

명세서

발명의 명칭: RHOA 펩티드 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제

기술분야

- [1] 본 발명은 RhoA 펩티드 억제제를 유효성분으로 함유하는 항암제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] Wnt 신호 전달은 세포 증식, 분화, 극성, 생존 및 발달 및 종양 발생 이벤트에 대한 이동을 포함한 다양한 생물학적 과정을 조절한다. Wnt 시그널링은 두 가지 경로, 즉 표준 변형 β -카테닌 의존 경로와 비표준 비 변형 β -카테닌 비의존 경로로 분류 될 수 있다 (Doble and Woodgett, 2003). Wnt 신호가 없으면 글리코젠 신타제 키나제-3 β (GSK-3 β)는 "과괴 복합체"에서 β -카테닌을 인산화한다. 이 복합체는 GSK-3 β , 선종성 용종증 대장균 (APC), Axin, β -카테닌 및 casein kinase I (CKI)로 구성되어 있으며, 여기서 CKI는 β -카테닌의 Ser45 잔기와 GSK-3 β 의 인산화를 프라이밍 한 다음 Thr- β -카테닌의 41, Ser37 및 Ser33은 26S proteasome에 의한 β -카테닌 분해를 유발한다 (Doble and Woodgett, 2003).
- [3] Wnt의 존재하에, GSK-3 β 는 β -카테닌이 아닌 지질 단백질 수용체 관련 단백질 6 (LRP6)을 인산화하므로 Axin이 GSK-3 β 및 APC 와 함께 LRP6에 결합하는데 필요한 표준 경로에 있는 세포 자극이 있다 (McCubrey et al., 2014). Wnt 자극으로 LRP6의 인산화된 N- 말단은 GSK-3 β 에 결합하여 β -카테닌을 인산화하는 GSK-3 β 의 능력을 억제한다 (Stamos et al., 2014). β -카테닌은 GSK-3 β 에서 방출되어 β -카테닌 안정성이 증가하고 세포질과 핵에 축적된다 (Wu and Pan, 2010).
- [4] Wnt 리간드 결합시, Wnt 수용체 Frizzled는 Disheveled (Dvl) 단백질에 결합하고, 이는 Formin 상 동성 어댑터 단백질인 Daam1 (Dvl 연관 활성제 1)을 통해 Rho-GTPase와 결합한다.
- [5] 흥미롭게도 Wnt3A는 표준 β -카테닌 의존적 신호 전달과 비표준적 Rho-GTPase 매개 신호 전달을 모두 유도한다 (Bikkavilli et al., 2008; Endo et al., 2005; Kishida et al., 2004; Qiang et al., 2003). RhoA 활성화와 β -카테닌 축적을 모두 유도하는 Wnt3A로 인해, CHO-K1 세포의 운동성은 β -카테닌경로의 파괴에 의해 억제되지 않았지만, ROCK의 억제제에 의해 부분적으로 차단되었다 (Endo et al., 2005). 더욱이, Wnt3A에 의한 β -카테닌 안정화나 β -카테닌의 핵 전좌는 RhoA의 영향을 받지 않았다 (Rossol-Allison et al., 2009). 따라서 β -카테닌 축적과 RhoA 활성화가 독립적으로 발생할 가능성이 있다. 그러나 최근에 β - 카테닌 축적은 Wnt3A에 대한 반응으로 RhoA 활성화에 의해 좌우된다고 보고되었다. 게다가, ROCK1은 GSK-3 β 의 Ser9를 인산화한다 (Kim et al., 2017b). 그러나 p-Ser9 GSK-3 β 가 Wnt3A

신호 전달 경로에서 β -카테닌 축적과 직접적으로 연관되어 있는지 여부는 명확하지 않다.

- [6] 작은 GTPase로서 RhoA는 여러 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자 (GEF)에 의해 활성화되어 RhoA에 GTP가 결합하여 활성화된 RhoA를 나타낸다. 반대로, RhoA는 GTP 가수 분해를 촉매하는 GTPase 활성화 단백질 (GAP)에 의해 비활성화 될 수 있으며, 이는 비활성인 GDP- 결합 RhoA로 이어진다. 비활성 RhoA-GDP는 Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor (RhoGDI)와의 복합체에서 cytosol에 국한되고 활성 RhoA-GTP는 RhoA의 C- 말단의 Cys 잔기에 공유 결합된 geranylgeranyl 그룹을 통한 연결을 통해 막에 국한된다. IKK γ (NEMO라고도 함)는 IKK γ (NEMO)를 통해 RhoA 활성화를 촉진하여 RhoA-RhoGDI 복합체의 해리를 유발한다는 점이 주목할만하다 (Kim et al., 2014). 활성 RhoA-GTP는 Rho 관련 코일 키나제 (ROCK)를 포함하는 이펙터 단백질에 결합하여 신호를 다운 스트림 신호 경로로 전송한다 (Jaffe 및 Hall, 2005). 특히 Tyr42 인산화된 RhoA는 IKK γ 에 결합하여 IKK β 활성화, I κ B 인산화 및 NF- κ B 활성화를 유도한다 (Kim et al., 2017a). 비정규 Wnt 신호에서 RhoA 경로는 Dvl 단백질로 작동하고 활성화된 Daam1이 WGEF(weak-similarity GEF), Rho GEF에 결합하여 RhoA-GTP의 형성을 촉진하여 ROCK의 활성화와 그에 따른 동적 세포 골격 재 배열을 유도한다.
- [7] 암에서 Rho GTPase는 종양 조직의 많은 경우에서 과다 발현된다 (Jung et al., 2020). 또한 GEF는 상향 규제되고 GAP는 하향 규제된다. ROCK과 같은 이펙터 단백질은 악성 조직에서 상향 조절된다. Rho-GAP 도메인-함유 DLC (간암-1에서 삭제됨)는 종양 억제 인자가 다양한 종양에서 하향 조절되는 것으로 간주된다. 따라서 다양한 암을 치료하기 위해 RhoA, Cdec42 및 Rac1, GEF 및 ROCK과 같은 이펙터 단백질을 포함한 Rho GTPase에 대한 억제제가 개발되었다 (Cardama et al., 2017). 현재 RhoA 활성을 직접 억제하는 화학적 억제제는 없다. C3 엑소엔자임(exoenzyme)은 RhoA의 아스파라긴 41에서 ADP- 리보 실화를 통해 RhoA, RhoB 및 RhoC를 억제할 수 있다 (Aktories et al., 1987; Ohashi and Narumiya, 1987). 그러나 C3-exoenzyme은 C3-exoenzyme이 단백질이기 때문에 세포로의 수송에 장벽이 있다. 대신, ROCK 억제제 Y27632는 RhoA 신호 전달 경로에 널리 사용되었다 (Uehata et al., 1997). (Rodrigues et al., 2001). C3 exoenzyme은 장의 trefoil factor pS2에 의해 유도된 상피 세포 MDCKts.src 및 대장 세포주 PCmsrc의 침입을 완전히 폐지했다 (Rodrigues et al., 2001). 논란의 여지가 있지만 암 세포 사멸은 RhoA와 ROCK에 의해 매개될 수 있다 (Li et al., 2014). 이로 인해 C3 엑소 엔자임과 Y27632 모두 항암제에 임상적으로 사용되지 않았다.
- [8] 특히 RhoA G17V {Yoo, 2014, 24584070; Sakata-Yanagimoto, 2014, 24413737; Palomero, 2014, 24413734; Manso, 2014, 24786457} 및 Y42C 돌연변이는 T 세포 림프종 및 미만성 위암에서 자주 발견된다 (Kakiuchi et al., 2014). RhoA G17V의

발현은 Jurkat 세포에서 증식을 증가시켰다. 그러나 이것은 야생형 RhoA의 과발현이 종양 형성을 촉진했다는 이전 보고서와 일치하지 않다. ROCK1 및 ROCK2의 많은 체세포 돌연변이가 발견되었으며 {Wei, 2016, 26725045}, Y27632 처리는 Db1 및 Ras에 의한 NIH3T3 세포의 형질 전환을 억제하는 것으로 보고되었다 (Sahai et al., 1999). 따라서, RhoA 활성을 직접 억제하는 화학적 억제제에 관한 기술 개발이 꾸준히 요구되고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

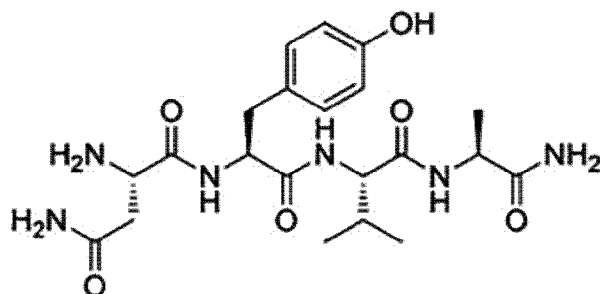
- [9] p-Tyr42 RhoA는 유방암 세포의 종양 형성에 밀접하게 관련되어 있으며, p-Tyr42 RhoA가 생존 확률에 중요하기 때문에 본 발명자들은 이펙터 단백질에 대한 결합을 끊음으로써 p-Tyr42 RhoA 활성을 억제하도록 개발했다. 또한 본 발명에서는 Wnt3A에 대한 RhoA 활성화와 β -카테닌 축적과의 관계를 조사하고자 하였다. Wnt3A는 p-Tyr42 RhoA와 β -카테닌의 상호 작용을 유도하고 p-Tyr42 RhoA는 β -카테닌을 핵에 전달하는 것으로 밝혀졌다. 또한 p-Tyr42 RhoA와 β -카테닌이 종양 형성을 조절한다는 것을 발견했다. 따라서 본원에서는 p-Tyr42 RhoA 및 β -카테닌 복합체의 파괴가 암세포 증식을 억제할 것이라고 가정했다. 결과적으로 우리는 세포 증식과 여러 암세포의 이동을 억제하는 EM3 약물을 개발했다.

기술적 해결방법

- [10] 본발명의 일 실시예에 따라, 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제가 제공된다.

[11] 화학식 1

[12]

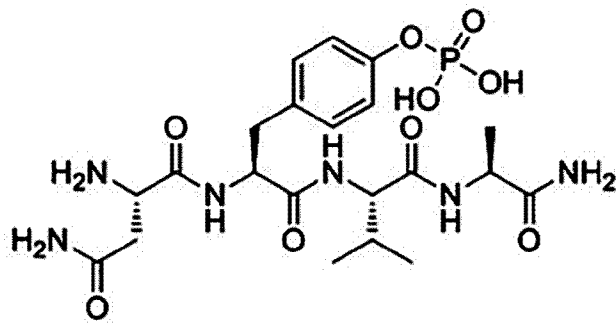


[13]

- [14] 본 발명의 일 실시예에 따라, 하기 화학식 2의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제가 제공된다.

[15] 화학식 2

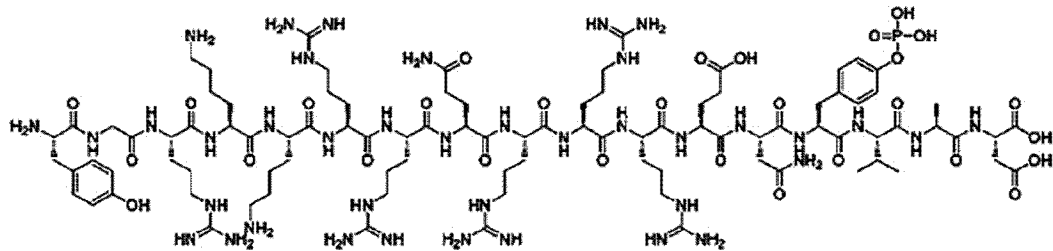
[16]



[17] 본 발명의 일 실시예에 따라, 하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제가 제공된다.

[18] 화학식 3

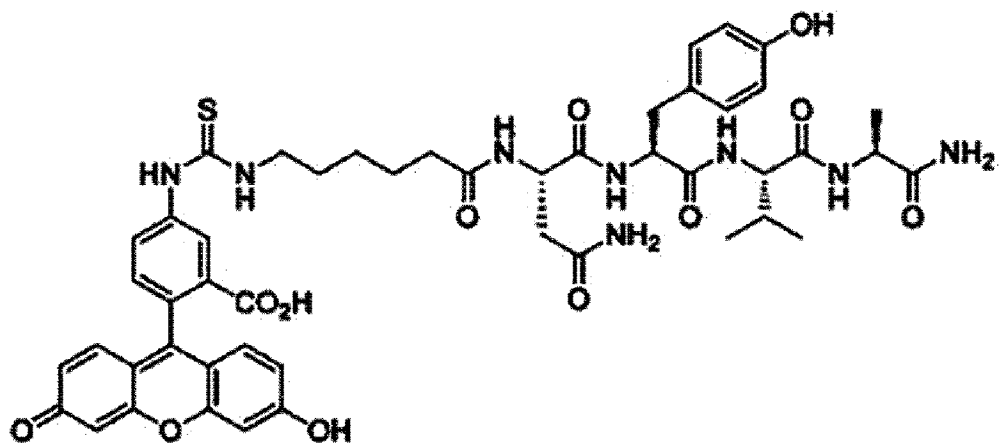
[19]



[20] 본 발명의 일 실시예에 따라, 하기 화학식 4의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제가 제공된다.

