(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0154984
(43) 공개일자 2024년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 41/00 (2020.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 285/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 41/0057 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0051598
(22) 출원일자 2023년04월19일
심사청구일자 2023년04월19일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(주)오투메디
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 울산과학기술원 106동 805-6호
(72) 발명자
권태혁
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
이채헌
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
박민규
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
(74) 대리인
오위환, 정기택

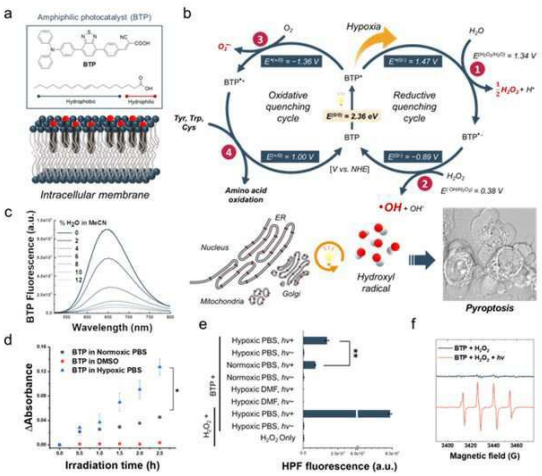
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **물 분해기반 광감각제 및 광역동 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 광감각제 및 상기 광감각제를 포함하는 광역동 치료용 조성물에 관한 것으로, 저산소 환경에서 물 분해를 통해 활성산소종의 생성 효율을 높여 암세포에 대한 세포 사멸 효율을 증가시킬 수 있는 광감각제 및 광역동 치료용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C07D 285/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465041149
과제번호 HA22C0101
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 국립암센터
연구사업명 암정복추진연구개발사업
연구과제명 췌장암 내막계 표적 산화를 통한 면역 활성화
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2022.04.01 ~ 2024.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711161696
과제번호 2021R1A2C2009504
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 단백질 상호작용체 지도 완성을 위한 광교차결합 화학도구 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

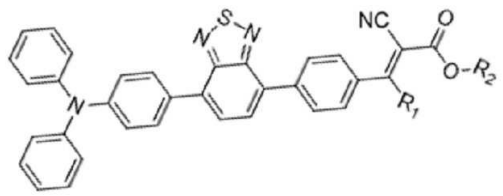
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 물 분해기반 광감각제:

[화학식 1]

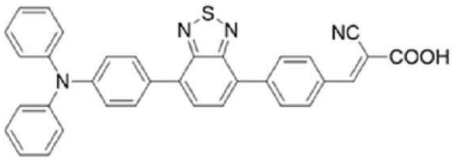


(여기서, R_1 및 R_2는 각각 수소(H) 또는 메틸기(CH_3)이다.)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 광감각제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 물 분해기반 광감각제:

[화학식 2]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 광감각제는 테트라하이드로퓨란(THF), 아세토나이트릴(ACN), 디메틸설폭사이드(DMSO) 및 디메틸포름아미드(DMF)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매에 용해된 형태인 것을 특징으로 하는, 물 분해기반 광감각제.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 광감각제는 1.35 V 보다 안정된 들뜬 상태의 환원 전위(reduction potential)를 가지는 분자로서, 저산소 환경에서 빛을 받았을 때 물을 산화하여 활성산소종을 생성하는 것을 특징으로 하는, 물 분해기반 광감각제.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 활성산소종은 하이드록실 라디칼(·OH)과 과산화수소(H_2O_2)인 것을 특징으로 하는, 물 분해기반 광감각제.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 광감각제는 정상 산소군(Normoxic) 환경을 가지는 정상세포에서는 광 독성이 낮아 정상세포 사멸로 인한 부작용을 예방할 수 있고, 저산소증(Hypoxic) 환경을 가지고 있는 암세포에서는 광 독성이 높아

암세포 사멸 유도 효과가 우수한 것을 특징으로 하는, 물 분해기반 광감각제.

청구항 7

제1항의 광감각제를 유효성분으로 포함하는 물 분해기반 광역동 치료용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 폐암, 유방암, 위암, 흑색종, 피부암, 담도암, 신경내분비종양, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 방광암, 결장암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 치료용인 것을 특징으로 하는, 물 분해기반 광역동 치료용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암 또는 췌장암 치료용인 것을 특징으로 하는, 물 분해기반 광역동 치료용 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 조성물은 미토콘드리아 막 단백질 구조의 불안정화를 유도하고 산화적 손상을 발생시켜 소포체 및 미토콘드리아 스트레스를 악화시키고, 빛 에너지의 조사에 따라 활성 산소종을 생성함으로써 용해성 세포 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는, 물 분해기반 광역동 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 광감각제 및 상기 광감각제를 포함하는 광역동 치료용 조성물에 관한 것으로, 저산소 환경에서 물 분해를 통해 활성산소종의 생성 효율을 높여 암세포에 대한 세포 사멸 효율을 증가시킬 수 있는 광감각제 및 광역동 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 광역동 치료(Photodynamic therapy, PDT)란, 광화학 반응을 이용하여 암 환자의 고통을 최소한으로 줄일 수 있는 치료법으로, 광감각제를 환자에 투여 후 빛을 암 조직에 조사하여 광감각제가 광화학 반응을 통해 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 생성함으로써 암세포의 생체분자를 산화시켜 사멸시키는 방법이다. 이러한 치료 방법의 경우 환자의 체력적 부담이 적어 1개월 내 재치료가 가능하며, 기존 암 치료법과 병행하는 것 또한 가능하다.

[0003] 이때, 화학 제제는 각각 활성산소종을 생산하거나 열 충격을 유발하기 위해 광감각제로 사용된다. 그런데, 일반적으로 실제 광역동 치료에 사용되는 광감각제인 '포트프린(Photofrin®)'과 '라다클로린(Radachlorin®)'은 수계에서 활성산소종 생산 효율이 현저히 낮으므로 광역동 치료를 위해서 매우 강한 빛 에너지(> 200~300 J/cm^2)를 가해야 한다.

