미래창조과학부 지정
연구성과 관리 · 유통전담기관
-화합물 전담기관-

한국화합물은행은 국가연구개발사업 수행을 통해 창출된 연구성과 중 화합물 및 관련 정보의 관리·유통 전담기관으로 지정되어 있습니다.
(미래창조과학부 고시 제2014-74호)

한국화합물은행 뉴스레터

We take care of your compounds
and create new value for you

한국화합물은행
Korea Chemical Bank

34114 대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원 한국화합물은행
Tel : 042-860-7190 Fax : 042-860-7096 E-mail : chembank@krict.re.kr http://www.chembank.org

2016.
No. 01
KCB newsletter

한국화합물은행 뉴스레터
2016년 제 1호

한국화합물은행 소식
화합물 확보 현황
화합물 활용 현황
화합물 활용사례(I , II)
신기술 소개
화합물 기탁 절차
화합물 활용 절차
결과활용 권리 규정
제공 라이브러리 종류

한국화합물은행
뉴스레터

한국화합물은행
Korea Chemical Bank

2016.

No. 01

KCB newsletter

한국화합물은행 뉴스레터
2016년 제 1호

[한국화합물은행 뉴스레터]
발행일 2016년 6월 24일
발행인 이규호
편집인 이현규
발행처 한국화합물은행

한국화합물은행은 국가연구개발사업 수행을 통해 창출된 연구성과 중 화합물 및 관련 정보의 관리·유통 전담기관으로 지정되어 있습니다.
(미래창조과학부 고시 제2014-74호)

Contents

한국화합물은행 소식

03 대외활동
03 방문인사
04 화합물 확보 현황
05 화합물 활용 현황
06 신규 약효시험 활용 현황
07 화합물 활용성과

10 [한국화합물은행 라이브러리 활용사례 I]
KRICT-Lilly 국제공동연구
12 [한국화합물은행 라이브러리 활용사례 II]
패혈증 치료 선도 물질 발굴 연구
15 [약효시험 신기술 소개]
Cell-based functional assay 관련 Label-free DMR assay 연구

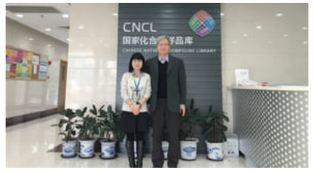
20 화합물 기탁 절차
21 화합물 활용 절차
22 결과활용 권리 규정
23 제공 라이브러리 종류

한국화합물은행 소식

대외활동

한국화합물은행은 화합물의 기탁 및 활용도를 높이기 위해 다양한 홍보 활동을 해오고 있으며 활용성과에 대한 해외 관심도가 증가되어 국제적으로도 다양한 발표의뢰가 이루어지고 있습니다.

- 2016. 1
  "공동활용을 통한 화합물의 가치 재창출"
  (특별기고, 연구소재은행 소식지 2016. 1월호)
- 2016. 2. 17
  대한화학회 유기화학분과회 총회 및 심포지움 홍보광고
  (한국화학연구원)
- 2016. 2. 18-19
  대한화학회 의약화학분과회 동계 워크숍 홍보광고
  (동국대학교 만해마을)
- 2016. 3. 16
  중국화합물은행 방문 및 협력방안 논의
  (Prof. Ming-Wei Wang, Director of CNCL
  [Chinese National Compound Library], Shanghai, China)



- 2016. 3. 31-4. 1
  한국유기합성학회 춘계 학술발표회 홍보광고
  (대전, KAIST)
- 2016. 4. 12
  SLAS Conference on Compound Management in Industry and Academia 한국화합물은행 소개 강연
  (이현규 센터장 Invited Lecture, Berlin, Germany)
- 2016. 4. 21-22
  대한화학회 춘계학회 홍보부스 운영
  (일산 킨텍스)
- 2016. 5. 10
  농림축산검역본부 한국화합물은행 소개 강연
  (이현규 센터장)
- 2016. 5. 19-20
  생화학분자생물학회 홍보부스 운영
  (서울 코엑스)

한국화합물은행 소식

방문인사

번호	방문일자	기관	방문자
1	2015. 12. 21.	UAE 과학기술장학생단	연구원 방문
2	2016. 01. 07.	환경부 화학물질정책과	김유경 사무관 외 1인
3	2016. 03. 09.	원광대학교	김형룡 교수
4	2016. 03. 28.	한국생명공학연구원	고성균 박사 외 1인
5	2016. 03. 29.	충남대 신약전문대학원	학생 3인
6	2016. 05. 03.	일동제약	권진선 부장 외 1인
7	2016. 05. 24.	University of Southern California	안우진교수

〈 UAE 과학기술장학생단 〉

한국화합물은행 소식

화합물 확보 현황

한국화합물은행은 현재 약 43만 종의 화합물을 보유하고 있으며 다양성, 약물성, 특이성이 우수한 고수준 신약소재 화합물 라이브러리를 제공하기 위하여 다양한 방법으로 우수한 화합물을 확보 하고자 노력하고 있습니다.

1. 연구성과물 기탁 [법정의무 기탁]

「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제 25조 13항에 의하여 국가연구개발사업 수행을 통해 창출된 화합물은 화합물 연구성과물 관리 · 유통 전담기관인 한국화학연구원 한국화합물은행에 의무적으로 기탁하도록 되어 있습니다. 연구성과물 기탁 효율 제고를 위하여 미래부에서는 화합물 기탁 실적을 개별 과제 평가에 반영하는 방안을 추진 중입니다.
[2015년 성과물 기탁 화합물 수 5,300여종]

2. 국내 전문가 공모 위탁합성

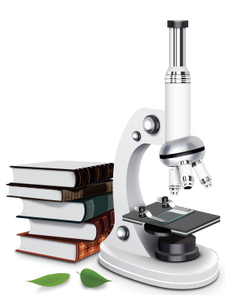
보유화합물의 구조 다양성 확대를 위하여 국내외 합성 전문가를 대상으로 위탁 합성 과제를 공모, 선정을 통하여 화합물을 확보하고 있습니다. 전문가 위탁합성은 2014년 15개 과제를 선정하여 1,600여종의 화합물을 확보하였으며 2015년에는 18개 과제를 선정, 2,400 여종의 화합물을 확보하였고 금년에도 13개 과제를 선정하여 1,600여종의 화합물 확보를 추진하고 있습니다.

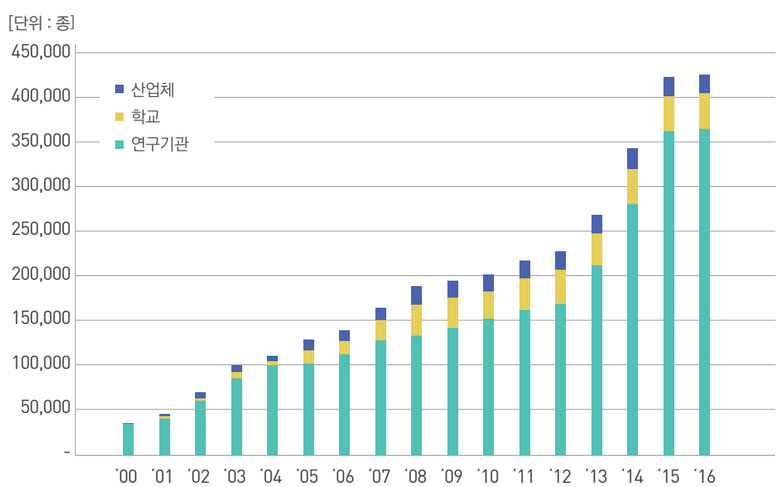
3. 특수 골격화합물 외국 구매

단순 기탁만으로 충족하기 어려운 화합물 다양성을 신속하게 확보하기 위하여 의약 및 분자설계 전문가의 화학정보학, 분자 모델링 기술을 활용하여 약물성 및 다양성 극대화를 고려한 특수 골격 화합물을 외국 vendor로 부터 선별하여 구매, 확보하고 있으며 2015년의 경우 75,000여 종을 확보하여 반출에 활용하고 있습니다.

연도별 화합물 확보 현황 (누적, 2000~2016.5)

2016년 5월 현재 총 43만 종 보유





한국화합물은행 소식

화합물 활용 현황

연 평균 60건 내외의 신규 작용점에 대하여 40만개 이상의 화합물이 국내 산·학·연에 제공되어 활용되고 있으며 현재까지 680여건의 약효검색에 활용되고 있습니다. Hit 화합물에 대한 구조 정보 제공시 LC-MS 분석에 의한 순도 및 분자량 검증 자료를 기본적으로 제공하고 있으며 그 외 요청시 유도체 검색, 약물성 예측, off-target 정보 등도 제공하고 있습니다.

