(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0108863
(43) 공개일자 2024년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/54 (2017.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/545 (2017.08)
A61K 47/64 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2022-0190776
(22) 출원일자 2022년12월30일
심사청구일자 2022년12월30일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김도경
서울특별시 성북구 화랑로 214, 106동 802호
박윤경
서울특별시 동대문구 경희대로1가길 3, 204호
(74) 대리인
위병갑

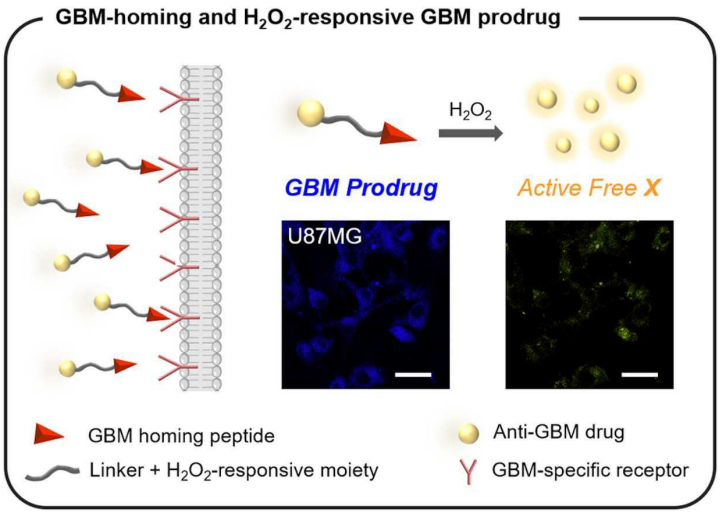
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **활성산소종 반응성 전구약물**

(57) 요 약

본 발명은 활성산소종 반응성 전구약물에 관한 것으로, 본 발명의 전구약물은 불활성 형태로 투여된 후 종양 미세 환경인 활성산소종에만 특이적으로 반응하여 활성 대사물의 형태로 변화하기 때문에 암세포가 아닌 정상 세포에 부작용을 나타내지 않고 암이 발생한 특정 기관(장기) 또는 암세포 특이적으로 약물을 전달할 수 있어, 표적화한 암만을 선택적으로 사멸시키는 효과가 있으므로, 이를 암의 진단 및 치료에 이용할 수 있으며, 표적화한 세포내 이입을 통해 암 병변에 축적되므로, 약물의 표적화 및 치료 효과를 모니터링할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도12



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465036238
과제번호 HI21C0239020022
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 질병중심 중개연구사업
연구과제명 신경교종 특이적 대사체의 실시간 시각화 형광 탐침자 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345352778
과제번호 2018R1A6A1A03025124
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 (통합)한국연구재단
연구사업명 [혁신]이공분야기초연구사업〉기초연구기반구축사업〉대학중점연구소지원사업
연구과제명 통합이지바로[중점연구소(이공),2단계 2/3] 경희대학교 의과학연구소 - 활성산소 조절을 통한 만성질병 예방 치료에 관한 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

약물 모이어티;

활성산소종 반응성 모이어티;

링커; 및

기관 또는 세포 표적화 모이어티를 포함하는 전구약물(prodrug).

청구항 2

제 1항에 있어서, 약물 모이어티는 항암제인, 전구약물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 항암제는 SN-38(7-에틸-10-히드록시-캠토테신, 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin), 발루비신(valrubicin), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신 C(mitomycin C), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 이리도테칸(iridotecan), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 벤다무스틴(bendamustine), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겜시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 에토포사이드(etoposide), 미토산트론(mitoxantrone), 이자베필론(izabepilone), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 전구약물.

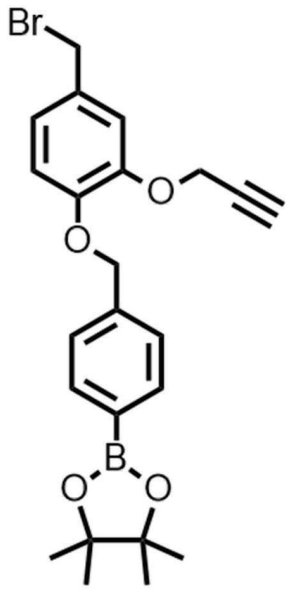
청구항 4

제 1항에 있어서, 활성산소종에 반응하여 약물 모이어티를 방출하는, 전구약물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 활성산소종 반응성 모이어티는 하기 화학식 7의 화합물을 포함하는, 전구약물:

[화학식 7]



.

청구항 6

제 1항에 있어서, 링커는 펩타이드 링커, 비펩타이드 링커 또는 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커인, 전구약물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 펩타이드 링커는 생체내 절단형 펩타이드 링커 또는 생체내 비절단형 링커인, 전구약물.

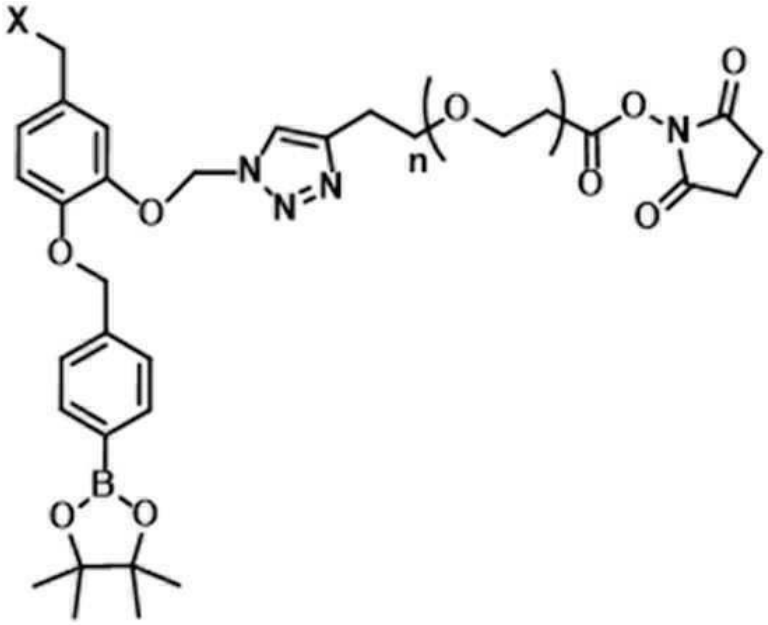
청구항 8

제 6항에 있어서, 비펩타이드 링커는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 말레이미드(maleimide), 5-아미노발레르산(5-Aminovaleric acid, 5AVA) 또는 트리옥사트리데칸 숙신남산(Trioxatridecan-succinamic acid, Ttds)인, 전구약물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 하기 화학식 9의 화합물을 포함하는 전구약물:

[화학식 9]



상기 식에서, X는 약물 모이어티이다.

청구항 10

제 1항에 있어서, 기관 또는 세포 표적화 모이어티는 기관 또는 세포 표적화 서열(targeting sequence)을 포함하거나 이로 구성되는 펩타이드 또는 펩타이드 모방체(peptidomimetic)의 접합체(conjugate)인, 전구약물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 기관 또는 세포 표적화 모이어티는 세포 투과 펩타이드(cell-penetrating peptides, CPPs)인, 전구약물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 세포 투과 펩타이드는 카베올린(Caveolin) 수용체 특이적 세포 투과 펩타이드인, 전구약물.

청구항 13

제 1항에 있어서, 세포 표적화 모이어티는 암세포 표적화 모이어티인, 전구약물.

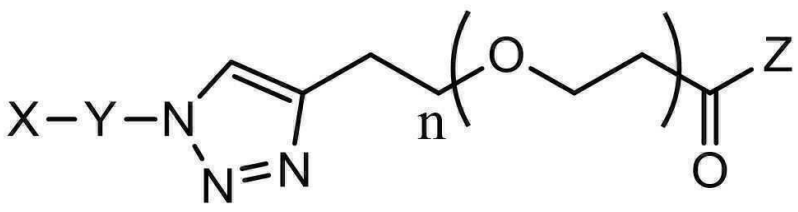
청구항 14

제 13항에 있어서, 암세포 표적화 모이어티는 암세포 특이적 바이오마커에 결합하는 펩타이드, 저분자 화합물 또는 단백질인, 전구약물.

청구항 15

제 1항에 있어서, 하기 화학식 1의 화합물을 포함하는 전구약물:

[화학식 1]



상기 식에서,

X는 약물 모이어티이고;

Y는 활성산소종 반응성 모이어티이며; 및

Z는 기관 또는 세포 표적화 모이어티이다.

청구항 16

제 15항에 있어서, 활성산소종에 반응하여 유리(Free) X 형태로 약물 모이어티를 방출하는, 전구약물.

청구항 17

제 1항의 전구약물을 포함하는, 암의 진단 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서, 진단 및 치료가 동시에 가능한, 암의 진단 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

제 17항에 있어서, 암은 교모세포종, 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종인, 암의 진단 및 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 활성산소종 반응성 전구약물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 전세계적으로 가장 많은 사망자를 내는 질병 중 하나로, 혁신적인 암 치료제의 개발은 이에 대한 치료시 발생되는 의료비를 절감할 수 있음과 동시에 고부가가치를 창출할 수 있다. 또한, 2008년의 통계에 따르면, 기존항암제 내성을 극복 할 수 있는 분자 치료제는 주요 7개국 (US, Japan, France, Germany, Italy, Spain, UK)에서 $17.5 빌리언(billion)을 차지했고, 2018년의 경우 약 $45 빌리언정도의 시장 크기(market size)를 차지하여, 2008년 대비 9.5%의 성장률을 보일 것이라 예측되고 있다. 암의 치료는 수술, 방사선치료, 화학요법, 생물학적 치료로 구분되는데, 이 중에 화학요법은 화학물질로서 암 세포의 증식을 억제하거나 죽이는 치료법으로 항암제에 의하여 나타나는 독성은 상당부분 정상세포에서도 나타나기 때문에 일정 정도의 독성을 나타내며, 항암제가 효과를 나타내다가도 일정 기간의 사용 후에는 효과가 상실되는 내성이 발생하기 때문에 암세포에 선택적으로 작용하고 내성이 생기지 않는 항암제의 개발이 절실하다. 최근 암에 대한 분자유전정보의 확보를 통해 암의 분자적 특성을 표적으로 한 새로운 항암제의 개발이 진행되고 있으며, 암세포만이 가지고 있는 특징적인 분자적 표적(molecular target)을 겨냥하는 항암제들도 약제 내성이 생긴다는 보고도 있다. 따라서, 새로운 개념의 항암제 개발이 필요하다. 최근, 암의 치료를 위해서 폴리펩티드 기반 전구약물을 특정 세포 수용체에 적용하는 전략에 대한 관심이 높아지고 있다. 하지만, 이러한 전구약물의 제조 방법이 상대적으로 복잡하고, 특정 부위로의 표적화 능력이 비교적 낮아 정상 부위에도 작용하는 문제점이 있다.

