



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0007239
(43) 공개일자 2019년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/574 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)

C07D 311/82 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)

A61K 49/0041 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0088419

(22) 출원일자 2017년07월12일

심사청구일자 2017년07월12일

(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

구세영

서울특별시 양천구 목동동로 130, 1401동 1103호

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 2 항

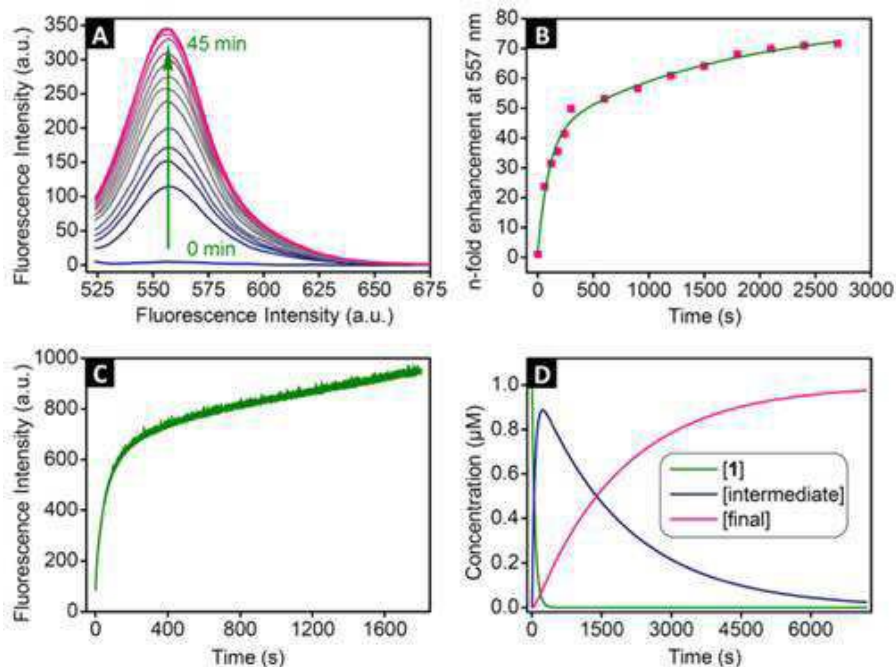
(54) 발명의 명칭 저산소환경에 의해 활성화되고 미토콘드리아에 대한 특이적 표적화가 가능한 항암 치료진단제

(57) 요약

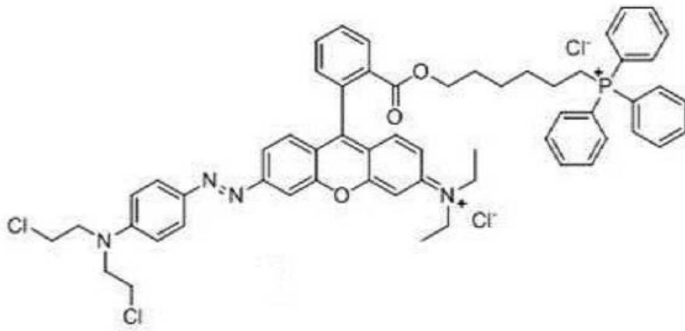
본 발명은 하기 [화합식 1]로 표시되고는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 저산소환경에 의해 활성화되고 미토콘드리아에 대한 특이적 표적화가 가능한 항암 치료진단제에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



[화학식 1]



(52) CPC특허분류

C07D 311/82 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0081566

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

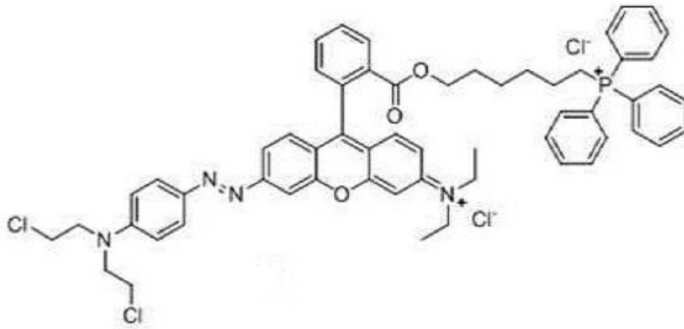
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제:

[화학적식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물은 저산소 환경에서 아조(azo) 결합이 절단되어 약물 전구체 및 형광물질이 방출되는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저산소환경에 의해 활성화되고 미토콘드리아에 대한 특이적 표적화가 가능한 항암 치료진단제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 초기 암을 진단하고, 종양에 치료 약물들을 전달하며, 약물 방출 동력학을 모니터링할 수 있으며, 암 단계들을 시각화할 수 있는 치료진단 전략들의 개발은, 암 환자들을 위한 효과적이고 개별화된 약물 기술들을 제공한다. 암 치료를 위한 이러한 양상들을 하나로 조합함으로써, 다양한 독성 부작용들을 최소화하고, 기존 약물들의 치료 지수들을 개선할 수 있다. 이러한 치료진단 전략들은, 다양한 효소들 및 활성 산소종들 (reactive oxygen species, ROS)을 과발현하고 진단 및 치료약물들의 활성화를 유발하는 산화환원 불균형을 보유한 암 조직들에 대해서 특히 유용하다. 적당한 치료진단제들을 고안하는 작업은 매우 어려운 것으로서, 그 개발을 위해서는 지속적인 노력이 요구된다.

[0003] 세포의 발전소라 할 수 있는 미토콘드리아는 항상성을 유지하며, 산화적 인산화 반응에 의해서 대사 에너지를 제공하고, ROS에 의해서 세포내 신호전달을 담당하며, 세포괴사 (apoptosis)를 조절한다. 미토콘드리아는 사멸 신호, 영양 인자 결핍, DNA 손상 및 생체이물들 (xenobiotics)을 포함하는 다양한 유형의 자극들에 반응하는 동시에, 미토콘드리아-매개 세포괴사 단백질들을 방출한다. 미토콘드리아는 단백질의 Bcl-2 패밀리에 의해서 조절되는 내생적 세포괴사 경로를 조절하고, 뒤이어 카스파아제-캐스캐이드 (caspase-cascades)를 활성화하며, 이는 세포 사멸로 이어진다. 정상적인 세포들에서의 중대한 역할에도 불구하고, 암세포들에서 미토콘드리아는 다르게 기능하며, 종양 발생 및 암 진전에 관여한다. 미토콘드리아의 교란은 많은 세포 기능들의 조절 불가능을 야기하는데, 이에겐 강화된 대사, 산화적 인산화 및 자가소화작용 (autophagy)이 포함되고, 이는 세포 생존 또는 사멸에 매우 큰 영향을 미친다.

[0004] 따라서, 미토콘드리아의 필수적이면서도 해로운 기능으로 인해서, 미토콘드리아-표적화된 항암 치료진단제들에 의한 내생적 세포괴사의 조절은, 종양 세포 박멸을 위해서 아직까지 연구된 바 없는 잠재적인 화학치료요법이 될 수 있다.

[0005] 예를 들어, 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0074177호는 미토콘드리아-표적화된 항-종양 물질을 개시하고 있으며, 이는 히트쇼크 단백질과 같은 분자 샤페론 억제자 (molecular chaperone inhibitor)와 미토콘드리아-관통성 모이어티가 결합된 구조를 갖는다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0135803호는 반응성 산소종을 생성하거나 산화촉진을 유도하는 잔기와 이러한 잔기를 미토콘드리아에 전달하는 전달 잔기를 포함하는 미토콘드리아 전달용 항암 화합물을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

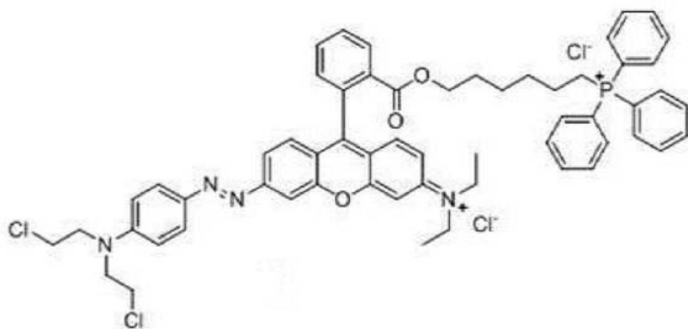
[0006] 본 발명에서는 미토콘드리아를 특이적으로 표적화하는 것이 가능하며, 종양 표적화, 진단 및 종양 부위로의 전구체 약물 전달이 가능한 항암 치료진단제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0008] 하기 [화합식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제를 제공한다:

[0009] [화합식 1]



[0010]

[0011] 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물은 저산소 환경에서 아조(azo) 결합이 절단되어 약물 전구체 및 형광물질이 방출될 수 있다.

발명의 효과

[0012] 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

[0013] 도 1은 10 mM PBS, 37 °C에서 소듐 다이티오나이트(sodium dithionite) 처리에 의해 환원된 화합물 1([화합식 1]로 표시되는 화합물, 1 μM)의 환원을 나타낸 것으로, (A)는 형광 증강(λ_{ex} : 514 nm), (B)는 557 nm에서 형광 강도 향상, (C)는 시간 의존적인 형광 스펙트럼(λ_{ex} : 524 nm, λ_{em} : 557 nm), (D)는 적절한 결과를 이용한 생성물의 모의실험된 농도를 나타낸다: $[1]_0 = 1 \mu M$, $\tau_1 = 1/k_1 = 66$ 초, $\tau_2 = 1/k_2 = 1910$ 초.

도 2의 (A)는 글라스 커버를 이용하여 산소 결핍을 유도시킨 저산소환경 조건에서 유도된(triggered) 화합물 1 (μM)의 형광을 나타낸 것으로, 좌측 패널은 형광 이미지, 우측 패널은 DIC 이미지로 입혀졌다. 스케일바 50 μm; 배율 100×. (B)는 3 % 저산소환경 조건에서 24 시간 동안 화합물 1 또는 6(μM) 처리된 세포의 형광이고, (C)는 정상산소 조건에서 24 시간 동안 화합물 1 또는 6(μM) 처리된 세포의 형광을 나타낸다. 스케일바 10 μm; 배율 400×; λ_{ex} : 555 nm, λ_{em} : 585 nm.

도 3은 화합물 1, 5 및 6의 항암 효과를 나타낸 것으로, (A)는 DU145-세포-접종된 이중이식 마우스에서 종양 조직의 생체내 이미징이다. 200 μ L의 PBS 중에서 500 μ M 화합물 1 또는 화합물 6으로 마우스에 꼬리-혈관 주사를 놓았다. 이중이식 마우스의 형광 이미지를 3회 주사 후 취했다. (B)는 13주 후 절단된 고형 종양(mm로 표시)을 나타내고, (C)는 시간의 함수로서 평균 종양 부피 $\pm$ s.e.m를 나타낸다. 화살표는 화합물 1, 5, 6 또는 대조예 (200 μ L의 PBS 중에서 500 μ M)의 주사를 의미하고, 유의성 (화합물 1 vs. 모든 대조예)를 양측-검정 t-시험에 의해 평가하였다 *P < 0.05, 종양 조직의 수, n = 12. (D)는 이중이식 마우스로부터 절개된 종결(13주)시 종양의 최종 중량을 나타낸다. 그래프는 n=12의 대표이며, 평균 종양 중량 $\pm$ s.e.m.을 나타내며, 유의성을 양측-검정 t-시험에 의해 평가하였다 *** P < 0.001. (E)는 대조예 및 화합물 1이 주사된 마우스로부터 절개된 동결절편된 종양 조직의 형광 이미징이다. 청색: 핵염색 (DAPI) 적색: 바이오-활성화된 화합물 1. (F)는 3,3'-다이아미노벤지딘 (DAB) 염색 (갈색 염색)에 의한 세포 증식 (Ki-67), 세포사멸 (TUNEL), 혈관형성 (CD31)을 묘사하는 H&E, Ki67, TUNEL, 및 CD31 염색 결과를 나타낸다. 13주에 종양 조직을 절개하였고, 파라핀-블로킹된 종양 조직의 조직화학 및 면역조직화학 분석을 그 다음에 수행하였다. 스케일바 100 μ m; 배율 200 $\times$ (실험의 도식적인 타임라인은 도 14에 나타냄).

