



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월09일

(11) 등록번호 10-1510319

(24) 등록일자 2015년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/69 (2006.01) *A61K 31/41* (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0010452

(22) 출원일자 2014년01월28일

심사청구일자 2014년01월28일

(56) 선행기술조사문헌

J. AM. CHEM. SOC., VOL. 135, NO. 11, PP. 4567-4572

ORG. LETT., VOL. 11, NO. 23, PP. 5386-5389

US20120232282 A1

US20050107335 A1

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

경기도 성남시 분당구 내정로 152 130-2402(수내동, 파크타운롯데아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 4 항

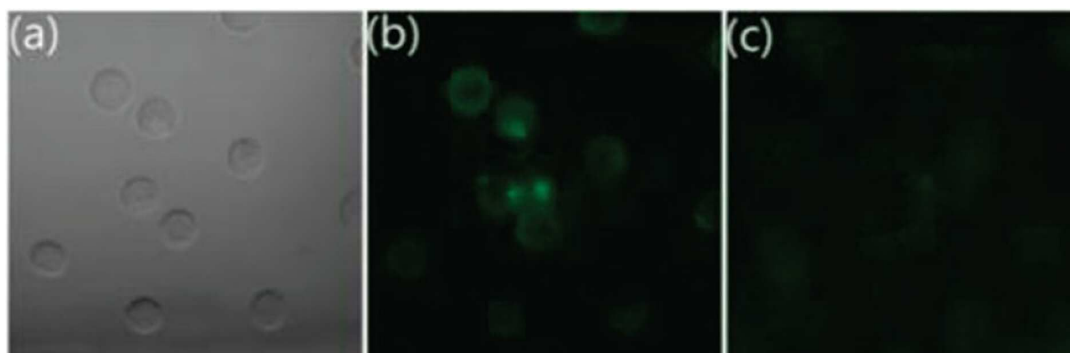
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 암세포 표적용 테라노스틱 약물 전달 시스템

(57) 요약

본 발명은 특정 표적 세포로 대상 약물을 효과적으로 전달할 수 있을 뿐만 아니라, 주입된 약물의 세포 흡수 및 방출을 광학적으로 직접 모니터링할 수 있는 약물전달 복합체 및 그 제조방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 생물학적 조직에서 형광 테라노스틱 DDS를 도입하기 위하여, 근적외선 형광 보론-다이피로메텐(boron-dipyrrromethene: BODIPY) 플루오로포어에 기초한 약물 전달 시스템을 제공하고자 한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2009-0081566
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 (이공)리더연구차지원_창의연구
 연구과제명 발광센서재료연구단
 기여율 1/1
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

명세서

청구범위

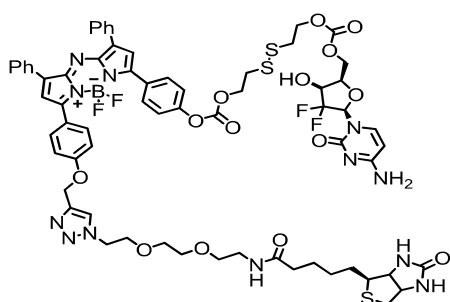
청구항 1

삭제

청구항 2

보론-다이피로메텐(boron-dipyrromethene: BODIPY) 플루오로포어를 기본구조로 하여 암세포-방향성 바이오틴 유닛과 컨쥬게이트되고 항암 약물 켐시타빈(GMC)과 이황화 결합에 의하여 연결된 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 화학식 2로 표시되는 암 표적용 약물 전달 시스템:

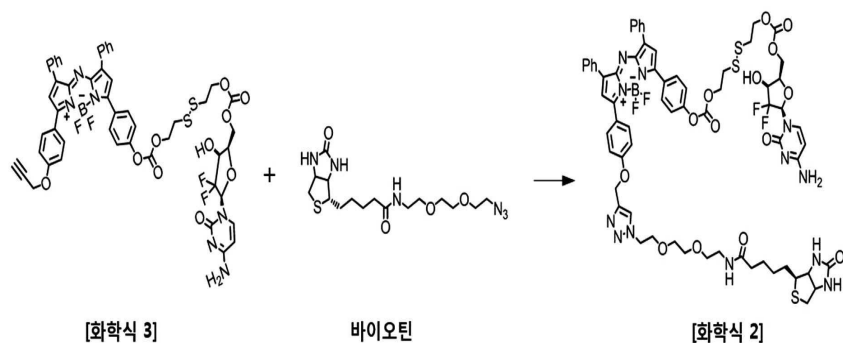
[화학식 2]



청구항 3

하기 반응식 1에 따라 화학식 3으로 표시되는 화합물과 바이오틴을 반응시킴으로써 제조되는 화학식 2로 표시되는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제조하는 방법.