[0003] 교모세포종(glioblastoma multiforme; GBM)은 뇌의 교세포에서 발생한 종양 중 조직학적으로 핵의 비정형성, 유사분열상, 혈관내피세포의 증식, 괴사가 관찰되는 악성도가 가장 높은 종양으로, 뇌에서 가장 흔히 발생하는 공격형 종양이다. 악성 교모세포종은 전체 뇌종양의 12~15%를 차지하고, 뇌 교종의 50~60%를 차지하며 환자의 5년 평균 생존율은 7% 이하에 불과하다. 교모세포종은 매우 빠르게 성장하는 종양이며 이로 인해 뇌압이 급속히 상승하여 두통, 오심, 구토 등을 유발하고, 성인은 경련이 자주 발생한다. 이외에도 종양 자체 또는 종양에 동반

되는 뇌 부종으로 인하여 인근 신경의 기능이 저하되어 사지 운동저하, 감각저하, 얼굴마비, 언어장애, 인지기능 저하, 좌-우 구분장애 등 다양한 증상이 나타날 수 있다. 이러한 신체 일부의 신경학적 결손은 종양의 발생 위치에 따라 매우 다양하여 어느 증상 하나만으로 진단을 내릴 수는 없다. 교모세포종을 치료하기 위하여 다양한 접근법이 제시되고 있으며, 기존에 사용 중인 치료법으로는 암세포의 외과적 절제 후 항암제를 사용하는 항암화학요법이 있다. 교모세포종이 발생하면 일반적으로 수술적 제거를 통해 최대한 종양을 절제하지만, 뇌 조직에서는 종양이 있다고 해서 무조건 제거할 경우 심각한 합병증이 남을 수 있기 때문에 절제의 범위를 신중하게 결정해야 한다. 수술 후 떼어낸 조직을 통해 조직학적으로 교모세포종이 확진된 후에는 방사선 치료와 항암화학요법을 시행하게 된다. 하지만 항암화학요법에 사용되는 기존의 항암제는 약물의 낮은 생체 이용률과 낮은 암세포 특이성으로 인해 암세포뿐만 아니라 정상 세포도 손상을 입게 되어 여러 부작용을 수반하게 되고, 뇌혈관장벽의 투과가 어려워 치료 효과는 감소하는 문제점이 있다 (A. Peixoto, M. Relvas-Santos, R. Azevedo, L. L. Santos and J. A. Ferreira, *Frontiers in Oncology*, 2019, 9.). 또한, 수술, 방사선 요법 및 화학 요법을 포함한 치료에 불구하고, 치료 저항성이 매우 높아, 치료 후 예후가 좋지 못한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 전구약물을 제공하는 것이다.

[0005] 아울러, 본 발명의 목적은 암의 진단 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 약물 모이어티; 활성산소종 반응성 모이어티; 링커; 및 기관 또는 세포 표적화 모이어티를 포함하는 전구약물을 제공한다.

[0007] 전구약물을 포함하는, 암의 진단 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 전구약물은 불활성 형태로 투여된 후 종양 미세 환경인 활성산소종에만 특이적으로 반응하여 활성 대사물의 형태로 변화하기 때문에 암세포가 아닌 정상 세포에 부작용을 나타내지 않고 암이 발생한 특정 기관(장기) 또는 암세포 특이적으로 약물을 전달할 수 있어, 표적화한 암만을 선택적으로 사멸시키는 효과가 있으므로, 이를 암의 진단 및 치료에 이용할 수 있으며, 표적화한 세포내 이입을 통해 암 병변에 축적되므로, 약물의 표적화 및 치료 효과를 모니터링할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 화학식 7의 활성산소종 반응성 모이어티 Y를 합성하는 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 화학식 1의 암 표적화 전구약물을 합성하는 과정을 나타낸 도이다.

도 3은 GBM 전구약물, Free X 및 Y-linker-Z의 흡광 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 GBM 전구약물, Free X 및 Y-linker-Z의 형광 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 과산화수소 조건 하에 시간에 따른 GBM 전구약물의 분해에 의한 Free X의 방출 정도를 형광 스펙트럼 분석으로 확인한 도이다.

도 6은 과산화수소 농도에 따른 GBM 전구약물의 분해에 의한 Free X의 방출 정도를 형광 스펙트럼 분석으로 확인한 도이다.

도 7은 GBM 전구약물의 과산화수소에 대한 선택적 활성화 능력을 형광 세기 변화를 통해 확인한 결과이다.

도 8은 GBM 전구약물을 교모세포종 세포(U87MG)에 처리하여 세포 내 유도된 활성산소종에 의한 GBM 전구약물의 활성화를 형광 영상화한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 GBM 전구약물의 U87MG에 대한 세포 독성 및 유도된 활성산소종에 의한 세포 독성의 증가 여부를 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 GBM 전구약물의 교모세포종 특이적 수용체 발현에 따른 교모세포종 특이적 표적화 효과 및 약물 활성화

효과를 형광 영상화한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 GBM 전구약물의 교모세포종 특이적 사멸 효과를 확인한 도이다.

도 12는 GBM 전구약물의 작용 방식을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구 범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0011] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

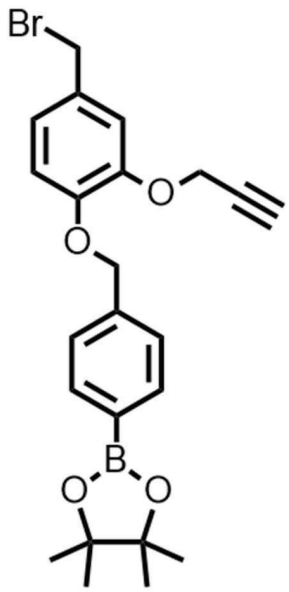
[0012] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0014] 일 측면에서, 본 발명은 활성산소종 반응성 모이어티; 링커; 및 기관 또는 세포 표적화 모이어티를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다.

[0015] 일 구현예에서, 활성산소종 반응성 모이어티는 아릴보론산(arylboronic acids); 프로킬레이터(Prochelators); 셀레늄화물 (selenides, selenols 및 hydrogen selenide), 황화물(Sulfide), 이황화물(disulfides) 및 티오에테르류(thioethers)를 포함하는 오가노찰콘(Organochalcogen); 설포네이트 에스테르류(Sulfonate esters); 티아졸리디논(Thiazolidinones, TZ) 또는 퀴논(Quinones)일 수 있다.

[0016] 일 구현예에서, 상기 활성산소종 반응성 모이어티는 하기 화학식 7의 화합물을 포함할 수 있다:

[0017] [화학식 7]

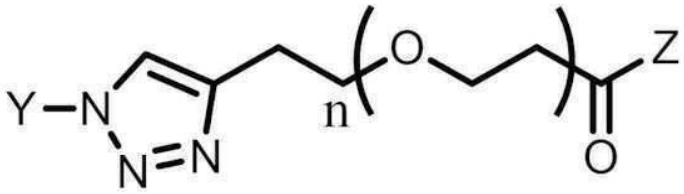


[0018] .

[0019] 일 구현예에서, 상기 링커는 펩타이드 링커, 비펩타이드 링커 또는 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커일 수 있으며, 펩타이드 링커는 생체내 절단형 펩타이드 링커 또는 생체내 비절단형 링커일 수 있고, 비펩타이드 링커는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 말레이미드(maleimide), 5-아미노발레르산(5-Aminovaleric acid, 5AVA) 또는 트리옥사트리데칸 숙신남산(Trioxatridecan-succinamic acid, Ttds)일 수 있다.

[0020] 일 구현예에서, 상기 약물 전달체는 청색 형광을 나타내는 하기 화학식 2의 화합물을 포함할 수 있다:

[0021] [화학식 2]

[0022] 

[0023] 일 구현예에서, 상기 화학식 2의 화합물은 430 nm에서 최대 형광파장을 나타낼 수 있다.

[0024] 일 측면에서, 본 발명은 약물 모이어티; 활성산소종 반응성 모이어티; 링커; 및 기관 또는 세포 표적화 모이어티를 포함하는 전구약물(prodrug)에 관한 것이다.

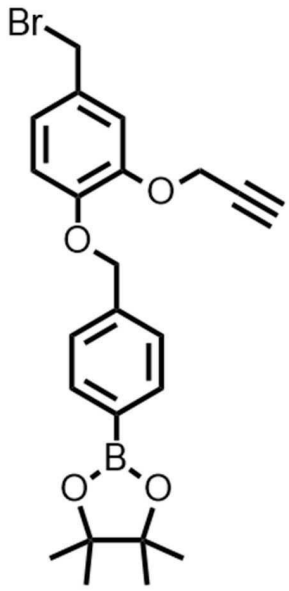
[0025] 일 구현예에서, 약물 모이어티는 항암제일 수 있으며, 항암제는 SN-38(7-에틸-10-히드록시-캠토테신, 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 픽산트론(pixantrone), 사바루비신(sabarubicin), 발루비신(valrubicin), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 메클로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 플리카마이신(plicamycin), 마이토마이신 C(mitomycin C), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 테니포사이드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 이리도테칸(iridotecan), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 벤다무스틴(bendamustine), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겜시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 에토포사이드(etoposide), 미토산트론(mitoxantrone), 이자베필론(izabepilone), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0026] 일 구현예에서, 본 발명의 전구약물은 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)에 반응하여 약물 모이어티를 방출할 수 있으며, 활성산소종은 과산화물 음이온(superoxide anion, O^{2-}), 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, HO˙), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 하이포염소산(hypochlorous acid, HOCl) 또는 일중항산소(singlet oxygen, $^1O_2$)일 수 있다.

[0027] 일 구현예에서, 활성산소종 반응성 모이어티는 아릴보론산(arylboronic acids); 프로킬레이터(Prochelators); 셀레늄화물 (selenides, selenols 및 hydrogen selenide), 황화물(Sulfide), 이황화물(disulfides) 및 티오에테르류(thioethers)를 포함하는 오가노찰콘(Organochalcogen); 설포네이트 에스테르류(Sulfonate esters); 티아졸리디논(Thiazolidinones, TZ) 또는 퀴논(Quinones)일 수 있다.

[0028] 일 구현예에서, 상기 활성산소종 반응성 모이어티는 하기 화학식 7의 화합물을 포함할 수 있다:

[0029] [화학식 7]

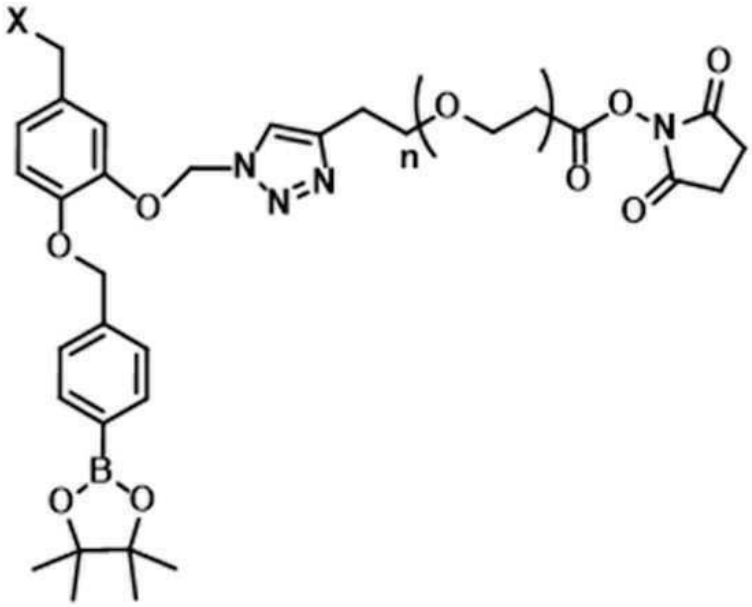


[0030] .

