



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0075706
(43) 공개일자 2021년06월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/704 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)

A61K 47/54 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)

A61K 47/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0167098

(22) 출원일자 2019년12월13일

심사청구일자 2019년12월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

서울특별시 성북구 안암로 145

아밋 샤르마

서울특별시 성북구 고려대로 45, 202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

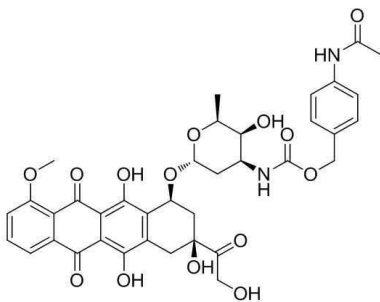
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 4 항

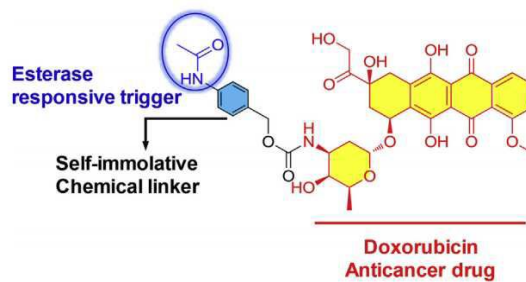
(54) 발명의 명칭 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제

(57) 요약

본 발명은 하기 [화학적 1]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제에 관한 것이다:



대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/54 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2121/00 (2013.01)

A61K 2123/00 (2013.01)

(72) 발명자

지명선

서울특별시 성북구 돌곶이로22길 41 201호

김은중

대전광역시 서구 도안동로 183, 1509동 1501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A3B1052702

부처명 미래창조과학부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스

기 여 율 100/100

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

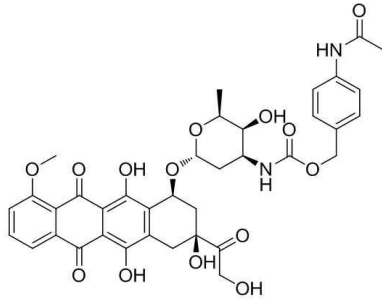
연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학적식 1]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제:



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물은 카르복실 에스테라제에 의해 가수분해되어 약물이 방출 및 활성화되는 것을 특징으로 하는 항암 치료진단제.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 약물은 독소루비신(doxorubicin, Dox)인 것을 특징으로 하는 항암 치료진단제.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 간세포성 암종은 HepG2 또는 Chang 간세포인 것을 특징으로 하는 항암 치료진단제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간세포성 암종 (Hepatocellular carcinoma, HCC)은 전세계적으로 사망률이 높은 다섯 번째로 흔한 암이자 사망의 두 번째 주요 원인으로 보고되고 있다(비특허문헌 1). 외과적 절제술을 제외하면, 간세포성 암종의 치료는 화학 요법이 주요 치료 옵션으로 여겨지고 있다. 그러나 종양에 축적되는 화학 요법 치료제는 정상 장기에 도달하는 용량의 5-10%에 불과할 수 있다는 것이 보고된바 있다(비특허문헌 2). 이러한 비효율적인 전달로 인하여, HCC 부위에서 활성 약물의 농도가 너무 낮아서 치료에 효과적이지 않다는 문제가 있다. 또한, HCC의 경우 다중 약물 내성(multidrug resistance)으로 인해 암 재발이 발생할 확률이 높은 것으로 알려져 있다(비특허문헌 3). 따라서, 약물에 대한 HCC의 반응을 개선하기 위한 새로운 전략이 강하게 요구되고 있다.

[0003] 카르복실에스테라제 (Carboxylesterase, CE)는 카르복실산 에스테르, 아마이드 및 티오에스테르를 비롯한 다양한 약물의 가수 분해 대사에 관여하는 효소이다. 특정 약물의 가수 분해에 중요한 역할을 하는 두 가지 주요 유형의 인간 카르복실에스테라제 (hCE1 및 hCE2)가 알려져있다(비특허문헌 4). 특히, CE는 간에서 고도로 발현되며 간염, 고지혈증 및 HCC를 포함한 여러 간 관련 질병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 5).

[0004] 지난 몇 년 동안 종양 부위에 화학 요법제를 선택적으로 전달하기 위해 저분자, 나노 입자, 폴리머, 무기 재료, 폴리머 하이드로겔, 지질 및 생체 고분자 모티프와 같은 다목적 약물 운반체를 추구하기 위한 광범위한 연구가 이루어졌다(비특허문헌 6). 이러한 시스템은 약물 특이성을 개선하고 부작용을 감소시켜 다중 약물 내성 (MDR) 을 최소화 할 수 있다. 수동적 약물 표적화를 위한 몇 가지 전략이 개발되었지만, 그 중 몇 가지만이 임상 시험에 나섰다(비특허문헌 7).

[0005] 최근에, 나노 의학에서의 능동적 표적화 전략은 종양 이질성, 깊은 침투성, 저산소증과 같은 생리학적 장벽이 여전히 그들의 치료적 적용에 주요 장애물이지만, 흥미로운 결과를 보여 주었다(비특허문헌 8). 생물 약제학적 관점에서, 이상적인 시스템은 원하는 표적 부위에서 페이로드 전달을 허용하기에 충분한 시간 동안 바람직하지 않은 화학적 또는 효소 분해로부터 약물을 보존해야 한다. 저분자 기반 시스템은 나노 기반 시스템에 비해 능동 표적화, 보다 쉬운 합성 접근 및 심층 종양 침투 등의 장점으로 인해 전술한 단점을 극복할 수 있는 대안으로 주목받고 있다(비특허문헌 9).