2014년 도입한 화합물 선별 자동화 관리 장비[Brooks Sample Store II]를 활용하여 요청 화합물을 신속하게 제공하고 있으며 확보 화합물의 증가에 따라 2016년도에 관리장비의 추가 도입을 진행하고 있습니다.

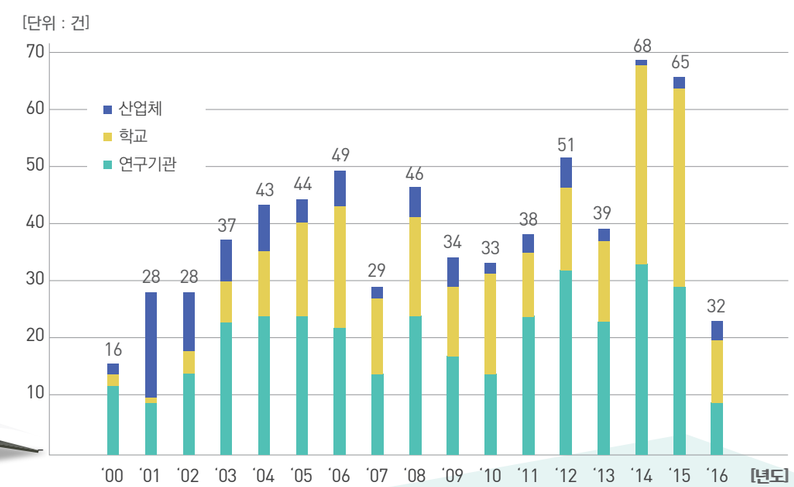
최근 3년간 화합물 활용지원 현황(2013~2015)

년도	지원과제 건수		화합물 반출 회수		반출 화합물 개수	
	전체과제	신규과제	전체과제	신규과제	전체과제	신규과제
2013	97	39	211	103	201,552	162,884
2014	120	68	295	161	414,185	293,566
2015	153	65	320	129	480,677	225,566

■ 2015년 유도체검색(의약화학) 지원 : 123회 (평균 2.6건/주), 평균 2,045개/일 반출

매년 화합물의 활용이 꾸준히 증가하고 있어 국내 기술 인프라 기관으로서의 역할을 충실히 수행하고 있음을 반영하고 있습니다.

연도별 신규 약효시험 활용 현황 (2000~2016.5)

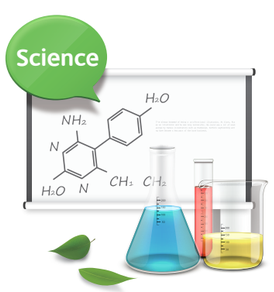


한국화합물은행 소식

신규 약효시험 활용 현황

(2015.12.4 ~ 2016.4.27, 31건)

약효시험명	약효시험기관	적용질환분류
** 분석을 통한 활성억제제 탐색	연구기관	암
**를 이용한 **효능 화합물 탐색	대학교	감염증
**억제물질 탐색	연구기관	신경계
**제 스크리닝	연구기관	암
**에 대한 ** 증가시킬 수 있는 ** 화합물 개발	연구기관	감염증
** 치료제 검색	대학교	감염증
** 억제물질 탐색	연구기관	감염증
** 억제물질 탐색	연구기관	감염증
** 약효 평가	연구기관	감염증
**에 대한 **물질 도출	연구기관	감염증
** 산화효소	연구기관	기타
** 활성제	대학교	면역
** proteins	대학교	감염증
**에 관여하는 **억제자 스크리닝	대학교	암
**반응 유도물질 선발	연구기관	농약
** 효율 시험	대학교	기타
**의 다양한 시스템에서의 약효 평가	연구기관	기타
** 억제제 스크리닝	대학교	암
**를 활용한 **치료제 탐색	연구기관	대사성질환
** 억제화합물 평가	산업체	기타
** 억제화합물 평가	산업체	기타
** 억제화합물 평가	산업체	기타
** 억제 후보물질 발굴	연구기관	암
** 활성 억제제 발굴	연구기관	암
**를 이용한 ** 질환 치료	대학교	대사성질환
** 탈수소효소	연구기관	대사성질환, 암
** 저해제 탐색	대학교	항암제
** 치료제 개발을 위한 ** 조절제 발굴	대학교	대사성질환
**억제효과 활성 검색	대학교	대사성질환
** agonist 개발	연구기관	대사성질환
** 유래의 ** 효소 저해	대학교	항균제



한국화합물은행 소식

화합물 활용 성과

한국화합물은행 제공 화합물 Library를 활용하여 발표된 논문, 특허 및 학회발표 목록

발표논문 (2016. 1 ~)

번호	논문명	저자	저널
1	Hit-to-lead optimization of phenylsulfonyl hydrazides for a potent suppressor of PGE_2 production: Synthesis, biological activity, and molecular docking study	Minju Kim, Sunhoe Lee, Eun Beul Park, Kwang Jong Kim, Hwi Ho Lee, Ji-Sun Shin, Katrin Fischer, Andreas Koeberle, Oliver Werz,* Kyung-Tae Lee,* Jae Yeol Lee*	*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016, *26*(1), 94-99
2	Chromo/Fluorogenic Detection of Co^{2+}, Hg^{2+} and Cu^{2+} by the Simple Schiff Base Sensor	Muhammad Saleem, Chung Ho Khang, Moon-Hwan Kim, Ki Hwan Lee*	*Journal of Fluorescence - RAPID COMMUNICATION* 2016, *26*(1), 11-22
3	Identification of novel protein tyrosine phosphatase sigma inhibitors promoting neurite extension	Hye Seon Lee, Bonsu Ku, Tae Hyun Park, Hwangseo Park, Joong-Kwon Choi, Kyu-Tae Chang, Cheol-Hee Kim, Seong Eon Ryu, Seung Jun Kim*	*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016, *26*(1), 87-93
4	Novel 2,4-diaminopyrimidines bearing tetrahydronaphthalenyl moiety against anaplastic lymphoma kinase (ALK): Synthesis, *in vitro, ex vivo*, and *in vivo* efficacy studies	Dawn Song, Minji Lee, Chi Hoon Park, Sunjoo Ahn, Chang Soo Yun, Chong Ock Lee, Hyoung Rae Kim*, Jong Yeon Hwang*	*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016, *26*, 1720-1725
5	Small molecule inhibitors of the Dishevelled-CXXC5 interaction are new drug candidates for bone anabolic osteoporosis therapy	Hyun-Yi Kim, Sehee Choi, Ji-Hye Yoon, Hwan Jung Lim, Hyuk Lee, Jiwon Choi, Eun Ji Ro, Jung-Nyoung Heo, Weontae Lee, Kyoung Tai No & Kang-Yell Choi*	*EMBO Molecular Medicine* 2016, *8*, 375-387
6	Minor modifications to ceritinib enhance anti-tumor activity in EML4-ALK positive cancer	Chung Hyo Kang, Eun-Young Kim, Hyoung Rae Kim, Chong Ock Lee, Heung Kyoung Lee, Hye Gwang Jeong, Sang Un Choi, Chang-Soo Yun, Jong Yeon Hwang, Joo-Youn Lee, You Hwa Son, Sunjoo Ahn, Byung Hoi Lee, Heejung Jung,* Chi Hoon Park*	*Cancer Letters* 2016, *374*, 272-278
7	DDRI-9: a novel DNA damage response inhibitor that blocks mitotic progression	Dong Wha Jun, Mihwa Hwang, Yun-Hee Kim, Kyung-Tae Kim, Sunshin Kim,* Chang-Hun Lee*	*Oncotarget* 2016, *7*(14), 17699-17710

