

새로운 항암제 개발을 위한 Cyclin-dependent kinase 저해제 탐색

이철훈 · 조윤희

한양대학교 의과대학 유전학교실

1. 서론

1.1 연구목적

기존 항암 화학요법제들의 가장 치명적인 단점은 바로 암세포와 정상세포에 대한 선택성이 거의 없음으로 해서, 정상세포의 괴사도 동시에 초래하는 점이었다. 그러나 세포주기의 이론을 도입하면, 즉 활발히 성장하려는 암세포는 성장이 상대적으로 거의 정지되어 있는 대다수의 정상세포에 비해 엄청나게 빠른 세포주기가 운영되고 있기 때문에, 세포주기의 조절 원천인 CDKs를 저해하여 암세포만을 선택적으로 cell cycle arrest를 유발시킨다. 이 자극을 바탕으로 소위 programmed cell death 인 apoptosis가 일어나게 되면, 암세포만을 선택적으로 괴사시킬 수 있으므로 기존의 항암요법의 부작용을 최소화할 수 있다는 항암요법의 새로운 전기를 마련할 수 있을 것이다. 이상과 같은 이유로 하여, 10여 년 전부터 전 세계적으로 CDKs의 저해물질을 찾고자 하는 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.

1.2 Cell Cycle Regulation

1.2.1 개요

포유류의 세포분열 과정은 cyclin-dependent kinase(CDK) family의 효소들의 활성화에 의하여 매우 정교히 조절되어 진다. 이와 같은 CDK 활성화의 조절(regulation)은 무척 다양한 경로를 통해 이루어 지는데, 예를 들자면, 1) cyclin의 생성과 파괴, 2) 인산화 반응(phosphorylation events)의 활성화 및 불활화, 3) CDK를 억제하는 단백질(peptides)의 생성, 결합 그리고 분해, 4) 그리고 그 외의 요인들(subcellular localization)을 들 수 있다¹⁻⁵.

이러한 CDK 활성화의 조절을 통하여, 세포들은 자신의 성장과 DNA 복제 그리고 새로운 딸 세포로 자신의 유전자(genome)의 전달(mitotic transfer) 등을 정교하고 정확하게 조절 할 수 있게 된다. 이와 같은 세포의 세포주기(cell cycle)를 자신이 원하는 데로 운영하기 위하여, 세포는 몇 가지의 cell cycle checkpoints를 가진다⁶⁻¹⁰. 이 점검점은, 세포의 성장을 야기시키는 세포신호전달 과정(growth-promoting signal

transduction pathways)의 경우와 같이, 주로 CDK의 활성화 조절을 통하여 운영된다¹¹⁻¹⁴.

세포신호전달 과정의 구성 성분들이 유전적으로 변이 되면 암이 발생되듯이, 마찬가지로 CDKs와 그들의 regulators 및 기질들에 유전적 손상이 발생되면, 발암 된다는 사실이 널리 보고되고 있다^{15,16}. 특히 이 중에서도 가장 많이 연구되고 있는 변이의 사례는 retinoblastome(RB) pathway이다. 정상 경우에는 D-type의 cyclins 중의 하나(cyclin D1)와 효소 Cdk4/Cdk6가 복합체(complex)를 이루어 RB protein(pRb)의 인산화를 야기 시킴으로, 세포주기의 G1/S phase의 전환(transition)이 일어난다. 반면에, pRb의 인산화가 CDK의 저해물질 등에 의하여 발생되지 않으면, 세포주기의 진행이 정지된다(cell cycle arrest). Cdk4와 Cdk6를 저해하는 대표적인 CDK 저해제로 INK4를 들 수 있는데, 거의 모든 인간의 암에서 바로 이 INK4가 관여하는 pathway의 여러 CDK 저해 성분들에 유전적 변이들이 보고되고 있다¹⁵⁻¹⁷.

최근 이러한 CDK 조절기전 및 세포주기 점검기전이 암의 발생과 밀접한 관련이 있음을 입증하는 대단히 우수한 총설들이 많이 발표되고 있으므로, 본 저자들은 이러한 세포주기 조절 기전을 바탕으로 한, 새로운 항암제의 개발 현황 및 그들의 가능성에 관해 간략히 정리해 보고자 한다.

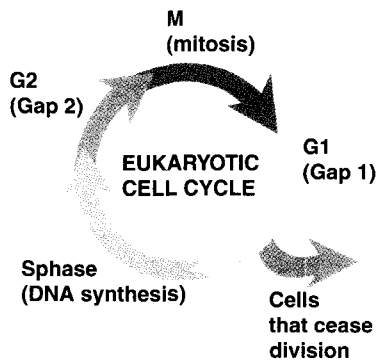
1.2.2 세포주기와 CDKs/Cyclins

세포주기란 일종의 시계와 같은 것이다. 이 시계는 두 가지의 중요한 요소로 구성되어 있다. 즉, Cyclin-dependent kinases(CDKs)와 cyclin이 그것이다. 대부분의 세포 내에 존재하는 protein kinase와 같이, CDKs도 어떤 특정 단백질의 serine과 threonine의 인산화에 관여하는 효소이다. Protein kinase는 세포 밖으로부터의 신호를 증폭하고 또 다른 효소에 그것을 신속히 전달하는 기능을 갖는다. 즉 하나의 protein kinase에 의해 하나의 단백질(target protein)이 인산화 되면, 그것을 기화로 하여 순식간에 수백-수천개의 다른 단백질들도 연속적으로 인산화 되어 신호가 전달되고, 그로 인해 세포의 기능이 조절된다.

한편 CDKs는 그의 파트너인 cyclin없이 아무런 능력도

발휘할 수 없다. 즉 cyclin이 있어야만 정확한 target 단백질을 구별하여 활성을 나타낼 수 있는 것이다. 따라서 세포주기의 각 구역마다 특정한 cyclin:cdk complex가 정해져 있고, 이들이 어떤 target 단백질의 인산화를 수행해야 하는 지가 정해져 있다. 그런데 CDKs의 level은 전체적인 cell cycle동안 항상 일정하게 유지되는 반면, cyclin의 level은 매우 유동적이다. 따라서 cyclin:cdk complex의 활성 능력을 좌우하는 것은, 필요한 때에 cyclin이 충분한 양 존재하는가의 여부에 따라 결정된다. 그러나, 나중에 다시 언급되겠지만, 이 cyclin에 의한 조절 외에도, 또 다른 조절 체계가 존재한다.

