

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2023년 7월 27일 (27.07.2023) WIPO | PCT

WO 2023/140505 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/517 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 25/14 (2006.01)

Do Yeon); 03069 서울특별시 종로구 성균관로 36, Seoul (KR).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/020102

(22) 국제출원일: 2022년 12월 12일 (12.12.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0007094 2022년 1월 18일 (18.01.2022) KR

(74) 대리인: 김보정 (KIM, Bo Jung); 06295 서울특별시 강남구 언주로 118, 716호, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

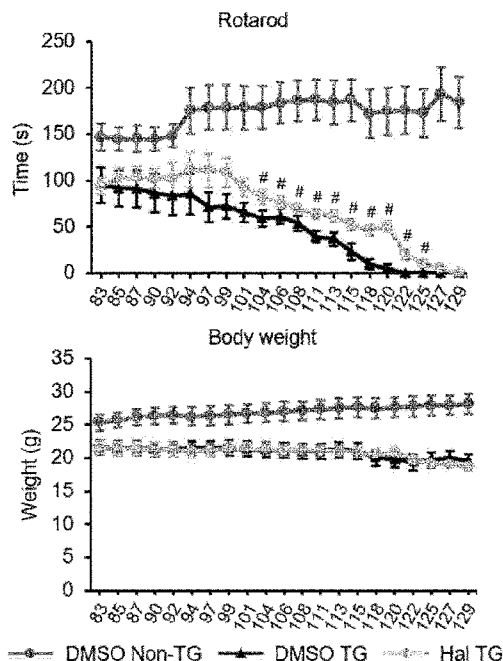
(71) 출원인: (주)큐라미스 (CURAMYS CO., LTD.) [KR/KR]; 03086 서울특별시 종로구 대학로12길 21, 2층, Seoul (KR). 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울특별시 종로구 대학로 101, Seoul (KR).

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

(72) 발명자: 성경준 (SUNG, Jung Joon); 13554 경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 613동 801호, Gyeonggi-do (KR). 권영남 (KWON, Young Nam); 03041 서울특별시 종로구 자하문로 19-1, 3층, Seoul (KR). 이도연 (LEE,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING NEURODEGENERATIVE OR MOTOR NEURON DISEASES CONTAINING HALOFUGINONE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 할로푸지논을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating neurodegenerative or motor neuron diseases, containing halofuginone as an active ingredient. Specifically, it was confirmed that, in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cell models and animal models, halofuginone exhibits dual effects of improving joint contracture by suppressing fibrosis and improving skeletal muscle production, and suppressing inflammatory responses and neuronal cell death of the central nervous system, thus delaying the progression of symptoms of ALS and improving performance status and survival time, and thus, the halofuginone can be effectively used as an active ingredient of a composition for the prevention or treatment of neurodegenerative or motor neuron diseases, including ALS.

(57) 요약서: 본 발명은 할로푸지논(Halofuginone)을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 세포모델 및 동물모델에서 할로푸지논이 섬유증을 억제하고 골격근 생성을 향상하여 관절 구축을 개선하고 중추신경계의 염증 반응 및 신경세포사멸을 억제하는 이중 효과를 나타내어, ALS의 증상 진행을 지연시키고 수행 능력 및 생존기간을 향상시킬 수 있음을 확인하였으므로, 상기 할로푸지논은 ALS을 포함한 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 할로푸지논을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 할로푸지논(Halofuginone)을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 다발성경화증(Multiple sclerosis) 등은 대표되는 퇴행성 신경질환 또는 운동신경 질환으로, 현재 임상적으로 사용되는 치료제가 극히 제한적이다.
- [3] ALS은 근위축, 관절 구축 및 통증의 진행으로 인해 삶의 질과 죽음의 질을 저하시킨다. 또한, 유전적 돌연변이, 단백질 항상성 장애, 미토콘드리아 기능 장애, 신경 기능 장애 및 신경 염증을 포함한 다양한 병태생리학적 기전으로 인해 임상 경과 및 예후가 이질적이다.
- [4] TGF- β (Transforming growth factor- β)는 세포 성장, 분화 및 세포사멸과 같은 세포 조절에 관여하는 다기능 사이토카인으로, TGF- β 와 ALS 사이의 연관성이 나타난 후 ALS 진행에서 TGF- β 의 역할이 밝혀지기 시작했다. 골격근에서 TGF- β 는 손상된 근육을 복구하는 역할을 하며 일반적으로 근형성, 성장 및 분화를 조절한다. 그러나 TGF- β 가 지속적으로 증가하면 근형성이 감소하고 근육 섬유화 및 위축이 촉진된다. ALS의 뮤린 모델을 사용한 이전 연구는 증상 단계에서 향상된 TGF- β 신호 전달 경로를 보여주었고 섬유/지방 생성 전구체의 증가로 인해 풍부한 세포외 기질(extracellular matrix, ECM) 생성이 나타났다. 마찬가지로, 정상 신경계에서는 흥분독성(excitotoxic) 및 산화적 손상으로부터 뉴런을 보호하고 신경 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 지속적으로 상승한 TGF- β 는 ALS 질환 진행 촉진과 관련이 있는 것으로 보고되었다.
- [5] 또한, TGF- β 신호 전달 경로는 ALS 뿐만 아니라 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증과도 연관성이 있는 것으로 보고되었다.
- [6] 이에, 지속적인 TGF- β 에 의한 ALS을 포함한 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 가속화를 막고 치료 효과를 나타낼 수 있는 치료제를 개발하기 위해 노력한 결과, ALS 세포모델 및 동물모델에서 할로푸지논(Halofuginone)이 TGF- β 상승에 의한 섬유증을 억제하고 골격근 생성을 향상하여 관절 구축을 개선하고, 중추신경계의 염증 반응 및 신경세포사멸을 억제하는 이중 효과를 나타내어, ALS의 증상 진행을 지연시키고, 수행 능력 및 생존기간을 향상시킬 수 있음을

확인하여, 상기 할로푸지논을 ALS을 포함한 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 출원에 이르게 되었다.

[7] [선행기술문헌]

[8] [비특허문헌]

[9] Katsuno, M. et al. Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. Current molecular medicine 11, 48-56, 2011.

[10] Kashima, R. & Hata, A. The role of TGF- β superfamily signaling in neurological disorders. Acta biochimica et biophysica Sinica 50, 106-120, 2018.

[11] Peters, S. et al. The TGF- β System As a Potential Pathogenic Player in Disease Modulation of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Frontiers in neurology 8, 669, 2017.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명의 목적은 할로푸지논(Halofuginone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 할로푸지논(Halofuginone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료에 사용하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 약학 조성물을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 개선에 사용하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약제로 제조하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

[19] 아울러, 본 발명은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 제조하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로

허용가능한 염의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [20] 본 발명자들은 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 세포모델 및 동물모델에서 할로푸지논(Halofuginone)이 섬유증을 억제하고 골격근 생성을 향상하여 관절 구축을 개선하고 중추신경계의 염증 반응 및 신경세포사멸을 억제하는 이중 효과를 나타내어, ALS의 증상 진행을 지연시키고 수행 능력 및 생존기간을 향상시킬 수 있음을 확인하였으므로, 상기 할로푸지논은 ALS을 포함한 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 동물모델에 할로푸지논(Halofuginone)을 투여하는 방법을 모식화한 도이다.
- [22] 도 2a 및 도 2b는 근아세포(myoblast)에 TGF- β 1(Transforming growth factor- β 1) 자극 후 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, α -SMA, MyoD mRNA 발현(도 2a) 및 TGF- β 1, α -SMA, MyoD 단백질 발현(도 2b)을 확인한 도이다.
- [23] 도 3a 내지 도 3c는 근아세포에 다양한 농도의 할로푸지논 처리(도 3a), 또는 TGF- β 1 및 다양한 농도의 할로푸지논 처리(도 3b) 후 세포 생존율을 확인하고, p-Smad2/Samd2 비율, TGF- β 1, α -SMA, MyoD, 콜라겐 I 단백질 발현(도 3c)을 확인한 도이다.
- [24] 도 4a 내지 도 4c는 근아세포에 TGF- β 1 및 할로푸지논 처리 후 TGF- β 1, α -SMA, MyoD, 콜라겐 I(collagen I) mRNA 발현(도 4a) 및 TGF- β 1, α -SMA, MyoD, 콜라겐 I 단백질 발현(도 4b)을 확인하고, 면역세포화학 분석으로 α -SMA, MyoD 발현(도 4c)을 확인한 도이다.
- [25] 도 5a 및 도 5b는 ALS 동물모델에서 분리한 섬유아세포에 할로푸지논 처리 후 TGF- β 1, α -SMA, 콜라겐 I mRNA 발현(도 5a) 및 p-Smad2/Samd2 비율, TGF- β 1, α -SMA, 콜라겐 I 단백질 발현(도 5b)을 확인한 도이다.
- [26] 도 6a 내지 도 6c는 ALS 동물모델에 할로푸지논 투여 후 운동 기능 및 체중 변화(도 6a) 및 증상 발병 변화(도 6b 및 도 6c)를 확인한 도이다.
- [27] 도 7a 내지 도 7d는 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하고 90일령 암컷(도 7a) 및 수컷(도 7b), 120일령 암컷(도 7c) 및 수컷(도 7d)에 TGF- β 1, α -SMA, MyoD, 콜라겐 I 발현을 면역조직화학 분석으로 확인한 도이다.
- [28] 도 8a 및 도 8b는 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하고 생후 120일에 무릎 관절 활막강에서 관절가동범위(ROM)을 확인하고(도 8a), p-Smad2/Samd2 비율, TGF- β 1, α -SMA, MyoD, 콜라겐 I 단백질 발현(도 8b)을 확인한 도이다.
- [29] 도 9a 내지 도 9f는 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하고 생후 120일에 요추 척수에서 미세아교세포 활성화(도 9a), 성상교세포 활성화(도 9b), IL-1 β 발현(도 9c),

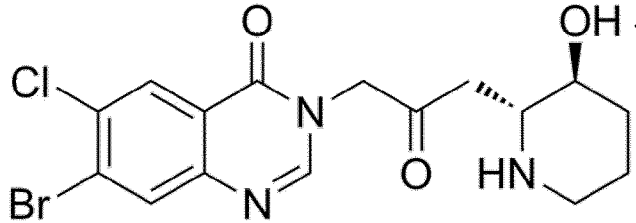
ChAT 양성 운동 뉴런 수(도 9d), ChAT mRNA 발현(도 9e), ChAT 단백질 발현(도 9f)을 확인한 도이다.

- [30] 도 10a 및 도 10b는 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하고 생후 90일에 요추 척수에서 미세아교세포 활성화(도 10a) 및 ChAT 양성 운동 뉴런 수(도 10b)를 확인한 도이다.
- [31] 도 11a 및 도 11b는 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하고 생후 120일에 요추 척수에서 TGF- β , iNOS, CD86, 아르기나아제 1(arginase 1), IFN- α , IL-6, IL-1 β , TNF- α , 카스파제-3(caspase-3), bcl2, bax mRNA 발현(도 11a) 및 절단된 카스파제-3, bcl2, bax 단백질 발현(도 11b)을 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [32] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [33] 본 발명에 있어서 용어 "예방"이란 본 발명의 조성물 투여로 질환의 발생 및 가속화, 증세의 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 용어 "치료"란 본 발명의 조성물 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [34] 본 발명에 있어서 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 조성물은 활성물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [35]
- [36] 본 발명은 할로푸지논(Halofuginone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [37] 또한, 본 발명은 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [38] 또한, 본 발명은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료에 사용하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 약학 조성물을 제공한다.
- [39] 또한, 본 발명은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약제로 제조하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.
- [40] 본 발명에서, 상기 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 TGF- β 억제제로, 하기 [화학식 1]로 기재되는 화학 구조를 갖는다:
- [41] [화학식 1]

[42]



[43] 또한, 상기 할로푸지논은 시판되는 것, 합성한 것 모두 무방하게 사용할 수 있다.

[44] 본 발명에서, 상기 신경퇴행성 또는 운동신경 질환은 근위축성 측삭경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증, 근육긴장이상증, 척수성 근위축증 또는 염증성 신경병증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[45] 구체적으로, 상기 신경퇴행성 또는 운동신경 질환에 있어서 할로푸지논은 TGF- β 자극에 의한 관절 활막강의 섬유증을 완화하고, 골격근 생성을 향상시켜, 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[46] 또한, 상기 신경퇴행성 또는 운동신경 질환에 있어서 할로푸지논은 TGF- β 자극에 의한 중추신경계의 염증 반응 및 신경세포사멸을 억제하여, 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 할로푸지논은 중추신경계에서 항염증 인자, 예컨대 아르기나아제 1(arginase 1)의 발현을 증가시키고, 전염증 인자, 예컨대 iNOS, CD86, IFN- α , TNF- α , IL-1 β 또는 IL-6의 발현을 감소시켜 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 또한, 상기 할로푸지논은 중추신경계에서 항신경세포사멸 인자, 예컨대 bcl-2의 발현을 증가시키고, 신경세포사멸 인자, 예컨대 카스파제-3(caspase-3) 및 bax의 발현을 감소시켜 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[47] 또한, 상기 신경퇴행성 또는 운동신경 질환에 있어서 할로푸지논은 증상 악화를 지연시키고, 수행 능력 및 생존기간을 향상시킬 수 있다.

[48] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 근아세포(myoblast)에서 TGF- β 1 자극으로 섬유증이 유도되고 근형성이 저하되는 반면, 할로푸지논을 처리할 경우 TGF- β 1 자극에 의한 섬유증 유도 및 근형성 저하가 억제되는 것을 확인하였다.

[49] 또한, 본 발명자들은 근위축성 측삭경화증(ALS) 동물모델로부터 섬유아세포를 분리한 후 할로푸지논을 처리한 결과 섬유아세포에서 섬유증 및 근육전사인자의 저하가 억제되는 것을 확인하였다.

[50] 또한, 본 발명자들은 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 결과 ALS 발병이 지연되고 수행 능력 및 생존기간이 향상되는 것을 확인하였다. 또한, 할로푸지논을 투여한 ALS 동물모델에서 관절 활막강의 섬유증이 감소하고 골격근 생성이 향상되어 관절 구축이 개선되는 것을 확인하였다. 아울러, 할로푸지논을 투여한 ALS 동물모델의 중추신경계(CNS)에서 항염증 및 신경세포사멸 억제 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[51] 따라서, 본 발명자들은 ALS 세포모델 및 동물모델에서 할로푸지논이 섬유증을

억제하고 골격근 생성을 향상하여 관절 구축을 개선하고 중추신경계의 염증 반응 및 신경세포사멸을 억제하는 이중 효과를 나타내어, ALS의 증상 진행을 지연시키고 수행 능력 및 생존기간을 향상시킬 수 있음을 확인하였으므로, 상기 할로푸지논은 ALS을 포함한 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

[52] 본 발명의 할로푸지논은 약학적으로 허용가능한 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[53] 본 발명의 할로푸지논은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[54] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 본 발명의 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[55] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 소듐, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리

- 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [56] 본 발명의 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 치료적으로 유효한 양으로, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [57] 본 명세서에서 사용된 "유효한 양 또는 유효량"은 신경퇴행성 및/또는 운동신경 질환을 늦추거나 또는 최소화하거나; 또는 신경퇴행성 및/또는 운동신경 질환의 치료 또는 관리에서 치료상 이점을 제공하기에 충분한 본 발명의 화합물의 양을 말한다.
- [58] 상기 약학적으로 허용가능한 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체가 사용될 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [59] 본 발명의 약학 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 투여 경로로도 투여할 수 있다. 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다.
- [60] 비경구적인 투여방법으로는 예를 들어, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, 본 발명의 약학 조성물을 주사형 제형으로 제조하여 이를 30 게이지의 가는 주사 바늘로 피부를 가볍게 단자(prick)하는 방법, 또는 피부에 직접적으로 도포 또는 부착하는 방법으로 투여될 수도 있다.
- [61] 본 발명의 약학 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다.
- [62] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을

붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[63] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 패치제, 에어로졸 및 비강흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 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 기재되어 있다.

[64] 본 발명의 약학 조성물의 총 투여량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있고, 보다 구체적으로 단일 투여량으로 장기간 다중 투여될 수 있으며, 또는 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 질환의 증상에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 조성물의 전체 용량은 1일당 환자 체중 1 kg 당 약 0.01 μg 내지 1,000 mg, 보다 구체적으로 0.1 μg 내지 100 mg일 수 있다. 그러나 상기 본 발명의 약학 조성물의 용량은 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이, 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여, 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자가 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[65] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 다른 치료제와 병용하여 투여되는 경우, 본 발명의 조성물과 다른 치료제는 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 이때 다른 치료제라 함은 신경퇴행성 및/또는 운동신경 질환의 치료 또는 개선 효과를 갖는 것으로 이미 알려져 있는 물질일 수 있다. 본 발명의 약학 조성물이 다른 치료제와 병용하여 투여될 경우, 본 발명의 조성물과 다른 치료제는 각각 별도의 용기로 분리시켜 제형화 되거나, 같은 제형에서 함께 복합 제형화 될 수 있다.

[66]

[67] 또한, 본 발명은 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[68] 또한, 본 발명은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 사용하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

[69] 아울러, 본 발명은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 제조하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

- [70] 본 발명에서, 상기 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환에 대한 내용은 전술한 바와 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용하고, 이하에서는 건강기능식품 조성물의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.
- [71] 한편, 본 발명자들은 ALS 세포모델 및 동물모델에서 할로푸지논이 섬유증을 억제하고 골격근 생성을 향상하여 관절 구축을 개선하고 중추신경계의 염증 반응 및 신경세포사멸을 억제하는 이중 효과를 나타내어, ALS의 증상 진행을 지연시키고 수행 능력 및 생존기간을 향상시킬 수 있음을 확인하였으므로, 상기 할로푸지논은 ALS를 포함한 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.
- [72] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [73] 상기 건강기능식품 조성물은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환을 예방하거나 개선하기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다.
- [74] 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

상기 건강기능식품 조성물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다.

[75]

[76] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[77] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[78] <실시예 1> 근아세포(myoblast) 배양, 및 TGF- β 1(Transforming growth factor- β 1) 및 할로푸지논(halofuginone) 처리

[79] TGF- β (Transforming growth factor- β)가 근아세포(myoblast)에 미치는 영향 및 할로푸지논(halofuginone)에 의한 효과를 알아보기 위하여, 마우스 근아세포를 배양하고, 상기 세포에 TGF- β 1 및 할로푸지논을 처리하였다.

[80] 구체적으로, 마우스 근아세포로 C2C12 세포(CRL-1772)를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 10%(v/v) 소태아혈청(FBS; Gibco), 1% 페니실린-스트렙토마이신(P/S; Gibco)이 포함된 DMEM 배지(Welgene)에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 유지하였다. C2C12 세포를 6웰-플레이트(3×10⁵ 세포/웰)에 옮기고 24시간 분주한 다음, 24시간 후 무혈청 배지로 교체하고 5 ng/ml의 rhTGF- β 1(재조합 인간 TGF- β 1; R&D Systems)로 자극하였다. 자극 후, 세포를 24시간 동안 무혈청 배지에서 다양한 농도(0[control] 또는 1, 2.5, 5(저농도), 10(고농도), 20, 50, 100 ng/ml)의 할로푸지논(halofuginone; Sigma)을 처리하였다.

[81] <실시예 2> 세포 생존력 분석

[82] 세포 계수 키트-8(CCK-8 키트) 분석(Enzo Life Sciences, ALX-850-039)을 사용하여 C2C12 세포에 대해 무혈청 조건에서 rhTGF- β 1 또는 할로푸지논 처리 후 세포 생존력을 측정하였다.

[83] 구체적으로, 상기 <실시예 1>의 C2C12 세포를 96웰-플레이트(10⁴ 세포/웰)에 24시간 배양하고, 24시간 동안 5 ng/ml의 rhTGF- β 1로 자극하였다. 자극 후 할로푸지논을 다양한 농도(0[control] 또는 1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 100 ng/ml)로 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후 각 웰에 10 μ l의 CCK-8 용액을 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 그 다음, VersaMax 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군(미처리) 세포의 생존율로 표현하였다. 할로푸지논의 각 농도에 대해 6개의 웰에서 얻은 평균 흡광도의 평균값을 계산하였다.

