

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 11 월 5 일 (05.11.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/167246 A1

- (51) 국제특허분류:
C07D 209/20 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004303
- (22) 국제출원일: 2015 년 4 월 29 일 (29.04.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0052583 2014 년 4 월 30 일 (30.04.2014) KR
- (71) 출원인: 세종대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIA COOPERATION GROUP OF SEJONG UNIVERSITY) [KR/KR]; 143-747 서울시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김양희 (KIM, Yang Hee); 143-758 서울시 광진구 아차산로 262, (자양동, 더샵스타시티아파트) 에이동 3006 호, Seoul (KR). 박황서 (PARK, Hwang Seo); 143-768 서울시 광진구 아차산로 69 길 19 (광장동, 현대아파트) 901 동 502 호, Seoul (KR). 엄재원 (EOM, Jae Won); 471-706 경기도 구리시 장자대로 37 번길 55 (교문동, 덕현아파트) 107 동 1702 호, Gyeonggi-do (KR). 고재영 (KOH, Jae Young); 135-884 서울시 강남구 광평로 51 길 22 (수서동, 한아름아파트) 101 동 1206

호, Seoul (KR). 김태윤 (KIM, Tae Youn); 143-836 서울시 광진구 광나루로 30 나길 22 (구의동, 현대하이츠빌라) 302 호, Seoul (KR). 서보라 (SEO, Bo Ra); 138-879 서울시 송파구 토성로 17 길 8 (풍납동) 303 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 한윤호 (HAN, Yun Ho); 137-876 서울시 서초구 사임당로 28 나이스빌딩 2층 올민국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

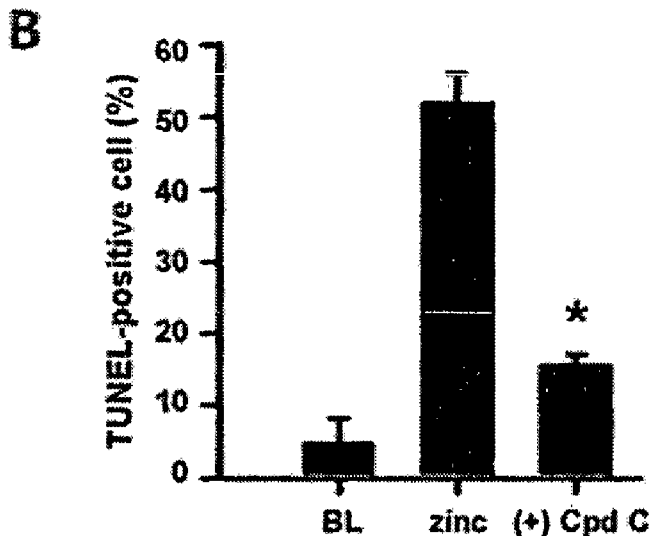
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING STROKE ON BASIS OF AMPK SUPPRESSION FUNCTION

(54) 발명의 명칭 : A M P K 억제기능에 기반한 뇌졸중 치료용 약학적 조성물 및 방법

[도 1]



(57) Abstract: The present invention provides a new composition for treating stroke which treats stroke by processing a new compound which inhibits AMPK activity of zinc neurotoxicity, which is a major cause of stroke.

(57) 요약서: 본 발명은 뇌졸중의 주요 원인인 아연신경독성의 AMPK 활성을 억제하는 새로운 화합물을 처리하여 뇌졸중 치료하는 새로운 뇌졸중 치료용 조성물을 제공한다.

WO 2015/167246 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, **공개:**
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: AMPK 억제기능에 기반한 뇌졸중 치료용 약학적 조성물 및 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 뇌졸중 치료용 약학적 조성물 및 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 AMPK 억제기능에 기반한 새로운 뇌졸중 치료용 약학적 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 뇌졸중(stroke)은 뇌혈류 이상으로 인해 갑작스레 유발된 국소적인 신경학적 증상을 통칭하는 말이다. 뇌는 몸 전체에서 무게로는 체중의 2%만 차지하지만, 뇌로 가는 혈류량은 심박출량의 15%, 산소 소모량은 몸 전체 산소 소모량의 20%나 된다. 게다가 뇌는 에너지원으로 포도당만을 사용하므로 에너지 공급이 잠시만 중단되어도 쉽게 괴사가 일어난다. 따라서 뇌혈류의 이상은 뇌손상과 밀접한 관련이 있다. 뇌졸중에 의한 뇌손상은 흥분독성(excitotoxicity), 산화성손상(oxidative stress), 아폽토시스(apoptosis) 및 아연독성(zinc neurotoxicity) 등의 다양한 독성기전을 포함하고 있어 뇌손상을 막기 위해서는 다양한 신경독성에 모두 효과적인 약물의 발굴이 필요하다.
- [3] 현재, 뇌졸중 치료를 위한 많은 연구가 진행되었으나 아직까지 뚜렷한 치료제 개발이 되고 있지 않다. 뇌허혈-재관류 손상은 여러 가지 복잡한 신경세포사 기전에 입각한 약물 개발 및 효과 평가를 위해 시험관내 모델이나 동물 모델과 같은 객관적인 평가 시스템이 필요하나 약물치료에 다른 생체 징후의 변화나 부작용을 평가할 수 있는 방법이 전임상 연구에서는 매우 제한적이어서 임상 시험 시 부작용으로 인한 실패를 초래할 가능성이 높다. 특히 NMDA 길항제(antagonist)를 중심으로 많은 임상연구들이 진행되었으나 모두 실패하였다.
- [4] 대한민국 공개특허 제1283416호는 AMPK 저해제 화합물 C 또는 FAS 저해제 C75를 허혈성 마우스에 투여하여 경색부의 크기를 유의하게 감소시켜 뇌졸중 또는 허혈성 상해 후 기능이 보존 되게 하는 신경보호 방법에 대해 개시하고 있다.

발명의 상세한 설명

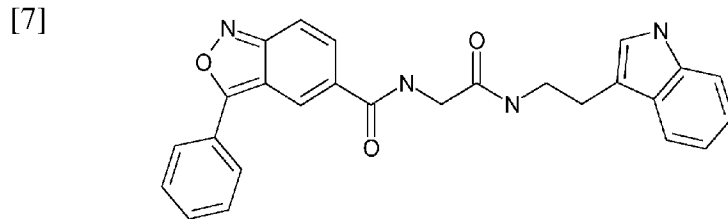
기술적 과제

- [5] 그러나, 상기 선행기술의 경우 허혈 모델 동물에 대하여만 뇌신경보호 효과를 입증한 것으로서 허혈이 아닌 다른 기전에 의한 뇌졸중에 대한 치료효과까지 보증하는 것은 아니다. 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 다양한 기전에 의한 뇌졸중에 효과적인 AMPK 억제기능에 기반한 새로운 뇌졸중 치료제를 제공하는 것을 목적으로

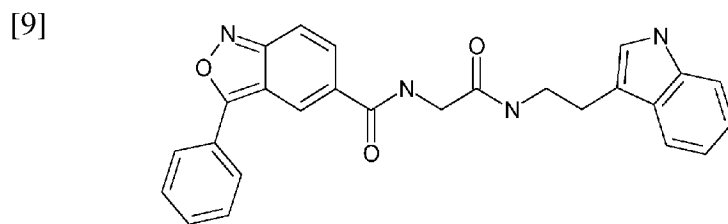
한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

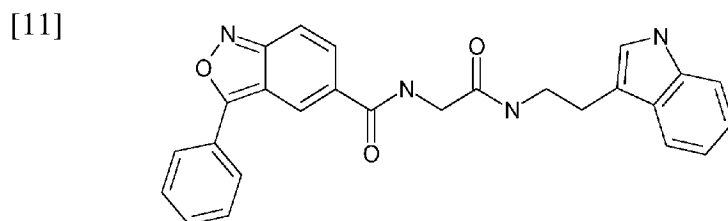
- [6] 본 발명의 일관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 치료용 약학적 조성물이 제공된다:



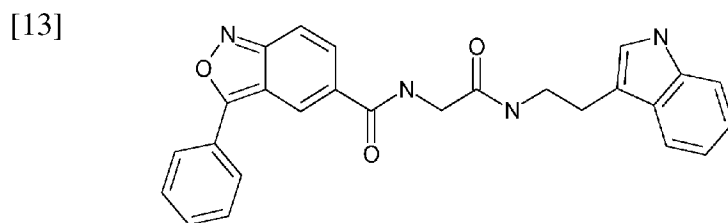
- [8] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 의약으로 사용되기 위한 하기 구조식을 갖는 화합물이 제공된다:



- [10] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 뇌졸중의 치료에 사용되기 위한 하기 구조식을 갖는 화합물이 제공된다:



- [12] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 뇌졸중에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌졸중의 치료방법이 제공된다:



