



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0041669

(43) 공개일자 2015년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 233/05 (2006.01) A61K 31/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0119039

(22) 출원일자 2013년10월07일

심사청구일자 2013년10월07일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

권용태

대한민국 서울시 관악구 낙성대동 서울대 교수

APT 122A-201

이민재

경기 수원시 영통구 영통로514번길 53, 105동 1102호 (영통동, 황골마을주공2단지아파트)

(74) 대리인

박원미

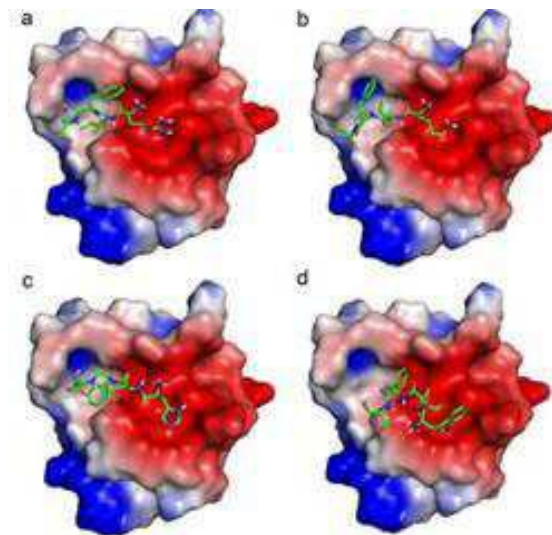
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 N-말단 법칙 경로를 표적으로하는 헤테로벨렌트 저해제 및 그 용도

(57) 요약

본원은 화학식 1의 화합물 및 이를 포함하는 N-end Rule 경로 저해용 조성물을 개시한다. 본원에 따른 화합물은 각각 타입 1 및 타입 2 기질을 인식하는 UBR box와 ClpS box를 갖는 포유동물 N-end rule E3 리가아제의 두 활성부위를 동시에 표적으로하는 헤테로벨렌트 저해제로서, 상호협동적으로 작용하여 N-end Rule 경로의 효과적 조절이 가능하여, 단백질 분해 조절 이상과 관련된 질환 예를 들면 심장 질환, 신경 변성 질환의 치료 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도12a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 800-20130218

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 아르기닌화-의존성 아미노-말단 단백질분해 경로의 심혈관 발생과 신호전달에서의 역할

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교(연건캠퍼스)

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

---

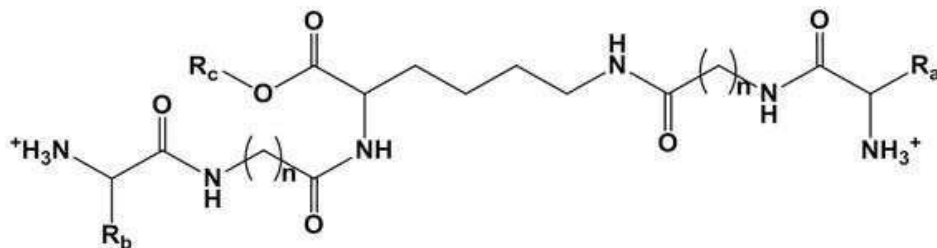
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

n은 각각 1부터 15까지의 정수이고;

Ra 및 Rb는 상이하며

Ra는 H, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬페닐 또는 헤테로아릴이고, 상기 페닐 및 헤테로아릴은 수소, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며;

Rb는 C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬페닐, 또는 헤테로아릴이고, 상기 알킬 및 페닐은 수소, 히드록시, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며;

또는

Ra는 C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬페닐, 또는 헤테로아릴이고, 상기 알킬 및 페닐은 수소, 히드록시, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며;

Rb는 H, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬페닐 또는 헤테로아릴이고, 상기 페닐 및 헤테로아릴은 수소, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며; 그리고

Rc는 비오틴 (biotin) 또는 이의 유도체, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬이고, 상기 알킬은 수소, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능함.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 n은 1부터 15까지의 정수이고;

상기 Ra는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 2-이미다졸릴, 3-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 2-피롤, 3-피롤, 2-피리딘, 3-피리딘, 4-피리딘, 2-피리미딘, 3-피리미딘 또는 4-피리미딘;

상기 Rb는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 2-부틸, 벤질, 2-히드록시페닐메틸, 3-히드록시페닐메틸, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고; Rc는 메틸, 에틸, n-프로필, 또는 이소프로필이며; 또는

상기 Ra는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 2-부틸, 벤질, 2-히드록시페닐메틸, 3-히드록시페닐메틸, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고; Rc는 메틸, 에틸, n-프로필, 또는 이소프로필;

상기 Rb는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 2-이미다졸릴, 3-이미다졸릴, 4-이미다졸

릴, 2-피롤, 3-피롤, 2-피리딘, 3-피리딘, 4-피리딘, 2-피리미딘, 3-피리미딘 또는 4-피리미딘인, 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 n은 1부터 15까지의 정수이고;

상기 Ra는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 또는 4-이미다졸릴;

상기 Rb는 이소프로필, 2-부틸, 벤질, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고; 또는

상기 Ra는 이소프로필, 2-부틸, 벤질, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고;

상기 Rb는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 또는 4-이미다졸릴이고;

상기 Rc는 메틸, 또는 에틸인. 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 n은 4이고;

상기 Ra는 -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> ;

상기 Rb는 벤질이고; 또는

상기 Ra는 벤질;

상기 Rb는 -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> 이며,

상기 Rc는 메틸인, 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

### 청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, N-end Rule 경로 저해용 조성물.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 심장 질환 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 심장 질환은 고혈압, 허혈성 심장 질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 죽상경화증(동맥경화증), 뇌혈관 질환, 뇌졸중 또는 부정맥인, 심장 질환 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신경 변성질환 예방 및 치료용 조성물.

## 청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 신경 변성질환은 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), 크로이츠펠트-야콥 병(Creutzfeldt-Jakob disease), 치명성 가계 불면증(familial fatal insomnia), 전두엽 측두엽 변성증(frontotemporal lobar degeneration), 헌팅턴병

(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), 스피클마이어-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 10

제 9 항에 있어서, 상기 신경변성 질환은 단백질변성과 관련된 질환 (proteinopathy)인, 신경 변성질환 예방 및 치료용 조성물.

## 청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 단백질변성과 관련된 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 레비 소체 치매, 근육 위축가쪽경화증(ALS), 헌팅턴병, 척수소뇌성 실조증 또는 척수구근 근위축증(spino bulbular muscular atrophy)인, 신경 변성질환 예방 및 치료용 조성물.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본원은 비정상적 N-end rule 조절에 의해 야기된 질환 치료제 분야이다.

## 배경 기술

[0002] 단백질 농도의 감소는 전사 감소, 번역 감소, 및/또는 분해 증가에 의해 일어날 수 있다. 대다수의 세포 단백질은 기질 동원 및 기질  $\epsilon$  분해 기구로 구성된 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(UPS: ubiquitin-proteasome system)에 의해 분해된다.

[0003] 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 단백질리가제이다. 유비퀴틴화된 단백질은 유비퀴틴에 결합하는 특징에 의해 인식되고, 리소좀(Lys63 결합) 또는 프로테아좀(Lys11, Lys29 또는 Lys48 결합)에 대해 표적화되며, 분해된다[Dahlmann, BMC Biochem. 22: Suppl 1 :S3 (2007) 및 [Miranda et al., Molecular

Interventions 7: 157-167 (2007)].

- [0004] 이러한 UPS에서, 유비퀴틴(Ub)의 C-말단 카르복실산과 타겟 단백질의 내부 Lys의 ε-아미노기의 이소펩타이드결합을 통해 타겟 단백질이 유비퀴틴과 공유결합한다. 이러한 유비퀴틴 프로세스는 Ub-charged E2 Ub 컨쥬게이팅 효소 및 기질-특이적 E3 Ub 리가아제에 의해 처음 매개되고, 이러한 프로세스는 탈유비퀴틴화 효소(DUBs)에 의해 반대로 조절되기도 한다. 따라서, 대부분 유비퀴틴-매개된 단백질 분해의 선택성은, 특이적 E3 Ub 리가아제에 의해 인식되는 분해 시그널(degron)의 시간 및 공간적 활성화에 의해 최초로 조절된다.
- [0005] N-end Rule 경로는 N-말단 아미노산을 가진 단백질을 분해하는 단백질 분해 경로로서, 상기 단백질의 인 vivo 반감기와 관련이 있다. N-말단 아미노산은 N-end Rule 경로를 창출하는 분해 시그널(N-degron)의 필수적 요소인 것으로 인식되어 왔다.
- [0006] UPS 및 N-end Rule 경로는 손상된 단백질을 분해하고, 전사, 번역 및/또는 폴딩 오류에 의해 생성된 기능장애성 단백질을 제거하는 주요한 기전이다. UPS 또는 N-end Rule 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 Aβ 응집체를 제거하는 UPS 및/또는 리소좀 프로세스의 상실에 의한 결과라고 가정하였다. 병적인 단백질 축적이 예를 들어, 파킨슨병(α 시누클레인을 함유하는 루이 소체) 및 헌팅톤병(헌팅틴 단백질)과 같은 다수의 다른 신경변성 질환에도 관여한다 [Upadhyay et al., BMC Biochem. 22: Suppl 1 :S1 (2007)]. 또한, BACE 분해가 유비퀴틴 프로테아좀 경로에 의해 매개된다[Qing, H. et al., FASEB J. 18:1571-1573 (2004)].
- [0007] 국제특허출원 공개공보 WO 2010/132390호는 유비퀴틴화된 단백질 농도를 감소시키는 방법에 관한 것으로, 유비퀴틴화된 단백질의 농도 감소를 필요로 하는 대상체에 헤테로시클릭 화합물을 투여하여 대상체에서 유비퀴틴화된 단백질의 수준을 감소시키는 방법에 관한 것이다.
- [0008] 미국 공개특허공보 제2010-0233730호는 자가포식 조절에 관한 것으로, 세포에 시험물질을 처리한 후 대사 스트레스를 가해 자가포식체(autophagosome)의 세포내 변화 관찰을 통해, 자가포식 조절제를 선별하는 방법에 관한 것이다.
- [0009] 상기 언급한 바와 같이 N-end Rule 경로의 저해를 통해 광범위한 다양한 질환이 치료될 수 있으며, 따라서 N-end Rule 경로의 저해에 관여하는 물질을 표적으로 하는 새로운 치료제 및 방법의 개발이 필요하다.

## 발명의 내용

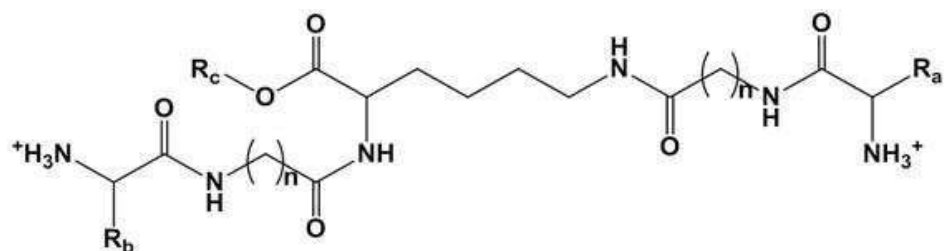
### 해결하려는 과제

- [0010] 본원은 N-end rule 경로를 표적으로하는 헤테로벨런트 저해제 및 이의 용도를 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0011] 한 양태에서 본원은 하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

- [0012] [화학식 1]



- [0013]

- [0014] 상기 화학식 1에서,
- [0015] n은 각각 1부터 15까지의 정수이고;
- [0016] Ra 및 Rb는 상이하며
- [0017] Ra는 H, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬페닐 또는 헤테로아릴이고, 상기 페닐 및 헤테로아릴은 수소, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며;
- [0018] Rb는 C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬페닐, 또는 헤테로아릴이고, 상기 알킬 및 페닐은 수소, 히드록시, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며;
- [0019] 또는
- [0020] Ra는 C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬페닐, 또는 헤테로아릴이고, 상기 알킬 및 페닐은 수소, 히드록시, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며;
- [0021] Rb는 H, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬페닐 또는 헤테로아릴이고, 상기 페닐 및 헤테로아릴은 수소, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며; 그리고
- [0022] Rc는 비오틴 (biotin) 또는 이의 유도체, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬이고, 상기 알킬은 수소, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능함.
- [0023] 본원에 따른 일 구현예에서, 화학식 1의 화합물에서, 상기 Ra는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 2-이미다졸릴, 3-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 2-피롤, 3-피롤, 2-피리딘, 3-피리딘, 4-피리딘, 2-피리미딘, 3-피리미딘 또는 4-피리미딘; 상기 Rb는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 2-부틸, 벤질, 2-히드록시페닐메틸, 3-히드록시페닐메틸, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고; Rc는 메틸, 에틸, n-프로필, 또는 이소프로필이며; 또는 상기 Ra는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 2-부틸, 벤질, 2-히드록시페닐메틸, 3-히드록시페닐메틸, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고; Rc는 메틸, 에틸, n-프로필, 또는 이소프로필; 상기 Rb는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 2-이미다졸릴, 3-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 2-피롤, 3-피롤, 2-피리딘, 3-피리딘, 4-피리딘, 2-피리미딘, 3-피리미딘 또는 4-피리미딘인, 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다.
- [0024] 또다른 구현예에서, 화학식 1의 화합물에서, 상기 n은 1부터 15까지의 정수이고; 상기 Ra는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 또는 4-이미다졸릴; 상기 Rb는 이소프로필, 2-부틸, 벤질, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고; 또는 상기 Ra는 이소프로필, 2-부틸, 벤질, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고; 상기 Rb는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 또는 4-이미다졸릴이고; 상기 Rc는 메틸, 또는 에틸인. 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다.
- [0025] 또다른 구현예에서, 화학식 1의 화합물에서, 상기 n은 4이고; 상기 Ra는 -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>; 상기 Rb는 벤질이고; 또는 상기 Ra는 벤질; 상기 Rb는 -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>이며, 상기 Rc는 메틸인, 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다.
- [0026] 본원에 따른 화합물은 각각 타입 1 및 타입 2 기질을 인식하는 UBR box와 ClpS box을 갖는 포유동물 N-end rule E3 리가아제의 두 활성부위를 동시에 표적으로하는 헤테로백린트 저해제로서, 상호협동적으로 작용하여 N-end Rule 경로의 효과적 조절이 가능하다.
- [0027] 따라서 다른 양태에서 본원은 본원에 따른 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, N-end Rule 경로 저해, 또는 조절용 약학 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 N-end Rule 경로 조절이 필요한 각 종 질환, 예를 들면 심장 질환 예를 들면 고혈압, 허혈성 심장 질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 죽상경화증(동맥경화증), 뇌혈관 질환, 뇌졸중 또는 부정맥인; 또는 신경 변성질환 예를 들면 단백질변성과 관련된 질환 (proteinopathy) 예컨대 알츠하이머병, 파킨슨병, 레비 소체 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 헌팅턴병, 척수소뇌성 실조증 또는 척수구근 근위축증(spinal muscular atrophy)의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

## 발명의 효과

[0028]

본원에 따른 화합물은 각각 타입 1 및 타입 2 기질을 인식하는 UBR box와 ClpS box을 갖는 포유동물 N-end rule E3 리가아제의 두 활성부위를 동시에 표적으로하는 헤테로벨린트 저해제로서, 상호협동적으로 작용하여 N-end Rule 경로의 효과적 조절이 가능하다. 본원에 따른 헤테로벨린트 저해제는 포유류 세포에서 세포독성이 없고, 세포-통과가능하며, N-end rule 기질의 분해 기질의 분해를 유의하게 지연시킬 수 있다. 또한 엔도캡티다아제에 대해 안정하며 높은 저해 효율을 지니며, 결합 모티프에 리간드의 결합을 도와 타입 1 및 타입 2 기질 모두에 효율적으로 작용할 수 있다. 따라서 본원에 따른 화합물은 비정상적 N-end rule 경로와 밀접하게 관련되어 있는 심장 질환, 신경 변성 질환 등의 치료 및 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0029]

도 1은 본원의 일 구현예에 따른 실시예 1의 화합물(RF-C2)의 20% 물의 아세토니트릴 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 2는 본원의 일 구현예에 따른 실시예 2의 화합물(RF-C3)의 20% 물의 아세토니트릴 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 3은 본원의 일 구현예에 따른 실시예 3의 화합물(RF-C3)의 100% 메탄올 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 4은 본원의 일 구현예에 따른 실시예 4의 화합물(RF-C8)의 메탄올 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 5는 본원의 일 구현예에 따른 실시예 5의 화합물(RF-C9)의 15% 물의 아세토니트릴 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 6은 본원의 일 구현예에 따른 화합물(RF-C11)의 100% 메탄올 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 7은 본원의 일 구현예에 따른 실시예 6의 화합물(RF-C15)의 100% 메탄올 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 8은 본원의 일 구현예에 따른 실시예 7의 화합물(GV-C5)의 100% 메탄올 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 9는 본원의 일 구현예에 따른 실시예 8의 화합물(RR-C5)의 100% 메탄올 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 10은 본원의 일 구현예에 따른 실시예 9의 화합물(FF-C5)의 100% 메탄올 용액에서의 HPLC 프로파일을 나타낸다.

도 11a는 본원의 일 구현예에 따른 모델 N-end rule 기질, X-nsP4의 생성의 생성을 나타낸다. 래빗 망상적혈구 용해물을 사용하여,  $^{f}\text{DHFR}^{\text{h}}\text{-Ub}^{\text{R48}}\text{-X-nsP4}^{\text{f}}$  융합 단백질(윗첨자 “h” 및 “f”는 각각 HA 및 flag 에피토프를 나타내며, X는 다양한 아미노산 잔기를 나타낸다)을 인비트로에서 발현시켰는데, 여기에서는 Ub-X 접합 부위에서 탈유비퀴틴화 요소에 의해 번역과 동시에 절단이 되어 수명이 긴 DHFR-Ub 참조군(B, 아래쪽 밴드), 및 수명이 짧은 X-nsP4 기질(X는 Arg과 같은 N-end rule 경로의 불안정화 잔기)이 생성되었다.

도 11b는 본원의 일 구현예에 따른 모델 N-end rule 기질의 인비트로 분해를 나타낸다. N-end rule 경로의 타입 1 모델 기질인 Arg-nsP4는 2mM의 Arg-Ala 디펩타이드에 의해 특이적으로 안정화되었으나, 50  $\mu\text{M}$  또는 100  $\mu\text{M}$  베스타틴 존재시 Ala-Arg(안정화) 디펩타이드 또는 Trp-Ala(타입 2)는 그렇지 않는 것으로 나타났다. 새로 합성된 단백질은  $^{35}\text{S}$ -메소이닌으로 표지하였다. SDS-PAGE/자가방사법.

도 11c는 도 11b의 Arg-nsP4 레벨을 포스포이미저(PhosphorImager)를 사용하여 정량하여 DHFR로 노말라이즈한 것이다.

도 11d는 항-Ub 체인을 사용한 면역침강 및 항-플래그 면역블랏팅을 나타낸다. 유비퀴틴화 Arg-nsP4는

Arg-Ala 디펩타이드 저해제가 없을 때 주로 탐지되었다. \* 는 비특이적 시그널을 나타낸다.

도 11e는 Met-nsP4, Arg-nsP4, 및 Tyr-nsP4 유비퀴틴화에 대한 Arg-Ala(타입 1) 및 Trp-Ala(타입 2)의 특이적 효과를, 항-비오틴 웨스턴 블랏 후의 항-Ub 체인 항체를 사용한 면역침강으로 모니터링한 것이다. 인비트로 전사/번역 반응은 100  $\mu$ M 베스타틴 및 5  $\mu$ M MG132 존재하에서 수행하였다. STV=스트렙타비딘.

