



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0011423
(43) 공개일자 2018년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 403/14 (2006.01) A61K 41/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) C07D 209/22 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 403/14 (2013.01)
A61K 41/0057 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0093435

(22) 출원일자 2016년07월22일

심사청구일자 2016년07월22일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

윤주영

서울특별시 용산구 서빙고동 이촌로 347 신동아아파트 2동 501호

첸샤오창

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여대 종합과학관 D동501호

이다영

부산광역시 사상구 주례로 93 104동 405호 (주례동, 현대무지개타운아파트)

(74) 대리인

이원희

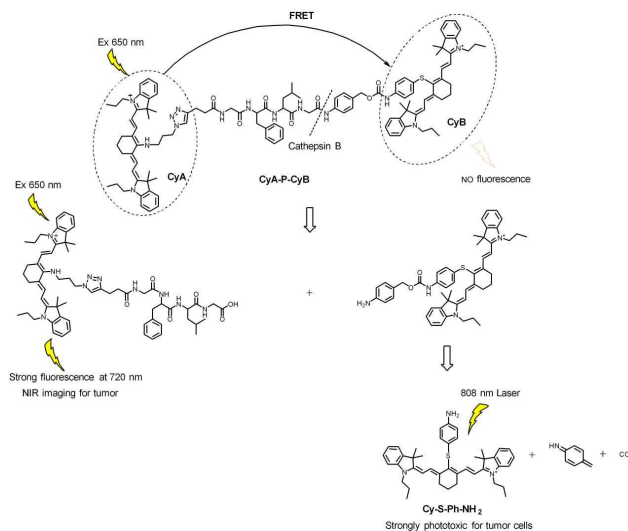
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 카텝신 B에 의해 활성화되는 암의 진단 또는 치료용 조성물, 이를 이용한 암의 근적외선 형광 이미징 및 광선 치료

(57) 요약

본 발명은 카텝신 B(cathepsin B)에 의해 활성화되는 암의 진단 또는 치료용 조성물, 이를 이용한 암의 근적외선 형광 이미징 및 광선 치료에 관한 것이다. 본 발명에 따른 시아닌을 포함하는 화합물은 카텝신 B에 의해 활성화되어 암세포에서 특이적 및 선택적으로 암세포의 형광 이미징 또는 암세포에 광독성 및 강력한 광선치료 효과를 나타내므로, 암의 진단 또는 치료를 동시에 수행할 수 있는 다기능성 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 49/0056 (2013.01)

C07D 209/22 (2013.01)

G01N 33/52 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A3A2048814

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

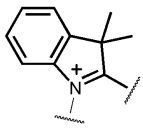
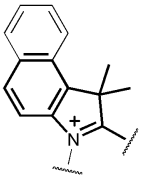
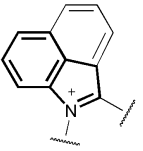
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 다차원 유기소재 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31

상기 치환된 , , 및 는 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알콕시 및 할로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다).

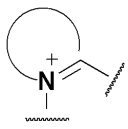
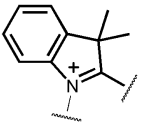
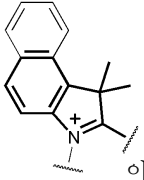
청구항 2

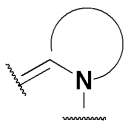
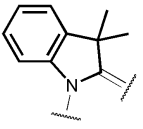
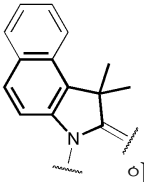
제1항에 있어서,

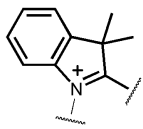
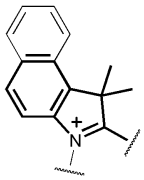
R¹은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬이고;

n은 2 내지 4의 정수이고;

L은 글라이신(Gly, G), 루신(Leu, L) 및 페닐알라닌(Phe, F)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 링커이되, 상기 L의 아미노산 개수는 1 내지 10이고, L의 카보닐과 연결된 말단은 -NH-이고, 아민과 연결된 말단은 -(C=O)-이고;

는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된  또는 이고;

는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된  또는 이고; 및

상기 치환된  및 는 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알콕시 및 할로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있는 것을 특징으로 하는 화합물.

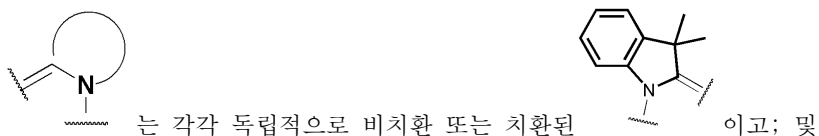
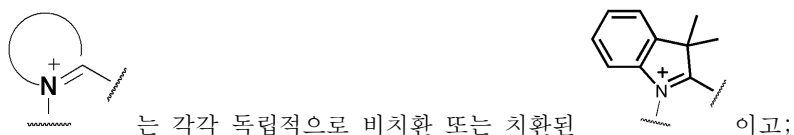
청구항 3

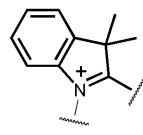
제1항에 있어서,

R¹은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₃알킬이고;

n은 3이고;

L은 글라이신(Gly, G), 루신(Leu, L) 및 페닐알라닌(Phe, F)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 링커이되, 상기 L의 아미노산 개수는 4이고, L의 카보닐과 연결된 말단은 -NH-이고, 아민과 연결된 말단은 -(C=O)-이고;



상기 치환된
 
 는 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알콕시 및 할로젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있는 것을 특징으로 하는 화합물.

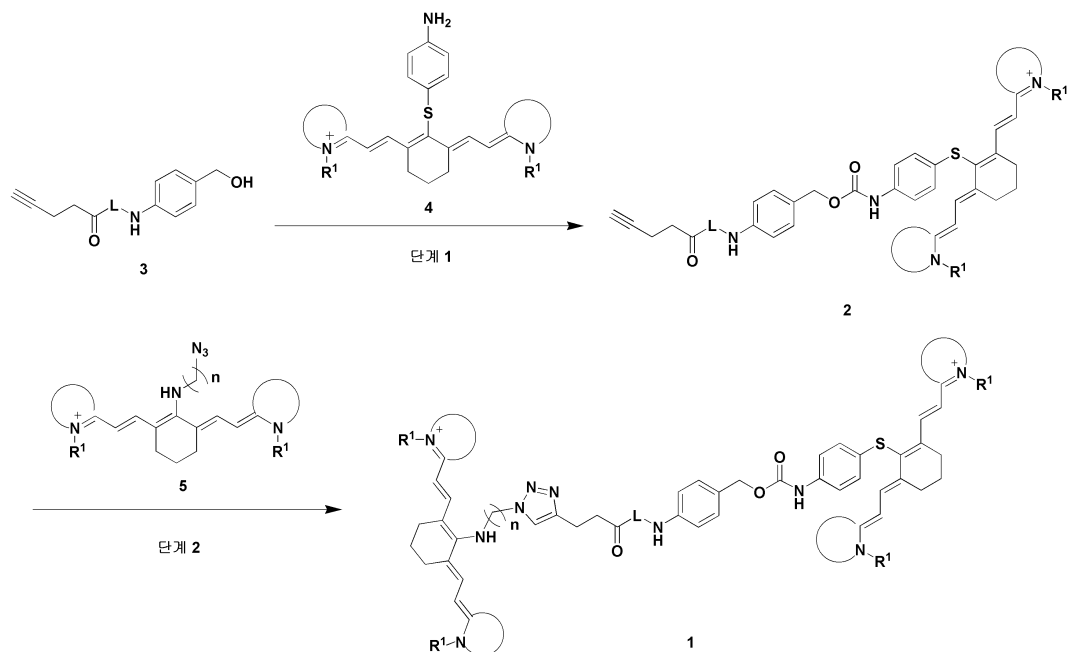
청구항 4

하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

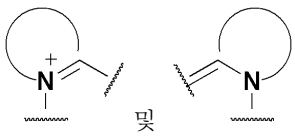
상기 단계 1에서 제조한 화학식 2로 표시되는 화합물을 화학식 5로 표시되는 화합물과 클릭 반응(click reaction)시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

R^1 , n, L



및 는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

청구항 5

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조성물은 카텡신 B에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.

청구항 7

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물.

청구항 8

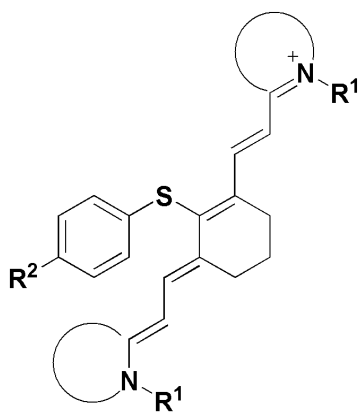
제7항에 있어서,

상기 조성물은 카텡신 B에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 9

하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 근적외선 치료용 조성물:

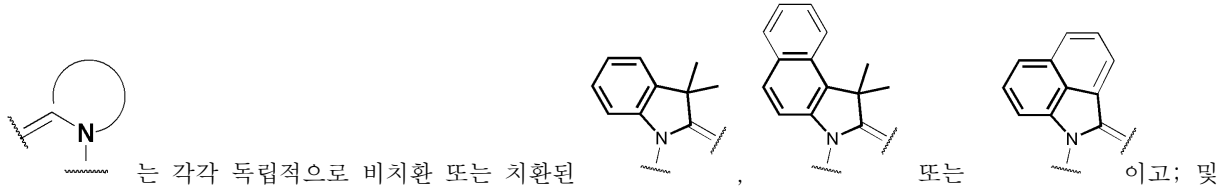
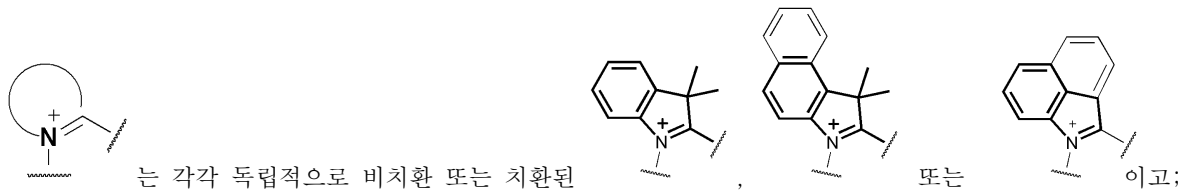
[화학식 8]

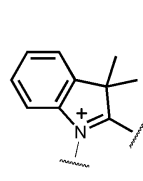
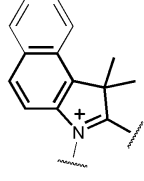
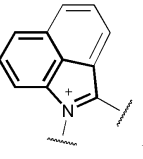


(상기 화학식 8에서,

R^1 은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-10} 알킬이고;

R^2 는 $-NH_2$ 또는 $-NH_3^+$ 이고;



상기 치환된
 ,
 
 ,
 
 및
 
 는 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알콕시 및 할로젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다).

청구항 10

제5항의 암 진단용 조성물을 동물개체로부터 분리된 조직 또는 세포에 처리하는 단계를 포함하는 암의 진단방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카텡신 B(cathepsin B)에 의해 활성화되는 암의 진단 또는 치료용 조성물, 이를 이용한 암의 근적외선 형광 이미징 및 광선 치료에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 형광 프로브는 높은 공간 해상도로 실시간으로 시각적인 정보를 제공할 수 있기 때문에 생물학자들이 생물학적 과정을 연구할 수 있는 강력한 도구가 되고 있다. 특히, 근적외선(near-infrared, NIR) 발광(650-900 nm)을 가지는 프로브는 생체내 (in vivo) 이미징에 선호되고 있다.

[0004] 상기 근적외선 형광 프로브는 짧은 발광 파장을 가지는 종래의 프로브와 비교하여 독특한 장점을 가진다. 먼저, 근적외선 프로브는 생체내 이미징에 적용될 때, 상기 근적외선 발광은 높은 신호대잡음비(signal-to-noise ratio)를 나타내면서 고유 생체분자의 자가형광의 방해로 피할 수 있다. 또한, 근적외선 형광 프로브는 긴 여기 파장(excitation wavelength)을 가지기 때문에, 심부조직에서도 이미징을 할 수 있다. 나아가, 근적외선 여기 및 발광은 빛의 짧은 파장보다 생물학적 시료에 적은 손상을 일으킨다.

[0005] 과거 20년 동안, 일부 근적외선 형광 프로브가 생체내 및 시험관내에서 다양한 생물종을 관찰하도록 개발되어왔다. 그러나, 이러한 근적외선 형광 프로브는 단일 기능 시약으로서, 이미징에만 사용할 수 있다. 이에, 특정 이미징 및 암 치료 모두가 가능한 다기능 시약의 개발은 큰 의미를 가진다.

[0006] 광역학 치료(photodynamic therapy, PDT) 및 광열 치료(photothermal therapy, PTT)를 포함하는 광선치료는 마일드하고 비침습적인 암치료방법이다. 상기 치료 양상에서는 감광제 또는 광열제의 도움과 함께, 빛이 흡광되어 활성산소로 이동하거나 암 세포의 사멸을 유도하는 국부적 고열이 야기된다.

[0007] 상기 근적외선 광 유도 PDT 또는 PTT는 심부 조직침투 때문에 짧은 파장 빛에서 바람직하다. 현재까지, 가장 적합한 근적외선 광민감 분자는 인도시아닌 그린 염료(indocyanine green dye, ICG)이다. 상기 인도시아닌 그린

염료는 미 식약청(Food and Drug Administration (FDA))에서 임상용으로 승인된 근적외선 염료이다. 그러나, 인도시아닌 그린 염료 자체는 근적외선 레이저 조사에서 정상 세포 또는 조직의 손상을 동반한 광선치료가 유도되므로 암 세포에 특이적이지 못하다.

