 결과: 바깥 구역에 머문 시간]



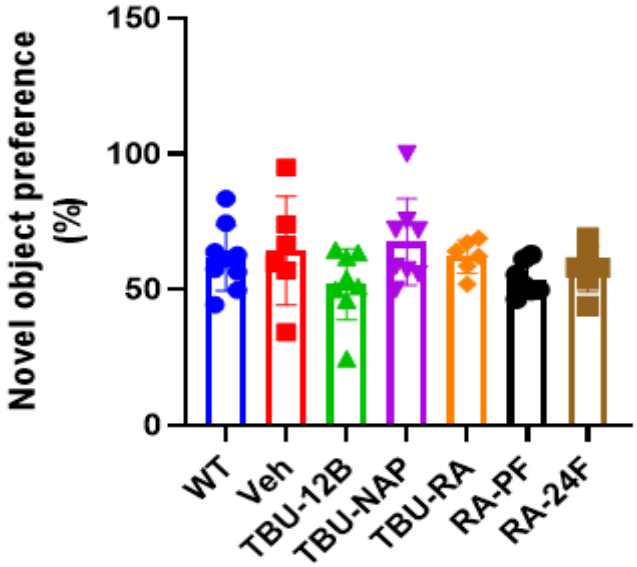
[그림 2-672. Open field test 결과: 안쪽 구역에서의 이동 거리]

KOPRI 극지연구소



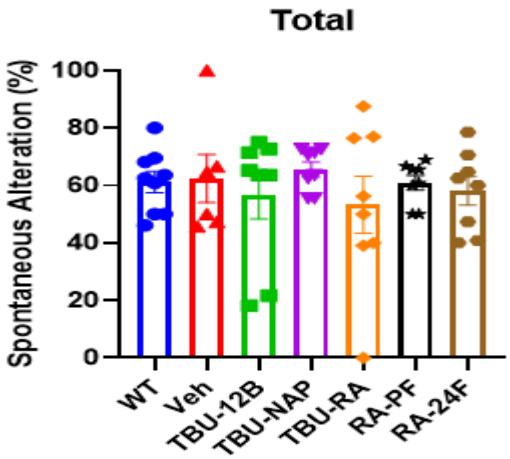
[그림 2-673. Open field test 결과: 바깥 구역에서의 이동 거리]

12) 실험동물들의 인지능력을 평가할 수 있는 novel object recognition test를 진행함. 마우스가 새로운 물체에 대해 호기심을 가지고 탐험한다는 점을 이용한 실험으로 본 실험에서는 새로운 물체에 대한 선호도에 있어 군간 유의한 차이를 보이지는 않았음

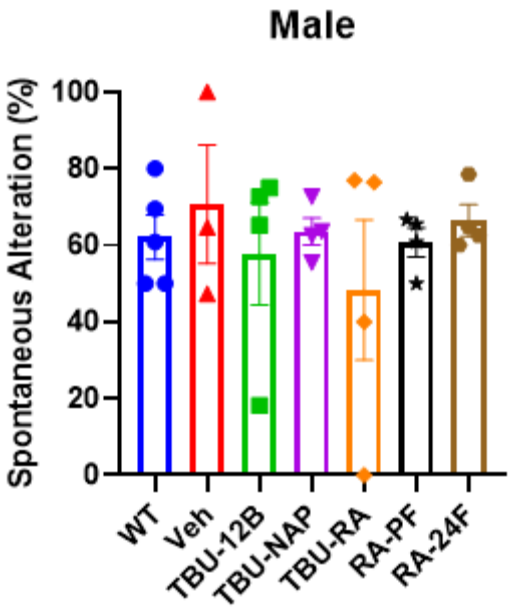


[그림 2-674. Novel object recognition test 결과]

13) Y-maze 실험을 통해 후보물질이 인지기능에 미치는 영향평가를 함. WT와 5xFAD를 비교시, spontaneous alteration이 vehicle에서 감소하는 것으로 보아 5xFAD에 인지기능의 장애가 있는 것을 확인함. 후보물질 투약에 의한 효과를 평가시, TBU-NAP, RA-PF에서 인지기능의 개선을 확인함

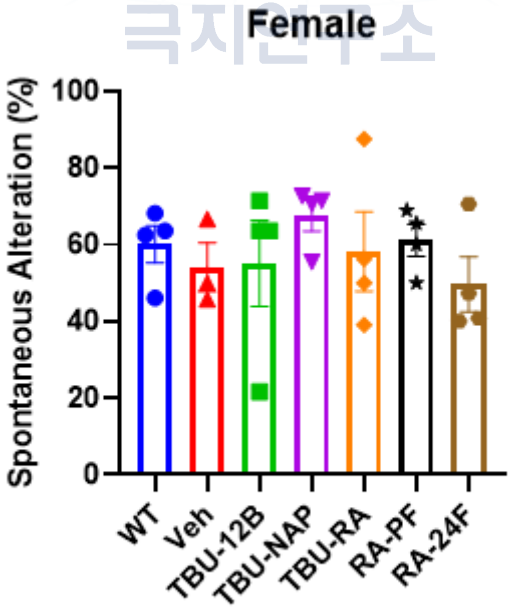


[그림 2-675. Y-maze 실험 결과: Total]

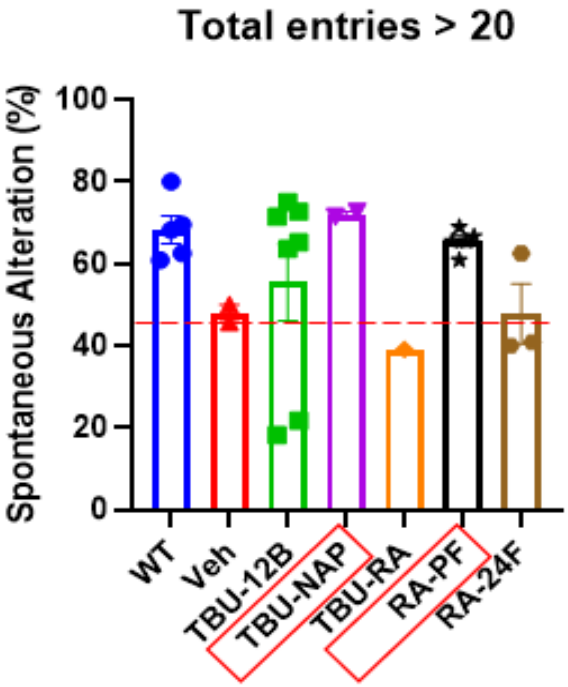


[그림 2-676. Y-maze 실험 결과: Male]

KOPRI
극지연구소



[그림 2-677. Y-maze 실험 결과: Female]

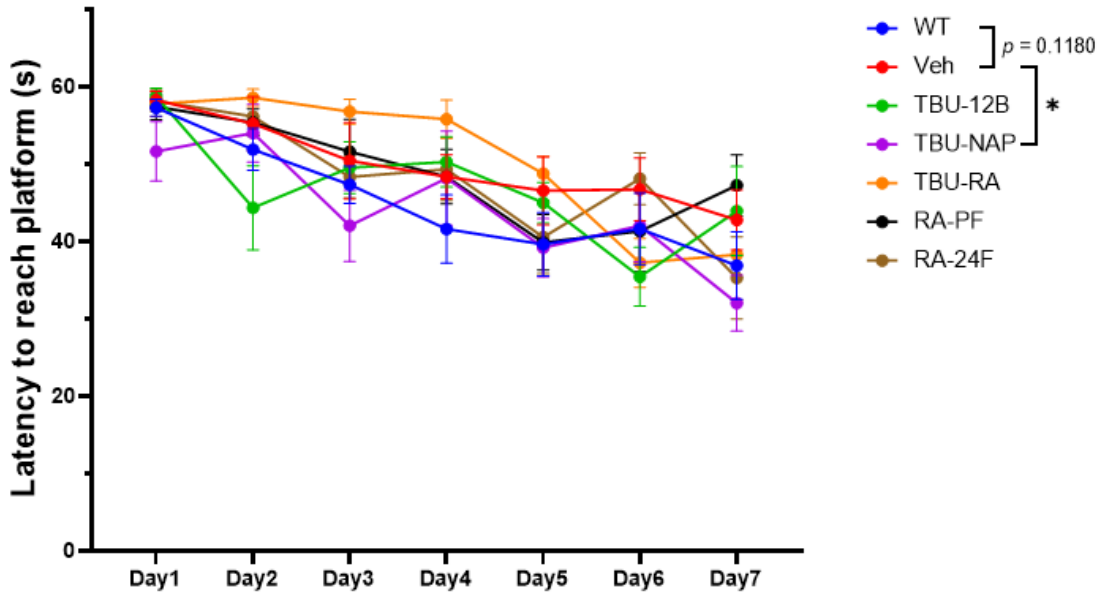


[그림 2-678. Y-maze 실험 결과: outlier 제거]

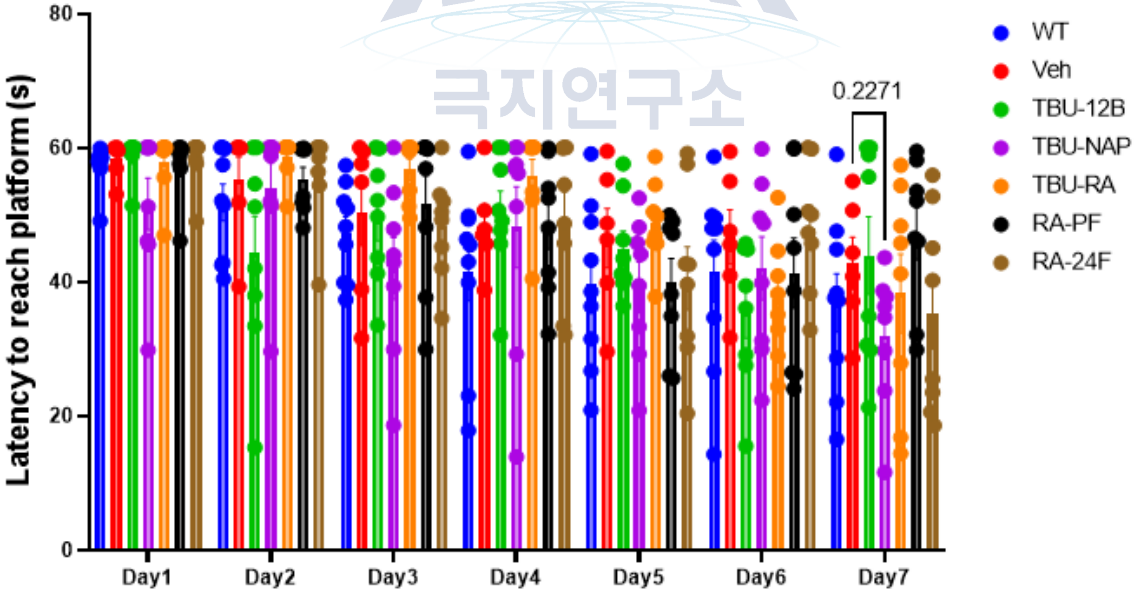
14) Morris water maze (MWM) 실험을 활용하여 마우스 인지기능을 평가함. WT 대비 5xFAD에서 7일간 training 결과 5xFAD에서 escape latency의 감소 정도가 적은 것을 확인했으며, 이는 학습능력의 감소를 의미함(그림 2-679)

15) 후보물질 투약에 의한 효과를 평가했을 때, TBU-12B, TBU-NAP, TBU-RA, RA-PF, RA-24F에서 시간이 갈수록 escape latency가 감소하는 것을 통해 학습능력이 5xFAD에 비해 증가한 것을 확인함. 7일간의 training 이후, probe day에서 인지기능을 평가했을 때, RA-PF, RA-24F 투약에 의한 platform crossing이 증가함

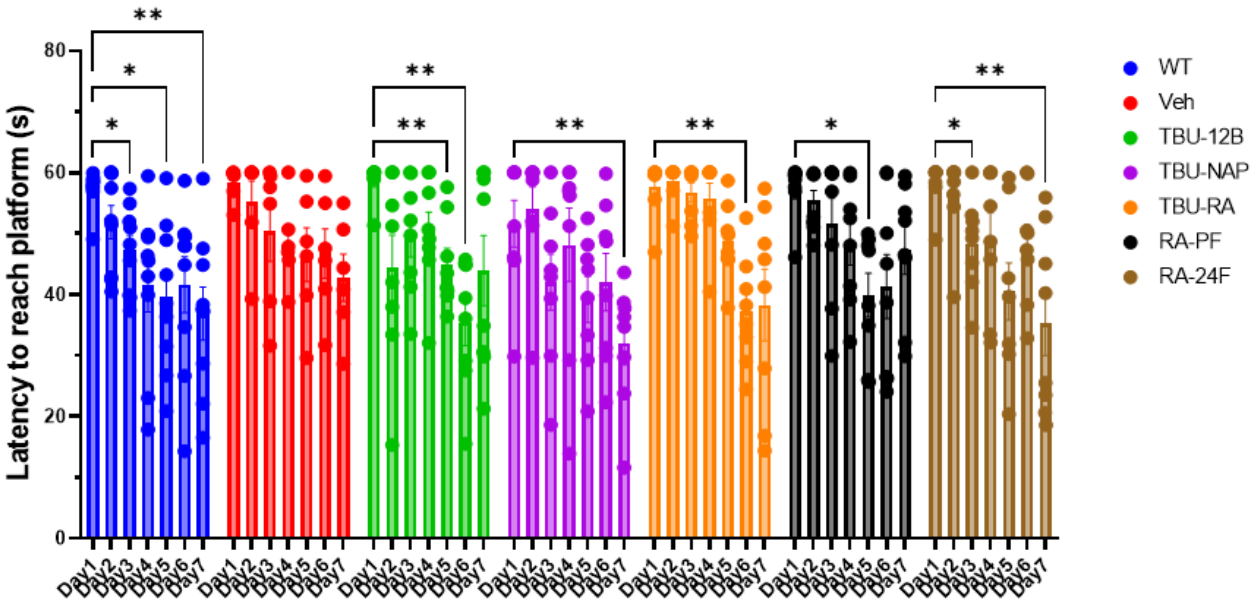
16) TBU-NAP, TBU-RA, RA-PF, RA-24F에서 platform을 찾는 시간이 빨라지는 경향을 확인함. Target 사분면에 머무른 시간을 평가했을 때, RA-PF, RA-24F 투약에 의해 사분면에 머문 시간이 증가하는 경향을 보임



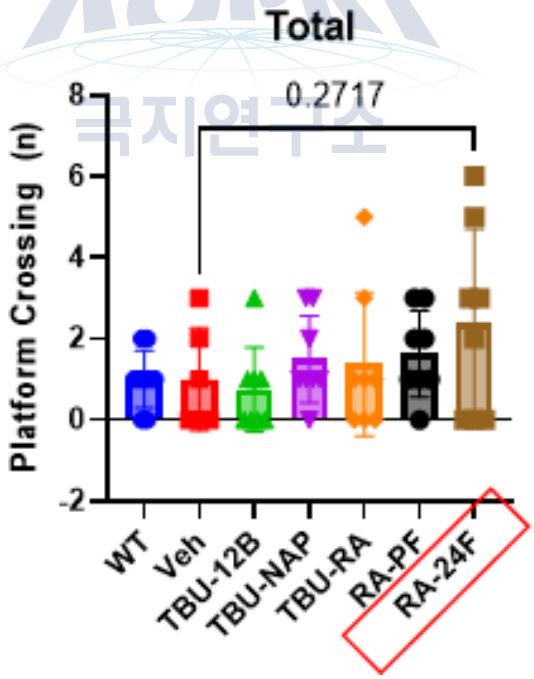
[그림 2-679. Morris water maze 실험 결과 1]



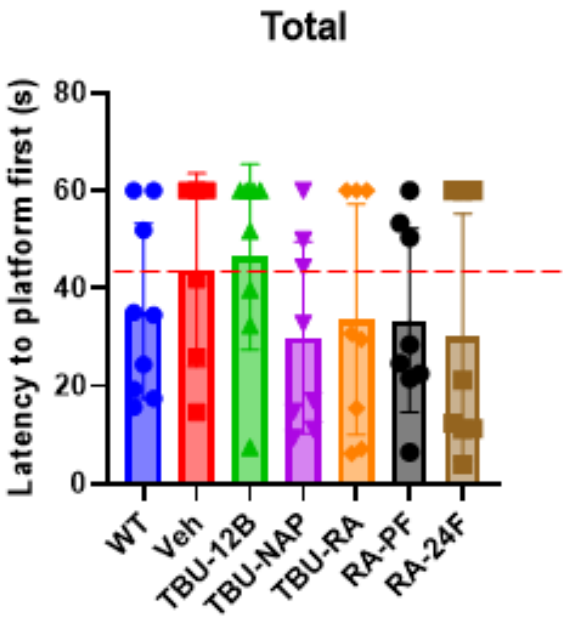
[그림 2-680. Morris water maze 실험 결과 2]



[그림 2-681. Morris water maze 실험 결과 3]

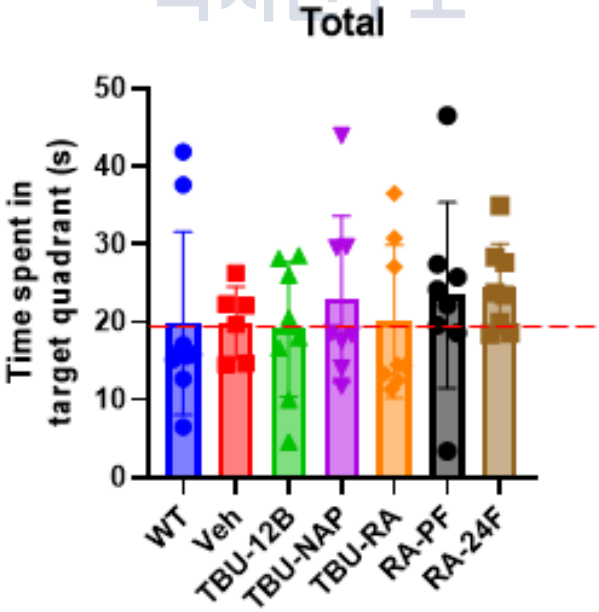


[그림 2-682. Morris water maze 실험 결과:
Probe day, platform crossing]

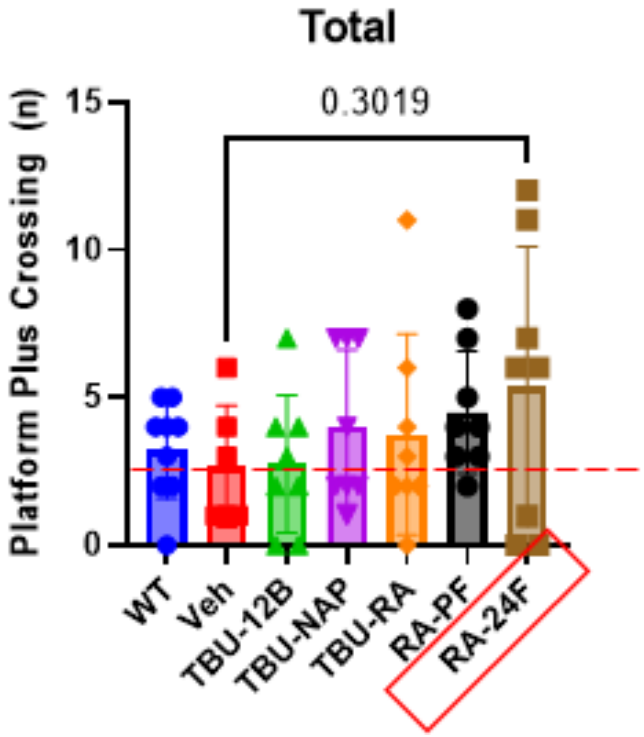


[그림 2-683. Morris water maze 실험 결과: Probe day, latency to platform first]

KOPRI 극지연구소

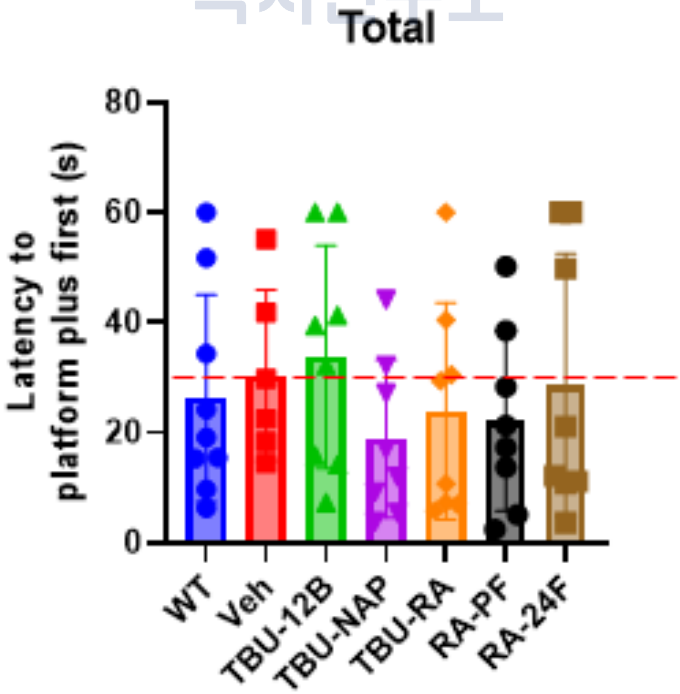


[그림 2-684. Morris water maze 실험 결과: Probe day, time spent in target quadrant]



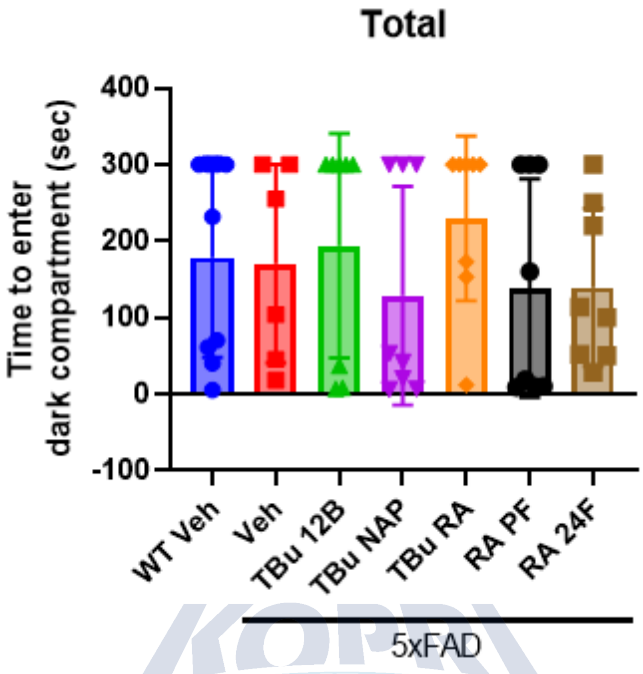
[그림 2-685. Morris water maze 실험 결과: Probe day, platform plus crossing]

KOPRI
극지연구소

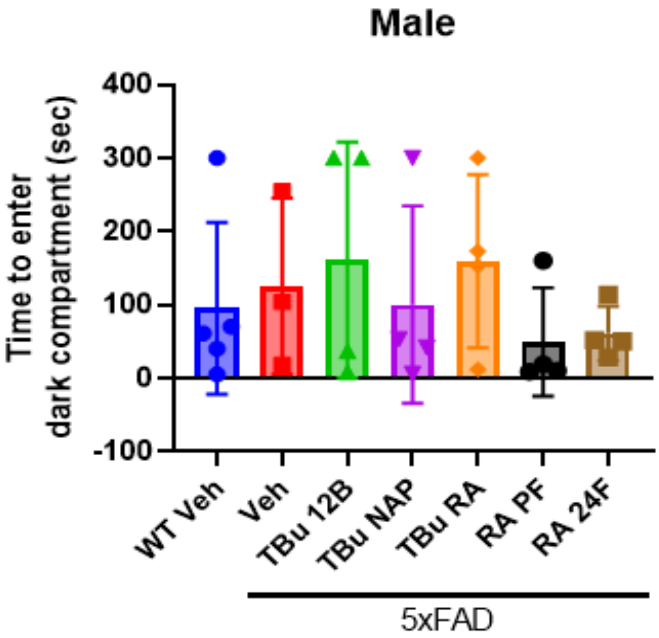


[그림 2-686. Morris water maze 실험 결과: Probe day, latency to platform plus first]

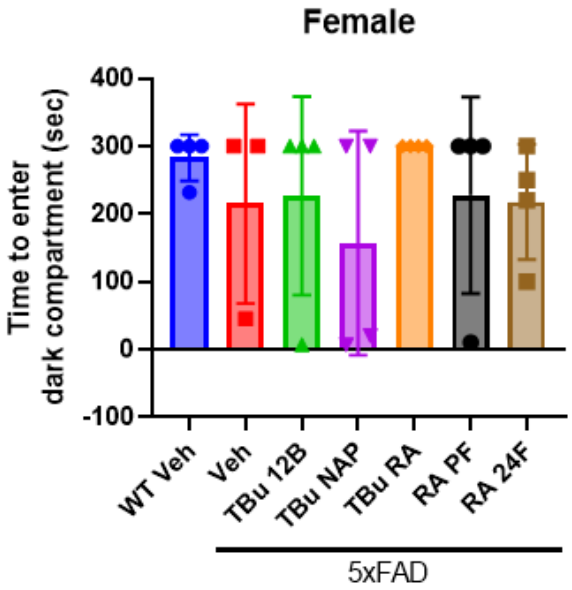
17) 자극에 의한 기억력을 테스트할 수 있는 passive avoidance test를 진행함. TBu RA 투여군이 5xFAD Veh군보다 암실에 들어가는 시간이 높은 경향을 보임. 이는 TBu RA 투여에 의해 기억력의 향상이 이뤄졌다고 해석할 수 있음



[그림 2-687. Passive avoidance test: Total]

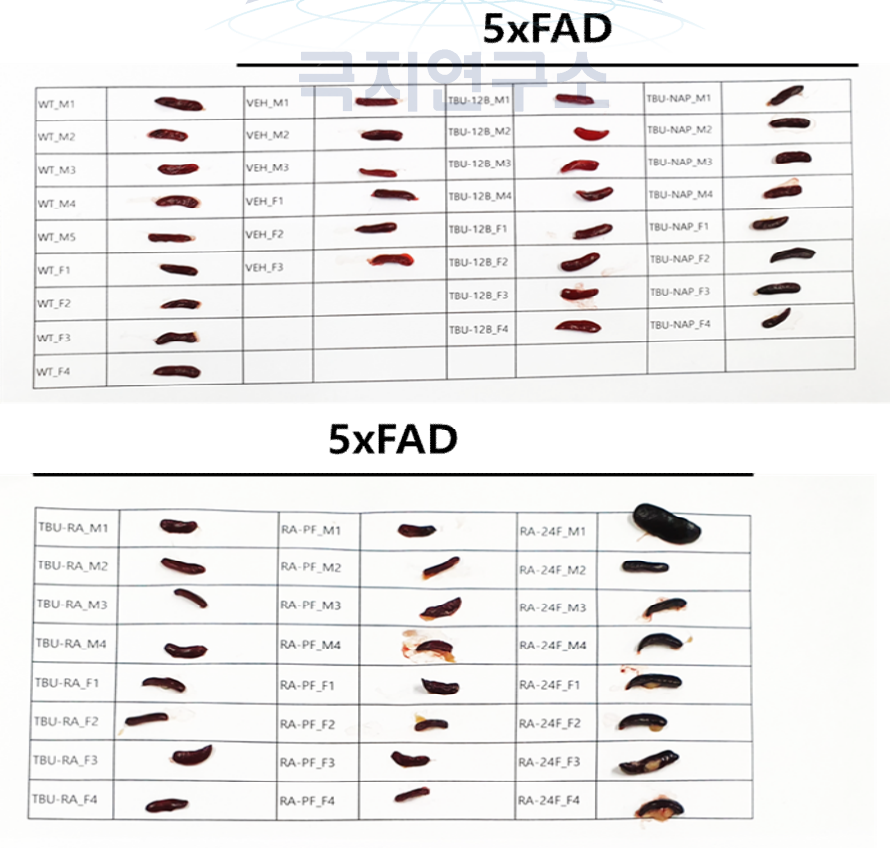


[그림 2-688. Passive avoidance test: Male]



[그림 2-689. Passive avoidance test: Female]

17) 비장크기 비교를 통한 독성 평가를 진행함. 그 결과, RA-24F에 의한 비장비대 독성을 확인함(그림 2-690)



[그림 2-690. 후보물질 투여에 의한 비장비대 독성 평가]

16) 3차 동물실험에서 TBU-12B, TBU-NAP, RA-PF, RA-24F 4종의 약효를 평가함. 약효를 보이는 결과에 + 로 표시함(그림 2-591)

17) RT-qPCR을 통해 mRNA를 분석했을 때, TBU-12B, RA-PF, RA-24F에서 anti-inflammatory 효과를 관찰함. IHC 결과, Aβ 축적에 대해 TBU-12B, RA-PF, RA-24F에서 약효를 확인했으며, gliosis 증상에 TBU-NAP, RA-PF, RA-24F에서 약효를 확인함

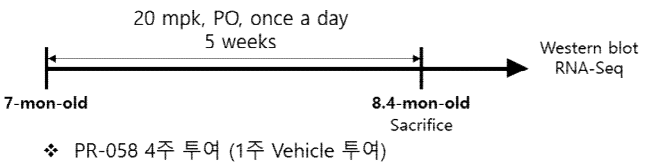
18) 동물 행동실험에서 TBU-NAP와 RA-PF이 우수성을 보임. 독성 평가 결과, RA-24F는 splenomegaly 증상을 보임. 종합해봤을 때, 행동학적 개선 효과와 분자세포생물학적 개선 효과를 보이는 가장 우수한 약물로 RA-PF를 동정하였으며, 이는 splenomegaly 독성을 보이지 않음

		TBU-12B	TBU-NAP	TBU-RA	RA-PF	RA-24F
Western blot	BACE1 inhibition					
	anti-inflammatory response					
qPCR	anti-inflammatory response	+++	+		+++	+++
	inhibition of gliosis					
IHC	inhibition of Amyloid β deposition	+			++	+
	inhibition of gliosis		+		++	++
Behavior study	Y-maze		+++		+++	
	MWM	+	++	+	+	+
Toxicity	Splenomegaly					Splenomegaly

[그림 2-691. 5xFAD에 대한 약효평가 요약]

○ 4차 동물실험: 3xTg-AD 동물모델에서 라말린 유도체의 유효성 평가

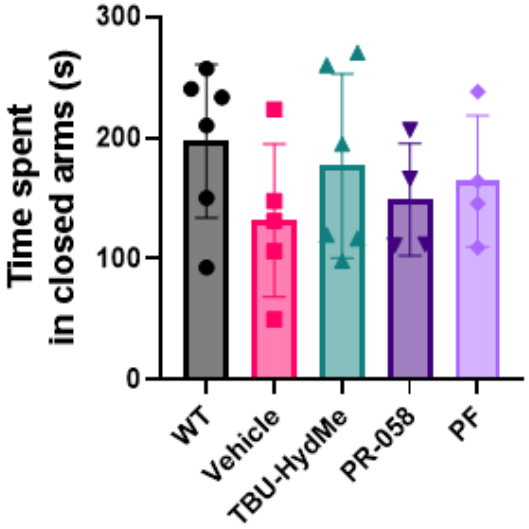
1) 3xTg-AD 동물모델에서 후보물질 효능을 평가함. 7개월령 3xTg-AD 마우스에 TBU-Hyd-Me, RA-PR058, RA-PF 약물을 20 mg/kg 용량으로 5주간 경구투여함. 불안장애 평가를 위해 elevated plus maze를 수행함. 생화학적 분석을 위해 단백질 및 전사체 발현을 western blot, RNA-seq을 활용하여 평가함(그림 2-692)



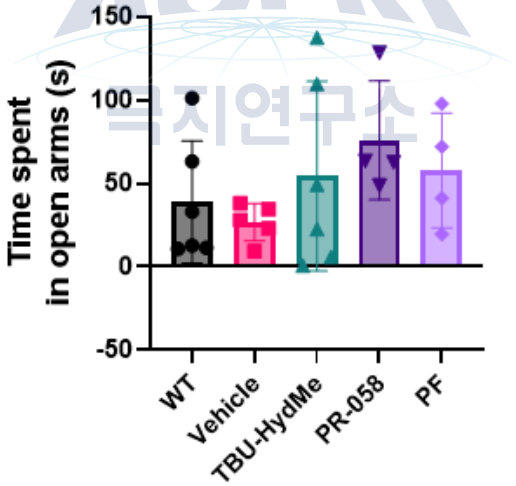
Group	Male	Female
WT	4	4
Vehicle	3	3
TBU-Hyd-Me	3	3
PR-058	2	3
RA-PF	2	2

3xTG

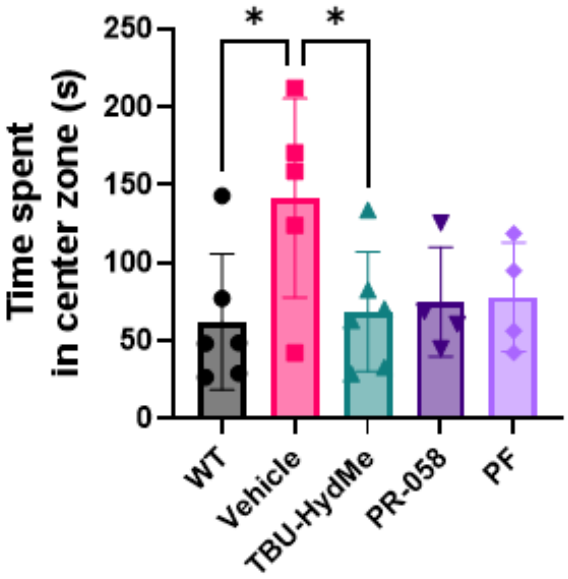
[그림 2-692. 3xTg-AD 동물모델에서 라말린 유도체 효능평가 일정]



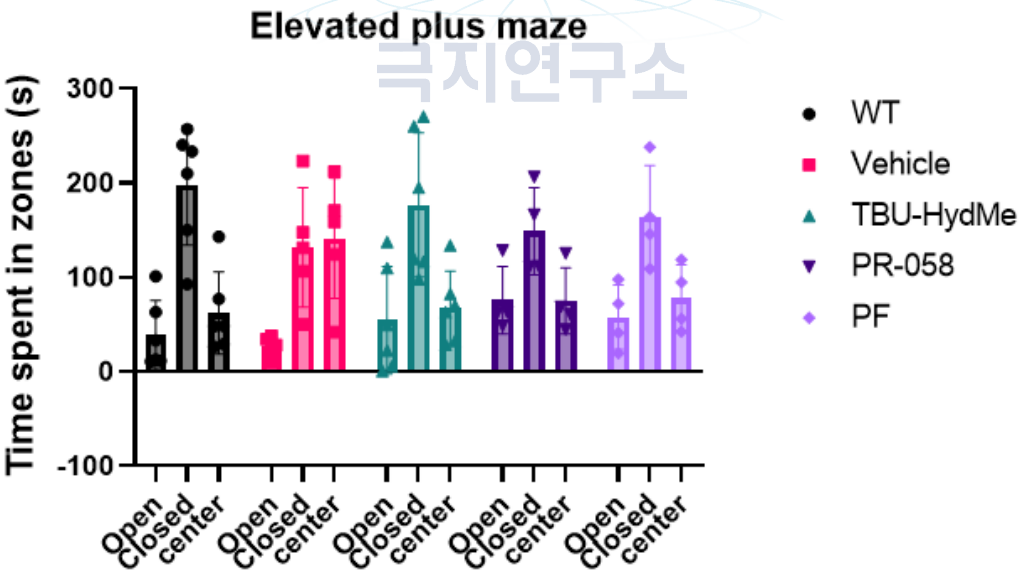
[그림 2-693. Elevated plus maze 실험 결과:
닫힌 구역에서 머문 시간]



[그림 2-694. Elevated plus maze 실험
결과: 열린 구간에서 머문 시간]

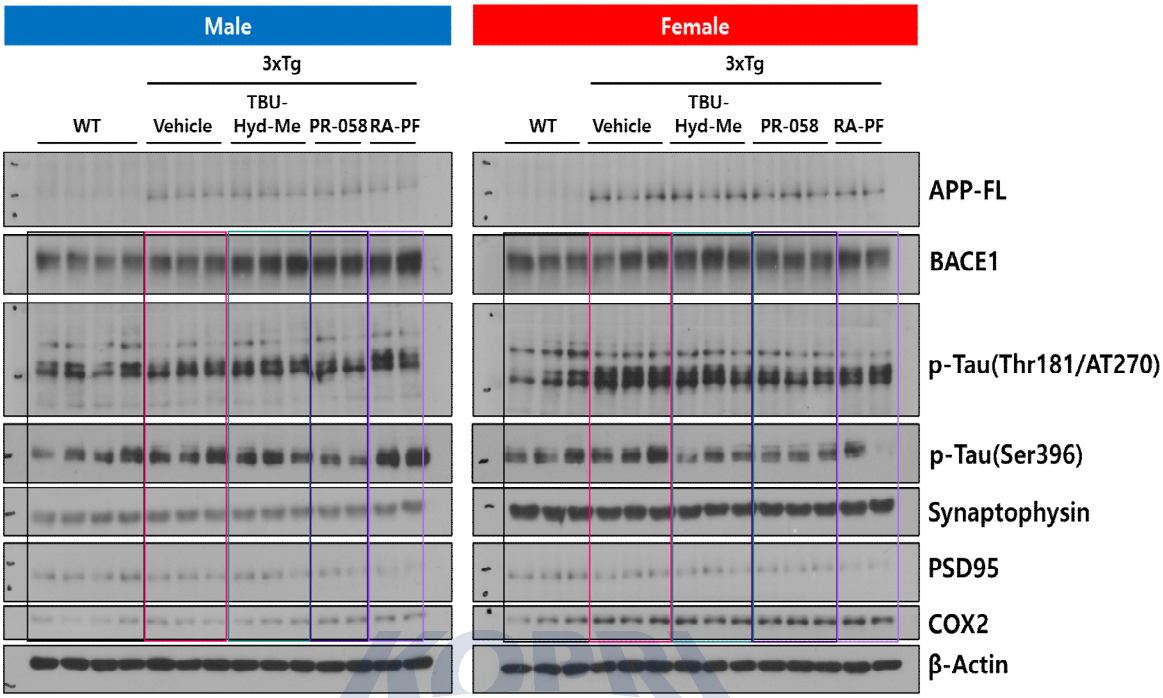


[그림 2-695. Elevated plus maze 실험 결과:
중앙 구역에서 머문 시간]



[그림 2-696. Elevated plus maze 실험 결과: 종합]

2) Western blot을 활용한 조직분석을 진행함. 3xTg-AD 마우스에서 amyloidogenic 병변과 tau 병변에 대해 western blot 기법을 통해 평가함. Female에서 TBU-Hyd-Me, RA-PR058, RA-PF 투약에 의해, p-Tau (Thr181, Ser396)의 감소가 보임(그림 2-697)

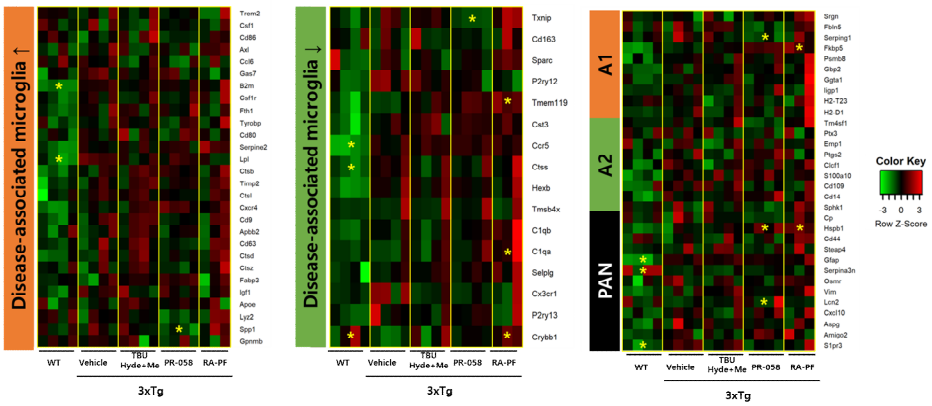


[그림 2-697. 3xTg-AD 동물모델에서 western blot을 통한 조직 분석]

3) RNA-seq을 활용하여 hippocampus에서 전사체를 분석함. Disease-associated microglia에서 증가되어 있다고 보고되는 유전자의 발현을 평가했을 때, 3xTg에서 증가되어 있는 것을 확인함

4) RA-PR058 투약에 의해 3xTg-AD 대비 *Spp1* 유전자 발현이 감소한 것을 확인함. Disease-associated microglia에서 감소되어 있다고 보고되는 유전자의 발현을 평가했을 때, RA-PR058 투여에 의해 *Txnip* 유전자 발현 감소가 확인되며, RA-PF 투여에 의해 *Tmm119*, *Crybb1*의 유전자 발현이 증가하는 것을 확인함

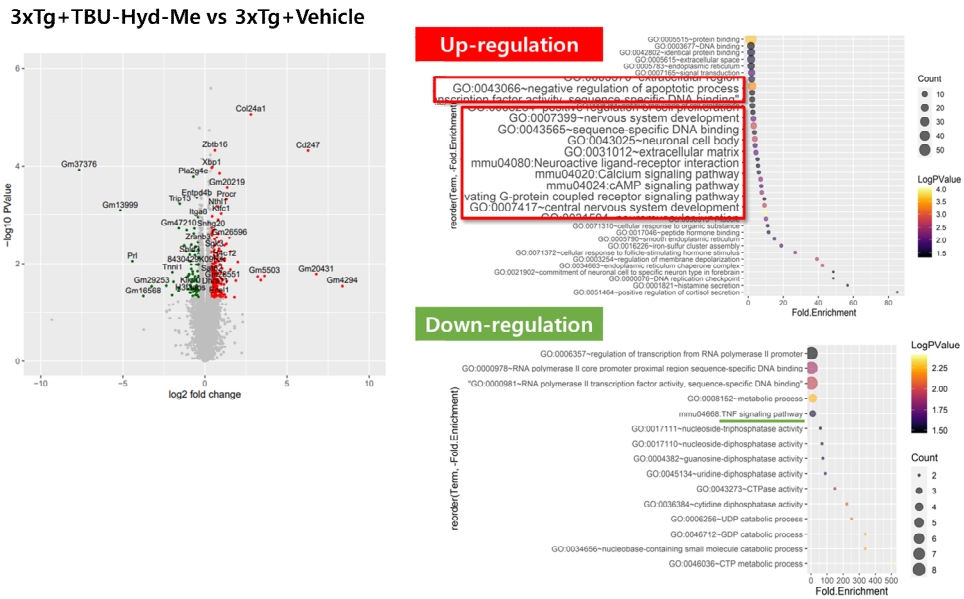
5) A1 astrocyte 마커의 경우 RA-PR058 투여에 의해 *Serping1* 발현이 감소하고, RA-PF 투여에 의해 *Fkbp5*가 증가함. Pan-astrocytre 마커의 경우 RA-PR058 투여에 의해 *Hspb1*, *Lcn2* 유전자 발현이 증가하며, RA-PF 투여에 의해 *Hsbp1* 유전자의 발현이 증가함(그림 2-698)



[그림 2-698. 3xTg-AD에서 후보물질 투여에 의한 microglia, astrocyte 유전자 발현패턴 분석]

6) 3xTg+Vehicle 투약군과 3xTg+TBU-Hyd-Me 투약군의 전사체를 분석하여, 유전자 발현 차이를 평가함

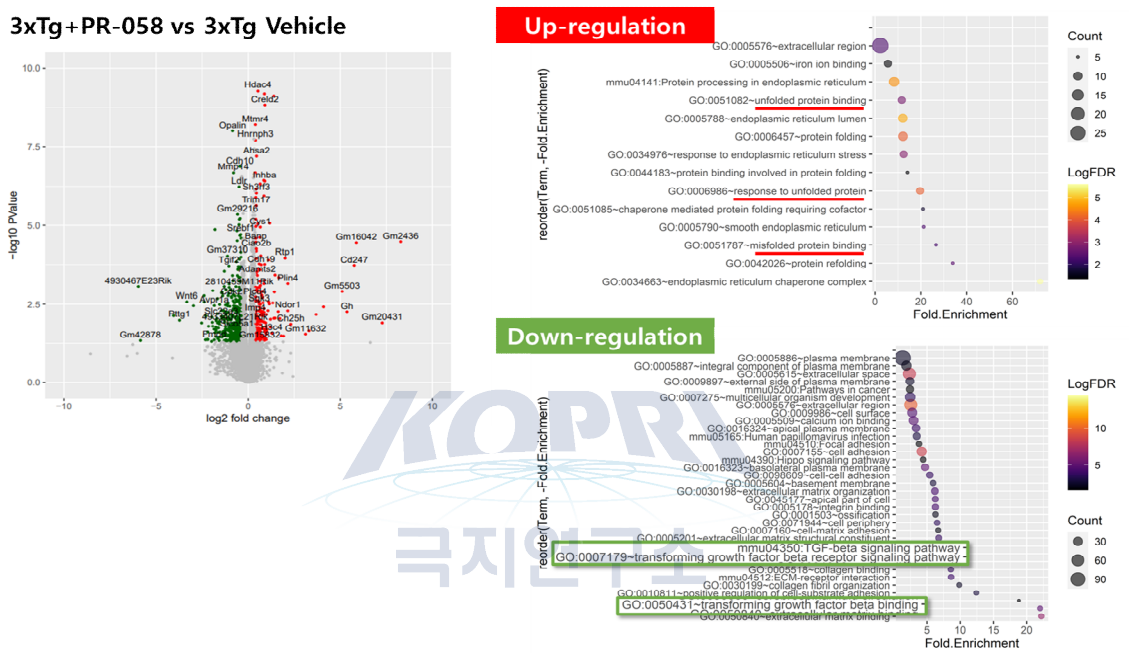
7) Up-regulation된 유전자를 붉은색으로, down-regulation된 유전자를 초록색으로 표시하여 volcano plot으로 표현함. Up-regulation된 유전자를 gene ontology 분석하였을 때 negative regulation of apoptosis process, nervous system development, central nervous system development 등에 관련한 것을 확인함. Down-regulation된 유전자를 Gene ontology 분석하였을 때, TNF signaling pathway 등에 관련한 것을 확인함(그림 2-699)



[그림 2-699. 3xTg-AD 마우스에서 TBU-Hyd-Me 투약에 의한 유전자 발현 gene ontology 분석]

8) 3xTg+Vehicle 투약군과 3xTg+RA-PR058 투약군의 전사체를 분석하여, 유전자 발현 차이를 평가함. Up-regulation된 유전자를 붉은색으로, down-regulation된 유전자를 초록색으로 표시하여 volcano plot으로 표현함

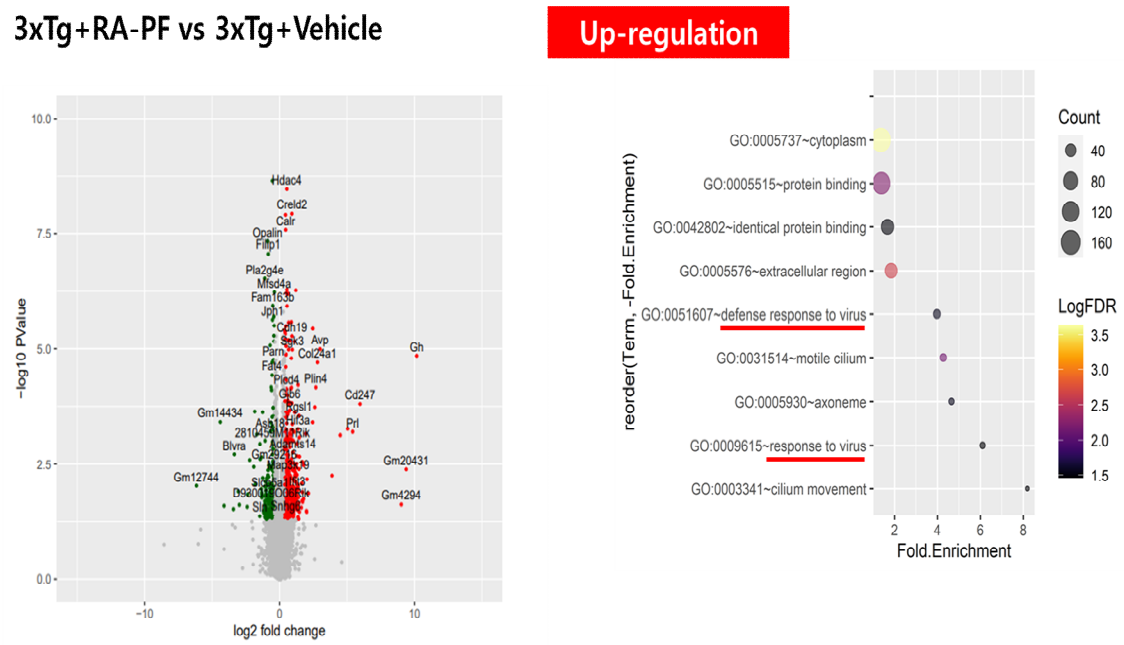
9) Up-regulation된 유전자를 Gene ontology 분석했을 때, unfolded protein binding, response to unfolded protein, misfolded protein binding 등에 관련한 것을 확인함. Down-regulation된 유전자를 Gene ontology 분석했을 때, TGF-β signaling pathway 등에 관련한 것을 확인함(그림 2-700)



[그림 2-700. 3xTg-AD 마우스에서 RA-PR058 투약에 의한 유전자 발현 gene ontology 분석]

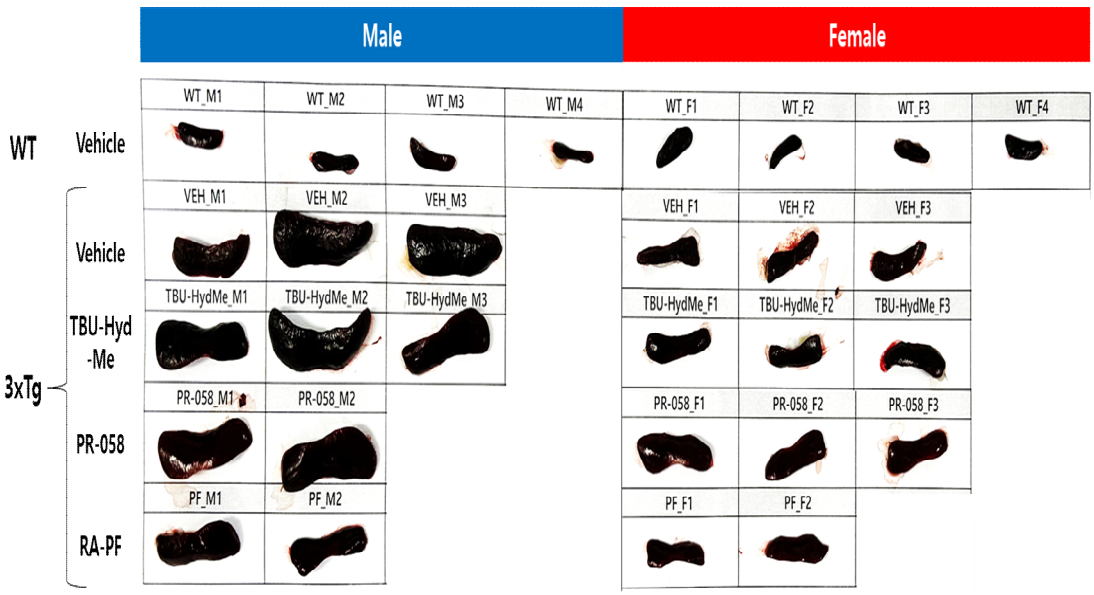
10) 3xTg+Vehicle 투약군과 3xTg+RA-PF 투약군의 전사체를 분석하여, 유전자 발현 차이를 평가함. Up-regulation된 유전자를 붉은색으로, down-regulation된 유전자를 초록색으로 표시하여 volcano plot으로 표현함

11) Up-regulation된 유전자를 Gene ontology 분석하였을 때 defense response to virus, response to virus 등에 관련한 것을 확인함(그림 2-701)



[그림 2-701. 3xTg-AD 마우스에서 RA-PF 투약에 의한 유전자 발현 gene ontology 분석]

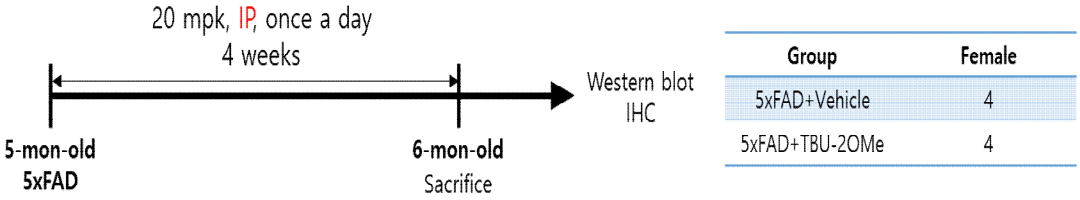
12) 비장크기 비교를 통한 후보물질의 독성 평가를 진행함. 3xTg-AD에서 WT에 비해 비장비대가 관찰됨. RA-PF 투약에 의해 비장 크기가 감소하는 것을 확인함. 이는 전신 염증반응의 감소와 관련될 수 있음(그림 2-702)



[그림 2-702. 후보물질 투약에 의한 비장비대 독성 평가]

○ 5차 동물실험: 5xFAD 동물모델에서 라말린 유도체의 유효성 평가

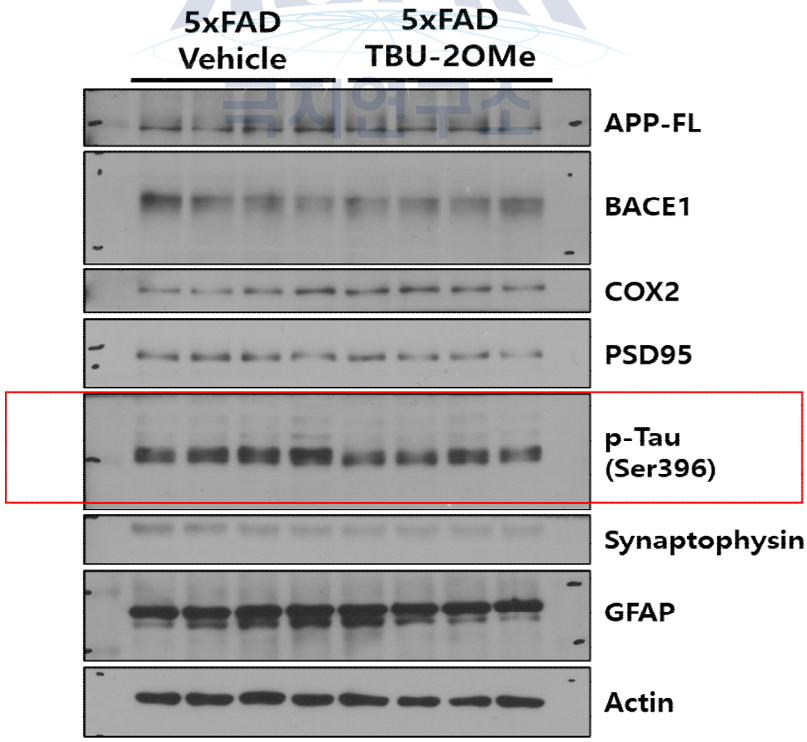
1) Amyloidogenic 병변을 관찰할 수 있는 5xFAD AD 동물모델을 활용하여 라말린 유도체의 유효성을 평가함. 5개월령 5xFAD Female 마우스에 TBU-2OMe 약물을 20 mg/kg 용량으로 1개월간 복강투여함. 이후 생화학적 분석을 위해 단백질 발현을 western blot, IHC를 활용하여 평가함(그림 2-703)



