

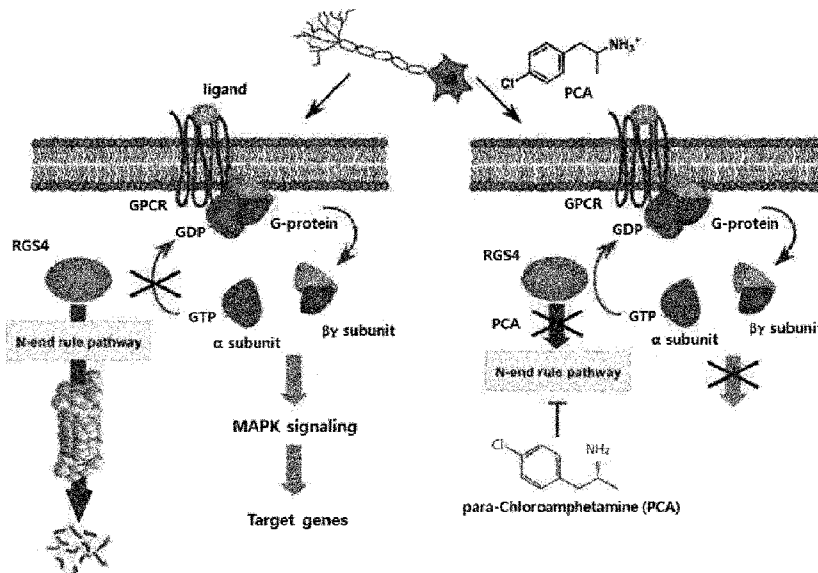


- (51) 국제특허분류:
A61K 31/137 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/000001
- (22) 국제출원일: 2015년 1월 2일 (02.01.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0000118 2014년 1월 2일 (02.01.2014) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 권용태 (KWON, Yong Tae); 151-907 서울시 관악구 관악로 1, 122A-201, Seoul (KR). 이민재 (LEE, Min Jae); 443-817 경기도 수원시 영통구 청명북로 81, 405-402, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 박원미 (PARK, Weonmee); 135-921 서울시 강남구 논현로 412, 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

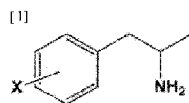
(54) Title: COMPOSITION AND METHOD FOR INHIBITING N-END RULE PATHWAY

(54) 발명의 명칭 : N-말단 법칙 경로의 저해용 조성물 및 방법



(57) Abstract: Disclosed are a composition for inhibiting the N-end rule pathway, the composition containing a compound of chemical formula 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a method for regulating the N-end rule pathway; and a method and kit for modulating protein denaturation through inhibition of the N-end rule pathway. The composition and method according to the present application can be favorably used to treat or prevent diseases associated with protein denaturation.

(57) 요약서: 본원은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, N-말단 법칙 경로 저해용 조성물 및 N-말단 법칙 경로의 조절 방법 및 N-말단 법칙 경로의 억제제를 통한 단백질 변성 조절 방법 및 키트를 개시한다. 본원에 따른 조성물 및 방법은 단백질변성과 관련된 질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.





공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: N-말단 법칙 경로의 저해용 조성물 및 방법 기술분야

- [1] 본원은 N-말단 법칙 조절과 관련된 분야이다.

배경기술

- [2] 단백질 농도의 감소는 전사 감소, 번역 감소, 및/또는 분해 증가에 의해 일어날 수 있다. 대다수의 세포 단백질은 기질 동원 및 기질 분해 기구로 구성된 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(UPS: ubiquitin-proteasome system)에 의해 분해된다.
- [3] 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(UPS)은 세포가 개별 단백질의 레벨을 조절하는 1차 기전이다. UPS를 통해, 세포는 생리학적 기능을 유지하고, 환경 및 병리적 변화에 적응하며, 단백질의 질을 조절한다. 기질 동원은 3가지 부류의 효소에 의해 매개되는데, E1은 유비퀴틴을 활성화시키고, E2는 유비퀴틴 운반체로서의 역할을 하며, E3은 활성화된 유비퀴틴을 단백질 기질에 부착시키는 유비퀴틴 단백질 라이게아제이다. 유비퀴틴화된 단백질은 유비퀴틴에 결합하는 특성에 의해 인식되고, 리소좀(Lys 63 결합) 또는 프로테아좀(Lys 11, Lys 29 또는 Lys 48 결합)에 대해 표적화되며, 분해된다(Dahlmann, BMC Biochem. 22: Suppl 1 :S3 (2007) 및 Miranda et al., Molecular Interventions 7: 157-167 (2007)).
- [4] 이러한 UPS에서, 유비퀴틴(Ub)의 C-말단 카르복실산과 표적 단백질의 내부 Lys의 ϵ -아미노기의 이소펩타이드 결합을 통해 표적 단백질이 유비퀴틴과 공유결합한다. 이러한 유비퀴틴 프로세스는 Ub-charged E2 Ub 컨쥬게이팅 효소 및 기질-특이적 E3 Ub 라이게아제에 의해 처음 매개되고, 이러한 프로세스는 탈유비퀴틴화 효소(DUBs)에 의해 반대로 조절되기도 한다. 따라서, 대부분 유비퀴틴-매개된 단백질 분해의 선택성은, 특이적 E3 Ub 라이게아제에 의해 인식되는 분해 시그널(degron)의 시간 및 공간적 활성화에 의해 최초로 조절된다.
- [5] N-말단 법칙 경로는 특정 N-말단 아미노산을 가진 단백질을 분해하는 단백질 분해 경로로서, 상기 단백질의 인 비보 반감기와 관련이 있다. N-말단 아미노산은 N-말단 법칙 경로를 창출하는 분해 시그널(N-degron)의 필수적 요소인 것으로 인식되어 왔다.
- [6] UPS 및 N-말단 법칙 경로는 손상된 단백질을 분해하고, 전사, 번역 및/또는 폴딩 오류에 의해 생성된 기능장애성 단백질을 제거하는 주요한 기전이다. UPS 또는 N-말단 법칙 경로가 비정상적으로 작동할 때, 변성된 단백질의 축적, 이어서 진행되는 응집은 신경변성 질환을 비롯한, 다수의 연령 관련 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 알츠하이머병에서의 베타 아밀로이드 축적이 부분적으로는 A β 응집체를 제거하는 UPS 및/또는 리소좀 프로세스의 상실에 의한 결과 여겨진다. 병적인 단백질 축적이 예를 들어, 파킨슨병(α 시누클레인을 함유하는 루이 소체) 및 헌팅턴병과 같은 다수의 다른

신경변성 질환에도 관여한다 (Upadhy et al., BMC Biochem. 22: Suppl 1 :S1 (2007)). 또한, BACE 분해가 유비퀴틴 프로테오좀 경로에 의해 매개된다(Qing, H. et al., FASEB J. 18:1571-1573 (2004))

- [7] 한편, 파라-클로로암페타민(para-chloroamphetamine, PCA)는 암페타민 유도체로서 도파민 방출제로 알려져 있으며, 한때 항우울제로 사용되었다.
- [8] 국제출원 공개공보 WO 2010/132390호는 유비퀴틴화된 단백질 수준을 감소시키는 방법에 관한 것으로, 유비퀴틴화된 단백질의 수준 감소를 필요로 하는 피험체에게 히데로시클릭 화합물을 투여하여 피험체에서 유비퀴틴화된 단백질 농도를 감소시키는 방법을 개시한다.
- [9] 미국 공개특허공보 제2010-0233730호는 치료를 위한 자가포식 조절에 관한 것으로, 세포에 시험물질을 처리한 후 대사 스트레스를 가해 자가포식체(autophagosome)의 세포내 변화 관찰을 통해, 자가포식 조절제를 선별하는 방법에 관한 것이다.
- [10] 국제출원 공개공보 제2011/011622호에는, 자가 포식에 효능을 갖는 저분자 억제제 및 그 용도가 개시되어 있다.
- [11] 상기 언급한 바와 같이 N-말단 법칙 경로의 저해를 통해 광범위한 다양한 질환이 치료될 수 있으며, 따라서 N-말단 법칙 경로의 저해에 관여하는 물질을 표적으로 하는 새로운 치료제 및 방법의 개발이 필요하다.

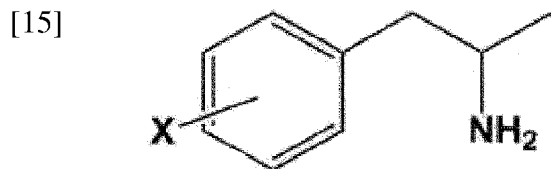
발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본원은 N-말단 법칙 경로를 저해하는 저해제 및 이의 용도를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [13] 한 양태에서 본원은 하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, N-말단 법칙 경로 저해용 조성물에 관한 것으로,
- [14] [화학식 1]



- [16] 상기 식에서, X는 H, 플루오로, 클로로, 브롬 또는 요오드이며, 2, 3, 또는 4 위치에 있을 수 있다.
- [17] 본원에 따른 일 구현예에서 N-말단 법칙 경로 저해용 화합물은 1-(4-클로로페닐)프로판-2-아민이다.
- [18] 본원에 따른 화합물이 효과가 있는 N-말단 경로는 타입 1 또는 타입 2의 Arg/N-말단 법칙 경로, 또는 아세틸화 N-말단 법칙 경로를 포함한다. 본원에 따른 일 구현예에서, 본원에 따른 화합물은 이로 제한하는 것은 아니지만 N-말단 경로의 기질을 인식하는 단백질, 예를 들면 N-레커그닌 또는 E3 유비퀴틴

- 라이게이즈와의 상호 작용에 의해 본원에 따른 효과를 발휘한다.
- [19] 본원에 따른 화합물은 N-말단 경로의 조절을 통해 GPCR (G Protein Coupled Receptor) 경로를 조절한다.
- [20] 본원에 따른 조성물은 신경변성질환 예를 들면 단백질변성과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 사용된다.
- [21] 본원에 따른 조성물이 효과가 있는 단백질변성과 관련된 질환은 예를 들면 알츠하이머병, 파킨슨병, 레비 소체 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 헌팅톤병, 척수소뇌성 실조증 또는 척수구근 근위축증(spino-bulbar muscular atrophy)을 포함한다.
- [22] 본원에 따른 조성물이 효과가 있는 신경변성질환은 예를 들면 부신성 백색질형성장애(Adrenal Leukodystrophy), 알콜중독, 알렉산더병(Alexander's disease), 알퍼병(Alper's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 근육위축가쪽경화증, 모세관확장실조(ataxia telangiectasia), 배튼병(Batten disease), 소해면양뇌증(bovine spongiform encephalopathy), 캐너번병(Canavan disease), 뇌성마비, 코케인 증후군(cockayne syndrome), 피질기저퇴화(corticobasal degeneration), 크로이츠펬트-야콥 병(Creutzfeldt-Jakob disease), 치명성 가계 불면증 (familial fatal insomnia), 전두엽 측두엽 변성증(frontotemporal lobar degeneration), 헌팅톤병(Huntington's disease), HIV-관련 치매, 케네디병(Kennedy's disease), 크라베병(Krabbe's disease), 레비소체 치매(Lewy body dementia), 신경보렐리아증(neuroborreliosis), 마카도 조셉 병(Machado-Joseph disease), 다계통 위축증(multiple system atrophy), 다발성경화증(multiple sclerosis), 발작수면(narcolepsy), 니이만-픽병(Niemann Pick disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 펠리체우스-메르츠바허병(Pelizaeus-Merzbacher disease), 픽병(Pick's disease), 원발가쪽경화증(primary lateral sclerosis), 프리온 질환(prion disease), 진행핵상마비(progressive supranuclear palsy), 레프숨병(Refsum's disease), 잔트호프병(Sandhoff disease), 실더병(Schilder's disease), 유독성 빈혈 속발성의 척수의 아급성연합변성(subacute combined degeneration of spinal cord secondary to pernicious anaemia), 스피를마이어-보그트-쇼그렌-배튼 병(Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten disease), 척수소뇌성 실조증(spino-cerebellar ataxia), 척수근위축증(spinal muscular atrophy), 스틸-리차드슨-올스제위스키 병(Steele-Richardson-Olszewski disease), 척수매독(Tabes dorsalis), 독성 뇌병증(toxic encephalopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [23] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 조성물 또는 화합물을 세포 또는 조직에 처리하는 단계를 포함하는 인비트로에서 N-말단 법칙 경로 저해 방법 또는 이를 통한 단백질 변성 조절 방법을 제공한다.
- [24] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 조성물 또는 화합물을 포함하는 N-말단 법칙 경로 저해를 통한 단백질 변성 조절 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [25] 본원의 화학식 1의 화합물, 특히 파라클로로암페타민은 시험관, 포유동물 세포, 그리고 실험동물 마우스에서 생리학적 N-말단 법칙의 적용을 받는 기질의 분해를 지연시키는데, 이를 통해 비정상적 N-end 법칙 경로와 밀접하게 관련되어 있는 신경 변성 질환 및 정신질환 등의 치료에 사용가능하다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 PCA가 인비트로에서 타입 1 및 2의 Arg/N-말단 경로를 억제하는 것을 나타내는 결과로,
- [27] 도 1a는 Arg-nsP4 (타입 1 모델 기질) 및 Phe-nsP4 (타입 2 모델 기질)와 같은 N-말단 법칙 모델 기질이 PCA에 의해 안정화된 결과를 나타낸다. 3부분 (Tripartite) DHFR-Ub-X-nsP4 융합단백질은 래빗 망상적혈구 용해물 및 바이오틴화된 라이실 tRNA를 이용하여 인비트로에서 발현 시키고, DUB (deubiquitinating enzymes)에 의한 번역과 동시(cotranslational)절단에 의해 오래 지속되는 DHFR-Ub 참조군 (아래 밴드) 및 X-nsP 기질 (위의 밴드)가 생성된다. 인비트로 발현/분해 반응은 0, 1, 2 mM PCA의 존재 중에서 수행되었다. 이어 총 반응 혼합물을 SDS-PAGE로 전기영동 한 후, 스트렙타비딘을 이용하여 웨스턴블랏을 수행하였다. *는 비특이적 밴드를 나타낸다.
- [28] 도 1b는 DHFR-Ub에 의해 노말라이즈된 남아있는 X-nsP4 단백질의 상대적 양을 나타낸다. 필름 영상은 덴시토메트리로 정량하였다.
- [29] 도 1c는 통상 수명이 짧은, 타입 1 N-테그론인 생리학적 N-말단 법칙 기질인 RGS4 및 RGS5이 PCA에 의해 안정화된 결과이다. 도 1a에서와 같이 프로테오솜 코어 입자 서브유닛 $\alpha 7$ 을 로딩 대조군으로 사용하였다.
- [30] 도 1d는 PCA와 구조적으로 유사한 화합물은 N-말단 법칙 경로를 방해하지 않는다는 결과이다. PCA와 달리, PMMA, PMA 및 PMTA는 RGS4의 안정성에 효과가 없는 것으로 나타났다. RGS4 농도 정량은 $\alpha 7$ 가 동일하게 수행되었다.
- [31] 도 1e는 (a) PCA, (b) 암페타민 (c) Phe-Ala 이펩타이드 및 (d) Phe-NH₂와 ClpS 도메인 (PBD code: 3DNJ)의 결합 친화도 (Docking, kcal/mol), 해리 상수 (K_d , μ M) 및 결합 모드를 나타낸 결과이다.
- [32] 도 1f는 PCA-유사 저분자 화합물 및 ClpS 도메인 간의 결합 파라미터를 나타낸다. 화합물과 (a) ClpS domain, (b) UBR1 box (3NY1), or (c) UBR2 box (3NY3)의 결합 모드 계산값은 색으로 표시하였다: PCA, PMMA, 4-MA, 및 4-MTA 각각은 시안, 황색, 마젠타 및 초록색으로 표시됨.
- [33] 도 2는 PCA가 포유류 세포에서 Arg/N-말단 경로를 특이적으로 억제하는 결과는 나타내는 것으로,
- [34] 도 2a는 PCA의 HeLa 세포 및 Neuro-2a 세포에 대한 독성을 MTT 분석으로 측정한 결과이다.
- [35] 도 2b는 Arg/N-말단 경로 기질인 Ub-Met-GFP (대조군), Ub-Arg-GFP (타입 1),

