



- (51) 국제특허분류:
A61K 31/352 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/005707
- (22) 국제출원일: 2015년 6월 8일 (08.06.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0069295 2014년 6월 9일 (09.06.2014) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (Ewha University - Industry Collaboration Foundation) [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이윤실 (LEE, Yun-Sil); 139-861 서울시 노원구 중계로 184, 108동 1101호, Seoul (KR). 나영화 (NA, Young Hwa); 410-720 경기도 고양시 일산동구 강촌로 114, 507동 1403호, Gyeonggi-do (KR). 권영주 (KWON, Youngjoo); 410-720 경기도 고양시 일산동구 강촌로 114, 507동 1403호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So-Young); 137-881 서울시 서초구 서초대로 344, 4층 안소영 국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

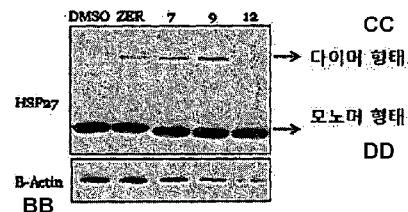
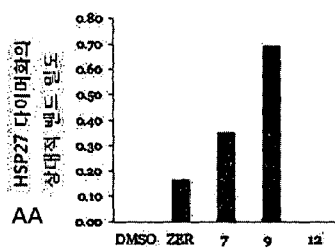
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: ANTICANCER DRUG COMPOSITION

(54) 발명의 명칭: 항암제 조성물

[Fig. 2]



AA ... Relative band density of HSP27 dimerization
BB ... β -Actin
CC ... Dimer form
DD ... Monomer form

(57) Abstract: The present invention provides a pharmaceutical composition for preventing and treating cancer, the composition containing, as an active ingredient, a compound represented by chemical formula 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof. The composition of the present invention generates HSP27-modified dimers to prevent normal HSP27-unphosphorylated multimers from functioning as a chaperone, thereby reducing cell protective ability that is originally performed by the chaperone, thus exhibiting an anticancer effect and, especially, reduces the resistance to radiation or anticancer drugs, thereby increasing the death of cancer cells.

(57) 요약서: 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 HSP27 변형된 이량체를 생성함으로써 정상적인 HSP27 비인산화 다량체가 샤페론으로 기능을 수행하지 못하게 하여 본래 샤페론이 수행하던 세포 보호 능력을 감소시킴으로써, 항암효과를 보이며, 특히 방사선 또는 항암제 내성을 감소시켜 암세포의 세포사 등을 증가시킨다.

명세서

발명의 명칭: 항암제 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온 또는 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9-온을 이용한 암의 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 인간 건강에 가장 치명적인 위협 중의 하나이다. 미국에서만 매년 1백 3십만명 정도의 새로운 암 환자가 발생하고, 이는 심혈관계 질환 다음으로 두 번째로 높은 사망 원인이며, 사망자 4명 중의 대략 1명이 암 환자인 것으로 추정된다. 이러한 사망의 대부분은 고형 암으로 인한 것이다. 특정 암의 의학적 치료에는 상당한 진보가 있어 왔지만, 모든 암에 대한 전반적인 5년 생존율은 과거 20년간 약 10% 정도만 개선되었다. 암 또는 악성 종양은 제어되지 않는 방식으로 신속하게 전이 및 성장하기 때문에, 제시간에 이를 검출하고 치료하는 것이 극도로 어렵다.
- [3] 암의 치료 요법에서 항암제 또는 방사선 치료에 대한 내성의 발현은 암 치료의 중대한 장애요소로 남아있으며, 내성이 생긴 세포는 작용 부위나 작용 기작이 상이한 다른 종류의 약제에 대해서도 교차 내성이 발생하는 경우가 많아 항암 치료 실패의 주요한 원인이 되고 있다. 이러한 항암제 내지 방사선에 대한 내성의 발현은 치료의 중대한 장애 요소로 남아있으며, 암 세포에 대한 내성 기작의 연구는 전 세계적으로 그 중요성이 점차로 증가하는 추세에 있으며, 암 세포에 대한 다양한 분자생물학적, 생화학적 정보들이 밝혀지고 있으나, 아직까지 암 세포의 약제 내지 방사선 내성 기작에 대한 이해는 초기 단계를 벗어나지 못하고 있는 실정이다.
- [4] 특히, 암 치료의 화학 요법 또는 방사선 요법은 암 치료에 있어서 불가결한 것으로 되어 있지만, 내성이 생기는 경우가 많다. 내성을 획득한 암 세포에서는, 치료에는 이용하고 있지않은 항암제, 혹은 작용 기전이나 구조가 상이한 복수의 약제에 대해서도 내성을 나타내는, 이른바 다제 내성을 나타내는 경우가 많다. 내성은 치료 상의 큰 문제이지만 그 중에서도 다제 내성은 심각하여, 그 극복약의 개발이 절실히 요망되고 있다.
- [5] 열충격 단백질(Heat shock protein) 중 하나인 HSP27은 1980년대에 발견되었다. HeLa세포를 배양할 때, 온도를 증가시키면 27kDa의 알려지지 않은 단백질이 발견되었는데 이 단백질이 HSP27로 세포 내에 편재하며 스트레스에 의해 과다 발현이 유도된다. HSP27은 세포의 생존, 세포의 이동, 암세포의 침습성을 향상시키며 HSP27의 발현이 높은 암세포의 경우 전이가 잘되며 항암치료에 대한 내성이 증가하는 양상을 보이게 된다. HSP27의 단백질 구조를 살펴보면

α -크리스탈린 도메인과 N-말단의 WDPF 도메인이 HSP27의 다량체 생성에 중요한 역할을 하게 된다. α -크리스탈린 도메인 내의 시스테인 잔기는 HSP27의 단량체와 단량체간의 이황화 결합(disulfide bond)을 형성하여 HSP27의 이량체를 형성하도록 한다. HSP27의 세포내 기능은 이러한 다량체 생성 정도와 관련이 있다. 인산화된 작은 단위의 HSP27 다량체는 액틴 필라멘트를 안정화시키며 인산화되지 않은 거대한 HSP27의 다량체는 HSP27의 이량체간의 상호작용에 의해 안정화되며 ATP에 영향을 받지 않는 샤페론으로의 기능을 수행하며 세포사와 관련이 있는 시토크롬 c 또는 Daxx등과 결합한다. 따라서 기존의 HSP 억제제가 아닌 새로운 형태의 저분자 물질을 이용하여 HSP27의 거대 다량체 형태를 저해함으로써 HSP27이 샤페론 기능을 수행하지 못하도록 한다면 방사선이나 항암제에 대한 내성이 극복될 것이다.

- [6] 이러한 배경 하에, 새로운 항암제, 방사선 내지 항암제 내성을 가진 암에 대한 신규 항암제 등에 대한 발굴이 절실한 실정이다.

발명의 상세한 설명

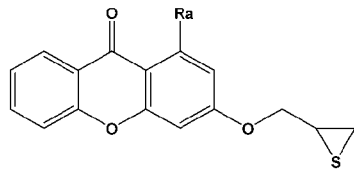
기술적 과제

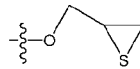
- [7] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [8] 본 발명은 또한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하고자 한다.
- [9] 본 발명은 또한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하고자 한다.
- [10] 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염의 용도를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명자들은 암, 특히 방사선 내지 항암제에 내성을 가진 암의 치료에 대해 예의 연구한 결과, 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온, 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 HSP27 이량체 형성에 효과를 보이며 방사선 내성 등을 저해하고 암세포 사멸을 유도함을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [12] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [13] [화학식 1]

[14]



[15] 상기 화학식 1에서 Ra는 -OH 또는  이다.

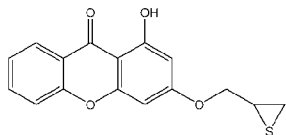
[16] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은

3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온 또는
1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온이며, 하기 화학식 2 또는 3의 구조를 가진다.

[17] 본 발명에 있어서, 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물이다.

