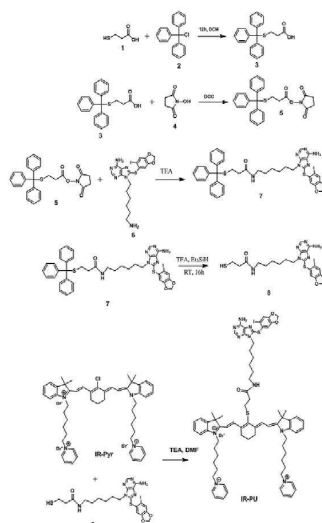


- 전체 청구항 수 : 총 17 항

(57) 요약

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 41/0057 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

아제쉬 피. 토마스

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이안중

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

김기범

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711050025

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(미래부)

연구과제명 세포 소기관 표적 자기조립을 통한 새로운 항암치료 연구

기 여 율 1/2

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711048290

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원

연구과제명 다공성 플랫폼 기반 생체모방 촉매

기 여 율 1/2

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

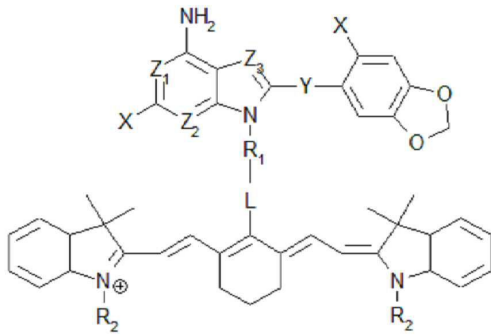
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

[화학식 I]



여기에서,

L은 N, S 또는 O 이고;

Z₁, Z₂ 및 Z₃은 독립적으로 C 또는 N이고;

Y는 -CH₂- 또는 -S- 이고;

X는 수소 또는 할로젠이고;

R₁은 $\#-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\#$, $\#-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-\#$, $\#-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-\#$, 또는 $\#-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-\#$ 이며,

여기에서,

#은 상기 화학식 I에서 N과의 부착 부위, #'은 L과의 부착 부위이고,

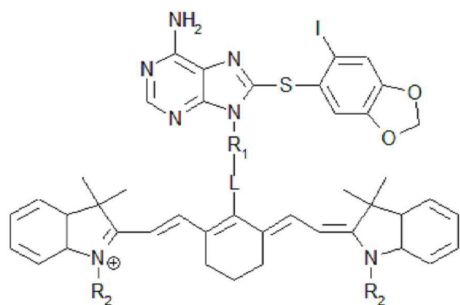
m은 1 내지 3의 정수, n은 1 내지 8의 정수이고; 및

R₂는 독립적으로, 알킬, n-프로필, 1-피리딜헥실 (1-pyridylhexyl) 또는 4-술포부틸 (4-sulfobutyl)인 것인 화합물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 II로 표시되는 것인 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

[화학식 II]



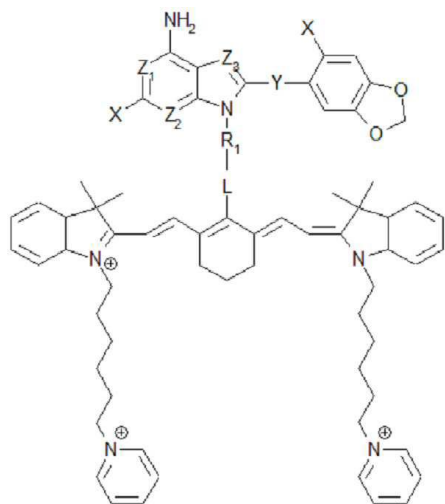
여기에서,

L, R₁, 및 R₂는 상기 정의된 바와 같은 것인 화합물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 III로 표시되는 것인 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

[화학식 III]



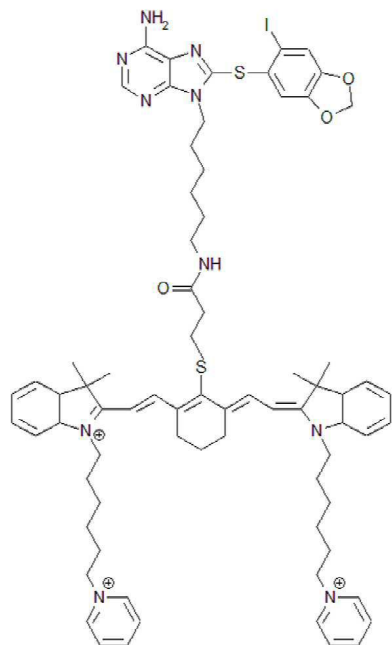
여기에서,

L, Z₁, Z₂, Z₃, X, R₁, 및 Y는 상기 정의된 바와 같은 것인 화합물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 IV로 표시되는 것인 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

[화학식 IV]



청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 광역학 진단을 위한 약학 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 조성물은 세포의 샤페론(Chaperones)에 결합하는 것인 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 샤페론은 열충격 단백질 90(Heat shock protein 90: Hsp90) 또는 트랩1(TNF receptor-associated protein 1 : TRAP1)인 것인 조성물.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 조성물은 타겟 세포에 축적되는 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 광역학적 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 조성물은 세포의 샤페론에 결합하여 활성을 억제하는 것인 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 샤페론은 Hsp90 또는 TRAP1인 것인 조성물.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 조성물은 타겟 세포에 축적되는 것인 조성물.

청구항 13

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을

유효성분으로 하는 암 치료를 위한 약학 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 조성물은 세포의 샤페론에 결합하여 활성을 억제하는 것인 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 샤페론은 Hsp90 또는 TRAP1인 것인 조성물.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 상기 조성물은 타겟 세포에 축적되는 것인 약학 조성물.

청구항 17

청구항 13에 있어서, 상기 암은 위암, 후두암, 방광암, 폐암, 식도암, 간암, 췌장암, 피부암, 담도암, 또는 자궁 경부암인 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HSP90 억제 효과와 광감작제로서의 효과를 동시에 갖는 새로운 광역학 치료제 및 그 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광역학 치료법(photodynamic therapy: PDT)은 광민감성 물질, 즉 광감작제(photosensitizer)를 이용하여 수술 없이 종양 또는 암 등의 난치병을 치료하는 기술을 일컫는다. 암 치료에 사용되는 PDT는 광민감성 물질에 빛을 조사하여 그로 인해 산소분자(O_2)를 일중항 산소(1O_2 , singlet oxygen)로 변화시키거나, 새로운 라디칼을 만들어 종양 세포만을 표적하여 선택적으로 죽이는 효과를 갖는다.

[0003] 최근 광역학 치료제는 기존의 약제가 가지고 있는 문제점을 개선하려는 노력과 광화학적 특성이 우수한 새로운 물질의 탐색에 맞추어져 있다. 기존 약은 종양 형성을 촉진의 주요 원인인 미토콘드리아를 표적으로 하는 감작제가 대부분인데, 미토콘드리아를 표적으로 하는 감작제는 미토콘드리아 기능 장애와 암세포의 세포 사멸을 일으키는 것으로 밝혀졌다. 그러나, PDT 진행 동안 감작제의 낮은 종양 선택성 및 항-괴사제의 높은 과다 발현으로 인한 낮은 치료 효능은 주요 문제점이었다. 이는 암세포에서 열충격 단백질(Heat shock protein : Hsp) 계열 단백질, 예를 들면 Hsp90(90 kDa)과 TRAP1(75 kDa)이 과발현되어 이들 감작제의 대상이 되는 단백질의 활성을 억제하기 때문이다.

[0004] 따라서, PDT에 있어서, 종양 선택성을 높이고, 치료 효능을 증진시키기 위한 기술의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 퓨린 유도체와 인도시아닌 유도체가 접합된 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 광역학적 진단을 위한 용도를 제공하는 것이다.

[0007] 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 광역학적 치료를 위한 용도를 제공하는 것이다.

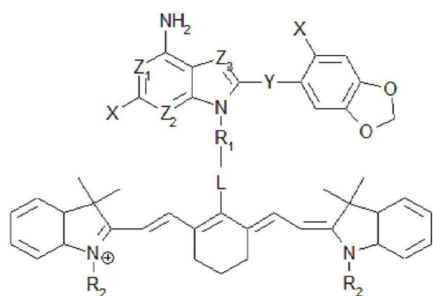
[0008] 다른 일 양상은 상기 일 양상에 따른 화합물의 암을 치료하기 위한 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 양상은 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염

을 제공한다.

[화학식 I]



여기에서,

L은 N, S, 또는 O 이고;

Z₁, Z₂ 및 Z₃은 독립적으로 C 또는 N이고;

Y는 -CH₂- 또는 -S- 이고;

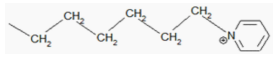
X는 수소 또는 할로젠이고;

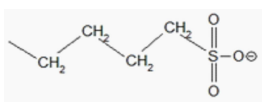
R₁은 $\#-[CH_2]_n-NH-C(=O)-[CH_2]_m-\#$, $\#-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-\#$, $\#-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-\#$, 또는 $\#-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-\#$ 이며,

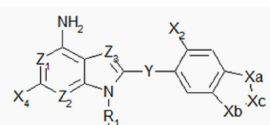
여기에서,

#은 상기 화학식 I 에서 N과의 부착 부위, #'은 L과의 부착 부위이고,

m은 1 내지 3의 정수, n은 1 내지 8의 정수이고; 및

R₂는 독립적으로 메틸, n-프로필, 1-피리딜헥실 (1-pyridylhexyl, ) 또는 4-술포부틸

(4-sulfobutyl, )인 것인 화합물이다.

상기 화학식 I 에서 에 해당하는 부분은 퓨린의 유도체에 해당할 수 있다. 퓨린은 화학

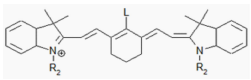
식 로 이루어진 헤테로 사이클릭(Heterocyclic) 계열의 유기화합물이다. 헤테로사이클릭은 고리 구조 내에 적어도 하나의 탄소 원자, 및 황(S), 산소(O) 또는 질소(N)와 같은, 적어도 하나의 탄소 이외의 원소를 포함하는 모이어티를 말한다. 이 헤테로사이클릭은 방향족 고리 또는 포화된 및 불포화된 비방향족 고리 중 어느 것일 수 있다. 상기 퓨린의 유도체 부분은 Hsp90과 결합하여 이를 억제하는 기능을 제공할 수 있다.

