



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월10일

(11) 등록번호 10-1465626

(24) 등록일자 2014년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4192 (2006.01) A61K 31/4188

(2006.01)

A61K 31/513 (2006.01) A61K 49/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0058088

(22) 출원일자 2013년05월23일

심사청구일자 2013년05월23일

(56) 선행기술조사문헌

WO2010008519 A2

KR1020120101727 A

전체 청구항 수 : 총 2 항

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

경기 성남시 분당구 내정로 152, 130동 2402호 (수내동, 파크타운롯데아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

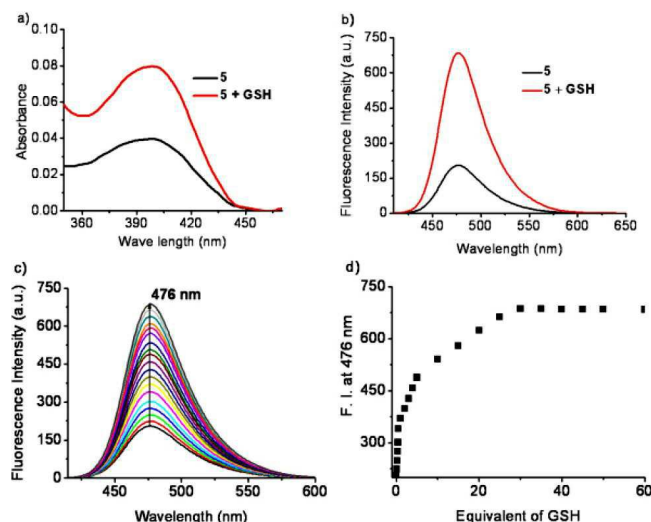
심사관 : 최영희

(54) 발명의 명칭 바이오틴을 포함하는 표적 특이적 항암 약물 전구체

(57) 요약

본 발명은 세포 이하 수준에서 이광자 형광 영상화에 의해서 약물 치료 효과 및 약물 흡수를 용이하게 모니터링할 수 있는 새로운 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120000243

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 연구지원부

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 발광센서 재료 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

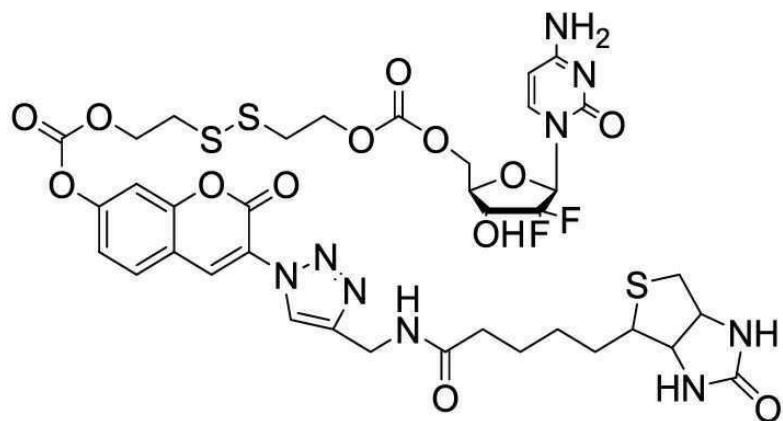
연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 표적 특이적 항암 약물 전구체.

<화학식 1>



청구항 2

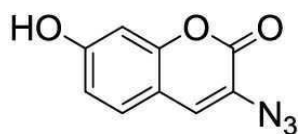
화학식 2의 화합물을 하이드록실 에틸 디설파이드와 반응시킴으로써 화학식 3의 화합물을 제조하는 단계;

상기 화학식 3의 화합물을 아세트산과 반응시킴으로써 화학식 4의 화합물을 제조하는 단계;

상기 화학식 4의 화합물을 4-니트로페닐 클로로포르메이트와 반응시킴으로써 화학식 5의 화합물을 제조하는 단계; 및

상기 화학식 5의 화합물을 화학식 6의 화합물과 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 표적 특이적 항암 약물 전구체의 제조방법.