도 11f는 도 11e의 유비퀴틴화 X-GFP의 상대적 양을 정량한 것이다. 필름 이미지는 덴시토메트리(densitometry)로 정량하였다.

도 11g는 유비퀴틴화된 Arg-nsP4를, 항-플래그 항체를 사용한 면역 침강 및 HA와의 면역블랏팅으로 가시화한 것이다. 타입 1 모델 기질인 Arg-nsP4는 세포내에서 활발하게 유비퀴틴화되었다. HA-Ub 및 Arg-nsP4를 발현하는 플라스미드를 MG132 존재/부존재시에 야생형 마우스에게 동시전달이입하였다.

도 12는 불안정 잔기를 입증하기 위한 인 실리코 도킹 분석 및 생화학 분석을 나타낸다.

도 12a는 UBR2 box(PDB code: 3NY3)와 (a) RIFS, (b) KIFS, (c) HIFS, 및 (d) WIFS의 결합 모드를 나타낸다.

도 12b는 UBR1 box(PDB code: 3NY1)와 (a) RIFS, (b) KIFS, (c) HIFS, 및 (d) WIFS의 결합 모드를 나타낸다.

도 12c는 타입 1 펩타이드와 UBR2 (a) 및 UBR1 box (b)의 결합 친화력(kcal/mol) 및 해리상수( $\mu$ M)를 실험데이터와 비교하여 나타낸 것이다.

도 12d는 ClpS 도메인(PDBcode:3DNJ)과, (a)WLFV, (b)FLFV, (c)YLFV, 및 (d)LLFV의 결합 모드를 나타낸 것이다. PyMOL로 만든 다른 펩타이드와 ClpS의 복합체에서 YLFV 펩타이드 구조를 추출하였다.

도 12e는 타입 2 펩타이드와 ClpS 박스의 결합 친화력(kcal/mol) 및 해리상수( $\mu$ M)를 실험 데이터와 비교하여 나타낸 것이다. RLFV 타입 1 펩타이드는 ClpS 도메인과의 결합이 적합하지 않은 것으로 나타났다.

도 12f는 안정한 X-nsP4 레벨을 덴시토메트리로 정량한 것이다. 상응하는 DHFR 레벨은 표준화하기 위하여 사용되었다. 프로 레벨(Pro level)은 DHFR-Ub-Pro-nsP4에서 유래하였는데, Pro 뒤의 Un 사이트는 절단되지 않았다.

도 13a는 RF-Cn 화합물, 대조군 화합물 및 디펩타이드 저해제의 구조를 나타낸다. N-말단 Arg 및 Phe, 타입 1 및 타입 2 불안정화 잔기는 각각 오렌지색 및 초록색 배경으로 나타나있고, Gly 및 Val는 노란색 배경으로 나타나있다.

도 13b는 10, 100, 및 250  $\mu$ M에서 다양한 RF-Cn화합물을 처리한 후 Arg-nsP4(타입 1) 상대적 양을 정량한 것을 나타낸다.

도 13c는 10, 100, 및 250  $\mu$ M에서 다양한 RF-Cn화합물을 처리한 후 Tyr-nsP4(타입 2) 상대적 양을 정량한 것을 나타낸다.

도 13d는 Gramm-X 단백질-단백질 도킹 웹 서버 및 가우시안 09 프로그램의 반-실험적 PM6 방법을 사용하여 얻은 두 개의 가능한 UBR2-ClpS 구조와 RF-C5 결합을 나타낸다.

도 13e는 RF-C5와, 도 3E의 두 개의 가능한 UBR2-ClpS 단백질 입체배위 (a) 및 (b)의 계산된 결합 친화력(kcal/mol) 및 해리상수( $\mu$ M)를 나타낸다.

도 13f는 타입 1 (Arg-nsP4) 및 타입 2 (Tyr-nsP4) 모델 기질 모두에서 헤테로멜린시를 통해 저해가 유의하게 증가되었음을 나타낸다. 오딧세이 적외 이미징 시스템(Odyssey infrared imaging system)을 사용하여 SDS-PAGE/면역블랏으로 인 비트로 전사/번역을 조사한 결과이다.

도 14a는 RF-C11이 수용액에서 미셀을 형성하지만, RF-C5는 그렇지 않다는 것을 나타내는 결과로, 평균 입자 크기는 동적광산란법(dynamic light scattering(DLS))으로 농도-코스 분석을 통해 측정하였다.

도 14b는 MTT 분석을 사용하여 헤테로멜린트 화합물의 세포독성을 측정한 결과이다.

도 14c는 일차성(primary) 심장 근육 세포로 RF-C11를 세포내이입, (endocytosis)시킨 것으로, DAPI 대조염색이 있는 스트렙타비딘-로다민을 사용하여 비오틴-GV-C11/RF-C11(적색; 각각 b 및 c)를 그리고 항-트로포닌 I(초록색)을 사용하여 심장근육세포를 동시 면역염색하였다.

도 14d는 일시적으로 과발현된 RGS4가 RF-C11에 의해 안정화된 것을 나타내는 결과이다.

도 14e는 MEF에서 RGS4, 생리학적 N-end rule 기질의 펄스 추적 분석(Pulse chase analysis) 결과이다.

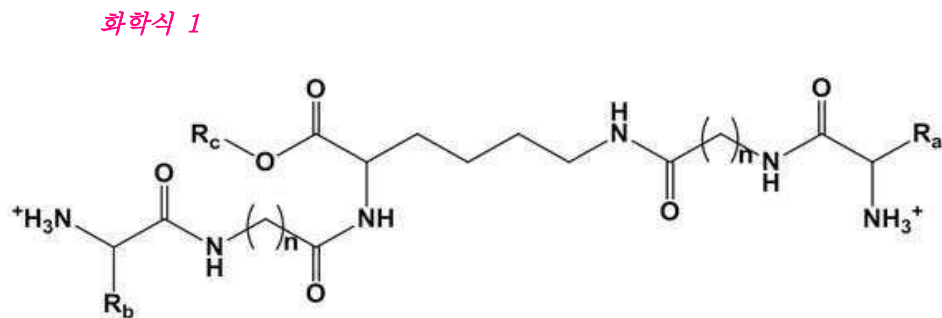
도 14f는 도 14d에 나타난 데이터를 포스포이미저(PhosphorImager)를 사용하여 정량화한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

본원에서는 nsP4를 기반으로 하는 모델 N-end rule 경로를 사용한 컴퓨터 도킹 분석 및 생화학적 분석을 활용하여, 타입 1과 UBR 박스의 상호작용 및 ClpS 도메인과 타입 2의 상호작용이 필적할 만하며, 양전하가 없는 N-말단 His는 불안정화 잔기로 기능한다는 발견을 근거로 한 것이다.

한 양태에서 본원은 하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.



상기 화학식 1에서, n은 1부터 20까지의 정수, 특히 1부터 15까지의 정수이고;

상기 Ra 및 Rb는 상이하며,

Ra는 H, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬-NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬페닐 또는 헤테로아릴이고, 상기 페닐 및 헤테로아릴은 수소, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며, 바람직하게는 Ra는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 2-이미다졸릴, 3-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 2-피롤, 3-피롤, 2-피리딘, 3-피리딘, 4-피리딘, 2-피리미딘, 3-피리미딘 또는 4-피리미딘이고, 더욱 바람직하게는 Ra는 H, -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(n-부틸)NH<sub>2</sub>, 벤질, 또는 4-이미다졸릴이고;

Rb는 C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub> 알킬, C<sub>1</sub>~C<sub>7</sub> 알킬페닐, 또는 헤테로아릴이고, 상기 알킬 및 페닐은 수소, 히드록시, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며, 바람직하게는 Rb는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 2-부틸, 벤질, 2-히드록시페닐메틸, 3-히드록시페닐메틸, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고, 더욱 바람직하게는 Rb는 이소프로필, 2-부틸, 벤질, 4-히드록시페닐메틸, 또는 3-인돌이고; 그리고

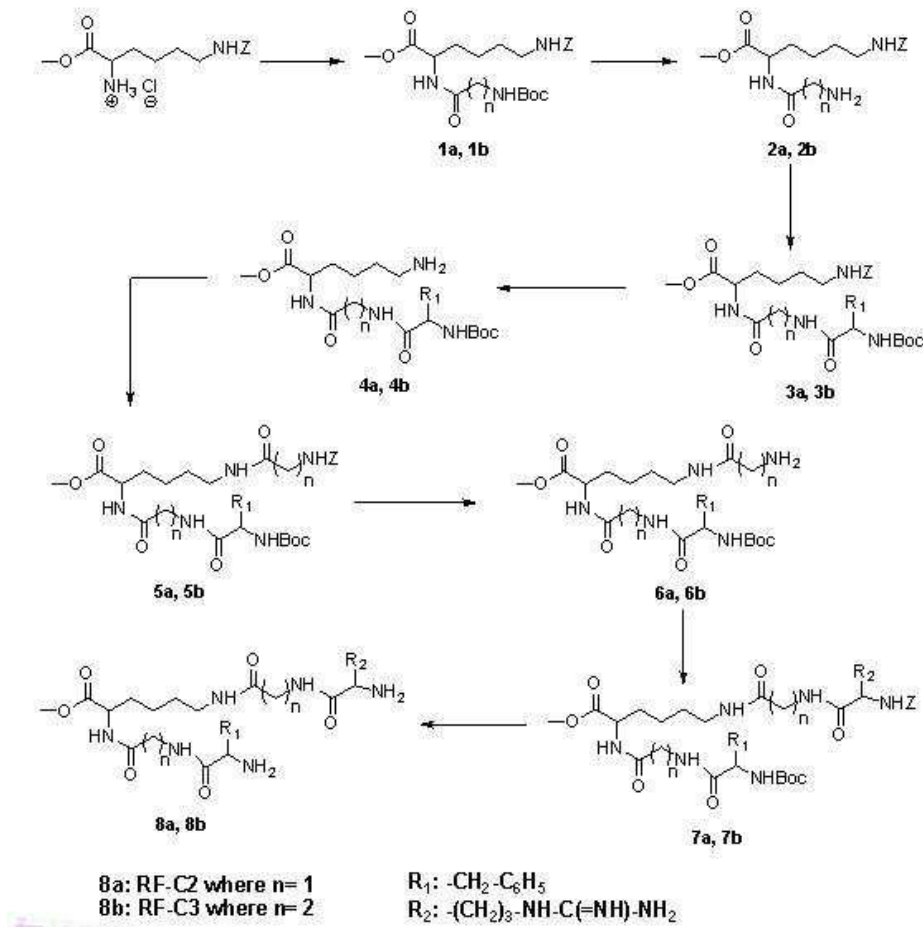
Rc는 비오틴 (biotin) 또는 이의 유도체, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬이고, 상기 알킬은 수소, 할로젠, 또는 C<sub>1</sub>~C<sub>5</sub> 알킬로 치환가능하며, 바람직하게는 Rc는 메틸, 에틸, n-프로필, 또는 이소프로필이고 더욱 바람직하게는 메틸 또는 에틸이다.

본원에 따른 일 구현예에서, 상기 n은 4이고, Ra는 -(n-프로필)-NHC(=NH)NH<sub>2</sub> 이고, 상기 Rb는 벤질이고; 상기 Rc는 메틸이다.

- [0041] 상술한 본원에 따른 화학식 I의 화합물에서 Ra 및 Rb 각각에 위치하는 치환기는 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 즉 Ra 및 Rb는 치환기는 상기 정의한 대로 한정되는 것은 아니며, Ra의 치환기가 Rb에 위치할 수 있으며, 그 반대도 가능하다.
- [0042] 본원의 상기 화학식 I의 화합물은, 화학식 I의 화합물 이외에 이의 약학적으로 허용가능한 산 부가염 또는 염기 부가염, 이의 용매화물, 이의 광학 이성질체를 포함하는 것이다.
- [0043] 약학적으로 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 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로파올레이트, 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,  $\beta$ -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타르테이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.
- [0044] 역으로 상기 산부가염을 적절한 염기로 처리하여 유리 염기 형태로 전환될 수 있다.
- [0045] 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 알칼리토금속 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.
- [0046] 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 크리플루오로메탄설포네이트, 알킬 메탄설포네이트 및 알킬 p-톨루엔설포네이트 등이 있다. 4차 암모늄 염은 양전하를 띤 질소를 지니고 있어, 약제학적으로 허용가능한 반대이온(counter ion)에는 클로로, 브로모, 아이오도, 트리플루오로아세테이트 및 아세테이트 이온이 포함된다.
- [0047] 역으로 상기 염의 형태의 화합물은 적절한 산으로 처리하여 유리 형태로 전환될 수 있다.
- [0048] 본 발명에 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.
- [0049] 또한, 본원의 상기 화학식 1의 화합물로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물을 모두 포함한다. 용매화물에는 수화물, 알코올레이트 등이 있다.
- [0050] 또한, 본원의 상기 화학식 1의 화합물의 광학이성질체를 모두 포함한다. 본원의 광학이성질체는 화학식 1의 화합물의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것이다. 상기 광학이성질체는 입체중심(stereogenic center)은 R- 또는 S- 배열을 가진다.
- [0051] 상기 화학식 1의 화합물은 하기 반응식 1, 2 또는 3에 따라 합성될 수 있다.

[0052]

[반응식 1]



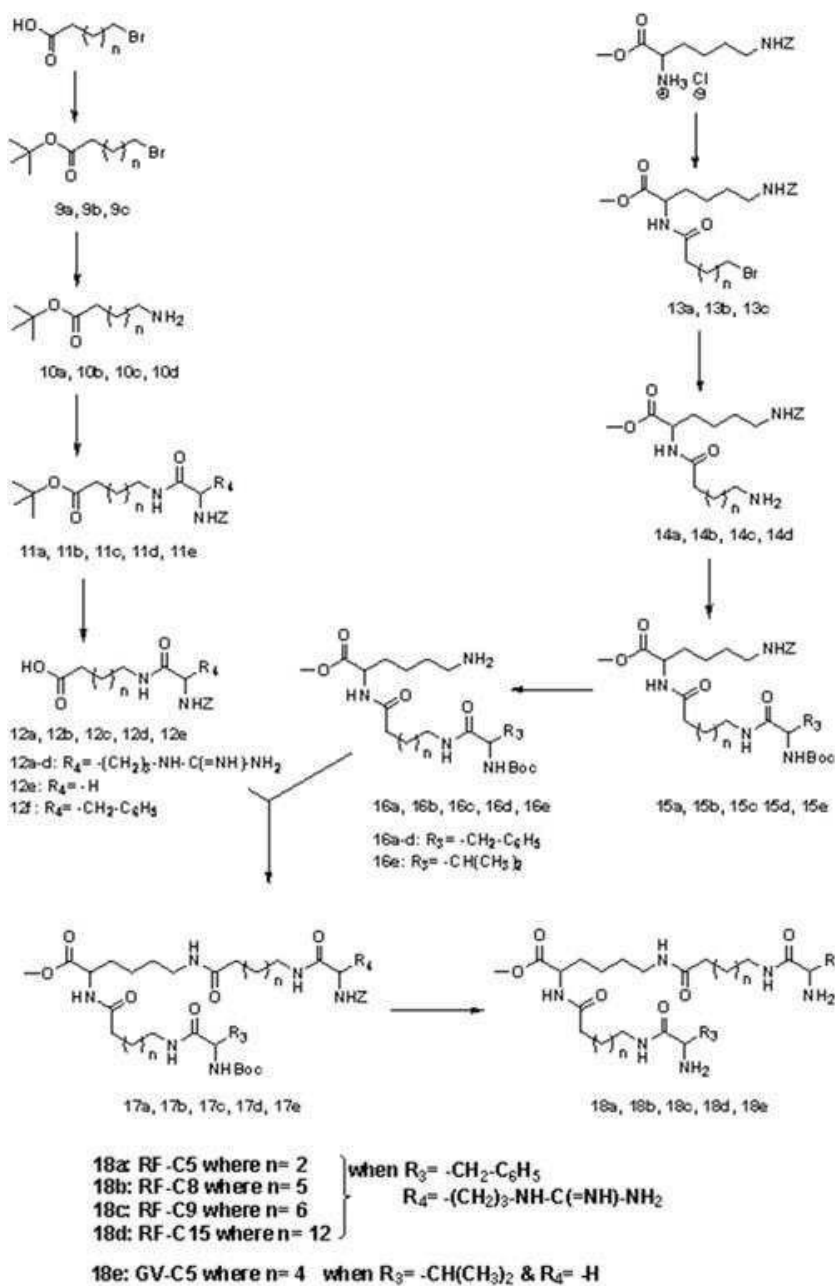
[0053]

[0054]

상기 반응식 1에 따라, N-카르보닐화 및 N-탈보호 반응, 두번째 N-카르보닐화 및 N-탈보호 반응, 세번째 N-카르보닐화 N-탈보호 반응, 네 번째 N-카르보닐화 및 N-탈보호 반응, 및 N-탈보호 반응의 순으로 합성이 이루어진다.

[0055]

[반응식 2]

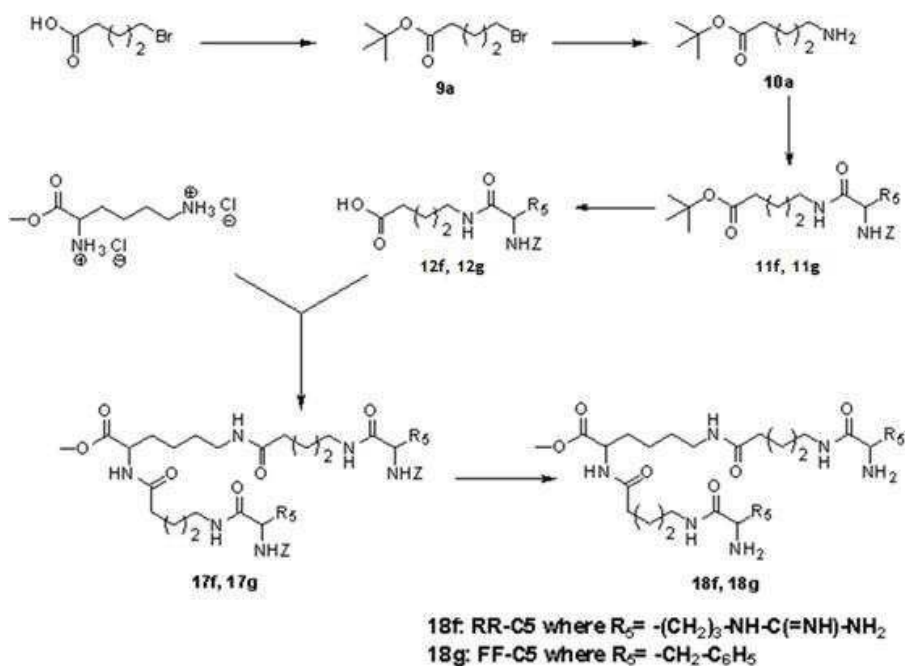


[0056]

[0057]

상기 반응식 2에 따라, 에스테르화 반응, 아민화반응, N-카르보닐화 반응, 가수분해 반응의 순으로 12번 시리즈 화합물의 합성이 이루어지고, N-카르보닐화, 아민화 반응, N-카르보닐화 반응, N-탈보호화 반응의 순으로 16번 시리즈 화합물을 합성한 뒤, 12번 화합물 및 16번 화합물의 N-카르보닐화 반응에 의한 결합 반응, N-탈보호 반응을 하여 최종 화합물을 합성하였다.

[0058] [반응식 3]



[0059]

[0060] 상기 반응식 3에 따라, 에스테르화 반응, 아민화 반응, N-카르보닐화 반응, 가수분해 반응, N-카로보닐화 반응, N-탈보호화 반응의 순으로 반응이 이루어진다.

