



(51) 국제특허분류:

A61K 31/4738 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/006593

(22) 국제출원일: 2015년 6월 26일 (26.06.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2014-0079650 2014년 6월 27일 (27.06.2014) KR
10-2015-0071667 2015년 5월 22일 (22.05.2015) KR

(71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 조성찬 (CHO, Sungchan); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김형기 (KIM, Hyeongki); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이규선 (LEE, Kyu-Sun); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 최광만 (CHOI, Kwangman); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

jeon (KR). 지승욱 (CHI, Seung-Wook); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 유권 (YU, Kweon); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김애경 (KIM, Ae-Kyeong); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 최미리 (CHOI, Miri); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 강현주 (KANG, Hyunju); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이정수 (LEE, Jeong-Soo); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이민성 (LEE, Min-Sung); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

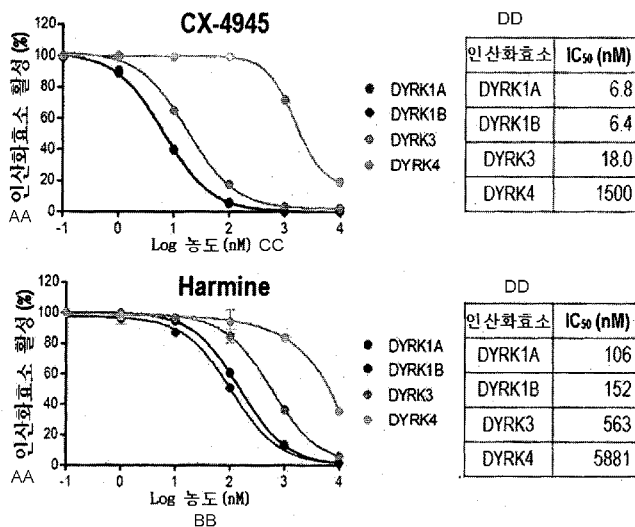
(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).

(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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING DEGENERATIVE BRAIN DISEASES, CONTAINING CX-4945 AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: CX-4945를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물



AA ... Phosphorylation activity (%)
BB ... Log concentration (nM)
CC ... Harmine
DD ... Phosphorylation

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing and treating degenerative brain diseases, containing 5-[(3-chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945) as an active ingredient. Specifically, the CX-4945, which is known as a strong inhibitor of CK and Cdc2-like kinase (Ck), was also verified to show a strong inhibitory effect on Dyrk1A *in vitro*; performs an inhibitory action in a competitive manner with ATP; strongly inhibits Dyrk1A even at the cellular level, thereby inhibiting the phosphorylation of Tau, amyloid precursor protein (APP), and presenilin 1 (PS1) as causative factors of neurofibrillary tangles and senile plaques; inhibits the phosphorylation of NFATc, thereby increasing transcriptional activity of NFATc; was also verified to distinctively remedy abnormalities in wings, eyes, and the nervous system, occurring at the time of over-expression of minibrain, which is drosophila Dyrk1A, in drosophila models; and was also verified to significantly lower the phosphorylation of Tau protein in Dyrk1A-overexpressed mice. Generally, the 5-[(3-chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945) shows a higher inhibitory efficacy compared with Harmine, INDY, and proINDY, used as Dyrk1A inhibitors, and thus can be favorably used as a composition for preventing and treating degenerative brain diseases associated with Dyrk1A.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



(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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 상기 CK2 와 Cdc2-like kinase(Clk)의 강력한 억제물질로 알려진 CX-4945 가 시험관 내(in vitro)에서 Dyrk1A 에도 강력한 억제효과를 나타냄을 확인하였고, ATP 와 경쟁적인 방식으로 억제 작용을 하며, Dyrk1A 를 세포수 준에서도 강력하게 억제하여, 신경섬유영킵과 노인반 유발 요인인 Tau, APP(amyloid precursor protein), PS1(presenilin 1) 의 인산화를 억제하고, NFATc 의 인산화를 억제시켜서, NFATc 의 전사활성을 증가시키고, 초파리 모델에서도 초파리 Dyrk1A 인 minibrain 이 과발현되었을 때 나타나는 날개, 눈, 신경계 발달 이상을 뚜렷하게 개선함을 확인하였으며, Dyrk1A 과발현 마우스에서도 Tau 단백질의 인산화가 현저하게 낮아지는 것을 확인함으로써, 일반적으로 Dyrk1A 저해제로 사용되는 Harmine, INDY, proINDY 에 비해서 높은 억제 효능을 보임으로써, 상기 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 Dyrk1A 와 관련된 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

CX-4945를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성
10 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 퇴행성 뇌질환으로, 노화의 과정 속에서 뇌조직이 기능을 잃으면서 점차 정신 기능이 쇠퇴하는 병이다. 이 병의 특
15 징은 기억력과 정서 면에서 심각한 장애를 일으킨다는 것이다. 현대 의학에서는 뚜렷한 치료법이 없는 '불치의 병'으로 인식되고 있다. 노인에게 주로 나타나는 치매의 주요 원인 가운데 하나이다. 병리조직학적으로는 뇌의 전반적인 위축, 뇌실의 확장, 신경섬유의 다발성 병변과 초로성 반점 등의 특징을 보인다. 임상적인 특징은 기억, 판단, 언어능력 등 지적인 기능의 점진적인 감퇴, 일상생활능력, 인격,
20 행동양상의 장애 등이다. 이와 함께 우울증세, 인격의 황폐, 격한 행동 등의 정신 의학적인 증세도 동반된다. 이러한 증세들이 점진적으로 진행되어 결국은 죽음에 이르게 된다. 발병 후 서서히 죽음에 이르는 기간은 6~8년 정도이지만 사람에 따라 20년이 넘는 경우도 있다. 현재 미국에서는 65~74세 인구의 약 3%, 75~84세 인구의 약 19%, 85세 이상 인구의 50%가 이 병을 앓고 있다고 한다.

Dyrk1A(이중 특이성 티로신 인산화 조절 키나아제-1A, Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A)는 세린(serine)/트레오닌(threonine) 키나아제(kinase)로 성인 중추신경계 내에서 다양한 역할을 수행 한다. Dyrk1A의 유전자는 인간의 21번 염색체 다운 증후군 위험 지역(Down syndrome critical region, DSCR)에 위치해 있으며, Dyrk1A의 활성 증가는 다운증후군(down syndrome), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 파킨슨병(parkinson's disease), 헌팅턴병(huntington's disease) 및 픽병(pick's disease)과 같은 신경 퇴행성 질환과 관련되어 있다고 보고되어있다.

인간 또는 쥐의 Dyrk1A를 과발현하는 형질전환 마우스 모델은 해마에 의존하는 공간학습과 운동신경 결핍 및 발달 지연을 포함하는 다운증후군의 표현형을 보이는데, 이것은 다운증후군과 관련된 정신 지체에 있어서 Dyrk1A의 중요한 기능을 암시하고 있다. 특히, 세포 골격 유지에 중요한 미세소관 조립(microtubule assembly) 안정성은 알츠하이머 질환 및 다운 증후군에서 비정상적인 양상을 보이는데, 이 과정에서 Tau 단백질은 미세소관의 안정성을 제어하는 중추적인 역할을 한다. 비정상적인 Tau의 발현 및 과인산화는 알츠하이머 및 다운 증후군에서 공통적으로 나타나는 특징이다. Dyrk1A는 여러 세포모델에서 Tau 단백질의 다양한 위치의 인산화에 중요하게 작용한다. 그 중에서도 특히 알츠하이머 질환 환자의 뇌에서 Tau의 Thr-212 잔기(residue)에서 과인산화가 나타나고, 인간의 Dyrk1A를 형질 전환한 마우스에서도 Tau의 Thr-212 residue가 과인산화 되어있는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 Dyrk1A가 알츠하이머 질환과 다운 증후군에서 Tau의 과인산화에 의한 병리에 중요한 기여를 할 가능성을 제시하고 있다.

특히, 알츠하이머 환자의 경우 신경 병리학적으로 과인산화된 Tau의 집합체로 구성된 세포 내 신경 섬유 엉킴(neurofibrillary tangles)의 형성 외에도 아밀로이드 베타 펩타이드(amyloid β peptide)의 불용성 침전물의 세포밖 축적이 나타나는데, Dyrk1A는 이와 관련된 amyloid β 전구체 단백질 (Amyloid precursor

protein), 프리세닐린(presenilin) 등을 직접 인산화하여 알츠하이머의 중요한 병리 원인 물질중 하나인 amyloid plaques(노인반) 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

또한, 파킨슨병의 병리학적 특징 중 하나인 루이소체(Lewy bodies)는 알츠하이머와 다운증후군 환자의 뇌에서도 공통적으로 관찰되는데, Dyrk1A는 Lewy bodies의 주요 구성성분인 알파-시뉴클린(α -Synuclein)의 인산화를 통해 α -Synuclein의 응집을 증가시켜 결국은 세포사멸을 초래시키는 것으로 알려져 있다. 또한, Dyrk1A는 헌팅턴 질병의 발병과 관련된 중요 단백질 HIP-1을 인산화시켜 결국 세포사멸과 해마신경원 세포의 분화에 관여한다고 밝혀져 있다.

더불어, Dyrk1A는 calcineurin/NFAT(nuclear factor of activated T cells) 신호를 조절하고 인간의 발달 과정 단계에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. NFATc 전사 인자(transcription factors)는 보통 세포질에서 인산화되어 있는 단백질로 존재하다가 세포의 Ca^{2+} 농도가 올라가게 되면 Ca^{2+} 의존성 단백질인 인산가수분해 효소 칼시뉴린에 의해서 NFATc가 탈인산화 되고 NFATc는 핵내로 이동하게 된다. 핵으로 들어간 NFATc는 파트너 단백질 NFATn와 전사 복합체를 형성하고 표적 유전자의 프로모터에 결합하여 타겟유전자 발현을 유도하게 된다. Dyrk1A는 NFATc를 인산화시킴으로써 세포질로 다시 이동시키게 하고, 결과적으로 타겟 유전자의 발현이 억제되게 된다.

CX-4945(5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산, 5-[(3-Chlorophenyl)amino] benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid, 실미타세르티브(Silmitasertib))는 인간의 암세포에서 자주 발견되며, 세포의 성장과 자가 사멸과 같은 다양한 세포 활성을 조절하는 단백질인 카제인 키나아제 2(casein kinase 2, CK2)의 억제제로서 알려져 있다. Adam Siddiqui-Jain 등은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 경구

투여로 생체 이용 가능한 선택적 억제제로서의 활성을 나타내며, CK2의 촉매 서브 유닛(catalytic subunit)인 CK2 α 의 발현 수준을 억제함으로써 암세포의 증식을 억제하는 것을 보고한바 있다(Siddiqui-Jain A, et al. *Cancer Res.* 70(24):10288-10298, 2010). 현재 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복

5 시산(CX-4945)을 CK2 억제제로 사용하기 위하여 임상 연구가 진행되고 있으며, 1차 임상에서 안전성 및 약물학적 효과(pharmacodynamic property)를 확인하였고, 2차 임상을 통한 임의 약물 혼합(randomized drug combination)에 대한 추가적 평가에 대한 연구가 진행 중에 있다(Sean E, Cylene Pharmaceuticals. Accessed 22 Mar 2011).

10 최근 연구에 따르면 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)은 CK2 외에도 세포 내 pre-mRNA 스플라이싱 조절에서 중요한 역할을 하는 cdc2-like kinase(Clk)에 강력한 억제효과를 보인다. 흥미롭게도 기존 연구에 따르면 TG-003, KH-CB19, Leucettine L₄₁ 등 Clk를 억제한다고 알려진 많은 저분자 물질들은 공통적으로 Dyrk를 저해한다고 알려져 있다. 이는 Clk와 Dyrk1가

15 비슷한 구조의 ATP 결합 포켓(ATP-binding pocket)을 가지고 있기 때문이다. CK2, Clk, Dyrk는 모두 CMGC superfamily kinase에 속한다.

