(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0106188
(43) 공개일자 2018년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4985 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/4436 (2006.01) *A61K 31/4439* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4985 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0033953
(22) 출원일자 2017년03월17일
심사청구일자 2018년03월12일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
김인기
서울특별시 강동구 고덕로 131, 126동 2201호 (암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)
남기엽
경기도 고양시 일산서구 일산로 487, 1801동 704호 (일산동, 후곡마을18단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

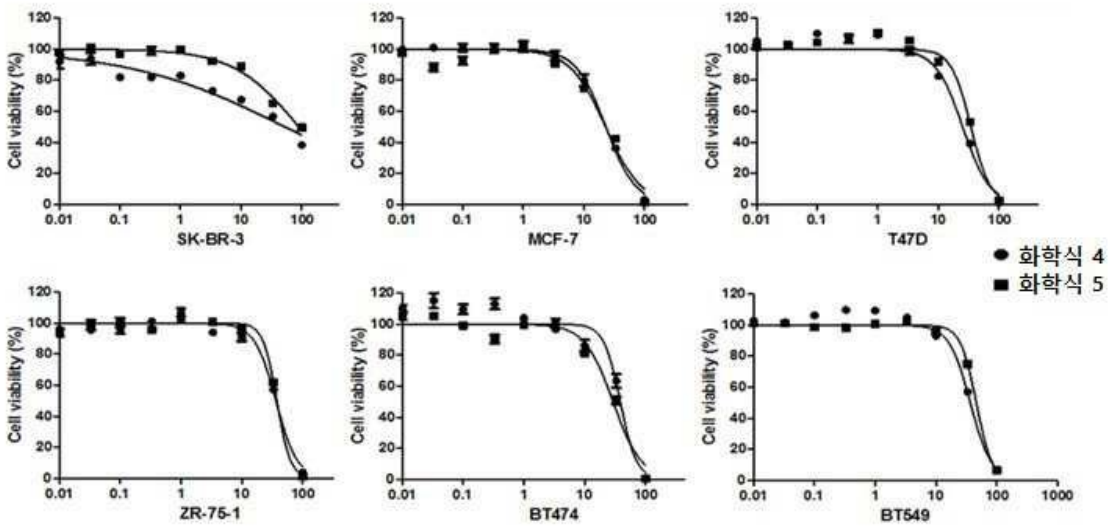
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **CDK9 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 CDK9 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 컴퓨터를 이용한 가상탐색을 진행하여, 1,260,775개의 virtual chemical library로부터 파마코포어 모델을 사용하여, 1820개의 1차 파마코포어 virtual hit을 얻었고, CDOCKER 프로그램을 사용하여 500개의 2차 virtual hit을 얻고, consensus score 5 이상인 2차 virtual hit을 대상으로 visual inspection을 이용하여 15개의 3차 virtual hit을 도출하였다. 상기 도출된 화합물들의 CDK9에 대한 시험관 내(in vitro) 활성을 측정하여 4개의 화합물을 항암 후보물질로 발굴하였다. 따라서, 상기 화합물들은 항암 치료에 있어 항암 약물로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61K 31/4436 (2013.01)
A61K 31/4439 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
(72) 발명자
김소영
서울특별시 강동구 풍성로 127, 104동 406호 (성내동, 성내동삼성아파트)
박소정
서울특별시 강동구 성내로 91, 1105호 (성내동, 다성이즈빌 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A1A1003831
부처명 미래부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공기초- 일반연구자 지원사업-신진연구자 지원사업
연구과제명 암세포에서 Syk가 Mcl-1의 분해를 조절하여 항암제 내성을 부여하는 기전에 대한 분자세포생물학적 연구
기 여 율 40/100
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1D1A1B03932365
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공기초-일반연구자 지원사업-기본연구
연구과제명 히스톤 메칠화 효소 EHMT2의 억제로 발생하는 단백질 합성 제어 기작이 삼중음성 유방암 특이적 세포사멸을 유도하는 신호 전달 기전 연구
기 여 율 60/100
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

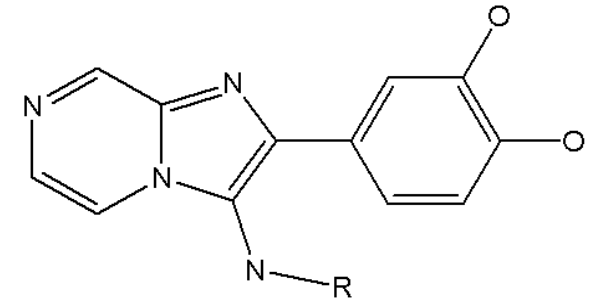
명 세 서

청구범위

청구항 1

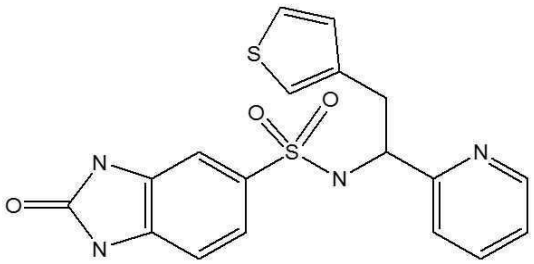
하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

<화학식 1>



상기 화학식 1에서, R은 퓨란-2-일(C1 내지 C4)알킬, 페닐(C1 내지 C4)알킬또는 티오펜-2일(C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

<화학식 2>



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 4-(3-((퓨란-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올, 4-(3-(페네틸아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올 또는 4-(3-((티오펜-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 CDK9(cyclin dependent kinase 9) 억제제인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

