



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0131196
(43) 공개일자 2024년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/64 (2017.01) A61K 41/00 (2020.01)
A61K 49/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/643 (2017.08)
A61K 41/0057 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0024648
(22) 출원일자 2023년02월23일
심사청구일자 2023년02월23일

(71) 출원인
주식회사 키텍바이오
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 ,에이동410
호(대현동, 이화여자대학교종합과학관)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호 (서빙
고동, 신동 아아파트)
김관묵
인천광역시 연수구 인천타워대로 253-25, 101동
3708호(송 도동, 아트원 푸르지오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

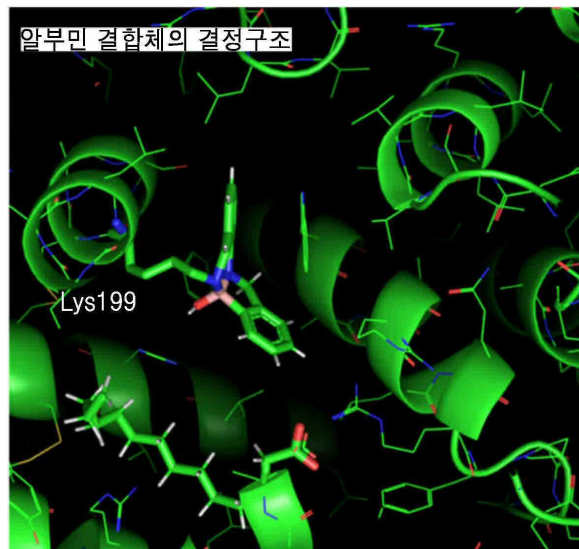
(54) 발명의 명칭 알부민 결합체, 이의 제조 방법 및 이를 포함한 암 진단 또는 치료용 조성물

(57) 요약

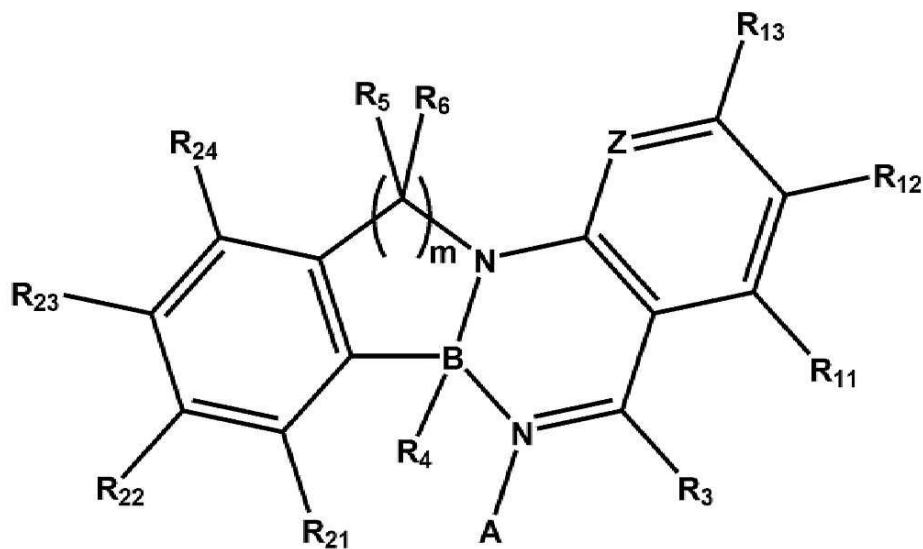
화학식 1로 표시된 알부민 결합체가 제공된다:

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



<화학식 1>



화학식 1 중,

A는 알부민 중 아민기를 제외한 그룹이고,

Z, R₁₁ 내지 R₁₄, R₂₁ 내지 R₂₄ 및 R₃ 내지 R₆ 및 m 각각은 본 명세서에 기재된 바를 참조한다.

(52) CPC특허분류

A61K 49/0021 (2023.08)

A61K 49/0056 (2013.01)

(72) 발명자

차선신

서울특별시 서대문구 증가로 150, 108동 503호 (남
가좌동, DMC센트럴아이파크)

김경미

서울특별시 강서구 강서로18길 71,1층 (화곡동)

양 멍야오

서울특별시 서대문구 봉원사길 9-1 (대신동)

쉬르바테 무케시 에크나트

서울시 서대문구 봉원사 길 41-15, 지하1층

김유진

서울특별시 양천구 목동로 212, 725동 105호(목동,
목동신 시가지아파트7단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711155438
 과제번호 2022R1A2C3005420
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 이미징 유도 치료를 위한 스마트 유기 감응제 연구
 기 여 율 50/100
 과제수행기관명 이화여자대학교
 연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711166370
 과제번호 2021R1A2C2014341
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 형광과 광학활성을 유도하는 신개념의 생물직교 클릭프로브의 개발 및 응용
 기 여 율 20/100
 과제수행기관명 이화여자대학교
 연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345347440
 과제번호 2021R1A6A1A10039823
 부처명 교육부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 이공학학술연구기반구축
 연구과제명 기초과학연구소
 기 여 율 13/100
 과제수행기관명 이화여자대학교
 연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485018426
 과제번호 ARQ202101660002
 부처명 환경부
 과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원
 연구사업명 생태모방기반환경오염관리기술개발
 연구과제명 저가 전이금속 광촉매에 의한 온실가스의 개미산 전환을 위한 경제적 반응시스템 및

공정 개발

기 여 율 17/100
 과제수행기관명 (주)키텍바이오
 연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

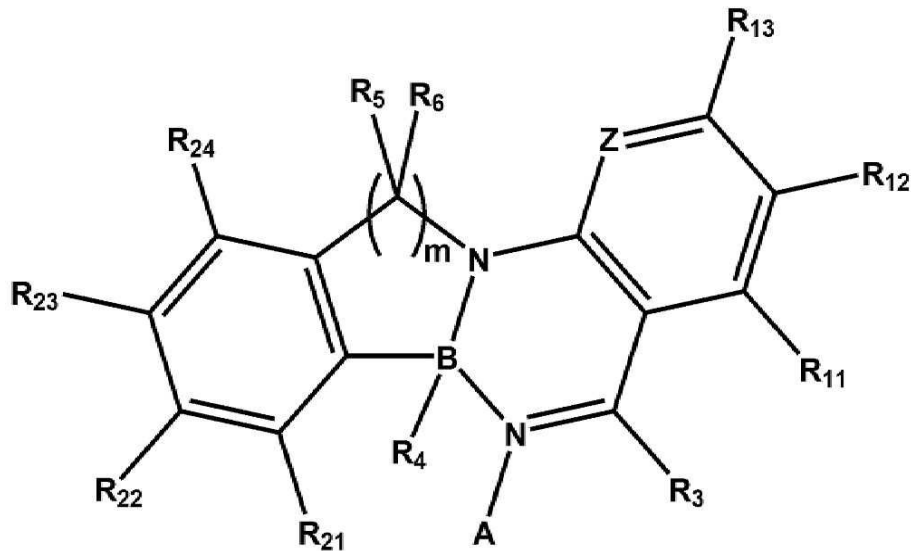
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시된 알부민 결합체:

<화학식 1>



상기 화학식 1 중,

A는 알부민 중 아민기를 제외한 그룹이고,

Z는 N, O 또는 C(R₁₄)이고,

R₁₁ 내지 R₁₄, R₂₁ 내지 R₂₄ 및 R₃ 내지 R₆은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 포밀기, 카르복실기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬기, 치환 또는 비치환된 C₂-C₁₀알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₂-C₁₀알키닐기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₂₀알콕시기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₂₀헤테로아릴기, Si(Q₁)(Q₂)(Q₃), -N(Q₁)(Q₂), -B(Q₁)(Q₂), -C(=O)(Q₁), -S(=O)₂(Q₁) 및 -P(=O)(Q₁)(Q₂) 중에서 선택되고,

선택적으로 i) R₁₁과 R₁₂, ii) R₁₂와 R₁₃, iii) R₁₃과 R₁₄, iv) R₂₁과 R₂₂, v) R₂₂와 R₂₃, vi) R₂₃과 R₂₄, 또는 vii) 이의 임의의 조합은 서로 결합하여 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀카보시클릭 그룹 또는 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클릭 그룹을 형성하고,

m은 1 내지 5 중에서 선택된 정수이고,

Q₁ 내지 Q₃은 서로 독립적으로,

수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기; 및

수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C₁-C₁₀알킬기, C₂-C₁₀알케닐기, C₂-C₁₀알키닐기, C₁-C₁₀알콕시기,

C_3 - C_{10} 시클로알킬기, C_1 - C_{10} 헤테로시클로알킬기, C_3 - C_{10} 시클로알케닐기, C_1 - C_{10} 헤테로시클로알케닐기, C_6 - C_{20} 아릴기 및 C_1 - C_{20} 헤테로아릴기 중에서 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아민기는 라이신(lysine)에 포함된 아민기인, 알부민 결합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아민기는 상기 알부민의 SS1 사이트에 위치한, 알부민 결합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 알부민 결합체는 인간 혈청 알부민(human serum albumin) 또는 송아지 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 포함한, 알부민 결합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화학식 1 중,

m은 1인, 알부민 결합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 알부민 결합체는 형광 특성을 갖는, 알부민 결합체.

청구항 7

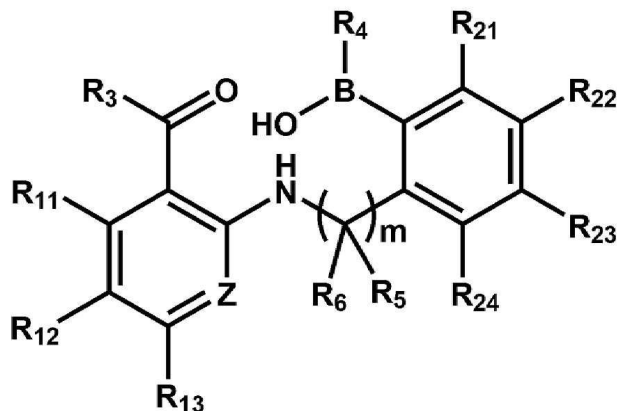
제1항에 있어서,

상기 알부민 결합체는 광 조사 하에 활성 산소종을 생성하는, 알부민 결합체.

청구항 8

하기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물과 알부민을 반응시키는 단계를 포함한, 알부민 결합체의 제조 방법:

<화학식 2>



상기 화학식 2 중,

Z는 N, O 또는 $C(R_{14})$ 이고,

R_{11} 내지 R_{14} , R_{21} 내지 R_{24} 및 R_3 내지 R_6 은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 포밀기, 카르복실기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10} 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10} 알키닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10} 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10} 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20} 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20} 아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20} 아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20} 헤테로아릴기, $Si(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-N(Q_1)(Q_2)$, $-B(Q_1)(Q_2)$, $-C(=O)(Q_1)$, $-S(=O)_2(Q_1)$ 및 $-P(=O)(Q_1)(Q_2)$ 중에서 선택되고,

선택적으로 i) R_{11} 과 R_{12} , ii) R_{12} 와 R_{13} , iii) R_{13} 과 R_{14} , iv) R_{21} 과 R_{22} , v) R_{22} 와 R_{23} , vi) R_{23} 과 R_{24} , 또는 vii) 이의 임의의 조합은 서로 결합하여 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10} 카보시클릭 그룹 또는 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 헤테로시클릭 그룹을 형성하고,

m 은 1 내지 5 중에서 선택된 정수이고,

Q_1 내지 Q_3 은 서로 독립적으로,

수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기; 및

수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_1-C_{10} 알킬기, C_2-C_{10} 알케닐기, C_2-C_{10} 알키닐기, C_1-C_{10} 알콕시기, C_3-C_{10} 시클로알킬기, C_1-C_{10} 헤테로시클로알킬기, C_3-C_{10} 시클로알케닐기, C_1-C_{10} 헤테로시클로알케닐기, C_6-C_{20} 아릴기 및 C_1-C_{20} 헤테로아릴기 중에서 선택된다.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 붕소 함유 화합물과 알부민을 반응시키는 단계는 개체의 체외에서 수행되는, 제조 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 붕소 함유 화합물과 알부민을 반응시키는 단계는 개체의 혈액 내에서 수행되는, 제조 방법.

청구항 11

제1항의 알부민 결합체를 포함한 암 진단 또는 치료용 조성물.

청구항 12

제8항의 붕소 함유 화합물을 포함한 암 진단 또는 치료용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 알부민 결합체는 형광 특성을 갖는, 암 진단 또는 치료용 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 알부민 결합체는 활성 산소종 생성 특성을 갖는, 암 진단 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 알부민 결합체, 이의 제조 방법 및 이를 포함한 암 진단 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 혈청 알부민(human serum albumin, 이하 HSA)은 인체 혈액 중에 약 35g/L 내지 약 55g/L로 존재하며 생명 활동에 필요한 물질을 전달하는 역할을 수행할 수 있다. 알부민은 약 19일의 반감기를 가진 안정한 단백질이다. 암(암세포 및/또는 암조직)은 성장에 필요한 영양분을 알부민을 통해 공급받을 수 있다. 암은 알부민을 이용하기 위해 gp18, gp60, SPARC와 같은 알부민 수용체를 가질 수 있다. 암은 알부민 수용체를 통해 알부민을 끌어들이 수 있어, 암이 성장할 때 혈액 내 알부민 농도가 감소될 수 있다. 이러한 특성을 이용해, 항암제를 암세포 및/또는 암조직에 전달하기 위하여, 항암제를 알부민에 결합하는 것에 대한 연구가 지속되었다.

[0003] 아브락산은 알부민과 항암제(예를 들어, 파클리탁셀)를 단순 혼합한 물질이다. 알부민과 단순 혼합된 항암제는 초기에 과도하게 방출될 수 있고, 알부민과 항암제의 결합 방식을 제어할 수 없으므로 재현성을 확보하기 어렵다는 문제가 있다.

[0004] 알부민과 항암제(예를 들어, 독소루비신)를 공유 결합시키기 위해, 말레이마이드(maleimide)가 적용될 수 있다. 항암제와 결합된 말레이마이드는 알부민의 시스테인-34 사이트에서 -SH와 공유 결합한다. 다만, 말레이마이드는 pH에 따라 불안정하고, 알부민의 시스테인-34 사이트에 위치한 -SH는 산화(예를 들어, 개체의 체외에서)될 수 있다는 문제가 있다. 말레이마이드는 고리 구조가 불안정하여 시간이 지남에 따라 분해되는 성질이 있는 문제가 있다. 따라서, 알부민과 항암제를 안정적으로 결합시키는 것에 대한 요구가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 측면은 고재현성 및 고안정성을 갖는 항암제와 알부민의 결합체를 제공하는 것이다.