발명의 효과

- [14] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 뇌졸중의 주요 원인인 아연신경독성의 AMPK 활성을 억제하는 새로운 화합물을 처리하여 뇌졸중 치료효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 신경독성이 증가되었음을 TUNEL 염색으로 확인한 사진(A)과 AMPK 억제제인 Compound C (+Cpd C) 처리 후 세포독성 정도를 TUNEL 염색과 LDH assay를 통해 정량화한 그래프이다(B 및 C).
- [16] 도 2는 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 AMPK 활성이 증가됨을 확인한 Western blot 사진(A)과 enzyme activity assay(B) 그래프이다.
- [17] 도 3은 배양된 대뇌피질 신경세포에 아연처리 후 아폽토시스 촉진 유전자인 Bim의 발현증가와 caspase-3 활성을 관찰한 Western blot 사진(A)과 AMPK 억제제인 Compound C (+Cpd C) 처리 후 Bim 발현증가와 caspase-3 활성이 모두 감소된 것을 확인한 Western blot 사진(B)이다.
- [18] 도 4는 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)와 recombinant AMPK ($\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$; CycLex, Japan)를 구입하여 효소활성을 측정하고 compound C 효과와 비교하여 비슷하거나 좀 더 강한 억제효과를 나타내는 40개의 후보 화합물을 선별한 그래프이다.
- [19] 도 5는 배양된 대뇌피질 신경세포에 다양한 신경독성을 유발한 뒤, 선별된 7개의 화합물을 처리하고 아폽토시스 정도를 LDH assay를 통해 정량화하여 아폽토시스 억제 여부를 관찰한 그래프이다.
- [20] 도 6은 뇌졸중 동물모델에 최종 선별된 약물 #35를 뇌실내투여하여 뇌손상 억제효과를 관찰한 그래프와 실험동물의 뇌손상 정도를 대조군과 비교한 뇌조직절편을 촬영한 사진이다.
- [21] 도 7은 뇌졸중 동물모델에 최종 선별된 약물 #35를 정맥투여하여 뇌손상 억제효과를 관찰한 그래프와 실험동물의 뇌손상 정도를 대조군과 비교한 뇌조직절편을 촬영한 사진이다.
- [22] 도 8은 최종 선별된 약물 #35를 랫트에 투여하고 비장(A), 간(B) 및 신장(C)을 적출하여 급성 독성 테스트 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [23] 용어의 정의:

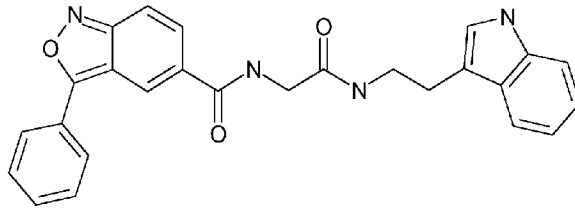
- [24] 본 문서에서 사용되는 "AMPK(AMP-activated protein kinase)"는 촉매 α 서브유닛($\alpha 1$ 또는 $\alpha 2$), 및 2개의 조절 서브유닛(β 및 γ)으로 구성된 헤테로삼량체 단백질이다. AMPK는 세포 에너지 수준이 낮을 때 인산화되고 활성화되며 다시 세포 대사 작용을 조절하여 유전자 발현을 장기간에 걸쳐 조절하여 ATP의 수준을 회복한다. AMP/ATP 비의 증가, 세포 pH 및 산화 환원 상태의 변화 및 크레아틴/포스포크레아틴 비의 증가가 AMPK를 활성화시키는 것으로 공지되어 있다.

- [25] 발명의 상세한 설명:

- [26] 본 발명의 일 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로

함유하는 뇌졸중 치료용 약학적 조성물이 제공된다:

[27]



[28]

상기 화합물 IUPAC 명칭은 N-[2-[2-(1H-indol-3-yl)ethylamino]-2-oxoethyl]-3-phenyl-2,1-benzoxazole-5-carboxamide으로서, 상기 화합물은 AMPK(AMP-activated protein kinase) 효소 활성을 억제하여 신정보호 효과를 제공하며, 상기 AMPK 효소는 $\alpha 2$ 서브유닛이 키나아제 효소활성 가지고 있다.

[29]

상기 뇌졸중은 출혈성(hemorrhagic) 뇌졸중, 허혈성(ischemic) 뇌졸중 및 금속 독성(metal toxicity) 뇌졸중일 수 있다.

[30]

상기 금속은 납(lead), 수은(mercury), 망간(manganese), 비소(arsenic), 탈륨(thallium), 철(iron), 아연(zinc), 카드뮴(cadmium), 비스무스(bismuth) 또는 주석(tin)일 수 있다.

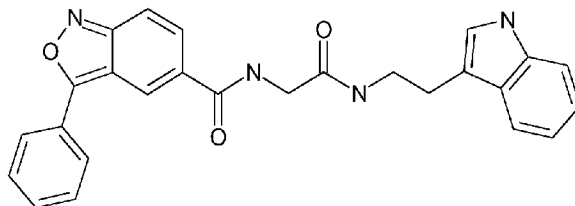
[31]

상기 허혈성 뇌졸중은 흥분성 신경세포사 또는 산화성 신경세포사에 의해 유발되는 뇌졸중일 수 있다. 지금까지 가장 널리 알려진 뇌허혈에 의한 신경세포사 기전으로는 2가지가 있다. 하나는 뇌허혈에 의해서 세포바깥에 과도한 글루타메이트(glutamate)가 축적되게 되며, 이러한 글루타메이트가 세포 내로 유입되어 결국 과도한 세포 내 칼슘의 축적으로 신경세포사가 유발된다는 흥분성 신경세포사 기전(Kang, T. C. *et al.*, *J. Neurocytol.*, 30: 945-955, 2001)이고, 다른 하나는 허혈-재관류시에 갑작스러운 산소 공급으로 인한 생체 내 라디칼의 증가로 인해 DNA 및 세포질에 손상을 입어 유발된다는 산화성 신경세포사이다(Won, M. H. *et al.*, *BrainRes.*, 836: 70-78, 1999; Sub, A. Y. and Chen, Y. M., *J. Biomed. Sci.*, 5: 401-414, 1998; Flowers, F. and Zimmerman, J. J., *New Horiz.* 6: 169-180, 1998).

[32]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 의약으로 사용되기 위한 하기 구조식을 갖는 화합물이 제공된다:

[33]



[34]

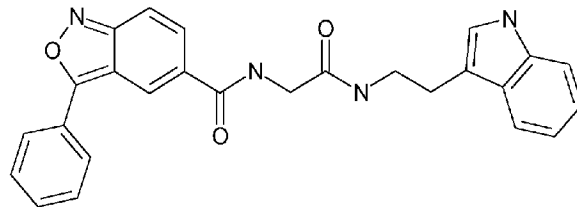
본 발명에서 사용된 상기 화합물은 그 구조는 공지되어 있으나, 그의 특별한 의약적 용도가 알려진 바 없어, 본 발명이 상기 화합물의 의약으로서의 용도로서는 최초의 것이다. 본 발명자들은 상기 화합물이 납(lead),

수은(mercury), 망간(manganese), 비소(arsenic), 탈륨(thallium), 철(iron), 아연(zinc), 카드뮴(cadmium), 비스무스(bismuth) 및 주석(tin) 등의 각종 금속에 의한 신경독성에 의해 유발되는 뇌졸중은 물론 다양한 신경독성에 의해 유발되는 뇌졸중의 치료에 효과적임을 입증함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[35] 따라서, 상기 화합물에 있어서, 상기 의약은 뇌졸중의 치료에 사용되는 것일 수 있다.

[36] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 하기 구조식을 갖는 화합물을 뇌졸중에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌졸중의 치료방법이 제공된다:

[37]



[38] 상기 투여는 경구 투여 또는 정맥내 주입, 피하주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내 주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 경피흡수로 구성되는 군으로부터 선택되는 비경구 투여일 수 있다.

[39] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물의 유효량은 환자의 환부의 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, 0.01 μ g/kg/day 내지 10 mg/kg/day일 수 있다. 상기 1일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일 간격으로 간헐 투여해도 된다.

[40] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1-100 중량%로 함유될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다.

[41] 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(cornstarch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 덱스트린, 카올린, 탄산칼슘 및 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스(tragacanth), 젤라틴, 셀락(shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 덱스트린 및 펙틴(pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의, 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제,

항산화제 등을 첨가할 수 있다.

- [42] 본 발명의 약학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며(예: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 최신판; Mack Publishing Company, Easton PA), 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042(Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기술되어 있다.
- [43] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은 경구 또는 비경구로 투여되는 것이 가능하며, 바람직하게는 비경구 투여로 정맥내 주입, 피하 주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내 주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.
- [44] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물의 유효량은 환자의 환부의 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, 0.01 μ g/kg/day 내지 10 mg/kg/day일 수 있다. 상기 1일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일 간격으로 간헐 투여해도 된다.
- [45] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1-100 중량%로 함유될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다.
- [46] 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(cornstarch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 덱스트린, 카올린, 탄산칼슘 및 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스(tragacanth), 젤라틴, 셀락(shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 덱스트린 및 펙틴(pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의, 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수 있다.
- [47] 본 발명의 약학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며(예: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 최신판; Mack Publishing Company, Easton PA), 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing

Company, Easton, Pennsylvania 18042(Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기술되어 있다.