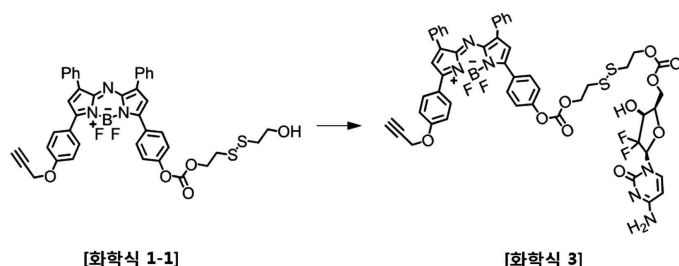
[반응식 1]



청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 하기 반응식 2에 따라 하기 화학식 1-1로 표시되는 화합물과 4-니트로페닐 클로로포름산을 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제조하는 방법.

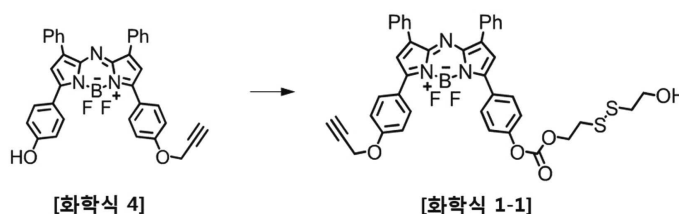
[반응식 2]



청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화학식 1-1로 표시되는 화합물은 하기 반응식 3에 따라 화학식 4로 표시되는 화합물과 포스겐을 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제조하는 방법.

[반응식 3]



발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 암세포로 특이적으로 이동하여 암세포로의 약물 전달이 가능하면서 동시에 암세포를 형광 이미징 가능한 테라노스틱 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

약물의 방출을 실시간 모니터링할 수 있는 테라노스틱(theranostic)이라는 특별한 약물 전달 시스템(DDS)이 의 약 및 약학 분야에서 주목을 받고 있다. 다른 DDS 시스템과 비교하여 보면, 약물을 조직으로 운반할 뿐 아니라 국소 약물 투여를 위해 약물 방출 신호를 제공할 수 있다는 점에서 장점이 있다. 바이오틴 또는 RGD 부분과 같은 암 표적 유닛을 가진 테라노스틱 DDS는 표적-선택적 약물 전달 시스템의 이상적인 후보가 될 것이다. 그러나, 대부분의 이러한 후보들은 조직을 투과해야 하나, DDS프로브가 빛의 450 내지 530 nm 파장 범위에서 강한 흡수가 일어나므로, 이 범위의 빛은 조직 투과가 극히 제한되므로 우수한 테라노스틱 DDS가 될 수 없다. 이러한 문제는 근적외선 기반 테라노스틱 시스템의 사용에 의하여 회피될 수 있을 것이다. 그러나, 기존의 약물 시스템에서는 거의 연구된 바가 없다.

[0003]

일반적으로, 약물의 흡수 및 방출은 직접적으로 측정되는 것이 아니라 활성 또는 세포 부착의 증가를 통해 유추되는 것이다. 따라서, 약학적으로 활성을 가지는 약물이 정확히 언제, 어디에서, 어떻게 세포로 전달되는지를 알기 어렵다. 그러므로, 치료효과를 위한 활성 약물과, 흡수 및 전달의 용이한 모니터링을 위한 형광원을 갖는 동시에 세포에 대한 가이드 그룹을 이용한 약물전달 시스템은 이러한 문제점을 해결하기 위한 바람직한 방안이 될 수 있을 것이며, 이를 통해 약물의 전달과 방출을 직접적으로 모니터링할 수 있을 것이다. 또한, 효능의 개선과 더불어 용이한 이미징을 가능하게 함으로써, 치료와 진단을 겸비한 테라노시스의 적용분야를 세포 이하 수준까지도 확장시킬 수 있을 것이다.

발명의 내용

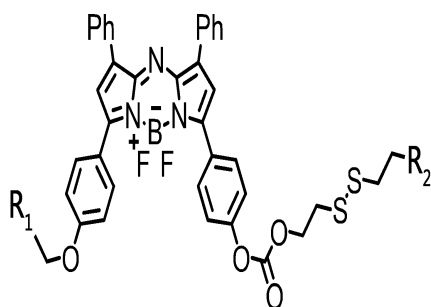
해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기 요구를 충족시키기 위해서, 특정 표적세포로 대상 약물을 효과적으로 전달할 수 있을 뿐만 아니라, 주입된 약물의 세포 흡수 및 방출을 광학적으로 직접 모니터링할 수 있는 약물전달 복합체 및 그 제조방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 생물학적 조직에서 형광 테라노스틱 DDS를 도입하기 위하여, 근적외선 형광 보론-다이피로메텐(boron-dipyrrromethene: BODIPY) 플루오로포어에 기초한 약물 전달 시스템을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다.

