

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 6월 29일 (29.06.2023) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2023/121199 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) A61K 31/4245 (2006.01)
C12Q 1/6883 (2018.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/020770
- (22) 국제출원일: 2022년 12월 20일 (20.12.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2021-0183885 2021년 12월 21일 (21.12.2021) KR
- (71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). (주)휴먼스케이프 (HUMANSCAPE INC.) [KR/KR]; 06163 서울특별시 강남구 봉은사로86길 6, 601호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이범희 (LEE, Beom Hee); 05530 서울특별시 송파구 올림픽로 525, 104동 1605호, Seoul (KR). 장민후 (CHANG, Min Hoo); 06196 서울특별시 강남구 삼성로 85길 33, 702호, Seoul (KR). 허선희 (HEO, Sun Hee);

05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 도효상 (DO, Hyo Sang); 05333 서울특별시 강동구 진향도로25길 14, 903호, Seoul (KR). 강민지 (KANG, Min Ji); 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR).

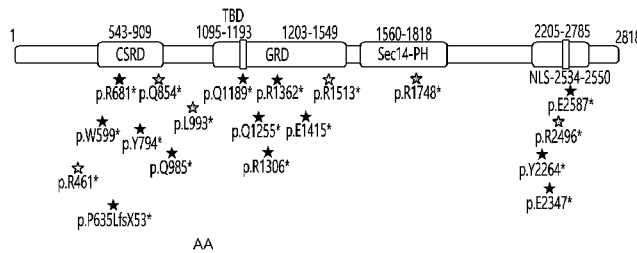
(74) 대리인: 특허법인더웨이브 (THEWAVE IP LAW FIRM); 06097 서울특별시 강남구 선릉로 602 6층, Seoul (KR).

(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.

(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),

(54) Title: ACTIVATED RAS AS THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC TARGET FOR NEUROFIBROMATOSIS AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신경섬유종증의 치료적 및 진단적 타겟으로서의 활성화된 RAS 및 그의 용도



CSRD: cystenin/serine-rich domain, GRD: GAP-related domain, TBD: tublin-binding domain, Sec14-PH: Sec14-homologous domain and pleckstrin homologous domain, NLS: nuclear localization signal, FAK: focal adhesion kinase.

빗금은 본 연구에서 확인된 아탈렌 반응 돌연변이를 나타냅니다.

BB

AA ... CSRD: cystenin/serine-rich domain, GRD: GAP-related domain, TBD: tublin-binding domain, Sec14-PH: Sec14-homologous domain and pleckstrin homologous domain, NLS: nuclear localization signal, FAK: focal adhesion kinase.

BB ... Hatching lines indicate ataluren-responsive mutations identified in this study.

(57) Abstract: The present invention relates to: a biomarker composition for predicting susceptibility to a therapeutic agent for neurofibromatosis by using Ras activity; and a pharmaceutical composition for preventing or treating neurofibromatosis, comprising a Ras activity inhibitor. The biomarker composition can accurately diagnose susceptibility to a therapeutic agent for neurofibromatosis through a simple method for measuring the expression levels of a GTP-bound and activated RAS (Ras-GTP) protein and an activated p-ERK protein or a gene encoding same in a biological sample of an individual, and the pharmaceutical composition inhibits the activity of a Ras protein, and thus can be effectively used for the prevention or treatment of neurofibromatosis in which the activity of the Ras protein is increased.

(57) 요약서: Ras 활성도를 이용하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물 및 Ras 활성 억제제를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 바이오마커 조성물은 개체의 생물학적 샘플에서 GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질과 활성화된 p-ERK 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 간단한 방법을 통하여 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 정확하게 진단할 수 있고, 약학적 조성물은 Ras 단백질의 활성을 억제하므로 Ras 단백질의 활성도가 증가된 신경섬유종증의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 것이다.

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 신경섬유종증의 치료적 및 진단적 타겟으로서의 활성화된 RAS 및 그의 용도

기술분야

- [1] 신경섬유종증의 치료적 및 진단적 타겟으로서의 활성화된 Ras 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 신경섬유종증 제1형(neurofibromatosis type 1, NF1)은 상염색체 우성 유전 질환으로, 전세계적으로 3,000명 당 1명의 빈도로 비교적 높은 발병률을 가지고 있는 유전 질환 중 하나이다. NF1 유전자 돌연변이에 의해 발병하며, 다발성 밀크커피 반점과 피부의 신경섬유종이 특징으로, 다양한 수준의 신경계, 골격계 발현과 신생물성 발현이 환자에게 큰 영향을 줄 수 있다. NF1 환자는 중추 및 말초 신경계 종양이 발생할 위험이 있고, 이는 일반인에 비해 1,000배 높은 비율이다.
- [3] 기존 신경섬유종증 제1형 치료법으로는 화학 요법, 방사선 요법, 외과적 수술 절제 등의 대증요법만이 유일한 치료법이나, 다기관에 다발적으로 발생하는 경우에는 수술이 불가능한 경우가 많다.
- [4] 최근, 신경섬유종증 제1형 환자의 비침습적 치료제로 MEK 억제제인 셀루메티닙(selumetinib)이 FDA 및 국내 희귀의약품으로 승인되었다. 다른 치료제로 티로신 키나제 억제제인 카보잔티닙(carbozantinib)이 임상 실험 결과 안전성 및 종양 억제 효과를 나타낸다고 보고되었지만, 다양한 종양을 축소시키거나 완전히 제거하지는 못하는 게 한계점이다. 또한, 신경섬유종증 제1형을 가지고 있는 환자가 위의 치료제에 모두 반응하는 것은 아니기 때문에 더 많은 치료제가 필요한 상황이다.
- [5] 한편, 한국인 신경섬유종증 환자의 유전자 돌연변이 유형에 대한 조사 결과, 약 30% 환자가 종결 코돈 돌연변이(stop-codon mutation)를 가지고 있다고 보고되었다. 또한, 최근에 조기 종결 코돈을 read-through하는 아탈루렌(Ataluren; PTC THERAPEUTICS, USA)이 근육 질환 치료제로 임상 연구가 진행되고 있어, 종결 코돈 돌연변이가 있는 신경섬유종증 환자의 치료제로 가능성이 언급되고 있으나, 이에 대한 약물 효능에 대한 연구는 없는 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 일 양상은 Ras 활성화도 또는 p-ERK의 활성화도를 이용하여 조기 종결 코돈을 read-through하는 화합물에 대한 신경섬유종증 환자의 감수성을 예측할 수 있는 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 다른 양상은, 상기 조성물을 포함하는 상기 화합물에 대한 신경섬유종증

환자의 감수성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

- [8] 또 다른 양상은, 상기 바이오마커 조성물을 이용하여 상기 화합물에 대한 신경섬유종증 환자의 감수성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 또 다른 양상은, Ras 활성을 억제할 수 있는 화합물을 포함하는 신경섬유종증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 또 다른 양상은, NF1 유전자 돌연변이를 갖는 생물학적 시료를 시험 물질과 접촉시키는 단계; 상기 접촉된 생물학적 시료에서 (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 또 다른 양상은, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하기 위한, (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 바이오마커의 용도를 제공하는 것이다.
- [12] 또 다른 양상은, 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신경섬유종증 환자의 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 또 다른 양상은, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경섬유종증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 또 다른 양상은, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 신경섬유종증의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [16] 용어 "RAS 단백질"은 저분자 GTP(Guanosine triphosphate) 결합 단백질의 일종으로, K-Ras 단백질, H-Ras 단백질, N-Ras 단백질 등의 이소폼(isoform)이

존재하는 단백질을 의미할 수 있다. Ras 단백질은 다양한 세포외 자극에 의한 세포의 증식, 분화, 접착 등의 시그널을 상류의 티로신 키나아제 수용체부터 하류의 이펙터로 중개하는 기능을 담당할 수 있다.

- [17] Ras 단백질은 GTP(Guanosine triphosphate)와 결합한 상태(Ras-GTP)가 활성형이고, GDP(Guanosine diphosphate)와 결합한 상태(Ras-GDP)가 비활성형이며, 활성형과 비활성형의 상태 변경을 통하여 세포 증식 등을 조절할 수 있다. 한편, 인간의 암에서는 Ras 단백질이 높은 빈도로 변이하고 있으며, 이 변이에서 기인하여 Ras 단백질이 항상적으로 활성형이 되고 있는 것이 알려져 있다.
- [18] 형질전환 활성을 갖는 활성형 Ras는 GDP나 GTP의 구아닌 고리나 인산기와의 상호작용에 중요한 아미노산 변이가 있어 내재성 GTP 가수분해 활성의 저하나 GDP 해리속도의 상승을 나타낼 수 있다. 그 발현에 따라 세포 내에서 GTP를 결합한 활성형 비율이 증가하여, 세포 증식 제어에 이상을 일으킬 수 있다. GTP가 결합한 활성형 Ras는 Raf와 결합함으로써 Raf에서 MAP 인산화효소에 이르는 세린-트레오닌 인산화효소 단계적 연쇄를 직접 제어할 수 있다.
- [19] 상기 ERK는 Ras 단백질에 의해 조절되는 Ser/Thr protein kinase중 하나일 수 있다. 활성화되지 않은 ERK는 세포질(cytoplasm)에 있을 수 있으나, 활성화된 ERK는 핵속으로 이동할 수 있다. 또한, 활성화된 ERK는 타겟 단백질의 인산화 또는 다른 단백질 인산화효소(protein kinases)를 활성화시키며 신호전달체계를 조절할 수 있다.
- [20] 용어 "감수성"은 개개의 신경섬유종증 환자에 대하여 특정 약물이 치료 효과를 나타내는지 여부를 의미할 수 있다. 신경섬유종증 치료에 유효한 것으로 인정되고 있는 종류의 치료제라도, 개개의 환자에 따라 효과를 나타내는 경우와 효과를 나타내지 않는 경우가 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 개개의 환자의 신경섬유종증에 대해 치료제가 효과를 나타내는지 여부를 치료제에 대한 감수성이라고 할 수 있다. 상기 "감수성"은 "치료 반응성"과 상호 교환적으로 사용할 수 있으며, "감수성 예측용"은 "치료반응성 예측용" 또는 "동반진단용"과 상호 교환적으로 사용 가능하다.
- [21] 용어 "동반진단(Companion Diagnosis)"은 환자의 치료반응성을 예측하기 위한 진단 기법을 의미할 수 있다.
- [22] 상기 동반진단용 조성물은 신경섬유종증 치료제의 투여의 필요성; 신경섬유종증 치료제에 대한 약제 저항성의 발현 가능성; 신경섬유종증 치료제에 대한 민감성; 또는 신경섬유종증 치료제에 의한 치료의 예후 예측에 대한 정보를 제공하기 위한 것일 수 있다.
- [23] 용어 "바이오마커"는 동반진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 샘플에서 환자의 특정 약물 치료에 대한 반응성을 미리 예측할 수 있는 물질을 의미할 수 있다. 정상 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에 비하여 신경섬유종증 환자에서 채취한 생물학적 샘플에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는

핵산(예를 들어, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(예를 들어, 단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있다.

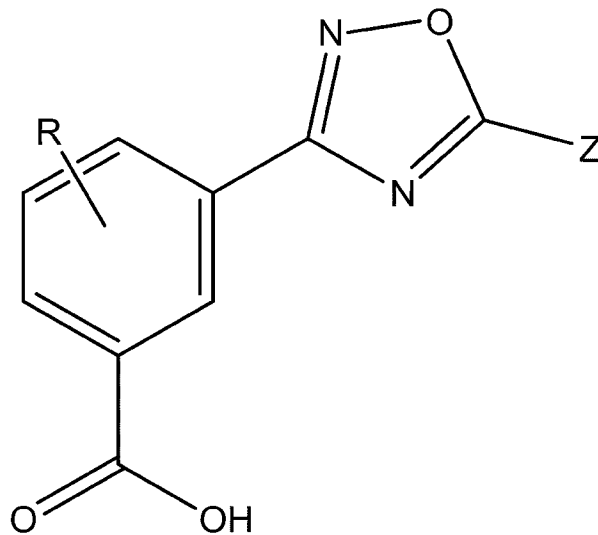
[24] 일 구체예에서, 상기 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커는 GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자일 수 있다. 이의 발현 수준이 높으면 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 높은 것으로 판단될 수 있으며, 반대로 이의 발현 수준이 낮은 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 낮은 것으로 판단될 수 있다.