이에, 본 발명자들은 Dyrk1A에 미치는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 역할에 대해 연구하기 위해 노력한 결과,

20 CK2와 Clk의 강력한 억제물질로 알려진 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 시험관 내(in vitro)에서 Dyrk1A에도 강력한 억제효과를 나타냄을 확인하였고, ATP와 경쟁적인 방식으로 억제 작용을 하며, Dyrk1A를 세포수준에서도 강력하게 억제하여, 신경섬유영킴과 노인반 유발 요인인 Tau, APP, PS1의 인산화를 억제하고, NFATc의 인산화를 억제시켜서, NFATc의 전사

25 활성을 증가시키고, 초파리 모델에서도 초파리 Dyrk1A인 minibrain이 과발현되었을

때 나타나는 날개, 눈, 신경계 발달 이상을 뚜렷하게 개선함을 확인하였으며, Dyrk1A 과발현 마우스에서도 Tau 단백질의 인산화가 현저하게 낮아지는 것을 확인함으로써, 일반적으로 Dyrk1A 저해제로 사용되는 Harmine, INDY, proINDY에 비해서 높은 억제 효능을 보임으로써, 이러한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A에 대한 저해효과는 Dyrk1A와 관련된 퇴행성 뇌질환의 연구를 위한 유용한 도구를 제공하고, 질환에 대한 새로운 치료 전략의 발명으로 이어질 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

10 【기술적 과제】

본 발명의 목적은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

15 【기술적 해결방법】

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 분리된 세포, 무세포(cell-free) 또는 시험관 내(in vitro)에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 Dyrk1 억제 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 퇴행성 뇌질환 예방 및 건강기능 식품으로 사용하기 위한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)의

용도를 제공한다.

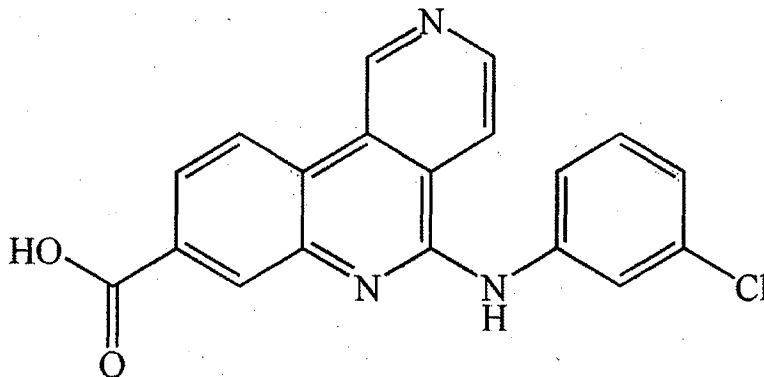
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 CX-4945는 하기 [화학식 1]로 표기되는 구조를 가지는 것이 바람직하

다;

【화학식 1】



상기 CX-4945는 Dyrk1(Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

상기 Dyrk1A의 활성 억제는 CX-4945가 Dyrk1A의 ATP binding pocket에 결합하여 발생하는 것을 특징으로 한다.

상기 CX-4945는 Dyrk1A 저해를 통해 Tau, APP(amyloid precursor protein) 및 PS1(presenilin 1) 단백질의 인산화를 억제시키고, NFATc1을 탈인산화 시키며, NFATc1의 전사활성을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

상기 퇴행성 뇌질환은 다운증후군(down syndrome), 알츠하이머병

(alzheimer's disease), 파킨슨병(parkinson's disease), 헌팅턴병(huntington's disease) 및 픽병(pick's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

5 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 CK2 억제제로서 알려져 있는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 Dyrk에 대해서도 억제 효능이 있는지 확인한 결과, 여러 Dyrk 단백질 중에서도 Dyrk1A, Dyrk1B에 대해 가장 강력하고 선택성이 높게 억제작용을 하고, 기존에 알려진 Dyrk1A 저해제인 Harmine보다 Dyrk1A의 저해 효과가 20배 이상 강한 것을 확
10 인하였으며(도 3 참조), 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 ATP 경쟁적인 방식으로 억제함을 생화학적 방법으로 확인하였고 (도 4 참조), 분자 모델링 연구에서도 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 Dyrk1A의 ATP 결합 포켓(ATP binding pocket)에 수소 결합(hydrogen bond)을 형성하여 결합하는 것을 확인하였다(도 5 참조).

15 또한, 본 발명자들은 세포에서 Dyrk1A의 대표적인 기질(substrate)인 Tau의 인산화를 확인한 결과, Tau 단백질만을 과발현하였을 때 나타나지 않던 인산화가 Dyrk1A를 같이 과발현하였을 때 뚜렷하게 나타나고, 여기에 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 농도를 증가시켜 처리함에 따라 Tau의 인산화가 감소함을 확인하였고, 이러한 효과가 Harmine보다 더 강한 것
20 을 확인하였고(도 6a 참조), 다른 Dyrk1A 저해제인 INDY와 proINDY는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 보다 약 10배 낮은 억제 효과를 확인하였으며(도 6b 참조), 기존에 잘 알려진 APP(amyloid precursor protein) 및 PS1(presenilin 1)의 인산화도 억제하는지를 확인한 결과, Tau 단백질 인산화와 마찬가지로, APP 및 PS1의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다(도 7 참
25 조).

또한, 본 발명자들은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 Dyrk1A 관련된 calcineurin/NFAT 신호를 조절할 수 있는지를 확인한 결과, 이오노마이신(ionomycin, IM) 처리조건에서 Dyrk1A 과발현에 의해서 세포질로 이동하는 Flag-NFATc1 융합 단백질이 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)처리에 의해서 다시 핵으로 재배치되는 것을 확인하였고(도 8 참조), NFATc 반응 프로모터 (NFATc-responsive element)를 포함하는 reporter를 통한 전사활성을 확인한 결과, IM과 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)를 처리한 경우에 루시페라제의 발현이 급격하게 증가되었고(20배 이상), 여기에 Dyrk1A를 과발현하니 루시페라제 발현이 1/3(5.4배 증가)로 억제되었고, 이 조건에 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 농도별로 처리했을 때 루시페라제의 발현이 다시 급격히 증가함을 확인하였다(도 9 참조).

또한, 본 발명자들은 세포 실험에서 확인된 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제 효과를 개체 수준에서 확인하기 위해 Dyrk1A의 초파리 상동인자인 minibrain(mnb) 유전자를 클로닝하여 UAS/Gal4 시스템을 이용하여 확인한 결과, 날개 프로모터(promoter)인 MS1096-Gal4 라인과 UAS-minibrain(mnb)을 교배하여 나온 F1 세대에서는 90% 이상의 개체에서 5번 장축시맥(L5 vein)의 발생 이상을 보이는 것으로 확인하였고(도 10a 참조), 이러한 minibrain 과발현에 의한 짧은 시맥 표현형이 100 nM 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 먹인 초파리에서 약 30% 억제되는 것을 확인하였으며, harmine의 경우에는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 최적 농도의 100배인 10,000 nM 이상에서 40% 수준의 minibrain 표현형 억제효과를 보이는 것을 확인하였다(도 10b).

또한, 본 발명자들은 눈 특이적 프로모터인 GMR-gal4를 이용하여 Tau를 발현할 경우에 초파리 눈 발생에 변화가 생기고, minibrain 및 Tau를 동시에 발현시

킬 경우에는 이러한 변화가 더 심해지는 것을 확인하였으며, 각각의 경우에 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 처리한 경우에는 minibrain 및 Tau에 의한 변화가 유의하게 억제되는 것을 확인하였고(도 11a 참조), minibrain의 과발현에 의해 중추신경계 및 말초신경계의 발생 이상이 확인되었고, 부모 세대에 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 7일간 먹인 후 교배를 하여 나온 F1 세대의 배아에서는 minibrain에 의한 신경계 발생 이상이 현저하게 억제되는 것을 확인하였으며(도 11b 참조), 신경계 특이적 minibrain 과발현은 신경계 발생 이상으로 70% 이상의 성충 치사율을 보이는 데 반해, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 처리한 개체는 65% 이상 치사율이 감소하는 것을 확인하였으므로, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 초파리 Dyrk1A인 minibrain의 저해제로 작용하는 것을 확인하였다(도 11c 참조).

또한, 본 발명자들은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 고등동물 수준에서도 Dyrk1A 억제 효능을 보이는지 확인하기 위해서 다운증후군을 모방하는 Dyrk1A 과발현 마우스에서 실험을 수행한 결과, 이미 알려진 것과 마찬가지로 정상 마우스에 비해서 Dyrk1A 과발현 마우스의 해마(hippocampus)에 존재하는 Tau 단백질의 T212 위치의 인산화 정도가 현저히 높게 나타나는 것을 확인하였고, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 75 mg/kg의 농도로 구강 투여한 30분 후에 Dyrk1A 과발현 마우스의 해마에 존재하는 Tau 단백질의 인산화는 대조군인 vehicle을 투여한 것에 비해 현저하게 낮게 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 정상 마우스에서 나타나는 수준과 비슷한 것을 확인하였다(도 12 참조).

따라서, 본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)은 시험관 내(in vitro)에서 Dyrk1A에 강력한 억제효과를 나타

5 냄을 확인하였고, ATP와 경쟁적인 방식으로 억제 작용을 하며, Dyrk1A를 세포수준
 에서도 강력하게 억제하여, 신경섬유영킴과 노인반 유발 요인인 Tau, APP, PS1의
 인산화를 억제하고, NFATc의 인산화를 억제시켜서, NFATc의 전사활성을 증가시키고,
 초파리 모델에서도 초파리 Dyrk1A인 minibrain이 과발현되었을 때 나타나는 날개,
 10 눈, 신경계 발달 이상을 뚜렷하게 개선함을 확인하였으며, Dyrk1A 과발현 마우스에
 서도 Tau 단백질의 인산화가 현저하게 낮아지는 것을 확인함으로써, 일반적으로
 Dyrk1A 저해제로 사용되는 Harmine, INDY, proINDY에 비해서 높은 억제 효능을 보
 임으로써, 본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복
 시산(CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 다운증후군, 알츠하이머병,
 15 파킨슨병 등 Dyrk1A와 관련된 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으
 로 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시
 산(CX-4945)은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는
 15 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다.
 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는
 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노
 에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방
 향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한
 20 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설펜아이드, 바이설펜아이드, 니트레
 이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포
 스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드,
 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이
 트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말
 25 로네이트, 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, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동량의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입여과시켜 제조할 수도 있다.

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

또한, 본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 수산화

성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

5 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

10 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

20 본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는
25 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로

제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

5 또한, 본 발명의 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 60 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이며, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

10 또한, 본 발명은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

15 상기 CX-4945는 상기 [화학식 1]로 표기되는 구조를 가지는 것이 바람직하다.

상기 CX-4945는 Dyrk1의 활성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

상기 Dyrk1A의 활성 억제는 CX-4945가 Dyrk1A의 ATP binding pocket에 결합하여 발생하는 것을 특징으로 한다.

20 상기 CX-4945는 Dyrk1A 저해를 통해 Tau, APP 및 PS1 단백질의 인산화를 억제시키고, NFATc를 탈인산화 시키며, NFATc의 전사활성을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

상기 퇴행성 뇌질환은 다운증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 및으로

픽병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한

25 정되지 않는다.

본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)은 시험관 내(in vitro)에서 Dyrk1A에도 강력한 억제효과를 나타냄을 확인하였고, ATP와 경쟁적인 방식으로 억제 작용을 하며, Dyrk1A를 세포수준에서도 강력하게 억제하여, 신경섬유영킴과 노인반 유발 요인인 Tau, APP, PS1의 인산화를 억제하고, NFATc의 인산화를 억제시켜서, NFATc의 전사활성을 증가시키고, 초파리 모델에서도 초파리 Dyrk1A인 minibrain이 과발현되었을 때 나타나는 날개, 눈, 신경계 발달 이상을 뚜렷하게 개선함을 확인하였으며, Dyrk1A 과발현 마우스에서도 Tau 단백질의 인산화가 현저하게 낮아지는 것을 확인함으로써, 일반적으로 Dyrk1A 저해제로 사용되는 Harmine, INDY, proINDY에 비해서 높은 억제 효능을 보임으로써, 본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강 기능식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 상기와 같은 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선을 위해 이용되기 위해서는, 식품학 또는 약제학적 분야에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며 그 자체 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 경구로 섭취할 수 있는 어떤 식품 형태로도 제조될 수 있다. 바람직하게는 음료, 환, 과립, 정제 또는 캡셀 형태이다.

본 발명의 건강 기능 식품은, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되고 식품학적으로 허용되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예컨대, 음료수로 제조되는 경우에는 본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등에서 하나 이상의 성분을 추가로 포함시킬 수 있다.