- [48] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물은 경구 또는 비경구로 투여되는 것이 가능하며, 바람직하게는 비경구 투여로 정맥내 주입, 피하 주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내 주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [49] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[50] 일반적 방법

[51] 대뇌피질 신경세포(Cerebral Cortex Neurons) 배양

- [52] 본 발명에서 사용한 마우스 대뇌피질 신경세포는 마우스 배아의 뇌로부터 추출 배양하여 5% 우태아혈청(FBS)과 5% 마혈청(HS)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, US)을 이용하여 95% 습도, 5% CO₂ 및 37°C 온도 조건에서 배양하였다. 상기 세포의 활성화와 분화를 위해 24-well 조직 배양 플레이트에서 2 x 10⁴ 세포의 밀도로 증식하였고 아연 및 화합물을 처리하기 전에는 FBS와 HS가 없는 DMEM 배지에서 배양하였다.

[53] 실시예 1: AMPK 억제제에 의한 세포독성 감소확인

- [54] 아연독성(Zinc toxicity)은 뇌졸중의 대표적인 원인기전 중 하나로서, 상기 배양된 대뇌피질 신경세포에서 유발된 아연독성이 AMPK 억제제 처리에 따른 독성 감소여부를 확인하였다.
- [55] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 배양된 대뇌피질 신경세포에 300 μ M의 아연(ZnCl₂)을 10분간 처리한 후 제거하고 10시간 후에 세포독성(Cytotoxicity)을 TUNEL 염색 또는 LDH(Lactate Dehydrogenase) 분석을 통해 관찰하였다. 또한 상기 세포에 AMPK 억제제인 Compound C(+Cpd C, Tocris)를 20 μ M로 처리한 후 신경독성 감소를 관찰하였다.
- [56] 그 결과, 대뇌피질 신경세포에 아연 처리 후 신경독성이 증가되었음을 TUNEL 염색으로 확인하였고(도 1A) 세포독성 정도를 TUNEL 염색과 LDH 분석을 통해 정량화하고 AMPK 억제제인 Compound C(+Cpd C) 처리에 의해 아연신경독성이 현저히 감소했음을 확인하였다(도 1B 및 1C).

[57] 실시예 2: 아연처리 후 AMPK 활성 관찰

- [58] 아연독성과 AMPK 효소 활성간의 상관관계를 파악하고자 대뇌피질 신경세포에 아연 처리 후 AMPK 활성을 웨스턴 블랏과 효소활성 분석을 통해 관찰하였다.

[59] **2-1: 웨스턴 블랏(Western blot)**

[60] 배양된 대뇌피질 신경세포에 300 μ M의 아연(ZnCl_2)을 10분간 처리한 후 제거하고 0.5, 1, 2, 4, 6시간 후에 상기 세포 샘플을 단백질 레더와 함께 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하고 단백질 크기에 따라 분리하였다. 그 후, 항체를 처리하고 세척한 뒤 관독하였다.

[61] 그 결과, 아연처리 후 30분 후부터 AMPK alpha-1과 alpha-2의 트레오닌 잔기(threonine residue)에 인산화됨이 관찰되었는데 이는 AMPK 활성화(phosphorylated AMPK)을 의미한다. 그러나 다른 세린 잔기(serine residue)의 인산화는 관찰되지 않았다(도 2A).

[62] **2-2: 효소활성 분석(enzyme activity assay)**

[63] 대뇌피질 신경세포에 상기와 같은 조건으로 아연을 처리한 후 0.5, 1, 2, 4 및 6시간 경과에 따라 각각 단백질 추출물을 얻어 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)를 이용하여 효소활성을 측정하였다.

[64] 그 결과, 아연 처리에 따른 AMPK 효소의 활성화는 시간 의존적(Time-dependent)으로 증가하는 것을 관찰하였다(도 2B).

[65] **실시예 3: AMPK 활성억제를 통한 아연독성 억제**

[66] 대뇌피질 신경세포에 아연을 처리하여 AMPK 효소 활성화가 증가하는 것이 세포사멸(apoptosis)과 관련이 있는지 관찰하였다.

[67] 구체적으로, 대뇌피질 신경세포에 300 μ M의 아연(ZnCl_2)을 2, 3, 4, 5 및 6시간 동안 처리하여 아연독성을 유발하였다. 상기 각 샘플의 단백질을 분리하여 웨스턴 블랏을 실시하였고 AMPK 억제제인 Compound C(+Cpd C)를 20 μ M로 처리하여 아연독성과 아포토시스와의 관계를 확인하였다.

[68] 그 결과, 아연 처리 후 3시간 이후부터 BH3-only Bcl family 중에 하나인 아포토시스 촉진 단백질(pro-apoptotic protein)인 Bim의 발현 증가가 관찰되었고 caspase-3 활성화도 관찰할 수 있었다(도 3A). 그러나 아연독성에 의한 Bim의 증가와 caspase-3 활성화 증가가 AMPK 억제제인 compound C 처리에 의해 모두 감소된 것을 확인하였다(도 3B). 그러므로 AMPK 효소는 아연독성 기전에서 아포토시스(apoptosis)와 관련되어 있으며 AMPK 효소의 활성억제는 아연독성에 의한 아포토시스를 억제하는 것을 의미한다.

[69] **실시예 4: AMPK 활성억제 화합물 스크리닝 및 억제효과 확인**

[70] **4-1: 구조기반 가상 스크리닝(Structure-based virtual screening)**

[71] AMPK 활성억제제로 작용할 가능성이 있는 화합물을 대상으로 1차 스크리닝을 실시하였다.

[72] 구체적으로, 상기 선행연구를 통해 AMPK 활성화가 아연독성 기전에 관련되어 있음을 확인하였고, 다른 연구논문에서도 흥분독성 기전에서 AMPK 활성화 및 Bim 발현 증가가 보고되었다. AMPK 효소는 α , β 및 γ 3개의 서브유닛이 복합구조를 이루어 작용하는 효소로, 이중 α 서브유닛이 키나아제 효소활성을 가지고 있다. 기존의 연구결과에서 AMPK α 2가 α 1과 달리

넉-아웃 마우스(knock-out mice)에서 허혈(ischemia)에 의한 신경독성을 현저히 억제한다고 보고하였다. 따라서 본 발명은 $\alpha 2$ 를 타겟으로 하여 AMPK 효소활성을 억제할 가능성이 있는 후보 케미컬(chemicals)을 구조기반 가상 스크리닝(Structure-based virtual screening)을 통해 선별하였고 결론적으로 208개의 후보 화합물이 선별되었다.

[73] **4-2: AMPK 효소활성 분석(AMPK enzyme activity assay)**

[74] 상기 실시예 4-1에서 선별된 화합물 208개를 화합물 라이브러리 제조회사(Interbioscreen, Russia)로부터 입수하여 이들의 AMPK 효소활성 억제효과 관찰을 통해 2차 스크리닝을 실시하였다.

[75] 구체적으로, AMPK 효소활성은 AMPK activity assay kit(CycLex, Japan)와 recombinant AMPK($\alpha 2/\beta 1/\gamma 1$; CycLex, Japan)를 이용하여 측정하였다. 상기 선별된 208개의 화합물과 기존에 잘 알려진 AMPK 억제제 compound C의 AMPK 효소활성 억제 효과를 측정한 결과, 40개의 약물이 10 μ M에서 compound C와 비슷하거나 더 좋은 억제효과를 나타내는 것을 확인하였다(표 1). 상기 40개의 약물을 하기 표 1에 표시하였다.

[76] 표 1

[표 1]

Compound ID	Mean(% remaining activity)	SEM	Compound ID	Mean(% remaining activity)	SEM
#1	-1.2626	1.768	#22	-0.5291	0.000
#2	-1.7934	0.072	#23	1.0582	0.000
#3	-0.9684	0.036	#24	5.0505	5.051
#4	5.5556	0.265	#25	-0.1793	0.538
#5	4.2328	0.529	#26	-1.2554	0.036
#6	2.3810	0.794	#27	5.8201	0.000
#7	3.4392	0.265	#28	3.9683	1.852
#8	-0.2152	0.215	#29	0.0000	0.000
#9	0.5739	0.359	#30	1.0000	0.667
#10	-0.3945	0.179	#31	0.3641	0.850
#11	5.2910	0.529	#32	0.1257	0.126
#12	-1.3245	0.662	#33	2.9801	2.980
#13	-0.9684	0.681	#34	0.3143	0.566
#14	-0.1435	0.000	#35	0.1214	0.121
#15	5.0265	0.265	#36	0.2514	0.126
#16	6.3492	0.529	#37	7.3333	1.000
#17	2.9101	0.265	#38	5.6667	4.667
#18	2.9053	0.681	#39	1.667	3.333
#19	4.3400	1.614	#40	3.6667	0.000
#20	-1.7575	0.036	Compound C	5.3000	0.760
#21	0.8967	0.251			

[77] **4-3: 아연독성 억제효과 관찰**

[78] 상기 실시예 4-2에서 선별된 화합물 40 개의 아연 신경독성 억제효과 관찰을 통해 3차 스크리닝을 실시하였다.