[0004] 그러나, 강한 빛 에너지, 장시간의 레이저 조사 등 부작용이 발생되면서 수계에서 활성산소종 생산 효율이 높으면서 상기와 같은 부작용을 최소화하기 위한 방법이 요구되고 있다.

[0005] 한편, 현재 상업적으로 이용되는 광감각제는 활성산소종을 생성하기 위해 산소를 사용하지만, 저산소 환경의 종양에서는 작동 효율이 현저히 낮은 문제점이 있다. 따라서, 저산소 환경에서도 작동할 수 있는 암 치료용 광감각제의 개발이 필요한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2066150호

발명의 내용

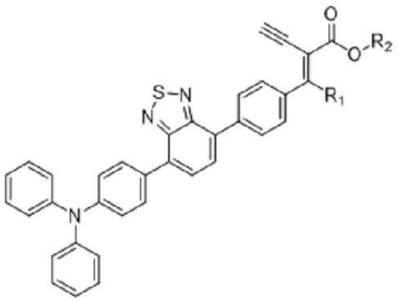
해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 저산소 환경에서 물 분해를 통해 활성산소종의 생성 효율을 높여 암세포에 대한 세포 사멸 효율을 증가시킬 수 있는 광감각제 및 이를 이용한 광역동 치료용 조성물을 제공하는 것으로 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 광감각제를 제공한다.

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] (여기서, R_1 및 R_2는 각각 수소(H) 또는 메틸기(CH_3)이다.

[0012] 또한 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 폐암, 유방암, 위암, 흑색종, 피부암, 담도암, 신경내분비종양, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 방광암, 결장암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 치료용 조성물일 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 광감각제는 저산소 환경에서 산소를 이용하지 않고 물을 산화시켜 활성 산소종(하이드록실 라디칼(·OH) 및 하이드로젠 퍼옥사이드(H_2O_2))를 더욱 효과적으로 생성함으로써, 다양한 암세포에 대한 높은 사멸 효과를 제공하여 광역동 치료의 효율을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 광감각제의 합성 방법을 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 광감각제의 막 산화를 통해 세포 사멸(Pyroptosis)을 유도하기 위한 광촉매 사이클을 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 광감각제의 세포 내 ROS 생성 효과를 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 광감각제에 의해 유도된 세포 사멸 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

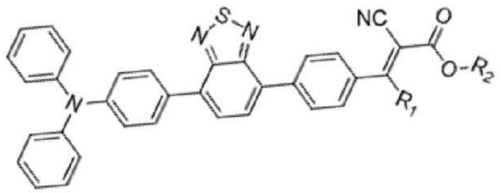
[0015] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 보다 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0016] 따라서 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0017] 본 발명은 물 분해기반 광감각제 및 광역동 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 광감각제는 극성 및 비극성 용매에 대해 모두 친화성을 나타내는 양친매성(Amphiphilic) 구조를 가지는 세포내 막에 위치한 유기 광촉매이다(도 2a).

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 광감각제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것을 특징으로 한다:

[0019] [화학식 1]

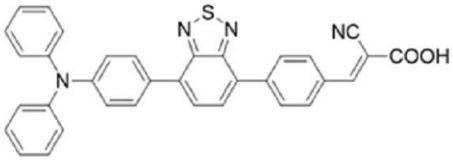


[0020]

[0021] (여기서, R_1 및 R_2는 각각 수소(H) 또는 메틸기(CH_3)이다.)

[0022] 상기 광감각제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물(BTP)을 포함할 수 있다.

[0023] [화학식 2]



[0024]

[0025] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 양친매성 광촉매인 화학식 1 또는 2의 화합물은 저산소 상태에서 가속되는 물 산화(water oxidation)를 통해 활성산소종인 하이드록실 라디칼(·OH)과 과산화수소(H_2O_2)를 생성하여 세포 내 막을 산화적으로 손상시키는 것을 특징으로 한다(도 2b).

[0026] 상기 화합물은 양친매성 특징으로 인해 암 세포에 투여 시, 세포 내 막(지질이중층)에 위치하게 된다. 이 위치에서 빛을 받아 활성산소종을 생성하기 때문에, 막을 구성하는 지질과 단백질의 구조적 변성을 일으키며, 이 구조적 변성이 면역원성 세포 사멸을 유발할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 화학식 1 또는 2를 포함하는 광감각제는 1.35 V 보다 안정된 들뜬 상태의 환원 전위(reduction potential)를 가지는 분자로서, 저산소 환경에서 빛을 받았을 때 물을 산화하여 활성산소종을 생성하는 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명에 따른 광감각제는 저산소 환경에서 더 많은 활성산소종을 생성하는 것을 특징으로 하는데, 이는 산소가 있는 조건 하에서는 들뜬 상태의 광감각제가 줄어들기 때문이다.

[0029] 상기 들뜬 상태의 광감각제는 산소와 물 모두와 반응할 수 있는데(반응하고 나면 다시 바닥 상태로 돌아감), 산소와 반응하는 경우 superoxide radical이 생성되고, 물과 반응하는 경우에는 hydroxyl radical과 hydrogen peroxide가 생성된다.

[0030] 본 발명에서와 같은 저산소 환경에서는 산소의 양이 적으므로, 들뜬 상태의 광감각제가 산소와 반응하기 어렵기 때문에 주변의 물과 더 많이 반응하게 되고, 따라서 저산소 환경에서는 hydroxyl radical과 hydrogen peroxide의 생성이 강화되며, 반대로 superoxide radical의 생성이 줄어들게 된다.