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA-Canc J Clin 2015;65(2):87-108.
- (비특허문헌 0002) Bosslet K, Straub R, Blumrich M, Czech J, Gerken M, Sperker B, Kroemer HK, Gesson JP, Koch M, Monneret C. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. Cancer Res 1998;58(6):1195-201.
- (비특허문헌 0003) Han KH, Park JY. Chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. J Gastroen Hepatol 2008;23(5):682-4.
- (비특허문헌 0004) Yang J, Shi D, Yang DF, Song XL, Yan BF. Interleukin-6 alters the cellular responsiveness to clopidogrel, irinotecan, and Oseltamivir by suppressing the expression of Carboxylesterases HCE1 and HCE2. Mol Pharmacol 2007;72(3):686-94.
- (비특허문헌 0005) Na K, Lee EY, Lee HJ, Kim KY, Lee H, Jeong SK, Jeong AS, Cho SY, Kim SA, Song SY, Kim KS, Cho SW, Kim H, Paik YK. Human plasma carboxylesterase 1, a novel serologic biomarker candidate for hepatocellular carcinoma. Proteomics 2009;9(16):3989-99.
- (비특허문헌 0006) Lee MH, Sharma A, Chang MJ, Lee J, Son S, Sessler JL, Kang C, Kim JS. Fluorogenic reaction-based prodrug conjugates as targeted cancer theranostics. Chem Soc Rev 2018;47(1):28-52.
- (비특허문헌 0007) Shi JJ, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nat Rev Canc 2017;17(1):20-37.
- (비특허문헌 0008) Anchordoquy TJ, Barenholz Y, Boraschi D, Chorny M, Decuzzi P, Dobrovolskaia MA, Farhangrazi ZS, Farrell D, Gabizon A, Ghandehari H, Godin B, La-Beck NM, Ljubimova J, Moghimi SM, Pagliaro L, Park JH, Peer D, Ruoslahti E, Serkova NJ, Simberg D. Mechanisms and barriers in cancer nanomedicine: addressing challenges, looking for solutions. ACS Nano 2017;11(1):12-8.
- (비특허문헌 0009) Chen GY, Roy I, Yang CH, Prasad PN. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. Chem Rev 2016;116(5):2826-85.

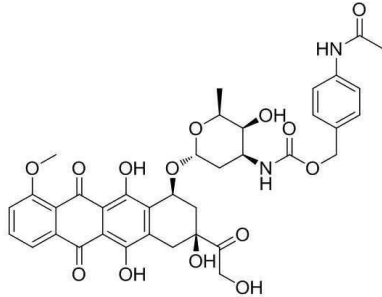
발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 간세포성 암종을 특이적으로 표적화하여, 진단 및 종양 부위로의 전구약물 전달이 가능한 항암 치료진단제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
[0009] 하기 [화합식 1]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제를 제공한다:



- [0010] .
[0011] 본 발명에 따르면, 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물은 카르복실 에스테라제에 의해 가수분해되어 약물이 방출 및 활성화되는 것을 특징으로 할 수 있다.
[0012] 이때, 상기 약물은 독소루비신(doxorubicin, Dox)일 수 있다.
[0013] 본 발명에 따르면, 상기 간세포성 암종은 HepG2 또는 Chang 간세포일 수 있다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따르면, 간세포성 암종(hepatocellular carcinoma, HCC)의 선택적인 진단과 치료를 동시에 할 수 있는 저분자 기반의 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항암 치료진단제 화합물은 간세포성 암종에 효과적으로 축적될 뿐만 아니라 암세포 내에서 활성화되어 우수한 치료효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명에 따른 화합물 EDOX 접합체(화합식 1로 표시되는 화합물)의 설계 전략을 나타낸 것이다.
도 2의 (A)는 37 °C, PBS에서 에스테라제 (3 U/mL)와 함께 배양시 EDOX (10 μM)의 형광 강도 반응 결과를 나타내고(여기 파장 = 470 nm), (B)는 37 °C, PBS에서 에스테라제 (3 U/mL)와 EDOX의 배양시 관찰된 시간 의존적 형광 강화를 나타낸다. 형광 강도의 변화는 EDOX로부터 활성 Dox의 방출과 직접 관련이 있다. (C)는 에스테라제의 존재하에 37 °C에서 0시간, 1시간 및 4시간 동안 EDOX의 역상 고정능 액체 크로마토 그래피 (RP-HPLC) 곡선을 나타내고, (D)는 에스테라제 노출시 EDOX 활성화 메커니즘을 나타낸 것이다.
도 3은 다양한 세포주에서 EDOX의 세포내 형광을 나타내는 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM) 이미지이다. HepG2, HT-29, HeLa, MCF7 및 NIH3T3 세포를 파라포름 알데히드(4%)로 고정된 2시간 동안 EDOX (5 μM)와 함께 배양하고, DAPI (파란색)와 Alexa Fluor 488-Phalloidin (녹색)으로 카운터 염색하여 핵과 F-액틴을 각각 시각화하였다. 488 nm의 여기 파장 및 560-590 nm의 방출 파장을 사용하여 EDOX (적색)의 CLSM 이미지를 획득하였다. 스케일바: 20 μm.
도 4는 다양한 세포주에서 EDOX의 항암 효과를 나타낸다. (A) HepG2, HT-29, HeLa, MCF7 및 NIH3T3 세포를 48시간 동안 다양한 농도로 EDOX로 처리하였다. 이어서, MTT 분석에 의해 세포 생존력을 결정하였다. (B)는 Dox 및 EDOX 처리된 HepG2 세포에서의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 세포를 12시간 동안 Dox 또는 EDOX (5 μM)로 처리하였다. 항-PARP-1 및 항-Caspase-3 모노클로날 항체, 및 β-액틴 항체를 로딩 대조군으로 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 아포토시스를 평가하였다.
도 5는 BNPP에 의한 EDOX 형광 억제 결과를 나타낸다. 12시간 동안 BNPP (100 μM)로 처리한 후, HepG2 세포를 2시간 동안 10 μM EDOX로 처리하고 CSLM을 통해 평가하였다. 스케일바: 20 μm.
도 6의 (A)는 인큐베이션 시간(0h-12 h)에 따른 EDOX (2 μM)의 형광 강도를 나타내고, (B)는 Dox (2 μM)의 형광 강도를 나타낸다. 최대 12시간 동안 EDOX의 분해는 관찰되지 않았다.
도 7은 카르복실 에스테라제 (3 U/mL) 및 다른 생물학적 분석 물질의 존재 또는 부재하에서, 배양 4시간 후 570 nm에서 EDOX (10 μM)의 형광 반응을 나타내는 막대 그래프이다: 1) EDOX 단독, 2) L-ascorbic acid, 3) L-

