

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 1월 24일 (24.01.2019) WIPO | PCT

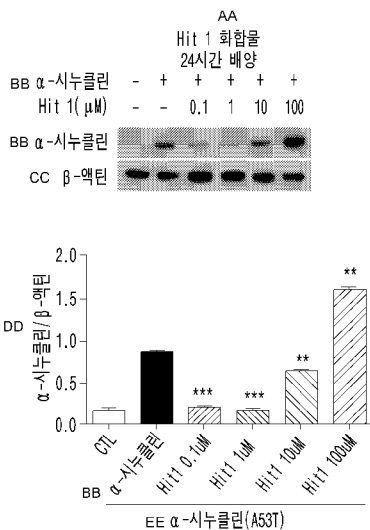


(10) 국제공개번호
WO 2019/017690 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/167 (2006.01) *A61K 31/4196* (2006.01)
A61K 31/4035 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/008120
- (22) 국제출원일: 2018년 7월 18일 (18.07.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0090784 2017년 7월 18일 (18.07.2017) KR
- (71) 출원인: 경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김명옥 (KIM, Myeong Ok); 52819 경상남도 진주시 가호로44번길 7 102-303, Gyeongsangnam-do (KR). 이근우 (LEE, Keun Woo); 52533 경상남도 사천시 사남면 조동길 61 106-701, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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 국내 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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING PROLYL OLIGOPEPTIDASE INHIBITOR AS EFFECTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING DEGENERATIVE BRAIN DISEASE

(54) 발명의 명칭: 프로릴 올리고펩티다아제 억제제를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물



AA ... Hit 1 compound incubated for 24 hours
BB ... α-Synuclein
CC ... β-Actin
DD ... α-Synuclein/β-actin
EE ... α-Synuclein (A53T)

(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising prolyl oligopeptidase inhibitor as an effective ingredient for preventing or treating degenerative brain disease. The composition of the present invention exhibits the effect of suppressing the activity of prolyl oligopeptidase and lowering a protein expression level of α-synuclein to treat or prevent a disease, thus finding useful applications in the prevention or treatment of degenerative brain disease such as synucleinopathy.

(57) 요약서: 본 발명은 프로릴 올리고펩티다아제 억제제를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로 본 발명의 조성물은 프로릴 올리고펩티다아제의 활성을 억제하며, α-시누클린(α-synuclein)의 단백질 발현 레벨을 억제해 질환을 치료 또는 억제하는 효과를 가지므로 시누클린성 질환(Synucleinopathy)과 같은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 프롤릴 올리고펩티다아제 억제제를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 프롤릴 올리고펩티다아제 억제제를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 프롤릴 올리고펩티다아제(Prolyl oligopeptidase; POP)는 세린 프로테아제(serine protease)의 일종으로 시상하부, 해마체, 대뇌피질, 줄무늬체 및 편도체 등 뇌의 다양한 부분에서 주로 발현되는 것으로 알려져 있다. POP는 펩티드에서 프롤린 잔기의 카르복실 사이드를 절단해 만들어진 30개 미만 길이의 짧은 아미노산으로서, 이는 뉴로펩타이드와 펩타이드 호르몬의 성숙(maturation)과 분해에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다. 또한 상기 역할에서 POP는 종양붕괴(oncolytic) 또는 세포독성 제제인 타시도틴(tasidotin)의 대사에도 작용한다. 그러나 세포 독성과 관련하여 POP의 중요성은 아직 밝혀지지 않았다.
- [4] POP의 가장 중요한 기질로는 안지오텐신 I 및 II, 물질 P(substance P), 갑상선 호르몬 분비 호르몬, 아르기닌 바소프레신(arginine vasopressin), 브래디키닌(bradykinin), 및 옥시토신과 같은 몇 가지 생물학적 활성 펩타이드가 있다. 가수 분해 활성을 제외하고, POP는 이노시톨-1,4,5-트리포스페이트(inositol-1,4,5-triphosphate; IP3) 신호 전달, 세포 내 트래피킹(intracellular trafficking)과 단백질 분비의 조절, 단백질-단백질 상호작용을 통한 신경 세포 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다. 게다가 POP는 중추신경계(CNS)의 몇가지 특징적 작용, 그중에서도 특히 학습, 기억 및 기분(mood) 관련 반응을 포함한 작용에 관계된다.
- [5] 알츠하이머(AD), 파킨슨 병(PD), 헌팅턴 병(HD), 조증, 임상적 우울증, 치매 및 자폐증과 같은 많은 신경학적 질환에서 POP 활성의 큰 변화가 보고되었지만, 발병 이전의 정확한 생리학적 역할은 불분명하다. 최근 연구에 따르면 POP는 α -시누클린(α -synuclein; aSyn)과 직접 작용하고 파킨슨 병의 병리에서 핵심 인자 중 하나인 이의 이량체화를 증가시킨다. 거대자가포식 현상은 시누클린성 질환에서 올리고머 aSyn 제거에 결정적인 세포 메커니즘이다. POP의 억제제는 aSyn 단백질 응집체의 제거를 촉진하는 자가포식의 양성 조절자인 베클린 1(Beclin 1)의 발현을 유도한다. 따라서, POP는 시누클린 병질 치료에서 잠재적인 표적이 될 것으로 예상되어 왔다. 또한 POP는 세포주기 진행에 관여하며 혈관 신생 촉진에 중요한 역할을 하므로 많은 암에서 증가한다. POP는 또한 샤가스 병(Chagas disease), 리슈만편모충증(leishmaniasis) 및 아프리카

과동편모충증(trypansomiasis)의 치료를 위한 잠재적 표적으로 검토되었다.

[6]

[7] 여러 신경 퇴행성 장애의 치료 방법으로 POP의 억제에 대한 지속적인 연구가 있었다. 초기에 N-벤질옥시카르보닐 프로릴-프로리날(N-benzyloxycarbonyl prolyl-prolinal; ZPP)이 기질 유사 펩타이드 모방 화합물인 POP 억제제로 발견된 후 항-건망증, 인지-강화 및 신경 보호 성질을 갖는 몇 가지 소분자들이 보고되었다. 또한, 보고된 합성 POP 억제제 중 다수는 ZPP의 시스템 변형된 유도체이다. 한편 POP 억제제로 보고된 기질과 유사한 짧은 슈도펩타이드는 혈뇌장벽을 거의 통과하지 못해 CNS 질환용 약물 설계에서 매우 불리한 약물동태학적 특성을 갖는다. 이러한 이유로 대한민국 공개특허 제 10-2006-002789호와 같이 POP 억제제에 대한 특허들이 다수 출원되었으나, 현재까지 인간을 대상으로 한 임상시험 단계에 도달한 것은 Z-321 및 S-17092 같은 일부에 지나지 않는다.

[8]

[9] 이에 본 발명자들은 약물작용발생단-기반 가상 스크리닝, 분자 도킹 및 분자 역학(molecular dynamic; MD) 시뮬레이션 방법론을 결합해 POP 억제제를 설계하기 위한 새로운 골격(scaffold)을 확인했으며, 화합물이 혈액 뇌 장벽을 통과할 수 있는지와 같은 여러 요소들을 고려하였다. 이렇게 선별된 화합물에 분자 도킹 및 분자역학 시뮬레이션 방법으로 추가적인 분석을 시행하였으며, 선별된 화합물은 aSyn 과발현을 유도시킨 SH-SY5Y 인간 신경모세포종(neuroblastoma) 세포의 aSyn 발현 수준을 감소시키는 것으로 효과를 확인하여 본 발명을 완성했다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명의 목적은 프로릴 올리고펩티다아제 억제제를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 특징을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[13] i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);

[14] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);

[15] iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및

[16] iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644

아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

[17]

[18] 또한, 본 발명은 하기 특징을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[19] i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);

[20] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);

[21] iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및

[22] iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

[23]

[24] 또한, 본 발명은 하기 특징을 가지는 화합물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료 방법:

[25] i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);

[26] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);

[27] iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및

[28] iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

[29]

[30] 또한, 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 하기 특징을 가지는 화합물의 용도:

[31] i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);

[32] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);

[33] iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및

[34] iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

[35]

발명의 효과

[36] 본 발명의 조성물은 프로릴 올리고펩티다아제의 활성을 억제하며, α -시누클린의 단백질 발현 레벨을 억제해 질환을 치료 또는 억제하는 효과를 가지므로 시누클린성 질환(Synucleinopathy)과 같은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[37]

도면의 간단한 설명

[38] 도 1은 본 발명에서 사용된 POP 억제제 스크리닝의 과정을 나타낸 모식도이다.

[39] 도 2a는 본 발명에서 얻어진 공통-특징 약물작용발생단 모델을 나타낸 도이고, 도 2b는 구조-기반 약물작용발생단 모델을 나타낸 도이다.

[40] 도 3은 약물작용발생단 모델이 POP의 활성부위와 결합하는 부위를 확인한 도이다.

[41] 도 4a는 분자 역학 시뮬레이션 상에서 각각의 화합물과의 단백질 백본 원자의 평균제곱근 편차(RMSD)를 나타낸 그래프이고, 도 4b는 분자 역학 시뮬레이션 상에서 각각의 화합물과의 단백질 백본 원자의 잠재 에너지 값을 나타낸 그래프이다 (Inh 1: Z-321; Inh 2: S-17092; Hit 1, 2, 3, 4: 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 후보 화합물).

[42] 도 5는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물과 공지된 화합물들이 POP의 활성부위에 결합하는 부위를 확인한 도이다(청색: Inh 1; 붉은색(magenta, 심홍색): Inh 2; 녹색: Hit 1; 보라색: Hit 2; 하늘색(cyan): Hit 3; 오렌지색: Hit 4).

[43] 도 6a는 공지된 화합물 Inh1의 POP 결합시 상태, 도 6b는 공지된 화합물 Inh2의 POP 결합시 상태, 도 6c는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물 Hit 1의 POP 결합시 상태, 도 6d는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물 Hit 2의 POP 결합시 상태, 도 6e는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물 Hit 3의 POP 결합시 상태, 도 6f는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물 Hit 4의 POP 결합시 상태를 나타낸 도이다.

[44] 도 7a는 시뮬레이션을 통한 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물과 공지된 화합물 각각과 단백질간의 수소 결합의 수를 나타낸 도이고, 도 7b는 시뮬레이션을 통한 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물과 공지된 화합물 각각과 단백질간의 수소 결합의 거리를 나타낸 도이다(청색: Inh 1; 붉은색(magenta, 심홍색): Inh 2; 녹색: Hit 1; 보라색: Hit 2; 하늘색(cyan): Hit 3; 오렌지색: Hit 4).

[45] 도 8a는 공지된 화합물(Ref)의 세포독성을 나타낸 결과이고, 도 8b는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물인 Hit 1의 세포독성을 나타낸 결과이며, 도 8c는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물인 Hit 2의 세포독성을 나타낸 결과이다.

[46] 도 9a는 공지된 화합물(Ref)의 α -시누클린 발현에 미치는 효과를 나타낸 결과이고, 도 9b는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물인 Hit 1의 α -시누클린 발현에 미치는 효과를 나타낸 결과이며, 도 9c는 본 발명의 POP 억제제 스크리닝에서 선별된 화합물인 Hit 2의 α -시누클린 발현에 미치는 효과를 나타낸 결과이다.

[47]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48] POP는 하기 도 10a와 같이 두 개의 메인 도메인으로 구성되어 있다.

[49]

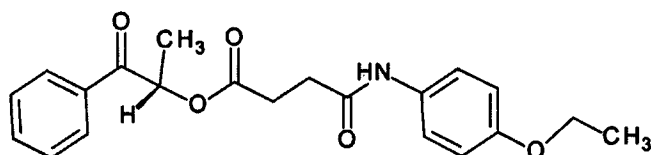
[50]

[51]

[52]

[53] 구체적으로, 프로테아제 촉매 도메인(도 10a의 상부; 잔기 1-72 및 428-710, 붉은색)은 펩티다아제 또는 촉매 도메인은 전형적인 α/β 가수분해효소 폴드(hydrolase fold)로 구성된다. β -프로펠러 도메인(도 10a의 하부; 잔기 73 내지 427)은 촉매 도메인의 C-말단에 부착된다. 아울러, POP의 활성부위는 Ser554, Asp641 및 His680 잔기를 포함하는 촉매 트라이어드(triad)에 의해 형성된 상기 두 도메인의 계면(interface)에 있는 커다란 공동(cavity)에 위치한다. 상기 활성부위에 억제제가 결합되는 것을 녹색으로 표시하였다.