도 4는 화합물 1의 작용 모드를 나타낸 것으로, (A)는 프로-세포사멸 유전자 및 안티-세포사멸 유전자의 발현을 RT-PCR에 의해 평가한 결과이고, (B)는 과발현된 단백질 및 세포사멸 관련 단백질 부분의 총 개수를 나타낸다. (C)는 웨스턴 블롯 분석에 의한 선택된 세포사멸-관련 단백질의 단백질 발현 수준을 나타낸 것이고, (D) 및 (E)는 GeneGo 소프트웨어를 이용한 구별되게 발현된 단백질의 작용을 분석한 결과이다. 리스트는 가장 유의미한 경로를 제일 위에 배열하고 그 다음 내림차순으로 배열하였다. 마는 -log p-값으로 나타내었다. (D)와 (E)는 각각 BJ 와 DU145 세포에서 구별되게 발현된 단백질의 표준 경로를 나타낸다.

도 5는 37 $^{\circ}$ C, PBS (10 mM, pH=7.4) 중 화합물 7의 정규화된 흡수 및 방출을 나타낸 것이다.

도 6은 37 $^{\circ}$ C, PBS (10 mM, pH=7.4) 중 화합물 1의 정규화된 흡수를 나타낸 것이다.

도 7은 37 $^{\circ}$ C, PBS (10 mM, pH=7.4) 중 화합물 1 및 6 vs. 화합물 7(1 μ M)의 상대적 방출 강도를 나타낸 것이다(λ_{ex} = 514 nm, 슬릿 폭 ex/em 5nm/5nm).

도 8은 다양한 환원제에 대한 화합물 1(1 μ M)의 형광 반응을 나타낸 것이다. 37 $^{\circ}$ C 정상산소 및 PBS (10 mM, pH 7.4) 중 저산소환경 조건하에서 화합물 1을 소듐 다이티오나이트 (SDT) 또는 50 μ M의 다양한 환원제 (Cys: 시스테인, Hcy: 호모시스테인, GSH: 글루타티온, NADH: 환원된 니코틴아미드 아데닌 다이뉴클레오티드)으로 처리하였다. 배양시간 30분, λ_{ex} = 514 nm, 슬릿 폭 ex/em 5nm/5nm.

도 9는 환원 후 화합물 1 및 37 $^{\circ}$ C, PBS (10 mM, pH=7.4) 중 화합물 7(1 μ M)의 정규화된 강도를 나타낸다. (λ_{ex} = 514 nm, 슬릿 폭 ex/em 5nm/5nm)

도 10은 종양 스페로이드 내에서 화합물 1의 형광 이미지를 나타낸다. 저산소환경 조건 (3% O₂)하에서의 300 μ m 크기의 DU145 종양 스페로이드 내에서 화합물 1 활성화의 z-스택 이미징이다.

도 11은 화합물 1과 화합물 6의 공존(Co-localization)을 나타낸 것이다. 화합물 1의 세포 내 위치를 기관-특이성 형광 염료 (Mito-Tracker, ER-Tracker, 및 Lyso-Tracker)로 식별하였다 (a) DU145 세포를 1 μ M의 화합물 1 또는 (b) 화합물 6과 함께 16시간 동안 배양하였고, 그 다음에 각각의 형광 트래커를 30분 동안 첨가하였다. 스케일바 50 μ m; 배율 1000 $\times$. 개개의 색 채널을 조절하여 둘 모두의 채널에서 유사한 최대 강도를 유도하였다. Pierson 상관 관계를 공존 산점도뿐만 아니라 모든 공존 이미지(노란색)에 대해 측정하였다.

도 12는 화합물 1의 세포독성을 나타낸다. (A)는 대조군 및 화합물 1의 세포 생존율 비교 결과를 나타낸다. 세포들을 96-웰 플레이트에 분주하고 화합물 1로 24시간 동안 처리하였으며, 그 다음에 WST-1 시험을 사용하여 시험하였다. 그래프는 3개의 독립된 실험의 대표에 해당하고 평균 농도 $\pm$ s.e.m.을 나타내었으며, 양측-검정 t-시험을 이용하여 유의성을 평가하였다. *** P < 0.001 (B)는 PI 염색된 대표적인 위상차 및 형광이미지로, 사멸 세포(적색)를 나타낸다. 스케일바 100 μ m; 배율 200 $\times$

도 13은 화합물 1, 5, 및 6의 시험관내 세포독성 효과를 나타낸 것이다. 세포들을 96-웰 플레이트에 분주하고 10 μ M 화합물 1, 5, 및 6으로 24시간 동안 처리하였으며, 그 다음에 WST-1 시험을 사용하여 시험하였다. 그래프는 3개의 분리된 실험의 대표에 해당하고 평균 농도 $\pm$ s.e.m.을 나타내었으며, 양측-검정 t-시험을 이용하여 유의성을 평가하였다 *P<0.05, **P<0.001.

도 14는 13주 후 화합물 1, 5 또는 6(n=6)이 주입된 마우스의 최종 체중량을 나타낸다.

도 15는 화합물 1, 5 또는 6이 주입된 마우스를 갖는 DU145 이종이식의 생체내 이미지화 및 생체의 분석 실험의 타임라인을 나타낸 것이다.

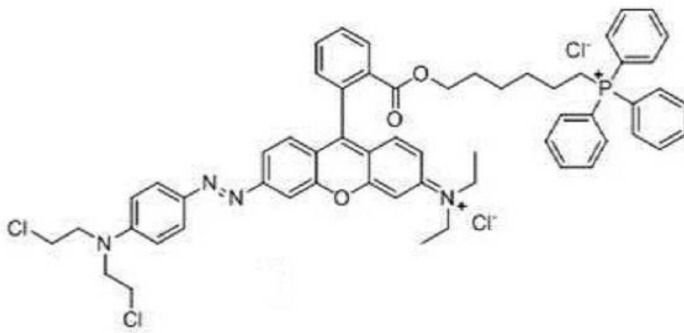
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명에서는 저산소조건 환경에서 활성화되어 약물 전구체 및 형광물질이 방출되도록 함으로써 미토콘드리아를 특이적으로 표적화하는 것이 가능하며, 중앙 표적화, 진단 및 중앙 부위로의 전구체 약물 전달이 가능한 항암 치료진단제를 제공하고자 한다.

[0016] 따라서, 본 발명은 하기 [화학적 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제를 제공한다:

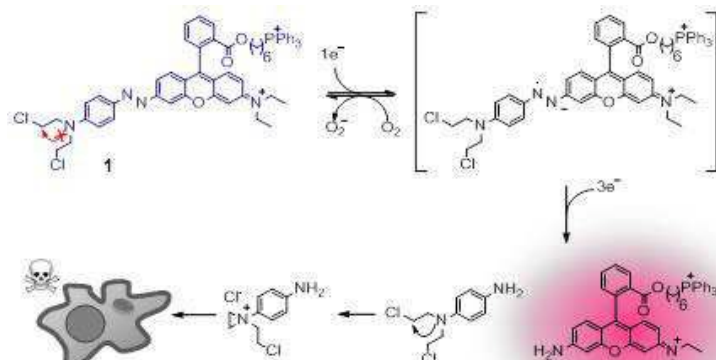
[0017] [화학적 1]



[0018] 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물은 저산소 환경에서 아조(azo) 결합이 절단되어 약물 전구체 및 형광물질이 방출될 수 있다.

[0020] 구체적으로, 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물의 항암 치료진단 메커니즘은 아래에 도식화한 것과 같으며, 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물은 저산소환경 조건하에서, 아조-결합이 감소하고, 이로 인해 DNA 알킬화제인 *N,N*-비스(2-클로로에틸)-1,4-벤젠다이아민의 방출, 및 약물의 활성화를 증명하는 형광 로다민 123/B 유사체가 방출된다. 다음으로, 미토콘드리아 대하여 국부화된 DNA 교차-찍지움 및 알킬화 손상에 의해 세포 사멸을 초래한다.

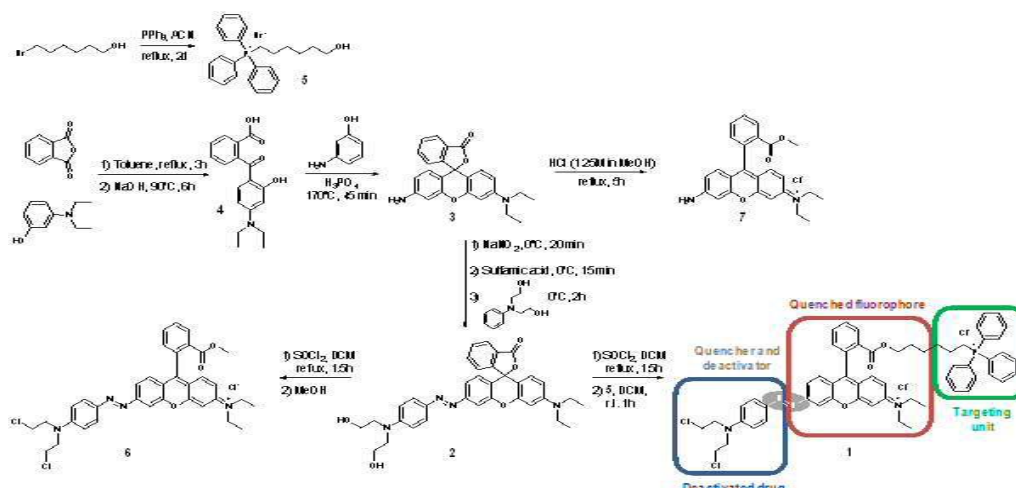
[0021] [항암 치료진단 메커니즘]



[0022]

[0023] 또한, 본 발명에 따른 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물의 구체적인 제조방법은 하기 합성경로에 표시된 바와 같으며, 구체적인 내용은 하기 실시예에서 설명하기로 한다.

[0024] [합성 경로]



[0025]

[0027] 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.

[0029] 실험 방법 및 합성에

[0030] 합성을 위한 재료 및 방법

[0031] 본 발명에서 사용된 시약은 Alfa-Aesar, Aldrich, TCI, Carbsynth, Dcsan, 및 Acros에서 구입하였으며, 추가 정제 없이 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피를 위해서 실리카 겔 60 (Merck)을 사용하였으며, ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼은 Varian 400 MHz 분광기로 측정하였다. 질량 스펙트럼은 LC/MS-2020 시리즈(Shimadzu) 기기를 이용하여 수행하였다.

[0033] UV/Vis 및 형광 분광법

[0034] 분광법 결과는 Scinco S-3100 분광기로 측정하였고, 형광 스펙트럼은 Shimadzu RF-5301PC 분광형광 광도계를 사용하여 측정하였다. 모든 형광 스펙트럼은 여기 파장에서 0.1 미만의 흡수값에 기록되었고, 기구 설정 및 용매는 이미지 캡션(샘플들은 최대 1% DMSO를 함유함)에 제공되었다. 형광 (화합물 7)의 양자 수율은 EtOH ($\Phi = 0.95\%$) 중 로다민 6G에 대해 MeOH 또는 PBS (10 mM, pH = 7.4) 중에서 측정하였다. 화합물 1(1 μ M)의 소듐 다이티오나이트 (2 mM) 매개된 아조-환원(azo-reduction)은 37 °C, PBS (10 mM, pH = 7.4, 1% DMSO) 중에서 수행하였고, 시간 경과 스펙트럼은 524 nm에서의 여기 및 514 nm (슬릿 ex/em 5/5)에서의 여기에 따른 시간 의존적 형광 스펙트럼에 따라 557 nm에서 기록하였다.

