(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0034439
(43) 공개일자 2022년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 491/22 (2006.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 491/22 (2013.01)
A61K 31/4745 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0116802
(22) 출원일자 2020년09월11일
심사청구일자 2020년09월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
서울특별시 성북구 안암로 145
아밋 샤르마
서울특별시 성북구 고려대로 45, 202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

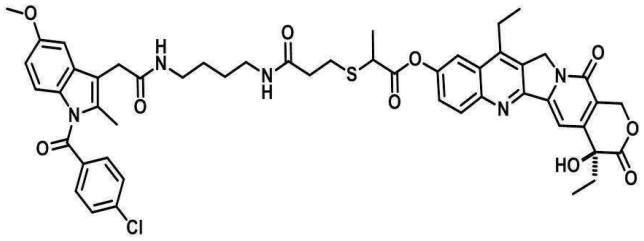
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **이종 종양을 표적화하기 위한 항암 약물전구체**

(57) 요 약

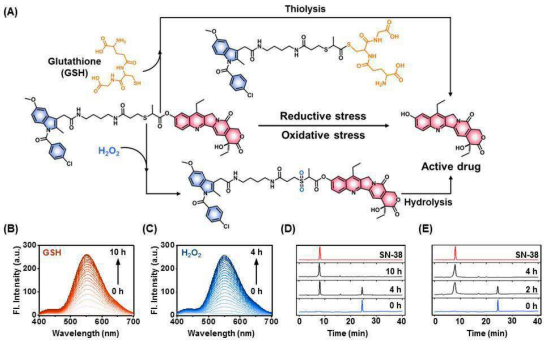
본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 항암 약물전구체에 관한 것이다:

[화학식 1]



.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
(72) 발명자
원미애
서울특별시 성북구 안암로 145
이민구
서울특별시 성북구 솔샘로25길 28, 107동 402호

지성길
경기도 고양시 일산서구 대화2로 68, 206동 1202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711074218
과제번호	2018R1A3B1052702
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명	정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

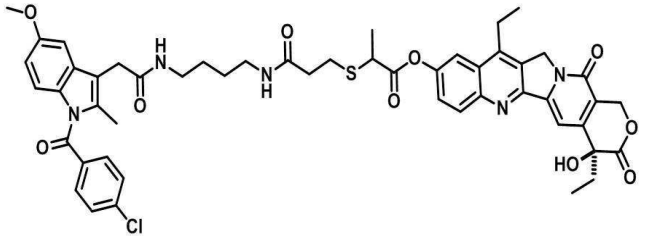
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 항암 약물전구체:

[화학식 1]



.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 사이클로옥시게나아제-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)가 과발현된 암세포에 특이적으로 흡수되는 것을 특징으로 하는 항암 약물전구체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 암세포는 SW620 세포 또는 LoVo 세포인 것을 특징으로 하는 항암 약물전구체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물은 H_2O_2에 의해 유도된 산화적 스트레스 환경에서 H_2O_2에 선택적으로 반응하여 SN-38을 방출하는 것을 특징으로 하는 항암 약물전구체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화합물은 글루타티온(Glutathione, GSH)에 의해 유도된 환원적 스트레스 환경에서 글루타티온에 선택적으로 반응하여 SN-38을 방출하는 것을 특징으로 하는 항암 약물전구체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이질적 성질의 이종 종양을 표적화하기 위한 항암 약물전구체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신규한 암 치료제 개발에 있어 고비용, 오랜 개발기간, 낮은 성공률과 같은 문제로 인해, FDA에 기승인된 항암제를 수정하는 전략이 각광받고 있다. 이러한 수정 전략은 기존 항암제의 부작용을 최소화시킬수 있으며 임상효능을 개선시킬 수도 있다. 궁극적으로, 이는 암환자의 생존률 연장과 같은 향상된 결과물을 가져올 수 있다. 특히, 이러한 수정 전략은 원하는 부위를 타겟으로 하는 화학 약물의 전달력을 향상시키는데 효과적일 수 있다(비특허문헌 1). 지금까지, 악성 종양으로의 진행과 관련된 복잡한 경로 및 암의 발달과정에 대한 이해에 있어 상

당한 진전이 있었으며, 이를 토대로 원하는 특정부위로의 세포독소 전달을 표적화하기 위한 수많은 혁신적인 전략을 세울 수 있다. 일반적으로, 이러한 표적화는 전달 및 방출에 효과적인 바이오마커를 포함하는 담체와 약물 또는 전구약물을 결합시킴으로써 행해지며, 관련하여, 기존 약물에 특정한 작용기를 도입하여 종양 내 축적 효율을 높이거나 종양 내 선택적인 반응을 통해 약물을 활성화시키는 약물전달시스템의 개발이 최근 암치료분야의 주요 연구분야로 대두되고 있다.

[0003] 한편, 암세포는 거의 모든 측면에서 뚜렷한 이종성을 나타낸다(비특허문헌 2). 정상세포와 비교해보았을 때, 대부분의 암세포는 세포 내 글루타티온(GSH) 수준의 증가로 인해 강한 환원성 환경에서 존재한다. 이러한 특징은 대개 화학치료의 조건 하에서 강화된다. 모순되어 보이지만, 수많은 암들은 다양한 활성산소종(ROS)의 과생성으로 인한 산화적 스트레스에 의해 특징지어진다. 상승된 환원적 및/또는 산화적 스트레스는 상이한 종류의 종양(종양 간)에서 존재할 수 있으며, 동일한 암세포 내의 하위세포기관 수준을 포함하여 동일한 종양 내, 다른 진행 단계에서 공동으로 존재할 수도 있다.

[0004] 이처럼, 암세포는 뚜렷한 이종성을 나타내고 있는 반면, 종래 연구된 약물전달시스템은 대부분 약물전구체의 단일 활성화 메커니즘에 의존하기 때문에 이질적 성질의 종양의 일부만을 타겟할 수 있고, 결과적으로 약물내성을 촉진할 수 있다는 문제점이 존재한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011, 144, 646-674.

(비특허문헌 0002) Visvader, J. E. Cells of origin in cancer. Nature 2011, 469, 314-322.

발명의 내용

해결하려는 과제

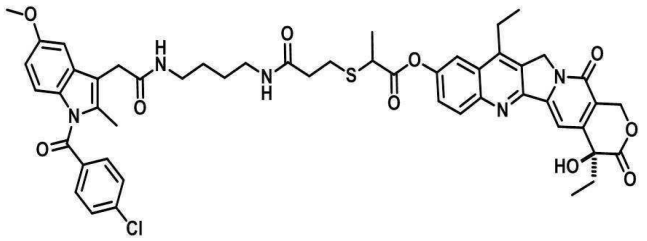
[0006] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명에서는 이질적 성질의 이종 종양을 동시에 타겟 할 수 있는 듀얼 활성화 메커니즘이 도입된 항암 약물전구체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0008] 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 항암 약물전구체를 제공한다:

[0009] [화학식 1]

[0010] 

.

[0011] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 사이클로옥시게나아제-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)가 과발현된 암세포에 특이적으로 흡수되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012] 이때, 상기 암세포는 SW620 세포 또는 LoVo 세포일 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 H_2O_2에 의해 유도된 산화적 스트레스 환경에서 H_2O_2에 선택적으로 반응하여 SN-38을 방출하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 글루타티온(Glutathione, GSH)에 의해 유도된 환원적 스트레스 환경에서 글루타티온에 선택적으로 반응하여 SN-38을 방출하는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 항암 약물전구체는 COX-2가 과발현된 암세포에 대해 높은 선택성을 가지며, 산화적 스트레스 및 환원적 스트레스 환경 모두에서 효과적으로 약물을 방출할 수 있는바, 이질적 성질의 이종 종양을 동시에 표적화할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항암 약물전구체는 약물을 방출하는 과정에서 암세포 내 H_2O_2와 GSH를 소모함에 따라 암세포의 생존신호경로에 관여하는 단백질 (AKT, p38, IL-6, VEGF, 및 TNF-α)의 발현을 줄이고 항염증 반응에 관여하는 단백질(IL-10)의 발현을 증가시킴으로써 약물 내성을 극복하고, 우수한 항암 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 환원 및 산화 스트레스 하의 전구약물 K1([화학식 1]로 표시되는 화합물)의 활성화 모드를 개략적으로 나타낸 것이다. (A)에 나타난 바와 같이, 환원 스트레스 하에서, 글루타티온(GSH)은 SN-38 연결된 에스테르 작용기에서 티올화(thiolysis)를 통해 활성약물 SN-38의 동시 방출과 함께 중간체를 형성한다. 산화적 스트레스 하에서, 화학적 링커인 설파이드 작용기는 설폰/설폭사이드 모이어티로 산화되고, 가수분해시 활성 약물 SN-38이 방출되면서 소수성 부위가 친수성으로 전환된다. (B) 및 (C)는 PBS에서 GSH (5 mM, 30분)(B) 및 H_2O_2 (10 μM, 10분)(C)와 함께 K1(10 μM) 배양시 SN-38 방출에 따른 시간 의존적 형광 강도 변화를 나타낸 것이다(37℃, λ_{ex} = 365 nm). (D) 및 (E)는 PBS (37℃) 중 (D) GSH (5 mM), (E) H_2O_2 (10 μM) 및 SN-38로 처리한 후 다양한 시간 간격으로 기록된 K1 (10 μM)의 고성능 액체 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 2는 종양세포 생존력에 대한 K1과 K2의 효과 및 COX-2 발현 정도와의 관련성을 나타낸 것이다. (A)는 암세포 세포 독성에 대한 K1 및 K2의 효과를 나타낸 것이다. 48시간 동안 세포를 K1 및 K2(0, 1, 5, 10 nM)로 처리하였다. WST 분석법을 통해 세포생존력을 평가하였다 (mean±SD, n=3, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$, n.s., not significant). (B)는 암세포 성장에 대한 K1 및 K2의 효과를 나타낸 것이다. 5일 동안 세포를 K1(1 nM) 및 K2(1 nM)로 처리하였고, 크리스탈바이올렛 용액으로 염색시켰다. (C)는 인간정상세포 및 암세포에서 세포생존력에 대한 K1의 효과를 나타낸 것이다. 48시간 동안 지시된 용량의 K1으로 세포를 처리하였다. WST-1 분석법 사용하여 세포 생존력을 측정하였다(mean±SD, n=3, $^{*}p < 0.05$). (D) 및 (E)는 각각 인간정상세포 및 암세포에서 K1의 세포내 흡수 정도를 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다. 세포된 지시된 시간과 용량의 K1으로 처리하였으며, SpectraMAX I3을 사용하여 형광 세기를 측정하였다.