[0061] 본원의 “N-카로보닐화 반응”은 N에 카르보닐기( $-C(=O)-$ )를 도입하는 반응으로 이 반응의 결과 아미드 결합이 생긴다.

[0062] 본원의 “N-탈보호 반응”은 아민의 N에 보호기가 도입되어 있을 때, 상기 보호기를 이탈시키는 반응을 말한다. 탈보호 반응은 보호기의 종류에 따라 반응 조건이 정해진다.

[0063] 본원의 “에스테르 반응”은 에스테르기를 형성시키는 반응을 말하며, O-알킬화 반응 등을 통하여 에스테르기를 형성시킬 수 있다.

[0064] 본원의 “가수분해 반응”은 에스테르기를 분해시켜 카르복실산을 형성시키는 반응을 말한다.

[0065] 본원의 “아민화 반응”은 알킬기에 아민기( $-NH_2$ )를 도입시키는 반응을 말한다.

[0066] 본원의 “Z”는 아민의 N의 보호기로서, 예를 들어 카보벤질옥시 (Cbz)그룹, p-메톡시벤질 카르보닐 (Moz or MeOZ) 그룹, tert-부틸옥시카르보닐 (BOC) 그룹, 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐(FMOC)그룹, 아세틸(Ac) 그룹, 벤조일 (Bz) 그룹, 벤질(Bn) 그룹, 카바메이트 그룹, p-메톡시벤질(PMB), 3,4-디메톡시벤질(DMPM), p-메톡시페닐(PMP)그룹, 토실(Ts) 그룹, 다른 설포아미드(Nosyl & Nps) 그룹 등이 있다. 본원의 일 구현예에 따른 실시예에서는 벤질 그룹을 사용하였다.

[0067] 다른 양태에서, 본원은 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는, N-end Rule 경로 저해용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0068] 본원에서 N-end rule 경로란 N-말단에 특정 불안정화 잔기 즉 N-degron을 갖는 단백질을 분해하는 단백질 분해 경로를 일컫는 것이다. N-end rule 경로의 기질(substrate)은 UBR 박스라고 불리는 N-degron 결합영역을 갖는 N-recognin이라는 단백질에 의해 인식된다. 이러한 UBR 박스는 기질의 처음 두 개 잔기와 상호작용을 통해 기질을 인식하는데 이를 N-end rule이라 한다. N-end rule 경로에서, 불안정화 잔기라 불리는 특이적 N-말단 아미노산을 지닌 단백질 기질은 수명이 짧다. 진핵생물에 있는 불안정화 잔기는 Arg, Lys, 또는 His과 같이

양전하를 띤 아미노산인 타이프 1과, Phe, Leu, Tyr, 및 Ile과 같은 부피가 큰 소수성 아미노산인 타이프 2로 분류된다.

[0069] 본원의 헤테로벨런트 저해제는 상이한 길이의 테터(tether)를 지니고 있으면서, UBR 1 및 2 단백질의 인식 모티프 모두를 타겟으로 하는 것으로, 테터의 한쪽 말단은 타이프 1의 아미노산기를, 다른 한쪽 말단은 주로 타이프 2의 아미노산기 (또는 그 반대)를 가지고 있어서 UBR 박스, 그리고 ClpS 박스 각각에 동시상호작용이 협동적으로 이루어 지게 함으로써, N-end rule 경로를 저해하게 된다.

[0070] N-end Rule 경로는 UPS와 더불어 손상된 단백질을 분해하고, 전사, 번역 및/또는 폴딩 오류에 의해 생성된 기능장애성 단백질을 제거하는 주요한 기전이다. N-end Rule 경로가 비정상적으로 작동할 때, 변성된 단백질의 축적, 이어서 진행되는 응집은 심장 질환, 신경변성 질환을 비롯한, 다수의 연령 관련 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다 (M. J. Lee, et al. (2012), J. Biol. Chem., 287, 24043; Komatsu et al., (2006), Nature, 441, 880-884). 나아가, 간 질환, 심장 질환, 근육 질환 및 췌장 질환과 연관된 것으로 알려져 있다 (Levine and Kroemer, (2008), Cell, 132, 27-42; Fortunato and Kroemer, (2009), Autophagy, 5(6)).

[0071] 이에 다른 양태에서, 본원은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 심장 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 심장 질환은 예를 들면 이에 제한하는 것은 아니나, 고혈압, 허혈성 심장 질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 죽상경화증(동맥경화증), 뇌혈관 질환, 뇌졸중, 및 부정맥을 포함한다.

[0072] 또다른 양태에서, 본원은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신경변성질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 신경변성 질환은 예를 들면 이에 제한하는 것은 아니나, 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), 헌팅턴병 (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), 스피엘마이어-보그트-쇼그렌-배튼 병(Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten disease), 척수소뇌성 실조증(spino cerebellar ataxia), 척수근위축증(spinal muscular atrophy), 스틸-리차드슨-올스체위스키 병(Steele-Richardson-Olszewski disease), 척수매독(Tabes dorsalis), 독성 뇌병증(toxic encephalopathy)을 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0073] 또 다른 양태에서, 본원은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 단백질변성과 관련된 질환 (proteinopathy) 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 단백질변성과 관련된 질환은 예를 들면 이에 제한하는 것은 아니나, 알츠하이머병, 파킨슨병, 레비 소체 치매, 근육위축가쪽경화증(ALS), 헌팅턴병, 척수소뇌성 실조증 및 척수구근 근위축증(spino bulbular muscular atrophy)를 포함한다.

[0074] 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.

[0075] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연

시키는 모든 행위를 의미한다. 자가포식 이상으로 인한 변성 단백질제거에 효과가 있는 본원 조성물은 변성 단백질 축적으로 인한 질환의 초기 증상, 또는 증상이 나타나기 전에 복용할 경우 이러한 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0076] 이에 본원의 약제학적 조성물은 동시에 또는 연속적으로 투여가능하며, 상기 질환 치료를 위한 다른 약학적 활성성분과 병행하여 투여될 수도 있다.

[0077] 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 아황산 수소나트륨, 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.

[0078] 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.

[0079] 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.

[0080] 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 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0081] 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  $\mu$ 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.

[0082] 투여횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다.

[0083] 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.

## [0084] 실 시 예

[0085] 본원 실시예에 사용된 실험방법 및 재료는 다음과 같다.

## [0086] 실험방법 및 재료

### [0087] 1. 인 비트로 분해/유비퀴틴화 분석

[0088] 시간- 및 농도-의존성 인 비트로 분해 분석을 하기와 같이 수행하였다. 간단히 설명하면, 비오틴화 리

신-tRNA 복합체(Transcend tRNA, Promega)를 반응혼합물에 첨가하여 DHFR-Ub-X-nsP4 융합 단백질을 비오틴으로 무작위로 표지하였다. 비오틴화된 단백질을 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)-접합된 스트렙타비딘(streptavidin)(Pierce)으로 검출하였다. 정량적 면역블로팅을 하기 위하여, 오딧세이 이미징 시스템 및 IR 다이-컨주게이티드 스트렙타비딘(Li-COR)을 사용하여 적외선 형광으로 단백질을 가시화하였다. 자가방사(autoradiographic) 분석을 하기 위하여, <sup>35</sup>S-메티오닌(Amersham Bioscience) 및 서플리먼트(supplement)를 인 비트로 전사/번역 반응에 첨가하였다. DHFR-Ub-X-nsP4 플라스미드를 생산하기 위하여, X-nsP4를 PCR로 증폭시켜 SmaI/XbaI 으로 절단한 후 UPR 벡터 pcDNA3(dEheI)FDHUMCM 로 서브클로닝하였다. 테스트 단백질의 유비퀴틴화를 5  $\mu$ M MG132의 존재하에서 특정화한 후, 항-Ub 면역침강 및 항-비오틴 웨스턴 블랏팅을 하였다.

## 2. 포유동물 세포내 N-end rule 모델 기질의 발현

리포펙틴 2000(Invitrogen)을 사용하여, MEF 및 심장 세포와 같은 포유동물 세포를 6-웰 플레이트내에서 세포가 >95% 콘플루언트할때까지 4~6시간동안 일시적으로 2~4  $\mu$ g의 총 플라스미드 DNA로 전달이입하였다. 포스트 트랜스펙션 약 36시간에서 세포 용해물을 RIPA 버퍼에 모아 면역블랏팅 또는 면역침강에 사용하였다. 총 유비퀴틴화 Arg-GFP 농도를 10  $\mu$ M MG 132의 존재하에서 탐지하였다. 펄스-체이스(pulse-chase) 분석을 하기 위하여, 세포를 <sup>35</sup>S-메티오닌/시스테인(<sup>35</sup>S-발현 단백질 표지 믹스; Perkin-Elmer)으로 처리 24시간 후에 표지하였고, 이어 시클로헥시미드 체이스를 하였다. 전(Whole) 세포 추출물을 준비하여 면역침전하였고, 이어, 상기한 바와 같이, SDS-PAGE 및 자가방사법을 시행하였다.

## 3. 인 실리코 단백질-단백질 및 단백질-리간드 상호작용의 도킹 분석

UBR1, UBR2, 및 Clps 박스의 크리스탈 구조를 단백질 데이터 뱅크(Protein Data Bank, PDB ID: 각각 3NY1, 3NY3, 및 3DNJ)에서 취득하였다. "결합된" UBR2-ClpS 구조는 알려져 있지 않기 때문에, Gramm-X 단백질-단백질 도킹 웹 서버를 사용하여 UBR2 및 ClpS 박스를 도킹하였다. 가장 안정한 결합에너지를 지니는 가능한 두 개의 UBR2-ClpS 구조를 발견하였다. RIFS 및 YLFV 펩타이드 구조는 각각 UBR2 박스 및 ClpS와의 복합체에서 뽑아내었다. 다른 펩타이드는 PyMOL 패키지(<http://sourceforge.net/projects/pymol/>)에 있는 Mutagenesis 모듈로 만들었다. RF-C5 구조는 가우시안 09 프로그램으로 세미-엠퍼리칼 PM6 방법을 사용하여 최적화하였다.

AutoDockTools 버전 1.5.4를 사용하여 폴라히드로젠을 첨가하였고 Gasteiger charges를 단백질, 펩타이드 및 RF-C5에 할당하였다. 각 단백질에 있어서, AutoGrid 버전 4.2를 사용하여 활성 부위에 중심을 둔 친화력 그리드를 만들었다. 상기 그리드는 모든 활성 부위를 함유할 만큼 충분히 컸다. Lamarckian 제네틱 알고리즘을 가진 AutoDock 버전 4.2를 사용하여 리간드-리셉터 도킹을 시뮬레이션하였다. 도킹 파라미터는 하기와 같다: 200회 도킹 시험, 300의 개체군 크기, 랜덤 출발 위치 및 입체구조, 2.0 Å의 번역 단계 범위, 50°의 회전 단계 범위, 1의 엘리티즘(elitism), 0.02의 돌연변이 속도, 0.8의 크로스 오버 속도, 0.06의 국소 탐색 속도 및 5천만 에너지 이벨류에이션. 2.0 Å RMSD의 톨러런스(tolerance)를 사용하여 도킹된 입체구조를 클러스터시켰다. 가장 많은 클러스터의 가장 낮은 결합에너지를 실험 데이터와 비교하였다. 하기 방정식에 근거한 해리 상수(dissociation constant)로부터 실험적 결합 자유 에너지를 계산하였다:  $\Delta G = RT \ln K_d$ , 상기에서, R은 기체 상수(1.987 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>)이고 T는 온도(298.15K)이다. PBD2PQR 웹 서버를 사용하여 pH=7에서의 PQR 파일 및 AMBER 포스 필드(force field)를 만들었다. 정전기 전위는 APBS 패키지를 사용하여 계산하였다. 모든 구조 도면은 PyMOL 패키지를 사용하여 제조하였다.

## 4. 세포 생존 능력의 측정

세포 생존 능력은 변형된 MTT 분석을 사용하여 평가하였다. 다양한 농도(0.1  $\mu$ M 내지 1000  $\mu$ M)의 RF-C11 및 GV-C11 DMSO 농도를 세포에 첨가하였다. 4 시간동안 배양한 후, 5mg/mL MTT 용액 25  $\mu$ L를 상기 샘플에 첨가하였고, 상기 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 트리아졸릴 블루 테트라졸리움 브로마이드(MTT, Sigma Aldrich)를 각 웰에 첨가하였고(최종 농도 0.5 mg/mL) 95% 대기 및 5% CO2의 습도를 조절 조건에서 37°C 2시간동안 배양하였다. HCl 이소프로판올 용액(0.08N)를 첨가하여 블루 MTT-포마르잔 생성물을 용해시켰고 상기 세포를 실온에서 30분간 배양하였다. 상기 용액의 흡광도는 570nm(test) 및 630nm(reference)에서 나타났다.

## 5. 헤테로벨런트 저해제의 합성 및 분석

보호기가 있는 아미노산은 노바바이오켄(Novabiochem)에서 구입하였다. 유기 용매는 램박시 파인 케미칼(Ranbaxy Fine Chemicals)에서 구입하였고, 다른 화합물질들은 시그마-알드리치에서 구입하였다. <sup>1</sup>HNMR 스펙트라는 Varian FT 200MHz 또는 Bruker FT 300MHz를 사용하여 기록하였다. 매스 스펙트라는 Micro mass QuattroLC(ESI)로 측정하였다. 분석 TLC는 실리카겔 코팅된 알루미늄 플레이트(Merck) 상에 전개시켰다. Hilar Purospher STAR컬럼(4.6mm-250mm, RP-18e)(Merck)에서 1ml/min의 흐름 속도(flow rate)로 Prostr 325 UV-Vis 디텍터가 있는 Varian Prostar HPLC를 사용하여 최종 생성물의 순도를 측정하였다.

DCM (dichloromethane), DIPEA (diisopropylethylamine), DMF (dimethylformamide), DMSO (dimethylsulfoxide), EDCI (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimide hydrochloride), HOBt (1-hydroxy-1H-benzotriazolehydrate), r.t. (room temperature), TFA (trifluoroacetic acid), THF(tetrahydrofuran), TMS-OTf (trimethylsilyltrifluoro methanesulfonate), HATU (1-Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate).

또한 본원 명세서에 기재된 아미노산은 약자로도 기재한 바, 본원에 사용된 아미노산의 약자는 하기와 같다: Ala:A, Arg:R, Asp:D, Asn: N, Cys:C, Gly:G, Glu:E, His:H, Ile:I, Ile:I, Leu:L, Lys:K, Met:M, Phe:F, Pro:P, Ser:S, Thr:T, Tyr:Y, Trp:W, Val:V.

### 실시예 1. 화합물 8a의 합성 (RF-C2)

#### 1. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C2-NHBoc(1a)의 합성

Boc-Gly-OH (0.529g, 3.02mmol)의 건조 DCM용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 HOBt (0.463g, 3.02mmol) 및 EDCI (0.579g, 3.02mmol)를 연속적으로 첨가하였다. 반시간 후에 건조 DCM에 용해시킨 N(ε)-Z-lysine 메틸 에스터 히드로클로리드(1g, 3.02mmol)를 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. 그후 반응혼합물이 약 염기성이 될 때까지 DIPEA를 적가하였다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 이어 상기 용액을 DCM으로 희석하고 연속적으로 1N HCl, 물 및 브라인으로 세척하였다. 상기 유기층을 건조시켜 용매를 증발시켰다. 잔류물을 1% 메탄올의 클로로포름용액을 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 순수 N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C2-NHBoc의 수율은 92.2%이며, 희미한 노란색의 고무질(gummy) 화합물이었다. (Rf=0.55 in 5% methanol in chloroform).

<sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDC13): δ = 1.2-1.5 [m, 13H], 1.75-1.9 [m, 2H], 3.1-3.3 [m, 2H], 3.65-3.8 [m, 5H], 4.4-4.6 [q, 1H], 5.05-5.1 [s, 2H], 5.1-5.3 [m, 1H], 5.35-5.5 [m, 1H], 6.9-7.1[d, 1H], 7.2-7.5[s, 5H]. ESI-MS: m/z = 452.7(calculated value for C22H33O7N3=451.5).

#### 2. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C2-NH2(2a)의 합성

N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C2-NHBoc (1.2g, 2.66mmol)의 건조 DCM 용액에 TFA를 0°C에서 서서히 첨가하였고, 상기 혼합물을 실온에서 3시간동안 교반하였다. 그후 질소가스를 플러쉬(flush)하여 DCM 및 과잉 TFA를 제거하였다. 2% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 크로마토그래피를 통해 상기 얻어진 고무질의 잔류물을 정제하였다. 노란색 고체의 N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C2-NH2 0.84g(90% 수율). (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 352.7 (calculated value for C17H25O5N3=351.4).

#### 3. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C2F(3a)의 합성

Boc-Phe-OH (0.51g, 1.91mmol)의 건조 DCM용액을 얼음으로 차갑게 하여 교반하면서 연속적으로 HOBt (0.29g, 1.91mmol) 및 EDCI (0.37g, 1.91mmol)를 첨가하였다. 반시간 후에, 건조 DCM에 용해된 N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C2-NH2(0.84g,2.39mmol)를 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. 그후 반응 혼합물이 약 염기성이 될 때까지 DIPEA를 적가하였다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 그 후DCM으로 희석하였고, 1N HCl, 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조하고 유기용매를 증발시켰다. 잔류물을 2% 메탄올의 클로로

포름 용액을 사용하여 크로마토그래피 정제하여 희미한 노란색 액체의 순수 N( $\epsilon$ )-Z-Lysine(-OMe)C2F 1.079g(75.5% 수율)을 얻었다.  $^1\text{H}$ NMR(200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.2-1.6 [m, 11H], 1.6-1.9 [m, 4H], 2.8-3.0 [m, 2H], 3.05-3.15 [m, 2H], 3.6 [s, 3H], 3.8-4.0 [m, 1H], 4.15-4.35 [m, 2H], 4.4-4.6 [m, 1H], 5.05 [s, 2H], 5.2-5.3 [m, 1H], 5.4-5.55 [d, 1H], 6.9-7.4 [m, 12H]. ESI-MS:  $m/z$  = 622 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ](calculated value for  $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{N}_4=598.7$ ).

4. Lysine(-OMe)C2F(4a)의 합성

N( $\epsilon$ )-Z-Lysine(-OMe)C2F (1g, 1.67mmol)를 HPLC등급의 메탄올(15ml)에 용해시켰다. 질소로 수회 플러쉬하여 용기내의 공기를 제거하였다. 차콜상의 10% Pd(0.4g)을 상기 용액에 조심스럽게 첨가하고 상기 플라스크의 내부벽을 HPLC 등급의 메탄올로 씻어내렸다. 다시 질소를 플러싱하여 플라스크 내의 공기를 제거하였다. 그 후 수소 가스를 상기 반응 혼합물에 통과시켜 밤새 교반하면서 두었다. 이어 셀라이트로 여과하고 HPLC 등급의 메탄올로 세척하였다. 여과액과 세척액을 합쳐 유기용매를 증발시켜 흰색 반고체상의 Lysine(-OMe)C2F 0.816g(90%)를 얻었다. 이를 추가의 정제과정없이 바로 다음 반응에 사용하였다. ( $R_f=0.1$  in 5% methanol in chloroform). ESI-MS:  $m/z$  = 465.9(calculated value for  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_4=464.6$ ).