[25] 일 구체예에서, 상기 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커는 활성화된 p-ERK 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자일 수 있다. 이의 발현 수준이 높으면 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 높은 것으로 판단될 수 있으며, 반대로 이의 발현 수준이 낮은 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 낮은 것으로 판단될 수 있다.

[26] 상기 신경섬유종증 치료제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물일 수 있다:

[27] [화학식 1]

[28]



[29] 상기 식에서

[30] Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;

[31] R은 수소 또는 할로젠일 수 있다.

[32] 용어 "할로젠"은 다른 언급이 없으면 F, Cl, Br 또는 I를 의미할 수 있다.

[33] 용어 "하이드록실"은 다른 언급이 없으면 한 개의 수소 원자와 한 개의 산소 원자로 이루어진 일가의 원자단으로, 화학식 -OH를 갖는 기를 의미할 수 있다.

[34] 용어 "알킬"은, 달리 명시되지 않는 한, 선형 또는 분지형의 포화된 탄화수소

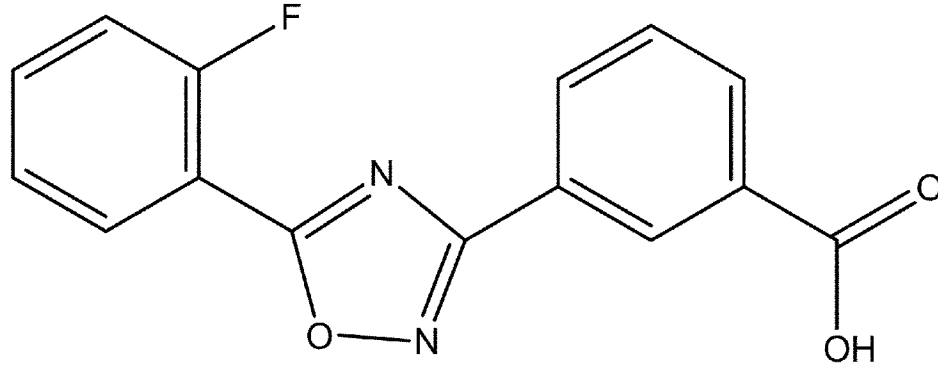
잔기를 의미할 수 있다. 예를 들어, " C_{1-10} 알킬"은 1 내지 10개 탄소로 골격이 이루어진 알킬을 의미한다. 구체적으로 C_{1-10} 알킬은 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, t-부틸, n-펜틸, i-펜틸, t-펜틸, sec-펜틸, 네오펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실 등을 포함할 수 있다.

- [35] 용어 "알콕시"는, 달리 명시되지 않는 한, 앞에 정의한 알킬기가 산소 원자를 통하여 모 화합물에 부착되어 있는, 화학식 -O-알킬을 갖는 기를 의미할 수 있다. 알콕시기의 알킬 부분은 1 내지 20개의 탄소원자(즉, C_1 - C_{20} 알콕시), 1 내지 12개의 탄소원자(즉, C_1 - C_{12} 알콕시), 또는 1 내지 6개의 탄소원자(즉, C_1 - C_6 알콕시)를 가질 수 있다. 적합한 알콕시기의 예로는 메톡시(-O-CH₃ 또는 -OMe), 에톡시(-OCH₂CH₃ 또는 -OEt), t-부톡시(-O-C(CH₃)₃ 또는 -O-tBu) 등이 있다.
- [36] 용어 "아릴"은 모 방향족 고리 시스템의 6개의 탄소원자로부터 1개의 수소 원자가 제거되어 유도되는 방향족 탄화수소 라디칼을 의미할 수 있다. 예를 들면, 아릴기는 6 내지 20개의 탄소원자, 6 내지 14개의 탄소원자, 또는 6 내지 12개의 탄소원자를 가질 수 있다.
- [37] 용어 "사이클로알킬"은 고리 중에 탄소원자만을 포함하는 포화 모노사이클 또는 폴리-사이클을 지칭한다. 사이클로알킬은, 모노사이클로서는 3 내지 7개의 탄소원자를, 바이사이클로알킬로서는 7 내지 12 탄소원자를, 폴리-사이클로서는 최대 약 20개의 탄소원자를 가질 수 있다.
- [38] 용어 "헤테로사이클"은 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 방향성 또는 비방향성의 고리를 의미하며, 포화되거나 불포화될 수 있고, 단일고리 또는 다중고리일 수 있다. 예를 들어 "4 내지 10원의 헤테로사이클"은 헤테로원자 및 탄소원자를 포함하여 총 4 내지 10개의 원자로 골격이 이루어진 헤테로사이클을 의미한다. 구체적으로 4 내지 10원의 헤테로사이클은 아제티딘, 디아제티딘, 피롤리딘, 피롤, 이미다졸리딘, 이미다졸, 피라졸리딘, 피라졸, 옥사졸리딘, 옥사졸, 이속사졸리딘, 이속사졸, 티아졸리딘, 티아졸, 이소티아졸리딘, 이소티아졸, 피페리딘, 피리딘, 피페라진, 디아진, 모폴린, 티오모폴린, 아제판, 디아제판 등을 포함할 수 있다.
- [39] 용어 "헤테로아릴"은 고리 내에 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 방향족 헤테로사이클릴을 지칭한다. 헤테로아릴의 비제한적인 예로는 피리디닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 인돌릴, 이소인돌릴, 퓨리닐, 퓨라닐, 티에닐, 벤조퓨라닐, 벤조티오펜닐, 카바졸릴, 이미다졸릴, 티아졸릴, 이속사졸릴, 피라졸릴, 이소티아졸릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 피리다질, 피리미딜, 피라질(이들은 고리에 하나 이상의 치환기를 가질 수 있음) 등이 있다.
- [40] 용어 "헤테로사이클로알킬"은 고리 내에 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 비방향족 헤테로사이클릴을 지칭할 수 있다. 헤테로사이클로알킬은 이중 결합의 존재로 인해 고리가 방향성(Aromatic)을 갖지 않는 범위에서 고리 내에 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합 또는 탄소-헤테로원자 이중 결합을 가질 수 있다. 헤테로사이클로알킬의 비제한적인 예로는 아제티딘일, 아지리딘일,

피롤리딘일, 피페리딘일, 피페라진일, 호모피페라진일, 모폴리노, 티오모폴리노, 테트라히드로퓨란일, 테트라히드로티오푸란일, 테트라히드로피란일, 피란일(이들은 고리에 하나 이상의 치환기를 가질 수 있음) 등이 있다.

- [41] 용어 "헤테로원자"는 탄소(C) 이외의 원자를 의미하며, 구체적으로 질소(N), 산소(O) 또는 황(S) 원자일 수 있다.
- [42] 용어 "치환"은, 지정된 원자 상의 원자가(Valence)를 초과하지 않으면서 이러한 치환으로부터 화학적으로 안정한 화합물이 되도록, 분자 구조체 내의 수소 원자를 치환기로 대체하는 것을 지칭할 수 있다. 예를 들어, "그룹 A가 치환기 B로 치환"된다는 것은, 그룹 A의 골격을 구성하는 탄소 등의 원자에 결합된 수소 원자가 치환기 B로 대체되어, 그룹 A와 치환기 B가 공유 결합을 형성함을 의미할 수 있다.
- [43] 상기 Z는 Z가 p-톨릴; (4-클로로메틸-페닐); (2-클로로-피리딘-3-일); (2-플루오로-페닐); (3,4-디플루오로-페닐); (4-메톡시-페닐); 벤조[1,3]디옥솔-일; (4-에틸-페닐); o-톨릴; (2-클로로-페닐); (3-메틸-티오펜-2-일); 벤조[b]티오펜-2-일; (3-플루오로-페닐); (4-tert-부틸-페닐); (2-메톡시-페닐); (2,디플루오로-페닐); 티오펜-2-일; (2,4-디플루오로-페닐); (3-클로로-페닐); m-톨릴; (4-트리플루오로메틸-페닐); (4-플루오로-페닐); (3-메톡시-페닐); 페닐; (2,6-디플루오로-페닐); (2,디메틸-푸란-3-일); (4-피롤-1-일-페닐); (3-디메틸아미노-페닐); 비페닐-4-일; (4-디메틸아미노-페닐); 벤조[1,2,5]옥사디아졸-일; m-톨릴; (2-트리플루오로메틸-페닐); (6-클로로-피리딘-3-일); (3,비스-트리플루오로메틸-페닐); 푸란-2-일; (4-니트로-페닐); (3,4-디메톡시-페닐); (3-트리플루오로메톡시-페닐); 나프탈렌-1-일; 시클로헥실; 피리딘-3-일; 피리딘-4-일; 시클로펜틸; 시클로프로필; (4-펜틸옥시-페닐); (3,4,트리메톡시-페닐); (4-이소부틸-페닐); 시클로부틸; (1-아세틸-피페리딘-4-일); 이소옥사졸-일; [2-클로로-6-플루오로-페닐)-메틸-이소옥사졸-4-일] 또는 [2-클로로-페닐)-메틸-이소옥사졸-4-일]일 수 있다. 구체적으로, 상기 Z는 (2-플루오로-페닐); (3,4-디플루오로-페닐); (2-클로로-페닐); (3-플루오로-페닐); (2,5-디플루오로-페닐); (2,4-디플루오로-페닐); (3-클로로-페닐); (4-플루오로-페닐); 또는 (2,6-디플루오로-페닐)일 수 있다.
- [44] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 조기 종결 코돈(premature stop codons)을 read-through할 수 있다.
- [45] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 3-[5-(2-플루오로-페닐)-[1,2,4]옥사디아졸-3-일]-벤조산일 수 있다. 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시될 수 있다:
- [46] [화학식 2]

[47]



[48]

상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 아탈루렌(Ataluren), PCT124 또는 트랜스라나(Translarna)라고도 불리며, 조기 종결 코돈(premature stop codons)을 read-through할 수 있다.

[49]

상기 신경섬유종증 치료제는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 인간에 대한 독성이 낮아야 하며, 모(母) 화합물의 생물학적 활성 및 물리화학적 특성에 임의의 부정적인 영향을 주지 않는 것일 수 있다.

[50]

예를 들어, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 알칼리금속염(나트륨염 등) 또는 알칼리토금속염(칼륨염 등)일 수 있다. 상기 알칼리금속염 또는 알칼리토금속염은, 예를 들어 상기 화합물을 과량의 알칼리금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 미용해된 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발 및 건조시켜 얻을 수 있다.

[51]

또한, 상기 화합물은 키랄 탄소 중심을 가질 수 있으며, 이에 따라 R 또는 S 이성질체, 라세미 화합물, 개개의 거울상 이성질체 또는 혼합물, 개개의 부분입체 이성질체 또는 혼합물 형태로 존재할 수 있으며, 이러한 모든 입체 이성질체 및 이들의 혼합물이 본 발명의 범주에 속할 수 있다.

[52]

또한, 상기 화합물은 상기 화합물의 수화물 및 용매화물을 포함할 수 있다. 상기 수화물 및 용매화물은 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있으며, 무독성 및 수용성인 것이 바람직하다. 특히, 바람직하게는 상기 수화물 및 용매화물은 각각 물 및 알코올성 용매(특히, 에탄올 등)의 1 내지 5개의 분자가 결합된 것일 수 있다.

