



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0091220
(43) 공개일자 2018년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/50 (2017.01) A61K 31/405 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/555 (2017.08)
A61K 31/405 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0016104
(22) 출원일자 2017년02월06일
심사청구일자 2017년02월06일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
장주희
서울특별시 서대문구 증가로32안길 76, 203호
아밋 샤르마
서울특별시 성북구 인촌로 45, 202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 4 항

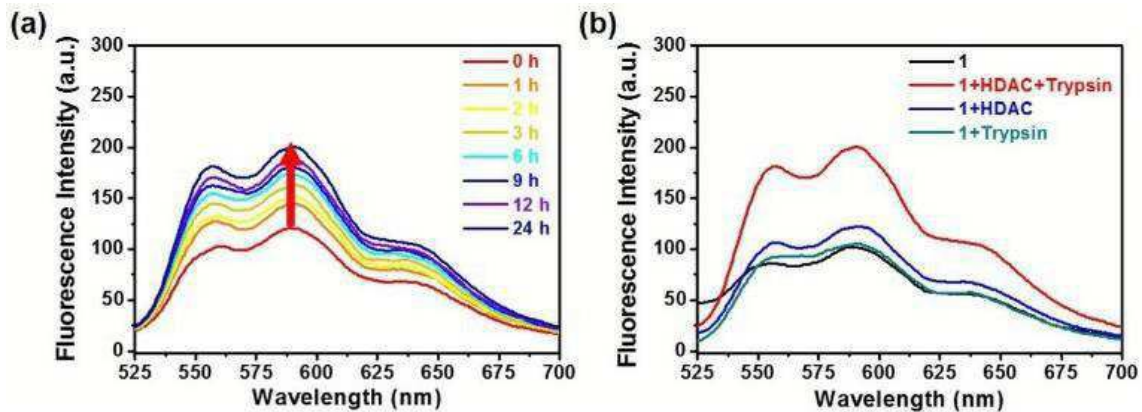
(54) 발명의 명칭 인도메타신 유도 약물 전달 접합체를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템

(57) 요약

본 발명은 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 정상 세포에 비해서 암 세포에 대해서만 높은 선택성을 가지며, 암 세포에서 높은 농도로 존재하는 히스톤 디아세틸라아제(HDAC) 및 시스테인 카텝신 L(CTSL)에 의해 단계적으로 활성화됨으로써 약물 방출 효율이 향상된 신규한 암 표적용 약물 전달 시스템을 제공하는바, 광범위한 소분자 암 화학치료제 개발에 새로운 접근 방법을 제시할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)

A61K 47/55 (2017.08)

(72) 발명자

강철훈

경기도 수원시 장안구 하พล로30번길 22, 105동 704호

김종승

경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호

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

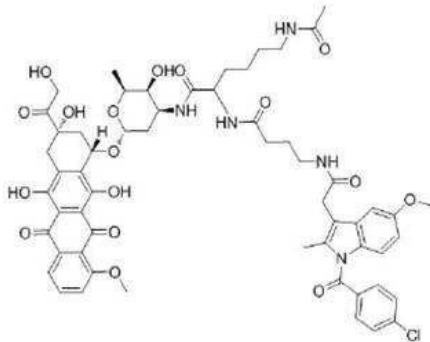
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템:

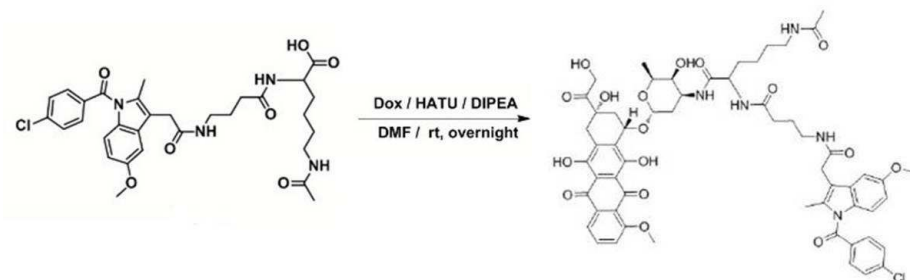
[화학식 1]



청구항 2

하기 [반응식 1]에 따라 N, N'-디메틸포름아미드 용매하에서 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘 3-옥시드 헥사플로уро포스페이트(HATU), N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA) 및 독소루비신을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제조하는 방법.

[반응식 1]



[화학식 2]

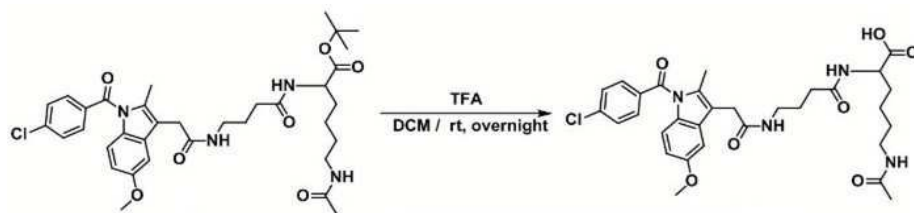
[화학식 1]

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 트리플루오로아세트산과 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물을 반응시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제조하는 방법.

[반응식 2]



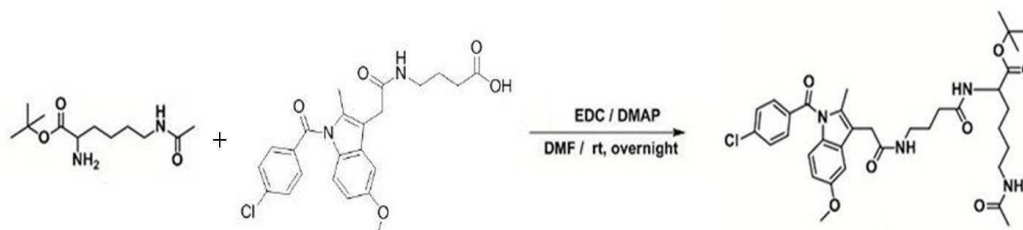
[화학식 3] [화학식 2]

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 3]에 따라 N, N'-디메틸포름아미드 용매하에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 5]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물과 반응시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제조하는 방법.

[반응식 3]



[화학식 4] [화학식 5] [화학식 3]

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDCC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암 치료 프로그램의 현재 요지는 약물 후보의 약물 동력학을 향상시키는 것이다(비특허문헌 1). 지난 수십 년에 걸쳐, 암세포와 비교하여 정상세포 기능을 동요시키는 부작용을 최소화함으로써 치료적 효능을 증가시키는 종양-표적 전달 전략이 화학요법에서 폭넓게 연구되어 왔다. 이러한 맥락에서 통상적인 접근은 암세포 표면상의 과발현된 수송체 또는 운반체에 선택적인 표적 리간드를 이용하여(비특허문헌 2), 나아가 회복된 세포독성을 가지는 항암 약물을 방출하기 위하여 암세포에 또는 암세포 주위에 산성 pH, 활성산소종(ROS), 및 과발현된 효소와 같은 병리학적 종양 미세환경을 이용하는 것이다(비특허문헌 3-5).

[0003] 사이클로옥시게나아제(COX)는 프로스타글란딘-엔도퍼옥사이드 신타아제(PTGS) 효소로, 프로스타노이드의 형성에 있어서 필수적인 역할을 한다(비특허문헌 6). 정상세포와 비교하여, 과발현된 COX-2 수준은 췌장, 대장, 위, 유방과 같은 다양한 암, 두경부 암, 또는 염증성 병변과 관련된 것으로, 종양 성장, 침입성, 혈관형성, 및 전이를 촉진하는데 있어서의 필수적인 역할을 나타내는 것이다(비특허문헌 7). 통상적으로 사용 가능한 비스테로이드성 항-염증성 약물(nonsteroid anti-inflammatory drug, NSAID)인 인도메타신(Indomethacin)은 비-선택적 COX 이형체 억제제(COX-1 및 COX-2)이다. COX-2 세포에 대해 이렇게 낮은 선택성을 가짐에도 불구하고, 이의 형광성 접합체는 종양 선택적 이미징에 성공적으로 이용되어 왔다(비특허문헌 8). 그러나, 현재까지 인도메타신 기반의 종양-표적 약물 전달 접합체는 보고된바 없다(비특허문헌 9).

[0004] 후성적 효소인, 히스톤 디아세틸라아제(HDACs)는 다양한 생물학적 공정에서의 중요한 역할 때문에, 종양학에서

많은 관심을 얻어왔다(비특허문헌 10). HDACs는 아미노-말단 히스톤 트레일 상의 라이신 잔기의 탈아세틸화에 의해 크로마틴 구조 및 기능을 조절한다(비특허문헌 11). 암 발병에 있어서 변형된 HDACs 발현의 관여는 집중적으로 면밀히 조사되고 입증되어 왔다(비특허문헌 12). 현재, 몇몇 HDACs는 단일요법 및 병용요법으로 응용하기 위해 다양한 개발 단계에 있다(비특허문헌 13). 마찬가지로, 양성조절된 시스테인 카텝신 L(cysteine cathepsins L, CTSL)이 암 진행 및 전이의 다양한 단계에서의 특징이 있는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 14). 그 때문에, 증가된 활성을 가진 CTSL 및 이의 위치화는 임상적으로 예후 및 진단적 가치를 가진다(비특허문헌 15). 종합하여, 우에키 등은 연속적인 데마스킹(demasking) 수단으로서 HDAC 및 CTSL 활성을 조합하여 향상된 효능을 가지는 신규한 항암 약물 활성화 시스템을 개발한 바 있다(비특허문헌 16).

