(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월27일
(11) 등록번호 10-1750658
(24) 등록일자 2017년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/437 (2006.01) *A61K 31/4188* (2006.01)
A61K 31/4192 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/437 (2013.01)
A61K 31/4188 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0045964
(22) 출원일자 2016년04월15일
심사청구일자 2016년04월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140010517 A*
Macromolecules, 46, 6243-6256쪽(2013.07.22.) 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호(백현동)
신원섭
서울특시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연대캠퍼스 아산이학관 238호
한지유
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연대캠퍼스 생명과학대학 서관 305호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 이형준

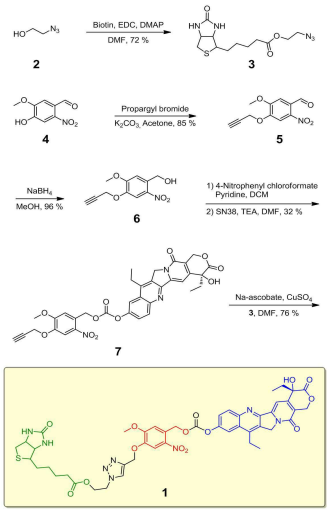
(54) 발명의 명칭 **종양 표적화 광치료제 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 종양 표적화 광치료제 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 광자극에 의해서 활성화되는 경우, 활성 형태로 변환되는 토포이소머라아제 I 억제제 전구체 유닛; 광자극에 의해서 활성화되는 경우, 형광 신호를 제공하는 형광 신호 방출 유닛; 및 암세포로의 특이적 표적화를 유도하는 암세포 표적화 유닛을 포함하는 종양 표적화 광치료제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 정상 세포에 비해서 암세포에 대해서만 매우 높은 특이성을 나타내며, 외부 광자극에 의해서 쉽게 활성화되고, 더 나아가 광학적 수단에 의해서 생체 내에서 모니터링이 가능한 종양 표적화 광치료제 및 그 제조방법을 하제공할 수 있는 바, 광범위한 소분자 암 화학치료의 개발에 새로운 접근 방법을 제시한다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 31/4192 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
A61K 41/0042 (2013.01)
A61K 41/0057 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015001883
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명 발광센서 재료 연구단
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.28
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

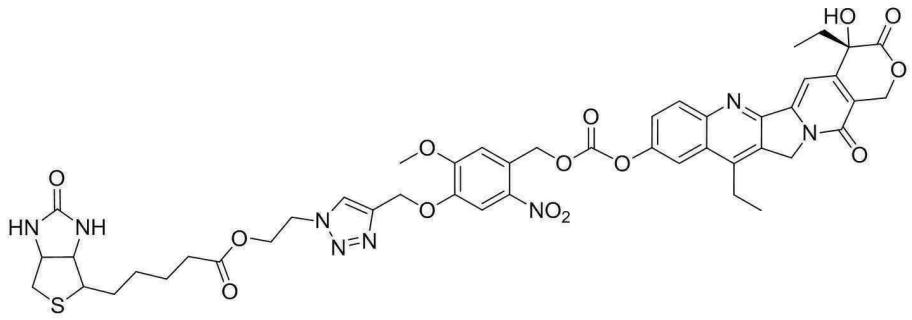
광자극에 의해서 활성화되는 경우, 활성 형태로 변환되는 토포이소머라아제 I 억제제 전구체 유닛;

광자극에 의해서 활성화되는 경우, 형광 신호를 제공하는 형광 신호 방출 유닛; 및

암세포로의 특이적 표적화를 유도하는 암세포 표적화 유닛을 포함하고,

하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광치료제:

<화학식 1>



.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 광자극은 405 ㎚의 파장을 갖는 광을 조사해줌으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광치료제.

청구항 4

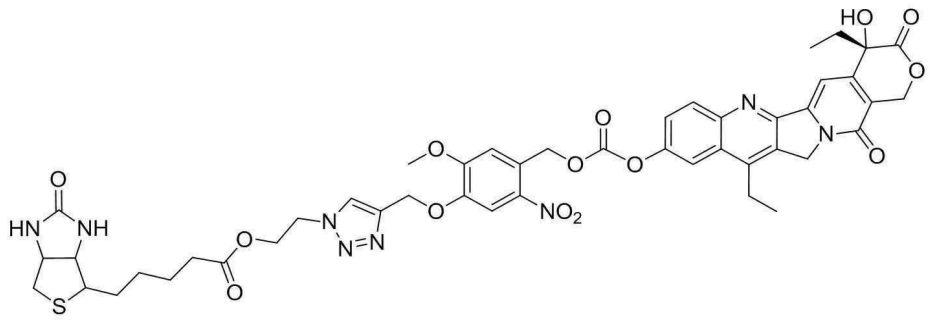
제1항에 있어서,

상기 암세포는 인간 폐암 세포, 인간 자궁 경부암 세포, 인간 유방암 세포, 인간 간암 세포, 인간 전립선암 세포, 인간 위암 세포, 및 인간 췌장암 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암세포인 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광치료제.

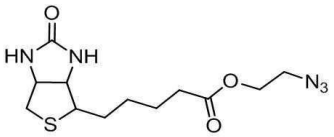
청구항 5

하기 화학식 3의 화합물과 하기 화학식 7의 화합물 사이의 클릭 반응을 통해서 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 종양 표적화 광치료제의 제조방법:

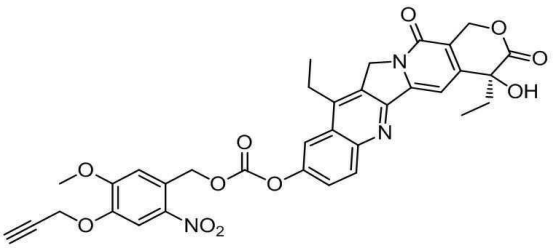
<화학식 1>



<화학식 3>



<화학식 7>



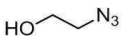
.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화학식 3의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물과 비오틴과의 반응을 통해서 제조되는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광치료제의 제조방법:

<화학식 2>



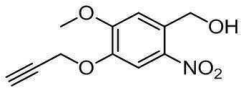
.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 화학식 7의 화합물은 하기 화학식 6의 화합물을 4-니트로페닐 클로로포르메이트로 처리한 후, 7-에틸-10-하이드록시캄토테신(SN-38)과 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광치료제의 제조방법:

<화학식 6>



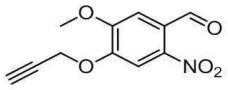
.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 화학식 6의 화합물은 하기 화학식 5의 화합물을 소듐 보로하이드라이드와 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광치료제의 제조방법:

<화학식 5>



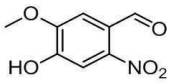
.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 화학식 5의 화합물은 하기 화학식 4의 화합물을 프로파길 브로마이드와 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광치료제의 제조방법:

<화학식 4>



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종양 표적화 광치료제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근에 소위 표적치료법의 개발에 상당한 관심이 집중되고 있다. 암치료제 개발의 경우에, 종양성 부위로의 활성화제의 집중적인 전달을 통해 투여가 제한되는 독성계통 물질의 사용이 허용될 수 있다는 점에서 이러한 표적치료법이 주목받고 있다. 이러한 표적치료법을 가장 효율적으로 사용하기 위해서는, 효과적인 전달 및 제한적인 방출이 필수적이라고 여겨지며, 광학적 또는 분광학적 수단을 통해, 흡수 및 국소화(국지화)를 모니터링할 수 있다는 점 또한 매력적이다. 그러나, 활성화제의 광-활성화 방출에 관한 것은 지금까지 보고된 바가 없다.

[0003] 한편, 토포이소머라아제 I (topoisomerase I)은, 예컨대, 복제, 전사, 복구 및 재조합 동안의 DNA 토폴로지의 조절에 관여하는 중요한 효소이다. 인간 토포이소머라아제 I은 가역적으로 DNA에서의 단일 가닥 분해(disruption)를 수리하며, 이러한 수리는 분해된 DNA의 3' 말단에서 공유 결합을 형성하고, 이어서 반대 말단의 분해되지 않은 가닥 주위에서 5' 하이드록실 말단의 자유 회전을 통해 수행된다. 이러한 과정을 "DNA 이완(DNA relaxation)"이라 하며, 건강한 세포의 DNA 복제에서 중요한 단계이다.

[0004] 토포이소머라아제 I의 증가된 수준은 다양한 암종에서 발견된다. 이는 DNA 토포이소머라아제 I이 항암제 개발의 좋은 타켓임을 암시한다. 토포이소머라아제 I 억제제로서 작용하는 캄토테신과 캄토테신의 유도체인 토포테칸, 이리노테칸과 같은 펜타시클릭-퀴놀론계 약물이 암 치료제로 미국 FDA의 승인을 받았다 (비특허문헌 1).

이러한 억제제들은 토포이소머라아제 I-DNA 분열성 복합체 내부로 침투하여 토포이소머라아제 I의 가닥 풀림 및 복구 기능을 방해하며, 3'-포스포티로실 중간체와 결합함으로써 효소-DNA 복합체를 안정화시켜 DNA 재결착(relegation)이 억제되어 세포가 사멸하게 된다 (비특허문헌 2). 이들의 임상적 성공에도 불구하고, 이러한 약물들은 낮은 수준의 암세포 타켓 특이성, 건강 세포에의 부정적인 영향 (예컨대, 혈액 독성 (hematological toxicity), 간 기능장애 및 빈혈), 다중 약제 내성 트랜스포터 (MDR)에 의한 약제 내성, 그리고 이상적이지 못한 치료 지수 등 여러 한계에 직면하고 있다. 이러한 한계들을 극복하기 위해, 활성 산소종, pH (비특허문헌 3 및 4), 효소 (비특허문헌 5 및 6) 및 세포내 티올 (비특허문헌 7 내지 9)과 같은 특정의 종양 특성에 의해 활성화되는 다수의 토포이소머라아제 I 억제제 전구약물이 개발되어 왔다. 그러나, 이러한 제제의 대부분은 건강한 세포에 독성을 나타낸다.

[0005] 한편, 빛의 조사는 높은 시간 해상도 및 공간 해상도를 지니며 독성이 최소화된 활성화의 가능성을 제공한다. 이와 관련하여, 바구니 화합물 (caged compound)이 특히 매력적인 바, 바구니 화합물은 빛에 노출시 발휘되는 차폐된 (masked) 생물학적 활성을 지닌 시스템에 활용 가능하다. 암 치료의 경우, 광활성화 전구약물의 사용은 치료 활성 조절의 가능성과 함께, 종양 부위에서 보다 정교한 약물 방출 제어를 가능하게 할 수 있다. 이에, 현재까지 광활성화 바구니 화합물이 화학 및 생물학 분야에서 널리 연구되어 왔으며, 예를 들어, 니트로벤질, 니트로벤조퓨란 및 쿠마린 유도체와 같은 다양한 니트로-함유 화합물이 광-민감성 분자로서 사용되어 왔다 (비특허문헌 10 내지 13). 또한, 폴리머성 상향변환 (up-conversion) 나노입자와 같은 광-민감성 나노입자가 여러 응용분야에 이용되어 왔다 (비특허문헌 14 내지 17). 그러나, 현재까지도 암 약물 방출 및 약물 전달 동시 모니터링을 위한 바구니 화합물에 대해서는 보고된 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Y. Pommier, Nat. Rev. Cancer 2006, 6, 789.

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: A. Y. Chen, L. F. Liu, Rev. Pharmacol. Toxicol. 1994, 34, 191.

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Y. Lee, S. Fukushima, Y. Bae, S. Hiki, T. Ishii, K. Kataoka, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 5362.

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Y. Li, K. Xiao, L. Berti, J. Luo, H. P. Tsent, G. Fung, K. S. Lam, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 2864.

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: T. C. Cheng, S. R. Roffler, S. C. Tzou, K. H. Chuang, Y. C. Su, C. H. Chuang, C. H. Kao, C. S. Chen, I. H. Harn, K. Y. Liu, T. L. Cheng, Y. L. Leu, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 3103.

(비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: T. Legigan, J. Clarhaut, I. T. Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. L. Pape, S. Lerondel, S. Papot, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 11606.

