



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0009216
(43) 공개일자 2013년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/433 (2006.01) A61K 31/429 (2006.01)

A61K 31/428 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0070146

(22) 출원일자 2011년07월14일

심사청구일자 2011년07월14일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

송문정

서울특별시 성북구 종암동 삼성래미안아파트 101동 1402호

조준현

대구광역시 달서구 성당동 829-23

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김선애

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 화학식 3, 4, 5, 또는 6으로 각각 표시되는 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물을 제공한다. 상술한 본 발명에 의하면 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성을 억제하여 감마허피스바이러스 등 허피스바이러스에 의한 질환 내지 질병을 약물독성 또는 약물내성 없이 효율적으로 치료 또는 예방할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도21

plate-position	구조	chemical name
H-000009-H23		5-phenyl-2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)isothiazol-3(2H)-one
H-000009-P21		methyl 4-((3,5-dioxo-2-p-tolyl-1,2,4-thiazolidin-4-yl)methyl)benzoate
H-000009-L23		2-phenyl-4-(2-(phenylsulfonyl)ethyl)-1,2,4-thiazolidine-3,5-dione
H-000009-P22		3-isopropyl-6-(pyridin-3-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole

(72) 발명자

박지은

서울특별시 노원구 상계9동 주공아파트 1214-1002

조혜정

서울특별시 성북구 안암동3가 132-3 엠에스엔오피스텔 601호

황광연

서울특별시 용산구 이촌1동 강촌아파트 102-1302

김현숙

경기도 구리시 수택1동 380-9 102호

이종국

대전광역시 유성구 신성동 럭키하나아파트 103동 101호

이계형

대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 119동 1104호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0020469

부처명 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업 [바이오기술개발사업 신약타겟발굴연구사업]

연구과제명 구조기반 항바이러스 in vitro 및 in vivo 신규타겟 검증연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

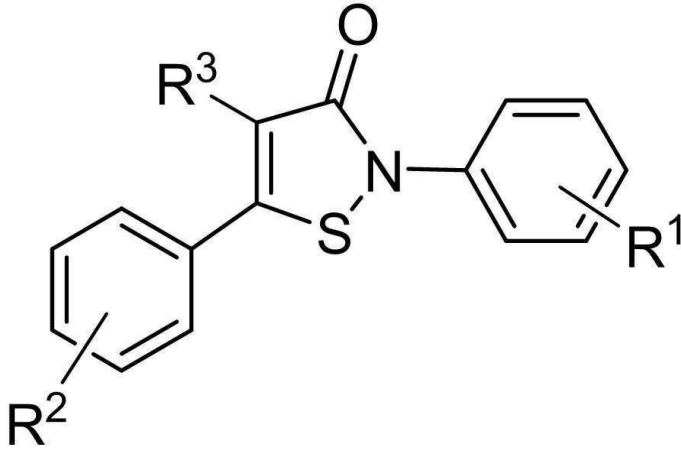
연구기간 2008.10.01 ~ 2011.07.15

특허청구의 범위

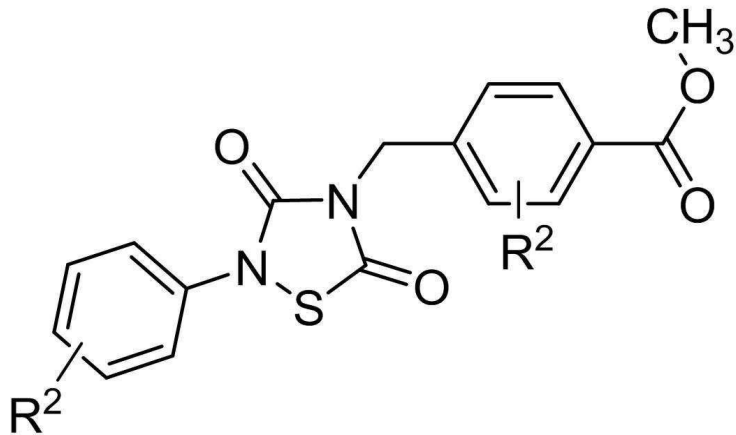
청구항 1

하기 화학식 3, 4, 5, 또는 6으로 각각 표시되는 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

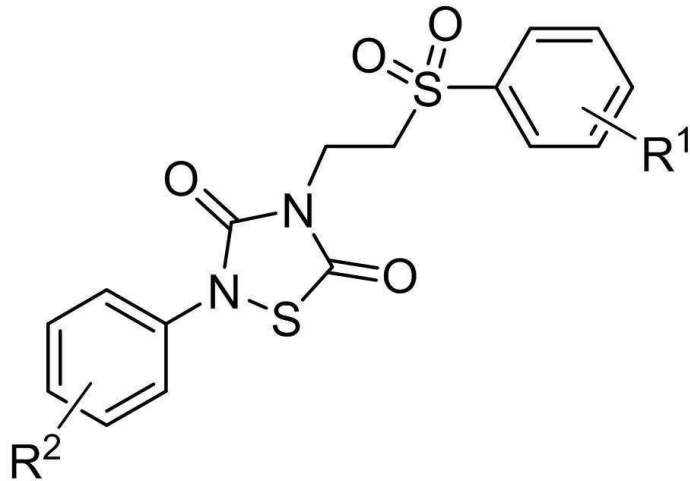
[화학식 3]



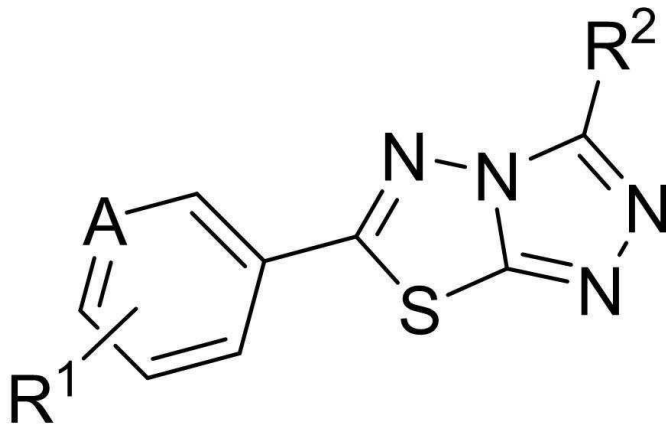
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



[상기 화학식 3, 4, 5 또는 6에서,

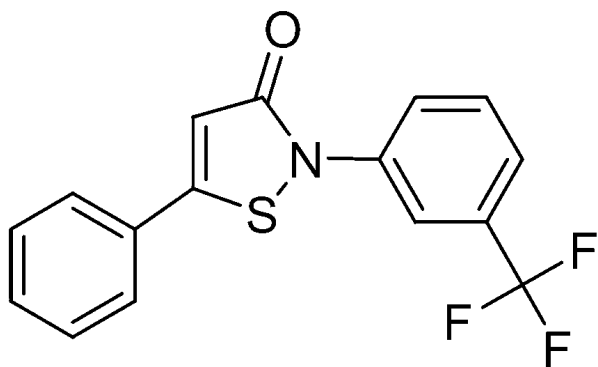
A는 C, N이며;

R1, R2 및 R3는 서로 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분쇄의 포화 또는 불포화 (C1 - C4)알킬, (C1 - C4)알콕시, 할라이드, -OH, CF₃, 에틸렌(CH₂CH₂), NO₂, CN, (C1 - C4)알콕시카보닐(C1 - C4)알킬, 페닐, 페닐(C1 - C4)알킬 또는 페닐카보닐메틸이며; 단 R1, R2 및 R3에서 알킬, 페닐 또는 페닐알킬은 (C1 - C7)알킬, (C1 - C7)알콕시, (C1 - C7)알콕시카보닐, 할로젠, 니트로, 히드록시, 카복실산, 피리딜로 더 치환될 수 있다.]

청구항 2

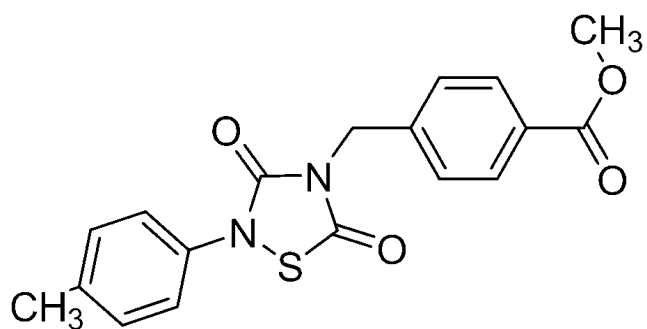
제1항에 있어서, 하기 화학식 7 ~ 10으로 각각 표시되는 화합물 3 ~ 화합물 6에서 선택되는 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

[화학식 7]



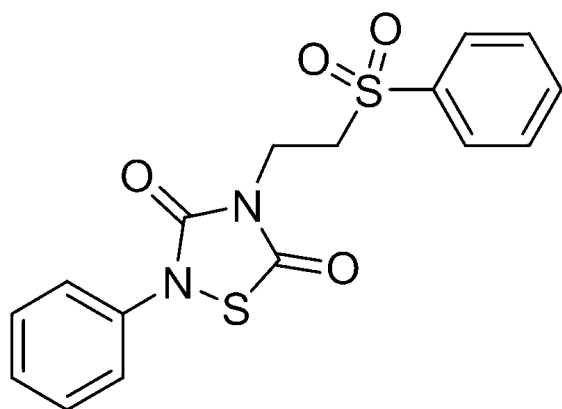
5-phenyl-2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)
isothiazol-3(2H)-one

[화학식 8]



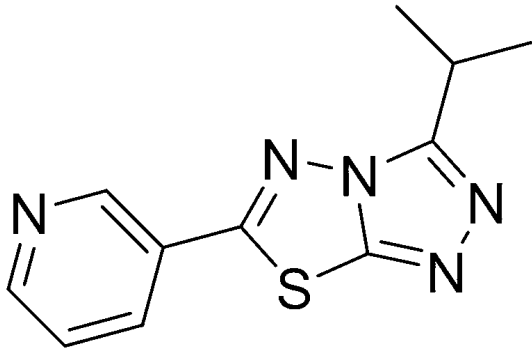
methyl 4-((3,5-dioxo-2-p-tolyl-1,2,4-
thiadiazolidin-4-yl)methyl)benzoate

[화학식 9]



2-phenyl-4-(2-(phenylsulfonyl)ethyl)-
1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione

[화학식 10]



3-isopropyl-6-(pyridin-3-yl)-[1,2,4]
triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 감마허피스바이러스에 항바이러스 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 감마허피스바이러스는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV) 또는 카포시육종 허피스바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, KSHV)인 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 전염성단핵구증, 버키파임프종, 코인두암종, B림프종양, 위암, 카포시육종 및 B림프종양으로 이루어진 그룹에서 선택되는 질환에 치료효과가 있는 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질은 1 ~ 100 μ M의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질을 유효성분으로 함유하여, 감마허피스바이러스를 포함한 모든 허피스바이러스에 의한 질환 내지 질병을 효율적으로 치료 또는 예방할 수 있는 항허피스바이러스용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인체 허피스바이러스 대부분은 국내 70-80% 이상의 높은 감염률을 나타내며, 한 번 감염되면 잠복감염을 형성하고, 숙주에서 잠복감염과 재활성을 반복하여 평생 동안 감염성 유지하는 대표적인 만성바이러스이다(표 1. 인체 만성바이러스의 특징 참조).

