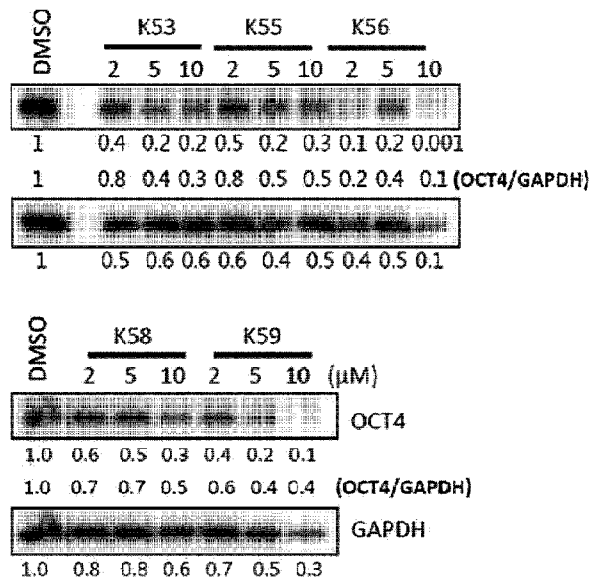




- (51) 국제특허분류: *A61K 31/12* (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/008027
- (22) 국제출원일: 2018 년 7 월 16 일 (16.07.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0089885 2017 년 7 월 14 일 (14.07.2017) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 한동초 (HAN, Dong Cho); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권병목 (KWON, Byoung-Mog); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김장환 (KIM, Janghwan); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 강용국 (KANG, Yong-Kook); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김석호 (KIM, Seok Ho); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김영미 (KIM, Young Mi); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박정선 (PARK, Jung Sun); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 심현아 (SIM, Hyuna); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 정지예 (JUNG, Ji-Ye); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 법원로 135 대명타워 6층 한얼국제특허사무소, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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,

(54) Title: COMPOSITIONS FOR INHIBITING OCT4 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: OCT4 저해용 조성물 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a composition for inhibiting octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) and a use thereof. Specifically, the present invention relates to a composition for removing undifferentiated cells or inhibiting formation of a teratoma or a teratocarcinoma of a cell therapy agent by using the composition for inhibiting OCT4; a pharmaceutical composition for preventing or treating testicular cancer; a method for removing undifferentiated cells; a method for inhibiting formation of teratoma or teratocarcinoma; a method for preparing a cellular therapeutic agent; and a method for preventing or treating testicular cancer.

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 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(57) 요약서: 본 발명은 OCT4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4) 저해용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로 상기 조성물을 이용한, 미분화 세포 (undifferentiated cell) 제거용 또는 세포 치료제의 테라토마 (teratoma) 또는 테라토칼시노마 (teratocarcinoma) 형성 억제용 조성물; 고환암의 예방 또는 치료용 약학 조성물; 미분화 세포 제거 방법; 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성 억제 방법; 세포치료제의 제조방법; 고환암의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: OCT4 저해용 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 OCT4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4) 저해용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로 상기 조성물을 이용한, 미분화 세포 (undifferentiated cell) 제거용 또는 세포 치료제의 테라토마 (teratoma) 또는 테라토칼시노마 (teratocarcinoma) 형성 억제용 조성물; 고환암의 예방 또는 치료용 약학 조성물; 미분화 세포 제거 방법; 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성 억제 방법; 세포치료제의 제조방법; 고환암의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인간 유도만능줄기세포는, 인체를 구성하는 내배엽, 중배엽, 및 외배엽으로 분화될 수 있는 전분화능(Pluripotency) 특성을 가지며, 자가재생(self-renewal)을 지속하는 세포로서, 재생의학(regenerative medicine)에 필요한 치료용 세포로 분화될 수 있다. 즉 유도만능줄기세포는 손상된 조직을 치료할 수 있는 신경세포, 간세포, 혈액세포, 등으로의 분화될 수 있다. 유도만능줄기세포는 2006년에 야마나카 박사가 4개의 전사인자(Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 transcription factors)를 성체세포에 도입하여 제조하였으며 (Cell. 126 (4): 663-76), 이로부터 유도만능줄기세포 제조를 위한 다양한 방법이 제안되었다. 일반적으로 OCT4 및 SOX2 전사인자는 성체세포의 줄기성 유도에 매우 중요한 인자이며, Myc 유전자는 줄기세포 제조의 효율을 향상시키는 역할을 한다. 특히 OCT4의 발현은 유도만능줄기세포의 전분화능 유지에 중요하다.
- [4] OCT4를 발현하는 인간 유도만능줄기세포로부터 분화된 세포를 얻기 위해서는, 인간 유도만능줄기세포를 특정 치료용 세포로 분화를 유도하고, 분화된 세포를 특정하는 세포막에 존재하는 표지인자(surface makers)의 항체를 이용하여 유세포 분리기(Fluorescent Activated Cells Sorter : FACS)를 사용하여 표지인자를 발현하는 분화된 세포만을 얻는다. 다만, 유세포 분리를 이용할 경우 사용되는 레이저에 의해 치료용 세포의 손상 위험이 있다.
- [5] 치료용 세포의 손상을 회피하기 위하여 세포막에 존재하는 표지인자에 대한 항체를 이용하여 세포를 표지 시킨 후 자성을 이용한 분리법(Magnetic Cell sorting: MACS)이 사용되고 있다. 자성을 이용한 분리법(MACS)은 유세포 분리를 이용할 경우 사용되는 레이저에 대한 세포의 손상 위험을 제거할 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- [6] 그러나 FACS 또는 MACS 방법 모두 치료용 세포군에 미분화된 유도만능줄기세포가 소수로 포함될 가능성을 완벽하게 배제할 수 없다. 만약

치료용 세포로서 100%의 순도로 분화된 세포만을 선별하는 것에 기술적인 한계가 있다면 안전성에 심각한 문제가 발생할 수 있다. 특히, 배아줄기세포에서 유래한 분화세포에 OCT4를 발현하는 미분화 세포가 혼재되어 있을 가능성이 존재하여, 세포치료제 개발에 있어서 '테라토마 (teratoma)'라는 미분화 만능 줄기세포에서 유래한 종양형성 위험에 대한 문제점이 끊임없이 대두되고 있다 (Stem Cells. 2009, 27 (5): 1050-1056.).

- [7] 그동안 많은 이종간 연구에서는 마우스의 줄기세포를 랫의 뇌에 접종하여 세포치료제 관련 연구를 보고하였으며, 이 경우에 테라토마 형성은 억제되었다. 그러나 동종간 연구에서는 마우스 유래 배아줄기세포의 경우, 단지 500개의 줄기세포를 마우스의 뇌조직에 접종하였을 때 모든 마우스에서 종양이 형성되었다 (J. CEREBRAL BLOOD FLOW MET, 2003, 23:780). 따라서 분화된 세포에는 영향이 없이, 테라토마의 위험성이 내재된 OCT4를 발현하는 미분화 세포를 선택적으로 제거하는 기술의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[8]

- [9] 한편, 종양 발병과 배아의 발생과정은 여러 특성들이 유사하다. 배아종양세포(ECC; embryonic carcinoma cells)은 기형암종 (teratocarcinoma)의 줄기세포를 말하며, 이것은 배아의 내세포집단(inner cell mass) 유래 배아줄기세포(ESC; embryonic stem cells)의 종양에 해당한다. 흥미로운 점은 이들 ECC 및 ESC가 표현형 유연성(plasticity)을 갖고 있어 특정 환경에서 분화를 한다는 점이다. 이제까지 ECC 및 ESC의 자기 재생(self-renewal) 및 다능성(pluripotency)에 관여하는 중요한 전사인자들이 보고되었다 (Jung et al. 2010, PLoS ONE 5, e10709; Young, 2011, Cell, 144, 940-954.).

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자들은 활콘 유도체 화합물들이 줄기성 전사인자 OCT4의 발현 및 활성을 조절하여, OCT4를 발현하는 세포를 특이적/선택적으로 제거할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 하나의 목적은, 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, OCT4(Octamer-Binding Transcription Factor 4) 저해용 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 상기 조성물을 포함하는, 미분화 세포(undifferentiated cell) 제거용; 또는 세포 치료제의 테라토마 (teratoma) 또는 테라토칼시노마 (teratocarcinoma) 형성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

- [15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 상기 조성물을 포함하는, 고환암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 상기 조성물을 세포 치료제에 처리하는 단계를 포함하는 미분화 세포 제거; 또는 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성 억제 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 상기 조성물을 세포 치료제에 처리하는 단계를 포함하는 세포 치료제의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은, 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 고환암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[19]

발명의 효과

- [20] 본 발명의 화합물은 OCT4 단백질의 발현 또는 활성을 저해하여, 이에 따라 세포 치료제에 잔존하는 미분화 세포를 사멸시킬 수 있고, 테라토마 또는 테라토칼시노마의 발생을 억제할 수 있으며, 고환암의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

[21]

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 화합물 K53, K55, K56, K58, K59를 각각 2 μ M, 5 μ M 및 10 μ M 처리한 NCCIT 고환암세포에서 OCT4의 발현이 저해되는지 여부를 확인한 웨스턴 블랏 분석 이미지이다. OCT4 발현 정량은 LAS-2000 이미지 분석기기를 사용하였다.
- [23] 도 2는 화합물 K53을 농도 별로 NCCIT 고환암세포에 처리하여 발현되는 OCT4 단백질을 OCT4 특이적 항체를 사용하여 분석한 웨스턴 블랏 분석이미지이다.
- [24] 도 3은 화합물 K53을 농도 별로 NCCIT 고환암세포에 처리할 경우 나타나는, OCT4에 의해 발현이 유도되는 유전자 NANOG 및 USP44의 mRNA 및 단백질 양의 변화를 분석한 도이다.
- [25] 도 4는 화합물 K53을 20 μ M 농도로 시간 별로 NCCIT 고환암세포에 처리하여, OCT4 발현 저해 및 세포사멸 마커인 PARP의 절단 정도를 확인한 도이다.
- [26] 도 5a는 화합물 K53 (30 mg/kg)의 복강투여에 의한 nude mouse regression model의 체중변화를 나타낸 도이다.
- [27] 도 5b는 화합물 K53의 복강투여에 의한 nude mouse regression model의 종양크기 변화를 투여 기간에 따라 나타낸 도이다.
- [28] 도 5c는 화합물 K53의 복강투여에 의한 nude mouse regression model의 종양의 이미지를 나타낸 도이다.

- [29] 도 6a은 화합물 K53을 2종의 고환암 세포주(NCCIT, Tera-1) 및 2종의 정상 세포주(HFF, MCF10A)에 대한 처리하였을 때 유도되는 세포의 수를 나타낸 도이다.
- [30] 도 6b은 2종의 고환암 세포주(NCCIT, Tera-1) 및 2종의 정상 세포주(HFF, MCF10A)에서 OCT4의 발현 정도를 OCT4 특이적 항체를 사용하여 분석한 웨스턴 블랏 분석 이미지이다.
- [31] 도 7은 K53 화합물에 OCT4 단백질이 특이적으로 결합한다는 사실을, K53-Biotin (KRIBB53-Biotin) 화합물을 합성하여 친화 크로마토그래피 (affinity chromatography) 방법으로 증명한 결과이다.
- [32] 도 8은 인간 유도만능줄기세포(iPSC) 및 이로부터 분화시킨 신경줄기세포(NSC)의 OCT4 발현여부를, OCT4 특이적 항체를 사용하여 분석한 웨스턴 블랏 분석 이미지이다. 유도만능줄기세포는 OCT4를 발현하지만 이로부터 분화된 신경줄기세포의 경우 OCT4의 발현이 억제되었다.
- [33] 도 9a은 인간 유도만능줄기세포(iPSC) 및 신경줄기세포(NSC)에 화합물 K53, K55, K56, K58 또는 K59를 5 μ M 농도로 24시간 처리하여 세포 형태를 관찰한 현미경 사진이다.
- [34] 도 9b는 인간 유도만능줄기세포(iPSC) 및 신경줄기세포(NSC)에 화합물 K53, K55, K56, K58 또는 K59를 5 μ M 농도로 24시간 처리하여 생존 세포 수를 나타낸 그래프이다.
- [35] 도 10은 NCCIT 고환암세포에 화합물 K53, K55, K56, K58, K59를 각각 10 μ M 및 30 μ M 농도로 48시간 처리한 후 생존 세포의 수를 나타낸 그래프이다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

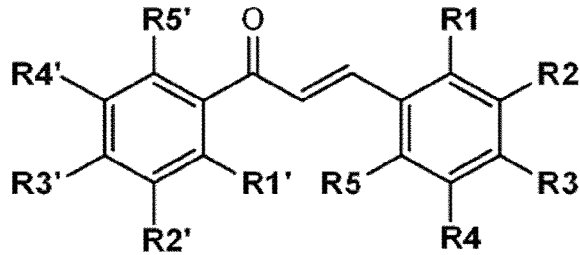
[38]

- [39] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, OCT4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4) 저해용 조성물을 제공한다:

[40]

- [41] [화학식 1]

[42]



[43] 상기 화학식 1에서

[44] R1, R2, R3, R4, R5, R1', R2', R3', R4' 및 R5'는 각각 독립적으로 H, 하이드록시, C₁₋₄ 알콕시, 및 할로젠으로 이루어진 군에서 선택됨.