[0036] 세포 배양

[0037] 4 개의 인간 암세포주: 전립선암 세포 (DU145), 유방암 세포 (MDA-MB-231), 폐암 세포 (A549), 간암 세포 (Huh7)를 Korean Cell Line Bank (Seoul, Republic of Korea)로부터 구매하였다. 신생아 포피 세포로부터 수득한 정상 인간 섬유아세포 (BJ)를 Modern Cell & Tissue Technologies (MCTT, Seoul, Republic of Korea)로부터 구매하였다. 10% 소태아 혈청 (FBS, GIBCO, Grand Island, NY, USA)을 지닌 Roswell Park Memorial Institute 배지 (RPMI-1640, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 또는 돌베코수정이글 배지 (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA), 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신 (GIBCO, Grand Island, NY, USA)을 세포 배양 배지로서 사용하였다. 세포배양 배양기는 37 °C에서 5% CO₂를 함유하는 습윤 분위기를 유지하였다. 밀도가 70-80%에 도달하면 세포들을 계대 배양하였다. 4개의 암세포주 (DU145, MDA-MB-231, Huh7, A549) 및 정상 세포 (BJ)에서의 추가적인 정

량화된 세포사멸 유전자 발현을 위해, 저혈청 배양 배지 (0.5% FBS)에서 2시간 후 세포 용해물을 샘플링하였다.

[0039] 저산소환경 조건 하에서의 세포 배양

[0040] 3% O₂의 저산소환경 조건하에서 세포를 배양하기 전에, 37 °C에서 습윤 CO₂ (5%)를 함유하는 표준 상태: 21% O₂ 하에서 최대 2개의 계대 배양으로 세포들을 배양하였다. 저산소환경 조건하의 세포독성뿐만 아니라 세포 내 형광 강도 변화를 조사하기 위해, 96-웰 플레이트 (웰 당 1.0×10^4) (SPL, Kyonggi, Republic of Korea) 또는 35 mm 공초점 유리 보텀 디시 (디시 당 1.5×10^6) (SPL) 상에 세포들을 뿌렸다. 21% O₂ (정상산소) 및 3% O₂ (저산소환경) 효과를 비교하는 모든 실험을 똑같이 반복하여 수행하였다. 24시간 내지 48시간 후에, 표준 가스 분위기 배양기 또는 5% CO₂/천칭 N₂ 습윤 가스 혼합물을 지닌 3% 저산소환경 챔버 (MiniGalaxy 4, RS Biotech Laboratory Equipment Ltd., Scotland, UK) 내로 플레이트를 옮겼다. 배양기 챔버의 21% 또는 3% O₂ 함량은 Fyrite 가스 분석계 (Bacharach, New Kensington, PA, USA)로 매일 체크하였다. 배양 배지는 실험에 사용되기 전에 밤새 가스를 제거하였고, 배지는 매일 바꾸었다.

[0042] 세포독성 분석

[0043] 대조군으로서 BJ 세포계, 및 4개 암세포주 (DU145, MDA-MB-231, A549, 및 Huh7)를 세포독성 분석에 사용하였다. MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 세포독성 분석을 수행하기 전에, 제조자의 설명서에 따라 배양 배지로부터 FBS를 제거하였다. 간단하게, 증가하는 농도(0, 0.5, 1, 10, 25, 50, 및 100 μ M)의 화합물 1, 5 또는 6을 PBS 세척 후에 1.5×10^4 세포에 첨가 및 96-웰 플레이트에 분주하였다. 12 mM MTT 용액 (150 μ L)을 각각의 웰에 첨가한 후에, 37 °C에서 24시간 동안 세포를 배양하였다. 약물 또는 화합물의 부재 하에, 네거티브 컨트롤로서, 웰 당 150 μ L의 증류수 또는 MTT 저장 용액 단독으로 첨가하였다. 각각의 웰의 배지를 24시간 배양 후에 제거하였고 50 μ L DMSO를 첨가하였다. 실온에서 추가의 15분 배양 후에, 마이크로플레이트 분광 광도계 (PowerWave XS, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 각각의 웰의 보라 색상의 종의 흡수를 540 nm에서 측정하였다. WST-1 시험 (Sigma)을 위해, 웰 당 1.5×10^4 세포의 96-웰 플레이트에 5개의 모든 세포 유형을 분주하였다. 프로브 화합물과 24시간 배양 후, 제조자의 설명서에 따라 WST-1를 수행하였다. 또한, 화합물 처리의 결과로서 세포 사멸을 10 μ M 프로피듐 요오드화물 (PI; 프로피듐 요오드화물; Sigma) 분석 (20-30분 동안 배양)으로 평가하였다. PI 염색은 사멸세포의 핵에서 적색 형광 신호 (형광 현미경 (Carl Zeiss))을 초래하였다.

[0045] 시험관내 세포 및 종양 스페로이드 이미지화

[0046] 세포내 형광이미지화 전에, 35-mm 공초점 유리 보텀 디시 (SPL)에 2.0×10^6 세포를 뿌리고 48시간 동안 배양 하였다. 모든 4개의 암세포주 (DU145, MDA-MB-231, A549, 및 Huh7)를 1 μ M 화합물 1 또는 화합물 6 (35-mm 디시 당 총 2 ml의 배양 배지에 탐지체 (DMSO 중 10 μ M)의 용액을 첨가함)으로 5% CO₂ 중 37 °C에서 24시간 동안 처리하였다. 다음으로, 무-FBS DMEM 또는 RPMI 1640 배양 배지를 첨가하기 전에 PBS로 세포를 2번 세척하였다. 생체내 종양 성장을 모방하는, 스페로이드의 세포내 형광 이미징을 위해, 디시 당 6.0×10^6 세포 밀도의 60 mm-Corning 극저 부착 배양 디시 (Sigma)에 암세포를 분주하였다. 현탁 배양 (suspension culture) 2일 차에, 화합물 1을 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 세포와 스페로이드를 PBS로 2번 세척한 후에, 공초점 주사레이저 현미경 기구 (Carl-Zeiss LSM 5 Exciter, Oberko, Germany)를 이용하여 세포내 형광 이미지를 캡처하였다.

[0048] 공존 실험(Co-localization experiment)

[0049] 화합물 1과 대조에 화합물 6의 세포내 공존을 조사하기 위해, 35-mm 공초점 유리 보텀 디시 (SPL)에 세포를 뿌렸다. 35-mm 공초점 유리 보텀 디시에서 세포 밀도가 2.0×10^6 에 도달했을 때, 배양 배지를 1 μ M 화합물 1 또는 대조에 6을 함유하는 새로운 배지로 바꾸었다. 제조자의 설명서에 따라 Mito-tracker Green FM (Thermo

Fisher, New Hampshire, USA, Ex/Em 490/516 nm), ER-tracker Green (Thermo Fisher, Ex/Em 374/430-640 nm), 또는 Lyso-tracker Green DND-26 (Thermo Fisher, Ex/Em 504/511 nm)을 사용하여 공존 분석을 수행하였다. 형광 염색된 세포를 Zeiss LSM510 레이저 공초점 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 이미지화하였다. Fiji/ImageJ 소프트웨어 패키지를 사용하여 각각의 이미지에 대한 Pierson 상관 계수 및 상응하는 공존 산점도를 획득하였다(J. Schindelin, C. T. Rueden, M. C. Hiner, K. W. Eliceiri, The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis, Mol. Reprod. Dev., 82 (7-8) (2015), 518-529.)

[0051] RT-PCR

[0052] 화합물 1 처리된 세포의 세포사멸의 기저를 이루는 메커니즘을 조사하기 위해, TRIzol Reagent (Invitrogen)을 이용하여 3% O₂ 하에서 배양된 DU145 세포로부터의 총 RNA를 추출하였다. 제조자의 프로토콜을 사용하여 전형적인 역전사 시스템 (Promega, Madison, WI)을 수행하였다. 상이한 유전자의 PCR 증폭을 위해, akara Ex Tag DNA 폴리머라아제 (Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 5분 동안 94 °C의 온도 프로그램, 30초 동안 94 °C의 35 사이클, 30초 동안 50 -57 °C, 30초 동안 72 °C, 및 10분 동안 72 °C에서 추가 연장시켰다. PCR 생성물을 0.5% 아가로스 겔에 넣고 전기영동을 이용하여 분리하였다. 본 실험에 이용된 PCR 조건 및 프라이머는 아래 표 1에 나타내었다.

표 1

Name of Gene	Forward primer sequence	Reward primer sequence	Annealing Tm (°C) Product size (bp)
MDR1	CAGGAACCTGTATTGTTTGCCACCAC	TGCTTCTGCCCACCACTCAACTG	60 (188)
BCRP	GGTGGAGGCAAATCTTCGTTATTAGA	GAGTGCCCATCACAACATCATCTT	59 (154)
NOXA	GCAAGAACGCTCAACCGAG	TCTGCCGGAAGTTCAGTTTG	60 (130)
Cyto C	CTAAAAAGAGGTGAGAGCGGGT	AGTCCAGGGTCTTCACTCCC	60 (154)
BAD	CGAGTGAGCAGGAAGACTCC	CTGTGCTGCCCAGAGGTT	58 (299)
BAX	CCCTTTTGCTTCAGGGTTTC	GCCACTCGGAAAAAGACCTC	50 (119)
CASP-3	TGGTGTTGATGATGACATGGCGTG	AGCATGGCACAAAGCGACTGGA	60 (130)
CASP-9	TCGAGGACATCCAGCGGGCA	GCCAGCATGTCTGGCCTGT	60 (130)
p53	GAGGTTGGCTCTGACTGTACC	TCCGTCCAGTAGATTACCAC	60 (130)
BCL-XL	AGGGACTGAATCGGAGATGG	CCTCAGCGCTTGCTTTACTG	55 (130)
BCL-2	CTGCACCTGACGCCCTTACC	CACATGACCCACCGAACTCAAAGA	61(119)
GAPDH	TTCAGTGGTGGACCTGACCT	CACCACCTGTTGCTGTAGC	60 (256)

[0055] 웨스턴 블롯

[0056] 암세포에서의 세포사멸 마커 단백질 발현을 그들의 최종 처리 단계의 4일 차에 수집하였다. 세포 용해물로부터 단백질을 획득하기 위해, 프로테아제 억제제 (Up-state, Lake Placid, NY, USA)를 함유하는 방사선면역측정 분석 (RIPA) 세포용해 완충액을 세포 용해물 내로 첨가하였고 1시간 동안 배양하였다. 각각의 세포주로부터 획득된 동일한 양의 단백질 (30 µg/lane)을 소듐 도데실 설페이트 폴리-아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 분리하였다. 겔 분리 후, 겔 상의 단백질 밴드를 메탄올-활성화된 나이트로셀룰로오스 막 (Schleicher & Schull, Dassel, Germany) 내로 이송하였으며, 4 °C에서 밤새 다양한 농도의 항체(표 2에 제시됨)를 함유하는 1% BSA (소혈청 알부민, Sigma)와 함께 배양하였다. 막을 트리스-완충 식염수 Tween-20 (TBS-T)로 3번 세척하였다. 그 다음에 적절한 서양고추냉이 과산화효소 (HRP)-컨쥬게이션된 2차. 막 상의 단백질 발현을 제조자의 설명서에 따라 강화된 화학발광 시약 (Luminat 항체 (Santa Cruz Biotechnology)와 함께 막을 실온에서 1.8시간 동안 배양하였다. 막 상의 단백질 발현을 제조자의 설명서에 따라 강화된 화학발광 시약 (Luminate, Merk Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용하여 탐지하였다.