(비특허문헌 0007) 비특허문헌 7: M. H. Lee, J. H. Han, P. -S. Kwon, S. Bhuniya, J. Y. Kim, J. L. Sessler, C. Kang, J. S. Kim, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 1316.

(비특허문헌 0008) 비특허문헌 8: M. H. Lee, Z. Yang, C. W. Lim, Y. H. Lee, S. Dongbang, C. Kang, J. S. Kim, Chem. Rev. 2013, 113, 5071.

(비특허문헌 0009) 비특허문헌 9: S. Maiti, N. Park, J. H. Han, H. M. Jeon, J. H. Lee, S. Bhuniya, C. Kang, J. S. Kim, J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 4567.

(비특허문헌 0010) 비특허문헌 10: S. Ikeda, T. Kubota, D. O. Wang, H. Yanagisawa, T. Umemoto, A. Okamoto, ChemBioChem 2011, 12, 2871.

(비특허문헌 0011) 비특허문헌 11: A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, C. Graham, Nat. Methods 2006, 3, 35.

(비특허문헌 0012) 비특허문헌 12: J. M. Govan, R. Uprety, M. Thomas, H. Lusic, M. O. Lively, A. Deiters, ACS Chem. Biol. 2013, 8, 2272.

(비특허문헌 0013) 비특허문헌 13: D. K. Sinha, P. Neveu, N. Gagey, I. Aujard, C. Benbrahim-Bouzidi, T. L. Saux, C. Rampon, C. Gauron, B. Goetz, S. Dubruille, M. Baaden, M. Volovitch, D. Bensimon, S. Vriz, L. Jullien, ChemBioChem 2010, 11, 653.

(비특허문헌 0014) 비특허문헌 14: Y. H. Chien, Y. L. Chou, S. W. Wang, S. T. Hung, M. C. Liau, Y. J. Chao, C. H. Su, C. S. Yeh, ACS Nano 2013, 7, 8516.

(비특허문헌 0015) 비특허문헌 15: B. Yan, J. C. Boyer, N. R. Branda, Y. Zhao, J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 19714.

(비특허문헌 0016) 비특허문헌 16: N. Fomina, C. Mcfearin, M. Sermsakdi, O. Edigin, A. Almutairi, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 9540.

(비특허문헌 0017) 비특허문헌 17: Y. Dai, H. Xiao, J. Liu, Q. Yuan, P. Ma, D. Yang, C. Li, Z. Cheng, Z. Hou, P. Yang, J. Lin, J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 18920.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명에서는, 종양을 표적화하고 외부 광자극 적용에 의해 쉽게 활성화되며, 광학적 수단을 통해 모니터링이 가능한 종양 표적화 광치료제 및 그 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서,

[0009] 광자극에 의해서 활성화되는 경우, 활성 형태로 변환되는 토포이소머라아제 I 억제제 전구체 유닛;

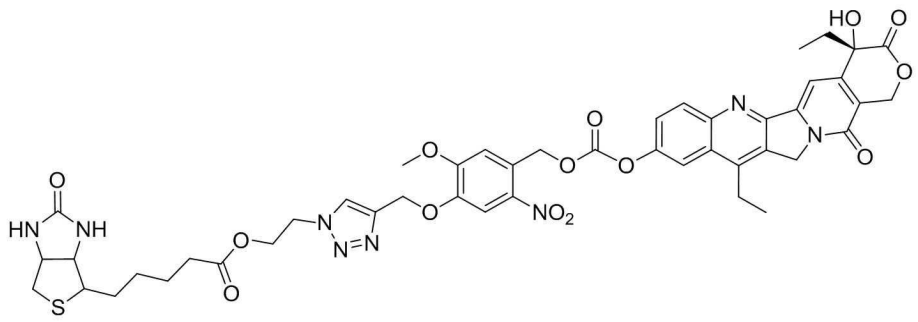
[0010] 광자극에 의해서 활성화되는 경우, 형광 신호를 제공하는 형광 신호 방출 유닛; 및

[0011] 암세포로의 특이적 표적화를 유도하는 암세포 표적화 유닛

[0012] 을 포함하는 종양 표적화 광치료제를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 종양 표적화 광치료제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0014] <화학식 1>



[0015]

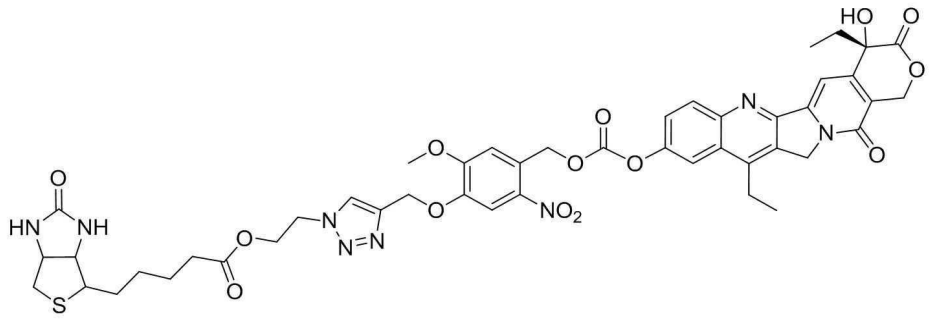
[0016] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 종양 표적화 광치료제는 405 nm의 파장을 갖는 광을 조사함으로써 활성화될 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 암세포는 인간 폐암 세포, 인간 자궁 경부암 세포, 인간 유방암 세포, 인간 간암 세포, 인간 전립선암 세포, 인간 위암 세포, 및 인간 췌장암 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암세포일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 다른 과제를 해결하기 위해서,

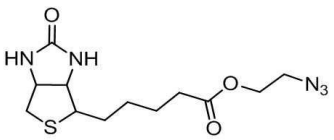
[0019] 하기 화학식 3의 화합물과 하기 화학식 7의 화합물 사이의 클릭 반응을 통해서 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 종양 표적화 광치료제의 제조방법을 제공한다:

[0020] <화학식 1>



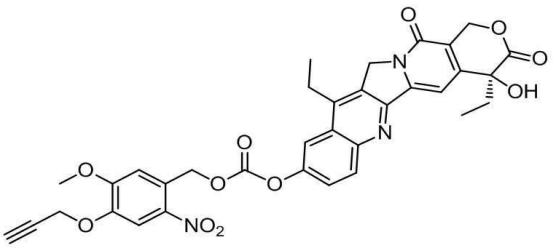
[0021]

[0022] <화학식 3>



[0023]

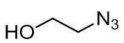
[0024] <화학식 7>



[0025]

[0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 3의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물과 비오틴과의 반응을 통해서 제조될 수 있다:

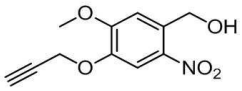
[0027] <화학식 2>



[0028]

[0029] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 화학식 7의 화합물은 하기 화학식 6의 화합물을 4-니트로페닐 클로로포르메이트로 처리한 후, SN-38과 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

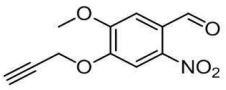
[0030] <화학식 6>



[0031]

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 화학식 6의 화합물은 하기 화학식 5의 화합물을 소듐 보로하이드라이드와 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

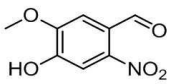
[0033] <화학식 5>



[0034]

[0035] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 화학식 5의 화합물은 하기 화학식 4의 화합물을 프로파길 브로마이드와 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

[0036] <화학식 4>



[0037]

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따르면, 정상 세포에 비해서 암세포에 대해서만 매우 높은 특이성을 나타내며, 외부 광자극에 의해서 쉽게 활성화되고, 더 나아가 광학적 수단에 의해서 생체 내에서 모니터링이 가능한 종양 표적화 광치료제 및 그 제조방법을 하제공할 수 있는 바, 광범위한 소분자 암 화학치료의 개발에 새로운 접근 방법을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1a 내지 1f는 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물에 대한 합성과정, 형광 변화 및 예상 작용 메카니즘을 도시한 도면이다.

도 2a 내지 2l은 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물에 대한 생체 영상 및 세포독성을 도시한 도면이다.

도 3a 내지 3e는 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물에 대한 FACS 분석 결과 및 제안된 메카니즘에 대한 입증 데이터를 도시한 도면이다.

도 4a 내지 4e는 인 비보/엑스 비보 이종이식 마우스 모델에서 관찰한, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물의 치료적 효과 및 영상화 유용성을 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 한다.

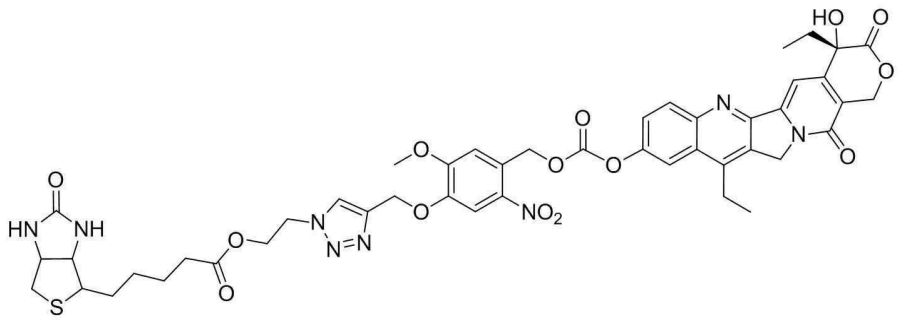
[0041] 본 발명은 종양-표적화 차폐 광치료제 (PT-1)에 관한 것이다. 본 발명에 따른 치료제는 7-에틸-10-하이드록시캄토테신 (SN-38) [토포이소머라아제 I 억제제 이리노테칸 (irinotecan)의 전구약물 (prodrug)]을 함유한다. 토포이소머라아제 I은 복제, 전사 및 재조합 동안 DNA 토폴로지 (topology)를 조절하는 필수적인 효소 중 하나이며, 다양한 암종 (carcinomas)에서 높은 수준의 토포이소머라아제 I가 발견된다. 따라서, 상기 토포이소머라아제 I은 유효한 항암제 개발에서 매우 유망한 타겟이 될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명에 따른 치료제는 활성 토포이소머라아제 I 억제제 외에, 광촉발형 (photo-triggered) 모이어티

(니트로바닐린)와 암 표적화 유닛 (비오틴)을 함유한다. 암세포 내에서 광활성화가 일어나면, 본 발명에 따른 치료제는 DNA 재결착 (re-ligation)을 저해하고, 토포이소머라아제 I의 발현을 감소시키며, 특히, 미토콘드리아 세포사멸 유전자, 사멸 수용체 및 카스파제 효소의 발현을 강화시킨다. 따라서, 본 발명에 따른 치료제를 세포에 처리할 경우, DNA 손상이 유발되며, 궁극적으로는 세포사멸이 유도된다.

[0043] 바람직하게는, 본 발명에 따른 종양 표적화 광치료제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0044] <화학식 1>



[0045] .

[0046] 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이, 생체 내 및 생체 외 실험을 통해서, 본 발명에 따른 광치료제가 405 nm에서 광활성화되었을 때 암 성장의 상당한 억제가 일어났음을 알 수 있었고, 형광 방출 세기의 증가도 함께 수반되었다. 따라서, 본 발명에 따른 종양-표적화 차폐 광치료제는 정상적인 세포는 남겨두고 암세포만을 선택적으로 사멸시킬 수 있도록 프로그램된 광치료 ("광치료학")의 가능성을 보여준다.

[0047] 특히, 본 발명에 따른 광치료제는 다양한 종류의 암세포에 대해서 광범위한 항암 활성을 나타내는 바, 이에 제한되는 것은 아니지만, 상기 암세포는 인간 폐암 세포, 인간 자궁 경부암 세포, 인간 유방암 세포, 인간 간암 세포, 인간 전립선암 세포, 인간 위암 세포, 및 인간 췌장암 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암세포일 수 있다.