[79] 구체적으로, 배양된 마우스의 대뇌피질 신경세포에 400 μ M의 아연을 10분간 처리하고 제거한 후 12시간이 경과한 시점에서 상기 선별한 40개의 약물들을 각각 아연과 함께 처리하여 신경보호효과를 관찰하였다. 상기 세포의 사멸

- 정도는 LDH 분석을 통해 정량화하였는데 각각의 효과를 평균하여 수치로 나타내었고 선별된 각각의 약물들에 대해 별도의 실험을 4회 수행하였다(도 4).
- [80] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 일부 화합물은 아연독성에 의한 세포사멸을 억제하였는데, 표 2에 나타난 바와 같이 이 중 7개의 화합물(#6, #11, #14, #17, #28, #35 및 #37)이 아연독성을 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다.
- [81] 상기 실시예 4-2에서 선별된 화합물 40 개의 아연 신경독성 억제효과 관찰을 통해 3차 스크리닝을 실시하였다.
- [82] 구체적으로, 배양된 마우스의 대뇌피질 신경세포에 400 μ M의 아연을 10분간 처리하고 제거한 후 12시간이 경과한 시점에서 상기 선별한 40개의 약물들을 각각 아연과 함께 처리하여 신경보호효과를 관찰하였다. 상기 세포의 사멸 정도는 LDH 분석을 통해 정량화하였는데 각각의 효과를 평균하여 수치로 나타내었고 선별된 각각의 약물들에 대해 별도의 실험을 4회 수행하였다(도 4).
- [83] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 일부 화합물은 아연독성에 의한 세포사멸을 억제하였는데, 표 2에 나타난 바와 같이 이 중 7개의 화합물(#6, #11, #14, #17, #28, #35 및 #37)이 아연독성을 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다.
- [84] 표 2

[표2]

Compound ID	유의성	Compound ID	유의성
#1	0.5487	#22	0.0200
#2	0.8483	#23	0.8757
#3	0.5597	#24	0.8699
#4	0.0283	#25	0.4870
#5	0.9326	#26	0.6624
#6	0.0278	#27	0.3030
#7	0.0003	#28	0.0008
#8	0.0001	#29	0.1137
#9	0.8649	#30	0.2142
#10	0.1253	#31	0.1777
#11	0.0311	#32	0.7276
#12	0.0000	#33	0.2386
#13	0.4384	#34	0.1043
#14	0.0220	#35	0.0016
#15	0.2378	#36	0.0381
#16	0.2488	#37	0.0290
#17	0.0048	#38	0.3225
#18	0.3961	#39	0.0027
#19	0.7590	#40	0.0390
#20	0.8889	Compound C	0.0003
#21	0.6141		

[85] **4-4: 다양한 신경독성에 대한 억제효과 관찰**

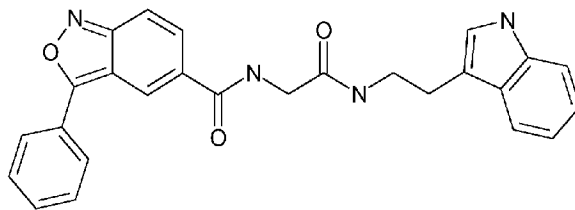
[86] 상기 실시예 4-3에서 선별한 7개 화합물의 신경독성 억제효과 관찰을 통해 4차 스크리닝을 실시하였다.

[87] 구체적으로, 배양된 마우스의 대뇌피질 신경세포에 50 μ M NMDA, 50 μ M FeCl₂, 100 μ M H₂O₂, 2 μ M TPEN(N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine, Sigma), 500 nM 스토로스포르린(staurosporine, Abchem) 및 10 μ M 에토포사이드(etoposide, Sigma)를 각각 처리 하여 세포독성을 유발한 후 상기 선별된 7개 화합물을 20 μ M의 농도로 처리하여 세포사멸 억제 효과를 관찰하였고 세포사멸 정도는 LDH assay를 통해 정량화하였다. 상기 사용한

신경독성 모델은 뇌졸중의 원인기전으로 생각되는 흥분독성, 산화성 손상 및 세포사멸(apoptosis) 등이 포함되어 있는데 그 중 흥분독성 모델로는 NMDA를 처리하였고, 산화성손상 모델로는 철(iron) 독성과 H_2O_2 독성 모델을 사용하였으며, 세포사멸 모델로는 TPEN, 스토로스포르린(staurosporine) 및 에토포사이드(etoposide) 독성모델을 이용하였다. 상기 TPEN은 아연 킬레이터(zinc chelator)로 신경세포에서 전형적인 세포사멸을 유발하는 것으로 잘 알려져 있고, 스토로스포르린은 효소활성 억제제(kinase inhibitor)로 역시 대표적인 세포사멸 유발물질 중 하나이며 에토포사이드는 DNA 손상으로 인한 세포사멸을 유발한다고 알려진 약물이다.

- [88] 그 결과, 상기 선별된 7개의 약물을 함께 처리하여 신경독성 감소에 따른 신경보호 효과를 관찰하였는데 특히, 화합물 #35 및 화합물 #28이 모든 독성에 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다(도 5). 화합물 #35의 경우, 세포사멸 모델 중에 스토로스포르린 독성만 억제하지 못하였으나 이는 스토로스포르린이 유발하는 독성기전과 관련된 것으로, 다른 2개의 세포사멸 모델에 효과가 있는 것으로 확인되었으므로 최종 화합물로 선별하였다. 라이브러리 구입처로부터 상기 화합물 #35는 하기와 같은 구조를 갖는 N-[2-[2-(1H-indol-3-yl)ethylamino]-2-oxoethyl]-3-phenyl-2,1-benzoxazole-5-carboxamide임을 확인하였다:

[89]



[90] **실시예 5: 뇌졸중 동물모델에서 뇌손상 억제효과 관찰**

[91] **5-1: 뇌실내 투여 실험**

[92] 상기 실시예 4-4에서 최종 선별된 화합물인 #35가 실제 동물 모델에서도 효과적이지 확인하기 위해 상기 화합물을 뇌손상을 유발한 뇌졸중 모델 동물에 처리한 후, 뇌손상 억제효과가 나타나는지 여부를 조사하였다.

[93] 구체적으로, 8-9 주령이 된 수컷 Sprague-Dawley(SD) 랫트(rat)를 이용하여 영구 중뇌동맥 폐쇄(middle cerebral artery occlusion, 이하, 'MCAO'라 약칭함) 모델을 제작하였다. MCAO 전 30분 및 폐쇄 후 10분경과 시점에서 레이저 도플러 혈류측정기(Laser-Doppler flowmetry)를 이용하여 대뇌 혈류(CBF)를 측정하였다(표 3). 상기 최종 선별된 AMPK 억제제 후보 화합물인 #35(4 μ l 내 100 ng) 또는 비히클(10% DMSO)을 MCAO 전 15분에 3.8 mm 깊이로 0.8 mm 후면 및 브레그마의 측면 1.2 mm의 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection)하였다. 이 후, 상기 랫트의 운동 결핍(motor deficit) 정도를 평가 하였는데 평가의 기준(Longa *et al.*, 1989)은 결핍을 나타내지 않는 것은 정상(Normal, 0점),

수직으로 정지할 때 앞발 연장의 실패는 경증(mild, 1점), 반대쪽으로 회전하는 것은 보통(moderate, 2점) 및 회전 손실(loss of circling) 또는 정확한 반사작용은 심각한 결핍(severe deficit, 3점), 아무런 반응이 없는 경우에는 무반응(no response, 4점), 그리고 실험동물이 죽은 경우에는 사망(death, 5점)으로 분류하였다. 또한, 상기 랫트 모델에 허혈(ischemia)을 유도 후 24시간 경과한 시점에서 뇌를 수득하였고 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(TTC)로 염색하여 뇌경색(cerebral infarction) 정도를 측정하였다. 아울러, MCAO 후 24시간 경과 후 실험 동물의 몸무게를 측정한 다음, 뇌를 적출하여 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(TTC)로 염색한 후 뇌조직 절편을 제조함으로써 뇌경색 정도를 측정하였다.