표 2

Antibody	Company	Origin	Dilution factor
Bad	Santa Cruz	Mouse	1:200
Bax	Santa Cruz	Mouse	1:200
Bcl-XL	Santa Cruz	Mouse	1:200
Bcl-2	Ab frontier	Mouse	1:200
Caspase 3	Santa Cruz	Mouse	1:200
Caspase 9	Ab frontier	Mouse	1:200
Noxa	Ab frontier	Rabbit	1:1,000
GADPH	Ab frontier	Rabbit	1:10,000

[0057]

[0059]

마우스 종양 이종이식 모델(Mouse tumor-bearing xenograft model)

[0060]

6주 내지 8주 나이의 수컷 BALB/c 누드마우스 (RaonBio, Gyeonggi-do, Yongin-si, South Korea)를 대조군 또는 화합물 1 그룹(모든 경우에서 n = 6)에 무작위로 배정하였다. 모든 동물들은 동물 시설에서 1주 이상 적응시켰다. 실험 과정 동안에, 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침 (National Institutes of Health, USA)을 철저히 따랐다. 모든 동물 실험을 수행하기 전에, 동물 실험 윤리 위원회 (IACUCs, Korea University)가 모든 절차를 조사하고 승인하였다. 대략 5.0×10^6 DU145 세포를 매트릭셀 (BD, San Jose, California, USA)과 혼합하였고 우측 및 좌측 옆구리에 피하 접종하였다.

[0062]

생체내 진단 이미지화 및 항암 효과의 평가

[0063]

접종 4주 후에, 동일한 농도의 화합물 1, 5, 및 6 또는 대조군을 1주에 1번 3주 동안 주입하였다. 화합물 1 및 6 또는 대조군으로서 PBS의 최종 투여량의 투여 2시간 후에 생체내 스펙트럼 형광 이미지를 Maestro 생체내 형광 이미지화 시스템 (Maestro, CRi Inc., Woburn, MA, USA)으로 획득하였다. 종양 성장을 정량화하기 위해, 클리퍼를 이용하여 주 단위로 종양 부피를 평가하였다. 보고된 부피를 $V = \text{길이} \times (\text{폭})^2$ 으로 계산하였다. 13주에, CO₂ 가스를 사용하여 마우스를 중절시키고 최종 종양 중량을 측정하였다.

[0065]

조직화학 및 면역조직화학적 분석

[0066]

생체내 형광을 기록한 후에, 종양 조직을 절개하였고 4% 파라포름알데하이드 용액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 고정하였다. 24시간 내에, 고정된 종양 조직을 자일렌 (Sigma)을 이용하여 탈수시키고, 파라핀 블록의 제조를 위해 파라핀 포매 (embedding)하였다. 그 다음에, 포르말린-고정된 파라핀-포매된 (FFPE) 조직을 마이크로톰 (Leica VT1200S, Wetzlar, Germany)을 이용하여 절단 (3 μ m 두께)하였다. 절단된 부분들을 50 °C 수조 (Thermo Fisher)에 흘려보낸 후에 접착 현미경 유리 슬라이드 (Paul Mariendel GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Germany) 상에 놓아두었다. 자일렌과 에탄올 용액의 일련의 공정으로 건조된 파라핀 섹션을 탈파라핀화 및 재수화시켰다. 종양 섹션 슬라이드를 10 mM 구연산나트륨 완충액, pH 9.0 내로 옮겼고, 끓는점 온도 미만에서 15분 동안 유지시켰다. 그 다음에, 추가의 면역조직화학을 위해 섹션 슬라이드를 30분 동안 실온으로 냉각시켰다. 헤마톡실린 (Merck, Readington Township, NJ, USA) 및 에오신 (BBC Biochemical, Mt. Vernon, WA, USA) 염색 용액을 15분 동안 슬라이드와 함께 배양하였고 슬라이드를 과량의 H&E 용액 및 수돗물로 슬라이드를 세척하였다. 종양 섹션의 면역조직화학을 위해, Ki67 (Abcam, Cambridge, MA, USA; ab15580, 1:50), CD31 (Abcam; ab28364, 1:50), 및 TUNEL (Abcam; ab206386) 분석을 수행하였다. 종양 섹션을 PBS로 세척하였고, 섹션 내생의 페록시다아제 활성을 퀀칭하여 섹션을 3% 과산화수소에 10분 동안 배양함에 의한 높은 배경 염색을 제거하였다. 항체의 비특이성 결합을 회피하기 위해, PBS 중 10% 당나귀 혈청 (Sigma)으로 종양 섹션을 블로킹하였다. 그 다음에, 조직 섹션을 각각의 항체가 PBS 중 10% 당나귀 혈청으로 희석된 채로 4 °C에서 밤새 배양하였다. 밤새 배양한 후에, 조직 섹션을 PBS로 3번 세척하였다. 적절한 2차 항체 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 조직 섹션에 첨가하였고 2시간 동안 실온에서 배양하였다. 마지막으로, 핵을 4,6-다이아미디노-2-페닐인돌 (DAPI; Sigma)로 5분 동안 대조염색하였다. PBS로 3번 세척한 후에, 자가형광 제거 시약 (Millipore)을

종양 섹션에 5분 동안 첨가하여 배경 신호를 감소시키고 잘못된 양성 결과를 방지하였다. 마지막으로, 조직 섹션을 PBS로 세척하고 Immu-mount (Thermo Fisher)로 처리하였다. Axiovert imager M1 형광 현미경 (Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 이미지들을 획득하였다.

[0068] 단백질체 실험(Proteomic experiments)

[0069] 개개 세포 (BJ 및 DU145)의 단백질의 농도를 2D Quant kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 측정하였다. 5 mM 트리스 (2-카르복시에틸) 포스핀 (Pierce, Rockford, IL, USA)을 1 mg 단백질 샘플에 첨가하고 환원을 위해 37 °C에서 30분 동안 배양하였다. 그 다음에 어둠 속 실온에서 1시간 동안 15 mM 아이오도아세트아미드 용액 (Sigma)으로 환원된 단백질을 알킬화하였다. 그 다음에, 샘플들을 37 °C에서 밤새 트립신 소화 (Promega, Madison, WI, USA)시켰다. 펩타이드 혼합물을 C18 카트리지 (Waters, Milford, MA, USA)로 청소하였다. 건조된 펩타이드를 360 µL 물로 희석하였고, 12-웰 기구 (3100 OFFGEL Low Res Kit, pH 3-10; Agilent Technologies)에 의한 OFFGEL 전기영동을 사용하여 그들의 등전점에 따라 분리하였다. 펩타이드의 분리는 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 1200 시리즈 나노-LC 시스템 및 6520 Q-TOF 질량 분석계로 구성된 HPLC-Chip/Q-TOF 시스템 (Agilent Technologies)으로 각각의 부분의 펩타이드 분석을 수행하였다. HPLC-칩을 160 nL 농축 컬럼 및 150 mm × 75 µm 분리 컬럼 (Polaris C18-A) 내로 삽입하였다. 각각의 샘플을 2 µL/분 유속으로 1시간 넘게 흐르게 하였다. 4 스펙트럼/초에서 300-2400 m/z 의 MS 스캔 범위 및 3 스펙트럼/초 속도에서 100-3000 m/z MS/MS 스캔 범위로 양성 이온화 모드에서 질량 분석 데이터를 획득하였다. 건조한 가스 온도는 300 °C 이었고, 유속은 5 L/분이었다. 펩타이드를 확인하기 위해, SwissProt 데이터베이스를 지닌 Spectrum Mill (Agilent Technologies)을 사용하여 모든 탠덤형 (tandem) 질량 스펙트럼을 분석하였다. 데이터베이스 조사를 위해, 효소는 2개의 그리워진 클리비지 (missed cleavage)를 지닌 트립신으로 설정하였고, 질량 허용오차를 전구물질 이온 및 생성물 이온 각각에 대해 20 ppm 및 50 ppm으로 제한하였다. 변형 파라미터는 cys-카르바미도메틸화(cyscarbamidomethylation)를 위한 정적 변형, 메티오닌 산화 및 N-말단 카르바미드화를 위한 동적 변형을 포함하였다. 본 실험에서, 다수 샘플의 특성의 유사점 및 상이점을 조사함으로써 무-라벨 정량화를 위해 MassHunter Mass Profiler Professional (MPP) 소프트웨어 (Agilent Technologies)를 이용하였다. 먼저, 각각의 샘플을 MS 모드로 3번 분석하였다. 질량, 전하, 및 머무른 시간 (retention time)을 포함하는 분자 특성을 데이터 파일로부터 추출하였다. 특성들을 배열하고 머무른 시간, 0.15분, 및 0.002 Da의 질량 창의 오차 범위 창으로 분류하였다. 정상화 후에, 각각의 특성들의 평균 강도를 다른 샘플들의 평균 강도와 비교하였다. 2배 초과와 강도 차이를 보이는 표적 특성을 선택하였고 그 다음에 이러한 구별되는 발현된 단백질을 식별하였다. 단백질은 세포사멸 관련 단백질로 분류하였고 GeneGo MetaCore (6.15 버전, GeneGo, MI, USA)을 이용하여 단백질의 작용 경로를 분석하였다. 정렬된 경로들을 그들의 계산된 P-값으로 분류하였다.

[0071] 통계적 분석

[0072] 모든 정량화된 실험에 대해, 관찰될 탐지체에 의한 네거티브 컨트롤과 포지티브 컨트롤/치료 간의 유의한 차이를 통계적으로 획득하기에 충분히 넓도록 샘플 크기를 선택하였다. 3개의 독립적 실험을 3회 수행하였다. 평균 오차 및 표준 오차로 통계 결과를 보고하였다. 군 당 $n = 6$ 동물 및 $n = 12$ 종양으로 동물 기반한 연구를 수행하였다. 통계적 유의성을 측정하기 위해, 변이의 일-방향 분석 (ANOVA) (SAS 소프트웨어 버전 8.2, Cary, NC, USA)을 이용하였다. ANOVA의 결과가 유의미한 차이를 나타내는 경우에는 양측-검정 (two-tailed) t-시험 (오리진 소프트웨어 패키지 버전 9.1, Northampton, MA, USA)을 수행하였다. 도면 설명에 기재된 바와 같이 유의성을 P-값으로 측정하였다. $P < 0.05$ 일 때 통계적 유의성을 보고하였다. 변이의 추정치는 도면 및 캡션에서 발견될 수 있고, 비교군 사이의 변이도 유사하게 측정되었으며, 다른 시험 전제들도 확인되었다.

[0074] 합성 절차

[0075] 화합물 5의 합성((6-하이드록시헥실)(트리페닐)포스포늄 브로마이드)

[0076] 종래 보고된 문헌상 절차에 따라(M. Culcasi, G. Casano, C. Lucchesi, A. Mercier, J.-L. Clement, V. Pique, L. Michelet, A. Krieger-Liszky, M. Robin, S. Pietri, Synthesis and Biological Characterization of New Aminophosphonates for Mitochondrial pH Determination by ^{31}P NMR Spectroscopy, J. Med. Chem., 56 (6)

(2013), pp 2487-2499) 화합물 5를 60% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.95 - 7.60 (m, 15H), 3.76 - 3.45 (m, 4H), 3.37 (br. s, 1H), 2.68 - 1.52 (m, 4H), 1.52 - 1.38 (m, 4H) ppm.

[0078] 화합물 4의 합성(2-[4-(다이에틸아미노)-2-하이드록시벤조일]벤조산)

[0079] 종래 보고된 문헌상 절차에 따라(Q.-H. Liu, X.-L. Yan, J.-C. Guo, D.-H. Wang, L. Li, F.-Y. Yan, L.-G. Chen, Spectrofluorimetric determination of trace nitrite with a novel fluorescent probe, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 73 (5) (2009), pp 789-793.) 화합물 4를 63% 수율로 제조하였다. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.93 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.66 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.58 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.15 (dd, J = 9.2 Hz, J = 2.1 Hz, 1H), 6.05 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.36 (q, J = 6.9 Hz, 4H), 1.07 (t, J = 6.9 Hz, 6H) ppm.