선행기술문헌

비특허문헌

[0005]

- (비특허문헌 0001) J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Jarvinen and J. Savolainen, Nat. Rev. Drug Discov., 2008, 7, 255.
- (비특허문헌 0002) M. J. Akhtar, M. Ahamed, H. A. Alhadlaq, S. A. Alrokayan and S.Kumar, Clinica. Chimic Acta, 2014, 436, 78.
- (비특허문헌 0003) S. Park, E. Kim, W. Y. Kim, C. Kang and J. S. Kim, Chem. Commun., 2015, 51, 9343.
- (비특허문헌 0004) D. S. Wilson, G. Dalmasso, L. X. Wang, S. V. Sitaraman, D. Merlin and N. Murthy, Nat. Mater., 2010, 9, 923.
- (비특허문헌 0005) S. Mura, J. Nicolas and P. Couvreur, Nat. Mater., 2013, 12, 991.
- (비특허문헌 0006) R. S. Seller, Z. A. Radi and N. K. Khan, Vet. Pathol., 2010, 47, 601.
- (비특허문헌 0007) M. M. Taketo, J. Natl. Cancer Inst., 1998, 90, 1609.
- (비특허문헌 0008) M. J. Uddin, B. C. Crews, A. L. Blobaum, P. J. Kingsley, D. L. Gorden, J. O. McIntyre, L. M. Matrisian, K. Subbaramaiah, A. J. Dannenberg, D. W. Piston and L. J. Marnett, Cancer Res., 2010, 70, 3618.
- (비특허문헌 0009) W. T. Godbey and A. Atala, Gene Therapy, 2003, 10, 1519.
- (비특허문헌 0010) I. Gregoret, Y.-M. Lee and H. V. Goodson, J. Mol. Biol., 2004, 338, 17.
- (비특허문헌 0011) M. A. Glozaka and E. Seto, Oncogene, 2007, 26, 5420.
- (비특허문헌 0012) M. Haberland, A. Johnson, M. H. Mokalled, R. L. Montgomery and E. N. Olson, Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2009, 106, 7751
- (비특허문헌 0013) P. A. Marks and W.-S. Xu, J. Cell. Biochem., 2009, 107, 600.
- (비특허문헌 0014) J. A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F. Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Boggyo and D. Hanahan, Cancer Cell, 2004, 5, 443.
- (비특허문헌 0015) V. Gocheva, W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, D. Hanahan and J. A. Joyce, Genes Dev., 2006, 20, 543
- (비특허문헌 0016) N. Ueki, S. Lee, N. S. Sampson and M. J. Hayman, Nat. Commun., 2013, 4, 2735

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명에서는 전술한 기술적 배경하에서, 암 세포에 대해서만 높은 선택성을 가지며, 암 세포에서 높은 농도로 존재하는 히스톤 디아세틸라아제(HDAC) 및 시스테인 카텝신 L(CTSL)에 의해 단계적으로 활성화되는 것을 특징으

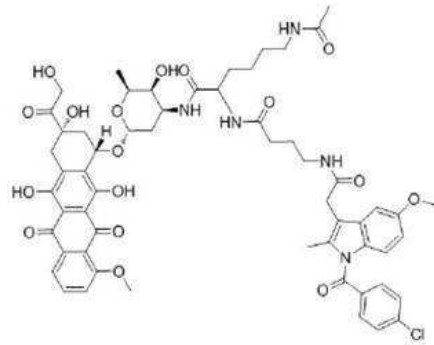
로 하는 인도메타신 기반의 신규한 암 표적용 약물 전달 시스템 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

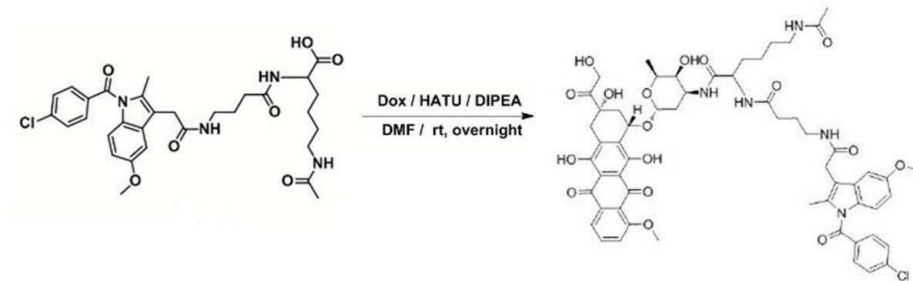
하기 [화학식 1]로 표시되는 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제공한다.

[화학식 1]



또한, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라 N, N'-디메틸포름아미드 용매하에서 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥시드 헥사플로уро포스페이트(HATU), N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA) 및 독소루비신을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제조하는 방법을 제공한다.

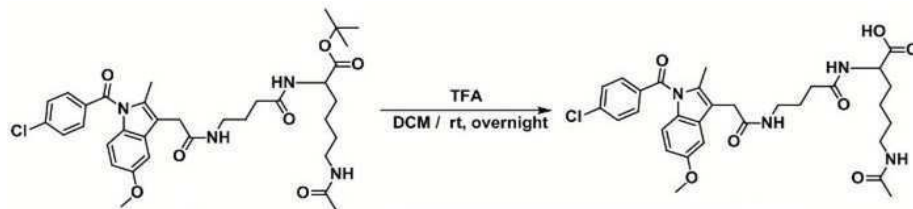
[반응식 1]



[화학식 2] [화학식 1]

본 발명에 따르면, 상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 트리플루오로아세트산과 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물을 반응시켜 제조될 수 있다.

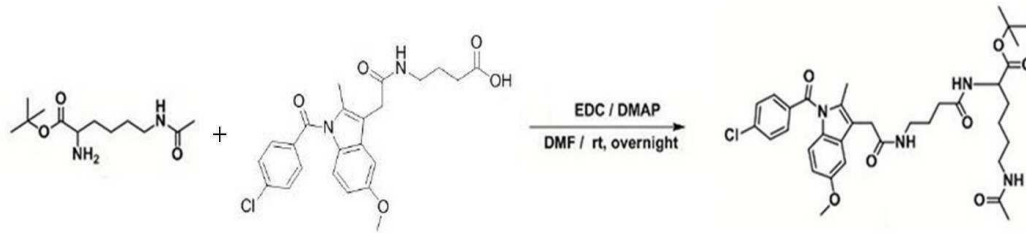
[반응식 2]



[화학식 3] [화학식 2]

본 발명에 따르면, 상기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 3]에 따라 N, N'-디메틸포름아미드 용매하에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 5]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물과 반응시켜 제조될 수 있다.

[0020] [반응식 3]



[0021]

[0022] [화학식 4] [화학식 5] [화학식 3]

발명의 효과

[0023]

본 발명에 따르면 정상 세포에 비해서 암 세포에 대해서만 높은 선택성을 가지며, 암 세포에서 높은 농도로 존재하는 히스톤 디아세틸라아제(HDAC) 및 시스테인 카텝신 L(CTSL)에 의해 단계적으로 활성화됨으로써 약물 방출 효율이 향상된 신규한 암 표적용 약물 전달 시스템을 제공하는바, 광범위한 소분자 암 화학치료제 개발에 새로운 접근 방법을 제시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1의 (a)는 HDAC 및 트립신 IX로 처리된 화학식 1로 표시되는 화합물(5 μ M)의 형광 스펙트럼, (b)는 화학식 1로 표시되는 화합물 (5 μ M) (흑색선), HDAC 및 트립신 처리된 화학식 1로 표시되는 화합물 (적색선), 화학식 1로 표시되는 화합물 및 HDAC (청색선), 화학식 1로 표시되는 화합물 및 트립신 (녹색선)의 형광 스펙트럼이다. 이때, 1% DMSO로 HDAC 완충액 내에서 499 nm에서 여기되었다(슬릿폭: ex 5 em 5).

도 2의 (a)는 배양 시간에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 공초점 및 형광 현미경 이미지로, 세포주를 1 (5 μ M)로 처리하고 2, 90 (공초점 이미지) 및 120 (형광 현미경 이미지)분 동안 배양하였다. 여기 파장이 488 nm (레이저 파워 10%)이고, 필터가 롱 패스 505 nm이며, 검출기 게인 값이 850일 때, 공초점 이미지를 얻었다. 형광 현미경 이미지는 460-490 nm 자극 및 롱 패스 520 nm 방출에서 얻었다. (i) HeLa; (ii) HepG2; (iii) HCT 119; (iv) MIA PaCa-2; (v) Caco-2. 기준자는 30 μ m를 나타낸다. (b)는 각각의 세포주의 세포 당 형광 절대값을 비교한 결과를 나타낸다.

