



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0005239

(43) 공개일자 2015년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0078890

(22) 출원일자 2013년07월05일

심사청구일자 2013년07월05일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

김은기

서울 양천구 목동서로 38, 131동 506호 (목동, 목동1단지아파트)

비비크

인천 남구 인하로 100, 생물공학과 (용현동, 인하대학교)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 22 항

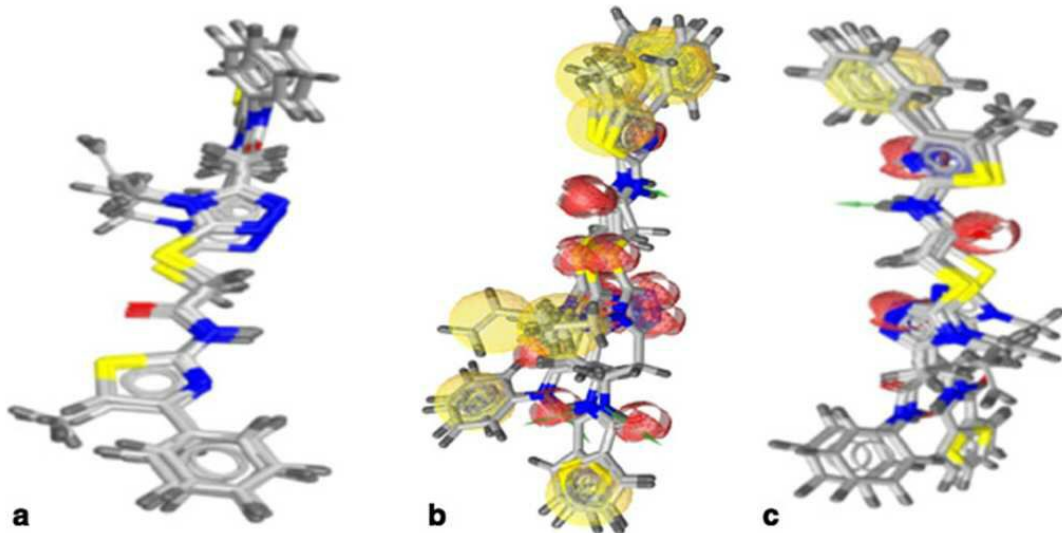
(54) 발명의 명칭 포스포트랜스아세틸라제 억제 활성을 가지는 화합물을 포함하는 세균 감염 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 가상 스크리닝 방법을 이용하여 스타필로코커스 아우레우스의 포스포트랜스아세틸라제에 대한 리간드를 동정하는 방법 및 상기 리간드를 유효성분으로 포함하는 세균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 인 실리코 가상 스크리닝 방법은 타겟 단백질의 3차 구조를 분석하고 상기 타겟 단

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6



백질과 레퍼런스 리간드 간의 상호작용을 분자동역학 시뮬레이션 방법으로 분석하여 상기 타겟 단백질의 활성 위치를 상동성 모델링으로 예측한다. 이를 토대로, 상기 타겟 단백질과 후보물질 리간드 라이브러리 간의 도킹 분석을 통해 상기 타겟 단백질에 대한 증가된 결합 에너지 및 약물동역학 특성을 가지는 약물-유사 분자들을 동정한다. 본 발명은 상술한 방법을 통해 스타필로코커스 아우레우스-유래된 포스포트랜스아세틸라제 억제제로서 화학식 I로 표시되는 화합물을 동정하였다. 따라서, 본 발명의 방법은 단백질체학, 바이오인포메틱스 및 조합 화학에 기반되어 보다 빠르고 효율적으로 대량의 생리활성 후보물질들을 예측할 수 있음으로써 생명공학기술을 이용한 신약 개발 연구 분야에서 적용되어 신약 개발 비용을 획기적으로 절감시킬 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A103017
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	보건산업진흥원
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	글로벌코스메틱연구개발사업단
기 여 율	1/1
주관기관	(재)대한화장품산업연구원
연구기간	2012.11.01 ~ 2013.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 약물-유사 활성(drugability)을 가지는 리간드(ligand)의 *인 실리코* 가상 스크리닝(*In silico* virtual screening) 방법:

- (a) 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드(reference ligand) 간의 상호작용을 분석하여 상동성 모델(homology modelling)을 제조하는 단계로, 상기 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드 간의 상호작용에 대한 3차원 구조(three-dimensional structure)를 컴퓨터 프로그램을 이용하여 모델링하고 이를 기반으로 상기 타겟 단백질에 결합하는 상기 레퍼런스 리간드에 대한 물리화학적 특성을 획득하며;
- (b) 후보물질 리간드 라이브러리(lead ligand library)를 제조하는 단계로, 상기 리간드 라이브러리는 상기 단계 (a)에서 얻어진 레퍼런스 리간드의 물리화학적 특성에 부합하고 약물적합성(drug-likeness)을 예측하는 규칙에 합치하도록 제조하고;
- (c) 상기 단계 (a)의 타겟 단백질과 상기 단계 (b)에서 제조된 리간드를 도킹(docking)시키는 단계로, 상기 도킹 과정은 MolDock 알고리즘(algorithm)을 이용한 컴퓨터 프로그램을 통해 도킹 스코어(docking score)를 계산하여 도킹 스코어가 상위 30위 이내의 리간드들이 선택되어 이들의 약리학적 특성들을 분석하여 약물적합성을 판단하며; 및
- (d) 상기 단계 (c)에서 동정된 리간드에 의한 상기 타겟 단백질의 활성 변화를 분석하는 단계로, 상기 동정된 리간드가 상기 타겟 단백질의 활성을 억제시키면 타겟 단백질 억제제로 판단되는 것을 특징으로 하는 *인 실리코* 가상 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 타겟 단백질은 미생물-유래된 단백질로 인간 단백질과 50% 이하의 아미노산 서열 상동성을 가지는 것을 특징으로 하는 *인 실리코* 가상 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 상기 물리화학적 특성은 분자량, 등전점(isoelectric point, pI), 계산된 $LopP$ 값, H-결합 공여체, H-결합 수용체, 중원자(heavy atom) 수, 회전가능한 결합 수(뒤틀림 수), 극성 표면적(polar surface area, $\text{\AA}^2$), 극성 또는 비극성 결합상호작용에너지(polar or apolar desolvation energy; Kcal/mol), 흡광계수(extinction coefficient), 불안정성 지수(instability index), 지방족 지수(aliphatic index, AI) 또는 GRAVY(grand average hydropathy) 결과를 포함하는 것을 특징으로 하는 *인 실리코* 가상 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 상기 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드 간의 상호작용에 대한 3차원 구조 분석은 상기 타겟 단백질의 서열-기반된 2차 구조 분석에 기반하여 이용가능한 컴퓨터 프로그램을 이용한 가상 구조 예측을 통해 모델링되는 것을 특징으로 하는 *인 실리코* 가상 스크리닝 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 이용가능한 컴퓨터 프로그램은 PROCHECK, WHAT IF, SuperPose, YASARA 또는 ESyPred3D인 것을 특징으로 하는 *인 실리코* 가상 스크리닝 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 약물적합성을 예측하는 규칙은 리핀스키 규칙(Lipinski's rule), CMC 규칙(CMC-like rule), MDDRF 규칙(MDDRF-like rule) 또는 WDI 규칙(WDI-like rule)인 것을 특징으로 하는 인 실리코 가상 스크리닝 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 도킹 스코어는 상기 타겟 단백질과 리간드 간의 결합 가능성을 나타내는 인자인 것을 특징으로 하는 인 실리코 가상 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 도킹 스코어는 MolDock 스코어링 함수를 이용하여 (i) 결합위치, (ii) 리간드와 단백질 간의 결합에 따른 표면 변화 및 (iii) 스코어링 함수 또는 에너지 계산 소프트웨어(energy calculation software)를 분석하여 도출되는 것을 특징으로 하는 인 실리코 가상 스크리닝 방법.

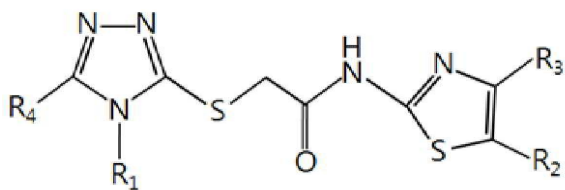
청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서 리간드의 약리학적 특성들은 리간드스카우트(ligandscout) 소프트웨어, START 소프트웨어, ADME(absorption, distribution, metabolism and excretion) 및 톡스트리(Toxtree) 소프트웨어를 통해 예측되어 약물작용발생단(pharmacophore) 모델 제조에 이용되는 것을 특징으로 하는 인 실리코 가상 스크리닝 방법.

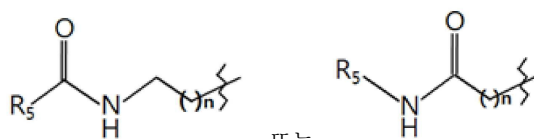
청구항 10

(a) 하기 화학식 I로 표시되는 화합물의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 세균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

화학식 I



상기 화학식 I에서, R₁ 및 R₂는 각각 서로 독립적으로 H, C₁-C₁₀ 직쇄(straight chain) 또는 가지쇄(branched chain)의 알킬 또는 C₂-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알케닐이고; R₃는 C₁-C₁₀ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 C₆-C₁₀



아릴; 또는 R₄는

또는

로 상기 n은 1-5의 정수이고, 상기 R₅는 5

각 또는 6각형의 아릴 또는 헤테로아릴이며, 상기 헤테로아릴에서 하나의 헤테로원자인 황을 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 서로 독립적으로 H 또는 C_1-C_5 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 알케닐인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

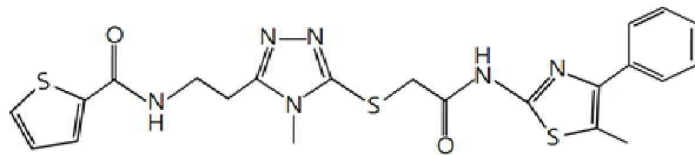
청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 R_3 는 C_1-C_5 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 C_6 아릴인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

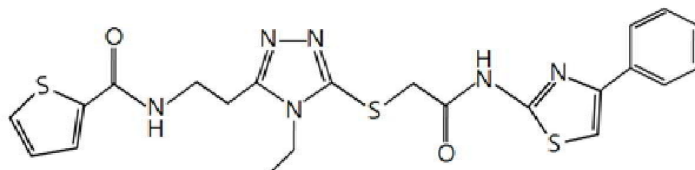
청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 하기 화학식 1-5로 표시되는 화합물 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물:

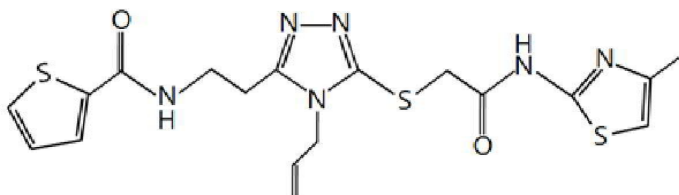
[화학식 1]



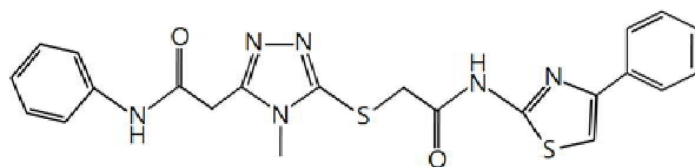
[화학식 2]



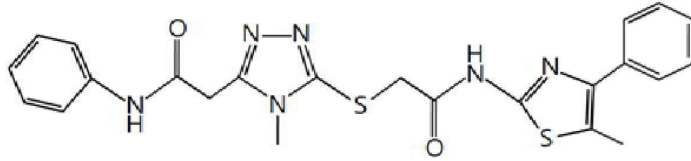
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



청구항 14

제 10 항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 포스포트랜스아세틸라제(phosphotransacetylase)의 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 15

제 10 항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 서열목록 제2서열의 포스포트랜스아세틸라제의 Arg88, Arg89, Arg134, Arg148, Cys167, Arg285, Arg308 및 Cys310 위치의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열에 결합하는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 16

제 10 항에 있어서, 상기 세균은 혐기성, 발효성, 통기성 또는 메탄생성 미생물인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 혐기성, 발효성, 통기성 또는 메탄생성 미생물은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 메타노사시나 서모필레(*Methanosarcina thermophila*) 또는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 18

제 10 항에 있어서, 상기 세균 감염 질환은 중기, 다래끼, 농가진 및 부스럼 같은 피부염, 후두염, 폐렴, 유방염, 정맥염, 뇌막염, 장염, 요로 감염, 골수염, 각막염, 수막염, 전립선염, 심내막염, 화농성 질환, 전쟁 상부(war wound), 식중독, 폐혈증, 균혈증, 결핵 또는 독성 쇼크 증후군(toxic shock syndrome)인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 19

서열목록 제2서열의 포스포트랜스아세틸라제의 Arg88, Arg89, Arg134, Arg148, Cys167, Arg285, Arg308 또는 Cys310 위치의 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 10-100 염기의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 RNAi(RNA interference) 분자 또는 상기 위치의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 결합제를 유효성분으로 포함하는 세균 감염 질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 RNAi 분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 miRNA인 것을 특징으로

로 하는 억제학적 조성물.