[53]

상기 Ras-GTP 단백질 및/또는 활성화된 p-ERK 단백질의 발현 수준 측정은 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 상기 단백질의 존재 여부와 그 단백질의 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것일 수 있다.

[54]

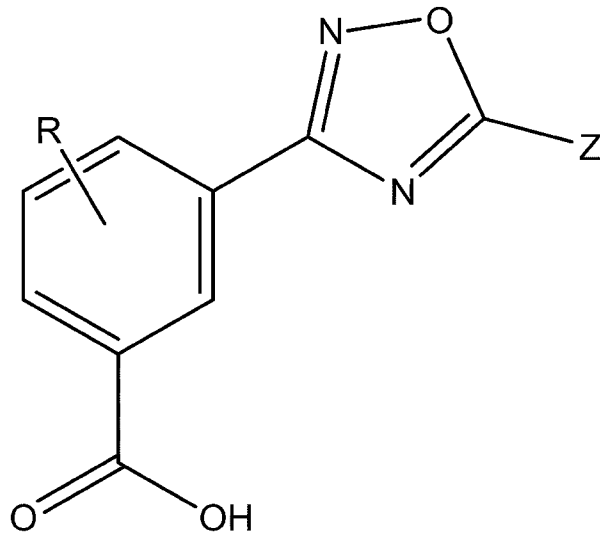
상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 모노클로날(monoclonal) 항체, 폴리클로날(polyclonal) 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid), aptamer 및 나노파티클(nanoparticle)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [55] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사선면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter), 단백질 칩(protein chip), 2차원 전기영동분석, 단백질 질량 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 일 구체에 따르면, 상기 Ras-GTP 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 Ras-GTP 단백질에 특이적으로 결합하고, Ras-GDP 단백질에는 결합하지 않는 것일 수 있다.
- [57] 일 구체에 따르면, 상기 활성화된 p-ERK 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 p-ERK 단백질에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [58] 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준의 측정은 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 존재 여부와 그 유전자의 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 유전자의 양을 확인하는 것일 수 있다.
- [59] 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [60] 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), RNase 보호 분석법(RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] 상기 신경섬유종증은 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지는 것일 수 있다.
- [62] 용어 "종결 코돈 돌연변이(stop codon mutation)"은 돌연변이에 의하여 염기서열의 일부가 종결 코돈인 UAG, UAA, UGA 중의 하나가 되어 폴리펩타이드의 합성이 중단되는 것을 의미할 수 있다.
- [63] 상기 종결 코돈 돌연변이는 DNA 염기가 다른 염기와 치환되는 점 돌연변이(point mutation) 중 하나인 넌센스 돌연변이(nonsense mutation) 또는

- 구조이동 돌연변이(Frameshift mutation)에 의한 것일 수 있다.
- [64] 용어 "넌센스 돌연변이(nonsense mutation)"는 DNA 염기서열이 단백질로 전환될 때, 염기서열의 일부가 정지코돈(UAG, UAA, UGA 중 하나)으로 전환되어 더 이상 단백질의 합성이 이루어지지 않는 돌연변이를 의미한다.
- [65] 용어 "구조이동 돌연변이(Frameshift mutation)"는 DNA 염기서열에 1개 또는 2개 또는 3의 배수가 아닌 수의 뉴클레오타이드의 삽입(insert) 또는 결실(deletion)이 되는 변이로 인하여 유전자의 전사, 번역 과정을 거쳐 생성되는 단백질의 아미노산 배열은 크게 달라지는 돌연변이를 의미할 수 있다.
- [66] 일 구현예에서, 상기 종결 코돈 돌연변이는 i) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 5242번째 염기인 시티딘(C)이 티민(T)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 1748번째 아미노산인 아르기닌(Arg, R)이 종결코돈으로 전환, ii) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 2560번째 염기인 시티딘(C)이 티민(T)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 854번째 아미노산인 글루타민(Gln, Q)이 종결코돈으로 전환, iii) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 4537번째 염기인 시티딘(C)이 티민(T)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 1513번째 아미노산인 아르기닌(Arg, R)이 종결코돈으로 전환, iv) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 2978번째 염기인 티민(T)이 구아닌(G)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 993번째 아미노산인 류신(Leu, L)이 종결코돈으로 전환, v) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 7486번째 염기인 시티딘(C)이 티민(T)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 2496번째 아미노산인 아르기닌(Arg, R)이 종결코돈으로 전환된 것일 수 있다.
- [67] 다른 구현예에서, 신경섬유종증 환자 중에서 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지고 있는 환자를 선별하고 선별된 환자의 섬유아세포에서 Ras-GTP 활성도를 측정한 후 아탈루렌을 처리한 결과, Ras-GTP 발현이 정상인과 비교하여 유의하게 증가된 환자 군에서 Ras-GTP 및 p-ERK 단백질의 발현이 유의하게 감소하는 것을 통하여, 아탈루렌이 신경섬유종증 치료 효과가 있음을 확인할 수 있다. 따라서, NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지는 신경섬유종증 환자 중에서 활성 상태의 Ras(Ras-GTP) 및/또는 활성화된 p-ERK 단백질 발현 증감 여부를 통하여 아탈루렌에 대한 감수성을 예측할 수 있다.
- [68] 다른 양상은, 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 키트를 제공한다.
- [69] 상기 키트는 개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 이용하여 상기 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측할 수 있다. 구체적으로는, 상기 키트는 개체로부터 채취한 섬유아세포를 이용하여 상기 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측할 수 있다.
- [70] 상기 키트에는 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.

- [71] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 해당 기술분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [72] 상기 바이오마커 조성물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [73] 또 다른 양상은, 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서, (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [74] 상기 방법은 활성화된 Ras-GTP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 측정한 발현 수준보다 증가한 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 높은 것으로 판단하고, 반대로 이의 발현 수준이 낮은 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 낮은 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [75] 상기 방법은 활성화된 p-ERK 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 측정한 발현 수준보다 증가한 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 높은 것으로 판단하고, 반대로 이의 발현 수준이 낮은 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 낮은 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [76] 용어 "생물학적 샘플"은 일 양상에 따른 Ras-GTP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준; 및/또는 p-ERK 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 개체로부터 수득한 모든 샘플을 의미할 수 있다.
- [77] 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 객담, 뇌척수액, 세포, 세포 배양액, 조직 추출물 또는 종양 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 상기 생물학적 샘플은 개체로부터 채취한 섬유아세포일 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 해당 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.
- [78] 또 다른 양상은, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경섬유종증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [79] [화학식 1]

[80]



[81]

상기 식에서

[82]

Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;

[83]

R은 수소 또는 할로젠일 수 있다.

[84]

상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 상기에서 설명한 바와 같다.

[85]

상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 3-[5-(2-플루오로-페닐)-[1,2,4]옥사디아졸-3-일]-벤조산일 수 있다.

[86]

상기 신경섬유종증은 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지는 것일 수 있다.

[87]

상기 신경섬유종증은 Ras 단백질의 활성도가 증가된 것일 수 있다.

[88]

상기 신경섬유종증에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[89]

일 구현예에서, 신경섬유종증 환자 중에서 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지고 있는 환자를 선별하고 선별된 환자의 섬유아세포에서 Ras-GTP 활성도를 측정한 후 아탈루렌을 처리한 결과, Ras-GTP 활성도가 정상인과 비교하여 유의하게 증가된 환자 군에서 Ras-GTP 및 p-ERK 단백질의 발현이 유의하게 감소하는 것을 통하여, 아탈루렌이 신경섬유종증 치료 효과가 있음을 확인할 수 있다. 따라서, 아탈루렌은 활성 상태의 Ras(Ras-GTP)의 발현이 증가한 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지는 신경섬유종증 환자의 치료 용도로 사용될 수 있다.

[90]

상기 약학적 조성물은 유효성분으로서 상기 화합물을 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.1 중량% 내지 약 90 중량%, 구체적으로 약 0.5 중량% 내지 약 75 중량%, 보다 구체적으로 약 1 중량% 내지 약 50 중량%로 함유할 수 있다.

[91]

상기 약학적 조성물은, 통상적인 방법에 따라 제제로 배합되는 통상적이고

무독성인 약학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

- [92] 상기 약학적 조성물에 사용되는 첨가제의 예는 감미제, 결합제, 용매, 용해 보조제, 습윤제, 유화제, 등장화제, 흡수제, 붕해제, 산화방지제, 보존제, 윤활제, 활택제, 충전제, 향미제 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 첨가제는 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로스, 글리신, 실리카, 활석, 스테아르산, 스테아린, 마그네슘 스테아레이트, 마그네슘 알루미늄실리케이트, 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 알긴산, 나트륨 알기네이트, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 한천, 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 염화나트륨, 염화칼슘, 오렌지 에센스, 딸기 에센스, 바닐라 향 등을 포함할 수 있다.
- [93] 상기 약학적 조성물은 경구 투여(예를 들어, 정제, 환제, 산제, 캡슐제, 시럽 또는 에멀전) 또는 비경구 투여(예를 들어, 근육내, 정맥내 또는 피하 주사)를 위한 다양한 제제 형태로 배합될 수 있다.
- [94] 구체적으로는, 상기 약학적 조성물은 경구 투여용 제제로 배합될 수 있으며, 이때 사용되는 첨가제로는 셀룰로스, 칼슘 실리케이트, 옥수수 전분, 락토오스, 수크로스, 덱스트로스, 칼슘 포스페이트, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 젤라틴, 활석, 계면활성제, 현탁제, 유화제, 희석제 등이 포함될 수 있다. 또한, 활택제(Glidant)의 예시로는 콜로이드성 이산화규소(Colloidal Silicon Dioxide), 마그네슘 실리케이트(Magnesium Silicate) 등이 있고; 희석제(Diluent)의 예시로는 미세결정질 셀룰로오스(Microcrystalline Cellulose), 락토오스 무수물(Lactose Anhydrous), 락토오스 일수화물(Lactose Monohydrate), 규화(silicified) MCC HD 90 등이 있으며, 붕해제(Disintegrant)의 예시로는 크로스카르멜로스 소듐(Croscarmellose Sodium), 크로스포비돈(Crospovidone) 등이 있고; 윤활제(Lubricant)의 예시로는 마그네슘 스테아레이트(Magnesium Stearate), 소듐 라우릴 설페이트(Sodium Lauryl Sulfate), 스테아르산(Stearic Acid) 등이 있다.
- [95] 또한, 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [96] 또한, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로콜, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤세라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

- [97] 상기 약학적 조성물은 치료학적으로 유효한 양 또는 약학적으로 유효한 양으로 환자에 투여될 수 있다.
- [98] 용어 "치료학적으로 유효한 양" 또는 "약학적으로 유효한 양"이란 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 화합물 또는 조성물의 양으로서, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [99] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 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.
- [100] 구체적으로, 상기 약학적 조성물에서 상기 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 약 0.1 mg 내지 약 1,000 mg, 또는 약 5 mg 내지 약 200 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1회 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로, 범위는 이에 한정되지 않는다.
- [101] 또한, 상기 약학적 조성물은 화학요법, 방사선 요법, 면역요법, 호르몬 치료, 골수 이식, 줄기세포 대체 치료, 다른 생물학적 치료, 수술적 개입 또는 이들의 조합과 병용하여 종양 요법을 위해 투여될 수 있다. 예를 들어, 장기적으로 진행되는 다른 치료 전략과 함께 보조 요법으로 사용되거나, 중증 환자에서 종양 퇴행 또는 화학 예방 요법 후 환자의 상태를 유지하기 위해 사용될 수 있다.
- [102] 또 다른 양상은, (a) NF1 유전자 돌연변이를 갖는 생물학적 시료를 시험 물질과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 접촉된 생물학적 시료에서, (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [103] 상기 생물학적 시료는 세포 또는 동물모델일 수 있다. 상기 시료는 신경섬유종증 환자로부터 분리된 시료일 수 있다.
- [104] 일 구체예에 따르면, 상기 스크리닝 방법은 상기 시험 물질과 접촉시킨 후의 생물학적 시료의 Ras-GTP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 시험 물질과 접촉시키기 전과 비교하여 감소한 경우, 상기 시험물질을 신경섬유종증 치료제로 판단하는 단계를 포함할 수 있다.
- [105] 일 구체예에 따르면, 상기 스크리닝 방법은 상기 시험 물질과 접촉시킨 후의 생물학적 시료의 활성화된 p-ERK 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현

수준이 시험 물질과 접촉시키기 전과 비교하여 감소한 경우, 상기 시험물질을 신경섬유종증 치료제로 판단하는 단계를 포함할 수 있다.