도 3은 세포내 산화 또는 환원 스트레스 하에서 K1의 효과를 나타낸 것이다. (A)는 LoVo 세포에서 H_2O_2 (50 μM) 및 NAC (50 μM) 전처리에 따른 K1의 형광 강도를 나타낸 것이다(mean±SD, n=3, $^{*}p < 0.01$). (B) 암세포 성장에 대한 K1 및 SN-38의 효과를 나타낸 것이다. LoVo 세포를 GSH siRNA 또는 대조군 siRNA로 형질 감염시키고, NAC (50 μM)으로 처리한 후에 지시된 용량의 K1 및 SN-38로 처리하였다. 크리스탈바이올렛 용액으로 세포를 염색하였다. (C)는 암세포 세포독성에 대한 K1 및 SN-38의 영향을 나타낸 것이다. K1 및 SN-38(0, 5, 10 nM)으로 48시간 동안 LoVo 세포를 처리하였다. WST 분석법으로 세포 생존력을 측정하였다 (mean±SD, n= 3, $^{*}p < 0.01$). (D)는 산화적 스트레스 하에 암세포 생존 및 세포사멸에 대한 K1의 영향을 나타낸 것이다. 대조군 또는 GSH 녹다운된 LoVo 세포를 48시간 동안 지시된 용량의 K1 및 SN-38로 처리하였다. 암 생존 단백질(phospho AKT 및 phospho p38)의 발현 수준을 웨스턴블롯을 통해 측정하였다. 절단 PARP(cleaved PARP) 및 절단 카스파제-3(cleaved caspase-3)의 웨스턴블롯 분석을 통해 세포사멸을 관찰하였다. 튜불린(tubulin)은 단백질 로딩 컨트롤로 사용되었다. (E)는 산화환원 스트레스에 따른 K1-유도 세포독성에 대한 개략도를 나타낸 것이다.

도 4는 K1의 항염증 효과를 나타낸 것이다. (A)는 K1 처리 시 COX-2 저발현 또는 고발현 암세포에서의 PGE_2 수준을 비교한 것이다. ELISA 분석을 통해 분비된 PGE_2의 수준을 측정하였다 (mean±SD, n=3, $^{*}p < 0.01$, n.s., not significant). (B)는 SW620 대장암세포에서 LPS-유도 PGE_2 분비에 대한 K1의 영향을 나타낸 것이다. (C)는 SW620에서 IL-6, TNF-α 및 VEGF mRNA 발현 수준에 대한 K1의 투여량 및 시간 관련 효과를 나타낸 것이다. (D)는 SW620 암세포 및 RAW264.7 마우스 대식세포에서 LPS-유도 IL-6, TNF-α 및 VEGF mRNA 발현 수준에 대한 K1의 효과를 나타낸 것이다. (E)는 NF-kB 신호전달경로에 대한 K1의 시간 및 용량 의존적 효과를 나타낸 것이다. (F)는 SN38, K1 또는 비히클 대조군으로서의 DMSO에 대한 반응에 따라 RAW264.7 세포에서의 IL-6,

TNF-α 및 IL-10의 ELISA 검출 결과를 나타낸 것이다(means±SD of triplicate assays. *p < 0.01 (Student's t test).

도 5는 종양 이종이식 모델에서 K1의 인비보 치료 효능을 나타낸 것으로, (A)는 SW620 종양을 갖는 마우스의 대표 형광이미지 및 해부된 기관들의 생체외 이미지를 나타낸 것이다(Li;Liver, Lu;Lung, He;Heart, Sp;Spleen, Ki;Kidney, Tu;Tumor). (B)는 대조군(DMSO), SN38, 및 K1으로 처리된 SW620 이종이식 종양의 대표 이미지를 나타낸 것이다. (C)는 K1-유도 종양 감소를 나타낸 것이다(n=5 per group, mean±SD, *p < 0.01, **p < 0.05). (D)는 DMSO, SN38 및 K1으로 처리된 마우스로부터 얻은 종양 억제율을 나타낸 것이다 (*P < 0.05 및 **P < 0.01, n=5/group). 종양 억제율(%)=100 - (SN38 또는 K1으로 처리된 종양 무게/DMSO로 처리된 종양 무게)×100. (E)는 DMSO 대조군, SN38 및 K1으로 처리된 조직에서 마우스의 항염증 사이토카인 mRNA 수준을 나타낸 것이다 (mean±SD, * p < 0.05, ** p < 0.01).

도 6은 37℃, PBS(pH=7.4)에서 인큐베이션 후, 0시간 및 24시간에 기록된 K1 (10mM)의 고성능 액체 크로마토그램 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 37℃, PBS(pH=7.4)에서 다양한 농도의 (A) GSH 및 (B) H_2O_2와 함께 인큐베이션된 K1(10 μM)의 시간 의존적 형광 강도 변화(at 540nm)를 나타낸 것이다.

도 8은 K1 (10μM)과 GSH (5mM)의 반응으로 형성된 중간체의 질량 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 9는 K1 (10 μM)과 H_2O_2 (10 μM)의 반응으로 형성된 중간체의 질량 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 10은 비암세포(MCF10A), 정상 섬유아세포 (NHDF) 및 결장암 (Caco2, DLD-1, SW620, HT-29, LoVo 및 SW480) 세포에서, COX-2 단백질 발현 수준을 보여주는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 11은 종양 세포 생존력에 대한 K1의 효과 및 SW620 암세포에서 COX-2 수준의 발현 상태와의 연관성을 나타낸 것으로, K1-매개 세포 독성 감쇠 (위) 및 COX-2 발현에 상응하는 siRNA 매개 녹다운 (아래)을 나타낸다.

도 12는 세포 내 산화 또는 환원 스트레스에 대한 K1의 영향을 나타낸 것이다. (A)는 암세포 성장에 대한 K1 및 SN-38의 효과를 나타낸다. LoVo 세포를 GSH siRNA 또는 대조군 siRNA로 형질 감염시키고 NAC (50mM)로 처리한 다음, 표시된 용량의 K1 및 SN-38로 48시간 동안 처리하였고, 세포는 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다. (B)는 siGSH로 형질 감염된 LoVo 세포의 GSH mRNA 수준 분석 결과를 나타낸다.

도 13은 SW620 세포에서 K1, SN38, Indomethacin 및 SN38+Indomethacin의 세포 독성 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다. 세포 생존력은 WST 분석을 통해 평가하였다 (mean±SD, n=3, *p < 0.05).

도 14는 절제된 이종 이식 종양 무게를 나타낸 것이다. DMSO, SN38 및 K1간의 종양 무게 차이는 통계적으로 유의하였다(*P < 0.05 및 **P < 0.01, n=5/group).

도 15는 DMSO (대조군), SN-38 및 K1으로 처리한 후, SW620 종양이 있는 누드 마우스의 체중 변화를 나타낸 것이다(파란색 (DMSO), 녹색 (K1) 및 빨간색 (SN-38)).