및 Ub-Phe-GFP (타입 1)을 안정적으로 발현하는 HEK293-유래의 세포주를 생성하고, 이를 0, 10, 20, 50, 100, 200, 또는 500 μM 농도의 PCA로 4시간 동안 처리하였다. 액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다.

- [36] 도 2c는 생리학적인 기질인 RGS4 HeLa 세포에 전달이입하고, 이를 후에, PCA 및 MG132 (세포 투과성 프로테오솜 억제제, N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal Z-Leu-Leu-Leu-al)를 기재된 양으로 처리한 결과이다. 시료는 SDS-PAGE/면역블랏팅 (IB)으로 분석하였으며, *는 비특이적 밴드를 나타낸다.
- [37] 도 2d는 RGS4 단백질을 발현하는 플라스미드로 전달이입된 *UBR1^{-/-}UBR2^{-/-}* 및 *ATE1^{-/-}MEF*를 0, 50, 100, 250, 500 μM 의 PCA 또는 20 μM 의 MG132로 6시간 동안 처리한 결과이다.
- [38] 도 3은 마우스의 뇌에서 PCA가 Arg/N-말단 법칙 경로를 억제하고, G-단백질 경로인 아래 단계의 효과기 작용에 장애가 발생한 것을 나타내는 결과로,
- [39] 도 3a는 뇌의 RGS4 농도가 복강에 PCA 주사 후에 유의적으로 증가한 것을 나타내는 결과이다. 뇌 추출물은 SDS-PAGE 및 RGS4 면역블랏으로 분석하였으며, 베타-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다.
- [40] 도 3b는 *+/+* 및 *ATE1^{-/-}* 배아 뇌의 추출물에서 RGS4 및 RGS16을 면역블랏팅으로 분석한 결과이다. *는 비특이적인 것을 나타내고, **는 RGS4 IB의 신호가 남아 잡힌 것이다.
- [41] 도 3c는 마우스 뇌에서 MEK1/2, p38, ERK1/2, 및 JNK와 같은 MAPK 신호전달 경로 분자의 활성화 프로파일을 나타내는 결과이다. 대조군 및 PCA 처리 전체 뇌 추출물에 대하여 표시된 항체로 면역블랏을 수행하였다.
- [42] 도 3d는 야생형 또는 *ATE1^{-/-}* 유래의 MEF를 ERK1/2 및 MEK1의 활성화와 비교한 결과이다.
- [43] 도 3e는 대조군 및 PCA가 주사된 마우스 뇌를 대뇌 피질, 선조체, 히포캠퍼스 및 소뇌로 분리하여, 시료를 추출하고, RGS4에 대하여 면역블랏을 수행한 결과이다.
- [44] 도 3f는 도 3e의 결과를 정량한 것으로, 전뇌 피질 및 히포캠퍼스에서 RGS4의 농도가 유의적으로 증가한 것으로 나타낸다.
- [45] 도 4는 뇌에서의 Arg/N-말단 법칙 경로 의존적인 GPCR 신호전달에 미치는 PCA의 영향 모델을 도식적으로 나타낸 것이다.
- [46] 도 5는 ATE1 유전자의 ATG 코돈으로 편입되고 핵 국소화 신호와 N-말단에서 융합된 리포터 β -갈락토시다제에 대하여 X-gal 염색 결과로, ATE1 유전자가 뇌 및 척수에서의 발현되고 있으며, 이는 Agr/N-말단 법칙 경로가 뇌의 GPCR 신호전달 조절에서의 역할을 나타내는 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

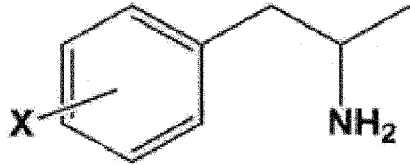
- [47] 본원은 N-말단의 특정 아미노산 잔기의 존재를 단백질 분해의 개시에

사용하는, 유비퀴틴 의존적 단백질 분해 기전의 한 가닥인, N-말단 법칙 경로를 조절할 수 있는 저분자 화합물의 규명에 기초한 것이다.

[48] 따라서 한 양태에서 본원은 하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, N-말단 법칙 경로 저해용 조성물에 관한 것이다.

[49] [화학식 1]

[50]



[51] 상기 식에서, X는 H, 플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오드이며, 2, 3, 또는 4 위치에 있을 수 있다. 바람직하게는 4-클로로이며, 이때 상기 화합물은 1-(4-클로로페닐)프로판-2-아민이 되는데 이는 파라-클로로암페타민(PCA)이라고도 한다.

[52] 본원의 상기 화학식 I의 화합물은, 화학식 I의 화합물 이외에 이의 약제학적으로 허용가능한 산 부가염 또는 염기 부가염, 이의 용매화물, 이의 광학 이성질체를 포함하는 것이다.

[53] 약제학적으로 허용가능한 산부가염은 화학식 I의 화합물에 의해 형성될 수 있는 치료적으로 활성인 무독성 부가염을 포함하는 것으로, 이러한 염은 염기 형태의 화학식 I의 화합물을 적절한 산, 예를 들면 약제학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 이러한 약제학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1, 4-디오에이트, 헥산-1, 6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[54] 역으로 상기 산부가염을 적절한 염기로 처리하여 유리 염기 형태로 전환될 수 있다.

[55] 산성의 프로톤을 포함하는 화학식 I의 화합물은 적절한 유기 또는 무기 염기로 처리하여 그 치료적으로 활성이 있는 무독성 금속 또는 아민 부가염 형태 (염

부가염)로 전환될 수 있다. 적절한 염기성 염기로는 예를 들면, 암모늄 염, 알칼리 및 알카리토금속 염, 특히 리튬염, 포타슘, 마그네슘 및 칼슘염, 유기염와의 염 예를 들면 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이브라민염, 및 예를 들면 알지닌 및 라이신과 같은 아미노산과의 염을 포함한다.

- [56] 또한, 본원의 상기 화학식 1의 화합물의 4차 암모늄염을 포함한다. 상기 4차 암모늄염은 화학식 1의 화합물에 존재하는 염기성 질소와 적당한 4기화제(quaternizing agent)를 반응시켜 얻을 수 있다. 4기화제에는 알킬할라이드, 아릴할라이드 또는 아릴알킬할라이드가 있는데, 예를 들어 메틸아이오다이드, 벤질아이오다이드, 알킬 트리플루오로메탄설포네이트, 알킬 메탄설포네이트 및 알킬 p-톨로엔설포네이트 등이 있다. 4차 암모늄 염은 양전하를 띤 질소를 지니고 있어, 약제학적으로 허용가능한 반대이온(counter ion)에는 클로로, 브로모, 아이오도, 트리플루오로아세테이트 및 아세테이트 이온이 포함된다.
- [57] 역으로 상기 염의 형태의 화합물은 적절한 산으로 처리하여 유리 형태로 전환될 수 있다.
- [58] 본원에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1의 화합물을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜 제조할 수 있다.
- [59] 또한, 본원의 상기 화학식 1의 화합물로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물을 모두 포함한다. 용매화물에는 수화물, 알코올레이트 등이 있다.
- [60] 또한, 본원의 상기 화학식 1의 화합물의 광학이성질체를 모두 포함한다. 본원의 광학이성질체는 화학식 1의 화합물의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것이다. 상기 광학이성질체는 입체중심(stereogenic center)으로 R- 또는 S- 배열을 가진다.
- [61] 본원에 따른 화합물은, 본 기전으로 제한하는 것은 아니나, N-말단 법칙 경로의 기질을 인식하는 단백질의 억제를 통해, 단백질의 분해를 조절 예를 들면 지연시킨다.
- [62] 본원에서 N-말단 법칙 경로란 N-말단에 특정 불안정화 잔기 예를 들면 Arg-Ala (후술하는 타입 1), 또는 Phe-Ala (후술하는 타입 2)과 같은 N-데그론(degron)을 갖는 단백질을 분해하는 단백질 분해 경로를 일컫는 것이다 (Sriram, S et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, 12, 735-47; Varshavsky, A. *Protein Sci* 2011. 등 참조). N-데그론을 갖는 N-말단 법칙 경로의 기질(substrate)은, UBR (ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin) 박스를 갖는 N-레커그닌 (N-recognin) 또는 E3 유비퀴틴 (ubiquitin, Ub) 라이게이즈와 같은 단백질에 의해 인식된다 (Sriram, Kim, Kwon. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, 12, 735-47). UBR 박스는 UBR1 내지 UBR7로 명명된 잘 보존된 N-말단 법칙 E3 패밀리에 존재하는 70개 잔기의 기본적인 기질 인식 영역으로, 불안정화 잔기 즉 N-데그론 기질에 존재하는 처음

두 개 잔기와의 상호작용을 통해 기질을 인식한다. N-말단 법칙 경로는 크게 Arg 경로와 아세틸화 경로를 포함한다 (Varshavsky, *Annu Rev Biochem* 2012, 81, 167-76.) 본원의 일 구현예에서 본원에 따른 화합물은 Arg 경로에 관여한다. 다른 구현예에서는 아세틸화 경로에 관여한다.