[0006] 일 측면은 암 진단 또는 치료에 사용할 수 있는 알부민 결합체를 제공하는 것이다.

[0007] 다른 측면은 상기 알부민 결합체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

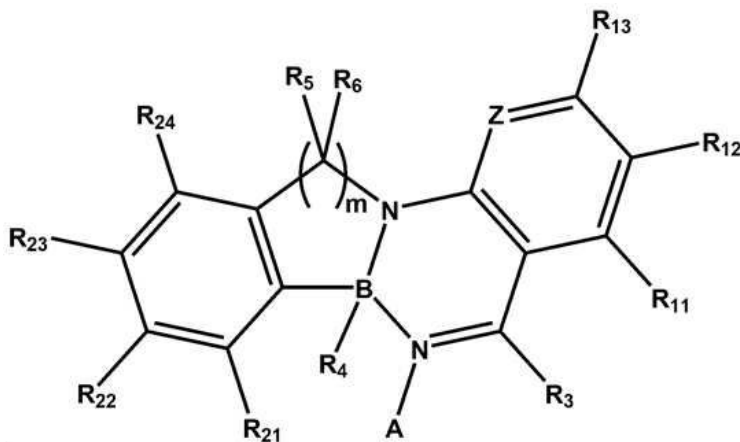
[0008] 또 다른 측면은 상기 알부민 결합체를 포함한 암 진단 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 측면은 붕소 함유 화합물을 포함한 암 진단 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 알부민 결합체가 개시된다:

[0011] <화학식 1>



[0012]

[0013] 상기 화학식 1 중,

[0014] A는 알부민 중 아민기를 제외한 그룹이고,

[0015] Z는 N, O 또는 C(R₁₄)이고,

[0016] R_{11} 내지 R_{14} , R_{21} 내지 R_{24} 및 R_3 내지 R_6 은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 포밀기, 카르복실기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2 - C_{10} 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2 - C_{10} 알키닐기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{10} 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{10} 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 헤테로아릴기, $Si(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-N(Q_1)(Q_2)$, $-B(Q_1)(Q_2)$, $-C(=O)(Q_1)$, $-S(=O)_2(Q_1)$ 및 $-P(=O)(Q_1)(Q_2)$ 중에서 선택되고,

[0017] 선택적으로 i) R_{11} 과 R_{12} , ii) R_{12} 와 R_{13} , iii) R_{13} 과 R_{14} , iv) R_{21} 과 R_{22} , v) R_{22} 와 R_{23} , vi) R_{23} 과 R_{24} , 또는 vii) 이의 임의의 조합은 서로 결합하여 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{10} 카보시클릭 그룹 또는 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 헤테로시클릭 그룹을 형성하고,

[0018] m 은 1 내지 5 중에서 선택된 정수이고,

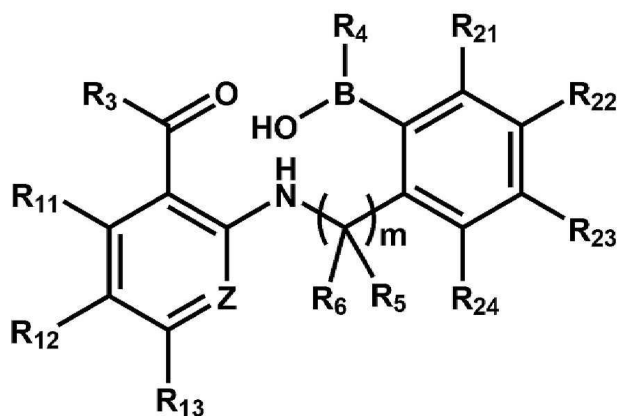
[0019] Q_1 내지 Q_3 은 서로 독립적으로,

[0020] 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기; 및

[0021] 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_1 - C_{10} 알킬기, C_2 - C_{10} 알케닐기, C_2 - C_{10} 알키닐기, C_1 - C_{10} 알콕시기, C_3 - C_{10} 시클로알킬기, C_1 - C_{10} 헤테로시클로알킬기, C_3 - C_{10} 시클로알케닐기, C_1 - C_{10} 헤테로시클로알케닐기, C_6 - C_{20} 아릴기 및 C_1 - C_{20} 헤테로아릴기 중에서 선택된다.

[0022] 다른 측면에 따르면, 하기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물과 알부민을 반응시키는 단계를 포함한, 상기 알부민 결합체의 제조 방법이 개시된다.

[0023] <화학식 2>



[0024]

[0025] 상기 화학식 2 중,

[0026] Z 는 N, O 또는 $C(R_{14})$ 이고,

[0027] R_{11} 내지 R_{14} , R_{21} 내지 R_{24} 및 R_3 내지 R_6 은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 포밀기, 카르복실기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2 - C_{10} 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2 - C_{10} 알키닐기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{10} 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{10} 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 헤테로아릴기,

$\text{Si}(\text{Q}_1)(\text{Q}_2)(\text{Q}_3)$, $-\text{N}(\text{Q}_1)(\text{Q}_2)$, $-\text{B}(\text{Q}_1)(\text{Q}_2)$, $-\text{C}(=\text{O})(\text{Q}_1)$, $-\text{S}(=\text{O})_2(\text{Q}_1)$ 및 $-\text{P}(=\text{O})(\text{Q}_1)(\text{Q}_2)$ 중에서 선택되고,

[0028] 선택적으로 i) R_{11} 과 R_{12} , ii) R_{12} 와 R_{13} , iii) R_{13} 과 R_{14} , iv) R_{21} 과 R_{22} , v) R_{22} 와 R_{23} , vi) R_{23} 과 R_{24} , 또는 vii) 이의 임의의 조합은 서로 결합하여 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{10} 카보시클릭 그룹 또는 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 헤테로시클릭 그룹을 형성하고,

[0029] m 은 1 내지 5 중에서 선택된 정수이고,

[0030] Q_1 내지 Q_3 은 서로 독립적으로,

[0031] 수소, 중수소, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기; 및

[0032] 수소, 중수소, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_1 - C_{10} 알킬기, C_2 - C_{10} 알케닐기, C_2 - C_{10} 알키닐기, C_1 - C_{10} 알콕시기, C_3 - C_{10} 시클로알킬기, C_1 - C_{10} 헤테로시클로알킬기, C_3 - C_{10} 시클로알케닐기, C_1 - C_{10} 헤테로시클로알케닐기, C_6 - C_{20} 아릴기 및 C_1 - C_{20} 헤테로아릴기 중에서 선택된다.

[0033] 또 다른 측면에 따르면, 상기 알부민 결합체 또는 상기 붕소 함유 화합물을 포함한 암 진단 또는 치료용 조성물이 개시된다.

발명의 효과

[0034] 상술한 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물은 알부민과 안정적으로 결합하여 화학식 1로 표시된 알부민 결합체를 형성할 수 있다. 상기 알부민 결합체는 개체 내의 암에 선택적으로 축적될 수 있고, 이로 인해 암세포 및/또는 암조직을 표적할 수 있다. 상기 알부민 결합체는 형광 특성을 가질 수 있고, 이로 인해 암조직을 시각화(형광 이미징)할 수 있다. 상기 알부민 결합체에 광이 조사되는 경우, 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)이 발생되어 암이 치료될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 알부민 결합체의 X-ray 결정 구조를 도시한다.

도 2는 붕소 함유 화합물에 알부민의 농도를 증가시키며 측정된 형광 세기의 변화 및 이를 기초로 산출한 해리상수를 나타낸 도면이다.

도 3a 내지 3c는 본 발명의 일 구현예에 따른 알부민 결합체에 광을 조사하여 발생하는 형광 세기를 도시한다.

도 4a 내지 4c는 붕소 함유 화합물에 광을 조사하여 발생하는 형광 세기를 도시한다.

도 5a 및 5b는 알부민 결합체 및 붕소 함유 화합물을 사용하지 않은 경우에 광을 조사하여 발생하는 형광 세기를 도시한다.

도 6은 도 3a 내지 3c, 4a 내지 4c, 5a 및 5b에 나타난 결과를 시간에 따른 특정 파장의 형광 세기 차이로 나타낸 도면이다.

도 7a 내지 7d는 붕소 함유 화합물과 혼합된 라이신의 농도에 따른 형광 세기의 차이를 나타낸 도면들이다.

도 8은 송아지 혈청 알부민 및 인간 혈청 알부민 각각을 이용한 알부민 결합체를 개체에 주사하여 형광 특성을 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9a, 9b, 10a 내지 10c는 본 발명의 일 구현예에 따른 알부민 결합체의 암 치료 능력을 평가한 결과를 나타낸 도면들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

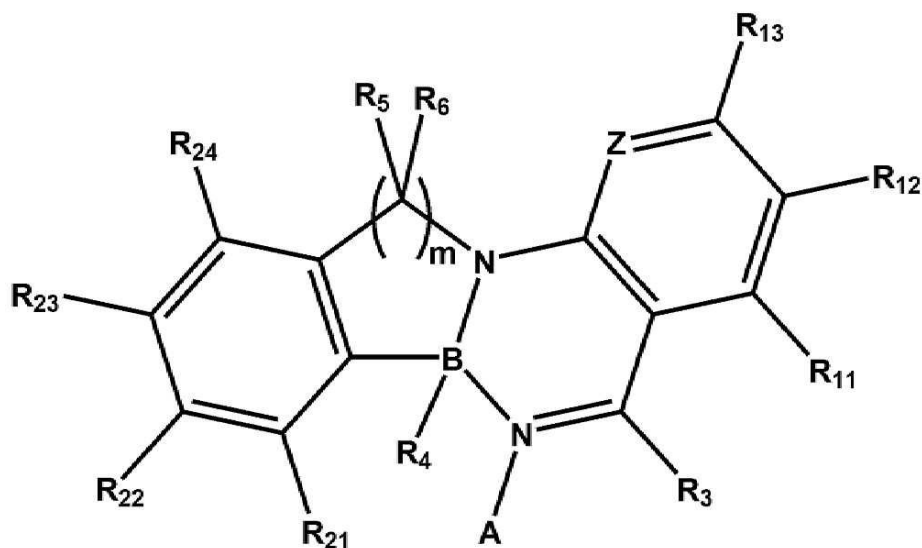
[0036] 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에 기재된 수치는 명시하지 않아도 "약"의 의미를 포함하는 것으로 간주한다.

- [0037] 본 명세서에서 용어 "포함"은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 추가 또는/및 개재할 수 있음을 나타내도록 사용된다.
- [0038] 본 명세서에서 용어 "임의의 조합"은 기재된 구성요소들 하나 이상과의 혼합 또는 조합되는 것을 의미한다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 "상호작용"은 직접 또는 간접적일 수 있고, 직접 결합을 포함하거나 또는 간접적으로 결합할 수 있으며, 결합은 다른 분자에 의해 매개될 수도 있다.
- [0040] 본 명세서에서, 치환기는 치환되지 않는 모그룹(mother group)에서 하나 이상의 수소가 다른 원자나 작용기와 교환됨에 의하여 유도된다. 다르게 기재하지 않으면, 어떠한 작용기가 "치환된"것으로 여겨질 때, 그것은 상기 작용기가 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 2 내지 40의 알케닐기, 탄소수 2 내지 40의 알킬닐기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알킬기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알케닐기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기에서 선택된 하나 이상의 치환기로 치환됨을 의미한다.
- [0041] 작용기가 "선택적으로 치환된다"고 기재되는 경우에, 상기 작용기가 상술한 치환기로 치환될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0042] 본 명세서에서, "탄소수 a 내지 b"의 a 및 b는 특정 작용기(group)의 탄소수를 의미한다. 즉, 상기 작용기는 a 부터 b까지의 탄소원자를 포함할 수 있다. 예를 들어, "탄소수 1 내지 4의 알킬렌기"는 1 내지 4의 탄소를 가지는 알킬렌기, 즉, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-(CH_3)_2C-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 및 $-(CH_3)_2C-$ 를 의미한다.
- [0043] 본 명세서에서, 본 명세서에서, "알킬"이라는 용어는 분지된 또는 분지되지 않은 지방족 탄화수소를 의미한다. 일 구현예에서 알킬기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 알킬기는 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, 펜틸기, 헥실기, 시클로프로필기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 시클로헵틸기 등을 포함하나 반드시 이들로 한정되지 않으며, 이들 각각은 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 일 구현예에서 알킬기는 1 내지 6의 탄소원자를 가질 수 있다. 예를 들어, 탄소수 1 내지 6의 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소-부틸, sec-부틸, 펜틸, 3-펜틸, 헥실 등일 수 있으나 반드시 이들로 한정되지 않는다.
- [0044] 본 명세서에서, "알케닐"이라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 의미한다. 알케닐기의 비제한적인 예로는 비닐, 알릴, 부테닐, 이소프로페닐, 또는 이소부테닐 등을 들 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서, "알킬닐"이라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 의미한다.
- [0046] 본 명세서에서, "알콕시"라는 용어는 상기 정의된 알킬기와 산소 원자가 결합된 형태로서, C_1-C_{20} 알콕시(기)를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 펜톡시, 헥실옥시, 헵실옥시, 옥틸옥시, 노닐옥시, 데실옥시, 운데실옥시, 도데실옥시, 트리데실옥시, 테트라데실옥시, 펜타데실옥시, 헥사데실옥시, 헵타데실옥시, 옥타데실옥시, 노나데실옥시, 에이코사닐옥시, 또는 이들의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 명세서에서, "시클로알킬"은 포화 탄화수소 고리를 가지는 1 개의 작용기의 형태로서, C_3-C_8 시클로알킬(기)을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵실, 시클로옥틸 또는 이들의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 명세서에서, "아릴"라는 용어는 고리 골격이 오직 탄소만을 포함하는 방향족 고리, 고리 시스템(즉, 2개의 인접하는 탄소 원자들을 공유하는 2 이상의 융합된(fused) 고리), 또는 복수의 방향족 고리가 단일결합, $-O-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-S(=O)_2-$, $-Si(Ra)(Rb)-(Ra$ 및 Rb 는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로젠으로 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 또는 $-C(=O)-NH-$ 에 의하여 서로 연결된 고리를 의미한다. 아릴기가 고리 시스템이면, 상기 시스템에서 각각의 고리는 방향족이다. 예를 들어, 아릴기는 페닐기, 비페닐기, 나프틸기, 페날트레닐기(phenanthrenyl), 나프타세닐기(naphthacenyl) 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0049] 본 명세서에서, "헤테로아릴"이라는 용어는 N, O, P 또는 S 중에서 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고,

나머지 고리원자가 탄소인 모노시클릭(monocyclic) 또는 바이시클릭(bicyclic) 유기 화합물을 의미한다. 상기 헤테로아릴기는 탄소수는 특별히 한정되지 않으나 탄소수 2 내지 60일 수 있다. 상기 헤테로아릴기는 예를 들어, 치환 또는 비치환된 이미다졸릴기, 치환 또는 비치환된 트리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 테트라졸릴기, 치환 또는 비치환된 옥사다리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 옥사트리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 싸이아트리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 벤즈이미다졸릴기, 치환 또는 비치환된 벤조트리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 피리디닐기, 치환 또는 비치환된 피리미디닐기, 치환 또는 비치환된 트리아지닐기, 치환 또는 비치환된 피라지닐기, 치환 또는 비치환된 피리다지닐기, 퀴놀린, 치환 또는 비치환된 이소퀴놀린, 치환 또는 비치환된 프탈라진, 치환 또는 비치환된 나프피리딘, 치환 또는 비치환된 퀴녹살린, 치환 또는 비치환된 퀴나졸린, 치환 또는 비치환된 아크리딘, 치환 또는 비치환된 페난트롤린 및 치환 또는 비치환된 페나진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상 또는 이들의 조합된 구조일 수 있다.

