



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0117847
(43) 공개일자 2018년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/50 (2017.01) A61K 31/437 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/556 (2017.08)

A61K 31/437 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0050882

(22) 출원일자 2017년04월20일

심사청구일자 2017년04월20일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호

피터 베르비스트

서울특별시 성북구 안암로 87, 202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열

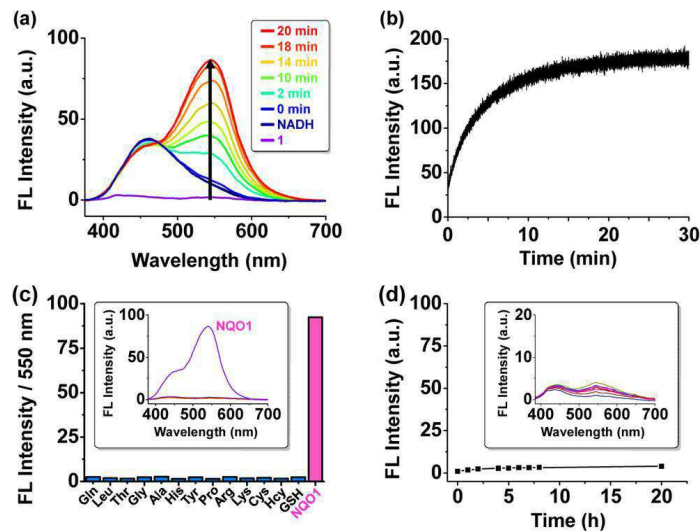
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 표적 특이적 항암 약물전구체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 표적 특이적 항암 약물전구체 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 정상 세포에 비해서 암 세포에 대해서만 높은 선택성을 가지며, 효소에 의해 분해되어 효과적으로 약물을 방출함으로써 항암 효과를 향상시킬 수 있으며, 더불어 세포 수준의 영상화를 통한 약물 모니터링이 동시에 가능하게 된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/557 (2017.08)

A61K 49/0052 (2013.01)

(72) 발명자

김중훈

서울특별시 성동구 마장로 137, 212동 505호

신원섭

충청남도 아산시 배방읍 광장로 210, 102동 2303호

한지유

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 자연대
캠퍼스 생명과학대학 서관 305호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016004821

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015036905

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업(신진-유형2)

연구과제명 세라노스틱(theranostic) 스마트 표적항암제 개발과 발암기전 연구

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

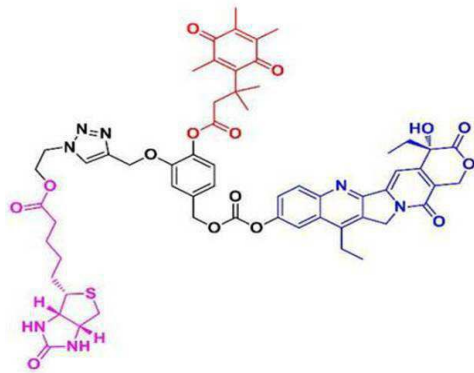
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 표적 특이적 항암 약물전구체:

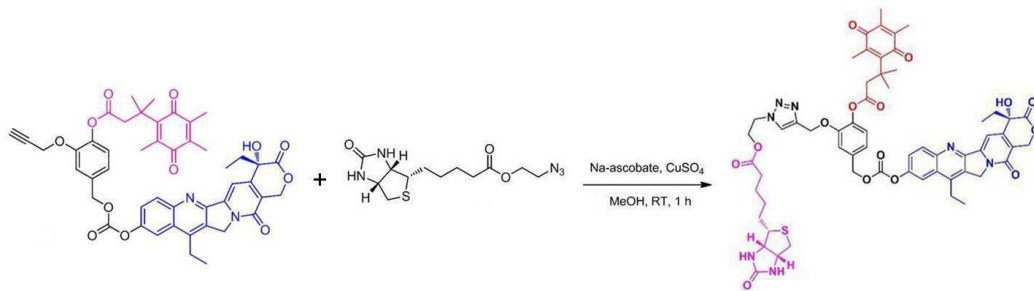
[화학식 1]



청구항 2

하기 [반응식 1]에 따라 디메틸포름아미드(dimethylformamide, DMF) 용매하에서 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 소듐 아스코베이트(sodium ascorbate) 및 하기 [화학식 9]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 표적 특이적 항암 약물전구체의 제조방법.

[반응식 1]



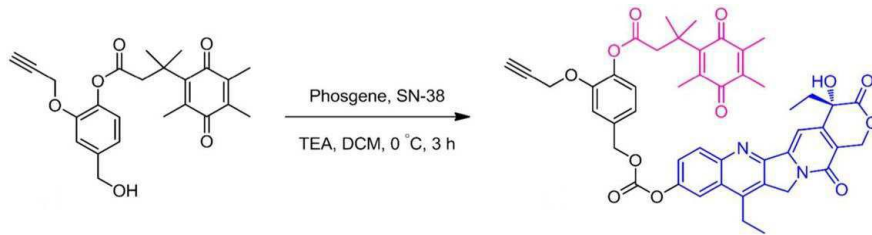
[화학식 2] [화학식 9] [화학식 1]

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물과 7-에틸-10-하이드록시캄프토테신(SN-38)을 반응시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 표적 특이적 항암 약물전구체의 제조 방법.

[반응식 2]



[화학식 3]

[화학식 2]

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표적 특이적 항암 약물전구체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본질적으로 매우 독성이 강한 항암제의 특이성 결핍은 현재 이용 가능한 항암화학요법 치료효과를 제한하는 주요 걸림돌 중 하나이다(비특허문헌 1). 지난 수십년동안, 세포 내 싸이올 농도의 증가(비특허문헌 2), 매우 낮은 세포 외 pH 농도(비특허문헌 3) 및 세포 내외 반응산소종(reactive oxygen species; ROS)의 증가된 농도(비특허문헌 4) 등 독특한 암 미세환경을 활용하는 수많은 약물전구체(prodrug)들이 개발되었다. 그러나 이러한 일들의 상세한 이해가 새로운 치료법 개발에서 매우 중요함에도 불구하고, 이러한 약물전구체들 중 약물 활성화의 실시간 모니터링이 쉽지 않다는 중대한 문제점을 가진다(비특허문헌 5).

[0003] 종양 미세환경은 pH, 환원 및 산화 포텐셜이 다를 뿐만 아니라, 종양에 대한 건강 조직의 악성 변이의 결과로서 효소의 전체 어레이는 다른 발현을 나타낸다. NAD(P)-H: 퀴논 옥시도리덕타아제-1 (NQO1)(비특허문헌 6)은 광범위하게 다양한 기원의 수많은 암세포가 NQO1 농도를 강하게 상승시키는 것으로 밝혀짐에 따라(12-50배)(비특허문헌 7), 최근 약물전구체의 인시츄(in situ) 활성화를 위한 주요 후보로 부상하였다(비특허문헌 8).

[0004] 종양에서 특정 생리학적 미세환경하에서의 약물의 활성화는 항암약물의 치료영역을 넓히는 주요 단계이지만, 이러한 조직으로의 약물의 표적화된 전달은 그 목표를 달성함에 있어 동등하게 중요한 역할을 한다. 수많은 막 결합 수용체는 암 세포에서 과발현되어 이들 세포로 전달되는 약물의 양을 증가시킬 잠재력을 가진다. 이에 최근에는 아주 다양한 소분자, 펩타이드 및 단백질과 폴리머들이 연구되고 있다(비특허문헌 9).

[0005] 이러한 종양 표적분자 중 비타민은 다른 표적 분자들이 내포하고 있는 낮은 확장성, 생산성과 정제비용 및 변형 또는 치환의 어려움, 대사 과정으로의 안정성 결핍 및 (자동)면역 반응을 증가시키는 잠재력을 포함하는 결점이 없기 때문에, 가장 효과적이고 실용적으로 적용 가능한 표적제에 속한다(비특허문헌 10). 암세포와 같이 빠르게 증식하는 세포는 이러한 분자들에 대한 증가된 요구를 가짐에 따라, 비타민 섭취를 매개하는 수용체는 많은 암 세포의 세포표면에서 과발현된다(비특허문헌 11). 비타민들 중 비타민 B는 특히 약물 전달 목적의 흥미로운 후보이다. 가장 널리 연구되고 있는 것은 엽산(비타민 B9), 코발라민(비타민 B12), 및 비오틴(비타민 B7)이고, 비오틴 수용체에 대한 최근의 연구를 통해 엽산 수용체 또는 코발아민 수용체들보다 악성 조직에서 가장 널리 과발현되는 것으로 나타났다(비특허문헌 12).