[106] 상기 스크리닝 방법은 상기 시험 물질과 접촉된 생물학적 시료의 Ras-GTP 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정된 결과와 시험 물질과 접촉되지 않은 생물학적 시료로부터 측정된 결과와 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[107] 상기 스크리닝 방법은 상기 시험 물질과 접촉된 생물학적 시료의 활성화된 p-ERK 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정된 결과와 시험 물질과 접촉되지 않은 생물학적 시료로부터 측정된 결과와 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

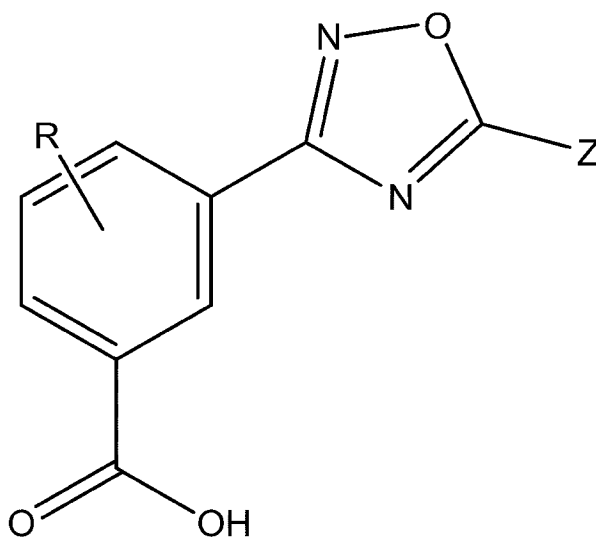
[108] 또 다른 양상은, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하기 위한, (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 바이오마커의 용도를 제공한다.

[109] 또 다른 양상은, 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서, (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신경섬유종증 환자의 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하는 방법을 제공한다.

[110] 또 다른 양상은, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경섬유종증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다:

[111] [화학식 1]

[112]



[113] 상기 식에서

[114] Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된

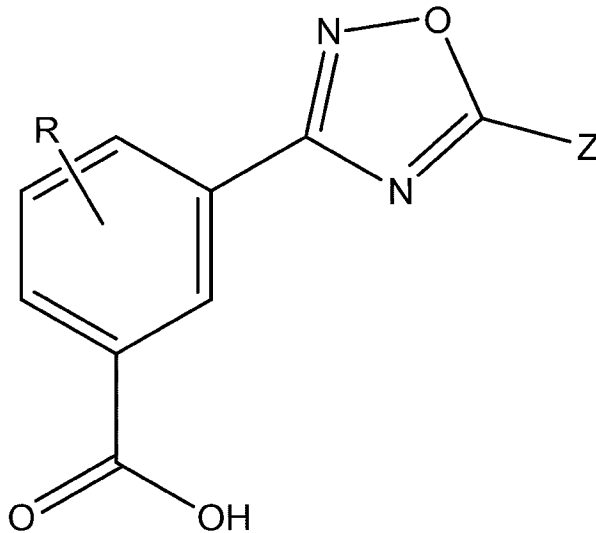
알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;

[115] R은 수소 또는 할로젠일 수 있다.

[116] 또 다른 양상은, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 신경섬유종증의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다:

[117] [화학식 1]

[118]



[119] 상기 식에서

[120] Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;

[121] R은 수소 또는 할로젠일 수 있다.

[122] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

발명의 효과

[123] 일 양상에 따른 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물을 이용하면, 개체의 생물학적 샘플에서 GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자; 및/또는 활성화된 p-ERK 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 간단한 방법을 통하여 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 정확하게 진단할 수 있다.

[124] 일 양상에 따른 신경섬유종증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이용하면, Ras 단백질의 활성을 억제하므로, Ras 단백질의 활성도가 증가된 신경섬유종증의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [125] 도 1은 일 양상에 의하여 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이가 존재하는 것으로 선별된 신경섬유종증 환자의 종결 코돈 돌연변이 정보를 나타낸 도면이다.
- [126] 도 2는 일 양상에 의하여 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이가 존재하는 것으로 선별된 신경섬유종증 환자의 GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질의 발현량을 측정한 결과이다.
- [127] 도 3은 일 양상에 의하여 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이가 존재하는 것으로 선별된 신경섬유종증 환자 중에서 Ras-GTP의 발현량이 높은 환자의 섬유아세포에 아탈루렌(PTC) 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하기 전과 후의 Ras-GTP의 발현량의 변화를 측정한 결과이다.
- [128] 도 4는 일 양상에 의하여 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이가 존재하는 것으로 선별된 신경섬유종증 환자 중에서 Ras-GTP의 발현량이 높은 환자의 섬유아세포에 아탈루렌(PTC-124) 20 $\mu\text{g/ml}$ 또는 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하기 전과 후의 p-ERK의 발현량을 비교하기 위하여 전기영동한 결과이다.
- [129] 도 5는 일 양상에 의하여 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이가 존재하는 것으로 선별된 신경섬유종증 환자 중에서 Ras-GTP의 발현량이 높은 환자의 섬유아세포에 아탈루렌(PTC-124) 20 $\mu\text{g/ml}$ 또는 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하기 전과 후의 ERK와 p-ERK의 발현 비율을 측정한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [130] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [131]
- [132] 실시예 1. 신경섬유종증 환자 중 NF1 유전자에 종결 코돈 변이가 존재하는 환자의 선별
- [133] 신경섬유종증 환자로부터 추출한 DNA를 대상으로 신경섬유종증의 원인 유전자인 NF1 유전자를 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 증폭한 후 생어 염기서열 분석(sanger sequencing)을 수행하였다. 분석 결과를 기반으로, NF1 유전자에 종결 코돈 변이가 존재하는 22명의 환자를 선별하였다. 선별된 환자의 NF1 유전자에 존재하는 종결 코돈 변이 정보는 하기 표 1에 기재한 바와 같다(도 1).

[134] [표 1]

ID	Initial	Mutation of <i>NF1</i>	
NF-08	LJS	c.7759G>T	p.Glu2587Ter (p.Q2587*)
NF-09*	HSW	c.5242C>T	p.Arg1748Ter (p.R1748*)
NF-10	SDE	c.1381C>T	p.Arg461Ter (p.R461*)
NF-11*	MJW	c.2560C>T	p.Gln854Ter (p.Q854*)
NF-13	LYJ	c.7039G>T	p.Glu234Ter (p.E2347*)
NF-14*	KSH	c.4537C>T	p.Arg1513Ter (p.R1513*)
NF-19	KH	c.4084C>T	p.Arg1362Ter (p.R1362*)
NF-20	YSH	c.4243G>T	p.Glu1415Ter (p.E1415*)
NF-21	KJS	c.3916C>T	p.Arg1306Ter (p.R1306*)
NF-22	CJW	c.1381C>T	p.Arg461Ter (p.R461*)
NF-23	YJH	c.4537C>T	p.Arg1513Ter (p.R1513*)
NF-24	PJS		p.Gln1255Ter (p.Q1255*)
NF-25	PCJ	c.6792C>A	p.Tyr2264Ter (p.Y2264*)
NF-26*	KJW	c.2978T>G	p.Leu993Ter (p.L993*)
NF-27	KDH		p.Gln985Ter (p.Q985*)
NF-28	KN	c.1797G>A	p.Trp599Ter (p.W599*)
NF-29	HKW	c.6792C>A	p.Tyr2264Ter (p.Y2264*)
NF-30	NYS	c.3916C>T	p.Arg1306Ter (p.R1306*)
NF-31	HKH	c.3565C>T	p.Gln1189Ter (p.Q1189*)
NF-32	KDH	c.1904del	p.Pro635Leufs*53 (p.P635LfsX53)
NF-33	LYJ	c.2382T>A	p.Tyr794Ter (p.Y794*)
NF-34*	PCK	c.7486C>T	p.Arg2496Ter (p.R2496*)

[135]

[136] 실시예 2. 선별된 신경섬유종증 환자의 **RAS** 단백질의 활성도 측정[137] 정상인과 실시예 1에서 선별된 신경섬유종증 환자의 피부 섬유아세포에서 다음과 같은 방법으로 **RAS** 단백질의 활성도를 비교하였다.

[138] 공여 받은 정상인과 신경섬유종증 환자 각각의 피부 섬유아세포를 DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin의 배지에서 배양하였다. 세포 밀도가 용기의 70-80%되도록 배양한 후에 FBS가 제외된 배지로 교체한 후 세포를

배양하여 24시간 동안 starvation 과정을 거쳤다. 다음으로, 세포를 FBS가 포함된 배지로 이동시킨 후 Ras 활성화제(activator)인 EGF(epidermal growth factor)를 100 ng/ml 농도로 희석하여 처리하고 5분 동안 37 °C에서 반응시켜 각 샘플을 준비하였다. RAS 단백질의 활성화도 분석은 기존 측정 방식인 Pull-down assay의 단점을 보완하여 적은 양의 세포와 동시에 많은 샘플이 측정 가능한 Cytoskeleton사의 G-LISA Ras activation Assay Biochem Kit(Absorbance Based)(Cytoskeleton, Cat No. BK131)를 사용하였다.

- [139] RAS 단백질의 활성화도 분석 방법을 간단하게 설명하면, EGF 처리 후 키트에 포함된 세포 용해(cell lysis) 용액을 이용하여 세포를 용해시키고, 상등액만 획득한 후 상등액에 포함된 단백질을 정량화하였다. 모든 샘플의 동일한 단백질 양을 Ras-GTP 결합 단백질(Ras-GTP binding protein)이 결합된 플레이트의 웰에 넣고 교반기에서 300 rpm 속도로 흔들어 주면서 4 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 세척액으로 3회 세척한 후 결합되지 않은 단백질을 제거한 다음 anti-Ras 항체를 넣고 상온에서 45분 동안 300 rpm 속도로 교반기에서 반응시킨 후, 3회 세척 과정을 거쳤다. 세척액을 완전하게 제거한 후 2차 항체를 넣어 준 후 1차 항체 반응 과정과 동일하게 상온에서 45분 동안 400 rpm 속도로 교반기에서 반응시킨 후, 3회의 세척 과정을 거쳤다. 이 과정들을 통해 활성 상태(active state)인 GTP에 결합된 Ras(GDP-bound Ras) 단백질은 남아있고, 비활성 상태(inactive state)인 GDP에 결합된 Ras(GDP-bound Ras) 단백질은 세척 과정에서 제거된다. 다음으로, HRP detection reagent를 넣고 15분 동안 상온에서 반응시킨 후에 490 nm에서 흡광도를 측정함으로써 Ras-GTP의 존재량을 통해 Ras 단백질의 활성화도를 측정하는 방식이다.

- [140] 그 결과, 정상인과 비교하여 대부분의 신경섬유종증 환자 유래 섬유아세포에서 Ras-GTP의 신호가 높게 측정되는 것을 통하여 Ras 단백질의 활성화도가 증가되어 있음을 확인하였다(도 2).