[0031] 일 구현예에서, 상기 링커는 펩타이드 링커, 비펩타이드 링커 또는 상기 펩타이드 링커와 상기 비펩타이드 링커가 혼재된 형태의 링커일 수 있으며, 펩타이드 링커는 생체내 절단형 펩타이드 링커 또는 생체내 비절단형 링커일 수 있고, 비펩타이드 링커는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 말레이미드(maleimide), 5-아미노발레르산(5-Aminovaleric acid, 5AVA) 또는 트리옥사트리데칸 숙신남산(Trioxatridecan-succinamic acid, Ttds)일 수 있다.

[0032] 일 구현예에서, 본 발명의 전구약물은 하기 화학식 9의 화합물을 포함할 수 있으며, 하기 식에서, X는 약물 모이어티이다:

[0033] [화학식 9]



[0034] .

[0035] 일 구현예에서, 상기 기관 또는 세포 표적화 모이어티는 기관 또는 세포 표적화 서열(targeting sequence)을 포함하거나 이로 구성되는 펩타이드 또는 펩타이드 모방체(peptidomimetic)의 접합체(conjugate)일 수 있으며, SIWV, iRGD, Cilengitide, SFITGv6, CNGRC, RGDechi, DAG, ZD2, CSG, BT1718, Dox-TAT, RGD-SSL-Dox, LPD-PEG-NGR, VWCS, FWCS, TAT-Bim, Poropeptide-Bax, R8-Bax, CT20p-NP, RRM-MV, RRM-IL12, PNC-27, PNC-21 또는 PNC-28, 또는 이의 모방체의 접합체일 수 있다.

[0036] 일 구현예에서, 상기 기관 또는 세포 표적화 모이어티는 세포 표면 항원 또는 자가항원을 표적화할 수 있으며, 세포 표면 항원은 CEA, ED-B 피브로넥틴, CD20, CD22, CD19, EGFR, IGF1R, VEFGR1/Flt-1, VEGFR2/KDR, VEGRF3/Flt-4, HER2/neu, CD30, CD33, CD3, CD16, CD64, CD89, CD2, 아데노바이러스 섬유 놉, PfMSP-1, HN/NDV, EpCAM/17-1A, hTR, IL-2R/Tac, CA19-9, MUC1, HLA 클래스 II, GD2, G250, TAG-72, PSMA, CEACAM6, HMWMAA, CD40, M13 외피 단백질 및 GPIIb/IIIa로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0037] 일 구현예에서, 상기 기관 또는 세포 표적화 모이어티는 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편을 포함할 수 있으며, 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), $F(ab')_2$, scFv, Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 상기 기관 또는 세포 표적화 모이어티는 카베올린(Caveolin) 수용체 표적화 펩타이드일 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 상기 기관 또는 세포 표적화 모이어티는 세포 투과 펩타이드(cell-penetrating peptides, CPPs)일 수 있으며, 카베올린 수용체를 통해 세포 내로 투과/섭취되는 카베올린 수용체 특이적 세포 투과 펩타이드일 수 있고, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용된 용어, "세포 투과 펩타이드"는 세포막에 발현되는 헤파란 설페이트(heparan sulfate), 클라트린(clathrin), 카베올린(caveolin) 및 인지질(phospholipid)과 같은 특정 분자를 사용한 투과 경로를 통해 세포로 유입되는 펩타이드이다.

[0041] 일 구현예에서, 상기 기관 또는 세포 표적화 모이어티는 암세포 특이적 바이오마커를 표적화할 수 있으며, 암세포 특이적 바이오마커는 17-1A 항원, GD3 갱글리오시드 R24, EGFRvⅢ, PSMA, PSCA, HLA-DR, EpCAM, MUC1 코어 단백질, 이상 글리코실화 MUC1, ED-B 도메인을 함유하는 피브로넥틴 이형, HER2/neu, 암종배아성 항원(CEA), 가스트린-방출 펩티드(GRP) 수용체 항원, 뮤신(mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체(EGF-R), HER3, HER4, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원, TAG 72, 탄산 무수화효소 IX(carbonic anhydrase IX), 알파-태아 단백질(alpha-fetoprotein), A3, A33 항체에 특이적인 항원, Ba 733, BrE3-항원, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD79a, CD80, CD138, 결장-특이적 항원-p(CSAp), CSAp, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, FIt-1, Flt-3, 폴산염 수용체(folate receptor), HLA-DR, 인간 융모성 성선자극호르몬(HCG) 및 그 소단위체들, 저산소증 유도 인자(HIF-I), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, 인슐린 성장 인자-1(IGF-1), KC4-항원, KS-1-항원, KSl-4, Le-Y, 대식세포 억제 인자(MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, PAM-4 항체에 특이적인 항원, 태반 성장 인자, p53, 전립선 산성 포스파타제(prostatic acid phosphatase), PSA, RS5, S100, TAC, 테나신(tenascin), TRAIL 수용체들, Tn 항원, 톰슨-프리덴라이히(Thomson-Friedenreich) 항원들, 종양 괴사 항원들, VEGF, ED-B 피브로넥틴(fibronectin), 혈관형성 표지(angiogenesis marker), 종양유전자 표지(oncogene marker) 또는 종양유전자 생성물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 종양유전자는 아폽토시스(Apoptosis) 관련 유전자, 전사인자(Trnscription Factor) 유전자, 전이(Metastasis) 관련 유전자, 혈관신생(Angiogenesis) 관련 유전자 또는 티로신-카이네이즈(Tyrosine-Kinase) 유전자일 수 있다.

[0042] 일 구현예에서, 상기 아폽토시스 관련 유전자는 ABL1, AKT1, AKT2, BARD1, BAX, BCL11B, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L12, BCL3, BCL6, BIRC2, BIRC3, BIRC5, BRAF, CARD11, CAV1, CBL, CDC25A, CDKN1A, CFLAR, CNR2, CTNNB1, CUL4A, DAXX, DDIT3, E2F1, E2F3, E2F5, ESPL1, FOXO1, HDAC1, HSPA5, IGF1R, IGF2, JUN, JUNB, JUND, MALT1, MAP3K7, MCL1, MDM2, MDM4, MYB, MYC, NFKB2, NPM1, NTRK1, PAK1, PAX3, PML, PRKCA, PRKCE, PTK2B, RAF1, RHOA, TGFB1, TNFRSF1B, TP73, TRAF6, YWHAG, YWHAQ 또는 YWHAZ일 수 있으며; 상기 전사 인자 유전자는 AR, ARID3A, ASCL1, ATF1, ATF3, BCL11A, BCL11B, BCL3, BCL6, CDC5L, CDX2, CREB1, CUX1, DDIT3, DLX5, E2F1, E2F3, E2F5, ELF4, ELK1, ELK3, EN2, ERG, ETS1, ETS2, ETV1, ETV3, ETV4, ETV6, FEV, FEZF1, FLI1, FOS, FOSL1, FOXA1, FOXG1, FOXM1, FOXO1, FOXP1, FOXQ1, GATA1, GATA6, GFI1, GFI1B, GLI1, GLI2, GLI3, HES6, HHEX, HLF, HMGA1, HMGA2, HOXA1, HOXA9, HOXD13, HOXD9, ID1, ID2, IKZF1, IRF2, IRF4, JUN, JUNB, JUND, KAT6A, KDM2A, KDM5B, KLF2, KLF4, KLF5, KLF6, KLF8, KMT2A, LEF1, LHX1, LMX1B, MAF, MAFA, MAFB, MBD1, MECOM, MEF2C, MEIS1, MITF, MYB, MYC, MYCL, MYCN, NANOG, NCOA3, NFIB, NFKB2, NKX2-1, OTX2, PATZ1, PAX2, PAX3, PAX4, PAX8, PBX1, PBX2, PITX2, PLAG1, PLAGL2, PPARG, PPP1R13L, PRDM10, PRDM13, PRDM14, PRDM15, PRDM16, PRDM6, PRDM8, PRDM9, RARA, REL, RERE, RUNX1, RUNX3, SALL4, SATB1, SFPQ, SIX1, SNAI1, SOX2, SOX4, SPI1, SREBF1, STAT3, TAF1, TAL1, TAL2, TBX2, TBX3, TCF3, TFCP2, TFE3,

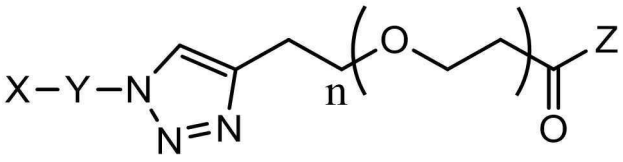
THRA, TLX1, TP63, TP73, TWIST1, WT1, YBX1, YY1, ZBTB16, ZBTB7A, ZIC2, ZNF217 또는 ZNF268일 수 있고; 상기 전이 관련 유전자는 AKT1, AKT2, AR, CBL, CDH1, CRK, CSF1, CTNNB1, CTTN, CXCR4, EGFR, FGFR1, FLT3, FYN, GLI1, ILK, ITGA3, JAK2, MET, PDGFRB, PLXNB1, PRKCI, PTCH1, PTPN11, RAC1, RHOA, RHOC, ROCK1, SMO, SNAI1, SRC, TCF3 또는 WT1일 수 있으며; 상기 혈관신생 관련 유전자는 BRAF, CAV1, CTGF, EGFR, ERBB2, ETS1, FGF4, FGF6, FGFR1, FGFR3, FGFR4, ID1, NRAS, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB 또는 SPARC일 수 있고; 상기 티로신-카이네이즈 유전자는 ABL1, ABL2, ALK, AXL, BLK, EGFR, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, FES, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGR, FLT3, FYN, ITK, JAK1, JAK2, KIT, LCK, MERTK, MET, MST1R, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PDGFRB, PTK2B, PTK7, RET, ROS1, SRC, SYK, TEC 또는 YES1일 수 있다.