[0006] [화학식 1]

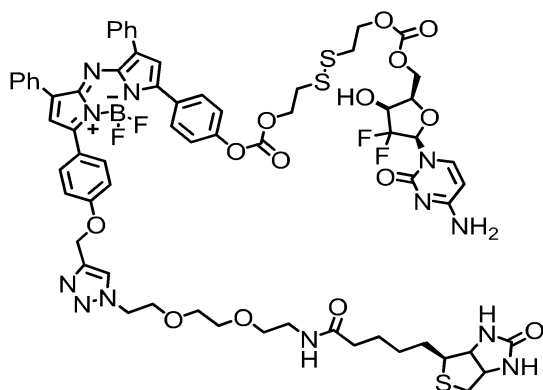


[0007]

[0008] 상기 약물 전달 시스템은 보론-다이피로메텐(boron-dipyrrromethene: BODIPY) 플루오로포어를 기본 구조로 하고, R₁에는 특정 세포에 대한 가이드 유닛을 갖고, R₂에는 질병 치료 또는 예방용 약물을 가질 수 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 화학식 2로 표시되는 암표적용 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다:

[0010] [화학식 2]

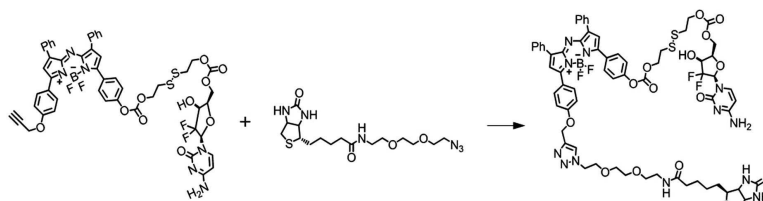


[0011]

[0012] 상기 약물 전달 시스템은 BODIPY 플루오로포어를 기본구조로 하여 암세포-방향성 바이오틴 유닛과 컨쥬게이트 되고 항암 약물 겐시타빈(GMC)과 이황화 결합에 의하여 연결된 구조이다.

[0013] 또한, 본 발명은 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

[0014] 화학식 2로 표시되는 화합물은 아래 반응식 1에 의하여 제조된다:

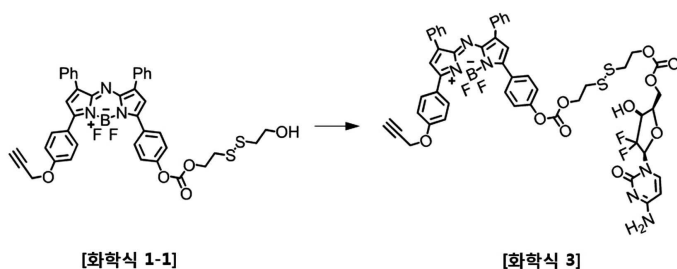


[반응식 1]

상기 반응식 1에서와 같이, 화학식 2로 표시되는 화합물은 화학식 3으로 표시되는 화합물과 바이오틴을 반응시켜 합성된다.

또한, 화학식 3으로 표시되는 화합물은 다음 반응식 2에 의하여 제조된다:

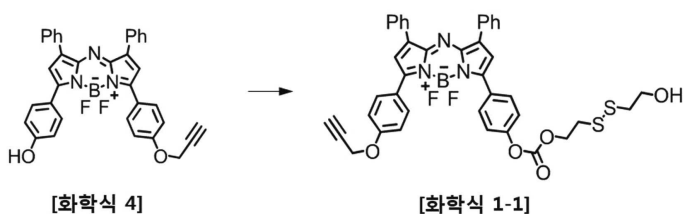
[반응식 2]



상기 반응식 2과 같이, 화학식 3으로 표시되는 화합물은 화학식 1-1로 표시되는 화합물과 4-니트로페닐 클로로포름산과 반응시켜 합성된다.

또한, 화학식 1-1로 표시되는 화합물은 다음 반응식 3에 의하여 제조된다:

[반응식 3]



상기 반응식 3과 같이, 화학식 1-1로 표시되는 화합물은 화학식 4로 표시되는 화합물과 포스젠을 반응시킴으로써 합성된다.

또한, 본 발명의 다른 양태로서, 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다.

또한, 본 발명의 또다른 양태로서, 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 암 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

발명의 효과

본 발명에 따른 약물전달시스템은 실시간으로 암세포로 특정 약물이 전달되었는지 유무를 형광을 통하여 명백히 확인할 수 있는 우수한 측정 프로브가 될 수 있다. 또한, 본 발명은 근적외선 영역에서 측정이 가능한 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 화학식 2로 표시되는 화합물의 UV-Vis 흡수 그래프(a) 및 형광 스펙트럼(b)을 나타낸다.

도 2는 화학식 2로 표시되는 화합물을 DTT 처리하고 관찰한 시간에 따른 형광 스펙트럼의 변화에 관한 그래프이다.

도 3은 화학식 2로 표시되는 화합물로 처리된 A549 세포의 공초점 현미경 사진이다.

도 4는 화학식 2로 표시되는 화합물로 처리된 A549 세포 및 WI138 세포에서 이광자 현미경 사진이다.