표 1

[0003]

인체허피스바이러스		종류	잠복감염	주요 질병
HHV-1	Herpes simplex virus-1	알파	신경계	단순포진, 뇌염
HHV-2	Herpes simplex virus-2	알파	신경계	생식기 포진 (STD), 뇌염
HHV-3	Varicells-Zoster virus	알파	신경계	수두, 대상포진
HHV-4	Epstein-Barr virus	감마	B림프계	전염성단핵구증, 버킷림프종, 코인두암종, B림프종양, 위암
HHV-5	Human cytomegalovirus	베타	림프계	전염성단핵구증, 선천기형, 망막염, 실명
HHV-6	Human herpesvirus-6	베타	T림프계	돌발진, 뇌수막염, 전염성 단핵구증, 전격성 간염, 비전형적 림프구증식증
HHV-7	Human herpesvirus-7	베타	T림프계	
HHV-8	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	감마	B림프계	카포시육종, B림프종양

[0004]

허피스바이러스들은 대표적인 기회감염 (opportunistic infection)으로서 면역기능 저하에 따른 재활성이나 선천감염을 통해 다양한 질병을 유발하고 환자의 면역상태에 따라 치명적인 감염 예후를 나타낸다. VZV(Varicells-Zoster virus)의 예방 생백신을 제외한 나머지 7종의 인체 허피스바이러스에 대해서는 예방 백신이나 치료 백신 모두 없는 실정이다.

[0005]

장기이식 (organ transplant) 및 조혈모세포 이식 (Hematopoietic Stem Cell Transplant)의 증가, 인체면역결핍바이러스 (HIV-1) 감염 등, 면역 저하에 따른 재활성 허피스바이러스 감염제어가 중요한 이슈가 되고 있다.

[0006]

또한, 허피스바이러스의 지속감염으로 인한 노년층 인구의 면역 저하(리뷰 논문: Koch et al, Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence, Ann N Y Acad Sci. 2007 1114:23-35)는 최고 속으로 고령화 사회에 진입하고 있는 우리나라 실정에서 중요한 보건 사회적 부담으로 작용할 것이다.

[0007]

한편, 허피스바이러스 가운데 감마허피스바이러스는 림프세포에 잠복 감염되어 종양을 일으킬 수 있으며, 상피세포나 섬유세포에서는 용해성 감염(lytic infection)을 일으키는 것으로 알려져 있다. 감마허피스바이러스에는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, 이하, 'EBV'라고 함)와 카포시육종 허피스바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, 이하, 'KSHV'라고 함)가 있다.

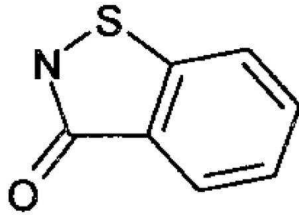
[0008]

통상 허피스바이러스는 높은 감염률을 특징으로 하는데, 특히 EBV의 경우 우리나라를 포함한 전세계 인구의 90% 이상이 혈청 양성반응을 나타낸다. EBV는 잠복감염에 의한 만성 감염시 코인두암종(nasopharyngeal carcinoma, NPC), 위암종(gastric carcinoma, GC), 버킷림프종 (Burkitt's lymphoma BL), 이식 후 B 세포 림프종(post-transplant B cell lymphomas, PTBL), 및 호지킨림프종(Hodgkin's disease, HD) 등 다종의 종양들의 형성과 깊은 연관성이 있다 (Roizman, 2007).

- [0009] KSHV는 가장 최근(1994년)에 발견된 인체 감염 허피스바이러스로서, 카포시 육종 (Kaposi's sarcoma, KS)과, B 세포 림프종의 일종인 원발성 삼출성 림프종(primary effusion lymphoma: PEL)이나 다중심성 캐슬만병 (multicentric Castleman's disease)의 원인 바이러스이다 (Alkan et al, 1997; Huang et al, 1995; Liberman et al, 1990; Moore et al, 1994).
- [0010] 존재하는 기존 항허피스바이러스제제는 대부분 바이러스 DNA 중합효소 (DNA pol)을 타겟으로 개발되었다. 그 중, 아실클로버(acyclovir) 및 그 유도체는 허피스바이러스의 티미딘 키나아제(thymidine kinase, 이하, 'TK'라고 함)에 의해서 특이적으로 인산화된 후 DNA pol에 의해 복제되는 바이러스 게놈으로 끼어들어 DNA 조기 종결 (premature termination)을 유도하는 약물로, 개발 후 지난 40여 년 동안 가장 많이 사용되었다. 이 외에 피로인산 유사체(pyrophosphate analogue)와 같은 포스카르네트(forscarnet) 등의 약물이 상용되고 있다.
- [0011] 이들은 알파-허피스바이러스의 치료에는 유효한 반면, 베타나 감마허피스바이러스의 초기감염증 (예: 전염성 단핵구증) 또는 재활성 감염에는 그 임상적인 역가가 제한적이다. 특히, 감마허피스바이러스의 제어에 유용하게 사용될 수 있는 항바이러스제는 존재하지 않아 주로 스테로이드 계열의 약물을 통한 대증요법에 의존하고 있는 실정이다.
- [0012] 또한, 최근 장기이식 및 조혈모세포이식, HIV 감염으로 인한 면역결핍환자의 경우 약물의 독성이 심하게 나타나고, 더 중요하게는 이들 환자에서 약물내성의 돌연변이 출현이 증가하고 있다 (Danve-Szatanek C et al. *Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up*. J Clin Microbiol. 2004 42(1):242-9.; Limaye AP et al. *Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants*. Lancet 2000; 356:645-649; Marfori JE et al. *Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients*. J Clin Virol 2007; 38:120-125).
- [0013] 대부분의 약물내성 돌연변이는 TK나 바이러스 DNA pol에 대한 돌연변이로서, 새로운 타겟이나 메커니즘을 가지는 항허피스바이러스제 신약 후보 물질 개발이 매우 시급한 실정이다.
- [0014] 이론적으로 바이러스복제의 모든 단계에 중요(essential)하게 작용하는 단백질은 항바이러스제의 타겟이 될 수 있다. 따라서, 바이러스 증식의 가장 핵심적인 단계인 바이러스 게놈 복제에 작용하는 DNA pol외에도 헬리케이스-프리메이즈 복합체 (helicase-primase complex) 및 바이러스 디엔에이즈(viral DNase)인 알카라인 엑소뉴클리에이즈(alkaline exo-nuclease) 등의 경우 매우 중요한 잠재적 타겟으로 주목받았다.
- [0015] HSV의 바이러스 게놈 복제에 필수적인 헬리케이스-프리메이즈 복합체 (helicase-primase complex)를 새로운 타겟으로 하는 길항제가 보고 (Koch et al., 2007) 되었으나, 헬리케이스-프리메이즈 길항제의 경우 상용화되기도 전에 세포배양 시스템에서 single amino-acid mutation을 가진 약물내성 돌연변이 바이러스가 보고된 바 있어 새로운 메커니즘의 항허피스제의 개발이 필요하다 (Danve-Szatanek C et al., 2004).
- [0016] 바이러스 디엔에이즈(viral DNase)인 알카라인 엑소뉴클리에이즈(alkaline exo-nuclease)와 관련하여, HSV-1 AE^{null} 바이러스는 DNA 복제와 패키징, 바이러스 출아에 문제가 있어서 감염성이 급격히 저하되는 표현형이 나타났다 (Danve-Szatanek C et al., 2004; Limaye AP et al., 2000).
- [0017] 최근, 본 발명자들과 다른 연구진들의 바이러스 유전체 수준에서의 functional mapping 결과에 의하면 베타와 감마-허피스바이러스에서도 alkaline exonuclease의 발현이 저해된 돌연변이바이러스는 그 증식이 억제되는 essential gene으로서의 표현형을 나타냄 (Danve-Szatanek C et al., 2004; Limaye AP et al., 2000).
- [0018] Alkaline exonucleases의 존재는 허피스바이러스와 baculovirus (곤충 바이러스)에서만 보고된 바 있으며, 숙주의 exonucleases와는 달리 높은 염기 pH에서 최적의 exonuclease 활성을 나타내는 DNase로 endonuclease 활성은 낮은 것으로 알려져 있다 (Alkaline exonucleases 유사 계열의 상동성을 나타낸 도 1 참조)
- [0019] 본 발명의 배경이 되는 기술로는 허피스바이러스의 alkaline exonuclease을 타겟으로 하는 억제제로 1,2-

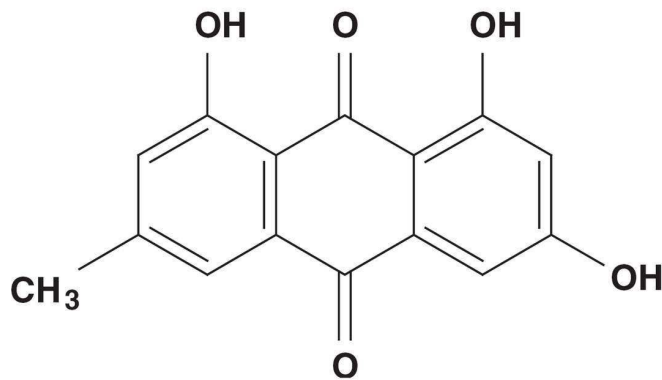
Benzisothiazolin-3-one (BIT, 화학식 1, 화합물 1)와 Emodin(화학식 2, 화합물 2)이 발굴된 바 있다 (비특허 문헌 1 Bronstein and Weber, 2001; 비특허문헌 2 Hsiang and Ho, 2008; 특허문헌 3).

화학식 1



1,2-Benzisothiazolin-3-one (BIT)

화학식 2



Emodin

그러나, 베타나 감마허피스바이러스의 알카라인 엑소뉴클리에이즈의 경우, 아직까지 항바이러스제의 직접적인 타겟으로서 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) US 5,411,977 A 1995.05.02.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공보 제10-0837785호(2008.06.13.)

(특허문헌 0003) US 4,670,265 1987.06.02.

비특허문헌

(비특허문헌 0001) Bronstein and Weber, A Colorimetric Assay for High-Throughput Screening of Inhibitors of Herpes Simplex Virus Type 1 Alkaline Nuclease, Analytical Biochemistry 293, 239-245, 2001.5.17.