본 발명에 따른 건강 기능 식품의 유효성분으로 포함될 수 있는 양은 퇴행

성 뇌질환 예방 및 개선을 원하는 사람의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 g 내지 10.0 g 정도로 포함되는 것이 좋으며, 이러한 함량을 갖는 건강 기능 식품을 섭취함으로써 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선 효과를 얻을 수 있다.

5

또한, 본 발명은 분리된 세포, 무세포(cell-free) 또는 시험관 내(in vitro)에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 Dyrk1 억제 방법

10 을 제공한다.

상기 CX-4945는 상기 [화학식 1]로 표기되는 구조를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 CX-4945는 Dyrk1의 활성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

상기 Dyrk1A의 활성 억제는 CX-4945가 Dyrk1A의 ATP binding pocket에 결합

15 하여 발생하는 것을 특징으로 한다.

상기 CX-4945는 Dyrk1A 저해를 통해 Tau 단백질의 인산화를 억제시키고, NFATc를 탈인산화 시키며, NFATc의 전사활성을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)은 시험관 내(in vitro)에서 Dyrk1A에도 강력한 억제효과를 나타냄을

20 확인하였고, ATP와 경쟁적인 방식으로 억제 작용을 하며, Dyrk1A를 세포수준에서도 강력하게 억제하여, 신경섬유영킴과 노인반 유발 요인인 Tau, APP, PS1의 인산화를 억제하고, NFATc의 인산화를 억제시켜서, NFATc의 전사활성을 증가시키고, 초파리 모델에서도 초파리 Dyrk1A인 minibrain이 과발현되었을 때 나타나는 날개, 눈, 신경계 발달 이상을 뚜렷하게 개선함을 확인하였으며, Dyrk1A 과발현 마우스에서도

25 Tau 단백질의 인산화가 현저하게 낮아지는 것을 확인함으로써, 일반적으로 Dyrk1A

저해제로 사용되는 Harmine, INDY, proINDY에 비해서 높은 억제 효능을 보임으로써, 본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 Dyrk1과 관련된 생물학적 연구를 위한 Dyrk1 억제 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

5

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료방법을 제공한다.

10 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 방법을 제공한다.

15 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)은 시험관 내(in vitro)에서 Dyrk1A에도 강력한 억제효과를 나타냄을 확인하였고, ATP와 경쟁적인 방식으로 억제 작용을 하며, Dyrk1A를 세포수준에서도 강력하게 억제하여, 신경섬유영킴과 노인반 유발 요인인 Tau, APP, PS1의 인산화를 억제하고, NFATc의 인산화를 억제시켜서, NFATc의 전사활성을 증가시키고, 초파리 모델에서도 초파리 Dyrk1A인 minibrain이 과발현되었을 때 나타나는 날개, 눈, 신경계 발달 이상을 뚜렷하게 개선함을 확인하였으며, Dyrk1A 과발현 마우스에서도

25

Tau 단백질의 인산화가 현저하게 낮아지는 것을 확인함으로써, 일반적으로 Dyrk1A
 저해제로 사용되는 Harmine, INDY, proINDY에 비해서 높은 억제 효능을 보임으로써,
 본 발명의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-
 4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 퇴행성 뇌질환에 대한 강력한 효과
 5 를 나타내므로, 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료방법에 유용하게 사용될 수 있다.

【유리한 효과】

본 발명은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시
 산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid;
 10 CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성
 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, CK2와 Cdc2-like kinase(Clk)
 의 강력한 억제물질로 알려진 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-
 8-카르복시산(CX-4945)이 시험관 내(in vitro)에서 Dyrk1A에도 강력한 억제효과를
 나타냄을 확인하였고, ATP와 경쟁적인 방식으로 억제 작용을 하며, Dyrk1A를 세포
 15 수준에서도 강력하게 억제하여, 미세소관(microtubule) 관련 단백질인 Tau, APP,
 PS1의 인산화를 억제하고, NFATc를 탈인산화 시키며, NFATc의 전사활성을 증가시키
 고, 초파리 모델에서도 초파리 Dyrk1A인 minibrain이 과발현되었을 때 나타나는 날
 개, 눈, 신경계 발달 이상을 유의적으로 개선함을 확인하였으며, Dyrk1A 과발현 마
 우스에서도 Tau 단백질의 인산화가 현저하게 낮아지는 것을 확인함으로써, 일반적
 20 으로 Dyrk1A 저해제로 사용되는 Harmine, INDY, proINDY에 비해서 높은 억제 효능
 을 보임으로써, 상기 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복
 시산(CX-4945)을 Dyrk1A와 관련된 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물로 유용하
 게 사용할 수 있다.

25 【도면의 간단한 설명】

도 1은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산 (5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)의 구조를 나타낸 도이다.

도 2는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산 (CX-4945) 및 기존에 Dyrk1A의 가장 강력한 억제물질로 알려진 Harmine, INDY 및 proINDY의 구조를 나타낸 도이다.

도 3은 인산화효소 프로파일링(kinase profiling) 분석을 수행하여 Dyrk에 대한 억제 효과를 나타낸 도이다:

(A)는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk에 대한 억제 효과를 나타낸 도이고, (B)는 Harmine의 Dyrk에 대한 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산 (CX-4945)의 ATP 경쟁적 Dyrk1A 억제효과를 나타낸 도이다.

도 5의 (A)는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)과 Dyrk1A의 분자모델링 결과를 나타내며, (B)는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)과 Dyrk1A의 결합 구조를 나타낸 도이다.

도 6a의 (A)는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Tau 단백질의 인산화 억제 효과를 웨스턴 블롯(western blotting) 실험을 수행하여 확인한 도이고, (B)는 (A)의 결과를 정량화하여 그래프로 나타낸 도이며, (C)는 Harmine의 Tau 단백질의 인산화 억제 효과를 웨스턴 블롯 실험을 수행하여 확인한 도이고, (D)는 (C)의 결과를 정량화하여 그래프로 나타낸 도이다.

도 6b의 (A)는 INDY의 Tau 단백질의 인산화 억제 효과를 웨스턴 블롯 실험을 수행하여 확인한 도이고, (B)는 (A)의 결과를 정량화하여 그래프로 나타낸 도이

며, (C)는 proINDY의 Tau 단백질의 인산화 억제 효과를 웨스턴 블롯 실험을 수행하여 확인한 도이고, (D)는 (C)의 결과를 정량화하여 그래프로 나타낸 도이다.

도 7의 (A)는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 APP(amyloid precursor protein) 인산화 억제 효과를 웨스턴 블롯 실험을 수행하여 확인한 도이고, (B)는 (A)의 결과를 정량화하여 그래프로 나타낸 도이며, (C)는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 PS1(presenilin 1) 인산화 억제 효과를 웨스턴 블롯 실험을 수행하여 확인한 도이고, (D)는 (C)의 결과를 정량화하여 그래프로 나타낸 도이다.

도 8은 여러가지 조건에서의 Flag-NFATc1 단백질의 세포 내 위치를 나타낸 도이다:

왼쪽 위는 control(대조군)로 아무 처리를 하지 않은 상태에서의 Flag-NFATc1 단백질의 위치를 나타내고, 오른쪽 위는 이오노마이신(ionomycin, IM)을 처리한 후 Flag-NFATc1 단백질의 위치를 나타내고, 왼쪽 가운데는 Dyrk1A를 과발현시킨 후 Flag-NFATc1 단백질의 위치를 나타내고, 오른쪽 아래는 IM을 처리한 후 Dyrk1A를 과발현시킨 후 Flag-NFATc1 단백질의 위치를 나타내며, 왼쪽 아래는 IM을 처리한 후 Dyrk1A를 과발현시킨 후 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 처리한 후 Flag-NFATc1 단백질의 위치를 나타낸다.

도 9는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제효과를 NFATc의 전사활성을 통해 측정하여 나타낸 도이다.

도 10a는 날개 특이적 minibrain(mnb) 과발현에 의한 표현형을 나타낸 도이다.

도 10b의 (A)는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 농도에 따른 minibrain 과발현 초파리 개체의 표현형 억제 효과를 확인한 도이고, (B)는 Harmine의 농도에 따른 minibrain 과발현 초파리 개체의 표현형 억제 효과를 확인한 도이다.

도 11a는 초파리 눈 특이적인 minibrain 과발현에 의한 표현형 및 Tau 과발현에 의한 표현형에 대한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 억제 효과를 확인한 도이다.

도 11b는 초파리 신경계 특이적인 minibrain 과발현에 의한 신경 발생 이상 표현형에 대한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 억제 효과를 확인한 도이다.

도 11c는 초파리 신경계 특이적인 minibrain 과발현에 의한 성충 치사율에 대한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 억제 효과를 확인한 도이다.

도 12는 Dyrk1A 과발현 마우스에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 억제 효과를 확인한 도이다:

(A)는 정상 마우스(normal)와 Dyrk1A 과발현 마우스의 해마에서 나타나는 Tau 단백질의 인산화를 웨스턴 블롯 실험을 수행하여 확인한 도이고, (B)는 Dyrk1A 과발현 마우스에 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 투여한 후 해마에서 나타나는 Tau 단백질의 인산화 감소 효과를 웨스턴 블롯 실험을 수행하여 확인한 도이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1 억제효능

TG-003, KH-CB19, Leucettine L₄₁ 등 Cdc2-like kinase(Clk)를 억제한다고

알려진 많은 저분자 물질들은 대부분 Dyrk를 저해한다고 알려져 있다. 이는 Clk와 Dyrk1이 비슷한 서열과 구조의 인산화 효소영역(kinase domain)을 가지고 있기 때문이다. 이에, 본 발명자들은 최근 연구에서 도 1에 개시된 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)라는 물질이 Clk에 대해서 강력한 억제효능을 가지고 있음을 규명하였고, 연장선상에서 Clk와 구조적으로 유사한 Dyrk1(Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1)에 대해서도 비슷한 효능을 가질 수 있는 가능성을 확인하였다. 또한, 도 2에 개시된 구조를 가진 기존에 널리 이용되고 있는 현재까지 가장 강력한 Dyrk1A 저해제로 알려진 하민(Harmine) 및 기존 연구에서 또 다른 Dyrk1A의 억제물질로 알려진 INDY와 proINDY를 실험에 사용하였다.

구체적으로, 여러 가지 농도의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 분리정제된 Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk3 및 Dyrk4와 반응시킨 다음, 형광-기반의 면역분석법(fluorescence-based immunoassay)을 사용하는 인산화효소 프로파일러 서비스(Kinase Profiler service; 인비트로젠 사 제공)를 사용하여 인산화효소 프로파일링(kinase profiling) 분석을 수행하여 Dyrk1A, Dyrk1B, Dyrk3 및 Dyrk4에 대한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 억제 효과를 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 μ M의 CX-4945 농도 및 각각 단백질의 인산화 효소활성에 적합한 ATP 농도(ATP에 대한 K_m 값과 동일한 ATP 농도)에서 측정하고 프리즘 프로그램을 이용해서 IC_{50} 값을 결정하여 각각의 인산화효소에 대한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 억제효과를 비교하였다. 대조군으로 Harmine의 억제 효과를 상기와 동일한 방법으로 확인하였다.

그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)은 여러 Dyrk 단백질 중에서도 Dyrk1A, Dyrk1B에 대해 가장 강력하고 선택성이 높게(IC_{50} 6.4-6.8 nM) 억제작용하는 것을

확인하였다. 또한, Harmine과 비교해 볼 때 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A의 저해효과가 20배 이상 훨씬 강한 것을 확인하였다(도 3).

상기 결과 및 구조를 분석하였을 때, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)은 Harmine과 매우 유사한 구조를 가지고 있으나, 벤질링(benzyl ring)을 추가적으로 가지고 있는데 (도 2), 이 차이가 Dyrk1A 억제효능의 차이에 중요한 요인으로 작용한 것으로 추정되고, INDY와 proINDY가 Harmine보다 약간 낮은 Dyrk1A 억제 효능을 가지는 것을 고려하면, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 가장 강력한 Dyrk1A 억제물질임을 확인하였다.

<실시에 2> 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 ATP 경쟁적 억제 효능

5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 ATP와 경쟁하는 방식으로 Dyrk1A를 억제하는지 확인하기 위해서 여러 농도의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 처리 조건에서 ATP의 농도를 달리하여 Dyrk1A 활성을 측정하고 그 값들을 이용해서 Lineweaver-Burk 그래프를 그려서 확인하였다.