- [54] 상기 활성 부위는 여러 개의 하위 부위로 더 그룹지어진다. S1 특이적 포켓인 Phe476, Asn555, Val580, Trp595, Tyr599 및 Val644의 측쇄로 형성되며, 억제제의 프롤린 기질 또는 방향족 고리가 쉽게 맞춰지도록 소수성 환경을 형성한다. Arg643의 구아니딘 측쇄는 이에 비해 덜 특이적인 S2 포켓의 일부이다. S3 포켓은 Phe173, Met235, Cys255, Ile591 및 Ala594를 포함한 많은 비극성 잔기의 측쇄에 의해 정렬되어 상대적으로 큰 소수성 환경을 생성한다.
- [55] 도 10b는 POP 활성부위에서 상보적인 상호작용부위(Sx)를 억제제의 부분(Px)와 함께 나타낸 것으로, 억제제들은 약물작용발생단(pharmacophore)으로 POP의 활성부위에서 상보적인 상호 작용을 형성한다. 억제제의 P1' 부분은 종종 CHO, C(O)CH₂OH 및 CN과 같은 반응기에 대응해, S1' 포켓의 측쇄인 Ser554에 공유 결합을 형성한다. 일반적으로 P1은 소수성 잔기로 구성되어 S1' 포켓을 막는다. P2 부분은 P1에 비해 특이성이 덜하고, 종종 Arg 또는 Pro 잔기를 포함한다. P3는 소수성 부분으로 크기 제한이 없으며 부피가 큰 지방족 및 방향족 그룹을 포함할 수 있다. 펩타이드 억제제에 포함된 2개의 카르보닐 그룹은 Trp595 및 Arg643 잔기와의 수소 결합 상호 작용에 관여한다.
- [56]
- [57] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [58]
- [59] 본 발명은 하기 특징을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:
- [60] i) 프롤릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);
- [61] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);
- [62] iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및
- [63] iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).
- [64] 상기 화합물은 하기 화학식 1 내지 화학식 4로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다:
- [65] [화학식 1]
- [66]



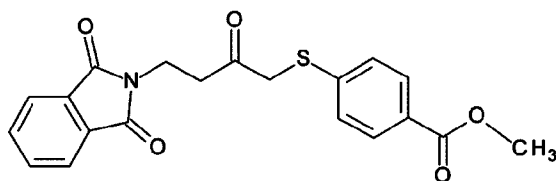
Hit 1

[67]

[68] [화학식 2]

[69]

;



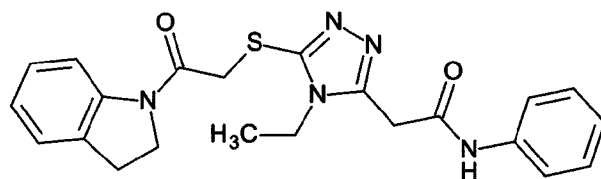
Hit 2

[70]

[71] [화학식 3]

[72]

; 및

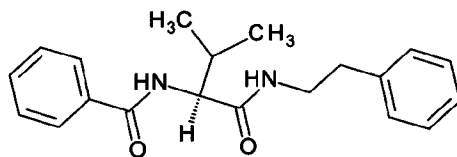


Hit 3

[73]

[74] [화학식 4]

[75]



Hit 4

[76] 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 염이란 표현은 처리 대상에 비교적 비독성이고 무해한 유효 작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1 내지 화학식 2의 염기 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 화학식 1 내지 화학식 2의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 또는 산 부가염 등을 포함한다. 예를 들면, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있다. 또한 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화 수소산, 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.

[77] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1 내지 화학식 4로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용되는 염 뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[78] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1 내지 화학식 4의 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 염기를 가한 후 침전시키거나 결정화 시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매를 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[79] 상기 [화학식 1]은 하기의 특징을 가지는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다:

[80] i) POP 활성 부위의 Arg643 및 Trp595 아미노산과 수소 결합 작용;

[81] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용;

[82] iii) POP 활성 부위의 Gln208, Gly237, Cys255, Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용; 및

[83] iv) POP 활성 부위의 Phe173, Ala594, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용.

[84] 또한, 상기 [화학식 2]는 하기의 특징을 가지는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다:

[85] i) POP 활성 부위의 Arg643 및 Trp595 아미노산과 수소 결합 작용;

[86] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용;

[87] iii) POP 활성 부위의 Ser554, His680, Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용; 및

[88] iv) POP 활성 부위의 Ala594, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용.

[89] 또한, 상기 [화학식 3]은 하기의 특징을 가지는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는

치료용 약학적 조성물일 수 있다:

- [90] i) POP 활성 부위의 Arg643 및 Tyr473 아미노산과 수소 결합 작용;
- [91] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용;
- [92] iii) POP 활성 부위의 Tyr473, Ser554, Asn555, Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용; 및
- [93] iv) POP 활성 부위의 Phe173, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용.
- [94] 또한, 상기 [화합식 4]는 하기의 특징을 가지는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다:
- [95] i) POP 활성 부위의 Arg643 및 Trp595 아미노산과 수소 결합 작용;
- [96] ii) POP 활성 부위의 Trp595 및 His680 아미노산과 π - π 상호작용;
- [97] iii) POP 활성 부위의 Ser554, Cys255, Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용; 및
- [98] iv) POP 활성 부위의 Phe173, Ala594, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용.
- [99] 상기 화합물은 프롤릴 올리고펩티다아제의 활성을 억제하는 것인, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다. 상기 프롤릴 올리고펩티다아제의 활성 억제는 활성부위를 블로킹(blocking)하는 방법일 수 있다.
- [100] 상기 퇴행성 뇌질환은 α -시누클린(α -synuclein) 단백질 응집체가 축적되어 발생하는 시누클린성 질환(Synucleinopathy)일 수 있다.
- [101] 상기 시누클린성 질환은 파킨슨 병(Parkinson's disease; PD), 레비소체치매(Dementia with Lewy bodies; DLB) 및 다계통위축(Multiple system atrophy; MSA)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [102] 상기 화합물은 α -시누클린의 단백질 발현 레벨을 억제할 수 있다.
- [103] 본 발명의 약학적 조성물은 임상 투여시에 다양한 하기의 경구 또는 비경구 투여의 형태로 제제화 되어 투여될 수 있다.
- [104] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경·연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제(elixirs) 등이 있는데, 이들 제형은 상기 유효성분 이외에 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 활택제, 결합제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 1종 이상 사용할 수 있다. 붕해제로는 한천, 전분, 알긴산 또는 이의 나트륨염, 무수인산일수소 칼슘염 등이 사용될 수 있고, 활택제로는 실리카, 탈크, 스테아르산 또는 이의 마그네슘염 또는 칼슘염, 폴리메틸렌 글리콜 등이 사용될 수 있으며, 결합제로는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 하이드록시프로필셀룰로오스 등이 사용될 수 있다. 이외에도 락토즈, 덱스트로오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스, 글리신 등을

희석제로 사용할 수 있으며, 경우에 따라서는 일반적으로 알려진 비등 혼합물, 흡수제, 착색제, 향미제, 감미제 등을 함께 사용할 수 있다.

- [105] 또한, 비경구 투여용 제형으로는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 또는 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 주사제의 기제로는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 안정화제 및 방부제와 같은 종래의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1 내지 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 상기 화합물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되거나 또는 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

- [106] 본 발명에 따른 상기 화합물의 투여를 위해서는 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 한가지 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 산제, 정제, 캡슐제, 환, 과립 또는 주사액제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 19th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [107] 본 발명의 화합물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

- [108] 본 발명의 화합물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 화합물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc.에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각

질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[109] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.

[110]

[111] 본 발명의 구체적인 실시예에서 공통-특징 및 구조-기반 약물작용발생단 모델을 구축하였으며(도 2a, 2b 및 3), 이에 적합한 4개의 후보 화합물을 선별하고(도 5 및 도 6a 내지 6f), 상기 화합물 중 기존에 알려진 POP 억제제를 참조하여(표 2), 선별된 화합물 1 및 2에 대하여 세포를 대상으로 α -syn 과발현 세포에 처리해 세포 독성 범위를 확인하고(도 8a 내지 8c), 기존에 알려진 POP 억제제와 비교해 유사하거나 우수한 α -syn 발현 억제 효과를 갖는 것으로 확인되었다(도 9a 내지 9c).

[112] 따라서, 본 발명에 의한 i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction); ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction); iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및 iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)을 특징으로 하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

[113]

[114] 또한, 본 발명은 하기 특징을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[115] i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);

[116] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);

[117] iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및

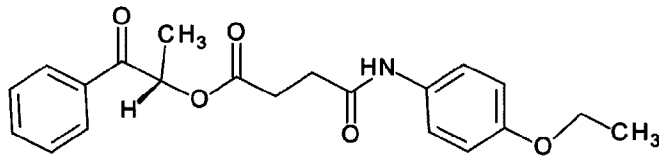
[118] iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

[119] 상기 조성물은 하기 화학식 1 내지 화학식 4로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다:

[120] [화학식 1]

[121]

;



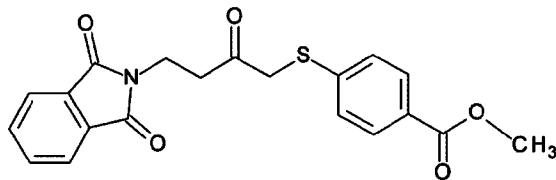
Hit 1

[122]

[123] [화학식 2]

[124]

;



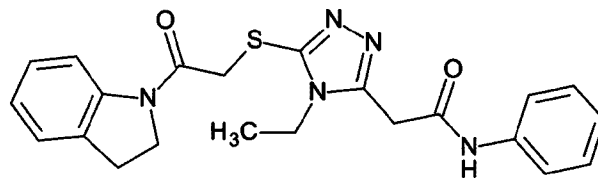
Hit 2

[125]

[126] [화학식 3]

[127]

; 및



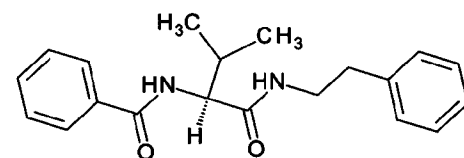
Hit 3

[128]

[129] [화학식 4]

[130]

.



Hit 4

[131] 본 발명의 퇴행성 뇌질환 개선용 건강기능식품은 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 투여를 위해서는 추가로 식품으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다.

[132] 본 발명의 퇴행성 뇌질환 개선용 건강기능식품은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형인 것이 바람직하지만 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는

[133] 상기 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알킨산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[134] 상기의 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 단당류, 말토스, 슈크로스 및 같은 이당류, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 다당류, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 ~0.04 g, 바람직하게는 약 0.02~0.03 g 이다.

[135]

[136] 본 발명의 구체적인 실시예에서 공통-특징 및 구조-기반 약물작용발생단 모델을 구축하였으며(도 2a, 2b 및 3), 이에 적합한 4개의 후보 화합물을 선별하고(도 5 및 도 6a 내지 6f), 상기 화합물 중 기존에 알려진 POP 억제제를 참조하여(표 2), 선별된 화합물 1 및 2에 대하여 세포를 대상으로 α -syn 과발현 세포에 처리해 세포 독성 범위를 확인하고(도 8a 내지 8c), 기존에 알려진 POP 억제제와 비교해 유사하거나 우수한 α -syn 발현 억제 효과를 갖는 것으로 확인되었다(도 9a 내지 9c).

[137] 따라서, 본 발명에 의한 i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction); ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction); iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및 iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)을 특징으로 하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 퇴행성 뇌질환 개선 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

[138]

[139] 또한, 본 발명은 하기 특징을 가지는 화합물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다:

- [140] i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);
- [141] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);
- [142] iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및
- [143] iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).
- [144] 본 발명에 따른 화합물은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 상기 개체는 포유동물, 구체적으로 인간일 수 있다.
- [145] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여는 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입 방식 중 선택될 수 있다.
- [146] 본 발명의 화합물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적인 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소, 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 치료학적 유효용량을 판단하기 위한 일반적인 복용 단위는 단일 용량으로 70kg 인간 대상에게 투여될 수 있는 활성 성분의 양을 기준으로 계산된다. 그러나, 활성 성분의 정확한 치료학적 유효 용량은 사용되는 각각의 활성 성분의 상대적 양, 사용되는 약물 및 상승 비율에 따라 변화되는 것으로 이해된다. 본 발명의 약학적 조성물에는 상기 화학식 1의 화합물은 약 0.1 내지 10 μ M의 범위로 함유되는 것이 바람직하고, 상기 화학식 2의 화합물은 약 0.1 내지 1 μ M의 범위로 함유되는 것이 바람직하나 이는 증상에 따라 증감될 수 있다.
- [147]
- [148] 나아가, 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 하기 특징을 가지는 화합물의 용도를 제공한다:
- [149] i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);
- [150] ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);
- [151] iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및
- [152] iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644

아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

[153] 본 발명에 따른 화합물은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.

[154]

발명의 실시를 위한 형태

[155] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해서 상세히 설명한다.

[156] 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[157]

[158] 실시예 1. 컴퓨터를 이용한 POP 억제제 탐색 모델의 제작

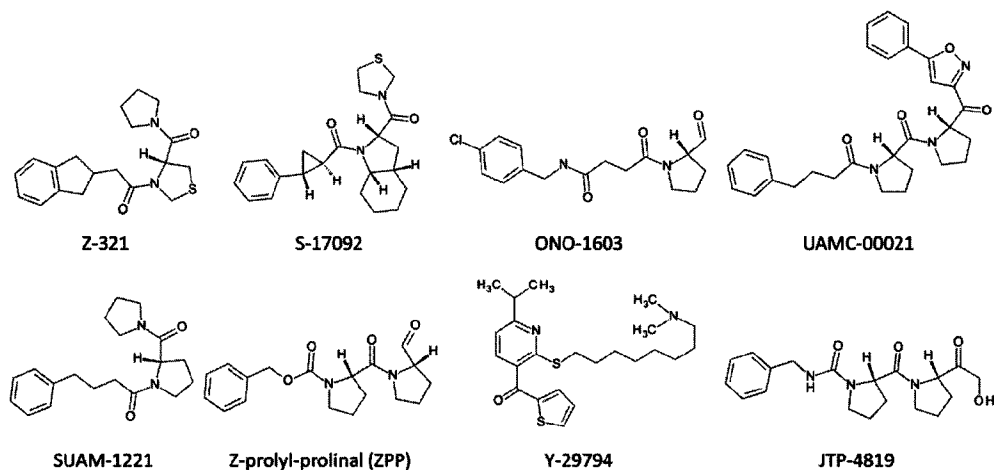
[159] 약물작용발생단 기반 가상 스크리닝을 도 1과 같이 시행하였다.