[0006] 펜타사이클릭-퀴논계 천연물질인 캄프토테신은 토포아이소머라아제 I의 저해로 인해, 암 세포에서 현저하게 강력한 항증식 활성을 나타내는 것으로 밝혀져있다. 용해도 및 약동학적 프로파일을 나타내는 두 개의 (반)합성 유사체인 토포테칸 및 이리노테칸은 미국 식품의약국(FDA)에 의해 승인을 받았고, 현재 임상에서 사용되고 있다(비특허문헌 12). 모 화합물보다 상당히 높은 독성을 나타내는 캄프토테신의 활성화 대사 산물(SN-38)은 컨쥬게이트 형태가 아니라 자유 형태의 고유 형광을 가지기 때문에(비특허문헌 13), 비형광 약물전구체들보다 확실한 이점을 나타내는데, 약물전달 실시간 모니터링 및 체내 활성을 연구하는 이상적인 약물이다. Liu 등의 최근 논문에서는 NQO1 활성화 가능한 트리거 및 펜타사이클릭-퀴논계 약물의 조합이 인비트로에서 특별히 강력한 약물전구체 조합을 나타내는 것을 보여주지만(비특허문헌 14), 생체내에서의 표적 그룹이 부재할 경우 동일하게 주목할만한 효과를 나타내지 못할 가능성이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007]

- (비특허문헌 0001) Cairns, R., Papandreou, I., and Denko, N. (2006) Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol. Cancer Res.* 4, 61-70.
- (비특허문헌 0002) Zhang, Q., Ko, N. R., and Oh, J. K. (2012) Recent advances in stimuli-responsive degradable block copolymer micelles: synthesis and controlled drug delivery applications. *Chem. Commun.* 48, 7542-7552.
- (비특허문헌 0003) Yang, Z., Lee, J. - H., Jeon, H. M., Han, J. H., Park, N., He, Y., Lee, H., Hong, K. S., Kang, C., and Kim, J. S. (2013) Folate-Based Near-Infrared Fluorescent Theranostic Gemcitabine Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 11657-11662.
- (비특허문헌 0004) Bhuniya, S., Maiti, S., Kim, E. - J., Lee, H., Sessler, J. L., Hong, K. S., and Kim, J. S. (2014) An Activatable Theranostic for Targeted Cancer Therapy and Imaging. *Angew. Chem., Int. Ed.* 53, 4469-4474.
- (비특허문헌 0005) Lee, M. H., Kim, J. Y., Han, J. H., Bhuniya, S., Sessler, J. L., Kang, C., and Kim, J. S. (2012) Direct Fluorescence Monitoring of the Delivery and Cellular Uptake of a Cancer-Targeted RGD Peptide-Appended Naphthalimide Theragnostic Prodrug. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 12668-12674.
- (비특허문헌 0006) Tedeschi, G., Chen, S., and Massey, V. J. (1995) DT-diaphorase. Redox potential, steady-state, and rapid reaction studies. *J. Biol. Chem.* 270, 1198-1204.
- (비특허문헌 0007) Danson, S., Ward, T. H., Butler, J., and Ranson, M. (2004) DTdiaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treat. Rev.* 30, 437-449.
- (비특허문헌 0008) Hettiarachchi, S. U., Prasai, B., and McCarley, R. L. (2014) Detection and Cellular Imaging of Human Cancer Enzyme Using a Turn-On, Wavelength-Shiftable, Self-Immolative Profluorophore. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 7575-7578.
- (비특허문헌 0009) Jaracz, S., Chen, J., Kuznetsova, L. V., and Ojima, I. (2005) Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 5043-5054.
- (비특허문헌 0010) Leamon, C. P., and Reddy, J. A. (2004) Folate-targeted chemotherapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 56, 1127-1141.
- (비특허문헌 0011) Russell-Jones, G., McTavish, K., McEwan, J., Rice, J., and Nowotnik, D. (2004) Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1625-1633.
- (비특허문헌 0012) Ren, W. X., Han, J., Uhm, S., Jang, Y. J., Kang, C., and Kim, J. S. (2015) Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery. *Chem. Commun.* 51, 10403-10418.
- (비특허문헌 0013) Kaneda, N., Nagata, H., Funita, T., and Yokokura, T. (1990) Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer Res.* 50, 1715-1720.
- (비특허문헌 0014) Liu, P., Xu, J., Yan, D., Zhang, P., Zeng, F., Li, B., and Wu, S. (2015) A DT-diaphorase responsive theranostic prodrug for diagnosis, drug release monitoring and therapy. *Chem. Commun.* 51, 9567-9570.

발명의 내용

해결하려는 과제

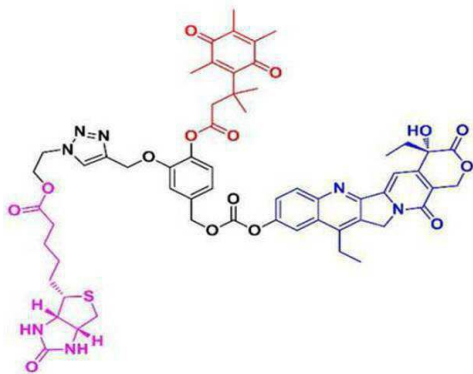
[0008] 본 발명은 전술한 기술적 배경하에서, 표적 특이적으로 약물을 전달할 수 있으면서도 체내 약물 분포를 효과적으로 모니터링할 수 있는 표적 특이적 치료진단 항암 전구약물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0010] 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 표적 특이적 항암 약물전구체를 제공한다:

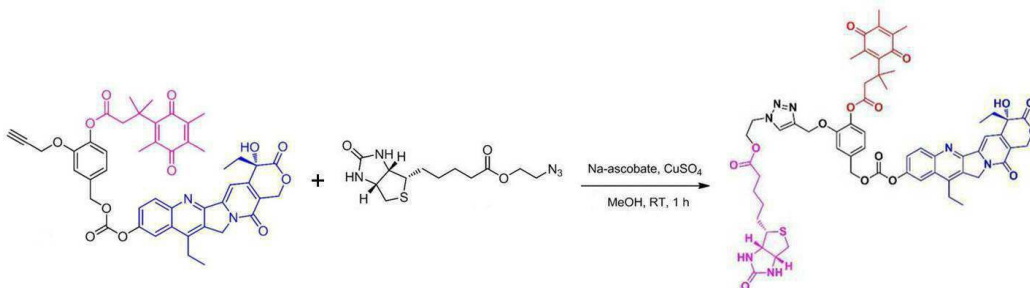
[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 또한, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라 디메틸포름아미드(dimethylformamide, DMF) 용매하에서 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 소듐 아스코베이트(sodium ascorbate) 및 하기 [화학식 9]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 표적 특이적 항암 약물전구체의 제조방법을 제공한다.

[0014] [반응식 1]

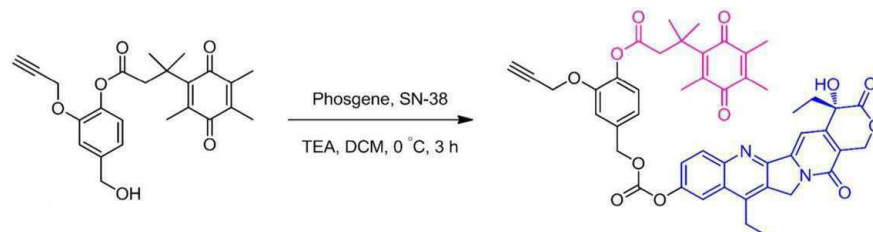


[0015]

[0016] [화학식 2] [화학식 9] [화학식 1]

[0017] 본 발명에 따르면, 상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물과 7-에틸-10-하이드록시캄프토테신(SN-38)을 반응시켜 제조될 수 있다.