'메틸'은 포화된 1가의 탄화수소 라디칼을 지칭하는 알킬의 한 예이다. 알킬 기는 직쇄형이거나 측쇄형일 수 있다. 알킬 기 내에서 탄소 원자의 수는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개, 또는 1개, 2개, 3개, 또는 4개일 수 있다. 탄소 원자의 수에 따라, 알킬은 메틸(1개), 에틸(2개), n-프로필과 이소프로필을 포함하는 프로필(3개), n-부틸, sec-부틸, 이소부틸 및 tert-부틸을 포함하는 부틸(4개), n-펜틸, 1-메틸부틸, 이소펜틸, 네오펜틸 및 tert-펜틸을 포함하는 펜틸(5개), n-헥실, 3,3-디메틸부틸 및 이소헥실을 포함하는 헥실(6개)일 수 있다. 각각의 화합물이 충분히 안정적이고, 의약 물질로서의 용도와 같이 원하는 목적에 적합하기만 하다면, 치환된 알킬 기는 임의의 위치에서 치환될 수 있다. 상기 일 양상에서 'n-프로필'은 탄소 원자의 수가 3개인 1가의 탄화수소

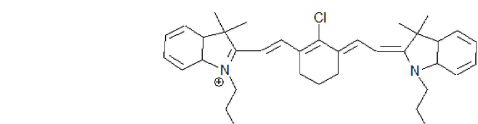
라디칼로서 직쇄형일 수 있다.

[0024] 용어 “할로젠”은 다른 언급이 없으면, 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 포함하며, 예를 들어 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 화학식 I에서 R_1 은 $\#-[CH_2]_n-NH-C(=O)-[CH_2]_m-\#$, $\#-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-\#$, $\#-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-\#$, 또는 $\#-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-\#$ 일 수 있다. R_1 은 합성과정에서 인도시아닌 유도체와 퓨린 부분을 이어주는 부분으로 합성 과정의 변경에 따라 상기와 같이 구성될 수 있다. 상기 부분은 미토콘드리아-관통성 부분에 해당할 수 있다. 상기 $\#-[CH_2]_n-NH-C(=O)-[CH_2]_m-\#$ 부분은 펩티드 결합 (또는 아마이드 결합) 링커를 갖는 것으로 양쪽에 알킬기가 치환될 수 있다. 상기 부분은 상기 화합물이 세포 내 미토콘드리아를 관통하여 미토콘드리아 내부의 TRAP1과 결합할 수 있는 효과를 제공한다. 상기 알킬기의 수는 상기에서 정의한 바와 같다.

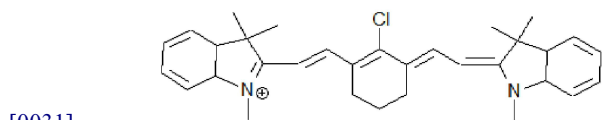
[0026] 상기 화학식 I에서 에 해당하는 부분은 인도시아닌 유도체로서 광역학 치료제에서 광감작제의 효과를 갖을 수 있다. 인도시아닌 유도체 중 잘 알려진 물질에는 IR-780이 있고, 대부분의 유도체는 IR-780 또는 IR-780의 이성질체를 기반으로 유도된 화합물일 수 있다. IR-780은 하기 화학식 A의 화합물이고, 이의 이성질체를 포함할 수 있다.

[0027] [화학식 A]



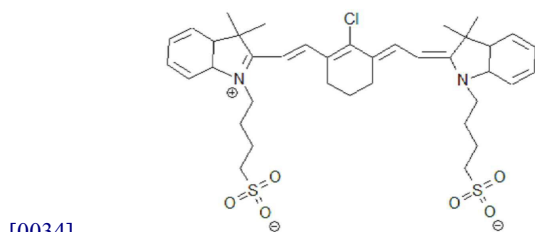
[0028] 또 다른 인도시아닌 유도체로는 IR-775, IR-783, 및 IR-Pyr이 있을 수 있다. IR-775는 하기 화학식 B의 화합물이고, 이의 이성질체를 포함할 수 있다.

[0030] [화학식 B]



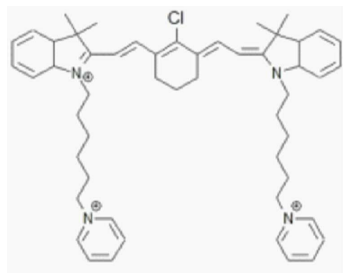
[0031] IR-783은 하기 화학식 C의 구조를 갖는 화합물이고, 이의 이성질체를 포함할 수 있다.

[0033] [화학식 C]



[0034] IR-Pyr는 하기 화학식 D의 구조를 갖는 화합물이고 이의 이성질체를 포함할 수 있다. 수용성 인도시아닌 유도체인 IR-Pyr은 미토콘드리아에서 IR-780보다 우수한 광 안정성을 보일 수 있다. 또한, 두 개의 1-피리딜핵심기는 미토콘드리아의 표적 기능을 할 수 있다.

[0036] [화학식 D]



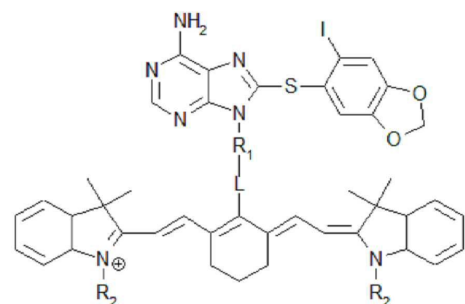
[0037]

[0038] 용어 '이성질체(isomer)'는 분자식은 같지만 서로 다른 물리/화학적 성질을 갖는 분자들을 이르는 말이다. 화학적 결합의 순서가 바뀌는지 여부에 따라서 구조 이성질체와 입체 이성질체로 나뉠 수 있다. 구조 이성질체는 화학적 결합의 순서(결합 관계)가 다른 분자로 치환기의 명칭이 바뀌어 명칭이 바뀌는 경우가 일반적일 수 있다. 입체 이성질체는 광학 활성 유무에 따라서 광학 이성질체와 부분입체 이성질체로 크게 구분할 수 있다. 그리고, 부분입체 이성질체는 입체 이성질 현상의 근거에 따라서 기하 이성질체와 형태 이성질체 등으로 구분할 수 있다.

[0039] 상기 화합물의 이성질체는 기하 이성질체(또는 시스-트랜스 이성질체)로서, 이는 분자 안에서의 작용기 방향에 따른 입체 이성질체일 수 있다. 일반적으로 이러한 이성질체는 회전할 수 없는 이중 결합을 포함할 수 있다. 결합의 회전이 크게 제한되는 고리 구조 때문에 이성질체가 생길 수 있다.

[0040] 일 양상에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 II로 표시되는 것인 화합물일 수 있다.

[0041] [화학식 II]



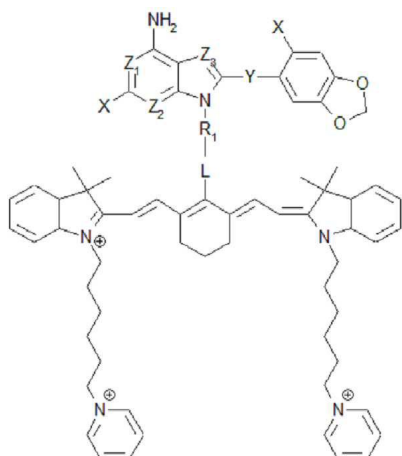
[0042]

[0043] 여기에서,

[0044] L, R₁, 및 R₂는 상기 정의된 바와 같다.

[0045] 일 양상에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 III로 표시되는 것인 화합물일 수 있다.

[0046] [화학식 III]



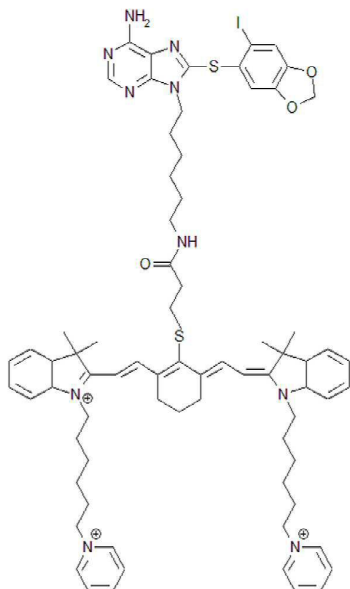
[0047]

[0048] 여기에서,

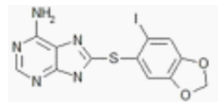
[0049] L, Z₁, Z₂, Z₃, X, Y, R₁ 및 Y는 상기 정의된 바와 같다.

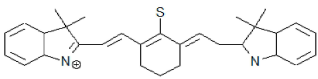
[0050] 일 양상에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 IV로 표시되는 것인 화합물일 수 있다.

[0051] [화학식 IV]



[0052]

[0053] 상기 화합물은 Hsp90과 같은 샤페론을 억제할 수 있는 퓨린 유도체 부분인 , 미토콘드리아

관통성 부분인 $-(CH_2)_6-NH-C(=O)-(CH_2)_2-$, 광감작제 역할을 하는 부분인 , 및 미토콘드리아 표적 부분인 2개의 1-피리딜헥실 부분으로 구성될 수 있다.

[0054] 상기 화합물에서, 모든 원자는 원자가를 만족시키기 위해 충분한 수소 또는 수소가 아닌 치환기를 갖거나, 약학적으로 허용 가능한 반대 이온을 포함할 수 있다.

[0055] 다른 일 양상은 상기 화합물, 이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 광역학적 진단을 위한 조성물을 제공한다.

