(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0076559
(43) 공개일자 2019년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4192 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4192 (2013.01)
A61K 49/0013 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0178455
(22) 출원일자 2017년12월22일
심사청구일자 2017년12월22일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
신원섭
충청남도 아산시 배방읍 광장로 210, 102동 2303호
박순기
서울특별시 동작구 신대방11길 17, 1층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 3 항

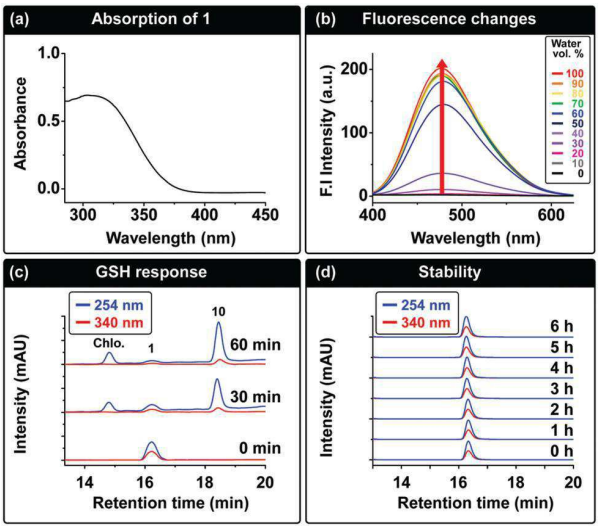
(54) 발명의 명칭 **미토콘드리아를 표적으로 하는 항암 치료진단제**

(57) 요 약

본 발명은 미토콘드리아를 표적으로 하는 항암 치료진단제에 관한 것으로, 상세하게는 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하여 미토콘드리아에 대해 특이적으로 표적화가 가능한 항암 치료진단제에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타내며, 활성화시에 암 세포들의 자가-모니터링 세포괴사 및 정확한 암 치료를 가능하게 하는 치료진단제를 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
(72) 발명자
피터 베르비스트
서울특별시 성북구 안암로 87, 202호
구세영
서울특별시 양천구 목동동로 130, 1401동 1103호
지성길
경기도 고양시 일산서구 대화2로 68, 206동 1202호
김종승
경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0081566
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016H1D3A1938052
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (교육인력)해외우수신진연구자유치사업
연구과제명 암과 알츠하이머 약물전달시스템의 난제 해결을 위한 단분자 진단치료제 개발
기 여 율 50/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.10.15 ~ 2017.04.30

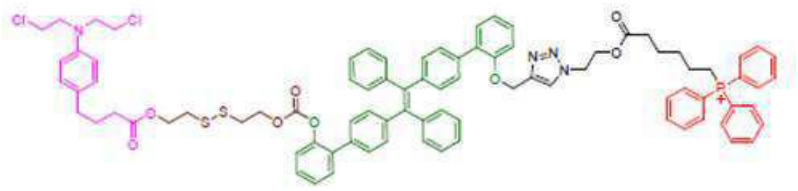
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제:

[화학식 1]

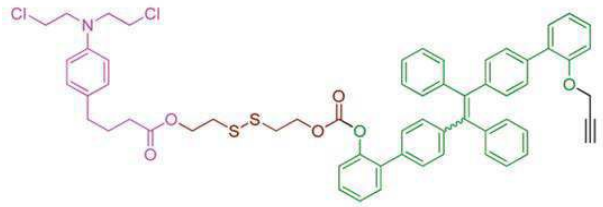


.

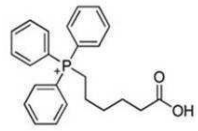
청구항 2

하기 [반응식 1]에 따라 디메틸포름아미드(DMF) 용매하에서 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 아스코르빈산 나트륨(sodium ascorbate) 및 하기 [화학식 8]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제의 제조방법:

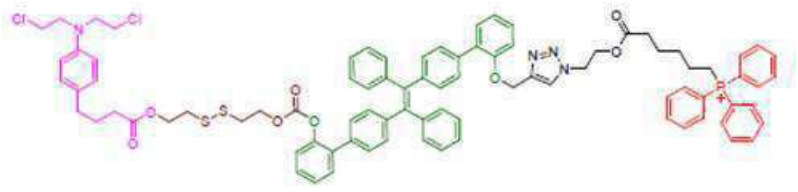
[화학식 2]



[화학식 8]



[화학식 1]



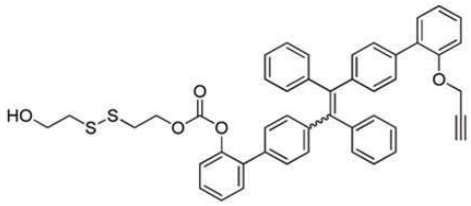
.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물을 클로람부실(Chlorambucil)과 반응시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제의 제조방법:

[화학식 3]



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아를 표적으로 하는 항암 치료진단제에 관한 것으로, 상세하게는 미토콘드리아에 대하여 특이적으로 응집 및 발광하여 미토콘드리아에 대해 특이적으로 표적화가 가능한 항암 치료진단제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지난 몇십년 동안 현저한 개선이 있었지만, 암은 여전히 전세계적으로 사망의 주요 원인 중 하나이며, 향후 몇십년 동안 주요 사망 원인이 될 것으로 예상된다(비특허문헌 1). 암 화학요법은 암 치료, 특히 수술을 지원하는 방법으로 이용되고 있으며, 상기 요법은 침습 절차를 줄이기 위한 수술-전 처리 및 종양 절제술 후에 암 재발의 위험을 줄이기 위한 보조 요법 둘 모두로 적용가능함이 확인되었다.

[0003] 종래의 항암 약물들은 일반적으로 특이성 결핍, 피부, 모낭, 위장 내벽 세포, 간 및 신장에서의 심각한 독성으로 인한 부작용을 유발하는 등 다수의 문제점들과 관련이 있다. 또한, 다른 제한점들은 상대적으로 낮은 종양 누적 및 선천적 또는 유발된 약물 내성이다. 종종, 허용 가능한 수준으로 부작용을 줄이기 위해 이러한 강한 약물을 차선책으로 투여해야 한다.

[0004] 클로람부실(Chlorambucil)은 특히 만성 림프성 백혈병 (CLL)의 임상 시험에 사용되는, 질소 머스터드(nitrogen mustard) 약물이다(비특허문헌 2). 클로람부실은 가닥 (strand)-간 결합 및 가닥-내 결합을 일으키는, 구아니딘 잔기의 N-7에서의 반응과 함께, DNA의 교차결합을 통해 그의 독성을 부여하고(비특허문헌 3-4), 이로 인해 DNA 복제의 중단 및 이중 가닥 파열을 일으킨다. 하지만, 이러한 유형의 질소 머스타드의 오프-타겟(off-target) 전달은 건강한 세포에서 돌연변이 유발효과를 일으키고(비특허문헌 5), 2차 악성 종양의 위험을 현저하게 증가시킨다(비특허문헌 6).

[0005] 건강한 함산소 세포의 ATP의 형성에서 에너지의 주요원인 미토콘드리아는 현재 항암 약물 설계에 대한 고도로 민감한 표적으로서 활발히 연구되고 있는데, 이는 이러한 세포기관이 암세포에서 증가된 막전위와 관련되어 있기 때문이다. 이렇게 변경된 막전위는 트리페닐포스포늄 잔기와 같은 큰 친유성 양이온이 이들 세포 내 세포기관에 축적되어 친유성 양이온 부가 분자에 대해 농도가 수 백배 향상됨이 알려짐에 따라 미토콘드리아에 약물을 표적화하는데 이용되었다. 비-악성 세포의 미토콘드리아 막전위가 낮으면 악성 세포와 비교하여 이들 양이온의 현저한 섭취가 감소하기 때문에 친유성 양이온과 공액 결합된 약물은 이들 약물의 종양 특이적 독성을 향상시키는 편리한 접근법이 된다(비특허문헌 7-11).

[0006] 치료진단 약물 전달 시스템의 중요한 이점은 약물의 세포내 국소화(localization)를 시각화할 수 있다는 점(비특허문헌 12)이며, 이는 독성 유발 메커니즘의 보다 철저한 이해를 얻는 중요한 파라미터이다. 보조적 생물적 기능이 없는 형광단을 붙이는 것보다는, 단일 분자에서 약물 및 형광단의 조합은 치료진단 분자 약물 전달 시스템의 원자-효율에서 큰 이점을 가진다.