[0048] 한편, 본 발명에 따른 광치료제 중 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조과정이 도 1a에 도시되어 있다. 도 1a를 참조하면, 먼저, 2-아지도에탄올 (2) 및 화합물 4를 종래 보고된 방법들을 이용하여 합성한다 (S. Beghdadi, L. A. Miladi, H. B. Romdhane, J. Bernard, E. Drockenmuller, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 4138; S. C. Tsaia, J. P. Klinman, *Bioorg. Chem.* **2003**, *31*, 172). 이어서, 화합물 2를 EDCI의 존재 하에 비오틴과 커플화하여 적정량의 화합물 3을 제조한다. 한편, 화합물 4와 프로파길 브로마이드의 반응을 통해 알카인 5를 제조한 다음, 소듐 보로하이드라이드와의 반응을 통해 기능화된 벤질 알코올 6을 제조하게 되고, 이러한 벤질 알코올 6을 4-니트로페닐 클로로포르메이트로 처리하고, 이어서 SN-38과 반응시킴으로써 중간체 7을 제조하게 된다. 본 발명에 따른 화합물 1 (이하, 하기 실시예에서는 "PT-1"으로도 명명함)은 상기와 같이 제조된 화합물 7과 화합물 3에 대해서 클릭 (click) 반응을 수행함으로써 제조할 수 있게 된다.

[0049] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0050] **세포 배양 및 프로브 처리**

[0051] 12개의 비오틴 수용체-양성 세포주들; 인간 폐암 세포 (A549), 인간 자궁 경부암 세포 (HeLa), 인간 유방암 세포 (MCF7, MDA-M231), 인간 간암 세포 (HepG2, Huh7, Hep3B), 인간 전립선암 세포 (Du145, PC3), 인간 위암 세포 (NCI-N87, AGS), 인간 췌장암 세포 (Panc-1), 및 비오틴 수용체-음성 세포: 인간 정상 배아 신장 상피 세포 (293T)는 Korean Cell Line Bank (Seoul, Republic of Korea)으로부터 구입하였다. 두 가지 비오틴 수용체-음성 정상 세포주들로서, 태아 폐로부터의 인간 정상 섬유아 세포들 (WI-38 cells) 또는 신생아 포피 (BJ) 세포들은 Korean Cell Line Bank (Seoul, Republic of Korea) 또는 Modern Cell & Tissue Technologies (MCTT, Seoul, Republic of Korea)로부터 구입하였다. 세포들은 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) 또는 10% 우태아 혈청 (FBS, GIBCO), 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신 (GIBCO)으로 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO BRL) 중에서, 5% CO_2를 함유하는

가습 대기, 37 ℃ 조건에서 배양하였다. 세포 밀도가 70-80%의 융합도 (confluence)에 도달하였을 때, 서브배양이 완료된 것으로 간주하였다. 배지는 대략 매 3 내지 4일 간격으로 교체하였다.

[0052] **세포독성 분석**

[0053] 본 발명에 따른 화합물 PT-1의 세포독성을 평가하기 위해서, 3개의 정상 세포주들 (WI-38, BJ, 및 293T) 및 12개의 비오틴 수용체-양성 세포주들을 사용하였다. 테스트 이전에, 세포들을 PBS로 2회 세척하고, FBS가 존재하지 않는 배양 배지로 교체하였다. 실제 세포 생존도는 제조업자 안내지침에 따라서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 분석을 사용하여 측정하였다.

[0054] 요약하면, 1.5 × 10^4 세포들을 24 웰 플레이트 중 각각의 웰에 접종하였다. 다음날, 배양 배지를 제거하고 다양한 농도의 PT-1을 함유하는 (0, 10, 100, 800, 또는 1000 nM) 신선한 배지로 (1 ml) 교체하였다. 세포들을 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 다음으로, 12 mM MTT 용액 (600 μl)을 각각의 웰에 가해주었다. 음대조군의 경우, 500 μl의 MTT 스톡 용액 및 증류수를 PT-1 부존재 조건, 즉 500 μl의 배지 단독에 각 웰 당 가해주었다. 각각의 웰의 배지를 24 시간 후에 제거하고, 300 μl의 DMSO를 첨가해 주었다. 결과물인 현탁액을 15분 동안 충분히 혼합해준 다음, 540 nm에서 마이크로플레이트 스펙트로포토미터 (PowerWave XS, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 흡광도를 모니터링하였다. A549 및 HeLa 세포들 중 PT-1의 세포독성은 광-활성화 없이 >100 μM인 것으로 확인되었다. 0, 1, 5, 10, 또는 50 nM PT-1으로 1 시간 동안 처리된 세포들에 대해서 1 시간 동안 405 nm 광조사를 수행하였다. 전술한 바와 같이 MTT 분석을 수행하였다.

[0055] **인 비트로 세포 영상화**

[0056] 형광 영상화 이전에, 세포들을 35-mm 콘포컬 (confocal) 접시 (유리 바닥 접시, SPL, Kyong-Gi, Republic of Korea)에 접종하고, 48 시간 동안 안정화시켰다. 35-mm 콘포컬 접시 중 세포 밀도는 2.0 × 10^6이었다. A549 및 HeLa 세포들을 PT-1으로 처리하였다. 세포들을 10 nM의 PT-1을 함유하는 배지로 (35-mm 접시 당 2 mL 배지 중 10 μl의 DMSO), 5% CO_2 중 37 ℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 다음으로, FBS-free DMEM 배양 배지를 가해주기 이전에, 1 ml의 PBS를 2회 가해서 세포들을 세척하였다. 세포들을 다시 PBS로 2회 세척하고, 405 nm Argon 레이저 및 500-nm pass 필터를 구비한 공초점 레이저 주사 현미경 (Carl-Zeiss LSM 5 Exciter, Oberko, Germany)을 사용하여 형광 영상들을 얻었다. 따라서, 광조사 또는 그 부존재에 따른 효과를 평가하였다.

[0057] PI-양성 사멸성 세포들에 대한 분석은 제조업체 지침에 따라서 수행하였다. PI는 염기 쌍들 사이에 삽입됨으로써 이중 나선 DNA에 결합하는 후기 사멸성 염료이다. 이는 488 nm에서 여기되며, 최대 파장 617 nm에서 발광한다. 요약하면, A549 세포들 (대략 80% 중첩도)을 10 nM PT-1 존재 또는 부존재 하에서 30분 동안 배양하였으며, 이어서 405 nm 레이저로 1 시간 동안 조사하였다. 세포들을 PI (1 μg/ml, Sigma-Aldrich)를 첨가하기 이전에 추가적으로 24 시간 동안 배양하였으며, 세포들을 추가적으로 37 ℃에서 90분 동안 배양하였다. 염색된 세포들은 cyc3.5 필터를 사용하여 Zeiss LSM510 레이저 주사 공초점 현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 가시화하였다.

[0058] **RT-PCR**

[0059] 세포들로부터의 전장 RNA를 TRIzol Reagent (Invitrogen)를 사용하여 분리하였다. 역전사 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 RNA를 역전사하였다. EXTaq 폴리머라아제 (Takara, Japan)를 사용하여 다양한 유전자들에 대한 PCR 증폭을 수행하였으며, 사이클링 조건들은 하기와 같다: 94 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s, 50-57 ℃, 30 s, 및 72 ℃, 30 s를 35 사이클; 72 ℃, 10 min 최종 배양.

[0060] **FACS analysis**

[0061] PI-양성 사멸성 세포들의 분석은 유동 세포분석기에 의해서 수행하였다. A549 세포들을 405 nm 레이저를 사용한 1시간 광조사 존재 및 부존재 하에서 30분 동안 10 nM PT-1으로 처리하였다. 세포들을 12 시간 동안 더욱 배양하고 회수하였다. 이어서, 세포들을 얼음 냉각된 PBS로 2회 세척하였다. 세포들을 BD FACS 튜브들 중에 위치시키고 (10^6/ml까지), 10% FBS를 함유한 PBS 중에서 5 mg/ml PI (Sigma-Aldrich)와 함께 실온에서 30분 동안 배양하였다. 이어서, 세포들을 얼음 냉각된 PBS 중에서 세척하였다. PI 형광을 FACSAria 장비 (BD, San Jose, California, USA)의 FL-1 채널 중에서 측정하였다.

[0062] **마우스 이종이식 모델**

[0063] 화학치료적 효과를 알아보고, 인 비보에서 PT-1의 영상들을 얻기 위해서, 7- 내지 8-주령 BALB/c 누드 마우스들 RaonBio (Kayonggido, Yonginsi, South Korea)을 하기와 같이 사용하였다: 대조군 이종이식: n = 8; 치료 및 이종이식: n = 8). 다양한 동물들을 동물 시설에 저장하기 이전에, 48 시간 동안 적응시키고, National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)에 의해서 발간된 Care and Use of Laboratory Animals 지침에 따라서 보관하였다. 동물들은 우리에 수용하였으며, 임의로 물 및 살균된 음식을 공급하였고, 30-40% 습도로 실온 (21 ± 2 ℃)에서 12 시간 명/암 사이클을 유지하였다. 354234-매트리겔 (BD, San Jose, California, USA)을 대략 5.0×10^6 A549 세포들과 혼합하고, 마우스의 오른쪽 및 왼쪽 옆구리에 피하 주사하였다.

[0064] **엑스 비보 형광 영상화 및 장기 중 약물 분포의 분석**

[0065] 전술한 A549 세포-접종된 마우스를 포함하는 엑스 비보 실험에 기초해서, PT-1의 종양 타겟 능력 및 장기 분포를 평가하였다. 치료진단 효과를 확인하기 위해서, 접종 3주 후에, PBS 0.1 ml 중 PT-1을 이종이식 마우스의 꼬리 정맥 내로 2주 동안 격일로 주사하였다. PT-1은 꼬리 정맥 주입 3 시간 후에 405 nm 레이저 (1.4 W/cm^3)로 활성화시켰다. 1 시간 광조사 이전 마지막 PT-1 주입 2 시간 경과 후에, 엑스 비보 스펙트럼-형광 영상들을, IVIS Lumina Series III 전임상 영상화 시스템 (PerkinElmer Co., Waltham, MA, USA)을 사용하여 얻었다. 대조군 및 주사된 마우스들의 종양 조직들 및 다양한 장기들 (폐, 심장, 신장, 및 비장)을 절개하여 엑스 비보 영상들을 획득하였다. 엑스 비보 영상들을 얻기 위해서 사용된 필터는 420 nm 여기 및 580 nm 발광에 세팅되었다. 이어서, 자가형광 및 형광 영상들을 제조업체의 다중여기 스펙트럼 분석 함수를 사용하여 디콘볼루션 (deconvoluted) 하였다. 엑스 비보 영상들을 획득한 다음, 이식된 종양 조직들을 사용하여 Tissue-Tek 100% Optimal Cutting Temperature Compound (O.C.T., Sakura Finetek, USA)에서 조직단편들을 획득하였다. 신선한 조직 샘플들을 액체 질소 (LN_2) 또는 드라이 아이스 중에서 신속하게 스냅 결빙 (snap-frozen)시킨 다음, 다음 분석에 사용될 때까지 80 ℃에서 저장하였다. 신선하게 동결보관된 조직들을 25 ℃에서 초박편제작기 (Leica CM 3050 S, Wetzlar, Germany)를 사용하여 절단 (6 μm 슬라이스)하였다. 각각의 슬라이스를 부착 현미경 글라스 슬라이드 (Paul Mariendeld GmbH & Co. KG, Lauda-Konigshofen, Germany) 상에 위치시켰다. 이어서, O.C.T. 화합물을 PBS로 2회 세척함으로써 제거하였다. 슬라이스들을 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 카운터염색을 수행하며 2 시간 동안 2 mM PT-1과 함께 배양하고, 형광 슬라이드 커버 글라스로 덮었다. 형광 영상들을 공초점 레이저 주사 현미경을 사용하여 얻었다 (Carl-Zeiss LSM 5 Exciter, Oberko, Germany).