Group	Female
5xFAD+Vehicle	4
5xFAD+TBU-2OMe	4

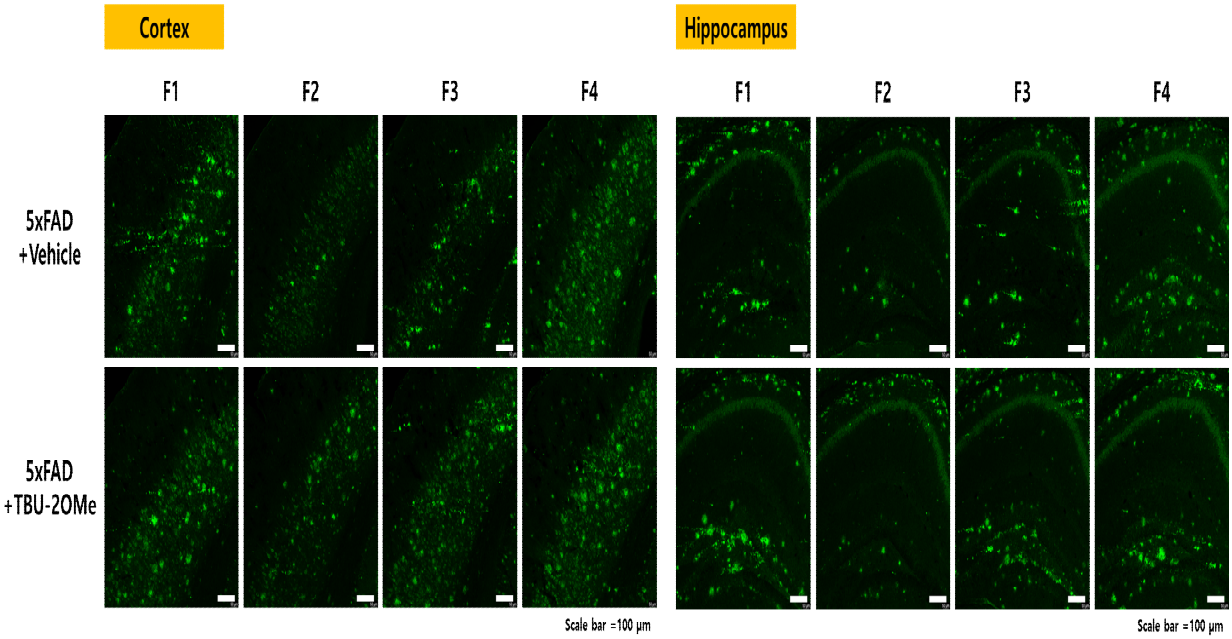
[그림 2-703. 5xFAD 동물모델에서 라말린 유도체 효능평가 일정]

2) 5xFAD 마우스에서 후보물질 TBU-NAP, RA-PF의 약효를 단백질 수준에서 평가함. 그 결과, Hippocampus에서 물질 투여에 의한 p-Tau(Ser396)의 감소를 확인함(그림 2-704)



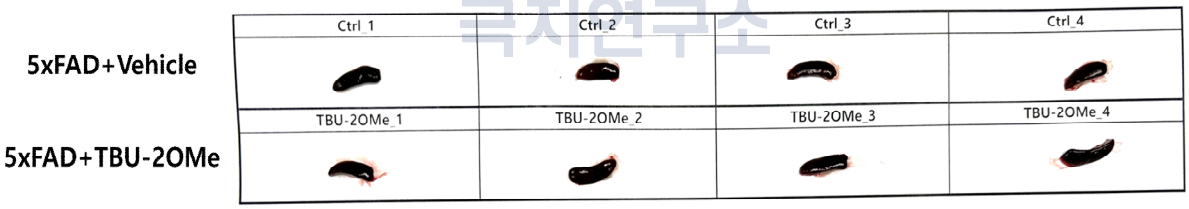
[그림 2-704. 5xFAD 마우스에서 western blot을 통한 조직 분석]

3) 6E10 항체를 이용하여 Aβ plaque 분포를 확인함. 그 결과, TBU-2OMe 투약에 의한 Aβ plaque 분포의 변화를 확인하지 못함(그림 2-705)



[그림 2-705. 5xFAD 마우스에서 IHC를 통한 Aβ 평가]

4) 비장크기 비교를 통해 후보물질의 독성 평가를 진행함. TBU-2OMe 복강투여에 의한 비장 비대독성은 보이지 않음(그림 2-706)

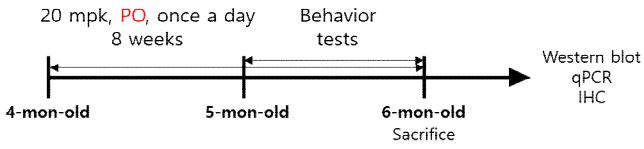


[그림 2-706. 후보물질 투약에 의한 비장비대 독성 평가]

○ 6차 동물실험: 5xFAD 동물모델에서 라말린 유도체의 유효성 평가

1) Amyloidogenic 병변을 관찰할 수 있는 5xFAD AD 동물모델을 활용하여 라말린 유도체의 유효성을 평가함

2) 4개월령 5xFAD 마우스에 TBU-Hyd-Me, Ramalin, RA-PF, RA-PR076, RA-058HM을 20 mg/kg 용량으로 2개월간 경구투여함. 행동실험으로써 open field test, Y-maze, MWM을 수행함. 생화학적 분석을 위해 단백질 및 mRNA 발현을 western blot, qPCR, IHC를 활용하여 평가함(그림 2-707)

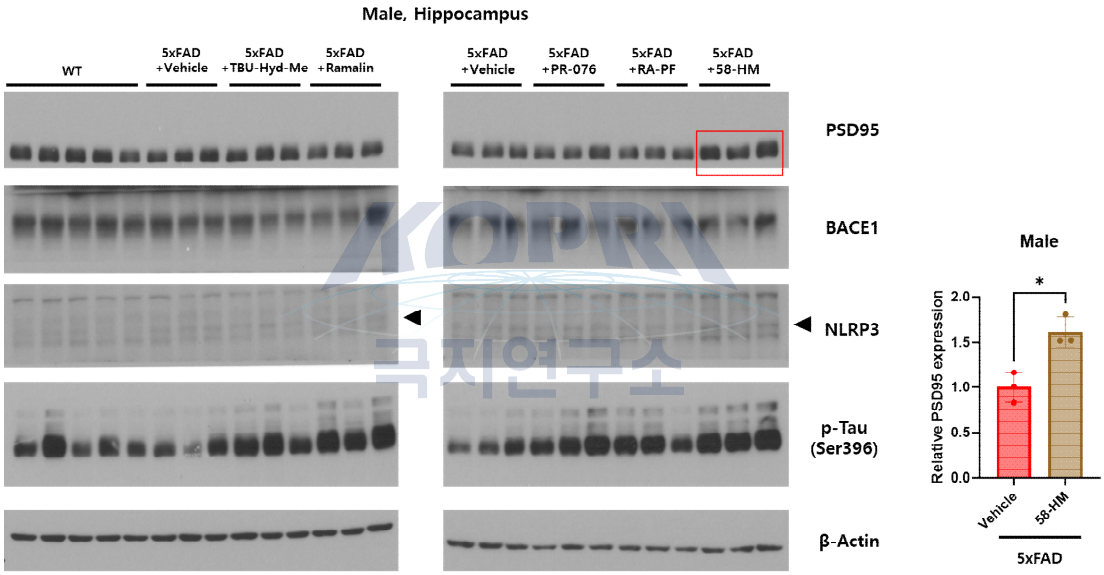


	Group	Male	Female
WT	Vehicle	5	5
5xFAD	Vehicle	3	5
	TBU-Hyd-Me	3	5
	Ramalin	3	4
	RA-PF	3	4
	PR-076	3	4
	058-HM	3	2

❖ 058-HydMe 6.5주 투여 (2.5주 Vehicle 투여)

[그림 2-707. 5xFAD 마우스에서 라말린 유도체 효능평가 일정]

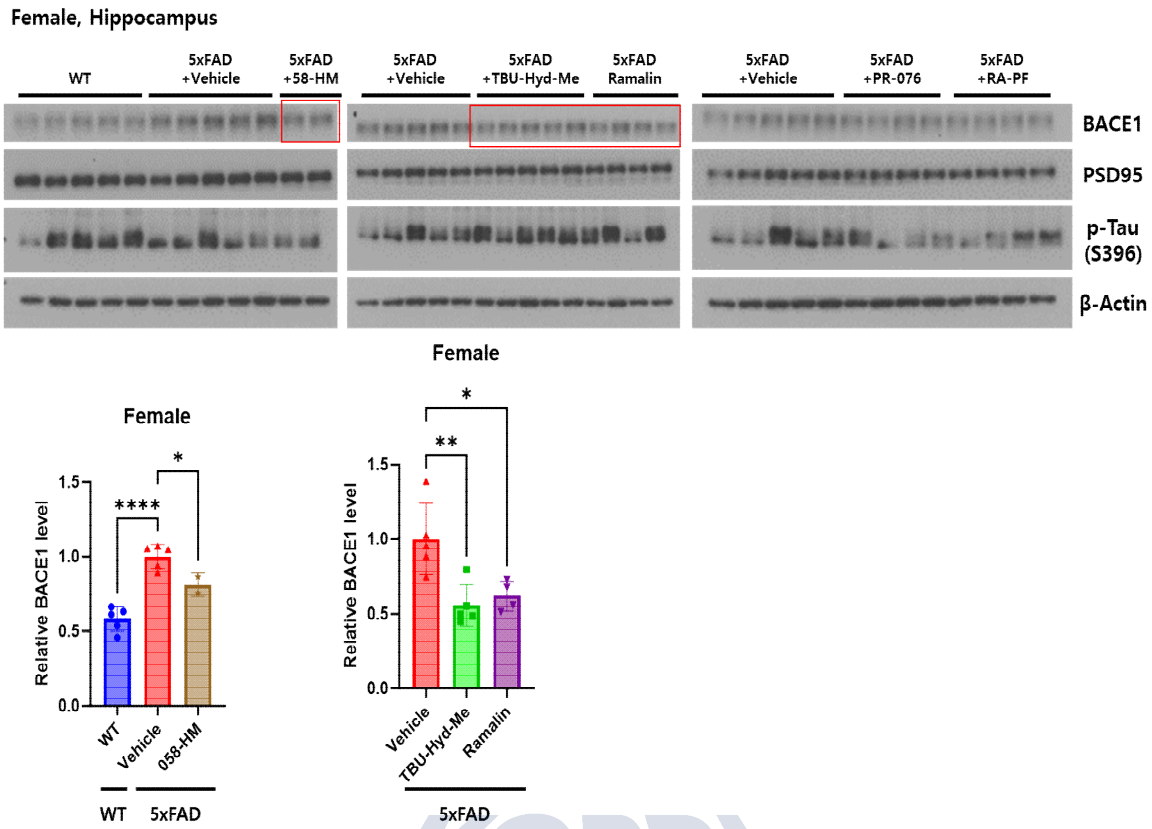
3) 5xFAD male 마우스의 hippocampus에서 후보물질 TBU-Hyd-Me, Ramalin, RA-PR076, RA-PF, RA-058HM의 약효를 단백질 수준에서 평가함. 그 결과, 5xFAD vehicle 투여군에 비해 RA-058HM 투여에 의해 PSD95 단백질 발현이 증가하는 것을 확인함(그림 2-708)



[그림 2-708. 5xFAD male 마우스에서 western blot을 통한 조직 분석]

4) 5xFAD female 마우스의 hippocampus에서 후보물질 TBU-Hyd-Me, Ramalin, RA-PR076, RA-PF, RA-058HM의 약효를 단백질 수준에서 평가함

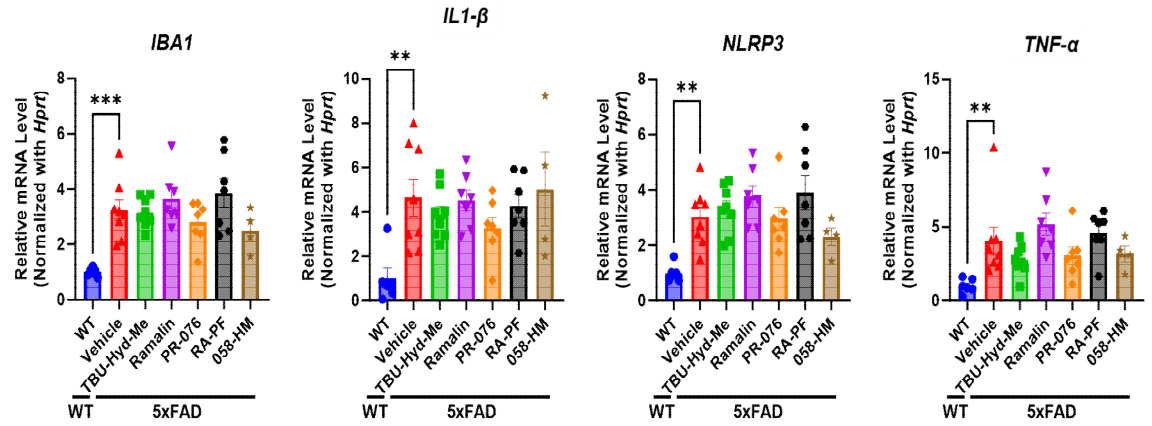
5) 5xFAD 마우스에서 BACE1의 발현 증가가 관찰되며, RA-058HM, TBU-Hyd-Me, Ramalin 투여에 의해 발현량이 통계적으로 유의하게 감소하는 것을 확인함(그림 2-709)



[그림 2-709. 5xFAD female 마우스에서 western blot을 통한 조직 분석]

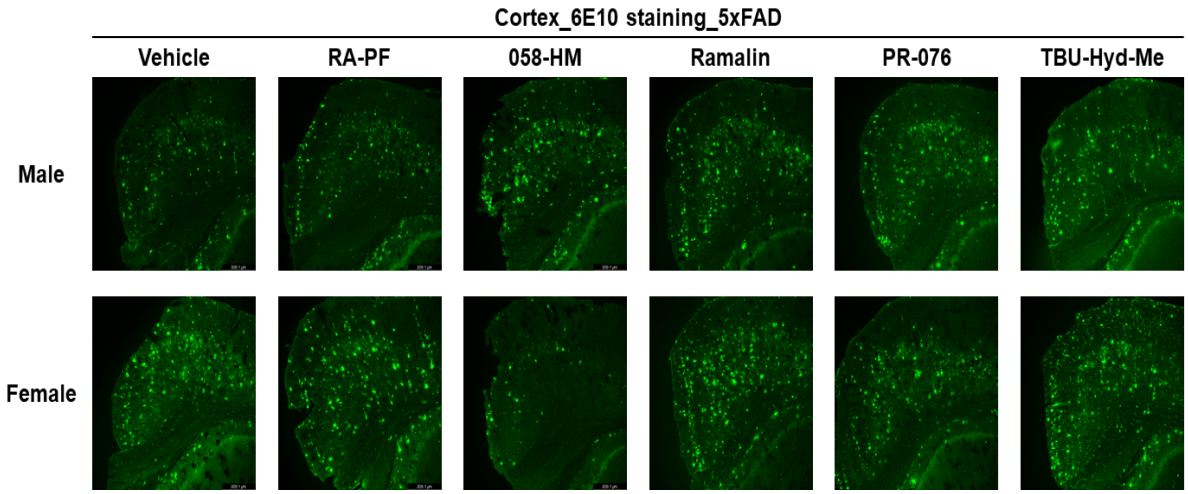
6) 5xFAD 마우스에서 후보물질 투여에 의한 hippocampus에서 염증인자의 mRNA 발현을 평가함

7) WT 대비 5xFAD에서 *Iba1*, *Il1b*, *Nlrp3*, *Tnfa*의 증가를 확인함. 후보물질 투약 중 RA-058HM 투여에 의해 *Iba1*, *Il1b*, *Tnfa* 발현의 감소 경향을 확인함(그림 2-710)



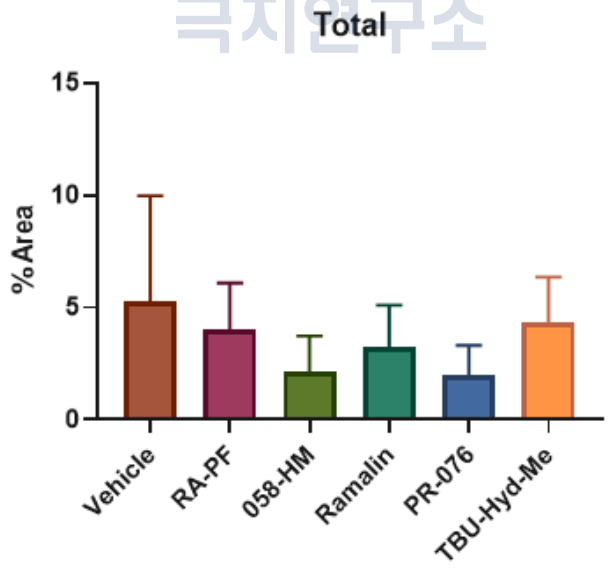
[그림 2-710. 5xFAD 마우스에서 RT-qPCR을 통한 mRNA 발현 평가]

8) 6E10 항체를 이용하여 Aβ 분포를 확인함. Male에서 후보물질의 투약에 의한 Aβ 분포에 감소 효과를 확인하지 못함. Female에서 후보물질 RA-058HM, RA-PR076에서 두드러진 Aβ 분포 감소를 확인하였으며 RA-PF, Ramalin, TBU-Hyd-Me 투약에 의해 Aβ 분포 감소 경향을 보임(그림 2-711~718)

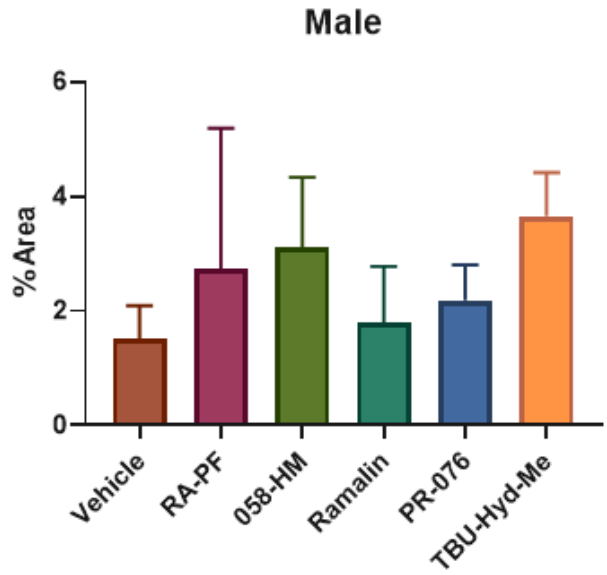


[그림 2-711. IHC를 통한 6E10 분포 평가: Cortex]

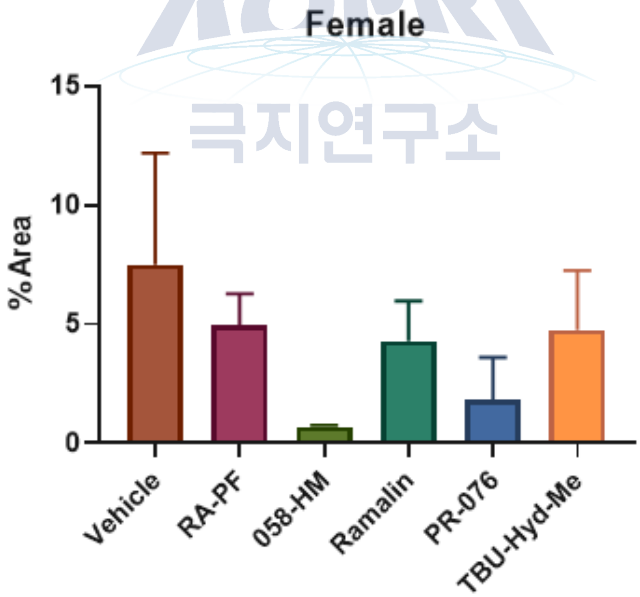
KOPRI 극지연구소



[그림 2-712. 그림 2-1441 정량 분석: Total]

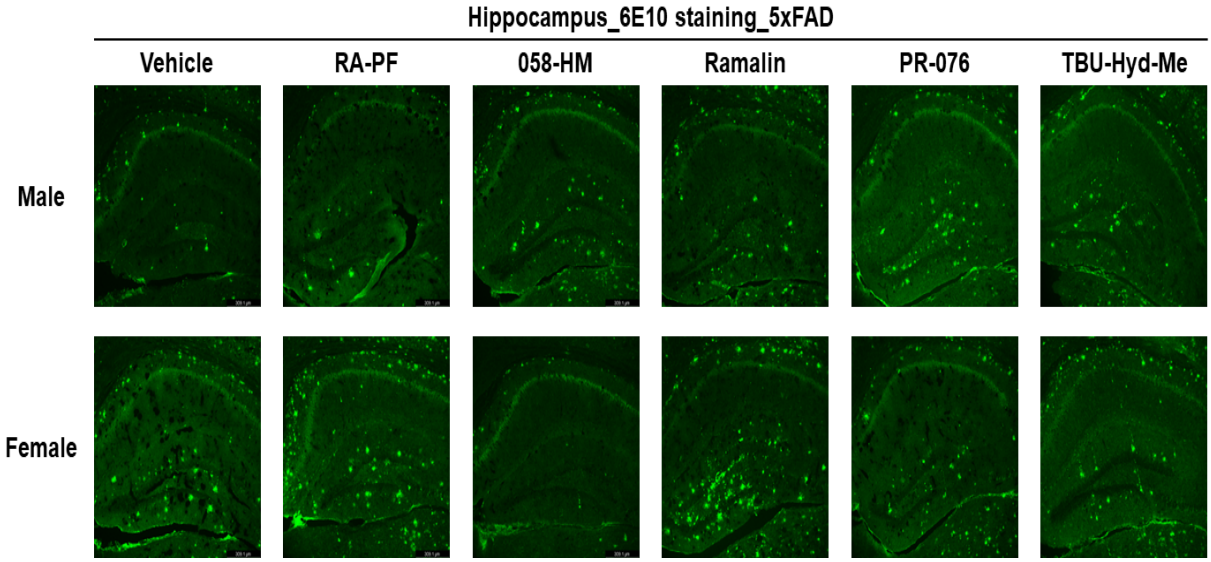


[그림 2-713. 그림 2-1441 정량 분석: Male]

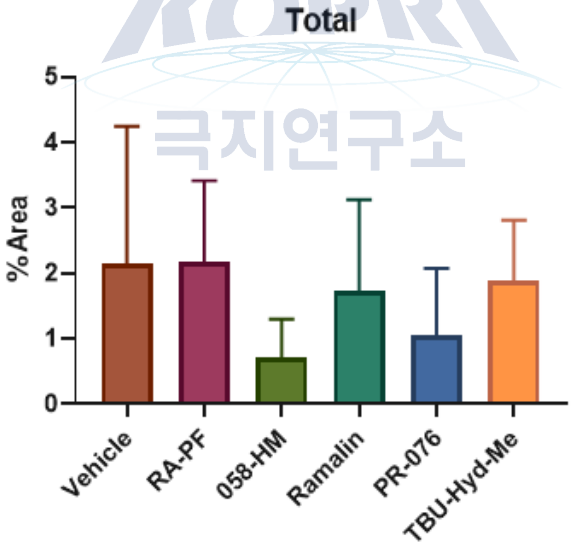


[그림 2-714. 그림 2-1441 정량 분석: Female]

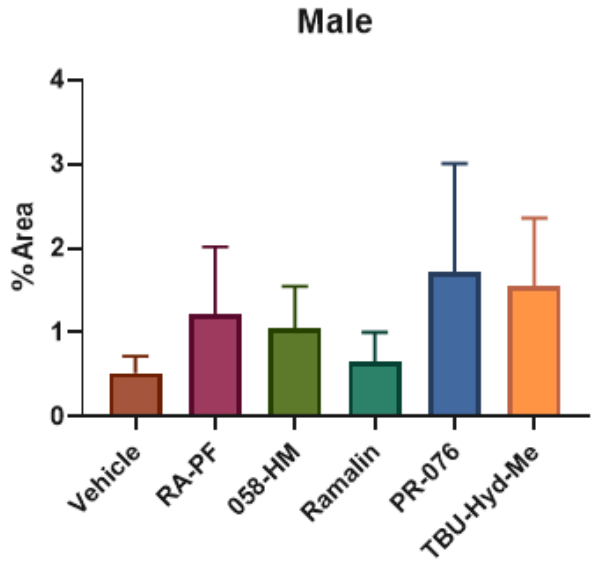
KORRI 극지연구소



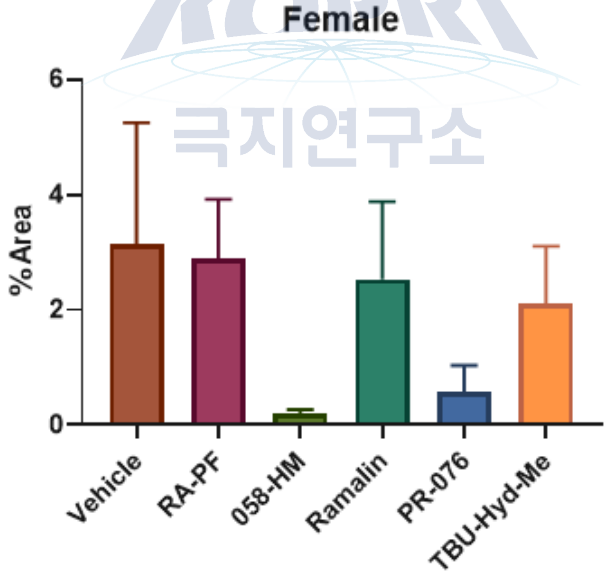
[그림 2-715. IHC를 통한 6E10 분포 평가: Hippocampus]



[그림 2-716. 그림 2-1445 정량 분석: Total]

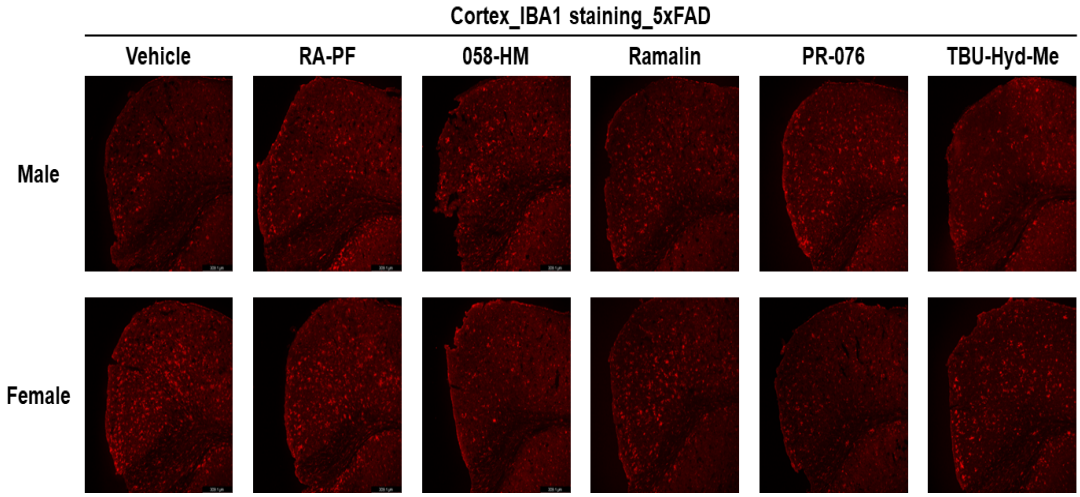


[그림 2-717. 그림 2-1445 정량 분석: Male]



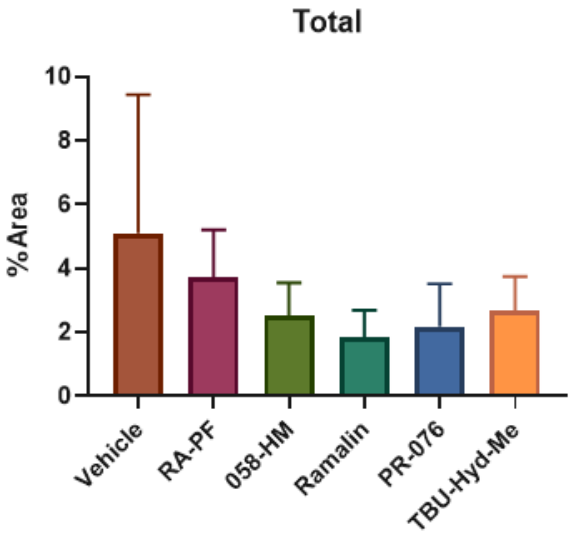
[그림 2-718. 그림 2-1445 정량 분석: Female]

9) IBA1 항체를 활용하여 microglica 활성을 평가함. Male에서 후보물질 투약에 의한 IBA1의 감소 효과를 확인하지 못함. Female cortex와 hippocampus에서 RA-PF, RA-058HM, Ramalin, RA-PR076, TBU-Hyd-Me 투약에 의해 IBA1 발현량이 감소하는 것을 확인함(그림 2-719~726)

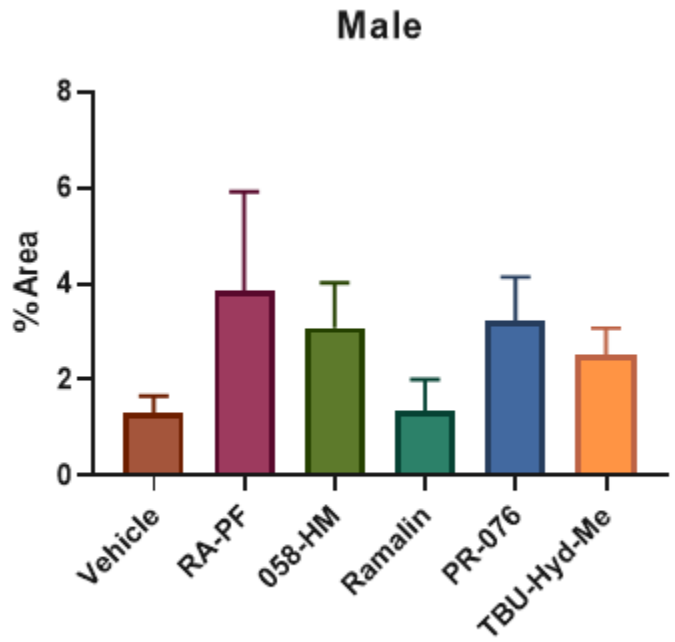


[그림 2-719. IHC를 통한 IBA1 분포 평가: Cortex]

KOPRI 극지연구소

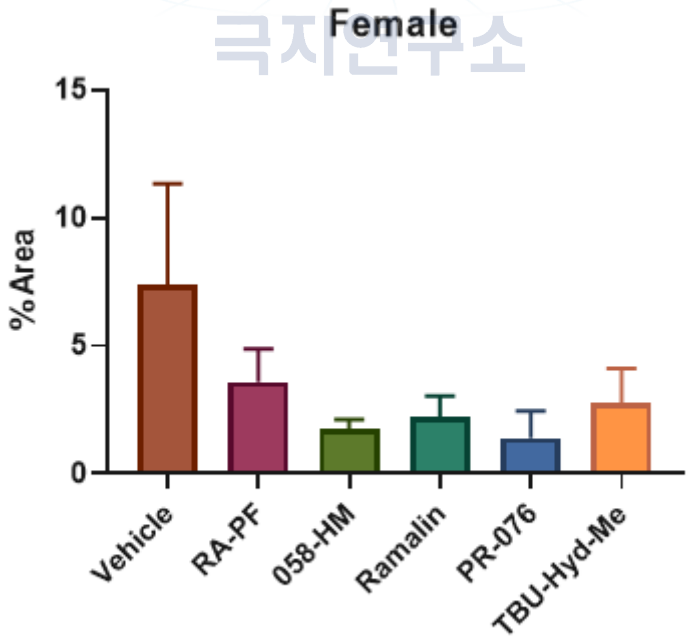


[그림 2-720. 그림 2-719 정량 분석: Total]

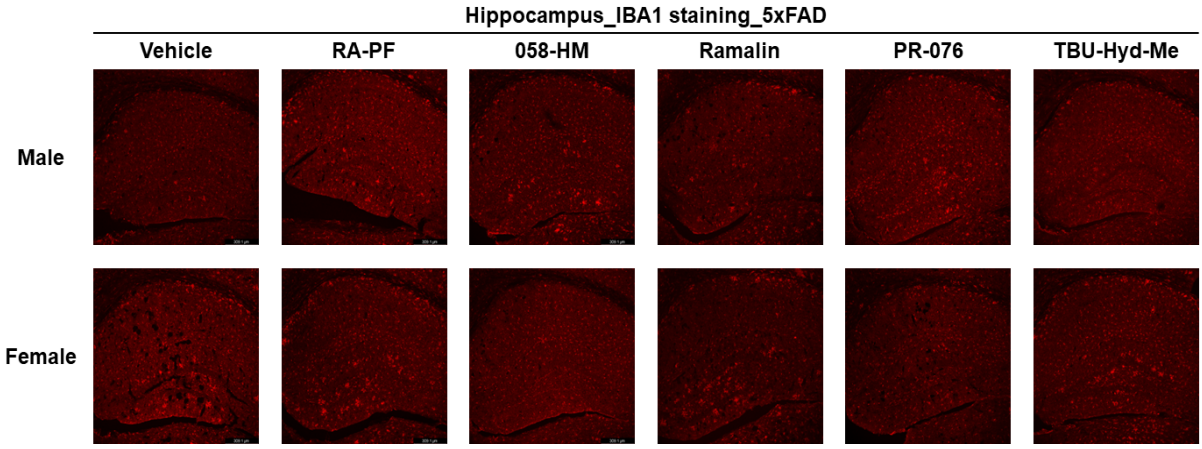


[그림 2-721. 그림 2-719 정량 분석: Male]

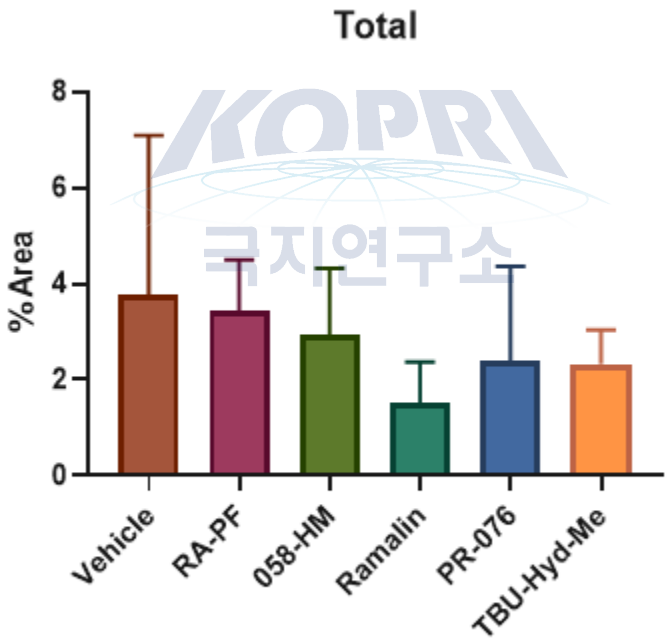
KOPRI
극지연구소



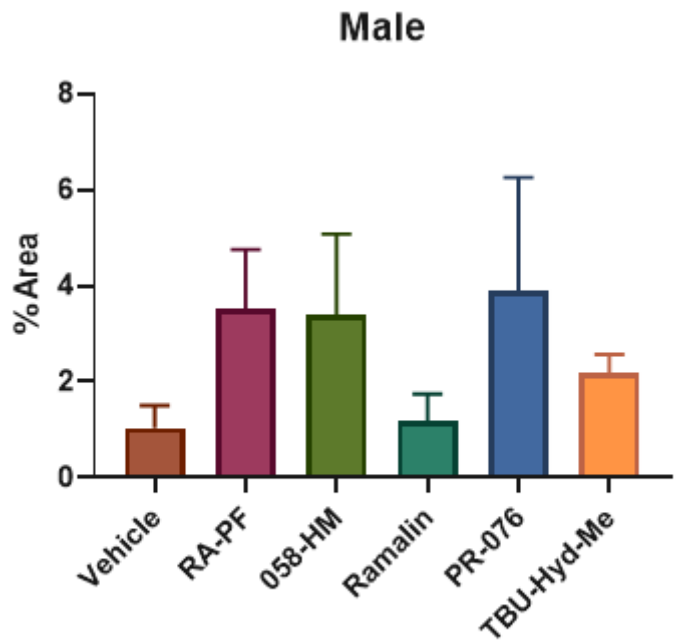
[그림 2-722. 그림 2-719 정량 분석: Female]



[그림 2-723. IHC를 통한 IBA1 분포 평가: Hippocampus]

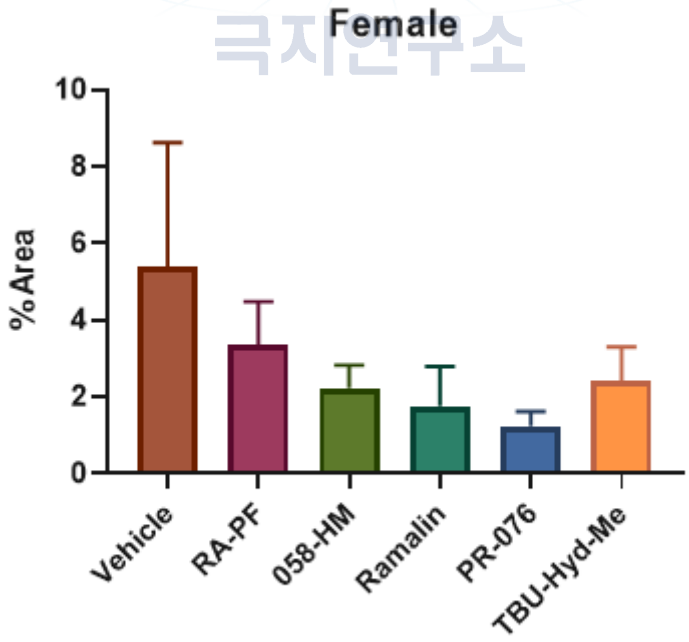


[그림 2-724. 그림 2-723 정량 분석: Total]



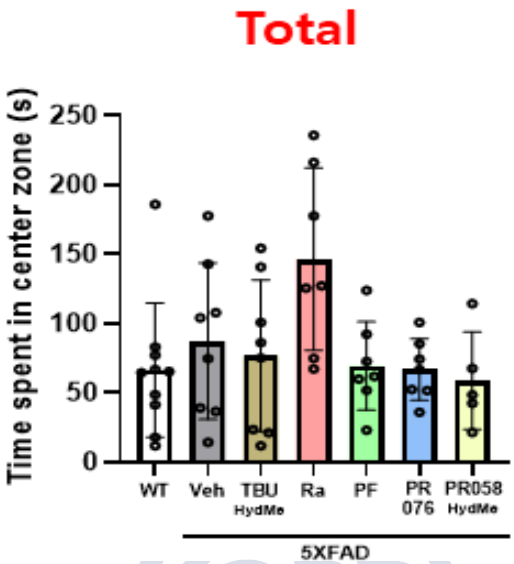
[그림 2-725. 그림 2-723 정량 분석: Male]

KOPRI
극지연구소

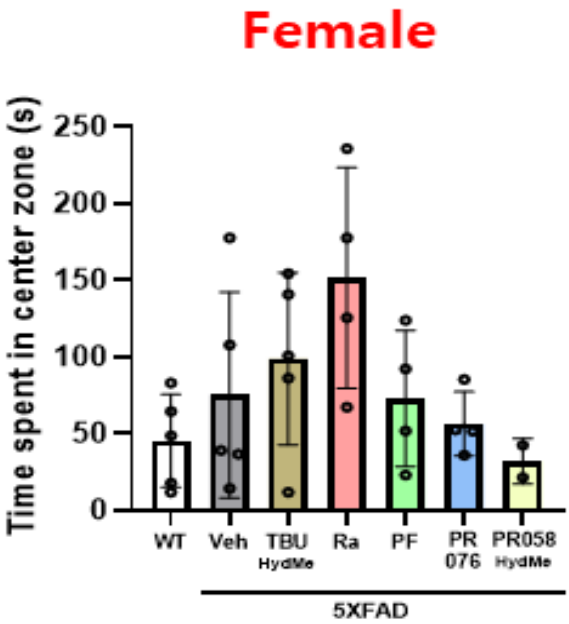


[그림 2-726. 그림 2-723 정량 분석: Female]

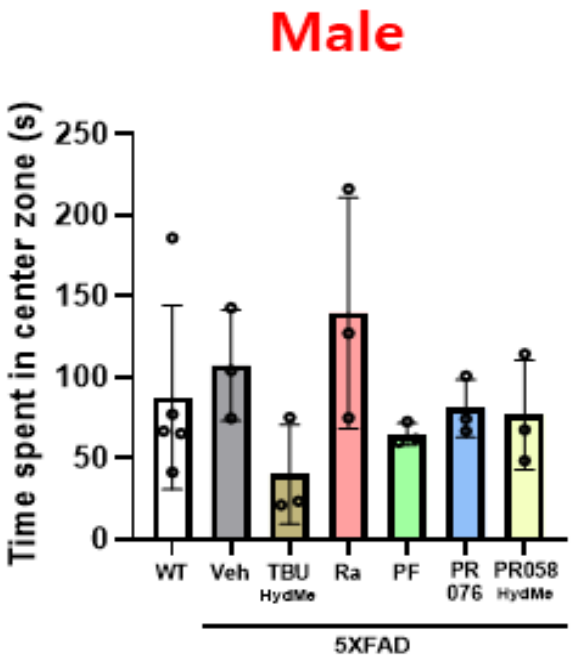
10) AD에서 나타나는 증상 중 하나인 불안장애를 평가하기 위하여 Open field test를 수행함. Open field 내에서 5xFAD 마우스에서 속도가 더 빠른 것으로 보아 불안장애를 보이는 것을 확인함. 후보물질 Ramalin 투약에 의해 5xFAD에 비해 불안장애 개선의 지표인 center zone에 머무르는 시간이 증가한 것을 확인함(그림 2-727~733)



[그림 2-727. Open field test 결과: Total, 중앙에 머문 시간]

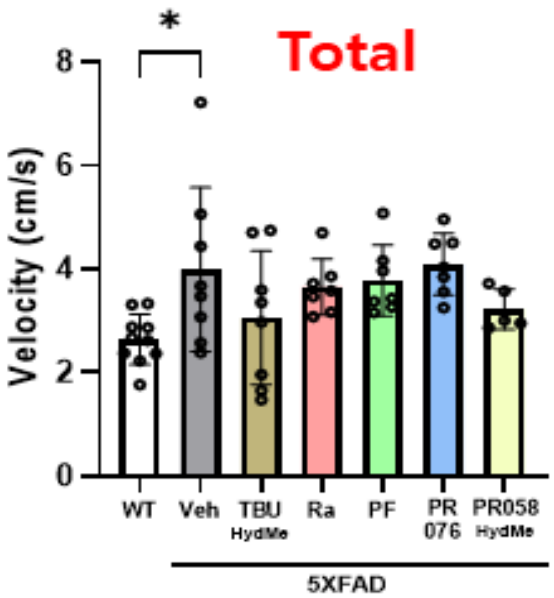


[그림 2-728. Open field test 결과: Female, 중앙에 머문 시간]

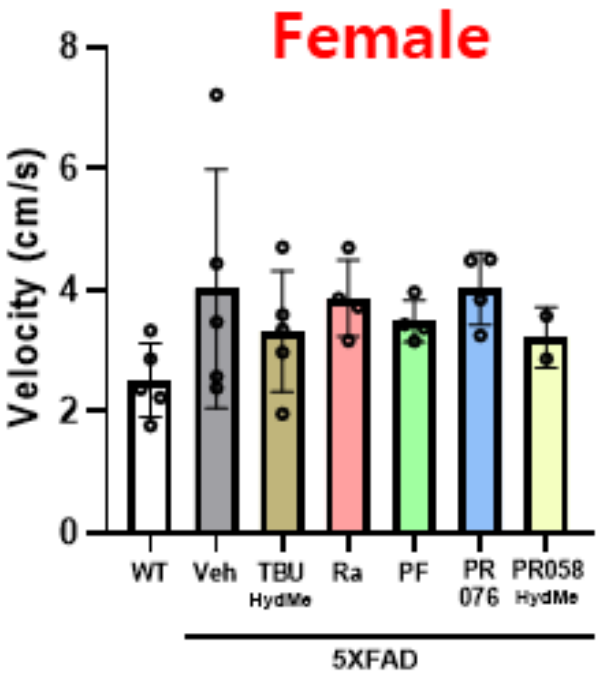


[그림 2-729. Open field test 결과: Male, 중앙에 머문 시간]

KOPRI
극지연구소

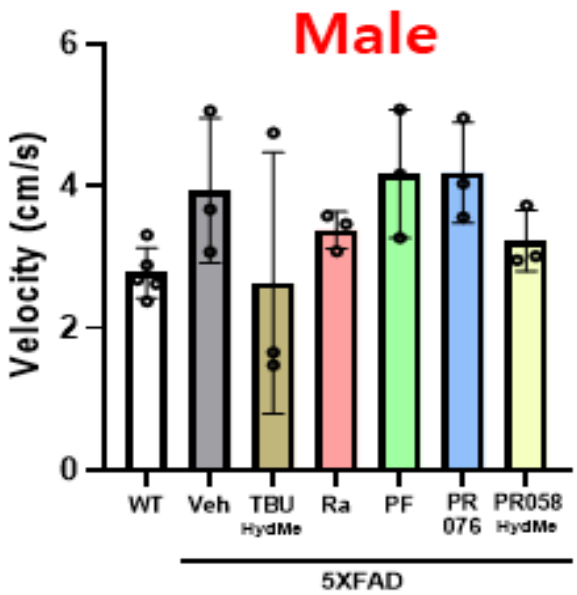


[그림 2-730. Open field test 결과: Total, 평균 속도]

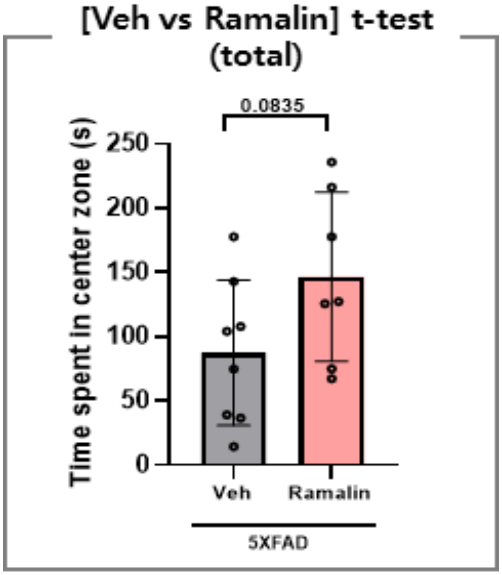


[그림 2-731. Open field test 결과: Female, 평균 속도]

KOPRI
극지연구소



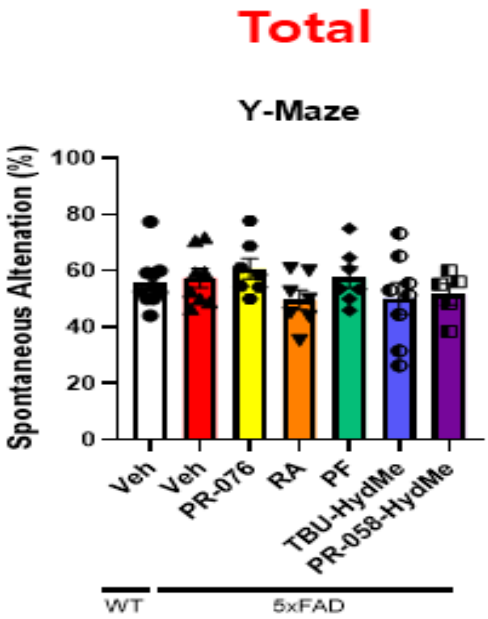
[그림 2-732. Open field test 결과: Male, 평균 속도]



[그림 2-733. Open field test 결과:
중앙에 머문 시간, vs Ramalin]

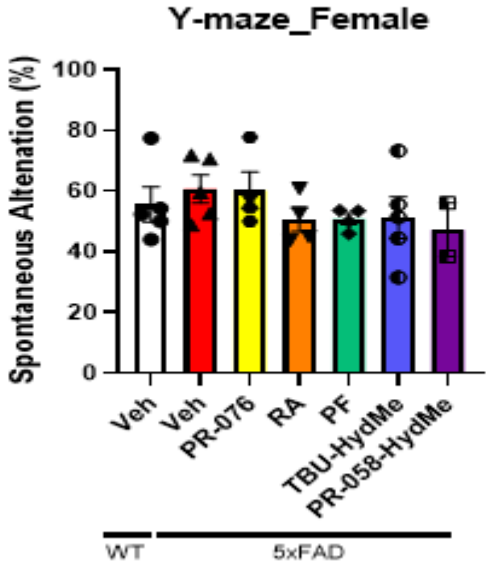
11) Y-maze 실험을 통해 후보물질 투여에 의한 인지기능 개선 효과를 평가함. 5xFAD군에 비해 RA-PF 투약한 male 마우스에서 인지기능 개선의 지표인 spontaneous alteration의 증가를 보임(그림 2-734~737)

KBRI 극지연구소



[그림 2-734. Y-maze 실험 결과: Total]

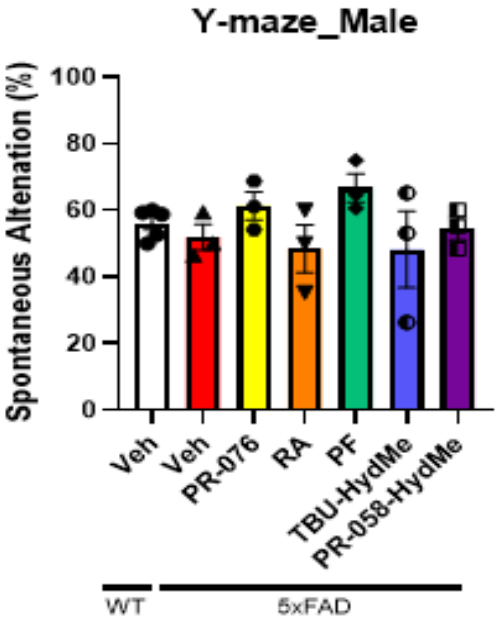
Female



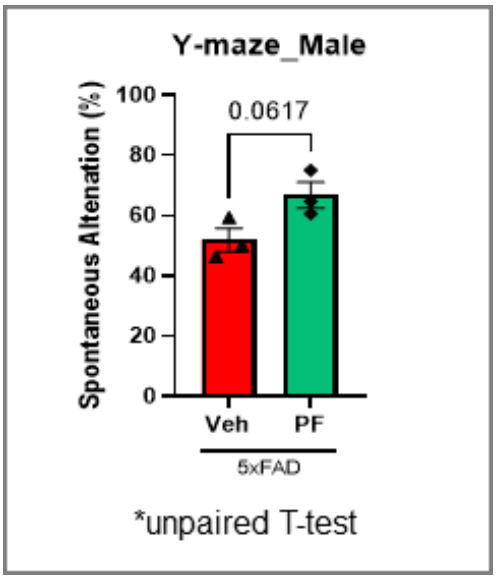
[그림 2-735. Y-maze 실험 결과: Female]

KOPRI
극지연구소

Male

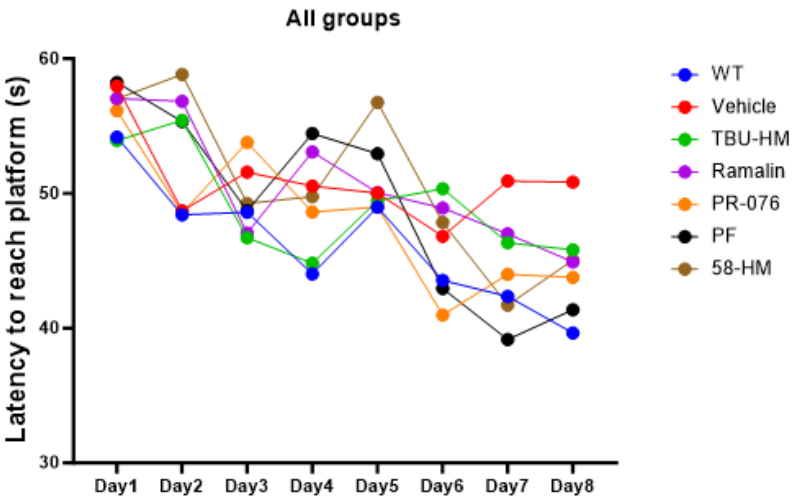


[그림 2-736. Y-maze 실험 결과: Male]

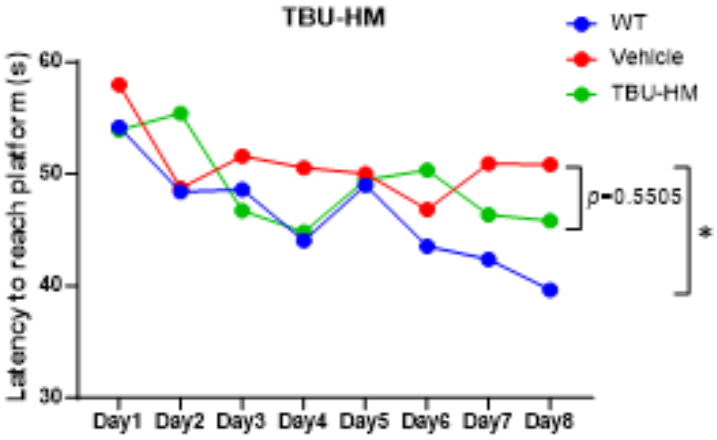


[그림 2-737. Y-maze 실험 결과: Male, vs PF]

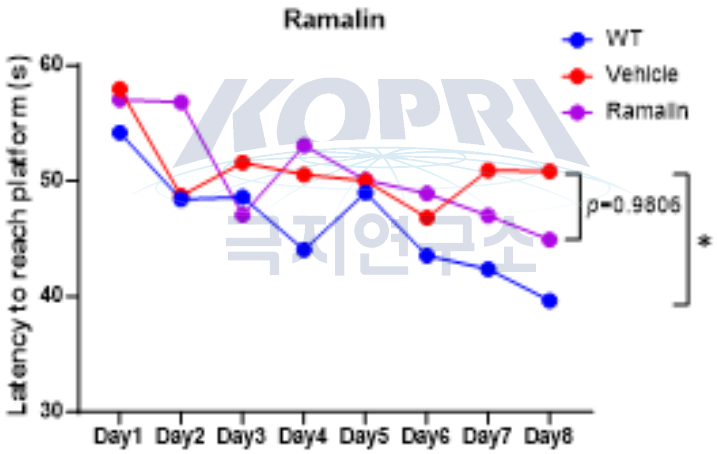
12) MWM 실험을 활용하여 마우스 인지기능을 평가함. 8일간 Training 결과 escape latency가 WT대비 5xFAD 마우스에서 오래 걸리는 것을 확인함. 이는 인지기능의 감소를 의미함. 후보물질 TBU-Hyd-Me, RA-PF, Ramalin, RA-058HM, RA-PR076 투여에 의해 Escape latency의 개선 경향을 보임(그림 2-738)