청구항 21

제 19 항에 있어서, 상기 결합제는 포스포트랜스아세틸라제(phosphotransacetylase)의 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 22

제 19 항에 있어서, 상기 세균 감염 질환은 스태필로코커스 아우레우스에 의해 유발되는 질환인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 가상 스크리닝 방법을 이용하여 스태필로코커스 아우레우스의 포스포트랜스아세틸라제에 대한 리간드를 동정하는 방법 및 상기 리간드를 유효성분으로 포함하는 세균 감염 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[0002]

스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 인간에게 다양한 화농성 감염 및 중독증상들(toxinoses)을 야기한다. 스태필로코커스 아우레우스는 종기(boils), 다래끼(styes) 및 부스럼(furuncles) 같은 피부 표면 병소들; 폐렴, 유방염, 정맥염, 뇌수막염 및 요로 감염 같은 보다 심각한 감염증들; 및 골수염 및 심내막염 같은 만성(deep-seated) 감염들을 야기한다[1-5]. 스태필로코커스 아우레우스는 외과적 상처에 대한 병원-유래(hospital-acquired; nosocomial) 감염 및 인공의료장치(indwelling medical devices)와 관련된 감염들의 주요 원인인자이다[1, 3, 4]. 스태필로코커스 아우레우스는 엔테로톡신(enterotoxin)을 식품에 배출하여 식중독을 야기하고 초항원(super-antigens)을 혈류로 배출하여 독성 쇼크 증후군(toxic shock syndrome, TSS)을 야기한다[6, 7]. 스태필로코커스는 호스트(host) 조직의 군집형성(colonisation)을 촉진시키는 표면 단백질들; 인베이신(invasins; 히알루로니다제, 키나제 및 류코시딘); 표면 인자들(캡슐 및 단백질 A); 면역성 위장인자(단백질 A 및 코아굴라제); 막-손상 독소(해몰리신, 류코톡신 및 류코시딘); 엑소톡신(SEA-G, TSST and ET); 및 항균제에 대한 선천성 및 후천성 저항성을 포함하는 생존을 증대시키는 생화학적 특성들을 가지는 다양한 종류의 병원성 인자들(카로테노이드 및 카탈라제 생산)을 통해 동정되어 왔다[8-13]. 상술한 병원성 인자들을 타겟팅하는 항생제를 디자인하는 것은 쉬운 일이 아니다. 항생제 내성 스트레인인 스태필로코커스 아우레우스의 출현율이 매우 높아 90%의 스트레인들이 페니실린 저항성을 가지고 50%의 스트레인들은 다약제(multidrug) 저항성을 가지기 때문에 이들 간의 전쟁은 현재 진행 중이다[3, 14]. 특정 분자를 타겟팅하는 것은 효과적인 항균제를 개발하기 위해 충분하지 않다. 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)[15, 16], 마이코플라스마 게니탈리움(*Mycoplasma genitalium*)[17], 아스퍼길러스(*Aspergillus*)[18, 19, 53] 및 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)[15, 20] 같은 다른 병원성 생물들에서 신규한 약물 타겟들을 조사하기 위해 컴퓨터를 이용한 접근방법이 이용되어 왔다. 가장 일반적으로 알려진 바와 같이, 항균제는 기본적으로 특정 박테리아 효소들에 대한 억제제들이다: 박테리아-특이적 효소는 잠재적인 약물 타겟들로서 고려될 수 있다[5, 18, 19, 21].

[0003]

본 발명자들의 이전 연구에서, 본 발명자들은 대사 경로에 대한 비교 분석을 실시하여 스태필로코커스 아우레우스에 대한 몇 가지 잠재적인 타겟들을 발견하였다[5]. 호스트 프로테옴(proteome)과 비교하여 특이적인 것으로 관찰된 효소들에 대한 약물가능성(drugability)이 추가적으로 조사되었다. 그 결과, 본 연구에서 본 발명자들은 잠재적인 타겟으로서 포스포트랜스아세틸라제(phosphotransacetylase, PTA)를 조사하였다. PTA(EC: 2.3.1.8)는 etuD 유전자에 의해 인코딩되는 328-아미노산-포함 효소로, 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제, 포스포트랜스아세틸라제 및 포스포아실라제로도 알려져 있다[22, 23]. 상기 효소는 3개의 다른 경로들(즉, 타우린 및 하이포타우린 대사경로, 피루베이트 대사경로 및 프로파노에이트 대사경로)에 포함된다(KEGG 데이터베이스).

매개 화합물인 아세틸-CoA 또는 아세테이트는 에너지 필요 과정의 완수 과정에서 매우 중요한 역할을 가진다 [5, 24]. PTA는 아세틸-CoA 외의 프로피오닐-CoA 및 뷰티릴-CoA 같은 짧은-체인 CoA 에스테르를 절단할 수 있지만, 석시닐-CoA 또는 팔미틸-CoA 같은 긴-체인 지방산 아실 CoA를 가수분해시킬 수 없다[25]. 특정 경로들을 통해 상기 화합물들을 이용하는 많은 혐기성/발효성/통기성/메탄생성 미생물들은 포스포트랜스아세틸라제의 활성화에 의해 아세틸-CoA를 아세테이트로 전환시킬 수 있고, 아세테이트 키나제는 대부분의 에너지를 제공하는 ATP 생산에 이용된다. 아세테이트의 주된 역할이 아세테이트 대사과정에 포함되어 있을 지라도, 아세테이트는 거의 모든 혐기성/발효성/통기성/메탄생성 미생물들의 최종 산물이며, 이후, 성장 기질로서 기능한다[26, 27]. 따라서, PTA의 억제는 스타필로코커스 아우레우스의 성장 및 증식을 효과적으로 억제할 수 있다. 현재까지, PTA를 이용한 스타필로코커스 아우레우스에 대한 구조적 또는 약물-타겟팅 정보는 어떠한 것도 이용가능하지 않다.

[0004] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 세균 감염 질환 치료용 약물 타겟의 동정 및 이의 억제제를 개발하기 위한 고속(high-throughput) 가상 스크리닝 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 타겟 단백질(예컨대, 포스포트랜스아세틸라제)의 구조 분석 및 레퍼런스 리간드를 이용한 상동성 모델링으로 상기 타겟 단백질에 대한 레퍼런스 리간드 결합 위치를 가상으로(virtually) 동정하고 이를 이용한 상기 타겟 단백질과 후보물질 리간드(lead ligand) 라이브러리 간의 도킹 분석을 통해 상기 타겟 단백질에 대한 증가된 결합 에너지 및 약물동력학 특성을 가지는 약물-유사 분자들을 동정함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 약물-유사 활성(drugability)을 가지는 리간드(ligand)의 *인 실리코* 가상 스크리닝(*In silico* virtual screening) 방법을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 세균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 약물-유사 활성(drugability)을 가지는 리간드(ligand)의 *인 실리코* 가상 스크리닝(*In silico* virtual screening) 방법을 제공한다: (a) 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드(reference ligand) 간의 상호작용을 분석하여 상동성 모델(homology modelling)을 제조하는 단계로, 상기 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드 간의 상호작용에 대한 3차원 구조(three-dimensional structure)를 컴퓨터 프로그램을 이용하여 모델링하고 이를 기반으로 상기 타겟 단백질에 결합하는 상기 레퍼런스 리간드에 대한 물리화학적 특성을 획득하며; (b) 후보물질 리간드 라이브러리(lead ligand library)를 제조하는 단계로, 상기 리간드 라이브러리는 상기 단계 (a)에서 얻어진 레퍼런스 리간드의 물리화학적 특성에 부합하고 약물적합성(drug-likeness)을 예측하는 규칙에 합치하도록 제조하고; (c) 상기 단계 (a)의 타겟 단백질과 상기 단계 (b)에서 제조된 리간드를 도킹(docking)시키는 단계로, 상기 도킹 과정은 MolDock 알고리즘(algorithm)을 이용한 컴퓨터 프로그램을 통해 도킹 스코어(docking score)를 계산하여 도킹 스코어가 상위 30위 이내의 리간드들이 선택되어 이들의 약리학적 특성들을 분석하여 약물적합성을 판단하며; 및 (d) 상기 단계 (c)에서 동정된 리간드에 의한 상기 타겟 단백질의 활성 변화를 분석하는 단계로, 상기 동정된 리간드가 상기 타겟 단백질의 활성을 억제시키면 타겟 단백질 억제제로 판단되는 것을 특징으로 하는 *인 실리코* 가상 스크리닝 방법.

- [0010] 본 발명자들은 세균 감염 질환 치료용 약물 타겟의 동정 및 이의 억제제를 개발하기 위한 고속 가상 스크리닝 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 타겟 단백질(예컨대, 포스포트랜스아세틸라제)의 구조 분석 및 레퍼런스 리간드를 이용한 상동성 모델링으로 상기 타겟 단백질에 대한 레퍼런스 리간드 결합 위치를 가상으로 동정하고 이를 이용한 상기 타겟 단백질과 후보물질 리간드 라이브러리 간의 도킹 분석을 통해 상기 타겟 단백질에 대한 증가된 결합 에너지 및 약물동력학 특성을 가지는 약물-유사 분자들을 동정하였다.
- [0011] 본 발명에 따르면, 본 발명은 타겟 단백질(예를 들어, 본 발명의 포스포트랜스아세틸라제)의 데이터베이스(또는 컴퓨터 프로그램)-기반된 1차, 2차 및 3차 구조 분석을 실시하고, 이를 기반으로 약물 타겟으로서의 타겟 단백질의 활성 위치를 예측한다(서열 정렬 및 상동성 모델링). 이후, 상기 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드 간의 상호작용(결합)을 분자동역학 시뮬레이션 방법으로 분석한다. 상기 결과를 토대로, 상기 타겟 단백질과 후보물질 리간드 라이브러리(lead ligand library) 간의 상호작용에서 상기 타겟 단백질에 대한 증가된 결합 에너지 및 약물동력학 특성을 가지는 후보물질 리간드를 동정한다.
- [0012] 본 발명의 인 실리코 가상 스크리닝 방법을 자세히 살펴보면 다음과 같다.
- [0013] (a) 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드(reference ligand) 간의 상호작용을 분석하여 상동성 모델(homology modelling)을 제조하는 단계:
- [0014] 우선, 생물체(구체적으로는, 감염성 세균)의 생존에 핵심적인 타겟 단백질을 선정한다. 상기 타겟 단백질은 생물체의 생존에 필수적인 단백질로 공중의 이용가능한 데이터베이스(예컨대, NCBI 서버, GenBank, 등)로부터 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열을 획득할 수 있는 단백질이고, 이의 억제를 통해 상기 생물체의 성장을 억제할 수 있는 단백질이라면 어떠한 것도 이용할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 타겟 단백질은 미생물-유래된 생존에 필수적인 단백질(essential protein)로 인간 단백질과 매우 낮은 서열 상동성을 가지는 단백질이고, 보다 구체적으로는 미생물-유래된 생존에 필수적인 단백질로 인간 단백질과 60% 이하의 아미노산 서열 상동성을 가지는 단백질이며, 보다 더 구체적으로는 스태필로코커스 속(Genus *Staphylococcus*)-유래된 생존에 필수적인 단백질로 인간 단백질과 50% 이하의 아미노산 서열 상동성을 가지는 단백질이고, 가장 구체적으로는 스태필로코커스 아우레우스-유래된 포스포트랜스아세틸라제로 인간 단백질과 매우 낮은 아미노산 서열 상동성을 나타내지 않는 단백질이다.
- [0016] 본 발명에 따르면, 상술한 타겟 단백질의 아미노산 서열을 이용하여 타겟 단백질의 2차 및 3차 구조를 분석한다. 본 발명의 타겟 단백질인 포스포트랜스아세틸라제의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 서열 목록 제1서열 및 서열목록 제2서열로 개시되어 있다. 상기 타겟 단백질의 2차 구조는 당업계에 잘 알려진 데이터베이스(예컨대, BLASTp, PROSITE, SOSUI, SOPMA, STRIDE, CYS_REC(<http://sun1.softberry.com/berry.phtml?topic>), ClustalW, LALIGN, 2ZIP, 등)를 이용하여 실시하며, 프로테옴 분석 결과가 존재하는 경우에는 PA-SUB 서버(프로테옴-특화된 세포 내 위치 서버 v2.5)를 이용하여 세포 내 위치도 분석할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 타겟 단백질인 스태필로코커스 아우레우스-유래된 포스포트랜스아세틸라제는 다른 미생물(세균)의 포스포트랜스아세틸라제와 높은 서열 상동성을 가지는 반면에, 인간 단백질과는 아미노산 서열 상동성을 나타내지 않았다(참고: 표 1 및 도 2).
- [0018] 본 발명의 타겟 단백질의 아미노산 서열 분석(1차 및 2차 구조 분석)에 기초하여 상동성 모델링을 통해 3차 구조를 모델링한다. 3차 구조의 모델링은 당업계에 잘 알려진 방법들, 예를 들어, 데이터베이스-이용한 모델링, X-선 결정학, NMR방법, 등을 이용하여 실시하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (a)에서 상기 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드 간의 상호작용에 대한 3차원 구조 분석은 상기 타겟 단백질의 서열-기반된 2차 구조 분석에 기반하여 이용가능한 컴퓨터 프로그램을 이용한 가상 구조 예측을 통해 모델링된다.
- [0020] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (a)에서 이용가능한 컴퓨터 프로그램(또는 데이터베이스)는 PROCHECK, WHAT IF, SuperPose, YASARA 및 ESyPred3D를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 예측된 3D 모델링 구조를 토대로, 상기 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드(예컨대, PTA와 아세틸 포스페이트) 간의 상호작용을 분석하여 상기 레퍼런스 리간드의 물리화학적 특성을 획득한다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "레퍼런스 리간드(reference ligand)"는 타겟 단백질과 상호작용(또는 결합)하는 것으로 당업계에 공지된 물질(예컨대, 화합물)로, 본 발명에서 후보물질 리간드를 동정하기 위한 양성 대조군으

로서 이용된다.

[0023] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (a)에서 측정된 물리화학적 특성은 분자량, 등전점 (isoelectric point, pI), 계산된 $LopP$ 값, H-결합 공여체, H-결합 수용체, 중원자(heavy atom) 수, 회전가능한 결합 수(뒤틀림 수), 극성 표면적(polar surface area, $\text{\AA}^2$), 극성 또는 비극성 결합상호작용에너지(polar or apolar desolvation energy; Kcal/mol), 흡광계수(extinction coefficient), 불안정성 지수(instability index), 지방족 지수(aliphatic index, AI) 및 GRAVY(grand average hydropathy)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, PTA를 이용한 스타필로코커스 아우레우스에 대한 구조 정보는 현재까지 이용 가능하지 않은 PTA의 구조에 대한 정보로 본 발명에서 최초로 제시된다.

[0025] (b) 후보물질 리간드 라이브러리(lead ligand library)를 제조하는 단계:

[0026] 본 발명의 리간드 라이브러리는 상술한 레퍼런스 리간드의 물리화학적 특성과 유사한 특징을 가지는 작은 화합물 라이브러리로 제조된다. 또한, 상기 리간드 라이브러리는 구강 생체이용률(oral bioavailability) 및 약물 적합성(drug-likeness)을 예측하는 규칙에 합치하도록 제조된다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약물적합성(drug-likeness)"은 약물-유사(drug-like) 물질의 디자인에 이용되어 온 정량적인 개념으로서, 다음과 같은 인자들을 통해 예측될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다: (a) 물 및 지방에 대한 용해도(solubility)를 예측하기 위해 분배 계수(partition coefficient, $LopP$); (b) 후보물질의 타겟에 대한 결합 활성을 나타내는 IC_{50} 값(half maximal inhibitory concentration); (c) 리간드 효율 및 친지성(lipophilic efficiency) 같은 물리화학적 특성들을 표현하는 데 이용될 수 있는 여러 가지 스코어링 방법; (d) H-결합 공여체 및 H-결합 수용체; (e) 분자량(예컨대, 450 Da 이하); 및 (f) 공지된 화합물 특성 또는 약리학적 특성을 나타내는 구조.