[45]

[46] 또한, 본 발명의 일 실시 양태에서,

[47] R1은 H, 또는 하이드록시이고;

[48] R2는 H, 또는 C₁₋₄ 알콕시이고;[49] R3는 H, 하이드록시, 또는 C₁₋₄ 알콕시이고;[50] R4는 H, C₁₋₄ 알콕시, 또는 할로젠이고;

[51] R5는 H이고;

[52] R1'는 H, 하이드록시 또는 C₁₋₄ 알콕시이고;

[53] R2'는 H, 또는 할로젠이고;

[54] R3'는 H, 또는 C₁₋₄ 알콕시이고;

[55] R4'는 H이고;

[56] R5'는 H, 하이드록시, 또는 C₁₋₄ 알콕시일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[57]

[58] 또한, 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 R1, R2, R3, R4, R5, R1', R2', R3', R4' 및 R5'는 각각 독립적으로 H, 하이드록시, 메톡시, 및 브로모로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[59]

[60] 또한, 본 발명의 일 실시 양태에서,

[61] R1은 H, 또는 하이드록시이고;

[62] R2는 H, 또는 메톡시이고;

[63] R3는 H, 하이드록시, 또는 메톡시이고;

[64] R4는 H, 메톡시, 또는 브로모이고;

[65] R5는 H;

[66] R1'는 H, 하이드록시, 또는 메톡시이고;

[67] R2'는 H, 또는 브로모이고;

[68] R3'는 H, 또는 메톡시이고;

[69] R4'는 H이고;

[70] R5'는 H, 하이드록시, 또는 메톡시일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[71]

- [72] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은, 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함하고, 가능한 모든 입체이성체도 포함한다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용매화물, 수화물 및 입체이성체는 통상적인 방법들을 사용하여 화학식 1로 표시되는 화합물로부터 제조할 수 있다.
- [73] 또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 결정 형태로 제조될 경우 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다. 본 발명에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 화학양론적 수화물뿐만 아니라 다양한 양의 물을 함유하는 화합물이 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 용매화물은 화학양론적 용매화물 및 비화학양론적 용매화물 모두를 포함한다.
- [74] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 획득 방법은 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나, 시판되는 물질을 사용할 수 있다.
- [75] 상기 화합물 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 OCT4 단백질의 발현 또는 활성의 억제제로 활용될 수 있으며, 이러한 생리활성을 통하여 미분화 세포의 제거, 테라토마 또는 테라토칼시노마의 형성 억제, 고환암의 예방 및 치료용 제제로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [76] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 OCT4에 대한 특이적 저해 효과뿐만 아니라, 미분화 세포의 제거 효과, 테라토마 또는 테라토칼시노마에 대한 특이적인 형성 억제 효과, 고환암의 예방 및 치료 효과는 본 발명 이전에는 밝혀진 바 없는 새로운 효과이다.
- [77] 본 발명에서, '약제학적으로 허용 가능한 염'은 의약품계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 칼슘, 칼륨, 나트륨 및 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염, 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산, 주석산 및 황산 등으로 제조된 무기산염, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산, 나프탈렌설폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산, 구연산, 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 트리메틸아민, 트리에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민염 등이 있으나, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다.
- [78] 본 발명에서 'OCT4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4)'는 POU5F1 (POU domain, class 5, transcription factor 1)로도 불리는 전사인자로서, 인간에서는 *POU5F1* 유전자에 의해 암호화 되는 단백질이다. 상기 OCT4는 성체세포의

줄기성 유도, 유도만능줄기세포의 다능성 (pluripotency) 유지에 중요한 인자로 알려져 있다.

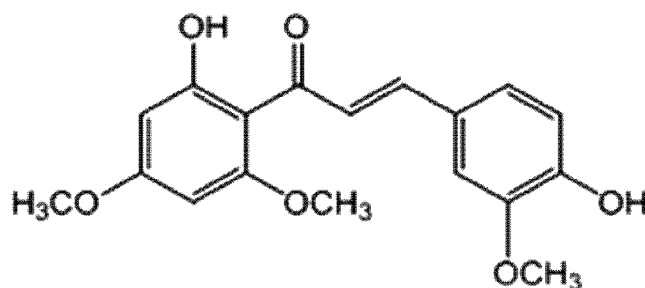
- [79] 본 발명에서 “OCT4 저해”란 OCT4의 발현 및/또는 활성을 감소 또는 억제하는 것을 의미한다. OCT4 저해를 통하여 세포성장이 억제되고 세포 사멸이 유도되므로 세포 증식성 질환을 예방 또는 치료할 수 있으며, 미분화 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있는바, OCT4를 저해하는 화합물을 세포 치료 시 안전성(safety) 증진 화합물로 사용할 수 있다. 또한, OCT4를 저해하는 화합물은 세포 치료제 투여로 인한 테라토마 또는 테라토칼시노마의 발생을 억제할 수 있으며, OCT4를 발현하는 암 세포를 효과적으로 사멸시켜, 우수한 항암 치료제로 사용될 수 있다.

[80]

- [81] 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[82] [화학식 2]

[83]



[84]

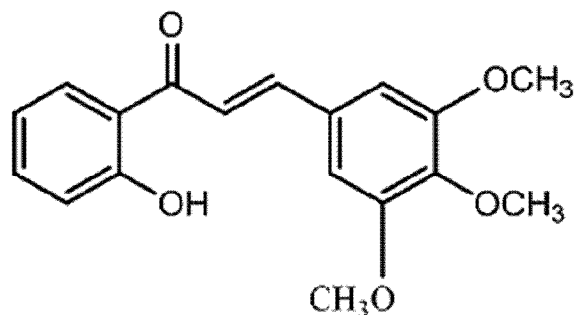
- [85] 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 $C_{18}H_{18}O_6$ 를 갖는 화합물로, IUPAC 명칭은 2',4-디하이드록시-3,4',6'-트리메톡시찰콘(2',4-dihydroxy-3,4',6'-trimethoxychalcone)에 해당한다.

- [86] 상기 화학식 2의 화합물은 상기 화학식 1의 화합물에서 R3 및 R5'이 하이드록시로, R4, R1', 및 R3'이 메톡시로, 나머지가 수소로 치환된 화합물로서, 본 발명에서는 상기 화학식 2의 화합물을 KRIBB53 (K53)으로 명명하였다.

[87]

[88] [화학식 3]

[89]



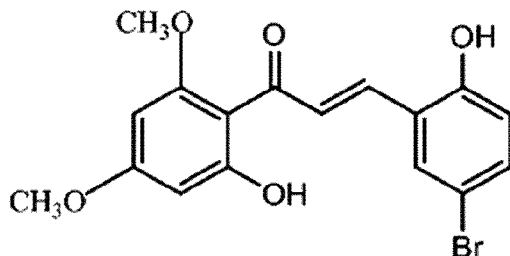
[90] 상기 화학식 3의 화합물은 화학식 $C_{18}H_{14}O_5$ 을 갖는 화합물로, IUPAC 명칭은 2'-하이드록시-3,4,5-트리메톡시찰콘 (2'-hydroxy-3,4,5-trimethoxychalcone)에 해당한다.

[91] 상기 화학식 3의 화합물은 상기 화학식 1의 화합물에서 R2, R3, R4가 메톡시로, R1'이 하이드록시로, 나머지가 수소로 치환된 화합물로서, 본 발명에서는 상기 화학식 3의 화합물을 KRIBB55 (K55)로 명명하였다.

[92]

[93] [화학식 4]

[94]



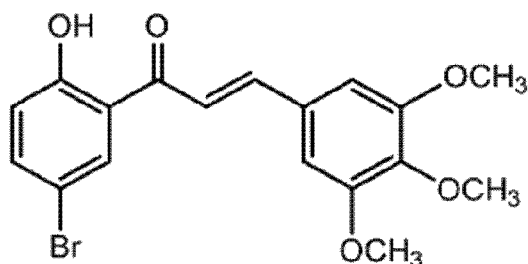
[95] 상기 화학식 4의 화합물은 화학식 $C_{17}H_{18}BrO_5$ 를 갖는 화합물로, IUPAC 명칭은 5-브로모-2,2'-디하이드록시-4',6'-디메틸찰콘(5-bromo-2,2'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone)에 해당한다.

[96] 상기 화학식 4의 화합물은 상기 화학식 1의 화합물에서 R1 및 R1'이 하이드록시로, R3' 및 R5'이 메톡시로, R4가 브로모기로, 나머지가 수소로 치환된 화합물로서, 본 발명에서는 상기 화학식 4의 화합물을 KRIBB56 (K56)으로 명명하였다.

[97]

[98] [화학식 5]

[99]



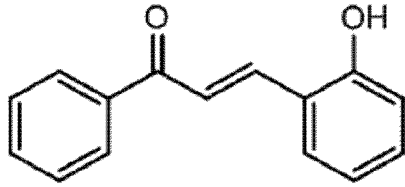
[100] 상기 화학식 5의 화합물은 화학식 $C_{18}H_{17}BrO_5$ 를 갖는 화합물로, IUPAC 명칭은 5'-브로모-2'-하이드록시-3,4,5-트리메틸찰콘(5'-bromo-2'-hydroxy-3,4,5-trimethoxychalcone)에 해당한다.

[101] 상기 화학식 5의 화합물은 상기 화학식 1의 화합물에서 R2 내지 R4가 메톡시로, R2'이 브로모로, R5'가 하이드록시로, 나머지가 수소로 치환된 화합물로서, 본 발명에서는 상기 화학식 5의 화합물을 KRIBB58 (K58)으로 명명하였다.

[102]

[103] [화학식 6]

[104]



[105] 상기 화학식 6의 화합물은 화학식 $C_{15}H_{12}O_2$ 를 갖는 화합물로, IUPAC 명칭은 2-하이드록시찰콘 (2-hydroxychalcone)에 해당한다.

[106] 상기 화학식 6의 화합물은 상기 화학식 1의 화합물에서 R1이 하이드록시로, 나머지가 수소로 치환된 화합물로서, 본 발명에서는 상기 화학식 6의 화합물을 KRIBB59 (K59)으로 명명하였다.

[107]

[108] 상기 OCT4의 저해는 시험관 내 (in vitro), 생체 내 (in vivo), 또는 생체 외 (ex vivo)에서 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[109] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 상기 화학식 2 내지 6의 화합물을 NCCIT 세포 (고환암 세포주)에 처리한 결과 OCT4 단백질의 활성을 억제하고 (표 1), OCT4의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 확인하여 (도 1 및 2), OCT4 저해용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

[110]

[111] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 이들을 포함하는 조성물을 포함하는, 미분화 세포 (undifferentiated cell) 제거용 조성물을 제공한다. 구체적으로 상기 조성물은 세포 치료제의 미분화 세포 제거용 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[112] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 이들을 포함하는 조성물을 포함하는, 세포 치료제의 테라토마 (teratoma) 또는 테라토칼시노마 (teratocarcinoma) 형성 억제용 조성물을 제공한다.

[113] 본 발명에서 '세포 치료제(cell therapy products)'란 세포 치료에 사용하는 살아있는 세포를 말하며, 보다 구체적으로 세포와 조직의 기능을 복원하기 위하여 살아 있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식, 선별한 세포를 포함하는 의약품을 의미한다. 상기 세포치료제의 종류로서, 분화 정도에 따라 체세포 치료제와, 줄기세포 치료제로 나눌 수 있으며, 상기 줄기세포 치료제는 배아줄기세포 치료제, 유도만능줄기세포 치료제, 성체줄기세포 치료제로 나눌 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 세포 치료제는 미분화 세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[114] 본 발명에서 '미분화 세포 (undifferentiated cell)'란 아직 분화가 끝나지 않고, 분화될 여지가 있는 세포를 의미하며, 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 종양 세포, 암 세포 등을 모두 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 미분화 세포는

OCT4를 발현하는 미분화 세포일 수 있다.