(비특허문헌 0002) Hsiang and Ho, Emodin is a novel alkaline nuclease inhibitor that suppresses herpes simplex virus type 1 yields in cell cultures, British Journal of Pharmacology, 2008

발명의 내용

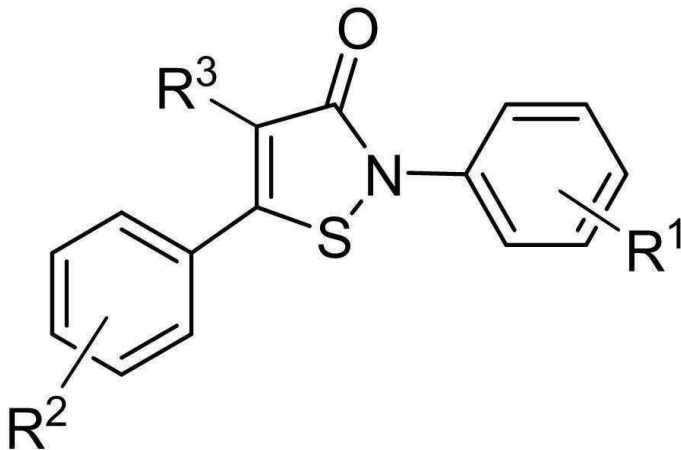
해결하려는 과제

- [0025] 본 발명자들은 신규 항히피스제 타겟으로서 알파, 베타, 감마의 모든 히피스바이러스에 존재하고 바이러스 DNA 복제에 중요하게 관여하는 히피스바이러스 alkaline exnuclease (AE)가 알파, 베타, 감마 히피스바이러스에 대해 공히 작용할 수 있는 항바이러스제의 중요한 신규 타겟으로 작용할 가능성을 제시하고, AE 효소 활성 어세이를 구축하고 AE 억제제를 chemical library를 대상으로 스크리닝하여 AE 억제물질을 발굴하였다.
- [0026] 따라서, 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명은 약물독성 및 약물내성이 없는 새로운 타겟인 히피스바이러스 엑소뉴클리에이즈의 활성 억제 물질을 유효성분으로 함유하는 항히피스바이러스용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0027] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

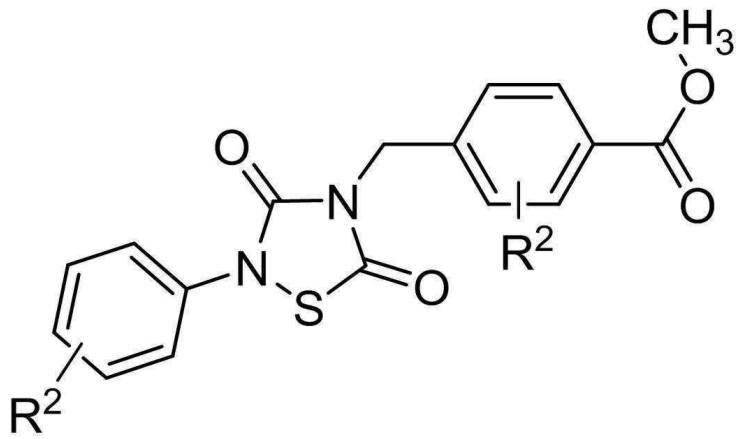
- [0028] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 3, 4, 5, 또는 6으로 각각 표시되는 히피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항히피스바이러스용 약학적 조성물을 제공한다.

화학식 3



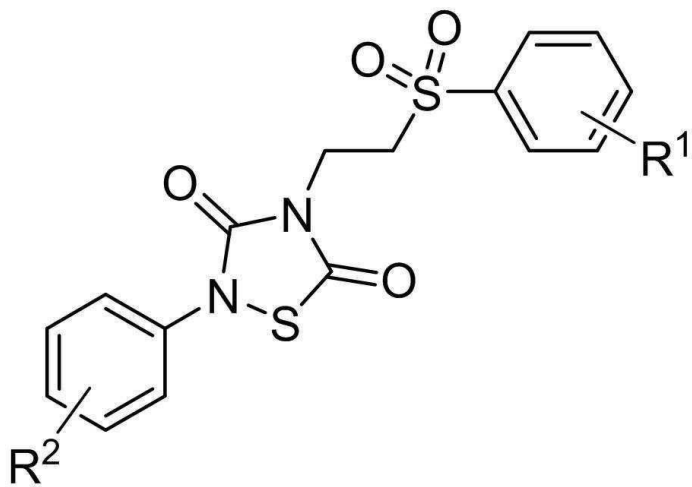
[0029]

화학식 4



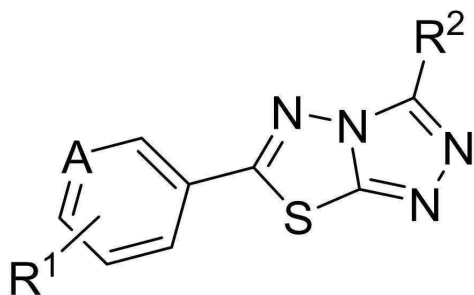
[0030]

화학식 5



[0031]

화학식 6



[0032]

[0033] [상기 화학식 3, 4, 5 또는 6에서,

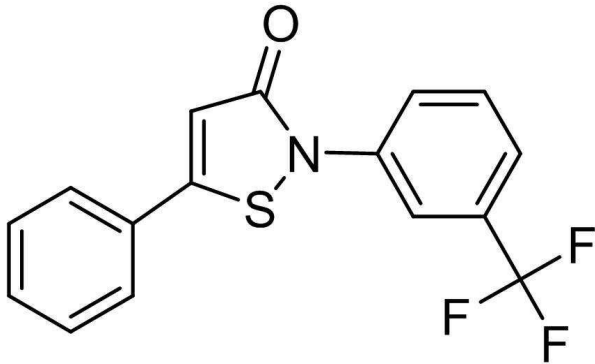
[0034] A는 C, N이며;

[0035] R1, R2 및 R3는 서로 독립적으로 수소, 직쇄 또는 분쇄의 포화 또는 불포화 (C1 - C4)알킬, (C1 - C4)알콕시,

할라이드, -OH, CF₃, 에틸렌(CH₂CH₂), NO₂, CN, (C1 - C4)알콕시카보닐(C1 - C4)알킬, 페닐, 페닐(C1 - C4)알킬 또는 페닐카보닐메틸이며; 단 R1, R2 및 R3에서 알킬, 페닐 또는 페닐알킬은 (C1 - C7)알킬, (C1 - C7)알콕시, (C1 - C7)알콕시카보닐, 할로젠, 니트로, 히드록시, 카복실산, 피리딜로 더 치환될 수 있다.]

[0036] 본 발명의 구체적인 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 7 ~ 10으로 각각 표시되는 화합물 3 ~ 화합물 6에서 선택되는 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물을 제공한다.

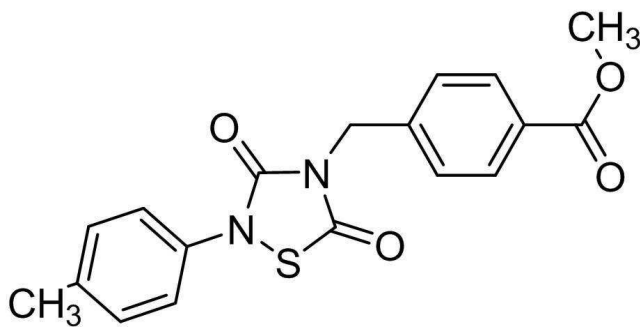
화학식 7



5-phenyl-2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)
isothiazol-3(2H)-one

[0037]

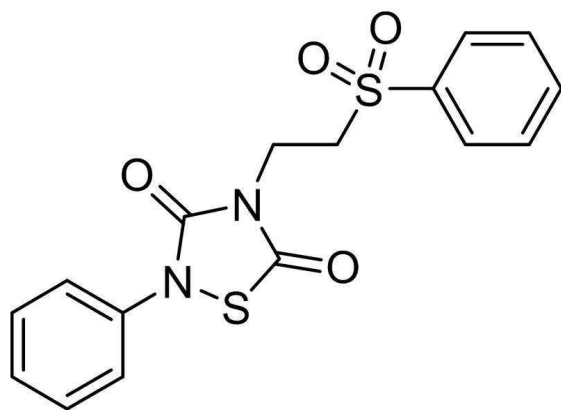
화학식 8



methyl 4-((3,5-dioxo-2-p-tolyl-1,2,4-
thiadiazolidin-4-yl)methyl)benzoate

[0038]

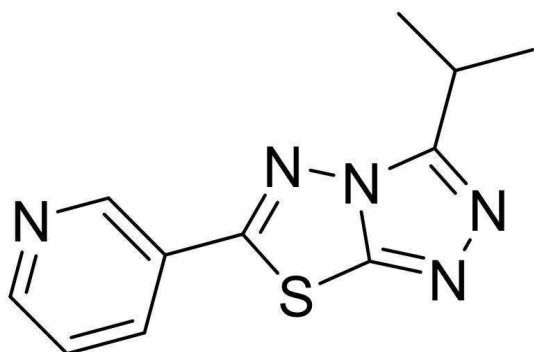
화학식 9



2-phenyl-4-(2-(phenylsulfonyl)ethyl)-
1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione

[0039]

화학식 10



3-isopropyl-6-(pyridin-3-yl)-[1,2,4]
triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole

[0040]

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 HSV-1, HSV-2, VZV의 알파헤르페스바이러스와 HCMV와 같은 베타헤르페스바이러스 등과 같은 헤르페스바이러스의 감염치료에 유용하다. 바람직하게 특별한 항바이러스제가 존재하지 않은 감마헤르페스바이러스에 유용하고 더욱 바람직하게는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV) 또는 카포시육종 헤르페스 바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, KSHV)에 유용하다.

[0042] 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명에 의한 조성물은 전염성단핵구증, 버킷림프종, 코인두암종, B림프종양, 위암, 카포시육종 및 B림프종양으로 이루어진 그룹에서 선택되는 질환에 치료효과가 있는 것을 특징으로 한다.

[0043] 본 발명에 사용된 화학식 7로 표시되는 5-페닐-2-(3-(트리플루오로메틸)페닐)이소티아졸-3(2H)-원 (5-phenyl-2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)isothiazol-3(2H)-one)은 상업적으로 정제된 화합물을 구입하거나 본 발명이 속하는 분야에서 알려진 공지의 방법을 이용하여 합성하여 사용할 수도 있다(US 5411977A 19950502 및 Bioorganic & Medicinal Chemistry(1996), 4(6), 851-858. 참조). 화합물 3은 혈전증 치료 효능에 대해 알려진 바는 있으나, 항바이러스 활성에 대해 알려진 바는 없다.