[84] <실시예 3> 면역세포화학 분석

[85] 상기 <실시예 1>과 같이 C2C12 세포에 대해 무혈청 조건에서 rhTGF- β 1 또는 할로푸지논 처리 후 면역세포화학 분석을 수행하였다.

[86] 구체적으로, C2C12 세포를 커버슬립이 있는 6웰-플레이트에 플레이트팅하고 무혈청 배지에서 rhTGF- β 1로 자극하였다. 자극 24시간 후, 세포를 24시간 동안

무혈청 배지에서 저농도 또는 고농도의 할로푸지논을 처리하였다. 세포를 PBS로 3회 세척하고 실온에서 15분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 이어서, 고정된 세포를 PBS에서 3회 세척하고 0.5% Triton X-100으로 5분 동안 처리한 후, 실온에서 1시간 동안 0.3% PBS-T에서 5% 소혈청 알부민으로 블로킹 하였다. 세포를 4°C의 블로킹 완충액에서 항- α -SMA 항체(1:200; abcam cat# ab7817), 항-MyoD 항체(1:200; Santa Cruz, cat# sc377460) 각각과 24시간 동안 인큐베이션 하고, PBS로 3회 세척한 후 Alexa Fluor 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 핵 DNA를 DAPI(4,6-diamino-2-phenylindole, 1:1,000; Sigma)로 염색하고 PBS로 두 번 세척한 후 커버슬립을 Dako 형광 마운팅 배지(Dako)를 사용하여 유리 슬라이드에 마운팅 하였다. 40 $\times$ 대물렌즈를 사용하여 Leica TCS SP8 공초점 현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 이미지를 관찰하였다. 또한, Leica Application Suite X 소프트웨어(Leica Microsystems)를 사용하여 블라인드 방식으로 정량화 하였다.

[87] <실시예 4> 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 동물모델 유전자 검사

[88] 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)에 있어서 할로푸지논의 효능을 알아보기 위하여, ALS 동물모델을 사용하였다.

[89] 구체적으로, 모든 동물 실험은 서울대학교 동물병원 동물관리위원회 지침(IACUC, 승인번호 SNU-200220-1-2)에 따라 진행하였다. ALS 동물모델로 인간 G93A 돌연변이 SOD1 유전자(B6SJL-Tg(SOD1-G93A) 1 Gur/J)를 발현하는 형질전환 마우스는 잭슨 연구소(Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였다. mtSOD1(G93A) H1 고발현자 균주(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA)의 수컷 형질전환 ALS 마우스를 암컷 마우스(B6/SJL F1)와 교배시켰다. 마우스는 일정한 온도(22 $\pm$ 1°C), 상대 습도(40%) 및 12시간 명암 주기의 표준 조건 하에서 사육하였고, 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 유전자형은 하기 [표 1]의 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)으로 확인하였고, 이식유전자 카피 수를 확인하였다. 그 다음, G93A 돌연변이 SOD1 형질전환 마우스를 시점에 따라 60일령(무증상), 90일령(초기 증상) 및 120일령(후기 증상)의 세 단계로 나누었다. 총 96마리의 마우스를 실험에 사용하였다. 비교군으로 비-형질전환 마우스를 이용하였다.

[90] [표1]

프라이머		서열(5'→3')	서열번호
hSOD1wt	정방향	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	1
	역방향	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	2
hSOD1G93A	정방향	CATCAGCCCTAATCCATCTGA	3
	역방향	CGCGACTAACAATCAAAGTGA	4

- [91] <실시예 5> ALS 동물모델 유래 섬유아세포 배양 및 할로푸지논 처리
- [92] ALS에 있어서 할로푸지논의 효능을 알아보기 위하여, 상기 <실시예 4>에서 G93A 돌연변이 SOD1 유전자를 확인한 ALS 동물모델에서 섬유아세포를 분리하고, 상기 세포에 할로푸지논을 처리하였다.
- [93] 구체적으로, 상기 <실시예 4>의 120일령의 비-형질전환 또는 G93A 돌연변이 SOD1 형질전환 마우스의 골격근에서 1차 섬유아세포를 분리하였다. 절제된 조직을 칼슘 및 마그네슘이 없는 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution; Gibco, cat# 14175095)와 페니실린-스트렙토마이신(Cat# 15070-063, Thermo Fisher Scientific)이 포함된 100 mm 배양 접시에 놓았다. 근육 조직을 얼음 블록에서 절단하였다. 그 다음, 조직을 1 mm 조각으로 자르고 37°C에서 1시간 동안 0.2% IV형 콜라게나아제(collagenase type IV; Sigma)로 효소반응 시켰다. 10 ml의 FBS(Gibco)를 첨가하여 효소 반응을 중단하였다. 조직 혼합물을 5분 동안 4°C에서 1,800 rpm으로 원심분리하고 10% FBS가 포함된 DMEM 배지(Welgene)로 재현탁하였다. 세포를 70 µm 세포 여과기(BD Biosciences, San Jose, CA)를 통해 여과하고 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지로 0.2% 젤라틴(Sigma) 코팅된 플레이트에서 배양하였다. 그 다음, 상기 <실시예 1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 할로푸지논을 처리하였다.
- [94] <실시예 6> ALS 동물모델에 할로푸지논 투여
- [95] ALS에 있어서 할로푸지논의 효능을 알아보기 위하여, 상기 <실시예 4>에서 G93A 돌연변이 SOD1 유전자를 확인한 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하였다.
- [96] 구체적으로, 도 1의 모식도와 같이 상기 <실시예 4>의 성별 및 연령이 일치하는 마우스를 무작위로 세 그룹으로 나누고, 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 DMSO TG군 및 Hal TG군은 G93A 돌연변이 SOD1 형질전환 마우스에 비히클(DMSO, Duchefa Biochemie, D1370) 및 할로푸지논(Sigma, S8144) 각각을 10주령(초기 증상 단계)에 10주 이상 주당 3회 복강내(i.p.) 주사하였다. 비교군으로 DMSO Non-TG군은 비-형질전환 마우스에 동일한 기간 동안 동일한 방법으로 비히클(DMSO)을 복강내(i.p.) 주사하였다.

[97] [표2]

그룹	성별	동물수 (마리)	시료		투여 방법
			투여시료	투여용량	
DMSO Non-TG	Male	16	비히클(DMSO)	5 μ l/마우스	복강 내, 주당 3회
	Female	16			
DMOS TG	Male	16			
	Female	16			
Hal TG	Male	16	할로푸지논	250 μ g/kg	
	Female	16			

[98] 한편, 생화학 분석에 사용되는 G93A 돌연변이 SOD1 형질전환 마우스 또는 비-형질전환 마우스를 생후 90일 및 120일에 희생시켰으며, 모든 실험은 삼중으로 수행하였다.

[99] <실시예 7> ALS 동물모델의 질병 진행, 생존 및 운동 기능 분석

[100] ALS에 있어서 할로푸지논의 효능을 알아보기 위하여, 상기 <실시예 6>과 같이 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 행동 실험을 단일 맹검 방식으로 수행하였다.

[101] 구체적으로, 상기 <실시예 6>의 마우스의 임상 상태와 체중을 출생 후 83일째부터 주당 3회 평가하였다. 질병 발병은 꼬리를 공중에 매달렸을 때 마우스의 팔다리가 떨어지는 것으로 정의하였고, 이는 상부 운동 뉴런 시스템의 임상적 관련으로 인한 것으로 보고되고 있다[S. Nagano, Y. Fujii, T. Yamamoto, M. Taniyama, K. Fukada, T. Yanagihara, et al. The efficacy of trientine or ascorbate alone compared to that of the combined treatment with these two agents in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice Exp Neurol, 179 (2003), pp. 176-180]. 종결 연령은 동물이 평평한 표면에 옆으로 눕혀진 후 30초 이내에 스스로를 바로잡을 수 없는 것으로 결정하였다. 이 시점에서 마우스가 죽은 것으로 보았다[C. Zheng, I. Nennesmo, B. Fadeel, J.I. Henter Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS Ann Neurol, 56 (2004), pp. 564-567]. 마우스의 운동 기능은 로타로드 장치(JD-A-07M, 정도비엔피(주))를 사용하여 검증하였다. 마우스는 기록을 시작하기 전에 일주일 동안 훈련되었다. 대략 8.3초마다 1 rpm씩 증가시키면서 300초에 걸쳐 4 rpm의 속도로 시작하여 40 rpm까지 가속되는 로드에서 마우스를 올려놓았다. 로타로드 테스트는 생후 83일부터 1주일에 3번씩 평균 3회 측정하여 연속 3회 로타로드에 10초 이상 머물 수 없는 시점까지 측정하였다.

[102] <실시예 8> 면역조직화학 분석

[103] ALS에 있어서 할로푸지논의 효능을 알아보기 위하여, 상기 <실시예 6>과 같이

ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 요추 척수(lumbar spinal cords)와 무릎 관절 조직을 이용하여 면역조직화학 분석을 수행하였다.

- [104] 구체적으로, 상기 <실시예 6>의 마우스를 생후 90일 및 120일에 4% 파라포름알데히드(PFA)를 관류하고 요추 척수와 무릎 관절을 분리하였다. 24시간 동안 4% PFA에 고정된 후 무릎 관절을 흐르는 수돗물에 24시간 동안 행구고 탈회 용액(decalcifying solution, Calci-Clear, HS-104, National Diagnostics)과 함께 4°C에서 지속적으로 흔들면서 인큐베이션 하였다. 바늘로 뼈가 쉽게 관통되는 탈회(decalcification) 과정이 완료될 때까지 탈회 용액을 매일 새로운 용액으로 교체하였다. 그 후 탈회된 무릎 관절을 흐르는 수돗물에 24시간 동안 행구고, 척수와 무릎 관절을 샘플이 가라앉을 때까지 30% 자당에 처리한 후 동결 보호한 다음 연속적으로 절단하였다(14 μ m). 요추 척수 및 무릎 관절 조직 절편을 PBS로 3회 세척하고 0.5% Triton X-100으로 5분 동안 투과한 후 실온에서 1시간 동안 0.3% PBS-T의 5% 소혈청 알부민으로 블로킹 하였다. 무릎 관절 조직 절편은 항-TGF- β 1 항체(1:200; Santa Cruz, cat# sc130348), 항- α -SMA 항체(1:200; abcam cat# ab7817), 항-MyoD 항체(1:200; Santa Cruz, cat# sc377460), 항-콜라겐 I항체(1:200; abcam cat# ab21286) 각각과, 요추 척수 절편은 항-GFAP 항체(1:200; Dako cat# Z0334), 항-Iba1 항체(1:200; Wako cat# 016) -20001), 항-TGF- β 1 항체(1:200; Santa Cruz, cat# sc130348), 항-TGF- β 1 항체(1:200; abcam, cat# ab92486), 항-IL-1 β 항체(1:200; R&D Systems cat# AF-401-NA) 각각과 4°C에서 24시간 동안 추가로 인큐베이션 하였다. 절편을 PBS로 3회 세척한 후 Alexa Fluor 2차 항체와 암실에서 1시간 동안 실온으로 인큐베이션 하였다. 염색 및 세척된 척수 절편을 실온에서 10분 동안 DAPI(DAPI; 1:1,000; sigma)로 염색한 다음 PBS로 두 번 행구고 커버슬립을 Dako 형광 마운팅 배지(Dako)로 마운팅 하고, 무릎 관절은 7.5배 대물렌즈를 이용하고 척수는 9.75배 대물렌즈를 이용하여 Leica TCS SP8 공초점 현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다. 또한, Leica Application Suite X 소프트웨어(Leica Microsystems)를 사용하여 분석하였다.

- [105] <실시예 9> 요추 척수의 운동 신경 세포 계수

- [106] ALS에 있어서 할로푸지논의 효능을 알아보기 위하여, 상기 <실시예 6>과 같이 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 요추 척수를 분리하여 운동 신경 세포를 계수하였다.

- [107] 구체적으로, 상기 <실시예 6>의 마우스의 임상 상태에 따라 다양한 시점(90일 및 120일)에 마우스를 희생하였다. 각 마우스에 차가운 PBS에 이어 차가운 4% 파라포름알데히드(PFA)를 경심 관류하고 요추 척수를 분리하였다. 샘플을 4% 파라포름알데히드에 후-고정하고 차가운 30% 자당 용액에 처리한 후 동결 보호한 다음, 14 μ m 두께의 횡단면 색션을 연속적으로 수득하였다. 조직 절편을 PBS로 세척하고 0.3% 과산화수소(H₂O₂)를 포함하는 PBS에 15분 동안 침지하여 내인성 퍼옥시다제 활성을 제거하였다. 절편을 PBS로 세척하고 0.5% Triton

X-100으로 5분 동안 투과하고 실온에서 1시간 동안 0.3% PBS-T의 5% 소혈청 알부민으로 블로킹 하였다. 각 세트의 조직 섹션을 1차 항체로 항-ChAT 항체(1:400; Millipore, cat# AB144P)와 함께 24시간 동안 인큐베이션 하였다. PBS로 세척 후, 절편을 비오틴화된 말 항-염소 IgG(H+L) 항체(1:200; Vector Laboratories, cat# BA-9500)와 함께 1시간 동안 인큐베이션 하고 PBS로 세척한 후 퍼옥시다제 결합 아비딘-비오틴 복합체(ABC 키트; 1:200; Vector Laboratories, cat# PK4000)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 철저한 세척 후, 디아미노벤지딘(diaminobenzidine, DAB, ImmPACT® DAB Vector Laboratories, cat# SK-4105)에서 섹션을 인큐베이션 하여 퍼옥시다제 염색을 시각화 하였다. 섹션을 탈수 및 공기 건조하고 톨루엔 가용성 Permount 마운팅 배지(Fisher Scientific, cat# SP15-500)로 마운팅 하였다. 4x 배율로 컴퓨터 보조 현미경(Olympus BX53) 및 소프트웨어(cellSens 소프트웨어)를 사용하여 ChAT 염색 섹션에서 운동 신경을 계산하였다. 계수는 그룹당 총 3마리의 마우스에서 배측 뿔당(per ventral horn) 수행하였다. 분석된 필드는 각 반구의 회백질에 명확하게 표시된 면역 염색 섹션의 배측 절반에 위치한 모든 ChAT+ 프로파일이었다.

[108] <실시예 10> 관절가동범위(ROM) 측정

[109] ALS에 있어서 할로푸지논의 효능을 알아보기 위하여, 상기 <실시예 6>과 같이 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 무릎 관절의 관절가동범위(ROM)을 측정하였다.

[110] 구체적으로, 무릎 신전(knee extension) 각도를 결정하기 위해 해부학적 지표를 사용하였다. 질병 연령 말기(120일)에 2D 각도 분석 시스템인 Random Two-line을 사용하여 수동 무릎 관절 ROM을 측정하였다. 상기 <실시예 6>의 마우스에 1% 이소플루란(isoflurane)을 흡입하여 마취시킨 다음 아크릴 플레이트에 놓고 뒷다리의 피부를 면도하였다. 대퇴골을 플레이트에 고정하고 마우스당 무릎 관절에 일정한 힘의 신전 모멘트를 가하였다. 그 후 대전자, 무릎 외측 상과, 외측 복사뼈에 마커를 부착하여 촬영 영상의 마커를 얻었다. 대퇴골의 축(무릎 외측 관절 공간에 대한 대전자)과 비골(무릎 외측 관절 공간에서 외측 복사뼈까지) 사이의 각도를 무릎 신전 ROM으로 측정하였다. 각 군에서 16마리의 마우스를 분석하였고, 대조군으로 120일째 군에서 DMSO를 주사한 비-형질전환 마우스의 무릎을 사용하였다.

[111] <실시예 11> 실시간 qRT-PCR 분석

[112] 상기 <실시예 1>에서 TGF-β1으로 자극 후 할로푸지논을 처리한 근아세포, 상기 <실시예 5>에서 ALS 동물모델에서 분리하여 할로푸지논을 처리한 섬유아세포 또는 상기 <실시예 6>과 같이 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 분리한 요추 척수를 이용하여 실시간 qRT-PCR 분석을 수행하였다.

[113] 구체적으로, 총 RNA를 FavorPrep™ Tri-RNA Reagent(Favorgen)를 사용하여 상기 <실시예 1>의 C2C12 세포, <실시예 5>의 섬유아세포 및 <실시예 6>의

마우스의 요추 척수에서 분리하였다. 상기 요추 척수는 <실시예 6>의 마우스에서 분리한 후 실험 전까지 -80°C 에서 동결 보관하였다. 총 RNA의 농도는 260 nm 흡광도에서 분광광도계(NanoDrop Spectrophotometer ND-2000, Thermo Scientific)로 측정하였다. cDNA는 제조사의 프로토콜에 따라 ReverTra Ace- α -TM(Toyobo)를 사용하여 1 μg 의 총 RNA를 이용하여 합성하였다. SYBR green ExcelTaq™ 2X Fast Q-PCR Master Mix(TQ1200, Smobio)를 사용하여 써모 싸이클러 CFX Connect Real-Time PCR Detection System(BIO-RAD)에서 하기 표 3의 프라이머를 사용하여 정량적 RT-PCR을 수행하였다. 형광 데이터는 Bio-Rad CFX Manager 3.1 소프트웨어로 분석하였고, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 방법으로 대조군 대 상대적 mRNA 발현을 계산하였다. 모든 샘플에 대해 4회 실험을 수행하였다. 모든 프라이머는 Primer3 온라인 소프트웨어를 사용하여 설계하였고, 대조군으로 GAPDH를 사용하였다.

[114] [표3]

프라이머		서열(5'→3')	서열번호
GAPDH	정방향	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	5
GAPDH	역방향	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	6
TGF-β	정방향	CACCGGAGAGCCCTGGATA	7
TGF-β	역방향	TGTACAGCTGCCGCACACA	8
TGF-β1	정방향	TCGCTTTGTACAACAGCACC	9
TGF-β1	역방향	ACTGCTTCCCGAATGTCTGA	10
TGF-β2	정방향	AGGCAGAGTTCAGGGTCTTC	11
TGF-β2	역방향	CCTTGCTATCGATGTAGCGC	12
TGF-β3	정방향	AGGAGACCTCGGAGTCTGAG	13
TGF-β3	역방향	CACTGAGGACACATTGAAACGA	14
α-SMA	정방향	AGTTTTGTGCTGAGGTCCCTATAT G	15
α-SMA	역방향	TTCCCAAACAAGGAGCAAAGA	16
MyoD	정방향	TACAGTGGCGACTCAGATGC	17
MyoD	역방향	GAGATGCGCTCCACTATGCT	18
Collagen I	정방향	CTGGCGGTTCAGGTCCAAT	19
Collagen I	역방향	TTCCAGGCAATCCACGAGC	20
ChAT	정방향	CTGTGCCCCCTTCTAGAGC	21
ChAT	역방향	CAAGGTGTTGGTGTCCCTGG	22
iNOS	정방향	ACCTTGTTTCAGCTACGCCTT	23
iNOS	역방향	CATTCCCAAATGTGCTTGTC	24
CD86	정방향	ACGATGGACCCCAGATGCACCA	25
CD86	역방향	GCGTCTCCACGGAAACAGCA	26
Arginase 1	정방향	TTAGGCCAAGGTGCTTGCTGCC	27
Arginase 1	역방향	TACCATGGCCCTGAGGAGGTTC	28
IFN-α	정방향	AAGGACAGGAAGGATTTTGGATT	29
IFN-α	역방향	GAGCCTTCTGGATCTGTTGGTT	30
IL-6	정방향	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	31
IL-6	역방향	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	32

IL-1 β	정방향	CCAAAAGATGAAGGGCTGCTT	33
IL-1 β	역방향	GAAAAGAAGGTGCTCATGTCCTC	34
TNF- α	정방향	TCTCATTCCTGCTTGTGGCA	35
TNF- α	역방향	GGTGGTTTGCTACGACGTGG	36
Bax	정방향	AGCAAACCTGGTGCTCAAGGC	37
Bax	역방향	CCACAAAGATGGTCACTGTC	38
Bcl2	정방향	GTGGTGGAGGAACTCTTCAG	39
Bcl2	역방향	GTTCCACAAAGGCATCCCAG	40
Caspase-3	정방향	CCTCAGAGAGACATTCATGG	41
Caspase-3	역방향	GCAGTAGTCGCCTCTGAAGA	42

[115] <실시예 12> 단백질 추출 및 웨스턴 블롯 분석

[116] 상기 <실시예 1>에서 TGF- β 1으로 자극 후 할로푸지논을 처리한 근아세포, 상기 <실시예 5>에서 ALS 동물모델에서 분리하여 할로푸지논을 처리한 섬유아세포 또는 상기 <실시예 6>과 같이 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 분리한 요추 척수 또는 무릎 관절을 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[117] 구체적으로, 상기 <실시예 6>의 마우스의 요추 척수 또는 무릎 관절을 분리하고 즉시 -80°C에 동결하였다. 그 다음, 각 요추 척수 또는 무릎 관절을 균질화하고 화학 처리하여 세포를 획득하였다. 상기 화학 처리된 세포, 상기 <실시예 1>의 C2C12 세포 또는 <실시예 5>의 섬유아세포를 RIPA 완충액(Thermo, MA, USA)에서 프로테아제 억제제 및 포스파타제 억제제(Roche, IN, USA)로 용해시키고 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 용해물을 4°C에서 13,000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후, 불용성 물질을 제거하였다. BCA 분석(Pierce Biotechnology)으로 단백질 농도를 측정하였다. 동량의 세포 용해물을 전기영동을 위해 SDS-PAGE 겔에 로딩하고, 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane, Amersham Protran 0.2um NC, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)으로 옮겼다. 그 다음, 멤브레인을 실온에서 1시간 동안 1X TBST의 5%(w/v) 스킵밀크로 블로킹 하였다. 블로킹 후 멤브레인에 1차 항체로 항- β -액틴 항체(1:5000; Santa Cruz, cat# sc47778), 항-Smad2 항체(1:1000; Cell Signaling, cat# 5339), 항-p-Smad2 항체 (1:1000; Cell Signaling, cat# 3108), 항-TGF- β 1 항체(1:1000; Santa Cruz, cat# sc130348), 항- α -SMA 항체(1:10000; abcam cat# ab7817), 항-MyoD 항체(1:1000; Santa Cruz, cat# sc377460), 항-콜라겐 I 항체(1:1000; abcam cat# ab21286), 항-절단된 카스파제-3 항체(1:1000; Cell Signaling, cat# 9661), 항-bax 항체(1:500; Santa Cruz, cat# sc493), 항-bcl2 항체(1:1000; Novus Biologicals, cat# NB100-56098), 항-ChAT

항체(1:1000; Millipore, cat# AB144P) 각각을 처리하고 4°C에서 밤새 인큐베이션 하였다. 그 후, 1X TBST로 여러 번 세척한 후 멤브레인을 실온(RT)에서 1시간 동안 블로킹 완충액에서 호스래디쉬 퍼옥시다제-접합 이차 항체(항-마우스, 토끼 또는 염소, 1:5000; GE Healthcare)와 함께 인큐베이션 하였다. 그 다음, 멤브레인을 세척하고, 제조사의 절차에 따라 SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate(Pierce Biotechnology)와 함께 간단히 인큐베이션 하고 이미지 분석기(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 정량화 하였다. 내부 대조군으로 β -액틴을 사용하였다. 단백질 강도의 농도 측정은 Image J(National Institutes of Health)를 사용하여 정량화 하였다.

