(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0002616
(43) 공개일자 2024년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 41/00 (2020.01) *A61K 31/4192* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 41/0033 (2013.01)
A61K 31/4192 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0080011
(22) 출원일자 2022년06월29일
심사청구일자 2022년06월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
서울특별시 성북구 안암로 145
원미애
서울특별시 성북구 안암로 145
손수빈
서울특별시 성북구 안암로 145
(74) 대리인
정은열, 김태훈

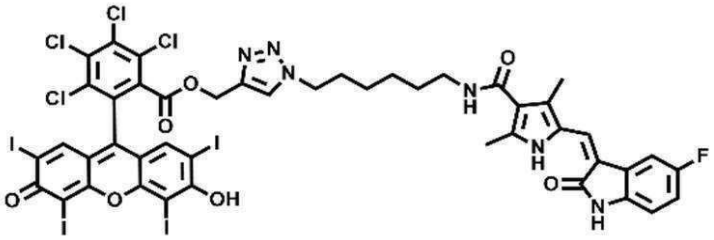
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **종양 표적화 초음파 동역학 치료제**

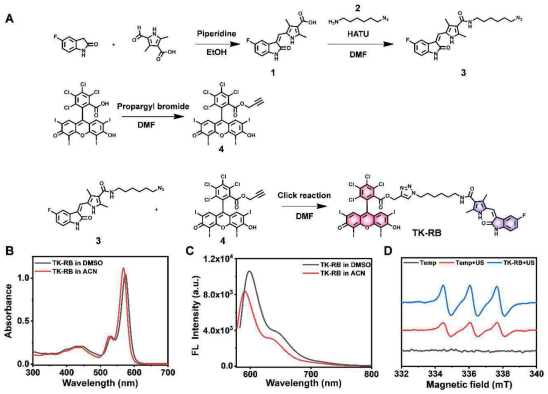
(57) 요 약

본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 종양 표적화 초음파 동역학 치료제에 관한 것이다:

[화학식 1]



대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711132422
과제번호 2018R1A3B1052702
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스
기 여 율 40/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711132893
과제번호 2019M3E5D1A01068998
부처명 다부처
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구(R&D)(과기정통부,복지부)
연구과제명 난치성 삼중음성유방암의 신규 표적치료제 상용화를 위한 프로드럭 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345323788
과제번호 2020R1A6A3A01100551
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 세포 카니발리즘 매개의 신규 암전이 극복 표적치료제 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.09.01 ~ 2021.08.31

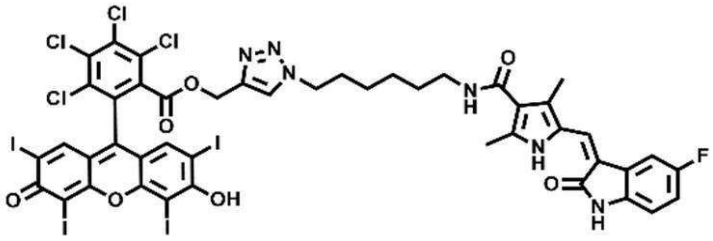
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 종양 표적화 초음파 동역학 치료제:

[화학식 1]



.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 초음파(Ultrasound, US) 조사 조건에서 반응성 산소종(ROS)를 생성하는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 초음파 동역학 치료제.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물은 VEGFR 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 초음파 동역학 치료제.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 화합물은 VEGFR 양성 세포에 선택성을 갖는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 초음파 동역학 치료제.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화합물은 혈관 신생을 억제하는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 초음파 동역학 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종양 표적화 초음파 동역학 치료제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 광역학 요법(Photodynamic therapy, PDT)은 악성 종양 치료를 위한 비침습적이고 안전한 치료 방식으로 주목받고 있으며, 반응성 산소종(ROS)을 생성하기 위해 감광제(photosensitizers, PS)의 광 매개 활성화에 의존하는 치료법이다. 생성된 ROS는 DNA 및 단백질 손상을 통해 종양 조직에 심각한 산화적 손상을 유발하고 암세포의 세포 사멸을 유발한다. 그러나 종양 저산소증(tumor hypoxia) 및 생성된 ROS의 짧은 수명, 낮은 침투 능력과 같은 본질적 제한에 의해 PDT의 치료 효과가 제한된다는 문제점이 존재한다.

[0003] 최근에는 초음파(ultrasound, US)에 의한 에너지 전달 방법을 통해 침투의 어려움을 극복하기 위한 방법이 시도되고 있다(P. Huang et al., Metalloporphyrin-encapsulated biodegradable nanosystems for highly

efficient magnetic resonance imaging-guided sonodynamic cancer therapy, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1275). US는 10 cm를 초과하는 깊이에서 높은 조직 침투, 비침습성, 비용 효율성 및 안전한 임상 양식의 장점이 있는바, 암 치료를 위한 감각제(sensitizer)를 활성화하는 유망한 도구가 될 수 있다.

[0004] 신생혈관 신호전달 경로(Angiogenic signaling pathway)는 암 재발 및 진행에 중요한 기여 요인으로, 특히 산소 의존성 광역학 및 초음파역학 요법을 통해 치료 결과를 크게 감소시킬 수 있다. VEGF 및 이의 수용체(VEGFR)는 신생혈관 생성에 중요한 역할을 하는데, 상향조절된 VEGF 신호전달은 주로 많은 유형의 암에서 신생혈관생성과 관련이 있다. VEGF를 표적으로 하는 것은 신생혈관생성 신호의 억제를 통해, 신경아교종의 증식, 대사 및 형태 뿐만 아니라 많은 유형의 암세포에 직접적인 영향을 미칠 수 있다(B. Cakar et al., *J. Oncol. Sci.* **2018**, *4*, 65). 한편, 높은 억제 성능(IC50: 4 ~ 55 nM)을 갖는 강력한 VEGFR 티로신 키나제 억제제인 수니티닙은 미국 식품의약국(FDA)의 승인을 받은바 있으며(J. G. Christensen, *Ann. Oncol.* **2007**, *18*, x3), 최근 화학요법제 또는 감광제와 결합된 특정 수용체/효소 억제제들은 다양한 종류의 암을 표적으로 하는 다중 경로로 인해 많은 관심을 받고 있다.

[0005] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 초음파 동역학 치료(sonodynamic therapy, SDT)와 함께 VEGFR 신호 전달을 억제할 경우 악성 종양 억제에 시너지 효과가 발생할 것으로 예상하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

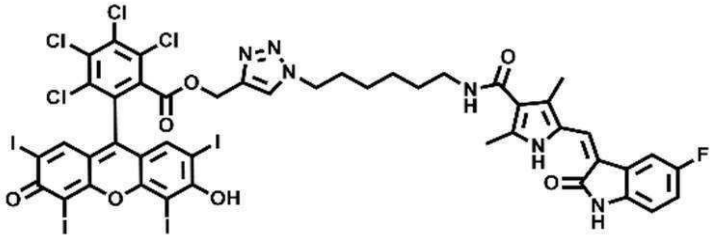
[0006] 본 발명에서는 초음파에 의해 활성화되어 반응성 산소종을 발생시키고, 이에 따라 세포 및 종양 성장 억제 및 VEGF 억제 매개 신생혈광생성 억제(VEGF inhibition mediated anti-angiogenesis)를 통한 항암 능력이 현저하게 향상된 신규 종양 표적화 초음파 동역학 치료제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0008] 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 종양 표적화 초음파 동역학 치료제를 제공한다:

[0009] [화학식 1]



[0010] .