- [63] Arg/N-말단 법칙 경로에서 불안정화 잔기라 불리는 특이적 N-말단 아미노산을 지닌 단백질 기질은 수명이 짧다. 진핵생물에 있는 N-데그론 불안정화 잔기는 Arg, Lys, 또는 His과 같이 양전하를 띤 아미노산인 타입 1과, Phe, Leu, Tyr, 및 Ile과 같은 부피가 큰 소수성 아미노산인 타입 2로 분류된다.
- [64] 본원에 따른 화합물은 타입 1 및 타입 2 경로에 모두 관여한다. 본 기전으로 한정하는 것은 아니지만, 본원에 따른 화합물은 N-말단 경로의 기질을 인식하는 단백질과의 상호 작용에 의해 N-말단 법칙 경로를 저해한다.
- [65] N-말단 경로의 기질을 인식하는 단백질은, N-데그론을 인식하는 UBR 박스를 포함하는 UBR 단백질 패밀리에 속하는 단백질로서, E3 Ub 라이게이즈 및 N-레커그닌이 속하며, 이들은 각각 UBR 박스 및 N-도메인 (*E.coli*의 경우에는 ClpS에 상응)를 통하여, 타입 1 및 타입 2 N-데그론과 직접 상호작용을 한다 (Tasaki, T. et al., *Trends Biochem Sci* 2007, 32, 520-8; Erbse, A. et al., *Nature* 2006, 439, 753-6; Roman-Hernandez, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, 8888-93 등 참조). 일 구현예에서 본원에 따른 화합물은 UBR 박스와 상호작용을 하는데, UBR 박스는 UBR 패밀리에 속하는 단백질 내에서 기질의 N-말단 잔기와 결합하는 활성부위이므로, 결국 이들의 결합을 방해하는 기능을 가지고 N-말단 법칙에 의한 단백질 분해 경로를 억제한다.
- [66] N-말단 법칙 경로는 UPS와 더불어 손상된 단백질을 분해하고, 전사, 번역 및/또는 폴딩 오류에 의해 생성된 기능 장애성 또는 변성 단백질을 제거하는 주요한 기전으로 세포내 많은 중요한 과정 예를 들면 심혈관 발생, 신경관 형성, 세포사멸, 정자생성, 염색체 안정성 및 산소/헴 감지 등과 관련이 있다. (Lee, M. J. et al., *J Biol Chem* 2012, 287, 24043-52). 또한 N-말단 법칙 경로가 비정상적으로 작동할 때, 변성된 단백질의 축적, 이어서 진행되는 응집은 심장 질환, 신경퇴행성질환, 및 신경변성 질환을 비롯한, 다수의 노화 관련 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. UPS 및 N-말단 법칙 경로는 손상된 단백질을 분해하고, 전사, 번역 및/또는 폴딩 오류에 의해 생성된 기능장애성 단백질을 제거하는 주요한 기전이다. UPS 또는 N-말단 법칙 경로가 비정상적으로 작동할 때, 변성된 단백질의 축적, 이어서 진행되는 응집은 신경변성 질환을 비롯한, 다수의 연령 관련 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 알츠하이머병에서의 베타 아밀로이드 축적이 부분적으로는 A 응집체를 제거하는 UPS 및/또는 리소좀 프로세싱의 상실에 의한 결과 여겨진다. 병적인 단백질 축적이 예를 들어, 파킨슨병(α 시누클레인을 함유하는 루이 소체) 및 헌팅톤병(헌팅틴 단백질)과 같은 다수의 다른 신경변성 질환에도 관여한다 (Upadhyaya et al., *BMC Biochem.* 22: Suppl 1 :S1 (2007)).

- [67] 따라서 본원에 따른 화합물은 N-말단 법칙 특히 Arg/N-말단 법칙 경로의 이상으로 인한 다양한 질환에 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들어 세포내 변성 단백질이 제거되지 않는 경우 변성된 단백질의 축적으로 인한 다양한 질환 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 신경퇴행성질환을 포함하는 신경변성 질환, 간질환, 항암 치료에 사용될 수 있다 (Hara t et al Nature 2006, Mizushima n et al Genes & Dev. 2007, Takamura a et al Genes & Dev. 2011, Ratuo p et al J Hepatology 2010 등 참조).
- [68] 따라서, 다른 양태에서 본원은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 단백질변성과 관련된 질환 (proteinopathy) 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [69] 일 구현예에서, 화학식 1의 화합물은 1-(4-클로로페닐)프로판-2-아민이다. 본원에 따른 조성물이 효과를 나타낼 수 있는 단백질변성 질환은 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니나, 알츠하이머병, 파킨슨병, 레비 소체 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 헌팅톤병, 척수소뇌성 실조증 및 척수구근 근위축증(spino-bulbar muscular atrophy)를 포함한다.
- [70] 또 다른 양태에서 본원은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신경 변성질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [71] 일 구현예에서, 화학식 1의 화합물은 1-(4-클로로페닐)프로판-2-아민이다. 본원에 따른 조성물이 효과를 나타낼 수 있는 신경변성 질환은 부신성 백색질형성장애(Adrenal Leukodystrophy), 알콜중독, 알렉산더병(Alexander's disease), 알퍼병(Alper's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 근육위축가쪽경화증, 모세관확장실조(ataxia telangiectasia), 배튼병(Batten disease), 소해면양뇌증(bovine spongiform encephalopathy), 캐너번병(Canavan disease), 뇌성마비, 코케인 증후군(cockayne syndrome), 피질기저퇴화(corticobasal degeneration), 크로이츠펔트-야콥 병(Creutzfeldt-Jakob disease), 치명성 가계 불면증 (familial fatal insomnia), 전두엽 측두엽 변성증(frontotemporal lobar degeneration), 헌팅톤병 (Huntington's disease), HIV-관련 치매, 케네디병(Kennedy's disease), 크라베병(Krabbe's disease), 레비소체 치매(Lewy body dementia), 신정보렐리아증(neuroborreliosis), 마카도 조셉 병(Machado-Joseph disease), 다계통 위축증(multiple system atrophy), 다발성경화증(multiple sclerosis), 발작수면(narcolepsy), 니이만-픽병(Niemann Pick disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 펠리체우스-메르츠바허병(Pelizaeus-Merzbacher disease), 픽 병(Pick's disease), 원발가쪽경화증(primary lateral sclerosis), 프리온 질환(prion disease), 진행핵상마비(progressive supranuclear palsy), 레프숨병(Refsum's disease), 잔트호프병(Sandhoff disease), 실더병(Schilder's disease), 유독성 빈혈 속발성의 척수의 아급성연합변성(subacute combined degeneration of spinal cord secondary to

pernicious anaemia), 스피를마이어-보그트-쇼그렌-배튼

병(Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten disease), 척수소뇌성 실조증(spinocerebellar ataxia), 척수근위축증(spinal muscular atrophy), 스틸-리차드슨-올스제위스키 병(Steele-Richardson-Olszewski disease), 척수매독(Tabes dorsalis), 독성 뇌병증(toxic encephalopathy)을 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.

- [72] 다른 양태에서 본원에 따른 화합물 또는 이를 포함하는 조성물은 GPCR (G Protein Coupled Receptor) 경로를 조절한다. GPCR 경로는 세포의 항상성 유지에 필수적인 신호기작으로서 또한 질병의 발병기작에도 깊이 관여하고 있으며, 다양한 의약품의 직접적인 타겟이 되고 있으며, 실제로 약 40%의 의약품이 이 신호기작을 표적으로 삼고 있다. 본원의 PCA에 의한 N-말단 경로 법칙의 조절이 가능하며, N-말단 경로 법칙은 GPCR 활성화 유지에 중요한 것으로 알려져 있다 Lee et al, 2005. PNAS, 105, 76-81). 따라서 본원에 따른 화합물 또는 이를 포함하는 조성물을 이용하여 GPCR 신호기작을 조절하는 것이 가능하다. 일구현예에서 N-말단법칙의 억제제인 PCA는 GPCR 신호전달 경로를 억제하며, 따라서, GPCR 경로의 과다 활성화로 인한 질환 치료 또는 예방 예를 들면 고혈압, 심장병, 색소성 망막염, 저칼슘혈증, 갑상선기능항진증, 또는 난소과잉자극증후군 등의 치료에 사용될 수 있다.

- [73] 본원에 사용된 용어 "치료"란 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

- [74] 본원에 사용된 용어 "예방"은 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본원 조성물은 변성 단백질 축적으로 인한 질환의 초기 증상, 또는 증상이 나타나기 전에 복용할 경우 이러한 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

- [75] 이에 본원의 약제학적 조성물은 동시에 또는 연속적으로 투여가능하며, 상기 질환 치료를 위한 다른 약학적 활성성분과 병행하여 투여될 수도 있다.

- [76] 본원에 따른 치료제 또는 약제학적 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 예로서 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 또한 본 발명에 따른 조성물은 그 투여방법이나 제형에

따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.

- [77] 본원의 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.
- [78] 본원의 약학 조성물의 투여방법은 제형에 따라 용이하게 선택될 수 있으며, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 산제, 정제, 환제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 액, 에멀전, 현탁액, 시럽제, 엘릭서, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화되어 전신 또는 국소적으로 경구 또는 비경구 투여될 수 있으며, 특히 비경구 투여가 바람직할 수도 있다.
- [79] 비경구 투여를 위한 제형에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [80] 본원의 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있으나, 유효 투여량은 통상적으로 성인(60 kg)의 경우, 약 1 ng 내지 10 mg/일, 특히 약 1 μ g 내지 1mg/일이다. 투여량은 여러 가지 조건에 따라 변동가능하기 때문에, 상기 투여량에 가감이 있을 수 있다는 사실은 당업자에게 자명하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [81] 투여횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다.
- [82] 상술한 바와 같은 본원에 따른 조성물은 N-말단 법칙 경로의 조절 및 이를 통한 단백질 변성 조절에 유용하다.
- [83] 따라서 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 화합물을 세포 또는 조직에 처리하는 단계를 포함하는 N-말단 법칙 경로 저해 및/또는 조절 방법 또는 키트에 관한 것이다.
- [84] 또다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 화합물을 세포 또는 조직에 처리하는 단계를 포함하는 N-말단 법칙 경로 저해 및/또는 조절을 통한 단백질 변성 조조절 방법 또는 키트에 관한 것이다.

- [85] 본원에 따른 방법 또는 키트는 인비보 또는 인비트로에서 수행 또는 사용될 수 있으며, 인비트로에서 수행되는 경우, N-말단 법칙 경로의 기전 연구를 위한 연구 수단은 물론, 인비트로에서 처리된 조직 또는 세포를 대상체 (환자)에게 도입하는 엑스비보 방식의, 상술한 바와 같은 질환의 치료 방법으로 사용될 수 있다.
- [86] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [87] 실 시 예
- [88] 실험방법 및 재료
- [89] 인비트로 분해 (degradation) 분석
- [90] PCA 또는 PCA 유도체의 존재 또는 부재 중에서 인비트로 분해 분석은 DHFR-Ub-X-nsP4 융합단백질, RGS4 (Regulator of G protein Signalling 4) 및 RGS5 (Regulator of G protein Signalling 5) 플라스미드를 이용하여 종전에 기술된 바와 같이 수행하였다. (Lee, M. J. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102, 15030-5; Jiang, Y. X. L. et al., *Chemical Science* 2013, 4, 3339-3346). 요약하면, DHFR-Ub-X-nsP4 융합단백질로부터 UbX 접합부위가 탈유비퀴틴화 요소에 의해 번역과 동시에 절단이 되어 수명이 긴 DHFRUb 참조군 및 수명이 짧은 X-nsP4 기질 (X는 Arg과 같은 N-end rule 경로의 불안정화 잔기, nsP4는 신드비스 바이러스 유래의 비구조적단백질 4로 N-말단 잔기를 다양한 아미노산을 갖도록 돌연변이를 유발하여 N-말단 법칙 기질로 사용됨)이 생성된다. 플라스미드의 각 단백질은 바이오틴화된 lysine-tRNA 복합체 (Promega, USA)를 이용하여 바이오틴으로 표지되어 발현되도록 하였으며, 세포내에서 de novo로 합성되는 단백질의 안정적 상태의 농도는 바이오틴에 대한 항체를 이용하여 웨스턴블랏으로 검출하였다. 웨스턴블랏은 호스래디쉬 퍼옥시다제 접합된 스트렙타비딘 (Pierce, USA)를 이용하여 발색되었다. 웨스턴블랏의 정량은 ImageJ software (ver. 1.38e, NIH)를 사용한 덴시토메트리법으로 수행되었다. 데이터는 mean $\pm$ SD 로 표시되며, 통계분석은 student's *t*-test 또는 ANOVA를 이용하여 수행하였다. $P < 0.1$ 값을 통계적으로 유의한 것으로 하였다.
- [91] 단백질-화합물 상호작용 분석을 위한 인실리코 도킹 분석
- [92] UBR1 박스 UBR2 박스, 및 ClpS 박스의 결정 구조는 Protein Data Bank (PDB ID: 3NY1, 3NY3, and 3DNJ, respectively)로부터 입수하였다. 저분자 화합물의 구조는 semi-empirical PM6 method of Gaussian 09를 이용하여 최적화를 수행하였다 (Stewart, J. et al., *J Mol Model* 2007, 13, 1173-213.). AutoDockTools version 1.5.4를 사용하여 극성 수소를 추가하고 단백질 및 화합물에 대한 Gasteiger 전하를 할당하였다 (Sanner, M. F. et al., *Structure* 2005, 13, 447-62). 각 단백질에 대하여 AutoGrid version 4.2를 사용하여 각 활성부위를 중심으로 친화도 격자를 형성하였다. 격자는 모든 활성부위를 포함할 수 있는 크기로 하였다. 활성화

부위와 PCA 또는 PCA 유사 물질의 결합력은 Lamarckian genetic algorithm이 내장된 AutoDock version 4.2를 사용하여 리간드-수용체 닥킹 계산법으로 계산하였다. 도킹 주요 파라미터는 하기와 같다: 200회 도킹 시험, 집단크기: 300, 랜덤 출발 위치 및 입체구조, 및 5천만 에너지 평가. 0.5 Å RMSD의 톨러런스(tolerance)를 사용하여 도킹된 입체구조를 클러스터시켰다. 가장 많은 클러스터의 가장 낮은 결합에너지를 실험 데이터와 비교하였다. 실험적 결합 자유 에너지는 하기 방정식에 근거한 해리 상수(dissociation constant)로부터 계산하였다: $\Delta G = RT \ln K_d$, 상기에서, R은 기체 상수(1.987 cal K⁻¹ mol⁻¹)이고 T는 온도(298.15K)이다. 정전기 포텐셜은 APBS 패키지를 사용하여 계산하였다 (Baker, N. A. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98, 10037-41.. 모든 구조 도면은 PyMOL 패키지(<http://sourceforge.net/projects/pymol/>)를 사용하여 제조하였다.

