



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0014834
(43) 공개일자 2018년02월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/282 (2006.01) A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01) A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/69 (2006.01)
A61K 36/886 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/282 (2013.01)
A61K 31/122 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7001614
(22) 출원일자(국제) 2016년06월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년01월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/038333
(87) 국제공개번호 WO 2016/205782
국제공개일자 2016년12월22일
- (30) 우선권주장
62/182,124 2015년06월19일 미국(US)
- (71) 출원인
신-닛 프로덕츠 엔터프라이즈 엘엘씨
미국, 뉴저지 08820, 에디슨, 아구스타 애비뉴 12
- (72) 발명자
리우, 샤오종
미국, 메릴랜드주 20854, 포토맥, 팜브룩 레인 10608
- (74) 대리인
안소영

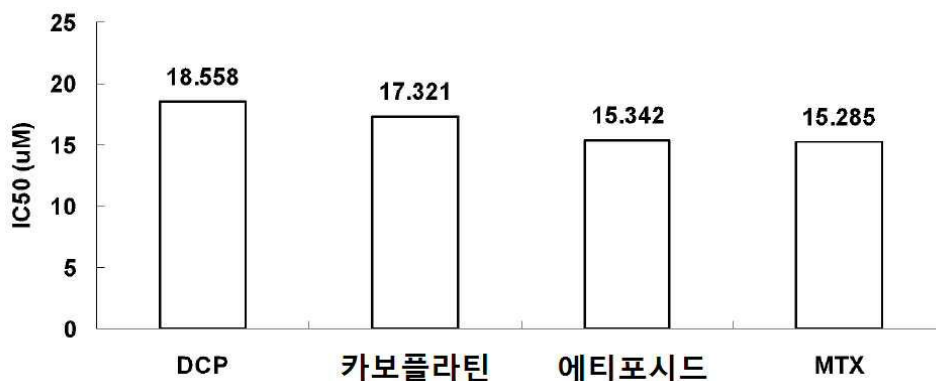
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 카보플라틴을 함유하는 조성물 및 용도

(57) 요약

본 발명은 백혈병, 신장 선암종 또는 흑색종의 예방 또는 치료를 위한 디시클로플라틴(DCP)의 약제학적 용도를 개시하고 있다. DCP를 단독으로 또는 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 보조 치료제와 함께 사용하는 방법이 또한 개시되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/198 (2013.01)

A61K 31/513 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 31/69 (2013.01)

A61K 36/886 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/02 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에게 디시클로플라틴(DCP)을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하거나 예방하는 방법,

여기서 상기 질환은 백혈병, 신장 선암종, 또는 흑색종임.

청구항 2

제1항에 있어서, 질환이 백혈병인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 질환이 신장 선암종인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 질환이 흑색종인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물이 적어도 하나의 치료제 또는 하나의 보조 치료제를 더 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 적어도 하나의 치료제 또는 하나의 보조 치료제가 엽산, 코엔자임 Q10, 커큐민, 글루타치온(GSH), 알로에 베라, 오리자놀, 5-플루오로우라실, 및 보르테조미프로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물이 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더 포함하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적 조성물이 주사로 또는 경구 경로를 통해 투여되는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, DCP가 대상체의 면역학적 반응을 조절하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 투여되는 약제학적 조성물 내 DCP의 양이 약 0.01 내지 10 mg/kg 체중의 양인 방법.

청구항 11

대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 백혈병으로 고통받는 대상체에서 악성 세포를 사멸시키는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 악성 세포가 암성 백혈구이고 대상체가 전골수성 백혈병에 걸린 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 악성 세포가 암성 골수아세포이고 대상체가 골수성 백혈병에 걸린 것인 방법.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, DCP의 유효량이 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중인 방법.

청구항 15

대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 신장 선암종에 걸린 대상체에 서 악성 신장 세포를 사멸시키는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 악성 신장 세포가 신장 암종 세포인 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, DCP의 유효량이 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중인 방법.

청구항 18

대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 흑색종에 걸린 대상체에서 악 성 세포를 사멸시키는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 엽산, 코엔자임 Q10, 커큐민, 글루타치온(GSH), 알로에 베라, 오리자 놀, 5-플루오로우라실, 및 보르테조미드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 치료제 또는 하나의 보 조 치료제를 더 포함하는 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, DCP의 유효량이 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 백혈병, 신장 선암종 또는 흑색종의 치료를 위한 디시클로플라틴(DCP)에 관한 것이다. DCP를 단독으 로 또는 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 보조 치료제와 함께, 사용하는 방법이 개시되어 있다.

배경 기술

[0002] 백혈병, 신장 선암종 및 흑색종은 매년 전 세계에서 수십만의 생명을 앗아가는 악성 암이다. 연구자들은 새롭고, 안전하며 효과적인 약물 및 치료를 지속적으로 추구하여 왔다.

[0003] 백혈병은 골수와 같은, 혈액-형성 조직에서 일반적으로 출발하는 암의 그룹이고, 다수의 비정상 혈액 세포를 생 산하고 혈류로 들어가도록 하는 원인이다. 백혈병의 주요 유형은 적어도 다음을 포함한다: 골수(bone marrow)의 골수 성분(myeloid element)(백혈구, 적혈구, 거핵구)이 연관된 급성 또는 만성 골수 백혈병, 및 림프구 계통의 세포가 연관된 급성 림프모구 백혈병(ALL) 및 만성 림프사이클릭 백혈병(lymphocytic leukemia: CLL). 백혈병 의 상이한 유형들에 대해 50종 이상의 시판 약물이 식품의약국(Food and Drug Administration: FDA)에 의해 승 인되었다. 단일 약물 치료에 더하여, 다중 약물의 조합이 광범위하게 사용되어 왔다. 그러나, 백혈병은 매우 복 잡하며, 약물의 선택은 백혈병의 유형에 의존한다. 추가의 약물 및 치료는 여전히 크게 가치있다.

[0004] 신장 선암종의 대략 208,500개의 새로운 케이스들이 매년 전세계에서 진단되고 있으며, 모든 암에 대해 2% 보다 조금 낮은 것으로 계산된다. 최대 비율이 북아메리카에서 최저 비율은 아시아 및 아프리카 지역에서 기록되어 있다. 신장 선암종의 2가지 가장 일반적인 유형은 신장 세포 암종(RCC) 및 신우의 이행 세포 암종(TCC)이다. 신장 선암종에 대한 치료는 질병의 유형 및 단계에 의존한다. 신장 선암종은 흔히 화학치료요법 및 방사선치료

요법에 반응하지 않기 때문에, 수술은 전형적으로 치료의 중심이며 많은 경우에 이는 화학치료요법 및 방사선치료요법을 포함하지 않는다. 미국에서 전체 5년 생존율은 73%이다. 새로운 치료 방법이 생존율을 더 개선시키기 위해 여전히 요구되고 있다.

[0005]

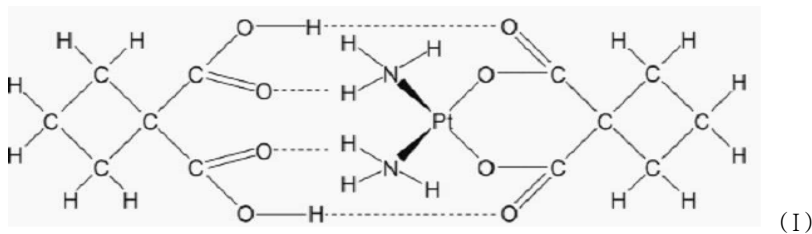
흑색종은 멜라닌세포로 알려진 색소-함유 세포를 형성하는 피부암의 유형이다. 흑색종은 초기 단계에서 진단되지 않을 경우 매우 위험하며 이는 피부암과 관련한 사망의 대부분(75%)을 유발한다. 전 세계적으로, 2012년에, 232,000명의 사람들에서 흑색종이 발생하였으며 55,000명 사망을 야기하였다. 호주 및 뉴질랜드는 세계에서 흑색종의 비율이 최대이다. 이는 대부분이 백인인 지역에서 최근 20년 내 보다 일반적인 것으로 되어왔다. 흑색종의 치료는 일반적으로 외과적 종양 제거를 포함한다. 흑색종이 감소하거나 확산할 수 있는 경향성은 종양이 피부의 층들을 얼마나 깊이 침투하였는지에 달려있다. 흑색종, 특히 역 확산되고 있는 흑색종의 다른 치료는 화학치료요법, 면역치료요법, 및 방사선 치료요법을 포함한다. 미국에서 5년 생존율은 평균 91%이다. 다양한 매개변수(종양 두께, 신체 위치, 연령 등)에 따라, 흑색종 환자에서 림프절 근처의 제거가 치료를 위해 추천될 수 있다. 흑색종이 신체의 다른 부위로 확산된 경우와 같은, 질병의 진행된 단계의 경우, 면역치료요법 또는 화학치료요법과 같은 치료가 일반적으로 추천되고 있다. 이들 치료 중 많은 것이 여전히 실험 중에 있고 이들의 사용은 제한될 수 있다. 종합적으로, 보다 효과적인 흑색종 치료가 여전히 크게 가치있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

디시클로플라틴(DCP)은 강한 수소 결합에 의해 결합되어 있는 카보플라틴(CBP) 및 1,1-시클로부탄 디카복실레이트(CBDCA)로 구성된 초 분자(super molecule)이다. 전임상 연구는 DCP가 수용액 속에서 CBP 불안전성의 문제를 극복하고 이의 항암 효과를 유지함을 보여주었다. 환자에서 제I상의 용량-증가 요법 연구(dose-escalation study)에서 임상 평가는 DCP가 100 내지 550 mg/m² 범위의 용량에서 견디어지며 암 환자에서 잠재적 효능을 가졌음을 보여주었다. DCP는 생체내(*in vivo*)에서 양호한 생체이용률 및 안전성을 나타내었으며, DCP-함유 화학치료요법에 대한 추천되는 용량은 450 mg/m²이다. DCP는 현재 전립선 암종에서 단독치료요법으로서 및 비-폐암 연구에서 파클리탁셀과 조합으로 연구되고 있다. DCP의 화학 구조는 식 I로 나타난다:



[0007]

[0008]

일부 연구들이 DCP의 특징의 항암 효과를 보여주었지만, 특수한 암에 있어서 구체적인 효과는 명확하게 나타나 있지 않다. 암의 상이한 유형들의 복잡성 및 구별되는 특성으로 인하여, DCP의 효과는 여전히 추가로 연구될 필요가 있다. 본 발명은 백혈병, 신장 선암종 및 흑색종의 예방 또는 치료에 있어서 DCP 효능을 보여준다.

과제의 해결 수단

[0009]

발명의 개요

[0010]

본 발명은 백혈병, 신장 선암종 또는 흑색종의 예방 또는 치료에 있어서 디시클로플라틴(DCP)의 약제학적 용도에 관한 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 본 발명은 암 세포와 DCP를 접촉시킴으로써 악성 암 세포를 사멸시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 암은 백혈병, 신장 선암종 또는 흑색종이다. 또한, 본 발명은 대상체에게 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이며, 여기서 질환은 백혈병, 신장 선암종 또는 흑색종이다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 DCP로 이루어지고; 다른 구체예에서, 약제학적 조성물은 DCP를 포함한다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 유효량의 DCP 및 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 보조 치료제를 포함한다.

[0011]

하나의 양태에 있어서, 본 발명은 백혈병의 예방 또는 치료에 있어서 DCP의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 백혈병을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 DCP를 포함

하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 백혈병으로 고통받는 대상체에서 악성 세포를 사멸시키는 방법에 관한 것이다.

[0012] 다른 양태에서, 본 발명은 신장 선암종의 예방 또는 치료에 있어서 DCP의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예에 있어서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 신장 선암종을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 신장 선암종으로 고통받는 대상체에서 악성 세포를 사멸시키는 방법에 관한 것이다.

[0013] 하나의 양태에서, 본 발명은 흑색종의 예방 또는 치료에 있어서 DCP의 용도에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 흑색종을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 흑색종으로 고통받는 대상체에서 악성 멜라닌 세포를 사멸시키는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 급성 전골수성 백혈병 환자로부터 유래된 세포주인, HL-60 세포에서 시험군 및 대조군 제제의 IC₅₀ 값을 나타낸다.

도 2는 만성 골수성 백혈병(CML) 환자로부터 유래된 세포주인, K562 세포에서 시험군 및 대조군 제제의 IC₅₀ 값을 나타낸다.

도 3은 태아 간세포 HL-7002에서 시험군 및 대조군 제제의 IC₅₀ 값을 나타낸다.

도 4는 인간 배아 신장 세포주 HEK293에서 시험군 및 대조군 제제의 IC₅₀ 값을 나타낸다.

도 5는 신장 암종 세포주인, A498 세포에서 시험군 및 대조군 제제의 IC₅₀ 값을 나타낸다.

도 6은 신장 암종 세포주인 ACHN 세포에서 시험군 및 대조군 제제의 IC₅₀ 값을 나타낸다.

도 7은 정상 간세포의 세포주인, HL-7002 세포에서 시험군 및 대조군 제제의 IC₅₀ 값을 나타낸다.

도 8은 정상 배아 신장 세포의 세포주인, HEK293에서 시험군 및 대조군 제제의 IC₅₀ 값을 나타낸다.

도 9는 뇌 및 부신에서 다발성 전이가 있는 흑색종 환자의 화학물질 처리 전(pre-chemo) 컴퓨터 단층촬영(CT)을 나타낸다.

도 10은 뇌 및 부신에서 다발성 전이가 있는 흑색종 환자의 화학물질 처리 후 CT를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 이 발명이 속한 당해 분야의 숙련가가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 언급된 모든 특허 및 공보는 이들의 전문이 참고로 포함된다.

[0016] 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 질환의 예방 또는 치료를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 의도된 적용을 유효화하기에 충분한 여기에서 기술된 하나의 화합물 또는 화합물들의 조합의 양을 의미한다. 치료학적 유효량은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 쉽게 결정될 수 있는 의도되는 적용(시험관 내 또는 생체 내) 또는 치료되는 대상체 및 질환 상태(예를 들어, 대상체의 체중, 연령 및 성별), 질환 상태의 중증도, 투여의 방법 등에 따라 변할 수 있다. 용어는 또한 표적 세포 및/또는 조직에서의 특정한 반응(예를 들어, 세포 증식의 감소 및/또는 조직의 형태학적 변형)을 유도할 수 있는 투여량에 적용된다. 특정한 투여량은 선택된 특정한 화합물, 준수되어야 할 투여요법, 화합물이 다른 화합물과 조합하여 투여되는지의 여부, 투여의 시기, 화합물이 투여되는 조직 및 화합물이 운반되는 물리적인 전달 시스템에 따라 변할 것이다.

