

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0084620

(43) 공개일자 2020년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/357 (2006.01) A61K 36/03 (2006.01)

A61K 36/70 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/357 (2013.01)

A61K 36/03 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0000719

(22) 출원일자 2019년01월03일

심사청구일자 2019년01월03일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

최재수

부산광역시 남구 오륙도로 85, 101동 204호(용호
동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)

성수희

부산광역시 남구 전포대로20번길 15, 109동 1001
호(문현동, 문현동삼성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

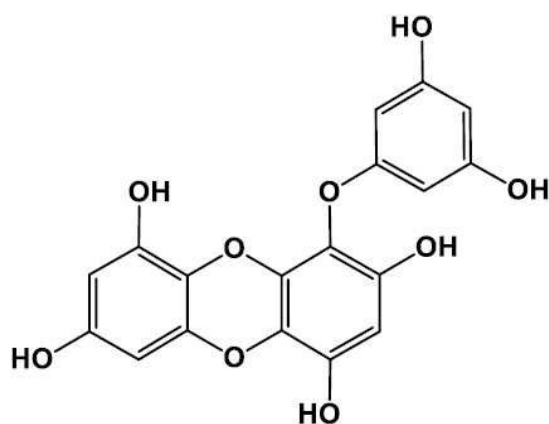
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 엑콜을 포함하는 퇴행성 신경질환예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 도파민 D₃ 및 D₄ 리셉터의 아고니스트로서 작용하는 엑콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



Eckol

(52) CPC특허분류

A61K 36/70 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

(72) 발명자

우상욱

부산광역시 남구 오륙도로 85, 109동 2205호(용호
동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)

박수현

부산광역시 강서구 명지오션시티12로 92, 514동
601호(명지동, 엘크루 블루오션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A6A1028677

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초 연구사업

연구과제명 해산식물 유래 항노화 소재개발 및 분자 작용 메커니즘

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2018.07.01 ~ 2019.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

엑콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 뇌졸중, 중풍, 기억력 상실, 기억력 손상, 치매, 건망증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크(Pick)병, 크로이츠펔트-야콥(Creutzfeldt-Jacob)병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭경화증 및 루게릭병으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 엑콜은 대황(*Eisenia. bicyclis*) 또는 곰피(*Ecklonia stolonifera*)로부터 분리된 것인 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 엑콜은 도파민 D₃ 및 D₄ 리셉터의 아고니스트로 작용하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

엑콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 엑콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 효과적인 뉴런 신호전달은 화학적 시냅스에서 신경전달물질(NT)의 분비를 통해 및/또는 전기적 시냅스에서 갭 결합(gap junctions)을 통한 세포내 신호의 직접 전달을 통해 척추동물에서 감각 지각, 신호 전달, 처리 및 운동 출력에서 필수적이다. 전기적 커플링은 척추동물 CNS에서 매우 드물기 때문에, 뉴런 신호전달은 매우 다양한 신경전달물질의 방출에 의존한다: (1) Ca₂⁺-촉발 엑소사이토시스에 의해 방출되고 급격한 뉴런 신호전달을 가능하게 하는 전형적인 NTs (아세틸콜린, 아데노신, 아데노신-트리포스페이트, 글루타메이트, γ-아미노부티르산 및 글리신); (2) 엑손 말단에서 Ca₂⁺-의존 엑소사이토시스에 의해 분비되고 더 먼 거리로 확산되는 모노아민자극성(monoaminergic) NTs (아드레날린, 노르아드레날린, 도파민, 히스타민 및 세로토닌); (3) Ca₂⁺-의존 엑소사이토시스를 실시하는 신경펩티드; 및 (4) 합성 후 즉시 방출되거나 소포체에 저장되지 않는 막-투과 전달물질(산화질소, 엔도카나비노이드, 그외 지질 NTs). 신경전달물질은 방출되면 후시냅스막의 리셉터에 결합하여 활성화시키고 다양한 생화학적 시그널링 캐스케이드를 조절한다. G 단백질-결합 리셉터(GPCR)는 막 단백질의 가장 큰 패밀리로써 90% 이상이 뇌에서 발견되어 일반 뇌 기능에 결정적인 역할을 한다. 뇌에서 많은 개별 GPCR 시스템의 저-활성 또는 고-활성이 하이퍼도파민성(hyperdopaminergic) 운동 장애에서 조광증 및 우울증에 이르는 범주의 병리학적 증상에 원인이 될 수 있다. 따라서, GPCR 활성의 조절이 뉴런 신약 개발에 유망한 전략이 될 수 있

다.

[0003] 다중약리학(polypharmacology)을 통한 단일 약물의 다중 타겟 상호작용은 파킨슨병이나 조현병과 같은 복합병을 치료하기 위한 새로운 전략으로 여겨졌다. GPCR 약물 선별을 위해 구조적 기반이 비슷한 것이 신약 개발에 새로운 통찰력을 부여할 수 있다. 현재 허용된 항우울제의 대부분이 1950년대에 우연한 발견에 근거한 것으로 모노아민 신경전달물질을 통해 작용한다. 현재까지 천연 또는 합성 경로의 많은 신경성 약물(대부분 효소 억제제)이 발견되어 FDA의 승인을 받았다. 그러나 임상실험을 통과한 일부 승인 약물들의 실패로 인해 안전하고 효과적인 약물을 찾고자 하는 연구는 더욱 진행되고 있다. 리셉터 아고니스트와 같은 도파민 D2는 파킨슨병, 운동장애, 고프로락틴혈증 및 하지 불안 증후군의 제어에 사용되었다. 도파민의 전구 약물인 L-DOPA는 D2, D3 및 D4 아형에서 적은 선별성을 나타낸다. 이는 도파민 유사체인 pramipexole, rotigotine, ropinirole 및 pergolide에 대한 기능성 및 라디오 리간드 결합 검정으로부터 뒷받침되는 것으로, D2 아형에 비해 D3 및 D4의 아고니스트-표지된 고-친화성 상태를 선호하지 않는 것을 보였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2014-0081339호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자는 엑콜이 도파민 D₃ 및 D₄ 리셉터의 아고니스트로서 작용함을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0006] 이에 따라 본 발명은 엑콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 기능성 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 엑콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 엑콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 기능성 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 엑콜이 도파민 D₃ 및 D₄ 리셉터의 아고니스트로서 작용하여 GPCR을 조절할 수 있어 유망한 퇴행성 신경질환 치료제로서 사용할 수 있다.