[0056] '광역학'은 '광역동학' 또는 '광학'으로서, 광감작제(photosensitizer)가 빛과 산소에 의해 화학적 반응을 일으킴으로써 일중항 산소(singlet oxygen)와 이에 의해 유발되는 자유 라디칼(free radical)이 목적하는 세포만 선택적으로 파괴하는 원리를 의미한다. 구체적으로, 광감작제가 세포 조직에 선택적으로 흡수되게 한 후, 광감작제에 민감한 흡수 파장을 가진 레이저를 조사하면 광감작제가 여기되면서 광에너지를 세포 조직 내의 산소에게 전달할 수 있다. 에너지를 전달받은 기저 상태의 산소는 화학 반응성이 뛰어난 활성산소나 라디칼 상태의 산소를 발생시켜 주변 세포와 혈관 조직을 화학적으로 파괴하기 시작한다. 이로 인해 세포는 세포자멸사(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)를 진행하게 된다(cytotoxic effect). 또한 이 과정에서 발생하는 트롬복산 A2(thromboxane A2)에 의하여 중양의 신생혈관 형성을 차단하여 허혈성 괴사(ischemic necrosis)를 일으켜 목적하는 세포를 파괴할 수 있다.

[0057] '광역학적 진단'은 상기 광역학의 원리를 활용하여, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 광역학적 진단의 대상이 되는 질병은 종양, 암, 또는 표재성 피부질환 등이 있을 수 있다. 일 구체예에서 상기 조성물은 암 진단을 위한 조성물일 수 있다. 암은 '악성 종양' 또는 '악성 신생물'을 의미한다. 다른 구체예에서, 상기 조성물로서 진단할 수 있는 암은 위암, 후두암, 방광암, 폐암, 식도암, 간암, 췌장암, 피부암, 담도암, 및 자궁 경부암일 수 있다. 가장 보편적으로 적응이 되는 암은 폐암과 식도암일 수 있다. 암 이외에 바렛식도와 같은 암으로 이행하기 쉬운 질환에도 사용될 수 있다. 광역학은 조직학적으로 모든 범위의 암에 효과를 보일 수

있으나 치료방법이 빛을 직접 종양조직에 전달해야 되고 레이저 광선의 투과 깊이에 한계가 있으므로 표재성 종양이나 고형암의 경우 외경이 2cm 미만인 종양에 적용될 수 있다. 따라서 기관지내시경, 소화기 내시경, 방광경, 질경 등을 통하여 종양을 볼 수가 있고 광섬유가 접근 가능한 암이 일차 대상이 될 수 있다.

[0058] 일 구체예에서, 상기 조성물은 세포의 샤페론에 결합하여 활성을 억제하는 것일 수 있다. '샤페론(Chaperone s)'은 '분자 샤페론(molecular Chaperones)' 또는 '샤페론 분자(Chaperones molecular)'를 의미한다. 샤페론은 단백질의 폴딩(folding)을 조절하는 단백질일 수 있다. 이들은 새로이 합성되거나 변성되거나 또는 미스폴딩(misfolding)된 단백질의 노출면에 비공유 결합하여 기질 단백질이 응집되지 않고 정확한 형태로 폴딩되는 것을 도울 수 있다. 이외에도 샤페론은 단백질 합성, 단백질 전이 및 DNA 복제와 같은 다수의 세포 프로세스에 관여할 수 있다. 샤페론 활성(chaperone activity)은 그 목적 단백질과 결합하여 그 단백질이 천연적으로 갖는 생리 활성을 나타내도록 단백질의 폴딩을 보조하거나, 단량체가 다량체로 결합하는 것을 보조하거나, 목적 단백질이 불활성 형태로 응집하는 것을 방지하거나, 또는 멤브레인으로의 타겟팅 과정을 보조하는 활성을 의미한다.

[0059] 샤페론에는 열충격 단백질(Heat shock protein : Hsp)이 있을 수 있다. Hsp에는 Hsp27, Hsp60(chaperonin), Hsp70, Hsp90, Hsp104, 등이 있을 수 있다. 일 구체예에서, 상기 조성물이 결합하는 샤페론은 세포의 Hsp90 또는 트랩1(TNF receptor-associated protein 1 : TRAP1)일 수 있다.

[0060] Hsp는 세포 내의 단백질의 폴딩과 운반에 관여하는 샤페론 분자 중의 하나일 수 있다. 이 중 Hsp90은 90 kDa의 ATP-의존적인 샤페론 분자로 다양한 신호전달분자와 전사인자의 단백질구조의 성숙과 3차 구조를 완성하는데 관여할 수 있다. 이때 결합하는 목적 단백질은 클라이언트 단백질일 수 있다. 클라이언트 단백질에는 다양한 종류의 종양유전자, 전사인자, 스테로이드 수용체 등이 있을 수 있다. Hsp90은 정상 및 스트레스 조건에서 다양한 키나제(kinase), 전사조절 인자, 신호전달 물질, 효소 등의 안정화와 활성을 조절함으로써, 세포의 성장, 분화, 생존과 관련된 다양한 생물학적 기능을 담당할 수 있다. 또한 Hsp90은 세포 내에 불안정한 단백질의 완충제로서의 역할을 통해 생물의 진화 및 질병 상태의 유지에도 기여할 수 있다. TRAP1은 상기 Hsp90의 상동 단백질 중 하나로서, 세포소기관, 소포체, 및 미토콘드리아 내에 위치할 수 있다. 따라서, 일 구체예에서 상기 조성물은 세포의 미토콘드리아 표적 광감작제일 수 있다.

[0061] 일 구체예에서 상기 조성물은 목적하는 타겟 세포에 축적되는 것일 수 있다. 다른 구체예에서, 목적하는 세포는 암세포, 종양세포일 수 있다. 일반적으로 광감작제는 암세포 또는 종양세포에 축적될 수 있다. 종양 조직은 저밀도 지질단백질(low-density lipoprotein : LDL)의 증가, 대식세포(macrophage), 산성 등이 특징인데, 이러한 특징이 정상 조직과 구별되어 광감작제의 종양선택성에 관계할 수 있다. 예를 들어 폐암이나 뇌종양 등의 경우 LDL-수용체는 정상조직보다 100배 이상 과발현되어 있으므로 정맥 주사된 광감작제는 혈중의 LDL과 결합한 후 종양 조직에 이르게 되면 과발현된 암세포 표면의 LDL-수용체에 결합하면서 세포 내로 들어가게 될 수 있다. 하지만, 일 구체예의 조성물은 상기한 기전과는 상이한 다음과 같은 기전으로 종양 선택성과 세포 축적성이 향상될 수 있다.

[0062] 암 세포 또는 종양 세포는 Hsp와 같은 샤페론이 활성화되어 있을 수 있는데, 암세포의 생성에 관련된 Her2/ErbB2, v-Src, Hif-1 α , Raf-1, AKT, hTERT 등을 포함한 50 여 가지의 단백질들은 Hsp90의 목적 단백질(target protein) 내지 클라이언트 단백질일 수 있다. 보통의 세포에서 Hsp90은 클라이언트와 결합하지 않는 상태로 존재하지만, 암 세포에서는 종양 유전자와 결합한 활성화된 Hsp90이 많이 발견될 수 있다. 따라서 상기 조성물은 Hsp와 같은 샤페론에 결합하는 성질로 인하여 샤페론이 활성화된 세포에 선택적으로 결합할 수 있고, 그곳에 축적될 수 있다.

[0063] 한편, PDT를 진행하는 중, 암세포에서 과다 발현된 Hsp90 또는 TRAP1은 세포에서 항괴사제의 작용을 할 수 있다. 이에 따라, PDT의 주요 기전인 세포자멸사 내지 세포괴사의 효과가 제한되어 PDT의 치료 효능이 저하될 수 있다. 일 구체예에서 상기 조성물은 Hsp90 또는 TRAP1의 결합, 암세포의 축적 이외에 상기와 같이 Hsp90과 같은 샤페론의 활성을 억제할 수 있으므로, 세포자멸사 효과를 향상시킬 수 있어, PDT의 치료 효능이 강화될 수 있다.

[0064] 따라서, 다른 일 양상은 어느 한 항의 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 광역학적 치료를 위한 약학 조성물을 제공한다. 광역학적 치료란 상기 광역학의 원리를 이용하여, 목적하는 세포를 자멸사시켜 세포를 파괴하는 치료를 의미한다. 상기 조성물은 샤페론에 결합할 수 있는 특성으로, Hsp90 또는 TRAP1과 같은 샤페론이 활성화된 세포 내지 암세포 내부에 침투 및 결합하여, 목적하는 세포에 축적될 수 있다. 그리고, 광역학의 원리에 따라 빛을 조사하면, 상기 조성물은 상기한 바와 같이 세포의 자멸사 또는 괴사를 진행시킬 수 있다.

[0065] 용어 "치료"는 개체에서 증상의 시작을 지연시키는 것, 심각성을 경감시키는 것 또는 암, 또는 다른 조건의 증후성 진행을 지연시키는 것을 말한다. 게다가, 이 치료 목표의 특정한 결과는 개체마다 각기 다를 것이고, 어떤 개체는 대표 인구에 대한 통계적 평균보다 더 크거나 더 작은 이득을 얻을 수 있다고 인식될 것이다. 그러므로, 치료는 치료적 이득을 얻을 것이라는 기대를 갖고서, 필요로 하는 개체에 대해 조성물을 투여하는 것을 말한다.

[0066] 다른 일 양상은 상기 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 치료를 위한 약학 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 PDT의 광감작제로서, 광역학 치료를 통한 암 치료 조성물일 뿐만 아니라, Hsp억제제로서의 암 치료의 효능도 갖을 수 있다. 다양한 종양유전자를 클라이언트로 가지고 있는 Hsp90의 억제제를 사용한 암 치료 타겟으로는 EGFR, ERBB2, c-MET, PDGFR, IGFR, FGFR3, EML4-ALK 융합 단백질, JAK-STAT 신호전달경로 등이 있을 수 있다. 다른 구체예에서 상기한 바와 같이 상기 암은 위암, 후두암, 방광암, 폐암, 식도암, 간암, 췌장암, 피부암, 담도암, 또는 자궁 경부암일 수 있다.

발명의 효과

[0067] 일 양상에 따른 화합물, 이의 부분입체 이성질체, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 이를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 기존의 PDT 치료법 보다 향상된 종양 선택성 및 세포 축적성을 갖추고 있어, 암을 포함한 치료에서 치료 효능을 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 IR-PU의 개략적인 합성 방법을 나타낸 그림이다.