[0066] **인 비트로 및 인 비보 역학**

[0067] A549 세포들은 60 mm 배양 접시 중에서 80% 중첩도까지 성장시켰다. 상기 A549 세포들을 다양한 농도의 PT-1 (0, 1, 10, 100, 500, 및 800 nM)으로 1 시간 동안 처리하고, 세포들을 PBS로 3회 세척하여 잔류 PT-1을 제거하였다. 신선한 배양 배지를 첨가하고, 세포들을 1시간 동안 광조사하였다. 24시간 경과 후에, 세포들을 PBS로 세척하고, DMSO 중에 용해시켰다. 형광 강도를 측정하였다. 인 비보 역학을 조사하기 위해서, 마우스 혈청 중의 PT-1 형광 강도를 측정하였다. 이종이식된 마우스들에 PT-1을 단일 꼬리 정맥 주사하였다 (0.1 ml PBS 중 8 mg/kg 체중). 혈청 시료들을 다양한 시간대에서 수집하였다 (0, 1, 4, 6, 12, 18, 및 24 시간). DMSO 용해된 세포 추출물 및 마우스 혈청 시료들을 365 nm 레이저로 1 시간 동안 조사함으로써 형광 강도를 측정하였다 (각 시간대별 4회). 흡수 및 발광 측정을 위한 시료들은 100 μl 석영 큐벳 중에 수용하였다 (Sigma). 형광 스펙트럼은 제논 램프를 구비한 RF-530 PC spectrofluorometer (Shimadzu, Seisakusho, Japan)를 사용하여 기록하였다. 정량은 550 nm; λ_{ex} = 365 nm; slit 10/10로 수행하였다.

[0068] **TUNEL 분석**

[0069] 8 마리 마우스들로부터 단편화된 (cryosectioned) 종양 조직들을 나누고 동결 단편화하였다 (5 μm). 신선하게 단편화된 종양 조직들을 차가운 에탄올로 3분 동안 고정하고, PBS로 세척하였다. TUNEL 염색을 제조업체 지침에 따라서 수행하였다 (*In situ* cell Death Detection Kit, POD; Roche). 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 사용하여 카운터 염색을 수행하였다. 염색된 종양 조직들을 형광 현미경 (Carl Zeiss)을 사용하여 영상화 및 정량화하였다. TUNEL-양성 세포들 (녹색 형광 점들)을, 조사된 슬라이드 또는 비조사된 슬라이드의 경우에 대해서, 7개의 무작위 영역들에서 계수하였다.

[0070] **통계적 분석**

[0071] 각 그룹들의 평균 및 평균의 표준오차 (SEM)는 삼중으로 수행된 3회의 독립적인 실험들로부터 계산하였다. SAS 소프트웨어 (version 8.2, Cary) 중 ANOVA (분산의 일방 분석)를 수행함으로써, 그룹들 사이에 통계적으로 유의

미한 차이를 평가하였다. ANOVA가 유의미한 차이를 나타내는 경우에는, Paired Student's t 테스트를 수행함으로써 평균들을 비교하였다. P 수치가 <0.05인 경우를 통계적으로 유의미한 경우로 간주하였다.

[0072] **합성**

[0073] **화합물 2의 합성**

[0074] 화합물 2는 기존에 보고된 방법에 따라서 (Z. Yang, J. H. Lee, H. M. Jeon, J. H. Han, N. Park, Y. He, H. Lee, K. S. Hong, C. Kang and J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 11657), 90%의 수율로 합성하였다.

[0075] **화합물 3의 합성**

[0076] 비오틴 (100.0 mg, 0.40 mmol)을 10 ml의 DMF에 용해시키고, DMF (3 ml) 중 아지드에탄올 용액 (2; 71.3 mg, 0.81 mmol)을 상기 초기 용액에 첨가하였다. 이어서, EDC·HCl (338.2 mg, 1.63 mmol) 및 DMAP (75.0 mg, 0.61 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질들을 감압 하에서 제거하고, 잔류물을 30 ml의 CH_2Cl_2에 용해시켰다. 유기층을 물 (3 × 10 ml)로 세척하고, 진공 중에서 농축시킨 다음, 실리카 겔 ($MeOH/CH_2Cl_2$:10/90) 상에서 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 산물을 72%의 수율로 수득하였다 (92 mg). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 1.37-1.45 (m, 2H), 1.59-1.69 (m, 4H), 2.34 (t, J = 7.44 Hz, 2H), 267-2.71 (m, 2H), 2.82-2.88 (m, 1H), 3.07-3.13 (m, 1H), 3.44 (t, J = 5.22 Hz, 2H), 4.19 (t, J = 5.01 Hz, 2H), 4.23-4.27 (m, 1H), 4.43-4.47 (m, 1H), 5.98 (s, 1H), and 6.29 (s, 1H) ppm; ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): 24.9, 28.4, 33.9, 40.8, 50.0, 55.6, 60.3, 62.1, 63.1, 163.8, 및 173.6 ppm; ESI-MS: the calculated value (calcd) for C12H19N5O3S (M+Na+): 336.11, found 336.00.

[0077] **화합물 4의 합성**

[0078] 상기 화합물은 이전에 보고된 과정 (S. Beghdadi, L. A. Miladi, H. B. Romdhane, J. Bernard and E. Drockenmuller, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 4138; S. C. Tsaia and J. P. Klinman, *Bioorg. Chem.*, 2003, **31**, 172)에 따라서 합성하였으며, 그 수율은 60%였다.

[0079] **화합물 5의 합성**

[0080] 프로파길 브로마이드 (120.7 mg, 1.01 mmol)를 MeCN (20 mL) 중 니트로바닐린 (100.0 mg, 0.50 mmol) 및 포타슘 카르보네이트 (140.3 mg, 1.01 mmol)의 현탁액에 가해주었다. 환류 하에서 6 시간 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 감압 하에서 농축시키고, 30 ml의 CH_2Cl_2로 희석하였다. 유기층을 물 (3 × 10 ml)로 세척하고, 진공 중에서 농축한 다음, 실리카 겔 (EtOAc/hexanes : 10/90) 상에서 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제함으로써 산물 (101.1 mg)을 85%의 수율로 수득하였다. $_1$H NMR ($CDCl^3$, 300 MHz): δ 2.63 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 4.91 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 및 10.46 (s, 1H) ppm.

[0081] **화합물 6의 합성**

[0082] MeOH (10 mL) 중 화합물 5의 용액 (100 mg, 0.42 mmol)에 과량의 $NaBH_4$ (64 mg, 1.70 mmol)를 소량씩 첨가하였다. 1시간 이후에, 반응물에 EtOAc를 가해주어 반응을 중지시켰다. 결과물인 유기 혼합물을 포화 NH_4Cl 및 염수로 세척하고, $MgSO_4$ 상에서 건조한 다음, 진공 중에서 증발시켰다. 상기 방식으로 얻어진 조생성물을 실리카 겔 상에서 (EtOAc/hexane: 10/40) 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제함으로써 산물 (96.7 mg)을 96% 수율로 수득하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 2.58 (t, J = 2.37 Hz, 1H), 3.99 (s, 1H), 4.82 (d, J = 2.34 Hz, 2H), 4.97 (t, J = 0.54 Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 및 7.87 (s, 1H) ppm; ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): 56.7, 57.3, 63.0, 1111, 111.5, 133.6, 139.7, 145.7, 및 154.7 ppm.

[0083] **화합물 7의 합성**

[0084] 화합물 6 (50 mg, 0.21 mmol)의 DMF (5 ml) 용액에, 0 ℃에서 4-니트로페닐 클로로포르메이트 (46.4 mg, 0.23 mmol) 및 피리딘 (33.3 mg, 0.42 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물이 실온까지 상승하도록 한 다음, 실온에서 12 시간 동안 추가로 교반하였다. 이 시점에서, DMF (5 mL) 중의 7-에틸-10-히드록시-캄토테신 (51.4 mg, 0.42 mmol) 및 TEA (42.6 mg, 0.42 mmol)를 실온, 아르곤 분위기 하에서 첨가하였다. 상기 혼합물을 실온에서

24 시간 동안 교반하고, 반응 혼합물을 CH_2Cl_2, 및 물과 혼합하였다. 유기층을 분리하고, $MgSO_4$ 상에서 건조한 다음, 진공 중에서 농축하였다. 실리카 겔 (MeOH/CH2C12: 10/90) 상에서 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제함으로써 32 mg의 원하는 산물을 32%의 수율로 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d-6, 400 MHz): δ 0.84 (t, J = 7.16 Hz, 3H), 1.25 (t, J = 7.48 Hz, 3H), 1.76-1.88 (m, 2H), 3.64 (t, J = 2.32 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 4.95 (d, J = 2.24 Hz, 2H), 5.28 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.61 (s, 2H), 6.52 (br s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.75 (dd, J = 9.16, 2.48 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 8.13 (d, J = 2.52 Hz, 1H), 및 8.18 (d, J = 9.16 Hz, 1H); ^{13}C (DMSO-d-6, 100 MHz): 8.4, 14.5, 21.4, 22.9, 30.9, 50.2, 57.0, 57.2, 65.9, 67.7, 73.0, 78.9, 80.0, 97.5, 111.0, 112.8, 115.7, 119.8, 125.6, 126.3, 127.7, 129.4, 132.2, 140.2, 146.2, 146.4, 146.5, 147.3, 149.9, 150.7, 152.9, 153.1, 154.2, 157.5, 및 173.2 ppm.

[0085] **화합물 PT-1의 합성**

[0086] 화합물 3 (26.2 mg, 0.08 mmol), 7 (50 mg, 0.07 mmol), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.38 g, 0.15 mmol), 및 소듐 아스코르베이트 (0.30 g, 0.15 mmol)를 DMF (5 ml) 중에 혼합하고, 실온, 아르곤 분위기 하에서 12 시간 동안 교반하였다. 이 시점에서, 휘발성 물질들을 감압 하에서 제거하고, 반응 혼합물을 HPLC에 의해서 정제함으로써 원하는 산물을 수득하였다 (56 mg; 76% 수율). ^{1}H NMR (DMSO-d-6, 400 MHz): δ 0.87 (t, J = 7.32 Hz, 3H), 1.27 (t, J= 7.6 Hz, 5H), 1.38-1.50 (m, 6H), 1.52-1.91 (m, 3H), 2.24 (t, J = 7.24 Hz, 2H), 2.52-2.58 (m, 4H), 2.77 (dd, J = 12.52, 5.04 Hz, 1.5H), 3.03-3.19 (m, 5H), 3.88 (s, 3H), 4.09-4.12 (m, 1.5H), 4.27-4.30 (m, 1.5H), 4.42 (t, J = 5.08 Hz, 2.5H), 4.66 (t, J = 4.96 Hz, 2H), 5.29 (s, 3H), 5.42 (s, 1.5H), 5.63 (s, 1.5H), 6.38 (s, 3H), 6.43 (s, H), 6.57 (s, 1.5H), 7.28 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.77 (dd, J = 9.12, 2.4 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 8.14 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.20 (s, 0.5H), 8.22 (s, 0.5H), 및 8.3 (s, 1H) ppm; ^{13}C (DMSO-d-6, 100 MHz): 8.4, 14.5, 22.9, 24.9, 28.6, 30.9, 33.7, 49.4, 50.2, 55.9, 56.9, 59.9, 61.7, 62.6, 62.8, 65.9, 67.7, 73.0, 97.5, 110.6, 112.7, 115.7, 119.8, 125.5, 125.7, 126.1, 127.7, 129.3, 140.4, 142.5, 146.2, 146.4, 147.2, 147.5, 149.9, 150.7, 152.8, 153.2, 154.1, 157.5, 163.5, 및 173.2; ESI-MS: calcd for C46H48N8O14S (M+H) was 969.40; detected 969.40.

[0087] **화합물 8의 합성**

[0088] EDCHCl (79 mg, 0.51 mmol)을, DMF (5 ml) 중 7-에틸-10-히드록시캄토테신 (100 mg, 0.25 mmol), 비오틴 (74 mg, 0.30 mmol) 및 DMAP (62 mg, 0.51 mmol)의 용액에 실온에서 첨가하였다. 8 시간 경과 후에, 반응물을 수성 1N HCl 용액으로 세척하고, 유기층을 $MgSO_4$ 상에서 건조한 다음, 여과 및 진공 중에서 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제함으로써 표제 화합물을 95 mg (61% 수율) 수득하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d-6, 400 MHz): δ 0.85 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.24 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.52 - 1.41 (m, 3H), 1.72 - 1.65 (m, 2H), 1.84 (quint., J = 6.92 Hz, 2H), 2.61 (d, J = 12.64 Hz, 1H), 2.64 (t, J = 7.28 Hz, 1H), 2.84 (dd, J = 12.44, 4.96 Hz, 2H), 3.17 - 3.08 (m, 3H), 4.37 - 4.33 (m, 2H), 5.22 (s, 2H), 5.40 (d, J = 9.12 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 33.64 Hz, 3H), 6.64 (s, 2H), 7.33 (s, 2H), 7.60 (dd, J = 9.24, 2.2 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 2.32 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 9.12 Hz, 2H)

[0089] **합성을 위한 재료 및 방법**

[0090] 본 발명에서 사용된 시약들은 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. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 장비로 $CDCl_3$ 또는 DMSO-d6 중에서 측정하였다.

