

베타아밀로이드응집 억제제 도출을 위한 새로운 벤질피페리디닐에터 유도체의 합성

권 영 이*

우석대학교 약학대학

(Received September 5, 2006; Revised October 2, 2006)

Synthesis of New Benzylpiperidinyl Ether Derivatives as Amyloid-beta Aggregation Inhibitors

Young-Ee Kwon*

College of Pharmacy, Woosuk University, Samnye-eup, Wanju-gun, Jeonbuk 565-701, Korea

Abstract — We designed and synthesized new benzylpiperidinyl ether derivatives as beta-amyloid aggregation inhibitors for the development of novel anti-Alzheimer's disease agents. As starting material, 4-hydroxypiperidine was used. For protection of the amine group in piperidine (2), di-*tert*-butyl dicarbonate was reacted with 4-hydroxypiperidine in the presence of triethylamine. For introduction of benzyl group, benzylbromide was treated with compound 2 in dioxane. After deprotection of Boc group on amine in compound 3, ester (5) was synthesized by addition of ethyl-4-chlorobutyrate. The alcohol 6 was synthesized by hydride reduction of 5 using LiAlH_4 . To obtain final products (7~14), the alcohol 6 was condensed with each of substituted benzoic acids. To screen beta-amyloid aggregation inhibition of the products, thioflavinT assay was performed using A β 1-42 at 37°C for 26 h incubation, *in vitro*. From the result of screening, compound 8, 9, 11 and 12 showed effective activity about 65~85 μM as IC_{50} value. Among the prepared compounds, 4-[4-(benzyloxy)piperidino]butyl-4-chlorobenzoate (8) was the most effective inhibitor having IC_{50} of 65.4 μM .

Keywords □ Amyloid-beta aggregation inhibitor, Alzheimer's disease, piperidine derivatives, A β 1-42

현대사회는 인간 수명 연장으로 노인 인구의 증가와 더불어 퇴행성 뇌질환인 치매 환자의 비율이 급증하고 있다. 오늘날 알츠하이머병은 암, 심장질환, 뇌졸중에 이어 노인 사망의 네 번째 원인이 되었으며, 85세 이상 인구의 약 47%가 알츠하이머병 증상을 나타내고 있고, 국내환자 수는 약 28만 명인 것으로 알려져 있다. 또한, 조지타운대 고령화 사회 연구소는 알츠하이머 심장병, 암 치료에 들어가는 의료비 부담이 기하급수적으로 늘어날 것으로 내다봤다. 연구소는 특히 알츠하이머 병 환자의 수가 5년마다 두배 이상 급증해 2050년에는 1,400 만명에 이를 것으로 전망했다. 알츠하이머병은 1910년 독일의 신경병리학자인 Alois Alzheimer에 의해 발견되었고, 원인은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나 약 5%만이 유전적이며, 95%는 환경 및 복합적인 원인으로 발병하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 원인으로서는 amyloid precursor protein(APP), presenillin 1(PS1), presenillin 2(PS2)

유전자등의 변이로 인한 뇌의 기질적인 병변으로 신경세포나 조직이 파괴되어 중추신경계의 이상을 불러일으키는 신경퇴행성 질환으로 알려져 있다.^{2,3)} 알츠하이머병의 주요한 원인은 뇌신경 전달 물질인 acetylcholine의 뇌중 농도의 감소와 베타아밀로이드 단백질의 응집으로 인한 뇌세포의 퇴행으로 알려져 있다.^{4,5)} 중추신경계의 choline system 관련 신경전달물질들과 이들의 세포내 대사에 관여하는 효소 및 유전자들과 APP와 관련된 유전자 및 효소들의 대사는 상호 상관관계가 있을 것으로 예상되었고, 최근 문헌에 이들의 상호관계에 대한 연구결과가 보고되었다.⁶⁻¹⁰⁾ 현재까지 미국 식품의약품안전청으로부터 알츠하이머병 치료제로 승인받아 임상에서 사용되는 의약품은 모두 아세틸콜린 억제제로 tacrine(CognexTM),¹¹⁾ donepezil(AriceptTM),¹²⁾ rivastigmine(ExelonTM)¹³⁾ 등과 천연물 추출 성분인 galanthamine(ReminylTM)¹⁴⁾이 있다(Fig. 1).