- [94] 그 결과, 본 발명을 통해 발굴된 최종 후보 화합물인 화합물 #35이 뇌졸중 동물모델 중 하나인 영구 중뇌동맥 폐쇄(permanent middle cerebral artery occlusion)에 따른 뇌손상을 현저하게 억제시킴을 최종 확인하였다(도 6). 아울러, 표 3에 나타난 바와 같이, 사망한 실험동물은 대조군 및 실험군 모두 없었고, 운동결핍 정도에 대한 분석 결과 본원발명의 화합물 #35 투여군이 미약하나마 운동결핍 정도가 개선되는 것으로 나타났다.

- [95] 표 3

[표3]

	Veh	화합물 #35
CBF(% of baseline)	36.9±2.5	38.4±2.4
Weight reduction(g)	48.8±2.9	40.0±3.5
Motor deficit	2.1±0.3	2.0±0.0
Mortality(%)	0/6(0%)	0/4(0%)

- [96] **5-2: 정맥투여 분석**

- [97] 뇌를 표적으로 하는 약물의 경우 가장 큰 문제점은 이들 약물이 혈뇌장벽(blood brain barrier, 이하, 'BBB'라 약칭함)을 통과하지 못할 경우, 실제 치료제로 개발이 어렵다는 점이다. 이를 해결하기 위해, BBB를 통과할 수 있는 약물전달체(drug delivery system, 이하, 'DDS'라 약칭함)와 결합시켜 해당 약물을 전달하는 시도도 이루어지고 있다. 대안으로는 이런 약물을 상기 실시예 5-1가 같이 직접 뇌실내에 투여하는 뇌실내 투여(intracerebroventricular injection)를 이용하기도 하는데, 매우 침습적인 방법이기 때문에 긴급상황이 아니고서는 그 사용이 제한적이다. 따라서, 뇌졸중 치료효과가 있는 것으로 규명된 화합물을 실제 뇌졸중 치료에 활용하기 위해서는 정맥주사와 같은 덜 침습적인 일반적인 투여방법으로 투여하더라도 동일한 약효가 나타나야 한다.

- [98] 이에 본 발명자들은 상기 화합물 #35가 실제 정맥주사에서도 동일한 효과가 나타나는지 확인하기 위해 실시예 5-1과 동일한 경색 유발에 의한 뇌졸중 모델

마우스에 꼬리정맥을 통해 주입한 후, 경색 부위의 조직 분석 및 행동학적 분석을 수행하였다.

- [99] 구체적으로, 상기 실시예 5-1와 동일한 방법으로 제조된 영구 중뇌 동맥 경색(MCA) 모델 마우스에 MCAO 전 15분에 대조군으로 담체인 DMSO만을 또는 DMSO에 용해된 상기 화합물 #35을 20 $\mu\text{g/kg}$ 의 투여량으로 각각 꼬리정맥을 통해 정맥주사하였다. 그리고 MCAO 전 30분 및 MCAO 후 10분 경과 시점에서 레이저 도플러 혈류측정기(Laser-Doppler flowmetry)를 이용하여 대뇌 혈류(CBF)를 측정하였고, MCAO 유도후 24시간 경과 후 실험동물의 몸무게를 측정하였으며(표 3), 몸무게 측정 바로 직후에 실시예 5-1과 마찬가지로 해당 실험동물의 뇌를 적출한 다음 2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(TTC)로 염색한 후 뇌조직 절편을 제조함으로써, 경색 부위의 정도를 분석하였다(도 7).

- [100] 그 결과 표 4 및 도 7에 나타난 바와 같이, 본발명의 화합물 #35를 정맥주사로 투여한 실험동물의 경색부위가 현저하게 감소하였을뿐만 아니라, 운동결핍도 대폭 개선시켰음을 알 수 있었다. 본발명의 화합물 #35의 투여에 따른 혈류량이나 체중의 변화도 감지되지 않았다.

- [101] 표 4

[표4]

	Veh	화합물 #35
CBF(% of baseline)	34.0 $\pm$ 3.8	34.7 $\pm$ 2.4
Weight reduction(g)	39.7 $\pm$ 2.2	38.7 $\pm$ 2.6
Motor deficit	2.4 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.1
Mortality(%)	0/5(0%)	0/5(0%)

- [102] **실시예 6: 급성 독성 테스트(Acute toxicity test)**

- [103] 상기 최종 선별된 화합물인 #35을 랫트에 주입하고 급성 독성 결과를 관찰하였다.

- [104] 구체적으로, 8-9 주령된 수컷 Sprague-Dawley(SD) 랫트에 상기 최종 선별된 AMPK 억제제 후보 화합물인 화합물 #35을 랫트 1 마리 당 100 $\mu\text{g/kg}$ 또는 비히클(10% DMSO)을 정맥내 주입(intravenous injection)하였고 이를 4회 반복하였다.

- [105] 그 결과, 24시간 경과 후에도 죽는 랫트는 발견되지 않았고 랫트를 희생시켜 간, 비장 및 신장 장기들을 적출하여 무게를 측정하였고, 상기 랫트의 혈액을 채취하여 WBC, RBC, BUN, AST, ALT, CREA 및 GLU 등의 지표 결과를 확인하였으나 대조군과 비교하여 대부분의 지표가 정상으로 나타났으며 눈에 띄는 독성을 관찰되지 않았다(도 8). 상기 지표에 대한 결과를 하기 표 5에 표시하였다.

[106] 표 5

[표5]

	정상 범위	Veh(n=4)	AMPK 억제제(n=4)
WBCB($\times 10^3$ cell/uL)	6.6 - 12.6	10.5 $\pm$ 3.5	9.9 $\pm$ 2.5
RBC($\times 10^3$ cell/uL)	6.8 - 9.8	6.7 $\pm$ 0.5	6.4 $\pm$ 0.3
BUN(mg/dL)	5 - 21	16.9 $\pm$ 2.0	15.2 $\pm$ 1.8
AST(U/L)	45.7 - 80.8	64.2 $\pm$ 5.0	91.2 $\pm$ 15.3
ALT(U/L)	17.5 - 30.2	38.9 $\pm$ 0.4	40.2 $\pm$ 5.0
CREA(mg/dL)	0.2 - 0.8	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0
GLU(mg/dL)	50 - 135	175.5 $\pm$ 26.5	162.1 $\pm$ 13.2

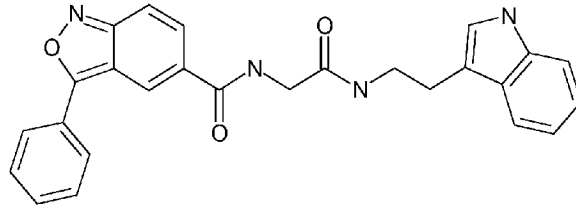
[107] 상기 결과들을 종합해보면, AMPK 효소가 뇌졸중의 원인기전 중 하나로 생각되는 아연독성에 중요한 역할을 하고 있음을 발견하여 AMPK 효소 활성을 억제기능을 가지고 있는 새로운 화합물 후보군에서 여러 차례 스크리닝을 실시하여 탁월한 아연독성에 효과를 보인 화합물 #35을 최종 선별하고 뇌졸중 동물모델에 처리한 결과 현저하게 뇌손상을 억제됨을 확인하였으므로 AMPK 억제기능에 기반한 새로운 뇌졸중 치료제로 활용 가능하다.

산업상 이용가능성

[108] 본 발명의 화합물은 큰 부작용 없이 각종 신경독성에 의해 유발되는 뇌졸중의 치료에 효과적이기 때문에, 뇌졸중을 포함하는 각종 퇴행성 뇌질환의 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 하기 구조식을 갖는 화합물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 치료용 약학적 조성물:

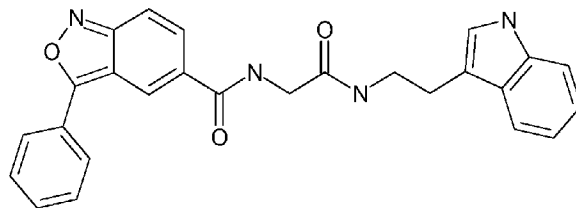


[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 뇌졸중은 출혈성(hemorrhagic) 뇌졸중, 허혈성(ischemic) 뇌졸중 또는 금속 독성(metal toxicity) 뇌졸중인 약학적 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 금속은 납(lead), 수은(mercury), 망간(manganese), 비소(arsenic), 탈륨(thallium), 철(iron), 아연(zinc), 카드뮴(cadmium), 비스무스(bismuth) 또는 주석(tin)인 약학적 조성물.

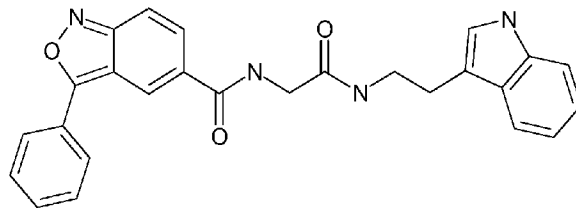
[청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 허혈성 뇌졸중은 흥분성 신경세포사 또는 산화성 신경세포사에 의해 유발되는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 5] 의약으로 사용되기 위한 하기 구조식을 갖는 화합물:



[청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 의약은 뇌졸중의 치료에 사용되는 것인, 화합물..