<화학식 2>



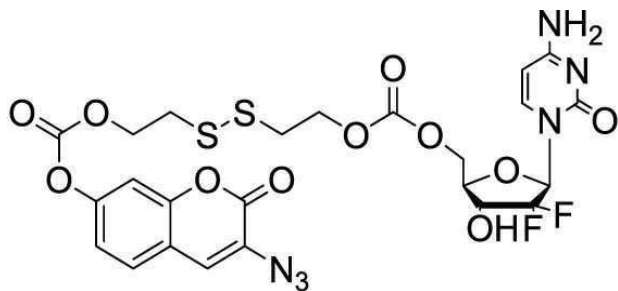
<화학식 3>



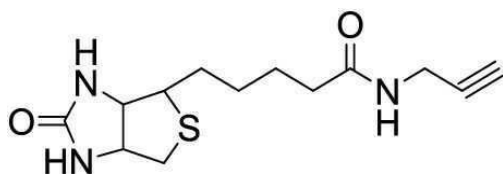
<화학식 4>



<화학식 5>



<화학식 6>



명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 세포 이하 수준에서 이광자 형광 영상화에 의해서 약물 치료 효과 및 약물 흡수를 용이하게 모니터링할 수 있는 새로운 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 표적 특이적 약물 전달 시스템은 현대 제약업계에서 매우 촉망받는 분야로서, 환자에 의한 약물 투여량 감소, 체내 약물 수준의 항상성 유지 및 약물 부작용 감소 등과 같은 다양한 장점들을 갖는 분야이다. 종래에는 금나노입자, 형광 양자점, 폴리머, 다공성 실리카 등과 같은 다양한 표적 특이적 약물 전달 시스템이 존재하였으나, 효과적 약물 전달 및 우수한 생체내 모니터링이 동시에 가능한 약물 전달 시스템에 대해서는 보고된 바가 없다.

발명의 내용

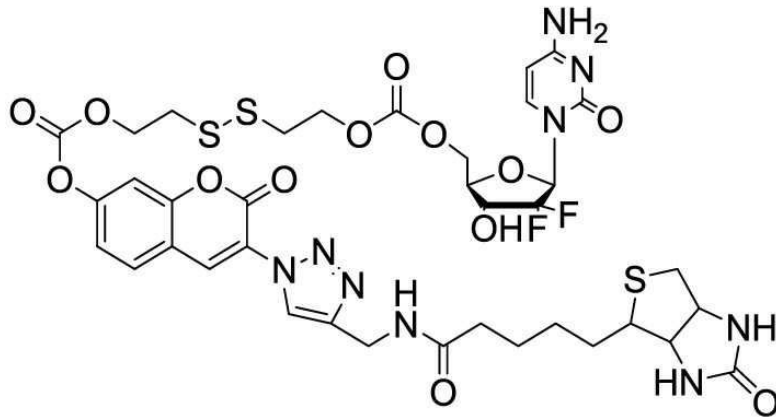
해결하려는 과제

[0003] 전술한 문제점을 인식하여 본 발명에서는 표적 특이적으로 약물을 전달할 수 있으면서도, 체내 약물 분포를 효과적으로 모니터링할 수 있는 표적 특이적 치료진단적 항암 전구약물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 표적 특이적 약물 전구체를 제공한다:

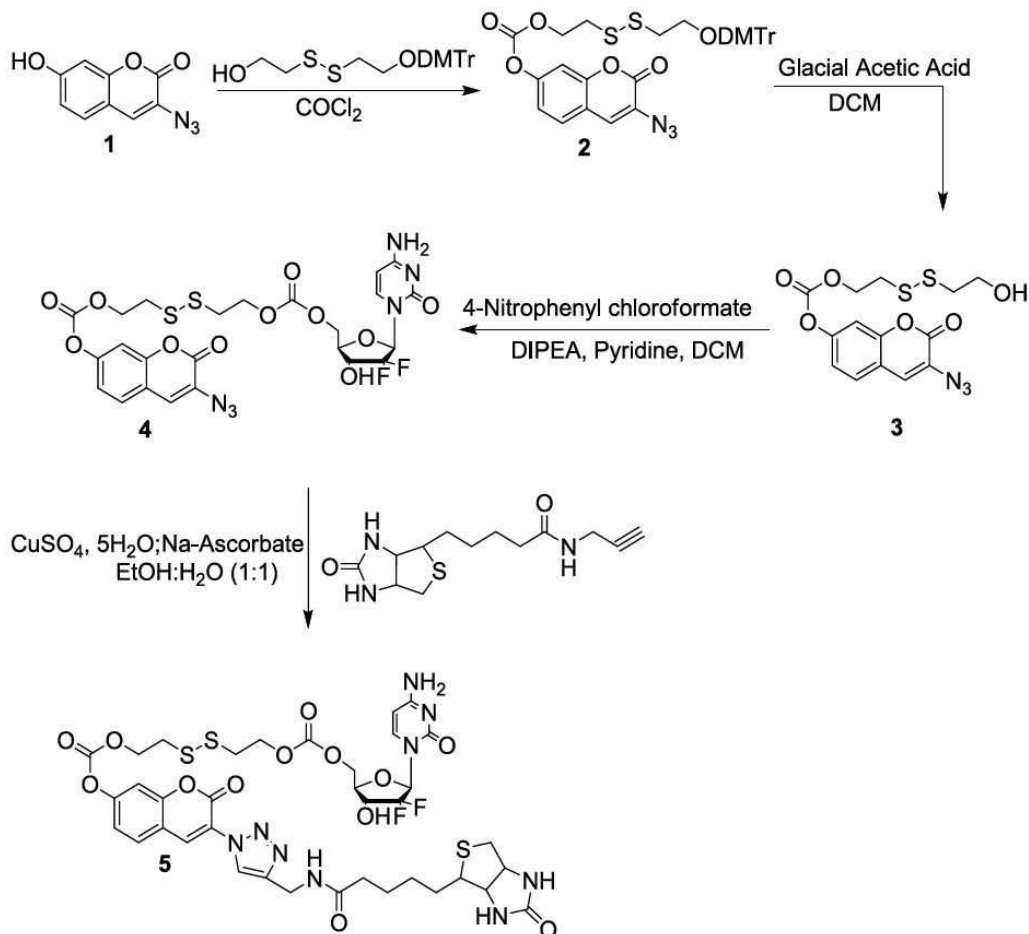
[0005] [화학식 1]



[0006]

[0007] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 표적 특이적 약물 전구체의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따른 제조방법은 하기 반응식 1로 설명될 수 있다.