그러나 신경병리학적인 연구에서 베타아밀로이드 펩티드가 알츠하이머병을 유발시키는 신경섬유종을 만드는 가장 주요한 물질임이 밝혀졌고, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 베타아밀로이드 펩티드는 38개에서 43개 정도의 아미노산으로 이루

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-290-1566 (팩스) 063-290-1567
(E-mail) yekwon@woosuk.ac.kr

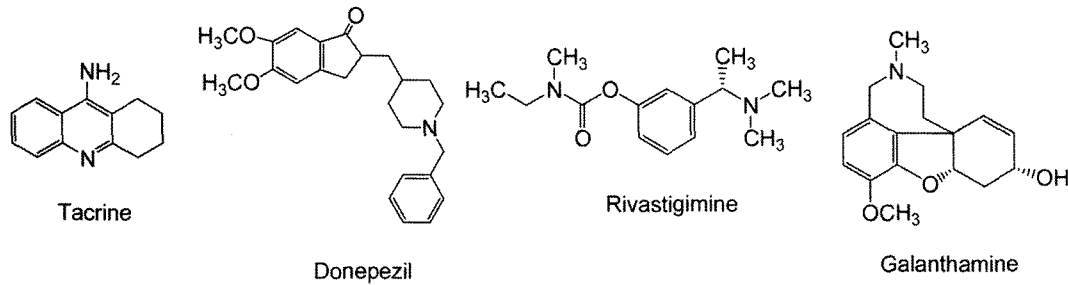


Fig. 1 - Structures of Acetylcholinesterase inhibitors as FDA approved Alzheimer's disease therapeutics.

어려있는데 특히 신경세포에 독성을 일으키는 것은 42개의 펩티드로 알려져 있다.¹⁵⁾ 특히, 뇌신경세포에서 베타아밀로이드 펩티드(Aβ1-42)가 과잉 생성되고 이들이 응집을 일으켜 계속 불용성 아밀로이드 덩어리를 형성하여 병변을 유발한다는 증거가 발견되면서 베타아밀로이드 펩티드 응집억제는 효과적인 새로운 치매치료제를 개발하는데 있어서 주요한 약물표적이 되었다.¹⁶⁾ 최근 베타아밀로이드펩티드의 beta-sheet 구조와 아밀로이드 섬유형성 및 약물과의 상관관계를 밝히기 위한 NMR연구^{17,18)}와 분자 모델링에 대한 연구^{19,20)}가 활발히 진행되고 있다. 이에 본 논문에서는 효과적인 베타아밀로이드 펩티드 억제제를 합성하기 위하여 분자설계와 합성을 하고, 베타아밀로이드 펩티드(Aβ1-42) 응집 억제능을 시험한 결과를 보고하고자 한다.

실험 방법

합성

일반적으로 사용한 시약과 용매는 특급이나 일급을 시약공급회사에서 구매하여 더 이상의 정제없이 사용하였다. 박층크로마토그래프(TLC)는 silica gel(Kieselgel 60F254, Merck)을 사용하였고, UV 광선(254 nm)하에서 확인하였다. 칼럼크로마토그래피는 silica gel(Kieselgel 60, 230~400 mesh, Merck)를 사용하였다. IR 스펙트라는 Jasco FT/IR-430 분광광도계로 측정하였으며 cm⁻¹로 표시하였다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트라는 Varian Gemini 300 MHz 또는 Bruker AMX 500 MHz 분광광도계를 이용하여 TMS를 내부표준물질로 하여 측정하였으며, 화학적 이동(chemical shift)은 δ 단위로 coupling constant는 Hz로 나타내었다.

tert-Butyl 4-hydroxypiperidine-1-carboxylate (2) - 4-Hydroxypiperidine 1(10.0 g, 98.86 mmol)을 THF(150 ml)에 녹이고, 0°C에서 냉각 후, triethylamine(13.8 ml, 118.63 mmol)과 di-tert-butyl dicarbonate(DIBOC, 25.8 g, 18.63 mmol)을 서서히 가하고 실온에서 약 1시간 교반하였다. 반응액에 증류수 30 ml를 가하여 반응을 종결하고, 빙욕상에서 염산으로 산성화하여 클로로포름 100 ml로 추출하였다. 클로로포름 층을 무수 Na₂SO₄로 탈수하고 감압농축 후, flash column chromatography

(CH₂Cl : CH₃OH=10 : 1)로 정제하여 황갈색 고형생성물 2 (16.52 g, 82.08 mmole)를 얻었다. yield : 83%. m.p.: 56~59°C. IR(KBr) : 3485, 2934, 1671, 1434, 1170 cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) : 1.52(s, 9H) 1.81~1.91(m, 4H) 2.95~3.08(m, 2H) 3.83~3.89(m, 3H). ¹³C-NMR(CDCl₃): 28.3 34.1 41.2 67.6 79.5 154.7.