[0010] 또한, 엑콜은 천연물질로서 세포독성이 일어나지 않으며, 약물에 대한 독성 및 부작용도 없어 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 체내에서도 안정한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 곰피(*Ecklonia stolonifera*)로부터 분리된 엑콜의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 도파민 (A) D₃ 및 (B) D₄ 리셉터에서 엑콜의 조절 아고니스트 반응의 농도 의존적 퍼센트를 나타낸 그래프이다.

도 3A는 양성 대조와 함께 엑콜과 결합한 인간 도파민 D₃ 리셉터(hD₃R)의 분자 도킹을 나타낸 것이다. 도파민(특이적 아고니스트), (+)-부타클라몰(안타고니스트로서 인비트로 검정을 위한 양성 대조), 및 엑콜의 화학 구조를 각각 파란색, 검은색 및 주황색으로 나타냈다. 도 3B 및 3C는 엑콜 결합 부위의 확대도로써 hD₃R-리간드 상호작용을 보인다.

도 4A는 양성 대조와 함께 엑콜과 결합한 인간 도파민 D₄ 리셉터(hDR)의 분자 도킹을 나타낸 것이다. 도파민, ChEMBL332154 및 엑콜의 화학 구조를 각각 파란색, 검은색 및 주황색으로 나타냈다. 도 4B 및 4C는 엑콜 결합 부위의 확대도로서 hDR-리간드 상호작용을 보인다.

도 5A는 POPC 막에 내장된 도파민 3 리셉터-엑콜 복합체를 나타낸 모식도로서, 명확하게 하기 위해 물 분자는 도시하지 않았다. 도 5B는 80 ns 분자 동역학 시뮬레이션 후 엑콜 분자와 상호작용하는 잔기 및 물 분자의 최종 스냅샷을 나타낸 것이다.

도 6A는 80 ns 분자 동역학 시뮬레이션 후 결합 포켓 내부의 리간드의 확대 이미지이다. 도 6B는 80 ns 분자 동역학 시뮬레이션 동안 단백질 백본(빨간색) 및 비-수소 리간드 분자(파란색)의 RMSD(Root Mean Squared Deviation)값을 나타낸 그래프이다. 도 6C는 80 ns 분자 동역학 시뮬레이션 동안 Phe346의 벤젠고리와 엑콜 분자의 벤젠고리의 질량 중심 사이의 거리를 나타낸 것이다. 도 6D는 60 ns 내지 80 ns에 Phe346의 벤젠고리와 엑콜 분자의 벤젠고리의 질량 중심 사이의 거리의 히스토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 엑콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0013] 엑콜은 디벤조-p-다이옥신 골격 및 플로로글루시놀 성분을 갖는 플로로탄닌으로서 감태과에 속하는 갈조류에 풍부한 물질이다(도 1). 상기 엑콜은 대항(*Eisenia bicyclis*) 또는 곰피(*Ecklonia stolonifera*)로부터 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 상기 엑콜은 도파민 D3 및 D4 리셉터의 아고니스트로 작용하여 GPCR의 활성을 조절할 수 있어 퇴행성 신경질환의 치료에 효과를 나타낼 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 퇴행성 신경질환은 뇌졸중, 중풍, 기억력 상실, 기억력 손상, 치매, 건망증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크(Pick)병, 크로이츠펔트-야콥(Creutzfeldt-Kacob)병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭경화증 및 루게릭병으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명에서 "치료"란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 치료란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 퇴행성 신경질환의 "치료" 또는 "치료요법"은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0017] (1) 퇴행성 신경질환의 발달을 저지시킴,
- [0018] (2) 퇴행성 신경질환의 확산을 예방함,
- [0019] (3) 퇴행성 신경질환을 경감시킴,
- [0020] (4) 퇴행성 신경질환의 재발을 예방함 및
- [0021] (5) 퇴행성 신경질환의 증상을 완화함(palliating)
- [0022] 상기 엑콜을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이나 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 유허제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0025] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 유허제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네

습 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 겔 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 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 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [0026] 본 발명의 액콜은 조성물의 총 중량에 대하여 0.001 내지 20 중량%로 포함될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있으며, 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 액콜을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0028] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강 보조식품류 등이 있다.
- [0030] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 액콜 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 유효성분인 액콜은 천연물질로서 화학약품과 같은 부작용은 거의 없으므로 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료를 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한 액콜을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 건강기능식품은 퇴행성 신경질환 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0036] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0037] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 액콜을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0038] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 액콜을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 톱니모자반 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세

린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0039] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 엑콜과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0040] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 엑콜과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0041] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0042] 또한 본 발명은 포유동물에게 엑콜 또는 엑콜을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0043] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0044] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료 방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 토피모자반 추출물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01mg/kg~100mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0045] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 엑콜을 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0047] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0049] <실시예>

[0050] 물질

[0051] 엑콜은 대황(*Eisenia. bicyclis*)의 잎 엽상체로부터 분리된 것을 사용하였다(Jung, H. A.; Jin, S. E.; Ahn, B. R.; Lee, C. M.; Choi, J. S., Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Food and Chemical Toxicology 2013, 59, 199-206). 엑콜의 구조는 도 1에 도시하였다.

[0053] 기능성 GPCRS 검증

[0054] 기능성 GPCRS 세포-기반 검정은 G_i 및 G_s -결합 리셉터에 대한 cAMP 및 G_q -결합 리셉터에 대한 IP_1 및 IP_3 /칼슘 플럭스를 포함하는 다중 이차 메신저의 관독을 제시하고 이러한 리셉터들의 천연 경로를 강조한다. 표로 나타낸 리셉터에서의 기능적 검정은 대표적인 인간 클로닝 리셉터를 발현하는 절개된 세포를 사용하여 인하우스 기능적 검증 프로토콜(<https://www.eurofinsdiscoveryservices.com/cms/cms-content/services/in-vitro-assays/gpcrs/functional/>)에 따라 Eurofins Cerep (Le Bois I' Eveque, France)에서 조사된 것으로, 실험 조건은 하기 표 1에 나타났다. 재조합 GPCR를 발현하는 안정한 세포주를 본 실시예에 사용하였다.