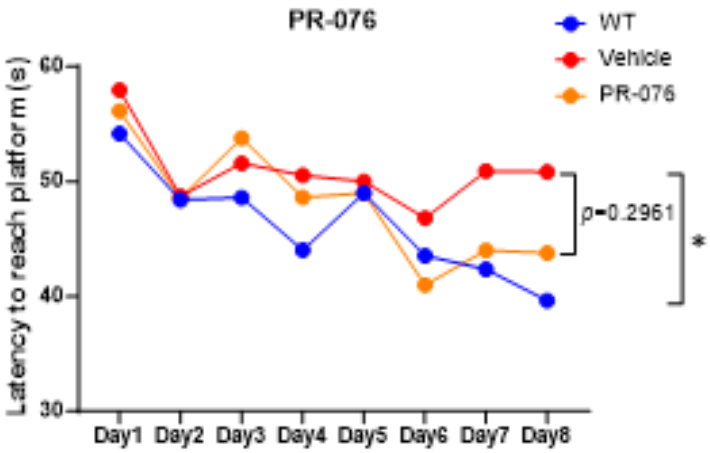
[그림 2-738. Morris water maze 실험 결과: 종합]



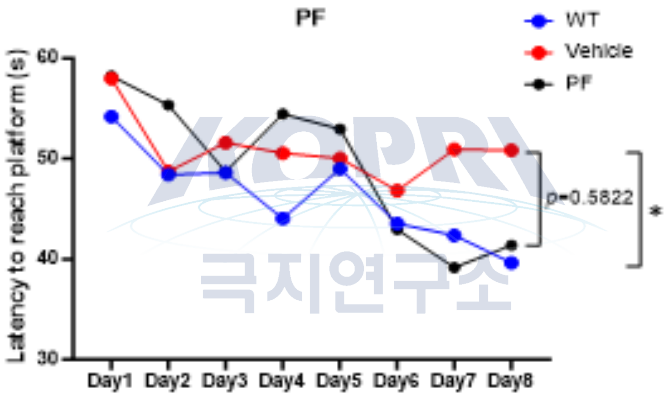
[그림 2-739. Morris water maze 실험 결과: TBU-HM]



[그림 2-740. Morris water maze 실험 결과: Ramalin]

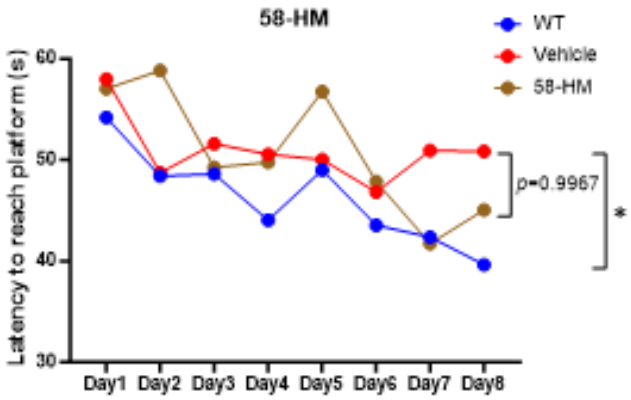


[그림 2-741. Morris water maze 실험 결과: RA-PR076]



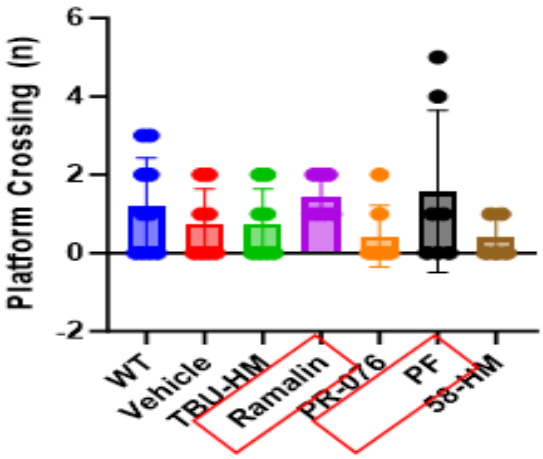
KOPRI
극지연구소

[그림 2-742. Morris water maze 실험 결과: RA-PF]

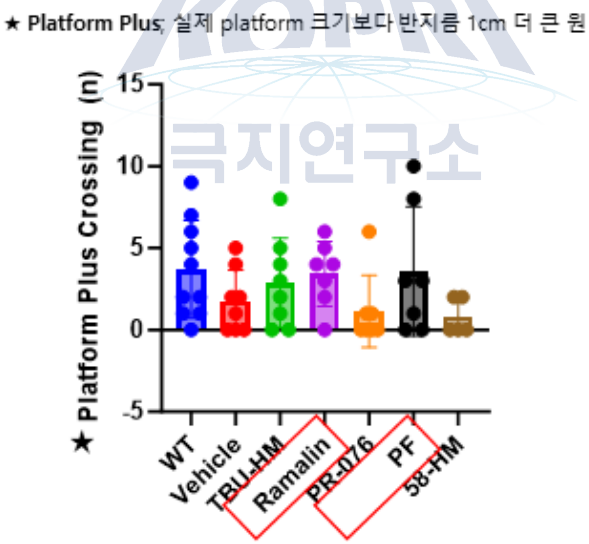


[그림 2-743. Morris water maze 실험 결과:
RA-058HM]

13) Probe day에 동물의 행동을 평가함. Platform plus crossing과 target 사분면에 머무른 시간을 평가했을 때, 5xFAD군의 인지기능 감소 경향을 확인하였으며, Ramalin, RA-PF 투약에 의한 개선 경향을 확인함(그림 2-744~752)

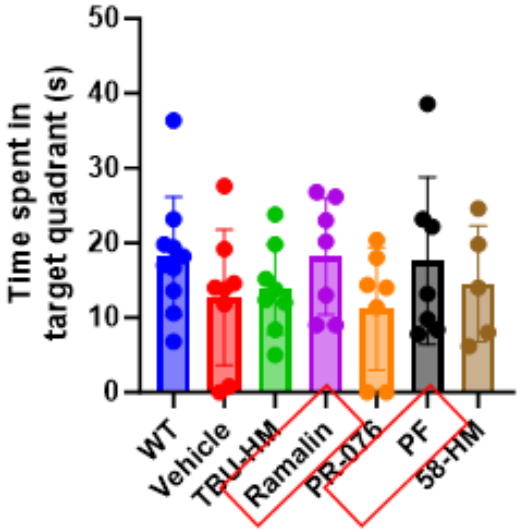


[그림 2-744. Probe day 결과: platform crossing]



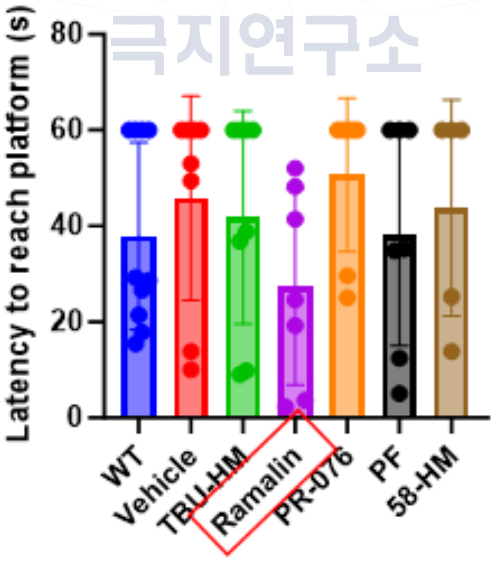
[그림 2-745. Probe day 결과: platform plus crossing]

KOPRI 극지연구소

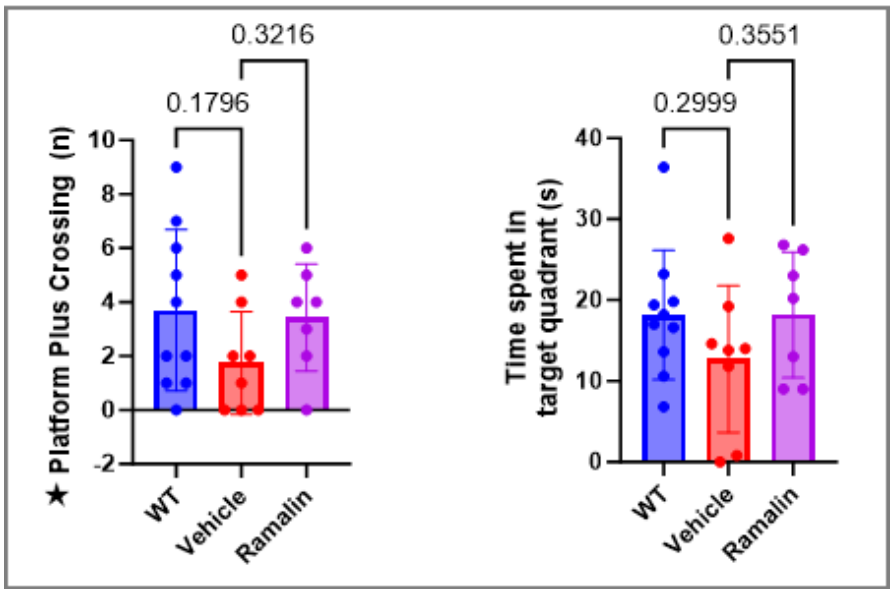


[그림 2-746. Probe day 결과: 타겟 사분면에 머문 시간]

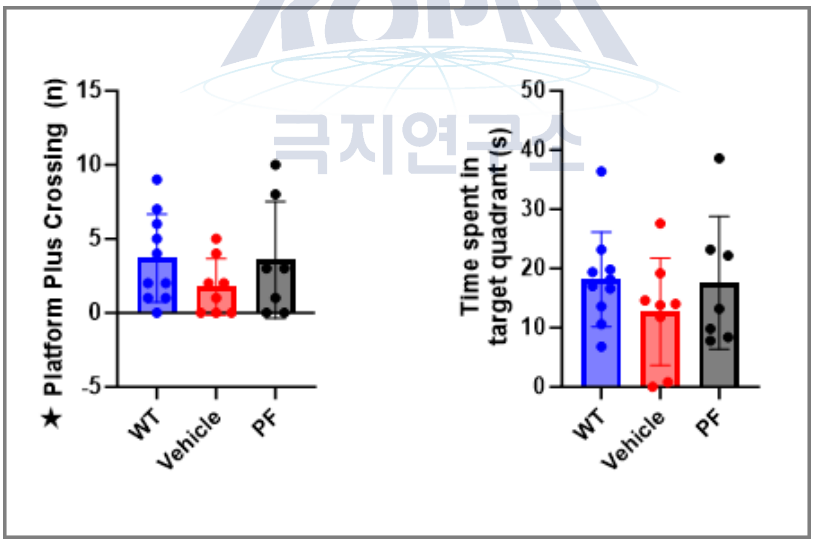
KOPRI 극지연구소



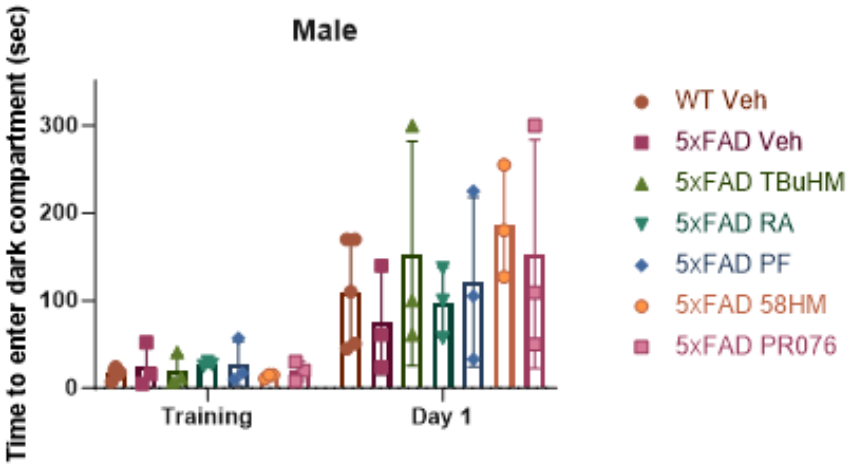
[그림 2-747. Probe day 결과: latency to reach platform]



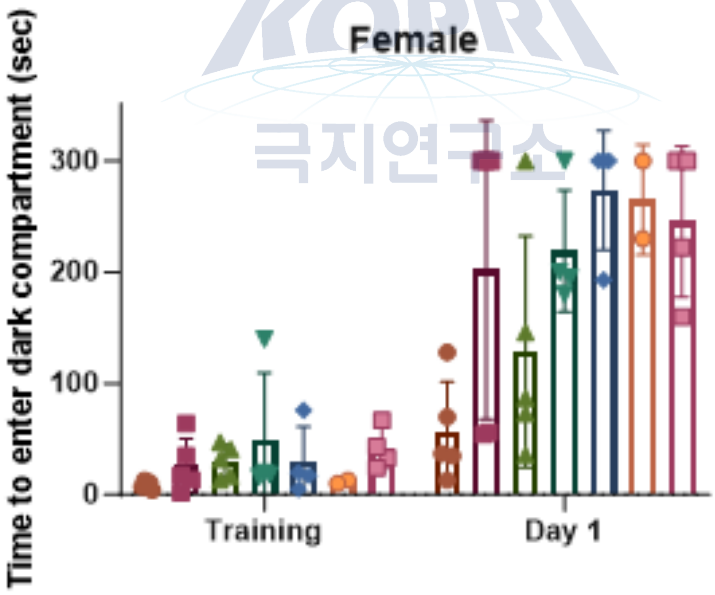
[그림 2-748. Probe day 결과: vs Ramalin]



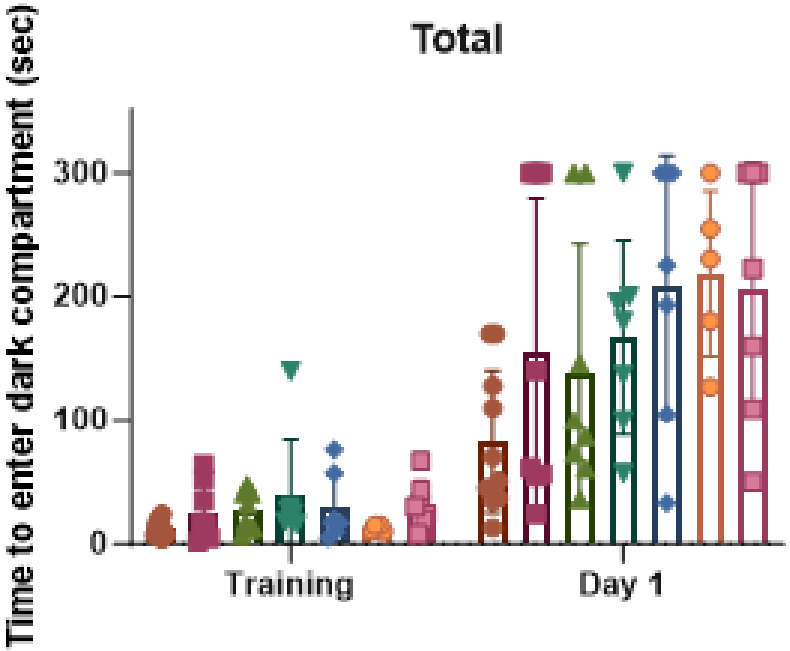
[그림 2-749. Probe day 결과: vs RA-PF]



[그림 2-750. Passive avoidance test: Male]

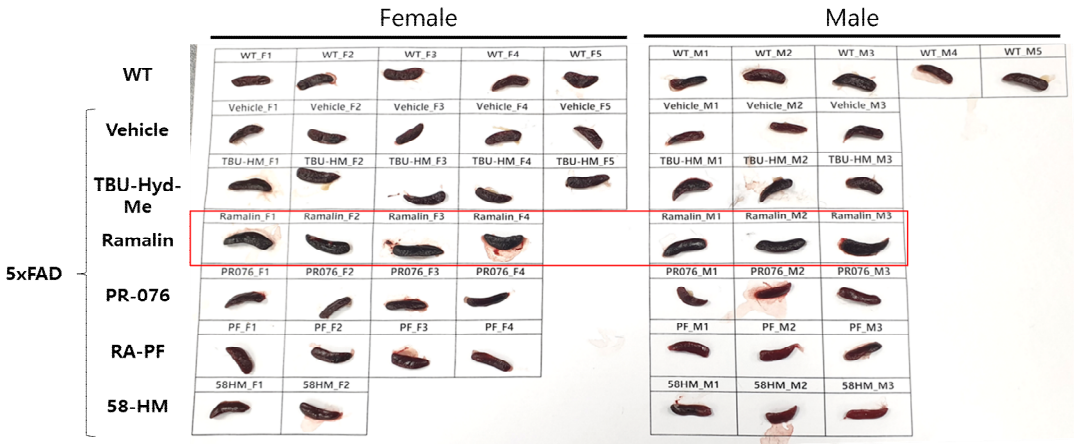


[그림 2-751. Passive avoidance test: Female]



[그림 2-752. Passive avoidance test: Total]

14) 라말린 유도체에 의한 독성을 평가하기 위해 비장을 적출하여 크기를 평가함. Ramalin에 의한 비장비대 증상이 관찰되며, 그 외 후보물질에 의한 비장비대 증상은 관찰되지 않음 (그림 2-753)



[그림 2-753. 후보물질에 의한 비장비대 독성 평가]

15) 6차 동물실험에서 TBU-12B, TBU-NAP, RA-PF, RA-24F 4종의 약효를 평가함. 약효를 보이는 결과에 + 로 표시함(그림 2-754) 전반적으로 male 마우스에서 약물에 의한 약효를 확인하지 못함. 하지만 같은 개월에서 보다 심한 병변을 보이는 female에서는 후보물질 투여에 의한 개선 효과를 확인함. Western blot을 통해 BACE1의 발현을 평가했을 때, TBU-Hyd-Me, Ramalin, RA-058HM에서 명확한 BACE1의 발현 감소를 확인함

16) RT-qPCR을 통해 mRNA를 평가했을 때, RA-058HM 투여에 의해 anti-inflammatory response와 gliosis 억제능을 확인함. IHC를 통해 Aβ 축적을 평가했을 때, RA-058HM과 RA-PR076에서 Aβ의 축적이 많이 감소하는 것을 확인하였으며, Ramalin, RA-PF, TBU-Hyd-Me에 의해 개선 효과 또한 확인함

17) Gliosis에 대한 영향을 평가하기 위해 IBA1으로 염색함. 그 결과, TBU-Hyd-Me, Ramalin, RA-PR076, RA-058HM에서 개선 효과를 확인하였으며, RA-PF에서 또한 활성감소를 확인함

18) 행동실험 결과, open field에서 Ramalin 투여에 의한 불안장애 개선 효과를 보임. Y-maze에서 RA-PF에 의한 인지기능 개선 효과를 확인하였으며, MWM에서 후보약물 TBU-Hyd-Me, Ramalin, RA-PR076m RA-PF, RA-058HM에 의한 개선 효과를 확인함

19) 독성평가 결과, Ramalin에서는 splenomegaly가 관찰됨. 이를 종합해봤을 때 가장 우위 효과를 보이는 약물 3종 TBU-Hyd-Me, RA-PF, RA-058HM을 선정함

20) TBU-Hyd-Me는 BACE1 inhibition 효과가 명확하며, IHC 결과 gliosis가 감소하는 것을 확인함. 그러나 RA-PF, RA-058HM약물에 비해 Aβ 축적 개선 및 행동학적 개선 효과는 적음. RA-PF는 행동학적 개선효과가 가장 우월함. IHC 결과 Aβ 축적과 gliosis의 감소를 보임. RA-058HM의 경우 western blot을 통한 BACE1의 감소가 명확하게 관찰되며, synapse degeneration에 대해서도 효과가 있음. Inflammatory response 및 gliosis와 관련된 mRNA 발현에서 또한 개선 효과가 보이며, IHC 결과 Aβ 축적과 gliosis의 감소를 보임

		TBU-Hyd-Me	Ramalin	PR-076	RA-PF	058-HM
Western blot	BACE1 inhibition	+++	+++			++
	anti-inflammatory response					
	Protect synapses from degeneration					++
qPCR	anti-inflammatory response					++
	inhibition of gliosis					++
IHC	inhibition of Amyloid β deposition	+	++	+++	++	+++
	inhibition of gliosis	+++	+++	+++	++	+++
Behavior study	Open field		++			
	Y-maze				+++	
	MWM	+	++	+	++	+
Toxicity	Splenomegaly		Splenomegaly			

[그림 2-754. 5xFAD 마우스에서 후보물질 약효 요약]

21) 최종 후보물질 선정

가. 3차년도에 라말린 유도체 총 56종에 대하여 *in vitro* 기반 실험 (N2a 및 SH-SY5Y mouse/human neuroblastoma cell line을 이용한 BACE1 발현량 측정, Tau-BiFC SH-SY5Y를 활용한 Tau 응집도 측정, BV-2 mouse microglial cell line을 이용한 염증인자 (NLRP3, COX2) 발현량 측정)을 진행함. 그 결과, 최종 후보물질로 TBU-Hyd-Me, RA-PR058, RA-058HM을 선정함

나. ①에서 선정된 후보물질을 포함하여 일부 물질들에 대해 알츠하이머성 치매 마우스 모델을 활용한 검증을 진행함. 그 결과, TBU-Hyd-Me, RA-058HM, RA-PF가 좋은 효과를 보이는 것을 확인함

다. TBU-Hyd-Me의 경우, BACE1의 발현량 감소, Aβ plaque 축적 및 gliosis 감소와 더불어 MWM에서도 학습 능력의 개선 효과를 보였음

라. RA-058HM의 경우 투여 기간이 다른 약물들에 비해 짧았음에도 불구하고 염증인자 및 BACE1 발현량 감소, Aβ plaque 축적 및 gliosis 감소, MWM에서의 학습능력 개선 효과를 보였음

마. RA-PF의 경우 염증인자 mRNA의 발현량 감소, gliosis 및 Aβ plaque 축적 감소, Y-maze와 MWM에서의 인지능력 향상 등의 결과를 보였으며, 3xTg-AD를 활용한 동물실험에서 비장비대증을 감소시키는 결과를 보임

바. ①에서 최종적으로 선정된 RA-PR058의 경우, 3xTg-AD를 활용한 동물실험에서 p-Tau의 발현량을 감소시키기는 했으나 행동실험이나 다른 생화학적 분석결과에서 RA-PF에 비교우위를 갖기 힘듦

사. 위 결과를 종합해봤을 때 최종 후보물질은 TBU-Hyd-Me, RA-058HM, RA-PF로 선정됨.

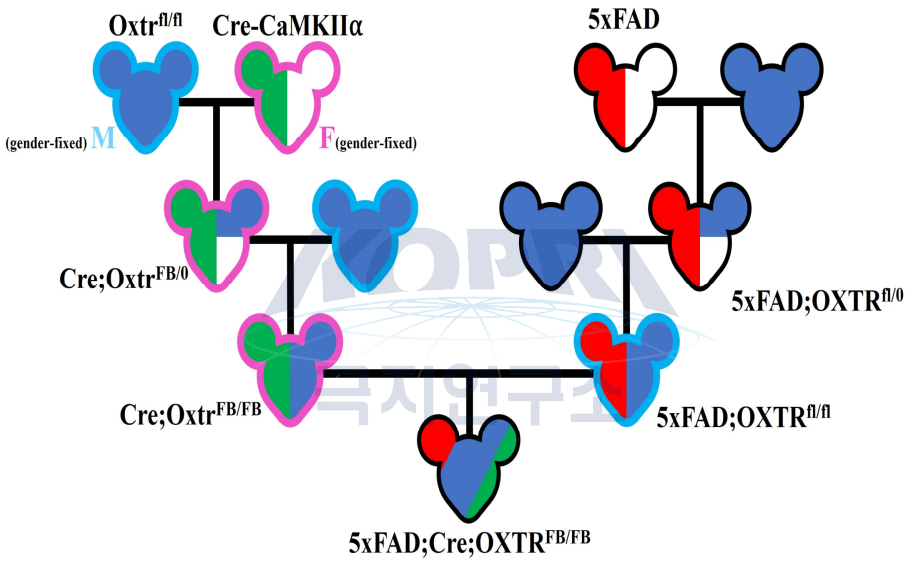
아. 최종적으로 선정된 TBU-Hyd-Me, RA-058HM, RA-PF의 경우 기존 라말린이 가지고 있던 문제점인 비장비대 독성을 보이지 않았으며, Aβ plaque, gliosis 감소 등에 대해 라말린과 비슷하거나 더 우위를 보이기도 함

KOPRI 극지연구소

○ 라말린 타겟 단백질을 knock-out한 AD 동물모델 구축 및 행동평가

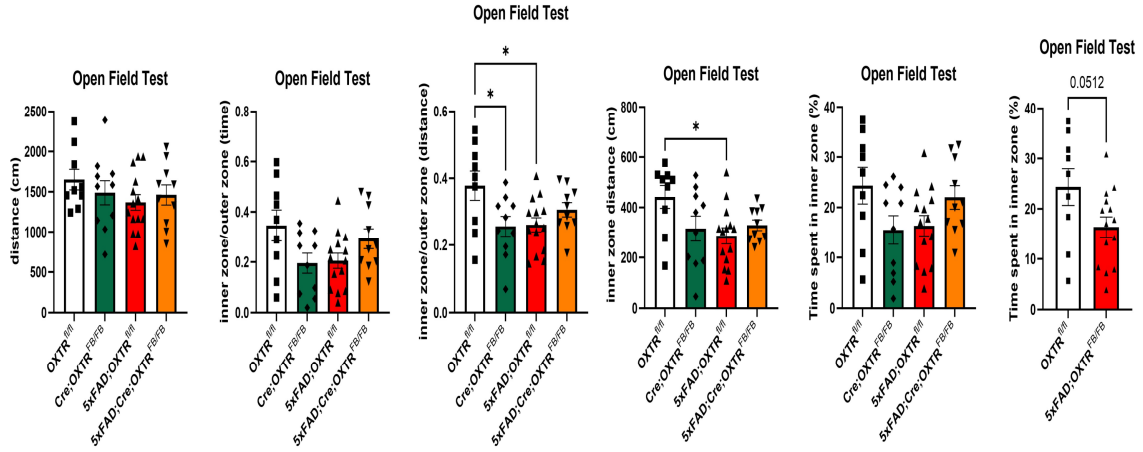
1) 라말린이 binding할 것으로 예상되는 oxytocin receptor (OXTR; 옥시토신 수용체)를 전뇌의 신경세포에만 특이적으로 knock-out 시킨 AD 동물모델인 5xFAD;Cre;OXTRFB/FB을 구축함 (그림 2-755)

2) 전뇌의 신경세포에만 특이적으로 작용하는 Cre-CamK2a 동물모델, OXTR의 exon이 loxP 단백질로 floxed 되어있는 OXTRfl/fl 동물모델, AD 동물모델인 5xFAD를 교배시켜 triplegenic mouse인 5xFAD;Cre;OXTRFB/FB을 구축함) 구축한 동물모델을 사용해 동물 행동실험인 open field test, Y-maze, elevated plus maze (EPM), Morris water maze (MWM) 등을 진행해 인지능력 및 불안도 등을 측정함



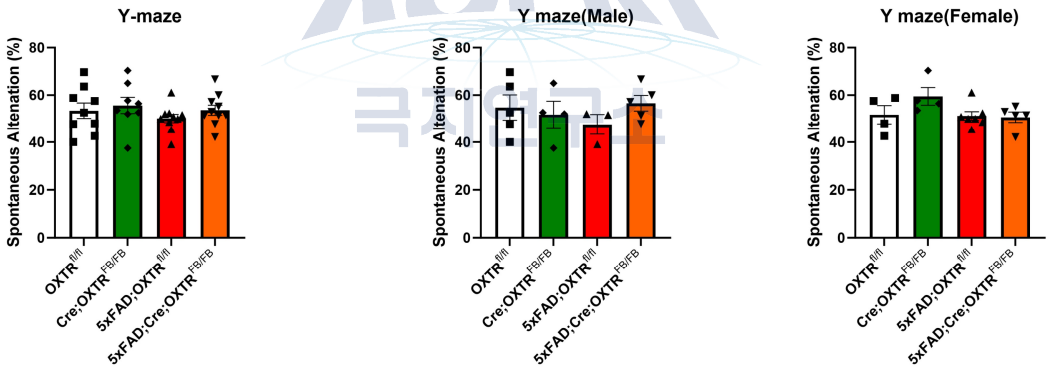
[그림 2-755. OXTR을 knock-out시킨 알츠하이머 치매 동물모델 구축 모식도]

3) Open field test: 가로, 세로, 높이가 각각 50 cm인 흰 상자에 마우스를 가운데에 넣어 마우스들의 움직임과 불안도를 측정함(그림 2-756). 그 결과, OXTRfl/fl 대비 5xFAD;OXTRfl/fl 에서 유의하게 inner zone distance 감소한 것을 확인함



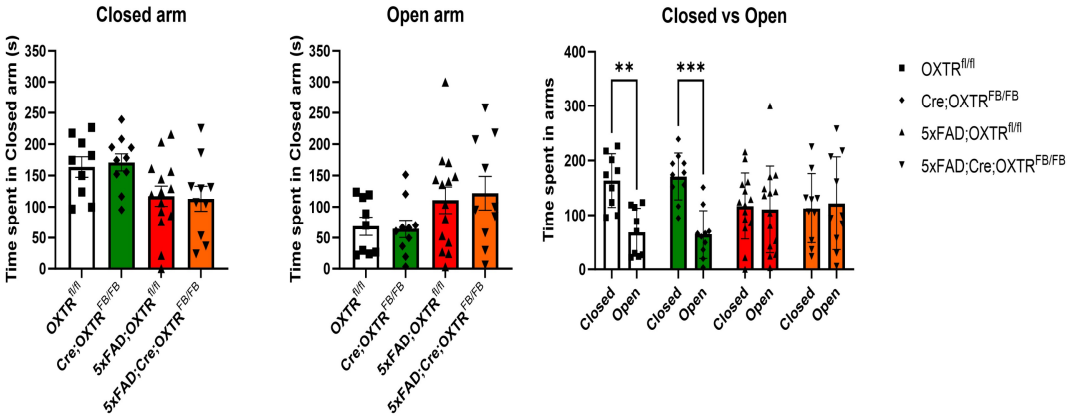
[그림 2-756. Open field test 결과]

4) Y-maze를 이용하여 인지능력 평가를 진행함(그림 2-757). 분석시 transition이 15회 미만이거나 45회 초과인 개체는 재외 후 분석 진행함. 그 결과, 그룹간 유의한 차이를 발견할 수 없었음



[그림 2-757. Y-maze 실험 결과]

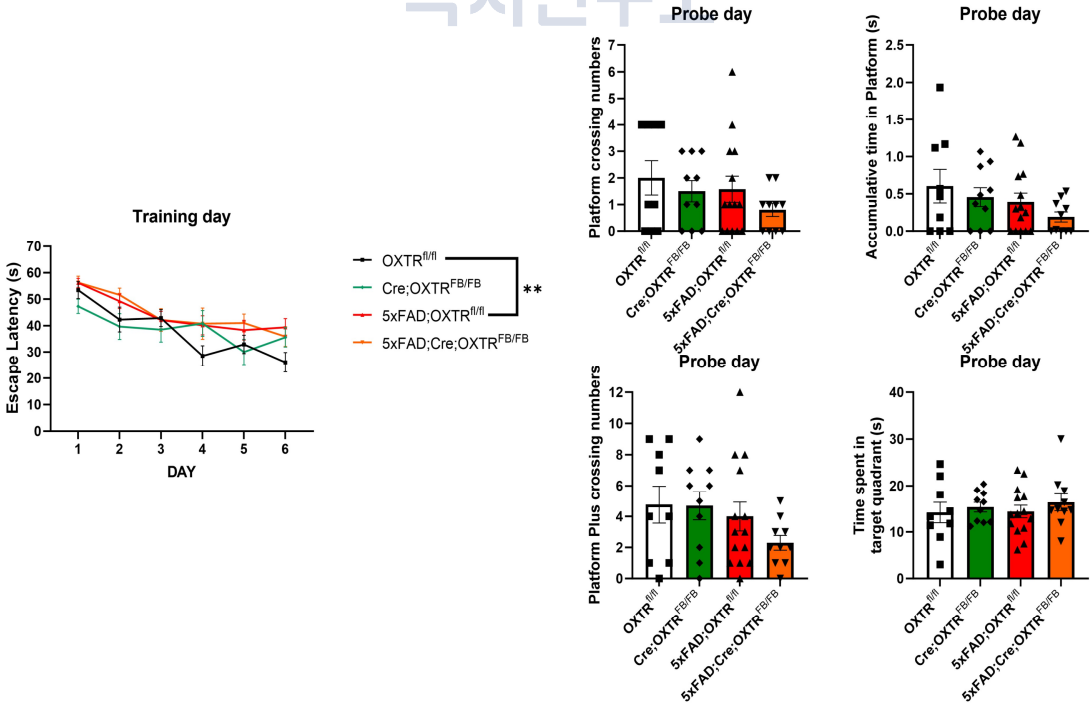
5) Elevated plus maze test를 통해 불안도를 비교함(그림 2-1488). 5xFAD;OXTRfl/fl군과 5xFAD;OXTRFB/FB군이 OXTRfl/fl군과 Cre;OXTRFB/FB군 대비 closed arm에 머문 시간이 감소한 경향이 있으나 유의하지는 않았음



[그림 2-758. Elevated plus maze 결과]

6) Morris water maze test를 통해 마우스들의 공간학습능력과 기억력을 비교함(그림 2-1489). 6일간의 training session에서 5xFAD;OXTRfl/fl군이 OXTRfl/fl군 대비 유의하게 escape latency가 높았으며 다른 군들과의 유의한 차이는 나지 않았음

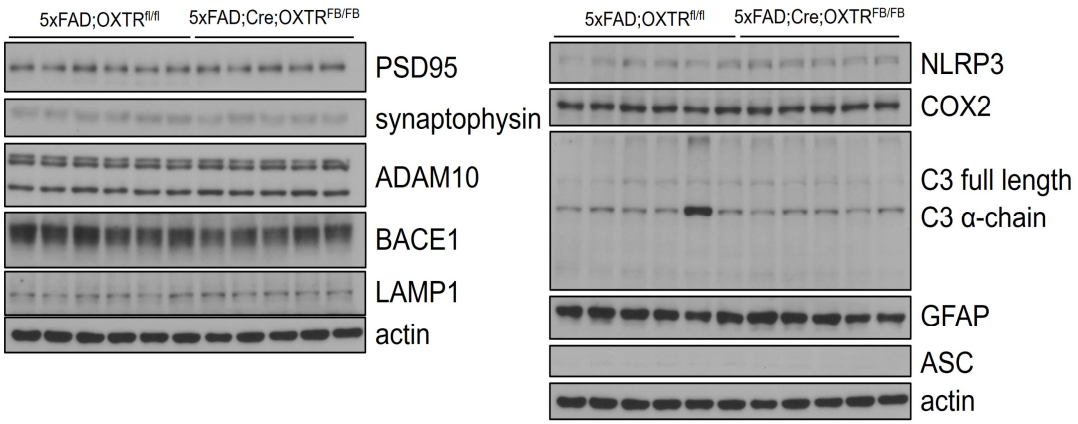
7) 또한, probe day에서 5xFAD;Cre;OXTRFB/FB군이 다른 군 대비 platform crossing 횟수와 platform plus crossing 횟수가 감소한 경향이 있으나 유의하지는 않았음



[그림 2-759. Morris water maze 실험 결과]

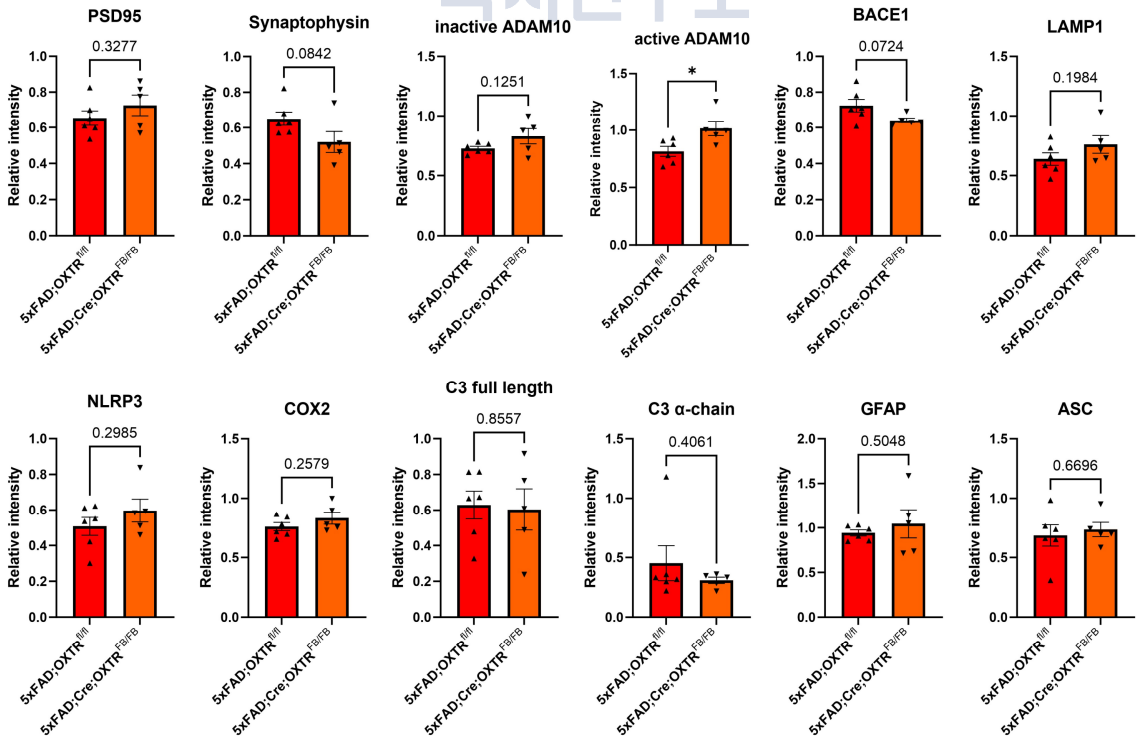
○ 라말린 타겟 단백질을 knock-out한 AD 동물모델 뇌 조직 평가

1) 앞서 구축한 AD 동물모델을 western blot을 통해 생화학적 분석을 진행함. 분석결과, male 5xFAD;OXTRfl/fl군 대비 5xFAD;Cre;OXTRFB/FB군에서 active ADAM10의 발현이 유의하게 증가해있었으며, BACE1의 발현량이 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았음(그림 2-760, 761)



[그림 2-760. Male mouse western blot 결과]

KOPRI 극지연구소



[그림 2-761. Male mouse western blot 결과 정량 분석]

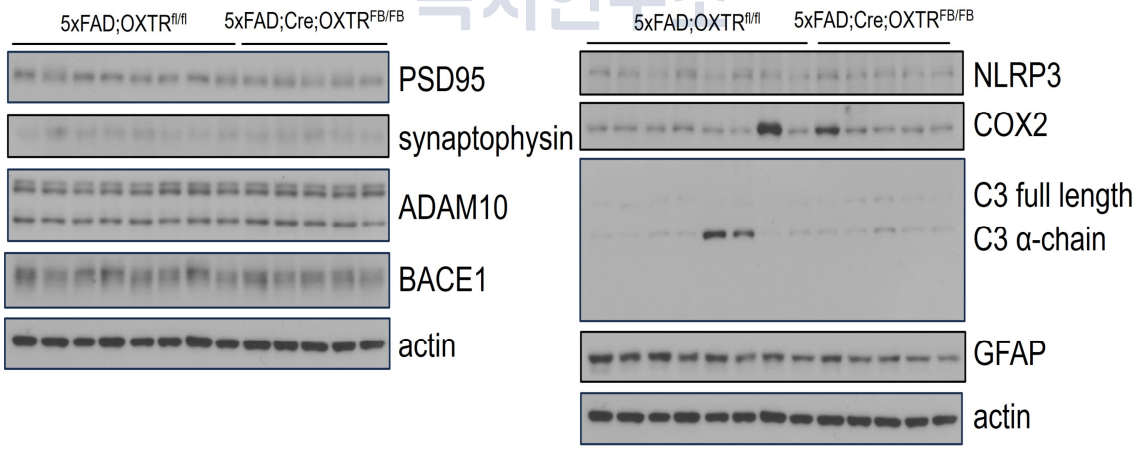
2) Female western blot 분석결과, 5xFAD;Cre;OXTRFB/FB군에서 5xFAD;OXTRfl/fl군 대비 inactive ADAM10과 C3 full length의 발현량이 유의하게 증가해있었으며, GFAP의 발현량은 유의하게 감소해있는 것을 확인함(그림 2-762)

3) 생화학적 분석을 진행한 개체들의 연령이 7개월 때이므로, 음성 대조군인 $OXTR^{fl/fl}$과 양성 대조군인 5xFAD;$OXTR^{fl/fl}$에서의 차이가 분명히 있을 것으로 판단, 양성대조군인 5xFAD;$OXTR^{fl/fl}$와 실험군인 5xFAD;Cre;$OXTR^{FB/FB}$사이에서의 AD 연관 인자 변화량을 비교함. OXTR이 여성에게서 더 영향을 주는 호르몬이기에 male과 female로 나누어 분석을 진행함

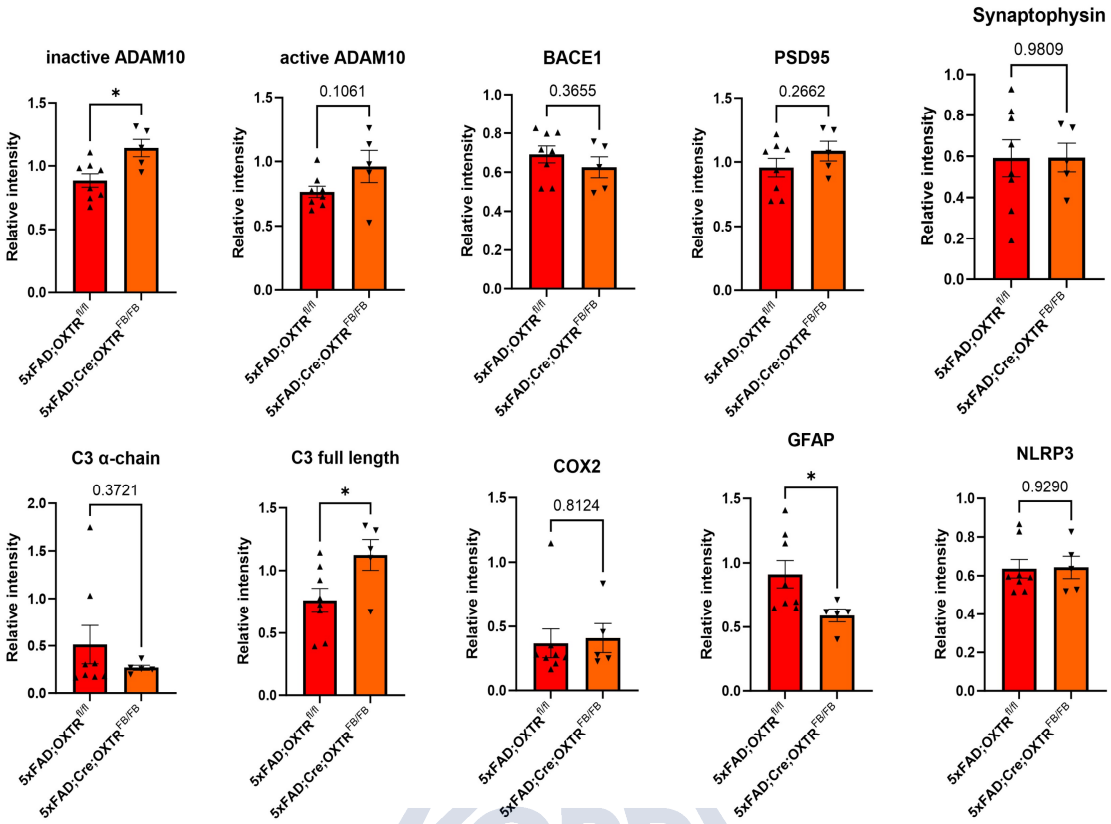
4) Male과 female 모두 ADAM10의 변화를 보였고, female의 경우 C3 full length의 증가와 GFAP의 감소를 보임. OXTR이 여성에게 더 영향을 주는 호르몬이어서 female에 유효한 차이를 보이는 인자가 더 많은 것으로 보임. OXTR이 뇌 염증을 담당하고 있는 별아교세포에 영향을 주는 것으로 보이며, C3가 그 과정에 사용되는 인자일 것으로 사료됨

5) 별아교세포와 연관된 인자들을 더 분석해야 할 것으로 보임. 또한, OXTR을 knock-out 했을 때 기존의 AD 모델보다 더 악화된 치매 상황을 보일 것으로 예상했으나 오히려 회복된 경향을 보이는 것을 통해 OXTR 작용의 fluctuation이 없이 일정하게 유지됨, 혹은 아예 영향을 미치지 않는 homeostasis가 더 주요한 영향을 미친 것이 아닌가 예상됨

KBRI 극지연구소



[그림 2-762. Female mouse western blot 결과]



[그림 2-763. Female mouse western blot 결과 정량 분석]

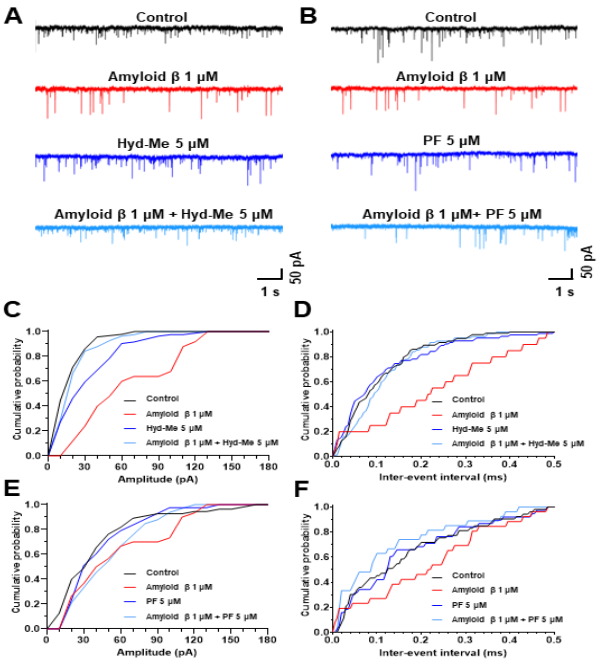
KOPRI 극지연구소

○ 마우스 신경세포 기반 후보물질의 전기생리학적 기능 평가

1) 후보물질의 전기생리학 기반 신경세포 기능 평가를 위해 mouse primary neuron을 사용함

2) WT 마우스 (C57BL6)로부터 primary neuron을 배양하고 Day 21에 후보물질 5 μM을 amyloid beta oligomer 1 μM 혹은 DMSO/DMEM/F-12 1 μM과 24시간 처리한 후 patch clamp를 진행함(그림 202, 203). 후보물질 5 μM만 처리한 군들의 경우 대조군과 비슷한 amplitude와 frequency를 보였으며 amyloid beta oligomer 1 μM만 처리한 군들의 경우 대조군 대비 amplitude가 증가하고 frequency가 낮아짐(그림 2-764)

3) 하지만, 후보물질 5 μM과 amyloid beta oligomer 1 μM을 같이 처리한 군의 경우 대조군과 비슷한 amplitude와 frequency를 보임(그림 2-765). 이를 통해 후보물질이 amyloid beta oligomer의 neuron에 대한 독성을 예방하는 데 어느 정도 효과가 있음을 알 수 있음



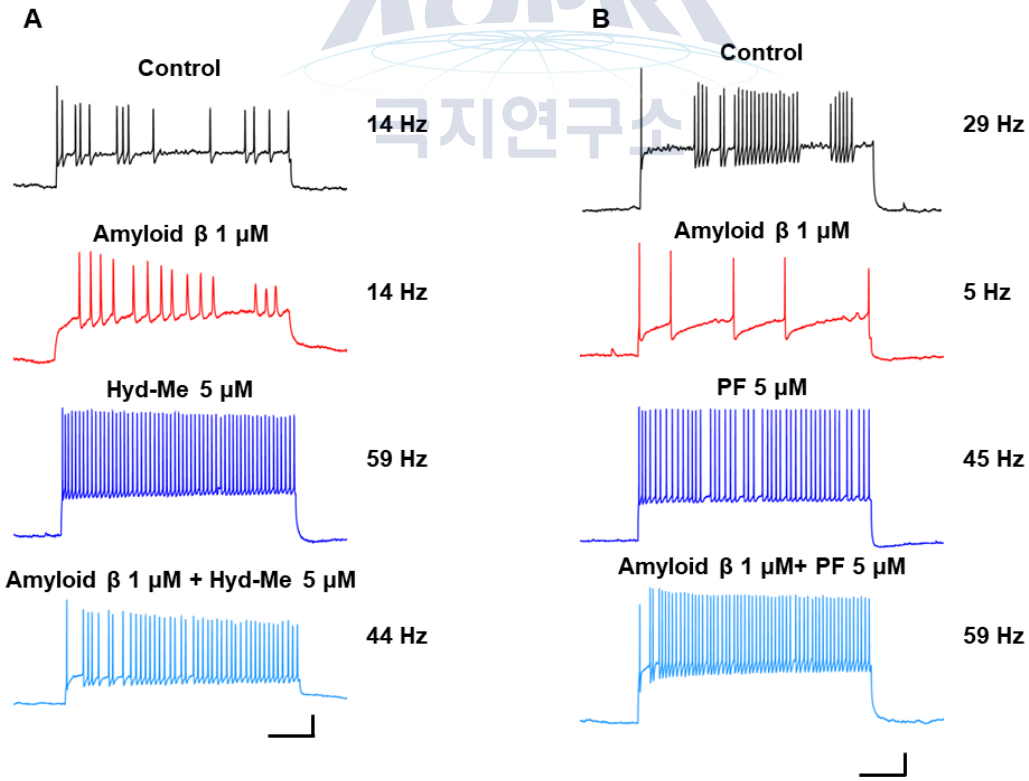
G

Average response	Amplitude (pA)	Frequency (Hz)
Control	20.7	9.4
Amyloid β 1 μM	67.4	2.5
Hyd-Me 5 μM	35.2	8.4
Amyloid β 1 μM + Hyd-Me 5 μM	24.7	8.3

H

Average response	Amplitude (pA)	Frequency (Hz)
Control	43.8	5.5
Amyloid β 1 μM	59.1	2.6
PF 5 μM	45.3	4.3
Amyloid β 1 μM + PF 5 μM	54.4	3.3

[그림 2-764. 후보물질의 전기생리학적 기능 평가: Patch clamp 1]



[그림 2-765. 후보물질의 전기생리학적 기능 평가: Patch clamp 2]

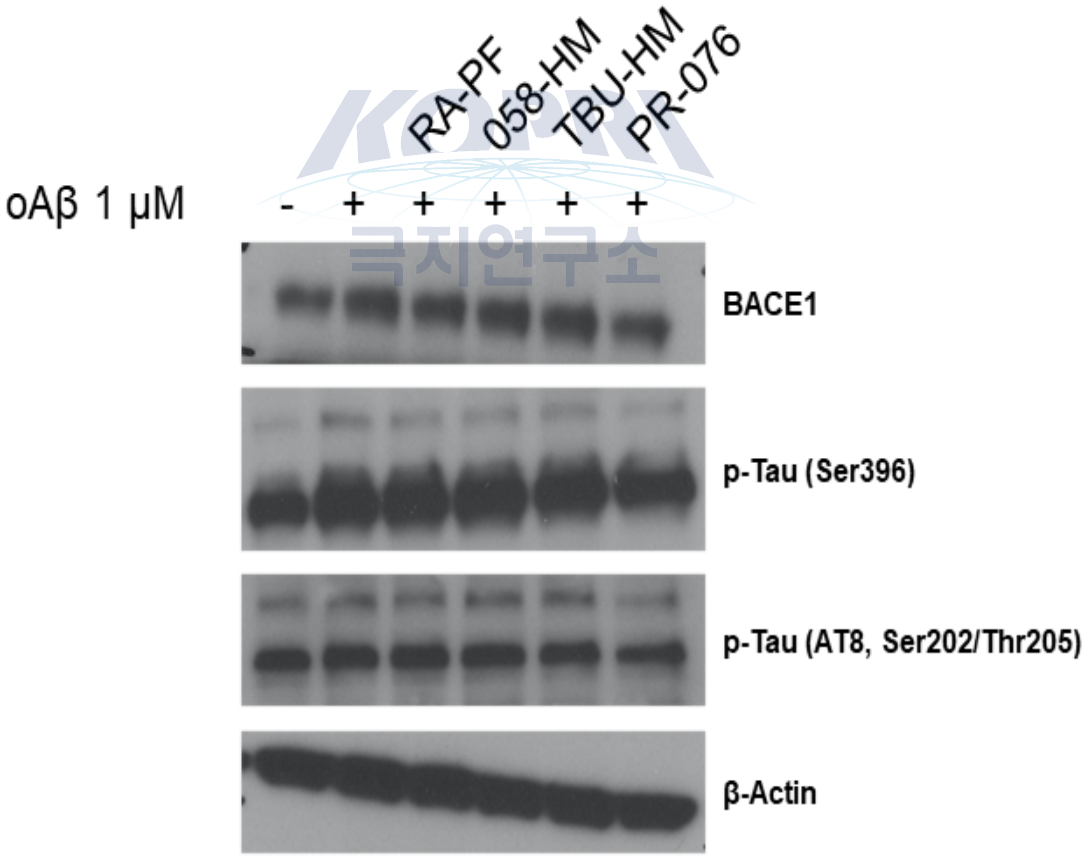
□ 연구내용 2-20. AD 인간 모델에서 라말린 유도체 유효성 평가

○ AD 인간모델에서 라말린 유도체 유효성 평가

1) 라말린 유도체 후보물질의 유효성을 AD 인간모델에서 확인하기 위해 APOE4 AD 환자 유래 iPSC를 neuron으로 분화시킨 후 21일차에 아밀로이드 베타 올리고머 1 μM과 후보물질 20 μM을 24시간 처리함

2) 아밀로이드 베타 올리고머 처리에 의해 BACE1 단백질 발현량이 증가했으며, 이는 RA-PF, RA-058HM, RA-PR076 처리에 의해 감소하는 경향을 보임

3) 또한, 아밀로이드 베타 올리고머 처리에 의해 증가한 타우 인산화 (p-Tau (Ser396), AT8)가 RA-PR076 처리에 의해 감소한 것을 확인함(그림 2-766)

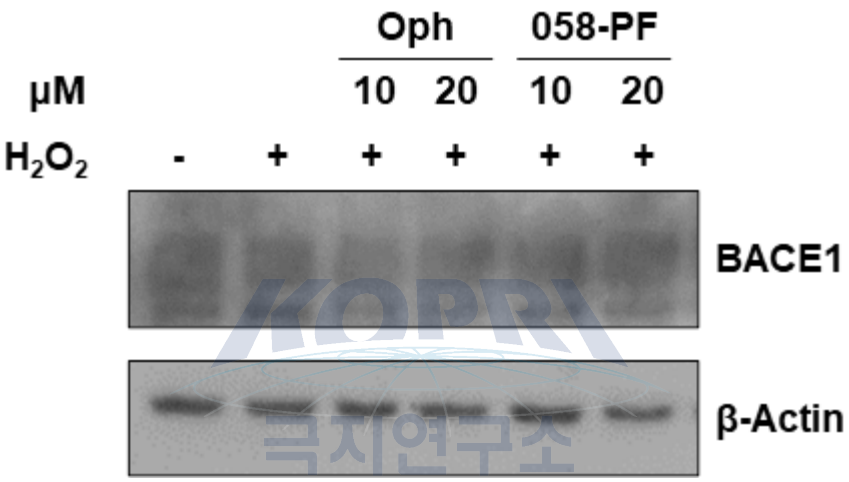


[그림 2-766. AD 인간모델에서 라말린 유도체 효능 평가]