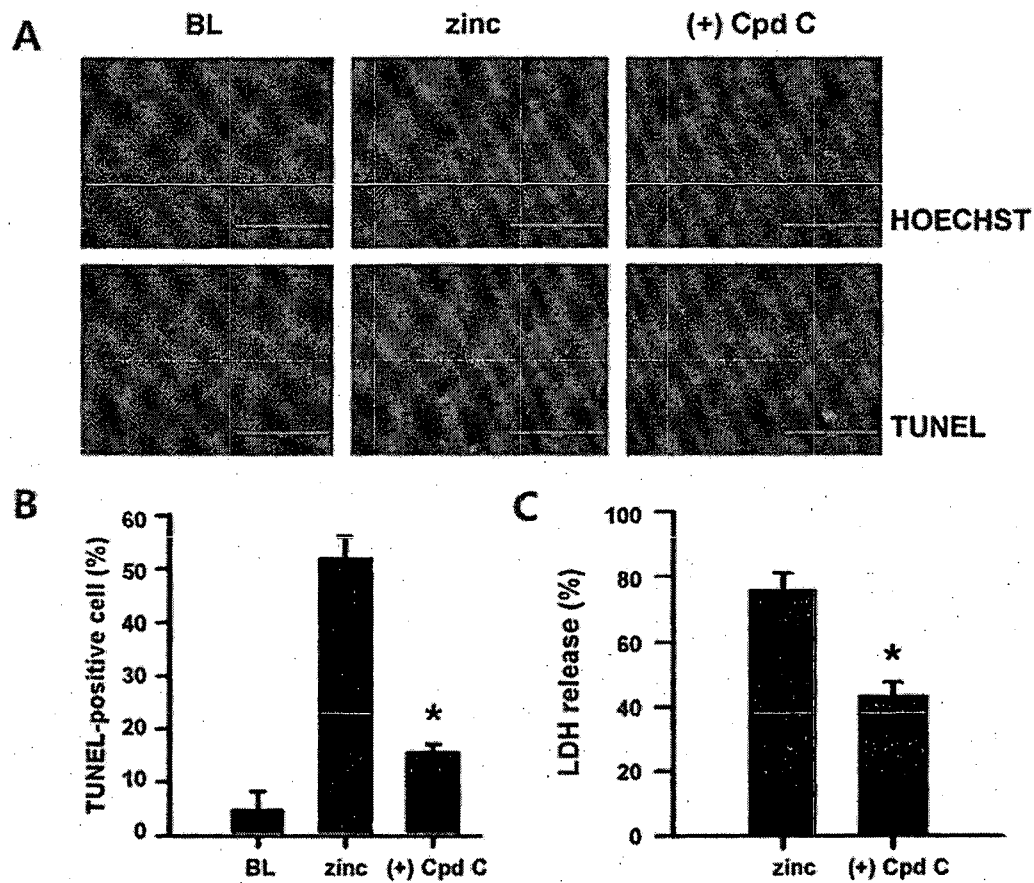
[청구항 7] 하기 구조식을 갖는 화합물을 뇌졸중에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌졸중의 치료방법:



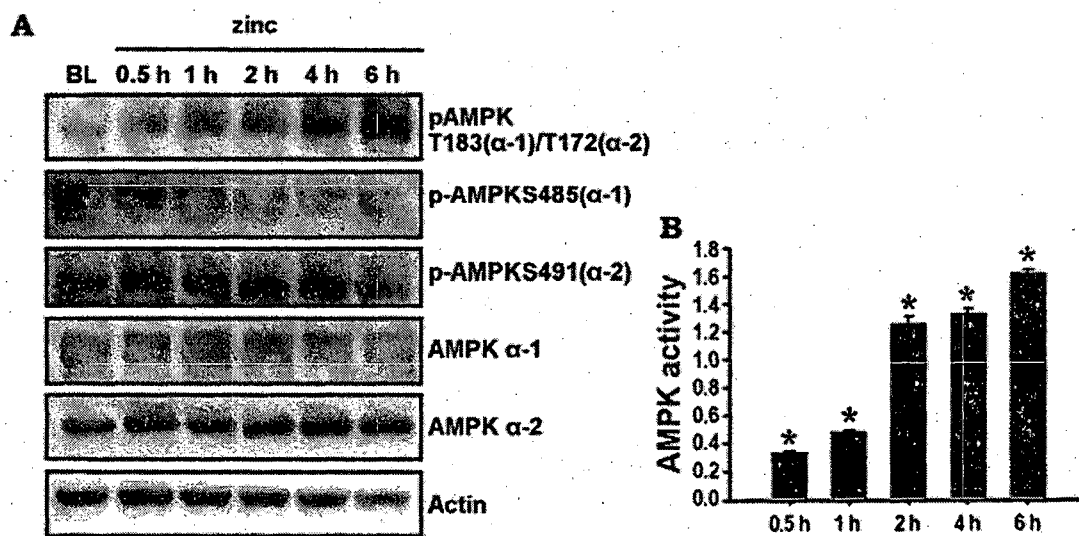
[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 투여는 경구 투여 또는 정맥내 주입, 피하주입, 근육내 주입, 뇌실내 주입(intracerebroventricular injection), 뇌척수액내

주입(intracerebrospinal fluid injection), 근육내 주입 및 경피 흡수로
구성되는 군으로부터 선택되는 비경구 투여인 뇌졸중의 치료방법.

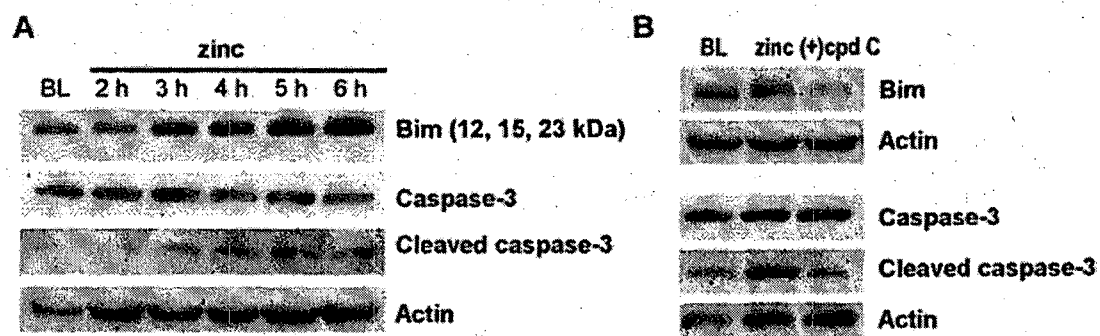
[도1]



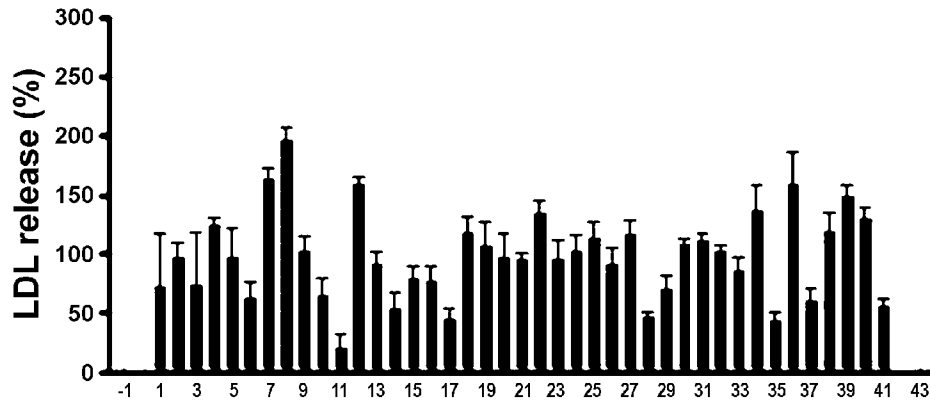
[도2]



[도3]

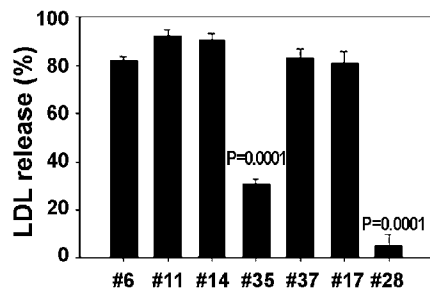


[도4]

