

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0032453
(43) 공개일자 2020년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C09K 11/06 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C09K 11/06 (2013.01)

A61K 49/0021 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0111503

(22) 출원일자 2018년09월18일

심사청구일자 2018년09월18일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

호지팅

서울특별시 성동구 사근동10가길 16-5

고경필

경기도 의왕시 포일세거리로 96, 502동 704호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열

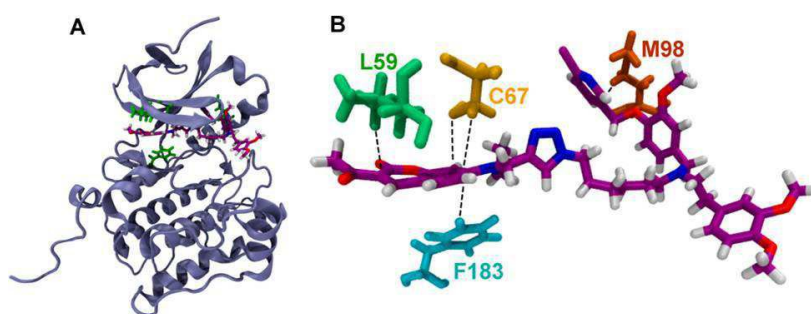
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 암 세포를 표적화하기 위한 PLK 선택적 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 PLK 검출용 형광 센서

(57) 요약

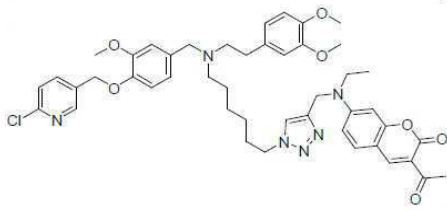
본 발명은 하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 암 세포를 표적화하기 위한 PLK 선택적 형광 프로브 화합물 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1

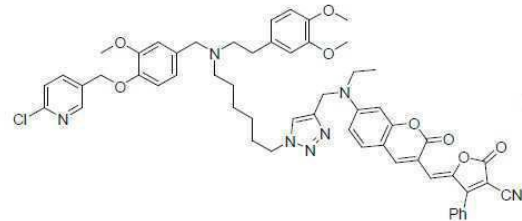


합물 및 이를 포함하는 PLK 검출용 형광 센서에 관한 것이다:

[화학식 1]



[화학식 2]



(52) CPC특허분류

C07D 405/14 (2013.01)

G01N 33/57492 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

C09K 2211/1062 (2013.01)

(72) 발명자

임문수

서울특별시 성동구 돌레9나길 26-7, 102호

피터 베르비스트

서울특별시 성북구 안암로 87, 202호

구세영

서울특별시 양천구 목동동로 130, 1401동 1103호

지성길

경기도 고양시 일산서구 대화2로 68, 206동 1202호

김중승

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

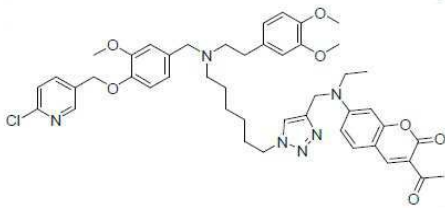
명세서

청구범위

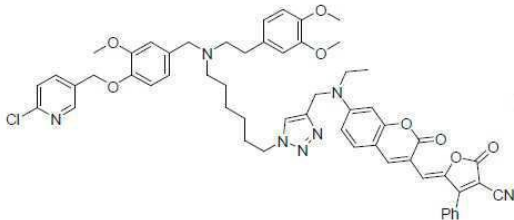
청구항 1

하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 암 세포를 표적화하기 위한 PLK 선택적 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PLK는 PLK1인 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 PLK 검출용 형광 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 세포를 표적화하기 위한 폴로 유사 키나아제(Polo-like kinase, PLK) 선택적 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 PLK 검출용 형광 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 선택적이고 효율적으로 암세포를 사멸시키는 정밀 치료법은 암 치료에 있어 유망한 기술이지만, 병든 세포와 정상 세포 간의 구별을 위한 강력한 이미징 장치를 필요로 한다(비특허문헌 1). 보조적 화학요법을 수반하는 수술적 절제법은 종양 치료에 있어 현재 가장 널리 사용되고 있는 방법이다. 그러나, 종양이 완전하게 제거되지 않는 경우 발생하는 종양 재발은 생존율을 계속 감소시킨다. 따라서, 종양 치료에 있어 종양 절제의 정밀성은 매우 중요하다. 이와 관련하여, 종양 조직의 시각화를 가능하게 하는 종양 조영제(imaging agent)의 사용은 완전한 종양 제거의 기회를 크게 증가시킬 수 있다. 이상적인 종양 조영제는 암 인지 및 정상 구조 보존, 높은 신호 대 바탕비(signal background ratio, SBR)(비특허문헌 2) 등 2 가지 기준을 만족해야 한다. 이용 가능한 이미징 양식 중에서, 고감도, 시공간적 해상도 및 선택적 종양 조직 인식과의 융통성을 결합한 스마트 이미징 체계에 대한 관심이 증대되고 있다(비특허문헌 3).

[0003] 일반적으로, 종양-표적 이미징을 위한 광화학적 프로브는 활성 기반 프로브(activity-based probe)와 친화성 기반 프로브(affinity based probe)로 분류될 수 있다. 활성 기반 프로브는 효소와 연관된 특정 질병에 선택적으로 활성화되어 형광 리포터(reporter)를 방출시킴으로써, 높은 SBR을 가능케 한다. 그러나, 활성 기반 프로브의 설계 및 변경은 대개 복잡하며, 복잡하게 엮힌 생물학적 미세환경으로부터 발생가능한 잠재적인 간섭으로 인해 형광 변화 또한 불확실하다. 대조적으로, 친화성 기반 프로브는 대개 상시적 형광단 및 표적 단백질, 또는 암세포에서 상향조절된 막-결합 수용체로 설계된다. 이러한 전략을 이용하는 최근의 인비보 형광 프로브들은 엽산 수용체(비특허문헌 4), 인테그린 수용체(비특허문헌 5), 전립선-특정 막 항원(비특허문헌 6) 및 사이클로옥시제나아제-2 효소(비특허문헌 7)에 집중되었다. 친화성 기반 프로브가 활성 기반 프로브보다 제조하는데 용이할지라도, 조직이 없다면 응용이 제한된다. 특히, 종양 이질성과 비결합 탐침자로부터 발생하는 증가된 배경 신호로 인한, 표적 수용체의 불균일 발현은 이러한 방법론의 주된 제한사항이다. 비결합 프로브의 형광의 결과로서 발생한 배경 신호는 제거하기가 어려운 반면에, 다양한 종양에서 보다 넓고 이상적으로 보편적인 발현을 지닌 신규 표적의 사용은 친화성 기반 탐침자의 응용가능성을 증가시키는 요인이 될 수 있다. 따라서, 종양의 선택적 이미징을 위한 신규 표적을 개발하는 것이 시급한 실정이다.