[0091] 검토

[0092] 본 발명에서는 7-에틸-10-하이드록시 캄토테신 (SN-38) - 토포이소머라아제 I 억제제 이리노테칸의 전구약물 - 및 광촉발 모이어티로서 니트로바닐린을 함유하는 종양-표적 차폐 광치료제 I (PT-1)을 개발하였다. 이러한 광치료제는 세 가지 모이어티로 이루어진다. 그 중 하나는 비오틴 유닛으로, 항암제를 선택적으로 암세포로 유인하는 암-표적화 유닛이다. 두 번째 구성성분은 광-활성화 유닛으로, 광-분해 후 형광 신호를 제공하는 o-니트로벤질(니트로바닐린)이다. 세 번째 모이어티는 항암성 전구약물로, 이미징(모니터링)을 위한 형광 그룹으로

작용하는 SN-38이다. SN-38은 이리노테칸의 대사물질이자, DNA 풀림을 억제하는 토포이소머라아제 I 억제제이다. 암세포에서 광활성화가 시작되면, PT-1은 DNA 재결착을 방해하고, 따라서 세포사멸을 유도하는 DNA 손상을 일으킨다. 생체 내 및 생체 외 연구에서, 405 nm의 레이저 빛으로 조사하면, PT-1에 의해 암 성장의 상당한 억제가 일어났음이 드러났다.

[0093] 도 1a는 PT-1의 합성과정을 보여준다. 2-아지도에탄올 (2) 및 화합물 4는 이전에 보고된 방법들을 이용하여 합성하였다. 화합물 2를 EDCI의 존재 하에 비오틴과 커플화하여 적정량의 화합물 3을 제조하였다. 화합물 4와 프로파길 브로마이드의 반응을 통해 알카인 5를 생성하였으며, 이어서 소듐 보로하이드라이드와의 반응을 통해 기능화된 벤질 알코올 6을 얻었다. 이어서, 벤질 알코올 6를 4-니트로페닐 클로로포르메이트로 처리하고, 이어서 SN-38과 반응시켜 중간체 7을 얻었다. 화합물 7과 3 사이의 "클릭 (click)" 반응을 통해 필요로 하는 타겟 PT-1을 제조하였다. 모든 새로운 화합물 (PT-1 및 2 내지 7)들은 ^{1}H 및 ^{13}C 핵자기공명 (NMR)과 전자분무이온화 질량분석을 통해 특정하였다.

[0094] PT-1은 광-촉발형 유닛으로 작용하도록 설계된 o-니트로벤질 (니트로바닐린) 서브유닛에 삽입되어, 암세포 내에서 광-활성화를 가능토록 한다. o-니트로벤질로부터 유도된 광바구니 분자는 세포 연구에 특히 가치가 있는데, 365 nm의 자외선으로 조사하면 이들의 파생 종 (daughter species)이 전형적으로 생체분자에 거의 손상을 일으키지 않기 때문이다. 따라서, PT-1을 활성화시키기 위해, 상업적으로 이용가능한 UV 핸드 램프를 사용하여 365 nm에서 조사하였다. PT-1은 실험실 시간 스케일 상에서는 안정하고, UV 조사가 없는 환경에서 550 nm에서 최대값을 나타내는 약한 형광 방출에 의해 특정된다 (도 1c). 365 nm로 조사하면, 550 nm에서 강한 형광 방출 특성이 관찰된다 (도 1b, c). 형광 방출 세기의 증가는, 빛 조사 하에서 PT-1으로부터 형광성 SN-38 서브유닛의 광유도 분해와 부합한다. PT-1의 광-활성화는 시간의 함수로 관찰하였다. 이러한 실험에 기초하여, 본 발명에서는 조사가 개시된 후 2 시간 이내에 완전한 약제 방출이 일어난다고 결론내렸다 (도 1c). 활성화의 제안 메커니즘 및 SN-38의 방출은 도 1f에 나타냈다.

[0095] 세포내 티올은 암세포 내에 과량 존재한다. SN-38의 광-방출을 방해하는 세포내 티올의 능력은, 다양한 티올 (시스테인, 호모시스테인, 또는 글루타티온(glutathione))의 존재 하에 PT-1을 365 nm에서 조사 처리함으로써 평가하였다. 세포내 티올이 존재하지 않았을 때와 동일한 형광 변화가 관찰되었으며, 이는 티올계 방해를 우려하지 않아도 되며, 결론적으로는 무시해도 된다는 것을 암시한다.

[0096] 암세포와 가장 일반적인 건강 세포 간의 불균형한 pH를 줌으로써, 본 발명에서는 PT-1 (10 μM 수성)의 형광 특성이 pH 의존적인지 여부를 평가하였다. 도 1d 및 e에 나타난 바와 같이, 365 nm에서의 조사가 없는 경우에, 3 내지 9 pH 범위에 걸쳐 감지할 수 있을 정도의 PT-1의 형광 세기 변화는 일어나지 않았다. 이러한 발견은, PT-1이 생체 내 또는 생체 외에서 적용되는 경우에 생물학적으로 관련된 pH 전범위에 걸쳐 높은 안정성을 나타낼 수 있음을 제시한다. 그러나, 조사 후, 3 내지 9 pH 범위에 걸쳐 PT-1의 형광 세기가 증가하였으며, 가장 큰 증가는 pH 7에서 도달되었음이 관찰되었다. 따라서, 본 발명에서는 PT-1이 넓은 pH 범위에 걸쳐 광활성화된다고 결론내렸다.

[0097] PT-1의 활성화 및 SN-38의 방출은 고성능액체크로마토그래피 (HPLC) 및 질량분석법 (MS)을 통해 분석하였다. HPLC 크로마토그램은, 조사하지 않은 상태에서 27분에 방출되는 PT-1에 상응하는 하나의 피크를 나타냈다. UV 조사 후 17.5분에, SN-38에 상응하는 새로운 피크가 나타났다. 이러한 발견은 PT-1에 대한 광-조사가 SN-38로의 깨끗한 생성을 이끈다는 점을 확신시켜 주었다.

[0098] 비오틴은 일반적인 세포의 성장, 기능 및 증식에 필수적이다. 유방 암세포 (4T1, JC, MMTO6056), 폐암세포 (A549), 백혈병 세포 (L1210FR), 비만 세포종 (P815), 헬라 세포 (HeLa cell), 폐 (M109), 신장 (RENCA, RD0995), 결장 (Colo-26), 및 난소 암세포 (Ov2008, ID8)를 포함하는 다양한 암세포주들은 건강 세포보다 높은 수준의 비오틴 수용체를 발현한다; 따라서, 비오틴 흡수는 암세포에서 훨씬 높게 나타난다. 이에, 본 발명에서는 PT-1의 설계에서 암세포-표적화 제제로서 비오틴을 사용하였다. 생체 외에서 PT-1의 국지화 정도를 측정하기 위해, 비오틴 수용체 양성 세포 (A549 및 HeLa)와 비오틴 수용체 음성 세포 (WI-38 인간 정상 배아 폐 섬유아세포 및 BJ 세포)를 시험하였다. A549와 HeLa 세포를 PT-1으로 1시간 동안 배양시킨 후에, 405 nm의 레이저로 조사하였다. 조사하지 않은 상태에서는, 어떠한 형광성도 관찰되지 않았다 (도 2a 내지 c). 그러나, 조사하고 난 후에는 방출 세기가 상당히 증가하였다 (도 2d 내지 f).

[0099] 또한, 암세포주 (A549 및 HeLa)와 건강 세포주 (WI-38 및 BJ)에 대한 PT-1의 세포독성을 평가하기 위해 세포 생존률 분석을 수행하였다. 10 nM의 PT-1으로 배양시킨 후 405 nm에서 조사한 결과, 건강 세포의 경우에서 보다 큰 세포독성이 암세포에서 관찰되었다 (도 2g, h 참조). 광-조사 전후의 A549 암세포 군집을 조사하여 PT-1의

광치료 능력을 평가하였다. 1시간 후에 다수의 세포사멸된 암세포가 조사된 부위에서 발견되었으나, 비조사된 부위에서는 발견되지 않았다 (도 2j, l). 이에 더하여, A459 세포의 24시간 라이브 이미징을 조사처리 및 조사처리되지 않은 두 가지 경우로 나누어 수행하였다; 그 결과, 세포사멸이 검출되었다.

[0100] 조사된 부위는 A459 세포의 이동이 없음을 보여주며, 이를 통해 PT-1 코어로부터 활성 SN-38 서브유닛의 비차폐화 (unmasking) 후 일어나는 세포사멸 과정이 예상된다. 비-조사된 부위에 기존에 존재했던 암세포는 효율적인 생존 특징을 보여주었다. 그러나, 조사된 부위로 이동한 암세포는 세포사멸을 겪은 것으로 나타났다. 이에 기초하여, 우리는 비오틴 표적화를 통해 PT-1을 선택적으로 암세포에 부착시키고, 광조사에 의해 세포사멸을 유도할 수 있다고 판단하였다.

[0101] PI (프로피디움 아이오다이드) 염색과 함께 형광-활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하여 추가 분석을 수행하였다. PT-1 (10 nM)의 존재 하에서, 1시간 동안 조사 후에 사멸세포의 수가 1.20 (도 3b)에서 13.19 (도 3d)로 증가하였다. 이에 상응하는 SN-38 (12.5 nM)로 처리한 사멸 세포의 수는 10.0이었다.

[0102] 이러한 결과는, PT-1이 SN-38보다 강한 화학치료 효과를 가지며, 암-국지화 능력을 지닌 시스템으로의 개발이 기대될 수 있음을 나타낸다. FACS 결과와 동일하게, 세포의 상 비교 및 형광 이미지는, 24시간 후 A459 세포 (PT-1에 의해 유도됨)의 경우에 효과적인 세포사멸의 증거를 보여주었다.

[0103] 일반적으로, SN-38, 이리노테칸의 활성 대사물질은 DNA 가닥에 침투하여 DNA 복제를 교란시킴으로써 DNA 토포이소머라아제 I를 억제한다. PT-1 및 SN-38의 작용 모드를 유효화하고 비교하기 위해, 본 발명에서는 미토콘드리아 세포사멸 유전자, 세포 사멸수용체 관련 유전자, 카스파제 효소 및 암세포의 세포사멸과 연관된 다중 약제 내성 (MDR) 단백질을 포함하는 다양한 유전자와 토포이소머라아제 I의 발현을 조사하였다 (도 3e). A459 세포는, PT-1 처리 후 조사하는 경우에 토포이소머라아제 I의 발현이 감소되었음을 보여주었다 (도 3e). 대조적으로, 조사가 없거나 PT-1의 부존재 하에서는 토포이소머라아제 I의 발현 상의 중대한 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 발견은, 조사 후 PT-1이 독립적으로 관리된 SN-38의 생성물과 유사한 작용 모드를 갖는 종들을 생성한다는 제안과 일치한다. 앞서 논의된 HPLC 및 MS 분석에서 나타난 바와 같이, 생체 외 광조사 후 방출되는 것이 SN-38이라는 제안은 합리적이다.