도 3의 (a)는 COX-2 억제제; 인도메타신에 의존적인 화학식 1로 표시되는 화합물의 공초점 현미경 이미지로, 세포주를 배양기에서 1시간 동안 다양한 농도의 인도메타신으로 처리하였다. 이전에 처리된 배지를 회수하고, 그 안에 화학식 1로 표시되는 화합물(5 μ M)을 용해시키고, 15분 동안 배양하였다. 대조군 이미지는 인도메타신으로 처리되지 않은 것이다. 기준자는 30 μ m를 나타낸다. (b), (c)는 다양한 인도메타신 농도에 의존적인 (b) HepG2 세포 및 (c) HCT 116의 세포 당 상대적인 형광 강도의 히스토그램을 이미지 J 프로그램을 이용하여 나타낸 것이다. 결과는 다섯 개의 독립적인 실험의 평균($\pm$ SEM)을 나타낸다 (n=5). 통계적 유의성은 대조군과 비교하여, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 각각에 대하여 ** 및 ***으로 표시하였다.

도 4의 (a)는 HDAC 억제제; 트리코스타틴 A(TSA), (b)는 CTSL 억제제; Z-Phe-Try-CHO에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 공초점 현미경 이미지이다. HepG2 및 HCT 116 세포주를 TSA (200 ng/ml) 또는 Z-Phe-Try-CHO (200 μ M)로 배양기에서 1시간 동안 처리하였다. 이전에 처리된 배지를 회수하고, 그 안에 화학식 1로 표시되는 화합물 (5 μ M)을 용해시키고, 15분 동안 배양하였다. 대조군 이미지는 TSA 또는 Z-Phe-Try-CHO로 처리되지 않은 것이다. 기준자는 20 μ m를 나타낸다. HepG2 세포 및 HCT 116의 세포 당 상대적인 형광 강도의 히스토그램을 이미지 J 프로그램을 이용하여 나타내었다. 결과는 다섯 개의 독립적인 실험의 평균($\pm$ SEM)을 나타낸다 (n=5). 통계적 유의성은 대조군과 비교하여, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 각각에 대하여 ** 및 ***으로 표시하였다.

도 5는 (a) HeLa (b) Caco-2 세포주 내 세포 생존능에 대한 화학식 1로 표시되는 화합물의 효과를 나타낸 것이다. 화학식 1로 표시되는 화합물로 처리된 세포를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 72 시간 동안 다른 농도에서 배양하였다. 30분 동안 MTT 처리 후에, 포르마잔 결정의 가시적인 흡수를 570 nm에서 측정하였다. 청색 막대는 대조군(처리되지 않은 프로브)을 나타내고, 세포 생존능은 대조군 값에 따라 정규화하였다. 결과는 네 개의 독립적인 실험의 평균($\pm$ SEM)을 나타낸다 (n=4). 통계적 유의성은 대조군과 비교하여, $p < 0.05$ 및 $p < 0.001$ 각각에 대하여 * 및 ***으로 표시하였다. [cell viability: 세포 생존능, concentration: 농도, Cont: 대조군]

도 6은 꼬리 정맥내 주사 후 이중이식된 쥐로부터의 화학식 1로 표시되는 화합물의 생체외 형광을 측정한 결과이다. (a) 형광 이미지 및 (b) 상대적인 형광 강도의 히스토그램을 HCT 116 (cox-2 음성) 및 HeLa or HepG2 (cox-2 양성) 세포주를 비교하여 얻었다. 위에서부터 흰색, 청색, 병합 이미지이다. *p < 0.05 vs. COX-2 음성 종양 HCT 116.

도 7은 HDAC와 트립신 처리된 화학식 1로 표시되는 화합물의 UV/Vis 및 형광 스펙트럼을 나타낸다.

도 8의 (a)는 화학식 1로 표시되는 화합물의 공초점 형광 현미경 이미지이다. 화학식 1로 표시되는 화합물의 공초점 형광 현미경 이미지는 인큐베이팅 시간 (2, 5, 10, 20, 30, 60 및 90 분)에 의존한다. 세포들은 화학식 1로 표시되는 화합물(5 μ M)로 처리하고 5 % (v/v) CO₂ 및 95 % (v/v) 습도 및 37 °C에서 인큐베이팅 하였다. 공초점 현미경 이미지는 여기 파장 488 nm (레이저 파워 10 %)이고 필터가 롱 패스 505 nm이며 검출기 게인 값이 850인 조건하에서 획득하였다. (i) HeLa; (ii) HepG2; (iii) HCT 119; (iv) MIA PaCa-2; (v) Caco-2. 기준자는 30 μ m를 나타낸다. (b)는 (i) HeLa, (ii) HepG2; (iii) HCT 119; (iv) MIA PaCa-2; (v) Caco-2의 상대 형광 강도의 히스토그램을 나타낸다. 이들의 상대 형광 강도는 인큐베이팅 시간에 의존한다.

도 9는 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 ¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) 스펙트럼이다.

도 10은 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 ¹³C NMR(CDCl₃, 100 MHz) 스펙트럼이다.

도 11은 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 ESI-MS 스펙트럼이다.

도 12는 HDAC 처리된 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 LTQ-Orbitrap-MS 스펙트럼이다.

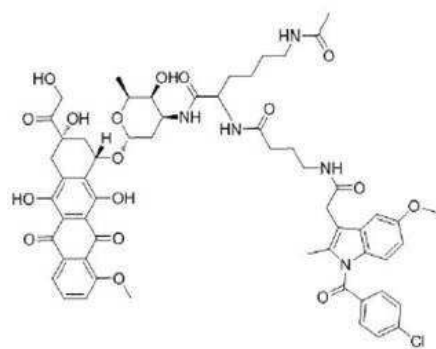
도 13-14는 HDAC 및 트립신 처리된 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 LTQ-Orbitrap-MS 스펙트럼이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

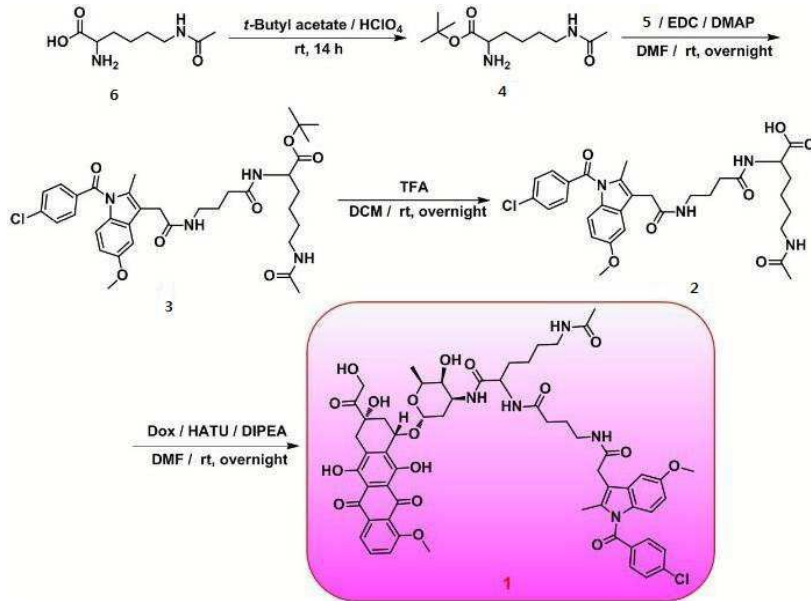
본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제공한다.

[화학식 1]



이때, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물인 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)는 하기 [반응식]의 과정을 통해 합성한다.

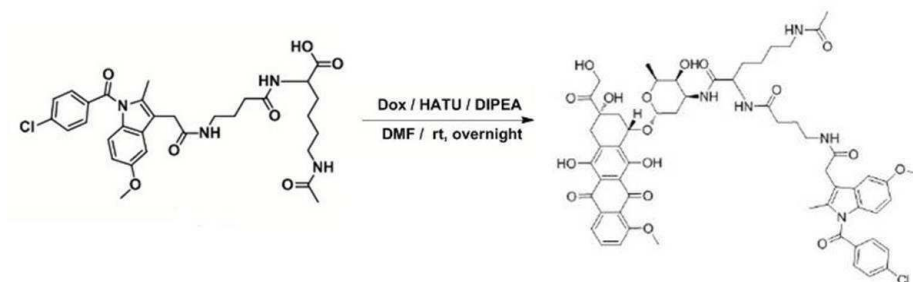
[0030] [반응식]



[0031]

[0032] 따라서, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라 N, N'-디메틸포름아미드 용매하에서 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트(HATU), N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA) 및 독소루비신을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제조하는 방법을 제공한다.

[0033] [반응식 1]

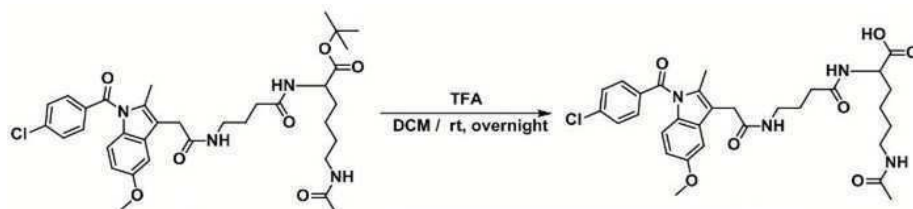


[0034]

[0035] [화학식 2] [화학식 1]

[0036] 이때, 상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 디클로로메탄 용매하에서 트리플루오로아세트산과 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물을 반응시켜 제조될 수 있다.