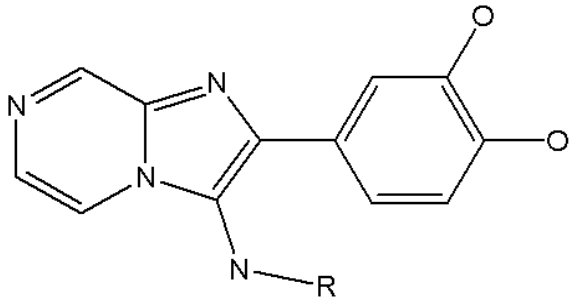
청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

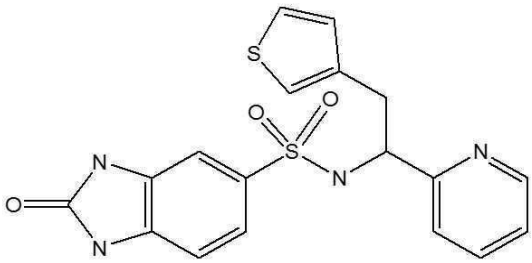
하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

<화학식 1>



상기 화학식 1에서, R은 퓨란-2-일(C1 내지 C4)알킬, 페닐(C1 내지 C4)알킬또는 티오펜-2일(C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

<화학식 2>



청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 4-(3-((퓨란-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올, 4-(3-(페네틸아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올 또는 4-(3-((티오펜-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CDK9(cyclin dependent kinase 9) 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] CDK9은 cyclin T 혹은 K와 복합체를 이루어 RNA polymerase II의 C 말단을 인산화 시킴으로써 mRNA 전사(transcription)의 과정을 제어한다. CDK9의 억제는 단백질 합성비율을 전반적으로 낮추기 때문에, 반감기가 짧은 단백질들의 경우 CDK9 억제시에 빠르게 사라지는 경향이 있다. 이러한 단백질로는 Myc, Cyclin D1, Mcl-1등을 예로 들 수 있다. 다수의 암세포의 생장 및 생존에 필요한 단백질이 바로 이러한 반감기가 짧은 단백질로 구성되기 때문에 CDK9 억제 물질을 발굴하면 항암제로 사용할 가능성이 충분히 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 미국공개특허 US 2016-0068496 (2016.03.10 공개)

발명의 내용

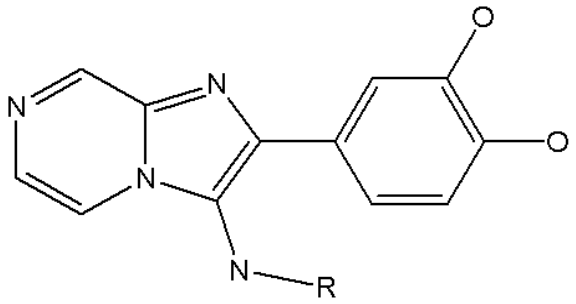
해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 CDK9 억제제를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물 또는 식품조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

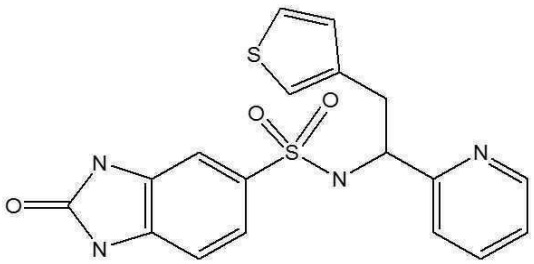
[0006] <화학식 1>



[0007]

[0008] 상기 화학식 1에서, R은 퓨란-2-일(C1 내지 C4)알킬, 페닐(C1 내지 C4)알킬또는 티오펜-2일(C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

[0009] <화학식 2>



[0010]

[0011] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 CDK9 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 컴퓨터를 이용한 가상탐색을 진행하여, 1,260,775개의 virtual chemical library로부터 파마코포어 모델을 사용하여, 1820개의 1차 파마코포어 virtual hit을 얻었고, CDOCKER 프로그램을 사용하여 500개의 2차 virtual hit을 얻고, consensus score 5 이상인 2차 virtual hit을 대상으로 visual inspection을 이용하여 15개의 3차 virtual hit을 도출하였다. 상기 도출된 화합물들의 CDK9에 대한 시험관 내(in vitro) 활성을 측정하여 4개의 화합물을 항암후보물질로 발굴하였다. 따라서, 상기 화합물들은 항암 치료에 있어 항암 약물로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 컴퓨터를 이용한 가상탐색 진행과정(Flow chart)을 나타낸다(단백질구조: 4BCF.pdb).

도 2는 (A) 2-옥소-N-(1-(피리딘-3-일)-2-(티오펜-3-일)에틸)-2,3-디하이드로-1H-벤조[d]이미다졸-5-설폰아미드[2-oxo-N-(1-(pyridin-3-yl)-2-(thiophen-3-yl)ethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-5-sulfonamide; 화학식 2] 및 (B) 4-(3-((퓨란-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올[4-(3-((furan-2-ylmethyl)amino)imidazo[1,2-a]pyrazin-2-yl)benzene-1,2-diol; 화학식 3]의 CDK9 키나아제와의 도킹 예측 구

조를 나타낸다.

도 3은 인산화 효소(CDK9) 활성 억제 평가의 분석 원리를 나타낸다.

도 4는 화학식 2 및 화학식 3 화합물의 인산화 효소(CDK9) 활성 억제 평가 결과를 나타낸다.

도 5는 화학식 3 화합물의 농도구배 의존적 CDK9 활성 감소 결과를 나타낸다(IC50 = 15.7 uM).