[0018] [반응식 2]



[0019]

[0020] [화학식 3] [화학식 2]

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면, 정상 세포에 비해서 암 세포에 대해서만 높은 선택성을 가지며, 효소에 의해 분해되어 효과

적으로 약물을 방출함으로써 항암 효과를 향상시킬 수 있으며, 더불어 세포 수준의 영상화를 통한 약물 모니터링이 동시에 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0022]

도 1의 (a)는 pH 7.4 PBS ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, Slit = 5/5, sensitivity = low, 25 °C)에서 NQ01 (40 μg) 및 NADH (100 μM)을 처리한 약물전구체([화학식 1]로 표시되는 화합물)의 형광 스펙트럼이고, (b)는 pH 7.4 PBS ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$, Slit = 3/3, sensitivity = high, 25 °C)에서 형광강도의 변화이며, (c)는 다른 생물학적 아미노산의 존재하에서 화합물 1([화학식 1]로 표시되는 화합물)의 반응성을 나타낸 것으로, pH 7.4 PBS에서 100 μM 아미노산에 대한 화합물 1의 형광 반응성을 나타내며, (d)는 20시간 동안 혈청에서의 화합물 1의(20.0 μM)의 안정성을 나타낸다.

도 2는 화합물 1의 체외 세포독성을 나타낸다. (a)는 2개의 암 세포주 (A549 및 HeLa) 및 2개의 정상세포주 (WI-38 및 BJ)의 세포독성을 나타내고, (b)는 세포 생존율의 상대적 백분율을 나타내었다(* $P < 0.05$). (c)는 다양한 농도의 화합물 1을 처리한 A549 세포의 위상차 이미지들이다. 이미지들은 화합물 1의 처리 24시간 후에 얻었다(배율 200배).

도 3은 이종이식 마우스 모델에서의 화합물 1의 체내 항암화학치료적 효과를 나타낸다. (a)는 화합물 1(3 mg/kg, 3주간 주당 2회 꼬리-혈관 정맥 주사)은 이종이식 마우스(치료당 $n = 4$)에서의 종양 증식에 영향을 미침을 나타낸다. 종양 사이즈는 화합물 1의 처리에 따라 점진적으로 감소하였다. SN-38 (3 mg/kg) 처리는 대조군으로 사용되었다. (b)는 화합물 1이 주사된 이종이식 마우스의 종양 종결시(14주) 최종 무게는 대조군 마우스의 종양보다 훨씬 낮음을 나타낸다(* $P < 0.05$). (c)는 생체내에서 A549-세포-접종된 이종이식 마우스 내 고형 종양을 시각화한 것이다. (d)는 주요 5개 기관; 심장 (1 및 1'), 폐 (2 및 2'), 간 (3 및 3'), 비장 (4 및 4'), 신장 (5 및 5') 및 종양 (6 및 6')의 체외 대표 형광 이미지를 나타낸다.

도 4는 화합물 1에 의해 유도된 세포사멸 메커니즘을 나타낸다. (a)는 화합물 1의 세포 내 위치를 나타낸 것으로, A549 세포 내 미토-트래커 레드 FM($\text{Ex/Em } 581/644 \text{ nm}$) 및 ER-트래커 레드($\text{Ex/Em } 587/615$)의 형광 이미지들이다. HeLa 세포들은 24시간 동안 10 μM 의 화합물 1로 처리되었다. 대조군으로 10 μM SN-38을 사용하여 세포들에 처리하였다. (b) 화합물 1에 의해 세포사멸 유전자 발현이 유도된 역전사 폴리머라아제 사슬 반응(PCR) 분석 결과이다. (C)는 화합물 1의 활성을 도식화한 것으로, ER- 및 미토콘드리아-매개 세포사 및 DNA 인테그레이션을 통한 화합물 1의 세포사멸 활성의 순차적 모드를 나타낸다.

도 5는 화합물 1(1 mM)의 UV-Vis 스펙트럼이다.

도 6의 (a)는 NADPH (100 μM) 및 NQ01 (20 $\mu\text{g}/2\text{mL}$) 존재하 다양한 pH 값에서 25 °C, 2시간 후의 화합물 1의 형광 반응을 나타낸다. (b)는 NADPH (100 μM)와 효소 존재(blue) 및 부존재(red)하에서 25 °C에서 2시간 동안 화합물 1(10 μM)의 안정성 시험 결과를 나타낸다.

도 7은 25 °C에서 2시간 동안 PBS 용액에서 다양한 pH 값에 따른 화합물 1(10 μM)의 안정성을 나타낸다. 데이터는 30분 간격으로 기록하였다.

도 8은 (a) NADPH, (b) SN38, (c) 화합물 1 (d) NADPH와 NQ01 효소와 화합물 1의 HPLC 트레이스(trace)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0024]

표적화되고 효과적인 치료진단적(치료 및 진단) 항암화학치료제의 발전은 암의 정확한 진단 및 치료를 위해 매우 가치있는 것이다. 이러한 과제를 해결하기 위하여 본 발명에서는 세포핵 내에서 토포아이스오머라아제 I에 결합하는 잘 알려진 항암제인 7-에틸-10-하이드록시캅토프테신(SN-38), 효소-유발(enzyme-triggered) 모이어티로서의 하이드로퀴논 및 암 표적 유닛으로서의 비오틴을 포함하는 암 표적 및 효소-유발 치료진단 약물전구체를 제공한다.

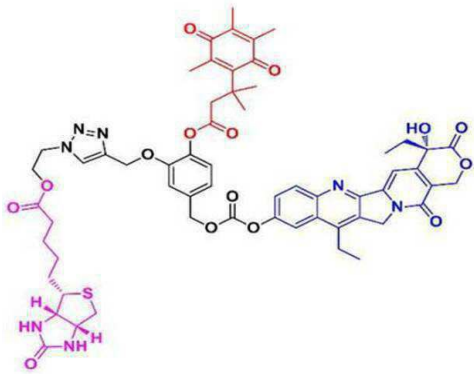
[0025]

본 발명에 따른 약물전구체는 암세포들을 선택적으로 타겟팅하고, NQ01, 전자제공자로서의 NADH 또는 NADPH의 부수적인 소비와 함께 퀴논 모이어티의 2-전자 환원을 촉매하는 세포기질 플라보프로틴의 존재하에 활성화된다. NQ01의 높은 농도는 건강한 세포와 비교하여 다양한 암 세포종에서 발견되고, 그러므로 암 표적 약물 전달 시스템의 발달을 위해 이는 훌륭한 표적이 될 수 있다. 비오틴에 의한 특이적 암세포 전달 및 흡수에 따라, 본 발명

에 따른 약물전구체는 SN-38의 방출과 함께 토포아이스머라아제 I을 억제하면서 세포 사멸을 유도한다.

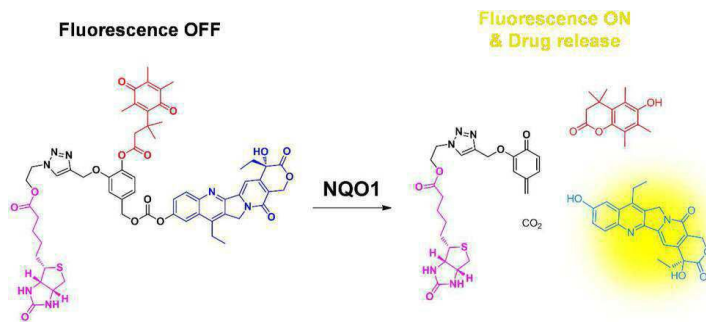
따라서, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 표적 특이적 항암 약물전구체를 제공한다:

[화학식 1]



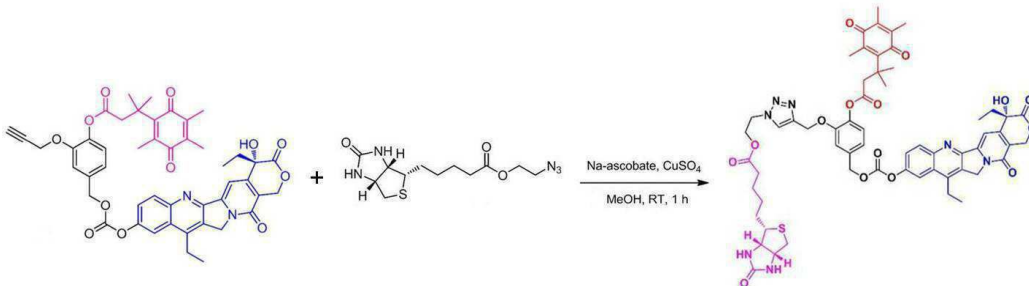
본 발명에 따른 상기 약물전구체는 하기 약물 방출 메커니즘에 도시된 바와 같이, 암 표적 유닛으로 작용하여 높은 선택성을 가지는 비오틴 컨주게이트, 강한 형광 소광제로 작용하는 퀴논 프로피온산 효소활성 유닛 및 강력한 항암 효과와 함께 이미징 및 모니터링을 위한 형광 그룹인 SN-38을 포함한다.