glutamic acid, 4) L-Proline, 5) NADH, 6) Pepsin, 7) L-glutathione, 8) AChE, 8) BChE, 10) hypochlorite ion (OCl^-), 11) H_2O_2 , 12) EDOX + carboxylesterase. 모든 스펙트럼은 PBS(0.1% DMSO)(pH 7.4)에서 기록하였다 (여기 파장은 470 nm).

도 8은 다양한 세포주에서 EDOX의 세포 형광을 평가하기 위한 유세포 분석 히스토그램을 나타낸다. 세포들을 37 °C에서 2시간 동안 5 μM 의 EDOX와 함께 인큐베이션 하였다.

도 9는 HepG2 세포에서 EDOX의 시간 의존적 형광 이미지를 나타낸다. HepG2 세포를 37 °C에서 다양한 시점에서 5 μM 의 EDOX로 처리하였다.

도 10은 다양한 세포주에서 DOX와 EDOX의 항암 활성을 비교한 결과를 나타낸다. 두 화합물을 37 °C에서 48시간 동안 상이한 농도로 HepG2, HT-29, HeLa, MCF7 및 NIH3T3 세포와 함께 인큐베이션 하였다. 이어서, MTT 분석을 수행하여 세포 생존력을 평가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0018] 실험 방법

[0019] 재료, 방법 및 기기장치

[0020] 모든 시약 및 용매는 Sigma Aldrich, Alfa Aesar 또는 TCI Korea에서 구입하여 사용하였다. 수분 민감성 반응은 일반적으로 아르곤 가스 블랭킷 하에서 수행하였다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker NMR 기기(^1H 의 경우 500MHz, ^{13}C 의 경우 125MHz의 경우)에서 기록하였다. 화학적쉬프트(δ 는 ppm으로 기록되며 커플링 상수는Hz로 표시된다. 질량 스펙트럼은 IonSpecHiRes ESI 질량 분석기로 기록하였다.역상 (RP) 컬럼 (C18, 5 mm, Waters)이 장착된 YL9101S (YL-Clarity) 기기에서 HPLC 분석을 수행하였다.

[0022] 예비 용액(Preliminary solution) 및 간섭 연구(interference studies)

[0023] DMSO 용액에서 EDOX (1 mM)의 스톡 용액을 제조하였다.EDOX의 작업 용액 (10 μM)은 PBS(pH 7.4, 37 °C에 희석하여 제조하였다. 카복실에스테라제(carboxylesterase)(Sigma Aldrich, E2884-1KU)를 예비 용액 테스트에 사용하였다. 간섭 연구를 위해, 바이오 분석물의 모든 스톡 용액을 PBS에서 제조하고 소정의 농도로 사용하였다.

[0025] 세포 배양, 형광 이미징 및 유세포 분석

[0026] HepG2 및 HT-29는 RPMI1640 배지 (Gibco, Invitrogen. Co., Carlsbad, CA, USA)에서 유지시켰고, HeLa, MCF7 및 NIH3T3 세포는 10% 소 태아혈청 (FBS, Gibco) 및 1% 페니실린/스트렙토 마이신 (Gibco)이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Gibco)에서 배양하였다. 다양한 세포 중에서 EDOX에 대한 가장 적절한 암 세포주 반응을 스크리닝하기 위해, 공 초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM) 및 유세포 분석을 사용하여 EDOX 처리된 세포에서 형광을 관찰 하였다. 1×10^5 cells/mL의 세포 현탁액을 8 웰 μ -슬라이드(ibidi, Munich)에 시딩하고 37 °C에서 12시간 동안 배양하였다. 다음으로, 5 μM 의 EDOX를 2시간 동안 세포에 첨가한 후 PBS로 세척하였다. 4% 파라 포르말데히드로 실온에서 30분 동안 고정시킨 후, 세포들을 fluorophore Alexa Fluor 488 phalloidin(Invitrogen, Molecular Probe, Eugene, OR, USA)을 이용하여 20분 동안 염색 및 4' 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 5분 동안 염색하였다. 형광 세포 이미지는 CLSM (LSM 710, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 획득하였다. 또한, 모든 세포를 4×10^5 /웰의 밀도로 12-웰 플레이트에서 배양하고 2시간 동안 5 μM EDOX로 처리하였으며, EDOX 처리된 세포에서 형광의 정량적 평가를 위해 세포 형광을 유세포 분석법(FACS, BDBiosciences, USA)을 이용하여 분석하였다. PBS로 3회 세척한 후, 수거된 세포를 유세포 분석법으로

검사하였다. 히스토그램 플롯은 FlowJo 소프트웨어 (TreStar, Switzerland)를 사용하여 수행하였다.