[0050] 일 측면에 따른 알부민 결합체는 하기 화학식 1로 표시된다:

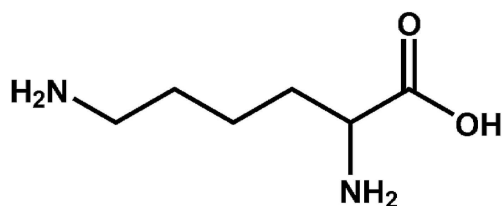
[0051] <화학식 1>



[0052]

[0053] 상기 화학식 1 중, A는 알부민 중 아민기를 제외한 그룹일 수 있다. 일 구현예에 따르면, 상기 아민기는 하기 화학식 3으로 표시된 라이신(lysine) 중 곁사슬에 포함된 아민기일 수 있다. 다른 구현예에 따르면, 상기 아민기는 하기 화학식 3으로 표시된 라이신 중 주사슬에 포함된 아민기일 수 있다.

[0054] <화학식 3>



[0055]

[0056] 일 구현예에 따르면, 상기 아민기는 상기 알부민의 SS1 사이트에 위치할 수 있다. 예를 들면, 상기 화학식 1 중 A는 상기 알부민 중 SS1 사이트에 위치한 라이신의 아민기를 제외한 모든 그룹일 수 있다. 상기 알부민의 SS1 사이트에 위치한 라이신은 라이신-199(Lysine-199 또는 Lys-199)로 지칭될 수 있다.

[0057] 일 구현예에 따르면, 상기 알부민 결합체는 인간 혈청 알부민(human serum albumin; HSA) 또는 송아지 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)을 포함할 수 있다. 즉, 상기 알부민은 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 송아지 혈청 알부민(BSA)일 수 있다.

[0058] 상기 화학식 1 중, Z는 N, O 또는 C(R₁₄)일 수 있으며 R₁₄에 대한 설명은 후술된다. 일 구현예에 따르면, Z는 C(R₁₄)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 상기 화학식 1 중, R₁₁ 내지 R₁₄, R₂₁ 내지 R₂₄ 및 R₃ 내지 R₆은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br,

-I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 포밀기, 카르복실기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬기, 치환 또는 비치환된 C₂-C₁₀알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₂-C₁₀알키닐기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₂₀알콕시기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₂₀헤테로아릴기, Si(Q₁)(Q₂)(Q₃), -N(Q₁)(Q₂), -B(Q₁)(Q₂), -C(=O)(Q₁), -S(=O)₂(Q₁) 및 -P(=O)(Q₁)(Q₂) 중에서 선택될 수 있고, Q₁ 내지 Q₃에 대한 설명은 후술된다.

[0060] 상기 화학식 1 중, 선택적으로 i) R₁₁과 R₁₂, ii) R₁₂와 R₁₃, iii) R₁₃과 R₁₄, iv) R₂₁과 R₂₂, v) R₂₂와 R₂₃, vi) R₂₃과 R₂₄, 또는 vii) i의 임의의 조합은 서로 결합하여 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀카보시클릭 그룹 또는 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클릭 그룹을 형성할 수 있다. 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중, R₁₂와 R₁₃은 서로 결합하여 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀카보시클릭 그룹 또는 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클릭 그룹을 형성할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중, R₁₁ 내지 R₁₄ 중 적어도 하나는 -F, -Cl, -Br, -I, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬기, 치환 또는 비치환된 C₂-C₁₀알케닐기 및 치환 또는 비치환된 C₁-C₂₀알콕시기 중에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중, R₂₁ 내지 R₂₄ 각각은 수소일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중, R₃은 수소, 중수소 및 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴기 중에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중, R₄는 히드록실기일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중, R₅ 내지 R₆ 각각은 수소일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

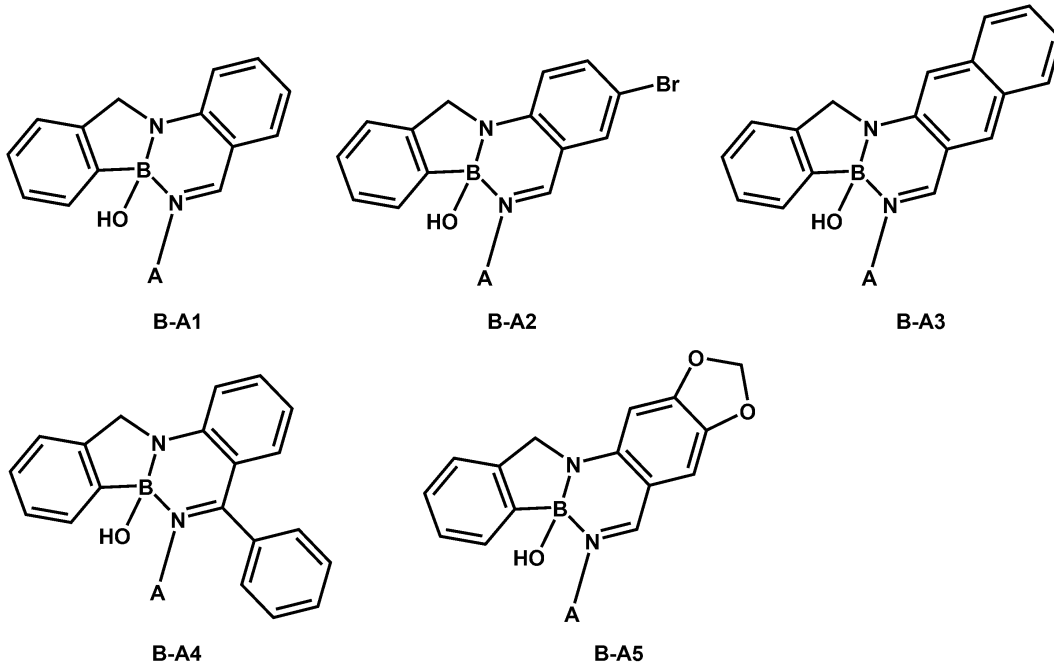
[0066] 화학식 1 중, m은 1 내지 5 중에서 선택된 정수일 수 있다. 일 구현예에 따르면, m은 1일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0067] Q₁ 내지 Q₃은 서로 독립적으로,

[0068] 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기; 및

[0069] 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기 또는 i의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C₁-C₁₀알킬기, C₂-C₁₀알케닐기, C₂-C₁₀알키닐기, C₁-C₁₀알콕시기, C₃-C₁₀시클로알킬기, C₁-C₁₀헤테로시클로알킬기, C₃-C₁₀시클로알케닐기, C₁-C₁₀헤테로시클로알케닐기, C₆-C₂₀아릴기 및 C₁-C₂₀헤테로아릴기 중에서 선택된다.

[0070] 일 구현예에 따르면, 상기 알부민 결합체는 하기 알부민 결합체 B-A1 내지 B-A5 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다:



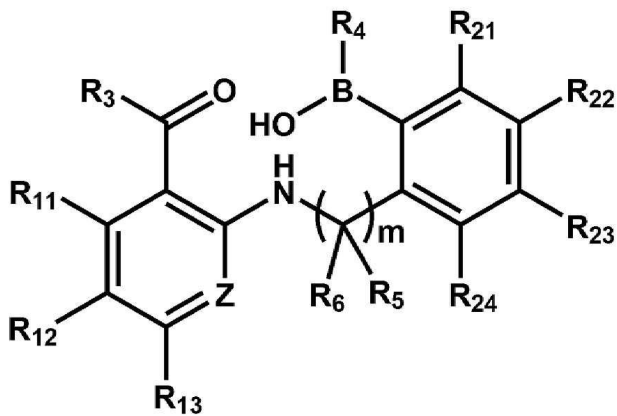
상기 알부민 결합체 B-A1 내지 B-A5 중, A는 본 명세서에 기재된 바와 동일하다.

일 구현예에 따르면, 상기 알부민 결합체는 형광 특성을 가질 수 있다.

일 구현예에 따르면, 상기 알부민 결합체는 광 조사 하에 활성 산소종을 생성할 수 있다.

다른 측면에 따르면, 하기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물과 알부민을 반응시키는 단계를 포함한, 알부민 결합체의 제조 방법이 개시된다:

<화학식 2>



상기 화학식 2 중,

Z는 N, O 또는 C(R₁₄)이고,

R₁₁ 내지 R₁₄, R₂₁ 내지 R₂₄ 및 R₃ 내지 R₆은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 포밀기, 카르복실기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀알킬기, 치환 또는 비치환된 C₂-C₁₀알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₂-C₁₀알키닐기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₂₀알콕시기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃-C₁₀시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₂₀아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C₁-C₂₀헤테로아릴기, Si(Q₁)(Q₂)(Q₃), -N(Q₁)(Q₂), -B(Q₁)(Q₂), -C(=O)(Q₁), -S(=O)₂(Q₁) 및 -P(=O)(Q₁)(Q₂) 중에서 선택되고,

[0081] 선택적으로 i) R_{11} 과 R_{12} , ii) R_{12} 와 R_{13} , iii) R_{13} 과 R_{14} , iv) R_{21} 과 R_{22} , v) R_{22} 와 R_{23} , vi) R_{23} 과 R_{24} , 또는 vii) 이의 임의의 조합은 서로 결합하여 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{10} 카보시클릭 그룹 또는 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 헤테로시클릭 그룹을 형성하고,

[0082] m 은 1 내지 5 중에서 선택된 정수이고,

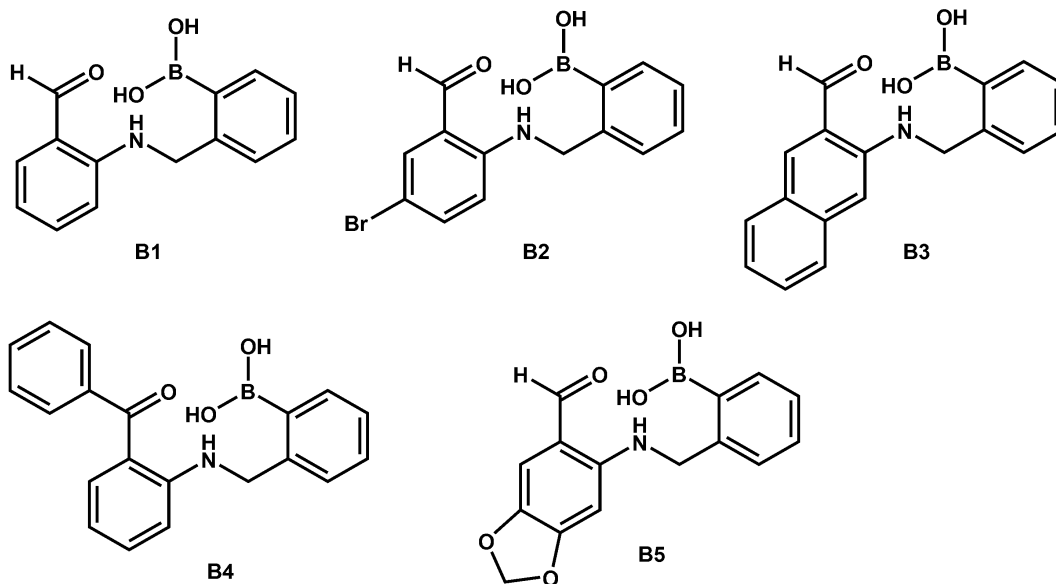
[0083] Q_1 내지 Q_3 은 서로 독립적으로,

[0084] 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기; 및

[0085] 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기 또는 이의 임의의 조합으로 치환 또는 비치환된, C_1 - C_{10} 알킬기, C_2 - C_{10} 알케닐기, C_2 - C_{10} 알키닐기, C_1 - C_{10} 알콕시기, C_3 - C_{10} 시클로알킬기, C_1 - C_{10} 헤테로시클로알킬기, C_3 - C_{10} 시클로알케닐기, C_1 - C_{10} 헤테로시클로알케닐기, C_6 - C_{20} 아릴기 및 C_1 - C_{20} 헤테로아릴기 중에서 선택된다.

[0086] 상기 화학식 2 중, Z, R_{11} 내지 R_{14} , R_{21} 내지 R_{24} 및 R_3 내지 R_6 및 m 각각에 대한 설명은 화학식 1 중, Z, R_{11} 내지 R_{14} , R_{21} 내지 R_{24} 및 R_3 내지 R_6 및 m 각각에 대한 설명을 참조한다.

[0087] 일 구현예에 따르면, 상기 붕소 함유 화합물은 하기 화합물 B1 내지 B5 중 어느 하나일 수 있다:



[0088]

[0089] 상기 알부민 결합체의 제조 방법은 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물과 인간 혈청 알부민(HSA)을 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[0090] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 2 중, 붕소(B)는 상기 알부민과 반응하여 4배위될 수 있다. 구체적으로, 3배위 붕소(B)는 알부민과 반응함으로써, 4배위 붕소(B)가 될 수 있다.