[0017] 여기에서 사용되는 용어로서 치료학적 "효과"는 치료학적 이익 및/또는 예방적인 이익을 포함한다. "예방적인 이익"(예를 들어 "예방", "방지" 및 "발병할 가능성을 감소시키는 것")은 질환 또는 상태의 개시 이전에 약물을 투여하는 것에 의하여 질환 또는 상태의 출현을 지연시키거나 제거하는 것, 질환 또는 상태의 증상의 발병을 지

연시키거나 제거하는 것, 질환 또는 상태의 진전을 늦추거나, 정지시키거나, 또는 역전시키는 것, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. "치료 효과"(예를 들어 "치료" 및 "치료하다" 등과 같은 용어에 대하여)는 질환 또는 상태의 발병 이후 약물을 투여하는 것에 의하여 질환 또는 상태의 출현을 감소시키거나 제거하는 것, 질환 또는 상태의 증상을 감소시키거나 제거하는 것, 질환 또는 상태의 진전을 늦추거나, 정지시키거나, 또는 역전시키는 것, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0018] 여기에서 사용되는 용어로서 "대상체"는 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다. 일부 구체예에 있어서, 대상체는 포유동물이다. 일부 구체예에 있어서, 대상체는 인간이다.

[0019] 여기에서 사용되는 범위가, 예를 들어, 분자량 또는 화학식 등과 같은 물리적 또는 화학적 특성을 기술하는 경우, 범위의 모든 조합 및 부-조합(subcombination) 및 그 안의 특정한 구체예가 포함되도록 의도된다. 숫자 또는 수치 범위를 언급하는 경우에 용어 "약"의 사용은 언급되는 그 숫자 또는 수치 범위가 실험적인 변동성의 범위 이내(또는 통계학적 실험 오차의 범위 이내)의 근사치이고, 따라서 그 숫자 또는 수치 범위는 변할 수 있다. 편차는 전형적으로 언급된 숫자 또는 수치 범위의 0% 내지 15%, 0% 내지 10%, 또는 0% 내지 5%이다. 용어 "포함하는"(및 "포함하다(comprise)" 또는 "포함한다(comprises)" 또는 "갖는(having)" 또는 "포함하는(including)" 등과 같은 연관된 용어들)은, 예를 들어, 기술된 특징으로 "이루어지거나 (consist of)" 또는 "필수적으로 이루어지는(consist essentially of)" 물질의 임의의 조성물, 방법 또는 공정의 구체예 등과 같은 그러한 구체예들을 포함한다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 화합물은, 예를 들어, 그 화합물의 다형체, 유사다형체(pseudopolymorph), 용매화물, 수화물, 비용매화된 다형체(무수물을 포함), 입체배와 다형체(conformational polymorph), 및 무정형 형태에 더하여 이들의 혼합물을 포함하는, 그러한 화합물의 결정 및 무정형 형태를 또한 포함한다. 특정한 결정 또는 무정형 형태가 언급되지 않는 한, "결정 형태" 및 "다형체"는, 예를 들어, 다형체, 유사다형체(pseudopolymorph), 용매화물, 수화물, 비용매화된 다형체(무수물을 포함), 입체배와 다형체, 및 무정형 형태뿐만 아니라, 이들의 혼합물을 포함하여, 화합물의 모든 결정 및 무정형 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0021] 다양한 양태 및 구체예에서 본 발명은 백혈병, 신장 선암종 또는 흑색종의 예방 또는 치료를 위한 DCP의 용도 및 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여함으로써 백혈병, 신장 선암종 또는 흑색종을 치료 또는 예방하는 방법을 수반한다.

[0022] 일부 구체예에서, DCP의 투여는 대상체의 면역학적 반응을 조절함으로써 질환을 치료하거나 예방한다. 특히 일부 구체예에서, DCP는 면역학적 반응을 향상시키고, 다른 구체예에서, DCP는 면역학적 반응을 감소시킨다. 예를 들면, 일부 구체예에서, DCP는 T 세포의 수 및/또는 유효성을 향상시키거나 감소시키고; 일부 구체예에서 DCP는 B 세포의 수 및/또는 유효성을 향상시키거나 감소시킨다. 면역학적 반응을 조절하기 위한 능력은 증식성 질환, 면역학적 질환, 퇴행성 질환, 및 다른 질환을 치료 및/또는 예방하는데 있어서 DCP의 효능에 영향을 미칠 수 있다.

[0023] 일부 구체예에서, 약제학적 조성물의 활성 성분은 DCP로 이루어질 수 있다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 DCP 및 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 보조 치료제를 포함할 수 있다. 추가의 치료제 또는 보조 치료제는: 엽산, 코엔자임 Q10, 커큐민, 글라타치온(GSH), 알로에 베라, 오리자놀, 5-플루오로우라실, 보르테조미드, 또는 이의 조합으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 치료될 특정한 질환에 따라, 추가의 치료제 또는 보조치료제는 이미 공지된 약물을 포함할 수 있다. 일부 구체예에 있어서, 추가의 치료제 또는 보조치료제는 질환을 치료하거나 예방하도록 이미 임상적으로 받아들여진 약물을 포함할 수 있다.

[0024] 일부 구체예에 있어서, 약제학적 조성물은 DCP 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용가능한 담체" 또는 "약제학적으로 허용가능한 부형제"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수지연제, 및 비활성 성분들을 포함하는 것으로 의도된다. 활성 약제학적 성분을 위한 이러한 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 약제학적으로 허용가능한 부형제의 용도는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 임의의 통상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 약제학적으로 허용가능한 부형제가 활성 약제학적 성분과 양립할 수 없는 것에 한하는 것을 제외하고는, 본 발명의 치료학적 조성물에서의 그의 용도가 고려된다. 다른 약물과 같은 추가의 활성 약제학적 성분이 또한 기술되는 조성물 및 방법에 포함될 수 있다.

[0025] 일부 구체예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 백혈병의 증상을 치료, 예방, 감소 또는 완화시키고/시키거나, 진행을 늦추거나 정지시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 대상체에게 DCP를 포함하는 약제학

적 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 백혈병은 급성 림프모구 백혈병(ALL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 모발 세포 백혈병(HCL), T-세포 전립프구성 백혈병(T-PLL), 거대 과립구 림프구성 백혈병, 또는 인간 T-림프친화 바이러스(HTLV)에 의해 유발된 T-세포 백혈병이다.

[0026] 일부 구체예에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 백혈병으로 고통받는 대상체에서 악성 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 악성 세포는 암성 백혈구이고 대상체는 전골수성 백혈병을 앓는다. 다른 구체예에서, 악성 세포는 암성 골수아세포이고 대상체는 골수성 백혈병을 앓는다.