tert-Butyl 4-(benzyloxy)piperidine-1-carboxylate (3) - 1,4-Dioxane 90 ml에 2(9.7 g, 26.4 mmol), Na₂CO₃(3.6 g, 34.38 mmol), benzylbromide(1.3 eq., 34.28 mmol)를 촉매인 KI(2 g, 12 mmol)와 함께 가하고, 이 혼합물을 10시간 환류 가열 후 반응액을 감압농축하여 이 액을 물 30 ml과 methylene chloride 100 ml로 추출하여 유기용매 층을 무수 Na₂SO₄로 탈수하고 감압농축 후, flash column chromatography(EtAc : Hexane=4 : 1)로 정제하여 황색의 액체 생성물 3(11.51 g, 39.5 mmol)을 얻었다. yield : 82%, IR(NaCl) : 3125, 1750, 1510, 1180, 1060 cm⁻¹. ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.53(s, 9H) 1.61~1.82(m, 2H) 3.04~3.17(m, 2H) 3.58(m, 1H) 3.67~3.79(m, 2H) 5.51(s, 1H) 7.21~7.38(m, 5H).

4-Benzyloxypiperidine (4) - 에탄올에 3(10 g, 34.32 mmol, 1 eq.)을 녹여, NaOH(1.37 g, 343.2 mmol, 10 eq.)을 가하고 6

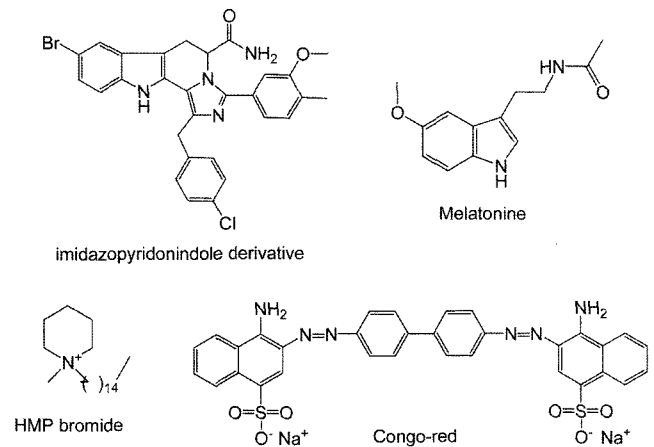


Fig. 2 - Structures of effective beta-amyloid fibril aggregation inhibitors in vitro.

시간 환류가열 후, 냉각하고 증류수 30 ml를 가하여 반응을 종결시킨 후 클로로포름 100 ml로 추출하고 유기용매 층을 Na₂SO₄로 탈수하고 감압농축하였다. 농축액을 flash column chromatography(EtAc : Hexane=4 : 1)로 정제하여 황색의 액상 생성물 **4** (5.2 g, 2.72 mmol)를 얻었다. yield : 80% ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.65~2.05(m, 4H) 3.04~3.12(m, 2H) 3.31~3.42(m, 2H) 3.45(m, 1H) 5.24(s, 1H) 7.28~7.36(m, 5H).