도 2a는 일구체예에 따른, IR-PU와 IR-Pyr의 일중량 산소 생성량의 비교를 나타낸 그래프이다.

도 2b는 일구체예에 따른, IR-PU와 IR-Pyr, 및 PU-H71의 TRAP1 단백질의 억제 효과를 비교한 데이터를 나타낸 그래프이다.

도 2c는 일구체예에 따른, IR-PU와 IR-Pyr, 및 PU-H71의 HSP90 단백질의 억제 효과를 비교한 데이터를 나타낸 그래프이다.

도 3은 일구체예에 따른, IR-PU의 미토콘드리아 표적 여부를 알아보기 위해 미토-트래커를 사용하여 IR-PU와의 상호위치 분석에 대한 결과를 나타낸 이미지이다.

도 4a와 4b는 일구체예에 따른, 미토삭스(MitoSOX)를 통하여, IR-PU의 미토콘드리아 표적 여부에 대한 결과를 나타낸 이미지이다.

도 5a와 5b는 일구체예에 따른, 미토콘드리아 막의 탈분극 변화를 조사하여, IR-PU의 TRAP1결합과 ROS 발생에 의한 세포 사멸 유도 결과를 나타낸 이미지이다.

도 6a와 6b는 일구체예에 따른, 인간 NCI-H460 종양세포에 대한 IR-PU의 세포 독성 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6c와 6d는 일구체예에 따른, 마우스의 간세포에 대한 IR-PU의 세포 독성 결과와, HSP 억제제인 노보비오신을 사용한 대조군과 비교하여, IR-PU의 HSP 억제 효능을 나타낸 그래프이다.

도 7a는 일구체예에 따른, IR-PU의 HSP억제와 TRAP1 억제 효능을 나타낸 그래프이다.

도 7b는 일구체예에 따른, IR-PU와 IR-Pyr의 세포 독성 효과를 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8a, 8b는 일구체예에 따른, 마우스에 이식한 인간 NCI-H460 종양세포에 대한 IR-PU의 종양세포 표적 여부를 나타낸 이미지이다.

도 8c는 일구체예에 따른, 마우스에 이식한 인간 NCI-H460 종양세포에 대한 IR-PU의 종양세포 표적과 세포 축적의 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8d는 일구체예에 따른, 마우스에 이식한 인간 NCI-H460 종양세포에 대한 IR-Pyr의 종양세포 표적 여부를 나타낸 이미지이다.

도 8e와 8f는 일구체예에 따른, 마우스에 이식한 인간 NCI-H460 종양세포에 대한 IR-PU의 종양세포 부피 및 중량의 변화 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0069] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0070] **실시예 1. IR-PU의 제조**
- [0071] IR-PU의 제조과정은 도 1에서 간략하게 나타냈다. 합성 시약과 재료는 화학 약품 공급 업체(Sigma Aldrich 및 Alfa Aesar)에서 얻은 것으로 사용했다. 모든 용매는 사용 전에 표준 방법으로 건조한 후에 사용했다.
- [0072] 애질런트(Agilent) 400 MHz 분광기에서 스펙트럼을 기록하였다. 스펙트럼은 SiMe₄에 대한 잔류 용매(CD₃OD-d₄의 경우, ¹H δ = 3.34 및 ¹³C δ = 49.86)의 공명을 이용하여 내부적으로 참조하였다. ESI-MS 스펙트럼은 Bruker사의 1200 시리즈 및 HCT 기본 시스템에 기록하였다.
- [0073] IR-Pyr의 합성은 A. P. Thomas, L. Palanikumar, M. T. Jeena, K. Kim, J. -H. Ryu, *Chem. Sci.* 2017, 8, 8351-8356.에서 이미 알려진 방법을 통하여 합성하였다.
- [0074] 화합물 (1)인 3-메르카프토 프로파노익산 (3-mercapto propanoic acid) 1g, 9.25 mmol과 화합물 (2)인 트리틸 클로라이드 (trityl chloride) 2.57 g, 9.25 mmol을 아르곤 공기 중, 건조 CH₂Cl₂ 에 용해시켰다. 상기 혼합물을 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 침전물을 CH₂Cl₂, 헥산을 통하여 세척하고, 디에틸 에테르로 다시 세척한다. MeOH/H₂O 으로 재결정하여 75%의 수득률로 화합물 (3)을 합성하였다.
- [0075] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298K): δ = 7.35 (d, 6H), 7.18 - 7.32 (m, 9H), 2.36 (t, 2H), 2.15 (t, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.21, 144.58, 129.46, 127.79, 126.58, 49.39, 49.18, 48.96, 48.75, 48.54, 33.24, 26.76. ESI-MS: m/z calculated for C₂₂H₂₀O₂S = 348.46; found = 371.55 (M+Na).
- [0076] 상기 방법으로 합성된 화합물 (3)의 용액(1 g, 2.87 mmol)과 N-히드록시숙신이미드 (N-hydroxysuccinimide) 0.363 g, 3.1 mmol을 CH₂Cl₂ 상에서 DCC 0.592, 2.87 mmol과 혼합하고, 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 상기 용매를 증발시키고, 상기 혼합물을 실리카겔 컬럼에 의해 정제하여 70 % 수득율로 목적하는 화합물 (5)를 수득하였다.
- [0077] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298K): δ = 7.44 (dd, 6H), 7.29 (t, 6H), 7.22-7.26 (m, 3H), 2.78 (s, 4H), 2.55 (t, 2H), 2.40 (t, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168.85, 167.04, 144.31, 129.50, 128.04, 126.82, 49.29, 33.81, 30.50, 26.09, 25.57, 25.53, 24.89. ESI-MS: m/z calculated for C₂₆H₂₃NO₄S = 445.53; found = 449.69).
- [0078] 상기 화합물 (5) 0.5 g, 1.12 mmol과 화합물 (6) 0.575 g, 1.12 mmol을 건조 DMF에서 용해시키고, TEA 0.170 g, 1.68 mmol을 서서히 첨가하였다. 상기 혼합물을 상온에서 16시간 동안 교반하였다. 용매는 진공으로 제거하고, 상기 혼합물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 80%의 수득률로 목적하는 화합물 (7)을 수득하였다.
- [0079] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 298K): δ = 8.22 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.37-7.39 (m, 6H), 7.28 (s, 1H), 7.26 (t, 3H), 7.24 (t, 2H), 7.23 (t, 1H), 7.21 (t, 1H), 7.19 (t, 1H), 6.08 (s, 2H), 3.17 (t, 2H), 2.4 (t, 2H), 2.21 (t, 2H), 1.86 (t, 2H), 1.48-1.54 (m, 2H), 1.38-1.45 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 176.31, 155.72, 154.49, 154.37, 153.44, 152.80, 148.69, 133.27, 132.38, 131.45, 130.31, 128.19, 123.31, 118.65, 106.87, 99.53, 70.24, 47.79, 42.69, 38.42, 32.92, 32.71, 31.71, 29.85, 29.83. ESI-MS: m/z calculated for C₄₀H₃₉IN₆O₃S₂ = 842.82; found = 844.25.
- [0080] 상기 화합물 7의 용액 (0.20 g, 0.24 mmol) CH₂Cl₂ 상에서 TFA 0.067 g, 0.59 mmol, 트리에틸실란 (triethylsilane) 0.110 g, 0.95 mmol과 함께 시작 물질의 소진까지 상온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 CH₂Cl₂ 로 희석하고, 5%의 NaHCO₃로 세척하였다. 무수 Na₂SO₄ 로 건조시키고, 용매는 증발시켰다. 상기 혼합물을 에틸 아세테이트/헥산 용리액을 사용한 실리카겔 컬럼에서 정제하여, 70%의 수득률로 화합물 (8)을 수득하였다.
- [0081] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 298K): δ = 8.22 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 5.99 (s, 2H), 4.22 (t,

2H), 3.07 (t, 2H), 2.61-2.64 (m, 2H), 2.34-2.37 (m, 2H), 1.76-1.79 (m, 2H), 1.39-1.41 (m, 2H), 1.29-1.32 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 172.30, 151.29, 150.67, 150.38, 149.53, 144.7, 124.51, 119.36, 118.7, 114.54, 102.91, 95.30, 39.31, 38.75, 28.97, 28.78, 25.97, 25.84, 19.77; ESI-MS: m/z calculated for C₂₁H₂₅IN₆O₃S₂ = 600.50; found = 601.39.

[0082] 상기 화합물 (8)의 용액 (0.10 g, 0.16 mmol)과 이미 제조된 IR-Pyr 0.169 g, 0.16 mmol을 상온에서 16시간 동안, DMF 상에서 TEA 0.025 g, 0.25 mmol과 교반하였다. 용매는 증발시키고, 상기 혼합물은 역상 HPLC (메탄올/물을 사용한 C18 컬럼)에 의하여 정제하였다. 65%의 수득률로 목적하는 화합물 IR-PU를 제조하였다.

[0083] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 298K): δ = 8.99 (dd, 4H), 8.88 (s, 1H), 8.40 (d, 1H), 8.58 (t, 2H), 8.28 (d, 1H), 8.08-8.12 (m, 4H), 7.47-7.50 (dd, 2H), 7.42 (d, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.25-7.29 (m, 3H), 7.22 (d, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.24 (d, 1H), 6.07 (d, 2H), 4.61-4.66 (m, 4H), 4.26 (t, 2H), 4.15 (t, 4H), 3.14 (t, 2H), 3.05 (t, 2H), 2.65 (t, 4H), 2.52 (t, 2H), 2.65 (t, 4H), 2.52 (t, 2H), 2.00-2.06 (m, 4H), 1.85 (t, 6H), 1.74 (d, 11H), 1.47-1.55 (m, 10H), 1.38 (t, 4H), 1.28 (d, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 174.68, 173.61, 162.72, 162.35, 159.00, 147.73, 146.75, 145.94, 144.96, 143.24, 135.52, 130.69, 130.36, 127.16, 126.53, 124.34, 121.57, 120.84, 119.81, 116.93, 112.83, 105.17, 97.75, 63.81, 51.34, 46.02, 48.88, 41.19, 38.09, 35.62, 33.15, 31.17, 31.01, 29.31, 29.09, 28.37, 28.24, 28.10, 28.05, 27.88, 25.06, 22.98; ESI-MS: m/z calculated for C₇₃H₈₈IN₁₀O₃S₂³⁺ = 447.85; found = 448.69.