번호	논문명	저자	저널
8	Stereoselective synthesis of 1,3-disubstituted isoindolines *via* Rh(III)-catalyzed tandem oxidative olefination-cyclization of 4-aryl cyclic sulfamidates	Se-Mi Son, Yeon Ji Seo, Hyeon-Kyu Lee*	*ChemComm* 2016, *52*, 4286-4289
9	Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*	Jin-Hyung Lee, Yong-Guy Kim, Shi Yong Ryu, Jintae Lee*	*Scientific Reports* 2016, *1*, 864
10	A Dual Readout Assay Based on Fluorescence Polarization and Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer to Screen for RSK1 Inhibitors	Eun-mi Jeong, Mi Young Lee, Jeong Hyun Lee, Byung Ho Lee, Kwang-Seok Oh*	*Biological and Pharmaceutical Bulletin (Japan)* 2016, *39*, 547-555
11	Discovery of indirubin derivatives as new class of DRAK2 inhibitors from high throughput screening	Myoung Eun Jung, Byung Jin Byun, Hye-Mi Kim, Joo Yun Lee, Jin-Hee Park, Nari Lee, You Hwa Son, Sang Un Choi, Kyung-Min Yang, Seong-Jin Kim, Kwangho Lee, Yong-Chul Kim,* Gildon Choi*	*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016, *26(11)*, 2719-2723
12	Dihydroergotamine Tartrate Induces Lung Cancer Cell Death through Apoptosis and Mitophagy	Chang S.-H., Lee A. Y., Yu K.-N., Park J., Kim K. P., Cho M.-H.*	*Chemotherapy* 2016, *61*(6), 304-312
13	Peptide inhibition of p22phox and Rubicon interaction as a therapeutic strategy for septic shock	Ye-Ram Kim, Hyun-Jung Koh, Jae-Sung Kim, Jin-Seung Yun, Kiseok Jang, Joo-Youn Lee, Jae U. Jung, Chul-Su Yang*	*Biomaterials* 2016, 101, 47-59
14	Small molecules that allosterically inhibit p21-activated kinase activity by binding to the regulatory p21-binding domain	Duk-Joong Kim, Chang-Ki Choi, Chan-Soo Lee, Mee-Hee Park, Xizhe Tian, Nam Doo Kim, Kee-In Lee, Joong-Kwon Choi, Jin Hee Ahn, Eun-Young Shin, Injae Shin and Eung-Gook Kim*	*Experimental & Molecular Medicine* 2016, 48, e229
15	Urinary Bladder-Relaxant Effect of Kurarinone Depending on Potentiation of Large-Conductance Ca^{2+}-Activated K^+ Channels	Sojung Lee, Mee Ree Chae, Byoung-Cheol Lee, Yong-Chul Kim, Jae Sue Choi, Sung Won Lee, Jae Hoon Cheong, and Chul-Seung Park*	*Molecular Pharmacology* 2016, in press

특허출원

번호	제목		
1	황색포도상구균에 대한 항균 조성물	이주연, 안진희, 강승규, 석영재, 김연란, 윤지희	한국특허 출원 2015-0098159 (2015-7-10) [한국화학연구원, 서울대학교]
2	비브리오 피루베이트 키나아제를 표적으로 하는 비브리오 항생제 및 이의 스크리닝 방법	이주연, 석영재, 김연란, 윤지희, 김혜민, 이창로	한국특허 출원 2015-0098283 (2015-7-10) [한국화학연구원, 서울대학교]
3	염증질환 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물	이주연, 양철수	한국특허 출원 2016-0011511 (2016-1-29) [한국화학연구원, 한양대학교]
4	글루코코르티코이드계 화합물을 포함하는 비소세포성 폐암 치료용 약학 조성물	전상민	한국특허 출원 2015-0153296 (2015-11-2) [아주대학교]
5	3-(4-클로로페닐)벤조[4,5]이미다조[2,1-b]싸이아졸-6-카복실산을 포함하는 항비만 또는 항우울증 치료용 조성물	김철희, 정승현, 황규석, 배명애, 김낙정, 이규양	한국특허 출원 2016-0039530 (2016-3-31) [충남대학교, 한국화학연구원]

학회발표

번호	제목	발표자	학회
1	Synthesis and Evaluation of Novel Pyrimidine Analogues as ALK Inhibitors	Gangadhar Rao Mathi, Chi Hoon Park, Chong Ock Lee, Joo-Youn Lee, Jong Yeon Hwang, Chang-Soo Yun, Hee Jung Jung, Jae Du Ha, Sung Yun Cho, Hyoung Rae Kim, Pilho Kim	2016년도 춘계 대한화학회 학술발표회 2016.4.20 일산킨텍스
2	Stereoselective synthesis of 1,3-disubstituted isoindolines *via* Rh(III)-catalyzed tandem oxidative olefination-cyclization of 4-aryl cyclic sulfamidates	Se-Mi Son, In A Jung, Hyeon-Kyu Lee	2016년도 춘계 대한화학회 학술발표회 2016.4.20 일산킨텍스
3	Discovery and characterization of novel BK_{Ca} channel modulators using a new cell-based assay platform	Sojung Lee, Byoung-Cheol Lee, Chul-Seung Park*	Experimental Biology 미국, 보스톤 2015.3.28-2015.4.1
4	Urinary Bladder-Relaxant Effect of Kurarinone Depending on Potentiation of Large-Conductance Co^{2+},-Activated K^+ Channels	Sojung Lee, Mee Ree Chae, Byoung-Cheol Lee, Yong-Chul Kim, Jae Sue Choi, Sung Won Lee, Jae Hoon Cheong, Chul-Seung Park*	Biophysical Society 미국, LA 2016.2.27-2016.3.2
5	Discovery of Indirubin Derivatives as a New Class of DRAK2 Inhibitors by High Throughput Screening	Myoung Eun Jung, Hye-Mi Kim, Joo Yun Lee, Yong-Chul Kim, Kyung-Min Yang, Seong-Jin Kim, Kwangho Lee, Gildon Choi*	생화학분자생물학회 2015.5.12-14 서울코엑스

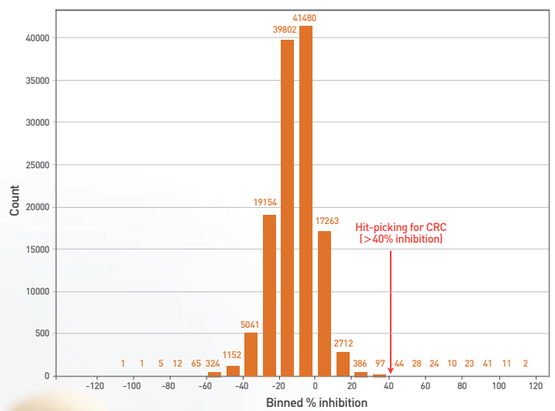
[한국화합물은행 라이브러리 활동사례 I]

KRICT-Lilly 국제 공동연구사업

한국화학연구원
의약화학연구센터
김형래

한국화합물은행은 신약개발을 수행하는 우리나라의 과학자들에게는 너무나 고마운 보배입니다. 한국화합물은행의 탄생부터 수많은 우여곡절을 통한 성장을 지켜봐온 한국화학연구원의 의약바이오연구본부 연구원들에게는 마치 공들여 키운 자식 같은 존재일 것이라고 생각합니다. 저는 우리 항암제연구팀에서 과거 2009년 Eli Lilly와의 공동연구를 수행한 경험을 통해 한국화합물은행의 우수성에 대해 다시 한 번 감사를 드리고 싶습니다.

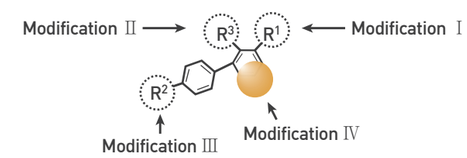
KRICT-Lilly 공동연구사업은 2009년 8월부터 약 1년 5개월간의 공동연구를 통해 유효물질 67개 화합물을 USD465,000에 기술 이전 하였습니다. 연구가 시작된 동기는 Lilly와의 만남을 통해 공동연구 가능성을 타진하는 단계에서 화합물은행의 라이브러리가 매우 다양하고 가치가 높다는 점이 가장 큰 장점으로 작용했습니다. 당시 Lilly가 개발가능성을 타진하고 있었던 SIRT 1/2 dual inhibitor에 대해 동물실험이 가능한 유효물질의 개발이 공동 연구의 목표가 됐습니다. Lilly에서는 스크리닝법을 이미 확립하였으나 자체 라이브러리에서 원하는 수준의 유효물질을 확보하지 못해 동물실험을 통한 항암 효과의 검증을 하지 못하는 단계였습니다. 저희는 최길돈 박사님이 중심이 되어 약 14만 개의 라이브러리를 2달에 걸쳐 모두 스크리닝하여 183개의 hit 화합물을 얻었습니다.