- [0044] 본 발명에 사용된 화학식 8로 표시되는 메틸 4-((3,5-디옥소-2-p-톨릴-1,2,4-티아다리아졸리딘-4-일)메틸)벤조에이트 (methyl 4-((3,5-dioxo-2-p-tolyl-1,2,4-thiadiazolidin-4-yl)methyl)benzoate; 화합물 4) 및 화학식 9로 표시되는 2-페닐-4-(2-(페닐설폰닐)에틸)-1,2,4-티아다리아졸리딘-3,5-다이온 (2-phenyl-4-(2-(phenylsulfonyl)ethyl)-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione; 화합물 5)은 상업적으로 정제된 화합물을 구입하거나 본 발명이 속하는 분야에서 알려진 공지의 방법을 이용하여 합성하여 사용할 수도 있다(대한민국 특허공보 제10-0837785호(2008.06.13.) 참조). 화합물 4 및 5는 염증관련 질환의 치료 효능에 대해 알려진 바는 있으나, 항바이러스 활성에 대해 알려진 바는 없다.
- [0045] 본 발명에 사용된 화학식 10으로 표시되는 3-이소프로필-6-(피리딘-3-일)-[1,2,4]트리아조로[3,4-b][1,3,4]티아다리아졸 (3-isopropyl-6-(pyridin-3-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole; 화합물 6)은 상업적으로 정제된 화합물을 구입하거나(ChemDiv, Inc.), 본 발명이 속하는 분야에서 알려진 공지의 방법을 이용하여 합성하여 사용할 수도 있다.
- [0046] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 화합물 3 ~ 화합물 6을 포함하는 본 발명에 의한 허피스바이러스 엑소뉴클리에이즈 활성 억제 물질은 1 ~ 100 μ M 농도로 함유되어 있는 것이 바람직하다. 상기 범위 내에서는 독성 없이 항바이러스 효능을 효과적으로 발휘할 수 있다.
- [0047] 상기의 화학식들의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식의 화합물에 존재할 수 있는 히드록시기의 염을 포함하며, 히드록시기의 염으로는 리튬, 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속류염, 마그네슘, 칼슘 등의 알칼리 토금속류염을 들 수 있다. 바람직하게는 생리학적으로 허용 가능한 나트륨, 칼륨, 칼슘과의 염 등을 들 수 있으며, 이들 염들은 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명의 화합물 3 ~ 화합물 6은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 무독성염 및 용매화물로 제조될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수산화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [0049] 본 발명의 화합물 3 ~ 화합물 6의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 화합물 3 ~ 화합물 6에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 조성물 총중량에 대하여 상기 화합물 3 ~ 화합물 6을 0.0001 내지 90 중량%로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 주사제, 크림, 젤, 패취, 분무제 또는 연고제 제형 제형을 가질 수 있다. 본 발명의 화합물 3 ~ 화합물 6을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 화합물 3 ~ 화합물 6을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 제형 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0052] 또한, 상기 화합물 3 ~ 화합물 6을 유효성분으로 함유하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순

한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 화합물은 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0055] 감마히피스바이러스 감염의 경우, 보통 숙주의 lymphocytes에서 평생감염을 일으키며 고령이나 장기이식 등으로 인한 면역저하 환자의 경우 감마히피스바이러스의 재활성화로 인한 문제가 야기될 수 있다. 감마히피스바이러스의 항바이러스 제제의 개발은 이런 질병들을 치료할 뿐 아니라 예방하는 차원에서도 임상적으로 중요하다. 본 발명에 의해 확보한 감마히피스바이러스의 AE 억제제들은 상술한 바와 같이 바이러스 복제에 중요한 핵심 인자인 alkaline exonuclease를 억제하기 때문에 항바이러스 효능을 가진다.

발명의 효과

[0056] 상술한 바와 같이 구성된 본 발명은, 새로운 타겟인 히피스바이러스 엑소뉴클리에이즈의 활성 억제 물질을 유효성분으로 함유하는 항히피스바이러스용 약학적 조성물을 제공하여 약물독성 및 약물내성 없이 감마히피스바이러스를 포함한 모든 히피스바이러스에 의해 유발되는 다양한 질환 또는 질병을 매우 효율적으로 치료 또는 예방할 수 있다.

[0057] 특히 본 발명은 히피스바이러스의 제어에 유용하게 사용될 수 있는 항바이러스제가 존재하지 않은 감마히피스바이러스의 치료 또는 예방에 매우 유용하다.

[0058] 나아가 본 발명에 의해 확보한 AE 억제제들은 종래 알려진 AE 억제제인 BIT를 기준물질로 하여 효능이 더 뛰어난 것으로 나타나 감마히피스바이러스의 AE 억제제 또한 다른 히피스바이러스의 AE를 억제할 가능성을 충분히 가지고 있는바, 범히피스바이러스 제재로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0059] 또한, 기존의 항히피스바이러스제제들이 모두 DNA polymerase를 타겟으로 한다는 점을 고려할 때, 신규 타겟인 AE를 억제하는 본 발명에 의한 AE 억제제를 병용투여하였을 경우 내성바이러스 발현 억제 및 항바이러스 효능의 증가를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 히피스바이러스의 AEs와 람다 엑소뉴클리에이즈 패밀리의 단백질의 unrooted phylogenetic tree를 나타낸 도면이다. 히피스와 Baculovirus의 AE 및 박테리아 바이러스인 파아지의 람다 엑소뉴클리에이즈의 진화적 거리를 나타낸다.

도 2는 히피스바이러스 alkaline exonuclease의 alignment을 나타낸 도면이다. HSV1 (알파), EBV, HHV-8, MHV-68 (감마) AE에서 나타나는 유사성은 회색블록으로 표시하였고, EBV의 경우는 BGLF5, KSHV (HHV-8)의 경우는 host shutoff protein (SOX)로 명명하였으며(Rowe et al, PNAS, 2007), 보존된 7개 부위의 모티프가 존재하는 것으로 나타났다.

도 3은 Mu transposon이 삽입된 ORF37 Null과 triple stop codon이 삽입된 ORF37 stop 바이러스제작 과정을 보

인 모식도이다.

도 4는 MHV-68 ORF37 결손 바이러스 BAC DNA의 DNA fragment를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 MHV-68 ORF37 결손 바이러스 증식에서 viral genome copy 수를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 MHV-68 ORF37 결손 바이러스 증식에서 viral 단백질의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 MHV-68 ORF37 결손 바이러스 증식에서의 virion production을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 재조합 alkaline exonuclease 단백질의 정제 및 정량한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 Exonuclease activity 측정을 위한 electrophoresis-based degradation assay의 개념도를 나타내는 도면이다.

도 10은 Electrophoresis-based degradation assay와 MHV-68 ORF37 wild type 정제 단백질의 DNase 활성을 나타낸 도면이다.

도 11은 DNA-Methyl green substrate를 이용한 exonuclease activity assay의 개념도를 나타낸 도면이다.

도 12는 DNA methyl green assay를 이용한 감마히피스바이러스 AE 단백질의 alkaline exonuclease 효소 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 BIT의 alkaline exonuclease 억제능을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 14a ~ 도 16은 DNA methyl green assay를 이용한 AE inhibitor 후보 화합물 스크리닝 결과를 나타낸 도면이다.

도 17은 본 발명에 의한 스크리닝을 통해 얻어진 23개의 1차 후보물질과 2차 후보물질 리스트를 나타내는 도면이다.

도 18a 및 도 18b는 1차 후보물질 (위, 가운데), 2차 후보물질 (아래) 중 8개의 화합물이 AE 효소 기능을 억제함을 재확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 19a ~ 19c는 본 발명에 의한 후보물질들의 농도별 억제율 확인과 BIT와의 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 20은 본 발명에 의한 8개의 화합물의 DNase I inhibition을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 21은 본 발명에 의한 히피스바이러스 alkaline exonuclease 활성 억제제의 구조 정보를 보인 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0062] 실시예 1. 히피스바이러스 알카라인 엑소뉴클리에이즈 유사성 조사

[0063] 히피스바이러스 알카라인 엑소뉴클리에이즈 유사성 조사해 본 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 알파, 베타, 감마의 같은 subfamily간에는 60-80% 정도의 유사성을, 다른 subfamily간에도 40%정도의 높은 유사성을 나타내었다. HSV-1의 AE와 HCMV의 AE는 서로 기능적으로 교환이 가능할 정도로 효소활성의 주요 잔기들은 보존되어 있다(Danve-Szatanek C et al., 2004). 본 발명에서는 마우스 감마히피스바이러스 68 (MHV-68)의 알카라인 엑소뉴클리에이즈(alkaline exonuclease) 단백을 이용하여 스크리닝을 진행하였다. 도 2에서 HSV1 (알파), EBV, HHV-8, MHV-68 (감마) AE에서 나타나는 유사성은 회색블록으로 표시하였고, EBV의 경우는 BGLF5, KSHV (HHV-8)의 경우는 host shutoff protein (SOX)로 명명하였다 (Rowe et al, PNAS, 2007). 보존된 7개 부위의 모티프가 존재하는 것으로 나타났다.

[0064] 실시예 2. 히피스바이러스의 AE 발현 억제가 바이러스 증식에 미치는 영향

[0065] 히피스바이러스의 alkaline exonuclease (AE) 발현/활성이 바이러스 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해, 감마히피스바이러스의 AE를 암호화하는 ORF37 결손바이러스를 제작하였고, 제작한 바이러스 DNA를 세포에 트랜스펙

선 시켰을 때의 바이러스 복제 및 증식에 관한 연구를 수행하였다.

- [0066] MHV-68 ORF37 결손 바이러스와 Marker Rescue 바이러스의 BACmid 제작 및 바이러스 reconstitution은 다음과 같이 수행하였다.
- [0067] RED recombination technique을 이용한 triple stop codon이 삽입된 ORF37 stop 바이러스 제작을 하였다. 감마 허피스바이러스 유전체를 포함하는 BAC plasmid를 이용하여 triple stop codon을 삽입한 ORF37 stop 바이러스를 RED recombination technique을 이용하여 제작하였다. 또한 ORF37 stop 바이러스를 주형으로 하여 revertant인 marker rescue를 제작하였고, triple stop codon에 *EcoRI*과 *PacI* enzyme site를 넣어 triple stop codon의 삽입여부를 enzyme digestion으로 확인하였다 (도 3).
- [0068] MHV-68 ORF37 Stop/MR/Null 바이러스의 BAC DNA 확인은, 우선 ORF37 결손 바이러스 BAC DNA를 *EcoRI*과 *PacI*으로 digestion한 후, 0.7% agarose gel에 전기영동하여 DNA fragment로 genome arrangement를 확인하였다. 이어서 ORF37의 위치를 확인하기 위하여 ORF37 부위를 probe로 하여 southern blotting을 수행하여 확인하였다(도 4).
- [0069] MHV-68 ORF37 Stop/MR 바이러스의 reconstitution은 우선 ORF37 Stop/MR 바이러스 BAC DNA를 BHK21 세포주에 transfection 시킨 후, cytopathic effect가 보이는 3~5일째에 상등액을 수거하였다. MR 바이러스는 증식하여 세포병변현상 (CPE) 이 관찰되었으나 ORF37stop 바이러스는 ORF37null과 마찬가지로 실험기간 내 cytopathic effect가 전혀 관찰되지 않았다. ORF37null은 이전에 제작된 1.2 kb의 transposon이 ORF37부위에 삽입된 돌연변이 바이러스이다(Song *et al.* , 2005, *Identification of Viral Genes Essential for Replication of Murine Gammaherpesvirus 68 Using Signature-Tagged Mutagenesis*, Proc Nat Acad Sci USA, 102 (10), 3805-3810).
- [0070] MHV-68 ORF37 Stop/MR 바이러스 증식 분석에서는 ORF37 유전자가 바이러스 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여, BHK21 세포주에 ORF37 Stop, MR, Null 바이러스 BAC DNA를 각각 transfection하여 1일부터 3일까지의 상등액과 세포를 수거하여 바이러스 증식을 viral genome, protein expression, virion production assay로 분석하였다. 수거한 세포에서 gDNA를 추출하여 M1 primer로 real-time PCR을 수행하여 증식된 genome copy 수를 분석한 결과, ORF37 stop 바이러스의 경우, 증식이 MR에 비해 현저하게 저해되었고, null 바이러스는 stop 보다도 더 저해되었다(도 5).
- [0071] 또한 ORF45와 M9의 단백질 발현을 각각에 해당하는 항체를 사용하여 western blotting을 수행한 결과, stop과 null 바이러스의 증식에서 이 단백질의 발현을 저해된 것을 확인할 수 있었다. 이들 바이러스의 ORF37 단백질 발현을 알아보기 위해 ORF37 항체로 western blotting을 했으며, stop과 null 바이러스에서는 예상대로 바이러스 ORF37 단백질 발현이 사라졌다 (도 6).
- [0072] Plaque assay로 virion production를 확인한 결과, ORF37 stop과 null 바이러스는 감염성 바이러스가 전혀 증식되지 않았다 (도 7). 따라서 감마 허피스바이러스 증식에서 ORF37 유전자가 필수적이며 잠재적인 항바이러스 타겟일 가능성을 제시되었다. 이러한 결과는 HSV-1 (알파) AE 결손 바이러스에서 복제가 1,000배 이상 억제되는 것과 HCMV (베타) AE 결손에서 바이러스 증식이 일어나지 않는 현상과 일치한다.
- [0073] 상술한 바와 같이, ORF37이 결손된 바이러스는 DNA 복제는 어느 정도 일어나지만, 바이러스 유전자 발현의 현격한 결손과 잠재적으로는 복제된 DNA의 비정상적인 패키징으로 인해 감염성 바이러스를 전혀 생산하지 못하는 증식불능(replication-incompetent) 바이러스가 형성됨을 확인하였다. 이는 ORF37 즉 감마허피스바이러스의 AE는 바이러스 복제에 필수적인 유전자로서 이를 억제할 경우 항바이러스효과를 기대할 수 있다.
- [0074] **실시예 3. 허피스바이러스의 AE 정제 단백질 확보**
- [0075] 본 발명자들은 모든 허피스바이러스에서 잘 보존되어있는 alkaline exonuclease (AE) 중 마우스감마허피스바이러스 AE 단백을 아래와 같이 박테리아에서 발현, 정제, 분리하여 스크리닝에 사용하였다(도 8).
- [0076] Alkaline exonuclease 효소활성을 알아보기 위하여 electrophoresis-based degradation assay 수행하였다. 감마허피스바이러스의 AE를 encoding하는 ORF37 유전자를 Hig-tag이 있는 pET 벡터에 클로닝하여 Hig-tag column