[0084] 인간 자궁 경부암 세포(HeLa 세포)와 인간 폐암 세포(NCI-H460 세포)를 37 °C, 5 % CO₂의 습윤상태에서 10 % 소태아혈청(fetal bovine serum : FBS)(Life Technologies)과 1 % 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 DMEM 배지 또는 RPMI 배지에 배양하였다. 8주의 BALB/c 마우스로부터 1차 간세포를 분리하기 위해, 마우스를 마취시키고, 간을 콜라게나제 용액으로 관류시키고, 해부하고, 덩어리를 피펫팅하여 파괴하여, 100-μm 세포 여과기(BD Biosciences)를 통해 여과시켰다. 세포를 M199/EBSS 배지(Hyclone)에서 반복적으로 원심분리 및 재현탁하여 수회 세척하였다. 세포 파편과 비실질세포를 퍼콜(Percoll, Sigma)을 이용한 밀도구배원심분리(gradient centrifugation)으로 간세포로부터 분리하였다. 반복하여 세척한 후, 세포 펠렛을 재현탁하고, 37 °C, 5 % CO₂에서 10 % FBS가 보충된 M199/EBSS 배지에 배양하였다.

[0085] 실험예 1. IR-PU의 1O₂(일중항 산소) 발생 비교

[0086] IR-PU의 광-유도 일중항 산소(¹O₂) 생성과 HSP90/TRAP1 억제 효능을 조사하기 위해, 일중항 산소 센서 그린(singlet oxygen sensor green:SOSG)를 사용하여 PDT의 1차 표준인 ¹O₂를 생성하는 능력을 조사하였다.

[0087] PBS 중의 IR-PU를 SOSG의 등몰량 용액(equimolar solution)과 혼합하여 형광 강도의 변화를 측정하였다. 전자 흡수 스펙트럼 및 정상 상태 형광 스펙트럼을 각각 분광 광도계(JASCO V-670) 및 형광 분광 광도계(Hitachi F-7000)에 기록하였다. 서로 다른 시간 간격으로 레이저 광(808 nm, 200 mW)을 조사하기 전후에, 504 nm에서 여기한 후 530 nm에서 SOSG를 관찰하였다. SOSG의 향상된 방출 강도는 단일의 증가된 생성 산소를 함유한다. 결과는 도 2a에서 나타낸다.

[0088] 도 2a에서 나타난 바와 같이, IR-PU는 IR-Pyr에 비하여 높은 ¹O₂의 생성을 보였다. 동시에, IR-PU가 없이 SOSG만 있는 조사 및 조사가 없는 형광 측정은 형광 강도를 나타내지 않았고, ¹O₂의 광 여기(excitation) 생성을 확인하였다. 이 결과는 IR-PU가 IR-Pyr보다 광 여기에서 ¹O₂를 생성하기 위한 3중 집단이 많다는 것을 나타낸다.

[0089] 실험예 2. HSP90 및 TRAP1의 억제 효능 비교

[0090] IR-PU의 PU-H71 부분은 Hsp90 및 TRAP1의 ATP 결합 포켓에 대한 경쟁적인 억제제이다. HSP90 및 TRAP1에 대한 IR-PU의 결합 친화도를 알아보기 위하여, PU-H71-FITC 프로브를 사용하여 형광 편광을 측정하였다. 결과는 도 2b 및 2c에 나타내었다.

[0091] 도 2b 및 2c에서 나타난 바와 같이, 데이터는 IR-PU가 PU-H71(공지된 HSP 억제제)에 비하여, TRAP1에 대해 높은

결합 친화도, HSP90에 대해선 다소 낮은 친화도를 갖는 반면, 대조 화합물인 IR-Pyr은 IR-PU에 비하여 전혀 친화성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 IR-PU가 HSP90 및 TRAP1 모두에 대해 높은 친화성을 갖는 것으로 판단된다.

[0092] **실험예 3. HeLa 세포주에서 미토-트랙커와 IR-PU의 상호 위치 분석**

[0093] IR-PU의 미토콘드리아 표적 여부를 알아보기 위해, 미토-트랙커와 IR-PU의 상호 위치 분석을 진행하였다.

[0094] 인간 자궁 경부암 세포(HeLa 세포)를 37 °C, 5 % CO₂의 습윤상태에서 10 % 소태아혈청(fetal bovine serum : FBS)(Life Technologies)과 1 % 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 DMEM 배지 또는 RPMI 배지에 배양하였다.

[0095] HeLa 세포를 2x10⁵ cell/well의 시딩 밀도(seeding density)로 한 개의 웰 커버 글래스(Lab Tek II, Thermo Scientific)에 시딩하였다. 24 시간 후, 세포를 2.5 μM의 IR-PU로 4 시간 동안 처리하고 새로운 매질로 대체한 후, 미토-트랙커 그린(Mito-tracker green)을 처리하였다. CO₂ 배양기에 연결된 다광자 현미경(Carl Zeiss LSM 780 NLO)을 사용하여 세포 흡수를 주기적으로 모니터링하였으며, 상기 배양기의 여기는 720 nm, 방출(emission)은 725-758 nm 사이에서 여기는 488 nm, 방출은 500-550 nm 사이로 설정한 미토-트랙커 그린 FM과의 상호 위치 분석과 함께 설정하였다. 미토콘드리아 국소화를 위한 피어슨 계수를 0.73으로 계산하였는데, 이는 널리 사용되는 인도시아닌 염료 IR-780(피어슨 계수 0.61)에 비교하여 더 높다. 해당 결과는 도 3에서 나타내었다.

[0096] 도 3에서 나타낸 바와 같이, IR-PU의 미토콘드리아 표적 여부는 미토-트랙커 그린과 비교하여 HeLa 세포주에서 공초점 현미경 분석에 의해 확인하였다. 조사 후 강렬한 적색 형광은 IR-PU의 102의 생성을 나타낸다. 도 3에서 보는 바와 같이, 세포에 주입된 IR-PU는 미토콘드리아에 축적되었음을 알 수 있다.

[0097] **실험예 4. 미토삭스(MitoSox) ROS 발생 분석**

[0098] IR-PU의 광역학 치료제로서 세포에 활성산소의 발생 효과 여부를 조사하기 위해, MitoSox를 통한 ROS의 발생을 분석하였다. HeLa 세포는 10 % FBS, 100 μg mL⁻¹ 스트렙토마이신, 및 100 μg mL⁻¹ 페니실린으로 보충된 DMEM 미디어에서, 밀집도 90 %가 되도록 Lab Tek II 챔버 커버 글래스에 뿌리고, 37 °C, 5 % CO₂에서 배양하였다. 2.5 μM의 IR-PU와 4 시간 동안 배양 한 후, 세포 배양 배지를 5 μM 미토삭스 시약(MitoSox, M36008) 작동 용액이 들어 있는 배지로 대체하여 제조자 프로토콜에 따라 접착 세포를 닦았다. 그 후 세포를 37 °C에서 10 분 동안 배양하고, 빛으로부터 보호한 후, 조사(200 mWcm⁻²) 하였다. 이어서, 상기 세포를 FV1000 레이저 공초점 스캐닝 현미경으로 분석 하였다. 해당 결과는 도 4a와 4b에 나타내었다.

[0099] 도 4a에서 조사 후 강렬한 적색 형광은 10₂의 생성을 나타낸다. 레이저 조사가 없는 대조군의 적색 신호는 PU-H71 잔기의 HSP90/TRAP1 억제에 기인한 활성 산소의 생성을 나타내는 신호일 것으로 추측된다.

[0100] **실험예 5. TMRM 탈분극 분석**

[0101] 미토콘드리아 막의 탈분극의 정도를 조사하기 위해, IR-PU의 ROS의 발생 정도를 측정하였다. 실시예 3.에서와 같은 방법으로 HeLa 세포주를 준비한 후, IR-PU(2.5 μM)와 함께 2시간 동안 배양하였다. 배지를 교체하여 미토콘드리아 막 탈분극 측정 지표로서 사용하였다. TMRM(Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate)을 첨가하고, 다시 30분 동안 항온 배양하였다. 배지를 다시 교체하고, FV1000 레이저 공초점 스캐닝 현미경을 사용하여 분석하였다. 그리고, 레이저(808 nm)로 2 분간 조사하였다. 해당 결과는 도 5a, 5b, 및 5c에 나타내었다

[0102] 도 5a와 5b를 살펴보면, 조사 후 공초점 이미지는 초기 강도에 비해 염료의 형광 강도 감소를 보여 주었는데, 이는 미토콘드리아에서 TRAP1과 퓨린 기의 결합에 의한 미토콘드리아 막의 탈분극을 나타낸다. 도 5c의 그래프를 살펴보면, IR-PU는 NCI-H460 세포에서 IR-pyr에 비해 높은 세포 축적을 보였다.

[0103] **실험예 6. 세포 생존력 분석(MTT Assay)**

[0104] IR-PU의 세포 독성을 측정하기 위해, 세포의 생존력 조사를 진행하였다. 인간 폐암 세포(NCI-H460 세포)를 37 °C, 5 % CO₂의 습윤상태에서 10 % 소태아혈청(Life Technologies)과 1 % 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies)이 보충된 DMEM 배지 또는 RPMI 배지에 배양하였다. 8주의 BALB/c 마우스로부터 1차 간세포를 분리하기 위해, 마우스를 마취시키고, 간을 콜라게나제 용액으로 관류시키고, 해부하고, 덩어리를 피펫팅하여 파괴하여, 100-μm 세포 여과기(BD Biosciences)를 통해 여과시켰다. 세포를 M199/EBSS 배지(Hyclone)에서 반복

적으로 원심분리 및 재현탁하여 수회 세척하였다. 세포 파편과 비실질세포를 퍼콜(Percoll, Sigma)을 이용한 밀도구배원심법(gradient centrifugation)으로 간세포로부터 분리하였다. 반복하여 세척한 후, 세포 펠릿을 재현탁하고, 37 °C, 5 % CO₂에서 10 % FBS가 보충된 M199/EBSS 배지에 배양하였다.

