



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월29일
(11) 등록번호 10-1830579
(24) 등록일자 2018년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/00 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/0019 (2013.01)
A61K 49/0004 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0050878
(22) 출원일자 2017년04월20일
심사청구일자 2017년04월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160129958 A

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(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

심사관 : 박제현

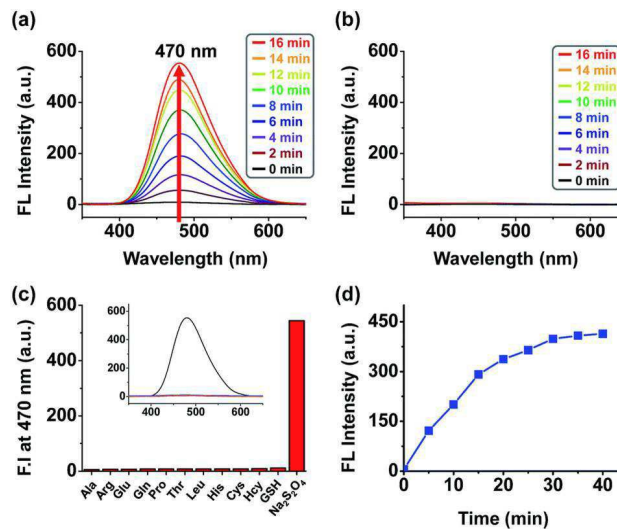
(54) 발명의 명칭 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 항암 치료진단제

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 항암 치료진단제에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타내며, 활성화 시에 암 세포들의 자가-모니터링 세포괴사 및 정확한 암 치료를 가능하게 하는 치료진단제를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/582 (2013.01)

(72) 발명자

신원섭

충청남도 아산시 배방읍 광장로 210, 102동 2303호

이민구

서울특별시 성북구 솔샘로25길 28, 107동 402호

지성길

경기도 고양시 일산서구 대화2로 68, 206동 1202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016004821

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

공지예외적용 : 있음

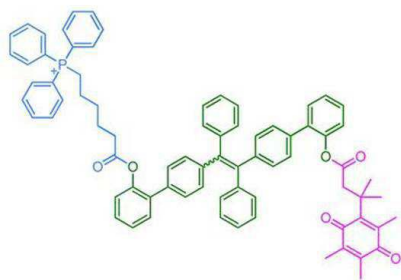
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 암 치료진단제:

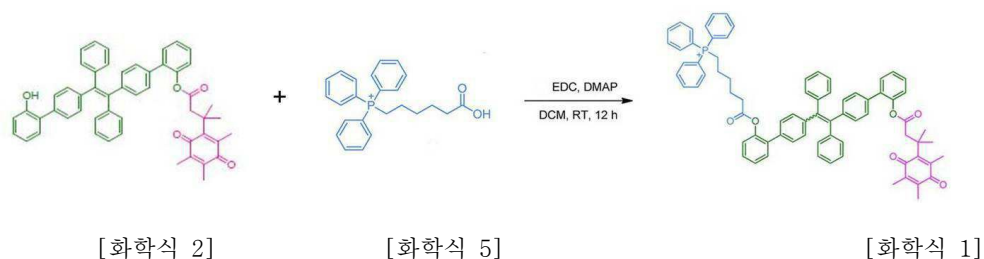
[화학식 1]



청구항 2

하기 [반응식 1]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 5]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 암 치료진단제를 제조하는 방법.

[반응식 1]

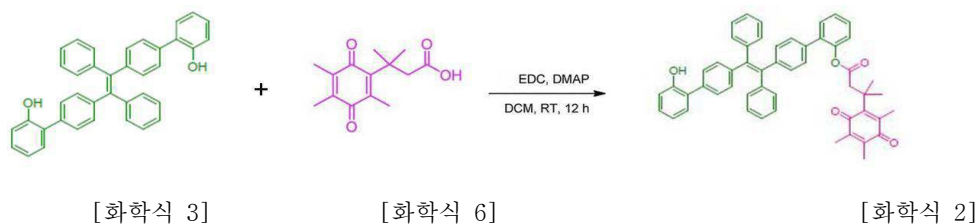


청구항 3

제2항에 있어서,

상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 6]으로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물과 반응시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 암 치료진단제를 제조하는 방법.

[반응식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 항암 치료진단제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지난 수십 년에 걸친 암 치료 분야에서의 놀라운 발전에도 불구하고, 종종 차선의 편협한 치료 지수를 나타내는, 암 치료법은 암에 걸린 조직에 대한 특이성의 결핍에 의한 심각한 부작용과 내재적으로 관련되어 있고, 암 치료 과정 동안 암세포가 비치사 농도의 약물에 반복적으로 노출되기 쉽기 때문에 약물 내성의 발달을 야기한다(비특허문헌 1).

[0003] 보다 특이적인 암 약물을 개발하여 부작용을 감소시키고 약물의 치료적 기회를 넓히기 위하여, 표적 약물 전달이 특이적 세포 수용체, 특정 종양 조직상 과발현, 및 다른 암-관련 생리학적 차이를 이용하는, 약물 전달을 위한 효과적인 방법이 보고되었으며(비특허문헌 2), 최근에는 암에 걸린 조직 자체의 특이적 표적이 아닌, 세포 소기관 수준의 세포독성 제제의 정밀한 전달이 부작용 및 다중-약물 내성을 방지하는 것으로 보고되었다(비특허문헌 3).

[0004] 세포의 발전소로 널리 알려진, 미토콘드리아는 정상 및 악성 세포 둘 모두 내 필수적인 세포 이하의 세포 소기관이다. 병리학적 상태로 세포가 진화하면, 미토콘드리아는 암세포의 생존 및 전이 잠재력에 중요한, 복잡하게 뒤섞인 신호 전달 경로를 나타낸다(비특허문헌 4). 따라서, 이러한 세포 소기관의 대사를 중단시키는 것이 신규한 암 치료법으로 주목받고 있다. 미토콘드리아는 현저한 암 관련 기능 장애를 나타내는데, 이들 중에, ATP 합성효소의 감소된 활성은 암세포가 산화환원 적응에 따른 약물 내성을 취득한 또 다른 메커니즘을 나타내는, 증가된 막 전위와 증가된 활성산소종(ROS) 생성을 야기한다(비특허문헌 5).

[0005] 미토콘드리아의 막관통 전위는, 음성적으로 전하된 내부와 함께, 탈위치화된 친유성 양이온을, 모범예로써 트리페닐포스포늄기와 함께 끌어당기는데, 이들의 전기영동 막관통 이주 및 500 배까지의 기록된 농도 향상으로 상향응축을 야기한다(비특허문헌 6). 암에 걸린 세포는 증가된 미토콘드리아 전위를 가진 미토콘드리아를 포함하고, 따라서 탈위치화된 친유성 양이온의 현저히 높은 미토콘드리아 상향응축 및 이러한 양이온의 세포독성 제제에의 집합이 항암제의 종양 특이성을 증가시키는데, 미트콘드리아는 편리한 표적 메커니즘을 가지는 민감한 세포소기관 표적 부위로 대표될 수 있다(비특허문헌 3, 6).

[0006] 보다 특이적인 항암제를 개발하기 위한 열쇠는 항암 약물의 조직 및 세포소기관 특이성을 조절하기 위해 노력하는 것뿐만 아니라, 신규한 약물의 전달을 증명하는 메커니즘의 존재 여부이며, 여러 가지 전략이 있겠지만, 특히 형광(fluorescence)의 사용은 상대적으로 비싸지 않은 실험 장비를 요구하며, 안전하고 비외과적인 방법으로 주목받고 있다. 소분자 기반의 암 치료진단(theranostic) 방법(비특허문헌 7)으로 알려진 이러한 치료 및 진단의 조합을 통한 통상적인 접근법은 약물에 형광단 또는 프로형광단의 공유 결합을 수반한다. 암 치료진단 플랫폼을 이루기 위한 보다 효율적인 방법은 약물이 전달되어 그 자체가 형광성을 갖는 것이다. 자기 조립 단계에서의 제한된 분자간 회전 때문에(비특허문헌 8) 응집된 후 형광을 켜칭(quenching)시키는 형광체와 달리, 응집에 따라 증가된 형광을 나타내는 형광체의 특정 부류인 응집 유도 방출(Aggregation induced emission, AIE) 형광체는 이러한 목적에 적합하다. 또한, 미토콘드리아 부위에서 이러한 유형의 형광단의 특이적 응집은 미토콘드리아로부터 비롯된 형광에 의해 신호를 감지하는 한편, 교란된 미토콘드리아 대사에 의한 세포 사멸을 일으키는 것으로 나타났다(비특허문헌 9).