[21] 화학식 4

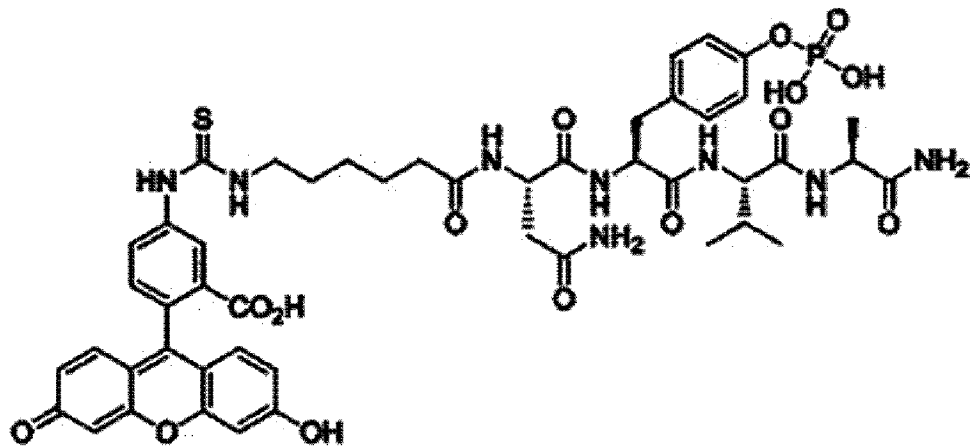
[22]



[23] 본 발명의 일 실시예에 따라, 하기 화학식 5의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제가 제공된다.

[24] 화학식 5

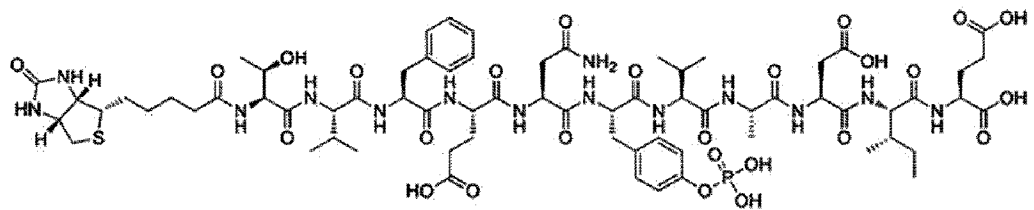
[25]



[26] 본 발명의 일 실시예에 따라, 하기 화학식 6의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제가 제공된다.

[27] 화학식 6

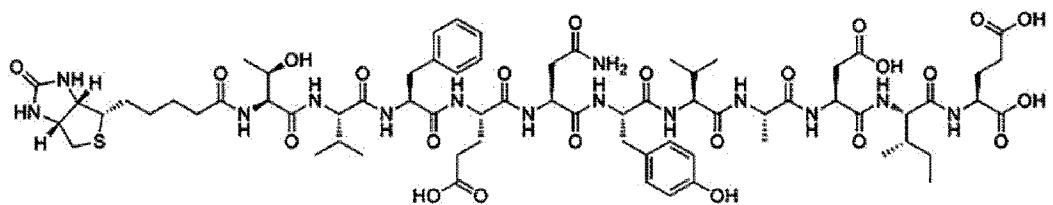
[28]



[29] 본 발명의 일 실시예에 따라, 하기 화학식 7의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제가 제공된다.

[30] 화학식 7

[31]



[32]

발명의 효과

[33] 본 발명에 따른 RhoA 펩타이드 억제제는 암세포 이동을 방지하는 효과가 있다.

[34] 또한, 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자가 명확하게 이해될 수 있을 있다.

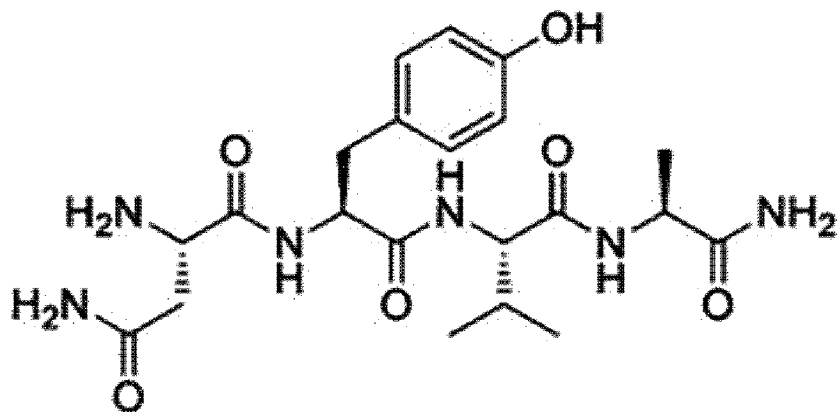
도면의 간단한 설명

[35] 도 1 내지 도 4는 암 환자에서 p-Tyr42 Rho 발현의 임상 결과를 도시한 것이다.

- [36] 도 5 내지 도 10은 P-Tyr42 RhoA의 Wnt3A에 대한 반응으로 세포 증식을 유도하는 것을 나타낸다.
- [37] 도 11 내지 도 21은 β -카테닌의 Wnt3A에 대한 응답으로 RhoA와 상호 작용을 보여준다.
- [38] 도 22 내지 도 36은 설계된 RhoA 억제제를 나타낸다.
- [39] 도 37은 RhoA 펩티드 억제제 (PR2, PR3 및 PR4)의 여러 암세포의 증식 억제를 보여준다.
- [40] 도 38은 RhoA 펩티드 억제제 (EM3 / E3)의 여러 암세포의 증식 억제를 보여준다.
- [41] 도 39 내지 도 40은 EM3의 치환 아미노산이 세포 증식에 미치는 영향을 보여준다.
- [42] 도 41 내지 도 42는 RhoA 펩타이드 억제제의 암세포 이동 방지를 보여준다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제가 제공된다.
- [44] 화학식 1
- [45]



발명의 실시를 위한 형태

- [46] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[47]

[48] 실험예

[49] 세포 배양

[50] 시험된 모든 세포는 37°C 및 5% CO₂에서 5% 소 태아 혈청 (FBS; GIBCO, Carlsbad, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토 마이신 (완전 배지)이 포함된 덜베코 변형 이글 배지 (Dulbecco modified eagle medium DMEM; 경산시 웰진)에서 배양되었다.

[51]

[52] 웨스턴 블로팅(Western blotting)

[53] HEK293T 세포를 수집하고 얼음처럼 차가운 PBS로 세척하고, RIPA 버퍼(50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% NaN₃, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM NaF)로 용해했다. 세포 용해물을 13,475 xg에서 20분 동안 원심 분리하고 상청액을 BCA 단백질 분석 키트 (Pierce; Rockford, USA)를 사용하여 단백질 농도에 대해 분석했다. 세포 용해물의 단백질을 SDS-PAGE에서 실행하고 PVDF 막 (Millipore; Billerica, USA)으로 옮겼다. Anti-RhoA (1/500), anti-actin (Santa Cruz; Dallas, CA), anti-GSK-3β (1/500), anti-phospho (Ser9) -GSK-3β (1/500) (둘 다 Cell Signaling, Beverly, USA), anti-β-카테닌(1/1000) (Invitrogen, Carlsbad, USA), anti-active β-카테닌(1/500) (Millipore, Billerica, USA) 및 anti-Tau (1/500) (Biosource; Camarillo, CA) 항체를 PVDF 막과 함께 실온에서 2 시간 동안 배양 한 다음 각각 5 분 동안 3 회 세척했다. 이어서 막을 항-랫 IgG 또는 말무 과산화 효소(horse radish peroxidase,HRP) 와 접합된 항-마우스 IgG 항체(둘 다 ENZO Life Science; Farmingdale, USA에서 제공/1/1000 희석)로 1시간 동안 배양하고 나중에 각각 10분 동안 3회 세척 하였다. 막을 강화된 화학 발광 (ECL) 시약 (Amersham; Uppsala, Sweden)과 함께 배양한 다음 X- 선 필름에 노출시켰다. 밴드의 강도는 U.S. National Institutes of Health (Bethesda, USA)의 ImageJ 프로그램으로 정량화되었다.

[54]

[55] 면역침전(Immunoprecipitation, IP)

[56] 1x10⁷의 세포를 1xPBS로 세척하고 세포 용해물을 각각 10µg/ml의 류벡틴, 아프로티닌 및 각각의 NaF, Na₃VO₄, PMSF 및 5mM MgCl₂를 함유하는 세포 용해 완충액(20 mM Tris pH 7.4, 120 mM NaCl, 1% Nonidet P-40)을 사용하여 제조하였다. 용해물은 특정 항체에 의한 면역 침전에 사용되었다.

[57]

[58] 제조합 GST-β-카테닌및 GST-RhoA 단백질 및 Tat-C3 독소의 정제

[59] 제조합 GST-β-카테닌및 GST-RhoA는 pGEX-4T1 숙주 벡터를 사용하여 E. coli에서 발현되었다. 단백질 발현은 E. coli의 형질 전환된 배양물에 0.5 mM

isopropylthio-galactosidase (IPTG)를 첨가하여 유도되었다. GST-β-카테닌 및 GST-RhoA 융합 단백질은 글루타티온 (GSH) -Sephrose 4B 비드를 사용하여 정제되었다. GST 단백질없이 준비하기 위해 트롬빈을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 GST 단백질을 절단하고 제거했다. 재조합 Tat-C3 독소는 E. coli에서 정제되었다.

[60]

[61] RhoA 플라스미드 형질 감염

[62] RhoA 플라스미드로 세포의 형질 감염은 HiPerFect (QIAGEN) 형질 감염 시약을 사용하여 수행되었다. 혈청이 없는 100μl 배양 배지에 있는 플라스미드 (2μg/ml)를 3μl의 HiPerFect 형질 감염 시약과 10 초 동안 볼텍싱과 함께 혼합하고 실온에서 5-10분 동안 배양했다. 그 다음 혼합물을 5ml 무혈청 배지에서 세포에 적가하였다. 4-5 시간 후, 8x10⁵ 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 혈청 및 항생제를 포함하는 5ml 적절한 배양 배지의 60mm 접시에서 배양하였다.

[63]

[64] 위암 환자의 생존 확률 분석

[65] 본 발명자들은 위암 환자 조직에서 상대적인 p-Tyr42 Rho 수준을 결정하고 이를 낮고 높은 p-Tyr42 Rho 표현자의 두 그룹으로 분류했다. 샘플은 국립 암 센터가 지원하는 부산 대학교 병원 암 센터 (부산)에서 채취했다. 환자의 사망 및 생존에 관한 정보는 한국 정부의 통계 정보원 (KOSIS)에서 입수하여 한림 대학교 (춘천)의 기관 심의위원회 (IRB)의 승인을 받았다.

[66]

[67] 통계 분석

[68] 모든 실험은 적어도 3회 수행되었으며, 분석 내 샘플은 2회 또는 3회 분석되었다. 데이터는 평균 ± SE로 표시된다. GraphPad Prism 프로그램 (GraphPad Software, San Diego, USA)을 사용하여 Student's t-test로 통계적 비교를 수행했으며 P 값이 지정된 한계보다 작으면 두 그룹 간의 차이가 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

[69]

[70] 평가예

[71] 위암 환자에서 p-Tyr42 RhoA 수준의 상향 조절

[72] p-Tyr42 Rho 수준은 위선암 사례에 초점을 맞춘 데이터로 더 진행된 암 유형에서 현저하게 증가했다. 이 경우 III 기 위선암 환자 표본은 I 기 및 II 기 샘플보다 p-Tyr42 Rho의 염색이 훨씬 더 강함을 나타냈다 (도 1). 다양한 위암 환자 샘플의 절대 비교를 위해, p-Tyr42 Rho의 상대적 수준을 웨스턴 블롯팅을 통해 결정한 다음 환자 생존 데이터와 상관 관계를 가졌다 (도 2). p-Tyr42 Rho 강도는 일반적으로 증가했지만 엄격하게는 아니지만 종양의 더 진행된 단계에서 놀랍게도 높은 p-Tyr42 RhoA 수준을 보유한 거의 환자가 현저하게 사망했다 (도 3). 또한 p-Tyr42 Rho GTPase 수치가 높은 환자는 p-Tyr42 Rho

수치가 낮은 환자 (생존율 > 85 %)에 비해 5 년 (60 개월)에 훨씬 더 나쁜 생존 확률을 나타냈다 (생존 <5 %, 도 4). 이러한 결과는 위 중앙 샘플에서 더 높은 수준의 p-Tyr42 Rho가 생존에 매우 해롭다는 것을 나타낸다.