도 16은 DMSO 대조군, SN-38 및 K1 처리 군 마우스 혈청에서의 AST 및 ALT 활성 수준을 나타낸 것이다(mean±SD, * p < 0.01).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0019] [실시예]

[0020] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0022] **실험 방법**

[0023] 재료 및 특성화

[0024] 합성에 사용된 모든 화학 물질과 용매는 Sigma-Aldrich, Alfa 또는 TCI-Korea에서 구입하여 추가 정제없이 그대로 사용하였다. 수분에 민감한 반응은 일반적으로 아르곤 가스 하에서 수행하였다. NMR 스펙트럼 분석은 실온에서 Bruker NMR (^{1}H의 경우 500MHz, ^{13}C의 경우 125MHz) 또는 Varian (^{1}H의 경우 400MHz, ^{13}C의 경우 100MHz) 기기에서 수행하였다. 고분해능 질량 스펙트럼은 Ion Spec Hi Res ESI 질량 분석기로 기록하였다. HPLC 분석은 역상 컬럼 (C18, 5mm, Waters)이 장착된 YL9101S (YL-Clarity) 기기에서 수행하였다. 분석에 사용된 용리제는 0.5 mL/min 유속의 물-아세토니트릴 구배 (0-35분; 아세토니트릴 5 내지 85%)였다. UV-vis 검출기 (365 nm)가 사용되었다. 인간 암 세포주(Human cancer cell lines), NHDF (normal human dermal fibroblast) 및 MCF10A (non-cancerous) 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) 또는 Korea Cell Line Bank (Seoul, South Korea)에서 구입하였다. 세포는 10% FBS (GIBCO BRL)가 보충된 둘베코 변형 이글 배지에서, 37 ℃, 5% CO_2를 함유하는 습합 분위기에서 유지시켰다. NAC (N-acetyl-L-cysteine), SN-38 (o7-etil-10-idrossi-camptotecina), H_2O_2 및 LPS (Lipopolysaccharide)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. GSH 녹다운을 위한 si-RNA 대조군 또는 siRNA의 형질 감염은 siRNA-올리고 펙타민 혼합물 또는 전기 천공법 (Neon transfection system; Invitrogen)을 사용하여 수행하였다.

[0026] 반-정량적 RT-PCR 분석

[0027] MoMuLV 역전사 효소 및 무작위 헥사머 프라이머 (Invitrogen)를 사용하여 역전사를 통해 전체 세포 RNA의 약 1 μg을 cDNA로 변환하였다. PCR은 초기에 희석된 cDNA를 사용하여 다양한 주기 (30-45주기)에 걸쳐 수행되었으며, 24-38주기를 거치는 1:4 희석된 cDNA (PCR 50 μl 당 12.5 ng)는 프라이머를 사용한 증폭의 대수 단계에서 발견되었다. 1.5mM $MgCl_2$ 함유 반응 버퍼에서 PCR을 수행하였다. 10μl의 PCR 산물을 2% (wt/vol) 아가로스겔에서 분리하였다.

[0029] 면역 블롯 분석

[0030] 면역 블롯 분석은 Cell Signaling Technology 또는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입한, COX-2 (4842), cleaved PARP (5625), cleaved caspase-3 (9664), phospho-AKT (4060), AKT (4685), phosphor-p38 (4511), p38 (8690), phosphor-p65 (3031), p65 (8242), phosphor-IκBα (2859)에 특이적인 항체들을 사용하여 수행하였다. 항-튜불린 항체는 Sigma-Aldrich에서 입수하였다. 간FIRGL, 세포를 차가운 PBS에서 두 번 세척하고, 25mM Tris·HCl (pH 7.5), 200mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% 나트륨 데옥시콜레이트, 프로테아제 억제제 혼합물을 포함하는 RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer)에서 용해시켰다. 초음파 처리 후, 용해물을 원심 분리하고 상등액을 회수하여 전기영동을 위해 12% SDS- 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하였다.

[0032] 세포 생존력 및 성장 분석

[0033] 세포를 24 웰 플레이트에 웰당 2×10^{5} 세포로 접종하고 적어도 24시간 동안 부착되도록 두었다. 성장 배지를 표시된 농도 및 시간에 K1 및/또는 K2를 포함하는 배지로 교체하고, WST-1 분석 (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada)을 통해 세포 생존력을 평가하였다. 콜로니 형성 분석을 위해, 세포를 6-웰 플레이트에 접종 하였다. 24시간 후, 세포를 각 화합물 또는 비히클 디메틸설폭사이드 (DMSO)의 존재하에 8일 동안 유지시켰다. 콜로니를 메탄올로 10분 동안 고정하고 20% 에탄올 중 0.05% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다.

[0035] ELISA 분석

[0036] 세포를 1% FBS 배양 배지에서 12-웰 플레이트 (1×10^{5} cells/well)에 접종 하였다. 24시간 후, 세포를 지시된

용량 또는 시간 과정 동안 각 화합물로 처리하였다. 화합물 처리 후 표시된 시점에 세포로부터의 상등액을 수집하고 50배 희석 하였다. IL-6, IL-10, TNF-a 및 PGE2는 R&D 시스템 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)에서 구입한 ELISA 키트의 프로토콜에 따라 상등액에서 측정하였다. 정규화를 위해, BioRad 세포 계수기를 사용하여 트리판 블루 제외(trypan blue exclusion) 방법에 따라 세포를 계수하였다.

[0038] 인비보(In vivo) 및 엑스비보(ex vivo) 형광 이미징

[0039] 동물 형광 이미징을 위해 6주령 면역 결핍 누드 마우스 (nu/nu) (Orient Bio, Inc.)를 사용하였다. 종양 표적 특이성 및 생체 내 및 생체 외 K1의 기관 분포를 분석하기 위해 SW620 세포 (1×10^7)를 마우스 뒷쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 마우스에는 비히클 (DMSO) 또는 K1 (5 mg/kg/d)을 복강내 주사로 주입하였다. 처리 12시간 후, 동물을 CO_2 질식을 통해 안락사시켰다. 이종 이식 종양을 절제하고 사진을 촬영하였다. 대조군 및 주사된 마우스의 종양 및 기관의 생체 외 형광 이미지를 기록하고 Maestro2 기기를 사용하여 정량화하였다 (여기 및 방출 파장 : 각각 500 및 650 nm). 형광 이미지 및 자동 형광은 다중 여기 스펙트럼 분석 기능을 사용하여, 기기와 함께 제공된 소프트웨어(Maestro software ver.2.4, CRi, Woburn, MA, USA)를 이용하여 디컨볼루션하였다.

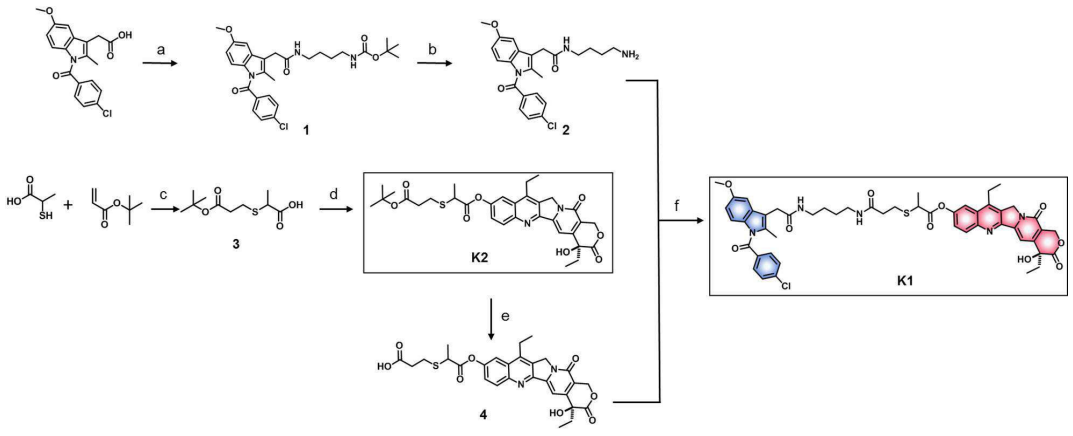
[0041] 동물 연구

[0042] 6주령 면역 결핍 누드 마우스 (nu/nu) 마우스 (Orient Bio, Inc.)를 멸균 수 및 식품에 대한 무제한 접근이 가능한 반복 제어 조명 조건 하(12h dark; 12h light), 가압 환기 케이지에서 유지시켰다. 200 μL PBS 중 SW620 세포 (1×10^7)를 각 마우스의 뒷쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양 부피가 80-100 mm^3에 도달하면 마우스를 3개의 처리 그룹으로 무작위로 분류하였다; K1, SN-38 및 비히클 대조군(DMSO)(n = 그룹당 5개). 마우스에게 3주 동안 5일마다 한 번씩 K1 (5 mg/kg/d), SN-38 (5 mg/kg/d) 또는 비히클 (DMSO)을 복강 내 주사하였다. 종양 성장을 주기적으로 모니터링하고, 변형된 타원 공식(ellipsoidal formula)을 사용하여 종양 부피 (V)를 계산하였다: V = 1/2 ×길이×(폭)^2. 처리 15일 후, 동물을 CO_2 질식을 통해 안락사시켰다. 이종 이식 종양을 절제하고 사진을 촬영하였다. 모든 동물 실험은 한국 동물 보호법에 의거하여, 고려대학교 동물 실험 실용위원회의 승인을 받아 수행하였다.

[0044] **화합물 합성**

[0045] 하기 합성 경로에 따라, 본 발명에 따른 [화학식 1](K1으로 표시)의 화합물을 합성하였다.

[0046] [합성 경로]



[0047]

[0048] a) EDC.HCl, HOBt, DMF, N-Boc-1,4-Butanediamine, DMAP, 12h; b) TFA, CH_2Cl_2, 12h; c) TEA, 60 ℃, 12h; d) EDC.HCl, HOBt, DMAP, SN-38, DMF, 12h; e) TFA, CH_2Cl_2, 24h; f) EDC·HCl, HOBt, DMAP, 화합물 2, DMF, 12h.