- [115] 본 발명에서 '테라토마 (teratoma)'란, 피부세포, 근육세포, 신경세포 등 다양한 세포와 조직으로 이루어진 기형종을 의미하는 것으로, 세포 치료제에 포함된 미분화 세포로 인해 테라토마가 발생할 수 있는 문제가 있다.
- [116] 본 발명에서 '테라토칼시노마 (teratocarcinoma)'란 태생기암(embryonal carcinoma)와 테라토마가 혼재된 배아세포 종양을 의미하며, 기형암종으로도 명명된다.
- [117] 상기 미분화 세포의 제거, 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성의 억제는 시험관 내 (in vitro), 생체 내 (in vivo), 또는 생체 외 (ex vivo)에서 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [118]
- [119] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물은 OCT4 단백질의 발현 또는 활성을 저해시킴으로써, 세포 치료제에 포함된 미분화 세포를 제거하거나, 세포 치료제의 투여로 인해 발생할 수 있는 테라토마 또는 테라토칼시노마를 억제할 수 있다.
- [120]
- [121] 본 발명의 일 실시 양태는 개체에 투여하기 전 세포 치료제에 본 발명의 화합물 또는 이를 포함하는 조성물을 처리하고/하거나, 세포 치료제가 투여되거나 또는 투여되기 전의 개체에 본 발명의 화합물 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하여, 세포 치료제의 미분화 세포를 제거하거나, 테라토마 또는 테라토칼시노마의 형성을 억제할 수 있다.
- [122]
- [123] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, OCT4의 단백질 수준의 발현이 유도만능줄기세포와 같은 미분화 세포에서만 관찰되며, 신경줄기세포에서는 관찰되지 않음을 확인하였으며 (도 8), 본 발명의 상기 화합물이 OCT4를 발현하는 미분화 세포인 유도만능줄기세포만을 선별적으로 억제함을 확인하였다.
- [124] 따라서, 본 발명의 상기 화합물은 OCT4를 발현하는 세포만을 특이적으로 억제하는바, 세포 치료제의 미분화 세포를 제거하는데 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 세포 치료제의 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성을 억제하는데 활용될 수 있다.
- [125]
- [126] 또한, 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 화학식 1의 화합물, 상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [127] 상기 암의 구체적인 예시로서, 간암, 대장암, 유방암, 위암, 폐암, 췌장암, 갑상선암, 자궁암, 전립선암, 또는 고환암 등이 있으며, 보다 구체적으로 고환암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [128] 본 발명에서 사용된 용어 “예방”은, 본 발명의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물의 투여로 암, 구체적으로 고환암의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [129] 본 발명에서 사용된 용어 “치료”는, 본 발명의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질병의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.
- [130] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물은 OCT4 단백질의 발현 또는 활성을 저해시킴으로써, OCT4를 발현하는 암세포만을 특이적으로 억제하여, 항암 제제로 유용하게 활용될 수 있다.
- [131] 본 발명의 약학 조성물은 추가로 항암제(예들 들어, 고환암의 항암제 등)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항암제는 예방 또는 치료 목적에 따라 선택될 수 있다.
- [132] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 상기 화합물의 암세포 세포사멸 유도 효과를 확인하기 위해 고환암 세포주에 본 발명의 상기 화합물을 처리한 결과, 생체 내에서 부작용을 유발하지 않으면서도 (도 5a) 종양의 부피 및 크기를 감소시키고 (도 5b 및 5c), 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서도 암 세포만을 특이적으로 억제하여 (도 6a), 암의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [133]
- [134] 본 발명에서 “약학 조성물”은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [135] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [136] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 상업 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [137] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데

흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[138] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다.

[139] 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[140] 본 발명의 일 실시예에 따른 약학 조성물에 포함된 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 5 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.

[141] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명에서 "약제학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 개체의 연령, 체중, 건강, 성별, 개체의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명의 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.

[142] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 예를 들어, 상기 화합물을 포함하는 조성물을 개체에 하루 동안 10 내지 1,000 mg/kg, 구체적으로는 10 내지 600 mg/kg으로 투여되도록 투여될 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.

[143]

[144] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 이들을 포함하는 조성물을 세포 치료제에 처리하는 단계를 포함하는, 미분화 세포 제거; 또는 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성 억제 방법을 제공한다.

[145] 상기 '화학식 1의 화합물', '상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물', '약제학적으로 허용 가능한 염', '세포 치료제', '미분화 세포', '테라토마', 및 '테라토칼시노마'에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[146] 본 발명의 화합물 또는 조성물은 세포 치료제에 시험관 내 (in vitro), 생체 내 (in

vivo), 또는 생체 외 (ex vivo)에서 처리될 수 있다.

[147] 본 발명의 일 실시 양태는 개체에 투여하기 전 세포 치료제에 본 발명의 화합물 또는 이를 포함하는 조성물을 처리하고/하거나, 세포 치료제가 투여되거나 또는 투여되기 전의 개체에 본 발명의 화합물 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하여, 세포 치료제의 미분화 세포를 제거하거나, 테라토마 또는 테라토칼시노마의 형성을 억제할 수 있다.

[148] 또한, 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 테라토마 또는 테라토칼시노마의 예방 또는 치료를 위한 억제학적 제제를 제조하는데 상기 화학식 1의 화합물, 상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물, 또는 이의 억제학적으로 허용 가능한 염을 사용하는 용도를 제공한다.

[149] 상기 '화학식 1의 화합물', '상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물', '억제학적으로 허용 가능한 염', '세포 치료제', '미분화 세포', '테라토마', 및 '테라토칼시노마'에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[150] 상기 미분화 세포의 제거, 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성의 억제는 시험관 내 (in vitro), 생체 내 (in vivo), 또는 생체 외 (ex vivo)에서 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[151] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, OCT4의 단백질 수준의 발현이 유도만능줄기세포와 같은 미분화 세포에서만 관찰되며, 신경줄기세포에서는 관찰되지 않음을 확인하였으며 (도 8), 본 발명의 상기 화합물이 OCT4를 발현하는 미분화 세포인 유도만능줄기세포만을 선별적으로 억제함을 확인하였다.

[152] 따라서, 본 발명의 상기 화합물은 OCT4를 발현하는 세포만을 특이적으로 억제하는바, 세포 치료제의 미분화 세포를 제거하는데 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 세포 치료제의 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성을 억제하는데 활용될 수 있다.

[153]

[154] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물, 또는 이의 억제학적으로 허용 가능한 염; 또는 이들을 포함하는 조성물을 세포 치료제에 처리하는 단계를 포함하는, 세포 치료제의 제조 방법을 제공한다. 구체적으로 상기 제조 방법은 미분화 세포가 제거되거나, 또는 테라토마 또는 테라토칼시노마의 형성이 억제된 세포 치료제의 제조 방법일 수 있다.

[155] 상기 '화학식 1의 화합물', '상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물', '억제학적으로 허용 가능한 염', '세포 치료제', '미분화 세포', '테라토마', 및 '테라토칼시노마'에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[156] 본 발명의 화합물 또는 OCT4 저해용 조성물은 OCT4 단백질의 발현 또는 활성 저해를 통해 세포 치료제에 잔존하는 미분화 세포를 사멸시킬 수 있어, 테라토마 또는 테라토칼시노마의 발생을 억제할 수 있는 바, 안전한 세포 치료제를 제조할

수 있다.

[157]

[158] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 또는 이들을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[159] 보다 구체적으로, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 고환암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[160] 상기 '화학식 1의 화합물', '상기 화학식 2 내지 6 중 어느 하나의 화합물', '약제학적으로 허용 가능한 염', '암'에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[161] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 암, 구체적으로 고환암이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[162] 본 발명의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 암, 구체적으로 고환암이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[163] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 상기 화합물의 암세포 세포사멸 유도 효과를 확인하기 위해 고환암 세포주에 본 발명의 상기 화합물을 처리한 결과, 생체 내에서 부작용을 유발하지 않으면서도 (도 5a) 종양의 부피 및 크기를 감소시키고 (도 5b 및 5c), 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서도 암 세포만을 특이적으로 억제하여 (도 6a), 암의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[164]

발명의 실시를 위한 형태

[165] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[166]

[167] <실시예 1> 화합물 K53, K55, K56, K58 및 K59의 OCT4 활성 억제효과 확인

[168]

[169] 화합물 K53, K55, K56, K58, 및 K59의 OCT4 활성 억제효과를 확인하기 위해 다음과 같은 이중 루시퍼라아제법을 수행하였다.

[170] 한국생명공학연구원에서 OCT4가 결합하는 염기서열(ORE; OCT4 Response Element)을 PCR 방법으로 제조하여 pTA-Luc 플라스미드(제조사: Clontech)에 삽입하여, OCT4의 활성화에 비례하여 반딧불 루시퍼라제(Firefly luciferase)의 발현이 증가하는 플라스미드인 [pORE-TA-Luc]를 제조하였다. OCT4의 활성화와

무관하게, 레닐라 루시페라제(Renilla luciferase)를 항상 일정하게 발현하는 플라스미드인 [pRL-TK] 벡터를 Promega사에서 구입하여 사용하였다. [pORE-TA-Luc]와 [pRL-TK] 플라스미드를 X-tremeGENE(Roche, USA)를 이용하여 고회암 세포주(NCCIT, 구입처: ATCC에서 구매)에 동시에 감염시켰다.

[171]

[172] 0.05% 트립신-EDTA(trypsin-EDTA)를 이용하여 플라스미드들이 도입된 고회암 세포를 세포배양 접시로부터 떼어내고, 96-웰 검정 플레이트의 각각의 웰(well)에 20,000개의 세포를 접종하였다. 10% FBS가 포함된 배지에서 5% 이산화탄소를 포함하는 37°C 배양기에 18시간 동안 배양한 후, 대조군[1% DMSO(Dimethylsulfoxide)]과, 화합물 K53, K55, K56, K58, 및 K59를 DMSO에 1000 μ M로 녹인 것을 10 μ M의 농도로 첨가하고 24시간 동안 37°C배양기에서 배양하였다. 반딧불 루시페라제(Firefly luciferase)와 레닐라 루시페라제(Renilla luciferase)에 특이적인 별도의 기질 Beetle luciferin(구입처:Promega)과 coelenterazine(구입처:Promega)을 순차적으로 25 μ l씩 첨가한 후 측정하였다.

[173] 기질의 분해에 의한 발광 강도는 GloMax™ 96 Microplate Luminometer (Promega)를 이용하여 측정하였으며, 그 측정값을 하기 수학적 식 1을 통해 활성저해도(%)를 계산하여 하기 표 1에 나타내었다 (OCT4의 활성을 비례적으로 반영하는 측정된 반딧불 루시페라제 활성은, 항상 일정하게 발현하는 프로모터에 의해 발현되는 레닐라 루시페라제 활성값을 사용하여 각각의 실험군에서 발생하는 비특이적인 세포독성 및 형질주입(transfection) 효율의 편차를 보정하였다).

[174]

[175] [수학적 식 1]

[176]
$$\text{활성저해도}(\%) = 100 \times \left[1 - \frac{\text{시료구 } RLU}{\text{대조구 } RLU} \right]$$

(RLU: relative luminescence unit)

[177]

[178] 상기 식에서, 대조구 RLU는 [pORE-TA-Luc] + [pRL-TK] + [DMSO]를 의미하며, 시료구 RLU는 [pORE-TA-Luc] + [pRL-TK] + [화합물 1]을 의미하며, [pORE-TA-Luc]는 OCT4에 의해 조절되는 프로모터를 갖고 있는 반딧불 루시페레이즈 발현 플라스미드이고, [pRL-TK]는 레닐라 루시페라제(Renilla luciferase)를 항상 일정하게 발현하는 플라스미드를 의미한다.

[179]

[180] [표1]

NCCIT	
화합물 농도: 10 μ M	
화합물명	활성저해도(%) (Luc activity)
K53	76
K55	52
K56	99
K58	26
K59	99

[181] 그 결과, 표 1에서 볼 수 있듯이, 화합물 K53, K55, K56 및 K59는 루시퍼라제의 활성을 50% 이상 저해하여, OCT4 활성을 억제하는 효과를 나타냄을 확인하였다. 특히, K56, K59는 거의 100%에 가까운 활성 저해도를 나타내어, OCT4 활성 저해 효과가 더욱 우수함을 알 수 있다.

[182]

[183] <실시예 2> 화합물 K53, K55, K56, K58 및 K59의 OCT4 발현 억제효과 확인

[184]

[185] OCT4 활성 억제효과에 더하여, 화합물 K53, K55, K56, K58, 및 K59의 OCT4 유전자 발현 억제효과를 확인하고자 하였다.