[0007] 악성 조직에 대한 항암 약물이 특이성을 증가시키기 위한 두 번째 전략은 효소 활성 프로드러그를 사용하는 것이다. 암 세포 및 미세환경 내 다양한 효소의 차별적인 발현의 사용으로, 이러한 마스킹된 세포독성 약물들은 목적 조직에서 대부분 활성화되고, 따라서 비-특이적 약물의 흡수를 야기하는 부작용의 발생 가능성을 낮추며, 그에 따라 치료 영역을 잠재적으로 넓힐 수 있다(비특허문헌 10).

[0008] NAD(P)H:퀴논 산화환원효소-1(NQO1)은 세포 전반에 걸쳐 발현되는 효소이며, 이의 발현은 스트레스에 대한 반응으로 상향조절된다. 이 효소는 NADH 또는 NADPH를 함께 소비하면서 퀴논 생체이물(quinone xenobiotics) 및 과산화물 음이온(superoxide anion)과 같은 다양한 독소에 대한 이전자 환원효소로 작용한다(비특허문헌 11). 이러한 스트레스 유도 상향조절의 관점에서, 효소가 다양한 암성 조직 내에서 인간 간 암종의 경우 50배까지의 비율로 과발현되는 것은 놀라운 것이 아니다. 게다가, NQO1 상향조절이 정상세포가 암 세포로 병리학적으로 변형

되는 초기의 사건일 수 있다고 이론화되었다(비특허문헌 11).

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) G. F. Ismael, D. D. Rosa, M. S. Mano and A. Awada, Cancer Treat. Rev. 2008, 34, 81-91.
- (비특허문헌 0002) S. P. Vyas, A. Singh and V. Sihorkar, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2001, 18, 1-76.
- (비특허문헌 0003) L. Rajendran, H. J. Knolker and K. Simons, Nat. Rev. Drug Discov. 2010, 9, 29-42.
- (비특허문헌 0004) D. C. Wallace, Nat. Rev. Cancer 2012, 12, 685-698.
- (비특허문헌 0005) D. Trachootham, J. Alexandre and P. Huang, Nat. Rev. Drug Discov. 2009, 8, 579-591.
- (비특허문헌 0006) F. Wang, M. A. Ogasawara and P. Huang, Mol. Asp. Med. 2010, 31, 75-92.
- (비특허문헌 0007) M. H. Lee, J. L. Sessler and J. S. Kim, Acc. Chem. Res. 2015, 48, 2935-2946.
- (비특허문헌 0008) J. Mei, Y. Hong, J. W. Y. Lam, A. Qin, Y. Tang and B. Z. Tang, Adv. Mater. 2014, 26, 5429-5479.
- (비특허문헌 0009) Q. Hu, M. Gao, G. Feng and B. Liu, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 51, 14225.
- (비특허문헌 0010) S. Arpicco, F. Dosio, B. Stella and L. Cattel, Curr. Top. Med. Chem. 2011, 11, 2346-2381.
- (비특허문헌 0011) T. Cresteil and A. K. Jaiswal, Biochem. Pharmacol. 1991, 42, 1021-1027.

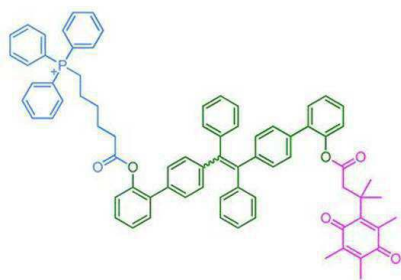
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명에서는 전술한 기술적 배경하에서, 미토콘드리아를 특이적으로 표적화하여 미토콘드리아 내에서 응집 및 발광하여 치료 및 진단이 가능한 항암 치료진단제 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

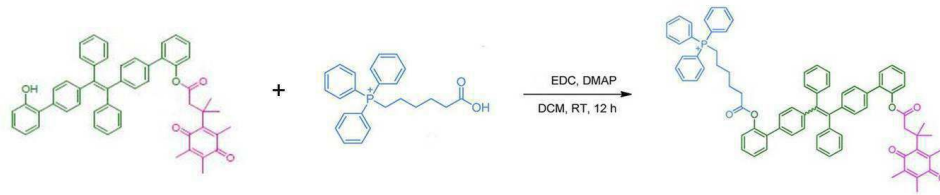
- [0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0012] 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 항암 치료진단제를 제공한다.
- [0013] [화학식 1]



- [0014]
- [0015] 또한, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 5]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는

화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 항암 치료진단제를 제조하는 방법을 제공한다.

[반응식 1]



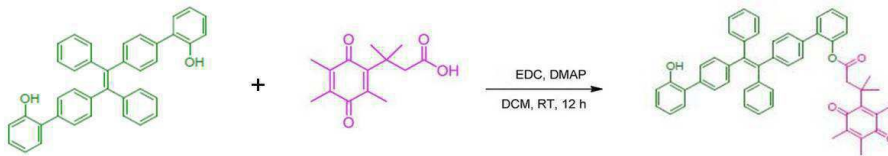
[화학식 2]

[화학식 5]

[화학식 1]

본 발명에 따르면, 상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 6]으로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물과 반응시켜 제조될 수 있다.

[반응식 2]



[화학식 3]

[화학식 6]

[화학식 2]

발명의 효과

본 발명에 따르면, 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타내며, 활성화 시에 암 세포들의 자가-모니터링 세포괴사 및 정확한 암 치료를 가능하게 하는 치료진단제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1의 (a)는 PBS (pH 7.4) 내에서, (b)는 MeOH 내에서 15분 동안 40 μ M 디티온산 나트륨에 의한 환원시킨 화학식 1로 표시되는 화합물 용액(20 μ M)의 형광 스펙트럼이다(λ_{ex} = 340 nm, 슬릿 = 5/5, T = 25 $^{\circ}$ C). (c)는 pH 7.4 인산 완충 식염수(0.5% DMSO) 내에서 화학식 1에 따른 화합물(20 μ M), 티올 환원제(100 μ M) 및 아미노산(100 μ M)을 포함하는, 다양한 생물학적 환원제에 대한 형광 반응 분석결과를 나타낸다. 이때 bar는 12시간 배양 후 470 nm (I470)에서의 최종 형광 강도를 나타내며 340 nm에서 여기되었다(슬릿 폭은 5 nm). (d)는 470 nm 및 디티온산 나트륨의 존재 하에서의 40분 동안 시간에 따른 형광 강도의 변화를 나타낸다.

도 2는 화학식 1, 8 및 9로 표시되는 화합물로 처리된 A549 세포의 공초점 현미경 이미지를 나타낸다. A549 세포를 20 μ M의 화학식 1, 8 및 9로 표시되는 화합물과 함께 12시간 동안 배양한 후 200 nm의 미토-트래커(Mito-tracker) 딥 레드(deep red)로 공동염색하였다. 붉은 형광은 미토-트래커 딥 레드 유래이고, λ_{ex} = 633 nm, λ_{em} = 650-700 nm이며, 녹색 형광은 프로브 유래이고, λ_{ex} = 740 nm, λ_{em} = 450-550 nm이다. 세포 이미지는 740 nm의 이광자 여기 파장과 녹색 신호인 450-550 nm의 방출 파장을 이용하여 각각 측정하였다.

도 3은 화학식 1로 표시되는 화합물의 종양 세포 생존율에 대한 효과 및 NQO1의 발현 수준과의 관련성을 나타낸다. (a)는 화학식 1, 8, 9로 표시되는 화합물의 양을 증가시키면서 48시간 동안 배양한 후 WST-1 분석에 의해 확인한 A549 세포의 세포독성을 나타낸다. (b)는 본 발명의 실시예에서 시험한 6 개의 인간 세포에서의 NQO1 발현 수준을 나타내는 면역블롯 분석(c-h)으로, 293T 배아 신장 세포를 포함한 세 가지 NQO1 저-발현 세포(c-e) 및 세 가지 NQO1 고-발현 세포(f-h)를 20 μ M의 화학식 1, 8 및 9로 표시되는 화합물로 48시간 동안 처리하였다. 세포 생존능은 WAT-1 분석을 이용하여 확인하였다. * P < 0.005; ** P < 0.001; 세포 생존능 데이터는 한번 또는 두번 비슷한 결과로 반복된 단일 실험의 세 번의 측정값의 평균 및 s.d.를 나타낸다.