[0008] [반응식 1]



[0009]

[0010] 구체적으로, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 표적 특이적 약물 전구체의 제조방법은 하기 단계를 포함한다:

[0011] 화학식 2의 화합물을 하이드록실 에틸 디설파이드와 반응시킴으로써 화학식 3의 화합물을 제조하는 단계;

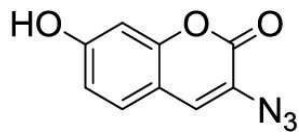
[0012] 상기 화학식 3의 화합물을 아세트산과 반응시킴으로써 화학식 4의 화합물을 제조하는 단계;

[0013] 상기 화학식 4의 화합물을 4-니트로페닐 클로로포르메이트와 반응시킴으로써 화학식 5의 화합물을 제조하는 단

계; 및

[0014] 상기 화학식 5의 화합물을 화학식 6의 화합물과 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계.

[0015] <화학식 2>



[0016]

[0017] <화학식 3>



[0018]

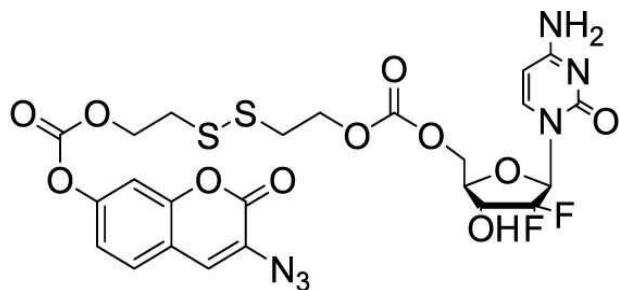
상기 DMTr은 4,4'-디메톡시트리틸(dimethoxytrityl)을 의미한다.

[0019] <화학식 4>



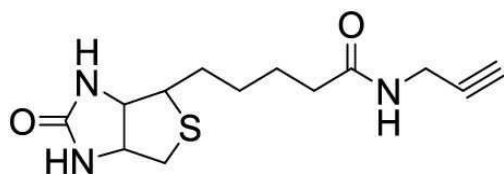
[0020]

[0021] <화학식 5>



[0022]

[0023] <화학식 6>



[0024]

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따르면, 표적 특이적 약물 전달과 더불어 세포 수준의 영상화를 통한 약물 모니터링이 동시에 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 화합물 5의 흡수 및 형광 스펙트럼이다. (a)는 GSH의 존재 또는 부재하에서 화합물 5의 흡수 스펙트럼이

다. (b)는 GSH의 존재 또는 부재하에서 화합물 5의 형광 스펙트럼이다. (C)는 GSH 농도 증가에 따른 5의 형광 스펙트럼이다. (d)는 GSH 농도의 함수로서 476 nm에서 형광 강도의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 2는 5로 처리된 A549 및 W138의 공초점 현미경 이미지이다. 좌측 사진은 PBS 완충액 중 화합물 5의 10.0 μ M으로 처리된 A549 및 W138 세포의 공초점 현미경 사진이다. 우측 사진은 비공초점 상 대조 사진이다.

도 3은 5로 처리된 A549 세포의 공초점 현미경 이미지이다. 각 이미지는 농도 0, 0.2 및 0.5 mM의 N-에틸말레미드(NEM)을 함유하는 배지에서 예비 처리된 세포이다.

도 4는 A549 세포에서 colocalization 실험한 공초점 현미경 이미지이다. (a)와 (d)는 화합물 5(10.0 μ M)가 함유된 A549 세포의 형광 이미지이다. (b)는 Lyso Tracker Blue DND-167(0.05 μ M)과 화합물 5로 항온처리한 A549 세포의 형광 이미지이다. (C)는 (a)와 (b)의 이미지를 겹친 이미지이다. (e)는 ER Tracker Red(0.05 μ M)와 화합물 5로 항온처리한 A549 세포의 형광 이미지이다. (f)는 (d)와 (e)의 이미지를 겹친 이미지이다.