[18] [화학식 2]

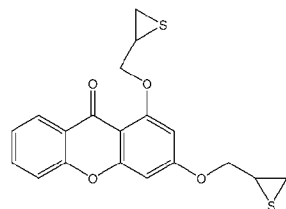
[19]



[20] 본 발명에 있어서, 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물이다.

[21] [화학식 3]

[22]

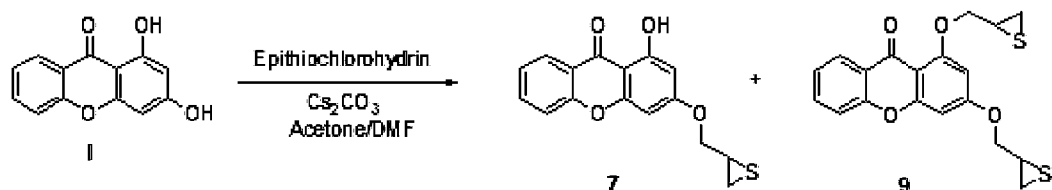


[23] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 1,3-디히드록시-9H-잔텐-9-온에 에피티오클로로하이드린(epithiochlorohydrin)을 처리하여 합성될 수 있다

[24] 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 합성 방법은 하기 반응식 1에 나타내었다.

[25] [반응식 1]

[26]



[27] 본 발명에서, 약제학적으로 허용되는 염은 의약품계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 칼슘, 칼륨, 나트륨 및 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염, 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산, 타르타르산 및 황산

등으로 제조된 무기산염, 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 시트르산, 말레산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만델산, 프로피온산, 시트르산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 하이드로 아이오딕산 등으로 제조된 유기산염, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 및 나프탈렌설폰산 등으로 제조된 설폰산염, 글리신, 아르기닌, 라이신 등으로 제조된 아미노산염 및 트라이메틸아민, 트라이에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민염 등이 있으나, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다.

[28] 본 발명에 있어서, 암은 폐암, 유방암, 골육종을 포함하며, 특히 방사선 내지 항암제에 내성을 가진 암에 현저한 효과를 보인다. 이러한 방사선 내지 항암제에 내성을 가진 암은 이에 제한되지 않으나 예컨대, 방사선 조사 내지 항암제 투여에 의한 치료가 수행되었던 폐암, 유방암 등을 포함한다.

[29] 본 발명의 조성물은 세포에서 변형된 HSP27 이량체를 생성하여 정상적인 HSP27 비인산화 다량체가 샤페론으로 기능을 수행하지 못하게 하고 본래 샤페론이 수행하던 세포 보호 능력을 감소시킴으로써, 항암효과를 보이며, 특히 방사선 또는 항암제 내성을 감소시켜 암세포의 세포사 등을 증가시킨다. 이에 따라, 화학 항암요법 내성 극복 또는 방사선 치료 내성 극복을 위해 효과적으로 사용될 수 있는 바, 항암 약물 치료 내성 환자 또는 방사선 치료 내성 환자 치료에 효과적이다.

[30] 본 발명의 조성물은 HSP90 억제제와 병용되어 사용될 수 있다. 일반적으로, 특정 열충격 단백질을 억제하면 다른 열 충격 단백질들의 발현이 더욱 증가하는 현상이 나타나며 HSP90 억제제의 부작용도 이러한 다른 열충격 단백질의 발현 증가에 의한다. 그러나, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염과 HSP90 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 상기과 같은 부작용을 개선하며 HSP27 생성을 억제하고 변형된 HSP27 이량체를 생성하며 다량체 생성을 저해함으로써, 다른 열충격 단백질의 발현 감소에도 영향을 미쳐 더 나은 항암 효과를 보인다. 본 발명의 바람직한 HSP90 억제제는 이에 한정되는 것은 아니지만, 라디시콜(radicicol) 또는 17-알릴아미노겔다나마이신(17-AAG, 17-allylaminogeldanamycin)이다.

[31] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.1~90 중량 % 함유할 수 있다.

[32] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄,

스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

- [33] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물 100중량부에 대해 1 ~ 50 중량부, 바람직하게는 20~ 50 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [34] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calciumcarbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [35] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

- [36] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 본 발명의 조성물의 양을 기준으로 0.01 내지 1000 mg/kg이고, 바람직하게는 1 내지 600 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

- [37] 아울러, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

- [38] 본 발명의 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

- [39] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며,

통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

- [40] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.
- [41] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하고자 한다.
- [42] 본 발명에서 사용되는 “치료학적으로 유효한 양”이라는 용어는 암의 예방 또는 치료에 유효한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염의 양을 나타낸다.
- [43] 본 발명의 암의 예방 또는 치료 방법은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염을 투여함으로써, 징후의 발현 전에 질병 그 자체를 다룰뿐만 아니라, 이의 징후를 저해하거나 피하는 것을 또한 포함한다. 질환의 관리에 있어서, 특정 활성 성분의 예방적 또는 치료학적 용량은 질병 또는 상태의 본성(nature)과 심각도, 그리고 활성 성분이 투여되는 경로에 따라 다양할 것이다. 바람직하게 1일 0.01 내지 1000 mg/kg으로, 보다 바람직하게는 1 내지 600 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 그러나, 이의 용량 및 용량의 빈도는 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 다양할 것이며, 적합한 용량 용법은 이러한 인자를 당연히 고려하는 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 쉽게 선택될 수 있다.
- [44] 또한, 본 발명의 암의 예방 또는 치료 방법은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염과 함께 질환 치료에 도움이 되는 추가적인 활성 제제의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 더 포함할 수 있으며, 추가적인 활성제제는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염과 함께 시너지 효과 또는 보조적 효과를 나타낼 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니지만, 바람직한 추가적인 활성제제는 열충격 단백질 90 억제제(HSP90)이며, 보다 바람직하게 라디시콜(radicicol) 또는 17-AAG(17-allylaminogeldanamycin)가 사용될 수 있다.
- [45] 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염의 용도를 제공하고자 한다. 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염은 허용되는 보조제, 희석제, 담체 등을 혼합할 수 있으며, 기타 활성제제와 함께 복합 제제로 제조되어 활성 성분들의 상승 작용을 가질 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니지만, 복합제제로써 바람직한 추가적인 활성성분은 열충격 단백질 90 억제제(HSP90)이며, 보다 바람직하게

- [46] 라디시콜(radicicol) 또는 17-AAG(17-allylaminogeldanamycin)가 사용될 수 있다.
본 발명의 용도, 조성물, 치료 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

발명의 효과

- [47] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물은 변형된 HSP27 이량체를 생성함으로써 정상적인 HSP27 비인산화 다량체가 샤페론으로 기능을 수행하지 못하게 하여 본래 샤페론이 수행하던 세포 보호 능력을 감소시킴으로써, 항암효과를 보이며, 특히 방사선 또는 항암제 내성을 감소시켜 암세포의 세포사 등을 증가시키고 현저한 항암 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

- [48] 도 1은 변형된 HSP27 이량화를 유도하는 화합물을 스크리닝한 결과를 나타내는 도이다.
- [49] 도 2는 화합물 7(3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온) 또는 화합물 9(1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온)의 변형된 HSP27 이량화를 나타내는 도이다.
- [50] 도 3은 화합물 7(3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온) 또는 화합물 9(1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온)의 농도 및 시간 의존적 변형된 HSP27 이량화를 나타내는 도이다.
- [51] 도 4는 화합물 7(3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온) 또는 화합물 9(1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온)의 세포 사멸 효과를 나타내는 도이다.
- [52] 도 5는 자외선 조사와 화합물 7(3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온) 또는 화합물 9(1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온)의 병용 처리시 세포 생존율을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [53] 도 6은 이중 이식 마우스에서 자외선 조사와 화합물 7(3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온) 또는 화합물 9(1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온)의 병용 처리시 종양 부피 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [54] 도 7은 세포사멸 마커인 TUNEL 또는 세포 증식 마커인 Ki-67을 이용하여 면역조직 화학법에 따라 종양 조직을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [55] 도 8은 HSP90 억제제와 화합물 9(1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온)의 병용 처리에 따른 HSP27 발현 억제를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- [56] 도 9는 HSP90 억제제와 화합물 7(3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온) 또는 화합물