[0091] 일 구현예에 따르면, 상기 붕소 함유 화합물과 알부민을 반응시키는 단계는 개체의 체외에서 수행될 수 있다.

[0092] 일 구현예에 따르면, 상기 붕소 함유 화합물과 알부민을 반응시키는 단계는 개체의 혈액 내에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 알부민은 상기 개체의 혈액 내에 존재하고, 상기 붕소 함유 화합물을 상기 개체에 투여함으로써, 상기 붕소 함유 화합물과 상기 알부민이 반응할 수 있다. 즉, 상기 알부민 결합체는 상기 개체의 체 내에서 제조될 수 있다.

[0093] 또 다른 측면에 따르면, 상기 알부민 결합체 또는 상기 붕소 함유 화합물을 포함한 암 진단 또는 치료용 조성물이 개시된다.

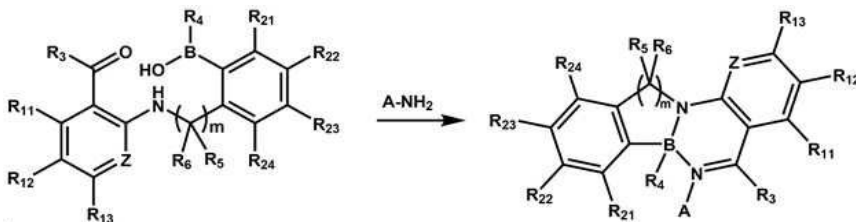
[0094] 상기 암의 예로서는 유방암, 신장암, 고환암, 전립선암, 난소암, 자궁암, 자궁 경부암, 질암, 난관암, 직장암, 폐암, 위암, 간암, 식도암, 소장암, 대장암, 구강암 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0095] 일 구현예에 따르면, 상기 알부민 결합체 또는 상기 붕소 함유 화합물은 형광 이미징 특성을 가질 수 있다. 예를 들면, 상기 알부민 결합체 또는 상기 붕소 함유 화합물은 형광을 방출하여 암(암세포 및/또는 암조직)을 시각화할 수 있다.
- [0096] 일 구현예에 따르면, 상기 알부민 결합체 또는 상기 붕소 함유 화합물은 활성 산소종 생성 특성을 가질 수 있다. 예를 들면, 상기 알부민 결합체 또는 상기 붕소 함유 화합물은 광 조사 하에 활성 산소종을 생성할 수 있다.
- [0097] 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물의 카르보닐기는 알부민의 SS1 사이트에 위치한 라이신(Lysine-199 또는 Lys-199)의 아민기와 반응하여 이민 결합을 형성할 수 있다. 이후, 이민 결합의 질소와 붕소 함유 화합물의 붕소가 결합하여 상기 화학식 1로 표시된 알부민 결합체를 형성할 수 있다.
- [0098] 상기 알부민 결합체는 상기 알부민 유래 그룹을 포함하므로, 알부민 수용체를 가진 암(암세포 및/또는 암조직)에 선택적으로 축적될 수 있다. 따라서, 상기 알부민 결합체는 암에 효과적으로 전달되어 암을 표적할 수 있다.
- [0099] 상기 알부민 결합체는 이민 결합 및 질소-붕소-질소(N-B-N) 그룹을 포함한 형광 발색단을 가지므로, 형광 특성을 가질 수 있다. 따라서, 상기 알부민 결합체는 암을 시각화 및/또는 형광 이미징할 수 있다.
- [0100] 상기 알부민 결합체는 광 조사 하에 활성 산소종을 생성할 수 있으므로, 광역학적으로 이용된 상기 알부민 결합체는 암을 치료할 수 있다.
- [0101] 또한, 상기 알부민 결합체는 상기 붕소 함유 화합물과 알부민을 단순 혼합함으로써 상대적으로 빠르게 생성되므로, 용이하게 제조될 수 있다. 따라서, 알부민은 개체의 혈액 내에 존재한다는 점에서, (예를 들어, 인간 혈청 알부민(HSA)은 인체 혈액 중에 약 35g/L 내지 약 55g/L로 존재함) 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물이 개체 내에 투여되는 경우, 개체 내에서 상기 화학식 1로 표시된 알부민 결합체가 상대적으로 빠르고 용이하게 생성될 수 있다.
- [0102] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 알부민 결합체의 X-ray 결정 구조를 도시한다.
- [0103] 도 1을 참조하면, 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물은 알부민의 SS1 사이트에 위치한 라이신(Lys-199)에 포함된 아민기와 공유 결합함을 알 수 있다. 즉, 알부민 중 시스테인-34 사이트의 -SH가 산화되는 경우 형성될 수 없는 결합체에 비해, 상기 붕소 함유 화합물과 알부민이 안정적으로 결합함으로써 본 발명에 따른 알부민 결합체는 안정적으로 형성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 알부민 결합체는 약 pH 3 내지 12에서 안정하며, 알부민의 SS1 사이트는 공기 중에 노출되어도 산화되지 않는다.

[0104] **합성예 1 (알부민 결합체의 합성)**

- [0105] PBS(phosphate-buffered saline) 완충용액 (pH 7.4)에 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물과 인간 혈청 알부민을 각각 200 μ M 용액이 되도록 1:1로 혼합하여 교반하였다. 이 용액을 냉장 또는 상온 보관하여 하기 반응식 1에 따라 상기 화학식 1로 표시된 알부민 결합체를 제조하였다:

[0106] <반응식 1>



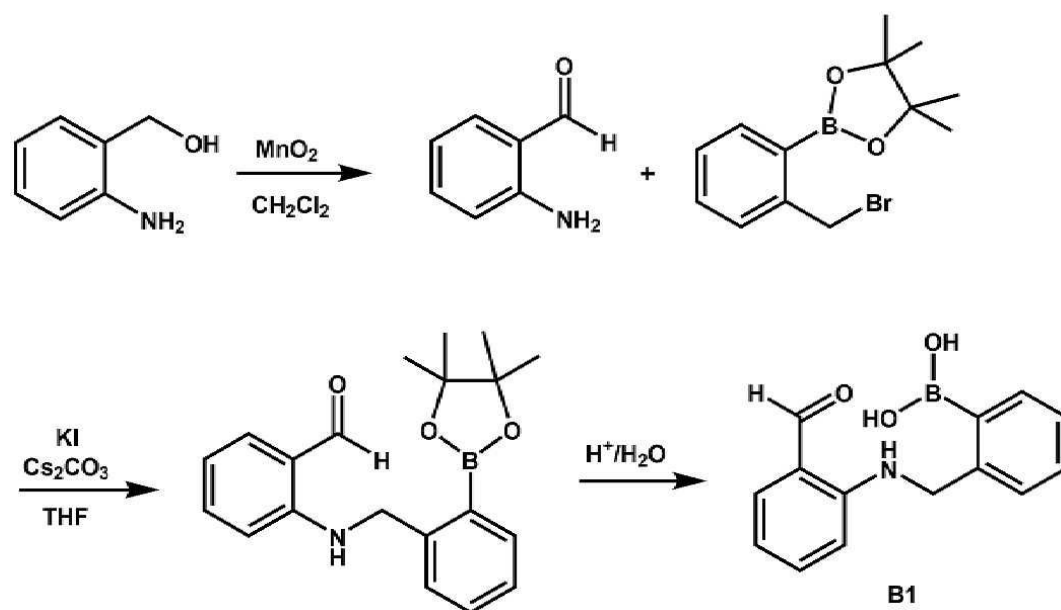
- [0107]
- [0108] 상기 반응식 1 중,
- [0109] A-NH₂는 알부민이고,
- [0110] NH₂는 알부민 중 SS1 사이트에 위치한 라이신의 아민기이고,
- [0111] A는 알부민 중 상기 SS1 사이트에 위치한 라이신(Lysine-199 또는 Lys-199)의 아민기를 제외한 모든 그룹이다.
- [0112] 상기 반응식 1에 따라, 붕소 함유 화합물에 포함된 3배위 붕소가 알부민 결합체에 포함된 4배위 붕소로 변화함에 따라, 상기 알부민 결합체는 형광 특성을 가질 수 있다. 특히, 붕소 함유 화합물은 알부민 중 라이신

(Lysine-199 또는 Lys-199)의 아민기와 결합됨으로써, 이민 결합이 생성되고, 질소-붕소-질소(N-B-N) 그룹이 생성되어 형광 발색단이 생성될 수 있다. 즉, 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물은 아민기와 반응하여 이민 결합을 형성할 수 있는 카르보닐기(C=O) 및 이민 결합과 4배위 형광 발색단을 생성할 수 있는 보론산기(-B(OH)₂)를 적절한 위치에 포함한다.

[0113] **합성예 2-1 (붕소 함유 화합물 B1의 합성)**

[0114] 화합물 B1을 합성하는 방법은 본 기술분야에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 하기 반응식 2-1의 방법으로 합성할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0115] <반응식 2-1>

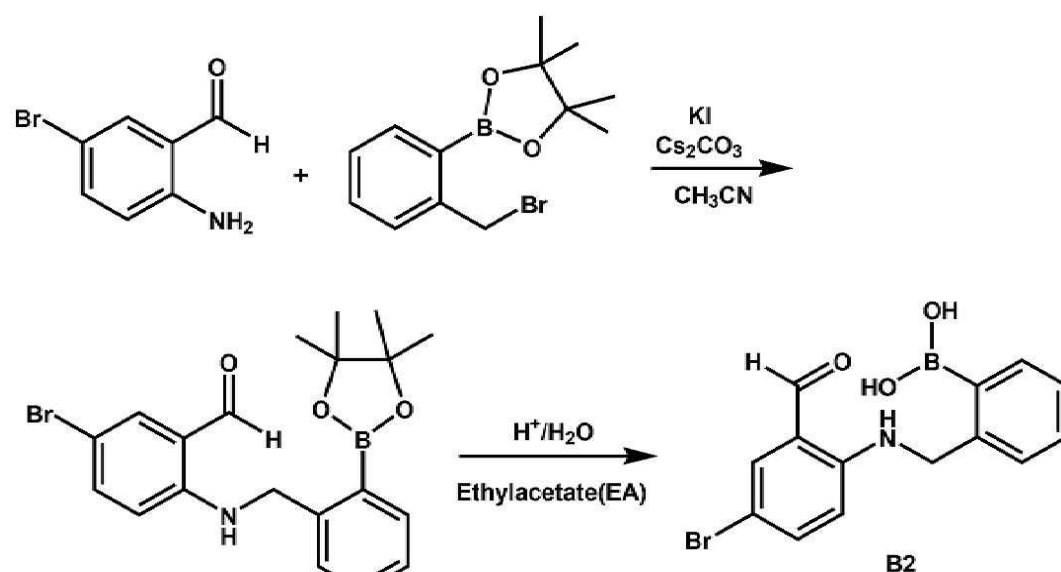


[0116]

[0117] **합성예 2-2 (붕소 함유 화합물 B2의 합성)**

[0118] 화합물 B2를 합성하는 방법은 본 기술분야에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 하기 반응식 2-2의 방법으로 합성할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0119] <반응식 2-2>



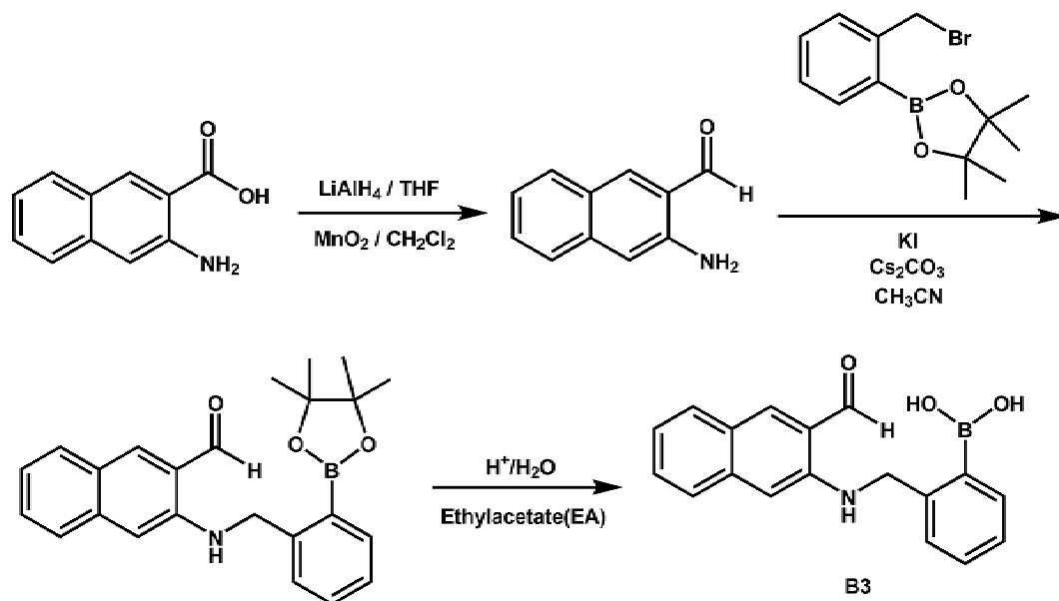
[0120]

[0121] **합성예 2-3 (붕소 함유 화합물 B3의 합성)**

[0122] 화합물 B3을 합성하는 방법은 본 기술분야에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 하기 반응식 2-3의 방

법으로 합성할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0123] <반응식 2-3>

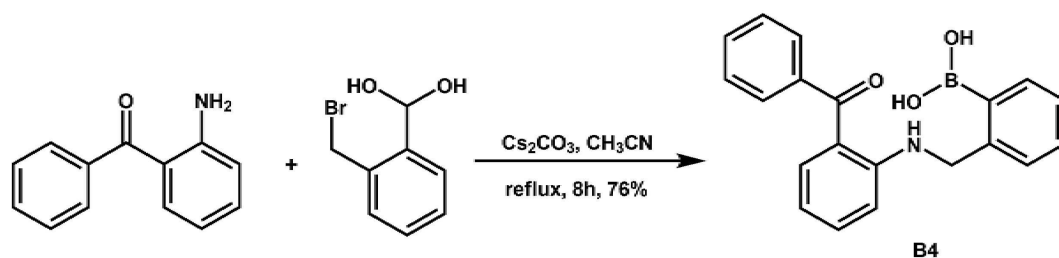


[0124]