[118] <실시예 13> 통계 분석

[119] 모든 데이터는 최소 3회의 독립적인 실험을 기반으로 하는 평균 및 평균의 표준 오차(SEM)로 표시하였고 대조군 값의 비율로 표시하였다. 그룹 간의 차이의 유의성은 Student's t-test 또는 one-way ANOVA에 이어 Tukey's post hoc comparison으로 분석하였다. p -값 < 0.05 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. KaplanMeier curve를 사용하여 증상 발병, 로타로드 부전 및 질병 종말점의 누적 확률을 분석하였다. 모든 분석은 GraphPad Prism을 사용하여 수행하였다.

[120] <실험예 1> 근아세포에서 TGF- β 1 자극에 의한 섬유증 증진 및 근형성 억제 확인

[121] TGF- β 1이 근아세포에 미치는 영향을 알아보기 위해, C2C12 마우스 근아세포 세포주에 TGF- β 1 자극 후 실시간 qRT-PCR 분석 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[122] 구체적으로, 상기 <실시예 1>과 같이 C2C12 세포에 TGF- β 1을 24시간 처리한 후 상기 <실시예 11>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 실시간 qRT-PCR을 수행하여 TGF- β 1, 2 및 3, α -SMA 및 MyoD mRNA 발현을 확인하였고(도 2a), 상기 <실시예 12>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 TGF- β 1 및 MyoD 단백질 및 α -SMA의 자가분비(autocrine) 발현을 확인하였다(도 2b).

[123] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, C2C12 세포주에 TGF- β 1 자극 24시간 후, TGF- β 1, 2 및 3의 mRNA 수준이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 또한, TGF- β 자극에 의한 근섬유아세포로의 근아세포의 활성화를 α -SMA의 mRNA 발현의 유의한 증가로 확인하였다. 대조적으로, MyoD의 mRNA 수준은 TGF- β 자극 후 유의하게 감소하였다(도 2a).

[124] 또한, 도 2b에 나타낸 바와 같이, C2C12 세포주에 TGF- β 1 자극 24시간 후, TGF- β 1 및 α -SMA 단백질 발현이 유의하게 증가하였다. 대조적으로, MyoD의 단백질 발현은 TGF- β 자극 후 유의하게 감소하였다(도 2b).

[125] 상기의 결과를 통해 근아세포에서 TGF- β 1 자극에 의한 섬유증 증진 및 근형성 억제가 유발됨을 알 수 있다.

- [126] <실험예 2> 할로푸지논(halofuginone)의 세포독성 확인
- [127] 근아세포에서 할로푸지논(halofuginone)의 세포독성을 알아보기 위하여, 세포 생존력 분석 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- [128] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 C2C12 세포에 TGF- β 1 자극 또는 무자극 후 할로푸지논을 처리하고 CCK-8 분석을 통해 세포 생존력 분석을 수행하였고(도 3a 및 도 3b), <실시예 12>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 p-Smad2, Smad2, TGF- β 1, MyoD, 콜라겐 I 단백질 및 α -SMA의 자가분비 발현을 확인하였다(도 3c).
- [129] 그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타낸 바와 같이, 1 ng/ml 내지 10 ng/ml의 할로푸지논 농도에서 세포 생존율이 크게 변하지 않는 것을 확인하였다(도 3a 및 도 3b).
- [130] 또한, 도 3c에 나타낸 바와 같이, 5 ng/ml 및 10 ng/ml의 할로푸지논 농도에서 TGF- β 1 자극에 의한 p-Smad2/Smad2 비율, TGF- β 1, α -SMA 및 콜라겐 I 단백질 수준의 상승이 유의하게 감소하고, TGF- β 1 자극에 의한 MyoD 단백질 수준의 감소가 유의하게 회복되었다(도 3c).
- [131] 이에, C2C12 세포에서 할로푸지논의 최적 농도로 저농도는 5 ng/ml, 고농도는 10 ng/ml 처리를 결정하였다.
- [132] <실험예 3> TGF- β 1 자극 근아세포에서 할로푸지논에 의한 섬유증 증진 및 근형성 억제 완화 확인
- [133] 근아세포에서 TGF- β 1에 의한 변화가 TGF- β 억제제로 할로푸지논에 의해 억제될 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, C2C12 마우스 근아세포 세포주에 TGF- β 1 자극 후 할로푸지논을 처리하고, 실시간 qRT-PCR 분석, 웨스턴 블롯 분석 및 면역세포화학 분석을 수행하였다.
- [134] 구체적으로, 상기 <실시예 1>과 같이 C2C12 세포를 TGF- β 1로 24시간 자극한 후 할로푸지논을 24시간 처리하고, 상기 <실시예 11>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 실시간 qRT-PCR을 수행하여 TGF- β 1, α -SMA, MyoD 및 콜라겐 I(Col-I) mRNA 발현을 확인하였다(도 4a). 또한, 상기 <실시예 12>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 TGF- β 1, α -SMA, MyoD 및 콜라겐 I 단백질 발현을 확인하였다(도 4b). 아울러, 상기 <실시예 3>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 면역세포화학 분석을 수행하여 α -SMA 및 MyoD 발현을 확인하였다(도 4c).
- [135] 그 결과, 도 4a 및 도 4b에 나타낸 바와 같이, 저농도 또는 고농도의 할로푸지논을 처리한 군에서 TGF- β 1 자극에 의한 TGF- β 1, α -SMA 및 콜라겐 I mRNA 수준의 상승이 유의하게 감소하고, TGF- β 1 자극에 의한 MyoD mRNA 수준의 감소는 유의하게 회복되었다(도 4a). 단백질 발현 또한 동일한 양상을 보였다(도 4b).
- [136] 또한, 도 4c에 나타낸 바와 같이, 면역형광 염색 및 공초점 현미경을 사용하여 할로푸지논 저농도 또는 고농도 처리에 의해 α -SMA가 감소된 강도와 MyoD가 회복된 강도를 확인하였다(도 4c).

- [137] 상기의 결과를 통해 근아세포에서 TGF- β 1 자극에 의한 섬유증의 증진 및 근형성 억제를 TGF- β 억제제로 할로푸지논을 사용하여 예방할 수 있음을 알 수 있다.
- [138] <실험예 4> ALS 동물모델 유래 섬유아세포에서 할로푸지논에 의한 섬유증 억제 확인
- [139] ALS 동물모델 유래 섬유아세포에서 TGF- β 1의 변화 및 할로푸지논의 효과를 알아보기 위하여, ALS 동물모델 유래 섬유아세포에 할로푸지논을 처리한 후 실시간 qRT-PCR 분석 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- [140] 구체적으로, 상기 <실시예 5>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 ALS 동물모델에서 섬유아세포를 분리하고 할로푸지논을 처리한 후, 상기 <실시예 11>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 실시간 qRT-PCR을 수행하여 TGF- β 1, α -SMA 및 콜라겐 I(Col-I) mRNA 발현을 확인하였다(도 5a). 또한, 상기 <실시예 12>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 p-Smad2, Smad2, TGF- β 1, α -SMA 및 콜라겐 I 단백질 발현을 확인하였다(도 5b). 대조군으로 비-형질전환 마우스에서 분리한 섬유아세포를 이용하였다.
- [141] 그 결과, 도 5a 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, p-Smad2/Smad2 비율, 및 TGF- β , α -SMA 및 Col-I의 단백질 발현 뿐만 아니라 mRNA의 수준은 비-형질전환 마우스 유래 섬유아세포(Non-TG)에 비해 G93A 돌연변이 SOD1 마우스 유래 섬유아세포에서 유의하게 상승하였다. 이러한 변화는 24시간 동안 저농도 또는 고농도 할로푸지논 처리로 약화되는 것을 확인하였다(도 5a 및 도 5b).
- [142] 상기의 결과를 통해 ALS 마우스 모델의 섬유아세포에서 섬유증이 증진되고, 할로푸지논 처리에 의해 섬유증이 억제될 수 있음을 알 수 있다.
- [143] <실험예 5> ALS 동물모델에서 할로푸지논 투여에 의한 ALS 발병 지연 및 수행 능력 향상 확인
- [144] 생체 내에서 할로푸지논의 효과를 평가하기 위해, ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하고 질병 진행, 생존 및 운동 기능 분석을 수행하였다.
- [145] 구체적으로, 상기 <실시예 6>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하고 상기 <실시예 7>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 질병 진행, 생존 및 운동 기능 분석을 수행하였다.
- [146] 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 증상 단계의 각 TG군은 non-TG군에 비해 로타로드에서 유의하게 시간이 단축되는 양상을 보였다. 한편, TG군 중에서, DMSO를 투여한 TG군(DMSO TG군)과 비교하여 할로푸지논을 투여한 TG군(Hal TG군)은 로타로드에서 유의하게 더 긴 시간을 나타냈다. 체중은 non-TG군과 비교하여 TG군에서 유의하게 감소되었고, DMSO TG군과 Hal TG군 간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다(도 6a).
- [147] 또한, 도 6b 및 도 6c에 나타낸 바와 같이, DMSO TG군과 Hal TG군 사이에 증상 발병의 차이가 있었고, Hal TG군의 증상 발병은 DMSO TG군에 비해 유의하게 지연되었다(평균 $\pm$ 표준 편차[SD], 113 ± 3.6 vs 94.2 ± 5.7 , $p < 0.05$). 또한,

로타로드 부전에 도달하는 연령은 DMSO TG군보다 Hal TG군에서 지연되었으며(각각 124.3 ± 3.5 vs 116.5 ± 3.1 , $p < 0.001$), 종결 연령도 유의하게 증가하였다($141.8 \pm$ 각각 9.8 vs 129.3 ± 7.6 , 도 6b 및 도 6c).

- [148] <실험예 6> ALS 동물모델의 질병 초기 단계에서 할로푸지논 투여에 의한 활막강의 섬유증 감소 및 골격근 생성 향상 확인
- [149] ALS 발병에 있어서 할로푸지논의 효과를 평가하기 위해, ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여하고 질병 초기와 후기에 무릎 관절 활막강의 변화를 면역조직화학 분석(IHC)으로 확인하였다.
- [150] 구체적으로, 상기 <실시예 6>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 G93A 돌연변이 SOD1 마우스에 ALS 발병 초기(73일)부터 할로푸지논을 투여하고, 상기 <실시예 8>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 질병 초기 암컷 및 수컷(90일령, 도 7a 및 도 7b)과 후기 암컷 및 수컷(120일령, 도 7c 및 도 7d) 무릎 관절을 이용하여 면역조직화학 분석을 수행하였다.
- [151] 그 결과, 도 7a 및 도 7b에 나타낸 바와 같이, DMSO Non-TG군과 비교하여 DMSO TG군은 성별에 관계없이 질병의 초기 단계에서 무릎 관절 활막강에서 TGF- β 1의 유의한 증가를 확인하였다. 또한, DMSO Non-TG군에 비해 DMSO TG군의 활막강에서 TGF- β 1의 증가와 함께 α -SMA 및 Col-I가 증가하고, MyoD는 감소하는 것을 확인하였다. 반면, Hal TG군에서는 질병의 초기 단계에서 TGF- β 의 증가가 억제되었고, 이에 따라 α -SMA 및 Col-I 발현도 DMSO TG군에 비해 현저히 낮게 나타남을 확인하였다(도 7a 및 도 7b).
- [152] 또한, 도 7c 및 도 7d에 나타낸 바와 같이, Hal TG군에서는 DMSO TG군과 비교하여 활막강에서 유의하게 더 낮은 TGF- β 1, α -SMA, Col-I 및 더 높은 MyoD가 질병 후기 단계에서 지속적으로 유지됨을 확인하였다. 또한, 암컷 Hal TG군에서 TGF- β 1, MyoD 및 Col-1의 강도는 DMSO non-TG군의 강도와 차이가 없었고, 수컷 Hal TG군의 MyoD 강도는 DMSO non-TG군에 비해 다소 증가하는 것을 확인하였다(도 7c 및 도 7d).
- [153] 상기의 결과를 통해 TGF- β 의 증가로 인한 ALS 마우스의 활막강에서의 근섬유아세포 활성화 및 강화된 섬유화가 할로푸지논 투여에 의해 개선될 수 있음을 알 수 있다. 또한, ALS 마우스의 활막강에서 감소되는 골격근의 근형성도 할로푸지논 투여로 예방할 수 있음을 알 수 있다. 더욱이, ALS 마우스의 질병 초기 단계에서 할로푸지논의 투여가 성별에 관계없이 활막강의 섬유증을 유의하게 감소시키고 근육 형성을 향상시킴을 알 수 있다.
- [154] <실험예 7> 할로푸지논 투여에 의한 ALS 동물모델의 관절 구축 개선 확인
- [155] ALS에 있어서 섬유증으로 인한 기능 저항 및 이에 대한 할로푸지논의 효과를 알아보기 위하여, ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 무릎 관절의 관절가동범위(ROM)를 측정하고, 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- [156] 구체적으로, 상기 <실시예 6>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 G93A 돌연변이 SOD1 마우스에 할로푸지논을 투여하고, 상기 <실시예 10>에 기재된

방법과 동일한 방법으로 무릎 관절의 ROM 측정을 수행하였다(도 8a). 또한, 무릎 관절 조직을 이용하여 상기 <실시예 12>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 p-Smad2, Smad2, TGF- β 1, α -SMA, MyoD 및 콜라겐 I 단백질 발현을 확인하였다(도 8b).

[157] 그 결과, 도 8a에 나타낸 바와 같이, 120일 된 DMSO Non-TG군에 비해 DMSO TG군에서 ROM이 유의적으로 감소하였고, Hal TG군에서는 ROM이 변화하지 않는 것을 확인하였다(도 8a).

[158] 또한, 도 8b에 나타낸 바와 같이, DMSO Non-TG군과 비교하여 DMSO TG군에서 p-Smad2/Smad2 비율, TGF- β , α -SMA, Col-I의 유의한 증가와 MyoD의 감소를 확인하였다. 또한, Hal TG군의 p-Smad2/Smad2 비율, 및 TGF- β 1, α -SMA 및 MyoD의 발현 수준은 DMSO non-TG 마우스와 유사하게 보존되었고 Col-1 발현 수준은 오히려 감소하였다(도 8b).

[159] 상기의 결과를 통해 ALS 마우스에서 TGF- β 의 증가가 무릎 관절 내 섬유증을 강화하여 관절 수축을 유도하는 반면, 할로푸지논 투여로 이를 개선할 수 있음을 알 수 있다.

[160] <실험예 8> ALS 동물모델의 중추신경계(CNS) 조직에서 할로푸지논 투여에 의한 항염증 및 신경세포사멸 억제 효과 확인

[161] ALS에 있어서 할로푸지논 투여에 의한 중추신경계(CNS) 내 효과를 조사하기 위하여, ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 요추 척수를 이용하여 면역조직화학 분석, 요추 척수의 운동 신경 세포 계수 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[162] 구체적으로, 상기 <실시예 6>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 G93A 돌연변이 SOD1 마우스에 할로푸지논을 투여하고, 생후 120일 마우스를 희생한 후 상기 <실시예 8>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 면역조직화학 분석을 수행하여 요추 척수에서 TGF- β 1 및 신경교세포(glial cell)를 확인하였다. 성상교세포(astrocyte)에서 과생된 TGF- β 가 ALS 마우스에서 질병을 가속화한다고 보고된 것을 감안하여, 면역조직화학 분석 시 각 그룹의 척수를 TGF- β 와 GFAP로 공동 염색하였다. 또한, 미세아교세포(microglia)의 활성을 확인하기 위해 Iba1 염색을 하였다(도 9a 및 도 9b).

[163] 또한, TGF- β 와 CNS의 신경교세포 변화가 염증에 미치는 영향을 알아보기 위해, 면역조직화학 분석 시 대표적인 전염증성 사이토카인인 IL-1 β 를 GFAP로 동시염색하였다(도 9c).

[164] 또한, 척수의 운동신경원을 조사하기 위해 상기 <실시예 9>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 요추 척수의 운동 신경 세포를 관찰 및 계수하고(도 9d), 상기 <실시예 11> 및 <실시예 12>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 실시간 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 ChAT mRNA(도 9e) 및 ChAT 단백질(도 9f) 발현을 정량적으로 분석하였다.

[165] 아울러, 상기 <실시예 6>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 G93A 돌연변이

SOD1 마우스에 할로푸지논을 투여하고, 생후 90일 마우스를 희생한 후 상기와 동일한 방법으로 미세아교세포의 활성을 확인하기 위해 Iba1 염색을 하고(도 10a), 운동 신경 세포를 관찰 및 계수하였다(도 10b).