[0105] 준비된 세포를 96-웰 플레이트에서 밤새 배양(5×10^3 cell /well)하고, IR-PU로 12 시간 동안 어두운 곳에서 처리한 후, 배지를 새로운 배지로 교체하였다. 세포를 2분 동안 레이저(808 nm, 200 mWcm^{-2})로 조사하고, 12시간 더 배양한 후, 세포 생존력 분석(MTT assay)을 이용하여 세포의 세포 독성을 확인하였다. 세포 생존력을 결정하기 위해, 세포를 3(4,5-디메틸-티아졸-2-일) 2,5 디페닐테트라졸륨브로마이드(3(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)2,5 diphenyltetrazolium bromide: MTT)에 노출시키고, 결정화된 포르마잔을 마이크로 플레이트 판독기(SYNERGY NEO, BioTek Instruments, Inc.)로 흡광도(595 nm)를 측정하여 정량화하였다. 흡광도 데이터를 대조군 세포의 흡광도 데이터와 비교하고 생존율(%)로 나타내었다. 대조군 실험은 레이저 조사가 없는 경우, IR-Pyr을 사용하는 경우, 및 IR-Pyr를 사용하면서 레이저 조사가 없는 경우를 수행하였다. 결과는 도면 6에 나타내었다.

[0106] 상기 분석 방법으로, NCI-H460 세포에 대한 결과는 도 6a와 6b에 나타내었다. 간세포의 경우, 노보비오신(HSP90에 대한 경쟁적 결합제)을 전처리한 샘플을 대상으로 실험하여, IR-PU의 생존력 감소 효과의 변화를 확인하였다. 해당 결과는 도 6c와 6d에 나타내었다.

[0107] 도 6a와 6b에서 나타내는 바와 같이, NCI-H460 세포주에서 IR-PU는 조사 후 농도 의존적인 광독성을 보였다. IR-PU의 광 독성은 IR-Pyr 에 비해 현저히 높았다. 또한, HSP90과의 결합에 의해 유발된 약물의 세포 축적이 더 커짐에 따라 추가적인 독성이 유발되었다.

[0108] 도 6c를 살펴보면, 마우스의 정상 간세포는 노보비오신과 HSP90의 결합 때문에, IR-PU의 HSP90과의 결합이 억제되었다. 그 결과 IR-PU의 축적 감소를 보였고, 이에 따른 IR-PU의 광독성 저하 결과를 확인할 수 있었다. 도 6d는 PU-H71가 IR-PU에 비해 낮은 세포 독성 효과를 보여주고 있는 바, IR-PU의 HSP 억제와 PDT의 시너지 효과를 간접적으로 입증했다.

[0109] 실험예 7. 사멸(Apoptosis) 유도, 웨스턴 블랏 및FACS 분석

[0110] IR-PU의 HSP90 억제에 따른 세포 사멸의 유도 효과를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏과 FACS 분석을 수행하였다. 실시예 6.에서와 같은 방법으로 준비한 인간 폐암 세포 NCI-H460을 6-웰 플레이트(4×10^5 cells/well)에서 밤새 배양하고, 약제로 12시간 동안 처리하였다. 2분 간 레이저 조사(200 mWcm^{-2}) 후 12 시간 후에 세포를 수확하였다. 그리고 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 이에 대한 결과는 도 7a에 나타내었다. PDT 동안 IR-PU로 세포 사멸을 지시하는 카스파제 3 및 PARP1을 절단하고, 이는 FACS 분석에 의해 추가로 확인하였다. FACS 분석은 DNA 내용물(propidium iodide)의 확인과 apoptosis kit(Molecular Probe)를 이용한 외인성 포스파티딜 세린(Annexin V) 사용하였다. 표지된 세포를 FACS Calibur 시스템(BD Biosciences)을 사용하여 정량하였다. 데이터는 FlowJo 소프트웨어(TreeStar)를 사용하여 처리하였다. FACS 분석의 결과는 도 7b에 나타내었다.

[0111] 도 7a에서 나타내는 웨스턴 블랏의 결과, IR-PU는 HSP90 클라이언트 단백질의 감소된 수준(chk1) 및 열쇼크(heat shock)반응(Hsp70의 상승)과 연관된 Hsp90을 강하게 억제하였다. 또한, IR-PU 처리 샘플에서 TRAP1 클라이언트 단백질 소르친(Sorcin)의 경미한 감소가 있었다. IR-Pyr을 이용한 대조군 실험에선 예상대로 HSP90 및 TRAP1 저해의 징후는 보이지 않았다.

[0112] 도 7b에서 나타내는 FACS 분석의 결과, 808 nm 레이저로 2 분간 조사한 후, 후기 세포 사멸 집단은 4 %에서 21 %로 증가하였다. 유사한 조건에서 IR-Pyr보다 훨씬 높은 수치였다. 카스파제 억제제(Z-VAD)의 처리는 세포사멸 집단을 5%로 감소시켰으며 이는 IR-PU의 PDT에 의한 세포 사멸 경로를 확인해준다.

[0113] 실험예 8. 종양 이중이식 동물모델 및 광역학 치료

[0114] IR-PU의 종양 치료 효과를 동물모델을 통해 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 9주의 BALB/c nu/nu 수컷 마우스 양측에 NCI-H460 세포를 피하 주사하였다. NCI-H460 (종양 체적: 200 mm^3) 세포를 가진 누드 마우스에게 DMSO와 IR-PU(PBS에 20 % Chremophor를 함유하고, 농도는 0.5 mg/mL)를 10 mg/kg으로 매일 복강 내 주사했다. 종양 체적은 체적=(종양 길이)×(종양 폭)²/2에 의해 계산되었다. 마우스를 DMSO, IR-PU 및 레이저를 조사한 IR-PU 투입의 세 그룹으로 나누었다. PDT 치료를 위해, 레이저를 조사한 마우스 그룹은 24시간 동안 IR-PU를 투여한 후 NIR 레이저(808 nm, 200 mWcm^{-2})를 사용하여 2분 동안 조사하였다. 이러한 주입 패턴을 9일째까

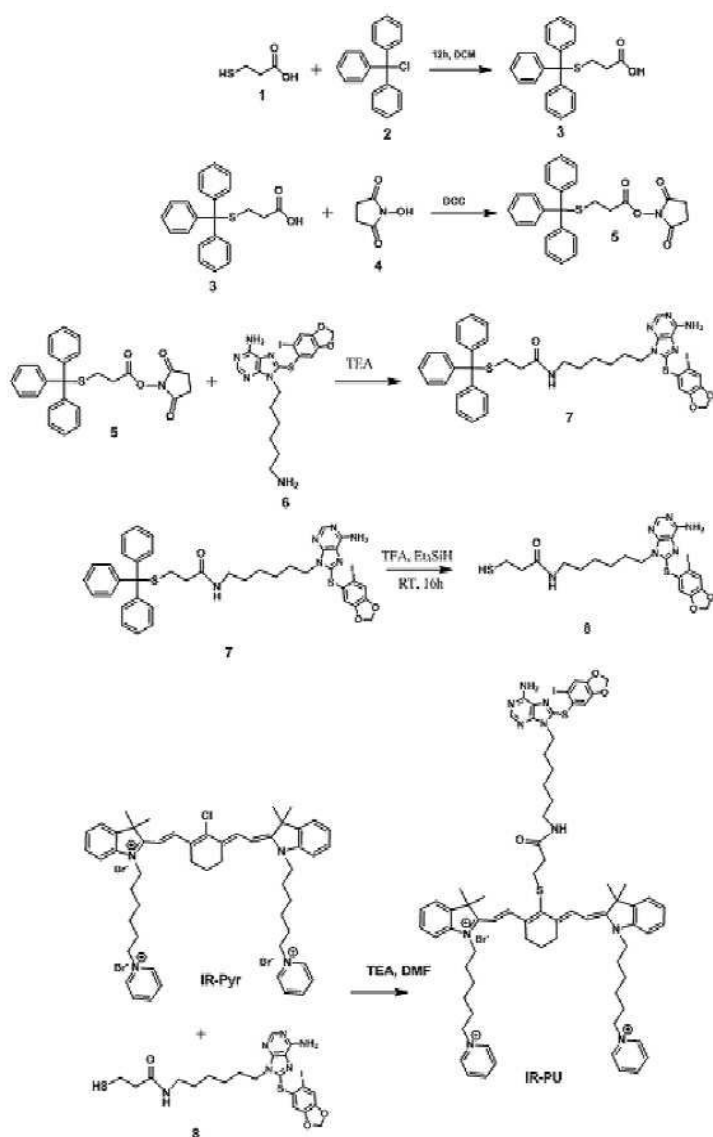
지 반복하였다. 여기는 830 nm, 방출은 760 nm으로 설정한 생체내 형광 이미징 시스템(Bruker Xtreme 모델)을 사용하여 표준 X선 배경과 함께 정기적으로 이미지화하였다. 해당 결과는 도 8에 나타내었다.

[0115] 도 8a, 8b, 및 8c에서 나타내는 바와 같이, 마우스의 종양 부위에 IR-PU의 축적과 종양 부위의 IR-PU 형광 신호가 나타났다. IR-PU로 처리한 마우스의 경우, 도면 8d에서 나타낸 IR-pyr로 처리한 마우스의 형광 신호보다 유의하게 높은 신호가 나타났다. 이는 HSP와의 결합으로 인한 IR-PU의 우수한 암 표적화 능력을 나타낸다.