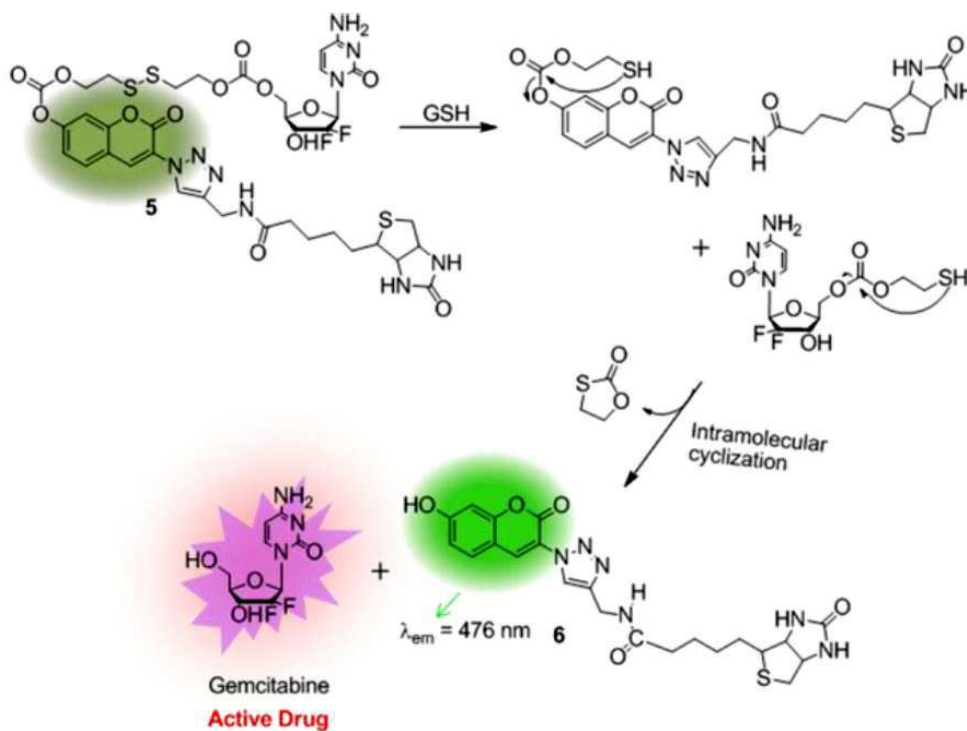
도 5는 A549 세포주에서 5의 세포 성장능에 대한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

본 발명에 따른 표적 특이적 약물 전구체는 비오틴-쿠마린-젬시타빈 구조를 갖는다. 화학식 1의 표적 특이적 약물 전구체의 형광 반응은 하기 반응식 2에 의하여 설명될 수 있다. 화학식 1의 화합물이 GSH의 존재하에서 S-S 결합이 절단되어 티올을 만들고, 생성된 티올은 분자내 친핵 치환에 의하여 5원 고리 티올락톤을 생성하고, 약학적으로 활성화 형태인 GMC 분자를 방출하면서 형광을 나타낸다.

[반응식 2]



합성 물질 및 방법

실리카겔 60(Merck, 0.063-0.2mm)이 컬럼 크로마토그래피에 사용되었다. 분석 박막 크로마토그래피는 Merck 60 F254 실리카겔(전코팅된 시트, 0.25 mm 두께)을 사용하여 수행하였다. H 및 C NMR 스펙트럼은 바리안 300 및 400 MHz 분광계측기의 CDCl_3 , DMSO (Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA)에서 측정하였다. 질량 스펙트럼은 ion Spec HiRes 질량 분광계측기에서 측정하였다.

[0033] 분광측정 물질 및 방법

[0034] 생물학적으로 적절한 분석물질의 저장 용액은 삼포중류방향수로 제조하였다. 5의 저장 용액 역시 삼포중류방향수로 제조하였다. 모든 분광계측은 생리적 조건하에서 측정하였다(DMSO 25%(v/v) 함유 PBS 완충액, pH 7.4, 36도). 흡수 스펙트럼은 S-3100(Scinco) 분광계측기로 측정하였고, 형광은 제논 램프가 장착된 RF-5301 PC 형광계측기(Shimadzu)로 측정하였다. 흡수 및 발광 측정을 위한 샘플은 석영 큐벳에 수용되었다(3mL 부피). 여기는 480 nm에서 이루어지고, 여기 및 방출 슬릿은 3 및 5 nm 넓이를 갖는다.

실시예 1

[0035] 화학식 1의 화합물의 합성

[0036] (1) 화학식 2의 화합물의 합성

[0037] 화학식 2의 화합물은 공지된 방법에 의하여 합성되었다. 수율 50%; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 6.72 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J=2.3$, 8.5 Hz, 1H), 7.44 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 10.53 (s, phenolic OH), ppm. ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 102.7, 112.0, 114.5, 121.8, 128.5, 129.8, 153.4, 158.0, 161.0 ppm. HRMS: Calculated for $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3\text{N}_3$ (M+1); 204.0409; found 204.0409.

