



(51) 국제특허분류:

C07D 495/04 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/002796

(22) 국제출원일: 2014 년 4 월 1 일 (01.04.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 702-701 대구시 북구 대학로 80 (산격동), Daegu (KR).

(72) 발명자: 디 루시오에릭 (DI LUCCIO, Eric); 702-701 대구시 북구 대학로 80, 경북대학교 교수아파트 305 호, Daegu (KR). 모리시타마사요 (MORISHITA, Masayo); 702-701 대구시 북구 대학로 80, 교수아파트 305 호, Daegu (KR). 이태호 (LEE, Tae Ho); 702-701 대구시 북구 대학로 80 경북대학교 약학대학, Daegu (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 디지털로 31 길 20 (구로동) 601 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, KR, 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.

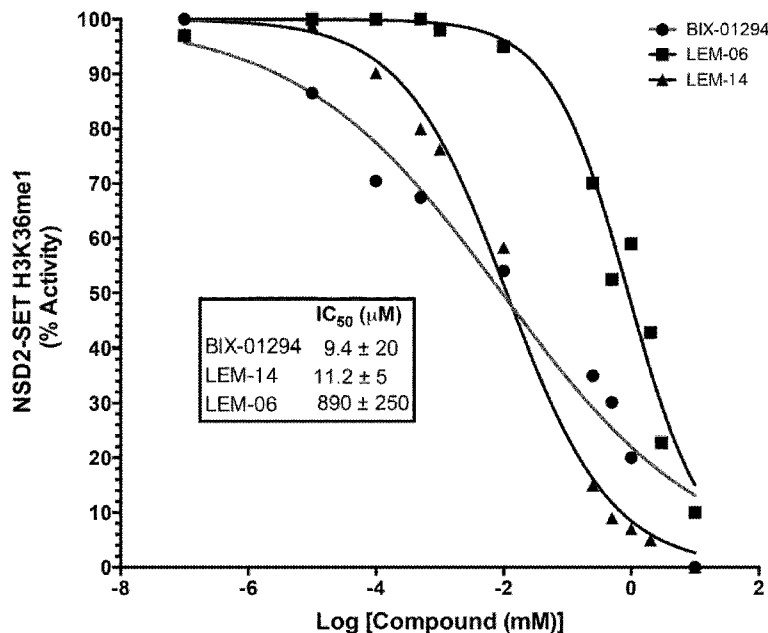
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, 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: NOVEL HISTONE METHYL TRANSFERASE INHIBITOR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제 및 그 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a novel histone methyl transferase inhibitor. The present invention also relates to a pharmaceutical composition or a food composition comprising the novel histone methyl transferase inhibitor. In addition, the present invention relates to a method for treating cancer using the novel histone methyl transferase inhibitor.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제를 포함하는 약학적 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제를 이용하여 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제 및 그 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제에 관한 것이다.
- [2] 또한, 본 발명은 상기 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제를 포함하는 약학적 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다.
- [3] 또한, 본 발명은 상기 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제를 이용하여 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 다양한 암 발생에 있어서, 후생성 (epigenetic) 탈조절 (deregulation)이 매우 중요한 요소로 조명되고 있다. NSD1, NSD2/MMSET/WHSC1 및 NSD3/WHSC1L1은 핵 수용체 결합 SET 도메인 (nuclear receptor binding SET domain, NSD) 패밀리를 이루며 히스톤메틸 트랜스퍼라아제 (histone methyltransferase, HMTase) KMT3 패밀리로 분류된다. NSD는 크로마틴의 유지에 관련되는 히스톤 변형제이다. NSD는 대부분 크로마틴의 히스톤 H3 라이신 36 (H3K36) 및 히스톤 H4 리신 20 (H4K20)을 메틸화하며, in vivo NSD1, NSD2, 및 NSD3는 각기 상이한 기작으로 작용한다. 구체적으로 NSD2 및 NSD3의 경우 과성장 표현형에 실질적으로 기여하지 않는 반면, NSD1 유전자 변형에서는 관찰된다. 다만, NSD 패밀리 구성들이 서로를 대체할 수 있는지 여부에 대해서는 아직 밝혀진바 없다. NSDs, 특히 NSD2는 다양한 암의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하고 있으며, 매우 중요한 약물 타겟으로 판단되고 있다. NSD1의 증폭은 다발성 골수종 (multiple myeloma), 폐암, 신경아세포종 (neuroblastoma), 교아종 (glioblastoma)에서 관찰되고 있다. NSD1 및 NSD2의 증폭은 암세포로의 세포 변형을 촉발한다. NSD3은 폐암에서 역할을 수행하며 유방암 세포주 및 일차 유방암종에서 증폭된 것으로 확인된다. NSD2/MMSET (multiple myeloma SET)은 전립선암, 다발성 골수종을 포함하는 대부분의 암 유형에서 종양의 공격력 및 예후에 관련된다. NSD2은 고형 종양, 특히 유방암, 골수종 및 교아종에서 과발현하여, H3K36me2의 전체 수준 (global level)의 비정상적인 증가를 야기한다. 전립선암에서의 NSD2의 과발현은 후생적 이상 (epigenetic aberration)을 유발하여 전이성 표현형 (metastatic phenotype)을 유도한다. NSD2/MMSET은 다발성 골수종 특히, 다른 종류와 비교하여 가장 좋지 않은 예후를 나타내는 t(4;14) 골수종에 대한 치료학적 개입 (therapeutic intervention)에 있어서 중요한 초점이다. 다발성 골수종은 비호지킨림프종에 이어서 두번째로 흔한 혈액암이다. 아직까지 다발성 골수종에 대한 치료 및 효과적인 치료방법이 존재하지 않는다.

[5]

[6] DNA 메틸트랜스퍼라아제 (DNMTs), 히스톤 메틸트랜스퍼라아제 및 히스톤 데아세틸라아제 (HDAC)를 표적하는, 크로마틴 리모델링 억제제는 항암화학요법 및 암예방화학요법 모두에서 추구하고 있다. 몇몇의 DNA-메틸화 및 히스톤 데아세틸라아제 억제제가 최근 임상 시험 단계에 와있다. HMTase는 신규한 시료 표적이며, HMTase 억제제는 아직 부족하고 매우 적은 양의 화합물이 보고되어 있다. 특히, GlaxoSmithKline Inc. 및 Epizyme Inc.가 HMTase DOT1L 및 EZH2 잠재적 억제제를 발견하여 큰 진보를 이루었다. DOT1L은 정기적인 SET 도메인을 포함하고 있지 않은바, 다른 HMTase와 구별된다. HMTase inhibitor인, BIX-01294 및 BIX-01338는 각각 3 및 5 IC_{50} 으로 G9a에 효과를 나타낸다. 또한, Chaetocin은 0.8 의 IC_{50} 으로 Su(var)3-9를 억제한다. 중요하게, Liu et al.는 15 nM의 IC_{50} 의 UNC0224과 같은, 몇몇의 G9a 억제제의 형성을 완료하였다. Epizyme Inc. 및 GlaxoSmithKline Inc 의 G9a 및 EZH2에 대한 연구자들은 나노몰 수준의 IC_{50} 의 HMTase 억제제를 보고하였다. 다만, 단 하나의 NSD2 억제제 (MCTP39) 만이 IC_{50} 이 ~3 인 것으로 확인하고 최근 특허등록되었다.

[7]

[8] 리신-HMTase의 촉매적 메커니즘은 공인자 (cofactor) SAM (SAdenosylmethionine)과 Lysine-NH₃ 기질간의 선행 SN₂ 친핵 공격을 통하여 수행된다. SAM은 양 결합부위 사이의 인터페이스에 위치한 채널 내로 리신 기질이 깊게 확장 되는 히스톤-꼬리 큰 결합 그루브에 인접하는 작은 구멍 (cavity) 내로 결합한다.

[9]

종래 본 발명자는 SET8에서 확인된 것과 유사하게 NSD1의 SET 도메인이 7-아미노산 펩티드를 수용한다는 것을 확인하였다. 또한 본 발명자는 SET 및 postSET 서브도메인 간의 인터페이스에서의 작은 루프의 회전을 통한 NSD1 의 SET 도메인의 개시 메커니즘을 입증하였다. 이 조절-루프는 리신-기질의 안전벨트와 같이 작용하여 기질 인식 및 촉매적 메커니즘에 모두 참여한다. 이 조절-루프는 SET 도메인에 히스톤-꼬리를 강력하게 고정시키는 리신-기질의 상부에 위치한다. 히스톤 꼬리 결합 부위는 SET 및 postSET 서브도메인 모두의 일부분과 관련된다. SET 도메인의 시퀀스는 NSDs 간에 매우 보존되어 있으며, 따라서 NSD1에서 기술된 것과 동일한 메커니즘이 NSD2 및 NSD3에서도 수행된다고 예상된다. 특히, NSDs는 계통학적으로 다른 알려진 HMTases와 거리가 있다 (도 2). HMTases의 억제는 SAM 결합 주머니 또는 히스톤-꼬리 결합 틈 (cleft)을 표적함으로써 이루어진다. EZH2에서, 억제제 GSK343는 SAM 경쟁자로서 EZH1에 대한 억제활성을 가지며, SET7 및 PRMT3의 억제 효과 역시 갖는다. 흥미롭게도, EZH1 및 EZH2은 NSDs 에 대하여 매우 가까운 SET 도메인 시퀀스를 가지며, 이는 NSDs 특히, NSD2에 대한 EZH2 억제제의 선별에 중요할 수 있다. MCTP39는 NSD2에 대한 SAM 경쟁자로서, 최근 특허등록되었다. SAM

결합 주머니는 NSD1 내의 SET 도메인의 결정 구조 내에 부분적으로 묻혀있으며, SAM을 안정화 시키는 주요 잔기는 NSDs간에 높게 보존되어 있다. 대조적으로, 더 크고 더 접근이 용이한 히스톤-꼬리 결합 부위의 경우, SAM 결합 주머니와 비교하여, 더 큰 시퀀스 이질성 (heterogeneity)을 가진다. 히스톤 기질의 결합을 안정화하는데 관여하는 잔기는 SAM 결합 부위와는 다르게 NSDs 간에 보존되어 있지 않다. 이는 HMTase G9a-유사 단백질과 히스톤 꼬리 결합 도메인을 표적하는 히스톤-꼬리 모방 억제제인, BIX-01294와의 결정 구조에서 관찰할 수 있었다. 또한, 히스톤-꼬리의 NSDs SET 도메인과의 결합에서 특이적 유동적인 조절 루프의 관여는, 히스톤-꼬리 결합 틈이 NSD2에서 특이적이고 선택적인 억제를 달성하기 위하여 개발될 수 있음을 암시한다.

- [10] 따라서 본 발명에서, 본 발명자는 히스톤-꼬리 결합 그루브에 대한 신규한 NSD2 억제제를 확인하였으며, 이는 NSD2-SET의 히스톤-꼬리 결합 도메인의 오픈된 형태의 분자 모델에 대한 가상 리간드 스크리닝을 이용하여 수행하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 신규한 NSD2 억제제의 유도체를 개발하기에 이르렀다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명의 일 양상은 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제를 제공하는 것이다.
- [13] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제를 포함하는 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 신규한 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제를 이용하여 암을 치료하는 방법에 을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명의 일 양상은 하기의 식으로 이루어진 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다:

[16]



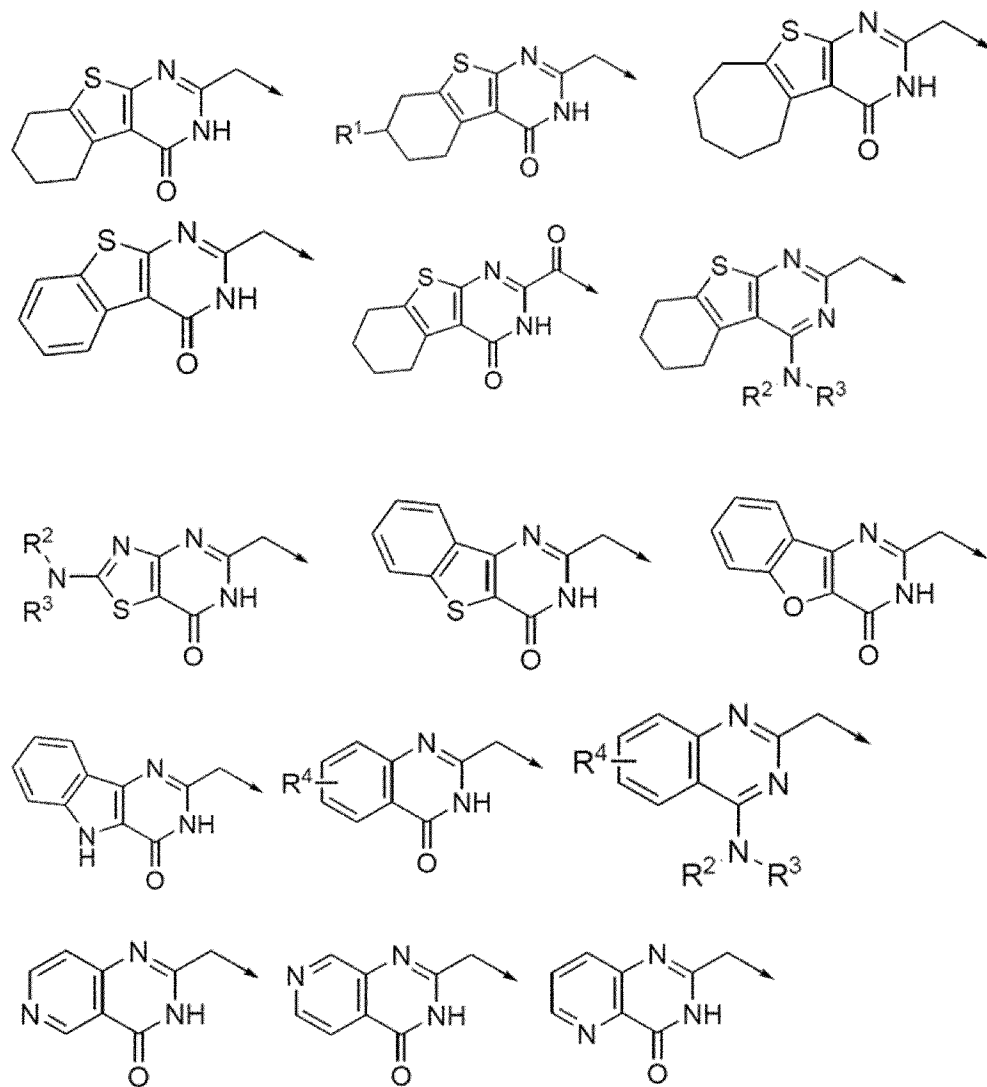
[17]

여기서,

[18]

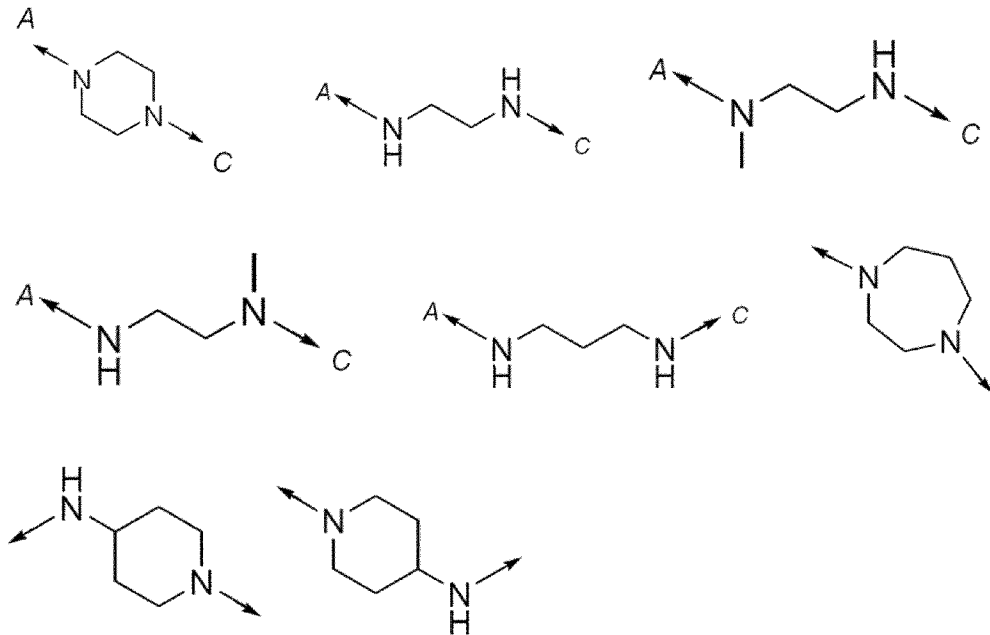
상기 A 기는 하기의 기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,

[19]



[20] 상기 B 기는 하기의 기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이며,

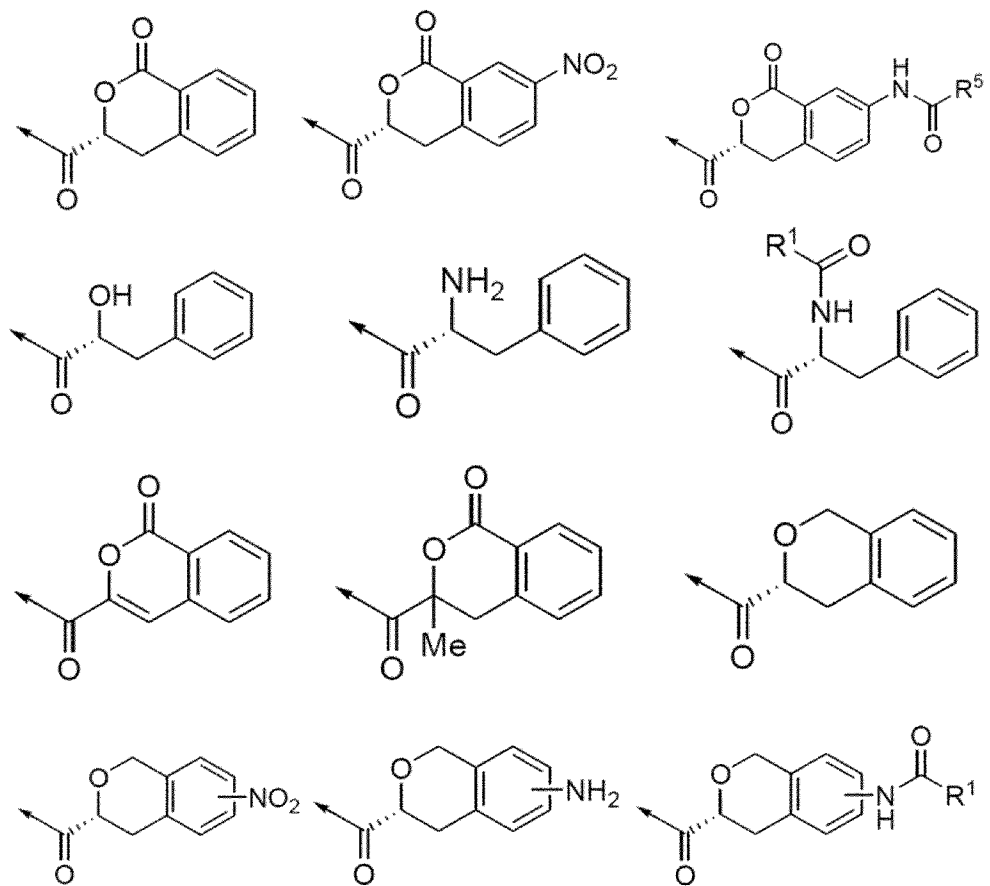
[21]



[22]

상기 C 기는 하기의 기로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로서;

[23]



[24]

상기 R1은 메틸, 에틸, 다이-메틸 및 i-Pr로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,

[25]

R2 및 R3는 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬기, 치환 또는 비치환된 시클로알킬기, 및 이중원소로 O, N, S 또는 P를 갖는 치환 또는 비치환된

헤테로시클로알킬기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이며,

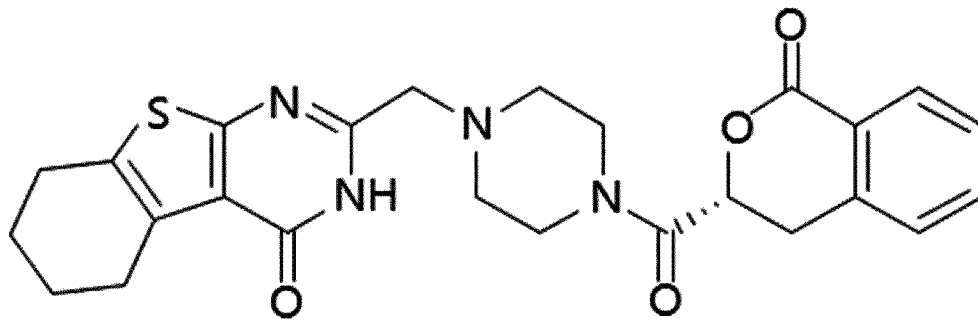
- [26] R4는 플루오르, 염소, 메틸, 및 OMe으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,
 [27] R5는 메틸, 에틸, tert-부틸, 치환 또는 비치환된 페닐, 및 이종원소로 O, N, S 또는 P를 갖는 치환 또는 비치환된 페닐기로부터 이루어진 군으로부터 선택된다.