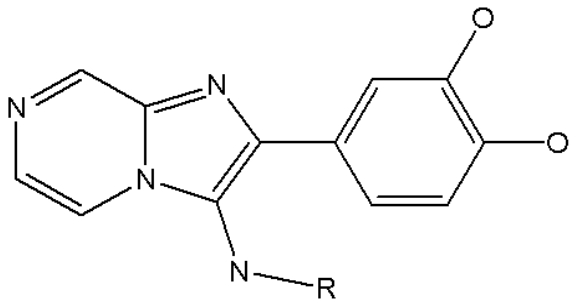
도 6은 화학식 4 및 화학식 5 화합물의 농도구배 의존적 CDK9 활성 감소 결과를 나타낸다(화학식 4 화합물 IC50 = 7.885 uM, 화학식 5 화합물 IC50 = 5.127 uM).

도 7은 화학식 4 및 화학식 5 화합물에 대한 유방암 세포주 세포 사멸 효능 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

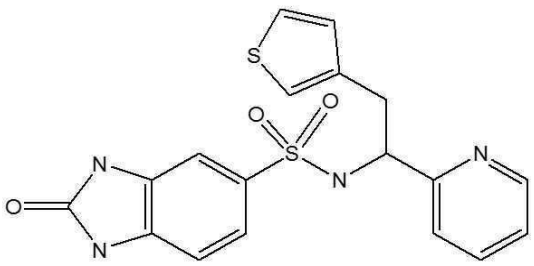
[0015] <화학식 1>



[0016]

[0017] 상기 화학식 1에서, R은 퓨란-2-일(C1 내지 C4)알킬, 페닐(C1 내지 C4)알킬또는 티오펜-2일(C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

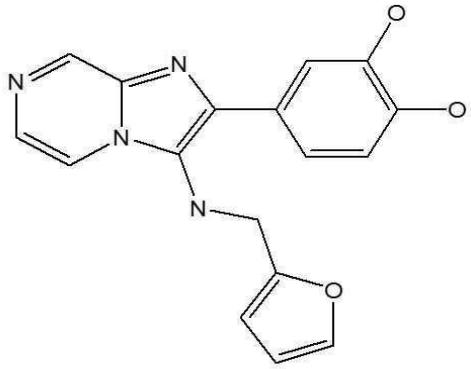
[0018] <화학식 2>



[0019]

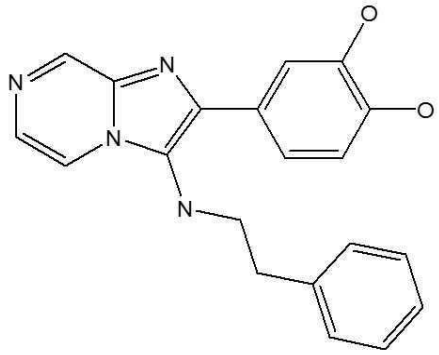
[0020] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 4-(3-((퓨란-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올(화학식 3), 4-(3-(페네틸아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올(화학식 4) 또는 4-(3-((티오펜-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올(화학식 5)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] <화학식 3>



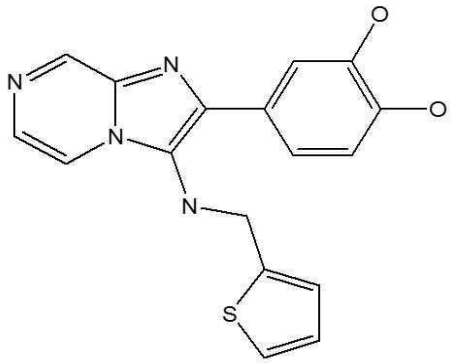
[0022]

[0023] <화학식 4>



[0024]

[0025] <화학식 5>



[0026]

[0027] 바람직하게는, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 CDK9(cyclin dependent kinase 9) 억제제일 수 있다.

[0028] 바람직하게는, 상기 암은 뇌종양, 섬유육종, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 직장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암 또는 피부암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상기 암은 본 발명의 실시예에서 기재한 유방암이 가장 적합하다.

[0029] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체,

부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

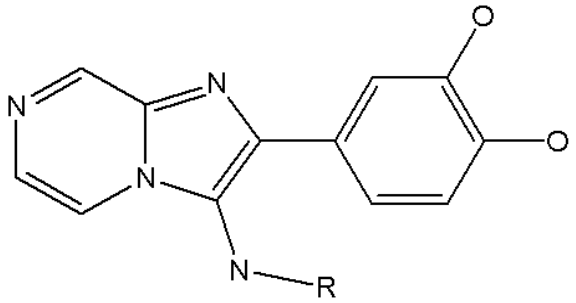
[0032] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0033] 상기 약학조성물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

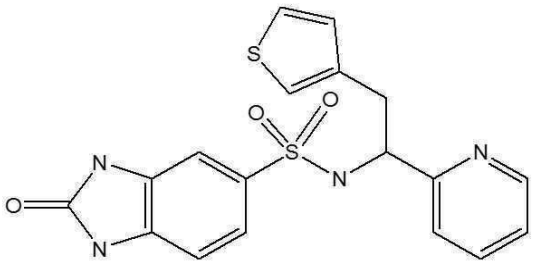
[0036] <화학식 1>



[0037]

[0038] 상기 화학식 1에서, R은 퓨란-2-일(C1 내지 C4)알킬, 페닐(C1 내지 C4)알킬또는 티오펜-2일(C1 내지 C4)알킬 중 어느 하나임.