[0050] 화합물 1의 합성

[0051] 무수 DMF (10 mL) 중 인도메타신 (0.21 g, 0.588 mmol) 교반 용액에 EDC·HCl (0.135 g, 0.705 mmol) 및 HOBt (0.095 g, 0.705 mmol)를 첨가하고 혼합물을 30분 동안 실온에서 교반하였다. tert-부틸 (4-아미노부틸)카르바메이트 (320 mg, 1.7 mmol) 및 DMAP (촉매)를 첨가하고 생성된 혼합물을 밤새 교반하였다. 물 (20 mL)을 반응 혼합물에 첨가하고 수용액을 에틸 아세테이트 (3 X 30 mL)로 추출하였다. 조합된 유기층을 분리하고, 무수 황산나트륨상에서 건조시키고, 여과 및 감압하에 증발시켰다. 미정제 혼합물을 CH_2Cl_2 중 2-5% MeOH의 용리 구배를 갖는 실리카겔을 사용하는 컬럼크로마토그래피로 정제하여 황색 고체 화합물 1을 수득하였다 (145 mg, 수율 46%).

[0052] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.41 (s, 9H), 1.43 (br s, 4H), 2.38 (s, 3H), 3.03-3.07 (m, 2H0, 3.19-3.23 (m, 2H), 3.63 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 4.55 (br s, 1H), 5.73 (br s, 1H), 6.68-6.71 (m, 1H), 6.85-6.89 (m, 2H), 7.47-7.50 (m, 2H), 7.66-7.68 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 13.31, 26.66, 27.45, 28.40, 32.23, 39.27, 40.01, 40.02, 55.77, 79.13, 101.06, 112.09, 112.96, 115.11, 129.21, 130.38, 130.91, 131.18, 136.53, 156.03, 156.20, 168.33, 169.93. MS (ESI): m/z calcd. for $C_{28}H_{34}ClN_3O_5$: 527.22 Found: 550.20 $[M + 23]^+$.

[0054] 화합물 2의 합성

[0055] CH_2Cl_2 (10mL) 중 화합물 1 (0.130g, 0.264mmol)의 교반된 용액에 TFA (0.5mL)를 첨가하고 혼합물을 불활성 분위기하에서 밤새 교반하였다. 반응 완료 후, 혼합물을 감압하에서 증발시켜 화합물 2를 수득하였다. 화합물 2의 얻었다. 화합물 2의 TFA 염은 갈색 고체로 나타났으며 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0056] MS (ESI): m/z calcd. for $C_{23}H_{26}ClN_3O_3$: 427.17 Found: 428.17 $[M + 1]^+$.

[0058] 화합물 3의 합성

[0059] 2-메르캅토프로피온산 (0.5g, 4.71mmol) 및 tert-부틸 아크릴레이트 (0.602g, 4.71mmol)를 둥근 바닥 플라스크에 넣었다. 이 혼합물에 트리에틸아민 (TEA, 0.5 mL)을 첨가하고 혼합물을 45 ℃에서 48시간 동안 교반하였다. 혼합물을 냉각시키고 메틸렌 클로라이드 (100 mL)로 희석하고 물 (100 mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고, 무수 황산나트륨으로 건조하고, 여과 및 감압하에 증발시켜 무색 오일 화합물 3을 수득하였다.

[0060] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.45 (s, 9H), 1.47 (s, 3H), 2.54-2.57 (m, 2H), 2.85-2.97 (m, 2H), 3.43-3.48 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 16.86, 26.79, 28.09, 29.71, 35.56, 40.90, 81.12, 171.08.

[0062] 화합물 K2의 합성

[0063] 무수 DMF (5mL) 중 화합물 3 (0.10g, 0.426mmol)의 용액에 EDC·HCl (0.098g, 0.51mmol) 및 HOBt (0.068g, 0.51mmol)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. SN-38 (0.166g, 0.426mmol) 및 DMAP (촉매)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 추가적으로 24시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후, 혼합물을 CH_2Cl_2 (100 mL)로 희석하고 수성 중탄산나트륨 (100 mL X 3)으로 세척하였다. 조합된 유기 추출물을 분리하고, 무수 황산나트륨상에서 건조, 농축 및 감압하였다. 미정제 혼합물을 5% MeOH/CH_2Cl_2의 용리액과 함께 실리카겔을 사용하는 플래쉬 크로마토그래피로 정제하여 회백색 고체 화합물 K2를 수득하였다(0.200g, 수율 77%).

[0064] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.04 (t, 3H, J = 7.35 Hz), 1.40 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.64 (d, 3H, J = 7.15 Hz), 1.87-1.93 (m, 3H), 2.61-2.64 (m, 2H), 3.00-3.06 (m, 2H), 3.17-3.19 (m, 2H), 3.72-3.75 (m, 2H), 5.74 (s, 2H), 5.31 (d, 1H, J = 16.14 Hz), 5.76 (d, 1H, J = 16.2 Hz), 7.26 (m, 2H), 7.89 (s, 1H),

8.25-8.27 (d, 1H, J = 9.1 Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 8.07, 14.24, 17.24, 23.34, 26.97, 26.98, 28.26, 28.30, 31.82, 35.83, 41.47, 49.59, 66.41, 73.07, 81.39, 98.42, 114.66, 118.91, 125.29, 127.56, 127.61, 132.31, 145.67, 146.84, 147.52, 149.78, 150.43, 152.05, 157.77, 171.06, 171.58, 173.93. MS (ESI): m/z calcd. for $C_{32}H_{36}N_2O_8S$: 608.22 Found: 609.20 $[M + 1]^+$.

[0066] 화합물 4의 합성

[0067] 화합물 K2 (0.150g, 0.246mmol)를 무수 CH_2Cl_2 (50mL)에 넣었다. TFA (10mL CH_2Cl_2 중 1mL)를 용액에 적가하고 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 완료 후(TLC), 용매를 감압하에 증발시켜 옅은 노란색 고체 화합물 4를 수득하였다.

[0069] 화합물 K1의 합성

[0070] 무수 DMF (10 mL) 중 화합물 4 (0.12 g, 0.217 mmol)의 용액에 EDC·HCl (0.05 g, 0.238 mmol) 및 HOBt (0.035 g, 0.238 mmol)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 화합물 2 (0.093g, 0.217mmol) 및 DMAP (촉매량)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 완료 후, 혼합물을 CH_2Cl_2 (100 mL)로 희석하고, 중탄산 나트륨 수용액 (100 mL X 3)으로 세척하고 CH_2Cl_2 (3 X 100 mL)로 추출하였다. 유기층을 분리하고 무수 황산나트륨으로 건조 및 감압 농축한 후 CH_2Cl_2 중 2-5% MeOH의 용리액을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피로 정제하여 회백색 교체 화합물 화합물 K1을 수득하였다(0.125g, 수율 60%).

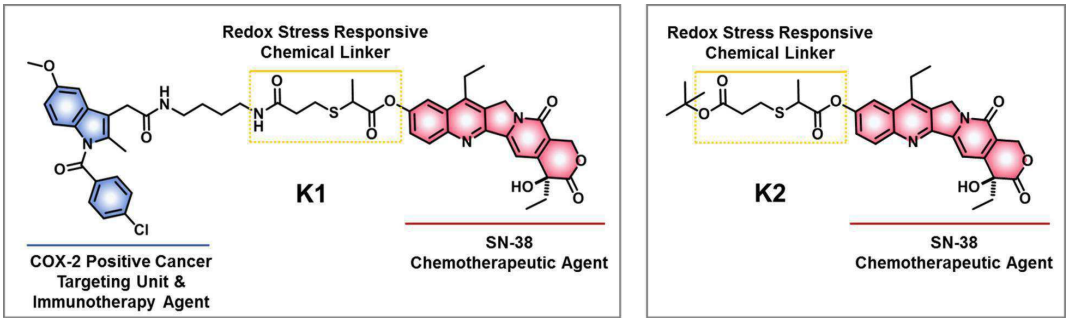
[0071] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.05 (t, 3H, J = 7.4 Hz), 1.04-1.52 (m, 7H), 1.68 (m, 3H), 1.93-1.98 (m, 2H), 1.35 (s, 3H), 2.59-2.62 (m, 2H), 3.12-3.3 (m, 8H), 3.66 (s, 2H), 3.79-3.82 (m, 4H), 5.09 (m, 2H), 5.34-5.36 (m, 2H), 5.74-5.77 (m, 1H), 6.12 (m, 1H), 6.48 (m, 1H), 6.68 (m, 1H), 6.86 (m, 2H), 7.49-7.50 (m, 2H), 7.60-7.67 (m, 4H), 7.90 (m, 1H), 8.27 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 0.20, 7.97, 13.40, 14.18, 17.26, 23.43, 26.27, 26.80, 27.56, 31.78, 31.83, 36.34, 39.45, 39.49, 41.81, 49.90, 56.08, 66.34, 73.02, 76.65, 76.91, 99.57, 99.59, 101.25, 111.95, 111.97, 112.36, 114.89, 115.29, 119.03, 125.71, 127.63, 127.79, 129.49, 130.19, 131.14, 131.44, 131.77, 133.46, 136.94, 140.04, 146.55, 149.96, 156.39, 157.93, 168.61, 171.71, 172.34, 173.93. MS (ESI): m/z calcd. for $C_{51}H_{52}ClN_5O_{10}S$: 962.31 Found: 962.15 $[M + 1]^+$.