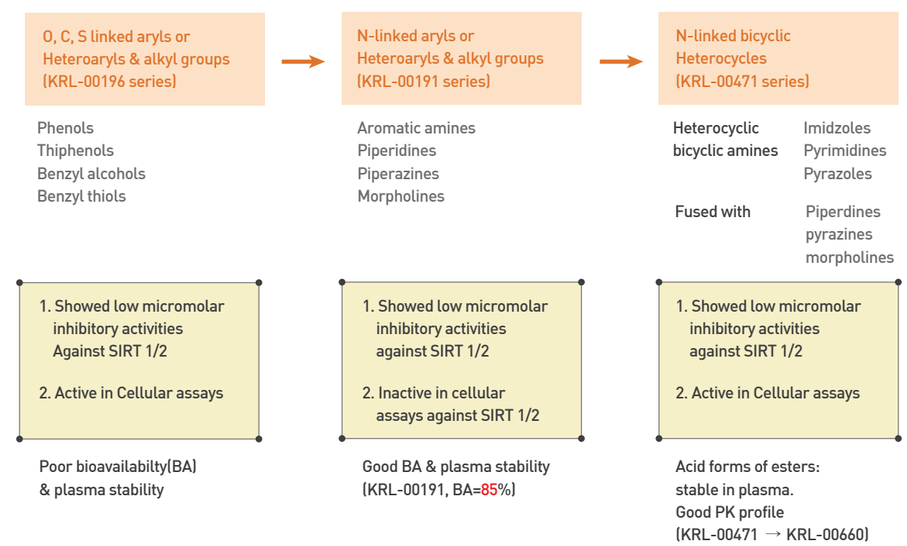


% inhibition	Number of compounds
> 90%	53
> 80%	28
> 70%	10
> 60%	24
> 50%	28
> 40%	44
Total=	183

추가적인 검증실험과 화합물 구조에 대한 분석을 통해 최종 hit 화합물은 30개로 압축되었고 이를 10개의 scaffolds로 나누었습니다. 각 scaffold들은 합성팀에서 주요 hit 화합물과 주변 유도체들을 합성하여 구조-활성 관계 (SAR) 분석을 수행하였으며 두 개의 scaffold 만이 가능성이 있다고 판단하였습니다. 이후 저희 항암제 그룹의 합성팀과 스크리닝팀, 그리고 Lilly, Singapore의 생물팀이 협력하면서 700여개의 화합물을 합성하면서 목표로 하는 화합물들을 확보할 수 있었습니다. 목표화합물 (Target product profile)을 간단히 요약하며 SIRT 1/2 dual inhibitor로서 암세포주에 세포독성을 가지며 적절한 PK를 가지는 새로운 화합물입니다. 아래의 그림은 저희 연구팀이 유도체의 합성을 통해 화합물의 성능을 발전시킨 내용을 요약한 것입니다. 과학자 분들이 모두 공감하시는 대로 세상에 쉬운 일은 없습니다. 화합물은행이 아무리 훌륭한 chemical library를 보유하더라도, 그리고 아무리 우수한 약효를 가진 hit를 제공한다하더라도 우리들의 노력이 더하여지지 않는다면 그저 남보다 조금 더 나은 시작점 (Starting point)에 서 있을 뿐이라고 생각합니다. 저희도 dual inhibition, plasma stability, PK 등의 문제들을 극복하기 위해 연구원들이 모두 온힘을 다했다고 생각합니다.

끝으로 이 연구를 성공적으로 이끌기 위해 함께하신 하재두 박사님, 조성윤 박사님, 이종국 박사님, 안성훈 박사님, 최길돈 박사님, 한선영 박사님, 배명애 박사님, 강남숙 박사님과 연구원들께 감사드리고 싶습니다. 그리고, 한국화합물은행이 우리나라의 신약개발에 보다 나은 시작점을 제공하기 위해 애쓰시는 화합물은행 직원 여러분들의 노고에 감사드립니다.





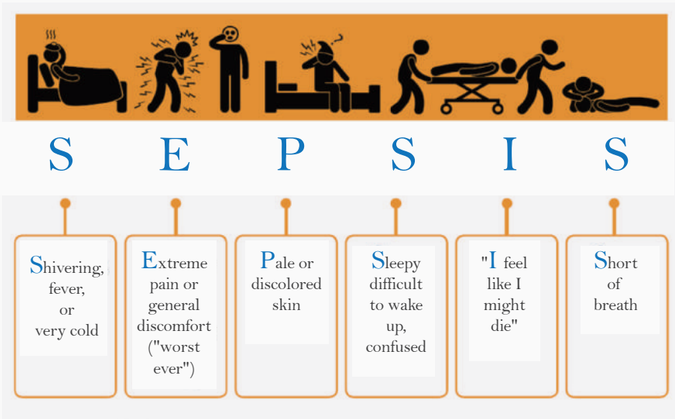
[한국화합물은행 라이브러리 활동사례 II]

패혈증 치료 선도 물질 발굴 연구

한양대학교
분자생명과학과
양철수

한양대학교
분자생명과학과
김예람

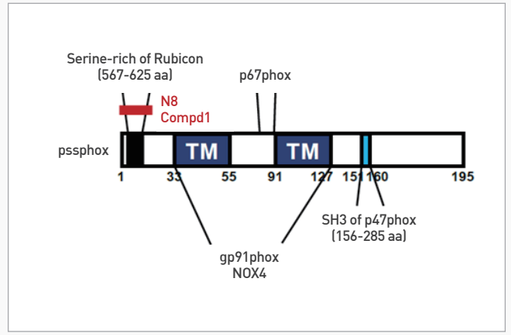
패혈증(Sepsis)은 장기가 혈액을 통해 유입된 과다한 미생물에 감염돼 죽음을 초래하는 중증 응급질환이다. 과염증, 산화적 손상, 응고 과잉, 조직 저관류, 저산소, 면역 저해, 여러 기관에서 기능 장애가 일어나는 전신성 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome;SIRS) 특징을 보인다. 패혈증은 연간 200,000명 정도의 사망을 유발하며, 많은 노력에도 불구하고 30~50%의 치사율을 보이고 있다. 지난 몇 십년간 패혈증의 발병이 상대적으로 증가하고 있는 이유는 노령 인구의 증가, 외과적 수술과 면역 억제제 사용의 증가, 감염 질환에 대한 항생제의 남용과 그에 따른 항생제 내성균의 등장 등의 원인이 복합적으로 작용한 것으로 추측하고 있다. 이러한 심각성에도 불구하고 현재 패혈증에 대한 완벽한 치료제가 개발되지 못한 실정이다. 따라서 패혈증의 유발 원인을 조절하는 연구를 통해 보다 직접적이고 구체적인 분자 기전 접근 및 치료 기반 기술 개발이 필요한 실정이다.



〈출처 : Centers for Disease Control and Prevention〉

본 연구진은 침입한 미생물을 제거하기 위한 체내 방어 작용인 NADPH oxidase(NOX) 복합체에서 활성산소(Reactive oxygen species; ROS)가 과도하게 생성되어 패혈증이 심각하게 진행된다는 것에 주목했다. 이전 연구를 통해 세균에 감염되면 체내 일차 방어 작용인 자가소화작용(autophagy)와 식세포작용(phagocytosis)과 연관된 단백질 Rubicon과 NOX 복합체의 촉매 작용을 하는 p22phox의 결합이 유도되어짐을 보였다. 이 결합은 ROS 생성, 염증성 사이토카인(신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 신호물질)을 통해 강력한 항균 활성을 나타내게 한다. 본 연구에서, p22phox에서 유래된 N-말단 8-아미노산 N8 펩타이드가 Rubicon과 p22phox 결합을 효과적으로 저해할 수 있음을 확인하였고, 이것으로 ROS와 염증성 사이토카인의 생성을 저해하는 결과를 얻었다. N8 펩타이드와 이를 모방한 펩타이드 활성

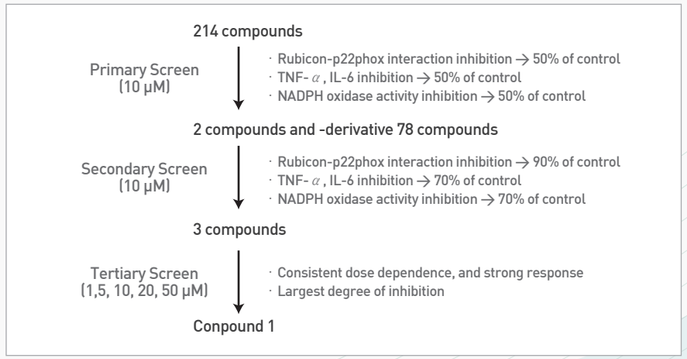
유사 저분자 화합물을 이용한 고속 스크리닝으로 가장 큰 항산화, 항염증 효과를 보이는 화합물을 선발하였다. 최종적으로 패혈증을유발시킨 쥐 모델에서 치사율을 감소시키는 효과를 검증하였다.