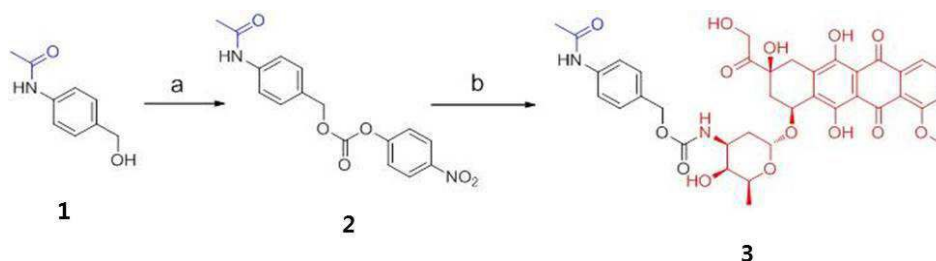
[0028] 항-증식반응 분석(Anti-proliferation assay) 및 웨스턴 블로팅

[0029] HepG2, HT-29, HeLa, MCF-7 및 NIH3T3 세포에 대해 MTT 분석 및 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 EDOX의 항암 효과를 평가하였다. 모든 세포를 웰 당 1×10^4 개의 세포로 96 웰 플레이트의 각 웰에 시딩한 후, 48시간 동안 다양한 농도의 EDOX로 처리하고, MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드, Roche Diagnostics GmbH, Germany) 비색 분석을 수행하였다. 배양 배지를 교체한 후, MTT 시약을 각 웰에 첨가하고 추가로 4시간 동안 배양하였다. 각 웰에 가용화 완충제 (Roche Diagnostics)를 처리한 후, 마이크로 플레이트 리더 (EL800, Bio-Tek Instruments, Winooski, USA)를 사용하여 MTT에 의해 생성된 포르마잔 생성물의 흡광도를 570 nm에서 측정하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해, HepG2 세포를 6 웰 플레이트에서 배양하고 12시간 동안 $5 \mu\text{M}$ 의 EDOX로 처리하였다. 이어서, 수확된 세포를 프로테아제 억제제 콕테일 용액 (Xpert Protease Inhibitor Cocktail Solution, GenDEPOT)을 포함하는 세포 용해 용액 (GenDEPOT, TX, USA)으로 용해시켰다. BCA 단백질 분석을 이용하여 총 단백질을 정량하고, 동일한 양 ($50 \mu\text{g}$)의 단백질을 10% (w/v) SDS 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의해 분리하였다. 단백질을 폴리 비닐리덴폴루오라이드 (PVDF) 막으로 옮긴 후, 1시간 동안 5% 탈지유로 블로킹 하였다. 막은 anti-PARP-1 (1:1000; abcam, UK), anti-Caspase-3 (1:1000; Cell Signaling Technology, USA), 및 β (Santa Cruz, USA) 항체와 함께 인큐베이션 하였다. 이어서, HRP- 접합된 이차 항체를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 세척 후, 상기 막을 기질로서 ECL 시약 (Amersham Biosciences, UK)과 함께 인큐베이션 한 다음, 어두운 방에서 X-선 필름을 노출시켰다.

[0031] 화합물 합성

[0032] 하기 합성 경로에 따라 본 발명에 따른 [화합식 1] (EDOX로 표시)의 화합물을 합성하였다.

[0033] [합성 경로]



[0034] a) 4-Nitrophenyl chloroformate, DCM, TEA, 0 °C, 92%; b) Doxorubicin·HCl, DMF, TEA, RT, 95%.

[0037] 화합물 2의 합성

[0038] 둥근 바닥 플라스크에서, 화합물 1 (0.200 g, 1.21 mmol)을 무수 MC (50 mL)에 현탁시킨 후 0 °C로 냉각시켰다. 이 혼합물에 p-니트로페닐클로로포르메이트 (0.36 g, 1.81 mmol)를 첨가한 후 TEA (0.3 mL, 2.45 mmol)를 적가하였다. 생성된 혼합물을 0 °C에서 추가로 30분 동안 교반하였다. 반응 완료 후 0.1 N HCl (10 mL)과 중탄산 나트륨으로 켄칭 및 세척하고, MC (3 X 50 mL)로 추출하였다. 유기 분획을 분리, 수집 및 Na_2SO_4 상에서 건조시킨 후 진공하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카겔상에서 컬럼 크로마토그래피 (MeOH/DCM 1-2%)로 정제하여 회백색 고체 화합물 2를 수득하였다 (0.37 g, 92%).

[0039] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 28 °C): 2.14 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 7.30-7.37 (m, 2H), 7.51-7.53 (m, 2H), 8.27-8.29 (m, 2H).

[0041] EDOX의 합성

[0042] 둥근 바닥 플라스크에서, 화합물 2 (0.100 g, 0.30 mmol)를 무수 DMF (10 mL)에 현탁시켰다. 이 혼합물에 Doxorubicin·HCl(0.175 g, 0.30 mmol)을 첨가한 후 TEA (0.5 mL, 0.20 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 반응물을 진공하에서 증발시키고, 실리카겔상에서 컬럼 크로마토그래피 (MeOH/DCM 2-5%)로 정제하여 적색 분말 화합물 EDOX를 수득하였다(0.21 g, 94%).