[0037] [반응식 2]

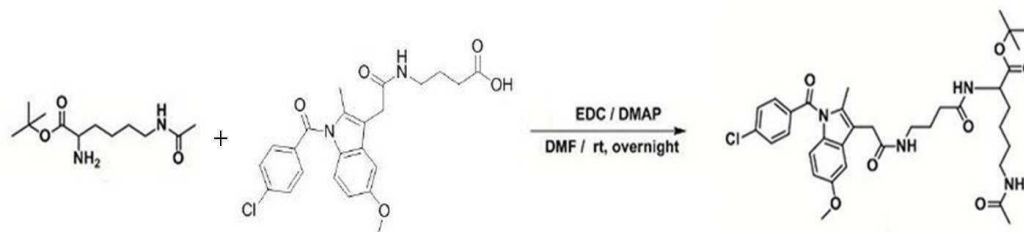


[0038]

[0039] [화학식 3] [화학식 2]

[0040] 또한, 상기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 3]에 따라 N, N'-디메틸포름아미드 용매하에서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보다이미드(EDC), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 하기 [화학식 5]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물과 반응시켜 제조될 수 있다.

[0041] [반응식 3]

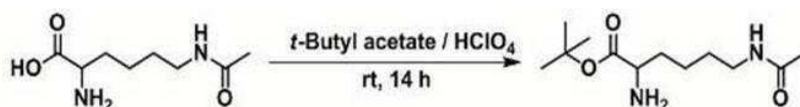


[0042]

[0043] [화학식 4] [화학식 5] [화학식 3]

[0044] 또한, 상기 [화학식 4]로 표시되는 화합물은 하기 [반응식 4]에 따라 하기 [화학식 6]으로 표시되는 화합물로부터 제조될 수 있다(S.-H. Hyun, H.-K. Kim, J.-M. Kim and D. H. Thompson, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 17053)에 따라 합성하였다.)

[0045] [반응식 4]

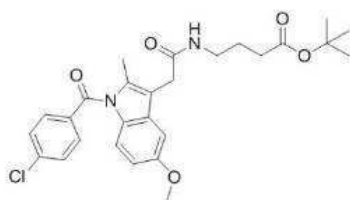


[0046]

[0047] [화학식 6] [화학식 4]

[0048] 또한, 상기 [화학식 5]로 표시되는 화합물은 디클로로메탄 용매하에서 트리플루오로아세트산과 하기 [화학식 7]로 표시되는 화합물을 반응시켜 제조될 수 있다.

[0049] [화학식 7]



[0050]

[0052] 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.

[0054] 실험 방법

[0055] 재료

[0056] 4-아미노부티르산(4-Aminobutyric acid), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), *N,N'*-Diisopropylethylamine (DIPEA)는 알드리치(Aldrich)에서, 벤질 클로로메이트(Benzyl chloromate), 4-Dimethylaminopyridine (DMAP), 인도메타신(Indomethacin), 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid), 과염소산(Perchloric acid)은 TCI에서, *tert*-Buthanol은 SAMSHUN에서, Lys(Ac)-OH는 Bachem에서, *tert*-butyl bromoacetate는 Alfa aesar에서, Doxorubicin은 Carbosynth에서, 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU)는 Irish에서 구매하여 사용하였다. 컬럼 크로마토 그래피는 실리카 겔 60 (70 ~ 230 메쉬)을 고정상으로 사용하여 수행하였다. 분석용 박층 크로마토그래피(Analytical thin layer chromatography)는 60 실리카겔 (0.25 mm 두께의 예비 코팅 시트)을 사용하여 수행하였다. 질량 스펙트럼은 IonSpecHiResESI 질량 분석기로 측정하였다. ¹H NMR 스펙트럼, ¹³C NMR 스펙트럼은 Varian 300 및 400 MHz 분광기로 측정하였다. 인간 자궁 경부암 세포주

HeLa, HepG2 및 Caco-2 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC) (VA, USA)에서 구입하였다. HCT 116 및 MIA PaCa-2 세포주는 한국 세포 은행 (Seoul, KOR)에서 구입하였다. 세포 배양을 위한 모든 시약은 Thermo Fisher Scientific Korea, Ltd. (Seoul, KOR)에서 구입하였다. 6-8주 된 누드 마우스(BALB / c, nu / nu)는 Orientbio Ltd. (KOR 성남)에서 입수하였다.

[0058] 합성

[0059] [화학적식 6]으로 표시되는 화합물은 종래 보고된 절차(M. S. Bjelakovic, D. M. Godjevac and D. R. Milic, Carbon, 2007, 45, 2260.)에 의해 합성하였다.

[0060] [화학적식 4]로 표시되는 화합물은 종래 보고된 문헌(S.-H. Hyun, H.-K. Kim, J.-M. Kim and D. H. Thompson, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 17053)에 따라 합성하였다.

[0061] [화학적식 5]로 표시되는 화합물의 합성 : 디클로로 메탄 (10 ml) 중 [화학적식 7]로 표시되는 화합물 (910 mg, 1.82 mmol)의 용액에 트리 플루오로 아세트산 (2 ml)을 첨가하고, 상기 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용매 및 과량의 TFA를 톨루엔과의 동시 증발을 통해 제거하여 백색 분말의 [화학적식 5]로 표시되는 화합물 (731 mg)를 수득하였다(90.7 %). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.69 (d, J = 8.40 Hz, 2H); 7.50 (d, J = 8.44 Hz, 2H); 7.11 (s, 1H); 6.95 (m, 2H); 6.67 (dd, J = 9.16 Hz, 1H); 3.81 (s, 3H); 3.56 (s, 2H); 3.23 (m, 2H); 2.33 (s, 3H); 2.26 (m, 2H); 1.76 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 175.32, 170.49, 168.45, 156.25, 139.19, 136.03, 134.17, 131.36, 131.04, 131.00, 129.29, 115.14, 113.84, 111.94, 101.50, 55.88, 39.10, 32.15, 31.67, 24.83, 13.71 ppm. ESI-MS m/z ($M - H^+$): calcd 441.1, found 441.1.

[0062] [화학적식 3]으로 표시되는 화합물의 합성 : [화학적식 5]로 표시되는 화합물 (100 mg, 0.23 mmol), EDC (54 mg, 0.34 mmol), DMAP (56 mg, 0.46 mmol) 및 [화학적식 4]로 표시되는 화합물 (84 mg, 0.34 mmol)을 N, N'-디메틸 포름아미드(10 ml)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 용매를 감압 하에 제거 및 물로 희석하고, 에틸 아세테이트 (3 X 10 ml)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 진공 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (DCM 중의 10 % MeOH)로 정제하여 93.6 mg (60.8 %)의 [화학적식 3]으로 표시되는 화합물을 수득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.68 (d, J = 8.60 Hz, 2H); 7.49 (d, J = 8.56 Hz, 2H); 6.91 (m, 2H); 6.70 (dd, J = 9.02 Hz, 1H); 6.60 (s, 1H); 6.40 (s, 1H); 6.37 (s, 1H); 6.13 (s, 1H); 4.31 (m, 1H); 3.81 (s, 3H); 3.62 (s, 2H); 3.27 (m, 2H); 3.20 (m, 2H); 2.37 (s, 3H); 2.18 (m, 2H); 1.94 (s, 3H); 1.75 (m, 4H); 1.61 (m, 2H); 1.44 (s, 9H); 1.33 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 172.60, 171.87, 170.78, 170.62, 168.57, 156.40, 139.69, 136.56, 133.87, 131.42, 131.17, 130.64, 129.40, 115.35, 113.09, 112.25, 101.23, 82.22, 55.99, 52.66, 39.19, 33.58, 32.42, 32.03, 29.89, 29.05, 28.19, 25.48, 23.41, 22.63, 13.57 ppm. ESI-MS m/z ($M + \text{Na}^+$): calcd 691.3, found 691.4

[0063] [화학적식 2]로 표시되는 화합물의 합성: 디클로로 메탄 (5 ml) 중 [화학적식 3]으로 표시되는 화합물 (93 mg, 0.14 mmol)의 용액에 트리 플루오로 아세트산 (1 ml)을 첨가하고, 상기 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 용매 및 과량의 TFA를 톨루엔과의 동시 증발을 통해 제거하여 황색 분말의 [화학적식 2]로 표시되는 화합물 (68 mg)을 수득하였다(79.1 %). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.68 (d, J = 8.36 Hz, 2H); 7.49 (d, J = 8.24 Hz, 2H); 6.95 (d, J = 2.20 Hz, 1H); 6.86 (d, J = 8.96 Hz, 1H); 6.67 (dd, J = 8.76 Hz, 1H); 4.17 (t, J = 7.76 Hz, 1H); 3.81 (s, 3H); 3.59 (s, 2H); 3.36 (m, 2H); 3.22 (m, 2H); 2.36 (s, 3H); 2.20 (t, J = 6.20 Hz, 2H); 1.92 (s, 3H); 1.72 (m, 2H); 1.59 (m, 2H); 1.34 (m, 2H); 1.31 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 173.45, 171.82, 171.57, 168.81, 156.17, 156.15, 139.40, 136.46, 133.76, 131.30, 131.07, 130.78, 129.30, 115.10, 113.17, 111.68, 101.52, 76.99, 55.79, 48.43, 39.09, 38.97, 33.29, 31.85, 31.77, 28.71, 25.39, 22.81, 22.55, 13.26 ppm. ESI-MS m/z ($M + H^+$): calcd 613.24, found 613.4, m/z ($M + \text{Na}^+$): calcd 635.2, found 635.4