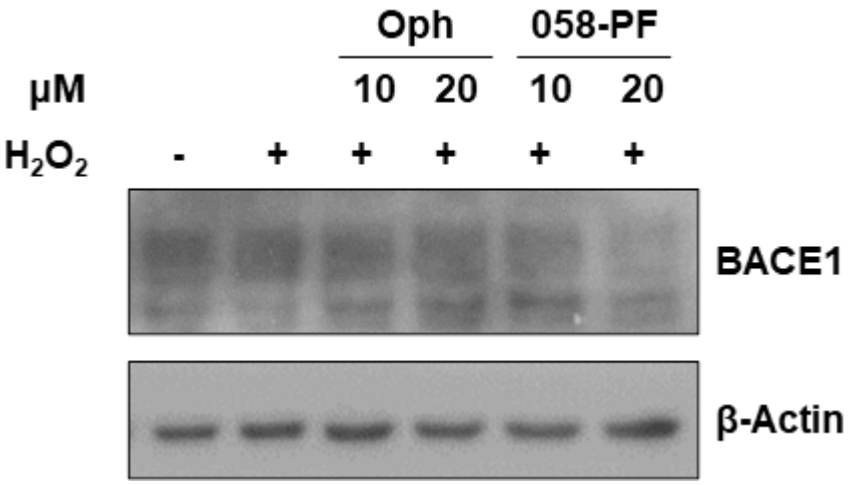
○ 신규 라말린 유도체 및 기존 라말린 유도체 *in vitro* 기반 약효 검증

1) 신규 라말린 유도체인 Oph와 058-PF 약물의 신경세포 기반 약효 검증을 진행함

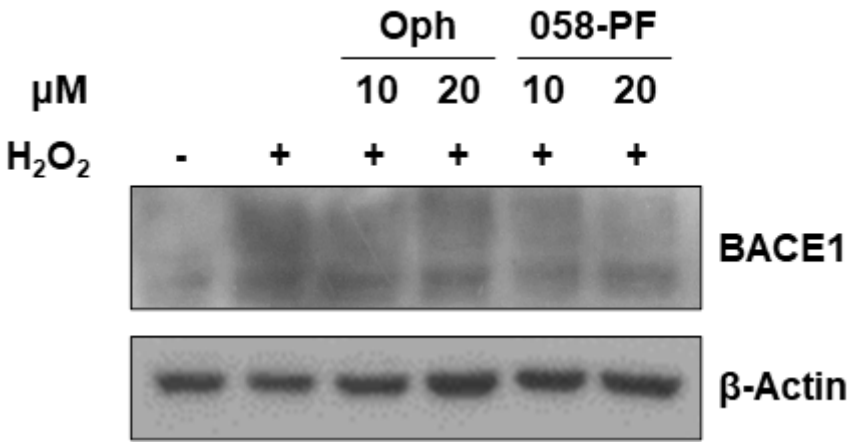
2) SH-SY5Y 세포에 Oph와 058-PF를 각각 10, 20 μM 농도로 처리한 후, H_2O_2를 처리하여 BACE1을 induction함. 그 결과, Oph와 058-PF 모두 저농도, 고농도에서 BACE1을 감소시키는 경향이 있었으나, 통계적으로 유의하지는 않았음. N2a 세포에 ②와 같은 방식으로 라말린 유도체와 H_2O_2를 처리함. 그 결과, 058-PF 20 μM에서 BACE1을 줄이는 것처럼 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았으며, 그 외의 조건에서는 BACE1을 줄이지는 못함(그림 2-767~774)



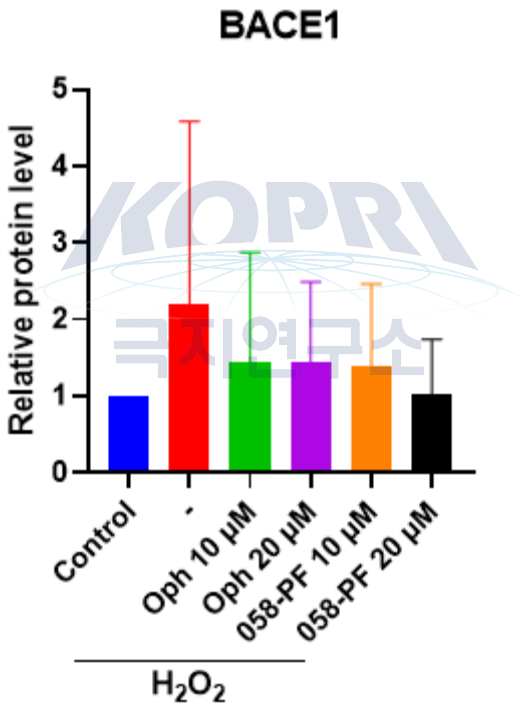
[그림 2-767. SH-SY5Y 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 1]



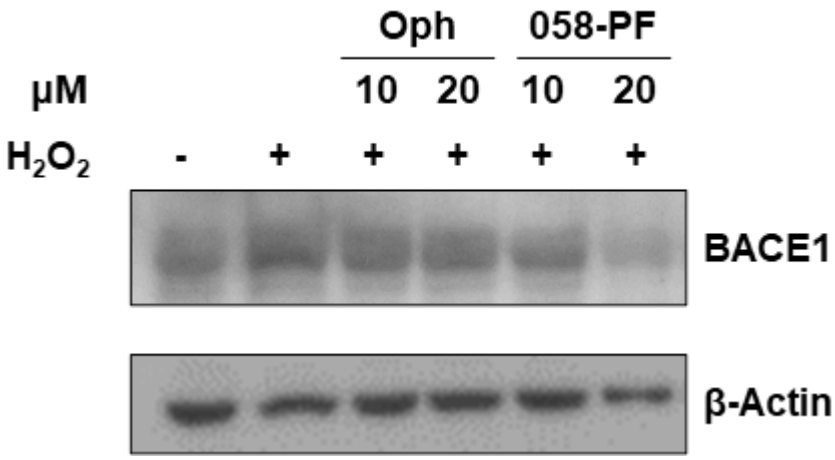
[그림 2-768. SH-SY5Y 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 2]



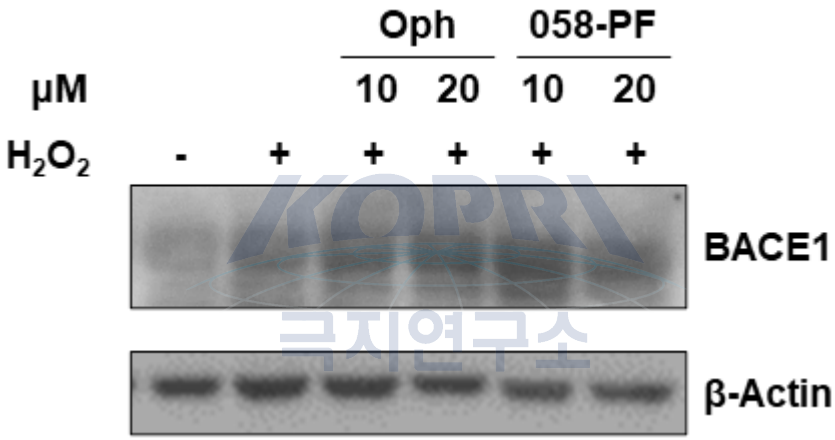
[그림 2-769. SH-SY5Y 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 3]



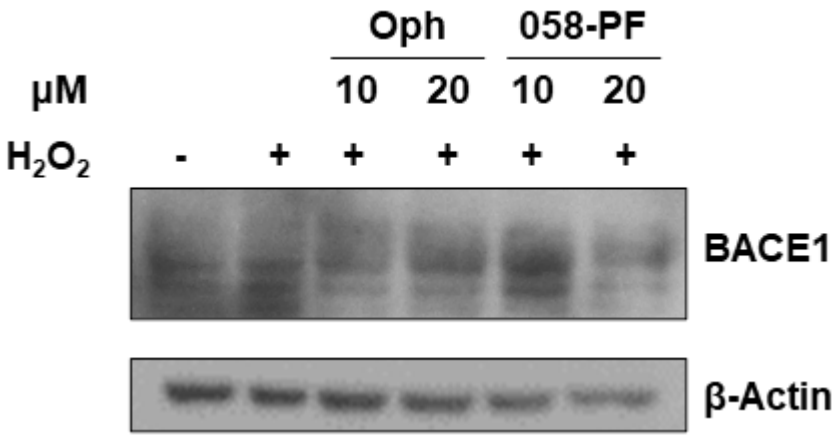
[그림 2-770. 그림 2-1497~1499 정량 분석]



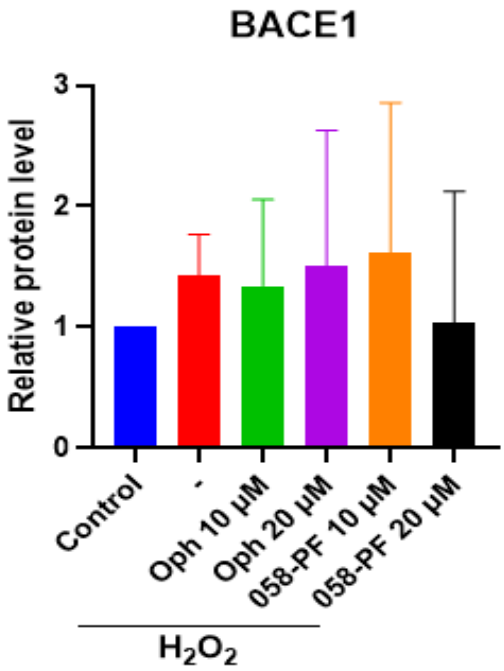
[그림 2-771. N2a 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 1]



[그림 2-772. N2a 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 2]



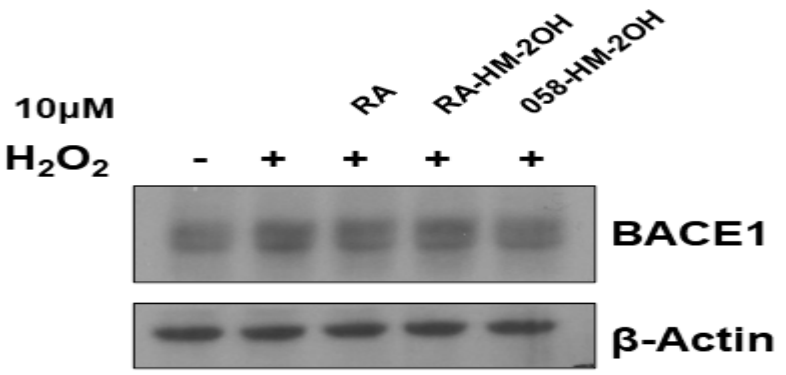
[그림 2-773. N2a 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 3]



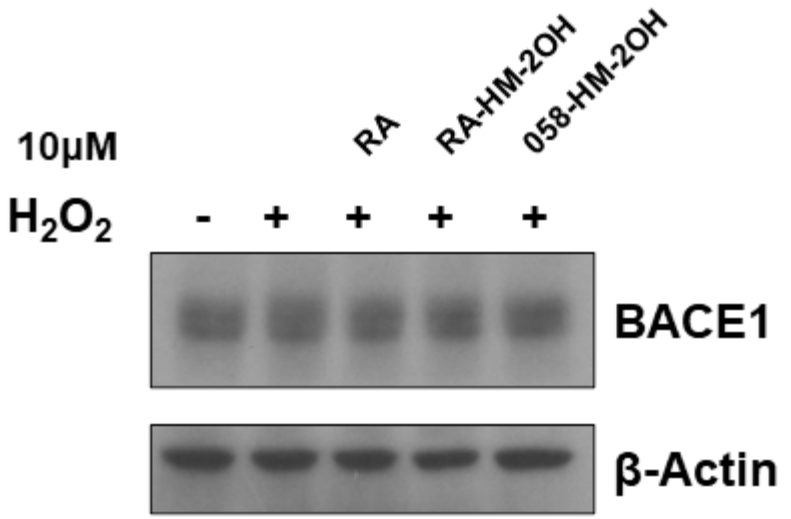
[그림 2-774. 그림 2-1501~1503 정량 분석]

3) 기존 라말린 유도체인 RA-HM-2OH와 신규 라말린 유도체인 RA-058HM-2OH를 이용해 SH-SY5Y 기반 작용기전 검증을 진행함(그림 2-775~2-778)

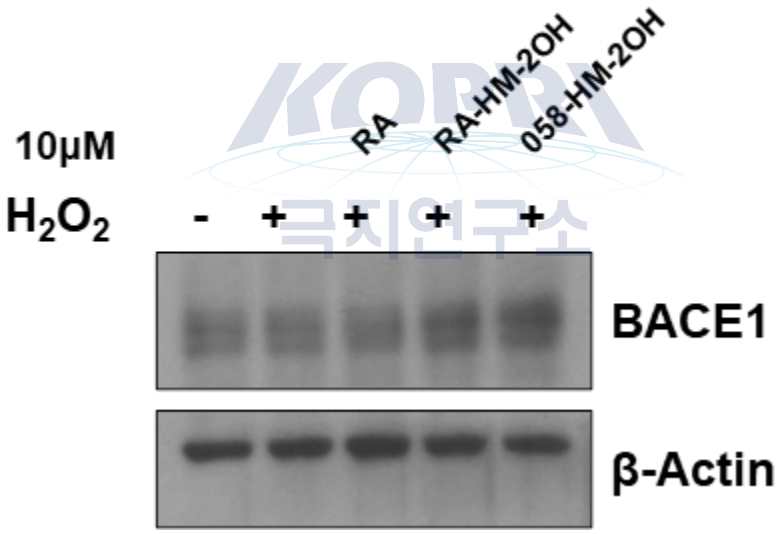
4) 라말린 (RA), RA-HM-2OH 및 RA-058HM-2OH를 각각 10 μM의 농도로 24시간 처리한 후 H_2O_2 200 μM을 4시간 처리하여 BACE1을 induction함. 그 결과, 라말린은 BACE1을 어느 정도 줄이긴 했으나 RA-HM-2OH와 RA-058HM-2OH는 산화적 스트레스에 의해 늘어난 BACE1을 줄이지는 못함



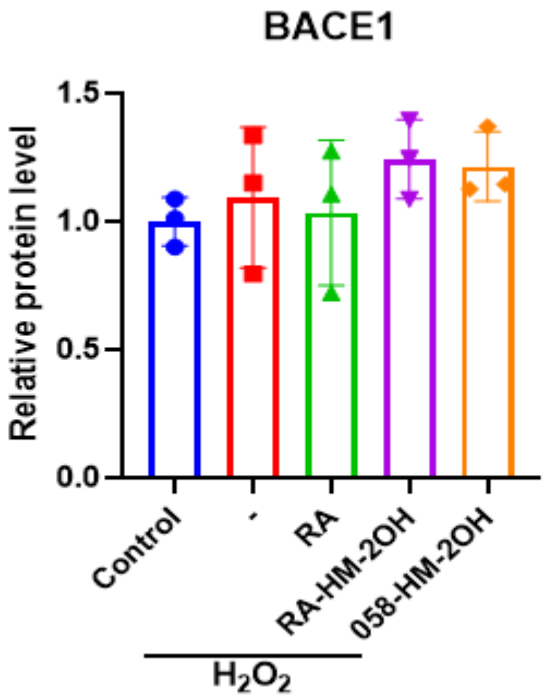
[그림 2-775. SH-SY5Y 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 1]



[그림 2-776. SH-SY5Y 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 2]



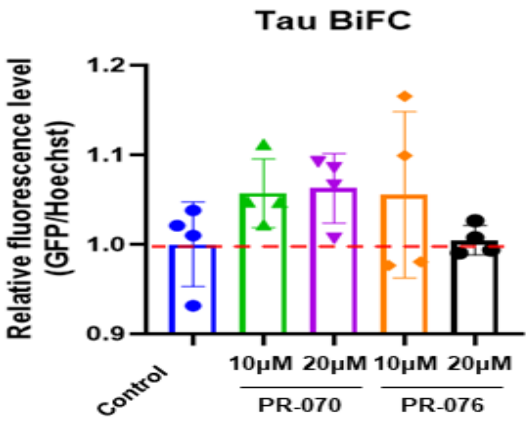
[그림 2-777. SH-SY5Y 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 3]



[그림 2-778. 그림 2-1505~1507 정량 분석]

5) 다음으로 tau-BiFC SH-SY5Y 기반 RA-PR070과 RA-PR076 약효 검증을 진행함(그림 2-779)

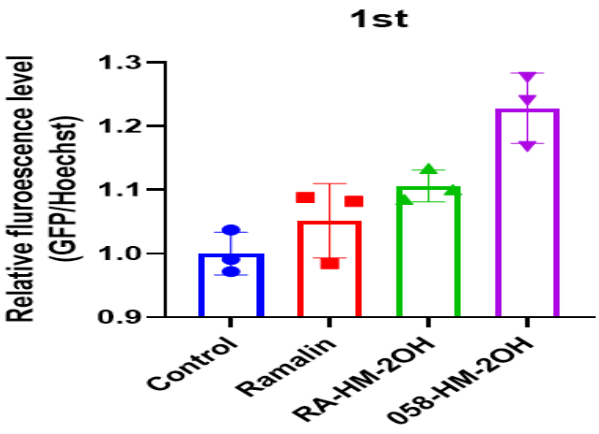
6) Tau-BiFC SH-SY5Y에 RA-PR070과 RA-PR076을 각각 10 μM, 20 μM의 농도로 24시간 처리한 후, Hoechst로 핵 염색을 진행한 뒤, cytation 5 기기를 통하여 형광레벨을 측정함. 그 결과, RA-PR070 10 μM, 20 μM과 RA-PR076 10 μM에서는 tau의 응집이 증가하는 경향을 보임(그림 2-779)



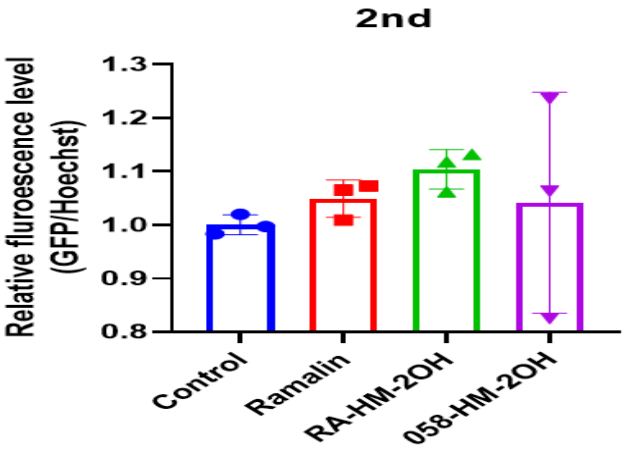
[그림 2-779. Tau-BiFC SH-SY5Y 기반 RA-PR070, RA-PR076 작용기전 검증]

7) 다음으로 라말린, RA-HM-2OH, RA-058HM-2OH의 tau-BiFC SH-SY5Y 기반 작용기전 검증을 진행함(그림 2-780~782)

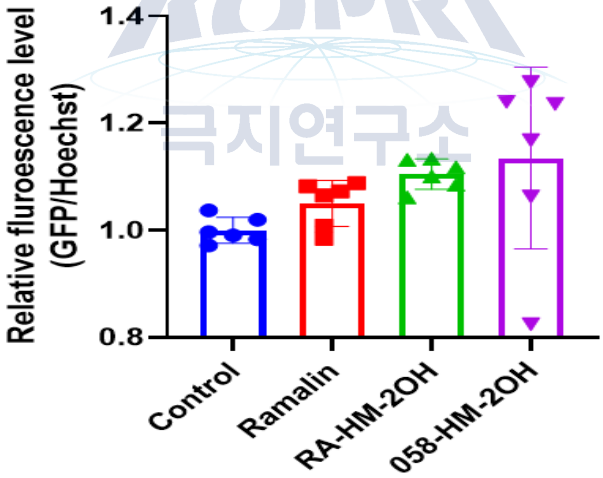
8) 각 물질들을 tau-BiFC SH-SY5Y에 10 μM씩 24시간 처리한 후, Hoechst를 통해 핵 염색을 진행하고 cytation 5를 통해 형광레벨을 측정함. 그 결과, 첫 번째 실험 및 두 번째 실험에서 라말린과 각 유도체들에 의한 유의한 tau 응집 감소를 확인할 수는 없었으며, 첫 번째, 두 번째 실험을 합쳐서 분석을 진행했을 때도 유의한 효과를 확인할 수 없었음



[그림 2-780. Tau-BiFC SH-SY5Y 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 1]



[그림 2-781. Tau-BiFC SH-SY5Y 기반 신규 라말린 유도체 작용기전 검증 2]



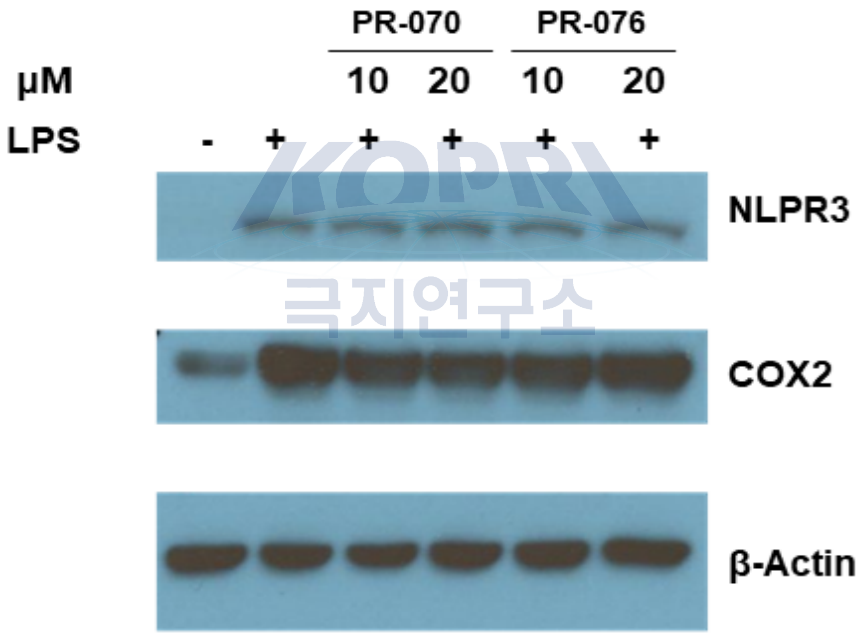
[그림 2-782. 그림 2-780~781 통합 분석]

○ 미세교세포 기반 약효 검증

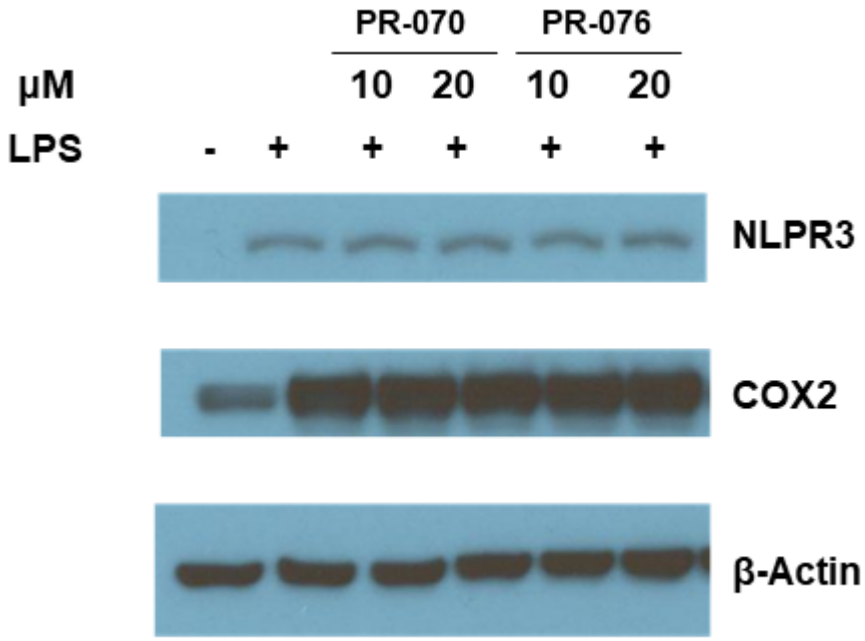
1) 다음으로 마우스 미세교세포인 BV-2 기반 RA-PR070과 RA-PR076의 작용기전 추가 검증을 진행함(그림 2-783~787)

2) BV-2에 RA-PR070, RA-PR076 각각 10 μM, 20 μM을 24시간 처리한 후, LPS를 처리하여 염증반응을 유도함. 그 결과, LPS에 의해 NLRP3가 control군 대비 20배 가까이 증가했으며, RA-PR076에 의해 NLRP3 발현량이 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았음

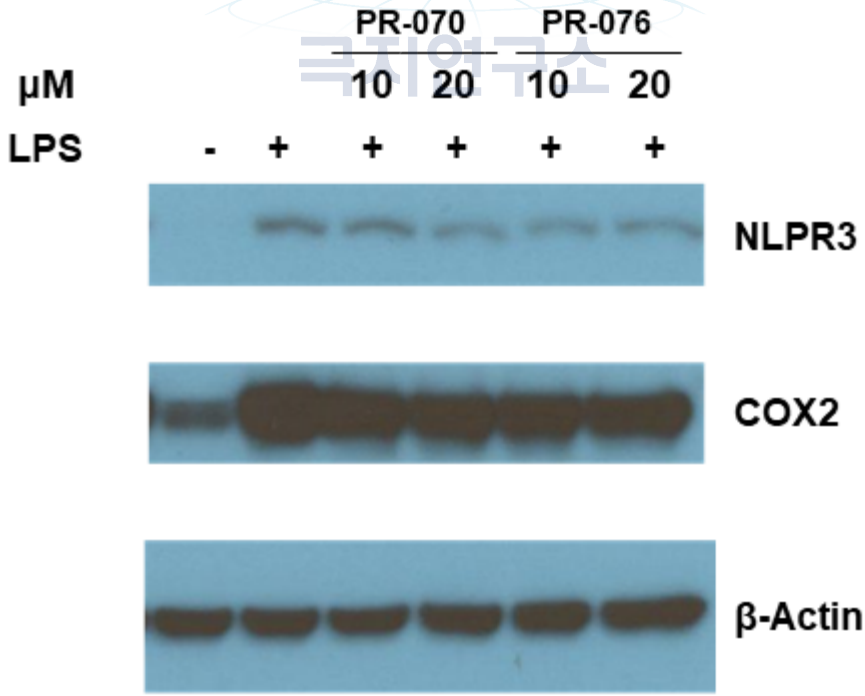
3) COX2의 경우, LPS에 의해 control군 대비 3배 이상 증가했으며, RA-PR070 20 μM군과 RA-PR076에 의해 COX2 발현량이 감소하는 경향은 있었으나 유의하지는 않았음



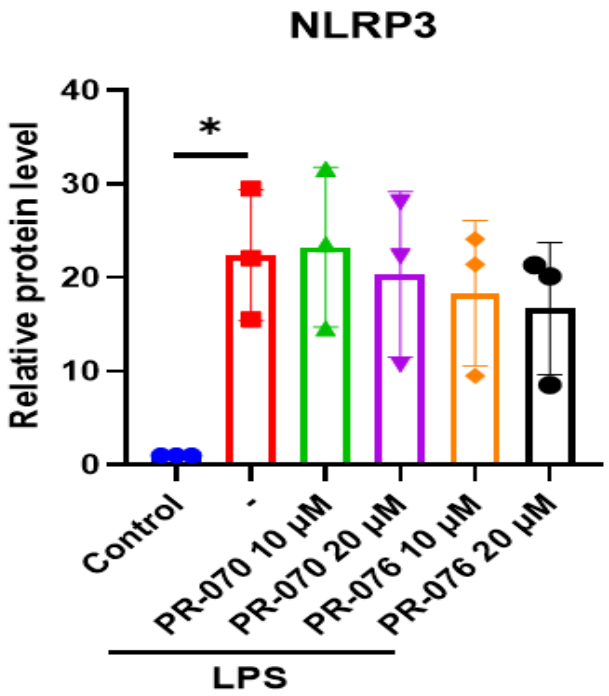
[그림 2-783. BV-2 기반 RA-PR070, RA-PR076 작용기전 검증 1]



[그림 2-784. BV-2 기반 RA-PR070, RA-PR076 작용기전 검증 2]

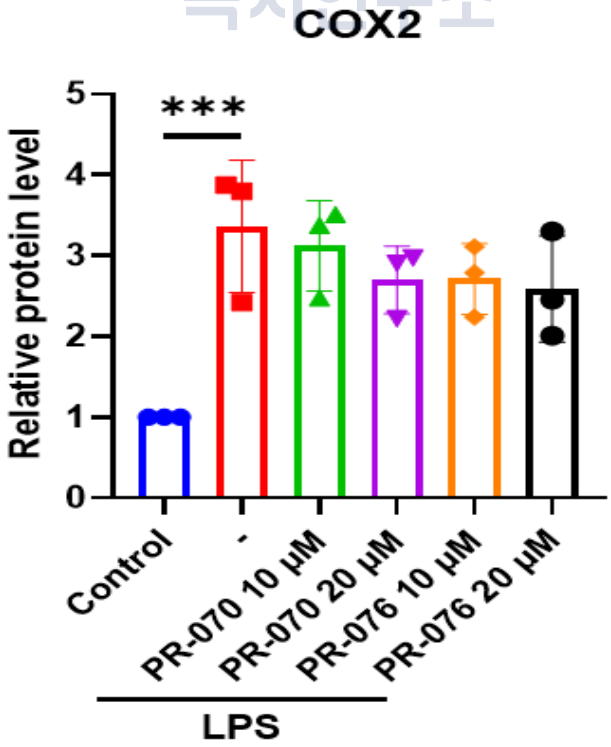


[그림 2-785. BV-2 기반 RA-PR070, RA-PR076 작용기전 검증 3]



[그림 2-786. 그림 2-783~785 NLRP3 정량 분석]

KOPRI 극지연구소



[그림 2-787. 그림 2-783~785 COX2 정량 분석]

□ 연구내용 2-21. 신규 타겟 단백질 및 후보약물과의 결합원리 측정

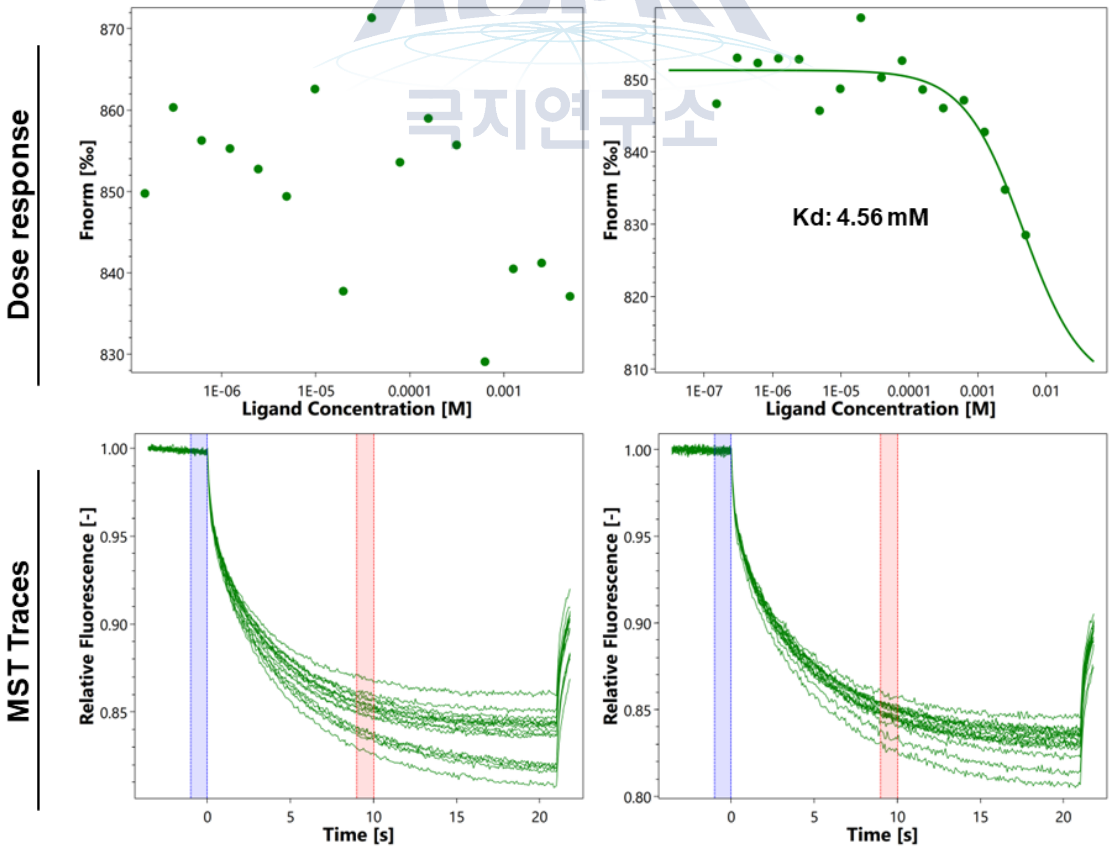
○ 신규 타겟 단백질과 후보물질과의 결합원리 측정

1) 라말린의 신규 타겟 단백질인 METAP1과 후보물질들인 RA-058HM, Hyd-Me, PF, TBU-Hyd-Me의 결합력을 Microscale thermophoresis (MST 분석)을 통해 분석했음(그림 2-788~791)

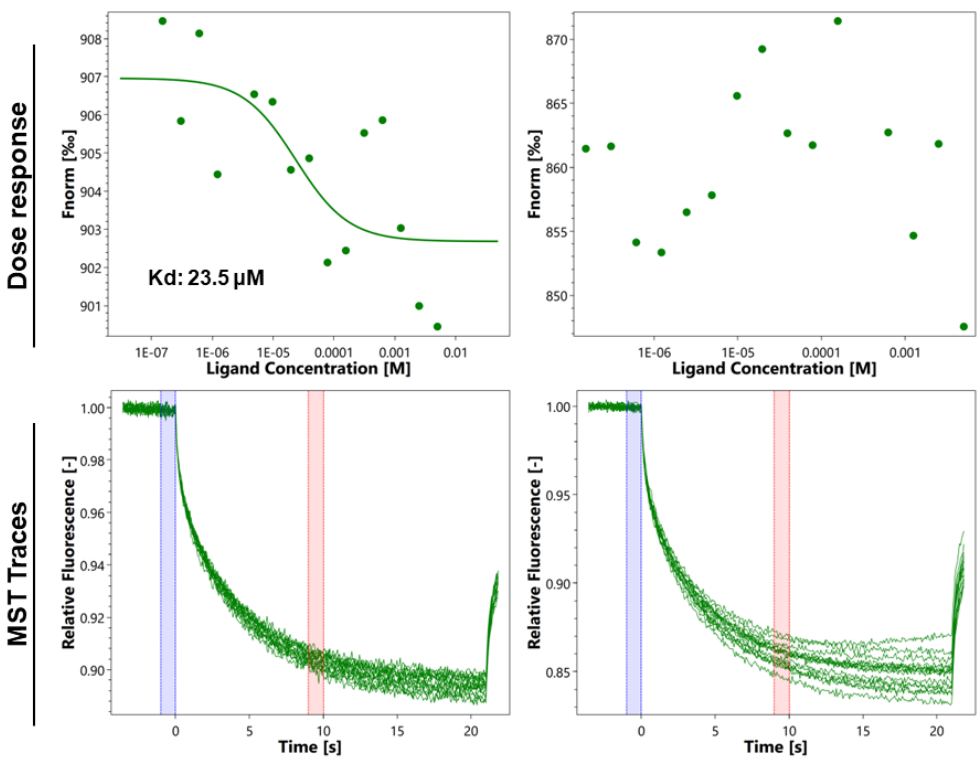
2) MST 분석은 온도 변화에 의해 단백질의 이동속도 차이가 나고 이에 의한 형광 변화를 측정하여 단백질과 ligand 사이의 결합력을 측정하는 분석방법임. 각 물질들은 5 x 2^{-16} M ~ 5 mM 의 농도로 처리했으며, 2 반복으로 실험을 진행함

3) 분석결과, RA-058HM, Hyd-Me, PF, TBU-Hyd-Me의 Kd 값은 각각 4.56 mM, 23.5 μM, 37.4 μM, 779 μM으로 나왔으나 반복실험에서는 값이 측정되지 않았음

4) 측정된 Kd 값의 경우 μM ~ mM 단위 수준의 값으로 METAP1과 후보물질들이 강력한 binding affinity를 가질 것이라고 예상하기는 어려울 것으로 판단됨

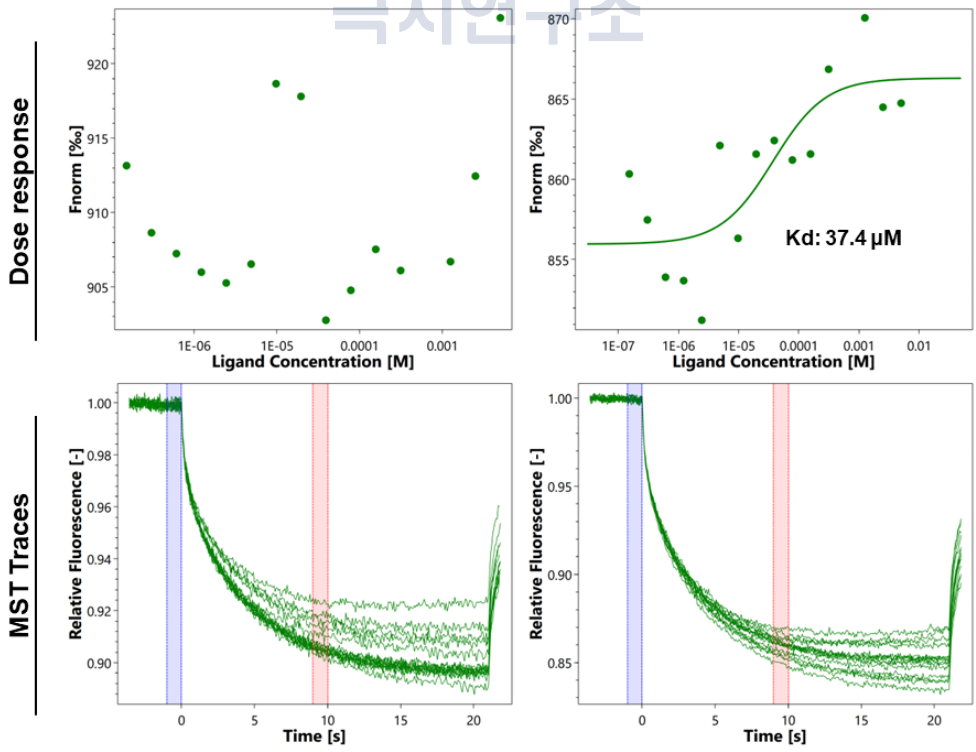


[그림 2-788. METAP1과 RA-058HM의 결합력 측정]

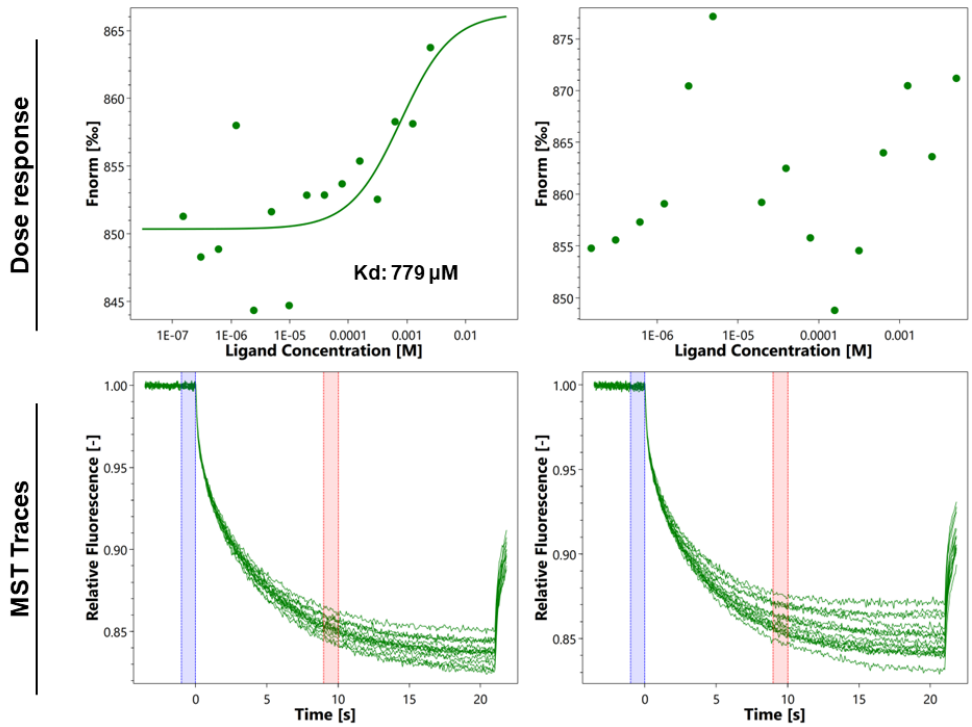


[그림 2-789. METAP1과 Hyd-Me의 결합력 측정]

KRIBB 극지연구소



[그림 2-790. METAP1과 PF의 결합력 측정]



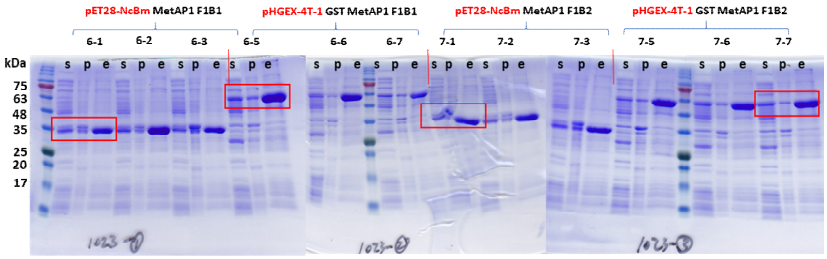
[그림 2-791. METAP1과 TBU-Hyd-Me의 결합력 측정]

○ 신규 타겟 human METAP1 단백질 정제 및 후보물질과의 결합원리 측정

1) METAP1은 신규합성된 단백질의 N말단의 methione 잔기를 제거하는 methionyl aminopeptidase 1 효소로, 단백질의 전사 과정 조절 및 세포분열을 조절하는 효소로 기존에 항암제 표적으로 보고되었음

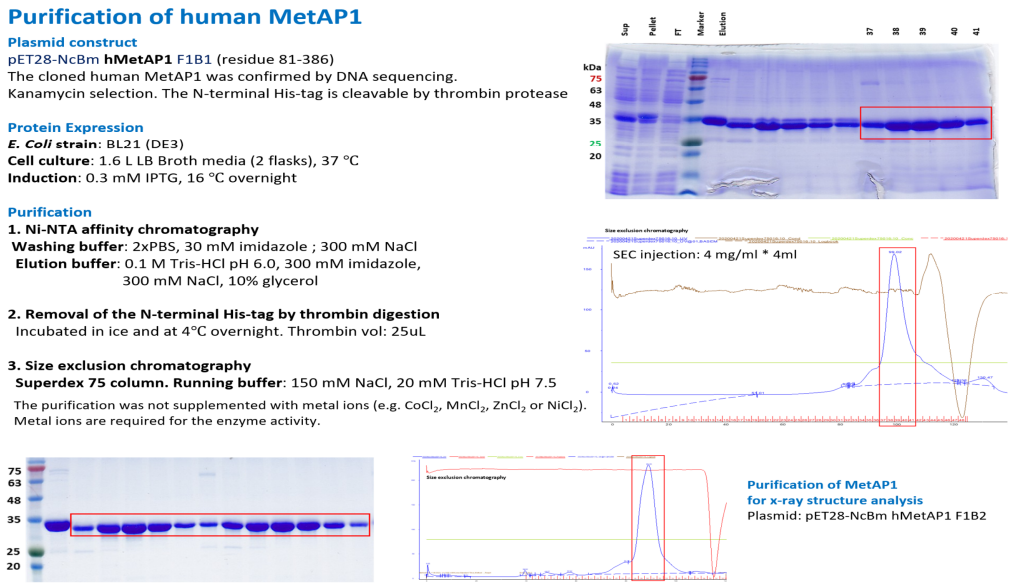
2) 라말린 유도체들의 표적 단백질로 human METAP1가 제시되어 재조합 단백질을 정제하고 ITC를 이용하여 라말린 유도체들의 직접결합을 확인하였음. METAP1의 유전자를 여러 대장균 발현 벡터에 클로닝하였고 재조합 단백질 발현시험을 통해 수용성이고 대량 정제가 가능한 construct를 선별하였음(그림 2-792)

Gene	Constructs	residue, AA	Plasmid	RE sites	결과
human MetAP1	F1B1	81 - 386, 306 a.a	pET28-NcBm	BamHI/XhoI	수용성 발현 및 대량정제 가능
human MetAP1	F1B2	81 - 384, 304 a.a	pET28-NcBm	BamHI/XhoI	수용성 발현 및 대량정제 가능
human MetAP1	F1B1	81 - 386, 306 a.a	pHGEX-4T-1	BamHI/XhoI	수용성 발현, 수율 낮음
human MetAP1	F1B2	81 - 384, 304 a.a	pHGEX-4T-1	BamHI/XhoI	수용성 발현, 고순도 수율 낮음



[그림 2-792. 신규 표적 METAP1의 유전자 클로닝 및 단백질 발현시험 선별]

3) 라말린 유도체의 결합시험 및 단백질 구조 분석용 시료 확보를 위해 METAP1의 단백질 발현 및 대량 정제법을 구축하였음(그림 2-793). METAP1의 활성 도메인을 클로닝하였고 2L의 대장균 배양으로 10mg 이상의 고순도 단백질을 정제할 수 있었음



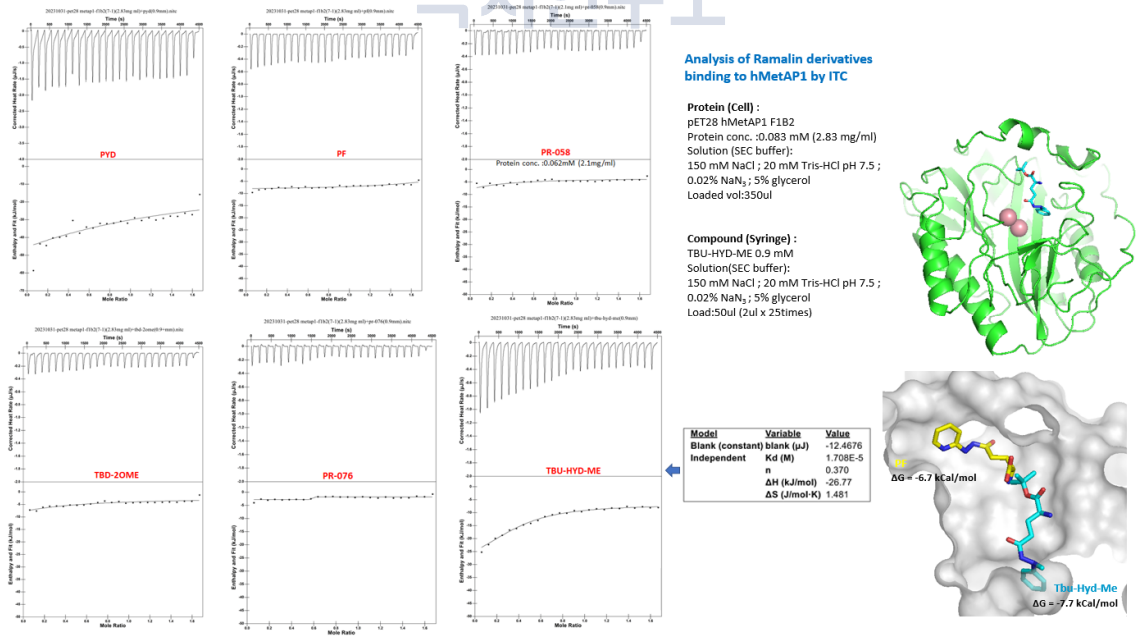
[그림 2-793. METAP1의 대장균 발현 및 단백질 대량 정제법 구축]

○ ITC를 이용한 리간드 표적 상호작용 정량적 분석

1) 활성을 보이는 선별된 라말린 유도체들의 작용기전을 규명하기 위해 METAP1에 대한 직접 결합능을 확인하고자 다양한 라말린 유도체들의 단백질 결합 활성을 ITC (Isothermal Titration Calorimetry)로 표적 결합능(Kd)을 정량적으로 측정 확인하였음(그림 2-794)

2) 6종의 선별된 라말린 유도체 (RA-PYD, RA-PF, Hyd-Me, RA-PR058, TBU-2OMe, RA-PR076, TBU-Hyd-Me)에 대하여 METAP1에 대한 결합 활성을 ITC로 시험함. 라말린 유도체들은 TBU-Hyd-Me만이 17 μM 정도의 결합능을 보임. 다른 5종의 유도체들의 ITC 실험으로는 유도체들이 결합능을 보이지 않아 METAP1에 대한 특이적 저해 데이터를 확보하지 못하였으나, ITC의 negative data는 다양한 원인 (ITC 측정 조건에서의 단백질의 비활성, 낮은 Kd로 인한 단백질 농도 부족, 비 최적인 buffer 조건 등)으로 발생할 수 있으므로, 라말린 유도체들의 METAP1에 대한 활성을 부정하는 것은 아님

3) 라말린 유도체 TBU-Hyd-Me는 METAP1에 대하여 수십 micromolar Kd를 보여, 강한 결합력을 보이지는 않음. TBU-Hyd-Me와 PF를 Swiss-Dock을 이용하여 METAP1에 대한 docking 예측을 하였을 때 결합력이 각각 –7.7 kCal/mol, -6.7 kCal/mol로서 TBU-Hyd-Me가 결합능을 보이는 ITC 실험 결과와 일관된 결론을 보임. 그러므로 METAP1에 대한 선도물질을 확보하기 위해 결합 활성이 더욱 개선된 유도체들의 개발이 필요함을 확인함



[그림 2-794. METAP1의 재조합 단백질 정제 및 라말린 유도체의 단백질 결합 ITC 분석]

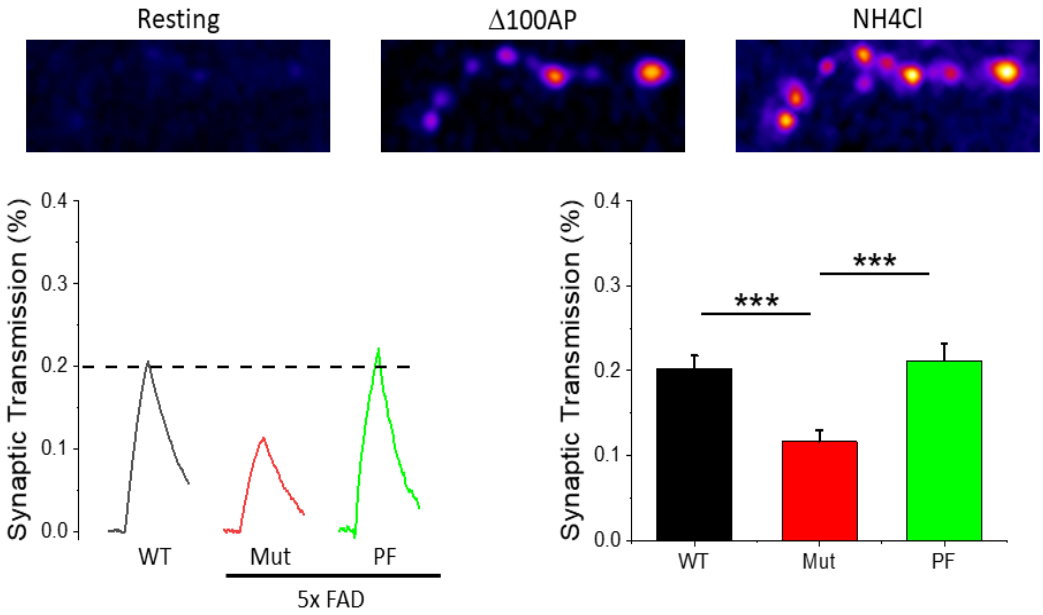
□ 연구내용 2-22. 신경세포 시냅스에 후보약물에 의한 타겟 후보 인자 발굴 및 작용 기전 규명

○ 라말린 유도체 RA-PR058, RA-PR076, RA-PF, TBU-Hyd-Me, 058-Hyd-Me에 의한 시냅스 기능조절 확인

1) 치매 모델 쥐의 뇌의 해마지역의 신경세포를 일차배양을 진행하였고 신경세포가 모두 성숙하게 자란 기간인 14일~21일 동안에 라말린 유도체 약물을 처리하고 실험을 진행. 각 유도체는 적절한 농도와 시간을 정하여 실험을 진행하였음

2) 일차배양된 신경세포의 시냅스의 기능 중 시냅스트랜스미션을 확인하기 위하여 vGlu1-pHourin 이라는 광센서를 신경세포에 발현시키고 주어진 신경활성 자극 (100 action potentials at 10Hz)을 신경세포에 주입하였고, WT의 시냅스트랜스미션과 5xFAD (or Mut)의 시냅스트랜스미션을 비교해 본 결과 약 50% 정도의 시냅스 기능이 약화되어 있는 것을 확인하였음. 이후 5xFAD 신경세포에 PF을 10 μM의 농도로 6시간 동안 처리하고 난 후 시냅스트랜스미션을 확인하였음

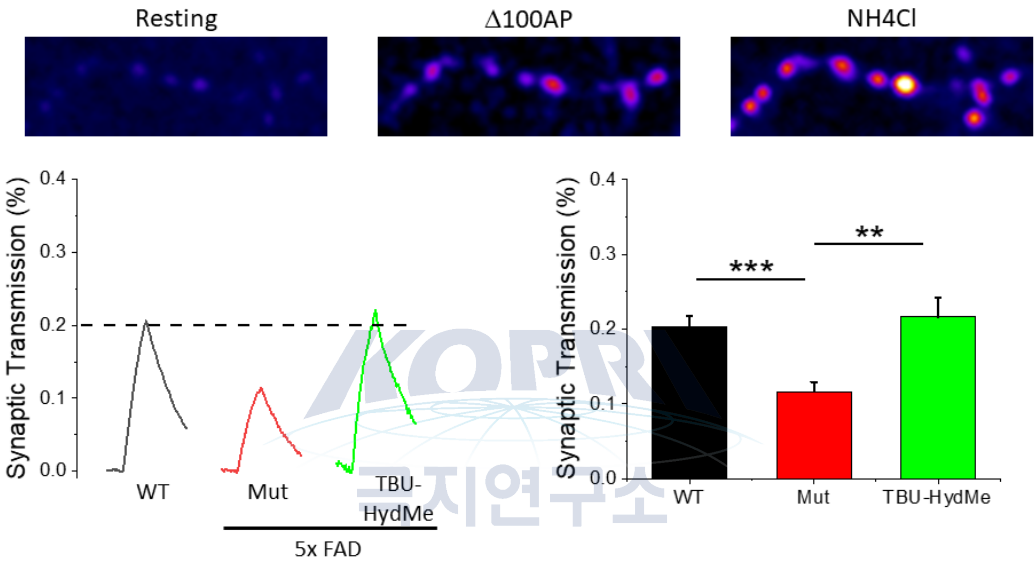
3) 그 결과, 약물이 처리된 5xFAD 신경세포의 시냅스트랜스미션이 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였음. RA-PF 약물에 의해 신경시냅스의 기능이 정상수준으로 보여줌(그림 2-795). 5xFAD 해마 신경세포에 라말린 유도체 PF를 처리한 후 신경 시냅스의 기능을 확인하여 PF에 의한 시냅스기능 회복 역할이 가능하다는 것을 확인하였음