[0038] (2) 화합물 3의 합성

[0039] 포스겐 용액(429 mg, 4.38 mmol, 2.14 ml)을 건조 디클로로메탄(5.0 mL) 중 DMTr 보호된 히드록실 에틸 다이설파이드(500 mg, 1.10 mmol) 및 DIPEA(849 mg, 6.57 mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 용액은 아르곤 분위기하에서 0도에서 교반하였다. 2시간 후, 과량의 포스겐을 아르곤 퍼지에 의하여 반응 혼합물로부터 제거하였다. 건조 디클로로메탄 중 3-아지도-7-히드록시 쿠마린(111 mg, 0.55 mmol)을 반응 혼합물에 첨가하고 밤새 교반하였다. 반응의 완결 후 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고 소금물로 2회 세척한 후 황산나트륨으로 건조하고, filter 하였다. 용매는 감압하에서 제거되었다. 조생성물은 실리카겔의 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제하여, 화학식 3의 화합물을 황색 점성 액체로 수득하였다.(460 mg, 61% 수율). ^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.852.91 (m, 4H), 3.39 (t, $J=6.1$ Hz, 2H), 3.77 (s, 6H), 4.46 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J=8.8$ Hz, 4H), 7.11 (dd, $J=2.2$, 8.5 Hz, 1H), 7.167.22 (m, 3H), 7.28 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=8.8$ Hz, 4H), 7.38 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), ppm. ^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 36.8, 39.9, 55.5, 62.0, 67.1, 86.6, 109.8, 113.3, 113.3, 117.5, 118.6, 125.3, 126.3, 127.1, 128.1, 128.2, 128.4, 130.3, 136.2, 145.0, 151.8, 152.2, 152.9, 157.3, 158.7 ppm. ESI-MS: Calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$; 685.16; found 685.48.

[0040] (3) 화합물 4의 합성

[0041] 화학식 3의 화합물(450 mg, 0.65 mmol)을 디클로로메탄 용매에 용해하고, 80% 차가운 아세트산을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물은 24시간동안 교반하면서 TLCdp 의하여 완결하였다. 차가운 아세트산을 포화 수용성 탄산수소나트륨 용액에 의하여 중화시켰다. EtOAc를 첨가하고 유기상은 황산나트륨에서 건조한 후, 필터링하였다. 용매는 감압하에서 제거하였다. 조생성물은 실리카겔의 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제하여, 화학식 4의 화합물을 황색 점성 액체로 수득하였다.(180 mg, 71% 수율). ^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.87 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.00 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.86 (t, $J=5.8$ Hz, 2H), 4.51 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 7.11 (dd, $J=2.2$, 8.6 Hz, 1H), 7.177.20 (m, 2H), 7.40 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), ppm. ^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 36.7, 41.7, 60.5, 67.0, 109.8, 117.5, 118.6, 125.4, 126.3, 128.3, 151.7, 152.1, 152.9, 157.3 ppm. HRMS: Calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ (M+1) 384.0324; found 384.0326.

[0042] (4) 화합물 5의 합성

[0043] 4-니트로페닐 클로로포르메이트(157.7 mg, 0.78 mmol), DIPEA(134 mg, 1.04 mmol) 및 피리딘의 촉매량을 화합물 3(100 mg, 0.26 mmol)의 DCM(5ml) 용액에 0도에서 첨가하고 5시간동안 교반하였다. 반응 혼합물은 진공하에서 농축시켰다. 조생성물은 DMF 5mL에서 용해되었다. 이 용액에 DMF(2mL) 및 TEA(0.5 mL) 중 켐시타빈(205 mg,

0.78 mmol)을 첨가하고 24시간동안 교반하였다. 반응 완결 후, 반응 혼합물을 물에서 회석하였다. 화합물을 EA로 추출하였다. 유기층은 무수 황산나트륨에서 건조시켰다. 조화합물을 용출제로 DCM/MeOH(9:1)을 사용한 실리카 컬럼 크로마토그래피를 통과시켜, 화학식 5의 화합물을 황색의 점성 액체로서 수득하였다(30 mg, 17% 수율). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.953.06 (m, 4H), 3.78 (s, 2H), 3.994.14 (m, 2H), 4.664.55 (m, 4H), 5.30 (s, 1H), 5.82 (d, J = 6.00 Hz, 1H), 6.23 (br s, 1H), 7.14 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.227.23 (m, 1H), 7.377.45 (m, 2H), 7.55 (br s, 1H), 8.26 (d, J = 7.2 Hz, 1H), ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 36.6, 36.9, 55.1, 59.7, 65.6, 66.9, 79.0, 95.9, 109.6, 117.4, 118.5, 121.9, 125.5, 125.4, 128.2, 141.6, 151.6, 152.8, 153.8, 155.6, 156.0, 165.9, 166.1 ppm. HRMS: Calculated for C₂₄H₂₃F₂N₆O₁₁S₂ (M+1) 673.0834; found 673.033.