[0011] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 초음파(Ultrasound, US) 조사 조건에서 반응성 산소종(ROS)를 생성하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 VEGFR 발현을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 VEGFR 양성 세포에 선택성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 혈관 신생을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 초음파에 의해 활성화되어 반응성 산소종을 발생시키고, 이에 따라 세포 및 종양 성장 억제 및 VEGF 억제 매개 신생혈관생성 억제를 통한 항암 능력이 현저하게 향상된 신규 종양 표적화 초음파 동역학 치료제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1의 (A)는 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물(TK-RB)의 합성 경로를 나타내고, (B) 및 (C)는 각

각 DMSO 및 ACN 용액에서 TK-RB(10 μM)의 UV-Vis(B) 및 형광(C) 스펙트럼을 나타내며, (D)는 서로 다른 조건 하에서(TEMP only (5%), TEMP + US, TEMP + TK-RB (100 μM) + US) $^1O_2$의 ESR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2의 (A)는 4시간 동안 다른 농도의 TK-RB와 함께 인큐베이션된 U87MG 및 MCF-7 세포의 공초점 이미지 및 상대 형광 강도를 나타낸 것이고, (B)는 US 레이저 출력(0.5 및 1.0 W/cm^2) 및 조사 시간(30 및 60초)의 함수로 다양한 조건 및 다양한 농도의 TK-RB와 함께 인큐베이션된 U87MG 세포에서 TK-RB의 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다. (C)는 다른 농도의 TK-RB와 함께 24시간 동안 인큐베이션된 U87MG 세포에서 VEGFR-1, ERK1/2 및 p-ERK1/2 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다. (D)는 다양한 조건하[대조군(control), US only (1 W/cm^2), TK-RB (10 μM), and TK-RB + US], U87MG 및 MCF-7 세포에서 DCFH-DA의 상대 형광 강도를 나타낸 것이다. (E)는 다양한 조건하[control, US only (1 W/cm^2), TK-RB (10 μM), and TK-RB + US], U87MG 및 MCF-7 세포의 Calcein-AM(4 μM) 및 PI(100 μg/mL) 공동 염색된 CLSM 이미지를 나타낸 것이다(녹색 및 빨간색은 각각 살아있는 세포(live cells)와 죽은 세포(dead cells). 데이터는 평균±SEM으로 표시하였다(n = 3 in A, B, and D). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 one-way/two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. a-j는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 3의 (A) 및 (B)는 U87MG 교모세포종 종양 이종이식편을 보유한 누드 마우스에서 RB 및 TK-RB(200 μL, 500 μM)를 정맥내 주사한 후 서로 다른 시점(0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24시간)에서의 (A) 실시간 형광 이미지 및 (B) 종양 부위의 평균 형광 강도를 나타낸 것이다. (C) 및 (D)는 RB 및 TK-RB의 정맥내 주사 후 24시간에, 누드 마우스의 피하 종양 및 주요 기관의 (C) 생체외 형광 이미지 및 (D) 평균 형광 강도를 나타낸 것이다. 데이터는 평균±SEM으로 표시하였다(n = 3 in D). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 one-way ANOVA test에 의해 결정하였다. 별표는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 4는 각각의 조건하에서 샘플 처리 후 18일 째에 U87MG 교모세포종 종양 이종이식편을 보유한 누드 마우스의 이미지(A) 및 평균 종양 중량(B), 시간 의존적 종양 성장 곡선(C) 및 마우스의 상대 체중(D)를 나타낸 것이다(대조군, RB (200 μL, 500 μM), 및 TK-RB (200 μL, 500 μM); 모든 조사군에서 US (1 W/cm^2)가 사용되었음). 데이터는 평균±SEM으로 표시하였다(n = 3 in D). 통계적 유의성은 post-hoc Bonferroni test와 함께 two-way ANOVA test에 의해 결정하였다. a-b는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 5는 U87MG 및 MCF-7 세포에서 VEGFR-1 발현에 대한 웨스턴 블로팅 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 4시간 동안 다른 농도의 RB와 함께 인큐베이션된 U87MG 및 MCF-7 세포의 공초점 이미지 및 상대 형광 강도를 나타낸 것이다.

도 7은 24시간 동안 다른 농도의 TK-RB와 함께 인큐베이션된 U87MG(A) 및 MCF-7(B) 세포에서 TK-RB의 암독성(Dark toxicity)을 나타낸 것이다. a-b는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 8은 24시간 동안 다른 농도의 TK-RB와 함께 인큐베이션된 VEGFR 음성(MCF-7) 세포에서 TK-RB의 세포 생존력 분석 결과를 나타낸 것이다. a-e는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

도 9는 다양한 조건하[control, US only (1 W/cm^{-2}), TK-RB (10 μM), and TK-RB + US], U87MG 및 MCF-7 세포에서 DCFH-DA의 공초점 이미지를 나타낸 것이다. Scale bar = 100 μm.

도 10은 샘플 처리 18일 째 종양 무게를 나타낸 것이다. a-b는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다($p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] [실시예]

[0018] 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.

[0020] **실험 방법**

[0021] **재료 및 방법**

[0022] 모든 시약과 용매는 Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, TCI Korea에서 구입하여 추가 정제 없이 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피는 고정상으로 실리카겔 100(Merck)을 사용하여 수행하였다. 실리카 겔 플레이트 Merck 60 F254에서 박층 크로마토그래피(TLC)를 수행하였다. 1H 및 13C NMR 스펙트럼은 Bruker 500 MHz 및 Bruker 125 MHz 분광기로 측정하였다. UV/Vis 흡수 및 형광 스펙트럼은 각각 Jasco V-750 분광 광도계 및 Jasco FP-8500 분광광도계를 사용하여 기록하였다. ESI 질량 스펙트럼 분석은 LC/MS-2020 시리즈(Shimadzu)를 사용하여 수행하였다. ESR 스펙트럼 분석은 JES-X320을 사용하여 수행하였다. 스펙트럼 검출을 위해 H_2O 탈이온화된 HPLC 시약 등급 DMSO를 사용하였다. U87MG 세포 및 MCF-7 세포는 Peking Union Medical College의 Center of Cells에서 구입하였다.

[0024] **TK-RB의 합성**

[0025] 하기 도 1A의 합성 경로에 따라 본 발명에 따른 화합물 TK-RB를 합성하였다.

[0027] 화합물 1, 2의 합성

[0028] 종래 문헌에 기재된 방법에 따라 화합물 1(P. W. Elsinghorst, M. Gutschow, *J. Label Compd. Radiopharm* **2009**, 52, 360) 및 화합물 2(P. Jangili, M. Won, S. J. Kim, J. Chun, I. Shim, C. Kang, W. X. Ren and J. S. Kim, *ACS Appl. Bio Mater*. **2019**, 2, 3532)를 합성하였다.

