



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0147511
(43) 공개일자 2022년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/12 (2006.01) A61K 31/551 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07D 403/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 401/12 (2013.01)
A61K 31/551 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0044593
(22) 출원일자 2022년04월11일
심사청구일자 2022년04월11일
(30) 우선권주장
1020210054078 2021년04월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김인기
서울특별시 강동구 고덕로27길 36, 101동 1502호
(암사동, 강동 현대홈타운)
김소영
서울특별시 강동구 풍성로 127, 104동 406호(성내동, 성내동삼성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

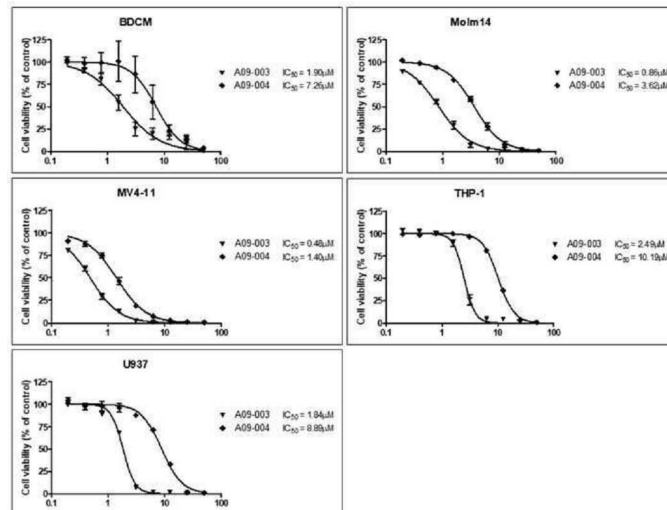
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 사이클린 의존성 키나아제 억제용 조성물 및 이의 의학적 용도

(57) 요약

본 발명은 사이클린 의존성 키나아제 활성 억제 효과를 나타내는 신규한 화합물 및 이의 의학적 용도에 관한 것으로, 상기 화합물은 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9) 활성을 억제시켜, 암의 세포분열을 조절함으로써 세포 사멸을 유도하는 것을 확인함에 따라, 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 암 질환 치료제 및 사이클린 의존성 키나아제 9 억제제로 제공하고자 한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07D 403/04 (2013.01)

(72) 발명자

남기엽

경기도 고양시 일산동구 강촌로 114, 507동 1401호(백석동, 백송마을5단지아파트)

심경미

경기도 시흥시 목감남서로 92-15, 105동 1902호(산현동, 목감중흥에스클래스레이크힐스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711036186

과제번호 2014R1A1A1003831

부처명 미래창조과학부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원

연구과제명 암세포에서 Syk가 Mcl-1의 분해를 조절하여 항암제 내성을 부여하는 기전에 대한 분

자세포생물학적 연구

기 여 율 50/100

과제수행기관명 울산대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465034378

과제번호 HR21C0198010021

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원육성(R&D)

연구과제명 의료현장 통합 지식베이스 및 인공지능형 가상 임상시험 시스템 구축

기 여 율 30/100

과제수행기관명 서울아산병원

연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345302804

과제번호 2016R1D1A1B03932365

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 히스톤 메틸화 효소 EHMT2의 억제로 발생하는 단백질 합성 제어 기작이 삼중음성 유

방암 특이적 세포사멸을 유도하는 신호 전달 기전 연구

기 여 율 20/100

과제수행기관명 울산대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

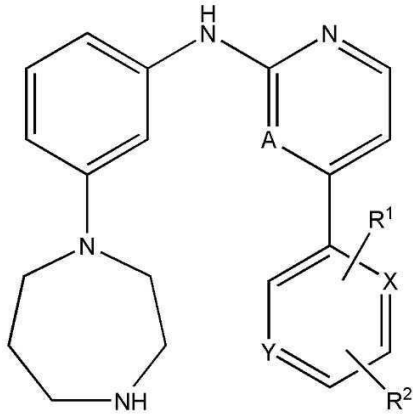
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

[화학식 1]



상기 화학식 1에 있어서,

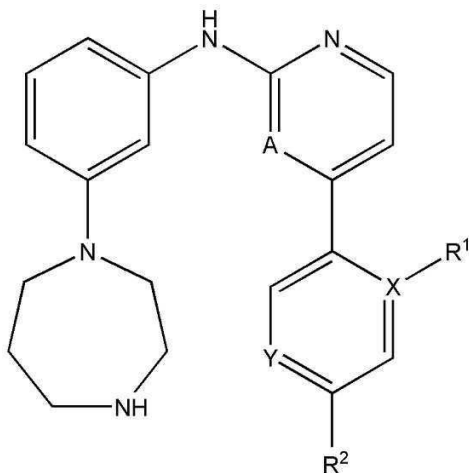
A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로겐 중 어느 하나임.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 화학식 1-1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

[화학식 1-1]



상기 화학식 1에 있어서,

A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로겐 중 어느 하나임.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 R^1 은 수소 또는 할로젠이고, 상기 R^2 는 수소 또는 C1 내지 C4 알콕시 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine], N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(피라진-2-일)피리미딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(pyrazin-2-yl)pyrimidin-2-amine] 또는 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine]인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

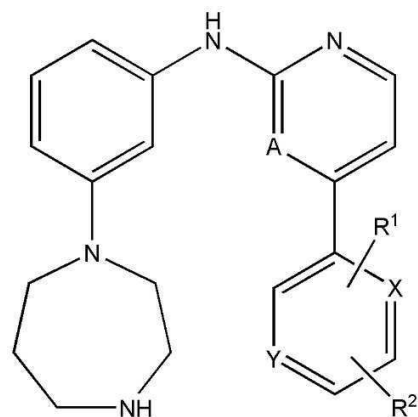
청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 사이클린 의존성 키나아제 9 (cyclin-dependent kinase 9)을 억제하는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에 있어서,

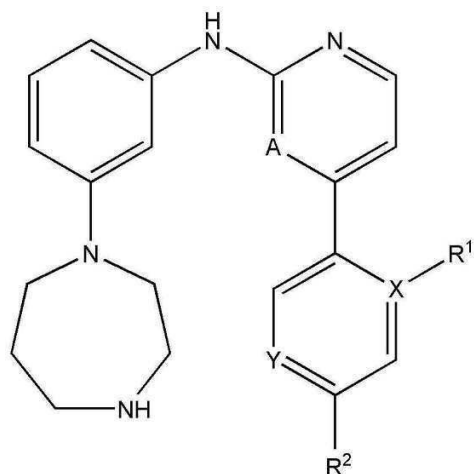
A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

R^1 및 R^2 는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로젠 중 어느 하나임.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 화학식 1-1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1-1]



상기 화학식 1에 있어서,

A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로젠 중 어느 하나임.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 R¹은 수소 또는 할로젠이고, 상기 R²는 수소 또는 C1 내지 C4 알콕시 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine], N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(피라진-2-일)피리미딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(pyrazin-2-yl)pyrimidin-2-amine] 또는 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine]인 것을 특징으로 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

청구항 6에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9)를 억제하는 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