[0043] 일 구현예에서, 종양유전자는 SEPTIN9, ACOD1, ACTN4, ADAM28, ADAM9, ADGRF1, ADRBK2, AFF1, AFF3, AGAP2, AGFG1, AGRN, AHCYL1, AHI1, AIMP2, AKAP13, AKAP9, AKIRIN2, AKTIP, ALDH1A1, ALL1, ANIB1, ANP32C, ANP32D, AQP1, ARAF, ARHGEF1, ARHGEF2, ARHGEF5, ASPSCR1, AURKA, BAALC, BAIAP2L1, BANP, BCAR4, BCKDHB, BCL9, BCL9L, BCR, BMI1, BMP7, BOC, BRD4, BRF2, CABIN1, CAMK1D, CAPG, CBFB, CBLB, CBLL1, CBX7, CBX8, CCDC28A, CCDC6, CCNB1, CCNB2, CCND1, CCNE1, CCNL1, CD24, CDC25C, CDC6, CDH17, CDK1, CDK14, CDK4, CDK5R2, CDK6, CDK8, CDKN1B, CDKN3, CDON, CEACAM6, CENPW, CHD1L, CHIC1, CHL1, CKS1B, CMC4, CNTN2, COPS3, COPS5, CRKL, CRLF2, CROT, CRTC1, CRYAB, CSF1R, CSF3, CSF3R, CSNK2A1, CSNK2A2, CT45A1, CTBP2, CTNND2, CTSZ, CUL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CYGB, CYP24A1, DCD, DCUN1D1DDB2, DDHD2, DDX6, DEK, DIS3, DNPH1, DPPA2, DPPA4, DSG3, DUSP12, DUSP26, ECHS1, ECT2, EEF1A1, EEF1A2, EEF1D, EIF3E, EIF3I, EIF4E, EIF5A2, ELAVL1, ELL, EML4, EMSY, ENTPD5, EPCAM, EPS8, ERAS, ERGIC1, ERVW-1, EVI2A, EVI5, EWSR1, EZH2, FAM189B, FAM72A, FAM83D, FASN, FDPS, FGF10, FGF3, FGF5, FGF8, FR1OP, FHL2, FIP1L1, FNDC3B, FRAT1, FUBP1, FUS, FZD2, GAB2, GAEC1, GALNT10, GALR2, GLO1, GMNN, GNA12, GNA13, GNAI2, GNAQ, GNAS, GOLPH3, GOPC, GPAT4, GPM6A, GPM6B, GPR132, GREM1, GRM1, GSK3A, GSM1, H19, HAS1, HAX1, HDGFRP2, HMGN5, HNRNPA1, HOTAIR, HOTTIP, HOXA-AS2, HRAS, HSPA1A, HSPA4, HSPB1, HULC, IDH1, IFNG, IGF2BP1, IKBKE, IL7R, INPPL1, INTS1, INTS2, INTS3, INTS4, INTS5, INTS7, INTS8, IRS2, IST1, JUP, KDM4C, KIAA0101, KIAA1524, KIF14, KRAS, KSR2, LAMTOR5, LAPTM4B, LCN2, LDHB, LETMD1, LIN28A, LIN28B, LMO1, LMO2, LMO3, LMO4, LSM1, LUADT1, MACC1, MACROD1, MAGEA11, MALAT1, MAML2, MAP3K8, MAPRE1, MAS1, MCC, MCF2, MCF2L, MCTS1, MEFV, MFHAS1, MFNG, MIEN1, MINA, MKL2, MLANA, MLLT1, MLLT11, MLLT3, MLLT4, MMP12, MMS22L, MN1, MNAT1, MOS, MPL, MPST, MRAS, MRE11A, MSI1, MTCP1, MTDH, MTOR, MUC1, MUC4, MUM1, MYD88, NAAA, NANOGP8, NBPF12, NCOA4, NEAT1, NECTIN4, NEDD4, NEDD9, NET1, NINL, NME1, NOTCH1, NOTCH4, NOV, NSD1, NUAK2, NUP214, NUP98, NUTM1, OLR1, PA2G4, PADI2, PAK7, PARK7, PARM1, PBK, PCAT1, PCAT5, PDGFA, PDZK1IP1, PELP1, PFN1P3, PIGU, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PIM2, PIM3, PIR, PIWIL1, PLAC8, PLK1, PPM1D, PPP1R10, PPP1R14A, PPP2R1A, PRAME, PRDM12, PRMT5, PSIP1, PSMD10, PTCH2, PTMA, PTP4A1, PTP4A2, PTP4A3, PTTG1, PTTG1IP, PTTG2, PVT1, RAB11A, RAB18, RAB22A, RAB23, RAB8A, RALGDS, RAP1A, RASSF1, RBM14, RBM15, RBM3, RBMY1A1, RFC3, RGL4, RGR, RHO, RING1, RINT1, RIT1, RNF43, RPL23, RRAS, RRAS2, RSF1, RUNX1T1, S100A4, S100A7, S100A8, SAG, SART3, SBSN, SEA, SEC62, SERTAD1, SERTAD2, SERTAD3, SET, SETBP1, SETDB1, SGK1, SIRT1, SIRT6, SKI, SKIL, SKP2, SLC12A5, SLC3A2, SMR3B, SMURF1, SNCG, SNORA59A, SNORA80E, SPAG9, SPATA4, SPRY2, SQSTM1, SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF6, SS18, SSX1, SSX2, SSX2B, STIL, STMN1, STRA6, STYK1, SUZ12, SWAP70, SYT1, TAC1, TACSTD2, TAF15, TALDO1, TAZ, TBC1D1, TBC1D15, TBC1D3, TBC1D3C, TBC1D7, TCL1A, TCL1B, TCL6, TCP1, TFG, TGM3, TINCR, TKTL1, TLE1, TMEM140, TMPOP2, TMPRSS2, TNS4, TPD52, TPR, TRE17, TREH, TRIB1, TRIB2, TRIM28, TRIM32, TRIM8, TRIO, TRIP6, TSPAN1, TSPY1, TXN, TYMS, TYRP1, UBE2C, UBE3C, UCA1, UCHL1, UHRF1, URI1, USP22, USP4, USP6, VAV1, VAV2, VAV3, VIM, WAPL, WHSC1, WHSC1L1, WISP1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT2, WNT3, WNT5A, WWTR1, XCL1, XIAP, YAP1, YEATS4, YY1AP1, ZEB1-AS1, ZFAND4, ZFAS1, ZMYM2, ZNF703 또는 ZNHIT6일 수 있다.

[0044] 일 구현예에서, 상기 세포 표적화 모이어티는 암세포 표적화 모이어티일 수 있으며, 암세포 표적화 모이어티는 상기 암세포 특이적 바이오마커에 결합하는 펩타이드, 저분자 화합물 또는 단백질일 수 있다.

[0045] 일 구현예에서, 본 발명의 전구약물은 하기 화학식 1의 화합물을 포함할 수 있으며, 하기 식에서, X는 약물 모이어티이고; Y는 활성산소종 반응성 모이어티이며; 및 Z는 기관 또는 세포 표적화 모이어티이다:

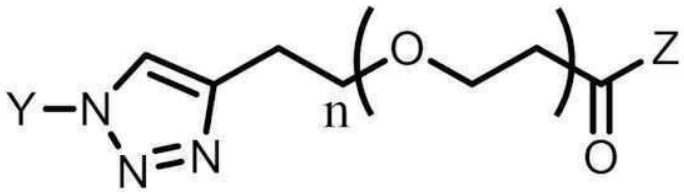
화학식 1

[0046] 

[0047] 일 구현예에서, 상기 화학식 1의 화합물은 수용액(pH 7.4)의 조건하에 370 nm에서 최대 흡수파장을 나타낼 수 있으며, 430 nm에서 최대 형광파장을 나타낼 수 있다.

[0048] 일 구현예에서, 상기 화학식 1의 화합물은 세포 내 활성산소종과 반응하여 광유발 전자 전이(photoinduced electron transfer)에 의한 퀜칭(quenching) 효과가 깨어지며 형광이 증가할 수 있으며, 활성산소종과 반응하여 청색 형광을 나타내는 하기 Y-linker-Z (화학식 2) 및 유리(free) X로 분해되어 유리(Free) X 형태로 약물 모이어티를 방출할 수 있다:

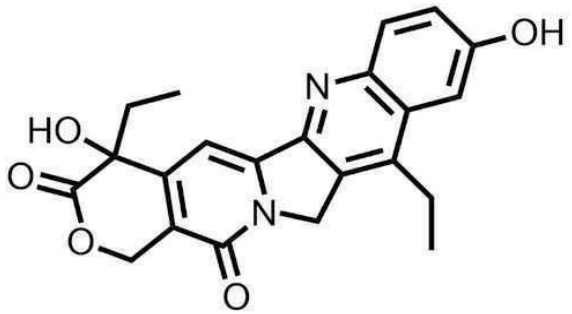
화학식 2

[0049] 

[0050] 일 구현예에서, 상기 화학식 2의 화합물은 430 nm에서 최대 형광파장을 나타낼 수 있다.

[0051] 일 구현예에서, 활성산소종과 반응하여 본 발명의 전구약물로부터 분해되어 방출된 약물 모이어티는 강한 황색 형광을 나타내는 화학식 3의 화합물일 수 있으며, 화학식 3의 화합물은 560 nm에서 최대 형광파장을 나타낼 수 있다:

화학식 3

[0052] 

[0053] 일 구현예에서, 상기 기관 또는 세포 표적화 모이어티 Z는 카베올린 수용체를 통해 세포 내로 투과/섭취되는 카베올린 수용체 특이적 세포 투과 펩타이드일 수 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있고, 이를 기관 또는 세포 표적화 모이어티 Z로서 포함하는 전구약물은 뇌암 세포를 표적화할 수 있으며, 교모세포종을 표적화하는 것이 더욱 바람직하다.

[0054] 일 구현예에서, 상기 전구약물은 교모세포종 특이적 수용체 (예컨대, 교모세포종 과발현 수용체인 카베올린 수용체)를 매개로 한 세포내이입(endocytosis)을 통해 전구약물의 종양 표적율을 향상시킬 수 있다.

[0055] 일 구현예에서, 본 발명의 전구약물은 불활성 상태에서 종양 미세 환경이라고 통칭하는 저산소 상태, 과발현된 활성산소종 및 산성의 조건에 반응하여 활성 대사물의 형태로 변화할 수 있다.

[0056] 일 구현예에서, 본 발명의 전구약물은 약물전달체로 사용될 수 있다.

[0057] 일 구현예에서, 본 발명의 전구약물은 표지(labeling) 모이어티를 추가로 포함할 수 있으며, 표지 모이어티는 발색효소, 방사성 동위원소, 크로모포어(chromopore), 발광물질 및 형광물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 형광물질은 Cy(cyanine) 계열, 로다민(Rhodamine) 계열, 알렉사(Alexa) 계열, BODIPY 계열 또는 ROX 계열의 형광물질일 수 있으며, 나일 레드 (Nile Red), 보디피 (BODIPY, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene), 시아닌 (cyanine), 플루오레세인 (fluorescein), 로다민 (rhodamine), 쿠마린 (coumarine) 또는 알렉사 (Alexa)일 수 있다.

[0058] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 전구약물을 유효성분으로 포함하는, 암의 진단 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0059] 일 구현예에서, 상기 조성물은 암의 진단 및 치료가 동시에 가능할 수 있다.

[0060] 일 구현예에서, 암은 고형암일 수 있으며, 교모세포종, 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있고, 교모세포종인 것이 더욱 바람직하다.

[0061] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질병 또는 질환 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0062] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 서 사용된, 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack PublishingCo.에 기술되어있다.

[0063] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack PublishingCompany, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0064] 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.

[0065] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 (예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 질병 또는 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 박쥐, 낙타, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미한다.