[0031] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 광감각제는 테트라하이드로퓨란(THF), 아세토나이트릴(ACN), 디메틸설폭사이

드(DMSO) 및 디메틸포름아미드(DMF)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 유기 용매에 용해된 형태인 것이 바람직하나, 상기 용매는 무극성 분자 용해를 위한 고분자 등 생체 내 적용 가능하면서 양친매성 구조의 화합물을 용해시킬 수 있는 용매라면 이에 제한되지 않고 사용할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 광감각제를 유효성분으로 포함하는 광역동 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 조성물은 본 발명의 화합물을 포함하는 광감각제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0033] 상기 화학식 1 또는 2의 화합물은 약제학적 유효량으로 포함되고, 상기 약제학적 유효량은 본 발명에 의한 화합물이 질환 또는 질병의 진단, 예방 및 치료에 적용 시 치료적 효과를 달성하는데 충분한 양을 의미한다.

[0034] 상기 조성물 내 약제학적 유효성분으로 포함되고, 예를 들어 상기 조성물의, 100 중량부에 대하여 0.001 중량부 내지 100 중량부 미만, 0.001 중량부 내지 50 중량부 또는 0.1 중량부 내지 10 중량부로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 상기 담체는 약제학적으로 허용되는 담체인 것이 바람직하다. 예를 들어, 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로오스, 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 조성물은 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나, 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0037] 상기 조성물은, 경구적 또는 비경구적 투여가 가능하고, 예를 들어, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여될 수 있고, 이외에 직장 투여, 흡입 투여, 경피 투여 등이 가능할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0039] 상기 조성물은 광역동 치료에 적용되어 광화학 반응을 이용한 암 치료에 적용될 수 있다. 상기 암은 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 폐암, 유방암, 위암, 흑색종, 피부암, 담도암, 신경내분비종양, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 방광암, 결장암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명은, 본 발명의 광감각제를 환자에 투여한 후 암 조직에 빛을 조사하는 단계를 통해 광감각제가 광화학 반응을 일으키도록 하며, 반응을 통해 생성된 활성산소종이 암세포의 생체 분자를 산화시켜 사멸시키게 된다. 상기 빛을 조사하는 단계는, 0.001 J/cm^2 이상, 바람직하게는 0.1 J/cm^2 이상, 보다 바람직하게는 1 J/cm^2 내지 300 J/cm^2 의 빛 에너지를 1초 이상, 바람직하게는 10초 이상, 보다 바람직하게는 1초 내지 5시간 동안 조사할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명은 상기 화학식 1 또는 2의 화합물을 포함하는 광감각제를 이용한 광역동 치료 방법에 관한 것으로, 종래 암 치료용 광감각제가 산소를 이용하여 활성 산소종을 생성하는 반면 물을 산화하여 활성 산소종을 생성하므로, 저산소 환경의 암 세포에 대한 사멸 효과가 우수한 것을 특징으로 한다.

[0042] 또한, 본 발명의 조성물은 소포체(ER), 골지체 및 단백질 품질 관리(PQC)와 관련된 미토콘드리아 막 단백질 구조의 불안정화를 유도하고 산화적 손상을 발생시켜 ER 및 미토콘드리아 스트레스를 악화시키고, 빛 에너지의 조사에 따라 활성 산소종을 생성함으로써 용해성 세포 사멸을 유도하여 암 치료가 가능한 것을 특징으로 한다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 조성물을 대상체에 투여하는 단계; 상기 조성물이 대상체의 목표 세포 내에 축적되도록 소정의 시간을 허용하는 단계 및 상기 대상체의 목표 세포에 빛 에너지를 조사하는 단계를 포함할 수 있다.

[0044] 상기 광역동 치료 방법은, 목표 세포 내에 광감각제를 축적시키고 빛 에너지를 조사하여 광감각제가 광화학 반

응을 통해 활성 산소종을 생성함으로써, 암 세포를 사멸시키는 기전을 통해 암을 치료할 수 있다.

[0045] 상기 투여하는 단계는, 경구적 또는 비경구적 방법으로 투여하는 것으로, 이러한 투여 방법은 상기 언급한 바와 같다.

[0046] 상기 대상체는 포유류일 수 있으며, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 곰, 토끼, 비비 또는 붉은털 원숭이 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0048] **실시예 1. 화학식 2의 화합물(BTP) 제조**

[0049] 도 1의 합성방법을 참조로 하여 화학식 2의 화합물(BTP)을 제조하였다.

[0050] 실시예 1-1. 4-브로모-N,N-디페닐아닐린(1)의 제조

[0051] 둥근 바닥 플라스크를 트리페닐아민(1.0g, 4.1mmol)으로 채우고 무수 DMF를 탈기시켰다. 용액을 얼음 수조에 넣고 30분 동안 교반하였다. 30분 후, 반응 혼합물에 N-브로모석신이미드를 첨가하고 4시간 동안 교반하였다. 4시간 후, 물을 첨가하여 반응을 켄칭하고 백색 분말을 침전시켰다. 백색 분말을 여과하고 물로 세척한 후 70℃에서 건조시켰다(수율: 97%)

[0052] 실시예 1-2. N,N-디페닐-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)아닐린(2)의 제조

[0053] 둥근 바닥 플라스크를 4-브로모-N,N-디페닐아닐린(1)(2.5g, 7.7mmol) 및 무수 THF(Ar 기포)로 채우고, 반응 혼합물을 -78℃로 냉각시켰다. 이어서, 2.5M n-BuLi(5.24mL, 13.11mmol)를 5분에 걸쳐 적가하였다. 교반 30분 후, 반응 혼합물에 2-이소프로폭시-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란(2.44g, 13.11mmol)을 천천히 첨가하였다. 첨가가 완료되면 반응 혼합물을 서서히 실온으로 가온하고 밤새 교반하였다. 그 후, 반응 혼합물을 물로 켄칭하고, 에틸 에테르와 함께 분액 깔때기로 옮겼다. 유기상을 수집하고 $MgSO_4$로 건조시켰다. 생성물을 헥산/EA(10:1, v/v)로 컬럼 크로마토그래피로 추가로 정제하였다.