Ethyl 4-[4-(benzyloxy)piperidino]butanoate (5) - N,N-dimethylformamide 12 ml에 **4**(1.0 g, 5.23 mmol, 1 eq.)를 녹이고, NaHCO₃(1.32 g, 15.72 mmol, 3 eq.), ethyl-4-chlorobutyrate (1.18 g, 7.842 mmol)와 촉매로 KI(1 g, 6 mmol)를 가하여 4시간 환류가열하고, 냉각 후 반응액을 감압 농축하였다. 이를 클로로포름 50 ml로 추출하고 유기용매 층을 Na₂SO₄로 탈수하고 감압 농축하였다. 농축액을 flash column chromatography(CH₃Cl : CH₃OH=10 : 1)로 정제하여 미황색의 액상 생성물 **5**(1.31 g, 4.29 mmol)를 얻었다. yield : 82%; ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.22(t, J=16.8 Hz, 3H) 1.67~1.91(m, 6H) 2.09~2.19(m, 2H) 2.27~2.36(m, 4H) 2.78~2.81(m, 2H) 3.38~3.42(m, 1H) 4.10(q, J=16.8 Hz, 2H) 4.51(s, 2H) 7.23~7.34(m, 5H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]-1-butanol (6) - Ether 10 ml에 **5**(1.0 g, 3.27 mmol)를 녹이고, dry ice bath상에서 LiAlH₄ (0.25 g, 6.542 mmol)를 서서히 이 용액에 가하였다. 반응액을 실온에서 2시간 교반하고, 증류수를 가하여 반응을 종결 후 ether로 추출하고, 유기용매 층을 Na₂SO₄로 탈수하고 감압 농축하였다. 농축액을 flash column chromatography(CH₃Cl : CH₃OH=10 : 1)로 정제하여 미황색의 액상 생성물 **6**(0.71 g, 2.7 mmol)을 얻었다. yield : 83%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.62~1.76(m, 6H), 1.84~1.91(m, 2H), 2.21~2.31(m, 4H) 2.70~2.76(m, 2H) 3.42~3.56(m, 3H) 4.48(s, 2H) 7.19~7.30(m, 5 H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]butyl benzoate (7) - 클로로포름 14 ml에 **6**(0.3 g, 1.14 mmol)을 녹이고, benzoic acid(0.21 g, 1.72 mmol, 1.5 eq.), dimethylaminopyridine(DMAP) (0.51 g, 4.17 mmol 3 eq.)과 N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(0.3 g, 1.25 mmol, 1.1 eq.)을 가하고, 실온에서 2시간 교반 후 증류수를 가하여 반응을 종결시킨 후, 1M HCl로 액성을 산성으로 하고 클로로포름으로 추출한다. 유기 용매 층을 취하여 1M NaOH로 중화하고, Na₂SO₄로 탈수, 감압 농축한다. 농축액을 flash column chromatography(CH₃Cl : CH₃OH=10 : 1)로 정제하여 미황색의 액상 생성물 **7**(0.29 g, 0.79 mmol)을 얻었다. yield : 69%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.58~1.79(m, 6H) 1.88~1.96(m, 2H) 2.08~2.16(m, 2H) 2.35(t, J=15.2 Hz, 2H) 2.74~2.78(m, 2H) 3.36~3.44(m, 1H) 4.30(t, J=13.2 Hz, 2H) 4.51(s, 2H) 7.21~7.33(m, 5H) 7.38~7.45(m, 2H) 7.50~7.54(m, 1H) 8.01(d, J=9.6 Hz, 2H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]butyl 4-chlorobenzoate (8) - 클로로포름 30 ml에 **6**(0.8 g, 2.36 mmol), 4-chlorobenzoic acid (0.55 g, 3.53 mmol), DMAP(0.86 g, 7.03 mmol)와 N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (0.5 g, 2.08 mmol)을 가한 후 생성물 **7**과 유사한 방법으로 반응을 진행시켜 미황색 액상 생성물 **8**(0.74 g, 1.84 mmol)을 얻었다. yield : 61%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.68~1.94(m, 8H) 2.15~2.22(m, 2H) 2.40(t, J=14.7 Hz, 2H) 2.78~2.84(m, 2H) 3.42~3.46(m, 1H) 4.34(t, J=12.6 Hz, 2H) 4.56(s, 2H) 7.28~7.37(m, 5H) 7.42(d, J=8.4 Hz, 2H) 7.98(d, J=8.4 Hz, 2H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]butyl 4-fluorobenzoate (9) - 클로로포름 14 ml에 **6**(0.37 g, 1.40 mmol), 4-fluorobenzoic acid (0.3 g, 2.107 mmol), DMAP(0.51 g, 4.17 mmol), N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (0.3 g, 1.25 mmol)을 가한 후 생성물 **7**과 유사한 방법으로 반응을 진행시켜 미황색 액상 생성물 **9**(0.34 g, 0.88 mmol)를 얻었다. yield : 63%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.61~1.78(m, 6H) 1.84~1.90(m, 2H) 2.10~2.16(m, 2H) 2.34(t, J=15.2 Hz, 2H) 2.71~2.78(m, 2H) 3.38~3.44(m, 1H) 4.29(t, J=13.2 Hz, 2H) 4.51(s, 2H) 7.07(t, J=23.2 Hz, 2H) 7.21~7.34(m, 5H) 8.02(d, J=20.0 Hz, 2H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]butyl-4-nitrobenzoate (10) - 클로로포름 14 ml에 **6**(0.37 g, 1.40 mmol), 4-nitrobenzoic acid (0.35 g, 2.107 mmol), DMAP(0.51 g, 4.17 mmol), N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(0.3 g, 1.25 mmol)을 가한 후, 생성물 **7**과 유사한 방법으로 반응을 진행시켜 미황색 액상 생성물 **10**(0.3 g, 0.73 mmol)을 얻었다. yield : 64%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.64~1.91(m, 8H) 2.12~2.18(m, 2H) 2.40(t, J=14.9 Hz, 2H) 2.76~2.82(m, 2H) 3.42~3.48(m, 1H) 4.40(t, J=12.9 Hz, 2H) 4.55(s, 1H) 7.27~7.36(m, 5H) 8.21(d, J=10.7 Hz, 2H) 8.29(d, J=10.6 Hz, 2H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]butyl 4-(tert-butyl)benzoate (11) - 클로로포름 30 ml에 **6**(0.35 g, 1.33 mmol), 4-*tert*-butylbenzoic acid(0.36 g, 1.99 mmol), DMAP(0.49 g, 4 mmol), N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (0.28 g, 1.17 mmol)을 가하고, 생성물 **7**과 유사한 방법으로 반응을 진행시켜 미황색 액상 생성물 **11**(0.43 g, 1.02 mmol)을 얻었다. yield : 76%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.32(s, 9H) 1.64~1.78(m, 6H) 1.86~1.92(m, 2H) 2.08~2.14(m, 2H) 2.35(t, J=15.2 Hz, 2H) 2.72~2.77(m, 2H) 3.37~3.41(m, 1H) 4.29(t, J=12.8 Hz, 2H) 4.51(s, 2H) 7.23~7.36(m, 5H) 7.42(d, J=8.0 Hz, 2H) 7.94(d, J=8.0 Hz, 2H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]butyl 4-isopropylbenzoate (12) - 클로로포름 20 ml에 **6**(0.63 g, 2.392 mmol), 4-isopropyl-