[0125] 합성예 2-4 (붕소 함유 화합물 B4의 합성)

[0126] 화합물 B4를 합성하는 방법은 본 기술분야에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 하기 반응식 2-4의 방법으로 합성할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0127] <반응식 2-4>

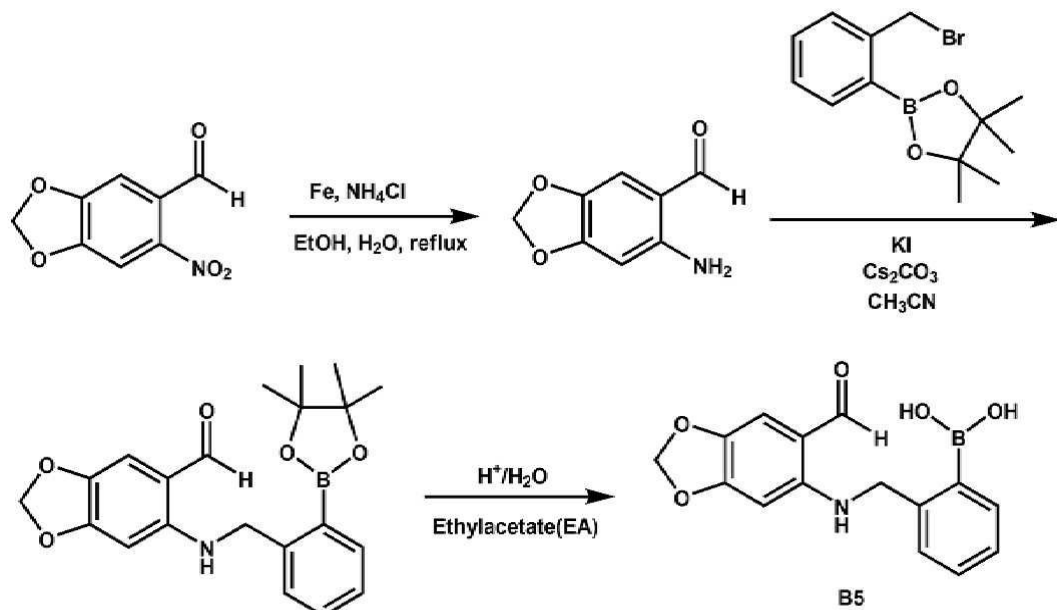


[0128]

[0129] 합성예 2-5 (붕소 함유 화합물 B5의 합성)

[0130] 화합물 B5를 합성하는 방법은 본 기술분야에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 하기 반응식 2-5의 방법으로 합성할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 하기 반응식 2-5 중 EtOH는 에탄올이다.

[0131] <반응식 2-5>



[0132]

[0133] **평가예 1 (결합능력 평가)**

[0134] 95 부피%의 PBS 완충용액 및 5 부피%의 다이메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)에 100nM의 붕소 함유 화합물 B1 및 알부민(HSA)을 혼합하여 2시간 동안 혼합하였다. 상기 알부민의 농도를 증가시키며 형광 세기(fluorescence intensity; F.I.)의 변화를 측정하고, 이를 기초로 산출된 해리 상수(dissociation constant; K_d)를 도 2에 나타내었다.

[0135] 도 2의 (a)는 100nM의 붕소 함유 화합물 B1에 대한 알부민의 농도 비율에 따른 형광 세기(F.I.)의 변화를 나타낸다. 예를 들어, 0:1은 붕소 함유 화합물을 사용하지 않고 100nM의 알부민(HSA)을 사용한 경우를 나타내며, 1:0은 100nM의 붕소 함유 화합물 B1을 사용하고 알부민(HSA)을 사용하지 않은 경우를 나타내고, 1:2는 100nM의 붕소 함유 화합물 B1 및 200nM의 알부민(HSA)을 사용한 경우를 나타내며, 1:16은 100nM의 붕소 함유 화합물 B1 및 1600nM의 알부민(HSA)을 사용한 경우를 나타낸다.

[0136] 도 2의 (b)는 530nm에서의 상기 형광 세기(F.I.)의 변화를 기초로 fitting 프로그램을 이용하여 해리 상수(K_d)를 산출하는 것을 나타낸다.

[0137] 붕소 함유 화합물 B1 대신 붕소 함유 화합물 B2 내지 B5에 대해서도 동일한 측정 방법에 의해 각각의 해리 상수(K_d)를 산출하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0138]

붕소 함유 화합물	B1	B2	B3	B4	B5
알부민 결합체	B-A1	B-A2	B-A3	B-A4	B-A5
해리 상수 (μ M)	0.185	0.383	2.48	2.22	0.571

[0139] 상기 표 1로부터, 알부민 결합체 B-A1 내지 B-A5 각각의 해리 상수(K_d)는 약 0.1 μ M 내지 약 2.5 μ M임을 알 수 있다. 따라서, 상대적으로 작은 해리 상수를 갖는 알부민 결합체 B-A1 내지 B-A5 각각은 우수한 결합 능력을 가짐을 알 수 있다. 이는, 붕소 함유 화합물 B1 내지 B5 각각은 알부민과 반데르발스 결합할 뿐만 아니라, 알부민의 SS1 사이트에 위치한 라이신(Lysine-199 또는 Lys-199)과 공유 결합하기 때문일 수 있다. 다만, 상기 화학식 1에 따른 알부민 결합체의 해리 상수는 약 0.1 μ M 내지 약 2.5 μ M의 범위에 한정되지 않으며, 상기 범위보다 작을 수 있고, 클 수도 있다.

[0140] 반면에, 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물과 단량체 아미노산인 라이신의 해리 상수(K_d)는 대략 수 mM

로서, 상기 붕소 함유 화합물은 알부민 이외의 단백질에 포함된 라이신과는 결합 능력이 매우 작을 수 있다. 실제로 일반적인 단백질에는 많은 라이신이 존재하지만, 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물들은 알부민 이외의 단백질들과는 결합 능력이 매우 작은 것으로 나타났다. 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물들이 인간 혈청 알부민(HSA)에 존재하는 199번의 라이신(Lysine-199)과 특히 강한 결합을 하는 것은 라이신과의 공유결합 이외에 화학식 2의 화합물들의 전체적인 구조와 인간 혈청 알부민(HSA)의 SS1 사이트의 공간적 상호 작용이 적합하기 때문일 수 있다는 것을 의미한다. 즉, SS1 사이트와의 반데르발스 결합 및 수소 결합에 의한 상호 작용을 통한 결합력과 라이신과의 공유 결합에 의한 결합력이 합쳐져서 화학식 2의 화합물과 인간 혈청 알부민(HSA)의 결합 능력이 강하게 나타난다고 볼 수 있다.

[0141] 평가예 2 (양자 수율 평가)

[0142] 상기 알부민 결합체 B-A1 내지 B-A5 각각의 양자 수율(quantum yield, Φ)은 Angew. Chem. Int. ed. 2016, 55, 14728-14732를 참조하여 산출하였다. 구체적으로, 에탄올 용액에서 양자 수율이 약 79.0%로 알려진 플루오레세인(fluorescein)을 기준 시료로 하고, 상기 알부민 결합체 각각을 측정 시료로 하여 하기 식 1에 따라 산출하고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0143] <식 1>

$$[0144] \Phi = (\Phi_s) \times (I \times Ab_s \times n_s^2) / (I_s \times Ab \times (n_s)^2)$$

[0145] 상기 식 1 중,

[0146] Φ 는 측정 시료의 양자 수율이고,

[0147] Φ_s 는 기준 시료의 양자 수율이고,

[0148] Ab 는 측정 시료의 흡수 스펙트럼(absorption spectrum)에서의 흡광도(absorbance)이고,

[0149] Ab_s 는 기준 시료의 흡수 스펙트럼에서의 흡광도이고,

[0150] I 는 측정 시료의 방출 스펙트럼(emission spectrum)의 적분 면적(integration area)이고,

[0151] I_s 는 기준 시료의 방출 스펙트럼의 적분 면적이고,

[0152] n 는 측정시료의 굴절률이고,

[0153] n_s 는 측정시료의 굴절률이다.

표 2

붕소 함유 화합물	B1	B2	B3	B4	B5
알부민 결합체	B-A1	B-A2	B-A3	B-A4	B-A5
양자 수율 (%)	52.6	5.6	ND	3.3	91.1

[0155] 상기 표 2 중, 붕소 함유 화합물 B3의 양자 수율은 상대적으로 낮아 측정되지 않았다(not detecting; ND).

[0156] 상기 표 2로부터, 알부민 결합체 B-A1 및 B-A5는 상대적으로 높은 양자 수율을 가지므로, 우수한 형광 특성을 가짐을 알 수 있다. 따라서, 암(암세포 및/또는 암조직)에 선택적으로 축적된 알부민 결합체 B-A1 및 B-A5에 의해, 상기 암의 위치는 시각적으로 확인될 수 있다. 즉, 본 발명의 일 구현예에 따른 알부민 결합체는 암의 위치를 형광 이미징할 수 있다.

[0157] 평가예 3-1 (ROS 생성 평가)

[0158] DCFH-DA(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)는 생성되는 활성 산소종(reactive oxygen species; ROS)의 양에 비례하여 형광을 발생시킨다.

[0159] PBS 완충용액 (pH 7.4)에 10 μ M의 알부민 결합체 B-A1-HSA 및 5 μ M의 DCFH-DA를 혼합하고, 530nm의 광을 조사하였다. 시간에 따라 발생하는 형광을 scinco FS-2를 이용하여 측정하고, 그 결과를 도 3a 및 6에 나타내었다.

도 6 중, "F.I. - F.I₀."는 "형광 세기 - 초기 형광 세기"를 의미한다. 상기 알부민 결합체 B-A1-HSA는 붕소 함유 화합물 B1에 알부민을 반응시켜 제조된 알부민 결합체 B-A1 중, 상기 알부민이 인간 혈청 알부민(HSA)인 경우를 의미한다.

- [0160] 상기 알부민 결합체 B-A1-HSA 대신 알부민 결합체 B-A2-HSA를 이용한 결과를 도 3b 및 6에 나타내었다. 상기 알부민 결합체 B-A2-HSA는 붕소 함유 화합물 B2에 알부민을 반응시켜 제조된 알부민 결합체 B-A2 중, 상기 알부민이 인간 혈청 알부민(HSA)인 경우를 의미한다.
- [0161] 상기 알부민 결합체 B-A1-HSA 대신 알부민 결합체 B-A3-HSA를 이용한 결과를 도 3c 및 6에 나타내었다. 상기 알부민 결합체 B-A3-HSA는 붕소 함유 화합물 B3에 알부민을 반응시켜 제조된 알부민 결합체 B-A3 중, 상기 알부민이 인간 혈청 알부민(HSA)인 경우를 의미한다.
- [0162] 상기 알부민 결합체 B-A1-HSA 대신 붕소 함유 화합물 B1을 이용한 결과를 도 4a 및 6에 나타내었다.
- [0163] 상기 알부민 결합체 B-A1-HSA 대신 붕소 함유 화합물 B2를 이용한 결과를 도 4b 및 6에 나타내었다.
- [0164] 상기 알부민 결합체 B-A1-HSA 대신 붕소 함유 화합물 B3을 이용한 결과를 도 4c 및 6에 나타내었다.
- [0165] 상기 알부민 결합체 B-A1-HSA를 사용하지 않고, DCFH-DA를 사용한 결과를 도 5a 및 6에 나타내었다.
- [0166] 상기 알부민 결합체 B-A1-HSA 및 DCFH-DA를 사용하지 않고, 인간 혈청 알부민(HSA)을 사용한 결과를 도 5b 및 6에 나타내었다.
- [0167] 상기 도 3a 내지 3c, 4a 내지 4c, 5a 및 5b를 참조하면, 붕소 함유 화합물만(B1, B2 또는 B3)을 채용하거나, DCFH-DA만을 채용하거나, 또는 인간 혈청 알부민(HSA)만을 채용한 경우에 비하여, 본 발명의 일 구현예에 따른 알부민 결합체 B-A2-HSA를 채용한 경우에 활성 산소종의 생성량이 증가함을 알 수 있다. 특히, 대략 520nm 내지 대략 540nm의 광이 조사된 경우, 알부민 결합체 B-A2-HSA의 활성 산소종(ROS) 생성 능력이 우수함을 알 수 있다. 다만, 상기 화학식 1에 따른 알부민 결합체의 산소종(ROS) 생성 능력은 대략 520nm 내지 대략 540nm의 광이 조사된 경우에만 우수하다는 것으로 한정되지 않으며, 자외선, 가시광선, 근적외선, 적외선 등 임의의 파장을 갖는 광이 조사된 경우에도 상기 화학식 1에 따른 알부민 결합체의 산소종(ROS) 생성 능력이 우수할 수 있다.
- [0168] 도 6 및 상기 표 2를 참조하면, 알부민 결합체 B-A2-HSA는 상대적으로 낮은 양자 수율을 갖는 대신에 우수한 활성 산소종 생성 능력을 가짐을 알 수 있다.
- [0169] 알부민 결합체는 4배위 붕소를 포함하고, 붕소 함유 화합물은 3배위 붕소를 포함하기 때문에, 알부민 결합체의 활성 산소종 생성 능력이 붕소 함유 화합물의 활성 산소종 생성 능력보다 우수할 수 있다. 즉, 붕소 함유 화합물은 알부민과 반응(또는 결합)하여 알부민 결합체가 제조되기 전과 후에 활성 산소종 생성 능력의 차이가 발생함을 알 수 있다.
- [0170] 다만, 도 3c, 4c 및 5b를 참조하면, 알부민 결합체 B-A3-HSA의 활성 산소종 생성 능력은 붕소 함유 화합물 B3의 활성 산소종 생성 능력 또는 인간 혈청 알부민(HSA)의 활성 산소종 생성 능력과 상대적으로 유사해 보일 수 있으므로, 하기 평가예 3-2를 수행하였다.
- [0171] **평가예 3-2 (라이신 농도에 따른 ROS 생성 평가)**
- [0172] i) PBS 완충용액 (pH 7.4)에 1.0mM의 라이신(이하, Lys)을 혼합하고, 대략 530nm의 광을 조사하였다. 시간에 따라 발생하는 형광을 scinco FS-2를 이용하여 측정하고, 그 결과를 도 7a에 나타내었다.
- [0173] ii) 상기 1.0mM의 라이신(Lys) 대신 10 μM의 붕소 함유 화합물 B3을 혼합한 결과를 도 7b에 나타내고, iii) 상기 1.0mM의 라이신(Lys) 대신 10 μM의 붕소 함유 화합물 B3 및 0.1mM의 라이신(Lys)을 혼합한 결과를 도 7c에 나타내고, iv) 상기 1.0mM의 라이신(Lys) 대신 10 μM의 붕소 함유 화합물 B3 및 1.0mM의 라이신(Lys)을 혼합한 결과를 도 7d에 나타내었다.
- [0174] 도 7a 내지 7d를 참조하면, 붕소 함유 화합물 B3는 상대적으로 큰 농도의 단량체 라이신(예를 들어, 대략 1.0mM)과 혼합되는 경우, 상대적으로 많은 양의 활성 산소종이 생성됨을 알 수 있다.
- [0175] 암세포 및/또는 암조직은 성장에 필요한 영양분을 알부민을 통해 공급받으므로, 알부민 결합체 B-A3가 암세포 내에서 분해되어 붕소 함유 화합물 B3이 생성될 수 있다. 암세포는 대략 1.0mM 이상의 단량체 라이신 및 아미노산을 포함하므로, 상기 생성된 붕소 함유 화합물 B3은 단량체 라이신 및 아미노산과 혼합되어 상대적으로 많은

양의 활성 산소종을 생성할 수 있다. 즉, 암세포에 축적된 알부민 결합체 B-A3(또는 붕소 함유 화합물 B3)는 광역학적으로 암을 치료할 수 있을 것으로 예상된다.