[0027] 일부 구체예에서, 약제학적 조성물의 활성 성분은 DCP로 이루어진다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 보조 치료제를 추가로 포함한다. 특정한 구체예에서, 추가의 치료제 또는 보조 치료제는: 엽산, 코엔자임 Q10, 커큐민, 글루타치온(GSH), 알로에 베라, 오리자놀, 5-플루오로우라실, 및 보르테조미드로부터 선택될 수 있다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 DCP 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다.

[0028] 일부 구체예에서, 백혈병의 예방 또는 치료를 위해, 대상체에게 투여되는 약제학적 조성물 내 DCP의 양은 약 0.005 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 2.5 mg/kg 체중, 0.01 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 2.5 mg/kg 체중, 0.1 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 2.5 mg/kg 체중, 1 내지 20 mg/kg 체중, 약 1 내지 10 mg/kg 체중, 약 1 내지 5 mg/kg 체중, 또는 약 1 내지 2.5 mg/kg 체중일 수 있다. 일부 구체예에서, DCP의 양은 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중이다. 다른 구체예에서, DCP의 양은 약 1 내지 10 mg/kg 체중이다.

[0029] 일부 구체예에서, 백혈병의 예방 또는 치료를 위해, DCP를 포함하는 약제학적 조성물은 주사로 또는 경구 경로로 투여된다. 일부 구체예에서, 백혈병의 예방 또는 치료를 위해, DCP를 포함하는 약제학적 조성물은 적어도 1주, 2주 또는 3주 동안 투여된다.

[0030] 일부 구체예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 신장 선암종의 증상을 치료, 예방, 감소 또는 완화시키고/시키거나, 진행을 늦추거나 정지시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 DCP를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 신장 선암종은 신장 세포 암종, 신우 암종, 편평 세포 암종, 토리결 세포 종양(juxtaglomerular cell tumor, reninoma), 혈관근육지방종, 벨리니 관 암종(Bellini duct carcinoma), 신장의 투명 세포 육종(clear-cell sarcoma), 중배엽성 신장종, 빌름스 종양(Wilms' tumor), 또는 혼합된 상피 기질 종양이다.

[0031] 일부 구체예에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 DCP를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 신장 선암종을 앓는 대상체에서 악성 신장 세포를 사멸시키는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 악성 신장 세포는 신장 암종 세포이다.

[0032] 일부 구체예에서, 약제학적 조성물의 활성 성분은 DCP로 이루어진다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 보조치료제를 더 포함한다. 특정한 구체예에 있어서, 추가의 치료제 또는 보조치료제는: 엽산, 코엔자임 Q10, 커큐민, 글루타치온(GSH), 알로에 베라, 오리자놀, 5-플루오로우라실, 및 보르테조미드로부터 선택될 수 있다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 DCP 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다.

[0033] 일부 구체예에서, 신장 선암종의 예방 또는 치료를 위해, 대상체에게 투여되는 약제학적 조성물 내 DCP의 양은 약 0.005 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 2.5 mg/kg 체중, 0.01 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 2.5 mg/kg 체중, 0.1 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 2.5 mg/kg 체중, 1 내지 20 mg/kg 체중, 약 1 내지 10 mg/kg 체중, 약 1 내지 5 mg/kg 체중, 또는 약 1 내지 2.5 mg/kg 체중일 수 있다. 일부 구체예에서, DCP의 양은 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중이다. 다른 구체예에서, DCP의 양은 약 1 내지 10 mg/kg 체중이다.

[0034] 일부 구체예에서, 신장 선암종의 예방 또는 치료를 위해, DCP를 포함하는 약제학적 조성물은 주사로 또는 경구 경로를 통해 투여된다. 일부 구체예에서, 신장 선암종의 예방 또는 치료를 위해, DCP를 포함하는 약제학적 조성물은 적어도 1주, 2주 또는 3주 동안 투여된다.

- [0035] 일부 구체예에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 흑색종의 증상을 치료, 예방, 감소 또는 완화시키고/시키거나, 진행을 늦추거나 정지시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 DCP를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 흑색종은 흑색암전구종, 악성 흑자 흑색종, 표재 확산성 흑색종, 말단 흑자성 흑색종, 점막 흑색종, 결절성 흑색종, 폴리포이드 흑색종(polypoid melanoma), 결합조직형성 흑색종, 무흑색소성 흑색종(amelanotic melanoma), 연조직 흑색종, 소 신경-유사 세포를 지닌 흑색종(melanoma with small nevus-like cell), 스피즈 모반의 특징을 지닌 흑색종(melanoma with features of a Spitz nevus), 또는 포도막 흑색종이다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물의 활성 성분은 DCP로 이루어진다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 보조치료제를 더 포함한다. 특정한 구체예에서, 추가의 치료제 또는 보조치료제는: 엽산, 코엔자임 Q10, 커큐민, 글루타치온(GSH), 알로에 베라, 오리자놀, 5-플루오로우라실, 및 보르테조미드로부터 선택될 수 있다. 일부 구체예에서, 약제학적 조성물은 DCP 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다.
- [0036] 일부 구체예에서, 흑색종의 예방 또는 치료를 위해, 대상체에게 투여되는 약제학적 조성물 내 DCP의 양은 약 0.005 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.005 내지 2.5 mg/kg 체중, 0.01 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 2.5 mg/kg 체중, 0.1 내지 20 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 10 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 5 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 2.5 mg/kg 체중, 1 내지 20 mg/kg 체중, 약 1 내지 10 mg/kg 체중, 약 1 내지 5 mg/kg 체중, 또는 약 1 내지 2.5 mg/kg 체중일 수 있다. 일부 구체예에서, DCP의 양은 약 0.01 내지 5 mg/kg 체중이다. 다른 구체예에서, DCP의 양은 약 1 내지 10 mg/kg 체중이다.
- [0037] 일부 구체예에서, DCP를 포함하는 약제학적 조성물의 투여는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 또는 98일 동안 지속될 수 있다. 일부 구체예에서, DCP를 포함하는 약제학적 조성물의 투여는 적어도 1주 지속될 수 있다. 일부 구체예에서, DCP를 포함하는 약제학적 조성물의 투여는 적어도 2주 지속될 수 있다. 바람직한 투여 기간은 치료될 특정한 질환 및 대상체의 특정한 상태에 의존한다.
- [0038] 일부 구체예에서, 흑색종의 예방 또는 치료를 위해, DCP를 포함하는 약제학적 조성물은 정맥내 주사로 또는 경구 경로를 통해 투여된다. 일부 구체예에서, 흑색종의 예방 또는 치료를 위해, DCP를 포함하는 약제학적 조성물은 적어도 1, 2 또는 3주 동안 투여된다.
- [0039] 다음의 실시예는 본 발명을 설명하고 나열하기 위해 제공된다. 따라서, 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 많은 다른 구체예가 상기한 본 명세서 및 청구범위에 기술되어 있으므로, 본 발명의 범위 내에 또한 속하는 것을 잘 인식할 것이다.
- [0040] **실시예**
- [0041] 백혈병, 신장 선암종 및 흑색종에 있어서 DCP의 효과는 생체내 및 시험관내 연구 및 임상 시험으로부터 수득된 결과에 의해 입증될 수 있다. 그러나, 본 발명의 범위는 본원에 제공된 실시예에 의해 제한되지 않는다.
- [0042] *백혈병에 대한 연구*
- [0043] 인간 전골수성 백혈병 세포(HL-60 세포)를 시험관 내에서 배양하고 세포 생존능을 처리 후 세포 수를 정량화함으로써 측정하였다. HL-60 세포를 일련의 단계별 농도의 DCP, 카보플라틴, 에토포시드 및 메토틀렉세이트(MTX)로 처리하였다. 시험군 제제 및 대조군 제제의 OD490 값을 비교한 후, 세포 증식의 상대적인 억제율 지수를 얻었다. IC₅₀ 값은 SPSS16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. DCP, 카보플라틴, 에토포시드 및 MTX의 IC₅₀ 값은 각각 18.558 μ M, 17.321 μ M, 15.342 μ M 및 15.285 μ M이었다. 결과는 도 1에 나타난다.
- [0044] 인간 불멸화 골수성 백혈병 세포주 K562 세포를 시험관 내에서 배양하고 세포 생존능을 처리 후 세포 수를 정량화함으로써 측정하였다. K562 세포를 일련의 단계별 농도의 DCP, 카보플라틴, 에토포시드 및 MTX로 처리하였다. 시험군 제제 및 대조군 제제의 OD490 값을 비교한 후, 세포 증식의 상대적인 억제율의 지수를 얻었다. IC₅₀ 값은 SPSS16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. DCP 및 카보플라틴의 IC₅₀ 값은 각각 812.27 μ M 및 1206 μ M이었다. 에토포시드 및 MTX는 어떠한 독성도 나타내지 않았다. 결과는 도 2에 나타난다.
- [0045] 인간 불멸화 인간 태아 간 세포주 HL-7002 세포를 시험관 내에서 배양하고 세포 생존능을 처리 후 세포 수를 정량화함으로써 측정하였다. HL-7002 세포를 일련의 단계별 농도의 DCP, 카보플라틴, 에토포시드 및 MTX로 처리하였다. 시험군 제제 및 대조군 제제의 OD490 값을 비교한 후, 세포 증식의 상대적인 억제율의 지수를