[0028] 약물적합성을 평가하는 종래기술은 친수성 그룹의 수, 분자량 및 소수성에 대한 평가를 포함하는 리핀스키 규칙(Lipinski's Rule of Five)을 이용한다. 이론적으로, 리핀스키 규칙에 따른 약물-유사 분자의 특성은 $-0.4 - 5.6$ 범위의 $LogP$, 160-480 g/mol의 분자량 및 40-130의 몰 굴절률(molar refractivity)을 나타낸다.

[0029] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (b)에서 약물적합성을 예측하는 규칙은 리핀스키 규칙(Lipinski's rule), CMC 규칙(CMC-like rule), MDDRF 규칙(MDDRF-like rule) 및 WDI 규칙(WDI-like rule)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 단계 (b)에서 약물적합성을 예측하는 규칙은 리핀스키 규칙(Lipinski's rule)이다.

[0030] 화이저 규칙(Pfizer's rule of five) 또는 R05로도 불리는 리핀스키 규칙은 약물적합성을 평가하거나 또는 특정 약리학적 또는 생물학적 활성을 가지는 화합물이 인간에게 구강 투여가 가능한 생물활성 약물로 적합한 지 여부를 결정하는데 효과적인 규칙이다. 리핀스키 규칙은 개략적으로 다음과 같다: (a) 5개 이하의 H-결합 공여체; (b) 10개 이하의 H-결합 수용체; (c) 500 Da 미만의 분자량; 및 (d) 5 이하의 분배 계수($LogP$). 리핀스키 규칙은 인간에서 ADME(absorption, distribution, metabolism and excretion)를 포함하는 약물동력학에 중요한 분자 특성들을 포함하지만, 화합물이 약리학적으로 활성을 가지는 지 여부를 예측할 수 없고, 예외적인 경우들(예컨대, 볼드윈 규칙)이 존재한다는 것이 알려지면서 규칙들이 다양하게 변형되어 이용되고 있다.

[0031] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되고 있는 리핀스키 규칙은 $1.5 \leq xlogP \leq 5$, $2 \leq H\text{-결합 공여체} \leq 5$, $5 \leq H\text{-결합 수용체} \leq 10$ 및 $140.03 \leq \text{분자량} \leq 500$ 을 이용하지만, 타겟 단백질과 레퍼런스 리간드의 상호작용(또는 레퍼런스 리간드의 물리화학적 특성)에 따라 변형될 수 있다.

[0032] CMC 규칙(CMC-like rule)은 리핀스키 규칙과 유사하지만, 진단용 이미징 제제(diagnostic imaging agents), 용매 및 약리학적 보조제(pharmaceutical aids) 같은 여러 클래스의 화합물이 제거된 CMC 데이터베이스에 대한 약물-유사 특성으로 제한된다. MDDRF 규칙(MDDRF-like rule)은 ACDF 및 MDDRF 서브셋트에 적용되어 유사한 결과들을 생산하는 5개의 테스트로, ACD 데이터베이스는 비-약물 데이터베이스이고 MDDRF는 약물 데이터베이스이다. ACDF 및 MDDRF는 아실-할라이드(acyl-halides), 설폰일-할라이드(sulfonyl-halides), 마이클 수용체(Michael acceptors), 등을 포함하는 반응성 작용기(reactive functional groups)가 제거된 데이터베이스이다. WDI 규칙(WDI-like rule)은 WDI(World Drug Index)에서 발견되는 분자 특성들의 90% 이상을 가지는 화합물에 기초한 규칙으로 preADME를 이용하여 약물적합성을 계산된다. PreADME는 크게 분자의 물성 계산과 흡수 관련

실험값 예측 및 약물적합성 예측으로 구성되어 있는데, 다양한 화합물들에 대한 약물동력학적 거동에 대해서 흡수, 분포, 대사에 관련된 각각의 정보를 컴퓨터상에서 예측할 수 있으며, 이미 발표되어진 여러 화합물의 실험값을 제공하고 있다. 예를 들어, 화합물의 용해도나 체내 흡수성을 보기 위한 실험적 모델인 Caco2-세포, MDCK 세포에서의 투과도, 신경 관련 계통의 투과도를 나타내는 혈뇌장벽(Blood Brain Barrier) 투과도를 예측할 수 있다.

[0033] 본 발명의 유효성분인 후보물질 리간드 라이브러리는 상기 레퍼런스 리간드의 초기 값(initial values)을 기반으로 당업계에서 이용가능한 화합물 데이터베이스를 이용하여 제조될 수 있으며, 예를 들어 ZINC 데이터베이스 또는 ChEMBL 데이터베이스를 이용하여 제조될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] ZINC 데이터베이스는 가상 스크리닝을 위해 제조된 상업적으로 유용한 화합물의 작은 집단(curated collection)을 제공하고, 제약 회사, 생명공학 회사 및 대학에 종사하는 연구자들(통상적으로, 생물학자 또는 화학자 같은 전문가들)에 의해 이용되는 데이터베이스이다. ZINC 데이터베이스는 UCSF(University of California, San Francisco)의 약물화학부 Shoichet 실험실에 의해 제공된다. 또한, ZINC 데이터베이스는 타겟 단백질과 결합하는 레퍼런스 리간드를 제공한다(참고: DUD 데이터베이스).

[0035] 또한, ChEMBL 데이터베이스(ChEMBLdb; 원래 StARlite로 알려졌음)는 수작업을 통해 확립된 약물-유사 활성을 가지는 생물활성 분자들(bioactive molecules)에 대한 화합물 데이터베이스로, 생명공학 회사인 Inpharmatica Ltd.에 의해 개발되었다. ChEMBL 데이터베이스는 24,000개의 천연물을 포함하는 622,824개의 화합물에 대한 2백만개 이상의 바이오어세이 결과들을 포함한다.

[0036] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 상동성 모델링을 예측된 포스포트랜스아세틸라제(서열목록 제2서열) 내 결합 위치는 Arg88, Arg89, Arg134, Arg148, Cys167, Arg285, Arg308 및 Cys310 위치의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 위치이다.

[0037] (c) 상기 단계 (a)의 타겟 단백질과 상기 단계 (b)에서 제조된 리간드를 도킹(docking)시키는 단계:

[0038] 본 발명의 도킹 단계에서 타겟 단백질과 후보물질 리간드 간의 결합 가능성을 나타내는 인자를 나타내는 도킹 스코어(docking score)를 계산하여 후보물질 리간드를 선별하고 이의 약물적합성을 판단한다.

[0039] 본 발명에서 타겟 단백질과 후보물질 리간드 간의 가상 도킹은 당업계에서 이용될 수 있는 소프트웨어를 이용하여 실시할 수 있으며, 구체적으로는 Molegro Virtual Docker version 1.1.1 소프트웨어를 이용한 분자 도킹 알고리즘인 MolDock을 이용하여 실시하였다(참고: 실험방법 내 도킹 분석 부분). 상기 도킹 과정은 정확도를 높이기 위해 MolDock 스코어링 함수를 이용하여 (i) 결합위치, (ii) 리간드와 단백질 간의 결합에 따른 표면 변화 및 (iii) 스코어링 함수 또는 에너지 계산 소프트웨어(energy calculation software)를 분석함으로써 실시한다. 본 명세서에서 사용하는 용어 "스코어링 함수(scoring functions)"는 리간드-타겟 단백질 간의 도킹 후 두 분자들 간의 비-공유적 상호작용의 강도(즉, 결합 친화도)를 예측하는 데 이용되는 가장 빠른 수학적 방법들을 의미하고, 일반적으로 약물 같은 작은 화합물들에 대한 평가에 사용된다. 스코어링 함수의 적용을 위한 필수적인 변수들은 다음과 같다: (a) 타겟 단백질의 3차 구조; (b) 타겟 단백질에 결합된 리간드의 3D 형태(활성 형태); 및 (c) 리간드-단백질 복합체에서 각 파트너 별 배향성(orientation)을 나타내는 결합 모드(binding-mode).

[0040] 또한, 상기 소프트웨어를 이용한 도킹 과정은 통계적으로 유의한 결과를 얻기 위해, 반복적으로(구체적으로는, 10개 이상) 실시하여 도킹 위치(즉, 단백질 내 결합 위치)를 결정한다. 이후, 가장 높은 랭킹의 MolDock 스코어를 가지는 위치와 리간드-단백질 간의 상호작용 에너지를 비교한다.

[0041] 상술한 도킹 분석을 통해, 가상 약물작용발생단(pharmacophore) 모델을 제조한다. 이때, 각 리간드에 대해 MolDock 스코어, 수소 결합 에너지, 전하 상호작용 또는 소수성 영역을 계산하고 리핀스키 규칙을 적용하여 약물-유사 특성을 나타내지 않는 분자들을 제거함으로써 타겟 단백질의 잠재적인 결합 위치들에 대한 높은 결합 친화도를 나타내는 리간드를 최종적으로 선별한다.

[0042] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (c)에서 최종 선별된 후보물질 리간드의 약리학적 특성들은 리간드스카우트(ligandscout) 소프트웨어, START 소프트웨어, ADME(absorption, distribution, metabolism and excretion) 평가 및 톡스트리(Toxtree) 소프트웨어를 통해 예측되어 약물작용발생단(pharmacophore) 모델 제조에 이용된다.

[0043] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 단계 (c)에서 동정된 후보물질 리간드는 도킹 스코어가 상위 30위 이내의 리간드를 포함하며, 보다 구체적으로는 상위 5위 이내의 리간드를 포함한다.

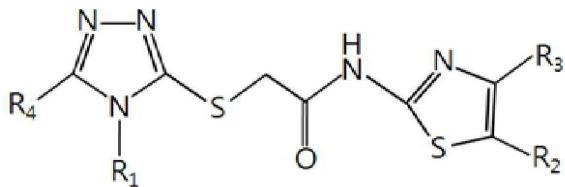
[0044] (d) 상기 단계 (c)에서 동정된 리간드에 의한 상기 타겟 단백질의 활성 변화를 분석하는 단계:

[0045] 최종적으로, 동정된 리간드가 상기 타겟 단백질의 활성을 억제시키면 타겟 단백질 억제제로 결정한다. 상기 타겟 단백질의 활성 분석은 당업계에 알려진 방법을 이용하여 실시할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 포스포트랜스아세틸라제의 활성 측정은 반응 산물인 아세틸-CoA를 측정함으로써 용이하게 실시할 수 있고, 예를 들어 233 nm에서 아세틸-CoA를 측정하는 연속적인 분광학적 속도 측정 방법(Continuous Spectrophotometric Rate Determination), HPLC 분석방법, 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 방법을 통해 동정된 후보물질 리간드는 화학식 1-5로 표현되는 화합물을 포함한다.

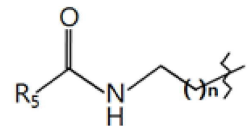
[0047] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 하기 화학식 I로 표시되는 화합물의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 세균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다:

[0048] **화학식 I**

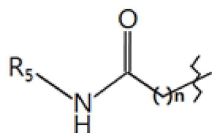


[0049] 상기 화학식 I에서, R₁ 및 R₂는 각각 서로 독립적으로 H 또는 C₁-C₁₀ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 알케닐이고;

[0050] R₃는 C₁-C₁₀ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 C₆-C₁₀ 아릴; 또는 R₄는



또는



로 상기 n은 1-5의 정수이고, 상기 R₅는 5각 또는 6각형의 아릴 또는 헤테로아릴이며, 상기 헤테로아릴에서 하나의 헤테로원자인 황을 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

[0051] 상기 화학식 I에서 사용되는 용어 "알킬(alkyl)"은 직쇄(straight chain) 또는 가지쇄(branched)의 비치환 또는 치환된 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 트리데실, 펜타데실 및 헵타데실 등을 포함한다. C₁₋₁₀ 알킬은 탄소수 1 내지 10의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C₁₋₁₀ 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다. 화학식 I에서 R₁ 또는 R₂ 위치의 C₁₋₁₀ 알킬은 구체적으로는 C₁₋₉ 알킬이고, 보다 구체적으로는 C₁₋₇ 알킬이며, 보다 더 구체적으로는 직쇄의 C₁₋₃ 알킬이다.

[0052] 상기 화학식 I에서 사용되는 용어 "알케닐(alkenyl)"은 지정된 탄소수를 가지는 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 불포화 탄화수소기를 나타내며, 예컨대, 에틸렌, 비닐, 프로페닐, 알릴, 이소프로페닐, 부테닐, 이소부테닐, t-부테닐, n-펜테닐 및 n-헥세닐을 포함한다. C₂₋₁₀ 알케닐은 탄소수 2 내지 10의 알케닐 유닛을 가지는 알케닐기를 의미하며, C₂₋₁₀ 알케닐이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다. 화학식 I에서 R₁ 또는 R₂ 위치의 C₂₋₁₀ 알케닐은 구체적으로는 C₂₋₉ 알케닐이며, 보다 구체적으로는 C₂₋₇ 알케닐이고, 보다 더 구

체적으로는 가장 구체적으로는 직쇄의 C₂₋₅ 알케닐이다.

[0053]

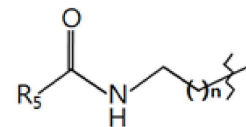
본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I에서 R₁ 및 R₂는 각각 서로 독립적으로 H, C₁-C₁₀ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 C₂-C₁₀ 직쇄 또는 가지쇄의 알케닐을 포함하고, 보다 구체적으로는 각각 서로 독립적으로 H, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 C₂-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알케닐을 포함한다.

[0054]

상기 화학식 I에서 사용되는 용어 "아릴(aryl)"은 전체적으로 또는 부분적으로 불포화된 치환 또는 비치환된 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄소 고리를 의미한다. 화학식 I에서 R₃ 위치의 C₆₋₁₀ 아릴은 탄소수 6 내지 10의 탄소 고리 원자를 가지는 아릴기를 의미하며, C₆₋₁₀ 아릴이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다. 구체적으로는, 본 발명의 아릴은 모노아릴 또는 비아릴이고, 보다 구체적으로는 모노아릴은 탄소수 5-6을 가지며, 비아릴은 탄소수 9-10을 가지고, 예를 들어 페닐기, 치환된 페닐기, 나프틸기, 치환된 나프틸기를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 페닐이 치환되는 경우에는 다양한 위치에서 다양한 치환체에 의해 치환이 이루어질 수 있으며, 예컨대, 할로, 히드록시, 니트로, 시아노, C₁-C₅ 치환 또는 비치환된 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알콕시에 의해 치환될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "C₁-C₅ 알콕시(alkoxy)"는 메톡시, 에톡시, 프로폭시 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 아릴기 치환(aryl group substituent)은 구체적으로는 적은 수의 알킬 또는 할로젠을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 아릴은 치환 또는 비치환된 페닐이다.