[0004] 세린/트레오닌 서브 패밀린 폴로 유사 키나아제(Polo-like kinase, PLK)는 PLK1 내지 PLK5로 구성되어 있다. PLK는 세포 주기, 분화의 과정뿐만 아니라 세포 사멸 및 생존과 관련된 수많은 일들을 제어한다(비특허문헌 8). 특히, PLK1은 유사분열과 관련된 여러 과정에 관여하며, 세포 분열 동안 현저하게 발현되며(비특허문헌 9), 또한, 세포 분열의 핵심 인자로서 세포의 악성 형질 전화에 관여하는 것으로 여겨진다(비특허문헌 10). 또한, 대다수의 암들은 증가된 수준의 PLK1을 나타내며, 이를 통해 이러한 키나아제가 예후징후 표지자로서 잠재적인 응용가능성을 지닌 암 유발 유전자로 간주되어 왔다(비특허문헌 11). 따라서, PLK1을 비롯한 PLK의 형광 이미징은 표지자의 가시화를 통해 의심되는 악성 세포의 식별을 가능케 할 수 있다. 그러나, PLK-표적 종양 이미징의 예는 거의 드물고, 합성 염료로 PLK를 도입하여 작은 형광 표지를 사용한 예도 보고된 바 없다. 합성 용이성, 비면역적 특성 및 빠른 표적 인식의 관점에서, PLK를 표적하는 소분자-기반 프로브는 현재 사용되는 방법들 대비 상당한 이점을 가질 것으로 예상된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Garland, M.; Yim, J. J.; Bogoy, M. A bright future for precision medicine: advances in fluorescent chemical probe design and their clinical application. *Cell Chem. Biol.* 2016, 23, 122-136.
- (비특허문헌 0002) Nguyen, Q. T.; Tsien, R. Y. Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation-a new cutting edge. *Nat. Rev. Cancer* 2013, 13, 653-662.
- (비특허문헌 0003) Srinivasarao, M.; Galliford, C. V.; Low, P. S. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2015, 14, 203-219.
- (비특허문헌 0004) van Dam, G. M.; Themelis, G.; Crane, L. M.; Harlaar, N. J.; Pleijhuis, R. G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J. S.; Arts, H. J.; van der Zee, A. G.; Bart, J.; Low, P. S.; Ntziachristos, V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat. Med.* 2011, 17, 1315-1319.
- (비특허문헌 0005) Choi, H. S.; Gibbs, S. L.; Lee, J. H.; Kim, S. H.; Ashitate, Y.; Liu, F.; Hyun, H.; Park, G.; Xie, Y.; Bae, S.; Henary, M.; Frangioni, J. V. Targeted zwitterionic near-infrared fluorophores for improved optical imaging. *Nat. Biotechnol.* 2013, 31, 148-153.
- (비특허문헌 0006) Wang, X.; Huang, S. S.; Heston, W. D.; Guo, H.; Wang, B. C.; Basilion, J. P. Development of targeted near-infrared imaging agents for prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2014, 13, 2595-2606.
- (비특허문헌 0007) Uddin, M. J.; Crews, B. C.; Blobaum, A. L.; Kingsley, P. J.; Gorden, D. L.; McIntyre, J. O.; Matrisian, L. M.; Subbaramaiah, K.; Dannenberg, A. J.; Piston, D. W.; Marnett, L. J. Selective visualization of cyclooxygenase-2 in inflammation and cancer by targeted fluorescent imaging

agents. Cancer Res. 2010, 70, 3618-3627.

(비특허문헌 0008) Strebhardt, K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. Nat. Rev. Drug Discovery 2010, 9, 643-660.

(비특허문헌 0009) McInnes, C.; Wyatt, M. D. PLK1 as an oncology target: current status and future potential. Drug Discovery Today 2011, 16, 619-625.

(비특허문헌 0010) Lee, K. S.; Burke, T. R., Jr.; Park, J.-E.; Bang, J. K.; Lee, E. Recent advances and new strategies in targeting Plk1 for anticancer therapy. Trends Pharmacol. Sci. 2015, 36, 858-877.

(비특허문헌 0011) Takai, N.; Hamanaka, R.; Yoshimatsu, Y.; Miyakawa, I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. Oncogene 2005, 24, 287-291.

발명의 내용

해결하려는 과제

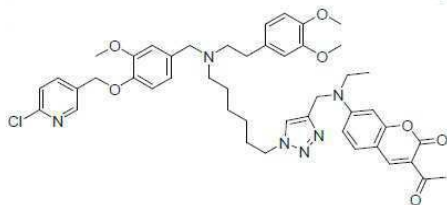
[0006] 본 발명에서는 암세포에 과발현된 PLK를 선택적으로 감지할 수 있는 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 PLK 검출용 형광 센서를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

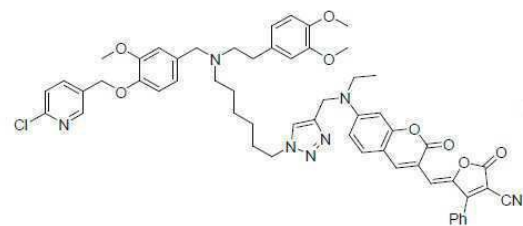
[0008] 하기 [화합식 1] 또는 [화합식 2]로 표시되는 암 세포를 표적화하기 위한 PLK 선택적 형광 프로브 화합물을 제공한다:

[0009] [화합식 1]



[0010]

[0011] [화합식 2]



[0012]

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 PLK는 PLK1일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 PLK1 검출용 형광 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물은 PLK에 대해서 고선택적으로 반응하며, 우수한 광물리적 특성과 낮은 세포 독성을 가지고 있어 암세포의 PLK1를 선택적으로 감지함으로써 종양을 효과적으로 이미징할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 본 발명의 [화학식 1]로 표시되는 화합물(프로브 1)의 구조(A) 및 PLK1 결합 부위(B)를 나타낸 도면이다.

도 2는 인간 세포에서 프로브 1의 PLK1-관련 형광 이미지 결과를 나타낸 것이다. (A)는 5 개의 인간 세포주에서의 PLK1 레벨을 나타낸다. 항-PLK1 항체를 사용하여 면역블롯분석법을 수행하였다. 튜불린을 로딩 대조군 (loading control)으로 사용하였다. (B)는 프로브 1 또는 11 처리된 세포의 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 세포를 20시간 동안 20 μ M의 프로브 1 또는 11과 함께 배양하였다(스케일 바 : 20 μ m, 배율 : 200 배). (C)는 프로브 1 처리된 세포의 상대 형광 강도를 나타낸다. 480 nm에서 형광 방출을 측정하였다. (D)는 HCT116에서 프로브 1과 PLK1의 공동-편재화(Colocalization)를 나타낸 것이다. 항-PLK1항체(적색), 프로브 1(녹색) 및 DAPI (청색)으로 세포를 염색하였다. 막대그래프는 3회 측정값들의 평균 및 SD를 나타낸다. DIC: 미분간섭 관찰법 (differential interface contrast). (스케일 바 : 20 μ m, 배율 : 400 배)