수득하였다. IC₅₀ 값은 SPSS16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. DCP, 카보플라틴 및 에토포시드의 IC₅₀ 값은 각각 502.653 μ M, 503.486 μ M 및 511.62 μ M이었다. MTX는 독성을 거의 나타내지 않았다. 결과는 도 3에 나타낸다.

[0046] 인간 배아 신장 세포주 HEK293 세포를 시험관 내에서 배양하고 세포 생존능을 처리 후 세포 수를 정량화함으로써 측정하였다. HEK293 세포를 일련의 단계별 농도의 DCP, 카보플라틴, 에토포시드 및 MTX로 처리하였다. 시험군 제제 및 대조군 제제의 OD490 값을 비교한 후, 세포 증식의 상대적인 억제율의 지수를 수득하였다. IC₅₀ 값은 SPSS16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 에토포시드 및 MTX의 IC₅₀ 값은 각각 359.194 μ M 및 17.63 μ M이었다. DCP 및 카보플라틴은 어떠한 독성도 나타내지 않았다. 결과는 도 4에 나타낸다.

[0047] 필수적으로, 상기 결과는 DCP의 세포 독성이 대조군 제제인 카보플라틴, 에티포시드 및 MTX에 필적한다. 만성 골수성 백혈병(CML) 세포주인, K562는 에티포시드 및 MTX에 대해 내성이었지만, DCP 또는 카보플라틴에 대해서는 그렇지 않으나, DCP는 보다 높은 수준의 효능을 나타내었다. 또한, MTX는 정상 간세포 HL-7002 세포에서 유의적인 세포 독성을 나타내었지만, DCP, 카보플라틴 및 에티포시드는 매우 낮은 수준의 독성을 보여주었다. DCP 및 카보플라틴은 HEK293 세포에 대해 어떠한 독성도 나타내지 않았지만, 에티포시드는 낮은 수준의 독성을 보여주었다. 전체적으로, DCP는 정상 세포를 보존하면서 백혈병 세포 사멸을 유도하는데 있어서 효과적이다.

[0048] 세포 배양: HL-60, K562, HL-7002 및 HEK393 세포는 ATCC로부터 입수하였다. 상기 세포는 RPMI + 5% 소 태아 혈청(FBS) 하에 배양하였다.

[0049] 약물 처리 및 세포 생존능(MTS) 검정: 세포(10^5 /100mL/웰)를 96 웰 플레이트 내 배양하고, 0.01 μ M 내지 300 μ M의 단계별 농도에서 DCP로 처리하였다. 용매로 처리한 세포를 음성 대조군으로서 사용하였고, 카보플라틴, 에티포시드 및 MTX를 양성 양성 대조군으로서 사용하였다. 세포를 매일 모니터링하고, 세포 생존능을 Promega CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)로 제조업자의 매뉴얼에 따라 평가하였다. 세포 생존능을 생물-분광기(Perkin Elmer, 미국 매사추세츠주 왈탄 소재)에서 OD490 판독으로 모니터링하였다.

[0050] 데이터 분석: OD490 판독 데이터를 용해 완충액(lysis buffer)의 첨가 후에 1 내지 4시간 동안 매시간마다 수집하였다. 음성 대조군에 대한 처리 그룹의 OD490 데이터를 비교함으로써 세포 성장 억제 비의 지수를 수득하였다. 약물 반응을 IC₅₀은 SPSS 16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.

[0051] 신장 선암종 세포에 대한 연구

[0052] 신장 암종 세포주 A498 세포를 시험관 내에서 배양하고 세포 생존능을 처리 후 세포 수를 정량화함으로써 측정하였다. A498 세포를 일련의 단계별 농도의 DCP, 카보플라틴 및 플루오로우라실(5-FU)로 처리하였다. 시험군 제제 및 대조군 제제의 OD490 값을 비교한 후, 세포 증식의 상대적인 억제율의 지수를 수득하였다. IC₅₀ 값은 SPSS16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. DCP, 카보플라틴, 에토포시드 및 5-FU의 IC₅₀ 값은 각각 20.887 μ M, 18.357 μ M 및 18.164 μ M이었다. 결과는 도 5에 나타낸다.

[0053] 신장 암종 세포주 ACHN 세포를 시험관 내에서 배양하고 세포 생존능을 처리 후 세포 수를 정량화함으로써 측정하였다. ACHN 세포를 일련의 단계별 농도의 DCP, 카보플라틴 및 플루오로우라실(5-FU)로 처리하였다. 시험군 제제 및 대조군 제제의 OD490 값을 비교한 후, 세포 증식의 상대적인 억제율의 지수를 수득하였다. IC₅₀ 값은 SPSS 16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. DCP, 카보플라틴 및 5-FU의 IC₅₀ 값은 각각 15.379 μ M, 11.034 μ M 및 6.454 μ M이었다. 결과는 도 6에 나타낸다.

[0054] HL-7002 세포를 시험관 내에서 배양하고 세포 생존능을 일련의 단계별 농도의 DCP, 카보플라틴 및 5-FU로 처리한 후 세포 수를 정량화함으로써 측정하였다. 시험군 제제 및 대조군 제제의 OD490 값을 비교한 후, 세포 증식의 상대적인 억제율의 지수를 수득하였다. IC₅₀ 값은 SPSS16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. DCP, 카보플라틴 및 5-FU의 IC₅₀ 값은 각각 1467 μ M, 1410.23 μ M 및 356 μ M이었다. 결과는 도 7에 나타낸다.