도 5는 화학식 2로 표시되는 화합물, Lyso Tracker Blue DND-167 또는 ER tracker 단독 또는 혼합 처리한 A549 세포에서의 공초점 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032]

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0033]

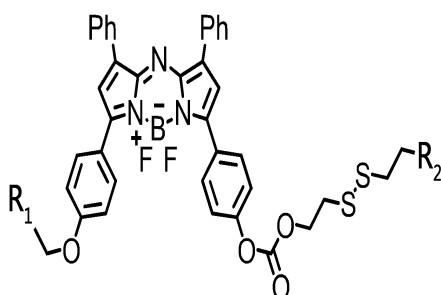
본 발명은 암 세포로 대상 약물을 전달하는 약물전달 시스템으로서, 주입된 약물의 세포 흡수 및 방출을 광학적으로 직접 모니터링할 수 있는 약물전달 시스템 및 그 제조방법에 관한 것이다.

[0034]

본 발명의 일 양태로서, 하기 화학식 1로 표시되는 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다.

[0035]

[화학식 1]



[0036]

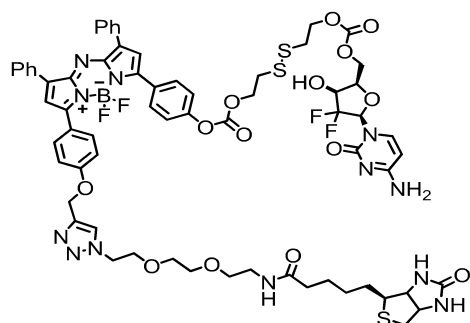
상기 약물 전달 시스템은 보론-다이피로메텐(boron-dipyrromethene: BODIPY) 플루오로포어를 기본 구조로 한다. 상기에서 R1은 특정 세포에 대한 가이드 유닛이고, R2는 약물이다.

[0038]

또한, 본 발명은 화학식 2로 표시되는 암 표적용 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다:

[0039]

[화학식 2]



[0040]

[0041]

상기 약물 전달 시스템은 BODIPY 플루오로포어를 기본 구조로 하여 암세포-방향성 바이오틴 유닛과 컨쥬게이트 되고 항암약물 겐시타빈(GMC)와 이황화 결합에 의하여 연결된 구조이다.

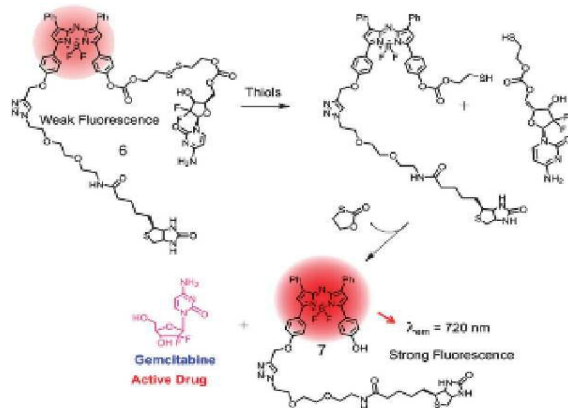
[0042]

본 발명에 따른 약물 전달 시스템은 광학적으로 모니터링이 가능하다는 장점이 있다. 도 1에 나타나 있는 바와 같이, DTT와 같은 티올의 존재하에서 UV-Vis 및 형광에서의 본 발명의 프로브의 발광을 관찰하였다. DTT를 첨가하면 700 nm에서 UV 흡광이 점차 증가하였다(도 1a). 720 nm에서 형광 세기가 증가하여 DTT의 100 당량의 존재 하에서 포화점에 달한다(도 1c 및 d). 화학식 2로 표시되는 화합물의 테라노스틱 효능은 시간에 따라 DTT의 고

정된 농도(5.0 mmol)에서 측정하였다.

[0043] 또한, 본 발명에 따른 약물 전달 시스템은 아래 반응 메카니즘 1에서 나타난 바와 같이, 화학식 2로 표시되는 화합물에서 S-S 결합이 절단되어 활성 GMC와 플루오로포어(붉은 색 표시)가 생성된다. 도 2에 나타난 바와 같이, 화학식 2로 표시되는 화합물의 흡광 및 형광은 10분 이내에 충분히 소비되어 포화점에 다다른다. 화학식 2로 표시되는 화합물은 37 에서 2시간동안 5.0 mmol GSH로 처리되었고, 분획(aliquot)은 MS analysis를 수행하였다. 그 결과, 겐시타빈($M_r=262$) 및 화합물 7($M_r=966.3$)에 대한 mass를 획득하였다. 이러한 데이터는 GSH 처리에 따라 약물 방출이 되었음을 확인하는 것이다.