도 4는 화학식 1로 표시되는 화합물의 세포 독성에 대한 NQO1-의존도를 나타낸다. (a)는 화학식 1로 표시되는 화합물의 세포사멸 유도에 대한 NQO1 분해 효과를 나타내는 세포사멸의 유동 세포 분석결과이다. siNQO1으로 형질주입된 A549 세포를 지시된 대로 화학식 1로 표시되는 화합물과 함께 배양하고, 유동 세포 분석을 서브-G1 단

편의 백분율을 확인하기 위하여 수행하였다. (b)는 NQO1 발현의 siRNA-매개 녹다운에 의한 화학식 1로 표시되는 화합물의 세포독성의 약화를 나타낸다. si대조군 또는 siNQO1 중 하나로 형질주입된 A549 세포를 화학식 1, 8 및 9로 표시되는 화합물로 배양하였다(10 μ M, 24시간). 세포 생존능을 WST-1 분석에 의해 확인하였다. 각각의 막대는 세 번의 측정값의 평균을 나타낸다; *, $P < 0.001$. (c)는 세포사멸을 위한 화학식 1로 표시되는 화합물 활성화에 대한 NQO1-의존도를 나타낸다. siRNA로 형질주입된 세포를 화학식 1로 표시되는 화합물(20 μ M)과 함께 배양하였다. 48시간 후에, 절단된 PARP, 카스파제-3 및 카스파제-9 수준을 측정하기 위하여 면역블롯 분석을 수행하였다. (d)는 시토크롬 C 방출의 자극에 대한 화학식 1로 표시되는 화합물의 NQO1-의존도를 나타낸다. 세포를 siRNA로 형질주입하고 화학식 1로 표시되는 화합물로 처리하였고, 시토줄 및 미토콘드리아 단편 유래 용해물을 시토크롬 C의 면역블롯 분석에 이용하였다. COX4 및 투블린을 각각 미토콘드리아 및 시토줄 단편에 대한 마커로 사용하였다.

도 5는 화학식 1로 표시되는 화합물의 형광 유도가 NQO1 발현 수준에 매우 의존적임을 나타낸다. (a)는 A549 세포 내 화학식 1로 표시되는 화합물 유도 형광 강도는 siNQO1 투여량 감소와 관련된다. siNQO1의 투여량 증가와 함께 형질주입된 세포를 화학식 1로 표시되는 화합물(10 μ M)과 함께 배양하였다. 세포 용해물의 형광성을 24시간 배양 후에 확인하였다. (b)는 A549 세포 내 siNQO1-매개 NQO1 녹다운의 면역블롯 분석 결과를 나타낸다. (c)는 HCT116 세포 내 화학식 1로 표시되는 화합물의 유도 형광 강도는 NQO1-관련 증가를 나타낸다. FLAG-NQO1 플라스미드의 투여량 증가와 함께 형질주입된 세포를 화학식 1로 표시되는 화합물(10 μ M)과 함께 배양하였다. (d) HCT116 세포 내 FLAG-NQO1 수준의 면역블롯 분석 결과를 나타낸다.

도 6은 화학식 1로 표시되는 화합물의 생체 내 종양 성장에 대한 효과를 나타내는 쥐 종양 이종이식 분석(A549 세포) 결과이다. (a)는 화학식 1로 표시되는 화합물에 의한 종양 성장 억제 및 NQO1의 의존도를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타낸다(그룹당 $n = 5$; **, $P < 0.01$). siNQO1 또는 si대조군 중 하나로 형질주입된 A549 세포를 누드 마우스의 오른쪽 측면으로 피하 주사하였다. 화학식 1로 표시되는 화합물을 8일째 및 다음 2주 동안 3일에 한번씩 꼬리 정맥 주사에 의해 투여하였다(2 mg/kg/d). 종양 성장을 주기적으로 모니터링하였고, 부피(V)를 변형 타원체 공식: $V = 1/2 \times \text{길이} \times (\text{너비})^2$ 으로 계산하였다. (b)는 화학식 1로 표시되는 화합물의 투여 5주 후, 이종이식 종양을 보유한 쥐의 대표 이미지이다.

도 7은 화학식 1로 표시되는 화합물의 종양 크기(HCT116 세포)에 대한 효과를 나타낸다. (A)는 대조군(pcDNA) 또는 NQO1-발현 HCT116 세포로부터 유래된 이종이식 종양의 프로드러그 1(화학식 1로 표시되는 화합물)에 대한 성장 반응을 나타낸다(그룹당 $n=5$; 오차 막대는 $\pm$ SD를 나타냄; ** $p\text{-value} < 0.01$). pcDNA 또는 NQO1 발현 플라스미드 중 하나로 형질주입된 HCT116 세포를 누드 마우스의 오른쪽 측면으로 피하 주사하였다. 화학식 1로 표시되는 화합물을 10일째 및 다음 2주 동안 5일에 한번씩 꼬리 정맥 주사로 투여하였다(4 mg/kg). 종양 성장을 주기적으로 모니터링하였고, 부피(V)를 변형 타원체 공식: $V = 1/2 \times \text{길이} \times (\text{너비})^2$ 으로 계산하였다. (B)는 화학식 1로 표시되는 화합물 주사 30일 후 이종이식 종양의 대표적인 이미지이다.

도 8은 치료 시작 40일 후 HCT116을 가지는 쥐의 생체 내 및 생체 외 이미지(도 7 참조)이다. (a)는 대조군 플라스미드(왼쪽) 및 NQO1 발현 플라스미드(오른쪽)로 전처리된, HCT116 세포를 가지는 쥐의 백광 하에서의 대표적인 이미지(맨 위) 및 이종이식 종양 내 화학식 1로 표시되는 화합물의 축적을 나타낸 대표적인 생체 내 형광 이미지이다($\lambda_{\text{ex}} = 430 - 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490 - 550 \text{ nm}$). (b)는 화학식 1로 표시되는 화합물이 주입된 쥐의 해부된 기관과 종양(위) 및 이의 형광 이미지(아래)이다($\lambda_{\text{ex}} = 430 - 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490 - 550 \text{ nm}$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0026]

약물 전달 시스템에 있어서 약물의 효소적 활성화와 관련된 효과적인 병리학과 결합하여 조직 선택적 표적 및 특이적인 세포소기관으로의 위치화는 종래 관습적인 암 치료에 비해 분명한 이점을 가질 수 있다.

[0027]

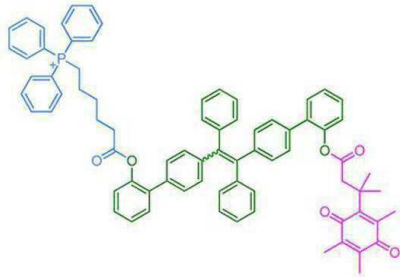
이에 본 발명에서는 세포소기관인 미토콘드리아에 특이적으로 위치하여 미토콘드리아 내에서 응집 및 발광하며, 선택적으로 활성화되어 미토콘드리아 기능 장애에 의해 유발된 카스파제 경로를 통한 세포사멸을 야기할 수 있는 미토콘드리아 표적(mitochondria targeted) 응집 유도 방출(aggregation induced emission, AIE) 형광단(fluorophore)을 포함하는 항암 치료진단제 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

[0028]

본 발명에 따른 AIE 형광단은 종양 및 세포소기관을 표적으로 하는 트리페닐포스포늄 모이어티 및 NQO1 효소에 의한 AIE 자가-조립의 선택적인 활성화를 가능하게 하는 쿼인 기반의 트리거(trigger)를 포함한다.

[0029] 구체적으로, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 항암 치료진단제를 제공한다.

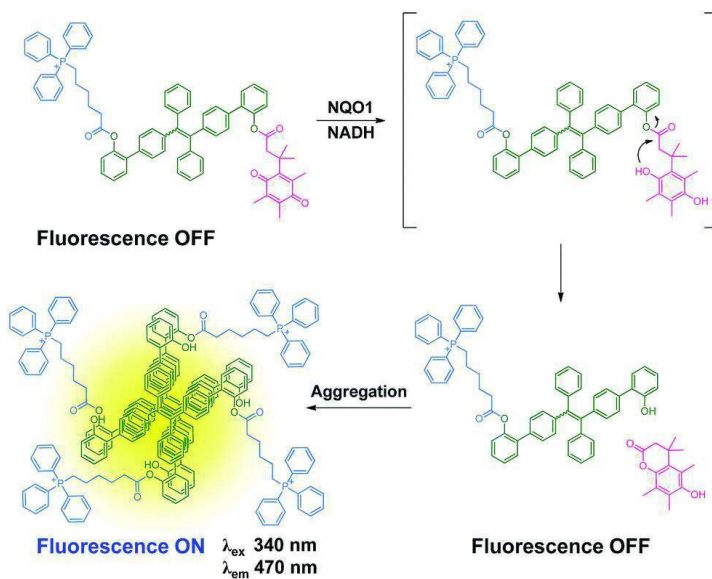
[0030] [화학식 1]



[0031]

[0032] 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 항암 치료진단 메커니즘은 아래에 도식화한 것과 같으며, 구체적으로 비-형광성 프로드러그 화합물 1(화학식 1로 표시되는 화합물)이 암세포의 미토콘드리아쪽으로 표적화되고 상향응축(upconcentration)된다. 다음으로 화합물 1의 응집체가 켜는 스캐폴드의 급속한 환원 과정을 거치게 되고, 그 다음의 고리화를 통해 AIE 스캐폴드와 켜는 트리거 사이의 광유도 전자 전달 과정의 제거로 인한 형광에 의해 신호된 활성 형태의 AIE 염료(dye)를 방출한다. AIE 응집체는 특히 미토콘드리아에 위치화하며, 그 후 주요한 대사 경로의 방해를 유도하고, 최종적으로 표적 세포의 선택적인 세포사멸에 이르게 한다.