[0055]

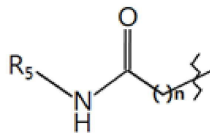
본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I에서 R₃는 C₁-C₁₀ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 C₆-C₁₀ 아릴을 포함하고, 보다 구체적으로는 C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 또는 C₆ 아릴을 포함한다.



[0056]

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I에서 R₄는

또는



로 상기 n은 1-5의 정수이다.

[0057]

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I에서 R₄ 내 상기 R₅는 5각 또는 6각형의 아릴 또는 헤테로아릴이고, 상기 헤테로아릴에서 하나의 헤테로원자인 황을 포함한다.

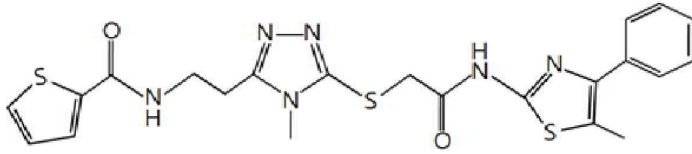
[0058]

상기 화학식 I에서 사용되는 용어 "헤테로원자로서 황(S)을 포함하는 헤테로아릴"은 헤테로사이클릭 방향족기로서, 헤테로원자로서 S를 포함하는 것이다. C₃₋₁₀ 헤테로아릴은 탄소수 3 내지 10의 탄소 고리 원자를 가지는 헤테로아릴기를 의미하며, C₃₋₁₀ 헤테로아릴이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않는다. 구체적으로는 헤테로원자의 개수는 1-4이며, 보다 구체적으로는 1-2이고, 보다 더 구체적으로는 1이다. 헤테로아릴에서 아릴은 구체적으로는 모노아릴이다. 헤테로아릴은 다양한 위치에서 다양한 치환체에 의해 치환될 수 있으며, 예컨대, 할로, 히드록시, 니트로, 시아노, C₁-C₅ 치환 또는 비치환된 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알콕시에 의해 치환될 수 있다.

[0059]

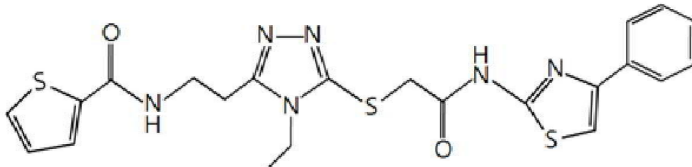
본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I로 표시되는 화합물은 하기 화학식 1-5로 표시되는 화합물을 포함한다:

[0060] [화학식 1]



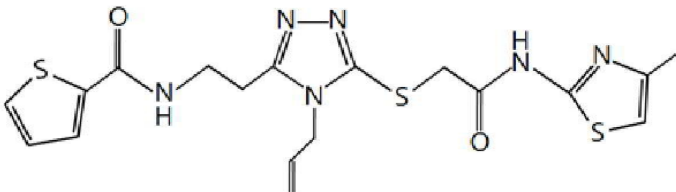
[0061]

[0062] [화학식 2]



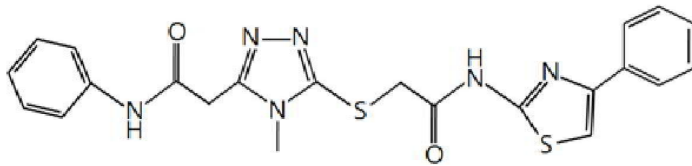
[0063]

[0064] [화학식 3]



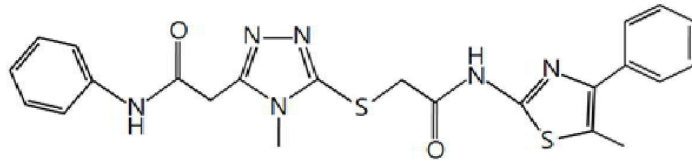
[0065]

[0066] [화학식 4]



[0067]

[0068] [화학식 5]



[0069]

[0070] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I로 표시되는 화합물은 포스포트랜스아세틸라제 (phosphotransacetylase, PTA)의 활성을 억제시키고, 보다 구체적으로는, 서열목록 제2서열의 포스포트랜스아세틸라제의 Arg88, Arg89, Arg134, Arg148, Cys167, Arg285, Arg308 및 Cys310 위치의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 결합하여 포스포트랜스아세틸라제의 활성을 억제한다.

[0071] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I에 의해 표시되는 화합물은 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)-유래된 포스포트랜스아세틸라제에 대한 억제 활성을 가진다.

[0072] 본 발명에 따르면, 본 발명의 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)-유래된 포스포트랜스아세틸라제는 보고된 박테리아 및 고세균[예를 들어, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 메타노사시나 서모필레(*Methanosarcina thermophila*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 또는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)] PTA 도메인들과 높은 서열 상동성을 가지고, 인간 PTA와는 낮은 상동성을 나타냈다(참고: 도 2 및 실험결과 내 '상동성 모델링 및 도킹' 부분).

- [0073] 본 발명의 화학식 I로 표현되는 화합물에 포함되는 화학식 1-5는 인 *비*트로 평가를 통해 포스포트랜스아세틸라제에 대한 우수한 억제 효과를 나타냈다(참고: 실험방법 및 실험결과, 도 7 내지 도 11). 구체적으로는, PTA에 대한 본 발명의 화학식 1 내지 화학식 5로 표현되는 화합물들의 IC₅₀ 값은 각각 0.0774 mg/ml, 0.0756 mg/ml, 0.0781 mg/ml, 0.0729 mg/ml 및 0.1184 mg/ml이었다.
- [0074] 본 명세서에서 사용되는 용어 "IC₅₀ 값(half maximal inhibitory concentration)"은 생물학적 또는 생화학적 활성을 억제하는 화합물의 효능을 평가하는 지표로, 특정 약물 또는 다른 물질(예컨대, 억제제)가 특정 생물학적 과정또는 상기 과정에 포함된 구성성분(예컨대, 효소, 세포 수용체, 등)을 절반까지 억제하는 데 필요한 정량적인 농도 측정치를 제공한다. 통상적으로, 약리학적 연구에서 길항제로서 약물의 강력함(potency)을 평가하는 데 이용된다.
- [0075] 본 발명에 따르면, 본 발명의 화합물에 대한 IC₅₀ 값의 계산은 투여량 반응 커브에서 50% 이상의 농도와 50% 이하의 농도 간의 선형 보간법(linear interpolation)을 이용하여 실시하였다. 상기 기본적인 IC₅₀ 값 계산은 Wyska 등(Methods of estimation of IC50 and SC50 parameters for indirect response models from single dose data. J Pharm Sci. 2003 Jul;92(7):1438-54(2003))에 의해 제시된 방법에 따라 실시하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I에 의해 표시되는 화합물은 세균 감염 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상술한 세균 감염 질환은 종기, 다래끼, 농가진 및 부스럼 같은 피부염, 후두염, 폐렴, 유방염, 정맥염, 뇌막염, 장염, 요로 감염, 골수염, 각막염, 수막염, 전립선염, 심내막염, 화농성 질환, 전쟁 상부(war wound), 식중독, 패혈증, 균혈증, 결핵 및 독성 쇼크 증후군(toxic shock syndrome)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상기 세균은 혐기성, 발효성, 통기성 또는 메탄생성 미생물이고, 보다 구체적으로는 그람-양성(Gram-positive) 박테리아이며, 보다 더 구체적으로는 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 엔테로코커스(*Enterococcus*), 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 및 메타노사시나(*methanosarcina*) 속(genera) 미생물이고, 보다 더욱 더 구체적으로는 스태필로코커스 아우레우스, 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 바실러스 서브틸리스, 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*) 및 메타노사시나 서모필레이며, 가장 구체적으로는 스태필로코커스 아우레우스, 바실러스 서브틸리스, 스트렙토코커스 뮤탄스 및 메타노사시나 서모필레를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 화합물의 효능 또는 활성(즉, PTA 억제 활성)을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0080] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0081] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 1일 당 0.001-100 mg/체중(kg)일 수 있다.
- [0082] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류 및 처방의 결정에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 화학식 I의 화합물의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

- [0083] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때, 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 포스포트랜스아세틸라제의 Arg88, Arg89, Arg134, Arg148, Cys167, Arg285, Arg308 또는 Cys310 위치의 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 10-100 염기의 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 RNAi(RNA interference) 분자 또는 상기 위치의 아미노산 서열에 특이적으로 결합하는 결합제를 유효성분으로 포함하는 세균 감염 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0085] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 RNAi 분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 miRNA를 포함한다.
- [0086] 본 발명에서 사용되는 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 명세서에서 용어 "상보적(complementary)"은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 타겟(예컨대, 서열목록 제1서열의 PTA 유전자)에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하는 것으로 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있으며, '실질적으로 상보적(substantially complementary)' 및 '완전히 상보적(perfectly complementary)'인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 보다 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 보다 구체적으로는 8 내지 60 염기이고, 가장 구체적으로는 10 내지 40 염기이다.
- [0087] 본 발명에서 언급되는 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자 치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다(Degot S, *et al.*, 2002; Degot S, *et al.*, 2004; Ballut L, *et al.*, 2005).
- [0088] 본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 센스 가닥(예를 들어, PTA 유전자 mRNA 서열에 상응하는(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(예를 들어, PTA 유전자 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일체 구조를 가질 수 있다.
- [0089] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 별지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 구체적으로는, 전체 길이는 10 내지 100 염기, 보다 구체적으로는 15 내지 80 염기, 그리고 보다 더 구체적으로는 20 내지 70 염기이다.
- [0090] 본 발명에서 사용되는 용어 "shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin RNA)"는 견고한 헤어핀 턴을 만드는 RNA의 서열을 나타내며, 이는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 사일런스시키는 데 이용될 수 있다. shRNA는 세포 도입용 벡터를 이용하여 shRNA를 발현할 수 있는 U6 프로모터를 주로 이용한다. 이러한 벡터는 항상 딸세포로 전달되어 유전자 사일런싱이 유전될 수 있도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작(machinery)인 siRNA로 분해되어 RNA-유도 사일런싱 복합체(RNA-induced silencing complex)에 결합된다. 상술한 복합체는 이에 결합된 siRNA에 상응하는(matched) mRNA에 결합하여 분해시킨다. shRNA는 RNA 폴리머라제 III에 의해 전사되며, 포유동물 세포에서 shRNA 생산은 세포가 shRNA를 바이러스 공격으로 인식하여 방어 수단을 찾는 것처럼 인터페론 반응을 야기시킬 수도 있다. 또한, shRNA는 식물 및 다른 시스템에서도 이용될 수 있으며 U6 프로모터가 반드시 필요한 것은 아니다.
- [0091] 본 명세서의 사용되는 용어 "마이크로RNA(microRNA, miRNA)"는 21-25개의 뉴클레오타이드의 단일가닥 RNA 분자로서 mRNA(messengerRNA)의 3'-UTR에 결합하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 물질을 나타낸다(Bartel DP, *et al.*, Cell, 23;116(2): 281-297(2004)). miRNA의 생성은 Drosha(RNaseIII type 효소)에 의해 스템-루프

구조의 전구체 miRNA(pre-miRNA)로 만들어지고, 세포질로 이동하여 다이서(Dicer)에 의해 절단되어 성숙한 miRNA로 만들어진단[Kim VN, *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol., 6(5): 376-385(2005)]. 상술한 바와 같이 제조된 miRNA는 표적단백질의 발현을 조절함으로써 발생, 세포증식 및 사멸, 지방대사, 종양형성 등에 관여한다 [Wienholds E, *et al.*, Science, 309(5732): 310-311(2005); Nelson P, *et al.*, Trends Biochem Sci., 28: 534-540(2003); Lee RC, *et al.*, Cell, 75: 843-854(1993); 및 Esquela-Kerscher A, *et al.*, Nat Rev Cancer, 6: 259-269(2006)].

[0092] 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용될 수 있는 결합체는 펩타이드, 앵타머 및 항체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0093] 본 명세서에서 사용되는 용어 "결합제"는 타겟 단백질의 활성 위치에 결합하여 상기 타겟 단백질의 활성을 억제하는 물질을 의미하고, 구체적으로는 본 발명의 결합제는 포스포트랜스아세틸라제의 활성 위치(예를 들어, 서열 목록 제2서열의 포스포트랜스아세틸라제의 Arg88, Arg89, Arg134, Arg148, Cys167, Arg285, Arg308 및 Cys310 위치의 아미노산 서열을 포함하는 모티프)에 높은 친화도로 결합하여 포스포트랜스아세틸라제의 활성을 억제할 수 있다.

[0094] 본 명세서에서 사용되는 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 상술한 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 예를 들어 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques; Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-54(1963); Stewart, *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) 또는 액상 합성 기술(US 등록특허 제5,516,891호)에 따라 제조될 수 있다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는 용어 "앵타머(aptamer)"는 타겟 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 또는 펩타이드 분자로, 이의 제작을 위해 참조하여야 하는 타겟 단백질의 아미노산 서열은 GenBank에서 확인할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 PTA 단백질의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열은 각각 GenBank 접근 번호 BA000018.3(서열목록 제1서열) 및 NP_373799(서열목록 제2서열)에 개시되어 있으며, 이 서열을 참조하여 항체 또는 앵타머를 디자인할 수 있다. 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC *et al.*, *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

[0096] 본 발명의 결합제로 이용될 수 있는 항체는 다중클론 또는 단일클론 항체이며, 구체적으로는 단일클론 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 다중클론 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 용이하게 수득할 수 있다.

발명의 효과

[0097] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0098] (a) 본 발명은 가상 스크리닝 방법을 이용하여 스타필로코커스 아우레우스의 포스포트랜스아세틸라제에 대한 리간드를 동정하는 방법 및 상기 리간드를 유효성분으로 포함하는 세균 감염 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

[0099] (b) 본 발명의 인 실리코 가상 스크리닝 방법은 타겟 단백질의 3차 구조를 분석하고 상기 타겟 단백질과 레퍼런

스 리간드 간의 상호작용을 분자동역학 시뮬레이션 방법으로 분석하여 상기 타겟 단백질의 활성 위치를 상동성 모델링으로 예측한다.

[0100] (c) 이를 토대로, 상기 타겟 단백질과 후보물질 리간드 라이브러리 간의 도킹 분석을 통해 상기 타겟 단백질에 대한 증가된 결합 에너지 및 약물동역학 특성을 가지는 약물-유사 분자들을 동정한다.