[141]

- [142] 실시예 3. 아탈루렌(Ataluren) 처리에 따른 RAS 단백질 활성화도 변화 측정

- [143] 공여 받은 정상인과 신경섬유종증 환자의 피부 섬유아세포를 DMEM + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin의 배지에서 아탈루렌을 20 ug/ml 및 30 ug/ml의 농도로 각각 처리한 후 3일 동안 배양하였다. 세포 밀도가 용기의 70-80%되도록 배양한 후에 FBS가 제외된 배지로 교체한 후 세포를 배양하여 24시간 동안 starvation 과정을 거쳤다. 다음으로, 세포를 FBS가 포함된 배지로 이동시킨 후 Ras 활성화제인 EGF(epidermal growth factor)를 100 ng/ml 농도로 희석하여 처리하고 5분 동안 37 °C에서 반응시켜 각 샘플을 준비하였다. 각 샘플에서의 Ras 단백질의 활성화도 측정은 실시예 2에 기재한 방법과 동일하게 수행하였다.

- [144] 그 결과, 정상인과 비교하여 Ras 단백질의 활성화도가 증가되어 있는 신경섬유종증 환자의 피부 섬유아세포에 아탈루렌을 처리한 경우에, Ras-GTP의 신호가 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(도 3). 이를 통하여, 아탈루렌은

Ras 단백질의 활성도를 감소시킴으로써 신경섬유종증 치료 효과가 있음을 알 수 있었다.

[145]

[146] 실시예 4. 아탈루렌처리에 따른 p-ERK/ERK 단백질 발현량 변화 측정

[147] NuPAGETM 4-12% Bis-Tris Gel(Invitrogen)을 이용하여 실시예 3에서 Ras 활성도를 측정한 동일한 단백질을 전기영동하였다.

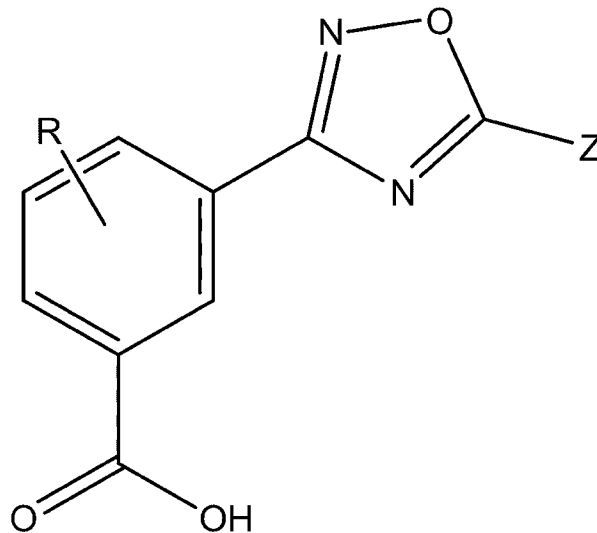
[148] 그 결과, 정상인의 섬유아세포에서는 아탈루렌 처리에 따른 활성 상태의 인산화된 ERK(p-ERK) 발현의 변화가 없었으나, 아탈루렌 처리에 따른 Ras 단백질의 활성도가 감소했던 신경섬유종증 환자의 섬유아세포에서는 p-ERK 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 4).

[149] ERK 활성도를 보다 정확하게 비교하기 위하여, 상기에서 전기영동한 단백질을 hybond-ECL membrane으로 이동(transfer)시킨 후, 3% skim milk를 이용하여 membrane을 블락킹(blocking)하였다. 다음으로, membrane에 ERK와 p-ERK 항체를 4 °C에서 24시간 동안 반응시킨 후 TBST로 3회 세척하였다. 2차 항체는 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBST로 3회 세척하였다. 세척이 끝난 membrane에서 ERK와 p-ERK의 발현 비율을 측정하였다.

[150] 그 결과, 정상인의 섬유아세포에서는 아탈루렌 처리에 따른 p-ERK 단백질의 발현 정도가 다소 증가하였지만, 아탈루렌 처리에 따른 Ras 단백질의 활성도가 감소했던 신경섬유종증 환자의 섬유아세포에서는 p-ERK 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 5).

청구범위

- [청구항 1] (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질; 또는
(2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
신경섬유종증 치료제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물:
[화학식 1]



상기 식에서

Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;
R은 수소 또는 할로젠이다.

- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 화학식 1로 표시되는 화합물이
3-[5-(2-플루오로-페닐)-[1,2,4]옥사디아졸-3-일]-벤조산인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날(monoclonal) 항체,
폴리클로날(polyclonal) 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드(ligand),

PNA(peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 및 나노파티클(nanoparticle)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

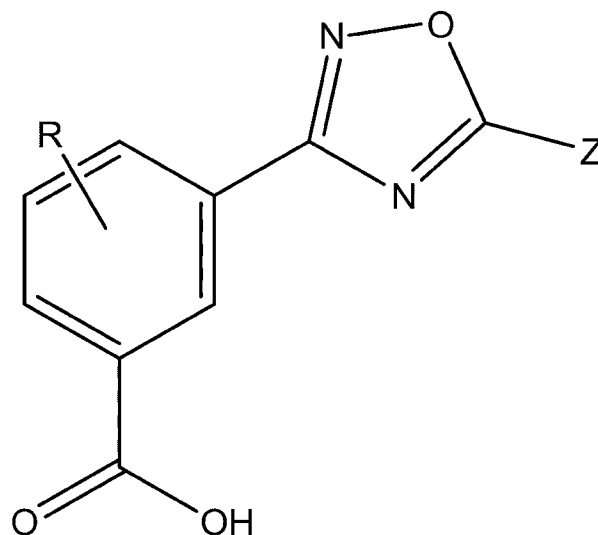
[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 신경섬유종증은 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지는 것인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

[청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 바이오마커 조성물을 포함하는, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 키트.

[청구항 8] 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서,
(1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질;
또는
(2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 9] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경섬유종증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

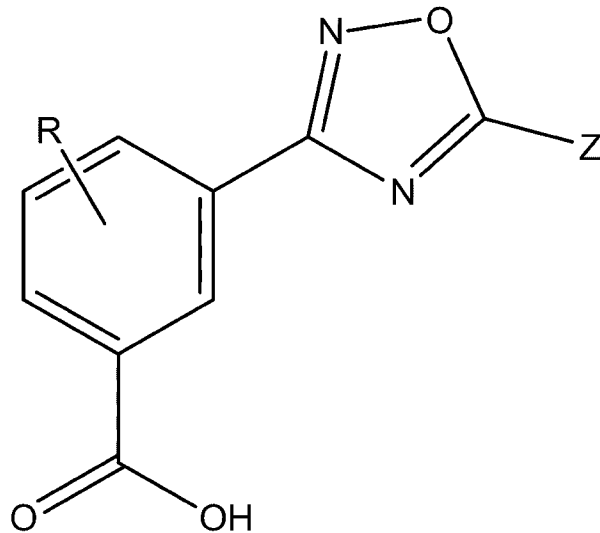
[화학식 1]



상기 식에서

Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;
R은 수소 또는 할로젠이다.

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 화학식 1로 표시되는 화합물이
3-[5-(2-플루오로-페닐)-[1,2,4]옥사디아졸-3-일]-벤조산인,
신경섬유종증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 신경섬유종증은 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지는 것인,
신경섬유종증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 신경섬유종증은 Ras 단백질의 활성도가 증가된 것인,
신경섬유종증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하기 위한,
(1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질;
또는
(2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정할 수 있는
제제를 포함하는 바이오마커의 용도.
- [청구항 14] 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서,
(1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질;
또는
(2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자;의 발현 수준을 측정하는 단계를
포함하는, 신경섬유종증 환자의 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을
예측하는 방법.
- [청구항 15] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한
염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는
신경섬유종증을 예방 또는 치료하는 방법:
[화학식 1]

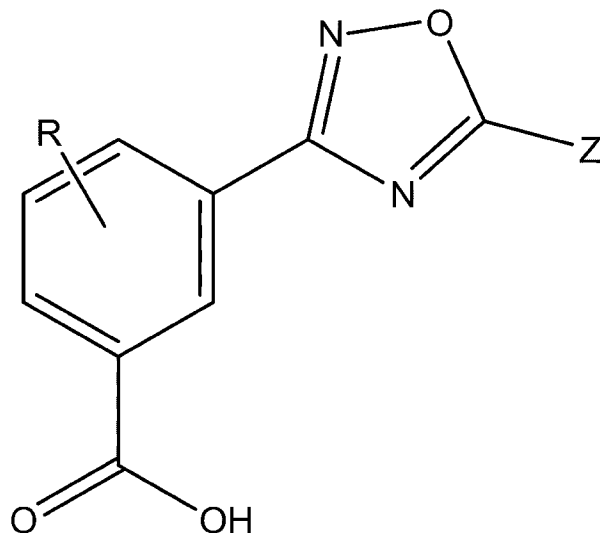


상기 식에서

Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;
R은 수소 또는 할로젠이다.

[청구항 16] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 신경섬유종증의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 치료제의 제조에 사용하기 위한 용도:

[화학식 1]



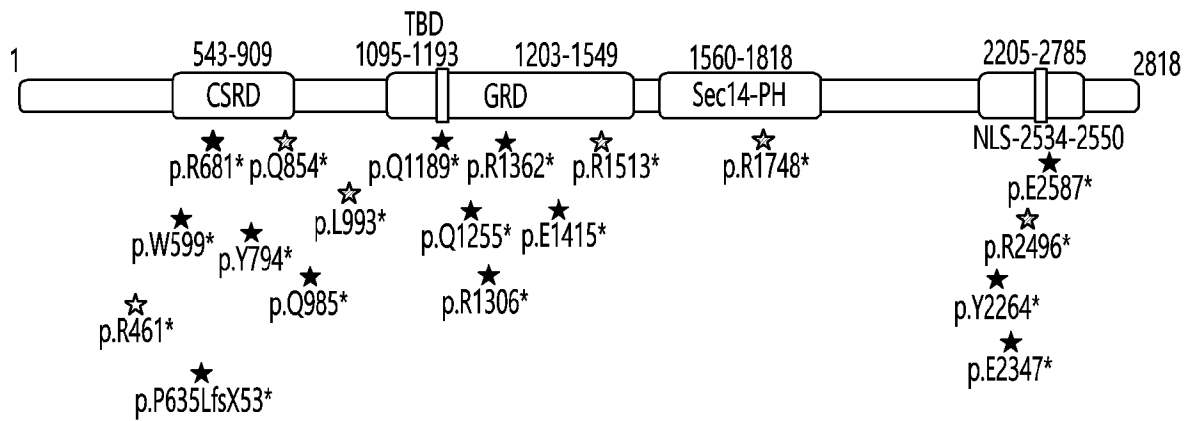
상기 식에서

Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;

R은 수소 또는 할로젠이다.

- [청구항 17] (a) NF1 유전자 돌연변이를 갖는 생물학적 시료를 시험 물질과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 접촉된 생물학적 시료에서, (1) GTP가 결합되어 활성화된 RAS(Ras-GTP) 단백질 및 활성화된 p-ERK 단백질으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을; 또는 (2) 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 치료제의 스크리닝 방법.