을 사용하여 정제하였다.

[0077] 실시예 4. 허피스바이러스의 AE 활성 어세이 시스템 구축

[0078] Electrophoresis-based degradation assay를 이용한 alkaline exonuclease의 활성을 다음과 같이 검증하였다. 정제된 단백질을 *EcoRI*으로 linearize 시킨 pKS (200ng)과 degradation buffer (100 mM MgCl₂, 500 mM Tris pH9.0, 100 ug/ml BSA, 5 mM beta-mercaptoethanol)에 반응시킨 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다. 정제된 wild type 단백질의 DNase activity가 30분 동안의 반응에서 dose-dependency하게 나타났다 (도 9와 도 10).

[0079] DNA-methyl green degradation assay를 이용한 alkaline exonuclease의 활성을 다음과 같이 검증하였다. DNase activity를 DNA-methyl green degradation assay (96 well plate)로도 확인하였다. 30mM MgSO₄, 500mM Tris pH7.5 assay buffer에 AE 정제단백질을 용량 별로 처리하여 5분 동안 37도에서 반응시킨 후, DNA-methyl green substrate를 첨가하여 37도에서 반응시켰다. 3시간 후, 0.2M sodium citrate로 반응을 종료시키고 650 nm 흡광도로 측정하였다. 그 결과, 20ug의 ORF37 단백질을 처리하였을 때 흡광도가 용량 의존적으로 DNA substrate를 분해하여 A650값이 감소하는 것을 확인하였다(도 12).

[0080] 실시예 5. BIT 기준물질을 이용한 허피스바이러스의 AE 억제제 HTS 스크리닝 구축

[0081] DNA-methyl green degradation assay를 이용한 highthroughput screening (HTS) 어세이 시스템을 다음과 같이 구축하였다.

[0082] 본 DNA-methyl green degradation assay 시스템은 96 well plate로 시작하여 본 발명자들이 384 well format으로 최적화시킨 후 화합물 스크리닝에 활용하였다.

[0083] 알파 허피스바이러스인 HSV-1의 Alkaline exonuclease 기능을 억제하는 1,2-benzisothiazolin-3-one (BIT)를 DNA Methyl-green assay를 이용하여 확인한 결과, BIT가 정제된 MHV68 ORF37 단백질의 alkaline exonuclease 기능을 억제함을 확인하였다 (도 13). 본 결과는 또한 허피스바이러스 AE간의 기능적인 상동성이 존재함을 시사하는 것이다.

[0084] 실시예 6. AE 정제단백질을 이용한 alkaline exonuclease 억제제 후보물질 스크리닝

[0085] 정제된 AE 단백질을 이용하여 alkaline exonuclease 기능을 억제하는 화합물을 찾기 위해 384 well plate에서 DNA Methyl-green assay 실험을 이용하여 후보 물질을 스크리닝하였다. 320개의 화합물이 들어있는 384 well plate 13개의 4160개 화합물 (5 mM의 농도)이 MHV68 ORF37의 alkaline exonuclease 기능을 억제하는지 스크리닝하였다.

[0086] 이때, 화합물은 PIN Tool을 사용하여 MHV68 ORF37 단백질이 들어있는 384 well plate에 동일한 양이 들어가도록 하였다. 화합물이 MHV68 ORF37 단백질의 기능을 억제하는지는 같은 농도 (5 mM)의 BIT를 처리하여 확인하였다. 스크리닝 결과는 도 14a ~ 도 16에 정리되어 나타나 있다.

[0087] 그리하여 BIT보다 더 높은 억제 활성을 보이는 화합물을 1차 후보물질로 정리하였으며 BIT의 10%적게 억제하는 화합물을 2차 후보물질로 정리하였다. 그 결과 23개의 1차 후보물질과 27개의 2차 후보물질을 확인하였다 (도 17).

[0088] 실시예 7. 타겟 후보물질의 검증

[0089] 실시예6의 스크리닝에서 확보한 1차 후보물질과 2차 후보물질을 384 well plate에서 DNA Methyl-green assay를 이용하여 다시 확인을 진행하였다. 그리고 각 후보물질들을 MHV 68 ORF37 단백질을 억제하는 지를 재확인하였다 (도 18a 및 도 18b).

[0092] 또한 이렇게 찾아낸 허피스바이러스 alkaline exonuclease 타겟 후보물질이 숙주 단백질 DNase I 을 억제하지 않고 바이러스 타겟만을 억제하는지를 확인하기 위해 DNase I 0.02 μ g에 화합물을 처리하였다. 그 결과 8개의 후보물질이 DNase I 을 억제하지 않고 타겟 물질인 MHV68 ORF37 단백질만을 억제하는 것을 확인하였다 (도 20).

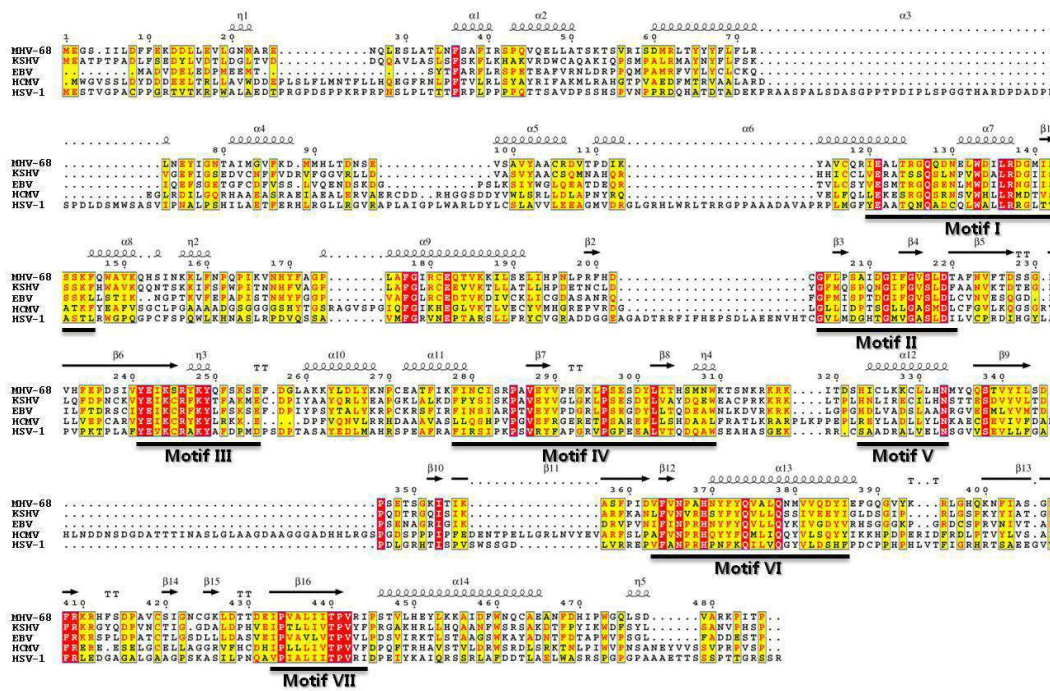
[0094] 상기 어세이를 통해 얻어진 허피스바이러스 alkaline exonuclease 활성 억제물질 4종의 화합물 3 ~ 6의 구조 정보는 도 21에 나타나 있다. 이는 구조를 알지못한 채 진행한 HTS 스크리닝을 통해 유사 골격을 공유하는 화합물들이 AE 효소 활성에 중요한 부위에 유사한 양식으로 결합하여 효소활성을 억제하는 것을 시사한다.