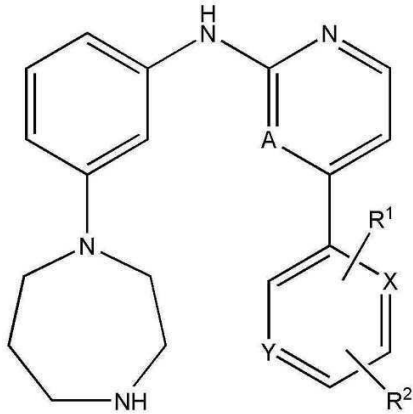
청구항 11

청구항 6에 있어서, 상기 암질환은 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 유방암, 난소암, 자궁암, 췌장암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 피부암, 방광암, 갑상선암, 뇌암 및 전립선암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 12

상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9) 억제용 조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에 있어서,

A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로젠 중 어느 하나임.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사이클린 의존성 키나아제 활성 억제 효과를 나타내는 신규한 화합물 및 이의 의학적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 통제되지 않는 세포분열을 나타내며, 암의 세포분열을 조절하기 위한 세포주기 제어는 효과적인 암 치료에 전략이 될 수 있다. 특히 세포주기의 진행을 촉진하는 CDK(cyclin-dependent kinase)는 세포주기 진행을 유도하는 중요한 조절효소로, 암 치료에 있어 중요한 치료 타겟으로 여겨지고 있다.

[0003] 지난 20년 동안 많은 CDK 억제제가 잠재적인 암 치료제로 개발되어 여러 종양 치료제로 사용되어왔다. 개발된 1세대 CDK 억제제는 상대적으로 비특이적이기 때문에 전 CDK (pan-CDK) 억제제라고 부르고 있다. 1세대 억제제 중 플라보피리돌은 지금까지 가장 광범위하게 연구된 CDK 억제제로 생체 밖(in vitro) 실험에서 상당한 활성을 나타내었지만, 생체 내(in vivo)에서는 CDK 억제제에 대한 초기 기대치를 충족시키지 못했고, 몇 가지 고형암(solid tumor)에 대한 2상 임상 시험에서 낮은 수준의 결과를 보였다.

[0004] CDK9는 cyclin T 혹은 K와 복합체를 이루어 RNA polymerase II의 C 말단을 인산화시킴으로써 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 성장 및 생존에 필요한 단백질이 바로 이러한 반감기가 짧은 단백질로 구성되기 때문에 CDK9 억제 물질을 발굴하면 항암제로 사용할 가능성이 충분히 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2013-0098151 (2013.09.04. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

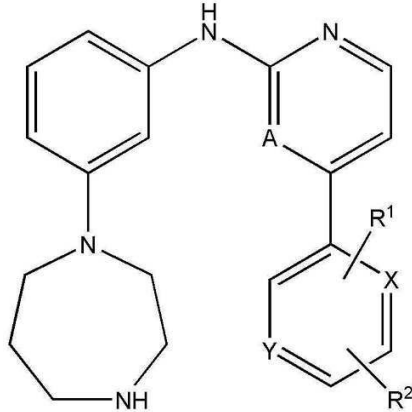
[0006] 본 발명은 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9) 활성을 억제시키는 신규한 화합물을 제공하

며, 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 암질환 예방 또는 치료제로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0008] [화학식 1]



[0009]

상기 화학식 1에 있어서,

[0010]

A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

[0011]

R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로젠 중 어느 하나임.

[0012]

본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0013]

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9) 억제용 조성물을 제공한다.

[0014]

발명의 효과

[0015] 본 발명은 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9) 활성을 억제시키는 효과를 나타내는 신규 화합물을 확인하였으며, 상기 화합물은 암의 세포분열을 조절하여 세포 사멸을 유도하는 것을 확인함에 따라, 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 암질환 치료제 및 사이클린 의존성 키나아제 9 억제제로 제공하고자 한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 화합물 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(2-메톡시페닐)피리딘-2-아민(이하 A09-003라 함), N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(피라진-2-일)피리미딘-2-아민(이하 A09-004라 함) 및 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘-2-아민(이하 A09-005 (AE09-005) 라 함)의 CDK9 활성 억제 효과를 확인한 키나아제 분석 결과이다.

도 2는 화합물 A09-003, A09-004 및 A09-005 (AE09-005)의 FLT3 활성 억제 효과를 확인한 키나아제 분석 결과이다.

도 3은 백혈병 세포주 BDCM, Molm14, MV4-11, THP-1 및 U937에서 A09-003 및 A09-004 화합물 처리에 의한 세포 생존율 및 IC₅₀ 값을 확인한 결과이다.

도 4는 백혈병 세포주 BDCM, Molm14, MV4-11, THP-1 및 U937에서 A09-005 (AE09-005) 화합물 처리에 의한 세포 생존율 및 IC₅₀ 값을 확인한 결과이다.

도 5는 백혈병 세포주 Molm14 및 MV4-11 세포에서 화합물 A09-003 처리에 따른 세포 사멸효과를 확인한 유세포 분석 결과이다.

도 6은 백혈병 세포주 Molm14 및 MV4-11 세포에서 화합물 A09-003 처리에 의한 세포사멸 효과를 형광 이미지로

확인한 결과이다.

도 7은 백혈병 세포주 Molm14 및 MV4-11 세포에서 화합물 A09-003 처리에 의한 세포 주기에 미치는 효과를 FACS 기기를 이용해 확인한 결과이다.

도 8은 백혈병 세포주 MV4-11에서 A09-003 및 A09-005 (AE09-005) 화합물 처리에 의한 단백질 발현 변화를 확인한 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

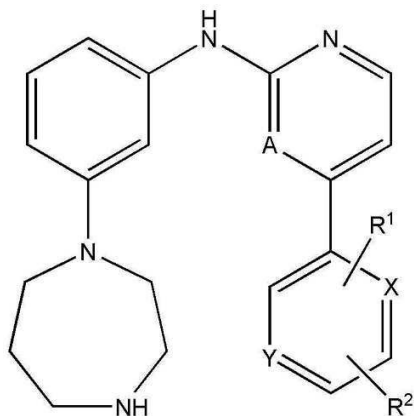
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

본 발명은 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9) 활성을 억제시키는 효과를 나타내는 신규 화합물을 확인함에 따라, 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 암질환 치료제 및 사이클린 의존성 키나아제 9 억제제로 제공하고자 한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공할 수 있다.

[화학식 1]



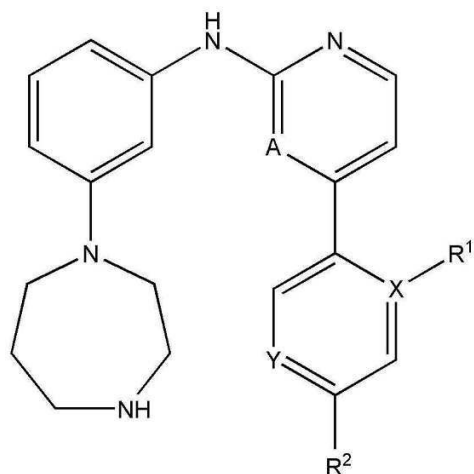
상기 화학식 1에 있어서,

A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로젠 중 어느 하나일 수 있다.

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 화학식 1-1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0028] [화학식 1-1]



[0029]

[0030] 상기 화학식 1에 있어서,

[0031] A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

[0032] R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로젠 중 어느 하나일 수 있다.

