

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0031029

(43) 공개일자 2020년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/517 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/517 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-0097251

(22) 출원일자 2019년08월09일

심사청구일자 2019년08월09일

(30) 우선권주장

1020180109475 2018년09월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인

오토텔릭바이오 주식회사

충청북도 홍덕구 오송읍 오송생명1로 194-41 ,30
2호(기업연구관2관)

(72) 발명자

홍진태

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 152,
802동 1801호(오송힐테스하임)

이희범

인천광역시 부평구 수변로 333, 216동 1503호(삼
산동, 삼산타운)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

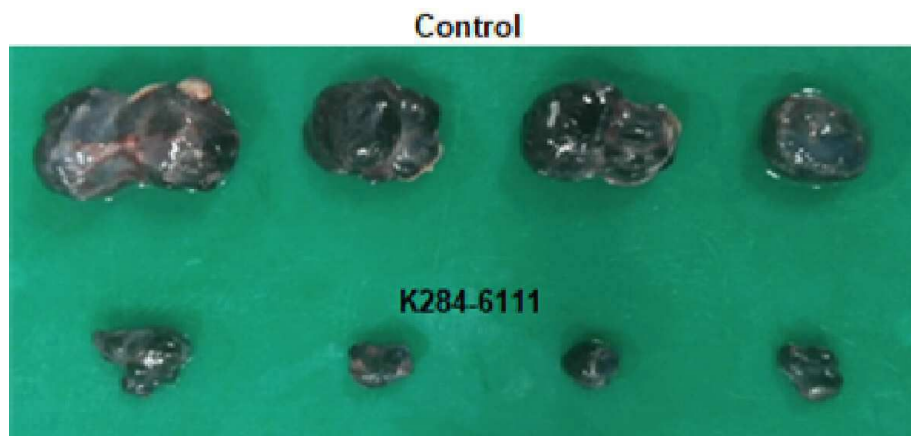
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 2-(3-[2-(1-시클로헥센-1-일)에틸]-6,7-디메톡시-4-옥소-3,4-디히드로-2-
퀴나졸리닐술폰아닐)-N-(4-에틸페닐)부탄아미드를 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 2-(3-[2-(1-시클로헥센-1-일)에틸]-6,7-디메톡시-4-옥소-3,4-디히드로-2-퀴나졸리닐술폰아닐)-N-(4-에틸페닐)부탄아미드 (K284-6111) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 예방용 조성물에 대한 것으로, 상기 화합물은 암을 예방 및 치료하며, 나아가 암 세포의 전이를 억제하는 효과를 가지는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/5011 (2013.01)

G01N 2500/02 (2013.01)

(72) 발명자

김기천

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 만수길 38-1, 103호

김태훈

세종특별자치시 연서면 도신고북로 1193

박전희

경기도 성남시 분당구 무지개로 144, 509동 1604호(구미동, 무지개마을청구아파트)

김지혜

경기도 김포시 김포한강11로 227, 516동 1201호(운양동, 풍경마을 래미안 한강2차)

권혜정

경기도 성남시 분당구 야탑로149번길 20-1, 106호(야탑동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017130882

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 중앙이환네트워크연구센터(cPRC)

기 여 율 1/1

주관기관 충북대학교 산학협력단

연구기간 2017.09.01 ~ 2024.02.28

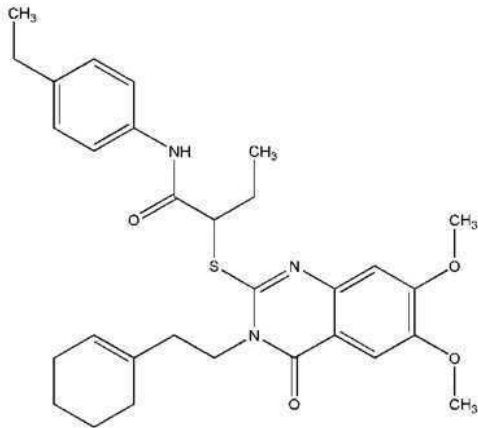
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[화학식 1]



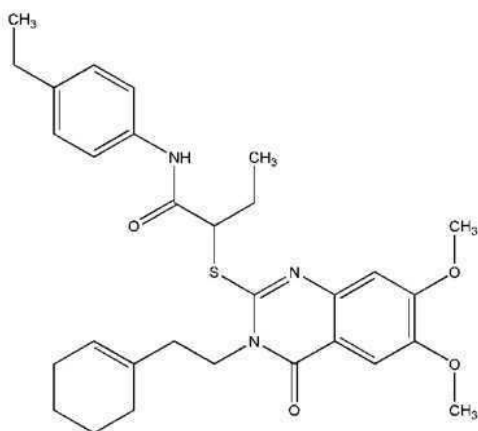
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 또는 골수암인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 4

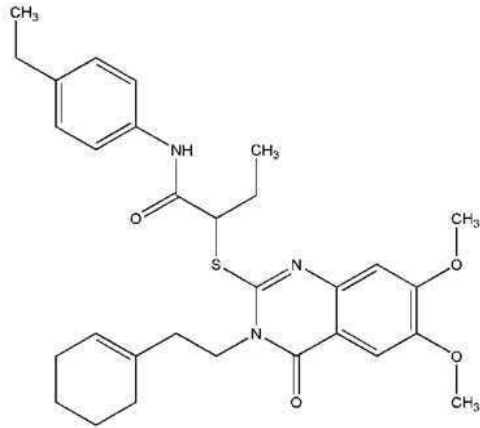
제3항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암,

갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 또는 골수암인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 암의 전이 억제용 약제학적 조성물.

[화학식 1]



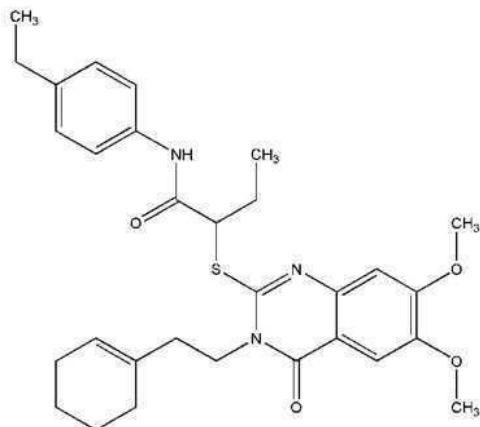
청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 또는 골수암인 것을 특징으로 하는 암의 전이 억제용 약제학적 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 암의 전이 억제용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 8

제7항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 또는 골수암인 것을 특징으로 하는 암의 전이 억제용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2-(3-[2-(1-시클로헥센-1-일)에틸]-6,7-디메톡시-4-옥소-3,4-디히드로-2-퀴나졸리닐술폰아닐)-N-(4-에틸페닐)부탄아미드 (K284-6111) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 예방용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 악성 신생물로도 불리우는 암(cancer)은 일군의 세포들이 조절되지 않는 성장과 침투 및 때때로 전이(metastasis)를 일으키는 질병으로서 세계적으로 주요한 보건 문제를 일으킨다. 암은 세포 주기 조절의 결함으로 인한 조절 불가능한 세포 증식으로 인한 질병이다.

[0003] 이러한 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있고, 의학 기술 또한 혁신적으로 발전하고 있음에도 불구하고, 암의 발생 및 암에 의한 사망은 계속 증가추세에 있다. 세계 보건 기구의 최근 통계 자료에 의하면 전세계적으로 연간 약 1천만 명 이상의 새로운 암 환자가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에서도 암은 가장 높은 사망원인으로 연간 약 십만명 이상이 진단되고, 약 6만명 이상이 암에 의해 사망하고 있다.