[160]

[161] 실시예 1-1. 공통-특징 약물작용발생단 생성

[162] 리간드-기반 전략이 리간드와 특정 표적 거대분자 사이의 결정적인 상호작용을 나타내는 일련의 화합물의 내재된 화학적 특징에 이용되었다.

[163]



[164]

[165] 구체적으로는, 상기 도면과 같이 8 가지의 잘 알려진 POP 억제제의 화학적 특성이 약물작용발생단 생성에 이용되었다. 가설의 생성은 *HipHop* 알고리즘에 의해 수행되었으며, Discovery Studio(DS) v3.5 에서 공통-특징 약물작용발생단 형성(*Common Feature Pharmacophore Generation*) 프로토콜로 구현되었다. 모든 화합물은 의약 합성에서 매우 중요한 규칙 중 하나인 리핀스키의 5의 규칙(Lipinski's Rule of Five)을 위반하지 않는 것을 확인했고, 특히 분자량이 500 이상이어서는 안 된다는 규칙에 따라 화합물의 분자량은 500 Da 미만으로 하였다. 이때 주 값(principal value)과 최대 생략 특징(*Maximum Omitted Feature*)를 각각 2와 0으로 설정하여 임상단계에 이른 화합물인 Z-321과 S-17092에 더 많은 가중치를 부여하고 주요 공지된 화합물(Z-321: Inh-1, S-17092: Inh-2)로 했다. 약물작용발생단 생성을 위해 내재된 화학적 특징은 DS의 특징 맵핑

프로토콜(Feature Mapping protocol)에 의해 조사되었으며, 모든 가설은 최소 2개 이상의 수소 결합 수용체(hydrogen bond acceptor; HBA), 수소 결합 수용체 지질(hydrogen bond acceptor lipid; HBAL), 수소 결합 수용체 돌출부(hydrogen bond acceptor projection; HBAP), 고리 방향족(ring aromatic; RA) 및 소수성(hydrophobic; HYP) 같은 약물작용발생단 특징을 포함하도록 선택하였다.

[166] 그 결과, 하기 표 1과 같은 10 개의 가설적 약물작용발생단 모델이 얻어졌다. 얻어진 10개의 가설적 모델은 화학적 특징 및 공간적 배치에서 차이가 존재했다. 이에 상기 모델을 POP의 활성 부위와 중첩시켜 6번 모델(공통-특징 약물작용발생단 모델)이 중요한 상보적 잔기에 잘 일치한다는 것을 확인했다.

[167] [표1]

No.	특징	Rank	Direct Hit	Partial Hit	Max Fit
1	3 HYP, 2 HBAP	88.67	11111111	00000000	5
2	3 HYP, 2 HBAP	88.67	11111111	00000000	5
3	1 RA, 2 HYP, 1 HBAL, 1 HBAP	87.58	11111111	00000000	5
4	3 HYP, 1 HBAL, 1 HBAP	87.56	11111111	00000000	5
5	1 RA, 2 HYP, 2 HBAP	87.12	11111111	00000000	5
6	3 HYP, 2 HBAL	86.68	11111111	00000000	5
7	1 RA, 2 HYP, 2 HBAL	86.62	11111111	00000000	5
8	1 RA, 2 HYP, 2 HBAL	86.41	11111111	00000000	5
9	1 RA, 2 HYP, 2 HBAL	86.33	11111111	00000000	5
10	1 RA, 2 HYP, 2 HBAL	86.22	11111111	00000000	5

[168]

[169] 실시에 1-2. 구조-기반 약물작용발생단 생성

[170] 저해제와 결합하는 인간 POP의 구조는 그 활동부위에 상보적인 약물작용발생단을 만드는데 유용하며, 이의 활성 부위는 효소 활성 부위의 잔기로서 Ser554, Asp641 및 His680이 잘 보존되어 있다. 또한, POP는 높은 수준의 서열 및 구조적 유사성을 공유하고 있어 각기 다른 유래에서 POP의 활성 부위에 보존된 잔기는 유사한 방식으로 다른 억제제에 결합한다. 이러한 사실에 기초하여, 인간 POP의 활성 부위에 중요한 상보적인 약물작용발생단 특징의 추가 분류를 행했다. 최종적인 구조-기반 약물작용발생단 모델은 2개의 HBA 및 4개의 HYP 특징을 포함하였다.

[171] 도 3과 같이 2개의 HBA는 Trp595 및 Arg643에 상호보완적인 특징을 가지며, HYP들 중 2개는 Ile478, Asn555, Val580 및 Trp595와 같은 S1 포켓 잔기에 대해 정렬되어있고, 다른 2개의 HYP는 S3 포켓 잔기의 Phe173과 Met235 부근에

위치하였다. 이에, 상기 특징의 대부분에 맵핑되는 화합물을 높은 효능으로 POP 억제 잠재성을 갖는 것으로 판단했다. 이어서, 구조-기반 약물작용발생단의 추가적인 검증 단계로서 실시예 1-1에 기재된 8가지 POP 억제 화합물의 구조와 대조해보았으며, Z-321(Inh-1)과 S-17092(Inh-2)는 2개의 HBA 및 3개의 HYP를 갖는 것으로 맵핑되었다. 따라서 구조-기반 약물작용발생단은 화학적 데이터베이스의 가상 선별 검사에서 화합물을 맵핑하는 강력한 방법이 확인되었다.

[172]

[173] 실시예 1-3. 공통-특징/구조-기반 약물작용발생단 비교 및 신뢰성 평가[174]

상기 실시예 1-1과 실시예 1-2에서 선별된 화합물을 POP의 활성부위와 대조해보았다. 도 2a 및 2b와 같이 실시예 1-1은 2개의 HBAL 및 3개의 HYP를 특징으로 가지며, 실시예 1-2는 2개의 HBA 및 4개의 HYP를 특징으로 갖는다. 상기 모델들에서 2개의 HBAL 및 2개의 HYP는 Trp595 및 Arg643 잔기로부터 수소 원자를 받고 있으며, 두 모델 모두 S1 및 S3 포켓에 HYP가 상보적으로 결합하였다.

[175]

잠재적 POP 억제제의 맵핑을 위한 상기 약물작용발생단 모델의 신뢰성은 Guener-Henry(GH) scoring으로 평가되었다. 결합 데이터베이스로부터 얻은 자료와 준비된 내부 데이터 세트로부터 동일한 생물학적 분석 방법을 통해 POP 억제제의 실험적 활성(IC₅₀)을 결정했다. 그 후, 활성 화합물을 동정하기 위해 리간드 기반의 공통-특징 및 구조-기반 약물작용발생단 모델의 능력을 평가하였다. 구체적으로, 57개의 활성 POP 억제제(IC₅₀ 100 nmol/L 미만)를 분류하고 2000개의 화합물로 된 디코이 세트와 혼합하였다. 공통-특징 약물작용발생단 모델 및 구조-기반 약물작용발생단 모델 모두 데이터베이스 상의 활성 화합물에 적용해보았다. 데이터베이스 스크리닝은 DS의 리간드 약물작용발생단 맵핑(Ligand Pharmacophore Mapping) 프로토콜을 사용하여 수행되었으며, 결합에 적합한 형태를 만들기 위해 FAST 알고리즘을 사용했다.

[176]

그 결과 공통-특징 약물작용발생단 모델 및 구조-기반 약물작용발생단 모델 모두 GH 점수가 선행연구에서 확인된 관련 모델들의 점수 범위 내인 0.84 및 0.85로 확인되었다. 따라서 잠재적 POP 억제 물질 개발을 위한 데이터 베이스 스크리닝 및 맵핑에 공통-특징 약물작용발생단 모델 및 구조-기반 약물작용발생단 모델이 적합한 것으로 나타났다.

[177]

[178] 실시예 2. POP 억제제 후보 화합물의 스크리닝[179] 실시예 2-1. 약물-유사 데이터 베이스 생성 및 가상 스크리닝[180]

많은 약물 후보 물질은 화합물의 빈약한 약물동태학적(pharmacokinetic) 성질 및 독성으로 인해 약물 개발 단계중 전임상 시험을 쉽게 통과 못한다. 따라서 약물-유사 특성을 충족시키지 못하는 화합물을 초기에 걸러내야한다. POP는 인체에 넓게 분포되어 있으나, 뇌에 특히 집중되어 있는 것으로 알려져 있어 POP

관련 중추신경계 장애에 효과를 얻으려면 POP 억제제는 혈뇌장벽(Blood-Brain Barrier; BBB)을 통과할 수 있어야 한다. 따라서 혈뇌장벽을 통과 할 수 있고 필수적인 약물과 유사한 특성 및 최소한의 독성을 갖는 화합물을 가상 스크리닝을 위해 고려해야한다. 이에 리핀스키의 5의 규칙과 ADMET 기준(Absorption: 흡수, Distribution: 분포, Metabolism: 대사, Excretion: 배설, Toxicity: 독성)을 만족하는 화합물로 구성된 약물-유사 데이터베이스가 만들어졌으며, 이는 Maybridge, Chembridge, Asinex 및 NCI의 4 가지 화학 데이터베이스의 화합물을 대상으로 하였다.

- [181] 신약 개발 및 개발 프로세스에서 높은 처리량 스크리닝 비용을 줄이기 위해 화학 데이터베이스의 가상 스크리닝에 약물작용발생단 기반의 방법을 사용했다. 상기 실시예 1에서 얻어진 약물작용발생단 모델(공통-특징 약물작용발생단 모델 및 구조-기반 약물작용발생단 모델)은 약물-유사 데이터베이스를 검색하기 위해 3D 쿼리로 사용되었다. 이에 따라 분자 도킹에 가장 적합할 것으로 예상되는 318개의 화합물을 선별했다.

[182]

[183] 실시예 2-2. 도킹 기반 스크리닝

- [184] 실시예 2에 의해 선별된 318개 화합물 및 공지된 화합물인 Inh-1과 Inh-2를 POP의 활성부위에 도킹했다. 약물작용발생단 기반 도킹 계산은 리간드 도킹을 위한 Genetic Optimization(GOLD v5.2.2) 56을 사용하여 수행되었다.

- [185] 먼저, 인간 POP의 구조(PDB ID: 3DDU)를 단백질 데이터 뱅크(www.rcsb.org)로부터 다운로드 받았으며, 상기 구조의 해상도는 1.56Å이었다. 도킹에 앞서, 모든 물 분자를 제거하고 수소 원자를 단백질에 첨가하였다. POP 활성 부위는 억제제에 결합하는 반경 6Å 이내로 규정되었으며, 각 리간드의 골드스코어(Goldscore)와 켐스코어(Chemscore)는 각각 기본 채점 기능과 재채점(rescoring) 기능을 사용했다. 골드스코어는 수소 결합 에너지, 반 데르 발스 에너지, 리간드 비틀림 변형(ligand torsion strain) 및 금속 상호 작용(metal interaction)과 같은 다양한 요인을 고려하여 결합 부위의 리간드의 전반적인 적합성을 계산하였다. 또한 켐스코어로 리간드 결합에서 발생하는 총 자유 에너지 변화를 측정하며 수소 결합, 소수성-소수성 접촉 영역, 금속 상호 작용 및 리간드 유연성을 고려해 각 리간드에 대해 결합 총 20개의 후보를 얻었다. 상기 화합물들에 대해 Trp595, Phe476, Val644, Val580 및 Tyr599가 이루는 S1 포켓, Phe173, Met235, Cys255, Ile591 및 Ala594가 이루는 S3 포켓 및 수소 결합과 정전기적 결합에 관련된 잔기를 비롯한 POP 억제 효과에 결정적인 POP의 활성부위 잔기와 반응 수작업으로 확인하였다.

- [186] 그 결과, 효과적으로 POP 억제 효과를 갖는 4개의 화합물을 얻었다.

[187]

[188] 실시예 2-3. 분자 역학 시뮬레이션을 이용하여 선별된 화합물의 결합 모드 분석

- [189] 분자 역학 시뮬레이션(Molecular Dynamics simulation) 접근법은 실험과 이론의

대조, 분자의 동작과 기능, 효소 기전 모델링 및 복합 생체분자 조립을 통해 원자 레벨에서 복잡한 분자 행동의 연구에 성공적으로 이용되고 있다. 분자 역학 시뮬레이션을 이용해 실시예 3에서 선별된 4개 화합물의 결합 안정성을 측정했다.