[0073] **결과 및 고찰**

[0074] 본 발명에서는 OX-2가 과발현된 암세포에 대해 높은 선택성을 가지며, 산화적 스트레스 및 환원적 스트레스 환경 모두에서 효과적으로 약물을 방출할 수 있는바, 이질적 성질의 이종 종양을 동시에 표적화할 수 있는 항암 약물전구체 K1([화학식 1]로 표시)을 제공한다.

[0075] 본 발명에 따른 전구약물 K1은 하기 [Scheme 1] 및 상기 [합성 경로]에 따라 합성하였다.

[0076] [Scheme 1]



[0077]

[0078] 간략하게, 먼저 2-머캅토프로피온산과 터트-부틸아크릴레이트 간의 미카엘 첨가 반응(Michael addition reaction)을 통해 중간체 화합물 3을 합성하였다. 이어서, 국소이성질화효소 I 억제제(topoisomerase I inhibitor)인 7-에틸-10-하이드록실-캄프토테신(SN-38, 이리노테칸의 활성 대사체)과 중간체 화합물 3을 EDC/DMAP을 이용하여 커플링 시켜 중간체 화합물 K2를 합성하였다. 다음으로, 메틸렌 클로라이드 중 TFA(트리플루오로아세트산)로 터트-부틸 탈보호화(deprotection) 처리를 한 후에, 중간체 화합물 4와 화합물 2를 산-아민 커플링(acid-amine coupling)시켜 본 발명에 따른 항암 약물전구체 화합물 K1을 합성하였다. 합성 화합물의 존재 및 특성은 질량분석계, ^{1}HNMR/^{13}C NMR을 통해 확인하였다.

[0079] 환원(글루타티온, GSH) 및 산화(과산화수소, H_2O_2) 스트레스 조건하에서, K1의 약물 방출 특성을 조사하기 위해, 37 ℃, PBS(pH = 7.4)에서 형광 특성을 분석하였다. 형광분석 및 고성능액체크로마토프래피(HPLC) 분석을 통해 확인된 바와 같이, K1은 H_2O_2 또는 GSH에 노출되기 전까지 PBS에서 상당히 안정정인 것으로 나타났다(도 1, 도 6-7). 도 1B 및 도 1C에 나타난 바와 같이, K1은 540 nm에서 약한 방출 밴드를 일으켰다. 환원 스트레스 조건, 즉 GSH (5 mM)로 K1을 처리한 경우에 전구약물 활성화를 시험하는 동안, 540 nm에서 형광 강도의 향상이 관찰되었다. 540 nm에서의 형광 밴드는 free SN-38의 특징이다. H_2O_2 (10 μM)의 처리시에도 유사한 형광 특성을 나타내었다 (도 1B 참조). 다음으로, 다양한 농도의 GSH 및 H_2O_2에서 K1의 활성화 특성을 평가하였다 (도 7 참조). 이러한 형광특성 분석에 기초하여, K1의 완전 활성화가 H_2O_2 (10 μM) 및 GSH (5 mM)에 의해 다양한 시간대에 걸쳐 일어남을 유추할 수 있었다. GSH 및 H_2O_2의 노출에 의한 K1 활성화는 고성능액체크로마토그래피(HPLC, 도 1D, 1E 참조)와 전자 스프레이 이온화 질량 분석법(ESI-MS, 도 8-9 참조)의 조합을 통해서도 확인할 수 있다. K1은 크로마토그램에서 24.5분에 머무름 피크를 나타내었다; 그러나, 10시간 동안 GSH (5 mM)를 처리하면, 8분(활성 약물 SN-38) 및 16분(부산물)의 머무름 시간을 지닌 새로운 피크가 형성되었다. 이러한 결과는 K1이 페놀 에스테르 모이어티의 티올화(GSH의 -SH기에 의해 매개되는 것으로 추측)를 겪고 자유 SN-38을 방출한다는 점과 부합한다. 다른 GSH 반응성 전구약물들과는 달리, K1은 활성 약물의 직접 방출과 동시에 GSH의 소비가 일어났다. 마찬가지로, H_2O_2 (10 μM, 4 h)으로 K1을 처리하면 티오에테르 모이어티가 설폰 또는 설폭사이드로 산화되는 결과를 낳는다. 이러한 중간체들은 상대적으로 친수성이며, 이는 가수분해를 촉진시킬 것으로 여겨진다. 이러한 가수분해는 K1에 존재하는 페놀 에스테르를 쪼개고 자유 형태의 SN-38 및 상응하는 중간체들을 방출함을 제안한다.

[0080] 본 발명에 따른 약물 전구체 화합물 K1은 SN-38(국소이성질화효소 I 억제제)과 OX-2 단백질과 보다 우수한 상호작용을 가지도록 제안된 인도메타신(COX-2 억제제) 서브유닛으로 구성된다. K1이 COX-2-의존 세포독성을 유발하는지를 확인하고자 COX-2 단백질의 다양한 발현을 갖는 인간 세포주를 사용하여 세포 생존력 분석을 수행하였다. COX-2 발현이 낮은 세포에서(즉, Caco-2, DLD-1, 도 10 참고), K1 또는 K2의 처리는 증가된 COX-2 발현을 나타내는 LoVo 및 SW620 세포에 비해 증식이 약간 감소하였다 (도 2A, 2B 참조). 추가적으로, K1의 COX-2 선택성 및 항암 능력을 평가하기 위해, COX-2 양성 암세포(즉, LoVo, SW620)와 낮은 COX-2 발현을 갖는 건강한 인간 세포주 NHDFs (normal human dermal fibroblasts) 및 MCF10A (human breast epithelial cell line)와 비교하여 세포 생존력 분석을 수행하였다 (도 2c, 도 10 참조). 그 결과, K1의 인비트로 효능과 COX-2 발현 간에 양의 상관 관계가 있음을 확인할 수 있었다. 마찬가지로, SW620 세포에서 siRNA COX-2 형질 감염을 이용한 COX-2 발현 녹다운은 K1-유도 세포독성을 감소시켰다 (도 11 참조). K1이 암세포를 표적하고 있는지 확인하고자, 암세포(SW620, LoVo)와 정상 세포(NHDF & MCF10A)에서 K1의 세포내 축적 정도를 조사하였다. K1은 보다 높은 COX-2 발현을 갖는 암세포에서 투여량 및 시간 의존적인 모습을 보였으나, 정상 및 낮은 COX-2 발현

암세포에서는 그렇지 않았다 (도 2D 및 2E 참조). 이러한 결과는 K1의 세포 독성 효과와 형광 유도가 암세포에서 COX-2 단백질 발현 수준에 크게 의존한다는 것을 입증하는 것이다.

[0081] 이전의 연구들에서는 높은 수준의 항암제 또는 자유 라디칼 인자들이 종양 산화환원 상태를 변화시키고 이로 인해 암치료 동안 약제 내성을 일으킴을 보고한 바 있다(Lee, B. W. L.; Ghode, P.; Ong, D. S. T. Redox regulation of cell state and fate. *Redox Biol.* 2018). 본 발명에서는 K1의 H_2O_2 및 GSH 의존 약물 방출 분석에 기초하여, 세포 산화제 또는 GSH(항산화제)가 암세포에서 K1의 약물 방출에 주된 관련이 있음을 확인하였다 (도 1B 및 1C 참고). 이어서, 세포내 산화환원 조건에서 K1이 암세포에 활성 약물을 방출할 수 있는지 분석하였다. 이를 위해, 먼저 LoVo 세포를 N-아세틸시스테인(NAC, GSH 전구체) 및 H_2O_2로 전처리하였다. 이후, 해당 세포를 K1으로 처리하고, SN-38의 약물 방출을 형광으로 모니터링하였다. 예상한 바와 같이, H_2O_2 및 NAC의 전처리는 K1-처리된 세포에서 free SN-38에 상응하는 형광 강도를 크게 증가시켰다 (도 3A 참조).

[0082] 다음으로, 세포내 산화환원 상태의 변화가 K1으로 처리된 암세포의 세포성장 및 생존력에 영향을 미치는지 여부를 추가로 조사하였다. 산화환원 스트레스의 부존재 하에서, 암세포 세포독성에 대한 K1의 영향은 SN-38과 유사하게 관찰되었다. 그러나 NAC 전처리된 세포에서, K1은 SN-38으로 처리된 경우와 비교해보았을 때 암세포 성장을 상당히 감소시켰다 (도 3B, 도 12A 참고). GSH (세포 항산화제)-siRNA 녹다운 세포에서 K1으로 처리할 경우에도 SN-38에 비해 암세포 성장 및 세포독성을 상당히 감소시키는 유사한 결과가 관찰되었다(도 3C 및 도 12B 참고). 산화환원 조건에서 암세포의 성장 및 생존에 대한 K1의 역할을 이해하기 위해, LoVo 세포에서 유사 세포 산화 스트레스를 통해 GSH 녹다운 연구를 수행하였다. 그런 다음 K1 또는 SN-38으로 해당 세포를 처리한 후에 웨스턴블롯을 통해 분석하였다 (도 12C 참고). 도 3D에 나타낸 바와 같이, K1 또는 SN-38으로 대조군 세포를 처리하면 폴리 (ADP-리보오스) 폴리메라아제(PARP)와 caspase-3의 절단이 유도되었고, p38 및 AKT의 인산화가 감소되었다. 반대로, GSH 녹다운 후 K1 처리는 PARP 및 caspase-3의 절단 유도를 크게 향상시켰으며, p38 및 AKT의 인산화를 크게 감소시킨 반면, SN-38로 처리된 세포는 더 이상 반응이 없어, SN-38에 내성이 있는 것으로 간주되었다. 이러한 결과는 도 1 및 도 3E에 나타난 바와 같이 K1이 세포내 산화제/항산화제 (oxidants/antioxidant) 수준을 동시에 감소시키며, 산화 및 환원 스트레스 하에서 우수한 항암 치료 특성을 나타냄을 의미한다. 또한 SW620 암세포에서 K1의 세포 독성을 다른 대조군 (DMSO, SN-38만, 인도메타신만, SN-38 + 인도메타신)과 비교한 결과, K1은 다른 시험 된 대조군에 비해 개선된 독성을 나타내는 것으로 확인되었다(도 13).