[0101] (d) 본 발명은 상술한 방법을 통해 스타필로코커스 아우레우스-유래된 포스포트랜스아세틸라제 억제제로서 화학식 I로 표시되는 화합물을 동정하였다.

[0102] (e) 따라서, 본 발명의 방법은 단백질체학, 바이오인포메틱스 및 조합화학에 기반되어 보다 빠르고 효율적으로 대량의 생리활성 후보물질들을 예측할 수 있음으로써 생명공학기술을 이용한 신약 개발 연구 분야에서 적용되어 신약 개발 비용을 획기적으로 절감시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0103] 도 1은 예측된 포스포트랜스아세틸라제의 3D 구조를 보여주는 도면이다. a, 2차 구조 제시; b, 표면 제시 (surface representation); 및 c, 예측된 구조와 템플레이트의 겹치기(PDB 접근 코드, ITD9).

도 2는 스타필로코커스 아우레우스 N315 스트레인과 바실러스 서브틸리스의 체인 A(PDB 접근 코드, itd9) 간의 서열 정렬을 보여주는 결과이다.

도 3은 PROCHECK에 의해 얻어진 스타필로코커스 아우레우스의 포스포트랜스아세틸라제의 라마찬드란 플롯(Ramachandran plot)을 보여주는 결과이다. 92.3% 잔기들이 가장 선호되는 부위(favourable region)에서 발견되고 7.6% 잔기들은 추가적으로 허용된 부위(allowed region)에서 발견되며, 0.3% 잔기들은 일반적으로 허용된 부위에서 발견된다.

도 4는 PTA의 공동 1에서 리간드의 위치를 보여주는 도면이다: a, ZINC08442078; b, ZINC08442087; c, ZINC08442182; d, ZINC08442184; 및 e, ZINC08442200.

도 5는 공동 1 형성에 포함된 잔기들(a) 및 수소 결합에 포함된 잔기들(b; 즉, Leu299, Gly298 및 Lys143)을 보여주는 도면이다.

도 6은 본 발명의 리간드인 ZINC08442078, ZINC08442087, ZINC08442182, ZINC08442184 및 ZINC08442200의 약물 발생작용단 맵핑 결과이다: a, 선택된 리간드들의 정렬; b, 약물발생작용단의 공유된 특성; 및 c, 약물발생작용단의 병합된(merged) 특성.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0104] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0105] 실시예

[0106] 실험재료 및 실험방법

[0107] 서열 검색, 물리화학적 특성 및 이차 구조 예측

[0108] 스타필로코커스 아우레우스의 PTA 서열은 NCBI 서버에서 이용가능한 단백질 데이터베이스로부터 검색되었다. 이론적인 등전점(isoelectric point, pI), 분자량, 양성 및 음성 잔기들의 총 수, 흡광계수(extinction coefficient)[28], 불안정성 지수(instability index)[29], AI(aliphatic index)[30] 및 GRAVY(grand average hydropathy)[31] 같은 PTA의 물리화학적 특성들은 Expasy's ProtParam 서버를 이용하여 평가되었다[32]. SOPMA[33]은 본 연구에서 이용된 포스포트랜스아세틸라제 서열의 2차 구조적 특성들을 계산하기 위해 이용되었다.

[0109] 세포 내 위치 및 기능성 평가

[0110] PTA 단백질의 세포 내 위치(subcellular localization) 분석은 프로테옴 분석-특화된 세포 내 위치 서버 v2.5(PA-SUB)[34]에 의해 실시되었다. 1차 구조(단백질 서열 데이터)로부터 'S-S' 결합에 대한 예측을 위해, CYS_REC(<http://sunl.softberry.com/berry.phtml?topic>)이 이용되었다. 단백질의 도메인들 및 패밀리들은 프로 시트 데이터베이스[35]에 의해 확인되었다.

[0111] 상동성 모델링(Homology Modelling)

[0112] 스타필로코커스 아우레우스 N315 스트레인의 328-아미노산-포함 포스포트랜스아세틸라제 서열은 NCBI 데이터베이스로부터 얻어졌으며 gi|159262661(BA000018.3; 서열목록 제1서열) 및 단백질 접근번호 NP_373799(서열목록 제2서열)로 동정되었다. 서열에 대한 파스타(FASTA) 파일은 상동성 모델링에 기초한 단백질 3D 구조 예측을 위한 서버인 EsyPresd3D에 제출되었다[36]. 정렬(alignment)-기반된 예측 모델은 상기 서버를 이용하여 얻어졌다. 유용한 모델 및 2차 구조는 STRIDE에 의해 확인되었다[37]. 에너지 최소화 모델 및 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)는 각각 YASARA 및 SuperPose 서버를 이용하여 실시되었다[38, 39]. 상기 개발된 모델의 RMSD 분석은 SuperPose를 이용한 템플레이트에 대한 평균 편차에 의해 평가되었다. SuperPose 웹 서버는 변형된 쿼터니언 고유치 접근방법(quaternion eigenvalue approaches)을 이용한 짝짓기(pairwise) 및 다중 단백질 구조 겹치기(superposition) 모두를 신속하고 확실하게 계산해 준다[39]. 상기 모델링된 구조는 UCLA 및 PROCHECK 서버에 제출되어 상기 제조된 구조의 질(quality) 및 입체화학을 보장한다[19, 40]. 본 연구에서 이용된 PTA 활성 위치의 정보가 CSA 데이터베이스[41]에서는 발견되지 않는 것으로 보아 상기 PTA 활성 위치는 본 연구에서 처음으로 예측되고 제시되었다.

[0113] 리간드 라이브러리의 제조

[0114] PTA에 대한 억제제로 알려진 아세틸 포스페이트(DB 02897)는 약물 은행 데이터베이스로부터 얻어졌고, 상기 분자의 초기 값들(initial values)이 라이브러리 제조를 위해 이용되었다[5]. 리간드 라이브러리는 리프스키의 5가지 규칙에 따른 변수들($1.5 \leq x \log P \leq 5$, $2 \leq H \text{ donors} \leq 5$, $5 \leq H \text{ acceptors} \leq 10$, $140.03 \leq \text{molecular weight} \leq 500$)을 이용한 ZINC 데이터베이스로부터 제조되었다[42, 51, 52].

[0115] 도킹(Docking) 분석

[0116] 제조된 라이브러리와 본 발명자들의 예측된 3D 모델의 포스포트랜스아세틸라제 간의 가상(virtual) 도킹 연구는 제조자의 지시에 따라 Molegro Virtual Docker version 1.1.1 소프트웨어(Molegro ApS, Aarhus, Denmark, <http://www.molegro.com>)를 이용한 분자 도킹 알고리즘인 MolDock[5, 19, 43]을 이용하여 실시하였다. 도킹 과정은 3개의 상호관계된 구성요소들로 구성되었다: (a) 결합 위치의 동정; (b) 도킹 알고리즘; 및 (c) 스코어링 함수 또는 에너지 계산 소프트웨어[42, 54]. 도킹을 위해, 구간 선형 포텐셜 함수(piecewise linear potential)에 기반하고 재-랭킹(re-ranking) 과정이 가장 높게 랭크된 위치에 적용된 MolDock 스코어링 함수가 도킹 정확도를 증가시키기 위해 이용되었다. Arguslab 및 단백질 구조 복합체들에 대해 모델링된 리간드들은 도킹 프로그램-할당 결합들, 빠져있다면 혼성화(hybridisation) 및 확실한 수소 분자, 그리고 Molegro Virtual Docker 소프트웨어를 이용한 전하 및 유연한 뒤틀림(flexible torsions) 내로 삽입되었다. 삽입된 리간드들의 분자 구조는 도킹 전에 수작업으로 체크되었으며, 실패한 경우에는 올바르게 정정되었다. 본 발명자들의 구조 분석이 단백질들만 포함하고 있을 뿐, 여기에는 조요소 또는 리간드들 모두 포함되지 않는다. 단백질 구조 내 물 분자들도 도킹 실험들에서 배제되었다[54-56]. 소프트웨어 변수의 기본 셋팅(default setting)이 본 연구에서 이용되었고, 리간드들은 mol2 포맷에서 제조된 본 발명의 라이브러리로부터 제공된다. 결합 위치들은 단백질 복합체 내 리간드의 관찰된 결합의 중심에 위치한 $15 \times 15 \times 15 \text{ \AA}^3$ 큐브 내로 제한되었다. 리간드-단백질 도킹 서치 알고리즘의 확률적(stochastic) 특성으로 인해, 10개의 실시(runs)를 행하여 각 리간드 별로 10개의 도킹 위치들(solutions; pose)을 선택하였다. 가장 높은 랭크 MolDock 스코어를 가진 위치와 단백질 간의 상호작용 에너지가 비교되었다[54-56].

[0117] **약물작용발생단(Pharmacophore) 제조 및 독스(Tox) 연구들**

[0118] 정렬 및 가상 약물작용발생단 모델 제조는 리간드스카우트(Ligandscout) 2.03[44]을 이용하여 실시하였다. 리간드스카우트 프로그램은 수소 결합 벡터들, 전하 그룹들, 방향성 측면 상호작용 및 방향성 양성 이온성 상호작용을 포함하는 넓은 범위의 화학적 특성들에 대한 정의를 제공한다. 진보된 정렬 알고리즘은 약물작용발생단과 분자들을 중첩시켜 공통적인 결합 모드들이 검출되고 공유된 화학적 특성들이 삽입될 수 있도록 허용하며, 독스 연구들은 화학적 독성 평가에서 컴퓨터-기반된 평가 방법들을 위한 상업적으로 이용가능한 소프트웨어인 토크스트리(toxtree; Ideacon Ltd에 의해 개발됨; Sofia, Bulgaria)를 이용하여 실시된다[45].

[0119] **실험결과 및 추가논의사항**

[0120] 본 연구를 위한 포스포트랜스아세틸라제(EC: 2.3.1.8)의 선택은 본 발명자들의 이전 연구 결과로, 이전 연구에서 본 발명자들은 핵심 효소에 대한 조사를 통해 스타필로코커스 아우레우스의 대사 경로들을 광범위하게 분석하였다. 상기 효소는 필수적인 것으로 조사되었다. 상기 효소는 BLASTp를 이용한 조사에서 인간 단백질들과 유사성을 가지지 않았다. 상기 328-아미노산-포함 효소는 eutD 유전자의 산물이다. 미생물의 생존을 위해 필수적인 효소 중 하나인 포스포트랜스아세틸라제는 신규한 클래스의 항균제의 고안 및 평가를 위한 잠재적인 약물 타겟일 수 있다[5, 18, 19].

[0121] **포스포트랜스아세틸라제의 물리화학적 및 기능적 특징들**

[0122] ExPASy's ProtParam 수단을 이용하여 컴퓨팅된 변수들은 표 1에 제시되어 있다.

표 1

[0123] 포스포트랜스아세틸라제의 물리화학적 및 기능적 특징들.

분석	변수들 및 각 특성들								
물리화학적 특성들	MW	pI	-R	+R	EC	II	AI	GRAVY	
	34,951.7	4.72	45	32	10,555	34.61	98.17	Y 0.086	
계산된 2차 구조(SOPMA)	알파 헬릭스, 46.95%	3_{10} 헬릭스, 0.00%	Pi 헬릭스, 0.00%	베타 브릿지, 0.00%	확장된 가닥, 14.02%	베타 턴, 7.93%	벤드 위, 0.00%	임의적 코일, 31.10%	모호한 상태, 0.00%
CYS_REC PA-SUB 및 SOSUI 분석	CYS_REC: C167 및 C310			PA-SUB: 세포질			SOSUI: 용해 단백질		

[0124] 포스포트랜스아세틸라제의 계산된 pI(isoelectric point) 값은 4.72(즉, $pI < 7$)였는데, 이는 상기 단백질이 자연 상태에서 산성이라는 것을 의미한다. 상기 단백질의 흡광 계수는 단백질-단백질의 정량적 연구를 확립하기 위해 필요하고, 용액 내 단백질-리간드 상호작용은 $10,555 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 로 확인되었다. 상기 효소의 불안정 지수는 34.61로 계산되었는데, 상기 수치는 40 이하였기 때문에 안정적인 단백질이라는 것을 의미한다[29]. 지방족 사이드 체인(A, V, I 및 L)에 의해 점유된 단백질의 상대적인 용량으로 정의되는 지방족 지수(AI)는 구상 단백질의 열 안정성 증가에 대한 양성 인자로서 간주되고 상기 계산된 값은 98.17이었다. 펩타이드 또는 단백질의 GRAVY 값은 서열 내 잔기들의 수로 나누어진 모든 아미노산의 수치값(hydrophathy)의 합으로서 계산된다. 포스포트랜스아세틸라제의 GRAVY 지수는 0.086이었다(표 1). 상기 낮은 범위의 수치는 물과의 보다 나은 상호작용의 가능성을 나타낸다. 상기 효소는 SOSUI에 의한 분석을 통해 수용성 세포질 단백질로 동정되었다. 이황화 결합(disulphide bridges)이 상기 단백질의 열 안정성에 핵심적인 역할을 수행한다는 사실이 잘 알려져 있다: CYS_REC에 의해 유추된 상기 확실한 이황화 결합의 위치가 표 1에 제시되어 있다. 상기 분석을 통해 밝혀진 위치 외에 다른 양성 위치들이 존재하지 않는다. 본 발명자들은 상기 서열을 Prosite 서버에 제출한 경우에 다른 패턴, 모티프, 특징(signature) 또는 지문(fingerprint)을 발견하지 못했다. 단백질의 2차 구조는 정렬과 함께 자가-최적화된 예측 방법(SOPMA)에 의해 예측되었는데, 상기 방법은 2차 구조 예측의 공식적 기제에 대해 69.5%의 아미노산들을 올바르게 예측한다[33]. SOPMA에 의해 예측된 바와 같이 2차 구조의 특징은 표 1에

제시되어 있다.

[0125]

상동성 모델링 및 도킹

[0126]

스타필로코커스 아우레우스의 포스포트랜스아세틸라제 효소의 3D 구조는 자동화된 상동성 모델링 서버인 ESyPred3D에 의해 모델링되었다(도 1). 정렬은 여러 개의 다중 정렬 프로그램들의 결과들을 조합, 웨이팅(weighting) 및 스크리닝하여 얻어지고, 최종 구조가 모델링 패키지인 MODELLER를 이용하여 수립되었다[36]. 본 발명의 조사에 이용된 템플레이트는 3D 구조 모델리에 이용되었던 바실러스 서브틸리스(*bacillus subtilis*)로부터 유래된 1TD9 체인 'A'였다: X-선 회절법에 의해 분석된 해상도는 2.75 Å[25]이었다. 상기 서버 결과는 상기 템플레이트가 ALIGN 프로그램을 이용한 본 발명자들의 탐색 서열(도 2)과 64.4% 동일성을 공유하는 반면에 PDB 데이터베이스를 통한 BLASTp 결과가 99% 탐색 범위(query coverage)를 보인다는 것을 보여준다. PTA는 보고된 박테리아 및 고세균성 PTA 도메인들과 높은 서열 유사성을 가진다(BLAST 서치 결과들; 결과를 보이지 않음).