[186] 먼저, 6-웰 플레이트에 NCCIT 세포를 2.5×10^5 개로 접종하였다. 18시간 후 화합물 K53, K55, K56, K58 및 K59를 각각 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 화합물이 처리된 세포를 RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM sodium vanadate, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% sodium deoxy sulfate)로 용해시켰다. 세포 용해액을 15,000g로 원심 분리하여 상층 세포액을 회수하였으며, 브래드포드 시약 (Bradford reagent) (Bio-Rad protein assay, USA)을 이용하여 회수한 세포액의 OCT4 및 GAPDH 단백질 농도를 측정하였다.

[187] 또한 10% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 15 μ g의 세포 용해액을 단백질 분리한 후, PVDF 막 (Millipore, USA)으로 단백질을 전기 이동하고 TBST (50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% tween 20)에 녹인 5% skim milk를 이용하여 블로킹(blocking) 하였다. OCT4 항체(Cell signaling, USA), GAPDH 항체(Santacruz, USA)로 2시간 동안 반응시키고 HRP가 conjugation된 2차 항체 (Jackson Immunolab, USA)와 30분 동안 반응시킨 뒤, 화학발광 (chemiluminescence) POD 시약 (Roche, Germany)을 사용하여 OCT4 및 GAPDH 발현량을 검출하였다.

[188]

- [189] 그 결과, 도 1에서 알 수 있듯이, 화합물 K53, K55, K56, K58 및 K59는 농도 의존적으로 OCT4의 발현을 억제하는 활성을 나타냄을 확인하였다.
- [190]
- [191] <실시예 3> 화합물 K53의 농도 비례적인 OCT4 발현 억제효과 확인
- [192]
- [193] 다음으로, 화합물 K53이 농도 의존적으로 OCT4의 발현을 억제하는지 여부를 구체적으로 확인하고자 하였다.
- [194]
- [195] 먼저, 6-웰 플레이트에 NCCIT 세포를 2.5×10^5 개로 접종하였다. 18시간 후 화합물 K53을 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M 농도로 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 화합물이 처리된 세포를 RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM sodium vanadate, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% sodium deoxy sulfate)으로 용해시켰다. 세포 용해액을 15,000g로 원심 분리하여 상층 세포액을 회수하였으며, Bradford reagent (Bio-Rad protein assay, USA)를 이용하여 회수한 세포액의 OCT4 및 GAPDH 단백질 농도를 측정하였다.
- [196] 또한, 10% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 15 μ g의 세포 용해액을 단백질 분리한 후, PVDF 막 (Millipore, USA)으로 단백질을 전기 이동하고 TBST (50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% tween 20)에 녹인 5% skim milk를 이용하여 블로킹 하였다. OCT4 항체(Cell signaling, USA), GAPDH 항체(Santacruz, USA)로 2시간 동안 반응시키고 HRP가 conjugation된 2차 항체 (Jackson Immunolab, USA)와 30분 동안 반응 시킨 뒤, chemiluminescence POD 시약 (Roche, Germany)을 사용하여 OCT4 및 GAPDH 발현량을 검출하였다.
- [197]
- [198] 그 결과, 도 2에서 알 수 있듯이, 화합물 K53는 농도 의존적으로 OCT4의 발현을 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [199]
- [200] <실시예 4> 화합물 K53의, OCT4 다운스트림 유전자인 NANOG 및 USP44의 발현 억제효과 확인
- [201]
- [202] OCT4 전사인자에 의해서 발현이 유도되는 NANOG는 세포의 줄기성 유지에 중요한 역할을 한다. 따라서, 화합물 K53을 처리하였을 때 OCT4에 의해 유도되는 NANOG 및 USP44의 mRNA 발현량 변화를 다음과 같은 실험방법을 통해 측정하여, 화합물 K53의 NANOG 및 USP44의 mRNA 발현 억제효과를 확인하였다.
- [203]
- [204] 6-웰 플레이트에 NCCIT 세포를 2.5×10^5 개로 접종하였다. 18시간 후 화합물 K53을 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M 농도로 처리하여 12시간 동안

배양하였다. 화합물이 처리된 세포를 RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM sodium vanadate, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% sodium deoxy sulfate)으로 용해시켰다. 세포 용해액을 15,000g로 원심 분리하여 상층 세포액을 회수하였으며, Bradford reagent (Bio-Rad protein assay, USA)를 이용하여 회수한 세포액의 단백질 농도를 측정하였다.

[205] 또한, 10% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 15 μ g의 세포 용해액을 단백질 분리한 후, PVDF 막 (Millipore, USA)으로 단백질을 전기 이동하고 TBST (50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% tween 20)에 녹인 5% skim milk를 이용하여 블로킹 하였다. NANOG 항체(R&D systems, USA), USP44 항체 (Santacruz, USA), GAPDH 항체(Santacruz, USA)로 2시간 동안 반응시키고 HRP가 conjugation된 2차 항체 (Jackson Immunolab, USA)와 30분 동안 반응 시킨 뒤, chemiluminescence POD 시약 (Roche, Germany)을 사용하여 검출하였다.

[206] RNA는 TRIzol(Invitrogen)을 통해 수집하였으며, 얻어진 RNA에서 2 μ g 정도를 취하여 RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Fermentas)을 이용하여 RNA에 상보적인 DNA를 합성하였다. 이 상보적인 DNA를 주형으로 하여 첨가한 IQTM SYBR green supermix (BioRad)의 형광 발색 정도로 NANOG의 mRNA 발현량을 실시간 역전사 효소 연쇄 증합 반응을 통해 확인하였다.

[207]

[208] 도 3에서 알 수 있듯이, 화합물 K53을 12시간 처리하였을 때 K53 화합물의 농도가 증가함에 따라 NANOG의 mRNA 발현량이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 화합물 K53의 처리 농도가 증가함에 따라 USP44의 mRNA 발현량 또한 감소하는 것을 확인하였다.

[209]

[210] <실시예 5> 화합물 K53의 암세포 세포사멸 유도효과 확인

[211]

[212] poly (ADP-Ribose) polymerase[이하, PARP]은 세포 사멸 유도를 확인 할 수 있는 마커로, 외부 자극에 대해 유전자의 안정성을 유지할 수 있게 해주는 대표적인 세포 내의 수리 시스템이다. 세포 사멸이 일어나게 되면 PARP가 잘리게 되고 이러한 PARP의 절단은 세포사멸의 대표적인 신호로 여겨진다.

[213] 따라서 PARP를 활용하여, 화합물 K53의 세포사멸 유도 활성과, 테라토마 억제 효과를 구체적으로 확인하고자 하였다.

[214]

[215] 구체적으로, 60mm 세포배양접시에 NCCIT 세포를 3×10^5 개로 접종한 후, 화합물 K53을 20 μ M 농도로 처리하여 표시된 시간 동안 배양하였다. 화합물 K53에 의한 PARP의 절단을 분석하기 위해 처리된 세포를 RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM sodium vanadate, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% sodium deoxy sulfate)로 용해시켰다. 세포 용해액을

15,000g로 원심 분리하여 상층 세포액을 회수하였으며, Bradford reagent (Bio-Rad protein assay, USA)를 이용하여 회수한 세포액의 단백질 농도를 측정하였다.

- [216] 또한 7.5% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 30 μ g의 세포 용해액을 단백질 분리한 후, PVDF 막 (Millipore, USA)으로 단백질들을 전기 이동하고 TBST (50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% tween 20)에 녹인 5% skim milk를 이용하여 블로킹 하였다. PARP 항체(Cell signaling, USA), GAPDH 항체(Santacruz, USA)로 2시간 동안 반응시키고 HRP가 conjugation된 2차 항체 (Jackson Immunolab, USA)와 1시간 동안 반응 시킨 뒤, chemiluminescence POD 시약 (Roche, Germany)을 사용하여 검출하였다. 그 결과는 도 4에 도시하였다.

[217]

- [218] 도 4에서 알 수 있듯이, 화합물 K53의 처리시간에 비례하여 절단된 PARP 형태가 관찰되는 것을 볼 수 있다. 따라서, 화합물 K53은 OCT4를 발현하는 NCCIT의 세포사멸이 유도하여 우수한 항암 효과를 나타내며, 나아가, 미분화 세포 또는 테라토마를 효과적으로 사멸시킬 수 있음을 알 수 있다.

[219]

- [220] <실시예 6> Nude mouse initiation model에서 화합물 K53의 복강투여에 의한 부작용 및 항암 효과 확인

[221]

- [222] NCCIT 5×10^6 cells을 Matrigel Matrix (BD biosciences) 100 μ l에 혼합하여 NOD.CB17-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJmice (6주령)에 이식 하였다. 접종 1일 후에 마우스를 무작위적으로 6마리씩 2개의 그룹(n=6)으로 나누어, 여기에 본 발명의 화합물 K53을 10% DMA(N,N-dimethylacetamide), 10% Cremophore 및 80% 증류수(v/v/v)로 구성된 용액에 녹인 후, 50일 동안 화합물 K53을 일일 투여용량 30 mg/kg으로 하여 매일 복강 투여하였다.

- [223] 시험 기간 동안 특이한 증상은 관찰되지 않았으며, 마우스 체중 변화 결과, 종양의 부피변화 결과 및 최종일의 종양 조직 적출사진은 각각 도 5a, 도 5b 및 도 5c과 같다.

[224]

- [225] **6-1) 체중변화 관찰**

[226]

- [227] 도 5a에 나타난 바와 같이, 최종일(day 51)의 결과를 보면 용매 대조군과 비교하여, 화합물 K53(30 mg/kg) 투여군에서 체중 감소는 없었다. 따라서, 화합물 K53은 생체 내에서 부작용을 유발하지 않는 안전한 물질임을 확인하였다.

[228]

- [229] **6-2) 종양 부피변화 관찰**

[230]

- [231] 도 5b에 나타난 바와 같이, Initiation model에서 화합물 K53의 매일 반복 복강

투여에 의한 종양크기 변화를 51일 동안 관찰하여 항암효과를 확인하였다. 최종일에 종양조직의 부피를 측정된 결과, 용매 투여군의 경우 $387.8 \pm 66.2 \text{ mm}^3$, 화합물 K53의 경우에는 $90.6 \pm 26.2 \text{ mm}^3$ 으로, 대조군에 비해 약 1/4 크기 정도로 감소하였음을 확인하였다.

[232] 또한, 도 5c의 결과를 하기 수학적 2를 통해 종양성장억제율(%)을 계산한 결과, 77% ($p < 0.001$)의 우수한 억제율을 나타냄을 확인하였다.

[233]

[234] [수학적 2]

[235] 종양성장억제율(%) = $[1 - (\text{시험군의 } t / \text{용매대조군의 } t)] \times 100$

[236] {상기식에서, $t = V_t - V_o$, V_t (Measurement of the tumor volume)이다}

[237]

[238] **6-3) 종양 크기의 육안 확인**

[239]

[240] 또한, 실험 최종일(day 51)에 용매 투여군(vehicle control) 및 화합물 K53 (30mg/kg)투여군의 조직을 적출하여 찍은 사진인 도 5c와 같이 나타내었다.

[241] 그 결과, 화합물 K53 투여군에서 적출한 종양 크기가 현저히 작아, 화합물 K53이 우수한 항암효과, 미분화 세포 억제효과 및 테라토마 억제효과를 나타냄을 확인하였다.

[242]

[243] <실시에 7> 화합물 K53의, OCT4 발현 고환암 세포주 특이적 성장 억제 효과 확인

[244]

[245] 화합물 K53이 고환암 세포주를 선별적으로 성장 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 고환암세포 NCCIT 및 Tera-1의 증식을 분석하였다.

[246]

[247] 구체적으로, NCCIT 및 Tera-1 인간 고환암 세포 7,000개를 96-웰 플레이트의 각 웰에 투여하고, 5% 이산화탄소를 포함한 37°C 배양기에서 10% FBS가 포함된 배지하에 세포를 배양시켰다. 24시간 후에 대조군(0.1 % DMSO) 또는 화합물 K53을 10 μM 및 30 μM 로 포함(DMSO에 녹인 화합물을 배지로 희석)한 배지로 교환한 후, 72시간 동안 배양시켰다. 트리판블루와 세포를 1:1로 섞은 뒤 헤마토사이토미터(hemocytometer)를 사용하여 세포 수를 측정하였으며, 그 결과를 도 6a에 나타내었다.

[248]

[249] 그 결과 도 6a에서 알 수 있듯이, K53 화합물을 30 μM 처리하였을 때 NCCIT 및 Tera-1의 증식이 각각 88.69% 및 70.4% 저해되었다. 반면에 K53을 30 μM 처리한 정상세포주 HFF 및 MCF10A는 증식이 억제되지 않았다.