그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, 전형적인 ATP 경쟁적 방식의 억제패턴이 나타났다(도 4).

또한, 실제로 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 Dyrk1A의 ATP 결합부위에 잘 들어맞는지를 확인하기 위해 컴퓨터 시뮬레이션을 통한 분자 모델링 연구를 수행하였다.

그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-

2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 Dyrk1A의 ATP binding pocket에 잘 들어
 맞는 것을 확인하였고(도 5A), Dyrk1A의 L241의 질소(nitrogen)와 5-[(3-클로로페
 니)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 카복실기(carboxyl
 group) 사이에 두 개의 수소결합이 예측되고, D307의 질소와 5-[(3-클로로페닐)아
 미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 트리사이클(tricyclic)
 질소 사이에 1개의 수소결합이 예측되었다(도 5B).

이러한 결합 형태는 기존 연구에서 Dyrk1A와 harmine, INDY, proINDY 사이
 의 co-crystal 구조를 통해서 밝혀진 것과 매우 유사한 형태이며, 이러한 결과들을
 토대로 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)
 이 Dyrk1A의 ATP 결합부위에 경쟁적으로 결합함으로써, 억제 효능을 보이는 것을
 확인하였다.

**<실시예 3> 세포수준에서의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티
 리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제 효과**

**<3-1> 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산
 (CX-4945)의 Tau 인산화 억제 효과**

세포수준에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복
 시산(CX-4945)이 Dyrk1A를 억제할 수 있는지를 테스트하기 위해 포유동물 세포인
 293T 세포에서 Dyrk1A의 대표적인 기질(substrate)인 Tau의 인산화를 확인하였다.
 Tau는 미세소관 관련 단백질로 Dyrk1A는 Tau 단백질의 Thr212를 주로 인산화하고,
 이러한 인산화는 Dyrk1A가 과발현된 다운증후군 모델 마우스의 해마조직에서 뚜렷
 하게 관찰된바 있다.

구체적으로, 293T 세포를 6 웰 플레이트에 5×10^5 세포수로 12시간 배양한
 후 Tau 및 Dyrk1A 발현 DNA 각각 1 μ g을 공동형질전환하였다. 이를 24시간 배양한
 후 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을

0.001, 0.01, 0.1 및 1 μ M 처리하여 6시간 배양한 후, 세포를 수득하고 파쇄하여 293T 세포의 전체 단백질을 포함하는 세포 추출물을 수득하였다. 그런 다음, SDS-PAGE로 상기 전체 단백질을 전개하고, 0.45 μ m의 폴리비닐이덴 플루오라이드 이동막(Polyvinylidene fluoride transfer membrane; GE 헬스케어 사, 미국)에 이동하

여 5% 스킴 밀크(skim milk)로 차단한 후, 1차 항체로 항-Tau 항체(써모 사), 항-pTau(T212) 항체(인비트로젠 사) 및 항-Dyrk1a 항체(산타크루즈 사)를 5% 스킴 밀크를 포함하는 트리스완충식염수 트윈-20(tris buffered saline tween-20, TBST)로 1:1000으로 희석하고, 상기 차단한 이동 막에 처리하여 밤새 반응시켰다. 그런 다음, TBST로 각각 10 분간 4 회 씻어준 뒤, 2차 항체를 반응시켰다. 반응 후, TBST로 각각 10 분간 4 회 씻어준 뒤, 상기 이동 막 위의 단백질을 WEST-ZOL 플러스 웨스턴블롯팅 검출 시스템(WEST-ZOL plus western blotting detection system; 인트론 생명공학 사, 미국) 및 LAS-4000 영상화 분석기(LAS-4000 Image analyzer; 후지필름 사, 일본)을 사용해 단백질의 인산화 수준을 검출하였다. 대조군으로 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 대신 다른

Dyrk1A 저해제인 Harmine, INDY 또는 proINDY를 사용하여 상기와 동일한 방법을 수행하였다. 발현양을 비교하기 위한 대조군으로는 1차 항체로 항-hnRNP A1(anti-hnRNA A1, Gideon Dreyfuss, 펜실베이니아대, 미국) 항체 및 항-GAPDH 항체를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 hnRNP A1 및 GAPDH 발현 여부를 확인하였다.

그 결과 도 6a 내지 도 6b에 나타낸 바와 같이, 293T 세포에서 Tau 단백질만을 과발현하였을 때 나타나지 않던 인산화가 Dyrk1A를 같이 과발현하였을 때 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 여기에 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 농도를 증가시켜 처리함에 따라 Tau의 인산화가 감소함을 확인하였으며, 이러한 결과는 세포수준에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 Dyrk1A의 강력한 억제 효과가 있음을 보여준다. 또한, 세포수준에서의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조

[c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Tau 단백질 인산화 억제효과는 Harmine보다 더 강한 것을 확인하였다(도 6a). 또한, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Tau 단백질 인산화 억제효과는 IC₅₀이 대략 100-200 nM이고, Harmine은 300-500 nM로 약간 낮았고, 다른 Dyrk1A
5 저해제인 INDY와 proINDY는 약 2,000 nM로 확인되어, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 보다 약 10배 낮은 억제 효과를 확인하였다(도 6b).

이러한 결과는 상기 <실시예 1>과 마찬가지로, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 가장 강력한 Dyrk1A 억제 물질
10 임을 확인하였다.

<3-2> 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산 (CX-4945)의 APP(amyloid precursor protein), PS1(presenilin 1) 인산화 억제 효과

5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)
15 이 Dyrk1A를 억제함으로써 Tau의 인산화 외에도 기존에 잘알려진 APP 및 PS1의 인산화도 억제하는지를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 APP 및 Dyrk1A, PS1 및 Dyrk1A를 과발현시킨 후, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 농도별로 처리한 후 세포 추출물을 수득하여, 1차 항체로 항-
20 APP 항체, 항-pAPP(T668) 항체 및 항-Dyrk1a 항체 또는 항-PS1 항체 및 항-Dyrk1a 항체를 사용하여 단백질의 인산화 수준을 검출하였다. 발현양을 비교하기 위한 대조군으로는 1차 항체로 항-hnRNP A1 항체 및 항-GAPDH 항체를 사용하여 상기과 동일한 방법으로 hnRNPA1 및 GAPDH 발현 여부를 확인하였다.

그 결과 도 7에 나타낸 바와 같이, Tau 단백질 인산화와 마찬가지로, APP
25 및 PS1의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다(도 7).

상기 결과들은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제를 명확히 보여주는 결과이고, 퇴행성 뇌질환에서 공통적으로 나타나는 신경병리인 노인반(Amyloid plaque)과 신경섬유 엉킴(Neurofibrillary tangle)의 형성에 핵심적인 Tau, APP, PS1의 과인산화를 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 억제할 수 있음을 보여주는 중요한 결과이다.

<실시예 4> 칼시뉴린/엔팻(calcineurin/NFAT) 신호에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제 효과 검증

본 발명자들은 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 Dyrk1A와 관련되어 다운증후군, 알츠하이머병의 발병에서 중요한 역할을 하는 calcineurin/NFAT 신호를 조절할 수 있는지를 확인해 보았다.

구체적으로, Flag-NFATc1 융합 단백질을 발현하는 293T 세포를 Slided 8 웰(ibidi)에 2×10^4 세포수로 배양하여 12시간 동안 배양한 뒤, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde) 용액으로 20분 동안 세포들을 고정시킨 후, PBS로 3회 플레이트를 씻어준 뒤, 0.5% Triton X-100 용액으로 5분 동안 반응시키고 PBS로 3회 씻어주었다. 그 후 2% BSA로 20분 동안 반응시켜 다른 항체들이 결합하지 못하게 한 후 일차항체(anti-Flag : 시그마 사)를 반응한 후 다시 이차항체(anti mouse-Alexa fluor 488 : 인비트로젠 사)를 반응시킨 후, PBS로 3회 세척한 뒤 형광 현미경으로 확인하였다.

그 결과 도 8에 나타낸 바와 같이, 293T 세포에서 발현된 Flag-NFATc1 융합 단백질의 위치를 확인하면 주로 세포질에 머물러 있는 것을 볼 수 있다(도 8 왼쪽 맨위). 이때, 세포에 칼슘 이온 운반체인 이오노마이신(ionomycin, IM)을 처리하면 Flag-NFATc1는 핵에 축적한다(도 8 오른쪽 위). 또한, Dyrk1A를 과발현시키면 Flag-NFATc1의 핵 축적을 차단하여 세포질에 머물러 있고(도 8 왼쪽 가운데),

Dyrk1A를 과발현시킨 후 IM을 처리하면 Flag-NFATc1는 세포질에 여전히 머물러 있으며(도 8 오른쪽 아래), 이는 Dyrk1A의 calcineurin/NFAT 경로의 음성 조절자(negative regulator)로서의 역할과 일치하는 결과이다. 또한, Dyrk1A를 과발현시킨 후 IM을 처리한 후 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 처리하게 되면 Dyrk1A가 존재함에도 불구하고 Flag-NFATc1가 다시 핵으로 재배치되는 것을 확인하였다(도 8 왼쪽 아래).

이러한 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제효과는 NFATc의 전사활성을 통해서도 확인하였는데, 이를 위해 NFATc의 전사활성을 측정하는데 유용한 NFAT-responsive element(NFAT-RE)를 포함하는 루시퍼라제 리포터를 사용하였다. NFAT-RE-루시퍼라제 리포터와 Dyrk1A를 293T 세포에서 과발현한 후 IM과 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)를 처리해 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키고, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 농도별 처리하였다.

그 결과 도 9에 나타난 바와 같이, IM과 PMA를 처리한 경우에 루시퍼라제의 발현이 급격하게 증가되었고(20배 이상), 여기에 Dyrk1A를 과발현하니 루시퍼라제 발현이 1/3로(5.4배 증가)로 억제되는 것을 확인하였다. 또한, 이 조건에 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 농도별로 처리했을 때 루시퍼라제의 발현이 다시 급격히 증가함을 확인하였다. 심지어 10 μ M을 처리하였을 경우 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 처리하지 않은 경우에 비해 7배 정도로 그 활성이 증가하는 것을 확인하였다(도 9).

상기 결과들로 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제 효능을 다시 한번 확인하였고, 다운증후군, 알츠하이머병의 발병과 관련되는 NFAT 신호 전달을 조절할 수 있음을 보여준다.

<실시예 5> Minibrain 과발현 초파리 모델에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제 효능 검증

상기 세포 실험에서 확인된 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제 효과를 개체 수준에서 확인하기 위해 Dyrk1A의 초파리 상동인자인 minibrain(mnb) 유전자를 클로닝하여 UAS/Gal4 시스템을 이용한 조직특이적 유전자 과발현 유도를 실시하였다.

구체적으로, UAS-minibrain 형질전환 초파리를 조직 특이적으로 발현시키는 Gal4 형질전환 초파리와 교배하여 F1 세대의 배아를 모아 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 각각 1, 10, 100, 1000, 10000, 25000 nM이 포함된 초파리 표준배지(텍스트로오스 7.0%, 이스트 5.0%, 옥수수전분 3.5%, 한천아가 0.5%, propionic acid 0.5%, Tegosept 0.7%)에서 배양한 후, 성충의 날개의 표현형을 기준으로 CX-4945의 효과를 분석하였다.

그 결과 도 10a 내지 10b에 나타난 바와 같이, 초파리 날개에 특이적으로 minibrain의 과발현을 유도하기 위해 날개 프로모터(promoter)인 MS1096-Gal4 라인과 UAS-minibrain(mnb)을 교배하여 나온 F1 세대에서는 90% 이상의 개체에서 5번 장축시맥(L5 vein)의 발생 이상을 보이는 것으로 확인하였고(도 10a), 이러한 minibrain 과발현에 의한 짧은 시맥 표현형이 100 nM 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 먹인 초파리에서 약 30% 억제되는 것을 확인하였으며, harmine의 경우에는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945) 최적 농도의 100배인 10000 nM 이상에서 40% 수준의 minibrain 표현형 억제효과를 보이는 것을 확인하였다(도 10b).