benzoic acid(0.59 g, 3.588 mmol), DMAP(0.50 g, 4.1 mmol), N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (0.88 g, 3.68 mmol)을 가하고, 생성물 7과 유사한 방법으로 반응을 진행시켜 미황색 액상 생성물 12(0.63 g, 1.54 mmol)를 얻었다. yield : 64%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.24(d, J=8.2 Hz, 6H) 1.63~1.77(m, 6H) 1.80~1.94(m, 2H) 2.10~2.14(m, 2H) 2.39(t, J=14.9 Hz, 2H) 2.76~2.81(m, 2H) 2.90~2.97(m, 1H) 3.38~3.44(m, 1H) 4.33(t, J=12.7 Hz, 2H) 4.56(s, 2H) 7.29~7.37(m, 12H) 7.94(d, J=8.2 Hz, 2H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]butyl 3-chlorobenzoate (13) – 클로로포름 12 ml에 6(0.43 g, 1.633 mmol), 3-chlorobenzoic acid (0.38 g, 2.449 mmol), DMAP(0.60 g, 4.9 mmol), N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(0.34 g, 1.42 mmol)을 가하고, 생성물 7과 유사한 방법으로 반응을 진행시켜 미황색 액상 생성물 13(0.31 g, 0.77 mmol)을 얻었다. yield : 47%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.57~1.77(m, 6H) 1.89~1.96(m, 2H) 2.08~2.14(m, 2H) 2.31(t, J=14.8 Hz, 2H) 2.71~2.78(m, 2H) 3.36~3.42(m, 1H) 4.30(t, J=12.8 Hz, 2H) 4.51(s, 2H) 7.21~7.38(m, 6H) 7.48(d, J=8.0 Hz, 1H) 7.86(d, J=7.6 Hz, 1H) 7.94(s, 1H).

4-[4-(Benzyloxy)piperidino]butyl 3-fluorobenzoate (14) – 클로로포름 12 ml에 6(0.7 g, 2.658 mmol), 3-fluorobenzoic acid (0.56 g, 3.987 mmol), DMAP(0.97 g, 7.92 mmol), N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(0.56 g, 2.34