도 3은 프로브 1의 PLK1-의존 형광 반응 결과를 나타낸 것이다. (A)는 노코다졸 처리 후 PLK1 발현에 대한 면역 블롯분석 결과를 나타낸다. (B)에서는 HCT116 세포를 노코다졸에 사전-노출시키고(50 ng/mL, 15시간), 프로브 1 또는 11과 함께 배양하였다(1 μ M, 3 h). PC: 위상 대조. (스케일 바: 20 μ m, 배율: 200 배) (C)는 세포에서 노코다졸 투여량에 따른 프로브 1의 형광 강도를 나타낸다. 화합물 11은 음성 대조군으로 사용하였다. (D) HCT116 세포에서 si-PLK1-매개 PLK1 녹다운의 면역블록 분석 결과를 나타낸다. (E)에서는 si-PLK1 (4 μ M) 또는 대조군 si-RNA로 감염된 HCT116 세포를 프로브 1과 함께 배양하였다 (1 μ M, 3 시간). (스케일 바: 20 μ m, 배율: 200 배) (F)는 프로브 1의 si-PLK1 투여량-관련 형광 감소를 나타낸다. 막대그래프는 3회 측정값들의 평균 및 SD를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 [화학식 2]로 표시되는 화합물(프로브 2)의 구조(A) 및 PBS에서의 정규화된 흡수 및 방출 스펙트럼(B)을 나타낸다.

도 5는 프로브 2의 인비보 형광 이미징에 대한 마우스 종양 이중이식 분석 결과를 나타낸다. (A)는 DMSO(좌측) 및 노코다졸(우측)로 사전 처리된 프로브 2가 주입된 마우스에 관한 HCT116-이종이식 종양 백색광(상부) 및 형광(하부) 이미지이다. (B)는 프로브 2-주입 종양-관련 마우스의 절개된 기관과 종양을 나타낸 형광 이미지이다. (C)는 프로브 2-주입 종양-관련 마우스의 절단된 기관 조직 및 종양의 형광 강도에 대한 정량화 결과를 나타낸다. (D)는 종양 무게에 대한 형광 측정 결과를 나타낸다. 막대그래프는 3회 측정값들의 평균 및 SD를 나타낸다. $\lambda_{ex} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 660 \text{ nm}$.

도 6은 PBS (10 mM, pH = 7.4) 중 프로브 1 (10 μ M)의 정규화된 흡수 및 방출 스펙트럼이다.

도 7은 프로브 1(5 μ M)의 형광을 향한 다른 생물 종으로부터의 간섭을 나타낸 것이다. $[M]^{n+} = 100 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{GSH}] = 4 \text{ mM}$, $[\text{Cys}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ } \mu\text{M}$.

도 8은 480nm에서의 시간에 따른 프로브 1의 형광 강도 변화를 나타낸 것이다.

도 9는 HeLa 세포에서 프로브 1 (5 μ M)의 공초점 형광 이미징 결과를 나타낸 것이다. (a)는 형광 이미지; (b)는 명시야 이미지. 30 분 배양 후 세포를 이미지화 하였다. Ex: 458 nm; Em: 465-510 nm.

도 10은 프로브 1이 세포 생존물에 미치는 효과를 나타낸 결과이다. 세포를 프로브 1로 처리하고 WST-1 분석을 사용하여 세포 생존물을 측정 하였다. 막대는 triplicate assay의 평균과 SD를 나타낸다.

도 11의 (A)는 프로브 2 및 PLK1의 구조, (B)는 결합 부위를 나타내고, (C)는 PLK1의 각 잔기와 프로브 1 간의 결합 자유 에너지(Binding free energy), (D)는 PLK1의 각 잔기와 프로브 2 간의 결합 자유 에너지를 나타낸 것이다.

도 12는 프로브 2(5 μ M)의 형광을 향한 다른 생물 종으로부터의 간섭을 나타낸 것이다. $[M]^{n+} = 100 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{GSH}] = 4 \text{ mM}$, $[\text{Cys}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ } \mu\text{M}$.

도 13은 660nm에서의 시간에 따른 프로브 2의 형광 강도 변화를 나타낸 것이다.

도 14의 (A)는 프로브 2 처리된 세포의 형광 현미경 이미지이다. 세포를 5 μ M의 probe 2 또는 화합물 16과 함께 24 시간 동안 배양하였다. (B)는 프로브 2가 세포 생존물에 미치는 효과를 나타낸 결과이다. HCT116 세포를 표시된 시간 동안 증가된 양의 프로브 2로 처리하고 WST-1 분석을 통해 세포 생존물을 측정하였다. 막대는 triplicate assay의 평균과 SD를 나타낸다. (C)는 프로브 2 처리된 세포에서의 형광 강도를 측정한 결과이다.

형광 방출은 파장 660nm에서 측정하였다.

도 15는 프로브 2의 PLK1-의존 형광 반응 결과를 나타낸 것이다. (A)는 노코다졸에 의한 PLK1 유도를 나타내는 면역블롯분석 결과를 나타낸다. HCT116 세포를 노코다졸 (50 ng/ml)로 12 시간 처리하였다. (B) 와 (C)는 프로브 2의 형광에 노코다졸이 미치는 효과를 나타낸다. HCT116 세포를 노코다졸에 미리 노출시키고 프로브 2 또는 화합물 16 (1 μ M, 3h)으로 항온 배양하였다. PC: 위상 대조. (D)는 HCT116 세포에서 si-PLK1 형질 감염에 의한 PLK1 knockdown을 나타내는 면역블롯분석 결과를 나타낸다. (E)는 프로브 2의 형광에 대한 PLK1 고갈의 효과를 나타낸다. si-PLK1 (4 μ M)으로 형질 감염된 HCT116 세포를 프로브 2 또는 16 (1 μ M, 3 h)으로 항온 배양하였다. (F) 프로브 2의 si-PLK1 용량-관련 형광 감소를 나타낸다. 화합물 16을 음성 대조군으로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0018] 실험 방법

[0019] 합성을 위한 재료 및 방법

[0020] 모든 반응물 및 용매는 Alfa-Aesar, Sigma-Aldrich, TCI, Carbosynth, 덕산 및 Acros에서 구매하였으며 추가적인 정제없이 사용하였다. 실리카겔 60 (Merck, 0.040-0.063 mm)을 컬럼 크로마토그래피에 사용하고 Merck 60 F254 실리카겔 플레이트를 분석 박층 크로마토그래피에 사용하였다. NMR 스펙트럼은 300 또는 400 MHz Varian NMR 분광기를 이용하여 측정하였다.