하나의 세포가 세포주기를 통해 자신을 증폭하기 위해서는 이렇듯 cyclin:cdk complex의 mechanism이 잘 조화되어 운영되어야 한다. 휴지기(quiescence)에 있던 세포가 분열을 시작하기 위해서(G1으로의 진입), 제일 처음 필요로 하는 것이 cyclin D이다(cyclin D는 세포분열을 자극하는 mitogen에 의해서 항상 충분한 양이 유지될 수 있도록 조절된다). 이 cyclin D는 Cdk4, Cdk6(이 두 가지 효소는 기능적 측면에서 아직 확실한 부분이 밝혀 지지 않았음)와 결합된다. 한편 S phase가 시작되기 몇 시간 전인, 즉 중기/후기 G1 phase에서는 cyclin E의 생성이 유도되고, 이것은 Cdk2와 complex를 형성하게 된다. 이 complex가 있어야만 S로의 진입이 가능하다. S phase로 진입되어, DNA가 합성되기 시작할 무렵에 cyclin A가 등장하고, 이것은 초기엔 Cdk2와 그리고 뒤엔 Cdk1(=Cdc2)과 결합하게 된다. 이 complex는 후기 G2 phase까지 지속되다가, cyclin B가 등장하면서 Cdk1은 cyclin B와 complex를 이루어 세포주기의 마지막 단계인 mitosis(M phase)로 진입하면서, cell cycle event를 마치게 된다.



Cell cycle: A schematic overview

1.2.3 G1 progression 및 cell cycle의 제한점(restriction point)

앞에서 언급한 내용 만으로는 전체적인 cell growth cycle의 충분한 이해가 부족하므로, 지금부터 자세한 각론을 시작하겠다. 세포는 외부로부터 mitogenic(cell growth 촉진) 또는 antimitogenic(cell growth 억제) signal을 끊임없이 받게 되고,

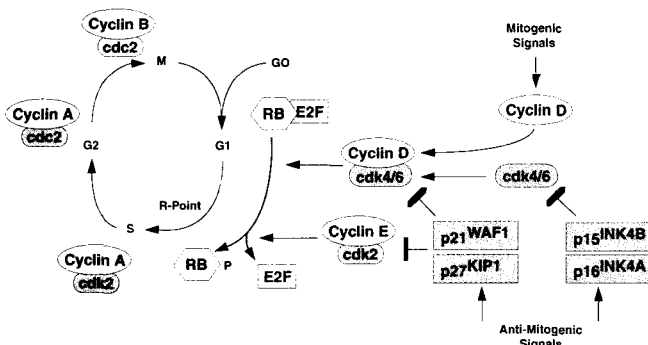
이 signal에 의해 cell cycle이 조정된다. 만약 이러한 cell cycle clock의 조절이 붕괴되면 암세포가 생성되는데 그 이유는 무엇일까? 대답은 간단하다. 세포는 자신의 G1 phase의 처음 2/3동안만 stimulation을 필요로 한다. 이 시간 동안만 mitogenic stimulation을 해 주면, 나머지 phase들은 아주 수월하게 진행되는 것을 알 수 있다. 이러한 사실에서 cell cycle clock에는 중기/후기G1 phase위치에 일종의 문턱이 있는 것으로 추측되었으며, 이것을 추후에 제한점(restriction point 또는 R point)이라 명명하였다. 즉 세포가 G1을 2/3쯤 진행하면, 이 중요한 point에 다다르게 되고, 이 point에서 세포는 “계속 전진 또는 중단”을 결정해야 한다. 이 시점에서 세포의 성장이 이롭지 못한 signal이 전달되면, 세포는 후퇴하여 다시 G0(휴지기) phase로 복귀하게, 반대의 경우엔 계속 전진한다.

이와 같이 R point의 역할은 cellular proliferation control의 중심 역할을 하는 것이다. R point를 극복하고 S로의 진입에 성공하면, 나머지 M phase까지의 진행은 큰 이변(대사의 붕괴, DNA의 손상 등)이 없는 한, 거침이 없다. 따라서 만약 이 문턱(R point)이 없어진다면, 세포는 질세 없이 cell cycle을 반복하게 되고, 그로 인해 세포의 neoplasia가 발생하는 것이다.

1.2.4 RB protein(pRb)과 R point의 극복(transition)

R point decision에서 결정적으로 중요한 역할을 하는 열쇠(R point switch)는 retinoblastoma protein인 pRb이다. 즉, pRb의 저 인산화(hypophosphorylation) 또는 인산화가 일어나지 않게 되면, pRb는 R point transition을 못하게 한다. 반면 인산화가 일어나면, pRb는 inhibitory power를 상실하게 되어 R point transition이 일어나, 세포는 후기 G1 phase로 진입하게 된다. 그리고 그 때 부터는 아주 자연스럽게 cell cycle이 진행된다. 따라서 거의 모든 인체의 암세포에서는 pRb의 인산화가 일어나서, R point transition이 수월하게 되어, 결국 부분적인 세포의 과성장에 의해 발암되는 것이다. 그렇다면 어떻게 중요한 pRb의 인산화는 어떻게 조절되는 것일까? 해답은 바로 cyclin D&E 그리고 Cdk4 or Cdk6, Cdk2 이다. 우선 cyclin D와 Cdk4/6의 complexes에 의해 pRb의 인산화가 시작되고(부분적인 인산화), cyclin E:Cdk2 complexes에 의한 최종적인 과인산화(hyperphosphorylation)가 발생되어, 결국 pRb는 inactive되고 cell cycle을 억제할 수 있는 능력을 상실하게 된다.

pRb의 인산화와 동시에 발생하는 또 다른 mechanism이 하나 있는데, 그것은 transcription을 지원하는 transcription factor인 E2F(E2F1,2 & 3)의 활성화가 그것이다. pRb가 인산화 되어 있지 않으면, E2F는 pRb에 결합되어 있어 활성이 억제되지만, pRb의 과인산화가 발생되면 pRb에서 유리되어 활성을 갖게 된다. 유리된 E2F는 S phase의 진행을 위해 필수적인 단백질들의 gene을 발현시키는 역할을 한다.