[0096] “ 이 특허는 2008-2011년 정부(교과부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2010-0020469). ”

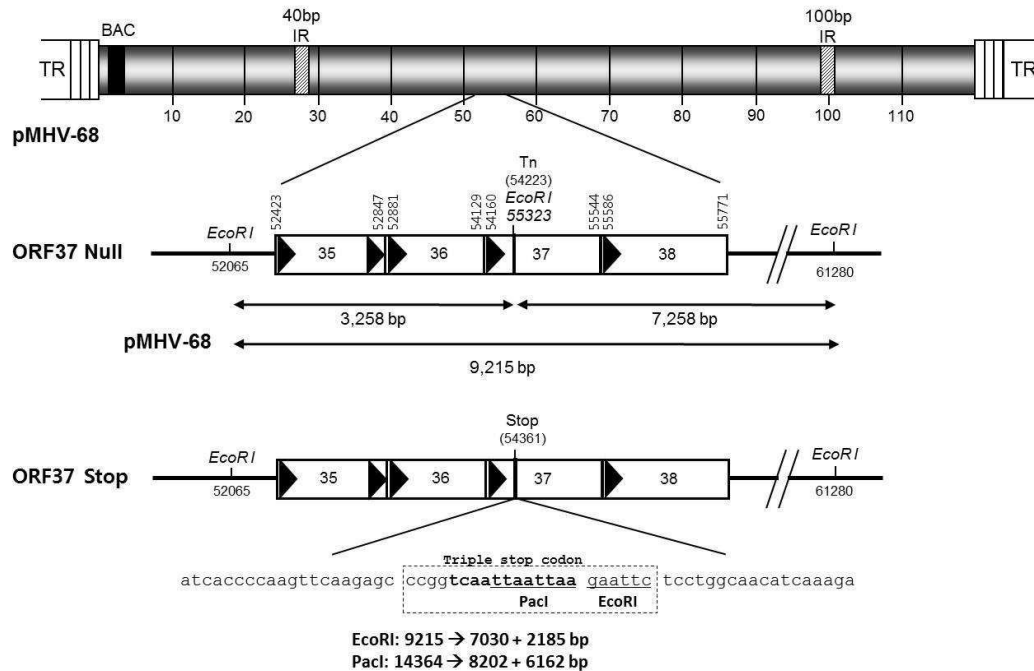
도면1



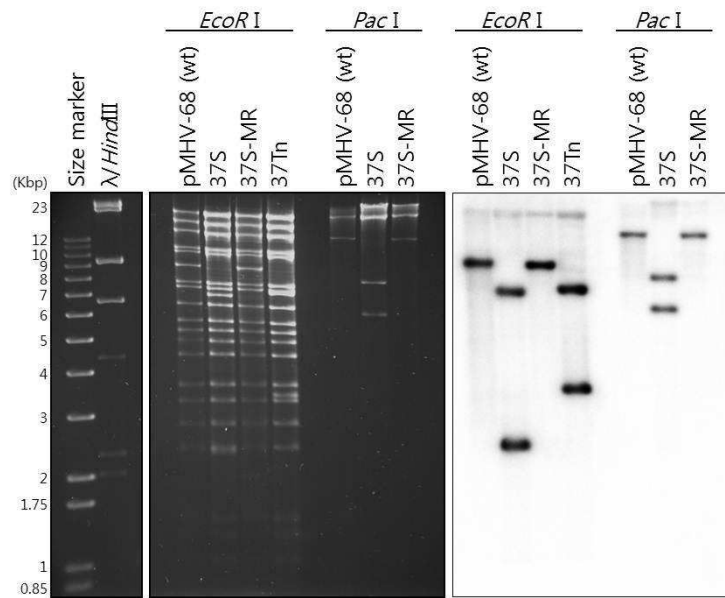
도면2



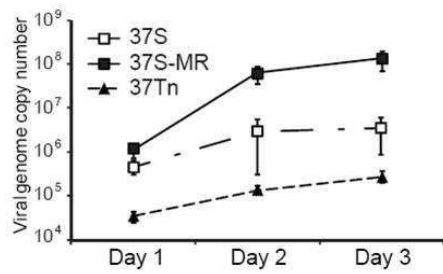
도면3



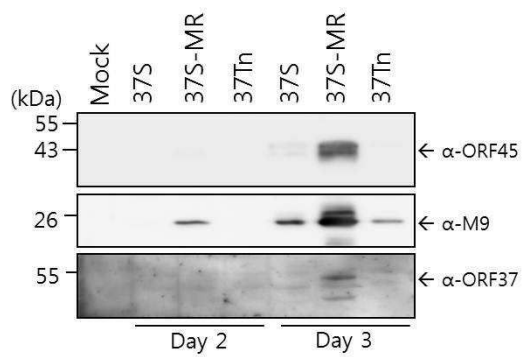
도면4



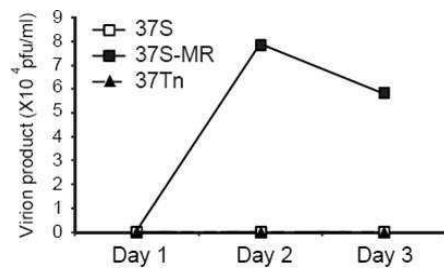
도면5



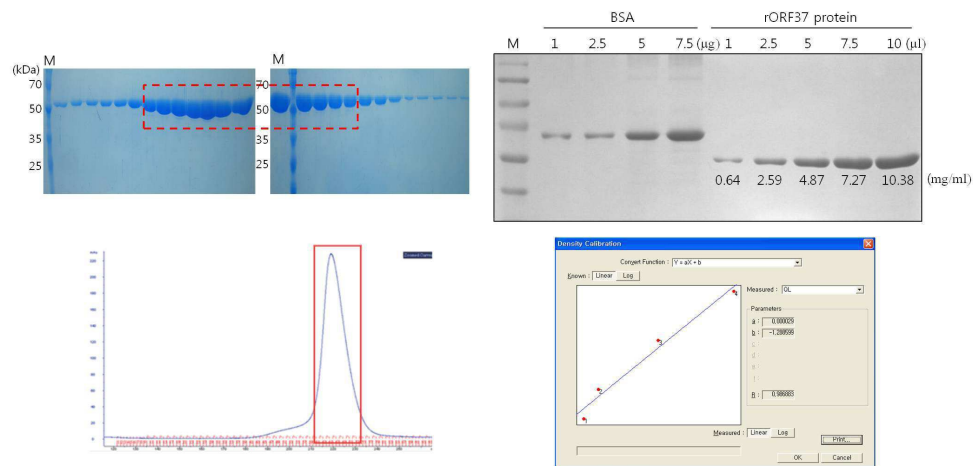
도면6



도면7

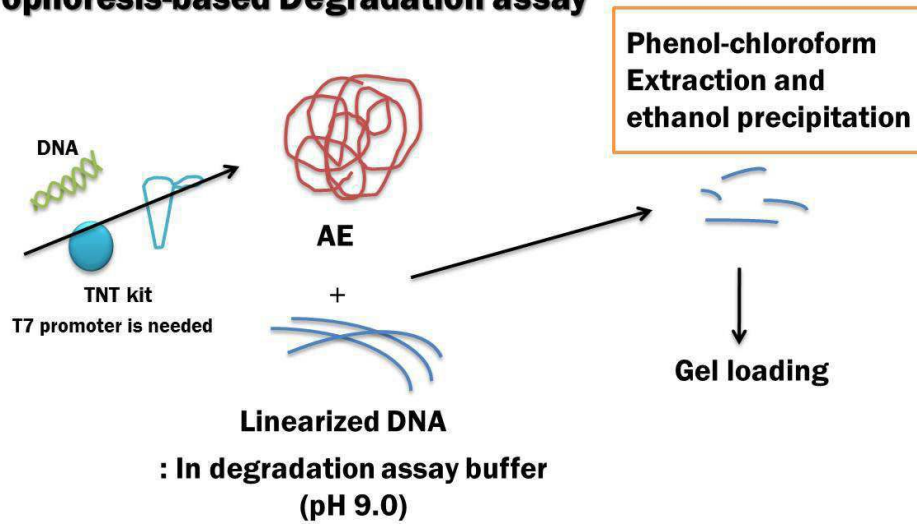


도면8

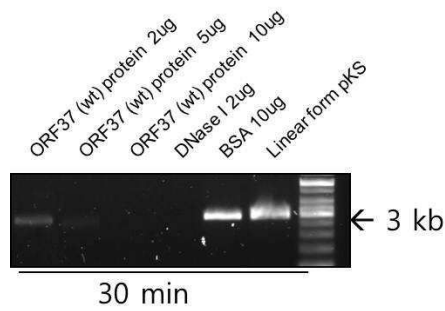


도면9

Electrophoresis-based Degradation assay



도면10



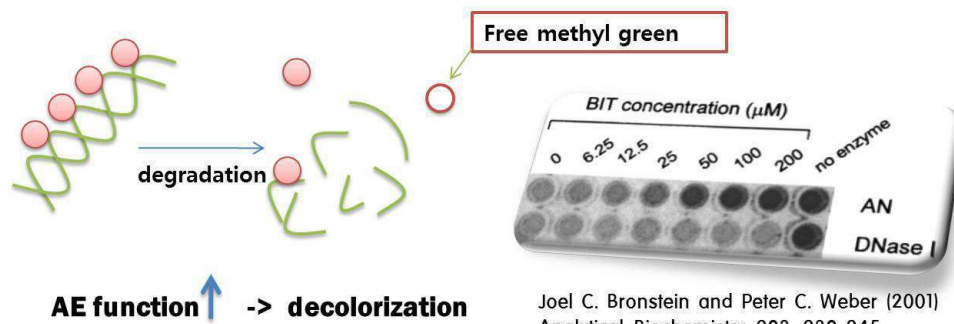
도면11

Degradation assay using DNA-methyl green substrate

Prepare the DNA-methyl green substrate & principles

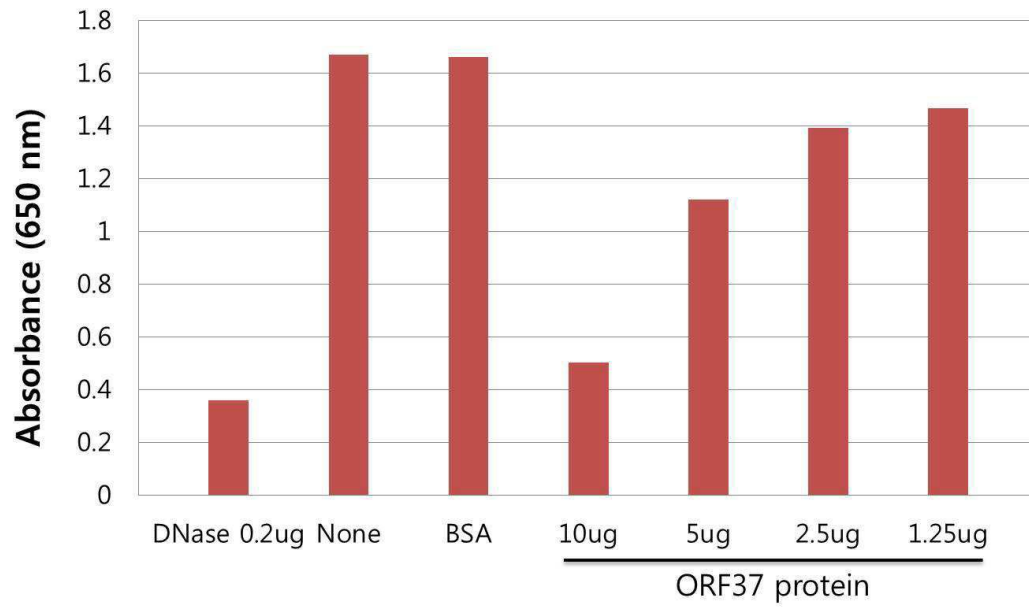
Salmon testes DNA + Solution of methyl green

: This assay is based on the enzymatic decolorization of DNA complexed with the dye methyl green