표 1

Assay/Receptors	Source	Stimulus	Incubation	Measured Component	Detection Method
D ₁ (h) Dopamine (agonist effect)	Human recombinant (CHO cells)	None (control: 10 μ M dopamine)	30 min RT	cAMP	HTRF
D ₁ (h) Dopamine (antagonist effect)	Human recombinant (CHO cells)	Dopamine (300 nM)	30 min RT	cAMP	HTRF
D ₃ (h) Dopamine (agonist effect)	Human recombinant (CHO cells)	None (control: 300 nM dopamine)	30 min 37°C	cAMP	HTRF
D ₃ (h) Dopamine (antagonist effect)	Human recombinant (CHO cells)	Dopamine (10 nM)	30 min 37°C	cAMP	HTRF
D ₄ (h) Dopamine (agonist effect)	Human recombinant (CHO cells)	None (control: 10 μ M dopamine)	10 min 37°C	cAMP	HTRF
D ₄ (h) Dopamine (antagonist effect)	Human recombinant (CHO cells)	Dopamine (100 nM)	10 min 37°C	cAMP	HTRF
M ₅ (h) Muscarinic (agonist effect)	Human recombinant (RBL cells)	None (control: 0.624 μ M ACh)	RT	Intracellular [Ca ²⁺]	Fluorimetry
M ₅ (h) Muscarinic (antagonist effect)	Human recombinant (RBL cells)	ACh (10 nM)	RT	Intracellular [Ca ²⁺]	Fluorimetry
NK ₁ (h) Tachykinin (agonist effect)	Human endogenous (U373MG cells)	None (control: 30 nM [Sar ⁹ , Met(O ₂) ¹¹]-SP)	RT	Intracellular [Ca ²⁺]	Fluorimetry
NK ₁ (h) Tachykinin (antagonist effect)	Human endogenous (U373MG cells)	[Sar ⁹ , Met(O ₂) ¹¹]-SP (1 nM)	RT	Intracellular [Ca ²⁺]	Fluorimetry
V _{1a} (h) Vasopressin / Oxytocin (agonist effect)	Human recombinant (CHO cells)	None (control: 1 μ M AVP)	RT	Intracellular [Ca ²⁺]	Fluorimetry
V _{1a} (h) Vasopressin / Oxytocin (antagonist effect)	Human recombinant (CHO cells)	AVP (10 nM)	RT	Intracellular [Ca ²⁺]	Fluorimetry
5-HT _{1A} (h) Serotonin (agonist effect)	Human recombinant (BA/F3 cells)	None (control: 2.5 μ M serotonin)	RT	Intracellular [Ca ²⁺]	Fluorimetry
5-HT _{1A} (h) Serotonin (antagonist effect)	Human recombinant (BA/F3 cells)	Serotonin (30 nM)	RT	Intracellular [Ca ²⁺]	Fluorimetry

HTRF: Homogeneous Time Resolved Fluorescence

[0055]

[0056]

cAMP 수준의 측정

[0057]

GPCR 유전자(도파민 D₁, D₃orD₄)를 포함하는 플라스미드를 CHO 세포에 형질전환시켰다. 결과적으로 생성된 안정한 형질전환체 (CHO-GPCR 세포주)를 20 mM HEPES 버퍼 및 500 μ M IBMX가 보충된 HBSS 버퍼 (Invitrogen)에 현탁한 후, 5×10^3 cells/well의 밀도로 마이크로플레이트에 분배하고 엑콜 없이(대조군) 또는 엑콜(25 및 50 μ M) 또는 기준 아고니스트 존재 하에서 실온에서 30분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포 용해시키고 형광 어셉터 (D2-labeled cAMP) 및 형광 도너(anti-cAMP antibody with europium cryptate)를 첨가하였다. 실온에서 60분 후, 형광 트랜스퍼를 $\lambda_{ex}=337$ nm 및 $\lambda_{em}=620$ 및 665 nm에서 마이크로플레이터 리더(Envison, Perkin Elmer)를 사용하여 측정하였다. cAMP 농도를 665 nm에서 측정된 시그널을 620 nm에서 측정된 시그널로 나누어(비율) 결정하였다. 결과는 아고니스트 효과에서 도파민에 대한 대조 반응의 퍼센트 및 도파민에 대한 대조 반응의 저해 퍼센트로 나타났다.

[0058]

표준 기준 대조는 도파민으로, EC₅₀ 수치가 계산되는 농도-반응 곡선을 생성하기 위해 여러 농도에서 각 실험마다 실험되었다.

[0060]

세포내 [Ca²⁺]수준의 측정

[0061]

각 리셉터 유형에서 세포내 [Ca²⁺]수준 정량을 위한 방법은 약간씩 달라지기는 하지만, 일반적으로 다른 리셉터를 발현하는 세포(표 1)를 리셉터 폴리펩티드를 암호화하는 발현 벡터로 형질전환시키고 세포에서 리셉터가 발현되기에 충분한 시간 동안 성장시켰다. 그런 다음 20 M HEPES (Invitrogen) (pH 7.4)가 보충된 HBSS 버퍼 (Invitrogen) 내에서 프로벤시드(probencid)와 혼합된 형광 프로브(Fluo8 Direct, Invitrogen)를 각 웰에 첨가한 후 37°C에서 60분 동안 세포와 함께 평형화시켰다. 그 후, 엑콜 (25 및 50 μ M), 기준 아고니스트 또는 HBSS 버퍼 (기저 대조)의 첨가 및 유리 시토졸 Ca²⁺ 이온 농도에 비례하여 변하는 형광 강도에서의 변화 측정을 위해 검정 플레이트를 마이크로플레이트 리더(CellLux, PerkinElmer)에 위치시켰다. EC₅₀ 수치가 계산되는 농도-반응 곡선을 생성하기 위해 여러 농도에서 각 실험마다 실험된 표준 기준 대조(아고니스트 및 안타고니스트)는 상기 표 1에 나타났다.

[0062]

세포성 아고니스트 효과는 각 타겟에서 알려진 기준 아고니스트에 대한 대조 반응 %로 계산하였으며, 세포성 안타고니스트 효과는 각 표적에서 대조 기준 아고니스트의 저해 %로 계산하였다. 결과는 엑콜의 존재 하에서 수득

된 대조 아고니스트 반응 또는 역 아고니스트 반응 (측정된 반응/대조 반응 $\times$ 100)의 퍼센트 및 대조 아고니스트 반응의 저해 퍼센트 $[100-(\text{측정된 반응}/\text{대조 반응} \times 100)]$ 로 나타냈다.