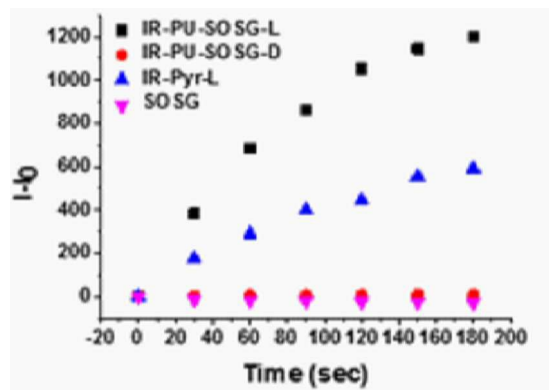
[0116] 또한, 도 8e에 나타난 바와 같이, 대조군 DMSO 그룹에 비하여 IR-PU로 PDT 처리한 마우스 그룹의 종양의 부피는 감소하였다. 이는 IR-PU에 의한 종양의 성장이 약화된 것을 나타낸다. 도 8f는 모든 마우스를 안락사시키고 종양을 수득한 후 종양의 무게를 나타내는데, PDT 처리한 마우스 그룹의 종양 무게는 대조군(DMSO)보다 매우 가벼웠다. 이러한 결과들은 IR-PU의 우수한 종양 특이성을 보여 준다.