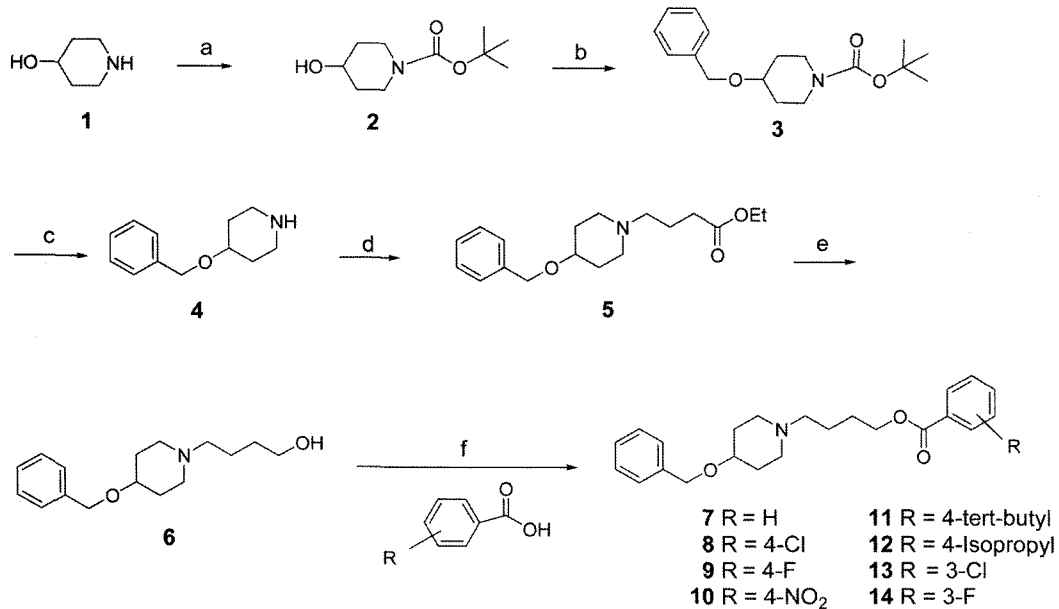
mmol)를 가하고, 생성물 7과 유사한 방법으로 반응을 진행시켜 미황색 액상 생성물 14(0.49 g, 1.27 mmol)를 얻었다. yield : 48%, ¹H-NMR(CDCl₃) : 1.64~1.79(m, 6H) 1.89~1.94(m, 2H) 2.08~2.17(m, 2H) 2.35(t, J=15.2 Hz, 2H) 2.73~2.84(m, 2H) 3.39~3.44(m, 1H) 4.31(t, J=12.8 Hz, 2H) 4.51(s, 2H) 7.24~7.66(m, 7H) 7.80(d, J=2.8 Hz, 1H) 7.79(d, J=3.2 Hz, 1H).

베타아밀로이드(Aβ1-42) 응집 저해효능 측정 실험

시약 및 기기 – 베타아밀로이드의 응집 정도를 측정하는데 사용한 베타아밀로이드(Aβ1-42)는 미국의 아메리칸 펩티드사 (American Peptide Co. USA)의 제품을, thioflavinT, phosphate buffered saline tablet, DMSO는 미국의 시그마 화학 회사의 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급의 시약을 사용하였다. 형광 분석분석기는 일본의 시마즈사(RF-5300PC, Shimadzu Corp.)의 기기를 사용하였다.

ThioflavinT assay – 베타아밀로이드의 응집 정도 측정은 형광 분석법을 이용하였다. 베타아밀로이드(Aβ1-42) 펩티드는 영하 80°C에서 보관하였으며, 측정 시 사용한 최종농도는 5 μM의 농도로 사용하였다. 합성된 화합물은 실험직전 99.5%의 DMSO에 녹여 원충용액으로 농도별로 희석하여 사용하였으며, 형광물질로 사용하는 5 μM의 thioflavinT는 0.01 M 인산소다완충용액에 녹여 제조하였다. Aβ1-42 응집억제 정도를 측정하기 위하여 0.01 M 인산소다완충용액 92.5 μl에 0.1, 1, 10, 100, 200 μM 농도로 각각 조제한 합성 화합물 5 μl씩 가하고, 5 μM Aβ1-42

Scheme^a



^a Reagents and conditions : (a) Et₃N, DIBOC, THF, 1h; (b) C₆H₅CH₂Br, Na₂CO₃, 1,4-Dioxan, 4h; (c) NaOH, EtOH, reflux, 6h; (d) NaHCO₃, KI (cat), Cl(CH₂)₃CO₂C₂H₅, DMF, reflux, 4h; (e) LAH, Ether, 2h (f) 4-dimethylaminopyridin, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, CHCl₃

Table I – Screening data of A β aggregation Inhibition (μ M, IC₅₀) by ThioflavinT assay

Compd.	Formula	M.W	A β aggregation inhibition (μ M, IC ₅₀)
Congo-red	C ₃₂ H ₂₂ N ₆ S ₂ Na ₂	696.66	1.65
7	C ₂₃ H ₂₉ NO ₃	367.48	105.32
8	C ₂₃ H ₂₈ ClNO ₃	401.93	65.4
9	C ₂₃ H ₂₈ FNO ₃	385.47	74.94
10	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₅	412.48	>150
11	C ₂₇ H ₃₇ NO ₃	423.59	78.5
12	C ₂₆ H ₃₅ NO ₃	409.56	85.92
13	C ₂₃ H ₂₈ ClNO ₃	401.93	>150
14	C ₂₃ H ₂₈ FNO ₃	385.47	>150
Tacrine	C ₁₃ H ₁₄ N ₂	198.27	>150
Donepezil	C ₂₄ H ₂₉ NO ₃	379.5	86.5

The each value of A β aggregation inhibition was from thioflavinT assay using fluorospectrometer. Each IC₅₀ values were calculated using quantal dose-response method.