5. Lysine(-OMe)C2FC2-NHZ(5a)의 합성

Z-Gly-OH (0.25g, 1.2mmol)의 건조 DCM용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 HOBt (0.183g, 1.2mmol) 및 EDCI (3.5g, 1.2mmol)를 연속적으로 첨가하였다. 반시간 후에 건조 DCM에 용해시킨 Lysine(-OMe)C2F (0.695g, 1.5mmol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 그 후, 반응 혼합물이 약 염기성이 될 때까지 DIPEA를 적가하였다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 그후 DCM으로 희석하여, 1N HCl, 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조시켜 유기용매를 증발시켰다. 1.5% 메탄올의 클로로포름용액을 이용하여 상기 잔류물을 크로마토그래피 정제하여 노란색 반고체의 순수 N( $\epsilon$ )-Z-Lysine(-OMe)C2FC2-NHZ 0.69g(70.3% 수율)을 얻었다. ( $R_f=0.3$  in 5% methanol in chloroform).  $^1\text{H}$ NMR(200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.2-1.55 [m, 11H], 1.75-1.9 [m, 4H], 2.8-3.5 [m, 4H], 3.6 [m, 5H], 3.6-3.8 [m, 2H], 4.2-4.3 [m, 1H], 4.45-4.6 [m, 1H], 5.1 [s, 2H], 5.65-5.75 [m, 1H], 6.2-6.3 [m, 1H], 6.9-7.0 [m, 1H], 7.1-7.4 [m, 12H]. ESI-MS:  $m/z$  = 656.9 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], & 679.1 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ](calculated value for  $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{O}_9\text{N}_5=655.7$ ).

6. Lysine(-OMe)C2FC2-NH2(6a)의 합성

N( $\epsilon$ )-Z-Lysine(-OMe)C2FC2-NHZ (0.69g, 1.05mmol)를 HPLC 등급 THF(15ml)에 용해시켰다. 질소를 수회 플러쉬하여 상기 용기 내의 공기를 제거하였다. 차콜상의 10% Pd를 상기 용액에 조심스럽게 첨가하고 상기 플라스크의 내부 벽을 HPLC 등급 THF로 씻어내렸다. 플라스크 내의 공기를 질소로 다시 플러쉬하여 제거하였다. 그 후 수소가스를 반응 혼합물에 통과시켜 밤새 교반하여 두었다. 그후 셀라이트로 여과하고 HPLC 등급 THF로 세척하였다. 여과액과 세척액을 합쳐 용매를 증발시켜 흰색 반 고체상의 Lysine(-OMe)C2FC2-NH2 0.49g(90%)를 얻었다. 이를 추가의 정제과정없이 다음 반응에 사용하였다. ( $R_f=0.1$  in 5% methanol in chloroform). ESI-MS:  $m/z$  = 522.8(calculated value for  $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{N}_5=521.6$ ).

7. PRF-C2(7a)의 합성

Z-Arg-(Z)2-OH(0.424g, 0.74mmol)의 건조 DCM 용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 여기에 HOBt (0.112 g, 0.74mmol) 및 EDCI (0.141g, 0.74mmol)를 연속적으로 첨가하였다. 반시간 후에 건조 DMF에 용해시킨 Lysine(-OMe)C2F2-NH2 (0.48g, 0.92mmol)를 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. 그후 상기 반응 혼합물이 약 염기성이 될 때까지 DIPEA를 적가하였다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 그후 유기층을 건조시켜 용매를 증발시켰다. 상기 잔류물을 5% 메탄올의 클로로포름을 사용한 크로마토그래피로 정제하여 흰색 고무질의 반고체의 순수 PRF-C2 0.558g(56.1% 수율)을 얻었다.  $^1\text{H}$ NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 1.4-2.2 [m, 19H], 3.0-3.5 [m, 4H], 3.9 [s, 3H], 4.0-4.4 [m, 7H], 4.4-4.7 [m, 2H], 5.2-5.5 [m, 6H], 6.8-7.2 [m, 3H], 7.3-7.6 [m, 20H], 9.9 [s, 1H]. ESI-MS:  $m/z$  = 1082 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]&1104 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ](calculated value for  $\text{C}_{55}\text{H}_{69}\text{O}_{14}\text{N}_9=1080.8$ ).

8. 화합물 RF-C2(8a)의 합성

질소 대기 하에서 PRF-C2 (0.1g, 0.093mmol)를 TFA(2ml)에 용해시켜 얼음 베스에서 계속 교반하였다. 상기 차가운 용액에 티오아니솔(0.4ml, 3.4mmol) 및 TMSOTf (0.6ml, 3.32mmol)를 연속적으로 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온이 되도록하여 24시간동안 계속 교반하였다. 그후 HPLC 등급 메탄올로 상기 반응을 소거하였다. 메탄올 및 과잉의 TFA는 질소를 플러쉬하여 제거하였다. 메탄올-아세톤 시스템을 반복하여 얻어진 잔류물을 재결정하였다. 최종적으로, 클로리드 이온 교환 크로마토그래피(암버라이트 IRA-400C1 클로리드 이온 교환 수지)를 수행하여 노란색을 띄는 흰색 반고체의 순수 RF-C2 0.031g(57% 수율)을 얻었다. (Rf=0.1 in 20% methanol in chloroform). ESI-HRMS: m/z = 578.3391([M+H]<sup>+</sup>, calculated value for C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>N<sub>9</sub>=578.3414). RP-HPLC: Rt = 3.9 min (20% water in acetonitrile), purity >99%.

실시예 2. 화합물 8b의 합성 (RF-C3)

1. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>Boc(1b)의 합성

Boc-Gly-OH 대신 3-(N-Boc)-amino propionic acid를 사용하여 실시예 1의 1의 방법에 따라 합성하였다.

Yield: 86.7% (Rf=0.55 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.4-1.7 [m, 13H], 1.75-1.9 [m, 2H], 2.3-2.45 [m, 2H], 3.1-3.2 [m, 2H], 3.25-3.4 [m, 2H], 3.7 [s, 3H], 4.45-4.55 [m, 1H], 5.0-5.1 [s, 2H], 5.2-5.3 [m, 1H], 6.5-6.6 [m, 1H], 7.25-7.35[m, 6H]. ESI-MS: m/z = 489.0 [M+Na<sup>+</sup>](calculated value for C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>=465.5).

2. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>(2b)의 합성

실시예 1의 2와 동일한 방법으로 수행하였다.

Yield: 90% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 366 (calculated value for C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>=365.4).

3. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>3</sub>F(3b)의 합성

실시예 1의 3과 동일한 방법으로 수행하였다.

Yield: 64.9% (Rf=0.5 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.2-1.6 [m, 15H], 1.6-1.9 [m, 2H], 2.15-2.45 [m, 2H], 2.8-3.25 [m, 4H], 3.7-3.8 [s, 3H], 4.15-4.25 [q, 1H], 4.4-4.5 [q, 1H], 4.9-5.0 [m, 1H], 5.15 [s, 2H], 5.2 [m, 1H], 6.95-7.1[m,1H],7.1-7.4[m,11H].ESI-MS: m/z = 635 [M+Na<sup>+</sup>](calculated value for C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub>=612.7).

4. Lysine(-OMe)C<sub>3</sub>F(4b)의 합성

실시예 1의 4와 동일한 방법으로 수행하였다.

Yield: 95.3% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 480.0 (calculated value for C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>=478.6).

5. Lysine(-OMe)C<sub>3</sub>FC<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>(5b)의 합성

Z-Gly-OH 대신 3-(N-Z)-amino propionic acid를 사용하여 실시예 1의 5와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0133] Yield: 56.8% (Rf=0.3 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDC13): δ = 1.2-1.9 [m, 15H], 2.25-2.55 [m, 4H], 2.8-3.5 [m, 8H], 3.7 [s, 3H], 4.2-4.3 [m, 1H], 4.35-4.5 [m, 1H], 5.0-5.1 [s, 2H], 5.2-5.35 [m, 1H], 7.1-7.4 [m, 10H]. ESI-MS: m/z = 685.3(calculated value for C35H49O9N5=683.8).

[0134] 6. Lysine(-OMe)C3FC3-NH2(6b)의 합성

[0135] 실시예 1의 6과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0136] Yield: 90% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 551 (calculated value for C27H43O7N5=549.7).

[0137] 7. PRF-C3(7b)의 합성

[0138] 실시예 1의 7과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0139] Yield: 64.6% (Rf=0.4 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDC13): δ = 1.2-1.5 [m, 15H], 1.6-1.8 [m, 4H], 2.3-2.65 [m, 8H], 3.1-3.25 [m, 2H], 3.4-3.6 [m, 4H], 3.7 [s, 3H], 4.05-4.2 [m, 1H], 4.2-4.4 [m, 2H], 5.0-5.4 [m, 6H], 7.15-7.45 [m, 20H]. ESI-MS: m/z = 1108 (calculated value for C57H73O14N9=1108.2).

[0140] 8. RF-C3(8b)의 합성

[0141] 실시예 1의 8과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0142] Yield: 61.6% (Rf=0.1 in 20% methanol in chloroform). ESI-HRMS: m/z = 606.3728 ([M+H]<sup>+</sup>, calculated value for C28H48O6N9=606.3727). RP-HPLC: Rt = 2.9 min (20% water in acetonitrile), purity >99%.

### [0143] 실시예 3. 화합물 18a의 합성 (RF-C5)

[0144] 1. 화합물 12a의 합성

[0145] 1-1. tert-부틸-5-브로모펜타노에이트(9a)의 합성

[0146] 5-브로모펜타노익 애시드(5g, 27.62mmol)의 건조 DCM용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 여기에 N, N'-디메틸아미노피리딘(1.68g, 13.75mmol) 및 DCC (6.83g, 33.15mmol)를 연속하여 첨가하였다. 반시간 후에 tert-부탄올(15.8ml, 165.75mmol)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 얻어진 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. 그 후 DCM으로 희석하고 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조하여 용매를 증발시켰다. 1% 에틸아세테이트의 hexan용액을 사용하여 잔류물을 크로마토그래피로 정제하여 연한 노란색 액체의 순수 tert-부틸-5-브로모펜타노에이트 4.1g (62.6% 수율)을 얻었다. (Rf=0.8 in 20% ethylacetate in hexane). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDC13): δ = 1.44 [s, 9H], 1.5-1.6 [m, 2H], 1.84-1.96 [m, 2H], 2.24 [t, 2H], 3.4 [t, 2H]. ESI-MS: m/z = 258(calculated value for C9H17O2Br=237.1).

[0147] 1-2. tert-부틸-5-아미노펜타노에이트(10a)의 합성

[0148] tert-부틸-5-브로모펜타노에이트(3.6g, 15.19mmol)를 건조 DMF에 용해시키고 여기에 소듐 아자이드(1.48g, 22.77mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 70-80 °C까지 가열하여 17 - 18 시간동안 교반하였다. 그 후 실온으로 식혔다. 클로로포름으로 희석하고 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 클로로포름 층을 건조시켜 용매를 증발시켰다. 상기 고무질의 조 물질에 트리페닐포스핀(2.29g, 8.77mmol)을 첨가하였다. 질소가스가 격렬하게 발생하고 나서 여기에 THF를 첨가하였다. 질소 발생이 멈추고 나서, 물 몇 방울을 상기 반응 혼합물에 첨가하고 추가로 4시간 동안 계속 교반하였다. 그 후 THF를 증발시켰다. 5% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여

상기 잔류물을 크로마토그래피로 정제하여 노란색 액체의 순수 tert-부틸-5-아미노펜타노에이트 2.79g(96% 수율)을 얻었다. (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.28 [s, 12 H], 1.44 [s, 9H], 1.5-1.6 [m, 4H], 2.1-2.2 [t, 2H], 2.76-2.84 [t, 2H], 2.92-3.4 [m, 2H].

[0149] 1-3. RC5(-CO<sub>2</sub>But)(11a)의 합성

[0150] Z-Arg-(Z)2-OH(1.54g, 2.82mmol)의 건조 DCM용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 여기에 HOBt (0.35g, 2.31mmol) 및 EDCI (0.44g, 2.30mmol)를 연속하여 첨가하였다. 반시간 후에 건조 DCM에 용해된 tert-부틸-5-아미노펜타노에이트 (0.50 g, 2.89mmol)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 약 염기성으로 만들기 위하여 DIPEA를 첨가하였다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 그후 클로로포름으로 희석하여 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조시켜 용매를 증발시켰다. 잔류물을 1% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 크로마토그래피 정제를 하여 흰 고체의 순수 RC5(-CO<sub>2</sub>But) 1.73g(72% 수율)을 얻었다. (Rf=0.8 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.1-1.2 [m, 2H], 1.4 [s, 9H], 1.5-1.8 [m, 6H], 2.1 [t, 2H], 2.7-2.9 [m, 2H], 3.7-3.8 [m, 2H], 4.2-4.4 [m, 1H], 4.9-5.1 [m, 6H], 6.2 [d, 1H], 6.5-6.6 [t, 1H], 7.2-7.4 [m, 15H], 9.3-9.5 [m, 2H]. ESI-MS: m/z = 732(calculated value for C<sub>39</sub>H<sub>49</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>=731.8).

[0151] 1-4. RC5(-CO<sub>2</sub>H)(12a)의 합성

[0152] RC5(-CO<sub>2</sub>But) (0.95g, 1.3mmol)의 건조 DCM용액에 TFA를 0℃에서 서서히 첨가하여 상기 혼합물을 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 그후 질소를 플러쉬하여 DCM 및 과잉 TFA를 제거하였다. 고무질의 잔류물을 2% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 크로마토그래피로 정제하여 흰 고체의 순수 RC5(-CO<sub>2</sub>H) 68g(77.5% 수율)을 얻었다. (Rf=0.5 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 676 (calculated value for C<sub>35</sub>H<sub>41</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>=675.7).

[0153] 2. 화합물 16a의 합성

[0154] 2-1. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>-Br(13a)의 합성

[0155] 5-브로모발레릭 एस이드 (1.09g, 6.03mmol)의 건조 DCM용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 여기에 HOBt (0.74g, 4.82mmol) 및 EDCI (1.15g, 6.02mmol)를 연속적으로 첨가하였다. 반시간 후에 건조 DCM에 용해시킨 N(ε)-Z-라이신 메틸 에스터 히드로클로리드(2g, 6.04mmol)를 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. 그후 반응 혼합물이 약 염기성이 될 때까지 DIPEA를 적가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그후 클로로포름으로 희석하여 0.5N HCl, 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조시켜 용매를 증발시켰다. 1% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 상기 잔류물을 크로마토그래피로 정제하여 흰 고체의 순수 N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>-Br 1.83g(66% 수율)을 얻었다. (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.25-1.4 [m, 2H], 1.45-1.6 [m, 2H], 1.65-1.9 [m, 6H], 2.25 [t, 2H], 3.2-3.3 [m, 2H], 3.35 [t, 2H], 3.65 [s, 3H], 4.55 [m, 1H], 4.95 [t, 1H], 5.1 [s, 2H], 6.3 [d, 1H], 7.3 [s, 5H]. ESI-MS: m/z = 458(calculated value for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>Br=457.4).

[0156] 2-2. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>(14a)의 합성

[0157] N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>-Br (1.5g, 3.28mmol)을 건조 DCM에 용해시키고 소듐 아자이드(0.26g, 3.94mmol)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 가열하여 70-80℃에서 17-18시간 동안 교반하였다. 그후 실온으로 식히고 클로로포름으로 희석하여 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조하여 용매를 증발시켰다. 트리페닐포스핀(1.29g, 4.92mmol)을 상기 조 물질에 첨가하였다. 질소가스가 격렬하게 발생하는 것이 관찰될때 THF를 첨가하였다. 질소 가스의 발생이 멈추고나서, 물 몇 방울을 상기 반응 혼합물에 첨가하고 실온에서 추가로 4시간 동안 더 교반하였다. 그후 회전 증발기로 THF를 증발시켰다. 5% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 잔류물을 크로마토그래피로 정제하여 노란색 고무질의 액체 화합물인 순수 N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> 1.2g (94% 수율)을 얻었다. (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z =

394(calculated value for C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>=393.5).

[0158] 2-3. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>F-NHBoc(15a)의 합성

[0159] Boc-Phe-OH (0.54g, 2.04mmol)의 건조 DCM 용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 여기에 HOBt (0.39g, 2.53mmol) 및 EDCI (0.48g, 2.53mmol)를 연속적으로 첨가하였다. 건조 DCM에 용해시킨 N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>(1g, 2.54mmol)를 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. DIPEA를 첨가하여 반응 혼합물을 약 염기성으로 만들었다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 그후 클로로포름으로 희석하여 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조시켜 용매를 증발시켰다. 2% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 잔류물을 크로마토그래피로 정제하여 흰 고무질의 반 고체인 순수 N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>F 0.9g(55.28% 수율)을 얻었다. (R<sub>f</sub>=0.55 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.3-1.4 [s, 9H], 1.5-1.7 [m, 6H], 2.15-2.35 [t, 2H], 2.9-3.1 [m, 4H], 3.2 [m, 2H], 3.75 [s, 3H], 4.25 [m, 1H], 4.6 [m, 1H], 5.0- [t, 1H], 5.1 [s, 2H], 5.4 [m, 1H], 6.5-6.65 [m, 1H], 7.05 [d, 1H], 7.15-7.4 [m, 10H]. ESI-MS: m/z = 641(calculated value for C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub>=640.8).

[0160] 2-4. Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>F(16a)의 합성

[0161] N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>F-NHBoc (0.8g, 1.25mmol)를 HPLC 등급 메탄올에 용해시켰다. 질소를 수회 플러쉬하여 둥근 바닥 플라스크의 공기를 제거하였다. 차콜상의 10% Pd(0.5g)을 상기 용액에 조심스럽게 첨가하고 플라스크의 내부벽을 HPLC 등급 메탄올로 씻어내렸다. 다시 질소를 플러쉬하여 플라스크의 공기를 제거하였다. 그후 수소 가스를 반응 혼합물에 통과시켜 밤새 교반하였다. 그후 셀로아트로 여과하고 HPLC 등급 메탄올로 세척하였다. 여과액과 세척액을 합하여 용매를 증발시켜 흰색 반고체의 Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>F 0.54g(85.1%)을 얻었다. 추가의 정제없이 다음 반응에 바로 사용하였다. (R<sub>f</sub>=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 507 (calculated value for C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>=506.6).

[0162] 3. 화합물 18a의 합성

[0163] 3-1. PRF-C<sub>5</sub>(17a)의 합성

[0164] RC<sub>5</sub>(-CO<sub>2</sub>H)(0.27g, 0.9mmol)의 건조 DCM용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 여기에 HOBt (0.061 g, 0.33mmol) 및 HATU (0.15g, 0.39mmol)를 연속하여 첨가하였다. 30분 후에 건조 DCM에 용해시킨 Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>F(0.25g, 0.49mmol)를 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 약 염기성으로 만들기 위하여 DIPEA를 첨가하였다. 얻어진 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 그후 클로로포름으로 희석하고 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조시켜 용매를 증발하였다. 2% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 노란색 고무질의 반고체인 순수 PRF-C<sub>5</sub> 0.33g(57.5% 수율)을 얻었다. (R<sub>f</sub>=0.5 in 5% methanol in chloroform, v/v). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD): δ = 0.7-0.8 [m, 2H] 1.1-1.2 [s, 9H], 1.2-1.7 [m, 16H], 2.0-2.2 [m, 4H], 2.9-3.1 [m, 4H], 3.3 [t, 4H], 3.6 [s, 3H, (merged with solvent peak)], 3.7 [m, 2H], 3.8-3.9 [m, 1H], 4.05-4.2 [m, 1H], 4.3-4.4 [m, 1H], 4.95-5.25 [m, 6H], 7.15-7.35 [m, 20H]. ESI-MS: m/z = 1164(calculated value for C<sub>61</sub>H<sub>81</sub>O<sub>14</sub>N<sub>9</sub>=1163.4).