[0004] 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으며, 유전인자 또는 면역학적 요인 등의 내적 요인과 화학물질, 방사선 또는 바이러스 등의 외적 요인으로 구분되기도 한다. 특히, 최근 암 환자의 증가와 관련하여, 현대 사회에서 암이 발생하는 원인은 유전적 요인보다 환경적 요인이 더 큰 비중을 차지하고 있는 것으로 알려져 있고, 특히 식생활에서 오는 발암율은 환경적 요인이 매우 높은 것으로 알려져 있어서, 현대 사회에서의 생활환경이 근본적으로 변화되지 않는 이상 이러한 암의 발병률 및 암에 의한 사망자 수의 증가추세는 계속해서 유지될 것으로 보인다. 특히, 암은 조기에 발견되지 못할 경우 완치가 거의 불가능하고, 병이 진전될수록 환자와 가족의 고통과 경제적 손실이 막대하며, 의료 보험의 재정고갈 등 사회적으로도 큰 비용을 초래한다는 점에서 암의 예방과 조기 치료의 중요성은 더욱 강조되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-180974호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1609323호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은, 2-(3-[2-(1-시클로헥센-1-일)에틸]-6,7-디메톡시-4-옥소-3,4-디히드로-2-퀴나졸리닐술폰아닐)-N-(4-에틸페닐)부탄아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물과, 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

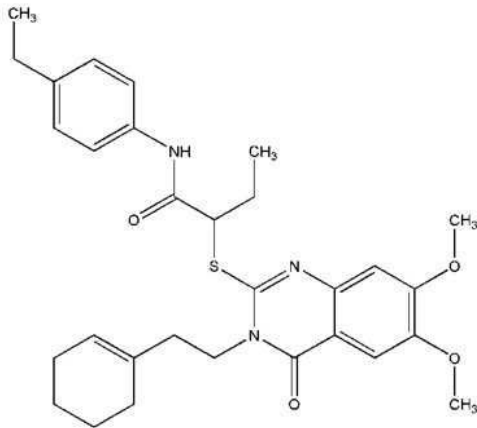
[0007] 본 발명의 다른 목적은, 2-(3-[2-(1-시클로헥센-1-일)에틸]-6,7-디메톡시-4-옥소-3,4-디히드로-2-퀴나졸리닐술폰아닐)-N-(4-에틸페닐)부탄아미드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 약제학적 조성물과, 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 2-(3-[2-(1-시클로헥센-1-일)에틸]-6,7-디메톡시-4-옥소-3,4-디히드로-2-퀴나졸리닐술폰아닐)-N-(4-에틸페닐)부탄아미드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하며, 상기 2-(3-[2-(1-시클로헥센-1-일)에틸]-6,7-디메톡시-4-옥소-3,4-디히드로-2-퀴나졸리닐술폰아닐)-N-(4-에틸페닐)부탄아미드는 하기 화학식 1로 표시

되는 화합물이다.

화학식 1



[0009]

[0010]

본 발명의 화합물은, 암에 대한 예방 또는 치료 효과를 가지는 것을 특징으로 한다. 본 명세서에서 “암”이란, 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침윤적(invasive) 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다.

[0011]

본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 치료 대상 암은 선암, 고형암, 혈액암 등 종류에 제한되지 아니하며, 보다 구체적으로는 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 또는 골수암일 수 있으며, 보다 바람직하게는 흑색종 또는 폐암이다.

[0012]

본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은, 상기 설명된 화학식 1로 표시되는 화합물인 2-(3-((1-((4-ethylphenyl)amino)propan-1-ylthio)-6,7-dimethoxy-3,4-dihydro-2-quinazolinyl)-N-(4-ethylphenyl)butanamide의 약제학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다.

[0013]

본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0014]

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 따라 다양한 방법으로 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-1000 mg/kg(체중)이다.

[0015]

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0016]

본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요 기간, 질환의 위중도 등을 고려하여 결정하며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0017]

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정

화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 치료 대상 암은 선암, 고형암, 혈액암 등 종류에 제한되지 아니하며, 보다 구체적으로는 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 또는 골수암일 수 있으며, 보다 바람직하게는 흑색종 또는 폐암이다.

[0020] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분인 본 발명에 따른 화합물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0021] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0022] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 또 다른 양태로서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 억제용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0025] 일반적으로 암은 발생한 부위에 존재하는 원발암과 상기 발생 부위로부터 신체의 다른 부위로 퍼져나간 전이암으로 구분된다. 즉, "암 전이"는 악성 종양이 발생한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 전파한 상태를 의미하며, 암세포가 혈액순환이나 림프순환을 통해 퍼져나가서 형성되는 것으로, 대개는 혈액순환을 타고 다른 장기로 옮겨간 후 새로운 종양으로 자라난 것이거나, 이와 달리 암세포가 이웃한 조직으로 직접 이동하여 형성되기도 한다. 본 발명에서 암 전이는 암세포가 이웃조직으로 직접 이동하고 침투하는 침윤(invasion)에 의한 암세포의 확산 및 암세포가 혈류를 타고 이동하여 물리적으로 원발암과는 인접하지 않은 장기에서 새로운 종양을 형성하는 전이(metastasis)를 모두 포함한다.

[0026]

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 전이 억제 대상 암은 선암, 고형암, 혈액암 등 종류에 제한되지 아니하며, 보다 구체적으로는 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암, 또는 골수암일 수 있으며, 보다 바람직하게는 흑색종 또는 폐암이다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 2-(3-[2-(1-시클로헥센-1-일)에틸]-6,7-디메톡시-4-옥소-3,4-디히드로-2-퀴나졸리닐술폰)-N-(4-에틸페닐)부탄아미드 (K284-6111) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 예방용 조성물에 대한 것으로, 상기 화합물은 암을 예방 및 치료하며, 나아가 암 세포의 전이를 억제하는 효과를 가지는 것을 특징으로 한다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1 내지 도 7은 C57BL/6 마우스에 유발된 흑색종에 대한 K284-6111의 효과를 확인하기 위한 실험에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 8 내지 도 16은 K284-6111이 폐암 세포주에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 폐암을 유도한 세포에 K284-6111을 처리하여 세포 사멸, 세포주기 조절, 세포 생존력 등에 관여하는 다양한 인자를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 K284-6111의 A549 세포 및 H460 세포 전이에 대한 효과를 확인하기 위해, 트랜스멤브레인(transmembrane) 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 K284-6111의 A549 세포 및 MDA-MB-231 세포 전이에 대한 효과를 확인하기 위해, 상처 치유(wound healing) 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 19 내지 도 21은 폐암 전이 마우스모델에서 K284-6111 처리 시, 전이된 폐 조직에 존재하는 종양의 개수 및 표면적 당 종양의 분포, Hematoxylin & eosin(H&E) staining과 면역조직화학 결과를 측정된 결과를 각각 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0031] <실험예>

[0032] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0033] 1. 화합물, 리간드 및 항체

[0034] 본 발명의 K284-6111의 기능을 확인하기 위하여, B16F10 흑색종 및 A549 및 H460 폐암 세포주에서 세포주기 및 세포 사멸사 조절 유전자의 조절을 통해 G1- 단계 세포주기 정지 및 세포 사멸을 유도하였다. 또한, ChemDiv Inc. (San Diego, CA, USA)에서 구입한 화합물을 사용하였다. 11 개의 화합물을 다음과 같이 명명하였다;

[0035] (1)N-[5-[2-(3,4-디하이드로-1(2H)-퀴놀리닐)-2-옥소에틸]설파닐-4-(3-메틸페닐)-4H-1,2,4-트리아졸-3-일-피리미딘-3-일]메틸-2-푸라미드 (C592-3733)

[0036] (2)N-(2-메톡시페닐)-2-[2-(4-메톡시페닐)-5H-크로메노[2,3-d]피리딘-2-일]설파닐 아세트아미드 (C683-0269)

[0037] (3)N-(2-[3-브로모-1-(4-메틸벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일]설파닐페닐) (F938-0173)

[0038] (4)N-알릴-2-[(6-부틸-1,3-디메틸-2,4-디옥소-1,2,3,4-테트라히드로피리도[2,3-d]피리미딘-4-일)설파닐]아세트아미드 (G721-0282)

[0039] (5)2-(3-[2-(1-사이클로헥센-1-일)에틸]-6,7-다이메톡시-4-옥소-3,4-다이하이드로- (4-에틸페닐)부탄아미드 (K284-6111, 화학식 1)

[0040] (6)2-[(3-시클로프로필-4-옥소-3,4-디히드로티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)설파닐]-N- [2-(4-설파모일페닐)에틸]아세트아미드(K292-1690)

[0041] (7)7-하이드록시-3-(1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일)-8-[(2-메틸메틸)-2H-크로멘-2-온 (3570-0063)

[0042] (8)N-[3-(2,3-다이하이드로-1H-인돌-1-일)-3-옥소프로필]-2,5(1-피롤리딘카보닐) -1H-피롤-3-술폰아미드 (F535-0062)

[0043] (9)2-[2-에틸-7-옥소-6-(2-페닐에틸)-6,7(4H)-디히드로-2H-피라졸로[4,3-d]피리미딘 -5-일]설파닐아세트아미드 (G020-0160)

[0044] (10)2-[(6-에틸-1,3-디메틸-2,4-디옥소-1, (2,3,4-테트라히드로피리도[2,3-d]피리미딘 -5-일)설파닐]아세트아미드(G857-0938)

[0045] (11)N-(2-[3-클로로-1-(4-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일]설파닐페닐)-2,6- 디플루오로벤즈아미드 (L150-0261).