[약물 방출 메커니즘]



또한, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라 디메틸포름아미드(dimethylformamide, DMF) 용매하에서 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 소듐 아스코베이트(sodium ascorbate) 및 하기 [화학식 9]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 표적 특이적 항암 약물전구체의 제조방법을 제공한다.

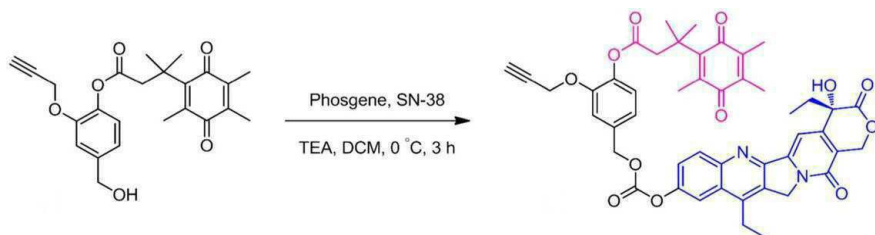
[반응식 1]



[화학식 2] [화학식 9] [화학식 1]

이때, 상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물과 7-에틸-10-하이드록시캄프토테신(SN-38)을 반응시켜 제조될 수 있다.

[0037] [반응식 2]

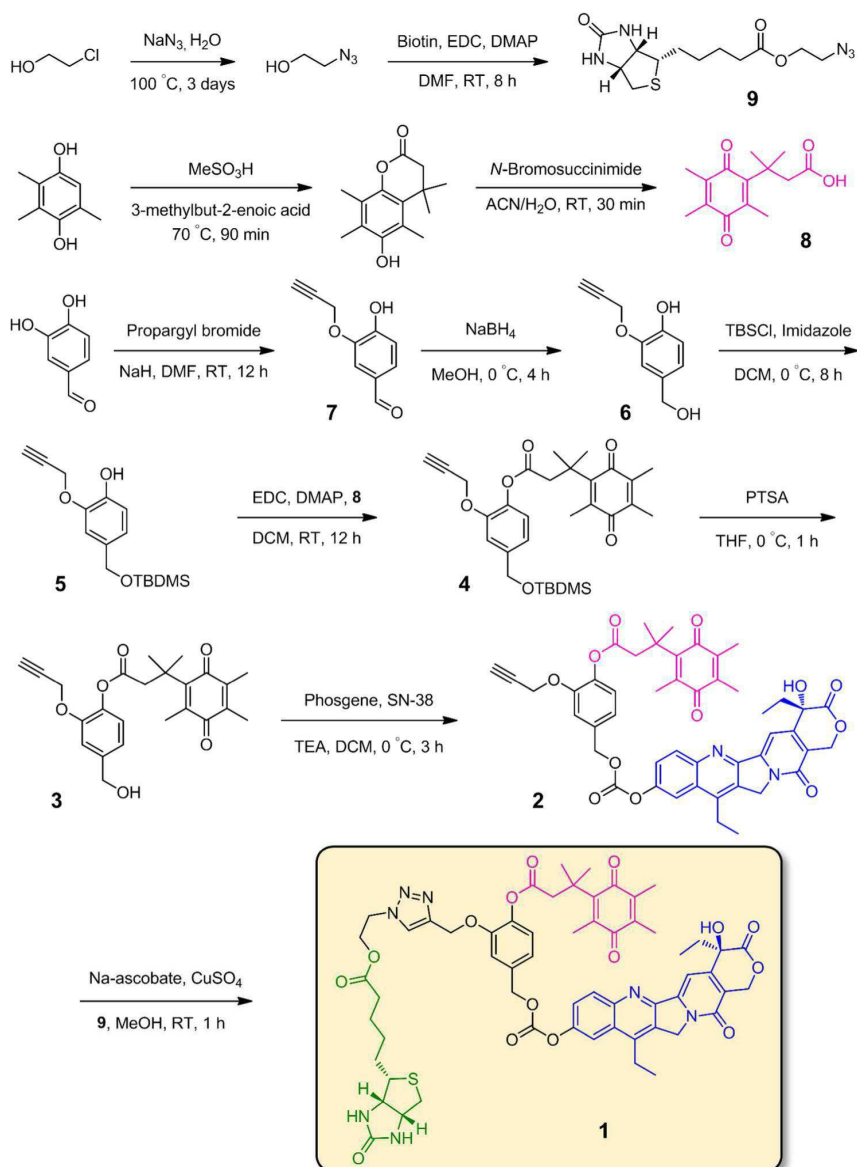


[0038]

[0039] [화학식 3] [화학식 2]

[0040] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 구체적인 제조방법은 하기 [합성 경로]에 표시된 바와 같다.

[0041] [합성 경로]



[0042]

[0043] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0044] **실험 방법**

[0045] 합성을 위한 재료 및 방법

[0046] 본 발명에서 사용된 시약들은 Alfa-Aesar, Aldrich, TCI, Carbosynth, Duksan, 및 Acros에서 구매하였고, 추가 정제 없이 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피를 위해서 실리카 겔 60 (Merck, 0.040-0.063 mm)을 사용하였으며, 분석 박막 크로마토그래피를 위해서 Merck 60 F254 실리카 겔 플레이트를 사용하였다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 분광기로 측정하였다. 역상 HPLC 실험은 용액 A (물과 0.5% v/v TFA) 및 용액 B(아세트나이트릴과 0.5% v/v TFA)의 농도로 구성된 이동상을 이용하여 VDSpher 100 C18-E 칼럼($5\mu\text{m}$, $250\times 4.6\text{ mm}$)이 구비된 Young Lin HPLC 시스템(YL9100)을 이용하여 수행하였다. LC/MS-2020 Series (Shimadzu)기기를 사용하여 질량 분석 방법을 수행하였다.

[0048] 화합물 1의 합성

[0049] 화합물 2 (20 mg, 0.024 mmol), 9 (7.56 mg, 0.024 mmol), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3 mg, 0.012 mmol), 및 소듐 아스코르브산(2.39 mg, 0.012 mmol)을 DMF (5 mL) 중 아르곤 하에서 상온에서 12 시간동안 혼합 및 교반하였다. 반응 종료 후, 용매를 제거하고 반응 혼합물을 HPLC로 정제하여 최종산물 23 mg (86% yield)을 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.21 (d, $J = 9.24\text{ Hz}$, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.647.60 (m, 1.5H), 7.27 (s, 0.5H), 7.18 (s, 1H), 7.096.98 (m, 2H), 6.41 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 5.73 (d, $J = 16.4\text{ Hz}$, 1H), 5.315.25 (m, 5H), 4.64 (t, $J = 5\text{ Hz}$, 1H), 4.534.48 (m, 2H), 4.344.31 (m, 1H), 3.26 (s, 1H), 3.163.12 (m, 2H), 2.89 (dd, $J = 12.8, 4.76\text{ Hz}$, 1H), 2.27 (t, $J = 6.96\text{ Hz}$, 1H), 2.17 (d, $J = 16.16\text{ Hz}$, 3H), 1.921.85 (m, 5H), 1.681.53 (m, 5H), 1.47 (s, 4H), 1.38 (t, $J = 7.48\text{ Hz}$, 5H), 1.01 (t, $J = 7.12\text{ Hz}$, 3H), 0.880.83 (m, 9H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 191.16, 187.58, 174.07, 173.11, 170.98, 164.62, 157.82, 153.47, 152.17, 150.58, 149.97, 149.86, 147.52, 146.88, 145.80, 144.12, 143.04, 140.35, 139.31, 138.78, 133.79, 132.33, 127.66, 127.58, 124.92, 123.76, 123.33, 122.02, 118.92, 114.50, 114.43, 98.51, 73.06, 70.32, 66.43, 62.89, 62.43, 62.18, 60.71, 55.60, 49.69, 49.55, 47.34, 40.58, 38.54, 37.29, 33.56, 32.95, 32.14, 31.76, 31.15, 30.24, 29.91, 29.57, 28.96, 28.37, 28.22, 27.29, 24.67, 23.38, 22.91, 19.94, 14.57, 14.34, 14.22, 12.87, 12.34, 8.05 ppm. ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{59}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_{15}\text{S}$ (M+Na): 1164.40; detected 1164.0.