[0039] <화학식 2>



[0040]

[0041] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 4-(3-((퓨란-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올, 4-(3-(페네틸아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올 또는 4-(3-((티오펜-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 식품조성물이란, 암 예방 또는 개선을 위한 식품조성물로 다양하게 이용되는 것으로서, 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 100%의 비율로 첨가할 수 있다. 여기서, 상기 식품조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다. 그 외 본 발명의 식품조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성풍미제 및 천연풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 100 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0044] 하기의 실험예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

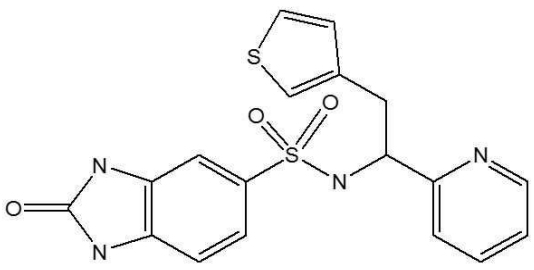
[0045] **<실험예>**

[0046] 1. 물질의 디자인

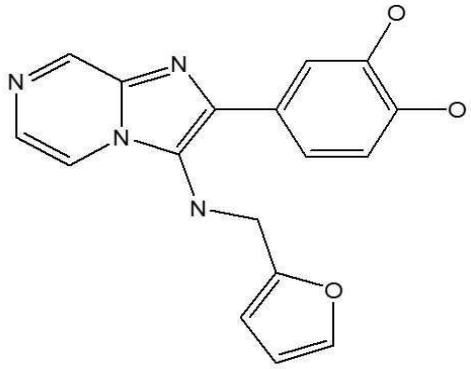
[0047] 도 1에 나타낸 바와 같이, 컴퓨터를 이용한 가상탐색을 진행하여, 1,260,775개의 virtual chemical library로부터 파마코포어 모델을 사용하여, 1820개의 1차 파마코포어 virtual hit을 얻었고, CDOCKER 프로그램을 사용하여 500개의 2차 virtual hit을 얻고, consensus score 5 이상인 2차 virtual hit을 대상으로 visual inspection을 이용하여 15개의 3차 virtual hit을 도출하였다.

[0048] 3차 virtual hit을 실제 chemical library 회사(ASINEX, ChemDiv사 등)으로부터 구입하여 CDK9에 대한 시험관내(in vitro) 활성을 측정하여 2-옥소-N-(1-(피리딘-3-일)-2-(티오펜-3-일)에틸)-2,3-디하이드로-1H-벤조[d]이미다졸-5-설폰아미드[2-oxo-N-(1-(pyridin-3-yl)-2-(thiophen-3-yl)ethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-5-sulfonamide; 화학식 2]과 4-(3-((퓨란-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올[4-(3-((furan-2-ylmethyl)amino)imidazo[1,2-a]pyrazin-2-yl)benzene-1,2-diol; 화학식 3] 화합물을 도출하였다(도 2). 또한, 화학식 3 화합물의 기본구조를 바탕으로 유사구조를 확보하여, 4-(3-(페네틸아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올[4-(3-(phenethylamino)imidazo[1,2-a]pyrazin-2-yl)benzene-1,2-diol; 화학식 4] 및 4-(3-((티오펜-2-일메틸)아미노)이미다조[1,2-a]피라진-2-일)벤젠-1,2-디올[4-(3-((thiophen-2-ylmethyl)amino)imidazo[1,2-a]pyrazin-2-yl)benzene-1,2-diol; 화학식 5] 화합물도 도출하였다.

[0049] <화학식 2>

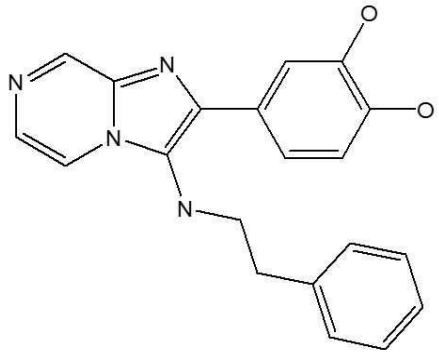
[0050] 

[0051] <화학식 3>



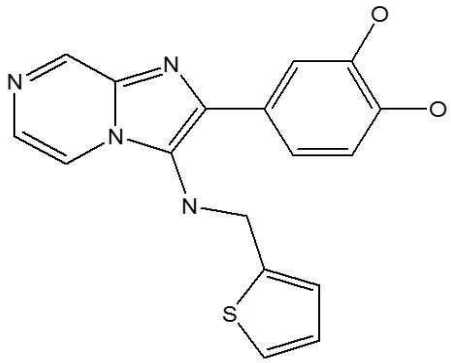
[0052]

[0053] <화학식 4>



[0054]

[0055] <화학식 5>



[0056]

[0057] 2. 물질의 합성

표 1

[0058]

코드	화합물명	화학식	분자량
AEM 17765069	2-oxo-N-(1-(pyridin-3-yl)-2-(thiophen-3-yl)ethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazole-5-sulfonamide (화학식 2)	C18H16N4O3S2	400.47
AEM 10039640	4-(3-((furan-2-ylmethyl)amino)imidazo[1,2-a]pyrazin-2-yl)benzene-1,2-diol (화학식 3)	C17H14N4O3	322.32
AEM 10039644	4-(3-(phenethylamino)imidazo[1,2-a]pyrazin-2-yl)benzene-1,2-diol (화학식 4)	C20H18N4O2	346.39
AEM 10039639	4-(3-((thiophen-2-ylmethyl)amino)imidazo[1,2-a]pyrazin-2-yl)benzene-1,2-diol (화학식 5)	C17H14N4O2S	338.39

[0059] **<실시예 1> 화학식 2 화합물(AEM-17765069) 및 화학식 3 화합물(AEM-10039640)의 인산화 효소(CDK9) 활성 억제 평가**

[0060] **1. 실험 방법**

[0061] LifeTechnology 사 (현 Thermo Fischer)의 Adapta kinase assay set을 사용하였다. 조성은 다음과 같다.