[93] 세포 생존도 (Viability) 평가

[94] 세포 생존도는 변형된 MTT 분석을 종전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (Mosmann, T. et al., *J Immunol Methods* 1983, 65, 55-63). 요약하면, Hela 세포를 0.1 μ M 내지 1000 μ M 농도의 PCA (Sigma-Aldrich, USA)로 4시간 동안 처리하고, 이어 5 mg/mL 티아졸릴 블루 테트라졸리움 브로마이드 (MTT, Sigma Aldrich) 용액 10 μ L를 배지에 첨가한 후 37C, 95% 습도의 대기, 5% CO₂ 조건에서 2.5 시간 동안 배양하였다. 이어 배지를 제거하고 200 μ L의 DMSO를 추가하여 블루 MTT-포르마잔 산물을 가용화하고 세포를 실온에서 추가로 30분간 정치하였다. 용액의 흡광도를 570 nm (시험군) 및 630 nm (참조군)에서 판독하였다.

[95] 마우스, 세포배양 및 임시발현

[96] 20-25g 수컷 C57B6 마우스에 PCA를 최종농도 10 mg/kg 및 20 mg/kg으로 3일간 하루 일회 복강투여 하였다. 대조군 마우스는 동일 부피의 식염수가 투여되었다. 이어 마우스를 3회 주사 후 6시간 후에 희생하여 뇌를 적출하여 단백질 또는 mRNA 분석에 사용하였다. 호모자이그트인 ATE1-null 마우스는 ATE1 유전자의 1 내지 3번 엑손을 CJ7 배아 줄기세포의 NLS-lacZ 마커로 대체한 것으로 종전에 기술된 바와 같다 (Kwon, Y. T. et al., *Science* 2002, 297, 96-9). 혼합된 129SvImJ/C57BL/6 유전적 배경의 헤테로자이그스 교배를 통해 ATE1^{+/+} 배아를 생산하였다.

[97] 포유류 세포는 2% FBS, 2mM 글루타민, 및 100unit/ml의 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 DMEM 배지에서 배양되었다. 세포는 총 2-4 μ g의 총 플라스미드를 6웰 플레이트의 각 웰에서 LipofectAMINE 2000 (Invitrogen)을 제조자의 방법대로 사용하여 수행하였으며, 전달이입시 세포는 95% 정도의 컨플루언시를 나타냈으며, 세포 농도는 웰당 백만개를 사용하였다. 세포 용해물은 전달이입 후 36 내지 48 시간에 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 완충액을 사용하여 준비하였으며, 면역블랏에 사용하였다.

[98] GPCR 경로 분석

[99] 혈청 결핍/활성화 분석을 위해, 야생형 및 ATE1^{+/+} MEFs 또는 HeLa 세포를

무혈청 배지에서 12시간 동안 배양하고, 20% FBS를 포함하는 DMEM 배지를 공급하여 활성화하였다. 이어 MAPK 경로 분자에 대한 면역블랏은 종전에 기술된 대로 수행하였다 (Lee, et al., *J Biol Chem*, 2012, 287, 24043-52). 세포를 수확하기 전에, 세포를 PCA 최종농도 50 μ M로 4시간 동안 처리하였다.

[100] **LacZ 염색**

[101] 전체 배아는 4% 파라포름알데하이드/PBS에서 10분간 고정한 후에, PBS로 3회 세척하였다. 이어 이를 PBS (pH 7.4) 중의 X-gal solution (1.3 mg/mL potassium ferrocyanide, 1 mg/mL potassium ferricyanide, 0.3% Triton X-100, 1 mM MgCl₂, 150mMNaCl 및 1mg/mL 4-choloro-5-bromo-3-indolyl-b-galactoside (X-gal, Roche Applied Science)을 이용하여 37°C에서 밤새 염색한 후, 4% 파라포름알데하이드로 상온에서 한시간 처리하여 후-고정을 하였다.

[102]

[103] 실험예 1. PCA에 의한 타입 1 및 타입 2 Arg/N-말단 법칙 기질 분해 억제

[104] PCA에 의한 타입 1 및 타입 2 Arg/N-말단 법칙 기질 분해 억제는 인비트로 생화학적 분석 및 인실리코 컴퓨터 분석을 통해 수행되었다.

[105] PCA에 의한 억제효과는 인비트로에서 래빗 망상적혈구 용해물에서 발현된 인위적으로 합성된 N-말단 법칙의 기질을 이용하여 수행되었다. 망상적혈구 용해물은 DHFRUbXnsP4 융합단백질 발현에 필수적인 성분을 포함하고 있을뿐이나, UPS 의존적 단백질 분해에 관여하는 다양한 단백질 또한 포함하고 있다. 정상적인 조건하에서는, 타입 1 기질인 Arg-nsP4와 타입 2 기질인 Phe-nsP4는 수명이 짧은 반면, Met-nsP4인 수명이 긴 안정한 대조군으로 모델 기질로 사용되었다 (도 1a 참조).

[106] 안정한 DHFR-Ub 단백질을 참조군으로 사용하였다. 두 유형의 N-말단 법칙 기질의 분해는 PCA에 의해 완전히 억제되었으나, Met-nsP4 및 DHFR-Ub의 농도로부터 판단하면 전사 및 번역에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. mM 농도에서, Met-nsP4 및 Arg/Phe-nsP4의 농도는 동일하였으며, 이는 PCA 억제가 인비트로에서 1mM 농도전에 효과가 최대에 달한다는 것을 나타낸다 (도 1a 및 1b). 또한 포유류 세포에서 발견되는 실제 N-말단 법칙 경로 기질인 RGS4 및 RGS5의 분해에 미치는 PCA의 영향을 분석한 결과, 이들 단백질의 농도는 인위적 N-말단 법칙 기질의 농도와 유사하며, 용량 의존적으로 PCA에 의해 유의적으로 증가한 것으로 나타났다 (도 1c 참조).

[107] PCA와 같은 유사한 구조적 스캐폴드를 포함하는 저분자 화합물이 Arg/N-말단 법칙 경로에서 억제 효과를 발휘하는지 여부를 조사하였다. PCA, *para*-methoxymethamphetamine (PMMA), *para*-methoxyamphetamine (PMA), *para*-methylthioamphetamine (PMTA)는 파라 위치에서 다양한 화학적 변형을 갖는 것을 제외하고는 동일한 페닐아이소프로필아민 기를 가지고 있지만, PCA만이 RGS4 단백질에 대하여 획기적인 안정성을 부여하였다 (매체 대조군과 비교하여 ~ 8배 높은 안전성, 도 1d 참조). 이는 페닐 코어의 클로린 기와 아이소프로필

기의 자유 아민이 UBR 단백질과의 분자간 상호작용에 중요하다는 것을 나타내는 것이다.

- [108] 인비트로 결과와 일치하게, N-레커그닌에 대한 PCA 도킹을 사용한 인실리코 계산 결과, 이의 UBR 박스 및 ClpS 영역 모두와의 강력하고 특이적인 상호작용을 발견하였다. PCA는 다른 Phe-유래 단일 억제제와 비교하여, ClpS 영역 ((PDB ID: 3DNJ)을 인식하는 타입 2 N-데그론의 결정 구조와 보다 강한 결합을 하는 것으로 나타났다 (-5.60 kcal/mol of PCA vs -3.90, -4.95, -5.37 kcal/mol of Phe-OH, amphetamine, Phe-NH₂, 각각)(도 1e 참조).
- [109] PCA의 해리 상수 (K_d)는 대조군의 해리상수와 비교하여 유의적으로 낮은 것으로 나타났다 (78.5μM의 PCA에 대하여 115.7 μM, 159.5 μM, 247 μM, 1183.5 μM 의 Phe-NH₂, Phe-Ala, amphetamine, 및 Phe-OH 각각). N-말단 아미노기의 아세틸화는 억제제가 ClpS 영역에 도킹하는 기회를 상당히 감소시켰다. 또한 유산 도킹 분석 결과 PCA는 PMA, PMMA, 및 PMTA보다 ClpS 영역과 보다 강하게 상호작용하는 것으로 나타났다 (도 1f). 이는 파라 위치의 클로린이 핵심적인 약물분자구조로서 중요하다는 것을 나타낸다. 타입 1 N-데그론을 인식하는, PCA의 UBR 박스에 대한 친화도는 PCA-ClpS 상호작용과 비교하여 10-배 더 강한 것으로 나타났다 (5.54 μM vs 78.84 μM 해리상수). 인실리코 계산결과 PCA는 PMA, PMMA, 및 PMTA와 비교하여 UBR과 보다 강하고 특이적인 상호작용을 하는 것으로 나타났으며, 이는 생화학적 분해 분석과 일치하는 결과이다 (도 1d, 1g 참조). 이러한 결과는 PCA가 N-말단 법칙 E3 Ub 라이게이즈의 ClpS 영역 및 UBR 박스 모두와 상호작용을 할 수 있으며, 인비트로 및 인실리코에서 타입 1 및 타입 2 Arg/N-말단 법칙 경로를 특이적으로 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [110] 실험예 2. 포유류 세포에서 PCA의 처리로 인한 RGS4의 분해 및 GPCR 신호전달 활성화의 장애
- [111] PCA의 화학적 구조는 세포 투과성이 매우 좋다는 것을 나타내며, Lipinski's 법칙을 모두 만족한다 (Lipinski, C. A. et al., *Adv Drug Deliv Rev* 2001, 46, 3-26). 나아가 세포에 대한 PCA의 세포독성은 750 μM 농도에서 유의적인 것으로 나타났다 (도 2a). 포유류 세포에서 PCA의 Arg/N-말단 법칙 경로에 미치는 억제 효과는 Met-, Arg-, and Phe-GFP를 발현하는 HEK293 세포주를 이용하여 관찰하였다. 이의 동족 인비트로 모델 기질인 X-nsP4와 유사하게 (도 1a), 각각 타입 1 및 타입 2 일차 불안정화 잔기인 Arg-GFP 및 Phe-GFP 정상 조건에서 신속하게 분해되었으나, Met-GFP는 매우 안정한 것으로 나타났다 (도 2b). 프로테오솜 억제제는 Arg- 및 Phe-GFP의 농도를 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 키모트립신 유사 및 케스페이즈 유사 프로테오솜 활성을 주요 표적으로 하는, PS342 (20S 프로테오솜 억제제)을 MG132와 추가하였을 때, 부가적 또는 상승적 효과는 관찰되지 않았다. 처리 4시간 후에, 통상 검출되지 않는 Arg-GFP 및 Phe-GFP 단백질이 50 μM 및 100 μM PCA 농도에서 상당하게

관찰되었다 (도 2b). Phe-GFP 농도는 500 μ M까지 PCA 농도 의존적으로 증가한 반면, Arg-GFP 안정화는 50 μ M에서 포화되었다. 이는 PCA의 ClpS보다 UBR 박스에 대한 낮은 친화도 및 타입 1 기질에 대한 보다 강한 억제 효과를 나타낸다.

- [112] PCA가 N-말단 법칙 경로의 생리학적 기질의 분해를 억제할 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, HeLa 세포에 RGS4를 과발현시키고, 세포를 세포독성 이하 농도의 PCA 또는 프로테오솜 억제제인 MG132로 처리하였다. 그 결과 PCA는 100 μ M 농도에서 RGS4의 농도를 증가시켰지만 안정화 효과는 MG132보다 약한 것으로 나타났다. 이는 PCA의 UPS 매개된 RGS4 분해의 관점에서 유의적이지만 제한적인 효능을 나타낸다 (도 2c). Arg-GFP와 같은 다른 타입 1 기질에서 관찰된 바와 같이, RGS4 농도는 높은 농도의 PCA (250 μ M)에서 더 증가하지 않았다 (도 2b, 2c). PCA에 의한 RGS4 안정화는 UPS의 다른 성분들에 영향을 미치지 않는다. 프로테오솜 수준, Arg/N-말단 법칙 의존적 프로테오솜 기질 예컨대 Nrf2 및 p53 및 벌크 세포 유비퀴틴 컨주게이트에서도 유의적인 변화는 관찰되지 않았다 (도 2c). 나아가 Arg/N-말단 법칙 경로의 주요 성분이 결여된 *UBR1^{-/-}UBR2^{-/-}* 및 *ATE1^{-/-}* 마우스 배아 섬유아세포 (embryonic fibroblast, MEF)에서 PCA에 의한 억제 효과가 없는 것을 고려하면, PCA는 후번역 단계에서 세포의 Arg/N-말단 법칙 경로를 특이적으로 억제하는 것으로 나타났다 (도 2d). PCA의 자가포식 플럭스에 대한 음성적 효과가 관찰되었으며 (결과는 나타내지 않음), 이는 자가포식이 Arg/N-말단 법칙 경로의 조절을 받고 있음을 나타내는 것이다. 그러나 이는 RGS4 분해와 독립적이고, 따라서, 이러한 결과는 PCA가 세포막을 용이하게 투과하여 포유류 세포에서 Arg/N-말단 법칙 경로를 특이적으로 표적하는 것임을 나타내는 것이다.