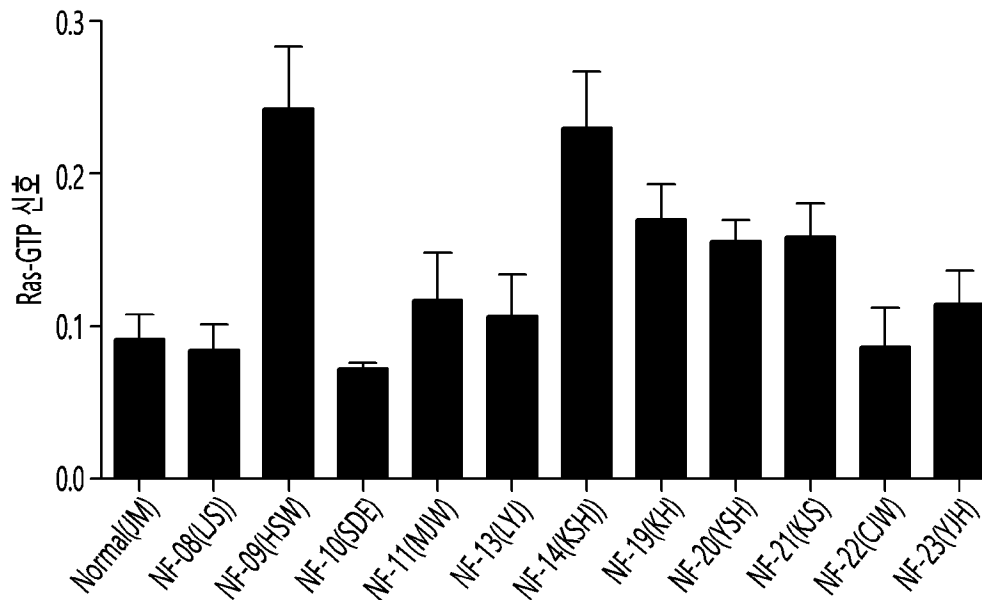
[도 1]



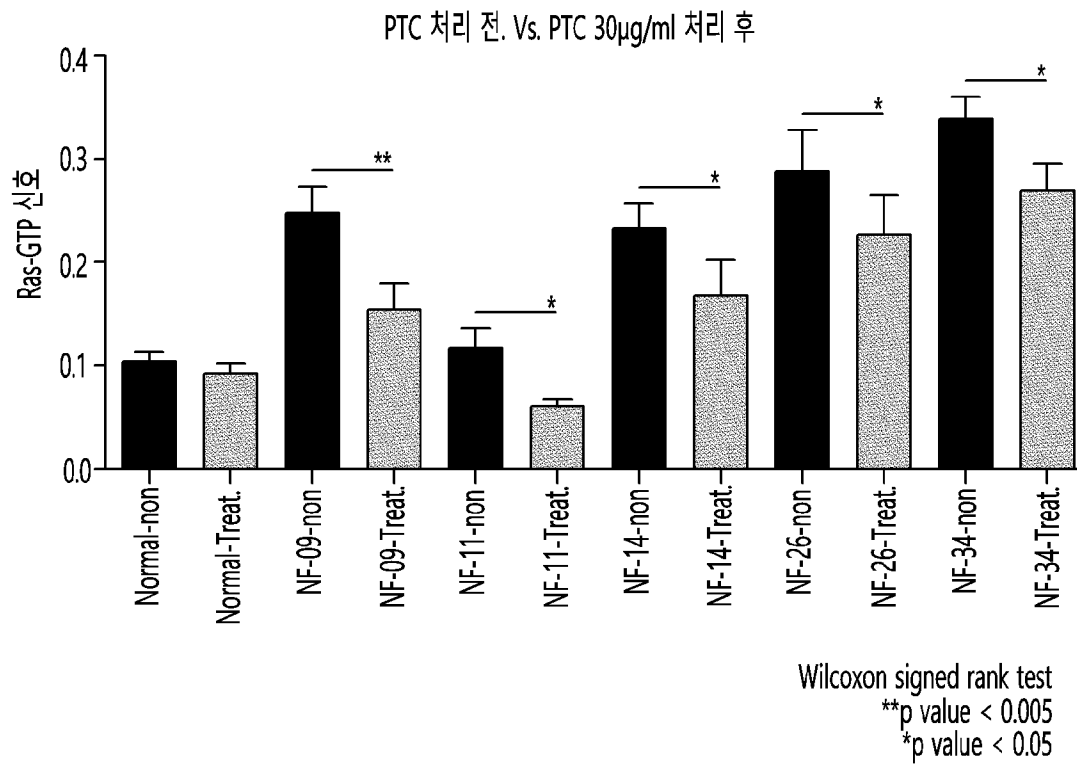
CSRD: cysteinine/serine-rich domain, GRD: GAP-related domain, TBD: tubulin-binding domain, Sec14-PH: Sec14-homologous domain and pleckstrin homologous domain, NLS: nuclear localization signal, FAK: focal adhesion kinase.

빛검은 본 연구에서 확인된 아탈루렌 반응 돌연변이를 나타냅니다.

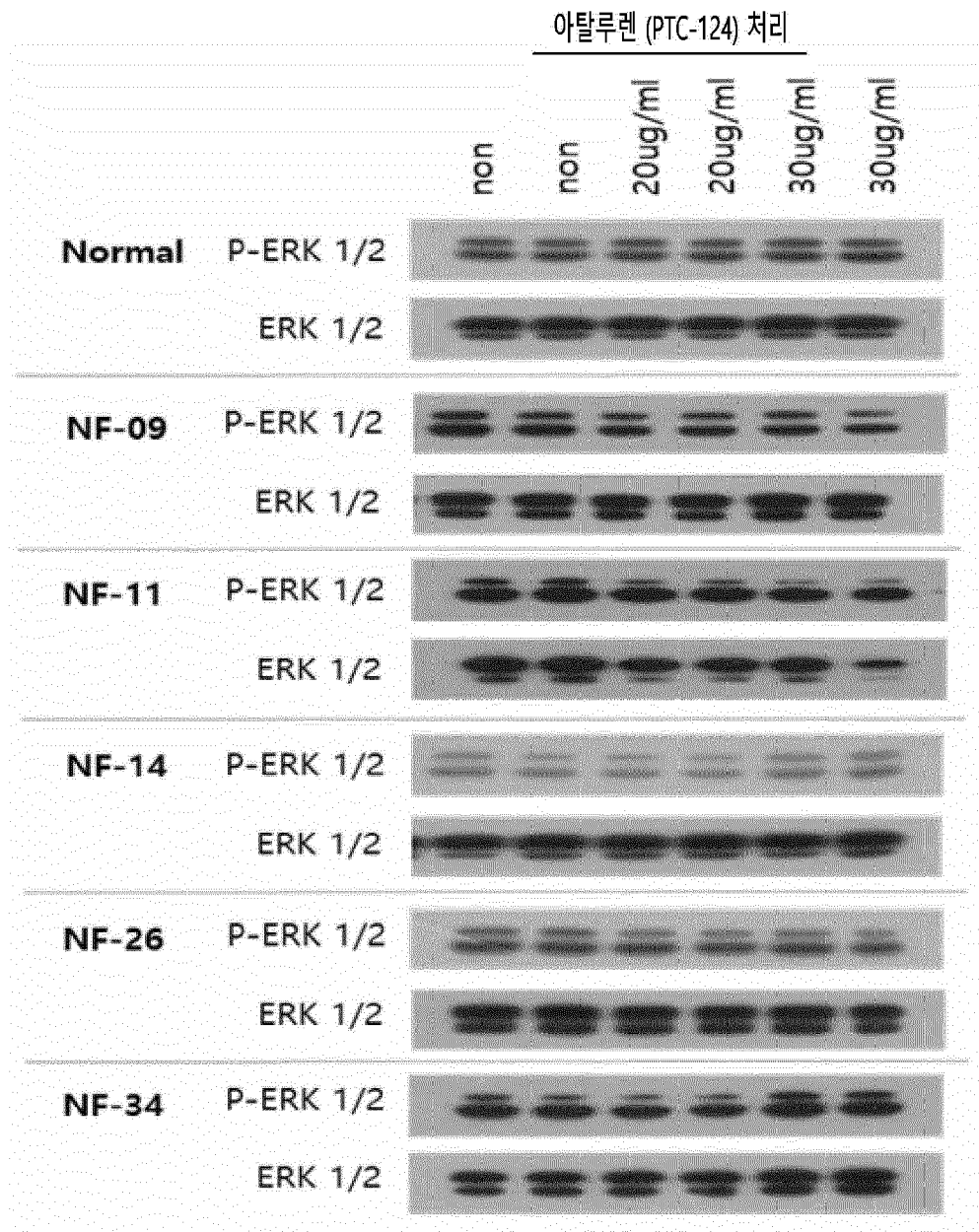
[도 2]



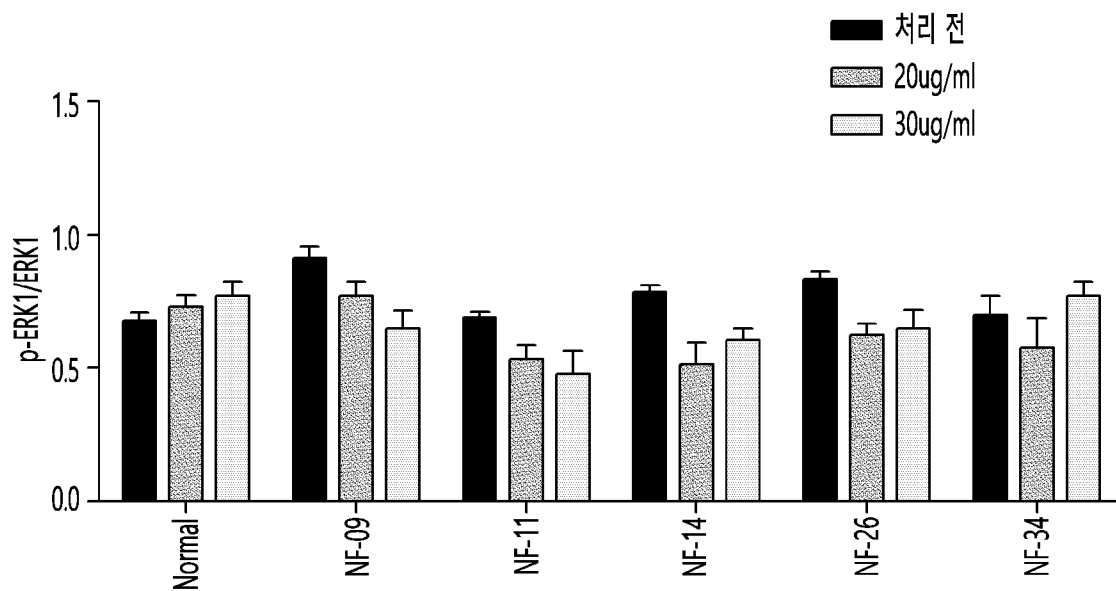
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020770

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; A61K 31/4245(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68(2006.01); A61K 31/4245(2006.01); A61K 47/30(2006.01); A61K 9/14(2006.01); A61P 21/04(2006.01); C07D 271/06(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) & keywords: 신경섬유종증 제1형(neurofibromatosis type 1, NF1), Ras 활성도(Ras activity), 감수성(sensitivity), 바이오마커(biomarker), 아탈루렌(ataluren)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	BARKAN, B. et al. The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid as a potential therapy for neurofibromatosis type 1. Clinical cancer research. 2006, vol. 12, no. 18, pp. 5533-5542. See abstract; pages 5534, 5536, 5537 and 5541; and figures 1 and 2C.	1,4-8,13,14,17 2,3,11,12 9,10,16
X Y	KR 10-1430144 B1 (PTC THERAPEUTICS, INC.) 13 August 2014 (2014-08-13) See claims 1 and 27; and paragraphs [0007], [0008], [0010] and [0034].	9,10,16 2,3,11,12
X Y	EP 2402002 B1 (PTC THERAPEUTICS, INC.) 11 July 2018 (2018-07-11) See claims 1-6; and paragraph [0043].	9,10,16 2,3,11,12