[28]

- [29] 상기 화합물은 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제의 억제제일 수 있으며, 상기 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제는 바람직하게는 NSD (nuclear receptor binding SET domain) 패밀리에, 더욱 바람직하게는 NSD2/MMSET일 수 있다.

- [30] 상기 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제의 억제제는 가장 바람직하게는 하기의 화학식으로 이루어진 것인, 화합물일 수 있다.

[31]



[32]

- [33] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 암은 림프종 (lymphoid malignancies), 급성 림프구성 백혈병 (Acute lymphoblastic leukemia, ALL), 만성 림프구성 백혈병 (Chronic lymphocytic leukemia, CLL), 골수종 (myeloma), 피부암, 원발성 흑색종 (primary melanomas), 난황주머니 종양 (Yolk sac tumour), 유방암, 폐암, 대장암, 췌장암, 난소암, 방광암, 전립선암, 신장암, 뇌종양(brain cancer), 자궁경부암, 백혈병, 육아종증(granulomatosis), 및 세포 형질 변환 (cellular transformation)일 수 있으며, 가장 바람직하게는 다발성 골수종일 수 있다.

- [34] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

- [35] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기 화합물의 약학적으로 효과적인 양을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [36] 본 발명에 따른 신규한 화합물은 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제 억제제를 효과적으로 억제할 수 있으므로 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제가 관여하는 다양한 종양에서 치료제로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [37] 도1는 NSD1, NSD2, 및 NSD3의 일차 구조의 모식도이다: NSD 구성원 모두는

- 2개의 PWWP 도메인, 4개의 PHD 아연 핑거 (zinc finger) 도메인 및 촉매 도메인 (catalytic domain)을 포함한다. 촉매도메인은 HMTase 활성을 가지며, pre-SET, SET, 및 post-SET 도메인을 포함한다. 히스톤-결합 부분을 덮는 조절 루프 (regulatory loop)를 붉은 색으로 표시하였다.
- [38] 도 2는 in vitro 에서 H3 및 H4 기질에 대한 NSD1-CTD, NSD2-CTD, 및 NSD3-CTD의 HMTase 활성을 나타낸 도이다.
- [39] 도 3은 촉매 도메인의 열린 및 닫힌 구조 및 분자 모델링을 확인한 도이다.
- [40] 좌측 패널: 촉매 도메인의 구조는 삼각형 방식 (triangular fashion)으로 정렬된 3개 군의 정규형 -시트 및 보존된 -헬릭스와 매우 인접한 두 -시트의 1개 군으로 이루어져, 리신-히스톤 리간드의 결합을 위한 틈을 형성한다. 공인자 AdoMet는 채널을 통하여 CD에 적합한 구성으로 결합한다. 유동적 조절 루프를 적색으로 표시하였다. 조절 루프의 이동을 굵은 역화살로 표시하였다.
- [41] 우측패널: MD 시뮬레이션 후 H3-펩티드 (a.a. 32-38)에 결합된 NSD-CDs의 모델. H3K36를 표시하였다. 정전기적 표면을 하기와 같이 색으로 표시하였다: 푸른색: 양전하; 붉은색: 음전하. 단위 +5/-5 kb.T.ec -1.
- [42] 도 4는 H3K4, H3K9 및 H3K27 결합의 분자 행렬식 (Molecular determinant)을 나타내는 도이다.
- [43] 펩티드 H3K4 (a.a.1-7), H3K9 (a.a. 5-11), 및 H3K27 (a.a. 23-29)을 수직으로 맞추고 잔기의 원자 디테일을 보라색으로 나타내었다. NSD의 CDs로부터의 아미노산의 상호작용을 갈색으로 표시하고 숫자를 부여하였다. 녹색 점선을 수소결합을 나타낸다. 소수성 상호작용은 생략하였다. 이 도면은 프로그램 Ligplot를 이용하여 구성하였다.
- [44] 도 5는 H3K36, H3K79 및 H4K20 결합의 행렬식은 나타내는 도이다. 펩티드 H3K36 (a.a. 32-38), H3K79 (a.a. 75-81), 및 H4K20 (a.a.16-22)을 나타내었다.
- [45] 도 6은 NSD2/MMSET의 구조 및 LEM-14을 포함하는 열린 SET 도메인의 모델을 나타낸 도이다.
- [46] (A) NSD2의 일차구조: PWWP 도메인; PHD zinc 핑거 도메인; preSET 및 postSET를 포함하는 SET HMTase (histone methyl transferase). 히스톤-결합 부분을 닫는 조절 루프를 붉은 색으로 표시하였다.
- [47] (B) 정제후의 재조합 NSD2-SET 를 SDS-PAGE 겔 상에서 쿠마시 염색한 결과이다.
- [48] (C) 가상 리간드 스크리닝을 통하여 LEM-14와 가장 선호되는 구조로 결합되어 있는 열린 NSD2-SET 모델이다. 조절 루프는 붉은 색으로 표시하였다.
- [49] (D) LEM-14와 결합한 NSD2-SET의 분자 표면을 나타낸 도이다. 정전기적 표면을 아래와 같이 색으로 표시하였다:
- [50] 푸른색: 양전하; 붉은색: 음전하, 단위 +5/-5 kb.T.ec⁻¹.
- [51] 도 7은 HMTases 간의 및 NSD의 SET 도메인 간의 서열 관련성을 나타낸 도이다.

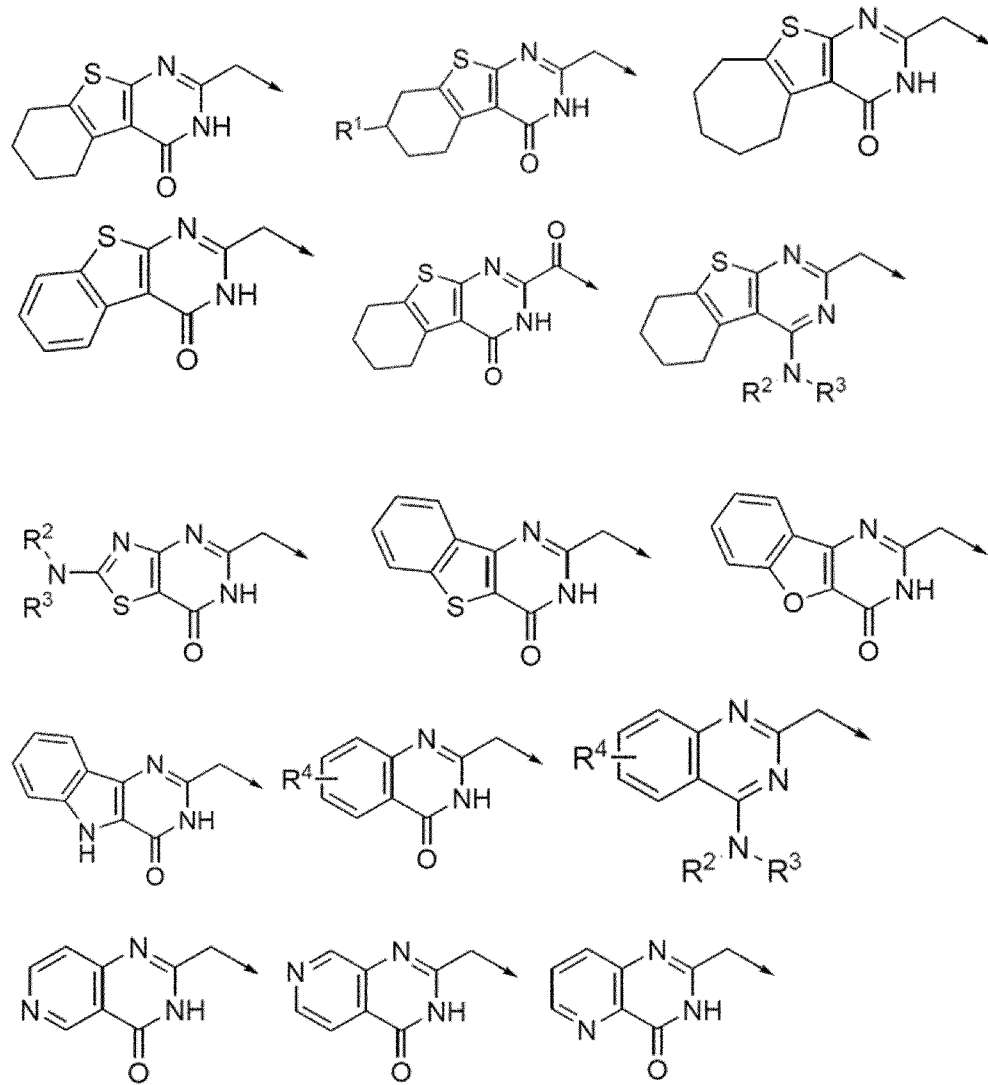
- [52] (A) 인간 및 효모 HMTases 의 SET 도메인의 단백질 서열에 대한 비뿌리형의 계통수 (Unrooted phylogenetic tree). NSD 패밀리는 알려진 다른 HMTases (붉은색)과는 거리가 멀다. 이 계통수는 CLUSTAL 2.1을 이용한 다중 서열 정렬 후 NJ (neighbor-joining) 방법을 이용하여 설계하였다. Hs: *Homo sapiens*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sp: *Saccharomyces pombe*
- [53] (B) NSD1, NSD2 및 NSD3의 preSET, SET 및 postSET 서브도메인의 서열 정렬 결과. 파란색 박스 안의 서열이 히스톤-꼬리 결합에 관여하는 부분. 붉은색 박스의 서열이 S-Adenosylmethionine에 반응성인 부분. 다중서열정렬은 CLUSTAL 2.1으로 수행하였다.
- [54] 도 8은 NSD2-SET H3K36 모노-메틸화 활성화에 대한 억제제의 농도반응 곡선을 나타낸 도이다. NSD2-SET H3K36 모노-메틸화 활성을 후보 억제제의 다양한 농도에서 표시하였다. LEM-06, LEM-14, 및 BIX-01294의 농도반응곡선 및 IC50을 GraphPad Prism 6.0를 이용하여 표시하였다.
- [55] 도 9는 LEM-06, LEM-14 및 BIX-01294의 화학 구조이다.
- [56] 도 10은 NSD2의 히스톤-꼬리 결합 그루브에서 억제제의 결합에 대한 분자적 디테일을 나타낸 도이다. (A) LEM-14, (B) LEM-06, (C) BIX-01294. 노란색 점선은 수소결합을 나타낸다.
- [57] 도 11은 NSD2 히스톤-꼬리 결합 그루브에 도킹된 BIX-01294 및 LEM-06의 결합을 나타낸 도이다. BIX-01294 (A) 및 LEM-06 (B)와 결합된 NSD2-SET의 열린 구조의 분자 표면 모델. 푸른색: 양전하; 붉은색: 음전하, 단위 +5/-5 kb.T.c⁻¹.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [58] 본 발명의 일 양상은 하기의 식으로 이루어진 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다:



[60] 여기서,

[61] 상기 A 기는 하기의 기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,

[62]



[63] 상기 B 기는 하기의 기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이며,

Seven chemical structures are shown, each with a label 'A' and an arrow pointing away from a nitrogen atom, and a label 'C' and an arrow pointing towards a nitrogen atom.

- Structure 1: A piperazine ring. Label 'A' with an arrow pointing away from the top-left nitrogen. Label 'C' with an arrow pointing towards the bottom-right nitrogen.
- Structure 2: A 1,3-bis(amino)propane molecule. Label 'A' with an arrow pointing away from the left amino group. Label 'C' with an arrow pointing towards the right amino group.
- Structure 3: A 1,3-bis(amino)propane molecule with a methyl group on the left nitrogen. Label 'A' with an arrow pointing away from the left nitrogen. Label 'C' with an arrow pointing towards the right amino group.
- Structure 4: A 1,3-bis(amino)propane molecule with a methyl group on the right nitrogen. Label 'A' with an arrow pointing away from the left amino group. Label 'C' with an arrow pointing towards the right nitrogen.
- Structure 5: A 1,4-bis(amino)butane molecule. Label 'A' with an arrow pointing away from the left amino group. Label 'C' with an arrow pointing towards the right amino group.
- Structure 6: A 1,4-bis(amino)butane molecule with a methyl group on the right nitrogen. Label 'A' with an arrow pointing away from the left amino group. Label 'C' with an arrow pointing towards the right nitrogen.
- Structure 7: A 1,4-diazepane ring. Label 'A' with an arrow pointing away from the top-left nitrogen. Label 'C' with an arrow pointing towards the bottom-right nitrogen.

The image displays a collection of chemical structures, primarily based on a benzodioxane core. The structures are arranged in four rows:

- Row 1:** Three structures showing a benzodioxane ring with a carbonyl group at the 2-position. The first has a carbonyl at the 4-position. The second has a nitro group (NO_2) at the 6-position. The third has an amide group (NH-C(=O)-R^5) at the 6-position.
- Row 2:** Three structures showing a benzodioxane ring with a carbonyl group at the 2-position. The first has a hydroxyl group (OH) at the 4-position. The second has an amino group (NH_2) at the 4-position. The third has an amide group (NH-C(=O)-R^1) at the 4-position.
- Row 3:** Three structures showing a benzodioxane ring with a carbonyl group at the 2-position. The first has a carbonyl group at the 4-position. The second has a methyl group (Me) at the 4-position. The third has a carbonyl group at the 4-position.
- Row 4:** Three structures showing a benzodioxane ring with a carbonyl group at the 2-position. The first has a nitro group (NO_2) at the 6-position. The second has an amino group (NH_2) at the 6-position. The third has an amide group (NH-C(=O)-R^1) at the 6-position.

[68] R2 및 R3는 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬기, 치환 또는 비치환된 시클로알킬기, 및 이종원소로 O, N, S 또는 P를 갖는 치환 또는 비치환된

헤테로시클로알킬기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이며,

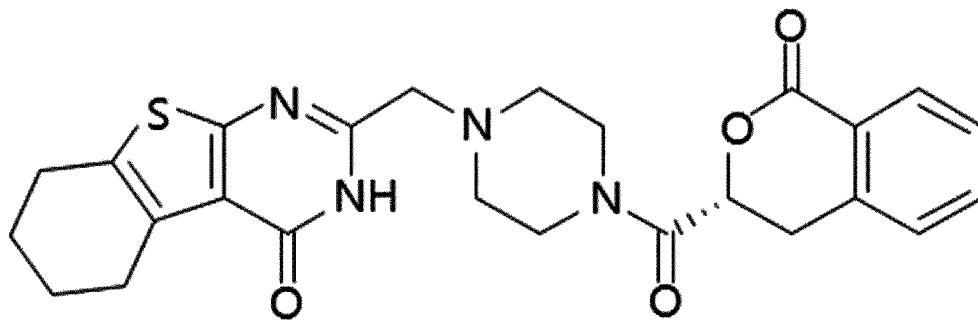
[69] R4는 플루오르, 염소, 메틸, 및 OMe으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,

[70] R5는 메틸, 에틸, tert-부틸, 치환 또는 비치환된 페닐, 및 이종원소로 O, N, S 또는 P를 갖는 치환 또는 비치환된 페닐기로부터 이루어진 군으로부터 선택된다.

[71] 상기 화합물은 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제의 억제제일 수 있으며, 상기 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제는 바람직하게는 NSD (nuclear receptor binding SET domain)이며, 더욱 바람직하게는 NSD2일 수 있다.

[72] 상기 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제의 억제제는 가장 바람직하게는 하기의 화학식으로 이루어진 것인, 화합물일 수 있다.

[73]



[74]

[75] 본 발명은 상기 화합물의 광학 이성질체, 거울상이성질체, 부분입체이성질체 및 기하 이성질체를 포함한다.. 본 발명은 또한 화합물의 모든 호변이성질체 형태를 포함한다.

[76] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 화합물의 N-옥사이드, 수화물, 용매화물, 약제학적으로 허용되는 염, 복합체 및 프로드럭을 제공한다.

[77] 본 발명의 화합물은 또한 본 발명의 범위 내에 있는 염을 형성한다. 본 발명의 상기 화합물에 대한 언급은 달리 언급되지 않는 한 이의 염에 대한 언급을 포함하는 것으로 이해된다. 본원에서 사용된 용어 "염(들)"은 무기 및/또는 유기 산 및 염기로 형성된 산성 및/또는 염기성 염을 나타낸다.

[78] 또한, 본 발명의 화합물이 이로 제한되는 것은 아니나 피리딘 또는 이미다졸과 같은 염기성 부분 및 이로 제한되는 것은 아니나 카르복실산과 같은 산성 부분 둘 모두를 함유하는 경우, 쯔비터이온 (zwitterion)("내부염")이 형성될 수 있고 이것은 본원에서 사용된 용어 "염(들)" 내에 포함된다. 다른 염도, 예컨대 제조 동안 적용될 수 있는 분리 또는 정제 단계에서 유용하나, 약제학적으로 허용되는 (즉, 무독성 (요망되지 않는 독물 효과가 최소이거나 없다)) 염이 바람직하다. 본 발명의 화합물의 염은, 예를 들어 본 발명의 화합물을 당량과 같은 산 또는 염기의 소정량과 배지, 예컨대 염이 침전되는 배지 또는 수성 배지에서 반응시키고 냉동 건조시킴에 의해 형성될 수 있다. 특정 경우에, 1을 초과하는 당량의 산 (염기)이 사용되어, 예를 들어 디- 또는 트리- 염을 제공할 수 있었다.