1.2.5 pRb의 인산화에 영향을 주는 외부자극

외부로부터의 자극에 의한 pRb의 대표적인 조절 기전은 pRb의 인산화이다. 어떠한 mitogens는 cyclin D1의 발현을 촉진시키고, 이 cyclin D1은 Cdk4 또는 Cdk6와 결합하여, pRb의 불활성화를 야기 시킨다. 이러한 cyclin D1의 mitogen에 의한 생합성 촉진은 Ras-Raf-Map kinase에 의한 signal transduction cascade에 의해서 조절된다. 이것은 pRb가 결손된 세포에 있어서는 Ras-Raf-Map kinase pathway를 blocking 해도, G1 arrest가 일어나지 않는 사실로 설명할 수 있다. 즉 Ras-Raf-Map kinase pathway의 근본적인 목표는 pRb 인산화임을 추측할 수 있다. 그러나, 이러한 cyclin D1 조절체계와는 달리, cyclin D2, D3의 조절은 cAMP level에 의해서 이루어진다. 즉 cAMP의 level은 cyclin D2의 level의 positive regulator이다. 이와 같이 유사한 기능을 갖음에도 불구하고, 다양한 조절기전에 의해 활성의 조절은 실로 생체의 다양성을 다시 한번 보여주는 것이다.

외부의 신호에 의해서 cyclin E나 cyclin E:Cdk2 complexes의 활성이 조절된다는 증거는 아직 발견되지 않았다. 그보다는 오히려 cyclin D1의 level이 어떤 critical threshold에 다다르게 되면, cyclin E:Cdk2 complexes가 생성되어 pRb의 인산화를 시작하는 것으로 보인다. 즉 cyclin D:Cdk4 또는 cyclin D:Cdk6 complexes의 활성이 cyclin E의 발현을 유발하는 것으로 보인다. 이 과정은 매우 복잡하므로 여기에서 설명하는 것은 생략하겠다.

Cyclin :CDK complexes의 인산화 활성을 억제하는 대표적인 외부자극으로는 Cdk inhibitor p27을 들 수 있다. 이 p27은 cyclin E:Cdk2에 결합하여, 그들을 불활성화 시키는 것으로 잘 알려져 있다. 그 외에도 세포성장 억제 요소 중의 하나인 TGF-β는 또 다른 Cdk-inhibitor인 p15INK4B의 합성을 활성화 시키며, 이 p15는 Cdk4/6 blocking하여 G1 arrest를 유발시킨다. 따라서 R points를 통과한 cells에서는 TGF-β가 growth-inhibitory powers를 상실하게 된다.

G0 phase에 trapped 되어 있는 cells에는 high level의 p21과 p27 Cdk inhibitors가 존재하여, 미량이라도 잔존할 수 있는 어떠한 cyclin:CDK complexes를 억제한다. 그러나 이 세

생물산업

포에 mitogenic stimulations가 발생되면, 세포 내의 p27 level의 급격한 감소를 초래한다. 이와 같은 p21과 p27에 의한 cell cycle control은 G1 mid-phase까지로 알려져 있다.

그 외의 cell cycle clock regulation의 조절 기전들은 확인된 것이 많지 않은 실정이다. 그 중의 한 기전으로 Cdc25A phosphatase가 있다. Mitogen이 cell stimulation하면, Myc protein의 합성이 induce되고, 이 Myc은 Cdc25A phosphatase의 생합성을 촉진시킨다. 이 Cdc25A phosphatase는 inactive한 Cdk로부터 phosphate groups를 제거하여 Cdk를 active form으로 전환시키나, 자세한 작용기전은 규명되지 못하고 있다.

2. 연구 방법

2.1 세포성장억제(cell growth inhibition assay)

96 well plate에 다양한 농도의 시험물질이 포함된 media 50 μl과 세포가 5 × 10³ cell/ml이 포함된 배지 50 μl을 넣어 총 100 μl/well가 도게 한다. Microplate을 37°C, CO₂ incubator에서 12과 24시간 동안 배양 한다. 시간별로 배양된 세포의 성장 억제를 측정하기 위해 각 well에 MTT dye를 15 μl씩 분주 후, formazen 형성을 위해 37°C에서 2시간동안 배양 한다. Formazen이 형성된 target cancer cell line(앞으로는 HL-60 세포를 선정한 것으로 간주함)을 1,500rpm으로 원심분리하고 상층 액을 제거한 뒤, Solubilization/stop 용액을 각 well에 100 μl씩 분주하고 형성된 formazen이 잘 녹을 때까지 잘 흔들 어준다. 세포성장 억제농도를 측정하기 위해서 파장 570nm에서 ELISA reader(molecular device, USA)을 사용하여 측정한다.

2.2 Immunoprecipitation 및 Cyclin-dependent kinase 활성 측정

2.2.1 Cdk4 와 Cdc2 kinase 활성 억제 측정

Cdc2 kinase 활성 억제제의 측정은 nocodazole(1 μg/ml)의 20 시간 처리에 의해 M phase arrest 된 HeLa cell extract를 Cdc2 kinase의 source로, Cdk4 kinase 측정에서는 total HeLa cell extract를 사용하여 50mM Tris, pH 7.4., 2mM DTT, 10mM MgCl₂, 1mM EGTA, 40mM β-glycerophosphate, 0.1mM sodium vanadate, 1 μCi[(γ-³²P) ATP(50 μM ATP) 그리고 Histone H1 또는 GST-Rb peptide를 함유한 반응 액에 시험물질을 농도별로 가해 최종 25 μl가 되도록 부피를 조절하여 30°C에서 15분 반응한다. 다음 100% trichloroacetic acid를 6 μl 가하여 얼음 위에서 40분 동안 방치하고, 10,000 xg에서 15분 원심분리 한 뒤 상층액 15 μl를 p-81 paper에 spotting 한다. Spot된 p-81 paper를 75mM phosphoric acid로 15분씩 3 번 세척하여 건조 시킨 후 radioactivity를 liquid scintillation counter(Backman, San Diego, CA, U.S.A.)로 측정한다.