[0064] **분자 도킹 연구**

[0065] 표적 리셉터와 엑콜의 도킹을 AutoDock 4.2 program을 사용하여 시뮬레이션하였다. 인간 도파민 D₃ 리셉터 (hD₃R)-에티클로프라이드(eticlopride) 복합체(PDB ID: 3PBL) 및 인간 도파민 D₄ 리셉터 (hD₄R)-네모나프라이드(nemonapride) 복합체(PDB ID: 5WU)의 X-선 결정을 RCSB Protein Data Bank (PDB)에서 각각 2.89 및 1.96 Å의 해상도로 수득하였다. 엑콜, 도파민, 에티클로프라이드, (+)-부타클라몰(butacclamol), ChEMBL332154의 3D 구조는 각각 145937 681, 57267, 37459, 및 9926143의 화합물 CIDs로 PubChem Compound (NCBI)에서 입수하였다. 자동 도킹 시뮬레이션은 AutoDockTools (ADT)을 사용하여 실행해 적절한 결합 방향을 평가하였다. 도킹 계산을 위해, Gasteiger charges를 디폴트로 추가하고, 회전가능한 결합을 ADT로 설정하고, 모든 torsion은 회전가능하도록 하였다. 그리드 맵(grid maps)은 AutoGrid로 생성했다. 구부러지지 않거나 구부러질 수 있는 리간드 도킹을 위한 도킹 프로토콜은 20개 독립 유전 알고리즘으로 구성되었다; 사용된 다른 파라미터들은 ADT 디폴트이다. 결과를 Discovery Studio (v17.2, Accelrys, San Diego, CA, USA) 및 PyMOL (v1.7.4, Schrodinger, LLC, Cambridge, MA)을 사용하여 시각화하고 분석하였다.

[0067] **ADME 예측**

[0068] 흡수, 분포, 대사 및 분비(ADME)와 같은 엑콜의 약동학적 파라미터들을 PreADMET을 사용하여 실행하였다. 이 웹 기반 소프트웨어는 엑콜의 약물 유사 특징을 특성화하기 위해 사용하였다.

[0070] **분자 동역학 시뮬레이션**

[0071] CMAP 용어를 반영한 단백질 및 지질 파라미터를 갖는 CHARMM 27 force field를 수반한 NAMD 2.9 package를 사용하여 도킹 연구에서 생성된 도파민 D₃ 리셉터-엑콜 복합체에 대한 분자 동역학적(MD) 시뮬레이션을 실시하였다. 엑콜에 대한 파라미터는 SwissParam에서 검색하였다. 단백질-리간드 복합체를 100 Å $\times$ 100 Å POPC (palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine) 지질 이중층에 내장시켰다. TIP3P 워터 모델을 사용하였다. Na⁺ 및 Cl⁻ 이온의 위치는 VMD의 AUTOIONIZE module을 사용하여 이온간 5 Å의 조건으로 생성하여 시스템이 NaCl에서 150 mM가 되도록 하였다. conjugate gradient method로 10,000 단계 이상의 에너지 최소화를 실시하였다. 시스템을 60 ps에서 300 K로 가열하였다. 시스템에서의 통제 시뮬레이션을 25 ns 동안 초기 도킹 포션을 유지하였다. 통제(2 kcal/mol/Å²)를 25 ns 동안 단계적으로 감소시켜 설정하였다. 그런 다음, NP_{AT} 앙상블 시뮬레이션을 단백질에서 통제 없이 (300 K, 1 atm) 80 ns 동안 실시하였다. Langevin piston Nose-Hoover method를 사용하여 압력(1atm)을 변함없이 유지하였다. 정전기 상호작용에 particle mesh Ewald (PME) method를 사용하였다. 댐핑(damping) 계수는 Langevin dynamics에서 1 ps⁻¹이었으며 다이렉트 스페이스 컷 오프는 12 Å이었다. 시뮬레이션은 2 fs 시간 간격으로 실시하였다.

[0073] **<결과>**

[0074] **기능성 GPCR 검정**

[0075] 각 리셉터 유형의 아고니스트 또는 안타고니스트로서의 엑콜을 특성화하기 위해 실시한 세포-기반 기능성 GPCR 검정 결과를 각각 표 2 및 3에 나타냈다. 50% 이상의 저해 또는 자극을 보이는 결과는 엑콜의 유의미한 효과를 보이는 것으로 간주되었다. 도 2는 도파민 D₃ 및 D₄ 리셉터에서 엑콜의 농도-의존성 대조 아고니스트 반응을 나타낸 것이다. 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 25 μM에서 엑콜은 각각 도파민 D₃ 및 D₄ 리셉터에서 10.6 및 36.5%의 대조 아고니스트 반응을 나타냈다. 50 μM로 농도가 증가함에 따라, 아고니스트 반응은 D₃ 및 D₄ 리셉터에서 48.62 $\pm$ 3.21 및 42.55 $\pm$ 2.54 μM의 EC₅₀ 수치로 50% 이상 증가하였다. 그러나, 이들 리셉터에서 안타고니스

트 효과는 불활성이었다. 또한, 엑콜은 실험한 나머지 리셉터인 도파민 D1, 세로토닌 (5HT1A), 바소프레신 (V1A), 타키키닌(NK1) 및 무스카린(M5)에서 조절 효과를 나타내지 않았다.

표 2

Receptors	% of Control Agonist Response		EC ₅₀ ^a (μM)	Reference agonists of respective target receptors EC ₅₀ (nM) ^b	
	25 μM	50 μM			
D ₁ (<i>h</i>) Dopamine	-0.58 ± 2.46	-2.77 ± 1.27	–	dopamine	36
D ₃ (<i>h</i>) Dopamine	10.60 ± 4.16	53.10 ± 6.67	48.62 ± 3.21	dopamine	2.9
D ₄ (<i>h</i>) Dopamine	36.55 ± 10.94	54.66 ± 7.05	42.55 ± 2.54	dopamine	3.3
M ₅ (<i>h</i>) Acetylcholine (Muscarinic)	0.38 ± 0.10	0.39 ± 0.46	–	acetylcholine	3.8
NK ₁ (<i>h</i>) Tachykinin	-2.32 ± 0.26	-2.99 ± 0.21	–	[Sar ⁹ , Met(O ₂) ¹¹]-SP	0.094
V _{1A} (<i>h</i>) Vasopressin / Oxytocin	-8.91 ± 3.20	-12.46 ± 0.51	–	AVP	0.11
5-HT _{1A} (<i>h</i>) Serotonin	-1.78 ± 0.45	-3.04 ± 1.23	–	serotonin	3.1

^a Concentration producing a half-maximal agonist response

^b Concentration producing a 50% agonist response for respected receptors, reported by Eurofins Panlab

[0076]

표 3

Receptors	% Inhibition of Control Agonist Response		IC ₅₀ ^a (μM)	Reference antagonists of respective target receptors IC ₅₀ (nM) ^b	
	25 μM	50 μM			
D ₁ (<i>h</i>) Dopamine	11.55 ± 2.15	1.89 ± 1.62	–	SCH 23390	0.5
D ₃ (<i>h</i>) Dopamine	-9.0 ± 6.98	-15.1 ± 2.51	–	(+)-butaclamol	16
D ₄ (<i>h</i>) Dopamine	1.33 ± 1.70	-3.33 ± 4.70	–	clozapine	49
M ₅ (<i>h</i>) Acetylcholine (Muscarinic)	1.0 ± 0.4	-4.8 ± 2.25	–	atropine	0.33
NK ₁ (<i>h</i>) Tachykinin	-11.35 ± 6.37	-4.32 ± 3.33	–	L 733,060	0.21
V _{1A} (<i>h</i>) Vasopressin / Oxytocin	-13.46 ± 6.93	-4.26 ± 11.06	–	[d(CH ₂) ₅ ¹ , Tyr(Me) ₂]-AVP	0.05
5-HT _{1A} (<i>h</i>) Serotonin	6.17 ± 10.31	3.49 ± 4.33	–	(S)-WAY-100635	0.77

^a Concentration producing a half-maximal inhibition of the control agonist response

^b Concentration producing a 50% antagonist response for respected receptors, reported by Eurofins Panlab

[0077]

분자 도킹 연구

엑콜의 도파민 D₃/D₄ 아고니스트 활성에서의 분자적 해석을 인실리코 도킹 연구를 통해 달성하였다. 도킹 연구는 각 도파민 리셉터의 기준 아고니스트 또는 안타고니스트를 사용하여 입증하였다. 인간 도파민 D₃ 및 D₄ 리셉터에서 엑콜의 결합 부위 및 도킹 스코어는 표 4에 나타났다. 도 3에 도시된 바와 같이, 엑콜은 5개의 H-결합 상호작용을 형성하여 음성 결합 에너지 (-6.41 kcal/mol)로 hD₃R의 활성 부위 구멍에 결합하였다. 기준 D₃모듈레이터가 헬릭스 III에서 강력하게 보존된 Asp110의 카르복실레이트에 염 브릿지를 형성하기는 하지만, 엑콜의 두 하이드록실기가 Asp110을 통해 hD₃R과 두 개의 H-결합 상호작용(O-H)을 형성하였다. 유사하게, hD₃R의 오르소스테릭(orthosteric) 결합 부위(OBS)에서 주요 상호작용 잔기인 헬릭스 VI에서 His349와의 H-결합 및 His349와의 π-lone 페어 상호작용이 관찰되었다. 또한, 엑콜은 세포외 루프(ECL) 2에서 Ile183과 H-결합, π-알킬 및 π-시그마 상호작용을 형성하며 Cys114와 π-sulphur 상호작용을 형성한다.

[0080]

hD₄R에서, 엑콜은 도파민(*?5.68 kcal/mol)보다 낮은 결합 에너지(-6.46 kcal/mol)를 나타내며, 이는 4개의 H-결합 상호작용에 의한 것이다. 도 4C에 도시된 바와 같이, 엑콜은 H-결합, 소수성 및 정전기 상호작용을 통해 hD₄R의 OBS와 복합체를 형성한다. 플로로글루시놀의 2개의 히드록실기는 헬릭스 V의 Tyr192, Val193, 및 Ser197와 H-결합 상호작용을 형성한다. 또한, 엑콜의 디벤조다이옥신 골격의 히드록실기는 리셉터에 결합하기 위한 결정적인 잔기인 헬릭스 III의 Asp115와 상호작용한다. 이외에도, hD₄R의 보존된 OBS 잔기인 Leu187 및 Val193와의 π-알킬 상호작용, Phe410 및 His414와의 π-π T 형태 상호작용, Cys119와의 π-설퍼 상호작용 및 His414와의 π-양이온이 관찰되었다.

[0081]

흥미롭게도, 엑콜은 H-결합을 통해 hD₃R/D₄R의 활성화에 중요한 헬릭스 V의 세린 잔기와 상호작용하였다.

표 4

Target	Compounds	Binding energy (kcal/mol)	No. of H-bonds	H-bond interaction residues	Hydrphobic interacting residues	Others
hD ₃ R	Dopamine ^a (Agonist)	-5.84	5	Salt bridge: Asp110, O-H bond: Val111, Thr115, Ser196	Alkyl: Val111, Cys114, π -Alkyl: Phe346	
	Rotigotine ^a (Agonist)	-9.23	2	Salt bridge: Asp110, C-H bond: Ser192	Alkyl: Val111, π -Alkyl: Phe345, His349, Val107, Cys181, Val111, Cys114	
	Eticlopride ^a (Antagonist)	-8.50 ^b	3	Salt bridge, O-H bond: Asp110, C-H bond: His349	Alkyl: Val111, Cys114, Val189, π -Alkyl: Phe346, His349, Val111, Ile183, π - π T shaped: Phe345	
	(+)-Butaclamol ^a (Antagonist)	-8.50	1	Salt bridge: Asp110	Alkyl: Val86, Val111, Cys114, π -Alkyl: Trp342, Phe346, π - π stacked: Phe345, π -Sigma: Thr369	
	Eckol	-6.41	6	O-H bond: Ile183, His349, Asp110, Val189	π -Alkyl: Val189, Val107, Ile183, π - π T shaped: His349, π -Sigma: Thr369	π -Sulfur: Cys114, π -lone pair: His349
hD ₄ R	Dopamine ^c (Agonist)	-5.68	3	Salt bridge: Asp115, O-H bond: Ser196	π -Alkyl: Cys119, π - π T shaped: Phe410, π -Sigma: Val116	
	Nemonapride ^c (Agonist)	-11.82 ^d	5	Salt bridge, O-N bond: Asp115, C-H bond: Ser196, O-H bond: Tyr438	Alkyl: Val193, π -Alkyl: Leu111, Cys185, π - π T shaped: Phe91, Phe410, π -Sigma: Val116	π -Sulfur: Cys119, Amide- π stacked: Leu90, Phe91
	CHEMBL332154 ^c (Antagonist)	-9.42	5	Salt bridge: Asp115, O-H bond: Asp115, Thr120, C-O bond: Cys185	π -Alkyl: Val87, Cys185, Val116, Leu187, Cys119, π - π T shaped: Phe410, Phe411, His414, π -Sigma: Leu111, Val116	
	Eckol	-6.46	4	O-H bond: Tyr192, Asp115, Val193, Ser197	π -Alkyl: Leu187, Val193, π - π T shaped: Phe410, His414	π -Sulfur: Cys119, π -Cation: His414