[0127]

메타노사시나 서모필레(*Methanosarcina thermophila*)로부터 얻어진 포스포트랜스아세틸라제의 구조적 특징들은 cys159가 안정성 및 가능한 촉매 작용을 위해 필요하고, 활성 위치(active site)로 기능하지만 촉매 작용에 필수적이지 않은 cys312, 그리고 arg87, arg133 및 arg310의 잔기들이 CoA와 상호작용하는 것으로 제안되었다[27, 46]. 스태필로코커스 아우레우스의 포스포트랜스아세틸라제는 cys167 및 cys310, 그리고 arg88, arg 89, arg134, arg148, arg285 및 arg308 잔기들을 가지고 있다. 이들 중, arg88, arg134 및 arg308, 그리고 cys167 및 cys310 잔기들이 활성 위치에 포함될 것으로 예상된다. PTA에서 예측된 활성 위치에 대한 가설을 유효화시키기 위해, CSA 서버가 이용되었지만 불행하게도 EC: 2.3.1.8에 대한 어떠한 기록도 검색되지 않았다[41]. 정렬 연구는 cys167 및 cys310, 그리고 arg88, arg 89, arg134, arg148, arg285 및 arg308 잔기들이 활성 위치 정보에 포함될 수 있다는 것을 알려준다. 패턴을 분석하기 위해 PTA의 2차 구조가 STRIDE[37]에 의해 제조되었다. 상기 모델링된 구조가 포스 필드 에너지 최소화(force field energy minimisation)에 적용된 결과, -56,133.5 kJ/mol 및 -2.97의 초기값과 비교하여 최종 수치는 -176,747.6 kJ/mol이고 스코어는 -0.09였다. 모델 결정 구조에 대한 Cα RMSD 및 템플레이트 결정 구조에 대한 백본 RMSD 편차 값은 각각 0.64 Å 및 0.65 Å이었다. 템플레이트로서 PTA의 모델링 구조 연구를 통해 예측된 구조가 도킹에 적합한 지 여부를 확인하였다[47]. 따라서, 예측된 구조의 질을 평가하기 위한 다른 변수가 연구되었다. 상기 예측된 모델에 대한 라마찬드란 플롯(Ramachandran plot)은 92.3% 잔기들이 가장 선호되는 부위(favourable region)에서 발견되고 7.6%는 허용된 부위(allowed region)에서 발견되는 것으로 나타났다(도 3). 전체적인 G 요소는 모델링된 구조가 가상 스크리닝에 적합한 것으로 해석된 주 체인 변수(main chain parameter)에 기반하여 계산되었다[48].

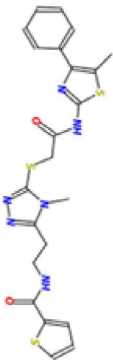
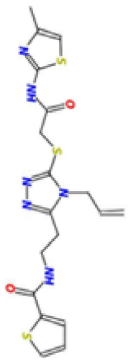
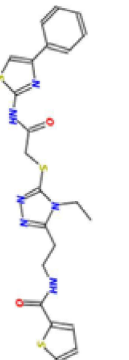
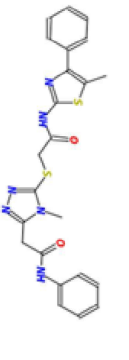
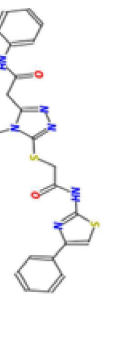
[0128]

제조된 라이브러리의 리간드들과 상기 효소의 모델링된 구조와의 도킹은 MolDock 알고리즘을 이용하여 실시하였다[43]. 또한, 분자 특징에서의 최근 진보들과 바이오인포매틱스는 단백질에 작은 분자들(즉, 리간드들)을 '도킹(dock)'하고 잠재적인 결합을 '스코어링(score)'하는 것을 가능하게 하였다. 가상 스크리닝은 컴퓨터 방법학들을 이용하여 실시됨으로써 특정 단백질 타겟에 대한 생물학적으로 활성을 가지는 분자들을 동정한다[49]. 본 연구에서, 본 발명자들은 타겟들의 결정(crystallographic) 데이터를 이용하여 검증된 리간드들에 대한 유사성 서치 및 분자 도킹 방법을 포함하는 방법학을 이용하였다. 그럼에도 불구하고, 스태필로코커스 아우레우스의 PTA 및 이에 대한 개별 억제제들에 대한 매우 제한된 정보만이 유용할 뿐이다. 본 연구의 신규성은 약리학적 특성에 따른 가상 스크리닝 및 분자들의 선택을 이용한 방법이라는 것에 기반한다. 가상 스크리닝 방법은 도킹에 적합한 모델을 위해 필요한 조건을 규정하는 모델링된 구조에 기초하여 실시하였다. 이에, 도킹 및 가상 스크리닝 같은 방법들은 약물 개발에 널리 이용되고 있다. 따라서, 결정학적으로 동정된 결합 오리엔테이션(bound orientations)에 대한 모든 재-도킹된 위치들의 유사성에 기초된 효과적인 도킹 프로토콜의 선택은 실험 과정 동안 가장 주된 관심사였다. 대칭성-합치된 RMSD가 모든 위치들에 대해 계산되었다. 가상 스크리닝 방법은 약물 발견 프로세스에서 실시되는 가장 빠른 방법들 중 하나로, 단백질의 활성 위치에 대해 친화도(affinity)를 나타낼 수 없는 원치 않는(undesired) 분자들을 여과하는 데 이용된다. 본 연구에서, 본 발명자들은 약물-유사 특성을 나타낼 수 없는 분자를 여과하기 위한 범주들 중 하나인 리핀스키 규칙들을 적용하였다. 상술한 조건들 하에서 제조된 1,001개의 분자들로 구성된 라이브러리를 이용하여 도킹을 실시하였다. 도킹 스코어에 기반하여, 5개의 리간드들이 반환된 위치들(returned poses) 당 2개의 스코어링 함수들과의 결합(conjugation)을 통한 2개의 서치 알고리즘을 이용하여 선택되었다. 48.128 Å³의 부피와 148.48 Å²의 표면적을 가지는 공동 1(cavity 1)이 대부분의 리간드들과의 결합에 포함된다는 것을 확인하였다. 리간드와 단백질

질 간의 상호작용 에너지를 평가하기 위해, 상술한 조건 하에서 도킹 실험을 실시하였다. 각 리간드의 MolDock 스코어 및 수소 결합 에너지가 분자들을 선택하기 위한 주요 기준들이었다. H-결합 공여체(donor), H-결합 수용체(acceptor), 분자량, 분자식, $\chi \log p$, 화합물 ID, 징크(zinc) ID, 리간드 명, 등 같은 선택된 화합물들의 특성들은 표 2에서 보여진다.

표 2

도킹 연구로부터 얻어진 5개의 선택된 리간드들의 물리화학적 특징들.

특성	리간드 분자				
라이브러리 리간드 명 구조	ZINC8442078 	ZINC8442200 	ZINC8442087 	ZINC8442184 	ZINC8442182 
화합물 ID	9542913	9542940	9542914	3660145	4612017
분자량	498.64408	448.5854	498.64408	478.58978	464.5632
분자식	C ₂₂ H ₂₂ N ₆ O ₂ S ₃	C ₁₈ H ₂₀ N ₆ O ₂ S ₃	C ₂₂ H ₂₂ N ₆ O ₂ S ₃	C ₂₃ H ₂₂ N ₆ O ₂ S ₂	C ₂₂ H ₂₀ N ₆ O ₂ S ₂
LogP3-AA	3.9	3	3.8	3.4	3
H-결합 공여체	2	2	2	2	2
H-결합 수용체	5	5	5	5	5
IUPAC 명	N-[2-4-메틸-5-[2-[(5-메틸-4-페닐-1,3-티아졸-2-일)아미노]-2-옥소에틸]설페닐-1,2,4-트리아졸-3-일]에틸]티오펜-2-카르복사미드	N-[2-[5-[2-[(4-메틸-1,3-티아졸-2-일)아미노]-2-옥소에틸]설페닐-4-프롭-2-에닐-1,2,4-트리아졸-3-일]에틸]티오펜-2-카르복사미드	N-[2-4-에틸-5-[2-옥소-2-[(4-페닐-1,3-티아졸-2-일)아미노]에틸]설페닐-1,2,4-트리아졸-3-일]에틸]티오펜-2-카르복사미드	2-[4-메틸-5-[2-[(5-메틸-4-페닐-1,3-티아졸-2-일)아미노]-2-옥소에틸]설페닐-1,2,4-트리아졸-3-일]-N-페닐아세트아미드	2-[4-메틸-5-[2-[(4-페닐-1,3-티아졸-2-일)아미노]에틸]설페닐-1,2,4-트리아졸-3-일]-N-페닐아세트아미드
도킹 스코어	-188.8	-181.242	-180.403	-179.924	-175.551
중원자	33	29	33	33	32
H-결합 에너지	-11.9416	-9.89572	-10.9408	-10.2336	-9.55797
회전가능한 결합들의 뒤틀림 수	9	10	10	8	8
재-랭킹 스코어	-130.24	-112.207	-98.3151	-128.719	-124.596

본 발명자들은 도킹 스코어에 기반하여 상기 리간드들을 선택하였다. 상위인 5개의 선택된 리간드 분자들과 공동에 대한 이들의 결합 위치가 도 4에 제시되어 있다. 공동의 형성에 포함된 잔기도 도 5a에 제시되어 있고 리간드 분자와 수소 결합 상호작용하는 공동 근처의 잔기도 도 5b에서 보여진다.

ADME/독스트리 예측 및 약물작용발생단 모델 생성

MolDock 스코어에 기반된 도킹 시뮬레이션 후, 개시 세트인 1,001개의 분자들로부터 상위 25개 화합물들이 선택되었다. 상술한 분자들은 약리학적 특성들을 여과하기 위해 제출되었는데, 이때 완전한 형태의 다양한 이용자-친화적인 개방 어플리케이션인 독스트리가 독성의 해로운 특성들을 평가하기 위해 이용되었다. 이용자-제한된 분자 구조들도 SMILES 또는 내장된 2D 구조 도식 편집기를 이용하여 도입될 수 있도록 제공된다[19].

ADME(absorption, distribution, metabolism and excretion) 같은 다른 특성들도 예측되었다. 상술한 특성들에 기반하여 5개의 분자들이 최종적으로 선택되었다(표 2).

[0133]

바이오인포메틱스 및 조합 화학의 분야에서 여러 기술의 진보로 인해, 이용가능한 화합물 라이브러리의 크기 뿐 아니라 알려진 타겟들의 수가 폭발적으로 증가하고 있다. 상기 5개의 분자들이 비-발암성(non-carcinogenic)이라는 것을 확인시켜 주었고 약물작용발생단을 이용한 가상 스크리닝 방법이 라이브러리로부터 타겟에 대한 *인 실리코(In silico)* 전-스크리닝 화합물들을 위한 우수한 기법이라는 것을 증명하였다[19, 50].

약물작용발생단은 3D 공간에서 거대분자의 활성 위치에 대한 리간드의 특이적 행동 모드를 규명하는 보편적인 화학 특징들의 앙상블(ensemble)로서 정의된다. 예를 들어, 리간드 라이브러리의 가상 스크리닝으로부터 상위 5개의 리간드들(약물-유사 분자)을 획득한 후, 분석된 상기 분자들의 화학적 특징들은 수소 결합들, 전하 상호작용, 소수성 영역(areas), 등을 포함한다. 본 발명자들은 리간드스카우트 2.03 소프트웨어(완전하게 자동화된 간편한 방식으로 거대분자/리간드 복합체들의 구조적 데이터들로부터 신속하고 투명한 3D 약물작용발생단을 창출할 수 있는 소프트웨어 수단)에서 레퍼런스 분자로서 ZINC08442078을 이용하여 상술한 분자들의 구조적 정렬을 실시하여 포스포트랜스아세틸라제에 대한 이론적인 약물작용발생단 모델을 생성하였다. 약물작용발생단 모델의 공유된(shared) 특징은 약물작용발생단의 6개 특징을 나타낸다: (a) 소수성 특징인 황색 구형(yellow sphere); (b) 녹색 벡터로 표시된 하나의 수소 결합 공여체; (c) 하나의 방향성 링; 및 (d) 3개의 수소 결합 수용체. 한편, 약물작용발생단 모델의 병합된(merged) 특징은 8개의 소수성 특징, 4개의 수소 결합 공여체, 9개의 방향성 링 및 11개의 수소 결합 수용체를 나타낸다. 병합된 약물작용발생단 모델 뿐 아니라 공유된 약물작용발생단 모델을 통한 5개의 리간드들의 정렬은 도 6에서 보여진다. 종합하여, 본 발명자들은 PTA를 잠재적인 타겟으로서 선택하였으며, 스타필로코커스 아우레우스에서 상기 효소에 대한 고찰이 표준 알고리즘을 이용한 몇몇 컴퓨터 분석방법을 통해 이루어졌다. 본 연구에 따르면, 본 발명자들은 효소와 리간드 간의 잠재적인 상호작용을 규명하고자 시도하였다. 본 연구는 적절한 활성을 위한 항균제 및 이의 보조제의 디자인 및 선택에 도움을 줄 수 있을 것이다.

[0134]

가상 스크리닝 접근방법들을 이용하여 억제제를 개발한 성공적인 몇 가지 예들이 있다. 첫 번째 성공적인 도킹 실험 테스트 결과는 HIV-1 프로테아제에 결합할 수 있는 다양한 서브세트의 분자들을 동정하기 위해 DOCK 프로그램을 이용하여 실시하였다[54-57]. VS로부터 동정된 리간드들 중 하나가 브로모페리돌(bromoperidol)로, 상기 화합물은 할로페리돌(haloperidol)의 유사체였으며 HIV 프로테아제 억제제로 밝혀졌다. 이후, 유사체 합성을 통해 15 μ M 억제능을 가지는 티오케탈(thiokeetal) 유도체를 생산하였다. 더 나아가, 머크사의 HIV 프로테아제 억제제인 인디나비르(Indinavir) 설페이트가 도킹을 이용하여 부분적으로 개발되었다[58].