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

29 March 2023

Date of mailing of the international search report

31 March 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/KR2022/020770

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2017-0100072 A (PTC THERAPEUTICS, INC.) 01 September 2017 (2017-09-01) See claim 1; and paragraphs [0041]-[0045].	9,10,16
Y		2,3,11,12
X	KR 10-2021-0151131 A (PTC THERAPEUTICS, INC.) 13 December 2021 (2021-12-13) See paragraphs [0022], [0023], [0031] and [0032].	9,10,16
Y		2,3,11,12
X	US 2020-0262800 A1 (PTC THERAPEUTICS, INC.) 20 August 2020 (2020-08-20) See claims 1 and 5; and paragraph [0111].	9,10,16
Y		2,3,11,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/020770

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.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 15 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/KR2022/020770

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-1430144	B1	13 August 2014	AR	062963	A1	17 December 2008
				AR	109300	A2	14 November 2018
				AU	2007-300542	A1	03 April 2008
				AU	2007-300542	B2	17 May 2012
				BR	PI0717107	A2	15 October 2013
				CA	2663574	A1	03 April 2008
				CA	2663574	C	24 November 2015
				CL	2007002743	A1	11 July 2008
				CL	27432007	A1	11 July 2008
				CN	101541770	A	23 September 2009
				CN	102382075	A	21 March 2012
				CN	102382075	B	28 October 2015
				CN	104341371	A	11 February 2015
				CY	1117339	T1	26 April 2017
				DK	2076501	T3	29 February 2016
				EP	2076501	A2	08 July 2009
				EP	2076501	B1	02 December 2015
				EP	2076501	B8	13 November 2019
				EP	2559689	A1	20 February 2013
				EP	2559689	B1	29 November 2017
				ES	2563958	T3	16 March 2016
				ES	2655338	T3	19 February 2018
				HK	1207070	A1	22 January 2016
				HU	E028503	T2	28 December 2016
				JP	2010-504340	A	12 February 2010
				JP	2015-110607	A	18 June 2015
				JP	2017-160253	A	14 September 2017
				JP	2019-104752	A	27 June 2019
				JP	2021-130697	A	09 September 2021
				JP	5714228	B2	07 May 2015
				JP	6407733	B2	17 October 2018
				JP	6495375	B2	03 April 2019
				LT	C2076501	I2	10 October 2017
				MX	2009003160	A	06 April 2009
				MX	344418	B	15 December 2016
				MY	191209	A	08 June 2022
				NO	20091488	A	17 June 2009
				NO	20091488	L	17 June 2009
				NO	341858	B1	12 February 2018
				NZ	575795	A	30 March 2012
				PE	07682012	A1	27 June 2012
				PE	12252008	A1	04 September 2008
				PE	14452015	A1	28 September 2015
				PE	20081225	A1	04 September 2008
				PE	20120768	A1	27 June 2012
				PE	20151445	A1	28 September 2015
				PL	2076501	T3	30 June 2016
				PL	2559689	T3	30 April 2018
				PT	2076501	E	31 March 2016
				RU	2009115649	A	10 November 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/020770

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		RU 2474577 C2	10 February 2013
		SG 10201609581 A	29 December 2016
		SG 185979 A1	28 December 2012
		SI 2076501 T1	31 May 2016
		SI EP2076501 T1	31 May 2016
		TW 200823181 A	01 June 2008
		TW 201420578 A	01 June 2014
		TW I452038 B	11 September 2014
		TW I496775 B	21 August 2015
		UA 99600 C2	10 September 2012
		US 10028939 B2	24 July 2018
		US 10300047 B2	28 May 2019
		US 10959988 B2	30 March 2021
		US 2008-0171377 A1	17 July 2008
		US 2011-0040100 A1	17 February 2011
		US 2013-0158081 A1	20 June 2013
		US 2014-0235679 A1	21 August 2014
		US 2016-0193189 A1	07 July 2016
		US 2018-0296538 A1	18 October 2018
		US 2019-0231754 A1	01 August 2019
		US 2020-0330440 A1	22 October 2020
		US 2021-0330647 A1	28 October 2021
		US 2022-0023268 A1	27 January 2022
		US 7863456 B2	04 January 2011
		US 8394966 B2	12 March 2013
		US 8748625 B2	10 June 2014
		US 9309206 B2	12 April 2016
		WO 2008-039431 A2	03 April 2008
		WO 2008-039431 A3	08 May 2008
		WO 2008-039431 B1	10 July 2008
		ZA 200901949 B	28 July 2010
EP	2402002 B1	11 July 2018	
		AU 2006-235115 A1	19 October 2006
		AU 2006-235115 B2	05 July 2012
		AU 2006-235115 C1	28 February 2013
		AU 2012-238226 A1	25 October 2012
		AU 2012-238226 B2	14 May 2015
		BR PI0609089 A2	16 November 2010
		CA 2603402 A1	19 October 2006
		CA 2603402 C	31 October 2017
		CN 101193632 A	04 June 2008
		CN 103720688 A	16 April 2014
		DK 1874306 T3	01 October 2012
		DK 2402002 T3	20 August 2018
		EP 1874306 A1	09 January 2008
		EP 1874306 B1	04 July 2012
		EP 2402002 A1	04 January 2012
		ES 2390804 T3	16 November 2012
		ES 2683359 T3	26 September 2018
		HK 1111897 A1	22 August 2008
		JP 2008-535846 A	04 September 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/020770

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
					JP 2013-189465 A	26 September 2013
					JP 2015-212292 A	26 November 2015
					JP 5800451 B2	28 October 2015
					JP 5808367 B2	10 November 2015
					MX 2007012206 A	05 December 2007
					NO 20075682 A	07 January 2008
					NO 20075682 L	07 January 2008
					NO 20170035 A1	07 January 2008
					NO 339909 B1	13 February 2017
					NO 340617 B1	15 May 2017
					NZ 562197 A	30 September 2010
					PL 1874306 T3	30 November 2012
					PL 2402002 T3	30 November 2018
					PT 1874306 E	11 October 2012
					PT 2402002 T	08 October 2018
					US 10034863 B2	31 July 2018
					US 10285980 B2	14 May 2019
					US 10675272 B2	09 June 2020
					US 11497736 B2	15 November 2022
					US 2009-0149513 A1	11 June 2009
					US 2014-0221436 A1	07 August 2014
					US 2017-0027913 A1	02 February 2017
					US 2018-0311219 A1	01 November 2018
					US 2019-0224173 A1	25 July 2019
					US 2020-0261425 A1	20 August 2020
					US 8716321 B2	06 May 2014
					US 9474743 B2	25 October 2016
					WO 2006-110483 A1	19 October 2006
					AU 2007-308067 A1	17 April 2008
					AU 2007-308067 B2	30 May 2013
					AU 2013-219243 A1	12 September 2013
					AU 2013-219243 B2	08 September 2016
					AU 2016-262645 A1	08 December 2016
					AU 2016-262645 B2	17 May 2018
					BR 122019020961 B1	09 March 2021
					BR 122019020961 B8	27 July 2021
					BR PI0719276 A2	29 April 2014
					CA 2675518 A1	17 April 2008
					CA 2675518 C	14 November 2017
					CL 2007002923 A1	06 June 2008
					CL 29232007 A1	06 June 2008
					CN 101553226 A	07 October 2009
					CN 101553226 B	13 May 2015
					CN 103211766 A	24 July 2013
					CN 103211766 B	11 March 2015
					CY 1116360 T1	08 February 2017
					DK 2073805 T3	15 June 2015
					EP 2073805 A1	01 July 2009
					EP 2073805 B1	04 March 2015
					EP 2460520 A1	06 June 2012
KR	10-2017-0100072	A	01 September 2017		AU 2007-308067 A1	17 April 2008
					AU 2007-308067 B2	30 May 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/020770

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 2460520 B1	30 September 2015
		ES 2538359 T3	19 June 2015
		HK 1136214 A1	25 June 2010
		HK 1170690 A1	08 March 2013
		HR P20150590 T1	03 July 2015
		JP 2010-506840 A	04 March 2010
		JP 2014-058533 A	03 April 2014
		JP 2016-029078 A	03 March 2016
		JP 2017-081946 A	18 May 2017
		JP 6129713 B2	17 May 2017
		JP 6333227 B2	30 May 2018
		KR 10-1758341 B1	14 July 2017
		KR 10-2009-0074231 A	06 July 2009
		KR 10-2015-0064244 A	10 June 2015
		KR 10-2016-0128468 A	07 November 2016
		MX 2009003909 A	25 May 2009
		NO 20091826 A	08 July 2009
		NO 20091826 L	08 July 2009
		NO 342061 B1	19 March 2018
		PE 06702012 A1	01 June 2012
		PE 09472016 A1	26 September 2016
		PE 09822008 A1	19 July 2008
		PE 20080982 A1	19 July 2008
		PE 20120670 A1	01 June 2012
		PE 20160947 A1	26 September 2016
		PE 20212245 A1	24 November 2021
		PL 2073805 T3	31 August 2015
		PT 2073805 E	13 July 2015
		RS 54025 B1	30 October 2015
		RU 2009117590 A	20 November 2010
		RU 2462247 C2	27 September 2012
		SI 2073805 T1	30 October 2015
		SI EP2073805 T1	30 October 2015
		TW 200820968 A	16 May 2008
		TW I405570 B	21 August 2013
		US 10172836 B2	08 January 2019
		US 10849885 B2	01 December 2020
		US 2008-0114039 A1	15 May 2008
		US 2016-0101087 A1	14 April 2016
		US 2017-0049752 A1	23 February 2017
		US 2017-0304275 A1	26 October 2017
		US 2018-0140583 A1	24 May 2018
		US 2019-0099405 A1	04 April 2019
		US 2021-0038572 A1	11 February 2021
		US 9226919 B2	05 January 2016
		US 9522137 B2	20 December 2016
		US 9737513 B2	22 August 2017
		US 9877952 B2	30 January 2018
		WO 2008-045566 A1	17 April 2008
		WO 2008-045566 B1	19 June 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/020770

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2021-0151131	A	13 December 2021	CA	3135641	A1	15 October 2020
				CN	114007608	A	01 February 2022
				EA	202192767	A1	29 December 2021
				EP	3952867	A1	16 February 2022
				JP	2022-526643	A	25 May 2022
				US	2022-0175739	A1	09 June 2022
				WO	2020-210432	A1	15 October 2020
				WO	2020-210432	A8	15 October 2020
US	2020-0262800	A1	20 August 2020	EP	3377476	A1	26 September 2018
				EP	3377476	A4	22 May 2019
				EP	3377476	B1	26 October 2022
				WO	2017-087364	A1	26 May 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/68(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; A61K 31/4245(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i														
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/68(2006.01); A61K 31/4245(2006.01); A61K 47/30(2006.01); A61K 9/14(2006.01); A61P 21/04(2006.01); C07D 271/06(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) & 키워드: 신경섬유종증 제1형(neurofibromatosis type 1, NF1), Ras 활성화도(Ras activity), 감수성(sensitivity), 바이오마커(biomarker), 아탈루렌(ataluren)														
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y A</td> <td>BARKAN, B. 등, "The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid as a potential therapy for neurofibromatosis type 1", Clinical cancer research, 2006, 제12권, 제18호, 페이지 5533-5542 초록; 페이지 5534, 5536, 5537, 5541; 도면 1, 2C</td> <td>1,4-8,13,14,17 2,3,11,12 9,10,16</td> </tr> <tr> <td>X Y</td> <td>KR 10-1430144 B1 (피티씨 테라퓨틱스, 인크.) 2014.08.13 청구항 1, 27; 단락 [0007], [0008], [0010], [0034]</td> <td>9,10,16 2,3,11,12</td> </tr> <tr> <td>X Y</td> <td>EP 2402002 B1 (PTC THERAPEUTICS, INC.) 2018.07.11 청구항 1-6; 단락 [0043]</td> <td>9,10,16 2,3,11,12</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X Y A	BARKAN, B. 등, "The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid as a potential therapy for neurofibromatosis type 1", Clinical cancer research, 2006, 제12권, 제18호, 페이지 5533-5542 초록; 페이지 5534, 5536, 5537, 5541; 도면 1, 2C	1,4-8,13,14,17 2,3,11,12 9,10,16	X Y	KR 10-1430144 B1 (피티씨 테라퓨틱스, 인크.) 2014.08.13 청구항 1, 27; 단락 [0007], [0008], [0010], [0034]	9,10,16 2,3,11,12	X Y	EP 2402002 B1 (PTC THERAPEUTICS, INC.) 2018.07.11 청구항 1-6; 단락 [0043]	9,10,16 2,3,11,12
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항												
X Y A	BARKAN, B. 등, "The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid as a potential therapy for neurofibromatosis type 1", Clinical cancer research, 2006, 제12권, 제18호, 페이지 5533-5542 초록; 페이지 5534, 5536, 5537, 5541; 도면 1, 2C	1,4-8,13,14,17 2,3,11,12 9,10,16												
X Y	KR 10-1430144 B1 (피티씨 테라퓨틱스, 인크.) 2014.08.13 청구항 1, 27; 단락 [0007], [0008], [0010], [0034]	9,10,16 2,3,11,12												
X Y	EP 2402002 B1 (PTC THERAPEUTICS, INC.) 2018.07.11 청구항 1-6; 단락 [0043]	9,10,16 2,3,11,12												
☒ 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 2023년03월29일(29.03.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년03월31일(31.03.2023)												
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												