[0030] 화합물 3의 합성

[0031] 화합물 1(1 mmol), HATU(1.2 mmol), DIPEA(2.4 mmol)를 무수 DMF에 녹인 후 질소 분위기하 0℃에서 30분간 교반하였다. 이어서, 화합물 2(1 mmol)를 혼합물에 첨가하고 실온으로 가온하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반하고 DMF를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 EtOAc에 용해시키고, 1N HCl로 세척한 후, 포화 $NaHCO_3$ 및 염수 용액으로 세척하였다. 유기층을 모아 무수 Na_2SO_4로 건조시키고, 여과 및 감압 농축하였다. 수득한 화합물 3(수율: 64%)을 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0032] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-*d6*) δ 13.67 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 7.76 (dd, *J* = 9.4, 2.6 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.96 - 6.89 (m, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.5, 4.6 Hz, 1H), 3.33 (t, 2H), 3.21 (dd, *J* = 13.0, 6.6 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 1.57 - 1.53 (m, 2H), 1.53 - 1.49 (m, 2H), 1.36 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H), 1.35 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d6*) δ 170.01, 165.19, 162.76, 159.72, 157.68, 136.65, 134.87, 130.53, 127.70, 126.36, 125.36, 121.62, 114.93, 112.85, 112.63, 110.46, 106.55, 106.16, 51.06, 39.03, 38.68, 36.23, 31.20, 29.64, 28.70, 26.51, 26.36, 13.68, 10.92.

[0034] 화합물 4의 합성

[0035] RB(Rose bengal)(1 mmol) 및 프로파길 브로마이드(5 mmol)를 CH_3CN에 용해시켰다. 반응 혼합물을 70℃에서 15시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 감압하에서 CH_3CN을 제거하였다. 생성된 조 혼합물(crude mixture)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH_2Cl_2중 5% MeOH)로 정제하여 화합물 4(수율: 19%)를 수득하였다.

[0036] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 7.47 (s, 2H), 4.65 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 2.99 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H).

[0038] TK-RB의 합성

[0039] 화합물 4(0.1 mmol) 및 아스코르브산나트륨(10 mol%)을 DMF 용액에 용해시켰다. 생성된 반응 혼합물을 아르곤

버블링을 사용하여 30분 동안 탈기시켰다. 동시에, 5 mol%의 $CuSO_4$를 물(1 mL)에 용해시키고 아르곤 가스로 30분 동안 버블링하여 탈기시켰다. $CuSO_4$ 용액을 시린지를 통해 반응 혼합물에 첨가하였다. 다음으로, 화합물 3(0.1 mmol)을 반응 혼합물에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후(TLC로 모니터링), 용매를 감압하에 제거하고 생성된 조 혼합물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH_2Cl_2 중 10% MeOH)로 정제하여 순수한 TK-RB(수율: 31%)를 수득하였다.

[0040] ^{1}H NMR (500 MHz, acetone-*d6*) δ 13.74 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.56 (s, 2H), 7.53 (dd, *J* = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.21 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.95 (dd, *J* = 8.4, 4.4 Hz, 1H), 6.87 (td, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.36 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.43 (dd, *J* = 12.7, 6.7 Hz, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 1.85 (dt, *J* = 14.9, 7.3 Hz, 2H), 1.65 (dt, *J* = 14.2, 7.0 Hz, 2H), 1.49 (dt, *J* = 14.6, 7.2 Hz, 2H), 1.42 - 1.34 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d6*) δ 207.01, 172.32, 172.27, 170.05, 165.08, 163.55, 163.30, 157.76, 157.50, 157.47, 140.34, 139.53, 136.82, 136.67, 136.46, 135.51, 134.94, 134.85, 133.55, 132.37, 130.77, 130.51, 130.49, 129.30, 127.70, 127.63, 126.25, 125.40, 124.63, 121.67, 114.91, 114.89, 112.87, 112.68, 110.70, 110.50, 110.44, 106.49, 106.28, 97.73, 76.49, 59.70, 50.17, 31.18, 30.01, 29.61, 26.39, 26.10, 13.81, 13.62, 11.04. FAB-MS calc. for $C_{45}H_{31}Cl_4FI_4N_6O_7$ $(M+Na)^+$: 1458, found 1458.

[0042] **UV-Vis 및 FL 스펙트럼**

[0043] UV/Vis 및 형광 측정을 위해, TK-RB 및 RB의 10 mM의 DMSO 및 ACN 스톡 용액을 준비하고, 각 용액 상 분석에 적합한 농도로 희석하였다. 5%의 2,2,6,6-테트라메틸피페리딘(2,2,6,6-tetramethylpiperidine, TEMP) 용액을 ACN에 용해시켜 제조하였다.

[0045] **세포 배양**

[0046] 인간 교모세포종(뇌종양) U87MG 세포주를 한국 세포주 은행(Seoul, Republic of Korea)에서 구입하였다. 세포는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)(GIBCO, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)(Hyclone)이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(Hyclone, USA)에서 배양하였다. 인간 유방암 MCF-7 세포주는 15% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 배양된 세포는 5% CO_2를 포함하는 가습된 대기에서 37℃로 유지시켰다.

[0048] **세포 흡수(Cellular uptake)**

[0049] U87MG 및 MCF-7 세포를 공초점 유리 바닥 접시에 5×10^4 세포 밀도로 시딩하였다. 24시간 동안 안정화시킨 후, 세포를 PBS로 1회 세척하고 다양한 농도의 TK-RB(1, 2, 4, 10 μM)로 4시간 동안 처리하였다. 인큐베이션 후, 샘플을 PBS로 2회 세척하였다. 그 후 FLUOVIEW FV3000 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan)을 사용하여 형광 이미지를 수득하였다.

[0051] **세포 생존력 분석**

[0052] TK-RB의 암독성(dark toxicity)을 확인하기 위해, VEGFR-양성 U87MG 및 VEGFR-음성 MCF-7 세포를 96웰 마이크로플레이트에 시딩하였다. 세포를 다양한 농도의 TK-RB(0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μM)로 24시간 동안 인큐베이션 한 다음, 새로운 배양 배지로 교체하였다. 그 후, 후속 표준 MTT 실험(subsequent standard MTT experiment)을 통해, 세포 생존율을 평가하였다.

[0053] TK-RB의 초음파 동역학 치료 효과(sonodynamic therapeutic effect)를 확인하기 위해, 먼저, 먼저 U87MG(VEGFR 양성) 및 MCF-7(VEGFR 음성) 세포를 12-웰 플레이트에 시딩하였다. 세포를 다양한 농도의 TK-RB(0, 1, 2, 4, 6 μM)로 4시간 동안 인큐베이션 한 다음 새로운 배양 배지로 교체하였다. 다음으로, 세포를 0.5 W/cm^2 또는 1

W/cm^2(frequency: 1 MHz, duty cycle: 10%의 초음파 출력으로 30초 또는 60초 동안 초음파 처리한 후 24시간 동안 처리하였다. 그 후, 후속 표준 MTT 실험에 의해 세포 생존율을 평가하였다.