[73]

[74] Wnt3A에 대한 세포 증식에 대한 RhoA 및 ROCK의 효과

[75] Wnt3A는 HEK293T 세포의 증식을 향상시켰다(도 5). 그러나 RhoA 억제제 (Tat-C3)와 ROCK 억제제 (Y27632)는 이러한 증식을 폐지했다(도 6). 유사하게, Tat-C3 및 Y27632는 또한 대식 세포주 RAW264.7에서 Wnt3A 매개 증식을 억제하였다 (도 7). RhoA Y42F transfection은 또한 세포 증식을 현저하게 제거했다 (도 8). Wnt3A는 또한 시험 세포에서 cyclin D1 및 c-Myc의 발현을 유도했지만 Tat-C3 및 Y27632는 Wnt3A 증가된 발현을 폐지했다(도 9). RhoA WT 및 RhoA Y42E 형질 감염된 세포는 또한 Wnt3A의 존재하에 cyclin D1 및 c-Myc의 발현이 증가한 반면, RhoA Y42F 형질 감염은이 cyclin D1 및 c-Myc 상향 조절을 억제하였다(도 10).

[76]

[77] Wnt3A 자극과 함께 RhoA/ β -카테닌 복합체의 형성

[78] Wnt3A에서 β -카테닌이 RhoA와 공동 면역 침전되는 것을 관찰하였다 (도 11).

차례로, p-Tyr42 Rho는 β -카테닌과 공동 면역 침전되었다 (도 12).

lysophosphatidic acid (LPA)가 β -카테닌의 핵 전좌와 함께 β -카테닌을 활성화하는 것으로 보고 되었으므로 (Burkhalter et al., 2015; Sun et al., 2013)LPA에 의한 β -카테닌/ RhoA 또는 p-Tyr42 Rho의 복합체 형성 가능성을 조사했EK. LPA는 RhoA와 β -카테닌의 수준을 변화시키지 않았고, p-Tyr42 Rho 수준은 분명히 증가했다 (도 13). 마찬가지로 RhoA와 β -카테닌의 공동 면역 침전이 분명하게 나타났지만 공동 면역 침 강제의 상대적인 수준은 거의 변하지 않았다. 그러나 co-immunoprecipitation을 통해 나타난 β -카테닌과 p-Tyr42 Rho의 연관성은 LPA 처리에서 현저하게 증가했다 (도 13). 다음에 우리는 RhoA의 GDP / GTP 결합 상태가 RhoA와 β - 카테닌 간의 상호 작용을 결정하는지 여부를 확인하려고 했다. 시험관 내에서 RhoA-GTP γ S 또는 RhoA-GDP에 결합하는 재조합 GST- β -카테닌은 크게 다르지 않았으며 (도 14), RhoA에 대한 GDP 또는 GTP 결합이 RhoA와 β -카테닌의 상호 작용에 중요하지 않음을 시사한다.

[79]

RhoA와 관련된 β -카테닌의 특정 도메인을 확인하기 위해 아미노산 (aa) 1-140, 141-390, 391-662 및 663-782로 구성된 β -카테닌 도메인의 GST- 융합을 발현하고 정제했다 (도 15 및 도 16). GTP γ S가 미리 로드된 RhoA는 GST- β -카테닌도메인의 aa 1-140 (N- 말단 도메인, NTD)에 쉽게 결합되고 비드에 접합된 반면 다른 도메인 융합 단백질은 RhoA에 약간만 결합된다 (도 17). 또한, NTD의 이소성 발현 (aa 1-140)만이 Wnt3A로 인한 세포 증식을 현저하게 방해했다 (도 18). 우리는 p-Tyr42 RhoA와 β -카테닌또는 다른 이펙터 단백질 사이의 복잡한 형성을 방해하는 경쟁 억제제를 설계했다 (도 19). P2, P3 P4, EM3은 p-Tyr42 RhoA와

β -카테닌의 공동 면역 침전을 억제했다 (도 20 및 도 21).

- [80] 종합하면, RhoA의 p-Tyr42 잔기의 억제가 암을 보호하는 좋은 전략이 될 수 있다고 생각한다. 여기에서 아미노산 서열 (도 22)과 RhoA의 3D 구조 (도 23)를 보여 주었다. 우리는 본 발명에 사용된 시약의 약어 (도 24)와 RhoA 억제제 (PR2, PR3, PR4, EM1, EM2, EM3, EM4) (도 25) 및 기타 화학 물질 (도 26, 27, 28, 29). PR2, PR3, PR4, EM1, EM2, EM3 및 EM4의 화학 구조는 도 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36에 도시하였다.

[81]

- [82] RhoA의 p-Tyr42 함유 펩타이드의 항암제

- [83] 특히 PR2, PR3 및 PR4는 Wnt3A에 의한 HEK293T 세포, LPS에 의한 HEK293T 세포, H₂O₂에 의한 HEK293T 세포, 인슐린에 의한 HepG2 세포, EGF에 의한 LN18 세포, PMA에 의한 A549 세포의 증식을 현저하게 억제하였다. 또한 1 μ M P4는 인슐린에 의한 HepG2 세포의 증식을 거의 완전히 억제하고 Wnt3A에 의한 AGS 세포의 증식을 거의 완전히 억제했다 (도 37). 더욱이 EM3 (NYVA-NH2)는 FBS를 자극한 HEK293T, LN18, HepG2, HT29, 4T1, RAW264.7 세포의 증식을 유의하게 억제하였다 (도 38). EM4의 인산기는 원형질막의 이동을 방해할 가능성이 있다.

- [84] 또한 세포 증식에 대한 EM3의 치환 아미노산을 조사하고자 하였다. NFVA 펩티드와 NYVA는 HepG2 세포 증식에 대해 유사한 억제 효과를 나타냈다 (도 39). 마찬가지로 NYVS, LYLA, NFVA 및 NYVA는 4T1 세포 증식에 대해 유사한 억제 효과를 나타냈다 (도 40).

- [85] RhoA Y42F (dephospho-mimic)로 형질 감염되었지만 RhoA WT 또는 RhoA Y42E (phospho-mimic)로 형질 감염되지 않은 HEK293T 세포의 이동은 Wnt3A에 대한 반응으로 억제되었으며, 이는 p-Tyr42 RhoA가 Wnt3A에 대한 세포 이동 (도 41)을 나타낸다. 더욱이, PR3, PR4, EM3 및 EM4는 Wnt3A에 대한 HEK293 세포의 이동을 감소시켜서 이를 시사한다 (도 42).

[86]

- [87] 이중 이식 실험

- [88] 동물 관리 및 실험은 한림 대학교 동물 기관 동물 관리 및 사용위원회 (HIRB-2016-52)의 승인을 받아 수행되었다. 수컷 BALB / c 마우스 (7 주령)에 4T1 세포 (100 μ l 1xPBS에서 5x10⁵)를 주사하고 EM3 처리 그룹 (7 마리 마우스) 또는 대조군 (6 마리 마우스)에 무작위로 할당했다. 정상 그룹에는 두 개의 비 종양 마우스도 포함되었다. 세포를 피하 주사하고 EM3 (2.5mM, 10 μ l / 마우스) 및 1xPBS (10 μ l / 마우스)를 매일 적용했다. 종양 부피는 매일 측정되었고 종양 무게와 비장 크기는 마우스 희생 후 측정되었다.

[89]

- [90] 도 43은 이중 이식 실험 결과로, (A) 종양 형성 기간 동안 4T1 마우스 유방암 세포의 종양 부피를 측정한 것이고, (B) 희생 후 4T1 마우스 유방암 세포의 종양

크기 및 무게를 측정한 것이며, (C) 마우스의 비장 크기와 무게는 희생 후 측정한 것이다.

- [91] 주목할 점은 EM3는 이중 이식 실험에서 종양 부피와 종양 무게를 극적으로 약화시켰다 (도 43A와 B). 비장 크기는 종양이 있는 마우스에서 증가된 반면 EM3 처리된 마우스는 대조군 마우스와 비교하여 동일한 크기를 나타냈다 (도 43 C).

[92]

- [93] 이하, 본 명세서에 첨부된 도면을 보다 구체적으로 설명한다. 먼저, 도 1 내지 도 4는 암 환자에서 p-Tyr42 Rho 발현의 임상 결과를 도시한 것으로, 환자의 여러 암 유형이 p-Tyr42 Rho 항체로 염색되었다. 여러 위암 조직을 p-Tyr42 Rho 항체로 염색하고 위암 조직 단계의 정량적 채점을 수행했다. 미국 국립 암 연구소에서 운영하는 The Cancer Genome Atlas의 원시 데이터에서 낮은, 중간 및 높은 RhoA mRNA 수준을 보유한 위암 환자의 생존 확률을 얻었다. 위암 환자 조직 표본의 P-Tyr42 RhoA 수준을 웨스턴 블롯팅으로 분석했다. 파란 별: 높은 수준; 빨간 별: 암에 걸린 환자 (사망)이다. 위암 환자에 대한 p-Tyr42 Rho 수준의 밴드 강도를 암 병기에 대해 플롯팅 했다. 붉은 반점 환자는 사망했으며, 푸른 반점 환자는 생존다. 상대적으로 검출된 p-Tyr42 Rho 수준을 기반으로 한 생존 확률이 플롯되고 표시되었다. p-Tyr42 RhoA를 통한 Wnt3A 신호 전달의 개략도가 표시된다. RhoA는 Daam, Disheveled 및 WGEF를 통해 Wnt3A에 의해 활성화될 수 있습니다. 활성화된 RhoA는 p-p47PHOX를 통해 슈퍼 옥사이드 생성을 자극한다. 결과적으로, superoxide는 Dishevelled를 억제하는 nucleoredoxin을 억제한다. Superoxide는 Src 키나아제를 활성화하고, 그 후 RhoA의 Tyr42의 인산화를 유도하고 GSK-3 β 의 Tyr216 인산화를 유도합니다. 이는 LRP5 / 6을 인산화하여 APC, Axin 및 GSK-3 β 를 포함하는 "파괴 상자"를 모집하여 β -카테닌 안정화로 이어진다. P-Tyr42 RhoA는 β -카테닌의 N- 말단에 결합하여 단백질 복합체의 핵 국소화를 유도한다 P-Tyr42 RhoA는 β -카테닌과 함께 Vim 유전자의 프로모터와 결합하여 EMT의 전형적인 마커 인 vimentin 발현을 증가시킨다.

- [94] 도 5 내지 도 10은 P-Tyr42 RhoA의 Wnt3A에 대한 반응으로 세포 증식을 유도하는 것으로, (A) HEK293T 세포를 10 분 동안 DAPI (1 μ g / ml) 염색과 함께 Wnt3A (30ng / ml)로 자극하고 DAPI 형광을 형광 현미경으로 측정했다. (B, C) HEK293T (B) 및 RAW264.7 (C) 세포를 Tat-C3 (1 μ g / ml) 및 Y27632 (10 μ M)로 1 시간 동안 전처리 한 다음 Wnt3A (30ng / ml)로 2 일. 형광 현미경으로 세포 증식을 측정 하였다. (D) HEK293T 세포를 RhoA WT, Y42E 및 Y42F (4 μ g DNA)로 24 시간 동안 형질 감염시킨 다음, Wnt3A (30ng / ml)로 2 일 동안 처리했습니다. MTT 분석은 세포 증식에 사용되었습니다. (E) HEK293T 세포를 Tat-C3 (1 μ g / ml) 및 Y27632 10 (μ M)으로 1 시간 동안 전처리 한 다음 Wnt3A (30ng / ml)로 2 시간 동안 처리하고 cyclin D1 및 c-Myc를 웨스턴 블로 텅. (F) HEK293T 세포를 RhoA WT, Y42E 및 Y42F (4 μ g DNA)로 24 시간 동안 형질 감염시킨 다음, Wnt3A (30

ng / ml)로 2 일 동안 처리하고 사이클린 D1 및 c-Myc를 웨스턴 블롯팅으로 검출했다.