[0067] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

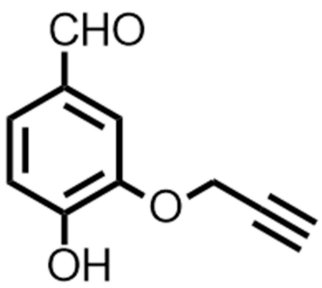
[0068] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 암의 진단 및 치료용 약학적 조성물을 포함하는, 암의 진단 및 치료를 동시 수행하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0070] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0072] **실시예 1. 활성산소종 반응성 모이어티 Y (화학식 7)의 제조**

[0073] 1-1. 화학식 4의 화합물 제조

화학식 4

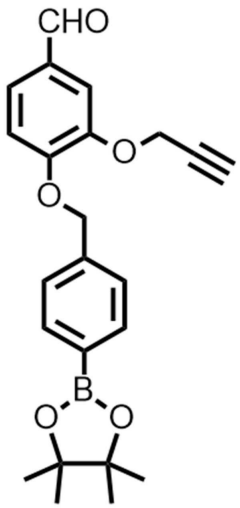


[0074]

[0075] 수소화나트륨(sodium hydride, NaH, 4.8 g, 200 mmol)을 무수다이메틸설폭사이드(anhydrous dimethyl sulfoxide, 50 mL)에 용해하였다. 상기 혼합물을 교반시키며 0 ℃로 냉각시켰다. 이후 혼합물에 3,4-다이하이드록시벤즈알데하이드(3,4-dihydroxybenzaldehyde, 13.8 g, 100 mmol)이 포함된 무수디메틸설폭사이드 (60 mL)를 한 방울씩 넣어주었다. 상기 혼합물을 상온 (25 ℃)에서 30분간 교반한 뒤, 프로파길브로마이드(propargyl bromide, 11.1 mL 100 mmol)을 첨가하여 상온에서 밤새 교반하였다. 반응이 끝난 후 박막 크로마토그래피(TLC, thin layer chromatography, silica gel 60F-254 glass plate, Merck)로 분석하였다. 생성물을 염산 용액(hydrochloric acid solution, HCl, 1 M)으로 중화시킨 후, 에틸 아세테이트(ethyl acetate, 3 × 250 mL)로 추출하여 유기층을 무수황산나트륨(sodium sulfate, Na_2SO_4, 5 g)으로 건조하였다. 이를 통해 얻은 화합물은 실리카겔(silica gel)을 이용한 컬럼 크로마토그래피(column chromatograph)를 이용하여 정제 (전개 액: ethyl acetate/n-hexane/acetic acid = 20:80:1)하여 상기 화학식 4의 화합물을 제조하였다. 각 합성 단계의 화합물을 $CDCl_3$ (δ, 7.26 ppm) 용액에 용해시켜서 분석할 시료를 제작하였고, Bruker DRX-500 NMR Spectrometer(BRUKER사 제품)를 이용하여 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR을 측정하여 구조 분석을 하였다.

[0077] 1-2. 화학식 5의 화합물 제조

화학식 5

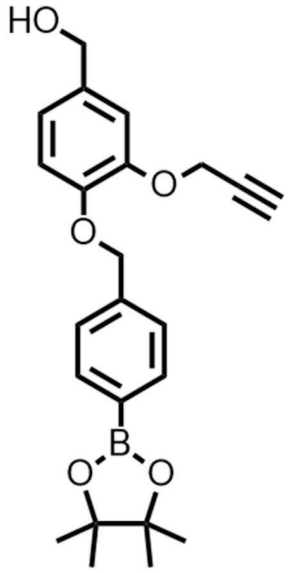


[0078]

[0079] 상기 실시예 1-1에서 제조한 화학식 4의 화합물 (1.0 g, 5.68 mmol) 및 4-브로모메틸 페닐보론산 피나콜 에스터(4-bromomethyl phenylboronic acid pinacol ester, 1.68 g, 5.68 mmol)를 아세토나이트릴(acetonitrile, 20 mL)에 용해하고, 혼합물을 80 ℃에서 밤새 교반하였다. 반응이 끝난 후 박막 크로마토그래피로 분석 (전개 액: 1:4 (*v*/*v*) ethyl acetate:n-hexane)하였고 필터(filter) 후 용매를 증발시켜 밝은 황색을 띠는 점도가 있는 액체 상태의 상기 화학식 5의 화합물을 제조하였다. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.81 (s, 1H), 7.82 (d, J = 7.54 Hz, 2H), 7.55 (t, J = 1.74 Hz, 1H), 7.44-7.40 (m, 3H), 6.96 (dd, J = 8.28, 1.62 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.81 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 2.55 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.33 (s, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 190.63, 154.00, 147.62, 138.93, 135.05, 130.01, 127.00, 126.18, 112.95, 83.78, 77.85, 76.35, 70.67, 56.75, 24.76 ppm.

[0081] 1-3. 화학식 6의 화합물 제조

화학식 6

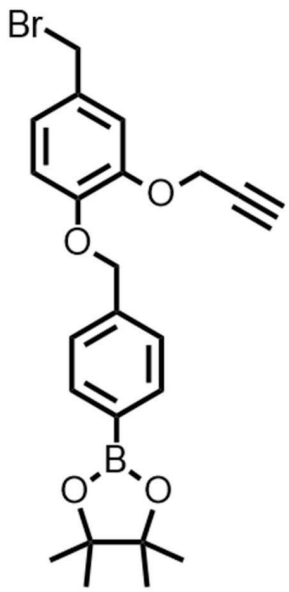


[0082]

[0083] 상기 실시예 1-2에서 제조한 화학식 5의 화합물 (1.60 g, 4.08 mmol) 및 수소화 붕소나트륨(sodium borohydride, $NaBH_4$, 0.31 g, 8.16 mmol)을 메탄올(methanol, 10 mL)에 용해하고, 혼합물을 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후 박막 크로마토그래피로 분석하였다. 이후 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 혼합물을 정제 (전개 액: ethylacetate/n-hexane=1:4에서 1:2)하여 밝은 황색을 띠는 고체 형태의 상기 화학식 6의 화합물을 제조하였다. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.82-7.79 (m, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 7.08 (d,*J* = 1.85 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J* = 8.25, 1.90 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.77 (d, *J* = 2.40 Hz, 2H), 4.58 (d, *J* = 4.60 Hz, 2H), 2.51 (t, *J* = 2.40 Hz, 1H), 1.86 (br s, 1H), 1.34 (s, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 148.33, 147.45, 140.14, 134.95, 134.13, 126.28, 120.91, 114.55, 114.49, 83.78, 78.70, 75.73, 70.99, 64.97, 57.04, 24.80 ppm.

[0085] 1-4. 화학식 7의 화합물 제조

화학식 7



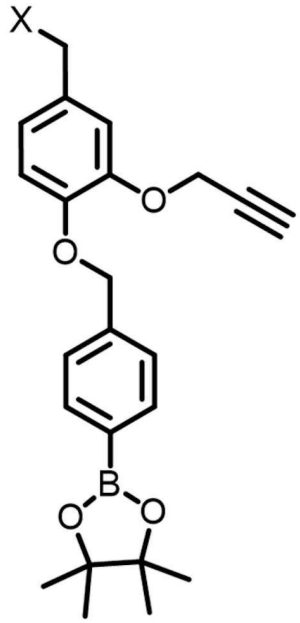
[0086]

[0087] 상기 실시예 1-3에서 제조한 화학식 6의 화합물 (1.20 g, 3.04 mmol) 및 포스포러스 트리브로마이드(phosphorus tribromide, PBr_3, 0.41 g,1.52 mmol)을 0 ℃에서 다이클로로메테인(dichloromethane, 30 mL)에 용해하였다. 혼합물은 상온에서 밤새 교반하고, 반응이 끝난 후 박막 크로마토그래피로 분석하였다. 이후 혼합물은 0 ℃로 식힌 후 황산 수소 나트륨(sodium hydrogen sulfate, $NaHSO_4$)을 이용하여 중화시켰다. 그런 다음, 다이클로로메테인 (3x30 mL)으로 추출한 후 유기층을 무수황산나트륨 (5 g)으로 건조하였다. 이후 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 혼합물을 정제 (전개 액: ethylacetate/n-hexane=1:4에서 1:2)하여 옅은 황색을 띠는 고체 형태의 상기 화학식 7의 화합물을 제조하고 (도 1), 활성산소종 반응성 모이어티 Y라고 명명하였다. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ7.82-7.79 (m, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 7.10 (d,*J* = 2.10 Hz, 1H), 6.93 (dd, *J* = 8.30, 2.10 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.79 (d, *J* = 2.35 Hz, 2H), 4.47 (s, 2H), 2.53 (t, *J* = 2.35 Hz, 1H), 1.34 (s, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 149.00, 147.22, 139.80, 134.93, 130.56, 126.20, 122.99, 116.24, 114.11, 83.72, 78.38, 75.95, 70.79, 57.04, 33.88, 24.76 ppm.

[0089] **실시예 2. 암 표적화 전구약물의 합성**

[0090] 2-1. 활성산소종 반응성 모이어티 Y에 항암제 X 결합

화학식 8

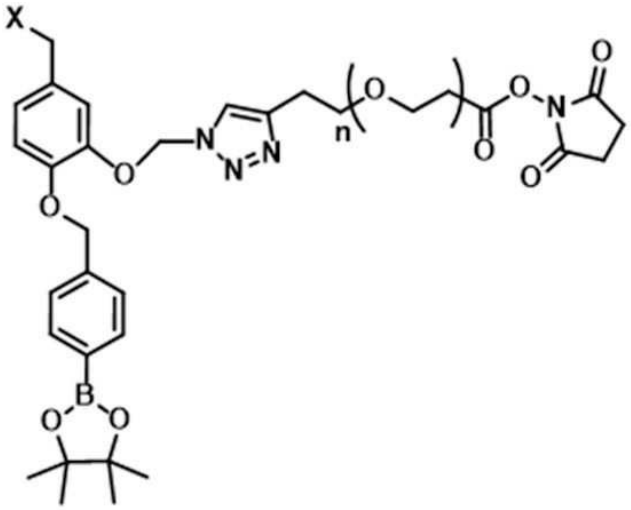


[0091]

[0092] 약물 X (0.10 g, 0.25 mmol)와 탄산세슘(cesium carbonate, Cs_2CO_3, 0.10 g, 0.30 mmol)을 드라이(dry) 다이메틸포름아마이드(dimethylformamide, 10 mL)에 용해하고, 혼합물에 상기 실시예 1-4에서 제조한 화학식 7의 화합물(활성산소종 반응성 모이어티 Y) (0.34 g, 0.75 mmol)을 첨가하여 상온에서 밤새 교반하였다. 반응 후 에틸아세테이트로 추출한 후 유기층을 무수황산나트륨 (5 g)으로 건조하고, 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 혼합물을 정제 (전개 액: methanol/dichloromethane = 1:99에서 2:99)하여 옅은 황색을 띠는 고체 형태의, 활성산소종 반응성 모이어티 Y에 항암제 X가 결합된 화합물 (화학식 8)을 제조하였다. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ8.13 (d,*J* = 9.25 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.52 (dd, *J* = 9.25, 2.65 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 2.65 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.30, 1.80 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.30 Hz, 1H), 5.75 (d, *J* = 16.15 Hz, 1H), 5.30 (d, *J* = 16.20 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 2.40 Hz, 2H), 3.74 (br s, 1H), 3.10 (q, *J* = 7.65 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 2.35 Hz, 1H), 1.95-1.82 (m, 2H), 1.34 (s, 12H), 1.33 (t, *J* = 7.70 Hz, 3H), 1.03 (t, *J* = 7.38 Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 173.80, 157.70, 157.57, 150.22, 149.47, 148.95, 147.56, 147.00, 145.13, 143.73, 140.01, 135.10, 135.04, 132.01, 132.00, 129.09, 127.99, 127.25, 126.31, 122.67, 121.77, 118.00, 115.07, 114.47, 103.15, 97.63, 83.86, 78.63, 75.99, 72.96, 70.94, 70.20, 66.20, 57.16, 49.40, 31.61, 24.90, 23.14, 13.55, 7.91 ppm.