Description	Part Name	Catalog #
Kinase Reaction Buffer	5X Kinase Buffer A	PV3189
	Additives: none	*N/A*
Kinase	Cdk9/cyclin T1	PV4131
Substrate	Cdk7/9tide	PV5090
Adapta™ Assay Kit:	Adapta™ Universal Kinase Assay Kit	PV5099
Antibody	*Adapta™ Eu-anti-ADP Antibody*	
Tracer	*10 µM Alexa Fluor® 647 ADP Tracer*	
Antibody Dilution Buffer	*TR-FRET Dilution Buffer*	
500 mM EDTA	*Kinase Quench Buffer*	
10 mM ATP	*10 mM ATP*	
10 mM ADP	*10 mM ADP*	

[0062]

[0063] **2. 분석의 원리**

[0064] Kinase의 반응이 일어나면 ATP가 에너지원으로 사용되므로 부산물로 ADP가 형성된다. 반응이 끝난 뒤 Europium이 연결된 ADP 인지 항체와 Alexa Fluor 647 형광물질이 연결된 ADP tracer를 반응에 주입하면 ATP의 부산물로 만들어진 ADP와 ADP-Alexa FL647 tracer가 경쟁적으로 항체와 결합한다. FL647 tracer와 항체에 연결된 Europium은 상호 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)반응을 일으켜 high FRET ratio를 만들어 낸다. 따라서 인산화 반응이 억제될수록 FRET ratio가 높으며, 인산화 반응이 잘 일어날수록 FRET ratio는 줄어든다. 상기 반응은 도 3에 자세히 나타냈으며, CDK9에 대한 억제활성을 보기 위해 두 가지의 양성 대조군(control)을 사용하였다(LDC000067-Sellekchem Cat S7461, Santa Cruz - SC203326).

[0065] **3. 실험 결과**

[0066] 양성 대조군으로 사용한 LDC000067이 가장 좋은 활성을 보이며, SanTaCruz 203326이 그 다음으로 농도구배를 보였다.

[0067] Virtual Screen으로 찾은 두 종류의 화합물(화학식 2 및 화학식 3)도 모두 미약하지만 농도구배 의존적인 CDK9 억제 활성을 보였다(도 4).

[0068] **<실시예 2> 화학식 3 화합물(AEM-10039640)의 인산화 효소(CDK9) 활성 억제 평가 및 IC50의 도출**

[0069] **1. 실험 방법**

[0070] Kinase는 다음 조성의 완충액(buffer)에 녹였다

[0071] - 20 mM MOPS, 1 mM EDTA, 0.01% Brij-35, 5% Glycerol, 0.1% beta- mercaptoethanol, 1 mg/mL BSA

[0072] 모든 물질은 최종 농도의 50배 농도로 100% DMSO에 녹였고, 실험용 well에 각 물질을 농도별로 투여하였다.

[0073] 정제된 CDK9을 다음 조성의 완충액(buffer)에 섞어서 실험용 well에 투여하였다.

[0074] - 8 mM MOPS pH 7.0, 0.2 mM EDTA, 100 µM KTFCGTPEYLAPEVRREPRILSEEEQEMFRDFDYIADWC, 10 mM Magnesium acetate 및 [gamma33-P]-ATP

[0075] Magnesium/ATP mix를 추가하면서 반응이 시작된다. 40분 상온 보관 뒤, 인산(phosphoric acid)을 최종 농도 0.5%가 되도록 투여하면 반응이 종료된다. 10uL의 반응물을 P30 filtermatt에 찍어주고, 4회 0.425% 인산(phosphoric acid)으로 씻어준다. Filtermatt를 메탄올(methanol)에 넣었다가 빼서 말린다. Scintillation counter로 계수(counting) 한다.

[0076] **2. 실험 결과**

[0077] 화학식 3 화합물에 의해 농도구배 의존적 CDK9 활성 감소가 나타났다(IC50 = 15.7 uM)(도 5).

[0078] **<실시예 3> 화학식 4 및 화학식 5 화합물의 인산화 효소(CDK9) 활성 억제 평가 및 IC50의 도출**

[0079] 화학식 3 화합물의 기본구조를 바탕으로 유사구조를 확보하여, 화학식 4과 화학식 5를 도출하였으며, 이를 대상으로 CDK9 활성억제 능력을 검증하였다. 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0080] 그 결과, 화학식 4과 화학식 5 화합물 모두 농도구배 의존적인 활성억제를 보였으며, 각각 IC50은 7.885 uM 및 5.127 uM을 나타냈다(도 6).

[0081] **<실시예 4> 유방암 세포주 세포 사멸 효능 검증**

[0082] **1. 실험 방법**

[0083] - 세포주 : 인간 유방암 유래 세포주 6 종(SK-BR-3, MCF-7, T47D, ZR-75-1, BT474, BT549)

[0084] - 화학식 4과 화학식 5 화합물

[0085] - 시험방법 : 100 uM부터 1/3씩 희석시킨 물질을 처리하여 총 9개의 농도 (대조군 물질처리 하지 않음) 대비 세포의 잔존 생존을 측정하였다.