[250] 따라서, 화합물 K53은 정상 세포에는 영향을 미치지 않으면서도, 암 세포, 테라토마만을 특이적으로 억제함을 알 수 있다.

[251]

[252] 한편, 화합물 K53의 세포사멸 유도 활성이 OCT4 활성 억제에 기인함을 을 확인하기 위하여 NCCIT, Tera-1, HFF 및 MCF10A 세포주에서의 OCT4 발현 정도를 분석하였다.

[253] 구체적으로, 60mm 세포배양접시에 NCCIT, Tera-1, HFF 및 MCF10A 세포를 3×10^5 개로 접종한 후 배양하였다. 세포를 RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM sodium vanadate, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% sodium deoxy sulfate)으로 용해시켰다. 세포 용해액을 15,000g로 원심 분리하여 상층 세포액을 회수하였으며, Bradford reagent (Bio-Rad protein assay, USA)를 이용하여 회수한 세포액의 단백질 농도를 측정하였다.

[254] 또한 7.5% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 30 μ g의 세포 용해액을 단백질 분리한 후, PVDF 막 (Millipore, USA)으로 단백질들을 전기 이동하고 TBST (50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% tween 20)에 녹인 5% skim milk를 이용하여 blocking 하였다. OCT4 항체(Cell signaling, USA) 및 Actin 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)로 2시간 동안 반응시키고 HRP가 컨쥬게이션된 2차 항체 (Jackson Immunolab, USA)와 1시간 동안 반응 시킨 뒤, chemiluminescence POD 시약 (Roche, Germany)을 사용하여 검출하였다. 그 결과는 도 6b에 도시하였다.

[255]

[256] 그 결과 도 6b에서 알 수 있듯이, 화합물 K53은 OCT4를 발현하는 고환암 세포만을 특이적으로 저해하며, 암세포가 아닌 일반 세포에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[257]

[258] <실시예 8> OCT4의 분자 표적에 대한 화합물 K53의 결합 확인

[259]

[260] OCT4 억제를 통한 K53의 활성에 대해 보다 구체적으로 분석하기 위하여, OCT4에 대한 K53의 결합 여부를 확인하고자 하였다.

[261]

[262] 먼저, DMF 용매에 N-biotinylcaproic acid, EDC 및 DMAP을 녹인 후 K53 (KRIBB53) 화합물을 반응시켜 KRIBB53-biotin을 합성하였다. 이후 HPLC를 사용하여 KRIBB53-biotin을 정제하였다.

[263]

NCCIT 용해액을 호모젠나이저 버퍼(60mM β -glycerophosphate, 25mM MOPS (pH7.2), 15mM EGTA, 1mM DTT, 1mM phenyl phosphate, 100 μ M benzamidine)를 사용하여 제조하였다. 용해액에 KRIBB53-biotin을 20 μ M 처리한 후 K53 화합물을 0, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M 농도로 처리하였다. 그 후에 NeutrAvidin-Agarose resin을 첨가하였다. KRIBB53-biotin에 결합하지 않은 세포 용해액은 비드 버퍼(50mM Tris (pH 7.4), 5mM NaF, 250mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.1% Nonidet P-40, 10 μ g/ml of leupeptin, aprotinin, and soybean trypsin

inhibitor, and 100 μ M benzamidine)로 세척하여 제거한 후 SDS-샘플 버퍼를 처리하여 결합단백질들을 회수하였다. 회수된 단백질들은 10% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 단백질 분리한 후, PVDF 막 (Millipore, USA)으로 단백질들을 전기 이동하고 TBST (50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% tween 20)에 녹인 5% skim milk를 이용하여 블로킹 하였다. OCT4 항체(Cell signaling, USA)로 2시간 동안 반응시키고 HRP가 conjugation된 2차 항체 (Jackson Immunolab, USA)와 1시간 동안 반응 시킨 뒤, chemiluminescence POD 시약 (Roche, Germany)을 사용하여 검출하였다. 그 결과는 도 7에 도시하였다.

[264]

[265] 그 결과 도 7에서 알 수 있듯이, OCT4가 KRIBB53-biotin에 결합하며, K53 (KRIBB53)을 처리하면 결합이 경쟁적으로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서, K53은 OCT4에 직접적으로 결합하는 활성을 가짐을 알 수 있다.

[266]

[267] <실시예 9> 유도만능줄기세포 및 신경줄기세포에서의 OCT4 발현 여부 분석

[268]

[269] 미분화 유도만능 줄기세포 및 신경 줄기세포에서 OCT4 발현여부를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 (western blot)을 수행하였다.

[270]

ATCC에서 구매한 사람유래 섬유아세포 (CRL2097)로부터 리프로그래밍을 통해 만들어진 유도만능줄기세포 CRL2097 iPSC와 분화시킨 신경줄기세포 CRL2097 NSC를 이용하였다. 신경줄기세포로의 분화는 Dual-smad inhibition을 바탕으로 한 Jun Takahashi의 논문을 참고로 하였다. (Doi, Daisuke, et al. "Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation." Stem cell reports 2.3 (2014): 337-350.)

[271]

RIPA (sigma #R0278-50ML) 버퍼에 펠릿을 풀어주고, ice에서 1시간 동안 두어 단백질이 용해되도록 하였다. 원심분리기를 이용하여 16000g, 4°C 조건에서 20분 동안 원심분리 후, 상층액만을 얻어 브래드포드 (Biorad #500-0006) 시험법을 통해 단백질을 정량하였다. 그 중 20 μ g을 폴리아크릴아미드 겔 (Biorad #456-1083)에 로딩하였고, PVDF membrane (Biorad #162-0177)으로 트랜스퍼하였다. 5% low fat dry milk (Biorad #170-6404)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 블로킹을 한 뒤, OCT3/4 항체 (Santa cruz #sc9081)를 1:4000 비율로 처리하였다. 항체 반응은 4°C 조건에서 16시간 동안 진행하였다. 그 후, Anti-rabbit-HRP 항체 (Santa cruz #sc2004)를 1:10000 비율로 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 내부 대조군을 위한 Beta-actin 항체 (Sigma #A5441)는 1:5000 비율로 처리하였다.

[272]

[273] 그 결과, 도 8에서 알 수 있듯이, OCT4 (size : 45 kDa) 발현은 단백질 수준에서 유도만능줄기세포에서만 관찰할 수 있었으며, 신경줄기세포에서는 관찰되지

않았다.

[274] 따라서 OCT4 저해하는 상기 화합물 K53 등은 유도만능줄기세포와 같은 미분화 세포, 또는 테라토마 세포에는 영향을 주지만, 신경줄기세포에는 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[275]

[276] <실시예 10> 화합물 K53, K55, K56, K58 및 K59의 유도만능줄기세포에 대한 특이적 성장 억제 효과

[277]

[278] K53, K55, K56, K58 및 K59 화합물을 처리할 경우, 유도만능줄기세포에 대한 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, 다음과 같이 세포 계수를 진행하였다.

[279] TeSR-E8 (stemcell #05940) 배지를 이용하여 배양 중인 유도만능줄기세포 CRL2097 iPSC를 Accutase (Millipore #SCR005)를 이용하여 단일세포로 분리한 뒤, 5×10^4 /well(12)로 접종(seed)하였다. 2일 뒤, 세포가 안정적으로 성장하는 시기에 약물을 처리하였다. 신경줄기세포의 경우, 5×10^5 /well(24)로 seed 한 뒤 11일간 분화시킨 세포에 약물을 처리하였다. 유의성을 확인하고자 각 조건은 $n=3$ 으로 반복실험을 진행하였다. DMSO (대조군), 화합물 K53 또는 K59를 각각 $5 \mu\text{M}$ 씩 24시간 동안 처리한 뒤, 세포 계수를 진행하였다. 트리판블루와 세포를 1:1로 섞은 뒤, Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen)을 이용하였고, 약물을 처리한 각 조건에서 살아있는 세포 수를 비교하였다. DMSO와 약물 처리시 조건을 비교하기 위해 T 검정을 이용하여 데이터 분석을 진행하였다.

[280]

[281] 그 결과, 도 9a 및 도 9b에서 알 수 있듯이, OCT4를 발현하는 유도만능줄기세포 CRL2097 iPSC의 경우, K53, K55, K56, K58과 K59를 처리한 조건에서 세포 사멸이 일어나, 살아있는 세포의 수가 감소하였다. 반면, OCT4를 발현하지 않는 신경줄기세포 CRL2097 NSC의 경우, K53, K55, K56, K58과 K59를 처리하여도 대조군과 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었으며, 세포수가 거의 감소하지 않았다.

[282] 따라서, 화합물 K53, K55, K56, K58과 K59는 OCT4를 발현하는 암 세포, 미분화 세포, 또는 테라토마 세포에 대한 특이적인 사멸 효과를 나타내므로, 우수한 항암 효과를 나타내며, 미분화 세포 또는 테라토마 세포 형성 억제 효과를 가짐을 알 수 있다.

[283]

[284] <실시예 11> 화합물 K53, K55, K56, K58 및 K59의 OCT4 발현 고환암세포에 대한 특이적 성장 억제 효과

[285]

[286] 화합물 K53, K55, K56, K58, 및 K59가 OCT4를 특이적으로 저해함으로써 OCT4를 발현하는 고환암 세포주 NCCIT의 성장을 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 고환암세포 NCCIT의 증식을 분석하였다.

[287]

[288] 구체적으로, NCCIT 인간 고환암 세포 2×10^5 개를 6-웰 플레이트의 각 웰에 투여하고, 5% 이산화탄소를 포함한 37°C 배양기에서 10% FBS가 포함된 배지하에 세포를 배양시켰다. 24시간 후에 대조군(0.1 % DMSO) 또는 화합물 K53, K55, K56, K58 및 K59을 10 μ M 또는 30 μ M로 포함(DMSO에 녹인 화합물을 배지로 희석)한 배지로 교환한 후, 48시간 동안 배양시켰다. 트리판블루와 세포를 1:1로 섞은 뒤 헤마토사이토미터(hemocytometer)를 사용하여 세포 수를 측정하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[289]

[290] 그 결과 도 10에서 알 수 있듯이, K53, K55, K56, K58 및 K59 화합물을 10 μ M 처리하였을 때 NCCIT의 증식이 각각 27, 42, 87, 31, 59% 저해되었다. 또한 K53, K55, K56, K58 및 K59 화합물을 30 μ M 처리하였을 때 NCCIT의 증식이 각각 59, 97, 100, 96, 99% 저해되었다.

[291]

[292] 따라서, 상기 화합물 K53, K55, K56, K58 및 K59 화합물은 OCT4를 발현하는 세포인 NCCIT 세포의 증식을 억제함을 확인하여, 미분화 세포의 사멸, 테라토마 및 테라토칼시노마 형성의 억제 효과를 나타낼 수 있으며, 또한 고환암의 예방 및 치료 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.

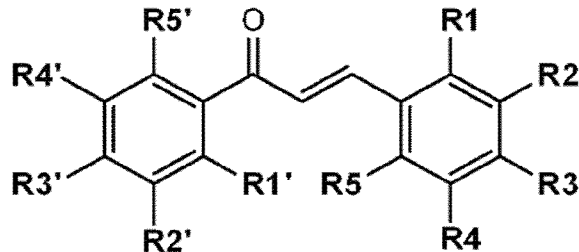
[293]

[294] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, OCT4(Octamer-Binding Transcription Factor 4) 저해용 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서

R1, R2, R3, R4, R5, R1', R2', R3', R4' 및 R5'는 각각 독립적으로 H, 하이드록시, C₁₋₄ 알콕시, 및 할로젠으로 이루어진 군에서 선택되는 것임.

[청구항 2] 제1항에 있어서,

R1은 H, 또는 하이드록시이고;

R2는 H, 또는 C₁₋₄ 알콕시이고;

R3는 H, 하이드록시, 또는 C₁₋₄ 알콕시이고;

R4는 H, C₁₋₄ 알콕시, 또는 할로젠이고;

R5는 H이고;

R1'는 H, 하이드록시 또는 C₁₋₄ 알콕시이고;

R2'는 H, 또는 할로젠이고;

R3'는 H, 또는 C₁₋₄ 알콕시이고;

R4'는 H이고;

R5'는 H, 하이드록시, 또는 C₁₋₄ 알콕시임.

[청구항 3] 제1항에 있어서,

R1, R2, R3, R4, R5, R1', R2', R3', R4' 및 R5'는 각각 독립적으로 H, 하이드록시, 메톡시, 및 브로모로 이루어진 군에서 선택되는 것임.