- [79] 이로 제한되는 것은 아니나 아민 또는 피리딘 또는 이미다졸 고리와 같은 염기성 부분을 함유하는 본 발명의 화합물은 다양한 유기 및 무기 산과 염을 형성할 수 있다. 예시적인 산 부가염으로는 아세테이트 (예컨대, 아세트산 또는 트리할로아세트산, 예를 들어 트리플루오로아세트산으로 형성된 것들), 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 바이설페이트, 보레이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로요오다이드, 히드록시에탄설포네이트 (예컨대, 2-히드록시에탄설포네이트), 락테이트, 말레에이트, 메탄설포네이트, 나프탈렌설포네이트 (예컨대, 2-나프탈렌설포네이트), 니코티네이트, 니트레이트, 옥살레이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 페닐프로피오네이트 (예컨대, 3-페닐프로피오네이트), 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 살리실레이트, 숙시네이트, 설페이트 (예컨대, 황산으로 형성된 것들), 설포네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 톨루엔설포네이트, 예컨대 토실레이트, 운데카노에이트 등이 있다.
- [80] 이로 제한되는 것은 아니나 카르복실산과 같은 산성 부분을 함유하는 본 발명의 화합물은 다양한 유기 및 무기 염기와 염을 형성할 수 있다. 예시적인 염기성 염으로는 암모늄 염, 알칼리 금속염, 예컨대 나트륨, 리튬 및 칼륨 염, 알칼리성 토류 금속 염, 예컨대 칼슘 및 마그네슘 염, 유기 염기와 염 (예를 들어, 유기 아민), 예컨대 벤자딘, 디시클로헥실아민, 히드라바민 (N,N-비스(데히드로아비에틸)에틸렌디아민으로 형성됨), N-메틸-D-글루카민, N-메틸-D-글리카미드, t-부틸 아민 및 아르기닌, 라이신과 같은 아미노산과의 염 등이 있다. 염기성 질소-함유 기는 저급 알킬 할라이드 (예컨대, 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드), 디알킬 설페이트 (예컨대, 디메틸, 디에틸, 디부틸 및 디아밀 설페이트), 장쇄 할라이드 (예컨대, 데실, 라우릴, 미리스틸 및 스테아릴 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드), 아르알킬 할라이드 (예컨대, 벤질 및 페네틸 브로마이드) 등과 같은 제제로 4차화될 수 있다.
- [81] 본원에서 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 염"이란 상기 언급된 화합물의 요구되는 생물학적 활성을 보유하고 독물 효과를 최소로 나타내거나 전혀 나타내지 않는 염을 언급한다. 이러한 염의 예로는 이로 제한되는 것은 아니나 무기 산으로 형성된 산 부가염 (예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산 및 질산) 및 유기 산, 예컨대 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 숙신산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 탄산, 파모산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌설포산, 나프탈렌디설포산, 및 폴리갈락투론산으로 형성된 염이 있다. 화합물은 당업자에게 공지된 약제학적으로 허용되는 4차 염으로서 투여될 수도 있고,

이들은 특히 화학식 $(-NR)^+Z$ (여기에서, R은 수소, 알킬 또는 벤질이고, Z는 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, -O-알킬, 톨루엔설포네이트, 메틸설포네이트, 설포네이트, 포스페이트 또는 카르복실레이트 (예컨대, 벤조에이트, 숙시네이트, 아세테이트, 글리콜레이트, 말레에이트, 말레이트, 시트레이트, 타르트레이트, 아스코르베이트, 벤조에이트, 신나모에이트, 만델로에이트, 벤질로에이트 또는 디페닐아세테이트)를 포함하는 반대이온이다)의 4차 암모늄 염을 포함한다.

- [82] 본 발명은 본 발명의 화합물의 프로드럭도 포함한다. 용어 "프로드럭"은 담체에 공유적으로 결합된 화합물을 나타내려는 것이고, 프로드럭이 포유동물 피검체에 투여될 때 프로드럭은 프로드럭의 활성 성분을 방출시킬 수 있다. 활성 성분의 방출은 생체내에서 일어난다. 프로드럭은 당업자에게 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다. 이러한 기술은 일반적으로 주어진 화합물의 적합한 작용기를 개질시킨다. 그러나 이렇게 개질된 작용기는 일상적인 조작에 의해 또는 생체내에서 원래 작용기를 재생시킨다. 본 발명의 화합물의 프로드럭은 히드록시기, 아미노기, 카르복실기 또는 유사한 기가 개질된 화합물을 포함한다. 프로드럭의 예로는 이로 제한되는 것은 아니나 에스테르 (예컨대, 아세테이트, 포르메이트 및 벤조에이트 유도체), 본 발명의 화합물에서 히드록시 또는 아미노 작용기의 카르바메이트 (예컨대, N,N-디메틸아미노카르보닐), 아마이드 (예컨대, 트리플루오로아세틸아미노, 아세틸아미노 등) 등이 있다.
- [83] 상기 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제는 및 "HMTase"는 히스톤의 리신에 하나, 둘 또는 세개의 메틸을 전이하는 것을 촉진하는 효소로, 히스톤-변형 효소이다. 용어 "히스톤"은 어느 종으로부터의 H1, H2A, H2B, H3, H4, 및 H5를 포함한 어떠한 히스톤 단백질을 나타냄을 의미한다.
- [84] 용어 "히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 억제제"는 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제와 상호작용하고 그의 효소적 활성을 억제할 수 있음을 의미한다. "히스톤 메틸 트랜스퍼라아제의 효소적 활성을 억제한다"는 표현은 히스톤에서 메틸기를 전이하는 능력을 감소시킴을 의미한다. 예를 들어, 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 활성의 억제는 약 10% 이상일 수 있다. 본 발명의 일부 바람직한 구체예에서, 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 활성의 그러한 감소는 약 50% 이상, 더욱 바람직하게는 약 75% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90% 이상이다. 다른 바람직한 구체예에서, 히스톤 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 활성은 95% 이상까지, 더욱 바람직하게는 99% 이상까지 감소된다. IC_{50} 값은 히스톤 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제의 활성을 50%까지 감소시키는 히스톤 탈아세틸화효소 억제제의 농도이다. 용어 "억제 유효량"은 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제 활성의 억제를 야기하는데 충분한 투여량을 나타내기 위함이다.
- [85] 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제는 세포에 존재할 수 있고, 바꾸어 말해 다세포 유기체에 있을 수 있다. 다세포 유기체는, 예를 들어 식물, 진균 또는 동물, 바람직하게는 포유동물 및 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다. 진균은 식물 또는

포유동물, 바람직하게는 인간을 감염시킬 수 있어서 식물 또는 포유동물 내에 및/또는 위에 존재할 수 있었다. 히스톤 메틸 트랜스퍼라아제가 다세포 유기체에 있는 경우, 본 발명의 상기 양태에 따른 방법은 유기체에 본 발명에 따른 화합물 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 투여는 제한없이 비경구, 경구, 설하, 경피, 국소, 비내, 기관내 또는 직장내를 포함하는 임의의 경로에 의해 수행될 수 있다. 특히 바람직한 특정 구체예에서, 본 발명의 화합물은 병원 환경에서 정맥내 투여된다. 다른 바람직한 특정 구체예에서, 투여는 경구 경로에 의한 것이 바람직할 수 있다.

[86]

[87] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 암은 림프종 (lymphoid malignancies), 급성 림프구성 백혈병 (Acute lymphoblastic leukemia, ALL), 만성 림프구성 백혈병 (Chronic lymphocytic leukemia, CLL), 골수종 (myeloma), 피부암, 원발성 흑색종 (primary melanomas), 난황주머니 종양 (Yolk sac tumour), 유방암, 폐암, 대장암, 췌장암, 난소암, 방광암, 전립선암, 신장암, 뇌종양(brain cancer), 자궁경부암, 백혈병, 육아종증(granulomatosis), 또는 세포 형질 변환 (cellular transformation) 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 다발성 골수종일 수 있다.

[88] 또한, 본 발명의 일 양상은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[89] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기 화합물의 약학적으로 효과적인 양을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[90] 본 발명의 약제학적 조성물은 당 분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제형화될 수 있고 제한 없이 비경구, 경구, 설하, 경피, 국소, 비내, 기관내 또는 직장내를 포함하는 임의의 경로에 의해 투여되기 위해 제조될 수 있다. 바람직한 특정 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 병원 환경에서 정맥내 투여된다. 다른 바람직한 특정 구체예에서, 투여는 바람직하게는 경구 경로에 의해 이루어질 수 있다. 약제학적 조성물은 이로 제한되는 것은 아니나 용액 또는 현탁액을 포함하는 임의의 형태일 수 있다. 경구 투여를 위해, 제형은 정제 또는 캡슐의 형태일 수 있다. 비내 투여를 위해, 약제학적 조성물은 분말, 점비제 또는 에어로솔의 형태일 수 있다. 약제학적 조성물은 국소적으로 또는 전신적으로 투여될 수 있다. 담체의 특성은 투여 경로에 좌우될 것이다. 본원에서 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는"은 생물학적 시스템, 예컨대, 세포, 세포 배양물, 조직, 또는 유기체와 양립가능하며, 활성성분(들)의 생물학적 활성의 효과를 방해하지 않는 무독성 물질을 의미한다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물은, 억제제 외에, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제 및 본 기술분야에 공지된 그 밖의 물질을 함유할 수 있다. 약제학적으로 허용 되는 제형의 제조방법은, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990]에 기재되어 있다.

- [91] 화합물, N-옥사이드, 수화물, 용매화물, 약제학적으로 허용되는 염, 복합체, 프로드럭 또는 혼합물, 또는 이의 라세믹 혼합물, 부분입체이성질체, 거울상이성질체 또는 호변이성질체는 치료되는 환자에게서 심각한 독성 효과를 야기하지 않으며 환자에게 치료적 유효량을 전달하기에 충분한 양으로 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제에 포함된다. 통상적인 국소 투여량은 적합한 담체 중 0.01-3% wt/wt의 범위일 것이다. 약제학적으로 허용되는 유도체의 효과적인 투여량 범위는 전달하려는 부모 화합물의 중량에 기초하여 산출될 수 있다. 유도체가 본래 활성을 나타내는 경우, 효과적인 투여량은 유도체의 중량을 이용하여 상기대로 산정될 수 있거나, 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 산정될 수 있다.
- [92] 치료하려는 특정 질환 또는 질병에 따라서, 그 질환 또는 질병을 치료하기 위해 보통 투여될 수 있었던 추가의 치료제도 본 발명의 조성물에 존재할 수 있다. 대안적으로, 이러한 제제의 투여는 본 발명에 따른 조성물의 투여에 연속되거나 동시에 수행될 수 있다. 바꾸어 말해, 본 발명의 화합물은 단독의 약제학적 제제로서 투여되거나 조합이 어떠한 허용되지 않는 부작용도 일으키지 않는 하나 이상의 다른 추가 치료(약제학)제와 함께 투여될 수 있다. 이것은 암과 같은 과증식성 질병의 치료에 특히 적절할 수 있다. 이러한 예에서, 본 발명의 화합물은 공지된 항암제(들) 뿐만 아니라 이의 혼합물 및 조합물과 조합될 수 있다. 본원에서 사용된 대로, 특정 질병 또는 질환을 치료하기 위해 일반적으로 투여되는 추가의 치료제는 "치료하려는 질병 또는 질환에 적합한" 것으로서 공지되어 있다. 본원에서 사용된 대로, "추가 치료제"는 예를 들어 화학요법제 및 다른 항-증식제를 포함한다. 본 발명의 바람직한 특정 구체예에서, 조성물은 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물(들)을 포함한다. 본 발명의 바람직한 특정 구체예에서, 조성물은 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물(들) 및/또는 당업자에게 공지되어 있거나 발견될 또 다른 HMTase 억제제를 포함한다. 이러한 조성물의 활성 성분들은 바람직하게는 상승적으로 작용하여 치료 효과를 일으킨다.

[93]

발명의 실시를 위한 형태

[94] 실시예 1: NSD1, NSD2/MMSET/WHSC1, 및 NSD3/WHSC1L에 의한 히스톤 리신 메틸화

[95] 본 발명자들은 NSDs에 의한 히스톤 H3의 인식 및 메틸화에 대하여 살펴보았다. 본 발명자들은 일관된 실험적 접근을 통하여 3개의 NSD의 CTD (carboxyl terminal domain)을 살펴보는 것에 집중하였다. NSDs-CTD는 촉매적 중심부 및 히스톤-인식 모듈 내에 pre-SET, SET, post-SET, 및 PHD4 도메인을 포함한다. 본 발명자들은 *in vitro* H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, 및 H4K20에서의 NSD1, NSD2, 및 NSD3의 CTD의 메틸화 특성을 조사하였다. 다음,

본 발명자들은 분자 동력학적 (molecular dynamic) 시뮬레이션을 이용하여 히스톤 꼬리와 NSD 촉매적 SET 도메인의 결합을 설명하였다.

[96]

[97] **1.1 클로닝**

[98] HMTase인 NSDs 패밀리에 속하는 NSD1, NSD2, 및 NSD3의 일차구조를 도 1A에 나타내었다.

[99] 도1은 NSD1, NSD2, 및 NSD3의 일차 구조의 모식도이다: NSD 구성원 모두는 2개의 PWWP 도메인, 4개의 PHD 아연 핑거 (zinc finger) 도메인 및 촉매 도메인 (catalytic domain)을 포함한다. 촉매도메인은 HMTase 활성을 가지며, pre-SET, SET, 및 post-SET 도메인을 포함한다. 히스톤-결합 부분을 덮는 조절 루프 (regulatory loop)를 붉은 색으로 표시하였다.

[100] NSD1, NSD2, 및 NSD3의 CTD (carboxyl terminal domain)를 하기와 같이 클로닝하였다.;

[101] NSD1-CTD (1338 bp, 5325-6663 nt; encoding 446 a.a., 1775-2221 a.a.), NSD2-CTD (1287 bp, 2808-4095 nt; encoding 429 a.a., 936- 1365 a.a.), 및 NSD3-CTD (1344 bp, 2967-4311 nt; encoding 484 a.a., 989- 1437 a.a.)를 인간 간 cDNA 라이브러리 (TAKARA, Japan)를 주형으로 이용한 PCR로 증폭하였다.

[102] 사용된 포워드 및 리버스 프라이머는 하기와 같다.

[103] NSD1-CTD의 경우,

[104] 5- GCTGAGGTCGAC(*SalI*)CATCCTCGAGCTGTTTCCTTCC-3 및

[105] 5- CGGTACGCGGCCGC(*NotI*)GCACATACTCACGGATCTCCCC-3;

[106] NSD2-CTD의 경우,

[107] 5-CAGGCGCATATG(*NdeI*)TTCCCGTACATGGAGGGGGGAC-3 및

[108] 5-CGCCTGCTCGAG(*XhoI*)TTTGCCCTCTGTGACTCTCCG-3;

[109] NSD3-CTD 의 경우

[110] 5-CTGAACGTCGAC(*SalI*)GGCCTTAAACATGACTTGGGG-3 및

[111] 5-GACACCGCGGCCGC(*NotI*)ATTCTTTTACTTC TTCTCCATG-3.

[112] 증폭된 NSD1-CTD 및 NSD3-CTD 가닥(*SalI* 및 *NotI* 제한효소 자리를 포함) 및 NSD2-CTD 가닥(*NdeI* 및 *XhoI* 제한 효소 자리를 포함)을 단백질 발현 인테인 (Intein)-태그된 벡터, pTYB2 또는 pTYB12 (New England Biolabs, USA)의 다-클론자리의 제한효소 자리에 삽입하였다.

[113]

[114] **1.2 단백질 발현 및 정제**

[115] NSD1-CTD, NSD2-CTD, 및 NSD3-CTD (NSD-CTDs)를 포함하는 pTYB2 또는 pTYB12 플라스미드로 *Escherichia coli* 발현 주 (ER2566 또는 BL21)를 형질전환시켰다. 형질전환된 세포주를 100 g/mL 암피실린을 포함하는 LB 배지에서 배양하고, 재조합 NSD-CTDs의 발현을 250 M IPTG (isopropyl 1-thio-D-galactopyranoside)로 15 에서 4시간동안 유도하였다.

- [116] *E. coli* 세포를 회수하고 동결-용해 방법 (freeze-and-thaw method)으로 용해하고, 0.1% Triton X-100 및 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)를 포함하는 버퍼 A [20 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl, 및 0.1 mM EDTA]에서 배양한 뒤, 얼음 상에서 20회 음파처리 (sonication)하였다.
- [117] NSD-CTD-Intein-CBD (chitin-binding domain) 융합 단백질을 포함하는 세포 추출물을 키틴 비드의 친화도 컬럼 상에서 로딩시키고, 0.1% Triton X-100를 포함하는 100-컬럼 부피의 버퍼 A로 워시한 뒤, Triton X-100를 포함하지 않는 20-컬럼 부피의 버퍼 A로 워시하였다. 제조합 단백질에 결합된 박테리아 샤페론을 제거하기 위하여, 10 mM ATP (adenosine triphosphate) 및 2.5 mM MgCl₂를 포함하는 10-비드 부피의 버퍼 A로 제조합 NSDCTD- 결합된 키틴 비드를 워시하였다. 뒤이어, 박테리아 샤페론을 제거하기 위하여 친화도 컬럼을 20 비드 부피의 버퍼 A로 워시하였다. 50 mM 2-머캅토에탄올 (mercaptoethanol)을 포함하는 버퍼 A 내에서 4 에서 48시간동안 인큐베이션하여 키틴 비드로부터 NSD-CTD 단백질을 잘라내었다. 버퍼 A로 용출한 뒤, Amicon Ultra 원심분리 필터를 이용하여 농축한 뒤, 메틸트랜스퍼라아제 (methyltransferase) 어세이에 이용하였다. 정제된 NSD-CTDs의 일부를 SDSPAGE로 분석하였다. 쿠마시 염색 겔에서 50.8 kDa (NSD1-CTD), 48.9 KDa (NSD2-CTD) 및 51.1 KDa (NSD3-CTD)의 예상된 분자량의, 용해성의 순수 NSD-CTDs를 확인하였다 (도 1B). 제조합 NSD2-SET은 80 에서 보관될 때, 이후에서 안정적이고 촉매적 활성을 유지하였다.
- [118]
- [119] **1.3 히스톤 메틸트랜스퍼라아제 (Histone Methyltransferase) 어세이**
- [120] H3K4, K9, K27, K36, K79, 및 H4K20 에서의 NSD-CTDs의 히스톤 메틸트랜스퍼라아제 활성을 비색 정량 키트 (colorimetric quantification kit) (Epigentek, USA)를 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. H3K36, H3K79, 및 H4K20의 경우, 정제된 제조합 NSD-CTDs (0.2 g 및 2.0g)를 제조합 히스톤 H3 또는 H4 (Epigentek, USA)와 함께 배양하고, 특이적 항체로 코팅된 스트립 웰 내의 메틸 기 공여체 (Adomet)와 60- 90 분 동안 실온에서 배양하였다. 스트립 웰의 바닥에 결합된 특이적 항체는 메틸화된 기질을 포획하였다.
- [121] H3K4, H3K9, 및 H3K27의 경우, 항체로 코팅된 스트립 웰 대신, 비오티닐화된 (biotinylated) 히스톤 기질을 이용하였으며, 60분 동안 37 에서 스트립 웰 상에서 안정적으로 포획하였다. 포획된 피호티닐화된 히스톤 기질을 그 다음 고-친화성 항체와 함께 60분동안 실온에서 100 rpm 의 교반으로 배양하였다. 과량의 정제된 NSD-CTDs, 히스톤, Adomet, 및 항체를 세척하여 제거하고, 항체 결합된 또는 비오티닐화된 H3/H4me가 결합된 스트립 웰을 라벨링된 검출 항체와 함께 60분동안 24 에서 암실에서 100 rpm의 소용돌이 조건에서 배양하였다. 웰을 워시한 후, 메틸화 정도를 HRP-결합된 이차 항체- 발색 시스템을 이용하여 ELISA 플레이트 리더로 450 nm에서 정량화하였다. Epigentek사에서 제공한

항체를 이용하여 기질 간의 교차반응이 일어나지 않음을 확인하였다. 어세이는 2회 수행하였다. 효소를 포함하지 않은 대조군 (도 2의 NC)을 바탕으로 결과를 정규화하였다.