[0094] 2-2. 링커의 연결

화학식 9

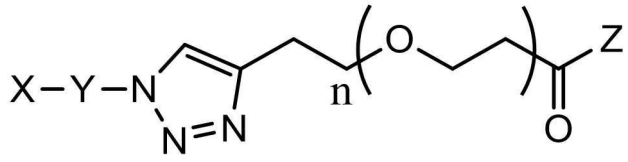


[0095]

[0096] 상기 실시예 2-1에서 제조한 화학식 8의 화합물(X-Y) (15 mg, 0.02 mmol) 및 링커(linker) (M.W. = 2,000 g/mol, 39 mg, 1 equiv.)를 다이클로로메테인/메탄올(methanol) (2:1, total = 10 mL) 용액에 용해한 후, 상기 혼합물에 아스코르브산나트륨(sodium ascorbate, 10 mol%)을 첨가하여 아르곤 가스(argon gas)로 탈가스(degassing)하며 30분간 교반시켰다. 그 동안 메탄올(0.5 mL)에 녹인 황산구리오수염($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)을 아르곤 가스(argon gas)로 탈가스(degassing)하였다. 30분 후 탈가스된 황산구리오수염 용액을 상기 혼합물에 첨가하여 8시간 교반하였다. 반응이 끝난 후 박막 크로마토그래피로 분석하였다. 이 후 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 혼합물을 정제 (전개 액: methanol/dichloromethane=1:19에서 2:8)하여 X-Y에 링커가 결합된 상기 화학식 9의 화합물을 제조하였다.

[0098] 2-3. 암 표적화 전구약물의 합성

[0099] [화학식 1]



[0100]

[0101] 세포가 가지는 특이적 종양 미세 환경 조건 중 하나인 과발현된 활성산소종(reactive oxygen species) (특히, 과산화수소(Hydrogen peroxide))에 반응하여 활성 대사물로 변화하여 암세포만을 선택적으로 치료할 수 있는 전구약물(prodrug)을 제작하기 위해, 상기 실시예에서 제작한 종양 미세 환경 조건에서 활성 대사물로 변화시키기 위해 활성산소종 반응성 모이어티 Y, 항암제 X 및 링커가 결합된 화합물 (화학식 9)에 암을 표적화하기 위한 펩타이드(targeting peptide) Z를 결합시킨 암 표적화 전구약물을 합성하였다. 구체적으로, 상기 실시예 2-2에서 제조한 화학식 9의 화합물 (2 mg, 1 equiv.) 및 펩타이드 Z (0.51 mg, 1 equiv.)를 증류수(D.I H_2O, 0.5 mL)에 용해한 후, 상기 혼합물을 4 ℃에서 4시간 교반하고 추가적인 정제 과정없이 상기 화학식 1의 전구약물 (X-Y-linker-Z)을 수득하였다 (도 2).

[0103] **실시예 3. 교모세포종 표적화 전구약물 제작**

[0104] 암 표적화 전구약물의 예시로서, 상기 실시예 2의 활성산소종 반응성 모이어티 Y-항암제 X-링커-암 표적화 펩타이드 Z로 이루어진 암 표적화 전구약물에서, X 모이어티를 항암제 SN-38(7-에틸-10-히드록시-캠토테신, 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin)로, 링커를 PEG로, 및 Z 모이어티를 교모세포종(glioblastoma multiforme;

GBM)을 표적화하는 펩타이드 SIWV (서열번호 1)로 적용하여 교모세포종 표적화 전구약물 (GBM 전구약물)을 합성하였다.

[0106] **실시예 4. GBM 전구약물의 특성 분석**

[0107] 4-1. 수용액 내 흡수 및 형광 특성 분석

[0108] 용매가 수용액 (pH 7.4)인 조건 하에 상기 실시예 3에서 제작한 GBM 전구약물과, GBM 전구약물이 활성산소종에 노출됨에 따른 활성화에 의해 분해된 Free X (SN38, 화학식 3) 및 Y-linker-Z (화학식 2) (각 10 μM)의 흡광도 및 형광강도 측정을 수행하였다. 흡광 스펙트럼(absorbance spectra) 특성을 분석하기 위해 흡수 분광광도계(UV/Vis spectrophotometer; Agilent, California, USA)를 사용하였고, 형광 스펙트럼(fluorescence spectra) 분석을 위해 형광 광도계 (SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였다. 이때 각 스펙트럼 측정 시 사면이 1 cm 두께인 표준 석영 셀(standard quartz cell; interanl volume= 0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)을 사용하였다.

[0109] GBM 전구약물, Free X 및 Y-linker-Z의 흡광 스펙트럼 분석 결과, 370 nm에서 최고 흡수 값을 나타냈다 (도 3). 또한, 형광 스펙트럼 분석 결과, Y-linker-Z는 430 nm에서 형광을 나타냈고, Free X은 560 nm에서 형광을 나타냈으나, GBM 전구약물은 광유발 전자 전이(photoinduced electron transfer)로 인한 퀜칭효과 때문에 Y-linker-Z 및 Free X에 비해 낮은 형광을 나타냈다 (도 4).

[0111] 4-2. 과산화수소 조건에서 시간에 따른 형광 변화 분석

[0112] 과산화수소 (1 mM) 조건의 37 ℃ 수용액 (pH 7.4)에서 시간의 변화 (0~12시간)에 따른 GBM 전구약물의 분해에 의한 Free X의 방출 정도를 확인하기 위해, 형광 스펙트럼 분석을 수행하였다. 이 때, GBM 전구약물의 분해에 따른 Free X의 방출은 560 nm에서의 황색 방출로 확인하고, 부산물인 Y-linker-Z (부산물)은 430 nm에서의 청색 방출로 확인하였다.

[0113] 그 결과, 과산화수소에 의한 GBM 전구약물의 분해는 동일한 과산화수소의 농도 하에 시간이 지남에 따라 증가하며 활성화되는 것으로 나타났다 (도 5).

[0115] 4-3. 과산화수소 농도에 따른 형광 변화 분석

[0116] 37 ℃ 수용액 (pH 7.4)에서 과산화수소 농도 0 내지 1 mM의 조건으로 12시간 반응시킨 후 GBM 전구약물로부터 Free X의 방출을 확인하기 형광 스펙트럼 분석을 수행하였다.

[0117] 그 결과, 과산화수소 농도가 증가함에 따라 560 nm에서의 Free X의 방출이 증가하는 것으로 나타났다 (도 6).

[0119] 4-4. 과산화수소 선택적 반응성 분석

[0120] GBM 전구약물의 과산화수소에 대한 선택성을 확인하기 위해, 다양한 금속 이온(metal ions) 또는 생체분자(biomolecules) (Sigma aldrich, TCI, Alfa)를 100 μM 농도로 포함하는 수용액 (pH 7.4 PBS buffer) 용매에 GBM 전구약물 (10 μM)를 첨가하여 37 ℃에서 1시간 동안 교반한 뒤, 형광 광도계(spectro-fluorophotometer)로 형광 세기를 측정하였다.

[0121] 그 결과, GBM 전구약물이 각 금속 이온과 생체분자에 노출되었을 때 반응하지 않아 형광 세기가 증가하지 않은 반면, 과산화수소에 노출되었을때만 반응하여 형광 세기가 증가하는 선택성을 가지는 것으로 나타났다 (도 7).

[0123] 4-5. 세포 내 흡수 효율과 활성화 효율 분석

[0124] GBM 전구약물을 U87MG (인간 1차 교모세포종 세포주)에 처리하여 세포 내 흡수 효율과 GBM 전구약물의 활성화 효율을 확인하였다. 구체적으로, U87MG 세포 (한국 세포주 은행, Korea Cell Line Bank)를 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum, Hyclone) 및 1% 페니실린-스트렙토 마이신(penicillin streptomycin, Gibco)을 추가한

DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium, Hyclone, US)에서 배양한 뒤, U87MG 세포를 공초점 유리디쉬(confocal dish, SPL) 바닥에 약 2×10^5의 개수로 분주한 후, 약 24시간 동안 37 ℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 이 후, 세포 내 활성산소종을 유도하기 위해 TBHP(*tert*-butyl hydroperoxide) (150 μM)로 3 시간 동안 전처리하고 37 ℃에서 6 시간 동안 GBM 전구약물 (10 μM)을 처리하였다. 6 시간 배양 후 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, Hyclone)으로 세포를 3회 세척하여 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, 10분)로 고정하였다. 그 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)으로 TBHP에 의해 세포 내 유도된 활성산소종에 의한 GBM 전구약물의 활성화를 시각화하였으며, GBM 전구약물은 여기 파장 및 방출 채널 405/422 nm 및 400~500 nm에서 관찰하였고, Free X는 여기 파장 및 방출 채널 405/553 nm 및 500~700 nm에서 관찰하였다.

[0125] 그 결과, GBM 전구약물이 처리된 U87MG 세포는 청색과 황색 채널 모두에서 유의미한 형광 변화를 나타냈으며, 세포 내 활성산소종을 유도하는 TBHP를 전처리 후 GBM 전구약물이 처리된 경우 U87MG 세포는 황색 채널에서의 형광 세기 변화가 증가하는 것으로 나타났다 (도 8).

[0127] 이를 통해, 세포 내 유도된 활성산소종에 의해 GBM 전구약물이 활성화되어 분해됨으로써 Free X의 방출량이 증가한 것을 확인하였다.

[0129] **실시예 5. GBM 전구약물의 교모세포종 사멸 효과 확인**

[0130] GBM 전구약물의 교모세포종에 대한 항암 효과를 확인하기 위해, U87MG 세포를 이용하여 세포독성키트(Cell counting Kit-8; CCK-8, Product No. CK04-13, Dojindo Molecular Tech. Inc, Tokyo, Japan)로 세포독성실험을 수행하였다. 구체적으로, 96 웰 플레이트 (SPL, 30096)에 약 $5x10^3$개의 U87MG 세포를 분주한 다음, 37 ℃, 5% CO_2에서 24시간 동안 배양하였다. 이 후 활성산소종 유도 여부에 따른 변화를 관찰하기 위해 TBHP (150 μM)를 3시간 전처리 후 GBM 전구약물을 처리한 군과 GBM 전구약물을 단독으로 처리한 군을 나누어 실험하였다. 이 때, GBM 전구약물은 배양 배지에 희석하여 농도별 (0~10 μM)로 처리하였다. 각 군을 48시간 동안 배양한 후 DPBS를 이용해 3번 세척한 뒤, 각 웰당 CCK-8 용액을 배양 배지에 희석하여 10 μL씩 처리하였다. 2시간 동안 배양 후 450 nm에서 흡광값을 측정하여 세포 독성 백분율 (샘플의 흡광값*100)/(대조군의 흡광값)을 계산하였다. 흡광값은 마이크로플레이트 리더기 (Microplate reader, Multiskan FC, Thermo Fisher)를 이용하여 측정하였다.