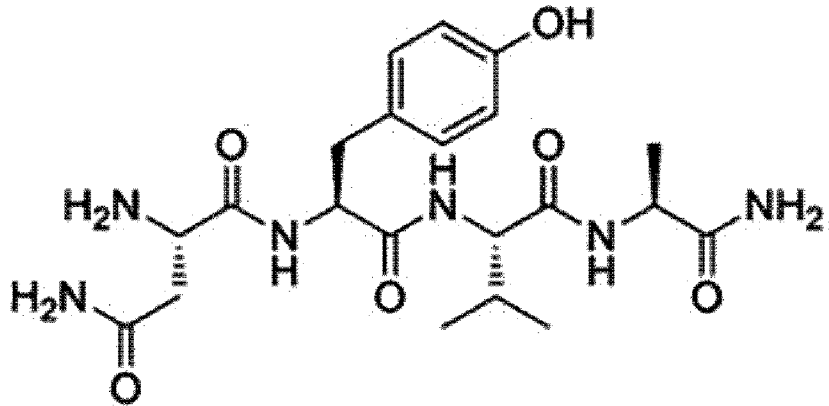
- [95] 도 11 내지 도 21은 β -카테닌의 Wnt3A에 대한 응답으로 RhoA와 상호 작용을 보여주는 것으로, (A, B) HEK293T 세포를 Wnt3A (30 ng / ml), β -카테닌 또는 p-Tyr42 RhoA로 처리하여 세포 용해물에서 면역 침전시키고 공동 면역 침전된 RhoA 및 p-Tyr42 RhoA를 웨스턴 블롯팅으로 검출했다. 면역 침전된 β - 카테닌은 면역 블롯팅되었다. (C) LPA (10 μ M)를 HEK293T 세포에 처리하고 β - 카테닌을 세포 용 해물로부터 면역 침전시키고 공동 면역 침전된 RhoA 및 p-Tyr42 RhoA를 웨스턴 블 롯팅에 의해 검출하였다. (D) 제조합 정제된 RhoA에 GDP 또는 GTP γ S를 RT에서 30 분 동안 미리 로드한 다음 GST- β -카테닌(0.1 μ g)과 함께 RT에서 2 시간 동안 배양했다. GST- β -카테닌과 관련된 RhoA는 Western blotting에 의해 검출되었다. (E) β - 카테닌 도메인의 개략도가 표시된다. (F) β - 카테닌의 제조합 정제된 도메인은 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색으로 실행되었다. (G) GST- β - 카테닌 도메인과 관련된 RhoA는 웨스턴 블롯팅에 의해 검출되었다. (H) RhoA 억제제가 설계되었다. (I) 세포를 P2, P3 및 P4 억제제로 전처리하고 Wnt3A로 처리했다. β -카테닌은 면역 침전되었고 공동면역침전된 p-Tyr42 RhoA는 면역 블롯팅으로 검출되었다. (J),(I) 세포를 EM3 및 EM4 억제제로 전처리하고 Wnt3A로 처리했다. β -카테닌은 면역 침전되었고 공동 면역 침전된 p-Tyr42 RhoA는 면역 블롯팅으로 검출되었다.
- [96] 도 22 내지 도 36은 설계된 RhoA 억제제를 나타낸 것으로, (도 22) RhoA의 아미노산 서열이 제시되고 RhoA의 Tyr42 주변의 펩타이드는 파란색과 빨간색으로 표시됩니다. (도 23) GDP 또는 GTP γ S와 결합된 RhoA의 3 차원 구조가 표시된다. (도 24) 결과에서 notes의 약어가 표시된다. (도 25) RhoA 펩티드 억제제가 설명되어 있다. (도 26) FITC의 화학 구조 (fluorescein isothiocyanate), (도 27) 비오틴의 화학 구조, (도 28) DMSO (dimethylsulfoxide)의 화학 구조, (도 29) 아미노 헥사 노산의 화학 구조, (도 30) PR2 (P2)의 화학 구조, (도 31) PR3 (P3)의 화학 구조, (도 32) PR4 (P4)의 화학 구조, (도 33) EM1 (E1)의 화학 구조, (도 34) EM2 (E2)의 화학 구조, (도 35) EM3 (E3)의 화학 구조, (도 36) EM4 (E4)의 화학 구조이다.
- [97] 도 37은 RhoA 펩티드 억제제 (PR2, PR3 및 PR4)의 여러 암세포의 증식 억제를 보여주는 것으로, RhoA 펩타이드 억제제를 1 시간 동안 사전 인큐베이션하고 Wnt3A, 리포 폴리사 카 라이드 (LPS), 과산화수소, 상피 성장 인자 (EGF), 인슐린, 포볼 미리 스테이트 (PMA)와 같은 여러 자극제를 48 시간 동안 처리했다. MTT 분석은 HEK293T, LN18 신경 교종, HepG2 간암, AGS 위암, A549 폐암 세포와 같은 여러 암 세포주의 증식을 측정하기 위해 수행되었다.
- [98] 도 38은 RhoA 펩티드 억제제 (EM3 / E3)의 여러 암세포의 증식 억제를 보여주는 것으로, RhoA 펩티드 억제제 (EM1, EM2, EM3 및 EM4)를 1 시간 동안 전처리하고 2% FBS로 48시간 동안 처리했습니다. MTT 분석은 HEK293T, LN18

신경 교종, HepG2 간암, HT29 결장암, 4T1 마우스 유방암 및 RAW264.7 마우스 대 식세포와 같은 여러 암 세포주의 증식을 측정하기 위해 수행되었다.

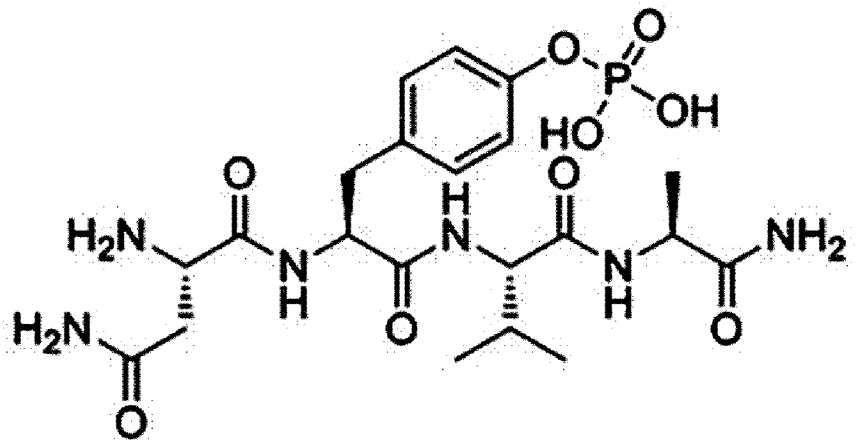
- [99] 도 39 내지 도 40은 EM3의 치환 아미노산이 세포 증식에 미치는 영향을 보여주는 것으로, 우리는 다른 아미노산으로 대체된 다양한 펩타이드 억제제를 설계했습니다. 세포는 48 시간 동안 2.5 % FBS를 포함하는 배양 용액 DMEM이었고 세포 증식은 MTT 분석으로 측정되었다. 도 39는 HL7 (NFVA) (3 μ M) 및 EM3은 HepG2 세포 증식에 유사한 억제 효과를 나타 냈습니다. 도 40은 HL1 (AYVA), HL4 (NYVS), HL5 (NYLA) 및 HL7 (NFVA)은 EM3보다 덜 효과적이면서 HepG2 세포 증식에 대한 억제 효과를 나타냈다.
- [100] 도 41 내지 도 42는 RhoA 펩타이드 억제제의 암세포 이동 방지를 보여주는 것으로, 도 41은 HEK293T 세포를 RhoA WT, Y42E (phospho-mimic) 및 Y42F (dephospho-mimic) 돌연변이로 형질 감염시키고 세포 이동을 상처 치유 방법으로 측정했다. 도 42는 HEK293T 세포를 PR2, PR3, PR4, EM2, EM3 및 EM4 (1 μ M)로 전처리하고 Wnt3A (30ng / ml)로 자극했다. 48 시간 동안의 세포 이동은 상처 치유 방법으로 측정되었다.

청구범위

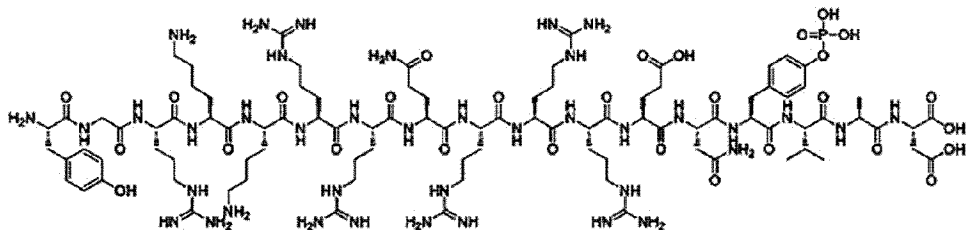
- [청구항 1] 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유한 항암제.
화학식 1



- [청구항 2] 하기 화학식 2의 화합물을 유효성분으로 함유하는 항암제.
화학식 2

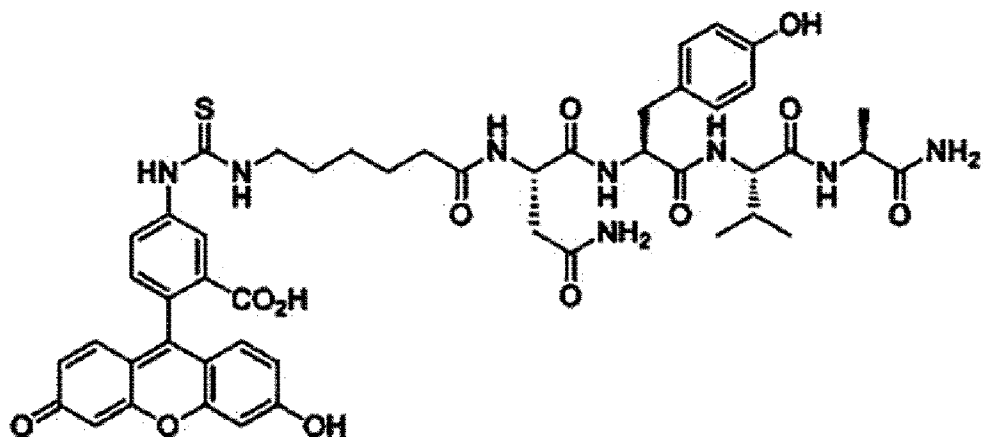


- [청구항 3] 하기 화학식 3의 화합물을 유효성분으로 함유하는 항암제.
화학식 3

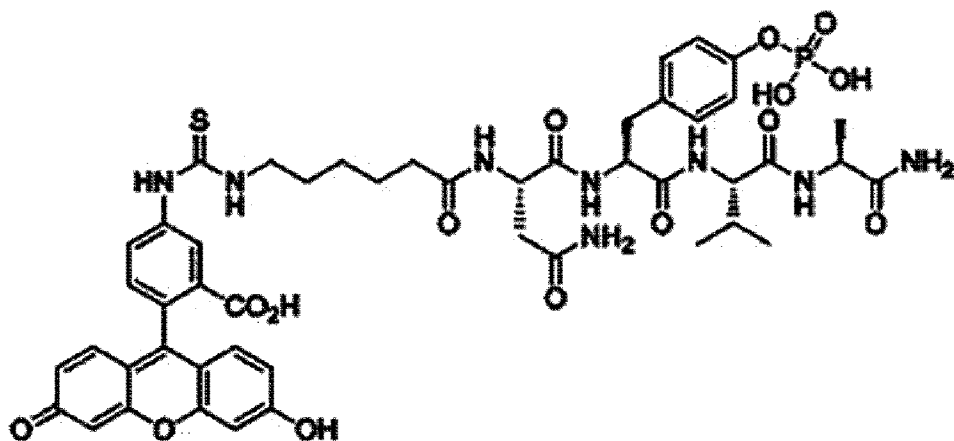


- [청구항 4] 하기 화학식 4의 화합물을 유효성분으로 함유하는 항암제.

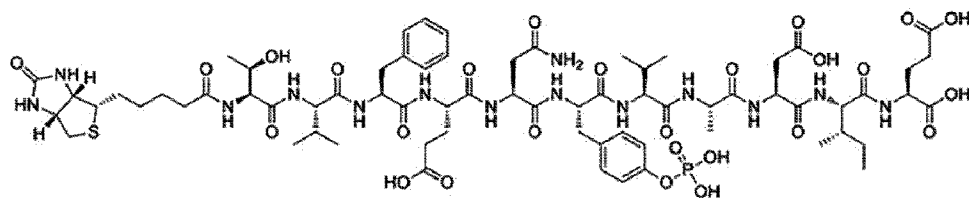
화학식 4



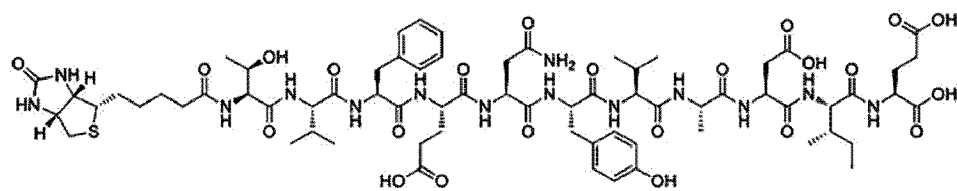
[청구항 5] 하기 화학식 5의 화합물을 유효성분으로 함유하는 항암제.
화학식 5