2.2.3 단백질 추출 및 정량

다양한 농도와 시간으로 시험물질을 HL-60 세포에 처리한 후, 세포를 1,500rpm 10분 동안 원심분리하여 모은 뒤 PBS로 세척한다. 단백질 lysis buffer(50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 1x protein inhibitor tablet)를 넣고 액화질소로 급속냉각 시킨 후, 37°C water bath에서 급속 해동한다. 이 작업을 3회 반복한 후 lysis된 세포를 15,000rpm, 4°C, 30분 동안 원심분리 한다. 상층액을 취한 뒤 새 튜브에 옮기고 -70°C에서 보관한다. 추출한 단백질의 정량은 단백질 1 μ l 와 TDW 9 μ l 를 넣어 1/10으로 희석한 후 1x로 희석한 Bio-Rad Protein assay(cat 500-0006)solution을 각 well에 200 μ l씩 분주한다. 그리고 96 well plate을 잘 섞은 후 ELISA를 이용하여 595nm 파장으로 측정한다.

2.2.4 Western blot

시험물질 적당량을 처리 후 시간별(0-12시간)로 세포를 1,500rpm으로 원심분리 후 모으고 D-PBS로 세척한다. 세척 후 모은 세포를 cell lysis buffer(50mM Tris-Cl pH 8.0, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 1x Protease inhibitor(complete tablet))로 잘 suspension 한다. 잘 suspension된 세포를 homogenizer로 lysis 시킨 후, 얼음에서 10분 유지한 후 15,000rpm에서 30분간 원심분리 한다. 추출된 단백질은 Bio-Rad 방법에 의거하여 정량한다. 단백질(30-50 μ g)을 10-15% SDS-PAGE에 분리시킨 후, PVDF membrane 이 transfer한다. Transfer한 membrane을 5% non-fat dried milk가 포함된 TBS-T buffer를 이용하여 non-specific binding site를 억제 시킨 후 TBS-T buffer로 세척한다. 세포 주기 조절에 관여하는 단백질들의 항체(antibody)를 이용하여 membrane에 부착시킨 후, 단백질들의 발현양상을 보기 위해 ECL-plus reagent(Amersham, Buckinghamshire, UK)로 반응 후, X-ray film에 노출하여 관찰한다.

2.2.5 Immunoprecipitation 및 Western blot

본 실험 방법은 protein-protein interaction을 관찰하기 위한 방법으로 co-immunoprecipitation으로 특정 조절 단백질을 얻은 후 western blot으로 확인한다. 배양 후 모은 세포에 RIPA buffer(50 mM Tris-HCl; pH 8.0, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 5mM NaF, 1 mM sodium o-vanadate, and proteinase inhibitors)를 가해 1시간 동안 얼음 위에 방치하여 lysis 시키고, 원심 분리한 후 상층액을 취한다. 이 상층액을 total protein으로 사용하며 단백질의 양을 정량 하여 각각의 반응 tube에 500 μ g의 단백질을 준비한 후, protein A 또는 G-Sepharose CL-4B 50 μ l 를 가해 2시간동안 4°C에서 preclearing시킨다. Protein A 또는 G bead에

Preclearing된 단백질에 antibody(2 μ g)를 가하여 4°C에서 12시간 반응 시킨다. Antigen-antibody로 binding 시킨 후 protein A 또는 G bead 50 μ l 를 가하여 4°C에서 2시간 반응한 후, spin-down시켜 protein A 또는 G bead-antibody 복합체에 binding 한 조절 단백질을 얻는다. 조절단백질 antigen-antibody-protein A or G bead에 lysis buffer(50 mM Tris-HCl; pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 5 mM NaF, 1 mM sodium o-vanadate, and proteinase inhibitors)로 3회 세척하고, buffer A(100 mM Tris-HCl; pH 7.6, 20 mM MgCl₂, 2mM DTT, and proteinase inhibitors)로 2회 세척한다. Immunoprecipitated 조절 단백질의 histone H1 또는 GST-Rb peptide가 포함된 R buffer(50 mM Tris-HCl; pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 50 mM β -glycerophosphate, 20 mM EGTA, 1 mM DDT, 10 μ M ATP, 25 mM NaF, and 1 μ Ci [γ -³²P]ATP)에 시험물질을 농도별로 가하여 30°C에서 15분 반응시킨다. 15분 반응한 후 2xSDS-loading buffer 동량을 넣어 반응을 종료 시키고, 100°C에서 5분간 가열한 후 10~18% SDS-PAGE로 전기영동하여 autoradiography로 분석한다.

2.3 Flow cytometry 분석

세포 내 DNA의 양을 측정하기 위한 방법으로, 시험물질을 처리한 HL-60 세포(3-5 \times 10⁶cells/ml)를 PBS로 두 번 세척한 후, 0.5ml PBS로 cell을 잘 suspension한다. 잘 현탁된 세포에 70% 에탄올/PBS 5ml을 넣어 4°C에서 12시간 고정 시킨다. 고정된 세포를 1,500rpm으로 10분 원심분리 하고 상층액을 제거하고 PBS(with 1% BSA) 5ml로 세척한다. 그리고 0.1mg/ml RNase A 를 처리하고 37°C에서 30분 반응시킨다. 모든 과정이 준비된 세포에 0.2mg/ml P.I(propidium iodide)로 염색한다. 처리된 세포는 4°C에서 빛을 차단하고 30분 반응시킨다. 실험의 결과는 FASTAR flow cytometry(Becton Dickinson, San-Diego, CA, U.S.A.)로 측정한다.

3. 연구 결과 및 현황

3.1 CDKs의 저해 small chemicals

이상과 같은 세포주기의 조절기전을 바탕으로 많은 연구자들이 기존의 항암제가 갖는 부작용을 현저히 줄일 수 있는 근거를 마련하였다. CDKs의 저해물질들은 크게 7개 군으로 구별할 수 있다. 1) 퓨린계 물질(purine-based compounds)인 olomoucine과 그 유도체들, 2) butyrolactone계 물질, 3) flavopiridol계 물질, 4) staurosporine과 UCN-01계 물질, 5) suramine계 물질, 6) 9-hydroxyellipticine계 물질 그리고 7) 뉴클레오사이드계 물질인 toyocamycin, sangivamycin의 유도체들이다.