[0022] 도킹 및 분자 동역학 시뮬레이션(Docking and Molecular Dynamics simulations)

[0023] PLK1 구조는 Protein Data Bank (PDB ID : 2u71)에서 입수하였다. 0.2 Å 간격으로 약물특이분자단 (pharmacophores)을 덮기 위해 0.2 Å 간격의 그리드 박스를 구성하였다. Lamarckian 유전 알고리즘을 사용하여 도킹 매개 변수를 Autodock 4.2 및 AutodockTools 1.5.62에 의해 각 사이클에 대해 50회 실행 및 2,500,000 회 에너지 평가로 설정하였다. 가장 낮은 결합 에너지를 갖는 10개의 구조는 추가의 분자 역학 (molecular dynamics, MD) 시뮬레이션을 위해 획득하였다. 프로브의 포스필드(force field)는 Gaussian 093을 사용하여 6-31 + G* 기본 세트와 기능적인 M06 교환을 사용하는 밀도 함수 이론 (DFT) 계산을 통해 생성하였다. MD 시뮬레이션에서 ff14SB 및 Tip3p 워터 모델을 사용하여 Amber14 패키지의 각 프로브에 대해 10개의 독립적인 MD 시뮬레이션을 수행하였다(Case, D. A.; Babin, V.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cai, Q.; Cerutti, D. S.; Cheatham III, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Gohlke, H.; *et al.* AMBER14, University of California: San Francisco, 2014.).수소를 포함한 결합을 제한하기 위해 SHAKE 알고리즘을 적용하였다. 장거리 정전기 (long-range electrostatics)는 입자-매쉬 Ewald 합산 방법을 사용하여 획득하였다. 비결합 컷오프 값은 12 Å 로 설정되었다. 시스템과 박스 가장자리 사이의 거리는 12 Å 이상이였다. 온도는 커플링 상수가 1.0 ps인 Langevin 서모 스탯으로 조절하였고, 압력은 커플링 상수 2.0 ps로 Berendsen barostat에 의해 제어하였으며, 시간 간격은 1.0 ps로 설정하였다. 구조적 제한 (단백질 및 프로브) 및 에너지 최소화 상태에서 10000 steps를 수행하였다. 그런 다음 시스템을 구조적 제한 하에서 500 ps 동안 0K에서 298.15K로 천천히 가열하였다. 다른 500 ps에서는 구조적 제한 하에서 압력 제어를 통해 시뮬레이션하였다. 마지막으로, 30 ns MD 궤도는 Zn²⁺ 결합 사이트에서 거리 제한 (distance restraint)이 된 경우에만 수집하였다. 평형 후에는 결합 자유 에너지 계산에 마지막 20 ns의 평형 궤적만 사용되었다. 결합 자유 에너지는 분자 역학 일반화된 표면적 (the molecular mechanics generalized-Born surface area, MM/GBSA) 방법을 통해 획득하였다.

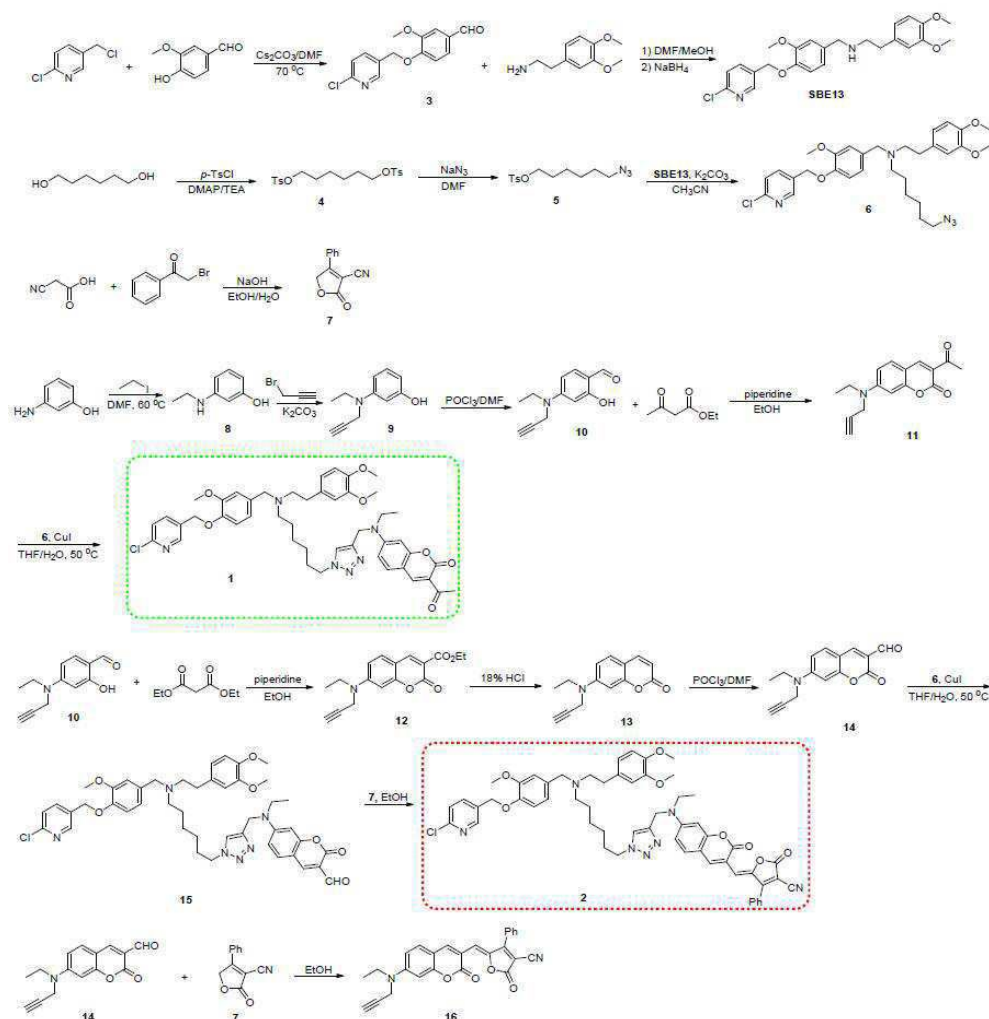
[0025] 세포주(Cell lines)

[0026] MCF10A, HaCaT, MDA-MB231, HCT116 및 MCF7을 포함한 5개의 인간 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) 또는 한국 세포주 은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포주는 RPMI1640, DMEM 또는 10% 태아 소 혈청 (Gibco BRL)이 보충된 MEM 배지에서 가습된 5% CO₂ 분위기에서 37 °C로 유지하였다.