[0081] 화합물 3의 합성(3'-아미노-6'-(다이에틸아미노)-4a',9a'-다이하이드로-3H-스피로[2-벤조퓨란-1,9'-잔텐]-3온)

[0082] 캠글라스 고압반응용기에, 1.00 g (3.19 mmol) 화합물 4 및 1.20 g (11.00 mmol) 3-아미노페놀을 10 mL 85% 인산에 현탁하였다. 압력 용기를 밀봉하였고, 혼합물을 170 °C에서 45분 동안 가열하였고, 그 후에 반응을 실온에서 냉각시켰다. (소량의 MeOH과 함께) 반응 혼합물을 150 mL 1M 수성 NaOH에 첨가하였고, 생성된 수성층을 DCM (5 × 50 mL)으로 추출하였다. 유기층을 조합하였고, Na_2SO_4 로 건조시켰으며, 용매를 진공에서 제거하였다. 크로마토그래피 분리 (실리카 겔, MeOH/DCM 5/95 50/50) 후 화합물 3을 41% 수율 (510 mg, 1.32 mmol)로 분리하였다. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.91 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.74 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.42 - 6.24 (m, 6H), 5.58 (br. s, 2H), 3.30 (q, J = 6.7 Hz, 4H), 1.05 (t, J = 6.7 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 169.59, 153.20, 153.13, 153.03, 151.84, 149.74, 135.91, 130.43, 129.23, 129.12, 127.53, 125.02, 124.74, 111.49, 108.84, 106.54, 105.86, 99.80, 97.66, 85.79, 44.41, 13.03 ppm. MS (ESI): $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+$ (M+H) $^+$, m/z 계산값: 387.17, 실측값: 387.25.

[0084] 화합물 2의 합성(3'-({4-[bis(2-하이드록시에틸)아미노]페닐}다이아제닐)-6'-(다이에틸아미노)-3H-스피로[2-벤조퓨란-1,9'-잔텐]-3-온)

[0085] 질소 가스분위기 하 0 °C에서 50 mL (1/4/0.01/0.005 ACN/DCM/TFA/ H_2O) 중 200 mg 화합물 3(0.52 mmol)이 교반된 용액에, 72 mg (1.04 mmol) NaNO_2 를 첨가하였고, 용액을 20분 동안 교반하였고 그 다음에 92 mg (0.95 mmol) 아미도 설펜산을 첨가하고 추가의 15분 동안 용액을 교반하였다. 그 다음에 10 mL ACN 중 608 mg (3.35 mmol) *N*-페닐다이에탄올아민을 첨가하였고, 혼합물을 0 °C에서 2시간 동안 교반하였고, 그 후 100 mL 물을 첨가하였다. DCM (5 × 50 mL)으로 혼합물을 추출하였고, 유기층을 조합하였고, Na_2SO_4 로 건조하였으며, 용매를 진공에서 제거하였다. 크로마토그래피 분리 (실리카 겔, 아세톤/DCM 5/95 40/60) 후 화합물 2를 58% 수율 (173 mg, 0.30 mmol)로 분리하였다. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.02 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.51 - 6.69 (m, 4H), 7.64 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.0 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.90 - 6.82 (m, 3H), 6.54 - 6.44 (m, 3H), 4.86 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.64 - 3.52 (m, 8H), 3.35 (q, J = 6.9 Hz, 4H), 1.09 (t, J = 6.9 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 169.42, 154.61, 153.06, 152.94, 152.31, 152.27, 150.04, 142.84, 136.37, 130.89, 129.47, 129.35, 126.82, 126.12, 125.40, 124.80, 120.18, 117.85, 112.09, 110.14, 109.53, 104.83, 97.63, 83.78, 58.79, 53.99, 44.48, 12.99 ppm. MS (ESI): $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_5^+$ (M+H) $^+$, m/z 계산값: 579.26, 실측값: 579.20.

[0087] 화합물 1의 합성([6-({2-[3-((E)-{4-[비스(2-클로로에틸)아미노]페닐}다이아제닐)-6-(다이에틸아미노)-9-잔텐일]벤조일}옥시)헥실](트리페닐)포스포늄 다이클로라이드)

[0088] 20 mL 건조 DCM 중 200 mg (0.33 mmol) 2의 용액에, 70 μ L (1.00 mmol) SOCl_2 를 첨가하였고, 생성된 보라색 용액을 환류 조건하에서 1.5시간 동안 가열하였고, 그 후 5 mL 건조 DCM 중 887 mg (2.00 mmol) 화합물 5를 첨가하였고, 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 진한 청색 용액을 100 mL 소금물 내로 붓고 DCM (3 $\times$ 50 mL)으로 추출하였다. 유기 부분들을 조합하고, Na_2SO_4 로 건조하였고, 용매를 진공에서 제거하였다. 제1 크로마토그래피 분리(실리카 겔, DCM MeOH/DCM 40/60)로부터 청색 부분을 조합하였고, 용매를 진공에서 제거하였으며, 잔류물을 최소량의 MeOH와 함께 H_2O 에 용해시켰다. 이러한 용액에 물 중 NaBF_4 의 포화 용액을 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 교반하였으며, 생성된 침전물을 수집하였다. 제2 크로마토그래피 분리(실리카 겔, ACN/톨루엔 2/8 7/3) 후에 순수 BF_4 염을 수득하였다. 조합된 순수 부분을 MeOH에 용해시켰고 그 다음에 DOWEX® 1X8 Cl 및 Sephadex® G-10을 통해 천천히 용출시켰다. (염화물 염으로서) 표제 화합물을 48% 수율 (168 mg, 0.16 mmol)로 분리하였다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.34 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.87 - 7.60 (m, 19H), 7.36 - 7.25 (m, 3H), 7.01 (s, 1H), 6.79 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 4.04 - 3.65 (m, 14H), 1.64 - 1.48 (m, 4H), 1.48 - 1.30 (m, 8H), 1.27 - 1.16 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 165.07, 159.98, 159.67, 158.74, 158.09, 154.59, 150.87, 145.09, 135.22 (d, $^4J_{\text{C-P}}$ = 2.5 Hz), 133.86 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 10.3 Hz), 133.46, 133.18, 133.08, 132.05, 131.23, 130.73 (d, $^2J_{\text{C-P}}$ = 12.5 Hz), 130.29, 130.19, 129.88, 127.16, 122.08, 121.35, 120.10, 118.83, 118.52 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 85.8 Hz), 112.21, 110.44, 96.93, 65.99, 53.68, 48.11, 47.85, 40.59, 30.26 ($^2J_{\text{C-P}}$ = 17.3 Hz), 28.28, 25.82, 22.75 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 4.7 Hz), 22.61 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 50.3 Hz), 14.02, 12.71 ppm. MS (ESI): $\text{C}_{58}\text{H}_{59}^{35}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{P}^{2+}$ M^{2+} , m/z 계산 값: 480.19, 실측값: 480.95.

[0090] 화합물 6의 합성(3-(4-[비스(2-클로로에틸)아미노]페닐)다이아제닐)-6-(디에틸아미노)-9-[2-(메톡시카보닐)페닐] 잔테늄 클로라이드)

[0091] 30 mL 건조 DCM 중 78 mg (0.13 mmol) 2의 용액에, 150 μ L (1.30 mmol) SOCl_2 를 첨가하였고, 생성된 보라색 용액을 환류 조건하에서 1.5시간 동안 가열하였고, 용액을 실온에서 냉각시킨 후 30 mL MeOH를 첨가하였고, 그 후 청색 혼합물을 증발시켜 건조하였다. 크로마토그래피 분리(실리카 겔, DCM DCM/MeOH 92/2) 후, (염화물 염으로서) 표제 화합물을 97% 수율 (87 mg, 0.13 mmol)로 분리하였다. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.30 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.96 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.91 - 7.79 (m, 4H), 7.57 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.32 - 7.24 (m, 2H), 7.15 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.00 - 3.70 (m, 12H), 3.56 (s, 3H), 1.28 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 1.20 (t, J = 7.0 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 165.72, 159.57, 159.26, 158.69, 157.72, 154.51, 152.16, 144.49, 134.28, 133.68, 132.96, 131.74, 131.66, 131.26, 130.63, 129.86, 127.20, 122.37, 120.88, 120.07, 119.07, 113.12, 110.19, 97.47, 53.27, 52.51, 47.50, 47.26, 41.71, 13.97, 13.00 ppm. MS (ESI): $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3^+$ M^+ , m/z 계산 값: 629.21, 실측값: 629.20.

[0093] 화합물 7의 합성(3-아미노-6-(다이에틸아미노)-9-[2-(메톡시카르보닐)페닐]잔테늄 클로라이드)

[0094] 100 mg (0.26 mmol) 화합물 3을 10 mL 1.25M 메탄올 HCl에 첨가하였고 생성된 밝은 분홍색 용액을 5시간 동안 환류 조건하에서 가열하였고 그 후 용액을 증발시켜 건조하였다. 크로마토그래피 분리(실리카 겔, DCM/MeOH DCM/MeOH 95/5 85/15) 후에, 표제 화합물을 95% 수율 (107 mg, 0.25 mmol)로 분리하였다. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.30 - 8.13 (m, 3H), 7.90 (dt, J = 7.5 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 7.81 (dt, J = 7.5 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 7.5 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 7.07 - 7.01 (m, 2H), 6.97 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.87 - 6.81 (m, 2H), 3.61 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.57 (s, 3H), 1.18 (t, J = 7.1 Hz,

4H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 165.73, 160.29, 158.95, 158.12, 157.69, 155.72, 134.18, 133.89, 132.20, 131.51, 131.44, 131.13, 131.11, 129.92, 117.66, 115.11, 113.77, 113.19, 97.67, 96.69, 53.11, 45.89, 13.15 ppm. MS (ESI): $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3^+ \text{M}^+$, m/z 계산값: 401.19, 실측값: 401.15.

[0096] **결과 및 고찰**

[0097] **합성**

[0098] 4-아미노아조벤젠을 제공하기 위한 방향족 다이아조늄 염과 이치환된 아닐린 간의 효율적인 아조결합은 *N*-페닐-다이에탄올아민을 비대칭 로다민 123/B 스캐폴드 상에 편리하게 접합시키고, 그 다음 에탄올아민 모이어티의 동시 염소화 및 로다민의 스피로에스터 아단위를 활성화하는 경로를 가능하게 한다. 마지막으로, 링커를 갖는 트리페닐포스핀과의 에스터화를 통해 본 발명에 따른 화합물 1을 합성하였다 ([합성 경로] 참조).

[0100] **광물리 특성**

[0101] 로다민-유래된 아조벤젠 머스타드의 광물리적 특성을 로다민 123/B 기반한 대조에 염료 (화합물 7, [합성 경로] 참조)를 따라 평가하였다. 대조에 염료인 화합물 7은 pH 7.4 PBS (포스페이트 완충 식염수) 중 524 nm에서 최대 흡수를 나타낸 반면, 514 nm에서 여기에 따라 557 nm에서 형광 (도 5)을 나타내었다. 염료는 MeOH 중 17%의 양자 수율 및 PBS 중 3%의 양자 수율 (표 3)로 특징지어진 반면, 화합물 1은 가상 정량적인 형광 퀀칭으로, 586 nm 중심의 광범위한 흡수 밴드 (도 6)에 의해 특징지어졌다. 결합의 감소 및 염료의 활성화는 형광의 큰 증가를 가능하게 하였다(도 7).