[0054] 실시예 1-3. 4-(7-브로모벤조[c][1,2,5]티아디아졸-4-일)벤즈알데히드(3)의 제조

[0055] 4,7-디브로모벤조[c][1,2,5]티아디아졸(500mg, 1.70mmol), (4-포르밀페닐)보론산(170mg, 1.13mmol), Pd(OAc)2(8mg, 0.034mmol)), 및 KOAc(167 mg, 1.70mmol)를 화염 건조된 2구 둥근 플라스크에 준비하였다. 탈기된 N,N-디메틸아세트아미드를 플라스크에 주입하였다. 혼합물을 30분 동안 교반한 후 반응 온도를 90 ℃에서 3일 동안 완화시켰다. 원료는 CH_2Cl_2로 추출하여 얻었고 유기 용매는 회전식 증발기로 완전히 증발시켰다. hexane/CH_2Cl_2(1:1, v/v%) eluent를 사용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 노란색 고체 생성물(수율 = 49.4%)만 수득하였다.

[0056] 실시예 1-4. 4-(7-(4-(디페닐아미노)페닐)벤조[c][1,2,5]티아디아졸-4-일)벤즈알데히드(4)의 제조

[0057] 둥근 바닥 플라스크를 N,N-디페닐-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)아닐린(2)(300mg, 0.81mmol), 4-(7-브로모벤조[c][1,2,5]티아디아졸-4-일)벤즈알데히드(3)(180mg, 0.56mmol), 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0)(30mg, 0.033mmol), 2-디사이클로헥실포스피노-2',4',6'-트리이소프로필비페닐(30mg, 0.066mmol), 인산칼륨 수용액(2M)(1.8mL, 3.24mmol) 및 탈기된 THF로 채웠다. 용액을 66℃에서 밤새 환류시켰다. 반응이 종료되면 물을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 생성물을 DCM으로 추출하고 유기층을 $MgSO_4$로 건조시켰다. 조 생성물을 헥산/DCM 용액(2:1, v/v)을 용리액으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다(수율: 84%).

[0058] 실시예 1-5. (E)-2-시아노-3-(4-(7-(4-(디페닐아미노)페닐)벤조[c][1,2,5]티아디아졸-4-일)페닐)아크릴산(BTP)의 제조

[0059] 건조된 2구 둥근 바닥 플라스크에서, 4-(7-(4-(디페닐아미노)페닐)벤조[c][1,2,5]티아디아졸-4-일)벤즈알데히드(4)(46mg, 0.095mmol), 암모늄 아세테이트(73mg, 0.95mmol) 및 시아노아세트산(162mg, 1.90mmol)을 아르곤 분위기에서 첨가하였다. 탈기된 아세트산을 용매로 사용한 후, 혼합물을 120℃에서 16시간 동안 환류시켰다. 용액을 상온으로 식힌 후 CH_2Cl_2로 원료를 추출하고 염수로 세척하였다. $MgSO_4$로 유기층의 일부 수분을 제거하고 회전 증발기로 용매를 증발시켰다. 남은 조생성물로 CH_2Cl_2/MeOH (9:1, v/v%) 컬럼크로마토그래피로 정제하여 밝은

오렌지색 고체화합물 (수율 = 51.9%)을 얻었다.

[0060] **비교실험예 1. 세포독성 테스트**

[0061] 상기 BTP(실시예)와 FDA 승인받은 광역동 치료용 광감각제인 Photofrin(비교예)에 대하여 정상 산소군(Normoxic) 및 저산소증(Hypoxia) 환경에서의 세포독성 테스트를 수행하여, 아래 표 1에 나타내었다. 이때, IC_{50} 값은 전체 세포의 50%가 사멸되는 약물의 농도로, 값이 작을수록 세포사멸 유도 효과가 큰 것을 의미한다.

표 1

[0062]

IC_{50} (μM)		PANC-1		Mia paca-2	
		Dark	Light	Dark	Light
BTP	Normoxia	>32	12.94	>32	9.48
	Hypoxia	>32	6.84	>32	5.53
Photofrin	Normoxia	>32	7.26	>32	6.99
	Hypoxia	>32	8.01	>32	6.74

[0063] 상기 표 1을 참조로, 비교예의 Photofrin 물질에 대해서는 저산소 환경에서 암세포에 대한 세포 독성에 큰 차이가 없으나, 본 발명에 따른 실시예인 BTP 물질의 경우 저산소 환경에서 암세포에 대한 광 독성이 2배 가까이 증가함을 확인하였다.

[0064] 광감각제의 광 독성은 (1) 정상세포에서는 낮고 (IC50 값이 높고), (2) 암세포에서는 높아야(IC50 값이 낮아야)한다. 본 발명에 따른 BTP의 경우, Normoxia 상태에서의 광 독성이 낮고, Hypoxia 상태에서의 광 독성이 높으므로 Normoxic 환경을 가지고 있는 정상세포에서는 독성이 낮으며, Hypoxic 환경을 가지고 있는 암세포에서는 독성이 높다고 할 수 있다.

[0065] 따라서, Normoxia와 Hypoxia 환경에서 광 독성 차이가 거의 없는 Photofrin 대비 본 발명에 따른 BTP의 암 세포 사멸 유도 효과가 더 좋다고 할 수 있다. 또한, Normoxic 환경에서 BTP의 독성이 작으므로 정상세포 사멸로 이어지지 않아 부작용을 예방할 수 있다.