[0043] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 28 °C): 1.28 (d, 3H, J = 6.5 Hz), 1.76-1.79 (m, 1H), 1.83-1.86 (m, 1H), 2.09-2.17 (m, 6H), 2.30-2.32 (m, 1H), 2.99 (s, 2H), 3.23-3.25 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.65-3.69 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 4.07 (s, 3H), 4.12 (m, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.74-4.76 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.18-5.30 (m, 3H), 5.48 (m, 1H), 7.22-7.42 (m, 5H), 7.77 (m, 1H) and 8.03 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl $_3$ + MeOD, 28 °C): 8.42, 16.7, 23.9, 29.9, 30.0, 33.7, 35.6, 45.6, 45.9, 46.9, 56.5, 66.3, 67.4, 68.9, 69.3, 76.3, 100.7, 118.5, 119.7, 120.7, 128.8, 135.8, 155.9, 160.9 and 187.1. MS (ESI): m/z calcd. for C $_{37}$ H $_{38}$ N $_2$ O $_{14}$: 734.23 Found: 757.20 [M + 23] $^+$.

[0045] 결과 및 고찰

[0046] EDOX의 설계, 합성 및 특성

[0047] 본 발명에서는 항암 약물인 독소루비신(Dox)의 전달을 위한 카르복실 에스테라제 반응 이중 기능성 약물 전달 시스템, EDOX를 합성하였으며, 상기 EDOX가 다양한 암 세포에 미치는 영향을 테스트하였다. 본 발명의 실험 결과는 EDOX가 HCC- 유래 세포의 세포 내 카르복실 에스테라제에 의해 정상 섬유 아세포 및 다른 암 세포주와 비교하여 우선적으로 활성화되었음을 보여주었다.

[0048] 본 발명에 따른 화합물인 EDOX는 상기 [합성 경로]에 따라 합성하였으며, 합성된 화합물의 존재는 질량분석계, ^1H NMR/ ^{13}C NMR을 통해 확인하였다. 다음으로, 약물 안정성과 활성화 메커니즘을 평가하였다. PBS(pH 7.4, 37 °C)에서 4시간 동안 EDOX를 인큐베이션 한 결과, 분해는 관찰되지 않았다. 또한, EDOX는 560 nm에서 고유한 약한 형광 방출을 나타내었으며(도 2A), 배양 배지에서 12시간까지 유사한 종류의 안정성을 나타내었다(도 6). 그러나 에스테라제 (3 U/mL)에 노출되면 아닐린 아마이드 결합이 절단되고, 1,6- 제거 경로를 통한 자가-희생(self-immolation)에 의해 활성 약물 Dox가 방출된다. 이 현상은 free Dox에 해당하는 560 nm에서 방출 밴드의 향상을 동반하였다. 형광 실험 및 HPLC 분석을 통해 EDOX 활성화를 추가로 확인하였다. 에스테라아제에 대한 EDOX의 노출은 4시간까지 활성 Dox의 시간 의존적 누적 방출을 야기하였다(도 2B). 본 발명자들은 560 nm에서의 형광 복원이 약물 분포의 진단 평가에 잠재적으로 적합한 턴온 반응일 수 있다고 추론하였다. 역상 HPLC 크로마토그램은 EDOX에 상응하는 2060초의 체류 시간에서 피크를 나타내었다 (도 2C). 특히, 1975초에서의 Dox standard 피크는 EDOX가 Dox 자체보다 소수성임을 나타낸다. 이러한 특성은 약물 약동학 (PK)의 최적화를 위해 폐길화(PEGylation)에 기반한 자기 조립 나노 의학 시스템의 설계에 유용할 수 있다. 카르복실 에스테라아제 작용시, EDOX는 도 2d에 도시된 경로에 의해 4시간 이내에 독점적으로 활성 Dox로 전환되었다. 다음으로, 아미노산, 생체 분자 및 효소를 포함한 다양한 생체 분석 물질의 EDOX 반응에 대한 간접 가능성 또한 테스트하였다. 그 결과, 이들 분자 중 어느 것도 에스테라제에 의해 단독으로 활성화된 것과 같은 현저한 EDOX 형광 변화를 유도하지 않았으며, 이는 에스테라제-EDOX 상호 작용이 매우 특이적임을 나타낸다(도 7).

[0050] EDOX의 세포 흡수 및 활성화

[0051] 다음으로, 인간 간세포 암종 (HepG2), 인간 결장 직장 선암종 (HT-29), 인간 자궁 경부 선암종 (HeLa), 인간 유방 선암종 (MCF7), 마우스 배아 섬유아세포 (NIH3T3)에서 추출한 세포를 포함한 다양한 세포주에서의 EDOX 활성을 평가하였다. 세포 카르복실 에스테라제에 의한 EDOX 활성화를 평가하기 위해, 공초점 레이저스캐닝 현미경 (CLSM)을 이용하여 Dox로부터 발생하는 세포 내 형광을 검출하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, HCC-유도된 HepG2 세포만이 5 μM EDOX로 2시간 동안 처리시 활성 Dox에 상응하는 현저한 형광 향상을 나타내었다. 이러한 결과는 유세포 분석으로도 확인되었으며(도 8), 이는 HT-29, HeLa, MCF7 및 NIH3T3 세포에서는 켄칭된 형광 방출이 유지됨에 따라 EDOX 내재화 및/또는 활성화가 발생하지 않았음을 암시한다. 다음으로, EDOX-세포 상호 작

용의 역학을 평가하기 위해, 접합체에 노출된 HepG2 세포에서 시간 의존적 형광 향상을 측정하였다(도 9). 그 결과, 형광 방출의 현저한 향상이 30분 내에 관찰되었고 24시간 내에 포화에 도달하였다. 또한, EDOX 효소 절단 시, 활성 Dox가 처음에 시토솔(cytosol)에 편재되고 36시간의 배양 시간에 걸쳐 핵으로 연속적으로 전위됨을 관찰하였다(도 9). 종합하면, 상기 결과들은 EDOX 가수 분해가 높은 카르복실 에스테라제 활성의 존재를 요구하고, 이에 따라 복합체는 HCC-유래 HepG2 세포에 의해 우선적으로 활성화되어, 형광 향상을 야기한다는 것을 암시한다.