또한, 상기 Dyrk1A의 Tau 단백질 인산화 촉진 및 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 인산화 활성 억제 효과

를 개체수준에서 확인하기 위해, UAS/Gal4 시스템을 이용하여 초파리 눈 특이적 프
로모터인 GMR-gal4를 이용하여 minibrain 또는 Tau 단독으로 과발현 시키거나,
minibrain과 Tau를 함께 과발현시킨 초파리를 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-
2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 포함된 배지에서 키운 후에 초파리 성충
5 의 눈을 해부현미경 하에서 표현형을 분석하였다.

그 결과 도 11a에 나타낸 바와 같이, minibrain 또는 Tau를 발현할 경우에
는 초파리 눈 발생이 변화가 생기고, minibrain 및 Tau를 동시에 발현시킬 경우에
는 이러한 변화가 더 심해지는 것을 확인하였으며, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조
[c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 처리한 경우에는 minibrain 및 Tau에
10 의한 변화가 유의하게 억제되는 것을 확인하였다(도 11a).

또한, 신경계 특이적인 elav-Gal4 프로모터 라인을 이용하여 신경계에
minibrain을 과발현 시킨 후, 1령기 유충으로 깨어나기 전인 24시간 이내의 F1 세
대 배아를 모아서 4% 포르말린으로 고정 후에, 신경계 구조를 확인할 수 있는 형광
15 단백질인 synaptobrevin-GFP를 함께 발현시켜 형광공초점현미경 하에서 관찰하여
신경계 구조 및 형태를 분석하였다. 또한, 신경계 특이적으로 minibrain을 과발현
시킨 후, 성충이 깨어나기까지 10일 이상 배양 후에 깨어난 성충을 개수하여 성충
의 치사율을 확인하였다.

그 결과 도 11b 내지 도 11c에 나타낸 바와 같이, minibrain의 과발현에 의
20 해 중추신경계 및 말초신경계의 발생 이상이 확인되었고, 부모 세대에 5-[(3-클로
로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 7일간 먹인 후
교배를 하여 나온 F1 세대의 배아에서는 minibrain에 의한 신경계 발생 이상이 현
저하게 억제되는 것을 확인하였으며(도 11b), 신경계 특이적 minibrain 과발현은
신경계 발생 이상으로 70% 이상의 성충 치사율을 보이는 데 반해, 5-[(3-클로로페
25 nil)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 처리한 개체는 65%

이상 치사율이 감소하는 것을 확인하였으므로, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 초파리 Dyrk1A인 minibrain의 저해제로 작용하는 것을 확인하였다(도 11c).

5 <실시예 6> Dyrk1A 과발현 마우스에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)의 Dyrk1A 억제 효능 검증

5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 고등동물 수준에서도 Dyrk1A 억제 효능을 보이는지 확인하기 위해서 다운증후군을 모방하는 Dyrk1A 과발현 마우스를 기존에 알려진 방법(Ahn et al., 2006
10 Neurobiol Dis)으로 제조하여 실험을 수행하였다.

그 결과 도 12에 나타낸 바와 같이, 이미 알려진 것과 마찬가지로 정상 마우스에 비해서 Dyrk1A 과발현 마우스의 해마(hippocampus)에 존재하는 Tau 단백질의 T212 위치의 인산화 정도가 현저히 높게 나타나는 것을 확인하였고, 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)을 75 mg/kg 농도
15 로 구강 투여한 30분 후 Dyrk1A 과발현 마우스의 해마에 존재하는 Tau 단백질의 인산화는 대조군인 vehicle을 투여한 것에 비해 현저하게 낮게 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 정상 마우스에서 나타나는 수준과 비슷한 것을 확인하였다(도 12).

이러한 결과는 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(CX-4945)이 마우스 모델에서 혈액뇌관문(blood-brain barrier; BBB)를 효과
20 적으로 통과해서 Dyrk1A을 억제하는 것을 보여준다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 CX-4945는 Dyrk1(Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 CX-4945는 Tau, APP(amyloid precursor protein) 및 PS1(presenilin 1) 단백질의 인산화를 억제시키고, NFATc1을 탈인산화 시키며, NFATc1의 전사활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 다운증후군(down syndrome), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 파킨슨병(parkinson's disease), 헌팅턴병(huntington's disease) 및 픽병(pick's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 5】

5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

5

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 CX-4945는 Dyrk1의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

10 **【청구항 7】**

제 5항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 다운증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 픽병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품.

15 **【청구항 8】**

분리된 세포, 무세포(cell-free) 또는 시험관 내(in vitro)에서 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 Dyrk1 억제 방법.

20

【청구항 9】

약학적으로 유효한 양의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리딘-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)을 퇴행성 뇌질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료방법.

25

【청구항 10】

약학적으로 유효한 양의 5-[(3-클로로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리
단-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-
5 carboxylic acid; CX-4945)을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예
방 방법.

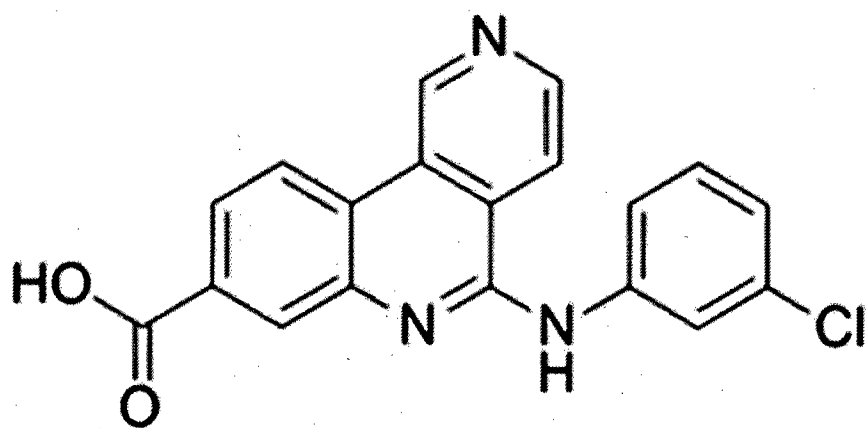
【청구항 11】

퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 5-[(3-클로
10 로페닐)아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리단-8-카르복시산(5-[(3-
Chlorophenyl)amino]benzo [c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)의
용도.

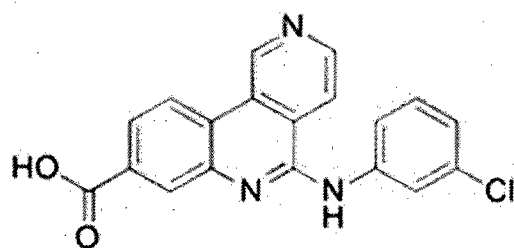
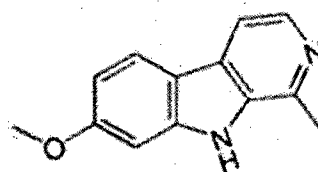
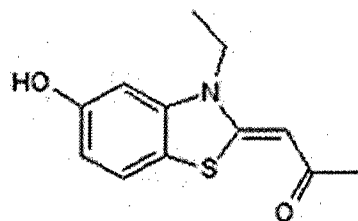
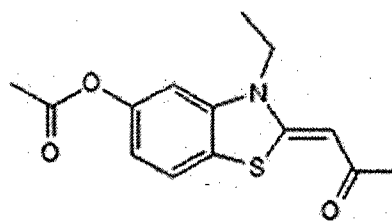
【청구항 12】

15 퇴행성 뇌질환 예방 및 건강기능 식품으로 사용하기 위한 5-[(3-클로로페닐)
아미노] 벤조 [c]-2,6-나프티리단-8-카르복시산(5-[(3-Chlorophenyl)amino]benzo
[c]-2,6-naphthyridine-8-carboxylic acid; CX-4945)의 용도.

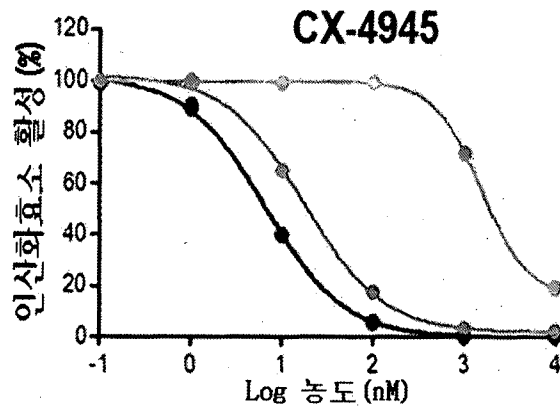
[도 1]



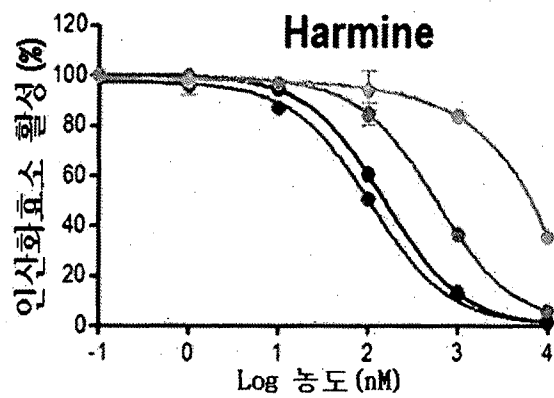
[도 2]

**CX-4945****Harmine****INDY****ProINDY**

[도 3]