[0066] **실험예 1. 산화 라디칼 종을 생성하는 광감각제 사이클 비교 실험**

[0067] 광조사 하에서 BTP(BTP*)의 들뜬 상태는 몇 나노초 동안 지속되어 BTP*의 환원 및 산화 전위인 $E^{*(0/-)}$ 및 $E^{*(+/0)}$를 생성한다. 물 환경에서는 BTP*의 수명이 매우 짧기 때문에 물과 산소와 같은 인접한 분자만이 BTP*의 전자 이동을 유도할 수 있다. 따라서 BTP의 광물리적 특성에서 $E^{*(0/-)}$ 및 $E^{*(+/0)}$를 측정했다.

[0068] 특히, BTP의 $E^{*(0/-)}$는 1.47V(vs. pH 7의 일반 수소 전극)로, 이는 2개의 전자 경로를 통해 물을 산화시킬 수 있는 H_2O_2($E^{(H_2O_2/H_2O)}$ = 1.34V; 도 2b 참조)를 수득하였다. 따라서 형광 소광 분석을 사용하여 물과 BTP* 사이의 전자 이동을 조사하였다(도 2c). BTP 형광은 아세토니트릴 용액의 수분 함량이 증가함에 따라 점차 감소하여 10% 수분 함량에서 대부분의 BTP 형광을 소멸시켰다. 또한, 수분 함량이 증가함에 따라 BTP* 수명도 감소하였다. 따라서, BTP*와 물의 산화환원 전위 중첩 및 여기 상태 동역학은 BTP*가 물 산화를 통해 환원적으로 켄칭되었음을 의미한다.

[0069] 이에 따라, 본 발명에서는 peroxidase와 N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD)을 사용하여 예상되는 물 산화 생성물인 H_2O_2를 분석했습니다(도 2d). BTP의 광여기는 PBS에서 H_2O_2를 생성하는 반면, BTP*는 물이 없을 때(DMSO에서) H_2O_2를 생성할 수 없음을 확인하였다. 그 결과, BTP 광감각제에서 물로부터 H_2O_2가 생성되었음을 알 수 있었다.

[0070] 또한, 저산소 환경이 광감각제 H_2O_2 생산을 실질적으로 가속화하여 산소가 산소 환원을 통해 BTP*의 소광제 역할을 함을 의미한다($E^{*(+/0)}$ = -1.36 V, $E^{(O_2/O_2^{\cdot -})}$ = -0.33 V, 도 2b).

[0071] 산소 환원 반응은 BTP*에 의한 물 산화와 경쟁하므로 저산소증은 H_2O_2 생성을 향상시킬 수 있었다. 또한, BTP*가 전자를 받아들임에 따라 $BTP^{\cdot -}$로 변환된다. 상기 $BTP^{\cdot -}$는 하이드록실 라디칼로 전파되는 근처의 H_2O_2에 전자를

쉽게 줄 수 있다(·OH; $E^{(O/-)}$ = -0.89 V, $E^{(H_2O_2/\cdot OH)}$ = 0.38 V; 도 2b).

[0072] 따라서 ·OH 생성을 확인하기 위해 hydroxyphenyl fluorescein (HPF) assay를 시행하였다(도 2e). HPF 분석을 통해 BTP 광감각제가 저산소증 및 H_2O_2 첨가 조건에서 촉진되는 ·OH를 생성함을 확인하였다.

[0073] 이러한 결과는 ·OH가 H_2O_2에서 생성되며, 산소가 BTP*를 급냉시켜 H_2O_2 생성을 억제하는 역할을 한다는 점을 고려할 때 저산소 상태에서 이 반응이 확대됨을 의미한다.

[0074] 또한, ·OH 생성은 물이 없는 경우(DMF에서) 손상되었으며, 이는 ·OH가 물 매개 광감각제 작용에서도 생성됨을 의미한다(도 2e). BMPO(·OH에 대한 스핀 트랩)를 사용한 전자 상자성 공명(EPR) 분광법은 ·OH 생성을 명확히 하기 위해 이어 수행하였다(도 2f).

[0075] 산소가 BTP*에 의해 환원되면 슈퍼옥사이드 라디칼($O_2^{\cdot -}$)도 생성될 수 있으며, $BTP^{\cdot +}$는 Trp, Tyr, Cys와 같은 근처 아미노산으로부터 전자를 받아들일 수 있다. BTP 광감각제는 H_2O_2 및 ·OH를 생성하지만 Singlet 산소($^1O_2$)를 생성하지 않는 것을 확인하였다. ·OH는 멤브레인 구성 요소를 산화시키기에 충분한 고도로 산화되는 반응성 산소 종(ROS)이다. 따라서 메티오닌과 불포화 지질의 산화를 조사하였다.

[0076] 고해상도 질량 분석법(HR-MS)은 Met와 포스파티딜콜린의 산화된 생성물을 밝혀냈고, 세포막에 심각한 산화 스트레스를 가할 가능성을 추가로 보여주었다.

[0077] 따라서, 본 발명에 따른 광감각제를 통해 H_2O_2 및 ·OH가 모두 저산소(Hypoxic) 상태에서 더 많이 생성되었음을 확인하였다.

[0078] **실험예 2. BTP 광감각제에 의한 멤브레인의 산화 손상 확인 실험**

[0079] 다음으로, BTP가 세포의 어디에 있고 산화 스트레스가 생성되는지 조사하였다. Co-localisation 실험은 BTP가 골지체(GA) 및 ER을 포함한 내막 시스템에 있지만 미토콘드리아 막에는 없는 것으로 나타났다(도 3a).

[0080] 그러나, BTP 광감각제는 구조화 조명 현미경(SIM)에서 생존 가능한 HeLa 세포로 확인된 바와 같이 국소화 패턴을 ER 막에서 미토콘드리아 막으로 변경하였다(도 3b 및 c). 위치의 변화는 BTP 광감각제가 ER 막 무결성을 감소시켜 인근 막으로 이동하기 때문일 것으로 예측하였다.