- [113] RGS4 단백질은 Gi 및 Gq- 매개된 신호전달 경로를 $G\alpha$ -GTP 가수분해 속도를 촉진하여 $G\alpha\beta\gamma$ 헤테로삼량체의 재결합을 초래하여 음성적으로 조절하는, GTPase 활성화 단백질이다 (Ross, E. M. et al., *Annu Rev Biochem* 2000, 69, 795-827). RGS4의 생리학적 기능을 감안하여, 하류의 G-단백질 신호전달 활성이 PCA 처리에 의해 영향을 받는지 여부를 조사하였다. PCA에 의한 화학적 억제는 Arg/N-말단 법칙 경로의 유전적 돌연변이와 유사한 표현형을 초래할 수도 있다. ATE1 유전자를 전체로 결손시키는 경우 기형적 심혈관 발생으로 인해 배아가 죽게된다. 그러나, 출생 후 조직 특이적 결손법으로 생산된 최근의 ATE-1 결손된 성체 마우스의 분석 결과, ATE1이 놀랍게도 대사율, 항비만, 뇌크기 및 남성 불임과 같은 넓은 범위의 생물학적 과정에 관여되어 있는 것으로 나타났다 (Brower, C. S. et al., *PLoS One* 2009, 4, e7757). 이러한 Arg/N-말단 법칙 경로가 갖는 복잡한 생리학적 의미는 RGS4 단백질에 의해 조절되는 G-protein coupled receptor (GPCR) 신호전달경로의 다양한 기능과 관련이 되어 있을 수 있다. 이러한 결과는 PCA가 강력하면서도 특이적인 인비보 Arg/N-말단 경로 억제제인 것을 나타내며, 이의 처리는 Arg/N-말단 법칙 경로의 유전적 억제와 표현형이

동일하다. 또한 PCA는 경로의 근원적인 조절 회로를 규명하는데 사용될 수도 있으며, 인비보 N-말단 법칙 경로의 기질을 발굴하는데도 사용될 수 있을 것이다.

- [114] 실험예 3. 마우스 뇌에서 PCA에 의한 RGS4 분해 억제 및 GPCR 신호전달 경로 억제
- [115] *ATE1* 유전자의 ATG 코돈으로 편입되고 핵 국소화 신호와 N-말단에서 융합된 리포터 β -갈락토시다제에 대하여 X-gal 염색 결과, *ATE1* 유전자는 뇌 및 척수에서 상당히 발현되는 것으로 나타났다 (도 5). 이러한 결과는 Arg/N-말단 법칙 경로가 뇌의 GPCR 신호전달 조절에서의 역할을 나타내는 것이다. PCA의 혈액-뇌 장막 통과 기능을 고려하여, PCA가 마우스 뇌에서 RGS4를 분해하고, Gq 신호전달 경로의 하방신호에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. 마우스에게 PCA를 10 mg/kg 또는 20 mg/kg 농도로 3일간 주사하고 마지막 주사 12시간 후에 희생하였다. 전체 뇌 추출물을 이용하여 면역블랏을 수행하였다. 전체 뇌에서 내인성 RGS4의 농도는 PCA 투여에 의해 증가하였으며, 대조군으로 식염수를 주입한 경우에는 RGS4가 검출되지 않았다 (도 3a). 뇌에 미치는 PCA 효과는 N-말단 법칙 경로의 알지닌화 브랜치가 와해되었을 경우에 나타나는 것과 유사하였다. *ATE1*^{-/-} 인, 마우스 뇌에서, N-말단의 끝에서 두 번째 잔기인 Cys 잔기를 갖는 RGS4 및 RGS16는 대조군 뇌와 비교하여 놀라우리 만큼 안정화되었다 (도 3b). 이러한 결과는 PCA가 마우스 뇌에서 Arg/N-말단 법칙을 표적으로 하는 최초의 인비보 N-말단 법칙 억제제임을 나타낸다.
- [116] 마우스의 GPCR 신호전달 경로에서 PCA 유도된 RGS4 안정화의 영향을 조사하기 위하여, 하방의 신호전달자 특히 MAPK의 활성을 추가로 조사하였다. PCA로 처리된 마우스 뇌는 MEK1/2, p38, ERK 및 JNK 활성이 감소되었다 (도 3c). 이는 기능적 관련성과 일치하는 것이었으며, *ATE1*^{-/-} 뇌 결과와도 일치하는 것이다 (도 3d). 이러한 결과는 PCA에 의한 Arg/N-말단 법칙 경로의 강력한 억제자로서 화학적 억제가 유전적 방법과 마찬가지로 GPCR 신호전달 경로 억제의 효과를 모방하고, RGS 과활성화를 모방할 수 있음을 나타내는 것이다. 다음으로 PCA의 영역별 특이성을 뇌의, 전두피질, 선조체, 히포캠퍼스 및 소뇌에서 분석한 결과, PCA의 복강주사에 의해 RGS4가 전두피질 및 히포캠퍼스 부위에서 강하게 안정화되는 것으로 나타났다 (도 3e 및 3f). 상기 부위는 RGS4 mRNA의 농도가 높은 부위로 알려져 있다. 선조체 및 소뇌에는 영향을 없는 것으로 나타났다. 이러한 뇌 부위 특이적 효과가 발현된 RGS4 농도의 차이에 의한 것인지, 뇌의 모세혈관 막의 뇌의 수송 시스템을 통한 PCA 농도 조절에 의한 것인지는 추가로 결정되어야 한다.
- [117]
- [118] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의

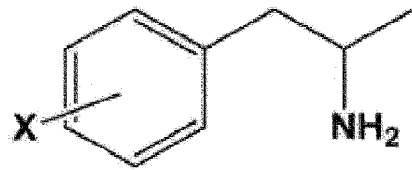
권리범위에 속하는 것이다.

- [119] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, N-말단 법칙 경로 저해용 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서, X는 H, 플루오로, 클로로, 브롬 또는 요오드이며, 2, 3, 또는 4 위치에 있을 수 있음.

[청구항 2] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 화합물이 1-(4-클로로페닐)프로판-2-아민인, N-말단 법칙 경로 저해용 조성물.

[청구항 3] 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 N-말단 경로는 타입 1 또는 타입 2의 Arg/N-말단 법칙 경로, 또는 아세틸화 N-말단 법칙 경로인, N-말단 법칙 경로 저해용 조성물.

[청구항 4] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 저해는 상기 화합물이 상기 N-말단 경로의 기질을 인식하는 단백질과의 상호 작용에 의한 것인, N-말단 법칙 경로 저해용 조성물.

[청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 N-말단 경로의 기질을 인식하는 단백질은 N-레커그닌 또는 E3 유비퀴틴 라이게이즈인 것인, 조성물.

[청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 화합물은 상기 N-레커그닌 또는 E3 유비퀴틴 라이게이즈의 UBR 박스와 상호작용하는 것인, 조성물.

[청구항 7] 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 GPCR (G Protein Coupled Receptor) 경로를 조절하는 것인, 조성물.

[청구항 8] 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 신경변성질환의 예방 또는 치료에 사용되는 것인, 조성물.

[청구항 9] 제 8 항에 있어서, 상기 신경변성질환은 단백질변성과 관련된 질환 (proteinopathy)인, 조성물.

[청구항 10] 제 9 항에 있어서,

상기 단백질변성과 관련된 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 레비소체 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 헌팅톤병, 척수소뇌성 실조증 또는 척수구근 근위축증(spino-bulbar muscular atrophy)인, 신경 변성질환 예방 및 치료용 조성물.

[청구항 11]

제 8 항에 있어서,

상기 신경변성질환은 부신성 백색질형성장애(Adrenal Leukodystrophy), 알콜중독, 알렉산더병(Alexander's disease), 알퍼병(Alper's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 근육위축가쪽경화증, 모세관확장실조(ataxia telangiectasia), 배튼병(Batten disease), 소해면양뇌증(bovine spongiform encephalopathy), 캐너번병(Canavan disease), 뇌성마비, 코케인 증후군(cockayne syndrome), 피질기저퇴화(corticobasal degeneration), 크로이츠펬트-야콥 병(Creutzfeldt-Jakob disease), 치명성 가계 불면증(familial fatal insomnia), 전두엽 측두엽 변성증(frontotemporal lobar degeneration), 헌팅톤병(Huntington's disease), HIV-관련 치매, 케네디병(Kennedy's disease), 크라베병(Krabbe's disease), 레비소체 치매(Lewy body dementia), 신정보렐리아증(neuroborreliosis), 마카도 조셉 병(Machado-Joseph disease), 다계통 위축증(multiple system atrophy), 다발성경화증(multiple sclerosis), 발작수면(narcolepsy), 니이만-픽병(Niemann Pick disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 펠리체우스-메르츠바허병(Pelizaeus-Merzbacher disease), 픽병(Pick's disease), 원발가쪽경화증(primary lateral sclerosis), 프리온 질환(prion disease), 진행핵상마비(progressive supranuclear palsy), 레프숨병(Refsum's disease), 잔트호프병(Sandhoff disease), 실더병(Schilder's disease), 유독성 빈혈 속발성의 척수의 아급성연합변성(subacute combined degeneration of spinal cord secondary to pernicious anaemia), 스피르마이어-보그트-쇼그렌-배튼 병(Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten disease), 척수소뇌성 실조증(spino-cerebellar ataxia), 척수근위축증(spinal muscular atrophy), 스틸-리차드슨-올스제위스키 병(Steele-Richardson-Olszewski disease), 척수매독(Tabes dorsalis), 독성 뇌병증(toxic encephalopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 신경 변성질환 예방 및 치료용 조성물.

[청구항 12]

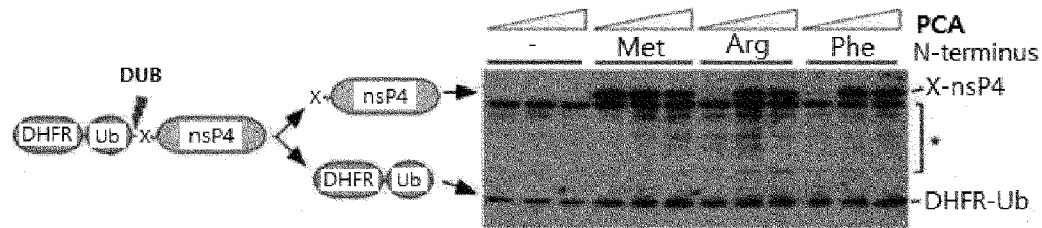
제 1 항 또는 제 2 항에 기재된 화합물을 세포 또는 조직에 처리하는 단계를 포함하는 인비트로에서 N-말단 법칙 경로 저해를 통한 단백질 변성 조절 방법.

[청구항 13]

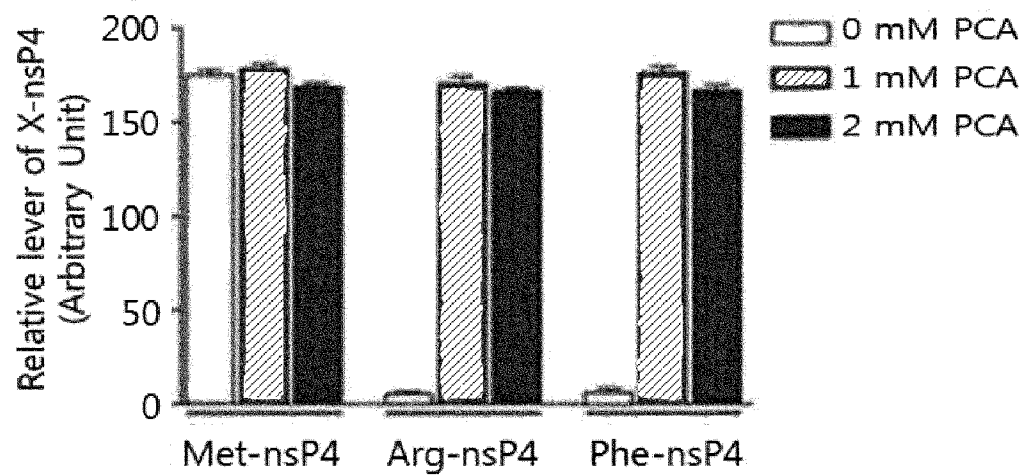
제 1 항 또는 제 2 항에 기재된 화합물을 포함하는 N-말단 법칙

경로 저해를 통한 단백질 변성 조절 키트.