[0008] 따라서, 정상 세포보다 타겟 암 세포에 특이적 및 효율적으로 손상을 야기하는 광선치료제가 바람직하다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 암의 이미징 및 치료가 모두 가능한 다기능 조성물을 개발하던 중, 본 발명에 따른 시아닌을 포함하는 화합물이 카텡신 B에 의해 활성화되어 암세포에서 특이적 및 선택적으로 암세포의 형광 이미징 또는 암세포에서 광독성 및 강력한 광선치료 효과를 나타내므로, 암의 진단 또는 치료를 동시에 수행할 수 있는 다기능성 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 10-1385855

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 시아닌을 포함하는 화합물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 시아닌을 포함하는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 시아닌을 포함하는 화합물을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 시아닌을 포함하는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 근적외선 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

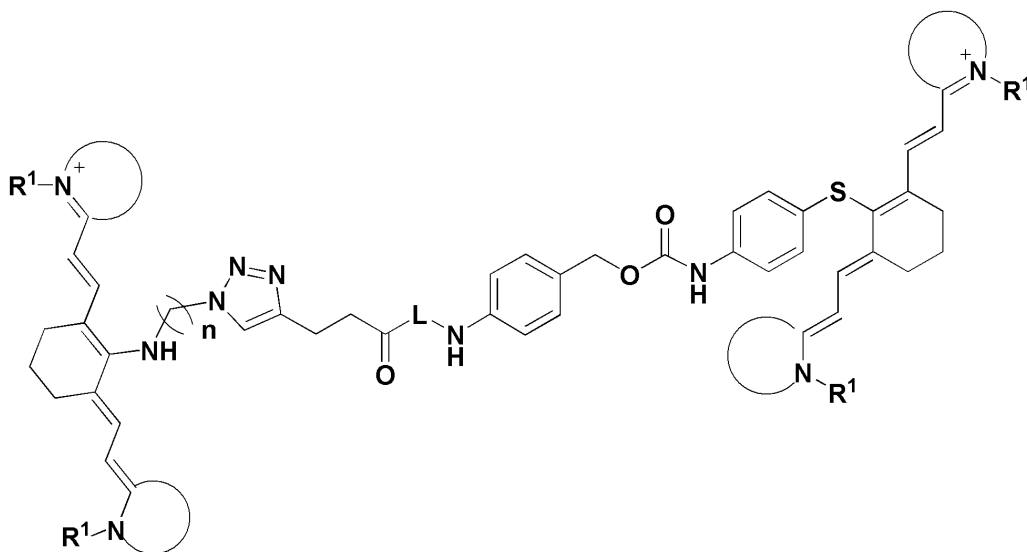
[0018] 본 발명의 다른 목적은 상기 암 진단용 조성물을 사용하는 암의 진단방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0021] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 시아닌을 포함하는 화합물을 제공한다:

[0022] [화학식 1]



[0023]

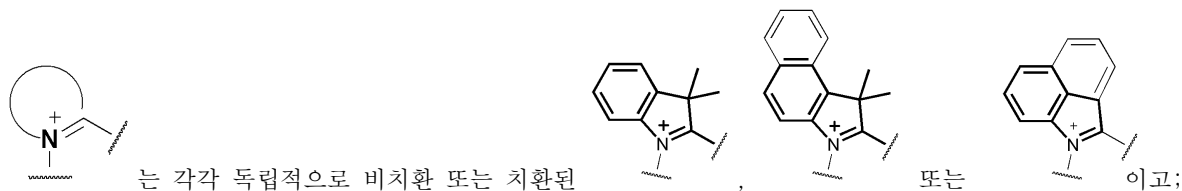
[0024] (상기 화학식 1에서,

[0025] R^1 은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-10} 알킬이고;

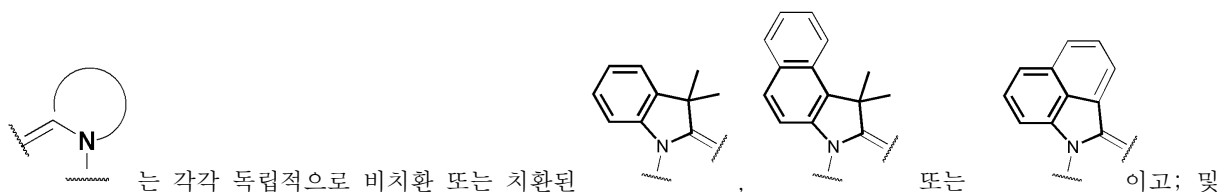
[0026] n 은 1 내지 5의 정수이고;

[0027] L은 알라닌(Ala, A), 아르기닌(Arg, R), 아스파라긴(Asn, N), 아스파틱산(Asp, D), 시스테인(Cys, C), 글루탐산(Glu, E), 글루타민(Gln, Q), 글라이신(Gly, G), 히스티딘(His, H), 이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 라이신(Lys, K), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 프롤린(Pro, P), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 트립토판(Trp, W), 티로신(Tyr, Y) 및 발린(Val, V)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 링커이되, 상기 L의 아미노산 개수는 1 내지 10이고, L의 카보닐과 연결된 말단은 -NH-이고, 아민과 연결된 말단은 -(C=O)-이고;

[0028]



[0029]



[0030]

상기 치환된 , 및 는 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-5} 알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-5} 알콕시 및 할로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다).

[0032]

또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

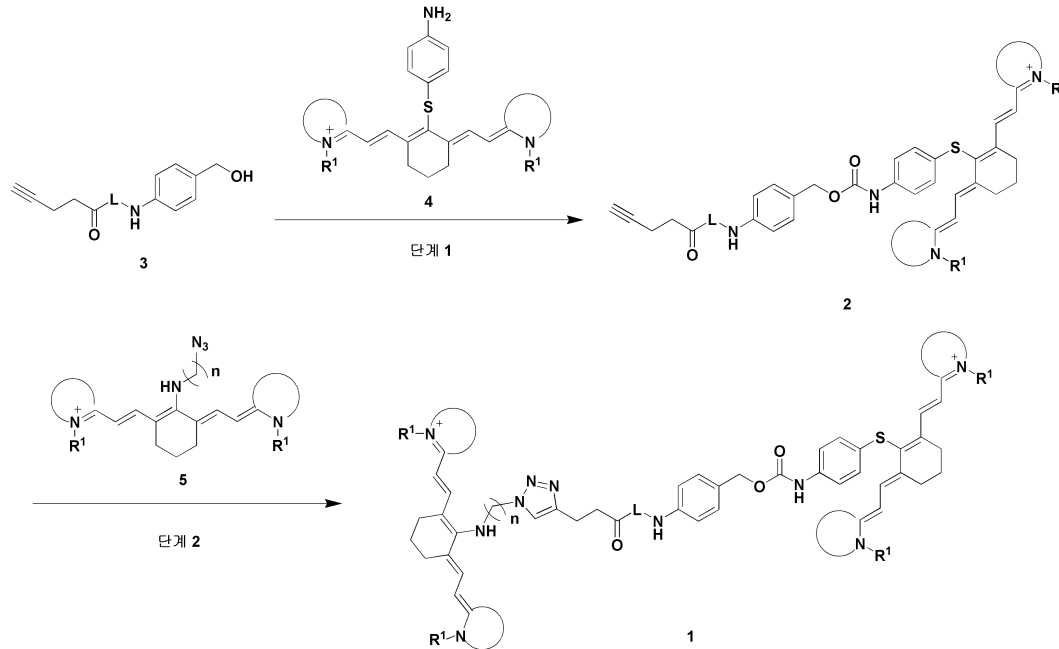
[0033]

화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하

는 단계(단계 1); 및

[0034] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 2로 표시되는 화합물을 화학식 5로 표시되는 화합물과 클릭 반응(click reaction)시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0035] [반응식 1]



[0036]

[0037] (상기 반응식 1에서,

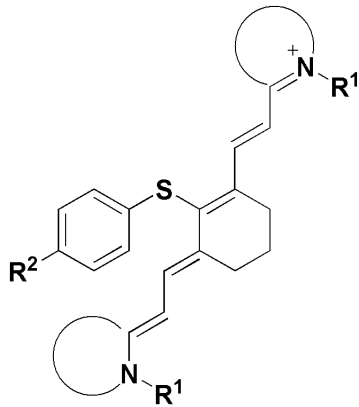
[0038] R^1 , n , L 및 는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

[0040] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물을 제공한다.

[0044] 나아가, 본 발명은 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 근적외선 치료용 조성물:

[0045] [화학식 8]



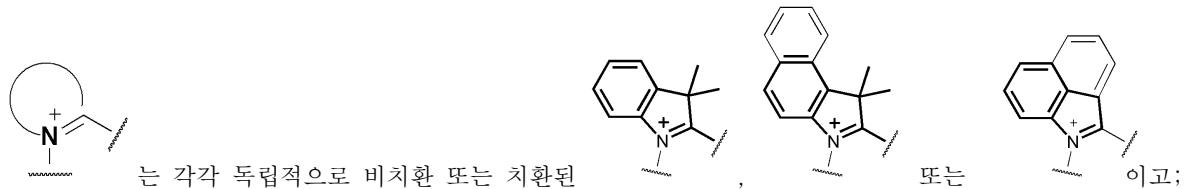
[0046]

[0047] (상기 화학식 7에서,

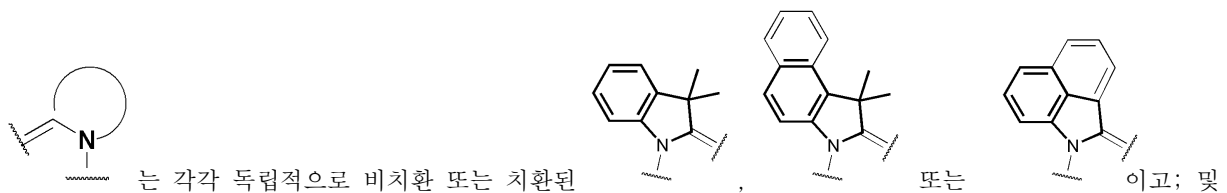
[0048] R^1 은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-10} 알킬이고;

[0049] R^2 는 $-NH_2$ 또는 $-NH_3^+$ 이고;

[0050]



[0051]



[0052]

상기 치환된 , 및 는 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-5} 알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-5} 알콕시 및 할로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다).

[0054]

또한, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 동물개체로부터 분리된 조직 또는 세포에 처리하는 단계를 포함하는 암의 진단방법을 제공한다.

발명의 효과

[0056]

본 발명에 따른 시아닌을 포함하는 화합물은 카텝신 B에 의해 활성화 되어 암세포에서 특이적 및 선택적으로 암 세포의 형광 이미징 또는 암세포에 광독성 및 강력한 광선치료 효과를 나타내므로, 암의 진단 또는 치료를 동시에 수행할 수 있는 다기능성 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058]

도 1은 본 발명에 따른 실시예 1에서 제조한 화합물(CyA-P-CyB)을 사용하는 카텝신 B에 의해 유발된 암 세포의 근적외선 이미징 및 광선치료를 도식화한 그림이다.

도 2a는 $\lambda_{ex} = 650 \text{ nm}$ 에서의 Cy-S-Ph-NH₂의 흡광 스펙트럼(붉은선) 및 Cy-N₃의 발광 스펙트럼(검은선)을 나타낸 그래프이고, 도 2b는 버퍼용액(25 mM 아세트레이트, 1.0 mM EDTA, pH 5.0, 및 500 μM GSH)에서 카텝신 B로 배양된 후, $\lambda_{ex} = 650 \text{ nm}$ 에서의 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB의 발광 스펙트라의 시간에 따른 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3a 내지 3d는 세포에서의 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB의 형광 이미징을 나타낸 사진으로, 도 3a는 전처리 과정을 거치지 않은 헬라 세포, 도 3b는 150 μM H₂O₂를 24시간, 도 3c는 10 μM 캄토테신(camptothecin)을 24시간, 도 3d는 30 nM 칼페인 저해제 I(calpain inhibitor I)을 30분간 처리한 후, 각각의 세포를 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB 10 μM 로 2시간 배양하였다. 상기 세포는 각각 DPBS로 세척하고, 공초점 현미경(confocal microscopy)으로 형광이미지를 얻었다. 라이소트랙커(LysoTracker)를 사용하여 상기 세포를 co-stain시켰다(상부: CyA-P-CyB 처리(ex. 635 nm/em. 655 - 755 nm), 중부: LysoTracker 염색(ex. 405 nm/em. 430 - 455 nm), 하부: DIC로 병합. 스케일 바: 10 μm).

도 4는 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB의 존재 하에, 레이저 조사 및 카텝신 B 저해제 I를 처리 또는 비처리 때의 세포 성장의 MTT 측정 결과를 나타낸 그래프로, 도 4a 및 4b는 레이저 조사를 수행 또는 비수행하였을 때의 세포 독성 효과를 나타낸 그래프이고, 도 4c 및 4d는 카텝신 B 저해제를 처리 또는 비처리하였을 때의 세포독성을 나타낸 그래프이고, 도 4e는 정상 세포와 암세포에서의 세포독성의 비교를 나타낸 그래프이다. 도 4a는 U87 세포에서, 도 4b는 A549 세포에서 다양한 농도의 CyA-P-CyB로 16시간 배양한 후, CyA-P-CyB를 제거하였다. 상기 세포에 808 nm의 레이저(2 W/cm², 10 min)를 조사하여 24시간 배양하였다. 도 4c는 U87 세포에서, 도 4d는 A549 세포에서 칼페인 저해제 I 30 nM로 30분간 전처리하고, 5 μM 의 CyA-P-CyB로 16시간 배양한 후, CyA-P-CyB를 제거하였다. 상기 세포에 808 nm의 레이저(2 W/cm², 10 min)를 조사하여 24시간 배양하였다. 도 4e는 세포를 5 μM 의 CyA-P-CyB로 16시간 배양한 후, CyA-P-CyB를 제거하였다. 상기 세포에 808 nm의 레이저(2 W/cm², 10 min)를 조사하여 24시간 배양하였다. 도 4a 내지 4e의 결과는 세번의 독립적인 실험의 $\pm$ 평균 표준 편차 값을 표현하였다.

도 5는 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB의 근적외선 형광 이미징 및 생체내에서의 CyA-P-CyB의 광선치료 효능을 나타낸 그래프로, 도 5a는 PEG-PLA/CyA-P-CyB를 정맥 주사한 후, 48 시간이 경과할 때 까지의 담압 마우스의 근적외선 이미징(중량은 점선원으로 표시)이고, 도 5b는 H640 종양이 있는 마우스에 그래프에 표시된 물질을 정맥 주사한 후 시간에 따른 종양 성장 정도를 측정한 그래프(빨간 화살표는 PEG-PLA/CyA-P-CyB의 정맥주사 시작을 나타내고, 파란 화살표는 레이저 조사일을 나타낸다)이고, 도 5c는 서로 다른 처리 후의 H640 종양이 있는 마우스의 사진이다. 도 5b에서, 마우스는 PEG-PLA/CyA-P-CyB를 5 mg/kg씩 매일 4일간(총 20 mg/kg) 처리하였으며, 실험 결과는 $\pm$ SEM 값으로 표시하였다(* P < 0.05, PEG-PLA 처리와 함께 레이저를 조사한 그룹과 비교).