[0044]

(5) 화학식 1의 화합물 합성

[0045]

화학식 6의 화합물(29 mg, 0.01 mmol)과 아스코르베이트(10 mol%)를 화합물 4(70mg, 0.01 mmol)의 MeOH(3.0 mL) 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 아르곤 가스 퍼지에 의하여 15분간 탈기시켰다. 물 0.5 mL 중 CuSO₄ 2mg(0.002 mmol)을 반응 혼합물에 첨가하고 3시간동안 교반하였다. 조 반응혼합물은 용출제로 DCM/MeOH(8.5:1.5)를 사용한 실리카 컬럼 크로마토그래피를 직접 통과하여, 화학식 1의 화합물을 황색 점성 액체로 수득하였다(25 mg, 25% 수율). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.211.32 (m, 2H), 1.361.58 (m, 4H), 2.05 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.532.57 (m, 2H), 2.772.83 (m, 2H), 2.993.10 (m, 5H), 3.68 (br s, 2H), 3.793.82 (m, 3H), 4.084.12 (m, 2H), 4.264.31 (m, 3H), 4.374.41 (m, 2H), 5.255.27 (m, 1H), 5.79 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.186.25 (m, 1H), 6.366.42 (m, 3H), 7.437.45 (m, 2H), 7.64 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.218.24 (m, 2H), ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): 25.8, 28.3, 28.7, 28.8, 35.5, 36.9, 38.7, 55.4, 56.1, 59.8, 61.7, 65.8, 73.5, 82.0, 95.7, 101.2, 108.1, 109.0, 116.4, 116.8, 118.9, 119.5, 121.7, 124.7, 126.9, 127.0, 128.1, 130.5, 140.7, 142.1, 147.7, 153.7, 155.6, 163.3, 163.4, 166.3, 172.5 ppm. ESI-MS: Calculated for C₃₇H₄₂F₂N₉O₁₃S₃(M+1) 954.20; found 954.21

실시예 2

[0046]

세포 배양액 제조

[0047]

인간 폐 선암 상피 세포(KCLB, 서울, 한국)를 10% FBS(Welgene), 페니실린(100 유닛/ml) 및 스트렙토마이신(100 ug/mL)으로 보충된 RPMI(WelGene Inc, 서울, 한국)에서 배양하였다. 사진 촬영 이틀전, 세포를 계대배양하고 유리바닥 접시에 플레이트하였다.

[0048]

모든 세포들은 37도의 5/95(v/v) 비율의 CO₂/공기의 습기 분위기로 유지하였다. 레이블을 위하여, 성장 배지를 제거하고, FBS가 없는 RPMI로 교환하였다. 이 세포들은 15분 동안 5% CO₂하 37도에서 리간드로 처리하고 항온처리하였다. 이 세포들은 포스페이트 완충된 식염수(PBS, Gibco)로 3회 세척한 후, 15분간 무색의 무혈청 배지에서 추가로 항온처리하였다.

실시예 3

[0049]

세포의 현미경 이미지 촬영

[0050]

실시예 2의 세포를 24-웰 플레이트에 심고 밤새 안정화시켰다. 화합물 5를 약물의 흡수 및 방출을 모니터링하기 위하여 세포에 적용하였다. 세포는 5로 처리하기 이전에 Lyso- 또는 ERtracker를 함유하는 배지로 항온처리하였다. 이 세포를 1 mL의 PBS로 간단히 세척하고 PBS에 5로 처리하였다. 항온처리한 후, 세포에 흡수되지 않고 남은 화합물 5를 제거하였다. 세포는 PBS 용액 1mL에 옮겼다. 형광 이미지는 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Zeiss LSM 510, Zeiss, Oberko, Germany)를 사용하여 촬영하였다.

[0051]

분석 결과

[0052]

도2에서 볼 수 있는 바와 같이, 비오틴 부분은 비오틴 수용체 양성 암세포에 우선적으로 본 발명의 약물 전구체를 인도한다. A549 세포는 비오틴 수용체가 존재하는 세포이고, W138 세포는 비오틴 수용체가 없는 세포이다.