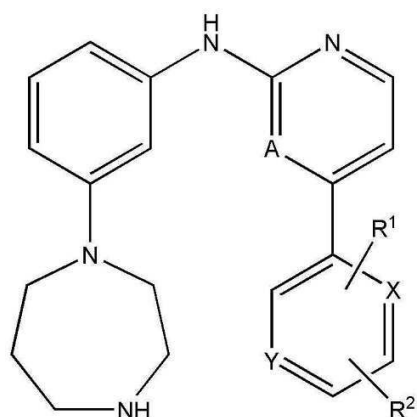
[0033] 상기 R¹은 수소 또는 할로젠이고, 상기 R²는 수소 또는 C1 내지 C4 알콕시 중 어느 하나인 것일 수 있다.

[0034] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine], N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(피라진-2-일)피리미딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(pyrazin-2-yl)pyrimidin-2-amine] 또는 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine]일 수 있다.

[0035] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 사이클린 의존성 키나아제 9 (cyclin-dependent kinase 9; CDK9)을 억제하는 것일 수 있다.

[0036] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 상기 화학식 1에 있어서,

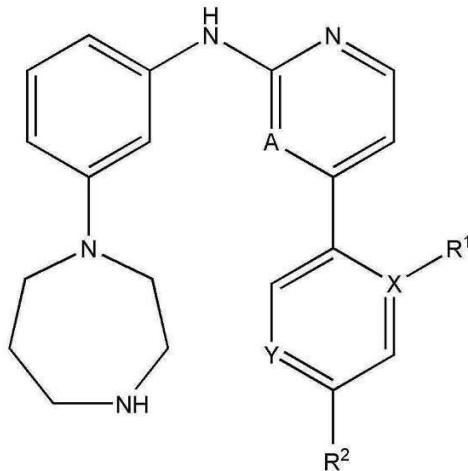
[0040] A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

[0041] R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로젠 중 어느 하나일 수

있다.

[0042] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 화학식 1-1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0043] [화학식 1-1]



[0044]

[0045] 상기 화학식 1에 있어서,

[0046] A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

[0047] R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로겐 중 어느 하나일 수 있다.

[0048] 상기 R¹은 수소 또는 할로겐이고, 상기 R²는 수소 또는 C1 내지 C4 알콕시 중 어느 하나인 것일 수 있다.

[0049] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine], N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(피라진-2-일)피리미딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(pyrazin-2-yl)pyrimidin-2-amine] 또는 N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine]일 수 있다.

[0050] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9)를 억제하는 것일 수 있다.

[0051] 상기 암질환은 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 유방암, 난소암, 자궁암, 췌장암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 피부암, 방광암, 갑상선암, 뇌암 및 전립선암으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0054] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 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 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카

보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 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, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

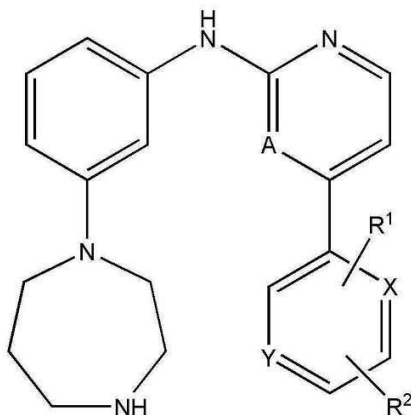
[0056] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0057] 상기 화학식 1의 화합물의 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 일 실시예에 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.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 사이클린 의존성 키나아제 9(cyclin-dependent kinase 9) 억제용 조성물을 제공할 수 있다.

[0061] [화학식 1]



[0062] 상기 화학식 1에 있어서,
[0063]

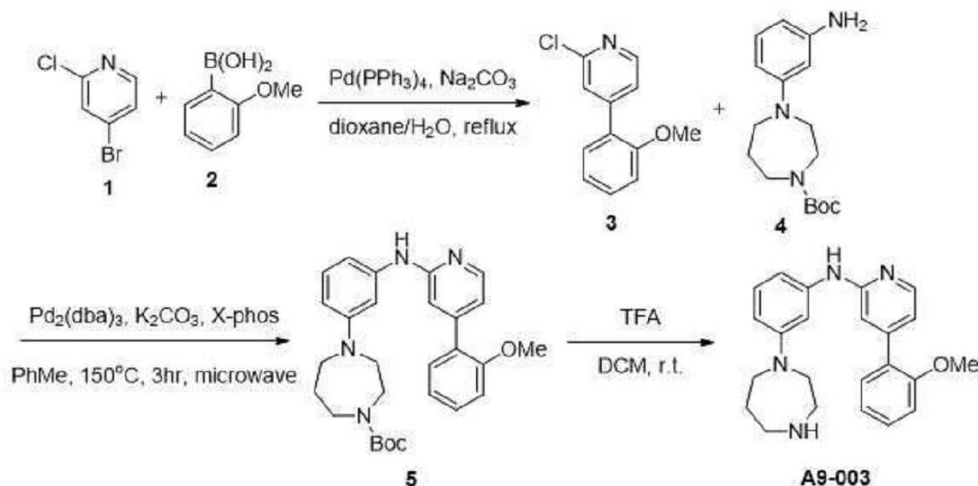
[0064] A, X 및 Y는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, CH 또는 N 중 선택되고,

[0065] R¹ 및 R²는 각각 동일하거나 다를 수 있으며, 수소, C1~C4 알킬, C1~C4 알콕시 또는 할로젠 중 어느 하나일 수 있다.

[0067] 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.

[0069] <합성예> 화합물 합성

[0070] [반응식 1]



[0071]

[0073] 1-1. 2-클로로-4-(2-메톡시페닐)피리딘 [2-chloro-4-(2-methoxyphenyl)pyridine (3)] 합성

[0074] 실온에서 4-브로모-2-클로로피리딘 (4-bromo-2-chloropyridine; 2.00 g, 10.40 mmol), (2-메톡시페닐)브론산 [(2-methoxyphenyl)boronic acid; 1.58 g, 10.40 mmol], 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 [Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0); 0.60 g, 0.52 mmol], 탄산나트륨(sodium carbonate; 2.20 g, 20.80 mmol)을 1,4-디옥산 (1,4-dioxane, 30 ml) 및 물 (10 mL) 용액에 넣고 12시간 동안 환류 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸아세테이트 (Ethyl acetate, 20 mL)로 층을 분리하고 유기층을 증류수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 건조한 후 여과하였다. 여과액을 감압 농축한 후 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물(3) (1.56 g, 68%)을 얻었다.

[0076] 1-2. tert-부틸 4-(3-((4-(2-메톡시페닐)피리딘-2-일)아미노)페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-((4-(2-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)amino)phenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate (5)] 합성

[0077] 실온에서 2-클로로-4-(2-메톡시페닐)피리딘 [2-chloro-4-(2-methoxyphenyl)pyridine; 100 mg, 0.46 mmol], tert-부틸 4-(3-아미노페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-aminophenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate; 132 mg, 0.46 mmol], 트리(디벤질리덴아세톤)디팔라듐 [Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0); 21 mg, 0.03 mmol], X-phos (22 mg, 0.05 mmol), 포타슘 카보네이트 [potassium carbonate; 125 mg, 0.91 mmol]를 톨루엔 (toluene, 2 ml) 용액에 넣고 150°C에서 3시간 동안 microwave 반응기를 이용하였다. 반응 혼합물을 물과 에틸아세테이트 (Ethyl acetate, 5 mL)로 층을 분리하고 유기층을 증류수로 세척하여 무수 Na₂SO₄로 건조한 후 여과하였다. 여과액을 감압 농축한 후 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물(5) (60 mg, 27%)를 얻었다.