[0046] 헤마톡실린 및 에오신 용액은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

[0047] 2. 흑색종 주입

- [0048] 본 발명의 화합물에 대한 실험은 6~7 주령의 체중 부하 24~28g 무작위 육성체, 수컷 C57BL/6 마우스에 수행하였다. 동물은 온도와 빛의 통제 된 조건 하에 유지되었다 (Light: dark, 10 h: 14 h). 마우스에게는 표준 식이(힌두스탄 레버스 (Hindustan Levers Ltd.)에서 조달)와 물을 자유롭게 제공하였다. B16F10 마우스 흑색종을 8 주 된 C57BL/6 마우스에 피하 주사하였다 (27페이지 바늘로 인산 완충 식염수 (PBS)에서 2×10^5 종양 세포 / 200 μ l). 다음날 K284-6111을 0.5 mg/kg의 농도로 정맥 주사하였고, 실험하는 35일 동안 3일에 한 번씩 주사하였다. 흑색종 주사 후 15 일 이후로, 동물의 종양 체적을 5 일마다 모니터링 하였다. 종양 용적은 Vernier 캘리퍼스로 측정하였고 다음 식에 의해 계산되었다
- [0049] : $(A \times B^2)/2$, 여기서 A는 더 크고 B는 두 차원 중 더 작은 것이다.
- [0050] 실험이 끝난 후, 이산화탄소를 사용하여 동물들을 흡입제로 희생시켰다. 종양은 주변의 근육 및 진피로부터 분리되어 절제되었다.
- [0051] **3. Hematoxylin과 eosin staining과 면역조직화학(IHC)**
- [0052] 흑색종 조직을 절개하고 즉시 4 % 포르말린 용액에 고정시킨 후, 농도별 에탄올 (70-100 %)에서 탈수시키고 과라판에 끼워 넣었다. 조직을 로타리 마이크로톰 (Sakura Finetek Europe BV, Alphen aan den Rijn, 네덜란드)으로 절편 화하고 (두께 4 μ m) hematoxylin과 eosin으로 염색하였다. 광학 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 단면을 관찰하고 $\times 200$ 배율로 촬영하였다. IHC의 경우 흑색종 조직 절편을 PBS로 희석 한 3% 정상 말 혈청으로 30 분간 차단하였다. 절편을 블로팅하고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 혈청을 블로킹하는 Cyclin D1, MMP9, PCNA, Caspase-3, Chi3L1 및 IL-13R α 2 항체와 함께 적절한 희석 배수 (1:100 희석)에서 배양하였다. 슬라이드를 PBS로 세척한 후, 아비딘-비오틴-퍼옥시다제 복합체 (ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 세척하였다. 슬라이드를 세척하고, 퍼옥시다아제 반응을 디아미노벤지딘 및 퍼옥사이드로 전개시키고, 아쿠아-마운트 (Aqua-Mount)에 장착하여 광학 현미경 (Olympus) 하에서 $\times 200$ 배율로 평가하였다. 일차 항체를 생략함으로써 음성 대조군을 수행하였다.
- [0053] **4. 세포 배양**
- [0054] B16F10, A549 및 H460 비소 세포 폐암 (NSCLC) 세포 및 루이스 폐 암종 (LLC)은 American Type Culture Collection (Manassas, VA)에서 입수하였다. A549 및 H460 세포를 10 % 열 불 활성화 태아 소 혈청 (FBS), 100U/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토 마이신이 보충 된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. B16F10 피부 흑색종을 10 % 열-불활성화 된 FBS, 100U/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신으로 보충 된 DMEM에서 배양하였다. 세포 배양은 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO₂의 가습 분위기로 인큐베이터에서 진행되었다.
- [0055] **5. 세포 생존률 분석**
- [0056] A549, H460 세포주를 96-웰 플레이트에 분주했다. 다음날, 세포를 K284-6111 (0-5 μ M)로 24 시간 동안 처리한 후, MTT [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드] 분석 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 분석하였다. 간단히 MTT (5mg/mL)를 첨가하고 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 4 시간 동안 배양 한 후 디메틸 술폰 (100 μ L)를 각 웰에 첨가하였다. 마지막으로, 각 웰의 흡광도를 플레이트 판독기를 사용하여 540 nm의 파장에서 판독하였다.
- [0057] **6. 웨스턴 블롯**
- [0058] 흑색종 종양 조직을 EzRIPA 용해 키트 (ATTO, Tokyo, JP)를 사용하여 균질화시켰다. 또한, A549 및 H460 세포를 실험 후 단백질을 추출 용액 (PRO-PREPTM; 인트론 바이오테크놀로지 (Intron Biotechnology))으로 균질화시키고, 얼음 위에서 60 분 동안 인큐베이션하여 용해시켰다. 조직 및 세포 용해물을 4 $^{\circ}$ C에서 15 분 동안 13,000 x g에서 원심 분리 하였다. 동량의 단백질 (20 μ g)을 12 % SDS-PAGE로 분리 한 다음 폴리 비닐 리덴 플루오라이드 막 (GE Water and Process technologies)에 옮겼다. 블롯을 Tween-20 [TBST : 10 mM Tris (pH 8.0) 및 0.05 mM Tween을 함유하는 150 mM NaCl 용액 (pH 7.0)으로 트리스 완충 식염수 중 5% (w/v) 무지방 건조우유로 실온에서 1 시간 동안 블로킹시켰다. TBST에서 짧은 세척 후 Chi3L1 (Abcam), IL-13R α 2 (Santacruz), Cdk2 (Santacruz), Cdk4, Cdk6, cyclin D1, cyclin E, MMP2, MMP3, MMP9, MMP13에 대한 1 차 항체로 막을 면역 블로킹 하였다. PCNA, caspase-3, Bax, Bcl-2, p21, p53, p-ERK, ERK, p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-Akt, Akt, pc-Fos, c-Fos 및 β -actin을 포함하는 2 차 항체를 사용하여 반응을 검출하고 화학 발광 검출 시스템을 사용하여 시각화 하였다.

[0059] **7. 세포 주기 분석**

[0060] 세포주기 분석을 위해, A549 세포는 하룻밤 준수를 위한 6-well 세포 배양 플레이트에 1×10^5 cell/ML의 밀도로 도금하고 48 시간 동안 또는 K284-6111의 다양한 농도로 치료. 처리 후, 세포를 트립신 처리에 의해 수확하고, 4 °C에서 밤새 빙냉 70 % 메탄올에 고정시켰다. 이어서 세포를 300 x g에서 5 분간 원심 분리하고 37 °C에서 30 분 동안 propidium iodide (PI) 작업 용액 (100 µg/ml PI 및 100 µg/ml RNaseA)과 함께 배양했다. 세포주기 분포는 유동 세포 계측기 (FACSCalibur; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 분석하였다.