[0044] [반응 메카니즘 1]



[0045]

[0046] 시험예에 따르면, 살아있는 세포에서 본 발명에 따른 약물 방출 및 형광 변화를 확인하였다(도 3 참조). A549 세포에서 화학식 2로 표시되는 화합물을 처리한 후 *in vitro* 세포 이미징을 수행하였다. 도 3b는 이광자 레이저를 사용하여 740 nm에서 흥분시 강한 형광 반응을 보여준다. 도 3에서는, 이와 반대로, NEM으로 전처리되면 세포에서는 거의 형광이 나타나지 않는다. 이러한 실험 결과 *in vitro* 용액 테스트에 의하면 단지 생물학적으로 이용가능한 티올이 약물 방출을 촉발시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0047] 도 4은 암 세포에서 화학식 2로 표시되는 화합물이 더 선호됨을 보여준다. 여기서 A549 세포 및 WI38 세포, 각각 바이오틴 수용체 양성 세포주 및 음성 세포주를 이용하여 형광 발생을 측정하였다. 도 4a에서 보듯이, 형광은 A549 세포에서 현저히 나타나며, 강한 형광 신호가 동시에 나타난다. 반대로, 음성 세포, WI38 세포(도 4b)는 유사한 조건하에서 심지어 어렵게 남아있다. 바이오틴 수용체의 과발현은 다수의 암 세포에서 예상되므로, 테라노스틱 화학식 2로 표시되는 화합물이 항암치료를 위한 약물 전달 시스템에 바람직할 것이다.

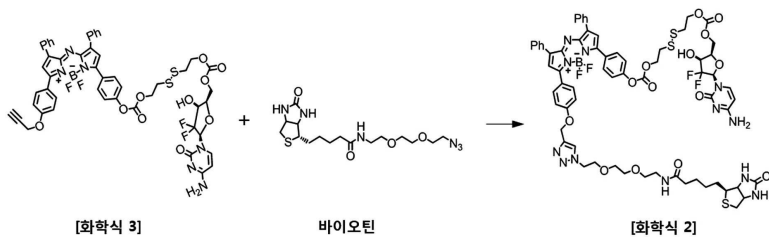
[0048] 화학식 2로 표시되는 화합물에서 GMC가 방출되어 세포내 이동을 확인하기 위하여, co-localization 실험을 형광 소포체(ER)-선택 마커 및 리소좀-선택 마커를 이용하여 수행하였다. 도 5e에서 보듯이, 화학식 2로 표시되는 화합물에 의한 형광은 소포체에서 명백히 나타난다. 그러나, 도 5c에서 보듯이, lyso-tracker와 함께 존재하는 것을 보여주지는 못했다. 따라서 화학식 2로 표시되는 화합물의 티올-유도된 이황화 결합의 절단이 소포체에서 일어나고, GMC 분자를 방출하여 세포핵으로 확산되어 GMC의 최종 목적지로 도달함을 명백히 확인하였다.

[0049] 본 발명은 치료진단적 약물 전달 시스템에 관한 것이다. 세포내 티올 중에 의한 이황화 결합 절단은 활성 약물을 방출하고, 형광이 나타나도록 만든다. 상업적으로 시판되는 리소좀-선택적 염료와 소포체-선택적 염료를 사용한 co-localization 실험은 화학식 2로 표시되는 화합물은 수용체-매개된 엔도사이토시스를 통하여 소포체로 이동함을 보여준다. 공초점 현미경 실험 연구에 따르면, 최종 화합물인 프로드러그는 바이오틴 수용체-음성 WI38 세포에 대비하여, 바이오틴 수용체-양성 A549 세포에만 이동한다. 따라서, 본 발명에 따른 약물 전달 시스템(DDS)는 특정 암 표적 약물 전달 및 비침습성 세포 이미징의 새로운 방법을 제공할 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

[0051] 화학식 2로 표시되는 화합물은 아래 반응식 1에 의하여 제조된다:

[0052] [반응식 1]

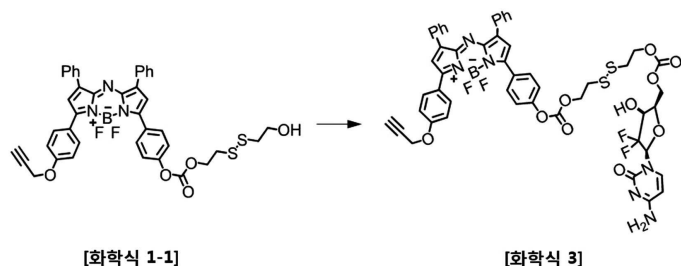


[0053]

[0054] 상기 반응식 1에서와 같이, 화학식 2로 표시되는 화합물은 화학식 3으로 표시되는 화합물과 바이오틴을 반응시켜 합성된다.

[0055] 또한, 화학식 3으로 표시되는 화합물은 다음 반응식 2에 의하여 제조된다:

[0056] [반응식 2]

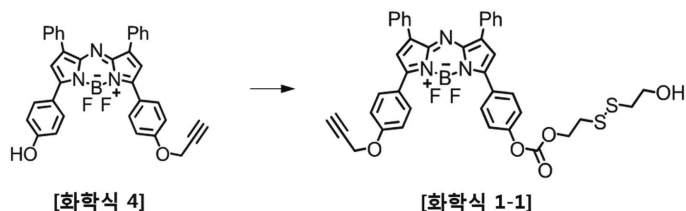


[0057]

[0058] 상기 반응식 2과 같이, 화학식 3으로 표시되는 화합물은 화학식 1-1로 표시되는 화합물과 4-니트로페닐 클로로포름산과 반응시켜 합성된다.