[0135]

수많은 경고에도 불구하고, 가상 스크리닝 방법은 생물학적으로 관련된 화학 분야를 탐구하기 위한 매우 중요한 수단이다. 따라서, 보다 거대한 가상 스크리닝 연구가 작은 분자들의 라이브러리(예컨대, 수백만 개의 화합물로 구성된 라이브러리)에 집중되고 있다. 본 발명자들의 이전 연구에서, 본 발명자들은 약물 디자인을 위해 타겟팅될 수 있는 핵심 단백질의 발견을 목적으로 대사경로들을 분석하였다. 스타필로코커스 아우레우스의 대사체군에 대한 비교 연구는 핵심 효소들이 약물 디자인을 위해 타겟팅될 수 있다[5]는 아이디어를 제공하여 8개의 필수 단백질들이 스타필로코커스 아우레우스로부터 동정되었다. 상술한 잠재적인 타겟들 외에도, PTA가 본 연구를 위해 선택되었는데, 이는 상기 단백질이 인간 단백질과의 비교에서 비-상동성 단백질로 발견되어 보다 안전한 타겟일 수 있기 때문이다. 상기 효소에 대한 억제제로서 보고된 분자는 약물 디자인을 위해 추가적으로 탐구될 수 있다. 본 연구에서, 본 발명자들은 효소의 활성 위치 및 억제제의 결합을 조사할 수 있는 포괄적이고 효과적인 분자 모델링 및 도킹 방법학을 기재하였다. 약물로서 완전한 평가를 위한 보다 많은 *인 비보* 실험 결과를 조사하는 것이 여전히 필요한 상태이다. 약물을 디자인하기 위한 상기 선택가능한 접근방법을 이용하여, 탐구자는 시도 및 히트 방법학(try and hit methodology)을 최소화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 시간, 비용 및 테스트 동물의 생명을 보호할 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 연구는 잠재적인 약물-유사 특성들을 가지는 몇몇 분자들이 스타필로코커스 아우레우스에 대한 항균제로서 조사될 수 있음을 보여준다.

[0136]

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술 하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 일 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0137]

참고문헌

- [0138] 1. Carleton, H. A., Diep, B. A., Charlebois, E. D., Sensabaugh, G. F., & Perdreau-Remington, F. (2004). Community-adapted methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): population dynamics of an expanding community reservoir of MRSA. *Journal of Infectious Diseases*, 190, 1730-1738.
- [0139] 2. Diekema, D. J., Pfaller, M. A., & Schmitz, F. J. (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clinical Infectious Diseases*, 32, S114-S132.
- [0140] 3. Freeman-cook, L., & Freeman-cook, K. (2006). *Staphylococcus aureus* infections (deadly diseases and epidemics). Philadelphia, Chelsea House Publications.
- [0141] 4. King, M. D., Humphrey, B. J., Wang, Y. F., Kourbatova, E. V., Ray, S. M., & Blumberg, H. M. (2006). Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Annals of Internal Medicine*, 144, 309-317.
- [0142] 5. Morya, V. K., Dewaker, V., Mecarty, S. D., & Singh, R. (2010). In silico analysis metabolic pathways for identification of putative drug targets for *Staphylococcus aureus*. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 3(3), 062-069.
- [0143] 6. Ross, R. A., & Onderdonk, A. B. (2000). Production of toxic shock syndrome toxin 1 by *Staphylococcus aureus* requires both oxygen and carbon dioxide. *Infection and Immunity*, 68(9), 5205-5209.
- [0144] 7. Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(11), 1620-1625.
- [0145] 8. Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2011). Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *Journal of Pathogens*, 2011(601905), 13. doi:10.4061/2011/601905.
- [0146] 9. Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6), 747-763.
- [0147] 10. Ellis, M. W., Griffith, M. E., Jorgensen, J. H., Hospenthal, D. R., Mende, K., & Patterson, J. E. (2009). Presence and molecular epidemiology of virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing and infecting soldiers. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 940-945.
- [0148] 11. Ferry, T., Perpoint, T., Vandenesch, F., & Etienne, J. (2005). Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Current Infectious Disease Reports*, 7, 420-428.
- [0149] 12. Hogevis, H., Sderquist, B., Tung, H. S., Olaison, L., Westberg, A., Rydn, C., Tarkowski, A., & Andersson, R. (1998). Virulence factors of *Staphylococcus aureus* strains causing infective endocarditis: a comparison with strains from skin infections. *APMIS*, 106(9), 901-908.
- [0150] 13. Spanu, V., Spanu, C., Viridis, S., Cossu, F., Scarano, C., & De Santis, E. P. (2012). Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(12), 53-57.
- [0151] 14. Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, 339, 520-532.
- [0152] 15. Sarkar, M., Maganti, L., Ghoshal, N., & Dutta, C. (2012). In silico quest for putative drug targets in *Helicobacter pylori* HPAG1: molecular modeling of candidate enzymes from lipopolysaccharide biosynthesis pathway. *Journal of Molecular Modelling*, 18(5), 1855-1866.
- [0153] 16. Perumal, D., Lim, C. S., Sakharkar, K. R., & Sakharkar, M. K. (2007). Differential genome analyses of metabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* for drug target identification. *Silico Biology*, 7(45),

453-465.

- [0154] 17. Butt, A. M., Tahir, S., Nasrullah, I., Idrees, M., Lu, J., & Tong, Y. (2012). *Mycoplasma genitalium*: a comparative genomics study of metabolic pathways for the identification of drug and vaccine targets. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(1), 53-62.
- [0155] 18. Morya, V. K., Kumari, S., & Kim, E. (2011). Imperative pathway analysis to identify the potential drug target for *Aspergillus* infection. *International Journal of Latest Trends in Computing*, 2(1), 178-182.
- [0156] 19. Morya, V. K., Kumari, S., & Kim, E. K. (2012). Virtual screening and evaluation of ketol-acid reductoisomerase (KARI) as a putative drug target for aspergillosis. *Clinical Proteomics*, 9(1), 1.
- [0157] 20. Dutta, A., Singh, S. K., Ghosh, P., Mukherjee, R., Mitter, S., & Bandyopadhyay, D. (2006). In silico identification of potential therapeutic targets in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Silico Biology*, 6 (1-2), 43-47.
- [0158] 21. Singh, S., Joshi, P., & Chopade, B. A. (2011). Pathway analysis of *Acinetobacter baylyi*: a combined bioinformatic and genomics approach. *Chemical Biology & Drug Design*, 78(5), 893905. doi:10.1111/j.1747-0285.2011.01191.x.
- [0159] 22. Bologna, F. P., Campos-Bermudez, V. A., Saavedra, D. D., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2010). Characterization of *Escherichia coli* EutD: a phosphotransacetylase of the ethanolamine operon. *Journal of Microbiology*, 48(5), 629-636.
- [0160] 23. Campos-Bermudez, V. A., Bologna, F. P., Andreo, C. S., & Drincovich, M. F. (2010). Functional dissection of *Escherichia coli* phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation. *FEBS Journal*, 277(8), 1957-1966.
- [0161] 24. Dimou, M., Venieraki, A., Liakopoulos, G., & Katinakis, P. (2011). Cloning, characterization and transcriptional analysis of two phosphate acetyltransferase isoforms from *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Biology Reports*, 38(6), 3653-3663.
- [0162] 25. Xu, Q. S., Jancarik, J., Lou, Y., Kuznetsova, K., Yakunin, A. F., Yokota, H., Adams, P., Kim, R., & Kim, S. H. (2005). Crystal structures of a phosphotransacetylase from *Bacillus subtilis* and its complex with acetyl phosphate. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 6(4), 269-279.
- [0163] 26. Iyer, P. P., Lawrence, S. H., Luther, K. B., Rajashankar, K. R., Yennawar, H. P., Ferry, J. G., & Schindelin, H. (2004). Crystal structure of phosphotransacetylase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Structure*, 12(4), 559-567.
- [0164] 27. Rasche, M. E., Smith, K. S., & Ferry, G. J. (1997). Identification of cysteine and arginine residues essential for the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Bacteriology*, 179(24), 7712-7717.
- [0165] 28. Gill, S. C., & Von Hippel, P. H. (1989). Extinction coefficient. *Analytical Biochemistry*, 182, 319-328.
- [0166] 29. Guruprasad, K., Reddy, B. V. P., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering*, 4, 155-164.
- [0167] 30. Ikai, A. J. (1980). Thermo stability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*, 88, 1895-1898.
- [0168] 31. Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132.
- [0169] 32. Gasteiger, E. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: J. M. Walker (Ed.), *The proteomics protocols handbook* (pp. 571-607). Totowa: Humana.

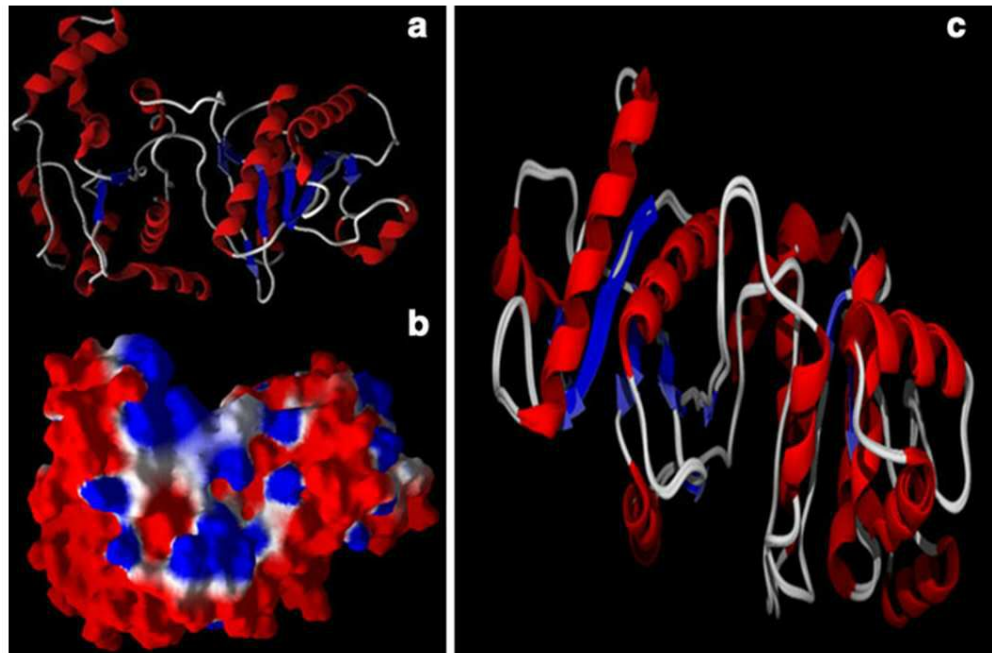
- [0170] 33. Geourjon, C., & Delage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer Applications in the Biosciences*, 11, 681-684.
- [0171] 34. Lu, Z., Szafron, D., Greiner, R., Lu, P., Wishart, D. S., Poulin, B., Anvik, J., Macdonell, C., & Eisner, R. (2004). Predicting subcellular localization of proteins using machine-learned classifiers. *Bioinformatics*, 20(4), 547-556.
- [0172] 35. Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J., Hofmann, K., & Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 235-238.
- [0173] 36. Lambert, C., Lonard, N., De Bolle, X., & Depiereux, E. (2002). ESyPred3D: prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics*, 18(9), 1250-1256.
- [0174] 37. Heinig, M., & Frishman, D. (2004). STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of protein. *Nucleic Acids Research*, 32, W500-W502.
- [0175] 38. Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., & Karplus, K. (2009). Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins*, 77(Suppl 9), 114-122.
- [0176] 39. Maiti, R., Gary, H., Domselaar, V., Zhang, H., & Wishart, D. S. (2004). SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Research*, 32, W590-W594.
- [0177] 40. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283-291.
- [0178] 41. Porter, C. T., Bartlett, G. J., & Thornton, J. M. (2004). The Catalytic Site Atlas: a resource of catalytic sites and residues identified in enzymes using structural data. *Nucleic Acids Research*, 32, D129-D133.
- [0179] 42. Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(1), 177-182.
- [0180] 43. Thomsen, R., & Christensen, M. H. (2006). MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11), 3315-3321.
- [0181] 44. Wolber, G., & Langer, T. (2005). LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(1), 160-169.
- [0182] 45. Wolber, G., Seidel, T., Bendix, F., & Langer, T. (2008). Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discovery Today*, 13(12), 23-29.
- [0183] 46. Lawrence, S. H., Luther, K. B., Schindelin, H., & Ferry, J. G. (2006). Structural and functional studies suggest a catalytic mechanism for the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 1143-1154.
- [0184] 47. Lee, M. R., Tsai, J., Baker, D., & Kollman, P. A. (2001). Molecular dynamics in the endgame of protein structure prediction. *Journal of Molecular Biology*, 313, 417-430.
- [0185] 48. Engh, R. A., & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallographica*, A47, 392-400.
- [0186] 49. Vianna, C. P., & de Azevedo, W. F., Jr. (2012). Identification of new potential *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase inhibitors through molecular docking simulations. *Journal of Molecular Modelling*, 18(2), 755-764.
- [0187] 50. Wermuth, C., & Langer, T. (1998). In H. Kubinyi (Ed.), *Pharmacophore Identification* (pp. 117-136).

Leiden: Escom.

- [0188] 51. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25.
- [0189] 52. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(13), 3-26.
- [0190] 53. Morya, V. K., Yadav, S., Kim, E. K., & Yadav, D. (2012). In silico characterization of alkaline proteases from different species of *Aspergillus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(1), 243-257.
- [0191] 54. Moraes, F. P., & de Azevedo, W. F., Jr. (2012). Targeting imidazoline site on monoamine oxidase B through molecular docking simulations. *Journal of MolecularModelling*, 18, 38773886. doi:10.1007/s00894-012-1390-7.
- [0192] 55. Heberl, G., & De Azevedo, W. F., Jr. (2011). Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. *Current Medicinal Chemistry*, 18(9), 1339-1352.
- [0193] 56. Dias, R., & de Azevedo, W. F., Jr. (2008). Molecular docking algorithms. *Current Drug Targets*, 9(12), 1040-1047.
- [0194] 57. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., & Ferrin, T. E. (1982). A geometric approach to macromoleculeligand interactions. *Journal of Molecular Biology*, 161(2), 269-288.
- [0195] 58. DesJarlais, R. L., Seibel, G. L., Kuntz, I. D., Furth, P. S., Alvarez, J. C., Ortiz de Montellano, P. R., De Camp, D. L., Bab, L. M., & Craik, C. S. (1990). Structure-based design of nonpeptide inhibitors specific for the human immunodeficiency virus 1 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6644-6648.