2.5 μ M를 가한 뒤, 37°C에서 26시간 배양하여 응집시키고, 5 μ M thioflavinT 2,000 μ M를 가하여 형광 분광 분석기로 측정하였다. 동일한 실험을 적어도 3회 이상 반복하였다. 이때 사용한 형광 분광분석기의 파장 값은 Ex=446 nm (slit width=5 nm), Em=490 nm (slit width=10 nm) 이었으며, 응집 저해에 대한 IC₅₀ 값은 quantal-dose response 방법으로 계산하였다.

결과 및 고찰

아세틸콜린에스테라제 저해제의 경우 임상으로 사용되는 약물이 4개이며,¹¹⁻¹⁴⁾ 이외에도 연구개발 중인 신약후보물질들이 매우 많다.²¹⁾ 더구나, 최근 아세틸콜린에스테라제의 말단부위의 아미노산에 의하여 베타아밀로이드의 응집이 촉진된다는 연구결과가 보고되면서, 이들 약물에 대한 새로운 조명과 연구가 진행되고 있다.^{10,22)} 베타아밀로이드 펩티드(A β 1-40, A β 1-42)는 그 X-ray 결정 구조가 아직 밝혀지지 않았고, 응집 저해제에 대한 많은 연구가 진행 중이나 아직 임상 1상에 진입한 후보 신약이 없다. 베타아밀로이드 응집 저해능이 우수한 것으로 알려진 congo-red는 염료로 사용되는 화학물질로 분자량이 크고, 독성으로 인하여 의약품으로 사용되지는 못하나 현재까지 우수한 저해제가 없어 *in vitro* A β 1-40, A β 1-42 응집억제시험에서 비교대상 약물로 사용되고 있다.²³⁾ Congo-red 외에도 *in vitro*에서 A β 응집저해 효능이 있는 화합물들의 구조를 Fig. 2에 나타내었다. Imidazopyridonindole 유도체는 조합화학적으로 합성된 library들을 혼합하여 도출된 구조로 A β 25-35 응집억제에 대한 IC₅₀ 값이 42 \pm 7 μ M로 보고되었고, melatonin은 A β 1-40와 A β 1-42 두 펩티드 모두에 대한 응집억제능이, HMP bromide는 A β 1-40이 보고되었다.²³⁾ 이에 저자는 A β 1-42가 병풍구조를 이루어 이중체가 되고, 이중체가 사중체, 팔중체로 계속 응집이 일어나는 것을 저

해하기 위하여는 구조적으로 평면으로 펼쳐진 것보다 선형이면서 유연성을 가진 구조가 더 유리할 것으로 판단하였다. 또한, 아미노산의 방향족 잔기들과 pi-pi 상호작용을 할 수 있는 방향족기의 도입을 고려하였고, 전자를 방출할 수 있는 작용기를 고려하였다. 따라서 piperidine 고리와 benzy기를 ether 형태로 연결하였고, piperidine에 탄소사슬을 연결하고 혈액뇌관문 통과나 베타아밀로이드의 아미노산 잔기와 결합이 유리하도록 arylester 결합을 고려하여 화합물을 설계하였다. Scheme에 나타난 대로 출발물질로 hydroxy piperidine을 사용하여 triethylamine 존재 하에 DIBOC을 반응시켜 piperidine의 아민기를 보호하고, benzyl bromide와 SN1 반응으로 benzyl piperidinyl ether를 합성하였다. 가수분해하여 보호기를 이탈시켜 아민기를 복구한 후 ethyl-4-chlorobutyrate를 작용하여 ester를 합성하였다. 합성된 ester를 LiAlH₄로 hydride reduction을 하여 alcohol로 만든 후 이 alcohol에 meta 또는 para 위치에 halogen이나 니트로기가 있는 benzoic acid 유도체들을 축합하여 benzyl piperidinyl ether 최종 생성물 8개를 합성하였다. 합성된 8개 물질에 대한 베타아밀로이드 응집 억제능을 시험하기 위하여 thioflavinT assay를 실시하였으며, 이때 베타아밀로이드 펩타드는 A β 1-42를 사용하였다. 그 이유는 A β 1-42의 응집이 A β 1-40이 응집될 때보다 신경세포에 대한 독성이 더 큰 것으로 보고되어 있기 때문이다. 8개 물질에 대한 thioflavinT assay 결과 화합물 8, 9, 11과 12에서 약 65~85 μ M 정도의 IC₅₀ 값이 나타났다. 이 효능 검색 결과는 합성된 화합물들이 어느 정도의 베타아밀로이드 응집 억제효과가 있기는 하나 아주 우수한 효능을 가진 것은 아니다. 구조-활성 상관관계를 살펴보면, ester로 연결된 benzoate기의 para 위치에 halogen이나 bulky한 alkyl기가 치환되었을 때 더 효능을 보여주었으며, 그 중 가장 효능이 좋은 화합물은 IC₅₀ 65.4 μ M로 4-[4-(benzyloxy)piperidino]butyl 4-chlorobenzoate(8)로 나타났다. 이 값은 비록 매우 우수한 억제능은 아니나 이를 토대로 구조적으로 좀 더 다양한 설계를 통한 합성을 시도할 필요가 있다고 사료된다.