[0059] 또한, 화학식 1-1로 표시되는 화합물은 다음 반응식 3에 의하여 제조된다:

[0060] [반응식 3]



[0061]

[0062] 상기 반응식 3과 같이, 화학식 1-1로 표시되는 화합물은 화학식 4로 표시되는 화합물과 포스겐을 반응시킴으로써 합성된다.

[0063] [실시예]

[0064] **화학식 1-1로 표시되는 화합물의 합성**

[0065] 모노-O-DMTr-2-히드록시에틸 디설파이드(456 mg, 1.0 mmol)의 DCM 용액(10 ml)에 포스겐(20% 톨루엔 중; 2.0 mL, 4.04 mmol) 및 DIPEA(0.5 mL, 5 mmol)을 -10℃에서 첨가하고, 2시간동안 교반하였다. 반응이 일어나지 않은 포스겐을 15 내지 20분간 아르곤 기체 퍼징에 의하여 제거하였다. DCM 중 화합물 3(284 mg, 0.5 mmol)을 0℃에서 첨가하고 실온에서 12시간동안 계속 교반하였다. 반응 혼합물은 물로 희석하고 EtAc로 추출하여, 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조시켰다. 조 화합물을 DCM(20%) 중 AcOH(80%)로 2시간동안 처리하였다. AcOH는 NaHCO₃ 용액으로 퀼칭하였고 EtOAc로 추출하였다. 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조시켰다. 조 화합물을 실리카 컬럼 크로마토그래피에서 EtOAc/Hex(1:1)을 용출제로 이용하여 통과시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 150 mg(40%) 획득하였다.

[0066] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.05 (m, 8H); 7.42 (m, 6H); 7.30 (d, $J = 8.32$ Hz, 2H); 7.08 (br, 2H); 6.93 (s, 1H); 4.7(s, 2H); 4.54 (t, $J = 6.72$ Hz, 2H); 3.03 (t, $J = 6.78$ Hz, 2H); 2.90 (t, $J = 7.78$ Hz, 2H); 2.58 (s, 1H); 2.21(s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 160.53, 160.31, 156.06, 153.26, 152.58, 146.43, 144.79, 144.73, 142.81, 132.68, 132.21, 132.18, 132.07, 131.22, 131.28, 131.14, 130.11, 129.62, 129.48, 128.82, 124.49, 121.33, 119.72, 118.48, 115.37, 78.87, 76.52, 66.78, 60.46, 56.10, 41.73, 36.82. ESI-MS m/z ($M+1$) calcd 747.18, found 747.30.

[0067] **화학식 3으로 표시되는 화합물의 합성**

[0068] 화학식 1-1로 표시되는 화합물(0.5 mmol)의 DCM (5.0 mL) 용액에 4-니트로페닐 클로로포름에이트(201.56 mg, 1.0 mmol), DIPEA(258 mg, 2.0 mmol) 및 피리딘의 촉매량을 0 °C에서 첨가하고 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 그리고 반응 혼합물을 진공하에서 농축시켰다. crude 잔류물을 5.0 mL DMF에 용해시켰다. 이 용액에 DMF(2.0 mL) 및 TEA(0.5 mL) 중 젤시타빈(262 mg, 1.0 mmol)을 첨가하였고, 12시간동안 계속 교반하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물을 물로 희석하였다. 화합물을 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. crude 화합물을 실리카 컬럼 크로마토그래피에서 DCM/MeOH(9:1)을 용출제로 이용하여 통과시켜 화학식 3으로 표시되는 화합물을 50 mg(10%) 획득하였다.

[0069] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.12 (br, 8H); 7.46 (br, 11H); 7.18 (d, $J = 6.54$ Hz, 1H); 6.18 (s, 1H); 5.74 (d, $J = 7.54$ Hz, 1H); 5.23 (m, 1H); 4.95 (m, 1H); 4.32 (br, 8H); 3.47 (dd, $J_1 = 10.54$ Hz, $J_2 = 4.54$ Hz, 2H); 3.32 (t, $J = 8.57$ Hz, 2H); 2.89 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 160.39, 160.08, 156.00, 153.68, 153.08, 152.49, 146.20, 131.92, 130.98, 129.69, 128.61, 124.34, 121.86, 119.55, 118.42, 115.91, 78.05, 76.26, 66.55, 66.46, 55.93, 36.54, 29.43. ESI-MS m/z ($M-1$) calcd 1035.24 found 1035.40.