표 3

[0102]

	λ_{Abs}^a	$\lambda_{\text{Em}}^{a,b,c}$	$\Phi_{\text{fl}}^{d,e,f}$	$\Phi_{\text{fl}}^{a,c,f}$
1	586 nm	n.d.	< 0.05%	< 0.05%
7	524 nm	557 nm	17%	3%

[0104] 과량의 소듐 다이티오나이트의 처리에 따라 (도 1A-D), 아조환원효소의 화학적 모방 및 형광 스펙트럼을 시간적 간격을 두고 기록하였고, 이는 인상적인 형광 강도의 2배 증가를 나타내었다 (도 1A-B 및 도 7). 화합물 1의 환원의 반응 속도론 (도 1C)이 디콘볼루션되었고(deconvoluted), 이는 지수감소 모형 ($\text{Adj. } R^2 > 0.997$)에서 우수한 피팅을 나타내었고, 이는 각각 66.16 ± 0.20 초 및 1910 ± 20 초의 반감기를 지닌, 빠른 초기 환원 및 보다 느린 제2 환원으로부터 초래된 것이다. 이러한 반감기를 이용하여, 초기 생성물, 중간 종 및 최종 환원 생성물의 시간 의존성 농도를 연이은 비가역 반응의 시간 의존성 농도 모델을 이용하여 플롯팅하였다 (도 1D 및 Eq. 1-4).



$$[\text{A}] = [\text{A}]_0 e^{-k_1 t} \quad (2)$$

$$[\text{B}] = \frac{k_1}{k_2 - k_1} [\text{A}]_0 (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (3)$$

$$[\text{C}] = \frac{[\text{A}]_0}{k_2 - k_1} (k_2 (1 - e^{-k_1 t}) - k_1 (1 - e^{-k_2 t})) \quad (4)$$

[0105]

[0106] 그 다음에, 저산소환경 및 정상산소 조건하에서 다양한 세포 환원제의 첨가에 따라 형광을 모니터링하였고, 이는 덜 강한 환원제의 존재하의 탐지체(화합물 1)의 안정성에 대한 증거를 제공한다 (도 8). 방출된 형광단의 방출 프로파일 (도 1A)은 대조에 염료인 화합물 7과 사실상 동일하고 (도 9), 이에 따라 방출된 로다민 123/B 유

사체의 정체를 확인하고, [항암 치료진단 메커니즘]에 도시된 바와 같이 방출 메커니즘을 뒷받침한다.

[0108] 3.3 세포 흡입 및 세포내 저산소환경-매개된 환원

[0109] 커버 글라스 슬라이드를 현미경 디시에 부착되고 화합물 1로 사전 배양된 암 기원의 세포 상에 위치시켰다(도 2A). 탐지체의 세포내 바이오-환원 이후 형성된, 생성물로부터 방출된 형광은 모든 4개의 시험된 세포주에서 커버 글라스 밑에 위치한 저산소 세포로부터 오직 명백하게 기원되었다. 이러한 환경에서, DU145 및 MDA-MB231 세포는 가장 밝은 형광을 나타낸 반면, A549 및 Huh7 세포는 보다 낮은 정도의 세포내 환원을 나타내었다.

[0110] 다음으로, 종양 조직 조건을 모의실험하기 위해 DU145 종양 스페로이드와 함께 탐지체 화합물 1을 배양하였다. z-스택 (stack) 이미지화 결과 (도 10)는 저산소 스페로이드 내부로부터 유래된 유의하게 강화된 형광을 나타내었다.

[0111] 정상산소 (21% O₂) 및 생리학적으로 관련된 저산소환경 (3% O₂) 조건 (도 2B-C) 하에서 세포들을 화합물 1 및 표적화 유닛이 결핍된 대조 분자 (화합물 6, [합성 경로] 참조)와 함께 배양하였다. 고무적으로, 정상 산소 및 저산소환경 둘 모두의 조건하에서, 암이 아닌 BJ 세포에서 형광이 관찰되지 않았다. 반면에, 탐지체 화합물 1은 글라스 커버 실험 (도 2A)에서 관찰된 바와 유사한 패턴을 따르는 강도를 가지면서, 저산소환경 하에서만 확실한 증가를 나타내었고, 탐지체 화합물 6은 이러한 조건들하에서 환원되지 못하였다.

[0113] 3.4 탐지체의 세포단위 위치

[0114] 탐지체 화합물 1 및 6의 세포단위 위치를 저산소환경 조건 (3% O₂) 하에서 DU145 세포로 측정하였고, 탐지체 화합물 1로부터 기원된 활성화된 형광단은 미토트래커 (mitotracker) 염료와 명백한 중첩을 나타내었고, 전술한 바와 같이 낮은 탐지체의 낮은 형광을 위해 조절된, 탐지체 화합물 6에 의한 유사한 실험은 그것의 리소솜내 우선적인 위치를 나타내었으며, 이때 화합물 1과 미토트래커에서 가장 높았던 Pierson 계수는 ($r = 0.73$), 화합물 6과 리소트래커 에서 가장 높았던 Pierson 계수는 ($r = 0.84$)이었다 (도 11).

[0116] 3.5 세포독성 연구

[0117] 탐지체 화합물 1의 세포독성 포텐셜을 10 μ M의 농도의 몇몇의 세포주에서 평가하였고, 이는 모든 암세포주에서 두드러진 환원 및 암이 아닌 BJ 세포에서 덜 두드러진 효과를 나타내었고(도 12A), 이는 오직 탐지체 화합물 1로 처리된 암세포가 3% O₂ 하에서 프로피듐 요오드화물의 축적으로 인한 유의한 형광을 나타낸 것과 일관된 결과를 확인하였다(도 12B).

[0118] 10 μ M 투여량의 탐지체 화합물 1 vs. 대조에 화합물 5 ([합성 경로] 참조) 및 6의 세포독성은 저산소환경 조건 하에서 우세한 세포독성을 드러내었다(도 13). 화합물 1은 DU145 및 MDA-MB-231 세포에서 우수한 독성을 나타내며, 탐지체 화합물 5 및 6을 명백하게 능가하였지만, A549 및 Huh7 암세포주의 독성은 덜 두드러졌다. 암세포의 미토콘드리아 포텐셜이 침습 표현형과 직접 상관관계가 있다는 증거가 점점 증가하고 있으므로(B. G. Heerdt, M. A. Houston, L. H. Augenlicht, The Intrinsic Mitochondrial Membrane Potential of Colonic Carcinoma Cells Is Linked to the Probability of Tumor Progression, Cancer Res., 65 (21) (2005), pp 9861-9867.), DU145 및 MDA-MB231이 전이 종양으로부터 유래되는 반면, A549 및 Huh7 세포는 덜 침습 표현형인 일차 종양으로부터 유래된다는 사실에 의해, 4개의 암세포주의 구별되는 세포독성이 용이하게 설명될 수 있다.

[0119] 마지막으로, 화합물 1의 독성은 특히 명백한 저산소환경 조건하에서, 세포내 환원에 따라 모든 세포주에서 증가된 독성을 나타내는 것으로 측정되었고 (표 4), 이 때, 아조환원을 따르는 머스타드의 증가된 반응 속도론으로부터 유래된, DU145 및 MDA-MB231 세포 vs. 정상산소 조건의 경우에, 50% 이상으로 IC₅₀가 작았다. 유사한 조건 하에서, 농도가 증가될 친유성 양이온을 갖는 전구약물 화합물 1에 대한 유의미한 추진력을 세포주가 나타내지 않으므로, 정상 BJ 세포의 IC₅₀은 이러한 두 조건에 비해 25% 이하로 작았다. 중요하게는, 정상 BJ 세포계의 세포 생존율을 절반으로 감소시키는 것이 요구되는 전체 농도는 저산소환경 조건 (3% O₂) 하에서, 세포주 MDA-MB231 및 DU145로부터 유래된 전이에 비해 각각 377% 및 411%만큼 높았고, 정상산소 조건하에서 각각 209% 및

261%만큼 높았다 (표 4).

표 4

Name of cell line	BJ	DU145	MDA-MB-231	A549	Huh7
Normoxia	41.3 ± 1.1 μM	15.8 ± 1.1 μM	19.8 ± 1.1 μM	25.1 ± 1.2 μM	22.9 ± 1.1 μM
3% Hypoxia	31.3 ± 1.1 μM	7.6 ± 1.1 μM	8.3 ± 1.0 μM	20.5 ± 1.1 μM	14.3 ± 1.1 μM

3.6 이중이식 뮌 모델에서 치료 효과의 평가

세포주에서 화합물 1의 세포 유형 및 산소첨가 상태에 대한 선택적 독성에 의해, 종양 이중이식 뮌 모델에서 탐지체를 추가로 평가하였다. 이중이식 종양이 배양된 DU145를 갖는 마우스에 꼬리 혈관 주사에 의해, 대조군과 함께 화합물 1 또는 6으로 3회 주사를 놓았다. 마지막 주사 2시간 후에 생체내 형광을 측정하였고, 그 결과 탐지체 화합물 1의 경우에 종양 부위로부터 기원된 명백한 형광을 나타냈지만, 탐지체 화합물 6 또는 대조군 샘플로 주사 맞힌 마우스는 어떠한 유의미한 생체내 형광을 나타내지 않았다 (도 3A).

각각 2개의 종양을 갖는 6마리 마우스에 화합물 5, 6 및 오직 대조군으로서의 치료에 기반한 비히클을 이용하여, 탐지체 화합물 1을 처리하였다. 마지막 주사 후 5주째 (도 3C)에 화합물 1 처리된 마우스에서 유의하게 작은 종양 크기 ($P < 0.05$)를 나타내었다. DU145 세포 접종 후 13주째에 마우스는 종결되었고, 종양을 절개하였다. 종양 중량은 화합물 1 처리된 마우스에서 유의하게 작았다 ($P < 0.001$) (도 3D).

화합물 1이 주사된 마우스의 동결절편된 종양 조직은 밝은 형광을 나타내었고, 이는 인시츄 환원적으로 활성화된 화합물 1의 존재를 가리키는 것이었다 (도 3E). 화합물 1, 5, 또는 대조군으로서 처리된 종양의 H&E 염색된 종양 조직은 화합물 1의 처리에 따라 형태학적 변화를 나타내었다. 차후의 면역 염색은 세포사멸 세포의 현저하게 증가된 개수(TUNEL, 도 3F)뿐만 아니라, 화합물 1 또는 5 처리된 마우스로부터의 종양 조직에서 억제된 세포 증식 (Ki67, 도 3F)을 보여주었다. 또한, 화합물 1 또는 5 처리된 마우스로부터의 종양 조직에서, 혈관형성 마커 (CD31, 도 3F)의 발현이 명백하게 감소하였으며, 이때, 모든 경우에서 탐지체 화합물 1 처리된 마우스로부터의 종양 조직에서 대조군과 명백한 차이가 관찰되었다. 치료군들 사이의 변함없는 최종 체중량에 의해 판단되는 바와 같이 (도 15), 본 발명에 따른 탐지체 화합물 1이 일반적으로 마우스에 의해 잘 지지되면서, 종양 조직을 정상화하고 보통 종양 저산소환경과 관련된 제한 및 치료 합병증을 극복하는 능력을 가짐을 확인하였다.

3.7 세포 기반한 메커니즘 연구

탐지체 화합물 1의 거동을 추가로 설명하기 위해, 탐지체 첨가의 효과를 2개의 세포주에서 유전자 및 단백질 수준에서 평가하였다. 도 4A의 PCR 결과는 화합물 1의 첨가가 유전자 인코딩 안티-세포사멸 단백질 (Bcl-1, Bcl-XL, 및 p53)의 감소된 발현을 야기하지만, 미토콘드리아 매개된 세포사멸 유전자의 발현 수준이, 바이오활성화된 탐지체의 세포단위 위치와 일관되게 유의하게 증가함을 보여준다(도 11). 흥미롭게도, 탐지체 화합물 1은 또한 DU145 세포 내 약제 내성의 발전과 관련된 2개의 중요한 유전자의 발현 수준을 감소시켰다(도 4A).

3% O₂ 하에서 배양된 둘 모두의 세포주의 단백질체 분석은, 65개 단백질이 BJ 세포의 대조군 그룹과 비교하여 2배 이상의 차이를 지닌 발현 수준을 나타내는 것으로 밝혀졌고, DU145 세포에서 화합물 1의 처리가 182개 단백질의 구별되는 발현을 야기하는 것으로 나타났다. 이러한 단백질에서, 19%가 BJ 세포 내 세포사멸과 관련되고, 23%가 DU145 세포 내 세포사멸과 관련됨이 밝혀졌다 (도 4B). 도 4C에 나타낸 바와 같이, 웨스턴 블롯에 의한 단백질 수준에서 선택된 세포사멸 관련 단백질을 추가로 조사하였다. 특히, 안티-세포사멸 단백질 Bcl-2 및 Bcl-XL의 발현이 화합물 1로 처리됨에 따라 감소되고, 프로-세포사멸 단백질 Bax 및 Bad가 증가된 발현 수준을 보였다.