[0007] 대부분의 형광단과는 달리, 오직 자기조립 상태에서만 고유 형광을 갖는 형광 분자의 집합인 응집 유발된 발광(Aggregation induced emission, AIE) 형광단(비특허문헌 13-15)은 효율적인 다목적 분자 성분의 명백한 예시에 해당하며, 이는 응집된 상태에서 이들 염료의 미토콘드리아 전달이 심각한 미토콘드리아 기능 장애, 막 보존의 손실 및 궁극적으로는 세포 사멸을 일으키기 때문이다(비특허문헌 16-18).

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal, Ca-Cancer J. Clin., 2015, 65, 87-108.

(비특허문헌 0002) B. Eichhorst, M. Dreyling, T. Robak, E. Montserrat and M. Hallek, Ann. Oncol., 2011, 22(Suppl. 6), vi50-vi54.

(비특허문헌 0003) W. B. Mattes, J. A. Hartley and K. W. Kohn, Nucleic Acids Res., 1986, 14, 2971-2987.

(비특허문헌 0004) J. A. Hartley, J. P. Bingham and R. L. Souhami, Nucleic Acids Res., 1992, 20, 3175-3178.

(비특허문헌 0005) B. J. Sanderson and A. J. Shield, Mutat. Res., 1996, 355, 41-57.

(비특허문헌 0006) J. J. Castillo and M. A. Gertz, Leuk. Lymphoma, 2016, DOI: 10.1080/10428194.2016.1217527.

(비특허문헌 0007) F. Wang, M. A. Ogasawara and P. Huang, Mol. Aspects Med., 2010, 31,75-92.

(비특허문헌 0008) S. Fulda, L. Galluzzi and G. Kroemer, Nat. Rev. Drug Discovery, 2010,9, 447-464.

(비특허문헌 0009) R. A. Smith, R. C. Hartley and M. P. Murphy, Antioxid. Redox Signaling, 2011, 15, 3021-3038.

(비특허문헌 0010) S. R. Jean, D. V. Tulumello, S. P. Wisnovsky, E. K. Lei, M. P. Pereira and S. O. Kelley, ACS Chem. Biol., 2014, 9, 323-333.

(비특허문헌 0011) Z.-P. Chen, M. Li, L.-J. Zhang, J.-Y. He, L. Wu, Y.-Y. Xiao, J.-A. Duan, T. Cai and W.-D. Li, J. Drug Targeting, 2016, 24, 492-502.

(비특허문헌 0012) R. Kumar, W. S. Shin, K. Sunwoo, W. Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya and J. S. Kim, Chem. Soc. Rev., 2015, 44, 6670-6683.

(비특허문헌 0013) J. Mei, Y. Hong, J. W. Y. Lam, A. Qin, Y. Tang and B. Z. Tang, Adv. Mater., 2014, 26, 5429-5479.

(비특허문헌 0014) R. T. Kwok, C. W. Leung, J. W. Lam and B. Z. Tang, Chem. Soc. Rev., 2015, 44, 4228-4238.

(비특허문헌 0015) J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam and B. Z. Tang, Chem. Rev., 2015, 115, 11718-11940.

(비특허문헌 0016) Q.Hu,M. Gao, G. Feng andB.Liu, Angew. Chem., Int. Ed., 2014, 51, 14225.

(비특허문헌 0017) C.-J. Zhang, Q. Hu, G. Feng, R. Zhang, Y. Yuan, X. Lu and B. Liu, Chem. Sci., 2015, 6, 4580-4586.

(비특허문헌 0018) W. S. Shin, M.-G. Lee, P. Verwilst, J. H. Lee, S.-G. Chi and J. S. Kim, Chem. Sci., 2016, 7, 6050-6059.

발명의 내용

해결하려는 과제

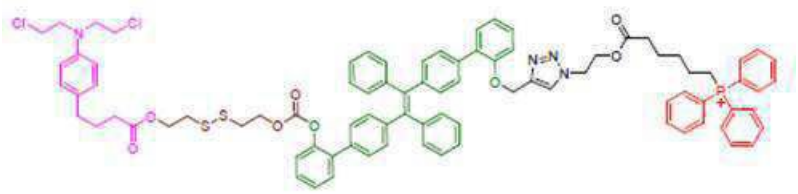
[0009] 본 발명에서는 전술한 기술적 배경하에서, 미트콘드리아를 특이적으로 표적화하여 미토콘드리아 내에서 응집 및 발광하여 치료 및 진단이 가능한 항암 치료진단제 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0011] 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제를 제공한다:

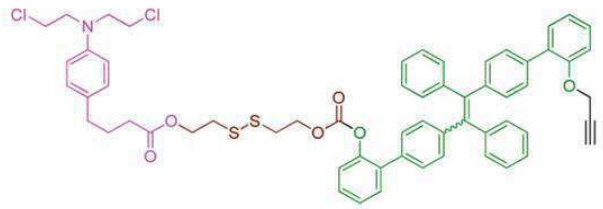
[0012] [화학식 1]



[0013] .

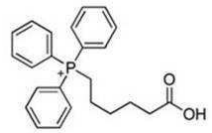
[0014] 또한, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라 디메틸포름아미드(DMF) 용매하에서 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 아스코르빈산 나트륨(sodium ascorbate) 및 하기 [화학식 8]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제의 제조 방법:

[0015] [화학식 2]



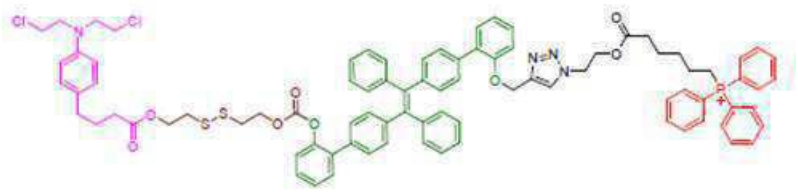
[0016]

[0017] [화학식 8]



[0018]

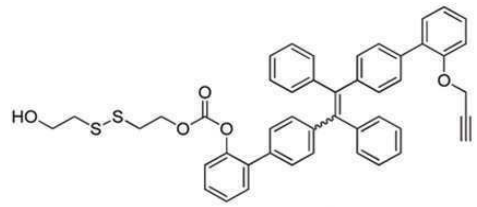
[0019] [화학식 1]



[0020] .

[0021] 본 발명에 따르면, 상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물을 클로람부실(Chlorambucil)과 반응시켜 제조될 수 있다:

[0022] [화학식 3]



[0023] .

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면, 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타내며, 활성화시에 암 세포들의 자가-모니터링 세포괴사 및 정확한 암 치료를 가능하게 하는 치료진단제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 화학식 1로 표시되는 화합물(화합물 1)의 물리화학적 특성을 나타낸 것으로, (a)는 실온에서 pH 7.4 PBS 용액 중 화합물 1(20 μM)의 흡광(absorption), (b)는 화합물 1의 AIE 방출에 대한 (메탄올 중) 물 함량의 의존성(lex = 360 nm, 슬릿 = 3/3, T = 24 ℃)를 나타내고, (c)는 Glutathione(GSH)의 존재 하, (d)는 GSH 부존재 하에서(37 ℃에서 6시간 동안)의 HPLC 크로마토그램이다. 변화도(gradient): 17분 동안 70% B에서 100% B로 변화, 그 다음에 100% B, 10 분; A: 물, B: ACN.

도 2는 인간 암세포의 성장 및 생존율에 대한 화합물 1의 효과를 나타낸 것으로, (a), (b)는 HCT116 (대장) 및 HeLa (자궁경부) 암세포에서 화합물 1과 클로람부실의 성장 억제 효과의 비교한 것이다. 이때, 세포들을 처리 24시간 후에 계수하였다. (c), (d)는 세포 생존율에 대한 화합물 1, 2 및 클로람부실을 비교한 것이다. 이때, 처리 (20 μM) 24시간 후에 MTT 분석을 수행하였다.