[0086] - 생존률 측정 방법 : Promega 사의 CellTiter Glo solution을 이용하였다.

[0087] - 프로토콜은 아래와 같다.

[0088] * 제 1일 : 각 3천개의 세포를 96 well plate에 seeding 하였다(부피 90 uL - 세포 배양 용액).

[0089] * 제 2일 : 10 uL의 세포 배양 용액에 원하는 농도의 10배의 (10X) 물질이 포함되도록 물질을 추가하였다. 세포에 처리되는 최종 DMSO 농도는 0.2%를 넘지 않도록 하였다.

[0090] * 제 5일 : 처리 뒤 72시간에, CellTiterGlo 용액을 각 well마다 10 uL씩 추가하고, 20분 뒤 rwading 하였다(Perkin Elmer Victor 3 plate reader).

[0091] * 비처리군에서 도출된 Glo 값을 100% 생존률로 계상하여 각 well별 Glo 값을 상대적인 생존률로 계산하였다.

[0092] **2. 실험 결과**

[0093] 6가지 유방암 세포주에서 측정한 결과 모든 세포주에서 농도구배적인 세포사멸 및 증식 억제의 유도가 확인되었다(도 7).

[0094] 세포주에서 보이는 화학물의 EC50는 각각 다음과 같다(micro mole).

표 2

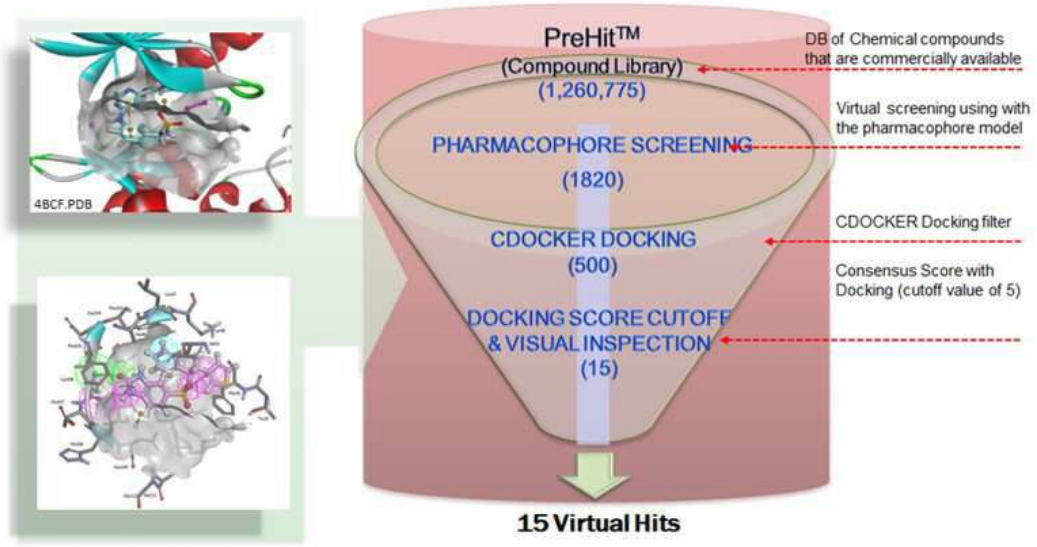
[0095]

화합물	SK-BR-3	MCF-7	T47D	ZR-75-1	BT474	BT549
화학식 4	52	22	25	36	38	36
화학식 5	89	22	34	37	29	46