[0064] [화학적식 1]로 표시되는 화합물의 합성: [화학적식 2]로 표시되는 화합물 (250 mg, 0.41 mmol), 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) (189 mg, 0.49 mmol), N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) (64 mg, 0.49 mmol) 및 독소루비신 (288 mg, 0.49

mmol)을 N, N'-디메틸 포름아미드(20 ml)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 용매를 감압 하에 제거 및 물로 희석하고, 에틸 아세테이트 (3 X 10 ml)로 추출하였다. 유기층을 무수 황산 나트륨으로 건조시키고 진공 농축시켰다. 잔류물을 HPLC로 정제하여 110 mg (23.8 %)의 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 수득하였다. ¹H-NMR (400 MHz, CDC13): δ 7.96 (m, 1H); 7.76 (m, 1H); 7.66 (d, J = 9.68 Hz, 2H); 7.48 (d, J = 8.28 Hz, 2H); 7.38 (d, J = 8.36 Hz, 1H); 6.89 (s, 1H); 6.83 (m, 2H); 6.66 (m, 1H); 6.33 (br, 1H); 6.15 (br, 1H); 5.99 (br, 1H); 5.54 (br, 1H); 5.19 (br, 1H); 4.75 (s, 2H); 4.66 (br, 1H); 4.26 (br, 1H); 4.17 (br, 1H); 4.05 (br, 3H); 3.97 (s, 3H); 3.78 (s, 3H); 3.69 (s, 1H); 3.58 (m, 2H); 3.48 (s, 1H); 3.25 (m, 2H); 3.13 (m, 4H); 2.95 (m, 1H); 2.32 (s, 3H); 2.15 (m, 4H); 1.94 (br, 2H); 1.89 (s, 3H); 1.59 (br, 6H); 1.42 (br, 2H); 1.27 (m, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDC13): 214.14, 186.77, 186.55, 173.00, 172.41, 171.19, 171.05, 168.58, 161.15, 160.94, 156.30, 155.55, 139.70, 136.64, 135.84, 135.56, 135.38, 134.17, 133.77, 131.42, 131.38, 131.09, 130.70, 130.67, 129.40, 120.74, 119.86, 118.55, 115.26, 113.09, 112.99, 111.90, 111.51, 101.54, 100.99, 69.38, 68.84, 68.04, 67.75, 65.69, 56.61, 56.01, 55.98, 53.27, 39.01, 38.88, 35.79, 34.09, 33.88, 33.24, 32.21, 29.35, 25.57, 25.22, 23.35, 22.67, 17.14, 13.58 ppm. ESI-MS m/z (M - 2H⁺): calcd 1136.4, found 1136.4, m/z (M + 2H²O - H⁺): calcd 1172.4, found 1172.4.

[0066] UV/Vis 및 형광측정

[0067] 모든 형광 및 UV / Vis 흡수 스펙트럼을 RF-5301PC 및 S-3100 분광 광도계에서 각각 기록하였다. 형광 측정은 표준 HDAC(cayman) 및 트립신 (welgene)에 의해 수행되었다. [화학식 1]로 표시되는 화합물의 스톡용액 (1 mM)을 DMSO에서 제조하였다. HDAC 완충액 중 1 μM [화학식 1]로 표시되는 화합물 용액을 90 분 동안 HDAC1 양성 대조군과 함께 인큐베이팅 하였다. 다음으로, HDAC 처리 된 화합물 1에 트립신을 첨가하고 0 내지 24 시간 동안 인큐베이팅하였다. 499nm에서 여기 슬릿 폭 5, 방출 슬릿 폭 5 nm으로 여기(excitation)시켰다.

[0069] 세포 배양

[0070] HepG2 및 HCT 116 세포를 RPMI 배지 1640에서 배양하였다. HeLa 및 MIA PaCa-2 세포는 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM))에서 배양하였다. Caco-2 세포는 Minimum Essential Media (MEM)에서 배양하였다. 모든 배지에는 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ 및 95 % (v/v) 습도에서 10 % (v/v) FBS, 페니실린 (100 units /mL) 및 스트렙토 마이신(100 μg /ml)이 공급되었다.

[0072] 공초점 현미경 이미징(Confocal microscopy imaging)

[0073] 영상화 하루전에, 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ 함유 가습 분위기에서 인큐베이팅된 세포들을 Coverglass Bottom Dish (SPL Lifesciences Co., Ltd.)에 분주하였다. 세포 이미지는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Zeiss LSM 510, Zeiss, Oberko, Germany)을 사용하여 얻었다.

[0075] 생체의 형광 실험

[0076] 기하 급수적으로 성장하는 HCT116, HeLa 및 HepG2 세포를 수확하고, 4×10⁶ cells/100 μl로 조정하고, 누드 마우스 각각의 우측 및 좌측 겨드랑에 피하 주사하였다. 접종 2주 후, 마우스를 HCT116/HeLa 및 HCT116/HepG2와 같이 두 그룹(6 마리/그룹)으로 무작위로 나누었다. 각 군에는 2 mM / kg 농도의 꼬리 정맥 주사로 1 일 동안 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 투여하였다.

[0078] 결과 및 고찰

[0079] 본 발명에서는 종양 표적 치료를 위한 신규의 인도메타신-유도 약물 전달 접합체(IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제공한다. 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물, 즉 IGDDC는 상기 [반응식]에 나

타넨 바와 같이 세 가지 부분을 포함하는데, 이는 표적 효과를 향상시키기 위하여 의도적으로 통합된 것이다. 첫 번째 부분은 NSAID(비스테로이드성 항-염증성 약물)인 인도메타신을 암 표적 유닛으로 구성된다. 두 번째 부분은 HDAC에 의한 탈아세틸화 후에 라이신 모이어티가 노출될 수 있고, 나아가 약물을 방출하기 위하여 그의 아미드 결합이 CTSL에 의하여 선택적으로 분해되는 암 풍부 HDAC 및 CTSL 활성을 통한 약물-방출 시스템으로 구성되어 있다. 세 번째 부분은 효과적인 항암 치료를 위한 토포이소머라아제 억제제인, 독소루비신(DOX)이다. 이러한 구성을 통해 IGDDC 시약은 암세포에 의해 우선적으로 취해지고, 뒤이어 수반되는 형광 증강과 함께 DOX 방출을 야기하는 내재적인 HDAC 및 CTSL 활성에 의해 단계적으로 활성화된다. 본 발명에서는 상기 IGDDC의 시험관 내 및 생체의 암세포 표적 능력을 DOX 모이어티의 현장 형광 증강에 의해 모니터링 하였다.

[0080]

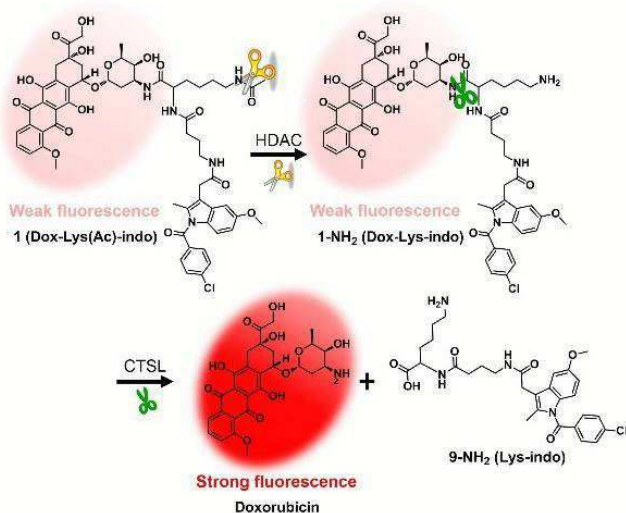
[화학적식 1]로 표시되는 화합물, 즉 IGDDC는 전술한 [반응식]에 따라 합성되었다. DMF 내에서의 인도메타신의 EDC 결합에 따라 [화학적식 7]로 표시되는 화합물 (88% 수율)에 뒤이어 [화학적식 5]로 표시되는 화합물(90%)이 생성되며, TFA/DCM 내 삼차-부틸기 탈보호를 야기한다. 삼차부틸아세테이트/ HC10_4 를 이용한 Lys(Ac)-OH의 선택적인 산 보호 (26% 수율) 및 [화학적식 5]로 표시되는 화합물과의 EDC 결합을 통해 [화학적식 3]으로 표시되는 화합물 (60% 수율)을 생성한다. 그 다음의 탈보호 반응에 뒤이은 HATU 결합을 통한 DOX와의 접합을 통해 본 발명에 따른 [화학적식 1]로 표시되는 화합물이 생성된다. 모든 화합물은 ^1H , ^{13}C NMR 분광학 및 ESI-MS 분광학에 의해 잘 확인되었다.