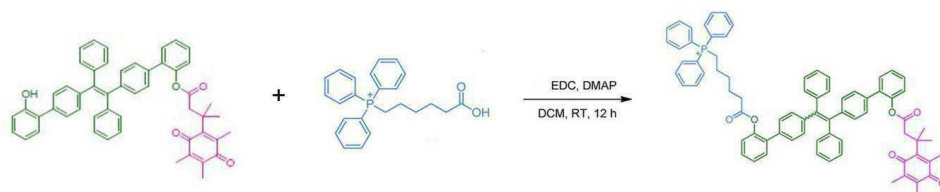
[0033] [항암 치료진단 메커니즘]



[0034]

[0035] 또한, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 5]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하는 항암 치료진단제를 제조하는 방법을 제공한다.

[0036] [반응식 1]



[0037]

[0038] [화학식 2]

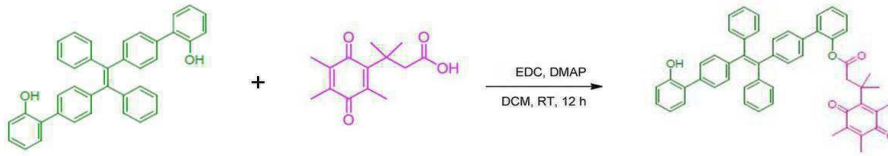
[화학식 5]

[화학식 1]

[0039] 이때, 상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 1-에틸-3-(3-디

메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 6]으로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물과 반응시켜 제조될 수 있다.

[0040] [반응식 2]



[0041]

[0042]

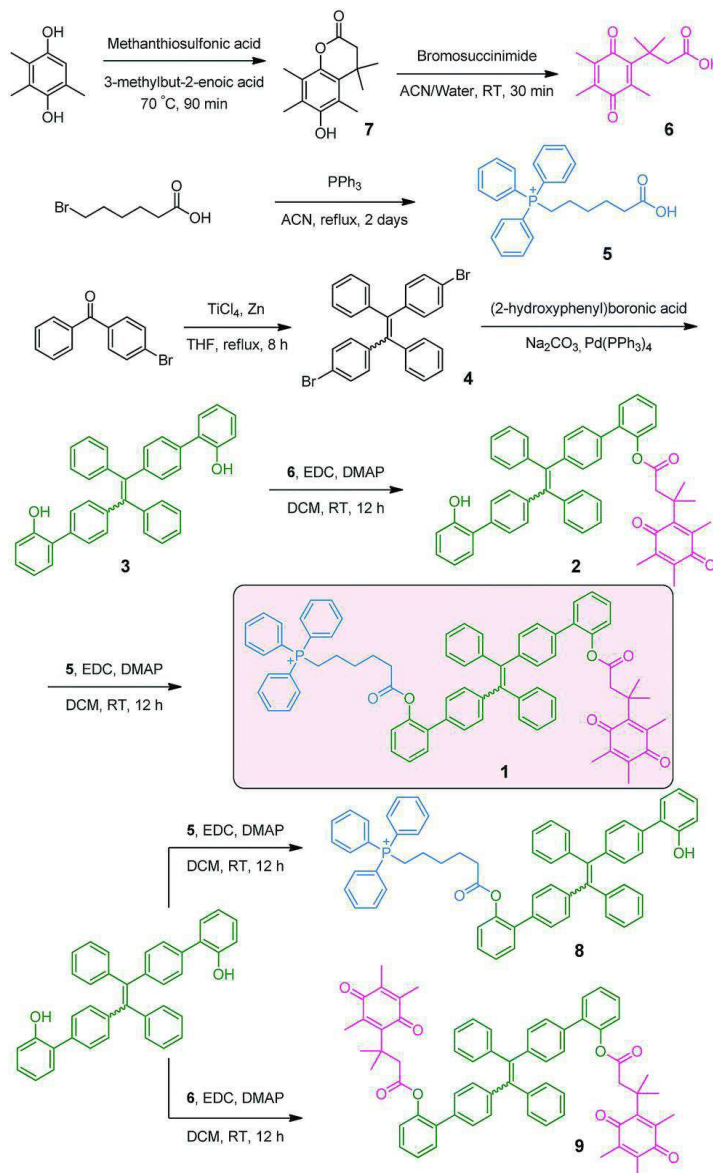
[화학식 3]

[화학식 6]

[화학식 2]

[0043] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물, 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물과의 비교를 위한 [화학식 8], 및 [화학식 9]로 표시되는 화합물의 구체적인 제조방법은 하기 합성경로에 표시된 바와 같다.

[0044] [합성 경로]



[0045]

[0047] 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.

[0049] **실험 방법**

[0050] 합성을 위한 재료 및 방법

[0051] 본 발명에서 사용된 시약은 Alfa-Aesar, Aldrich, TCI, Carbsynth, Ducsan, 및 Acros에서 구입하였으며, 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 400 MHz 분광기로 측정하였다. 모든 화학적 이동은 TMS 피크를내부 기준으로 사용하여 ppm 값으로 기록하였다. 역-상 HPLC 실험은 이원체 기울기의 용매 A(0.5% v/v TFA와 물) 및 용매 B(0.5% v/v TFA와 아세토니트릴)로 구성된 이동상을 이용하여 1 mL/min의 유속에서 작동하는 VDSpher 100 C18-E 칼럼(5 μm , 250 $\times$ 4.6 mm)이 구비된 Young Lin HPLC 시스템(YL9100)을 이용하여 수행하였다. ESI 질량 분석법은 LC/MS-2020 시리즈 (Shimadzu) 기기를 이용하여 수행하였다.

[0053] DFT 계산

[0054] 밀도 함수 이론 계산을 이론의 6-31G(d) 수준에서(W. J. Hehre, R. Ditchfield and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, 1972, 56, 2257-2261) B3LYP(S. H. Vosko, L. Wilk and M. Nusair, *Can. J. Phys.*, 1980, **58**, 1200-1211), 가우시안 G09W 소프트웨어 패키지를 이용하여(Gaussian 09 et al. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, **2010**) 수행하였다. 가우시안 입력 파일 생성 및 분자 궤도 가시화를 가베딧 2.4.8 소프트웨어 패키지를 이용하여 수행하였다(A. R. Allouche, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 174-182). 글로벌 최소값에 도달하기 위해 몇몇 스타팅 기하학으로부터 구조 최적화를 수행하였다.

[0056] 인간 정상 및 암 세포주

[0057] 인간 암세포주 및 배아 신장 293T 세포를 미국 군주 은행(Rockville, MD, USA) 또는 한국 세포주 은행(서울, 한국)으로부터 구입하였다. 세포를 10% FBS (집코 BRL)가 보충된 둘베코 수정 이글 배지에 37 $^{\circ}\text{C}$ 및 5% CO_2 가습 대기에 보존하였다.

[0059] 발현 플라스미드, siRNA 및 형질주입

[0060] NQ01 발현 벡터를 애드진(MA, USA)으로부터 구입하였다. 형질주입은 리포펙타민 2000(인비트로젠)을 이용하여 수행하였다. NQ01에 대한 siRNA 듀플렉스(5'-GAGAGTTGCTTACTTA-3')를 다마콘 리서치에 의해 합성하였다. siRNA의 형질주입을 siRNA 올리고펙타민 혼합물 또는 전기천공법(Neon transfection system; Invitrogen)을 이용하여 수행하였다.

[0062] 면역블롯 분석

[0063] 면역블롯 분석을 산타크루즈 바이오테크놀로지 또는 셀 시그널링 테크놀로지로부터 구입한, NQ01에 특이적인 항체(SC-16464), 절단된 PARP(5625), 절단된 카스파제-3(9664), 절단된 카스파제-9(7237), COX-4(4850) 및 시토크롬 C(4280)을 이용하여 수행하였다. 항-Flag(F3165) 및 항-tubulin 항체를 각각 시그마 및 인비트로젠으로부터 얻었다. 간략히, 세포를 얼음처럼 차가운 PBS에서 두 번 씻고, 50 mM trisHCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% 데옥시콜레이트 나트륨, 및 프로테아제 억제제 혼합물을 함유하는, 방사성면역침전 분석 완충액에서 용해시켰다. 초음파파쇄 후, 용해물을 원심분리하고, 상청액을 회수하고, 전기영동을 위해 8% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에 로드하였다.