[그림 2-795. 5xFAD primary neuron에서 RA-PF 처리에 의한 시냅스 기능 관찰]

4) WT과 5xFAD의 시냅스 기능 차이가 확인된 가운데, 5xFAD의 해마 신경세포를 일차배양하고 난 후에 TBU-HydMe 약물을 5 μM의 농도로 6시간 동안 처리하고 난 후 시냅스트랜스미션을 확인하였음

5) 그 결과, TBU-HydMe이 처리된 5xFAD 신경세포의 시냅스트랜스미션이 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였음(그림 2-796) . 이는 TBU-HydMe 약물이 신경시냅스의 회복 기능을 가질 수 있음을 보여줌. 5xFAD 해마 신경세포에 라말린유도체 TBU-HydMe를 처리한 후 신경 시냅스의 기능을 확인하여 TBU-HydMe에 의한 시냅스기능 회복 역할이 가능하다는 것을 확인하였음

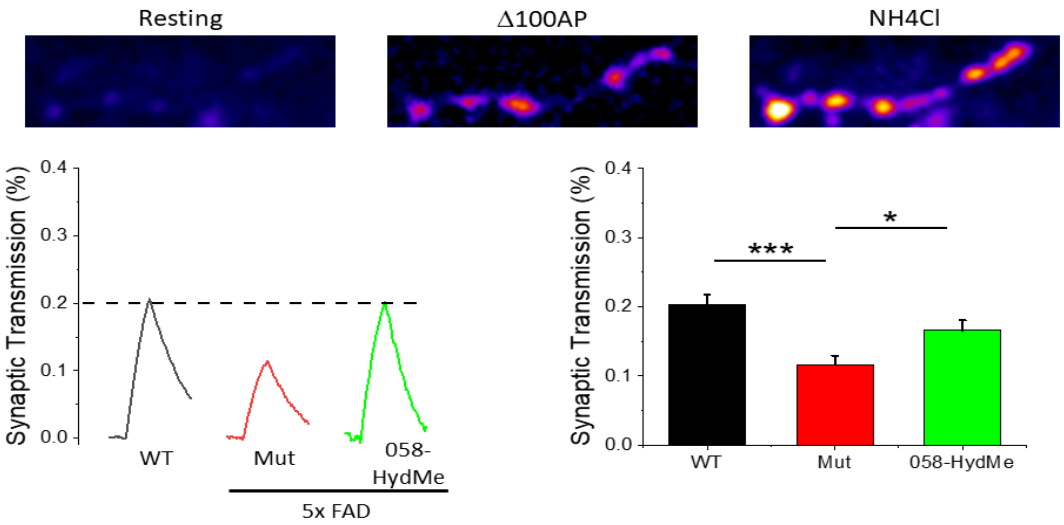


[그림 2-796. 5xFAD primary neuron에서 TBU-HydMe 처리에 의한 시냅스 기능 관찰]

6) 5xFAD의 해마 신경세포를 일차 배양하고 난 후에 058-HydMe 약물을 5 μM의 농도로 6시간 동안 처리하고 난 후 시냅스트랜스미션을 확인하였음

7) 그 결과, 058-HydMe가 처리된 5xFAD 신경세포의 시냅스트랜스미션도 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였음(그림 2-797). 다만 현재 충분한 수의 실험 반복이 되질 않아서 통계적 유의성은 있으나 그리 높게 나타나지 않고 있음. 앞으로 좀 더 반복실험을 통해 유의성이 커질 것으로 예상됨. 그러므로 058-HydMe도 치매환경에 의해 문제가 있는 신경시냅스를 회복 시킬 수 있는 가능성이 있을 것으로 예상됨

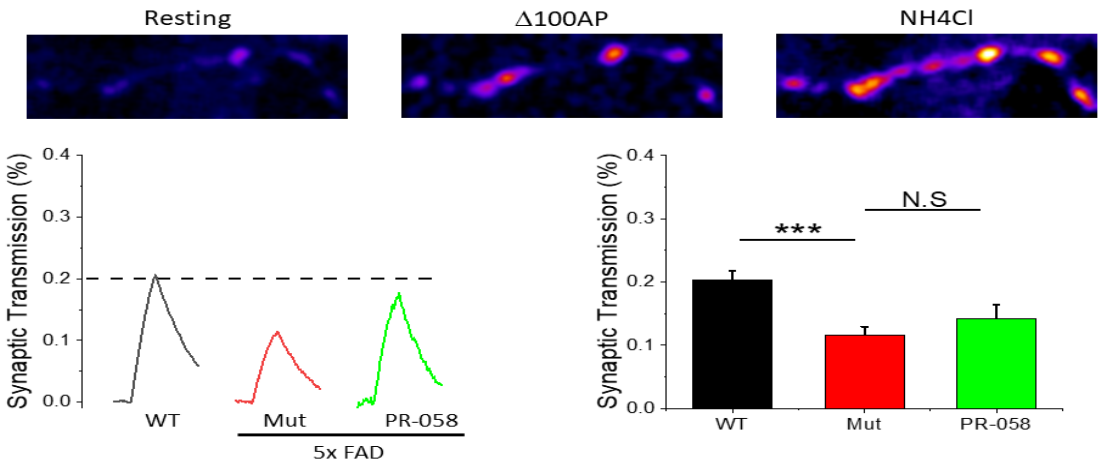
8) 5xFAD 해마 신경세포에 라말린유도체 058-HydMe를 처리한 후 신경 시냅스의 기능을 확인하여 058-HydMe에 의한 시냅스기능 회복 역할이 가능하다는 것을 확인하였음



[그림 2-797. 5xFAD primary neuron에서 058-HydMe 처리에 의한 시냅스 기능 관찰]

9) 5xFAD의 해마 신경세포에 RA-PR058 약물을 5 μM의 농도로 6시간 동안 처리하고 난 후 시냅스트랜스미션을 확인하였음

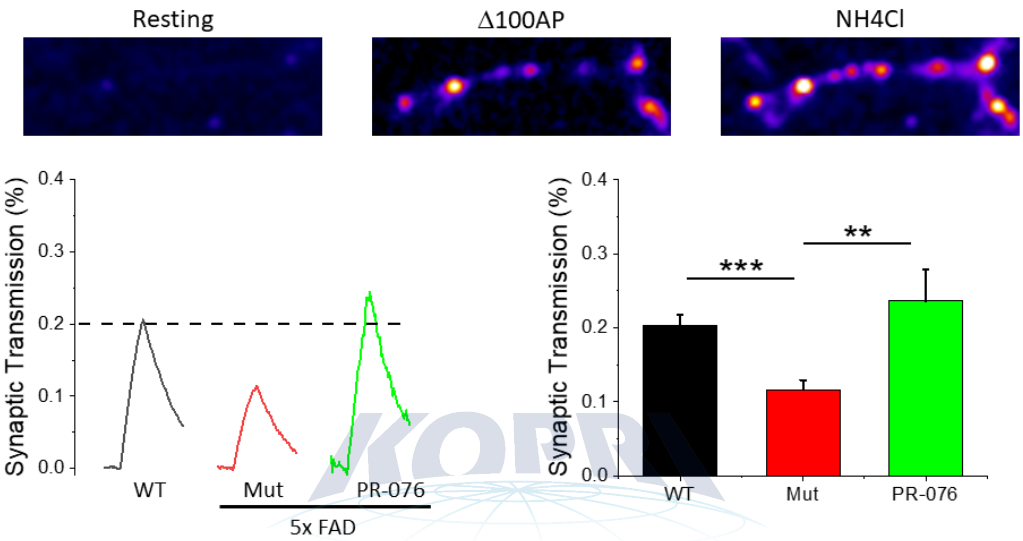
10) 그 결과, RA-PR058이 처리된 5xFAD 신경세포의 시냅스트랜스미션이 어느 정도 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였음. 다만, 현재 실험 반복이 충분히 이루어지지 않아서 통계적 유의성이 낮은 것으로 나타남(그림 2-798). 앞으로 좀 더 반복실험을 통해 유의성이 나타날지 확인할 필요가 있음. 5xFAD 해마 신경세포에 라말린 유도체 RA-PR058을 처리한 후 신경 시냅스의 기능을 확인하여 RA-PR058에 의한 시냅스기능 회복 가능성이 있어 보임 (실험 반복 필요)



[그림 2-798. 5xFAD primary neuron에서 RA-PR058 처리에 의한 시냅스 기능 관찰]

11) 5xFAD의 해마 신경세포에 RA-PR076 약물을 5 μM의 농도로 6시간 동안 처리하고 난 후 시냅스트랜스미션을 확인하였음

12) 그 결과, 약물이 처리된 5xFAD 신경세포의 시냅스트랜스미션이 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였음(그림 2-799). 이는 RA-PR076 약물도 신경시냅스의 회복 기능을 가질 수 있음을 보여줌. 5xFAD 해마 신경세포에 라말린 유도체 RA-PR076을 처리한 후 신경 시냅스의 기능을 확인하여 RA-PR076에 의한 시냅스기능 회복이 가능하다는 것을 확인하였음

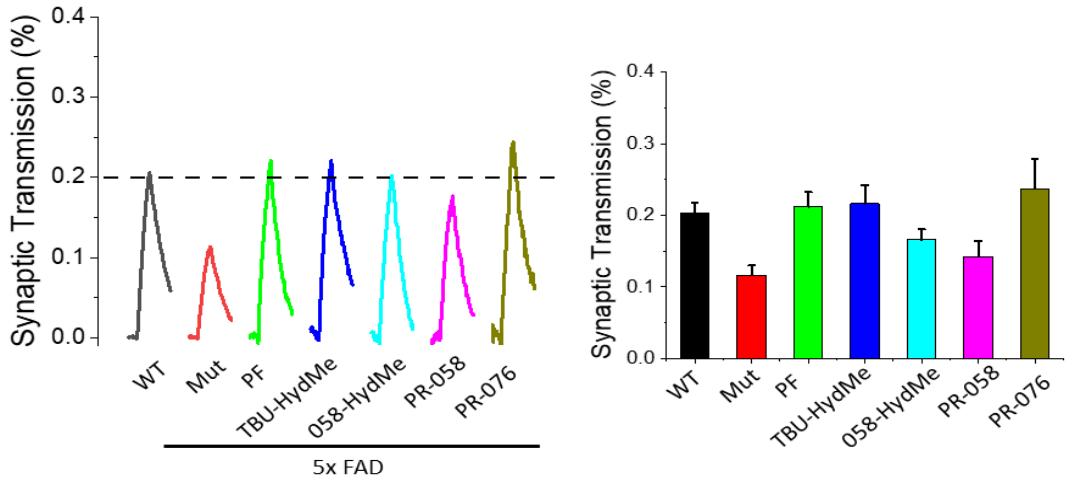


KORA
극지연구소

[그림 2-799. 5xFAD primary neuron에서 RA-PR076 처리에 의한 시냅스 기능 관찰]

13) 종합적으로 총 5가지의 라말린 유도체 (RA-PR058, RA-PR076, RA-PF, TBU-HydMe, 058-HydMe)에 의한 시냅스 기능조절을 정리하여 보면 위 그림과 같음. 전체적으로 5가지 후보약물은 약간의 크고 작음은 있지만 대체적으로 시냅스의 기능회복의 효과가 있는 것으로 판단됨(그림 2-800)

14) 다만, 적절한 처리 농도와 처리시간이 필요로 하며 과다한 농도 혹은 장기간 처리 시에는 신경세포의 안정성에 영향을 줄 가능성에 대해 좀 더 실험적 확인이 필요함



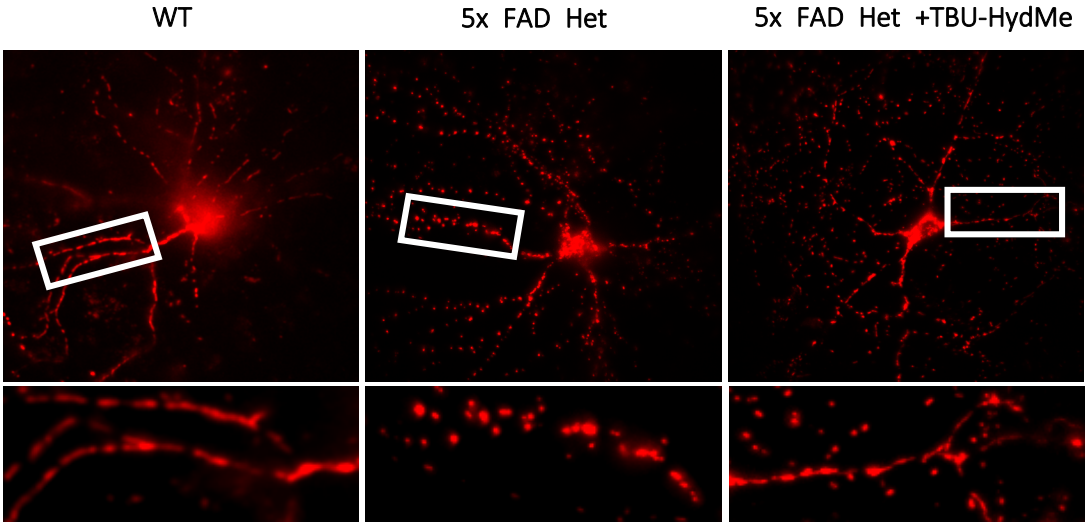
[그림 2-800. 5xFAD primary neuron에서 라말린 유도체 5종 처리에 의한 시냅스 기능 관찰]

○ 라말린 유도체 TBU-HydMe에 의한 신경세포 미토콘드리아 구조 및 이동조절 확인

1) 치매 모델 신경세포에 미토콘드리아의 형광마커를 발현하여 미토콘드리아의 구조를 영상화하고, 미토콘드리아의 기본 구조 (길이, 크기 등)의 변화와 일반적인 미토콘드리아의 움직임이 라말린 유도체 약물들에 의해 변화가 있는지를 확인하였음

2) 정상 신경세포에서의 미토콘드리아는 신경세포의 위치에 따라 다양한 구조를 가짐. 특히, dendrite 지역은 비교적 기다린 모양의 미토콘드리아 형태를 가지며, axon과 nerve terminal 지역에는 짧은 점 모양의 구조를 가짐. 하지만 치매 모델 신경세포에는 이러한 미토콘드리아의 모양이 모두 짧은 절편으로 잘린 구조로 되어있는 것이 확인됨. 특히 dendrite 지역에는 이러한 모양의 변화가 더욱 크게 나타남

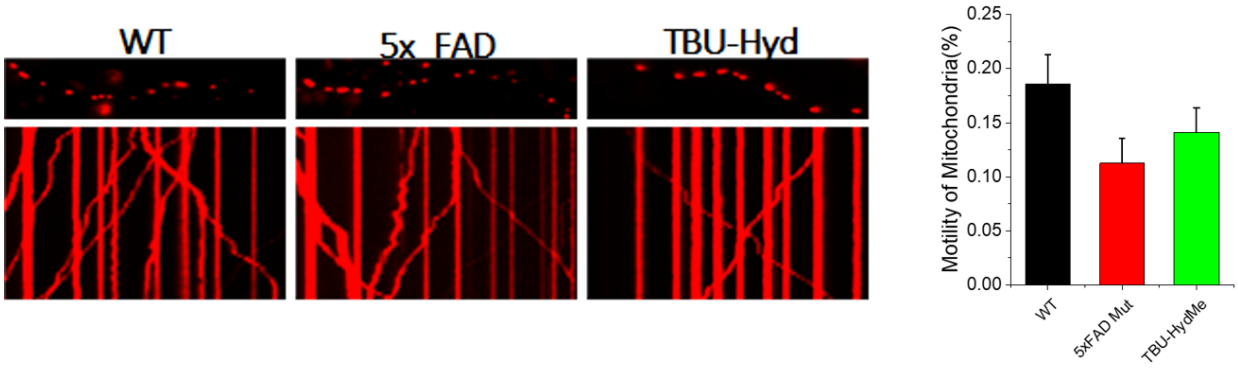
3) 이러한 치매 모델 신경세포에 TBU-HydMe를 5 μM의 농도로 6시간 동안 처리하였을 경우 미토콘드리아 구조의 부분적 회복이 나타남을 확인함(그림 2-801). 전체적으로 회복되지는 않았지만, 이는 처리 조건이 아직 적절하지 않을 수 있는 결과로 해석되며 추후 연구에서 적절한 처리 조건을 확립할 예정임. 따라서, TBU-HydMe의 약물이 미토콘드리아 구조적 문제 회복의 기능을 가질 가능성이 있어 보임



[그림 2-801. 5xFAD primary neuron에서 TBU-HydMe 처리에 의한 미토콘드리아 구조 관찰]

4) 약물처리에 의한 미토콘드리아의 이동에 대한 부분을 확인했음. 미토콘드리아는 여러 가지 조건(예: 에너지 요구 환경)에 따라 세포 내에서 이동하는 것으로 알려져 있음. 특히 정상적이고 활성이 높은 신경세포 내에서 많은 이동이 있는 것으로 알려져 있음. 이러한 이동성은 본 실험에서도 확인되었고, 또한 치매 모델 신경세포에는 그 움직임이 현저하게 저하되어 있음을 확인했음

5) 치매 모델 신경세포에 라말린 유도체 TBU-HydMe를 5 μM의 농도로 6시간 동안 처리하였을 경우 미토콘드리아의 이동이 조금씩 회복되는 경향이 관찰되었음(그림 2-802). 아직 초기 단계의 실험이라 조금 더 반복과 함께 적절한 처리 조건을 확립해야 하는 상황임. 처리 조건이 확립된다면 TBU-HydMe 약물이 미토콘드리아의 기능회복에 긍정적인 영향을 가질 것으로 예상됨



[그림 2-802. 5xFAD primary neuron에서 TBU-HydMe 처리에 의한 미토콘드리아 이동 확인]

□ 연구내용 2-23. 신규 활성 저분자 발굴 및 최적화

○ 신규 활성 저분자 발굴 및 최적화

1) 본 연구자는 AlphaFold3 기반 high throughput 단백질-저분자물질 복합체 co-folding 시스템을 확립하였음. AlphaFold3는 단백질과 저분자 물질과의 복합체 구조를 co-folding을 통하여 만들어 낼 수 있는 최신 방법임.

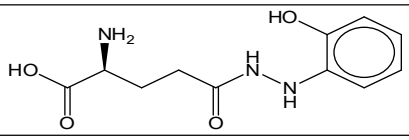
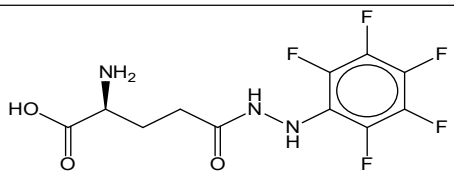
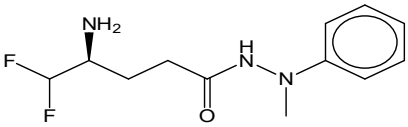
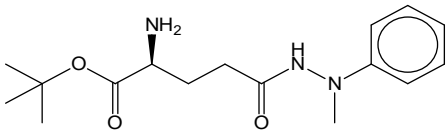
2) 기존 rigid-body를 상정한 docking의 단점을 극복하고 induced-fit 등 미묘한 구조의 변화를 반영하여 정확한 3차 구조 모델링이 가능하며, 논문에 보고된 바에 의하면 80% 이상의 정확도로 복합체 구조 생성이 가능함. 그러나 하나의 복합체 계산에 많은 시간이 필요하고 A100 이상의 고가 GPU 장비가 필요하여 high throughput 계산이 쉽지 않음. 또한, AlphaFold3를 만든 Deepmind는 AlphaFold3를 단백질-저분자물질의 high throughput co-folding 계산에 이용하는 것을 제한하고 있음

3) 최근 AlphaFold3 알고리듬을 자체 코드로 구현하여 high throughput 이용에 제한이 없는 일련의 유사 프로그램이 등장함. Boltz-1, Chai-1, Protenix 등의 프로그램이 여기에 해당하며, 본 연구자는 이 프로그램을 활용한 high throughput 계산 시스템을 자체 구축하여 다양한 용도에 이용 중임

4) 본 연구자는 이를 활용하여 Ramalin, RA-PF, RA-058HM, tBu-Hyd-Me 화합물과 SLC (Soluble Carrier)계열 수송체 및 hERG와의 복합체를 AlphaFold3 알고리듬으로 모델링함. 정교한 복합체 모델에서의 저분자 물질의 포즈 및 선택적 상호작용의 존재 여부로 결합 여부를 판단할 수 있다고 가정함

5) SLC 수용체는 세포막에 위치한 다기능 운반체 그룹으로, 아미노산, 당류, 이온, 약물 등 다양한 기질의 세포 내외 이동을 조절하여 세포 항상성 유지, 대사 조절, 약물 흡수 및 배설 등에서 핵심 역할을 수행함. 현재 약 400 여종 이상 존재하고 이를 65개 정도의 family로 분류 가능함. 이중 신약개발 과정 중 상호작용을 고려하는 SLC는 10여종이며, hERG는 K^+ 이온 채널로 심장 근육세포 재분극에 역할함

6) 이 단백질과 저분자 약물의 상호작용이 저분자 약물의 생체내 흡수, 분포, 배설과 독성 등 약효 관련 약제학적 프로파일 변화에 중요한 역할 수행함. 레보도파 (L-DOPA)는 SLC7 계열 LAT1에 결합하여 뇌로 이동하나 도파민은 LAT1에 결합하지 않기에 레보도파를 파킨슨병 치료에 이용함. Metformin의 Phenformin과 비교한 SLC22 계열 OCT1 수송체에 대한 결합력 우위가 Metformin의 현저히 적은 부작용의 이유. 항히스타민제인 테르페나딘 (Terfenadine)은 hERG 채널을 강력하게 차단하는 부작용으로 시장에서 퇴출됨

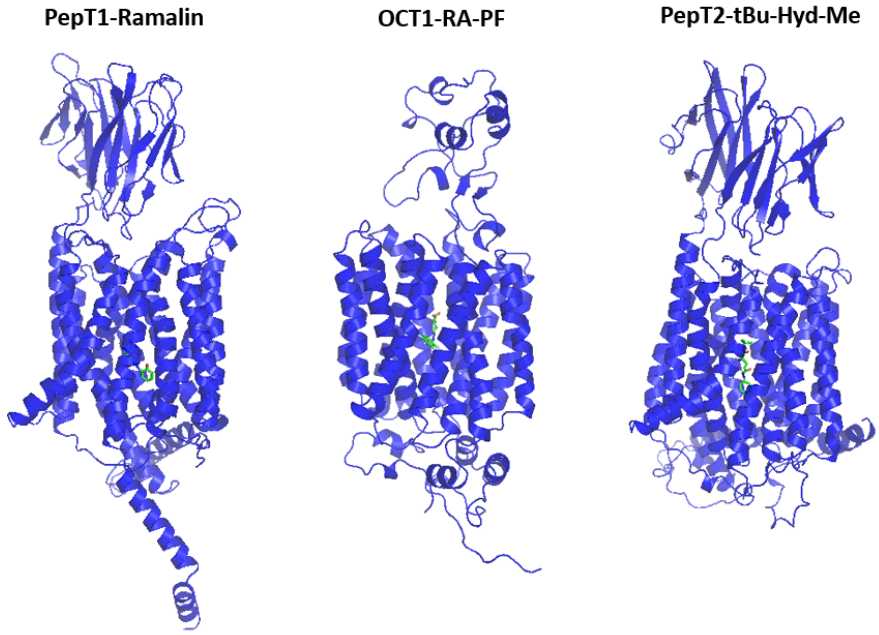
Compound	Chemical structure	SMILES
Ramalin		c1ccc(c(c1)NNC(=O)CC[C@@H](C(=O)O)N)O
RA-PF		C(CC(=O)NNc1c(c(c(c(c1F)F)F)F)F)[C@@H](C(=O)O)N
RA-058HM		CN(c1ccccc1)NC(=O)CC[C@@H](C(F)F)N
tBu-Hyd-Me		CC(C)(C)OC(=O)[C@H](CCC(=O)NN(C)c1ccccc1)N

[표 2-16. AlphaFold3 알고리즘으로 테스트한 저분자물질]

7) Boltz-1 및 Chai-1을 주로 이용하여 단백질-저분자물질 복합체 모델링 수행. In-house에서 작성한 스크립트를 이용하여 분산 및 자동화 계산을 실시함

수송체	유전자	역할 및 발현
PepT1	SLC15A1	소장에서 발현. 이량체 및 삼량체 펩타이드를 비롯하여 펩타이드 유사 전구체의 흡수 담당
PepT2	SLC15A2	주로 신장 및 기타 조직에서 발현. 펩타이드와 펩타이드 유사 약물의 재흡수에 관여
OCT1	SLC22A1	주로 간에서 발현. 다양한 유기 양이온의 간 내 섭취를 촉진하여 약물의 제거와 분포에 영향
OCT2	SLC22A2	주로 신장에서 발현. 유기 양이온 약물의 신장 제거에 중요한 역할
OAT1	SLC22A6	신장에서 주요 유기 음이온 수송체로, 다양한 음이온 약물 및 대사산물의 흡수와 제거에 관여
OAT3	SLC22A8	신장에서 OAT1과 함께 작용. 유기 음이온의 수송에 참여하여 약물 제거 및 약물 간 상호작용에 영향
LAT1	SLC7A5	대형 중성 아미노산을 수송. 혈뇌장벽 및 종양에서 높은 발현을 보여 뇌 약물 전달 및 표적 치료에 중요한 역할
MCT1	SLC16A1	젖산, 피루브산 등의 모노카복실산을 수송. 에너지 대사에 관여하고, 대사 활동이 높은 조직에서 약물 분포에 영향
NTCP	SLC10A1	간에서 담즙산의 흡수를 매개. 담즙산 유사 구조를 모방하거나 NTCP 기능에 영향을 주는 약물은 간의 약물 흡수 및 담즙산 항상성에 영향
MATE1	SLC47A1	간 및 신장 세포에서 약물과 그 대사산물의 능동적 배출에 관여하며, 전체적인 약물 제거에 중요한 역할
hERG	KCNH2	K^+채널. 심장의 재분극에 중요한 역할

[표 2-17. AlphaFold3 알고리즘으로 저분자 물질과의 결합 여부를 테스트한 수송체]

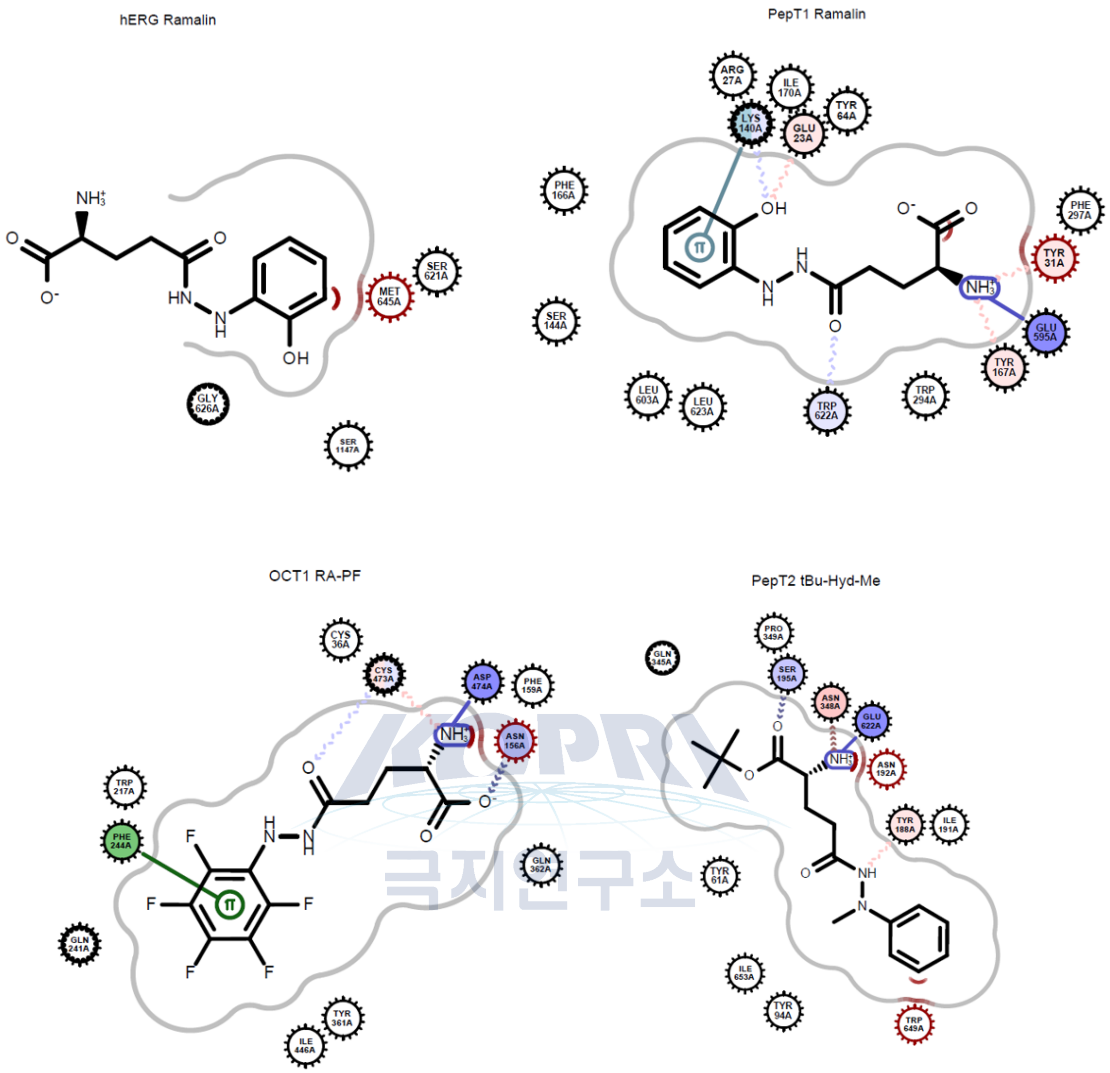


[그림 2-803. Boltz-1(AlphaFold3 기능 구현 프로그램)을 활용하여 예측한 저분자물질(녹색)-단백질(청색) 복합체 3차 구조]

8) 단백질과 저분자 물질의 결합 가능성은 단백질-저분자물질 선택적 상호작용의 존재 유무로 판단. ◎, O, △, X의 4단계로 분류. ◎는 결합 가능성이 높은 상호작용을 의미. 현시점에서 방법론이 완전하지는 않으나 대략적인 흡수 정도를 예측하는데 참고할 수 있는 결과 제공

수송체	Ramalin	RA-PF	RA-058HM	tBu-Hyd-Me
PepT1	◎	O	O	O
PepT2	◎	O	△	◎
OCT1	O	◎	O	◎
OCT2	◎	△	O	△
OAT1	◎	◎	O	X
OAT3	O	△	X	△
LAT1	O	O	△	△
MCT1	O	◎	△	△
NTCP	X	X	△	X
MATE1	△	△	△	△
hERG	X	X	△	△

[표 2-18. 수송체와 테스트 저분자 물질의 결합 여부의 판단]

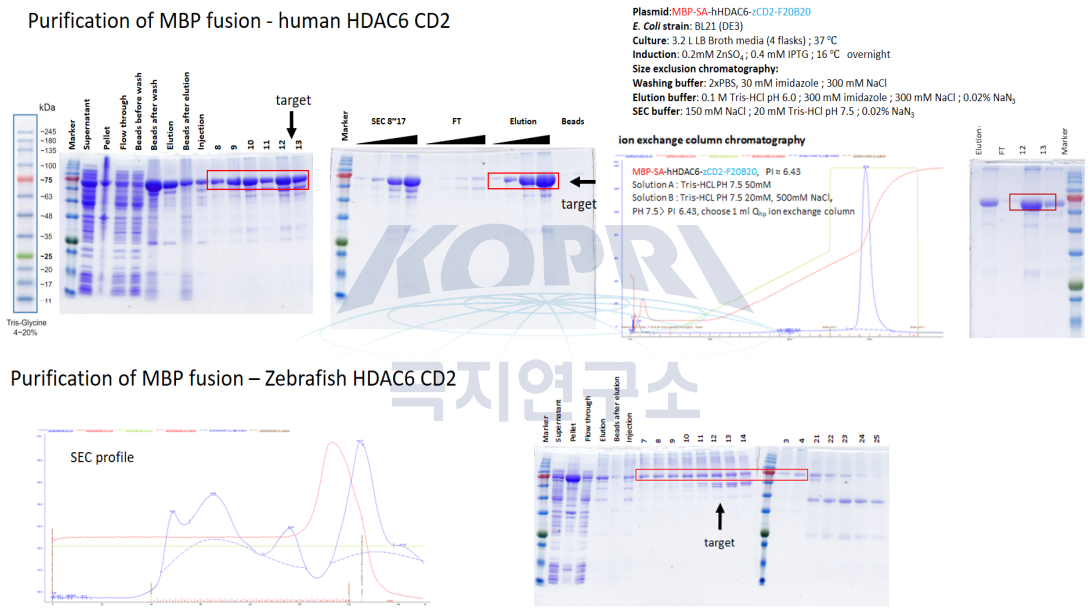


[그림 2-804. Boltz-1 활용 저분자물질-단백질 복합체에서의 상호작용 모식도]

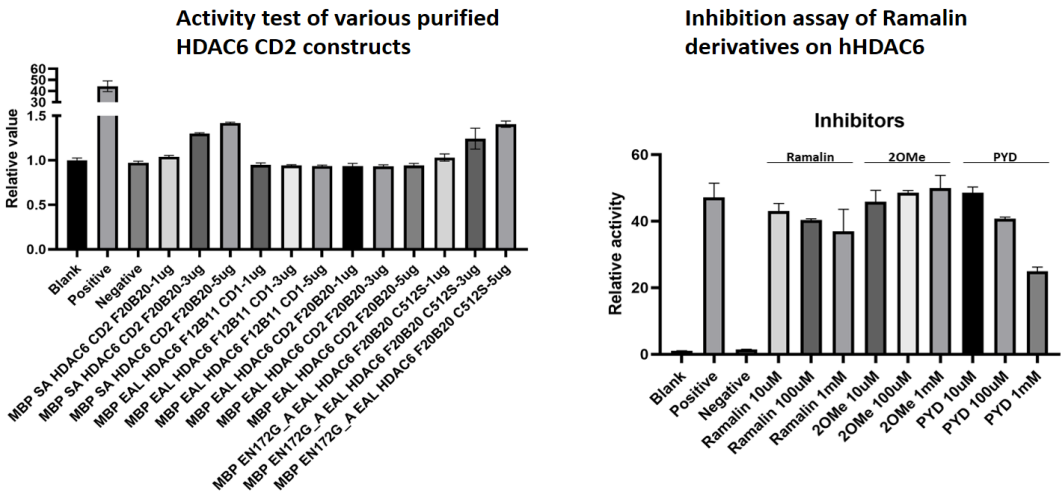
□ 연구내용 2-24. 후보약물의 표적 결합/저해 기전 검증, 신규 표적 구조 연구

○ 구조 분석 및 저해 기전 연구를 위한 HDAC6 단백질 대량 정제

1) 다양한 HDAC6 construct의 단백질 고순도 대량 정제를 진행하였음. 결정화 성질 개선을 위해 MBP-HDAC6 CD2 돌연변이체 제작을 하였고, 단백질 대량 정제를 수행하여, ITC를 이용한 유도체 결합 측정 및 결정화 실험에 사용하고 있음(그림 2-805). Human HDAC6 CD2외에도 zebrafish HDAC6 (DrHDAC6) CD2를 클로닝하고 단백질 정제를 하였음. DrHDAC6의 결정구조가 많이 보고되어 있어 한 개만 알려진 human HDAC6보다 결정화가 용이할 것으로 예상됨. 활성 부위의 구조는 human과 zebrafish가 동일하여 저해제 복합체 구조연구에 이용될 수 있음(그림 2-806)



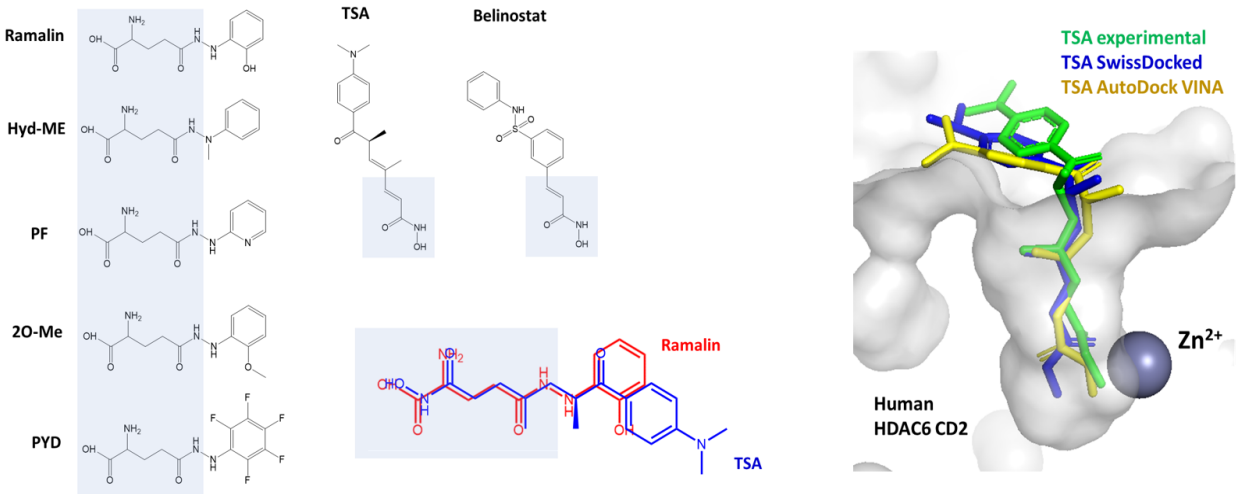
[그림 2-805. Human 및 zebrafish의 HDAC CD2 단백질 정제]



[그림 2-806. 정제된 HDAC6 construct들의 활성 시험]

○ 라말린 유도체-표적 단백질 복합체의 x-선 분자 구조 규명

1) 라말린 유도체들이 결합된 HDAC6와의 복합체의 3차 구조를 규명하여, 결합을 확인하는 것이 가장 정확하나, 단백질의 결정화 및 양질의 회절능을 보이는 결정의 확보가 어려움. 2차년도에 초기 결정을 확보하였고 현재 회절능 개선을 위한 실험을 진행하였으나, 회절능이 높지 않아 복합체 구조 규명을 하지 못하고 있음. 결정화 조건 및 construct 최적화로 해결 가능할 것으로 예상하며, 이와 병행하여 computational docking으로 결합 모드를 분석하였음(그림 2-807)



[그림 2-807. 라말린 유도체들과 HDAC6 저해제인 TSA의 골격 유사성 비교 (좌). 실제 실험 구조가 알려진 TSA와 비교하여 HDAC6에 대한 computational docking 예측 결과 신뢰도 확인 (우)]

○ 라말린 및 유도체들의 virtual docking을 이용한 HDAC6 표적 결합 분석

1) 표적 복합체의 x-선 구조 규명 연구와 병행하여, 기존에 알려진 HDAC6의 3차 구조를 이용하여, 여러 라말린 유도체들의 computational docking을 수행하였고, 결합 방식을 예측 분석하여 유도체들의 표적 저해기전을 이해하고자 하였음(그림 2-808)

2) Virtual docking은 다음과 같은 방법으로 수행함

가. 라말린 유도체들의 3D 분자구조 생성: Chemdraw로 3D 구조를 그린 후 energy minimization (Avogadro 이용)으로 3차 분자 구조를 생성함

나. HDAC6의 표적구조는 human HDAC6 CD2-Trichostatin A 복합체 3차 구조 (PDB id: 5EDU, 해상도 2.8Å)에서 리간드를 제거하고 HDAC6 apo형을 분리하여 사용

다. Docking에 사용한 프로그램: SwissDock, Autodock VINA

3) Trichostatin A (TSA)는 HDAC6의 효과적인 저해제로, 그 복합체 3차 구조가 알려져 있어, virtual docking의 양성 대조군으로서 결합 예측의 신뢰도를 확인하고, 라말린 유도체들의 결합 방식을 비교하는데 이용함. 라말린 유도체들은 HDAC6의 저해제인 TSA와 belinostat의 주요활성 골격의 2차원적인 topology 유사성을 가짐. 라말린 유도체와 TSA의 결합방식의 유사성이 존재할 수 있음

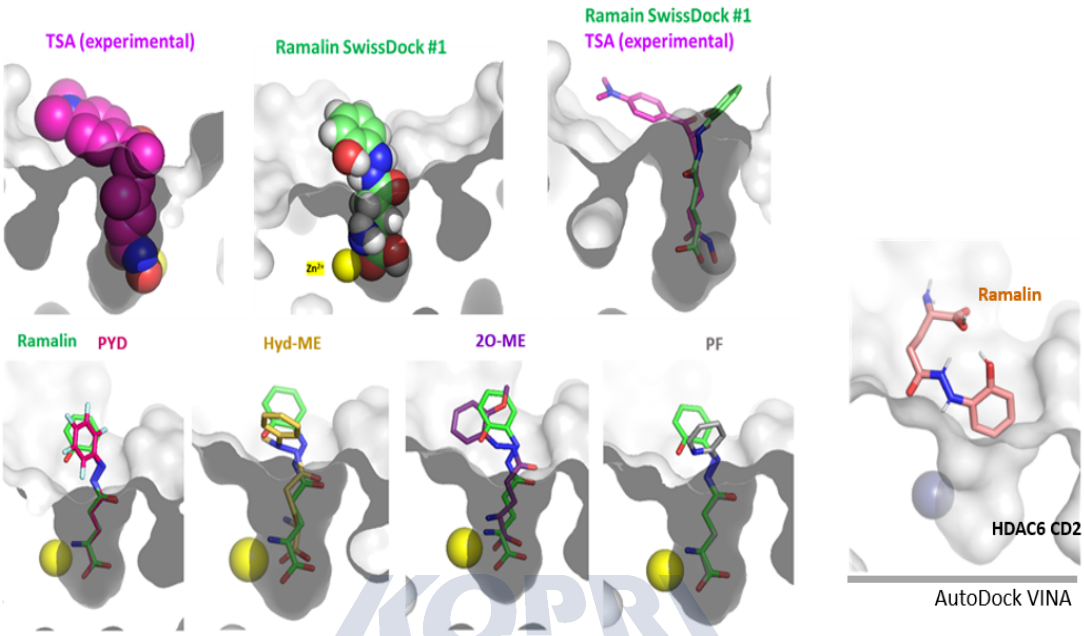
4) TSA를 SwissDock과 AutoDock VINA로 결합 모드를 예측했을 때, 실험구조 TSA (PDB id: 5EDU)와 매우 유사한 결과를 보임. SwissDock을 이용한 결합 예측에서 라말린 및 RA-PYD, RA-Hyd-Me, RA-2OMe, PF는 공통적으로 라말린 골격의 glutamine 작용기가 HDAC6 CD2의 활성부위 포켓에 같은 방식으로 결합함

5) 라말린 유도체들의 차이를 보이는 head group들은 활성부위 입구 근처의 노출된 subpocket에 위치하여, 각 유도체의 구조적 특징에 따라 결합력에 차이를 미칠 것으로 예상됨. 즉, 본 과제에서 유도체 확보의 다양한 시도로서 head group 변형 유도체 제작은 HDAC6를 표적으로 효과적인 전략으로 판단됨

6) AutoDock VINA를 이용하여 라말린의 결합을 예측하였을 경우는 SwissDock과는 다른 결과를 보임. 라말린의 glutamine 작용기가 active site pocket에 위치하지 않고, 표면의 shallow pocket에 위치함

7) AutoDock의 ΔG값은 TSA는 –8.3kcal/mol인 반면, 라말린은 –6.0 정도로 –2.3kCal/mol의 차이로 TSA보다 결합력이 약하게 예측됨. 즉, 라말린의 결합이 강하지 않기 때문에, 다른 프로그램인 SwissDock과 결합 모드에서의 차이를 보이는 것 같음

8) AutoDock의 결합방식은 carboxyl goup 및 phenyl ring이 노출되는 방향으로 결합하므로 이 부위의 변형 및 작용기 도입으로 결합력을 증가시키는 유도체 다양화 방식이 가능할 것으로 예상됨. 현재 새롭게 합성되고 있는 라말린 유도체들이 이 두 작용기의 변형체들로 적절히 제작하고 있는 것으로 판단함

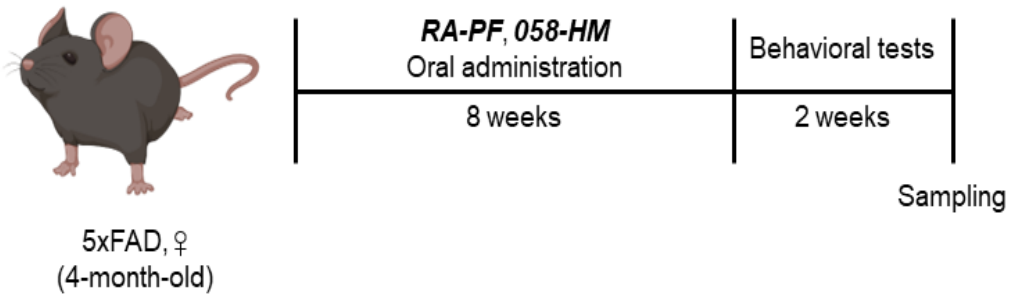


[그림 2-808. SwissDock 및 AutoDock VINA를 이용한 라말린 유도체들의 HDAC6 CD2 활성 부위 결합 방식 비교]

□ 연구내용 2-25. 최종 후보물질의 AD 동물 모델기반 유효성 평가

○ 5xFAD 동물모델에서 RA-PF, RA-058HM 유효성 평가 1

1) 본 연구진은 앞선 연차들에서 후보물질로 선정된 RA-PF와 RA-058HM의 약효 평가를 5xFAD 동물모델에서 진행함(그림 2-809). 4개월령의 5xFAD 동물모델에 RA-PF을 20 mg/kg, RA-058HM은 10 mg/kg와 20 mg/kg의 용량으로 매일 한 번씩 8주간 경구투여를 진행했으며, 6개월령부터 MWM 실험을 통해 학습능력 및 인지능력의 개선 여부를 확인함



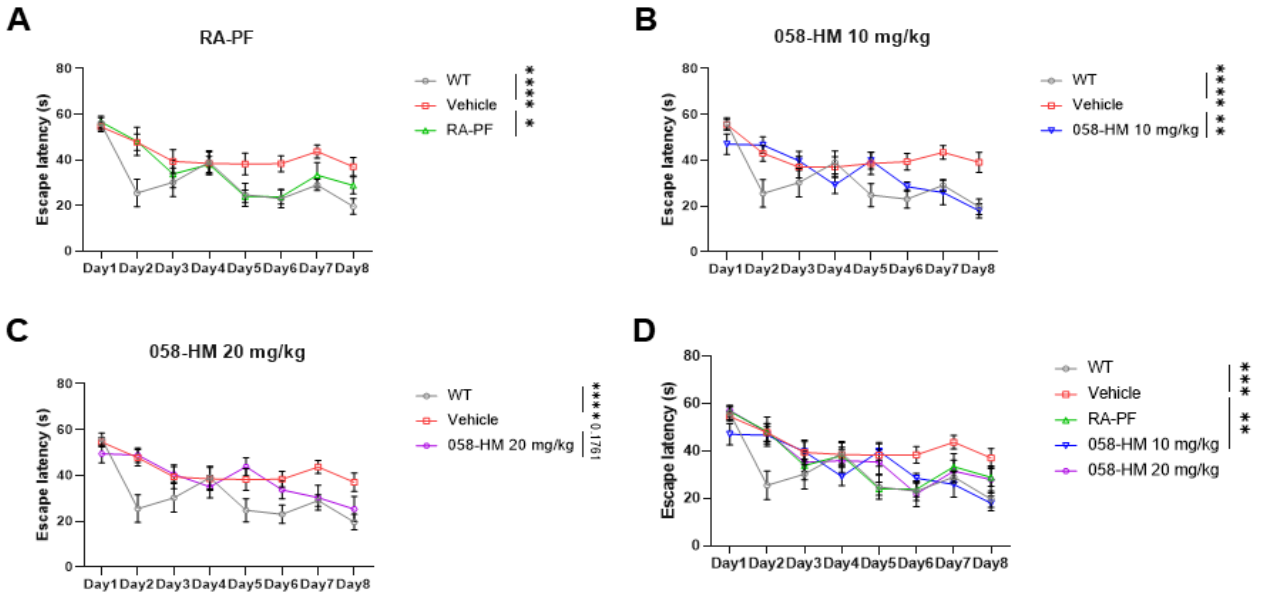
[그림 2-809. RA-PF, RA-058HM 실험 일정]

2) 총 8일간의 training session이 이뤄졌으며, 5xFAD+Vehicle군의 경우, WT+Vehicle군보다 유의하게 escape latency가 높았으며, 이는 학습능력이 유의하게 떨어져 있음을 의미함(그림 2-810)

3) 5xFAD의 학습능력 저하 현상은 RA-PF 투약에 의해 유의하게 개선되었으며, 이는 RA-058HM 10 mg/kg 투약에 의해서도 개선되었음을 확인함 .