[0055] **ROS 생성 분석**

[0056] U87MG 또는 MCF-7 세포에서 TK-RB의 ROS 생성을 확인하기 위해, **TK-RB** 처리 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 DCFH-DA(10 μM)로 20분 동안 염색한 다음 공초점 레이저 주사 현미경(CLSM)DMFH FL 이미징을 기록하였다. 각 이미지의 평균 형광 강도는 CLSM 소프트웨어로 계산하였다.

[0058] **Calcein AM/PI 염색 분석**

[0059] U87MG 또는 MCF-7 세포에서 TK-RB의 세포 사멸을 추가로 확인하기 위해, **TK-RB** 처리 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 Calcein AM (4 μM) 및 PI (100 μg/ mL)로 20분 동안 염색한 다음 CLSM으로 형광 이미지를 기록하였다.

[0061] **웨스턴 블롯팅(Western blotting)**

[0062] VEGFR(Abcam; ab32152), ERK1/2(Cell signaling Technology; #4696), phospho-ERK1/2(Cell signaling Technology; #4370) 및 b-actin (SantaCruz Biotechnology; sc-47778)의 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석을 통해 측정하였다. 간략히, 부착된 세포를 ice-cold PBS로 3회 세척하고 긁어내어 세포 펠렛을 수집하였다. PBS를 제거한 후, 50 mM Tris/HCl(pH 7.5)을 함유하는 RIPA(radioimmunoprecipitation assay) 용해 완충액(lysis buffer), 150 mM NaCl, 0.1% 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 1% Triton X-100, 1% 나트륨 데옥시콜레이트, 및 프로테아제 억제제(protease inhibitor) 혼합물을 세포 펠렛에 첨가하여 단백질 용해물(protein lysate)을 수득하였다. 각 시료의 단백질 농도를 측정하기 위해 BCA assay(Bicinchoninic acid assay)를 수행한 후, 각 세포주의 단백질(30 μg/lane)을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis)에 로딩하여 단백질을 밴드로 분리하였다. 분리된 단백질 밴드를 PVDF(Polyvinylidene difluoride) 멤브레인(Merk Millipore, Burlington, MA, USA)으로 옮긴 후, 4℃에서 항체와 함께 밤새 인큐베이션하였다. 생성된 멤브레인들을 Tween-20(TBS-T)을 포함하는 Tris 완충 식염수로 세척한 다음, 항-마우스 겨자무과산화효소(HRP)-접합된 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology; sc-2357) 및 항-래빗 겨자무과산화효소(HRP)-접합된 이차 항체(GTX213110-01; GeneTex, Irvine, CA, and USA)와 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 면역 반응성 단백질 밴드를 감지하기 위해, 강화된 화학 발광 시약(Luminate, Merk Millipore)을 제조사의 지시에 따라 사용하였다.

[0064] **초음파 동역학 치료(sonodynamic therapy, SDT)를 위한 이종이식 마우스 모델**

[0065] 모든 동물 실험은 고려대학교 동물관리위원회(#KUIACUC-2019-90)의 승인을 받아 수행하였다. U87MG 세포(5×10^6) 현탁 PBS(100 μL)를 각각의 암컷 nu/nu 누드 마우스(age: 6-8 weeks; weight: 15-20 g)의 등에 피하 주사하여 종양 모델을 확립하였다. U87MG 종양 보유(tumor-bearing) 마우스(~100 cm^3)를 6개 그룹으로 나누었다: (1) without ultrasound; (2) RB (*i.v.* injection, 200 μL, 0.5 mM); (3) **TK-RB** (*i.v.* injection, 200 μL, 0.5 mM); (4) ultrasound only; (5) RB (*i.v.* injection, 200 μL, 0.5 mM) + ultrasound; (6) **TK-RB** (*i.v.* injection, 200 μL, 0.5 mM) + ultrasound. 정맥내 주사 8시간 후, 종양에 초음파를 조사하였다(frequency: 1 MHz, intensity: 1.0 W/cm^2, duty cycle: 50%, 5 min). 종양 크기 및 체중을 격일로 기록하였다. 종양 크기는 다음의 공식을 사용하여 계산하였다: Tumor volume (V) = length × $width^2$ / 2. 18일 후, 각 마우스 그룹의 종양을 수집하고 사진을 찍고 무게를 측정하였다.

[0067] **생체 내(In vivo) 및 생체 외(ex vivo) 이미징**

[0068] U87MG 종양 보유 마우스에 TK-RB(200 μL, 0.5mM)를 정맥 주사한 후 서로 다른 시점(0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 및 24시간)에 이미징하였다(여기 파장 560 nm, 방출 파장 620 nm). 24시간 후, 생체외 이미징을 위해 주요 장기

와 종양을 수집하였다.

[0070] **통계 분석**

[0071] 모든 데이터는 평균±SEM으로 표시하였다. 통계 분석은 SAS 9.4 프로그램과 다중 비교를 위한 one-way or two-way ANOVA test 및 Bonferroni's test를 사용하여 수행하였다.

[0073] **결과 및 고찰**

[0074] 본 발명의 [화학식 1]로 표시되는 화합물(TK-RB)는 하기 도 1A의 합성 경로에 따라 합성하였다. 간략하게, 피페리딘/EtOH 중 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid와 5-fluoro-2,3-indoledione의 반응을 통해 화합물 1을 수득하였다. 다음으로, 화합물 1을 DMF 중 HATU 및 DIPEA의 존재 하에 화합물 2로 처리하여 화합물 3을 수득하였다. 화합물 4는 RB와 아세토니트릴(ACN) 중 프로파길 브로마이드의 반응을 통해 합성하였다. 마지막으로 화합물 3과 화합물 4의 구리 촉매 알킨-아지드 클릭 반응(copper-catalyzed alkyne-azide click reaction)을 통해 TK-RB를 합성하였다. 합성된 화합물의 특징은 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR 및 ESI-MS 분석을 통해 확인하였다.

[0075] 다음으로, DMSO 및 ACN 용액에서 TK-RB의 광물리적 특성(UV-Vis 흡수 및 FL 방출 스펙트럼) 분석 결과, RB의 특성과 일치하는 것을 확인하였다(도 1B 및 1C). TK-RB는 DMSO와 ACN에서 각각 생물학적 응용에 적합한 범위인 573과 568 nm에서 강한 흡수 밴드 및 598과 591 nm에서 발광 피크를 나타내었다. 다음으로 초음파(Ultrasound, US)가 TK-RB의 초음파 동역학(sonodynamic) 효과를 유발하는지 확인하기 위해, ROS 생성 실험을 진행하였다. 일중항 산소 발생을 확인하기 위해 잘 알려진 일중항 산소 센서인, 전자 스핀 공명(electron spin resonance, ESR)을 위한 TEMP(2,2,6,6-tetramethylpiperidine)(T. Luo, Y. Peng, L. Chen, J. Li, F. Wu, D. Zhou, *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54*, 10261)를 사용하였다. ESR 분석은 TEMP 자체가 US 조사에 관계없이 유의미한 일중항 산소 발생을 나타내지 않았음을 나타내었다. 반면에, TEMPO의 신호는 TK-RB를 사용한 US 조사에 의해 크게 향상되었으며(도 1D), 이를 통해, UV 노출 시 TK-RB의 RB에서 일중항 산소가 생성된다는 것을 확인하였다.