[0081]

단계적인 HDAC 및 CTSL 작용 후 [화학적식 1]로 표시되는 화합물로부터의 약물 방출 메커니즘을 자외선-가시광선 및 형광 현미경관찰에 의해 예상되는 스펙트럼의 변화를 통해 모니터링하였다. [화학적식 1]로 표시되는 화합물은 499 nm에서 넓은 흡수띠와 590 nm에서 약한 방출띠를 나타내었다(도 7). 용액에 HDAC (1.25 mM)에 뒤이어 트립신 (500 BAEE 단위/ml)(CTSL(D. Wegener, F. Wirsching, D. Riester and A. Schwienhorst, *Chem. Biol.*, 2003, **10**, 61.)에 대한 유사한 프로테아제 활성을 가짐)의 첨가 후, 590 nm에서 형광 강도가 시간-의존적인 방법으로 증강되었는데, 대부분 [화학적식 1]로 표시되는 화합물로부터의 DOX 방출 때문이다(도 1a). 그러나 이러한 형광 변화는 HDAC 및 트립신 홀로는 어느 쪽이든 관찰되지 않았다(도 1b). 이러한 결과는 첫 번째 단계에서 HDAC 활성에 의해 아세틸기가 선택적으로 분해되고, DOX가 수반되는 형광 증강과 함께 트립신에 의해 방출되는 것으로, 본 발명에서 의도한 하기 [독소루비신 방출 메커니즘]과 일치하는 결과이다.

[0082]

[독소루비신 방출 메커니즘]



[0083]

[0084]

다음으로, 본 발명에서는 [화학적식 1]로 표시되는 화합물 용액에 HDAC 및 CTSL 첨가 후 질량 분광 분석을 수행하였다. [화학적식 1]로 표시되는 화합물은 1136.4 m/z에서 단일 분자 이온 피크를 가진다. 그러나, HDAC 하나만의 추가 후의 질량 스펙트럼은 1095.649에서 피크를 나타냈는데, 이는 1-NH₂ (1은 [화학적식 1]로 표시되는 화합물)의 m/z와 일치하며, 나아가 그 다음으로 트립신을 첨가하자, 543.201 및 571.140에서 피크를 나타냈는데, 이는 Dox 및 9-NH₂ (9는 [화학적식 9]로 표시되는 화합물)의 m/z와, 각각 일치한다(도 9 내지 13). 나아가, HPLC 데이터를 통해 [화학적식 1]로 표시되는 화합물이 DOX를 방출하기 위하여 세포 추출물에 의해 분해된 것을 확인하였다(도 14). 따라서 이러한 결과로부터, [화학적식 1]로 표시되는 화합물이 세포 내 두 가지 효소, HDAC 및 트립신 혹은 CTSL의 단계적인 작용 후에만 DOX를 방출한다는 것을 확인하였다.

[0085] 암세포 표적 능력에 대한 [화합식 1]로 표시되는 화합물 내의 인도메타신(COX-선택적 항-염증성 약물)의 중요한 역할을 확인하기 위해, 선택된 암세포주에 대하여 형광 현미경 연구를 수행하였다. 세포들을 [화합식 1]로 표시되는 화합물과 함께 90분 동안 배양한 후, 방출된 DOX의 형광 강도를 기록하였다(도 2). COX-2 양성 세포주(HeLa, HepG2)에서, 형광 강도가 현저히 향상되었고, 한편 다른 세포주에서는 약하게 증가하거나 거의 증가하지 않았다(도 2b). 형광 증강 순서는 HeLa, HepG2 > HCT 116, MIA PaCa-2 > Caco-2로 관찰되었는데, 세포 내 향상된 HDAC 및 CTSL 활성뿐만 아니라 증가된 COX-2 발현(표 1)(B. Chen, Z.-H. Hou, Z. Dong and C.-D. Li, *Biomed. Res. Int.*, 2015, DOI 10.1155/2015/829513)과 일치한다. 시간-의존적인 형광 변화를 도 8에 나타내었다. 이러한 모든 결과들은 [화합식 1]로 표시되는 화합물 내의 인도메타신이 현저한 종양 표적 능력을 나타낸다는 것을 뒷받침한다. 나아가 HeLa 및 HepG2 세포주 내 증가된 형광 강도를 통해 [화합식 1]로 표시되는 화합물의 효율적인 활성화를 확인하였다.

표 1

Cell line	Origin	Enzyme Activity		
		HDAC	CTSL	COX-2
HeLa	Cervical cancer	⁺ ³	⁺ ³	⁺ ⁴
HepG2	Liver cancer	⁺ ³	⁺ ³	⁺ ⁴
HCT 116	Colon cancer	⁺ ³	⁺ ³	⁻ ⁵
MIA PaCa-2	Pancreatic cancer	⁺ ³	⁺ ³	⁻ ⁵
Caco-2	Colon cancer	⁻ ³	⁻ ³	⁻ ⁶

[0086]

[0087] 인도메타신의 표적 능력을 추가적으로 확인하기 위하여, 경쟁 연구를 수행하였다(도 3a). 그 결과, HepG2를 150 μ M까지 다양한 농도의 인도메타신으로 1시간 동안 전처리하였을 때, [화합식 1]로 표시되는 화합물에 대한 형광 강도가 점차적으로 줄어들었고(도 3a), 반면 HCT 116, COX-2 음성 세포주에 의한 강도는 유사한 조건 하에서 변동이 없었다. 두 가지 실험에 대한 평가 결과는 도 3b 및 3c에서 입증되었다. 이러한 결과를 통해 [화합식 1]로 표시되는 화합물 내 인도메타신 모이어티가 COX-2 양성 암-표적 능력을 나타낸다는 것을 확인하였다.

[0088]

[화합식 1]로 표시되는 화합물로부터의 DOX의 방출이 세포 내 HDAC 및 CTSL 활성에 따른 것인지 조사하기 위하여, 잘 알려진 HDAC 억제제(트리코스타틴 A, TSA) 및 CTSL 억제제 (Z-Phe-Try-CHO)를 이용하여 억제 연구를 수행하였고, 공초점 현미경 결과를 도 4에 나타내었다. 세포를 1시간 동안 200 ng/ml TSA(M. S. Bjelakovi., D. M. Godjevac and D. R. Mili., *Carbon*, 2007, **45**, 2260.)로 전처리하고, 처리되지 않은 세포와 비교할 때, 강도가 HepG2 및 HCT 116 세포주에 대해서 각각 약 40 및 50 % 감소하였다(도 4a). 유사하게, 세포에 200 μ M Z-Phe-Try-CHO(M. S. Bjelakovi., D. M. Godjevac and D. R. Mili., *Carbon*, 2007, **45**, 2260.) 처리시 형광 강도가 각각 50 및 60 % 감소하였다(도 4b). 종합하여, 이러한 결과들은 [화합식 1]로 표시되는 화합물이 정상세포에 비해 높은 HDAC 및 CTSL 활성을 가지는 암세포에 대해 더 높은 선택성을 가진다는 것을 증명한다.

[0089]

[화합식 1]로 표시되는 화합물의 항암 약물 효과를 확인하기 위하여, HeLa 및 Caco-2 세포에 처리하였다(도 5). [화합식 1]로 표시되는 화합물은 농도를 1 내지 200 μ M로 증가시키에 따라 양성 세포(HeLa)에 대해 현저히 높은 세포독성을 나타내었다. 반대로, [화합식 1]로 표시되는 화합물의 세포독성은 유사한 조건에서 Caco-2 세포에 대해서는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 [화합식 1]로 표시되는 화합물이 효소 양성 세포에 선택적으로 이동한다는 것을 증명한다.

[0090]

마지막으로, 살아있는 동물 내 [화합식 1]로 표시되는 화합물의 종양 표적 능력을 시험하기 위하여, 피하로 주사된 종양 세포를 이용한 이종이식 쥐 모델을 이용하였다. 세포주로는 인간 대장암 HCT 116 (COX-2 음성), 인간 자궁경부암 HeLa (COX-2 양성) 및 인간 간세포암종 HepG2 (COX-2 양성)를 사용하였다. [화합식 1]로 표시되는 화합물의 꼬리-정맥 주사 후, 형광 강도의 분포를 생체외에서 분석하였다(도 6). 도 5에 나타낸 바와 같이, HCT 116 (COX-2 음성)과 비교하여, COX-2 양성 세포 (HeLa 및 HepG2)로 주사된 쥐의 해부된 종양 조직으로부터 강한 형광 신호가 관찰되었다. COX-2 음성 종양 (HCT 116)과 비교하여, 형광 신호가 4.3 ± 0.1 (HeLa) 및 3.8 ± 0.4 (HepG2) 배까지 현저히 향상되었다. 이러한 데이터는 COX-2 음성 조직에 비해 더 적절하게 COX-2 과발현된

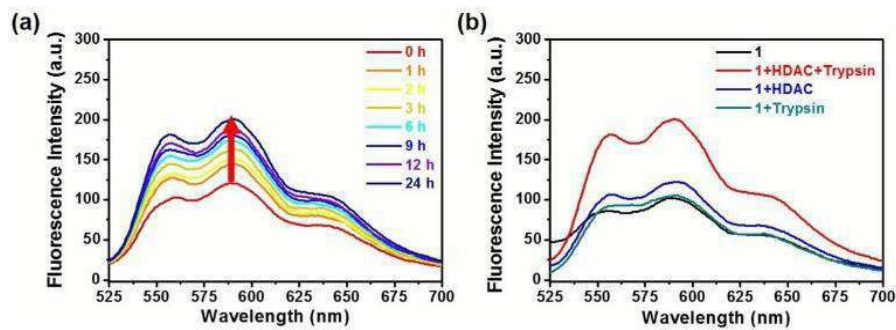
종양을 표적하는데 있어서의 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 능력을 증명해준다.