[0061] **8. 루시페라아제 어세이**

[0062] A549 세포를 12- 웰 플레이트 (1×10^5 cell/well)에 플레이팅하고, 제조자의 설명서에 따라 OPTI-MEM에서 플라스미드와 Lipofectamine 3000의 혼합물을 사용하여 Chi3L1-Luc 플라스미드 (Stratagene, La Jolla, CA)로 일시적으로 형질 도입시켰다 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 24 시간 동안 처리하였다. 형질 도입된 세포를 10 µg/mL로 24 시간 더 처리하였다. 루시페라아제 활성은 루시페라아제 분석 키트 (Promega, Madison, USA) 및 제조자 명세 (WinGlow, Bad Wildbad, Germany)에 기재된 루미노미터를 사용하여 측정하였다.

[0063] **9. 유세포 분석**

[0064] A549 및 H460 세포 (7×10^5 cell)를 60mm 접시에 옮기고 세포가 정상 상태로 되돌아 올 때까지 37 °C 배양기 (5 % CO₂)에서 배양했다. 세포를 K284-6111로 24 시간 동안 처리하였다. 그리고 나서, 부착성 및 부유성 세포 모두가 트립신-EDTA 0.25 %를 사용하여 수확되었다. 수확 된 세포를 튜브로 옮겨 원심 분리 하였다. Pelleted 세포를 차가운 PBS로 세척하고 propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich) (40 µg/mL), RNase (100 µg/mL) (Gibco) 및 TritonX-100 (Sigma-Aldrich) 37 °C에서 10 분간 배양하였다. 샘플은 형광-활성화 세포 분류를 사용하여 분석하였다. G1, S 및 G2 / M 단계의 세포 백분율은 Cell Quest를 사용하여 계산하였다.

[0065] **10. Trans-well 이동 분석**

[0066] 인간 폐암 세포인 A549와 H460의 이동은 투과성 인서트 (8 µm pore trans-well, Corning Inc.)에서 정량적으로 수행되었다. 5 µM의 K284-6111 처리 A549 및 H460 세포를 웰당 2.0×10^4 세포에 도달하고 가습된 배양기에서 37 °C, 5 % CO₂에서 17 시간 동안 배양했다. 배양 후, 세포를 3.7 % 포르말데히드로 2 분간 고정시킨 후, 1XPBS로 2 회 세척하였다. 다음으로, 세포를 15 분 동안 100 % 메탄올로 침투시키고 트리판블루로 20 분 동안 염색하였다. 우물 내부의 비 이동 세포를 면봉으로 제거하고, 광학 현미경 (Olympus) 하에서 200 배 확대하여 촬영한 이미지를 NIH ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0067] **11. 상처 치유(wound healing) 분석**

[0068] A549와 MDA-MB-231 세포를 6-웰 플레이트에 6×10^5 cells/well 세포로 배양배지(10% FBS RPMI 1640 with 1% A.A)를 사용하여 플레이팅하고, 하루 동안 배양기에서 부착시킨다. 세포가 부착된 플레이트 바닥을 동일한 간격으로 스크래치 후 부유된 세포를 제거하기 위해서 인산염 완충 식염수 (PBS)로 2회 세척한다. 새로운 배지(5% FBS, RPMI 1640)를 첨가한 뒤 약물(K284-6111) 처리 전 스크래치 부위를 현미경으로 관찰하고 각 농도의 약물(K284-6111)을 처리하여 가습된 배양기에서 37°C, 5% CO₂에서 48시간 배양 후 약물 처리 전에 관찰한 동일한 스크래치 부위의 상처 치유 정도를 육안으로 비교하였다.

[0069] **12. 세포사멸 검출**

[0070] A549 및 H460 세포를 8-챔버 슬라이드 상에서 배양 한 다음, K284-6111 (0-5 µM)로 24 시간 동안 처리하였다. 세포를 인산염 완충 식염수 (PBS)로 2 회 세척하고 실온에서 1 시간 동안 PBS 중의 4 % 파라 포르말데히드에서 배양하여 고정시켰다. DeadEnd™ Fluorometric TUNEL 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling(TUNEL) 분석을 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 주어진 영역에서 총 세포 수는 DAPI 염색을 사용하여 결정하였다. 세포 사멸 지수는 TUNEL 양성 염색 세포의 수를 전체 세포 수 × 100 %로 나눔으로써 결정되었다.

[0071] **13. 폐암 전이 마우스 모델**

[0072] 흑색종 모델과 동일한 방법으로, 폐암 전이 마우스 모델을 제작하였다. 6~7 주령의 체중 부하 24~28g 무작위 육성체, 수컷 C57BL/6 마우스에 수행하였다. 동물은 온도와 빛의 통제 된 조건 하에 유지되었다 (Light: dark, 10

h: 14 h). 마우스에게는 표준 식이(힌두스탄 레버스 (Hindustan Levers Ltd.)에서 조달)와 물을 자유롭게 제공하였다. B16F10 마우스 흑색종을 8 주된 C57BL/6 마우스에 꼬리 정맥 주사하였다 (27페이지 바늘로 인산 완충 식염수 (PBS)에서 4×10^4 종양 세포 / $100\mu\text{l}$). 2일 후, K284-6111을 0.5 mg/kg의 농도로 정맥 주사하였고, 실험하는 4주 동안 일주일에 두 번 (화, 금)씩 주사하였다. 실험이 끝난 후, 동물들을 이산화탄소 흡입을 통하여 희생시켰다. 폐조직은 조직이 상하지 않도록 하여 횡경막과 심장을 분리하였다.

[0073] 14. 통계적 분석

[0074] 통계 분석은 SPSS 버전 18.0으로 수행되었으며. 보고 된 모든 오차 막대는 달리 명시하지 않는 한 평균의 표준 오차 (SEM)이다. 한쪽 학생의 t-검정을 사용하여 쌍으로 비교하였다. Tukey의 테스트에 이어 일원 분산 분석을 사용하여 여러 비교가 이루어졌다. 그룹 간의 차이는 0.05 이하의 P 값에서 유의한 것으로 간주되었다.

[0075] <실시예 1> C57BL/6 마우스에 유발된 흑색종에 대한 K284-6111의 효과

[0076] 상기 기재된 방법에 따라, C57BL/6 마우스로부터 분리한 흑색종 조직의 크기 및 부피의 변화, Hematoxylin & eosin(H&E) staining과 면역조직화학 결과, 그리고 흑색종 조직의 용해물로부터 세포주기조절, 세포증식 및 세포사멸에 관여하는 유전자의 상대적 발현량을 각각 측정하였다.

[0077] 도 1은 C57BL/6 마우스에 피하 주사된 B16F10 흑색종으로부터 얻어진 사진으로, 흑색종 주사 후, K284-6111을 0.5 mg/kg의 용량으로 3일 간격으로 10 회, 꼬리를 통하여 정맥주사로 주입한 결과, 하단의 사진과 같이 흑색종의 크기가 유의하게 감소되었다.

[0078] 도 2는, 흑색종 유발된 마우스에 K284-6111 투여 후, 종양의 부피가 변화된 결과를 수치로 계산하여 나타낸 것이다. 종양의 부피는 $\text{Volume}=(d_1 \times d_2 \times d_3) \times 0.5236$ 의 공식으로 계산되었다. 여기서 d_n 은 3 개의 직교 직경 측정 결과이고, 각 값은 4 마리의 마우스 평균과 표준 편차 ($n = 4$)를 나타낸다.

[0079] 도 3은 대조군의 해부 된 흑색종 종양을 H&E로 염색한 절편으로, 흑색종 종양 절편의 헤마톡실린 및 에오신(H & E) 염색 부위는 흑색종이 유발된, 손상되지 않은 종양 세포 구조를 나타낸다. K284-6111로 치료한 종양은 세포와 세포 사이의 비 균열 부분에서 균열이 일어났으며, 혈관 주위의 세포가 사멸되었음을 보여준다. 그 예로써, 마우스의 B16F10 흑색종 조직에서 PCNA, CyclinD1, MMP9, PCNA, 절단된 카스파제-3, Chi3L1 및 IL-13R $\alpha 2$ 에 대한 IHC의 결과, 다른 단백질 발현이 관찰되었다.