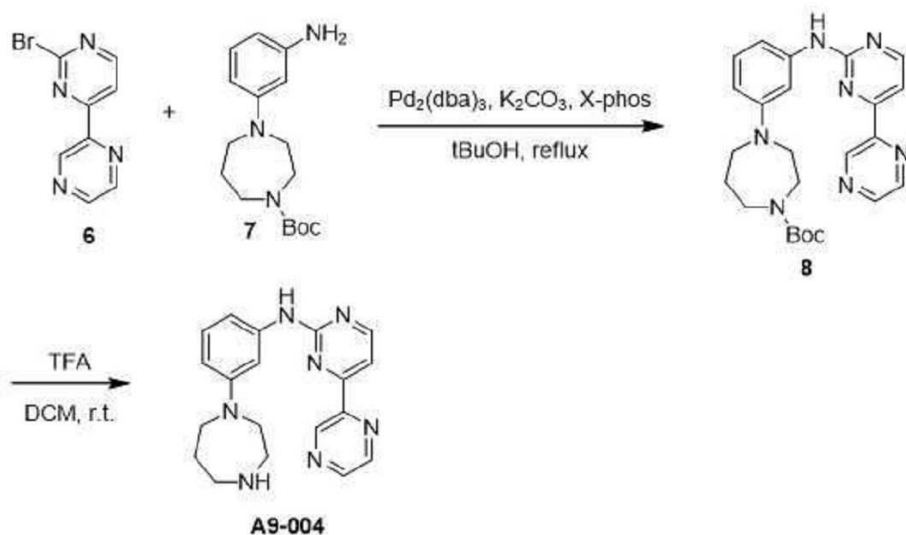
[0079] 1-3. N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine (A9-003)]

[0080] 실온에서 tert-부틸 4-(3-((4-(2-메톡시페닐)피리딘-2-일)아미노)페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-((4-(2-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)amino)phenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate; 60 mg, 0.13 mmol]를 디클로로메탄 (dichloromethane, 2 ml)에 녹이고 트리플루오로아세트산 (trifluoroacetic acid; 0.03 ml, 0.39 mmol)을 넣은 후 12시간 동안 교반하였다. 반응혼합물을 물과 디클로로메탄으로 층분리하고 유기층을 sat. NaHCO₃로 세척한 후 무수 Na₂SO₄로 건조하여 여과하였다. 여과액을 감압 농축한 후 에틸 에테르 (diethyl ether)로 재결정하여 화합물(A9-003) (27 mg, 57%)을 얻었다.

[0081] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.19(d, 1H, J=4.0Hz), 7.35(m, s), 7.30(dd, 1H, J=2.0 and 8.0Hz), 7.13(m,

2H), 7.02(dd, 1H, J=2.0 and 8.0Hz), 6.98(d, 1H, J=8.0Hz), 6.90(dd, 1H, J=2.0 and 8.0Hz), 6.66(m, 2H), 6.53(bs, 1H), 6.42(dd, 1H, J=2.0 and 8.0Hz), 3.82(s, 3H), 3.53(m, 4H), 3.03(m, 2H), 2.83(m, 2H) and 1.89(m, 2H).

[0083] [반응식 2]



[0084]

[0086] 2-1. 테르트-부틸 4-(3-((4-(피라진-2-일)피리미딘-2-일)아미노)페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-((4-(pyrazin-2-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate (8)] 합성

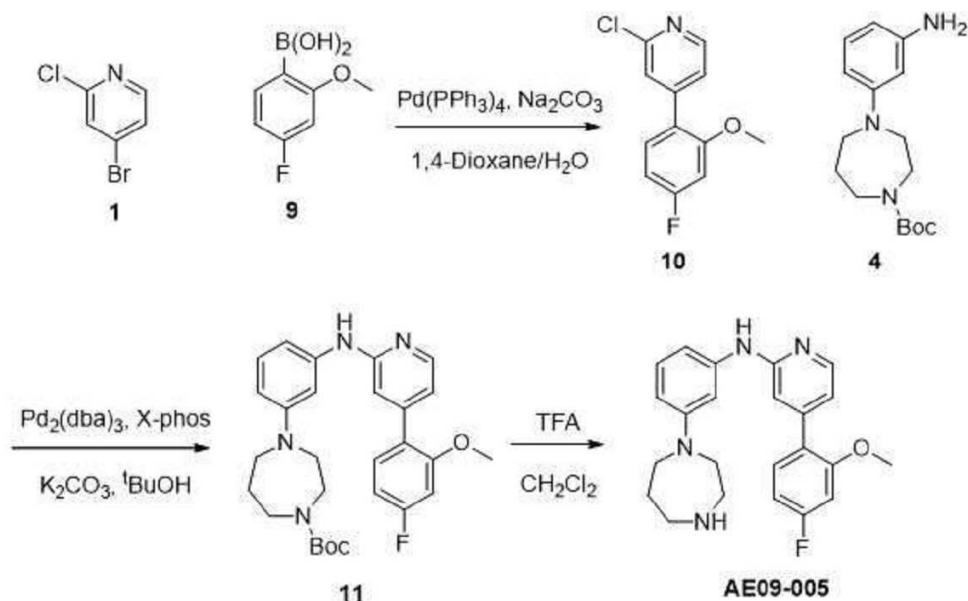
[0087] 실온에서 2-클로로-4-(피라진-2-일)피리미딘 [2-chloro-4-(pyrazin-2-yl)pyrimidine; 100 mg, 0.52 mmol], 테르트-부틸 4-(3-아미노페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-aminophenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate; 151 mg, 0.52 mmol], 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라디움 [Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0); 24 mg, 0.03 mmol], X-phos (25 mg, 0.05 mmol), 포타슘 카보네이트 (potassium carbonate; 143 mg, 1.04 mmol)을 테르트-부탄올 (tert-butanol, 2 ml)에 넣고 12시간 동안 환류 교반하였다. 반응혼합물을 물과 에틸 아세테이트 (Ethyl acetate, 5 mL)로 층을 분리하고 유기층을 증류수로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조한 후 여과하였다. 여과액을 감압 농축한 후 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물(8) (60 mg, 25%)을 얻었다.

[0089] 2-2. N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(피라진-2-일)피리미딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(pyrazin-2-yl)pyrimidin-2-amine (A9-004)] 합성

[0090] 실온에서 테르트-부틸 4-(3-((4-(피라진-2-일)피리미딘-2-일)아미노)페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-((4-(pyrazin-2-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate; 60 mg, 0.13 mmol]를 디클로로메탄 (dichloromethane, 2 ml)에 녹이고 트리플루오로아세트산 (trifluoroacetic acid, 0.03 ml, 0.40 mmol)을 넣은 후 12시간 동안 교반하였다. 반응혼합물을 물과 디클로로메탄으로 층분리하고 유기층을 sat. NaHCO₃로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조한 후 여과하였다. 여과액을 감압 농축한 후 디에틸 에테르 (diethyl ether)로 재결정하여 화합물 A9-004 (30 mg, 65%)를 얻었다.