도 6은 생체내에서의 CyA-P-CyB의 독성; 및 세포증식 및 세포사멸에서의 CyA-P-CyB의 효과;를 나타낸 그래프로, 도 6a는 PEG-PLA 또는 PEG-PLA/CyA-P-CyB (20 mg/kg)를 정맥주사하여 14일이 경과된 후의 마우스에서 적출한 장기(폐, 간, 심장, 신장, 췌장, 비장 및 뇌)의 조직학적 분석결과를 나타낸 그래프이고, 도 6b는 종양의 세포 증식 및 세포사멸을 측정한 사진이고, 도 6c는 TUNEL 분의 정량화를 나타낸 그래프이다. 도 6b에서, 세포증식은 Ki-67 항체로 조직 염색하여 측정되며, 갈색으로 표시된다. 핵(nuclei)은 헤마톡실린으로 대비염색되었다. 세포사멸은 TUNEL 분석(assay)를 사용하여 측정되었다. 녹색은 양성 신호를 나타낸다. 핵은 DAPI 염색(파란색)을 통해 시각화되었다. 도 6c에서 양성 신호는 각 슬라이드는 슬라이드당 5 프레임에서 카운트 된 것이다. 실험 결과는 $\pm$ SEM (n = 3-6) 값으로 표시하였다(** P < 0.01, 대조군 (PEG-PLA), 레이저 처리한 대조군(PEG-PLA) 또는 PEG-PLA/CyA-P-CyB 그룹과 각각 비교)

도 7은 카텝신 B(10 $\mu\text{g/mL}$) 및 칼페인 저해제 I(100 μM) 존재 하에 버퍼 용액(25 mM 아세트레이트, 1.0 mM EDTA, pH 5.0, 500 μM GSH)에서 서로 다른 배양시간으로 배양하여 $\lambda_{ex} = 650 \text{ nm}$ 에서의 CaA-P-CyB의 흡광 스펙트라를 나타낸 그래프이다.

도 8은 일중향 산소 생성 및 808 nm 레이저 조사후 Cy-S-Ph-NH₂의 광열 효과의 분석을 나타낸 그래프로, 도 8a는 $\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$ 에서 Cy-S-Ph-NH₂ (10 μM) 존재 하에 808 nm 레이저(0.5 W/cm²)를 사용하여 다양한 레이저 조사 시간시간에 따른DPBF (10 μM)의 형광 스펙트라를 나타낸 그래프이고, 도 8b는 레이저를 조사하지 않았을 경우, Cy-S-Ph-NH₂ (10 μM) 존재하에서 DPBF (10 μM)의 형광 스펙트라를 나타낸 그래프이고, 도 8c는 Cy-S-Ph-NH₂ (■) 및 물 (●)에 808 nm 레이저(2 W/cm²)를 조사하였을 때 시간에 따른 온도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 동적 레이저 산란을 통해 PEG-PLA/CYA-P-CYB 나노 입자의 특성을 분석한 그래프이다(본 도 9에서, 나노 입자의 크기=230.9 nm, PDI=0.461).

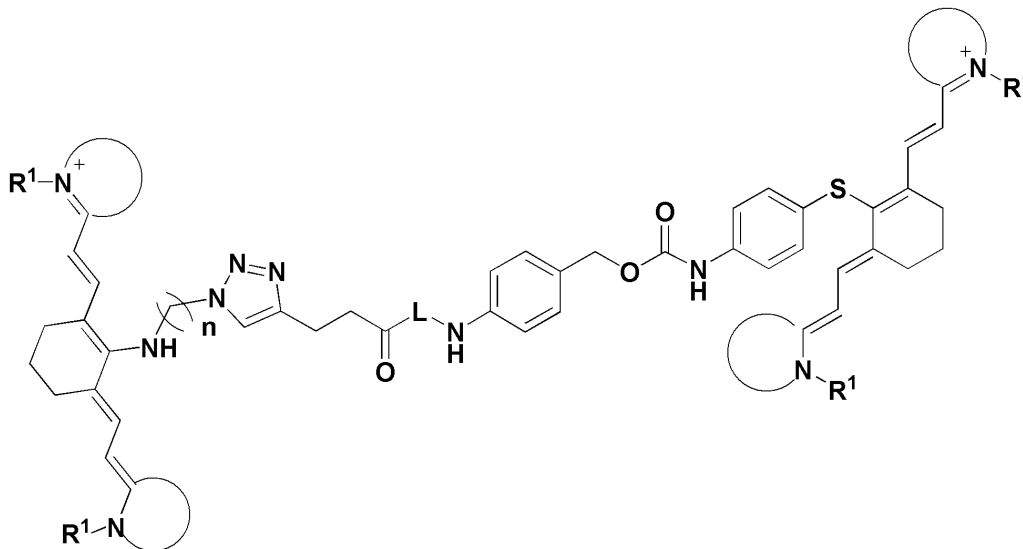
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 이하 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되는 것이며, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 시아닌을 포함하는 화합물을 제공한다.

[화학식 1]

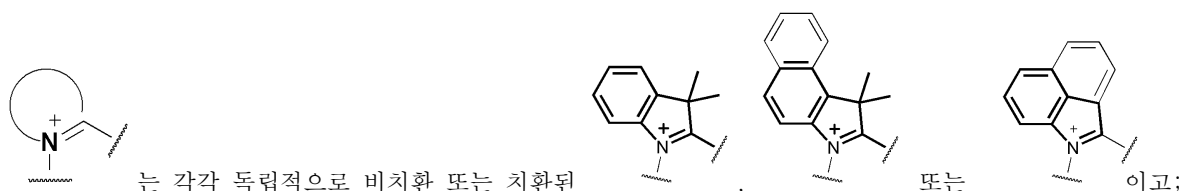


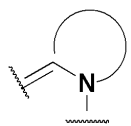
(상기 화학식 1에서,

R¹은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₁₀알킬이고;

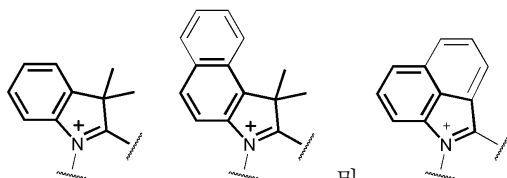
n은 1 내지 5의 정수이고;

L은 알라닌(Ala, A), 아르기닌(Arg, R), 아스파라긴(Asn, N), 아스파틱산(Asp, D), 시스테인(Cys, C), 글루탐산(Glu, E), 글루타민(Gln, Q), 글라이신(Gly, G), 히스티딘(His, H), 이소루신(Ile, I), 루신(Leu, L), 라이신(Lys, K), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 프롤린(Pro, P), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 트립토판(Trp, W), 티로신(Tyr, Y) 및 발린(Val, V)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 링커이되, 상기 L의 아미노산 개수는 1 내지 10이고, L의 카보닐과 연결된 말단은 -NH-이고, 아민과 연결된 말단은-(C=O)-이고;





[0070] 는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된 , 또는 이고; 및



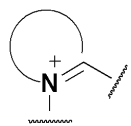
[0071] 상기 치환된 , 및 는 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알콕시 및 할로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다).

[0073] 바람직하게는.

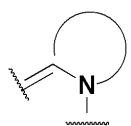
[0074] R¹은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬이고;

[0075] n은 2 내지 4의 정수이고;

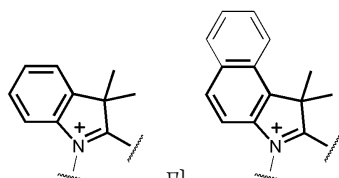
[0076] L은 글라이신(Gly, G), 루신(Leu, L) 및 페닐알라닌(Phe, F)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 링커이되, 상기 L의 아미노산 개수는 1 내지 10이고, L의 카보닐과 연결된 말단은 -NH-이고, 아민과 연결된 말단은 -(C=O)-이고;



[0078] 는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된 또는 이고;



[0079] 는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된 또는 이고; 및



[0080] 상기 치환된 및 는 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알콕시 및 할로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다.

[0082] 보다 바람직하게는,

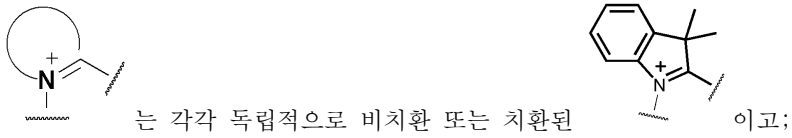
[0083] R¹은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₃알킬이고;

[0084] n은 3이고;

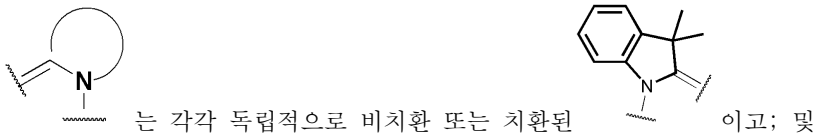
[0085] L은 글라이신(Gly, G), 루신(Leu, L) 및 페닐알라닌(Phe, F)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 링커이되, 상기 L의 아미노산 개수는 4이고, L의 카보닐과 연결된 말단은

-NH-이고, 아민과 연결된 말단은-(C=O)-이고;

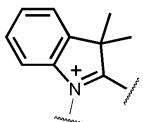
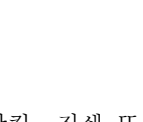
[0087]



[0088]

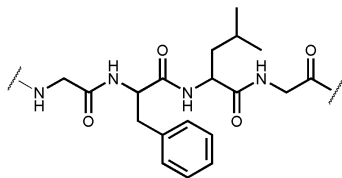


[0089]


 상기 치환된
 
 는 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C₁₋₅알콕시 및 할로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다.

[0091]

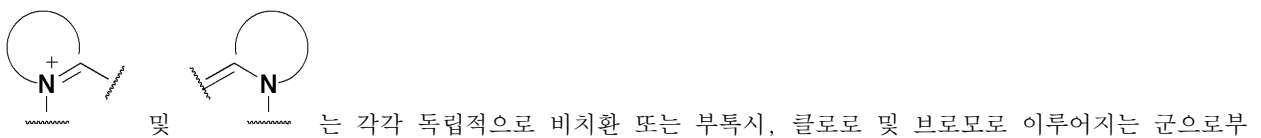
상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 있어서, 치환기의 가장 바람직한 예로는, R¹은 프로필일 수 있고, n은 3일

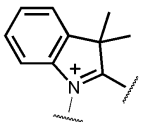


수 있고, L은

 일 수 있고, 이때, L의 아민 말단은 카보닐과 연결되고, 카보닐 말단은 아민과 연결되며,

[0092]

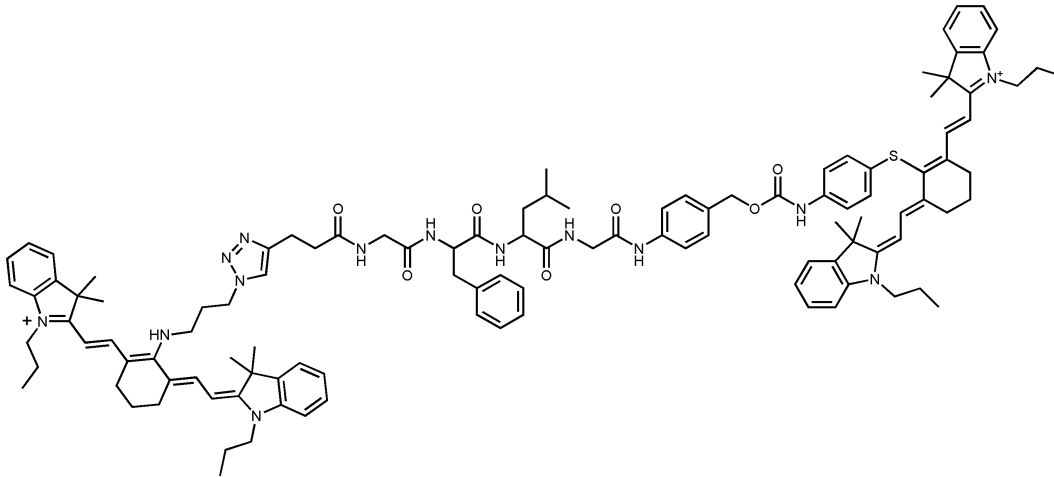


터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환된
 
 일 수 있다.

[0094]

본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 바람직한 예는 하기 화합물 A로 표시되는 화합물이다.

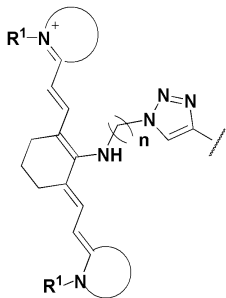
[0095] [화학식 A]



[0096]

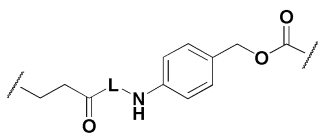
[0098] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 설계 원리는 하기 화학식 b로 표시되는 프로테아제(protease) 기질인 펩타이드 링커를 중심으로 하여, 하기 화학식 a로 표시되는 형광 공여자(donor) 및 하기 화학식 c로 표시되는 비형광 수용체(acceptor)에 기초한다.

[0099] [화학식 a]



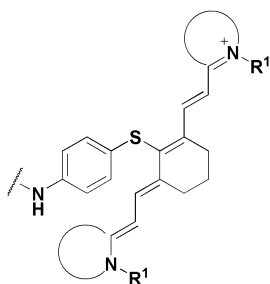
[0100]

[0101] [화학식 b]



[0102]

[0103] [화학식 c]



[0104]

[0105] (상기 화학식 a, b 및 c에서,

[0106] R^1 , n, L  및  는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

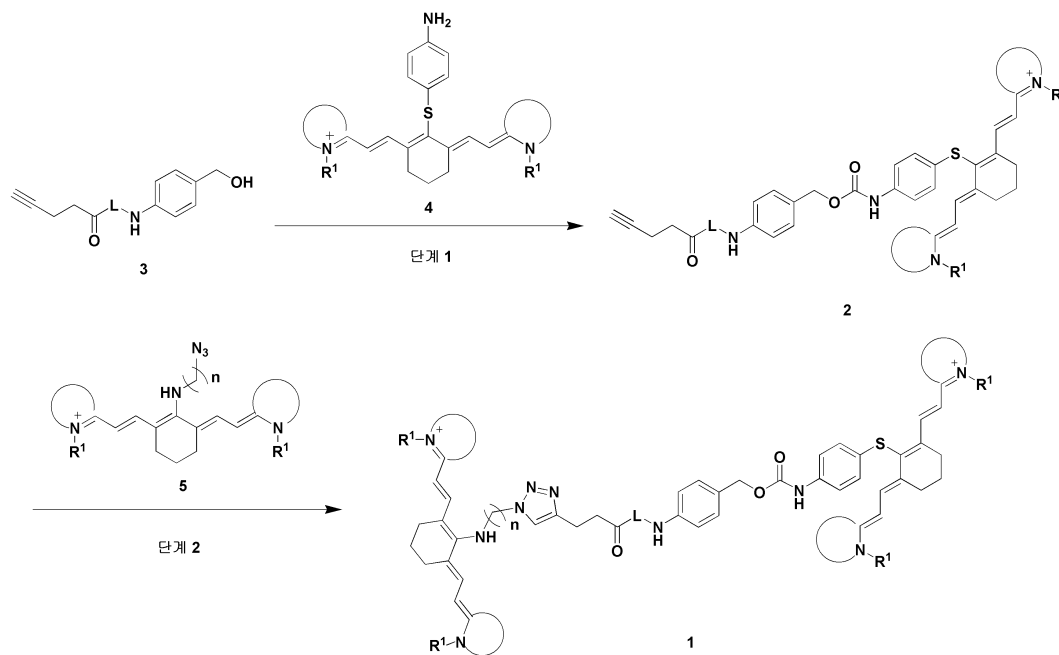
[0108] 상기 화학식 a로 표시되는 화합물 및 화학식 c로 표시되는 화합물은 적외선 영역의 파장으로 여기될 수 있는 시아린 계열의 발색단을 포함한다면 특히 한정되는 것은 아니나, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 치환기 범위 내가 바람직하다.