9(1,3-비스((티이란-2-일)페톡시)-9H-잔텐-9온)를 병용 처리시 세포 사멸 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [57] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [58] <제조예> 3-((티이란-2-일)페톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온 (7) 및 1,3-비스((티이란-2-일)페톡시)-9H-잔텐-9-온 (9)의 제조
- [59] (1) 3-((티이란-2-일)페톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온 및 1,3-비스((티이란-2-일)페톡시)-9H-잔텐-9-온의 제조
- [60] 1,3-디히드록시-9H-잔텐-9-온(1,3-dihydroxy-9H-xanthen-9-one, 0.50 g, 2.19 mmol)과 Cs_2CO_3 (1.43 g, 4.28 mmol)이 들어있는 아세톤/디엠에프(DMF) (14 mL/7 mL) 반응 혼합액에 에피티오클로로히드린(epithiochlorohydrin, 0.71 g, 6.57 mmol)을 첨가하고 62 °C에서 20시간 동안 환류 교반하였다. 반응 종료 후 물을 가하고 에틸아세테이트(EtOAc)로 추출하고, 유기층을 모아 포화 소금물(brine)로 씻고 무수 MgSO_4 로 수분을 제거하였다. 고체 물질을 여과하여 제거하고, 여액의 용매를 감압 하에서 증류하고, 남은 잔사를 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (전개용매, 에틸아세테이트:n-헥산 = 1:2 1:1(v/v))로 분리 정제하여 연노랑색의 고체 (화합물 7) (40 mg, 6.1%)과 흰색의 고체 (화합물 9) (148 mg, 18.1%)을 얻었다.
- [61] 화합물 7: m.p. 178 °C; R_f 0.82 (에틸 아세테이트:n-헥산 = 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 2.38 (dd, J = 0.8, 5.2 Hz, 1H), 2.67 (dd, J = 0.8, 6.0 Hz, 1H), 3.29-3.35 (m, 1H), 4.03 (dd, J = 7.0, 10.3 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 5.8, 10.3 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.36-7.47 (m, 2H), 7.74 (ddd, J = 1.3, 7.0, 7.4 Hz, 1H), 8.27 (dd, J = 1.3, 8.1 Hz, 1H), 12.89 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) 24.0, 30.9, 73.1, 93.4, 97.6, 104.3, 117.7, 120.7, 124.2, 126.0, 135.2, 156.1, 157.8, 163.3, 165.4, 180.9 ppm; LC-ESI: m/e 301.1 $[\text{M}+1]^+$.
- [62] 화합물 9: R_f 0.68 (에틸 아세테이트:n-헥산 = 1:1(v/v)); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.36 (dd, J = 5.2, 1.2 Hz, 1H), 2.45 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 2.65 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 2.71 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.26-3.32 (m, 1H), 3.44-3.50 (m, 1H), 3.95 (dd, J = 10.0, 7.2 Hz, 1H), 4.03 (dd, J = 10.0, 6.8 Hz, 1H), 4.25 (dd, J = 10.0, 6.0 Hz, 1H), 4.45 (dd, J = 10.0, 4.8 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.31-7.38 (m, 2H), 7.64 (ddd, J = 7.2, 7.2, 2.0 Hz, 1H), 8.28 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100

MHz, CDCl₃) 23.9, 24.7, 30.9, 31.2, 73.1, 74.0, 94.4, 97.4, 108.2, 117.2, 123.2, 124.2, 126.9, 134.1, 155.2, 159.9, 161.0, 163.6, 175.5 ppm;

[63] (2) 3-메톡시-1(티이란-2-일메톡시)-9H-잔텐-9온의 제조

[64] 본 발명 화합물과 대비되는 비교예 중 하나로

3-메톡시-1(티이란-2-일메톡시)-9H-잔텐-9온을 다음과 같이 제조하였다.

1,3-디히드록시-9H-잔텐-9-온(1,3-dihydroxy-9H-xanthen-9-one, 0.50 g, 2.19 mmol)과 K₂CO₃ (0.30 g, 2.17 mmol)이 들어있는 아세톤/디엠에프(DMF) (20 mL/ 10 mL) 반응 혼합액에 CH₃I (0.47 g, 3.29 mmol)을 넣고 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 이 반응 혼합액에 물을 가하고 생성된 고체물질을 여과하고, 건조하여 연노랑색의 고체 (1-하이드록시-3-메톡시-9H-잔텐-9-온, 388 mg, 73.7%)을 얻었다.

[65] Rf 0.58 (에틸 아세테이트:n-헥산 = 1:3(v/v)); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.89 (s, 3H), 6.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.37 (ddd, *J* = 8.0, 7.2, 0.8 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 7.71 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 1.6 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 12.86 (s, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 56.0, 93.0, 97.3, 104.2, 117.8, 120.9, 124.2, 126.1, 135.2, 156.2, 157.9, 163.8, 167.0, 181.0 ppm.

[66] 상기에서 얻어진 화합물인 1-하이드록시-3-메톡시-9H-잔텐-9-온 (0.10 g, 0.40 mmol)과 K₂CO₃ (0.08 g, 0.59 mmol)이 들어있는 아세톤/디엠에프(DMF) (5 mL/5 mL) 반응 혼합액에 에피티오클로로히드린(epithiochlorohydrin, 0.09 g, 0.80 mmol)을 첨가하고 64 °C에서 20시간 동안 환류 교반하였다. 반응 종료 후 물을 가하고 에틸아세테이트(EtOAc)로 추출하고, 유기층을 모아 포화소금물(brine)로 세척하고 무수 MgSO₄로 수분을 제거하였다. 고체 물질을 여과하여 제거하고, 여액의 용매를 감압 하에서 증류하고, 남은 잔사를 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (전개용매: 에틸 아세테이트:n-헥산 = 1:2 1:1(v/v))로 분리 정제하여 흰색의 고체 (화합물 12) (46 mg, 35.9%)을 얻었다.

[67] Rf 0.33 (에틸 아세테이트:n-헥산 = 1:3(v/v)); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.53 (dd, *J* = 5.2, 1.2 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 6.0, 1.2 Hz, 1H), 3.44-3.50 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.94 (dd, *J* = 10.4, 3.6 Hz, 1H), 4.45 (dd, *J* = 10.4, 4.0 Hz, 1H), 6.34 (dd, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.32 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 0.8 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 7.63 (ddd, *J* = 7.2, 7.2, 2.0 Hz, 1H), 8.29 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 24.7, 31.2, 56.0, 74.0, 93.9, 97.2, 107.9, 117.2, 123.2, 124.1, 126.9, 134.0, 155.2, 160.0, 160.9, 165.0 ppm.

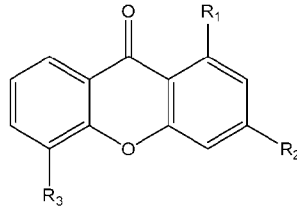
[68] <실시예 1> 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온 및 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9온의 변형된 HSP27 이량화 유도 확인

[69] 잔톤계 화합물들의 구조의 차이에 따른 HSP27의 변형된 이량화 정도를 확인하고자, 유사한 구조를 가지는 하기 화합물을 인체 유래 비소세포 폐암 세포인 NCI-H460 세포에 12.5 μM 농도로 3시간 처리하여 웨스턴 블랏으로

확인하였다. 처리된 화합물로 화합물 1 내지 12는 하기 화학식 4의 구조를 모핵으로 가지며, 하기 표 1과 같은 R1 내지 R3기를 치환기로 가진다.