^a Positive ligand for D₃R.
^b RMSD value: 0.48 Å
^c Positive ligand for D₄R.
^d RMSD value: 0.21

[0082]

[0083]

ADME 예측

[0084]

표 5에 나타난 바와 같이, PreADMET (표 6)에 의한 인실리코 약동학적 파라미터 예측은 2.99의 logP_{o/w} 값을 나타낸다. LogP_{o/w} 값은 일반적으로 화합물의 친유성의 표준으로서 사용된다. 엑콜의 플라즈마 결합은 우수하며 (100%), 중간 정도의 인간 장내 흡수율(55.60%)을 갖는다. 또한, 인비보 혈내장벽(BBB) 투과는 중추신경계(CNS)로 중간의 흡수(0.25)를 입증했다. 화합물의 우수한 BBB 투과성은 CNS-활성 약물의 개발에 결정적인 요소이다. 이러한 예측의 결과 모두는 엑콜의 특성이 약물로서 명백함을 입증했다.

표 5

Compound	Molecular weight (g/mol)	Log ^a P _{o/w}	Plasma protein binding ^b	Human intestinal absorption ^c	<i>In vivo</i> blood-brain barrier penetration ([brain]/[blood]) ^d
Eckol	372.285	2.99	100%	55.60%	0.25

^a The log of the coefficient for solvent partitioning between 1-octanol and water
^b <90%: weakly bound, >90%: strongly bound.
^c 0~20%: poorly absorbed, 20~70%: moderately absorbed, 70~100%: well absorbed.
^d <0.1: low absorption to central nervous system, 0.1~2.0: middle absorption, >2.0: high absorption.

[0085]

[0086]

분자 동역학 시뮬레이션 연구

[0087]

단백질-리간드 복합체(도 3C)에서 시작하여, POPE 막 및 명시적인 수중 환경(explicit water environment)의 존재 하에서 분자 동역학 시뮬레이션을 실시하였다 (도 5A). 80 ns의 생산적 MD 시뮬레이션 후, 결합 포켓 내 엑콜과의 상호작용 패턴이 유의적으로 변화함을 발견하였다. 도킹 결과와 달리, 7개의 물 분자가 H-결합을 통해 엑콜과의 상호작용에 관련되었다. 물 분자와의 H-결합은 도킹 결과와 비교했을 때 주위 분자와 리간드의 상호작용 패턴을 변화시켰다. Val107, Cys114, Val189 및 Ser193, 및 Cys114가 MD 시뮬레이션 결과에서 치환되었다. 그러나, Asp110, Ile183, 및 His349는 MD 시뮬레이션 결과에서 엑콜과의 상호작용에서 보존되었다. 엑콜과의 상호작용에 관여하는 새로운 잔기가 발견되었다: Ser192 및 Phe346. MD 시뮬레이션 결과에서, Ser192는 2.82 Å의 거리로 엑콜과 H-결합 상호작용을 한다. Phe346는 엑콜과 소수성 상호작용을 한다. Phe346의 벤젠고리와 엑콜의 벤젠고리가 π - π 상호작용을 한다. 엑콜에 대해 새롭게 발견된 잔기 Phe346의 상대적 배열은 도 6A에

나타냈다. Phe346은 에티클로프라이드 및 도파민과 소수성 상호작용을 하는 잔기로서, $\pi-\pi$ 결합을 통해 결합 포켓 내부에서 리간드의 안정화에 기여한다(표 4). 단백질 백본 및 액콜 분자에 대한 RMSD값은 도 6B에 나타났다. 단백질 백본 RMSD의 단계적 증가는 60 ns 후(세로 점선으로 표시함) 액콜 분자의 RMSD값의 갑작스런 증가와 일치함을 보였다. “induced-fit” 모델의 관점에서, 단백질의 형태는 액콜이 결합 포켓 내부에서 더 좋은 결합 위치를 위해 자신을 조절하는 것처럼 유의미하게 변화하였다. 다른 분석들이 액콜에 대한 Phe346의 결합이 액콜 결합에 의해 유도되는 단백질 형태 변화의 주요 원인임을 뒷받침한다. Phe346의 벤젠고리의 질량 중심과 벤젠고리 중 하나의 질량 중심 사이의 결합 거리를 측정하였다(도 6C 및 삽도에 도시함). 거리는 60 ns까지 약 7 Å로 변동했다. 그러나 Phe346과 액콜의 거리는 60 ns (세로 점선으로 표시됨) 후 더 낮은 값으로 뚜렷한 변이를 보였으며, 이는 Phe346가 결합 포켓 내에서 액콜을 더 안정화시키기 위해 액콜에 접근하는 것임을 시사한다. 거리는 60 ns 후 약 5.6 ± 0.6 Å로 변동했다. 거리(Phe346-리간드)의 분포는 60 ns 후 히스토그램으로 나타났다(도 6D).

[0089]