[청구항 4] 제1항에 있어서,

R1은 H, 또는 하이드록시이고;

R2는 H, 또는 메톡시이고;

R3는 H, 하이드록시, 또는 메톡시이고;

R4는 H, 메톡시, 또는 브로모이고;

R5는 H;

R1'는 H, 하이드록시, 또는 메톡시이고;

R2'는 H, 또는 브로모이고;

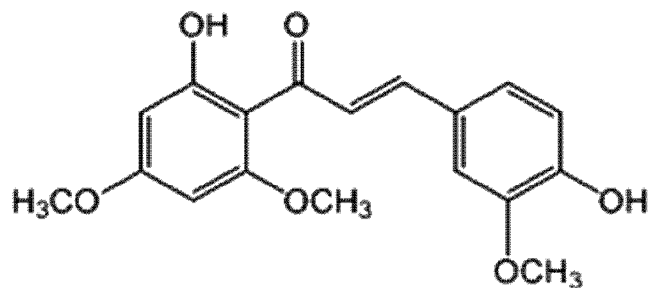
R3'는 H, 또는 메톡시이고;

R4'는 H이고;

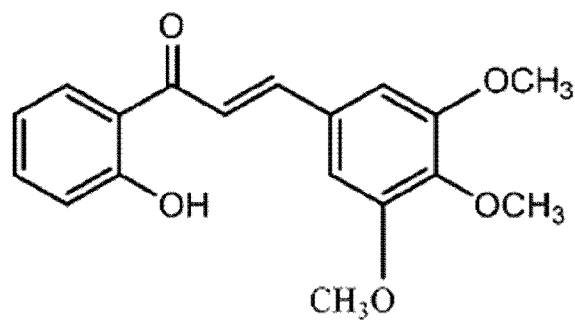
R5'는 H, 하이드록시, 또는 메톡시임.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2 내지 6로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 화합물인 것인, 조성물:

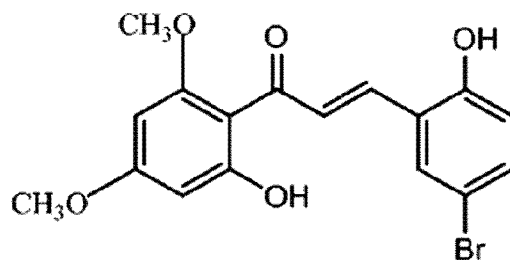
[화학식 2]



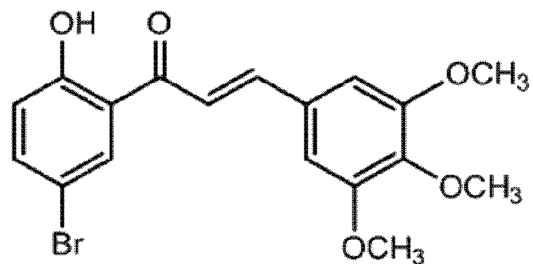
[화학식 3]



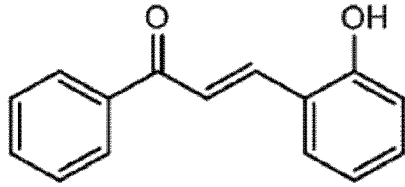
[화학식 4]



[화학식 5]

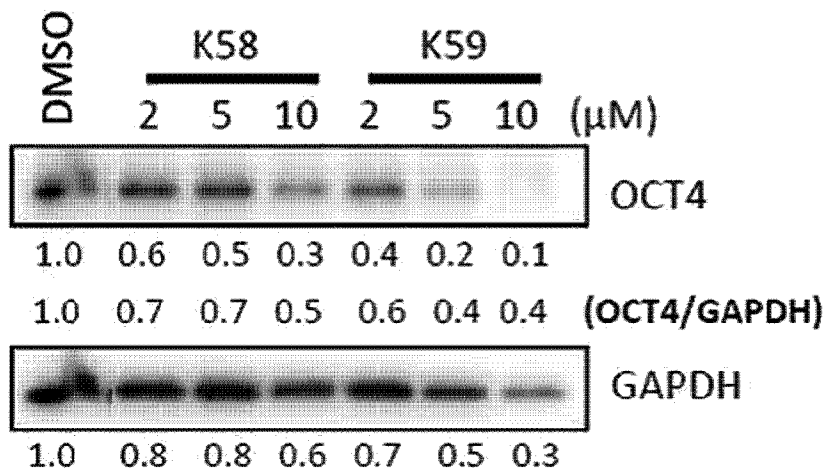
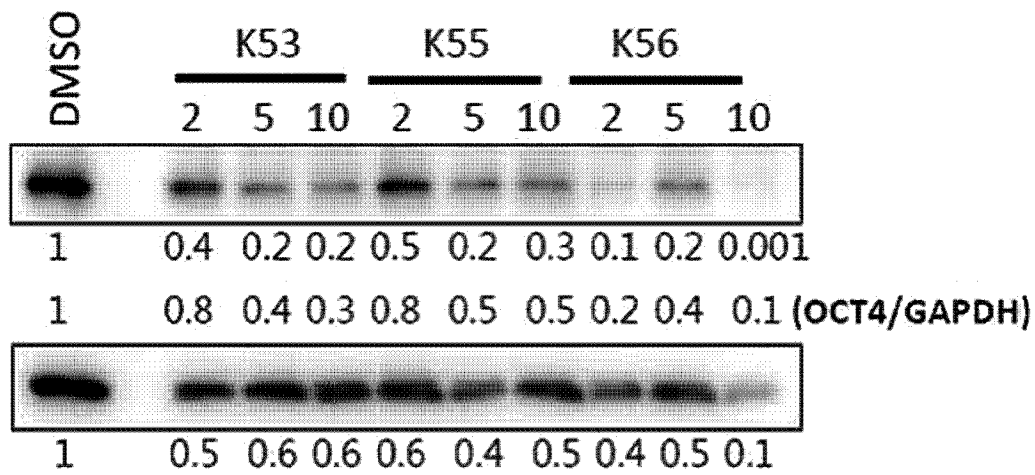


[화학식 6]

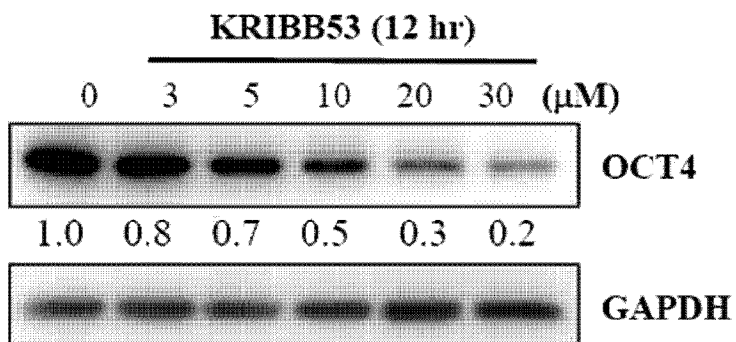


- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 미분화 세포 (undifferentiated cell) 제거용; 또는 세포 치료제의 테라토마 (teratoma) 또는 테라토칼시노마 (teratocarcinoma) 형성 억제용 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 미분화 세포는 OCT4 (Octamer-Binding Transcription Factor 4)를 발현하는 것인, 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 미분화 세포 제거; 또는 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성 억제는 시험관 내 (in vitro), 생체 내 (in vivo), 또는 생체 외 (ex vivo)에서 이루어지는 것인, 조성물.
- [청구항 9] 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 세포 치료제에 처리하는 단계를 포함하는, 미분화 세포 제거; 또는 테라토마 또는 테라토칼시노마 형성 억제 방법.
- [청구항 10] 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 세포 치료제에 처리하는 단계를 포함하는, 미분화 세포가 제거되거나, 또는 테라토마 또는 테라토칼시노마의 형성이 억제된 세포 치료제의 제조 방법.
- [청구항 11] 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 세포 치료제는 체세포 치료제, 줄기세포 치료제 또는 이들의 조합인, 방법.
- [청구항 12] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 고환암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 약학 조성물은 항암제를 추가로 포함하는, 약학 조성물.
- [청구항 14] 제12항 또는 제13항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 고환암의 예방 또는 치료방법.

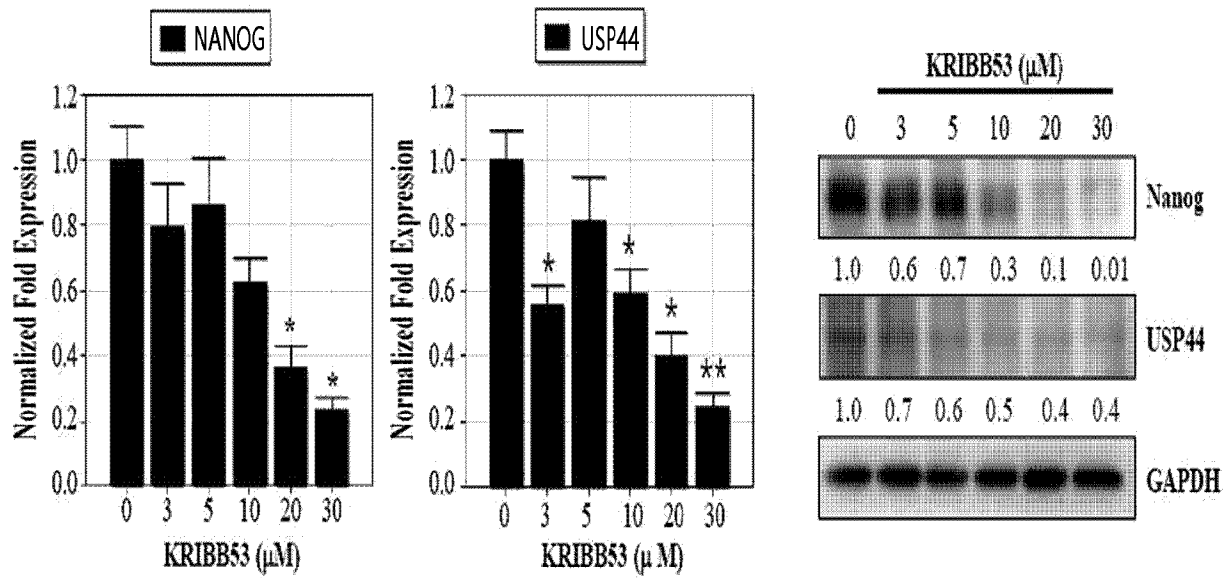
[도1]



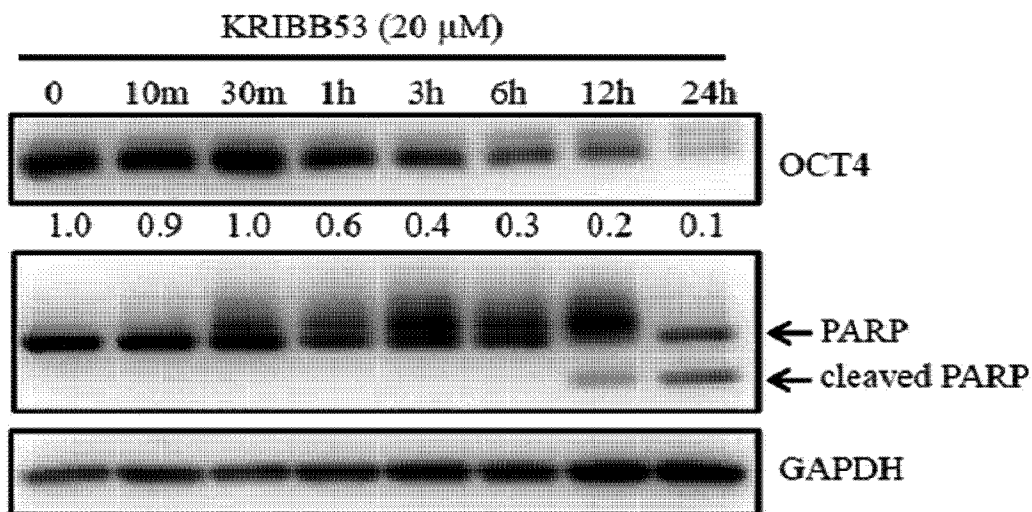
[도2]