[0055] HEK293 세포를 시험관 내에서 배양하고 세포 생존능을 일련의 단계별 농도의 DCP, 카보플라틴 및 5-FU로 처리한 후 세포 수를 정량화함으로써 측정하였다. 시험군 제제 및 대조군 제제의 OD490 값을 비교한 후, 세포 증식의 상대적인 억제율의 지수를 수득하였다. IC₅₀ 값은 SPSS16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. DCP, 카보플라틴

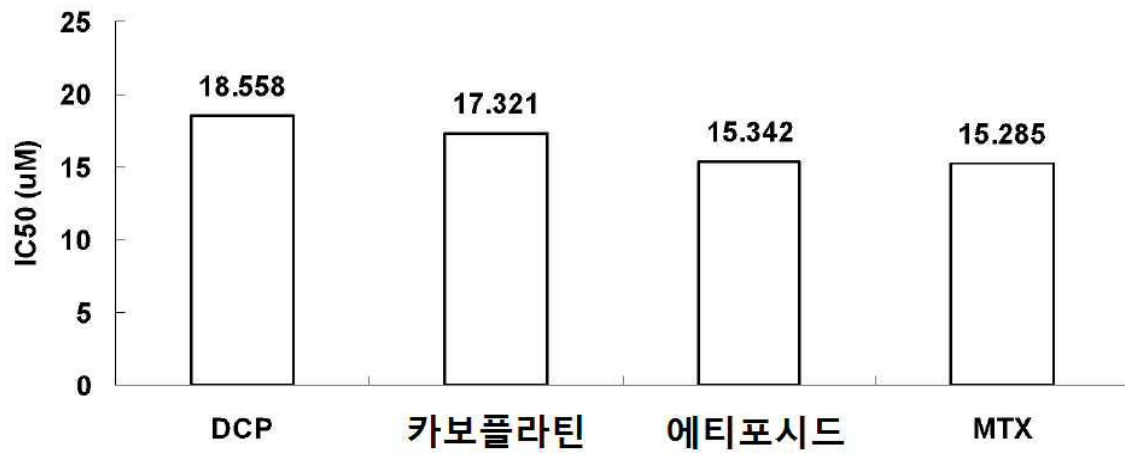
및 5-FU의 IC_{50} 값은 각각 463 μM , 410.23 μM 및 45 μM 이었다. 결과는 도 8에 나타낸다.

- [0056] 필수적으로, 상기 결과는 A498 및 ACHN 세포에서 DCP의 세포 독성이 카보플라틴 및 5-FU보다 약간 더 약하였음을 보여주었다. 또한, 상기 실험은, 정상의 간세포인, HL-7002, 및 정상의 배아 신장 세포인, HEK293 세포에 있어서, DCP의 세포 독성이 카보플라틴과 비교하여 더 약하고 5-FU보다는 훨씬 더 약함(4배 더 낮음)을 보여주었다.
- [0057] DCP는 신장 선암종 환자에서 효과적인 의약으로서 광범위하게 수용되는, 카보플라틴 및 5-FU와 비교하여 신장 선암종의 치료에 사용된다. DCP의 효과가 신장 선암종 세포의 세포 생존능을 억제하는데 있어서 카보플라틴 및 5-FU보다 약간 더 약하지만, DCP는 정상 세포에서 더 약한 독성을 나타내며, 이는 암 환자에 대해 덜 심각한 부작용을 나타낸다. 전체적으로, DCP는 정상 세포는 보존하면서 신장 선암종 세포 사멸을 유도하는데 있어서 효과적이다.
- [0058] 세포 배양: A498 및 ACHN 세포는 Tongbai Bio(중국 상하이 소재)로부터 구입하였다. HL-7002 및 HEK393 세포는 ATCC로부터 구입하였다. 세포는 RPMI + 5% 소태아 혈청(FBS)에서 배양하였다.
- [0059] 약물 처리 및 세포 생존능(MTS) 검정: 세포(10^5 /100mL/웰)를 96웰 플레이트 에서 배양하고, 0.01 μM 내지 300 μM 의 단계별 농도에서 DCP로 처리하였다. 용매로 처리한 세포는 음성 대조군으로 사용하였고, 카보플라틴, 및 5-FU는 양성 대조군으로서 사용하였다. 세포를 매일 모니터링하고, 세포 생존능을 Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)을 사용하여 제조 매뉴얼에 따라 평가하였다. 세포 생존능은 생물-분광기(Perkin Elmer, 미국 매사추세츠주 왈탄 소재)에서 OD490 판독으로 모니터링하였다.
- [0060] 데이터 분석: OD490 판독 데이터를 용해 완충액(lysis buffer)의 첨가 후에 1 내지 4시간 동안 매시간마다 수집하였다. 음성 대조군에 대한 처리 그룹의 OD490 데이터를 비교함으로써 세포 성장 억제 비의 지수를 획득하였다. 약물 반응을 IC_{50} 은 SPSS 16.0 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.
- [0061] 흑색종 환자에 대한 연구
- [0062] 다음의 경우는 뇌 및 부신에서 다발성 전이를 가진 흑색종 환자에서 DCP의 약제학적 용도를 요약한다. 전이성 종양 덩어리를 먼저 MRI에 의해 환자 뇌의 우측 전두엽 및 마루엽에서 검출하고, 1개월 후에 외과위가 제거하였다. 그러나, 이의 주변에 부종이 있는 새로운 종양 덩어리가 마루엽의 좌측에서 검출되었다. 종양은 보다 크게 성장하였으며, 종양 주변의 부종은 새로운 종양이 검출된 후 약 2개월째에 악화되었다. 환자를 DCP 용액(250mL의 수용액 중 150 mg의 DCP로 3일마다 1회)으로 약 3주 동안 처리하였다. MRI는 종양 수축을 보여주었으며, 종양 주변의 부종은 완화되었다.
- [0063] 화학-처리 전 CT는 종양 덩어리가 종양 주변의 부종과 함께, 뇌의 마루엽의 좌측에서 상당히 커져 있음을 나타내었다(도 9). 좌측 측 뇌실은 압박되었다. 제거된 종양의 징후는 우측 전두엽 및 마루엽에서 구별할 수 있었으며, 수술 후 회복이 우측 전 마루엽 끝에서 발견되었다. 중간선 구조는 우측으로 이동하였다.
- [0064] DCP 용액으로 약 3주 동안 처리한 후, 환자를 시험하였다(도 10). 화학-처리 후 CT는 화학-처리 전 CT와 비교하여 마루엽의 좌측에서 종양 덩어리가 수축하였고, 종양 주변의 부종은 유의적으로 완화되었음을 나타내었다. 우측 전두엽 및 마루엽에서 종양은 제거되었으며, 중간선 구조는 정상이었다.
- [0065] DCP를 포함하는 샘플 약제학적 조성물 및 투여
- [0066] 본 발명의 수성 또는 고체 약제학적 조성물은 적절한 양의 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 보조제와 함께 또는 없이, 유효량의 DCP를 포함한다. 치료제 또는 보조제 뿐만 아니라, DCP도, 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 수성 매질 속에 용해되거나 분산될 수 있다.
- [0067] 치료될 특정 암에 따라, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여는 표적 조직이 그 경로를 통해 이용가능하기만 하면 임의의 일반적인 경로를 통해서 수행할 수 있다. 예를 들면, 약제학적 조성물은 주입, 주사에 의해, 또는 경구 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0068] 다수의 약제학적 조성물이 제조되었다:
- [0069] 약제학적 조성물 샘플 A: 70 g의 DCP를 전-처리된 생리식염수 또는 5%의 수성 글루코즈(수 중)에 용해하고 용액의 최종 부피를 5.0 L로 조절하였다. 이후에 용액을 0.22 μm 필터를 통해 여과하고 각각 50.0 mL로 앰플 병