[0104] FADD, FASL 및 TRAIL와 같은 세포 사멸수용체는 특이적 리간드에 의한 세포사멸 도입에 상당히 기여하는 표면-결합 수용체들이다. 사멸수용체의 활성화는 카스파제-의존적 세포사멸 유전자를 급속히 활성화시킨다; 따라서, 이러한 세포사멸 통로는 빠르게 진행된다. 세포사멸수용체 (FADD, FASL 및 TRAIL)는 PT-1 처리 후 조사하면 상향조절된다 (도 3e). 대조적으로, 조사하지 않거나 PT-1을 추가하지 않는 경우, 발현 상의 변화가 거의 관찰되지 않는다. 따라서, 본 발명에서는 PT-1과 조사의 조합이 암세포 내의 TRAIL 수용체를 조절가능케 하며, 세포사멸에 대한 감수성을 향상시킬 수 있다고 결론내렸다.

[0105] 표면 사멸수용체와 함께, 또한 PT-1 처리 및 조사 후 BAK, BID 및 CytC와 같은 미토콘드리아 세포사멸 유전자의 증가를 관찰하였다 (도 3e); 이러한 상향 조절은 미토콘드리아의 기능장애를 유도하며, 점차적으로 세포사멸로 이끈다. 또한, 미토콘드리아 중간막 단백질 시토크롬 c는 PT-1의 존재 하에 광 활성화 후 증가된 발현을 보여주었다. 시토크롬 c는 카스파제 9 및 3의 활성화를 통해 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다 (도 3e). 보다 높은 수준의 카스파제 9 및 3이 PT-1 처리 및 조사 후 나타났다. 관련 미토콘드리아 단백질, 세포 표면 수용체 및 카스파제의 상향 조절은 PT-1이 조사를 거쳐 암세포에서 효과적으로 세포사멸을 유도할 수 있다는 증거로 채택될 수 있다.

[0106] 화학 치료와 관련된 주요 과제는 다중 약제 내성의 유발이다. 다양한 다중약제 내성 단백질들이 항암제로의 처리 후 상향 조절된다. 따라서, 본 발명에서는 다중 약제 내성 단백질 (MRP2) 및 유방암 내성 단백질 (BCRP)에서 광-활성화 PT-1의 효과를 측정하였다. PT-1 및 빛의 존재 하에서 이들의 발현이 증가할지라도, A459 세포의 경우에 향상된 항암 효과가 관찰되었다. 추측하건대, 이러한 원하는 효과는 비오틴계 표적화의 이점을 반영하였다고 생각된다.

[0107] 앞선 생체 외 실험에서 관찰된 PT-1의 강한 항암 효과로부터 종양 모델에서의 생체 내 화학치료 가능성을 조사할 필요성이 있다. 이러한 조사는 A549 세포-접종 (이종이식) 마우스 내에서의 종양 성장을 모니터링하여 수행하였다. PT-1은 꼬리 정맥 주사를 통해 투여하였다 (8번 투여). 좌측 종양은 꼬리 정맥 주사 투여 후 405 nm 레이저 (1.4 W/cm^3)를 사용하여 3시간 동안 조사 처리하였고, 우측 종양은 조사처리하지 않았다 (도 4a). 광-조사의 조건 하에서, PT-1은 종양 성장을 억제하였다. 이는, 우측 종양 (조사처리되지 않음) 또는 대조군 동물 (PT-1으로 처리되지 않았지만 조사처리됨; 도 4b)보다 상당히 작은 좌측의 종양 부피에 반영되어 있다. 이러한

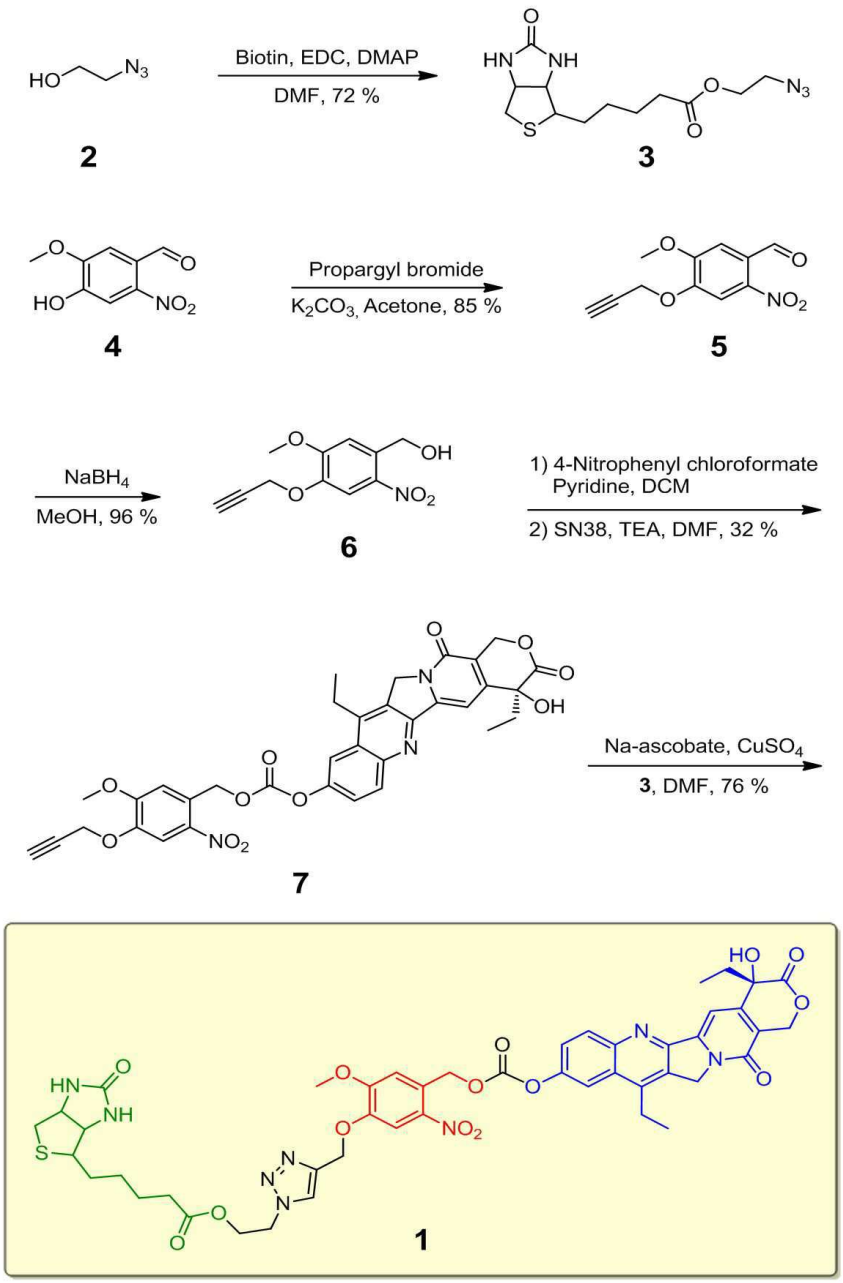
결과는 암세포 내에서 일어나는 PT-1의 광활성화와 이어서 세포사멸을 유도하는 SN-38의 동반 방출과 합치한다.

[0108] 절개된 기관 및 종양 조직을 생체 외 (*ex vivo*)에서 이미징 처리하여 여러 기관에서의 PT-1의 분포와 종양-표적화 능력을 평가하였다; 이러한 평가는 대조군 (비처리됨)과 PT-1 처리된 마우스로 수행하였다 (도 4c, d). 강한 형광 신호가 처리된 마우스의 종양 부분에서만 검출되었다; 신장, 폐, 비장, 간 및 심장을 포함하여 다른 어떤 기관도 감지할 수 있을 정도의 형광 신호를 생성하지 못했다 (도 4c, d). PT-1의 꼬리 정맥 주사 후 조사처리된 종양 조직의 동결부위 (Cryosection)는 비처리된 대조군 종양 조직에서 나타난 것보다 강한 형광 신호로 특정되었다 (도 4e). 이에 기초하여, 본 발명에서는 PT-1이 1) 우수한 종양 표적화, 2) 빛에 의한 선택적 활성화, 및 3) 종양 조직 내로의 SN-38 방출이라는 특성을 지닌다고 결론내었다. 또한, PT-1은 광-조사 상태에서 종양의 재성장을 막는데 매우 효과적이다.

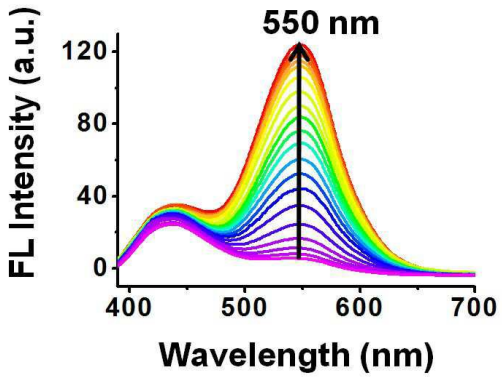
[0109] 본 발명에서는 종양을 표적화하고 외부 광-자극 적용에 의해 쉽게 활성화되며, 광학적 수단을 통해 모니터링이 가능한 새로운 시스템을 개발하였다. 광-활성화와 비오틴계 표적화의 결합은 생체 외에서 건강 세포에 비해 높은 수준의 암세포 특이성을 나타내며, A549 마우스 이종이식의 경우에 생체 내에서 모니터링이 가능하다. 따라서, 본 발명에 따르면, PT-1에 존재하는 특정 성분을 넘어서 합리적으로 설계된 소분자 암 화학치료의 개발에 있어서 새로운 일반적인 접근법을 제공하는 것이라 할 수 있다.

도면

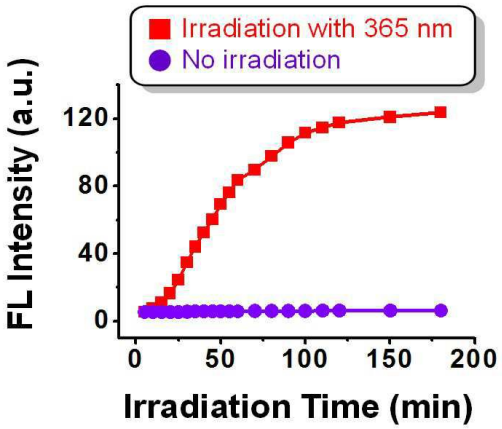
도면1a


Biotin, EDC, DMAP
DMF, 72 %
2
3
Propargyl bromide
K2CO3, Acetone, 85 %
4
5
NaBH4
MeOH, 96 %
6
1) 4-Nitrophenyl chloroformate
Pyridine, DCM
2) SN38, TEA, DMF, 32 %
7
Na-ascobate, CuSO4
3, DMF, 76 %
1