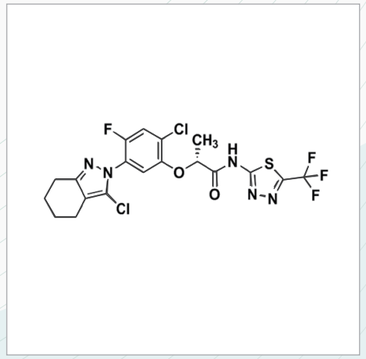
〈N8 펩타이드와 화합물 1의 작용기전〉

N8 펩타이드를 세포내로 전달하기 위해 cell penetrating peptides (CPPs)로 알려진 HIV-1의 Tat 단백질과 결합된 Tat- N8 펩타이드를 제작하였다. 그람 음성균의 세포막을 구성하는 LPS (Lipopolysaccharide)를 이용하여 세포에 자극을 주면 선천적 면역계를 구성하는 Toll-유사 수용체4(Toll-like receptor 4; TLR4) 신호 전달을 통해 Rubicon과 p22phox의 결합이 유도되는데 Tat-N8 펩타이드를 처리한 세포에서는 이 결합이 효과적으로 저해됨을 보였다. Tat-N8 펩타이드를 처리함에 따라 항산화, 항염증 효과가 보였다. 또한 Tat-N8 펩타이드를 CLP(cecal ligation and puncture)로 패혈증을 유도한 쥐에 처리하여 패혈증 쇼크에서 치료 효과를 확인하였다. Tat-N8 펩타이드가 치명적인 패혈증에서 치료적 효과를 가짐을 세포 수준의 실험과 동물 실험으로 검증하였다.

펩타이드 사용은 순도 높은 펩타이드 합성을 하기 위한 비싼 가격, 세포내 전달 어려움, 세포 내 효소들에 의한 낮은 안정성, 낮은 생체 이용률 등 제한점이 존재해 효능 분석을 위한 연구용으로는 사용이 가능하나 실질적 치료 목적을 지닌 후보 물질로서 발전 가능성이 적다. 이를 극복하기 위해서 합성 비용이 적고 기술적으로 용이하며 세포내 전달이 쉽고 효소들에 분해가 되지 않아 안정적이고 적은 용량으로도 효과를 볼 수 있으며 경구 투여가 가능하다는 장점을 가진 저분자 화합물을 주목하였다. Rubicon과 p22phox 결합을 타켓으로 한 p22phox N말단 8 아미노산을 모방한 저분자 화합물을 한국화학연구원 한국화합물은행의 화합물 라이브러리 및 분자 모델링 방법을 적용한 선별(이주연 박사)을 통해 제공받았고 고속 스크리닝을 진행하였다. 1차, 2차, 3차 스크리닝을 거쳐 최종적으로 화합물 1을 발굴하였다. 화합물 1 자체에 세포 독성이 없음을 검증하고 Rubicon과 p22phox 자체 발현에 영향을 미치지 않음을 보였다. 또한 Tat-N8과 같이 화합물 1도 NOX 활성을 저해하고, 사이토카인의 생성을 억제해 항산화, 항염증 효과를 보였다. 이로써 화합물 1이 p22phox가 매개한 NOX 복합체의 결합과 염증반응을 억제하는 면역 조절 작용을 함을 증명했다.



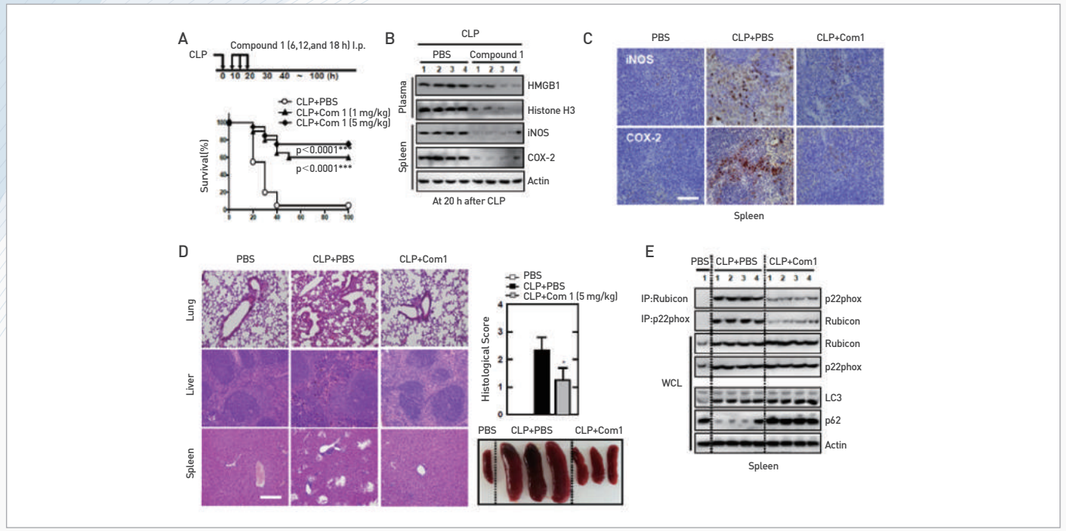
〈화합물 스크리닝 과정〉



〈화합물 1의 구조〉

화합물 1의 CLP로 유도한 패혈증 쥐 모델에서 치료적 효능을 검증하였다. 패혈증 유도된 쥐에게 화합물 1을 고농도로 주입하면 쥐의 70%까지 생존하였다. 생존율 결과와 마찬가지로 NOX 활성, 염증성 사이토카인의 생성도 화합물 1에 의해 감소하는 것을 확인하였다.

* 편집자 주: 화합물 1은 한국화학연구원 고영관 박사님이 한국화합물은행에 기탁하신 화합물입니다.



〈화합물 1의 패혈증 효능 검증〉

본 연구를 통해 활성 산소 제어를 통한 감염/염증 질환에 대한 제어 및 치료의 기전을 규명함으로써 신규 의약 후보로 활용할 수 있는 면역조절 단백질들의 기능에 대한 새로운 지식과 기술 정보들을 획득할 수 있다. 또한 한국화합물은행에서 제공한 p22phox 상호 작용 저분자 화합물 라이브러리는 감염/염증 질환 및 암 치료 연구를 위한 가치 있는 귀중한 자산으로 활용될 것으로 기대되어진다. 또 패혈증 뿐만 아니라 세포내 기생하는 다른 병원균에 기인한 질환 연구에도 기초 자료로 이용되어 질 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Autophagy protein Rubicon mediates phagocytic NADPH oxidase activation in response to microbial infection or TLR stimulation.
Yang CS, Lee JS, Rodgers M, Min CK, Lee JY, Kim HJ, Lee KH, Kim CJ, Oh B, Zandi E, Yue Z, Kramnik I, Liang C, Jung JU.
Cell Host Microbe, 2012 Mar 15;11(3):264-76.

2. The targeted delivery of the c-Src peptide complexed with schizophyllan to macrophages inhibits polymicrobial sepsis and ulcerative colitis in mice.
Kim YR, Hwang J, Koh HJ, Jang K, Lee JD, Choi J, Yang CS.
Biomaterials, 2016 May;89:1-13.

3. Peptide inhibition of p22phox and Rubicon interaction as a therapeutic strategy for septic shock
Kim YR, Koh HJ, Kim JS, Yun JS, Jang K, Lee JY, Jung JU, Yang CS.
Biomaterials, 2016, 101, 47-59.

[약효시험 신기술 소개]

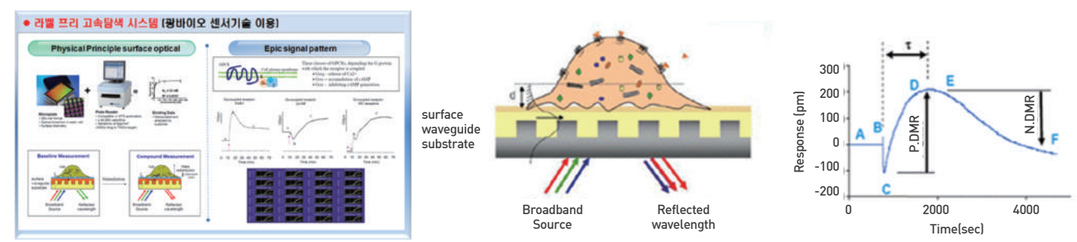
Cell-based functional assay 관련 Label-free DMR assay 연구

한국화학연구원
신물질기반기술연구센터
오광석

01. 연구의 목적

전체 신약표적의 약 40%를 차지하고 있는 G protein coupled receptor (GPCR) 경우, 약효평가를 위해서는 수용체 결합 시험뿐만 아니라, antagonist 혹은 agonist를 판단하는 cell-based functional assay가 필수적이다. 세포내의 칼슘 농도를 실시간으로 측정하는 Ca^{2+} mobilization assay가 가장 널리 이용되지만, Ca^{2+}을 메신저로 이용하는 GqPCR을 제외하고는 cAMP를 메신저로 이용하는 Gi, GsPCR 경우 해당 신호전달을 Ca^{2+}신호전달로 전환시켜야 하는 번거로움이 있고, 사용되는 Ca^{2+} dye의 부작용이 종종 세포에 유발되기도 한다. 따라서 최근 주목받고 있는 Label-free 기반의 dynamic mass redistribution (DMR) assay를 GqPCR의 한 종류인 urotensin II receptor (UT)에 적용하고 기존의 Ca^{2+} mobilization assay 방법과 비교 장단점을 파악하고자 한다.