[122]

[123] **1.4 분자 모델링, 도킹, 및 에너지 최소화**

[124] NSD2-CD (a.a. 971-1202) 및 NSD3-CD (a.a. 1044-1283)의 상동성 모델을 구성하기 위하여 NSD1의 촉매 도메인 (catalytic domain, CD)의 결정 구조 (PDB: 3OOI - a.a. 1850- 2080)를 주형으로 사용하였다. NSD2- CD (a.a. 971-1202)가 NSD1-CD (PDB: 3OO1)와 75.9% 동일성 (identity) 및 90.1% 유사성 (similarity)을 공유하고, NSD3-CD (a.a. 1044-1283)는 NSD1-CD와 72.9% 동일성 및 85% 유사성을 공유함을 나타내었다.

[125] 분자 모델을 정확하게 구성하기 위하여, 종래 본 발명자들이 기술한 가이드라인 및 방법에 따랐다. ClustalW V2.0.9를 이용한 다중서열정렬 (multiple-sequence alignment) 후, Modeler V9.5을 이용하여 100개의 모델을 생성하였다. 고유의 Modeler 기능에 따른, 최적의 모델을 SCWRL4 프로그램을 이용하여 잔기 포지셔닝 (side-chains positioning)을 수행하였다. 입체화학은 PROCHECK를 이용하여 확인하였다. 모델은 COOT를 이용하여 수동으로 점검하였다. 히스톤 꼬리 펩티드를 H3K4 (a.a. 1- 7), H3K9 (a.a. 5-11), H3K27 (a.a. 23-29), H3K36 (a.a. 32-38), H3K79 (a.a. 75-81), 및 H4K20 (a.a. 16-22)의 잔기로, COOT내에 수동으로 구성하였다. COOT 에서 SSM 알로리즘을 이용하여, NSD1-CD, NSD2-CD, 및 NSD3-CD의 히스톤 결합 부분에 H3- 또는 H4- 펩티드 꼬리를 위치시키고 맞추는데 NSD1- CD (PDB: 3OOI)와 히스톤 H4 펩티드 (PDB: 3F9Y) 와 결합된 SET8의 결정 구조와의 구조적 오버레이를 이용하였다. APBS V1.2.1 를 이용하여 정전기학적 계산을 수행하였으며, 분자 표면의 정전기적 특성을 VMD V1.8.7 및 PyMOL V1.2으로 나타내었다.

[126]

[127] **1.5 에너지 최소화 및 분자 동역학적 시뮬레이션**

[128] 펩티드- NSD-CD 복합체를 VMD 1.9를 이용하여 수조 (140 x 100 x 110)에서 완전히 용매화하였다. 에너지 최소화 (energy minimizations, EM) 및 분자 동역학 (molecular dynamics, MD)에 이용되는 분자 시스템은 하기의 원자 수를 포함한다: NSD1-CD-H3K4(1- 7), 42,121 원자; NSD1-CD-H3K9(5-11), 42,104 원자; NSD1-CD-H3K27(23-27), 42,095 원자; NSD1-CD-H3K36(32-38), 42,106 원자; NSD1- CD-H3K79(75-81), 42,120 원자; NSD1-CDH4K20(32-38), 42,130 원자; NSD2-CDH3K4(1-7), 44,848 원자; NSD2-CD-H3K9(5- 11), 44,840 원자; NSD2-CD-H3K27(23-27), 44,828 원자; NSD2-CD-H3K36(32-38), 44,830 원자; NSD2-CD-H3K79(75-81), 44,844 원자; NSD2-CD-H4K20(32-38), 44,860 원자; NSD3- CD-H3K4(1-7), 44,367 원자; NSD3-CDH3K9(5-11), 44,353 원자; NSD3-CDH3K27(23-27), 44,341 원자; NSD3-CDH3K36(32-38), 44,349 원자;

NSD3-CDH3K79(75-81), 44,366 원자; NSD3-CDH4K20(32-38), 44,379 원자. 약 90 %의 원자는 물분자로부터 유래하였다. EM 및 MD은 CHARMM force field를 이용한 NAMD v2.8으로 수행하였다. 항온은 300K에서의 Langevin 댐핑을 이용하여 유지하였으며, 압력은 Langevin 피스톤을 이용하여 1 압력으로 일정하게 유지하였다. 정전기력은 PME (particle mesh Ewald) 방법을 이용하여 10 컷-오프 거리 (cut-off distance)로 고려하였다. 용매화된 복합체, 히스톤펩티드-NSD-CD를 5,000 단계의 (5ns) 공액 경사 (conjugate gradient) EM, 뒤이은 20,000 단계의 (20ns) 분자 동역학 및 5,000 단계(5ns)의 EM의 5회 반복으로 최초 평형화시켰다. 마지막 단계는 EM의 5ns 였다. 용매화된 히스톤-펩티드-NSD-CD 복합체 각각에 대하여 총 100,000 단계(100ns)의 MD 및 총 30,000 단계(30ns)의 EM을 수행하였다. MD 시뮬레이션 후, 용매화된 복합체를 이상적 입체화학을 위하여 수동으로 COOT으로 확인하였다. MD 궤적을 VMD 1.9으로 분석하였다.

[129]

[130] **1.6 결합 에너지의 결정**

[131] 결합 에너지를 NAMD 54 의 총 에너지 계산을 이용하여 하기와 같이 계산하였다.

[132] binding = complex (peptide + NSD).

[133] 최종 MD 단계의 모델을 용매 분자로부터 분리하고, 복합체의 결합 에너지를 계산하는데에 사용하였다. 결합 복합체, 펩티드, 및 NSD-CD apo의 모델 모두를 동일한 EM 과정을 거치게 한 다음 결합 에너지 계산을 하였다. 모델을 4,000 단계(4ns)의 공액 경사 (conjugate gradient) EM, 뒤이어 2,000 단계(2ns)의 MD, 및 6,000 단계(6ns)의 EM (NAMD v2.8)로 에너지 최소화하였다. EM 단계는 <1 kJ/mol의 국소 최소점 (local minimum)에 도달하기에 충분할 정도로 길었다. 항온은 300K에서의 Langevin 댐핑을 이용하여 유지하였으며, 압력은 Langevin 피스톤을 이용하여 1 압력으로 일정하게 유지하였다.

[134]

[135] **1.7 모델 분석 및 확인**

[136] NSD-CD과 H3- 또는 H4- 펩티드간의 상호작용의 디테일은 Ligplot로 분석하였다. COOT 내에서의 모델의 시각적 검토를 통하여 상호작용 구조를 수동으로 매핑하였다.

[137]

[138] **1.8 NSD 구성원의 CTD가 *in vitro*에서 다중 히스톤 리신을 메틸화 할 수 있음을 확인**[139] NSD1, NSD2, 및 NSD3의 CTD가 *in vitro* 에서 H3 및 H4 내의 다중의 상이한 리신을 특이적으로 인식하고 메틸화할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, 및 H4K20 상에서의 NSD1-CTD, NSD2-CTD, 및 NSD3- CTD의 전체-메틸화 (pan-methylation) 활성을 정량화 하였다.

- [140] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2는 *in vitro* 에서 H3 및 H4 기질에 대한 NSD1-CTD, NSD2-CTD, 및 NSD3-CTD의 HMTase 활성을 나타낸 도이다.
- [141] 도 2에 나타난 바와 같이, NSD1-CTD, NSD2-CTD, 및 NSD3-CTD는 유사한 기질 인식 및 메틸화 특성을 나타내지만, NSD3-CTD에서 감소된 메틸화 활성을 확인하였다 (도 2). NSD1-CTD 및 NSD2-CTD에서 H3K4me3 및 H3K27me3 중이 me1 및 me2 종보다 더 많이 검출되었다. 그러나, H3K9-me1 & -me2 및 H3K79-me1 & -me2 중이 me3 종보다 더 선호되었다. NSD1-CTD 및 NSD2-CTD와 비교하여 볼 때, NSD3-CTD는 H3K4 및 H3K9에 대한 미미한 활성을 제외하고, 현저한 메틸화 활성 (~1.5 배)를 나타내었다. 특이적 기질에 대하여, H3K9, H3K27, 및 H3K79에의 NSD3-CTD의 메틸화 활성은 NSD1-CTD 및 NSD2-CTD의 활성과 거의 동일하였다.
- [142] 그러나, H4K20 메틸화는 NSD-CTDs 사이에서 다양하였다. 그렇더라도, H4K20에서 NSD1-CTD의 현저한 mono-/tri-메틸화 활성, NSD2-CTD의 di-/tri-메틸화 활성, 및 NSD3-CTD의 di-/tri-메틸화 활성이 확인되었으며, 이는 H4K20가 *in vitro* 에서 모든 NSD-CTDs의 표적임을 나타낸다. H3K36는 NSD-CTDs 모두에 의해 메틸화되었으며, NSD1-CTD의 바람직한 기질이였다.
- [143] 종합하여 볼 때, 상기 결과는, NSD1, NSD2, 및 NSD3의 CTD는 *in vitro* 에서 기질에 따라 매우 다양한 촉매적 활성으로, H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, 및 H4K20를 인식하고 메틸화 할 수 있음을 나타낸다. 일부 HMTases (예를 들어 SET9)은 *in vitro* 에서 현저한 메틸트랜스퍼라아제 활성을 보유하지 않지만, 이는 현저한 촉매 활성이 확인된 NSD의 구성원이 아니다.
- [144]
- [145] **1.9 촉매 도메인의 열린 및 닫힌 구조 및 분자 모델링의 확인**
- [146] 상기 결과는 NSD1, NSD2, 및 NSD3의 CTD가 다수의 히스톤 리신을 인식하고 메틸화 할 수 있음을 나타낸다 (도 2). NSD 구성원에 의한 히스톤 리신의 메틸화를 더 구체적으로 살펴보기 위하여, 본 발명자들은 촉매 도메인 (catalytic domain, CD)을 구조적 변형하여 리신-결합 주머니에 접근을 시도하였다.
- [147] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [148] 좌측 패널: 촉매 도메인의 구조는 삼각형 방식 (triangular fashion)으로 정렬된 3개 군의 정규형 -시트 및 보존된 -헬릭스와 매우 인접한 두 -시트의 1개 군으로 이루어져, 리신-히스톤 리간드의 결합을 위한 틈을 형성한다. 공인자 AdoMet는 채널을 통하여 CD에 적합한 구성으로 결합한다. 유동적 조절 루프를 적색으로 표시하였다. 조절 루프의 이동을 굵은 역화살로 표시하였다.
- [149] 우측패널: MD 시뮬레이션 후 H3-펩티드 (a.a. 32-38)에 결합된 NSD-CDs의 모델. H3K36를 표시하였다. 정전기적 표면을 하기와 같이 색으로 표시하였다: 푸른색: 양전하; 붉은색; 음전하. 단위 +5/-5 kb.T.ec -1.
- [150] 도 3에 나타난 바와 같이, NSD1-CD (PDB: 3OOI)의 결정 구조는 펩티드 기질이 없으며, 히스톤-리신 결합 부분은 SET 및 post-SET 부분의 인터페이스에서 조절

루프 (regulatory loop)로 폐색되어 있다. 이 조절 루프의 분자적 행렬식 (molecular determinant)은 히스톤 결합 부분까지 확장되며, 다른 기질의 결합을 입체적으로 방해한다. H3K4 HMTase MLL1는 리신-기질 결합 부분의 열린- 및 닫힌 구조의 원인이 되는 유동적인 post-SET과 유사한 특성을 공유한다. NSD2 및 NSD3의 CDs를 구성하기 위하여 NSD1-CD (PDB: 3OOI - a.a. 1850-2080)의 결정 구조를 이용하였으며, 이는 40 % 이상의 서열 동일성을 공유하여 유사한 구조를 가짐에 따른 상동성 모델링을 통하여 수행하였다.

[151] 주형과 표적간의 쌍별 서열 정렬 (pair-wise sequence alignment)은 NSD2- CD (a.a. 971-1202)가 NSD1-CD (PDB: 3OO1)와 75.9% 동일성 (identity) 및 90.1% 유사성 (similarity)을 공유하고, NSD3-CD (a.a. 1044-1283)는 NSD1-CD와 72.9% 동일성 및 85% 유사성을 공유함을 나타내었다. NSD1-CD, NSD2-CD, 및 NSD3-CD는 매우 높은 염기 상동성을 공유하며, 이는 매우 유사한 구조를 공유하는 것을 나타낸다 (도 1).

[152]

[153] 그 다음, 본 발명자들은 MD (molecular dynamics)을 이용하여 히스톤-리신 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, H4K20) 및 NSD1-CD, NSD2-CD, NSD3-CD를 포함하는 펩티드의 도킹을 조사하였다. 최초 모델은 밝혀진바 있는 닫힌 구조의, 기질이 없는 NSD1-CD의 결정 구조를 바탕으로 하였다. 따라서, 펩티드에 도킹된 NSD1, NSD2, 및 NSD3의 apo CD의 모델은 의도적으로 입체적으로 불안한 구조가 되게 한다. 수조 (water box)에서 에너지 최소화 및 장기 MD 시뮬레이션을 수행하여, 입체적 충돌이 없게 하고 CDs가 기질을 수용하는 열린 구조가 되도록 하는 것에 초점을 두었다.

[154] 도 4는 H3K4, H3K9 및 H3K27 결합의 분자 행렬식 (Molecular determinant)을 나타내는 도이다.

[155] 펩티드 H3K4 (a.a.1-7), H3K9 (a.a. 5-11), 및 H3K27 (a.a. 23-29)을 수직으로 맞추고 잔기의 원자 디테일을 보라색으로 나타내었다. NSD의 CDs로부터의 아미노산의 상호작용을 갈색으로 표시하고 숫자를 부여하였다. 녹색 점선을 수소결합을 나타낸다. 소수성 상호작용은 생략하였다. 이 도면은 프로그램 Ligplot를 이용하여 구성하였다.

[156] 도 5는 H3K36, H3K79 및 H4K20 결합의 행렬식은 나타내는 도이다. 펩티드 H3K36 (a.a. 32-38), H3K79 (a.a. 75-81), 및 H4K20 (a.a.16-22)을 나타내었다.

[157] 장기 MD 시뮬레이션은 복합체가 post-SET 부분에서 관찰되는 작은 RMSD 진동 (oscillation)으로 안정한 구조로 평형화시키는데 적용되었다 (overall c-RMSD < 0.6 Å). 결과 모델은 뉴클레오솜의 DNA가 다른자리 입체적작용체 (allosteric effector)로서 결합하는 것으로부터 야기되는 열린 CD의 구조와 가까울 수 있다. MD 시뮬레이션에 이어, NSD2 및 NSD3의 CD 상의, 특히 SET 및 post-SET 부분 간(NSD2-CD 경우 a.a. 1178 내지 1191, 및 NSD3-CD의 경우 a.a. 1260-1273)의 인터페이스의 루프 상의 구조적 변형을 관찰하였다. 이 루프는

~40로 회전하였으며, 끝은 ~6로 변형 (translated) 되었으며, 이는 매우 현저한 변위 (displacement)이다 (도 3). 백본의 나머지는 총 c- RMSD <0.6 로 현저한 구조적 변형을 겪지 않았다.

[158]

[159] **1.10 H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, 및 H4K20 펩티드의 결합의 분자적 디테일.**

[160] NSD 구성원의 CD는 유사한 기능적 도메인을 공유하며, 일반적인 구조적 특성 역시 공유한다 (도 1A). 히스톤 꼬리-결합 부분은 SET 및 post-SET 부분 사이의 인터페이스의 조절 루프가 회전되고 옮겨져서, 음으로 하전된 표면 부위가 노출되어 양으로 하전된 H3 및 H4 펩티드 꼬리가 도킹하기에 적합해 질 때에 한하여 접근이 가능하다 (도 3).

[161] NSD-CDs에 의한 기질 인식의 분자적 디테일을 이해하기 위하여, 본 발명자들은 수조 내에서 장기 MD 시뮬레이션을 수행하여, H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, 및 H4K20 펩티드의 결합 특성을 시험하였다.

[162] 최종적으로, 본 발명자들은 시험된 모든 히스톤 H3 및 H4 펩티드 (H3K4 a.a.1-7; H3K9 a.a.5-11; H3K27 a.a.23-29; H3K36 a.a.32-38; H3K79 a.a.75-81; H4K20 a.a.16-22)가 유사한 입체 장애 (steric hindrance)를 공유하며, 전기장 및 분자 표면에 유사한 양전하를 갖는 것을 확인하였다. 이들 특성은 NSD-CDs의 선호되는 결합 에너지를 암시한다 (표 1).

[163] 표 1은 NSD1, NSD2, 및 NSD3의 촉매 도메인 상에서 리신-히스톤 기질을 포함할 때의 펩티드의 결합 에너지를 나타낸 표이다. 펩티드는 하기와 같다: H3K4 (a.a. 1-7); H3K9 (a.a. 5-11); H3K27 (a.a. 23-29); H3K36 (a.a. 32-38); H3K79 (a.a. 75-81); H4K20 (a.a. 16-22). 도킹시험에서 대조 실험으로 polyE를 사용하였다. polyE는 6-mer 폴리-글루타민산 펩티드이다.

[164] [표 1]

[165]

(Kcal/mol)	NSD1	NSD2	NSD3
H3K4	-229.7	-299.4	-200.5
H3K9	-353.2	-280.4	-282.9
H3K27	-151.9	-252.6	-247.4
H3K36	-277.1	-272.2	-261.6
H3K79	-285.6	-332.4	-254.3
H4K20	-277.2	-269.5	-289.0
polyE	444.2	862.9	663.2

[166] MD 시뮬레이션 후 복합체의 총 에너지는 시험된 기질 간에 매우 비슷하였으며

(NSD1 및 NSD2에서 0.12%의 표준편차, NSD3에서 0.11%의 표준편차), 이는 시험된 모든 펩티드가 NSD구성원과 유사하게 결합함을 나타낸다 (표 1). 또한, 조절 루프는 안전벨트처럼 작용하여 단일 히스톤 꼬리를 결합 도메인에 고정시켜, 리신 기질이 공인자 (cofactor)-결합 부분까지 연장되어 촉매 반응을 일으키도록 한다 (도 3). 펩티드-결합 부분은 7-아미노산 펩티드를 수용할 정도로 충분히 크다. 흥미롭게도, 7-아미노산 펩티드 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, 및 H4K20 포함)는 매우 유사한 입체적 및 정전기적 특성을 공유한다 (도 1). 시험된 모든 H3 및 H4 히스톤 펩티드는 수소결합의 광범위한 네트워크를 통하여 NSD1, NSD2, 및 NSD3의 히스톤-꼬리 결합 틈 (histone-tail binding cleft)에서 매우 단단하게 안정화되어 있다 (도 4 & 5).