- [166] 그 결과, 도 9a 및 도 9b에 나타낸 바와 같이, 120일령 마우스의 DMSO TG군에서는 DMSO Non-TG군에 비해 GFAP 강도가 유의하게 증가하였고, 동일한 부위에서 TGF- β 1도 증가하였다. 정상교세포 활성 및 TGF- β 1의 이러한 증가는 Hal TG군에서 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 9b). 한편, 미세아교세포는 DMSO TG군에서 유의한 증가를 보였고, Hal TG군에서도 미세아교세포가 지속적으로 증가함을 확인하였다(도 9a).
- [167] 또한, 도 9c에 나타낸 바와 같이, 120일령 마우스의 DMSO non-TG군과 비교하여 DMSO TG군에서는 GFAP 활성과 함께 IL-1 β 가 증가하여 활성화된 염증을 보였고, 이 활성화된 염증은 Hal TG군에서 억제되었다(도 9c).
- [168] 또한, 도 9d 내지 도 9f에 나타낸 바와 같이, 120일령 마우스의 DMSO TG군에서 ChAT의 모든 mRNA 수준, ChAT 양성 운동신경세포의 수 및 ChAT 발현이 DMSO Non-TG군보다 유의하게 낮게 나타나는 반면, Hal TG군에서는 DMSO Non-TG군과 유사하게 보존되는 것을 확인하였다(도 9d 내지 도 9f).
- [169] 아울러, 도 10a 및 도 10b에 나타낸 바와 같이, 상기와 같은 변화는 90일령 마우스에서도 유사하게 나타났다(도 10a 및 도 10b).
- [170] 상기의 결과를 통해 ALS 마우스의 CNS에서 TGF- β 의 증가가 염증 반응의 증가 및 그에 따른 운동신경세포의 감소와 관련이 있으며, 이 과정은 할로푸지논 투여에 의해 억제될 수 있음을 알 수 있다.
- [171] <실험예 9> ALS 동물모델에서 할로푸지논 투여에 의한 CNS의 만성 염증 및 신경세포사멸 억제 확인
- [172] ALS에 있어서 할로푸지논 투여가 CNS의 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여, ALS 동물모델에 할로푸지논을 투여한 후 요추 척수를 이용하여 실시간 qRT-PCR 분석 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- [173] 구체적으로, 상기 <실시예 6>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 G93A 돌연변이 SOD1 마우스에 할로푸지논을 투여하고, 생후 120일 마우스를 희생한 후 요추 척수를 분리하였다. 그 다음, CNS의 염증 관련 인자 및 신경세포사멸 관련 인자의 mRNA 발현을 상기 <실시예 11>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 실시간 qRT-PCR 분석을 수행하여 확인하였고(도 11a), 신경세포사멸 관련 인자의 단백질 발현을 상기 <실시예 12>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 확인하였다(도 11b). 미세아교세포의 M1 또는 M2 아형에 따라 역할(전염증 또는 항염증 효과)이 다르기 때문에 CNS의 염증 관련 인자로는 M1 표지자(iNOS, CD86), M2 표지자(arginase 1)와 전염증 인자(IFN- α , TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 발현을 확인하였다. 또한, 신경세포사멸 관련 인자로 caspase-3, bax, bcl-2의 발현을 확인하였다.
- [174] 그 결과, 도 11a에 나타낸 바와 같이, DMSO TG군에서 TGF- β 의 mRNA 수준에

따라 M1 표지자 및 전염증성 인자의 mRNA 수준이 유의하게 증가되며, 이는 할로푸지논에 의해 억제됨을 확인하였다. 또한, 항신경세포사멸 인자인 bcl-2의 mRNA 수준은 DMSO Non-TG군 비교하여 DMSO TG군에서 감소하였고, Hal TG군에서 보존되는 것을 확인하였다(도 11a).

[175] 또한, 도 11b에 나타낸 바와 같이, DMSO Non-TG군과 비교하여 DMSO TG군에서 신경세포사멸 인자인 절단된 카스파제-3(cleaved caspase-3) 및 bax의 단백질 발현은 증가하고 항신경세포사멸 인자인 bcl-2는 감소하였으며, 이러한 변화는 Hal TG군에서 개선되는 것을 확인하였다(도 11b).

[176] 상기의 결과를 통해 할로푸지논이 ALS 마우스에서 지속적으로 증가된 TGF- β 를 차단하여 CNS에서 항염증 효과를 나타내고 신경세포사멸을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

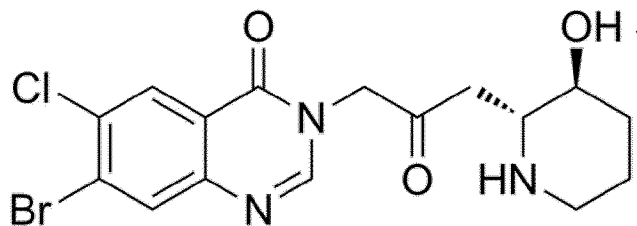
[177] 상기 <실험예 1> 내지 <실험예 9>의 결과를 통해 할로푸지논이 ALS에 있어서 TGF- β 증가로 인한 관절 구축 개선 및 CNS의 만성 염증 및 신경세포사멸 억제라는 이중 치료 효과를 나타냄을 확인하였다. 따라서, 상기 할로푸지논은 ALS를 포함한 TGF- β 증가에 의한 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

산업상 이용가능성

[178] 본 발명에서는 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 세포모델 및 동물모델에서 할로푸지논(Halofuginone)이 섬유증을 억제하고 골격근 생성을 향상하여 관절 구축을 개선하고 중추신경계의 염증 반응 및 신경세포사멸을 억제하는 이중 효과를 나타내어, ALS의 증상 진행을 지연시키고 수행 능력 및 생존기간을 향상시킬 수 있음을 확인하였으므로, 상기 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 ALS를 포함한 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

청구범위

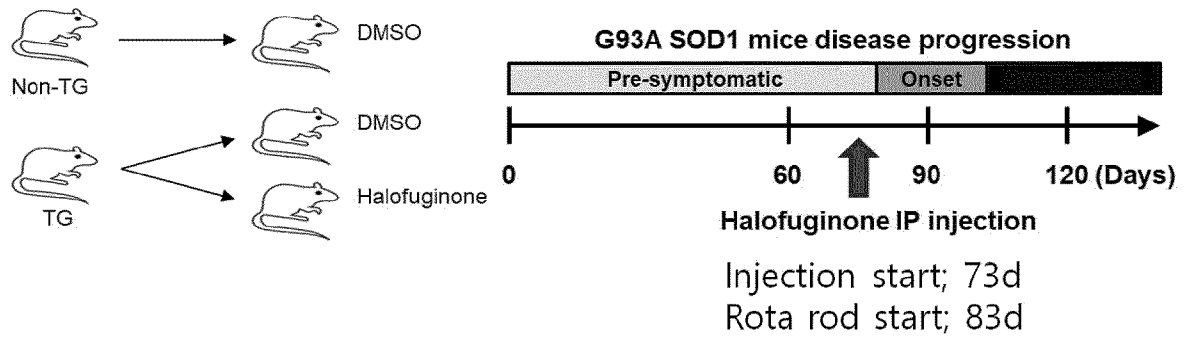
- [청구항 1] 할로푸지논(Halofuginone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 TGF- β 억제제인, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 할로푸지논은 하기 [화학식 1]로 기재되는 화합물인, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물: [화학식 1]



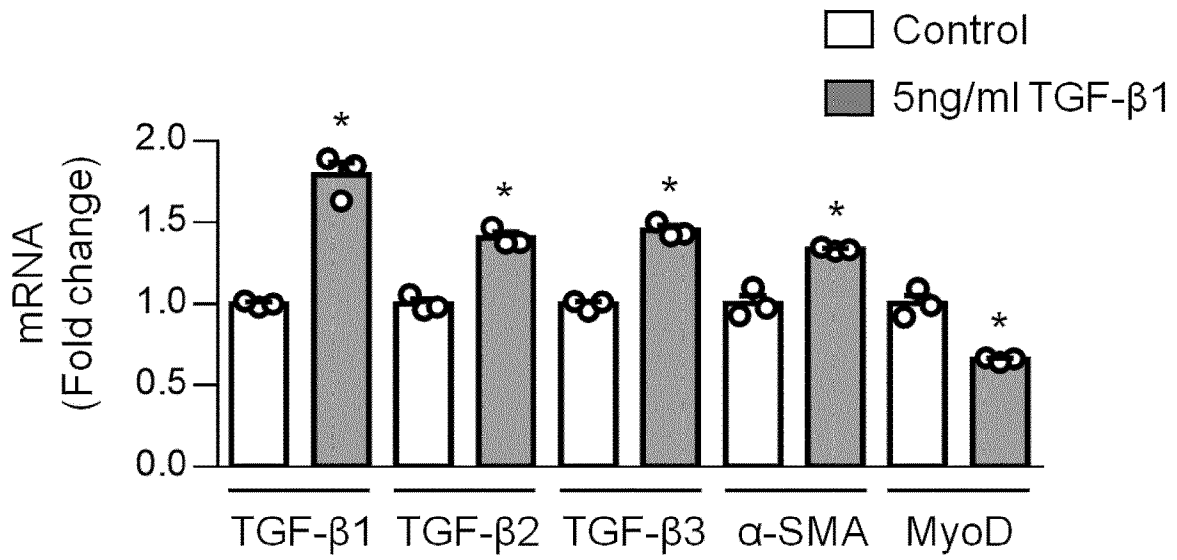
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 할로푸지논은 관절 활막강의 섬유증을 완화하고, 골격근 생성을 향상하는 것인, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 할로푸지논은 중추신경계의 염증 반응 및 신경세포사멸을 억제하는 것인, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 할로푸지논은 신경퇴행성 또는 운동신경 질환의 증상 악화를 지연시키고, 수행 능력 및 생존기간을 향상시키는 것인, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 신경퇴행성 또는 운동신경 질환은 근위축성 측삭경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증, 근육긴장이상증, 척수성 근위축증 또는 염증성 신경병증인, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 9] 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료방법.
- [청구항 10] 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 치료용 약제로 제조하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.
- [청구항 11] 신경퇴행성 또는 운동신경 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 제조하기 위한 할로푸지논 또는 이의 약학적으로 허용가능한

염의 용도.

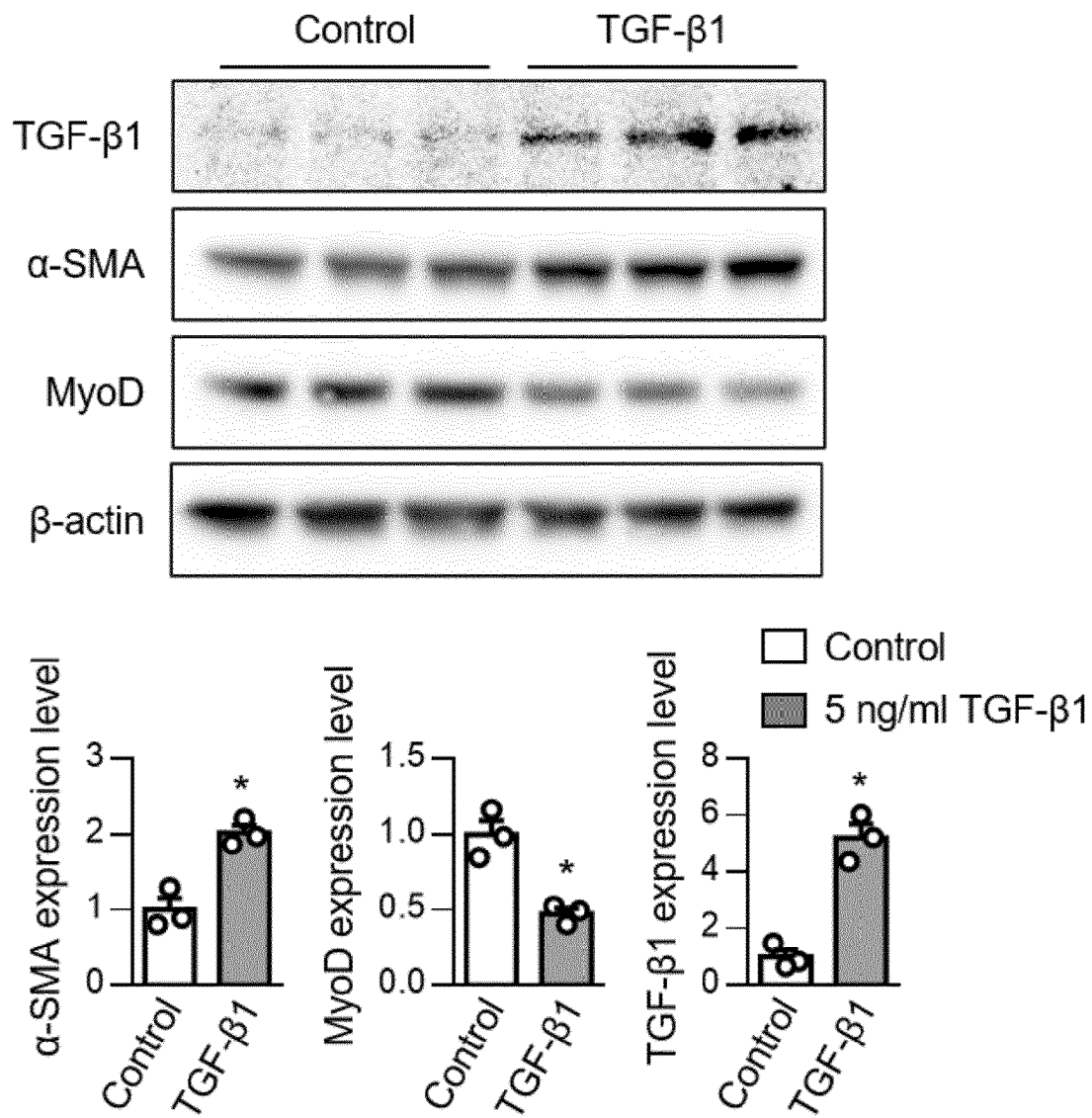
[도1]



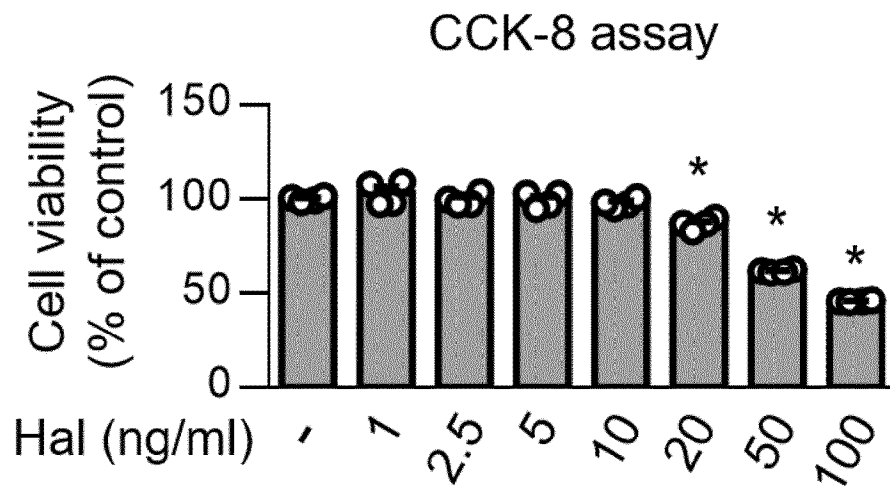
[도2a]



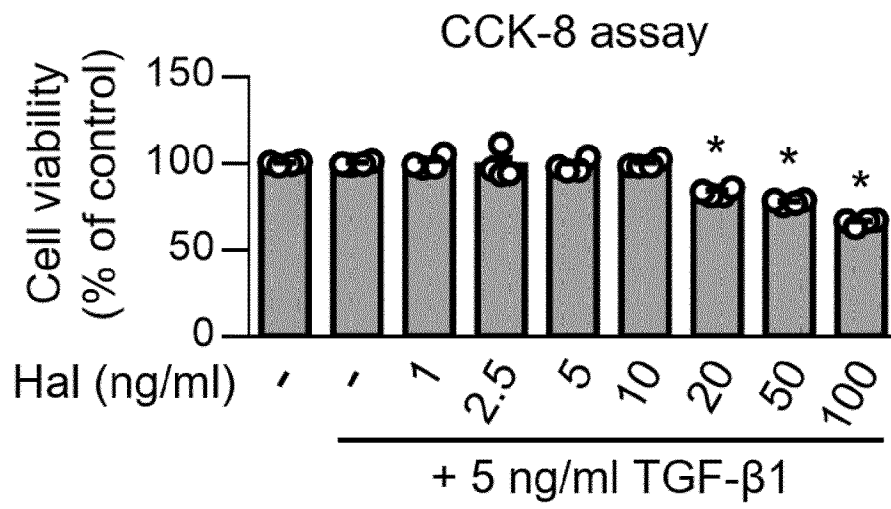
[도2b]



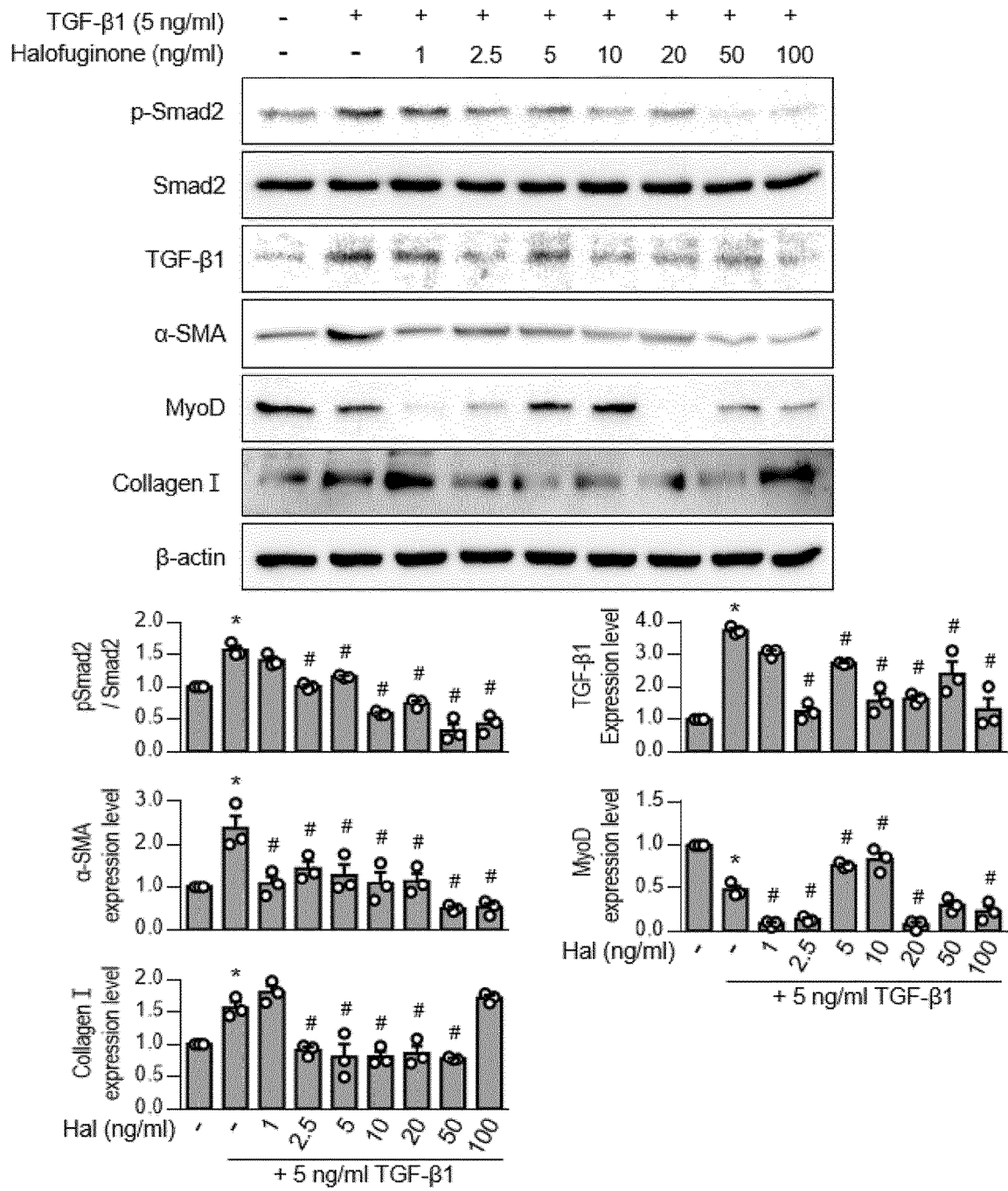
[도3a]