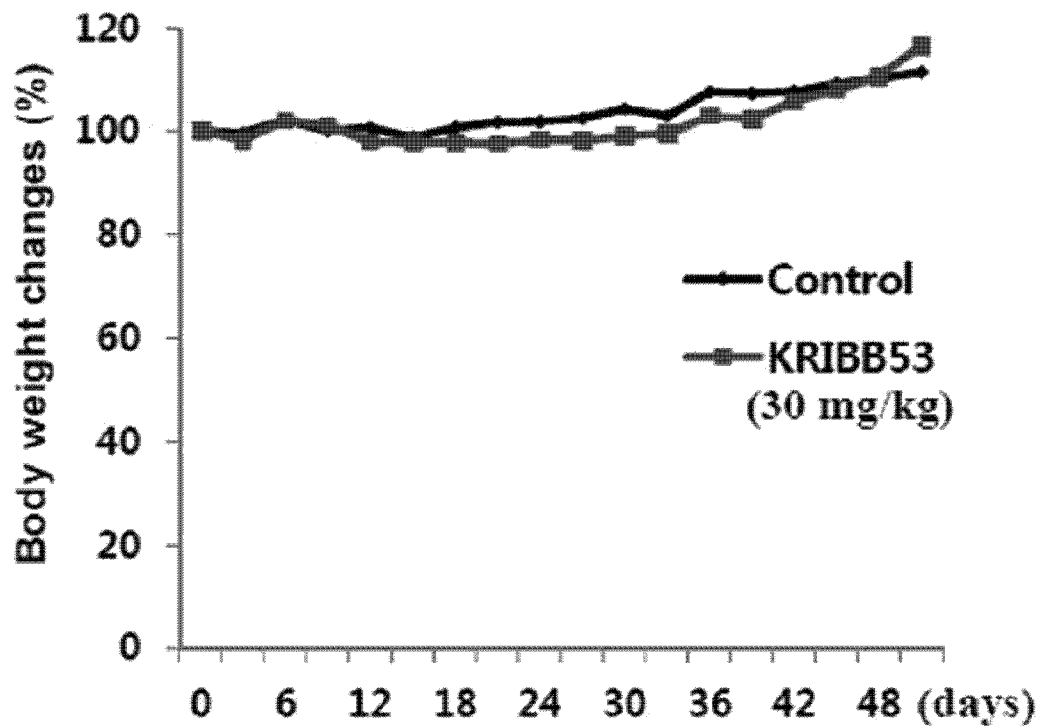
[도3]



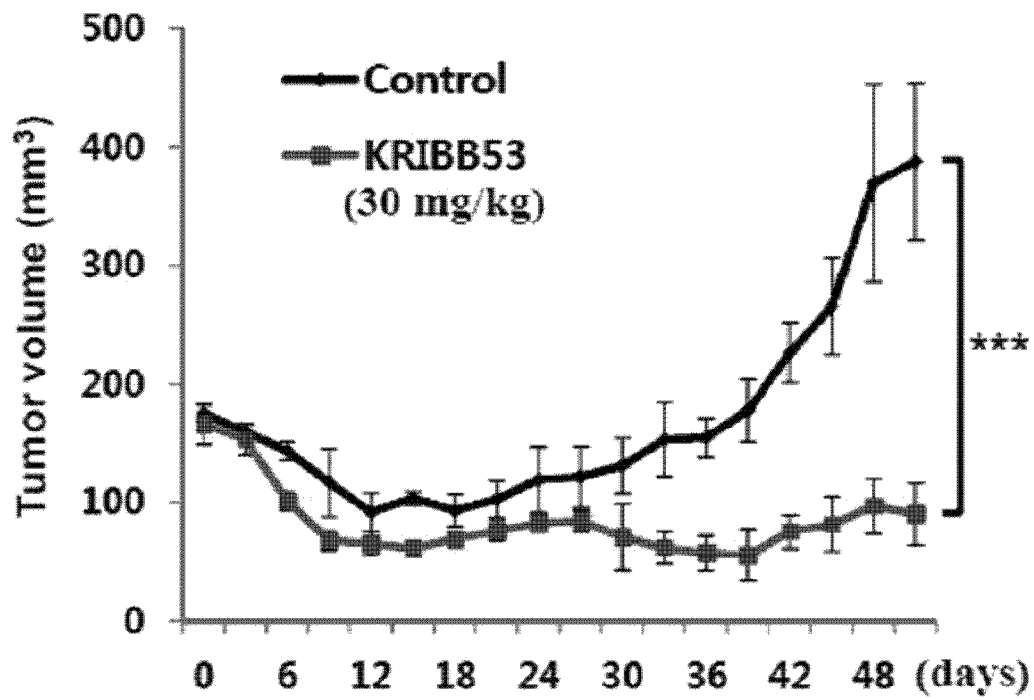
[도4]



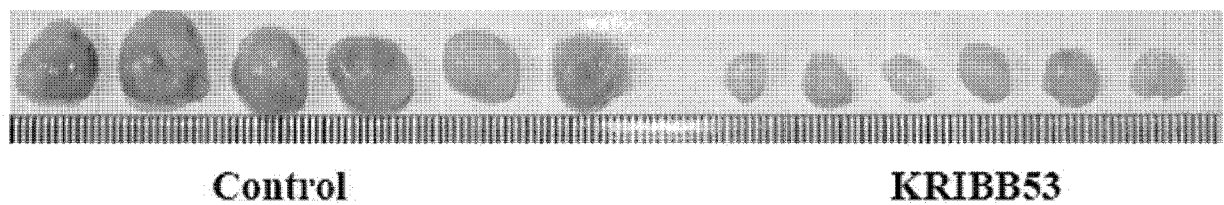
[도5a]



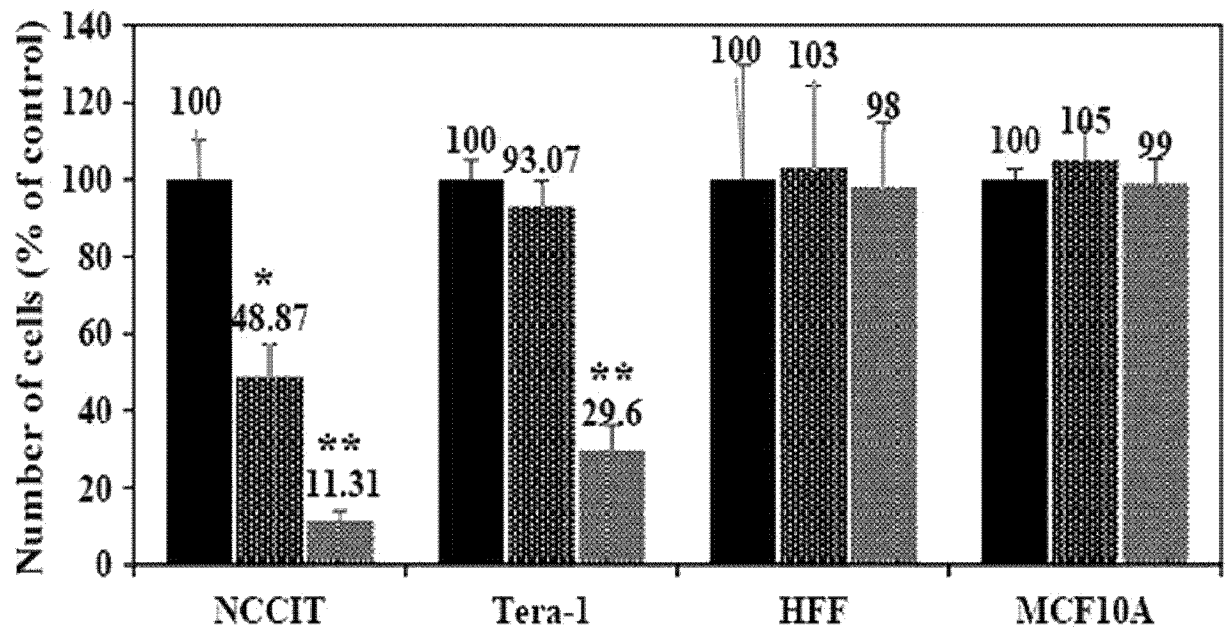
[도5b]



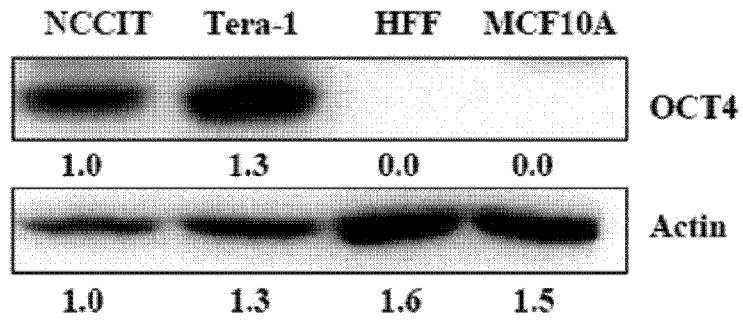
[도5c]



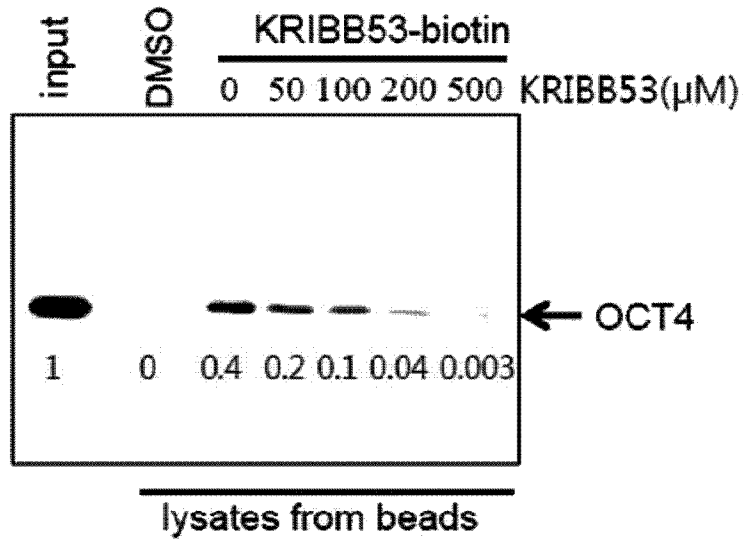
[도6a]



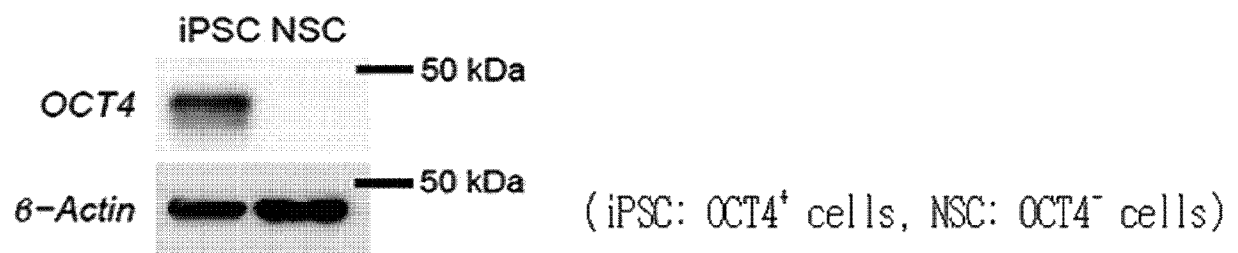
[도6b]



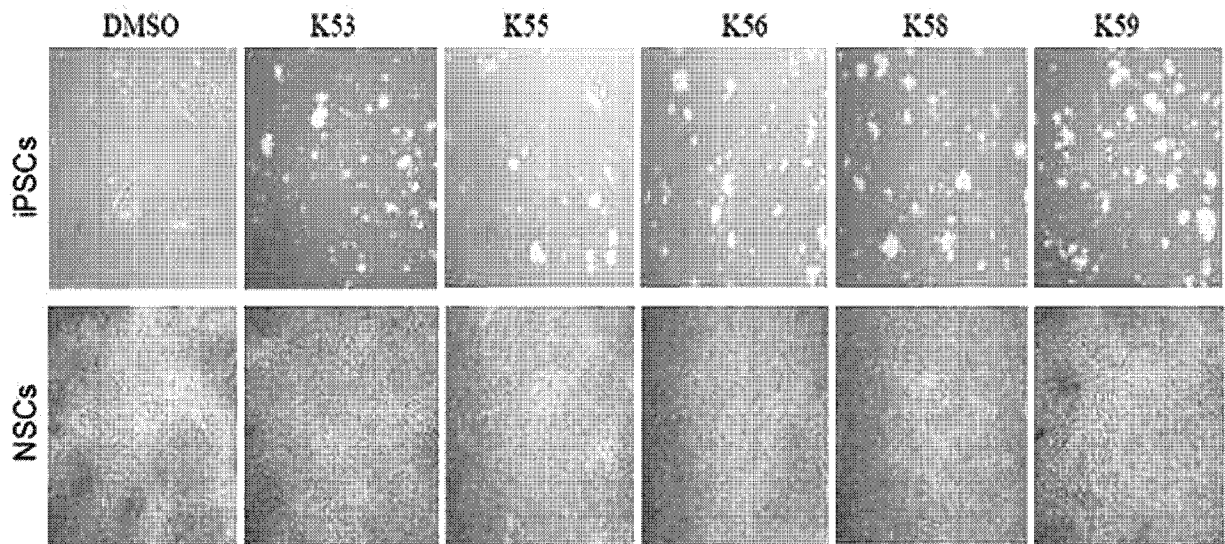
[도7]