- [190] 구체적으로, 시뮬레이션은 Groningen Machine for Chemical Simulations (GROMACS 4.5.7) 소프트웨어를 사용하여 CHARMM27 all-atom force field로 수행되었다. 초기 구조(initial structure)는 시뮬레이션 전에 입체 충돌이나 부적절한 기하학적 구조를 피하기 위해 가장 가파른 하강 알고리즘(descent algorithm)에 의한 에너지 최소화를 통해 완화되었다. 단계의 수는 10000으로 제한되었고 최소화를 위해 사용된 최대 힘은 1000 kJ/mol 미만이었다. 에너지 최소화 후 2 단계 평형이 수행되었다. 평형의 첫 번째 단계는 V-rescale thermostat을 사용하여 300 K에서 200 ps 동안 입자, 부피 및 온도가 일정한 바르톨 앙상블(canonical ensemble, NVT 앙상블) 하에서 수행되었고, 두 번째 단계는 200 ps 동안 입자의 수, 압력 및 온도가 일정하게 유지되는 정온정압 앙상블(NPT 앙상블) 하에서 수행되었다. 시스템의 밀도는 Parrinello-Rahman barostat를 사용하여 시스템의 압력을 1 bar로 유지함으로써 안정화되었다. 평형 과정에서 상대 이온과 함께 용매 분자가 움직일 수 있게하면서 단백질 백본(backbone)은 구속시켰다. NPT의 평형 구조는 300 K 및 1 bar에서 20 ns MD 시뮬레이션을 수행하는 데 사용되었다. LINCS 알고리즘은 결합을 강제하는데 사용되었다. PME(Particle Mesh Ewald) 방법을 사용하여 장거리 정전기 상호작용을 계산했다. MD 시뮬레이션은 모든 방향에서 주기적인 경계 조건하에 수행되었으며, 결과는 DS, GROMACS 및 VMD (visual molecular dynamics) 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.
- [191] 그 결과, 도 4a 및 4b와 같이 시스템에서 단백질 백본 원자와 잠재 에너지 값은 평균 제곱근 편차(Root Mean Square Deviation; RMSD)는 시뮬레이션 시간동안 전반적인 단백질 안정성 평가용으로 계산되었다. 도 4a와 같이 참조용 POP 억제 화합물인 Inh-1(Z-321) 및 Inh-2(S-17092)와 실시예 3을 통해 선별된 Hit 1, Hit 2, Hit 3 및 Hit 4의 단백질 백본 원자에 대한 RMSD는 각각 0.09 nm, 0.10 nm, 0.09 nm, 0.11 nm 및 0.11 nm으로 나타나 시스템은 잘 수렴되었다. 또한, 시스템에 대한 잠재 에너지는 도 4b와 같이 20 ns의 시뮬레이션 시간 동안 단백질의 정상적인 행동과 관련하여 일정하게 유지되었다. 전체 시뮬레이션 시간 중 마지막 5 ns로부터 궤적(trajecory)을 취하여 선별된 화합물과 POP의 신뢰성있는 결합 모드를 나타냈다. 또한 공지된 화합물과 선별된 화합물을 겹쳐본 결과 이들 화합물들이 도 5와 같이 POP의 동일한 기질/억제제 결합 공동(substrate/inhibitor binding cavity)에 결합되는 것을 확인하였다.

[192]

- [193] 구체적으로, 도 6a 내지 6f에 나타난 바와 같이, Inh 1의 카르보닐기가 Trp595 및 Arg643 같은 주요 아미노산과 수소 결합하는 것처럼 피롤리딘 고리(pyrrolidine

ring)는 POP 활성 부위의 S1 포켓에 특이적으로 결합하였다. Inh 2도 마찬가지로 카르보닐기가 Trp595 및 Arg643에 수소 결합하였다. 두 억제제는 S1 포켓에서 Trp595의 방향족 측쇄와 π - π 상호작용하였고, S3 포켓에 대응하는 대형의 소수성 고리를 포함하였다. 또한 상기 억제제들은 Ser554, Trp595 및 Arg643과 정전기적 상호작용을 나타냈다. S1 포켓의 잔기 Phe476, Val580 및 Val644로 결정되는 특이성과는 별도로, Inh 1 및 Inh 2는 모두 Met235, Cys255, Ile478, Ile591 및 Ala594를 포함하는 S3 포켓의 잔기와 소수성 상호작용을 나타내었다. 상기 화합물들에서와 마찬가지로 실시예를 통해 얻어진 후보 물질들도 표 2에 나타난 바와 같이 상호작용을 하는 것으로 나타났다.

[194] [표2]

화합물	수소결합 반응				π - π 상호작용	정전기 적 상호작용	소수성 상호작용
	리간드 원자	아미노 산	아미노 산 원자	길이(Å)			
Inh 1	O2	Trp595	HE1	1.849	Trp595	Ser554, Trp595, Arg643	Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, Ala594, Val644
	O1	Arg643	HH11	1.599			
Inh 2	O2	Trp595	HE1	1.733	Trp595	Ser554, Trp595, Arg643	Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, Ala594, Val644
	O1	Arg643	HH11	1.826			
Hit 1	O3	Trp595	HE1	2.014	Trp595	Gln208, Gly237, Cys255, Trp595, Arg643	Phe173, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, Ala594, Val644
	O1	Arg643	HH11	1.631			
Hit 2	O2	Trp595	HE1	1.950	Trp595	Ser554, Trp595, Arg643, His680	Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, Ala594, Val644
	O1	Arg643	HH11	1.836			
Hit 3	O1	Tyr473	HH	2.281	Trp595	Tyr473, Ser554, Asn555, Trp595, Arg643	Phe173, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, Val644
	O2	Arg643	HH12	2.011			
Hit 4	N5	Trp595	HE1	2.190	Trp595, His680	Cys255, Ser554, Trp595, Arg643	Phe173, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, Ala594, Val644
	O11	Arg643	HH11	3.042			

[195]

[196] 구체적으로, Hit 1은 잔기 Trp595 및 Arg643과 강한 수소 결합을 형성하였으며,

Gln208, Gly237, Cys255, Trp595 및 Arg643과 정전기적 상호 작용을 나타냈다. 또한 S1의 Phe476, Val580, Val644 및 S3 포켓의 Phe173, Met235, Cys255, Ile478, Ile591 및 Ala594 잔기와의 소수성 상호 작용을 나타냈다. Hit 2는 Trp595 및 Arg643과 함께 하나의 수소 결합을 형성하였고, Ser554 및 His680과 같은 촉매 잔기와의 정전기적 상호작용을 나타냈다. 또한 Hit 2는 S1의 잔기(Phe476, Val580 및 Val644) 이외에 Cys255, Phe476, Ile478, Ile591 및 Ala594를 포함하는 S3 포켓의 잔기와의 소수성 상호 작용을 나타냈다. 한편, Hit 3는 Tyr473 및 Arg643과 수소 결합 형성에 관계하며, Asn555, Trp595 및 Arg643과 함께 촉매 잔기인 Ser554와 정전기적 상호 작용을 나타냈다. 또한, Hit 3는 Phe173, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591 및 Val644와 소수성 상호작용을 나타냈다. Hit 4는 Trp595 및 Arg643과 수소 결합을 형성했다. Hit 4의 결합 모드는 Cys255, Trp595 및 Arg643뿐만 아니라 Ser554 촉매 잔기와 정전기적 상호작용을 나타냈다. 또한, POP에 대한 Hit 4의 결합은 S1(Phe173, Met235, Cys255, Ile591 및 Ala594) 및 S3(Phe476, Ile478, Val580 및 Val644) 포켓 잔기와의 소수성 상호 작용에 의해 확인되었다. 또한, Hit 4의 트리아졸 고리와 Arg643의 양이온- π 작용도 관찰되었다.

[197] 상기 화합물들과 POP 사이의 수소결합수를 20 ns 시뮬레이션 동안 관찰해 도 7a 및 7b에 나타내었다. 도 7a와 같이 Inh 1 및 Inh 2는 모두 시뮬레이션 시간 동안 각각 1.773 및 1.883의 수소결합 평균 수를 유지하고 있으며, 상기 Hit 1, Hit 2, Hit 3 및 Hit 4는 각각 1.911, 2.128, 1.952 및 1.905의 수소결합 평균 수를 나타냈다. 이에 Arg643과 각 리간드 사이의 수소 결합을 관찰하였으며, 도 7b에서와 같이 공지된 화합물과 함께 모든 선별된 화합물은 20 ns 시뮬레이션 동안 Arg643과 수소 결합을 유지하여 선별된 화합물들이 POP에 대한 억제제로 작용할 가능성을 확인했다. 또한 상기 표 2에서 나타난 바와 같이 선별된 화합물들에 있는 다른 방향족 고리들은 Trp595와 π - π 적층(π - π stacking) 상호작용을 나타내었고, 본 발명에 사용된 공지된 화합물을 포함하는 대부분의 공지된 억제제와 유사했다. 상기 선별된 화합물들은 Phe173, Met235, Arg252, Phe476, Ile478, Ser554, Ile591, Ala594, Val644 및 His680 같은 잔기들과 반 데르 발스 상호 작용을 나타냈다.

[198] 결과적으로 선별된 화합물들은 수소 결합, 정전기 상호 작용, 소수성 상호 작용 및 반 데르 발스 상호 작용과 같은 다양한 분자 상호 작용을 통해 POP 활성 부위에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 공지된 화합물과 비교해, 선별된 화합물들은 결합에 있어서 중요한 아미노산과 맞아떨어지는 수소 결합 상호 작용 및 더 큰 정전기 상호 작용을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 선별된 화합물은 소수성 S3 포켓과 특이성을 결정하는 S1 포켓 잔기에 상호 작용하여, 이는 POP 억제제로서의 이들 화합물의 잠재성을 나타낸다. 유사성 검색은 Pubchem Structure 및 ChemSpider를 사용하여 수행되었으며, 검색 결과 상기 선별된 화합물들은 이전에 POP의 억제 활성이 보고되지 않은 화합물들로 확인되었다.

[199]

[200] **실험예 1. 선별된 화합물의 세포 독성 여부 관찰**

[201] 파킨슨 병은 점진적 신경퇴행성 질환으로 줄무늬체(striatum) 말단의 소실과 루이 소체(Lewy body)의 α -시누클린(aSyn) 응집체 축적이 특징이다. POP는 파킨슨 병과 다른 시누클린성 질환(Synucleinopathy)의 발생에서 aSyn 응집을 가속화시킨다. 선행 연구를 통해 POP 억제제는 aSyn-과발현 세포와 *in vivo* 모델에서 aSyn 응집을 감소시키고, aSyn 응집체의 제거를 촉진한다는 것이 알려져 있다.

[202] 이에 앞서 상기 실시예에 의해 얻어진 화합물의 세포독성을 확인하기 위해, 생체 외에서 과발현시킨 SH-SY5Y 인간 신경 모세포종(neuroblastoma) 세포를 구축하였다. 여기에 상기 실시예를 통해 얻어진 POP 억제제 후보 물질인 선별된 화합물의 독성을 MTT 시험(MTT assay)으로 평가하였다. 비교를 위한 참조용 화합물(Ref)로 공지된 화합물인 Z-321과 S-17092를 이용하였다.

[203] 구체적으로는, 한국 세포주 은행(Korea Cell Line Bank; KCLB)에서 SH-SY5Y 세포를 얻어 37°C에서 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 배양된 세포에 EGFP-alphasynuclein-A53T 플라스미드(Addgene)를 Lipofectamine 3000(Invitrogen)을 이용해 형질전환시켰으며, 제조사 매뉴얼에 기반해 진행해 과발현된 SH-SY5Y 세포를 만들었으며, 상기 세포(5x10³ cells/well)를 96-웰 플레이트에 파종(seeding)하고, 37°C에서 5% CO₂ 조건의 배양기에서 24시간 동안 배양하고, Ref, Hit 1 및 Hit 2 (0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 및 100 μ M)를 각각 투여한 뒤 24시간동안 추가 배양했다. 그 후, MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 용액(Life technologies)을 첨가하고 3시간 동안 37 °C에서 반응시켰다. 상층액을 제거하고, 디메틸 설펝사이드 (Dimethyl Sulfoxide; DMSO)를 첨가한 후 포르마잔 결정(formazan crystal)이 가용화되도록 셰이커에서 20분 동안 반응시켰다. 그 후 마이크로 플레이트 분광 광도계인 Glomax Multi Detection System(Promega BioSciences)에서 흡광도 값을 560nm 파장에서 측정하고 대조군 세포의 생존율을 백분율로 환산해 세포 생존성을 계산했다.

[204] 그 결과, 도 8a 내지 8c에서와 같이 MTT assay를 통해 Hit 1 화합물은 0.1 내지 10 μ M의 범위에서 독성을 나타내지 않았으며, 이와 달리 Ref와 Hit 2 화합물은 100 μ M에서 세포의 생존성이 감소되었다.

[205]

[206] **실험예 2. 선별된 화합물의 α -시누클린 발현 레벨 감소효과 관찰**

[207] α -시누클린의 발현 및 응집에 대한 Hit 1 및 Hit 2의 영향을 분석했다. 상기 실험예 1에서 얻어진 결과를 바탕으로 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 및 100 μ M 농도에서 Hit 1 및 Hit 2 처리에 의한 α -시누클린 단백질의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 관찰했다.