4) RA-058HM 20 mg/kg 투약군은 유의하게 학습능력의 개선을 가져오지는 않았으나 시간이 지남에 따라 WT에 가까운 학습능력을 보임

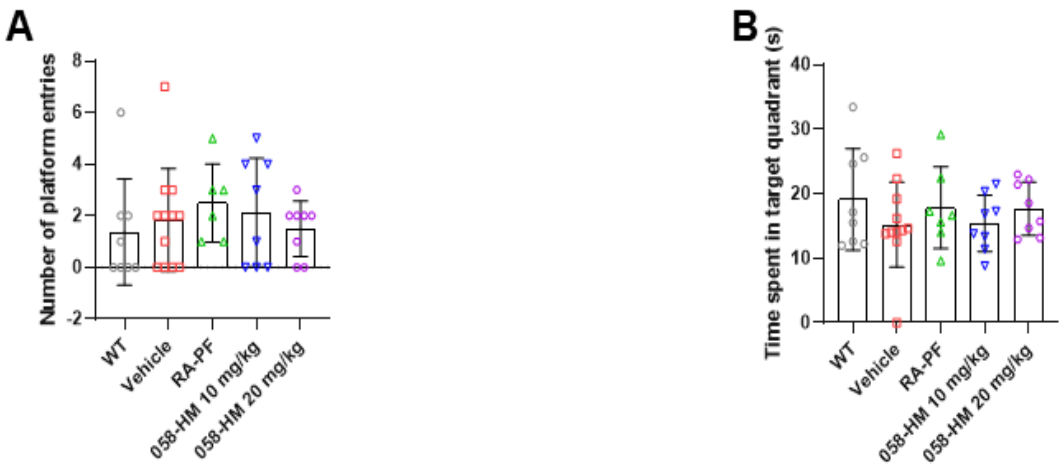
5) 모든 군을 한 번에 비교하면, 5xFAD+Vehicle군이 학습능력이 가장 저하되어 있으며, 이는 RA-PF와 RA-058HM 투약에 의해 개선되는 양상을 볼 수 있음



[그림 2-810. Morris water maze 실험 결과: training session]

6) 8일간의 training session 이후, hidden platform을 제거하고 해당 platform을 기억하는지를 테스트하는 probe day를 진행함(그림 2-811)

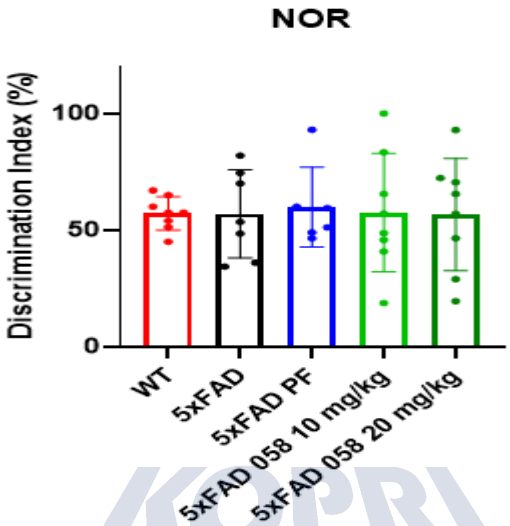
7) 그 결과, 원래 platform이 있던 곳을 통과하는 횟수는 각 군들간 유의한 차이를 보이지 않았으며 , platform이 존재했던 사분면에 머물렀던 시간의 경우 5xFAD+Vehicle군이 WT군에 비해 머물렀던 시간이 적은 경향을 보였으며 이는 RA-PF 투약군과 RA-058HM 20 mg/kg 투약군에서 약간 회복된 것처럼 확인됨



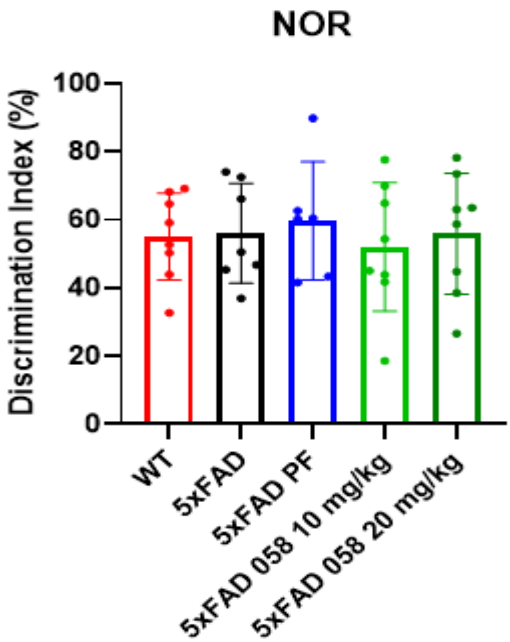
[그림 2-811. Morris water maze 실험 결과: probe day]

8) 마우스들이 새로운 것을 탐구하려는 습성을 이용하여 기억력 테스트를 할 수 있는 novel object recognition test (NOR)을 진행함(그림 2-812, 813)

9) 익숙한 물체와 새로운 물체를 탐험한 시간의 합이 각각 20초와 10분인 경우로 나눠 분석함. 그 결과, 두 경우 모두 군간 유의한 차이가 없었음



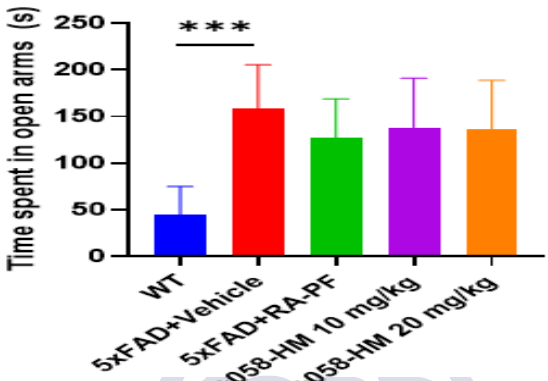
[그림 2-812. NOR 실험 결과 1: 합계 20초]



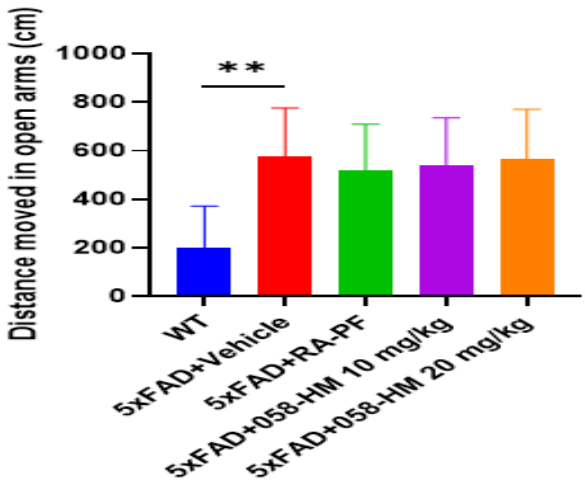
[그림 2-813. NOR 실험 결과 2: 합계 10분]

10) 마우스들의 불안감 정도를 평가할 수 있는 elevated plus maze (EPM) 실험을 진행함(그림 2-814, 815)

11) 분석 결과, 5xFAD+Vehicle이 WT 대비 열린 구역에서 머문 시간과 이동 거리가 유의하게 증가해있는데, 이는 5xFAD+Vehicle군이 WT군 대비 위험 회피 능력이 저하되어 있다고 해석될 수 있음. 이러한 현상은 RA-PF 투약에 의해 소폭 개선되는 경향을 보이나 유의하지는 않음



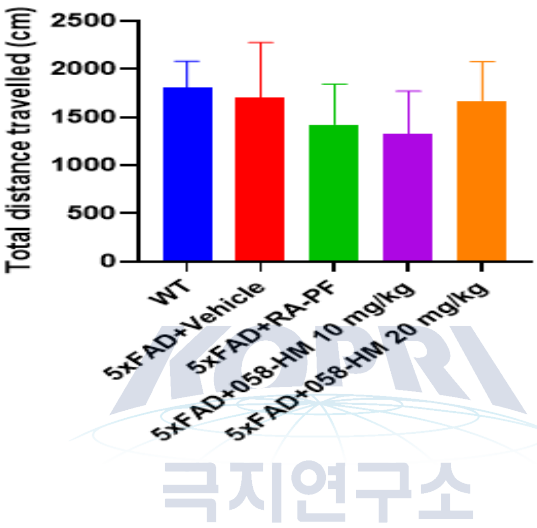
[그림 2-814. EPM 실험 결과 1: 열린 구역에서 머문 시간]



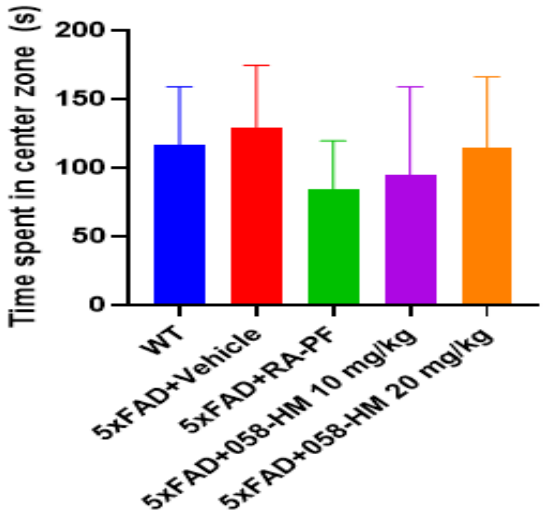
[그림 2-815. EPM 실험 결과 2: 열린 구역에서의 이동 거리]

12) 다음으로 open field test (OFT)를 진행함(그림 2-816, 817). 총이동 거리의 경우 5xFAD+RA-PF군과 5xFAD+RA-058HM 10 mg/kg군에서 다른 군에 비해 감소되어있음(그림 2-816)

13) Open field의 가운데 지역에 머문 시간을 비교했을 때, RA-PF군과 RA-058HM 10 mg/kg군이 5xFAD+Vehicle군에 비해 감소하여있는 것을 확인함. 이는 불안감이 증가했다고 해석할 수는 있으나 총이동 거리 자체가 적은 편이어서 영향을 받은 결과일 수 있음(그림 2-817)

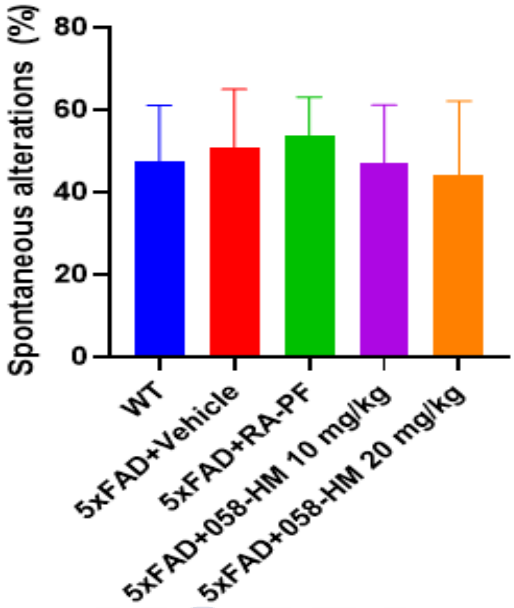


[그림 2-816. OFT 실험 결과 1: 총이동 거리]



[그림 2-817. OFT 실험 결과 2: 가운데 구역에서 머문 시간]

14) 마우스들의 단기 기억력을 평가할 수 있는 Y-maze 실험을 진행함(그림 2-818). 분석 결과, 각 군간 유의한 차이가 없었음



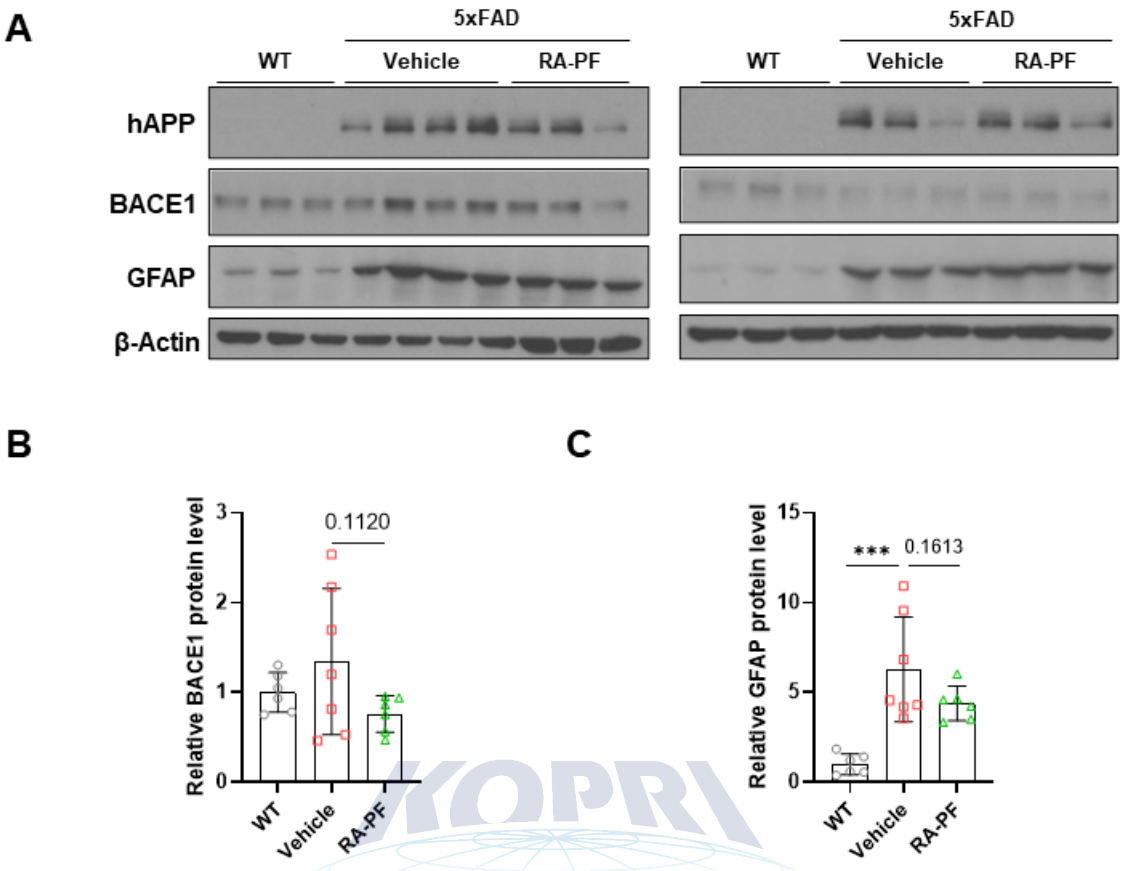
[그림 2-818. Y-maze 실험 결과]

15) MWM 실험이 끝난 후, 마우스를 sacrifice하여 뇌조직 샘플링을 진행함. Cortex 샘플을 homogenize하여 단백질을 추출한 뒤 western blot을 통해 BACE1과 GFAP의 발현량을 확인함(그림 2-819, 820)

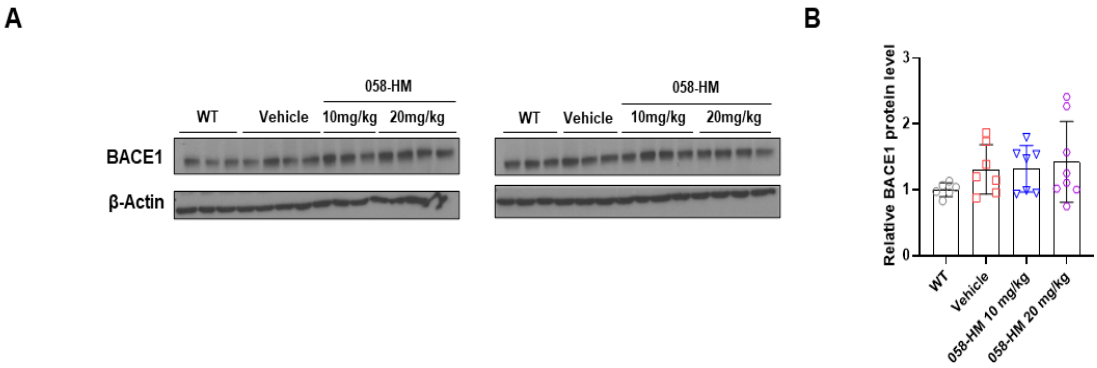
16) 그 결과, 5xFAD+Vehicle군에서 WT군 대비 BACE1의 발현량이 약간 증가해있으며, RA-PF군에서 5xFAD+Vehicle군 대비 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았음

17) Astroglisosi의 마커 중 하나인 GFAP 단백질의 발현량을 비교했을 때, 5xFAD+Vehicle군에서 WT군 대비 5배 이상 유의하게 증가해있었으며, RA-PF군에서 5xFAD+Vehicle군 대비 감소하는 경향을 보임

18) RA-058HM 투약군에서의 BACE1 단백질 발현량은 5xFAD+Vehicle군과 큰 차이가 없었음



[그림 2-819. Cortex 샘플 생화학적 분석 결과: RA-PF]



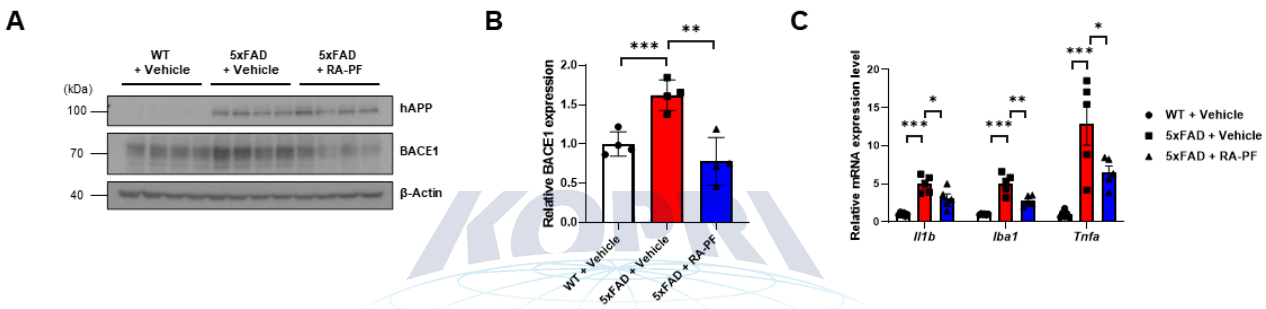
[그림 2-820. Cortex 샘플 생화학적 분석 결과: RA-058HM]

19) Hippocampus 조직을 homogenize하여 단백질 샘플과 mRNA 샘플을 얻은 뒤 생화학 분석을 진행함(그림 2-821, 822)

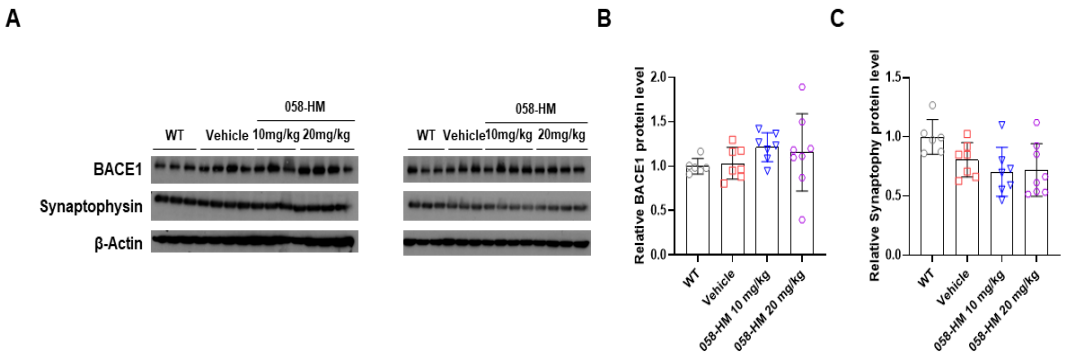
20) Western blot을 통해 BACE1 단백질 발현량 분석결과, 5xFAD+Vehicle군에서 WT+Vehicle 군 대비 유의하게 BACE1 단백질 발현량이 증가해있으며, 이는 RA-PF에 의해 유의하게 감소한 것을 확인함

21) RT-qPCR을 통해 염증인자들의 mRNA 발현량을 분석함. 그 결과, *Il1b*, *Iba1*, *Tnfa* mRNA 발현량이 5xFAD+Vehicle군에서 WT+Vehicle군 대비 유의하게 증가해있으며, 이는 RA-PF에 의해 유의하게 감소한 것을 확인함

22) 다음으로 RA-058HM 투약군과의 비교를 진행함. BACE1 단백질 발현량과 presynapse 마커인 synaptophysin 단백질 발현량을 분석한 결과, RA-058HM 투약에 의한 유의한 변화를 관측할 수 없었음



[그림 2-821. Hippocampus 샘플 생화학적 분석 결과: RA-PF]

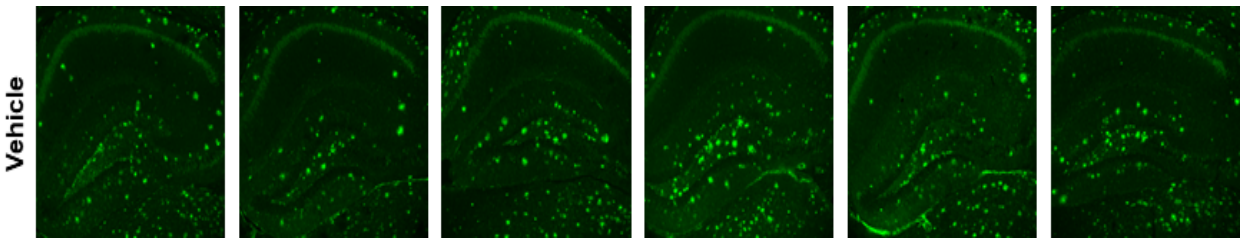


[그림 2-822. Hippocampus 샘플 생화학적 분석 결과: RA-058HM]

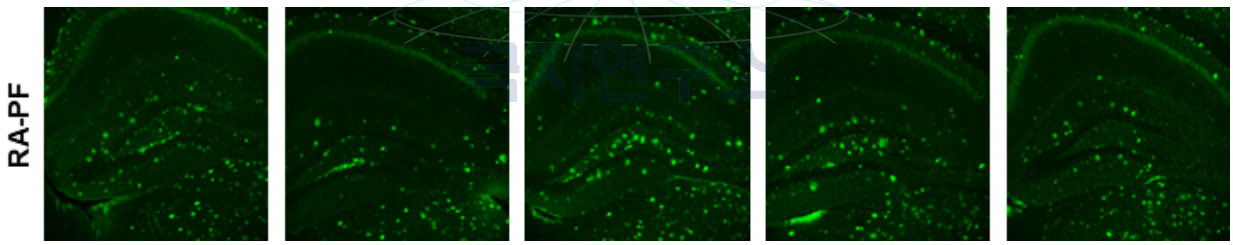
23) 다음으로 6E10 항체를 이용하여 아밀로이드 베타 플라그의 분포 정도를 비교·분석함(그림 2-823~826)

24) Hippocampus 지역에서 분석한 결과, vehicle군 대비 RA-PF 투약군에서 6E10 % Area가 감소하는 경향을 보임

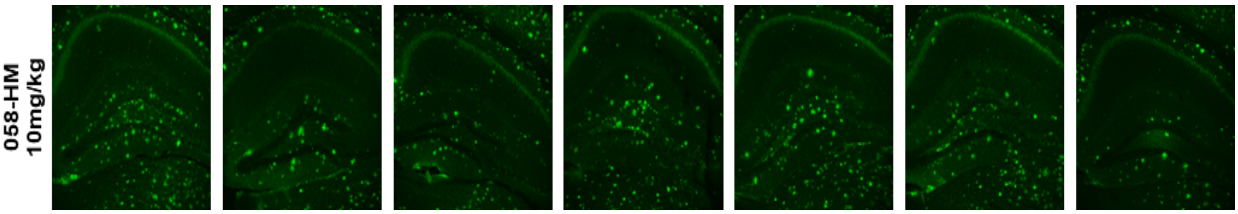
25) RA-058HM 투약군과 vehicle군을 비교시, vehicle군 대비 RA-058HM 10 mg/kg 투여군에서 6E10 % Area가 감소하는 경향을 보였으며, RA-058HM 20 mg/kg 투여군은 거의 변화가 없었음



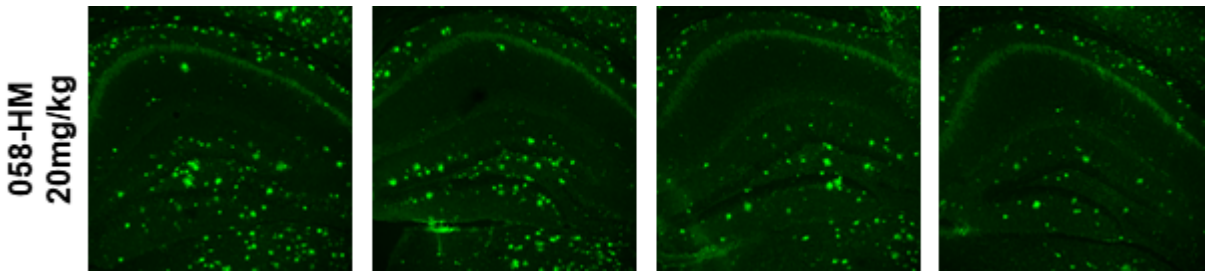
[그림 2-823. 6E10 항체를 이용한 아밀로이드 베타 플라그 평가: Vehicle]



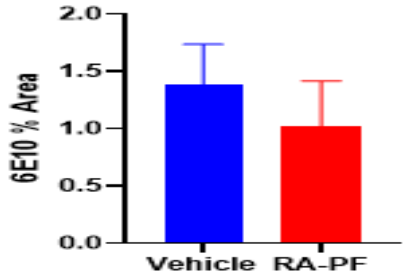
[그림 2-824. 6E10 항체를 이용한 아밀로이드 베타 플라그 평가: RA-PF]



[그림 2-825. 6E10 항체를 이용한 아밀로이드 베타 플라그 평가: RA-058HM 10 mg/kg]

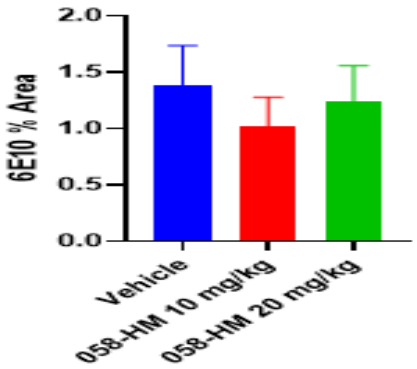


[그림 2-826. 6E10 항체를 이용한 아밀로이드 베타 플라그 평가: RA-058HM 20 mg/kg]



[그림 2-827. 6E10 정량 분석: RA-PF]

KOPRI
극지연구소

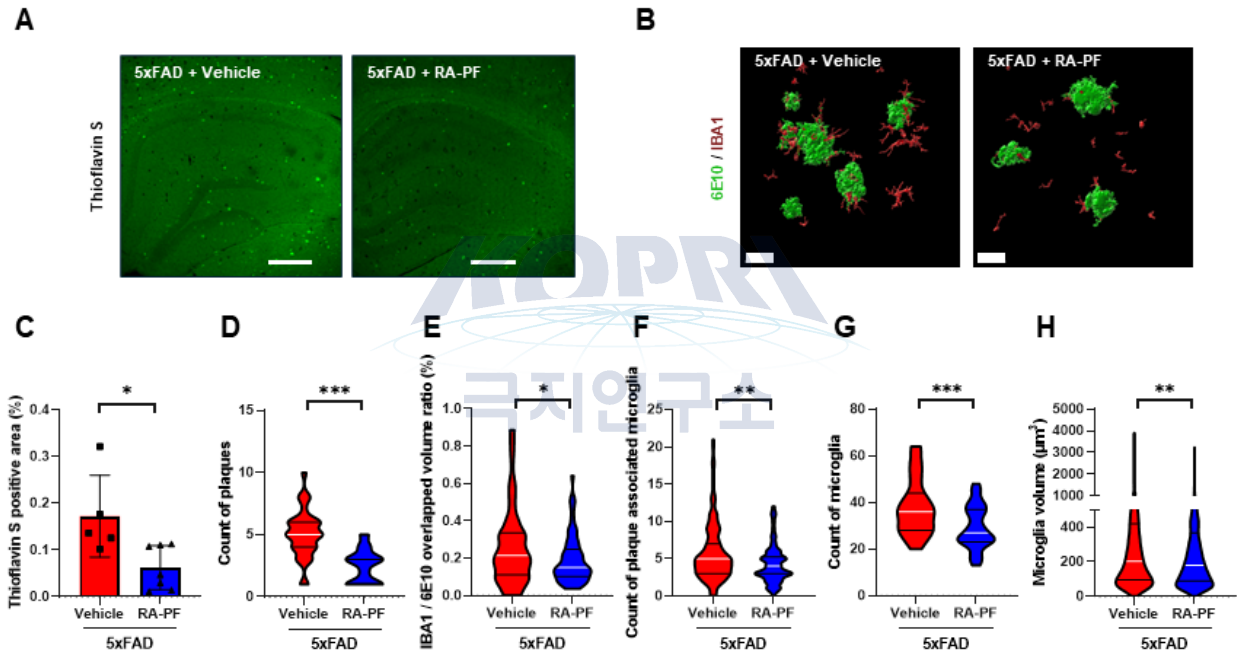


[그림 2-828. 6E10 정량 분석:
RA-058HM 10 mg/kg, 20 mg/kg]

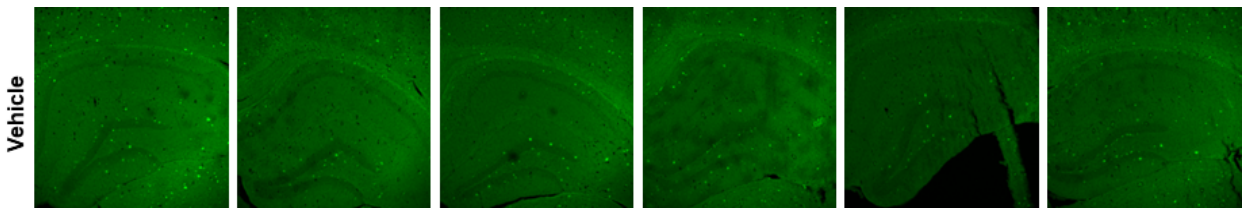
26) Thioflavin S 염색을 통해 응집된 아밀로이드 베타 플라그의 양을 분석함(그림 2-1559). 그 결과, thioflavin S positive area (%)가 vehicle군 대비 RA-PF 투약군에서 유의하게 감소해있음을 확인함

27) 또한, 6E10 항체와 IBA1 항체를 이용해 co-staining을 진행하여 IMARIS 소프트웨어를 이용하여 분석을 진행함. 그 결과, RA-PF 투약군에서 vehicle군 대비 유의하게 플라그의 수가 줄어들어 있으며, microglia의 수와 volume이 줄어든 것을 확인함. 또한, 6E10과 IBA1이 겹친 비율과 plaque-associated microglia의 수가 vehicle군 대비 RA-PF 투약군에서 유의하게 감소해있음을 확인함

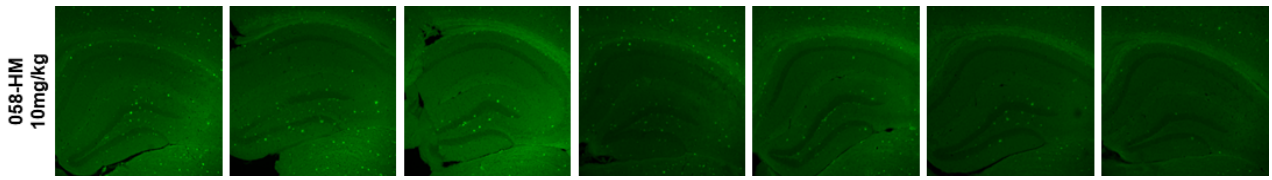
28) 다음으로 RA-058HM 투약에 의한 효과를 확인함 . 5xFAD+Vehicle군과 비교했을 때, RA-058HM 투약에 의해 thioflavin S positive area (%)가 절반 아래로 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았음



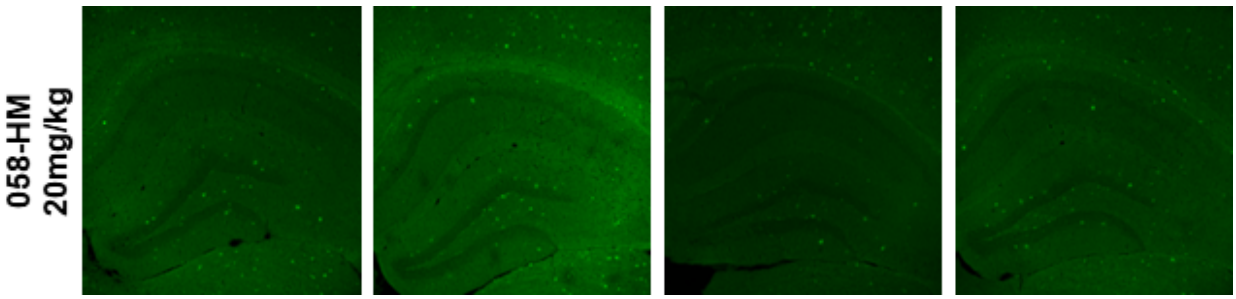
[그림 2-829. Thioflavin S staining을 통한 RA-PF 효능 확인]



[그림 2-830. Thioflavin S staining을 통한 아밀로이드 베타 플라그 평가: Vehicle]

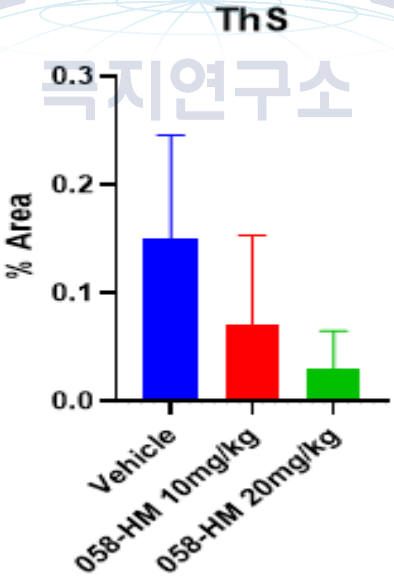


[그림 2-831. Thioflavin S staining을 통한 아밀로이드 베타 플라그 평가: RA-058HM 10 mg/kg]



[그림 2-832. Thioflavin S staining을 통한 아밀로이드 베타 플라그 평가: RA-058HM 20 mg/kg]

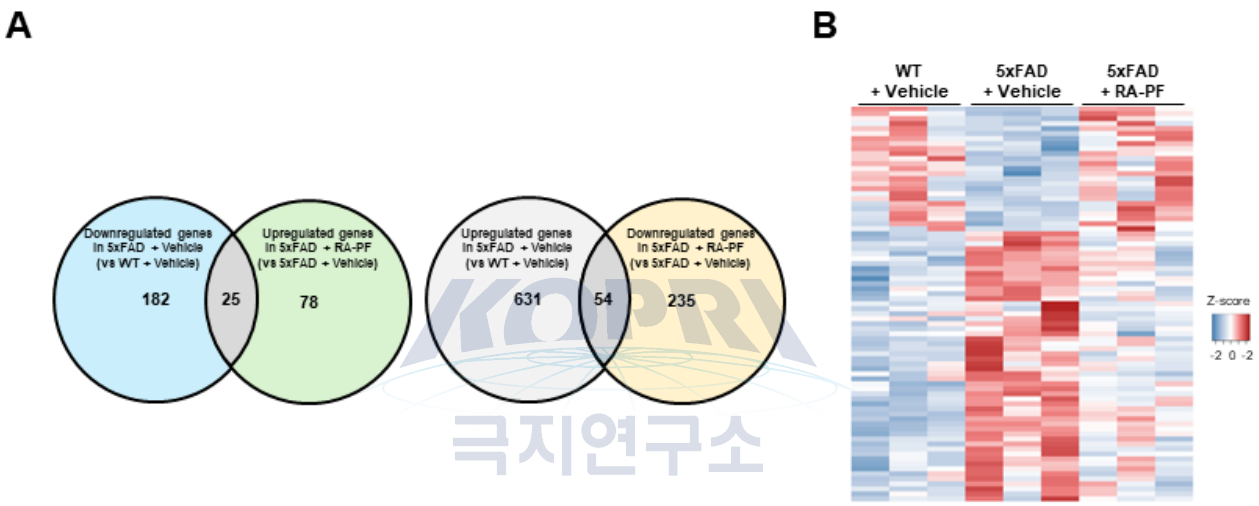
KOPRI
극지연구소



[그림 2-833. Thioflavin S 정량 분석:
RA-058HM 10 mg/kg, 20 mg/kg]

29) Cortex 조직에서 얻은 RNA로 mRNA-sequencing을 진행함. Fold change] 1.3 & *p*-value [0.05인 경우, 유의하게 변화했다 (differentially expressed)라고 판단했으며 WT+Vehicle 군 대비 5xFAD+Vehicle군에서 유의하게 감소해있는 유전자는 207개, 5xFAD+Vehicle군 대비 5xFAD+RA-PF군에서 유의하게 증가해있는 유전자는 103개이며 교집합에 포함된 유전자는 25개임(그림 2-834)

30) 반대로 WT+Vehicle군 대비 5xFAD+Vehicle군에서 유의하게 증가해있는 유전자는 685개, 5xFAD+Vehicle군 대비 5xFAD+RA-PF군에서 유의하게 감소해있는 유전자는 28개이며 교집합에 포함된 유전자는 54개임(그림 2-834A). ②, ③에서 교집합에 있는 유전자 총 79개를 이용하여 heatmap 분석을 진행함(그림 2-834B)



[그림 2-834. Cortex 샘플을 이용한 RNA-sequencing 결과]

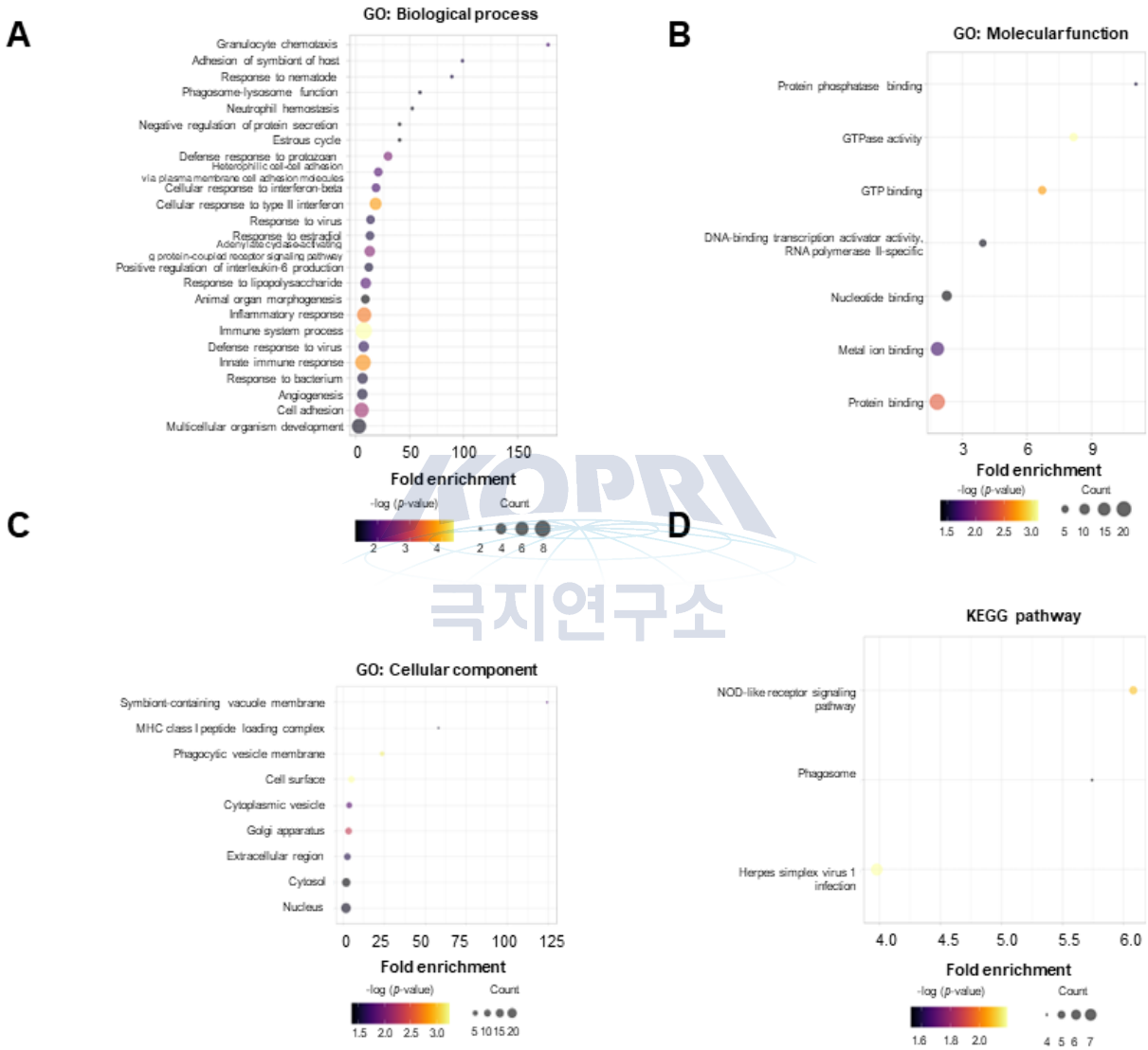
31) 그림 220에서 얻어진 교집합 79개의 유전자를 이용하여 gene ontology, KEGG pathway 분석을 진행함(그림 2-835)

32) *p*-value [0.05인 terminology에 대해서만 분석을 진행했으며, biological process에선 'Phagosome-lysosome function', 'Response to lipopolysaccharide', 'Inflammatory response', 'Immune system process' 등과 같은 term에 enrich 되어있는 유전자들이 많은 것으로 나타남(그림 2-835A)

33) Molecular function에서는 'Protein phosphatase binding', 'GTPase activity', 'DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific' 등에 관련 있는 유전자들이 많은 것으로 나타남(그림 2-835B)

34) Cellular component에서는 'Phagocytic vesicle membrane', 'Cytoplasmic vesicle', 'Cell surface' 등에 관련 있는 유전자들이 많은 것으로 나타남(그림 2-835C)

35) KEGG pathway 분석에서는 'NOD-like receptor signaling pathway', 'Phagosome', 'Herpes simplex virus 1 infection'과 관련 있는 유전자들이 enrich 되어있는 것으로 나타남(그림 2-835D)

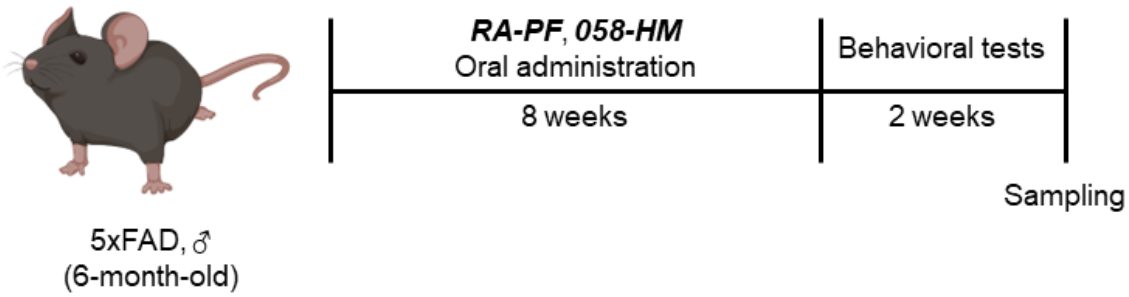


KOPRI 극지연구소

[그림 2-835. Gene ontology, KEGG pathway 분석 결과]

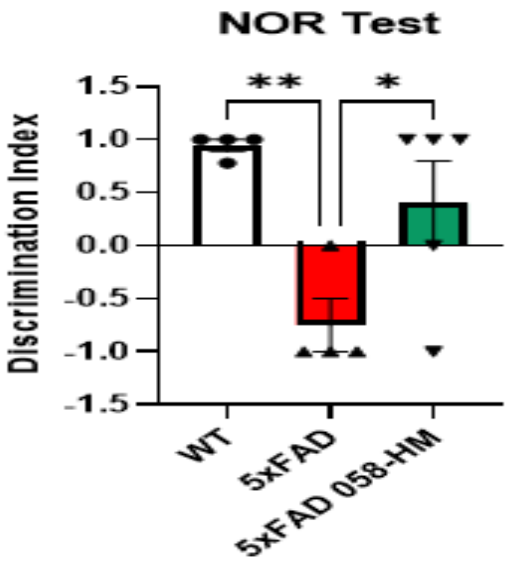
○ 5xFAD 동물모델에서 RA-PF, RA-058HM 유효성 평가 2

1) 후보물질로 선정된 RA-PF, RA-058HM을 6개월령 5xFAD에서 약효 평가를 진행함. RA-PF 20 mg/kg, RA-058HM 10 mg/kg, 20 mg/kg를 매일 한 번 8주간 경구투여를 진행함(그림 2-836). 약물 투여 6주 후부터 novel object recognition (NOR)과 MWM을 진행하고 8주 후 sampling을 진행함



[그림 2-836. RA-PF, RA-058HM 실험 일정]

2) 약물 투여 6주 후, 인지기능을 평가하는 실험인 NOR을 진행함. 새로운 물체 (novel object)를 구별하는 지표인 discrimination index가 WT군 대비 5xFAD vehicle군에서 유의하게 감소해있으며, 이는 RA-058HM 투약에 의해 유의하게 회복된 것을 확인함(그림 2-837)

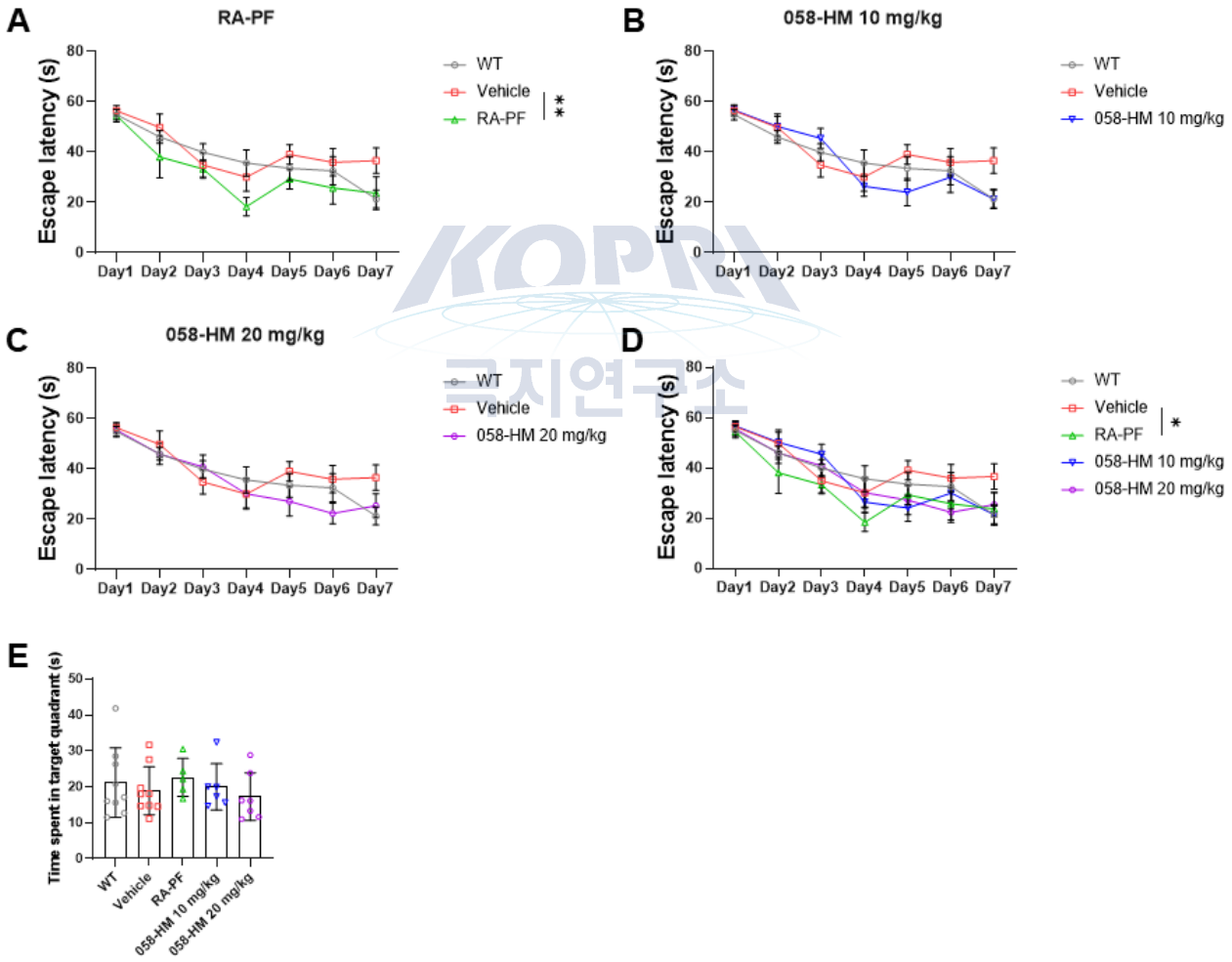


[그림 2-837. NOR 실험 결과]

3) 7일간 training을 진행한 결과, 5xFAD vehicle군의 escape latency가 WT군의 escape latency보다 유의하게 높았으며, 이는 RA-PF 투약에 의해 유의하게 개선된 것을 확인함(그림 2-838A)

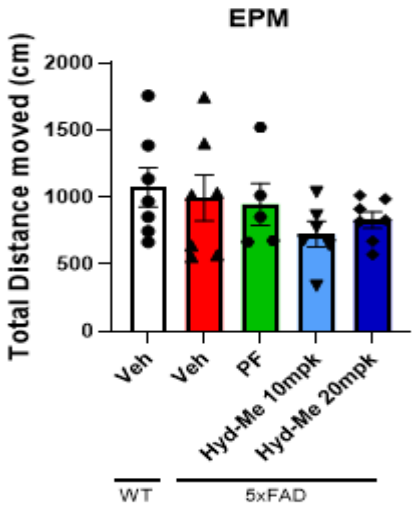
4) RA-058HM의 경우, 저농도 (10 mg/kg) 및 고농도 (20 mg/kg) 모두 5xFAD vehicle군보다 학습능력의 개선효과를 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았음(그림 2-838B, C)

5) Training session 다음 날, hidden platform을 제거하고 기억력을 테스트할 수 있는 probe day를 진행함. Hidden platform이 위치했던 사분면에 머문 시간을 비교했을 때, 각 군들간 유의한 차이를 보이지는 않았음(그림 2-838E)



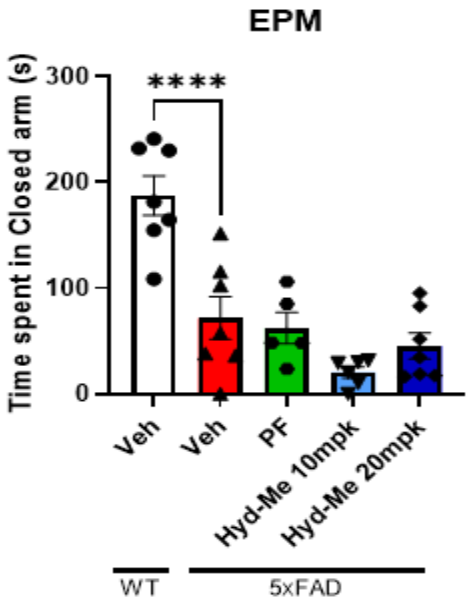
[그림 2-838. Morris water maze 실험 결과]

6) 다음으로 불안감을 테스트할 수 있는 elevated plus maze (EPM) 실험을 진행함. 총 이동한 거리를 분석한 결과, 각 군간 유의한 차이가 없었음(그림 2-839)



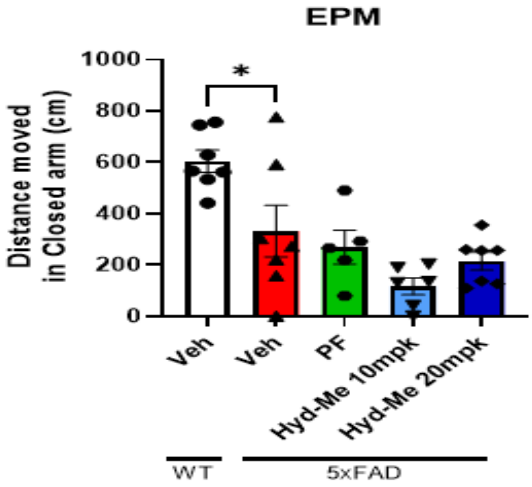
[그림 2-839. EPM 실험 결과 1: 총 이동한 거리]

7) 닫힌 구역에서 머문 시간의 경우, 5xFAD+Vehicle군이 WT+Vehicle군 대비 유의하게 감소해있었으며 후보 약물에 의한 개선 효과는 없었음(그림 2-840)



[그림 2-840. EPM 실험 결과 2: 닫힌 구역에서 머문 시간]

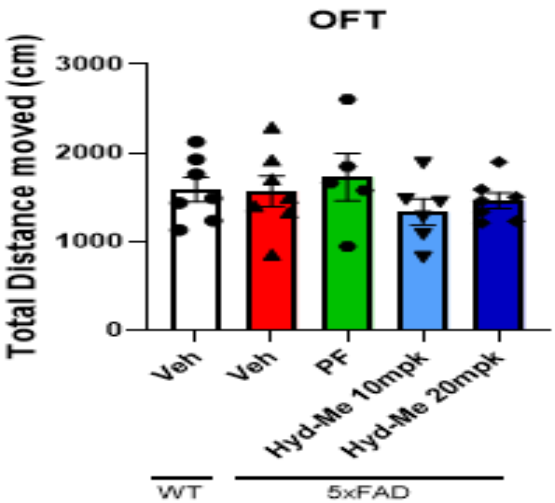
8) 또한, 닫힌 구역에서 이동한 거리를 분석했을 때, 5xFAD+Vehicle군이 WT+Vehicle군 대비 유의하게 감소해있었으며, 후보 약물에 의한 차이는 없었음(그림 2-841)



[그림 2-841. EPM 실험 결과 3: 닫힌 구역에서 이동한 거리]

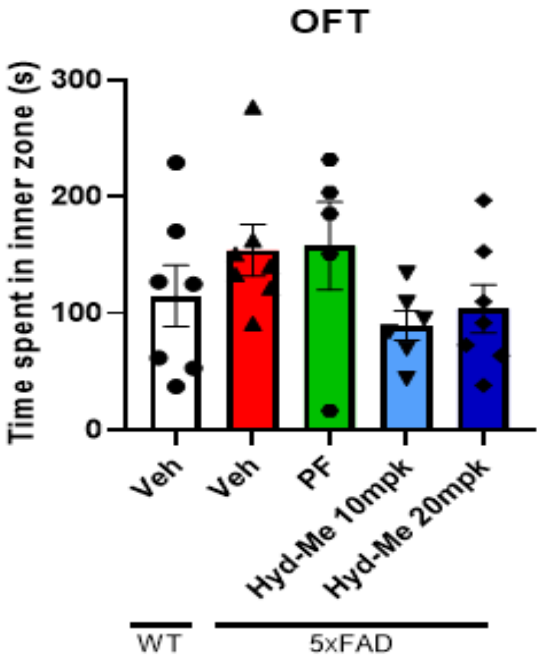
9) 다음으로 open field test (OFT)를 진행함. 총 이동한 거리의 경우, 각 군간 유의한 차이가 없었음(그림 2-842)

10) 안쪽 구역에서 머문 시간과 이동한 거리의 경우, 5xFAD+Vehicle군과 5xFAD+PF군이 다른 군에 비해 증가해있었으나 유의하지는 않았음(그림 2-842, 843)



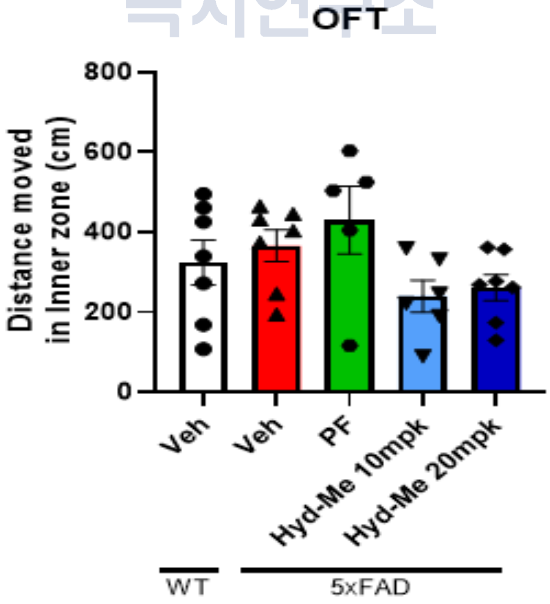
[그림 2-842. OFT 실험 결과 1: 총 이동한 거리]

KORRI 극지연구소



[그림 2-843. OFT 실험 결과 2: 안쪽 구역에서 머문 시간]

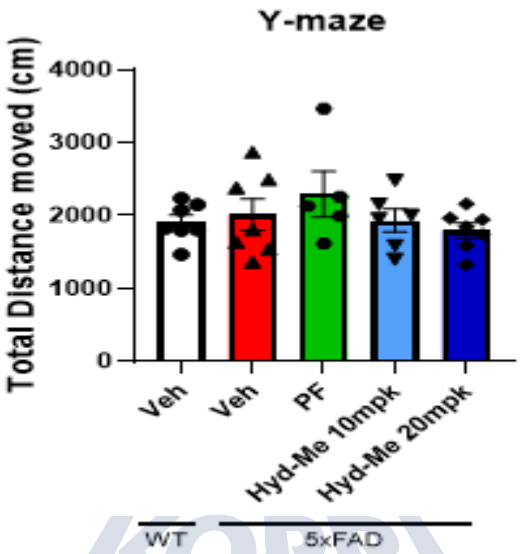
KOPRI 극지연구소



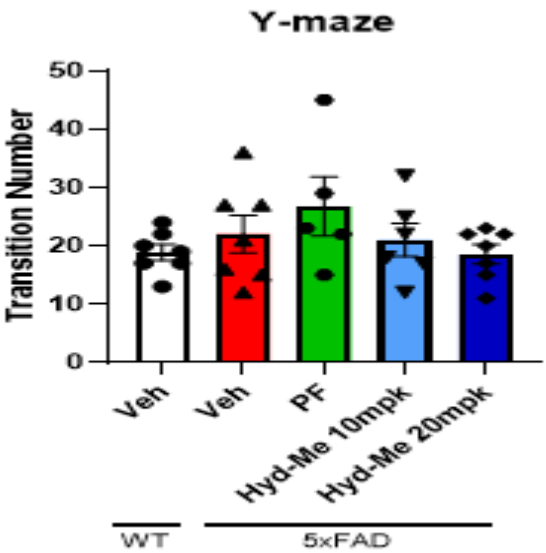
[그림 2-844. OFT 실험 결과 3: 안쪽 구역에서 이동한 거리]

11) 단기 기억력을 평가하는 Y-maze 실험을 진행함 . 총 이동한 거리와 각 구역에 들어간 횟수의 경우, 군간 유의한 차이는 없었음(그림 2-845, 846)

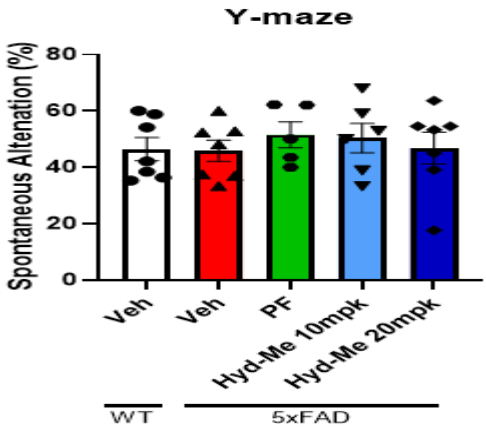
12) 단기 기억력을 평가할 수 있는 지표인 spontaneous alternation (%)은 각 군 사이에 유의한 차이가 없었음



[그림 2-845. Y-maze 실험 결과 1: 총 이동한 거리]



[그림 2-846. Y-maze 실험 결과 2: 각 구역에 들어간 횟수]