[70] [화학식 4]

[71]



[72] [표 1] 화합물 1 내지 12에 있어서 R1 내지 R3 치환기 종류

[73]

화합물	R1	R2	R3
1	OH	C ₃ H ₅ O ₂	H
2	C ₃ H ₅ O ₂	C ₃ H ₅ O ₂	H
3	C ₃ H ₅ O ₂	C ₃ H ₅ O ₂	OCH ₃
4	OH	C ₄ H ₇ O ₂	H
5	C ₄ H ₇ O ₂	C ₄ H ₇ O ₂	H
6	C ₄ H ₇ O ₂	C ₄ H ₇ O ₂	OCH ₃
7	OH	C ₃ H ₅ OS	H
8	OH	C ₃ H ₅ OS	OCH ₃
9	C ₃ H ₅ OS	C ₃ H ₅ OS	H
10	C ₃ H ₅ OS	C ₃ H ₅ OS	OCH ₃
11	OCH ₃	C ₃ H ₆ ClO ₂	H
12	C ₃ H ₅ OS	OCH ₃	H

[74] 상기에서, 본원 발명의 화합물은 화합물 7

(3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온) 및 화합물 9
(1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9-온)이다.

[75] 실험을 위하여 12.5 μ M 농도로 상기 화합물 1 내지 12가 처리된 NCI-H460

세포는 10% FBS와 1X Antibiotic-Antimycotic (GIBCO-Invitrogen, Paisley, Scotland, UK)가 포함된 RPMI 1640 (RPMI, GIBCO-Invitrogen, Paisley, Scotland, UK)배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 배양기에서 3시간 배양하였다.

[76] 웨스턴 블랏을 수행하기 위해 화합물 1 내지 12를 처리한 세포를 1X PBS(0.14 M NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.83mMKH₂PO₄)로 2회 세척한 후 Radio Immunoprecipitation Polyacrylamide Assay buffer(20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1% NP-40, 1% Sodium deoxycholate, 1mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 4mM NaF)에 용해시켰다. 세포 현탁액을 13000 rpm으로 30분간 원심분리를 수행하여 상층액을 취하고 Bradford assay를 이용하여 Protein Dye 1 mL에 standard로는 1% BSA 용액을 8, 6, 4, 2, 0 μ L를 넣고 상층액 2 μ L를 넣어 96-well plate에 200 μ L씩 분주하여 ELISA 리더기에 넣고 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 같은 양의 단백질을 함유하도록 6X 시료 버퍼(0.35 M

Tris(pH6.8), 3% 글리세롤, 1% Sodium Dodecyl Sulfate, 6 mM Dithiothreitol)를 넣어 샘플을 만들어 5분간 100 °C 물에 담가 끓이고 SDS-PAGE를 이용하여 같은 양의 단백질을 분석했다. 웨스턴 블랏을 위한 일차 항체는 Goat polyclonal anti-HSP27(sc-1029) 및 β -actin(sc-47778)를 사용하였으며, 이차항체는 Donkey anti goat(sc-2020), Goat anti rabbit(sc-2004), Goat anti mouse(sc-2005)를 사용하였다.

- [77] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 본원 발명의 화합물 7 및 9는 HSP27 이량화를 유도하는 화합물로 알려진 Zerumbone(ZER)과 대비하여서도 더 높은 HSP27 이량화를 유도하였다. 반면, 유사한 잔톤계 화합물에 해당하더라도 치환기가 상이한 화합물 1 내지 6, 8 및 10 내지 12의 경우 HSP27의 이량화를 거의 유도하지 못하거나 매우 낮은 수준으로 유도함을 확인하였다.
- [78] 또한, 상기 스크리닝 결과에서 HSP27 이량화에 현저한 효과를 보이는 화합물 7 및 9에 대해서는 NCI-H460 세포에 12.5 μ M 농도로 3시간 처리한 후 다시 웨스턴 블랏을 수행하여 이량화된 HSP27을 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다. HSP27 이량화를 유도하지 못하였던 화합물 12는 대조군으로 사용되었다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 화합물 7((3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온)) 및 화합물 9(1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9-온)는 HSP27 이량화에 효과를 보임을 확인할 수 있었다.
- [79] <실시예 2> 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9-온 및 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온의 시간 및 농도 의존적 HSP27 이량화 유도 확인
- [80] 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9-온 및 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온의 농도 의존적 HSP27 이량화를 확인하고자 NCI-H460 세포에 농도 의존적으로 0, 5, 10, 15 및 20 μ M 농도의 화합물 7, 9 또는 12를 12시간 처리하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 또한, 시간 의존적 HSP27 이량화를 확인하고자 NCI-H460 세포에 시간 의존적으로 0, 3, 6, 12 및 24시간 동안 10 μ M의 화합물 7, 9 또는 12를 처리하여 상기 실시예 1과 같이 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [81] 그 결과를 도 3의 A 및 B에 나타내었다.
- [82] 도 3에 나타낸 바와 같이, HSP27의 이량화를 유도하였던 화합물 7 및 화합물 9는 투여량과 투여 시간에 비례하여 증가하는 것을 확인하였다.
- [83] <실시예 3> 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9-온 및 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온의 세포사멸 효과 확인
- [84] HSP27 이량화에 따른 사페론 기능 억제 등을 통한 화합물 7 및 9의 암세포 사멸효과를 확인하기 위하여 MTT 검정을 수행하였다.
- [85] MTT 검정은 96 웰 플레이트에 NCI-H460세포를 같은 양으로 분주하고

플레이트에 잘 붙을 때까지 배양한 후 10 μ M 농도의 화합물 7, 9 또는 12를 각각 3칸씩 처리하였다. 이후 24시간 동안 더 배양하였던 세포의 배지를 제거하고 1X PBS로 세척하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) 시약을 1X PBS에 5 mg/ml 농도로 희석하여 100 μ L씩 칸마다 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 정도 배양한 후 세포가 보라색으로 변한 것이 확인되면 상층액을 제거하고 DMSO를 100 μ L씩 넣어 생성된 Formazan 결정을 잘 용해시켜준다. 용해가 끝나면 ELISA 리더기로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

- [86] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, HSP27 이량화가 큰 화합물 9에서 세포사멸이 가장 높게 나타났으며, 화합물 7 역시 HSP27 이량화 효과가 없는 화합물 12를 처리한 대조군과 대비하여 통계적으로 유의미하게 세포 사멸 효과가 나타남을 확인하였다.

[87] <실시예 4> 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온 및

3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온과 방사선 병용 처리

- [88] 항암 치료시에 이용되는 방사선 치료 방법과 시스템을 적용하기 위하여 NCI-H460 세포에 먼저 10 μ M 농도로 화합물을 처리하고 비교적 낮은 방사선 용량인 3Gy의 방사선을 노출시킨 후, 24시간을 배양하였다. 트립판 블루(trypsin blue)를 이용하여 살아 있는 세포 수를 측정하였다.

- [89] 세포 수 측정은 다음 방법으로 수행하였다. 35mm cell culture dish에 8x10⁵개의 세포를 각 그룹당 3개의 dish에 분주한 후 플레이트에 붙을 정도로 배양한 후 Zerumbone, 화합물 7, 9 또는 12를 처리하고, 일부 시험군에서는 이와 함께 방사선 조사를 수행하여 배양한 후 배지를 제거하고 1X PBS로 2번 세척하고 0.05 % Trypsin-EDTA(GIBCO-Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) 100 μ L를 처리하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 3분간 처리하였다가 배지 200 μ L를 넣어서 세포를 모은 후 trypan blue 90 μ L에 세포를 모은 용액 10 μ L를 넣어 잘 섞은 후 10 μ L씩 Counting chamber(Marientfeld, Germany)에 넣어 세포 수를 세었다.

- [90] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 화합물 7 및 9를 처리한 시험군은 Zerumbone을 처리한 시험군과 대비하여서도 세포 사멸이 더 높게 나타났으며, 특히, 자외선과 병용하여 처리시에 HSP27 이량화에 의해 방사선 내성을 극복함에 따라 더욱 현저한 세포 사멸 효과를 보이는 것을 확인하였다.

[91] <실시예 5> 누드마우스 이종이식 시스템을 이용한 화합물의 치료 효과 확인

- [92] BALB/C nude mouse에 NCI-H460 세포로 이종 이식을 수행한 후에, *in vivo* 에서양상을 확인하였다. BALB/C nude mouse에 NCI-H460 세포 1x10⁶를 주사하여 종양을 형성하였으며, 형성된 종양에 방사선을 종양부위에 5 Gy를 일주일에 1회 조사하면서, 3 mg/mL농도의 화합물 7, 9 또는 12 용액을 50 μ L씩 일주일에 3회 종양에 직접 주사하였다.