도 3은 세포 생존율에 대한 화합물 1의 효과의 GSH-의존성을 나타낸 것으로, (a), (b)는 N-acetyl-L-cysteine(NAC)-처리된 세포에서 1의 세포독성 효과의 향상을 나타낸다. NAC-비처리된 (Mock) 또는 처리된 (1 mM) NHDF (정상) 및 HeLa (암) 세포를 24시간 동안 화합물 1 (20 μM)과 함께 배양하였다. 세포 생존율을 MTT 분석에 의해 측정하였다. (c)는 GSS-고갈된 암세포에서 화합물 1의 세포독성 효과의 감쇠를 나타낸다. small interfering(si)-Control 또는 si-glutathione synthetase(GSS)로 형질주입된 HeLa 세포를 화합물 1 (20 μM, 24 h)과 함께 배양하였다. 삽도: siRNA 처리된 세포의 GSS 함량. (d)는 높거나 낮은 수준의 GSH 세포에서 화합물 1의 세포독성 효과를 비교한 것이다. 상이한 수준의 GSH (PC3, 높은 GSH; LNCaP, 낮은 GSH)를 발현하는 2개의 인간 전립선암세포를 24시간 동안 10 또는 20 μM의 화합물 1로 처리하였다.

도 4는 화합물 1에 의한 종양세포 세포사멸 유도를 나타낸 것으로, (a)는 화합물 1의 세포사멸 유발 효과를 나타내는 아넥신 V 분석 결과이다. 24시간 동안 HeLa 세포를 20 μM의 컨쥬게이트 1과 함께 배양하였고, 아넥신 V/PI 이중 염색된 세포를 유동 세포 분석법에 의해 분석하였다. (b)는 세포사멸 서브-G1 부분의 유동 세포측정 분석결과이다. HeLa 세포를 화합물 1 또는 2 (20 μM)와 함께 24시간 동안 배양하였고, 서브-G1 부분의 퍼센트를 유동 세포 분석법을 사용하여 측정하였다. (c)는 쪼개진 PARP의 면역블롯팅 분석으로, 화합물 1의 세포사멸-유발 효과를 확인하기 위해, 화합물 1 또는 2 (20 μM, 24 h)로 처리된 HeLa 세포의 용해물을 쪼개진 PARP-특이적 항체를 사용하여 면역블롯팅 분석하였다.

도 5는 PC3 (암세포) 및 NHDF (정상세포)에서 화합물 1의 형광 강도를 나타낸 것이다. 부유 (suspended)세포의 형광 강도를 350 nm의 여기 파장 및 460 nm의 방출 파장에서 탐지하였다.

도 6은 화합물 1, 2, 11 및 클로람부실의 세포 생존율을 비교한 결과이다. 24시간 처리 (20 μM) 후 MTT 분석을 수행하였다.

도 7은 공초점 현미경을 사용한 PC3 세포에서 화합물 1의 세포내 공존 이미지이다. 세포 이미지는 20 μM의 화합물 1과 2시간 동안 배양 및 0.5 μM의 Mito-tracker 진홍으로 30분 동안 공동 염색시킨 후 얻었다. 적색 형광은 Mito-tracker 진홍(λ_{ex} = 633 nm, λ_{em} = 650-700 nm)으로부터 비롯되었고, 녹색 형광은 이광자 여기(two photon excitation)를 이용하여 화합물 1(λ_{ex} = 740 nm, λ_{em} = 400-600 nm)로부터 비롯되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

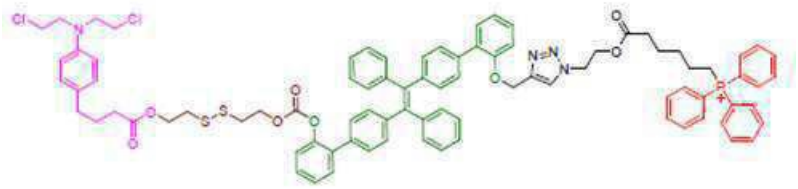
[0026] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0027] 약물 전달 시스템에 있어서 약물의 효소적 활성화와 관련된 효과적인 병리학과 결합하여 조직 선택적 표적 및 특이적인 세포소기관으로의 위치화는 종래 관습적인 암 치료에 비해 분명한 이점을 가질 수 있다.

[0028] 이에 본 발명에서는 세포 소기관인 미토콘드리아에 특이적으로 위치하여 미토콘드리아 내에서 응집 및 발광하며, 선택적으로 활성화되어 미토콘드리아 기능 장애에 의해 유발된 카스파제 경로를 통한 세포사멸을 야기할 수 있는 미토콘드리아 표적(mitochondria targeted) 응집 유도 방출(aggregation induced emission, AIE) 형광단(fluorophore)을 포함하는 항암 치료진단제 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

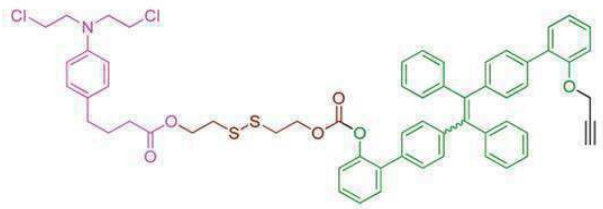
[0029] 구체적으로, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제를 제공한다:

[0030] [화학식 1]

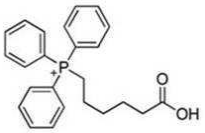
[0031] 
.

[0032] 또한, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라 디메틸포름아미드(DMF) 용매하에서 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 아스코르빈산 나트륨(sodium ascorbate) 및 하기 [화학식 8]로 표시되는 화합물을 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 반응시켜 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제의 제조방법을 제공한다:

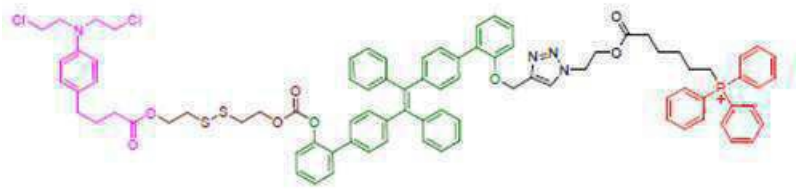
[0033] [화학식 2]

[0034] 

[0035] [화학식 8]

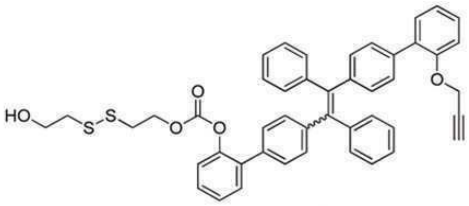
[0036] 

[0037] [화학식 1]

[0038] 
.

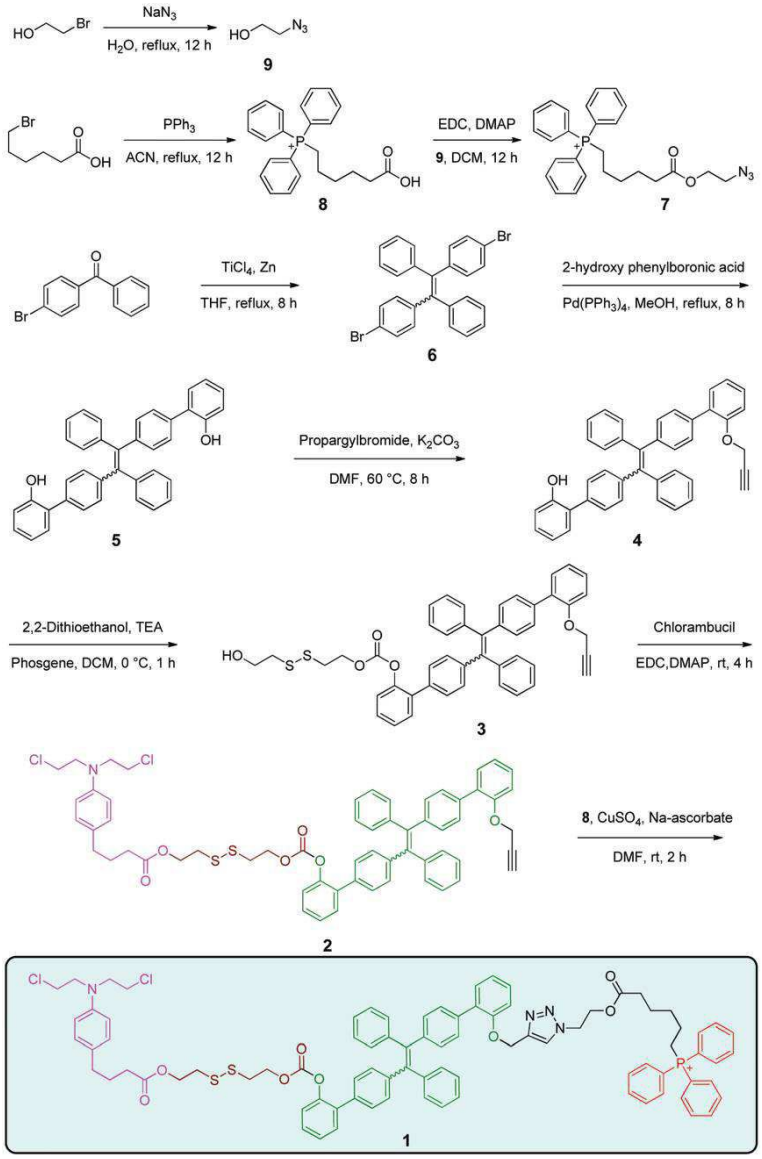
[0039] 이때, 상기 [화학식 2]로 표시되는 화합물은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물을 클로람부실(Chlorambucil)과 반응시켜 제조될 수 있다:

[0040] [화학식 3]

[0041] 
.

[0042] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 구체적인 제조방법은 하기 합성경로에 표시된 바와 같다.

[0043] [합성 경로]

[0044] 

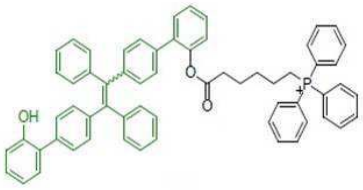
[0046] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0048] **실험 방법**

[0049] 합성을 위한 재료 및 방법

[0050] 본 발명에서 사용된 시약들은 Alfa-Aesar, Aldrich, TCI, Carbsynth, Duksan, 및 Acros에서 구입하였으며, 추가 정제 없이 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피를 위해서 실리카 겔 60 (Merck, 0.040-0.063 mm)을 사용하였으며, 분석 박막 크로마토그래피를 위해서 Merck 60 F254 실리카 겔 플레이트를 사용하였다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 400 MHz 및 Bruker 500 MHz 분광기로 측정하였다. 고려대에 있는 Center for Molecular Spectroscopy and Dynamics, Institute of Basic Science의 NMR 실험실에서 500 MHz NMR 데이터를 수집하였다. 역-상 HPLC 실험은 이원체 기울기의 용매 A (0.1% *v*/*v* TFA를 지닌 물) 및 용매 B (0.1% *v*/*v* TFA를 지닌 아세토니트릴)로 이루어진 이동상을 사용하여 Young Lin HPLC 시스템 (YL9100)으로 SunFire C18 컬럼(5 μm, 250 × 4.6 mm) 상에서 수행하였다. ESI 질량 분석법은 LC/MS-2020 시리즈(Shimadzu) 기기를 이용하여 수행하였다.

[0052] 비교화합물 11의 합성



[0053]

[0054] [화학식 11]

[0055] 종래 문헌(W. S. Shin, M.-G. Lee, P. Verwilst, J. H. Lee, S.-G. Chi, J. S. Kim, *Chem. Sci.*, 2016, ***7***, 6050-6059.)에 보고된 과정에 따라 화합물 11을 합성하였다.

[0057] 화합물 9의 합성

[0058] 종래 문헌(O. Norberg, L. Deng, T. Aastrup, M. Yan, O. Ramstrom, *Anal. Chem.*, 2011, ***83***, 1000-1007.)에 보고된 과정에 따라 화합물 9를 합성하였다.

[0060] 화합물 8의 합성

[0061] 종래 문헌(C. Trapella, R. Voltan, E. Melloni, V. Tisato, C. Celeghini, S. Bianco, A. Fantinati, S.Salvadori, R. Guerrini, P. Secchiero, G. Zauli, *J. Med. Chem.*, 2016, ***59***, 147-156.)에 보고된 과정에 따라 화합물 8을 합성하였다.

[0063] 화합물 7의 합성

[0064] 실온 및 CH_2Cl_2 (40 mL) 중에서 화합물 9 (120 mg, 1.37 mmol), 화합물 8 (571 mg, 1.51 mmol) 및 DMAP (336 mg, 2.75 mmol)의 용액에 EDCHCl (427 mg, 2.75 mmol)을 첨가하였다. 12시간 후에 수성 1*N* HCl 용액으로 혼합물을 세척하였고, 유기층을 MgSO4로 건조시켰으며, 진공에서 여과 및 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 414 mg (67 % 수율)의 생성물을 수득하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ 7.85 - 7.73 (m, 15H), 4.21 (t, J = 5 Hz, 2H), 3.72 - 3.66 (m, 2H), 3.49 (t, J =5.15 Hz, 2H), 2.33 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.75 - 1.63 (m, 6H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ 22.11, 22.15, 22.56, 23.97, 29.41, 29.54, 33.36, 49.59, 62.75, 117.54, 118.22, 130.40, 130.50, 133.38, 133.46, 135.04, 135.06, 172.83 ppm.

[0066] 화합물 6의 합성

[0067] 종래 문헌(Y. Liu, C. Deng, L. Tang, A. Qin, R. Hu, J. Z. Sun and B. Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.*,2011, ***133***, 660-663.)에 보고된 과정에 따라 화합물 6을 77% 수율로 합성하였다.

[0069] 화합물 5의 합성

[0070] 종래 문헌(W. S. Shin, M.-G. Lee, P. Verwilst, J. H. Lee, S.-G. Chi, J. S. Kim, *Chem. Sci.*, 2016, ***7***, 6050-6059.)에 보고된 과정에 따라 화합물 5를 합성하였다.

[0072] 화합물 4의 합성

[0073] MeCN (50 mL) 중 화합물 5 (200.0 mg, 0.38 mmol) 및 포타슘 카보네이트 (80.35 mg, 0.58 mmol)의 부유액에 프

로파르길 브로마이드(Propargyl bromide) (46.1 mg, 0.38 mmol)를 첨가하였다. 환류 조건하에서 8시간 동안 교반시킨 후에, 감압 하에서 반응 혼합물을 농축시켰고 100 ml의 CH_2Cl_2로 희석하였다. 1*N* HCl 용액 (3 × 20 mL)으로 유기층을 세척하였고, MgSO4를 통해 건조시켰으며 진공에서 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 132 mg (62 % 수율)의 생성물을 수득하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.32 - 6.93 (m, 26H), 5.21 (d, J = 20.92 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 6.84 Hz, 2H), 2.45 (d, J = 32.76 Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 56.40, 56.45, 75.43, 75.44, 78.74, 114.21, 115.85, 115.86, 120.45, 122.09, 122.14, 126.46, 126.52, 127.63, 127.73, 128.28, 128.34, 128.67, 128.79, 130.97, 130.98, 131.41, 131.44, 131.47, 131.82, 143.72, 154.48 ppm.

[0075] 화합물 3의 합성

[0076] 얼음 욕조에서 포스겐(phosgene) 용액 (톨루엔 중 30 mL, 20%) 내로 DCM (30 mL) 중 TEA (18mg, 0.18 mmol)를 지닌 화합물 **4**(100mg, 0.18 mmol)의 용액을 적상 첨가하였다. 1시간 후에 용액을 증발시켰다. 실온에서 잔류물 내로 DCM (10 mL) 중 TEA (72 mg, 0.72 mmol)를 지닌 2-하이드록시에틸 디설파이드 (111.19mg, 0.72 mmol)의 용액을 첨가하였다. 3시간 동안 교반시킨 후에, 진공에서 농축된 1*N* HCl 용액 (3 × 20 mL)으로 반응 혼합물을 추출하였다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 33 mg (25 % 수율)의 생성물을 수득하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.40 - 7.05 (m, 26 H), 4.60 (d, J = 2.36 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.32 (t, J = 6.84 Hz, 1H), 4.25 (t, J = 6.68 Hz, 1H), 3.83 (t, J = 5.72 Hz, 1H), 3.78 (t, J = 5.64 Hz, 1H), 2.86 - 2.69 (m, 4H), 2.46 (t, J = 2.36 Hz, 0.5H), 2.40(t, J = 2.4 Hz, 0.5H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 36.56, 36.57, 41.76, 41.84, 56.60, 56.68, 60.38, 60.41, 66.44, 66.50, 75.70, 75.77, 79.06, 79.07, 114.20, 114.39, 122.36, 122.38, 122.45, 126.73, 126.79, 126.98, 127.00, 127.91, 127.96, 127.98, 128.04, 128.31, 128.40, 128.74, 128.95, 129.02, 131.24, 131.27, 131.66, 131.69, 131.72, 131.76, 134.48, 134.55, 135.09, 135.21, 136.42, 136.47, 140.70, 141.44, 141.45, 142.45, 143.35, 143.42, 143.89, 143.95, 143.96, 144.02, 148.15, 148.16, 153.23, 153.28, 154.72, 154.73 ppm. ESI-MS: $C_{46}H_{38}O_5S_2Na$ (M + Na+)에 대한 계산치 (calcd): 757.21, $C_{46}H_{38}O_5S_2K$ (M + K+): 773.18, 실측치 757.20, 773.20.