[0080] 도 4는 흑색종이 피하 주입된 C57BL/6 마우스의 흑색종 조직의 용해질로부터의 Chi3L1, IL-13R $\alpha 2$ 및 세포주기 조절 유전자에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과이다. 대조군과 비교하여 K284-6111 처리 군의 상대적 단백질 발현량을 하부 그래프로 나타내었다. 그 결과, CyclinD1, CyclinE, CDK2, CDK4, CDK6의 발현량이 K284-6111 처리 후 크게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 도 5는 흑색종이 피하 주입된 C57BL/6 마우스의 흑색종 조직의 용해질에 포함되어 있는 세포 증식 유전자에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸 것이다. 대조군과 비교하여 K284-6111 처리 군의 상대 단백질 발현을 하부 그래프로 나타내었다. K284-6111 처리 시, 세포 증식에 관여하는 유전자의 발현량이 크게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0082] 도 6은 흑색종이 피하 주입된 C57BL/6 마우스의 흑색종 조직의 용해질로부터 세포 사멸 관련 유전자에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과이다. 대조군과 비교하여 K284-6111 처리 군의 상대 단백질 발현을 하부 그래프로 나타내었다. 결과에서 보듯이, 세포 사멸 관련 유전자의 경우, K284-6111 처리 시 Cleaved-Caspase-3, Bax, p21, p53에서 발현량이 증가된 것을 확인하였다.

[0083] 도 7의 경우, 흑색종이 피하 주입된 C57BL/6 마우스의 흑색종 조직의 용해질로부터 MAPK, Akt 및 AP1 (c-Jun 및 c-Fos)의 인산화에 대한 웨스턴 블랏 분석을 나타낸 것이고, 대조군과 비교하여 K284-6111 처리 군의 상대 단백질 발현을 하부 그래프로 나타내었다. p-p38의 경우, 발현량이 증가되었으나, 다른 인자들은 발현량이 감소된 것을 확인할 수 있다.

[0084] <실시예 2> K284-6111가 폐암 세포주에 미치는 영향

[0085] 두 가지 폐암 세포주 A549(선암) 및 H460(비소세포폐암)으로 K284-6111이 미치는 영향에 대하여 실험을 수행하였으며, 아래와 같은 결과를 확인하였다.

[0086] 도 8은 각각의 세포 생존력을 측정한 결과로서, 도 8A는 A549 세포에 대한 결과, 도 8B는 H460 세포에 대한 결

과를 나타낸 것이다. A549 세포 및 H460 세포에 0 내지 5 μ M의 K284-6111를 48 시간 동안 처리하고, MTT 분석에 의해 세포 생존력을 측정하였다. 데이터는 3회 실험의 평균 $\pm$ SD로 표현된다. (*P<0.05 대 대조군. #P <0.01 대 대조군.) 그 결과, 두 세포주 모두 K284-6111의 농도가 증가됨에 따라 세포 생존률이 낮아지는 결과를 확인할 수 있었다. A549 세포는 IC₅₀ 이 2.7 μ M, H460은 2.5 μ M인 것을 확인하였다.

- [0087] 도 9는 K284-6111 처리된 A549 세포주 및 H460 세포주의 세포주기 조절 유전자에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과이다. 도 9A는 A549 세포에 대한 결과, 도 9B는 H460 세포에 대한 결과를 나타낸 것이다. 각각의 결과에서, K284-6111의 처리 농도가 높아질수록, 관련 유전자의 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0088] 도 10은 K284-6111이 처리된 A549 세포주 및 H460 세포주에서 세포 사멸 관련 유전자에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과이며, 도 10A는 A549 세포에 대한 결과, 도 10B는 H460 세포에 대한 결과를 나타낸 것이다. 상기 실험에서 K284-6111는 용량 의존적으로 처리하였다.
- [0089] 도 11은 K284-6111 처리된 A549 세포주 및 H460 세포주에서 인산화된 MAPK, Akt 및 AP1에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과이며, 도 11A는 A549 세포에 대한 결과, 도 11B는 H460 세포에 대한 결과를 나타낸 것이다. 상기 실험에서 K284-6111는 용량 의존적으로 수행되었다.
- [0090] 도 12는 A549 세포주 및 H460 세포주의 루시페라제 분석 결과이며, 상기 결과는 A549 세포주(A) 및 H460 세포주(B)에서 IL-13에 의해 유도된 AP-1 루시페라제 활성화에 대하여, K284-6111를 농도별로 처리한 결과를 확인한 것이다. 각 세포주에서 모두 루시페라아제 활성이 모두 K284-6111의 처리 농도에 의존적으로 감소하는 경향을 보이는 것을 확인하였다.
- [0091] 도 13은 K284-6111가 세포 주기에 미치는 효과를 측정하기 위해 K284-6111를 농도별로 처리한 결과를 나타낸 것이고, 도 14는 5 μ M의 K284-6111를 처리한 A549 및 H460 세포주의 트랜스웰(Trans-well migration) 이동 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [0092] TUNEL 분석은 A549 세포주 및 H460 세포주에서 K284-6111의 용량 의존적 처리 시 세포 사멸에 미치는 효과를 확인하기 위하여 수행되었다. 도 15 및 도 16은 각각의 세포주에 대한 결과를 나타내는 것이며, 농도 의존적으로 세포 사멸에 대한 효과가 증가되는 것을 확인할 수 있다.
- [0093] 한편, 추가적으로 다양한 암세포주에 대한 K284-6111의 항암 효과는 표 1에 나타냈다.

표 1

[0094]

Cell line	IC50(μ M)	Tissue	Disease	Organism
HCT-116	5.5	Colon	colorectal carcinoma	Homo sapiens, human
SW480	6.4		Dukes' type B, colorectal adenocarcinoma	
SK-Mel-28	5.4	skin	malignant melanoma	Homo sapiens, human
B16F10	5.0		melanoma	Mus musculus, mouse
MCF-7 (ER+, PR+)	7.4	Breast	adenocarcinoma	Homo sapiens, human
MDA-MB-231 (TNBC)	8.4			
PC-3	6.4	Prostate	grade IV, adenocarcinoma	Homo sapiens, human
PA-1	5.6	Ovary	teratocarcinoma	
Ca-ski	6.9	cervix	epidermoid carcinoma	Homo sapiens, human
HeLa	5.9		adenocarcinoma	
HepG2	5.5	liver	hepatocellular carcinoma	Homo sapiens, human
Hep3B	5.3			
A549	2.7	Lung	carcinoma; non-small cell lung carcinoma	Homo sapiens, human
H460	2.5		carcinoma; large cell lung cancer	
KATOIII	12.7	Stomach	gastric carcinoma	Homo sapiens, human
NCI-N87	23.8			
Capan-2	16.7	Pancreas	adenocarcinoma	Homo sapiens, human

[0095] <실시예 3> K284-6111의 암세포 전이 억제 효과 확인

[0096] 도 17은 K284-6111의 A549 세포 및 H460 세포 전이에 대한 효과를 확인하기 위해, 트랜스멤브레인 (transmembrane) 분석을 수행한 결과로서, 약물이 0-5 μ M 에서 농도 의존적으로 세포 이동을 억제시키는 것을 관찰하였다.

[0097] 도 18은 K284-6111의 A549 세포 및 MDA-MB-231 세포 전이에 대한 효과를 확인하기 위해, 상처 치유(wound healing) 분석을 수행한 결과로서, 동일한 간격의 스크래치 후 약물을 10 μ M 농도로 처리하였을 때, 처리하지 않은 웰 보다 스크래치 간격이 넓게 유지되는 것을 확인하였고, 이는 약물이 세포이동을 저해시켜 상처 치유능력이 억제된 것으로 판단된다.

[0098] <실시예 4> 폐암 전이 마우스 모델을 통한 K284-6111의 암 전이 억제 효과 확인

[0099] C57BL/6 마우스로부터 분리한 암이 전이된 폐 조직에 존재하는 종양의 개수 및 표면적당 종양의 분포, Hematoxylin & eosin(H&E) staining과 면역조직화학 결과를 측정하였다.