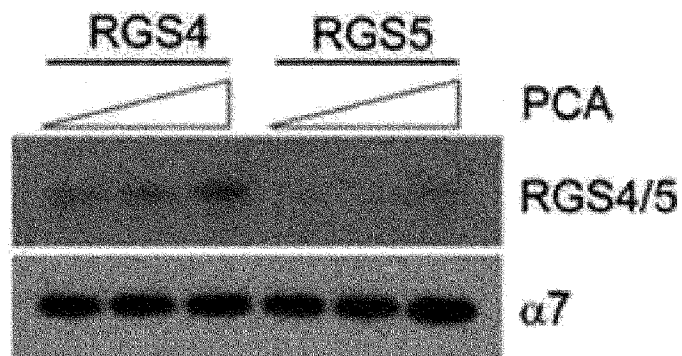
[Fig. 1a]



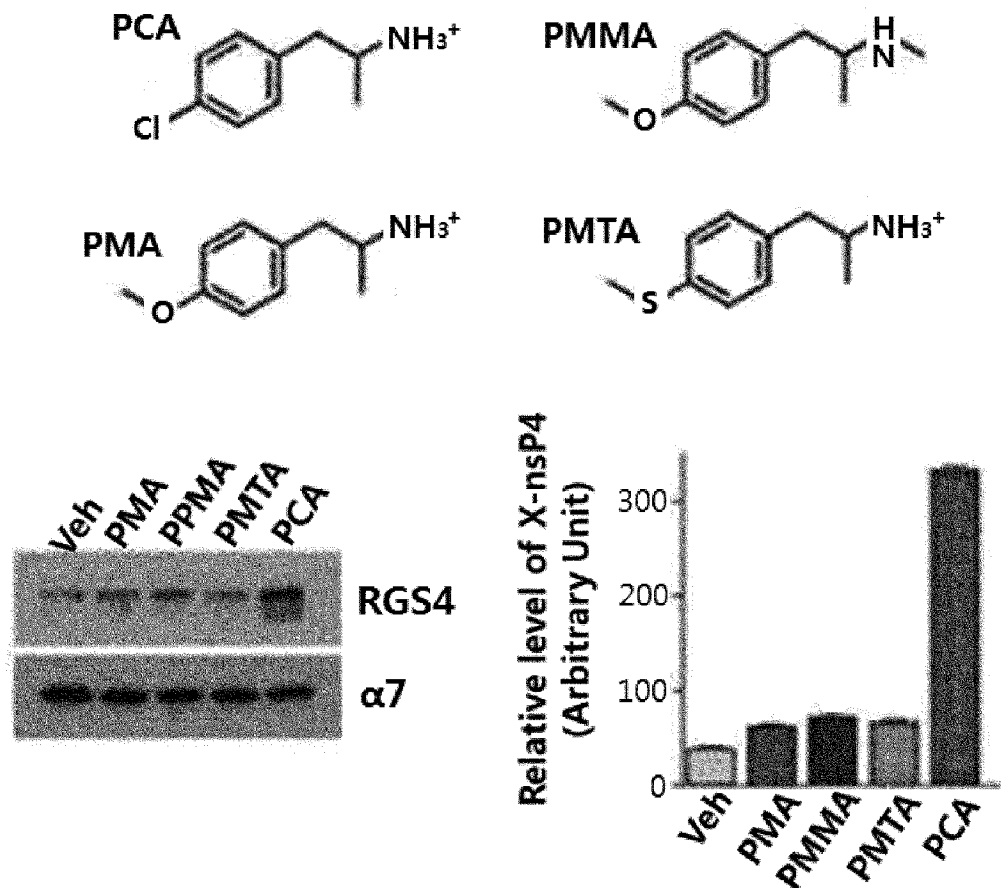
[Fig. 1b]



[Fig. 1c]

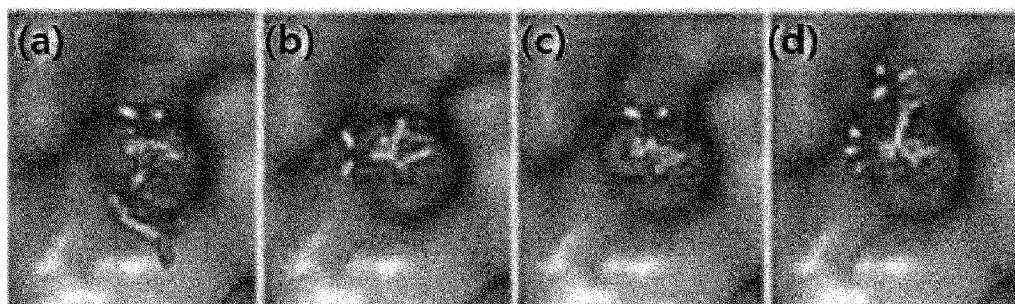


[Fig. 1d]



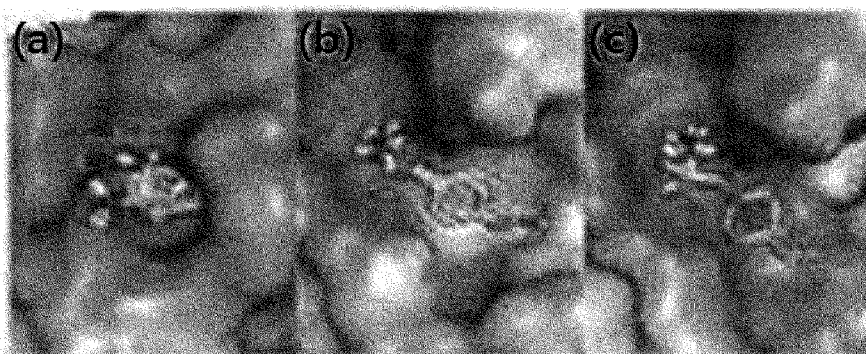
[Fig. 1e]

Small-molecule	Docking	K _d , docking
PCA	-5.60	78.48
Amphetamine	-4.92	247.31
H-Phe-Ala-OH	-5.18	159.47
H-Phe-NH ₂	-5.37	115.71

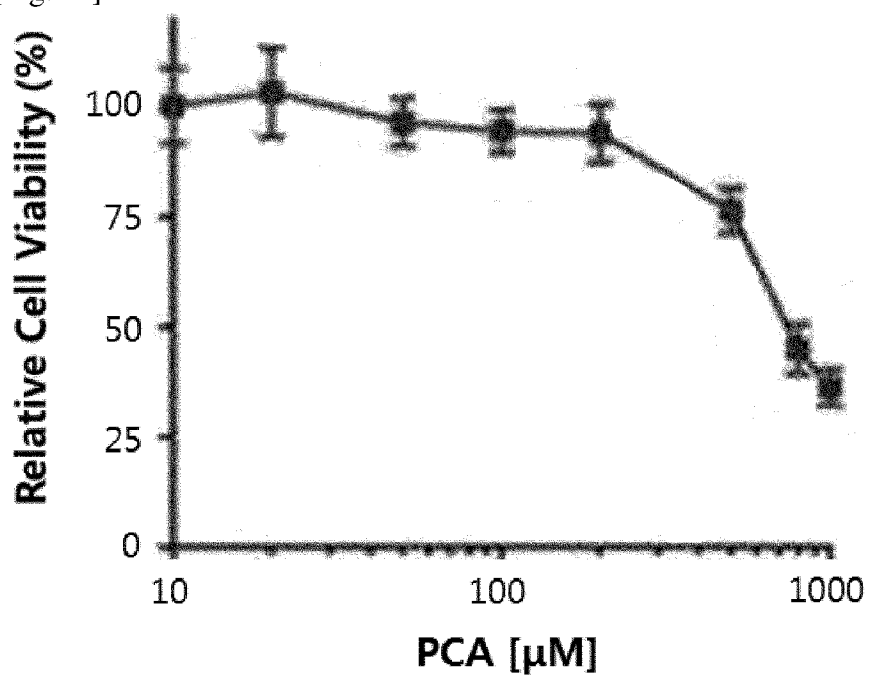


[Fig. 1f]

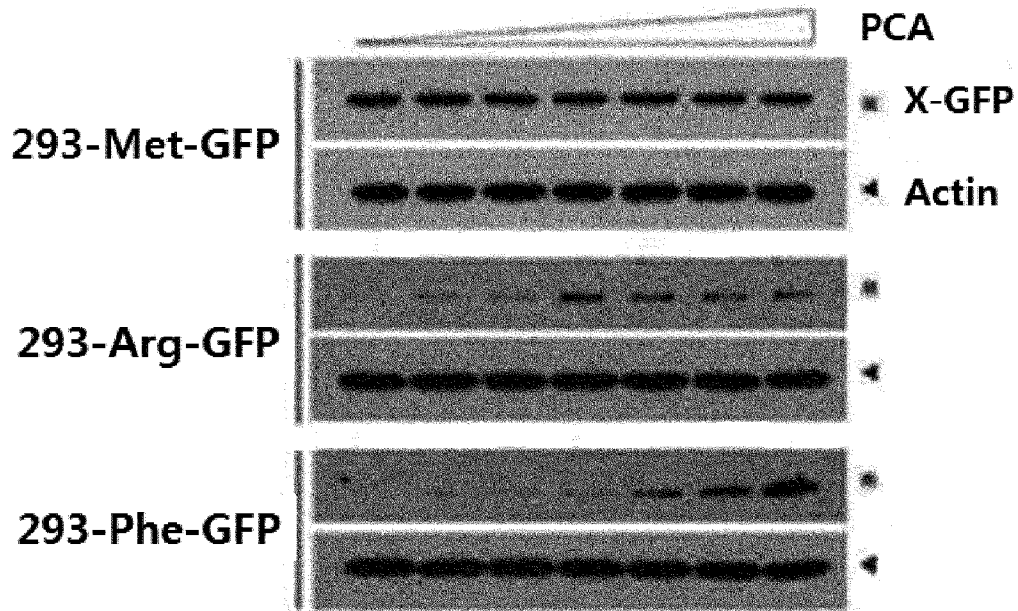
Small-molecule	Docking	K_d , docking
PCA	-5.60	78.48
PMA	-5.41	108.15
PMMA	-5.32	125.90
PMTA	-5.25	141.69



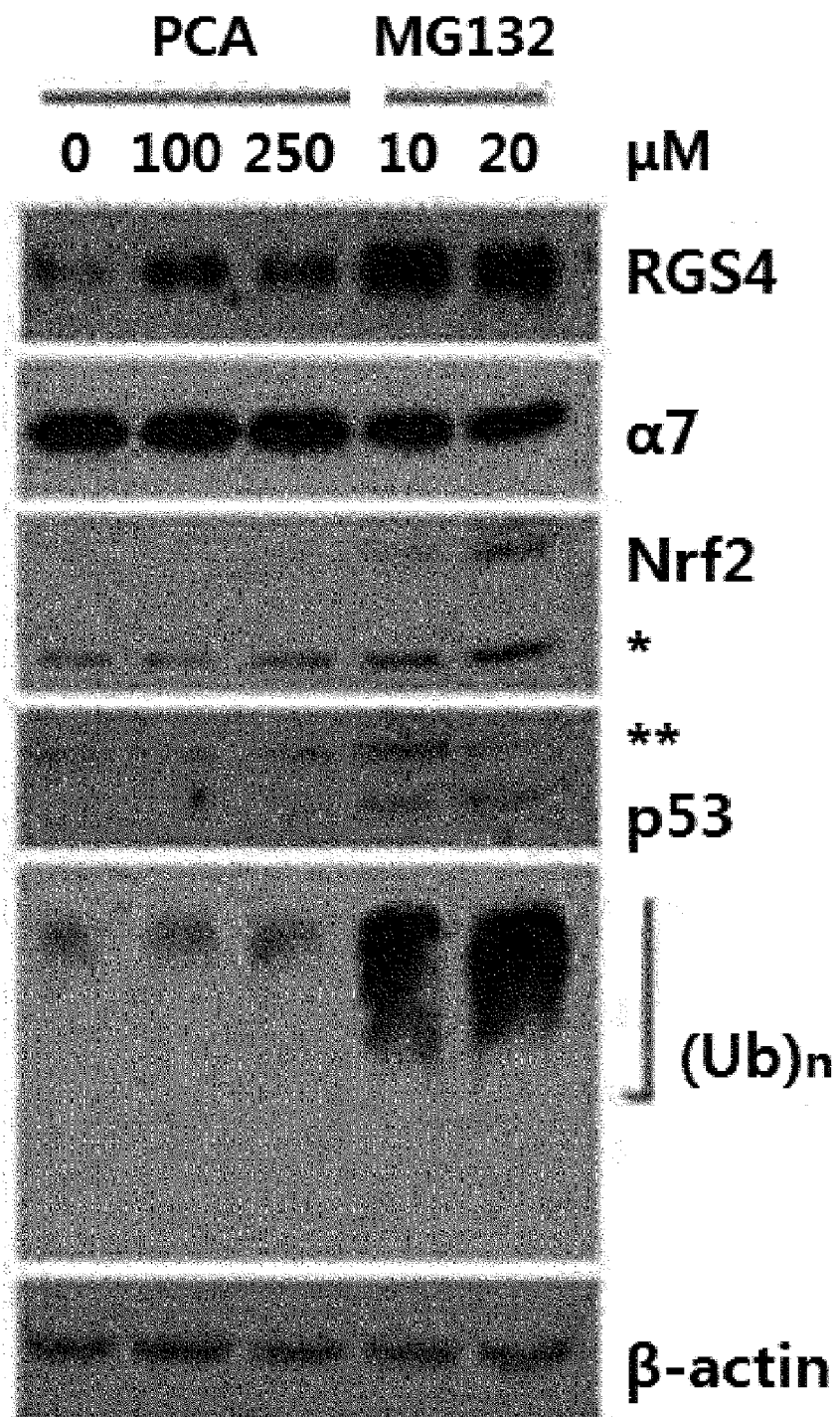
[Fig. 2a]