[0078] 화합물 2의 합성

[0079] 실온 및 CH_2Cl_2 (15 mL) 중에서 화합물 3 (100 mg, 0.13 mmol), 클로람부실 (62 mg, 0.20 mmol) 및 DMAP (33 mg, 0.27 mmol)의 용액 내로 EDCHCl (42 mg, 0.27 mmol)를 첨가하였다. 12시간 후에, 수성 1*N* HCl 용액으로 혼합물을 세척하였고, MgSO4를 통해 유기층을 건조시켰으며, 진공에서 여과시키고 농축시켰다. 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 114 mg (83 % 수율)의 생성물을 수득하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.40 - 7.03 (m, 28H), 6.60 (d, J = 8.44 Hz, 2H), 4.59 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 2.36 Hz, 1H), 4.32 - 4.20 (m, 4H), 3.68 - 3.57 (m, 8H), 2.89 (t, J = 6.52 Hz, 1H), 2.84 (q, J = 6.32 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 6.72 Hz, 1H), 2.53 (t, J = 7.44 Hz, 2H), 2.45 (t, J = 2.28 Hz, 0.5H), 2.39 (t, J = 2.32 Hz, 0.5H), 2.33 - 2.28 (m, 2H), 1.90 - 1.85 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 14.34, 14.35, 22.89, 26.85, 26.89, 29.91, 29.94, 31.82, 33.65, 33.68, 34.13, 34.16, 36.74, 37.49, 37.51, 40.64, 40.68, 53.83, 53.86, 56.67, 62.21, 62.24, 66.36, 66.43, 75.62, 75.65, 75.72, 76.92, 76.94, 77.23, 77.26, 77.55, 112.46, 114.17, 114.38, 122.32, 122.44, 126.75, 126.93, 127.91, 128.28, 128.37, 128.55, 128.66, 128.88, 128.95, 129.92, 129.95, 131.22, 131.63 ppm. ESI-MS: $C_{60}H_{55}Cl_2NO_6S_2Na$ (M + Na+)에 대한 계산치 (calcd): 1042.27, $C_{60}H_{55}Cl_2NO_6S_2K$ (M + K+): 1058.25, 실측치 1042.20, 1056.20.

[0081] 화합물 1의 합성

[0082] DMF (5 ml) 중에서 화합물 2 (20 mg, 0.02 mmol), 화합물 7 (10 mg, 0.023 mmol), $CuSO4 \cdot 5H_2O$ (2.44 mg, 0.001 mmol), 및 아스코르빈산 나트륨 (2 mg, 0.001 mmol)을 혼합하였고, 그 다음에 아르곤 하 실온에서 4시간 동안 교반시켰다. 이 시점에서, 감압 하에서 휘발 성분들을 제거하였고 HPLC에 의해 반응 혼합물을 정제하여, 26 mg (91 % 수율)의 생성물을 수득하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.72 - 7.61 (m, 15H), 7.28 - 6.96 (m, 26H), 6.56 (d, J = 7.96 Hz, 2H), 5.05 (br.s, 2H), 4.55 - 4.16 (m, 8H), 3.64 - 3.53 (m, 8H), 2.90 - 2.77 (m, 4H), 2.65 (t, J = 6.36 Hz, 1H), 2.49 (t, J = 7.52 Hz, 2H), 2.29 - 2.24 (m, 2H), 2.20 - 2.17 (m, 2H), 1.86 - 1.82 (m, 2H), 1.62 - 1.46 (m, 8H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 14.35, 22.22, 22.50, 22.85, 24.27, 26.87, 29.62, 29.79, 29.89, 31.78, 33.65, 33.72, 34.11, 36.69, 36.76, 36.81, 37.32, 37.45, 40.79, 53.75, 62.21, 66.35, 112.33, 114.21, 117.92, 118.77, 122.02, 122.44, 124.82, 126.72, 127.87, 127.93, 128.27, 128.92, 128.98, 129.90, 130.59, 130.69, 130.81, 131.13, 131.59, 133.74, 133.84, 135.32, 135.35, 140.74, 141.22, 142.41, 143.26, 144.53, 148.10, 153.10, 155.32 ppm. ESI-MS: $C_{86}H_{84}Cl_2N_4O_8S_2P^+$ (M + H^+)에 대한 계산치 (calcd): 1465.48, 실측치 1466.95.

[0084] 인간의 정상세포 및 암세포

[0085] 인간 암세포계 (HCT-116, HeLa, LNCaP, 및 PC-3) 및 인간 정상 섬유아세포인 NHDF 세포를 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) 또는 Korea Cell Line Bank (Seoul, South Korea)로부터 구매하였다. 5% CO_2를 지닌 습한 분위기 하 37 ℃에서 10% 소태아 혈청 (FBS; Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)이 보충된 둘베코 수정 이글 배지 또는 Roswell Park Memorial Institute 1640에서 세포들을 유지시켰다. N-아세틸-L-시스테인 (NAC)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구매하였다.

[0087] 세포 성장 분석

[0088] 세포 성장을 측정하기 위해, 웰 당 0.8 x 10^5 세포의 농도로 세포들을 6-웰 플레이트 내에 3회 뿌렸고, 10% FBS의 존재하에 48시간 동안 유지시켰다. PBS로 세포들을 세척하였고, 화학적 화합물과 함께 10% FBS를 함유하는 배지를 첨가하였다. 24시간 배양 후에 혈구계산기를 사용하여 세포 개수를 계수하였다.

[0090] 세포 생존율 분석

[0091] MTT 분석을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 96-웰 마이크로플레이트에 웰 당 5 × 10^3의 농도로 세포들을 뿌렸고, 48시간 동안 안정시킨 후에, 합성된 화합물, 클로람부실, 또는 NAC에 노출시켰다. 배양 24시간 후에, 3시간 동안 PBS 중 20 μl/웰의 5 mg/ml 용액내로 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드를 첨가하였다. 50 μl/웰의 0.04 N HCl/이소프로필 알코올을 첨가함으로써 전환된 자색 포르마잔 염료의 용해화를 완료하였다. Bio-Rad 680 마이크로플레이트 판독기 (Bio-Rad)를 사용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 반응 생성물을 정량화하였다.

[0093] 세포사멸의 유동 세포 분석

[0094] 6-웰 플레이트에 0.8 x 10^5 세포의 농도로 세포들을 뿌렸고, 48시간 동안 10% 혈청을 지닌 배지에서 유지시켰다. PBS로 세포들을 2번 세척하였고, 10% FBS를 함유하는 배지 및 합성된 화합물을 첨가하였고 24시간 동안 배양하였다. 70% 에탄올로 세포들을 고정시켰고 50 μg/ml RNase 및 50 μg/ml 요오드화 프로피듐 (Sigma)을 함유하는 1 ml의 PBS 중에 재부유시켰다. FACScan 유동 세포 분석기 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 상에서 분석을 수행하였고, MultiCycle 소프트웨어 (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA)를 사용하여 서브-G1 부분을 분석하였다. 아넥신 V 분석을 위해, 동등하게 처리된 세포들을 트립신화하였고, 아넥신 VFITC (0.5 μg/ml) 및 요오드화 프로피듐으로 염색하였으며, FACScan 유동 세포 분석기를 사용하여 분석하였다.