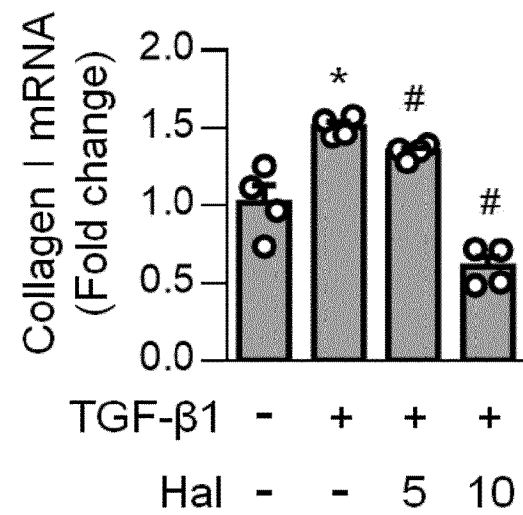
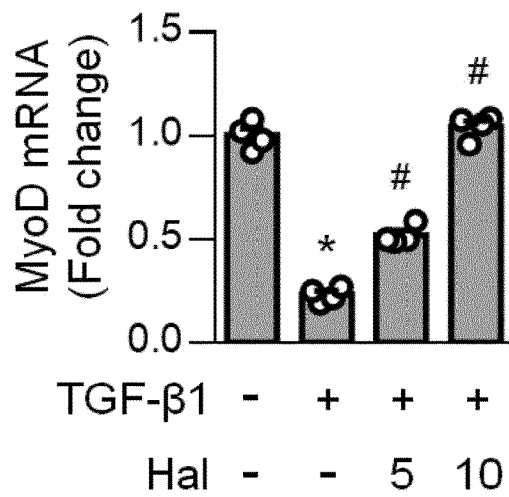
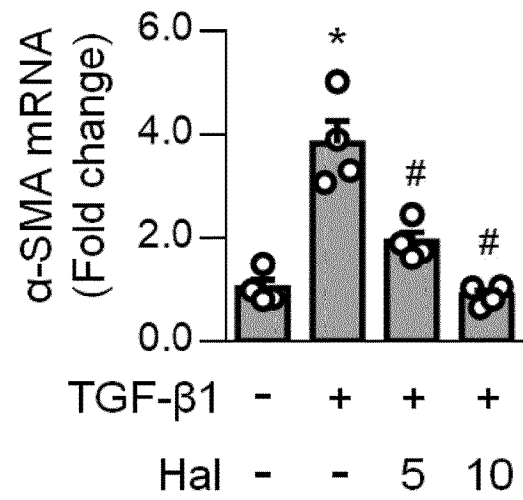
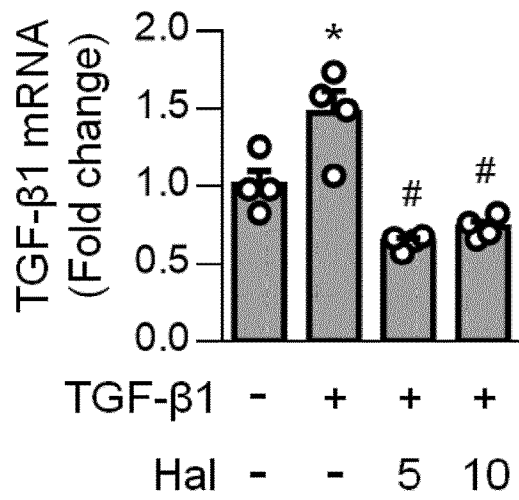
[도3b]



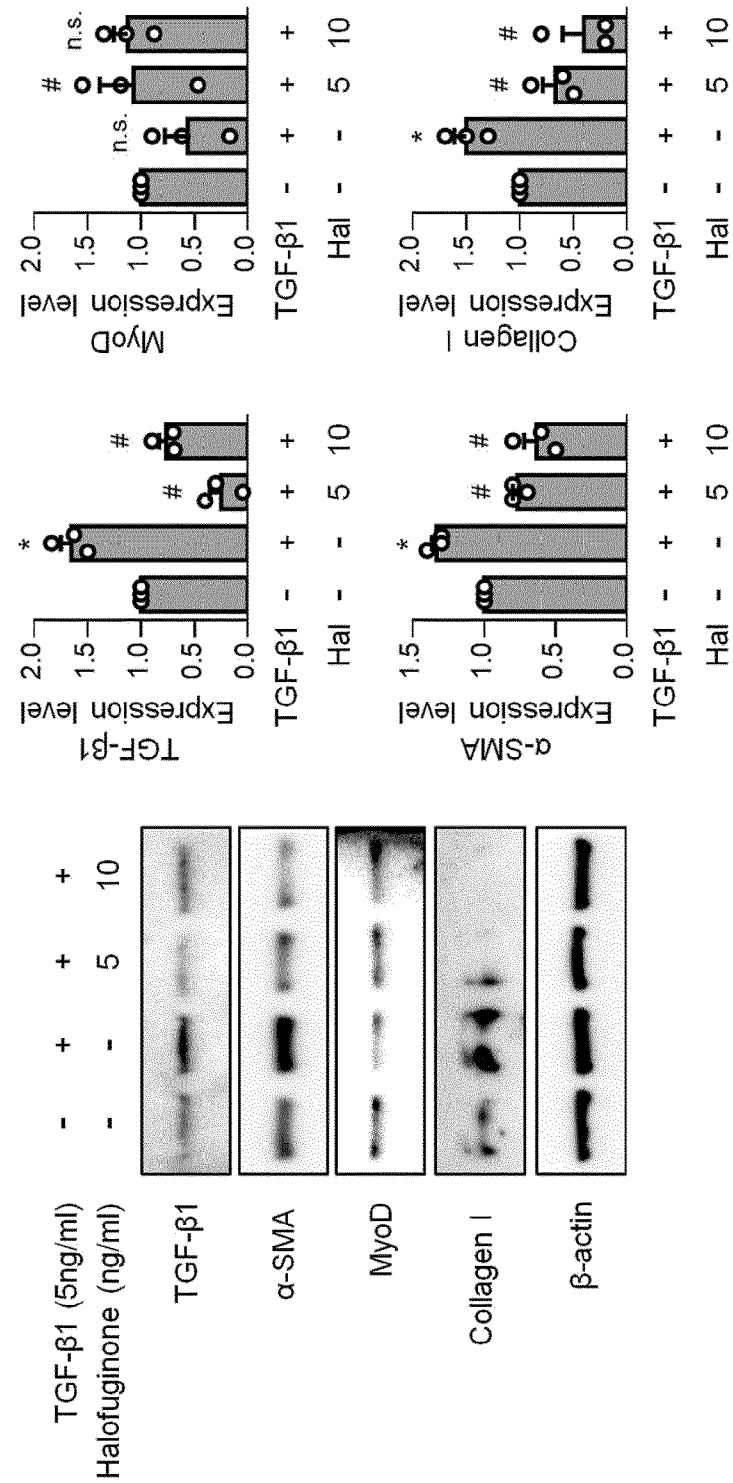
[도3c]



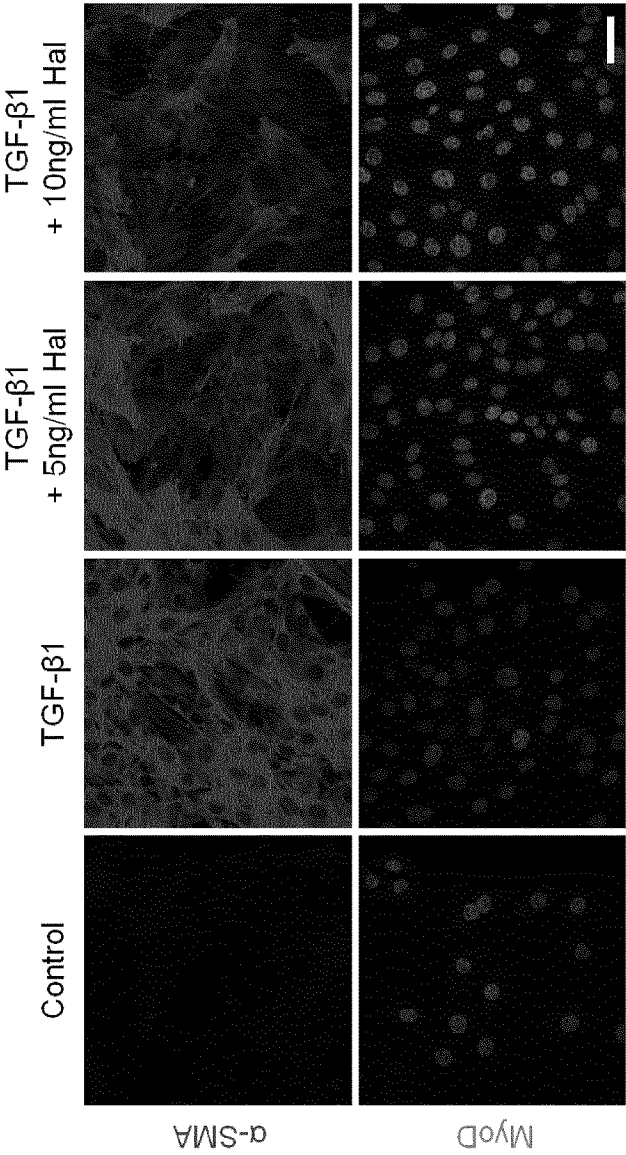
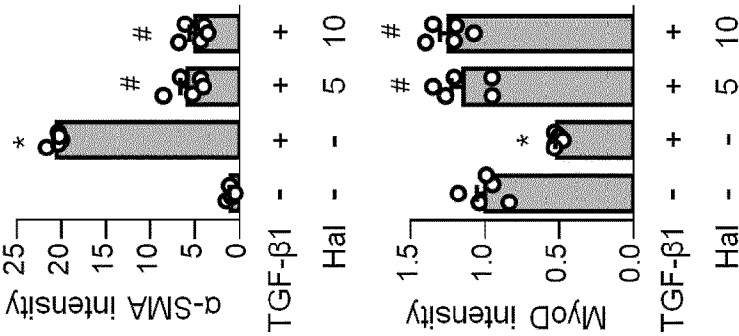
[도4a]



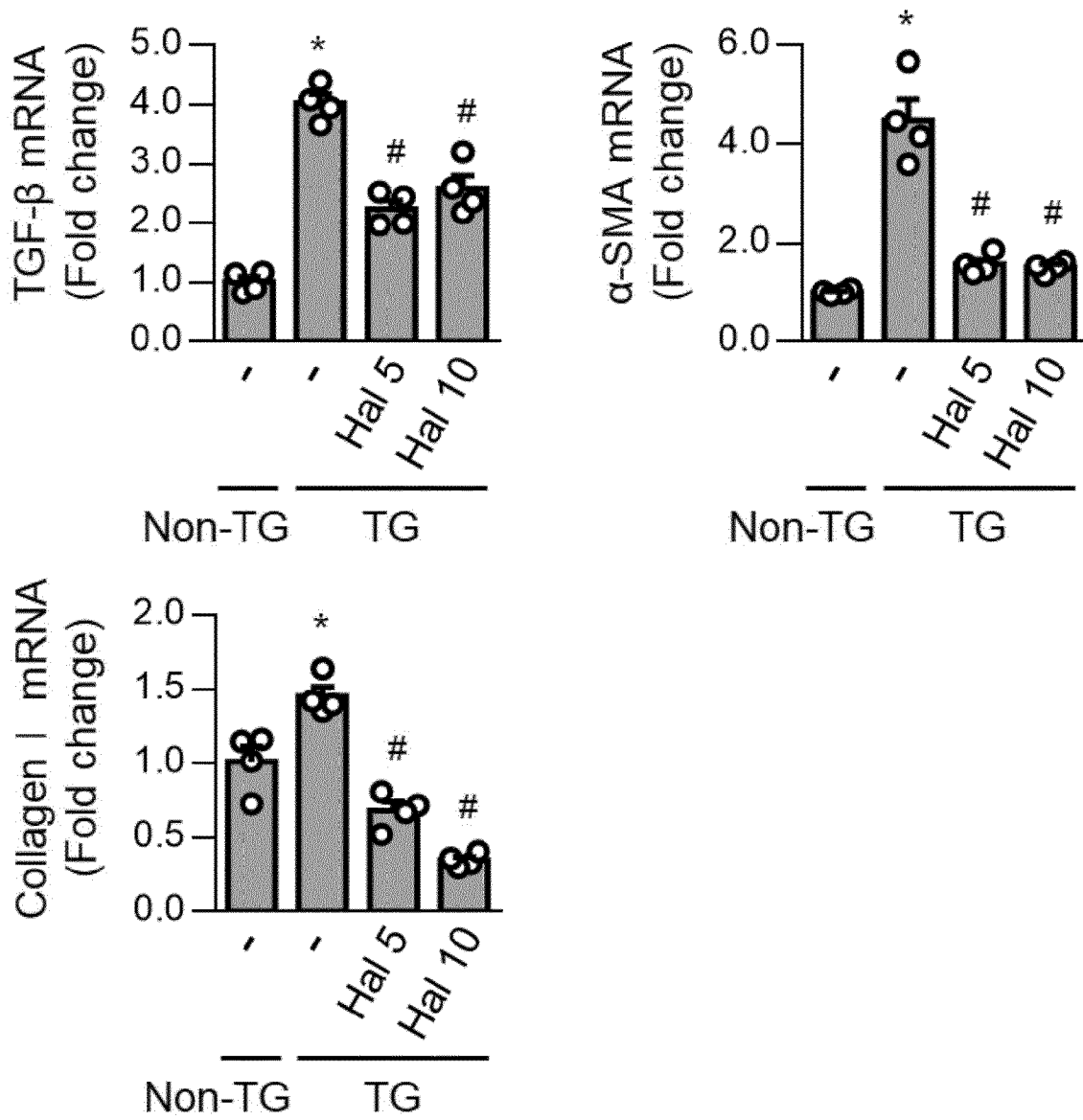
[도4b]



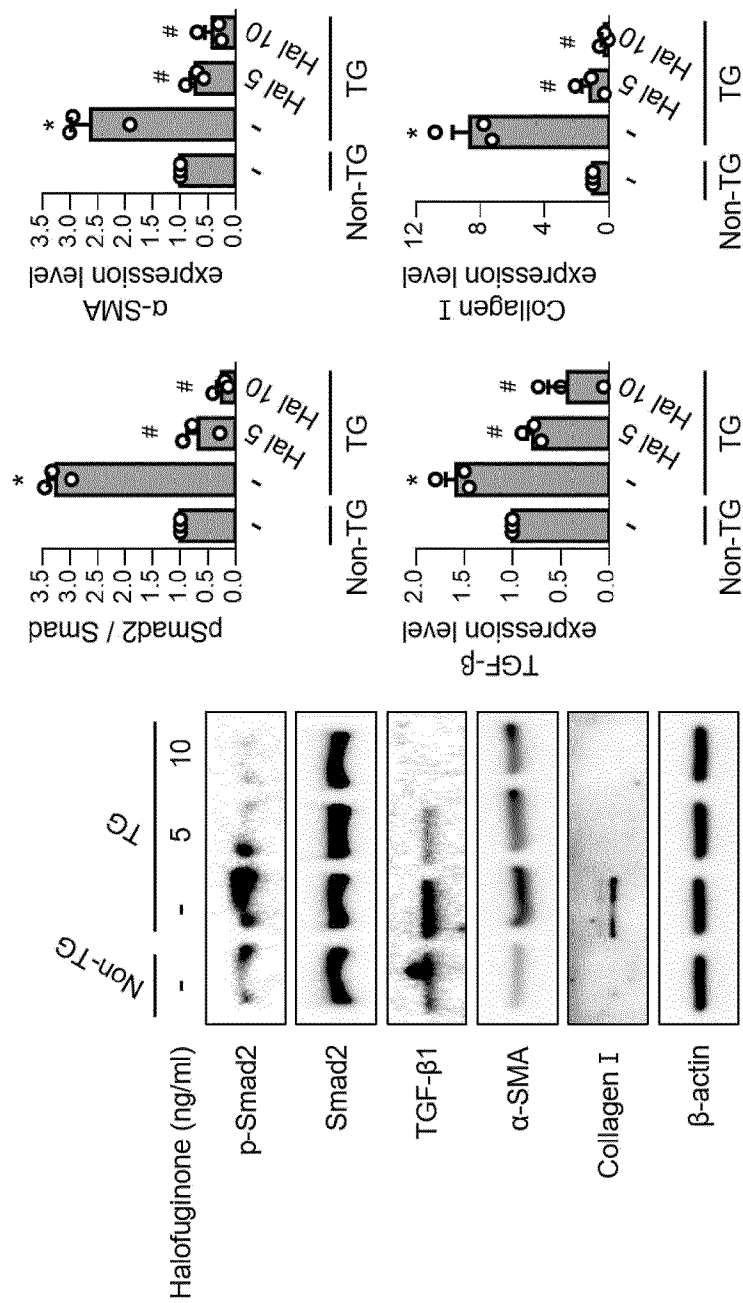
[도4c]



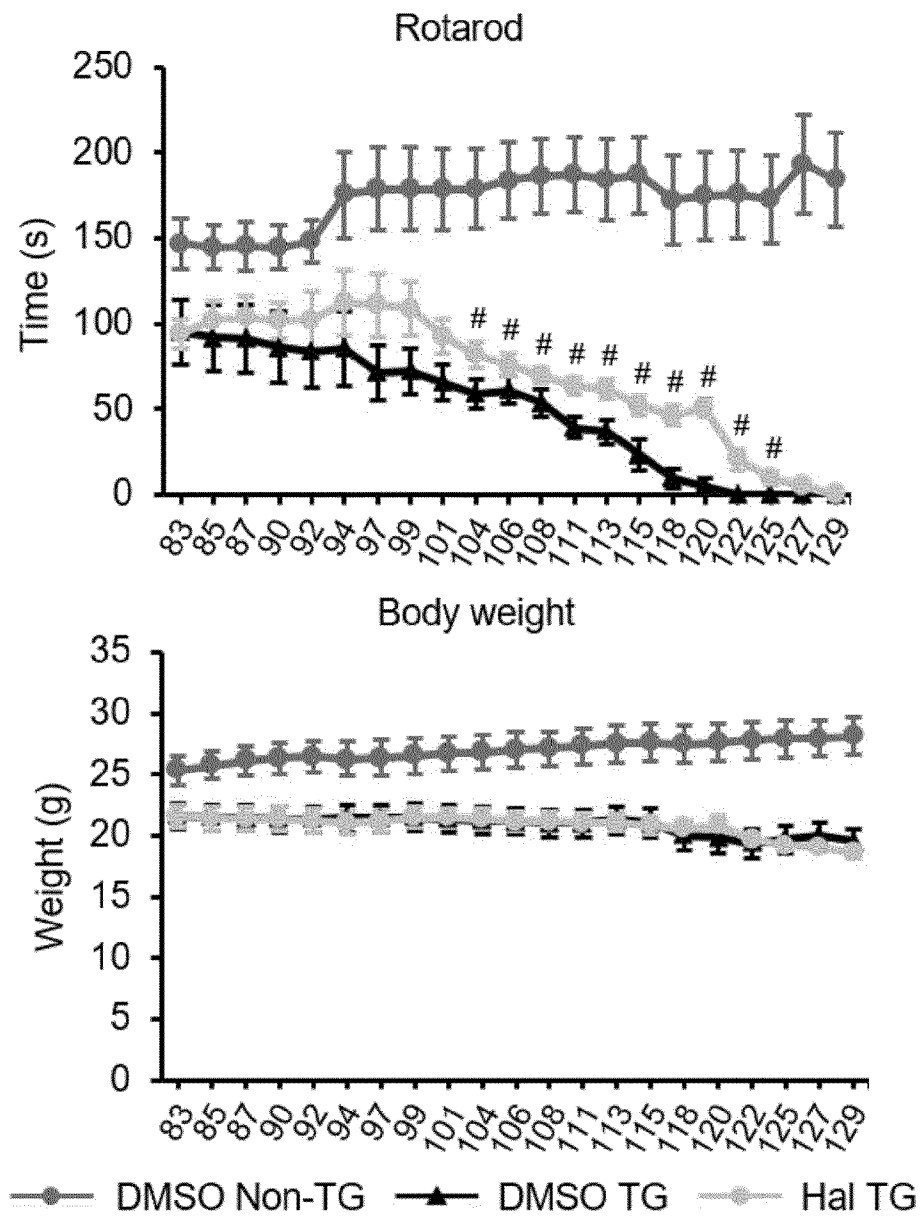
[도5a]