- [167] 이러한 관찰은 계산된 결합 에너지와 일치하며, 이는 히스톤 펩티드와 CDs간의 바람직한 입체적 및 정전기적 양립성을 나타낸다 (Table 1).
- [168] CD에서의 모든 히스톤 펩티드의 도킹은 유의적으로 유리한 도킹 에너지와 관련성이 있으며, 이는 좋은 기질 양립성을 강조한다. 대조 실험으로서, 본 발명자들은 단백질 결합-주머니에 유의적인 입체 장애를 유발하는 크게 음전하된 7-mer의 polyE (poly-glutamic acid) 펩티드의 도킹을 모델링하였다. polyE 펩티드의 도킹은 매우 분리한 결합 에너지와 관련성이 있으며, 이는 어떠한 NSD-CDs과도 좋지 못한 조화를 나타냄을 강조한다 (표 1).
- [169] 종합하여 볼 때, 상기 결과는 NSD 구성원의 히스톤-결합 주머니가 시험되는 히스톤 펩티드와 동등하게 양립될 수 있으며, 이는 H3 및/또는 H4 히스톤 꼬리의 안정성을 위한 입체적 및 정전기적 매치를 제공한다.

[170]

[171]

[172] **실시예 2: HMTase인 NSD2의 소분자 억제제**

- [173] 본 발명자들은 NSDs의 선택적인 억제제, 보존된 SAM 결합 위치 상의 히스톤-꼬리 위치를 표적하는 소분자에 의하여 달성 될 수 있음을 가정하였다. 기존의 SAM 결합 주머니를 표적하는 억제 방법을 보완하기 위하여, 본 발명자는 NSD2-SET의 히스톤-꼬리 결합 부분에 결합할 수 있는 분자를 스크리닝하였다.

[174]

[175] **2.1 클로닝**

- [176] 인간 간 cDNA 라이브러리 (TAKARA, Japan)를 주형으로 이용한 PCR을 수행하여 인간 NSD2 유전자 (NSD2-SET, 873 bp, 2844-3717 nt; 291 a.a., 948-1239 a.a)를 증폭하였다. 포워드 및 리버스 프라이머는 각각 PK162, 5-GGCAGCCATATG(NdeI)CAGGGGGTCAGAGGGATCGGAAGAG -3 및 PK163, 5-GAAGCACTCGAG(XhoI)CTCTGACTGCCTCTTCCCTTCCCC -3이었다. PCR 증폭된 NSD2-SET DNA 조각을 NdeI 및 XhoI으로 분해시키고, 단백질 발현 인테인 (Intein)-태그된 벡터, pTYB2 (New England Biolabs, USA)의 다중 클로닝 위치 내로 삽입하였다. 시퀀싱을 통하여 시퀀스를 확인하였다.

[177]

[178] **2.2 단백질 발현 및 정제**

[179] NSD2-SET를 포함하는 pTYB2 플라스미드로 형질전환된 *Escherichia coli* 발현주, BL21를 100 g/mL 암피실린을 포함하는 LB 배지로 배양하였다. 제조합 NSD2-SET의 발현을 250 M IPTG (isopropyl 1-thio-D-galactopyranoside)로 15 4시간동안 유도하였다. *E. coli* 세포를 회수하고 동결-용해 방법 (freeze-and-thaw method)으로 용해하고, 0.1% Triton X-100 및 10 mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)를 포함하는 버퍼 A [20 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl, 및 0.1 mM EDTA]에서의 배양한 뒤, 얼음 상에서 20회 음파처리 (sonication)하였다. NSD2- SET-인테인-키틴-결합 도메인 융합 단백질을 포함하는 세포 추출물을 키틴 비드의 친화도 컬럼 상에서 로딩시키고, 0.1% Triton X-100를 포함하는 100-컬럼 부피의 버퍼 A로 워시한 뒤, Triton X-100를 포함하지 않는 20-컬럼 부피의 버퍼 A로 워시하였다. 제조합 단백질에 결합된 박테리아 사포론을 제거하기 위하여, 10 mM ATP (adenosine triphosphate) 및 2.5 mM MgCl₂를 포함하는 10-비드 부피의 버퍼 A로 제조합 NSD2- SET-결합된 키틴 비드를 워시하였다. 50 mM 2-머캅토에탄올 (mercaptoethanol)을 포함하는 버퍼 A 내에서 4 에서 48시간동안 인큐베이션하여 키틴 비드로부터 NSD2-SET 단백질을 잘라내고, 버퍼 A로 용출하고, Amicon Ultra 원심분리 필터를 이용하여 농축한 뒤, 메틸트랜스퍼라아제 (methyltransferase) 어세이에 이용하였다. 정제된 NSD2-SET의 일부를 SDSPAGE로 분석하였다. 쿠마시 염색 겔에서 33.2 KDa의 예상된 분자량의, 용해성의 순수 NSD2-SET을 확인하였다 (도 6B). 제조합 NSD2-SET은 80 에서 보관될 때, 이후에서 안정적이고 촉매적 활성을 유지하였다.

[180]

[181] **2.3 화합물**

[182] 화합물은 MolPort (<http://www.molport.com/>) (Table 2)으로부터 구매하여, DMSO (dimethyl sulfoxide) 내 >99.9% 순도로 준비하였다 (D8418 Sigma).

[183]

[184] **2.4 히스톤 메틸트랜스퍼라아제 (Histone Methyltransferase) 억제제 어세이 (Inhibitor Assay)**

[185] H3K36 상에서의 NSD2-SET의 히스톤 메틸트랜스퍼라아제 활성을 비색 정량 키트 (colorimetric quantification kit) (Epigentek, USA)를 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다. 정제된 제조합 NSD2-SET (4.0 g, 최종 2.42 M)을 제조합 인간 히스톤 H3.1 (5 M) (New- England Biolabs NEB, USA)와 함께 선배양 (preincubate)하고, 어세이 키트의 C2 버퍼 내에서 억제제/DMSO 또는 DMSO 단독 (0 mM 억제제) 의 농도를 측정하였다. 이 어세이에 이용된 제조합 히스톤은 *E. coli* 에서의 생산에서 어떠한 잠재적 변형도 받지 않았으며, 제조사 (NEB) 의 지시에 따라 ESI-TOF 질량 분석법을 이용하여, 이를 확인하였다. 선배양된

혼합물에 메틸 기 공여체 (50 M)를 첨가하고, 즉시 스트립 웰로 옮겨 120분 동안 실온 조건의 암실에서 배양하였다. 모노-메틸화된 H3K36 (H3K36me1)를 스트립 웰의 바닥에 붙어있는 항-모노- H3K36 항체를 이용하여 포획하였다. 과량의 정제된 NSD2-SET, 히스톤 H3, 억제제, 및 Adomet를 세척하여 제거하고, 라벨링된 검출 항체, 뒤이은 발색제 (colour development reagent)가 포획된 항체-H3K36me1를 검출하였다. 스트립 웰은 ELISA 플레이트 리더로 450 nm에서 분석하였다. H3K36me1의 수준은 흡광도의 강도와 비례한다. 어세이는 독립적으로 3차례 수행되었다. 결과는 효소를 포함하지 않은 대조군으로 정규화하였다.

[186]

[187] **2.5 NSD2-SET 의 닫힌 구조의 분자 모델링**

[188] 상동성 모델링을 이용하여 (homology modelling) NSD1 의 SET 도메인 (PDB: 3OOI - a.a. 1850-2080)의 결정 구조를 NSD2 (a.a. 971-1202)의 SET 도메인을 구성하기 위한 주형으로 사용하였다. NSD2-SET (a.a. 971-1202)의 서열은 주형 NSD1-SET (PDB: 3OO1)와 75.9% 동일성 (identity) 및 90.1% 유사성 (similarity)를 공유한다. ClustalW V2.0.9를 이용한 조심스러운 다중-서열 정렬 (multiple-sequence alignment) 후, Modeler V9.5을 이용하여 100개의 모델을 제조하였다. 고유의 모델 기능 (intrinsic Modeler function)에 따라, SCWRL4 프로그램을 이용하여, 최적의 모델에 대하여 잔기 포지셔닝 (side-chains positioning)을 수행하였다. 입체화학은 PROCHECK를 이용하여 확인하였다. 모델은 COOT를 이용하여 수동으로 점검하였다. NSD2-SET의 모델은 18.1%으로 H-인자를 가졌다. 모델 세트의 품질 및 정확도를 H-인자로 평가하였다. 이는 상동성 모델링에 있어서 새로운 품질 지수 (quality metric)이다. NSD1와 NSD2 사이에서 SET 도메인의 높은 서열 보존에 의하여, NSD2-SET의 모델링은 이상적인 경우를 나타내었다.

[189]

[190] **2.6 NSD2-SET 의 열린 구조의 분자 모델링**

[191] 히스톤 꼬리 H3K36 (a.a. 32-38) 펩티드를 COOT에서 수동으로 구성하였다. NSD1-SET (PDB: 3OOI)와 히스톤 H4 펩티드 (PDB: 3F9Y)에 결합된 SET8의 결정 구조 간의 구조적 오버레이 (overlay)를 NSD2의 닫힌 구조 모델의 히스톤 결합 위치 내에 H3K36 (a.a. 32-38) 펩티드를 수동으로 위치시키고 맞추는데 이용하였다. 구조적 오버레이는 COOT 내의 SSM 알고리즘을 이용하여 수행하였다. 펩티드-NSD2- SET 복합체를 VMD 1.9를 이용하여 수조 (140 x 100 x 110)에서 완전히 용매화하였다. 에너지 최소화 및 분자 동역학 (molecular dynamics, MD)은 CHARMM force field를 이용하여 NAMD v2.8으로 수행하였다. 항온은 300K에서의 Langevin 댐핑을 이용하여 유지하였으며, 압력은 Langevin 피스톤을 이용하여 1 압력으로 일정하게 유지하였다. 정전기력은 PME (particle mesh Ewald) 방법을 이용하여 10 컷-오프 거리 (cut-off distance)로 고려하였다.

용매화된 펩티드-NSD2- SET 복합체에 대하여 총 100,000 단계의 (100ns) MD 및 총 30,000 단계의 (30ns) 에너지 최소화를 수행하였다. MD 시뮬레이션 후, 용매화된 복합체를 이상적 입체화학을 위하여 수동으로 COOT으로 확인하였다. MD 궤적은 VMD 1.9으로 분석하였다. 펩티드 H3K36 (a.a. 32-38) 및 물 분자를 펩티드-NSD2- SET 복합체로부터 제거하고 가상적 리간드 스크리닝에 적합한 NSD2-SET의 열린 구조를 남겼다.

[192]

[193] **2.7 가상적 리간드 스크리닝 및 화합물의 선별**

[194] ZINC 도킹 데이터베이스 버전 11 42으로부터 다운로드한 Clean Drug-Like compounds로 도킹을 수행하기 위하여 AutoDock Vina를 사용하였다. 열린 NSD2-SET 상의 없어진 수소 원자를 PDB2PQR 프로그램과 CHARMM force field을 함께 이용하여 첨가하였다. 리간드는 AutoDock tools (ADT) v1.5.4 r29으로 제조하였다. 도킹 격자 크기 및 위치는 ADT를 이용하여 수동으로 설정하였다. 격자의 크기 (22x20x20)는 열린 NSD2- SET를 덮기에 충분히 컸으며, NSD1-SET에서 확인된 효소적 채널의 중심이었다. 40,325 분자 (190 Da < MW < 500 Da)의 일부분을 도킹하였으며, 상위 3,000개의 결과를 Cresset의 FieldView (Herts, AL7 3AX, United Kingdom)로 분석하고 여과하였다. 각 분자에서, 상위 9개의 결합 구조를 보존하였다. 상위 도킹 용액을 COOT 및 PyMOL을 이용하여 수동으로 점검하였다.

[195]

[196] **2.8 결과**

[197] NSD2/MMSET은 다발성 골수종에 대한 치료학적인 주요 표적이다. 다발성 골수종은 매우 낮은 생존률을 나타내며 치료방법이 없는 악성종양 (malignancy)이다. HMTase 억제제는 매우 희귀하며 단 하나의 NSD2 억제제인, MCTP39, SAM 경쟁자가 지금까지 확인되었다. 본 발명에서는, 구조-기초적 발견 접근을 이용하여, 본 발명자들은 *in vitro*에서 NSD2의 H3K36 HMTase 활성을 억제하는 소분자를 확인하였다.

[198] NSD2의 구조는 아직 밝혀진 바가 없으며, 확인된 가장 가까운 결정구조는 NSD1의 apoSET 도메인이다. 본 발명자들은 상동성 모델링을 이용하여, NSD1-SET 결정 구조를 활용한 NSD2-SET 모델을 구성하였으며, 이들이 매우 높은 서열 동일성 (75.9%) 및 유사성 (90.1%)을 공유하는 것으로 확인하였다. 종래 본 발명자들은 NSD1-SET에서의 SET과 postSET 도메인 사이의 인터페이스에 위치하는 조절 루프의 운동 및 역할을 연구하였다

[199] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[200] 도 6은 NSD2/MMSET의 구조 및 LEM-14을 포함하는 열린 SET 도메인의 모델을 나타낸 도이다.

[201] (A) NSD2의 일차구조: PWWP 도메인; PHD zinc 핑거 도메인; preSET 및 postSET를 포함하는 SET HMTase (histone methyl transferase). 히스톤-결합 부분을

닫는 조절 루프를 붉은 색으로 표시하였다.

[202] (B) 정제후의 재조합 NSD2-SET 를 SDS-PAGE 겔 상에서 쿠마시 염색한 결과이다.

[203] (C) 가상 리간드 스크리닝을 통하여 LEM-14와 가장 선호되는 구조로 결합되어 있는 열린 NSD2-SET 모델이다. 조절 루프는 붉은 색으로 표시하였다.

[204] (D) LEM-14와 결합한 NSD2-SET의 분자 표면을 나타낸 도이다. 정전기적 표면을 아래와 같이 색으로 표시하였다:

[205] 푸른색: 양전하; 붉은색: 음전하, 단위 +5/-5 kb.T.ec⁻¹.

[206] 도 6에 나타난 바와 같이, 닫힌 구조에서, H3 또는 H4 꼬리의 결합은 입체학적으로 방지되었다. 이에 따라 장기 MD 시뮬레이션을 이용하여 열린 구조의 NSD2-SET를 모델링하였다. 본 발명자들은 NSD2-SET의 닫힌 구조의, SET과 postSET 서브-도메인의 인터페이스에서의 조절 루프의 밑에 7-mer H3 펩티드 (a.a. 32-38)를 삽입하였다. NSD2- SET-H3K36 (a.a. 32-38) 복합체를 의도적으로 입체학적으로 불안정한 구조가 되게 하였다. 에너지 최소화 및 장기 MD 시뮬레이션은 입체적 제약을 완화하고 SET 도메인이 기질을 수용하도록 하였다 (도 6C 및 D). MD 시뮬레이션은 복합체가 안정한 구조로 안정화되도록 하였다. NSD2-SET의 조절 루프는 끝부분에서 ~45 회전 (rotation) 및 ~6 변형 (translation)으로 현저한 변위 (displacement)를 겪었으며, 이는 H3 또는 H4 꼬리의 도킹에 적합하도록 매우 크게 음전화된 결합 그루브를 열게 한다 (도 6D). NSD1-SET 및 NSD2-SET 모두는 H4K20 HMTase SET8의 일부 에서 7개 이상의 아미노산을 포함하는 인식 서열을 갖는다.

[207]

[208] BIX-01294은 G9a 유사 단백질 HMTase의 SET 도메인을 표적하는 히스톤-꼬리 모방체이다. GLP의 히스톤꼬리 틈에 결합된 BIX-01294의 결정구조를 확인함으로써, 본 발명자들은 NSD2-SET의 열린 구조의 히스톤-꼬리 결합 주머니에 중점을 둔 가상 리간드 스크리닝 방법을 디자인 하였다. HMTase 억제제 BIX-01294, BIX-01338, 및 케토신 (Chaetocin)은 각각 492 Da, 535 Da, 및 696 Da의 분자량을 갖는다 (도 9). BIX-01294, BIX-01338 및 케토신은 히스톤 꼬리의 결합 그루브와 매칭되는 입체 장애 (steric hindrance)와 함께 양성 정전기장을 갖는다. 그러나, 500 Da 이상의 분자는 저하된 약동학적 파라미터를 가진다. 따라서, 본 발명자들은 500 Da 미만의 분자량으로 화합물을 선별하여, 도킹에 사용하기 위한 40,325개 분자의 부분 집합을 형성하였다. 40,325개 도킹 결과를 최적으로 도킹된 컨포머 (conformer)의 최적의 도킹 에너지에 따라 정렬시켰다. 본 발명자는 선택된 화합물이 NSD2-SET의 히스톤-꼬리 결합 그루브와 매칭되는 양성적 전자기장을 갖는지 여부 (priority #1), COOT을 이용한 수동적 점검에 따른 SET 도메인에서의 적합한 구조적 조화 및 결합 상호작용을 갖는지 여부 (priority #2), Lipinski의 5의 법칙을 따르는지 여부 (priority #3), 총 극성 표면 범위 (polar surface area) <100 ²(priority #4), 분자 굴절 (molar refractivity)

(priority #5)을 확인하기 위하여 상위 3,000 개의 화합물에 대하여 스크리닝 필터를 적용하였다. 중원자를 갖는 분자는 고려되지 않았다. 20 개의 엄선한 분자 중에서, 9개의 분자를 H3K36 모노메틸화 (H3K36me1)에 대하여 *in vitro* 어세이를 수행하였다. 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[209] [표 2]

[210]

Potential Inhibitor	IC ₅₀ (μM)	Docking energy (Kcal/mol)	MW (Da)	wcLogP	TPSA (Å ²)	Rot. B.	Rule of 5 violations	ZINC ID	Molport ID
LEM-01	>1000	-11.7	456.5	6.2	61.5	3	1	08970024	000-811-870
LEM-02	>1000	-10.2	491.6	5.8	54.3	4	1	21796628	008-000-436
LEM-03	>1000	-10.2	466.4	5.7	71.8	8	1	09948565	002-965-128
LEM-04	>1000	-10.1	502.4	6.9	78.9	6	2	28049293	004-921-754
LEM-05	>1000	-10.2	501.6	4.7	95.9	7	1	09380990	002-459-090
LEM-06	890±250	-10.3	492.7	2.4	58.7	4	0	20503683	001-744-919
LEM-14	11.2±5	-10.7	478.6	1.7	93.2	3	0	23116671	005-735-962
LEM-08	>1000	-10.5	450.6	2.1	72.7	4	0	14879956	005-022-263
LEM-09	>1000	-10.8	486.6	2.9	63.2	5	0	11976344	005-011-910
BIX-01294	9.4±20	-9.7	492.6	3.9	68.4	7	0	36382102	B9311 Sigma

[211] 선별된 9개의 분자와 BIX-01294를 제조합 NSD2-SET와 제조합 변형되지 않은 인간 히스톤 H3.1을 이용하여 H3K36me1의 억제활성을 시험하였다. 화합물 LEM-06, LEM-14, 및 BIX-01294는 각각 890 M, 11.2 M, 및 9.4 M의 IC₅₀으로 NSD2-SET을 억제하였다. LEM-14 *in vitro* IC₅₀은 MCTP39, TMDC 1c, AMI-1, AMI-5, AMI-6, AMI-9 및 GSK343와 같은 다른 HMTase 억제제의 IC₅₀범위와 상응하였다.