[0081] 또한, 본 발명에서 상기 BTP 광감각제가 멤브레인에 상당한 산화 스트레스를 생성한다는 것을 확인하였다. dichlorodihydrofluorescein diacetate($DCFH_2$-DA, ROS 지시약) 분석에서는 BTP 광감각제 작용이 HeLa 세포(도 3d 및 e)에서 DCF 형광을 증가시키는 것으로 나타났으며, BODIPY™ 581/591 C11을 사용한 지질 과산화 분석에서는 광조사 영역에서만 지질 과산화물이 생성됨을 보여주었다(도 3f 및 g).

[0082] 또한, 우리는 dihydroethidium($O_2^{\cdot -}$ 센서) 분석을 사용하여 BTP 광감각제 유도 $O_2^{\cdot -}$ 생성을 확립하였다(도 3h). 이러한 결과는 BTP 광감각제가 세포막에서 산화 스트레스와 지질 과산화를 유도함을 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0083] **실험예 3. 암세포 사멸 효과 확인 실험**

[0084] 막에 대한 BTP 광감각제의 영향을 감안할 때 BTP 광감각제가 세포 사멸 신호 반응에 어떤 영향을 미칠 수 있는지 조사하였다.

[0085] HeLa 세포 생존력은 요오드화프로피듐(PI) 흡수 또는 칼세인 AM 흡수 및 MTT 분석을 검사하여 테스트하였다. 결과는 거의 모든 세포가 BTP 광감각제 후 24시간 이내에 죽었다는 것을 보여주었다(도 4a, b).

[0086] 저산소 췌장암 세포주(Panc-1 및 MiaPaca-2)에서도 MTT 분석은 저산소 상태에서 증가된 ·OH 생성으로 인한 심각한 독성을 나타내는 것을 확인하였다(도 4c). 세세포 형태의 검사는 BTP 광감각제가 원형질막 부종 및 비정상 수포를 포함하는 열분해 형태와 일치하는 용균성 유형의 세포 사멸을 유발함을 나타낸다.

[0087] BTP 광감각제는 Pyroptosis 유발자로 알려진 LPS 및 Nigericin 자극, 또는 광역동 요법에 사용되는 광감작제(Ce_6)보다 더 큰 정도로 원형질막 파열의 척도인 LDH 방출을 유도했으며, 이는 BTP 광감각제에 의해 유도된 세포 사멸이 매우 용해성이 높다는 것을 나타내는 것을 확인하였다.

[0088] 세포 사멸과는 달리 PI는 BTP 광감각제 작용 후 몇 시간 이내에 원형질막에 침투했지만 핵 외피에는 침투하지 않았으며(도 4d), 핵 외피는 원형질막 무결성이 손상된 후에 만 붕괴됨을 의미한다. 이러한 세포 사멸 특성을 바탕으로 우리는 BTP 광감각제가 세포 사멸(Pyroptosis)을 유발할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0089] 많은 경우에 ·OH 생성 및 지질 과산화는 페롭토시스(ferroptosis)와 관련이 있다. 따라서, 본 발명에서는 먼저 BTP 광감각제 작용에 의한 세포 사멸의 특성을 ferroptosis와 구별하였다.

[0090] 먼저, Liproxstatin-1(지질 과산화 및 페롭토시스 억제제) 및 z-VAD-fmk(범카스파제 억제제)를 사용하여 카스파제 또는 지질 과산화가 BTP 광감각제 작용에 의해 유발된 용균성 세포 사멸에 관여하는지 여부를 조사하였다. 그 결과, z-VAD-fmk 처리는 BTP 광감각제 작용으로 인한 LDH 방출을 감소시켰지만 Liproxstatin-1은 덜 효과적이었다(도 4e).

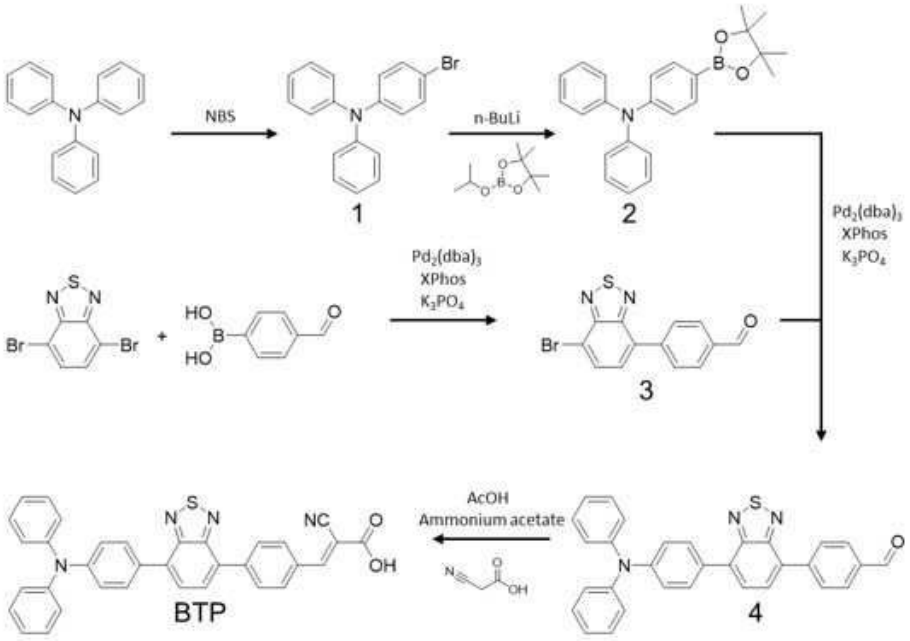
[0091] 또한, Liproxstatin-1 처리된 세포에서는 상당한 수준의 막 수포 및 PI 침투가 여전히 관찰되었지만, z-VAD-fmk 처리된 세포에서는 관찰되지 않았다(도 4f). 이러한 결과는 BTP 광감각제 작용에 의해 유발된 세포 사멸이 지질 과산화보다는 카스파제 활성화에 의존한다는 것을 나타낸다.