[0076] 본 발명의 화합물 TK-RB는 상향조절된 VEGFR 종양 유형을 표적으로 하는 RB 및 VEGFR 억제제로 구성된다. 이를 평가하기 위해 먼저 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 서로 다른 암세포주[인간 교모세포종(U87MG) 및 인간 유방암(MCF-7)]에서 VEGFR 단백질 발현을 조사하였다. 웨스턴 블롯 결과, U87MG 세포가 상승된 VEGFR 발현 수준을 나타내는 반면 MCF-7 세포는 거의 무시할 수 있는 VEGFR 단백질 발현을 나타내었다(도 5). 다음으로, VEGF 음성 세포보다 VEGF 양성 세포에 대한 TK-RB의 선택성을 확인하기 위해 공초점 현미경을 사용하여 U87MG 및 MCF-7 세포에서 TK-RB 및 RB의 세포 흡수 실험을 수행하였다. 도 2A에 나타난 바와 같이, U87MG 세포는 MCF-7보다 7배 더 많은 TK-RB를 흡수하였으며, 이러한 결과는 VEGFR 양성 U87MG 세포에 대한 수니티닙의 표적화 가능성을 입증한다. 대조적으로, RB는 U87MG 및 MCF-7 세포에 대해 유의미한 세포 침투 거동을 나타내지 않았다(도 6). 세포 독성 실험에 대한 추가 조사를 통해, US 조사 없이 U87MG 및 MCF-7 세포주에서 TK-RB의 암독성(dark toxicity)을 테스트하였으며, 그 결과 최대 10 μM까지 무시할 수 있는 수준의 세포 독성이 관찰되었다(도 7). 또한, US 레이저 출력(0.5 및 1.0 W/cm^{-2}) 및 조사 시간(30 및 60초)의 함수로 다양한 조건에서 TK-RB의 세포 생존율 실험을 수행하였다. 도 2B에 나타난 바와 같이, VEGFR 양성 U87MG 세포에서는 짧은 조사 시간 및 낮은 레이저 출력 하에서도 민감한 세포 독성을 보인 반면, VEGFR 음성 MCF-7 세포에서는 무시할 수 있는 수준의 효과만 보였다(도 8).

[0077] VEGF와 그 수용체(VEGFR)는 신생혈관 생성에 중요한 기본 조절자로 알려져 있으며, VEGF 신호는 세린/트레오닌 키나제 ERK(pERK)의 인산화를 통해 혈관신생을 촉진하고, VEGFR의 차단은 신생혈관생성 신호전달 경로의 억제를 유도하여 pERK 신호를 감소시킬 수 있다(E. Karali, S. Bellou, D. Stellas, A. Klinakis, C. Murphy, T. Fotsis, *Mol. Cell* 2014, *54*, 559).

[0078] TK-RB에서 수니티닙의 신생혈관생성 억제(anti-angiogenic) 역할을 확인하기 위해, Western blotting 실험을 수행하였다. 그 결과, TK-RB의 투여량을 증가시키면 p-ERK 발현 수준은 TK-RB의 VEGF 억제 매개된 신생혈관생성 억제능으로 인해 극적으로 감소하였다(도 2C). 또한, 시험관 내에서 DCFH-DA 염색을 사용하여 TK-RB의 ROS 생성 능력을 분석하였다. 그 결과, 다른 대조군 세포와 비교하여 TK-RB로 처리된 U87MG 세포에서 강한 형광 이미지가 관찰되었으며(도 2D 및 도 9), 이는 수니티닙과 접합된 RB가 ROS를 크게 생성할 수 있음을 나타내는 것이다. 다

음으로, calcein-AM(green, live cell) 및 PI(red, dead cell) 염색으로 세포 사멸 분석을 수행하였다. U87MG 세포의 경우 US 조사 및 TK-RB 처리군에서 PI 채널의 강렬한 적색 형광 신호가 관찰된 반면, MCF-7 세포에서는 어는 조건하에서도 명백한 세포 사멸이 관찰되지 않았다(도 2E). 종합하면, TK-RB는 VEGFR 음성 세포(MCF-7)보다 VEGFR 양성 세포(U87MG)에 훨씬 더 잘 침투하고, US 조사 하에 생성된 ROS에 의해 U87MG 세포에 유의적이고 선택적인 세포독성을 나타낸다. 또한, TK-RB에서 수니티닙의 VEGFR 억제 특성은, U87MG 세포에 대한 TK-RB의 시너지 효과라 불리는 신생혈관생성 억제 신호전달 경로(anti-angiogenic signaling pathway)를 제공한다.

[0079] TK-RB의 생체 내 종양 표적화 가능성 확인을 위해, U87MG 교모세포종 종양 이종이식편이 있는 누드 마우스에 RB 및 TK-RB의 정맥 주사 후, 시간 의존적 형광 이미지 분석을 진행하였다. 도 3A 및 3B에 나타난 바와 같이, TK-RB 처리군은 종양 부위에서 강한 형광 이미지를 나타내었고, 최대 8시간 까지 상당한 형광 향상이 관찰되었으며, 그 이후에는 형광 강도가 점진적으로 감소하였다. 이 기간 동안, RB 처리 그룹에서는 주목할만한 신호가 감지되지 않았다. 또한, 이러한 초음파 감각제(sonosensitizer)(RB 및 TK-RB)의 생체 분포를 추적하기 위해 마우스를 희생하여 각 기관과 종양을 수집하고 형광 강도를 확인하였다(도 3C 및 3D). TK-RB 처리군의 경우, 종양 부위에서 유의적인 형광 강도가 확인되었으며, 이는 고형 종양에서 TK-RB의 종양 축적이 증가되었음을 나타낸다. RB로 처리된 종양 영역에서는 최소의 형광 강도가 감지되었다. 이러한 결과들을 통해 TK-RB의 종양 표적화 능력을 확인할 수 있었다.

[0080] 다음으로, U87MG 교모세포종 종양 이종이식편이 있는 누드 마우스를 이용하여 TK-RB의 US 매개 치료 효능을 평가하였다. TK-RB 처리군의 경우, US 조사하에서 종양 부위에서 유의미한 종양 퇴행이 확인된 반면(도 4A-4C 및 도 10), 다른 대조군(대조군, RB w/o US, TK-RB w/o US)에서는 눈에 띄는 종양 억제가 관찰되지 않았다. 또한, 모든 처리군에서 현저한 체중 변화는 관찰되지 않았다(도 4D). 종합하면, 전술한 결과들을 통해, RB와 티로신 키나제 억제제(TK)가 조합된 TK-RB는 현저하게 향상된 항종양 능력을 갖는다는 것을 확인하였다.