[0096] siRNA 및 형질주입

[0097] 글루타티온 합성효소 (glutathione synthetase, GSS) (si-GSS: 5'-CAUCAAACAGGAUGACUUU-3')에 대한 짧은-간섭 RNA (siRNA) 이중가닥(duplexes) 및 음성 대조군인 siRNA 이중가닥을 Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA)에 의해 합성하였다. siRNA 또는 발현 플라스미드의 형질 주입을 Microporator™ (Neon transfection system, Invitrogen)을 사용하여 수행하였다. GSS 발현의 녹다운을 정량 RT-PCR 분석을 사용하여 확인하였다. 간단히 말하면, 무작위 헥사머 프라이머를 사용한 역전사 및 MoMuLV 역전사 (Invitrogen)에 의해 1 μg의 총 세포 RNA를 cDNA로 변환하였다. 1:4로 희석된 cDNA (12.5 ng per 50 μl of PCR) 및 *GSS* (센스; 5'-TCCAGCACCATCAAACAGGAT-3' 및 안티센스; 5'-ATCACATGGATGTTCCTGGC-3')에 대한 프라이머 및 내생적 발현 기준 유전자 *GAPDH*을 사용하여 35 사이클 동안 1.5 mM MgCl2-함유 반응 완충액 중에서 PCR을 수행하였다. 10 μl의 PCR 생성물을 2% (*wt/vol*) 아가로오스 겔 상에서 분해하였다.

[0099] 면역블롯팅 분석

[0100] 세포들을 아주 차가운 PBS 중에서 2번 세척하였고, 50 mM 트리스·HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% 소듐 디옥시콜레이트, 및 단백분해효소 억제제 혼합물을 함유하는 방사선 면역 촉진 분석 완충액에 용해시켰다. 초음파파쇄 후에, 용해물을 원심분리시켰고, 상청액을 회수하여 전기영동을 위해 8% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에 로딩하였다. 쪼개진 PARP에 대해 특이적인 항체 및 β-튜불린 (Santa Cruz Biotechnology)을 사용하여 면역블롯팅 분석을 수행하였다.

[0102] 공존 실험

[0103] HeLa 세포를 20 μM의 화합물 1 (PBS 중 0.4% DMSO, pH 7.4)과 함께 20분 동안 배양하였고, 그 다음에 10분 동안 0.5 μM의 Mito-tracker deep Red로 처리하였다. 세포를 식염수 (PBS, pH 7.4)로 3회 세척한 후에, 100x 오일 렌즈 (개구수 = 1.30)로 맞춰진 공초점 현미경 (Leica TCS SP2 모델)으로 세포 이미지들을 수득하였다. 화합물 1에 대한 형광 이미지는 740 nm에서의 이광자 여기 후 400-600 nm 범위에서 수득하였고, Mito-tracker deep Red에 대한 형광 이미지는 630 nm에서의 여기에 따라 650-700 nm에서 수득하였다.

[0105] 세포 형광 강도 측정

[0106] 웰 당 0.8 x 10^5 세포 밀도로 6-웰 플레이트에 NHDF 및 PC3 세포들을 뿌렸고 10% FBS의 존재하에서 24시간 동안 유지시켰다. 세포들을 PBS로 2회 세척하였고, 10% FBS를 함유하는 배지를 화합물 1과 함께 첨가하였다. 24시간 배양 후에, 평평하고 검정색인 밑부분을 지닌 96-웰 블랙 플레이트에서 350 nm의 여기 파장 및 460 nm의 방출 파장에서 SpectraMAX I3x (Molecular devices)에 의해 트립신화된 세포의 형광 강도를 측정하였다.

[0108] **결과 및 고찰**

[0109] 본 발명에서는 DNA 가교제인 클로람부실 및 미토콘드리아 표적화된 응집 유발 발광 형광단을 함유하는, 신규의 조합 전구약물인 [화학식 1]로 표시되는 화합물(화합물 1)을 포함하는 미토콘드리아 특이적 항암 치료진단제를 제공한다.

[0110] 약물 컨쥬게이트의 악성종양-의존성 효능은 GSH 대 비악성 세포의 증가된 세포내 농도를 나타내는, 암세포에서 특이적 약물 활성화가 입증된, 글루타티온 (GSH)-절단 가능한 링커를 포함함으로써 더욱 향상되었다(O. W. Griffith, Free Radical Biol. Med., 1999, 27, 922.935.). 항산화제로서 GSH는 미토콘드리아 손상 및 세포 사멸을 발생시키는 반응성 산소종 (ROS)을 스캐빈징 (scavenging)함으로써 정상적인 생리적 조건하에서 중요한 역할을 한다. 하지만, 암세포에서 GSH의 상승은 암의 초기 및 말기 상태에 대해 성장 이점 및 화학요법 내성을 부여한다(N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, B. Marengo, A. L. Furfaro, M. A. Pronzato, U. M. Marinari and C. Domenicotti, Oxid. Med. Cell. Longevity, 2013, 2013, 972913.).

[0111] 본 발명에 따른 화합물 1은 상기 [합성 경로]에 따라 합성하였다. 구체적으로, *o*-페놀-결합된 테트라페닐 유도

체 5(화합물 5)를 대응되는 디아릴케톤의 McMurry 커플링에 이은 2-하이드록시페닐보론산과의 Suzuki 반응을 통해 합성하였다. 스캐폴드는 그 다음에 프로파르길 브로마이드와의 Williamson 에테르 합성에 따라 프로파르길기와 결합되어, 중간체 4(화합물 4)를 생성하였다. 포스겐의 존재하에 2,2-디티오에탄올과의 축합반응에 이어 클로람부실과의 EDC (1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드) 커플링을 통해 중간체 2(화합물 2)를 생성하였다. 최종적으로, 아자이드 결합된 트리페닐포스포늄 모이어티 (화합물 7)와의 구리 촉매화된 "클릭" 반응을 사용하여 표적화 기를 첨가하였고, 최종적으로 본 발명에 따른 화합물 1을 합성하였다. 모든 신규의 화합물들 (화합물 1-4 및 7)을 ^{1}H 및 ^{13}C 핵자기 공명 (NMR) 분광법 및 전기분무 이온화 질량 분석법 (ESI-MS)에 의해 특성화하였다.

[0112] 광물리적 특성, 글루타티온의 존재하의 반응성 및 화합물 1의 안정성을 조사하였고, 그 결과를 하기 도 1에 나타내었다. 약물 컨쥬게이트는 MeOH 중 UV/Vis 스펙트럼에서 대략 320 nm에서 최대 흡광도를 나타낸반면 (도 1a), 이러한 조건하에서 형광성은 탐지되지 않았다 (도 1b). 물의 양이 증가함에 따라, 형광성이 확연히 증가하여 대략 490 nm 주위의 형광 스펙트럼을 나타내었다. 물의 양이 증가하는 경우 형광성이 증가하는 것은 응집 유발 발광 효과를 명백히 나타내는 것이다(W. S. Shin, M.-G. Lee, P. Verwilst, J. H. Lee, S.-G. Chi and J. S. Kim, Chem. Sci., 2016, 7, 6050.6059.).

[0113] 과량의 글루타티온의 첨가에 따라, HPLC 크로마토그램 (도 1c)은 60분 후 약물의 거의 완전한 활성화를 명확히 나타내었고, 16분의 체류 시간 후에 피크가 사라졌다. GSH를 첨가하면, 화합물 10 뿐만 아니라 클로람부실 (체류 시간 14.7분)의 이 방출되어 18.5분의 체류시간을 나타내었다(데이터 미도시).

[0114] 중요하게도, 화합물 1은 6시간 후 용액에서 분해의 징조가 없는, 첨가된 티올의 부재하에서 명확한 안정성을 나타내었다(도 1d).

[0115] 화합물 1을 상이한 GSH 수준을 갖는 2개의 세포주에 첨가하였으며, 그 결과 정상 NHDF 세포들은 낮은 세포내 GSH 함량을 나타낸 반면, PC3 암세포주에서는 이 트리펩타이드가 높은 세포 내 농도를 나타내었다. GSH의 세포내 농도는 화합물 1-로딩된 세포에 대해 관찰되는 형광성에 의해 반영되고, PC3 세포에서 현저히 향상된 형광성을 명확하게 보여준다 (도 5).