도면

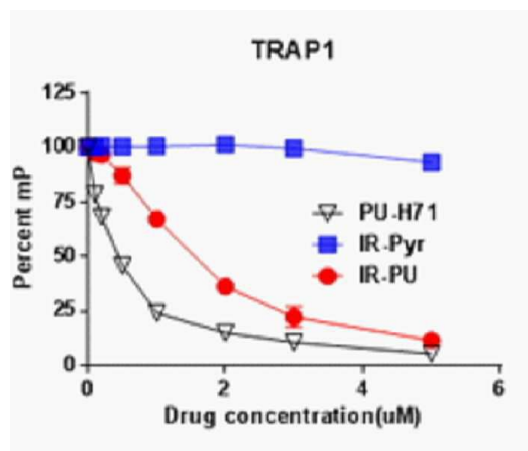
도면1



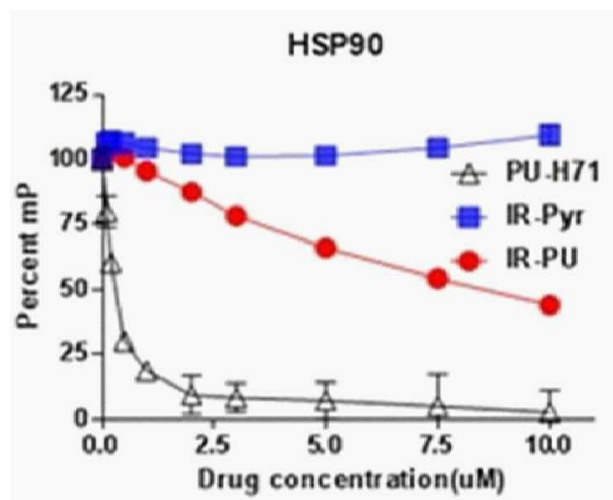
도면2a



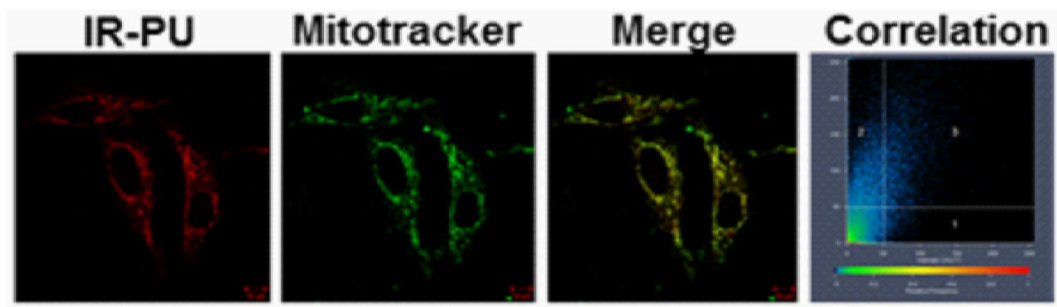
도면2b



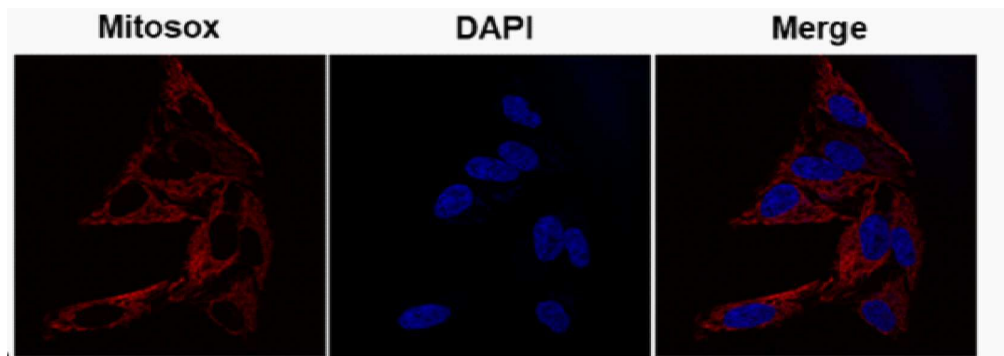
도면2c



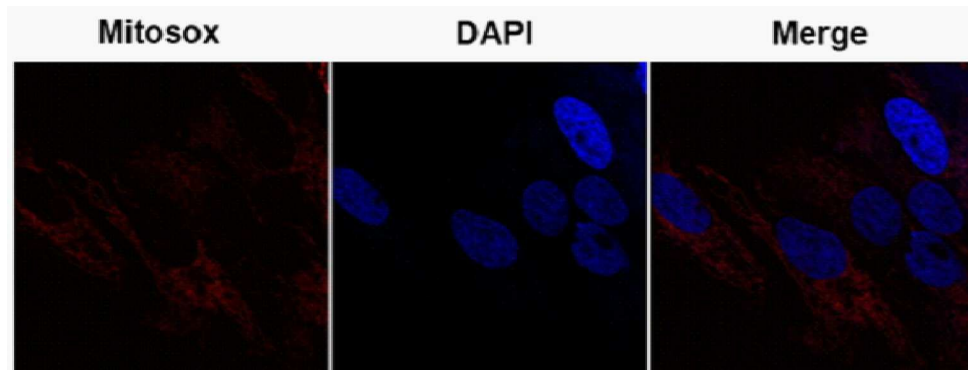
도면3



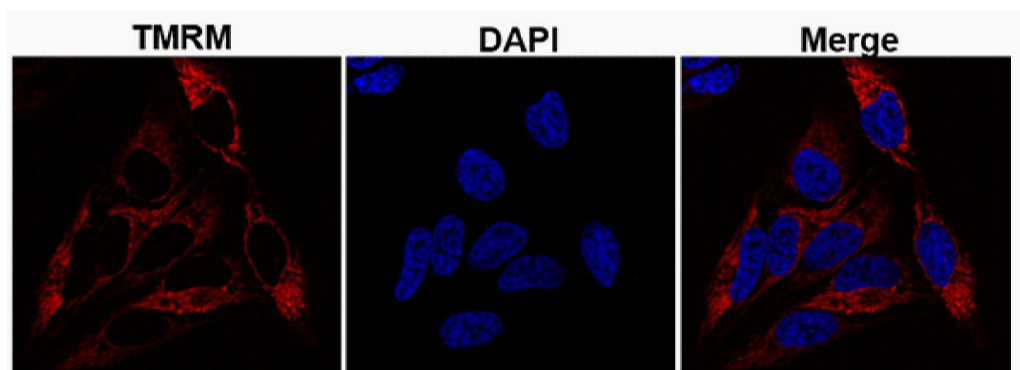
도면4a



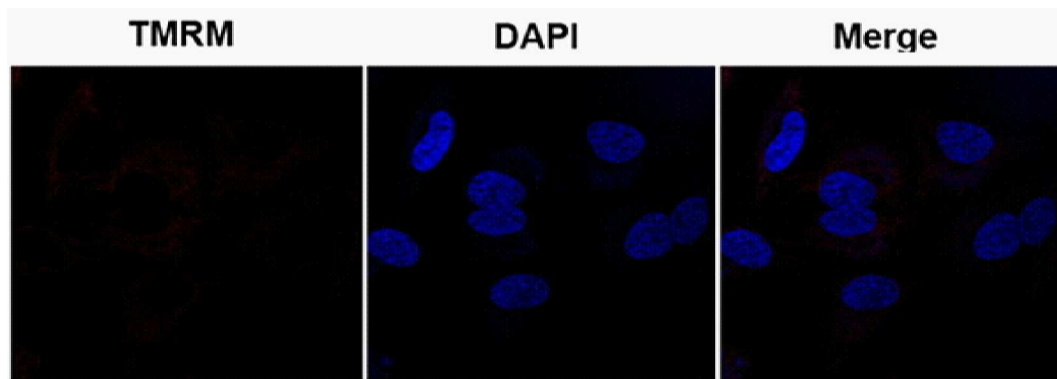
도면4b



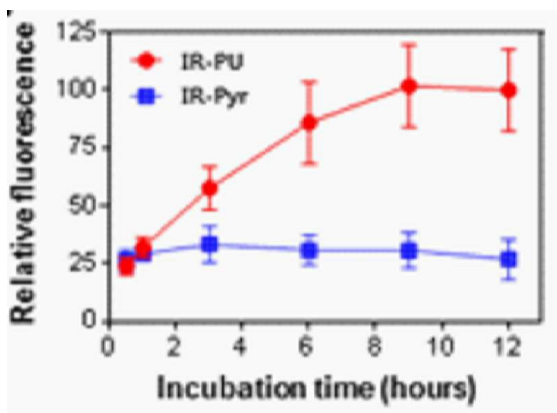
도면5a



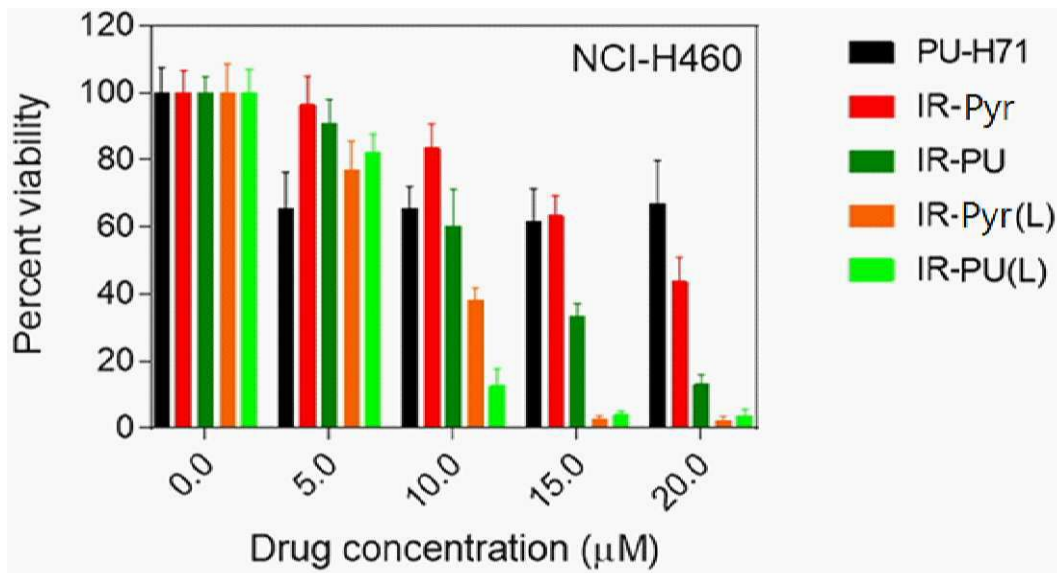
도면5b



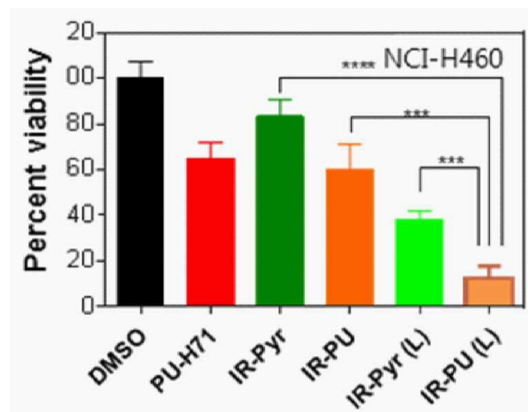
도면5c



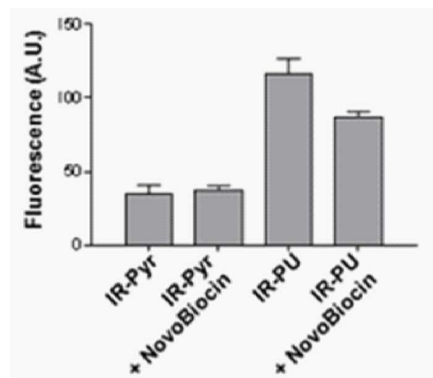
도면6a



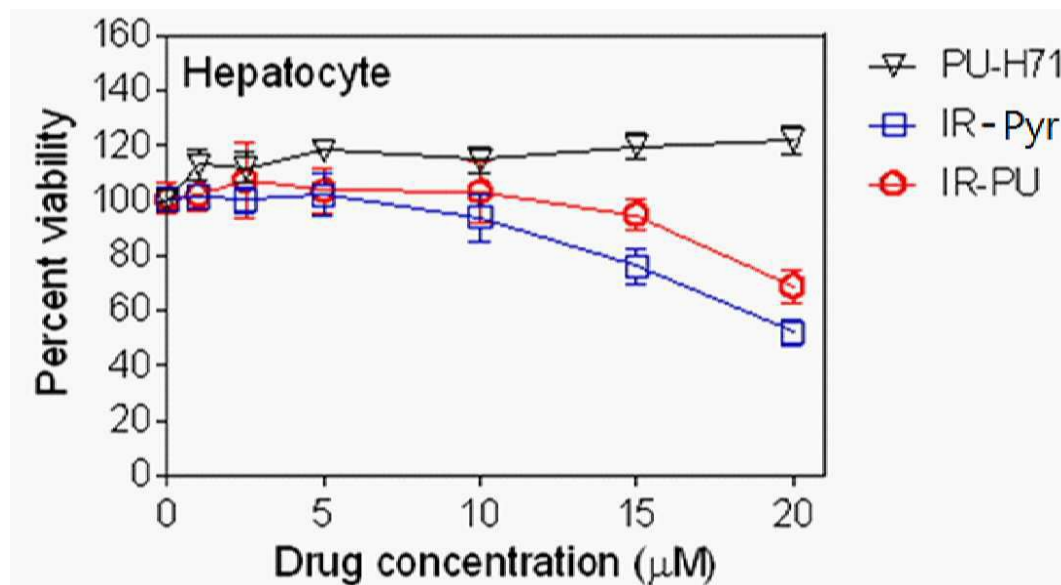
도면6b



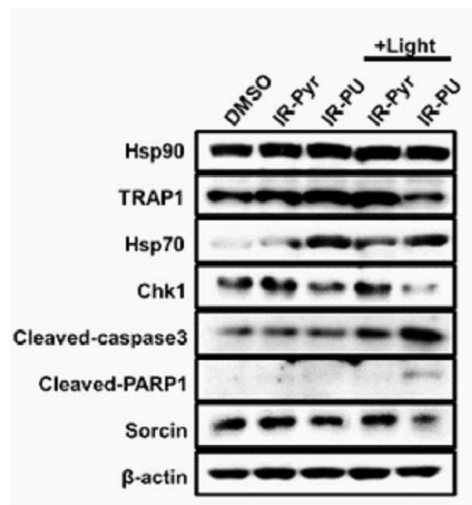
도면6c



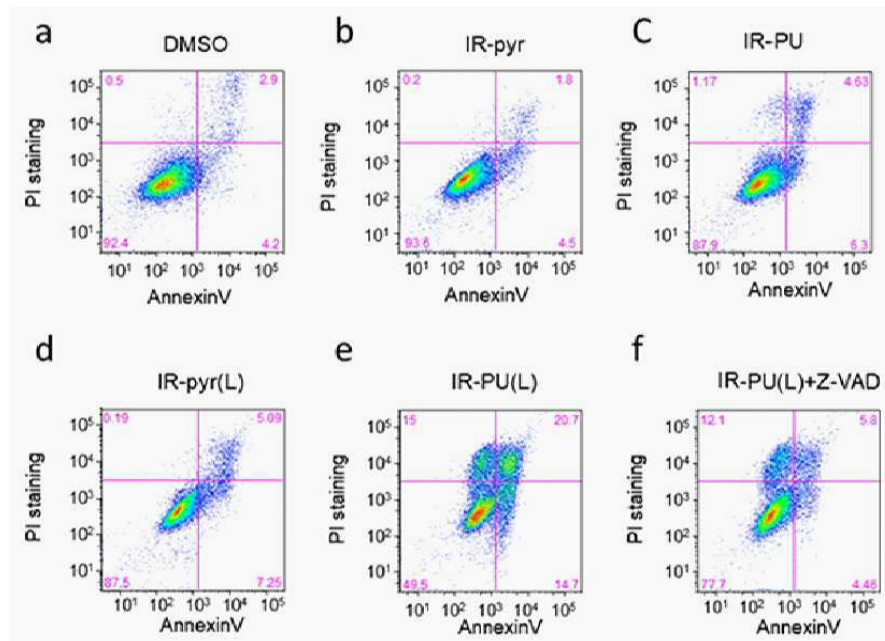
도면6d



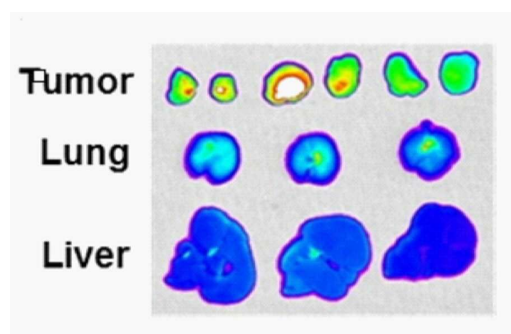
도면7a



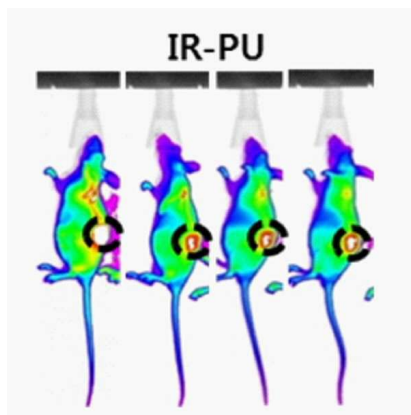
도면7b



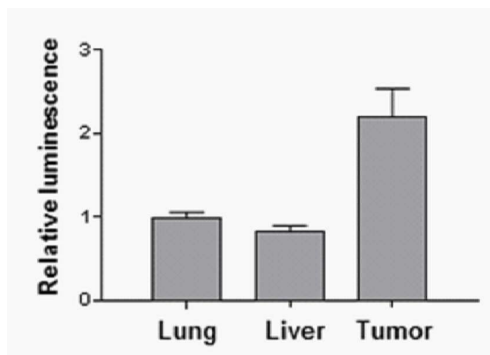
도면8a



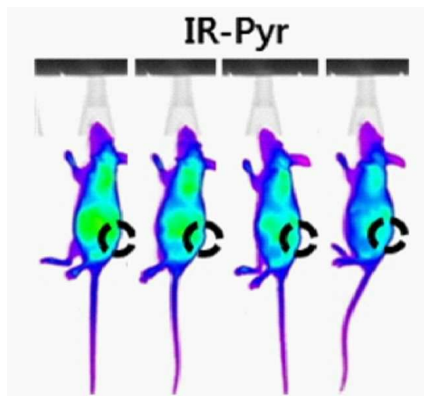
도면8b



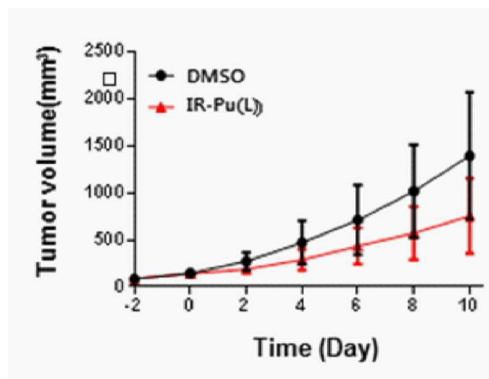
도면8c



도면8d



도면8e



도면8f