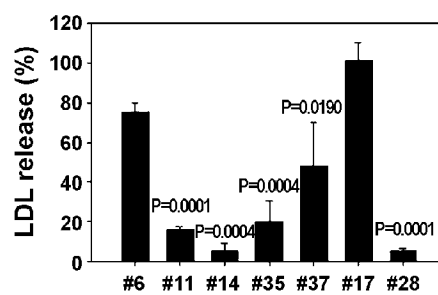
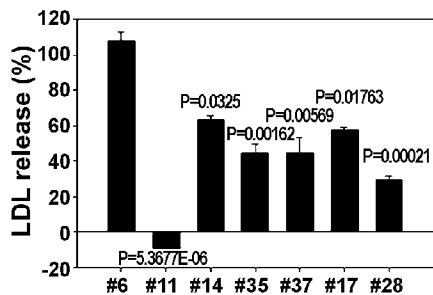


[도5]

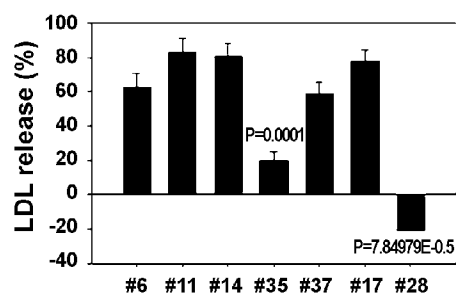
NMDA toxicity



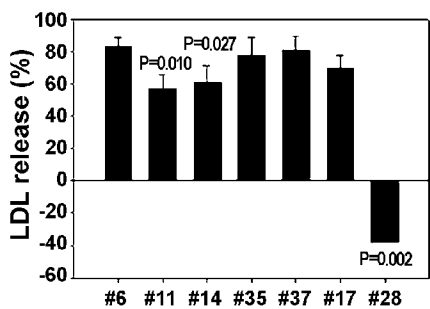
Iron toxicity

H₂O₂ toxicity

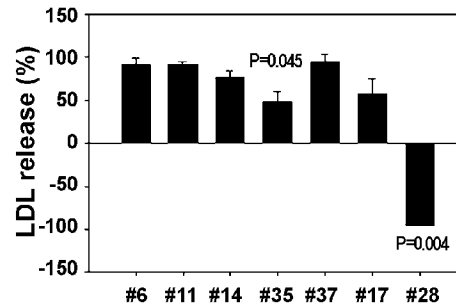
TPEN toxicity



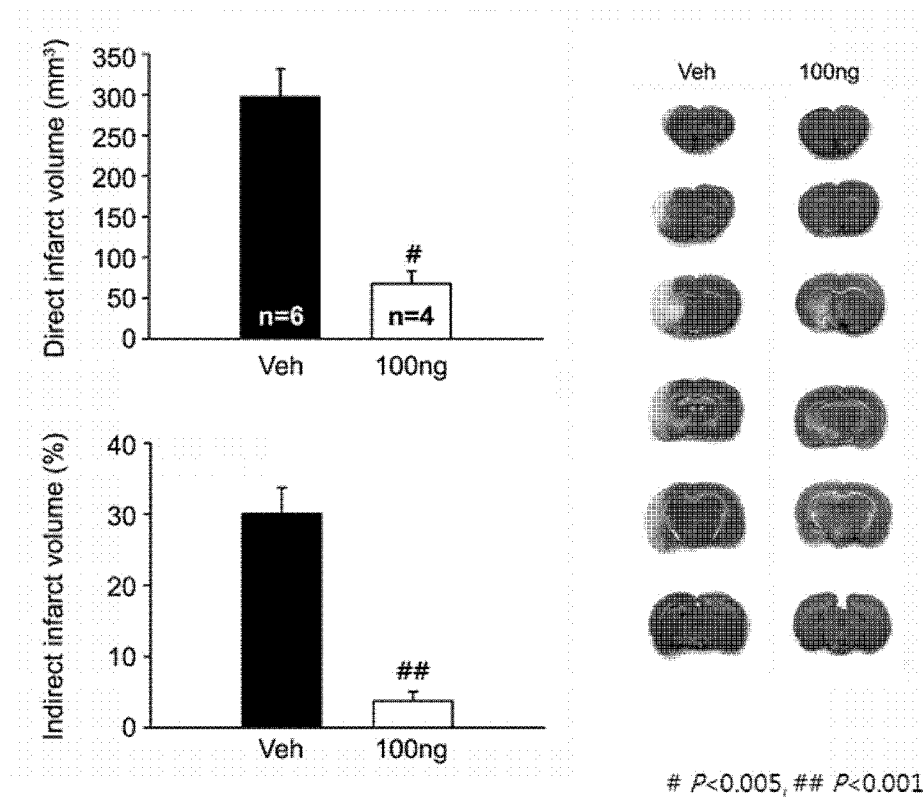
Staurosporine toxicity



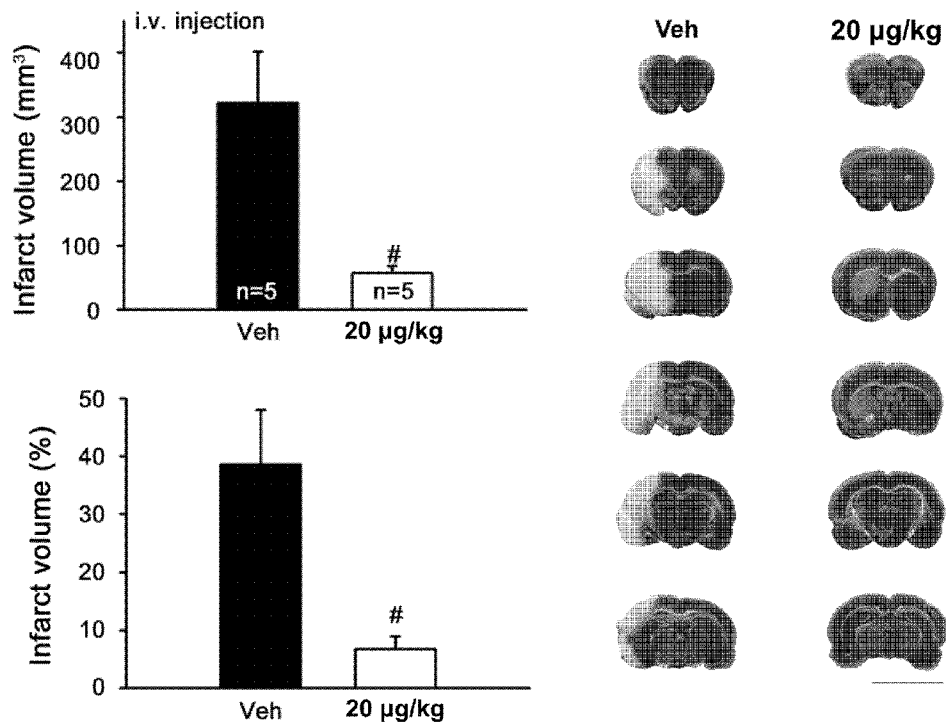
Etoposide toxicity



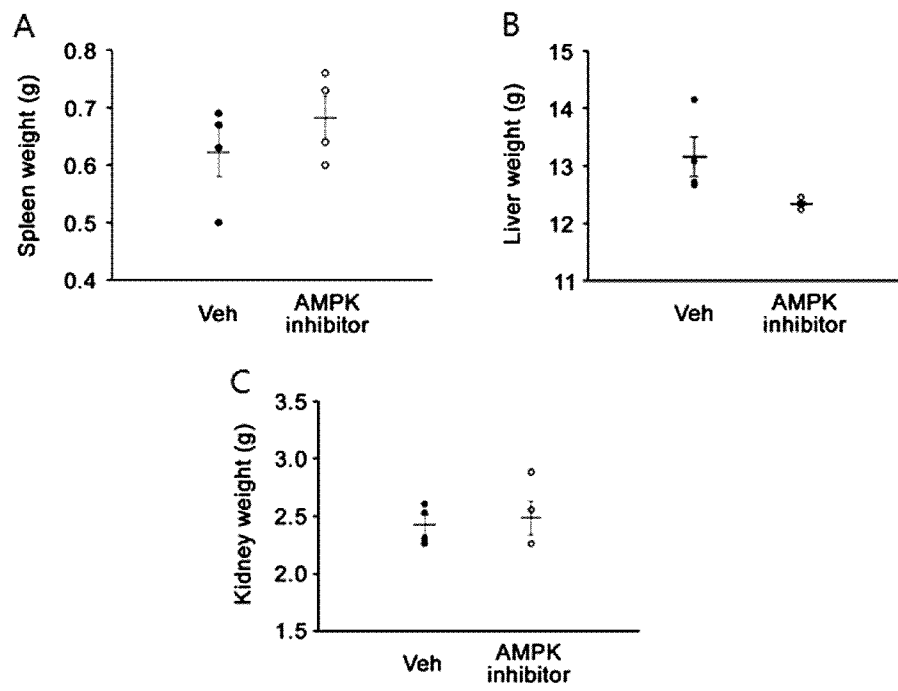
[도6]