[청구항 6] 하기 화학식 6의 화합물을 유효성분으로 함유하는 항암제.
화학식 6



[청구항 7] 하기 화학식 7의 화합물을 유효성분으로 함유하는 항암제.
화학식 7



Adenocarcinoma

Stage: IA IB II IIIA IIIB

Age ↓

Non-neoplastic

Adenocarcinoma

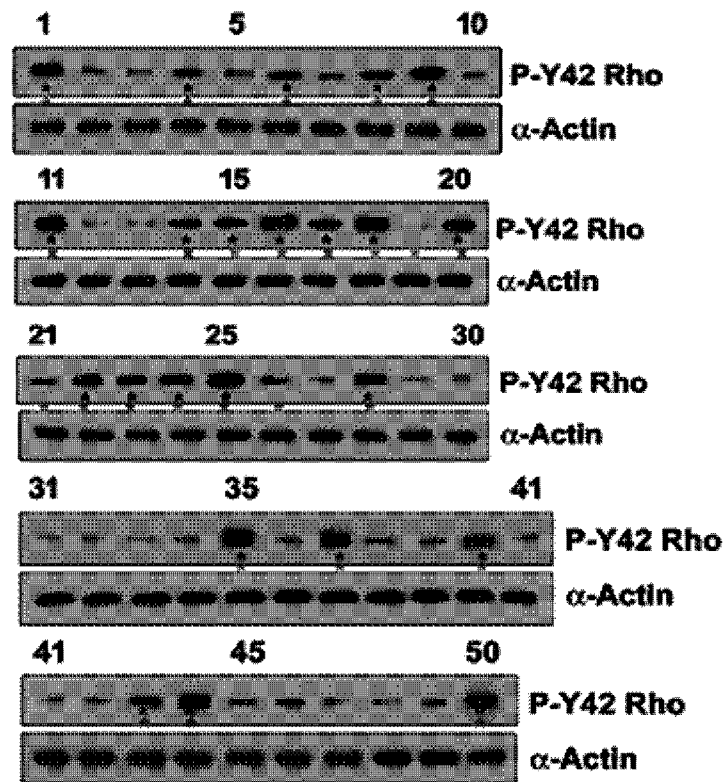
Score

Stage I+II III

**

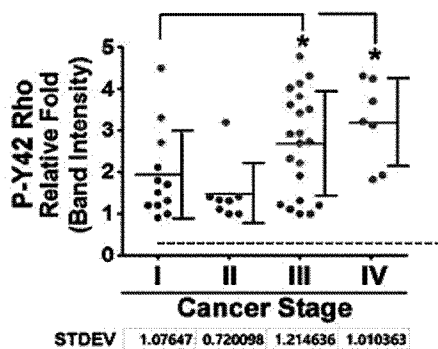
Stage	Score
I+II	~2.8
III	~5.0

[도2]

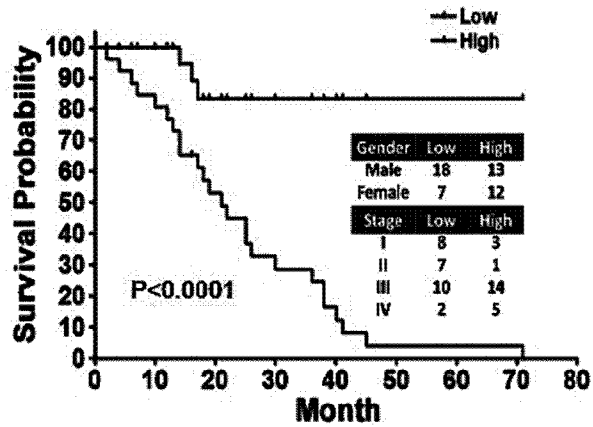


Number	Band Intensity	Stage	Death Age	Date of Diagnosis	Date of Death	Number	Band Intensity	Stage	Death Age	Date of Diagnosis	Date of Death
1	4.3	IV	73	2011-02	2013-04-09	26	1.9	IV	48	2012-06	2012-09-09
2	1.2	IIIB		2011-03		27	1	IIIB		2012-07	
3	1.1	IIA		2011-04		28	3.3	IB	70	2012-11	2013-05-17
4	2.3	IIIA	38	2011-03	2012-07-28	29	1.2	IB		2012-11	
5	1.9	IIIB		2011-04		30	1.3	IIIB		2012-11	
6	2.7	IIIC	52	2011-05	2012-02-17	31	1	IB		Unknown	
7	1.4	IIA		2011-05		32	1	IIIB		2012-12	
8	3.2	IV	54	2011-07	2011-09-28	33	1.1	IIIA		2013-02	
9	4.5	IA	74	2011-08	2012-05-17	34	1.3	IA		2013-02	
10	1	IIIB		2011-09		35	3.8	IIIC	74	2013-03	2015-04-30
11	4.11	IIIB	71	2011-09	2011-10-10	36	1.8	IB		Unknown	
12	1.22	IIIB		2011-10		37	3.5	IIIB	68	2013-04	2014-12-12
13	1.33	IIA		2011-10		38	2.1	IA		2013-03	
14	2.67	IIIC	63	2011-10	2014-07-29	39	1.7	IB		2013-04	
15	2.89	IIIC	64	2011-11	2012-10-02	40	3.2	IIA	83	2013-04	2013-05-27
16	4.78	IIIC	79	2011-11	2012-09-10	41	1.3	IIIB		2013-03	
17	3.67	IV	66	2011-12	2012-11-18	42	1.3	IIIA		Unknown	
18	4.22	IV	71	2012-01	2013-10-24	43	2.7	IB	47	2013-05	2014-12-12
19	1	IIIA	49	2011-12	2014-11-19	44	3.4	IIIC	67	2013-05	2013-08-09
20	4	IIIC	68	2012-02	2017-06-08	45	1.4	IB		2013-03	
21	1.8	IV	43	2012-03	2012-12-16	46	1.5	IB		2013-07	
22	2.9	IIIB	69	2012-04	2013-08-14	47	1.1	IIIA		Unknown	
23	2.2	IIIA	62	2012-04	2012-08-07	48	1	IB		2013-08	
24	3.1	IV	70	2012-04	2013-02-13	49	1.2	IA		2013-08	
25	4.3	IIIC	78	2012-05	2013-10-04	50	3.6	IIIB	65	2013-07	2014-01-10

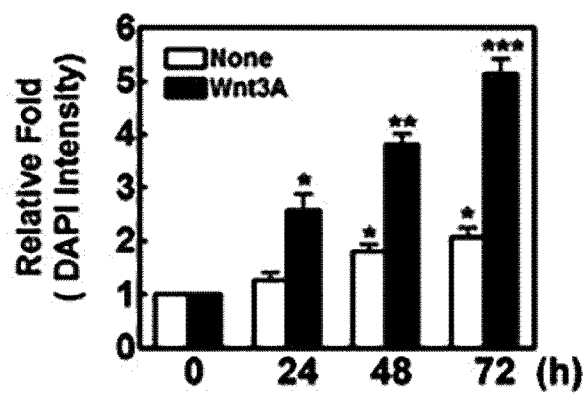
[도3]



[도4]

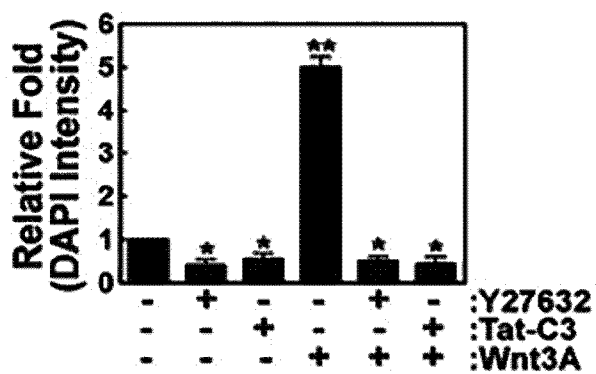


[도5]



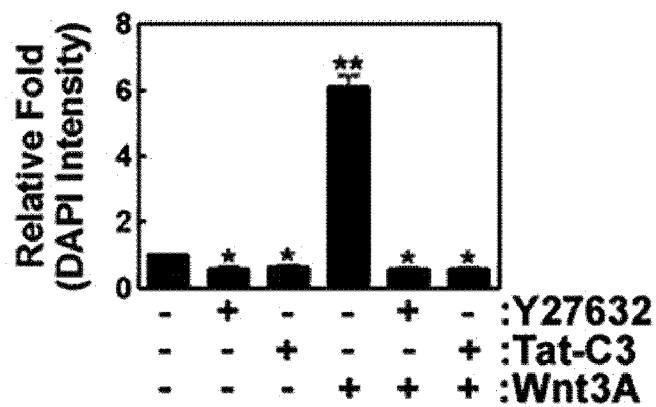
[도6]

HEK293

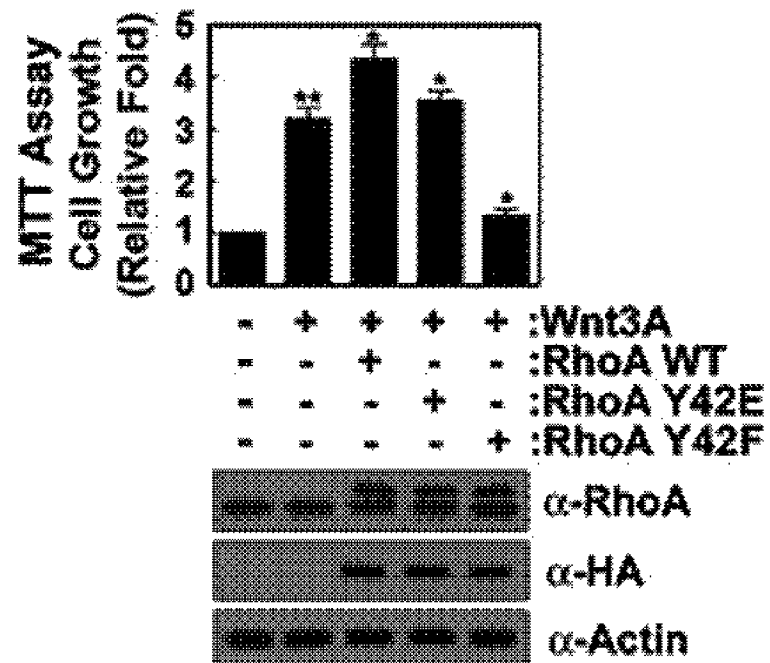


[도7]

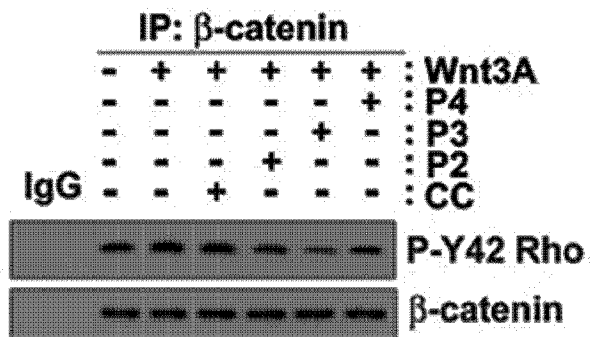
RAW264.7



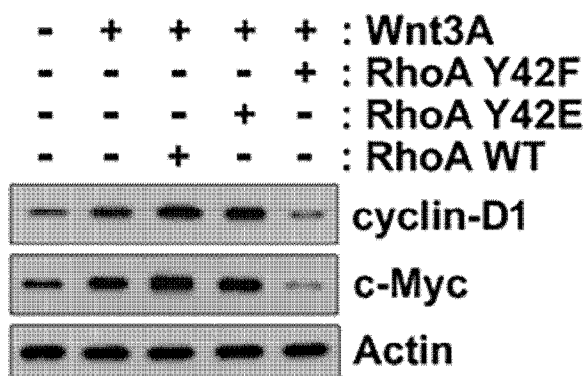
[도8]



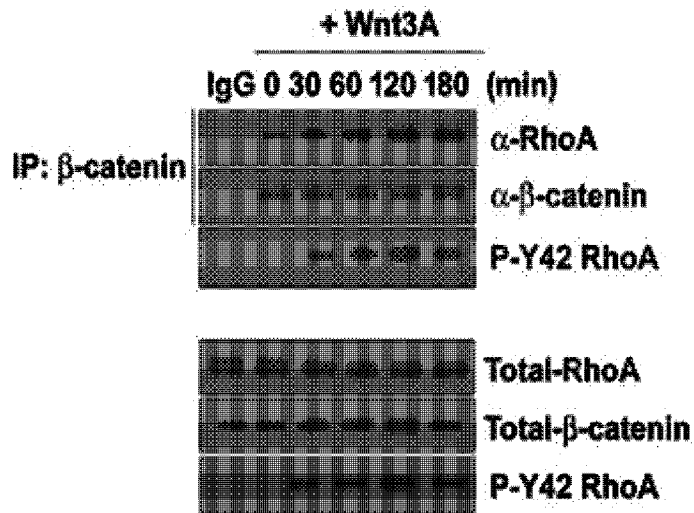
[도9]



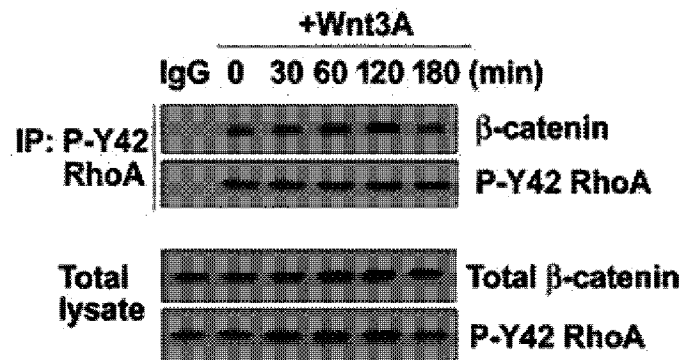
[도10]