[0083] K1 중 인도메타신 모이어티로부터의 항염증 효과가 COX-2 억제제에 의해 매개되는지를 확인하고자, ELISA 분석법을 사용하여 가변적인 COX-2 발현을 갖는 K1-처리 암세포의 PGE_2 수준을 검출함으로써 COX-2 활성 변화를 평가하였다. 도 4A에 나타난 바와 같이, K1은 높은 COX-2 발현이 높은 암세포(LoVo 및 SW620 세포)에서만 PGE_2 발현을 매우 약화시켰고, COX-2 발현이 낮은 다른 세포(Caco-2 및 DLD1 세포)에서는 그렇지 않았다. 또한, SN-38이 아닌 K1의 처리가 외부 지질다당류(LPS) 매개 자극에 따라 SW620 세포에서 PGE_2 수준을 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(도 4B). 다음으로, K1이 SW620 암세포 및 RAW 264.7 대식세포에서 NF-κB 활성화와 표적 유전자 발현을 억제하는지 여부를 조사하였다. 반-정량 RT-PCR 분석은 시간-의존 및 용량-의존 방식 모두에서 K1 처리가 IL-6, TNF-α 및 혈관내피성장인자(VEGF)와 같은 NF-κB 표적 유전자의 발현을 억제함을 보여주었다 (도 4C 참고). 특히, K1은 암세포 및 대식세포 모두에서 이러한 NF-κB 표적 유전자들의 LPS 활성화에 대해서 강한 억제 효과를 보여주었다 (도 4D). 또한, 주된 NF-κB 성분 p65와 이의 조절제 IκBα에 대한 면역 블롯 분석은 K1 처리가 시간-관련 및 용량-관련 방식으로 p65 및 IκBα 둘 모두의 인산화를 강하게 억제함을 보여주었다 (도 4E 참고). 이어서, RAW264.7 대식세포에서 ELISA를 통해 염증성 사이토카인 생성에 대한 K1의 영향을 조사하였다. 도 4F에 나타난 바와 같이, SN-38과 달리 K1은 전염증성 사이토카인 IL-6 및 TNF-α의 생성을 상당히 감소시켰으며, 항염증 사이토카인인 IL-10의 생성을 증가시켰다.

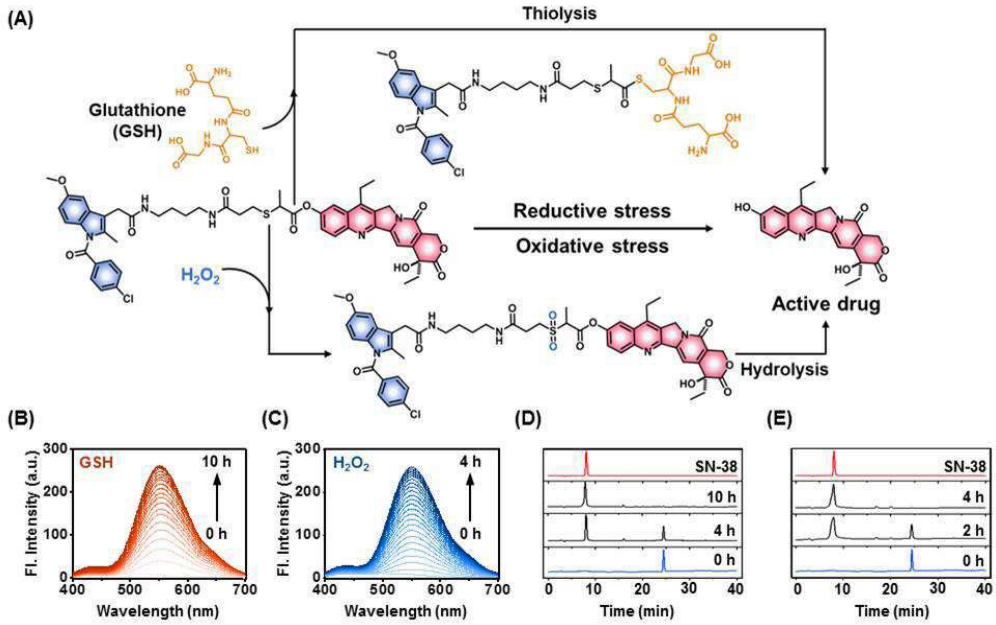
[0084] 인비보 상에서, K1에서 방출된 약물의 종양 표적특이성을 평가하기 위해, SW620 대장암이 피하에 이종이식된 누드마우스를 인비보 형광이미지로 분석하였다. 도 5A에 나타난 바와 같이, K1에서 방출된 약물의 형광 신호는 K1-처리된 마우스의 이종이식 종양에서 관찰된 반면, 절제된 기관의 형광 이미지에서는 그러한 형광 신호가 관찰되지 않았다 (도 5A 참고). 다음으로, SW620가 이종이식된 누드마우스에서 K1과 SN-38의 효능을 평가하였다. DMSO와 비교해 볼 때, SN-38 처리 시 종양은 약한 반응을 보이는 반면(20% 종양 감소), K1-처리시 종양 성장이 상당히 억제되는 것으로 나타났다(41% 종양 감소) (도 5B-D, 도 14 참조). 처리과정에서 유의한 체중 감소는 관찰되지 않았다 (도 15 참조). 또한, K1으로 처리된 마우스의 혈청에서 아스파르테이트아미노전달효소(AST) 및 알라닌아미노전달효소(ALT) 수준이 정상 범주에서 유지되었다 (도 16 참조). 반면에, SN-38로 처리된 그룹에서

는 AST 및 ALT의 수준이 보다 높게 나타났다. 다음으로, 이종이식 종양 조직을 이용해 종양 생존 사이토카인 유전자 발현에 대한 K1의 영향을 조사하였다. DMSO 또는 SN-38와 비교해보았을 때, K1은 TNF-α, IL-6 및 VEGF 유전자 발현의 상당한 감소를 유도하였다(도 5E). 이를 통해 K1은 암 생존 사이토카인 발현의 선택적 억제를 통해 향상된 항암 효과를 나타냄을 확인하였다.

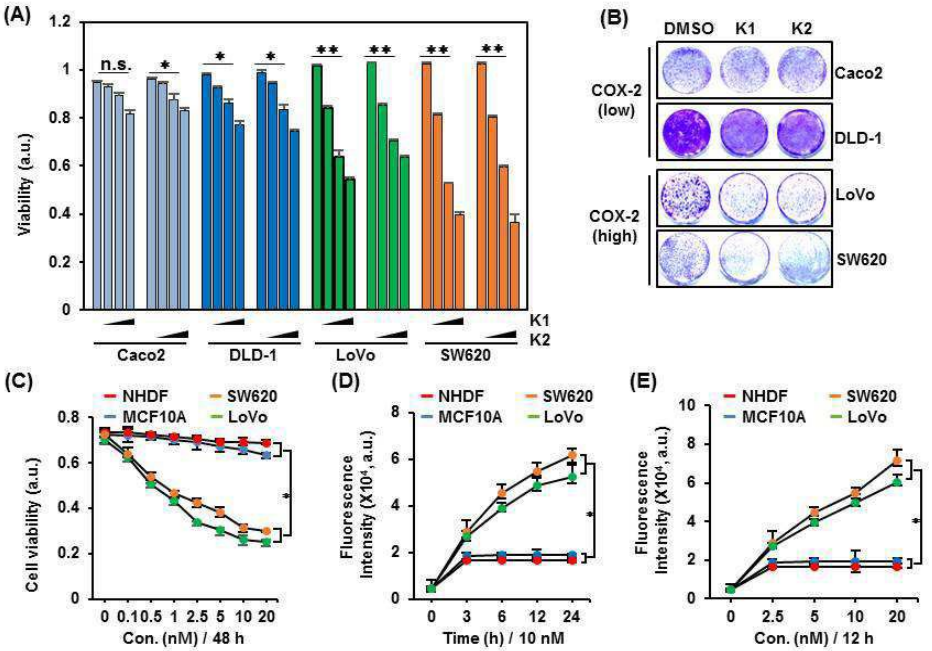
[0086] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