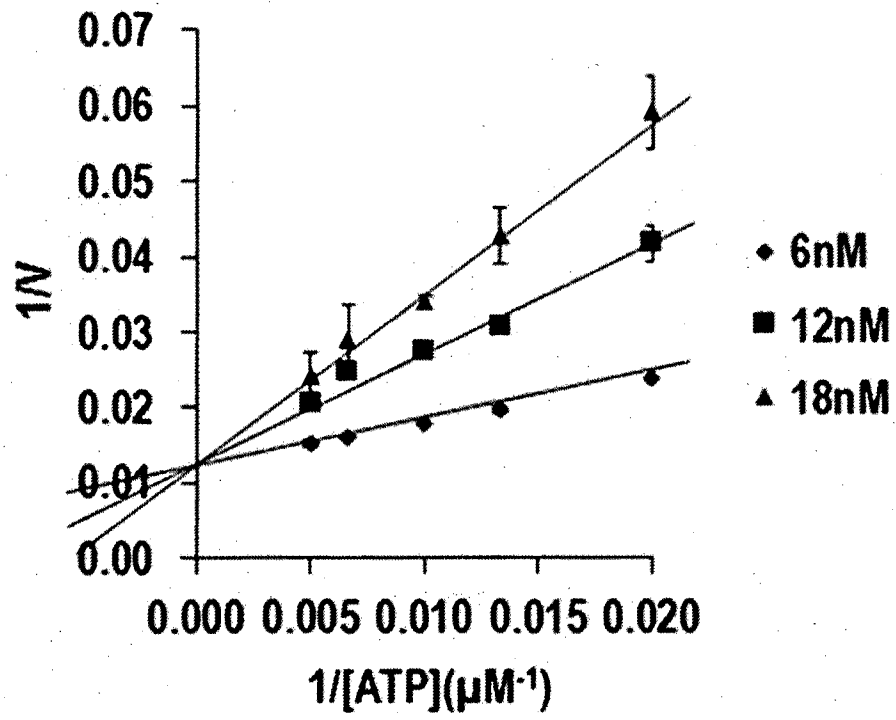


인산화효소	IC ₅₀ (nM)
DYRK1A	6.8
DYRK1B	6.4
DYRK3	18.0
DYRK4	1500

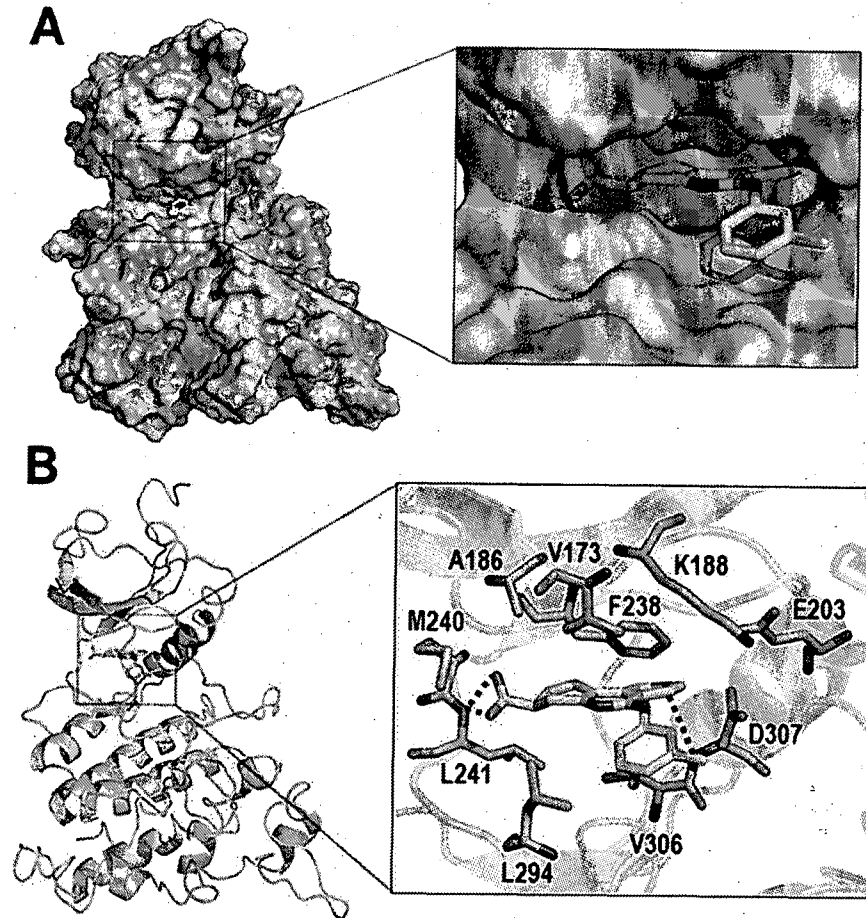


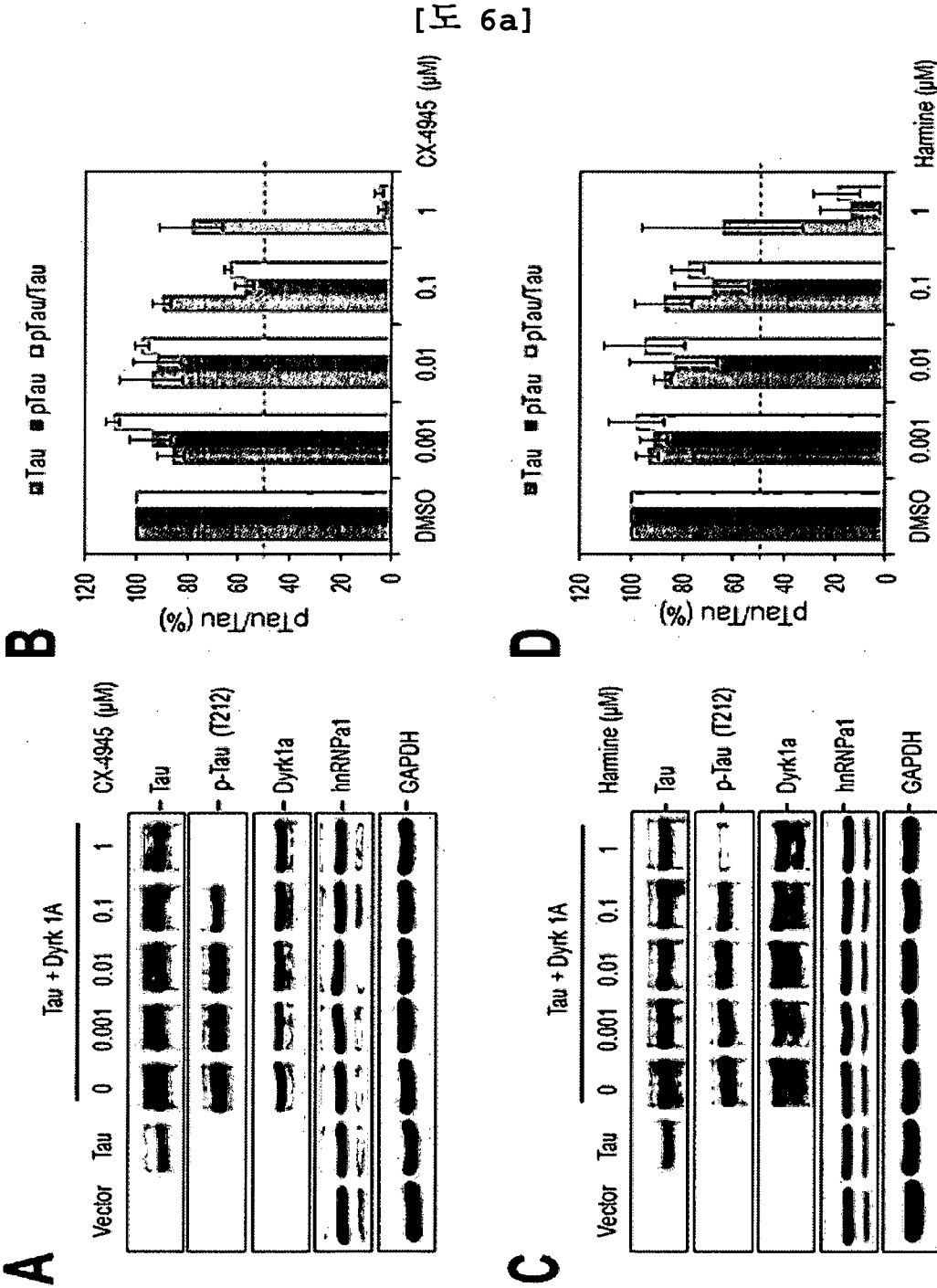
인산화효소	IC ₅₀ (nM)
DYRK1A	106
DYRK1B	152
DYRK3	563
DYRK4	5881

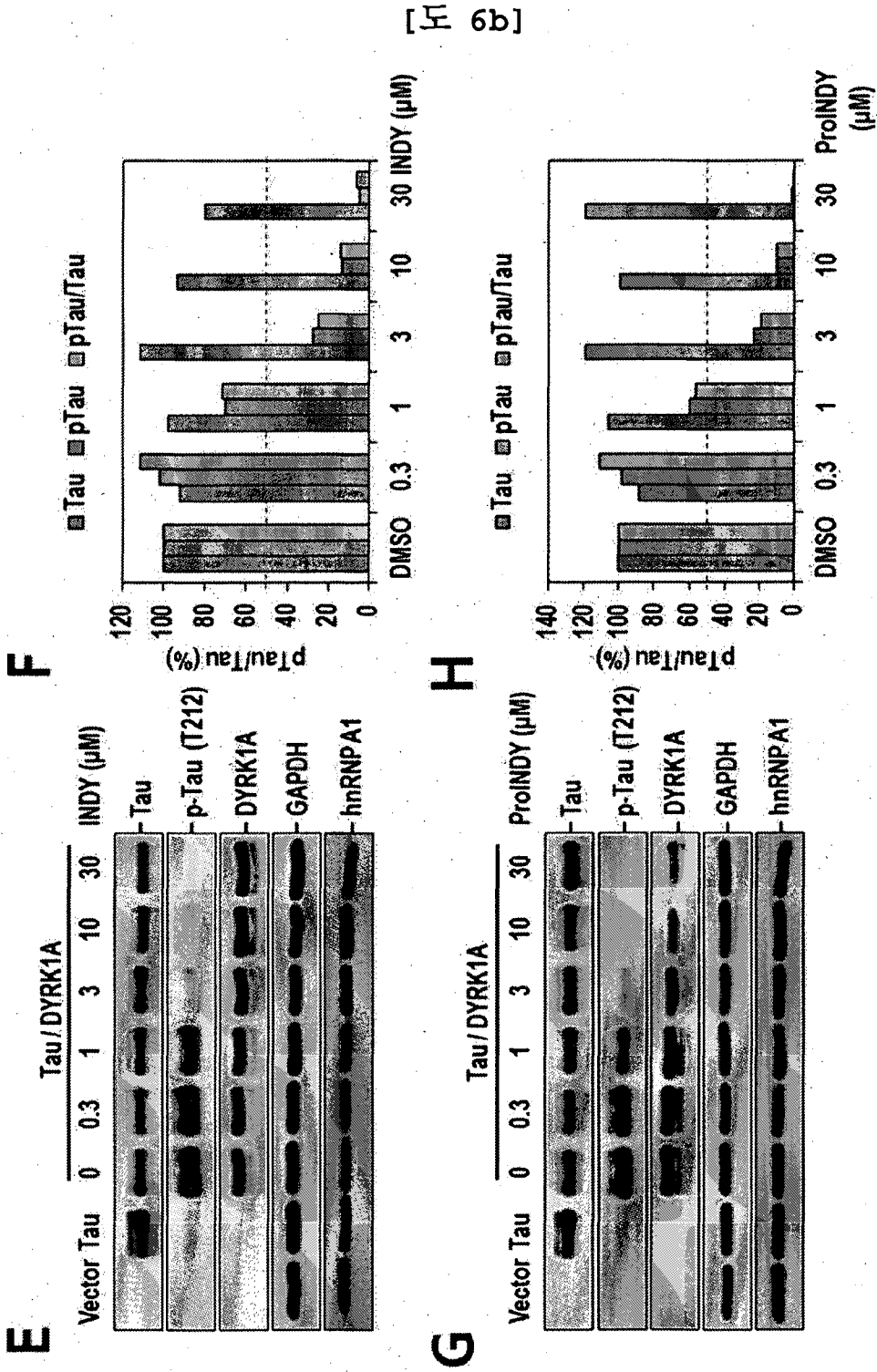
[도 4]

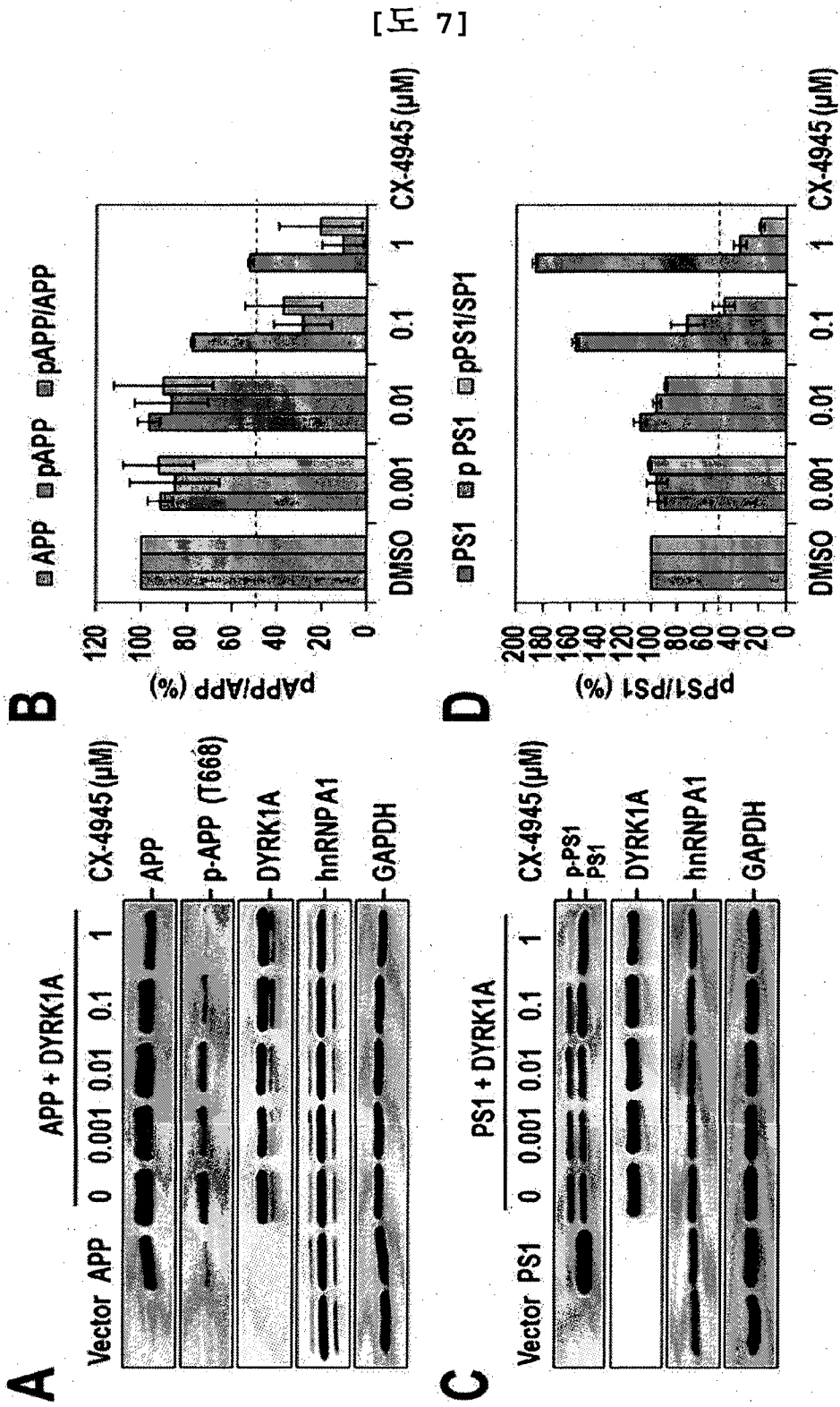


[도 5]