[208] 구체적으로, 실험예 1에서 얻어진 aSyn 과발현이 유도된 SH-SY5Y 형질전환

세포에, Ref, Hit 1 및 Hit 2를 각각 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 및 100 μ M 처리했다. 각 대조군 및 실험군(6×10^6 cell)의 전체 단백질을 된 RIPA 파쇄 완충용액(RIPA lysis buffer)에 1X 복합 단백질분해효소 억제제 및 인산화효소 억제제(Protease and Phosphatase inhibitor Cocktail, GenDEPOT)를 포함한 EDTA 단백질 추출 용액으로 4 °C에서 추출했다. 단백질 분석 키트(Bio-Rad Laboratories)를 이용해 단백질 샘플의 농도를 결정했다. 용해물(단백질 20 ug /레인)들을 10-15% SDS-PAGE로 분리한 후 0.2 μ m PVDF Immobilon membrane(Merck Millipore)으로 옮겨졌다. 상기 멤브레인은 5% 탈지유(BD Difco) 또는 5% 소 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin; BSA, Amresco)이 포함된 TBST(10 mM Tris-Hcl, pH 7.5, 150 mM NaCl 및 0.1% Tween-20)로 실온에서 1시간 동안 처리해 블로킹하고 α -시누클린을 1차 항체(Cell Signaling Technology)로 4°C에서 밤새 처리하였으며, 이의 대조를 위해 β -액틴을 하우스키핑 단백질로 했다. 멤브레인을 실온에서 2시간 동안 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체에 반응시킨 후, 암실에서 EzWestLumiOne(ATTO)으로 교차 반응 단백질을 검출했다.

[209] 그 결과 도 9a 내지 9c에 나타난 바와 같이 과발현된 SH-5Y 형질전환 세포는 대조군에 비해 뚜렷하게 α -시누클린 단백질이 과발현되었다. 그러나, 이는 Hit 1 및 Hit 2 또는 대조군 화합물에 의해 감소되었다. 구체적으로 Hit 1은 0.1, 1, 또는 10 μ M을 첨가하였을 때 α -시누클린 및 β -액틴의 발현 비율을 대조군 수준으로 억제시켰다($p < 0.001$). 한편 Hit 2는 0.1 μ M($p < 0.001$) 또는 1 μ M($p < 0.01$)을 첨가하였을 때 대조군 수준으로 α -시누클린의 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

[210]

[211] 결론적으로, 상기 선별된 화합물들은 컴퓨터를 이용한 분석을 통해 POP의 활성 부위를 블로킹하는 POP 억제제로 확인되었고, 실제 실험 결과에서도 시누클린성 질환(Synucleinopathy) 치료에 사용될 수 있음을 확인하였다.

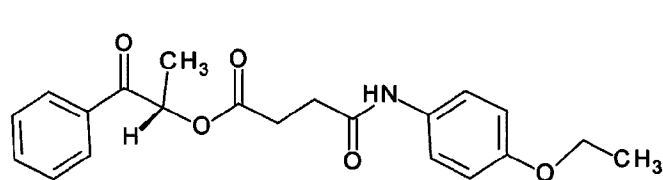
청구범위

[청구항 1] 하기 특징을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

- i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);
- ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);
- iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및
- iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

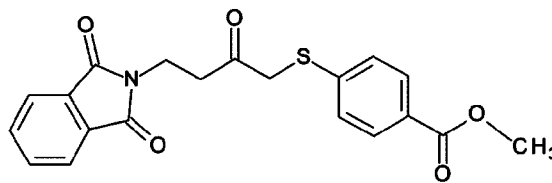
[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1 내지 화학식 4로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



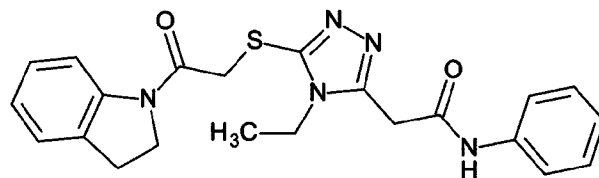
Hit 1

[화학식 2]



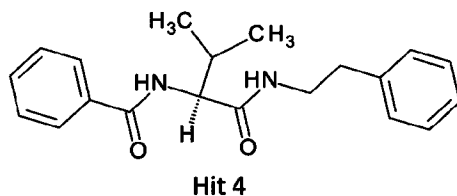
Hit 2

[화학식 3]



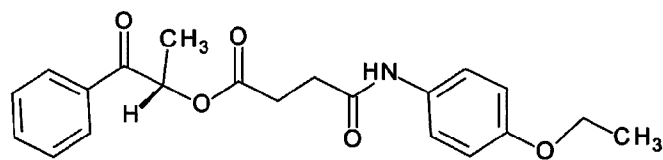
Hit 3

[화학식 4]



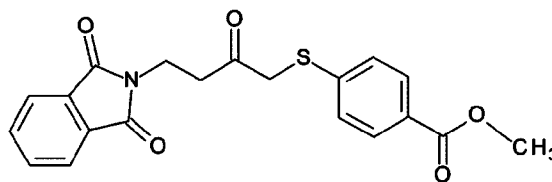
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 [화학식 1]은 하기의 특징을 가지는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
- i) POP 활성 부위의 Arg643 및 Trp595 아미노산과 수소 결합 작용;
 - ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용;
 - iii) POP 활성 부위의 Gln208, Gly237, Cys255, Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용; 및
 - iv) POP 활성 부위의 Phe173, Ala594, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서, 상기 [화학식 2]는 하기의 특징을 가지는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
- i) POP 활성 부위의 Arg643 및 Trp595 아미노산과 수소 결합 작용;
 - ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용;
 - iii) POP 활성 부위의 Ser554, His680, Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용; 및
 - iv) POP 활성 부위의 Ala594, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용.
- [청구항 5] 제 2항에 있어서, 상기 [화학식 3]은 하기의 특징을 가지는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
- i) POP 활성 부위의 Arg643 및 Tyr473 아미노산과 수소 결합 작용;
 - ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용;
 - iii) POP 활성 부위의 Tyr473, Ser554, Asn555, Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용; 및
 - iv) POP 활성 부위의 Phe173, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용.
- [청구항 6] 제 2항에 있어서, 상기 [화학식 4]는 하기의 특징을 가지는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
- i) POP 활성 부위의 Arg643 및 Trp595 아미노산과 수소 결합 작용;
 - ii) POP 활성 부위의 Trp595 및 His680 아미노산과 π - π 상호작용;
 - iii) POP 활성 부위의 Ser554, Cys255, Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용; 및
 - iv) POP 활성 부위의 Phe173, Ala594, Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용.

- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 화합물은 프로릴 올리고펩티다아제의 활성을 억제하는 것인, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 α -시누클린(α -synuclein) 단백질 응집체가 축적되어 발생하는 시누클린성 질환(Synucleinopathy)인, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 시누클린성 질환은 파킨슨 병(Parkinson's disease; PD), 레비소체 치매(Dementia with Lewy bodies; DLB) 및 다계통위축(Multiple system atrophy; MSA)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 알파-시누클린 단백질의 발현을 억제하는 것인, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 하기 특징을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환 개선용 건강기능식품:
 i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);
 ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);
 iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및
 iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).
- [청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1 내지 화학식 4로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 퇴행성 뇌질환 개선용 건강기능식품:
- [화학식 1]



Hit 1

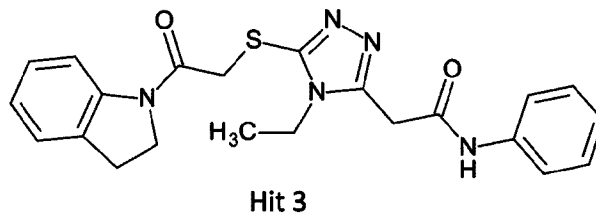
[화학식 2]



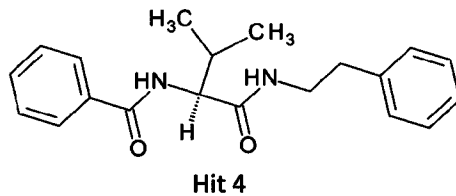
Hit 2

[화학식 3]

; 및



[화학식 4]



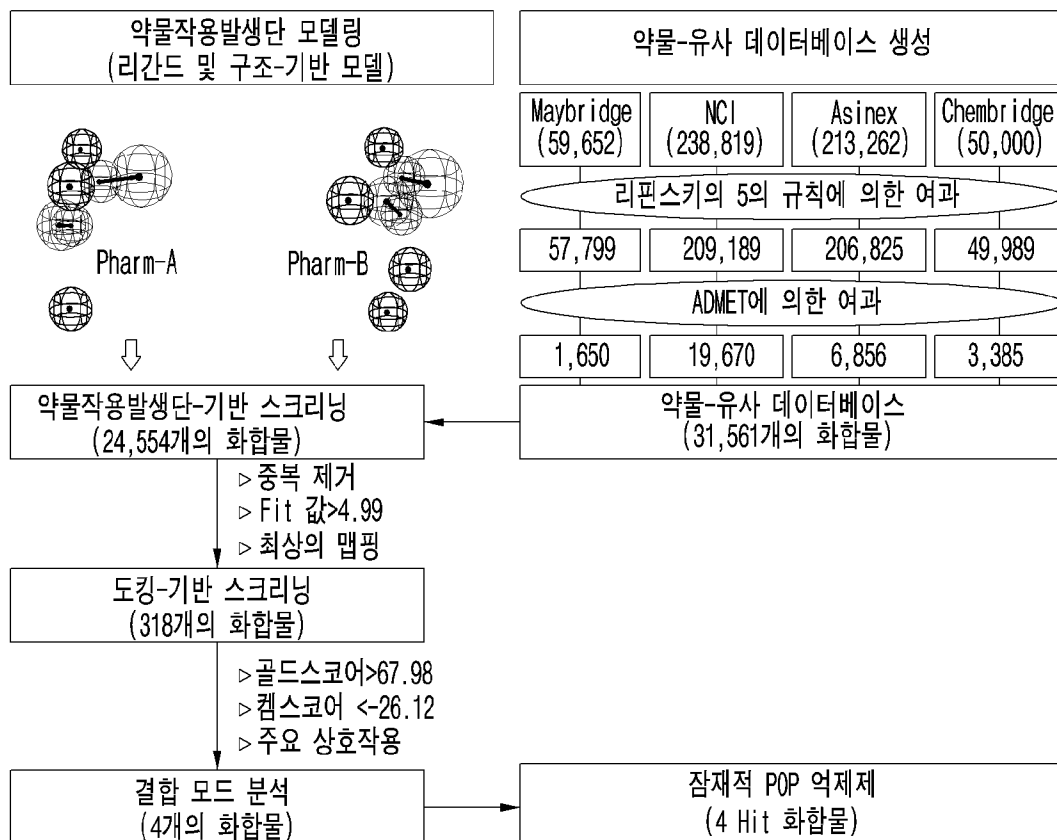
[청구항 13] 하기 특징을 가지는 화합물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료 방법:

- i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);
- ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);
- iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및
- iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

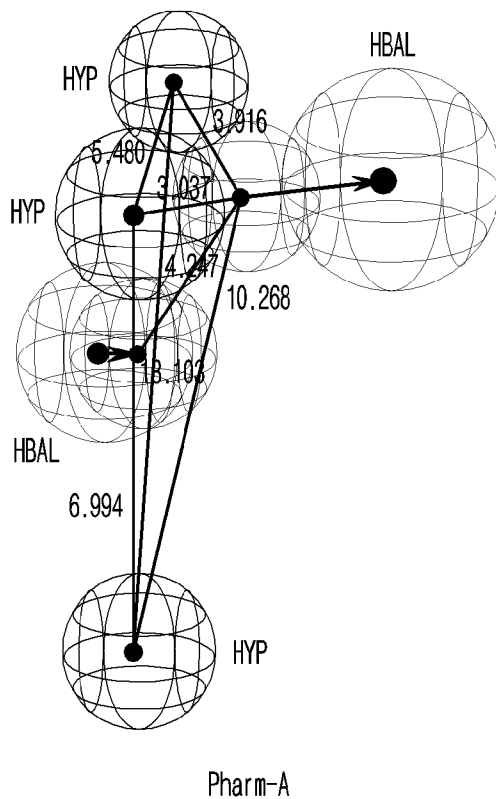
[청구항 14] 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 하기 특징을 가지는 화합물의 용도:

- i) 프로릴 올리고펩티다아제(Prolyl Oligopeptidase; POP)의 활성 부위의 Arg643 아미노산과 수소 결합 작용(hydrogen bond interaction);
- ii) POP 활성 부위의 Trp595 아미노산과 π - π 상호작용(pi-pi interaction);
- iii) POP 활성 부위의 Trp595 및 Arg643 아미노산과 정전기적 상호작용(electrostatic interaction); 및
- iv) POP 활성 부위의 Met235, Cys255, Phe476, Ile478, Val580, Ile591, 및 Val644 아미노산과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction).