[0176] **평가예 4 (암 표적 평가)**

[0177] 6개체의 마우스(mouse)에 암 세포(MDA-MB-231 cell)를 이식하고 약 7~10일 후 암조직이 약 $100\sim150\text{mm}^3$ 으로 성장한 것을 확인하였다. 이후, i) vehicle, ii) 붕소 함유 화합물 B2와 송아지 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)이 반응하여 제조된 알부민 결합체 B-A2-BSA ($50\mu\text{M}$) 및 iii) 붕소 함유 화합물 B2와 인간 혈청 알부민(human serum albumin; HSA)이 반응하여 제조된 알부민 결합체 B-A2-HSA ($50\mu\text{M}$) 각각을 마우스에 정맥 주사하였다. 일정 시간마다 마우스의 장기 조직을 적출하여 형광 특성을 관찰하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 구체적으로, 마우스의 심장, 폐, 간, 신장, 비장 및 암조직 각각의 형광 특성을 관찰하였다.

[0178] 나노 물질은 EPR(Enhanced Permeability and Retention) 효과에 의해 암조직에 선택적으로 축적될 수 있다. 다만, 일반적으로 나노 물질은 간에도 선택적으로 축적될 수 있어 간독성 등의 부작용이 발생할 수 있다.

[0179] 도 8을 참조하면, B-A2-HSA는 우수한 효율로 암조직에만 선택적으로 축적되고, 상대적으로 간에는 축적되지 않음을 알 수 있다. 이는, B-A2-HSA는 단순히 EPR 효과에 의해 암조직에 축적되는 것이 아니라, 암조직이 알부민을 수용하는 능력으로 인해 암조직에만 선택적으로 축적된 것을 의미할 수 있다. 따라서, B-A2-HSA는 간에 축적되어 부작용을 발생시킬 가능성을 감소시킬 수 있다.

[0180] 평가예 4는 붕소 함유 화합물 B2에 대해 실시되었으나, 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물은 동일한 상기 반응식 1에 의해 상기 화학식 1로 표시된 알부민 결합체로 제조될 수 있으므로, 본 발명에 따른 알부민 결합체가 암조직에 선택적으로 축적될 수 있음은 자명하다.

[0181] 또한, 상기 화학식 1로 표시된 알부민 결합체 및 상기 화학식 2로 표시된 붕소 함유 화합물은 암조직에 선택적으로 축적될 수 있는 바, 상기 알부민 결합체 또는 상기 붕소 함유 화합물에 항암제를 결합하는 경우, 상기 항암제를 효과적으로 암조직에 선택적으로 축적(또는 이동)시킬 수 있음은 자명하다.

[0182] **평가예 5 (암 치료 평가 1)**

[0183] 6개체의 마우스에 암(MDA-MB-231 cell)을 이식하고 암조직이 약 100mm^3 이상으로 성장한 것을 확인하였다.

[0184] i) 제1개체는 대조군이다.

[0185] ii) 제2개체에 붕소 함유 화합물 B2를 정맥 주사(intravenous, 이하 I.V.)하였다. (B2(I.V.))

[0186] iii) 제3개체에 붕소 함유 화합물 B2와 인간 혈청 알부민(HSA)이 반응하여 제조된 알부민 결합체 B-A2-HSA를 정맥 주사하였다. (B-A2-HSA(I.V.))

[0187] iv) 제4개체에 B-A2-HSA를 직접 암조직에 주사(intratumor, 이하 I.T.)하였다. (B-A2-HSA(I.T.))

[0188] v) 제5개체에 붕소 함유 화합물 B2와 송아지 혈청 알부민(BSA)이 반응하여 제조된 알부민 결합체 B-A2-BSA를 정맥 주사하였다. (B-A2-BSA(I.V.))

[0189] vi) 제6개체에 B-A2-BSA를 직접 암조직에 주사하였다. (B-A2-BSA(I.T.))

[0190] 주사 후 4시간이 경과한 때, 녹색광(약 490 내지 530nm)을 20분간 조사하였다. 상기 주사하는 것과 상기 녹색광을 조사하는 것은 일주일에 1회씩 진행되었고, 총 3회 진행되었다. 암을 이식한 시점으로부터 28일 후 각 마우스의 암조직 크기를 비교하였고, 그 결과를 도 9a 및 9b에 나타내었다.

[0191] 도 9a 및 9b를 참조하면, 본 발명에 따른 알부민 결합체(B-A2-HSA, B-A2-BSA)는 정맥 주사하였는지 암조직에 직접 주사하였는지와 무관하게 암조직의 크기를 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있다.

[0192] 마우스는 인간 혈청 알부민을 포함하지 않으므로, 붕소 함유 화합물 B2를 주사한 경우보다 알부민 결합체(B-A2-HSA, B-A2-BSA)를 주사한 경우의 암 치료 효과가 우수할 수 있다. 다만, 마우스 이외의 개체가 인간 혈청 알부민을 포함한 경우, 붕소 함유 화합물 B2를 주사한 경우에 우수한 암 치료 효과를 가질 수 있음은 자명하다.

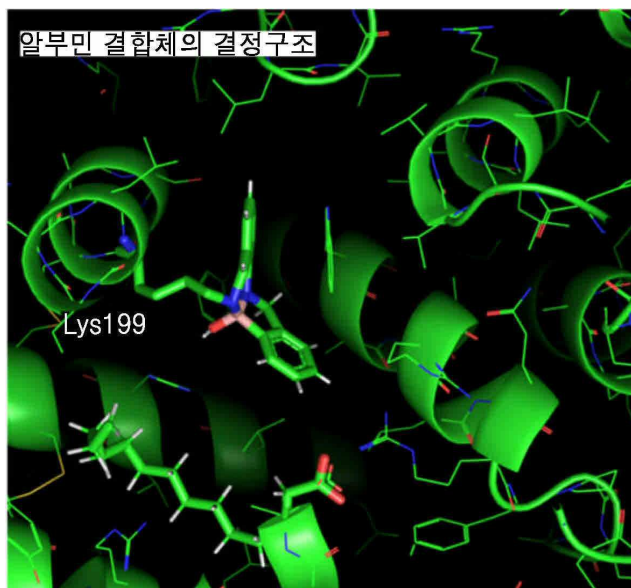
[0193] **평가예 6 (암 치료 평가 2)**

[0194] 8개체의 마우스에 암(MDA-MB-231 cell)을 이식하고 암조직이 약 100mm^3 이상으로 성장한 것을 확인하였다.

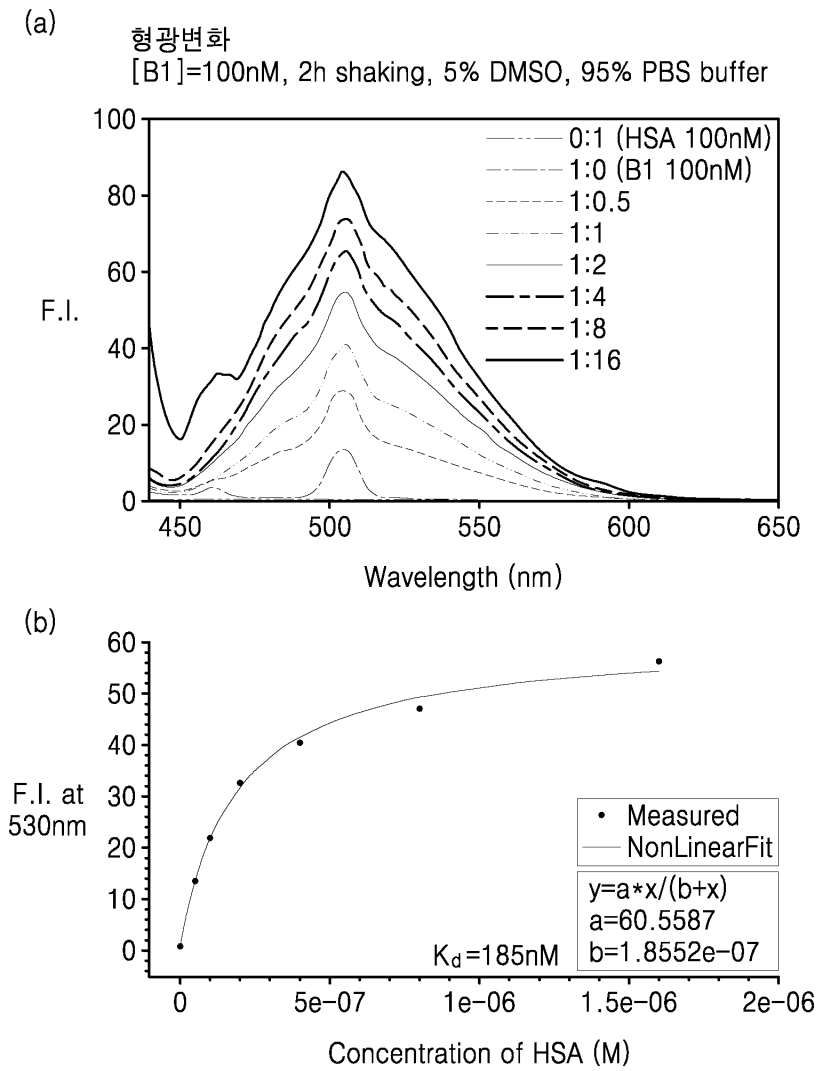
- [0195] i) 제1개체 및 제5개체 각각은 대조군이다.
- [0196] ii) 제2개체 및 제6개체 각각에 붕소 함유 화합물 B2를 정맥 주사하였다.
- [0197] iii) 제3개체 및 제7개체 각각에 붕소 함유 화합물 B2와 인간 혈청 알부민(HSA)이 반응하여 제조된 알부민 결합체 B-A2-HSA를 정맥 주사하였다.
- [0198] iv) 제4개체 및 제8개체 각각에 붕소 함유 화합물 B2와 송아지 혈청 알부민(BSA)이 반응하여 제조된 알부민 결합체 B-A2-BSA를 정맥 주사하였다.
- [0199] 정맥 주사 후 4시간이 경과한 때, 상기 제1개체 내지 제4개체 각각에 녹색광(약 490 내지 530nm)을 20분간 조사하고, 상기 제5개체 내지 제8개체에는 광을 조사하지 않았다. 상기 주사하는 것과 상기 녹색광을 조사하는 것은 일주일에 1회씩 진행되었고, 총 3회 진행되었다.
- [0200] 암을 이식한 시점으로부터 28일 후 각 마우스의 암조직 크기를 비교하였고, 그 결과를 도 10a 내지 10c에 나타내었다. 구체적으로 도 10a는 제1개체 내지 제8개체 각각의 암을 염색한 결과를 나타낸 도면이고, 도 10b는 제1개체 내지 제4개체 각각의 암을 적출한 도면이고, 도 10c는 제1개체 내지 제4개체 각각의 암의 크기를 시간에 따라 나타낸 도면이다.
- [0201] 도 10a 내지 10c를 참조하면, 본 발명에 따른 알부민 결합체(B-A2-HSA, B-A2-BSA)는 광 조사 하에 암조직의 크기를 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있다.