- [0028] **siRNA and 트랜스펙션**
- [0029] 대조군 siRNA는 Ambion (# AM4635)에서 구입하였고 PLK1 (5'-GAAGAUGUCCAUGGAAAUUU -3 ')에 대한 siRNA는 Genolution Inc (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 트랜스펙션은 마이크로 포레이터(microporator) (MP-100, Neon transfection system; Invitrogen)를 사용하여 수행하였다.
- [0031] **면역블롯 분석(Immunoblot assay)**
- [0032] 프로테아제 저해제 혼합물을 사용하여 RIPA 완충액 [50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% 나트륨 데옥시콜레이트 및 0.1% SDS]에서 전체 세포 용해물을 제조하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 블롯을 PLK1 및 튜불린 항체와 함께 배양하고 chemoluminescence (Santa Cruz Biotechnology)로 시각화하였다. PLK1 (SC-17783) 및 튜불린 (SC-9104)에 특이적인 항체는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입 하였다.
- [0034] **형광 측정**
- [0035] 세포를 차가운 PBS에서 두 번 세척하고 트립신 처리하였다. 차가운 PBS로 3회 세척한 후, Spectramax 장치 (Molecular Devices, CA, USA)로 형광을 측정하고 Countess 장치 (Invitrogen, MA, USA)를 사용하여 총 세포 수로 형광 강도를 표준화하였다.
- [0037] **면역 형광 분석법**
- [0038] HCT116 세포를 유리 플레이트 상에 플레이팅하고 10 ng/mL 노코다졸로 12 시간 동안 처리하였다. 1 μ M의 probe 1과 함께 3 시간 인큐베이션한 후, 세포를 4% paraformaldehyde에 고정시키고, 0.2% Triton X-100으로 permeabilized 한 다음 블로킹 완충액 (PBS 중 2% BSA)에서 1 시간 동안 차단시켰다. 세포를 4 °C에서 밤새 블로킹 완충액에서 PLK1 항체와 함께 항온 배양하고, PBS로 3회 헹구낸 다음, 암실 및 실온에서 1 시간 동안 Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific, MA, USA)와 접합된 2차 항체와 함께 항온 배양하였다. 핵을 DAPI로 10분 동안 염색하였다. 40 $\times$ 워터를 사용하여 Carl Zeiss LSM700 confocal microscope로 이미지를 획득하였다. 프로브 1의 경우, Ex @ 488 nm 및 Em @ 492-548 nm; 항체의 경우, Ex 555 nm 및 Em @ 570-696 nm; DAPI의 경우, Ex @ 405 nm 및 Em @ 410-476 nm.
- [0040] **동물 연구 및 형광 이미징**
- [0041] Orient Bio Inc. (성남, 한국)에서 4 주된 면역 결핍 마우스 (nu/nu)를 얻고 가압 환기 케이지에서 유지하였다. 5 $\times$ 10⁶ HCT116 세포를 생쥐에 피하 주사하여 종양을 만들었다. 눈에 보이는 종양 성장 2주 후에, DMSO 또는 노코다졸 (5 mg/kg)을 복강 내 주사하였다. 프로브 2(5 mg/kg)의 꼬리 정맥 주사 24 시간 후, 마우스를 CO₂로 안락사시키고 전신과 기관의 형광 강도 (λ_{ex} = 560nm, λ_{em} = 660nm)를 Maestro2 장치 (Caliper Lifesciences, MA, USA)로 측정하였다. 모든 동물 실험은 고려대학교 동물 보호 및 사용위원회와 한국 동물 보호법의 승인을 받아 수행하였다.
- [0043] **세포 생존율 분석**
- [0044] WST-1 분석법을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 세포를 6-웰 플레이트에 0.5 $\times$ 10⁵의 밀도로 시딩하였다. 48 시간 동안 안정화시킨 후 지시된 시간 동안 프로브 1 또는 2로 세포를 처리한 다음 WST-1 시약(10 μ L)에 노출시켰다. 빛 흡광도는 450 nm의 파장에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다.
- [0046] **화합물 합성**
- [0047] 하기 합성 경로에 따라 본 발명에 따른 [화학식 1](화합물 1 또는 프로브 1로 표시), [화학식 2](화합물 2 또는

프로브 2로 표시)의 화합물을 합성하였다.

[합성 경로]



화합물 3의 합성

DMF 15 mL가 들어있는 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 2-클로로-5-(클로로메틸)피리딘 (1.5 g, 10 mmol) 및 4-하이드록시-3-메톡시벤즈알데히드 (1.9 g, 12 mmol)를 넣었다. Cs₂CO₃ (3.9 g, 12 mmol)를 한번에 첨가하고 혼합물을 70 °C로 가열하였다. 반응을 이 온도에서 4 시간 동안 유지하고 냉각시켰다. 이어서, 물을 첨가하고, 용액을 EtOAc (3x60 mL)로 추출하였다. 유기상을 합하고 염수로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조시켰다. 용매를 제거한 후, 조 생성물을 메탄올/H₂O로 재결정화시켜 담황색의 화합물 3(2.6 g, 93%)을 수득하였다.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.87 (s, 1H), 8.49 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 8.2, 2.5 Hz, 1H), 7.53-7.31 (m, 3H), 7.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 3.94 (s, 3H) ppm. ESI-MS: *m/z* 278.12 [M + H]⁺: (calcd 278.06).

SBE13의 합성

화합물 3 (1.28 g, 4.6 mmol)을 DMF/MeOH (2 mL/10 mL)의 혼합물에 첨가하고, 혼합물을 가열 환류시켰다. 격렬하게 교반하면서, MeOH (2 mL) 중 2-(3,4-다이메톡시페닐)에탄-1-아민 (0.83 g, 4.6 mmol)의 용액을 상기 혼합물에 적가하였다. 4 시간 후, MeOH 중의 NaBH₄ (2.2g) 용액을 반응물에 첨가하고, 혼합물을 60 °C에서 2 시간

동안 더 냉각시켰다. 그 후, 물을 첨가하여 반응을 급냉시켰다. 혼합물을 EtOAc (3x60 mL)로 추출하고, 유기 상을 합하고, 염수로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 감압하에 용매를 증발시켜 제거한 후, 용리액으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 100/1$ 을 사용하여 실리카 컬럼 크로마토그래피를 통해 조 생성물을 정제하여 백색 점성 물질의 화합물 SBE13(1.67 g, 82%)을 수득하였다.

[0057] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.42 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.82 – 6.64 (m, 5H), 5.07 (s, 2H), 3.84 (s, 9H), 3.73 (s, 2H), 2.86 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H) ppm. ESI-MS: m/z 443.21 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 443.17).

[0059] 화합물 4의 합성

[0060] 1,6-헥산디올 (2.36 g, 20 mmol), DMAP (20 mg, 0.16 mmol) 및 TEA (10.1 g, 100 mmol)를 CH_2Cl_2 에 용해시켰다. 이어서, CH_2Cl_2 (20 mL) 중의 p-톨루엔 술폰일 클로라이드 용액을 0 °C에서 격렬하게 교반하면서 30 분에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 첨가가 완료된 후, 용액을 실온에서 밤새 교반 한 다음, 용매를 제거하였다. 생성된 오일을 용리제로서 hexane/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1/2$ 를 사용하여 실리카겔을 통해 정제하여 백색 고체의 화합물 4(4.2 g, 49.4%)를 수득하였다.

[0061] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H), 3.97-3.93 (m, 4H) 2.43 (s, 6H), 1.68-1.65 (m, 4H), 1.28-3.92 (m, 4H) ppm. ESI-MS: m/z 427.26 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 427.12).

[0063] 화합물 5의 합성

[0064] 화합물 4 (4.2g, 10mmol)를 DMF(10mL)에 용해시키고, NaN_3 (420mg, 7.5mmol)을 첨가 하였다. 용액이 투명해질 때까지 혼합물을 교반하였다. 물을 첨가하고, 혼합물을 EtOAc로 추출하고, 염수로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 감압하에 용매를 증발 제거한 후, 용리액으로서 hexane/EtOAc = 10/1을 사용하여 실리카 컬럼 크로마토그래피를 통해 조생성물을 정제하여 무색 오일의 화합물 5(1.2g, 40.4%)를 수득하였다.

[0065] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.00 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 3.21 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 2.43 (s, 3H), 1.66-1.62 (m, 2H), 1.58-1.51 (m, 2H), 1.36-1.28 (m, 4H) ppm. ESI-MS: m/z 298.05 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 298.12).