- [93] 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 종양 부위에 5 Gy의 방사선 조사와 화합물을 같이 투여한 그룹에서는 HSP27의 변형된 이량화를

가장 강하게 유도하는 화합물 9에서 종양의 크기가 가장 감소하였고 HSP27의 변형된 이량화를 유도하지 않는 화합물 12의 경우는 대조군과 비교하여 큰 차이가 없는 것이 관찰되었다.

[94] 또한 종양 조직을 세포사의 마커인 TUNEL과 세포 증식의 마커인 Ki-67을 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였다. 종양조직은 4% 포름알데히드 용액에 고정하였고, 파라핀으로 포매하였다. 조직절편은 두께 3 μ m 박절하고, 파라핀을 제거한 뒤 재수화하였다. 면역퍼옥시다아제 라벨링을 위해 세포내의 퍼옥시다아제를 0.3% H₂O₂에 15분간 노출하여 억제하였다. 그 후, 항원 복구를 위해 조직절편을 구연산 용액(pH 6.0)에 넣고 10분간 전자레인지에 가열하였다. 비특이성 면역 반응 배제를 위해 블로킹 용액에 20분간 노출시켰다. 조직 절편 위에 희석된 일차항체를 24시간동안 4°C에서 반응시켜 항원-항체 반응 복합체를 형성시켰다. 그 다음으로 중간항체(이차항체)로 항원-항체반응을 진행하였다. 이어서, 퍼옥시다아제-항퍼옥시다아제 복합체(PAP:Peroxidase-antiperoxidase)를 반응시킨 후 DAB(3,3-diaminobenzidine)기질로 정색 반응을 시켜 항원의 존재부위를 현미경으로 관찰하였다.

[95] 상기 면역 조직화학 수행 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 변형된 HSP27 이량화를 유도하는 7 번 및 9번 화합물에서 세포사가 증가하고 세포 증식이 감소하는 반면, 변형된 이량화를 유도하지 않는 12번 화합물의 경우는 대조군과 비교하여 큰 차이가 없는 것을 관찰하였다.

[96] 상기와 같은 결과를 통해서, HSP27의 변형된 이량화를 유도하는 화합물을 처리하여 발생하는 HSP27의 변형된 이량체는 HSP27의 거대한 다량체의 생성을 억제함으로써, HSP27의 샤페론 기능을 억제하여 세포 보호 기능을 감소시키고 방사선에 대한 내성을 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 실험 결과들을 통해 1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온 및 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온의 항암제로써의 효과, 방사선 치료와 병용 효과를 확인하였다.

[97] <실시예 6> HSP90 억제제와 병용 효과

[98] 열충격 단백질 90(Heat shock protein 90, HSP90)의 억제제로 알려진 Radicicol을 이용하여, HSP90을 억제함으로써 유도되는 HSP27 발현 유도를

1,3-비스((티이란-2-일)메톡시)-9H-잔텐-9온 및 3-((티이란-2-일)메톡시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온이 효과적으로 저해할 수 있는지 확인하였다. 즉, 본 발명 화합물의 투여가 HSP90 억제제에 의한 내성을 극복할 수 있는지 여부를 본 발명 화합물들의 투여를 통해 확인하였다.

[99] HSP90 억제제인 Radicicol 처리에 따른 HSP27 모노머 생성 여부를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다. NCI-H460세포에 각각 Radicicol 5 μ M 단독투여, 9번 화합물 10 μ M 단독투여, Radicicol과 9번 화합물 병용 투여 후 24 시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하여 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타낸 바와 같이, Radicicol 처리시 HSP27의 발현량이

증가하였으나, Radicicol과 9번 화합물을 병용 투여하자 Radicicol 투여량에 따라 증가하였던 HSP27의 발현이 크게 감소되는 것을 확인하였다.

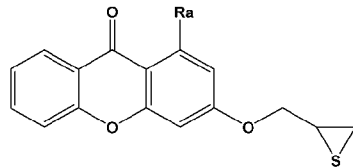
- [100] 또한, 상기와 같이 화합물을 처리한 후에 FACS를 이용하여 세포 사멸 여부를 확인하였다. FACS는 60 mm cell culture dish에 원하는 양의 세포를 분주 후 각각 24시간 배양한 후 1X PBS로 2회 세척한 후 500 μ L의 0.05 % Trypsin-EDTA(GIBCO-Invitrogen, Paisley, Scotland, UK)를 넣고 37°C 배양기에서 3분간 처리한 후 세포를 dish에서 떼어내 1300 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 1X PBS로 현탁액이 되도록 세포를 세척하여 1300 rpm에서 3분간 원심분리하는 것을 2회 실시하여 세척한다. 세척된 세포는 1X PBS로 문치지 않도록 풀어 500 μ L씩 5ml Polystyrene round-bottom tube에 넣은 후 1X PBS에 5 mg/mL으로 용해시킨 Propidium Iodide(PI; Sigma, Saint Louis, USA)용액을 5 μ L첨가하여 샘플을 준비하고 FACS(BD Biosciences, CA, USA)를 수행하였다.
- [101] 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 화합물 7 또는 9와 Radicicol을 병용투여한 시험군에서 암세포 사멸효과가 가장 현저함을 확인하였다.
- [102] 상기 결과를 통해서, HSP27을 변형된 이량체로 만들어 다량체 생성을 저해함으로써 샤페론 기능을 수행하지 못하게 하는 것은 방사선 치료에 대한 민감성을 증가시킴을 확인하였다. 또한, 다른 열충격단백질의 발현 감소에도 영향을 미쳐 항암제, 특히 항암제 또는 방사선 내성을 가지는 암에 대한 치료제로써 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

청구범위

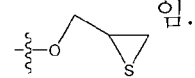
[청구항 1]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



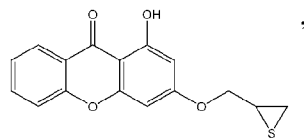
상기 화학식 1에서 Ra는 -OH 또는



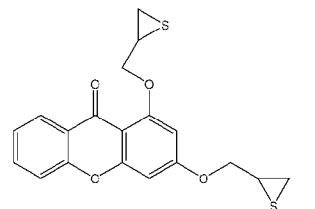
[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 2 또는 3으로 표시되는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 2]



[화학식 3]



[청구항 3]

제2항에 있어서, 열충격 단백질 90 억제제(HSP90)를 더 포함하는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

[청구항 4]

제3항에 있어서, 상기 열충격 단백질 90 억제제(HSP90)는 라디시콜(radicicol) 또는 17-알릴아미노겔다나마이신(17-AAG)인 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

[청구항 5]

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암 또는 골육종으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물

[청구항 6]

제5항에 있어서, 상기 암의 예방 및 치료용 조성물은 항암 약물 치료 내성 환자 또는 방사선 치료 내성 환자에게 투여되는 암의 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

[청구항 7]

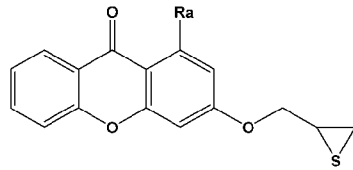
제6항에 있어서, 상기 암의 예방 및 치료는 열 충격

단백질27(HSP27)의 이량화를 통한 샤페론 기능 억제에 의한 것인 암의 예방 및 치료용 억제학적 조성물.