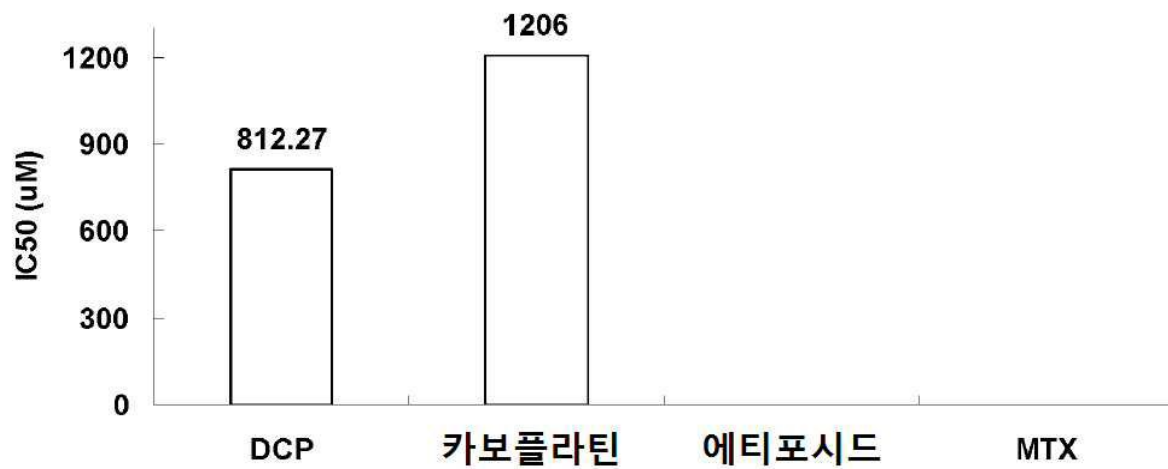
(ample bottle)으로 분산시켰다.