[0091] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 9.65(d, 1H, J=2.0Hz), 8.67(m, 2H, J=4.0Hz), 8.58(d, 1H, J=4.0Hz), 7.70(d, 1H, J=8.0Hz), 7.22(m, 4H), 6.93(dd, 1H, J=2.0 and 8.0Hz), 6.46(dd, 1H, J=2.0 and 8.0Hz), 3.62(m, 4H), 3.08(m, 2H), 2.87(m, 2H) and 1.95(m, 2H).

[0093] [반응식 3]



[0094]

[0096] 3-1. 2-클로로-4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘 [2-chloro-4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridine (9)] 합성

[0097] 실온에서 4-브로모-2-클로로피리딘 (4-bromo-2-chloropyridine; 5.00 g, 25.98 mmol), (4-플루오로-2-메톡시페닐)브로닉산 [(4-fluoro-2-methoxyphenyl)boronic acid; 4.90 g, 28.58 mmol], 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 [Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0); 1.50 g, 1.30 mmol], 탄산나트륨 (sodium carbonate; 5.60 g, 51.96 mmol)을 1,4-디옥산 (1,4-dioxane, 60 ml), 물 (20 mL) 용액에 넣고 12시간 동안 환류 교반하였다. 반응혼합물을 에틸 아세테이트 (Ethyl acetate, 60 mL)로 층을 분리하고 유기층을 증류수로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조한 후 여과하였다. 여과액을 감압 농축한 후 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물(9) (5.00 g, 66%)을 얻었다.

[0099] 3-2. tert-부틸 4-(3-((4-(4-플루오로-2-메톡시벤질)피리딘-2-일)아미노)페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-((4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)amino)phenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate (10)] 합성

[0100] 실온에서 2-클로로-4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘 [2-chloro-4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridine; 1.80 g, 7.57 mmol], tert-부틸 4-(3-아미노페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-aminophenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate; 2.70 g, 9.09 mmol], 트리(디벤질리덴아세톤)디팔라듐 Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0); 0.35 g, 0.38 mmol), X-phos (0.37 g, 0.76 mmol) 및 탄산칼륨 (potassium carbonate; 2.10 g, 15.15 mmol)을 tert-부탄올 (tert-butanol, 20 ml)에 넣고 12시간 동안 환류 교반하였다. 반응혼합물을 물과 에틸 아세테이트 (Ethyl acetate, 20 mL)로 층을 분리하고 유기층을 증류수로 세척하고 무수 Na₂SO₄ 건조한 후 여과하였다. 여과액을 감압 농축한 후 농축액을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물(10) (2.5 g, 67%)을 얻었다.

[0102] 3-3. N-(3-(1,4-디아제판-1-일)페닐)-4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘-2-아민 [N-(3-(1,4-diazepan-1-yl)phenyl)-4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridin-2-amine (AE09-005)] 합성

[0103] 실온에서 tert-부틸 4-(3-((4-(4-플루오로-2-메톡시페닐)피리딘-2-일)아미노)페닐)-1,4-디아제판-1-카복실레이트 [tert-butyl 4-(3-((4-(4-fluoro-2-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)amino)phenyl)-1,4-diazepane-1-carboxylate; 2.5 g, 5.08 mmol]을 디클로로메탄 (25 ml)에 녹이고 트리플루오로아세트산 (trifluoroacetic

acid; 1.10 ml, 15.23 mmol)을 넣은 후 12시간 동안 교반하였다.

[0104] 반응혼합물을 물과 디클로로메탄으로 층분리하고 유기층을 sat. NaHCO_3 으로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조한 후 여과하였다. 여과액을 감압 농축한 후 디에틸 에테르 (diethyl ether)로 재결정하여 화합물 AE09-005 (1.90 g, 95%)를 얻었다.

[0105] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.83(dd, 1H, $J=2.0$ and 8.0Hz), 7.53(dd, 1H, $J=4.0$ and 8.0Hz), 7.40(m, 1H), 7.36(d, 1H, $J=2.0\text{Hz}$), 7.21(dd, 1H, $J=2.0$ and 12.0Hz), 6.88(m, 2H), 6.81(m, 1H), 6.76(m, 1H), 3.90(s, 3H), 3.86(m, 2H), 3.64(m, 2H), 3.41(m, 2H), 3.31(m, 2H), and 2.22(m, 2H).

[0107] <실시예 1> 화합물의 키나아제 억제 활성 및 IC_{50} 확인

[0108] 화합물 A09-003, A09-004 및 A09-005 (AE09-005)의 CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK9 및 FLT3 활성억제 능력을 확인하였다.

[0109] 화합물 A09-003, A09-004 및 A09-005 (AE09-005)의 키나아제 활성 억제 효과 및 IC_{50} 을 확인하기 위해, 각 화합물을 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 및 0 μM (총 10 개)의 농도 구간에서 CDK2/cyclinE (h), CDK4/cyclinD3 (h), CDK5/p25 (h), CDK6/cyclinD3 (h), CDK7/cyclinH/MAT1 (h), CDK9/cyclinT1 (h) 및 FLT3 (h) 키나아제 활성 분석을 수행하였다.

[0110] 그 결과, 도 1과 같이 A09-003, A09-004 및 A09-005 (AE09-005) 화합물 모두 농도 구배 의존적으로 CDK9 활성 감소가 나타났으며, 특히 A09-003 > A09-005 > A09-004 순으로 CDK9 활성 감소효과가 확인되었다. 또한, FLT3 활성 억제 효과는 도 2와 같이 A09-003 > A09-004 > A09-005 순으로 활성 감소 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0111] 한편, 각 화합물의 키나아제 활성 IC_{50} 은 표 1과 같이 확인되었다.

표 1

IC_{50} (nM)	화합물 A09-003	화합물 A09-004	화합물 A09-005 (AE09-005)
CDK2	1205	2895	5286
CDK4	1662	9107	4209
CDK5	574	4386	1287
CDK6	9483	> 100,000	20380
CDK7	N/A	N/A	19986
CDK9	16	345	43
FLT3	25	69	81

[0114] <실시예 2> 백혈병 세포주에 대한 세포사멸 효과 및 IC_{50} 확인

[0115] 1. 세포생존을 확인

[0116] 백혈병 세포주 5종 (BDCM, Molm14, MV4-11, THP-1 및 U937)에 대한 A09-003, A09-004 및 A09-005 (AE09-005) 화합물의 세포 사멸 효과를 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Cat.# G7572)로 확인하였다.

[0117] 각 화합물을 50 μM 부터 1/2 씩 희석시켜 총 9개의 농도 (대조군 물질 처리 하지 않음) 대비 세포의 잔존 생존을 확인하였다.

[0118] 먼저, 각각 삼천 개의 세포가 담긴 세포배양 용액 80 μL 씩 96 웰 플레이트에 분주하고 37°C 인큐베이터에서 하루 동안 배양하였다.

[0119] 배양 2일째에 20 μL 의 세포 배양 용액에 상기 9개의 농도 조건의 5배 (5X) 희석된 화합물이 포함되도록 준비

한 후 세포에 처리하였다 (최종 부피 100 μ L). 화합물이 처리된 세포를 37°C 인큐베이터에서 72시간 배양하였다. 세포에 처리되는 최종 DMSO 농도는 0.2 %를 넘지 않도록 하였다.