[0131] 그 결과, 농도 의존적으로 GBM 전구약물이 교모세포종을 사멸시키는 것으로 나타났다. 1 μM 이상의 고농도에서는 GBM 전구약물만을 처리한 군과 활성화시킨 군의 차이가 크지 않은 것으로 나타났으나, 낮은 농도에서는 GBM 전구약물을 활성산소종으로 활성화시킨 경우에 교모세포종의 사멸 효과가 유의미하게 증가하는 것으로 나타났다. (도 9).

[0133] **실시예 6. GBM 전구약물의 교모세포종 표적화 확인**

[0134] GBM 전구약물의 Z 모이어티에 의한 교모세포종 특이적 표적화 효과를 확인하기 위해, 교모세포종 특이적 수용체 발현에 따른 세포 내 흡수 효율과 GBM 전구약물의 활성화 효율을 확인하였다. 구체적으로, U87MG 및 Huh7 (인간 간세포암종 세포주) (한국 세포주 은행)를 10% 소 태아 혈청(fetal bovine serum, Hyclone) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin streptomycin, Gibco)을 추가한 DMEM 배지에서 배양한 뒤, 공초점 유리디쉬 바닥에 약 2×10^5의 개수로 각각 분주한 후, 약 24시간 동안 37 ℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 이 후, GBM 전구약물 (10 μM)을 처리하고 37 ℃에서 12시간 동안 배양한 뒤, DPBS으로 3회 세척하고 4% 파라포름알데하이드로 10분 동안 고정하였다. 그 후, 공촛점 레이저 스캐닝 현미경을 이용하여 GBM 전구약물은 여기 파장 및 방출 채널 405/422 nm 및 400~500 nm에서 관찰하였고, Free X는 여기 파장 및 방출 채널 405/553 nm 및 500~700 nm에서 관찰하였다.

[0135] 그 결과, GBM 전구약물이 처리된 U87MG 세포는 GBM 전구약물이 처리되지 않은 U87MG 세포와 비교하여 청색과 황색 채널 모두에서 형광 세기가 변화된 것으로 나타나 (도 10), 세포내 이입된 GBM 전구약물이 세포 내 활성산소종에 의해 활성화되었음을 확인하였다. 반면, GBM 전구약물이 처리된 Huh7세포는 GBM 전구약물이 처리된 U87MG

세포와 비교하여 청색과 황색 채널 모두에서 U87MG 세포에 비해 형광 세기 변화가 낮은 것으로 나타났다 (도 10).

[0137] 이를 통해, GBM 전구약물이 교모세포종 특이적 수용체가 발현된 U87MG 세포에 우수한 표적화 효과를 가지며 효율적인 약물 활성화 효과를 가지는 것을 확인하였다.

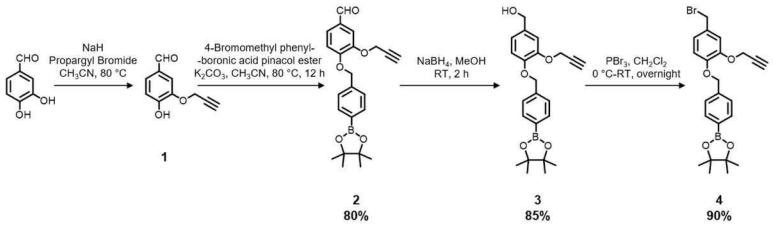
[0139] **실시예 7. GBM 전구약물의 교모세포종 선택적 사멸 효과 확인**

[0140] GBM 전구약물의 교모세포종 선택적 사멸 효과를 확인하기 위해, GBM 전구약물 (0~10 μM)을 U87MG 세포 및 Huh7 세포에 처리하여 48시간 동안 배양한 뒤, CCK-8 assay를 이용하여 세포독성실험을 수행하여 교모세포종 세포 특이적 항암 효과를 확인하였다.

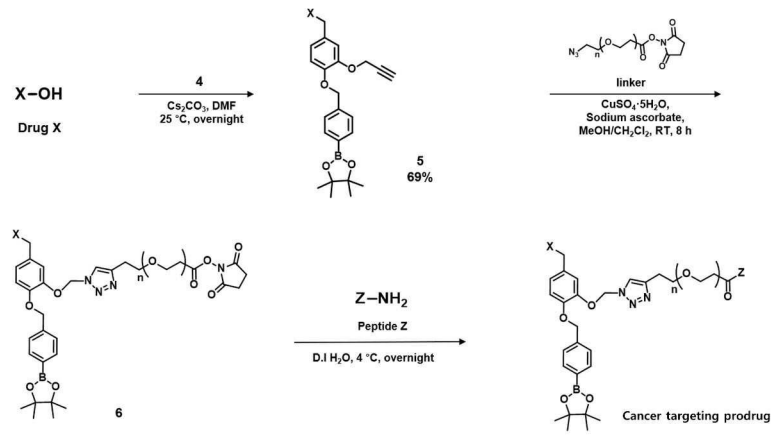
[0141] 그 결과, GBM 전구약물은 간세포암종 (Huh7 세포주)에 비해 교모세포종 (U87MG 세포주)에 선택적으로 세포독성을 나타내 (도 11), GBM 전구약물이 다른 세포에 대한 독성 부작용 없이 교모세포종을 특이적으로 치료할 수 있음을 확인하였다.

도면

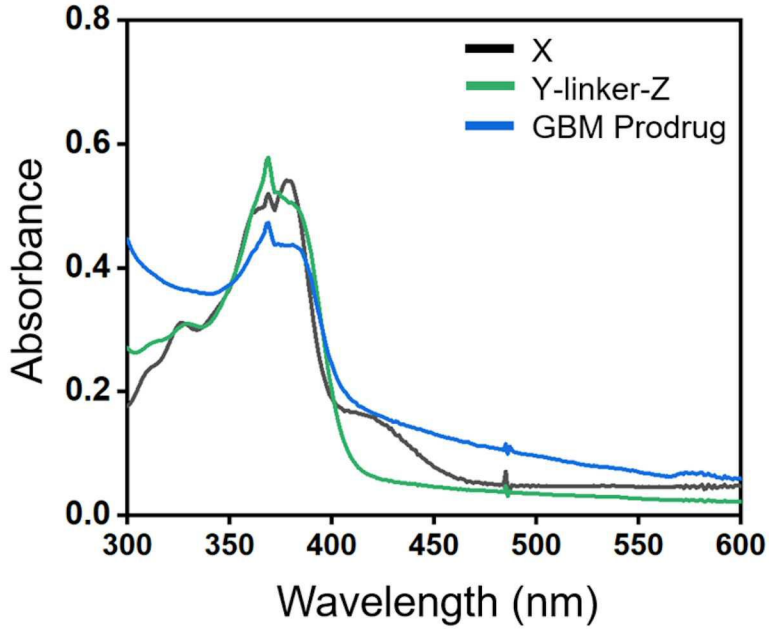
도면1



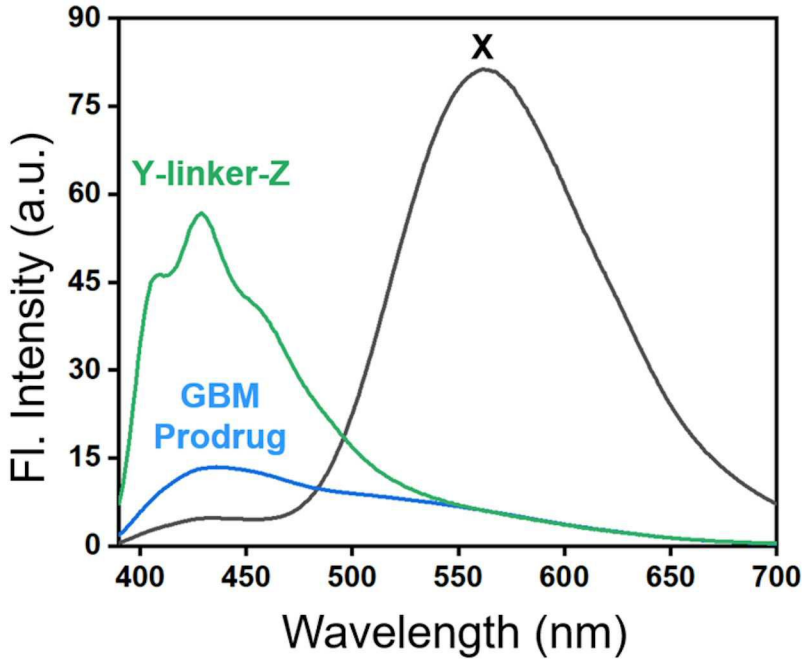
도면2



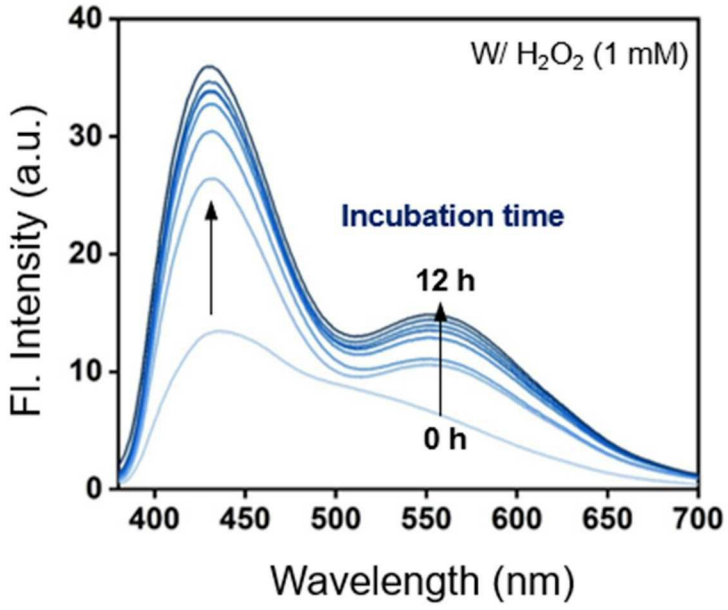
도면3


X
Y-linker-Z
GBM Prodrug
Absorbance
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
300
350
400
450
500
550
600
Wavelength (nm)

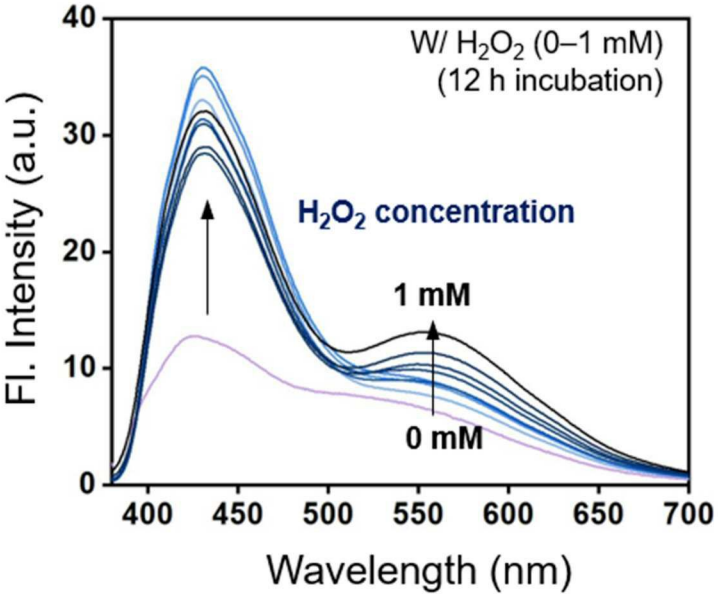
도면4


X
Y-linker-Z
GBM
Prodrug
Fl. Intensity (a.u.)
0
15
30
45
60
75
90
400
450
500
550
600
650
700
Wavelength (nm)