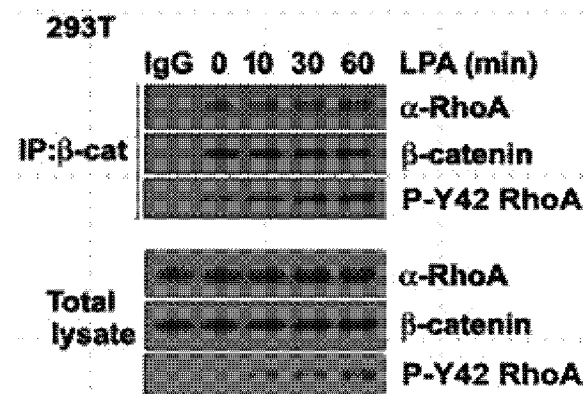
[도11]



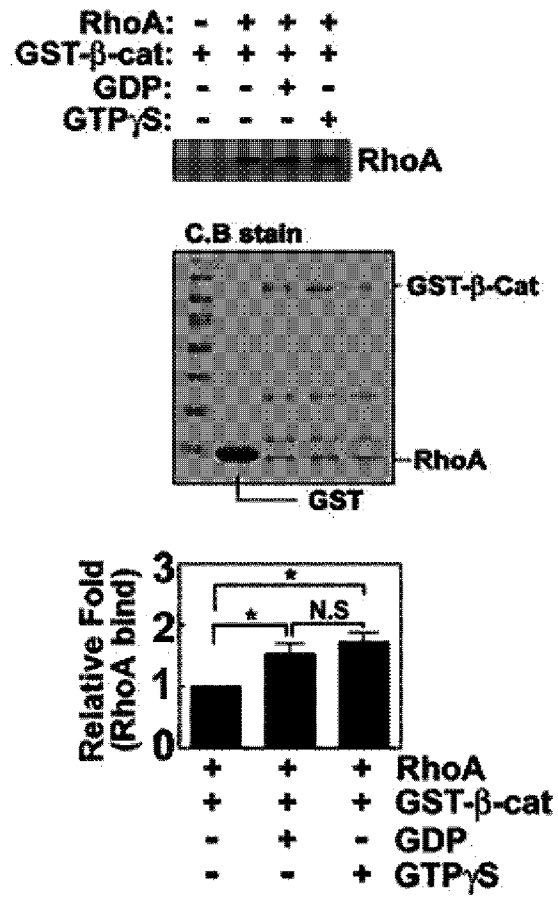
[도12]



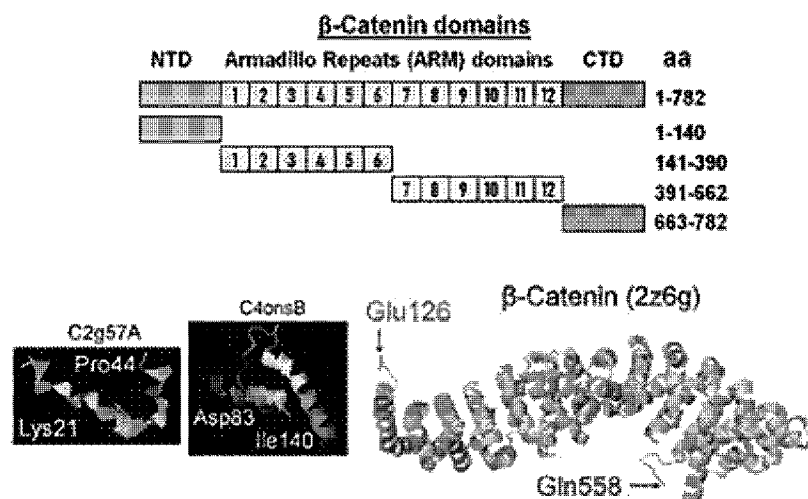
[도13]



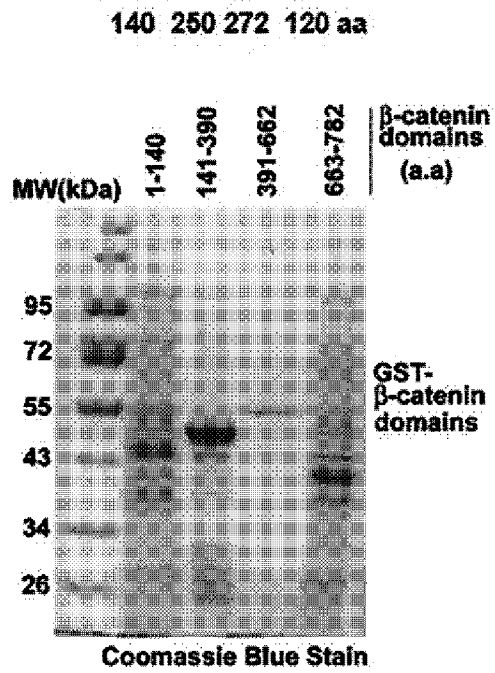
[도14]



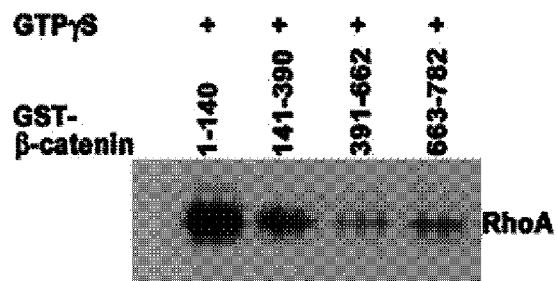
[도15]



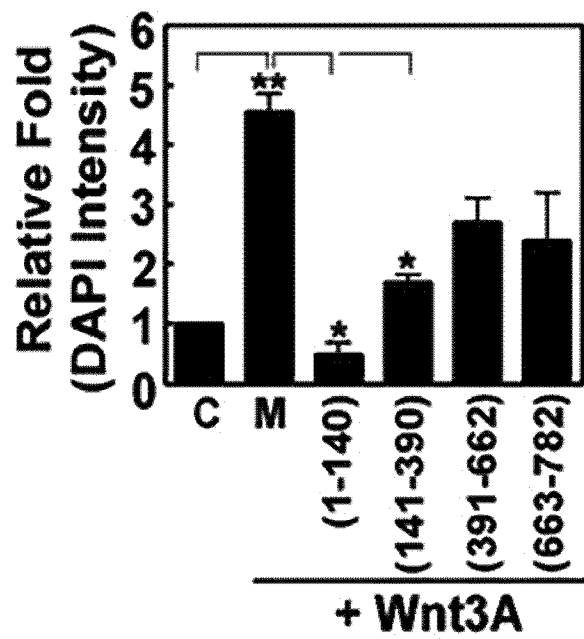
[도16]



[도17]



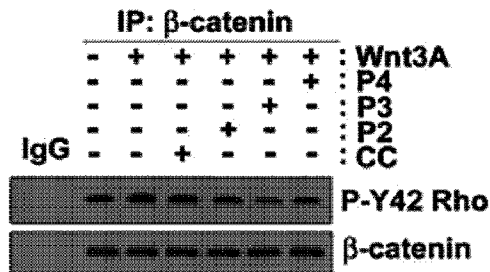
[도18]



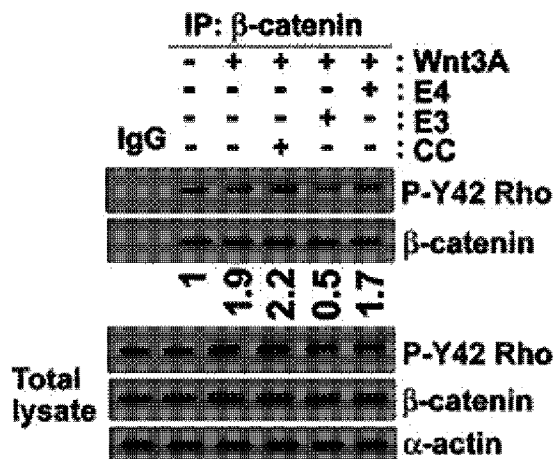
[도19]

Mark	Inhibitor Name	Description of amino acid sequence (RhoA 41-44)
P2	Prib2	YGRKKRRQRRRE-N-pY-VAD
P3	Prib3	FITC-Ahx-NYVA-NH2
P4	Prib4	FITC-Ahx-N-pY-VA-NH2
E3	Elmib3	NYVA-NH2
E4	Elmib4	N-pY-VA-NH2

[도20]



[도21]



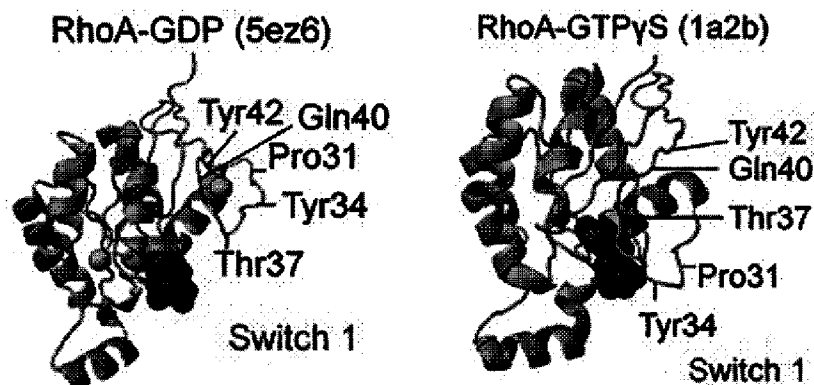
[도22]

Amino acid sequence of RhoA

42

1 MAAIRKKLVI VGDGACGKTC LLIVFSKDQF PEVYVPTVFE NYVADIEVDG KQVELALWDT 60
61 AGQEDYDRLR PLSYPDTDVI LMCFSIDSPD SLENIPKWT PEVKHFCPNV PIILVGNKKD 120
121 LRNDEHTRRE LAKMKQEPVK PEEGRDMANR IGAFGYMECS AKTKDGVREV FEMATRAALQ 180
181 ARRKKKSGC LVL

[도23]



[도24]

Abbreviations

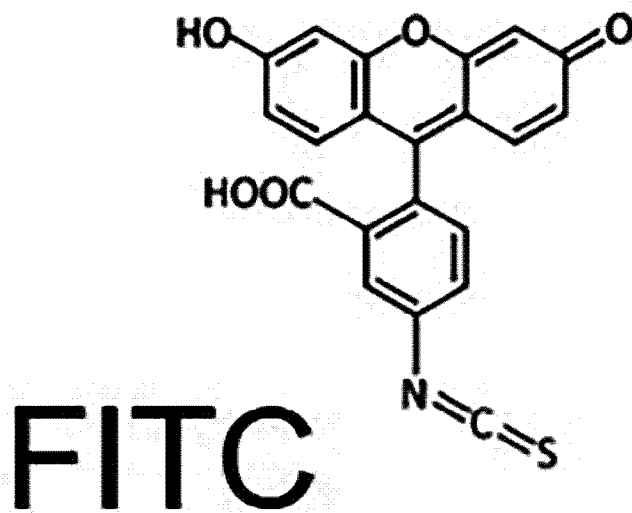
Note	Description	Abbreviation of chemicals and amino acid sequence
C	Control	Without stimulants
N	None	Control with stimulants
CC	Control Compound	YGRKKRRQRRR (Tat peptide)
D	DMSO	Dimethyl sulfoxide

[도25]

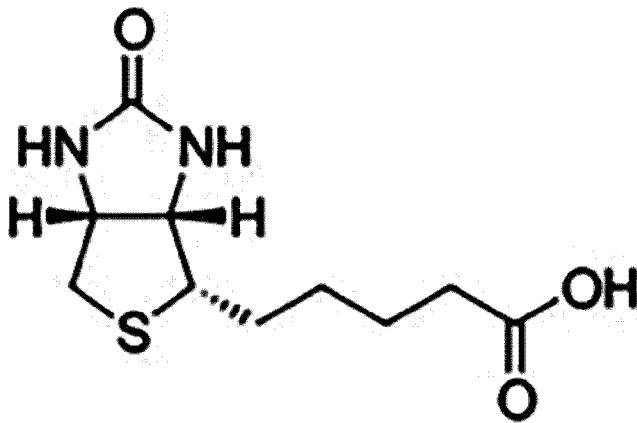
Description of Chemicals

Mark	Name	Description	Abbreviation of chemicals and amino acid sequence
P2	PR2	Tat-P-Y42RhoA peptide	YGRKKRRQRRRE-N-pY-VAD
P3	PR3	FITC-Ahx-RhoA peptide-NH ₂	FITC-Ahx-NYVA-NH ₂
P4	PR4	FITC-Ahx-p-Y42 RhoA peptide-NH ₂	FITC-Ahx-N-pY-VA-NH ₂
E1	EM1	Biotin-p-Y42 RhoA peptide	Biotin-TVFEN-pY-VADIE
E2	EM2	Biotin-RhoA peptide	Biotin-TVFENYVADIE
E3	EM3	RhoA peptide	NYVA-NH ₂
E4	EM4	p-Y42 RhoA peptide	N-pY-VA-NH ₂

[도26]