도면

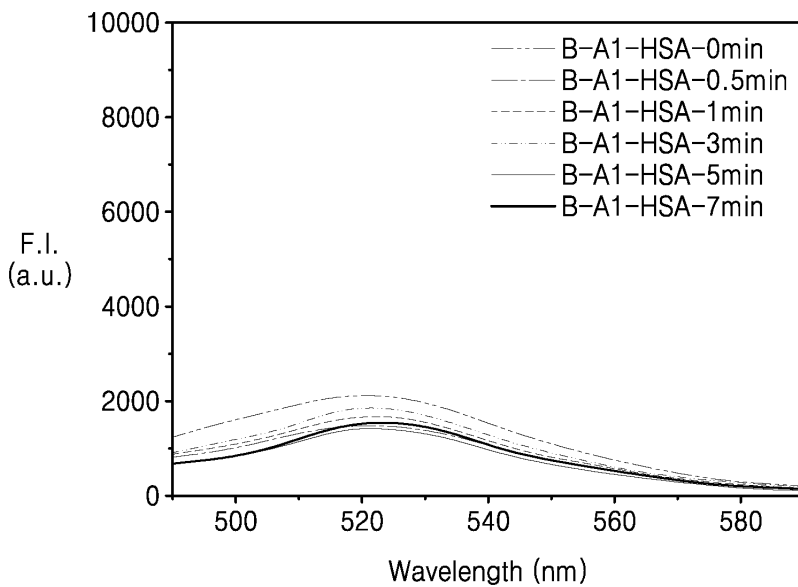
도면1



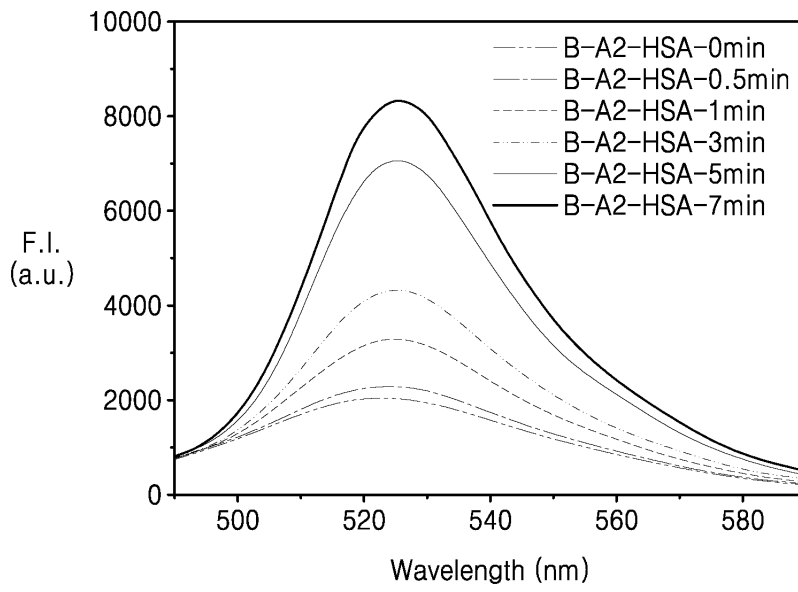
도면2



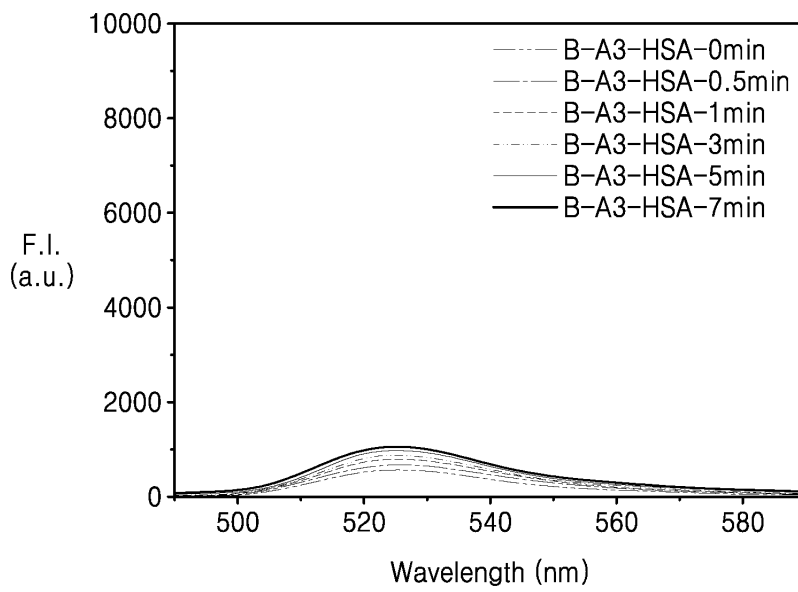
도면3a



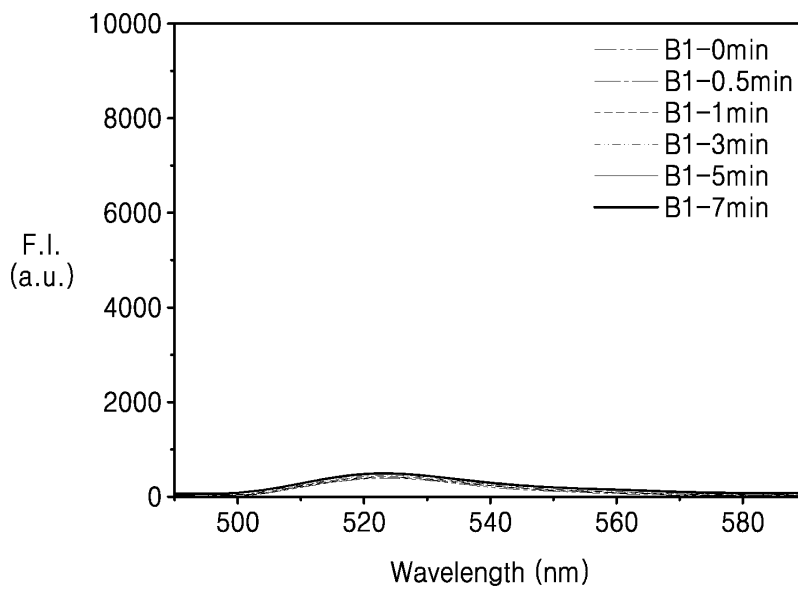
도면3b



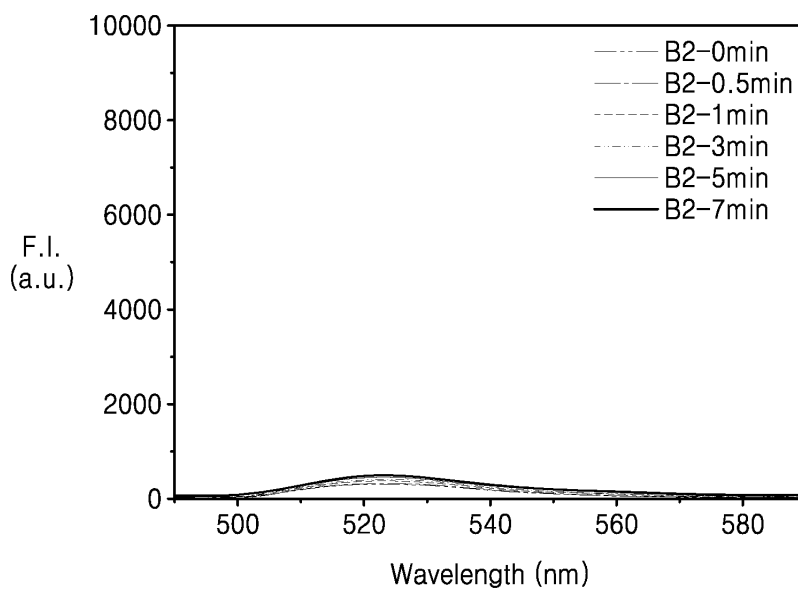
도면3c



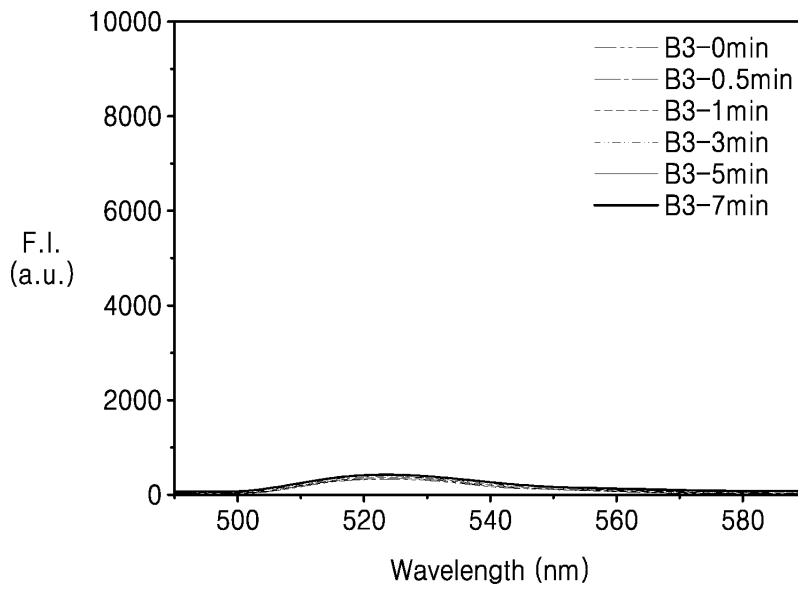
도면4a



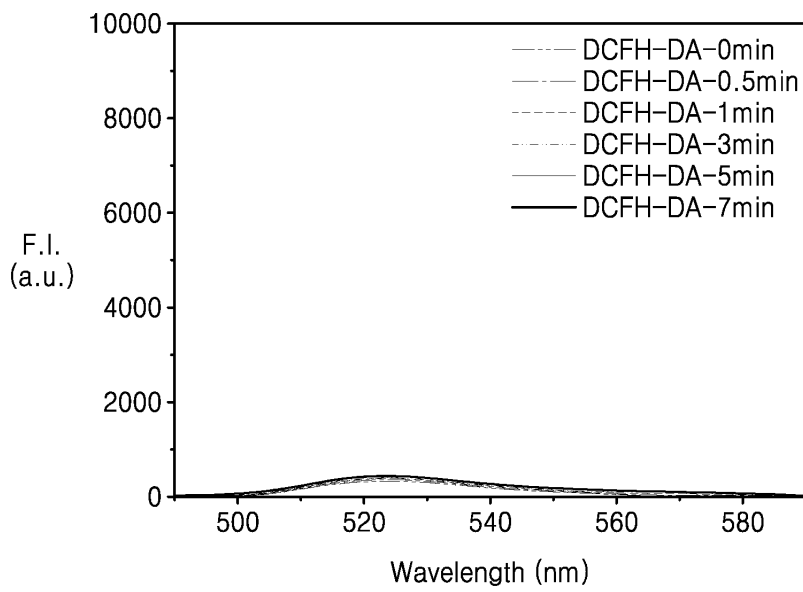
도면4b



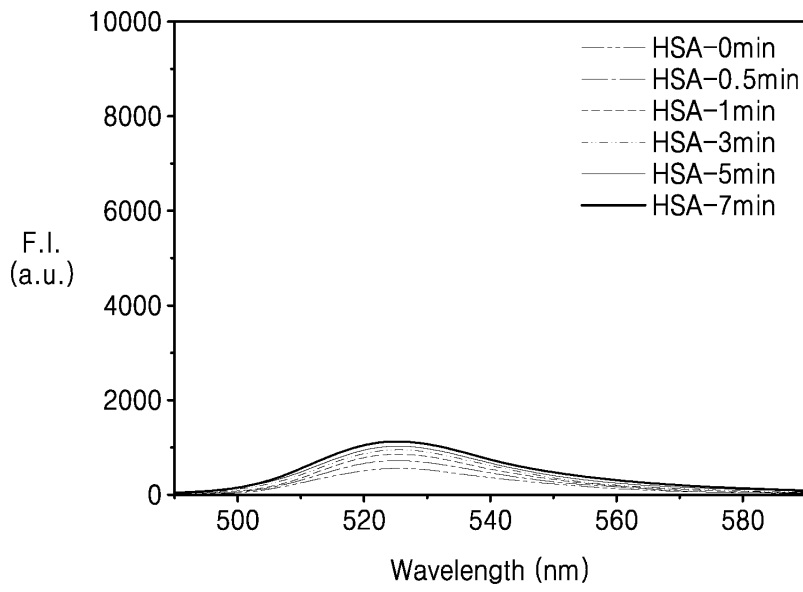
도면4c



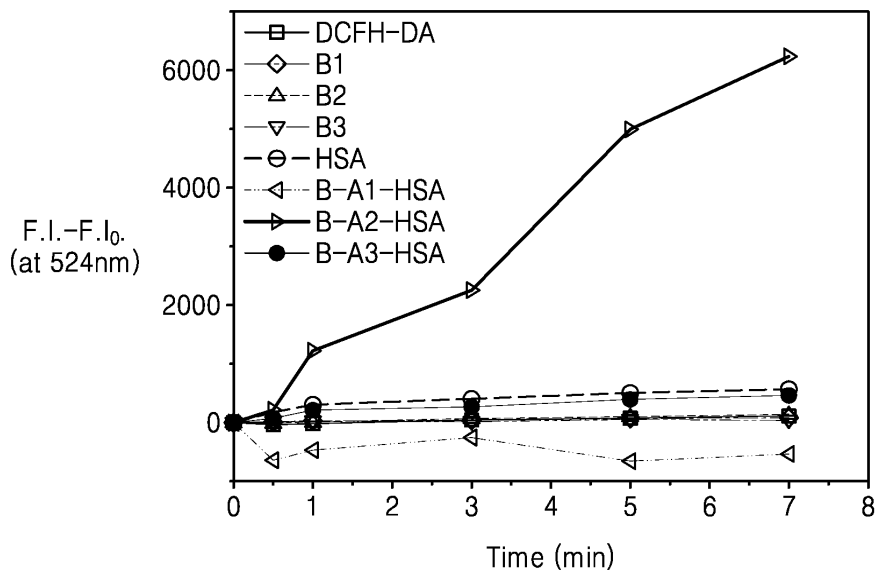
도면5a



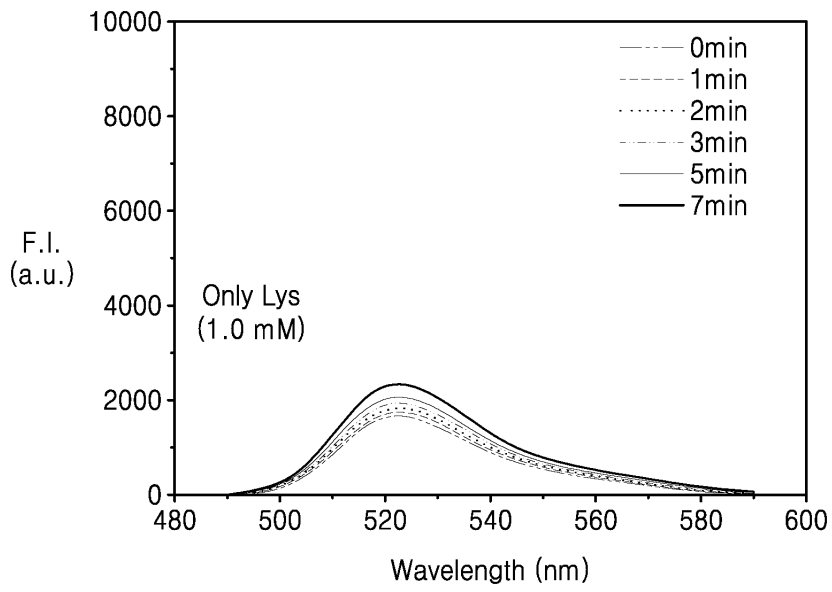
도면5b



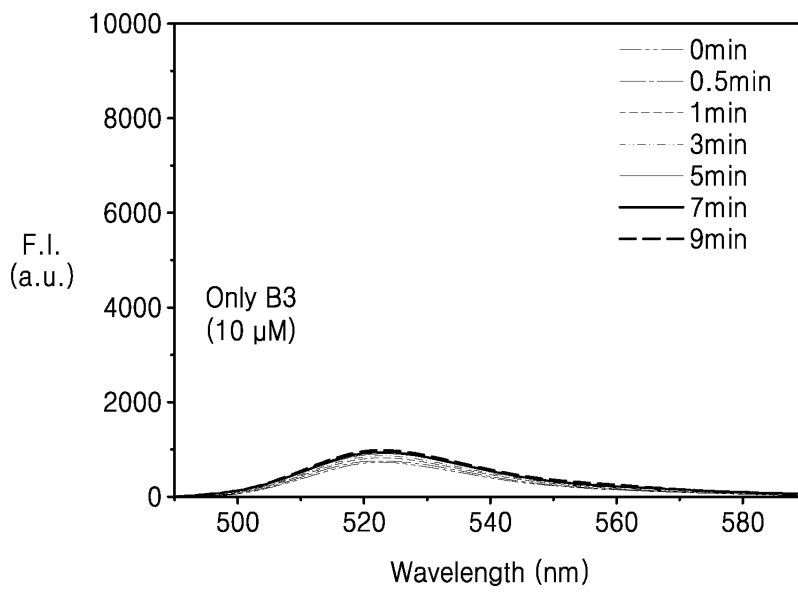