[0110] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0111] 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

[0112] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 2로 표시되는 화합물을 화학식 5로 표시되는 화합물과 클릭 반응(click reaction)시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0113] [반응식 1]



[0114]

[0115] (상기 반응식 1에서,

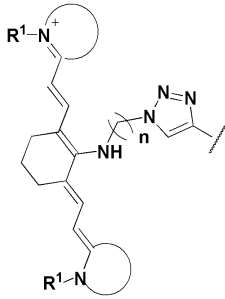
[0116] R^1 , n, L  및  는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

[0118] 이하, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 대하여 상세히 설명한다.

[0120] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이며, 구체적으로, 화학식 3으로 표시되는 화합물을 트리포스젠 및 염기 존재하에 반응시켜 에시드 클로라이드 화합물을 형성한 후, 화학식 4로 표시되는 화합물의 아민과 반응하여 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조할 수 있다.

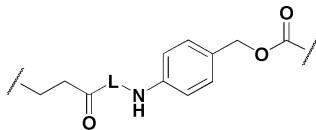
- [0121] 또한, 상기 염기로는 특히 한정되는 것은 아니나, N,N-다이메틸아미노피리딘(DMAP), 피리딘, 트라이에틸아민, N,N-다이이소프로필에틸아민(DIPEA), 1,8-디아자비사이클로[5.4.0]-7-운데센(DBU) 등의 유기염기 또는 소듐바이 카보네이트, 수산화나트륨, 수산화칼륨 등의 무기염기를 사용할 수 있으며, 이를 단독 또는 혼합하여, 당량 또는 과량으로 사용할 수 있고, N,N-다이이소프로필에틸아민과 N,N-다이메틸아미노피리딘(DMAP)를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0122] 나아가, 상기 반응에서 사용 가능한 용매로는 테트라하이드로퓨란, 다이옥산, 디클로로메탄, 1,2-다이메톡시에 탄과 같은 에테르계 용매, 벤젠, 톨루엔, 자일렌과 같은 아로마틱 하이드로카본용매, 저급 알코올, 디메틸포름 아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세트나이트릴, 물, 클로로포름 등이 있으며, 이를 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0124] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 제조한 화학식 2로 표시되는 화합물을 화학식 5로 표시되는 화합물과 클릭 반응(click reaction)시켜 화학식 1로 표시 되는 화합물을 제조하는 단계이며, 구체적으로, 화학식 2로 표시되는 화합물의 알카인과 화학식 5로 표시되는 화합물의 아자이드가 금속 이온 촉매 존재하에 클릭 반응을 통해 트리아졸을 형성하여 화학식 1로 표시되는 화 합물을 제조하는 단계이다.
- [0125] 이때, 상기 금속 이온 촉매는 클릭반응을 유도할 수 있는 촉매라면 특히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는, 구리 이온을 포함하는 촉매를 사용할 수 있고, 사익 구리 이온을 포함하는 촉매로는 CuCl_2 를 사용할 수 있다.
- [0126] 나아가, 상기 반응에서 사용 가능한 용매로는 테트라하이드로퓨란, 다이옥산, 디클로로메탄, 1,2-다이메톡시에 탄과 같은 에테르계 용매, 벤젠, 톨루엔, 자일렌과 같은 아로마틱 하이드로카본용매, 저급 알코올, 디메틸포름 아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세트나이트릴, 물, 클로로포름 등이 있으며, 이를 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0128] 상기 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법의 각 단계는 해당 분야의 당업자라면, 각 단계별 목적에 맞게 수정하거나 변경할 수 있는 범위를 포함하고, 반응 용매, 온도, 반응 시간과 같은 반응 조건은 특 별히 상술한 내용에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법은 하기 본 발명의 실시예와 같이 수행할 수 있다.
- [0130] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.
- [0131] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물을 제공한다.
- [0133] 이하, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 조성물 또는 치료용 조성물에 대 하여 상세히 설명한다.
- [0135] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 조성물 또는 치료용 조성물은 하기 화 학식 b로 표시되는 프로테아제(protease) 기질인 펩타이드 링커를 중심으로 하여, 하기 화학식 a로 표시되는 형 광 공여자(donor) 및 하기 화학식 c로 표시되는 비형광 수용체(acceptor)로 구성된다.

[0136] [화학식 a]



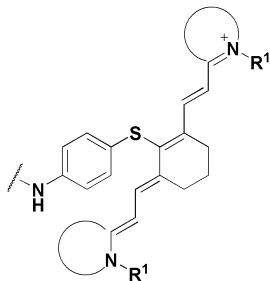
[0137]

[0138] [화학식 b]



[0139]

[0140] [화학식 c]



[0141]

[0142] (상기 화학식 a, b 및 c에서,

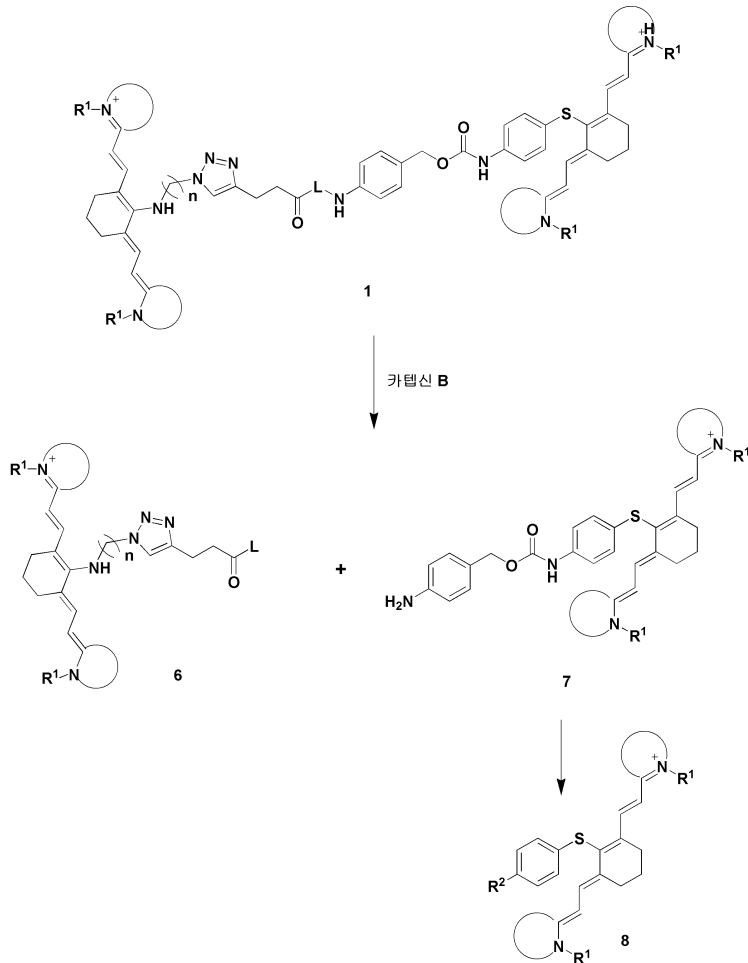
[0143] R^1 , n, L,  및  는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

[0145] 이때, 상기 화학식 b로 표시되는 화합물은 프로테아제(protease) 기질인 펩타이드 링커는 화학식 a 및 화학식 c 사이를 콘쥬게이션 시키고, 상기 화학식 a로 표시되는 화합물은 형광 공여자 역할을 하며, 상기 화학식 c로 표시되는 화합물은 비형광 수용체로서 소광제(quencher) 역할을 한다.

[0147] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 조성물 및 암 치료용 조성물은,

[0148] 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이, 화학식 1로 표시되는 화합물이 캡테신 B에 의해 분해되어 화학식 6으로 표시되는 화합물 및 화학식 7로 표시되는 화합물을 생성하는 단계를 포함하는 기작을 통하여 활성화된다.

[0149] [반응식 2]



[0150]

[0151] (상기 반응식 2에서,

[0152] R¹, n, L, 및 는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고; 및

[0153] 상기 화학식 6으로 표시되는 화합물에서, L의 카보닐과 연결된 말단은 -NH-이며, 다른 말단은 -COOH이다).

[0155] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 암 진단용 또는 암 치료용 조성물의 역할을 수행하기 위해서는 활성화가 이루어져야 하며, 상기 활성화에는 카텟신 B가 필수적으로 존재하여야 한다. 카텟신 B에 의하여, 상기 반응식 2와 같은 반응이 일어나, 화학식 6으로 표시되는 화합물 및 화학식 7로 표시되는 화합물이 생성되고, 각 화합물은 각기 다른 역할을 수행하게 된다.

[0157] 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 화학식 a로 표시되는 화합물에서 화학식 c로 표시되는 화합물로 효율적인 FRET이 일어나, 형광을 나타내지 못한다. 이에, 화학식 a 및 화학식 b를 연결하는 펩타이드 링커가 카텟신 B에 의해 절단되고, 형광 공여자인 화학식 a로 표시되는 화합물 및 수용체인 화학식 c로 표시되는 화합물이 분리되고, 이는, 강한 근적외선 형광을 유도한다.

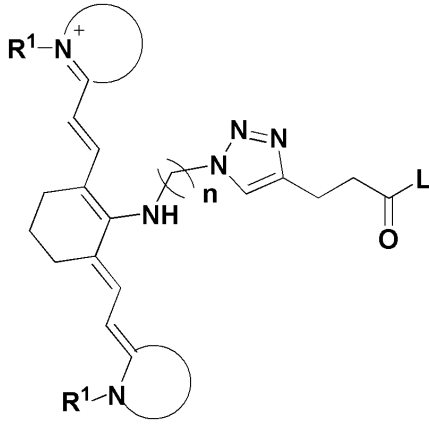
[0158] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 또는 치료용 조성물은 세포내의 카텟신 B에 의해 활성화되므로, 카텟신 B의 위치 및 활성을 시각화하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0159] 한편, 카텟신 B는 암 세포에 특이적으로 많이 존재하는 물질이므로, 본 발명에 따른 암 진단용 조성물 및 암 치

료용 조성물은 암 세포만을 특이적 및 선택적으로 진단 또는 치료할 수 있다.

[0161] 상기 반응식 2와 같은 기작에 의해 생성된 하기 화학식 6으로 표시되는 화합물은 근적외선을 조사하면 형광을 나타낸다.

[0162] [화학식 6]



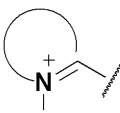
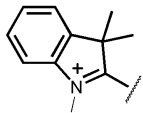
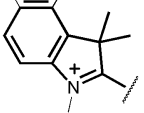
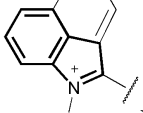
[0163]

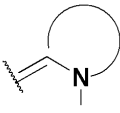
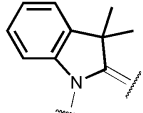
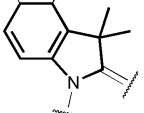
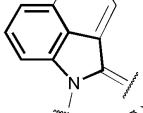
[0164] (상기 화학식 6에서,

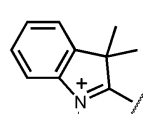
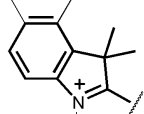
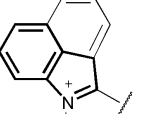
[0165] R^1 은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-10} 알킬이고;

[0166] n 은 1 내지 5의 정수이고;

[0167] L은 알라닌(Ala, A), 아르기닌(Arg, R), 아스파라긴(Asn, N), 아스파틱산(Asp, D), 시스테인(Cys, C), 글루탐산(Glu, E), 글루타민(Gln, Q), 글라이신(Gly, G), 히스티딘(His, H), 이소루신(Ile, I), 루신(Leu, L), 라이신(Lys, K), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 프롤린(Pro, P), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 트립토판(Trp, W), 티로신(Tyr, Y) 및 발린(Val, V)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 링커이되, 상기 L의 아미노산 개수는 1 내지 10이고, L의 카보닐과 연결된 말단은 -NH-이며, 다른 말단은 -COOH이고;

[0168]  는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된  ,  또는  이고;

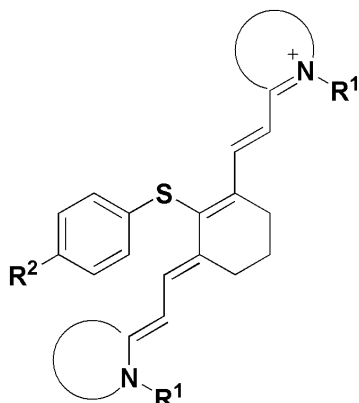
[0169]  는 각각 독립적으로 비치환 또는 치환된  ,  또는  이고; 및

[0170] 상기 치환된  ,  및  는 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-5} 알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-5} 알콕시 및 할로젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다).

[0171] 상기 화학식 6으로 표시되는 화합물은 특정 근적외선 파장대에서 강한 형광을 나타낸다.

[0173] 나아가, 본 발명은 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 근적외선 치료용 조성물을 제공한다.