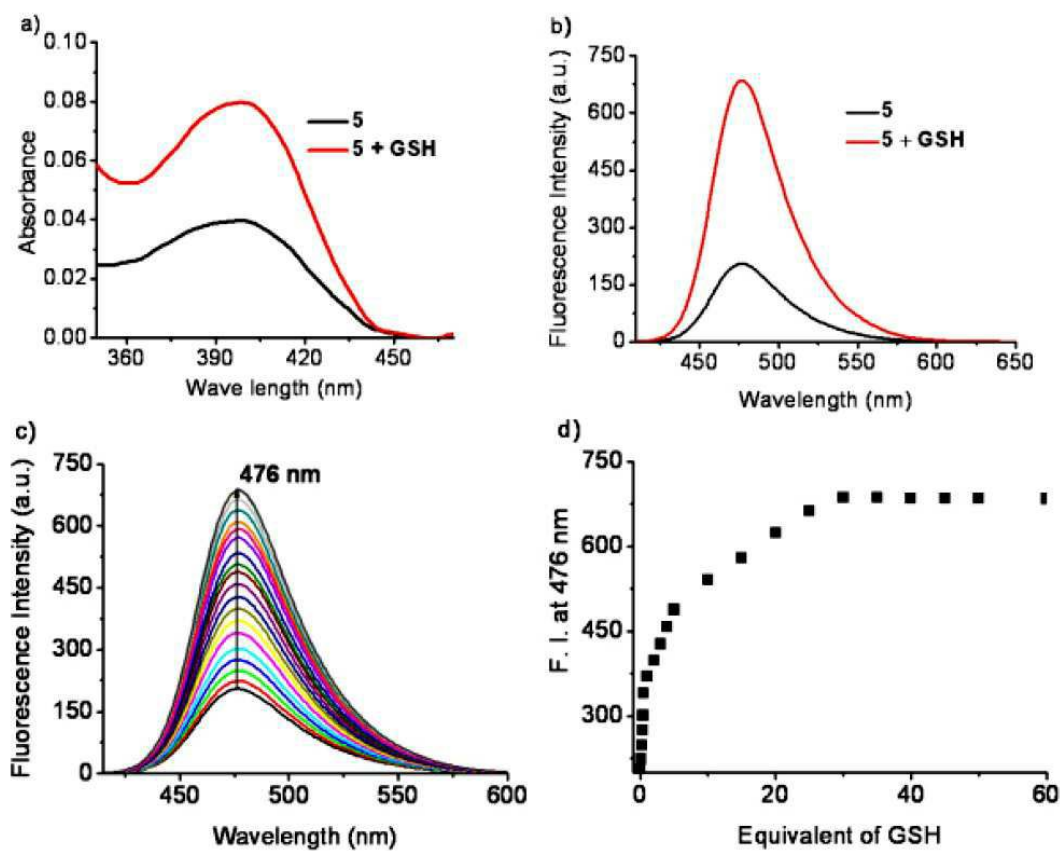
A549 세포는 강한 형광을 나타내지만, W138 세포는 거의 형광을 나타내지 않는다. 이러한 결과를 통해서, 화학식 1의 약물 전구체가 암 세포의 비오틴 수용체와 비오틴 부분의 상호작용에 의하여 세포내로 유입되었음을 확인할 수 있다.

[0053] 세포 유입후 GMC의 세포내로 GMC가 방출되었음을 도4에 의하여 확인할 수 있다. 화학식 1의 약물 전구체에서 티올-유도된 이황화결합의 절단은 리소좀에서 일어나 GMC를 방출시키고, 세포 핵으로 들어갈 수 있다. 이러한 GMC는 DNA 복제시 시티딘, 핵산의 단위체를 대체하여, 세포자살(apoptosis)을 유도하게 된다.

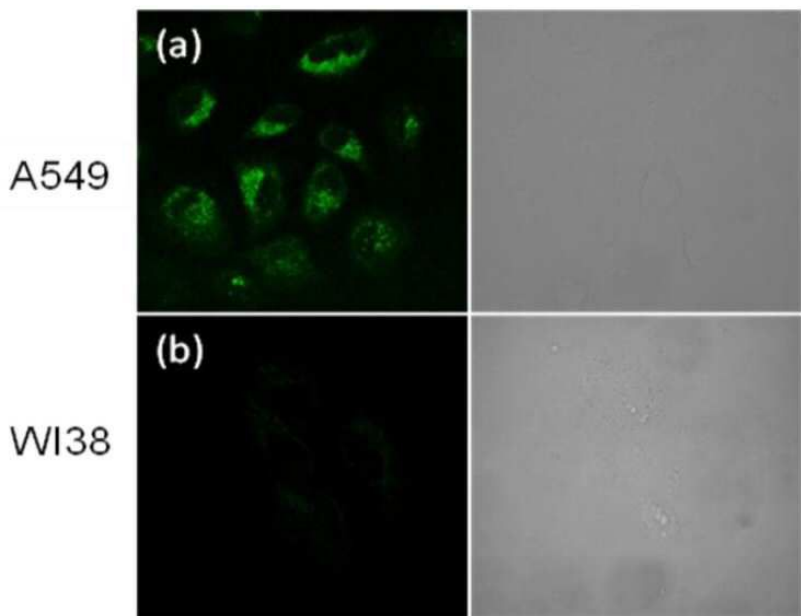
[0054] 도5에서 보는 바와 같이, 비오틴 분자를 갖는 약물 전구체의 항암효과를 A549 세포에서 확인하였다. 도5에서 4는 비오틴을 갖지 않는 화합물이고, 5는 비오틴을 갖는 화합물이다. 비오틴을 갖는 화합물을 투여한 경우 세포의 생성능이 더 높았다. 즉, 비오틴이 약물 전구체에서 항암 세포를 표적화하는 효과가 있음을 알 수 있다.