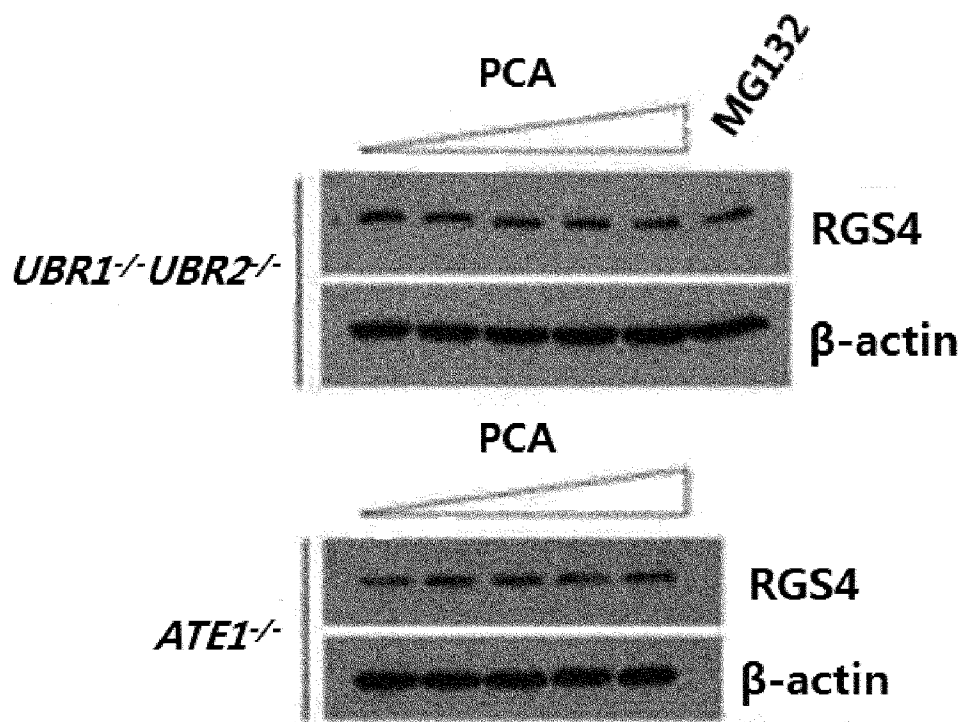
[Fig. 2b]



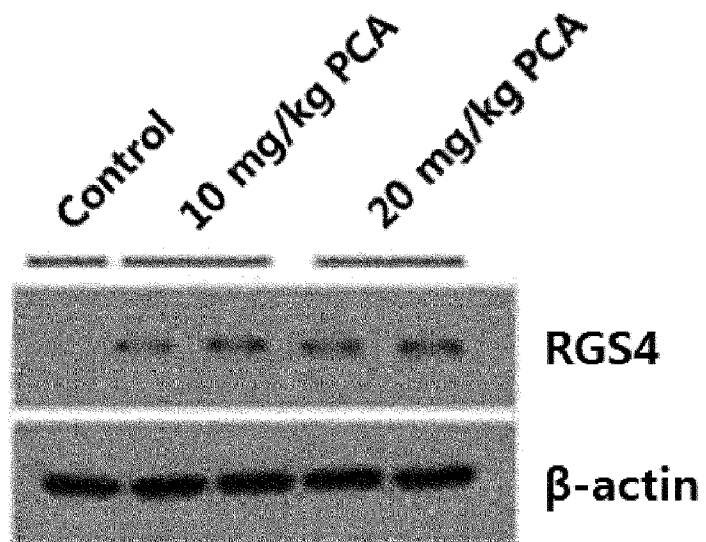
[Fig. 2c]



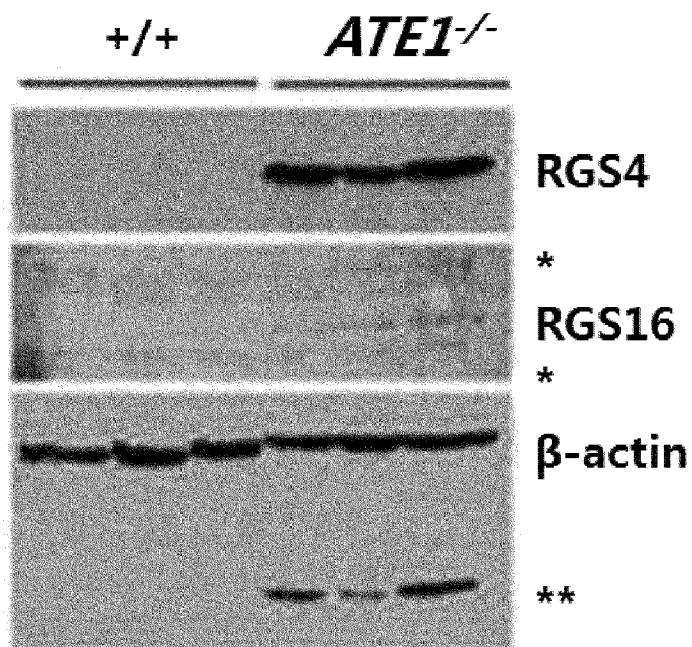
[Fig. 2d]



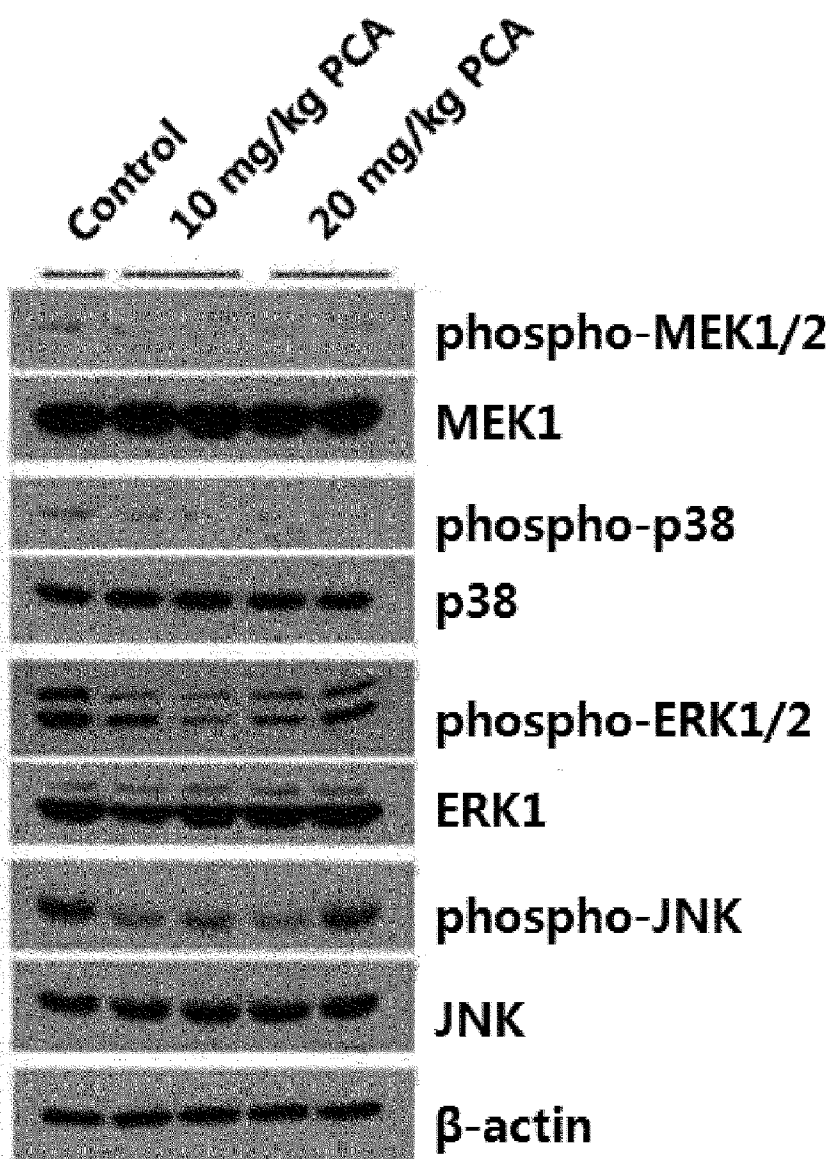
[Fig. 3a]



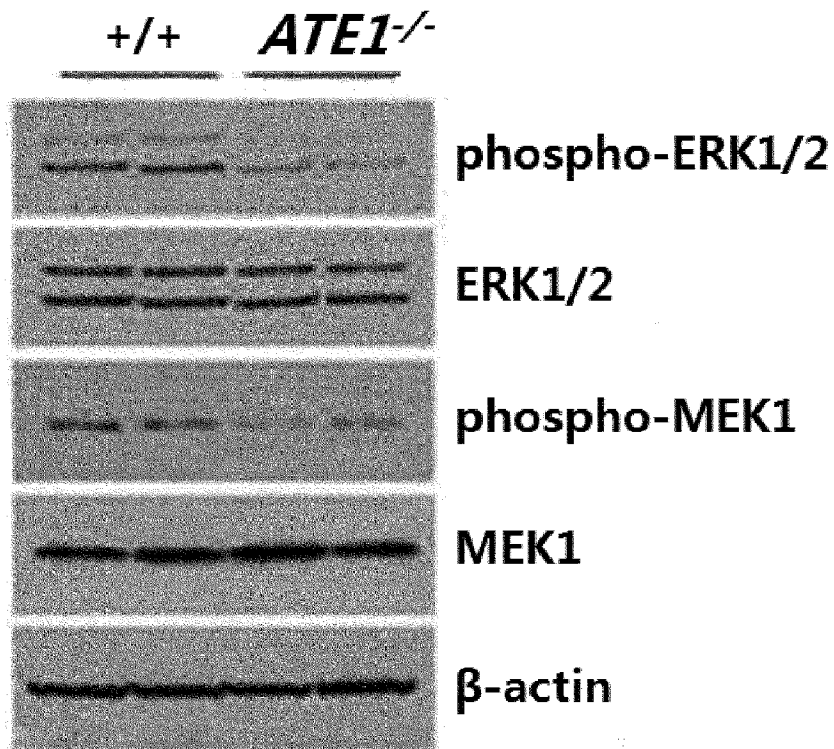
[Fig. 3b]



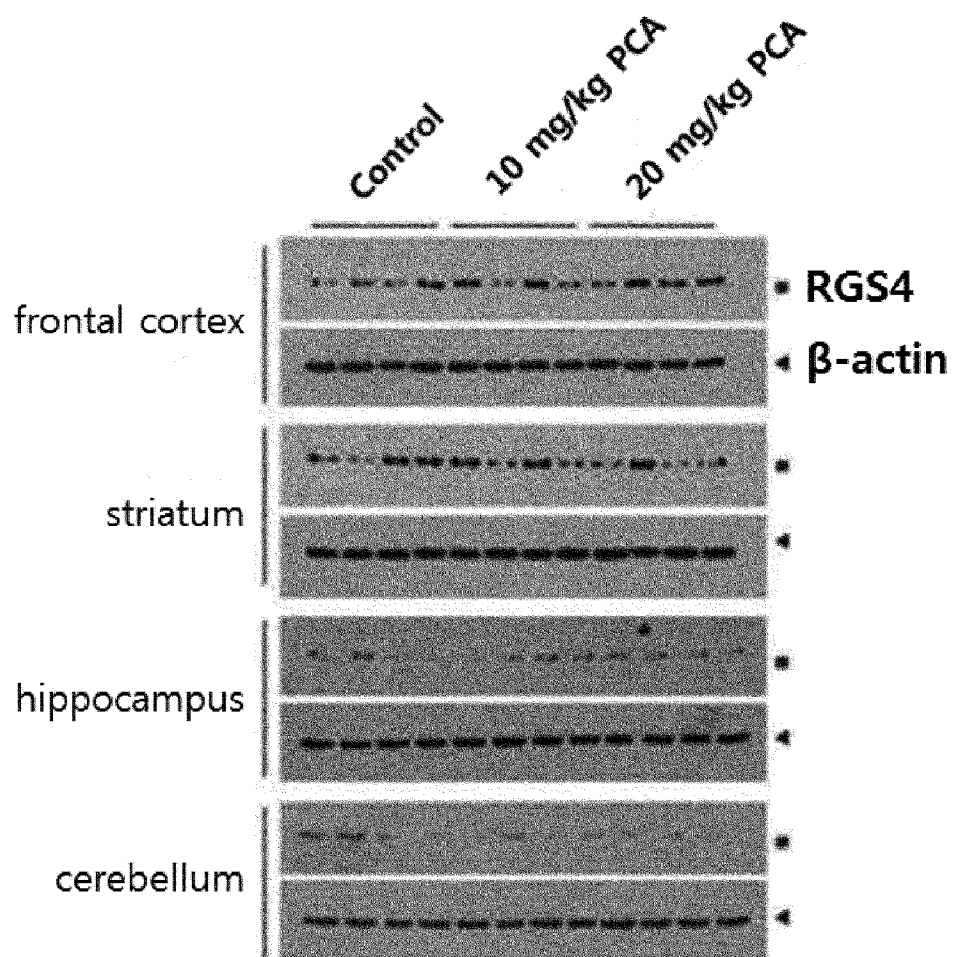
[Fig. 3c]