[0174] [화학식 8]



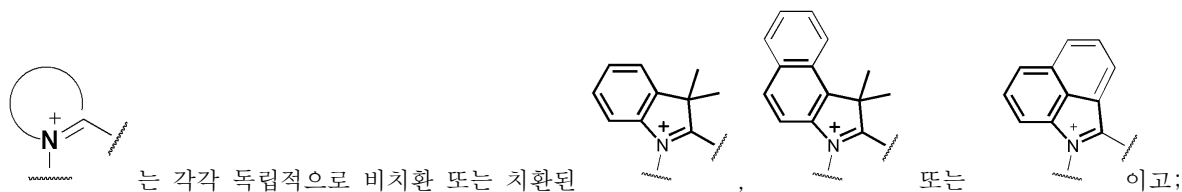
[0175]

[0176] (상기 화학식 8에서,

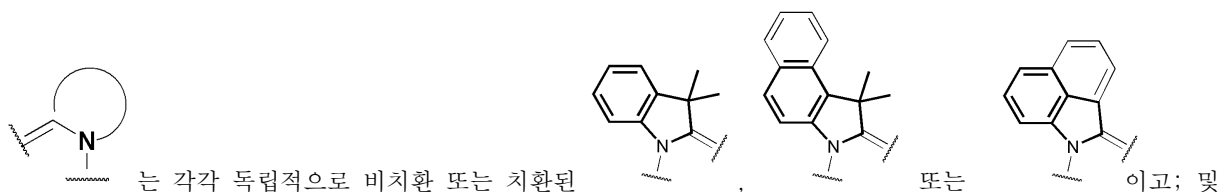
[0177] R^1 은 각각 독립적으로 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-10} 알킬이고;

[0178] R^2 는 $-NH_2$ 또는 $-NH_3^+$ 이고;

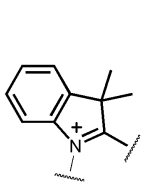
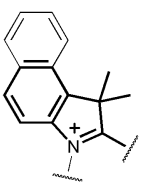
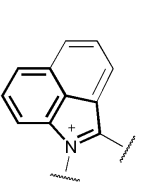
[0179]



[0180]



[0181]

상기 치환된 ,  및 는 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-5} 알킬, 직쇄 또는 측쇄의 C_{1-5} 알콕시 및 할로겐으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 치환기로 하나 이상 치환될 수 있다).

[0183]

상기 화학식 8로 표시되는 화합물은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물이 반응식 2와 같은 기작에 의해 카텡신 B로 분해되면서 생성된 화학식 7로 표시되는 화합물로부터 생성된 화합물로서, 특정 근적외선을 조사하면 강한 광독성을 나타내므로, 암의 광역학 치료(photodynamic therapy, PDT)제 및 광열 치료(photothermal therapy, PTT)제로 사용할 수 있다.

[0185]

따라서, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 또는 치료용 조성물은 카텡신

B에 의해 활성화되어 근적외선 조사하에 강한 형광을 나타내는 화학식 6으로 표시되는 화합물 및 근적외선 조사하에 강한 광독성을 나타내는 화학식 8로 표시되는 화합물로 분해되고, 카텝신 B는 정상 세포보다 암 세포에서 특이적으로 높은 활성을 나타내므로, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 또는 치료용 조성물은 암의 진단 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

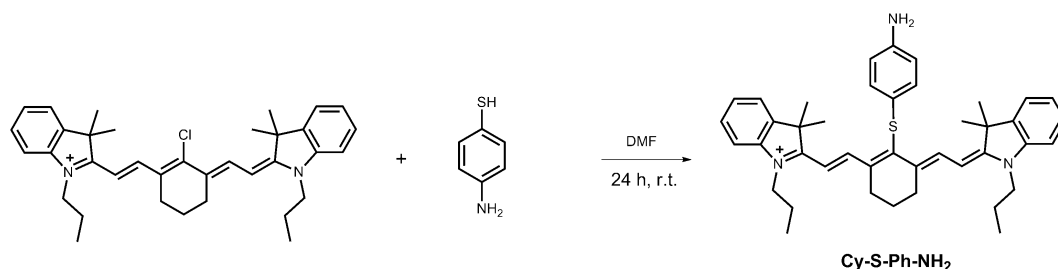
[0187] 또한, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 동물개체로부터 분리된 조직 또는 세포에 처리하는 단계를 포함하는 암의 진단방법을 제공한다.

[0189] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 상기 암 진단용 조성물은 카텝신 B에 의해 활성화되어 근적외선 조사하에 강한 형광을 나타내고, 카텝신 B는 정상 세포보다 암 세포에서 특이적으로 높은 활성을 나타내므로, 암의 진단에 유용하게 사용될 수 있으므로, 상기 암 진단용 조성물을 사용하는 본 발명의 암의 진단방법 또한 암 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

[0191] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명하나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0193] <실시예 1> 본 발명에 따른 암의 진단 또는 치료용 조성물(CyA-P-CyB)의 제조

[0194] 단계 1: Cy-S-Ph-NH₂의 제조



[0195]

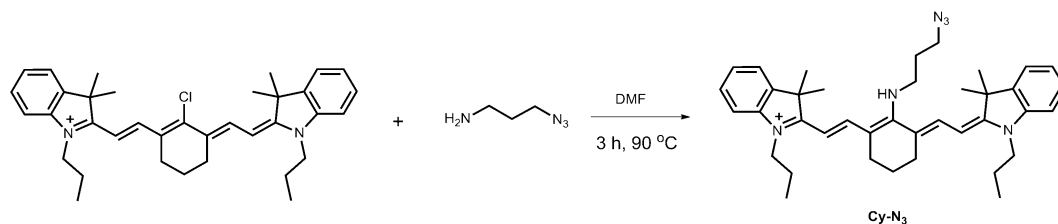
[0196] 2-((E)-2-((E)-2-클로로-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌-2-일리텐)에틸리텐)사이클로헥스-1-엔-1-일)바인)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌-1-리움(IR-780, 320 mg, 0.48 mmol)을 4-아미노티오펜올(120 mg, 0.96 mmol)과 DMF(디메틸포름아마이드, 10 mL)에서 혼합하고, 상온에서 24시간 교반시켰다. DMF를 진공하에 감압농축하고, 미정제(crude) 혼합물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂/MeOH 100 : 2)를 통하여 분리하여 Cy-S-Ph-NH₂(290 mg, yield 80%)를 얻었다.

[0197] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (d, J = 15 Hz, 2H), 7.40-7.28 (m, 4H), 7.24 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.14 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 6.64 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.23 (d, J = 14.1 Hz, 2H), 4.14 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 2.72 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.04 (m, 2H), 1.92 (m, 4H), 1.57 (s, 12H), 1.07 (t, J = 7.5 Hz, 6H);

[0198] ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 172.28, 154.40, 146.52, 145.35, 142.38, 141.13, 134.11, 128.64, 128.19, 125.02, 124.64, 122.20, 116.30, 110.70, 101.40, 49.20, 46.23, 28.06, 26.71, 20.87, 11.71;

[0199] HRMS (ESI): m/z (M)⁺ calcd for C₄₂H₅₀N₃S, 628.3720; found, 628.3807.

[0201] 단계 2: Cy-N₃의 제조



[0202]

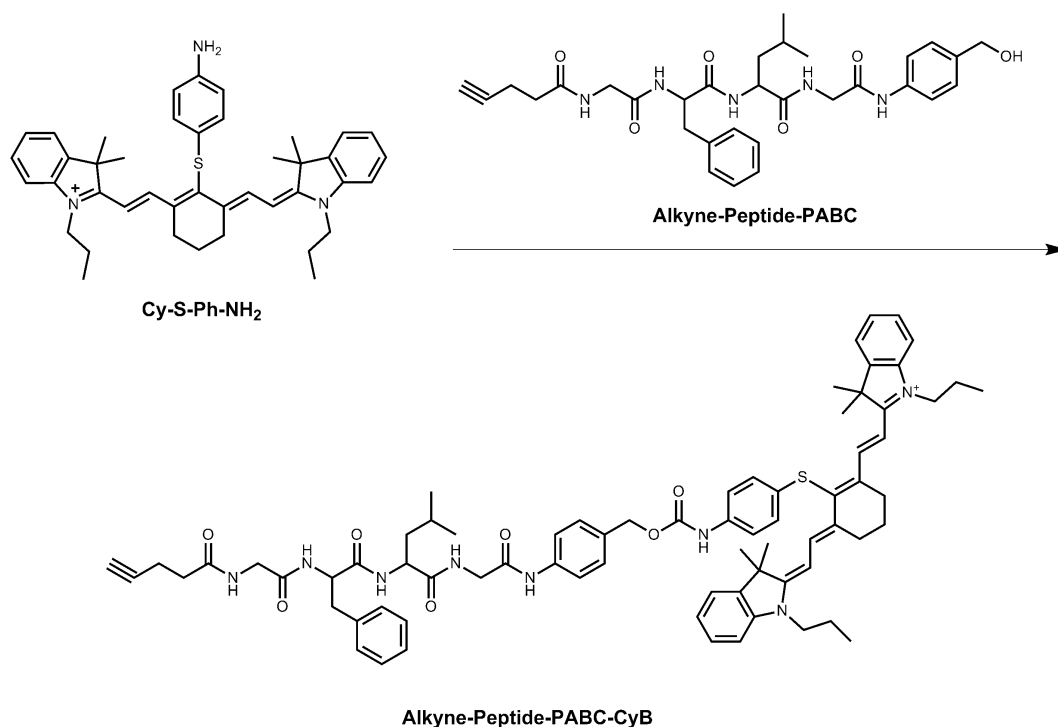
[0203] 2-((E)-2-((E)-2-클로로-3-((E)-2-(3,3-디메틸-1-프로필인돌-2-일리덴)에틸리덴)사이클로헥스-1-엔-1-일)바인)-3,3-디메틸-1-프로필-3H-인돌-1-리움(IR-780, 150 mg, 0.22 mmol)을 3-아지도프로판-1-아민 (42 mg, 0.42 mmol)과 DMF (10 mL)에서 혼합하여 90 °C에서 3시간 교반시켰다. DMF를 진공하에 감압농축하고, 미정제(crude) 혼합물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂/MeOH 100 : 2)를 통하여 분리하여 Cy-N₃(90 mg, yield 56%)를 얻었다.

[0204] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.226 (br, 1H), 7.77 (d, J = 12.9 Hz, 2H), 7.30-7.25 (m, 4H), 7.09 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 5.65 (d, J = 12.9 Hz, 2H), 4.03-3.97 (m, 2H), 3.97-3.80 (m, 4H), 3.58 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.51 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.33-2.25 (m, 2H), 1.86-1.82 (m, 6H), 1.73 (s, 12H), 1.04 (t, J = 7.5 Hz, 6H);

[0205] ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 169.15, 167.47, 140.18, 138.20, 128.00, 122.65, 122.10, 119.99, 108.37, 94.18, 53.47, 49.46, 47.84, 30.60, 29.16, 25.30, 21.56, 20.07, 11.76;

[0206] HRMS (ESI): m/z (M)⁺ calcd for C₃₉H₅₁N₆, 603.4170; found, 603.4317.

[0208] 단계 3: 알카인-펩타이드-PABC-CyB(Alkyne-Peptide-PABC-CyB)의 제조



[0209]

[0210] 상기 단계 1에서 얻은 Cy-S-Ph-NH₂ (100 mg, 0.13 mmol) 및 트리포스젠(78 mg, 0.26 mmol)의 무수 CHCl₃(10 mL)에서 무수 DIPEA(디이소프로필에틸아민, 85 mg, 0.65 mmol)를 적하첨가하였다. 상기 용액을 상온에서 8시간 교반시켰다. 미반응된 포스젠 가스를 아르곤 퍼지로 제거한 후, 상기 혼합물에 알카인-펩타이드-PABC(Alkyne-

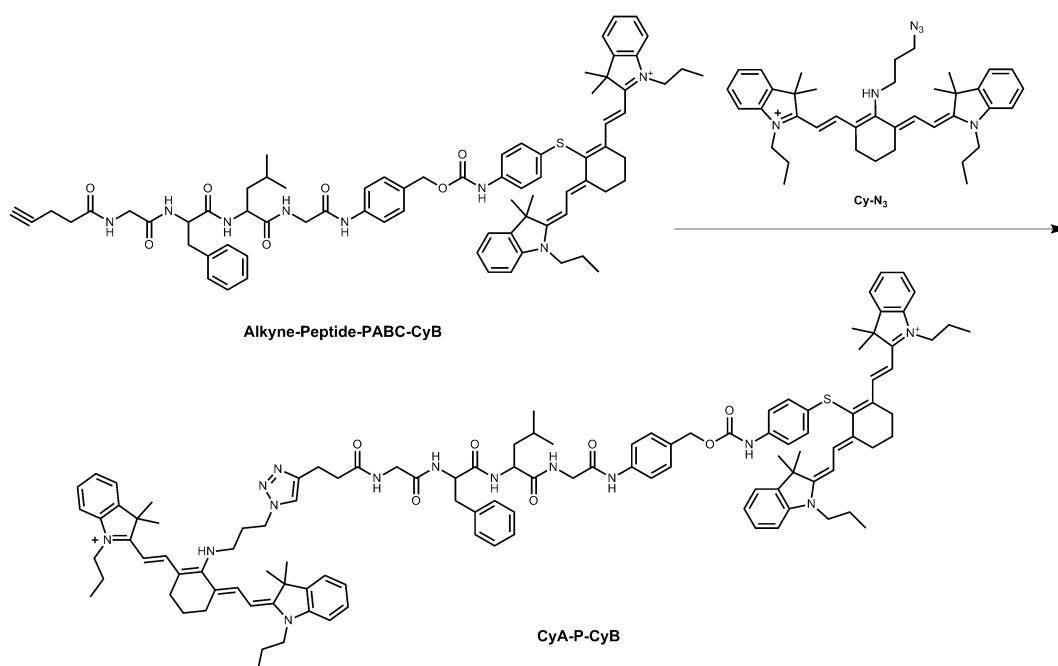
Peptide-PABC, 74 mg, 0.13 mmol, DgPeptides Co., Ltd, Hangzhou, China 에서 구매) 및 DMAP (디메틸아미노피리딘, 32 mg, 0.26 mmol)의 CHCl₃ 용액을 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 밤샘 교반시켰다. 용매를 증발시킨 후, 잔여물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂/MeOH 100 : 7)를 통하여 분리하여 알카인-펩타이드-PABC-CyB(85 mg, yield 53%)를 얻었다.