[212] 도 8은 NSD2-SET H3K36 모노-메틸화 활성화에 대한 억제제의 농도반응 곡선을 나타낸 도이다. NSD2-SET H3K36 모노-메틸화 활성을 후보 억제제의 다양한 농도에서 표시하였다. LEM-06, LEM-14, 및 BIX-01294의 농도반응곡선 및 IC50을 GraphPad Prism 6.0를 이용하여 표시하였다.

[213] 도 9는 LEM-06, LEM-07 및 BIX-01294의 화학 구조이다.

[214] LEM- 14 및 BIX-01294 보다 약한 LEM-06의 억제는 SET 도메인에서 LEM-15 및 BIX-01294가 5개의 수소결합을 갖는 반면, LEM-06는 3개의 수소결합을 갖는 것으로부터 기인한 약한 안정화로 설명된다 (도 9). 다른 LEM 들이 *in vitro*에서 현저한 H3K36me1 HMTase 억제 효과를 나타내지 못하는 이유는 명확하지 않다. 그러나, 가능한 설명은 히스톤 H3.1과의 결합과 효과적으로 경쟁하는 시험된 분자들의 분자 굴절에 있다. LEM-14 및 BIX-01294는 모두 다른 LEMs와 비교하여 가장 강력한 양성 정전기장을 가지며, 이는 히스톤-꼬리 결합 도메인의 음전하된 표면과의 상호작용의 세기와 관계가 있을 수 있다 (도 6D 및 도 11). BIX-01294는 HMTase G9a의 히스톤-결합 그루브와 결합하고 3M의 IC₅₀으로

활성을 억제한다. 또한 BIX-01294의 유도체는 H3K9 주머니 디메틸라아제 (Jumonji demethylase)의 패밀리를 0.05- 75M의 IC_{50} 으로 억제할 수 있다.

- [215] SAM 결합 주머니 내로 히스톤-꼬리 대신 LEM-07 및 BIX-01294가 결합하는 것을 배제하지 않는다. 따라서, 결합의 가능성을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 NSD2-SET 의 SAM-결합 주머니 내로 LEM-14 및 BIX-01294를 도킹하였다. LEM-14 및 BIX-01294는 각각 -9.2 Kcal/mol 및 - 7.6 Kcal/mol의 도킹 에너지로 결합한다. 이는 LEM-14 및 BIX- 01294가 각각 -10.7 Kcal/mol 및 9.7 Kcal/mol의 도킹 에너지로 히스톤-꼬리 주머니에 더 선호되는 결합을 하는 것과 아주 극명한 대조이다 (표 2). 또한, LEM-14 및 BIX-01294 모두 MCTP39 또는 AdoMet 보다 더 부피가 크며, 전자들의 NSDs의 SAM결합주머니 내로 입체적으로 제한된 (sterically constrained) 결합은 더 큰 에너지를 소비하고, 발생의 가능성이 감소한다.
- [216] 본 발명에서, 본 발명자들은 H3K36 메틸화에 대한 신규한 NSD2 억제제인 LEM-07를 개발하였으며, 이는 *in vitro* IC_{50} =11.2M를 나타내었다. 또한, 본 발명자들은 BIX- 01294 가 G9a에서 관찰되는 것과 유사한 결합 특성으로 NSD2를 억제 (IC_{50} =9.4M)하는 것을 확인하였다.
- [217] 종합적으로 본 발명자들은 LEM- 14의 유도체가 다발성 골수종을 포함하는 다양한 종양에 적합한 특이적 NSD2/MMSET 억제제로서 사용할 수 있음을 밝혔다.

청구범위

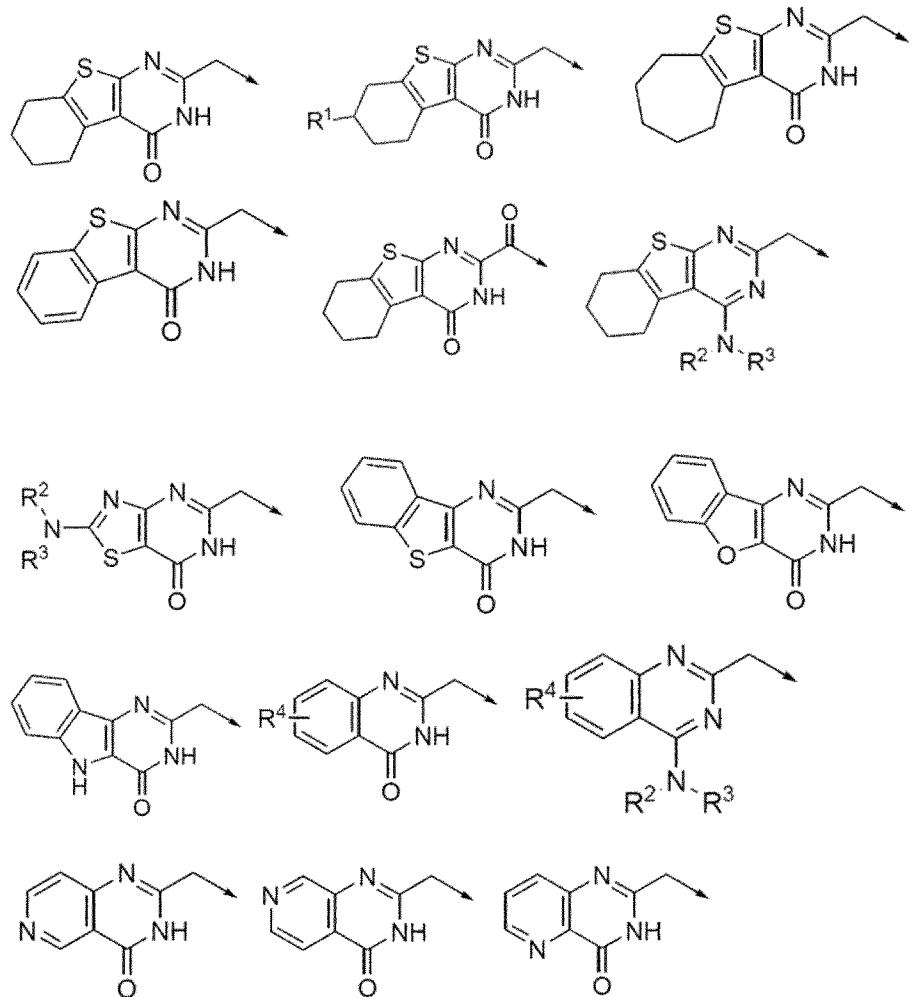
[청구항 1]

하기의 식으로 이루어진 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:

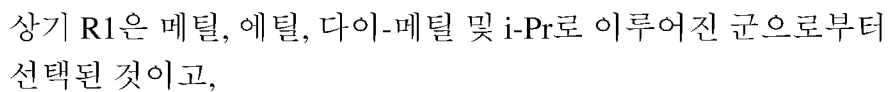
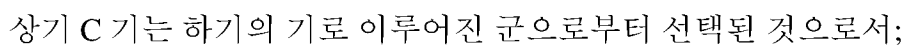
A-B-C

여기서,

상기 A 기는 하기의 기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,



상기 B 기는 하기의 기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이며,



R2 및 R3는 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 알킬기, 치환 또는 비치환된 시클로알킬기, 및 이종원소로 O, N, S 또는 P를 갖는 치환 또는 비치환된 헤테로시클로알킬기로 이루어진 군으로부터 선택된 것이며,

R4는 플루오르, 염소, 메틸, 및 OMe으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고,

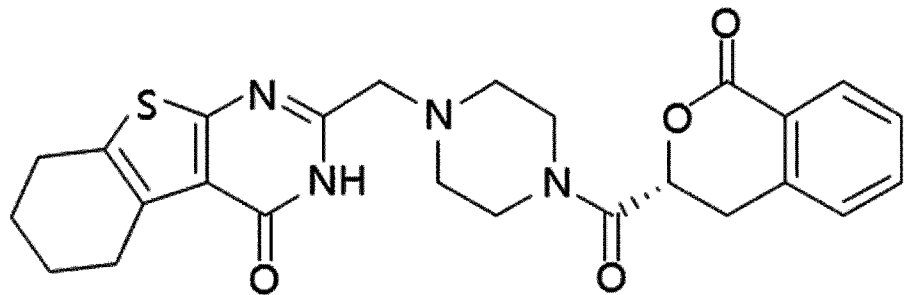
R5는 메틸, 에틸, *tert*-부틸, 치환 또는 비치환된 페닐, 및 이종원소로 O, N, S 또는 P를 갖는 치환 또는 비치환된 페닐기로부터 이루어진 군으로부터 선택된다.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제의 억제제인 것인, 화합물.

[청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제는 인간 NSD (nuclear receptor binding SET domain) 패밀리인 것인, 화합물.

[청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 NSD는 NSD2/MMSET인 것인, 화합물.

[청구항 5] 청구항 2에 있어서 상기 히스톤 라이신-메틸 트랜스퍼라아제 억제제는 하기의 화학식으로 이루어진 것인, 화합물.



[청구항 6] 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

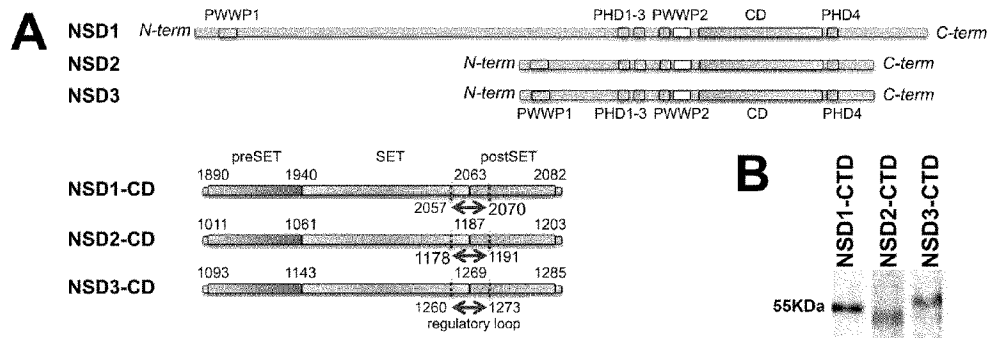
[청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 암은 림프종 (lymphoid malignancies), 급성 림프구성 백혈병 (Acute lymphoblastic leukemia, ALL), 만성 림프구성 백혈병 (Chronic lymphocytic leukemia, CLL), 골수종 (myeloma), 피부암, 원발성 흑색종 (primary melanomas), 난황주머니 종양 (Yolk sac tumour), 유방암, 폐암, 대장암, 췌장암, 난소암, 방광암, 전립선암, 신장암, 뇌종양(brain cancer), 자궁경부암, 백혈병, 육아종증(granulomatosis), 및 세포 형질 변환 (cellular transformation)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 8] 청구항 6에 있어서, 상기 암은 다발성 골수종인 것인, 약학적 조성물.

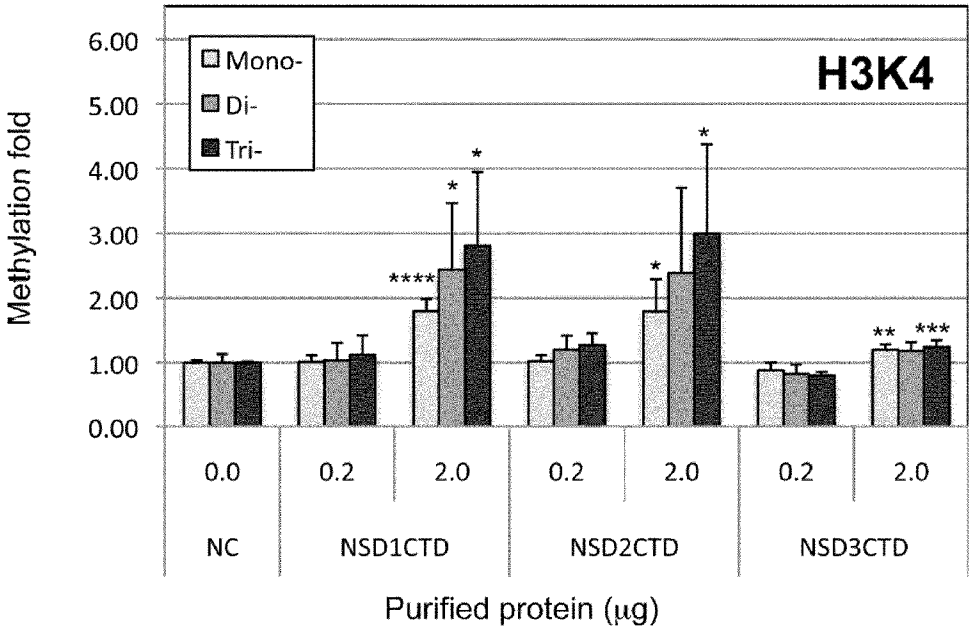
[청구항 9] 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 10] 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 화합물의 약학적으로 효과적인 양을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

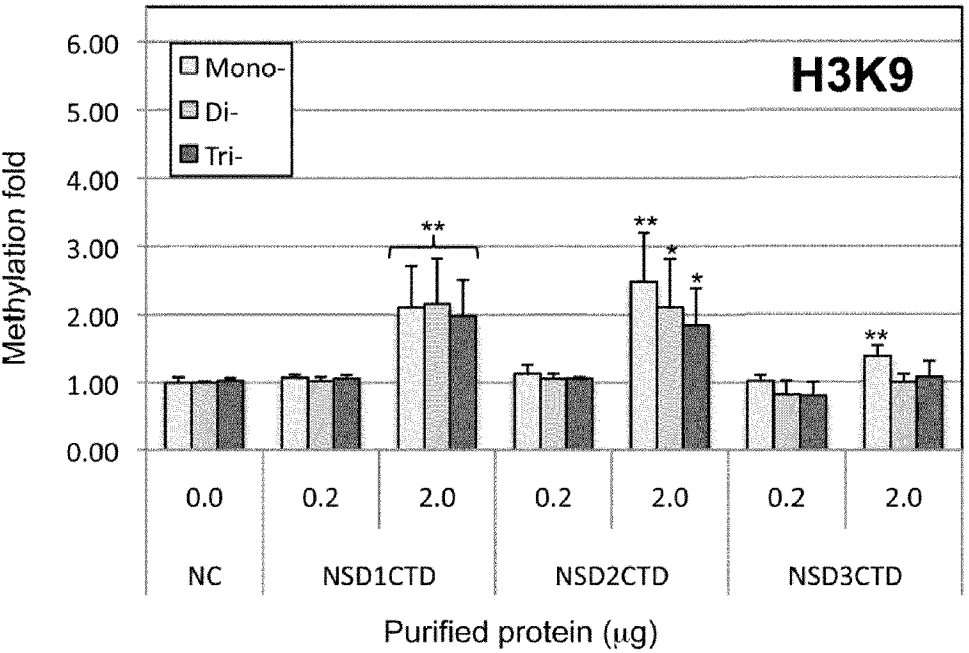
[Fig. 1]



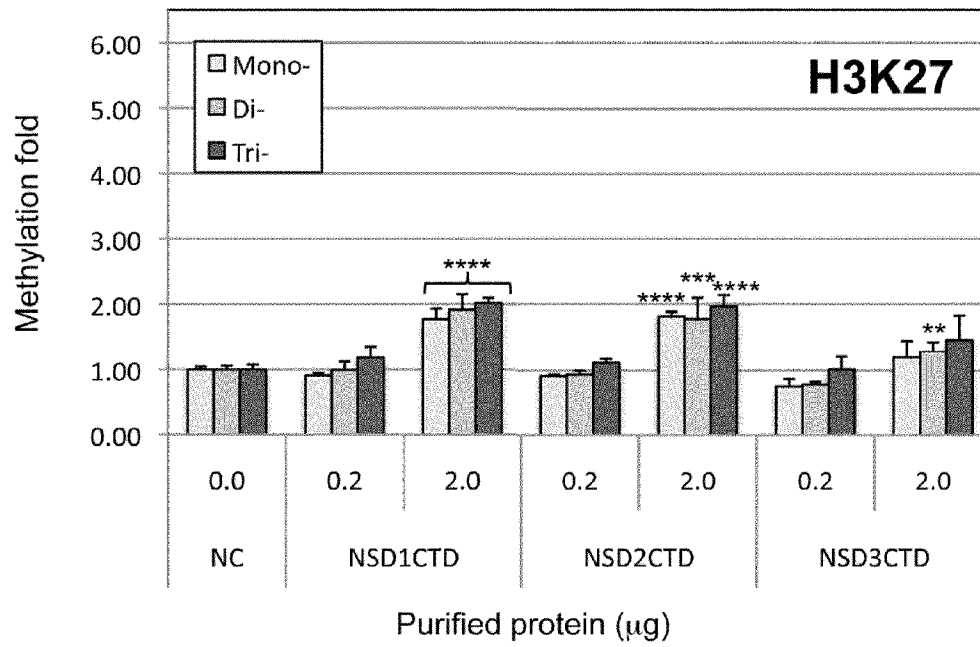
[Fig. 2a]



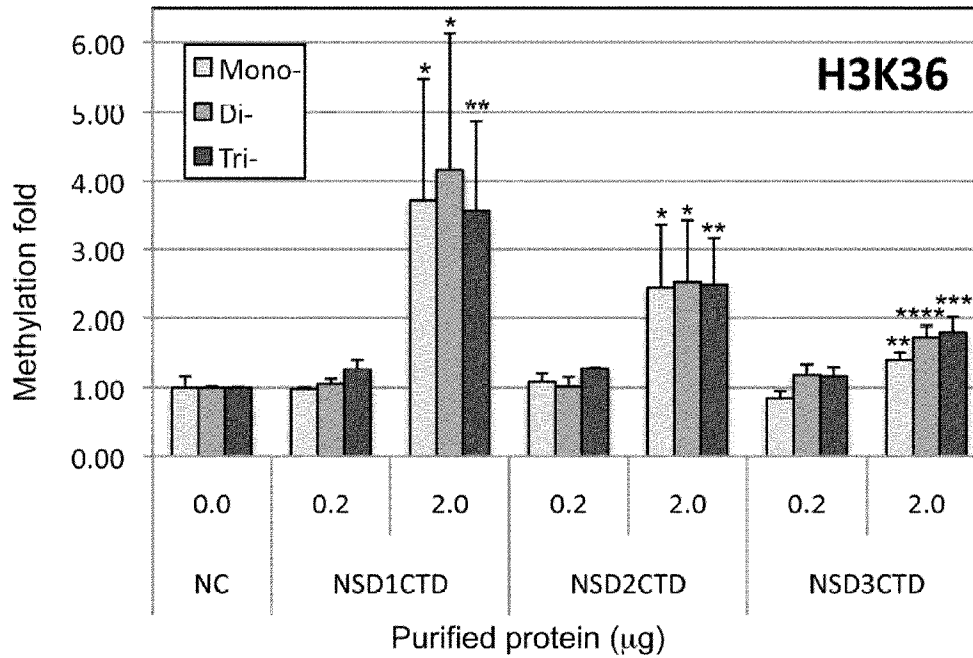
[Fig. 2b]