[0100] 도 19는 C57BL/6 마우스에 꼬리 정맥 주사로 유도된 폐암 전이 모델의 폐 조직으로부터 얻어진 사진으로, B16F10 흑색종을 C57BL/6 마우스의 꼬리를 통하여 생리 식염수와 함께 주사하였고, 2일 후 정맥주사를 통하여 K284-6111을 0.5 mg/kg의 용량으로 일주일에 2번을 주기로 총 8회, 꼬리를 통하여 정맥주사로 주입한 결과, 사진과 같이 폐암 전이율이 유의하게 감소되었다.

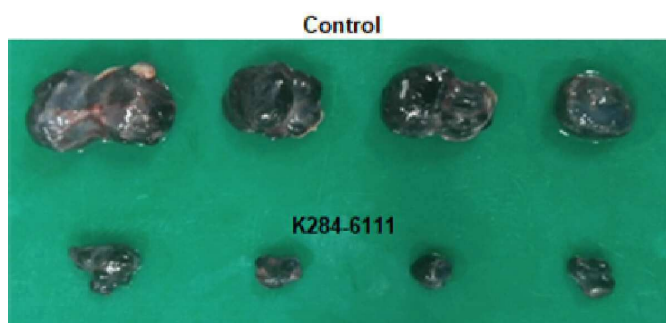
[0101] 도 20은 폐암 전이로 생성된 폐 조직의 종양의 갯수를 육안으로 계수하여 측정한 결과이고, 각 값은 6마리의 마우스 평균과 표준 편차 (n=6) 를 나타낸다.

[0102] 도 21은 폐암 전이 모델에서 떼어낸 폐 조직을 H&E로 염색한 절편으로, 폐 조직 내부에 폐 조직의 형태가 아닌 형태로 군집을 이루고 있는 종양을 확인할 수 있다. K284-6111을 주사한 마우스의 전이된 종양은 그 개체수가 대조군에 비해 현저히 감소되어 있음을 보여준다.

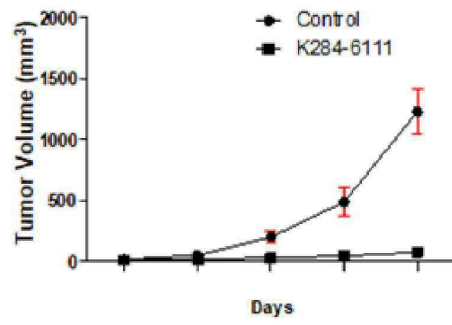
[0103] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