[0065] 세포사멸의 유동 세포 분석

[0066] siNQ01 또는 si대조군으로 형질주입된 세포를 화학식 1로 표시되는 화합물(20 μM)로 처리하였다. 처리 24시간 후에, 세포를 70% 에탄올로 고정하고, 50 mg/ml RNase 및 50 mg/ml의 프로피디움 요오드화물(Sigma)를 함유하는 1 ml의 PBS에서 재부유시켰다. FACScan 유동 세포분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA)로 분석을 수행하였고, 세포사멸 특성을 모드핏 소프트웨어(Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

[0068] 시토줄 및 미토콘드리아 단편의 분리

[0069] 시토줄 및 미토콘드리아 단편의 분리를 미토콘드리아 분리 키트(Thermo Scientific, USA)를 이용하여 수행하였다. 간략히, 세포를 차가운 PBS에서 씻고, 10 nM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(PMSF)를 함유하는 미토콘드리아 분리 시약 A 완충액에서 5-회 냉동-해동에 의해 용해시켰다. 10분 동안의 냉동 배양 및 미토콘드리아 분리 시약 B 완충액 첨가 후, 용해물을 700 g에서 10분 동안 원심분리하고, 뒤이어 미토콘드리아 분리 시약 C 완충액의 처리 후 비활성시켰다. 상청액을 새로운 튜브에 옮기고, 12,000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 원심분리하고, 시토줄 단편으로 회수하였다. 500 μL 의 미토콘드리아 분리 시약 C의 첨가 후, 펠렛을 12,000 g에서 15분 동안 원심분리하

여, 미토콘드리아 단백을 회수하였다.

[0071] 동물 연구

[0072] 4주령 면역결핍 누드 마우스 (nu/nu) (Orient Bio Inc.)를 가압 환기 우리에 두었다. siNQ01 또는 si대조군으로 형질주입된 세포(1×10^7)를 다섯 마리의 쥐에 피하 주사하였다. 화학식 1로 표시되는 화합물을 2주 동안 3일에 한번씩 꼬리 정맥 주사로 주입하였다(2 mg/kg/d). 빈(pcDNA) 또는 NQ01 발현 플라스미드로 형질주입된 HCT116 세포(1.0×10^7)를 쥐의 오른쪽 측면으로 피하 주사하였다. 종양 성장이 관찰가능한 크기(대략 20 mm^3)에 도달하면, 쥐를 화학식 1로 표시되는 화합물(4 mg/kg) 또는 운반체 PBS로 20일 동안 5일에 한번씩 꼬리 정맥 주사로 주입하였다. 종양 성장을 주기적으로 모니터링하였고, 부피(V)를 변형 타원체 공식: $V = 1/2 \times \text{길이} \times (\text{너비})^2$ 으로 계산하였다. 모든 동물 연구는 고려대학교 동물실험윤리위원회 및 한국 동물보호법의 승인을 받아 수행하였다.

[0074] 생체 내 및 생체 외 형광 이미징

[0075] 종양 표적 특이도 및 프로브 1(화학식 1로 표시되는 화합물)의 생체 내 및 생체 외 기관 분포를 연구하기 위하여, 안정적으로 발현된 빈(pcDNA) 또는 NQ01 HCT116 세포를 쥐에 피하 주사하였다. 종양 성장이 관찰가능한 크기(대략 20 mm^3)에 도달하면, 쥐를 프로브 1(4 mg/kg) 또는 운반체 PBS로 20일 동안 5일에 한번씩 꼬리 정맥 주사로 주입하였다. 프로브 1 주입 20일 후, 쥐를 희생시켜, 생체 내 종양 및 대조군 및 주입된 쥐의 기관의 형광 강도를 마에스트로 2(여기 및 방출; 각각 500 및 650 nm)를 이용하여 측정하였다. 다음으로 형광 이미지 및 자기형광을 상업화 소프트웨어(Maestro software ver.2.4, CRi, Woburn, MA, USA)의 다중여기 스펙트럼 분석 기능을 이용하여 분리하였다.

[0077] 화합물 1([화학식 1]로 표시되는 화합물의 합성

[0078] EDCHCl (41 mg, 0.26 mmol)을 상온에서 CH_2Cl_2 (20 mL)에서 화합물 3(100 mg, 0.13 mmol), 화합물 5(45 mg, 0.12 mmol) 및 DMAP(32 mg, 0.26 mmol) 용액에 첨가하였다. 12시간 후, 혼합물을 수성 1 N HCl 용액으로 씻어내고, 유기층을 MgSO_4 로 건조시키고, 여과한 후 진공 내에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 114 mg (78% 수율)의 주산물을 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 7.86 - 7.75 (m, 9H), 7.70 - 7.65 (m, 5H), 7.37 - 7.19 (m, 7H), 7.17 - 7.01 (m, 16H), 6.96 - 6.88 (m, 1H), 3.88 - 3.70 (m, 3H), 3.03 (d, $J = 4.76 \text{ Hz}$, 2H), 2.27 (q, $J = 7.28 \text{ Hz}$, 2H), 2.10 (d, $J = 18.36 \text{ Hz}$, 3H), 1.87 - 1.80 (m, 6H), 1.76 - 1.47 (m, 8H), 1.36 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 0.96 - 0.83 (m, 3H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 12.26, 12.29, 12.83, 12.86, 14.34, 14.43, 14.49, 23.83, 24.07, 24.21, 24.23, 25.46, 28.72, 28.83, 29.66, 29.78, 29.83, 29.95, 31.76, 33.67, 33.70, 34.84, 38.07, 38.12, 47.57, 47.65, 53.75, 118.01, 118.06, 118.86, 118.92, 123.94, 123.06, 123.09, 128.45, 126.53, 126.62, 126.76, 126.78, 126.87, 127.87, 127.91, 128.00, 128.27, 128.33, 128.39, 128.55, 130.65, 130.77, 130.83, 130.89, 131.00, 131.06, 131.42, 131.46, 131.47, 131.53, 131.55, 131.59, 131.62, 131.66, 133.75, 133.78, 133.85, 133.88, 134.53, 134.59, 134.64, 134.68, 153.23, 135.23, 135.24, 135.26, 135.55, 135.57, 135.66, 135.77, 138.44, 138.48, 138.72, 138.74, 140.89, 140.93, 140.95, 142.92, 142.98, 143.04, 143.07, 143.11, 143.15, 143.71, 143.80, 147.59, 147.60, 147.84, 147.85, 152.41, 152.46, 171.59, 171.64, 171.93, 171.99, 187.55, 187.58, 190.91, 190.96 ppm. ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{76}\text{H}_{68}\text{O}_6\text{P}$ (M+H) 1107.47; detected 1107.25.

[0080] 화합물 2의 합성

[0081] DCM 내 화합물 6(109 mg, 0.43 mmol)의 용액을 0 °C에서 CH_2Cl_2 (30 mL)에서 EDCHCl (180 mg, 1.16 mmol), 화합물 3 (300 mg, 0.58 mmol), 및 DMAP (141 mg, 1.16mmol) 용액에 적상으로 천천히 첨가하였다. 12시간 후 1 N 수성 HCl로 혼합물을 씻어내고, 유기층을 MgSO_4 로 건조시키고, 여과한 후 진공 내에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 243 mg의 주산물을 수득하였다(56% 수율). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.35 - 7.30 (m, 4H), 7.29 - 7.18 (m, 6H), 7.17 - 7.08 (m, 13H), 6.98 - 6.91 (m, 3H), 3.04 (d, $J = 6.24 \text{ Hz}$, 2H), 2.12 (d, $J = 15.12 \text{ Hz}$, 3H), 1.86 (t, $J = 14.04 \text{ Hz}$, 6H), 1.38 (s, 3H), 1.30 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100

MHz): 12.32, 12.35, 12.88, 12.92, 14.41, 14.52, 14.56, 23.92, 28.77, 28.89, 31.85, 38.14, 38.18, 116.04, 116.19, 121.00, 121.04, 123.98, 123.02, 126.61, 126.65, 126.87, 127.00, 127.93, 127.96, 128.05, 128.15, 128.43, 128.46, 128.51, 128.58, 128.61, 128.65, 129.25, 129.27, 130.38, 130.47, 131.08, 131.15, 131.54, 131.58, 131.65, 131.69, 131.72, 132.39, 132.42, 134.73, 135.33, 135.55, 135.69, 135.84, 138.60, 138.63, 138.86, 140.91, 140.92, 141.21, 141.30, 143.00, 143.03, 143.23, 143.23, 143.35, 143.52, 143.70, 143.79, 143.84, 147.67, 147.68, 152.51, 152.55, 152.72, 152.76, 171.70, 171.76, 187.68, 191.06 ppm. ESI-MS: m/z calcd for $C_{52}H_{44}O_5$ (M+Na) was 771.31; detected 771.30, (M+K) 787.28, detected 787.25.