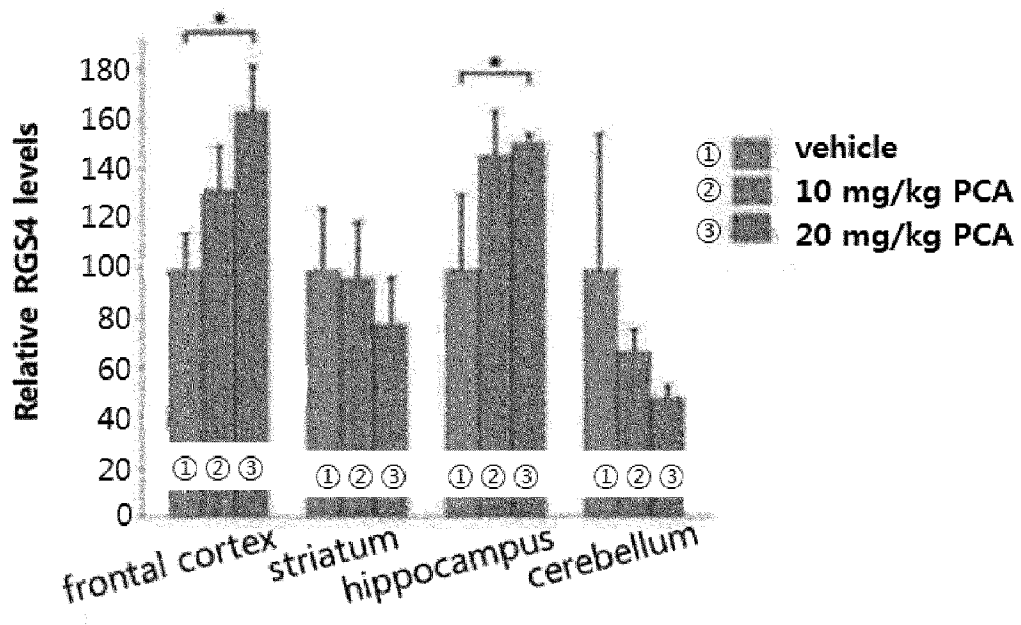
[Fig. 3d]



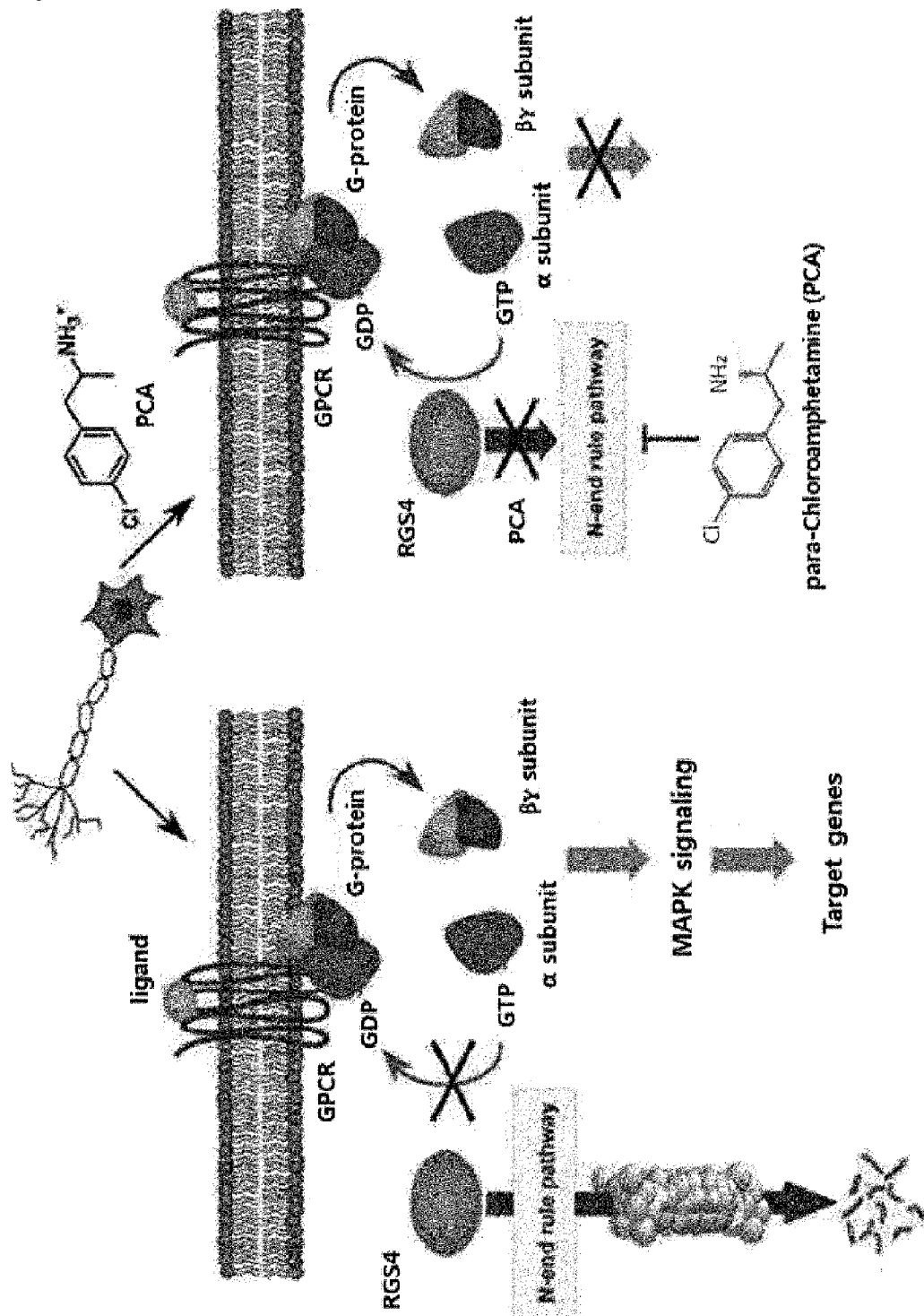
[Fig. 3e]



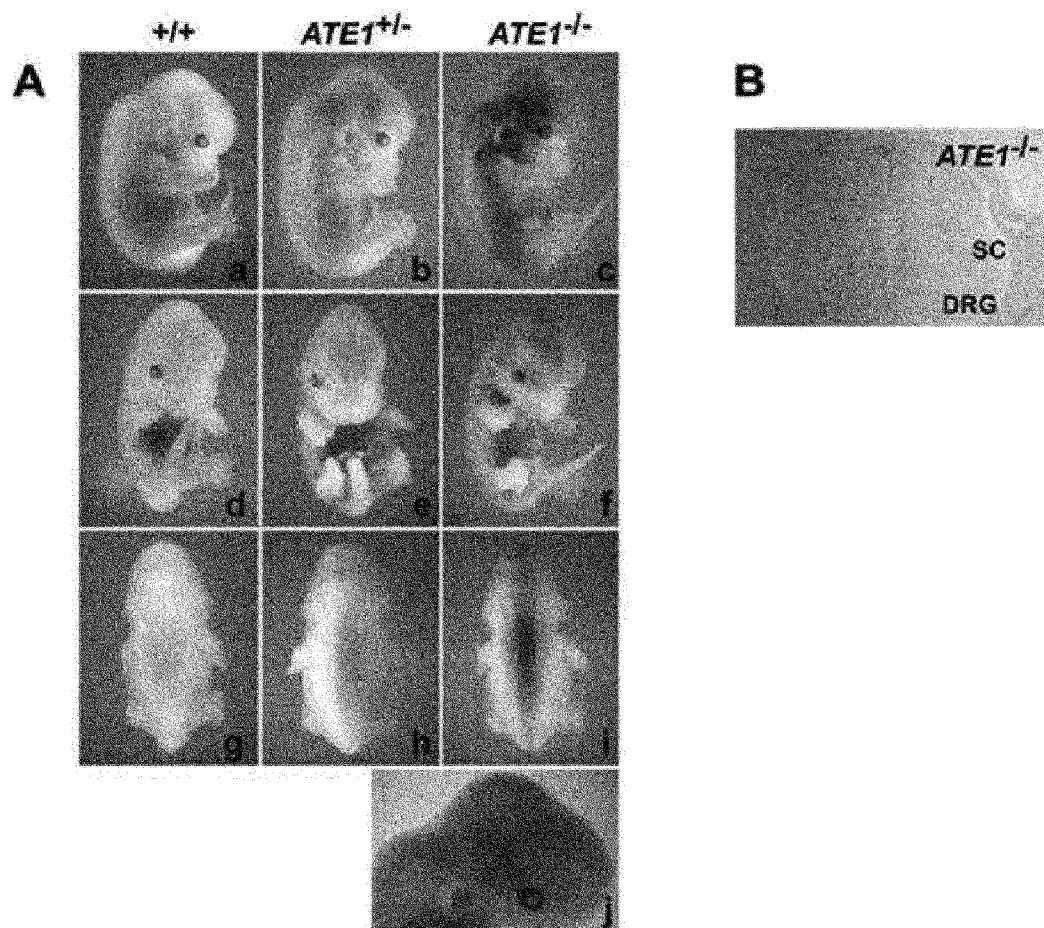
[Fig. 3f]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/000001**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/137(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/16(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/137; A61K 31/44; A61P 25/28; A61P 25/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), PubMed, Esp@snet, PAJ, USPTO, Google & Keywords: 1-(4-Chlorophenyl)propan-2-amine, p-chloroamphetamine, N-end rule pathway inhibition, N-end rule inhibition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHASHI SRIRAM et al., Development and characterization of monomeric N-end rule inhibitors through in vitro model substrates. Journal of Medicinal Chemistry. 28 March 2013, 56(6), pages 2540-2560 See abstract, pages 2543-2544 Result part, Figure 4	1-3,12-13
A	KR 10-2009-0059125 A (THE UNIVERSITY OF MONTANA) 10 June 2009 See the entire document	1-3,12-13
A	MIN JAE LEE et al., Characterization of arginylation branch of N-end rule pathway in G-protein-mediated proliferation and signaling of cardiomyocytes. The Journal of Biological Chemistry. 06 July 2012, 287(28), pages 24043-24052 See the entire document	1-3,12-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 APRIL 2015 (27.04.2015)

Date of mailing of the international search report

27 APRIL 2015 (27.04.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/000001

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **5, 6, 9 to 11**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 5, 6, 9 to 11 refer to multiple dependent claims which do not meet the requirement of PCT Rule 6.4(a) or a claim referring to said multiple dependent claims, and thus claims 5, 6, 9 to 11 are not clear. Therefore, a valid international search cannot be carried out.

3. ☒ Claims Nos.: **4, 7, 8**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/000001

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0059125 A	10/06/2009	AU 2007-286933 A1	28/02/2008
		CA 2661495 A1	28/02/2008
		CN101516194 A	26/08/2009
		CN103479603 A	01/01/2014
		EP 2053919 A2	06/05/2009
		EP 2053919 B1	25/12/2013
		JP 05-243428B2	24/07/2013
		JP 2010-501581A	21/01/2010
		US 2009-0197969 A1	06/08/2009
		US 2010-0249242 A1	30/09/2010
		US 2011-0105621 A1	05/05/2011
		WO 2008-024660 A2	28/02/2008
		WO 2008-024660 A3	20/11/2008
		WO 2010-099546 A1	02/09/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/137(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/16(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/137; A61K 31/44; A61P 25/28; A61P 25/16

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(KIPO internal), PubMed, Esp@net, PAJ, USPTO, Google & 키워드: 1-(4-클로로페닐)프로판-2-아민, p-chloroamphetamine, N-말단 법칙 경로 저해, N-end rule inhibition

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SHASHI SRIRAM 외 8명, Development and characterization of monomeric N-end rule inhibitors through in vitro model substrates. Journal of Medicinal Chemistry. 2013.03.28., 56(6), 2540-2560페이지 요약, 2543-2544 페이지 Result 파트, Figure 4 참조	1-3, 12-13
A	KR 10-2009-0059125 A (더 유니버시티 오브 몬타나) 2009.06.10. 문헌 전체 참조	1-3, 12-13
A	MIN JAE LEE 외 11명, Characterization of arginylation branch of N-end rule pathway in G-protein-mediated proliferation and signaling of cardiomyocytes. The Journal of Biological Chemistry. 2012.07.06., 287(28), 24043-24052페이지 문헌 전체 참조	1-3, 12-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 04월 27일 (27.04.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 04월 27일 (27.04.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 7140

심사관

김범수

전화번호 +82-42-481-5412



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 제5항, 제6항, 제9항 내지 제11항
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제5항, 제6항, 제9항 내지 제11항은 PCT 규칙 제6.4조(a)의 규정을 충족시키지 않는 다수 종속청구항을 인용하고 있거나, 상기 다수 종속청구항을 인용하는 청구항을 인용하고 있어 명확하지 않으므로 유효한 국제조사를 할 수 없습니다.
3. ☒ 청구항: 제4항, 제7항, 제8항
이 청구항은 종속청구항이나 PCT 규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2009-0059125 A	2009/06/10	AU 2007-286933 A1	2008/02/28
		CA 2661495 A1	2008/02/28
		CN101516194 A	2009/08/26
		CN103479603 A	2014/01/01
		EP 2053919 A2	2009/05/06
		EP 2053919 B1	2013/12/25
		JP 05-243428B2	2013/07/24
		JP 2010-501581A	2010/01/21
		US 2009-0197969 A1	2009/08/06
		US 2010-0249242 A1	2010/09/30
		US 2011-0105621 A1	2011/05/05
		WO 2008-024660 A2	2008/02/28
		WO 2008-024660 A3	2008/11/20
		WO 2010-099546 A1	2010/09/02