마지막으로, BJ 및 DU145 세포를 화합물 1로 처리시 단백질의 발현 수준을 GeneGo 소프트웨어를 이용하여 분석하였고, 단백질 네트워크의 발현 수준을 감소하는 통계적 유의성 vs. 컨트롤 그룹으로 표현하였다 (도 4D-E). 특히, BJ 세포는 감소된 수의 과발현 단백질을 보여줄 뿐만 아니라, 상위 10위 내 과발현된 경로에서 임의의 세

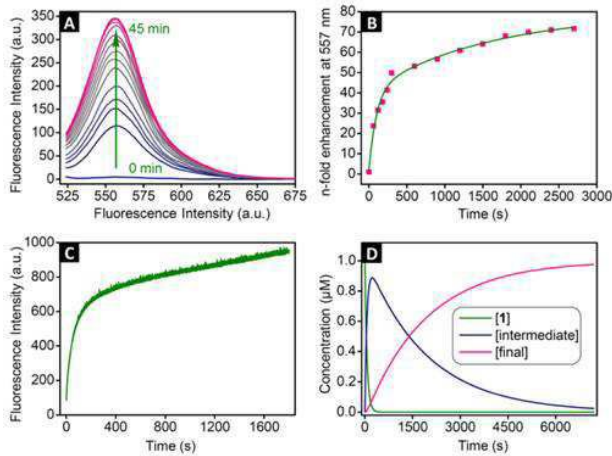
포사멸 관련된 구별되는 단백질 발현의 결핍을 보여주었다. 반면, DU145 세포는 화합물 1 vs. 대조군으로 처리된 세포에서 세포사멸과 관련된 상위 10위 내 과발현 경로 중 3개를 나타내었다.

[0131]

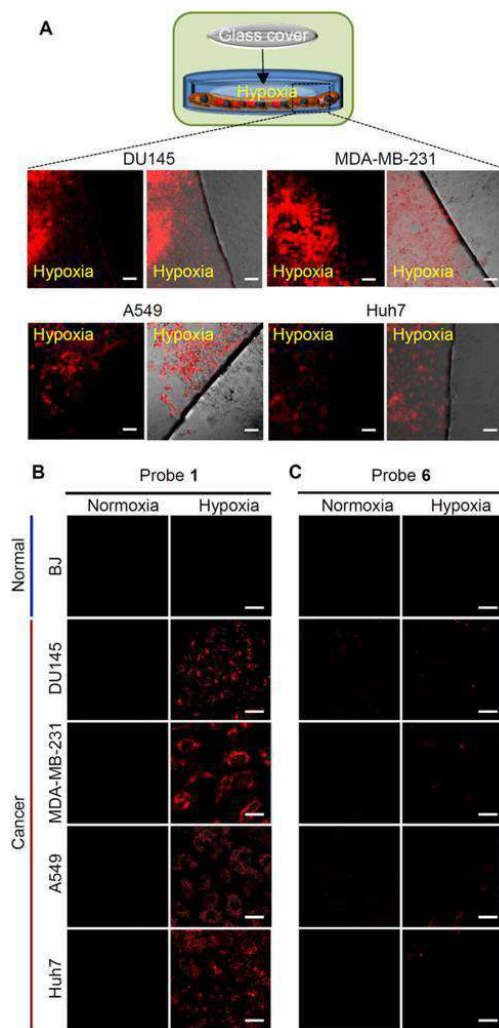
흥미롭게도, DU145 세포에서 프로-세포사멸 그랜자임 A 및 B 발현 수준에서 유의미한 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 이러한 단백질은, 세포사멸 유발 요인의 방출을 가능하게 하는 미토콘드리아 ROS 유발인자로 이전에 보고되었고(I. Rousalova, E. Krepla, Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review), Int. J. Oncol., 37 (6) (2010), pp 1361-1378.), 이는 상기 데이터에 의해 강하게 뒷받침되는 바와 같이, 미토콘드리아-매개된 세포사멸 요인 Bax, Bad, Noxa, 및 Cyto C의 과발현을 입증한다 (도 4A 및 4C). 단백질체 분석은 또한 종양형성 및 암 진행의 억제에 야기할 수 있는, 암세포에서 빈번하게 억제된, 슬릿-로보 신호전달 경로의 활성화를 드러내었다(R. K. Gara, S. Kumari, A. Ganju, M. M. Yallapu, M. Jaggi, S. C. Chauhan, Slit/Robo pathway: a promising therapeutic target for cancer, Drug Discov. Today, 20 (1) (2015), pp 156-164.)