[0165] 3-2. RF-C<sub>5</sub>(18a)의 합성

[0166] 0°C 질소 대기하에서 PRF-C<sub>5</sub> (0.1g, 0.086mmol)를 TFA(2ml)에 용해시켰다. 상기 차갑게 한 용액에 티오아니솔(0.4ml, 3.4mmol) 및 TMS-OTf(0.6ml, 3.32mmol)를 연속하여 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온이 되도록 한 후 24시간동안 계속 교반하였다. 그후 HPLC 등급 메탄올로 반응을 소거시켰다. 질소 플러쉬하여 메탄올 및 과잉 TFA를 제거하였다. 잔류물을 최소량의 HPLC 등급 메탄올에 용해시키고 과잉의 디에틸에테르를 첨가하였다. 고무질의 노란색 액체가 침전하였다. 원심분리를 하여 이들을 모으고 메탄올-디에틸에테르 시스템을 반복하여 재침전시켰다. 최종적으로 클로리드 이온 교환 크로마토그래피(앰버라이트 IRA-400C1 클로리드 이온 교환 수지를 사용함)를 하여 노란색 반고체의 순수 RF-C<sub>5</sub> 0.037g(65% 수율)을 얻었다. (R<sub>f</sub>=0.1 in 20% methanol in chloroform). ESI-HRMS: m/z = 662.4375 ([M+H]<sup>+</sup>, calculated value for C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>N<sub>9</sub>=662.4348). RP-HPLC: Rt

= 2.3 min (100% methanol), purity >99%.

#### [0167] 실시예 4. 화합물 18b의 합성 (RF-C8)

##### [0168] 1. 화합물 12b의 합성

##### [0169] 1-1. tert-부틸-8-브로모옥타노에이트(9b)의 합성

[0170] 5-브로모펜타노익 애시드 대신 8-브로모옥타노익애시드를 사용하여 실시예 3의 1-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0171] Yield: 70.5% (Rf=0.85 in 20% ethylacetate in hexane). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDC13): δ = 1.28-1.36 [m, 6H], 1.4-1.48 [s, 9H], 1.55-1.64 [m, 2H], 1.8-1.92 [q, 2H], 2.16-2.24 [t, 2H], 3.36-3.44 [t, 2H].

##### [0172] 1-2. tert-부틸-8-아미노옥타노에이트(10b)의 합성

[0173] 실시예 3의 1-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0174] Yield: 90.5% (Rf=0.1in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 216.5(calculated value for C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub>N=215.3).

##### [0175] 1-3. RC8(-CO<sub>2</sub>But)(11b)의 합성

[0176] 실시예 3의 1-3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0177] Yield: 65.2% (Rf=0.85 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDC13+CD3OD): δ = 1.1-1.35 [m, 10H], 1.45 [s, 9H], 1.5-1.7 [m, 4H], 2.1-2.25 [t, 2H], 2.9-3.1 [t, 2H], 3.8-4.1 [m, 3H, (merged with solvent peak)], 5.05-5.25 [m, 6H], 7.25-7.4 [m, 15H]. ESI-MS: m/z = 775 (calculated value for C<sub>42</sub>H<sub>55</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>=773.9).

##### [0178] 1-4. RC8(-CO<sub>2</sub>H)(12b)의 합성

[0179] 실시예 4의 1-4와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0180] Yield: 81.1% (Rf=0.5 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDC13+CD3OD): δ = 1.15-1.4 [m, 10H], 1.5-1.75 [m, 4H], 2.2-2.35 [t, 2H], 2.9-3.1 [m, 2H], 3.35 [m, 2H], 4.1-4.2 [m, 1H], 5.0-5.25 [m, 6H], 7.3-7.5 [m, 15H]. ESI-MS: m/z = 718 (calculated value for C<sub>38</sub>H<sub>47</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>=717.8).

#### [0181] 2. 화합물 16b의 합성

##### [0182] 2-1. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>8</sub>-Br(13b)의 합성

[0183] 5-브로모발레릭애시드 대신 8-브로모옥타노익애시드를 사용하여 실시예 3의 2-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0184] Yield: 64.85% (Rf=0.7 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDC13): δ = 1.3-1.8 [m, 14H], 1.8-1.9 [m, 2H], 2.15-2.25 [t, 2H], 3.15-3.25 [m, 2H], 3.35-3.4 [t, 2H], 3.75 [s, 3H], 4.55-4.65 [m, 1H], 4.8-4.9 [t, 1H], 5.1 [s, 2H], 6.1 [d, 1H], 7.25-7.4 [s, 5H]. ESI-MS: m/z = 501(calculated value for C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>Br=499.4).

##### [0185] 2-2. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>(14b)의 합성

[0186] 실시예 3의 2-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0187] Yield: 88.5% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS:  $m/z$  = 436.8 (calculated value for  $C_{23}H_{37}O_5N_3=435.6$ ).

[0188] 2-3. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C8F-NHBoc(15b)의 합성

[0189] 실시예 3의 2-3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0190] Yield: 61% (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform).  $^1H$ NMR(200MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.1-1.8 [m, 25H], 2.1-2.2 [t, 2H], 2.9-3.2[m, 6H], 3.7 [s, 3H], 4.15-4.3 [m, 1H], 4.5-4.6 [m, 1H], 5.0-5.15 [m, 2H], 5.25-5.4 [m, 1H], 6.1-6.2 [m, 1H], 6.45-6.55 [m, 1H], 7.1-7.4 [m, 11H]. ESI-MS:  $m/z$  = 684 (calculated value for  $C_{37}H_{54}O_8N_4=682.9$ ).

[0191] 2-4. Lysine(-OMe)C8F(16b)의 합성

[0192] 실시예 3의 2-4와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0193] Yield: 80% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS:  $m/z$  = 549 (calculated value for  $C_{29}H_{48}O_6N_4=548.7$ ).

[0194] 3. 화합물 18b의 합성

[0195] 3-1. PRF-C8(17b)의 합성

[0196] RC5(-CO<sub>2</sub>H) 및 Lysine(-OMe)C5F 대신 12b 및 16b를 사용하여 실시예 3의 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0197] Yield: 53.6% (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform).  $^1H$ NMR(200MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.1-1.4 [m, 33H], 1.4-1.9 [m, 8H], 2.05-2.15 [t, 2H], 2.15-2.25 [t, 2H], 2.75-3.3 [m, 8H], 3.7 [s, 3H], 3.75-3.9 [m, 2H], 3.95-4.1 [m, 1H], 4.25-4.35 [m, 1H], 4.55-5.65 [m, 1H], 4.95-5.3 [m, 6H], 5.7 [m, 1H], 5.95-6.0 [m, 1H], 6.3-6.35 [m, 1H], 6.6 [m, 1H], 7.15-7.45 [m, 20H]. ESI-MS:  $m/z$  = 1248 (calculated value for  $C_{67}H_{93}O_{14}N_9=1248.1$ ).

[0198] 3-2. RF-C8(18b)의 합성

[0199] 실시예 3의 3-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0200] Yield: 68.5% (Rf=0.1 in 20% methanol in chloroform). ESI-HRMS:  $m/z$  = 746.5274([M+H]<sup>+</sup>, calculated value for  $C_{38}H_{68}O_6N_9=746.5292$ ). RP-HPLC:  $R_t$  = 3.8 min (100% methanol), purity >99%.

[0201] **실시예 5. 화합물 18c의 합성 (RF-C9)**

[0202] 1. 화합물 12c의 합성

[0203] 1-1. tert-부틸-15-브로모펜타데카노에이트(9c)의 합성

[0204] Yield: 75% (Rf=0.9 in 20% ethyl acetate in hexane).  $^1H$ NMR(300MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.2-1.36 [m, 20H], 1.36-1.44 [m, 9H], 1.48-1.6 [m, 2H], 1.8-1.92 [q, 2H], 2.12-2.2 [t, 2H], 3.32-3.4 [t, 2H].

[0205] 1-2. tert-부틸-9-아미노나노네이트(10c)의 합성

[0206] 건조 DMSO(3ml)에 tert-부틸-8-브로모옥타노에이트(1.87g, 6.71mmol)를 용해시키고 여기에 소듐 시아나이드(2.63g, 53.68mmol)를 첨가하였다. 소듐 아이오다이드를 촉매량만큼 첨가하였다. 반응 혼합물을 80-90℃로 가열시켜 2-3시간동안 교반하였다. 그 후 실온으로 식혔다. 클로로포름으로 희석하여 차가운 물 및 브라인

으로 연속하여 세척하였다. 유기층은 건조시켜 용매를 증발시켰다. 조물질을 차가운 건조 MeOH에 용해시키고 무수 니켈 클로리드(0.081g, 0.625mmol)를 첨가하였다. 어느 정도 지난 후 소듐 보로히드라이드(1.65g, 43.54mmol)를 반응 혼합물에 첨가하여 2-3 시간 두었다. 그후 반응 혼합물을 셀라이트로 여과하고 HPLC 등급 MeOH로 세척하였다. MeOH를 제거하고 조물질을 클로로포름에 용해시켰다. 브라인 물로 워시업하고 건조시켰다. 5% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 잔류물을 크로마토그래피로 정제하여 노란색 액체의 순수 tert-부틸-9-아미노노나에이트 1.26g(88.6% 수율)을 얻었다. (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 230 (calculated value for C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>O<sub>2</sub>N=229.4).

1-3. RC9(-CO<sub>2</sub>But)(11c)의 합성

실시에 3의 1-3과 동일한 방법으로 수행하였다.

Yield: 60.5% (Rf=0.85 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.1-1.8 [m, 25H], 2.15-2.25 [m, 4H], 2.3-2.4 [t, 2H], 5.05-5.3 [m, 6H], 7.2-7.4 [m, 15H]. ESI-MS: m/z = 789(calculated value for C<sub>43</sub>H<sub>57</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>=787.9).

1-4. RC9(-CO<sub>2</sub>H)(12c)의 합성

실시에 3의 1-4와 동일한 방법으로 수행하였다.

Yield: 75.5% (Rf=0.5 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD): δ = 1.1-1.4 [m, 12H], 1.5-1.7 [m, 4H], 2.2-2.3 [t, 2H], 2.9-3.0 [t, 2H], 3.8-4.0 [m, 2H], 4.05-4.1 [m 1H] 5.0-5.25 [m, 6H], 7.2-7.4 [m, 15H]. ESI-MS: m/z = 732(calculated value for C<sub>39</sub>H<sub>49</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>=731.8).

2. 화합물 16c의 합성

2-1. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>15</sub>-Br(13c)

5-브로모발레릭에이드 대신 9-브로모노나노익에이드를 사용하여 실시에 3의 2-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

Yield: 60.1% (Rf=0.75 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.2-1.7 [m, 26H], 1.7-1.9 [m, 2H], 2.1-2.2 [t, 2H], 3.1-3.2 [q, 2H], 3.3-3.4 [t, 2H], 3.7 [s, 3H], 4.5-4.6 [m, 1H], 4.75-4.85 [m, 1H], 5.05 [s, 2H], 6.0-6.1 [m, 1H], 7.25-7.35 [s, 5H].

2-2. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>(14c)의 합성

N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>8</sub>-Br (1.23g, 2.46mmol)를 건조 DMSO에 용해시키고 소듐 시아나이드(0.97g, 19.72mmol)를 첨가하였다. 소듐 아이오다이드를 촉매량만큼 첨가하였다. 반응 혼합물을 80-90℃로 가열하여 2-3 시간동안 교반하였다. 그후 실온으로 식혔다. 클로로포름으로 희석한 후 차가운 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조시켜 용매를 증발시켰다. 붉은 노란색 생성물을 얻었다. 상기 조물질을 얼음으로 차갑게 한 건조 MeOH에 용해시켜 무수 니켈 클로리드(0.24g, 1.88mmol)를 첨가하였다. 어느 정도 지난 후 소듐 보로히드라이드(0.5g, 13.15mmol)를 반응 혼합물에 첨가하고 2-3시간동안 두었다. 그후 반응 혼합물을 셀라이트로 여과하고 HPLC 등급 MeOH로 세척하였다. 회전 증발기로 MeOH를 제거하고 조물질을 클로로포름에 용해시켰다. 브라인 물로 워시업하고 건조시켰다. 5% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 잔류물을 크로마토그래피로 정제하여 노란색 액체의 순수 tert-부틸-9-아미노노나에이트 0.9g(81.8% 수율)을 얻었다. (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 451 (calculated value for C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>=449.6).

2-3. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C<sub>9</sub>F-NHBoc(15c)의 합성

실시에 3의 2-3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0221] Yield: 56.5% (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.1-1.9 [m, 27H], 2.15-2.25 [m, 2H], 2.95-3.3 [m, 6H], 3.65 [s, 3H], 4.2-4.3 [m, 1H], 4.55-4.65 [m, 1H], 5.1 [s, 2H], 5.3-5.4 [m, 1H], 5.9-6.0 [m, 1H], 6.5 [m, 1H], 7.15-7.4 [m, 11H]. ESI-MS: m/z = 697 (calculated value for C<sub>38</sub>H<sub>56</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub>=696.9).

[0222] 2-4. Lysine(-OMe)C<sub>9</sub>F(16c)의 합성

[0223] 실시예 3의 2-4과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0224] Yield: 88.5% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 563 (calculated value for C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>=562.7).

[0225] 3. 화합물 18c의 합성

[0226] 3-1. PRF-C<sub>9</sub>(17c)의 합성

[0227] RC<sub>5</sub>(-CO<sub>2</sub>H) 및 Lysine(-OMe)C<sub>5</sub>F 대신 12c 및 16c를 사용하여 실시예 3의 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0228] Yield: 61.2% (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD): δ = 1.2-1.7 [m, 41H], 2.1-2.3 [m, 6H], 3.0-3.2 [m, 4H], 3.3-3.35 [t, 4H], 3.7 [m, 3H], 3.85-4.0 [m, 2H], 5.0-5.3 [m, 6H], 7.15-7.45 [m, 20H]. ESI-MS: m/z = 1277(calculated value for C<sub>69</sub>H<sub>97</sub>O<sub>14</sub>N<sub>9</sub>=1276.6).

[0229] 3-2. RF-C<sub>9</sub>(18c)의 합성

[0230] 실시예 3의 3-2과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0231] Yield: 72% (Rf=0.1 in 20% methanol in chloroform). ESI-HRMS: m/z = 774.5579 ([M]<sup>+</sup>, calculated value for C<sub>40</sub>H<sub>71</sub>O<sub>6</sub>N<sub>9</sub>=774.5604). RP-HPLC: Rt = 3.7 min (15% water in acetonitrile), purity >99%.

[0232] **실시예 6. 화합물 18d의 합성 (RF-C<sub>15</sub>)**

[0233] 1. 화합물 12d의 합성

[0234] 1-1. tert-부틸-15-아미노펜타데카노에이트(10d)의 합성

[0235] tert-부틸-8-브로모옥타노에이트 대신 tert-부틸-14-브로모테트라데카노에이트를 사용하여 실시예 5의 1-2와 동일한 방법으로 수행하였다. Yield: 85% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform).

[0236] 1-2. RC<sub>15</sub>(-CO<sub>2</sub>But)(11d)의 합성

[0237] 실시예 3의 1-3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0238] Yield: 67.5% (Rf=0.9 in 5% methanol in chloroform).

[0239] 1-3. RC<sub>15</sub>(-CO<sub>2</sub>H)(12d)의 합성

[0240] 실시예 3의 1-4와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0241] Yield: 79% (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform).

[0242] 2. 화합물 16d의 합성

- [0243] 2-1. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C15-NH2(14d)의 합성
- [0244] N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C8-Br 대신 N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C14-Br를 사용하여 실시예 5의 2-2와 동일한 방법으로 수행하였다. Yield: 90.5% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform).
- [0245] 2-2. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C15F-NHBoc(15d)의 합성
- [0246] 실시예 3의 2-3과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0247] Yield: 61.8% (Rf=0.7 in 5% methanol in chloroform).
- [0248] 2-3. Lysine(-OMe)C15F(16d)의 합성
- [0249] 실시예 3의 2-4과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0250] Yield: 92.5% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform).
- [0251] 3. 화합물 18d의 합성
- [0252] 3-1. PRF-C15(17d)의 합성
- [0253] RC5(-CO2H) 및 Lysine(-OMe)C5F 대신 12d 및 16d를 사용하여 실시예 3의 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0254] Yield: 65.1% (Rf=0.7 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDC13+CD3OD): δ = 1.1-1.4 [m, 20H], 1.5 [s, 9H], 1.5-1.85 [m, 10H], 2.15-2.25 [m, 4H], 2.3-3.0 [m, 4H], 3.75-4.4 [m, 4H], 5.0-5.4 [m, 6H], 6.2-6.3 [m, 2H], 6.5-6.6 [m, 2H], 7.25-7.45 [m, 20H].
- [0255] 3-2. RF-C15(18d)의 합성
- [0256] 실시예 3의 3-2과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0257] Yield: 74.3% (Rf=0.1 in 20% methanol in chloroform). ESI: m/z = 943([M+H]<sup>+</sup>, calculated value for C52H96O6N9=943.3), 472([M+2H]<sup>2+</sup>, calculated 472.1). RP-HPLC: Rt = 3.87 min (100% methanol), purity >99%.
- [0258] **실시예 7. 화합물 18e의 합성 (GV-C5)**
- [0259] 1. 화합물 12e의 합성
- [0260] 1-1. GC5(-CO2But)(11e)의 합성
- [0261] Z-Arg-(Z)2-OH 대신 Z-Gly-(Z)2-OH를 사용하여 실시예 3의 1-3와 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0262] Yield: 63.1% (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDC13): δ = 1.4 [s, 9H], 1.5-1.6 [m, 4H], 2.2 [t, 2H], 3.2 [m, 2H], 3.8 [d, 2H], 5.1 [s, 2H], 5.55 [m, 1H], 6.35 [m, 1H], 7.25-7.35 [m, 5H]. ESI-MS: m/z = 365 (calculated value for C19H28O5N2=364.4).
- [0263] 1-2. GC5(-CO2H)(12e)의 합성
- [0264] 실시예 3의 1-4와 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0265] Yield: 79% (Rf=0.4 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 309 (calculated value for C15H20O5N2=308.3).

- [0266] 2. 화합물 16e의 합성
- [0267] 2-1. N(ε)-Z-Lysine(-OMe)C5V(15e)의 합성
- [0268] Boc-Phe-OH 대신 Boc-Val-OH를 사용하여 실시예 3의 2-3와 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0269] Yield: 65% (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDC13): δ = 0.9-1.0 [d, 6H], 1.4 [s, 9H], 1.5-1.9 [m, 10H], 1.95-2.05 [m, 1H], 2.15-2.35 [m, 2H], 3.15-3.2 [m, 4H], 3.4-3.5 [m, 1H], 3.65 [s, 3H], 4.5-4.6 [m, 1H], 5.0 [m, 1H], 5.05 [s, 2H], 5.25 [d, 1H], 6.85 [m, 1H], 7.15 [m, 1H], 7.25-7.4 [s, 5H].
- [0270] 2-2. Lysine(-OMe)C5V(16e)의 합성
- [0271] 실시예 3의 2-4와 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0272] Yield: 78.1% (Rf=0.1 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 459 (calculated value for C22H42O6N4=458.6).
- [0273] 3. 화합물 18e의 합성
- [0274] 3-1. PGV-C5(17e)의 합성
- [0275] RC5(-CO2H) 및 Lysine(-OMe)C5F 대신 12e 및 16e를 사용하여 실시예 3의 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0276] Yield: 54.5% (Rf=0.6 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDC13+CD3OD): δ = 0.8-1.0 [d, 6H], 1.45-1.55 [s, 9H], 1.55-2.0 [m, 15H], 2.1-2.3 [m, 4H], 3.15-3.3 [m, 6H], 3.65-3.8 [m, 6H], 4.4 [m, (merged with CD3OD solvent peak), 1H], 5.1[s, 2H], 7.25-7.4[m, 5H]. ESI-MS: m/z = 749 (calculated value for C37H60O10N6=748.9).
- [0277] 3-2. GV-C5(18e)
- [0278] 실시예 3의 3-2와 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0279] Yield: 60.5% (Rf=0.1 in 10% methanol in chloroform). ESI-HRMS: m/z = 537.33955([M+Na]<sup>+</sup>, calculated value for C24H46O6N6Na=537.3371). RP-HPLC: Rt = 3.8 min (100% methanol), purity >99%.
- [0280] **실시예 8. 화합물 18f의 합성 (RR-C5)**
- [0281] 1. FC5(-CO2But)(11f)
- [0282] Z-Arg-(Z)2-OH 대신 Z-Phe-(Z)2-OH를 사용하여 실시예 3의 1-3와 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0283] Yield: 58.9% (Rf=0.7 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(300MHz, CDC13): δ = 1.3-1.5 [m, 13H], 2.1-2.2 [t, 2H], 2.9-3.2 [m, 4H], 4.3 [m, 1H], 5.05 [s, 2H], 5.45 [d, 1H], 5.85 [t, 1H], 7.1-7.35 [m, 10H]. ESI-MS: m/z = 455(calculated value for C26H34O5N2=454.6).
- [0284] 2. FC5(-CO2H)(12f)의 합성
- [0285] 실시예 3의 1-4와 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0286] Yield: 84.4% (Rf=0.5 in 5% methanol in chloroform). ESI-MS: m/z = 399 (calculated value for C22H26O5N2=398.5).

[0287]

### 3. PRR-C5(17f)의 합성

[0288]

RC5(-CO<sub>2</sub>H)(0.53g, 0.78mmol)의 건조 DMF용액을 얼음으로 차갑게하여 교반하면서 여기에 HATU (0.3g, 0.78mmol)를 첨가하였다. 30분 후에 건조 DMSO에 용해시킨 L-라이신 메틸에스터 디-히드로클로리드 (0.1g, 0.43mmol)를 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. 그후 반응 혼합물이 약 알칼리가 될 때까지 DIPEA를 적가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 48시간동안 교반하였다. 그 후 클로로포름으로 희석시켜 0.5N HCl, 물 및 브라인으로 연속하여 세척하였다. 유기층을 건조하여 용매를 증발시켰다. 1% 메탄올의 클로로포름 용액을 사용하여 잔류물을 크로마토그래피로 정제하여 흰 고체의 순수 PRR-C5 0.38g(60% 수율)을 얻었다.

[0289]

(R<sub>f</sub>=0.7 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(200MHz, CDC13+CD3OD): δ = 1.3-1.4 [m, 4H], 1.4-1.7 [m, 12H], 2.05-2.25 [m, 4H], 2.9-3.05 [m, 4H], 3.05-3.2 [m, 2H], 3.7 [s, 3H], 3.75-4.0 [m, 6H], 4.35-4.45 [m, 1H], 5.05-5.25 [m, 12H], 7.15-7.4 [m, 30H]. ESI-MS: m/z = 1472 (calculated value for C77H94O10N6=1447.6).

[0290]

### 4. RR-C5(18f)의 합성

[0291]

실시예 3의 3-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0292]

Yield: 47% (R<sub>f</sub>=0.0, spot resided at baseline in 20% methanol in chloroform). ESI-HRMS: m/z = 336.2387 ([M+2H]<sup>2+</sup>, calculated value for [C29H60O6N12]/2= 336.2334). RP-HPLC: R<sub>t</sub> = 3.6 min (100% methanol), purity >99%.

[0293]

### 실시예 9. 화합물 18g의 합성 (FF-C5)

[0294]

#### 1. PFF-C5(17g)의 합성

[0295]

RC5(-CO<sub>2</sub>H) 대신 FC5(-CO<sub>2</sub>H)를 사용하여 실시예 8의 3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0296]

Yield: 59.8% (R<sub>f</sub>=0.6 in 5% methanol in chloroform). <sup>1</sup>HNMR(400MHz, CDC13+CD3OD): δ = 1.3-1.4 [m, 4H], 1.45-1.85 [m, 6H], 2.1-2.3 [m, 4H], 2.75-3.15 [m, 10H], 3.7 [s, 3H], 4.25-4.3 [m, 3H], 4.95-5.1 [m, 4H], 7.15-7.35 [m, 20H]. ESI-MS: m/z = 944 [M+Na<sup>+</sup>] (calculated value for C51H64O10N6=921.1).

[0297]

#### 2. FF-C5(18g)의 합성

[0298]

실시예 3의 3-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0299]

Yield: 53% (R<sub>f</sub>=0.1 in 10% methanol in chloroform). ESI-HRMS: m/z = 653.4009 ([M+H]<sup>+</sup>, calculated value for C35H53O6N6=653.4021), 327.2064 ([M+2H]<sup>2+</sup>, calculated 327.2017). RP-HPLC: R<sub>t</sub> = 3.9 min (100% methanol), purity >99%.

[0300]

#### 3. RF-C11(18h)의 합성

[0301]

RF-C11 (n= 10)를 기존의 방법 [M. J. Lee, K. Pal, T. Tasaki, S. Roy, Y. Jiang, J. Y. An, R. Banerjee and Y. T. Kwon, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 105; 100 (2008)]에 따라 합성하였다. 수율: 60.8% (R<sub>f</sub>=0.1 in 20% methanol in chloroform). 최종 화합물은 ESI-MS를 사용하여 확인하였고 HPLC로 정제하였다. ESI-MS : m/z=831 ([M+H]<sup>+</sup>, calculated value for C44H80O6N9=831.2), 416([M+2H]<sup>2+</sup>, calculated value for C44H80O6N9=416.2). RP-HPLC: R<sub>t</sub> = 3.78 min (100% methanol), purity >98%.

[0302] 실험 예

[0303] 실험예 1. N-recognin에 포함된 프로테아좀 분해를 일으키는 불안정화 잔기에 결합하는 두 개의 독립적인 결합 부위 규명

[0304] 포유동물의 N-degron을 평가하기 위하여, UPS의 요소들이 풍부한 토끼 망상적혈구(reticulocyte) 용해물(lysate)에 있는 신규한 N-end rule 기질을 본원에서 처음 규명하였다. DHFR-Ub-X-nsP4 융합 단백질(도 11a)이 상기 용해물에서 발현되었는데, 여기에서 Ub-X junction에 있는 DUB 효소에 의해 번역과 동시에 절단되어 수명이 긴 DHFR-Ub reference(DHFR-Ub) 및 the X-nsP4 모델 기질이 생산되었다. 타입 1 불안정화 잔기가 있는 Arg-nsP4는 재빨리 분해되고, 정상 상태에서는 탐지되지 않았다(도 11b, 레인 1). 이러한 결과는 베스타틴 존재 하의 디펩타이드 저해제 Arg-Ala의 결과와는 반대되는데(도 11b, 레인 2를 레인 6 및 10과 비교), 이는 망상적혈구 용해물에서 디펩타이드 N-end rule 저해제를 안정화시킨다는 것을 나타낸다. Ala-Arg (안정화시킴) 또는 Trp-Ala (type 2) 중 어느 것도 2mM 농도에서 Arg-nsP4를 안정화시키지 않았다(도 11b 및 11c). 이러한 결과는, 상대적으로 단순한 인식 모티프(recognition motif)에도 불구하고 UBR 박스 및 N-recognin의 N-도메인이 매우 선택적이며 독립적임을 나타낸다.

[0305] 프로테아좀 저해제인 MG132로 처리하였을 때, Arg-nsP4의 유비퀴틴화된 형태는 면역침강에 의해 더 풍부해졌으며 이는 Ub에 대한 면역블랏팅으로 가시화시켰다(도 11d). Arg-nsP4 (type 1)는 정상 상태에서 신속하게 유비퀴틴화되었는데, 하지만 이 과정은 Arg-Ala 디펩타이드에 의해 유의하게 감소하였다(도 11d, 레인 3 및 4). 본원에서는 또한 Met-nsP4 (안정화시킴) 및 Phe-nsP4 (type 2)와 같은 다른 모델 기질의 유비퀴틴화를 조사하였다(도 11e 및 f). Met-nsP4 (안정화시킴)는 수명이 길고, 디펩타이드와 관계없이 유비퀴틴화되지 않았으며, 반면 Arg-nsP4 (type 1) 및 Phe-nsP4 (type 2)는 유비퀴틴화를 통해 신속하게 분해되었다(도 11e- 레인 9 내지 12). 타입 1 디펩타이드가 Arg-nsP4 유비퀴틴화를 차단할 때 타입 2 디펩타이드 저해제 Trp-Ala는 특이적으로 Phe-nsP4 유비퀴틴화를 차단하였다. 포유류 세포에서의 N-end rule 기질의 유비퀴틴화를 연구하기 위하여, HA-tagged 유비퀴틴 및 flag-tagged Arg-nsP4를 발현하는 플라스미드를 마우스 태아 섬유아세포(Mouse embryonic fibroblasts, MEF)내로 동시 전달이입하였다. MG132 처리 후, 면역침강을 통해 실질적으로 유비퀴틴화된 Arg-nsP4를 얻었다(도 11g).

[0306] 종합하면, 상기 결과는 망상적혈구 용해물 시스템 및 포유류 세포에서 모델 N-end rule 기질이 빠른 유비퀴틴화를 통해 분해된다는 것을 의미한다. nsP4에 기초한 기질에서, 불안정화 잔기는 N-degron을 구성하기에 충분하였으며, 다른 분해 결정물의 효과를 배제하였다. 타입 1 및 2 불안정화 N-말단 잔기는 매우 선택적이며 N-recognin-N-degron 상호작용은 완전히 독립적인 것임을 나타낸다.

[0307] 실험예 2. 진핵생물 N-degron의 보존

[0308] 진핵생물 N-end rule 경로 시스템은 이스트 *사카로미세스 세레비시애*(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 최초로 규명되었다 (D. K. Gonda, et al, (1989), J. Biol. Chem., 264, 16700). 포유동물에서, 불안정화 잔기는 세 가지 타입으로 분류된다 (Tasaki and Y. T. Kwon, (2007), Trends Biochem. Sci., 32, 520). 타입 3 불안정화 잔기는 Ala, Ser 및 Thr을 포함하였는데, 이들은 지금은 안정화잔기인 것으로 여겨진다. 오리지널 모델 기질은  $\beta$ -갈락토시다아제에 근거를 두고 있었으며, 다른 어떤 기질도 분류법적으로(systematically) 테스트되지 않았다. N-degron은 접근가능한 내부(internal) Lys 및 N-말단 아미노산을 수반하는 구조화되지 않는 N-말단 익스텐션을 필요로 하기 때문에, Ub와 컨주게이트할 수 있는 N-recognin의 능력은 기질마다 상당히 달라진다. 나아가, 등온열량측정기(isothermal titration calorimetry (ITC))분석에 기초하여 Arg(19  $\mu$ M)과 비교할 때, N-말단 His는 UBR 박스에 약한 결합 친화력(370  $\mu$ M 해리상수)을 가지는 것으로 나타났다 (E. Matta-Camacho, et al, (2010), Nat. Struct. Mol. Biol., 17, 1182). UBR 박스 및 타입 1 불안정화 사이의 결합은, ClpS 및 타입 2 잔기 사이의 결합보다  $10^2$ - $10^3$ 배약한데 이는 나아가 불안정화 잔기를 재평가해야한다는 것을 나타낸다.

[0309] N-end rule 경로에서의 타입 1 펩타이드, 및 UBR 1 또는 UBR 2의 UBR 박스(이하, UBR 1 박스 및 UBR 2 박스라 한다)사이의 결합 친화력은, Lamarckian genetic algorithm이 있는 Autodock를 사용한 리간드-수용체 도킹 분석을 통해 처음 측정되었다 (도 12a & 12b; 도킹 프로세스에 기재된 방법 참조). UBR 1 및 UBR 2 박스의 크리스탈 구조는 단백질 데이터 뱅크 유레이고(PDB ID: 3NY1 및 3NY3, 각각), 펩타이드 구조는, UBR 2의 복합

구조에서 추출한 RIFS 펩타이드를 기초로 하는 PyMol 패키지의 돌연변이 모듈에서 만들었다. 타입 2 WIFS 펩타이드는 도킹방법을 입증하기 위하여 사용되었다. 도킹 분석에서 얻은 가장 낮은 결합에너지는 ITC 데이터에서 얻은 결합에너지보다  $10\text{--}10^2$ 배 더 낮다(도 12c, 패널 a). RIFS, KIFS, 및 HIFS 펩타이드는 UBR 2 박스에 대해 각각  $-8.15$ ,  $-7.71$ , 및  $-7.29\text{kcal/mol}$ 의 결합 친화력을 가지고 있었는데, 이는  $1.08$ ,  $2.26$ , 및  $4.5\text{ }\mu\text{M}$ 의 해리 상수에 상응한다. 타입 1 펩타이드는 ITC 실험과 유사한 결합 친화력을 지니는 경향을 가졌다. 그러나, 실험 데이터와는 달리, 도킹 분석에 의하면, Lys 및 His 또한 UBR 2 박스에 효율적으로 결합한다고 나타났다. 타입 2 펩타이드(WIFS)는  $\sim 103$ 배 높은 결합 친화력을 가지고 있으며, 활성부위에 적절하지 않은 상호작용을 나타낸다(도 12a-12c). 흥미롭게도, UBR 1 박스는 Lys 및 His에 약한 결합 친화력( $-6.91$  및  $-5.60\text{kcal/mol}$ , 각각)을 가지고 있는 반면 UBR 1 박스에 대한 Arg 결합은 UBR 2 박스와의 결합과 비교할 만하다( $-8.07$  및  $-8.15\text{kcal/mol}$ , 각각)(도 12c, 패널 a & b).

[0310]

또한, 이들 결과는, His 및 Lys는 UBR 박스에 예전에 결과보다 더 강하게 결합할 수 있다는 것을 나타낸다. UBR 1 및 UBR 2는 기능적으로 불필요한 세케로그(sequellog)인 것으로 여겨져 왔다. 그러나 UBR 2 박스는 UBR 1의 특이적 불안정화 잔기와 상호작용하도록 진화되어왔을 수 있다. UBR 1 및 UBR 2의 이러한 독립적 역할은 UBR 1 및 UBR 2 녹아웃 마우스 표현형의 차이로 설명할 수 있다. 나아가, 도킹 분석에 의해, UBR 박스와 상호작용하는 타입 1 잔기는 타입 2-ClpS 상호작용만큼 강하다는 것이 나타났으며, 나아가 UBR 및 ClpS 박스 모두를 타겟으로 하는 헤테로벨런트 저해제의 이점이 입증되었다.

[0311]

이스트에서, N-end rule 기질의 유비퀴틴화는 E3 리가아제 단독, UBR 1에 의해 매개되는데, 반면 포유류에서는 UBR 박스로 정의된 7개의 UBR 단백질이 이 과정에 매개되어 있다. 7개의 UBR 중에서, UBR 1 및 UBR 2가 N-도메인을 함유하는 유일한 E3이다. ClpS의 이스트 오솔로그(ortholog)인 ClpS 도메인은 Leu, Phe, Tyr, 및 Trp와 같은 박테리아 N-end rule 기질을 인식하는데, 이들은 세포에서는 타입 2 불안정화 잔기이다. 플루오레세인-표지된(fluorescein-labeled) 펩타이드를 사용하여 형광 이방성(fluorescence anisotropy)으로 측정하였을 때 ClpS 및 타입 2 잔기사이의 결합 친화력은 서브마이크로몰 범위내이다.

[0312]

그런데, 본원에서는 도킹 분석을 사용하여, 타입 1 잔기-UBR 박스 상호작용과 유사한, 약한 결합 친화력을 발견하였다(도 12d 및 12e). N-말단 Trp은  $-9.51\text{ kcal/mol}$ 의 예외적으로 높은 결합 친화력을 지니는데, 이는 해리 상수  $0.11\text{ }\mu\text{M}$ 에 해당한다. N-말단 Phe, Tyr, 및 Leu의 결합친화력은 각각  $-7.76$ ,  $-7.41$ , and  $-7.01\text{ kcal/mol}$ 이었다. 이들 친화력은 Lys 및 His와, UBR2 박스와의 상호작용과 유사하다. 타입 1 및 타입 2 상호작용은 매우 기질-특이적이며, N-말단 Arg만이 ClpS 박스에 대해  $-3.01\text{ kcal/mol}$ 의 결합 친화력을 지니고 있다(도 12e, 데이터는 기재되어 있지 않음).

[0313]

인 실리코(*in silico*) 도킹 결과는 도 11에 있는 인 비트로 생화학적 분석 결과에 의해 뒷받침된다. 이를 위하여, 타입 1 (Arg, His), 타입 2 (Phe, Tyr, Leu), 3차(tertiary) (Glu, Asp, Cys), 및 안정화 (Met, Ala, Pro, Gly, Ser) 잔기를 포함하는 13개의 서로 다른 N-말단 아미노산을 가지는 X-nsP4 컨스트럭트(construct)를 구축하였다(도 12f). 도킹 분석과 일치하게도, His-nsP4 단백질은 UPS를 통해 신속하게 분해되었다(도 12f & 도 15). 불안정화 잔기로 알려진 모델 기질은, 최초에는  $\beta$ -갈락토시다아제에 근거한 분석을 사용하여 분류되었었는데, 모두 망상적혈구 용해물에서는 수명이 짧았다.  $\beta$ -갈락토시다아제 모델을 사용하여 이스트와 포유동물류에서 종전에 관찰한 바와 같이, Ub-Pro-nsP4의 탈유비퀴틴화는 느리고, 융합 단백질은 안정하였다(도 15, 라인 3). 흥미롭게도, Ala-nsP4는 Met-, Gly-, 및 Ser-nsP4보다 더 느리게 분해하였다(도 12f). N-말단 Ala는 원래 타입 3으로 분류되었는데, 상대적으로 긴 반감기를 가진 불안정화 잔기이다(Ala- $\beta$ -갈락토시다아제에서  $> 4.4$  시간). 최근에는 그러나 N-말단 Ala는 안정화 잔기인 것으로 여겨진다. penultimate N-말단 잔기를 통해 N-영역 박스 또는 UBR 박스와 N-말단 Ala이 상호작용하는지는 불분명하다. N-말단 Cys는 nsP4 및  $\beta$ -갈락토시다아제 모델에서 불안정화 잔기이다.

[0314]

분해를 촉발시키기 위해서는, Cys-degron은 세포내에 특정 농도의 활성 산소 또는 일산화질소를 필요로 한다. 본원에서는 포유동물 세포 내 Cys-degron이 있는, 매우 다양한 안정성을 가지는 단백질을 발견하였는데 이는 세포내 산소 상태를 반영하는 것으로 보인다(데이터는 나타나있지 않음). 2차 Cys (Cys-2) 산화는 생화학적으로 그리고 기능적으로 세포 생리학 및 항상성과 연관되어 있다. 최근, 식물에서 저산소증에 대한 항상성 반응의 새로운 조절자가 pro-N-degron Cys-2를 가지는 N-end rule 기질인 것으로 확인되었다 (D. J. Gibbs, et al, (2011), Nature, 479, 415). 저산소증-Responsive element 1 및 2 (HRE1 and HRE2) 및 Related to AP2.12 (RAP2.12)를 포함하여, 에틸렌 반응(response) 인자 그룹 VII 번역 인자는 저산소(normoxic) 상태에서 UPS를 통해 분해되고 저산소 상태에서 축적되는데, 이러한 상태에서는 무산소 대사 및 저산소증에서의 생존을 촉진하

는 유전자 발현을 유도한다. 아라비도시스(Arabidopsis) 및 인간 계놈은 각각 Cys-2 degron을 가지는 최소한 206 및 502개의 단백질을 코딩한다.

[0315]

이스트에서의 N-end rule E3 리가아제는 UBR box만을 가지고 있는 데 반하여, 포유동물은 UBR box와 ClpS box을 동시에 가지고 있고 이는 각각 타입 1과 타입 2 기질을 인식하기 위해 존재한다. 본원은 이러한 포유동물 N-end rule E3 리가아제의 특징을 이용하여 두 활성부위를 동시에 표적하여 이 효소에 대한 상호작용의 효율을 상호협동적으로(cooperative) 높이도록 하였고 이의 성공적인 적용을 보였다.

[0316]

### 실험예 3. RF-C5 헤테로벨렌트 분자에 의한 효과적인, N-end rule 기질 분해 억제

[0317]

많은 단백질-단백질, 효소-기질 및 수용체-리간드 상호작용은 친화력 및 선택성을 증가시키기 위하여 다양한 상호작용을 사용하는데, 예를 들어 항원-항체, 바이러스-세포, 및 박테리아 독신-세포 상호작용등이 있다. 상술한 바와 같이, UBR 단백질은 두 개의 독립적인 기질 결합 모티프 (motif)를 통한 헤테로벨렌트 저해를 할 수 있는, 독특한 구조의 스캐폴드를 제공한다: 타입 1 잔기에 대한 UBR 박스 및 타입 2 잔기에 대한 N-도메인.

[0318]

나아가, 본 발명의 도킹 연구에 의해 밝혀진 바에 의하면, 예전에 알려진 바와는 달리, 상기 두 상호작용은 필적한 만한 결합 친화력을 가지며, 나아가 UBR 박스 및 N-도메인을 동시에 표적으로 하는 헤테로벨렌트 저해제가 유용할 수 있음을 나타내는 것이다. UBR 단백질을 표적으로 하는 헤테로벨렌트 저해의 개념-증명 시험으로써, 본 발명자는 일찍이 프로토타입 헤테로벨렌트 작은 분자인 RF-C11을 개발하였다. RF-C11에는 타입 1 상호작용을 위한 N-말단 Arg, 및 타입 2 상호작용을 위한 N-말단 Phe가 함유되어 있는데, 이들은 각각 탄소수 11개의 탄화수소 체인의 코어 Lys의  $\epsilon$ - 및  $\alpha$ -아미노 그룹에 결합되어 있다. N-recognin과 상호작용할 때, UBR 도메인에 결합하는 Arg는 부분적으로는 결합되지 않은 Phe 리간드를 제약하고, 그럼으로써 N-도메인의 근접한 곳에 국소 Phe 농도를 증가시킬 것이다. 이러한 제약은 N-도메인에 대한 Phe 결합 가능성을 증가시킬 것이다. Phe 결합은 또한 UBR 도메인에 대한 Arg 결합 가능성을 증가시킬 것이다. 그러나, RF-C11은 결합 친화력을 단지 완만한 정도로 증가시켰을 뿐인데, 이는 비-최적화된 테터(tether) 길이와 타겟에 대한 리간드 친화력때문이었다. 열역학적으로, 유연성있는 테터가 타겟 단백질에서 결합부위사이 공간보다 가깝거나 약간 길 때 멀티벨렌트 저해제가 가장 효율적인데, 이는 이 길이가 입체 장애를 만들지도 않고 배위의 엔트로피를 감소시키지 않으면서 결합 부위 부근의 가장 효율적인 농도를 극대화시키기 때문이다.

[0319]

2가 저해제에 대한 적절한 테터 길이를 측정하고 구조-활성 관계를 규명하기 위하여 본원에서는 다양한 RF-Cn 유도체(n은 탄화수소 체인 테터의 길이를 말한다)를 합성하였다(도 13a). 또한 GV-Cn (Gly 및 Val, 이들 둘다 말단에 안정화 잔기가 있음), R-Cn(Arg으로 1가 저해제. n=1-14), 및 F-Cn (Phe이 있음)과 같은 RF-Cn 화합물을 합성하였다. 전통적 디펩타이드 저해제인 Arg-Ala (R-A, 타입 1) 및 Phe-Ala (F-A, 타입 2)를 RF-Cn 시리즈 화합물과 비교하였다. 도 13에 나타난 바와 같이 RF-Cn 의 저해 효율을 도 11의 인 비트로 N-end rule 모델 기질을 사용하여 시간- 및 용량 의존 방식으로 테스트하였다(도 13b & 13c, 도 16). 도 13에 나타난 바와 같이 헤테로벨렌트 RF-Cn화합물이 모노벨렌트 화합물 또는 디펩타이드보다 N-end rule 경로를 더 강력하게 저해하였고, n=5 일 때 효과가 최대였다. 타입 1 (Arg-nsP4, 도 13b) 및 타입 2 (Tyr-nsP4, 도 13c) 모두 n=5일 때 40분에서 가장 높은 활성이 관찰되었다. n=3 내지 n=11인 모든 2가 저해제는 Arg-Ala보다 강한 저해제이지만, RF-C2 또는 RF-C15는 그렇지 않았는데, 이는 헤테로벨렌트 상호작용은 서로 협력하며 두 개의 결합 모티프사이의 거리는 예상한 것보다 가깝다는 것을 제시한다. UBR 박스 및 N-도메인 둘다를 함유하는 UBR 단백질 총 길이 (full length)의 구조는 아직 다 해석되지 않았기 때문에, Gramm-X 단백질-단백질 도킹 웹 서버를 사용하여 합쳐진 구조를 구축하였다. 분석에 의해 추출해낸 두 개의 구조는, 독립적 구조와 비교하여 볼 때 UBR 2 박스 및 ClpS 도메인이 복합체를 형성할 때 가장 낮은 결합 에너지를 가졌다(도 13d). 이들 입체구조는, 독립적인 인식 모티프는 헤테로벨렌트 상호작용을 반영하여 강한 결합 친화력을 지닌 RF-C5와 가깝게 결합할 수 있다는 사실을 반영하였다(도 13e). RF-C5에 대한 UBR-ClpS 입체배위의 결합 친화력 (-8.70 및 -8.83 kcal/mol)은, N-말단 Trp를 제외하고는 측정된 모든 타입 1 및 타입 2 상호작용보다 더 강하였다(도 12c & 12e). 상기 복합체와의 가장 낮은 결합 에너지에서, RF-C5의 Arg 및 Phe의  $\alpha$ -탄소는 13.5Å 내지 15Å 떨어져 스트레치하였다(도 13d). 따라서, UBR 1/2 단백질에서 RF-C2는 너무 짧아서 결합 모티프 둘다에 걸쳐 이어질 수 없는 것으로 보인다. 타입 2 모델 기질에서 헤테로벨렌트의 효과는 타입 1 저해에서 만큼 상당하지 않았다. 이런 결과는 아마 몇몇 요인에 기인하는 것이다. N-말단 Arg 및 UBR 박스사이의 상호작용이 N-말단 Phe와 ClpS 도메인 사이의 상호작용보다 내인적으로 더 강하기 때문이라고 가장 간단히 설명할 수 있다(도 12e & 12e). 그러나 가장 타당한 기전은,

특히 두 도메인이 가까이 위치하고 있다고 고려하여, 결합 포켓사이의 조절이 가능하다는 것이다. 타입 2 기질 상호작용은 ClpS 도메인의 알로스테릭(allosteric) 입체배위 변화를 수반하는데, 이는 타입 1 잔기에의 UBR 박스 결합을 조절할 수 있다.

[0320]

본 발명자는 일찍이 모노밸런트 RR-C11 및 FF-C11와 비교함으로써 RF-C11의 멀티발란시가 결합 효율을 증가시킨다는 것을 입증하였다. 나아가 단일 테터 Arg 또는 Phe (R-C5+F-C5, 도 13a) 테터와 모노밸런트 리간드의 조합을 사용하여 이러한 발견을 확증하였다. nsP4-기초한 N-end rule 모델 기질을 비오틴화 라이신과 무작위로 포함시켰는데, 이는 스트렙타비딘(STV)-적외 콘주게이트 및 정량적 오딧세이 적외 이미징 시스템으로 탐지되었다. 헤테로밸런트 리간드(RF-C5) 및 대조군을 100  $\mu$ M에서 인 비트로 번역 반응으로 테스트하였고, 샘플은 40, 60, 80 및 100분에 채취하였다(도 13e). 예상한 바와 같이, 병합된 모노밸런트-테터된 리간드(R-C5+F-C5)는 단일 헤테로밸런트 리간드(RF-C5)보다 유의하게 적게 저해한다. 게다가, RF-C5는 RR-C5, FF-C5, 또는 GV-C5보다 더 높은 저해 효과를 가진다고 밝혀졌다. 이와 함께, 이들 결과는 두 개의 분리된 개별적 상호작용을 병합하면 멀티밸런트 상호작용처럼 동일한 열역학 및 동역학 효과를 가지지 않는다는 것을 말해준다.

[0321]

#### 실험예 4. RF-C11에 의한 포유동물 세포에서 N-end rule 경로 저해

[0322]

도 14에 헤테로밸런트 저해제를 세포 배양 시스템에 적용한 결과를 나타내었다. 전하를 띤 불안정화 잔기 및 친수성 테터로 인해 RF-Cn 시리즈 화합물은 수용액에서 미셀을 형성한다. 펜타머 테터를 가진 헤테로밸런트 저해제는 인 비트로에서 N-end rule 경로를 더욱 효율적으로 저해함에도 불구하고, RF-C11은 포유동물 세포에서 저해를 더 잘하는데, 이는 아마 RF-C11이 수용액에서 안정한 미셀을 형성하여 플라스마 멤브레인을 통과할 수 있기 때문이다. 동적광산란법(Dynamic light scattering)으로 보면 RF-C11은 좁은 사이즈 분포(narrow size distribution)( $497 \pm 40.2$  nm)를 가진, 안정한 단일 라미나(lamellar) 미셀을 형성하고 상대적으로 낮은 임계 미셀 농도( $\sim 1 \mu$ M 이하)를 가지는 반면, RF-C5는 미셀이나 리포솜을 형성하지 않는다(도 14a). RF-C11 및 이의 구조적 대조군인 GC-C11은 밀리몰 농도에서조차도 세포독성이 나타나지 않았다(RF-C11은  $IC_{50} > 2$  mM 및  $IC_{50}=331.1 \mu$ M (GV-C11), 도 14b). 배발생(embryogenesis) 및 비대성(hypertrophism) 중의 심근근육세포 증식에의 세포 자율조절에 N-end rule 경로의 ATE1 브랜치가 연관되어 있는 것으로 나타났다.

[0323]

심근 세포에 RF-C11을 적용할 가능성이 있는가를 알아보기 위하여, 본 발명자는 첫 번째 심근세포를 배아 마우스 심장에서 분리하여 이들을 25  $\mu$ M 비오틴화 헤테로밸런트 저해제로 처리하였다. 스트렙타비딘-로다민으로 면역염색함으로써, 항-트로포닌 면역 염색으로 가시화되는, 심근세포내에 내부화된 GV-C11 및 RF-C11을 관찰하였다(도 14c). RF-C11은 재빨리 포유동물세포에 의해 인터널라이즈(세포내 섭취)되기 때문에, 헤테로밸런트 저해제가 RGS4.15와 같은 N-end rule 경로의 생리학적 기질에 영향을 미칠 것인지 살펴보았다. 일시적으로 과발현된 RGS4의 정상 상태 레벨이 유의하게 RF-C11에 의해 증가하며, Arg-Ala 디펩타이드에 의해서는 그렇지 않다는 것을 발견하였다(도 14d). RGS4 및 LacZ 플라스미드와 함께 MEF를 동시전달이입하고 24시간 후에, 혈청 존재/부존재 하에 10, 50, 또는 100  $\mu$ M RF-C11 또는 Arg-Ala 디펩타이드와 세포를 배양하였다. RGS4는 10  $\mu$ M MG132에 의해 안정화되었다. RF-C11의 효과는 처리기간 동안 배양 배지에 혈청이 없을 때에 더욱 중요한데, 이는 양전하-매개된 세포내 전달에서 통상 그러하다. 도 14e는 MEFs에서 RGS4, 생리학적 N-end rule 기질의 펄스 추적 분석(Pulse chase analysis)을 나타낸다. 전달이입된 세포를 100  $\mu$ M RF-C11 또는 GV-C11로 전(pre)배양한 후 항-RGS4 면역침강, SDS-PAGE 분석 및 자가방사법을 수행하였다. 펄스 추적 분석에서, 일시적으로 과발현된 RGS4는 마우스 배아 섬유아세포에서 재빨리 분해되는데, RF-C11에 의하여 유의하게 분해가 지연되는 것으로 나타났다(도 14e 및 14f). 반대로, GV-C11은 RGS4 안정성에 유의한 효과를 지니지 않았다. 이러한 결과는, 비세포독성 및 플라스마 멤브레인 통과가능한 헤테로밸런트 RF-C11이 포유동물세포에서 N-end rule 경로를 강력하게 저해한다는 것을 말한다.

[0324]

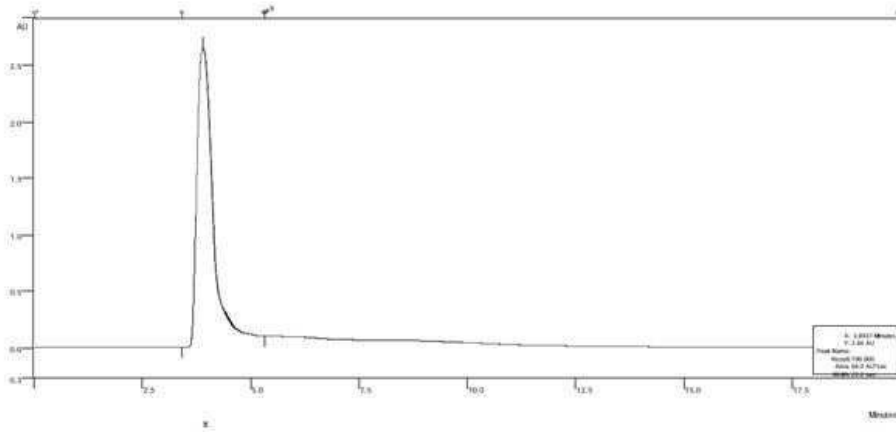
이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

[0325]

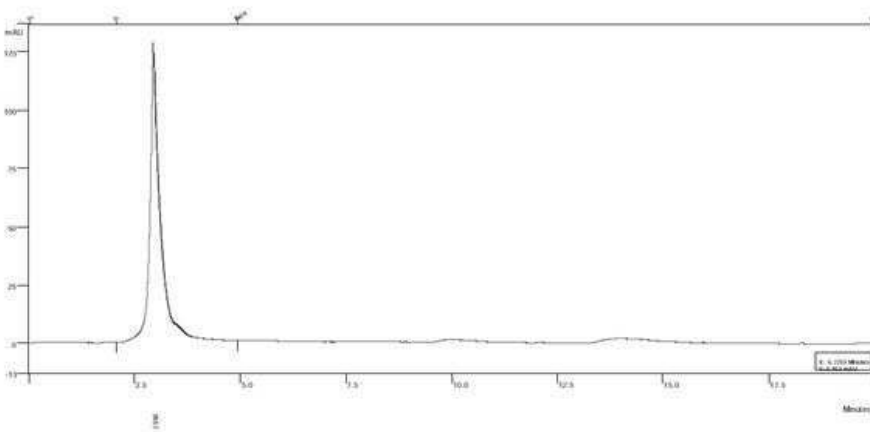
본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

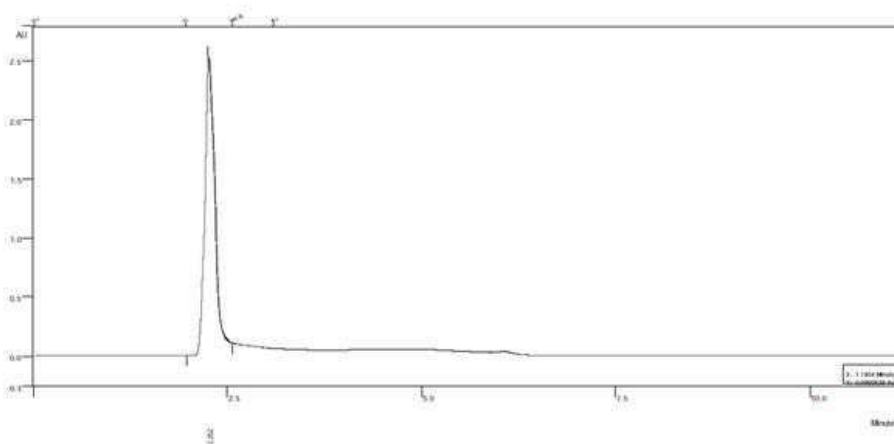
도면1



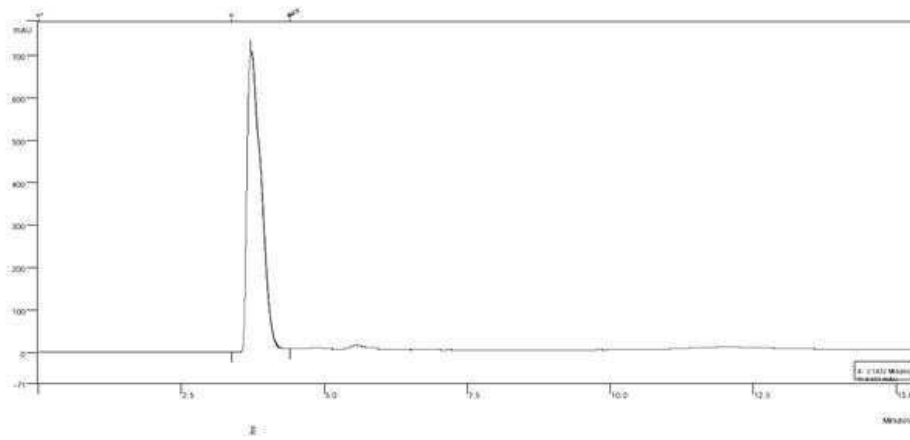
도면2



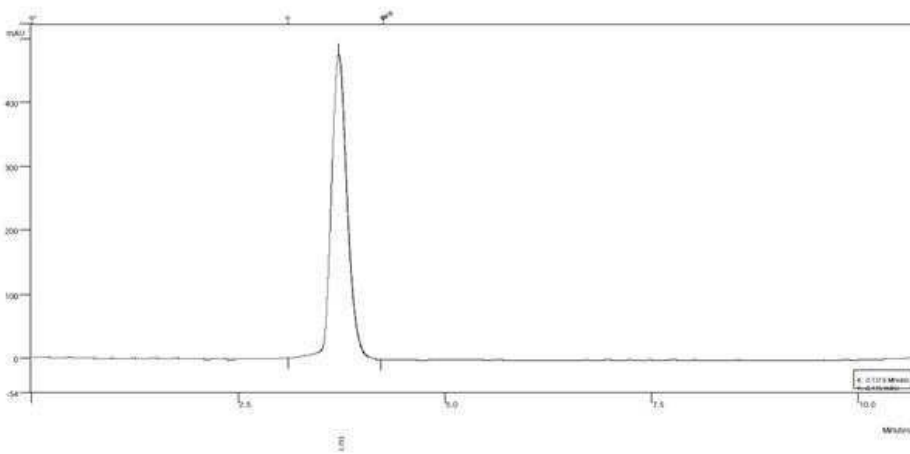
도면3



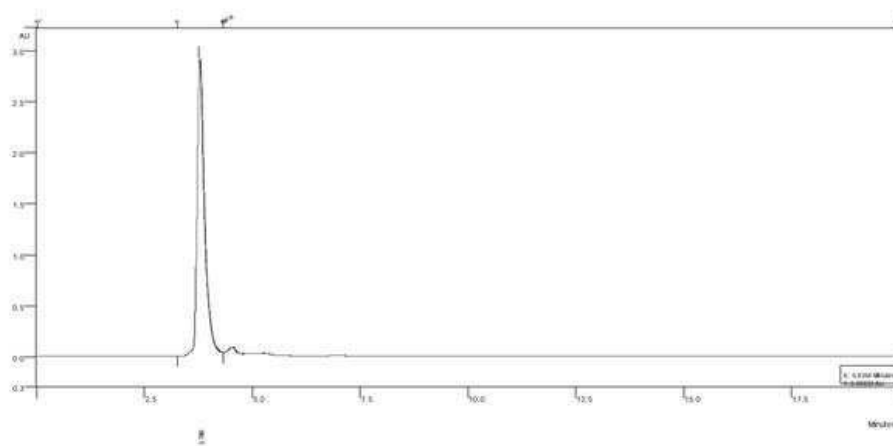
도면4



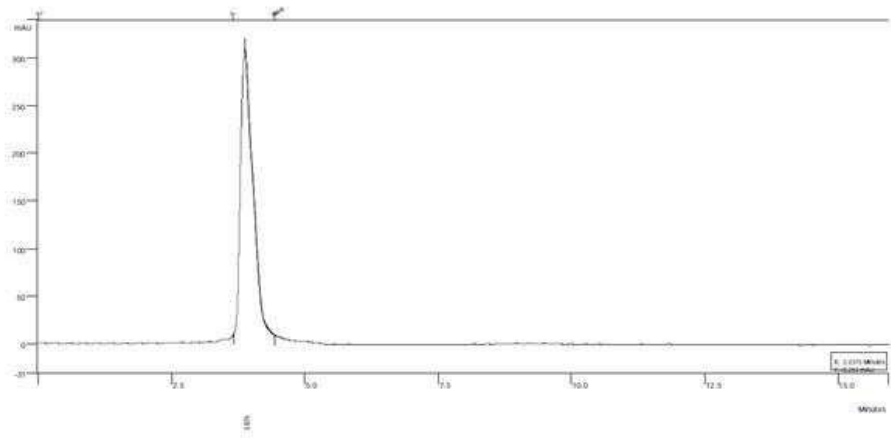
도면5



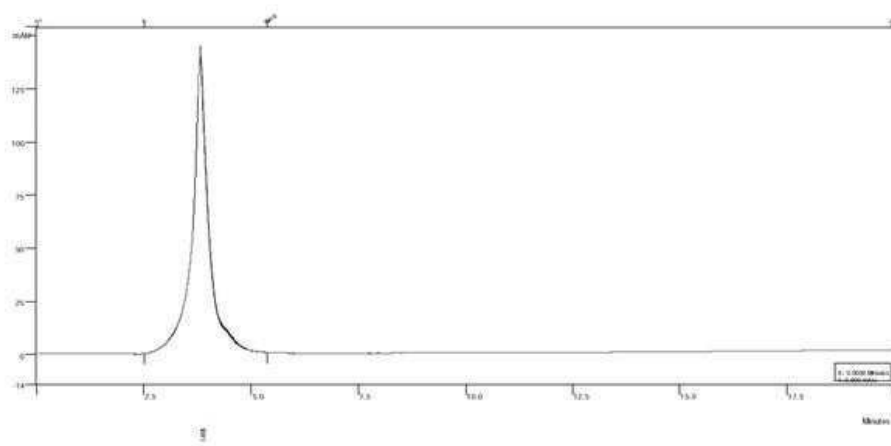
도면6



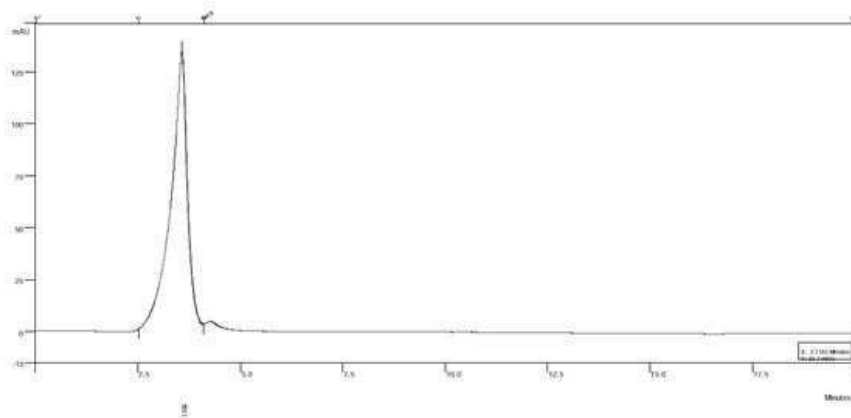
도면7



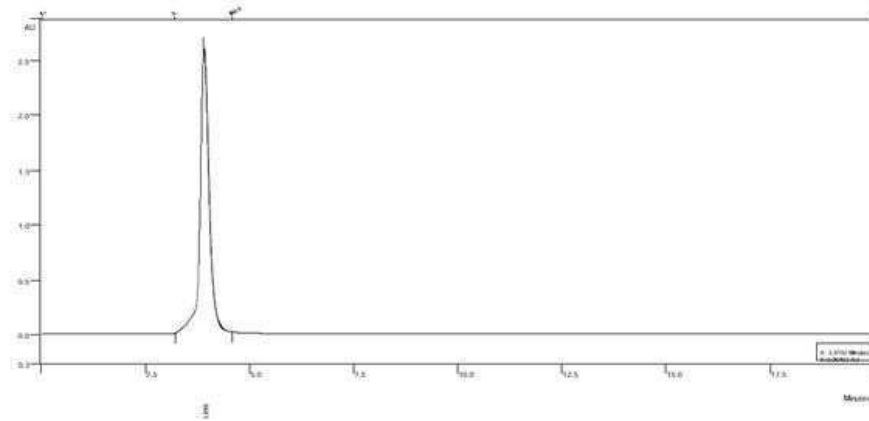
도면8



도면9



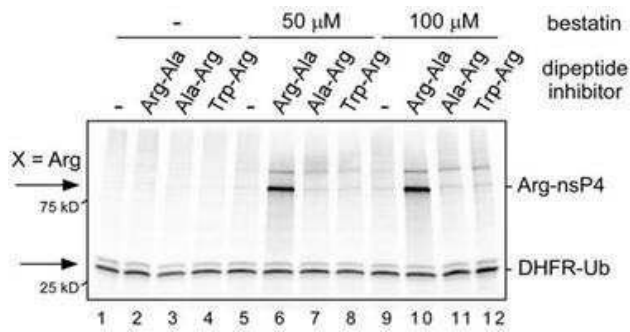
도면10



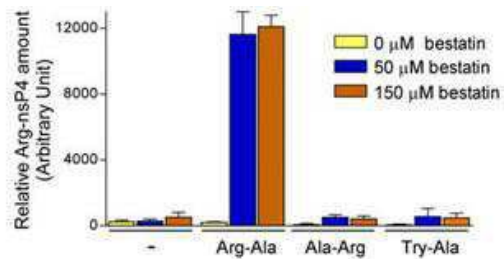
도면11a



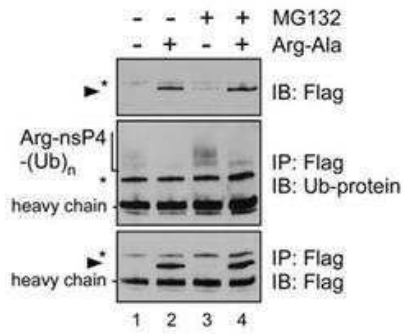
도면11b



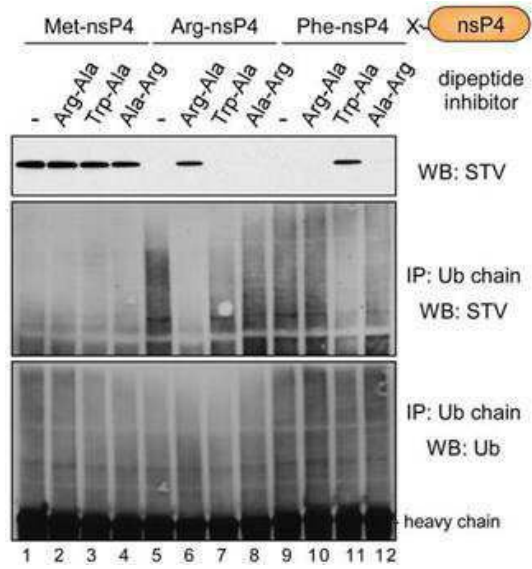
도면11c



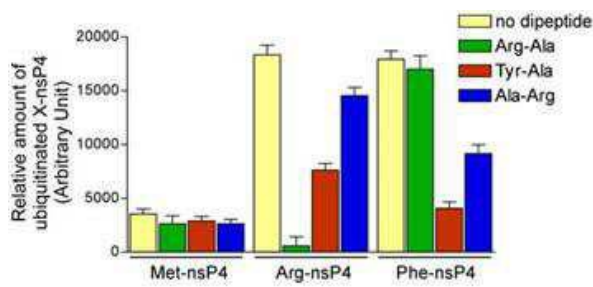
도면11d



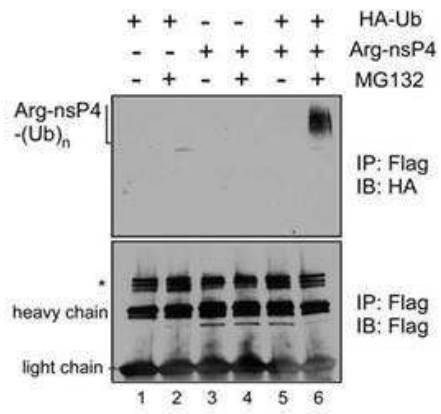
도면11e



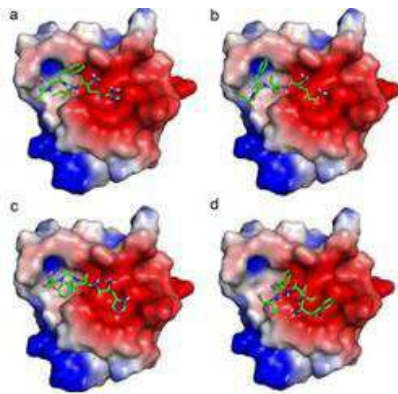
도면11f



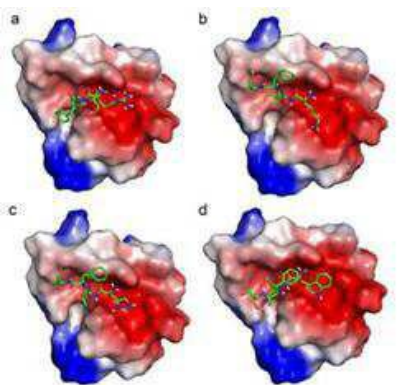
도면11g



도면12a



도면12b



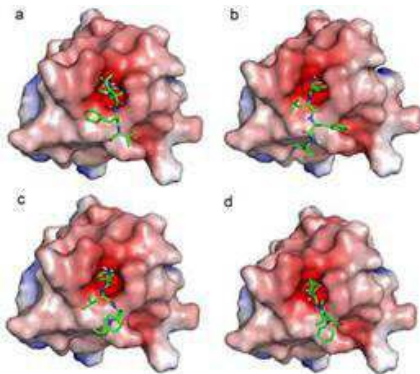
도면12c

| a | Peptides Docking Exp |       |       |
|---|----------------------|-------|-------|
|   | RIFS                 | -8.15 | -6.43 |
|   | KIFS                 | -7.71 | -5.40 |
|   | HIFS                 | -7.29 | -4.68 |
|   | WIFS                 | -3.62 | ND    |

| b | Peptides Docking Exp |       |       |
|---|----------------------|-------|-------|
|   | RIFS                 | -8.07 | -6.30 |
|   | KIFS                 | -6.91 | ND    |
|   | HIFS                 | -5.60 | ND    |
|   | WIFS                 | -3.46 | ND    |

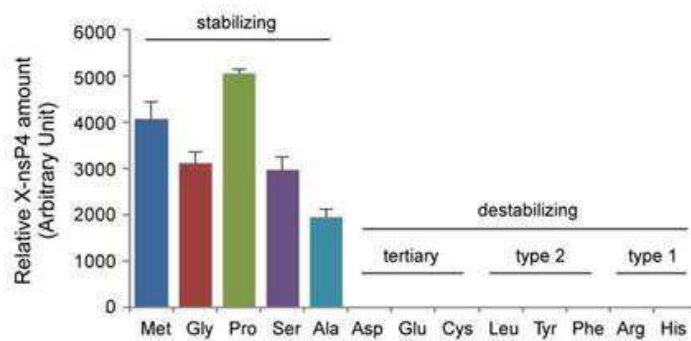
도면12d



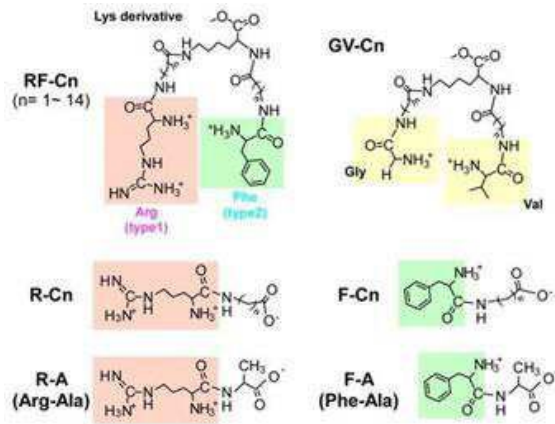
도면12e

| Peptides | Docking | Exp   |
|----------|---------|-------|
| WLFV     | -9.51   | -9.32 |
| FLFV     | -7.76   | -9.25 |
| YLFV     | -7.41   | -8.74 |
| LLFV     | -7.01   | -8.63 |
| RLFV     | -3.10   | ND    |

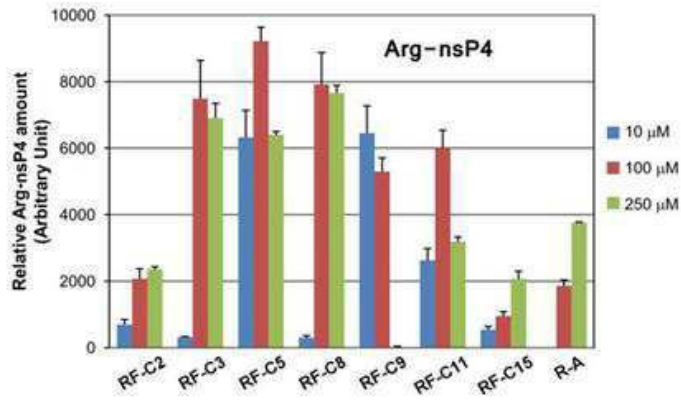
도면12f



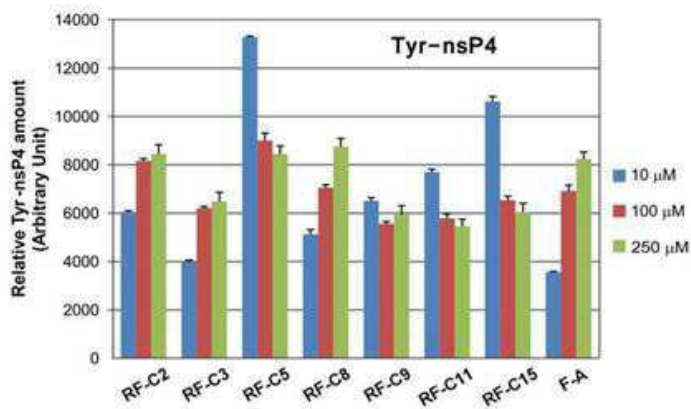
도면13a



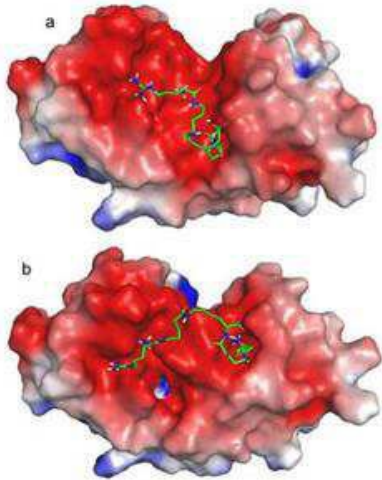
도면13b



도면13c



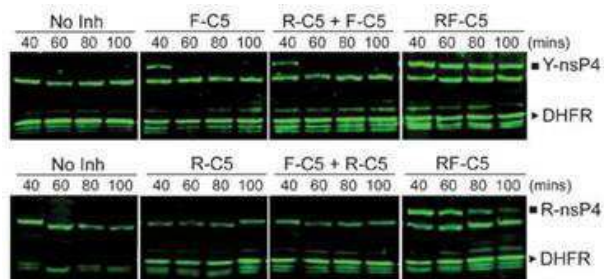
도면13d



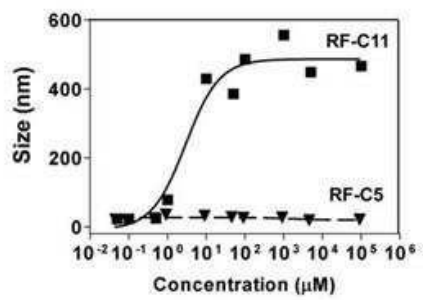
도면13e

| Peptides         | Affinity | $K_d$ |
|------------------|----------|-------|
| Conformation (a) | -8.70    | 0.42  |
| Conformation (b) | -8.83    | 0.33  |

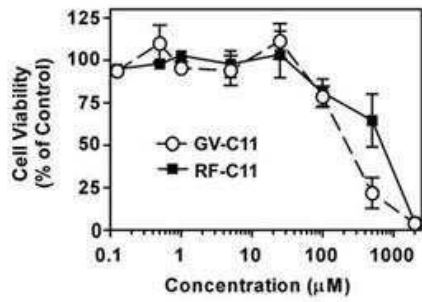
도면13f



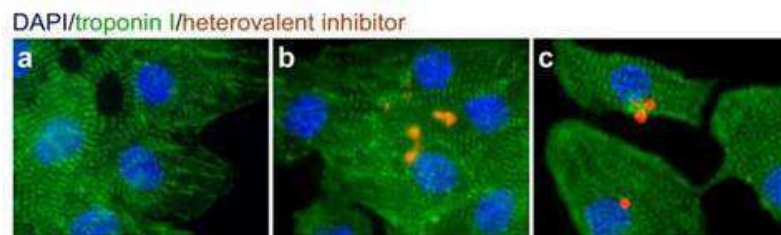
도면14a



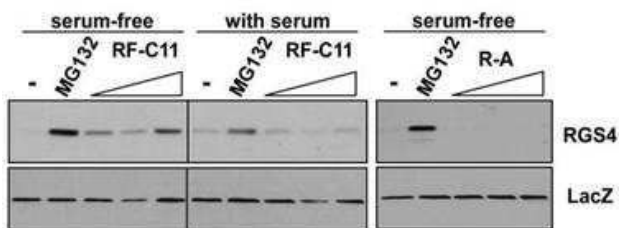
도면14b



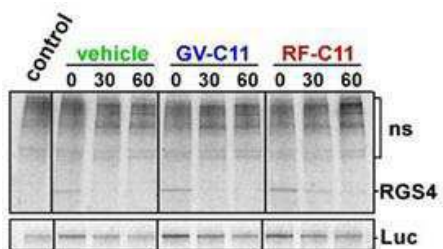
도면14c



도면14d



도면14e



도면14f