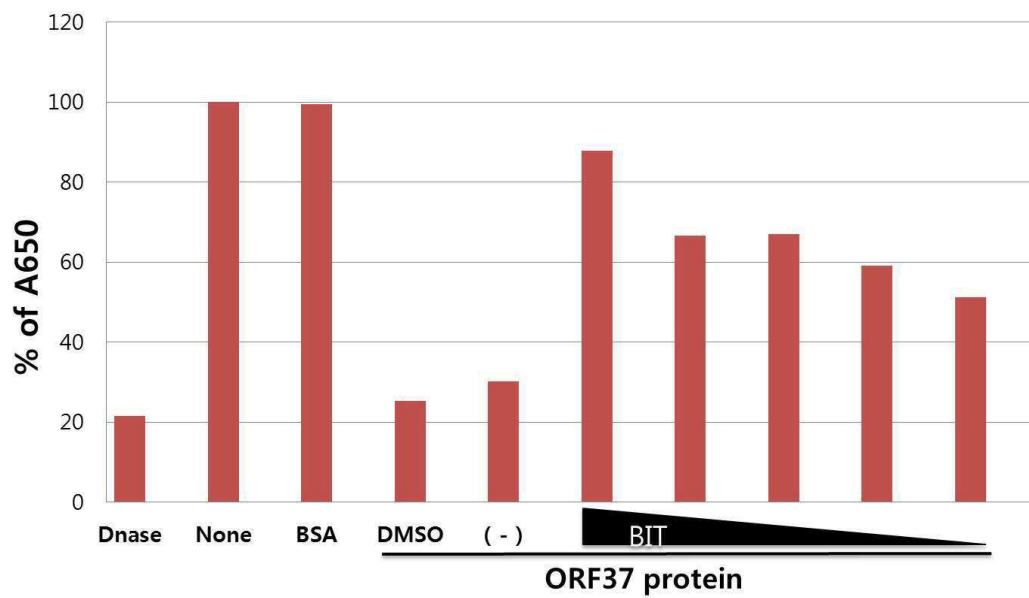


Joel C. Bronstein and Peter C. Weber (2001)
Analytical Biochemistry 293, 239-245

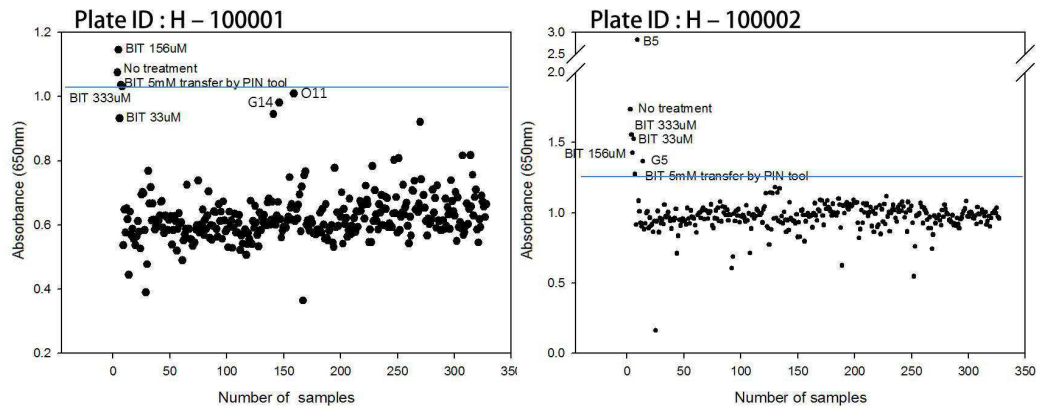
도면12



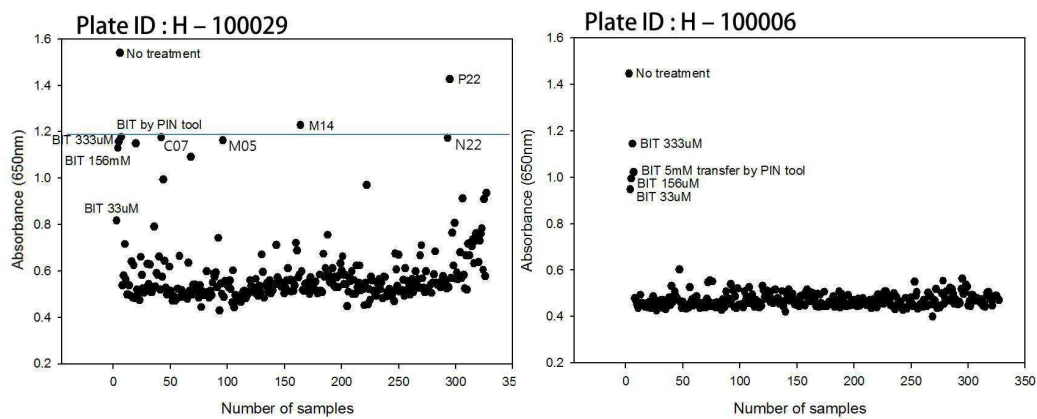
도면13



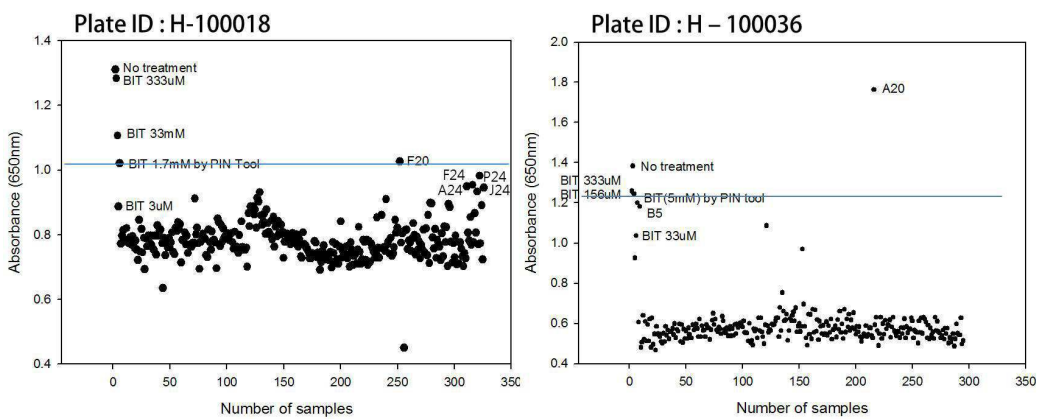
도면14a



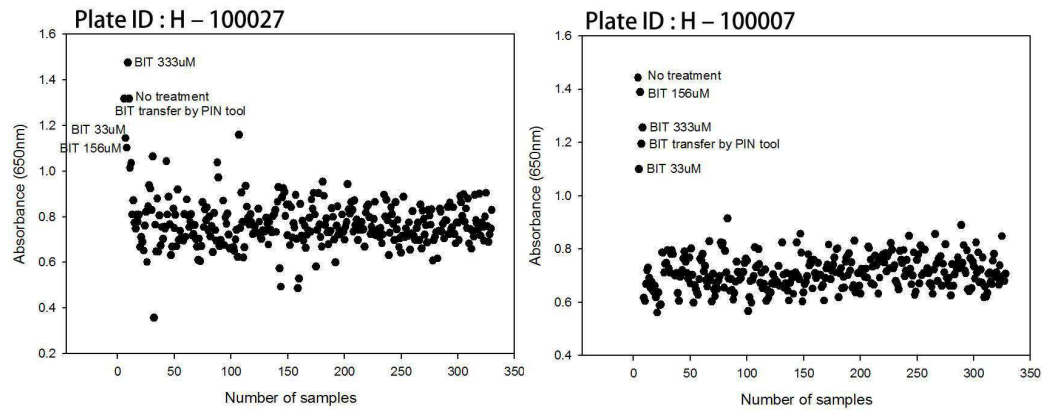
도면14b



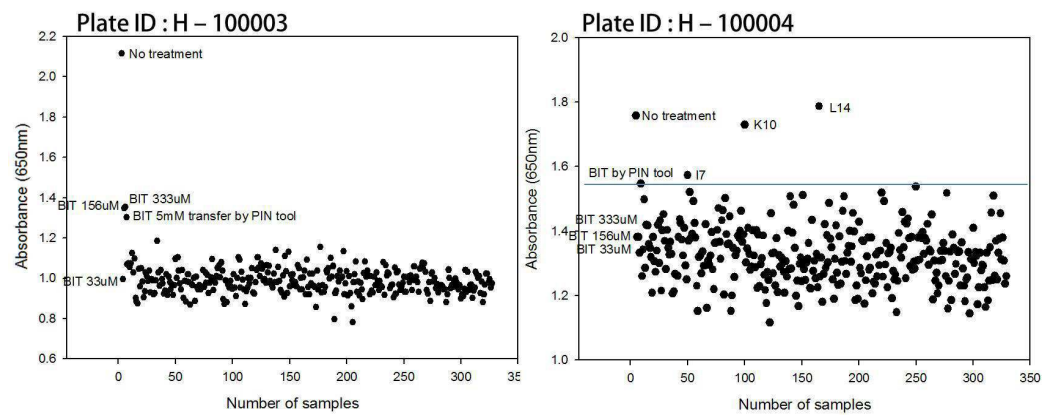
도면14c



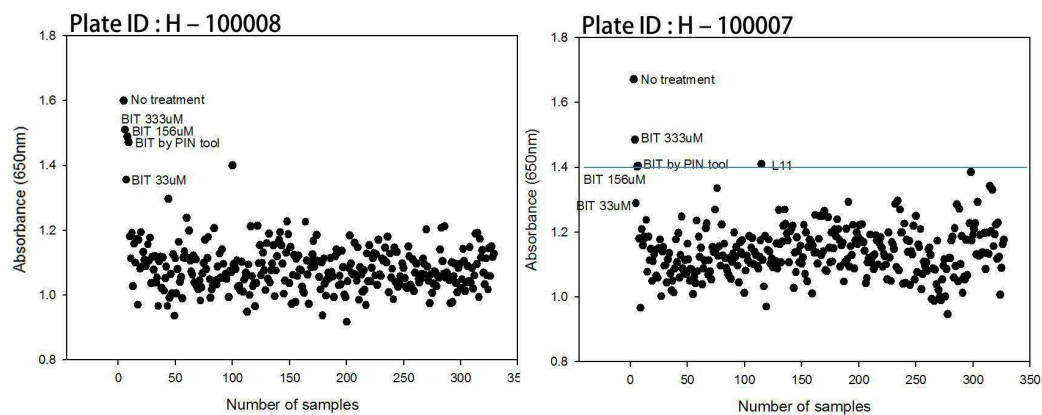
도면15a



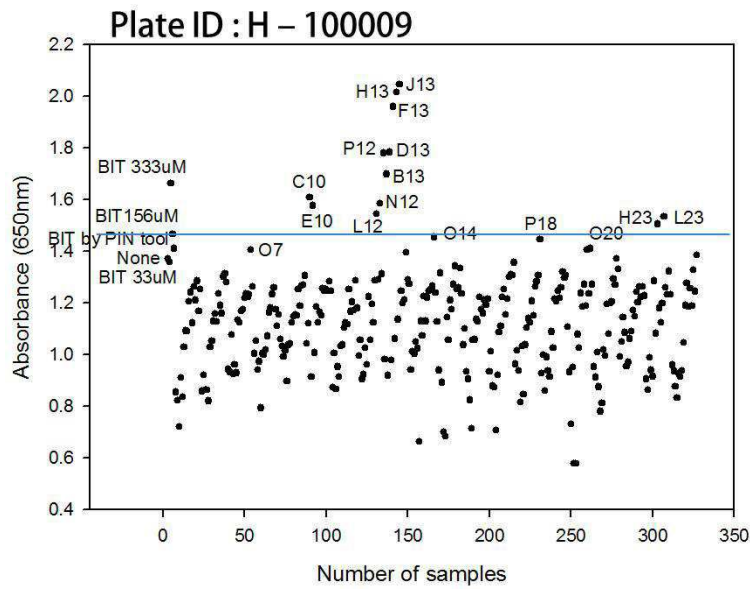
도면15b



도면15c



도면16

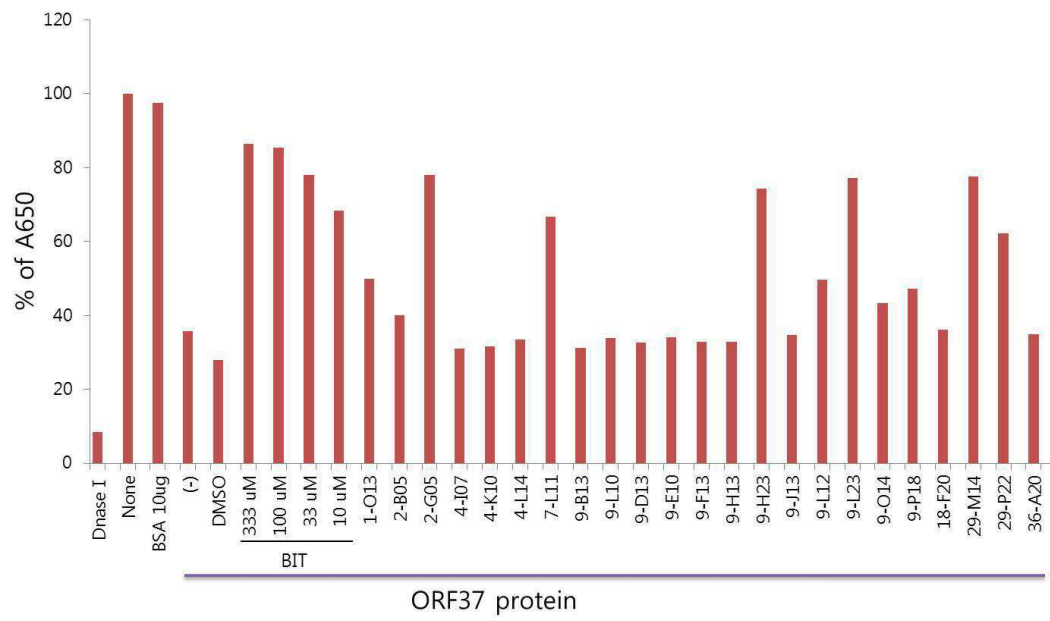


도면17

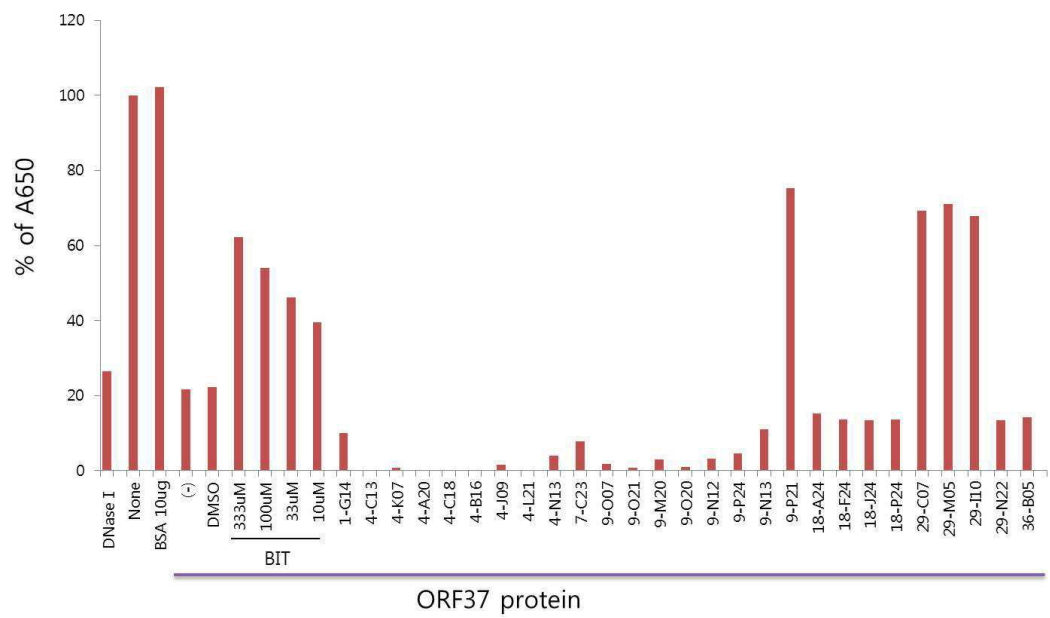
Candidate compound list

Primary		Secondary	
ID	Position	ID	Position
32103	H-000001-O13	35859	H-000001-G14
35680	H-000002-B05	33159	H-000004-A20
119108	H-000002-G05	30949	H-000004-B16
130855	H-000004-I07	33272	H-000004-C13
128792	H-000004-K10	30936	H-000004-C18
32968	H-000004-L14	166769	H-000004-J09
77023	H-000007-L11	130545	H-000004-K07
118192	H-000009-B13	167085	H-000004-L21
166255	H-000009-C10	166924	H-000004-N13
118939	H-000009-D13	28039	H-000007-C23
166286	H-000009-E10	25971	H-000009-M20
118959	H-000009-F13	53877	H-000009-N12
118996	H-000009-H13	118178	H-000009-N13