문 헌

- 1) Khachaturian, Z. S. : Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **42**, 1097 (1985).
- 2) Selkoe, D. J. : Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23 (1999).
- 3) Hollander, E., Mohs, R. C. and Davis, K. L. : Cholinergic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. *Br. Med. Bull.* **142**, 97 (1986).
- 4) Pietrzik, C. and Behl, C. : Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanisms and clinical application. *Int. J. Exp. Pathol.* **86**, 173 (2005).

- 5) Silverberg, G. D., Mayo, M., Saul, T., Carvalho, J. and McGuire, D. : Novel ventriculo-peritoneal shunt in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers. *Expert. Rev. Neurother.* **4**, 97 (2004).
- 6) Cottingham, M. G., Voskuil, J. L. and Vaux, D. J. : The intact human acetylcholinesterase C-terminal oligomerization domain is alpha-helical in situ and in isolation, but a shorter fragment forms beta-sheet-rich amyloid fibrils and protofibrillar oligomers. *Biochemistry* **42**, 10863 (2003).
- 7) Prous, J., Rabasseda, X. and Castaner, J. : SDZ-ENA-713 cognition enhancer acetylcholinesterase inhibitor. *Drugs Future* **19**, 656 (1996).
- 8) Lilienfeld, S. : Galantamine - a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* **8**, 159 (2002).
- 9) Cottingham, M. G., Hollinshead, M. S. and Vaux, D. J. : Amyloid fibril formation by a synthetic peptide from a region of human acetylcholinesterase that is homologous to the Alzheimer's amyloid-beta peptide. *Biochemistry* **41**, 13539 (2002).
- 10) De Ferrari, G. V., Canales, M. A., Shin, I., Weiner, L. M., Silman, I. and Inestrosa, N. C. : A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* **40**, 10447 (2001).
- 11) Kurz, A. : The therapeutic potential of tacrine. *J. Neural Transm. Suppl.* **54**, 295 (1998).
- 12) Sugimoto, H. : Donepezil hydrochloride: a treatment drug for Alzheimer's disease. *Chem. Rec.* **1**, 63 (2001).
- 13) Jann, M. W. : Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* **20**, 1 (2000).
- 14) Zarotsky, V., Sramek, J. J. and Cutler, N. R. : Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **60**, 446 (2003).
- 15) Barril, X., Orozco, M. and Luque, F. J. : Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: a structural and computational approach. *Mini. Rev. Med. Chem.* **1**, 255 (2001).
- 16) Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., Krafft, G. A. and Klein, W. L. : Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A-beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10417 (2003).
- 17) Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F. and Tycko, R. : A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16742 (2002).
- 18) Luhrs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D. and Riek, R. : 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17342 (2005).
- 19) Massi, F. and Straub, J. E. : Structural and dynamical analysis of the hydration of the Alzheimer's beta-amyloid peptide. *J. Comput. Chem.* **24**, 143 (2003).
- 20) Santini, S., Mousseau, N. and Derreumaux, P. : In silico assembly of Alzheimer's Abeta16-22 peptide into beta-sheets. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11509 (2004).
- 21) Greig, N. H., Sambamurti, K., Yu, Q. S., Brossi, A., Bruinsma, G. B. and Lahiri, D. K. : An overview of phenserine tartrate, a novel acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2**, 281 (2005).
- 22) Clarimon, J., Bertranpetit, J., Calafell, F., Boada, M., Tarraga, L. and Comas, D. : Association study between Alzheimer's disease and genes involved in Abeta biosynthesis, aggregation and degradation: suggestive results with BACE1. *J. Neurol.* **250**, 956 (2003).
- 23) Patrice, T. : β -Amyloid aggregation inhibitors for Treatment of Alzheimer's disease: Dream or Reality? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **1**, 175 (2001).