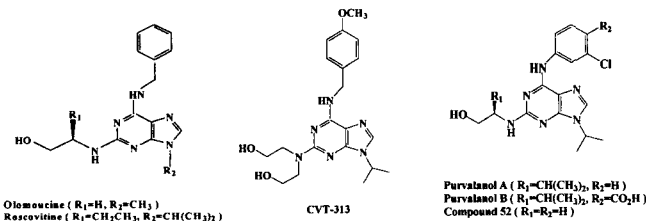
이들 저해제들은 CDK의 ATP-binding pocket에서 ATP와

경쟁적 저해(competitive inhibition)를 하는 것으로 확인되었다. 이 중에서도 olomoucine과 그 유도체, butyrolactone, flavopiridol 그리고 toyocamycin 유도체들은 CDK 이외의 kinases에는 활성이 거의 없는, 즉 CDK에 대한 강한 선택적 활성(specificity)을 보이는 반면, 위에서 언급된 나머지 저해제들은 그러한 선택성이 없다¹⁸⁻²⁰. 이제부터 강한 선택성을 보이는 4가지의 저해제 그룹에 대하여 좀더 자세히 알아보도록 한다.

• **Olomoucine, roscovitine, CVT-313 그리고 purvalanol**

최초로 발굴된 Cdc2(Cdk1) 저해제는 6-dimethyl aminopurine (DMAP; IC₅₀=120μM)이었으며, 이 물질은 세포의 단백질 합성은 전혀 억제하지 않으면서 세포의 mitosis를 중지시키는 활성을 보였다²¹⁻²³. 이 DMAP로부터 좀 더 활성이 강한 유도체가 합성되었으며, 그 중 가장 우수한 물질이 olomoucine이었다²⁴⁻²⁵. 이 olomoucine의 특징은 강력한 Cdc2 저해력(IC₅₀= 7 μM)이며, 동시에 강한 선택성이다. 즉 Cdc2, Cdk2, Cdk5 그리고 MAP kinase에 대해서는 μM 단위의 활성을 보이는 반면 나머지 CDK에 대해서는 거의 활성이 없을 정도이다. 이외에도 olomoucine의 특이한 저해활성기전이 많이 보고되어있다²⁶. 따라서 이 olomoucine은 강력한 후보물질로 대두되고 있으나, 암세포의 세포주기를 중지시킨 것이 apoptosis와 연관이 되는가의 여부는 좀 더 면밀히 연구되어야 할 것이다.

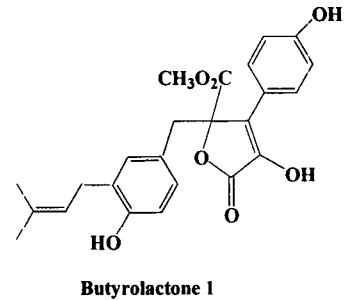
또 다른 퓨린계열의 물질로서 roscovitine을 꼽을 수 있는데, olomoucine에 비해 Cdc2 억제 활성이 10배 이상 강력하며, CDK 저해 기전은 olomoucine과 동일한 것으로 규명되었다^{27,28}. 그 외에도 Cdc2 억제 활성이 roscovitine에 버금가는 유사구조의 약물로 CVT-313을 들 수 있으며²⁹, Cdc2가 아닌 Cdk2의 억제를 목표로 발굴된 대표적인 약물로는 purvalanol A와 B가 있다³⁰. 특히 purvalanol B는 Cdk2/cyclin A 억제 활성(*in vitro*)이 olomoucine에 비해 약 1,000배가 우수하다.



• **Butyrolactone**

Butyrolactone은 olomoucine 등과는 달리 *Aspergillus terreus* var. *africanus* IFO8835의 배양액으로부터 분리된 미생물 2차 대사 산물이다³¹. 위에서 언급된 DMAP 유래 물질들과 같이, butyrolactone도 Cdk4에 대해서는 저해력이 없으나, Cdk2와 Cdc2에 대해 선택적인 저해활성을 보이는 물질이며, human WI-38 cell line을 이용한 *in vitro* 실험에서 pRb의 인

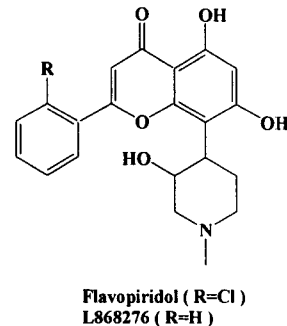
산화를 억제하여, 세포주기의 G1 phase arrest를 유발하는 것이 확인되었다^{18,32}. 그러나 이 세포주를 미리 digitonin으로 처리한 뒤에 butyrolactone을 처리하면, 세포 침투성(cell permeability)이 매우 저하되어 활성이 급격히 줄어든다는 단점이 등장하기도 한다³³. Butyrolactone을 사용하여 몇 가지 폐암 세포주에 대한 *in vitro* 항암 활성 결과들이 많이 보고되어 있어 의약품으로의 개발 가능성이 기대되고 있는 상황이다³³⁻³⁵.



• **Flavopiridol(L86-8275)**

Flavopiridol은 인도에서 자생하는 *Dysoxylum binectariferum* 이란 식물의 줄기로부터 분리된 천연 알칼로이드의 유도체 합성을 통해 만들어진 물질이다³⁶. 이 물질은 처음엔 EGF 수용체형 tyrosine kinase 저해제 스크리닝을 통해 발굴되었으나 (IC₅₀=21μM), 나중에 Cdk4를 포함한 몇몇 CDKs 저해활성이 더 우수하다는 사실이 규명되었다. 이 물질도 역시 Cdk2의 ATP binding pocket에서 ATP와 경쟁적으로 작용한다고 보고되고 있다³⁷.