도면

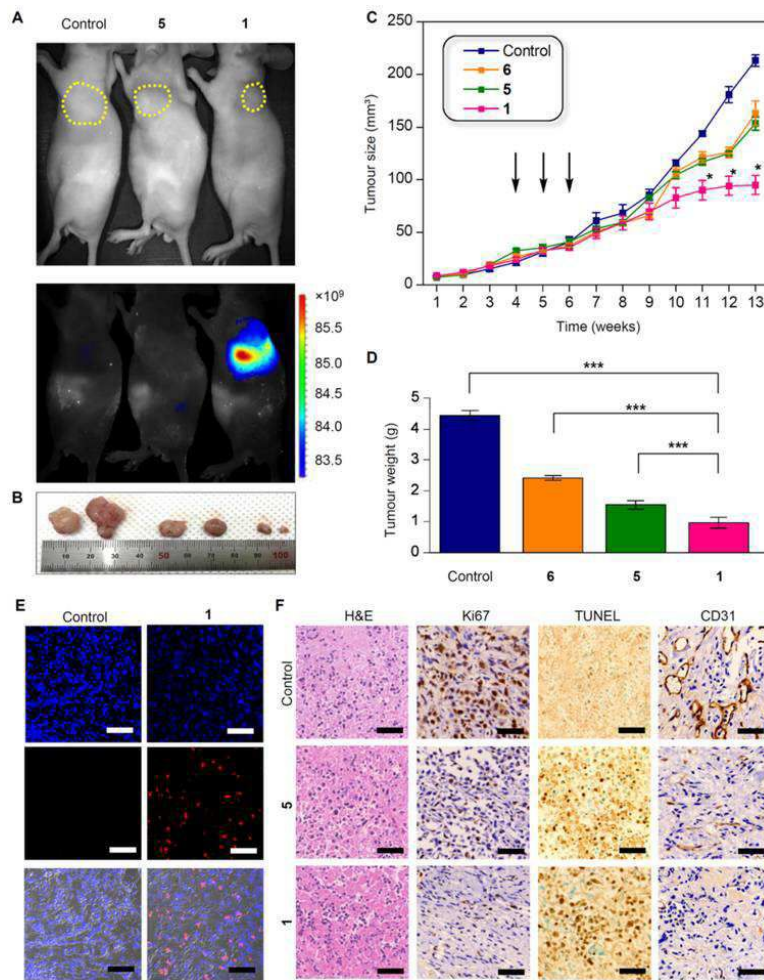
도면1



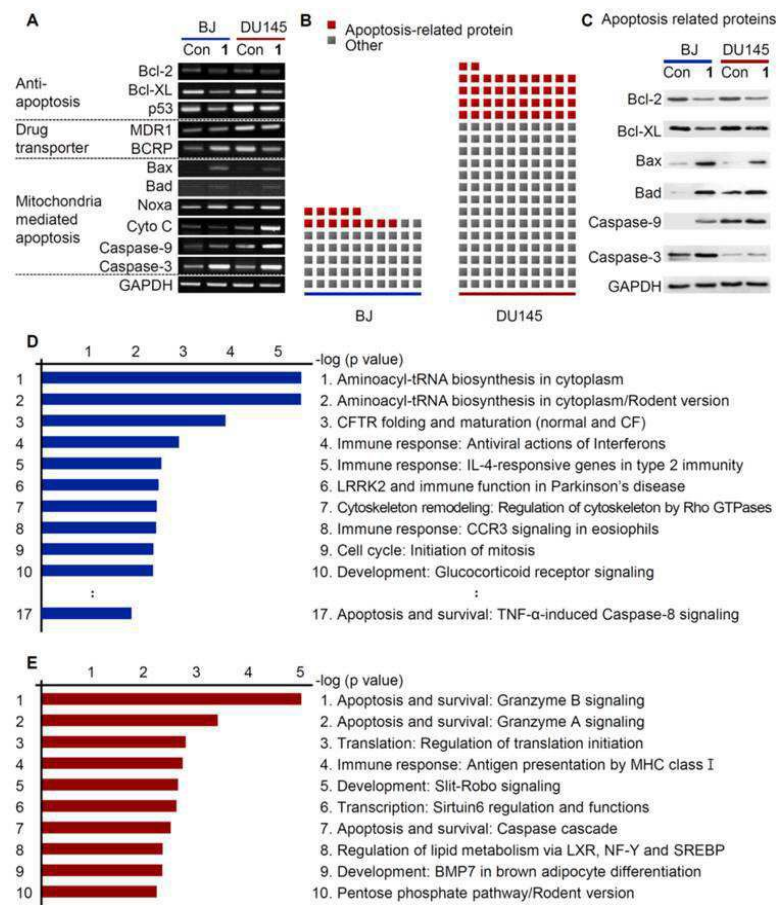
도면2



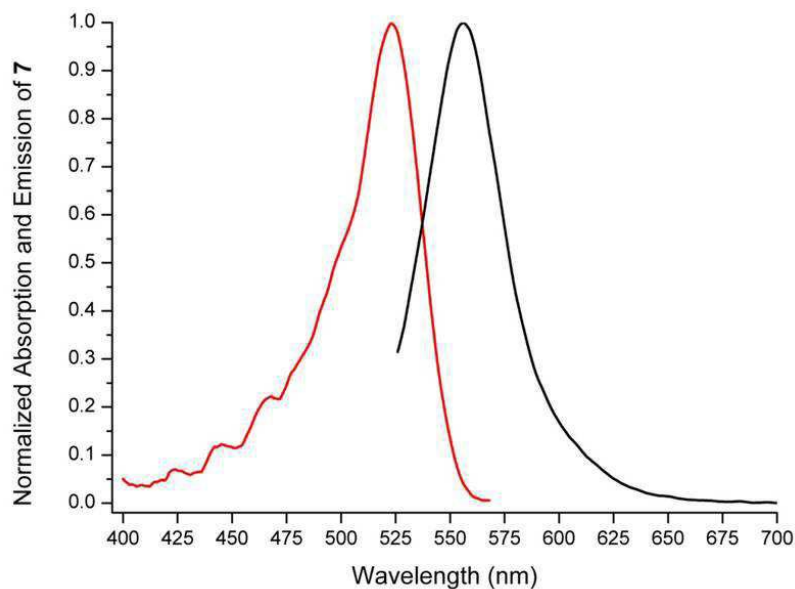
도면3



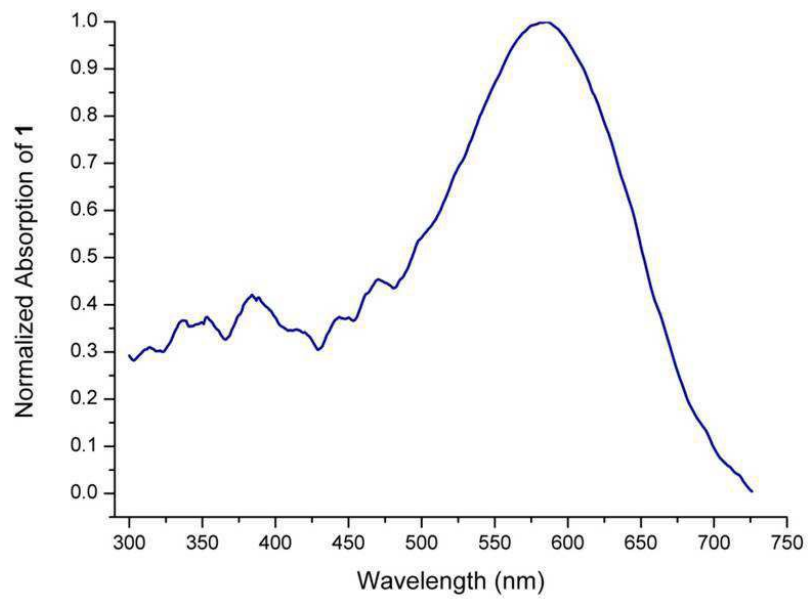
도면4



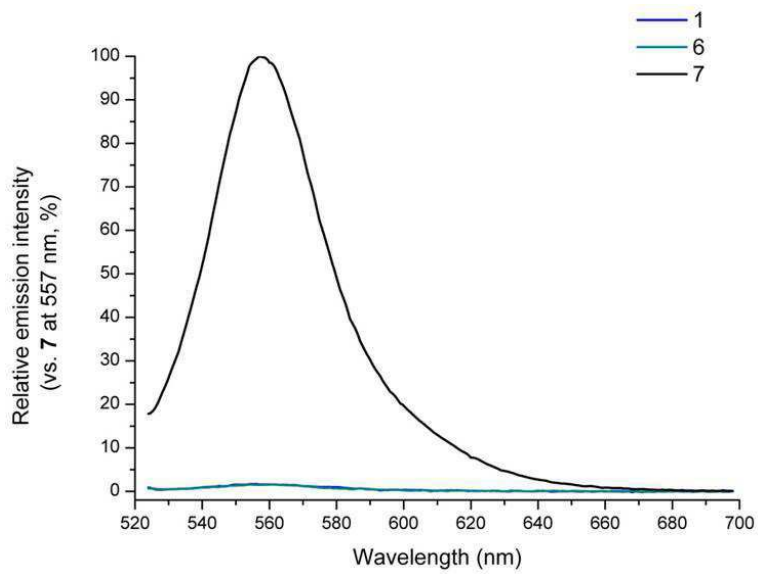
도면5



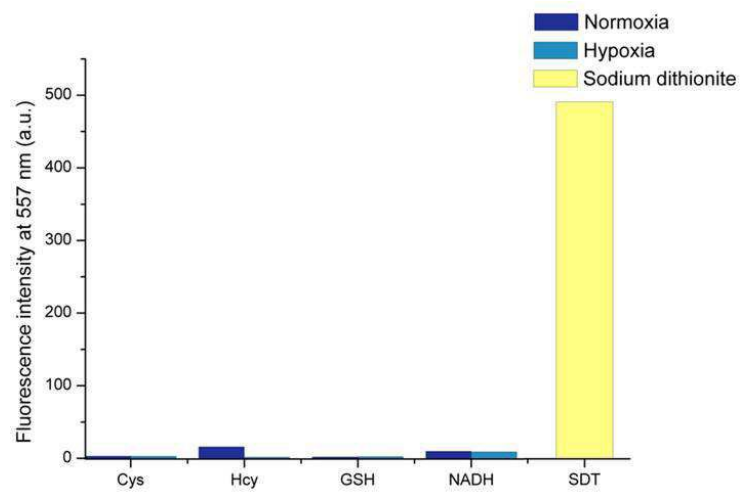
도면6



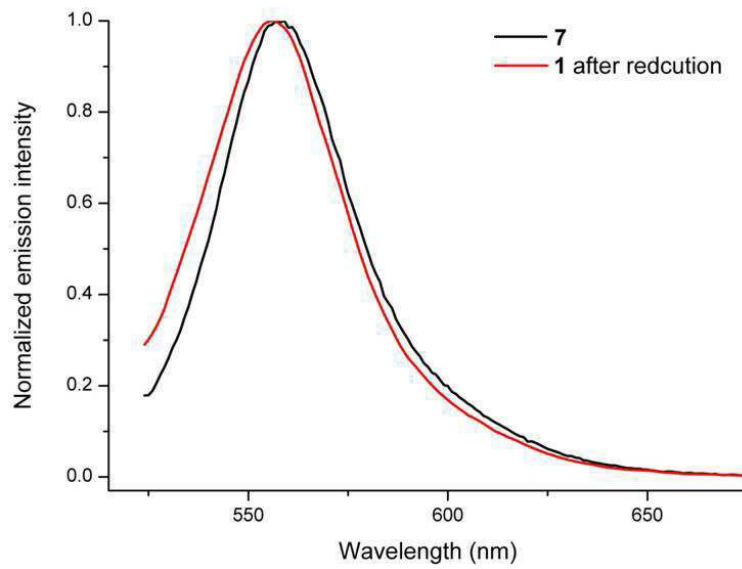
도면7



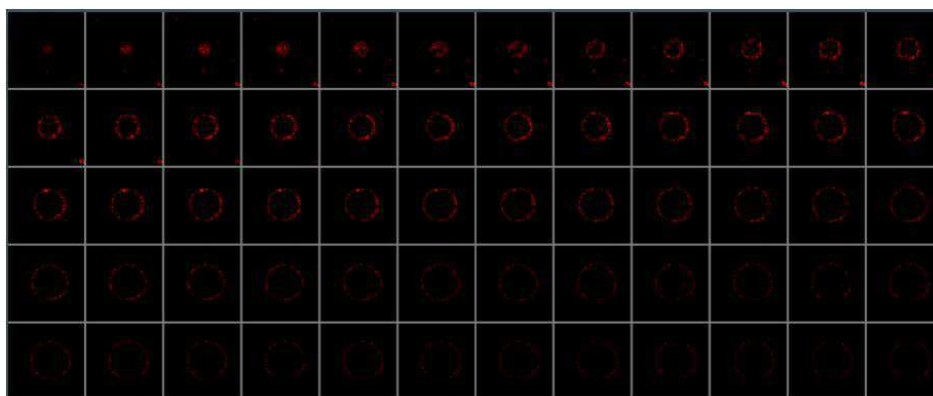
도면8



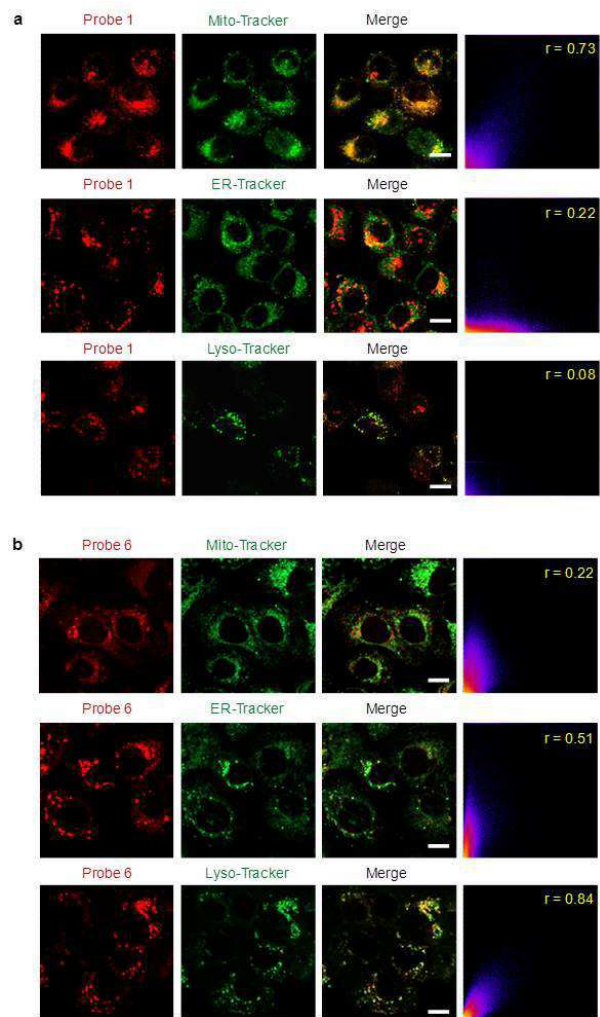
도면9



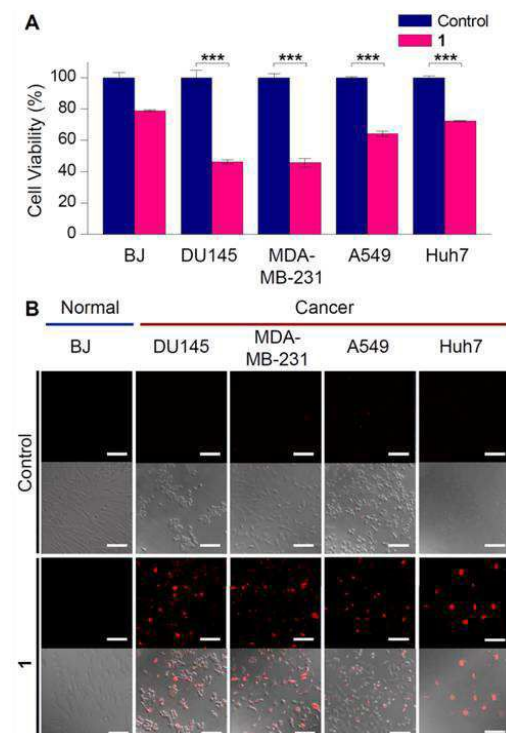
도면10



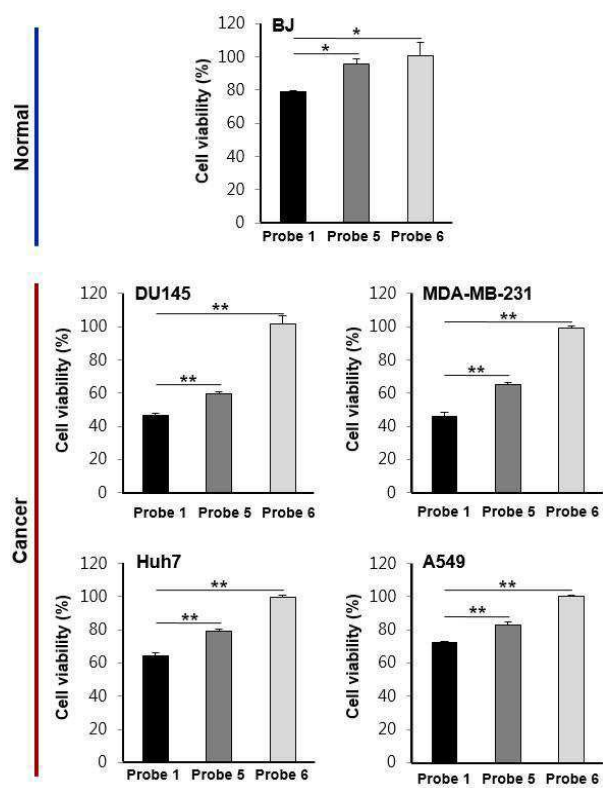
도면11



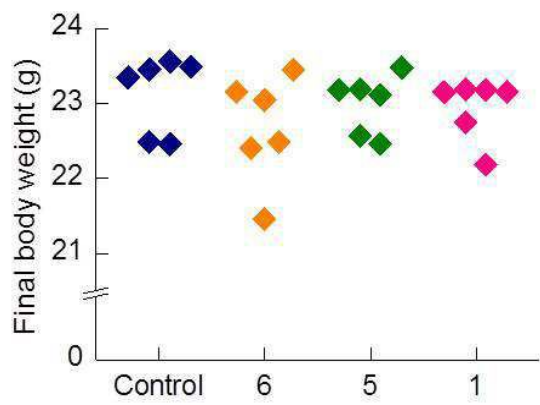
도면12



도면13



도면14



도면15