[0070] **화학식 2로 표시되는 화합물의 합성**

[0071] 화학식 3으로 표시되는 화합물(103.5 mg, 0.01 mmol)의 MeOH (2.0 mL) 용액에 소듐 아스코르베이트(10 mmol%) 및 화합물 8(40 mg, 0.01 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 15분간 아르곤 가스 퍼징에 의하여 탈기체시켰다. 0.5 mL 물 중 CuSO_4 2.0 mg(0.002 mmol)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응은 4시간동안 계속되었다. 그리고 crude 반응 혼합물을 직접 실리카 컬럼 크로마토그래피에서 DCM/MeOH(8.5:1.5)을 용출제로 이용하여 통과시켜 화학식 2로 표시되는 화합물을 30 mg(50%) 획득하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.26 (s, 2H); 8.14 (br, 4H); 7.87 (br, 2H); 7.76 (m, 3H); 7.48 (m, 8H); 7.34 (m, 2H); 6.42 (m, 1H), 6.37 (m, 1H); 6.10 (d, $J = 8.73$ Hz, 1H); 5.83 (m, 1H); 5.78 (m, 1H); 5.28 (t, $J = 7.89$ Hz, 1H); 4.74 (t, $J = 9.89$ Hz, 4H); 4.47 (t, $J = 6.89$ Hz, 4H); 4.09 (t, $J = 9.89$ Hz, 4H); 3.74 (br, 8H); 3.63 (m, 5H); 3.16 (m, 7H); 1.93 (d, $J = 4.14$ Hz, 2H); 1.53 (m, 2H); 1.21 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 170.40, 168.24, 159.52, 156.23, 153.43, 151.35, 151.32, 150.25, 145.54, 135.55, 131.21, 131.065, 130.90, 116.64, 116.17, 111.16, 110.65, 109.44, 101.26, 78.23, 70.72, 70.45, 70.22, 68.31, 66.63, 60.42, 55.60, 55.63, 50.67, 41.59, 40.00, 36.67, 36.82, 28.34, 27.51. ESI-MS m/z ($M+1$) calcd 1437.42 found 1437.50.

[0072] **[시험예]**

[0073] **UV-vis 및 형광 측정**

[0074] 화학식 2로 표시되는 화합물의 스톡 용액 및 생물학적으로 적절한 분석물(티올 및 금속 이온 포함)을 3차 증류수에서 제조하였다. 흡수 스펙트럼을 S-3100(Scinco) 분광광도계로 측정하였고, 형광 스펙트럼은 제논 램프가 장착된 RF-5301 PC 분광형광계(Shimadzu)를 이용하여 측정하였다. 흡수 및 방출 측정을 위한 샘플들은 퀴즈 큐벳(3.0 mL volume)내에 보관하였다. 730 nm에서 3nm 너비로 여기 및 방출 슬릿을 갖고 여기(excitation)을 시켰다. 모든 분광 측정은 생리적 조건하에서 수행되었다(37 °C, PBS 완충용액, pH 7.4).

[0075]

세포 배양 및 세포 이미징

[0076]

인간 폐 선암종 상피세포(KCLB, Seoul, Korea)를 10% FBS(WelGene), 페니실린(100 units/ml) 및 스트렙토마이신(100 ug/ml)으로 보충된 RPMI(WelGene Inc, Seoul, Korea)에서 배양하였다. 이미징하기 이틀 전, 세포를 계대배양하고 밀바닥이 유리인 접시(MatTek)에 플레이트하였다. 모든 세포를 37 °C CO₂/공기(5/95)의 습기 분위기 하에서 유지시켰다. 라벨링하기 위하여, 성장 배지를 제거하고 FBS가 없는 RPMI로 대체하였다. 세포를 Ligandat 로 처리하여 37°C 5% CO₂ 하에서 15분 동안 항온배양하였다. 세포를 포스페이트 완충 식염수(PBS; Gibco)로 3회 세척하고, 무색 무혈청 배지에서 15분 동안 추가 항온배양한 후 이미징하였다. 세포를 24-웰 플레이트에서 시드하고 밤새 안정화시켰다. 화학식 2로 표시되는 화합물을 세포에 처리하여 이것의 흡수 및 약물의 방출을 모니터링하였다. 일부 실험에서, 화학식 2로 표시되는 화합물로 처리하기 전에 세포를 Lyso- 또는 ER 트래커를 함유하는 배지에서 항온배양하였다. 그리고 세포를 1 ml PBS로 간단히 세척하고 PBS 중 화학식 2로 표시되는 화합물로 처리하였다. 항온처리 후, 화학식 2로 표시되는 화합물의 잔류물을 PBS로 3회 세포를 세척하여 제거하고, 그 세포를 PBS 용액 1ml에 위치시켰다. 형광 이미징은 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Zeiss LSM 510, Zeiss, Oberko, Germany)을 이용하여 촬영하였다.