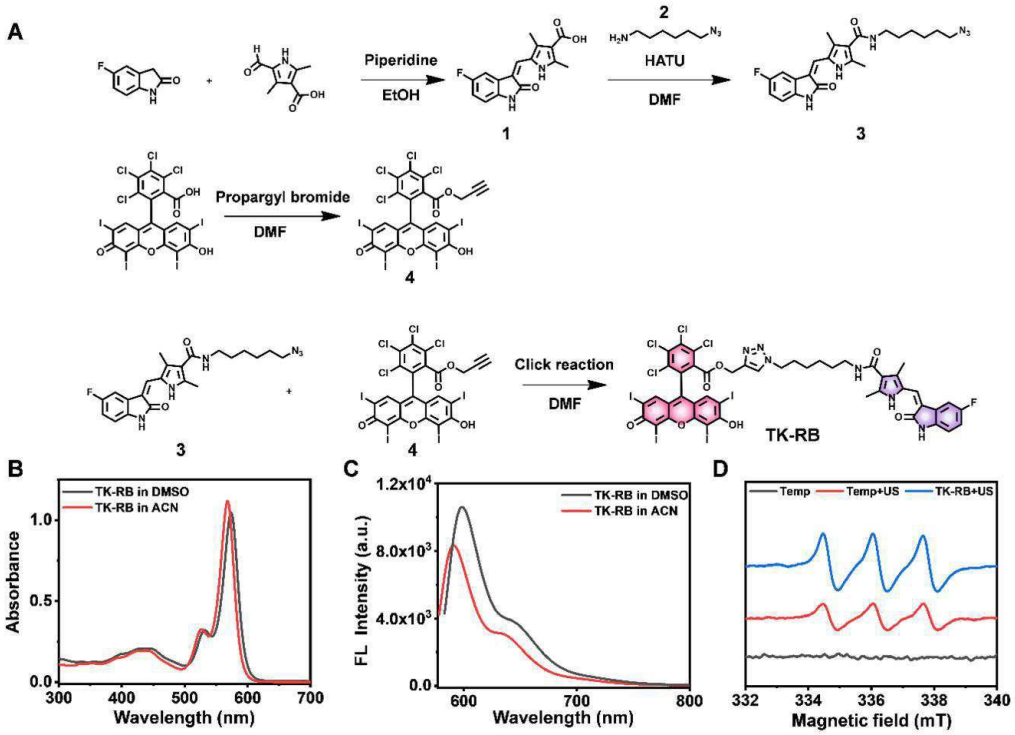
[0082] **결론**

[0083] 본 발명에서는 US 조사 하에 생성된 ROS에 의한 세포/종양 손상 및 VEGFR 억제 매개 신생혈관생성 억제를 통한 항암 효과가 향상된 수니티닙-접합 RB 초음파 감각제인 TK-RB를 제공한다. 시험관 내 결과를 통해, TK-RB는 VEGFR 양성 세포(U87MG)에 대한 RB 흡수를 증가시킨 후 US 조사 하에서 ROS 생성을 현저하게 증가시켜 U87MG 암세포에 향상된 세포독성 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한, TK-RB에서 수니티닙의 VEGFR 억제 특성은 U87MG 세포에 대한 TK-RB의 세포독성 효과를 증가시키는 신생혈관생성 신호전달 경로를 억제하여, U87MG 교모세포종 이종이식편을 보유하는 누드 마우스에서 생체내/생체외 및 종양 성장 연구의 형광 이미지 분석을 통해, TK-RB는 향상된 항종양 효과를 가진다는 점을 확인하였다.

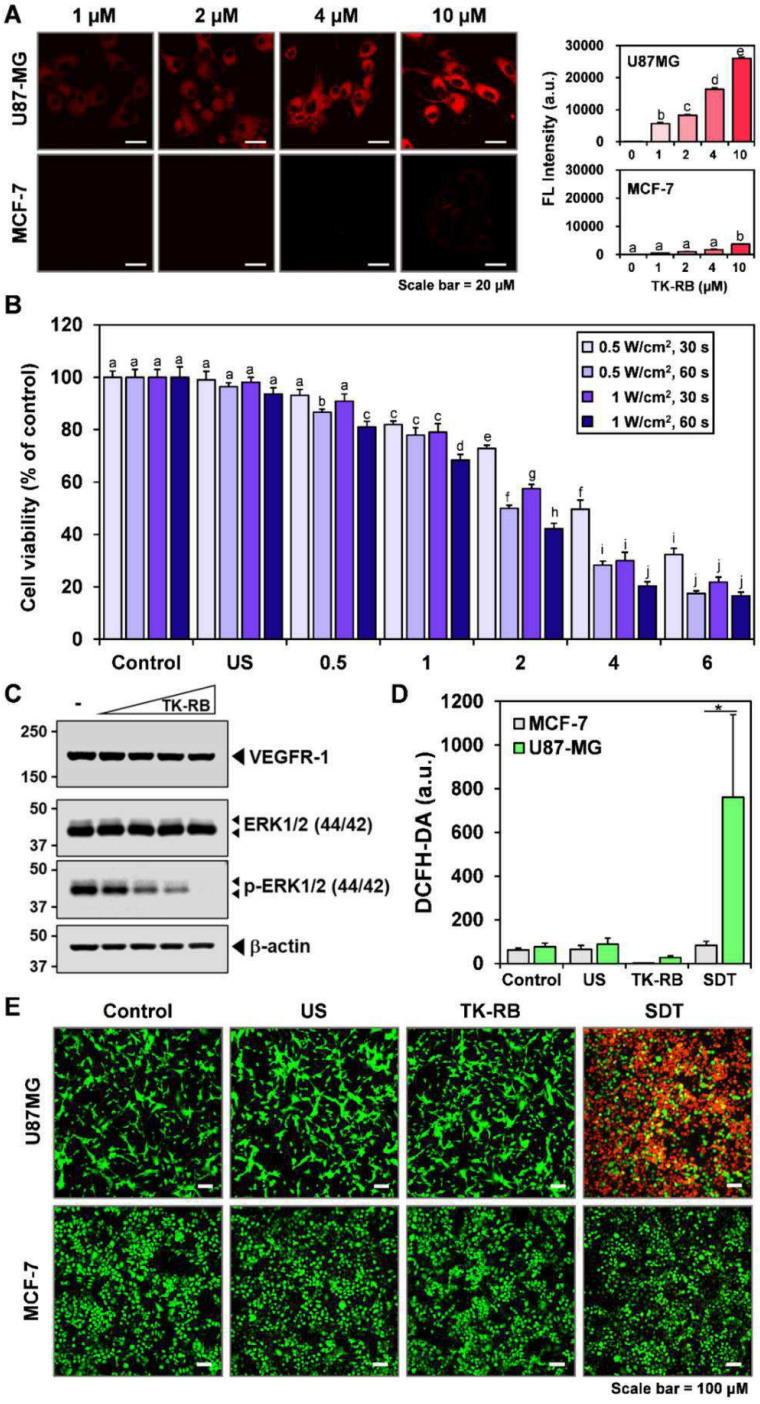
[0085] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