[0096] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

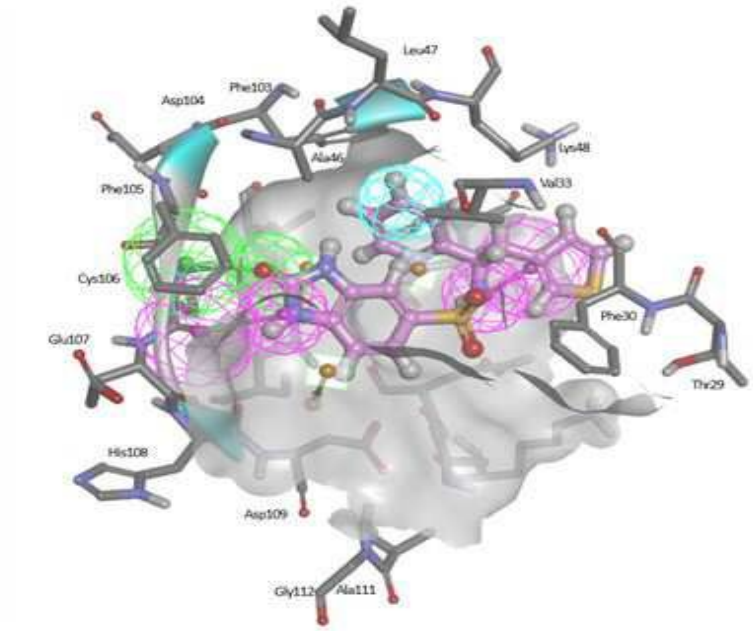
도면

도면1

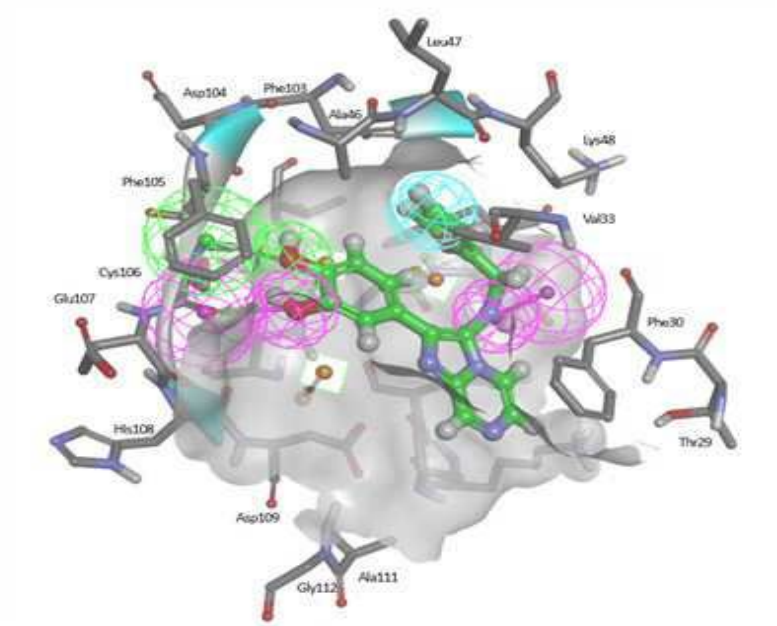

4BCF.PDB
PreHit™
(Compound Library)
(1,260,775)
DB of Chemical compounds
that are commercially available
PHARMACOPHORE SCREENING
(1820)
Virtual screening using with
the pharmacophore model
CDOCKER DOCKING
(500)
CDOCKER Docking filter
DOCKING SCORE CUTOFF
& VISUAL INSPECTION
(15)
Consensus Score with
Docking (cutoff value of 5)
15 Virtual Hits

도면2

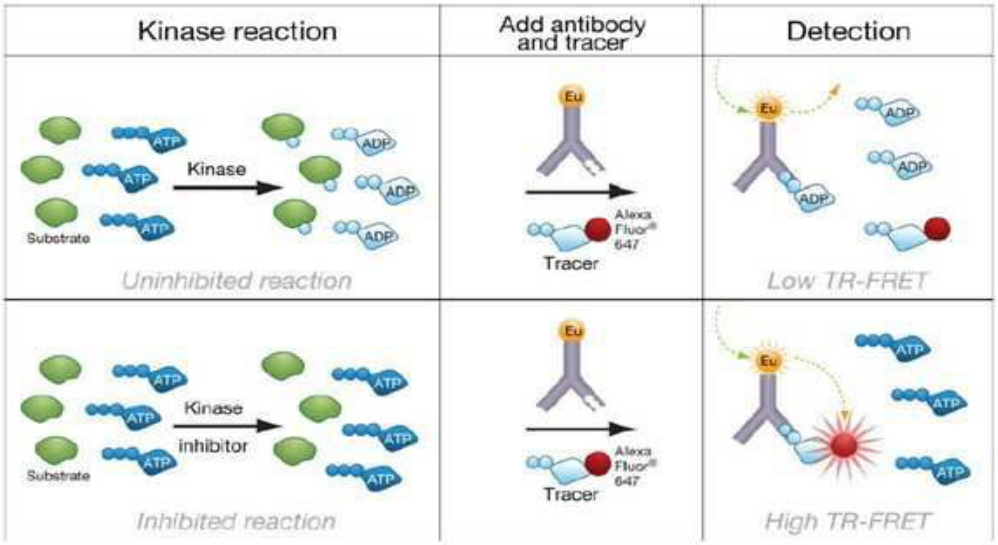
A)


Leu47
Asp104
Phe103
Ala46
Lys48
Phe105
Val33
Cys106
Phe30
Glu107
Thr29
His108
Asp109
Gly112
Ala111

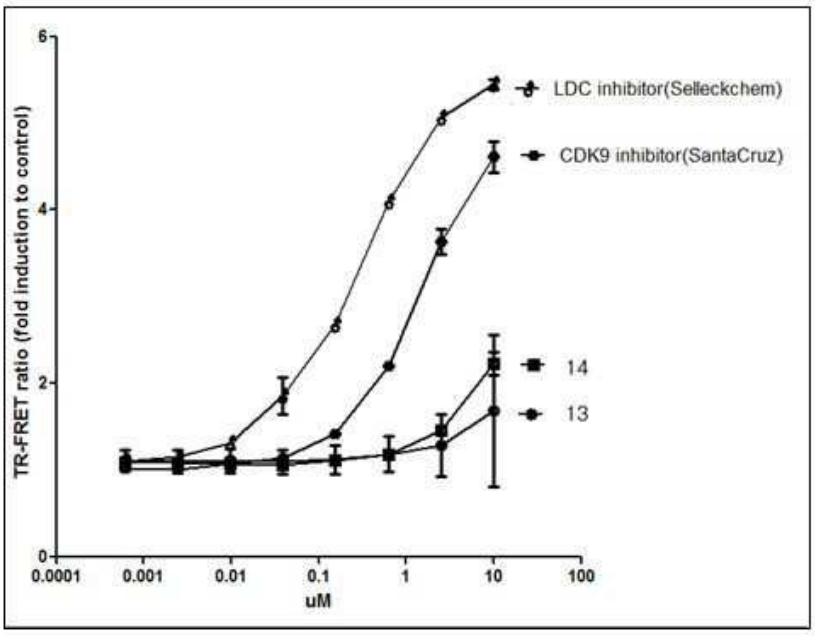
B)


Leu47
Asp104
Phe103
Ala46
Lys48
Phe105
Val33
Cys106
Glu107
Phe30
His108
Thr29
Asp109
Gly112
Ala111