[0067] 화합물 6의 합성

[0068] 화합물 SBE13 (442 mg, 1 mmol), 화합물 5 (297 mg, 1 mmol) 및 탄산 칼륨 (138 mg, 1 mmol)을 무수 아세토니트릴에서 혼합하였다. 반응물을 8 시간동안 가열 환류 및 냉각시켰다. 용매를 제거한 후, 조 생성물을 실리카 컬럼상에서 정제하여 담황색 오일의 화합물 6(420mg, 73.9%)을 수득하였다.

[0069] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.43 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.76 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.80-6.71 (m, 3H), 6.67-6.64 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 3.89-3.71 (m, 9H), 3.54 (s, 2H), 3.21 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.84-2.55 (m, 4H), 2.44 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 1.68-1.61 (m, 2H), 1.49-1.38 (m, 2H), 1.37-1.15 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 151.20, 149.92, 148.98, 148.88, 147.39, 146.40, 138.43, 134.55, 133.54, 132.09, 124.45, 120.85, 120.77, 114.51, 112.60, 112.25, 111.26, 68.43, 58.43, 56.11, 56.02, 55.80, 53.74, 51.60, 33.28, 29.06, 27.19, 27.13, 26.89 ppm. ESI-MS: m/z 568.15 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 568.27).

[0071] 화합물 7의 합성

[0072] 시아노 아세트산 용액 (1.7 g, 20 mmol), 수산화 나트륨 (0.8 g), 에탄올 (30 mL), 물 (7.2 mL) 및 2-브로 모 아세트페논 (3.98 g, 20 mmol)의 혼합물을 1 시간 동안 교반하면서 환류시켰다. 실온으로 냉각하여 분리된 고체 를 아세트 나이트릴로부터 재결정화하여 짙은 고체 화합물 7(1.6g, 42%)을 수득하였다. 스펙트럼 데이터는 종래 문헌(Ford, J. A.; Wilson, C. V.; Young, W. R. The preparation of 2(5H)-furanones and dyes derived from them. *J. Org. Chem.* **1967**, 32, 173-177.)과 일치하였다.

[0074] 화합물 8의 합성

[0075] 3-아미노 페놀 (5.45g, 50 mmol) 용액, iodoethane (7.8g, 50 mmol) 및 아세트나이트릴 중 탄산 칼륨 (20.7g, 150 mmol)을 80 °C로 가열하고 2 시간 후에 냉각시켰다. 여과 후, 포화 NH₄Cl(수성)을 여액에 첨가하고 EtOAc로 추출하였다. 조합된 유기상을 염수로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조시켰다. 감압하에 용매를 증발 제거한 후, 용 리제로서 hexane/EtOAc = 10/1을 사용하여 실리카 컬럼 크로마토그래피를 통해 조생성물을 정제하여 오일로서 화합물 8(3.4 g, 49.3%)을 수득하였다. 스펙트럼 데이터는 종래 문헌(Lin, Q.; Huang, Q.; Li, C.; Bao, C.; Liu, Z.; Li, F.; Zhu, L. Anticancer drug release from a mesoporous silica based nanophotocage regulated by either a one- or two-photon process. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10645-10647.)과 일치하 였다.

[0077] 화합물 9의 합성

[0078] 화합물 8 (2.86g, 20 mmol) 용액, propargyl bromide (2.86 g, 24 mmol) 및 아세트나이트 릴 중 탄산 칼륨 (4.1g, 30 mmol)을 실온에서 12 시간 동안 교반하였다. 감압하에 용매를 제거한 후, 물을 첨가하고 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. 조합된 유기상을 염수로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조시켰다. 감압하에 용매를 증발 제거한 후, 용리제로서 hexane/EtOAc = 15/1을 사용하여 실리카 컬럼 크로마토 그래피를 통해 조생성물을 정제하여 황 색 오일의 화합물 9(2.2g, 62.8%)를 수득하였다.

[0079] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.09 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.41 (dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.37-6.28 (m, 1H), 6.24 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 5.19 (s, 1H), 3.98 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 3.40 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.18 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 156.79, 149.57, 130.34, 106.71, 104.93, 101.09, 80.48, 71.99, 45.84, 39.81, 12.59 ppm. ESI-MS: m/z 176.10 [M + H]⁺: (calcd 176.11).

[0081] 화합물 10의 합성

[0082] 0 °C에서 무수 DMF 5 mL를 POCl₃ 1.33 mL에 적가하였다. 혼합물을 N₂ 대기하 0 °C에서 15 분 동안 교반 하였다. 이어서, 3mL의 무수 DMF 중 화합물 9 (2.2g, 12.6mmol)의 현탁액을 적가하고, 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 그 후, 혼합물을 80 °C에서 30 분 더 가열하고 실온으로 냉각시켰다. 25 mL의 물을 교반하면서 첨가하고 녹색 고체를 천천히 형성시켰다. 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 밤새 진공 건조시켰다. 고체를 CH₂Cl₂에 용해시 키고, 실리카겔상에서 컬럼 크로마토 그래피로 정제하여 옅은 분홍색 고체의 화합물 10 (1.8g, 70.5%)을 수득하 였다.

[0083] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.56 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.39 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.08 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.53 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.26 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 192.92, 164.34, 154.24, 135.56, 112.58, 105.32, 98.42, 79.07, 72.64, 46.17, 39.94, 12.62 ppm. ESI-MS: m/z 203.95 [M + H]⁺: (calcd 204.10).

[0085] 화합물 11의 합성

[0086] 에틸아세토아세테이트 (1.95 g, 15 mmol) 및 화합물 10 (2.03 g, 10 mmol)을 EtOH (20 mL)의 용액에 첨가한 후, 피페리딘 (0.2 mL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 6 시간 동안 환류시킨 다음 실온으로 냉각시켰다. 황색 결정을 여과하고 EtOH에서 재결정 화하여 황색 고체의 화합물 11 (1.58 g, 58.6%)을 수득하였다.

[0087] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.46 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.75 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.13 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.58 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.30 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 195.91, 160.78, 158.48, 152.91, 148.12, 131.96, 117.71, 110.78, 109.30, 98.29, 78.56, 73.06, 46.57, 40.23, 30.86, 12.54 ppm. ESI-MS: m/z 270.05 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 270.11).

[0089] 화합물 1의 합성

[0090] THF/ H_2O (5 mL/5 mL) 중의 화합물 11 (24 mg, 0.09 mmol) 및 화합물 6 (60.8 mg, 0.11 mmol)의 용액에 CuI (38 mg, 0.2 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 50 $^\circ\text{C}$ 에서 8 시간 동안 교반하였다. 그 후, THF를 감압하에 제거하고 EtOAc로 추출하였다. 조합된 유기상을 염수로 세척하고 용리액으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 30/1을 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 황색 고체의 화합물 1 (68 mg, 91.1%)을 수득하였다.