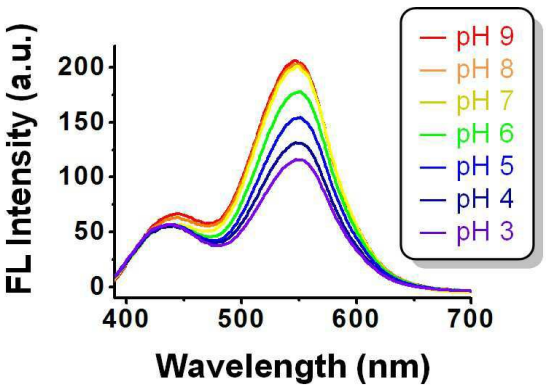
도면1b



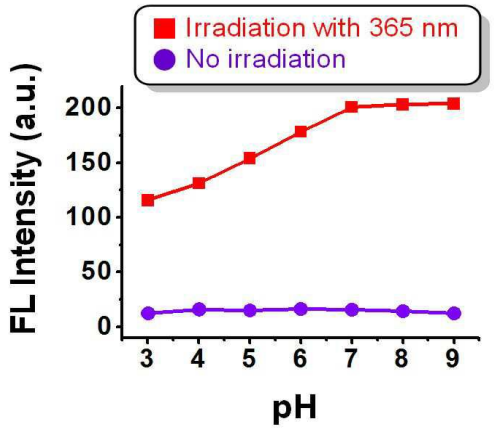
도면1c



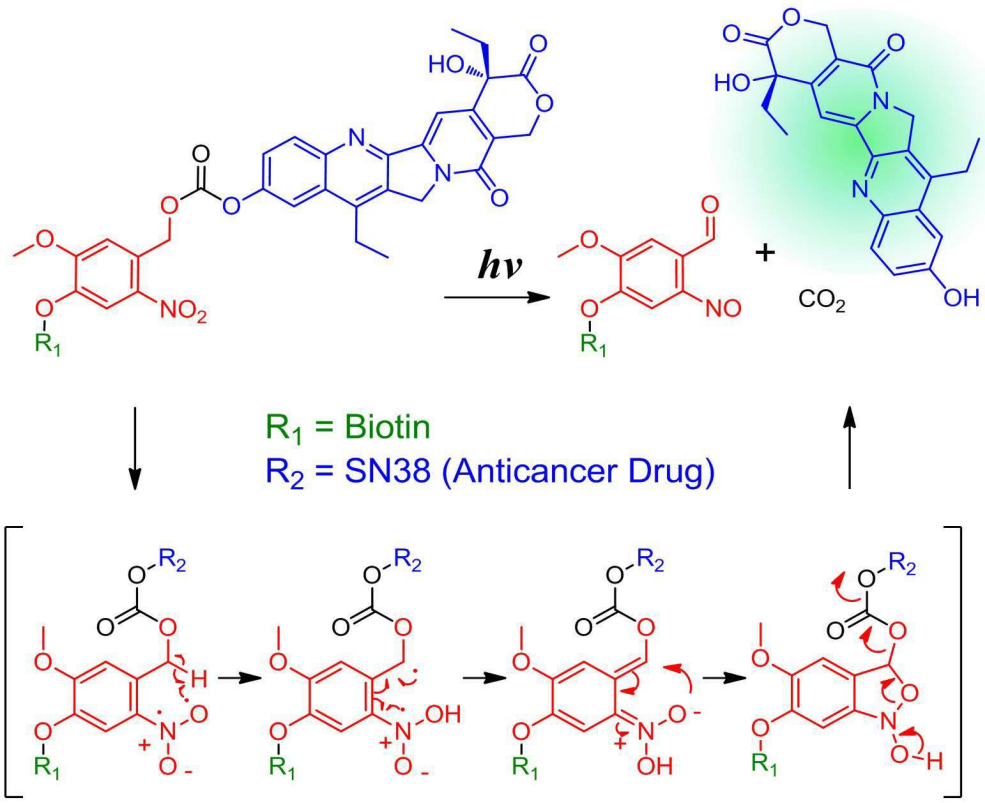
도면1d



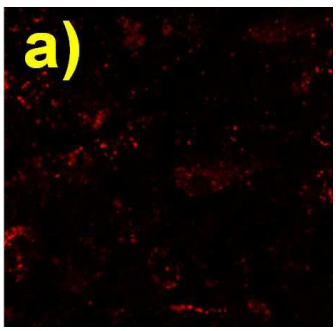
도면1e



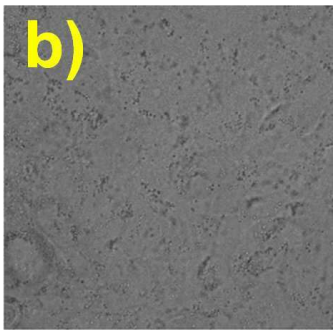
도면1f



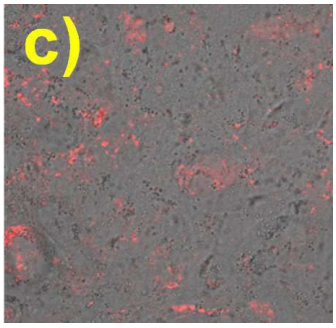
도면2a



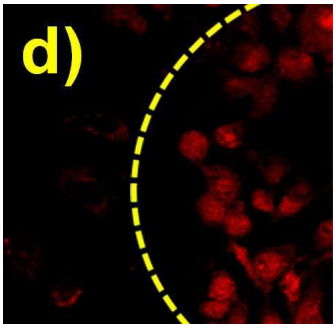
도면2b



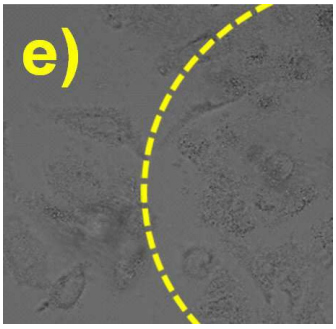
도면2c



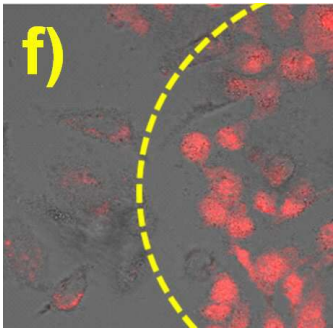
도면2d



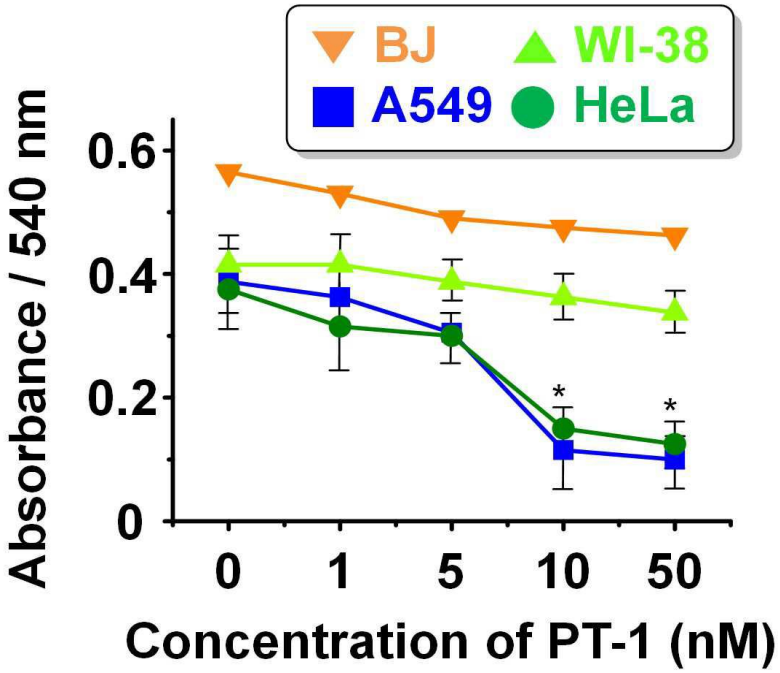
도면2e



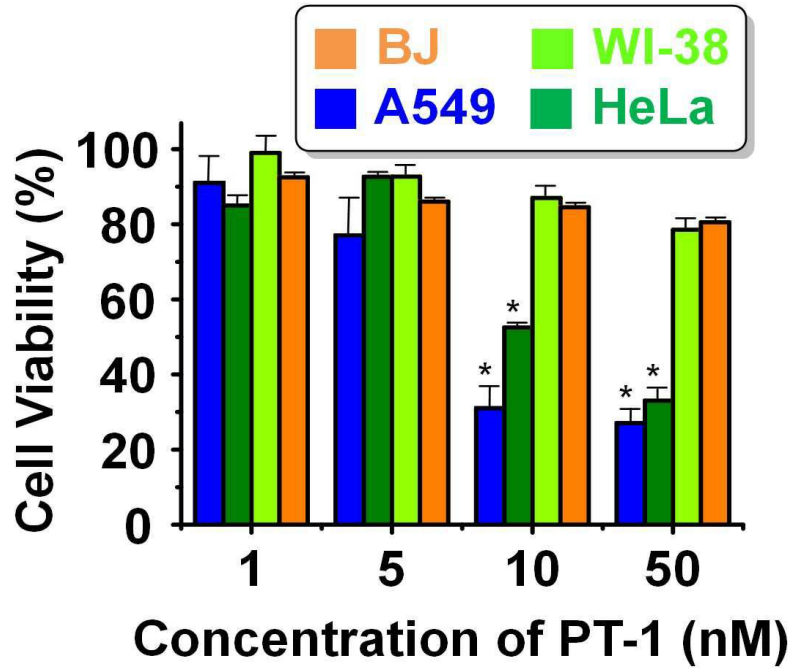
도면2f


f)

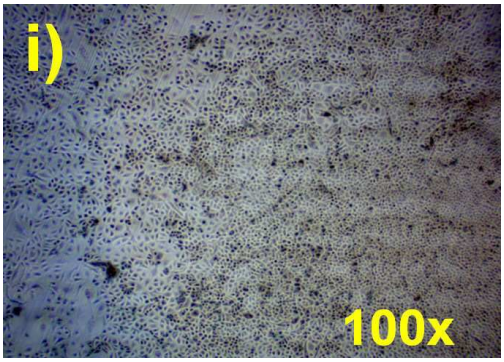
도면2g


BJ
WI-38
A549
HeLa
Absorbance / 540 nm
0.6
0.4
0.2
0
0
1
5
10
50
Concentration of PT-1 (nM)
*
*