[0083] 화합물 3의 합성

[0084] 화합물 4 (1.0 g, 2.05 mmol) 용액에, 100 mL의 플라스크에 DME (40 mL) 및 2M Na_2CO_3 20 mL 내 2-하이드록시페닐보론산(1.13 g, 8.19 mmol), 24 mg의 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)을 첨가하였다. 혼합물을 1시간 동안 상온에서 휘젓고, 뒤이어 12시간 동안 환류 조건하에서 가열하였다. 반응 완료 후에, 혼합물을 1 N HCl 용액으로 씻어내고, 유기층을 $MgSO_4$ 로 건조시키고, 여과한 후 진공 내에서 농축시켰다. 재발생물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.25 - 7.08 (m, 23H), 6.96 - 6.91 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 116.09, 121.11, 126.96, 127.93, 128.05, 128.58, 129.32, 130.43, 131.59, 132.42, 135.53, 141.17, 143.41, 143.52, 152.60 ppm. ESI-MS: m/z calcd for $C_{38}H_{28}O_2$ (M+Na) 539.20, detected 539.25, (M+K) 555.17, detected 555.25.

[0086] 화합물 4의 합성

[0087] 종래 문헌(Y. Liu, C. Deng, L. Tang, A. Qin, R. Hu, J. Z. Sun and B. Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 660-663)에 보고된 과정에 따라 화합물 4를 77%의 수율로 합성하였다.

[0089] 화합물 5의 합성

[0090] 종래 문헌(S. U. Hettiarachchi, B. Prasai and R. L. McCarley, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, **136**, 7575-7578)에 보고된 과정에 따라 화합물 5를 98% 수율로 합성하였다.

[0092] 화합물 6의 합성

[0093] 종래 문헌(R. D. Rohde, H. D. Agnew, W. S. Yeo, R. C. Bailey and J. R. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 9518-9525)에 보고된 과정에 따라 화합물 6을 84% 수율로 합성하였다.

[0095] 화합물 7의 합성

[0096] 종래 문헌(R. D. Rohde, H. D. Agnew, W. S. Yeo, R. C. Bailey and J. R. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 9518-9525)에 보고된 과정에 따라 화합물 7을 98% 수율로 합성하였다.

[0098] 화합물 8의 합성

[0099] $EDCHCl$ (63 mg, 0.40 mmol)을 상온에서 화합물 2 (152 mg, 0.20 mmol), 화합물 5 (68 mg, 0.18 mmol) 및 CH_2Cl_2 (20 mL) 중 DMAP (49 mg, 0.40 mmol)에 첨가하였다. 12시간 후에 혼합물을 수성 1 N HCl 용액으로 씻어내고, 유기층을 $MgSO_4$ 로 건조시키고, 여과한 후 진공 내에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 160 mg(72%)의 주산물을 수득하였다. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.76 - 7.57 (m, 15H), 7.50 (d, J = 7.88 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.24 Hz, 1H), 7.32 - 7.21 (m, 6H), 7.10 - 6.96 (m, 17H), 6.82 - 6.69 (m, 2H), 3.73 - 3.46(m, 3H), 2.20 (t, J = 7 Hz, 1H), 2.02 (t, J = 6.96 Hz, 1H), 1.61 - 1.26 (m, 10H), 0.97 - 0.83 (m, 3H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 14.37, 23.87, 24.15, 31.80, 33.75, 34.88, 117.47, 117.92, 117.96, 118.77, 118.81, 119.28, 123.94, 126.37, 126.65, 127.46, 127.83, 127.89, 128.44, 128.69, 128.71, 130.33, 130.64, 130.67, 130.77, 130.80, 131.17, 131.40, 131.62, 131.66, 133.70, 133.73, 133.80, 133.83, 134.79, 135.23, 135.26, 135.63, 136.87, 137.41, 140.35, 140.64, 141.46, 141.76, 142.09, 143.26, 143.99, 144.04, 147.90, 154.44, 155.49, 171.96, 172.33 ppm. ESI-MS: m/z calcd for $C_{62}H_{52}O_3P$

(M+H) was 875.36; detected 875.35

[0101] 화합물 9의 합성

[0102] EDCHCl (60 mg, 0.38 mmol)을 상온에서 화합물 3 (100 mg, 0.19 mmol), 화합물 6 (145 mg, 0.58 mmol) 및 CH₂Cl₂ (30 mL) 중 DMAP (47 mg, 0.38 mmol) 용액에 첨가하였다. 12시간 후에 혼합물을 수성 1 N HCl 용액으로 씻어내고, 유기층을 MgSO₄로 건조시키고, 여과한 후 진공 내에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 118 mg(82% 수율)의 주산물을 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.85 - 6.91 (m, 26H), 3.28 (s, 4H), 2.15 (s, 6H), 1.90 - 1.89 (m, 12H), 1.51 (s, 12H). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 12.34, 12.86, 14.59, 28.96, 38.27, 47.45, 123.61, 123.62, 126.95, 138.76, 139.21, 142.20, 143.09, 152.13, 170.76, 187.63, 191.09 ppm. ESI-MS: *m/z* calcd for C₆₆H₆₀O₈ (M+Na) was 1003.42; detected 1003.45, (M+K) was 1019.39; detected 1019.35.

[0104] 결과 및 고찰

[0105] 합성

[0106] 상기 [합성 경로]에 도시한 바와 같이, NQO1 트리거인 화합물 6을 종래 문헌에(R. D. Rohde, H. D. Agnew, W. S. Yeo, R. C. Bailey and J. R. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 9518-9525) 보고된 과정에 따라 두 단계로 합성하였다. 트리페닐포스포늄-함유 표적 모이어티 화합물 5 또한 이미 설명된 바와 같이 효율적으로 제조하였다(S. U. Hettiarachchi, B. Prasai and R. L. McCarley, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, **136**, 7575-7578). 디브롬화된 테트라페닐에텐 전구체 화합물 4를 이전에 보고된 바와 같이(Y. Liu, C. Deng, L. Tang, A. Qin, R. Hu, J. Z. Sun and B. Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 660-663), 44/56의 시스/트랜스 비율이 되는(테이터는 나타내지 않음), 4-브로모아세토펴의 맥머리 결합을 통해 제조하였다. 뒤이어 시스/트랜스 혼합물을 π-확장된 테트라페닐에텐 화합물 3을 발생시키는, (2-하이드록시페닐)보론산과의 스즈키 결합 반응을 위한 스캐폴드로 사용하였다(L. Rajendran, H. J. Knolker and K. Simons, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, **9**, 29-42). 마지막으로, 각각 NQO1 유발 유닛 및 미토콘드리아 표적 유닛이 결합된 비교 화합물 8 및 9 뿐만 아니라, 미토콘드리아 표적 NQO1 활성 AIE 형광단 화합물 1을 카르보다이미드 결합 시약을 이용한 화합물 3의 에스터화를 통해 제조 가능하다. 화합물 1 내지 6은 ¹H NMR, ¹³C NMR 및 ESI-MS 데이터로 확인하였다. 화합물 1, 8 및 9의 순도는 HPLC에 의해 각각 92.4%, 85.8% 및 95.0%로 확인되었다.

[0108] DFT 계산

[0109] AIE 코어의 시스 및 트랜스 이성질체 프론티어 오비탈의 상대적인 에너지를 기상의 6-31G(d) 이론 수준에서 B3LYP 하이브리드 함수를 이용하여 DFT 계산에 의해 계산하였다. 계산에 따르면, HOMO에 대해 시스 및 트랜스 이성질체 각각 -5.31 및 -5.37 eV, LUMO에 대해 시스 및 트랜스 이성질체 각각 -1.43 및 -1.44 eV로, 그들 사이 에너지가 상대적으로 작은 차이를 나타내었다. 이는 프론티어 분자 궤도의 전자 분포로부터 알 수 있듯이 ortho-치환 페닐아세테이트 pendent arms의 상대적으로 작은 기여에 의해 설명될 수 있다.