[0211] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.69 (d, J = 14.1 Hz, 2H), 8.55 (s, 1H), 8.47-8.43 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.50 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.33-6.99(m, 21H), 6.05 (d, J =14.1 Hz, 2H), 4.91 (s, 2H), 4.34-4.27 (m, 2 H), 3.96-3.89 (m, 6H), 3.78-3.41 (m, 2H), 3.18-2.95 (m, 2H), 2.62 (t, J = 6 Hz, 4H), 2.41 (t, J =12 Hz, 2H), 2.28-2.08 (m, 2H), 1.97-1.93 (m, 2H), 1.84-1.77 (m, 5H), 1.68-1.60 (m, 2H), 1.43 (s, 12H), 1.35-1.28 (m, 1H), 0.98 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.83 (d, J =6.9 Hz, 6H);

[0212] ¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 173.68, 173.38, 172.71, 172.24, 168.22, 153.55, 146.66, 142.08, 141.06, 138.22, 135.70, 133.41, 129.59, 129.15, 128.87, 128.72, 127.20, 126.97, 125.46, 122.40, 120.45, 110.62, 100.97, 82.99, 69.09, 56.05, 52.98, 49.35, 45.99, 43.67, 39.46, 36.05, 34.49, 28.01, 26.39, 24.49, 23.28, 20.95, 20.84, 14.21, 11.68;

[0213] HRMS (ESI): m/z (M)⁺ calcd for C74H87N8O7S⁺, 1231.6413, found, 1231.6424; m/z (M)²⁺ calcd for C74H88N8O7S²⁺, 616.3243, found, 616.3276.

[0215] 단계 4: CyA-P-CyB의 제조



[0216]

[0218] 아스코로베이트 소듐(4 mg, 0.02 mmol) 및 CuCl₂ (1 mg, 0.007 mmol)를 포함하는 MeOH-H₂O (5 mL, 1:4, v/v) 용액에 상기 단계 3에서 제조한 알카인-펩타이드-PABC-CyB (40 mg, 0.03 mmol) 및 상기 단계 2에서 제조한 Cy-N₃ (24 mg, 0.03 mmol)의 CH₂Cl₂(10 mL)를 첨가하였다. 상기 반응액을 36시간 교반시킨 후, 물층을 비분리하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 건조하고 용매를 진공하에 증발시켰다. 잔여물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂/MeOH 100 : 5)를 통하여 분리하여 CyA-P-CyB(25 mg, yield 45%)를 얻었다.

[0219] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.73-8.69 (m, 3H), 8.2 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 7.84-7.65 (m, 8H), 7.56 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.46 (d, J =9 Hz, 2H), 7.36-7.07 (m, 21H), 7.02 (t, J = 7.2 Hz, 2 H), 6.86 (d, J = 9Hz, 2

H), 6.13 (d, J = 15 Hz, 2H), 5.63 (d, J = 12.9 Hz, 2H), 4.97 (s, 2H), 4.51-4.29 (m, 4H), 4.03-3.95 (m, 6H), 3.89-3.73 (m, 6H), 3.59-3.52 (m, 2H), 3.38-3.16 (m, 2H), 2.91 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 2.69 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.53-2.43 (m, 6H), 2.03-1.99 (m, 2H), 1.90-1.75 (m, 14H), 1.63 (s, 12H), 1.48 (s, 12H), 1.29-1.27 (m, 1H), 1.05-0.98 (m, 12H), 0.80-0.75 (m, 6H);

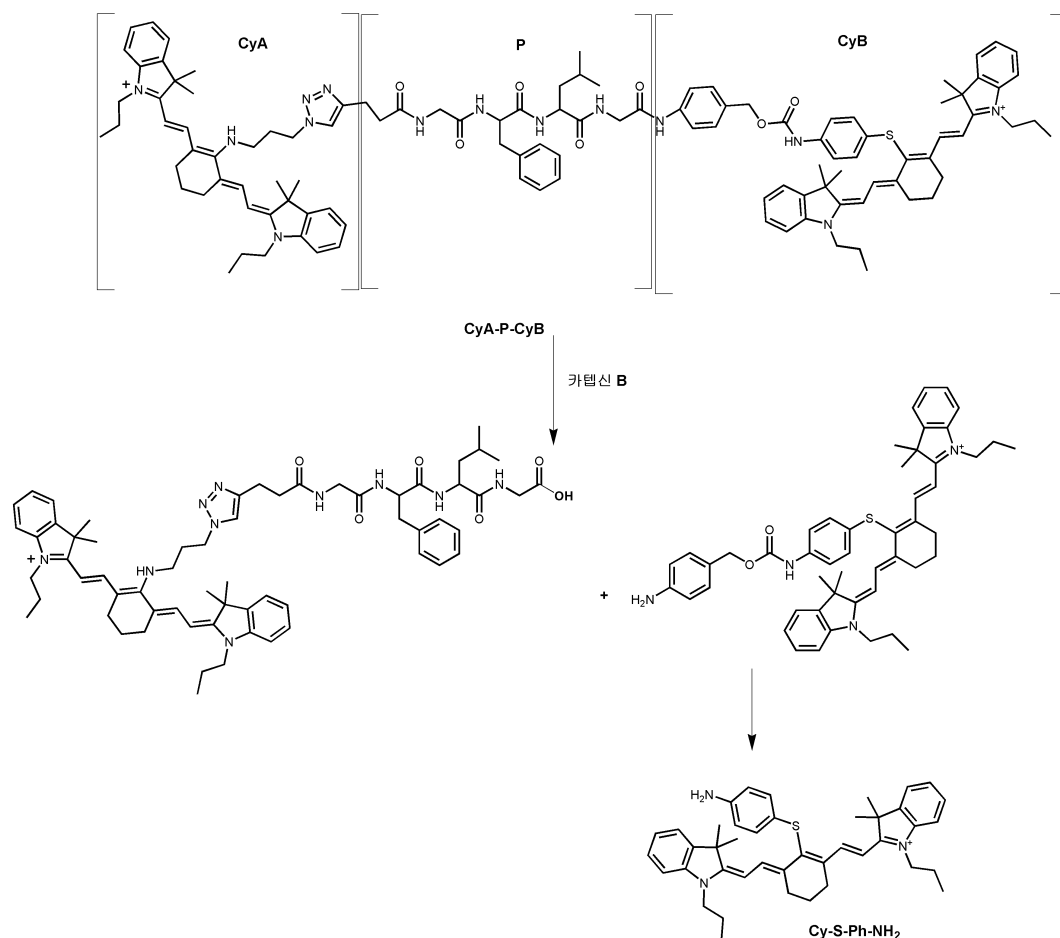
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 175.09, 173.37, 172.92, 172.58, 171.95, 168.95, 168.29, 167.75, 162.55, 153.61, 146.59, 146.51, 143.09, 142.15, 141.08, 140.14, 137.95, 137.13, 133.60, 129.41, 128.90, 128.69, 128.61, 128.05, 126.96, 125.33, 122.85, 122.34, 122.13, 120.49, 120.19, 110.71, 110.35, 108.57, 107.74, 101.16, 94.56, 65.30, 53.46, 49.30, 47.85, 47.56, 46.08, 44.86, 36.51, 31.92, 31.44, 29.70, 29.65, 29.36, 29.15, 29.10, 28.01, 26.49, 25.48, 24.58, 23.24, 23.26, 21.44, 21.01, 20.86, 20.11, 14.13, 11.76, 11.69, 11.11;

MS (ESI): m/z (M)²⁺ calcd for C₁₁₃H₁₃₈N₁₄O₇S²⁺, 918.0; found, 918.0.

<실험예 1> 카텝신 B에 의한 암의 진단 또는 치료용 조성물의 활성화

본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 진단 또는 치료용 조성물이 하기 반응식 3에 나타낸 바와 같이, 카텝신 B에 의하여 활성화되는 것을 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 2a 및 2b에 나타내었다.

[반응식 3]



구체적으로, 카텝신 B는 DL-디테오트레톨(DTT, 60 mM)/EDTA (30 mM, 5 μL)에서 상온에서 60분간 첫번째로 활성화 시킨 후, 상기 실시예 1에서 제조한 암의 진단 또는 치료용 조성물(CyA-P-CyB)을 초기 농도가 1 mM이 되도록 DMSO에 용해킨 용액에 첨가하여 반응 버퍼(25 mM 아세트이트, 1.0 mM EDTA, pH 5.0, 및 500 μM GSH)에서 다양한 시간 간격으로 배양하였다. CyA-P-CyB 및 카텝신 B의 최종 농도는 각각 10 μM 및 10 μg/mL이었다. 상기 효

소적 반응은 650 nm의 여기 파장에서 형광 분광기로 측정하면서 관찰하였다.

[0228] 저해 실험은 상기와 동일한 조건에서 100 μ M 칼페인 저해제 I를 첨가하여 수행하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0230] 도 2a는 $\lambda_{ex} = 650$ nm에서의 Cy-S-Ph-NH₂의 흡광 스펙트럼(붉은선) 및 Cy-N₃의 발광 스펙트럼(검은선)을 나타낸 그래프이고, 도 2b는 버퍼용액(25 mM 아세테이트, 1.0 mM EDTA, pH 5.0, 및 500 μ M GSH)에서 카텡신 B로 배양된 후, $\lambda_{ex} = 650$ nm에서의 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB의 발광 스펙트라의 시간에 따른 변화를 나타낸 그래프이다.

[0231] 도 7은 카텡신 B(10 μ g/mL) 및 칼페인 저해제 I(100 μ M) 존재 하에 버퍼 용액(25 mM 아세테이트, 1.0 mM EDTA, pH 5.0, 500 μ M GSH)에서 서로 다른 배양시간으로 배양하여 $\lambda_{ex} = 650$ nm에서의 CaA-P-CyB의 흡광 스펙트라를 나타낸 그래프이다.

[0233] 도 2a에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 단계 1에서 제조된 Cy-S-Ph-NH₂의 흡광과 단계 2에서 제조된 Cy-N₃의 발광 사이에 스펙트럼 중첩이 일어남을 알 수 있으며, 이는, Cy-S-Ph-NH₂에 포함된 CyB 모이어티가 CyA 공여자를 위한 효과적인 수용체임을 나타내며, CyB는 형광은 발광하지 않고, FRET 시스템에서 소광자 역할을 수행함을 나타낸다.

[0234] 또한, 도 2b에 나타난 바와 같이, 시간이 경과함에 따라 720 nm의 파장에서 형광의 강도가 증가하는 것을 알 수 있으며, 이는, CyA의 발광이 일어나고 있음을 나타내며, 카텡신 B에 의하여 CyA-P-CyB가 활성화 되었음을 나타낸다.

[0235] 나아가, 도 7에 나타난 바와 같이, 카텡신 B가 저해될 경우, 형광의 증가가 관찰되지 않음을 알 수 있으며, 이는 카텡신 B가 CyA-P-CyB를 활성화 시킴을 나타낸다.

[0237] <실험예 2> 808 nm 레이저 조사에 의한 Cy-S-Ph-NH₂로부터 일중항 산소 생성

[0238] 410 nm 여기 하에 808 nm 레이저로 조사하기 전에 Cy-S-Ph-NH₂ (10 μ M)를 포함하는 수용액에서 레이저 조사 시간이 0 (t = 0) 일때, 형광으로 표시되는 DPBF(10 μ M) 형광을 측정하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0239] 상기 용액을 근적외선 빛(808nm, 0.5 W/cm²)으로 5분까지 조사하면서, 10 s, 30 s, 1 min, 2 min, 및 5 min에서의 발광 스펙트라(430 nm-600 nm)를 측정하였다.

[0240] 대조군은 레이저 조사를 하지 않는 것을 제외하고 동일한 조건에서 실험을 수행하였다.

[0242] 도 8은 일중항 산소 생성 및 808 nm 레이저 조사후 Cy-S-Ph-NH₂의 광열 효과의 분석을 나타낸 그래프로, 도 8a는 $\lambda_{ex} = 410$ nm에서 Cy-S-Ph-NH₂ (10 μ M)존재 하에 808 nm 레이저(0.5 w/cm²)를 사용하여 다양한 레이저 조사 시간시간에 따른DPBF (10 μ M)의 형광 스펙트라를 나타낸 그래프이고, 도 8b는 레이저를 조사하지 않았을 경우, Cy-S-Ph-NH₂ (10 μ M) 존재하에서 DPBF (10 μ M)의 형광 스펙트라를 나타낸 그래프이다.

[0244] 도 8a에 나타난 바와 같이, Cy-S-Ph-NH₂ 및 DPBF를 함유하는 용액을 808 nm 레이저로 조사한 후, 레이저 조사 시간이 증가함에 따라 480 nm에서 DPBF의 형광이 점차적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 대조적으로, 도 8b에 나타난 바와 같이, 레이저를 조사하지 않았을 경우에는 변화가 관찰되지 않는 것을 알 수 있었다. 이는, Cy-S-Ph-NH₂ 용매에서의 일중항 산소의 생성은 근적외선 레이저의 조사에 의한 것임을 나타낸다.

- [0246] <실험예 3> 808 nm의 레이저 조사 후, Cy-S-Ph-NH₂의 광열 효과 측정
- [0247] 수용액에서의 Cy-S-Ph-NH₂의 광열 효과를 측정하기 위하여, Cy-S-Ph-NH₂ (10 M)를 큐벳의 위에서 아래의 조명 방향으로 808 nm 레이저 조사(2 W/cm²)에 노출시켰다. 음성 대조군은 상기와 동일한 양의 물에 동일한 레이저를 조사하였다. 용액의 온도는 0 s, 30 s, 1 min, 1.5 min, 2.0 min, 2.5 min, 3.0 min, 3.5 min, 4.0 min, 4.5 min 및 5 min에서 적외선 이미징 기기(FLIR E5)로 측정하였다. 그 결과는 도 8c에 나타내었다.
- [0249] 도 8c는 Cy-S-Ph-NH₂ (■) 및 물 (●)에 808 nm 레이저(2 W/cm²)를 조사하였을 때 시간에 따른 온도 변화를 나타낸 그래프이다.
- [0251] 또한, 도 8c에 나타난 바와 같이,
- [0252] 5분간의 레이저 조사 후, 대조군인 물에서는 뚜렷한 온도 변화가 감지되지 않은 반면, Cy-S-Ph-NH₂ 용액의 온도는 6 ° C 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는, 근적외선을 조사할 경우, Cy-S-Ph-NH₂이 빛을 흡수하여 열로 전달시킬 수 있음을 나타내며, 빛 에너지를 열 에너지로 전환시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0254] <실험예 4> PEG-PLA로 CyA-P-CyB의 캡슐화(Encapsulation)(CyA-P-CyB가 봉입된 PEG-PLA 나노입자의 제조)
- [0255] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단 또는 치료용 조성물의 물에 대한 용해성을 증가시키고, 혈액내에서의 방출(clearance)을 늦추기 위하여, PEG-PLA로 미셀구조를 형성하여 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 봉입한 나노입자를 제조하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0257] CyA-P-CyB (5 mg) 및 PEG₅₀₀₀-PLA₃₀₀₀ (45 mg, Daigang Biomaterial Co., Ltd, Jinan, China 에서 구매)(CyA-P-CyB 및 PEG₅₀₀₀-PLA₃₀₀₀의 무게 비 = 1:9)를 CH₂Cl₂ (0.5 mL)에 교반시키면서 완전히 용해시키고, 박막(thin film)을 얻기 위하여 로터기 증발기(rotary evaporation)로 2시간 건조하였다. 그 후, 미셀 용액(micellar solution)을 형성하기 위하여 탈이온수(deionized water, 10 mL)를 적하첨가하였다. CyA-P-CyB가 봉입된 PEG-PLA 나노입자의 크기는 동적 레이저 산란 분광계(dynamic laser scattering spectrometer)를 사용하여 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0259] 도 9는 동적 레이저 산란을 통해 PEG-PLA/CyA-P-CyB 나노 입자의 특성을 분석한 그래프이다.
- [0261] 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 CyA-P-CyB가 봉입된 PEG-PLA 나노입자의 크기는 230.9 nm이고, 분산액 지수(polydispersion index, PDI)는 0.461임을 알 수 있었다.
- [0263] <실험예 5> 생체내에서의 CyA-P-CyB의 근적외선 형광 분석
- [0264] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 조성물의 근적외선 형광을 분석하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 5a에 나타내었다.
- [0266] 모든 동물의 절차는 연세 대학교에서 기관 동물 관리위원회에 의해 승인되었다. H640 폐암세포 (각 마우스당 1.0 x 10⁷ 세포)를 수컷 BALB/c 누드 마우스에 피하 주사 투여하였다. 암의 부피가 거의 100 mm³에 도달하였을 때, 실험예 4에서 제조한 PEG-PLA/CyA-P-CyB 캡슐 (2 mg/kg)을 상기 마우스에 정맥주사하였다.
- [0267] 근적외선 이미지는 PEG-PLA/CyA-P-CyB 주사 후, 각 0, 1, 2, 4, 8, 11, 24, 32 및 48 시간마다 동물 광학 이미

징 시스템(IVIS, Caliper Life Sciences)을 사용하여 캡처하였다.