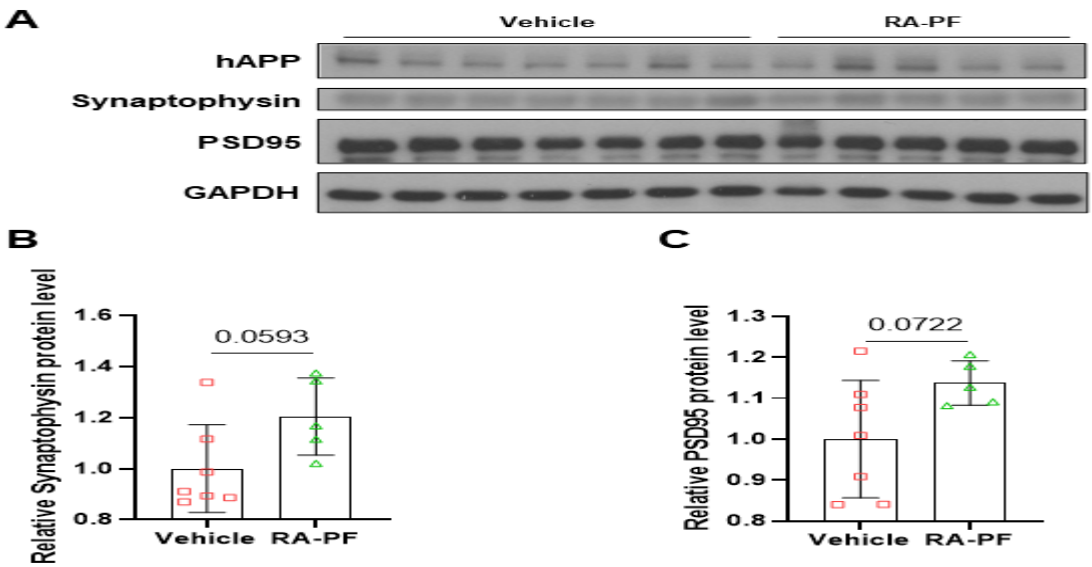


[그림 2-847. Y-maze 실험 결과 3:
spontaneous alternation]

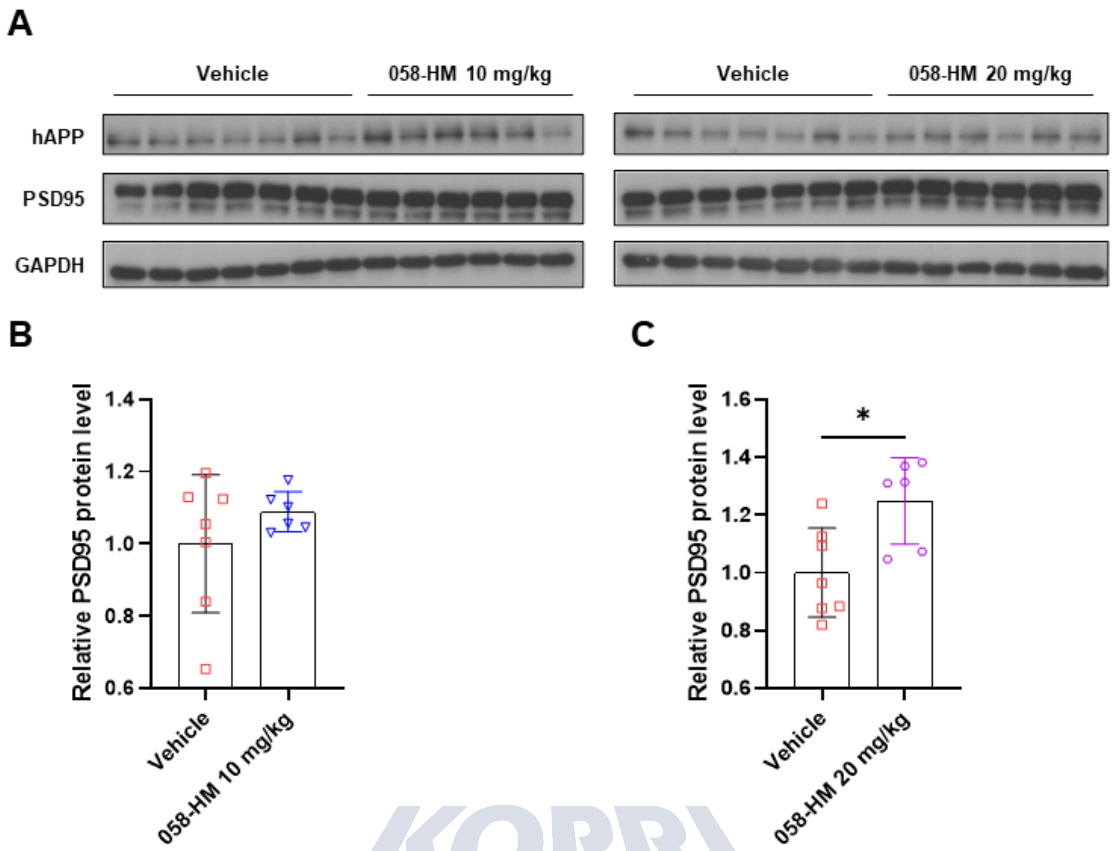
12) 행동실험이 완료된 후, 마우스들을 sacrifice하여 뇌조직 sampling을 진행함(그림 2-848, 849)

13) Cortex를 homogenize하여 단백질 샘플을 추출한 후, western blot을 통해 시냅스 마커들의 단백질 발현량을 비교함. 그 결과, RA-PF 투약에 의해 vehicle군 대비 synaptophysin과 PSD95 단백질 발현량이 증가하는 경향을 보임

14) RA-058HM의 경우, 저농도 (10 mg/kg) 투여군에서 PSD95의 발현량이 vehicle군 대비 증가하는 경향은 보였으나 유의하지는 않았음. 하지만 고농도 (20 mg/kg) 투여군에서 vehicle군 대비 유의하게 증가한 것을 확인함



[그림 2-848. Cortex 샘플 생화학적 분석: RA-PF]

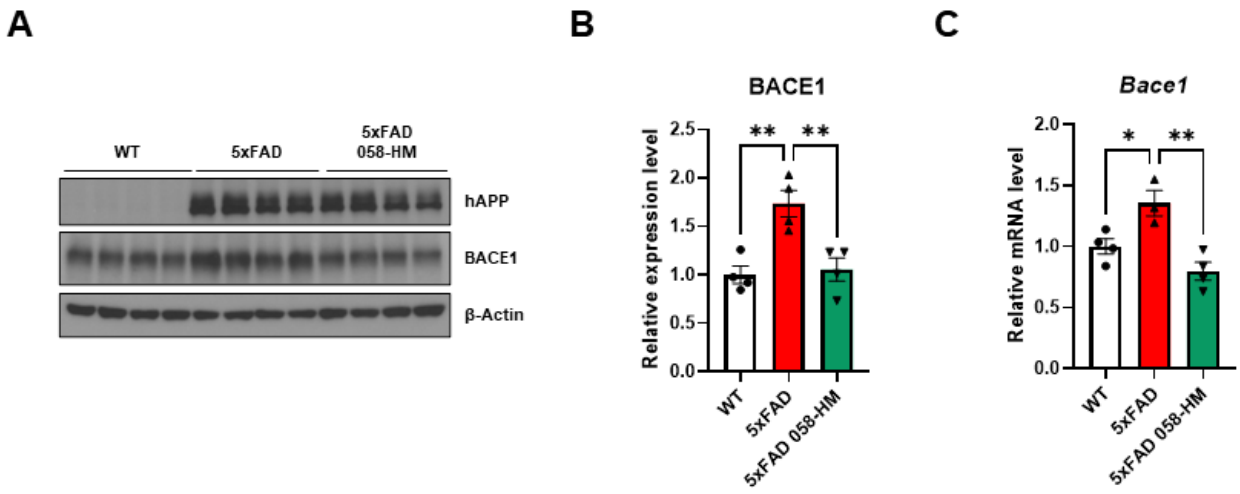


[그림 2-849. Cortex 샘플 생화학적 분석: RA-058HM]

15) Hippocampus 조직을 homogenize하여 단백질 샘플과 mRNA 샘플을 얻은 후 western blot과 RT-qPCR을 진행함(그림 2-850)

16) Western blot 결과, 5xFAD vehicle군에서 WT군 대비 유의하게 BACE1 단백질의 발현량이 증가해있으며, 이는 RA-058HM 투약에 의해 5xFAD vehicle군 대비 유의하게 감소함

17) RT-qPCR을 통해 *Bace1* mRNA 발현량을 비교했을 때도 마찬가지로 5xFAD vehicle군에서 WT군 대비 유의하게 *Bace1* mRNA 발현량이 증가해있으며, RA-058HM에 의해 유의하게 감소한 것을 확인함

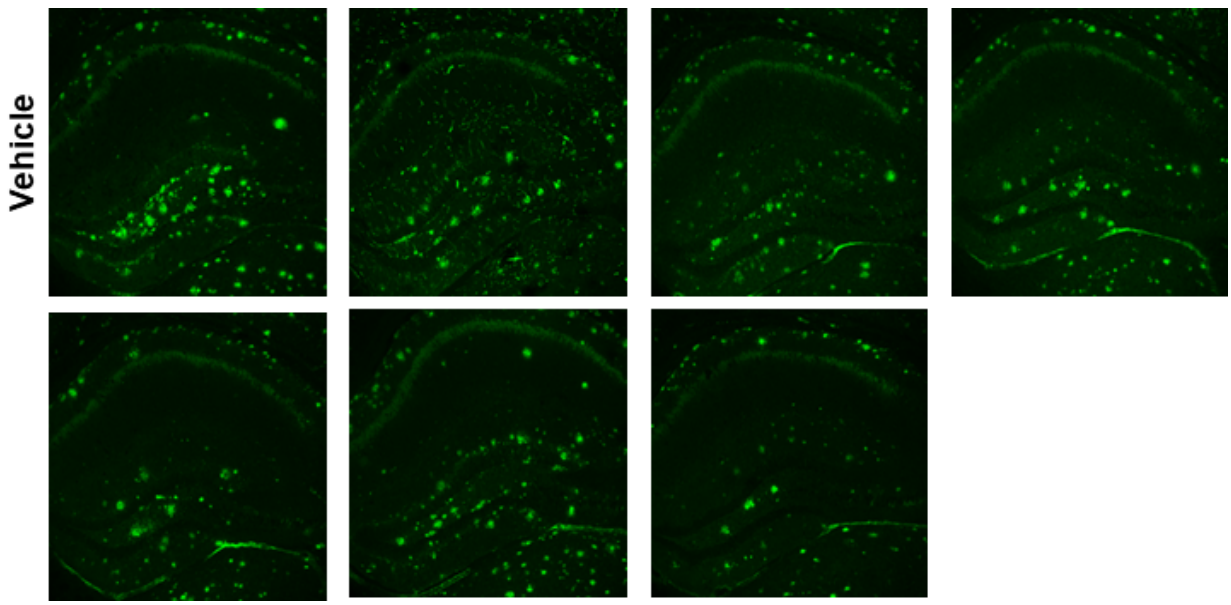


[그림 2-850. HIppocampus 샘플 생화학적 분석 결과]

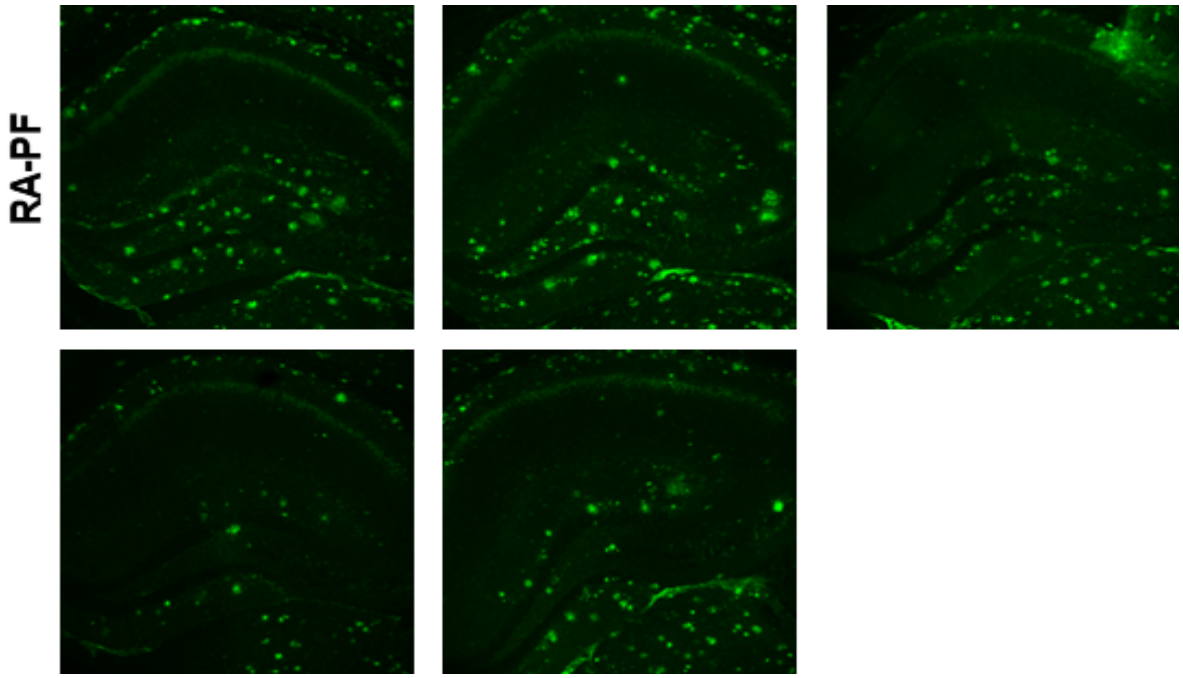
18) 6E10 항체를 이용하여 아밀로이드 베타 플라그 분포 정도를 비교 분석함

19) Hippocampus 지역에 대해 분석한 결과, RA-PF군에서의 6E10 % Area가 Vehicle군 대비 30% 정도 감소했음을 확인함(그림 2-851~854)

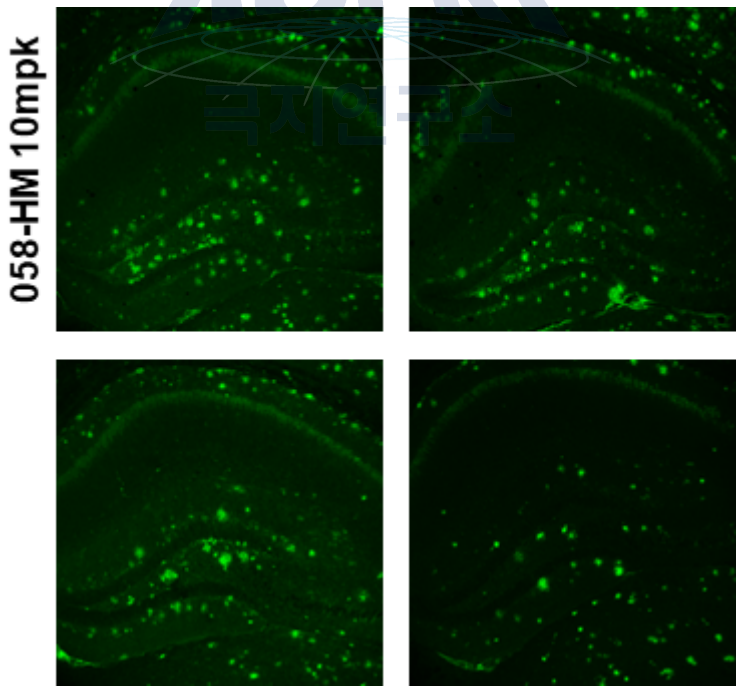
20) RA-058HM 투여군의 경우, 투여 용량이 높아질수록 6E10 % Area가 감소하는 것을 확인할 수 있음 (2-855, 856)



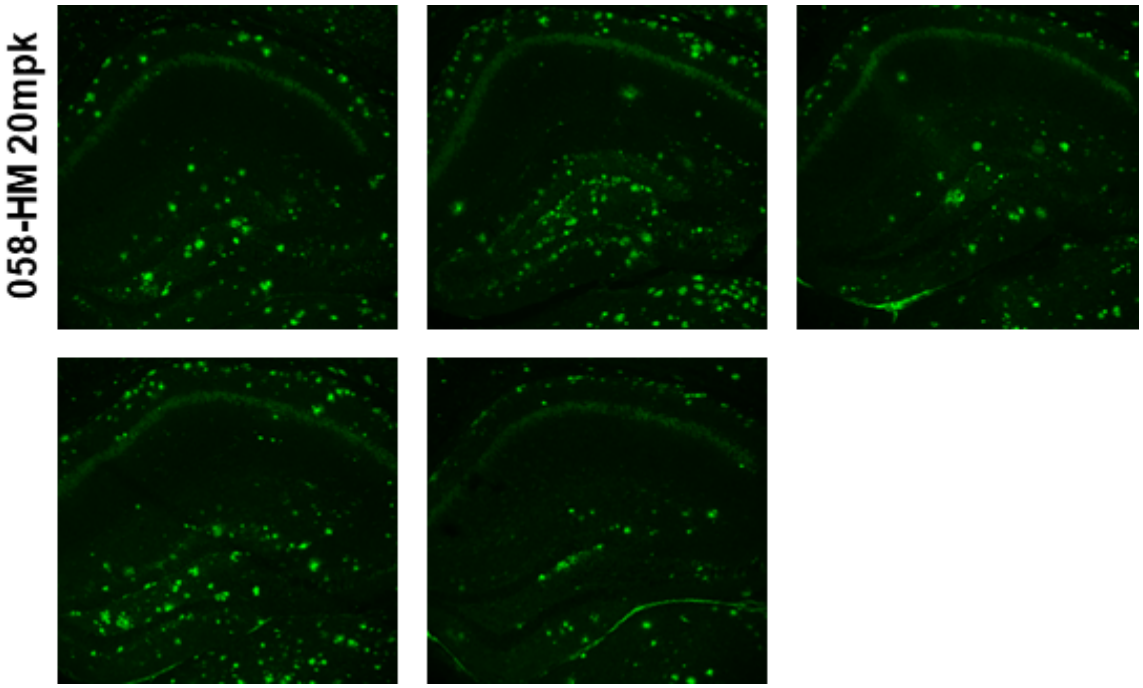
[그림 2-851. 6E10 항체를 이용한 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석: Hippocampus, vehicle]



[그림 2-852. 6E10 항체를 이용한 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석: Hippocampus, RA-PF]

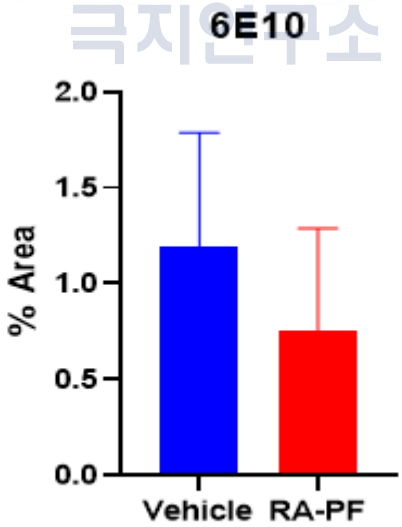


[그림 2-853. 6E10 항체를 이용한 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석: Hippocampus, RA-058HM 10 mg/kg]

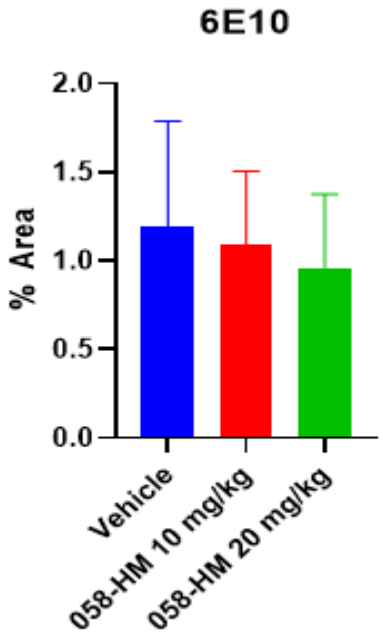


[그림 2-854. 6E10 항체를 이용한 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석: Hippocampus, RA-058HM 20 mg/kg]

KOPRI 극지연구소



[그림 2-855. 6E10 정량 분석: Hippocampus, RA-PF]

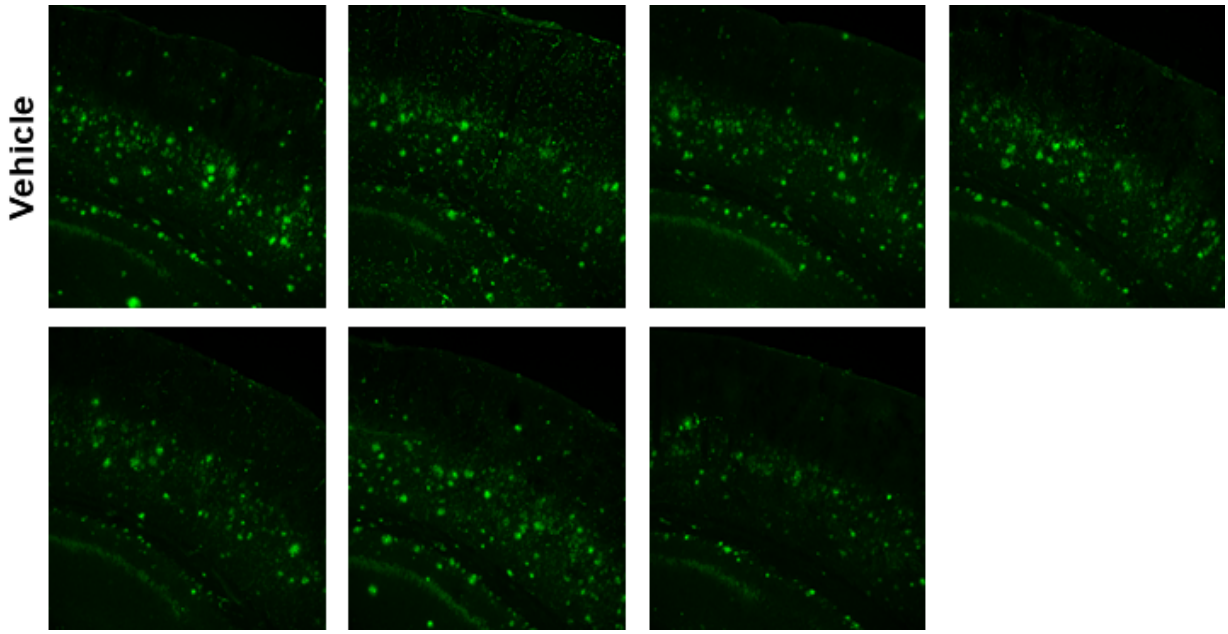


[그림 2-856. 6E10 정량 분석:
Hippocampus, RA-058HM 10 mg/kg,
20 mg/kg]

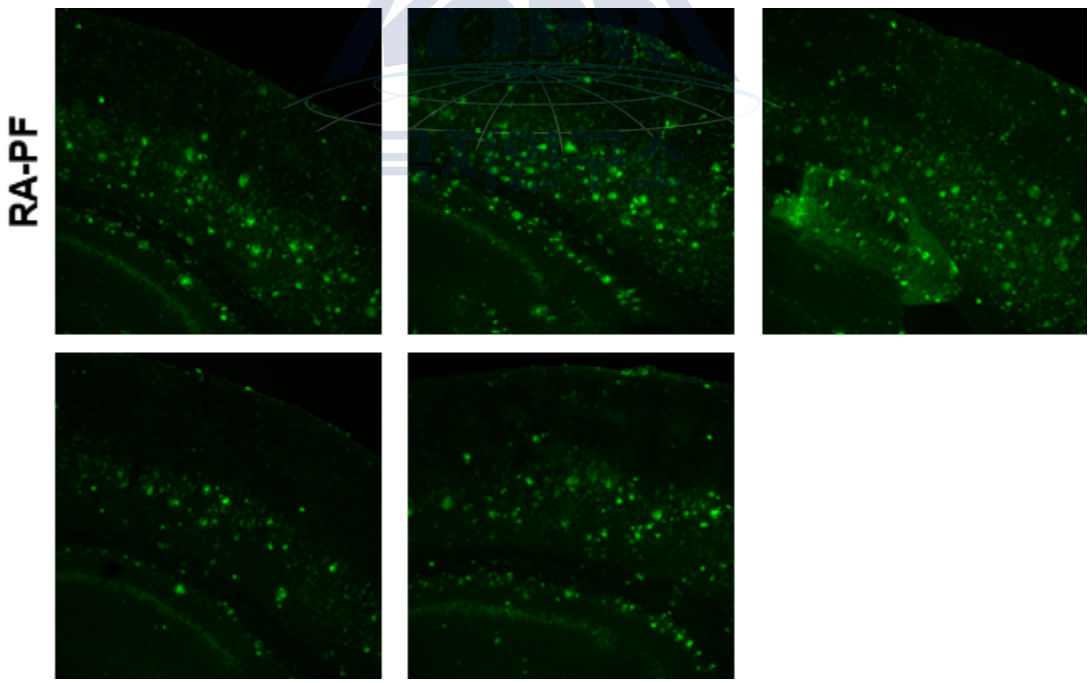
KBRI
극지연구소

21) Cortex 지역에 대해서 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석을 진행함

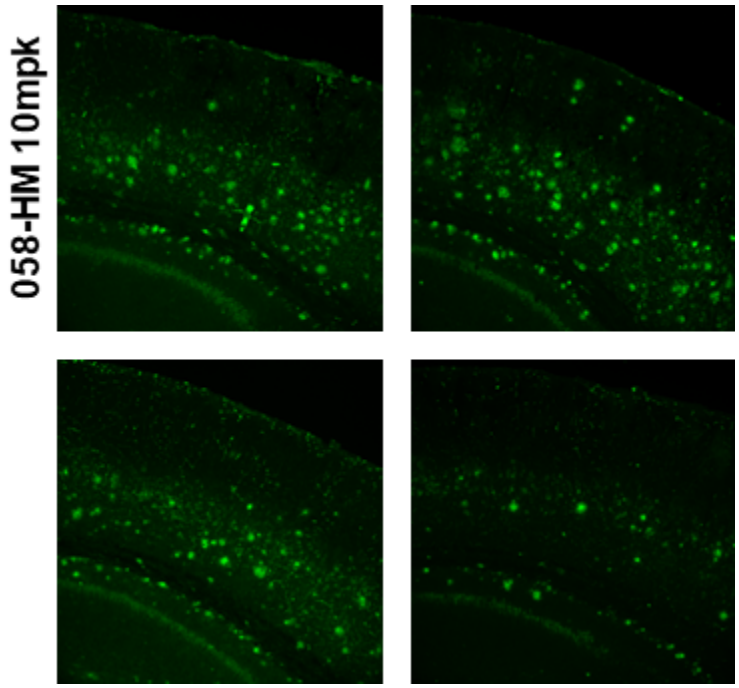
22) RA-PF 투여군의 경우, vehicle군과 비교했을 때 큰 차이가 없었음. RA-058HM 투여군의 경우, 6E10 % Area값이 20 mg/kg 투여군에서 vehicle군 대비 30% 정도 감소하는 것을 확인함(그림 2-861, 862)



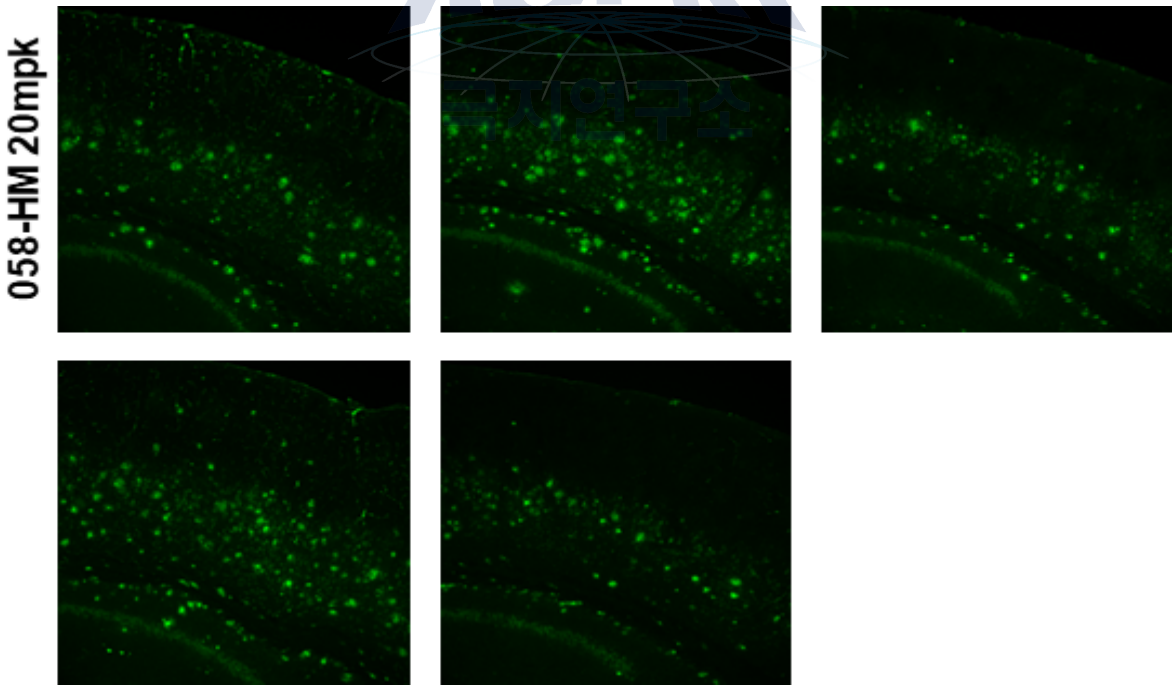
[그림 2-857. 6E10을 이용한 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석: CTX, Vehicle]



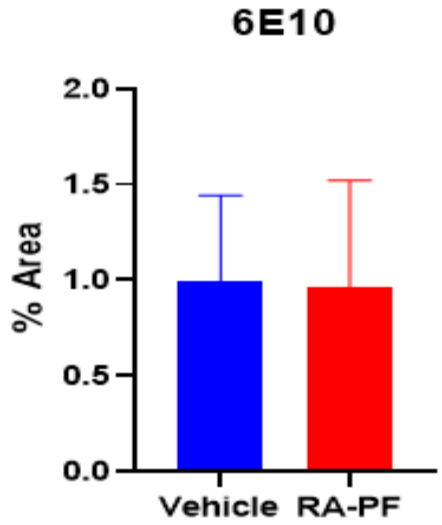
[그림 2-858. 6E10을 이용한 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석: CTX, RA-PF]



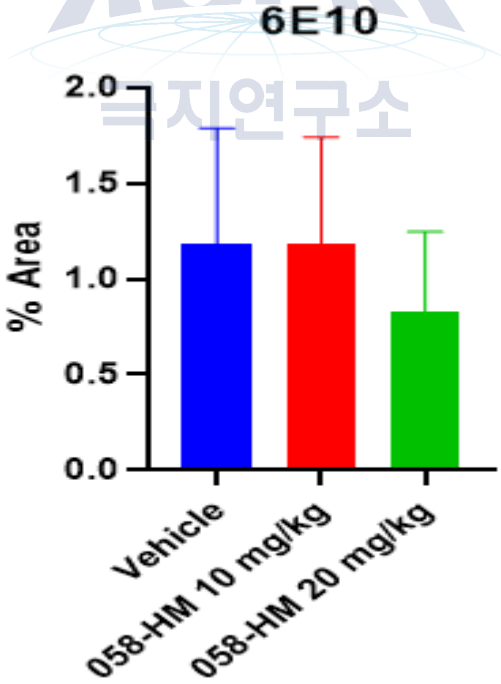
[그림 2-859. 6E10을 이용한 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석: CTX, RA-058HM 10 mg/kg]



[그림 2-860. 6E10을 이용한 아밀로이드 베타 플라그 분포 분석: CTX, RA-058HM 20 mg/kg]



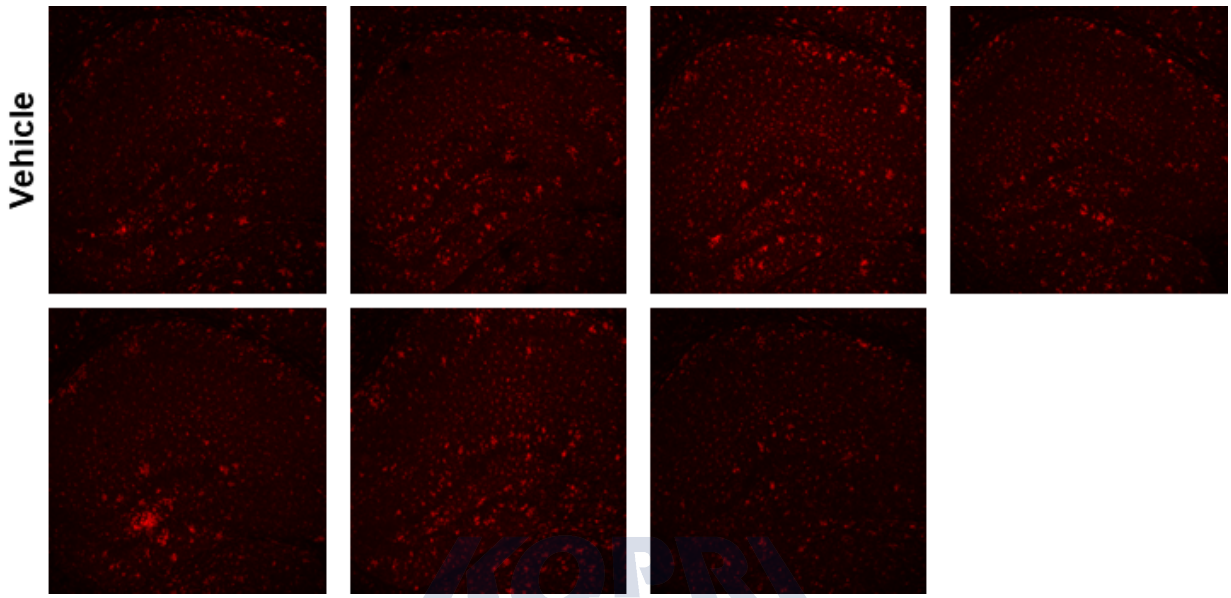
[그림 2-861. 6E10 정량 분석: CTX, RA-PF]



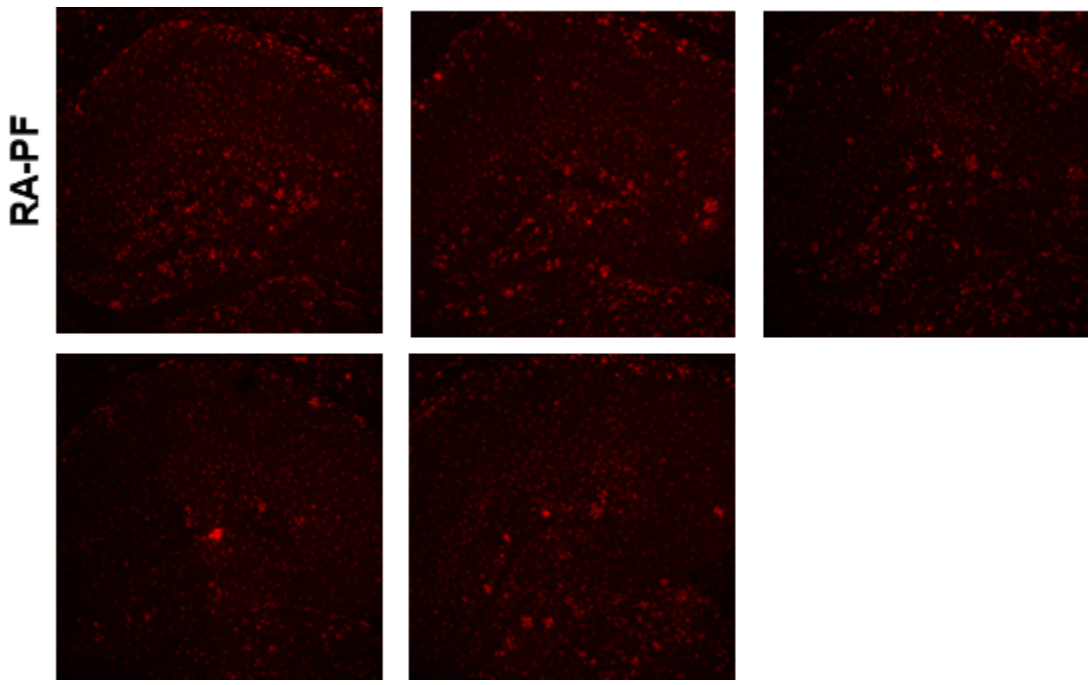
[그림 2-862. 6E10 정량 분석: CTX, RA-058HM 10 mg/kg, 20 mg/kg]

23) 다음으로, IBA1 항체를 이용하여 microglia 분포 정도를 분석함(그림 2-863~868)

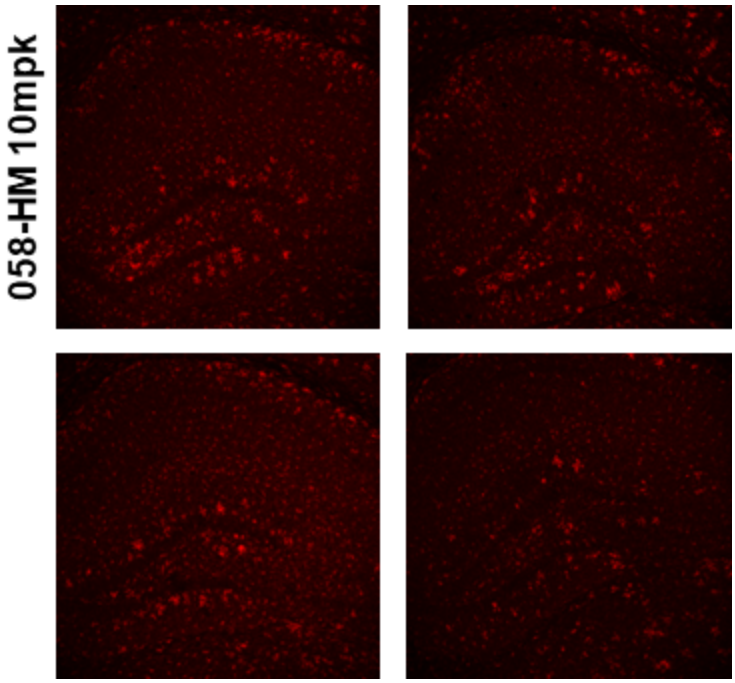
24) Hippocampus 지역에 대해 분석한 결과, RA-PF에 의해 vehicle군 대비 IBA1 % Area가 감소한 경향을 확인함.RA-058HM의 경우, vehicle군 대비 IBA1 % Area가 소폭 증가한 경향을 확인함



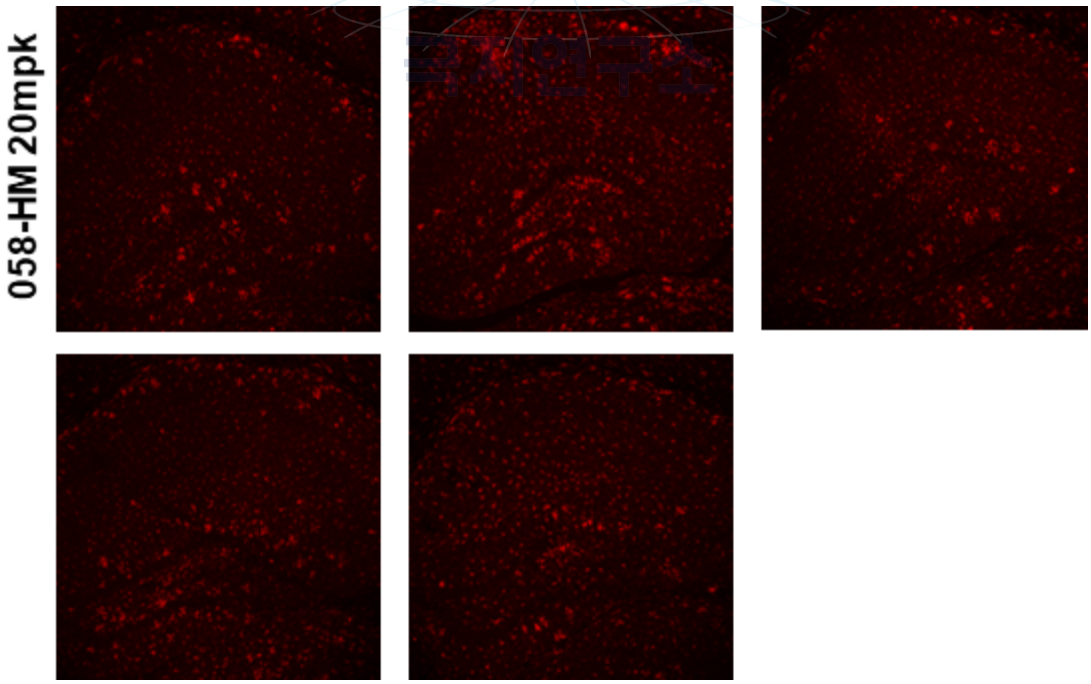
[그림 2-863. IBA1을 이용한 microglia 분포 분석: Hippocampus, vehicle]



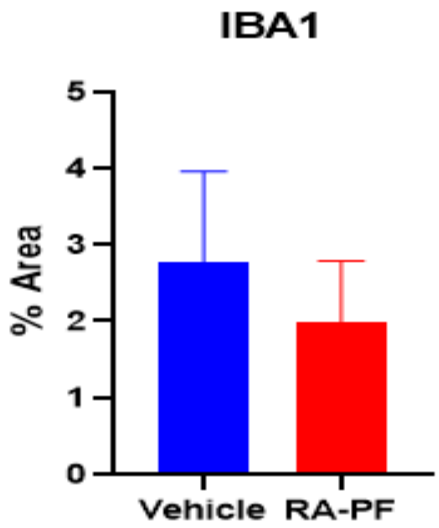
[그림 2-864. IBA1을 이용한 microglia 분포 분석: Hippocampus, RA-PF]



[그림 2-865. IBA1을 이용한 microglia 분포 분석:
Hippocampus, RA-058HM 10 mg/kg]

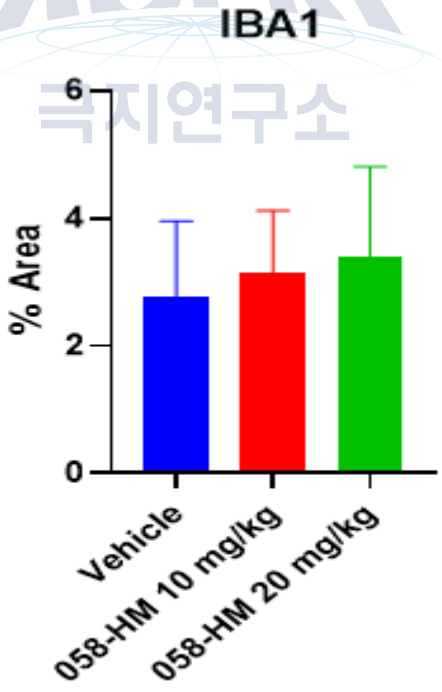


[그림 2-866. IBA1을 이용한 microglia 분포 분석: Hippocampus, RA-058HM 20 mg/kg]



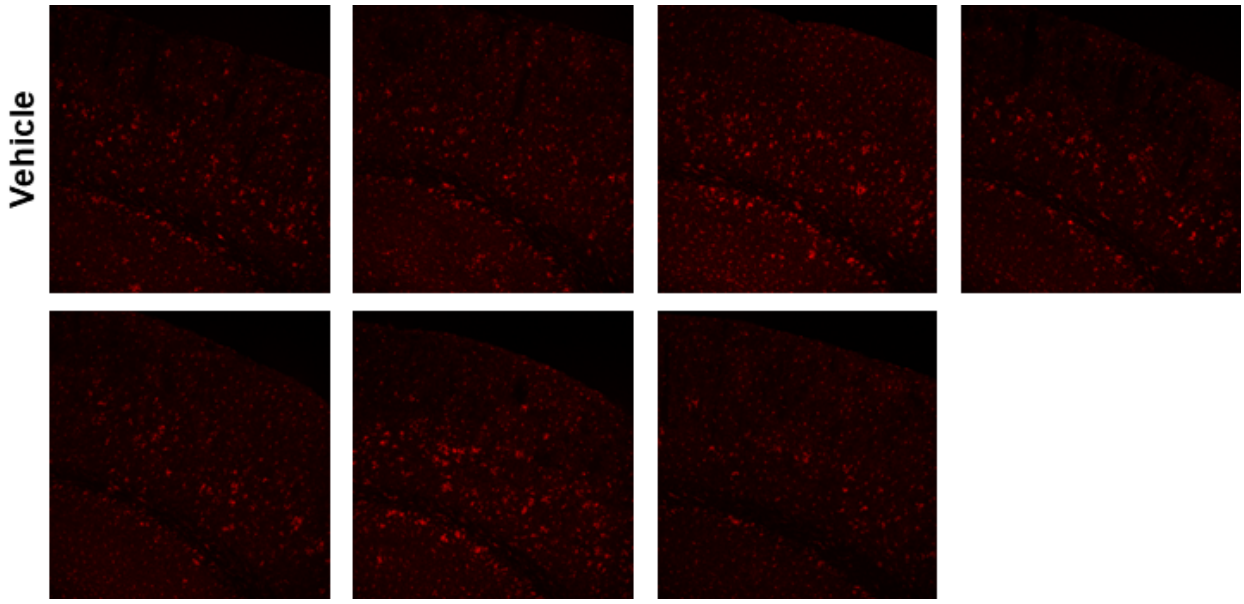
[그림 2-867. IBA1 정량 분석: Hippocampus, RA-PF]

KOPRI 극지연구소

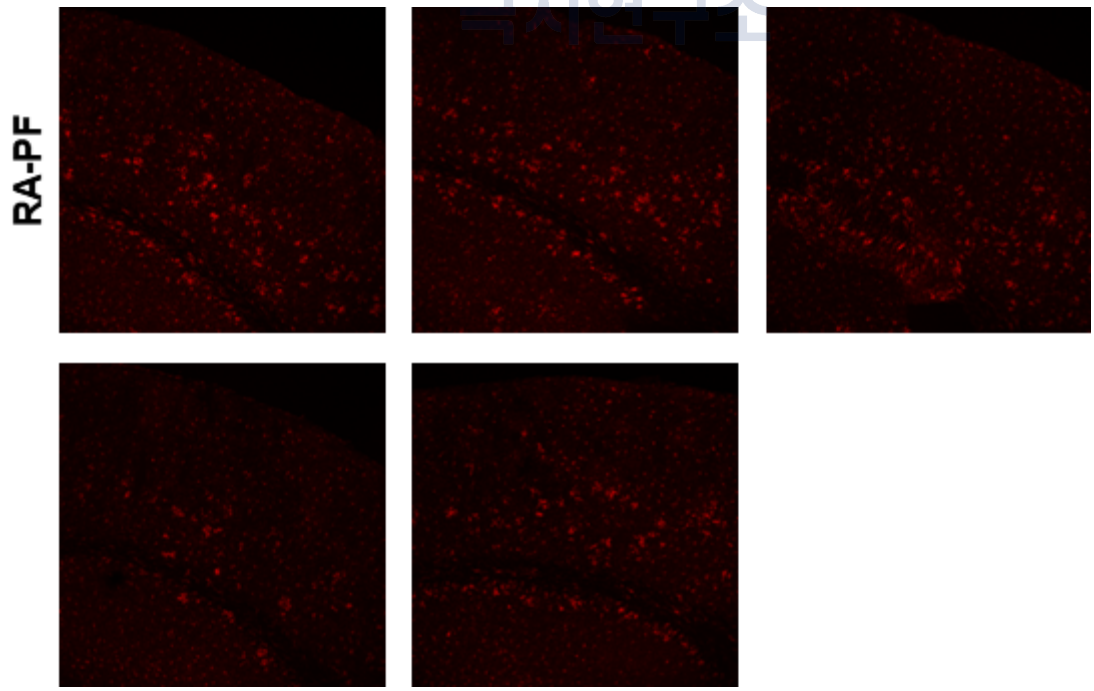


[그림 2-868. IBA1 정량 분석: Hippocampus, RA-058HM 10 mg/kg, 20 mg/kg]

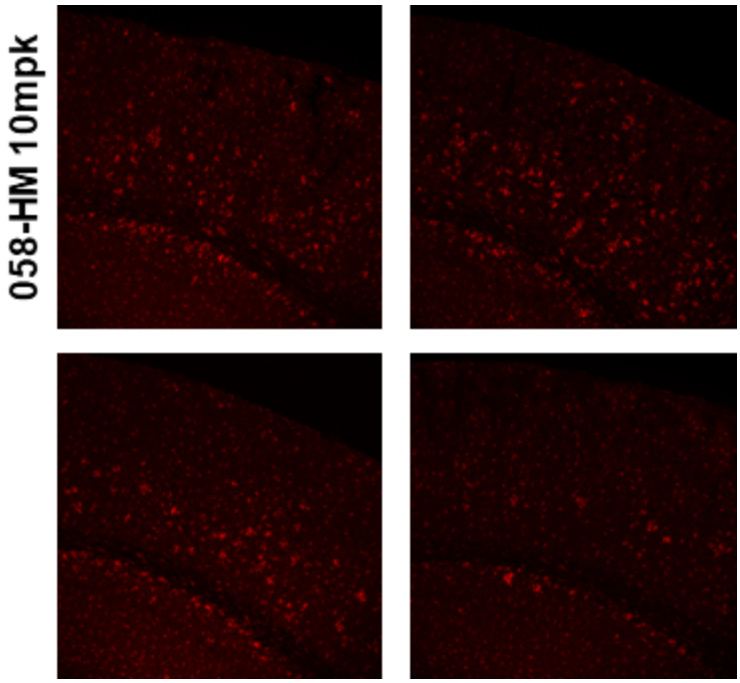
25) Cortex 지역에 대해 microglia의 분포를 분석함(그림 2-1599~1604). RA-PF 투약군의 경우, vehicle군 대비 소폭 감소하는 경향을 보이나 유의하지는 않음



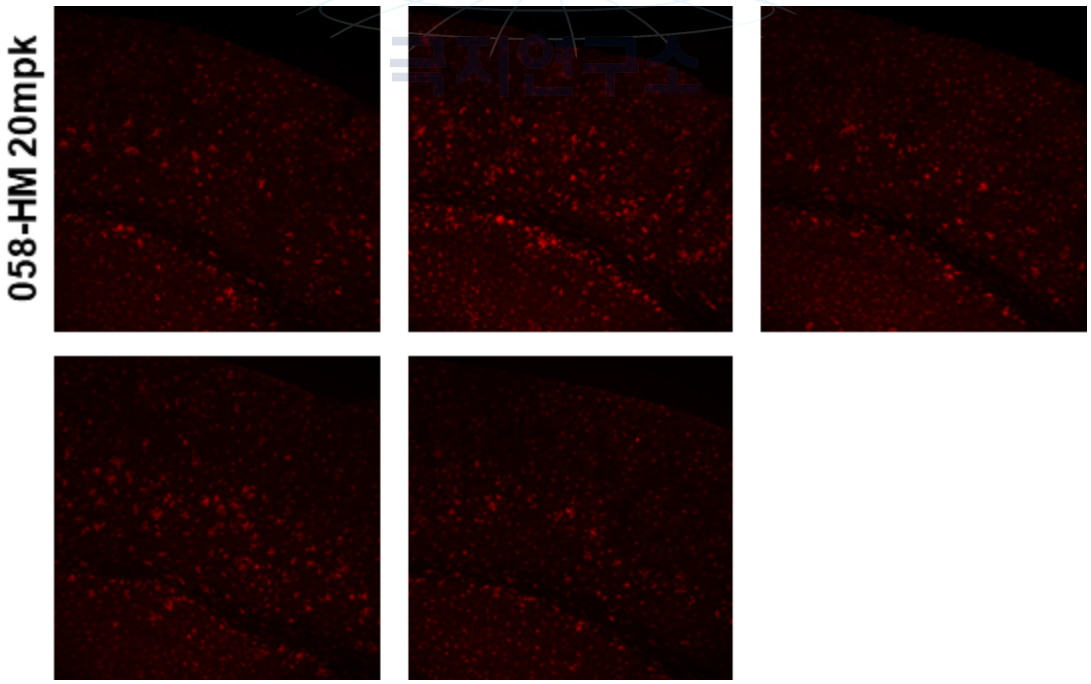
[그림 2-869. IBA1을 이용한 microglia 분포 분석: CTX, vehicle]



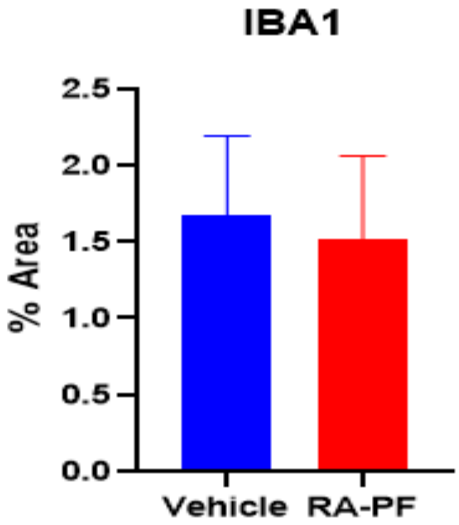
[그림 2-870. IBA1을 이용한 microglia 분포 분석: CTX, RA-PF]



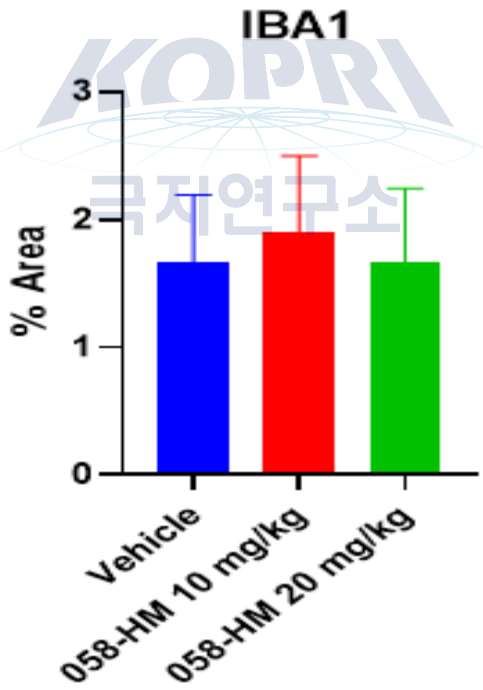
[그림 2-871. IBA1을 이용한 microglia 분포 분석: CTX, RA-058HM 10 mg/kg]



[그림 2-872. IBA1을 이용한 microglia 분포 분석: CTX, RA-058HM 20 mg/kg]



[그림 2-873. IBA1 정량 분석: CTX, RA-PF]

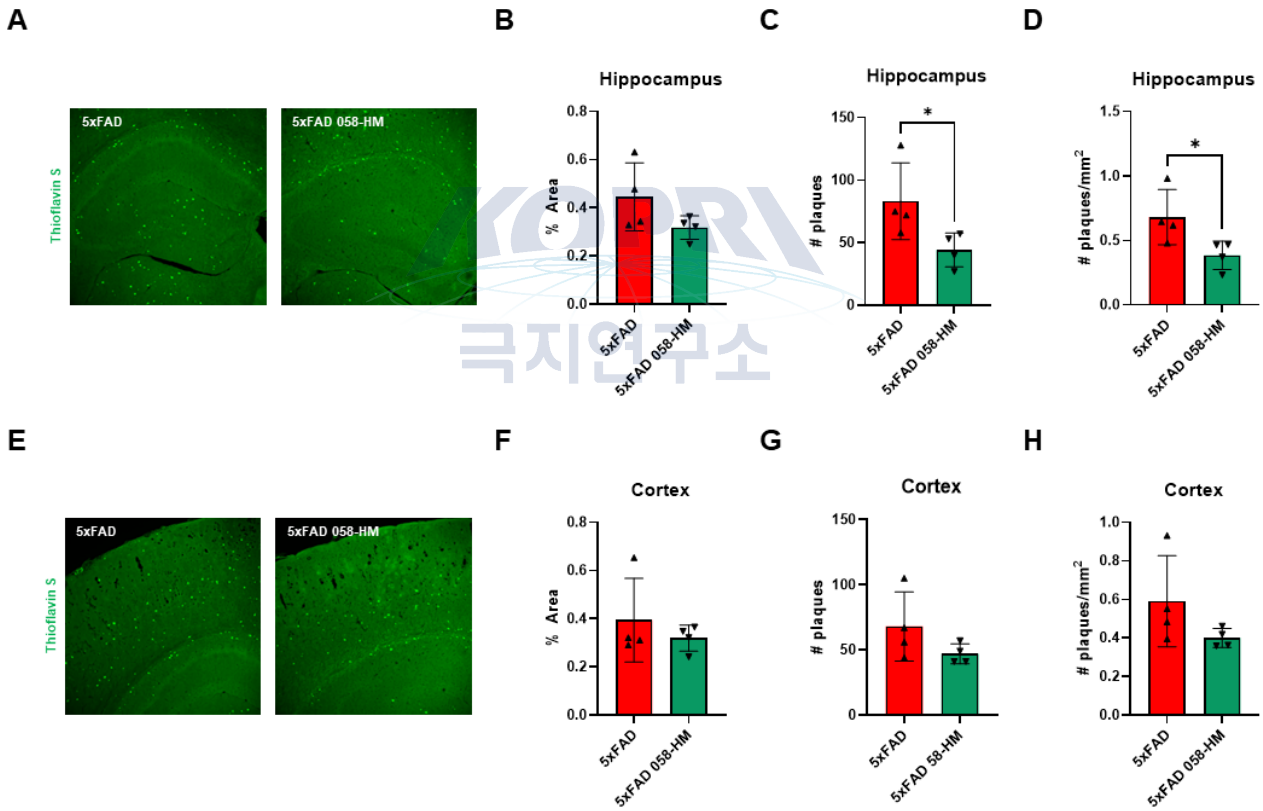


[그림 2-874. IBA1 정량 분석: CTX, RA-058HM 10 mg/kg, 20 mg/kg]