[0091]

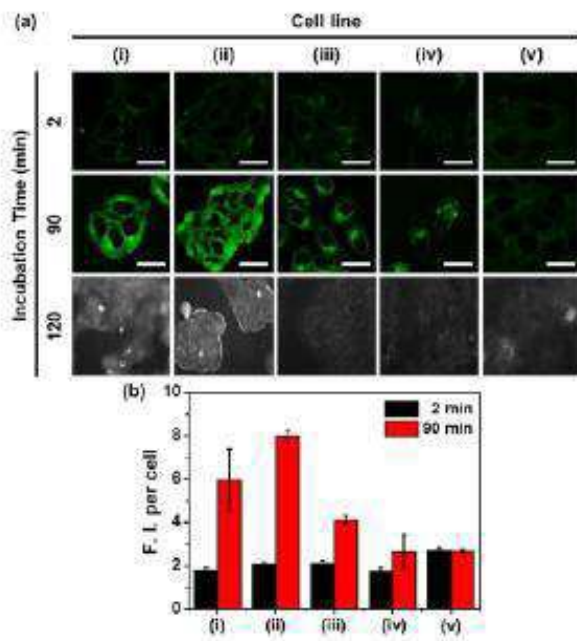
결론적으로, 본 발명에서는 보다 높은 수준의 COX-2, HDAC, 및 CTSL 활성을 나타내는 악성 암세포에 대한 치료제의 선택적 전달을 위한 [화학식 1]로 표시되는 신규의 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제공한다. 전술한 결과들을 통해 본 발명에서는 HDAC 및 CTSL-유도 약물 방출 메커니즘과 함께 암-표적 약물 전달 시스템에 대한 유도 유닛으로써 NSAID의 가능성을 증명하였다. 또한, 본 발명에 따른 암 표적용 약물 전달 시스템은 정상 세포에 비해서 암 세포에 대해서만 높은 선택성을 가지며, 암 세포에서 높은 농도로 존재하는 히스톤 디아세틸라아제(HDAC) 및 시스테인 카텝신 L(CTSL)에 의해 단계적으로 활성화됨으로써 약물 방출 효율이 향상된다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 인도메타신 유도 약물 전달 접합체(Indomethacin guided drug delivery conjugate, IGDDC)를 포함하는 암 표적용 약물 전달 시스템은 광범위한 소분자 암 화학치료제 개발에 새로운 접근 방법을 제시할 것으로 기대된다.