도면

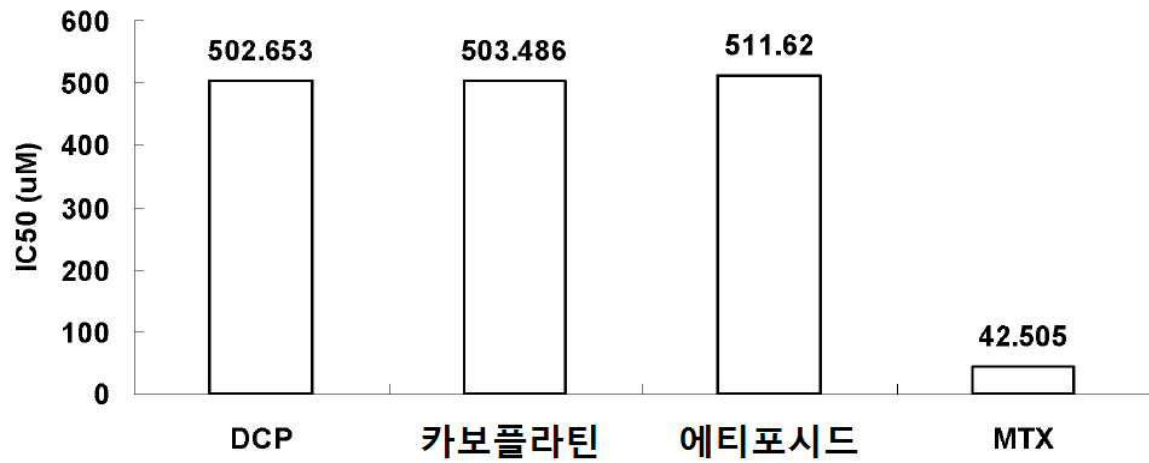
도면1



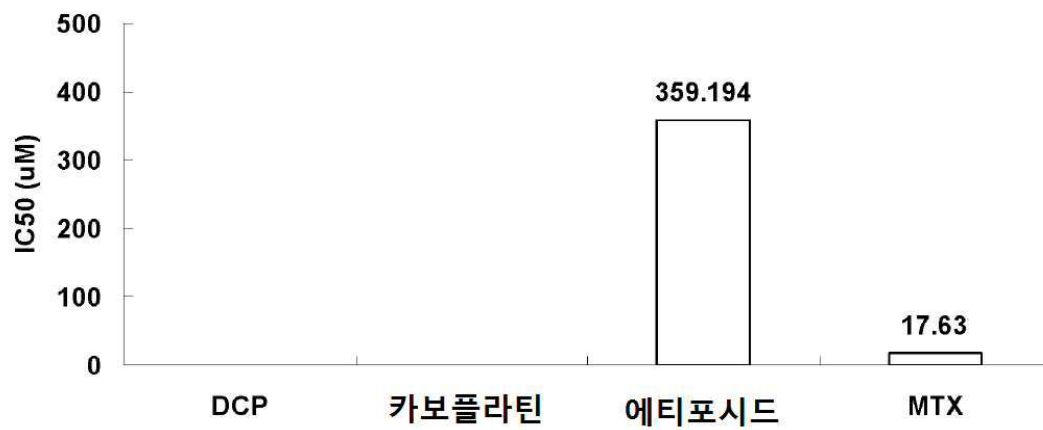
도면2



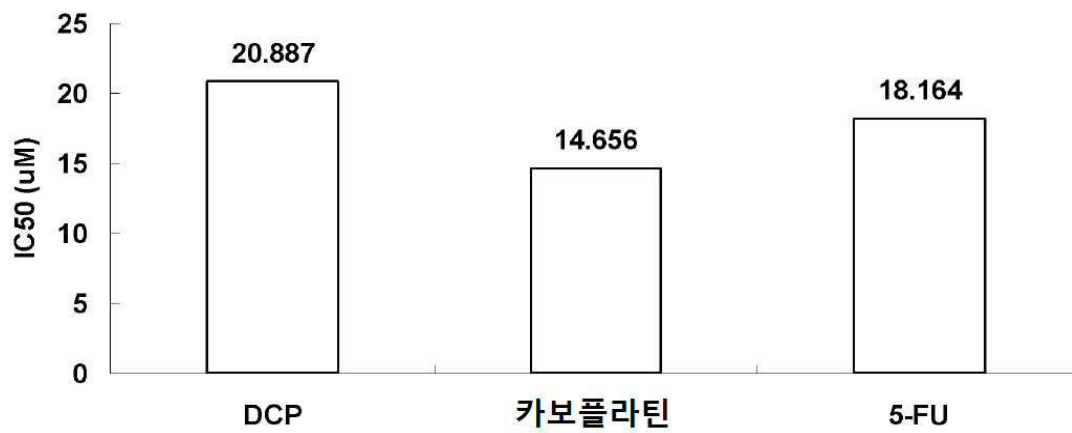
도면3



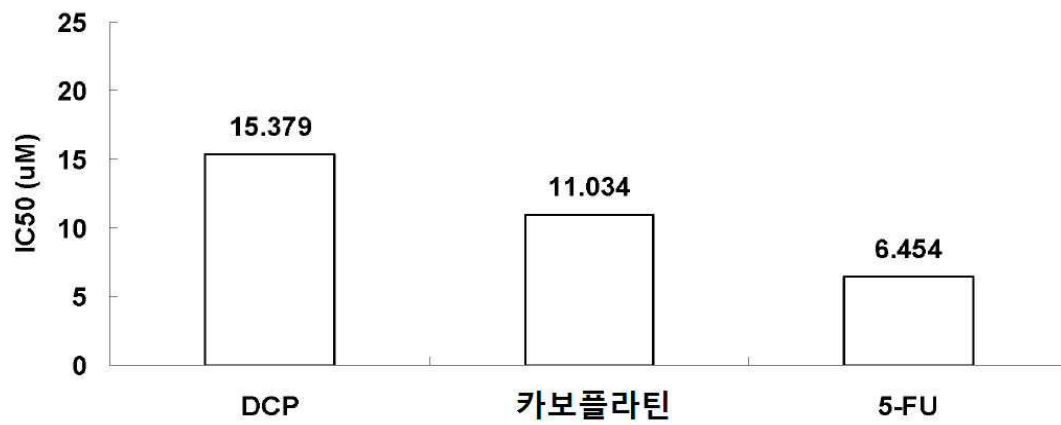
도면4



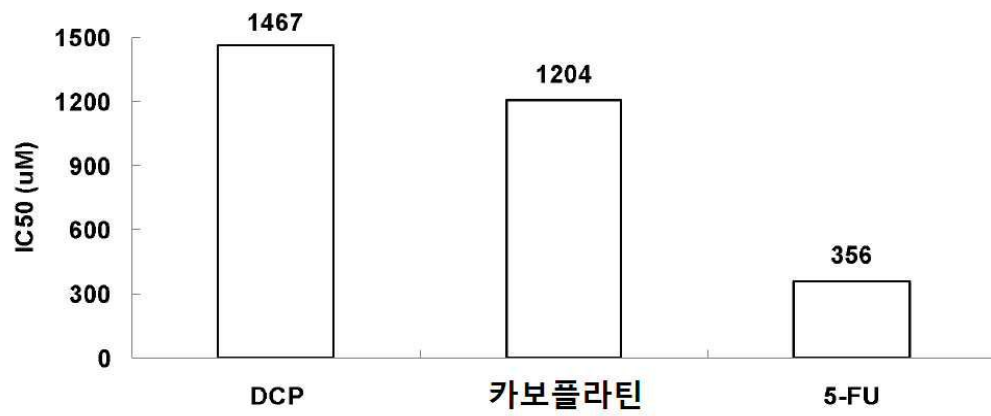
도면5



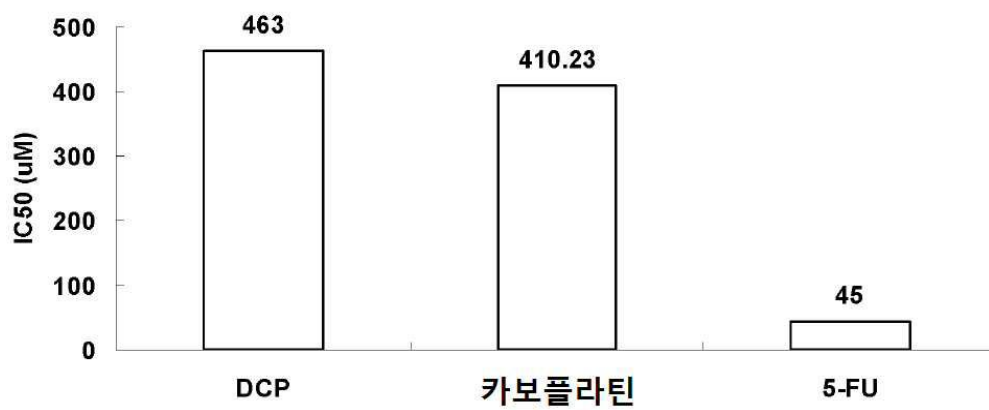
도면6



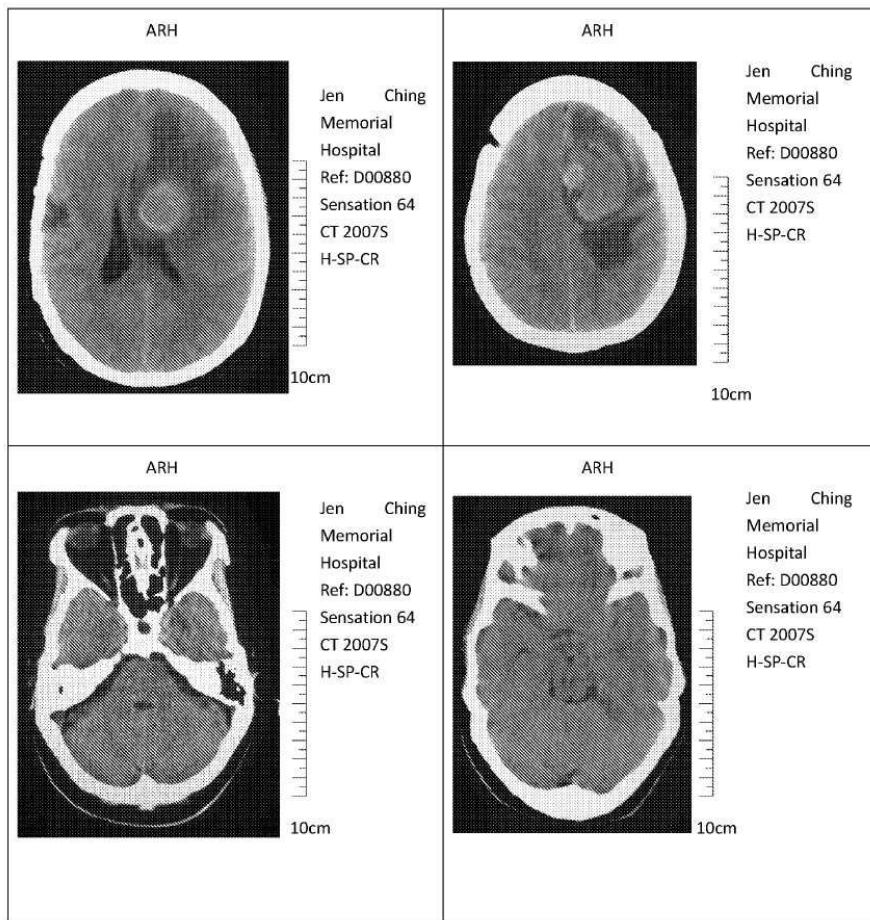
도면7



도면8



도면9



도면10