[0051] 화합물 2의 합성

[0052] 화합물 3 (100 mg, 0.24 mmol)을 둥근바닥 플라스크에서 증류된 DCM(10 mL)에 용해시키고, 질소가스 하의 얼음 배쓰에 방치하였다. 톨루엔(2.00 mL) 중 포스젠은 실린지로 첨가하였다. 트리에틸아민(25 μL , 0.3 mmol)을 실린지로 천천히 첨가하였다. 1시간 동안 교반한 후, 잔여 포스젠 가스를 제거하기 위하여 혼합물을 증발시켰다. 5 mL DMF 중 7-에틸-10-하이드록시캄프토테신(86 mg, 0.21 mmol) 및 트리에틸아민(25 μL , 0.3 mmol)을 첨가하였다. 12시간 후, 에틸아세테이트와 함께 1 N HCl 용액으로 혼합물을 씻어냈다. 유기층은 MgSO_4 로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 56 mg (28% yield)의 화합물 2를 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.28 (d, $J = 9.24\text{ Hz}$, 1H), 7.91 (d, $J = 2.37\text{ Hz}$, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.66 (dt, $J = 9.21\text{ Hz}, 2.52\text{ Hz}$, 1H), 7.32 (dd, $J = 8.43\text{ Hz}, 2.1\text{ Hz}$, 1H), 7.176.99 (m, 3H), 5.76 (d, $J = 16.35\text{ Hz}$, 1H), 5.345.23 (m, 5H), 4.67 (t, $J = 2.28\text{ Hz}$, 2H), 3.28 (s, 2H), 3.17 (q, $J = 7.68\text{ Hz}$, 2H), 2.52 (t, $J = 2.88\text{ Hz}$, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.01 (s, 1H), 1.931.89 (m, 8H), 1.39 (t, $J = 7.71\text{ Hz}$, 3H), 1.02 (t, $J = 7.41\text{ Hz}$, 3H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 191.03, 187.72, 173.91, 170.92, 170.88, 157.93, 153.46, 152.24, 152.19, 151.79, 151.04, 150.16, 150.14, 149.83, 149.46, 147.21, 146.69, 146.32, 146.31, 143.15, 140.12, 139.31, 138.70, 133.43, 132.04, 128.23, 127.80, 127.68, 127.63, 127.61, 125.27, 124.06, 123.56, 122.49, 118.98, 114.75, 114.42, 114.24, 99.39, 77.88, 76.51, 73.04, 70.11, 66.33, 56.74, 49.87, 47.42, 38.69, 31.78, 29.15, 29.12, 23.47, 14.55, 14.19, 12.90, 12.35, 8.00 ppm. ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{12}$ (M+Na): 851.28, (M+K): 867.25; detected 851.0, 867.0, respectively.

[0054] 화합물 3의 합성

[0055] 화합물 4(100 mg, 0.19 mmol)를 THF 중에 용해시키고, 얼음-물 배스에서 냉각하였다. p-톨루엔설푼산(18 mg, 0.095 mmol)을 첨가하여 상온에서 반응시켰다. 8 시간 후, DCM 및 물로 추출하였다. 유기층을 MgSO_4 로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 37 mg (48% yield)의 화합물 3을 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.15 (dd, J = 8.4 Hz, 2.04 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 1.98 Hz, 1H), 4.624.56 (m, 4H), 3.25 (s, 2H), 2.48 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 1.921.88 (m, 6H), 1.52 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 171.03, 152.33, 148.59, 143.21, 140.07, 139.16, 138.60, 135.10, 125.46, 123.12, 120.19, 114.35, 112.78, 78.19, 76.22, 64.53, 56.79, 47.44, 38.67, 29.93, 29.10, 14.53, 14.37, 12.89, 12.33 ppm. ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_6$ (M+K): 449.14; detected 449.0.

[0057] 화합물 4의 합성

[0058] EDC · HCl (106 mg, 0.68 mmol)을 상온에서 DCM (5 mL)중 화합물 5(100 mg, 0.34 mmol), 화합물 8 (73 mg, 0.41 mmol), 및 DMAP (83 mg, 0.68 mmol)의 용액에 첨가하였다. 12시간 후, 혼합물을 수용성 1 N HCl 용액으로 세척하였고, 유기층을 MgSO_4 로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 112 mg (37% yield)의 화합물 4를 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.12 (dd, J = 8.43 Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.43 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.62 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.26 (s, 2H), 2.47 (t, J = 2.37 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.89 (d, J = 1.11 Hz, 3H), 1.53 (s, 6H), 0.91 (s, 9H), 0.07 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 191.16, 187.72, 170.92, 152.50, 148.08, 143.26, 148.08, 143.26, 140.01, 139.00, 138.51, 135.67, 124.34, 121.06, 114.24, 76.03, 64.27, 58.89, 47.48, 38.65, 29.06, 26.14, 14.50, 12.88, 12.31 ppm. ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Si}$ (M+Na): 547.25; detected 547.0.

[0060] 화합물 5의 합성

[0061] 화합물 6 (100 mg, 0.56 mmol)을 건조 DCM에 용해시켰고, 얼음-물 배스에서 냉각시켰다. 이미다졸(45 mg, 0.67 mmol) 및 tert-부틸다이메틸실릴 클로라이드 (101 mg, 0.67 mmol)를 첨가하였고, 상온에서 반응시켰다. 8 시간 후, 에테르 (50 mL)로 희석 및 포화 NH_4Cl (50 mL) 및 소금물(25 mL)로 세척하였으며, 유기층을 MgSO_4 로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 123 mg (75% yield)의 화합물 5를 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 6.966.92 (m, 3H), 5.82 (s, 1H), 4.72 (d, J = 2.37 Hz, 2H), 4.66 (s, 2H), 2.56 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 0.96 (s, 9H), 0.12 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 146.03, 143.68, 136.12, 117.66, 113.36, 112.78, 78.32, 76.17, 64.63, 57.16, 26.04, 18.47 ppm.

[0063] 화합물 6의 합성

[0064] 메탄올(3 mL) 및 물(100 μL) 중 화합물 7 (200 mg, 1.13 mmol)의 용액에 NaBH_4 (37 mg, 3.40 mmol)를 첨가 및 교반하였다. MeOH (2 mL), 물 (1 mL), 및 고형 NH_4Cl (중성 pH까지)을 현탁액에 순차적으로 첨가하여 상온에서 4시간 동안 반응혼합물을 교반하였다. 생성된 현탁액을 5분간 교반 및 EtOH 로 희석한 후 건조하였다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 179 mg(89% 수율)의 화합물 6을 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 6.956.92 (m, 2H), 6.84 (dd, J = 8.22 Hz, 1.98 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 2.37 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 2.55 (t, J = 2.4 Hz, 1H) ppm.