[0091] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.43 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.51-7.30 (m, 3H), 7.02-6.62 (m, 7H), 6.55 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.68 (s, 2H), 4.35-4.23 (m, 2H), 4.12-3.72 (m, 9H), 3.72-3.45 (m, 4H), 2.74-2.67 (m, 7H), 2.43 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 1.57-1.03 (m, 11H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 195.73, 160.79, 158.61, 153.29, 151.09, 149.87, 148.95, 148.85, 148.02, 147.38, 146.49, 143.98, 138.47, 133.20, 132.15, 132.05, 124.42, 121.73, 121.02, 120.78, 116.99, 114.45, 112.74, 112.22, 111.28, 110.47, 97.34, 68.32, 58.28, 56.09, 56.02, 55.57, 53.44, 50.57, 46.21, 46.15, 32.99, 30.79, 30.44, 29.87, 26.85, 26.78, 26.52, 12.42 ppm. ESI-MS: m/z 859.10 $[\text{M} + \text{Na}]^+$: (calcd 859.36).

[0093] 화합물 12의 합성

[0094] 화합물 10 (1.8 g, 8.9 mmol), 디에틸말로네이트 (2.8 g, 18 mmol) 및 무수 에탄올 (20 mL) 중 피페리딘 (1 mL)의 혼합물을 6 시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 냉각시키고, 용매를 증발시켰다. 생성물을 EtOAc로 추출하고, 염수로 세척하고, 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 황색 고체의 화합물 12 (2.2g, 82.7%)를 수득하였다.

[0095] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.46 (s, 1H), 7.43 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.74 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.39 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.11 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 3.57 (dd, J = 14.3, 7.1 Hz, 2H), 2.28 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 1.40 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 164.25, 158.22, 152.77, 149.45, 131.11, 110.79, 110.48, 108.90, 98.47, 98.37, 78.64, 72.97, 61.57, 46.54, 40.20, 14.59, 12.54 ppm. ESI-MS: m/z 300.00 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 300.12).

[0097] 화합물 13의 합성

[0098] 18% v/v 염산 60 mL 중 화합물 12 (2.2 g, 7.4 mmol)를 5 시간 동안 가열 환류시켰다. 냉각 후, 45% w/v 수산화 나트륨으로 pH 값을 4 내지 5로 조정하였다. 결정성 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 50 $^\circ\text{C}$, 진공하에 건

조시킴, 실리카 겔상에서 칼럼 크로마토그래피를 통해 추가 정제하여 오렌지색 고체 화합물 13 (1.34g, 80.2%)을 수득하였다.

[0099] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.57 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.11 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 4.08 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.53 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.25 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 162.16, 156.51, 150.66, 143.78, 128.91, 110.81, 109.95, 109.76, 99.48, 79.31, 72.52, 46.28, 39.99, 12.50 ppm. ESI-MS: m/z 228.00 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 228.10).

[0101] 화합물 14의 합성

[0102] 4 mL의 무수 DMF를 0.7 mL의 POCl_3 에 0 °C에서 적가하였다. 혼합물을 N_2 대기하에 0 °C에서 15 분 동안 교반하였다. 이어서, 5 mL의 무수 DMF 중의 화합물 13 (1.33 g, 5.9 mmol)의 현탁액을 적가하고, 이어서 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 그 후, 혼합물을 80 °C에서 2 시간 더 가열하고 실온으로 냉각시켰다. 25 mL의 물을 교반하면서 첨가하여 적색 고체를 천천히 형성시켰다. 침전물을 여과하고, 물로 세척하고, 밤새 진공 건조시켰다. 고체를 CH_2Cl_2 에 재용해시키고 실리카 겔상에서 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 황색 고체의 화합물 14 (956 mg, 63.5%)를 수득하였다.

[0103] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 10.15 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.49 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.14 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 3.60 (dd, J = 14.3, 7.1 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 188.17, 161.76, 158.70, 153.37, 145.77, 132.57, 115.79, 111.05, 109.30, 78.29, 73.25, 40.33, 12.57 ppm. ESI-MS: m/z 256.05 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 256.10).

[0105] 화합물 15의 합성

[0106] THF/ H_2O (10 mL/10 mL) 중 화합물 14 (74 mg, 0.29 mmol) 및 화합물 6 (138 mg, 0.24 mmol)의 용액에 CuI (114 mg, 0.6 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 50 °C에서 8 시간 동안 교반하였다. 그 후, THF를 감압하에 제거하고 EtOAc로 추출하였다. 조합된 유기상을 염수로 세척하고 용리액으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 40/1을 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 황색 고체의 화합물 15 (120 mg, 60.8%)를 수득하였다.

[0107] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 10.15 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.49 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.14 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 3.60 (dd, J = 14.3, 7.1 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 188.17, 161.76, 158.70, 153.37, 145.77, 132.57, 115.79, 111.05, 109.30, 78.29, 73.25, 40.33, 12.57 ppm. ESI-MS: m/z 845.05 $[\text{M} + \text{Na}]^+$: (calcd 845.34).

[0109] 화합물 2의 합성

[0110] 화합물 15 (74 mg, 0.09 mmol) 및 화합물 7 (25 mg, 0.14 mmol)을 8 mL의 무수 EtOH에 용해시켰다. 혼합물을 4 시간 동안 환류시키고 냉각시켰다. 용매를 제거하고 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 50/1을 사용하여 실리카겔상에서 조성생물을 정제하여 보라색 고체의 화합물 2 (50 mg, 56.1%)를 수득하였다.

[0111] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.65 (s, 1H), 8.43 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.93-7.49 (m, 6H), 7.50-7.38 (m, 2H), 7.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.00-6.40 (m, 9H), 5.10 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.35 - 4.19 (m, 2H),

4.11-3.67 (m, 9H), 3.62 (dd, $J = 14.1, 7.0$ Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 2.69 (s, 4H), 2.43 (s, 2H), 1.83 (s, 2H), 1.47-1.08 (m, 9H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 164.53, 163.57, 161.40, 156.94, 153.07, 151.22, 149.95, 148.99, 146.29, 146.08, 143.85, 138.43, 132.61, 132.02, 131.84, 129.86, 129.20, 127.61, 124.44, 121.62, 120.79, 115.35, 114.57, 113.37, 112.73, 112.21 (d, $J = 13.3$ Hz), 111.32, 110.85, 110.39, 97.95, 97.46, 68.41, 58.35, 56.09 (d, $J = 7.4$ Hz), 55.67, 53.59 (d, $J = 14.9$ Hz), 50.63, 46.29, 33.21, 30.47, 26.59, 26.56, 12.50 ppm. ESI-MS: m/z 1012.10 $[\text{M} + \text{Na}]^+$: (calcd 1012.38).

[0113] 화합물 16의 합성

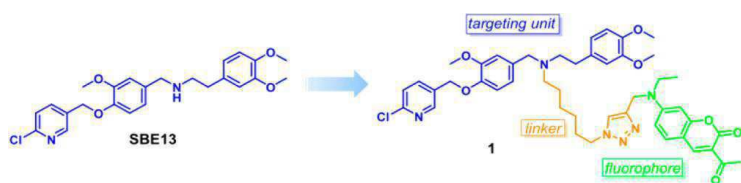
[0114] 화합물 14 (128 mg, 0.5 mmol) 및 화합물 7 (111 mg, 0.6 mmol)을 8 mL의 무수 EtOH에 용해시켰다. 혼합물을 4 시간 동안 환류시키고 냉각시켰다. 침전물을 여과하고 EtOH로 2회 세척하여 청자색 고체의 화합물 16 (96mg, 45.4%)을 수득하였다.