[0116] 화합물 1의 세포독성 효과를 평가하기 위해, 2개의 인간 암세포주 (HCT116; 대장암, HeLa; 자궁경부암)를 화합물 1의 투여량을 증가시키면서 처리하였고, 세포 성장 및 세포 생존율을 세포 계수 및 MTT 분석에 의해 측정하였다. 화합물 1 처리로 인해 세포 수가 감소하는 양상을 보였으며, 시험된 모든 투여량 범위 (도 2a 및 b)에서 클로람부실에 비교하여 보다 급격한 효과를 나타내었다. 일관되게, MTT 분석은 화합물 1이 세포 생존율을 크게 감소시키고, 클로람부실보다 훨씬 높은 세포독성 효과를 유발한다는 것을 확인하였다(도 2c 및 d). 트리페닐포스포늄 표적화 기를 갖고 있지 않은 중간체(화합물 2)를 대조예로 사용하였고, 둘 모두의 암세포의 생존율은 약간 감소함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 본 발명에 따른 화합물 1이 클로람부실보다 더 강한 세포독성 효과를 가지며, 이러한 효과가 미토콘드리아-표적화 모이어티에 의존한다는 것을 확인하였다.

[0117] NHDF (저 GSH)와 PC3 (고 GSH) 세포에서 20 μM 농도의 여러 대조 화합물과 함께 화합물 1의 세포 독성을 측정하였다(도 6). 본 발명에 따른 화합물 1은 병리학적 차등 독성(pathology associated differential toxicity)을 나타내는 유일한 분자이다. 화합물 2 및 클로람부실은 이러한 농도에서 유의적인 독성을 나타내지 못한 반면, GSH 트리거가 없는 화합물 11은 이 분자에 대한 이전의 독성 데이터와 일치하게, 보편적으로 독성을 나타내었다(W. S. Shin, M.-G. Lee, P. Verwilst, J. H. Lee, S.-G. Chi and J. S. Kim, Chem. Sci., 2016, 7, 6050.6059.).

[0118] 다음으로, 화합물 1의 GSH-관련 세포독성을 조사하였다. HeLa 세포에서 GSH 유도인자로서 N-아세틸-L-시스테인 (NAC)를 사용하였다. 화합물 1의 세포독성 효과는 NAC와의 사전-배양에 의해 현저하게 증가한 반면, (화합물 1의 부존재 하에서) NAC 그 자체는 오히려 세포 생존율을 향상시켰다 (도 3a). 다음으로, NAC의 부존재 및 존재하에서 정상 세포 (NHDFs; 인간의 정상 섬유아세포)의 생존율에 대해 미치는 영향을 비교하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 화합물 1은 HeLa 암세포와 비교하여, 정상 세포에서 유의하게 덜 효능이 있었지만; NAC의 첨가는 독성의 현저한 증가를 가져왔다. 이러한 결과들은 비-암세포가 다수의 암세포보다 훨씬 작은 세포내 GSH 농도를 나타내는 것으로 알려져 있는 종래 보고된 결과와 일치하였지만(O. W. Griffith, Free Radical Biol. Med., 1999, 27, 922.935.), NAC를 보충하면 차동 GSH 농도가 제거되어 약물 접합체(화합물 1)에 대한 NHDF 세포의 민감성이 크게 증가함을 확인하였다.

[0119] GSH 생합성에 포함된 중요한 효소인 글루타티온 합성효소 (GSS)의 짧은 간섭 (si) RNA-매개된 녹다운

(knockdown)을 사용하여 독성에 대한 GSH 의존성을 추가로 연구하였다. GSS 발현의 녹다운은 GSS mRNA 수준의 RT-PCR 분석을 통해 확인하였다(도 3c 삽도). 이전 결과에 따르면, HeLa 세포에서 화합물 1의 세포독성 효과는 GSS 결핍에 의해 약화되었다(도 3c).

[0120] 2개의 인간 전립선 세포계 (PC3 및 LNCaP)를 사용하여 GSH-의존성 세포독성을 입증하기 위한 최종 실험을 수행하였는데, 이는 각각 상대적으로 높고 낮은 세포내 GSH 수준을 나타내었다(H.-W. Lim, S. Hong, W. Jin, S. Lim, S.-J. Kim, H.-J. Kang, E.-H. Park, K. Ahn and C.-J. Lim, Exp. Mol. Med., 2005, 37, 497.506.). 예상된바와 같이, PC3 vs. LNCaP 세포에서 훨씬 강한 효과가 관찰되었다 (도 3d). 이러한 결과들은 화합물 1이 GSH-의존적 방식으로 세포독성 효과를 발휘한다는 것을 명확하게 입증한다.

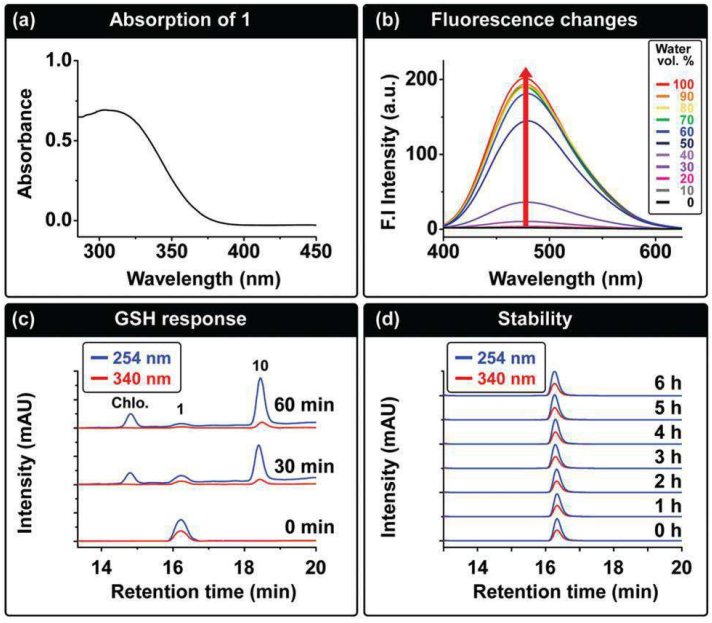
[0121] 미토콘드리아 기능장애 및 DNA 손상은 세포 사멸을 촉발시켜 비정상적으로 손상된 세포를 제거한다. 첫째로, AIE 염료의 미토콘드리아 국소화(localization)를 공초점 현미경을 사용하여 확인하였는데, 이는 MitoTracker 염료와의 현저한 중첩을 나타내는 것이다(도 7). 둘째로, 화합물 1이 세포 사멸을 유발하는지를 조사하기 위해, 아넥신 V 발현 및 세포사멸 서브-G1 부분의 유동 세포측정 분석을 수행하였다. 도 4a 및 b에 나타나는 바와 같이, 아넥신 V-양성 세포 숫자 및 서브-G1 분획 모두 화합물 1 처리에 의해 실질적으로 증가되었지만, 화합물 2 처리된 세포에서는 검출 가능한 변화가 나타나지 않았다. 이와 일치하게, 면역블롯 분석은 화합물 1의 처리가 세포사멸 유발에 대한 대리 마커(surrogate marker)인 PARP 절단을 강력하게 유도함을 보여준 반면, 화합물 2는 검출한 만한 효과를 나타내지 않았다(도 4c). 따라서, 이러한 결과들은 화합물 1의 세포독성 효과가 그의 세포사멸-유도 활성으로부터 기인함을 뒷받침한다.

[0122] 미토콘드리아 알킬화 DNA 손상 및 AIE 염료에 의한 미토콘드리아 막 파괴가 모두 ROS 생성을 증가시킨다고 알려져 있으므로(M. Millard, J. D. Gallagher, B. Z. Olenyuk and N. Neamati, J. Med. Chem., 2013, 56, 9170.9179., Q.Hu,M. Gao, G. Feng andB.Liu, Angew. Chem., Int. Ed., 2014, 51, 14225.), 본 발명자들은 막 손상에 따른 미토콘드리아 기질 내로의 GSH 전좌(translocation)의 감소와 함께, 미토콘드리아 ROS 생성의 증가가 시토졸 내로의 시토크롬 c의 방출 초래하여 내재성 경로를 통해 세포 사멸을 개시한다고 가정하였다.