Effect of AMPK inhibitor I on focal cerebral ischemia

[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004303**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07D 209/20(2006.01)i, A61K 31/427(2006.01)i, A61K 31/426(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 209/20; A61K 31/365; C07D 487/04; A61K 31/42; C07D 487/18; A61K 39/00; C07D 471/04; A61K 31/435; C07D 453/02; A61K 31/424; A61K 31/427; A61K 31/426; A61P 9/10; A61P 9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), CAlus/REGISTRY (STN) & Keywords: stroke, AMPK, benzisoxazole, indole, carboxamide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PubChem CID 17592753 (13 November 2007) < http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17592753 > See the entire document.	5-6
A		1-4
A	KR 10-2008-0048550 A (MEMORY PHARMACEUTICALS CORPORATION) 02 June 2008 See claims 1, 35, 47 and 50, paragraphs [0125], [0533], [0535] and [0540].	1-6
A	KR 10-2012-0078756 A (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY et al.) 10 July 2012 See claims 1 and 7, paragraphs [0002], [0018] and [0019].	1-6
A	KR 10-2012-0120416 A (VANDERBILT UNIVERSITY) 01 November 2012 See claims 1, 5, 26, 27 and 60, paragraphs [0229] and [0231].	1-6
A	KR 10-2013-0128460 A (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 26 November 2013 See claims 1, 25 and 29, paragraphs [0345] and [0643].	1-6
A	KR 10-2006-0120694 A (MEMORY PHARMACEUTICALS CORPORATION) 27 November 2006 See claims 1, 27 and 28.	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 AUGUST 2015 (04.08.2015)

Date of mailing of the international search report

04 AUGUST 2015 (04.08.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004303

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **7, 8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 7 and 8 pertain to a method for treatment of the human body by a therapeutic agent, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0048550 A	02/06/2008	AU 2006-295397 A1	05/04/2007
		CA 2622677 A1	05/04/2007
		CN 101312968 A	26/11/2008
		EP 1940833A1	09/07/2008
		JP 2009-509964 A	12/03/2009
		WO 2007-038367 A1	05/04/2007
KR 10-2012-0078756 A	10/07/2012	AU 2005-226731 A1	06/10/2005
		CA 2560843 A1	06/10/2005
		CN 101132802 A	27/02/2008
		EP 1734973 A2	27/12/2006
		JP 2008-504228 A	14/02/2008
		KR 10-2007-0085093 A	27/08/2007
		US 2009-0137665 A1	28/05/2009
		US 8293791 B2	23/10/2012
		WO 2005-092068 A2	06/10/2005
		WO 2005-092068 A3	20/09/2007
KR 10-2012-0120416 A	01/11/2012	CN 102834009 A	19/12/2012
		CN 102892288 A	23/01/2013
		EP 2533639 A1	19/12/2012
		EP 2533642 A1	19/12/2012
		JP 2013-519684 A	30/05/2013
		JP 2013-519685 A	30/05/2013
		KR 10-2013-0029368 A	22/03/2013
		US 2013-0079366 A1	28/03/2013
		US 2013-0096110 A1	18/04/2013
		US 8916584 B2	23/12/2014
		WO 2011-100607 A1	18/08/2011
		WO 2011-100614 A1	18/08/2011
KR 10-2013-0128460 A	26/11/2013	CA 2826649 A1	30/08/2012
		CN 103476258 A	25/12/2013
		EP 2677869 A1	01/01/2014
		JP 2014-506598 A	17/03/2014
		JP 2015-096550 A	21/05/2015
		JP 5728099 B2	03/06/2015
		KR 10-2015-0075120 A	02/07/2015
		US 2013-0123237 A1	16/05/2013
		US 8796258 B2	05/08/2014
KR 10-2006-0120694 A	27/11/2006	WO 2012-116145 A1	30/08/2012
		AU 2004-309367 A1	14/07/2005
		AU 2004-309367 B2	01/04/2010
		CA 2550689 A1	14/07/2005
		CN 1918167 A	21/02/2007
		EP 1697378 A2	06/09/2006
		EP 1697378 B1	21/11/2007
		JP 2007-515424 A	14/06/2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/004303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 4824578 B2	30/11/2011
		US 2005-0176754 A1	11/08/2005
		US 2009-0088437 A1	02/04/2009
		US 2011-0028483 A1	03/02/2011
		US 7396833 B2	08/07/2008
		US 7790722 B2	07/09/2010
		US 7964600 B2	21/06/2011
		WO 2005-063767 A2	14/07/2005
		WO 2005-063767 A3	25/08/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 209/20(2006.01)i, A61K 31/427(2006.01)i, A61K 31/426(2006.01)i, A61P 9/10(2006.01)i, A61P 9/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 209/20; A61K 31/365; C07D 487/04; A61K 31/42; C07D 487/18; A61K 39/00; C07D 471/04; A61K 31/435; C07D 453/02; A61K 31/424; A61K 31/427; A61K 31/426; A61P 9/10; A61P 9/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), Cplus/REGISTRY (STN) & 키워드: 뇌졸중, AMPK, benzisoxazole, indole, carboxamide

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PubChem CID 17592753 (2007.11.13) < http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17592753 > 전문 참조.	5-6
A		1-4
A	KR 10-2008-0048550 A (메모리 파마슈티칼스 코포레이션) 2008.06.02 청구항 1, 35, 47 및 50, 단락 [0125], [0533], [0535] 및 [0540] 참조.	1-6
A	KR 10-2012-0078756 A (더 존스 홉킨스 유니버시티 등) 2012.07.10 청구항 1 및 7, 단락 [0002], [0018] 및 [0019] 참조.	1-6
A	KR 10-2012-0120416 A (벤더르빌트 유니버시티) 2012.11.01 청구항 1, 5, 26, 27 및 60, 단락 [0229] 및 [0231] 참조.	1-6
A	KR 10-2013-0128460 A (머크 샤프 앤드 돔 코포레이션) 2013.11.26 청구항 1, 25 및 29, 단락 [0345] 및 [0643] 참조.	1-6
A	KR 10-2006-0120694 A (메모리 파마슈티칼스 코포레이션) 2006.11.27 청구항 1, 27 및 28 참조.	1-6

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 08월 04일 (04.08.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 08월 04일 (04.08.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 +82-42-481-8738



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 7, 8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제7항 및 제8항은 치료제에 의한 사람의 치료방법에 해당하는 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0048550 A	2008/06/02	AU 2006-295397 A1 CA 2622677 A1 CN 101312968 A EP 1940833 A1 JP 2009-509964 A WO 2007-038367 A1	2007/04/05 2007/04/05 2008/11/26 2008/07/09 2009/03/12 2007/04/05
KR 10-2012-0078756 A	2012/07/10	AU 2005-226731 A1 CA 2560843 A1 CN 101132802 A EP 1734973 A2 JP 2008-504228 A KR 10-2007-0085093 A US 2009-0137665 A1 US 8293791 B2 WO 2005-092068 A2 WO 2005-092068 A3	2005/10/06 2005/10/06 2008/02/27 2006/12/27 2008/02/14 2007/08/27 2009/05/28 2012/10/23 2005/10/06 2007/09/20
KR 10-2012-0120416 A	2012/11/01	CN 102834009 A CN 102892288 A EP 2533639 A1 EP 2533642 A1 JP 2013-519684 A JP 2013-519685 A KR 10-2013-0029368 A US 2013-0079366 A1 US 2013-0096110 A1 US 8916584 B2 WO 2011-100607 A1 WO 2011-100614 A1	2012/12/19 2013/01/23 2012/12/19 2012/12/19 2013/05/30 2013/05/30 2013/03/22 2013/03/28 2013/04/18 2014/12/23 2011/08/18 2011/08/18
KR 10-2013-0128460 A	2013/11/26	CA 2826649 A1 CN 103476258 A EP 2677869 A1 JP 2014-506598 A JP 2015-096550 A JP 5728099 B2 KR 10-2015-0075120 A US 2013-0123237 A1 US 8796258 B2 WO 2012-116145 A1	2012/08/30 2013/12/25 2014/01/01 2014/03/17 2015/05/21 2015/06/03 2015/07/02 2013/05/16 2014/08/05 2012/08/30
KR 10-2006-0120694 A	2006/11/27	AU 2004-309367 A1 AU 2004-309367 B2 CA 2550689 A1 CN 1918167 A EP 1697378 A2 EP 1697378 B1 JP 2007-515424 A	2005/07/14 2010/04/01 2005/07/14 2007/02/21 2006/09/06 2007/11/21 2007/06/14

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 4824578 B2	2011/11/30
		US 2005-0176754 A1	2005/08/11
		US 2009-0088437 A1	2009/04/02
		US 2011-0028483 A1	2011/02/03
		US 7396833 B2	2008/07/08
		US 7790722 B2	2010/09/07
		US 7964600 B2	2011/06/21
		WO 2005-063767 A2	2005/07/14
		WO 2005-063767 A3	2005/08/25