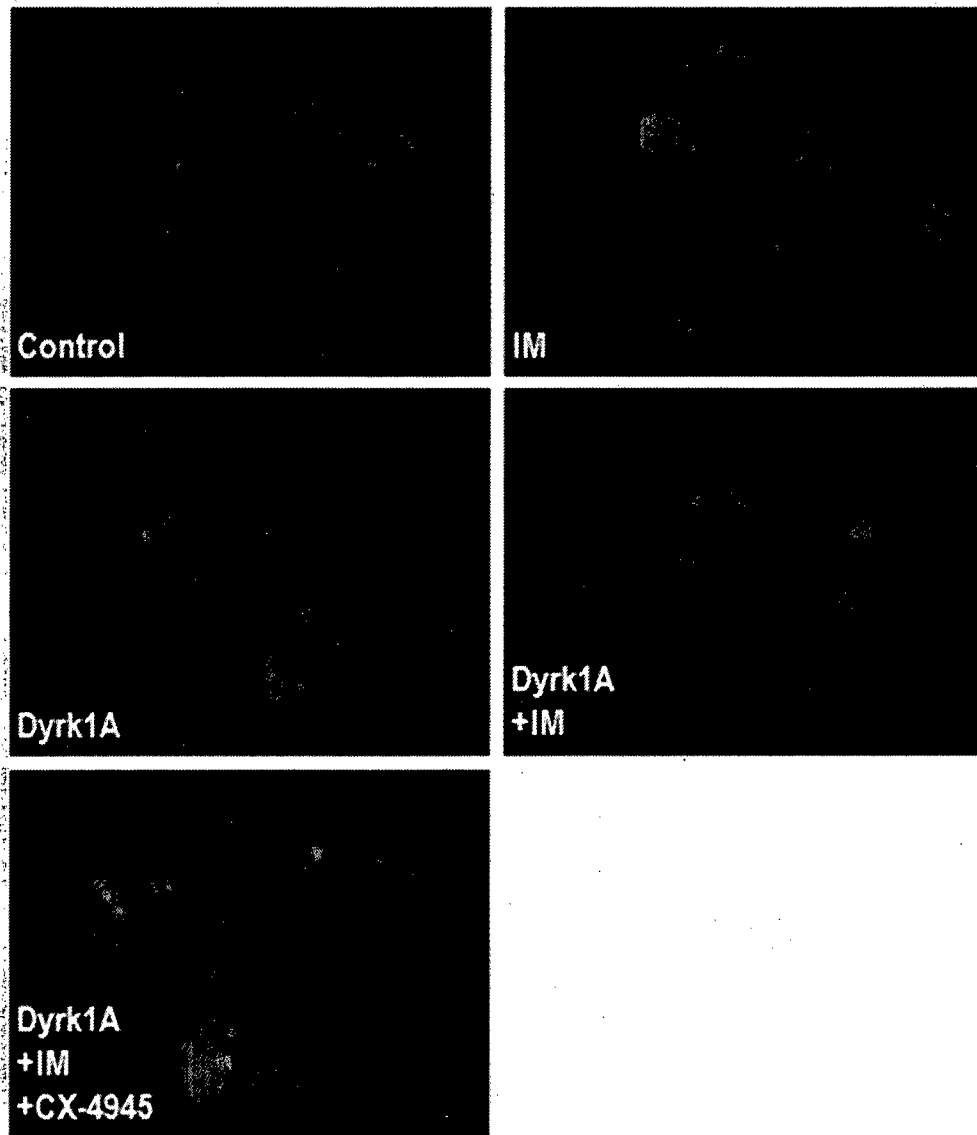




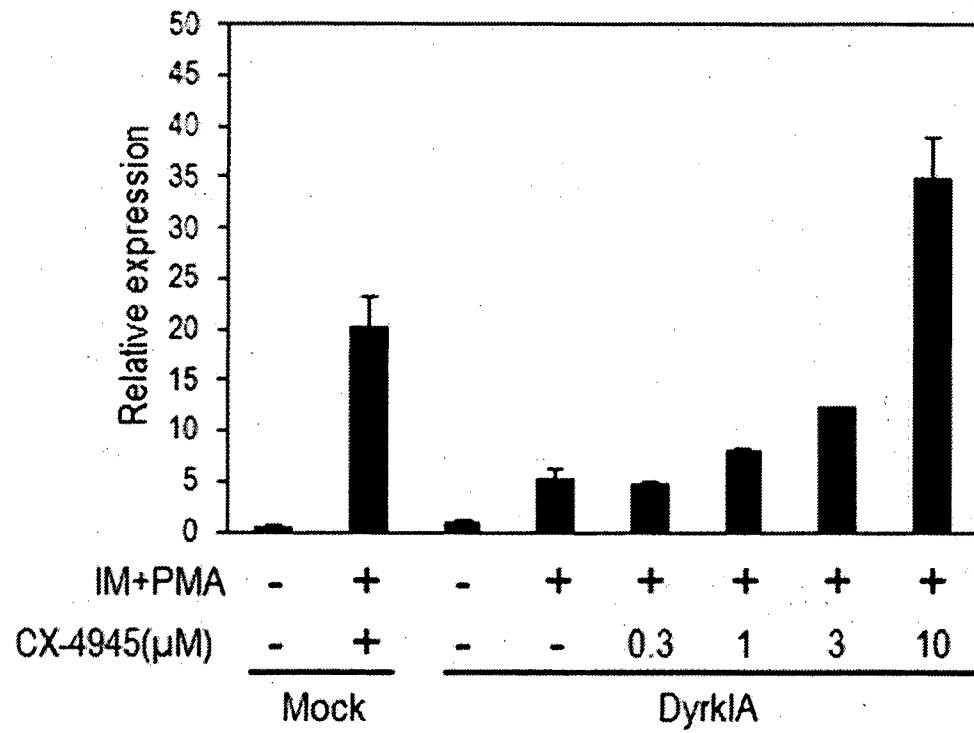




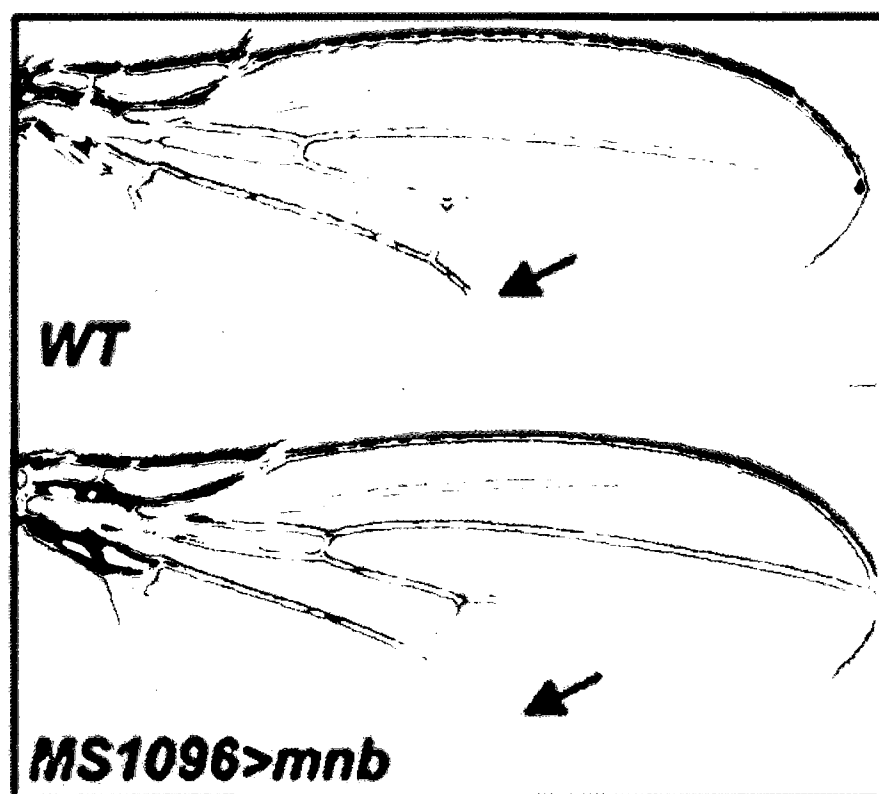
[도 8]



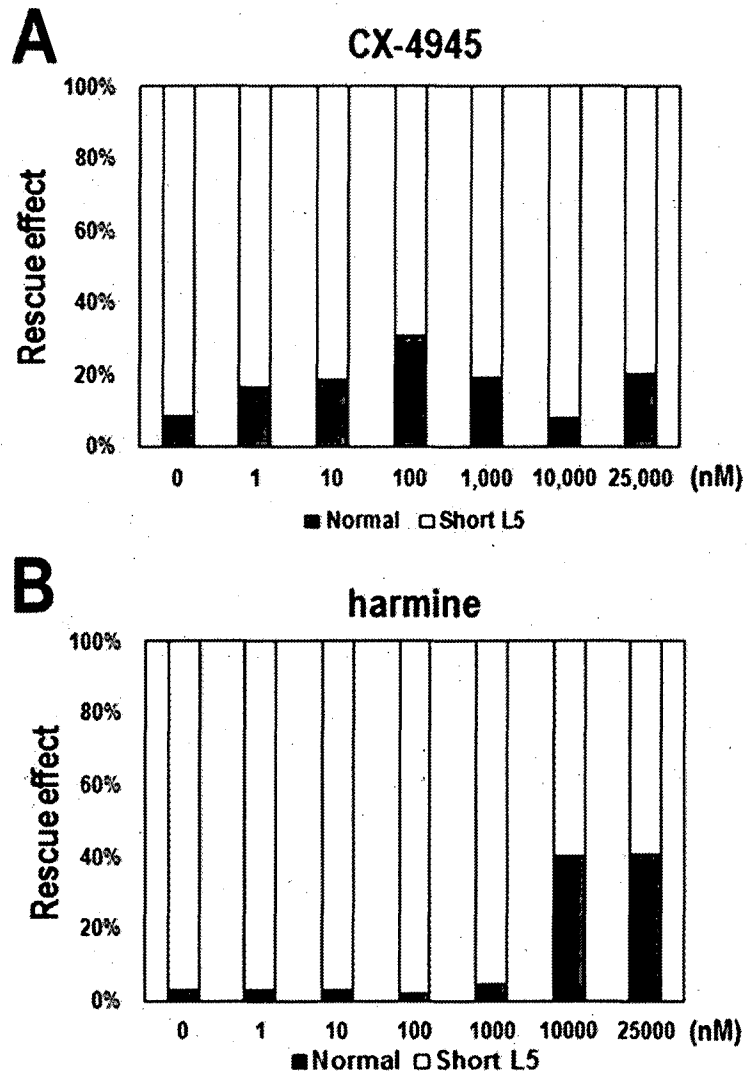
[도 9]