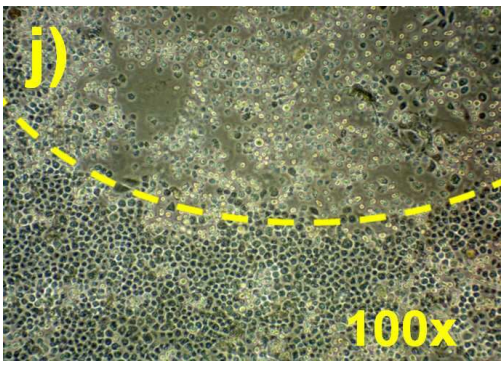
도면2h



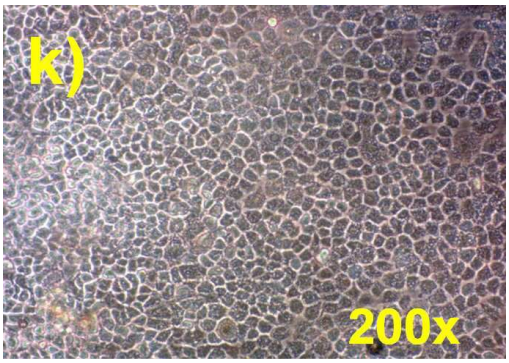
도면2i



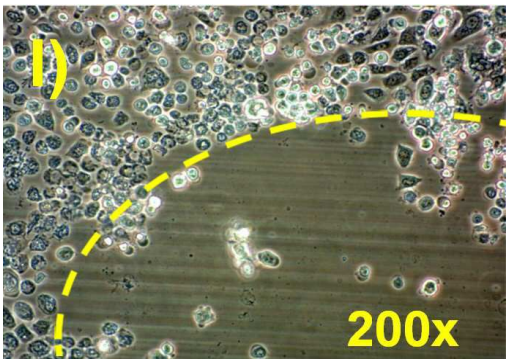
도면2j



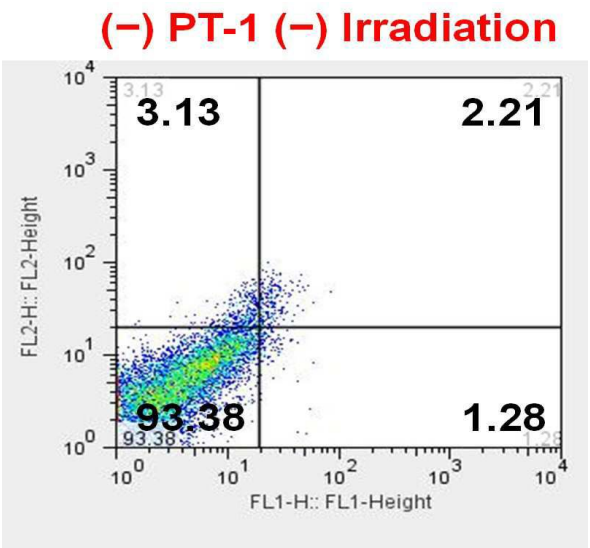
도면2k



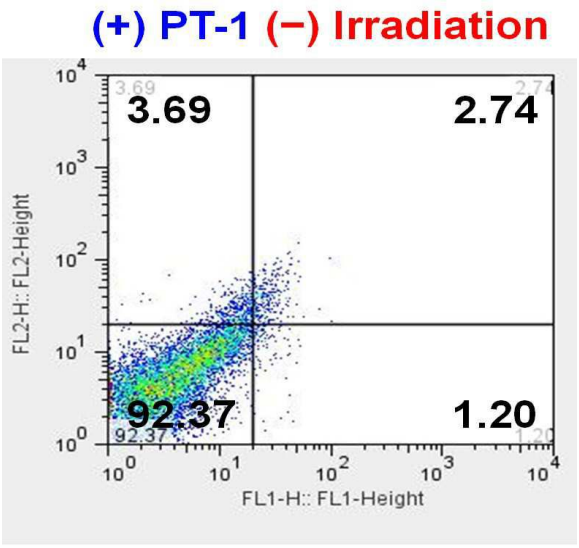
도면21



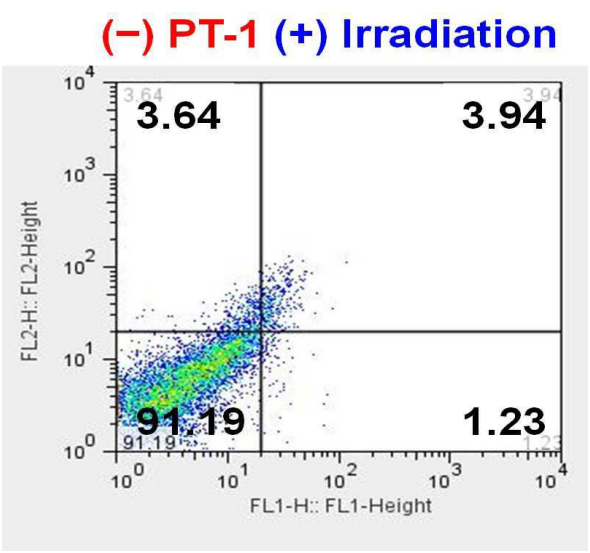
도면3a



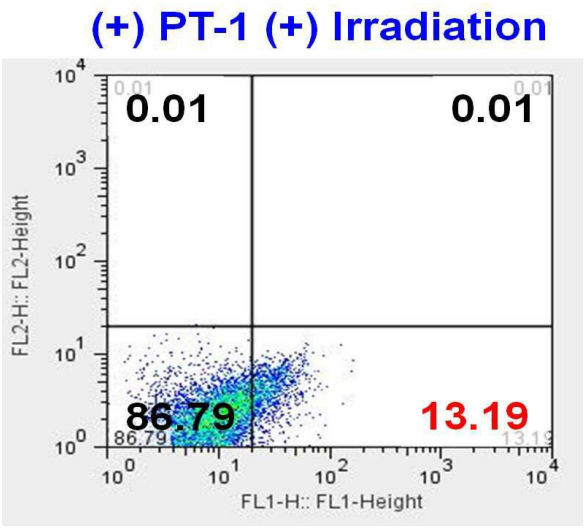
도면3b



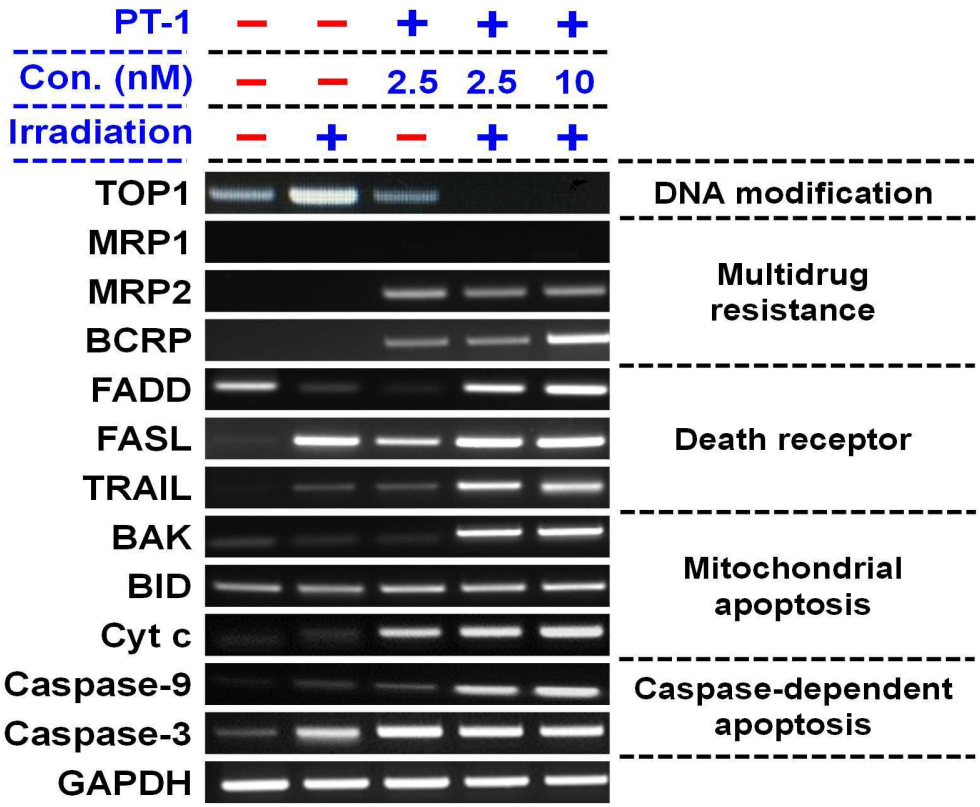
도면3c



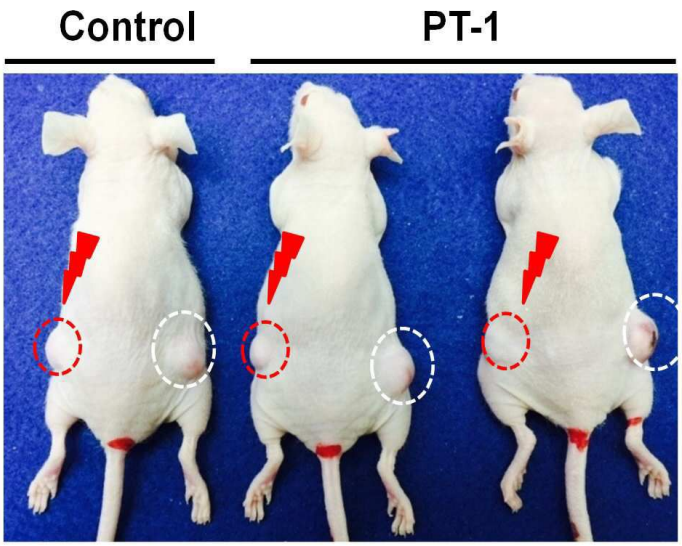
도면3d



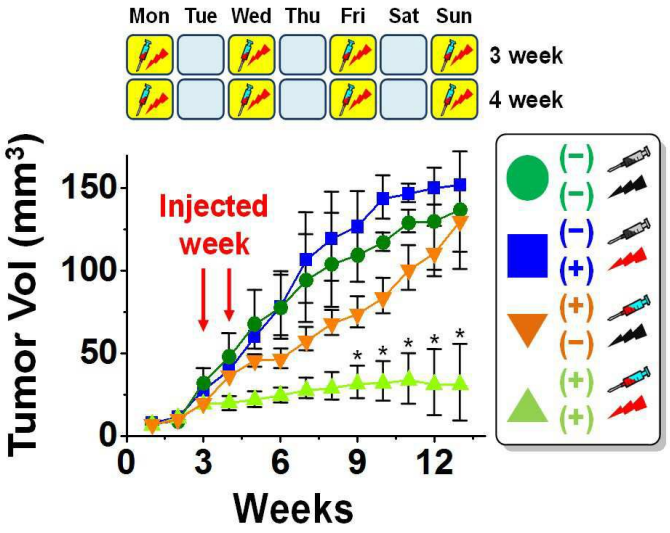
도면3e


PT-1 − − + + +
Con. (nM) − − 2.5 2.5 10
Irradiation − + − + +
TOP1
MRP1
MRP2
BCRP
FADD
FASL
TRAIL
BAK
BID
Cyt c
Caspase-9
Caspase-3
GAPDH
DNA modification
Multidrug resistance
Death receptor
Mitochondrial apoptosis
Caspase-dependent apoptosis

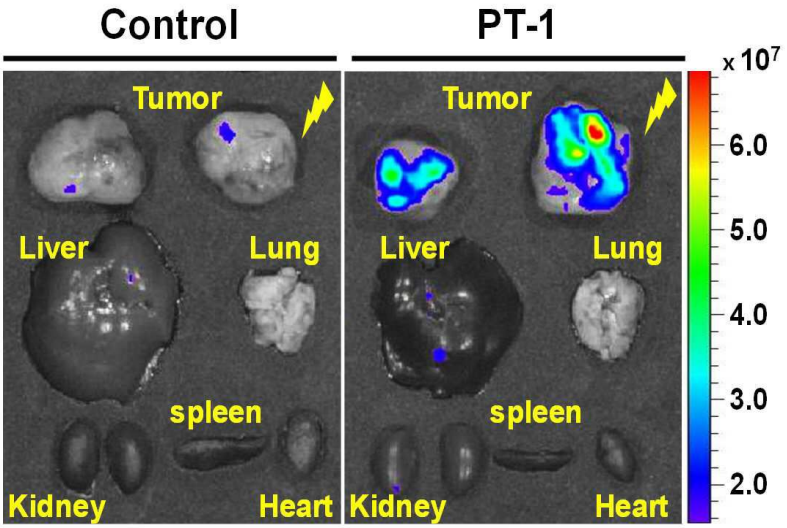
도면4a


Control
PT-1

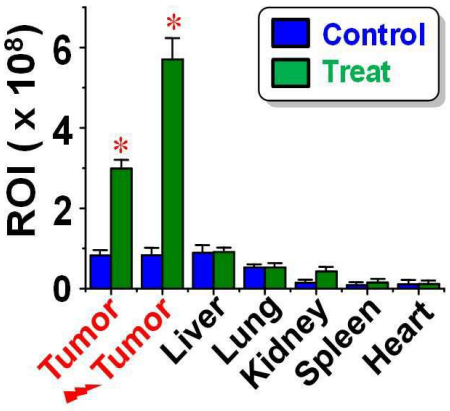
도면4b


Mon Tue Wed Thu Fri Sat Sun
3 week
4 week
Tumor Vol (mm³)
150
100
50
0
Injected week
0 3 6 9 12
Weeks
(−) (−)
(−) (+)
(+) (−)
(+) (+)

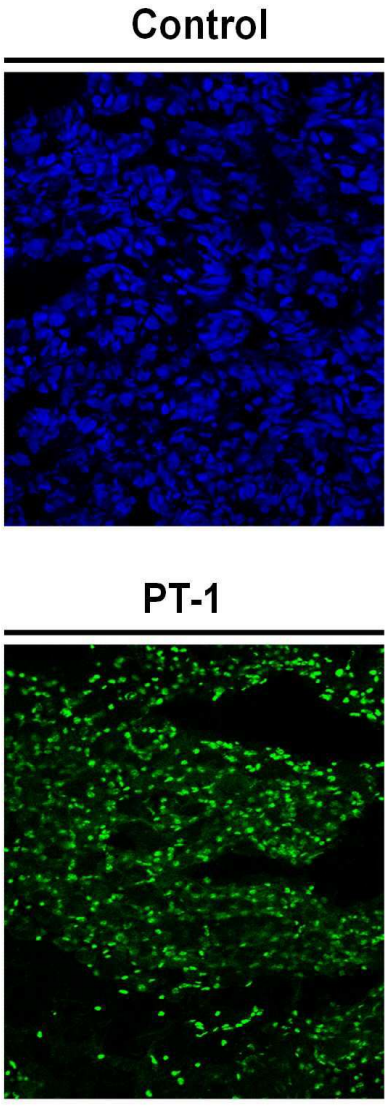
도면4c


Control
PT-1
Tumor
Liver
Lung
spleen
Kidney
Heart
x 10⁷
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0

도면4d


ROI (x 10⁸)
0
2
4
6
Control
Treat
*
*
Tumor
Tumor
Liver
Lung
Kidney
Spleen
Heart

도면4e


Control
PT-1