- [0269] 도 5a는 PEG-PLA/CyA-P-CyB를 정맥 주사한 후, 48 시간이 경과할 때 까지의 담암 마우스의 근적외선 이미징(종양은 점선원으로 표시)이다.
- [0271] 도 5a에 나타난 바와 같이, PEG-PLA/CyA-P-CyB를 정맥 주사 11시간 경과 후, 형광 신호가 종양이 있는 지점까지 도달한 것을 알 수 있었다. 이는 CyA-P-CyB가 종양에 축적될 수 있음을 나타낸다. PEG-PLA/CyA-P-CyB를 정맥 주사 24시간 경과 후, 형광 신호가 점차 감소함을 알 수 있다. 이는, 레이저 조사를 위한 최적의 시간이 CyA-P-CyB 주사 후, 24시간이 경과한 후라는 것을 나타낸다. 대조적으로, PEG-PLA만을 처리했을 때는, 유의적인 형광 신호가 나타나지 않음을 알 수 있다.
- [0273] <실험예 6> 생체내에서의 CyA-P-CyB의 광선치료 효과 측정
- [0274] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 치료용 조성물의 광선 치료 효과를 측정하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하여 그 결과를 도 5b 및 5c에 나타내었다.
- [0275] 구체적으로, H640 폐암세포 (각 마우스당 1.0×10^7 세포)를 수컷 BALB/c 누드 마우스에 피하 주사 투여하였다. 암의 부피가 거의 $100-200 \text{ mm}^3$ 에 도달하였을 때, 실험군 마우스에 실험예 4에서 제조한 PEG-PLA/CyA-P-CyB 캡슐 (5 mg/kg , $n = 3-6$)을 매일 4일간 정맥주사하였다. 대조군 마우스에 동일한 양의 PEG-PLA ($n = 3$)를 투여하였다. PEG-PLA/CyA-P-CyB 주사 24시간이 경과한 후, 상기 마우스에 5분간 808 nm 의 레이저(1 W/cm^2)를 조사하였다. 종양 직경은 Vernier caliper를 사용하여 측정하였다. 종양의 부피(V)는 하기 수학적 식 1에 의해 계산되었다.
- [0276] [수학적 식 1]
- [0277]
$$V = \pi \times (W \times H \times D)/6$$
- [0278] 상기 수학적 식 1에서, W는 가장 작은 종양의 직경이고, H는 가장 큰 종양의 직경이고, 및 D는 종양의 두께이다.
- [0279] 상대적인 종양의 부피는 V/V_0 (V_0 는 처리 시작 전의 종양의 최초 부피)로 계산되었다.
- [0280] 상기 데이터는 $\pm \text{SEM}$ 값으로 나타내었다. 다양한 군은 ANOVA를 사용하여 비교하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 설정하였다.
- [0282] 도 5b는 H640 종양이 있는 마우스에 그래프에 표시된 물질을 정맥 주사한 후 시간에 따른 종양 성장 정도를 측정한 그래프(빨간 화살표는 PEG-PLA/CyA-P-CyB의 정맥주사 시작을 나타내고, 파란 화살표는 레이저 조사일을 나타낸다)이고, 도 5c는 서로 다른 처리 후의 H640 종양이 있는 마우스의 사진이다.
- [0284] 도 5b에 나타난 바와 같이, 주사 24시간 경과 후, 마우스에 근적외선 레이저를 조사하였다. PEG-PLA/CyA-P-CyB 주사 및 레이저를 조사한 마우스의 종양은 PEG-PLA만을 주사하거나, PEG-PLA 주사와 레이저 조사를 동시에 수행하거나, PEG-PLA/CyA-P-CyB 주사후, 레이저 조사를 하지 않은 마우스보다 현저하게 작아진 것을 확인하였다.
- [0285] 도 5c에 나타난 바와 같이, PEG-PLA/CyA-P-CyB 주사 및 레이저 조사를 수행한 마우스의 종양 부피는 다른 세 그룹의 마우스의 종양 부피와 비교하여 1/3 수준인 것을 알 수 있었다.
- [0286] 상기와 같은 결과는 CyA-P-CyB가 종양 성장 억제에서 현저한 광선치료 효능을 나타내는 것을 증명한다.
- [0288] <실험예 7> 생체내에서의 CyA-P-CyB 독성 평가
- [0289] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 치료용 조성물의 생체내에서의 독성

을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 6a 내지 6c에 나타내었다.

[0291] 구체적으로, 수컷 BALB/c 누드 마우스에 동일한 양의 PEG-PLA(n = 3) 또는 PEG-PLA/CyA-P-CyB (20 mg/kg, n = 3-6)를 정맥 주사하였다. 수컷 BALB/c 누드 마우스 (n = 3-6)는 PEG-PLA/CyA-P-CyB (50 mg/kg, 마우스 당 200 마이크로리터)를 4일간 매일 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다. 대조군으로 사용하기 위한 BALB/c 누드 마우스 (n = 3)은 동일한 양의 PEG-PLA를 주사하였다. 14일 경과 후, 상기 마우스들을 안락사 시키고, 폐, 간, 심장, 신장, 췌장 비장 및 뇌를 적출하고, 포르말린에 고정한 후, 세포 증식 및 세포사멸을 H&E 염색 및 면역 조직화학을 사용하여 병리조직학적으로 분석하였다.

[0292] 세포 증식 분석을 위하여, 파라핀 고정된 조직으로부터의 분획을 파라핀제거화하고, 재수화한 후, 항원을 조직으로부터 섹션 은 재수 탈 파라핀 한 후 항원검색하였다. 내인성 퍼옥시다아제 및 단백질을 차단한 후, 상기 조직을 2차 토기 IgG(Dako, Denmark)에 이어, 항-Ki-67 항체로 배양하고, DAKO Envision+ System-HRP DAB (Dako, Denmark)으로 검출하였다. 상기 분획은 헤마톡실린(Sigma-Aldrich, USA)으로 대조염색하였다. 세포사멸 분석은 TUNEL 분석 키트(Life Technologies, USA)를 사용하여 수행하였다. 세포의 핵은 DAPI 염색을 통하여 시각화하였다.

[0294] 도 6은 생체내에서의 CyA-P-CyB의 독성; 및 세포증식 및 세포사멸에서의 CyA-P-CyB의 효과;를 나타낸 그래프로, 도 6a는 PEG-PLA 또는 PEG-PLA/CyA-P-CyB (20 mg/kg)를 정맥주사하여 14일이 경과된 후의 마우스에서 적출한 장기(폐, 간, 심장, 신장, 췌장, 비장 및 뇌)의 조직학적 분석결과를 나타낸 그래프이고, 도 6b는 종양의 세포 증식 및 세포사멸을 측정된 사진이고, 도 6c는 TUNEL 분의 정량화를 나타낸 그래프이다. 도 6b에서, 세포증식은 Ki-67 항체로 조직 염색하여 측정되며, 갈색으로 표시된다. 핵(nuclei)은 헤마톡실린으로 대비염색되었다. 세포 사멸은 TUNEL 분석(assay)를 사용하여 측정되었다. 녹색은 양성 신호를 나타낸다. 핵은 DAPI 염색(파란색)을 통해 시각화되었다. 도 6c에서 양성 신호는 각 슬라이드는 슬라이드당 5 프레임에서 카운트 된 것이다. 실험 결과는 $\pm$ SEM (n = 3-6) 값으로 표시하였다(** P < 0.01, 대조군 (PEG-PLA), 레이저 처리한 대조군(PEG-PLA) 또는 PEG-PLA/CyA-P-CyB 그룹과 각각 비교)

[0296] 도 6a에 나타난 바와 같이, PEG-PLA/CyA-P-CyB 또는 PEG-PLA를 꼬리 정맥으로 주사한 마우스에서 CyA-P-CyB의 독성을 평가한 결과, PEG-PLA/CyA-P-CyB(20 mg/kg) 주사군의 마우스는 죽지 않고, 16일간 생존하였다. PEG-PLA 또는 PEG-PLA/CyA-P-CyB (20 mg/kg)를 주사한 후, 14일이 경과한 마우스로부터 7개의 장기(폐, 간, 심장, 신장, 췌장, 비장 및 뇌)를 얻었으며, H&E 염색을 사용하여 독성을 평가하였다. 7개 장기의 분획에서는 뚜렷한 병변(괴사, 부종, 염증성 침윤, 또는 과형성)은 없었다. 이러한 병리조직학적 결과는 CyA-P-CyB가 마우스에서 세포독성 효과를 가지지 않음을 나타낸다.

[0298] 도 6b에 나타난 바와 같이, PEG-PLA를 주사하여 레이저 조사를 수행 또는 비수행한 마우스 및 PEG-PLA/ CyA-P-CyB를 주사하고 레이저 조사를 수행 또는 비수행한 종양덩어리에서 세포증식 및 세포사멸을 분석한 결과, 세포 증식은 항 Ki-67 염색 처리하여 측정하였고, PEG-PLA/CyA-P-CyB 주사 및 레이저 처리한 마우스 군에서 그렇지 않은 나머지 군들의 마우스에서보다 세포증식이 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[0300] 도 6c에 나타난 바와 같이, TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) 염색을 사용하여 수행된 세포사멸 분석에서, PEG-PLA/CyA-P-CyB 및 레이저를 처리한 마우스군에서 세포사멸이 감소한 것을 확인하였고, 반면, 그렇지 않은 나머지 군들에서는 사멸된 세포의 수가 현저하게 증가한 것을 확인하였다.

[0302] <실험예 8> CyA-P-CyB의 형광 이미징 분석

[0303] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단용 조성물의 형광 이미징을 분석하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하여 그 결과를 도 3a 내지 3d에 나타내었다.