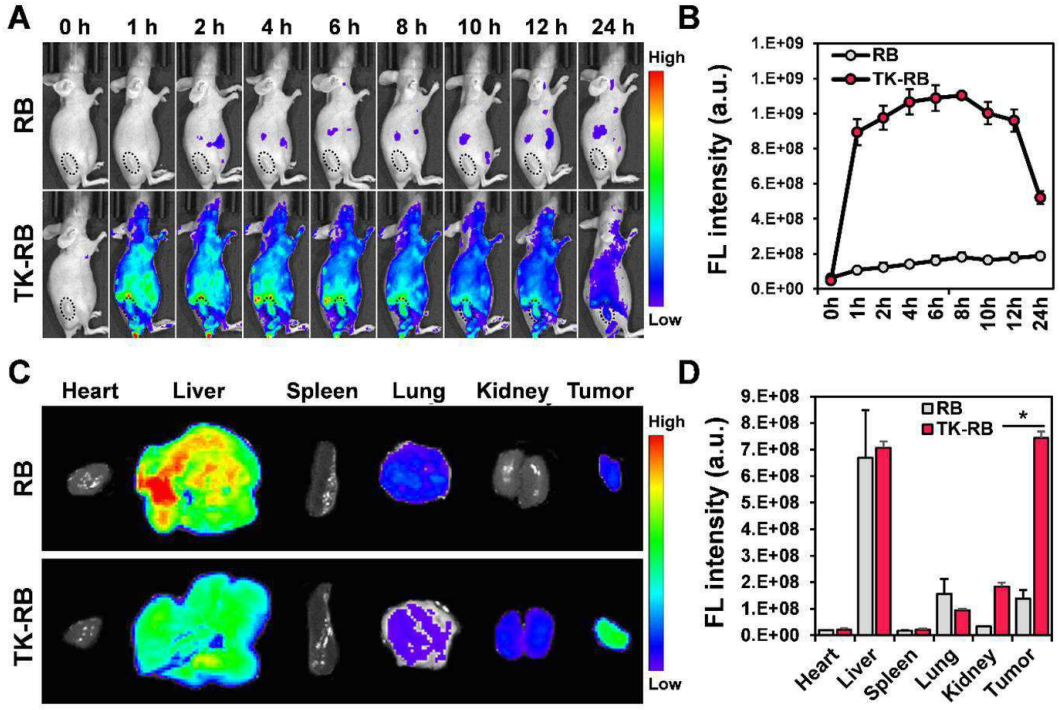
도면1


A
Piperidine
EtOH
1
2
HATU
DMF
3
Propargyl bromide
DMF
4
Click reaction
DMF
TK-RB
B
TK-RB in DMSO
TK-RB in ACN
Absorbance
Wavelength (nm)
C
TK-RB in DMSO
TK-RB in ACN
FL Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
D
Temp
Temp+US
TK-RB+US
Magnetic field (mT)

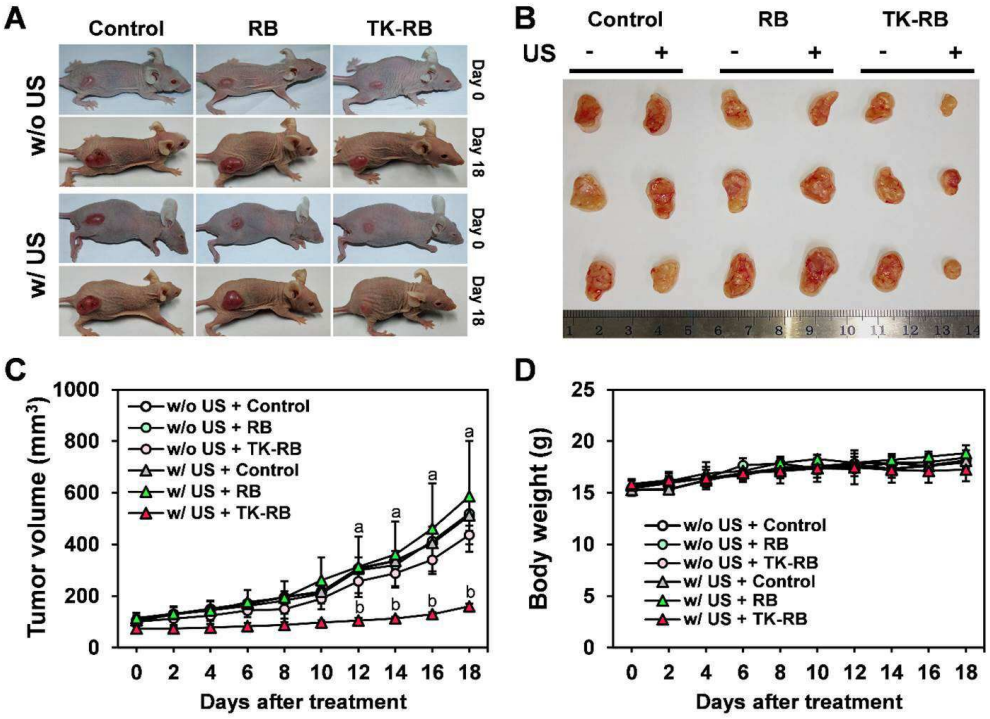
도면2


A
1 μM
2 μM
4 μM
10 μM
U87-MG
MCF-7
Scale bar = 20 μM
U87MG
MCF-7
FL Intensity (a.u.)
TK-RB (μM)
B
Cell viability (% of control)
0.5 W/cm², 30 s
0.5 W/cm², 60 s
1 W/cm², 30 s
1 W/cm², 60 s
Control
US
0.5
1
2
4
6
C
TK-RB
VEGFR-1
ERK1/2 (44/42)
p-ERK1/2 (44/42)
β-actin
D
MCF-7
U87-MG
DCFH-DA (a.u.)
Control
US
TK-RB
SDT
E
Control
US
TK-RB
SDT
U87MG
MCF-7
Scale bar = 100 μM

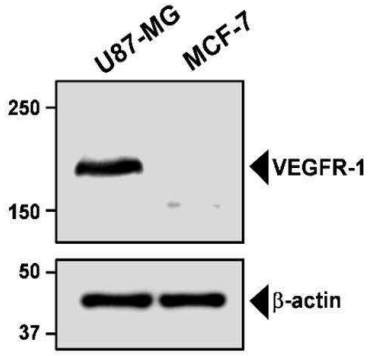
도면3


A
0 h
1 h
2 h
4 h
6 h
8 h
10 h
12 h
24 h
RB
TK-RB
High
Low
B
FL intensity (a.u.)
RB
TK-RB
C
Heart
Liver
Spleen
Lung
Kidney
Tumor
D
*

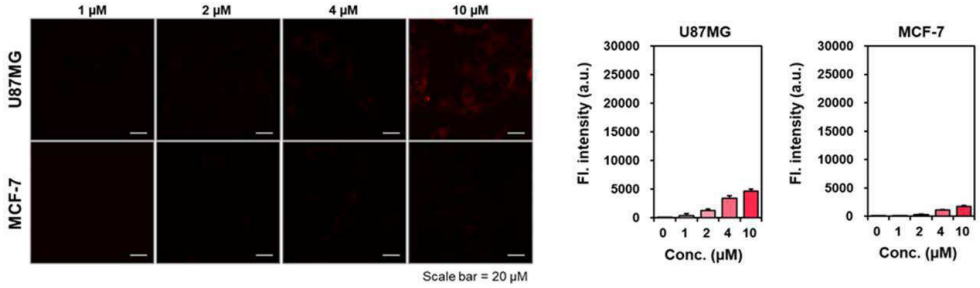
도면4


A
Control
RB
TK-RB
w/o US
w/ US
Day 0
Day 18
B
US
C
Tumor volume (mm³)
w/o US + Control
w/o US + RB
w/o US + TK-RB
w/ US + Control
w/ US + RB
w/ US + TK-RB
Days after treatment
D
Body weight (g)
Days after treatment