다양한 리셉터의 아고니스트 또는 안타고니스트가 파킨슨병에 관여하고 있기 때문에 액콜을 특성화하기 위해 세포 기반 기능성 검정을 실시하였다. 본 실험의 결과를 입증하기 위해 다른 기준 아고니스트 및 안타고니스트도 사용하였다. 기능성 검정의 결과는 도파민 D_3 및 D_4 리셉터의 아고니스트로서 액콜이 작용함을 보였다. 이는 낮은 수준의 도파민(파킨슨 상태)에서 액콜이 이러한 두 리셉터에 결합하여 활성화시키고 시그널링 캐스케이드를 조절하여 일반적인 뉴런 신호전달을 유지시킴을 암시하는 것이다. 파킨슨병에 어느 정도 관련된 7개의 실험 리셉터 중에서, 액콜은 도파민 D_3 및 D_4 리셉터에 선택적인 아고니스트 효과를 보였다. 기능성 검정을 좀더 확인하고 리셉터-결합의 메커니즘을 입증하기 위해서, 인간 D_3 및 D_4 리셉터에 대한 액콜의 컴퓨터 예측을 AutoDock 4.2 program을 사용하여 예측하였다. 상기에 기재된 바와 같이, 액콜이 ECL2 및 헬릭스 III, V, 및 VI를 포함하는 인간 도파민 D_3/D_4 리셉터의 OBS에 잘 들어맞는다(도 2A 및 3A). hD_3R 의 강하게 보존된 Asp110 및 hD_4R 의 Asp115의 카르복실레이트기로의 염 브릿지가 도파민성 리셉터에 결합하는 고-친화성 리간드에 약리학적으로 중요하다. 액콜이 염 브릿지를 형성하지는 않지만, hD_3R 의 Asp110 및 hD_4R 의 Asp115와 각각 H-결합(O-H) 상호작용을 형성한다. Kortagere 등의 논문(Kortagere, S.; Cheng, S.-Y.; Antonio, T.; Zhen, J.; Reith, M. E.; Dutta, A. K., Interaction of novel hybrid compounds with the D_3 dopamine receptor: Site-directed mutagenesis and homology modeling studies. *Biochemical Pharmacology* 2011, 81, 157-163)에서는 D_3R 의 활성화에 헬릭스 V의 Ser192가 중요함을 입증하였다. 또한, 헬릭스 V에서 보존된 세린 잔기는 도파민 리셉터로부터 아고니스트-유도 시그널링을 위한 분자 결정요인으로서 알려져 있다. 본 발명의 분자 도킹 결과에서, H-결합 상호작용이 D_3R 의 Ser192 (D_4R 의 Ser197)과 액콜의 히드록실 부분사이에서 관찰되었다. 이러한 도킹 결과는 본 발명의 실험 결과와 일치하는 것으로 액콜이 이중 hD_3/D_4R 아고니스트로서의 역할을 수행할 수 있음을 시사하는 것이다. 초기 구조로서 단백질-리간드 복합체의 도킹 구조를 사용한 MD 시뮬레이션은 지질 막과 명시적 물 분자를 갖는 좀더 현실적인 환경에서 실행되었다. 이는 단백질의 형태 변화가 결합 포켓 내부에서 액콜의 형태 변화에 연결된 것임을 입증하였다. 특히, MD 시뮬레이션 분석(RMSD값 및 거리) 액콜로의 Phe346의 추가 결합이 결합 포켓 내부에서 단백질과 리간드의 형태 변화를 유도함을 뒷받침한다. MD 시뮬레이션은 Phe346이 에티클로프라이드와 도파민의 경우와 같이 액콜로 분자의 결합에서 일반적인 특징을 보임을 나타냈다.

[0090]

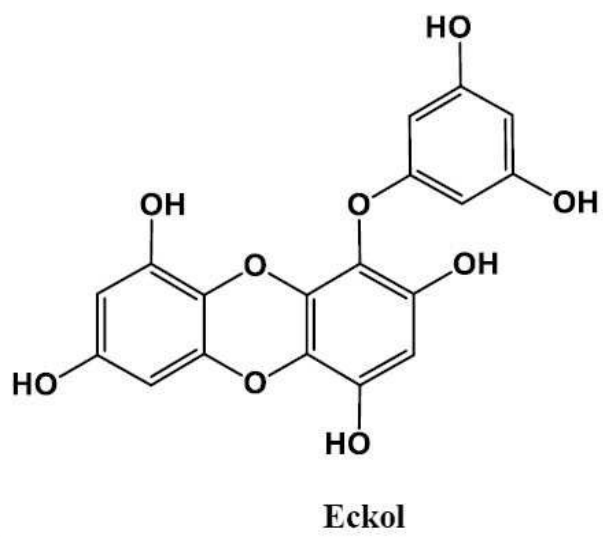
또한, 액콜의 약물동력학적 거동을 분석하였다. ADME 예측 데이터는 소분자 액콜이 소장에 적절하게 흡수되어 CNS로 침투할 수 있음을 보였다. 따라서, 분자 도킹 결과와 예측된 ADME 특징은 액콜이 이중 D_3R/D_4R 을 타겟팅하는 유망한 항-퇴행성 신경질환 약물로서 개발될 수 있음을 입증한다.

[0092]

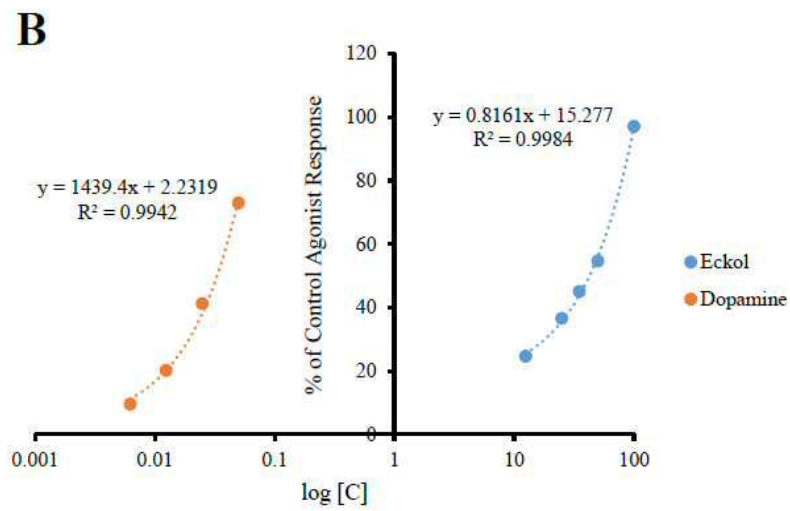
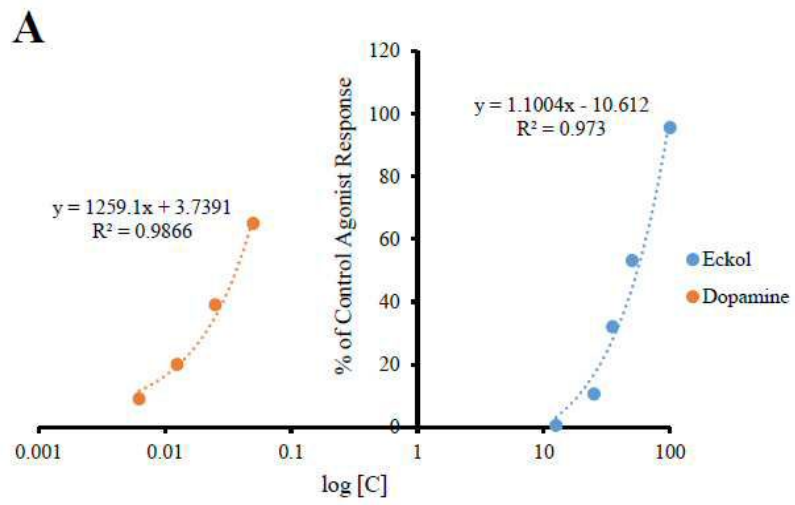
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