- [0066] 화합물 7의 합성
- [0067] 종래 문헌(Wei, Q., Seward, G. K., Hill, P. A., Patton, B., Dimitrov, I. E., Kuzma, N. N., and Dmochowski, I. J. (2006) Designing 129Xe NMR Biosensors for Matrix Metalloproteinase Detection. J. Am. Chem. Soc. 128, 13274-13283.)에 보고된 과정에 따라 화합물 7을 60%의 수율로 합성하였다.
- [0069] 화합물 8의 합성
- [0070] 종래 문헌(Rohde, R. D., Agnew, H. D., Yeo, W. - S., Bailey, R. C., and Heath, J. R. (2006) A Non-Oxidative Approach toward Chemically and Electrochemically Functionalizing Si(111). J. Am. Chem. Soc. 128, 9518-9525.)에 보고된 과정에 따라 화합물 8을 82%의 수율로 합성하였다.
- [0072] 화합물 9의 합성
- [0073] 종래 문헌(Yang, Z., Lee, J. - H., Jeon, H. M., Han, J. H., Park, N., He, Y., Lee, H., Hong, K. S., Kang, C., and Kim, J. S. (2013) Folate-Based Near-Infrared Fluorescent Theranostic Gemcitabine Delivery. J. Am. Chem. Soc. 135, 11657-11662)에 보고된 과정에 따라 화합물 8을 72%의 수율로 합성하였다.
- [0075] 세포 배양
- [0076] 두 개의 비오틴 수용체-양성 세포주; 인간 폐암 세포(A549) 및 인간 자궁 경부암 세포(HeLa)는 한국 세포주 은행(서울, 대한민국)에서 구매하였다. 두 개의 비오틴 수용체-음성 정상 세포주; 태아의 폐(WI-38 세포) 또는 신생아 표피 세포(BJ)로부터 얻은 인간 정상 섬유아세포는 한국 세포주 은행(서울, 대한민국) 및 Modern Cell & Tissue Technologies (MCTT, 서울, 대한민국)에서 구매하였다. 세포들은 37 °C, 5%의 CO₂를 포함하는 가슴분위 기에서 10% 소 태아 혈청(FBS, GIBCO), 및 1% 페니실린과 스트렙토마이신(GIBCO) 이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO BRL) 또는 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에서 배양하였다. 세포 농도가 군집의 70~80%에 도달할 때, 계대배양이 완료된 것으로 간주하였다. 세포 배지는 약 3~4일에 한번씩 교체하였다.
- [0078] 세포독성 분석
- [0079] 정상 세포주(WI-38 및 BJ) 및 비오틴 수용체-양성 세포주들을 화합물 1의 독성 평가를 위해 사용하였다. 테스트에 앞서, 세포들은 PBS로 2회 세척된 다음, FBS가 없는 배양 배지로 교환하였다. 제조사의 지시에 따라, 3-(4,5-다이메틸싸이아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라조리움 브로마이드 (MTT; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 실제 세포 생존율을 모니터링하였다. 요약하면, 1.5×10^4 세포들을 96 웰 플레이트의 각 웰에 시딩하였다. 다음날, 배지를 제거하고, 다른 농도의 화합물 1(0, 2.5, 10, 또는 50 μ M)을 함유하는 신선한 배지(100 μ L)로 교환하였다. 추가적으로 100 μ L 배지 중 SN-38 (10, 25, 50, 100, 200 μ M)을 화합물 1의 독성을 비교하기 위해 교체되었다. 세포들은 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 각 웰에 12 mM의 MTT 용액(150 μ L)을 첨가하였다. 음성 대조군의 경우, 화합물 1이 없는 상태에서 MTT 원액 또는 증류수 150 μ L를 각 웰에 첨가하였다(예를 들면, 150 μ L 단독 배지). 각 웰의 배지는 24시간 배양 후 제거하였고, 50 μ L DMSO를 첨가하였다. 생성된 현탁액을 15분동안 충분히 혼합하였고, 540nm에서 마이크로 플레이트 분광계(PowerWave XS, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 흡광도를 모니터링 하였다.
- [0081] 체의 세포 이미징
- [0082] 형광 이미징에 앞서, 세포들을 35 mm 공초점 접시(유리바닥접시, SPL)에 시딩하였고, 48시간 동안 안정화하였다. 세포 농도는 35 mm 공초점 접시에서 2.0×10^6 이었다. A549 및 HeLa 세포들을 화합물 1로 처리

하였다. 세포는 10 μ M의 화합물 1을 함유하는 배지(35 mm 접시 당 2 mL 배지 내 10 μ L DMSO를 첨가)로 5% CO₂, 37 °C에서 24시간동안 배양하였다. 이어서, FBS가 없는 DMEM 또는 RPMI 1640 배양 배지를 첨가하기 전에 PBS 1 mL를 첨가하여 세포를 2회 세척하였다. 이어서, 화합물 1을 24시간 동안 처리하였다. PBS로 다시 세포를 2회 세척하고, 405nm 아르곤 레이저 및 500nm 통과 필터를 장착한 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Carl-Zeiss LSM 5 Exciter, Oberko, Germany)으로 형광 이미지를 촬영하였다. 공존(colocalization) 분석은 미토트래커 Red FM (Thermo Fisher, New Hampshire, USA, Ex/Em 581/644 nm) 또는 ER-트래커 Red (Thermo Fisher, Ex/Em 587/615)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 염색된 세포는 cyc3.5 필터(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여, Zeiss LSM510 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 시각화하였다.

[0084] RT-PCR

[0085] TRIzol 시약 (Invitrogen)을 이용하여 세포들로부터 전체 RNA를 분리하였다. RNA는 역전사 시스템(Promega, Madison, WI)을 이용하여 역전사시켰다. EXTaq 폴리머라아제(Takara, Japan)는 서로 다른 유전자들의 PCR 증폭을 위해 하기 순환 조건 하에서 사용하였다: 94 °C 에서 5 분; 이후 94 °C 30 초, 35 사이클; 50-57 °C에서 30 초; 및 72 °C에서 30 초; 및 72 °C에서 10분 동안 배양하였다.

[0087] 마우스 이중이식 모델

[0088] 항암 효과를 조사하고, 생체내 화합물 1의 이미지를 얻기 위해, RaonBio (Kayonggido, Yongsinsi, South Korea)로부터 구매한 6주령 BALB/c 누드 마우스를 다음과 같이 사용하였다(처리당 n = 4).: 다양한 동물이 동물 시설에 저장되기 전에 그들을 48시간 동안 적응시키고, 국립 보건 연구소(National Institutes of Health ; Bethesda, MD, USA)에 의해 발간된 "Care and Use of Laboratory Animals published"에 따라 유지하였다. 동물을 케이지에 수용하고, 임의량의 물과 살균 식품을 제공하고, 12시간 동안 상온(21±2 °C)에서 30~40% 습기로 광/암주기를 유지시켰다. 354234-마트리겔(BD, San Jose, California, USA)을 약 5.0×10^6 A549 세포가 되도록 혼합하고, 쥐의 왼쪽과 오른쪽 옆구리에 피하로 주사하였다.

[0090] 화합물 1의 체내 투여

[0091] 생체내에서 화합물 1의 진단 효과를 평가하기 위해, 0.1 mL PBS 중 3 mg/kg 프로드럭 1을 3주간 일주일에 두번씩 주사한 후, 마우스 혈청 내 프로드럭 1의 형광 강도를 측정하였다. 이중 이식 마우스에 화합물 1을 단일 꼬리 정맥 주사하였다. Maestro In Vivo Fluorescence Imaging System (Maestro, Cri Inc., Woburn, MA, USA)을 이용하여 형광 이미지를 얻었다. 치료 효과를 비교하기 위해, 동일 농도의 SN-38을 4주간 주사하였다. 총 종양 무게는 실험의 마지막에 측정하였다. 동물들은 CO₂ 가스에 의해 종결되었다.

[0093] 통계학적 분석

[0094] 각 그룹의 평균 및 평균의 표준 오차(standard error of the mean; SEM)는 3개의 독립적인 실험으로부터 계산하였다. SAS 소프트웨어(version 8.2, Cary) 내 ANOVA (일원 변량 분석)를 그룹들 사이의 통계적 유의성을 평가하기 위해 수행하였다. 한 쌍의 스튜던트 t-테스트는 ANOVA가 유의성을 나타내는 경우, 평균을 비교하기 위해 수행하였다. P 값<0.05는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 가정하였다.

[0096] 결과 및 고찰

[0097] 화합물 1의 합성은 전술한 합성경로와 같다. 화합물 7, 8, 9는 종래 문헌에 보고된 방법에 따라 합성하였다. 화합물 6은 소듐 보로하이드라이드를 사용하여 간단한 환원 후에 수득하였다. 환원 후에 화합물 6을 tert-부틸다이에틸실릴 클로라이드와 반응시켜 화합물 5를 수득하였다. EDCI 커플링 반응을 거쳐 퀴논 프로피온산(8)으로 페놀릭 위치 연속적 에스테르화 후, 카보네이트 결합(2)으로 SN-38의 컨쥬게이션을 허용하여 메탄술폰산으로 TBDMS기를 제거하였다. 최종적으로 화합물 2 및 9 사이의 클릭 반응으로 최종 화합물 1을 수득하였다. 모든 신

규 화합물은 ^1H 및 ^{13}C 자기 핵 공명(NMR) 및 전기 분무 이온화 질량 분석법으로 특징하였다.