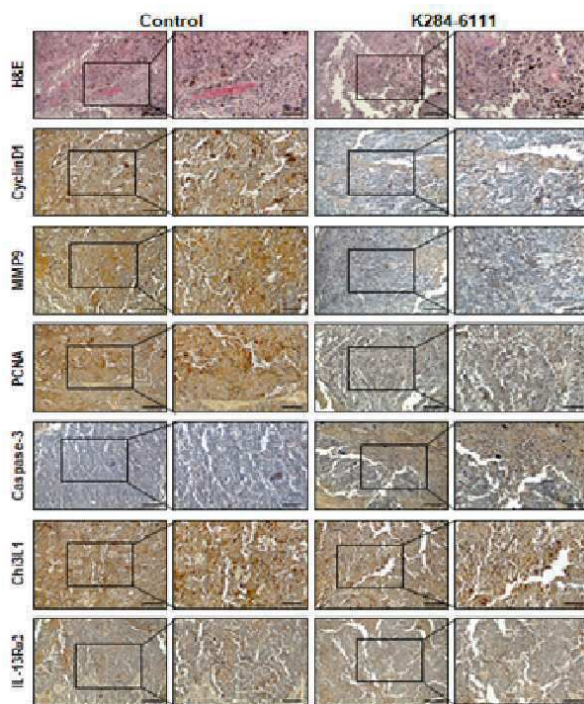
도면1



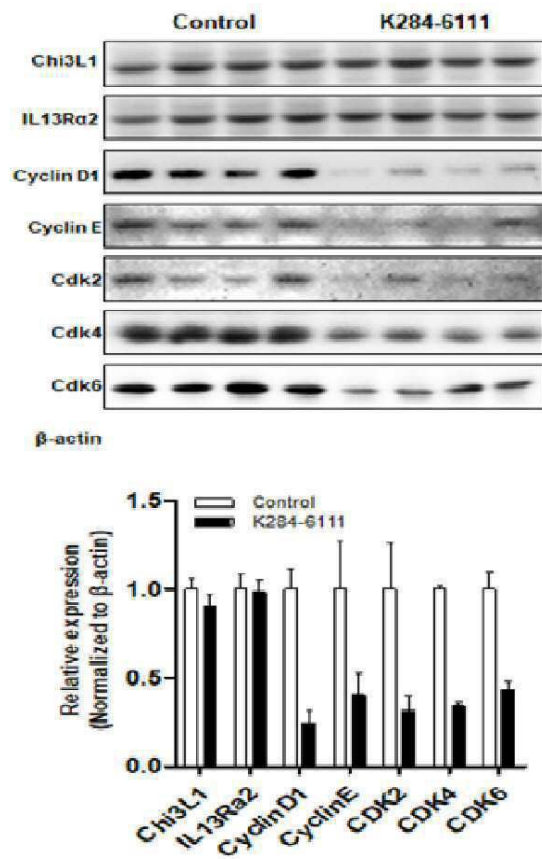
도면2



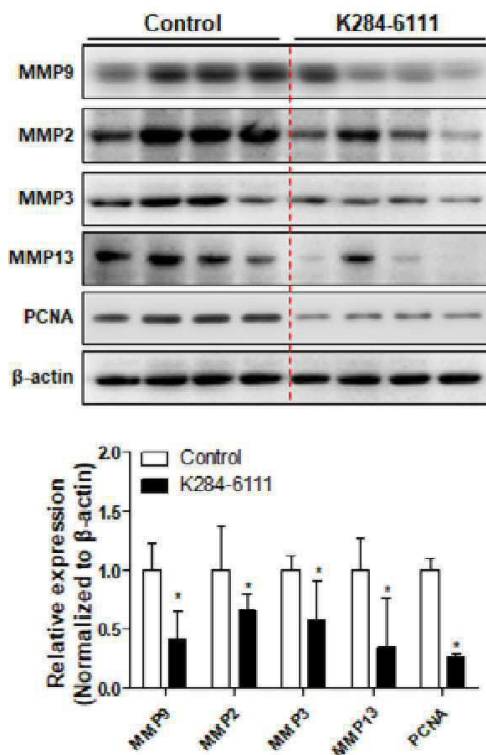
도면3



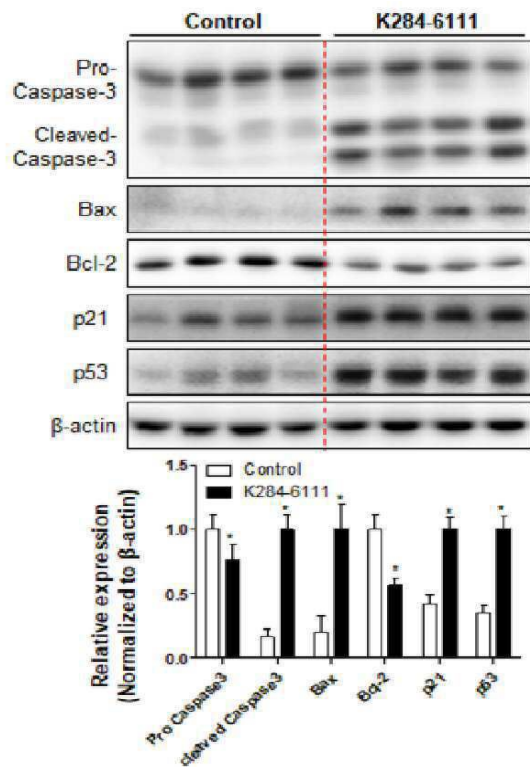
도면4



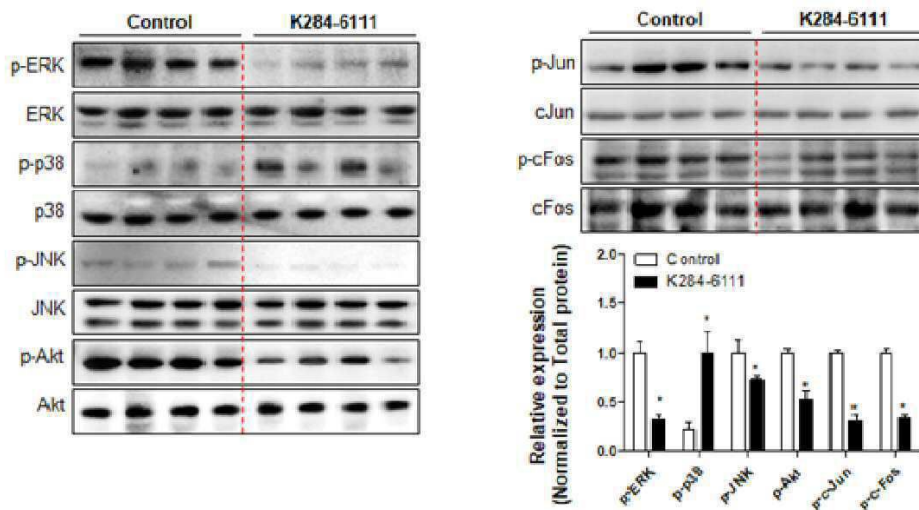
도면5



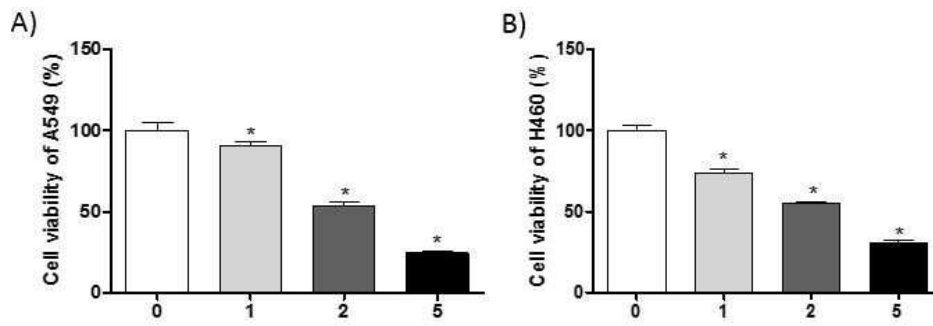
도면6



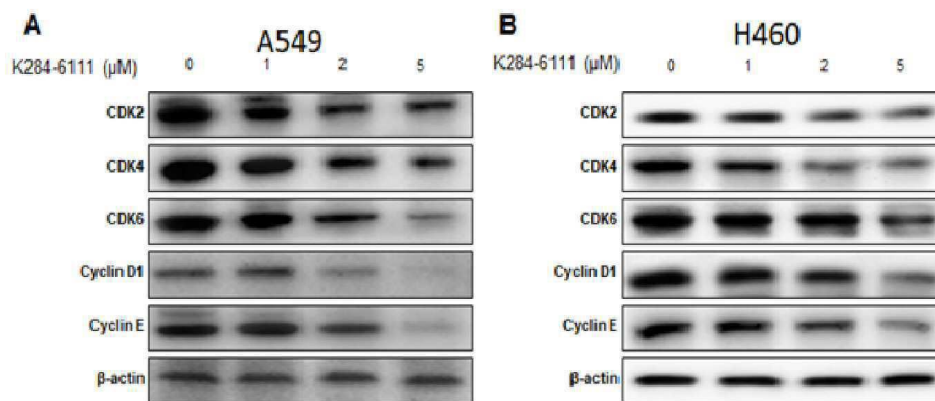
도면7



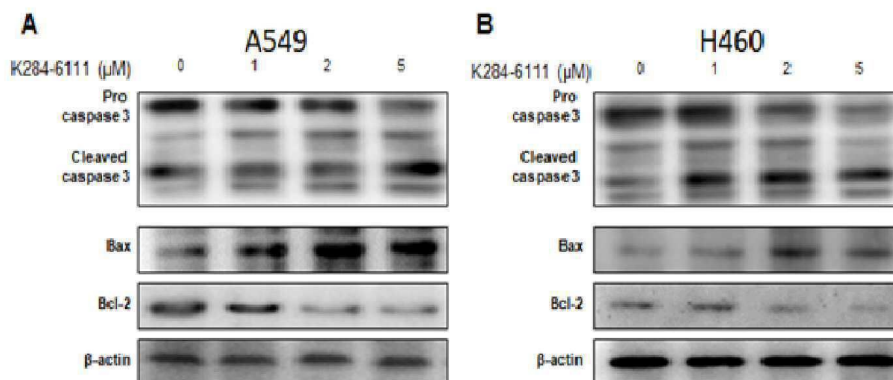
도면8



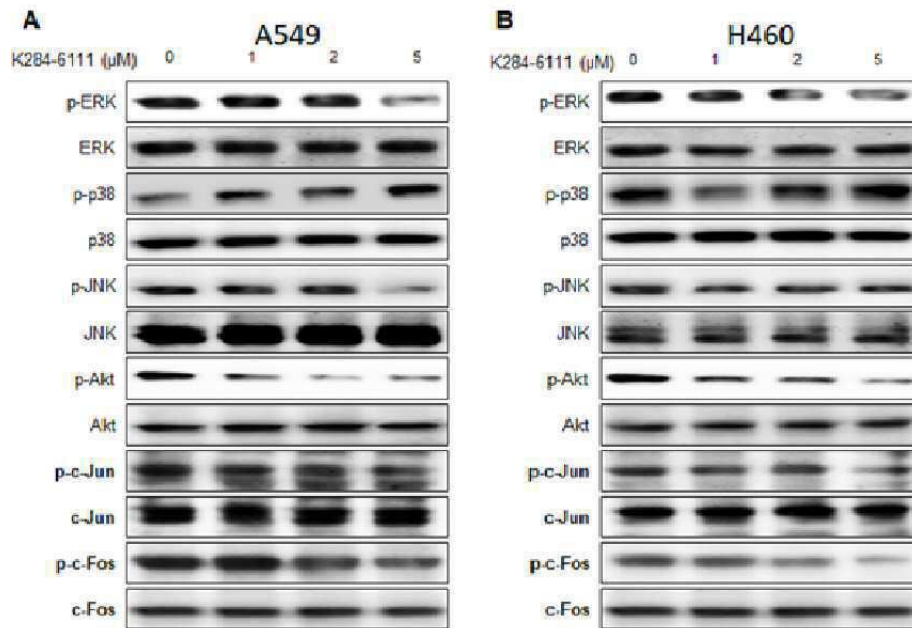
도면9