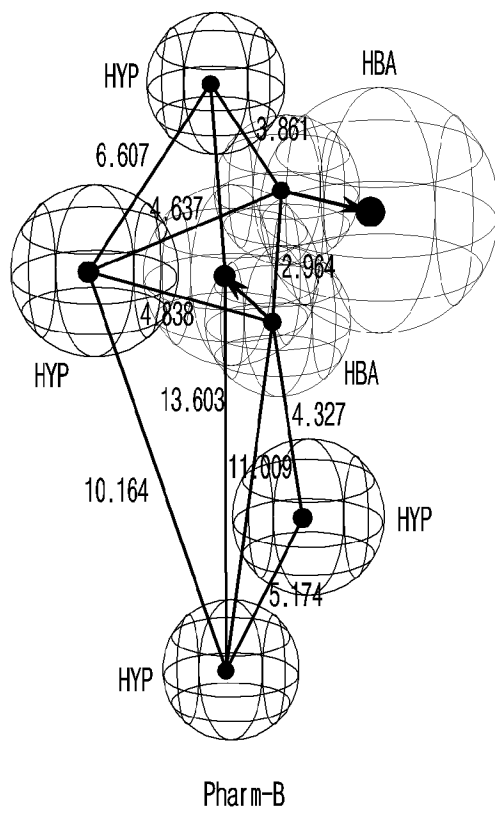
[도1]



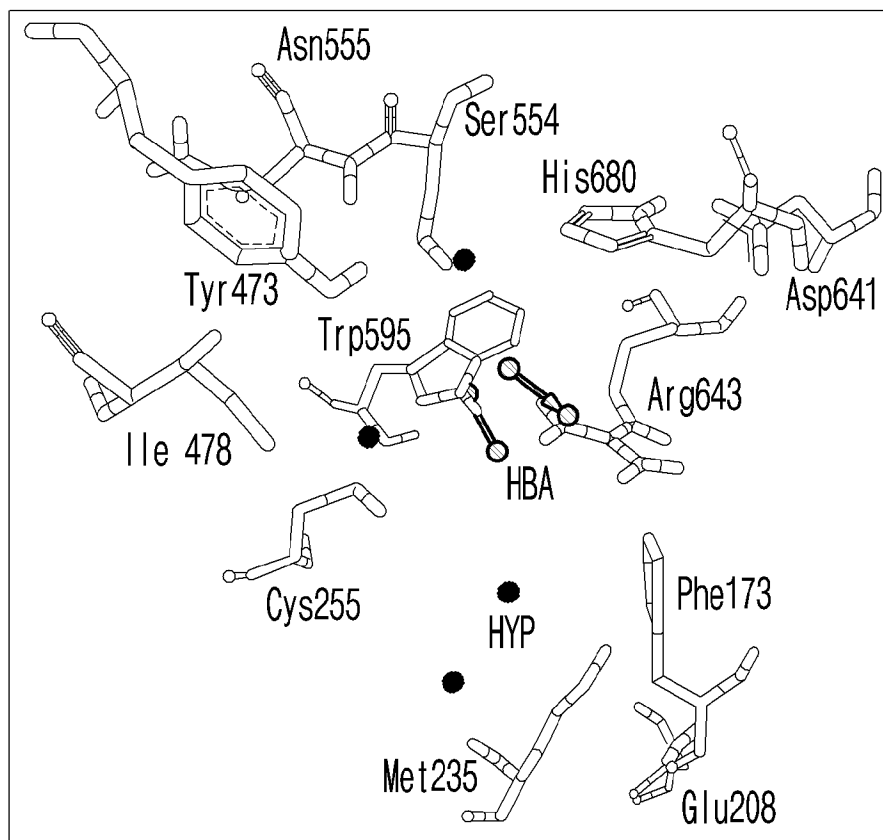
[도2a]



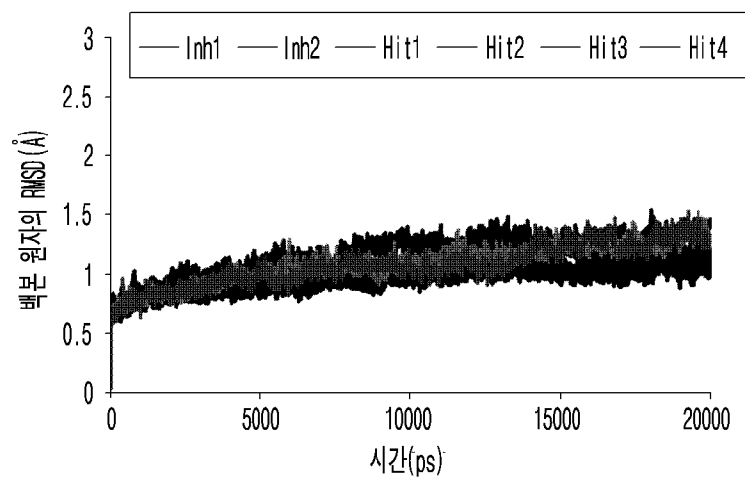
[도2b]



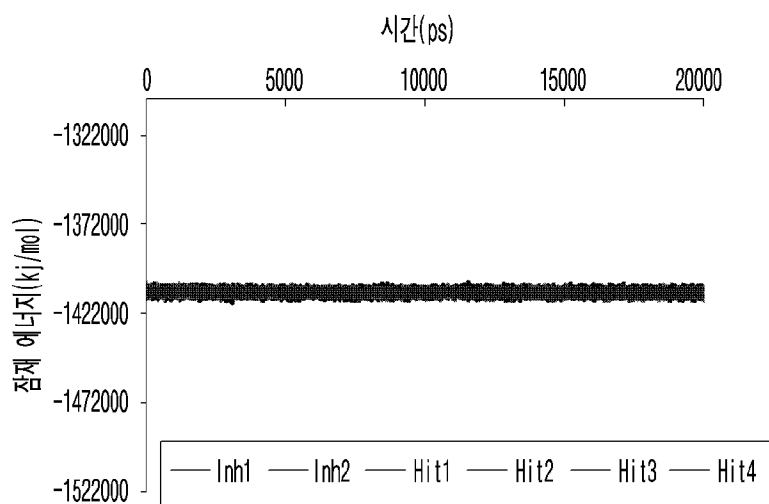
[도3]



[도4a]



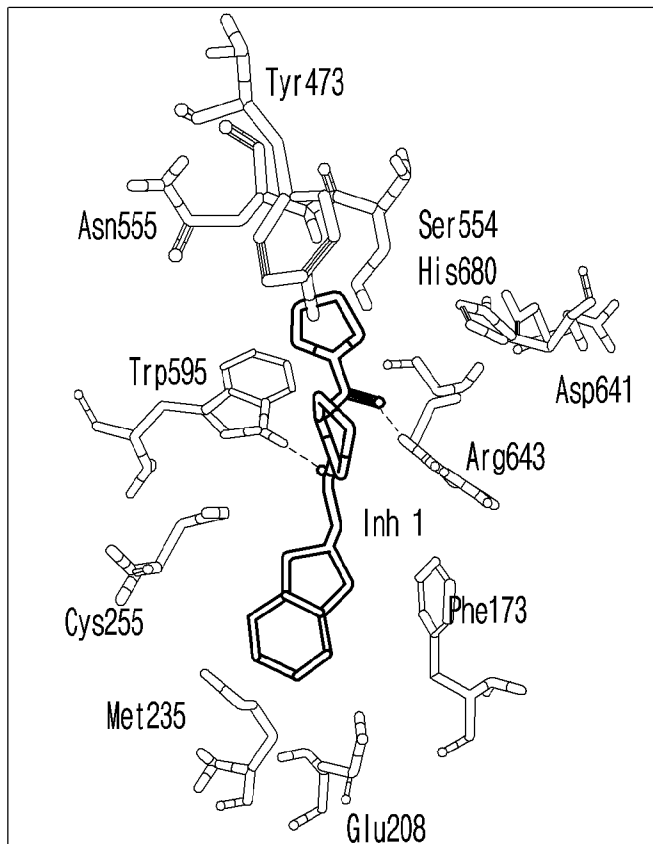
[도4b]



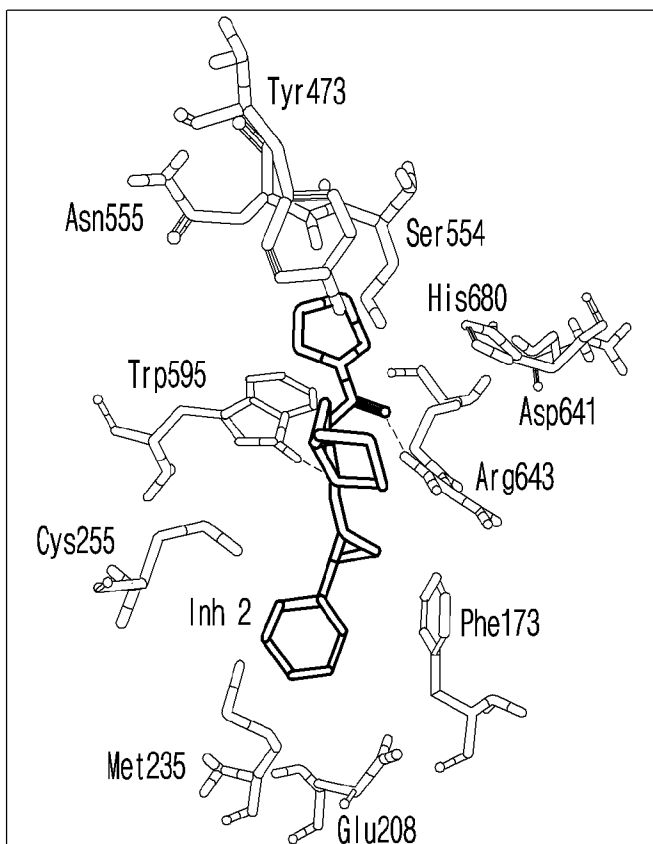
[도5]



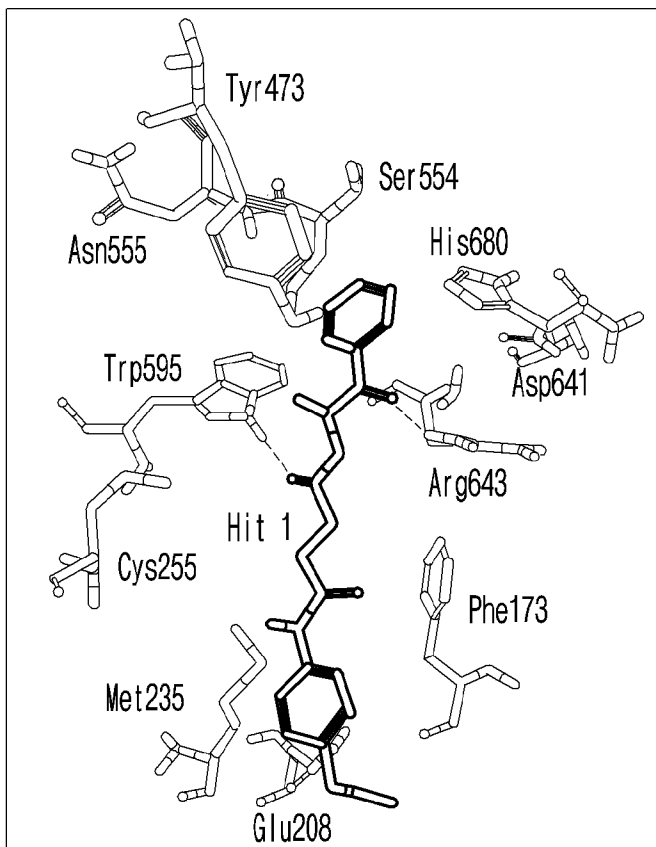
[도6a]



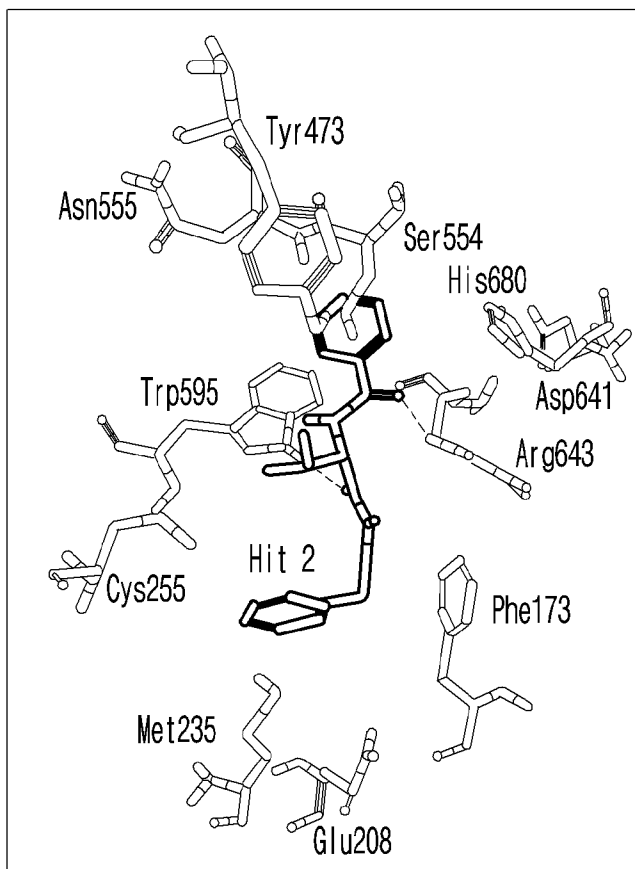
[도6b]