02. 개요



본 label-free 기반의 cell-based functional assay인 DMR assay는 국내에 처음 도입되는 신기술로 광바이오센서를 이용한 비침습적 라벨 프리 고속탐색법이며 특정 형광 표지 없이 세포내의 신호전달을 실시간으로 모니터링 가능한 방법이다.

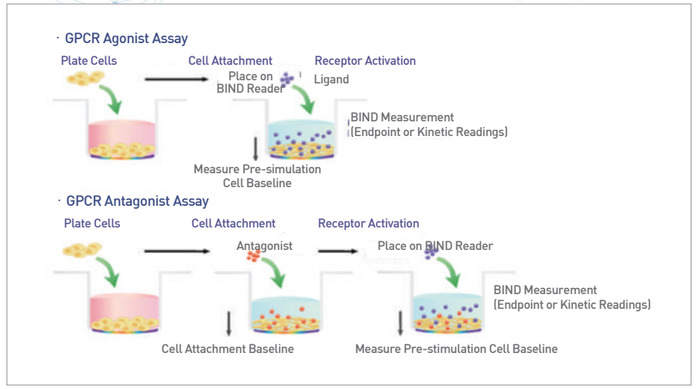
측정원리로는 plate 바닥에 광바이오센서가 존재하며, broadband의 light source로부터 세포내의 바닥으로부터 10 nm의 거리 안의 mass의 재분배에 따른 굴절률의 변화를 측정하게 된다.

03. 용도

본 실험에서는 UT 과발현된 세포주 (HEK293UT)을 대상으로 하여 Urotensin II (UII)에 의한 DMR을 측정하였고, reference UT antagonist를 활용하여 길항작용을 검증하였다. 또한 기존의 Ca^{2+} mobilization assay와 비교함으로써 새로운 Label free 기반의 DMR assay의 장단점을 파악하였다.

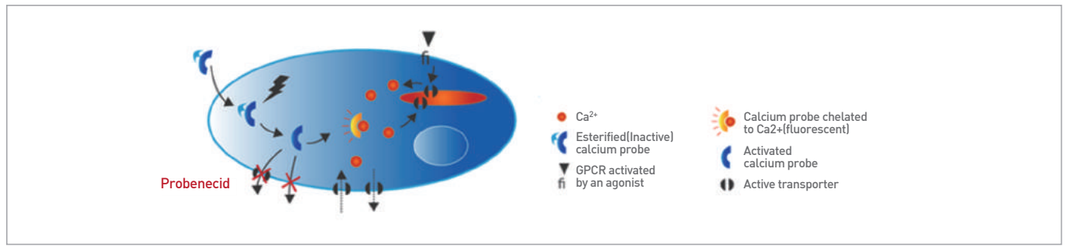
04. 실험 방법

① DMR assay실험방법



HEK293UT 세포를 1 x 10^6cells/ml 준비 후, 광바이오센서가 부착된 384plate에 30,000 cells/well로 seeding 하였다. 하루 동안 배양 후 안정화된 세포에 배지를 assay buffer (HBSS/20 mM Hepes/1% DMSO)로 교환한 후 25℃ 2시간동안 Enspire 기기 안에서 평형화를 유지시킨다. Enspire 내부에서 baseline을 3분 동안 측정 후, reference compounds 혹은 시료를 5분, UII 처리 후 30분 동안 실시간으로 dynamic mass의 재분배 변화에 따른 굴절률의 변화를 측정하였다.

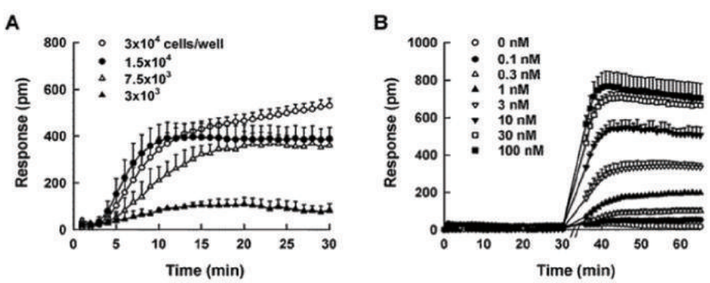
② Ca^{2+}mobilization assay방법



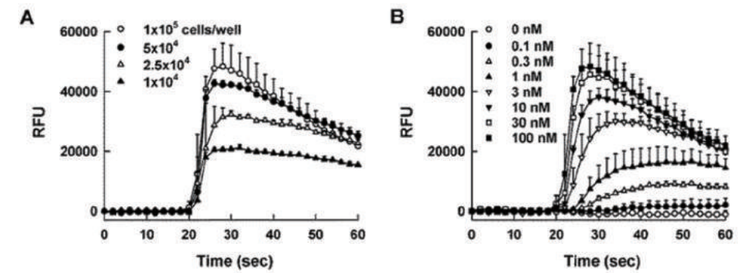
HEK293UT 세포를 1 x 10^6cells/ml 준비 후, poly-lysine이 코팅된 96plate에 100,000 cells/well로 seeding하였다. 하루 동안 배양하고 안정화된 세포에 2.5 mM probenecid와 Ca^{2+} dye를 함유한 loading buffer를 첨가하고 60분간 37℃에서 평형화를 유도시킨다. 이때 reference compounds 혹은 시료는 측정 30분전 전처리를 하고, Flexstation내부에서 UII 처리 후 1분 동안 실시간으로 Ca^{2+} signal의 변화를 측정 비교하였다.

05. 실험 결과

HEK293UT 세포 수 및 UII 의 농도에 따른 변화 측정



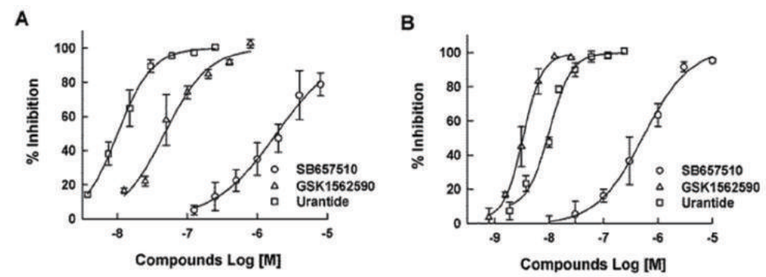
(DMR assay)



(Ca^{2+} mobilization assay)

UT가 과발현된 세포 수의 증가에 따른 UII-induced DMR 증가가 관찰되었으며, 1×10^6 cell/ml (3×10^4 cell/well in 384 plate, 1×10^5 cell/well in 96 plate)에서 가장 강한 DMR signal 및 Ca^{2+}mobilization signal을 보였다. 또한, UII의 농도 의존적으로 DMR 및 Ca^{2+}mobilization signal의 증가가 관찰되었으며, 각기 EC_{50} value는 4.58 nM와 4.15 nM로 유사하였다.

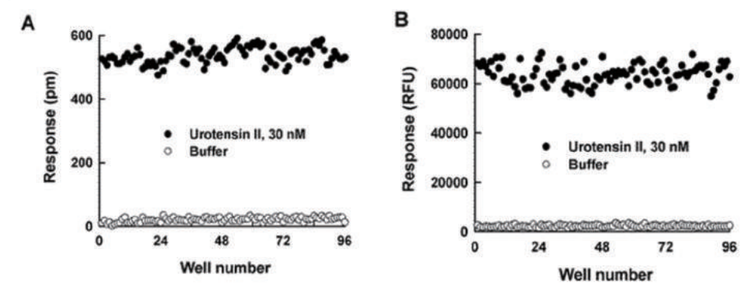
UT antagonists (SB657510, GSK1562590, Urantide) 의 효과 비교



(DMR assay) (Ca^{2+} mobilization assay)

DMR assay에서 SB657510, GSK1562590 그리고 Urantide의 IC_{50} 값은 각각 1,880 ± 138, 47.4 ± 13.7 그리고 10.7 ± 1.1 nM로 측정되었으며, 이는 Ca^{2+} mobilization assay에서 측정된 528 ± 163, 3.3 ± 0.7 그리고 8.1 ± 0.36 nM 값에 비해 약하게 측정되었다. 이런 차이는 아마도 compound의 선택성 그리고, Ca^{2+} 신호에 국한된 측정방법과는 달리 DMR assay는 전체적인 세포내 신호를 측정하는 방법의 차이에 기인한 것으로 분석된다.