[0092] 따라서, 본 발명에 따른 광감각제에 빛 조사시, 자궁경부암 HeLa 세포, 췌장암 Panc-1과 Miapaca-2 세포의 사멸을 유도하며, 특히 저산소 환경에서는 더 효과적으로 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

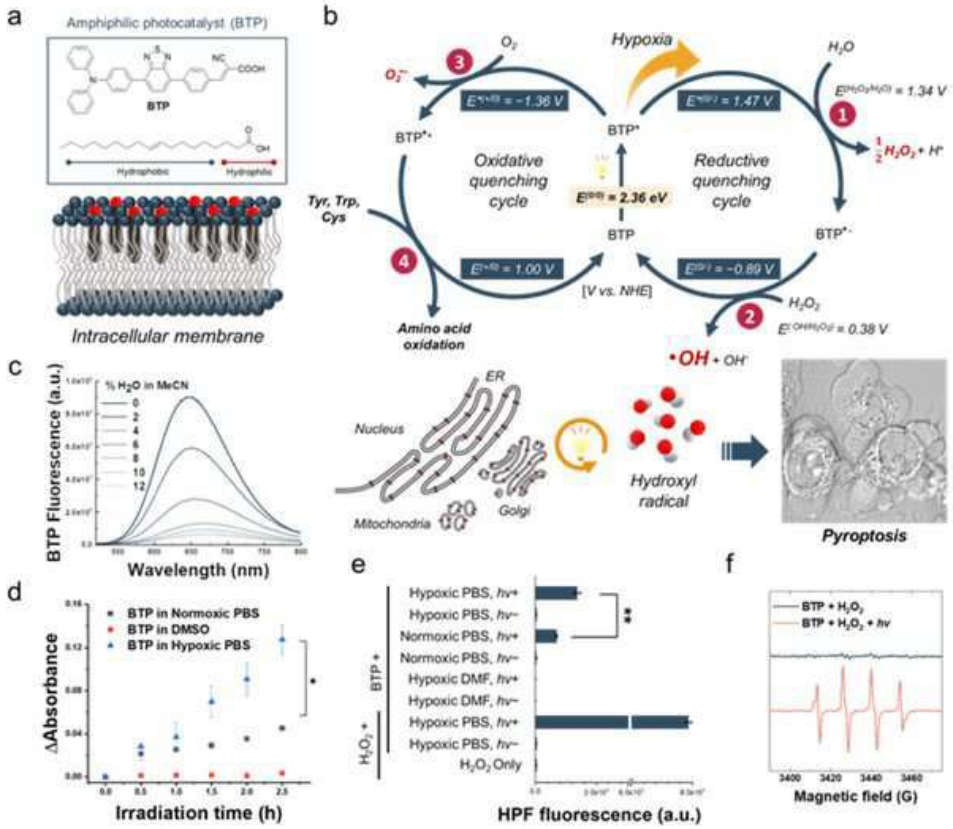
[0093] 이상의 설명은 본 발명을 예시적으로 설명한 것이고, 명세서에 게시된 실시예는 본 발명의 기술사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이므로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 그러므로 본 발명의 보호범위는 청구범위에 기재된 사항에 의해 해석되고, 그와 균등한 범위 내에 있는 기술적 사항도 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