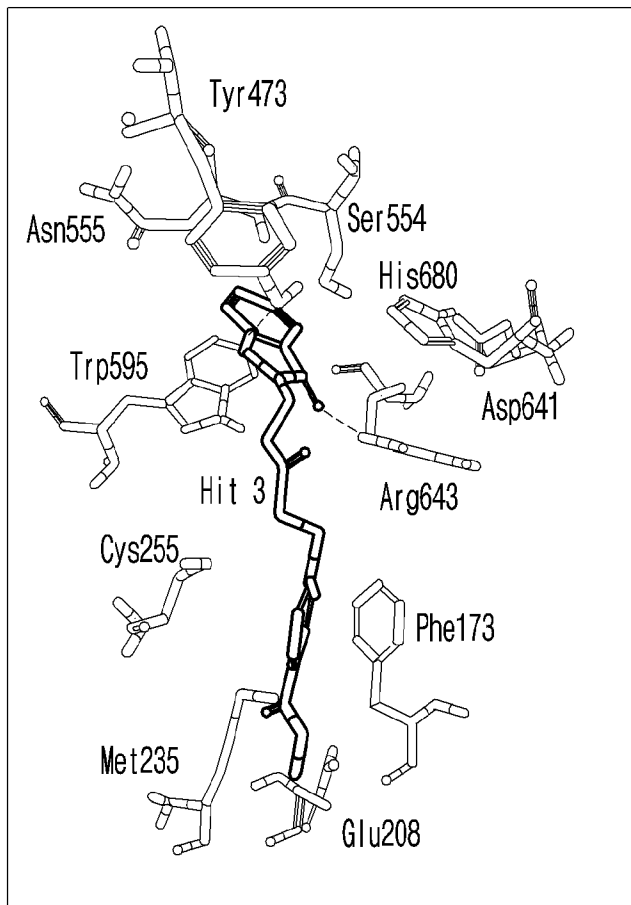
[도6c]



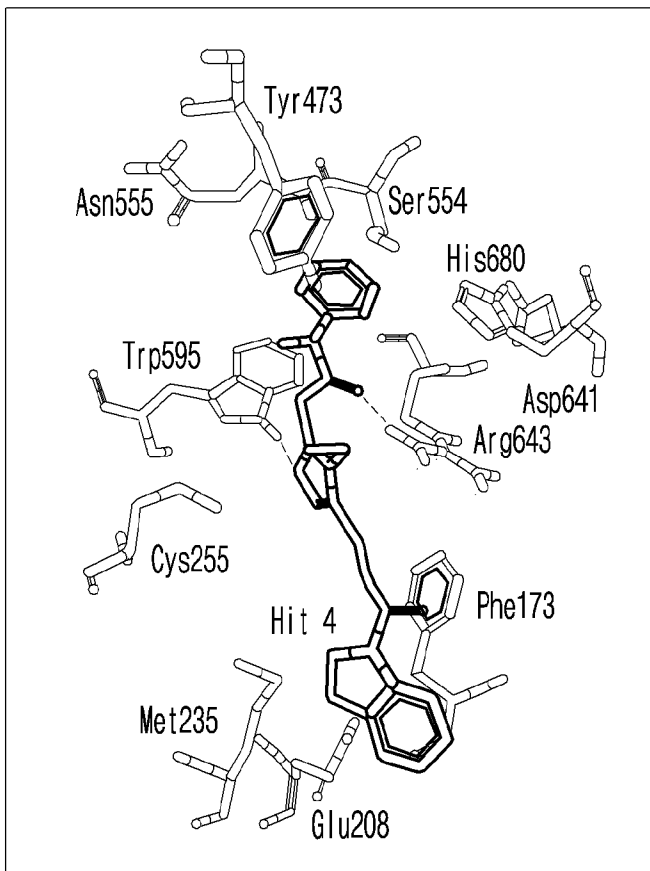
[도6d]



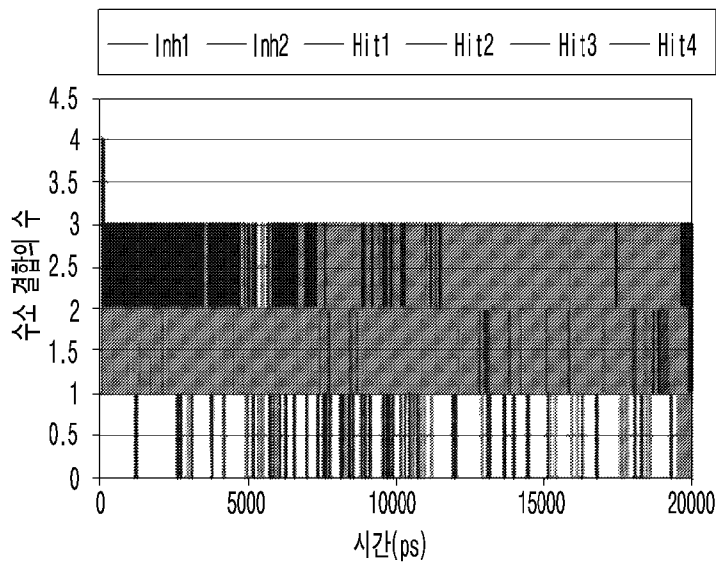
[도6e]



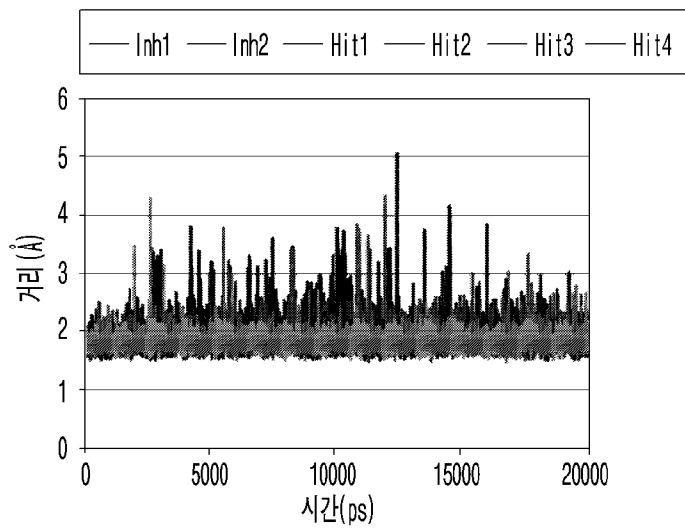
[도6f]



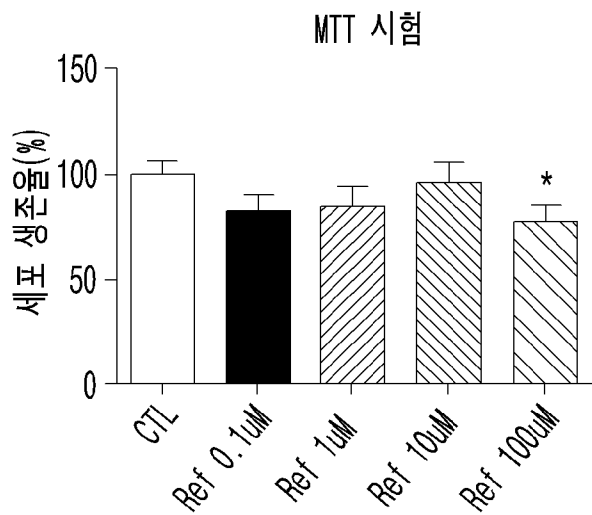
[도7a]



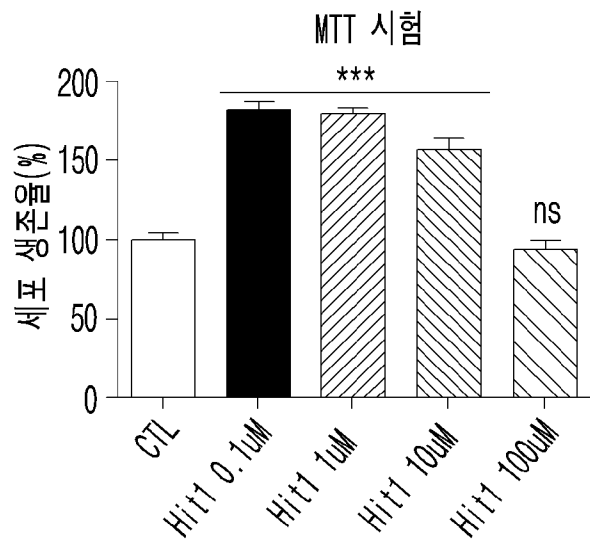
[도7b]



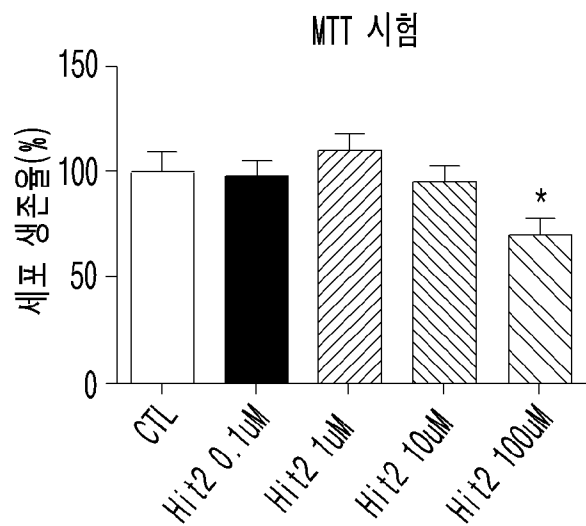
[도8a]



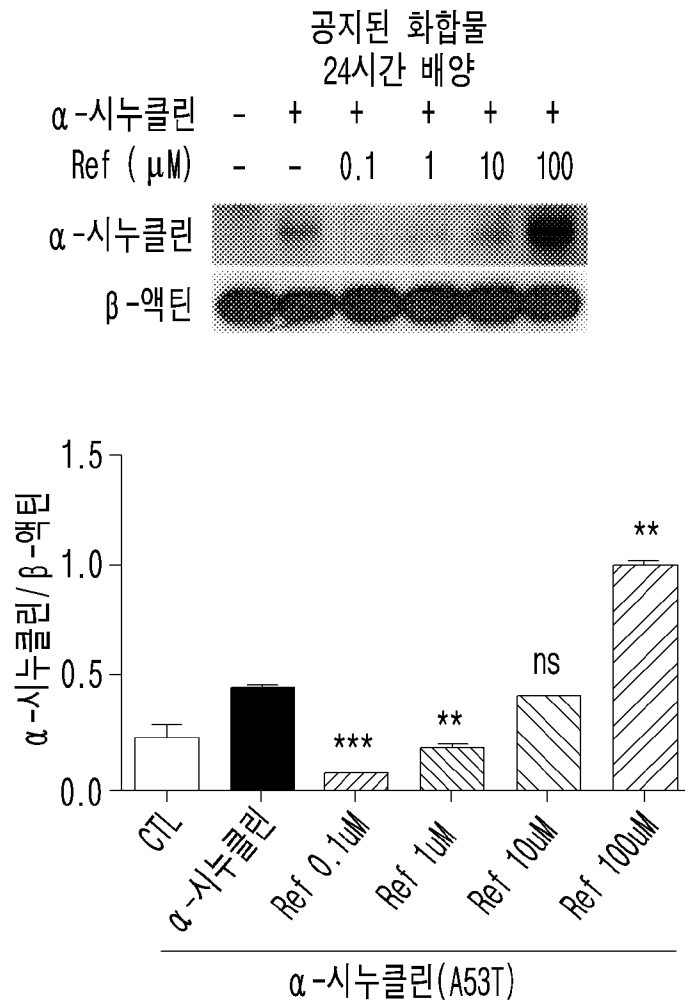
[도8b]



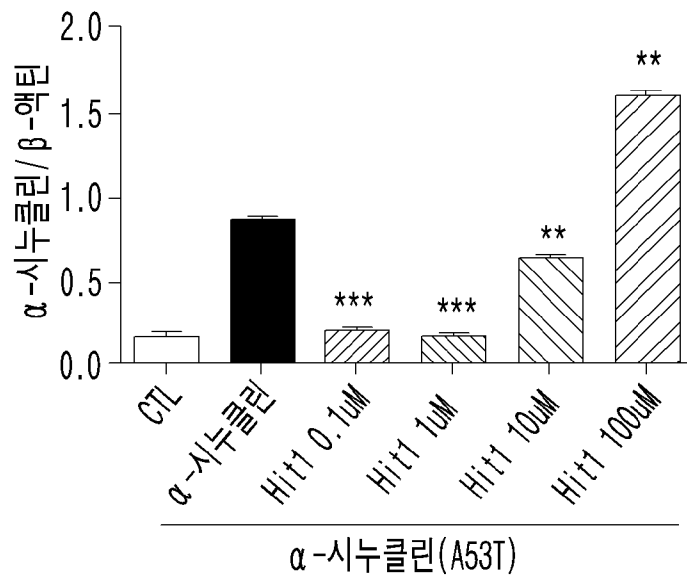
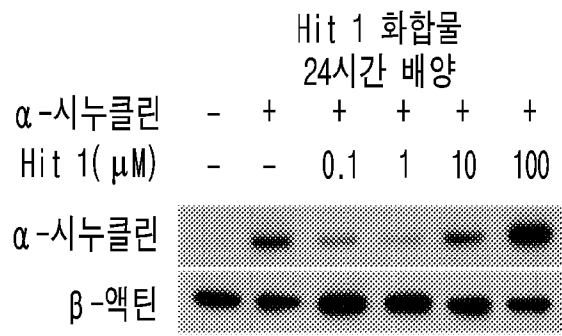
[도8c]