도면

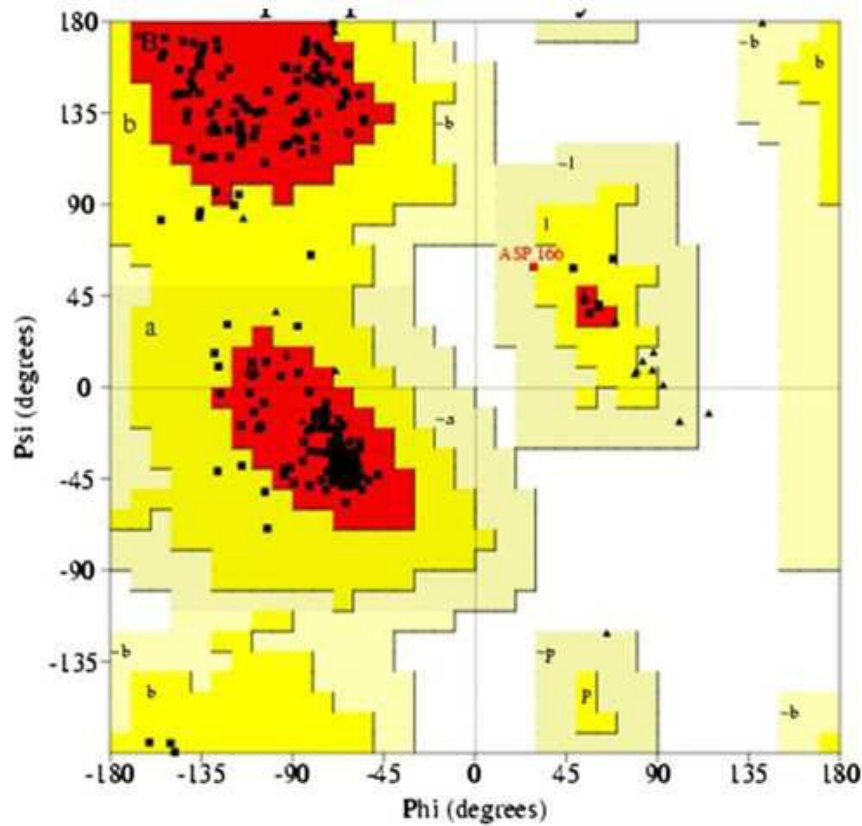
도면1



도면2

query 1
1td9 MADLLNLKDK KLSGNNVKIV LPEGEDERVL TAATOLQATD YVTPIVLGDE TKVQSLAQKL DLDISNIELI
71
query NPATSEKAE LVQSFVERRK GKATEQQAEE LLNNVNYFGT MLVYAGKADG LVSGAAHSTG DTVRPALQII
1td9 DPHTYEGMED LVQAQFVERRK GKATEQQAEE ALLDENYFGT MLVYKGLADG LVSGAAHSTA DTVRPALQII
141
query KTKPGVSRTS GIFFMIKGEDE QYIFGDCAIN PELDSQGLAE IAVESAKSAL SFGMDPKVAM LSFSTKGSAN
1td9 KTKEGVKKTS GVFIMARGE E QYVFADCAIN IAPDSQDLAE IAIESANTAK MFDIEPRVAM LSFSTKGSAN
211
query SDDVTIKVOEA VKLAQQAEE EKLEAIIDGE FQFDAAIVPG VAEKKAPGAK LOGDANVFVF PSLEAGNIGY
1td9 SDETEKVADE VKIAKEKAEE L-----TLDGE FQFDAAIVPS VAEKKAPDSE IKGDANVFVF PSLEAGNIGY
281
query KIAQRLGGYD AVGPVLOGIN SPVNDLSRGC SIEDVYNLSI ITAAQAL
1td9 KIAQRLGNFE AVGPILQGIN MPVNDLSRGC NAEDVYNLAL ITAAQAL

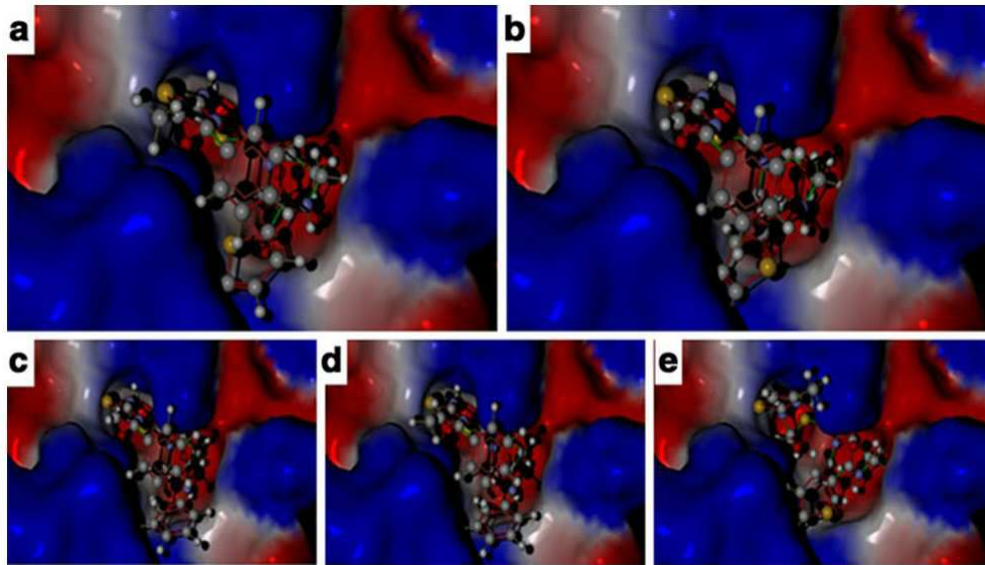
도면3



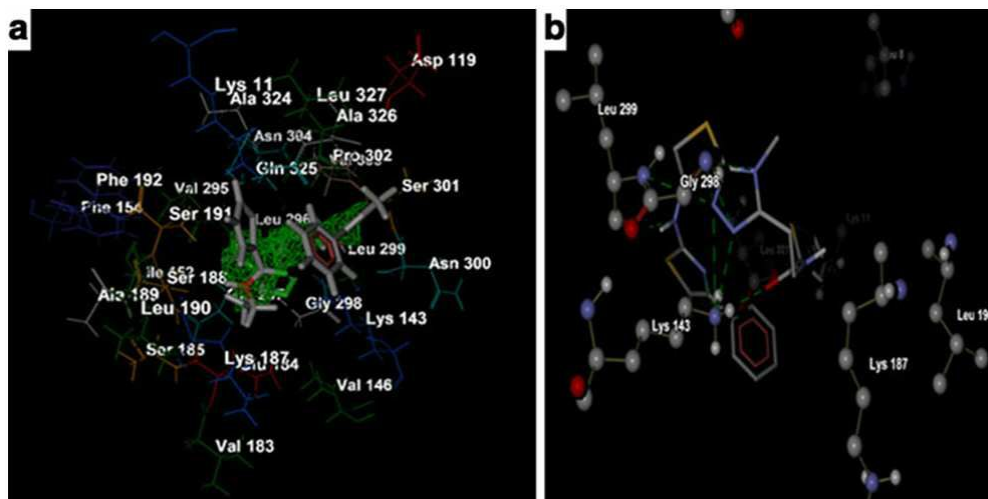
	A	P	Ctv	Cbw	Mbw	
Ramachandran plot quality	286	92.3	83.8	100	0.9	Inside
Residues (A,B,L)						
Peptide bond planarity	326	6.0	6.0	3.0	0.0	Inside
Bad non-bonded interactions	0	0.0	4.2	10.0	-0.4	Inside
Calpha tetrahedral distortion	300	1.5	3.1	1.6	-1.0	Inside
Main-chain hydrogen bond energy	211	0.7	0.8	0.2	-0.7	Inside
Overall G-factor	327	0.2	-0.4	0.3	1.9	better

A: Amino acids involved; P: Parameter value; Ctv: comparison of typical value; Cbw: Comparison value of band worth; Mbw: No. Of band widths from mean

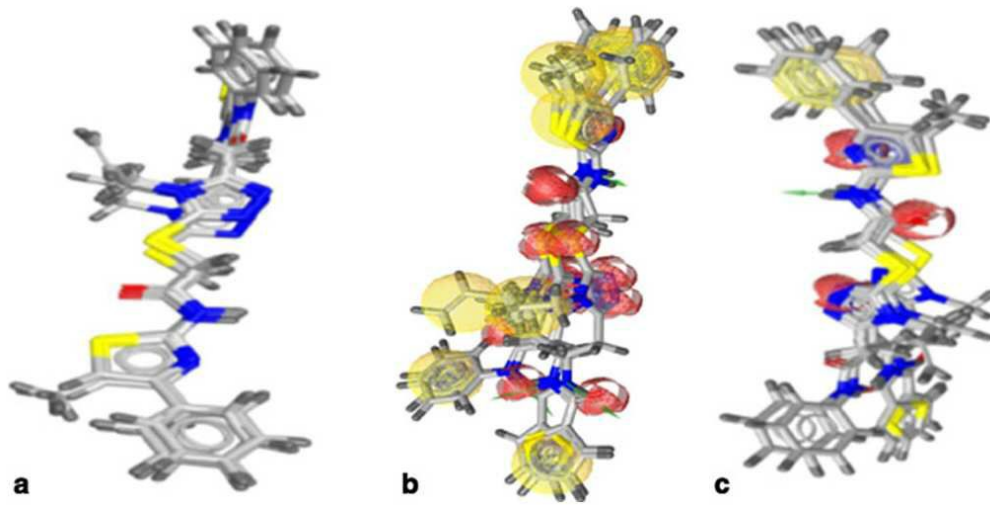
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

- <110> INHA Industry Partnership Institute
- <120> Pharmaceutical Compositions for Preventing or Treating a
Microorganism Infection Disease Comprising a Chemical Compound
with an Inhibitory Activity Against Phosphotransacetylase
- <130> PN130292
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 984
- <212> DNA
- <213> Staphylococcus aureus
- <400> 1

atggttgatt tattaaatgt attaaaagac aaactttctg gtaaaaacgt taaaatcgta	60
ttacctgaag gagaggacga acgtgttcta acagctgcaa cacaattaca agcaacagat	120
tatgttacac caatcgtgtt aggtgatgag actaaggttc aatctttagc gcaaaaactt	180
gatcttgata ttctaatat tgaattaatt aatcctgcga caagtgaatt gaaagctgaa	240
ttagttcaat catttggtga acgacgtaaa ggtaaagcga ctgaagaaca agcacaagaa	300
ttattaaaca atgtgaacta cttcgggtaca atgcttggtt atgctggtaa agcagatggt	360
ttagttagtg gtgcagcaca ttcaacagga gacactgtgc gtccagcttt acaaatcatc	420
aaaacgaaac caggtgtatc aagaacatca ggtatcttct ttatgattaa aggtgatgaa	480

caatacatct ttggtgattg tgcaatcaat ccagaacttg attcacaagg acttgagaa 540

attgcagtag aaagtgcaaa atcagcatta agctttggca tggatccaaa agttgcaatg 600

ttaagctttt caacaaaagg gtctgctaaa tcagacgacg tgacaaaagt tcaagaagct 660

gtcaaatag cacaacaaaa agctgaagaa gaaaaattag aagcaatcat tgatggcgaa 720

ttccaatttg atgctgcgat tgtaccaggt gttgctgaga aaaaagcgcc aggtgctaaa 780

ttacaaggtg atgcaaatgt cttgtattc ccaagtttag aagctggtaa tattggttac 840

aaaattgcac aacgtttagg tggatatgat gcagttggtc cagtattaca aggtttaaat 900

tctccagtaa atgacttate acgtggctgc tcaattgaag atgtatacaa tctttcaatt 960

attacagcag cgcaagcctt acaa 984

<210> 2

<211> 328

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

Met Ala Asp Leu Leu Asn Val Leu Lys Asp Lys Leu Ser Gly Lys Asn

1 5 10 15

Val Lys Ile Val Leu Pro Glu Gly Glu Asp Glu Arg Val Leu Thr Ala

20 25 30

Ala Thr Gln Leu Gln Ala Thr Asp Tyr Val Thr Pro Ile Val Leu Gly

35 40 45

Asp Glu Thr Lys Val Gln Ser Leu Ala Gln Lys Leu Asp Leu Asp Ile

50 55 60

Ser Asn Ile Glu Leu Ile Asn Pro Ala Thr Ser Glu Leu Lys Ala Glu

65 70 75 80

Leu Val Gln Ser Phe Val Glu Arg Arg Lys Gly Lys Ala Thr Glu Glu

85 90 95

Gln Ala Gln Glu Leu Leu Asn Asn Val Asn Tyr Phe Gly Thr Met Leu

100 105 110

Val Tyr Ala Gly Lys Ala Asp Gly Leu Val Ser Gly Ala Ala His Ser

115 120 125

Thr Gly Asp Thr Val Arg Pro Ala Leu Gln Ile Ile Lys Thr Lys Pro

130 135 140
 Gly Val Ser Arg Thr Ser Gly Ile Phe Phe Met Ile Lys Gly Asp Glu
 145 150 155 160
 Gln Tyr Ile Phe Gly Asp Cys Ala Ile Asn Pro Glu Leu Asp Ser Gln
 165 170 175
 Gly Leu Ala Glu Ile Ala Val Glu Ser Ala Lys Ser Ala Leu Ser Phe
 180 185 190

 Gly Met Asp Pro Lys Val Ala Met Leu Ser Phe Ser Thr Lys Gly Ser
 195 200 205
 Ala Lys Ser Asp Asp Val Thr Lys Val Gln Glu Ala Val Lys Leu Ala
 210 215 220
 Gln Gln Lys Ala Glu Glu Glu Lys Leu Glu Ala Ile Ile Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Phe Gln Phe Asp Ala Ala Ile Val Pro Gly Val Ala Glu Lys Lys Ala
 245 250 255
 Pro Gly Ala Lys Leu Gln Gly Asp Ala Asn Val Phe Val Phe Pro Ser

 260 265 270
 Leu Glu Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Ile Ala Gln Arg Leu Gly Gly
 275 280 285
 Tyr Asp Ala Val Gly Pro Val Leu Gln Gly Leu Asn Ser Pro Val Asn
 290 295 300
 Asp Leu Ser Arg Gly Cys Ser Ile Glu Asp Val Tyr Asn Leu Ser Ile
 305 310 315 320
 Ile Thr Ala Ala Gln Ala Leu Gln
 325