[0111] 용액 연구

[0112] 화합물 1, 8, 9의 흡수 및 방출 스펙트럼은 메탄올 중에서 물의 양을 증가시키면서 기록하였다. 흡수는 용매 조성도에 매우 무관한 반면, 용매 의존적 형광성 증가는 화합물 8에서만 관찰되었는데, 이는 높은 물 농도에서의 효율적인 응집 유도 형광때문이다. NQO1 트리거를 생산하는 화합물 1 및 9 둘다 화합물 8과 비슷한 극성을 가짐에도 불구하고, 높은 물 농도에서 현저한 형광성의 증가를 나타내지 않는다는 것은 흥미롭다. 퀴논 트리거의 DFT 결과를 살펴보면, 이러한 관찰은 유발제 및 AIE 코어(시스 및 트랜스 이성질체 둘 다)의 프론티어 궤도의 상대적인 에너지에 의해 뒷받침되는데, 여기서 NQO1 트리거는 나프탈리미드-기반 NQO1 특이적 형광단에 대해 이전에 보고된 바와 같이, 산화적 전자 이동(OeT)-타입 광유도 전자 이동(PeT) 효과에 의해 AIE 유닛의 형광성을 낮춘다(W. C. Silvers, B. Prasai, D. H. Burk, M. L. Brown and R. L. McCarley, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, **135**, 309-314).

[0113] 트리거 활성화에 대한 접합체 화합물 1의 행동을 평가하기 위하여, NAD(P)H 형광으로부터의 잠재적인 간섭이 없는 무 효소 모델 시스템으로서, 디티온산 나트륨의 첨가 후에 PBS(인산 완충 식염수)내 화합물 1 용액의 형광성을 모니터링하였다. 수성 PBS 내 화합물 1 용액(20 μM)에 디티온산 나트륨(40 μM)의 첨가할 경우 470 nm에 집중

된 AIE 띠의 신속한 출현을 야기한다(도 1a 및 1d). 반대로, MeOH 내 형광단의 방출은 방출된 형광단의 MeOH 용매화가 AIE 효과를 막기 때문에, 형광성의 AIE 근원을 확인하는, 현저한 형광성 증가를 야기하지 않는다(도 1b). 없거나 무시해도 될 정도의 양의 형광성 증가가 다른 생물학적으로 적절한 티올 및 아미노산의 첨가로 관찰될 수 있는 반면, 디티온산 나트륨의 첨가로 200배 이상의 형광성 증가를 나타내었는바, 화합물 1은 우수한 선택성을 가짐을 확인하였다(도 1c).

[0115] 세포 내 위치화

[0116] 물에서 화합물 8의 이광자 단면은 0.47 GM으로 확인되었다(데이터 미도시). NQO1 양성 A549 세포주를 이용한 공동위치화 연구(Colocalization studies)는 AIE 프로브에 미토콘드리아 표적을 허용하기 위한 친유성 탈위치화된 양이온의 효율성을 증명한다(도 2). 여기서 트리페닐포스포늄을 가지는 화합물 1 및 8은 모두 미토콘드리아에서 유래한 효율적인 세포 내 AIE 방출을 나타내지만(도 2a-d 및 2eh), 이러한 세포성 표적제(subcellular targeting agent)가 없는 경우 사실상 형광성은 관찰되지 않았다(도 2i-l).

[0118] NQO1에 대한 세포 독성의 시험관내 의존도

[0119] 고수준의 NQO1 효소를 발현하는 A549 세포에서 화합물 1, 8 및 9의 세포 독성의 용량 의존성을 WST-1 분석을 이용하여 확인하였다. 비-표적 참고 화합물 9와 대조적으로, 트리페닐포스포늄이 부가된 화합물 1, 8은 증가된 세포독성을 나타내었는데(도 3a), 이는 도 2에 기록된 세포 내 위치화 연구에 따른 결과를 반영한다. 화합물 1이 NQO1-관련 세포독성 효과를 유발하는지 설명하기 위하여, 인간 배아 293T 세포 및 다른 수준의 NQO1 단백질을 발현하는 다양한 조직 기원의 다섯 가지 인간 암세포주에 20 μ M의 화합물 1, 8 및 9의 투여하여 세포 생존능 분석을 수행하였다(도 3b). 흥미롭게도, 화합물 1의 처리는 낮은 NQO1 발현 수준을 가진, 293T(정상 신장), U203(골육종), 및 HCT116(대장암) 세포의 약한 감소 또는 감소하지 않음을 야기한 반면(도 3c-e), 높은 NQO1 발현 수준과 관련된, NHA(신경교종), HeLa(자궁경부암), 및 A549(폐암) 세포의 세포 생존능에는 상당한 감소를 야기하였다(도 3f-h). 예상된 바와 같이, 화합물 8은 본 발명에서 시험한 모든 세포 유형, 무차별적인 NQO1 수준 및 병리학적 단계에서의 강한 세포독성 효과를 나타낸 반면, 화합물 9는 어떠한 현저한 효과도 나타내지 않았다. 이를 통해 본 발명에 따른 화합물 1은 NQO1에 매우 의존적인 방식으로 인간 암세포 상 세포독성 효과를 발휘한다는 것을 뒷받침한다.

[0120] 화합물 1의 세포독성에 대한 NQO1-의존도를 추가로 확인하기 위하여, NQO1의 소간섭 RNA(siRNA)-매개 녹다운을 이용하여, A549 세포 내 화합물 1의 활성화에 대한 NQO1 소모 효과를 시험하였다. 도 4b에 나타난 바와 같이, 화합물 1의 생존능-감소 활성화는 투여량-의존적인 방식으로 siNQO1 형질주입에 의해 약화되는 반면, 화합물 8 및 9의 효과는 siNQO1에 영향을 받지 않았다. 절단된 PARP 및 카스파제의 면역블롯 분석을 수행하여 화합물 1의 세포독성에 대한 NQO1-의존성 기전으로서 세포사멸 유도를 조사하였다. 화합물 1은 PARP, 카스파제-9, 및 카스파제-3의 절단을 강하게 활성화하였는데, 이러한 효과는 NQO1-분해 세포에서 눈에 띄게 차단되었다(도 4c). 일관되게, 세포사멸 서브-G1 단편의 유동 세포 분석 결과는 화합물 1의 세포사멸 유도가 투여량-의존적인 방식으로 siNQO1에 의해 억제된다는 것을 나타낸다(도 4a). 또한, 세포 분획화 분석은 화합물 1이 NQO1-의존적인 방식으로 시토크롬 C의 세포질 방출을 자극한다는 것을 나타내었다(도 4d). 더불어, 이러한 결과들은 미토콘드리아 내 화합물 1의 NQO1-의존적 응집이 시토크롬 C 방출 및 뒤이은 카스파제 활성화를 이끄는, 막 투과성의 조절장애를 유발할지도 모른다는 것을 강하게 암시한다.

[0121] 다음으로, 화합물 1의 세포내 응집 및 NQO1에 대한 의존도를 AIE 형광단의 형광 강도 및 NQO1 분해 및 과발현 사이의 관계를 모니터링하여 확인하였다. 높은 NQO1 수준을 품고 있는 A549 세포에서, siNQO1 형질주입의 투여량 증가를 이용한 내재적 NQO1 발현의 녹다운은 형광 강도의 투여량-관련 감소를 야기한다(도 5a 및 5b). 일관되게, HCT 세포 내 FLAG-NQO1 형질주입을 이용한 NQO1의 이소성 과발현은 관찰된 AIE 형광성에 투여량-관련 급격한 증가를 야기하였다(도 5c 및 5d). 따라서, 이러한 결과들은 화합물 1의 응집 및 형광 유도가 종양 세포 내 NQO1 발현에 대해 매우 의존적이라는 것을 분명히 나타내는 것이다.

[0123] 생체 내 종양 성장 억제 및 종양 성장 감소

[0124] 화합물 1의 종양 성장에 대한 효과 및 NQO1 발현에 대한 그의 의존도를, NQO1 녹다운과 함께 및 없이 A549 세포의 이종이식 종양을 이용하여 시험하였다. 동일한 수의 si대조군 또는 siNQO1 세포(1×10^7)를 누드 마우스의 측면에 피하 주사하였다. 두 세포 모두 주입 8일 후 비슷한 양의 종양이 나타났고, 2주 동안 3일에 한번씩 화합물 1을 꼬리 정맥 주사로 투여하였다(2 mg/kg/d). 종양 성장을 60일까지 규칙적으로 모니터링하였다. 화합물 1에 대한 극적인 반응을 나타내는(79% 감소) si대조군 종양과 비교하여, siNQO1 종양은 매우 약화된 반응을 나타내

는데(28% 감소), 이는 화합물 1이 매우 NQ01-의존적인 방식으로 생체 내에서 종양 성장을 억제한다는 것을 나타낸다(도 6a). 뒤이어, 대조군 플라스미드(pcDNA) 또는 NQ01 발현 플라스미드 (1×10^7 세포) 중 하나로 형질주입된 HCT116 세포 기반 종양에서 종양 크기의 퇴행을 야기하는 화합물 1의 잠재성을 평가하기 위하여, 누드 마우스의 피하 측면에 주사하였다. 종양 성장 곡선은 종양 이종이식 접종 10일 후 처리되었을 때, 종양 크기 퇴행 효과에 대한 NQ01 효소 및 화합물 1의 존재의 중요성을 분명히 시사한다. 종양 이종이식 접종 후 대략 35일 후에, 대조군 처리는 제한없는 성장을 나타낸 반면, 효소 및 화합물 1의 조합만이 암 크기를 감소시킨다는 것이 확인되었다. 따라서 치료는 궁극적으로 치료 시작 40일 후, 종양 크기에서 대략 4배 차이를 야기하였다(도 7a).