도면6



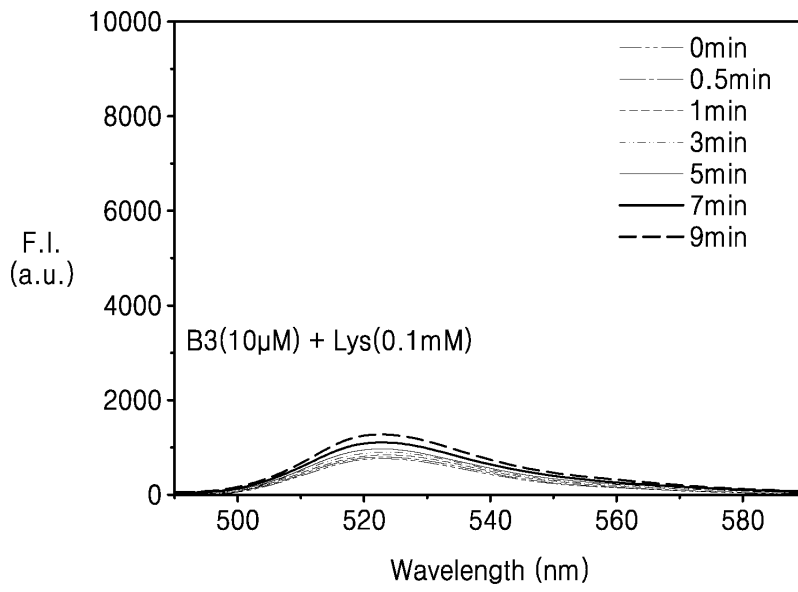
도면7a



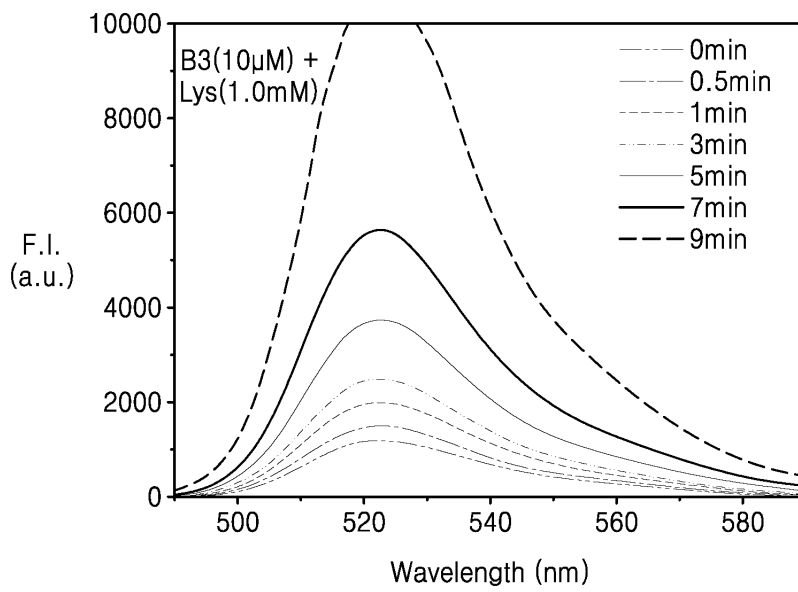
도면7b



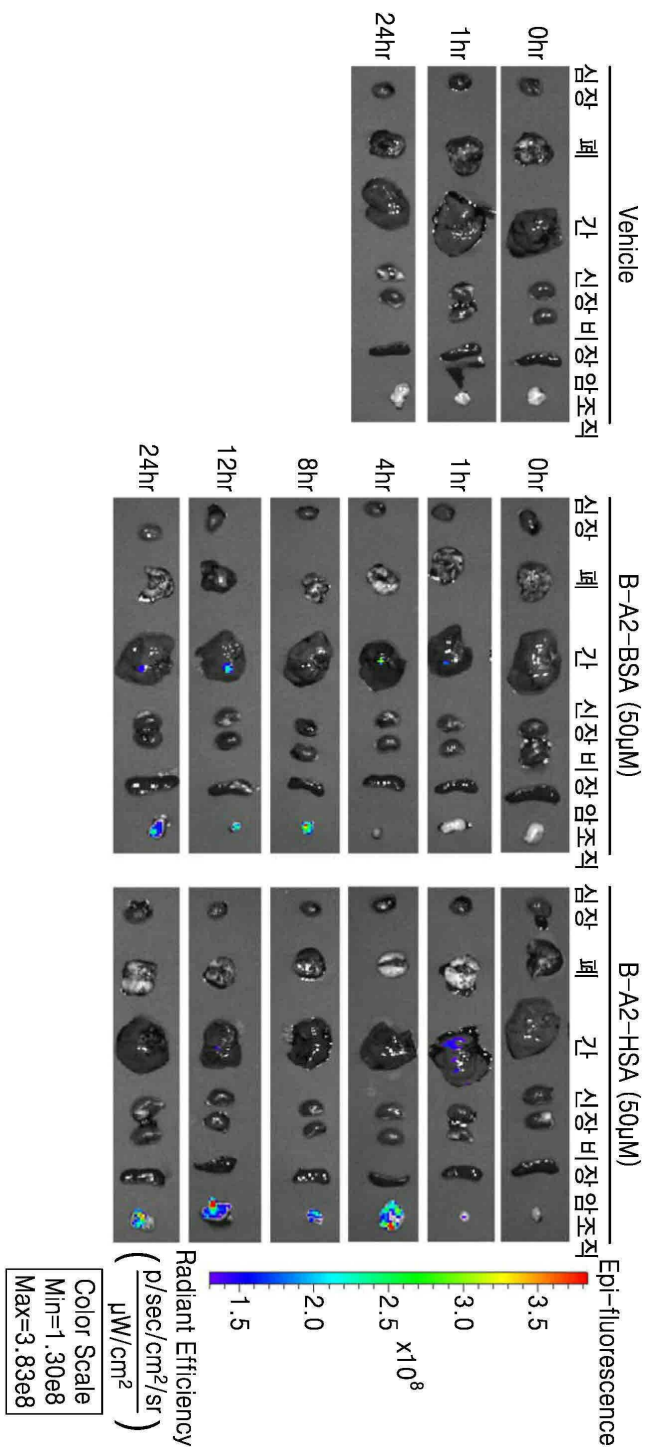
도면7c



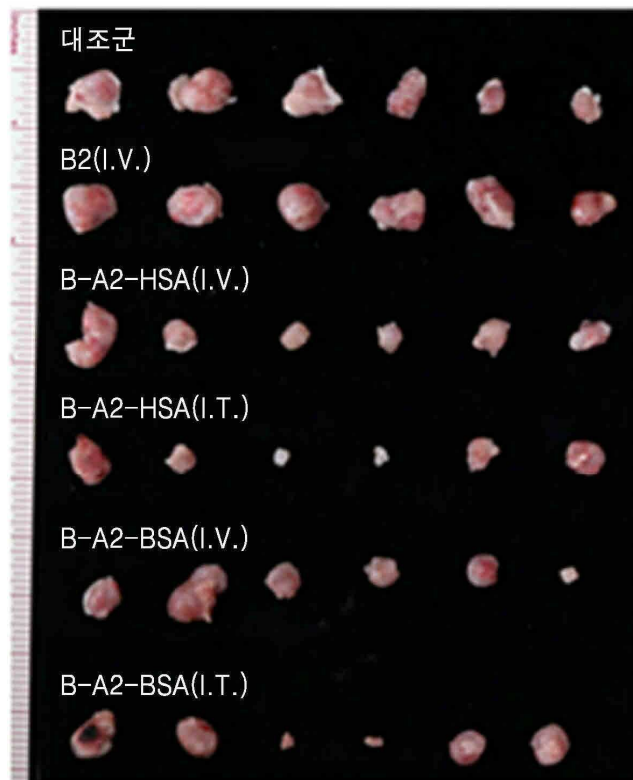
도면7d



도면8



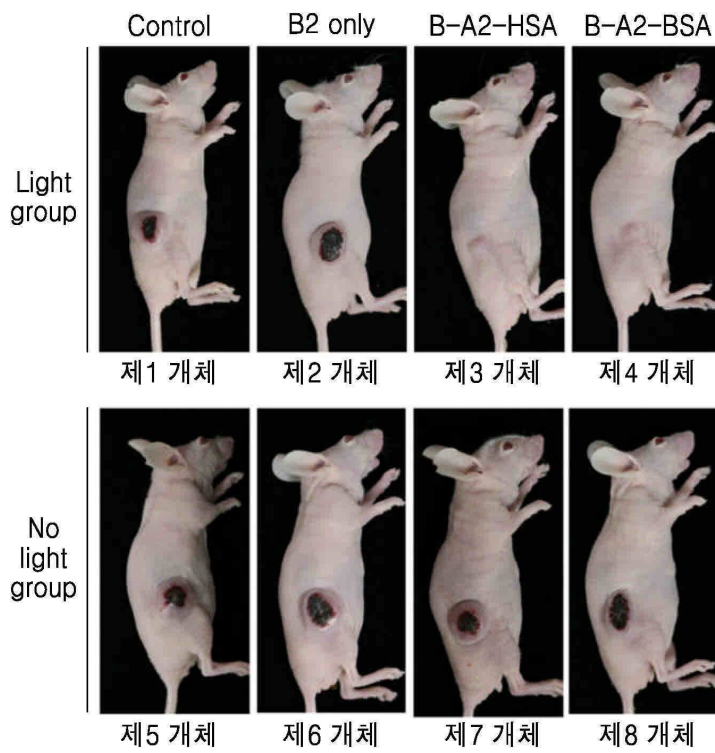
도면9a



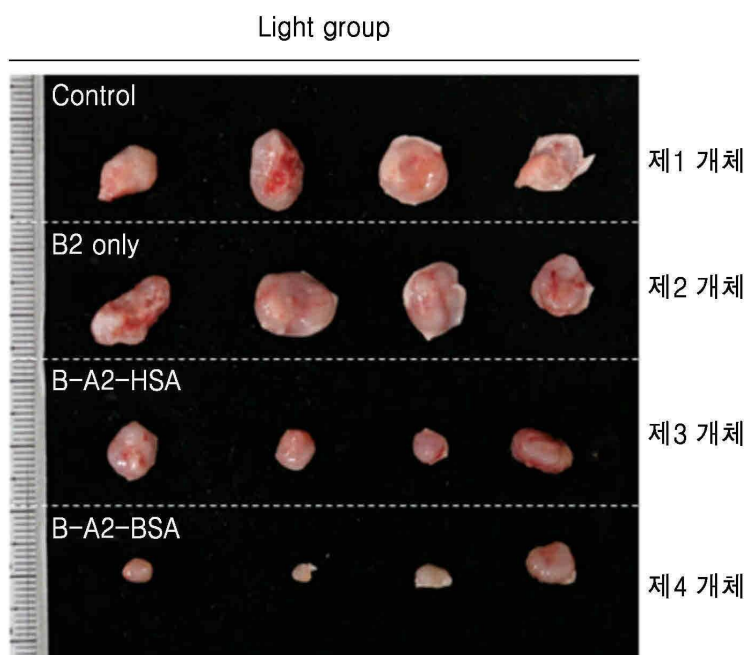
도면9b



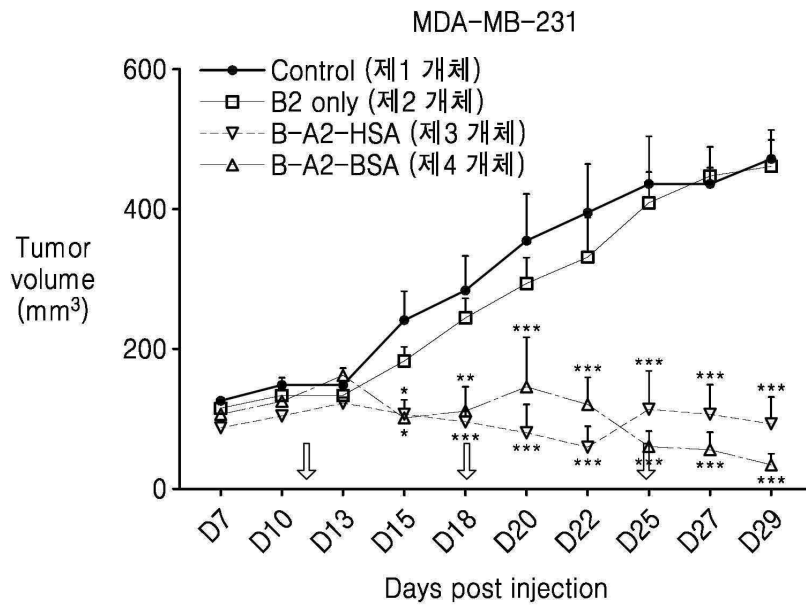
도면10a



도면10b



도면10c



Significance was obtained by Two-way ANOVA test.

All data represents mean $\pm$ SEM.

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

↓ 약물 투여