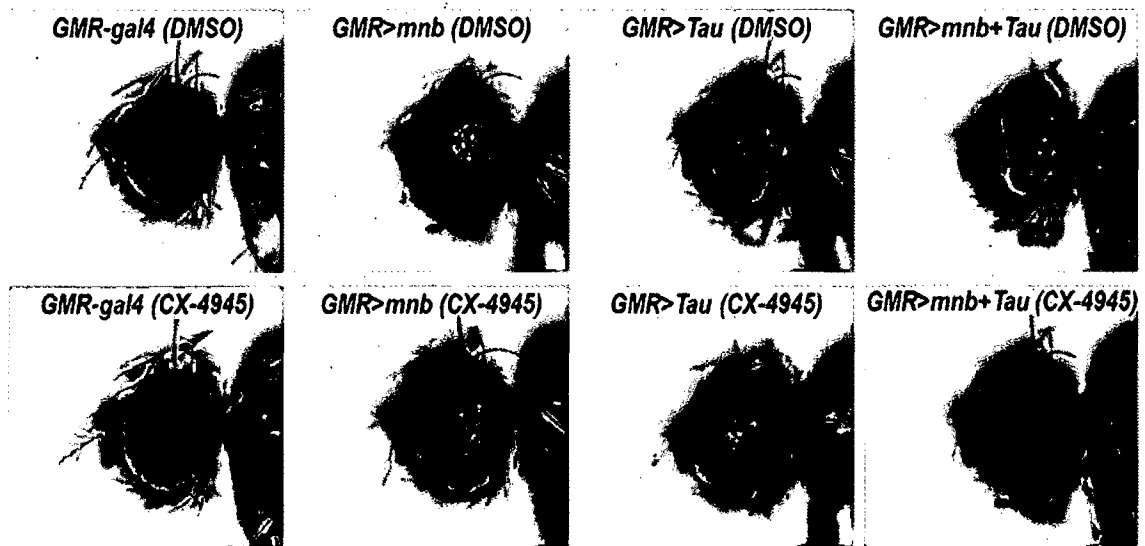
[도 10a]



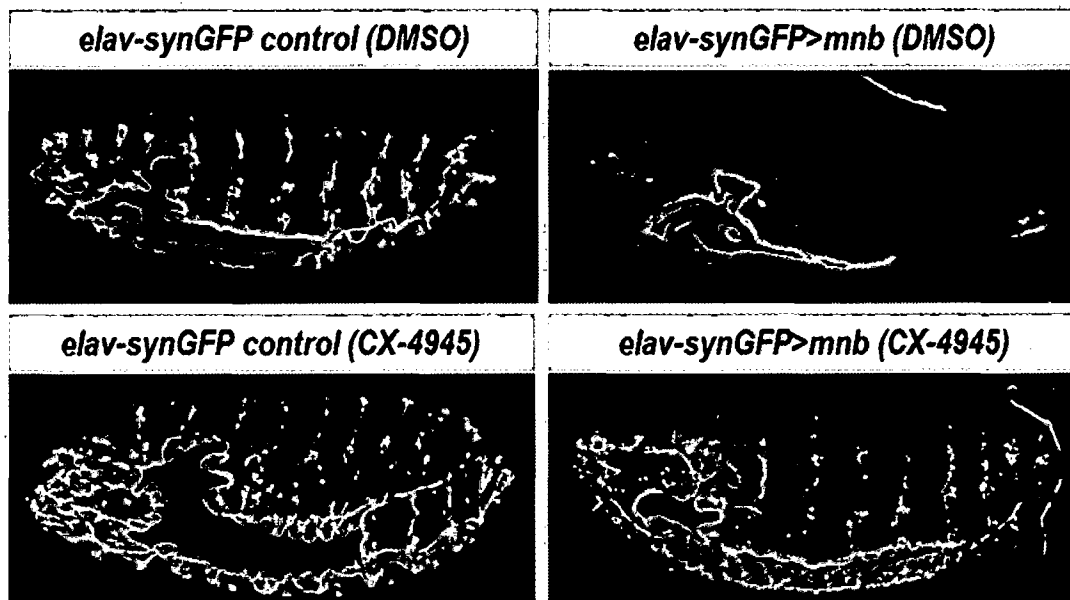
[도 10b]



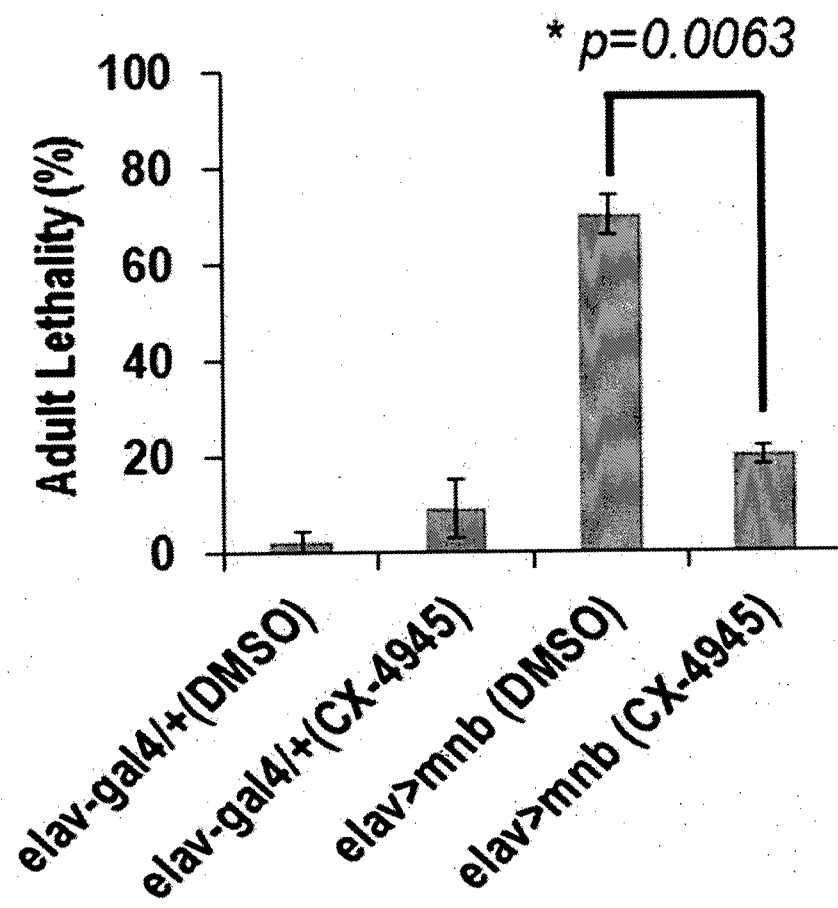
[도 11a]



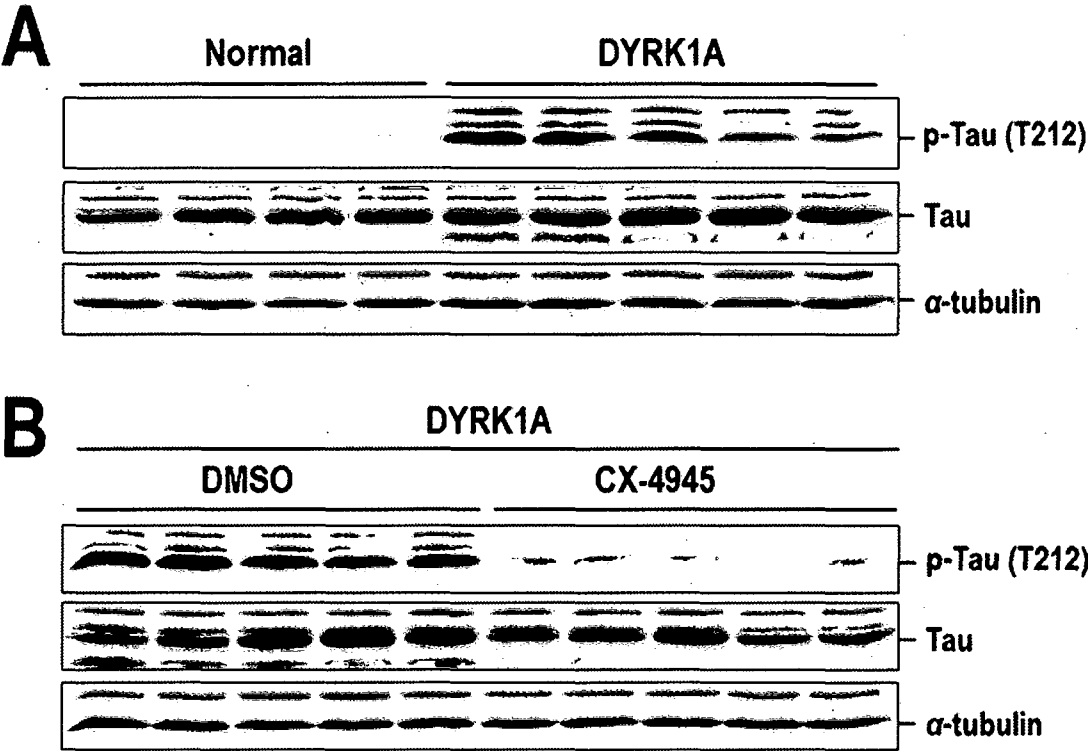
[도 11b]



[도 11c]



[도 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/006593**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/4738(2006.01)i, A61K 31/4745(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/4738; A61K 31/435; A61K 31/4745; A23L 1/30; A61P 25/28; A61P 25/00

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: CX-4945, degenerative brain diseases, Dyrk1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, H. et al., Identification of a novel function of CX-4945 as a splicing regulator, PLoS One, April 2014, vol. 9, no. 4, Thesis Number e94978 (pages 1-8) See abstract; and pages 1, 6, 7.	1-7,11,12
Y		8
Y	COOMBS, T. C. et al., Small-molecule pyrimidine inhibitors of the cdc2-like (Cdk) and dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated (Dyrk) kinases: Development of chemical probe ML315, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter, 2013, vol. 23, no. 12, pages 3654-3661 See abstract; and page 3655.	8
Y	MARTINS, L. R. et al., Activity of the clinical-stage CK2-specific inhibitor CX-4945 against chronic lymphocytic leukemia, Leukemia, February 2014, vol. 28, pages 179-182 See page 179.	1-7,11,12
Y	PEREZ, D. I. et al., Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases, Medicinal Research Reviews, 2011, vol. 31, no. 6, pages 924-954 See pages 937, 938.	1-7,11,12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 SEPTEMBER 2015 (22.09.2015)

Date of mailing of the international search report

23 SEPTEMBER 2015 (23.09.2015)

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/KR2015/006593

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PIGINO, G. et al., Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, vol. 106, no. 14, pages 5907-5912 See the entire document.	1-8,11,12
PX	KR 10-2015-0041559 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 16 April 2015 See paragraphs [0047]-[0049]; and claims 14, 16.	1-7,11,12
PY		8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/006593

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.: **9, 10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 and 10 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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/KR2015/006593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0041559 A	16/04/2015	WO 2015-053452 A1	16/04/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/4738(2006.01)i, A61K 31/4745(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/4738; A61K 31/435; A61K 31/4745; A23L 1/30; A61P 25/28; A61P 25/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CX-4945, 퇴행성 뇌질환, Dyrk1

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, H. 등, Identification of a novel function of CX-4945 as a splicing regulator, PLoS One, 2014년 04월, 9권, 4호, 논문번호 e94978 (내부페이지 1-8) 초록; 및 페이지 1, 6, 7 참조.	1-7, 11, 12
Y		8
Y	COOMBS, T. C. 등, Small-molecule pyrimidine inhibitors of the cdc2-like (Clk) and dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated (Dyrk) kinases: Development of chemical probe ML315, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter, 2013년, 23권, 12호, 페이지 3654-3661 초록; 및 페이지 3655 참조.	8
Y	MARTINS, L. R. 등, Activity of the clinical-stage CK2-specific inhibitor CX-4945 against chronic lymphocytic leukemia, Leukemia, 2014년 01월, 28권, 페이지 179-182 페이지 179 참조.	1-7, 11, 12
Y	PEREZ, D. I. 등, Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases, Medicinal Research Reviews, 2011년, 31권, 6호, 페이지 924-954 페이지 937, 938 참조.	1-7, 11, 12

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

“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 09월 22일 (22.09.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 09월 23일 (23.09.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

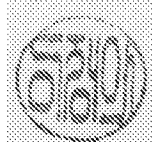
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이정아

전화번호 +82-42-481-8740



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	PIGINO, G. 등, Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009년, 106권, 14호, 페이지 5907-5912 문헌 전체 참조.	1-8,11,12
PX	KR 10-2015-0041559 A (한국생명공학연구원) 2015.04.16. 단락 [0047]-[0049]; 및 청구항 14, 16 참조.	1-7,11,12
PY		8

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: 9, 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제9항 및 제10항은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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.

국제출원번호
PCT/KR2015/006593

공개일

2015/04/16