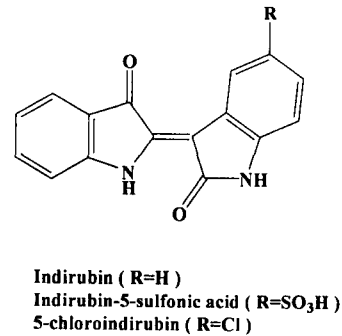
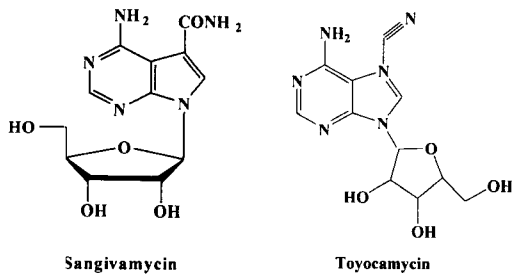
Flavopiridol도 퓨린계 물질들과 동일하게 세포에 처리하게 되면, 세포주기의 G1, G2 phase arrest를 유발시키며³⁶, 유방암 세포주인 MCF7 및 기타 다양한 암 세포주에 대해 강력한 성장억제를 보이는 것이 광범위하게 보고되고 있다³⁹⁻⁴². 특히 이 flavopiridol은 다른 물질들과는 달리 항암제로의 개발을 위한 임상실험 중에 있음은 매우 고무적인 상황이다^{43,44}.



• **Toyocamycin, Sangivamycin**

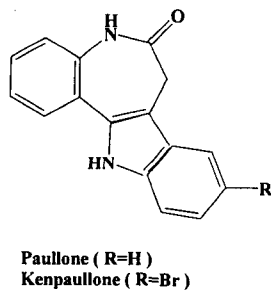
Toyocamycin과 sangivamycin은 1996년 저자가 발굴한 천연 물질이다. 이 물질은 토양으로부터 분리한 방선균인 *Streptomyces* sp. LPL931의 발효액에서 정제한 것으로, 단지

Cdk2와 Cdc2(Cdk1)에 대해서 상당한 선택적 활성($IC_{50} = 0.88 \mu\text{M}/\text{Cdc2}$, $5.1 \mu\text{M}/\text{Cdk2}$)을 갖는 물질이다⁴⁵. 이 물질은 염기(base)와 당(sugar)으로 구성된 D-form의 뉴클레오사이드 계열의 물질이다. 단지 암 세포주를 이용한 *in vitro* 연구에서 세포 통과성이 상당히 저조하여, 후보약물로서의 자격 기준에 미달이란 것이 최대의 약점이었다. 따라서 그들의 유도체 연구를 계속하여, 최근엔 세포 통과성 및 저해 활성이 월등히 향상된 L-form의 새로운 물질을 개발하였다⁴⁶. L-toyocamycin은 protein kinase A, protein kinase C, casein kinase II에 대한 활성보다 Cdc2에 대한 활성이 33, 10, 42배 였으며, L-sangivamycin의 경우엔 71, 9, 59배의 활성을 보였다.



• Paullone

위에서 언급한 바 있는 flavopiridole의 성공 사례에 자극을 받아, 미국의 National Cancer Institute의 computer-based algorithm COMPARE에서는 flavopiridole-like activities를 갖는 물질들을 연구하기 시작하였으며, 그 결과 paullone 및 그의 유도체들을 발굴하였다. 특히 kenpaullone(9-bromopaullone)은 Cdk1/cyclin B, Cdk2/cyclin A 그리고 Cdk2/cyclin E에 대한 IC_{50} 값이 각각 $0.4 \mu\text{M}$, $0.68 \mu\text{M}$ 그리고 $7.5 \mu\text{M}$ 인 매우 우수한 물질이다. 그러나 Cdk4/cyclin D1에 대한 IC_{50} 값은 그 보다는 훨씬 약한 $100 \mu\text{M}$ 이었다⁶⁹. 즉 Cdk에 대한 상당한 선택성이 있는 물질이다. 더욱이 Cdk2의 crystal structure를 이용한 molecular modeling studies를 통해, paullones는 Cdk2의 ATP-binding domain 외의 구역에서 Cdk2와 반응하여, ATP-binding site에서 competitive하게 활성을 억제하는 것으로 보고되었다. 흥미로운 것은 그의 유도체인 kenpaullone은 이와는 달리, ATP-binding pocket에서의 경쟁적 저해 기전은 약한 것으로 밝혀졌다. 지금 그의 정확한 작용 site에 대한 연구가 한창 진행 중이다.



• Indirubin

전통적으로 중국에서 myelocytic leukemia의 치료에 사용하고 있는 Danggui, Longhui, Wan으로부터 indigo-isomer인 indirubin이 발굴되었다⁷⁰. Indirubin 및 그의 유도체들은 cell cycle의 late G1과 G2/M phase에서 arrest를 유도하며, 이는 Cdk 및 Rb phosphorylation의 억제에 의한 것임이 규명되었다. Indirubin은 거의 모든 Cdk에 대해 거의 동일한 활성 ($IC_{50}=10 \mu\text{M}$)을 보였으며, X-ray crystallographic studies로 olomoucine, roscovitine과 같이 ATP-binding site에 관여한다는 사실이 보고되었다.

3.2 CDKs의 저해 단백질(CKI)

CKI가 발견된 이래 지금까지, 많은 연구자들에 의해 암세포의 과도성장을 유발하는 CDK의 억제를 위해, 이 CKI를 유용하게 활용할 수 있을 것인가에 대해 다양한 관점에서 검토되어 왔다. 결국 adenoviral vector를 이용하여 CKI 유전자의 세포전달 및 발현법이 확립되어, CDK를 억제하기 위한 CKI의 활용에 한 걸음 다가설 수 있게 되었다. 이러한 성공적 결과는 몇 종류의 폐암 세포주에 대표적인 CKI인 p16을 도입시킨 결과, cell cycle의 S phase로의 진입이 억제됨(G1 phase arrest)과 동시에 세포의 성장도 정지된 연구 결과를 통해 입증되었다⁴⁷. 또한 아데노바이러스를 이용해 p16을 도입시킨 암 세포주를 통한 *in vivo* 실험에서도, p16의 발현과 세포의 성장억제가 확인되기도 하였다.