[0053] 다양한 암 세포주에 대한 EDOX의 세포 생존률 및 아포토시스 메커니즘

[0054] 다음으로, MTT 분석법을 이용하여 다양한 세포주에 대한 EDOX의 항암 활성을 평가하였다. 상이한 농도의 EDOX와 함께 48시간 인큐베이션 후 세포 생존력을 측정하였다(도 4A). 그 결과, EDOX는 10 μ M 미만의 농도에서도 HepG2 세포-특이적 항암 활성을 발휘하였고, 최대 50 μ M까지 효과적이었으나, 다른 세포주의 생존력에 대한 중대한 영향은 관찰되지 않았다. MTT 분석 결과는 공초점 현미경에 의해 얻은 결과와 일치하였다. EDOX-유도된 세포 독성은 이러한 조건하에서 free Dox에 의한 것보다 낮지만, 세포 특이성은 Dox 관련 부작용을 최소화하는 데 도움이 될 수 있다(도 10). 또한, IC₅₀ 값의 비교 결과를 통해, EDOX 처리된 HepG2 세포가 다른 세포주보다 더 강력한 치료 효과를 나타냄을 확인하였다(표 1).

표 1

μ M	HepG2		HT-29		MCF7		NIH3T3	
	Dox	EDOX	Dox	EDOX	Dox	EDOX	Dox	EDOX
IC ₅₀	1.21	16.39	1.62	232.80	4.79	157.50	5.41	1,862
IC ₅₀ (EDOX/Dox)	14.62		143.62		32.83		344.12	

[0055]

[0056] EDOX의 효과를 추가로 특성화하기 위해, 웨스턴 블로팅 EDOX-처리된 HepG2 세포를 이용하여 아포토시스 관련 단백질의 발현을 평가하였다. PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1)은 DNA 손상 세포의 회복에 중요한 역할을 한다. 절단된 PARP-1의 레벨은 아포토시스의 가장 중요한 마커 중 하나이며, Dox 처리 후 증가하는 것으로 보고된바 있다(Park HJ et al, J Exp Clin Canc Res 2018;37:107). 유사하게, 미토콘드리아 아포토시스 관련 단백질인 활성화된 caspase-3의 발현 수준은 Dox-처리된 세포에서 상향 조절되는 것으로 알려져있다(Wei L et al, PLoS One 2015;10(7):e0131763). 관련하여, 본 실험을 통해, HepG2 세포에 Dox 또는 5 μ M EDOX로 처리시 PARP-1 및 절단된 caspase-3의 발현이 현저하게 향상됨을 확인하였다(도 4B). 12시간 동안 HepG2 세포에서 아포토시스 단백질의 발현을 유도하는 Dox 및 EDOX의 상이한 능력은 카복실에스테라제에 의한 절단시 Dox 방출의 완료에 필요한 추가 시간 때문일 수 있다. 상기 결과들을 통해, 본 발명에 따른 화합물 EDOX는 HepG2 카르복실 에스테라제에 의해 특이적으로 활성화되고, 이는 아포토시스 유도에 의해 세포 사멸을 야기한다는 것을 확인하였다.

[0058] HCC 세포에서 EDOX의 에스테라제 매개 활성화

[0059] 마지막으로, EDOX 활성화와 내인성 카르복실 에스테라제 사이의 관계를 명확하게 확립하기 위해, 카르복실 에스테라제 활성의 억제에 의해 EDOX 형광 증진이 방지될 수 있는지를 확인하였다. 이를 위해, HepG2 세포를 카르복실 에스테라제 억제제인 BNPP(bis-(4-nitrophenyl)phosphate)로 12시간 동안 전처리한 후, 추가 2시간 동안 10 μ M EDOX로 처리하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, EDOX 반응은 BNPP 전처리된 HepG2 세포에서는 거의 일어나지 않았고, 이를 통해, EDOX 활성화에 카르복실 에스테라제가 중요한 역할을 한다는 것을 추가적으로 확인하였다.

[0061] 결론적으로, 본 발명에서는 지속적인 HCC 특이적 약물 방출과, 전구약물 활성화 및 약물 분포의 실시간 모니터링을 가능하게 하는, 아세트 아마이드 화학 약물 접합체인 EDOX를 제공한다. 본 발명에 따른 화합물 EDOX는

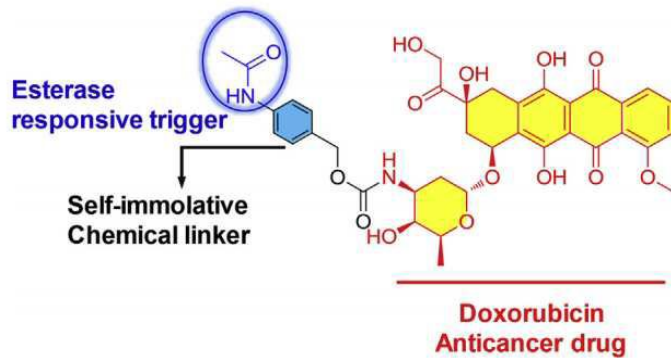
HCC-유래 세포에 대한 우선적인 세포 독성 효과를 나타내었는바, HCC에 적합한 화학요법 치료제로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0063]