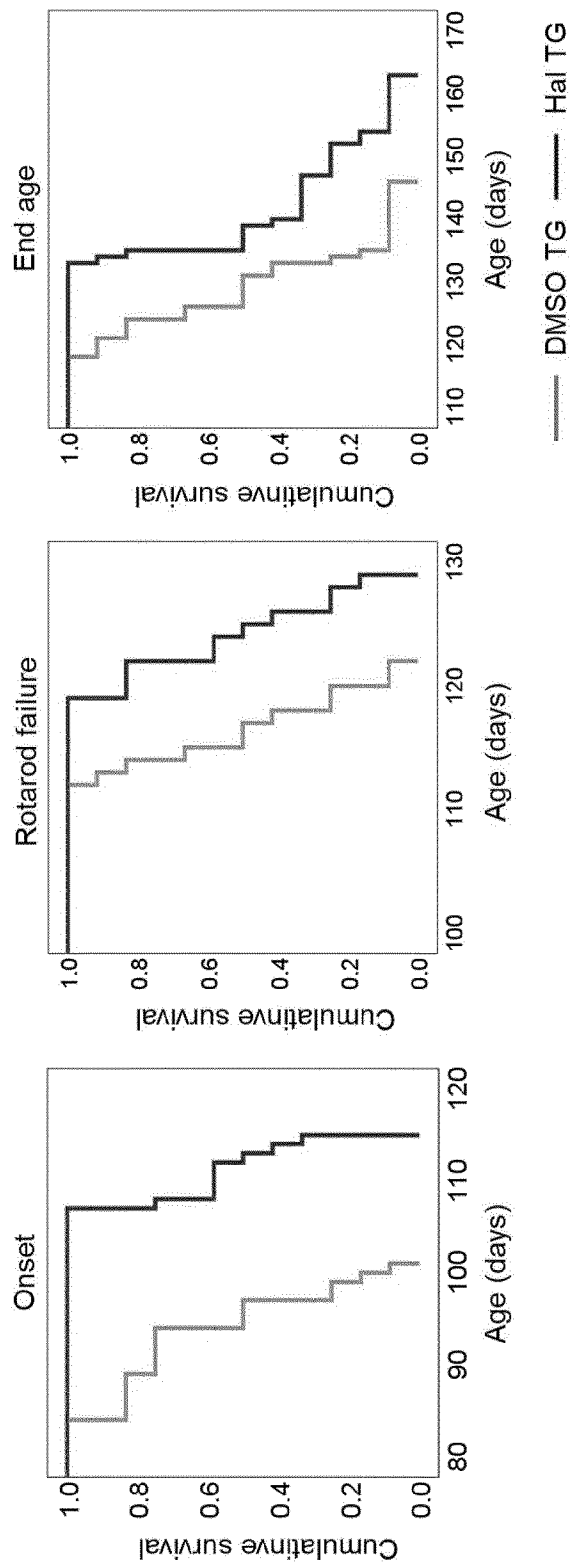
[도5b]



[도6a]



[도6b]



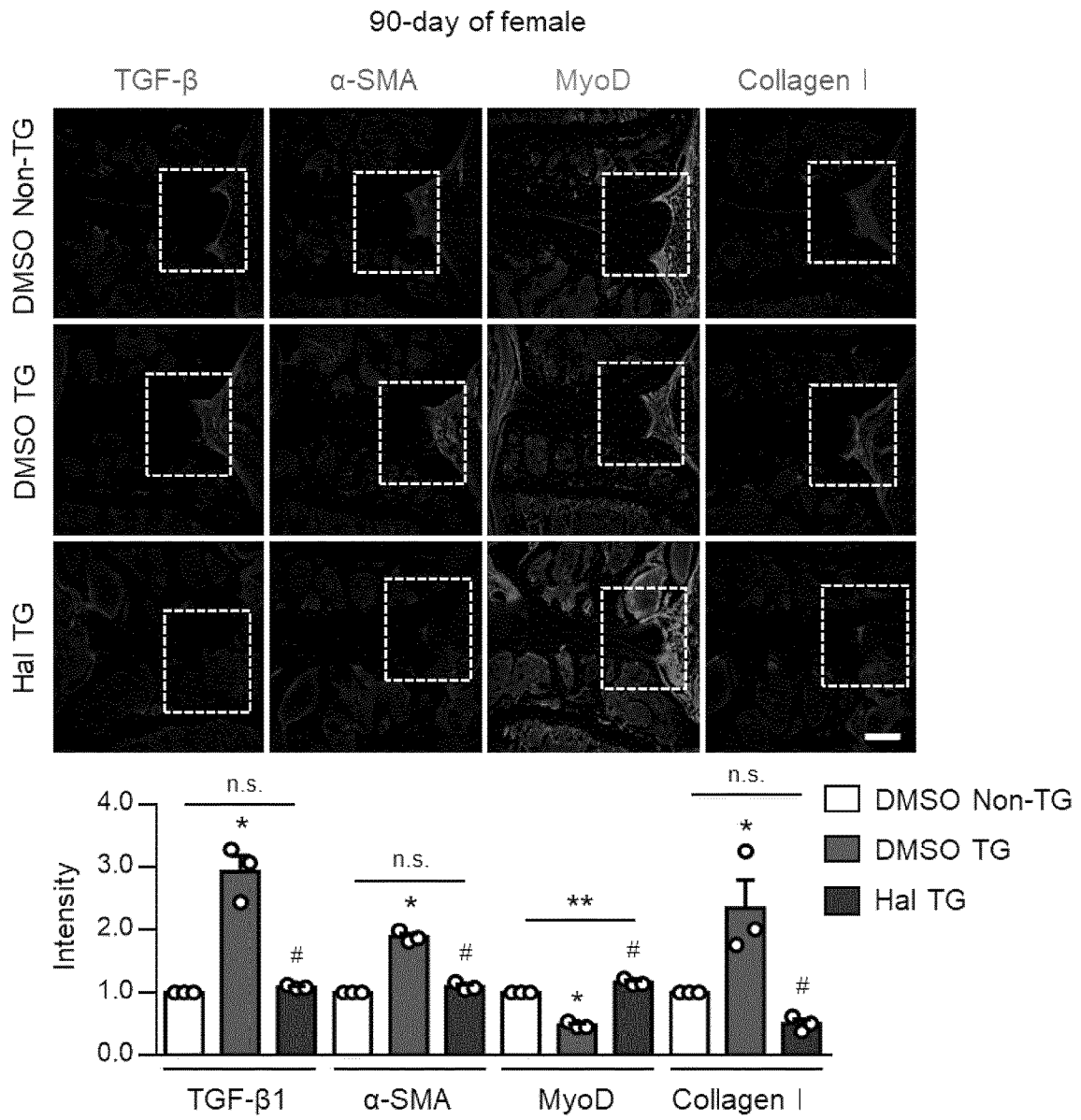
[도6c]

Group	Onset	Rotarod failure	End age
DMSO TG	94.2 ± 5.7	116.5 ± 3.1	129.3 ± 7.6
Hal TG	111.3 ± 3.6 †	124.3 ± 3.5 †	141.8 ± 9.8 †

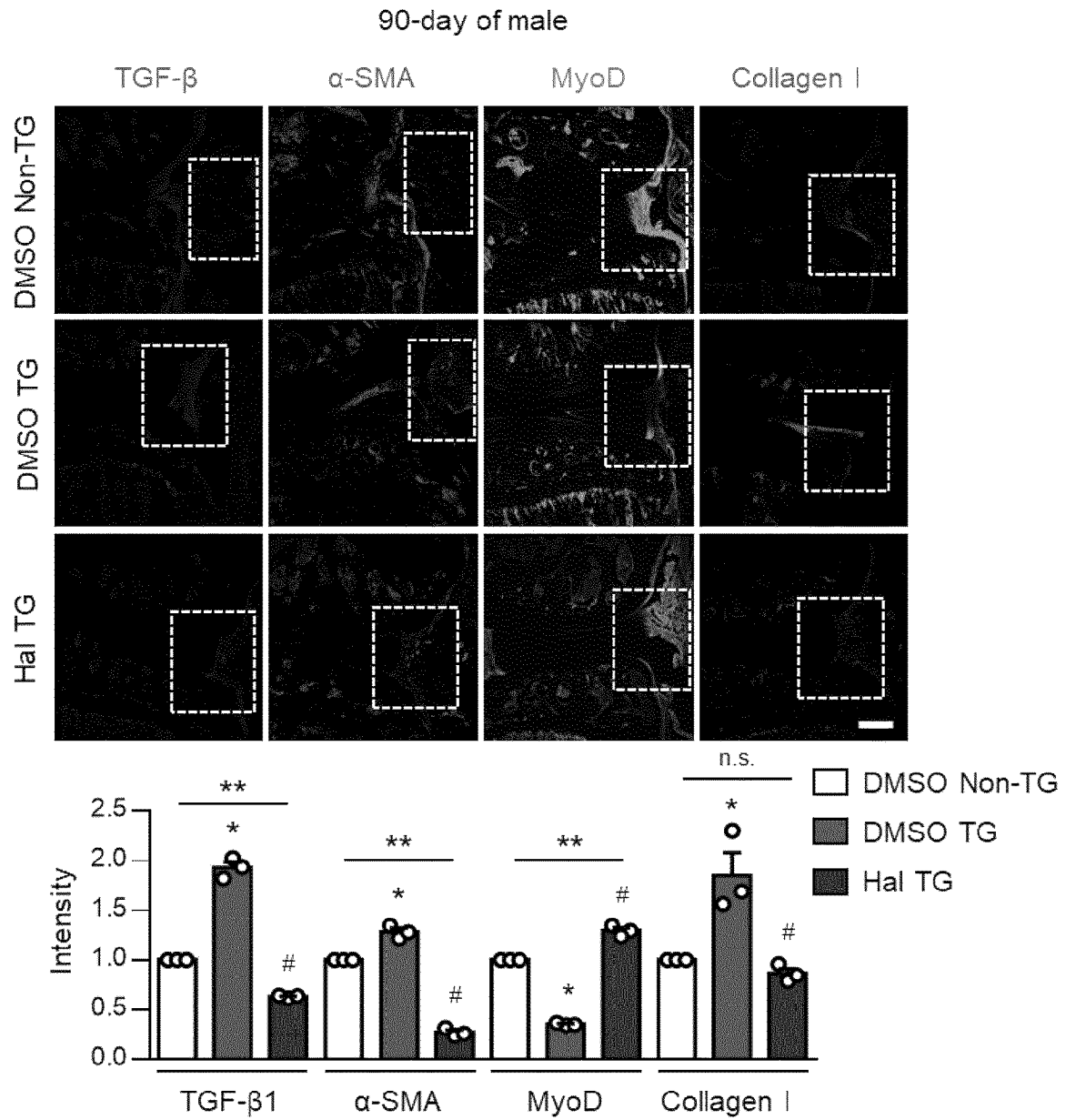
Values are shown as means ± SD

† indicates significant difference from DMSO TG (†; $p < 0.05$)

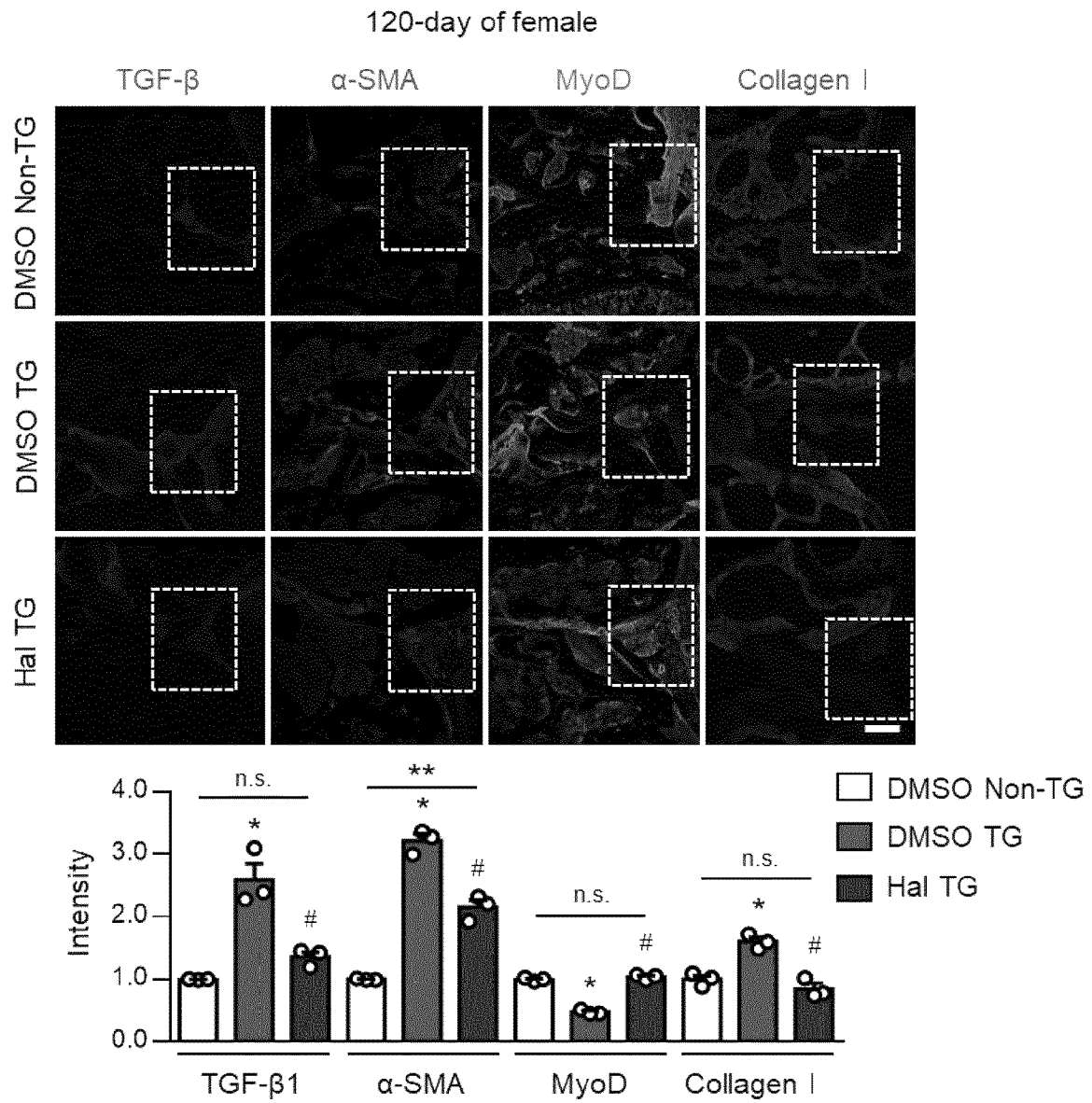
[도7a]



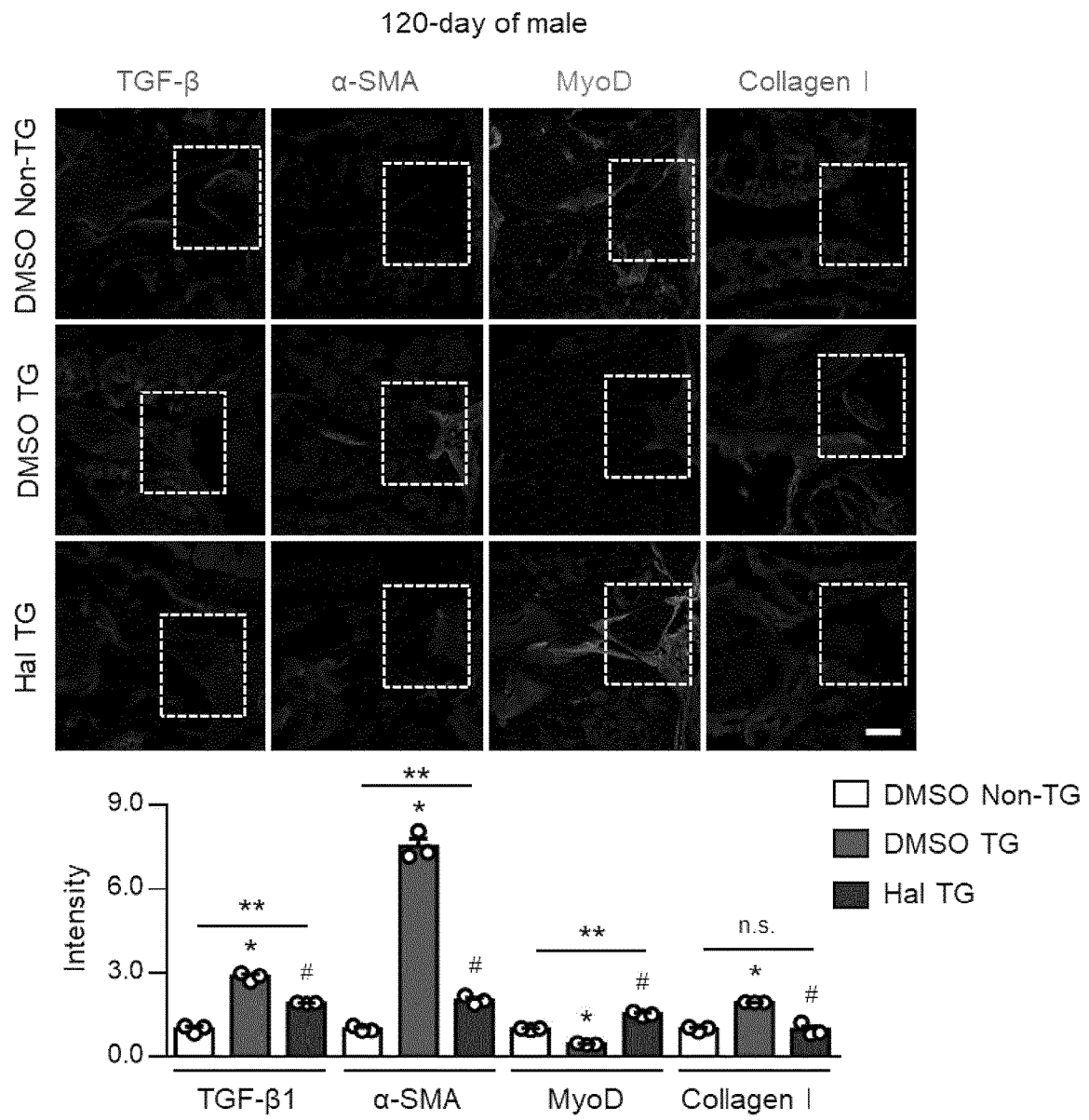
[도7b]



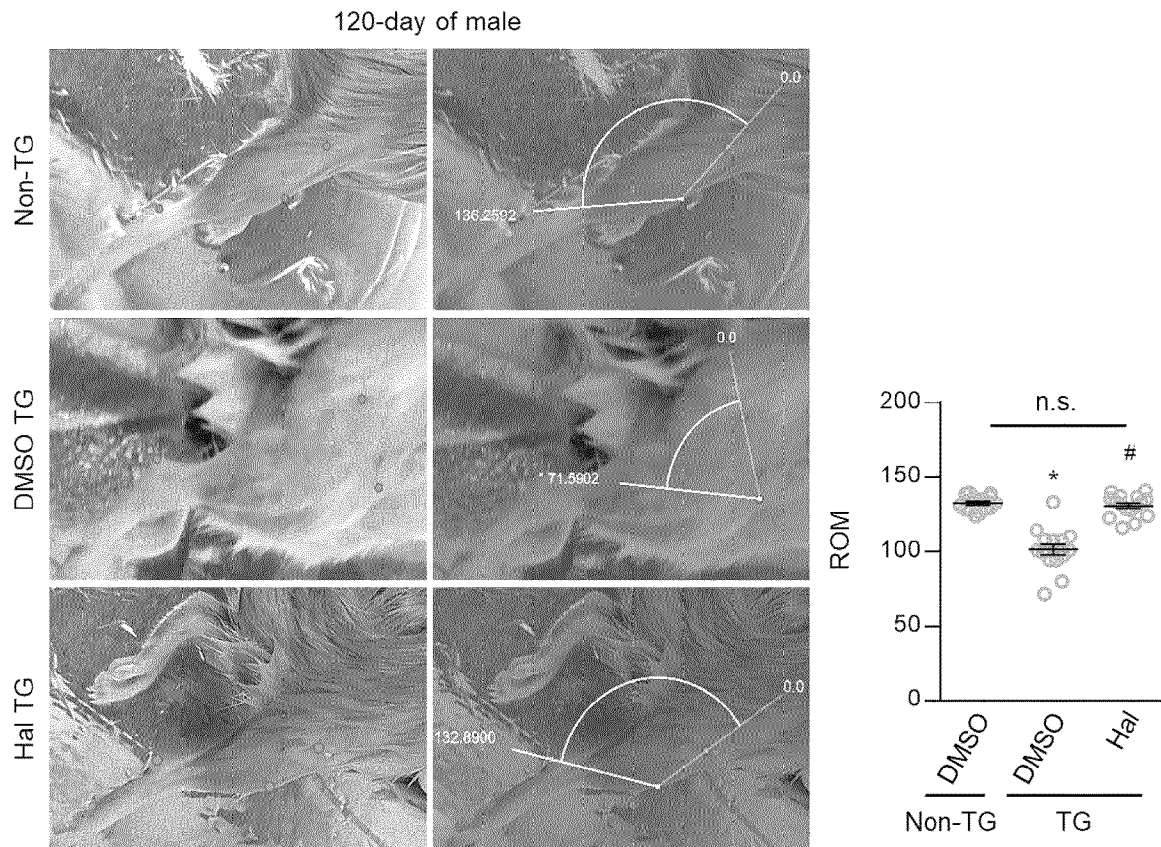
[도7c]