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2017-0100072 A (피티씨 테라퓨틱스, 인크.) 2017.09.01 청구항 1; 단락 [0041]-[0045]	9,10,16
Y		2,3,11,12
X	KR 10-2021-0151131 A (피티씨 테라퓨틱스, 인크.) 2021.12.13 단락 [0022], [0023], [0031], [0032]	9,10,16
Y		2,3,11,12
X	US 2020-0262800 A1 (PTC THERAPEUTICS, INC.) 2020.08.20 청구항 1, 5; 단락 [0111]	9,10,16
Y		2,3,11,12

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: **15**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 15는 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
KR 10-1430144 B1	2014/08/13	AR 062963 A1	2008/12/17
		AR 109300 A2	2018/11/14
		AU 2007-300542 A1	2008/04/03
		AU 2007-300542 B2	2012/05/17
		BR PI0717107 A2	2013/10/15
		CA 2663574 A1	2008/04/03
		CA 2663574 C	2015/11/24
		CL 2007002743 A1	2008/07/11
		CL 27432007 A1	2008/07/11
		CN 101541770 A	2009/09/23
		CN 102382075 A	2012/03/21
		CN 102382075 B	2015/10/28
		CN 104341371 A	2015/02/11
		CY 1117339 T1	2017/04/26
		DK 2076501 T3	2016/02/29
		EP 2076501 A2	2009/07/08
		EP 2076501 B1	2015/12/02
		EP 2076501 B8	2019/11/13
		EP 2559689 A1	2013/02/20
		EP 2559689 B1	2017/11/29
		ES 2563958 T3	2016/03/16
		ES 2655338 T3	2018/02/19
		HK 1207070 A1	2016/01/22
		HU E028503 T2	2016/12/28
		JP 2010-504340 A	2010/02/12
		JP 2015-110607 A	2015/06/18
		JP 2017-160253 A	2017/09/14
		JP 2019-104752 A	2019/06/27
		JP 2021-130697 A	2021/09/09
		JP 5714228 B2	2015/05/07
		JP 6407733 B2	2018/10/17
		JP 6495375 B2	2019/04/03
		LT C2076501 I2	2017/10/10
		MX 2009003160 A	2009/04/06
		MX 344418 B	2016/12/15
		MY 191209 A	2022/06/08
		NO 20091488 A	2009/06/17
		NO 20091488 L	2009/06/17
		NO 341858 B1	2018/02/12
		NZ 575795 A	2012/03/30
		PE 07682012 A1	2012/06/27
		PE 12252008 A1	2008/09/04
		PE 14452015 A1	2015/09/28
		PE 20081225 A1	2008/09/04
		PE 20120768 A1	2012/06/27
		PE 20151445 A1	2015/09/28
		PL 2076501 T3	2016/06/30
		PL 2559689 T3	2018/04/30
		PT 2076501 E	2016/03/31
		RU 2009115649 A	2010/11/10

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		RU 2474577 C2	2013/02/10
		SG 10201609581 A	2016/12/29
		SG 185979 A1	2012/12/28
		SI 2076501 T1	2016/05/31
		SI EP2076501 T1	2016/05/31
		TW 200823181 A	2008/06/01
		TW 201420578 A	2014/06/01
		TW I452038 B	2014/09/11
		TW I496775 B	2015/08/21
		UA 99600 C2	2012/09/10
		US 10028939 B2	2018/07/24
		US 10300047 B2	2019/05/28
		US 10959988 B2	2021/03/30
		US 2008-0171377 A1	2008/07/17
		US 2011-0040100 A1	2011/02/17
		US 2013-0158081 A1	2013/06/20
		US 2014-0235679 A1	2014/08/21
		US 2016-0193189 A1	2016/07/07
		US 2018-0296538 A1	2018/10/18
		US 2019-0231754 A1	2019/08/01
		US 2020-0330440 A1	2020/10/22
		US 2021-0330647 A1	2021/10/28
		US 2022-0023268 A1	2022/01/27
		US 7863456 B2	2011/01/04
		US 8394966 B2	2013/03/12
		US 8748625 B2	2014/06/10
		US 9309206 B2	2016/04/12
		WO 2008-039431 A2	2008/04/03
		WO 2008-039431 A3	2008/05/08
		WO 2008-039431 B1	2008/07/10
		ZA 200901949 B	2010/07/28
EP 2402002 B1	2018/07/11	AU 2006-235115 A1	2006/10/19
		AU 2006-235115 B2	2012/07/05
		AU 2006-235115 C1	2013/02/28
		AU 2012-238226 A1	2012/10/25
		AU 2012-238226 B2	2015/05/14
		BR PI0609089 A2	2010/11/16
		CA 2603402 A1	2006/10/19
		CA 2603402 C	2017/10/31
		CN 101193632 A	2008/06/04
		CN 103720688 A	2014/04/16
		DK 1874306 T3	2012/10/01
		DK 2402002 T3	2018/08/20
		EP 1874306 A1	2008/01/09
		EP 1874306 B1	2012/07/04
		EP 2402002 A1	2012/01/04
		ES 2390804 T3	2012/11/16
		ES 2683359 T3	2018/09/26
		HK 1111897 A1	2008/08/22
		JP 2008-535846 A	2008/09/04

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2013-189465 A	2013/09/26
		JP 2015-212292 A	2015/11/26
		JP 5800451 B2	2015/10/28
		JP 5808367 B2	2015/11/10
		MX 2007012206 A	2007/12/05
		NO 20075682 A	2008/01/07
		NO 20075682 L	2008/01/07
		NO 20170035 A1	2008/01/07
		NO 339909 B1	2017/02/13
		NO 340617 B1	2017/05/15
		NZ 562197 A	2010/09/30
		PL 1874306 T3	2012/11/30
		PL 2402002 T3	2018/11/30
		PT 1874306 E	2012/10/11
		PT 2402002 T	2018/10/08
		US 10034863 B2	2018/07/31
		US 10285980 B2	2019/05/14
		US 10675272 B2	2020/06/09
		US 11497736 B2	2022/11/15
		US 2009-0149513 A1	2009/06/11
		US 2014-0221436 A1	2014/08/07
		US 2017-0027913 A1	2017/02/02
		US 2018-0311219 A1	2018/11/01
		US 2019-0224173 A1	2019/07/25
		US 2020-0261425 A1	2020/08/20
		US 8716321 B2	2014/05/06
		US 9474743 B2	2016/10/25
		WO 2006-110483 A1	2006/10/19
KR 10-2017-0100072 A	2017/09/01	AU 2007-308067 A1	2008/04/17
		AU 2007-308067 B2	2013/05/30
		AU 2013-219243 A1	2013/09/12
		AU 2013-219243 B2	2016/09/08
		AU 2016-262645 A1	2016/12/08
		AU 2016-262645 B2	2018/05/17
		BR 122019020961 B1	2021/03/09
		BR 122019020961 B8	2021/07/27
		BR PI0719276 A2	2014/04/29
		CA 2675518 A1	2008/04/17
		CA 2675518 C	2017/11/14
		CL 2007002923 A1	2008/06/06
		CL 29232007 A1	2008/06/06
		CN 101553226 A	2009/10/07
		CN 101553226 B	2015/05/13
		CN 103211766 A	2013/07/24
		CN 103211766 B	2015/03/11
		CY 1116360 T1	2017/02/08
		DK 2073805 T3	2015/06/15
		EP 2073805 A1	2009/07/01
		EP 2073805 B1	2015/03/04
		EP 2460520 A1	2012/06/06

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 2460520 B1	2015/09/30
		ES 2538359 T3	2015/06/19
		HK 1136214 A1	2010/06/25
		HK 1170690 A1	2013/03/08
		HR P20150590 T1	2015/07/03
		JP 2010-506840 A	2010/03/04
		JP 2014-058533 A	2014/04/03
		JP 2016-029078 A	2016/03/03
		JP 2017-081946 A	2017/05/18
		JP 6129713 B2	2017/05/17
		JP 6333227 B2	2018/05/30
		KR 10-1758341 B1	2017/07/14
		KR 10-2009-0074231 A	2009/07/06
		KR 10-2015-0064244 A	2015/06/10
		KR 10-2016-0128468 A	2016/11/07
		MX 2009003909 A	2009/05/25
		NO 20091826 A	2009/07/08
		NO 20091826 L	2009/07/08
		NO 342061 B1	2018/03/19
		PE 06702012 A1	2012/06/01
		PE 09472016 A1	2016/09/26
		PE 09822008 A1	2008/07/19
		PE 20080982 A1	2008/07/19
		PE 20120670 A1	2012/06/01
		PE 20160947 A1	2016/09/26
		PE 20212245 A1	2021/11/24
		PL 2073805 T3	2015/08/31
		PT 2073805 E	2015/07/13
		RS 54025 B1	2015/10/30
		RU 2009117590 A	2010/11/20
		RU 2462247 C2	2012/09/27
		SI 2073805 T1	2015/10/30
		SI EP2073805 T1	2015/10/30
		TW 200820968 A	2008/05/16
		TW I405570 B	2013/08/21
		US 10172836 B2	2019/01/08
		US 10849885 B2	2020/12/01
		US 2008-0114039 A1	2008/05/15
		US 2016-0101087 A1	2016/04/14
		US 2017-0049752 A1	2017/02/23
		US 2017-0304275 A1	2017/10/26
		US 2018-0140583 A1	2018/05/24
		US 2019-0099405 A1	2019/04/04
		US 2021-0038572 A1	2021/02/11
		US 9226919 B2	2016/01/05
		US 9522137 B2	2016/12/20
		US 9737513 B2	2017/08/22
		US 9877952 B2	2018/01/30
		WO 2008-045566 A1	2008/04/17
		WO 2008-045566 B1	2008/06/19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2021-0151131 A	2021/12/13	CA 3135641 A1	2020/10/15
		CN 114007608 A	2022/02/01
		EA 202192767 A1	2021/12/29
		EP 3952867 A1	2022/02/16
		JP 2022-526643 A	2022/05/25
		US 2022-0175739 A1	2022/06/09
		WO 2020-210432 A1	2020/10/15
		WO 2020-210432 A8	2020/10/15
US 2020-0262800 A1	2020/08/20	EP 3377476 A1	2018/09/26
		EP 3377476 A4	2019/05/22
		EP 3377476 B1	2022/10/26
		WO 2017-087364 A1	2017/05/26