[0126]

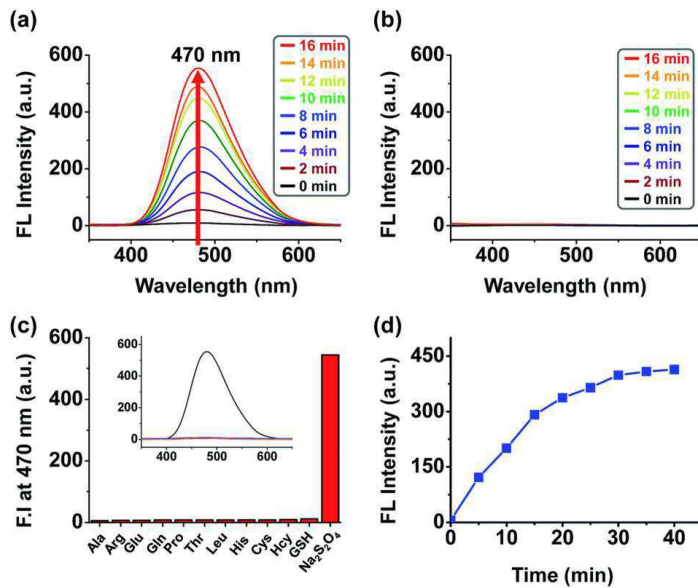
생체 내 및 생체 외 응집된 화합물 1의 조직 분포

[0127]

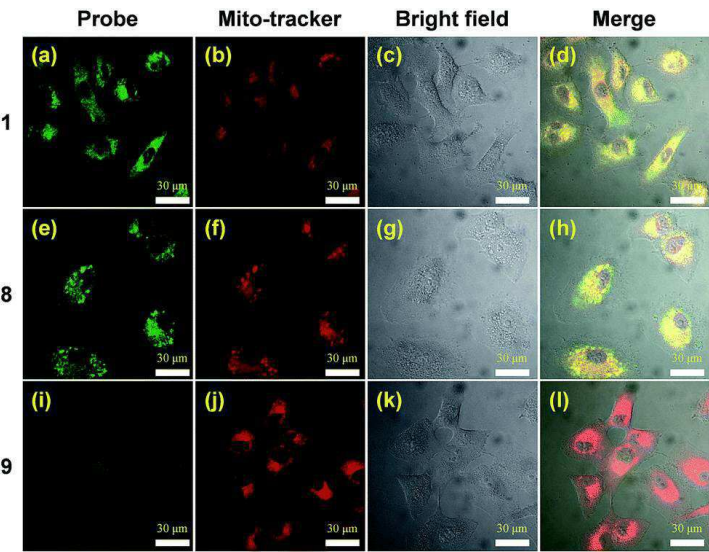
최종적으로, NQ01 양성 종양 내 화합물 1의 특이적 전달 및 활성화에 의해 유발된 암 성장 곡선 결과를 증명하기 위하여, HCT116 세포를 포함하는 쥐를 NQ01 발현과 함께 및 없이(도 7B 참조) HCT116 세포와 배양하고 25일 후 및 화합물 1 기반 치료 시작 10일 후 생체 내에서 형광성 연구를 하였다. 도 8a에 분명히 나타난 바와 같이, 화합물 1은 종양 조직에 특이적으로 상향응집되었고, NQ01 양성 세포의 활성화는 더 높은 수준의 프로브 형광성 및 그에 따른 응집을 야기하였다. 동일한 쥐를 뒤이어 안락사시키고, 잘라낸 기관 조직의 형광성을 기록하여, NQ01 양성 세포 기반 종양으로부터 유래된 우수한 형광성을 확인하였다. 망막 내피 시스템(간 및 비장) 또는 신장계(신장) 뿐만 아니라 심장에서 유래된 형광성이 없거나, 현저하지 않은 수준의 형광성을 통해 나타난 우수한 조직 선택성은 화합물 1의 우수한 조직 특이적 및 효소 선택적 활성화를 증명한다.

도면

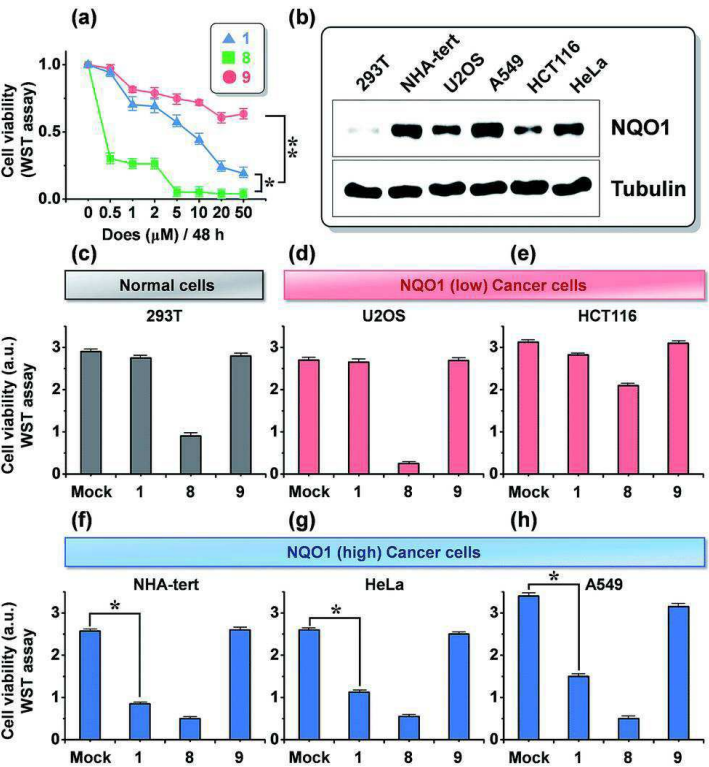
도면1



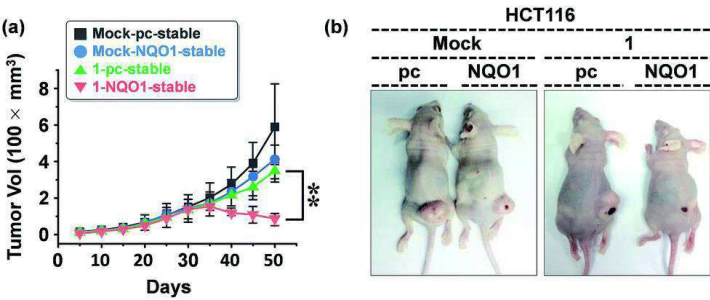
도면2



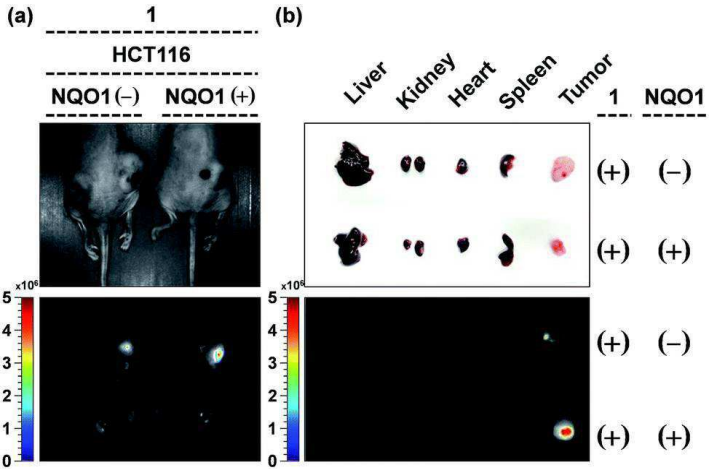
도면3



도면7



도면8



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1-3

【변경전】

항암 치료진단제

【변경후】

암 치료진단제