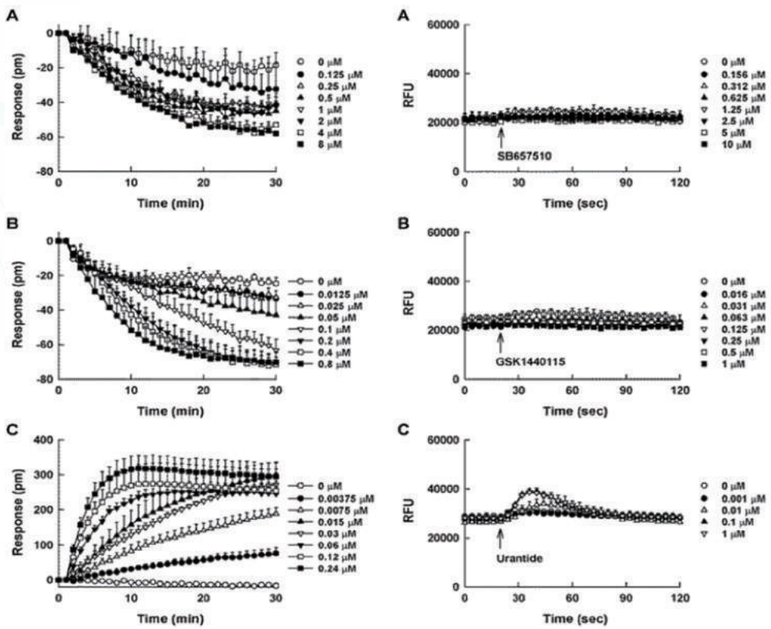
Assay의 quality 비교 (Z'factor 와 S/B 비교)



(DMR assay) (Ca^{2+} mobilization assay)

DMR assay에서 Z' factor와 S/B는 각기 0.81, 25.6 으로 Ca^{2+} mobilization assay의 0.77, 28.0과 유사하게 측정되었다. 이는 cell-based functional assay 측정에 부합되는 민감도와 재현성을 나타내는 결과이다.

UT antagonist들의 Inverse 혹은 partial agonist 분석



(DMR assay) (Ca^{2+} mobilization assay)

최근 연구결과에 따르면, 전체 antagonist 중 약 85%가 inverse agonist로 분석되며, antagonist와 inverse agonist의 구분은 추후 약물투약 방법을 결정하는 중요한 지표가 된다. 따라서 antagonist 약물이 antagonist 자체, 혹은 inverse/partial agonist로 작용하는지 판독하는 in vitro research tool 개발은 꾸준히 요구되어졌다.

Ca^{2+} mobilization assay와는 달리 DMR assay에서는 SB657510, GSK1562590의 inverse agonist로의 분석 그리고 Urantide의 partial agonist로의 분석이 가능하였다. 이는 SB657510, GSK1562590가 단순히 수용체와 리간드와의 신호를 차단하는 역할 뿐만 아니라, 화합물 자체가 리간드와는 상관없이 수용체의 활성을 감소시킨다는 것을 의미하며, 반대로 Urantide의 경우는 UT 수용체의 신호 차단뿐만 아니라 일부분 수용체를 활성화시키는 기능을 가진다는 것을 의미한다.

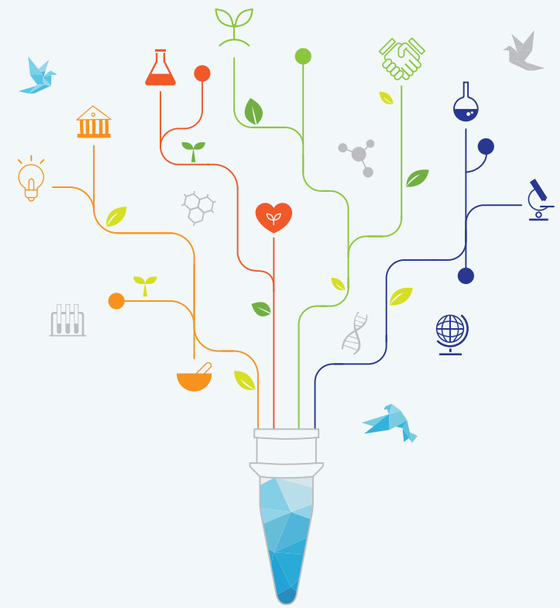
Label-free기반의 DMR assay는 기존의 cell-based functional assay에서 수행할 수 없는 antagonist의 functional activity 분석기능이 가능해진 새로운 cell-based function assay 방법이다.

06. 참고문헌

1) Assay Drug Dev Technol. 2014 Aug;12(6):361-8.

공동 활용을 통한 화합물의 가치 재창출

We take care of your compounds and
Create new value for you!!

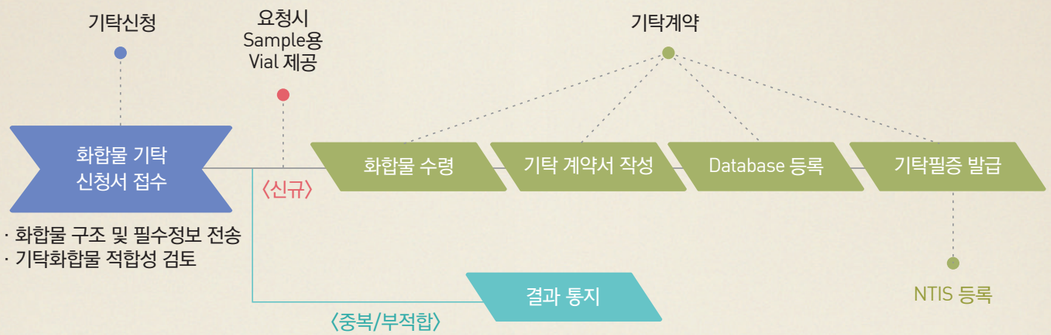


화합물 기탁 및 활용 문의

- **홈페이지 :** http://www.chembank.org
- **주소 :** 대전광역시 유성구 가정로 141 한국화학연구원 한국화합물은행 (우. 34114)
- **전화(대표) :** 042-860-7190 / 팩스: 042-860-7096 / E-mail: chembank@krict.re.kr

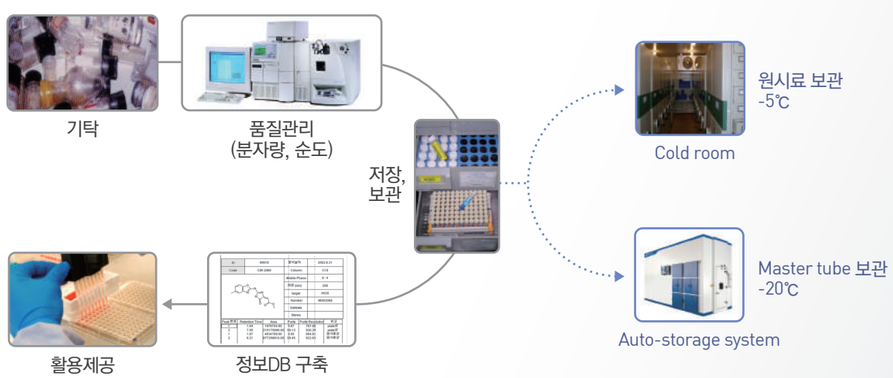
이름	담당업무	전화	E-mail
이현규	센터장	(042)860-7016	leehk@krict.re.kr
이주연	화학정보학/분자모델링	(042)860-7181	leejy@krict.re.kr
채종학	화학정보학/분자모델링	(042)860-7451	chchae@krict.re.kr
최중권	의약화학	(042)860-7070	jkchoi@krict.re.kr
황순희	대외협력/정보관리	(042)860-7190	chembank@krict.re.kr
김선우	화합물관리/장비관리	(042)860-7171	swkim@krict.re.kr
김선호	화합물관리/저온창고관리	(042)860-7090	shkim@krict.re.kr
이유리	화합물정보/DB관리	(042)860-7092	yurilee@krict.re.kr
이수연	LC-MS, 물성분석	(042)860-7747	suyoun@krict.re.kr

화합물 **기탁 절차**

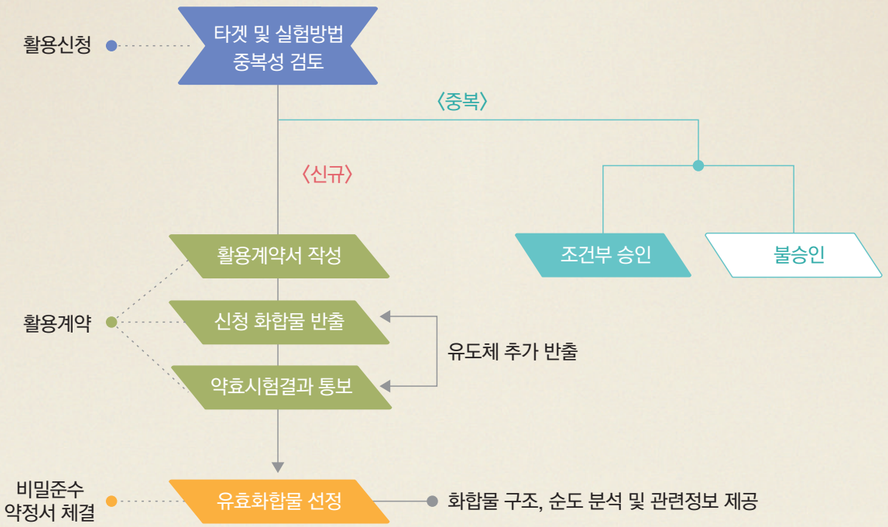


- 기탁자 혜택
  - 기탁화합물에 대한 활용 결과 도출시 그 결과를 통보 받을 수 있습니다.
  - 기탁화합물의 활용결과 Hit이 도출된 경우
    - 활용자와 협의하여 후속연구에 공동연구자로 참여할 수 있습니다.
    - 활용결과를 논문 또는 특허로 출판할 경우: 기탁자의 기여도에 따라 공동저자 또는 공동출원인으로 참여 할 수 있습니다.
    - 기탁화합물의 활용결과 수익이 발생할 경우: 기탁자의 기여도에 따라 수익의 일부를 분배 받을 수 있습니다.