도면

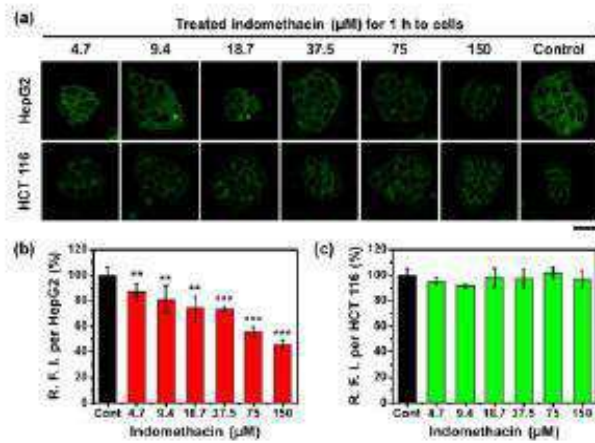
도면1



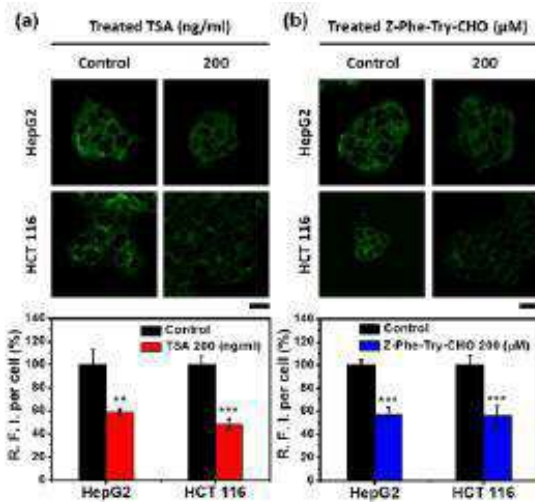
도면2



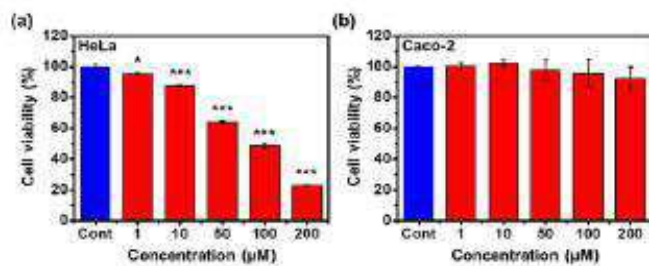
도면3



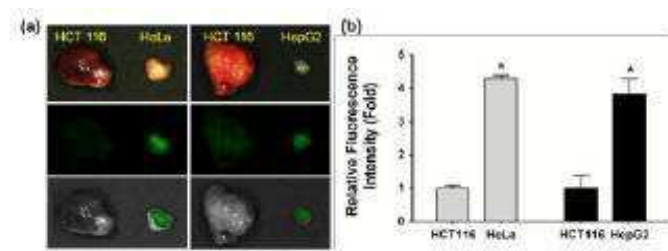
도면4



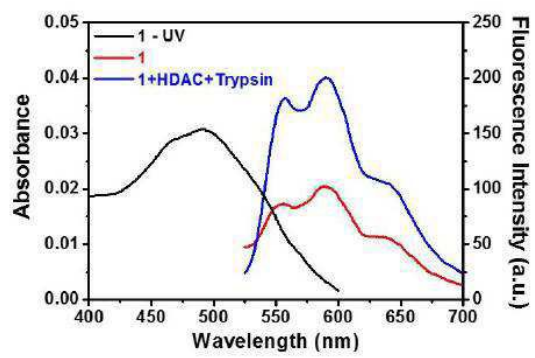
도면5



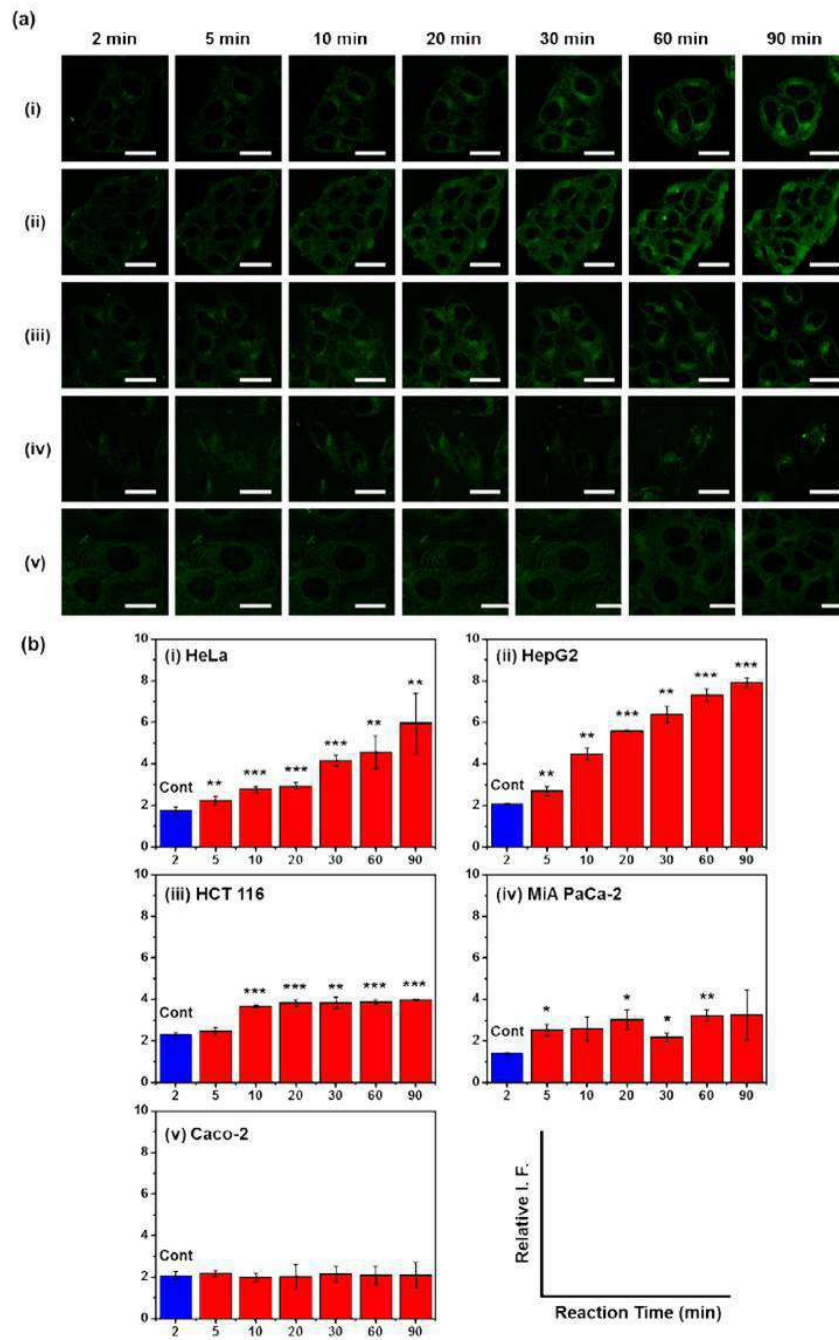
도면6



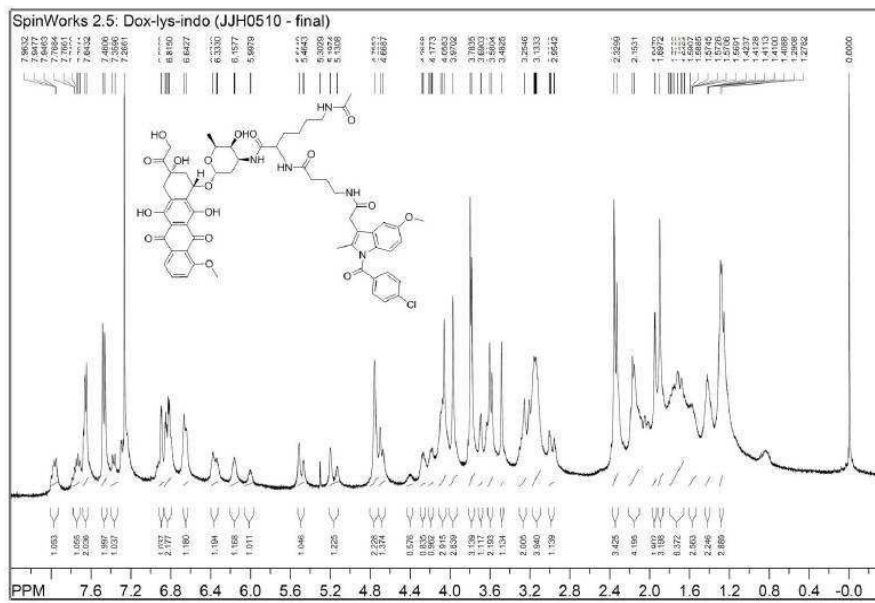
도면7



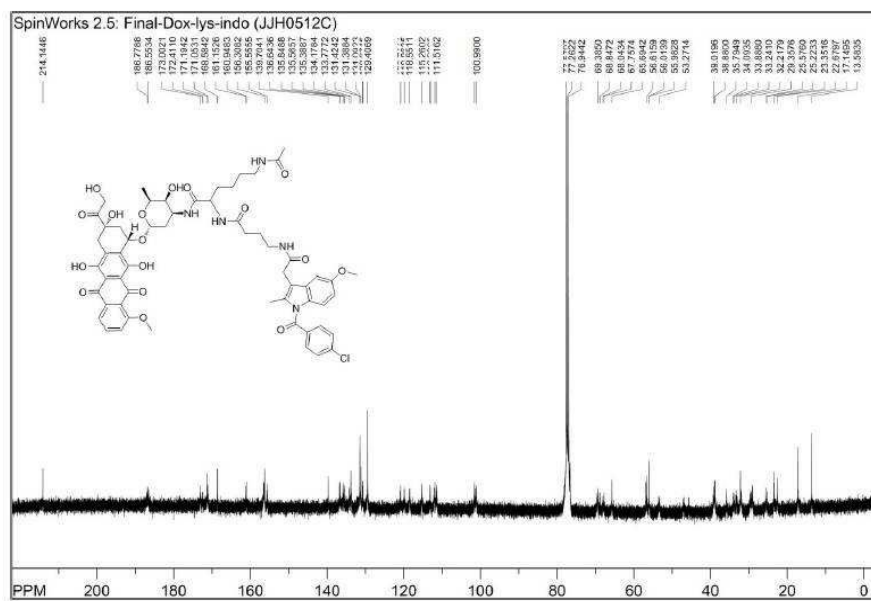
도면8



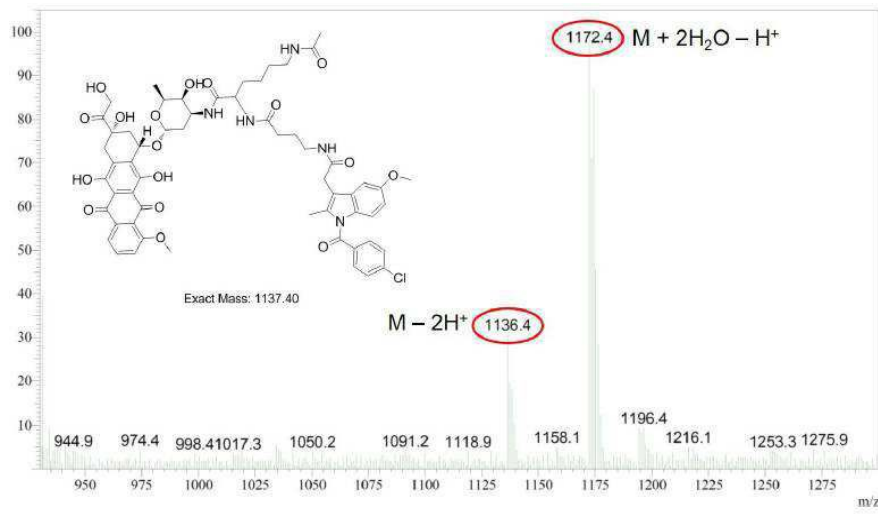
도면9



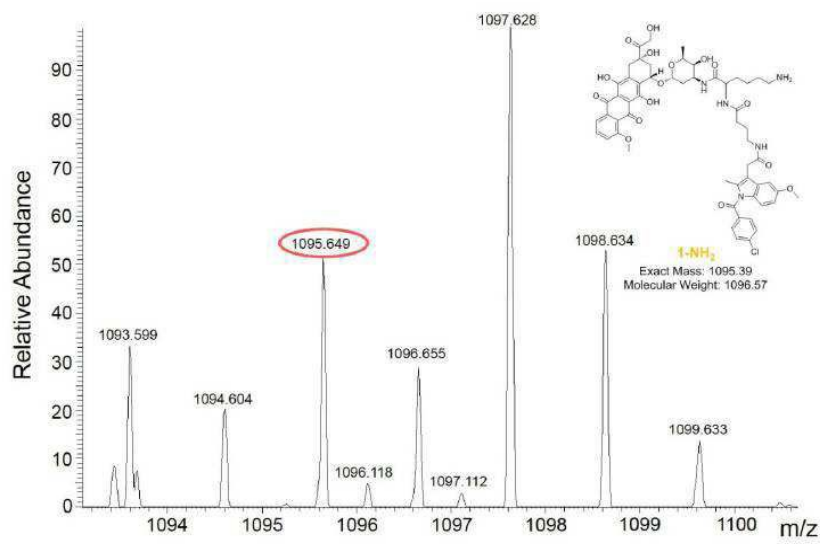
도면10



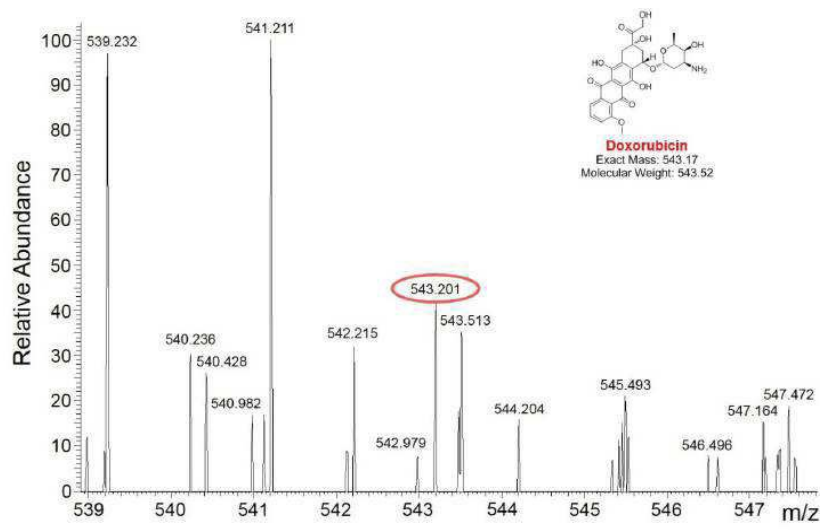
도면11



도면12



도면13



도면14