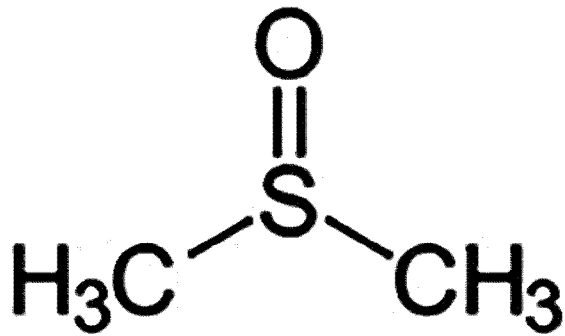


[도27]



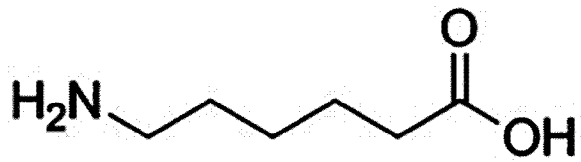
Biotin

[도28]



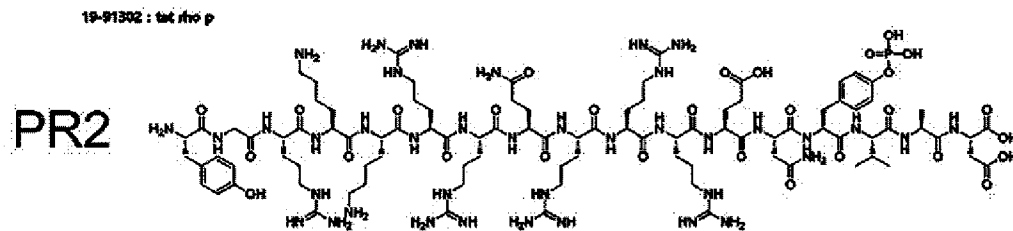
DMSO

[도29]



Aminohexanoic acid (Ahx)

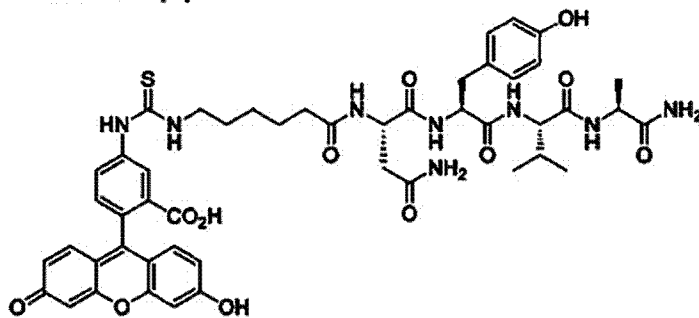
[도30]



[도31]

PR3

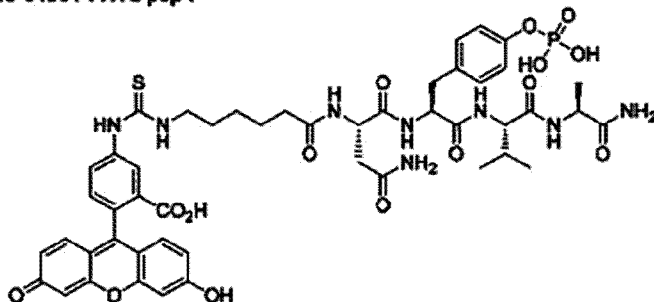
19-91303 : FITC pep



[도32]

PR4

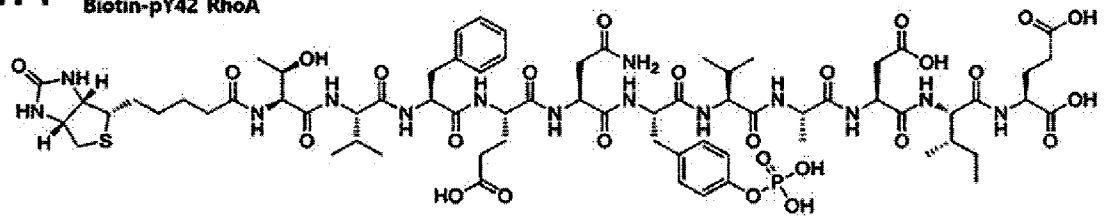
19-91304 : FITC pep P



[도33]

EM1

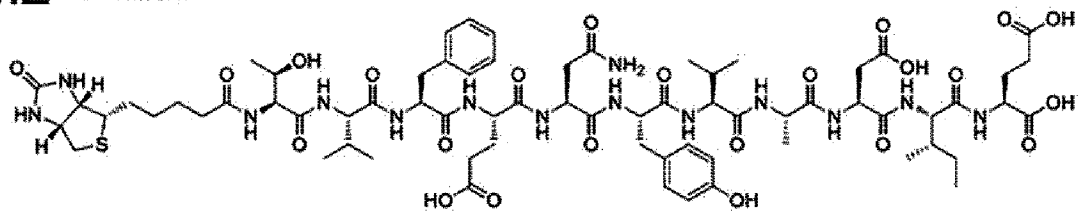
Biotin-pY42 RhoA



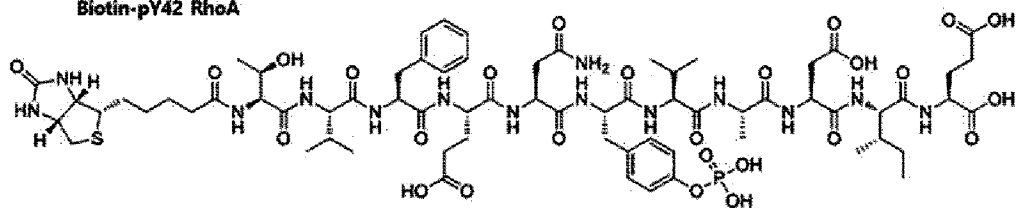
[도34]

EM2

Biotin-RhoA



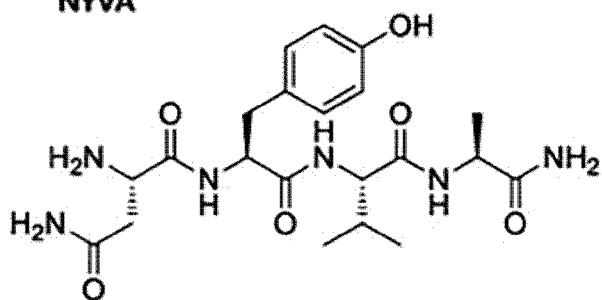
Biotin-pY42 RhoA



[도35]

EM3

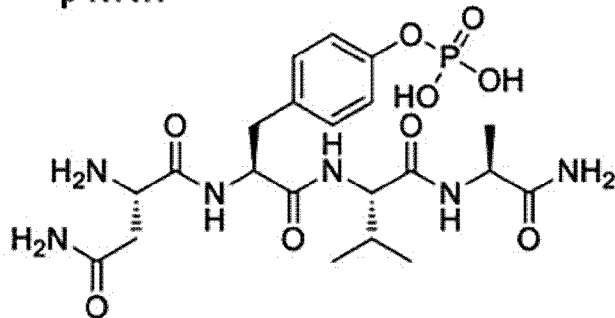
NYVA



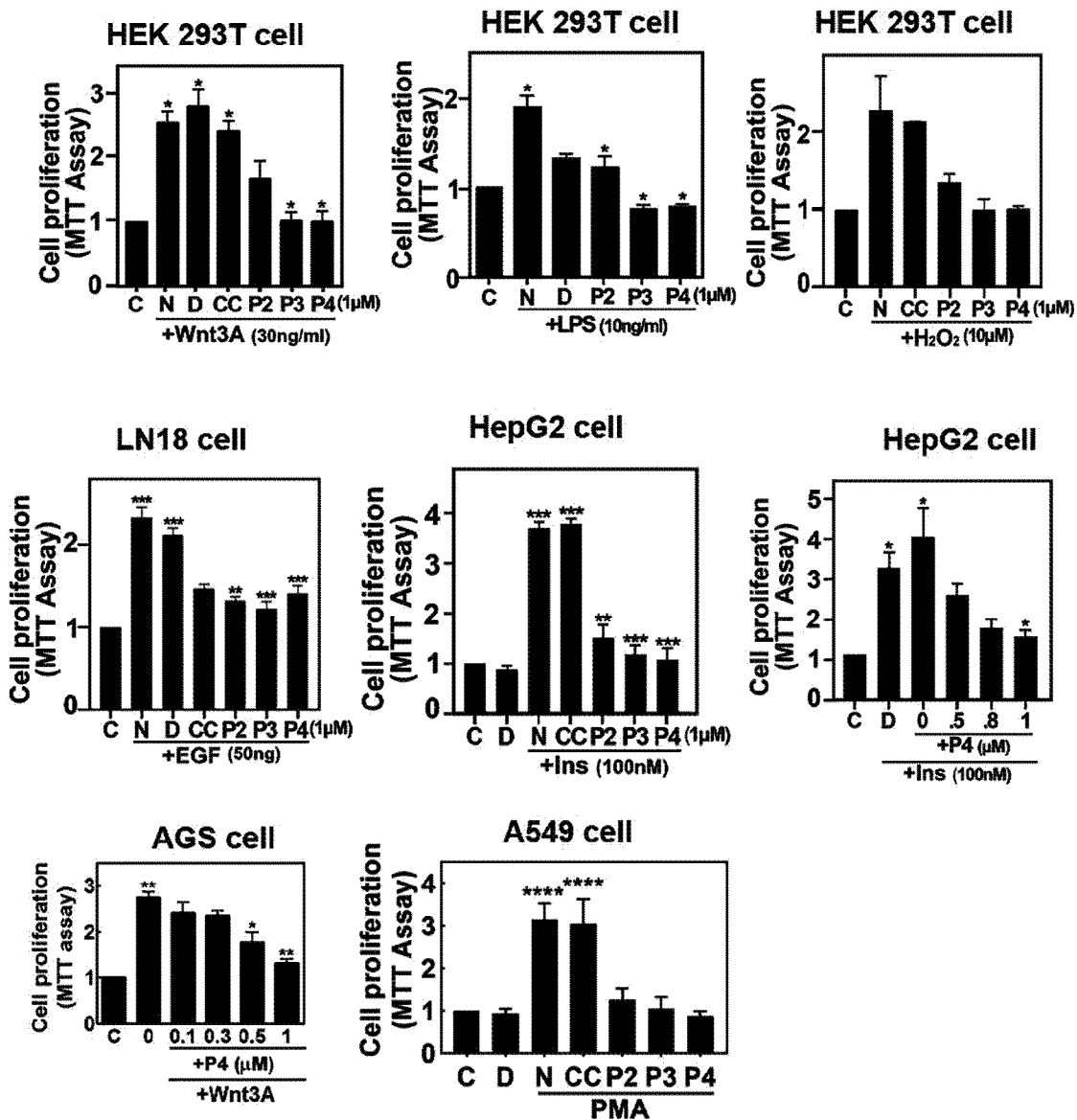
[도36]