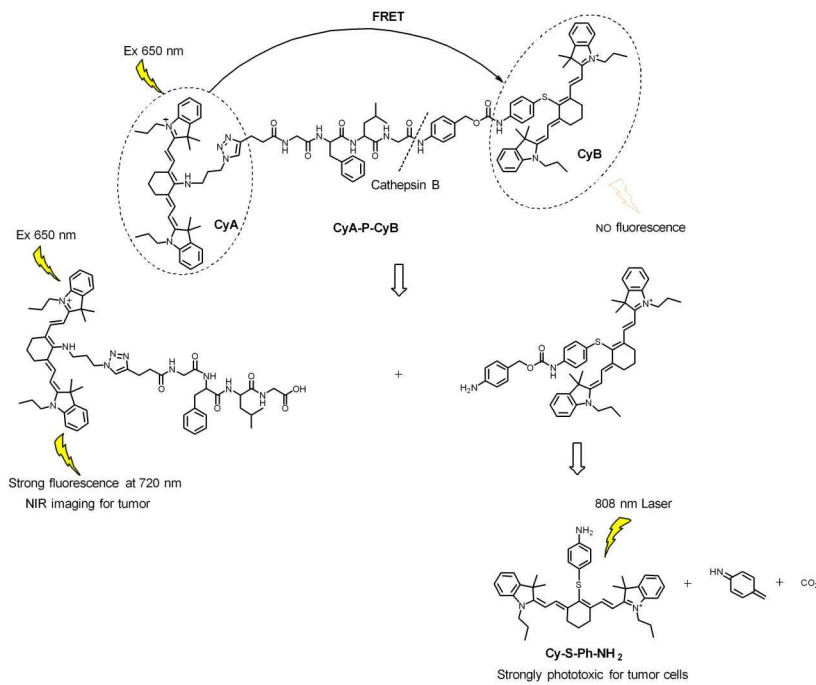
- [0305] 구체적으로, 도 3a는 전처리 과정을 거치지 않은 헬라 세포, 도 3b는 150 μM H_2O_2 를 24시간, 도 3c는 10 μM 캠토테신(camptothecin)을 24시간, 도 3d는 30 nM 칼페인 저해제 I(calpain inhibitor I)을 30분간 처리한 후, 각각의 세포를 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB 10 μM 로 2시간 배양하였다. 상기 세포는 각각 DPBS로 세척하고, 공초점 현미경(confocal microscopy)으로 형광이미지를 얻었다. 라이소트랙커(LysoTracker)를 사용하여 상기 세포를 co-stain시켰다(상부: CyA-P-CyB 처리(ex. 635 nm/em. 655 - 755 nm), 중부: LysoTracker 염색(ex. 405 nm/em. 430 - 455 nm), 하부: DIC로 병합. 스케일 바: 10 μm).
- [0307] 도 3a 내지 3d는 세포에서의 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB의 형광 이미징을 나타낸 사진이다.
- [0308] 표 3a에 나타난 바와 같이, HeLa 세포를 CyA-P-CyB(10 μM)으로 2시간 동안 전처리하였을 때, LysoTracker가 파란 형광을 나타내고 있는 리소좀(lysosome)에서 근적외선 형광이 관찰되었고, 이는 CyA-P-CyB가 리소좀의 카텡신 B를 이미지화 할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0310] 도 3b 및 3c에 나타난 바와 같이, DNA 손상을 야기하는 DNA 토모아이스머라제 I 저해제를 활성화시키는 150 μM 의 H_2O_2 (활성산소, ROS) 또는 10 μM 의 캠토테신(CPT)를 세포에 처리하였을 때, 세포질에서 확산된 형광이 증가한 것을 확인하였다. 이는 H_2O_2 또는 CPT 및 카테신에 의해 LMP(리소좀 막 투과화, lysosome membrane permeabilization)가 유도되었음을 나타내고, 카테신이 리소좀 루멘에서 세포질로 이동되었음을 나타낸다.
- [0311] 도 3d에 나타난 바와 같이, CyA-P-CyB로 배양하기 전에 칼페인 저해제 I을 전처리한 HeLa 세포에서는 근적외선 형광이 관찰되지 않았으며, 이는 카테신 B에 의해 CyA-P-CyB가 절단됨으로 인하여 근적외선 발광이 일어남을 나타낸다.
- [0313] <실험예 9> CyA-P-CyB이 세포 성장에 미치는 영향 분석
- [0314] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 치료용 조성물의 세포 성장에 미치는 영향을 분석하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 4a 내지 4e에 나타내었다.
- [0316] 구체적으로, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물 CyA-P-CyB의 존재하에, 레이저 조사 및 카텡신 B 저해제 I를 처리 또는 비처리 때의 세포 성장의 MTT 측정 결과를 그래프로 나타내었다.
- [0317] 도 4a는 U87 세포에서, 도 4b는 A549 세포에서 다양한 농도의 CyA-P-CyB로 16시간 배양한 후, CyA-P-CyB를 제거하였다. 상기 세포에 808 nm의 레이저(2 W/cm^2 , 10 min)를 조사하여 24시간 배양하였다.
- [0318] 도 4c는 U87 세포에서, 도 4d는 A549 세포에서 칼페인 저해제 I 30 nM로 30분간 전처리하고, 5 μM 의 CyA-P-CyB로 16시간 배양한 후, CyA-P-CyB를 제거하였다. 상기 세포에 808 nm의 레이저(2 W/cm^2 , 10 min)를 조사하여 24시간 배양하였다. 도 4e는 세포를 5 μM 의 CyA-P-CyB로 16시간 배양한 후, CyA-P-CyB를 제거하였다. 상기 세포에 808 nm의 레이저(2 W/cm^2 , 10 min)를 조사하여 24시간 배양하였다. 도 4a 내지 4e의 결과는 세번의 독립적인 실험의 $\pm$ 평균 표준 편차 값을 표현하였다.
- [0320] 도 4a 및 4b는 레이저 조사를 수행 또는 비수행하였을 때의 세포 독성 효과를 나타낸 그래프이고, 도 4c 및 4d는 카텡신 B 저해제를 처리 또는 비처리하였을 때의 세포독성을 나타낸 그래프이고, 도 4e는 정상 세포와 암세포에서의 세포독성의 비교를 나타낸 그래프이다.

[0322] 도 4a 내지 4e에 나타난 바와 같이, MTT 분석법을 사용하여 CYA-P-CYB가 농도 의존적으로, 종양 세포의 세포 생존능력이 감소하는 것을 확인함으로써, CYA-P-CYB가 종양 세포에서 광독성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한, 카텝신 B 저해제를 사용하였을 때, 세포 생존도의 감소 정도가 줄어드는 것으로 보아, CYA-P-CYB의 광독성은 카텝신 B의 활성화에 의존적임을 확인하였다.

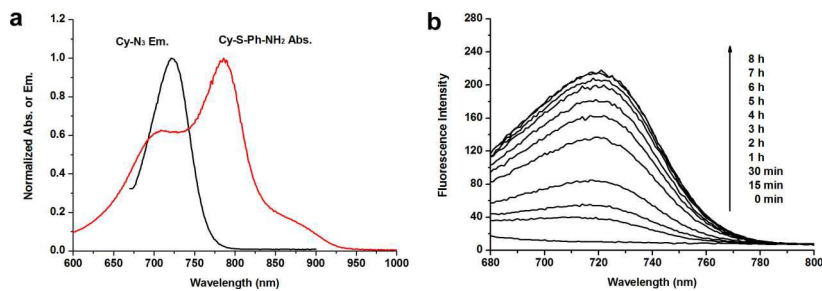
[0324] 따라서, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물은 카텝신 B에 의해 활성화 되어 암세포에서 특이적 및 선택적으로 암세포의 형광 이미징 또는 암세포에 광독성 및 강력한 광선치료 효과를 나타내므로, 암의 진단 또는 치료를 동시에 수행할 수 있는 다기능성 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면

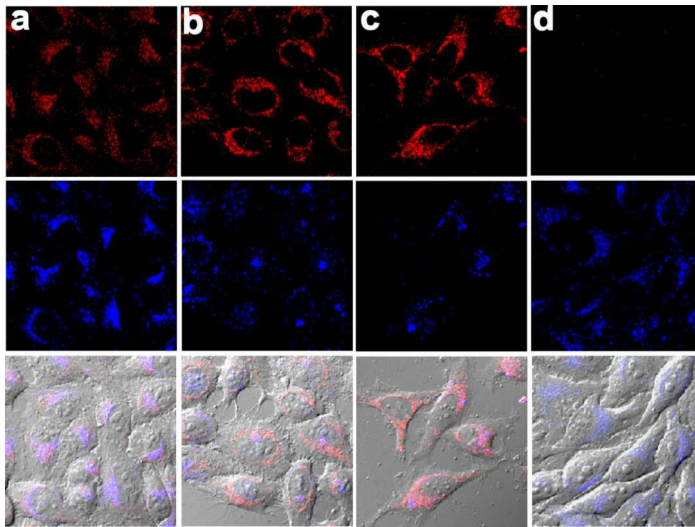
도면1



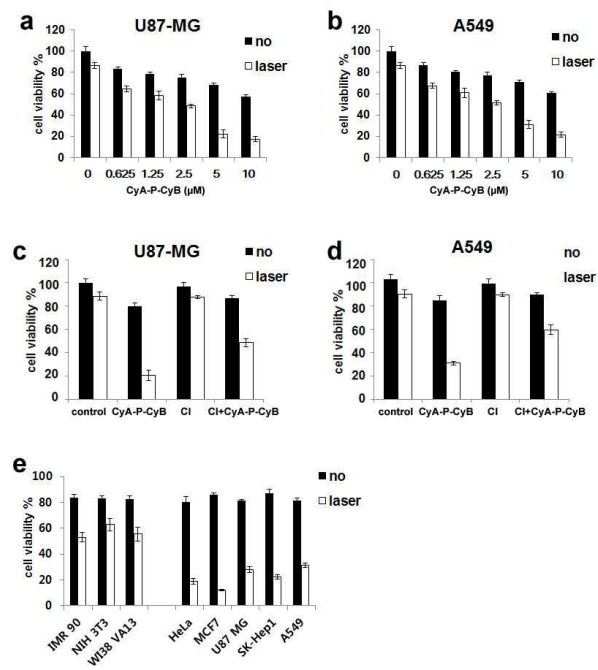
도면2



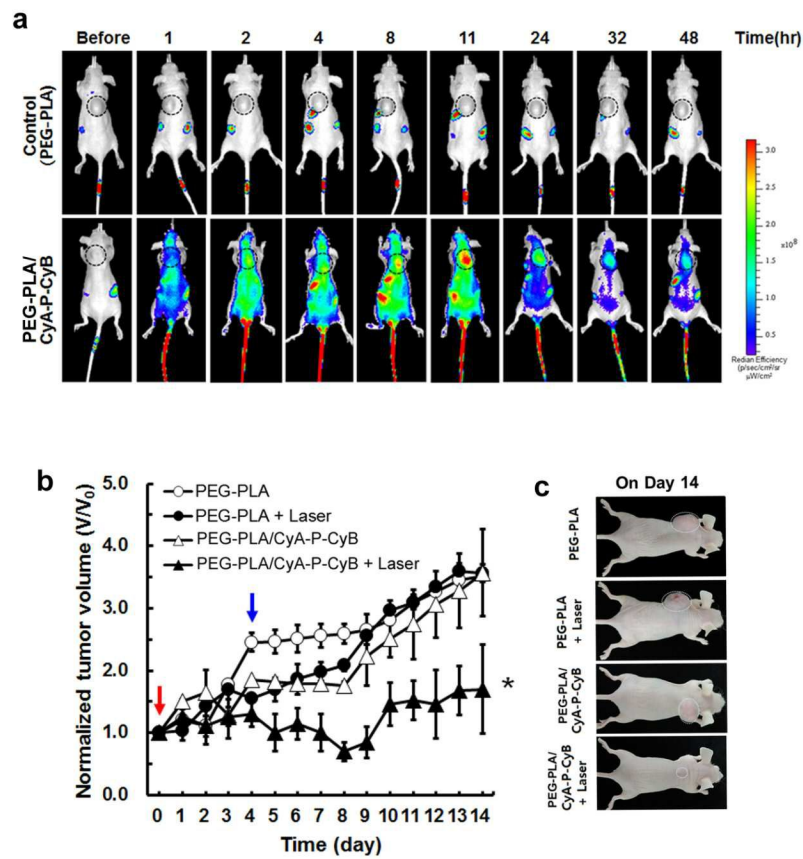
도면3



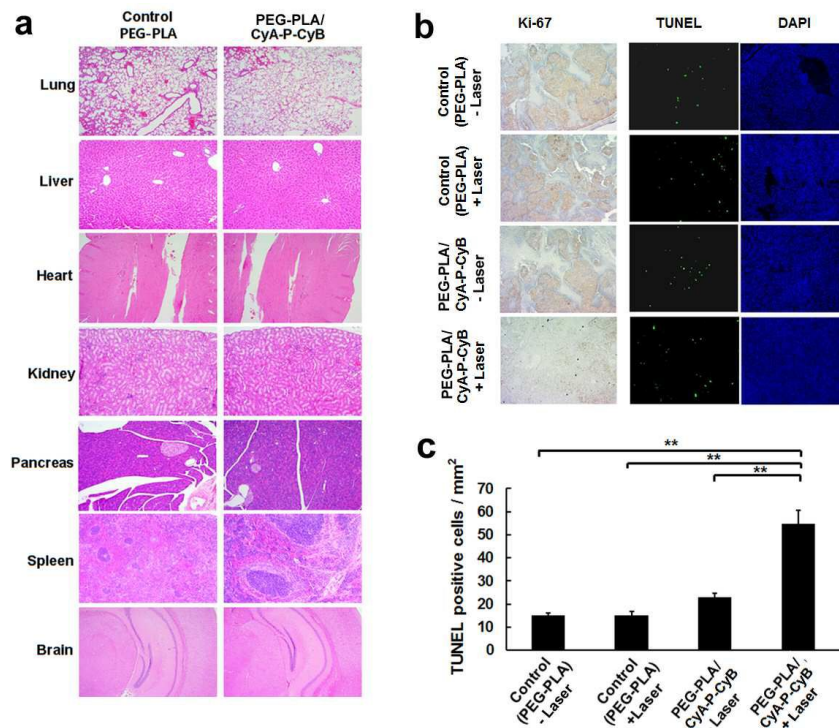
도면4



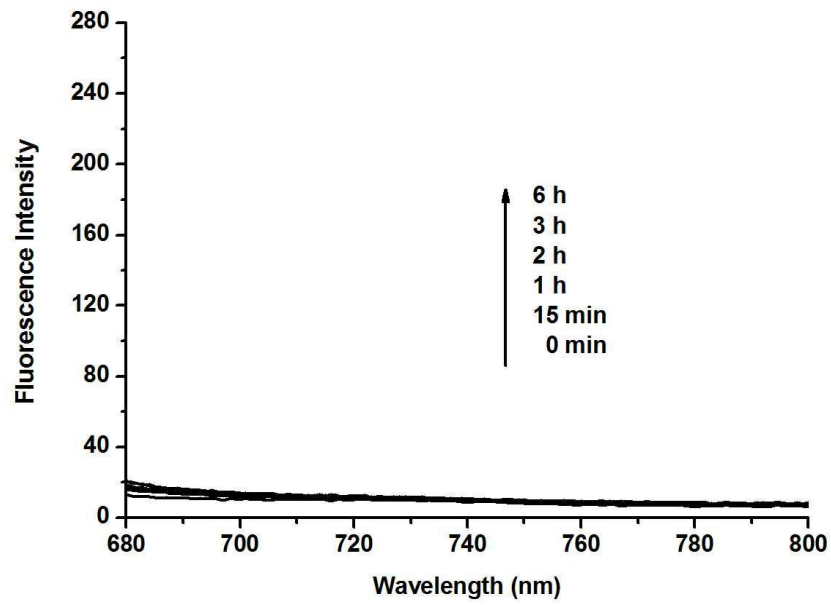
도면5



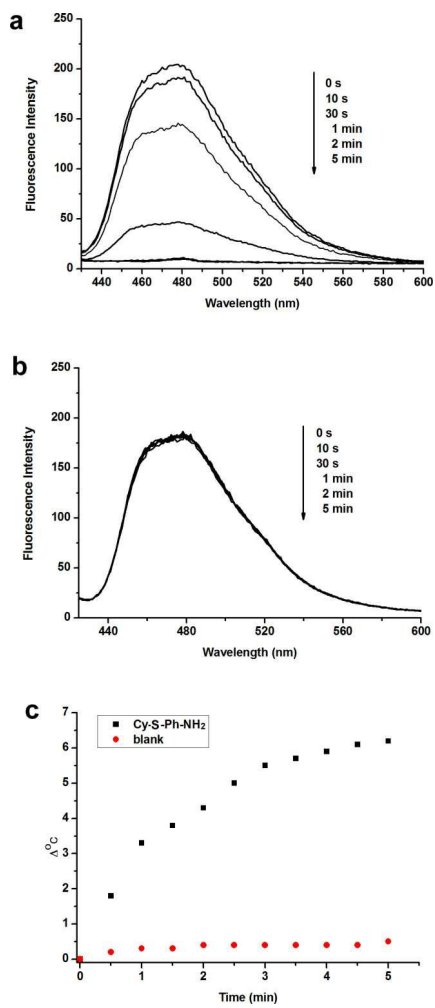
도면6



도면7



도면8



도면9