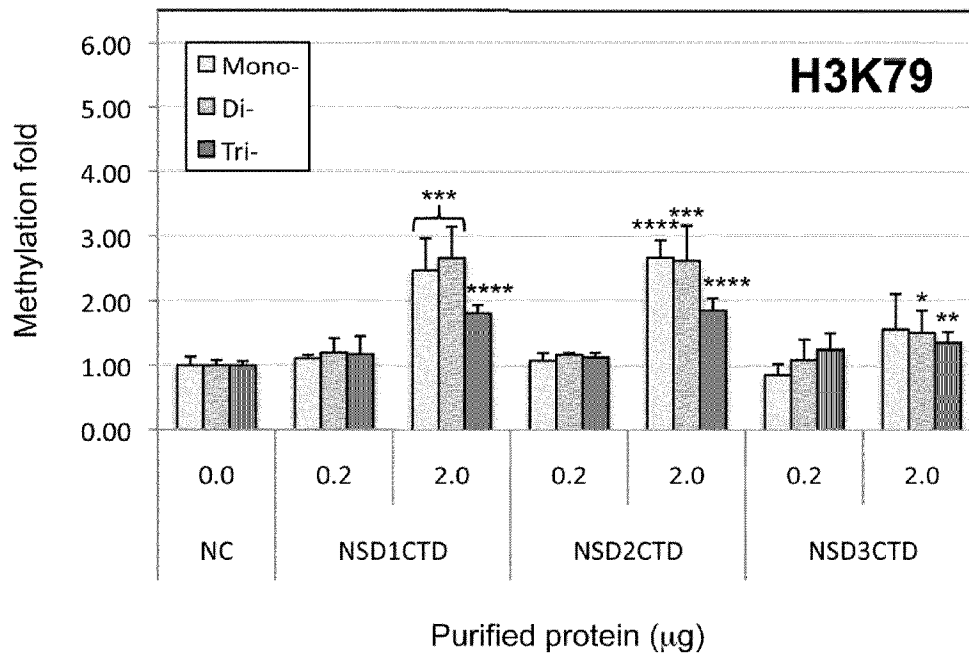
[Fig. 2c]



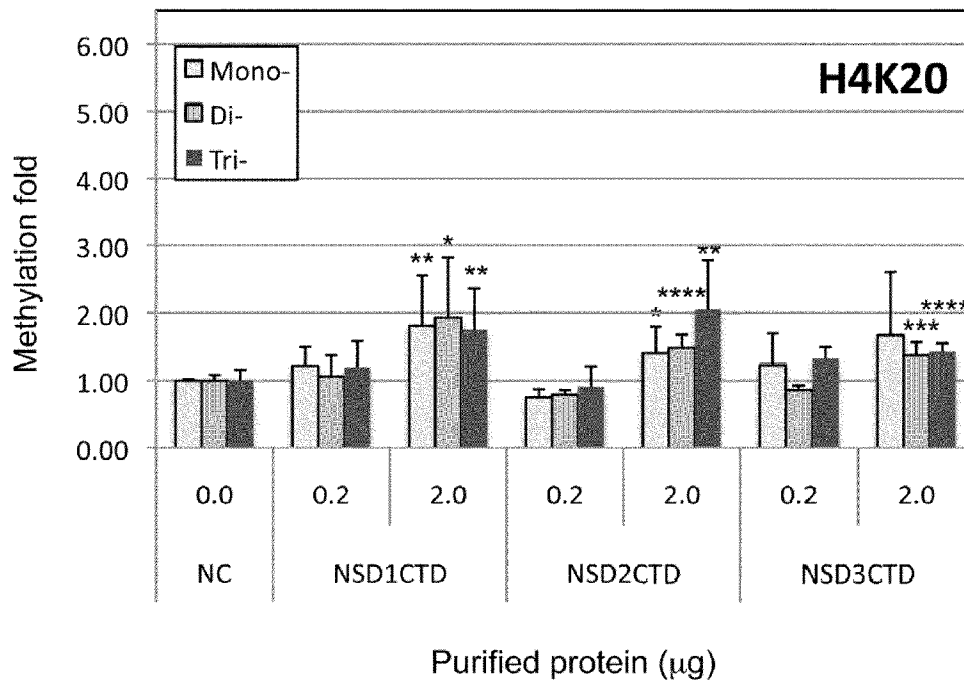
[Fig. 2d]



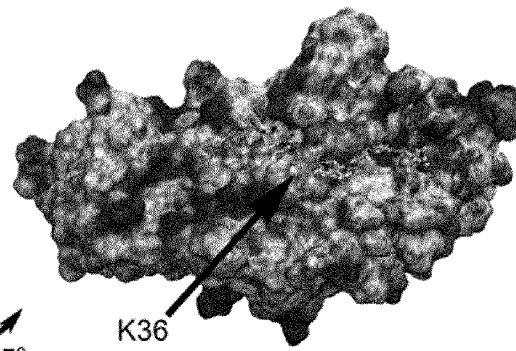
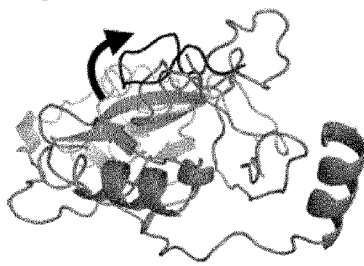
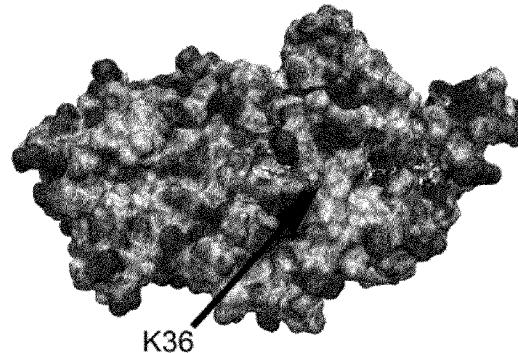
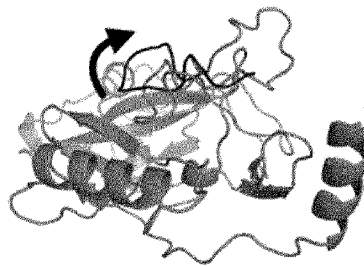
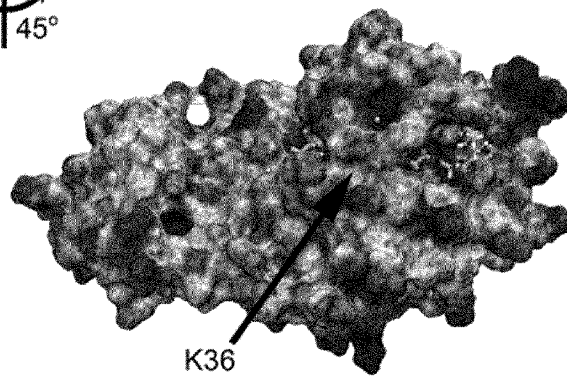
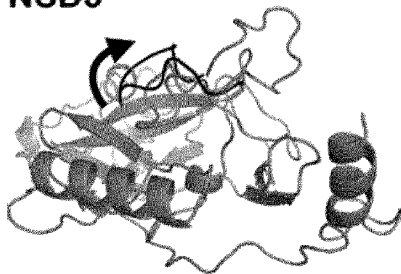
[Fig. 2e]



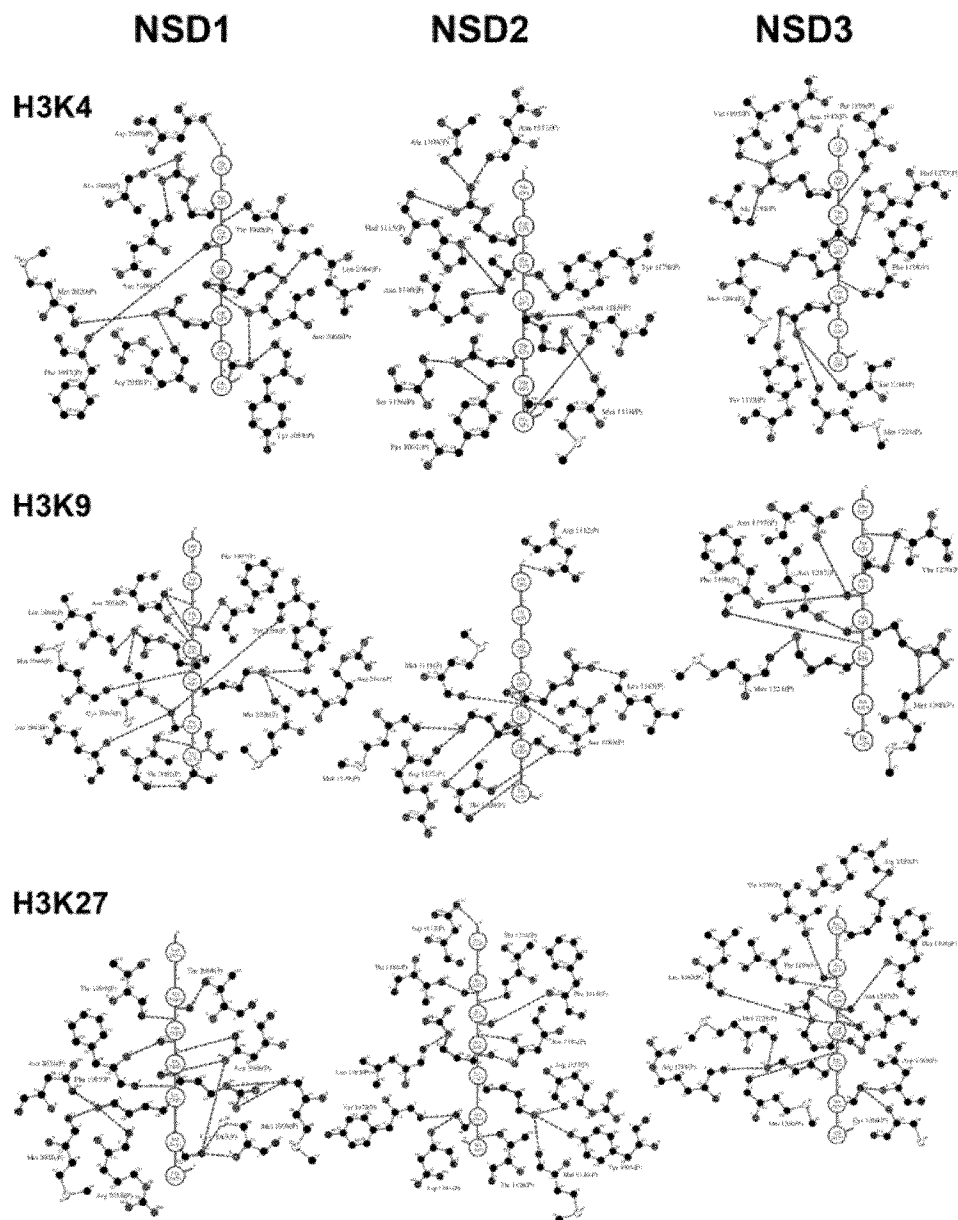
[Fig. 2f]



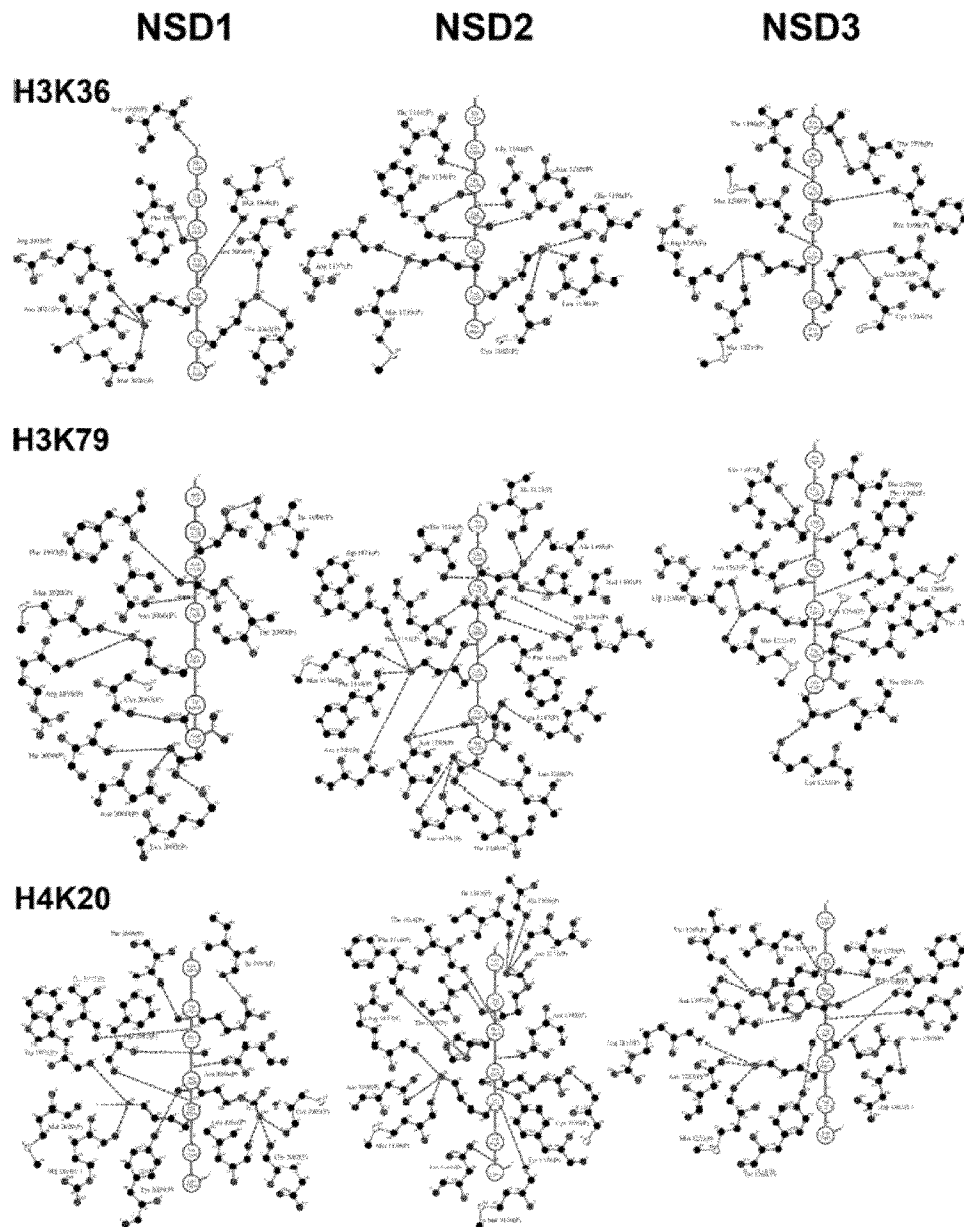
[Fig. 3]

NSD1**NSD2****NSD3**

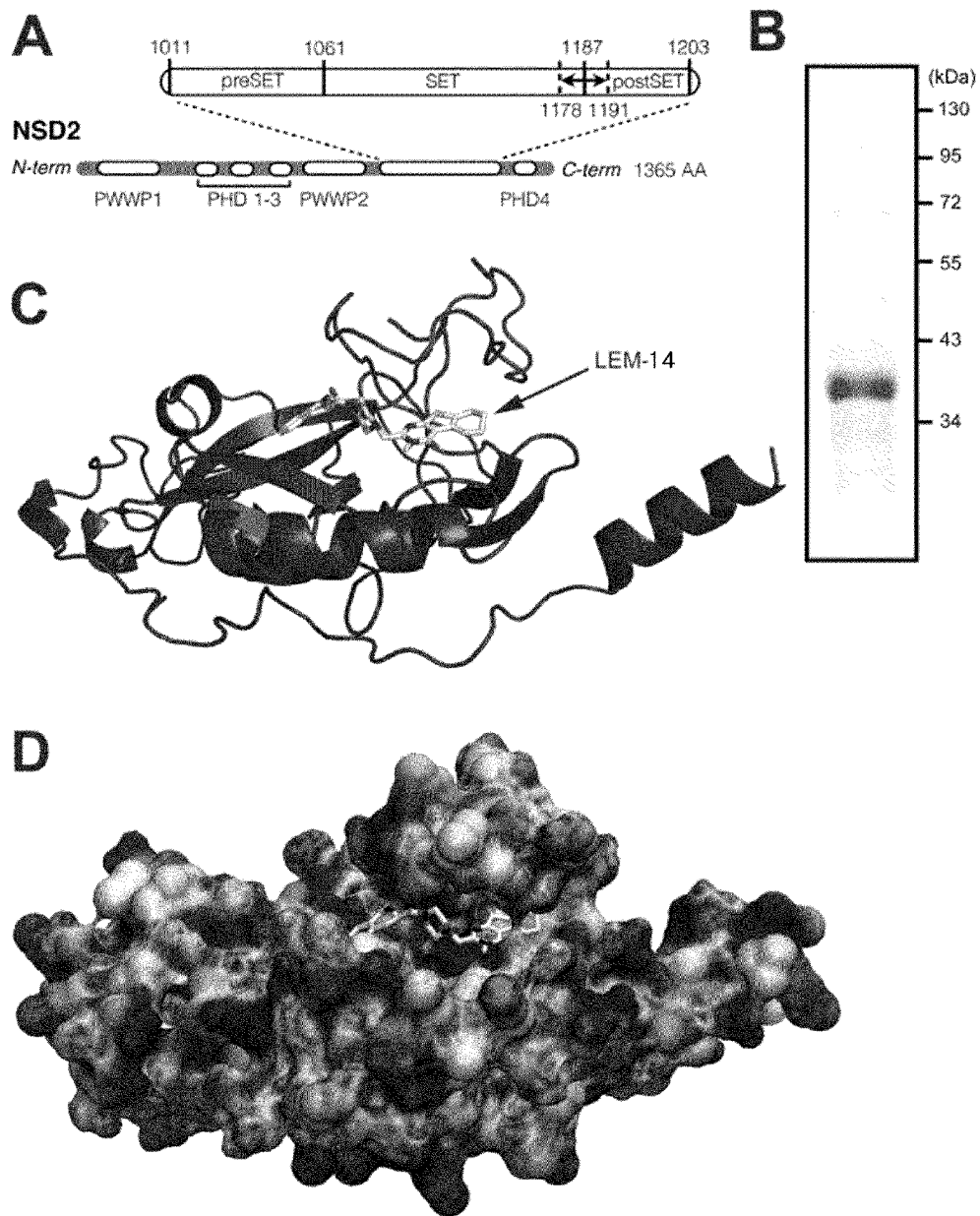
[Fig. 4]