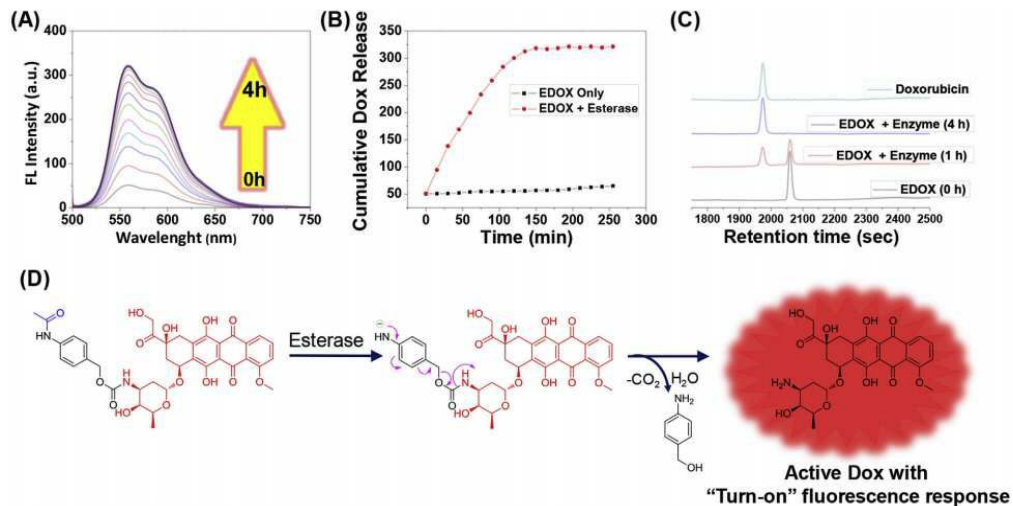
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