[0098] NQ01 노출에 따른 화합물 1의 거동을 연구하기 위해, NADH 형광에 대응하는 약 450nm에의 형광으로 자유 SN-38과 일치하면서(도 1a) 550nm에서 중심 형광 밴드의 양태를 드러내는 화합물 1의 형광을 인간 재조합 NQ01 및 NADH의 첨가에 따라 모니터링하였다. NQ01의 첨가시, 시간-경과 실험은 550nm에서의 형광의 증가로 30분 이내에 최대 400%(도 1b)의 SN-38의 전체 방출을 나타내었다. NQ01을 위한 트리거의 특이성이 약물 전달 시스템의 성공에서 원천적으로 중요하기 때문에, 화합물 1의 형광은 NQ01과 대조하여(도 1c), 550nm에서 전혀 없거나 무시할 수 있는 수준을 보여주는 다양한 아미노산 및 바이오싸이올의 첨가에 따라 모니터링하였다. 생리학적 조건 하에서 프로브의 안정성에 대한 추가 증거는 90% 이상 변형되지 않은 화합물 1(도 1d)을 나타내는 혈청에서 20시간 동안 형광 모니터링에 의해 제공되었다. 화합물 1의 안정성에 대한 pH 의존성은 나아가 도 5-7 도시된 것과 같이 나타났고, 이는 2시간의 코스 동안 NQ01의 존재 하에서 전혀 없거나 무시할 수 있는 가수분해, 연속적인 NQ01 및 NADPH의 연속적인 첨가 2시간 후 형광으로 나타난 SN-38의 명확한 방출을 보여주었다. NQ01 매개 약물 방출 후 약물의 식별은 HPLC 분석으로 확인하였다(도 8).

[0099] 이러한 결과에 의하여, 체내 및 체외에서의 화합물 1을 포함하는 약물전달시스템의 항암치료적 효과를 평가하였다. 비오틴 수용체의 상당한 농도가 결핍된 인간 정상 섬유아 세포주(WI-38 및 BJ)는 화합물 1의 영향을 받지 않은 반면(도 2a, b), 비오틴 수용체를 발현하는 것을 나타내는 두 개의 암 세포주(A549 및 HeLa)의 세포 생존율은 상당히 감소되었다. 이러한 결과는 비오틴에 의한 화합물 1의 표적 특이성을 나타내는 것이다. 또한, 정상 세포에서 발현된 NQ01은 상대적으로 낮으며, 이는 세포사멸을 유도하기에 충분하지 않을 수 있다.

[0100] 체외 암 특이적 독성이 확인된 후, 본 발명에서는 화합물 1의 종양 선택성을 확인하기 위해 생체내 실험을 수행하였다. A-549-세포-접종된 이중 이식 마우스에 화합물 1 또는 SN-38을 꼬리 정맥 주사로 주사하였다. 상당한 종양 성장 지연 관찰에 따라, 화합물 1로부터 SN-38의 종양-특이적 축적 및 효소적 방출은, 그 표적특이성을 나타낸다(도 3a, b). 화합물 1의 주입 3주 후, SN-38 및 대조군과 비교하여 종양의 부피는 상당히 감소됨이 관찰되었다(도 3c). 실험의 끝에서, 다른 기관들에 비교하여 고형 종양에서의 향상된 형광 방출을 통해 증거된 화합물 1의 진단 능력은 명백히 확실했다(도 3d). 이러한 체내 결과는 비오틴 및 NQ01의 존재하에서 SN-38을 배타적으로 방출하는 종양 조직 내에서 화합물 1의 선택적 활성화의 설계 전략을 확인해줌으로써 종양 성장을 억제할 수 있다. 흥미롭게도, 이러한 결과들은 나아가 반복적으로 투여될 때, 화합물 1의 항암치료적 효과가 매우 효과적으로 체내 시스템에서 14주 이상 유지됨을 설명하는 것이다.

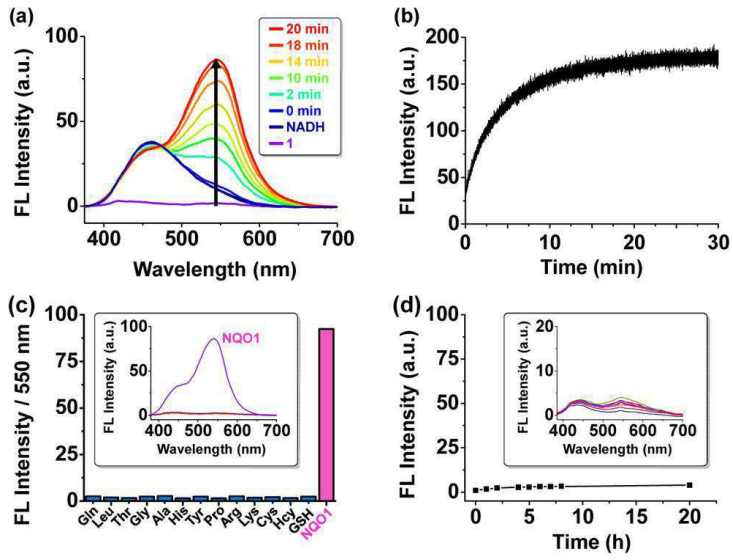
[0101] NQ01은 세포질 내에서 주로 발현되나, 최근 몇몇 연구들은 미토콘드리아, ER 및 세포핵 내에 또한 위치될 수 있다고 보고되고 있다. 따라서, 공존(colocalization) 실험으로부터 얻은 형광 이미지는 명확하게 NQ01의 특정양이 미토콘드리아, ER 및 세포핵 내에서 발현되는 것을 나타낸다(도 4a). 병합된 이미지들에 근거하여(도 4a), 화합물 1에 의해 방출된 SN-38로부터 유래된 형광은 부분적으로 미토트래커와 중첩되었고, 완전하게 ER-트래커와 중첩되었다. 인시츄에서 발현은 화합물 1이 형광 SN-38을 방출하도록 유도하기에 충분히 높다. 나아가, SN-38 처리된 세포뿐만 아니라 대조군에 비해 토포아미소머리아제 I의 유전자 발현은 용량의존적으로 감소되었다(도 4b, TP01). 암치료에서 가장 큰 장애물은 항암제로 사용된 널리 알려진 것들의 대부분에서 관찰되는 약물 전달체에 의한 다중 약물 내성이다. 주요 약물 전달체 중 하나로서, 인간 BCRP(ABCG2)는 항암제에 있어서 다중 약물 내성에 상당히 기여한다. 흥미롭게도, SN-38의 주요 약물 전달체인 ABCG2는 10 μM 의 화합물 1 처리 세포에서 감소되었다(도 4b). 이는 SN-38에 대한 항암제 내성은 본 발명에 따른 화합물 1을 통해 극복될 수 있을 것임을 암시한다.

[0102] 사이토크롬(Cyt C) 및 BAX의 발현, 미토콘드리아- 및 ER-매개 세포사멸 유전자, 세포-사멸 수용체(FADD) 및 카스파아제 사멸 유전자(Caspase-3 및 -9)는 각각 증가된 반면, 항-세포사멸제 p53의 발현은 화합물 1의 처리 후에 감소되었다(도 4b). 특히 미토콘드리아뿐만 아니라, ER에서 중요한 Ca^{2+} 채널 조절 역할을 갖는 BAX는 도 4c에서 개략적으로 설명된 바와 같이, 화합물 1의 활성화 모드 메커니즘 내에서 중추적인 역할을 하는 것으로 생각된다.