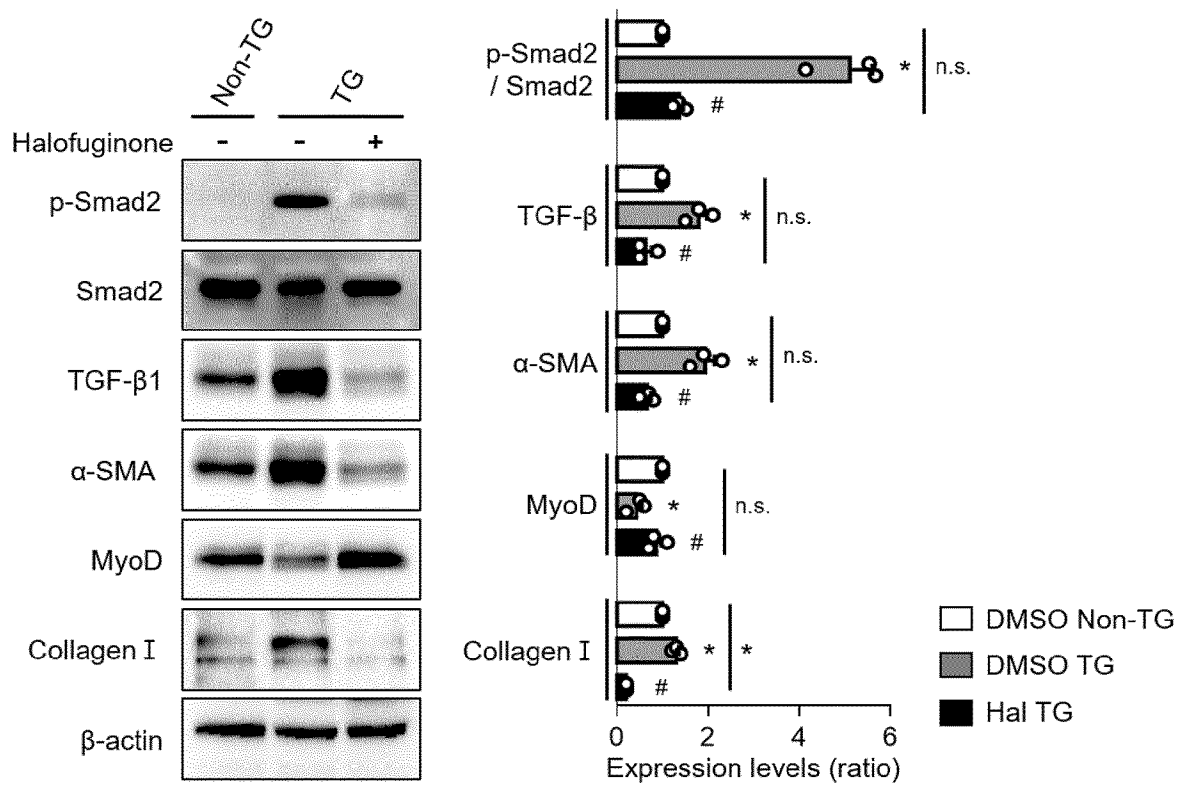
[도7d]



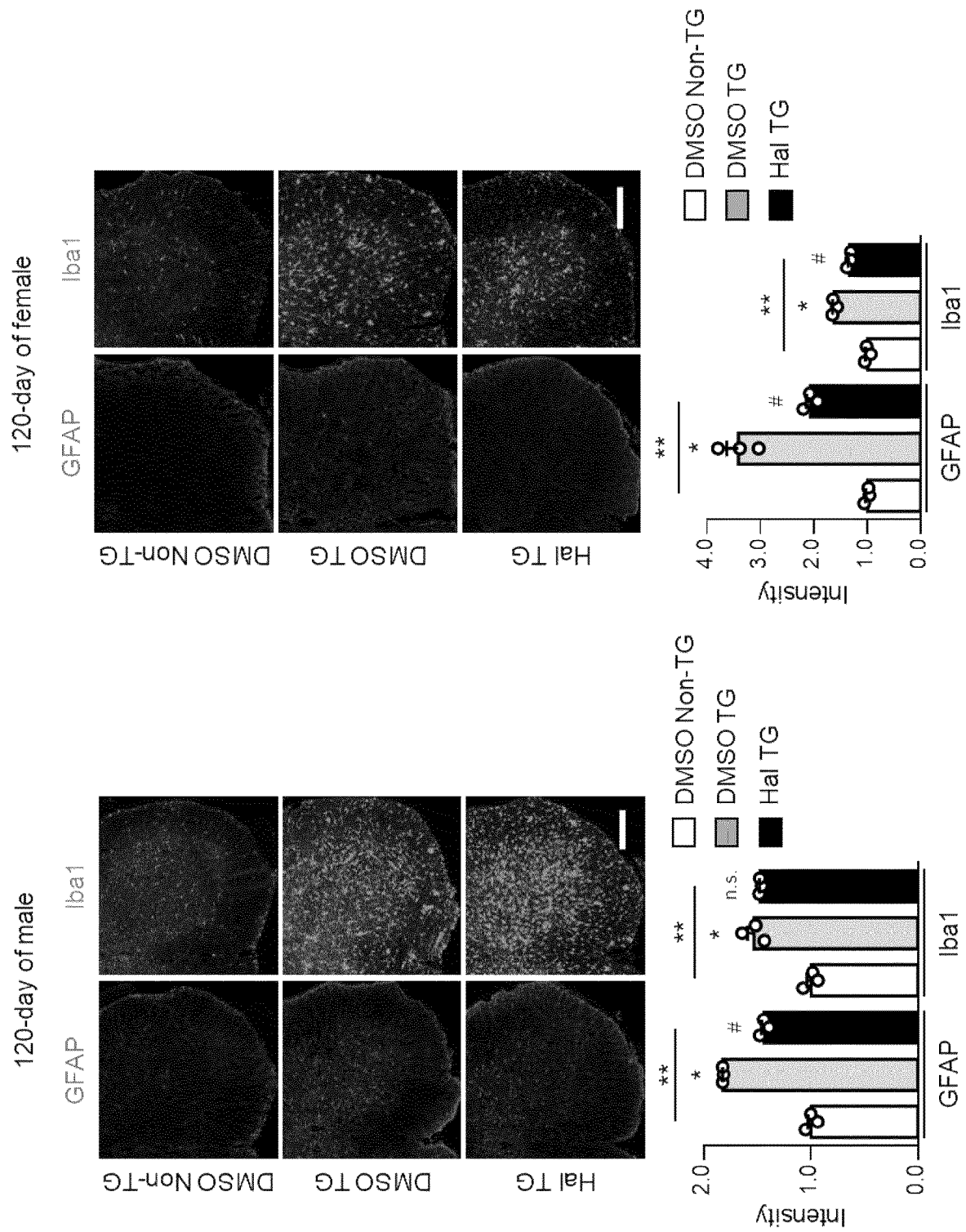
[도8a]



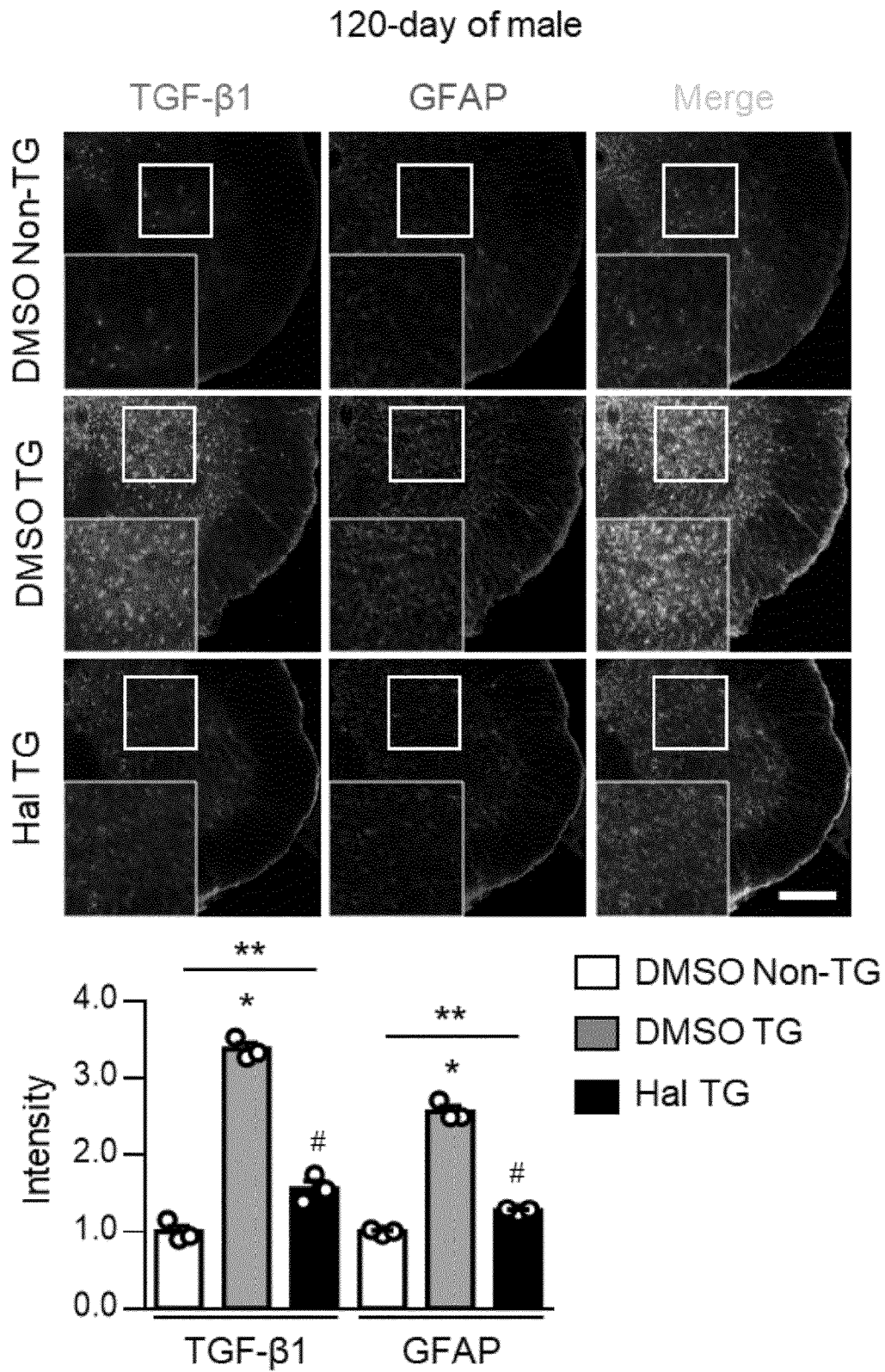
[도8b]



[도9a]

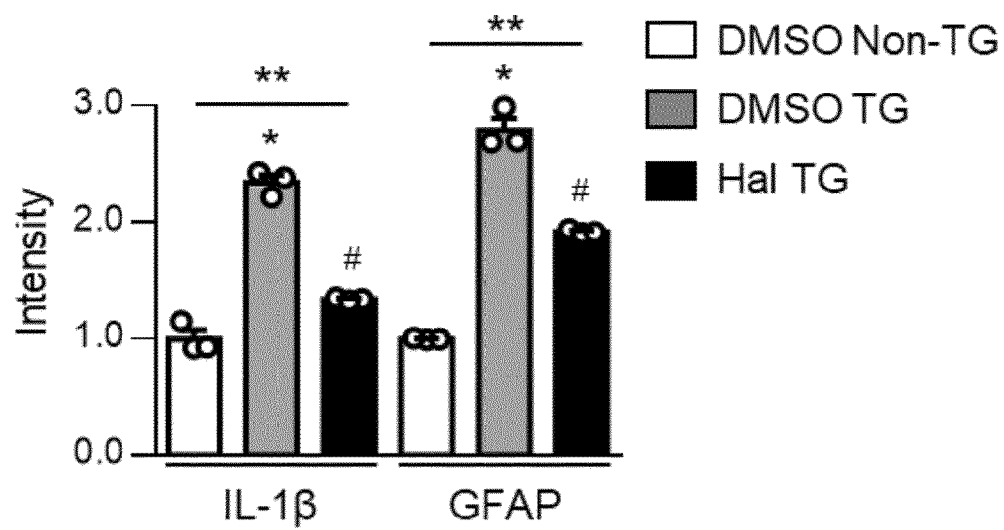
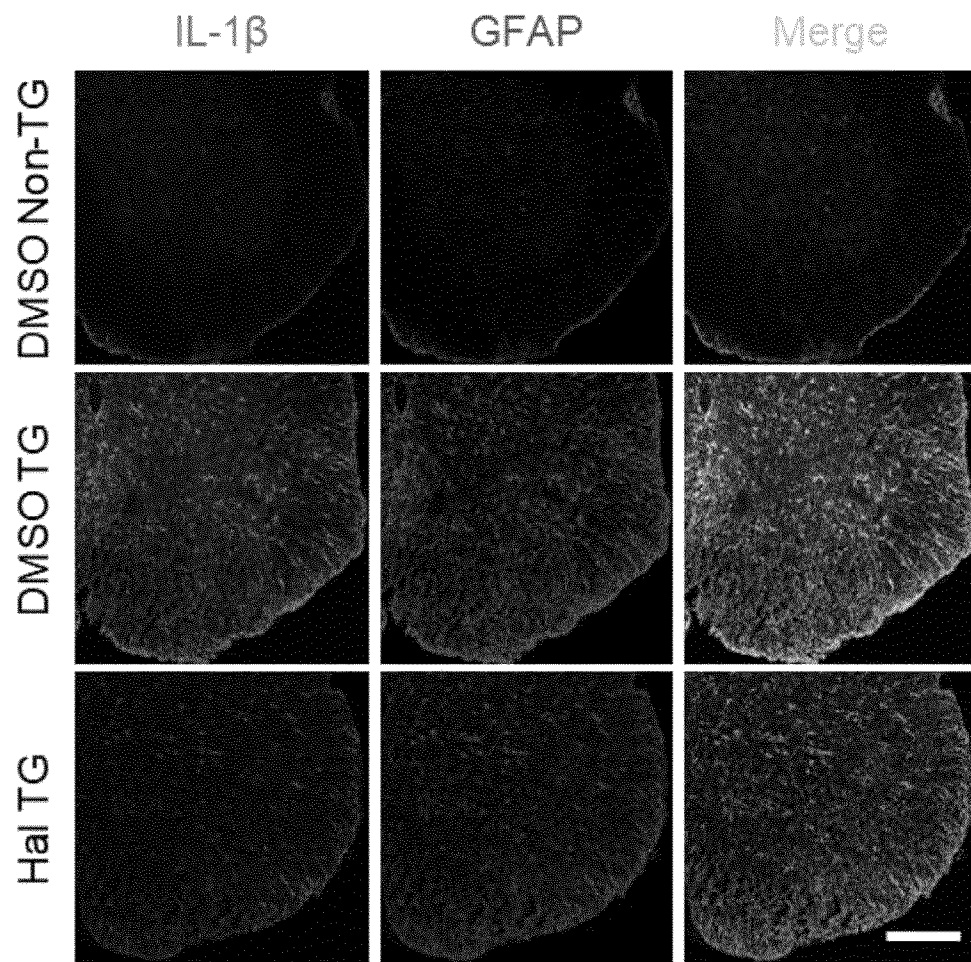


[도9b]

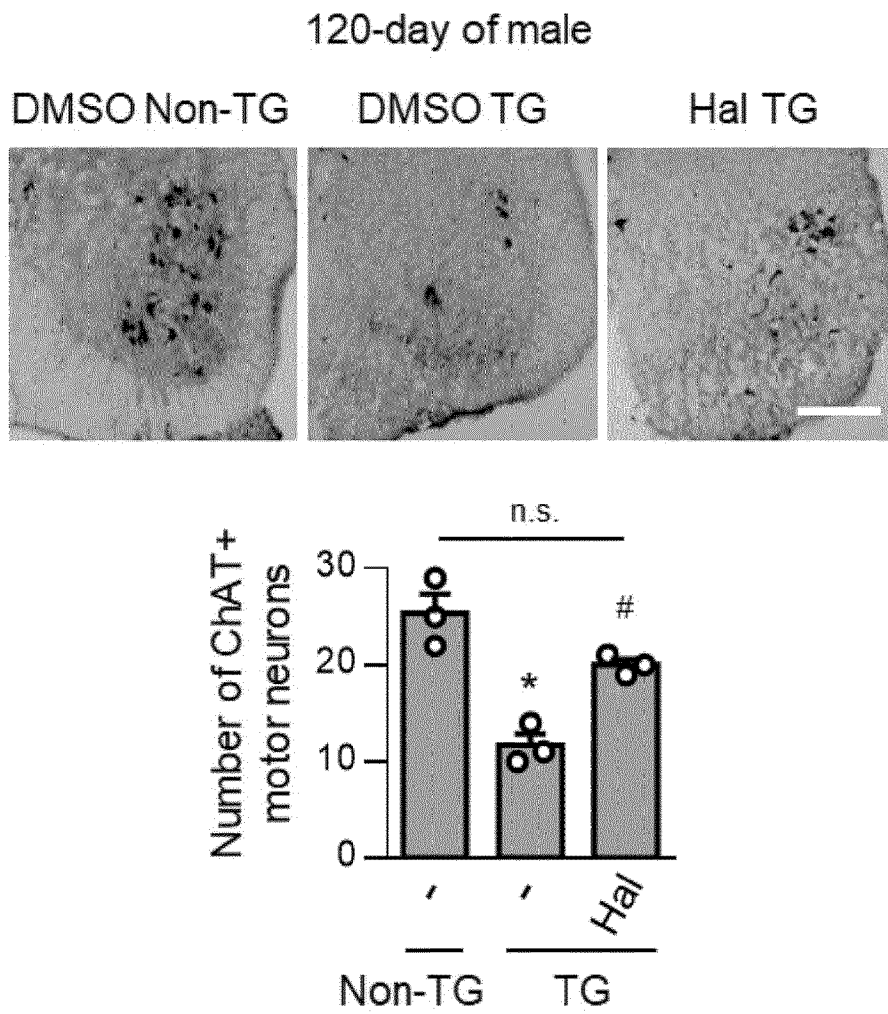


[도9c]