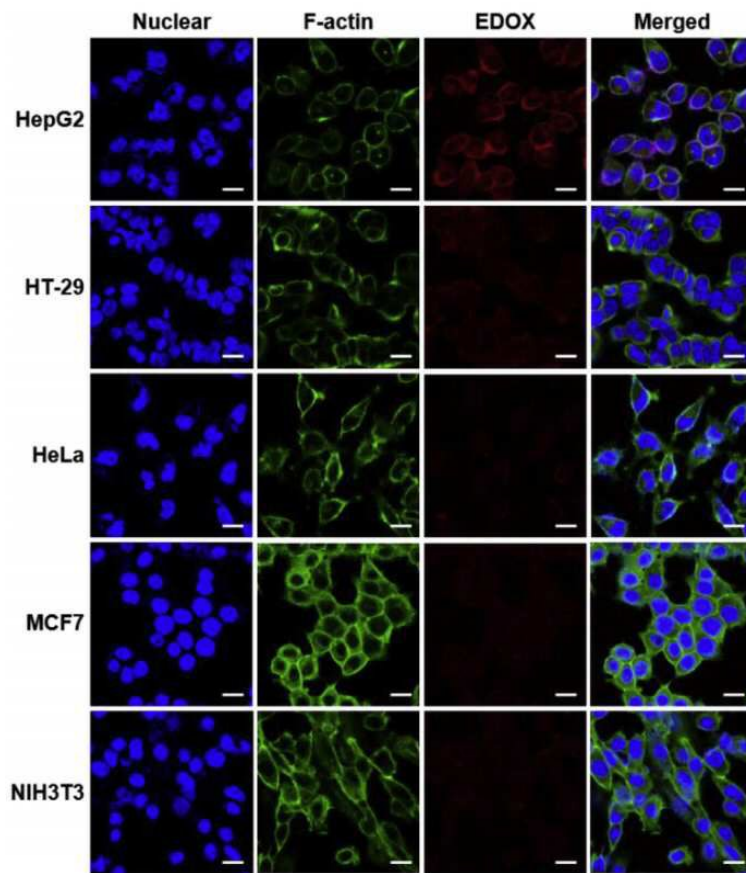
도면1



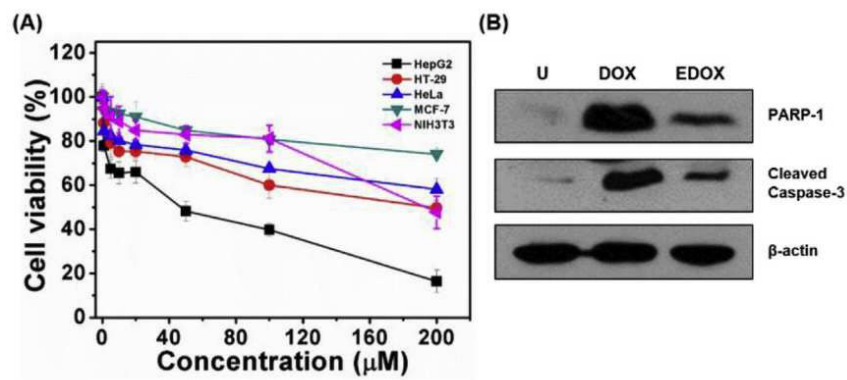
도면2



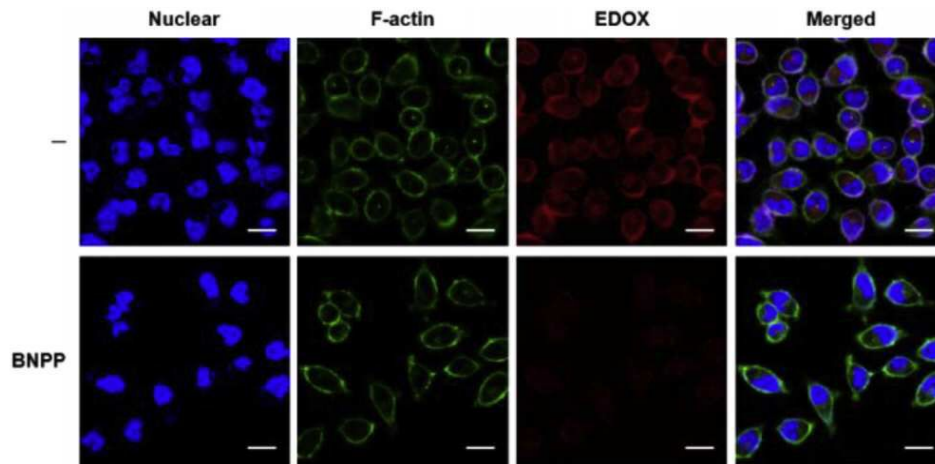
도면3



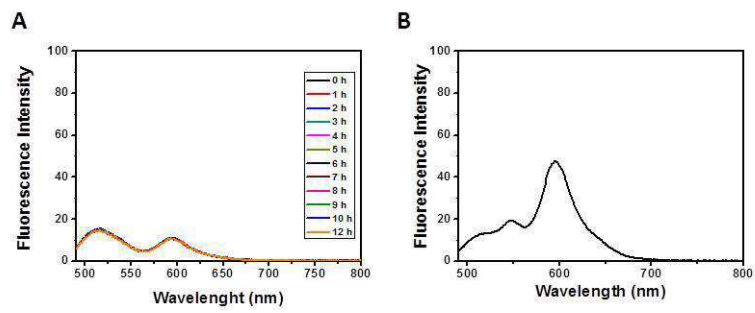
도면4



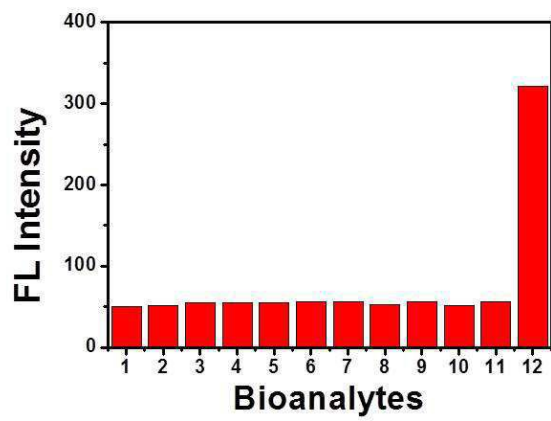
도면5



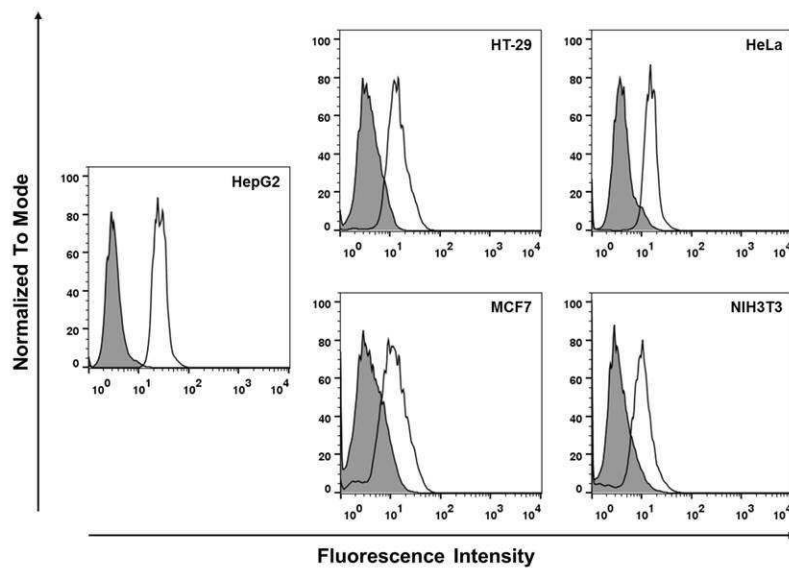
도면6



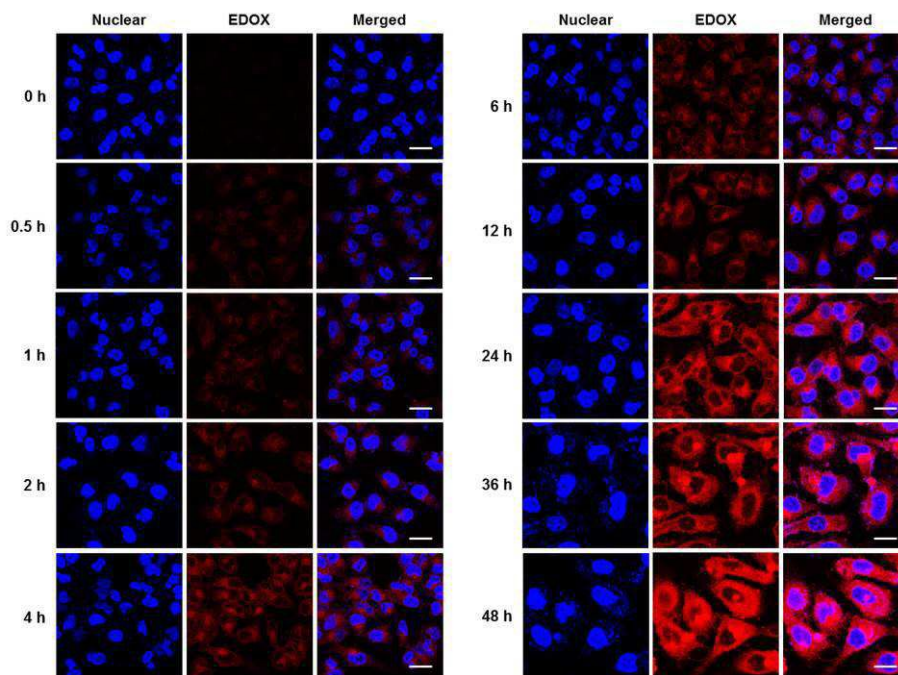
도면7



도면8



도면9



도면10