[0077]

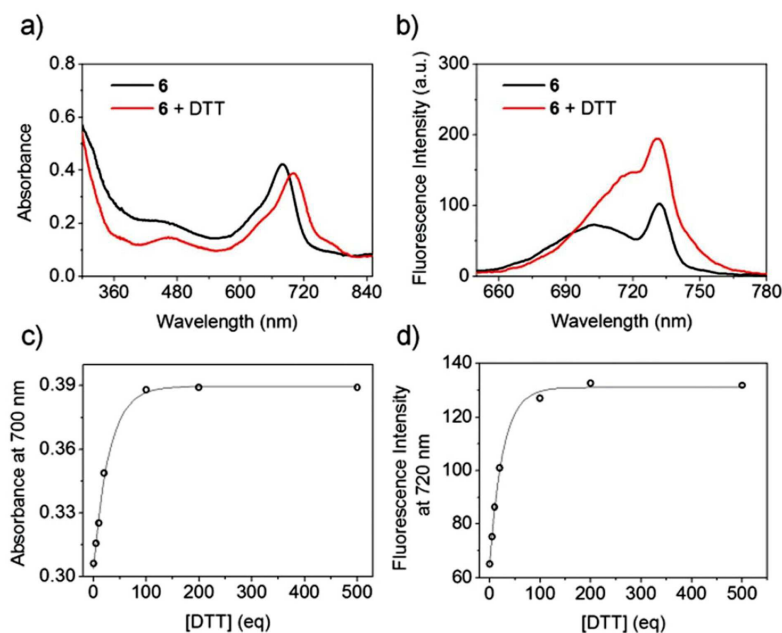
MTT 분석

[0078]

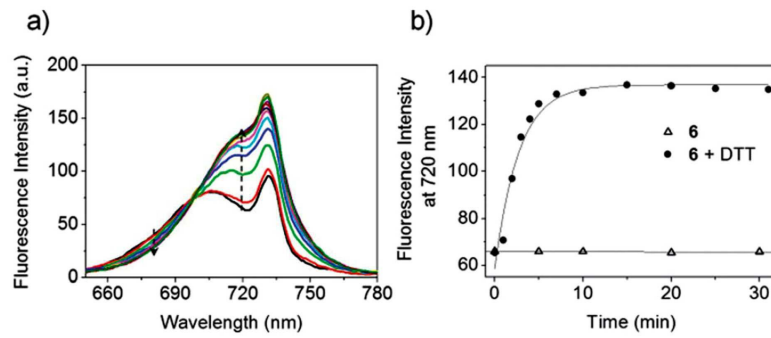
세포 성장능 분석은 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT)를 이용하여 측정하였다. 화학식 3으로 표시되는 화합물 및 화학식 2로 표시되는 화합물 및 캄시타빈의 효과를 측정하기 위하여, 세포를 96 웰 플레이트에서 1×10^4 cells/well로 시드하였다. 실험을 위한 적절한 처리 후에, 세포를 37 °C에서 72시간 항온처리하였고, 이후 배지를 제거하였다. MTT 용액(0.05 mg/ml)을 각 웰에 첨가하고 37 °C에서 2시간 동안 항온처리하여, 세포가 포르마잔(formazan) 결정을 형성하도록 하였다. 상기 용액을 제거하고 100 μ l DMSO를 웰 마다 첨가하여 결정을 용해하였다. 결정의 양은 마이크로플레이트 리더기(Molecular Devices, VERSAMAX microplate reader)를 이용하여 570 nm에서의 흡수량에 기초하여 측정하였다.

도면

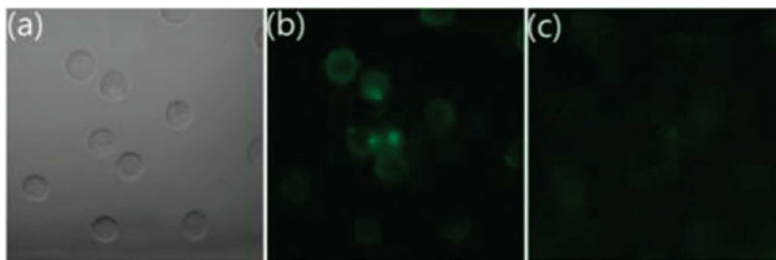
도면1



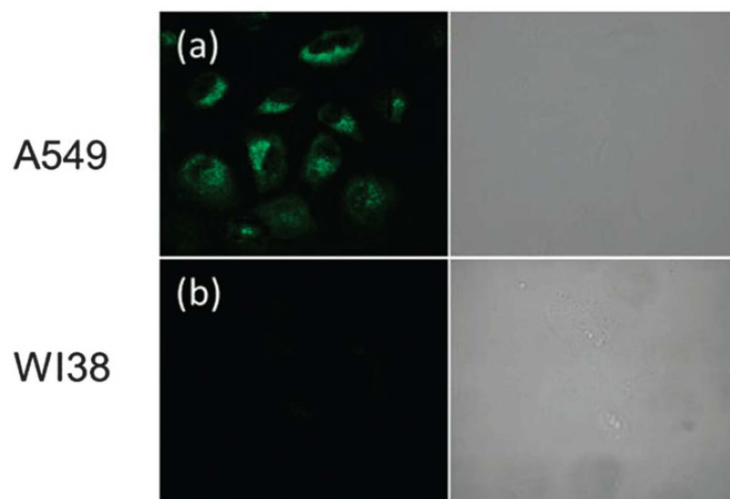
도면2



도면3



도면4



도면5