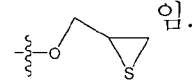
[청구항 8]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 억제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



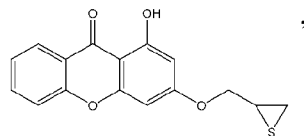
상기 화학식 1에서 Ra는 -OH 또는



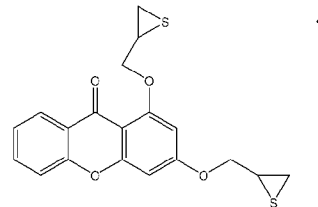
[청구항 9]

제8항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 억제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 2 또는 3으로 표시되는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 2]



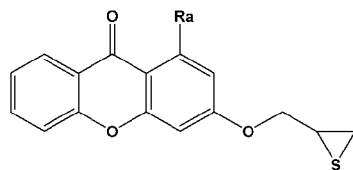
[화학식 3]



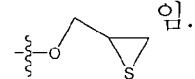
[청구항 10]

하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법:

[화학식 1]



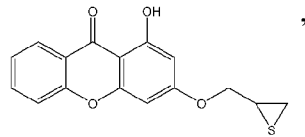
상기 화학식 1에서 Ra는 -OH 또는



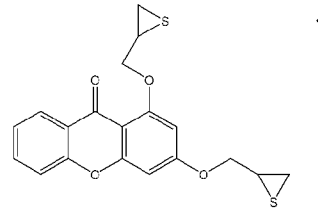
[청구항 11]

제10항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 또는 3으로 표시되는 암의 예방 및 치료 방법:

[화학식 2]

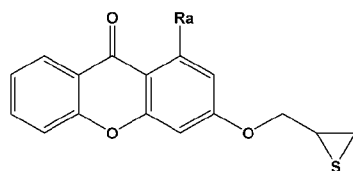


[화학식 3]

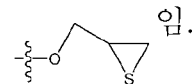


- [청구항 12] 제11항에 있어서, 열충격 단백질 90 억제제(HSP90)의 투여를 더 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 열충격 단백질 90 억제제(HSP90)는 라디시콜(radicicol) 또는 17-AAG인 암의 예방 및 치료 방법.
- [청구항 14] 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암 또는 골육종으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 암의 예방 및 치료 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 치료학적으로 유효한 양의 투여는 항암 약물 치료 내성 환자 또는 방사선 치료 내성 환자에게 투여되는 것인 암의 예방 및 치료 방법.
- [청구항 16] 암 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도:

[화학식 1]



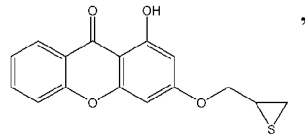
상기 화학식 1에서 Ra는 -OH 또는



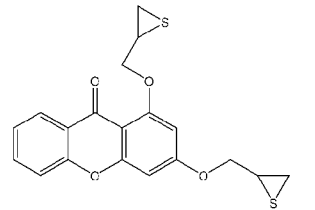
임.

- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 또는 3으로 표시되는 화합물인 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도:

[화학식 2]



[화학식 3]



[청구항 18]

제17항에 있어서, 상기 약제는 열충격 단백질 90 억제제(HSP90)를 더 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도.

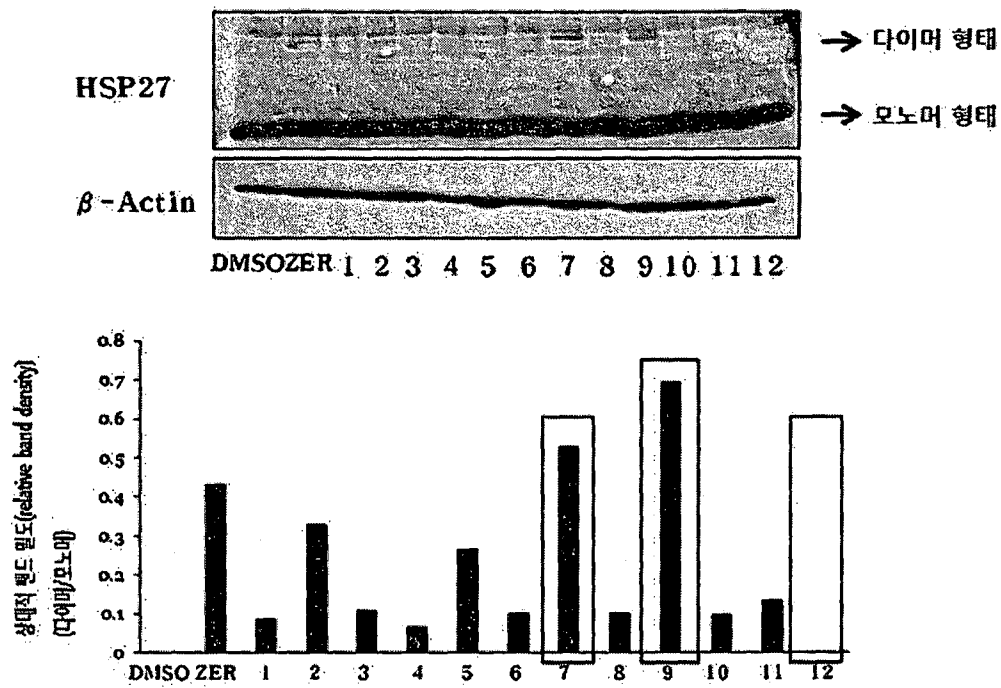
[청구항 19]

제18항에 있어서, 상기 열충격 단백질 90 억제제(HSP90)는 라디시콜(radicicol) 또는 17-AAG인 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도.

[청구항 20]

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암 또는 골육종으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 암의 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도.

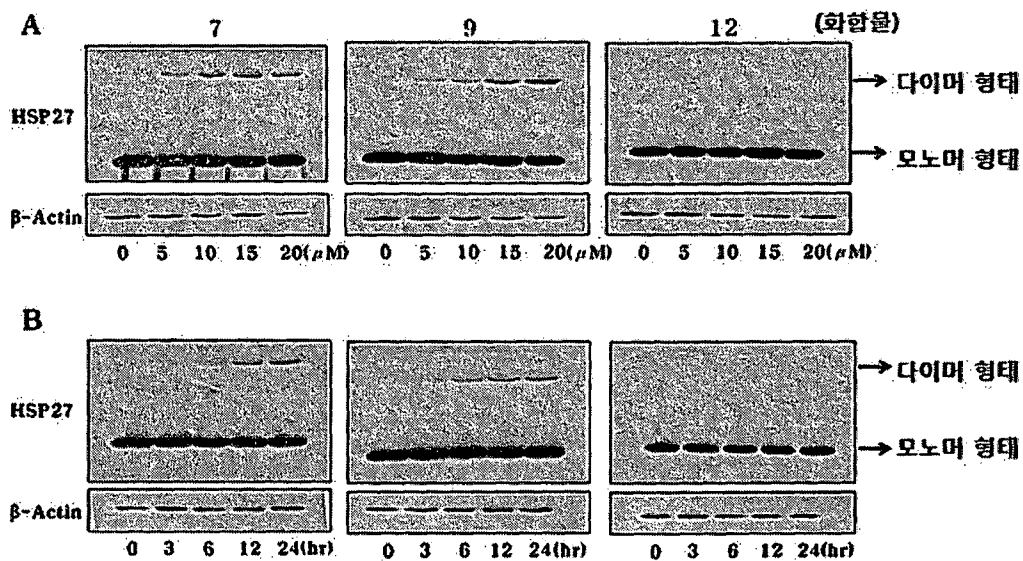
[Fig. 1]



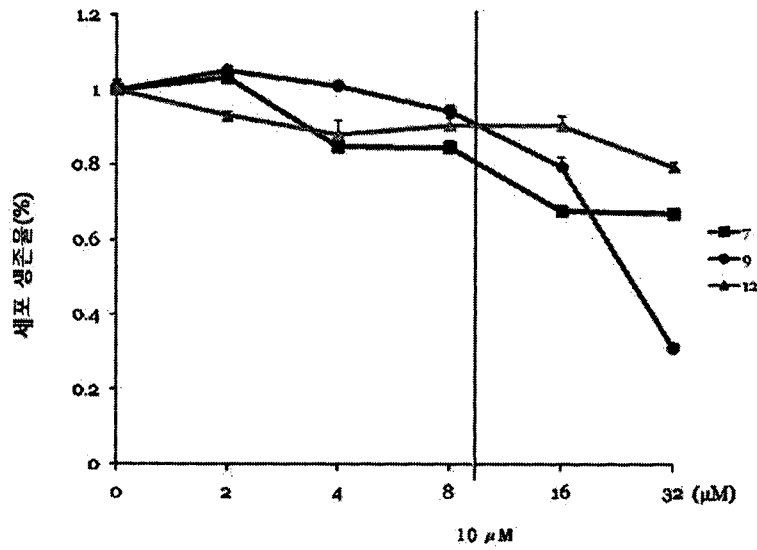
[Fig. 2]