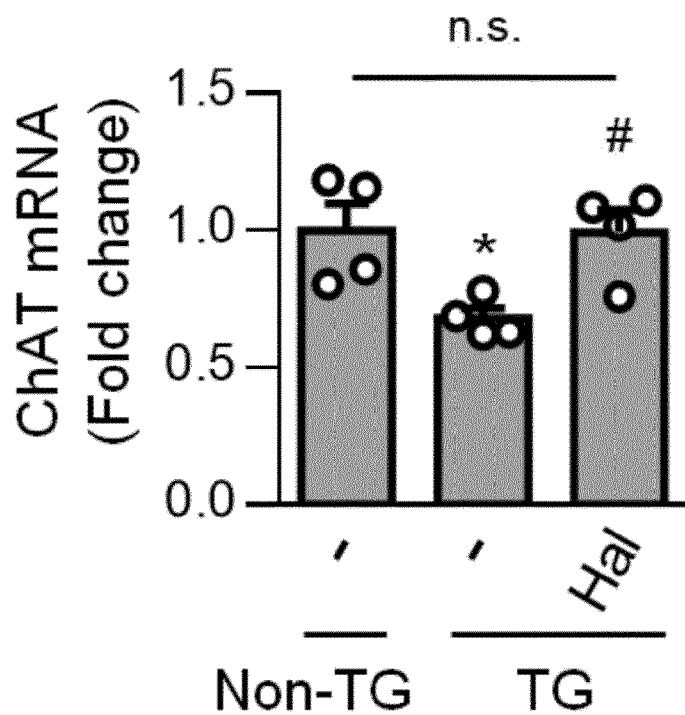
120-day of male



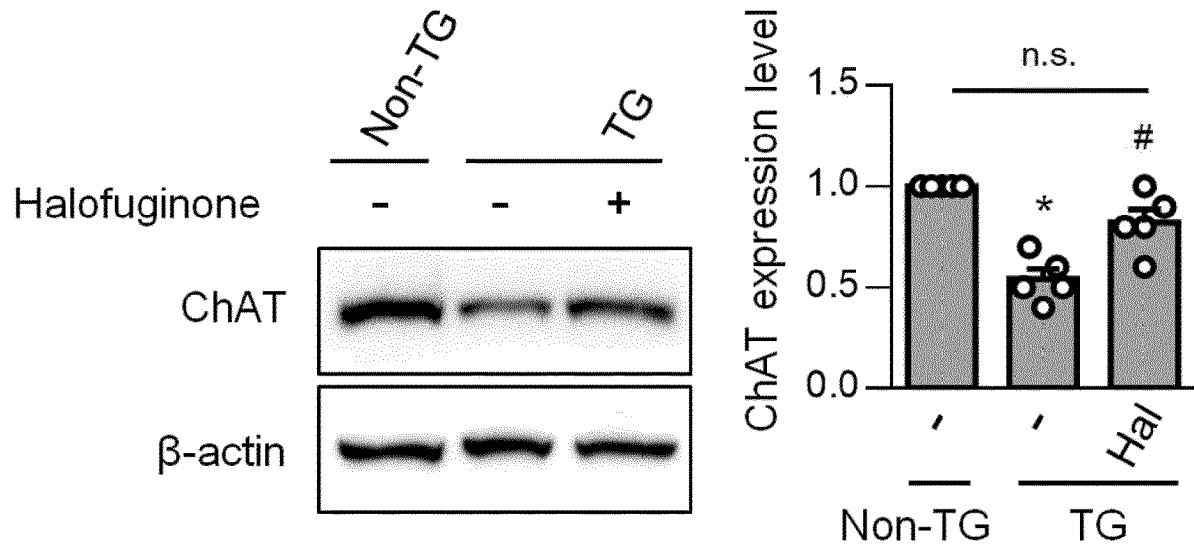
[도9d]



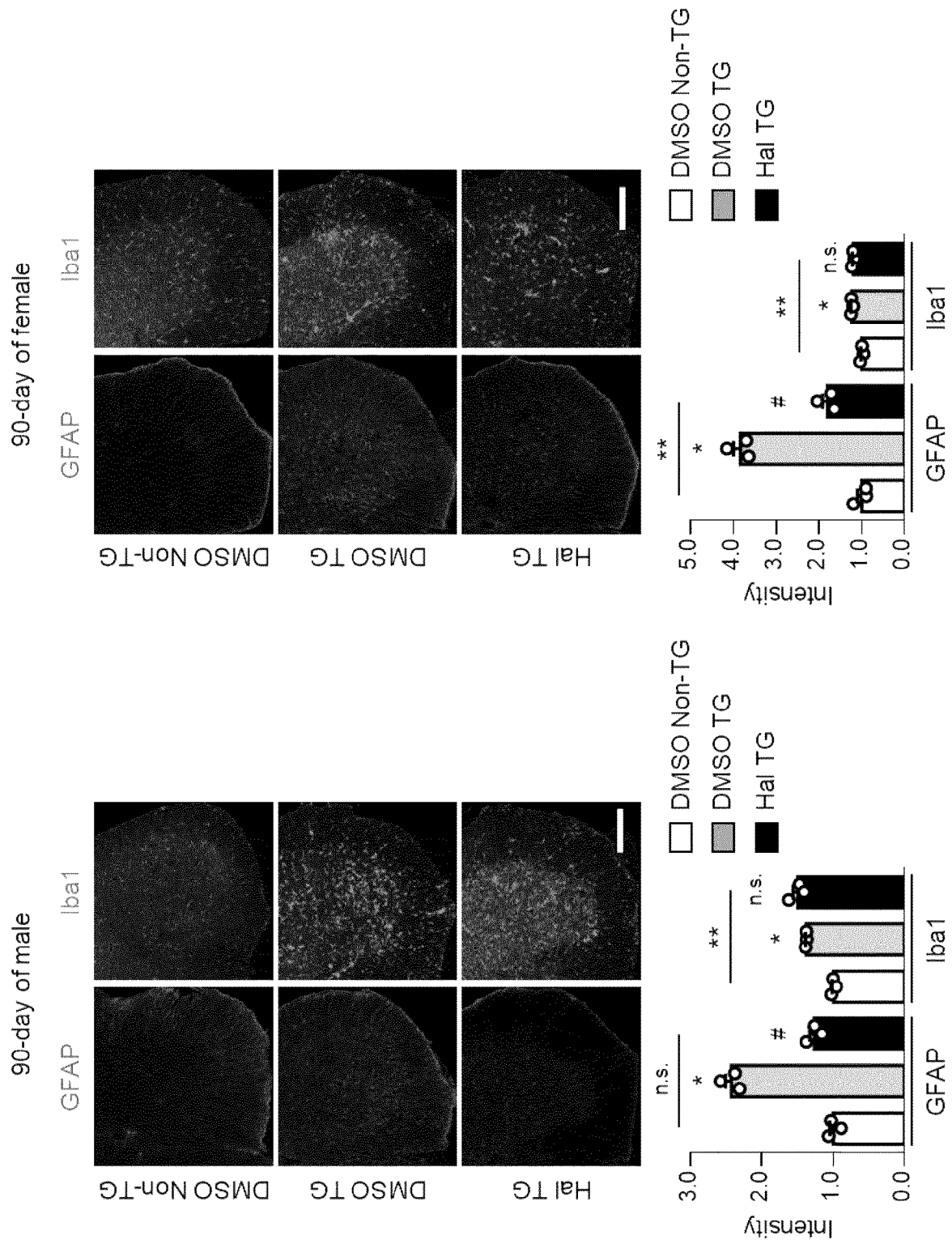
[도9e]



[도9f]

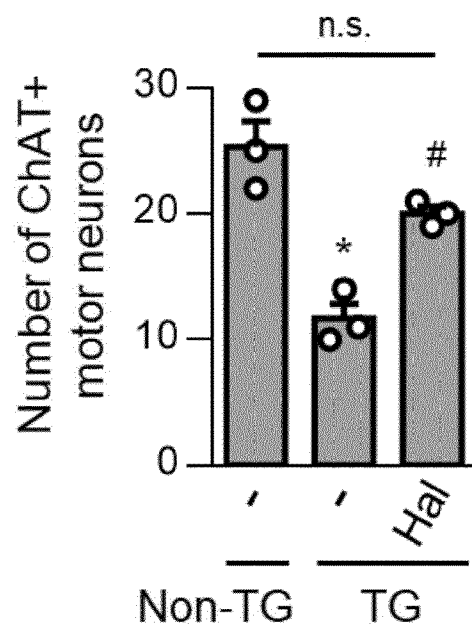
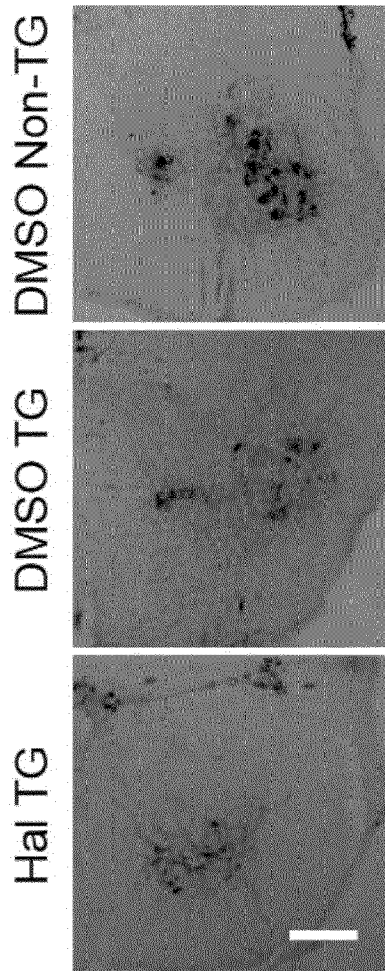


[도 10a]

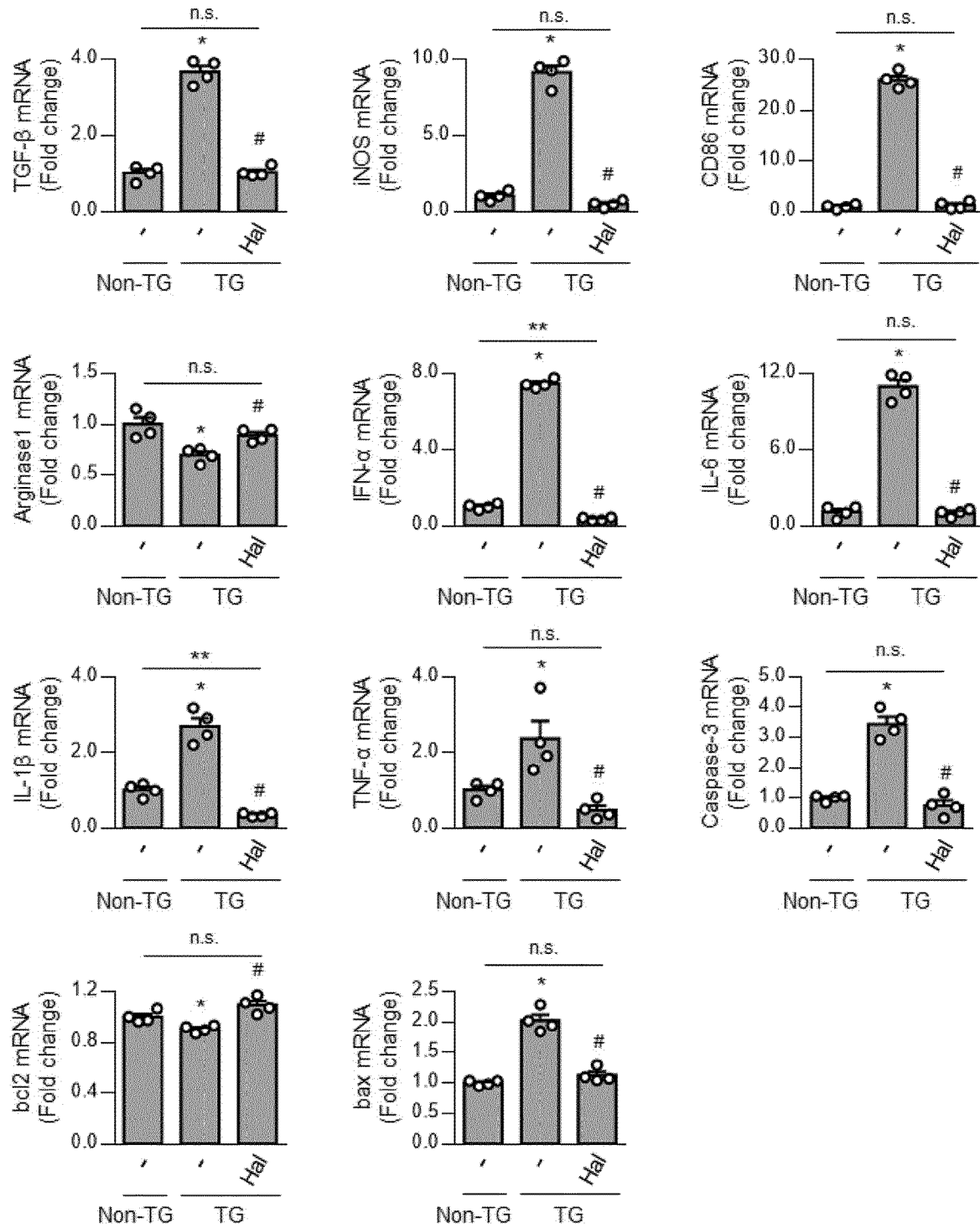


[도10b]

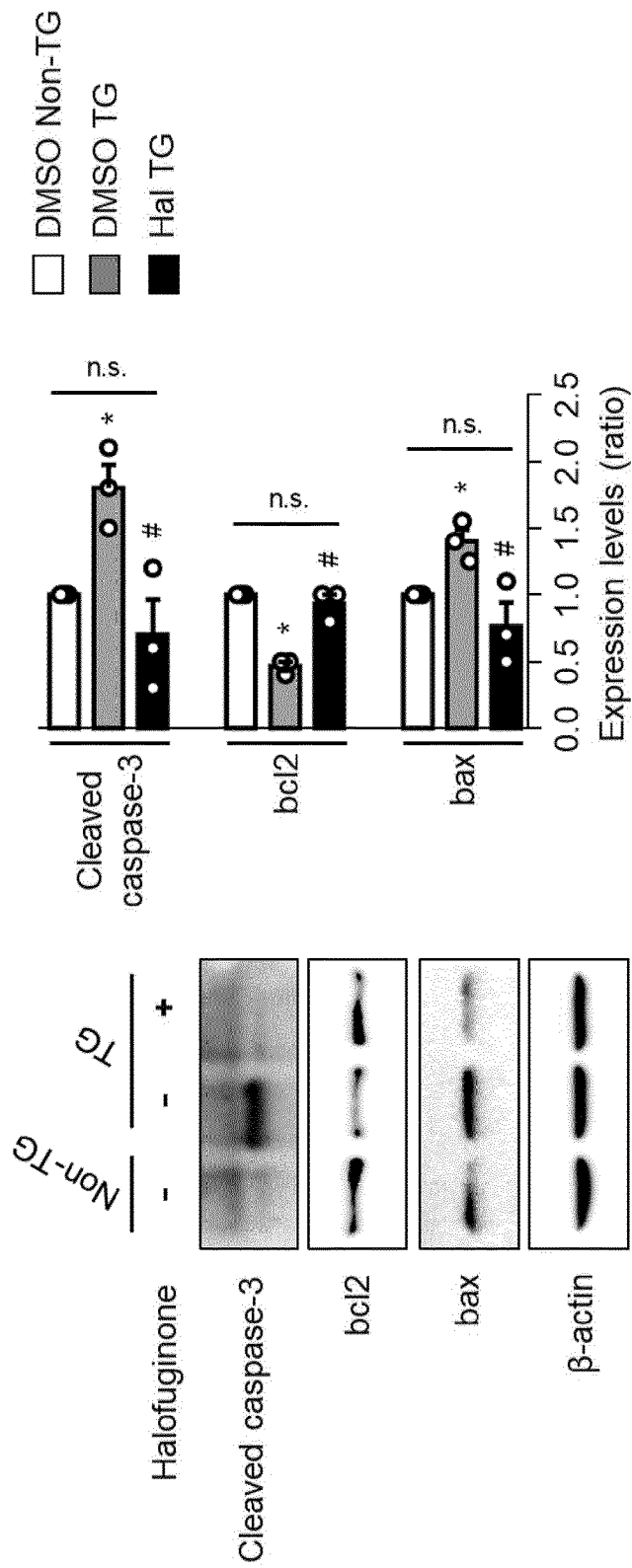
90-day of male



[도 11a]



[도11b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 31/517(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/14(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)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) A61K 31/517(2006.01); A61K 31/4184(2006.01); A61K 31/685(2006.01); A61K 36/185(2006.01); A61K 45/06(2006.01); C07D 403/06(2006.01) 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), STN (Registry, Caplus) & keywords: 할로푸지논(halofuginone), 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease), 운동신경 질환(motor neuron disease), TGF-β 억제제(TGF-β inhibitor)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019-0365760 A1 (KEIO UNIVERSITY) 05 December 2019 (2019-12-05) See paragraphs [0084], [0088], [0091] and [0092].	1-8,10,11
A	KUNIMI, H. et al. A novel HIF inhibitor halofuginone prevents neurodegeneration in a murine model of retinal ischemia-reperfusion. International journal of molecular sciences. 2019, vol. 20, article no. 3171, pp. 1-19. See abstract; and pages 2 and 3.	1-8,10,11
A	US 2016-0317498 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE et al.) 03 November 2016 (2016-11-03) See claim 173; and paragraphs [0003], [0005] and [0021].	1-8,10,11
A	WO 2013-106702 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE et al.) 18 July 2013 (2013-07-18) See claim 1.	1-8,10,11
☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 “T” 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 April 2023		Date of mailing of the international search report 04 April 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020102

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KELLER, T. L. et al. Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase. Nature chemical biology. 2012, vol. 8, pp. 311-317. See entire document.	1-8,10,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020102

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020102

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.: **9**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 9 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/020102

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2019-0365760	A1	05 December 2019	WO	2018-088566	A1	17 May 2018
US	2016-0317498	A1	03 November 2016	AU	2009-282480	A1	18 February 2010
				AU	2009-282480	B2	07 May 2015
				CA	2737219	A1	18 February 2010
				CA	2737219	C	28 February 2017
				CN	102177152	A	07 September 2011
				EP	2331525	A2	15 June 2011
				JP	2011-530596	A	22 December 2011
				US	2011-0263532	A1	27 October 2011
				US	9284297	B2	15 March 2016
				WO	2010-019210	A2	18 February 2010
				WO	2010-019210	A3	14 May 2010
WO	2013-106702	A1	18 July 2013	AU	2013-207796	A1	07 August 2014
				AU	2013-207796	B2	27 April 2017
				CA	2861840	A1	18 July 2013
				CA	2861840	C	15 December 2020
				EP	2802572	A1	19 November 2014
				EP	2802572	B1	07 November 2018
				HK	1203947	A1	06 November 2015
				JP	2015-506363	A	02 March 2015
				US	10155742	B2	18 December 2018
				US	2015-0057297	A1	26 February 2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/517(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/14(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/517(2006.01); A61K 31/4184(2006.01); A61K 31/685(2006.01); A61K 36/185(2006.01); A61K 45/06(2006.01); C07D 403/06(2006.01) 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), STN(Registry, Caplus) & 키워드: 할로푸지논(halofuginone), 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease), 운동신경 질환(motor neuron disease), TGF-β 억제제(TGF-β inhibitor)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2019-0365760 A1 (KEIO UNIVERSITY) 2019.12.05 단락 [0084], [0088], [0091], [0092]	1-8,10,11
A	KUNIMI, H. 등, "A novel HIF inhibitor halofuginone prevents neurodegeneration in a murine model of retinal ischemia-reperfusion", International journal of molecular sciences, 2019, 제20권, 아티클넘버 3171, 페이지 1-19 초록; 페이지 2, 3	1-8,10,11
A	US 2016-0317498 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE 등) 2016.11.03 청구항 173; 단락 [0003], [0005], [0021]	1-8,10,11
A	WO 2013-106702 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE 등) 2013.07.18 청구항 1	1-8,10,11
A	KELLER, T. L. 등, "Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-tRNA synthetase", Nature chemical biology, 2012, 제8권, 페이지 311-317 전체 문헌	1-8,10,11
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년04월04일(04.04.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년04월04일(04.04.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

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: 9
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 9는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a) (i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2019-0365760 A1	2019/12/05	WO 2018-088566 A1	2018/05/17
US 2016-0317498 A1	2016/11/03	AU 2009-282480 A1	2010/02/18
		AU 2009-282480 B2	2015/05/07
		CA 2737219 A1	2010/02/18
		CA 2737219 C	2017/02/28
		CN 102177152 A	2011/09/07
		EP 2331525 A2	2011/06/15
		JP 2011-530596 A	2011/12/22
		US 2011-0263532 A1	2011/10/27
		US 9284297 B2	2016/03/15
		WO 2010-019210 A2	2010/02/18
		WO 2010-019210 A3	2010/05/14
WO 2013-106702 A1	2013/07/18	AU 2013-207796 A1	2014/08/07
		AU 2013-207796 B2	2017/04/27
		CA 2861840 A1	2013/07/18
		CA 2861840 C	2020/12/15
		EP 2802572 A1	2014/11/19
		EP 2802572 B1	2018/11/07
		HK 1203947 A1	2015/11/06
		JP 2015-506363 A	2015/03/02
		US 10155742 B2	2018/12/18
		US 2015-0057297 A1	2015/02/26