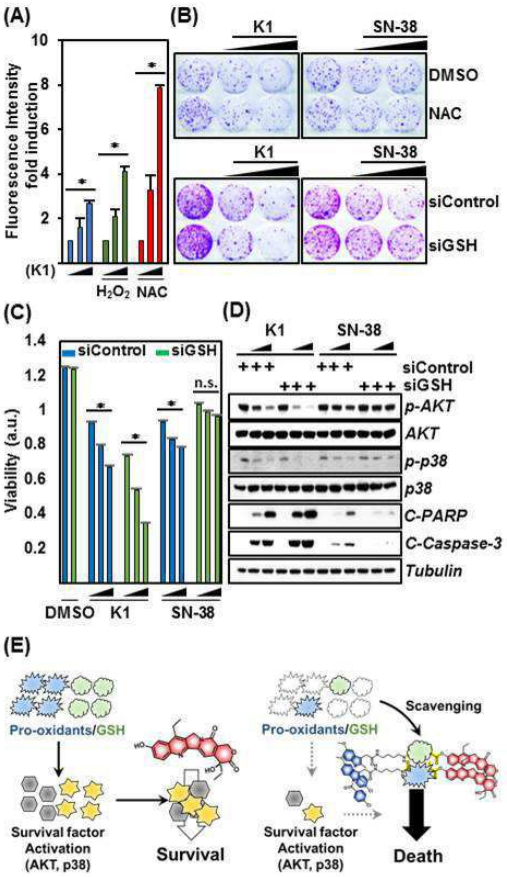
도면1



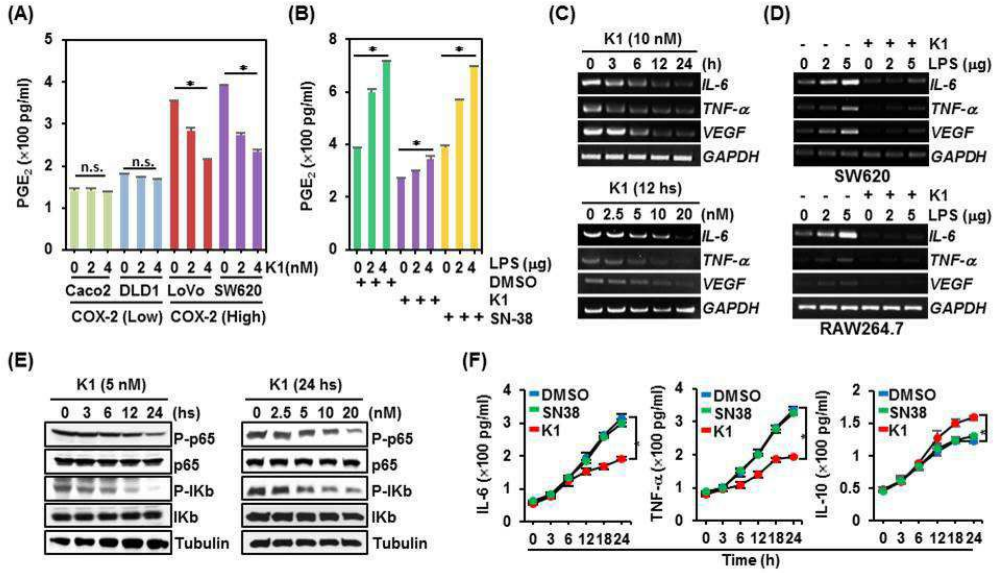
도면2


(A)
Viability (a.u.)
n.s.
K1
K2
Caco2
DLD-1
LoVo
SW620
(B)
DMSO
K1
K2
COX-2 (low)
COX-2 (high)
Caco2
DLD-1
LoVo
SW620
(C)
NHDF
MCF10A
SW620
LoVo
Cell viability (a.u.)
Con. (nM) / 48 h
(D)
Fluorescence Intensity (X10⁴, a.u.)
Time (h) / 10 nM
(E)
Con. (nM) / 12 h

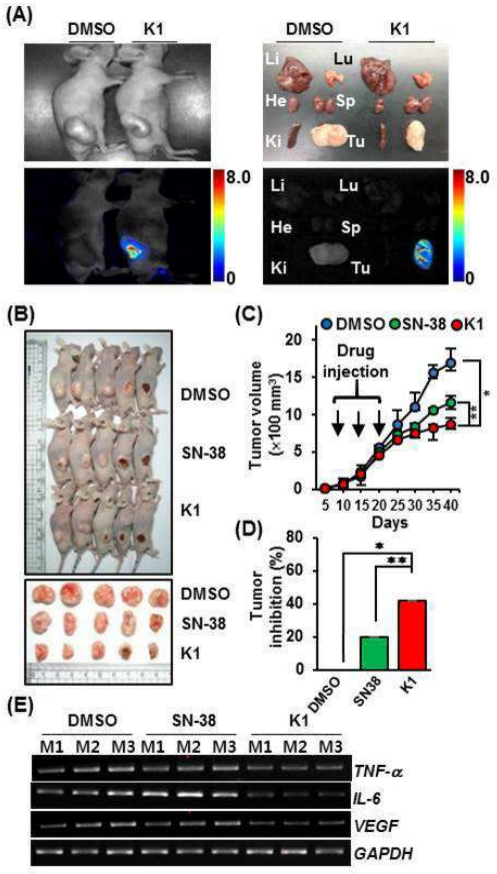
도면3


(A)
Fluorescence Intensity fold induction
(K1)
H2O2
NAC
(B)
K1
SN-38
DMSO
NAC
siControl
siGSH
(C)
siControl
siGSH
Viability (a.u.)
n.s.
DMSO
K1
SN-38
(D)
K1
SN-38
siControl
siGSH
p-AKT
AKT
p-p38
p38
C-PARP
C-Caspase-3
Tubulin
(E)
Pro-oxidants/GSH
Survival factor Activation (AKT, p38)
Survival
Scavenging
Death

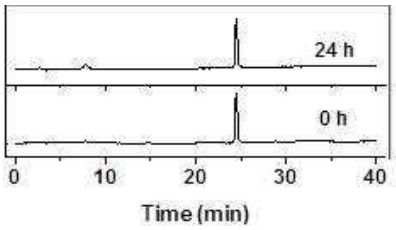
도면4


(A)
PGE2 (×100 pg/ml)
n.s.
n.s.
0 2 4 0 2 4 0 2 4 0 2 4 K1(nM)
Caco2 DLD1 LoVo SW620
COX-2 (Low) COX-2 (High)
(B)
PGE2 (×100 pg/ml)
0 2 4 0 2 4 0 2 4 LPS (μg)
+ + + DMSO
+ + + K1
+ + + SN-38
(C)
K1 (10 nM)
0 3 6 12 24 (h)
IL-6
TNF-α
VEGF
GAPDH
K1 (12 hs)
0 2.5 5 10 20 (nM)
IL-6
TNF-α
VEGF
GAPDH
(D)
- - - + + + K1
0 2 5 0 2 5 LPS (μg)
IL-6
TNF-α
VEGF
GAPDH
SW620
- - - + + + K1
0 2 5 0 2 5 LPS (μg)
IL-6
TNF-α
VEGF
GAPDH
RAW264.7
(E)
K1 (5 nM)
0 3 6 12 24 (hs)
P-p65
p65
P-IKb
IKb
Tubulin
K1 (24 hs)
0 2.5 5 10 20 (nM)
P-p65
p65
P-IKb
IKb
Tubulin
(F)
IL-6 (×100 pg/ml)
TNF-α (×100 pg/ml)
IL-10 (×100 pg/ml)
DMSO
SN38
K1
0 3 6 12 18 24
Time (h)

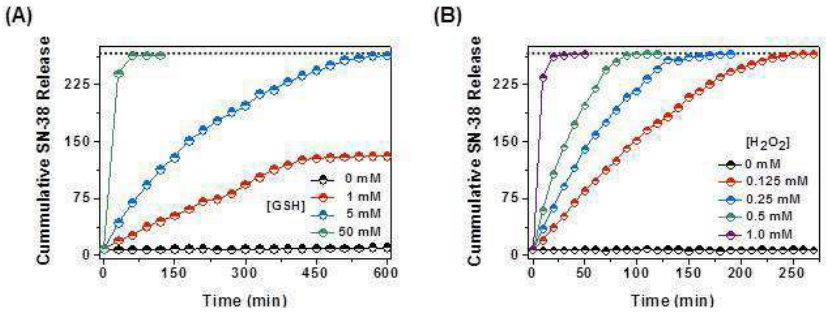
도면5


(A)
DMSO K1
DMSO K1
Li Lu
He Sp
Ki Tu
8.0
0
(B)
DMSO
SN-38
K1
DMSO
SN-38
K1
(C)
DMSO SN-38 K1
Drug injection
Tumor volume (×100 mm3)
5 10 15 20 25 30 35 40
Days
(D)
Tumor inhibition (%)
DMSO
SN38
K1
(E)
DMSO SN-38 K1
M1 M2 M3 M1 M2 M3 M1 M2 M3
TNF-α
IL-6
VEGF
GAPDH