이러한 adenovirus-mediated p16 발현 실험을 통해 얻은 특이한 결과는 암세포주에 정상적인 pRb가 존재하는 경우에는 p16의 도입으로 성장이 억제되지만, Rb 유전자가 결손 또는 변이된 세포주에서는 성장 억제를 관찰할 수 없었다는 것이다⁴⁸⁻⁵¹. 또한 더욱 흥미로운 사실은 위의 두 경우에서 모두, p16의 발현에도 불구하고 암세포주의 계획된 사멸(apoptosis)은 일어나지 않았다는 점이다. 그러나 p16과 p53을 동시에 co-infection시킨 아데노바이러스 연구 결과에선 암세포주의 확실한 apoptosis를 확인할 수 있었다⁵².

또한 p21, p27의 경우에도 아데노바이러스 감염실험을 통해 암세포주의 성장 억제가 *in vitro*와 *in vivo*에서 모두 확인되었으며^{49,53-59}, p16의 경우와는 달리 p27의 아데노바이러스 감염

in vitro 실험에서는 apoptosis의 발생이 보고되었다^{60,61}. 그러나 유감스럽게도 그러한 현상이 CDK의 억제에 의해서 유발되었는지는 증명하지 못했다. 그러나 결론적으로 p16, p21 그리고 p27의 아데노바이러스를 이용한 항암 유전자 치료법이 실제적으로 활용될 수 있는 가능성이 제시되었다는 점에서 매우 고무적이라 할 수 있다.

3.3 CDKs의 저해 small peptide mimics

CKI의 대표적인 단백질인 p16과 p21의 small peptide mimic도 역시 강력한 암세포의 성장억제를 유발한다는 사실이 규명되자, 이들 peptides를 어떻게 하면 살아있는 암세포 속으로 도입시킬 수 있는가 하는 문제에 봉착하게 되었고, 많은 연구자들의 연구 결과 그 해결책이 얻어지게 되었다. 그 중 가장 보편적으로 인정 받는 방법은 초파리의 antennapedia protein 중의 16개의 아미노산 서열이 세포의 세포막투과 기능이 있음이 규명되었고, 이 아미노산 서열에 p16의 small peptide mimics를 인위적으로 융합 시킨 fused peptide를 합성하였다. 이 융합 peptide를 암세포에 처리하게 되면, 세포 내로 자연스럽게 도입되며 동시에 Cdk4, 6를 저해 함으로서 G1 arrest와 암세포의 노화(senescence)를 야기시킨다는 연구결과가 보고되었다⁶²⁻⁶⁵. 또한 p21의 경우에도 위와 동일한 실험 결과, 암세포의 Cdk4/cyclin D complex를 강력히 저해하여 G1 arrest와 노화를 유발한 결과도 보고되었다⁶⁶⁻⁶⁸.

이러한 단백질 공학을 응용한 유전자 치료가 궤도에 이를 경우에, 효과적인 항암치료 분야의 새 장이 열릴 것이라는 기대감이 점차 확산되고 있으며, 현재의 화학요법 및 방사선 치료가 갖고 있는 필연적인 많은 부작용들이 사라질 날이 멀지 않았음을 기대한다.

4. 참고 문헌

- Morgan DO, Fisher RP, Espinoza FH et al: Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases. *Cancer J Sci Am* 1998; 4(Suppl 1): S77-83.
- Arellano M, Moreno S: Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 559-573.
- Lees E: Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 773-780.
- Morgan DO: Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374: 131-134.
- Norbury C, Nurse P: Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 441-470.
- Elledge SJ: Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996; 274: 1664-1672.
- Nasmyth K: Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 1996; 274: 1643-1645.
- Nasmyth K: At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet* 1996; 12: 405-412.
- Nurse P, Masui Y, Hartwell L: Understanding the cell cycle. *Nat Med* 1998; 4: 1103-1106.
- Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH: When checkpoints fail. *Cell* 1997; 88: 315-321.
- Peeper DS, Bernards R: Communication between the extracellular environment, cytoplasmic signalling cascades and the nuclear cell-cycle machinery. *FEBS Lett* 1997; 410: 11-16.
- Peeper DS, Upton TM, Ladha MH et al: Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature* 1997; 386: 177-181.
- Lavoie JN, Rivard N, L'Allemain G et al: A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog Cell Cycle Res* 1996; 2: 49-58.
- Aktas H, Cai H, Cooper GM: Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3850-3857.
- Hall M, Peters G: Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996; 68: 67-108.
- Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-1677.
- Weinberg RA: How cancer arises. *Sci Am* 1996; 275: 62-70.
- Meijer L: Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol* 1996; 6: 393-397.
- Ohashi M, Sugikawa E, Nakanishi N: Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 819-827.
- Nomoto T, Nishio K, Saijo N: Cell cycle regulation by anticancer agent. *Gan To Kagaku Ryoho* 1995; 22: 1719-1723.
- Rebhun LI, White D, Sander G et al: Cleavage inhibition in marine eggs by puromycin and 6-dimethylaminopurine. *Exp Cell Res* 1973; 77: 312-318.
- Neant I, Guerrier P: 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp Cell Res* 1988; 176: 68-79.
- Meijer L, Pondaven P: Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp Cell Res* 1988; 174: 116-129.
- Rialet V, Meijer L: A new screening test for antimetabolic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34cdc2/cyclin Bcdc13, affinity-immobilized on p13suc1-coated microtitration plates. *Anticancer Res* 1991; 11: 1581-1590.
- Vesely J, Havlicek L, Strnad M et al: Inhibition of

- cyclindependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 771-786.
26. Schulze-Gahmen U, Brandsen J, Jones HD et al: Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins* 1995; **22**: 378-391.
 27. Havlicek L, Hanus J, Vesley J et al: Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem* 1997; **40**: 408-412.
 28. De Azevedo WF, Lecelrc S, Meijer L et al: Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 1997; **243**: 518-526.
 29. Brooks EE, Gray NS, Joly A et al: CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 29207-29211.
 30. Gray NS, Wodicka L, Thunnisen AM et al: Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* 1998; **281**: 533-538.
 31. Kitagawa M, Okabe T, Ogino H et al: Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* 1993; **8**: 2425-2432.
 32. Kitagawa M, Higashi H, Takahashi IS et al: A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. *Oncogene* 1994; **9**: 2549-2557.
 33. Nishio K, Ishida T, Arioka H et al: Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 1996; **16**: 3387-3395.
 34. Wada M, Hosotani R, Lee et al: An exogenous cdk inhibitor, butyrolactone-I, induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 1998; **18**: 2559-2566.
 35. Yamamoto H, Monden T, Miyoshi H et al: Cdk2/cdc2 expression in colon carcinogenesis and effects of cdk2/cdc2 inhibitor in colon cancer cells. *Int J Oncol* 1998; **13**: 233-239.
 36. Hans Harald Sedlacek JC, Naik R, Kaur G et al: Flavopiridol(L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int J Oncol* 1996; **9**: 1143-1168.
 37. De Azevedo WF Jr, Muller-Dieckmann -HJ, Schulze-Gahmen U et al: Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2735-2740.
 38. Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA et al: Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase(CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 2973-2978.
 39. Patel V, Senderowicz AM, Pinto D et al: Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1674-1681.
 40. Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S et al: Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**: 1736-1740.
 41. Drees M, Dengler WA, Roth T et al: Flavopiridol(L86-8275): selective antitumor activity in vitro and activity in vivo for prostate carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 273-279.
 42. Bible KC, Kaufmann SH: Flavopiridol: a cytotoxic flavone that induces cell death in noncycling A549 human lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 4856-4861.
 43. Wright J, Blatner GL, Cheson BD: Clinical trials referral resource. Clinical trials of flavopiridol. *Oncology* 1998; **12**: 1018, 1023-1014.
 44. Senderowicz AM, Headlee D, Stinson SF et al: Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 2986-2999.
 45. Park SG, Lee CH, Lee SK et al: A specific inhibitor of CDC2 and CDK2. *Mol. Cells* 1996; **6**: 679-683.
 46. Chun MW, Lee CH, Lee SK et al: Synthesis of L-sangivamycin and toyocamycin analogues and their inhibitory activities of ser/thr protein kinases. *Nucleos Nucleot* 1999; **4&5**: 617-618.
 47. Jin X, Nguyen D, Zhang WW et al: Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector. *Cancer Res* 1995; **55**: 3250-3253.
 48. Chintala SK, Fueyo J, Gomez-Manzano C et al: Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer suppresses glioma invasion in vitro. *Oncogene* 1997; **15**: 2049-2057.
 49. Craig C, Wersto R, Kim M et al: A recombinant adenovirus expressing p27Kip1 induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 1997; **14**: 2283-2289.
 50. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK et al: Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer induces growth arrest and modifies the transformed phenotype of glioma cells. *Oncogene* 1996; **12**: 103-110.
 51. Frizelle SP, Grim J, Zhou J et al: Re-expression of p16INK4a in mesothelioma cells results in cell cycle arrest, cell death, tumor suppression and tumor regression. *Oncogene* 1998; **16**: 3087-3095.
 52. Sandig V, Brand K, Herwig S et al: Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to

- induce apoptotic tumor cell death. *Nat Med* 1997; **3**: 313-319.
53. Chen J, Willingham T, Shuford M et al: Effects of ectopic overexpression of p21(WAF1/CIP1) on aneuploidy and the malignant phenotype of human brain tumor cells. *Oncogene* 1996; **13**: 1395-1403.
 54. Eastham JA, Hall SJ, Sehgal I et al: In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 5151-5155.
 55. Gotoh A, Kao C, Ko SC et al: Cytotoxic effects of recombinant adenovirus p53 and cell cycle regulator genes(p21 WAF1/CIP1 and p16CDKN4) in human prostate cancers. *J Urol* 1997; **158**: 636-641.
 56. Joshi US, Dergham ST, Chen YQ et al: Inhibition of pancreatic tumor cell growth in culture by p21WAF1 recombinant adenovirus. *Pancreas* 1998; **16**: 107-113.
 57. Joshi US, Chen YQ, Kalemkerian GP et al: Inhibition of tumor cell growth by p21WAF1 adenoviral gene transfer in lung cancer. *Cancer Gene Ther* 1998; **5**: 183-191.
 58. Katayose D, Wersto R, Cowan KH et al: Effects of a recombinant adenovirus expressing WAF1/Cip1 on cell growth, cell cycle, and apoptosis. *Cell Growth Differ* 1995; **6**: 1207-1212.
 59. Yang ZY, Perkins ND, Ohno T et al: The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo. *Nat Med* 1995; **1**: 1052-1056.
 60. Wang X, Gorospe M, Huang Y et al: p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene* 1997; **15**: 2991-2997.
 61. Katayose Y, Kim M, Rakkar AN et al: Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997; **57**: 5441-5445.
 62. McConnell BB, Starborg M, Brookes S et al: Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* 1998; **8**: 351-354.
 63. Fahraeus R, Paramio JM, Ball KL et al: Inhibition of pRb phosphorylation and cell-cycle progression by a 20-residue peptide derived from p16CDKN2/INK4A. *Curr Biol* 1996; **6**: 84-91.
 64. Fahraeus R, Lain S, Ball KL et al: Characterization of the cyclin dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumour suppressor molecule. *Oncogene* 1998; **16**: 587-596.
 65. Kato D, Miyazawa K, Ruas M et al: Features of replicative senescence induced by direct addition of antennapedia-p16INK4A fusion protein to human diploid fibroblasts. *FEBS Lett* 1998; **427**: 203-208.
 66. Ball KL, Lain S, Fahraeus R et al: Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1. *Curr Biol* 1997; **7**: 71-80.
 67. Bonfanti M, Taverna S, Salmona M et al: p21WAF1-derived peptides linked to an internalization peptide inhibit human cancer cell growth. *Cancer Res* 1997; **57**: 1442-1446.
 68. Colas P, Cohen B, Jessen T et al: Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 1996; **380**: 548-550.
 69. Zaharevitz DW, Gussio R, Loest M et al: Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res* 1999; **59**: 2566-2569.
 70. Wu GY and Fang FD: Studies on the mechanism of indirubin action in the treatment of chronic granulocytic leukemia. *Chung Kuo I Hsueh Yuan Husueh Pao* 1980; **2**: 83-87.