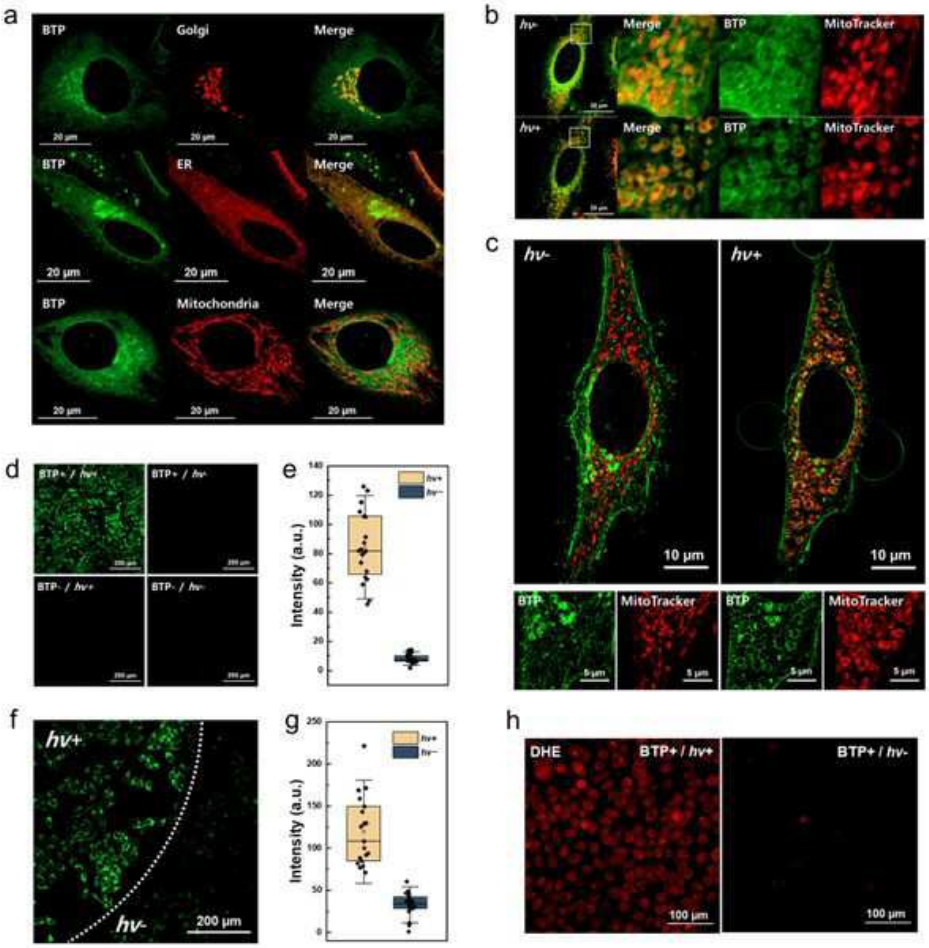
도면1



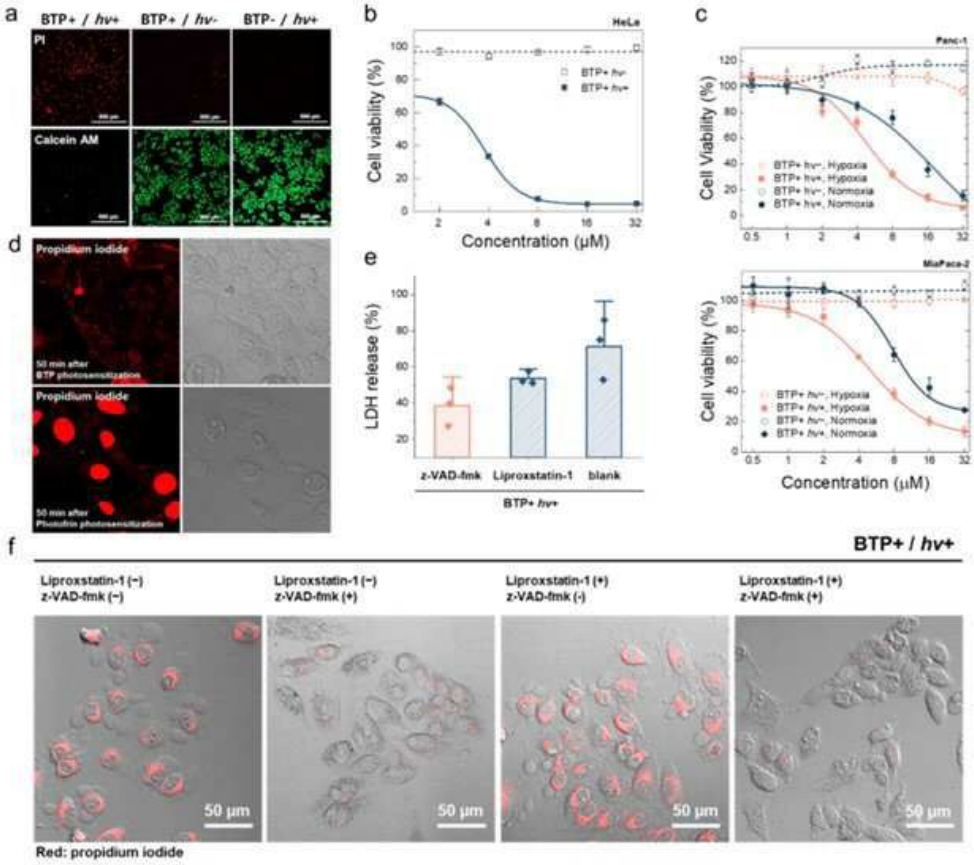
도면2


a
Amphiphilic photocatalyst (BTP)
BTP
Hydrophobic
Hydrophilic
Intracellular membrane
b
Hypoxia
Oxidative quenching cycle
Reductive quenching cycle
BTP*
BTP
BTP*+
BTP*-
Tyr, Trp, Cys
Amino acid oxidation
[V vs. NHE]
•OH + OH-
Nucleus
ER
Mitochondria
Golgi
Hydroxyl radical
Pyroptosis
c
% H2O in MeCN
BTP Fluorescence (a.u.)
Wavelength (nm)
d
BTP in Normoxic PBS
BTP in DMSO
BTP in Hypoxic PBS
ΔAbsorbance
Irradiation time (h)
e
Hypoxic PBS, hv+
Hypoxic PBS, hv−
Normoxic PBS, hv+
Normoxic PBS, hv−
Hypoxic DMF, hv+
Hypoxic DMF, hv−
Hypoxic PBS, hv+
Hypoxic PBS, hv−
H2O2 Only
BTP +
H2O2 +
HPF fluorescence (a.u.)
f
BTP + H2O2
BTP + H2O2 + hv
Magnetic field (G)

도면3


a
BTP
Golgi
Merge
BTP
ER
Merge
BTP
Mitochondria
Merge
20 μm
b
hv-
Merge
BTP
MitoTracker
hv+
Merge
BTP
MitoTracker
c
hv-
hv+
10 μm
10 μm
BTP
MitoTracker
BTP
MitoTracker
d
e
Intensity (a.u.)
f
hv+
hv-
200 μm
g
Intensity (a.u.)
h
DHE
BTP+ / hv+
BTP+ / hv-
100 μm
100 μm

도면4


a
BTP+ / hv+
BTP+ / hv-
BTP- / hv+
PI
Calcein AM
b
HeLa
Cell viability (%)
Concentration (μM)
BTP+ hv-
BTP+ hv+
c
Panc-1
Cell Viability (%)
BTP+ hv-, Hypoxia
BTP+ hv+, Hypoxia
BTP+ hv-, Normoxia
BTP+ hv+, Normoxia
MiaPaca-2
Cell viability (%)
Concentration (μM)
d
Propidium iodide
50 min after BTP photosensitization
Propidium iodide
50 min after Photofrin photosensitization
e
LDH release (%)
z-VAD-fmk
Liproxstatin-1
blank
BTP+ hv+
f
BTP+ / hv+
Liproxstatin-1 (-)
z-VAD-fmk (-)
Liproxstatin-1 (-)
z-VAD-fmk (+)
Liproxstatin-1 (+)
z-VAD-fmk (-)
Liproxstatin-1 (+)
z-VAD-fmk (+)
50 μm
Red: propidium iodide