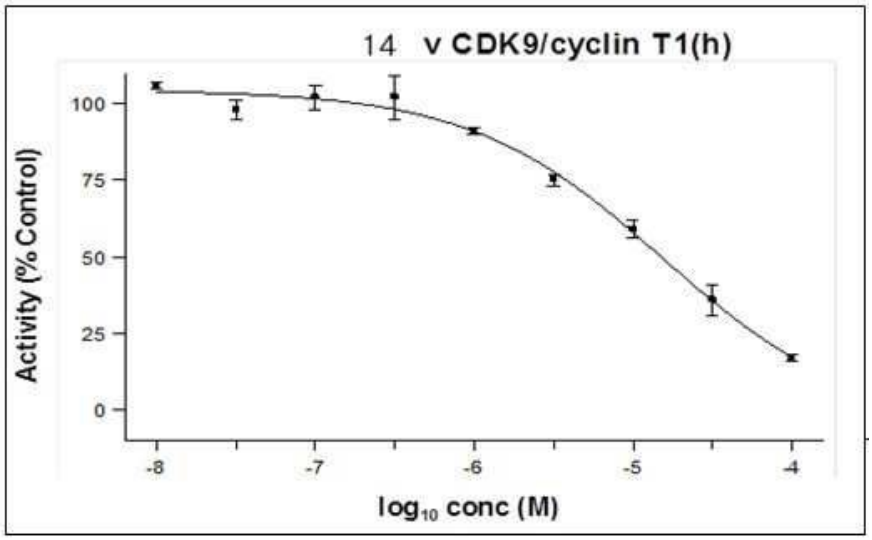
도면3


Kinase reaction
Add antibody and tracer
Detection
ATP
ADP
Kinase
Substrate
Uninhibited reaction
Eu
Alexa Fluor 647
Tracer
Low TR-FRET
Kinase inhibitor
Inhibited reaction
High TR-FRET

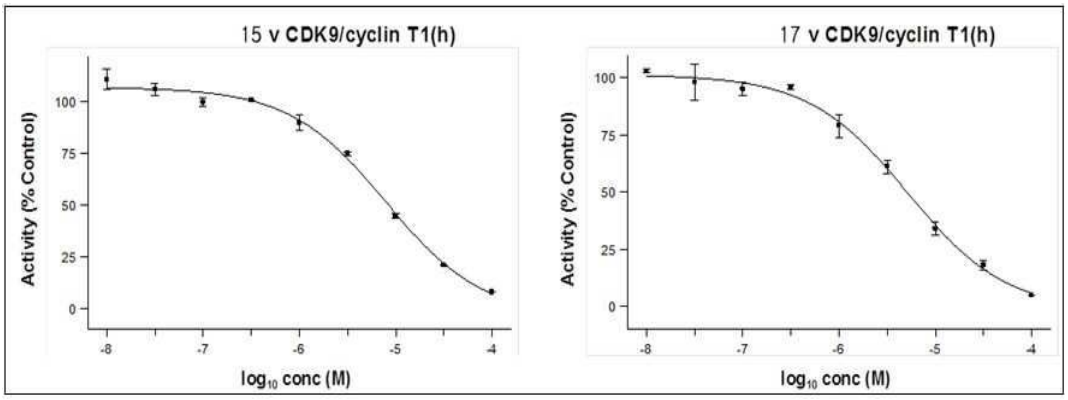
도면4


TR-FRET ratio (fold induction to control)
0
2
4
6
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
uM
LDC inhibitor(Selleckchem)
CDK9 inhibitor(SantaCruz)
14
13

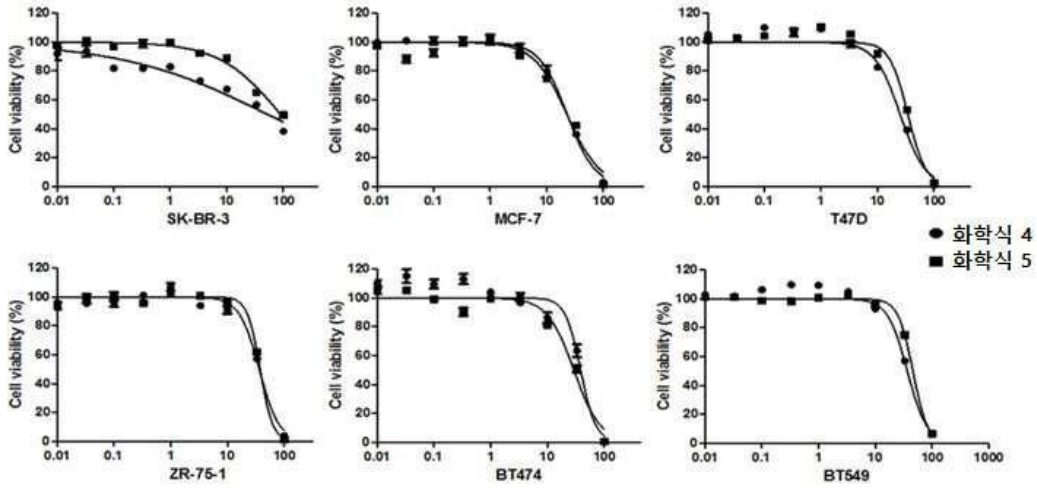
도면5


14 v CDK9/cyclin T1(h)
Activity (% Control)
100
75
50
25
0
-8
-7
-6
-5
-4
log10 conc (M)

도면6


15 v CDK9/cyclin T1(h)
Activity (% Control)
log10 conc (M)
17 v CDK9/cyclin T1(h)
Activity (% Control)
log10 conc (M)

도면7


Cell viability (%)
SK-BR-3
MCF-7
T47D
ZR-75-1
BT474
BT549
화학식 4
화학식 5