- 화합물 관리 체계



화합물 **활용 절차**



- 약효시험결과 활용

- 약효시험결과 Hit 화합물이 도출될 경우 화합물 기탁기관과 협의하여 공동연구 권장

- 시험결과의 학술적 (비상업적) 활용
  - 시험기관은 화합물에 대한 시험결과를 활용하여 논문, 학회발표, 특허, 컨퍼런스, 출판물 등에 공개 또는 발표할 경우 화합물의 출처로써 한국화합물은행을 기재하여야 합니다.
  - 시험기관은 기탁화합물에 대한 시험결과를 활용하여 논문, 학회발표, 특허, 컨퍼런스, 출판물 등에 공개 또는 발표하고자 할 때, 해당 화합물의 기탁자가 단순기탁 이외의 추가적인 기여를 한 경우 기탁자를 공저자 또는 공동출원인으로 고려하여야 합니다.

- 시험기관의 상업적 활용
  - 시험기관은 화합물에 대한 시험결과를 활용하여 상업적 개발을 진행하고자 할 경우 개발후보물질 선정 후 6개월 이내에 한국화합물은행과 시험기관의 역할 및 권리분배에 관한 별도의 서면협약을 체결하여야 합니다.
  - 시험기관이 서면협약 체결 후 6개월 이내에 개발연구를 진행하지 않을 경우 한국화합물은행은 약효시험결과의 사장을 방지하기 위하여 시험기관과 협의하여 제3의 기관에게 개발연구를 의뢰할 수 있습니다.

- 화합물 사용료
  - 화합물 사용에 따른 실비는 징수하는 것을 원칙으로 합니다.
  - 다만 한국화합물은행의 운영에 필요한 경비를 정부로 부터 지원받는 동안은 화합물 사용료 징수를 유예합니다.

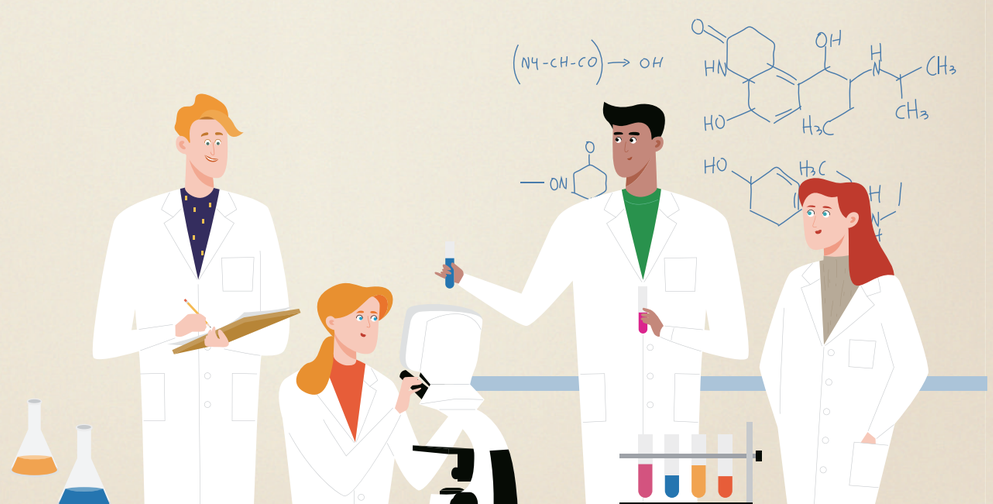
결과활용 권리 규정

한국화합물은행 제공 화합물의 활용결과 (논문, 특허 등)에 대한 권리관계 규정

한국화합물은행은 기본적으로 기탁자들이 기탁한 화합물을 바탕으로 운영되고 있습니다. 기탁자들의 화합물 기탁을 장려하기 위하여 기탁자들에게 최소한의 혜택을 드리며, 동시에 화합물 사용자들의 불편함을 최소화하기 위하여, 한국화합물은행이 제공한 화합물을 활용하여 도출된 연구결과(논문, 특허 등)의 권리관계에 대하여 아래와 같은 규정을 적용합니다.

● 활용결과(논문, 특허 등) 권리관계 규정 내용

- 기탁자가 기탁 이외의 추가적인 기여가 없는 경우에는 화합물 기탁자로서 논문의 사사(acknowledgement)에만 포함되는 것이 "원칙" 입니다. 그러나 해당 화합물이 논문의 핵심 화합물이고 구조까지 공개되는 경우에는 기탁자를 공동저자로"적극고려"하여야 합니다.
- 기탁자가 추가적인 기여(화합물 유도체 합성 제공, 관련 정보제공 등)을 하였을 경우에는 기여 정도에 따라 기탁자를 논문 공저자, 특허 공동 발명인 또는 공동 출원인으로"고려"하여야 합니다.
- 기탁자의 추가적인 기여가 없는 경우, 활용 결과에 대한 용도특허는 사용자(발견자)에게 귀속되며 물질특허에 관해서는 기탁자와 협의하여야 합니다.
- 모든 논문 및 학회 발표에는 한국화합물은행 제공 화합물을 사용하여 연구가 진행되었다는 사사(acknowledgement)를 포함하여야 합니다.
- 한국화합물은행 활용결과의 권리 규정은 기본적으로 과학계에서 통용되는 연구결과 기여도에 대한"연구윤리 기본원칙"을 따르고 있습니다.



한국화합물은행 제공 라이브러리 종류

임상화합물 Library
- 화합물수 : 2,300
- 기본 제공량 : 5 uL (DMSO 용액, 평균농도 5 mM)
- 라이브러리 구성 :
  임상 Ⅰ-Ⅲ상 단계 화합물 및 승인 약물 (Clinically Active Compounds)

Fragment Library
- 화합물수 : 1,000
- 기본 제공량 : 5 uL (DMSO 용액, 평균농도 20 mM)
- 라이브러리 구성 :
  분자량 300이하 라이브러리, 순도 및 분자량 검증 (LC-MS)

GPCR 및 PPI Library
- 화합물수 : 각10,000
- 기본 제공량 : 5 uL (DMSO 용액, 평균농도 5 mM)
- 라이브러리 구성 :
  해외 Vendor로 부터 선별 구매

Virtual Screening
- 화합물수 : 협의
- 기본 제공량 : 5 uL (DMSO 용액, 평균농도 5 mM)
- 화학정보학 및 분자모델링 방법을 적용한 가상탐색
- 타겟 연구관련 별도협의 필요

대표 Library
- 화합물수 : 8,400
- 기본 제공량 : 5 uL (DMSO 용액, 평균농도 5 mM)
- 라이브러리 구성 :
  전체 화합물을 대표하는 라이브러리, 순도 및 분자량 검증 (LC-MS) 기탁/구매 분리 구성 (2014.8 신규구성)

Kinase Library
- 화합물수 : 3,200
- 기본 제공량 : 5 uL (DMSO 용액, 평균농도 5 mM)
- 라이브러리 구성 :
  분자모델링방법 (Docking)을 적용하여 kinase 타겟의 active site에 결합할 가능성이 높은 화합물로 구성

천연물 Library
- 화합물수 : 1,200
- 기본 제공량 : 5 uL (DMSO 용액, 평균농도 5 mM)
- 라이브러리 구성 :
  단일성분 천연물 및 천연물 유사골격 (Natural product-like) 화합물

PharmaCore Collection
- 화합물수 : 요청개수
- 기본 제공량 : 5 uL (DMSO 용액, 평균농도 5 mM)
- 라이브러리 구성 :
  요청골격으로 선별 구성한 화합물

전체 Library
- 화합물수 : 43만종
- 농도 : 5mM, 5uL