127721	H-000009-H23	22892	H-000009-O07
118210	H-000009-J13	22832	H-000009-O20
54306	H-000009-L12	96074	H-000009-O21
128859	H-000009-L23	127692	H-000009-P21
168819	H-000009-O14	125998	H-000009-P24
128037	H-000009-P18	103978	H-000018-A24
19541	H-000018-F20	57437	H-000018-F24
162235	H-000029-M14	35236	H-000018-J24
140344	H-000029-P22	26906	H-000018-P24
137980	H-000036-A20	161917	H-000029-C07
		161916	H-000029-I10
		161914	H-000029-M05
		140286	H-000029-N22
		177599	H-000036-B05

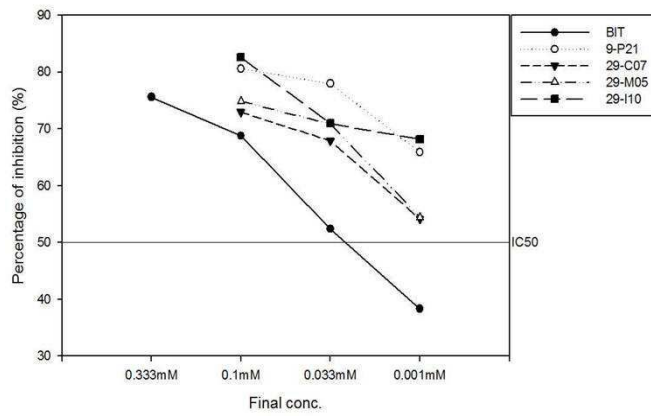
도면18a



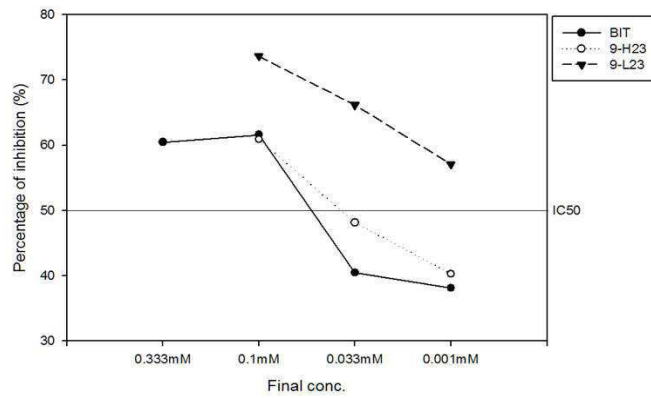
도면18b



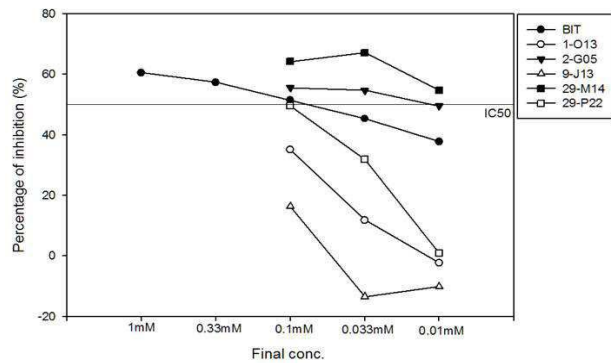
도면19a



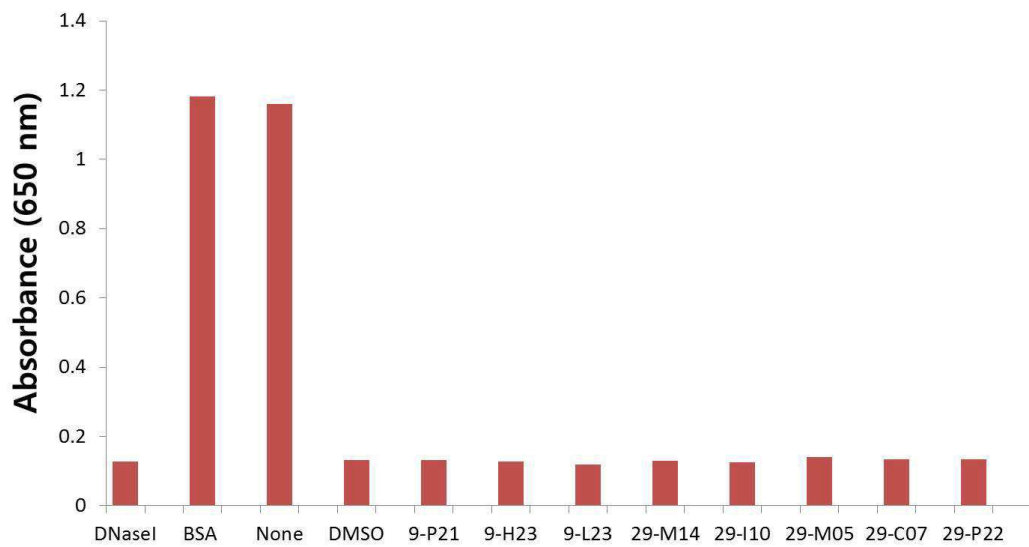
도면19b



도면19c



도면20



도면21

plate-position	구조	chemical name
H-000009-H23		5-phenyl-2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)isothiazol-3(2H)-one
H-000009-P21		methyl 4-((3,5-dioxo-2-p-tolyl-1,2,4-thiadiazolidin-4-yl)methyl)benzoate
H-000009-L23		2-phenyl-4-(2-(phenylsulfonyl)ethyl)-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione
H-000029-P22		3-isopropyl-6-(pyridin-3-yl)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole