

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 5월 1일 (01.05.2014)



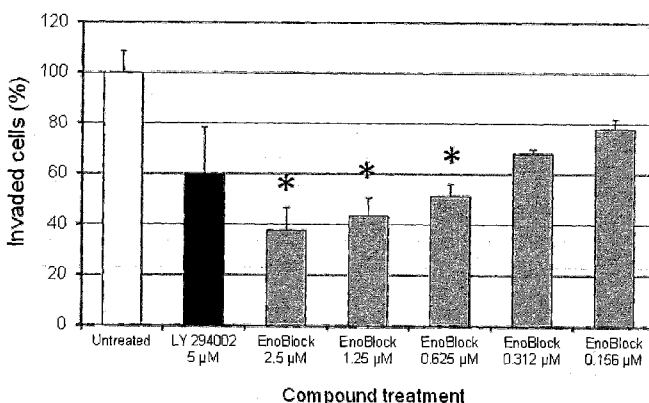
(10) 국제공개번호
WO 2014/065572 A1

- (51) 국제특허분류: A61K 31/53 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
 - (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/009438
 - (22) 국제출원일: 2013년 10월 22일 (22.10.2013)
 - (25) 출원언어: 한국어
 - (26) 공개언어: 한국어
 - (30) 우선권정보: 10-2012-0117417 2012년 10월 22일 (22.10.2012) KR
 - (71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 500-712 광주 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).
 - (72) 발명자: 정다운 (JUNG, Da-Woon); 500-712 광주 북구 첨단과기로 261, 광주과학기술원 국제관 801 호, Gwangju (KR). 김용희 (KIM, Woong-Hee); 500-734 광주 북구 비엔날레로 65, 현대아파트 101 동 806 호, Gwangju (KR). 윌리엄스다런 (WILLIAMS, Darren); 500-712 광주 북구 첨단과기로 261, 광주과학기술원 국제관 801 호, Gwangju (KR).
 - (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 인현동 1659-2, 청동빌딩 301 호, 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, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CANCER, CONTAINING ENOBLOCK AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : ENOblock 을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

Cancer cell invasion assay



(57) Abstract: The present invention relates to ENOblock, which is a non-substrate analogue having an enolase inhibitory activity, and a pharmaceutical composition for preventing or treating cancer or enolase-associated diseases, containing the same. The EN-Oblock of the present invention directly binds to enolase so as to inhibit an activity thereof, and the inhibition is more effective in hypoxia than in normoxia. In addition, the ENOblock of the present invention inhibits migration, metastasis and invasion of cancer cells. Furthermore, the ENOblock of the present invention induces glucose uptake into cells, down-regulates the expression of PEP-CK, and inhibits adipogenesis and foam cell formation. Therefore, a composition containing the ENOblock of the present invention can be very effectively applied to prevent or treat cancer or enolase-associated diseases.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2014/065572 A1



본 발명은 에놀라제 억제 활성을 가지는 비-기질성 유사체(non-substrate analogue)인 ENOblock 및 이를 포함하는 암 또는 에놀라제-관련된 질환(enolase-associated) 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 ENOblock은 에놀라제에 직접적으로 결합하여 이의 활성을 억제하고 이는 정상산소 상태(normoxia)보다 저산소 상태에서 더욱 효과적이다. 또한, 본 발명의 ENOblock은 암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제한다. 한편, 본 발명의 ENOblock은 세포 내 글루코오스 섭취(glucose uptake)를 유도하고 PEPCK 발현을 하향-조절(down-regulation)할 뿐 아니라, 지방세포분화(adipogenesis) 및 거품세포 형성(foam cell formation)을 억제한다. 따라서, 본 발명의 ENOblock을 포함하는 조성물은 암 또는 에놀라제-관련된 질환(enolase-associated) 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 적용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

ENOblock을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 대한민국 교육과학기술부의 지원 하에서 과제번호 NRF-2012-003460에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “일반연구자지원사업/신진연구자지원사업”, 연구과제명은 “당뇨병 치료제 개발을 위한 인슐린양(樣) 작용 저분자 화합물의 탐색과 특성 규명”, 주관기관은 광주과학기술원, 연구기간은 2012.05.01 ~ 2015.04.30이다. 또한, 본 발명은 대한민국 교육과학기술부의 지원 하에서 과제번호 NRF-2012-000462에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “일반연구자지원사업/여성과학자지원사업”, 연구과제명은 “암 미세환경 제어에 의한 새로운 항암 기전 및 항암 표적발굴”, 주관기관은 광주과학기술원, 연구기간은 2012.05.01 ~ 2015.04.30이다. 또한, 본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 A120326에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 “보건의료연구개발사업”, 연구과제명은 “저분자 분화조절제를 이용한 환자 자가유래 iPSCs의 생산과 심근 경색 세포 치료에의 응용”, 주관기관은 광주과학기술원, 연구기간은 2012.08.01~2014.07.31이다.

본 특허출원은 2012년 10월 22일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2012-0117417 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 에놀라제 억제 활성을 가지는 비-기질성 유사체(non-substrate analogue)인 ENOblock 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

30 【배경기술】

에놀라제는 해당과정 경로(glycolysis pathway)의 한 구성요소로,

해당과정에서의 기능과 연관되지 않은 다양한 세포 내 과정들에서 중요한 '부가적 기능(moonlighting)' 을 하는 다양한 기능의 단백질이다. 하지만, 에놀라제 기능을 탐침하는 작은 분자 도구들은 결정학(crystallography) 또는 효소학(enzymology)에 국한되어 왔다. 본 연구에서, 본 발명자들은 에놀라제에 직접 결합하여 이의 활성을 억제하는 최초의 비-기질성(non-substrate) 유사체로 작은 분자인 'ENOblock' 의 발견을 보고한다. ENOblock은 이전에 약물 저항성(drug resistance)을 유도하는 것으로 알려진 저산소 상태(hypoxia)에서 기능하는 세포독성(cytotoxicity) 제제들을 검출하기 위한 암 세포 어세이를 이용한 작은 분자 스크리닝을 통해 동정되었다. 추가적인 분석을 통해, ENOblock은 인 비보에서 암 세포 전이를 억제할 수 있다는 것을 확인하였다. 더 나아가, 글루코오스 항상성에서 에놀라제의 예상치 못한 기능이 인 비보 분석에 의해 확인되었다. 따라서, ENOblock은 생물학적 어세이에 적합한 최초로 보고된 에놀라제 억제제이며 암 및 당뇨병의 약물 개발을 위한 매력적인 분자이다.

해당과정은 하나의 글루코오스 분자를 2개의 피루베이트로 전환시키는 진화적으로 매우 잘 보존된 대사 경로이다. 자유 에너지가 방출되어 고-에너지를 함유하는 분자인 ATP(adenosine triphosphate) 및 환원된 NADH(nicotinamide adenine dinucleotide)를 형성하는 데 이용된다. 해당과정은 10개의 생화학적 반응들로 구성되고 각 단계는 다른 효소에 의해 촉매되어 조절된다. 지난 20년 동안, 해당과정에 관여하는 효소들의 다양한 세포 과정들에서 기능하는 복합 기능들에 대한 놀라운 이해가 있었다(1).

암 세포는 와버그 효과(Warburg effect)로 알려진 현상인 ATP를 생산하기 위해 증가된 해당과정을 나타낸다(2). 상기 대사적 변형은 암 세포와 정상 세포 간의 기본적인 차이로, 이는 해당과정 억제제들을 이용한 암 세포의 선택적 사멸에 대한 치료 전략을 제공한다(3). 또한, 해당과정 억제제들은 형성된 종양에서 발생하는 저산소 환경에서 암 세포 사멸을 보다 효과적으로 유도한다는 사실이 알려져 있다(4). 더욱이, 상술한 저산소 환경은 암 세포가 시타라빈(cytarabine) 및 독소루비신(doxorubicin) 같은 항암제에 덜 민감하도록 만든다(4).

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

5

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 저산소 상태(hypoxia)에서 암 세포 생존을 억제할 수 있는 작은 분자를 분리/동정하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 ENOblock으로 명명한 트리아진계 화합물(triazine compound)이 에놀라제에 직접적으로 결합하여 이의 활성을 정상산소 상태(normoxia)보다 저산소 상태에서 더 효과적으로 억제하며, 상기 화합물은 암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제할 뿐 아니라, 세포 내 글루코오스 섭취(glucose uptake)를 유도하고 PEPCK 발현을 하향-
10 조절(down-regulation)하며 지방세포분화(adipogenesis) 및 거품세포 형성(foam cell formation)을 억제한다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 목적은 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적은 에놀라제-관계된 질환(enolase-associated
20 disorders) 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 목적은 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

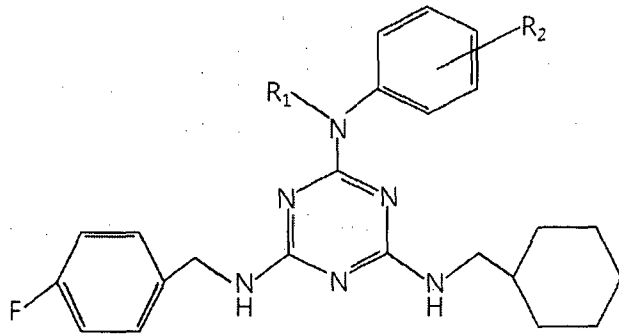
본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

25

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 하기 화학식 I로 표시되는 트리아진(triazine)계 화합물의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적
30 조성물을 제공한다:

화학식 I



상기 화학식에서, R₁은 H 또는 C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; R₂는 H, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올, $-\text{[(CH}_2\text{)}_m\text{-O]}_n\text{-(CH}_2\text{)}_p\text{-NH}_2$ (상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), $-\text{[(CH}_2\text{)}_m\text{-O]}_n\text{-CH}_3$ (상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이다), $-\text{[(CH}_2\text{)}_m\text{-O]}_n\text{-(CH}_2\text{)}_p\text{-CH}_3$ (상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), $-\text{(CH}_2\text{)}_q\text{-(CONH)-C}_{1-5}$ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬 (상기 q는 0-5의 정수이다), $-\text{(CH}_2\text{)}_q\text{-(CONH)-C}_{1-5}$ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올 (상기 q는 0-5의 정수이다), $-\text{(CH}_2\text{)}_q\text{-(CONH)-[(CH}_2\text{)}_m\text{-O]}_n\text{-(CH}_2\text{)}_p\text{-NH}_2$ (상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다), $-\text{(CH}_2\text{)}_q\text{-(CONH)-[(CH}_2\text{)}_m\text{-O]}_n\text{-CH}_3$ (상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다) 또는 $-\text{(CH}_2\text{)}_q\text{-(CONH)-[(CH}_2\text{)}_m\text{-O]}_n\text{-(CH}_2\text{)}_p\text{-CH}_3$ (상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다)이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 조성물을 유효성분으로 포함하는 에놀라제-관계된 질환(enolase-associated disorders) 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명자들은 저산소 상태에서 암 세포 생존을 억제할 수 있는 작은 분자를 분리/동정하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 ENOblock으로 명명한 트리아진계 화합물이 에놀라제에 직접적으로 결합하여 이의 활성을 정상산소 상태보다 저산소 상태에서 더 효과적으로 억제하며, 상기 화합물은 암 세포의 이동, 전이 및 침윤을 억제할 뿐 아니라, 세포 내 글루코오스 섭취를 유도하고 PEPCK 발현을 하향-조절하며 지방세포분화 및 거품세포 형성을 억제한다는 사실을 확인하였다.

본 발명의 유효성분인 AP-III-a4('ENOblock' 으로 명명됨)는 트리아진(triazine)계 화합물로, 384종의 태깅된 트리아진계 화합물을 포함하는 화합물 라이브러리(tagged library)로부터 본 발명자들에 의해 확립된 스크리닝 시스템을 이용하여 저산소 상태에서 암 세포 사멸을 보다 효과적이고 특이적으로 유도하는 작은 분자 화합물로서 동정된 화합물이다. 본 발명에서 사용된 트리아진 화합물 라이브러리의 합성방법 및 이의 용도에 대해서는 국제특허출원 공개공보 WO 03/032903 및 WO 03/050237에 설명되어 있으며, 이들 문헌은 본 명세서에 참조로써 삽입된다.

본 발명의 화학식 I에서 용어 "C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄 알킬" 은 메틸아민, 에틸아민, n-프로필아민, 이소프로필아민, n-부틸아민, sec-부틸아민, tert-부틸아민, n-아밀(amyl), tert-아밀, 헥실 등의 직쇄(straight chain) 또는 가지쇄(branched chain)의 알킬기를 의미한다. 본 명세서에서 화학식 I에서 알킬 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 벤질 알코올, 페네틸 알코올 및 이의 유사체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

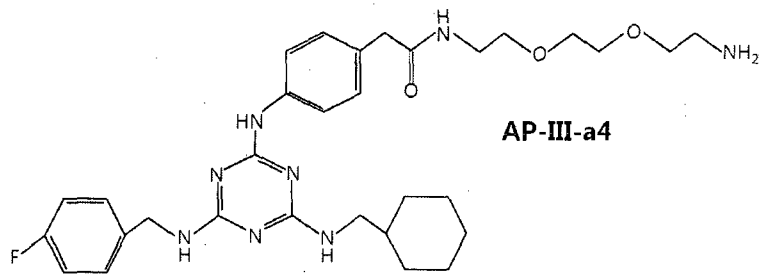
본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I에서 R₁은 H 또는 C₁-C₂ 알킬을 포함하며, 보다 바람직하게는 H를 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 I에서 R₂는 H, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올, -[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), -[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이다), -[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-CH₃(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-C₁₋₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬(상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-C₁₋₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올(상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다) 또는 -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-CH₃(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다)를 포함하고, 보다 바람직하게는, H, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올, -[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-5의 정수이다), -[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기 m 및 n은 각각 1-5의

정수이다), $-(\text{CH}_2)_m\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-CH}_3$ (상기 m , n 및 p 는 각각 1-5의 정수이다), $-(\text{CH}_2)_q\text{-(CONH)-C}_{1-5}$ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬(상기 q 는 0-2의 정수이다), $-(\text{CH}_2)_q\text{-(CONH)-C}_{1-5}$ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올(상기 q 는 0-2의 정수이다), $-(\text{CH}_2)_q\text{-(CONH)-}[(\text{CH}_2)_m\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-NH}_2$ (상기 m , n 및 p 는 각각 1-5의 정수이고, 상기 q 는 0-2의 정수이다), $-(\text{CH}_2)_q\text{-(CONH)-}[(\text{CH}_2)_m\text{-O}]_n\text{-CH}_3$ (상기 m 및 n 은 각각 1-5의 정수이고, 상기 q 는 0-2의 정수이다) 또는 $-(\text{CH}_2)_q\text{-(CONH)-}[(\text{CH}_2)_m\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-CH}_3$ (상기 m , n 및 p 는 각각 1-5의 정수이고, 상기 q 는 0-2의 정수이다)를 포함한다.

본 발명의 보다 바람직한 구현예에 의하면, 상기 화학식 I로 표시되는 트리아진계 화합물은 하기 화학식 II로 표시되는 화합물을 포함한다:

화학식 II



본 발명은 에놀라제에 직접 결합하여 이의 활성을 억제하는 비-기질성 유사체인 작은 분자(ENOblock)에 대한 최초 보고이다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 ENOblock은 정상산소 상태 또는 저산소 상태에서 에놀라제의 활성을 투여량-의존적으로 특이적으로 억제하였으며, 이를 통해 암 세포 이동, 전이 및 침윤을 억제하였다(참고: 도 1 내지 도 3). 상술한 효과는 저산소 상태에서 더욱 우수한 효능을 발휘하였다. 따라서, 본 발명의 ENOblock은 에놀라제 활성 억제를 통해 암 또는 에놀라제-관련된 질환 치료제로 효과적으로 적용될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 에놀라제의 활성을 억제하고 암 세포의 이동(migration), 침윤(invasion) 및 전이(metastasis)를 억제한다. 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 ENOblock에 의한 상술한 억제 효과는 정상산소

상태(normoxia)보다 저산소 상태(hypoxia)에서 더욱 촉진된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 아팍토시스-유도성 단백질(apoptosis-inducible proteins)의 발현을 감소시키고, 보다 바람직하게는 AKT 또는 Bcl-xL 단백질의 발현을 5 감소시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 암은 뇌암, 신경 내분비 암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 부신암, 10 대장암, 결장암, 자궁경부암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 구성된 군으로부터 선택되는 암을 포함한다.

상술한 암의 증후는 유방 소피, 유두 변화, 유방 낭종, 유방 고통, 죽음, 몸무게 감소, 허약, 과도한 피로, 섭취 및 숨쉬기의 어려움, 식욕 감퇴, 만성 재채기, 각혈, 혈뇨, 혈변, 멀미, 구토, 간 전이, 폐 전이, 골 전이, 대장 전이, 방광 전이, 신장 전이, 췌장 전이, 복부팽만(abdominal 15 distension), 더부룩함, 복강 내 액체, 질출혈, 변비, 대장천공, 급성 복막염, 고통, 과도한 땀흘림, 열, 고혈압, 빈혈, 설사, 황달, 어지러움, 오한 또는 근육 경련을 포함한다.

본 명세서의 용어 “에놀라제-관련된 질환(enolase-associated disorders)”은 에놀라제의 과다발현(overexpression)이 유도되는 질환으로, 20 보다 바람직하게는 정상산소 상태보다는 저산소 상태에서 유도되는 질환을 의미하며, 예를 들어 암(cancers), 자가면역질환(autoimmune disorders), 허혈(ischemia) 및 박테리아 감염을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

한편, 본 발명의 조성물은 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물로서도 25 이용될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 인슐린 모방 활성(insulin-mimicking activity)을 가진다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에 의한 상술한 인슐린 모방 활성은 세포 내 글루코오스 섭취(glucose uptake)를 30 촉진시키는 것을 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 포도당

신생합성(gluconeogenesis)에 중요 단백질인 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 발현을 하향-조절(down-regulation)시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 지방세포분화(adipogenesis) 및 거품세포 형성(foam cell formation)을 억제한다.

본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 트리아진계 화합물의 효능 또는 활성(예컨대, 항-암제, 항-당뇨병제, 등)을 달성하는데 충분한 양을 의미한다.

본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-100 mg/kg(체중)이다.

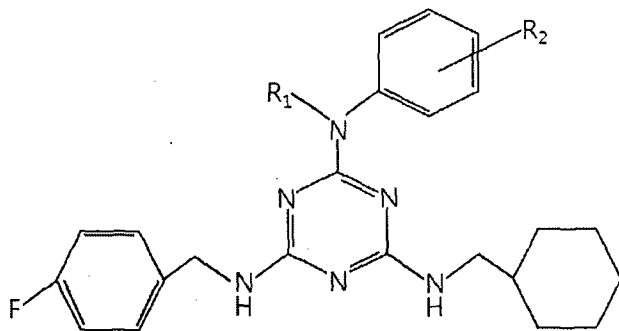
본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.

본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 화학식 I의 트리아진 계열 화합물의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 하기 화학식 I로 표시되는 트리아진(triazine)계 화합물의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다:

화학식 I



상기 화학식에서, R₁은 H 또는 C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; R₂는 H, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올, -[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), -[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이다), -[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-CH₃(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-C₁₋₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬(상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-C₁₋₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올(상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다) 또는 -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-CH₃(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고,

상기 q는 0-5의 정수이다)이다.

본 발명의 방법은 상술한 조성물을 이용하기 때문에, 이 둘 사이의 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 회피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

5

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 에놀라제 억제 활성을 가지는 비-기질성 유사체(non-substrate analogue)인 ENOblock 및 이를 포함하는 암 또는 에놀라제-
10 관련된 질환(enolase-associated) 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

(b) 본 발명의 ENOblock은 에놀라제에 직접적으로 결합하여 이의 활성을 억제하고 이는 정상산소 상태(normoxia)보다 저산소 상태에서 더욱
15 효과적이다.

(c) 또한, 본 발명의 ENOblock은 암 세포의 이동(migration), 전이(metastasis) 및 침윤(invasion)을 억제한다.

(d) 한편, 본 발명의 ENOblock은 세포 내 글루코오스 섭취(glucose uptake)를 유도하고 PEPCK 발현을 하향-조절(down-regulation)한다.

(e) 또한, 본 발명의 ENOblock은 지방세포분화(adipogenesis) 및
20 거품세포 형성(foam cell formation)을 억제한다.

(f) 따라서, 본 발명의 ENOblock을 포함하는 조성물은 암 또는 에놀라제-관련된 질환(enolase-associated) 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 적용될 수 있다.

25 【도면의 간단한 설명】

도 1은 AP-III-a4 화합물(ENOblock)의 발견을 보여주는 도면이다. 도 1a는 저산소 상태(hypoxia) 하에서 효과적인 아팜토시스 유도인자들을
30 검출하기 위해 이용된 스크리닝 시스템을 도식적으로 보여준다. HCT116 암 세포들이 평행 96-웰 배양 플레이트들에 분주되었다. 저산소 상태는 150 mM 코발트 클로라이드(CoCl_2) 처리를 통해 하나의 플레이트에서 유도하였다. 트리아진 화합물 라이브러리(5 mM)이 4시간 후에 첨가되고 세포 사멸은

저산소 상태 유도 후 24시간 쯤에 조사하였다. ‘히트(Hit)’ 화합물들은 정상산소 상태(normoxia)와 비교하여 저산소 상태에서 25% 또는 그 이상의 세포 사멸을 유도하였다(MTT 어세이 흡광도로서 측정되었음). 도 1b는 본원발명의 AP-III-a4(ENOblock), 대조군 화합물인 AP-IV-e3 및 AP-I-f10, GAPDH를 타겟팅하는 GAPDS, 그리고 잘-알려진 항-당뇨병 약물인 로지글리타존의 화학적 구조를 보여주는 도면이다. 도 1c는 정상산소 상태(Norm)와 비교하여 저산소 상태(Hypox)에서 ENOblock가 HCT116 대장암 세포 사멸을 현저하게 유도한다는 것을 보여주는 결과이다. 약어: 오차(error) = 표준편차(SD); *, 정상산소 상태와 비교하여 증가된 세포 사멸을 나타내는 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값(variable)에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: hypox 10 = 1.23×10^{-6} ; hypox 5 = 2.38×10^{-6} ; hypox 2.5 = 1.16×10^{-5} ; hypox 1.25 = 0.000334. 도 1d는 정상산소 상태 또는 저산소 상태로 처리된 HCT116 대장암 세포들의 대표적인 위상차 현미경 이미지를 보여주는 결과이다.

도 2는 HCT116 암 세포에 150 μ M CoCl_2 의 4시간 처리가 저산소 상태를 유발한다는 것을 의미하는 결과로, 저산소 상태-반응성 유전자인 에놀라제의 증가된 발현을 보여준다. 이와 대조적으로, 해당과정 경로에 포함된 다른 단백질인 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)는 이전 보고들(예컨대, Said, *et al.*, BMC Mol Biol. 8: 55(2007))과 일치하게도 저산소 상태가 유도된 후에도 증가된 발현을 나타내지 않았다. 빨간색 숫자는 밀도계측 분석(densitometry analysis)을 통해 계산된 발현의 배수-변화(fold-change)를 지시한다.

도 3은 AP 링커 라이브러리(AP linker library)의 합성을 개략적으로 나타내는 도면이다. 도 3a는 직교 합성 시약 및 조건에 대한 통상적인 도식을 보여준다. 반응조건: (a) R_1NH_2 또는 $\text{R}_1\text{NH}_2\text{OH}$ (5당량), THF에 녹여진 2% 아세트산, 상온, 1시간; $\text{NaB(OAc)}_3\text{H}$ (7당량), 상온, 12시간; (b) THF에 녹여진 빌딩 블록(Building block) II(4당량), 60°C, 1시간, DIEA(*n,n*-diisopropylethylamine); (c) $\text{R}_2\text{R}_3'\text{NH}$, DIEA, NMP:*n*-BuOH=1:1, 120°C, 3시간; 및 (d) 디클로로메탄(dichloromethane)에 녹여진 10% TFA(trifluoroacetic acid), 30분. 도 3b는 링커(Linker)를 나타낸다. 도 3c는 빌딩 블록 I의 구축을 위해 이용된 아민류 및 아미노 알코올류를

보여주는 결과이다. 도 1d는 빌딩 블록 III의 구축을 위해 이용된 아민류를 보여주는 결과이다.

도 4는 본원발명의 AP-III-a4 화합물(ENOblock)이 에놀라제의 직접적인 억제제라는 것을 나타내는 결과이다. 도 4a는 HCT116 암 세포에서 ENOblock에 대한 친화성 크로마토그래피 연구 결과를 보여준다. 'a' 및 'b' 로 지시된 단백질 밴드들은 질량분석을 통해 에놀라제의 헤테로다이머의 서브유닛들로 동정되었다. 이와 대조적으로, ENOblock 친화성 매트릭스로부터 얻어진 용출액 내 다른 뚜렷한 단백질 밴드들은 질량분석(mass spectrometry)을 통해 동정할 수 없었다. 대조군 매트릭스 = HCT116 용해물 단백질들에 결합하지 않았던 AP-IV-e3(2) 친화성 매트릭스. 도 4b는 에놀라제 모노머 서브유닛의 서열을 보여준다. 동정된 펩타이드는 빨간색으로 제시된다. 100 이상의 마스코트 스코어(Mascot scores)는 유의한 것으로 간주된다. 도 4c는 HCT116 암 세포 용해물 내 에놀라제가 ENOblock 친화성 매트릭스에 결합한다는 것을 확인시켜 주는 웨스턴 블랏 분석이다. 경쟁인자로 프리(free) ENOblock(ENO 약자로 표기됨)을 이용한 경쟁 분석은 ENOblock 친화성 매트릭스에 대한 에놀라제 결합을 완벽하게 억제하였다. YD-10B 구강 암 세포 또는 Huh7 간세포(hepatocytes)로부터 유래한 세포 용해물(20 μ g)은 양성 대조군으로서 이용하였다. 도 4d는 정제된 인간 에놀라제가 ENOblock 친화성 매트릭스에 결합한다는 것을 보여주는 웨스턴 블랏 분석이다. 경쟁인자로 프리 ENOblock을 이용한 경쟁 분석은 ENOblock 친화성 매트릭스에 대한 정제된 에놀라제 결합을 완벽하게 억제하였다. 이와 대조적으로, 대조군인 AP-IV-e3 화합물 친화성 매트릭스는 정제된 에놀라제에 결합할 수 없었다. 양성 대조군으로서, ENOblock 친화성 매트릭스는 HCT116 세포 용해물(200 μ g)과 반응시켰다. HCT116 암 세포로부터 얻어진 세포 용해물(50 μ g)은 에놀라제 항체에 대한 양성 대조군으로서 이용하였다. 도 4e는 ENOblock이 정제된 에놀라제의 활성을 투여량-의존적으로 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. ENOblock은 잘-알려진 에놀라제 억제제인 NAF보다 현저하게 더 낮은 농도에서 에놀라제 활성을 억제하였고, 2.5 μ M의 ENOblock 처리는 1 mM의 NaF 처리와 유사한 레벨로 에놀라제 활성을 감소시켰다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *,

비처리된 그룹과 비교한 P 값 < 0.05 . 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: 플루오라이드 0.5 mM = 0.007708; 플루오라이드 1 mM = 0.000543; 플루오라이드 2 mM = 0.000376; EnoBlock 2.5 μ M = 0.000527; EnoBlock 5 μ M = 0.000474; EnoBlock 10 μ M = 0.000335.

5 도 5는 ENOblock 동정에 이용된 동일한 트리아진 화합물 라이브러리로부터 얻어진 '비-히트(non-hit)' 화합물인 AP-I-f10가 에놀라제 활성을 현저하게 억제하지 않는다는 것을 보여주는 결과이다. ENOblock은 양성 대조군으로서 이용하였다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 비-처리된 그룹과 비교하여 P 값 < 0.05 .

10 도 6은 HCT116 암 세포에서 에놀라제 발현의 siRNA-매개된 핵-다운이 저산소 상태에 대한 민감성(susceptibility)을 증가시킨다는 것을 보여주는 결과이다. 세포에 에놀라제(ENO1) siRNA 또는 음성 대조군인 2개의 siRNA를 다양한 농도로 처리하였다: 음성대조군 siRNAs; (a) 80 pmols의 스크램블(scrambled) siRNA 또는 (b) 80 pmols의 p57(cyclin dependent
15 kinase inhibitor) siRNA. 24시간의 siRNA 트랜스펙션 후, 세포들은 10^4 세포/웰의 밀도로 96-웰 배양 플레이트로 옮겨 정상산소 상태 또는 150 mM CoCl_2 처리에 의해 유도된 저산소 상태에서 24시간 동안 배양시켰다. 세포독성은 24시간 후에 MTT 어세이로 평가하였다. 증가하는 농도의 ENO1 siRNA는 저산소 상태 하에서 투여량-의존적으로 암 세포 사멸을 유도하였다.
20 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 정상산소 상태와 비교하여 저산소 상태 하의 증가된 세포독성 결과에 대한 P 값 < 0.05 . 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: 저산소 상태 하의 에놀라제(40 pmols) = 0.00990; 저산소 상태 하의 에놀라제(60 pmols) = 3.32×10^{-6} ; 저산소 상태 하의 에놀라제(80 pmols) = 1.43×10^{-8} .

25 도 7은 ENOblock가 암 세포 침윤(invasion) 및 이동(migration)을 억제할 수 있다는 것을 보여주는 결과이다. 도 7a은 정상산소 상태에서 HCT116 암 세포들에 ENOblock의 처리는 투여량-의존적으로 침윤을 억제한다는 결과를 나타낸다. ENOblock 처리는 이전에 알려진 침윤에 대한 작은 분자 억제제인 LY294002(포스포이노시티드 3-키나제 시그널링의
30 억제)보다 훨씬 더 효과적으로 세포 침윤을 억제하였다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 비처리된 그룹과 비교한 P 값 < 0.05 . 각각 유의한

변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: EnoBlock 2.5 μM = 0.0191; EnoBlock 1.25 μM = 0.0286; EnoBlock 0.625 μM = 0.0481. 도 7b는 트랜스웰 인서트(transwell inserts)에 침투된 크리스탈 바이올렛(crystal violet)-염색된 HCT116 세포들의 현미경 이미지들을 나타낸다[축척
 5 막대(scale bar) = 100 μm]. 도 7c는 정상산소 상태에서 HCT116 암 세포들에 대한 ENOblock의 처리가 투여량-의존적으로 세포 이동을 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 세포 침윤과 유사하게도, 세포 이동을 억제함에 있어 ENOblock은 LY294002보다 더욱 효과적이었다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 비처리된 그룹과 비교한 P 값 < 0.05. 각각 유의한
 10 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: EnoBlock 2.5 μM = 0.00939. 도 7d는 트랜스웰 인서트(transwell inserts)로 이동된 크리스탈 바이올렛-염색된 HCT116 세포들의 현미경 이미지들을 나타낸다(축척 막대 = 100 μm). 도 3e는 ENOblock treatment of HCT116 암 세포에 대한 ENOblock의 처리는 항-튜블린(antitubulin) 화학치료제인 탁솔(taxol) 및
 15 빈크리스틴(vincristine)에 대한 민감성을 증가시켰다는 것을 보여주는 결과이다. 10 mM ENOblock의 존재 또는 부존재 하에서 세포에 10 nM 탁솔 및 10 nM 빈크리스틴을 처리하였다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 그래프에 지시된 그룹들 간의 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: ENOblock+탁솔과 비교된 탁솔 = 2.55×10^{-6} ;
 20 EnoBlock+빈크리스틴과 비교된 빈크리스틴 = 0.000304. 도 7f는 ENOblock treatment of HCT116 암 세포에 대한 ENOblock의 처리가 아팍토시스의 음성 조절자들인 AKT 및 Bcl-X1의 발현을 감소시켰다는 것을 보여주는 결과이다. AKT 웨스턴 블랏 분석을 위해, 세포에 ENOblock을 24시간 동안 처리하였고; Bcl-X1 웨스턴 블랏 분석을 위해, 세포에 ENOblock을 48시간 동안
 25 처리하였다.

도 8은 AP-I-f10 화합물(10 μM)의 처리가 HCT116 암 세포 침윤을 감소시키지 않는다는 것을 나타내는 크리스탈 바이올렛-염색된 트랜스웰 인서트의 사진을 보여주는 결과이다. LY294002(5 μM)의 처리는 양성 대조군으로 이용되었으며, 침윤된 암 세포들에서 현저한 감소를 나타냈다.

30 도 9는 ENOblock의 독성 연구(toxicological study) 및 항-암 활성에 대한 인 비보 분석 결과를 보여준다. 도 9a는 제브라피쉬 치어

시스템(zebrafish larvae system)을 이용한 ENOblock 처리의 독성 분석 결과이다. 다양한 발생학적 변수(developmental parameters)의 측정을 통해, 10 μ M ENOblock 투여량은 치어에 해롭지 않으나, 20 μ M ENOblock 투여량은 제브라피쉬의 수영 능력을 억제한다는 것을 확인하였다. 도 9b는 증가하는 ENOblock 투여량에 따른 수정 후 72일 째(72 days post fertilization, 72 dfp) 제브라피쉬 치어의 현미경 관찰 결과를 보여준다. 그 결과, 20 μ M ENOblock의 투여량은 비정상적으로 큰 부레(swim bladder; 빨간색 화살표)를 발생시킨다는 것을 관찰할 수 있었다. 40 μ M ENOblock의 투여량은 치어에서 수많은 비정상적 표현형을 발생시켰다. 도 9c는 20 μ M 또는 40 μ M ENOblock의 투여량도 전체적으로 제브라피쉬의 치어 생존율(larvae viability)을 감소시킨 반면에, 10 μ M ENOblock의 투여량은 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주는 결과이다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, DMSO-처리된 그룹과 비교하여 생존율의 변화에 대한 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: 20 μ M ENOblock = 0.0121; 40 μ M ENOblock = 0.0019. 도 9d는 HCT116-이종이식된 제브라피쉬에 xenotransplanted zebrafish with a dose of 10 μ M ENOblock의 96시간 처리가 난황 주머니 주입 위치로부터 이동 및 전이(광범위한 암 세포들)을 나타내는 배아들의 수를 감소시킨다는 것을 보여주는 결과이다. DMSO 처리는 대조군으로 이용하였다. 3개의 대표적인 배아들이 각 실험 그룹으로부터 보여지고 광범위한 암 세포 병소들(foci)이 파란색 화살표들로 제시된다. 이종이식된 암 세포 미세병소들의 정량을 통해, 본 발명자들은 ENOblock 처리가 암 세포 이동 및 전이를 현저하게 감소시켰다는 것을 확인하였다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, DMSO-처리된 그룹과 비교하여 항-전이의 효과에 대한 P 값 < 0.05.

도 10은 ENOblock은 글루코오스 섭취를 유도하고 PEPCK 발현을 억제한다는 것을 의미하는 결과이다. 도 10a는 Huh7 간세포 또는 HEK 신장 세포에 10 μ M ENOblock(약어로 ENO)의 24시간 처리가 형광성 글루코오스 프로브인 2-NBDG를 이용하여 측정된 바와 같이 글루코오스 섭취(glucose uptake)를 유도한다는 것을 보여주는 결과이다. 해당과정 효소인 GAPDH의 작은 분자 조절자인 GAPDS(10 μ M)의 24시간 처리도 간세포에서 글루코오스 섭취를 유도할 수 있었다. 이와 대조적으로, 잘-알려진 항-당뇨병 약물인

로지글리타존(약어로 ROSI; 10 μ M)의 24시간 처리는 간세포에서
 글루코오스 섭취를 유도할 수 있었지만, 신장 세포에서는 글루코오스
 섭취를 유도하지 않았다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 비처리된 그룹과
 비교하여 글루코오스 섭취 결과에 대한 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값에
 5 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: 간세포의 경우, ROSI = 0.0227; GAPDS =
 0.0302; ENO = 0.0213; 신장 세포의 경우, GAPDS = 0.0231; ENO=0.0271. 도
 10b는 Huh7 간세포에 ENOblock(10 μ M)의 24시간 처리는 포도당
 신생합성(gluconeogenesis)의 핵심 양성 조절자인 PEPCK의 발현을
 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 10 μ M 로지글리타존의 24시간 처리도
 10 PEPCK 발현을 억제할 수 있었다. 하지만, 10 μ M GAPDS의 24시간 처리는
 PEPCK 발현을 억제하지 않았다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 약물-
 처리되지 않은 그룹(DMSO-처리된 그룹)과 비교하여 PEPCK 발현 결과에 대한
 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다:
 15 GAPDS = 0.00213; ENO = 0.00466. 도 10c는 HEK 세포에 BNOblock(10 μ M)의
 24시간 처리가 PEPCK의 발현을 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 이와
 대조적으로, 10 μ M GAPDS, 1 μ g/mL 인슐린(약어로 Ins) 또는 10 μ M
 로지글리타존의 24시간 처리는 PEPCK 발현을 감소시키지 않았다. 약어:
 오차 = 표준편차(SD); *, 약물-처리되지 않은 그룹(DMSO-처리된 그룹)과
 비교하여 PEPCK의 증가된 발현 결과에 대한 P 값 < 0.05. 각각 유의한
 20 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: ENO = 0.000393. 도 10d는
 간세포에 BNOblock(10 μ M)의 24시간 처리가 포도당 신생합성을 조절하는
 다른 효소인 G6Pase(glucose 6-phosphatase) 또는 세포 내 에너지 항상성을
 조절하는 AMPK(5' AMP-activated protein kinase)의 발현에 영향을 미치지
 않는다는 것을 보여주는 결과이다. 유사하게도, 10 μ M GAPDS 또는 10 μ M
 25 rosiglitazone의 24시간 처리도 상술한 효소들의 발현에 영향을 미치지
 않았다. 약어: 오차 = 표준편차(SD).

도 11는 간세포 또는 신장 세포에서 에놀라제 발현의 siRNA-매개된
 녀-다운은 글루코오스 섭취를 유도한다는 결과로, 형광성 글루코오스
 프로브인 2-NBDG의 증가하는 표지로 확인할 수 있다. 세포에 에놀라제(ENO1)
 30 siRNA 또는 음성 대조군인 2개의 siRNA를 다양한 농도로 처리하였다:
 음성대조군 siRNAs; (a) 80 pmols의 스크램블(scrambled) siRNA 또는 (b) 80

pmols의 p57(cyclin dependent kinase inhibitor) siRNA. 24시간의 siRNA 트랜스펙션 후, 세포들은 10^4 세포/웰의 밀도로 96-웰 배양 플레이트로 옮겨 100 μ M 2-NBDG를 30분 동안 처리하였다. 이후, 2-NBDG 형광 측정은 본 명세서의 실험방법에 기재된 바와 같이 실시하였다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 스크램블 siRNA-처리된 세포와 비교하여 증가된 글루코오스 섭취 결과에 대한 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: (a) 신장 세포의 경우, i) 에놀라제(40 pmols) = 1.83×10^{-5} , ii) 에놀라제(60 pmols) = 1.76×10^{-6} , iii) 에놀라제(80 pmols) = 5.1×10^{-6} ; (b) 간세포의 경우, I) 에놀라제(40 pmols) = 2.42×10^{-5} , ii) 에놀라제(60 pmols) = 0.00264, iii) 에놀라제(80 pmols) = 0.00239.

도 12는 ENOblock이 인 비/보에서 PEPCK 발현을 억제하고 글루코오스 섭취를 유도할 수 있다는 것을 보여주는 결과이다. 도 12a는 제브라피쉬에서 PEPCK 발현 상에 ENOblock 처리의 효과를 측정하기 위한 본 발명자들의 접근방법을 도식적으로 보여주는 도면이다. 도 12b는 ENOblock(10 μ M)의 3시간 처리가 제브라피쉬 성어의 간 조직에서 PEPCK 발현을 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 간세포에서 PEPCK 발현을 억제하였던 로지글리타존(10 μ M)의 3시간 처리도 제브라피쉬 간 조직에서 PEPCK 발현을 억제한다는 것을 나타내는 결과이다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 비-처리된 그룹과 비교하여 PEPCK 발현 결과에 대한 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: ROSI = 0.00310; ENO = 5.02×10^{-5} . 도 12c는 제브라피쉬 치어(larvae)에서 형광-태깅된 글루코오스 바이오프로브(2-NBDG)의 섭취 상에 ENOblock 처리의 효과를 측정하기 위한 본 발명자들의 접근방법(치어의 투명성으로 인해 용이하게 관찰할 수 있음)을 도식적으로 보여주는 도면이다. 도 12d는 ENOblock(10 μ M)의 4시간 처리가 제브라피쉬 치어에서 글루코오스 섭취를 증대시킨다는 것을 보여주는 결과이다. 증가된 글루코오스 섭취는 발달하는 배아, 특히 눈(하얀색 화살표), 소장(intestine) 및 난황 주머니를 통해 관찰될 수 있다. 비교군으로서, 글루코오스 섭취를 촉진하는 알려진 항-당뇨병 천연산물인 에모딘(10 μ g/mL)이 처리된 제브라피쉬도 ENOblock이 처리된 제브라피쉬의 패턴과 유사하지만 더욱 강한 패턴으로 글루코오스 섭취를 증가시켰다. 도 12e는 치어 단계에서 수많은 글루코오스

트랜스포터들을 발현하는 72 hpf 제브라피쉬 치어의 눈에서 형광성 글루코오스 프로브인 2-NBDG로부터 발생한 형광 시그널 강도의 정량 결과를 보여주는 그래프이다. 10 μ M ENOblock 또는 10 μ g/mL 에모딘이 4시간 동안 투여된 제브라피쉬 치어는 제브라피쉬 눈에서 현저하게 큰 형광-태깅된 글루코오스 섭취를 유도하였다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 2-NBDG 단독-처리된 제브라피쉬와 비교하여 측정된 형광 강도 결과에 대한 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: NBDG+ENOblock = 0.0252; NBDG+에모딘 = 0.0203.

도 13은 72 hpf 제브라피쉬에 ENOblock(10 μ M)의 1시간 처리가 글루코오스 섭취를 유도한다는 것을 보여주는 결과로, 용해된 치어에서 2-NBDG 시그널을 형광 판독기(fluorescent plate reader)를 이용하여 측정하였다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, NBDG 단독-처리된 그룹과 비교하여 증가된 형광 검출 결과에 대한 P 값 < 0.05.

도 14는 ENOblock이 지방세포분화(adipogenesis) 및 거품세포 형성(foam cell formation)을 억제한다는 것을 의미하는 결과이다. 도 14a(i)는 지방세포분화를 거치는 지방전구세포(pre-adipocytes)의 현미경 분석 결과로, 10 μ M ENOblock의 처리는 Oil Red O 염색의 부재에서 알 수 있듯이 지질 축적(lipid accumulation)을 억제하였다. 이와 대조적으로, 지방세포분화-유도성 인자의 부재 하에서 지방전구세포에 대한 인슐린의 처리는 여전히 지질 축적을 유도하였다. 도 14a(ii)는 ENOblock 처리가 지방세포분화 과정동안 지질 축적을 차단한다는 것을 보여주는 정량 그래프 결과이다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 비-처리된 지방세포(adipocytes)와 비교하여 지질 축적 결과에 대한 P 값 < 0.05. 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: 인슐린 단독 = 0.004793; 지방세포분화성 칵테일(adipogenic cocktail) 단독 = 0.0252. 도 14b는 올레산(oleic acid)이 처리된 대식세포의 현미경 분석 결과로, 10 μ M ENOblock의 처리는 Oil Red O 염색의 감소에서 알 수 있듯이 거품세포 형성을 억제하였다. 도 14c는 지질 축적을 보여주는 세포들의 카운팅에서 알 수 있듯이 ENOblock 처리(10 μ M)가 거품세포 형성을 억제한다는 것을 보여주는 정량 그래프 결과이다. 이와 대조적으로, 거품세포로 발생(development)하는 대식세포에 항-당뇨병 약물인 로지글리타존(10

μM)의 처리는 지질 축적을 보이는 세포들의 수에 영향을 미치지 않았다.
 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 올레산-처리된 지방세포 그룹과 비교하여
 감소된 지질을 포함하는 세포 카운팅 결과에 대한 P 값 < 0.05 . 각각
 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: 올레산+ENOblock =
 5 0.0335. 도 14d는 배양 디쉬에 부착된 세포들의 수를 카운팅을 통해
 단핵구(monocytes)에 대한 ENOblock($10 \mu\text{M}$)의 처리가 대식세포로의
 분화(differentiation)를 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 이와
 대조적으로, 단핵구에 로지글리타존($10 \mu\text{M}$)의 처리는 대식세포로의 분화에
 영향을 미치지 않았다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, PMA-처리된 그룹과
 10 비교하여 부착된 세포의 감소된 수를 카운팅한 결과에 대한 P 값 < 0.05 .
 각각 유의한 변수값에 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: PMA+ENOblock =
 0.0235. 도 14e는 MTT 어세이 분석에서 알 수 있듯이 대식세포에 대한
 ENOblock 처리 효과들이 세포독성에서 기인하지 않는다는 것을 보여주는
 그래프 결과이다. H_2O_2 (3 mM)의 48시간 처리가 양성 대조군으로서
 15 이용되었다. 약어: 오차 = 표준편차(SD); *, 비-처리된 그룹과 비교하여
 감소된 흡광도(570 nm) 결과에 대한 P 값 < 0.05 . 각각 유의한 변수값에
 대한 정확한 P 값은 다음과 같다: $3 \text{ mM H}_2\text{O}_2 = 8.84 \times 10^{-7}$.

도 15는 HEK 신장 세포 및 Huh7 간세포에서 siRNA 처리를 통한
 에놀라제 발현 턱-다운을 보여주는 면역블롯 분석 결과이다. 세포에 80
 20 pmols의 siRNA들을 48시간 동안 트랜스펙션시켰다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

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

실시예

실험방법

30 태깅된 트리아진(tagged triazine) 화합물 라이브러리의 구축

태깅된 트리아진 화합물 라이브러리는 이전에 보고된 과정에 따라

제조되었다(도 1; 5). 합성된 화합물들의 순도는 분석 HPLC(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)로 결정하였다.

5 저산소 상태 하에서 효율성을 유지하는 아폽토시스(apoptosis) 유발인자들에 대한 스크리닝

HCT116 대장 암종 세포들(ATCC)이 웰 당 5×10^3 세포의 밀도로 2세트의 96-웰 플레이트에 분주되었다. 5 mM 글루코오스(Sigma)를 포함하는 ‘저농도 글루코오스(Low glucose)’ DMEM(Invitrogen, OR, USA) 배지가 스크리닝에 이용되었는데, 이는 2-DG(2-Deoxy-D-glucose; Sigma) 같은 10 해당과정 억제제들이 글루코오스와의 경쟁에서 효과적이기 때문이다. 24시간 후, 저산소 상태는 0.22 μm -여과된 150 μM CoCl_2 (Sigma)의 처리를 통해 한 세트의 96-웰 플레이트에서 유도되었고 이전에 기재된 바와 같이(49) 배양 배지의 용량이 50%(웰 당 100 μL)까지 감소되었다. 네 시간 후에 태깅된 트리아진 화합물 라이브러리(5)로부터 테스트 화합물들이 15 2개의 독립적인 웰(duplicate wells)에서 5 μM 의 농도로 스크리닝되었다. 세포독성은 약물 처리 후 24시간 후에 MTT 어세이를 통해 조사하였다. 추가적인 분석을 위한, ‘히트(hit)’는 정상산소 상태(normoxia)와 비교하여 저산소 상태에서 25% 또는 그 이상의 세포독성(MTT 어세이 흡광도로서 측정되었음)을 나타내는 화합물들로 분류되었다. 저산소 20 상태에서 선택적으로 암 세포들을 죽이는 해당과정 억제제인 2-DG(50 μM ; 50)는 양성 대조군으로서 이용하였다.

CoCl_2 처리-유도된 저산소 상태를 검증하기 위해, 에놀라제 발현이 조사되었다. 에놀라제 발현은 저산소 상태에 대한 반응에서 증가하는 것으로 알려져 있다(51). HCT116 암종 세포에 150 μM CoCl_2 의 4시간 동안 25 처리는 에놀라제 발현을 유도하였다(도 2).

에놀라제 활성 어세이

래빗 근육에서 정제된 에놀라제는 Sigma-Aldrich로부터 구매하였다. 30 일 유니트의 에놀라제는 표준 어세이에서 분 당 포스포-D-글라이세레이트(phospho-D-glycerate; Sigma)로부터 1 μmol 의 포스포에놀 피루베이트(phosphoenol pyruvate)를 생산하는 효소의 양으로 정의된다(52).

에놀라제 활성 어세이는 ENOblock 또는 NaF(Sigma)의 부존재 또는 존재 하에서 50 mM 이미다졸(imidazole)-HCl(pH 6.8)(JUNSEI), 2.0 mM MgSO₄(JUNSEI) 및 400 mM KCl(JUNSEI)을 포함하는 완충액에서 정제된 에놀라제(3-9 U)를 37°C에서 반응시킴으로써 실시하였다. 반응은 1 μmol의 2-포스포-D-글라이세레이트(2-phospho-D-glycerate)를 첨가하여 개시하였으며, OD 값은 10분의 반응 시간 후 분광광도계(spectrophotometer; VERSA max, Molecular Devices, USA)를 이용하여 240 nm에서 측정하였다.

10 제브라피쉬 종양 세포 이종이식 모델(xenograft model)

제브라피쉬(Lotte Mart, Gwangju, Republic of Korea)는 표준 프로토콜에 따라 유지되었다(53). 제브라피쉬의 관리 및 처리는 광주과학기술원(한국)의 동물 관리 및 윤리위원회(Animal Care and Ethics Committees)에 의해 확립된 가이드라인에 따라 실시하였다. 제브라피쉬 배아들은 표준 교배 조건을 이용하여 얻어졌으며 세포 이종이식(cell xenoplantation)을 위해 수정 후 48시간 쯤까지 분화되었다. 하기와 같이 암 세포의 염색 후, 배아들은 미세-집계를 이용하여 탈용모화(dechorionization)시키고 0.0016% 트리케인(tricaine; Sigma)으로 마취시킨 후, 1.0% 습식(wet) 아가로오스 패드(Invitrogen) 위에 오른쪽 사이드를 위치시켰다. 종양 세포들은 0.05% 트립신(trypsin)-EDTA(Gibco)로 배양 접시로부터 분리되어 상온에서 두 번에 걸쳐서 PBS(Sigma)로 세척되었다. 세포들은 PBS에 희석된 DiI(2 μg/ml; Invitrogen)로 염색되고 네 번에 걸쳐서 세척되었다: FBS(Invitrogen)로 한 번; PBS로 두 번; 및 PBS에 희석된 FBS(10%)로 한 번. 이후, 세포들은 주입 전에 얼음에 놓았다. 암 세포들은 현미경(OLYMPUS CKX41)에 의해 카운팅되었고, 10% FBS에 재현탁하여 이중 100개의 세포들은 보로실리케이트 글래스 모세관(borosilicate glass capillaries; PV820 pneumatic picopump, World Precision Instruments)이 장착된 주입기를 이용하여 난황주머니(yolk sac)의 중앙으로 주입되었다. 주입된 배아들은 200 mL의 메틸렌 블루가 없는 E3 배지에 희석된 목적 약물을 포함하는 96-웰 플레이트(1개의 배아/웰)에 옮겨 전-선택된 배양 온도에서 유지하였다. 주입 후 4일 쯤에,

주입 위치로부터 암 세포의 파종(dissemination)을 나타내는 배아들의 수가 카운팅되고 업라이트 현미경(Leica DM2500 microscope, Germany)으로 사진을 찍었다. 이동된 세포들의 수가 카운팅되고 난황주머니로부터 5개 이상의 형광 미세초점 거리(microfoci distant)를 보여준 배아들이 세포 5 파종(cell dissemination)으로 스코어링되었다.

제브라피쉬에서 글루코오스 섭취의 측정

수정 후 72시간 짜(72 hpf(hour post fertilization)), 치어(larvae)를 96-웰 플레이트(0.2 mM 2-페닐티오우레아(phenylthiourea; Sigma)가 첨가된 200 μ L의 E3 물을 포함하는 웰 당 6개의 난자)에 위치시켰다. 목적 약물을 1시간 동안 처리하였다. 이후, 상기 용액은 600 μ M 2-NBDG(Invitroge)가 첨가된 E3 물로 대체되어 3시간 동안 반응시켰다. 상기 치어를 E3 물로 세척하고 0.02% 트리케인-보충된 E3 물로 마취시켰다. 한 마리의 치어가 형광현미경(DFC425C 디지털 카메라로 장착된 Leica 15 DM2500 현미경) 관찰을 위해 3% 메틸셀룰로오스(methylcellulose)를 포함하는 E3 물을 포함하는 챔버 슬라이드(chamber slide)에 위치되었다. 이미지들은 50배율로 캡처되었다. 나머지 5마리의 치어들은 120 μ L의 CelLytic M 용액(Sigma-Aldrich) 및 초음파(4°C, 10' / 5' 펄스, 10분)로 용해되었다. 용해된 치어들은 10분 동안 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액(100 μ L)이 96-웰 플레이트로 옮겨진 후, 형광 판독기(fluorescent microplate reader; SpectraMAX Gemini XS, Molecular 20 Devices; λ_{ex} =466 nm, λ_{ex} =540 nm)를 이용하여 형광 측정되었다.

통계 분석

25 실험 그룹 간의 비교를 위한 student's t-검정이 이용되었다(Microsoft Excel). 실시된 모든 테스트에서 0.05 이하의 *p*-값이 통계적으로 유의성을 가지는 것으로 간주하였다. 특별히 언급되지 않는 한, 제시된 모든 결과들은 3개의 독립적인 실험들의 대표적인 예이다.

30 실험결과

AP-III-a4(ENOblock)의 동정

본 발명자들은 저산소 환경에서 암 세포들을 우선적으로 죽이는 분자들을 동정하기 위한 신규한 이중 스크리닝 시스템을 개발하였다(도 1a). 고품 지지체(solid support) 상에 제조된 384개의 트리아진 화합물을 포함하는 하나의 작은 분자 라이브러리가 스크리닝에 이용되었다(5; 도 3).

- 5 ‘히트(hit)’ 분자는 정상상태정상산소 상태와 비교하여 저산소 상태에서 적어도 25% 이상의 암 세포독성(MTT 어세이 흡광도로서 측정되었음)을 나타내는 화합물들(inducer)로 정의되었다. 384개의 트리아진계 화합물들 중 5개의 화합물이 저산소 상태 하에서 우수한 암 세포독성을 나타냈다. 가장 우수한 히트 분자는 AP-III-a4이었다(1; 도 1b). 저산소 상태에서
- 10 배양된 암 세포들에 대한 AP-III-a4 처리는 투여량-의존적으로 세포 생존율을 감소시켰다(도 1c-d).

ENOblock은 에놀라제에 결합하여 이의 활성을 억제한다

- 본 발명자들은 AP-III-a4의 세포 내 타겟을 동정하기 위해 친화성 크로마토그래피(Affinity chromatography)를 이용하였다. 본 연구에서
- 15 이용된 트리아진 화합물 라이브러리에 대한 타겟 동정 전략은 매우 간편한(straightforward) 데, 이는 상기 분자들이 내장성 링커 모이어티(built-in linker moiety)를 포함하기 때문이다. 상기 링커 모이어티는 친화성 매트릭스(affinity matrix)으로의 컨주게이션을
- 20 가능하게 하는 데, 이를 통해 생물학적 활성의 감소될 수 있는 위험을 초래할 수 있다. AP-III-a4 친화성 매트릭스로부터 용출된 단백질들의 실버 염색 결과는 도 4a에 제시된다. 질량분석(Mass spectrometry analysis)을 통해, 약 45 kD의 2개의 단백질 밴드들이 해당과정 효소인 에놀라제의 서브유니트라는 것을 확인하였다(도 4b). 이에, 본 발명자들은 AP-III-a4
- 25 분자를 ‘ENOblock’ 로 재명명하였다. 암 세포 용해물에서 에놀라제에 대한 ENOblock의 결합은 ENOblock 친화성 매트릭스로부터 용출된 단백질들에 대한 웨스턴 블랏 분석으로 다시 확인하였다. 프리(free) ENOblock를 이용한 경쟁 분석은 ENOblock 친화성 매트릭스에 대한 에놀라제 결합을 억제하는 것을 보여주었다(도 4c). 더욱이, ENOblock은 정제된 인간
- 30 에놀라제에 결합할 수 있었는데, 이는 ENOblock과 에놀라제 간의 직접적인 상호작용을 의미한다(도 4d). 이후의 분석을 통해, ENOblock이 투여량-

의존적으로 에놀라제 활성을 억제할 수 있다는 것을 확인하였다(도 4e). 또한, 본 발명자들은 추가적인 대조군으로서 태깅된 트리아진 화합물 라이브리리로부터 얻어진 다른 비-히트 화합물인 AP-I-f10(3)을 테스트하였다. 상기 비-히트 화합물은 에놀라제 활성을 감소시키지 않는 것으로 확인되었다(도 5). 저산소 상태에서 암 세포 생존을 증대시키는 에놀라제의 기능은 siRNA-매개된 에놀라제 발현의 녹-다운(knock-down) HCT116 암 세포에서 재확인하였다(도 6).

ENOblock은 암 세포 이동(migration) 및 침윤(invasion)을 억제한다

10 에놀라제는 고유의 해당과정 기능(6)과 연관되지 않은 많은 기능들을 실행하는 ‘부가적(moonlighting)’ 기능을 하는 대사 단백질이다. 따라서, 본 발명자들은 ENOblock이 에놀라제의 부수적 기능들을 특징화하는 강력한 화학 수단을 의미한다고 추론하였다. 첫 번째 테스트로서, 본 발명자들은 암 세포 성장(progression)에서의 에놀라제의 역할을 조사하였다(도 7). 본 발명자들은 ENOblock에 의한 에놀라제 억제가 암 세포 침윤을 감소시킬 수 있다는 것을 발견하였는 데, 이는 우리의 지식 하에서 에놀라제 활성이 전이(metastasis)와 연결되어 있다는 최초의 확인이었다(도 7a-7b). 또한, 본 발명자들은 추가적인 대조군으로서 태깅된 트리아진 화합물 라이브리리로부터 얻어진 다른 화합물인 AP-I-f10(3)을 테스트하였다. 상기 화합물은 세포 침윤(cell invasion)을 감소시키지 않는 것으로 확인되었다(도 8). 또한, ENOblock 처리는 암 세포 이동을 억제하였다(도 7c-7d). ENOblock 처리는 세포독성을 유발하지 않는 농도에서 정상산소상태에서 암 세포 침윤/이동을 감소시켰다(참조, 도 7a-7b와 도 1c의 비교). 이전의 연구들은 에놀라제 발현의 녹-다운은 항암제인 25 탁솔(taxol) 및 빈크리스틴(vincristine)에 의해 유발된 세포독성을 증가시킬 수 있다는 것을 보고하였다(7). 이와 일치하게도, 본 발명자들은 ENOblock 처리도 탁솔 및 빈크리스틴에 의해 유도된 암 세포독성을 증가시킬 수 있다는 것을 발견하였다(도 7e). 어떻게 ENOblock가 암 세포독성을 유도하는 지를 조사하기 위해, 본 발명자들은 아팍토시스의 유도와 연결된 2개의 단백질 발현(AKT(8) Bcl-xL(9))을 측정하였다. 그 30 결과, ENOblock 처리는 AKT 및 Bcl-xL 단백질의 발현을 감소시켰다(도 7f).

제브라피쉬(*Danio rerio*) 암 세포 이중이식 모델은 인 비보에서 항암제 후보물질의 테스트에 있어서 증가하는 탁월한 연구 성과들을 얻기 위해 이용되는 유효하고 편리한 수단이다(10, 11). 또한, 제브라피쉬는 포유동물에서 독성 효과(toxicological effects)를 예측하기 위한 적절한 척추동물 플랫폼이다(12). 본 발명자들은 발생중인 제브라피쉬 치어에 10 μ M ENOblock를 처리하는 것이 독성이 없음을 확인하였다(도 9a-9c). 최근 공개된 제브라피쉬 종양 이중이식 모델을 이용하는 것이 항-암제 테스트에 유효하였다(10). 본 발명자들은 ENOblock 처리가 암 세포 파종을 감소시킨다는 것을 관찰하였는데, 이는 ENOblock이 암 세포 이동 및 침윤 프로세스를 억제한다는 것을 의미한다(도 9d).

ENOblock은 세포 내 글루코오스 섭취(uptake)를 유도하고 PEPCK 발현을 하향-조절(down-regulation)한다

흥미롭게도, ENOblock(화합물 AP-III-a4)은, 그 활성 기작에 대해 규명하지 않았을 지라도, 글루코오스 섭취의 신규한 조절자를 발견하기 위한 스크리닝을 통해 이전에 동정된 트리아진 화합물들 중 하나였다(13). 따라서, 본 발명자들은 세포 내 글루코오스 흐름(flux)을 모니터링하는 데 이용할 수 있는 형광 프로브인 2-NBDG(2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose; 14)를 이용하여 세포에서 글루코오스 섭취를 증가시키는 ENOblock의 활성을 확인하였다(도 10a). 현재까지, 에놀라제 기능의 조절이 증가된 글루코오스 섭취와 연결되어 있다는 본 발명의 규명은 첫 번째 증명이다. 세포 내 글루코오스 섭취를 촉진하는 에놀라제의 역할은 siRNA-매개된 에놀라제 발현 넉-다운에 의해 재확인되었다(도 11).

ENOblock이 글루코오스 섭취를 촉진시킬 수 있는 기작을 규명하기 위해, 본 발명자들은 글루코오스 항상성과 결합된 핵심 효소의 발현을 조사하였다. 본 발명자들은 ENOblock이 간세포(hepatocytes)에서 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 발현을 하향-조절한다는 것을 확인하였는데, 상기 PEPCK 효소는 간 조직 포도당 신생합성의 속도-제한(rate-limiting) 단계(15)를 촉매하는 효소이다(도 9b). 주지하다시피, GAPDS(4)가 글루코오스 섭취를 촉진하기 위해 GAPDH(glyceraldehyde 3-

phosphate dehydrogenase)를 타겟팅한다(GAPDH는 에놀라제의 업스트림인 해당과정의 6번째 단계를 촉매한다)는 보고(16)와 함께, 해당과정 효소에 대한 작은 분자 조절이 글루코오스 섭취를 조절한다는 선행 발견이 있다. 따라서, 본 발명자들도 GAPDS 또는 PEPCK 발현을 하향-조절할 수 있는 것으로 잘 알려진 당뇨병 제제인 로지글리타존(rosiglitazone; 5)을 처리한 후 간세포에서 PEPCK 발현을 측정하였다(17). 본 발명자들은 로지글리타존이 PEPCK 발현을 하향-조절할 수 있는 반면에 GAPDS는 효과가 없다는 것을 발견하였는데, 이는 GAPDS 및 ENOblock이 다른 세포 내 기작들에 의해 글루코오스 섭취를 촉진한다는 것을 의미한다(도 10b). 흥미롭게도, 본 발명자들은 포도당 신생합성의 위치(18)인 신장에서 ENOblock 처리가 PEPCK 발현을 하향-조절할 수 있다는 것을 확인하였다(도 5c). 이와 대조적으로, 신장 세포에서 GAPDS, 로지글리타존 또는 인슐린의 처리는 PEPCK 발현에 영향을 미치지 않았다(도 10c). G6Pase(glucose 6-phosphatase) 효소는 포도당 신생합성에서 마지막 단계를 촉매하고 간에 의한 글루코오스 섭취의 항상성 조절에서 핵심 기능을 한다(19). 본 발명자들은 간 세포에 대한 ENOblock 처리가 G6Pase 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였으며, 상기 G6Pase 발현은 GAPDS 또는 로지글리타존의 처리 후에도 영향을 받지 않았다(도 10d). AMPK(5' AMP-activated protein kinase) 효소는 세포 내 에너지 항상성에서 핵심 기능을 한다(20). G6Pase와 유사하게도, 본 발명자들은 ENOblock, GAPDS 또는 로지글리타존의 간 세포 처리가 AMPK 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 관찰하였다(도 10d).

ENOblock은 PEPCK 발현을 하향-조절하고 인 비보에서 글루코오스 섭취를 유도한다

글루코오스 항상성에서 ENOblock의 인 비보 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 제브라피쉬를 선택하였는데, 이는 상기 동물 모델이 적은 양의 테스트 화합물을 필요로 하는 편리하고 신속한 실험 포맷을 제공하기 때문이다. 더욱이, 제브라피쉬와 포유동물은 유사한 글루코오스 조절성 반응들을 공유한다고 알려져 왔다(17, 21). ENOblock 또는 로지글리타존으로 처리된 제브라피쉬 성어는 하향-조절된 간 PEPCK 발현을

나타냈으며(도 12a-12b), 이는 본 발명자들의 세포-기반된 발견들을 재확인시켜 주었다. 형광성 글루코오스 프로브인 2-NBDG는 투명하여 2-NBDG 형광의 시각화가 가능한 제브라피쉬 치어(22)에서 글루코오스 섭취를 평가하는 데 이용되어 왔다. 본 발명자들은 ENOblock 처리가 제브라피쉬 치어에서 글루코오스 섭취를 유도한다는 것을 관찰하였다(도 12c-12d). 비교군으로서, 본 발명자들은 세포 내 글루코오스 섭취를 촉진하는 것으로 알려진 식물의 생물학적 활성 성분인 에모딘(6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone; 23)의 효과를 테스트하였다. 2-NBDG-처리된 치어에 대한 형광현미경 분석 결과, 에모딘 처리는 글루코오스 섭취를 증가시켰다(도 12e). 2-NBDG 섭취는 72 hfp에 제브라피쉬 치어의 눈에서 2-NBDG 형광 강도를 측정함으로써 정량화되었는데, 상기 조직이 상기 발달 단계에서 상대적으로 많은 수의 글루코오스 트랜스포터 이소형들(glucose transporter isoforms)을 발현하는 것으로 알려져 있기 때문이다(24). 이미지 J 분석(National Institutes of Health, USA)은 ENOblock 또는 에모딘 처리가 제브라피쉬에서 글루코오스 섭취를 촉진할 수 있다는 것을 확증하였다. 제브라피쉬에서 글루코오스 섭취를 정량화하기 위한 택일적인 접근방법으로서, 용해된 치어에서 2-NBDG 형광 시그널을 형광 판독기를 이용하여 측정하였다(도 13). 상기 접근방법을 통해 조사한 결과들도 ENOblock 처리가 인 비보에서 글루코오스 섭취를 유도한다는 것을 확인시켜 주었다.

ENOblock 처리는 지방세포분화(adipogenesis) 및 거품세포 형성(foam cell formation)을 억제한다

당뇨병 환자에 대한 일반적으로 처방되는 약물들은 체중증가(weight gain) 또는 심혈관계 질환들(cardiovascular events) 같은 부작용들을 초래한다(25). 이에, 본 발명자들은 지방세포 전구세포들의 분화 상에 지질 축적에 대한 ENOblock의 효과를 테스트하였으며, 이는 신규한 항-비만 제제들에 대한 편리한 테스트 방법을 제공한다(26). 지방세포분화 상에 로지글리타존의 양성적 효과는 이미 보고되어 있다(27). 이와 대조적으로, 본 발명자들은 ENOblock 처리가 지방세포형성 인자들(adipogenic factors)에 노출된 지방세포 전구세포들에서 지질 축적을 억제한다는 것을

발견하였다(도 14a). 혈관벽에 부착된 대식세포로부터의 거품세포 분화는 죽상동맥경화증(atherosclerosis)의 진행에 필수적인 단계이다(28). ENOblock 처리는 거품세포 분화를 거치도록 유도된 대식세포에서 지질 축적을 억제하였다(도 14b). 세포 카운팅 결과, ENOblock 처리는

5 대식세포로부터의 거품세포 분화 및 단핵구로부터의 대식세포 분화 모두를 억제하였다(도 14c-14d). 상술한 ENOblock의 억제 효과는 세포독성을 유발하지 않는 처리 농도에서 관찰되었다(도 14e).

추가논의사항

10 본 연구에서, 본 발명자들은 에놀라제에 직접적으로 결합하는 최초의 비-기질성 유도체인 신규한 작은 분자인 ENOblock을 보고하며, 이는 생물학적 시스템에서 에놀라제 활성을 특징지을 수 있는 프로브로서 이용될 수 있다. 에놀라제는 해당과정의 9번째 단계(끝에서 두 번째 단계)인 2-

15 포스포-D-글라이세레이트의 탈수화(dehydration)를 촉매하는 금속이온 효소(metalloenzyme)이다(6). 에놀라제는 포도당 신생합성의 동화 경로의 한 부분으로서 기질들의 환경적 농도에 따라 역반응을 촉매한다(6). 또한, 에놀라제는 고유의 해당과정 상 기능과

20 다양한 기능들을 명확하게 알려주는 작은 분자 수단들은 거의 없다. 가장 널리 보고된 에놀라제 억제제는 PhAH(phosphonoacetoxyamate)이다. PhAH는 반응의 중간산물인 카바니온(carbanion)의 아시-

25 카르복실레이트(aci-carboxylate) 형태를 모방하는 것으로 생각되고 있고, 결정학적 연구들을 위해서만 적용되고 있다(29, 30). 다른 2개의 기질 유사체들(D-tartronate semialdehyde phosphate 및 3-aminoenolpyruvate phosphate)이 개발되었지만, 에놀라제 활성 위치의 직접적인 분광학적 적정

30 및 효소 동력학의 stopped-flow 연구들에만 적용되어 왔다(31, 32). 더욱이, 상술한 기질 유사체들은 상업적으로 유용하지 않다. 또한, 무기 소듐 플루오라이드(sodium fluoride)도 에놀라제에 대한 기질 경쟁자이다. 하지만, 플루오라이드는 포스파타제 억제 및 증가된 산화적 스트레스 또는 혼란된 항-산화 방어 기작들의 유도과 같은 다양한 비-특이적 독성

효과들(33, 34)로 인해 생물학적 시스템에서 에놀라제를 연구하는 데 적합하지 않다. 최근의 한 보고는 말라리아 약물인 메플로퀸(mefloquine)을 기생충(*Schistosoma mansoni*)에서 에놀라제 억제제로 기술하였다(34). 하지만, 메플로퀸은 상기 기생생물로부터 유래된 재조합 에놀라제에
 5 직접적으로 결합할 수 없고 정제된 에놀라제 활성을 억제하지 못 했다. 이는, 본 발명의 ENOblock과는 달리, 메플로퀸이 에놀라제에 직접 결합하는 것이 아니라 세포 추출물 내 규명되지 않은 에놀라제-조절성 분자와의 상호작용을 통해 상기 효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 예를 들어, 에놀라제는 액포에 결합하거나 또는 마이토콘드리아와 연계된 거대 고분자
 10 복합체(macromolecular complexes)를 형성할 수 있는 것으로 알려져 왔다(34). 따라서, 본 발명자들은 ENOblock이 에놀라제의 다양하고 비-해당과정성 '부가적' 기능들(35)을 규명하기 위한 강력한 화학적 수단이라는 것을 제안한다.

ENOblock의 활성을 논의함에 있어, 본 발명자들은 저산소 상태 또는
 15 정상산소 상태에서 상기 화합물의 효과들을 구별하는 것이 중요하다고 생각한다. 본 발명자들은 정상산소 상태와 비교하여 저산소 상태에서의 암 세포 사멸을 보다 크게 유도할 수 있는 화합물에 대해 스크리닝함으로써 ENOblock을 발견하였다. 본 발명자들은 일반적인 암 화학치료를 위한 약물들이 저산소 상태에서 덜 효과적이기 때문에(4) 상기 접근방법을
 20 채택하였다. 저산소 상태의 활성화 이후에 에놀라제 발현이 빠르게 상향-조절된다는 본 발명자들의 규명은 저산소 상태에서 암 세포들을 죽이고(도 2) 에놀라제에 대한 억제 활성을 가지는 ENOblock와 연관되어 있다. 더 나아가, 암 세포들은 에너지 발생을 위한 동화성 해당과정의 증대시키는 일련의 대사 변형들을 보여주는 와버그 효과(Warburg effect)에 의해
 25 특징지을 수 있다(2). 따라서, 3-브로모피루베이트(bromopyruvate) 및 6-아미노니코틴아마이드(aminonicotinamide) 같은 해당과정 억제제들은 암 세포들을 죽일 수 있다(3). 본 연구에서, 본 발명자들은 ENOblock이 저산소 상태 하에서 암 세포들을 선택적으로 죽일 수 있으며(도 1c-1d), 이는 해당과정-관련된 에놀라제의 기능(도 6)으로 인한 것이라는 것을 보였다.

30 또한, 에놀라제의 다양한 기능적 역할들은 정상산소 상태 하에서 ENOblock을 이용하여 탐침될 수 있다. 예를 들어, 에놀라제는 비-고전적

배출 경로(non-classical export pathway)를 통해 진핵세포 표면으로 이동되고 암 세포 침윤을 매개하여 전이를 유발할 수 있는 것으로 제안되어져 왔다(36, 37). 본 발명자들은 정상산소 상태에서 암 세포에 대한 ENOblock 처리가 비-세포독성 농도에서 암 세포 침윤 및 이동을
 5 억제한다는 것을 관찰하였다(도 7a-7d). 상술한 발견은 ENOblock이 암 세포 전이를 조절하기 위해 세포 표면-결합된 에놀라제를 타겟팅할 수 있다는 것을 의미한다. 암 전이와 관련하여, ENOblock 처리에 대한 본 발명자들의 *in vivo* 분석은 정상산소 상태에서도 실시되었다. 그 결과, 본 발명자들은 ENOblock이 암 세포 생존율에 현저한 영향을 미치지 않고 암 세포 전이를
 10 억제할 수 있다는 것을 확인하였다(도 9d-9e; 암 세포들은 세포 수의 감소 없이 주입 위치에서 유지되고 있는 것으로 보인다). 더 나아가, 에놀라제는 미세소관(microtubule)을 파괴하는 항암제들의 효과에 음성적으로 영향을 미칠 수 있는 세포 미세소관 시스템과 연관되어 있는 것으로 알려져 있었다(7, 38). 본 발명자들의 결과들은 ENOblock 처리가 암 세포들을
 15 죽이는 미세소관-불안정화 약물들의 효과를 증가시킬 수 있다는 것을 보여준다(도 7e). 따라서, 본 발명자들은 암 세포 전이를 억제하고 정상산소 상태에서 미세소관-불안정화 약물들의 효과를 증대시킬 뿐 아니라 종양 내 저산소 상태의 환경(niches)에서 암 세포들을 선택적으로 죽일 수 있는 강력한 활성을 가지는 ENOblock을 암 치료법을 위한 강력한 신규 약물
 20 후보라고 추론한다(암 줄기세포들은 저산소 상태 하에서 생존율을 촉진하는 저산소 상태-유도성 인자들을 발현하는 것으로 알려져 있다; 39).

한편, 본 발명자들의 연구는 ENOblock에 의한 에놀라제 억제가 세포 내 글루코오스 섭취를 유도할 수 있다는 것을 보여주었다(도 10a). 본 발명자들의 결과들은 글루코오스 섭취를 증가시키는 ENOblock의 활성이
 25 인슐린에 의해서도 억제(40)되는 PEPCK의 억제로 인한 것이라는 것을 보여준다. 간에서의 PEPCK 억제는 포도당 신생합성을 감소시킬 뿐 아니라 동시에 글루코오스 섭취를 촉진한다(15, 41). 흥미롭게도, 신장에서의 포도당 신생합성은 혈액 내 글루코오스 레벨을 조절하는 데 중요한 기능을 하며(18), 본 발명자들의 결과들은 ENOblock이 신장 세포들에서 PEPCK
 30 발현을 억제할 수 있고 인슐린 또는 당뇨병 약물인 로지글리타존은 억제하지 않는다는 것을 보여준다(도 10c). 또한, 본 발명자들은 siRNA를

이용한 에놀라제 녹-다운도 글루코오스 섭취를 유도할 수 있다는 것을 확인하였다(도 15). ENOblock 처리가 PEPCK 발현을 인 *비보*에서 억제하고 글루코오스 섭취를 유도할 수 있다는 본 발명자들의 발견은 ENOblock이 항-당뇨병 약물로서 추가적인 개발을 위한 매력적인 후보물질일 수 있다는 것을 의미한다. 이것은 에놀라제 발현이 정상인과 비교하여 당뇨병 환자들에서 증가된다는 사실을 통해 뒷받침될 수 있다(42). 더욱이, 본 발명자들의 결과들은 증가된 지방세포분화 및 거품세포 형성(도 14) 같은 당뇨병 약물들의 사용에 따른 몇몇 합병증들을 억제한다는 것을 제시한다. 인슐린 시그널링은 촉진된 거품세포 형성과 연관되어 있으며(43), 일반적으로 처방된 당뇨병 약물들은 지방세포분화 또는 체중증가를 유도할 수 있다(27). 본 발명자들은 거품세포 형성 또는 지방세포분화를 억제하는 ENOblock의 활성이 항-당뇨병 약물 후보물질로서 개발될 수 있는 가능성을 더욱 더 지지해준다고 생각한다. 놀랍게도, 가장 일반적으로 처방되고 있는 항-당뇨병 약물인 메트포르민(metformin)도 간세포의 포도당 신생합성을 억제하고 최근에는 항-암 약물로서 다양한 임상실험들에 적용되고 있다(44).

본 발명자들이 아는 한, 본 연구는 에놀라제 억제와 PEPCK 발현의 하향-조절(포도당 신생합성의 억제) 간의 최초의 연결점을 제공한다. 하지만, 상기 관계의 선례가 자연계에 존재한다. 곰팡이(*Aspergillus nidulans*)에 대한 연구들은 에놀라제를 인코딩하는 acuN 유전자의 돌연변이가 해당과정 탄소 소스(glycolytic carbon sources)가 아니라 포도당 신생합성 탄소 소스(gluconeogenic carbon sources)에 따른 성장 억제를 유도한다는 것을 보고하였다(45). 따라서, 본 발명자들은 다른 해당과정 효소들이 포유동물에서 포도당 신생합성에 관여하는 조절성 기능을 가지는 지 여부를 평가하기 위한 이후의 연구들이 필요하다고 생각한다.

본 발명에서 제시된 ENOblock 처리의 인 *비보* 분석들은 제브라피쉬 척추동물 모델을 이용하였다. 제브라피쉬는 새로운 치료제를 테스트하기 위한 일차 동물로서 다음과 같은 많은 장점들을 가진다: (a) 포유동물에서 보존된 글루코오스 항상성 기작들; (b) 유효한 항암 약물을 테스트하는 시스템의 유용성; (c) 포유동물 테스트와 관련된 독성 반응들; 및 (d) 상대적으로 적은 양의 테스트 화합물의 필요성(10, 12, 17, 21, 46). 또한,

포유동물 세포 반응(cell behavior)에 대한 매우 상세한 연구들이 제브라피쉬에서 실시될 수 있다(47). 따라서, 본 발명자들의 제브라피쉬-기반된 일련의 분석들은 ENOblock 활성의 최초 보고를 위해 적절한 포맷이다.

5 요약하면, 본 발명자들의 연구는 에놀라제에 직접적으로 결합하는 최초의 비-기질 유사체 억제제이며 에놀라제의 다양한 비-해당과정 기능들을 탐침하는 데 이용될 수 있는 작은 분자인 ENOblock을 보고한다. 본 발명자들은 암 성장 상에 에놀라제 억제의 효과를 평가하는 데 ENOblock을 이용하였고, 에놀라제 억제가 암 세포 전이를 인 *비*보에서
10 감소시킬 수 있다는 것을 최초로 보인다. 또한, 본 발명자들은 에놀라제 억제제가 포도당 신생합성의 조절자인 PEPCK를 억제할 수 있으며 항-당뇨병 약물들을 개발하기 위한 신규한 타겟이라는 것을 처음으로 보인다. ENOblock의 발견은 인간 질환을 조절하는 규명되지 않은 세포 내 기작들에 대한 신규한 화학 프로브들, 약물 타겟들 및 후보물질 치료학을 제공하는
15 순화학유전학(forward chemical genetics)의 종언(testament)일 수 있다. 암 치료법을 위한 신규한 해당과정 억제제들의 발견의 필요성 이외에도, 박테리아 감염(예컨대, *Yersinia pestis*, *Borrelia spp.*, *Streptococcus pneumonia*, 등) 및 기생충(예컨대, trypanosomatid parasites; 48)의 병인학에서 에놀라제의 잠재적인 기능에 비추어 볼 때, 본 발명자들은
20 ENOblock이 상술한 질환들에 대한 이해를 현저하게 높일 수 있을 것으로 판단한다.

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

참조문헌

- 30 1. Kim, J. W. and Dang, C. V., Multifaceted roles of glycolytic enzymes. Trends Biochem Sci 30 (3), 142 (2005).

2. Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E., The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8 (6), 519 (1927).
3. Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. H., and Huang, P., Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25 (34), 4633 (2006).
- 5 4. Xu, R. H. et al., Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65 (2), 613 (2005).
5. Khersonsky, S. M. et al., Facilitated forward chemical genetics using a tagged triazine library and zebrafish embryo screening. *J Am Chem Soc* 125 (39), 11804 (2003).
- 10 6. Pancholi, V., Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58 (7), 902 (2001).
7. Georges, E., Bonneau, A. M., and Prinos, P., RNAi-mediated knockdown of alpha-enolase increases the sensitivity of tumor cells to antitubulin chemotherapeutics. *Int J Biochem Mol Biol* 2 (4), 303 (2011).
- 15 8. Kauffmann-Zeh, A. et al., Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385 (6616), 544 (1997).
9. Boise, L. H. et al., bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74 (4), 597 (1993).
- 20 10. Jung, D. W. et al., A novel zebrafish human tumor xenograft model validated for anti-cancer drug screening. *Mol Biosyst* 8 (7), 1930 (2012).
11. Corkery, D. P., Dellaire, G., and Berman, J. N., Leukaemia xenotransplantation in zebrafish--chemotherapy response assay in vivo. *Br J Haematol* 153 (6), 786 (2011).
- 25 12. Sipes, N. S., Padilla, S., and Knudsen, T. B., Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93 (3), 256 (2011).
- 30 13. Jung, D. W. et al., Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing

- useful secondary effects. *Mol Biosyst* 7 (2), 346 (2011).
14. Kim, W. H., Lee, J., Jung, D. W., and Williams, D. R., Visualizing sweetness: increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications. *Sensors (Basel)* 12 (4), 5005 (2012).
15. Rosella, G. et al., Impaired suppression of gluconeogenesis induced by overexpression of a noninsulin-responsive phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Endocrinol* 7 (11), 1456 (1993).
16. Min, J. et al., Forward chemical genetic approach identifies new role for GAPDH in insulin signaling. *Nat Chem Biol* 3 (1), 55 (2007).
17. Elo, B., Villano, C. M., Govorko, D., and White, L. A., Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. *J Mol Endocrinol* 38 (4), 433 (2007).
18. Mitrakou, A., Kidney: its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1, S66 (2011).
19. Hers, H. G., Mechanisms of blood glucose homeostasis. *J Inherit Metab Dis* 13 (4), 395 (1990).
20. Hardie, D. G. and Carling, D., The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246 (2), 259 (1997).
21. Jurczyk, A. et al., Dynamic glucoregulation and mammalian-like responses to metabolic and developmental disruption in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 170 (2), 334 (2011).
22. Jensen, P. J., Gunter, L. B., and Carayannopoulos, M. O., Akt2 modulates glucose availability and downstream apoptotic pathways during development. *J Biol Chem* 285 (23), 17673 (2010).
23. Yang, Y. et al., Emodin with PPARgamma ligand-binding activity promotes adipocyte differentiation and increases glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353 (2), 225 (2007).
24. Tseng, Y. C. et al., Specific expression and regulation of glucose

- transporters in zebrafish ionocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297 (2), R275 (2009).
25. Agabegi, ED and Steven, S, Step-Up to Medicine (Step-Up Series). (Lippincott Williams & Wilkins, 2008).
- 5 26. Zeng, X. Y. et al., Screening for the efficacy on lipid accumulation in 3T3-L1 cells is an effective tool for the identification of new anti-diabetic compounds. *Biochem Pharmacol* (2012).
27. Madsen, L. et al., Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem J* 375 (Pt 3), 539 (2003).
- 10 28. Chait, A., Progression of atherosclerosis: the cell biology. *Eur Heart J* 8 Suppl E, 15 (1987).
- 15 29. Zhang, E., Hatada, M., Brewer, J. M., and Lebioda, L., Catalytic metal ion binding in enolase: the crystal structure of an enolase-Mn²⁺-phosphonoacetohydroxamate complex at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* 33 (20), 6295 (1994).
30. Carmieli, R. et al., The catalytic Mn²⁺ sites in the enolase-inhibitor complex: crystallography, single-crystal EPR, and DFT calculations. *J Am Chem Soc* 129 (14), 4240 (2007).
31. Brewer, J. M., McKinnon, J. S., and Phillips, R. S., Stopped-flow studies of the reaction of D-tartronate semialdehyde-2-phosphate with human neuronal enolase and yeast enolase 1. *FEBS Lett* 584 (5), 979 (2010).
- 25 32. Spring, T. G. and Wold, F., Studies on two high-affinity enolase inhibitors. Reaction with enolases. *Biochemistry* 10 (25), 4655 (1971).
33. Mansour, H. H. and Tawfik, S. S., Efficacy of lycopene against fluoride toxicity in rats. *Pharm Biol* (2011).
- 30 34. Manneck, T., Keiser, J., and Muller, J., Mefloquine interferes with glycolysis in schistosomula of *Schistosoma mansoni* via inhibition

- of enolase. *Parasitology* 139 (4), 497 (2012).
35. Jeffery, C. J., Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 24 (1), 8 (1999).
36. Miles, L. A. et al., Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30 (6), 1682 (1991).
- 5 37. Liu, Ko-Jiunn and Shih, Neng-Yao, The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells. *Journal of Cancer Molecules* 3 (2), 45 (2007).
- 10 38. Walsh, J. L., Keith, T. J., and Knull, H. R., Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim Biophys Acta* 999 (1), 64 (1989).
39. Li, Z. and Rich, J. N., Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Curr Top Microbiol Immunol* 345, 21
15 (2010).
40. O'Brien, R. M. et al., Identification of a sequence in the PEPCK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription. *Science* 249 (4968), 533 (1990).
41. Quinn, P. G. and Yeagley, D., Insulin regulation of PEPCK gene
20 expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5 (4), 423 (2005).
42. Iori, E. et al., Glycolytic enzyme expression and pyruvate kinase activity in cultured fibroblasts from type 1 diabetic patients with and without nephropathy. *Biochim Biophys Acta* 1782 (11), 627 (2008).
- 25 43. Sekiya, M. et al., Ablation of neutral cholesterol ester hydrolase 1 accelerates atherosclerosis. *Cell Metab* 10 (3), 219 (2009).
44. Gallagher, E. J. and LeRoith, D., Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 1243, 54 (2011).
- 30 45. Hynes, M. J. et al., Transcriptional control of gluconeogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 176 (1), 139 (2007).

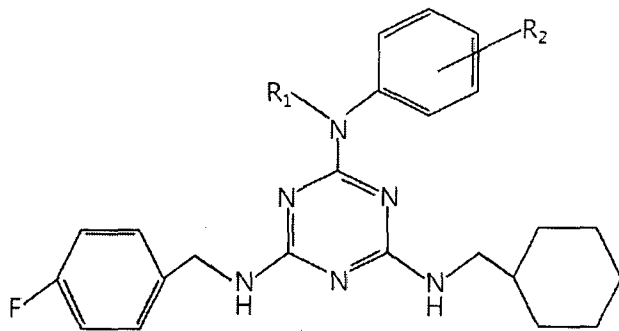
46. Selderslaghs, I. W., Blust, R., and Witters, H. E., Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reprod Toxicol* 33 (2), 142 (2012).
- 5 47. Zhu, S. et al., Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell* 21 (3), 362 (2012).
48. Ghosh, A. K. and Jacobs-Lorena, M., Surface-expressed enolases of Plasmodium and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl 1, 85 (2011).
- 10 49. Piret, J. P., Mottet, D., Raes, M., and Michiels, C., CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* 973, 443 (2002).
50. Maher, J. C., Krishan, A., and Lampidis, T. J., Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol* 53 (2), 116 (2004).
- 15 51. Sedoris, K. C., Thomas, S. D., and Miller, D. M., Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1. *BMC Cancer* 10, 157 (2010).
- 20 52. Gorsich, S. W., Barrows, V., Halbert, J., and Farrar, W. W., Purification and properties of gammagamma-enolase from pig brain. *J Protein Chem* 18 (1), 103 (1999).
53. Nusslein-Volhard, C and Dahm, R, *Zebrafish: A Practical Approach* (Practical Approach Series). (OUP, Oxford, 2002).

【특허청구범위】

【청구항 1】

(a) 하기 화학식 I로 표시되는 트리아진(triazine)계 화합물의
 5 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 예방
 또는 치료용 약제학적 조성물:

화학식 I

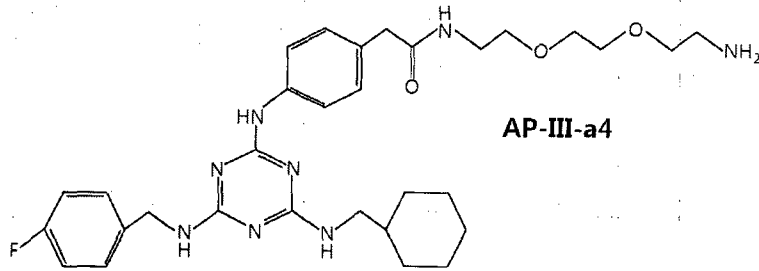


상기 화학식에서, R₁은 H 또는 C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고;
 10 R₂는 H, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의
 알킬알코올, -[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의
 정수이다), -[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이다), -
 [(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-CH₃(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), -(CH₂)_q-
 (CONH)-C₁₋₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬(상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-
 15 (CONH)-C₁₋₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올(상기 q는 0-5의 정수이다), -
 (CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의
 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기
 m 및 n은 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다) 또는 -(CH₂)_q-
 (CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-CH₃(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고,
 20 상기 q는 0-5의 정수이다)이다.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 트리아진계 화합물은
 하기 화학식 II로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물:

화학식 II



【청구항 3】

5 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 에놀라제의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 4】

10 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 암 세포의 이동(migration), 침윤(invasion) 및 전이(metastasis)를 억제하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 5】

15 제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 억제제는 정상산소 상태(normoxia)보다 저산소 상태(hypoxia)에서 더욱 촉진되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 6】

20 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 아폽토시스-유도성 단백질(apoptosis-inducible proteins)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 7】

25 제 6 항에 있어서, 상기 아폽토시스-유도성 단백질은 AKT 또는 Bcl-xL 단백질인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 모방 활성(insulin-mimicking activity)을 가지는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

5 【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 인슐린 모방 활성은 세포 내 글루코오스 섭취(glucose uptake)를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 10】

10 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 발현을 하향-조절(down-regulation)하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 11】

15 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 지방세포분화(adipogenesis) 및 거품세포 형성(foam cell formation)을 억제하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

【청구항 12】

20 제 1 항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신경 내분비 암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 부신암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 구성된 군으로부터 선택되는 암인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

25

【청구항 13】

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 에놀라제-관계된 질환(enolase-associated disorders) 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

30

【청구항 14】

제 13 항에 있어서, 상기 에놀라제-관계된 질환은 자가면역질환(autoimmune disorders), 허혈(ischemia) 및 박테리아 감염인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

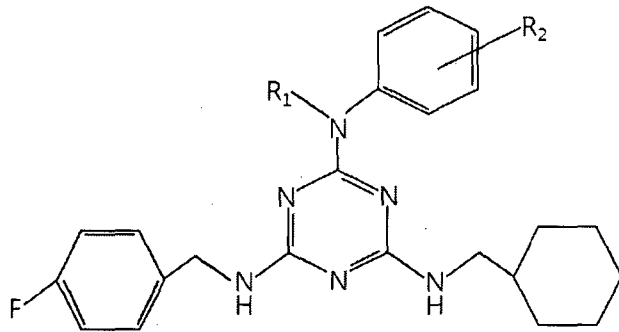
5

【청구항 15】

(a) 하기 화학식 I로 표시되는 트리아진(triazine)계 화합물의 치료학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법:

10

화학식 I



15

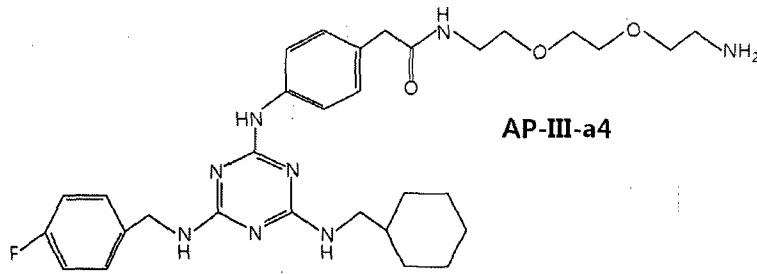
20

상기 화학식에서, R₁은 H 또는 C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬이고; R₂는 H, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬, C₁-C₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올, -[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), -[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이다), -[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-CH₃(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-C₁₋₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬(상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-C₁₋₅ 직쇄 또는 가지쇄의 알킬알코올(상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-NH₂(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다), -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-CH₃(상기 m 및 n은 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다) 또는 -(CH₂)_q-(CONH)-[(CH₂)_m-O]_n-(CH₂)_p-CH₃(상기 m, n 및 p는 각각 1-10의 정수이고, 상기 q는 0-5의 정수이다)이다.

【청구항 16】

제 15 항에 있어서, 상기 화학식 I로 표시되는 트리아진계 화합물은 하기 화학식 II로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 방법:

화학식 II



5

【청구항 17】

제 15 항에 있어서, 상기 조성물은 에놀라제의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

10

【청구항 18】

제 15 항에 있어서, 상기 조성물은 암 세포의 이동(migration), 침윤(invasion) 및 전이(metastasis)를 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

15 【청구항 19】

제 17 항 또는 제 18 항에 있어서, 상기 억제제는 정상산소 상태(normoxia)보다 저산소 상태(hypoxia)에서 더욱 촉진되는 것을 특징으로 하는 방법.

20 【청구항 20】

제 15 항에 있어서, 상기 조성물은 아폽토시스-유도성 단백질(apoptosis-inducible proteins)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

25 【청구항 21】

제 20 항에 있어서, 상기 아폽토시스-유도성 단백질은 AKT 또는

Bcl-xL 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 22】

제 15 항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 모방 활성(insulin-mimicking activity)을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 23】

제 22 항에 있어서, 상기 인슐린 모방 활성은 세포 내 글루코오스 섭취(glucose uptake)를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 방법.

10

【청구항 24】

제 15 항에 있어서, 상기 조성물은 PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 발현을 하향-조절(down-regulation)하는 것을 특징으로 하는 방법.

15

【청구항 25】

제 15 항에 있어서, 상기 조성물은 지방세포분화(adipogenesis) 및 거품세포 형성(foam cell formation)을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

20

【청구항 26】

제 15 항에 있어서, 상기 암은 뇌암, 신경 내분비 암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 부신암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 구성된 군으로부터 선택되는 암인 것을 특징으로 하는 방법.

25

【청구항 27】

제 15 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 에놀라제-관계된 질환(enolase-associated disorders) 예방 또는 치료 방법.

30

【청구항 28】

제 27 항에 있어서, 상기 에놀라제-관계된 질환은 자가면역질환(autoimmune disorders), 허혈(ischemia) 및 박테리아 감염인 것을 특징으로 하는 방법.

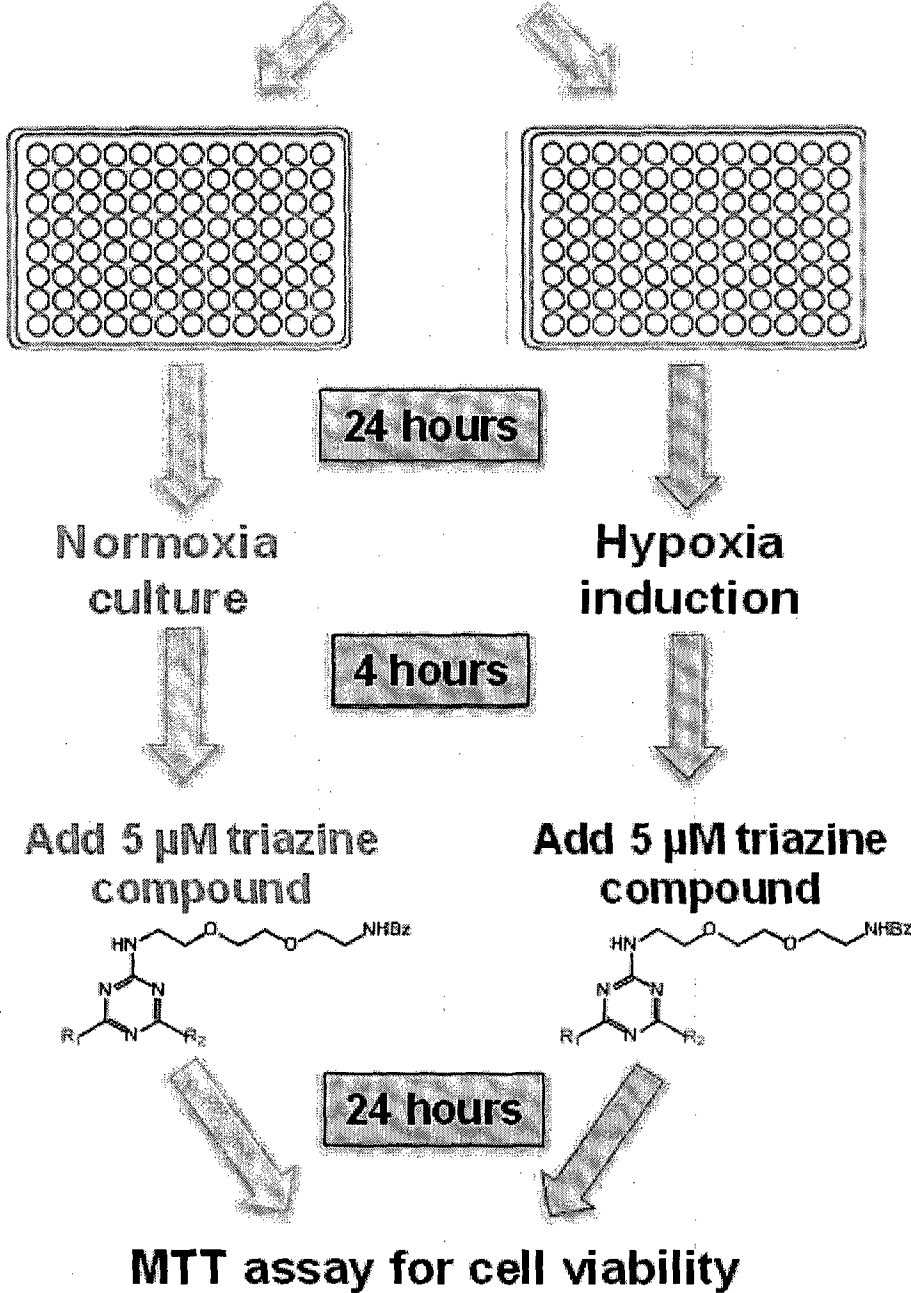
5

1/35

Figure 1a

Screening system to identify anti-cancer compounds effective under hypoxia

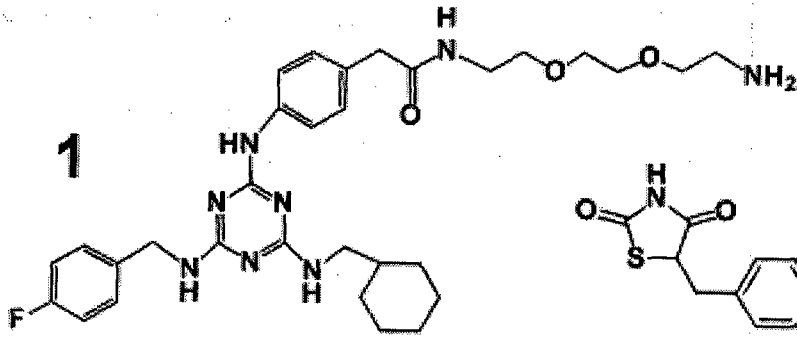
Seed 5×10^3 HCT116 cancer cells/well



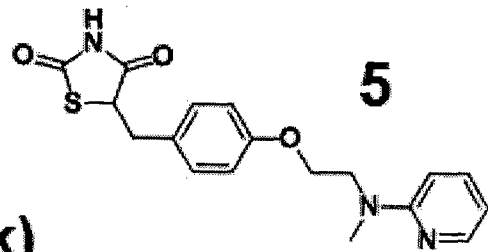
2/35

도 1b

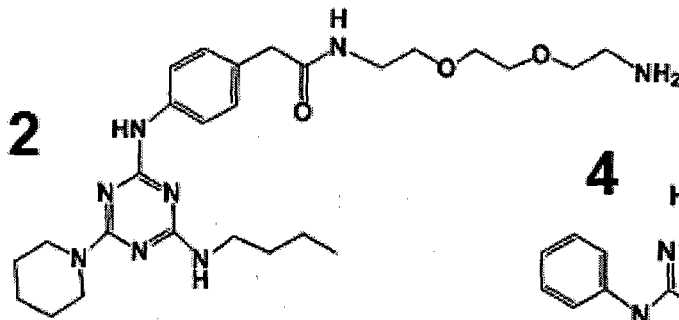
Chemical structures



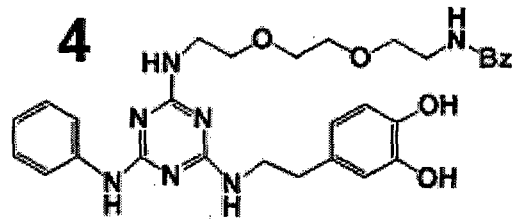
AP-III-a4 (ENOblock)



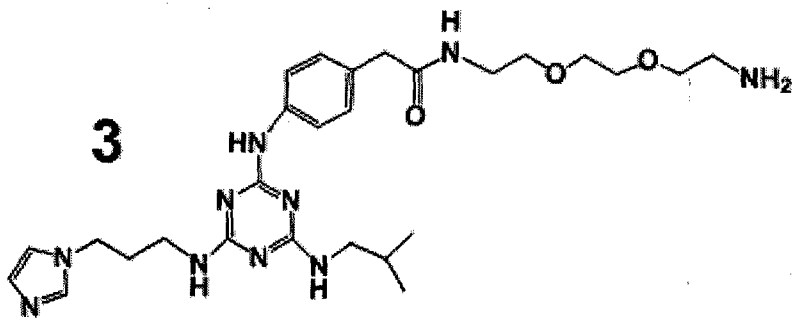
Rosiglitazone



AP-IV-e3



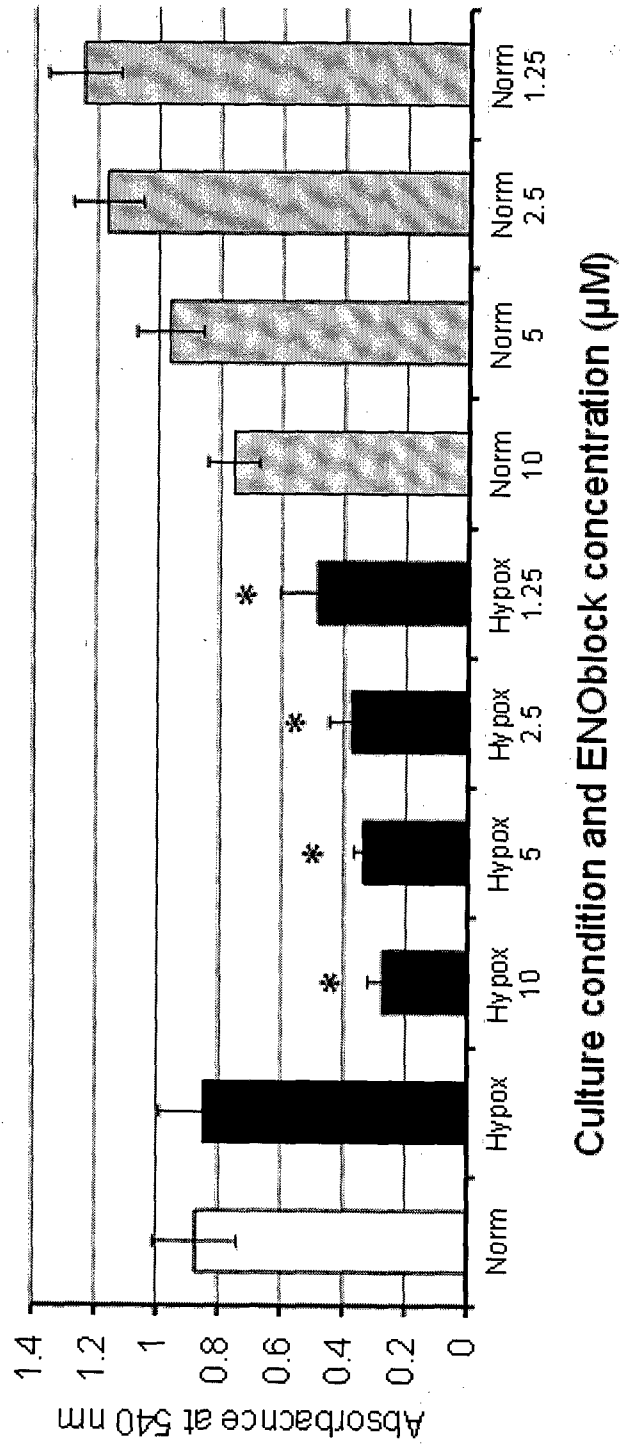
GAPDS



AP-I-f10

Figure 1c

Anti-cancer cell activity of ENOblock under normoxia or hypoxia

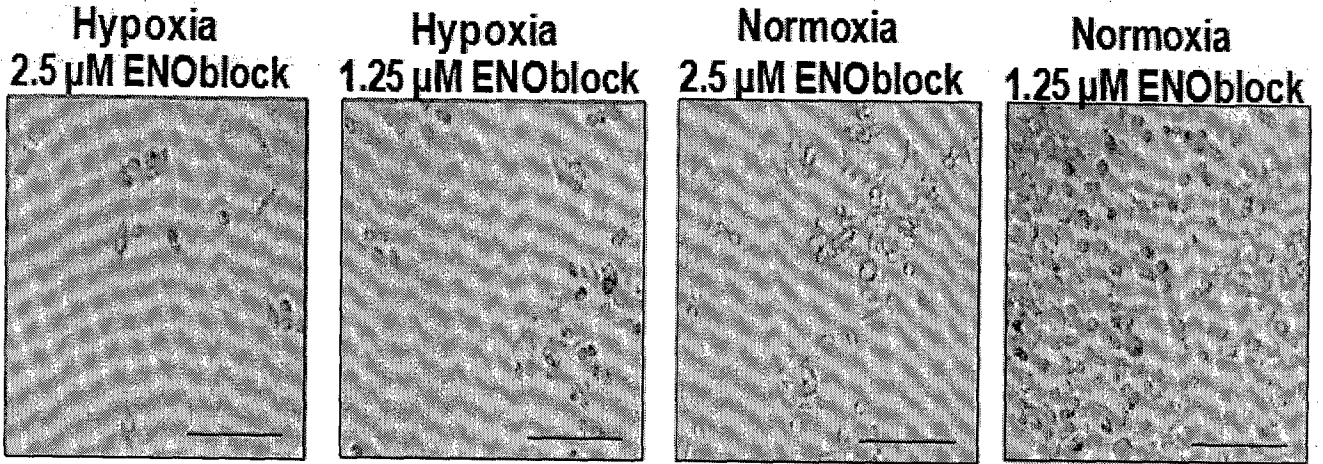


Culture condition and ENOblock concentration (μM)

4/35

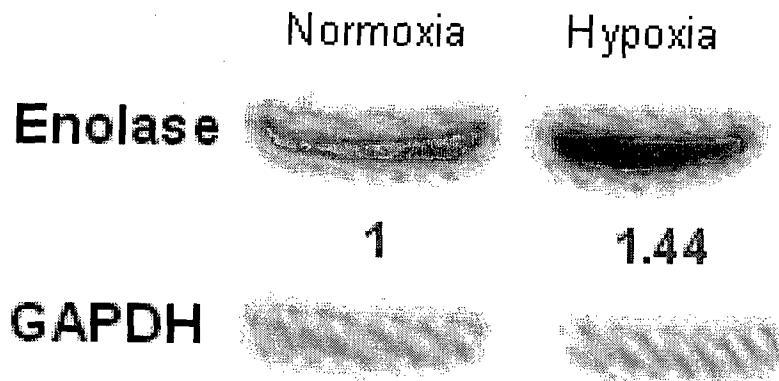
도 1d

Microscopic images of ENOblock anti-cancer cell activity

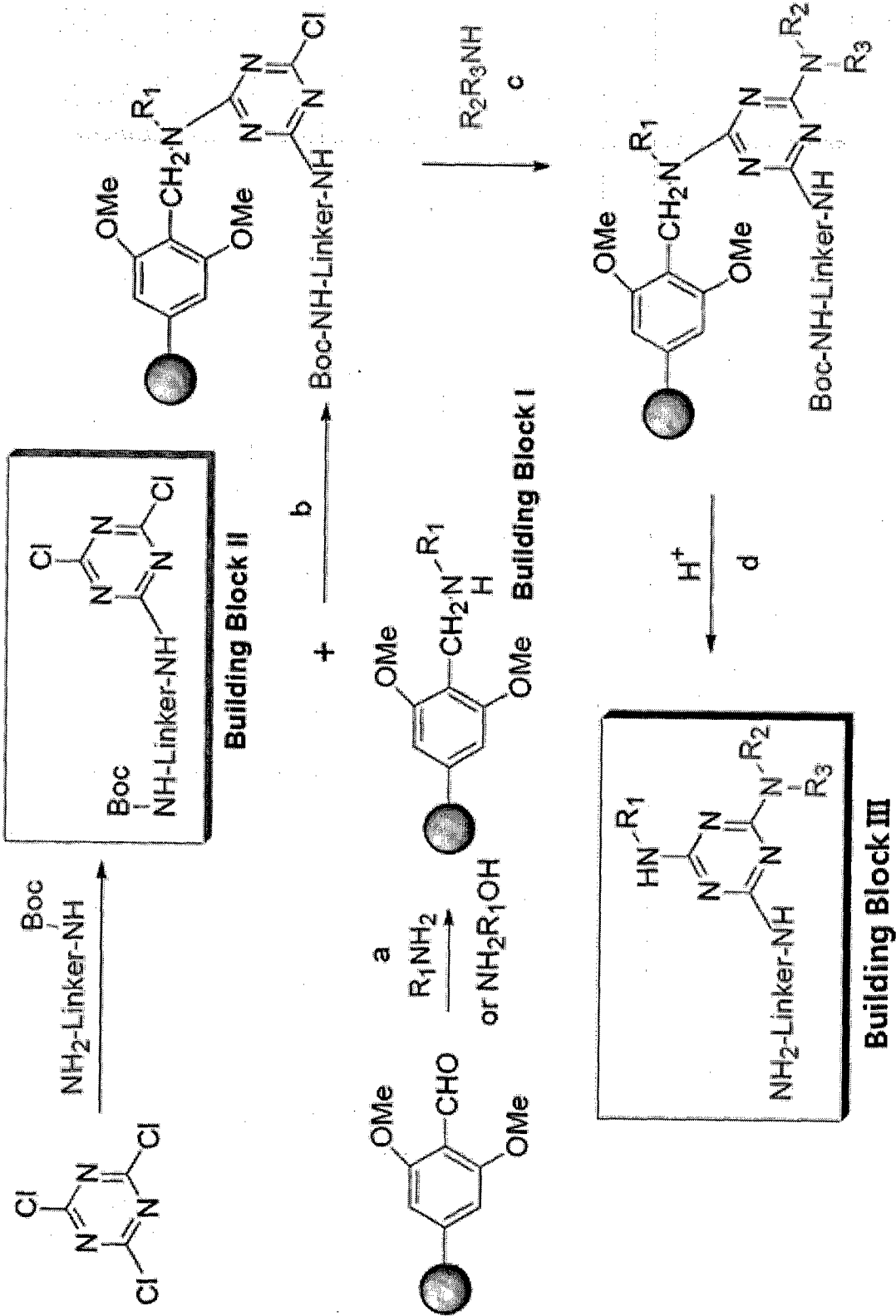


Scale bar=50 μ m

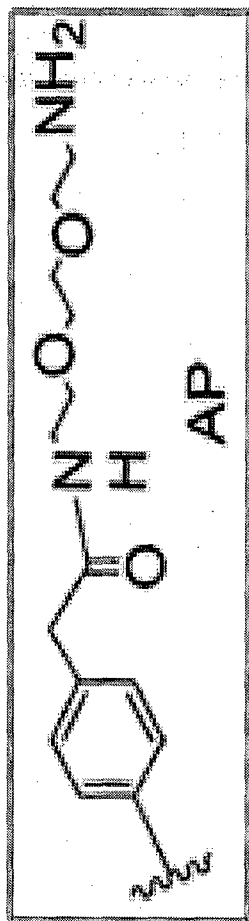
도 2



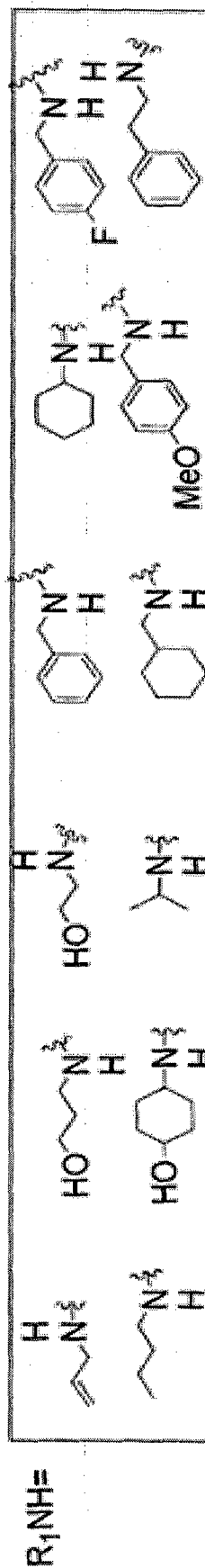
HT 3a



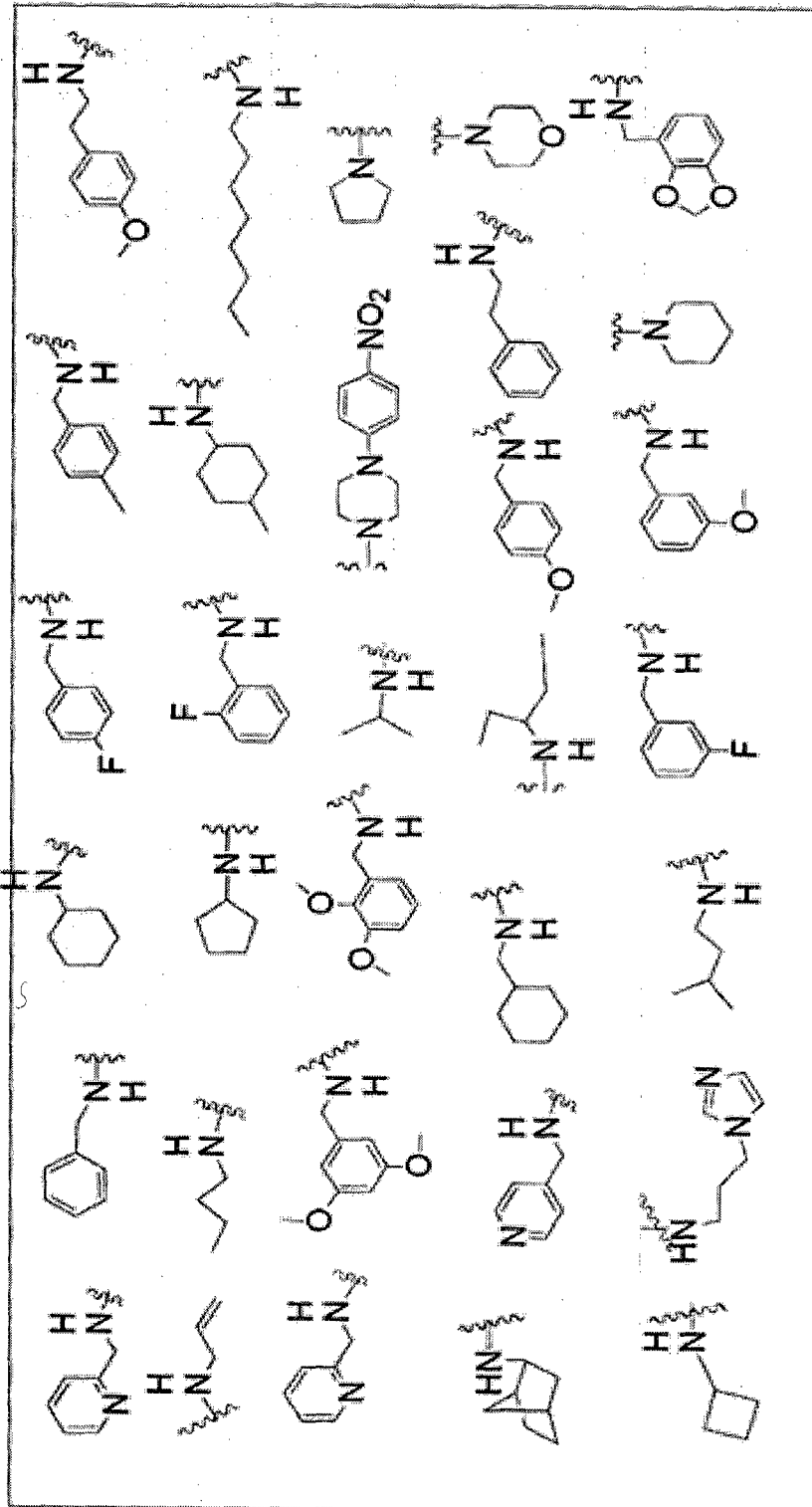
도 3b



도 3c



도 3d

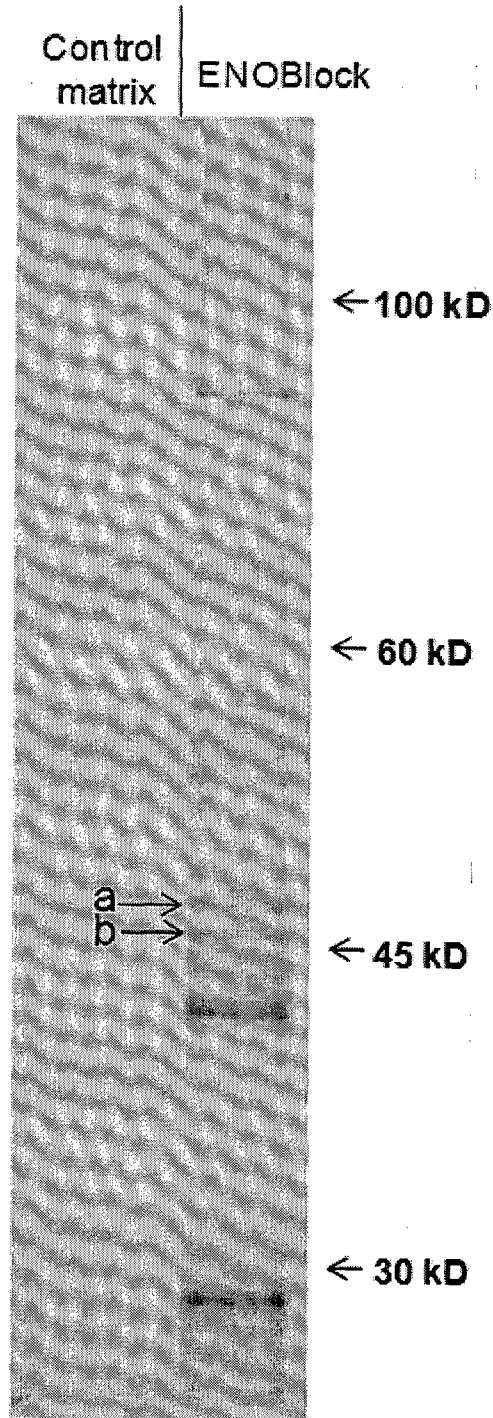


NR₂R₃=

8/35

도 4a

ENOblock affinity chromatography study



9/35

도 4b

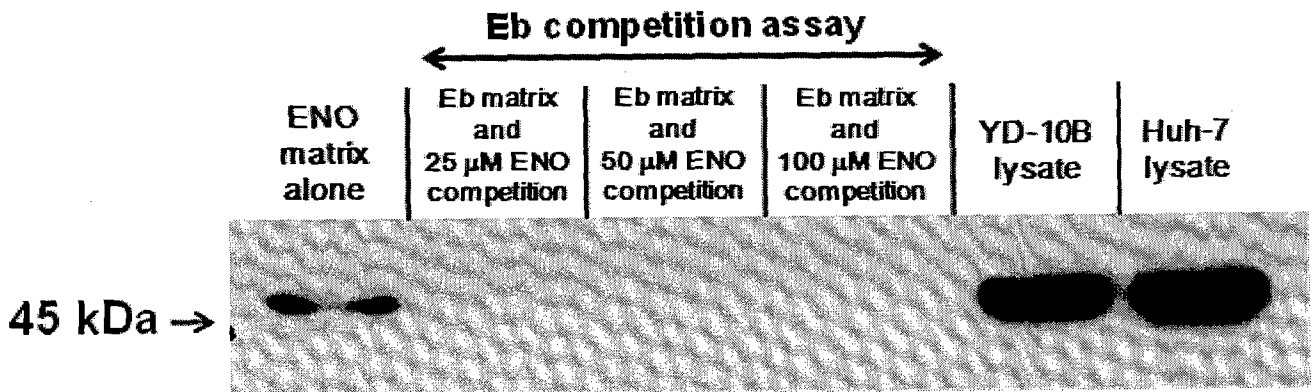
Mass spectrometry analysis

1 msilkihareifdsrgnptvevdlftskglfraavpsgastgiyealelrdndktrymgk
 61 gvskavehinktiapalvskklnvteqekidklmiemdgtenkskfganailgvslavck
 121 agavekgvplyrhiadlagnsevilpvafnvinggshagnklamqefmilpvgaanfre
 181 amrigaevyhnlnkvnikekygkdatnvgdeggfapnilenkeglellktaigkagytdkv
 241 vigmdvaaseffrsgkyldfdkspddpsryispdqladlyksfikdypvvsiedpfdqdd
 301 wgawqkftasagiqvvgddltvtnpkriakavneksncnllkvnqigsvtelqackla
 361 qangwgvmvshrsgetedtfiadlvvglctgqiktgapcrserlakynqllrieeelgsk
 421 akfagnfrnplak

Mascot scores: a=170; b= 155

도 4c

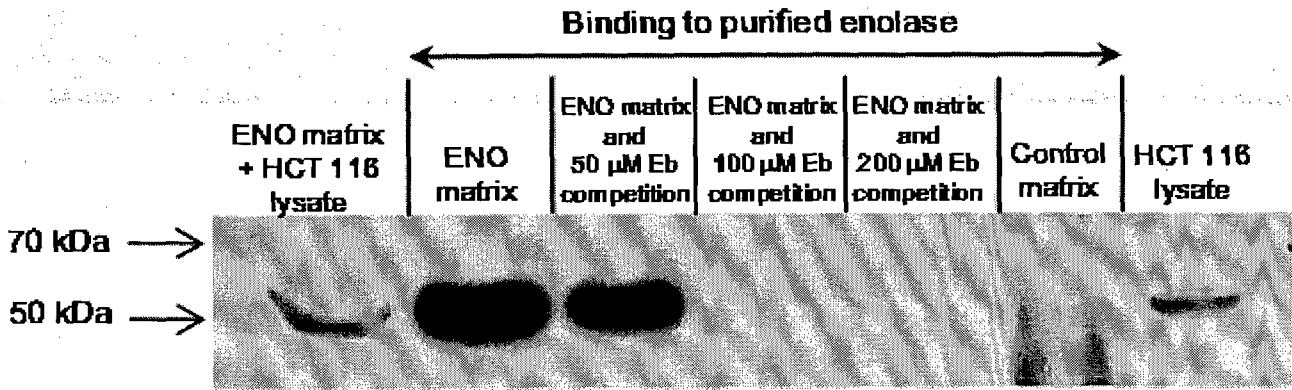
Binding to enolase in cell lysate



10/35

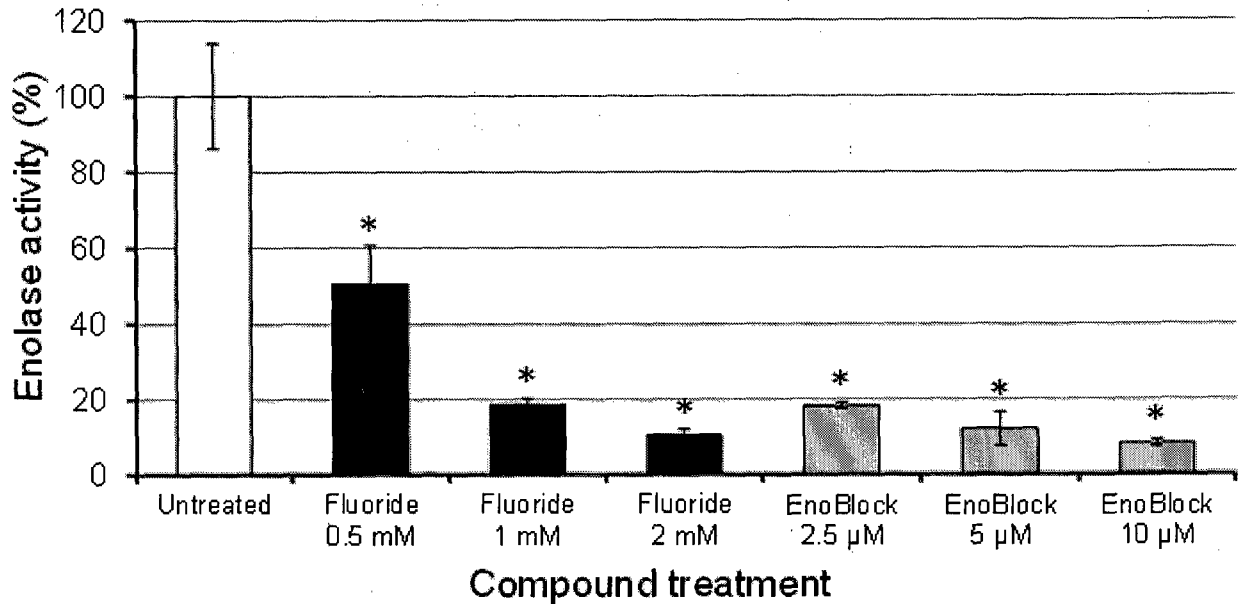
도 4d

Binding to purified enolase



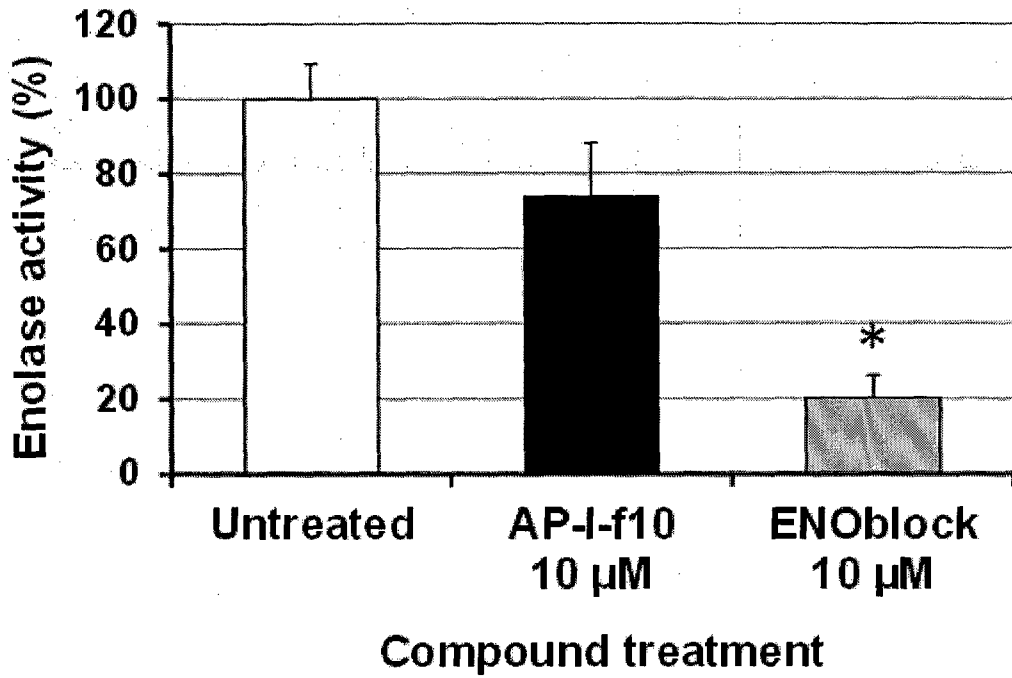
도 4e

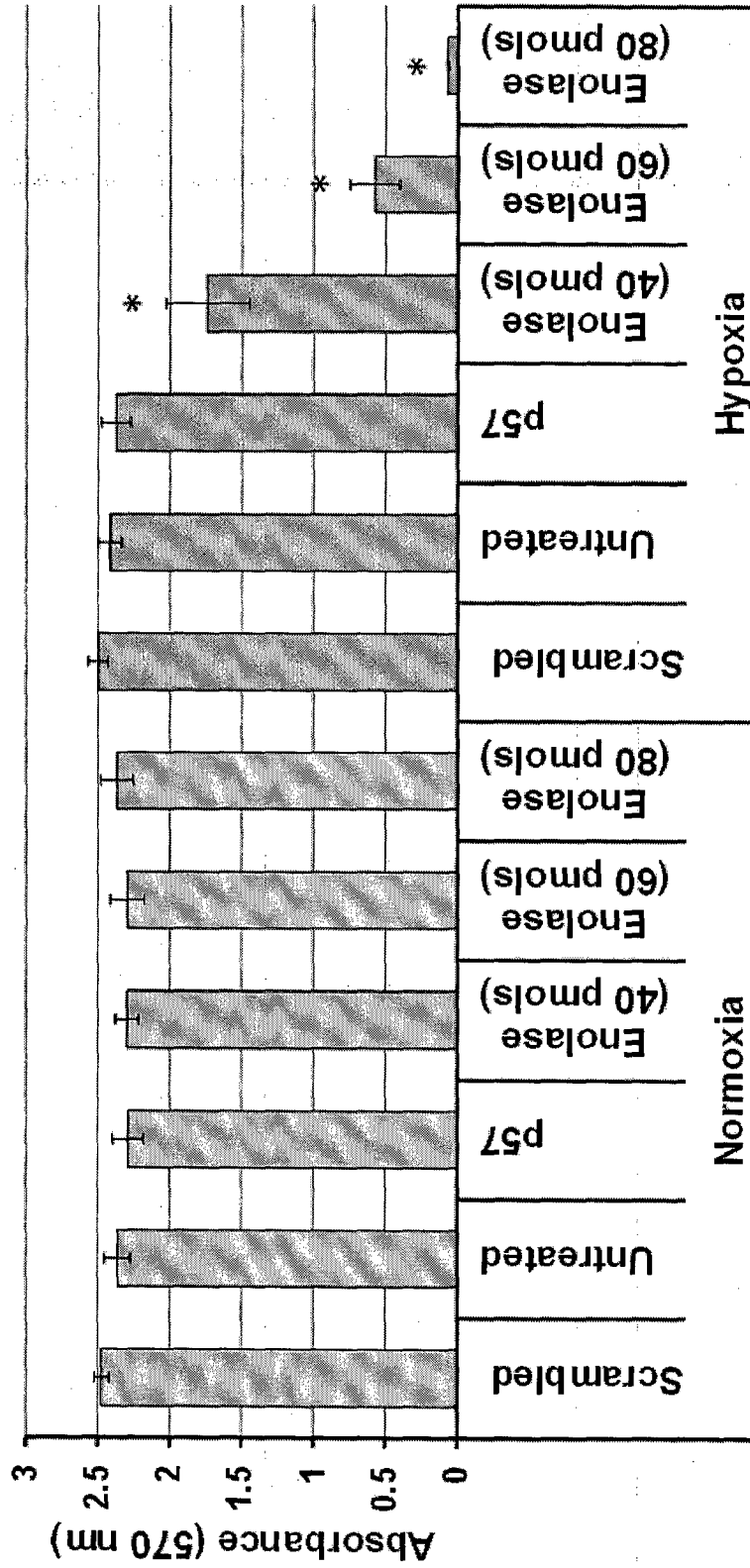
Inhibition of enolase activity



11/35

Figure 5



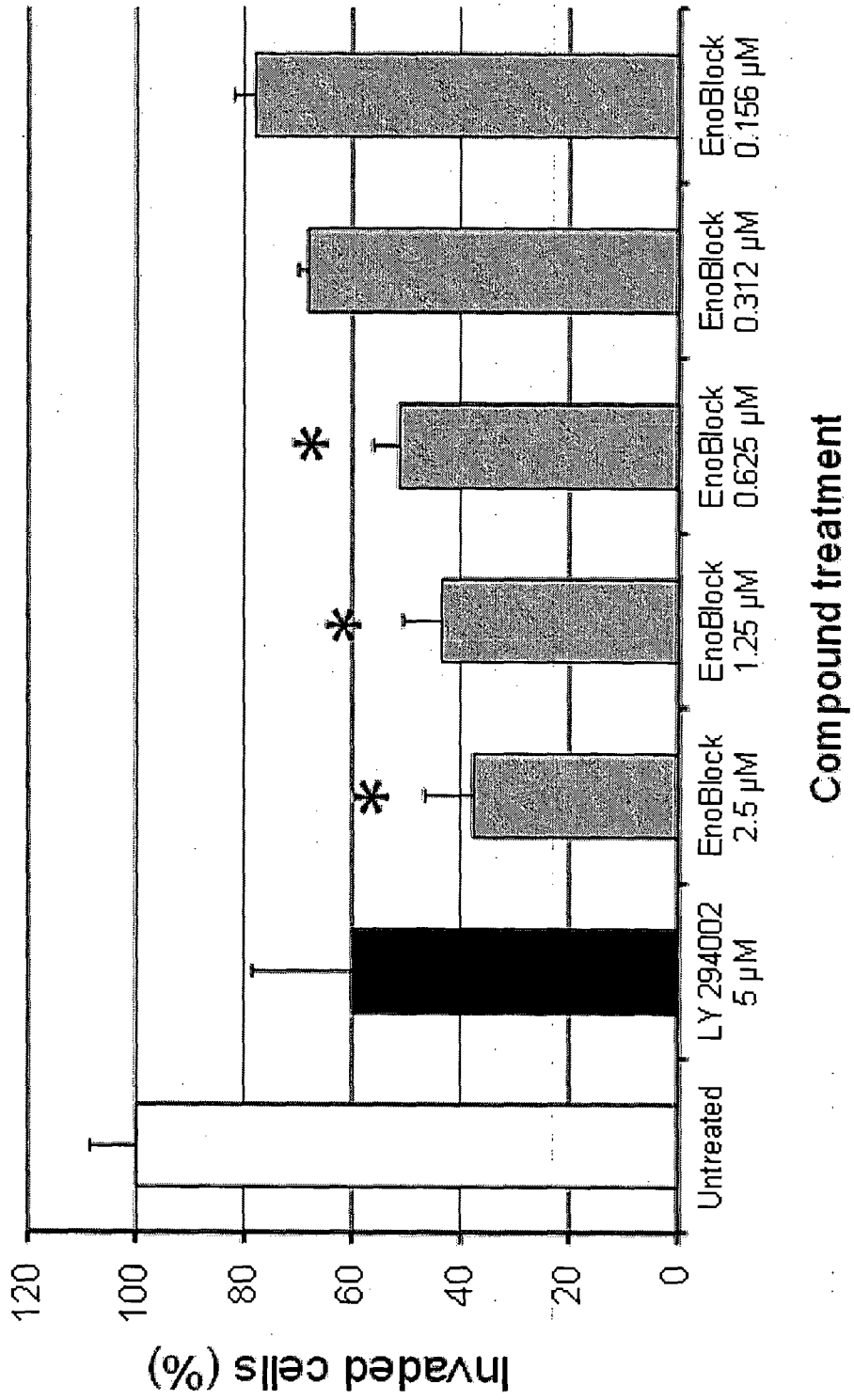


Culture condition and siRNA treatment

13/35

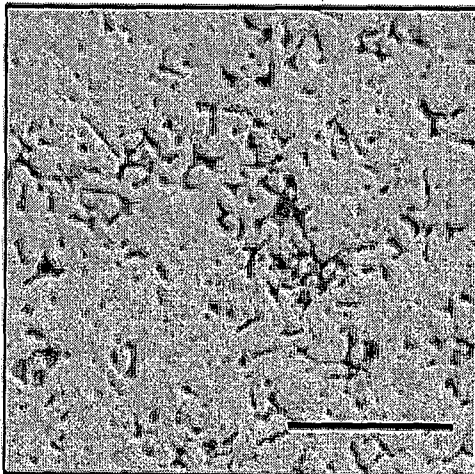
Figure 7a

Cancer cell invasion assay

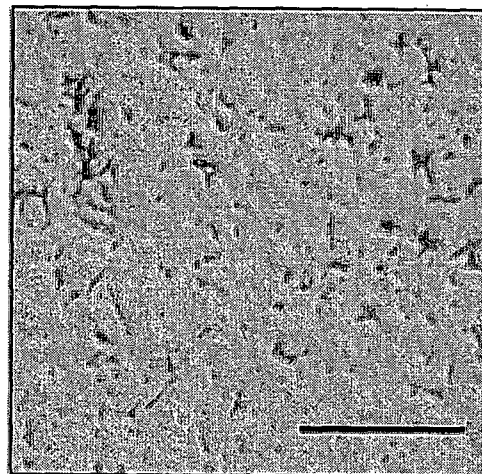


Invasion assay images

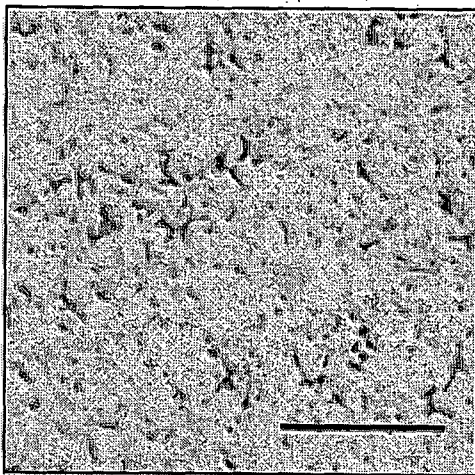
Untreated



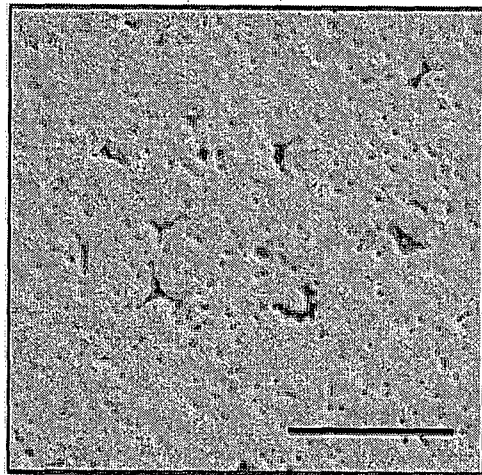
1.25 μ M ENOBlock



2.5 μ M ENOBlock



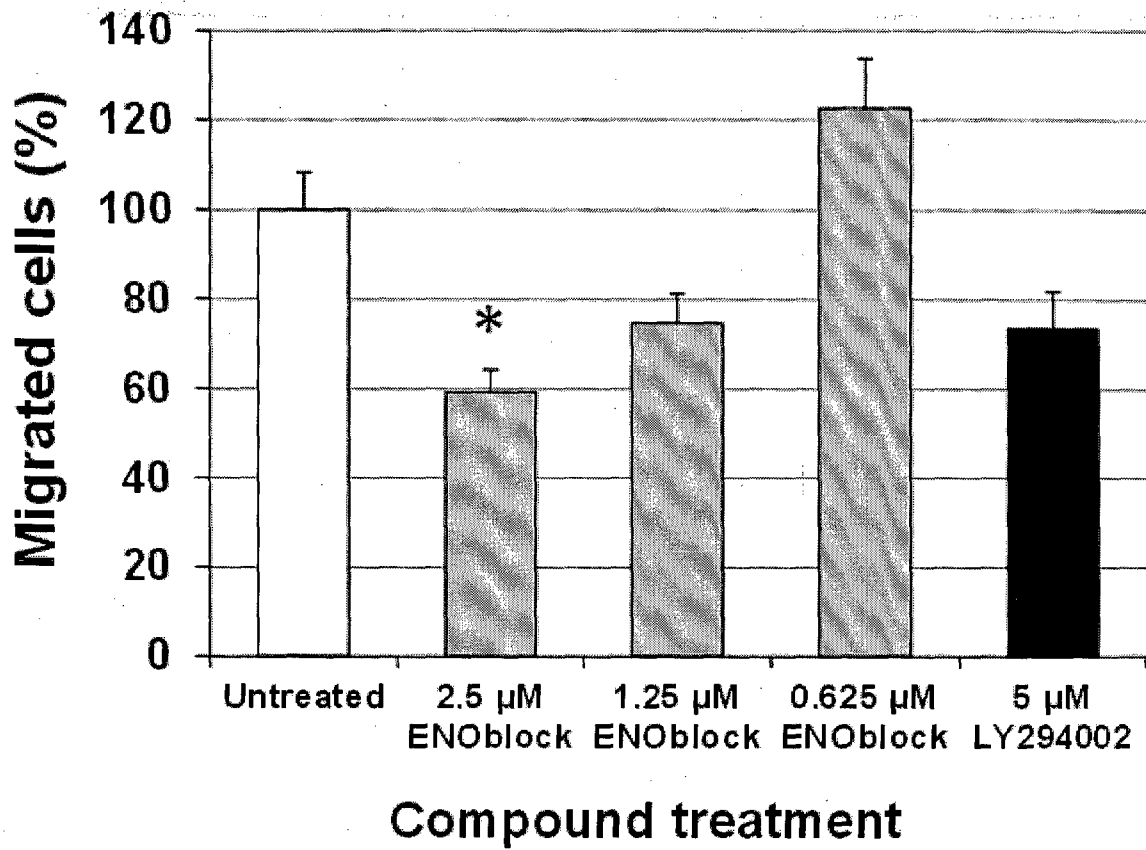
5 μ M LY294002



15/35

도 7c

Cancer cell migration assay

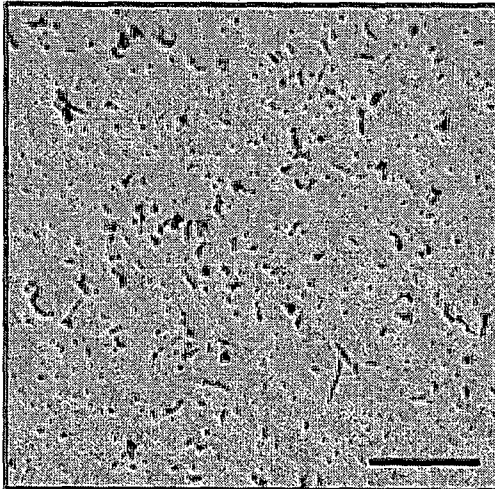


16/35

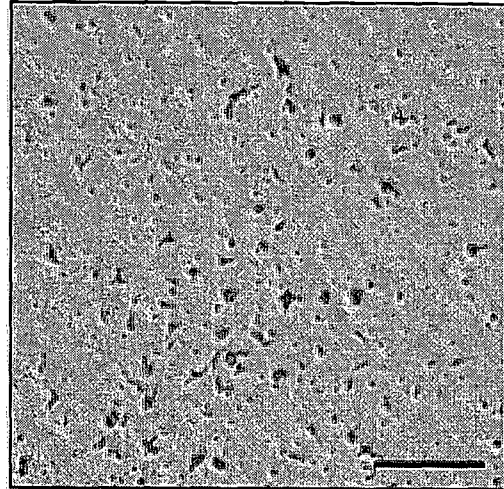
± 7d

Migration assay images

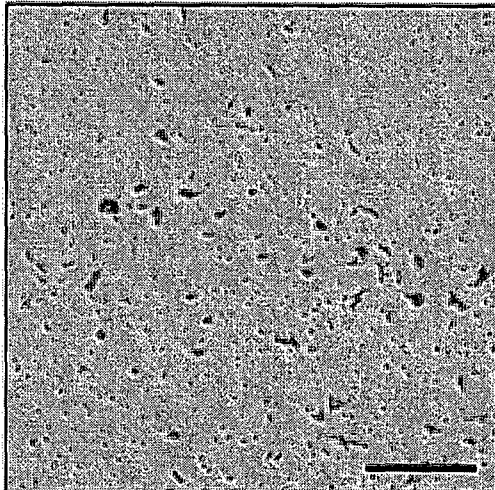
Untreated



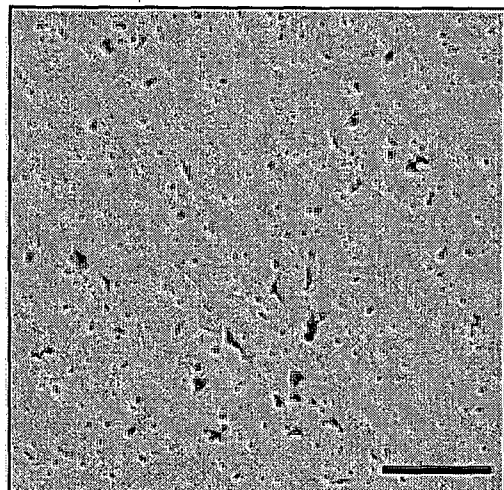
5 μ M LY294002



0.625 μ M ENOBlock



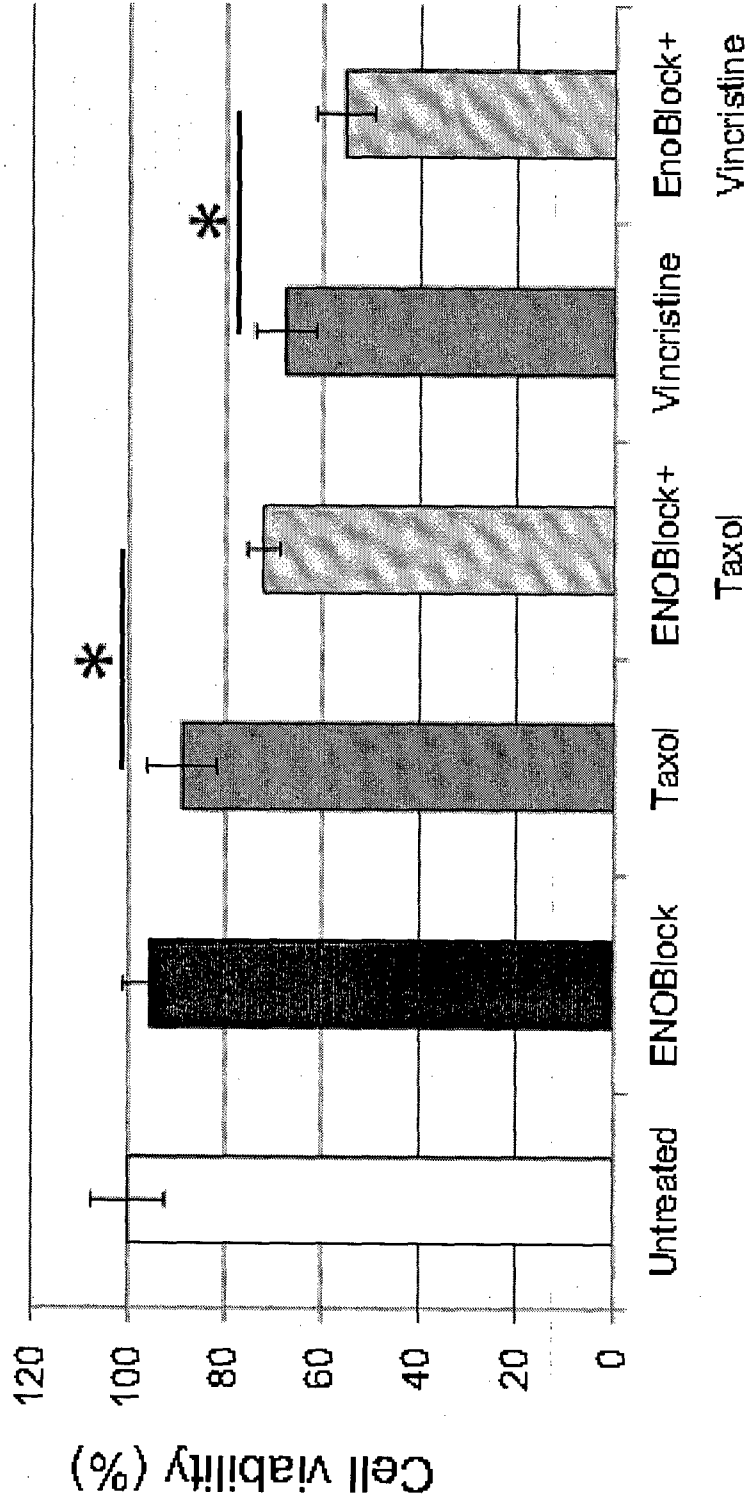
1.25 μ M ENOBlock



17/35

도 7e

Synergic effect with anti-cancer drugs

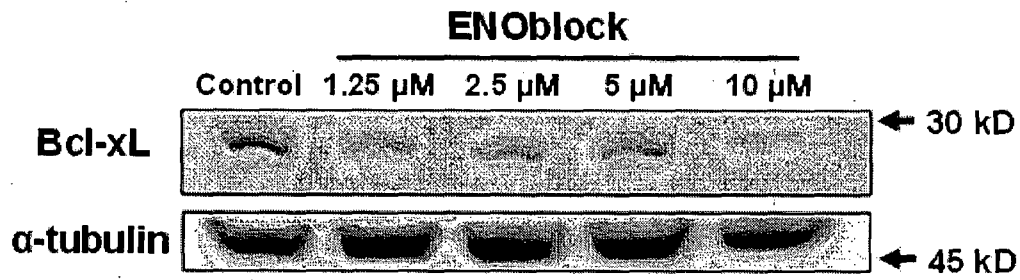
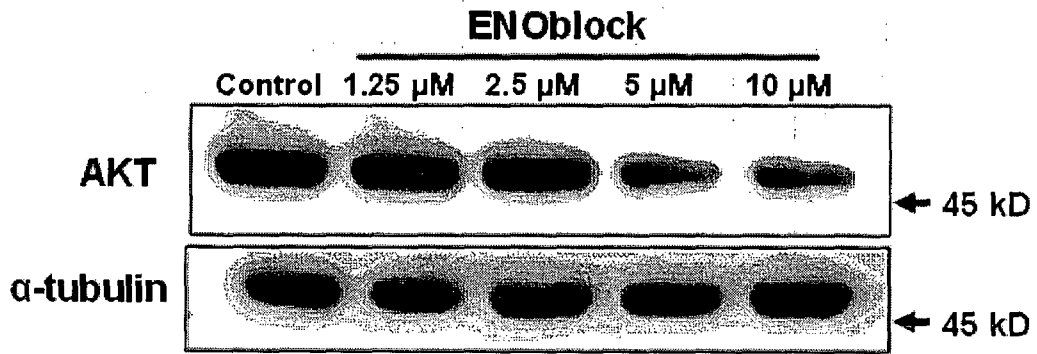


Compound treatment

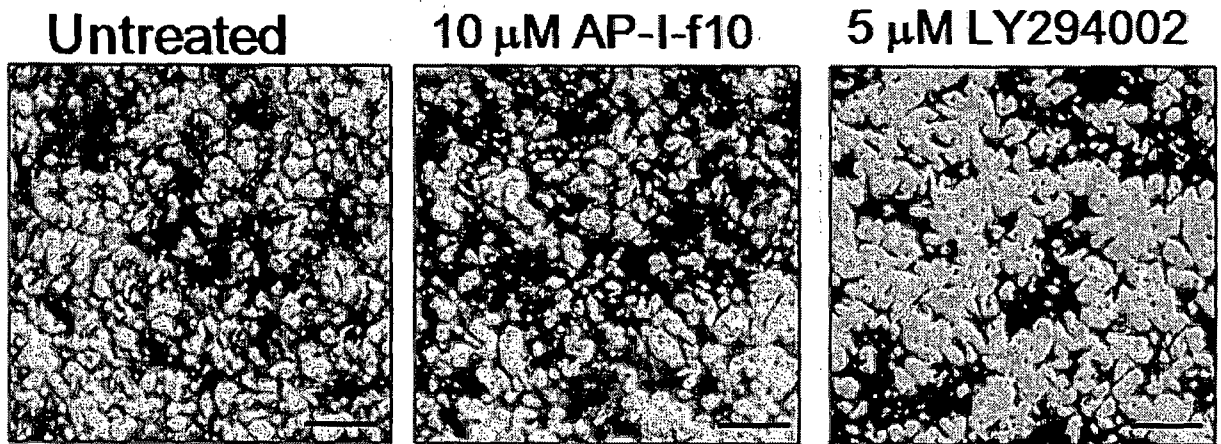
18/35

도 7f

Apoptosis-related protein expression



도 8



도 9a

Toxicological analysis using zebrafish

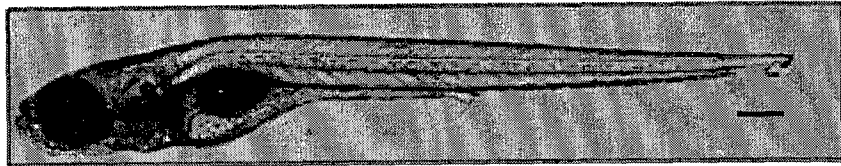
Test Compound	Somite	Tail detachment	Otoliths	Eyes	Heart Beat	Circulation	Delayed Hatching	Skeletal deformities	Lack of swimming
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENOblock(10µM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENOblock(20µM)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ENOblock(40µM)	+	-	-	-	-	+	-	+	+

20/35

도 9b

Microscopic images

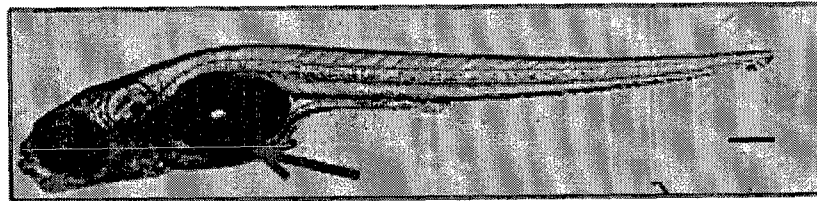
DMSO



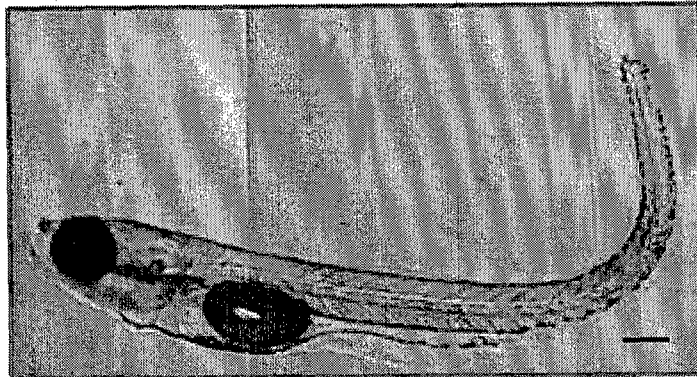
**10 μ M
ENOblock**



**20 μ M
ENOblock**



**40 μ M
ENOblock**

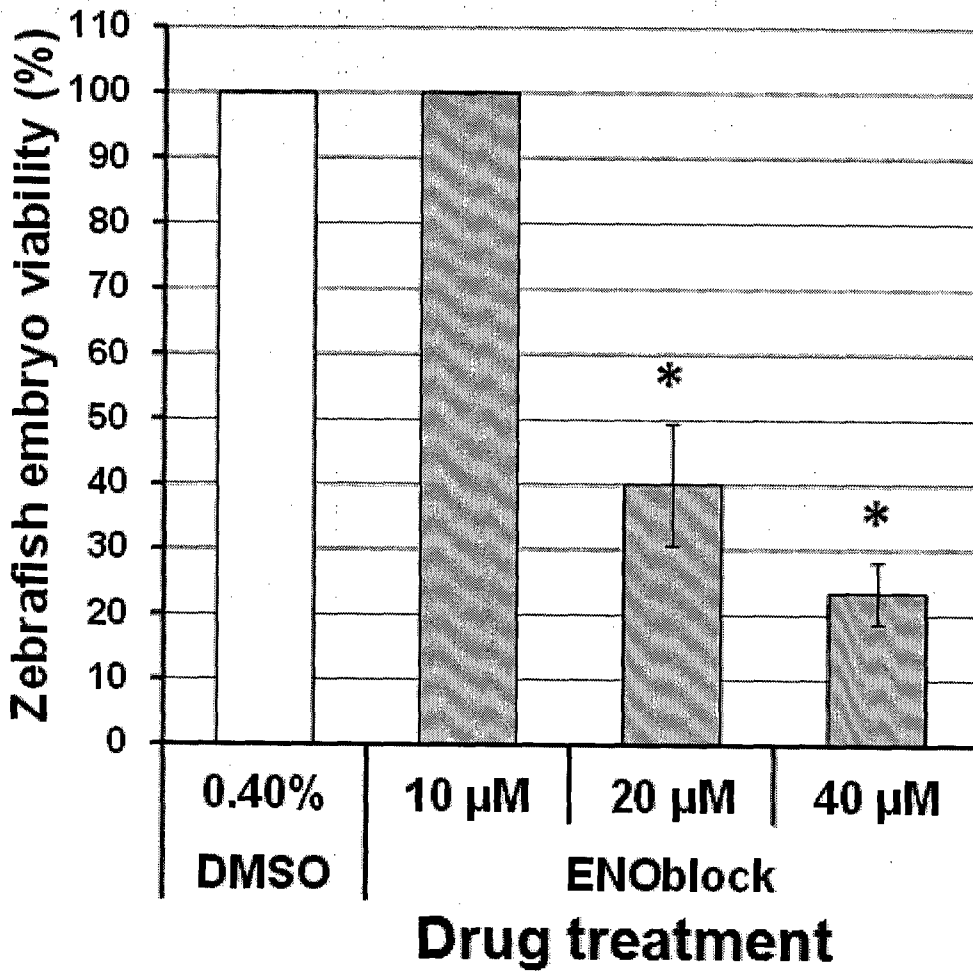


Scale bar=200 μ m

21/35

도 9c

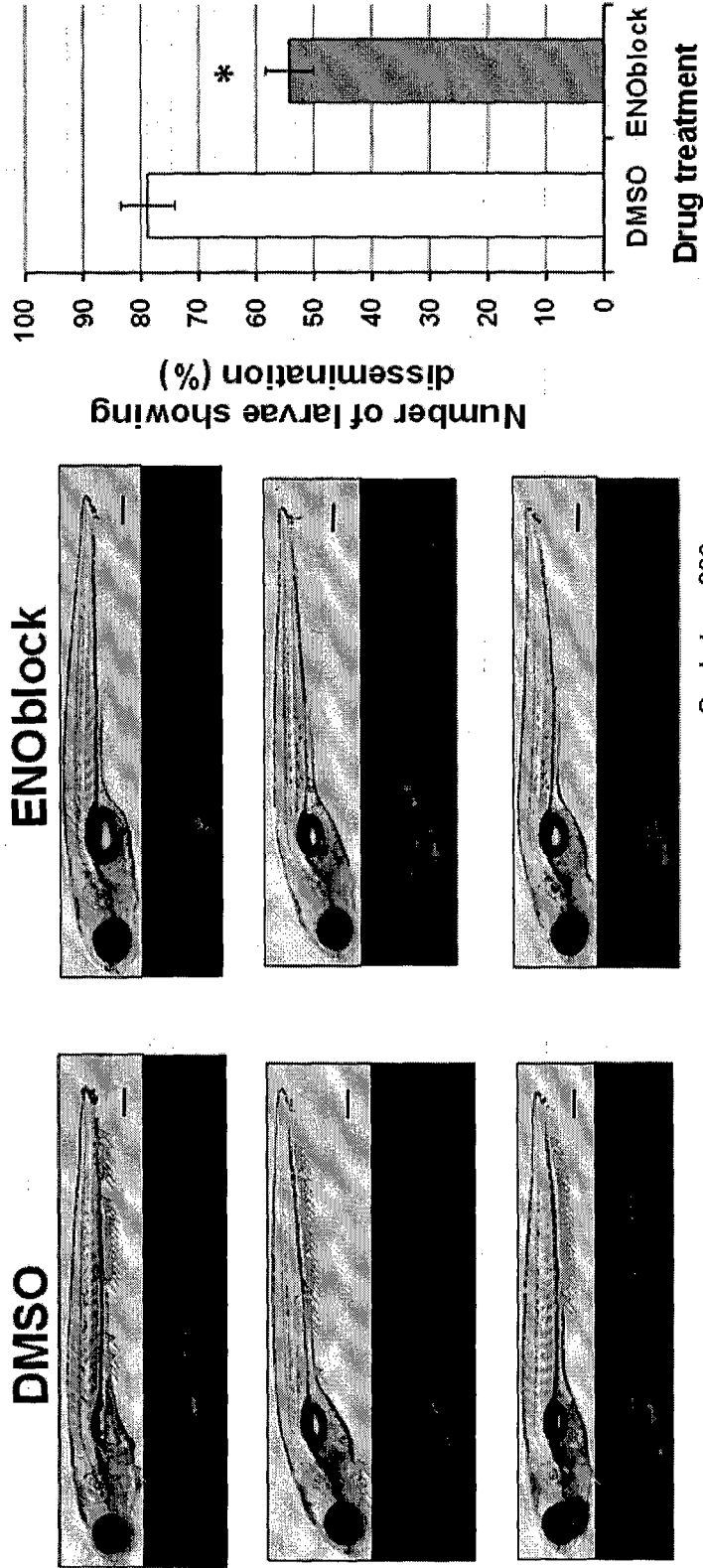
Zebrafish viability



22/35

Figure 9d

Anti-metastasis effect: zebrafish tumor xenograft model



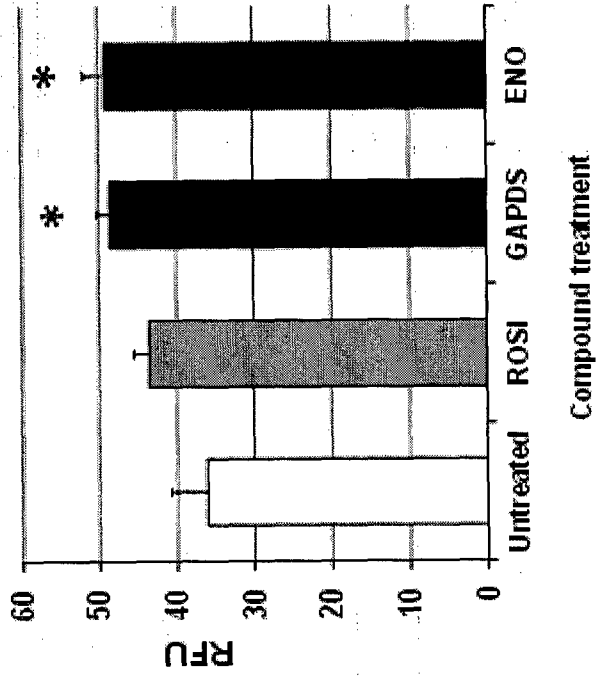
Scale bar=200 μm

Glucose uptake in hepatocytes and kidney cells

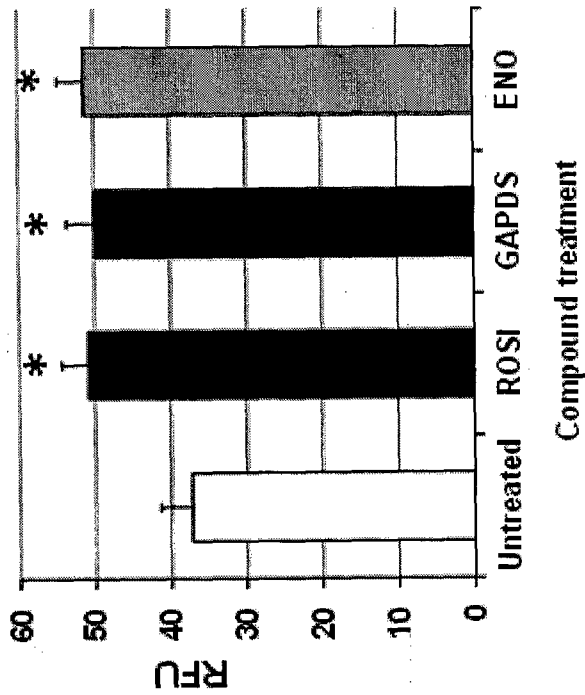
23/35

10a

Kidney cells



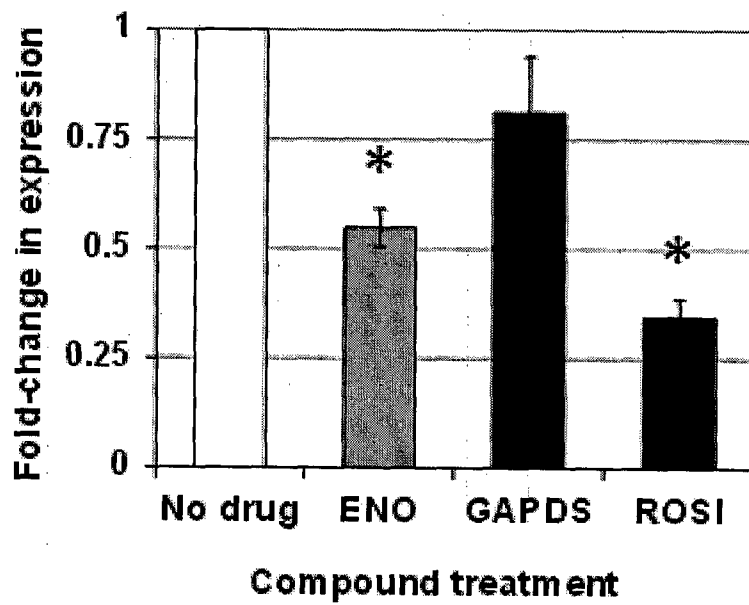
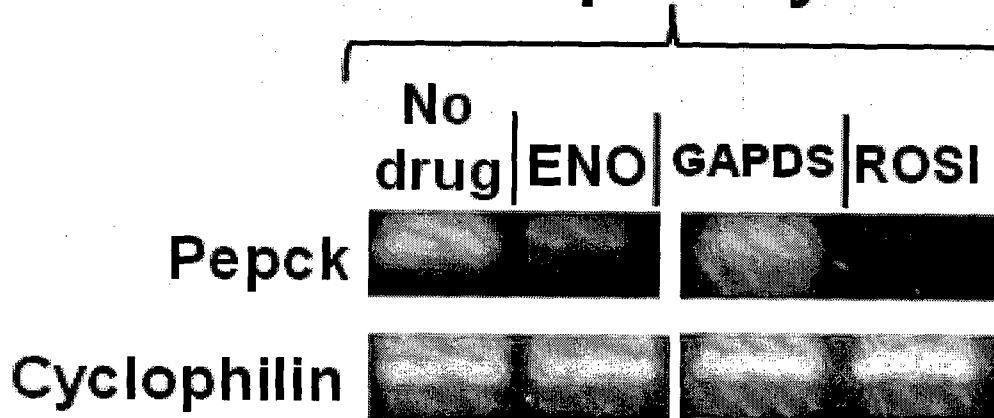
Hepatocytes



24/35

Figure 10b

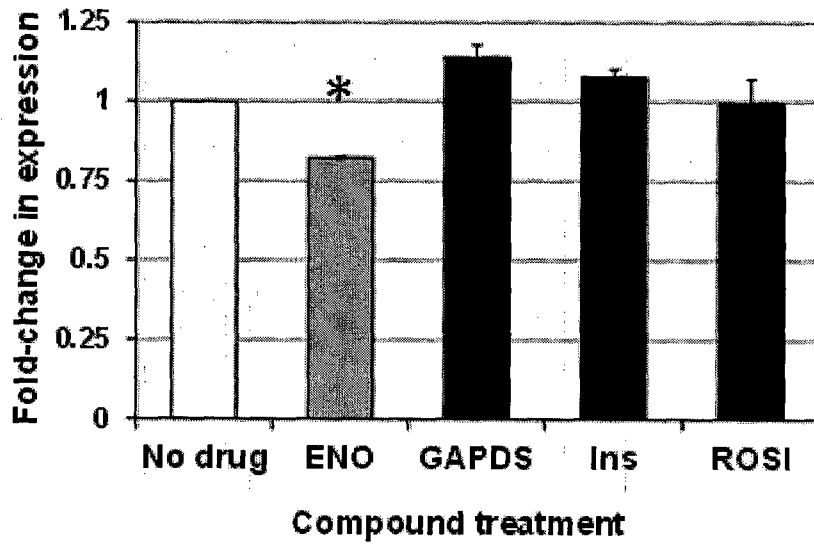
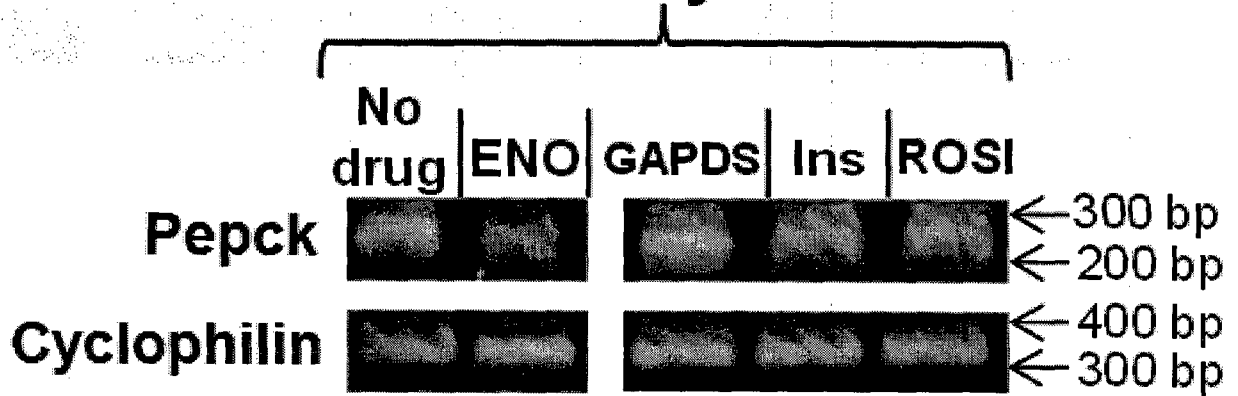
Hepatocytes



25/35

Figure 10c

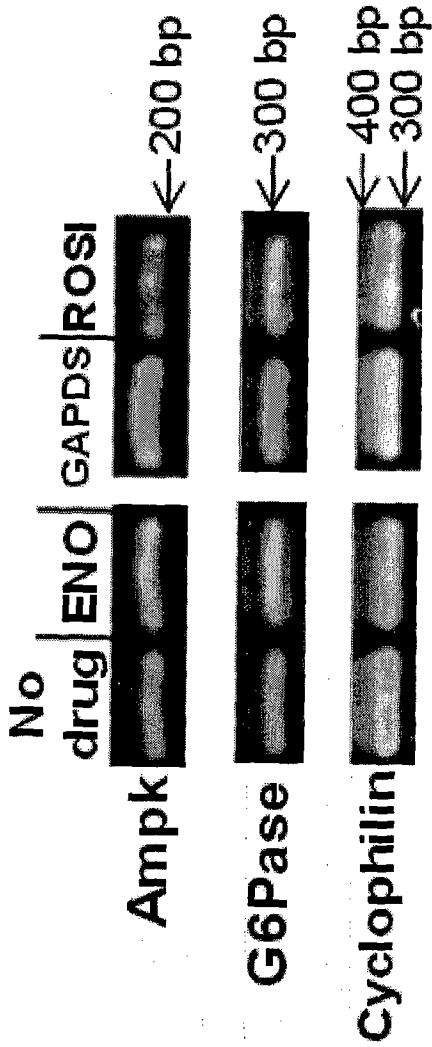
Kidney cells



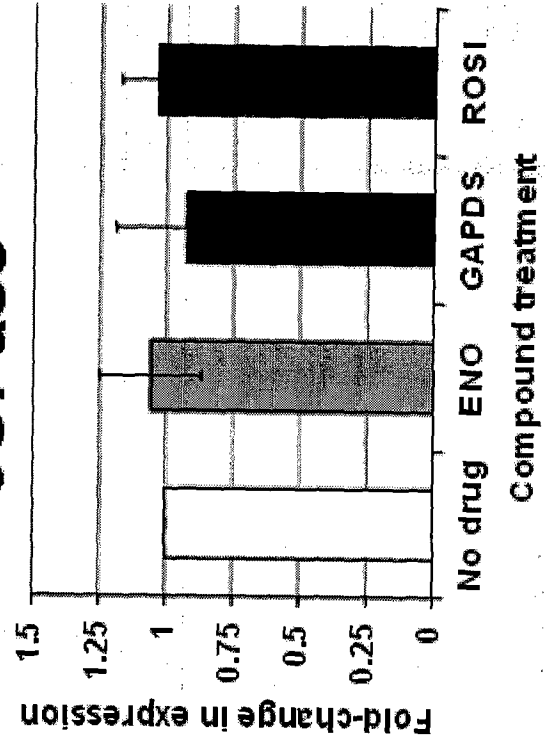
26/35

10d

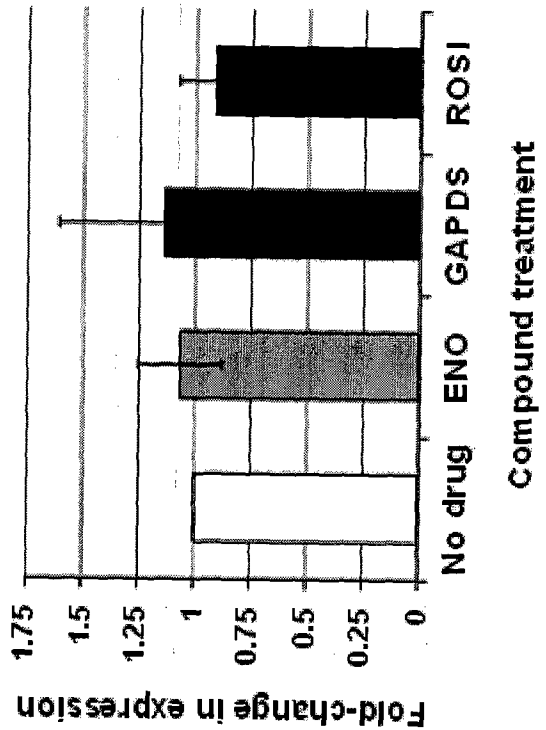
Hepatocytes



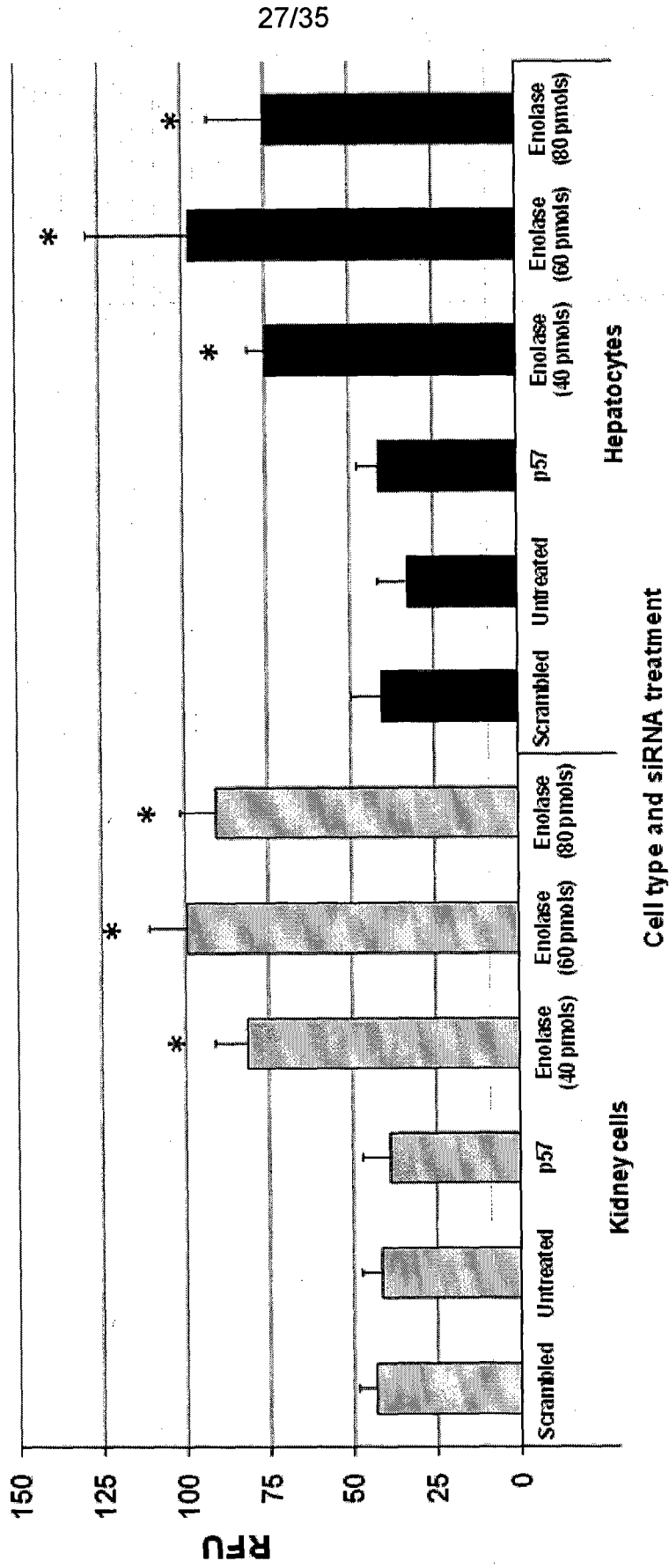
6GPase



AMPK



도 11



28/35

Figure 12a

Schematic for measuring zebrafish PEPCK expression

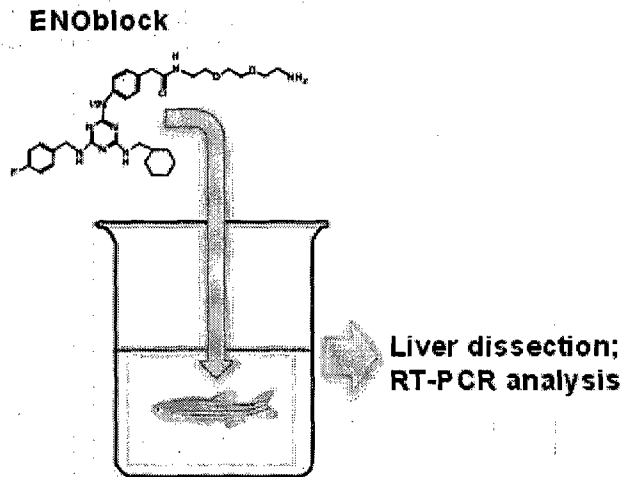
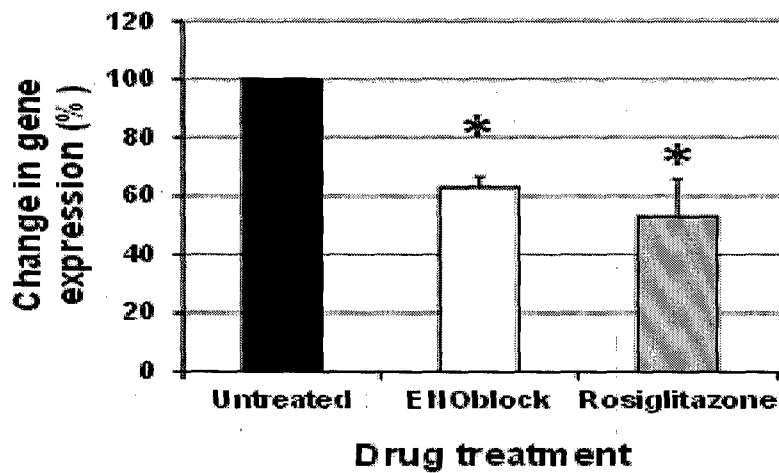
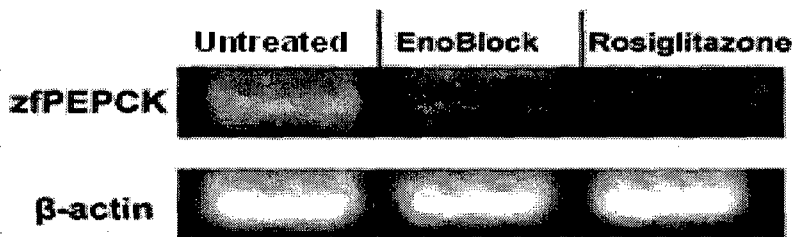


Figure 12b

Zebrafish liver PEPCK expression

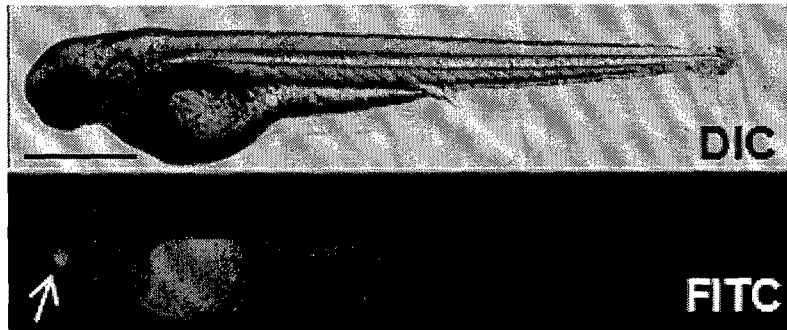


30/35

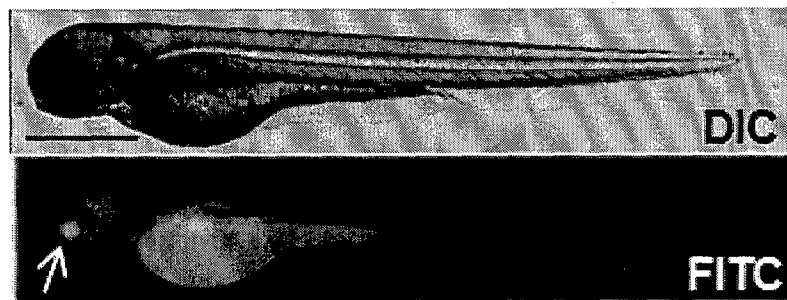
도 12d

Glucose uptake in zebrafish

2-NBDG alone



2-NBDG + ENOblock



2-NBDG + emodin

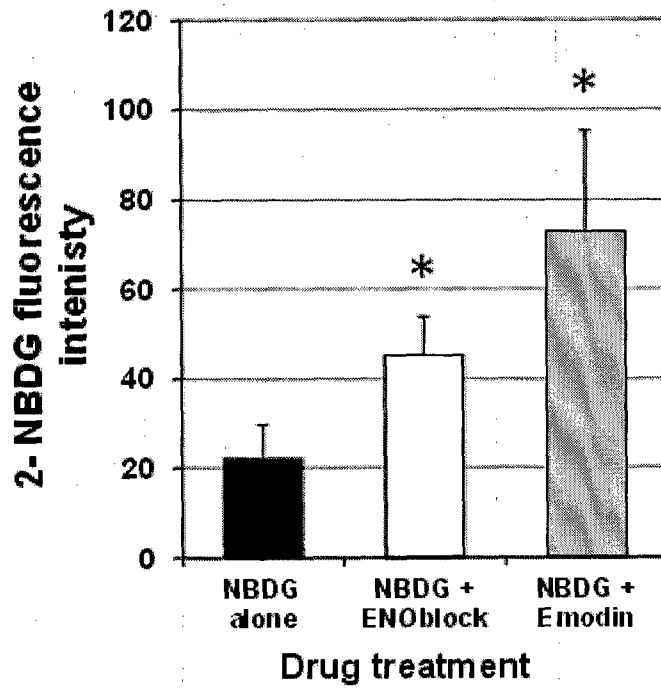


Scale bar=1 mm

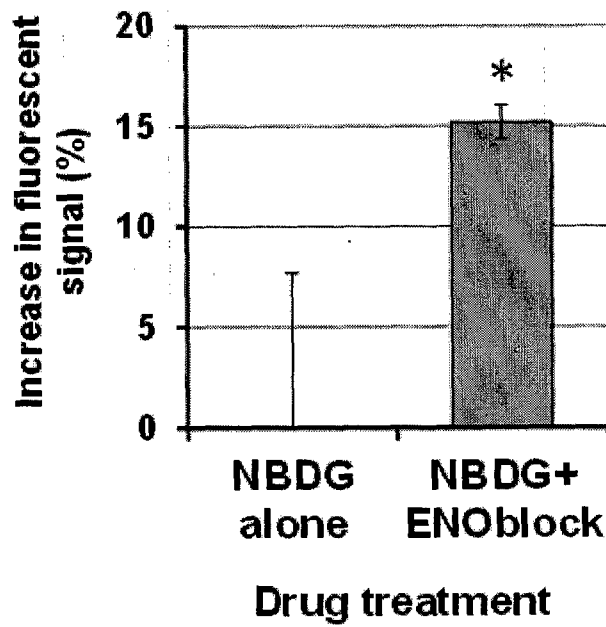
31/35

도 12e

Measurement of fluorescence intensity

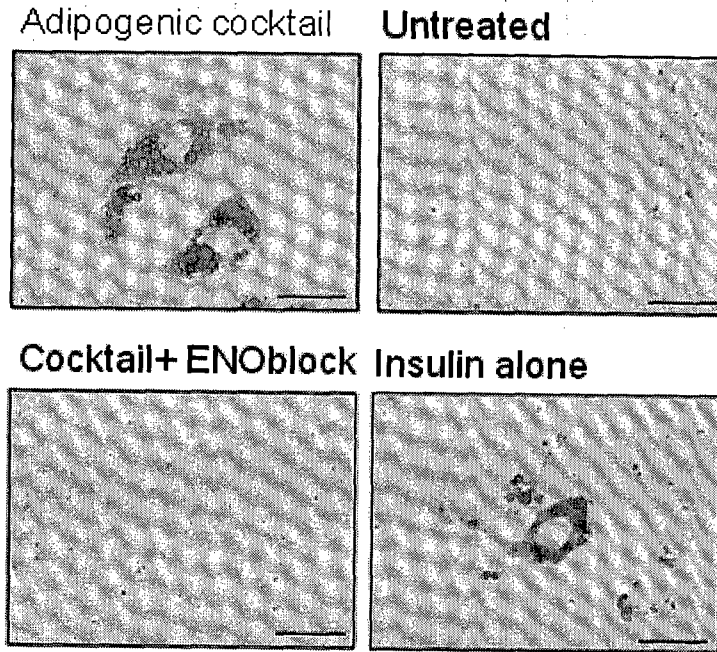


도 13

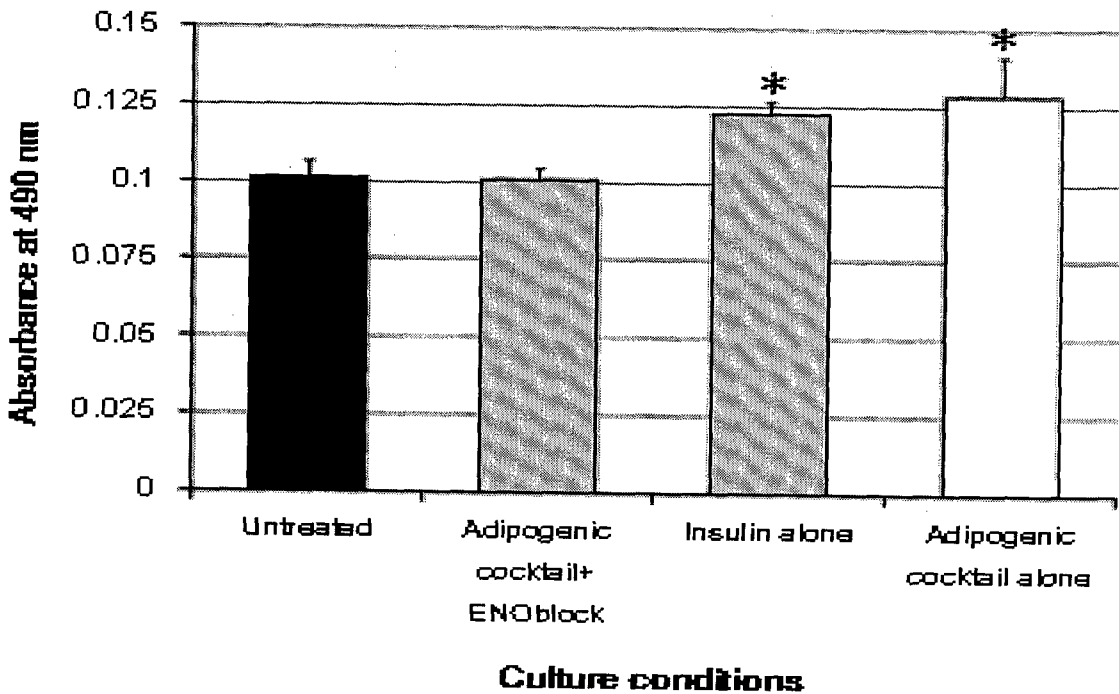


도 14a

(i) Visualization of lipid accumulation



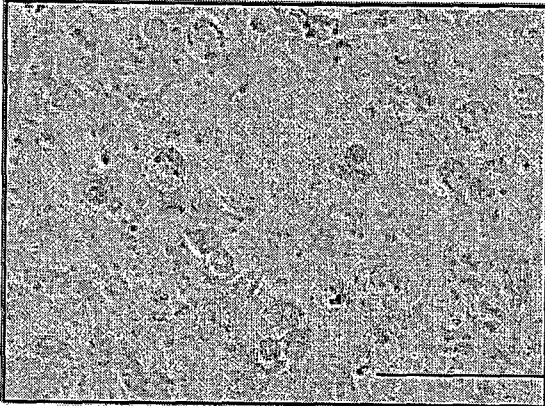
(ii) Assay for lipid accumulation



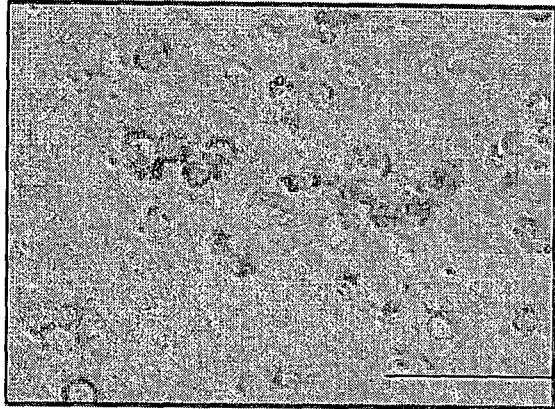
도 14b

(i) Staining for lipid accumulation

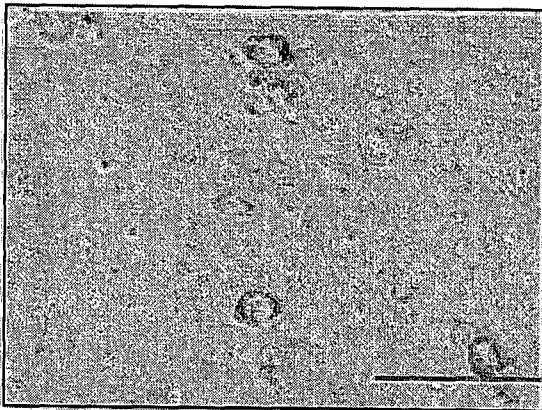
Untreated



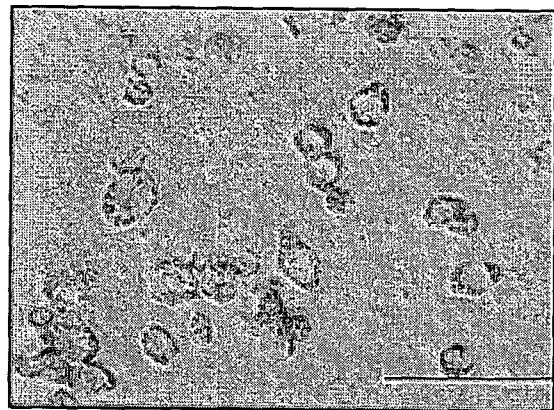
Oleic acid



Oleic acid+ENOblock



Oleic acid+rosiglitazone

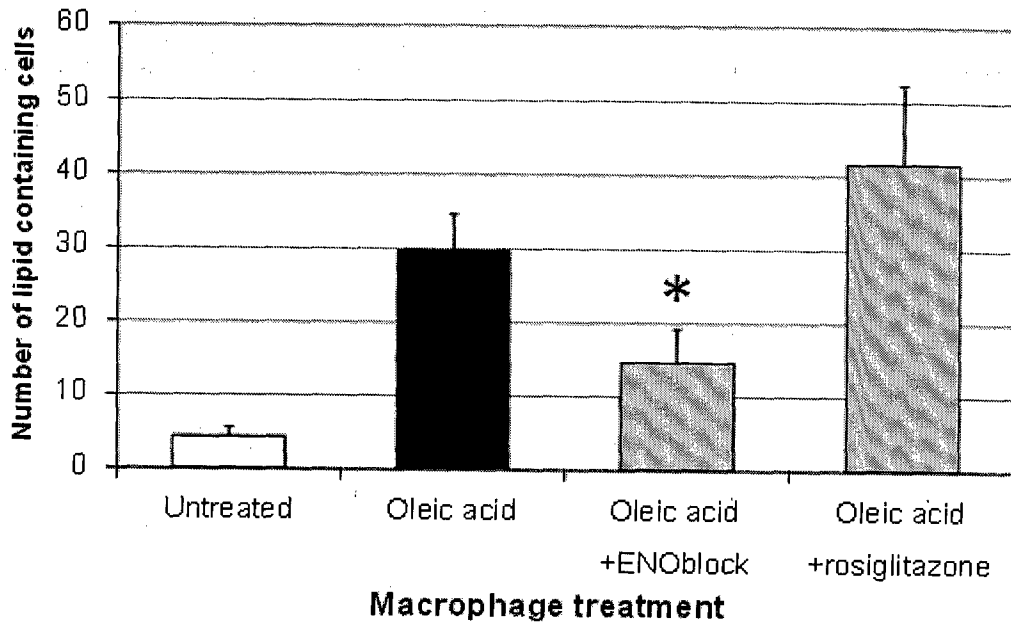


Bar=200 μ m

34/35

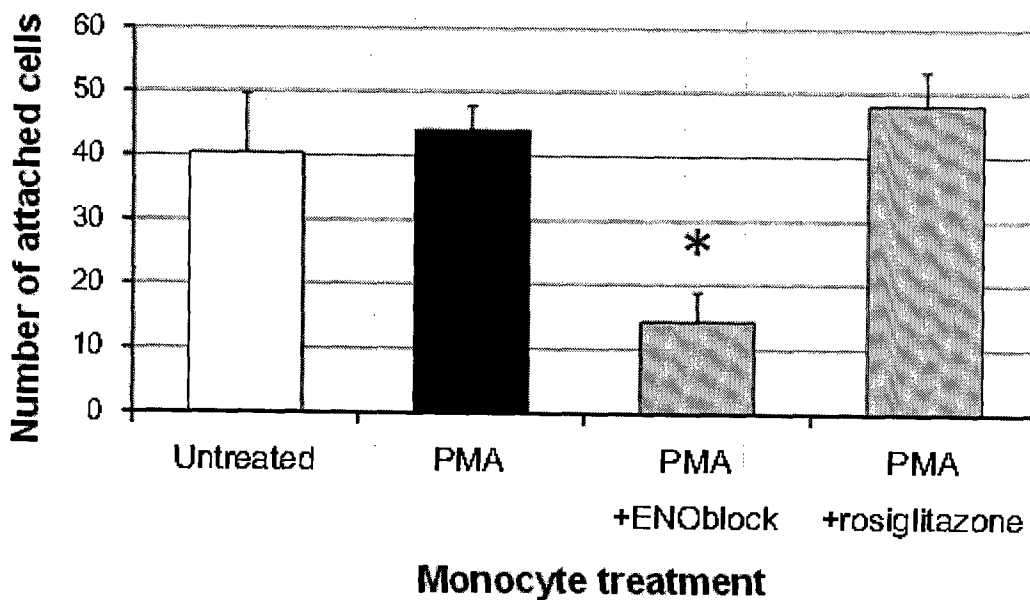
도 14c

(ii) Foam cell numbers



도 14d

(iii) Macrophage numbers



35/35

Figure 14e

(iv) Toxicity of ENOblock for macrophages

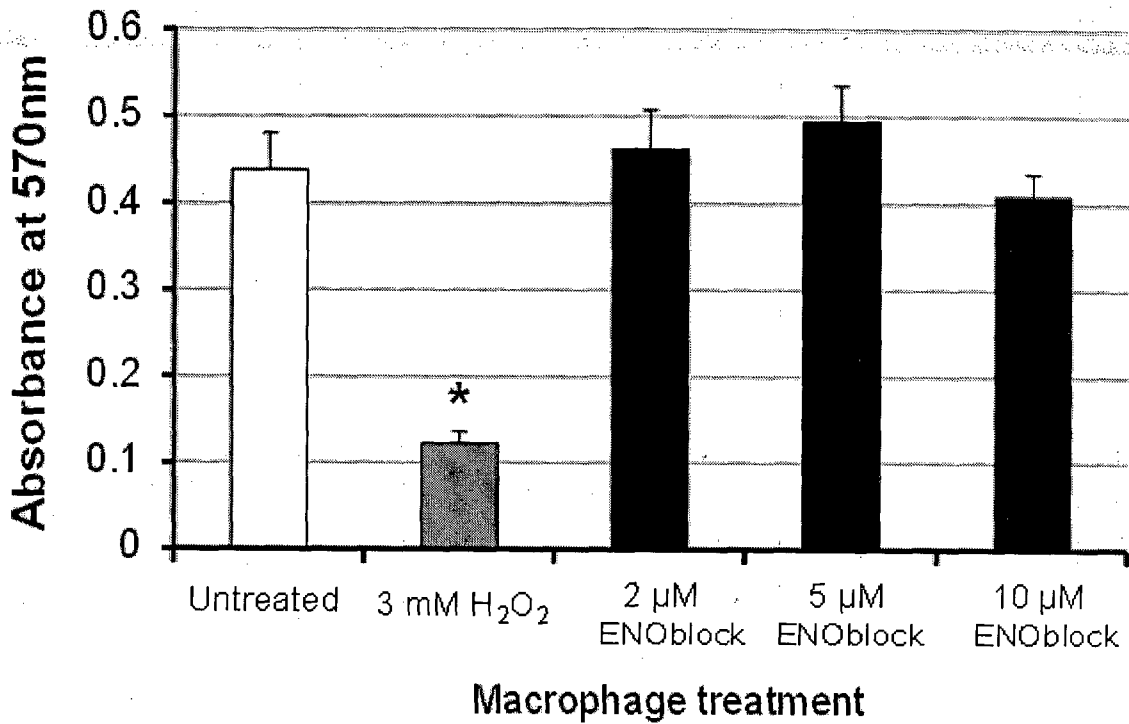
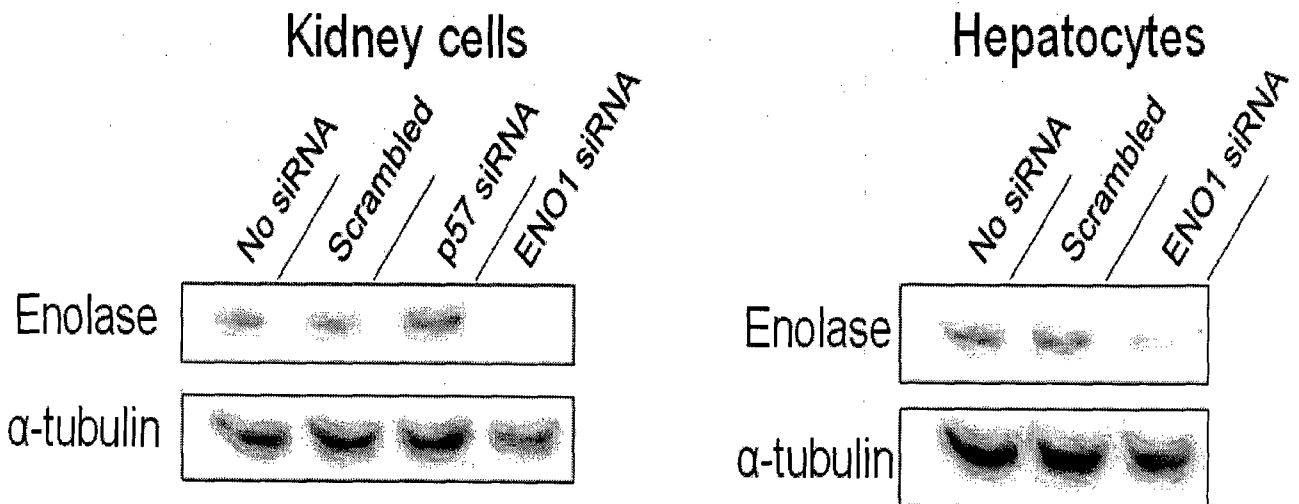


Figure 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/009438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/53(2006.01)i, A61P 35/00(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 31/53; A61P 3/10; G01N 33/15; A61K 45/00; C12Q 1/54; C07D 251/70; A61P 35/00

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 aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal), STN(Registry, CAPlus), Google & Keywords: 2,4,6-triaminotriazine, cancer.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 05536722 A (COE, Jotham W. et al.) 16 July 1996 See the entire document.	1-12
A	WO 2012-015249 A2 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 02 February 2012 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2012-0011664 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 08 February 2012 See the entire document.	1-12
A	EP 1479397 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO. LTD.) 24 November 2004 See the entire document.	1-12
A	JUNG, Da-Woon et al., "Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects." Molecular Biosystems, 2011, vol. 7, no. 2, pp. 346-358 See the entire document.	1-12

 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

10 FEBRUARY 2014 (10.02.2014)

Date of mailing of the international search report

11 FEBRUARY 2014 (11.02.2014)

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/KR2013/009438**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.: **15-28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15-28 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, or to a diagnostic method, 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.: **14, 28**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 14 and 28 refer to multiple dependent claims, thus the claims are not clear.
3. Claims Nos.: **13, 27**
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/KR2013/009438

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 05536722 A	16/07/1996	EP 0613477 A1 KR 10-1994-0703373 A WO 93-10116 A1	01/10/1997 24/10/1994 27/05/1993
WO 2012-015249 A2	02/02/2012	EP 2600147 A2 KR 10-1271218 B1 KR 10-2012-0011667 A KR 20120011667 A US 2013-0115642 A1 WO 2012-015249 A3	05/06/2013 07/06/2013 08/02/2012 08/02/2012 09/05/2013 10/05/2012
KR 10-2012-0011664 A	08/02/2012	KR 10-1314869 B1	27/09/2013
EP 1479397 A1	24/11/2004	AT 511858 T AU 2003-244463 A1 CA 2475432 A1 CN 102151273 A CN 1625410 A CN 1625410 C0 CN 1939307 A CN 1939307 C0 EP 1479397 A4 EP 1479397 B1 ES 2364645 T3 JP 04-325402 B2 KR 10-0581309 B1 KR 10-0875362 B1 KR 20060030922 A PT 1479397 E US 2006-0194803 A1 US 2008-0227785 A1 US 7375222 B2 WO 03-066099 A1	15/06/2011 02/09/2003 14/08/2003 17/08/2011 08/06/2005 08/06/2005 04/04/2007 04/04/2007 07/01/2009 08/06/2011 08/09/2011 02/09/2009 22/05/2006 22/12/2008 11/04/2006 01/09/2011 31/08/2006 18/09/2008 20/05/2008 14/08/2003

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 31/53(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 31/53; A61P 3/10; G01N 33/15; A61K 45/00; C12Q 1/54; C07D 251/70; A61P 35/00

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), STN(Registry, CAPlus), Google & 키워드: 2,4,6-triaminotriazine, cancer.

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 05536722 A (JOTHAM W. COE 외 4명) 1996.07.16 문헌 전체 참조.	1-12
A	WO 2012-015249 A2 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2012.02.02 문헌 전체 참조.	1-12
A	KR 10-2012-0011664 A (광주과학기술원) 2012.02.08 문헌 전체 참조.	1-12
A	EP 1479397 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO. LTD.) 2004.11.24 문헌 전체 참조.	1-12
A	정다운 외 4명, `Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects`, Molecular Biosystems, 2011, Vol. 7, No. 2, pp. 346-358 문헌 전체 참조.	1-12

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 특허문헌 "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 2014년 02월 10일 (10.02.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 02월 11일 (11.02.2014)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 성선영 전화번호 +82-42-481-3487
---	------------------------------------

제2기제란 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: 15-28
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제15항 내지 제28항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 또는 진단 방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사 할 의무가 없는 대상에 해당하는 것으로 인정됩니다.
2. 청구항: 14, 28
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제14항 및 제28항은 다중 종속청구항을 인용하고 있으므로 청구범위가 명확하지 않습니다.
3. 청구항: 13, 27
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기제란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 05536722 A	1996/07/16	EP 0613477 A1 KR 10-1994-0703373 A WO 93-10116 A1	1997/10/01 1994/10/24 1993/05/27
WO 2012-015249 A2	2012/02/02	EP 2600147 A2 KR 10-1271218 B1 KR 10-2012-0011667 A KR 20120011667 A US 2013-0115642 A1 WO 2012-015249 A3	2013/06/05 2013/06/07 2012/02/08 2012/02/08 2013/05/09 2012/05/10
KR 10-2012-0011664 A	2012/02/08	KR 10-1314869 B1	2013/09/27
EP 1479397 A1	2004/11/24	AT 511858 T AU 2003-244463 A1 CA 2475432 A1 CN 102151273 A CN 1625410 A CN 1625410 C0 CN 1939307 A CN 1939307 C0 EP 1479397 A4 EP 1479397 B1 ES 2364645 T3 JP 04-325402 B2 KR 10-0581309 B1 KR 10-0875362 B1 KR 20060030922 A PT 1479397 E US 2006-0194803 A1 US 2008-0227785 A1 US 7375222 B2 WO 03-066099 A1	2011/06/15 2003/09/02 2003/08/14 2011/08/17 2005/06/08 2005/06/08 2007/04/04 2007/04/04 2009/01/07 2011/06/08 2011/09/08 2009/09/02 2006/05/22 2008/12/22 2006/04/11 2011/09/01 2006/08/31 2008/09/18 2008/05/20 2003/08/14