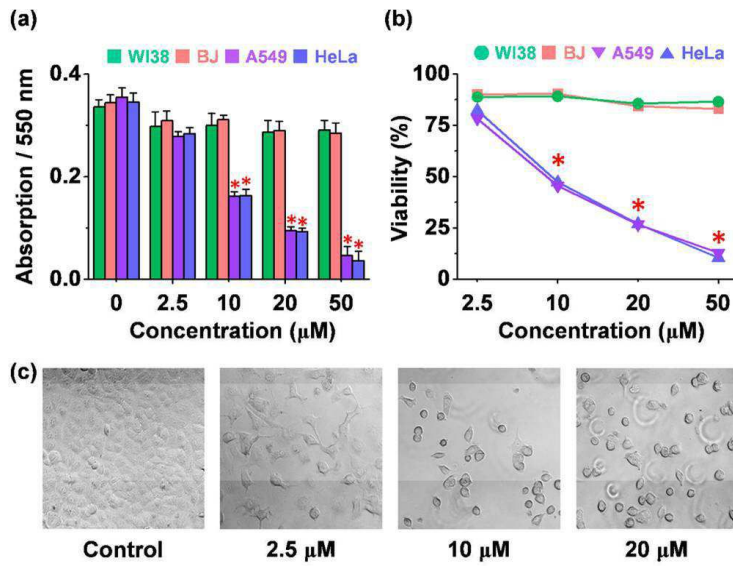
[0103] 결과적으로, 본 발명은 BAX 상향조절에 의해 야기되는 미토콘드리아- 및 ER- 매개 세포사멸을 성공적으로 유도하는 NQ01에 유도되는 약물전달시스템에 관한 것이다. 효소 활성화 및 비오틴-기반 표적의 조합은 체외 건강한 세포들에 비해 암세포에 대한 매우 높은 특이성을 제공하고, A549 이중 이식 마우스의 경우에는 체내에서 반영된 효과 및 감소된 약물 저항 유도 반응을 설명하는 역학적 연구를 제공한다.

도면

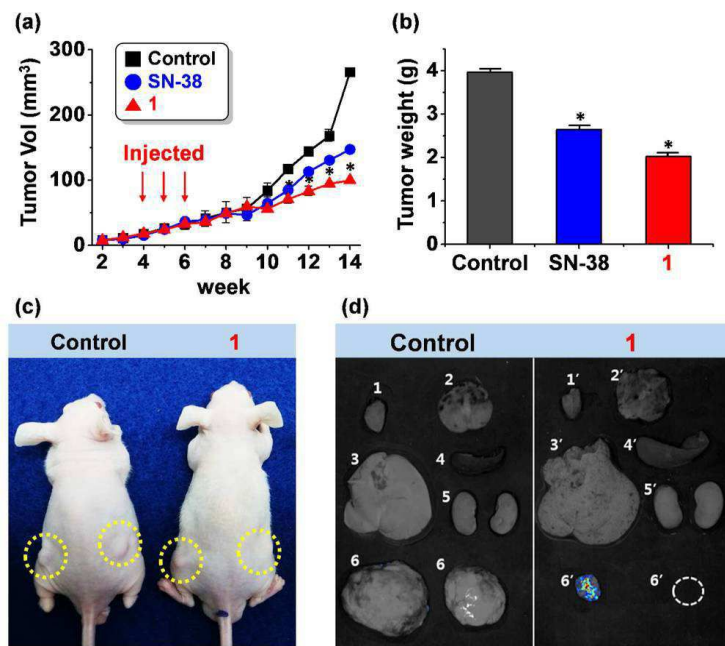
도면1



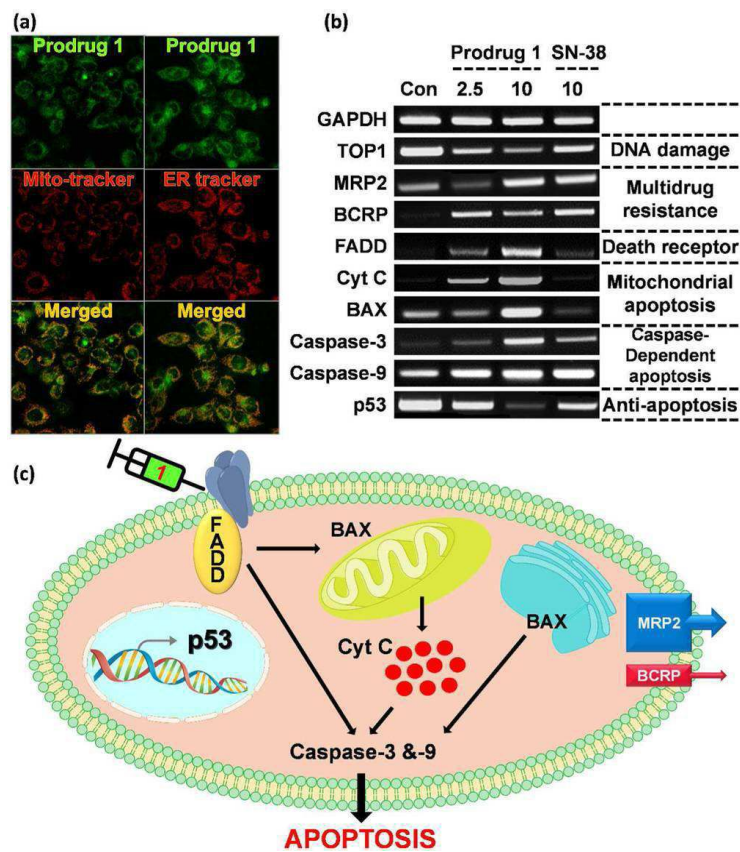
도면2



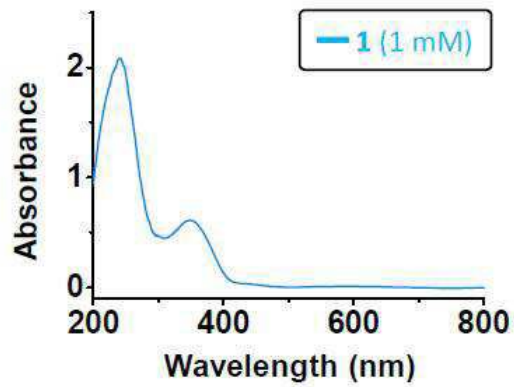
도면3



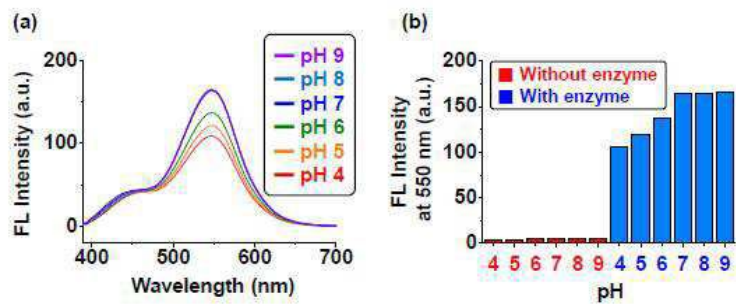
도면4



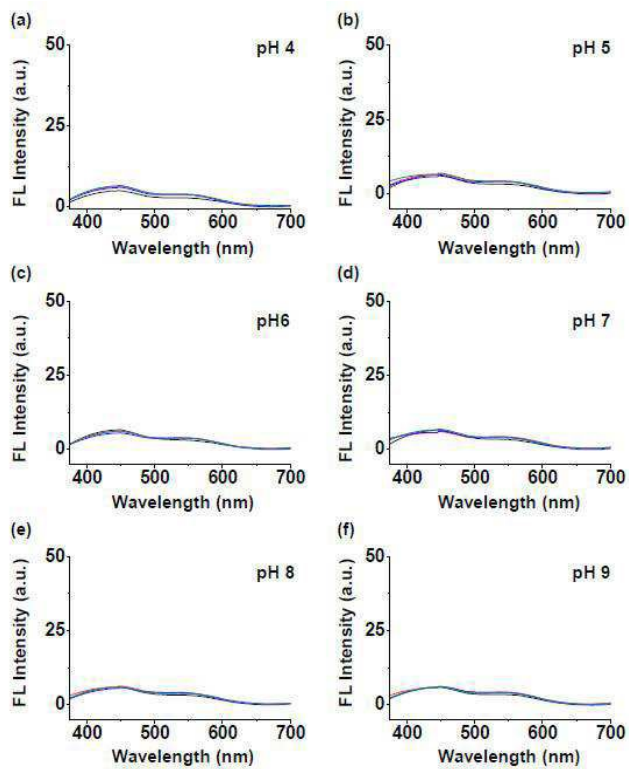
도면5



도면6



도면7



도면8