[0120] 배양 72시간 후 CellTiter-Glo solution을 각 웰마다 20 mL씩 처리하고, 20 분 반응이 지난 후 살아있는 세포의 ATP 양을 확인하였다 (Perkin Elmer Victor 3 plate reader). 비 처리군에서 도출된 ATP 값을 100 % 생존율로 계산하여 9개 처리군 ATP 값을 상대적인 생존율로 계산하고 그래프로 도출하였다 (GraphPad Prism 5).

[0121] 그 결과, 도 3 및 도 4와 같이 모든 백혈병 세포주에서 농도 구배적으로 세포 증식 억제 및 세포사멸 효과가 확인되었다. 특히 화합물 A09-003이 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었으며, 5 종의 백혈병 세포주에서 모두 효과적인 세포사멸 효과가 나타나는 것이 확인되었다. 또한, 각 화합물의 세포사멸 IC₅₀은 표 2와 같이 확인되었다.

표 2

IC ₅₀ (μ M)	BDCM	Molm14	MV4-11	THP-1	U937
화합물 A09-003	1.90	0.86	0.48	2.49	1.84
화합물 A09-004	7.26	3.62	1.40	10.19	8.89
화합물 A09-005 (AE09-005)	6.71	1.49	0.71	6.47	5.75

[0123] 2. 유세포 분석을 통한 세포사멸 효과 확인

[0124] 앞서 백혈병 세포주에 대한 우수한 세포사멸 효과를 나타낸 화합물 A09-003의 세포사멸 효과를 유세포 분석으로 확인하였다.

[0125] 백혈병 세포주 Molm14 및 MV4-11 세포가 각각 오십만 개씩 포함된 세포배양 용액을 배양 접시에 분주하고 37°C 인큐베이터에서 3시간 배양하였다.

[0126] 이후 화합물 A09-003을 0 μ M, 1 μ M, 2 μ M 및 3 μ M 농도 조건으로 희석하여 세포에 처리하였다. 화합물이 처리된 세포를 37°C 인큐베이터에서 72시간 배양하였다.

[0127] 배양 후 세포를 수확하고 차가운 인산염 완충 식염수로 세척한 후 원심 분리하여 상층액을 버리고, 1X Annexin 결합 버퍼로 세포를 희석한 후 분석 튜브 당 100 μ L이 되도록 세포를 준비하였다.

[0128] 5 μ L Alexa Fluor 488 Annexin V 및 5 μ L 100 μ g/mL PI mixture를 각 100 μ L의 세포 현탁액에 넣어 실온에서 15분간 반응시키고 300 μ L 1X Annexin 결합 버퍼를 추가한 후 유세포 분석을 수행하여 염색된 세포를 분석하고 형광을 측정하였다.

[0129] 2 종류의 백혈병 세포주 (Molm14, MV4-11)에서 Annexin V 양성/PI 양성으로 염색된 세포를 분석한 결과, 도 5와 같이 화합물 A09-003은 두 세포주에서 모두 농도 구배 적으로 세포 사멸 (apoptosis)이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0131] 3. 염색을 통한 세포사멸 이미지 확인

[0132] 백혈병 세포주 Molm-14 및 MV4-11에 대한 A09-003 화합물의 세포사멸 효과를 형광 이미지로 확인하였다.

[0133] Molm-14 및 MV4-11 세포배양 용액을 60mm 배양 접시에 각각 삼십만 개씩 분주하고 37°C 인큐베이터에서 3시간 배양하였다.

[0134] 이후 화합물 A09-003을 0 μ M, 1 μ M, 2 μ M 및 3 μ M 농도 조건으로 희석하여 세포에 처리하였다. 화합물이 처리된 세포를 37°C 인큐베이터에서 72시간 배양하였다.

[0135] 배양 후 세포를 수확하고 차가운 인산염 완충 식염수로 세척한 후 원심 분리하여 상층액을 버리고, 살아 있는 세포를 확인할 수 있는 칼세인 AM (calcein AM) 1 μ L, 죽어 있는 세포를 확인할 수 있는 에디움 호모다이어머-1 (ethidium homodimer-1) 4 μ L, 그리고 세포핵을 염색할 수 있는 핵스트 33342 (Hoechst 33342) 용액 1 μ L이 있는 2mL의 PBS 혼합물 100 μ L를 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 96 웰에 반응시킨 세포 일부를 넣고 형광을 측정하였다.

[0136] 2 종류의 백혈병 세포주 (Molm-14, MV4-11)에서 칼세인 AM에 의해 염색된 녹색과 에디움 호모다이어머-1에 의해

염색된 적색 수를 분석한 결과, 도 6과 같이 화합물 A09-003의 농도에 따라 녹색의 수는 감소하고 적색의 수는 증가함을 볼 수 있었고 이는 농도 구배적으로 세포사멸이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0138] 4. FACS (Fluorescence activated cell sorter)기기를 이용한 세포 주기 분석

[0139] A09-003 화합물이 세포 주기에 미치는 효과를 보기 위해 DNA를 염색할 수 있는 프로피디움 아이오딘(Propidium iodide, 이하 PI라 함)로 염색하여 FACS 기기를 이용하여 세포 주기를 확인하였다.

[0140] Molm-14 및 MV4-11 세포 배양 용액을 100mm 배양 접시에 각각 오십만 개씩 분주하고 영양분 없이 37℃ 인큐베이터에서 15시간 배양하였다.

[0141] A09-003을 0 μM, 1 μM, 2 μM 및 3 μM 농도 조건으로 희석하여 세포에 처리하면서 영양분 2%인 상태로 37℃ 인큐베이터에서 30시간 배양하였다.

[0142] 배양 후 세포를 수확하여 차가운 인산염 완충 식염수로 세척한 후 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포 펠렛 상태로 두었다. 세포를 고정시키기 위해 70% 에탄올을 더해 세포를 풀고 차가운 온도로 24시간을 흔들면서 세포를 고정시켰다.

[0143] 24시간 후 원심분리하여 에탄올을 깨끗이 제거하고 단일가닥 RNA를 절단할 수 있는 리보뉴클레이즈 A (Ribonuclease A) 100 μg/ml의 100 μl을 세포 펠렛에 쏜다. 그리고 PI 300 μl과 세포 염색 버퍼 5.7ml의 혼합물의 500 μl을 더해서 실온에서 30분간 반응시키고 FACS 기기를 이용하여 세포 주기를 분석하였다.

[0144] 그 결과, 도 7과 같이 A09-003을 농도별로 처리함에 따라 최대 60%가량 subG1 값이 높아지는 것을 확인하여 세포사멸이 유도됨을 확인하였고, 동시에 A09-003에 의해 subG1 정지가 일어나는 것을 확인하였다.

[0146] **<실시예 3> 백혈병 세포 내 단백질 발현 양상 확인**

[0147] 백혈병 세포주 MV4-11이 백만 개씩 담긴 세포배양 용액을 배양 접시에 분주하여 37℃ 인큐베이터에서 3시간 배양하였다.

[0148] 화합물 A09-003 및 A09-005를 각각 0 μM, 1 μM, 2 μM 및 4 μM 농도 조건으로 희석하여 세포에 처리하고 화합물이 처리된 세포를 37℃ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다.

[0149] 24시간 배양 후 MV4-11 세포를 수확하고 단백질을 추출하여 BCA 단백질 정량 방법을 이용하여 단백질의 농도를 측정하고, SDS-PAGE (Sodium Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분자량별로 단백질을 분리하였다.