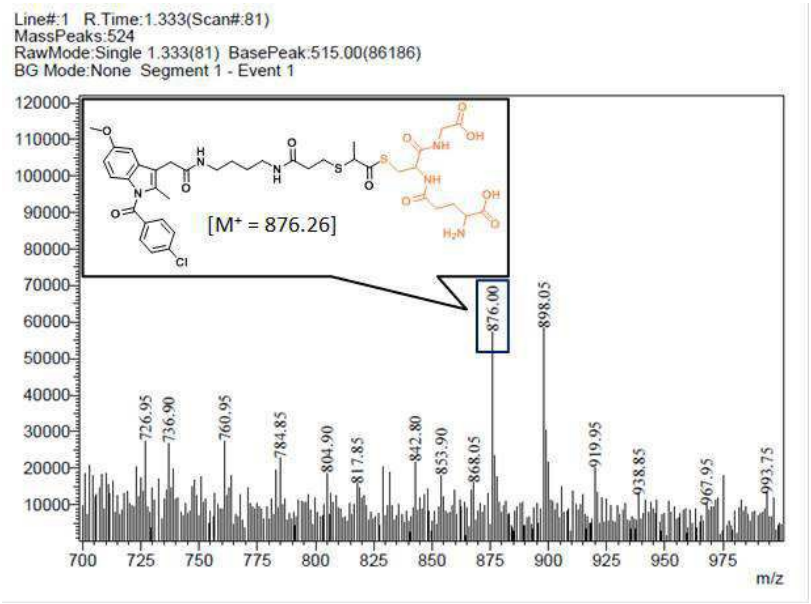
도면6


24 h
0 h
0
10
20
30
40
Time (min)

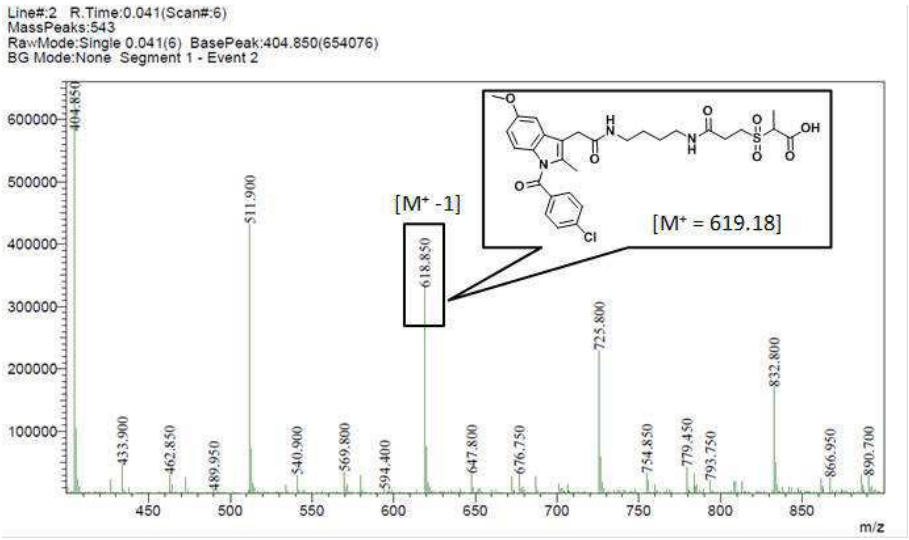
도면7


(A)
Cummulative SN-38 Release
225
150
75
0
0
150
300
450
600
Time (min)
[GSH]
0 mM
1 mM
5 mM
50 mM
(B)
Cummulative SN-38 Release
225
150
75
0
0
50
100
150
200
250
Time (min)
[H2O2]
0 mM
0.125 mM
0.25 mM
0.5 mM
1.0 mM

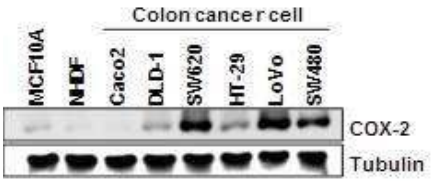
도면8


Line#:1 R.Time:1.333(Scan#:81)
MassPeaks:524
RawMode:Single 1.333(81) BasePeak:515.00(86186)
BG Mode:None Segment 1 - Event 1
[M+ = 876.26]
876.00
898.05
726.95
736.90
760.95
784.85
804.90
817.85
842.80
853.90
868.05
919.95
938.85
967.95
993.75
m/z

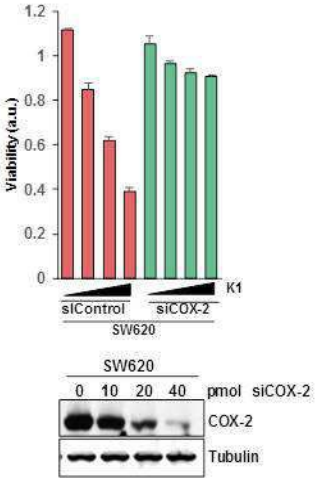
도면9



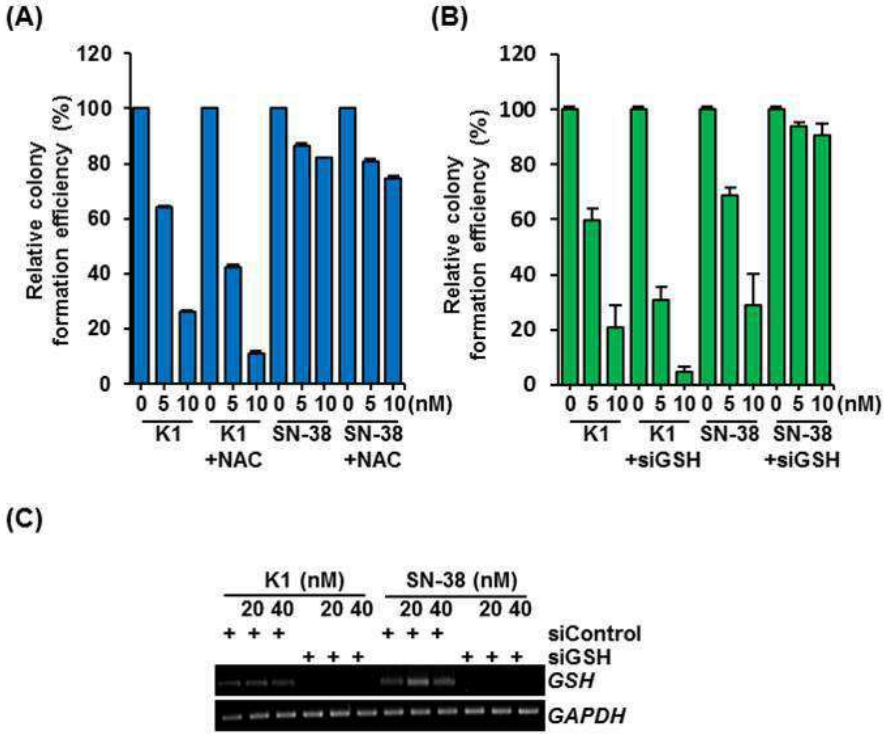
도면10



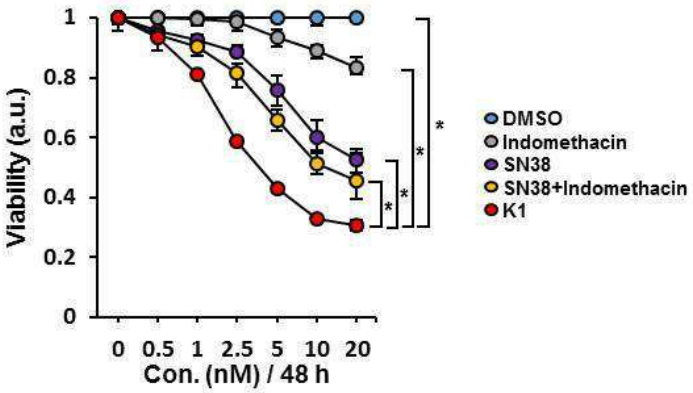
도면11



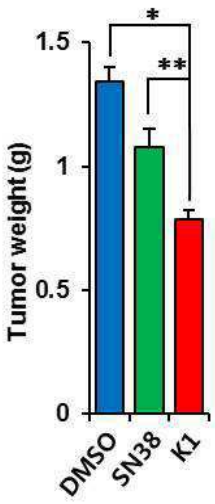
도면12


(A)
Relative colony formation efficiency (%)
120
100
80
60
40
20
0
0 5 10 0 5 10 0 5 10 0 5 10 (nM)
K1
K1 +NAC
SN-38
SN-38 +NAC
(B)
Relative colony formation efficiency (%)
120
100
80
60
40
20
0
0 5 10 0 5 10 0 5 10 0 5 10 (nM)
K1
K1 +siGSH
SN-38
SN-38 +siGSH
(C)
K1 (nM)
SN-38 (nM)
20 40 20 40
20 40 20 40
+ + + + + + + + +
siControl
siGSH
GSH
GAPDH

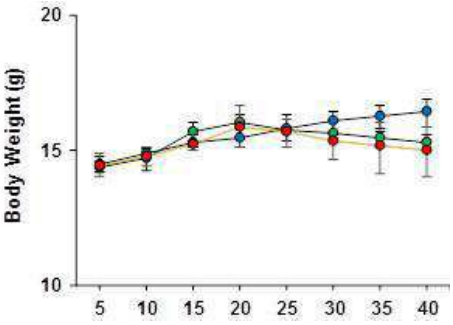
도면13


Viability (a.u.)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 0.5 1 2.5 5 10 20
Con. (nM) / 48 h
*
*
*
*
DMSO
Indomethacin
SN38
SN38+Indomethacin
K1

도면14



도면15



도면16