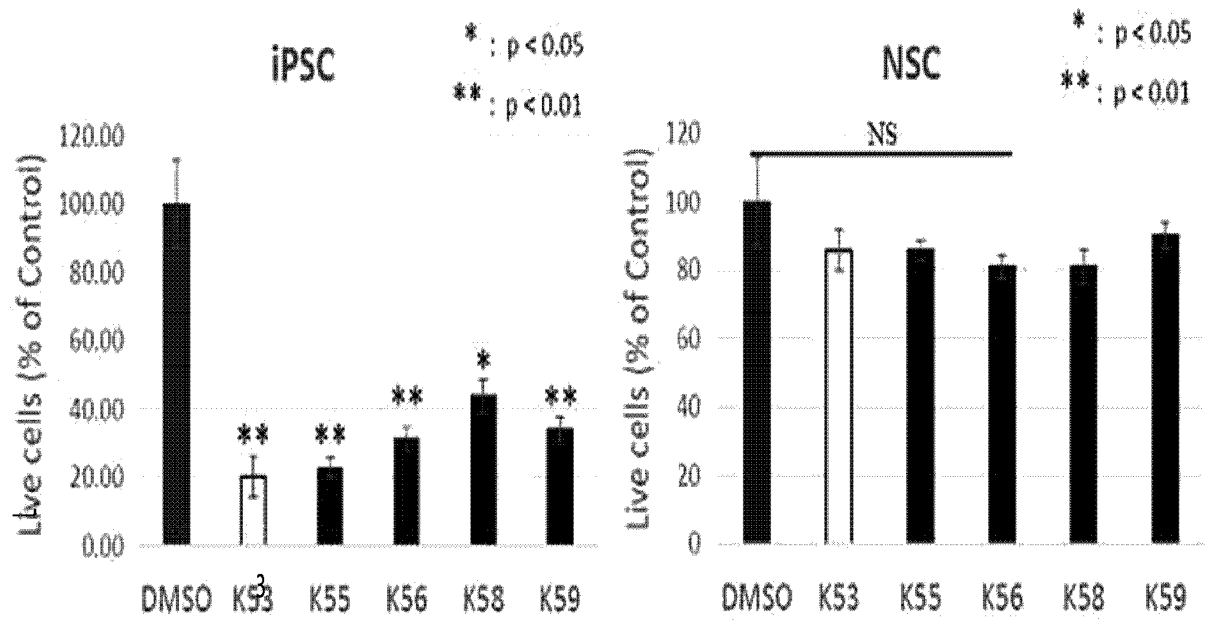
[도8]



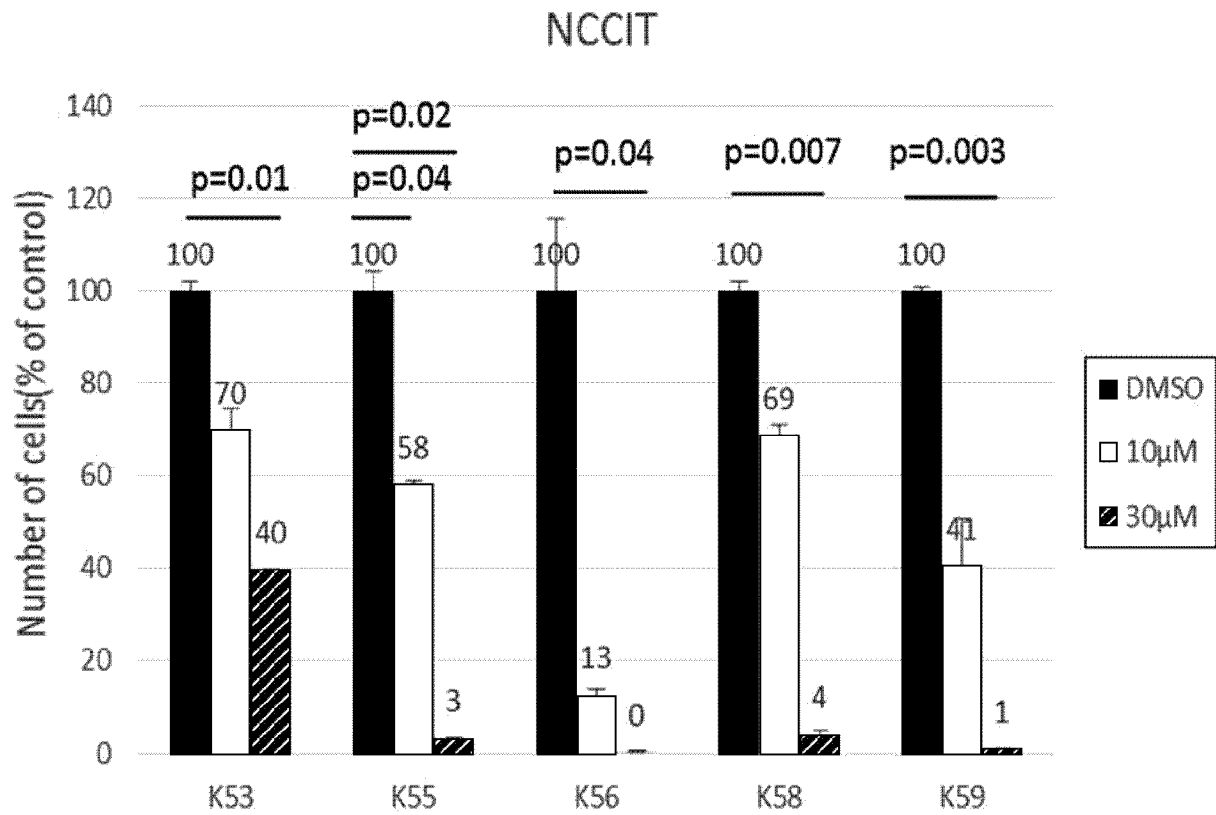
[도9a]

Drug treat : 5 μ M, 24 H

[도9b]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/008027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/12(2006.01)i, A61K 45/06(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 31/12; A61K 31/352; A61P 35/00; C07C 45/72; C07C 49/813; C07C 49/84; C07D 207/32; C12N 5/095; A61K 45/06

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: OCT4 expression inhibitor, undifferentiated cell, teratoma, teratocarcinoma, testicular cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01-46110 A2 (THE UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC. et al.) 28 June 2001 See claim 16; page 21, lines 9-22; page 59; and figure 6.	1-8,12,13
Y	WANG, Y.-J. et al., "The Emerging Roles of Oct4 in Tumor-initiating Cells", American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2015, vol. 309, pages C709-C718 See abstract.	1-8,12,13
A	KR 10-2012-0047513 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) 14 May 2012 See claims 1, 3-5.	1-8,12,13
A	US 2010-0016420 A1 (CHEN, S.) 21 January 2010 See claims 1, 2, 7.	1-8,12,13
A	KR 10-1543863 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 11 August 2015 See claims 2, 3.	1-8,12,13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 05 NOVEMBER 2018 (05.11.2018)	Date of mailing of the international search report 05 NOVEMBER 2018 (05.11.2018)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/008027

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.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 14 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and to a diagnostic method, and thus pertains 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.: **9-11, 14**
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/KR2018/008027

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	JUNG, J. et al., "KRIBB53 Binds to OCT4 and Enhances Its Degradation through the Proteasome, Causing Apoptotic Cell Death of OCT4-positive Testicular Germ Cell Tumors", Carcinogenesis, 28 May 2018, vol. 39, no. 6, pages 838-849 See the entire document.	1-8,12,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/008027

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 01-46110 A2	28/06/2001	AU 2291001 A	03/07/2001
		CA 2395191 A1	28/06/2001
		EP 1242352 A2	25/09/2002
		US 2002-0040029 A1	04/04/2002
		US 2003-0027830 A1	06/02/2003
		US 2005-0148599 A1	07/07/2005
		US 2009-0018167 A1	15/01/2009
		US 6462075 B1	08/10/2002
		US 6906105 B2	14/06/2005
		US 7432303 B2	07/10/2008
		US 7872029 B2	18/01/2011
		WO 01-46110 A3	21/02/2002
KR 10-2012-0047513 A	14/05/2012	NONE	
US 2010-0016420 A1	21/01/2010	AU 2007-251374 A1	22/11/2007
		BR P10712788 A2	11/09/2012
		CA 2651795 A1	22/11/2007
		CN 101495108 A	29/07/2009
		CN 101495108 B	15/10/2014
		EP 2026780 A1	25/02/2009
		JP 2009-536635 A	15/10/2009
		KR 10-2009-0037395 A	15/04/2009
		MX 2008014395 A	23/04/2009
		NO 20085147 A	09/02/2009
		RU 2008148833 A	20/06/2010
		RU 2455002 C2	10/07/2012
		SG 171583 A1	29/06/2011
		US 9089546 B2	28/07/2015
		WO 2007-132190 A1	22/11/2007
KR 10-1543863 B1	11/08/2015	KR 10-1539205 B1	24/07/2015
		KR 10-2014-0061277 A	21/05/2014
		KR 10-2015-0054728 A	20/05/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/12(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/12; A61K 31/352; A61P 35/00; C07C 45/72; C07C 49/813; C07C 49/84; C07D 207/32; C12N 5/095; A61K 45/06

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), Google & 키워드:OCT4 발현 저해제, 미분화 세포, 테라토마, 테라토칼시노마, 고환암

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	WO 01-46110 A2 (THE UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC. 등) 2001.06.28 청구항 16; 페이지 21, 라인 9-22; 페이지 59; 및 도면 6 참조.	1-8, 12, 13
Y	WANG, Y.-J. 등, "The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells", American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2015, 제309권, 페이지 C709-C718 초록 참조.	1-8, 12, 13
A	KR 10-2012-0047513 A (건국대학교 산학협력단) 2012.05.14 청구항 1, 3-5 참조.	1-8, 12, 13
A	US 2010-0016420 A1 (CHEN, S.) 2010.01.21 청구항 1, 2, 7 참조.	1-8, 12, 13
A	KR 10-1543863 B1 (성균관대학교산학협력단) 2015.08.11 청구항 2, 3 참조.	1-8, 12, 13

☒ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 11월 05일 (05.11.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 11월 05일 (05.11.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



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: 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
제14항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것이므로
PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이
국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: 9-11, 14
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 합
니다.
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 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 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.

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	JUNG, J. 등, "KRIBB53 binds to OCT4 and enhances its degradation through the proteasome, causing apoptotic cell death of OCT4-positive testicular germ cell tumors", Carcinogenesis, 2018.05.28, 제39권, 제6호, 페이지 838-849 전체 문헌 참조.	1-8,12,13

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 01-46110 A2	2001/06/28	AU 2291001 A CA 2395191 A1 EP 1242352 A2 US 2002-0040029 A1 US 2003-0027830 A1 US 2005-0148599 A1 US 2009-0018167 A1 US 6462075 B1 US 6906105 B2 US 7432303 B2 US 7872029 B2 WO 01-46110 A3	2001/07/03 2001/06/28 2002/09/25 2002/04/04 2003/02/06 2005/07/07 2009/01/15 2002/10/08 2005/06/14 2008/10/07 2011/01/18 2002/02/21
KR 10-2012-0047513 A	2012/05/14	없음	
US 2010-0016420 A1	2010/01/21	AU 2007-251374 A1 BR PI0712788 A2 CA 2651795 A1 CN 101495108 A CN 101495108 B EP 2026780 A1 JP 2009-536635 A KR 10-2009-0037395 A MX 2008014395 A NO 20085147 A RU 2008148833 A RU 2455002 C2 SG 171583 A1 US 9089546 B2 WO 2007-132190 A1	2007/11/22 2012/09/11 2007/11/22 2009/07/29 2014/10/15 2009/02/25 2009/10/15 2009/04/15 2009/04/23 2009/02/09 2010/06/20 2012/07/10 2011/06/29 2015/07/28 2007/11/22
KR 10-1543863 B1	2015/08/11	KR 10-1539205 B1 KR 10-2014-0061277 A KR 10-2015-0054728 A	2015/07/24 2014/05/21 2015/05/20