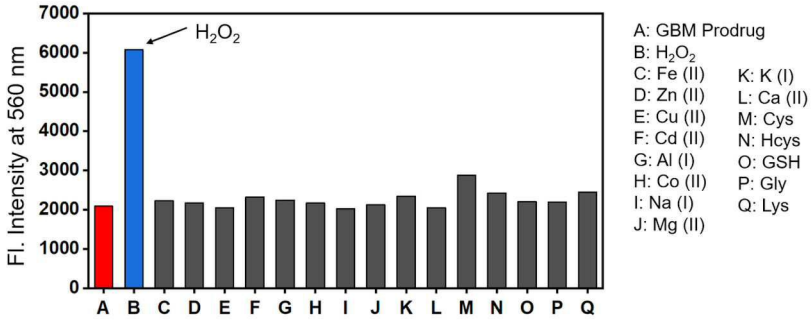
도면5


W/ H_2O_2 (1 mM)
Incubation time
12 h
0 h
Fl. Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
0
10
20
30
40
400
450
500
550
600
650
700

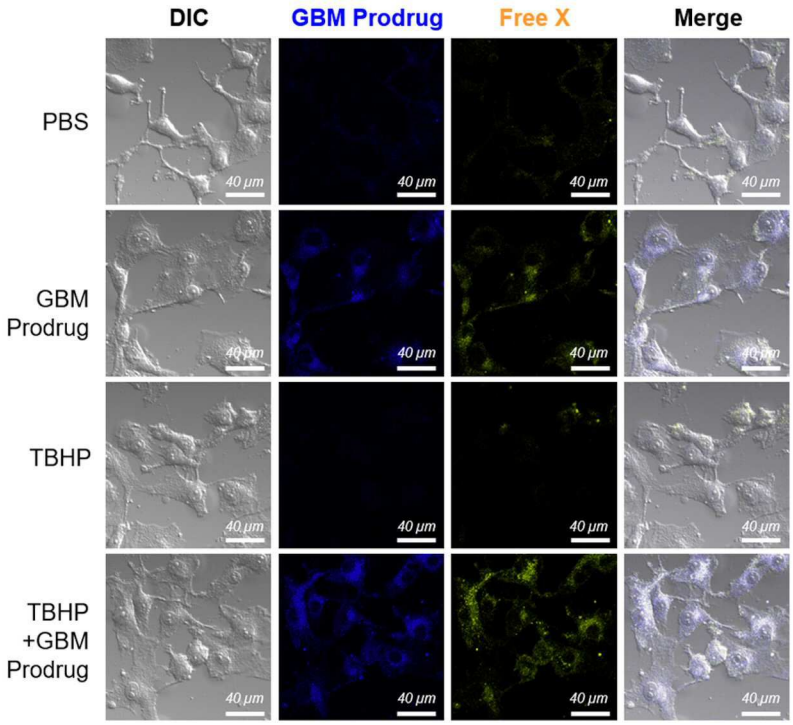
도면6


W/ H_2O_2 (0–1 mM)
(12 h incubation)
H_2O_2 concentration
1 mM
0 mM
Fl. Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
0
10
20
30
40
400
450
500
550
600
650
700

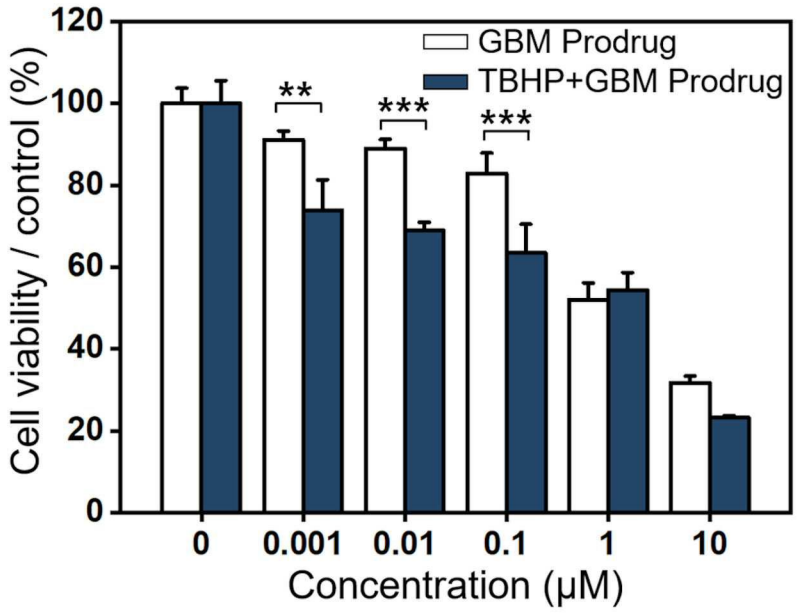
도면7


Fl. Intensity at 560 nm
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
H_2O_2
A B C D E F G H I J K L M N O P Q
A: GBM Prodrug
B: H_2O_2
C: Fe (II)
D: Zn (II)
E: Cu (II)
F: Cd (II)
G: Al (I)
H: Co (II)
I: Na (I)
J: Mg (II)
K: K (I)
L: Ca (II)
M: Cys
N: Hcys
O: GSH
P: Gly
Q: Lys

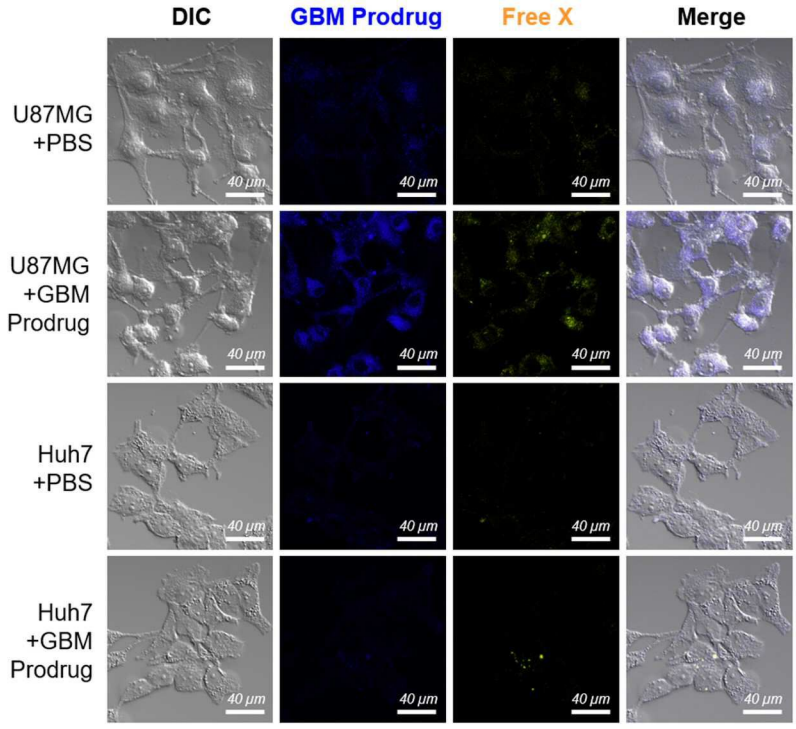
도면8


DIC
GBM Prodrug
Free X
Merge
PBS
GBM Prodrug
TBHP
TBHP +GBM Prodrug
40 μm

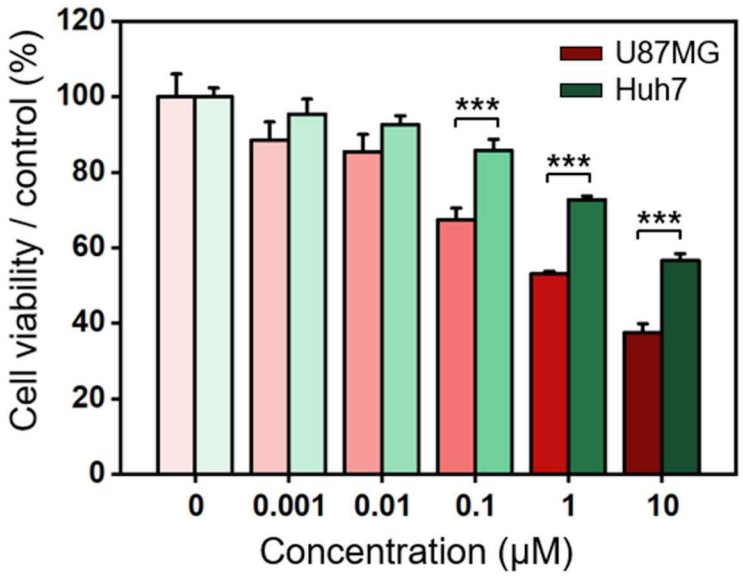
도면9


GBM Prodrug
TBHP+GBM Prodrug
Cell viability / control (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
***
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentration (μM)

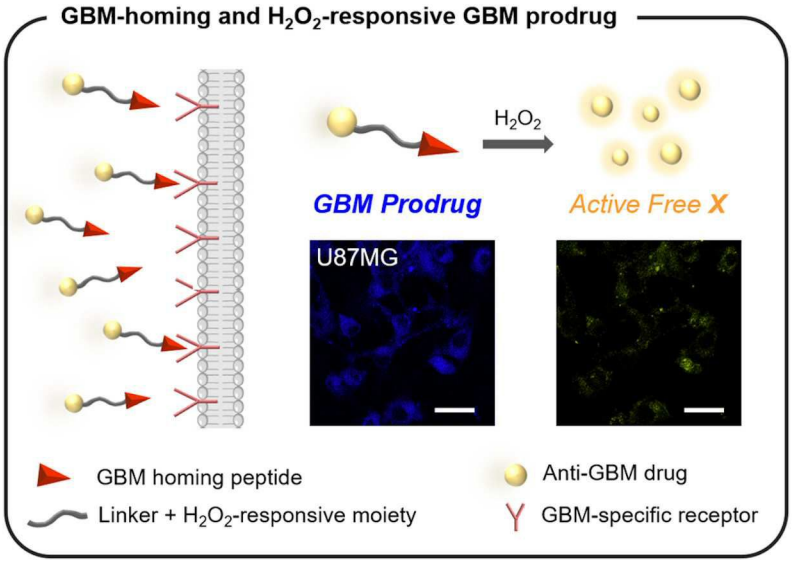
도면10


DIC
GBM Prodrug
Free X
Merge
U87MG +PBS
U87MG +GBM Prodrug
Huh7 +PBS
Huh7 +GBM Prodrug
40 μm

도면11


Cell viability / control (%)
120
100
80
60
40
20
0
U87MG
Huh7
***
***
***
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentration (μM)

도면12


GBM-homing and H2O2-responsive GBM prodrug
H2O2
GBM Prodrug
Active Free X
U87MG
GBM homing peptide
Linker + H2O2-responsive moiety
Anti-GBM drug
GBM-specific receptor

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.