도면

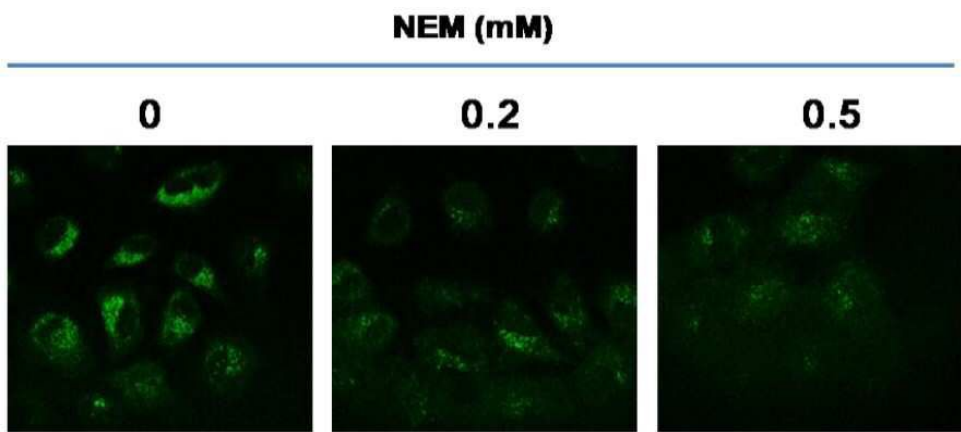
도면1



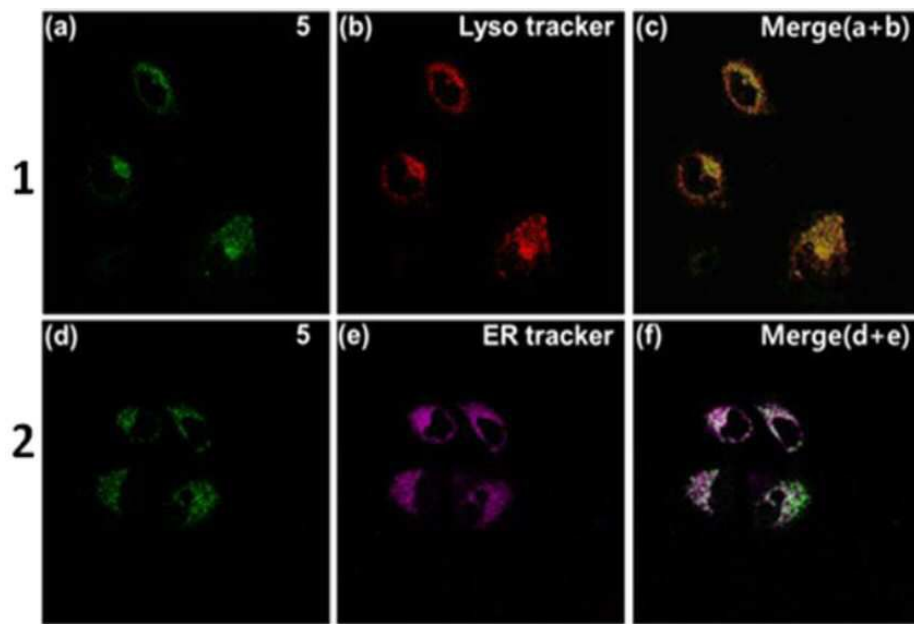
도면2



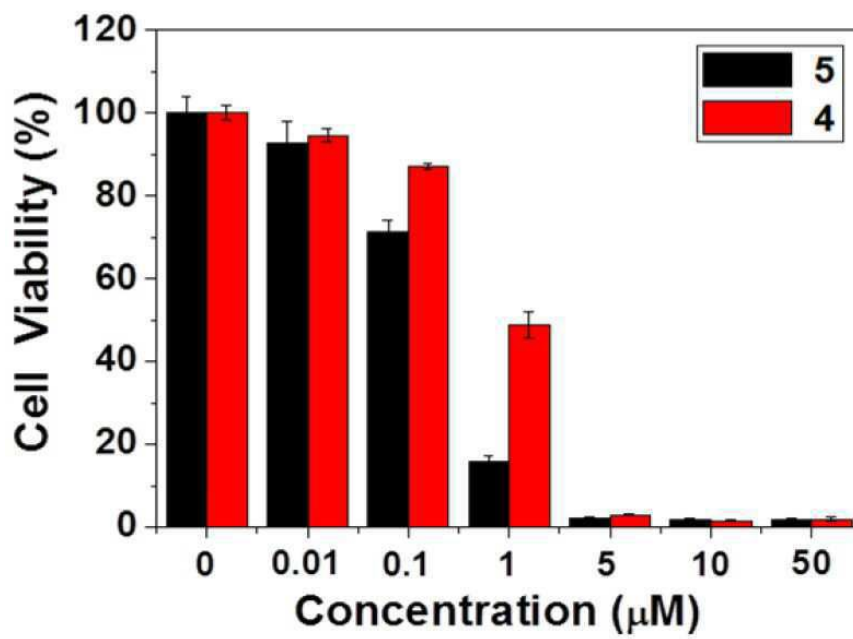
도면3



도면4



도면5



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제2항 9째줄

【변경전】

화학식 1로 표시되는

【변경후】

제1항의 화학식 1로 표시되는