26) Thioflavin S 염색을 통해 아밀로이드 베타 플라그에 대한 RA-058HM의 효능을 확인함(그림 2-875)

27) Hippocampus 지역에 대해서 분석 시, thioflavin S positive area (% area)는 5xFAD vehicle군과 RA-058HM 투약군 사이 유의한 차이가 없었으나, 플라그의 수는 RA-058HM 투약에 의해 5xFAD vehicle군 대비 유의하게 감소했으며, 이는 단위면적당 플라그의 수에서도 같은 결과를 보임

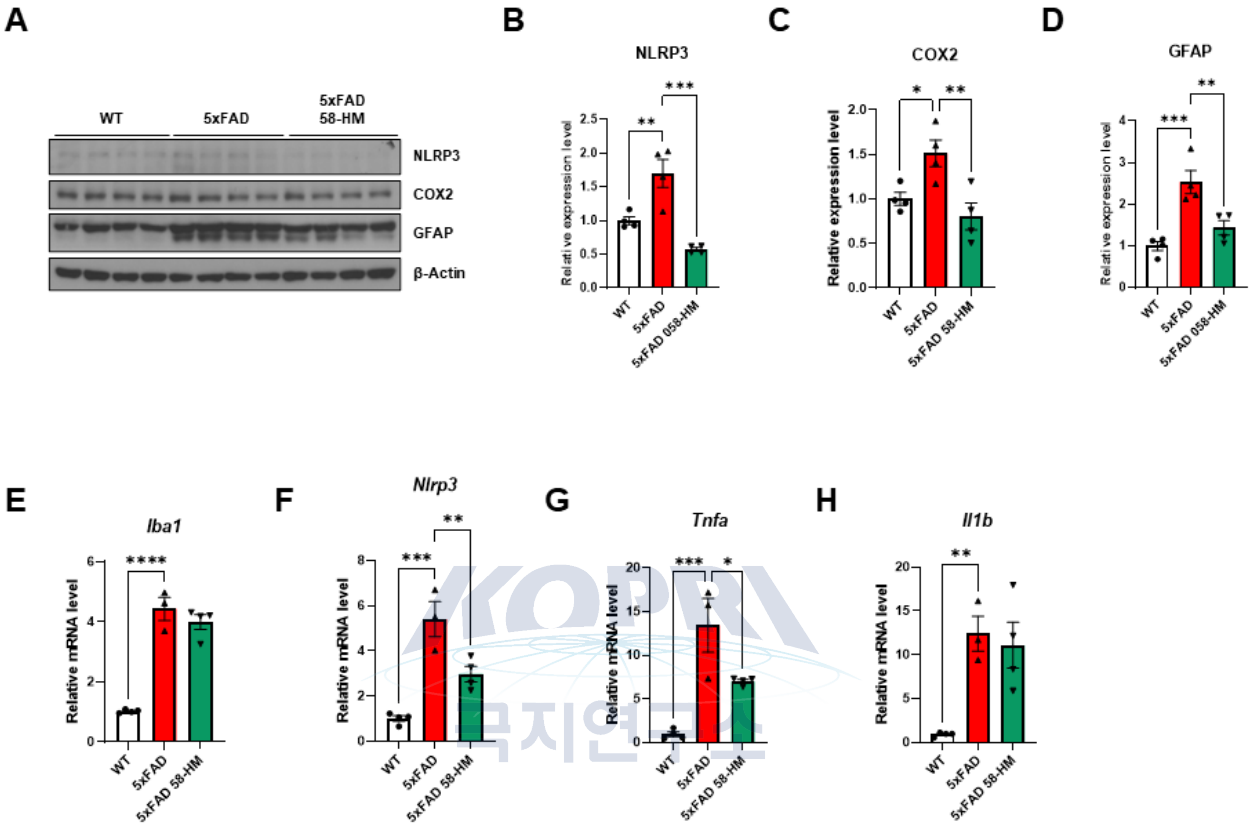
28) Cortex 지역에 대해서 분석 시, thioflavin S positive area (% area)는 5xFAD vehicle군과 RA-058HM 투약군 사이 유의한 차이가 없었음. 플라그의 수와 단위면적당 플라그의 수 결과에서 통계적 유의성은 없으나, RA-058HM 투약에 의해 5xFAD vehicle군 대비 감소하는 경향을 보임



[그림 2-875. IHC를 통한 RA-058HM 효능 확인]

29) 다음으로 hippocampus 조직에서 RA-058HM의 염증인자에 대한 효과를 확인함(그림 2-876). Western blot 결과, 5xFAD vehicle군에서 WT군 대비 NLRP3, COX2, GFAP 단백질 발현량이 유의하게 증가해있음을 확인함. 또한, 5xFAD vehicle군에서 증가해있는 NLRP3, COX2, GFAP를 RA-058HM이 유의하게 감소시킴을 확인함

30) RT-qPCR 실험결과, *Iba1* mRNA 발현량이 5xFAD vehicle군에서 WT군 대비 유의하게 증가해있으나 RA-058HM에 의한 효과는 없었음. *Nlrp3*, *Tnfa*, *Il1b* mRNA 발현량은 WT군 대비 5xFAD vehicle군에서 유의하게 증가해있으며, 이는 RA-058HM 투약에 의해 유의하게 감소함

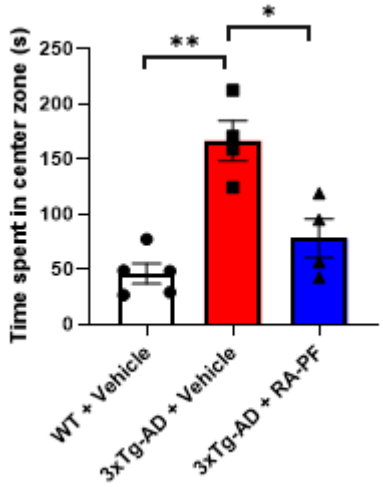


[그림 2-876. 염증인자 생화학적 분석 결과]

○ 3xTg-AD 기반 RA-PF 작용기전 검증

1) 3차년도 4차 동물실험인 3xTg-AD에서의 RA-PF 약효 및 작용기전을 추가 규명함

2) 마우스의 불안 (anxiety) 정도를 평가하는 행동실험인 elevated plus maze (EPM) 실험 결과, 3xTg-AD+Vehicle군이 WT+Vehicle군보다 유의하게 중앙에 머무는 시간이 많았으며, 이는 RA-PF 투약군에서 유의하게 감소한 결과를 보임(그림 2-1607). 이는 3xTg-AD+Vehicle군에서 WT+Vehicle군보다 유의하게 증가해있던 불안감이 RA-PF에 의해 해소되었다고 해석할 수 있음

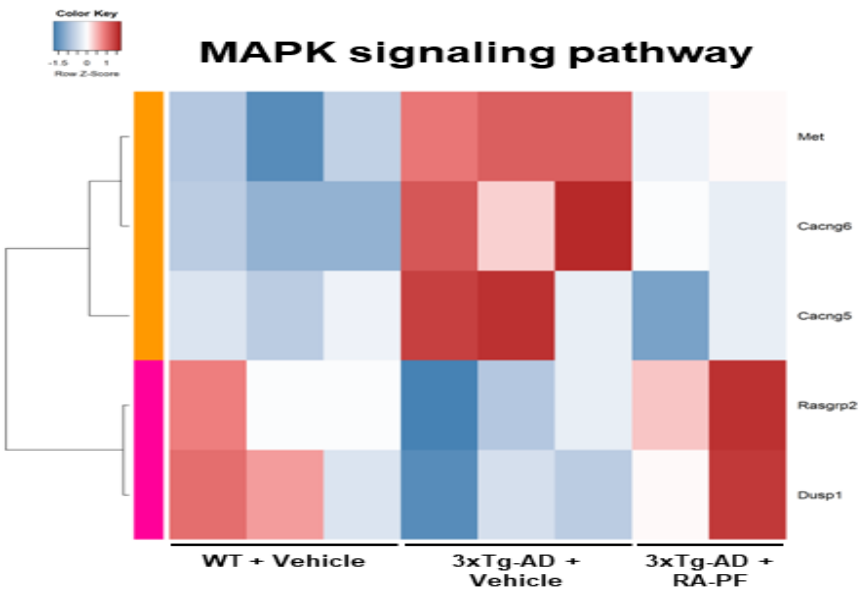


[그림 2-877. EPM 실험 결과]

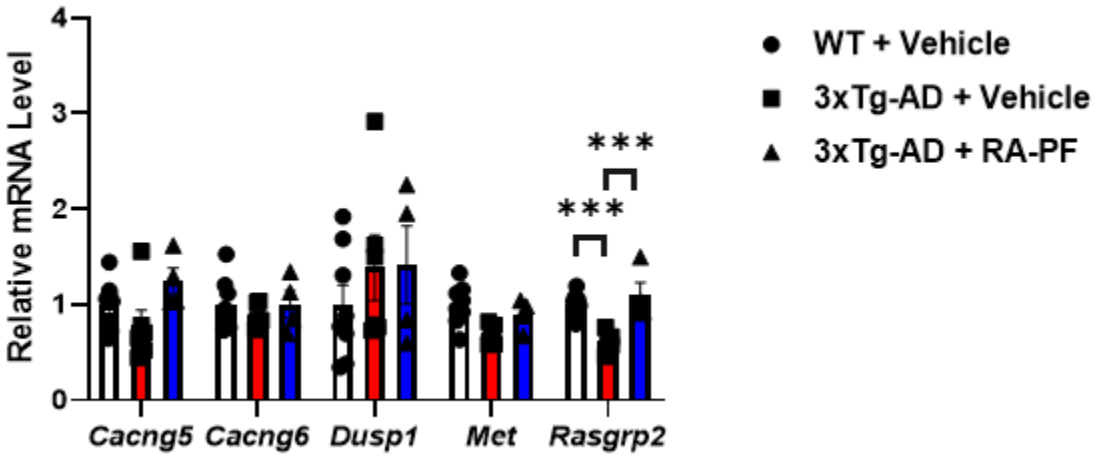
3) 3차년도 실험 결과, RA-PF 투약에 의해 cortex에서 vehicle군 대비 tau phosphorylation이 감소해있었음. 해당 결과에 대한 메커니즘을 알아내기 위해 tau 인산화와 관련하여 잘 알려져있는 MAPK signaling pathway에 대해 분석을 진행함(그림 2-878, 879)

4) 3차년도 실험에서 얻어진 RNA-sequencing 결과를 이용해 유의하게 변화되어있는 MAPK signaling pathway와 관련된 유전자들을 heatmap을 통해 시각화함(그림 2-878)

5) 그림 247에서 얻어진 유전자들에 대해 cortex mRNA를 이용하여 RT-qPCR을 진행함(그림 293). 그 결과, 3xTg-AD+Vehicle군에서 WT+Vehicle군 대비 *Rasgrp2* 유전자가 유의하게 감소해있었으며, RA-PF 투약에 의해 유의하게 회복되는 것을 확인함(그림 2-879)

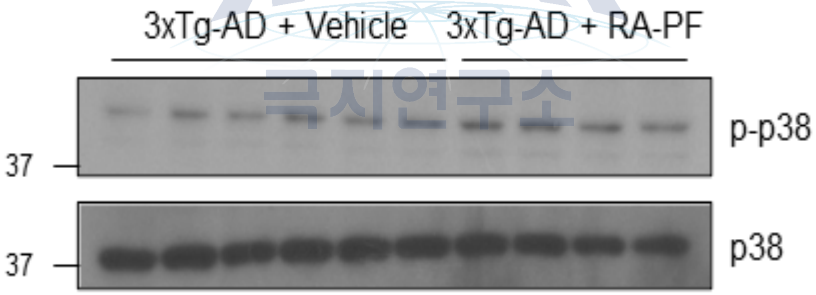


[그림 2-878. RNA-sequencing 결과: MAPK signaling pathway]

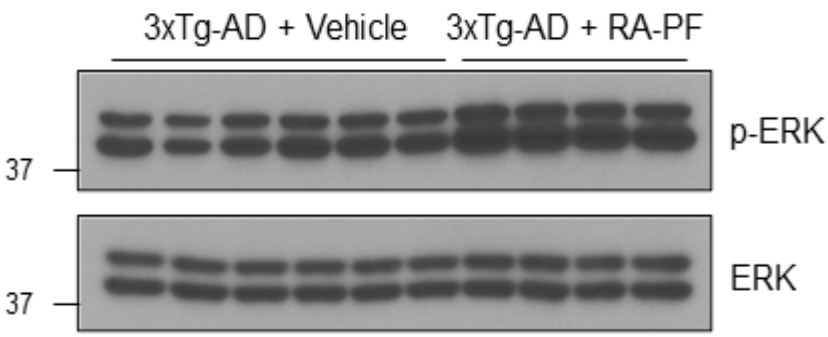


[그림 2-879. RT-qPCR 결과]

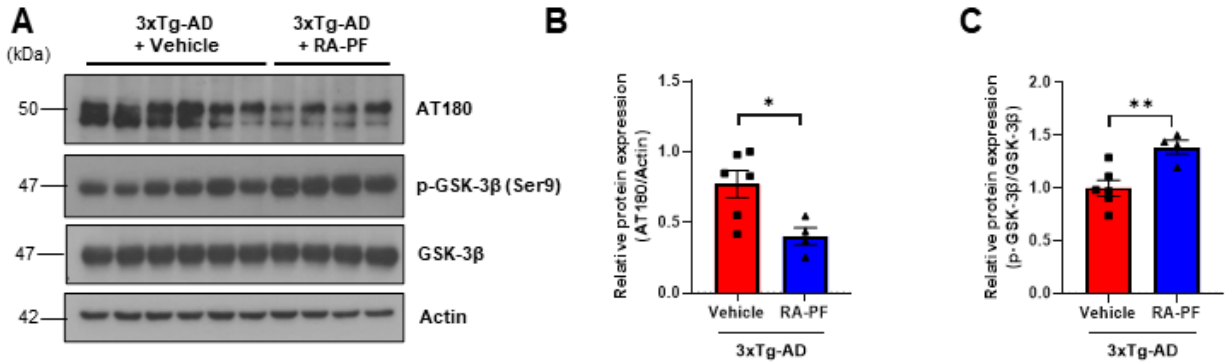
6) Western blot을 통해 MAPK signaling pathway에 속하는 단백질들의 활성 정도를 살펴봄(그림 2-880, 881). 그 결과, p-ERK의 양이 RA-PF 투약군에서 증가하는 경향을 보였으며 p-p38과 p-JNK의 양은 vehicle군과 큰 차이가 없었음(그림 2-882)



[그림 2-880. MAPK signaling pathway WB 검증 1]

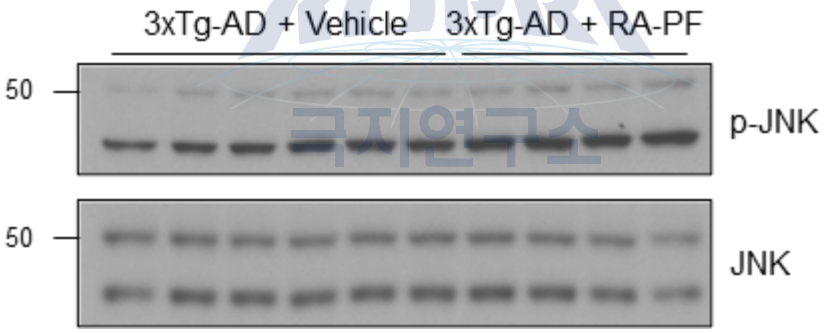


[그림 2-881. MAPK signaling pathway WB 검증 2]

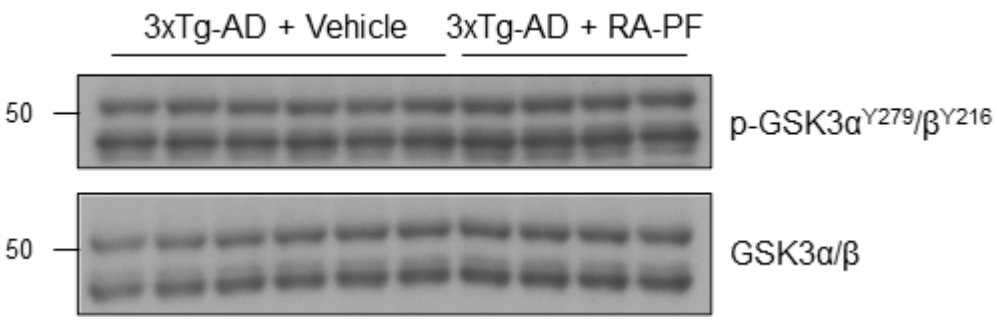


[그림 2-882. 3xTg-AD RA-PF 작용기전 규명]

7) 다음으로 tau의 인산화에 관여하는 GSK-3α/β의 active form에 대한 영향을 살펴봄. 그 결과, RA-PF에 의한 영향은 없는 것으로 판단됨. Western blot을 통해 cortex에서 RA-PF 투약에 의해 Vehicle군 대비 p-Tau (AT180)이 유의하게 감소한 것을 확인함. Tau의 인산화에 관여하는 kinase인 GSK-3β의 inactive form인 p-GSK3β (Ser9)의 발현량이 RA-PF에 의해 유의하게 증가함



[그림 2-883. MAPK signaling pathway WB 검증 3]

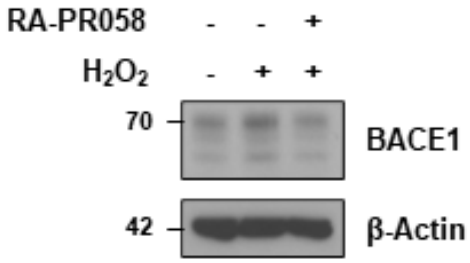


[그림 2-884. GSK3α/β의 활성도 검증]

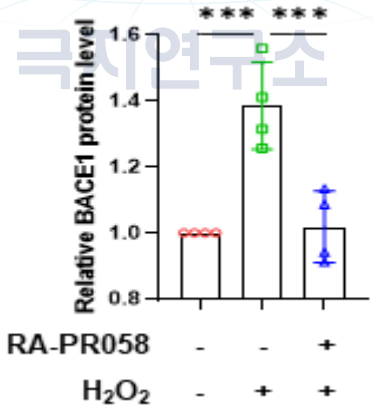
○ RA-RA-PR058 약효 및 작용기전 검증

1) 추가 후보물질 중 하나였던 RA-PR058 (RA-PR058)의 약효 및 작용기전 검증을 SH-SY5Y 세포 기반으로 진행함(그림 2-885, 886)

2) RA-PR058 10 μM을 SH-SY5Y에 24시간 처리한 후 H_2O_2를 통해 산화적 스트레스를 유발함. 그 결과, RA-PR058은 산화적 스트레스에 의한 BACE1 유도에 대해 protective한 효과를 보임

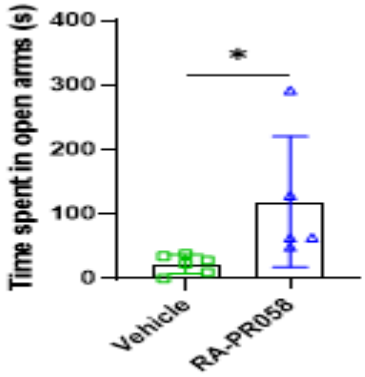


[그림 2-885. SH-SY5Y 기반 RA-PR058 약효 검증]



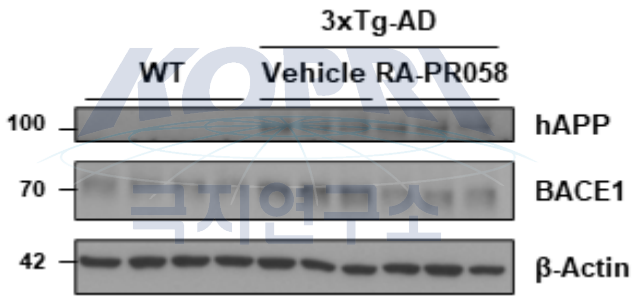
[그림 2-886. 그림 299 정량 분석]

3) 3차년도 동물실험 조직을 이용하여 RA-PR058에 의한 효과를 추가 검증함. EPM 실험 결과, vehicle군 대비 RA-PR058 투약군에서 open arm에 머문 시간이 유의하게 증가해있으며, 이는 약물에 의한 불안감 해소가 이루어졌다고 해석할 수 있음(그림 2-887)

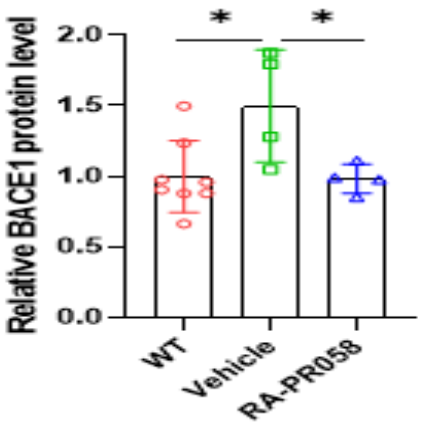


[그림 2-887. EPM 실험 결과]

4) Cortex 조직을 western blot한 결과, 3xTg-AD vehicle군에서 WT 대비 유의하게 BACE1의 발현량이 증가해있으며 이는 RA-PR058 투약에 의해 유의하게 감소한 것을 확인함(그림 2-888, 889)

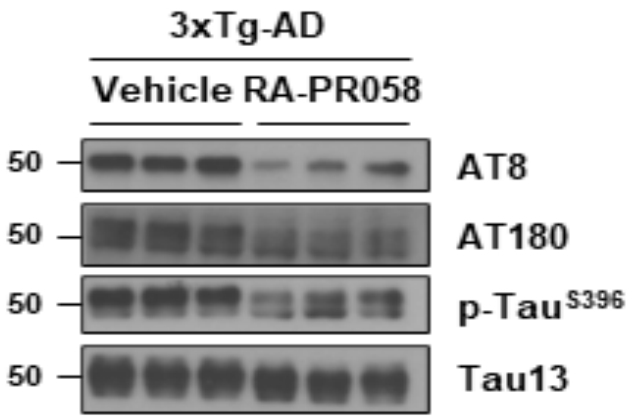


[그림 2-888. RA-PR058에 의한 BACE1 감소 검증]

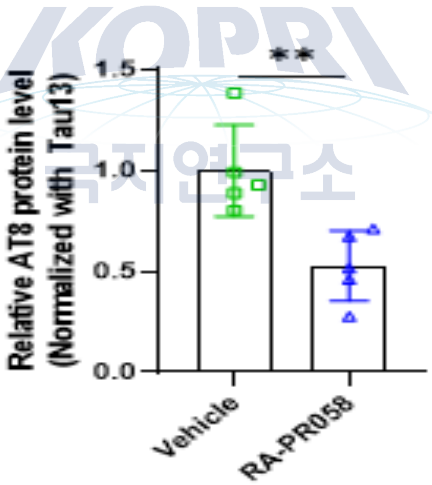


[그림 2-889. 그림 302 정량 분석]

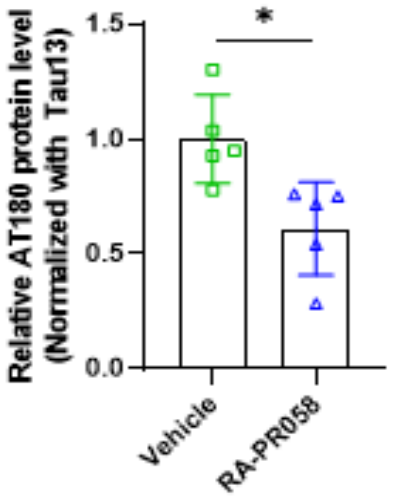
5) 또한, tau의 인산화를 western blot을 통해 확인한 결과, vehicle군 대비 RA-PR058 투약군에서 AT8, AT180, p-Tau^{S396}의 발현량이 유의하게 감소한 것을 확인함. 이는 RA-PR058에 의해 p-JNK의 발현량이 유의하게 감소한 것의 영향일 수 있음. 약물에 의한 tau 인산화의 정도는 DAB staining을 통해서도 확인함



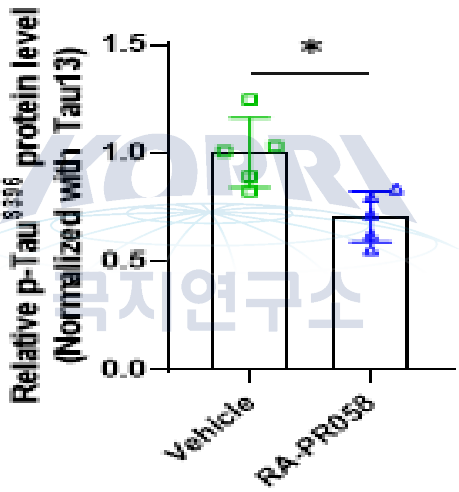
[그림 2-890. RA-PR058에 의한 tau 인산화 검증]



[그림 2-891. AT8 정량 분석]

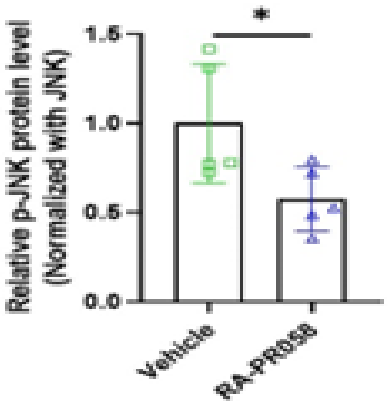


[그림 2-892. AT180 정량 분석]

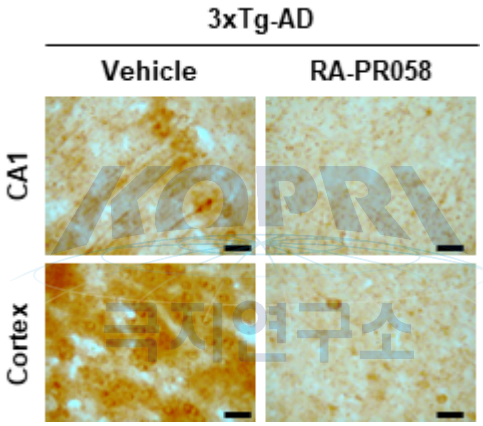


[그림 2-893. p-Tau(S396) 정량 분석]

[그림 2-894. RA-PR058에 의한 p-JNK 발현량 검증]



[그림 2-895. p-JNK 정량 분석]



[그림 2-896. DAB staining: AT8]

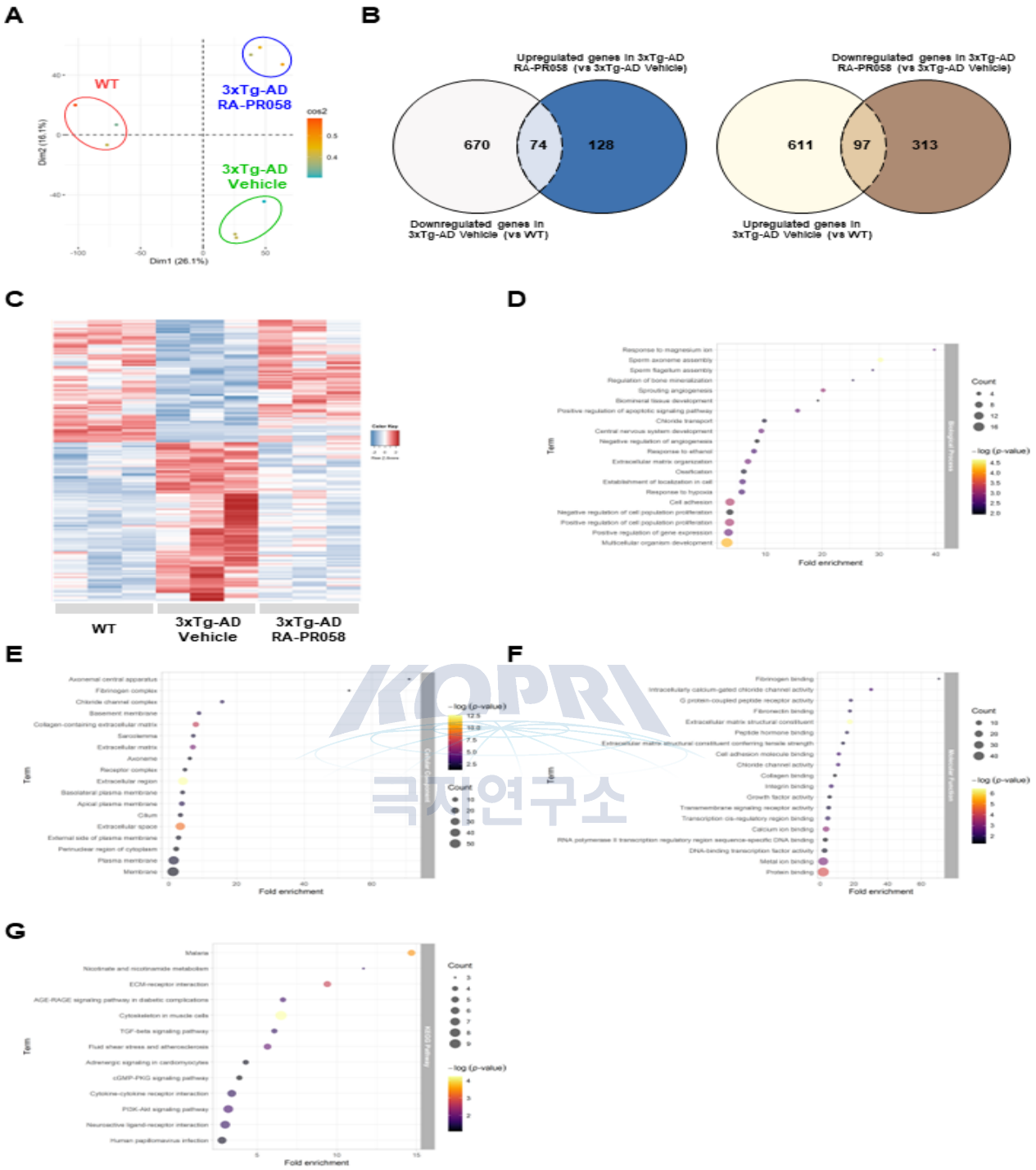
4) Cortical RNA를 이용하여 RNA-sequencing을 진행함(그림 2-897). 주성분 분석 결과, 각 그룹별로 발현패턴이 비슷한 것을 확인할 수 있음(그림 2-897A)

5) WT군 대비 3xTg-AD Vehicle군에서 유의하게 감소되어 있는 유전자가 744개, 3xTg-AD Vehicle군 대비 3xTg-AD RA-PR058군에서 유의하게 증가한 유전자가 202개이며 이 중 겹치는 유전자는 74개임(그림 2-1627B). 또한, WT군 대비 3xTg-AD Vehicle군에서 유의하게 증가되어 있는 유전자가 708개, 3xTg-AD Vehicle군 대비 3xTg-AD RA-PR058군에서 유의하게 감소한 유전자가 410개이며 이 중 겹치는 유전자는 97개임(그림 2-897B)

6) ③에서 교집합에 해당하는 171개의 유전자를 heatmap으로 시각화함(그림 2-897C)

7) 또한 교집합에 해당하는 유전자들을 이용하여 gene ontology, KEGG pathway 분석을 진행함(그림 2-897D-G). 그 결과, biological process 카테고리에서는 'Central nervous system development', 'Negative regulation of cell population proliferation', 'Response to hypoxia'와 관련된 유전자가, cellular component 카테고리에서는 'Axonemal central appratus', 'Axoneme', 'Cilium'과 관련된 유전자가, molecular function 카테고리에서는 'Fibrinogen binding', 'Extracellular matrix structural constituent', 'Calcium ion binding'과 관련된 유전자가 enrich 되어있음을 확인함(그림 2-897D-F). 추가로 KEGG pathway 분석에서는 'AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications', 'TGF-beta signaling pathway', 'Cytokine-cytokine receptor interaction', 'Neuroactive ligand-receptor interaction'과 관련된 유전자들이 enrich 되어있음을 확인함(그림 2-897G)

KOPRI
극지연구소



[그림 2-897. RNA-sequencing 결과]

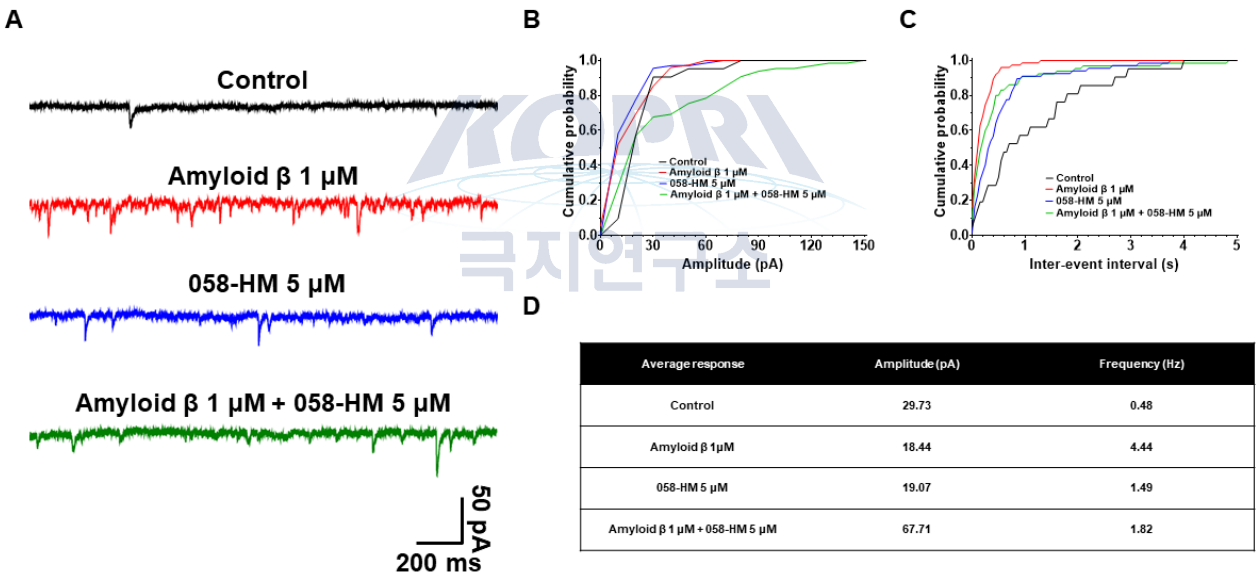
○ 전기생리학 기반 RA-058HM 효능 평가

1) 후보물질의 전기생리학 기반 신경세포 기능 평가를 위해 mouse primary neuron을 사용함 (그림 2-898, 899)

2) WT 마우스 (C57BL6)로부터 primary neuron을 배양하고 Day 21에 RA-058HM 5 μM을 amyloid beta oligomer 1 μM 혹은 DMSO/DMEM/F-12 1 μM과 24시간 처리한 후 patch clamp를 진행함

3) 후보물질 5 μM만 처리한 군들의 경우 대조군에 비해 amplitude가 감소했고 frequency가 증가했음

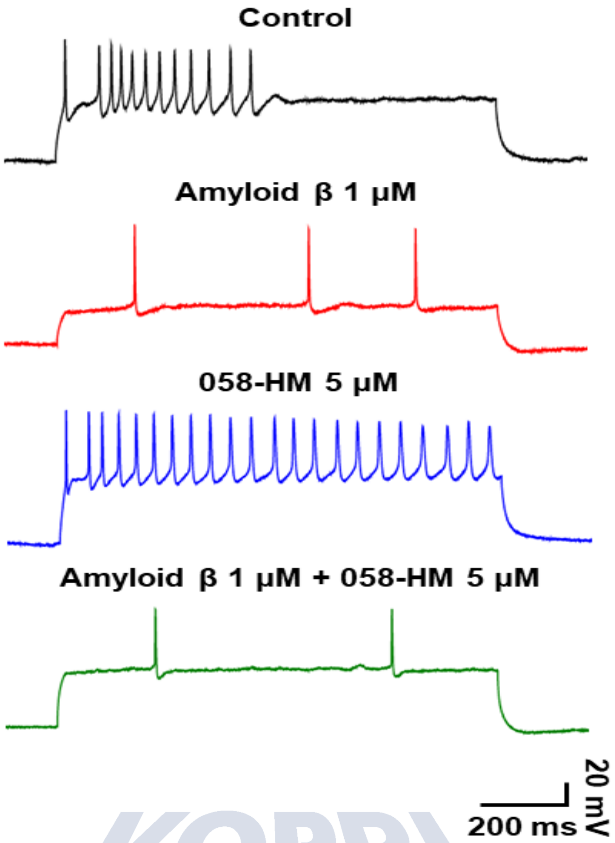
4) RA-058HM 5 μM과 amyloid beta oligomer 1 μM을 같이 처리했을 경우 amplitude가 amyloid beta oligomer만 처리한 군에 비해 증가했으며 frequency는 감소했음



D

Average response	Amplitude (pA)	Frequency (Hz)
Control	29.73	0.48
Amyloid β 1μM	18.44	4.44
058-HM 5 μM	19.07	1.49
Amyloid β 1 μM + 058-HM 5 μM	67.71	1.82

[그림 2-898. 전기생리학적 평가: Patch clamp 1]



[그림 2-899. 전기생리학적 평가: Patch clamp 2]

(다) 세부연구목표 3. 항치매 치료제 상용화 자료 확보

□ 연구내용 3-1. 라말린의 초기 안전성 자료 확보

○ 라말린의 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이시험

1) 시험물질 라말린에 대해 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 균주와 트립토판 요구성 *Escherichia coli* (WP2*uvrA*(pKM101)) 균주를 이용하여 복귀돌연변이 시험을 실시함

가. 전배양

- 동결보존된 각 균주를 해동하여 2.5 % nutrient broth 액체배지에 접종하고 약 37℃ 진탕 배양기에서 배양함. 배양 종료 후, 각 균주의 흡광도를 ELISA reader (파장: 600 nm, EPOCH, Biotek, U.S.A.)를 이용하여 측정함. 또한 생균수가 1 x 10^9cells/mL 이상인 균주를 사용함

나. 처리방법

- 대사활성계 존재하에서는 각 용량의 시험물질, 음성대조물질과 양성대조물질 및 균배양액을 각 0.1 mL씩 멸균된 시험관에 넣고, S9 Mix 0.5 mL을 멸균된 시험관에 넣음. 살모넬라균주는 살모넬라용 top agar, 대장균에는 대장균용 top agar를 각 2 mL씩 분주 후 vortexing 하였음. 그 후 최소 glucose 한천평판배지에 고르게 부어 실온에서 굳힘. 대사활성계 부재하에서는 S9 Mix를 대신해서 0.2 M Sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 0.5 mL 첨가함. 그 후 대사활성계 존재하와 같은 방법으로 처리함

S9 mix	균주명	양성대조물질	용량(μg/plate)
S9 mix(-)	TA98	2-NF	1.0
	TA100	SA	1.0
	TA1535	SA	1.0
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2*uvrA*(pKM101)	AF-2	0.005
S9 mix(+)	TA98	2-AA	0.5
	TA100	B[a]P	2.0
	TA1535	2-AA	2.0
	TA1537	2-AA	2.0
	WP2*uvrA*(pKM101)	2-AA	20.0

다. 배양

- Top agar가 굳은 후 plate를 뒤집어 약 37°C 배양기 (JSBI-420CP, JSR, Korea)에서 약 48 시간 배양함

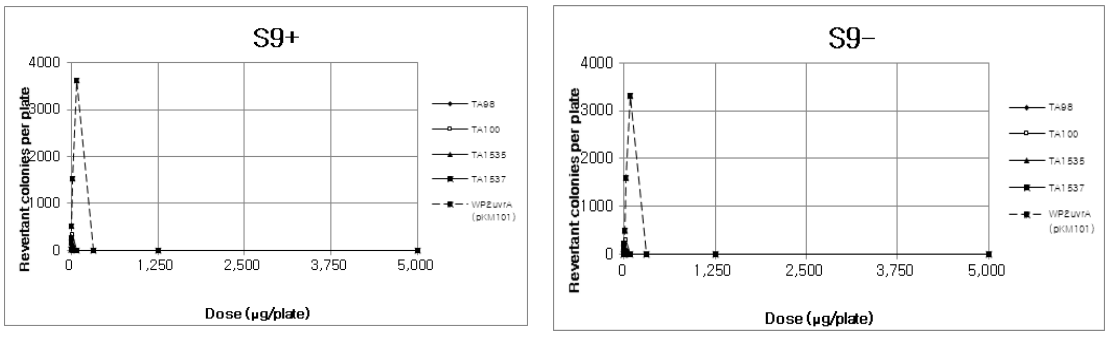
라. 시험결과의 판정

- 생육저해의 판정기준은 콜로니 수가 음성대조군과 비교하여 확연히 감소하거나 집락의 크기가 확연하게 작아지는 경우 또는 background lawn이 음성대조군과 비교 시 엷어지거나 없어져 현저히 감소하는 것으로 하였음. 대사활성계 유·무와 관계없이 최소 1개 이상의 균주 및 1용량 이상에서 복귀돌연변이 콜로니수가 음성대조군에 비해 2배 이상 증가하거나 또는 용량 의존적이거나 재현성 있는 증가를 보일 경우 양성으로 판정함

마. 예비시험

- 시험물질은 5,000 μg/plate을 최고용량으로 설정하며, 최고용량을 포함하여 공비 4의 총 7단계 (1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 312.5, 1,250 및 5,000 μg/plate)로 설정함. 대사활성계 존재하와 부재하로 설정함. 예비시험은 5,000 μg/plate을 최고용량으로 설정하고, 최고용량을 포함하여 공비 4의 총 7단계 용량으로 처리하여 시험물질에 의한 침전 및 생육저해를 관찰함

- 그 결과, 대사활성계 존재하 및 부재하의 모든 균주의 모든 용량에서 시험물질에 의한 침전은 관찰되지 않았으나 1,250 및 5,000 μg/plate 용량에서 시험물질에 의한 배지색 변화가 관찰됨. 또한, 대사활성계 존재하 및 부재하의 TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주의 경우 19.5 ~ 5,000 μg/plate, 대사활성계 존재하 및 부재하의 WP2*uvrA* (pKM101) 균주의 경우 312.5 ~ 5,000 μg/plate 용량에서 생육저해가 관찰됨. 따라서 대사활성계 존재하 및 부재하의 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 경우 19.5 μg/plate, 대사활성계 존재하 및 부재하의 WP2*uvrA* (pKM101) 균주의 경우 312.5 μg/plate을 본시험의 최고용량으로 하여 공비 2의 총 6용량으로 설정함



[그림 2-900. 다양한 박테리아 균주에서의 리버턴드 콜로니 수의 용량-반응 곡선 (예비연구)]

Strain	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies/plate presence of metabolic activation			Strain	Dose (μg/plate)	Number of revertant colonies/plate absence of metabolic activation		
		Colony No.		Mean ± S.D.			Colony No.		Mean ± S.D.
TA98	0	21	19	20 ± 1	TA98	0	19	20	20 ± 1
	1.22	26	30	28 ± 3		1.22	24	26	25 ± 1
	4.88	41	42	42 ± 1		4.88	44	40	42 ± 3
	19.5 #2)	98	101	100 ± 2		19.5 #2	103	97	100 ± 4
	78.1 #1)2)	0	0	0 ± 0		78.1 #1)2)	0	0	0 ± 0
	312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0		312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0
	1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0		1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0		5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	2-AA(0.5)	318	329	324 ± 8		2-AF(1.0)	207	233	220 ± 18
TA100	0	114	121	118 ± 5	TA100	0	102	111	107 ± 6
	1.22	155	146	151 ± 6		1.22	148	140	144 ± 6
	4.88	222	228	225 ± 4		4.88	210	232	221 ± 16
	19.5 #2)	357	312	335 ± 32		19.5 #2	297	310	304 ± 9
	78.1 #1)2)	0	0	0 ± 0		78.1 #1)2)	0	0	0 ± 0
	312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0		312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0
	1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0		1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0		5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	B[a]P(2.0)	520	472	496 ± 34		9A(1.0)	748	844	796 ± 68
TA1535	0	14	12	13 ± 1	TA1535	0	14	15	15 ± 1
	1.22	11	15	13 ± 3		1.22	13	11	12 ± 1
	4.88	15	18	17 ± 2		4.88	10	15	13 ± 4
	19.5 #1)2)	0	0	0 ± 0		19.5 #1)2)	0	0	0 ± 0
	78.1 #1)2)	0	0	0 ± 0		78.1 #1)2)	0	0	0 ± 0
	312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0		312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0
	1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0		1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0		5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	2-AA(2.0)	384	389	387 ± 4		9A(1.0)	808	680	744 ± 91
TA1537	0	9	6	8 ± 2	TA1537	0	8	9	9 ± 1
	1.22	5	10	8 ± 4		1.22	7	11	9 ± 3
	4.88	16	17	17 ± 1		4.88	15	16	16 ± 1
	19.5 #2)	36	33	35 ± 2		19.5 #2	40	36	38 ± 3
	78.1 #1)2)	0	0	0 ± 0		78.1 #1)2)	0	0	0 ± 0
	312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0		312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0
	1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0		1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0		5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	2-AA(2.0)	318	263	291 ± 39		9-AA(80.0)	436	521	479 ± 60
WP2 *uvrA* (pKM101)	0	182	183	183 ± 1	WP2 *uvrA* (pKM101)	0	156	160	158 ± 3
	1.22	256	266	261 ± 7		1.22	209	227	218 ± 13
	4.88	500	515	508 ± 11		4.88	473	524	499 ± 36
	19.5	1592	1464	1528 ± 91		19.5	1466	1698	1582 ± 164
	78.1	3976	3248	3612 ± 515		78.1	3464	3176	3320 ± 204
	312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0		312.5 #1)2)	0	0	0 ± 0
	1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0		1250 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0		5000 † #1)2)	0	0	0 ± 0
	2-AA(20.0)	2060	1872	1966 ± 133		AF-2(0.005)	1760	1808	1784 ± 34

†: Color changed of mgA plate

: Growth inhibition 1)decreased count of revertant colonies, 2)reduced background

S.D.: Standard Deviation

[표 2-19. 대사 활성화 시스템 존재 여부에 따른 평판당 리버턴트 콜로니 수 (예비 연구)]

바. 본시험

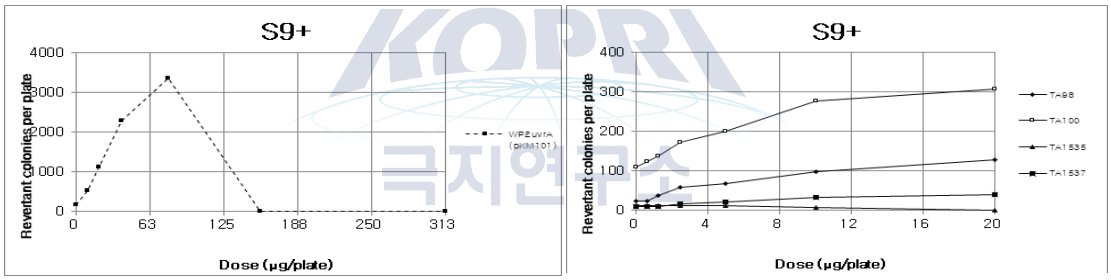
- 예비시험 결과, 대사활성계 존재하 및 부재하의 모든 균주의 1,250 및 5,000 μg/plate 용량에서 시험물질에 의한 배지색 변화가 관찰되었으며, 모든 균주의 모든 용량에서 시험물질에 의한 침전은 관찰되지 않았음. 그러나, 대사활성계 존재하 및 부재하의 TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주의 경우 19.5 ~ 5,000 μg/plate, 대사활성계 존재하 및 부재하의 WP2*uvrA* (pKM101) 균주의 경우 312.5 ~ 5,000 μg/plate 용량에서 생육저해가 관찰됨

- 따라서 대사활성계 존재하 및 부재하의 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주의 경우

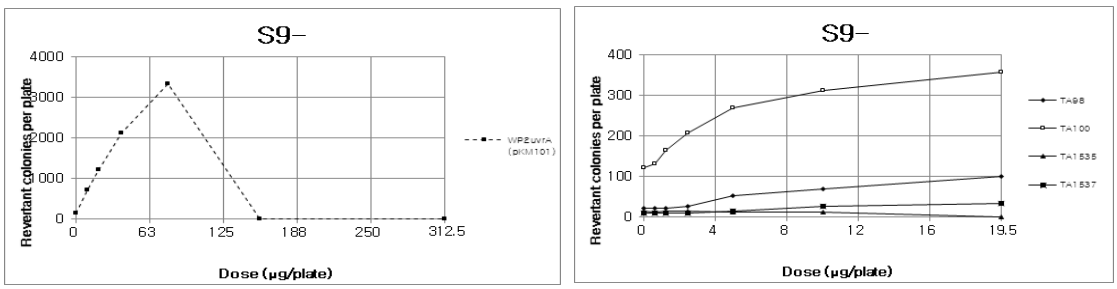
19.5 μg/plate, 대사활성계 존재하 및 부재하의 WP2*uvrA* (pKM101) 균주의 경우 312.5 μg/plate을 본시험의 최고용량으로 하여 공비 2의 총 6용량으로 설정함. 대사활성계 존재하와 부재하로 설정함. 음성대조군 및 양성대조군을 설정하며, 음성대조군은 부형제를 사용함

- 본시험 결과, 대사활성계 존재하 및 부재하의 TA98 및 TA100 균주와 대사활성계 존재하의 TA1535 균주의 경우 19.5 μg/plate, 대사활성계 존재하 및 부재하의 TA1537 균주와 대사활성계 부재하의 TA1535 균주의 경우 9.77 및 19.5 μg/plate 용량에서 생육저해가 관찰되었으며, 대사활성계 존재하 및 부재하의 WP2*uvrA* (pKM101) 균주의 경우 156.3 및 312.5 μg/plate 용량에서 생육저해가 관찰됨. 또한, 대사활성계 존재하 및 부재하의 TA98, TA100, TA1537 및 WP2*uvrA* (pKM101) 균주의 경우 시험물질에 의한 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 증가함

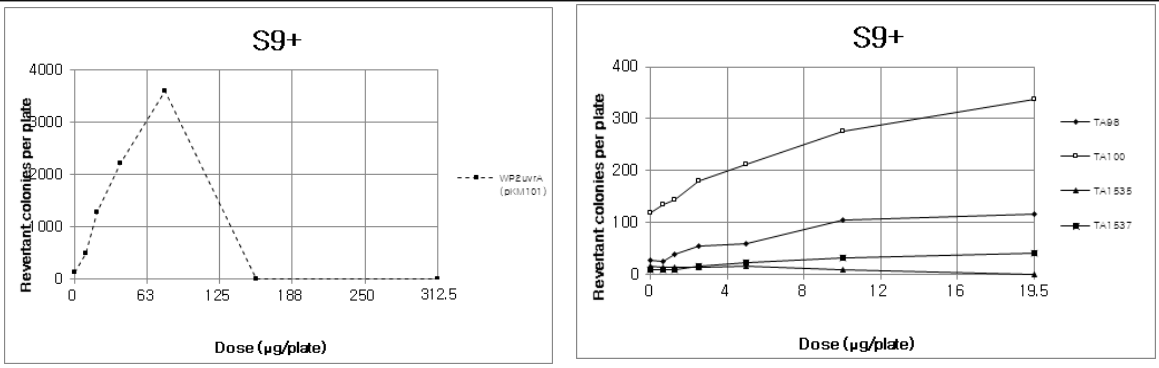
- 한편, 음성대조군의 복귀돌연변이 콜로니수는 historical data 범위 내에 평가되었고, 양성대조군의 복귀돌연변이 콜로니수는 음성대조군에 비해 현저하게 증가하여 뚜렷한 복귀돌연변이 양성반응을 나타냄. 이상의 결과로부터, 라말린은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발하는 것으로 판단됨



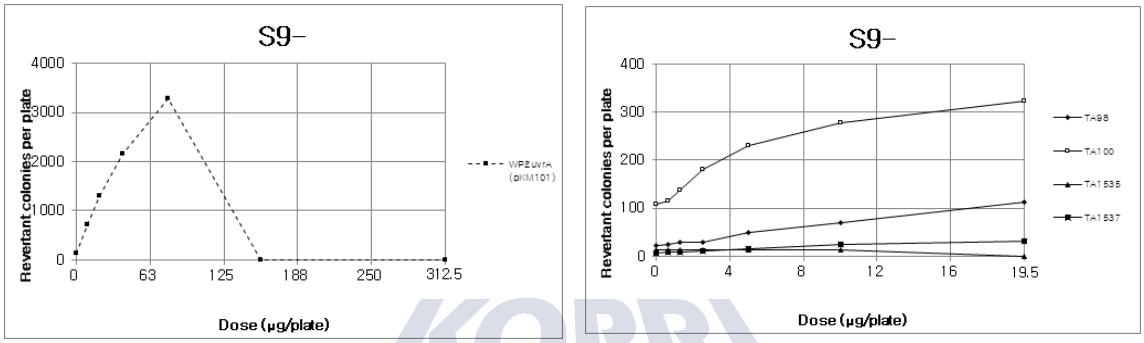
[그림 2-901. 대사 활성화 시스템 존재 하에서 다양한 박테리아 균주의 리버턴트 콜로니 수의 용량-반응 곡선 (본 연구 1)]



[그림 2-902. 대사 활성화 시스템 부재 하에서 다양한 박테리아 균주의 리버턴트 콜로니 수의 용량-반응 곡선 (본 연구 1)]



[그림 2-903. 대사 활성화 시스템 존재 하에서 다양한 박테리아 균주의 리버턴트 콜로니 수의 용량-반응 곡선 (본 연구 2)]



[그림 2-904. 대사 활성화 시스템 부재 하에서 다양한 박테리아 균주의 리버턴트 콜로니 수의 용량-반응 곡선 (본 연구 2)]

KOPRI 극지연구소

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 '극지 유전자원 활용기술 개발사업'의 '극지 지의류 유래 치매치료제 실용화 연구' 개발과제 최종보고서이다.

2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 해양수산부(해양수산과학기술진흥원)에서 시행한 연구 개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.

3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

KOPRI
극지연구소