[0150] Transfer 과정으로 겔 내부의 분리된 단백질을 막으로 이동시키고, 5 % Skim milk/T-TBS로 Blocking하였다. 이후 1차 항체 (단백질에 항체 (1차 ; p-RNA polymerase II ser2, RNA polymerase II, Mcl-1, XIAP, Cyclin D1, Cleaved caspase-3, β-Actin)를 단백질과 결합시키고, HRP (horseradish peroxidase)가 부착된 2차를 반응시켰다.

[0151] 2차 HRP가 ECL (Enhanced chemiluminescence) 용액의 Luminol을 산화시켜 방출되는 빛을 X-ray film에 감광시켜 단백질 발현량을 확인하였다.

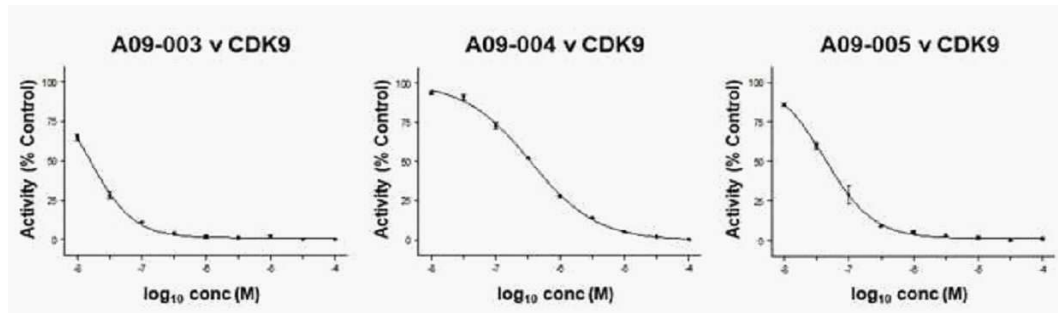
[0152] 그 결과, 도 8과 같이 화합물 A09-003 및 A09-005가 처리된 백혈병 세포주 MV4-11에서 모두 농도 구배적으로 Caspase-3 활성이 증가되어 세포사멸 (apoptosis)이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

[0153] 또한, 화합물 A09-003의 경우, 화합물 A09-005와 비교하여 RNA polymerase II의 serine 2 잔기의 탈 인산화, Mcl-1, XIAP, 및 Cyclin D1 단백질의 감소 효과가 크게 나타났다.

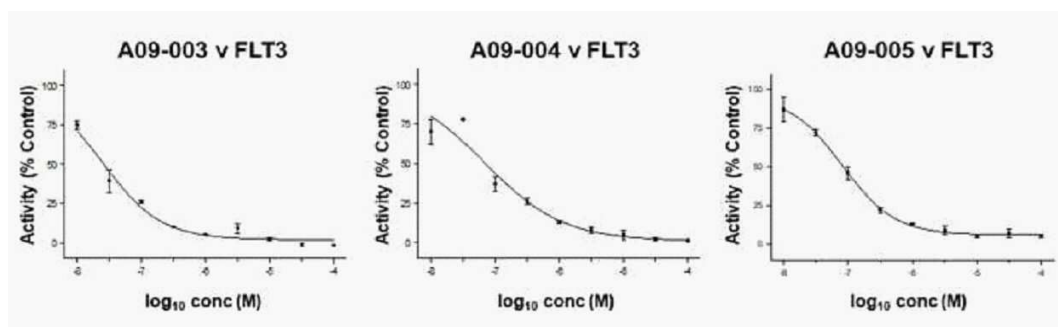
[0155] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