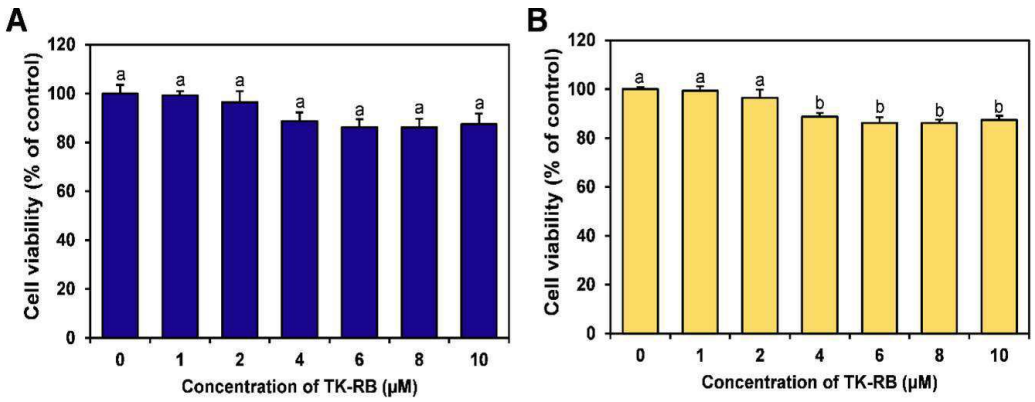
도면5


U87-MG
MCF-7
250
150
50
37
VEGFR-1
β-actin

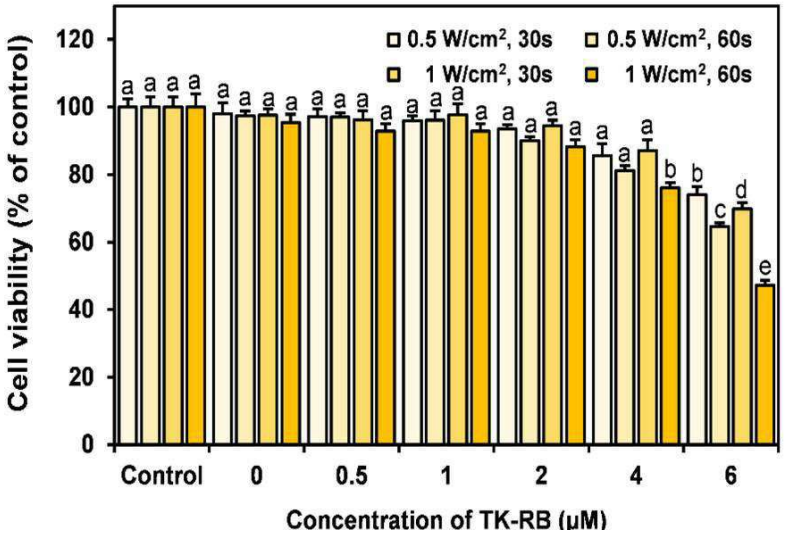
도면6


1 μM
2 μM
4 μM
10 μM
U87MG
MCF-7
Scale bar = 20 μM
U87MG
MCF-7
Fl. intensity (a.u.)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0 1 2 4 10
Conc. (μM)

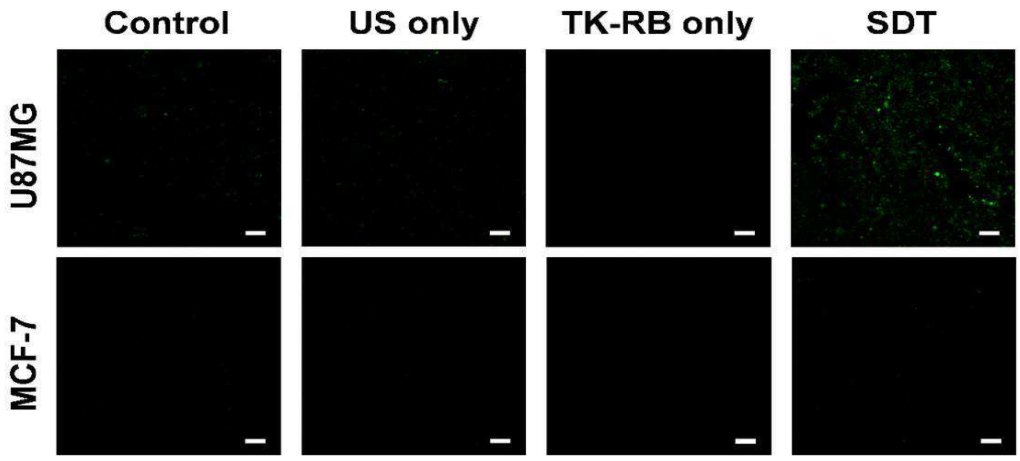
도면7


A
B
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
b
0 1 2 4 6 8 10
Concentration of TK-RB (μM)

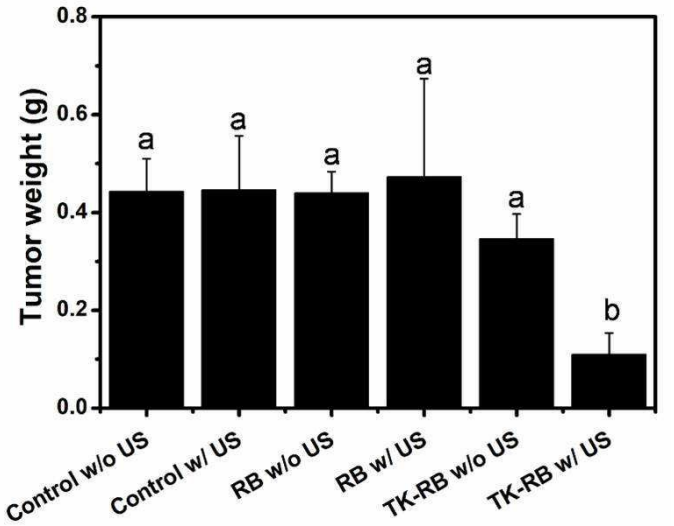
도면8


Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
0.5 W/cm², 30s
0.5 W/cm², 60s
1 W/cm², 30s
1 W/cm², 60s
Control
0
0.5
1
2
4
6
Concentration of TK-RB (μM)

도면9


Control
US only
TK-RB only
SDT
U87MG
MCF-7

도면10


Tumor weight (g)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Control w/o US
Control w/ US
RB w/o US
RB w/ US
TK-RB w/o US
TK-RB w/ US