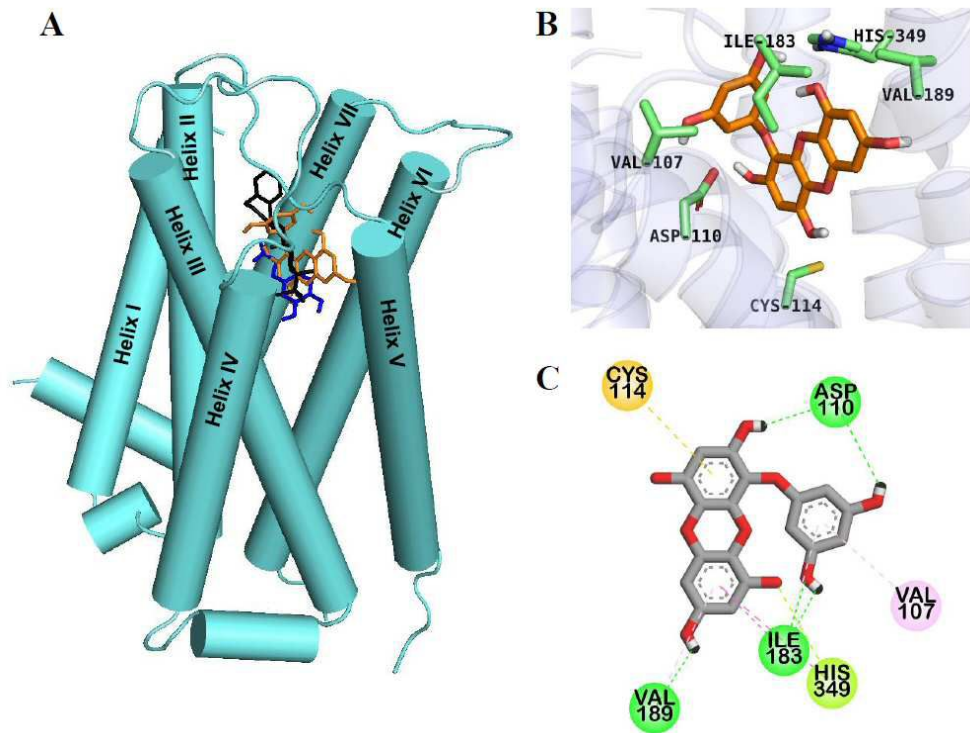
도면1



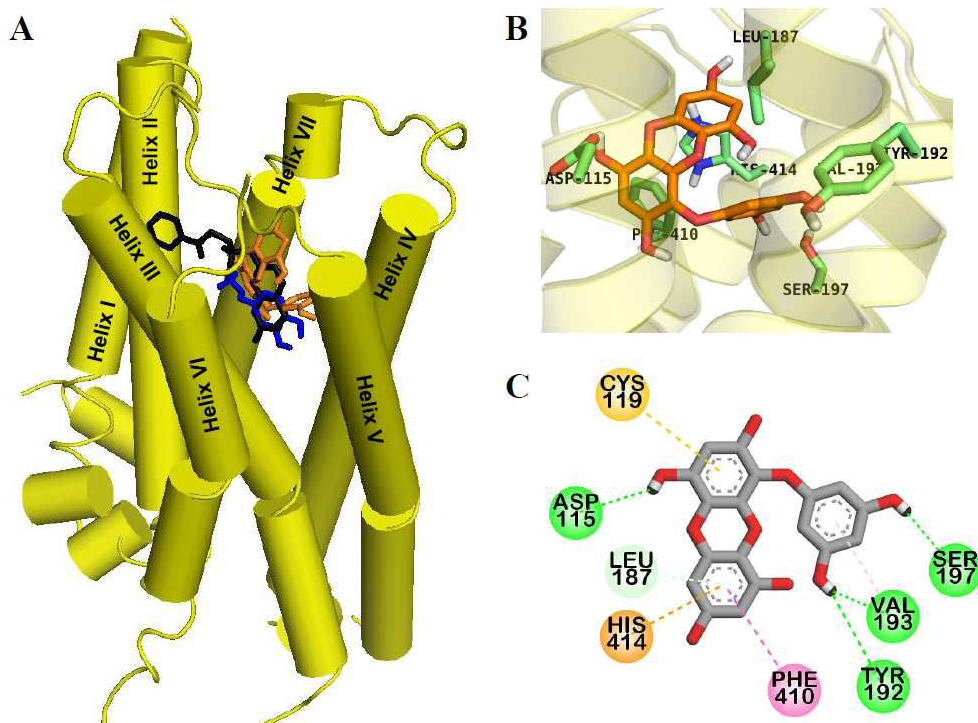
도면2



도면3

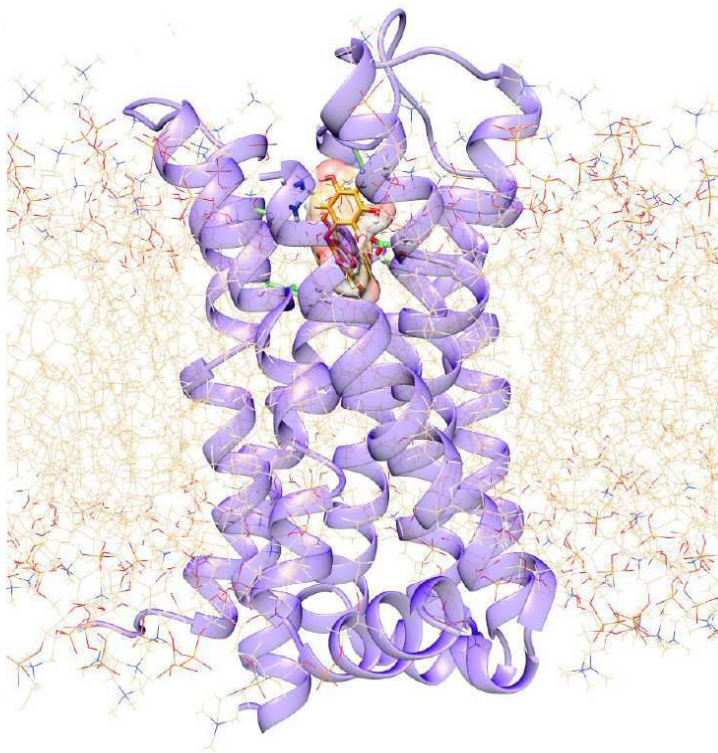


도면4



도면5

A



B