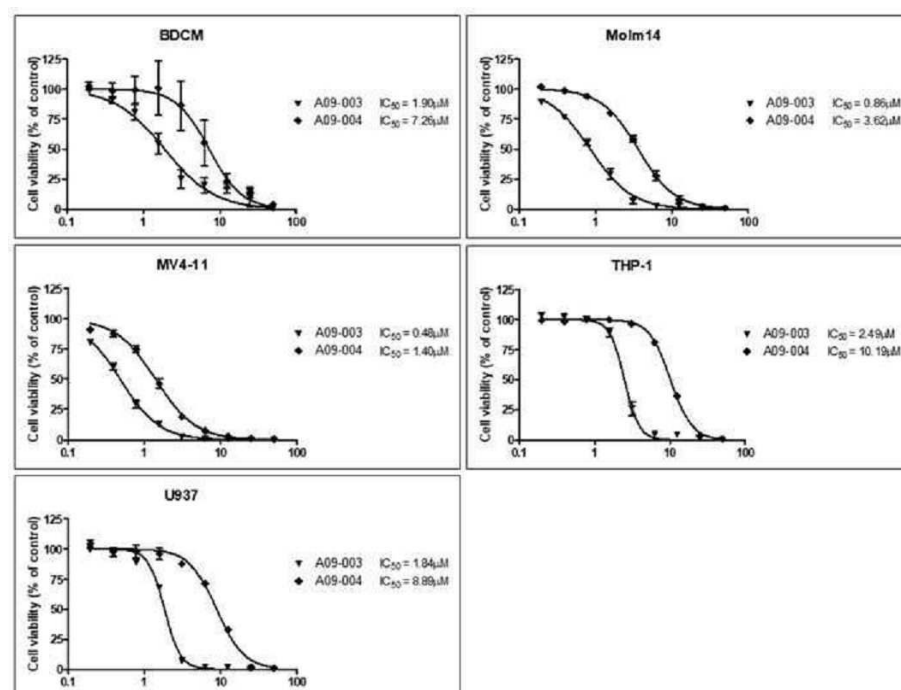
도면1



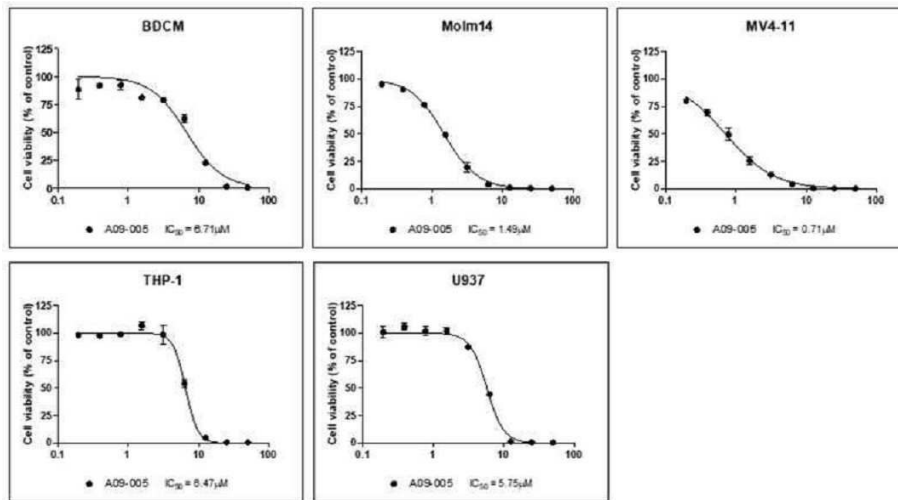
도면2



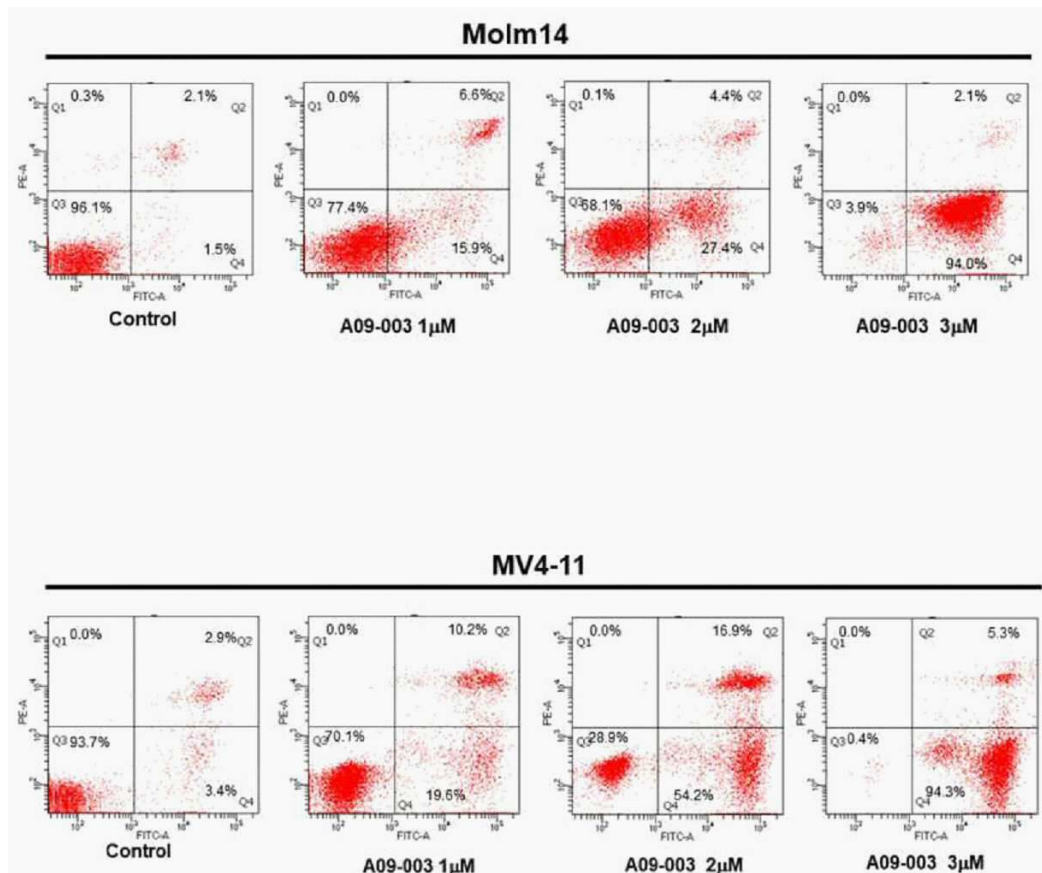
도면3



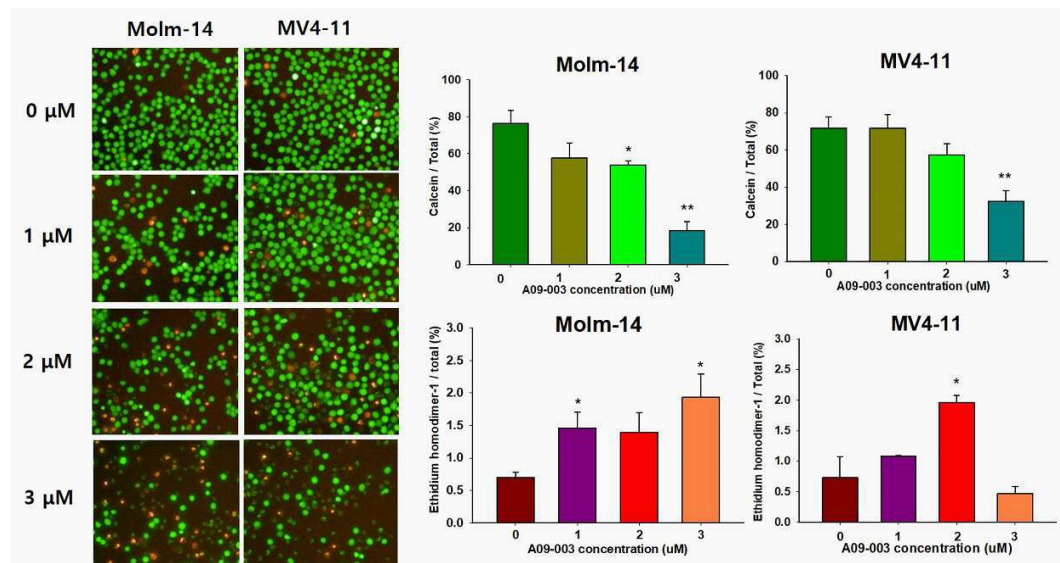
도면4



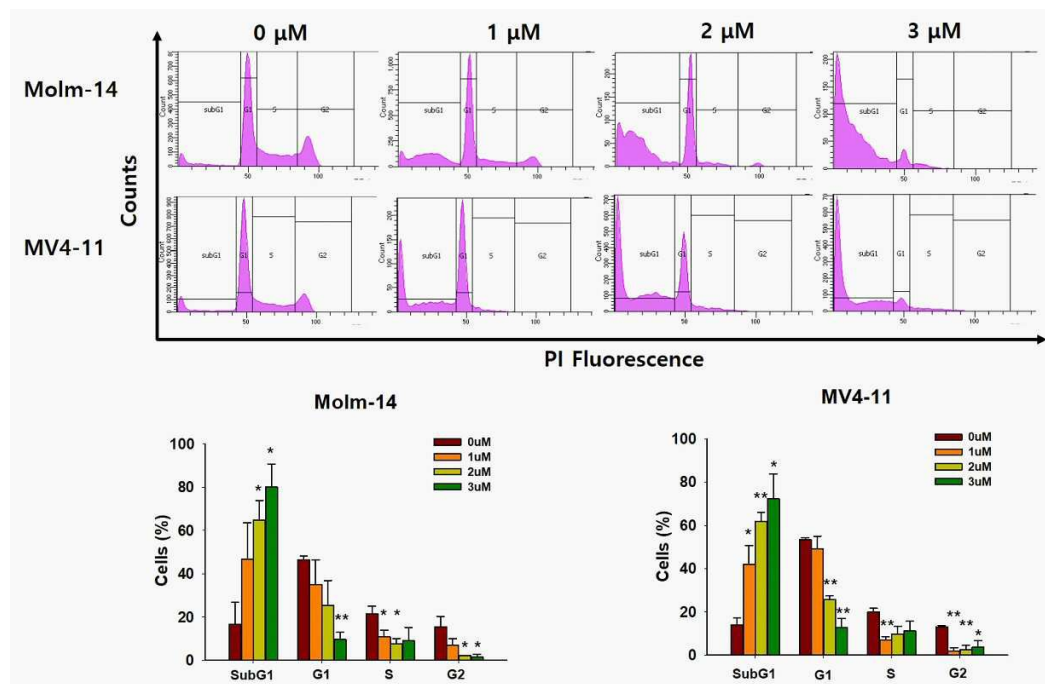
도면5



도면6



도면7



도면8