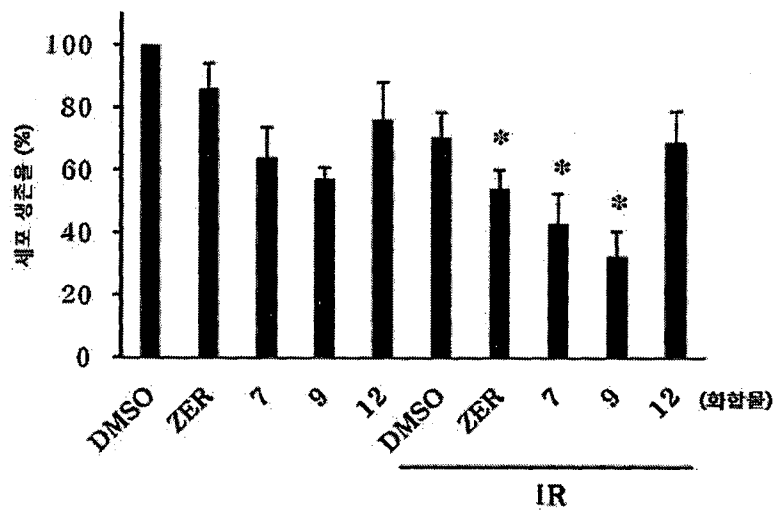
[Fig. 3]



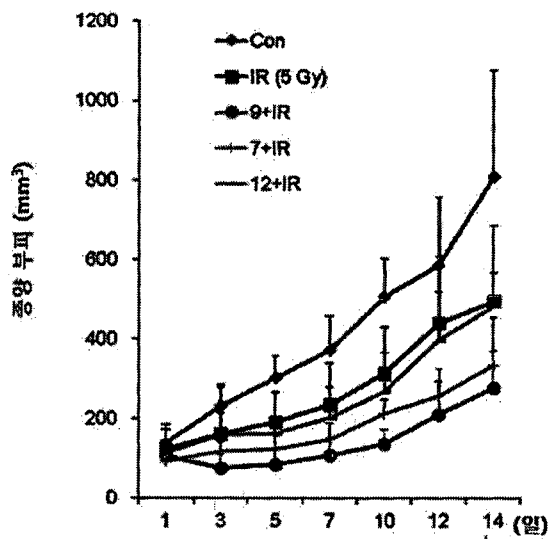
[Fig. 4]



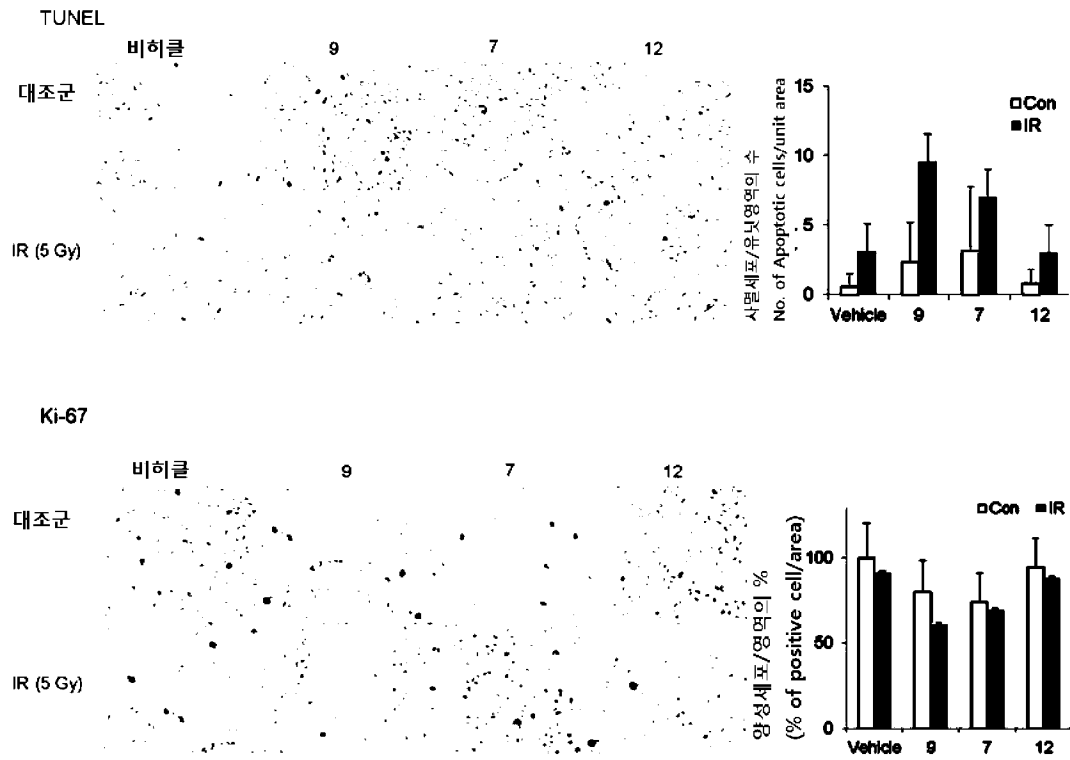
[Fig. 5]



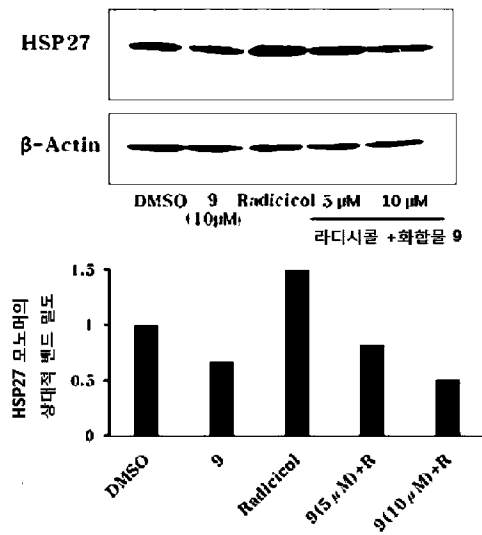
[Fig. 6]



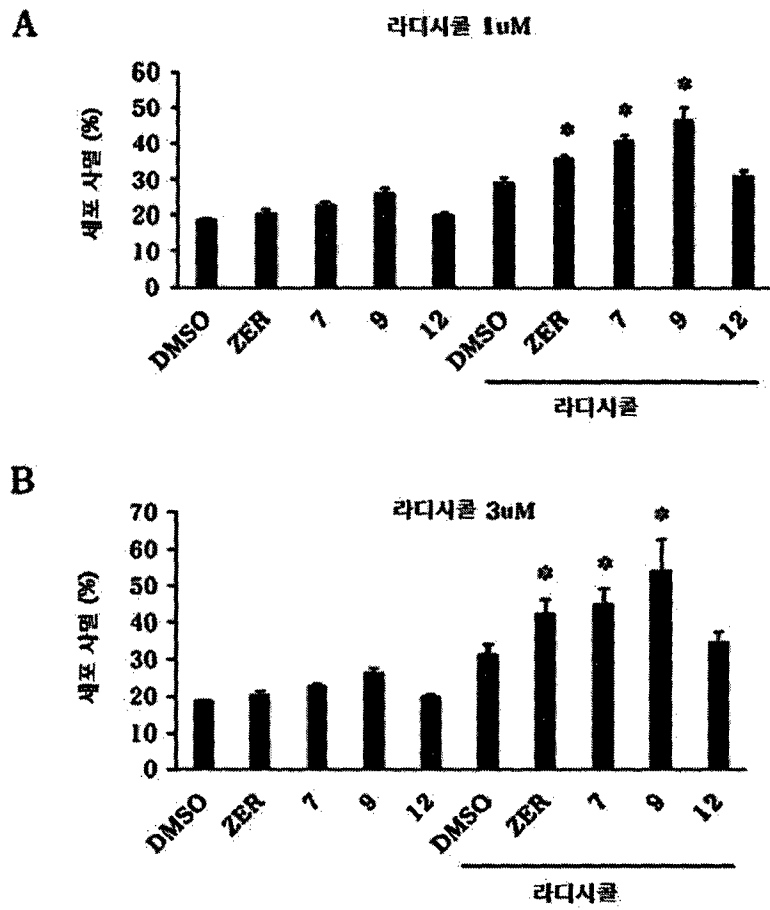
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/005707**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/35(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/352; C07D 311/86; C07D 335/16; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry & Caplus) & Keywords: xanthone, cancer, heat shock protein, xanthone, cancer, tumor, HSP, Heat shock protein, radicicol, glycoprotein