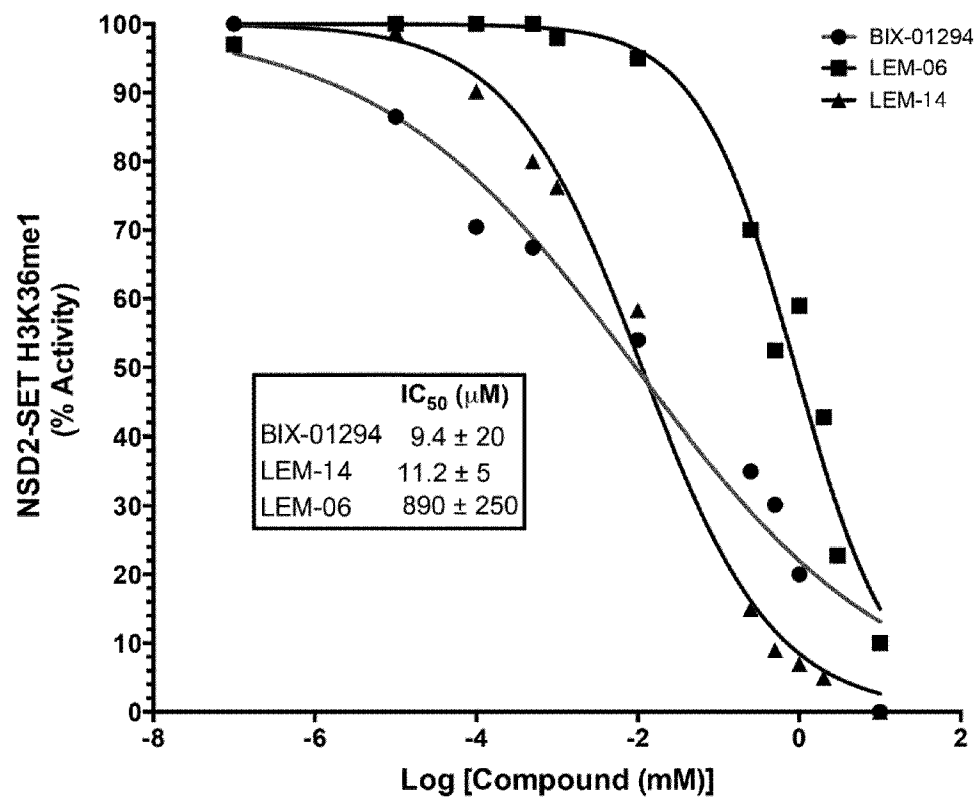
[Fig. 5]



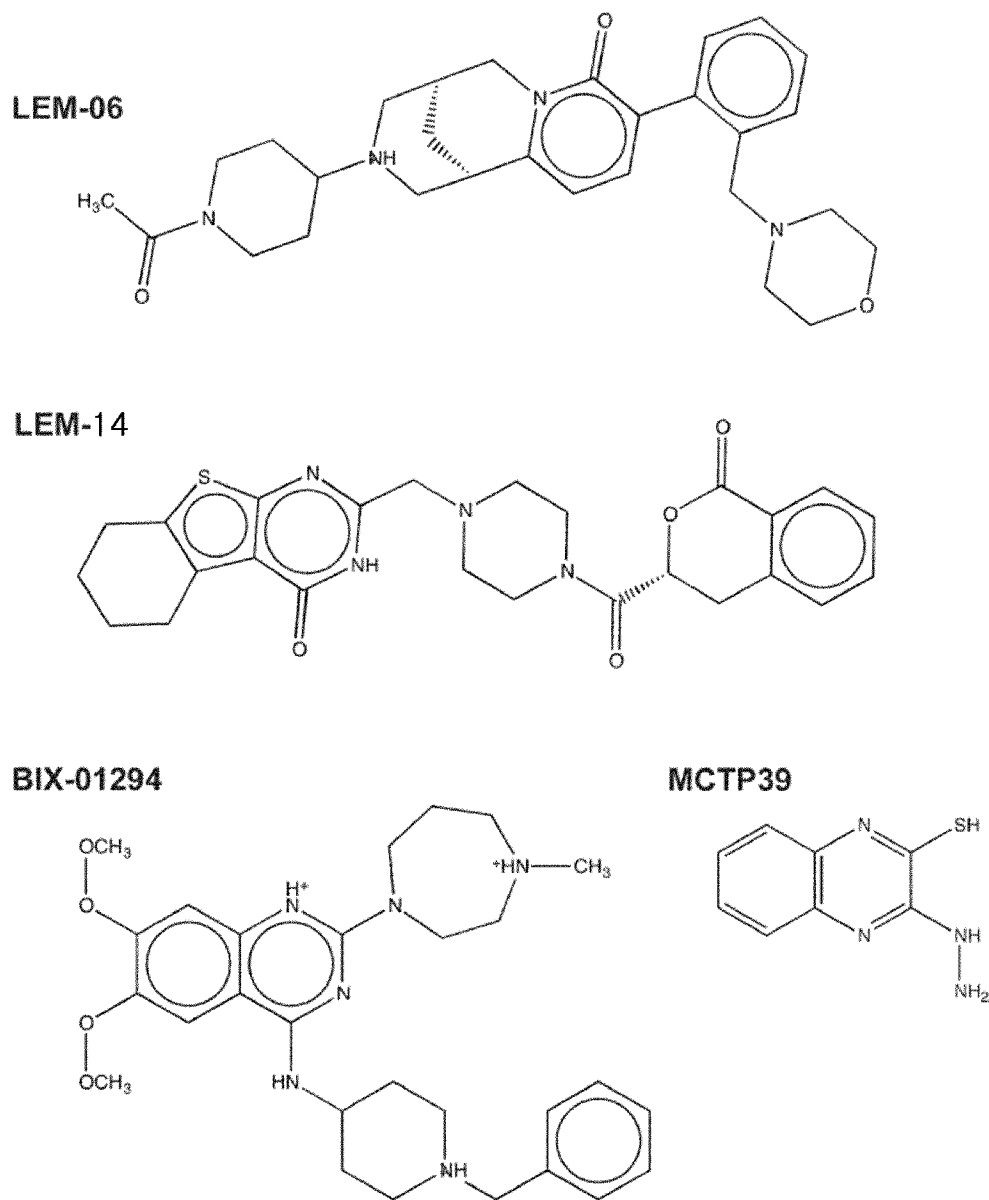
[Fig. 6]



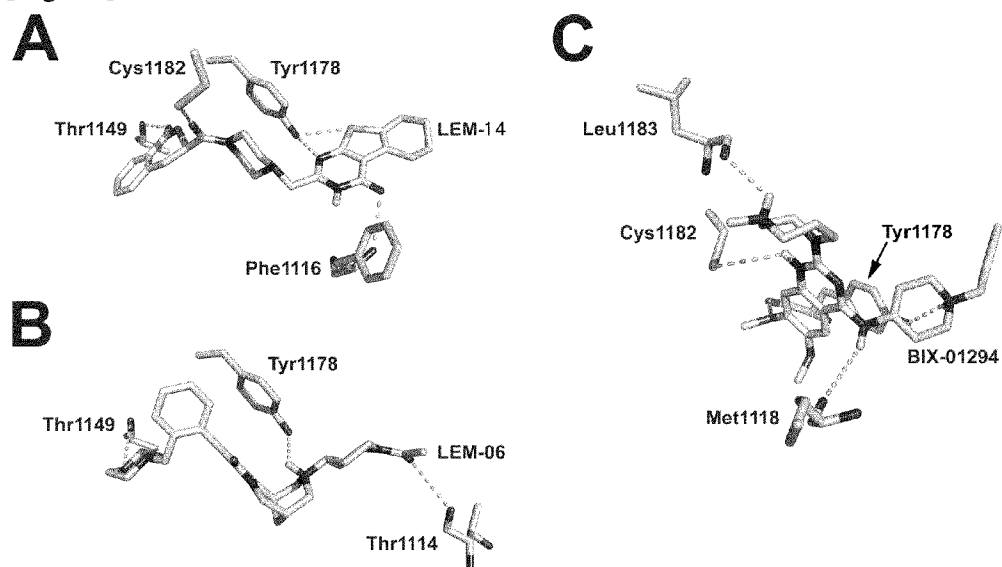
[Fig. 8]



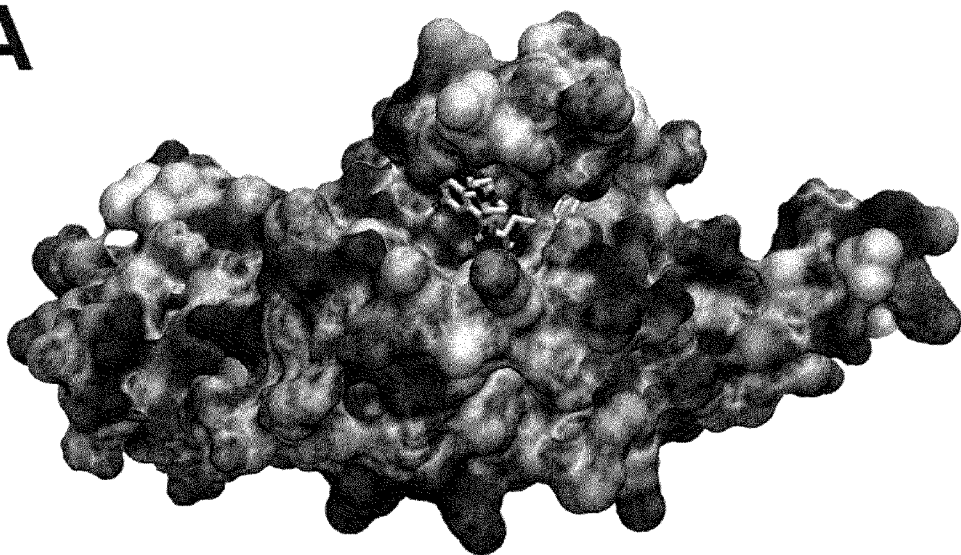
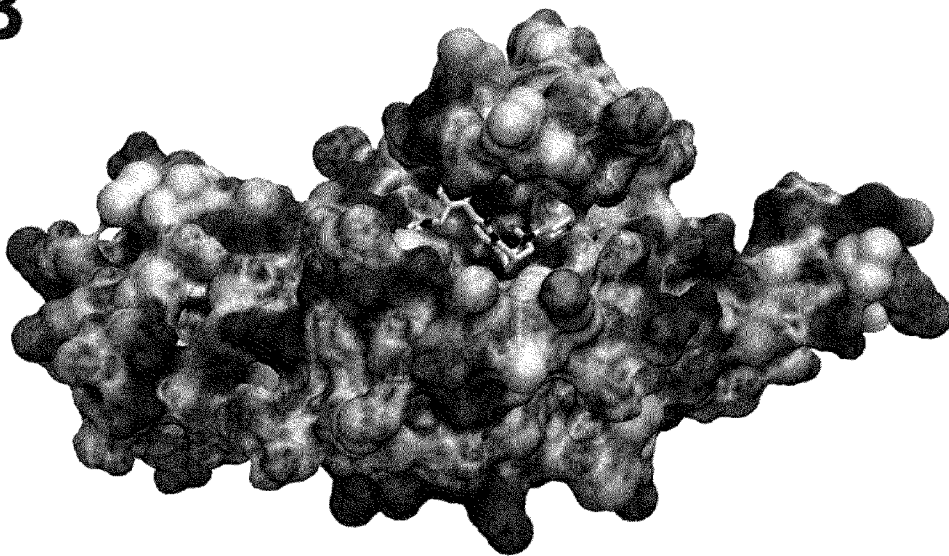
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

A**B**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/002796

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

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

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

The invention of group 1: claims 1-4 (a part), 5 and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-1" – "B-1" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 2: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-1" – "B-1" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, comprising the same.

The invention of group 3: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-1" – "B-1" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, comprising the same.

The invention of group 4: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-1" – "B-2" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 5: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-1" – "B-2" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 6: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-1" – "B-2" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

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.:
Part of claims 1-4, claim 5, part of claims 6-9

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/KR2014/002796

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-075500 A2	07/06/2012	AU 2011-336272 A1	20/06/2013
		CA 2819625 A1	07/06/2012
		CN 103339139 A	02/10/2013
		EP 2646454 A2	09/10/2013
		EP 2646454 A4	26/02/2014
		KR 10-2013-0124959 A	15/11/2013
		US 2013-0310334 A1	21/11/2013
		US 2014-073597 A1	13/03/2014
		US 8722877 B2	13/05/2014
		WO 2012-075500 A3	20/09/2012
WO 2013-063417 A1	02/05/2013	AU 2012-328609 A1	29/05/2014
		CA 2853501 A1	02/05/2013
		EP 2771343 A1	03/09/2014
		US 2014-0303106 A1	09/10/2014

(Continuation of Box No. III)

The invention of group 7: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-2" – "B-1" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 8: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-2" – "B-1" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 9: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-2" – "B-" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 10: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-2" – "B-2" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 11: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-2" – "B-2" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 12: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-2" – "B-2" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 13: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-3" – "B-1" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 14: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-3" – "B-1" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 15: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-3" – "B-1" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 16: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-3" – "B-2" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 17: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-3" – "B-2" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 18: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-3" – "B-2" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 19: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-4" – "B-1" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 20: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-4" – "B-1" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 21: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-4" – "B-1" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 22: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-4" – "B-2" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 23: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-4" – "B-2" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 24: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-4" – "B-2" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 25: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-5" – "B-1" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 26: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-5" – "B-1" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 27: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-5" – "B-1" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 28: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-5" – "B-2" – "C-1" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 29: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-5" – "B-2" – "C-2" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

The invention of group 30: claims 1-4 (a part) and 6-9 (a part) pertain to a compound of formula "A-5" – "B-2" – "C-3" or a composition for preventing, treating or alleviating cancer, containing the same.

A-1: 1st-6th of group A in claim 1

A-2: 7th of group A in claim 1

A-3: 8th-10th of group A in claim 1

A-4: 12th of group A in claim 1

A-5: 11th and 13th-15th of group A in claim 1

B-1: 1st-6th of group B in claim 1

B-2: 7th and 8th of group B in claim 1

C-1: 1st-3rd, 7th and 8th of group C in claim 1

C-2: 4th and 6th of group C in claim 1

C-3: 9th and 12th of group C in claim 1

(※ Groups A, B and C as set forth in claim 1 are numbered in a left, top, right and bottom order)

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07D 495/04(2006.01)i, C07D 405/14(2006.01)i, C07D 403/14(2006.01)i, A61K 31/519(2006.01)i, A61K 31/506(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07D 495/04; C07D 487/04; C07D 473/34; C07H 19/14; C07D 405/14; C07D 403/14; A61K 31/519; A61K 31/506; 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(REG, CAPlus), 구글 스칼라 & 키워드 : histone methyltransferase NSD2/MMSET inhibitor, cancer, tumor, multiple myeloma		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	STN (Registry) 데이터베이스(DB), datasheet RN 1031202-86-4 (Entered STN: 2008.06.27.) 참조.	1-5 6-9
X A	STN (Registry) 데이터베이스(DB), datasheet RN 1319363-08-0 (Entered STN: 2011.08.18) 참조.	1-4 5-9
A	WO 2012-075500 A2 (EPIZYME, INC. 외 4명) 2012.06.07 전문 참조.	1-9
A	WO 2013-063417 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 2013.05.02 전문 참조.	1-9
A	MARTINEZ-GARCIA 외 12명, 'The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t (4; 14) multiple myeloma cells', Blood, 2011, Vol. 117, No. 1, pp. 211-220 전문 참조.	1-9
☐ 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 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2015년 02월 17일 (17.02.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 02월 23일 (23.02.2015)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 3473		심사관 민경남 전화번호 ++82-42-481-3336 

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

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군 발명: 청구항 1-4(일부), 5, 6-9(일부)는 식 'A-1' - 'B-1' - 'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,
제2군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-1' - 'B-1' - 'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,
제3군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-1' - 'B-1' - 'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,
제4군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-1' - 'B-2' - 'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,
제5군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-1' - 'B-2' - 'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,
제6군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-1' - 'B-2' - 'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

(추가용지에 계속.)

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.
청구항 1-4(일부), 5, 6-9(일부)

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
WO 2012-075500 A2	2012/06/07	AU 2011-336272 A1 CA 2819625 A1 CN 103339139 A EP 2646454 A2 EP 2646454 A4 KR 10-2013-0124959 A US 2013-0310334 A1 US 2014-073597 A1 US 8722877 B2 WO 2012-075500 A3	2013/06/20 2012/06/07 2013/10/02 2013/10/09 2014/02/26 2013/11/15 2013/11/21 2014/03/13 2014/05/13 2012/09/20
WO 2013-063417 A1	2013/05/02	AU 2012-328609 A1 CA 2853501 A1 EP 2771343 A1 US 2014-0303106 A1	2014/05/29 2013/05/02 2014/09/03 2014/10/09

(제3기재란의 연속.)

제7군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-2'-'B-1'-'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제8군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-2'-'B-1'-'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제9군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-2'-'B-1'-'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제10군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-2'-'B-2'-'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제11군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-2'-'B-2'-'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제12군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-2'-'B-2'-'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제13군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-3'-'B-1'-'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제14군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-3'-'B-1'-'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제15군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-3'-'B-1'-'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제16군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-3'-'B-2'-'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제17군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-3'-'B-2'-'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제18군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-3'-'B-2'-'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제19군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-4'-'B-1'-'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제20군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-4'-'B-1'-'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제21군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-4'-'B-1'-'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제22군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-4'-'B-2'-'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제23군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-4'-'B-2'-'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제24군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-4'-'B-2'-'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제25군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-5'-'B-1'-'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제26군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-5'-'B-1'-'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의

추가 기재란에 계속

예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제27군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-5'-'B-1'-'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제28군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-5'-'B-2'-'C-1'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제29군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-5'-'B-2'-'C-2'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이고,

제30군 발명: 청구항 1-4(일부), 6-9(일부)는 식 'A-5'-'B-2'-'C-3'의 화합물, 또는 이를 포함하는 암의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것입니다.

A-1: 청구항 제1항의 A기 1 내지 6번

A-2: 청구항 제1항의 A기 7번

A-3: 청구항 제1항의 A기 8 내지 10번

A-4: 청구항 제1항의 A기 12번

A-5: 청구항 제1항의 A기 11, 13 내지 15번

B-1: 청구항 제1항의 B기 1 내지 6번

B-2: 청구항 제1항의 B기 7 및 8번

C-1: 청구항 제1항의 C기 1 내지 3, 7 및 8번

C-2: 청구항 제1항의 C기 4 내지 6번

C-3: 청구항 제1항의 C기 9 내지 12번

(※ 청구항 제1항에 기재된 A, B 및 C기를 좌상우하(左上右下) 순서로 번호 매김)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/002796**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07D 495/04(2006.01)i, C07D 405/14(2006.01)i, C07D 403/14(2006.01)i, A61K 31/519(2006.01)i, A61K 31/506(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)

C07D 495/04; C07D 487/04; C07D 473/34; C07H 19/14; C07D 405/14; C07D 403/14; A61K 31/519; A61K 31/506; 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 above

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

eKOMPASS (KIPO internal), STN(REG, CAplus), Google Scholar & Keywords: histone methyltransferase NSD2/MMSET inhibitor, cancer, tumor, multiple myeloma

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STN (Registry) Database(DB), datasheet	1-5
A	See RN 1031202-86-4 (Entered STN: 27 June 2008).	6-9
X	STN (Registry) Database(DB), datasheet	1-4
A	See RN 1319363-08-0 (Entered STN: 18 August 2011).	5-9
A	WO 2012-075500 A2 (EPIZYME, INC. et al.) 07 June 2012 See the entire document.	1-9
A	WO 2013-063417 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 02 May 2013 See the entire document.	1-9
A	MARTINEZ-GARCIA et al., "The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t (4; 14) multiple myeloma cells", Blood, 2011, Vol. 117, No. 1, pp. 211-220 See the entire document.	1-9



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

17 FEBRUARY 2015 (17.02.2015)

Date of mailing of the international search report

23 FEBRUARY 2015 (23.02.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.