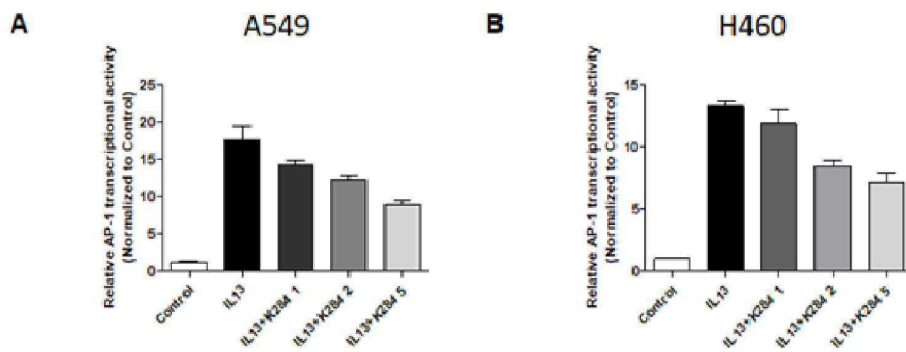
도면10



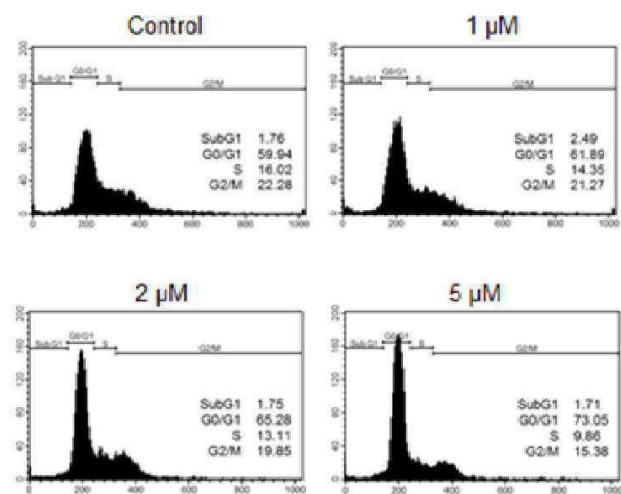
도면11



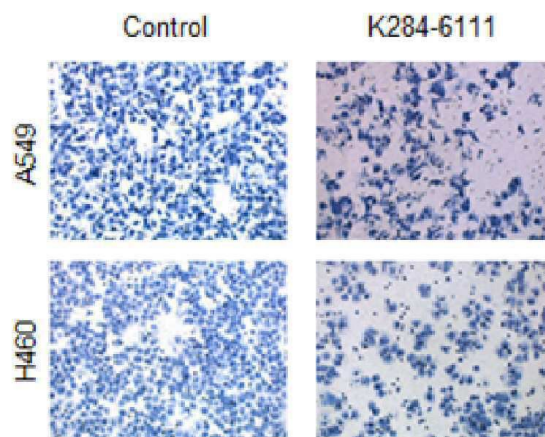
도면12



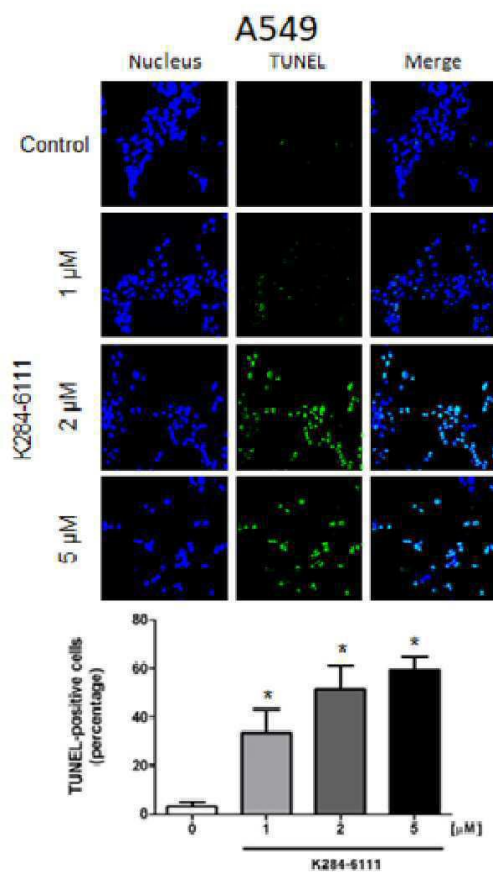
도면13



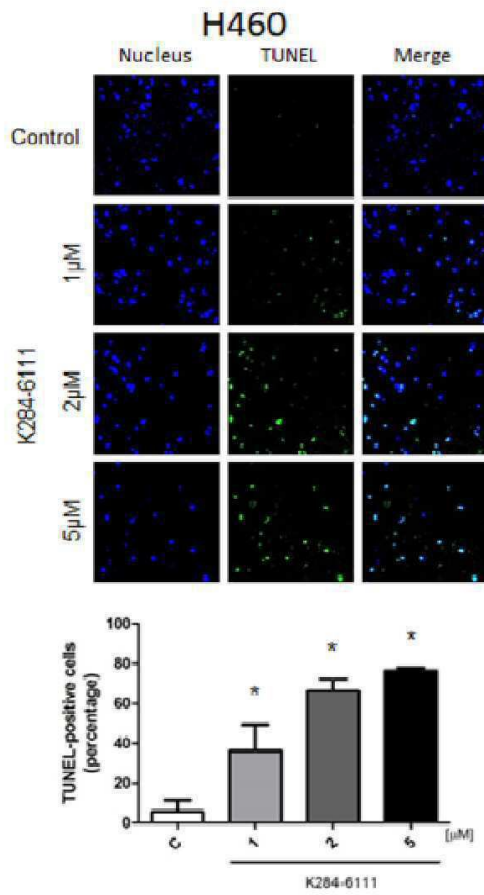
도면14



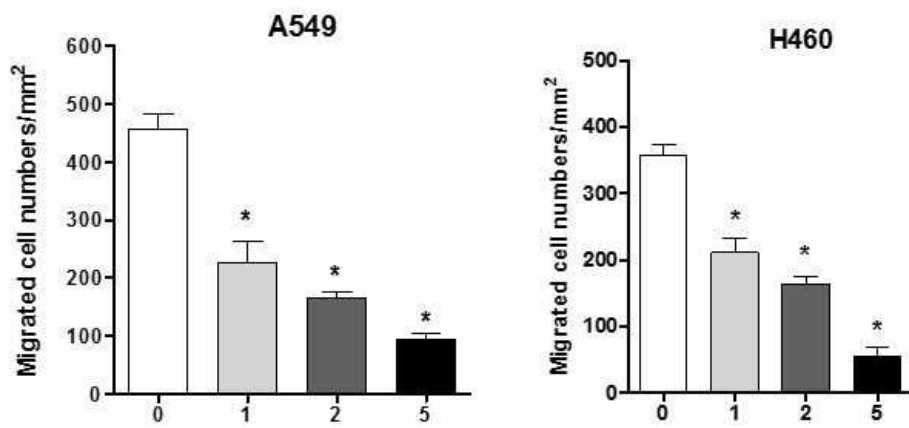
도면15



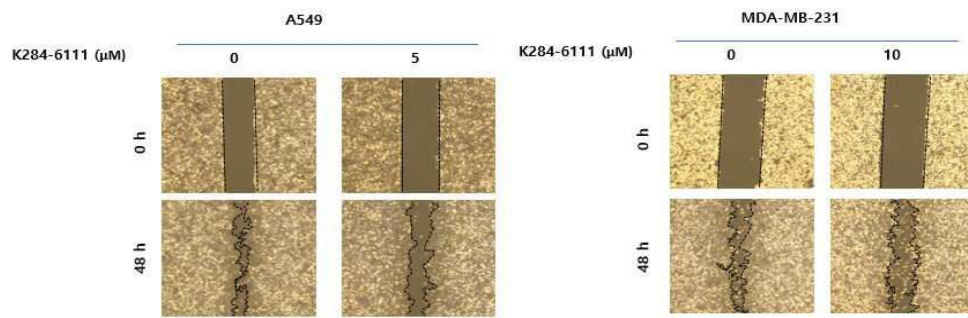
도면16



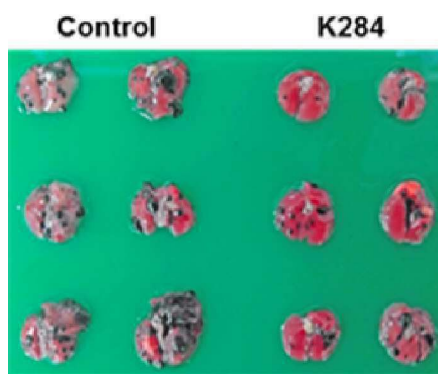
도면17



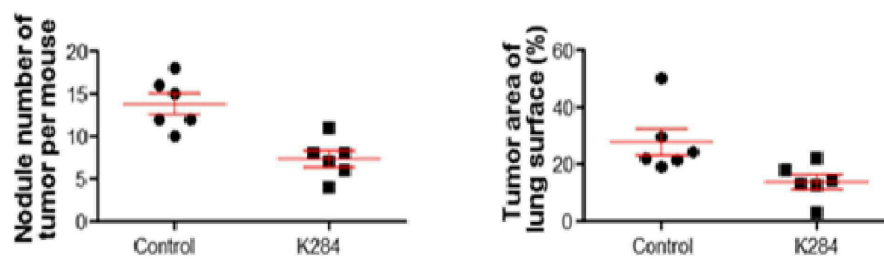
도면18



도면19



도면20



도면21