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011-021864 A2 (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION et al.) 24 February 2011 See abstract; example 4; experimental example 1; paragraph [0399]; claims 1, 2, 9, 12-17	1-9, 16-20
X	KIM, Ji Hyeon Master's Thesis, Modulation of P-glycoprotein function by synthesized xanthone analogues. 2009. Graduate School of Ewha Womans University See abstract; figures 3, 4; compounds SW-13, SW-14, SW-23; tables 2, 3	1-9, 16-20
X	SU, QUAN-GUAN et al., Anti-tumour effects of xanthone derivatives and the possible mechanisms of action. Invest New Drugs, 2011, Vol. 29, pp. 1230-1240 See abstract; compounds 17-19; figure 1	1-9, 16-20
A	GUARNIERI, MICHAEL T. et al., The Hsp90 Inhibitor Radicicol Interacts with the ATP-Binding Pocket of Bacterial Sensor Kinase PhoQ. Journal of Molecular Biology, 2008, Vol. 379, pp. 82-93 See the entire document	1-9, 16-20
A	KR 10-2013-0009203 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 23 January 2013 See the entire document	1-9, 16-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 SEPTEMBER 2015 (16.09.2015)

Date of mailing of the international search report

17 SEPTEMBER 2015 (17.09.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/005707

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10-15 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and to a diagnostic method, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/005707

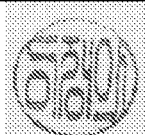
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARK, SO-EUN et al., 3-(3-Butylamino-2-hydroxy-propoxy)-1-hydroxy-xanthen-9-one acts as a topoisomerase IIa catalytic inhibitor with low DNA damage. European Journal of Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 69, pp. 139-145 See the entire document	1-9,16-20
PX	CHAE, SONG WHA et al., Xanthone analogues as potent modulators of intestinal P-glycoprotein. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, Vol. 93, pp. 237-245 See abstract; table 1; chemical equation 1; compounds 5-9, 17, 18, 21, 22	1-9,16-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/005707

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-021864 A2	24/02/2011	KR 10-1326900 B1	11/11/2013
		KR 10-2011-0020078 A	02/03/2011
		US 2012-0190724 A1	26/07/2012
		US 8846749 B2	30/09/2014
		WO 2011-021864 A3	14/07/2011
KR 10-2013-0009203 A	23/01/2013	KR 10-1281955 B1	03/07/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/35(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/352; C07D 311/86; C07D 335/16; A61P 35/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN (Registry & Caplus) & 키워드: 잔톤, 암, 열충격단백질, xanthone, cancer, tumor, HSP, Heat shock protein, radicicol, glycoprotein																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2011-021864 A2 (EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION 등) 2011.02.24 요약; 실시예 4; 실험예 1; 단락 [399]; 청구항 1, 2, 9, 12-17 참조</td> <td>1-9, 16-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>김지현 석사학위 청구논문, Modulation of P-glycoprotein function by synthesized xanthone analogues. 2009. 이화여자대학교 대학원 초록; 그림 3, 4; 화합물 SW-13, SW-14, SW-23; 표 2, 3 참조</td> <td>1-9, 16-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SU, QUAN-GUAN 등, Anti-tumour effects of xanthone derivatives and the possible mechanisms of action. Invest New Drugs, 2011, Vol. 29, pp. 1230-1240 요약; 화합물 17-19; 그림 1 참조</td> <td>1-9, 16-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>GUARNIERI, MICHAEL T. 등, The Hsp90 Inhibitor Radicicol Interacts with the ATP-Binding Pocket of Bacterial Sensor Kinase PhoQ. Journal of Molecular Biology, 2008, Vol. 379, pp. 82-93 문서 전체 참조</td> <td>1-9, 16-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2013-0009203 A (이화여자대학교 산학협력단) 2013.01.23 문서 전체 참조</td> <td>1-9, 16-20</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	WO 2011-021864 A2 (EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION 등) 2011.02.24 요약; 실시예 4; 실험예 1; 단락 [399]; 청구항 1, 2, 9, 12-17 참조	1-9, 16-20	X	김지현 석사학위 청구논문, Modulation of P-glycoprotein function by synthesized xanthone analogues. 2009. 이화여자대학교 대학원 초록; 그림 3, 4; 화합물 SW-13, SW-14, SW-23; 표 2, 3 참조	1-9, 16-20	X	SU, QUAN-GUAN 등, Anti-tumour effects of xanthone derivatives and the possible mechanisms of action. Invest New Drugs, 2011, Vol. 29, pp. 1230-1240 요약; 화합물 17-19; 그림 1 참조	1-9, 16-20	A	GUARNIERI, MICHAEL T. 등, The Hsp90 Inhibitor Radicicol Interacts with the ATP-Binding Pocket of Bacterial Sensor Kinase PhoQ. Journal of Molecular Biology, 2008, Vol. 379, pp. 82-93 문서 전체 참조	1-9, 16-20	A	KR 10-2013-0009203 A (이화여자대학교 산학협력단) 2013.01.23 문서 전체 참조	1-9, 16-20
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	WO 2011-021864 A2 (EWAH UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION 등) 2011.02.24 요약; 실시예 4; 실험예 1; 단락 [399]; 청구항 1, 2, 9, 12-17 참조	1-9, 16-20																		
X	김지현 석사학위 청구논문, Modulation of P-glycoprotein function by synthesized xanthone analogues. 2009. 이화여자대학교 대학원 초록; 그림 3, 4; 화합물 SW-13, SW-14, SW-23; 표 2, 3 참조	1-9, 16-20																		
X	SU, QUAN-GUAN 등, Anti-tumour effects of xanthone derivatives and the possible mechanisms of action. Invest New Drugs, 2011, Vol. 29, pp. 1230-1240 요약; 화합물 17-19; 그림 1 참조	1-9, 16-20																		
A	GUARNIERI, MICHAEL T. 등, The Hsp90 Inhibitor Radicicol Interacts with the ATP-Binding Pocket of Bacterial Sensor Kinase PhoQ. Journal of Molecular Biology, 2008, Vol. 379, pp. 82-93 문서 전체 참조	1-9, 16-20																		
A	KR 10-2013-0009203 A (이화여자대학교 산학협력단) 2013.01.23 문서 전체 참조	1-9, 16-20																		
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2015년 09월 16일 (16.09.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 09월 17일 (17.09.2015)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 이정아 전화번호 +82-42-481-8740 																		

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	PARK, SO-EUN 등, 3-(3-Butylamino-2-hydroxy-propoxy)-1-hydroxy-xanthen-9-one acts as a topoisomerase IIa catalytic inhibitor with low DNA damage. European Journal of Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 69, pp. 139-145 문서 전체 참조	1-9,16-20
PX	CHAE, SONG WHA 등, Xanthone analogues as potent modulators of intestinal P-glycoprotein. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015, Vol. 93, pp. 237-245 초록; 표 1; 반응식 1; 화합물 5-9, 17, 18, 21, 22 참조	1-9,16-20

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10-15
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10 내지 15는 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법 및 진단방법에 해당하는 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2015/005707

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-021864 A2	2011/02/24	KR 10-1326900 B1 KR 10-2011-0020078 A US 2012-0190724 A1 US 8846749 B2 WO 2011-021864 A3	2013/11/11 2011/03/02 2012/07/26 2014/09/30 2011/07/14
KR 10-2013-0009203 A	2013/01/23	KR 10-1281955 B1	2013/07/03