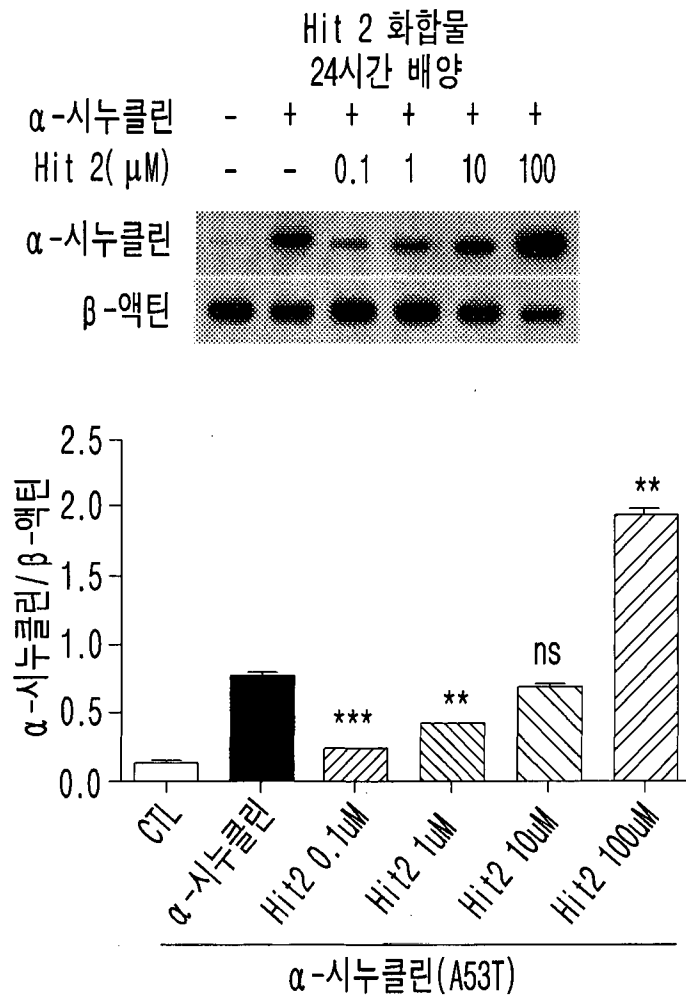
[도9a]



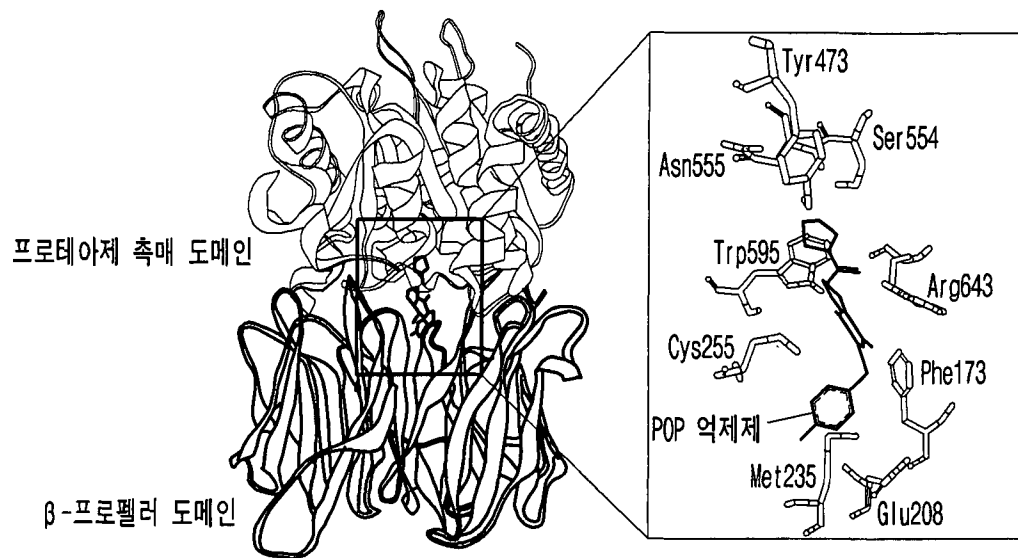
[도9b]



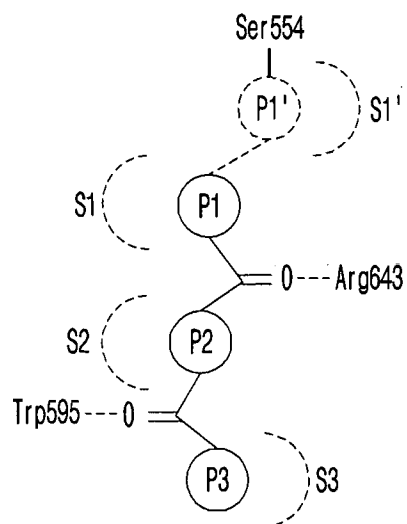
[도9c]



[도10a]



[도10b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/008120

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/167(2006.01)i, A61K 31/4035(2006.01)i, A61K 31/4196(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 31/167; A61K 31/4025; A61K 38/00; A61P 25/00; A61P 25/28; C07D 207/16; C07D 295/185; A61K 31/4035; A61K 31/4196; A23L 33/10

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) & Keywords: prolyl oligopeptidase, inhibitor, degenerative brain disease, synuclein

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORAIN, P. et al., "S 17092: A Prolyl Endopeptidase Inhibitor as a Potential Therapeutic Drug for Memory Impairment. Preclinical and Clinical Studies", CNS Drug Reviews, 2002, vol. 8, no. 1, pages 31-52 See abstract; pages 31, 32; and figures 1, 2.	1,7-11,14
A		2-6,12
X	BELLEMERE, G. et al., "Effect of S 17092, a Novel Prolyl Endopeptidase Inhibitor, on Substance P and Alpha-melanocyte-stimulating Hormone Breakdown in the Rat Brain", Journal of Neurochemistry, 2003, vol. 84, pages 919-929 See abstract; and pages 925, 926.	1,7-11,14
X	MYOHANEN, T. T. et al., "A Prolyl Oligopeptidase Inhibitor, KYP-2047, Reduces α -synuclein Protein Levels and Aggregates in Cellular and Animal Models of Parkinson's Disease", British Journal of Pharmacology, 2012, vol. 166, pages 1097-1113 See abstract.	1,7-11,14
X	LAWANDI, J. et al., "Inhibitors of Prolyl Oligopeptidases for the Therapy of Human Diseases: Defining Diseases and Inhibitors", Journal of Medicinal Chemistry, 2010, vol. 53, pages 3423-3438 See pages 3423, 3425.	1,7-11,14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 23 OCTOBER 2018 (23.10.2018)	Date of mailing of the international search report 23 OCTOBER 2018 (23.10.2018)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/008120

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2006-0027789 A (ORION CORPORATION) 28 March 2006 See abstract; and claims 1-7, 10-15.	1,7-11,14
A	US 2008-0269313 A1 (SIRVIO, J. et al.) 30 October 2008 See the entire document.	1-12,14
A	KR 10-2011-0085260 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 27 July 2011 See the entire document.	1-12,14
PX	KUMAR, R. et al., "New Compounds Identified through in Silico Approaches Reduce the α -synuclein Expression by Inhibiting Prolyl Oligopeptidase in Vitro", Scientific Reports, Electronic publishing on 07 September 2017, vol. 7, document no. 10827, pages 1-14 See abstract; pages 9, 10; and figure 7.	1-4,7-12,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/008120

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.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 pertains to a method for treatment of entities including humans, and thus pertains 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/KR2018/008120

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2006-0027789 A	28/03/2006	AU 2004-203788 A1	2004/07/22
		BR P10406618 A	06/12/2005
		CA 2511856 A1	22/07/2004
		CN 1747930 A	15/03/2006
		EA 010022 B1	30/06/2008
		EA 200501083 A1	24/02/2006
		EP 1581489 A2	05/10/2005
		HR P20050693 A2	31/10/2005
		IS 7963 A	28/07/2005
		JP 2006-516557 A	06/07/2006
		MX PA05007262 A	08/09/2005
		NO 20053726 A	28/09/2005
		PL 378329 A1	20/03/2006
		RS 20050514 A	31/12/2007
		RS P20050514 A	31/12/2007
		US 2006-0229254 A1	12/10/2006
		WO 2004-060862 A2	22/07/2004
		WO 2004-060862 A3	25/11/2004
		ZA 200505183 B	26/04/2006
US 2008-0269313 A1	30/10/2008	CA 2531083 A1	13/01/2005
		EP 1641489 A1	05/04/2006
		JP 2007-520426 A	26/07/2007
		WO 2005-002624 A1	13/01/2005
KR 10-2011-0085260 A	27/07/2011	KR 10-1308232 B1	06/11/2013
		US 2013-0210738 A1	15/08/2013
		US 9352018 B2	31/05/2016
		WO 2011-090270 A2	28/07/2011
		WO 2011-090270 A3	01/12/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/167(2006.01)i, A61K 31/4035(2006.01)i, A61K 31/4196(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/167; A61K 31/4025; A61K 38/00; A61P 25/00; A61P 25/28; C07D 207/16; C07D 295/185; A61K 31/4035; A61K 31/4196; A23L 33/10

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) & 키워드: 프롤릴 올리고펩티다아제, 억제제, 퇴행성 뇌질환, 시누클린

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MORAIN, P. 등, "S 17092: A prolyl endopeptidase inhibitor as a potential therapeutic drug for memory impairment. Preclinical and clinical studies", CNS Drug Reviews, 2002, 8권, 1호, 페이지 31-52 초록; 페이지 31, 32; 및 도면 1, 2 참조.	1,7-11,14
A		2-6,12
X	BELLEMERE, G. 등, "Effect of S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor, on substance P and alpha-melanocyte-stimulating hormone breakdown in the rat brain", Journal of Neurochemistry, 2003, 84권, 페이지 919-929 초록; 및 페이지 925, 926 참조.	1,7-11,14
X	MYOHANEN, T. T. 등, "A prolyl oligopeptidase inhibitor, KYP-2047, reduces α -synuclein protein levels and aggregates in cellular and animal models of Parkinson's disease", British Journal of Pharmacology, 2012, 166권, 페이지 1097-1113 초록 참조.	1,7-11,14
X	LAWANDI, J. 등, "Inhibitors of prolyl oligopeptidases for the therapy of human diseases: defining diseases and inhibitors", Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53권, 페이지 3423-3438 페이지 3423, 3425 참조.	1,7-11,14

☒ 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

2018년 10월 23일 (23.10.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 10월 23일 (23.10.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2006-0027789 A (오리온 코퍼레이션) 2006.03.28 요약; 및 청구항 1-7, 10-15 참조.	1, 7-11, 14
A	US 2008-0269313 A1 (SIRVIO, J. 등) 2008.10.30 전체 문헌 참조.	1-12, 14
A	KR 10-2011-0085260 A (경상대학교산학협력단) 2011.07.27 전체 문헌 참조.	1-12, 14
PX	KUMAR, R. 등, "New compounds identified through in silico approaches reduce the α -synuclein expression by inhibiting prolyl oligopeptidase in vitro", Scientific Reports, 전자공개 2017.09.07, 7권, 문헌번호 10827, 페이지 1-14 초록; 페이지 9, 10; 및 도면 7 참조.	1-4, 7-12, 14

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: 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13은 인간을 포함하는 개체에 대한 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
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 10-2006-0027789 A	2006/03/28	AU 2004-203788 A1 BR PI0406618 A CA 2511856 A1 CN 1747930 A EA 010022 B1 EA 200501083 A1 EP 1581489 A2 HR P20050693 A2 IS 7963 A JP 2006-516557 A MX PA05007262 A NO 20053726 A PL 378329 A1 RS 20050514 A RS P20050514 A US 2006-0229254 A1 WO 2004-060862 A2 WO 2004-060862 A3 ZA 200505183 B	2004/07/22 2005/12/06 2004/07/22 2006/03/15 2008/06/30 2006/02/24 2005/10/05 2005/10/31 2005/07/28 2006/07/06 2005/09/08 2005/09/28 2006/03/20 2007/12/31 2007/12/31 2006/10/12 2004/07/22 2004/11/25 2006/04/26
US 2008-0269313 A1	2008/10/30	CA 2531083 A1 EP 1641489 A1 JP 2007-520426 A WO 2005-002624 A1	2005/01/13 2006/04/05 2007/07/26 2005/01/13
KR 10-2011-0085260 A	2011/07/27	KR 10-1308232 B1 US 2013-0210738 A1 US 9352018 B2 WO 2011-090270 A2 WO 2011-090270 A3	2013/11/06 2013/08/15 2016/05/31 2011/07/28 2011/12/01