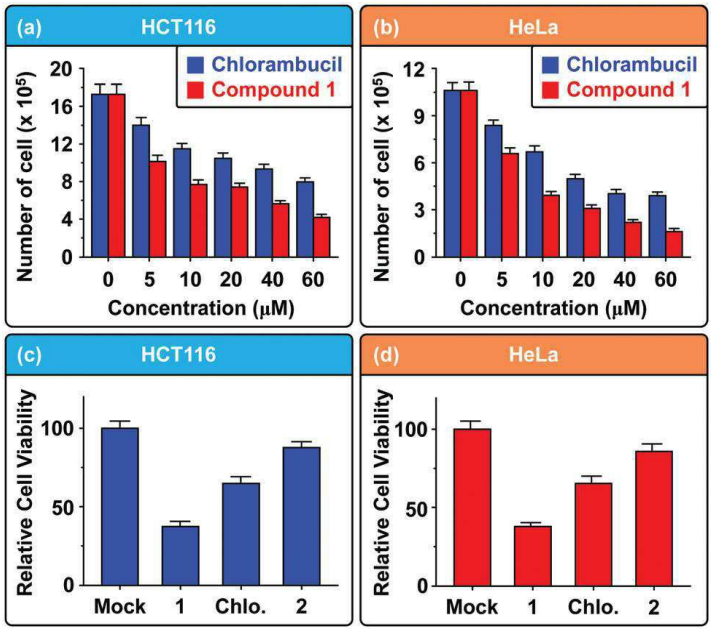
[0123] 요약하면, 본 발명에서는 고도의 GSH-의존적인 방식으로 세포 사멸을 유도하는 새로운 항암 치료진단제인 화합물 1을 제공한다. 암세포에서 관찰된 차등 GSH 발현(differential GSH expression) 수준을 고려하면, 세포내 GSH에 의해 활성화되는 신규의 약물을 발전시키려는 연구는 암 화학요법에 대한 확연한 이점과 함께, 현저한 선택성을 제공하여야 한다. 이러한 관점에서, 본 발명에 따른 화합물 1은 미토콘드리아 기능장애, DNA 손상 및 차후의 세포사멸을 유발함으로써 자연적으로 높은 GSH-발현하는 암세포에 선택적인 세포독성 효과를 유도한다.

도면

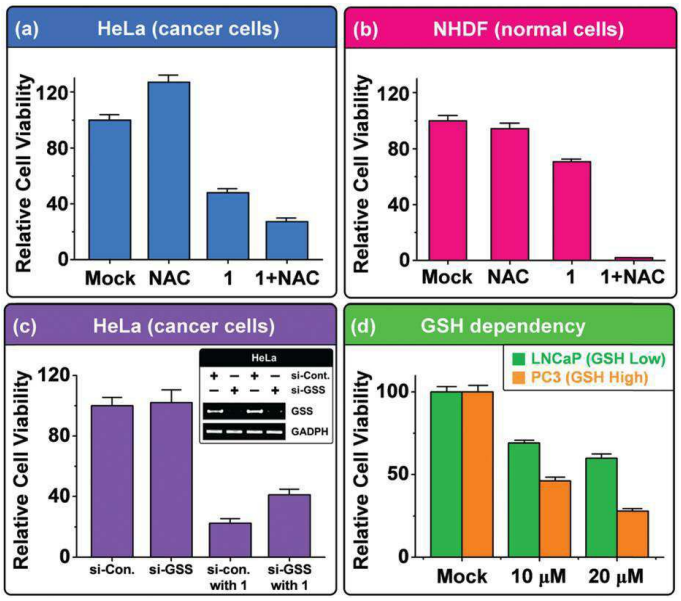
도면1



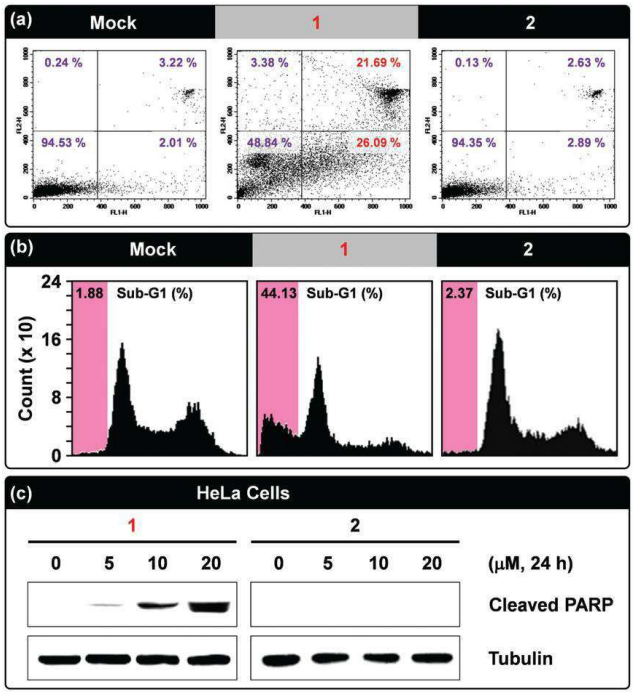
도면2


(a) HCT116
Chlorambucil
Compound 1
Number of cell (x 10⁵)
20
16
12
8
4
0
0 5 10 20 40 60
Concentration (μM)
(b) HeLa
Chlorambucil
Compound 1
Number of cell (x 10⁵)
12
9
6
3
0
0 5 10 20 40 60
Concentration (μM)
(c) HCT116
Relative Cell Viability
100
50
0
Mock 1 Chlo. 2
(d) HeLa
Relative Cell Viability
100
50
0
Mock 1 Chlo. 2

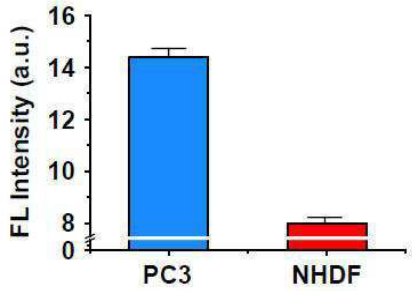
도면3


(a) HeLa (cancer cells)
Relative Cell Viability
120
80
40
0
Mock NAC 1 1+NAC
(b) NHDF (normal cells)
Relative Cell Viability
120
80
40
0
Mock NAC 1 1+NAC
(c) HeLa (cancer cells)
Relative Cell Viability
120
80
40
0
HeLa
si-Cont.
si-GSS
GSS
GADPH
si-Con.
si-GSS
si-con. with 1
si-GSS with 1
(d) GSH dependency
LNCaP (GSH Low)
PC3 (GSH High)
Relative Cell Viability
100
50
0
Mock 10 μM 20 μM

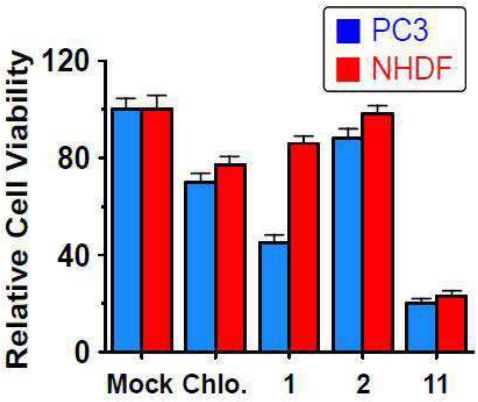
도면4


(a)
Mock
1
2
0.24 %
3.22 %
94.53 %
2.01 %
3.38 %
21.69 %
48.84 %
26.09 %
0.13 %
2.63 %
94.35 %
2.89 %
(b)
Mock
1
2
Count (x 10)
24
16
8
0
1.88 Sub-G1 (%)
44.13 Sub-G1 (%)
2.37 Sub-G1 (%)
(c)
HeLa Cells
1
2
0 5 10 20
0 5 10 20
(μM, 24 h)
Cleaved PARP
Tubulin

도면5


FL Intensity (a.u.)
16
14
12
10
8
0
PC3
NHDF

도면6


PC3
NHDF
Relative Cell Viability
120
80
40
0
Mock
Chlo.
1
2
11

도면7