EM4

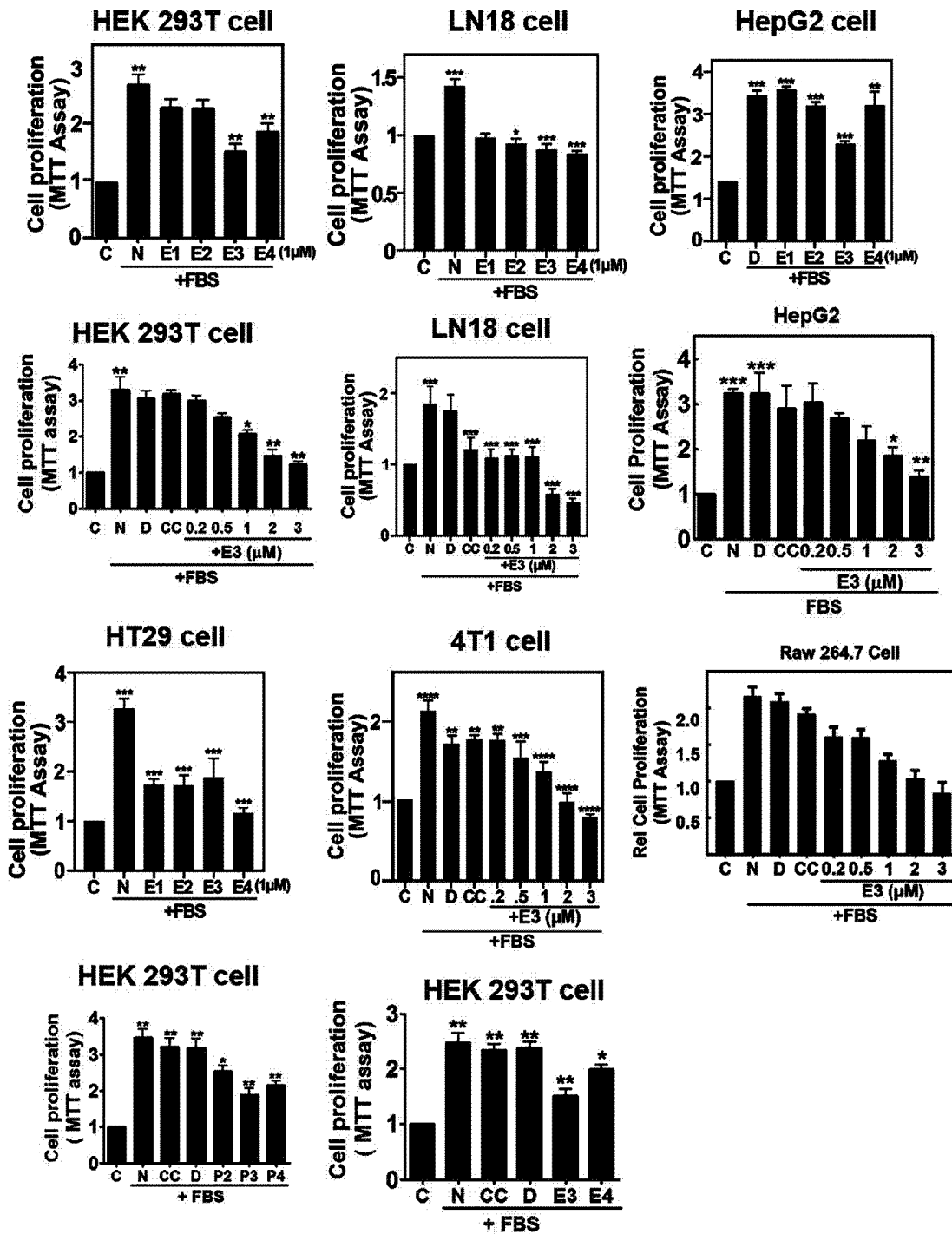
p-NYVA



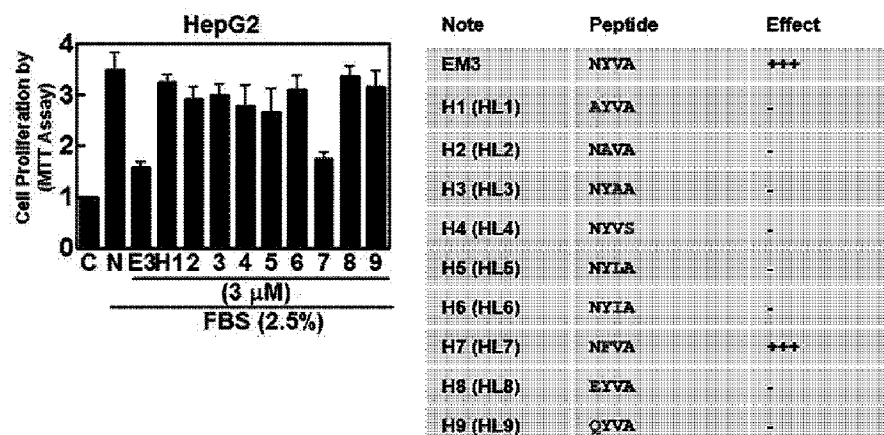
[도37]



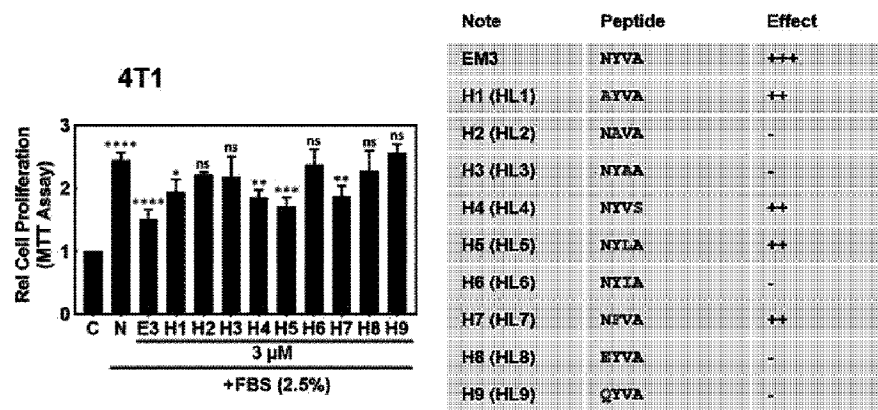
[도38]



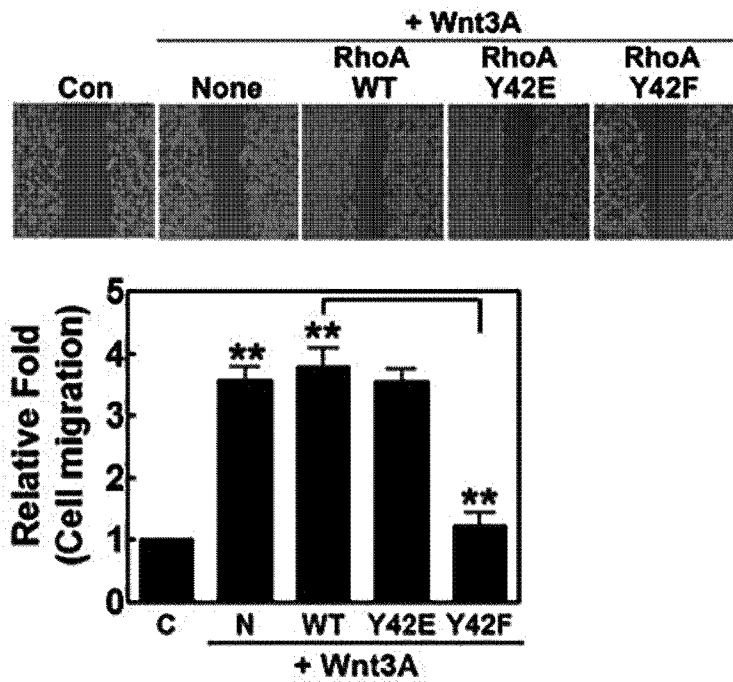
[도39]



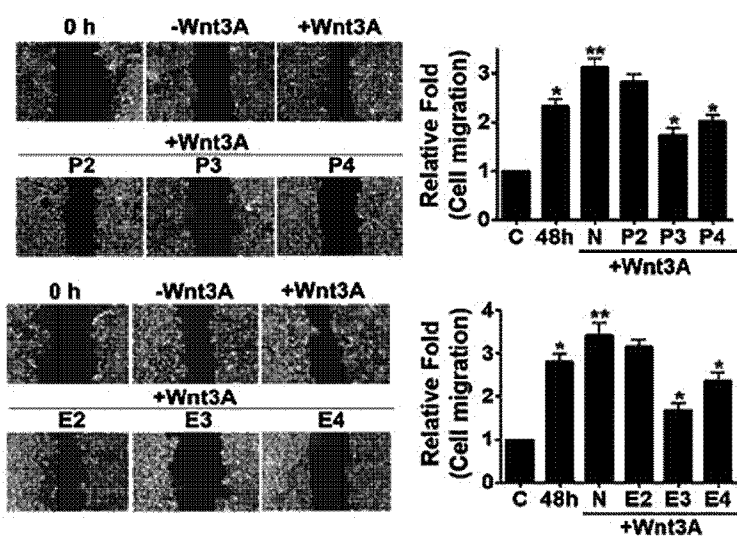
[도40]



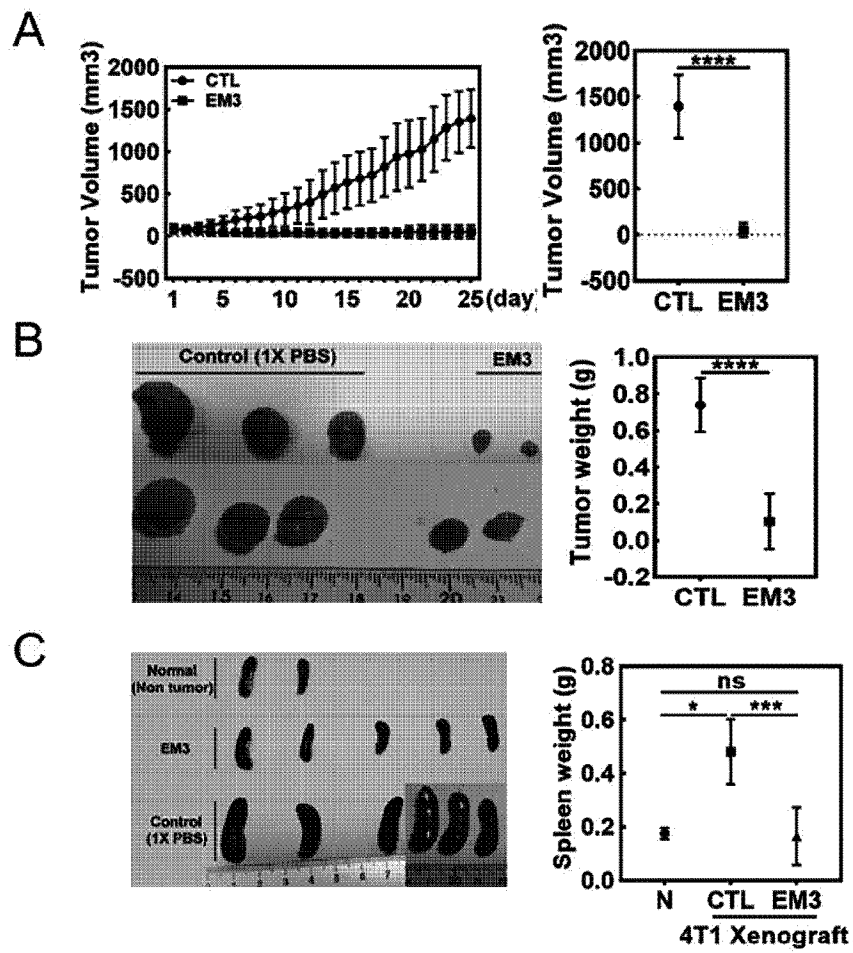
[도41]



[도42]



[도43]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/019481

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 38/07(2006.01)i; A61K 38/10(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 38/07(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 31/36(2006.01); A61K 31/38(2006.01); A61K 31/404(2006.01); A61K 38/17(2006.01); A61P 9/04(2006.01); C07D 405/04(2006.01); G01N 33/574(2006.01) 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), Google & keywords: 암 (cancer), 펩티드 (peptide), 억제제 (inhibitors), RhoA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2017-0141542 A (NATIONAL CANCER CENTER) 26 December 2017 (2017-12-26) See claims 1 and 5; and paragraphs [0032] and [0063].	1-7
A	KR 10-2019-0114299 A (KIM, Yon Hui) 10 October 2019 (2019-10-10) See paragraph [0016]; and claim 10.	1-7
A	KR 10-2019-0114300 A (KIM, Yon Hui) 10 October 2019 (2019-10-10) See entire document.	1-7
A	KR 10-2019-0010940 A (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 01 February 2019 (2019-02-01) See entire document.	1-7
A	US 2018-0296640 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 18 October 2018 (2018-10-18) See entire document.	1-7
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 "T" 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 03 August 2021		Date of mailing of the international search report 04 August 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/019481

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0141542	A	26 December 2017	WO	2017-217796	A1	21 December 2017
KR	10-2019-0114299	A	10 October 2019	None			
KR	10-2019-0114300	A	10 October 2019	None			
KR	10-2019-0010940	A	01 February 2019	KR	10-1974728	B1	02 May 2019
US	2018-0296640	A1	18 October 2018	AU	2016-348632	A1	31 May 2018
				CA	3003156	A1	11 May 2017
				EP	3371212	A1	12 September 2018
				JP	2018-535973	A	06 December 2018
				US	10688153	B2	23 June 2020
				US	2020-0297813	A1	24 September 2020
				WO	2017-079725	A1	11 May 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/07(2006.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/07(2006.01); A23L 1/30(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 31/36(2006.01); A61K 31/38(2006.01); A61K 31/404(2006.01); A61K 38/17(2006.01); A61P 9/04(2006.01); C07D 405/04(2006.01); G01N 33/574(2006.01) 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 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 암 (cancer), 펩티드 (peptide), 억제제 (inhibitors), RhoA		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2017-0141542 A (국립암센터) 2017.12.26 청구항 1, 5; 단락 [0032], [0063]	1-7
A	KR 10-2019-0114299 A (김미희) 2019.10.10 단락 [0016]; 청구항 10	1-7
A	KR 10-2019-0114300 A (김미희) 2019.10.10 전문	1-7
A	KR 10-2019-0010940 A (한림대학교 산학협력단) 2019.02.01 전문	1-7
A	US 2018-0296640 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 2018.10.18 전문	1-7
☐ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 신규성 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 2021년08월03일(03.08.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년08월04일(04.08.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0141542 A	2017/12/26	WO 2017-217796 A1	2017/12/21
KR 10-2019-0114299 A	2019/10/10	없음	
KR 10-2019-0114300 A	2019/10/10	없음	
KR 10-2019-0010940 A	2019/02/01	KR 10-1974728 B1	2019/05/02
US 2018-0296640 A1	2018/10/18	AU 2016-348632 A1	2018/05/31
		CA 3003156 A1	2017/05/11
		EP 3371212 A1	2018/09/12
		JP 2018-535973 A	2018/12/06
		US 10688153 B2	2020/06/23
		US 2020-0297813 A1	2020/09/24
		WO 2017-079725 A1	2017/05/11