[0115] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.67 (s, 1H), 7.72-7.54 (m, 5H), 7.50 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.77 (dd, $J = 9.0, 1.9$ Hz, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.12 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 3.57 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.28 (s, 1H), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 164.50, 163.70, 161.39, 156.76, 152.69, 146.35 (d, $J = 18.1$ Hz), 132.64, 131.66, 129.89, 129.21, 127.60, 115.29, 113.89, 112.11, 111.18, 110.75, 98.77, 78.43, 73.21, 46.71, 40.34, 12.64 ppm. ESI-MS: m/z 422.95 $[\text{M} + \text{H}]^+$: (calcd 423.11).

[0117] 결과 및 고찰

[0118] 케프너 등에 의해 개발된 Type II PLK1 억제제인 SBE13는 0.2 nM의 저해 농도로, 다른 PLK들 대비 우수한 선택성을 지니며, PLK1의 불활성 DFG-아웃 형태를 안정화시킨다(keppner, S.; Proschak, E.; Schneider, G.; Spankuch, B. Identification and validation of a potent type II inhibitor of inactive polo-like kinase 1. ChemMedChem 2009, 4, 1806-1809.). 따라서, 본 발명에서는 형광단으로서 쿠마린 유도체와 결합 리간드로서 SBE13을 가진 프로브 1을 합성하여 PLK1과 선택적이면서도 강력하게 결합가능하도록 설계하였다(하기 Scheme 1 참조). PLK1에 대한 SBE13의 친화성에 대한 형광단의 영향을 최소화시키기 위해, 6개의 탄소 원자를 지닌 알킬 사슬을 형광단과 리간드 사이에 삽입하여 카고(cargo)의 입체 장애를 회피하였으며, 높은 광안정성, 큰 스토크스 이동, 손쉬운 기능화로 인해 쿠마린을 형광단으로 선택하였다.

[0119] [Scheme 1]



[0120]

[0122] 먼저, 프로브 1과 PLK1의 결합여부를 실험하였으려, 구체적으로는 활성 부위를 식별하고 프로브 1과 PLK1 간의 상호작용을 원자 수준에서 조사하기 위해, 도킹과 분자동력학적(MD) 시뮬레이션을 수행하였다 (도 1). 프로브 1에 결합하는 PLK1의 자유에너지는 MD 시뮬레이션으로부터 -71.8 kcal/mol로 계산되었으며, 4 개의 잔기들(L59, C67, M98 및 F183)은 활성 부위에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다(도 11). C67 및 F183은 PLK와 기타 키나아제에 대한 억제제의 선택성을 유지하는데 중요하다는 점에 주목할 필요가 있다. 시뮬레이션 결과 프로브 1이 PLK1에 잘 결합하는 것으로 예상되었으며, 프로브의 결합이 링커와 형광 그룹에 의해 입체적으로 방해받지 않는 것으로 나타났다.

[0123] 다음으로, 프로브 1의 흡수 및 방출 스펙트럼을 인산완충식염수(PBS)(10 mM, pH = 7.4, 0.2% DMSO 함유)에서 조사하였다. 프로브 1은 425 nm에서 최대 흡수를 나타내었으며(이는 쿠마린 모이어티의 특성임), 480 nm에서 강하

게 발광하였고 스톡스 쉬프트(Stokes shift)는 55 nm이었다(도 6). 양자 수율은 플루오레세인을 기준으로 하였을 때, 0.13으로 측정되었다. 프로브 1의 형광 강도는 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , GSH, Cys 및 H_2O_2 와 같은 생물학적으로 관련이 있는 잠재적 간섭의 존재하에서도 미미하게 변경되었다(도 7). 시간에 따른 가시광선의 조사 또한 프로브 1의 방출 강도에 영향을 미치지 않았으며(도 8), 원하는 수준의 안정성과 견고성을 나타내었다. 다음으로, HeLa 세포에서 프로브 1의 주된 세포내 이미징 능력을 시험하였다. 30분의 배양 후에, 5 μM 의 탐침자 농도를 지닌 세포에서 강한 형광이 관찰되었으며, 이는 탐침자의 세포 투과도가 우수하다는 것을 확인시켜준다(도 9).

[0124] 이어서, 5 개의 인간 세포주, 즉 MCF10A(유방 상피 세포), HaCaT (불멸성 케라틴 형성세포), HCT116 (대장암), MDA-MB231 (유방암) 및 MCF7(유방암) 세포에서 프로브 1의 형광 방출과 PLK1 발현 수준의 상관관계를 조사하였다. 면역블롯분석법을 통해, MCF10A 세포는 가장 낮은 수준의 PLK1 단백질을 발현한 반면, HaCaT와 HCT116 세포는 PLK1의 수준이 매우 높은 것으로 밝혀졌다(도 2A). 이에 상응하여, 프로브 1은 MCF10A에서 가장 낮은 형광을 방출한 반면 나머지 세포들에서는 매우 밝은 형광이 방출되었다(도 2B 및 C). 이는 프로브 1의 세포 내 형광 강도가 PLK1 발현 수준과 긴밀하게 연관되어 있음을 암시한다. 또한, 형광 표지된 항-PLK1 항체와 공동배양(coincubation) 시 프로브 1과 PLK1의 공동-편재화(colocalization)를 조사하였다. 흥미롭게도, 공초점 현미경을 통해 프로브 1의 형광이 항-PLK1의 것에 완전하게 포함되었다는 것을 확인할 수 있었다. PLK1이 후기(anaphase) 및 세포질분열 동안 중앙 방추사 미세소관에 축적된다는 것이 알려져 있기 때문에, 프로브 1이 분열 세포에서 미세소관-풍부 PLK1에 우세하게 결합한다는 점을 알 수 있으며, 이는 프로브 1의 우수한 PLK1 표적능력을 통해 검증되었다(도 2D).

[0125] 세포내 형광 상 차이가 프로브 1에 대한 차별적 세포독성 반응에 의한 것인지 여부를 조사하기 위해, WST-1 분석을 수행하였으며, 프로브 1은 시험된 세포들에서 최대 72시간 후-처리(20 μM) 후까지 검출가능한 세포독성 효과를 유발시키지 않는 것으로 나타났다(도 10A, 10B). 이러한 결과는 프로브 1이 다중 조직 근원으로부터 PLK1-발현 인간 세포의 민감한 검출 및 식별을 가능케하는 비세포독성 제제임을 의미한다.

[0126] 다음으로, 프로브 1이 세포에서 PLK1 수준 변화를 관찰하는 능력을 조사하고자 추가 실험을 수행하였다. 노코다졸은 G2상 특이적 세포 주기 체동을 촉발시키고 그로 인해 PLK1 축적을 유도하는 항신생물제이다. 도 3에 나타난 바와 같이, HCT116 세포를 노코다졸로 전-처리하였을 때, PLK1의 투여량-관련 증가가 관찰되었다. 일관되게, 프로브 1의 형광성은 노코다졸로 처리된 HCT116 세포에서 현저하게 향상되었다. 그러나, 화합물 11(PLK1-표적 리간드가 없는 1의 유사체)의 형광성은 노코다졸 처리 전후에 무시할만한 변화만을 나타내었다(도 3C). 이는 노코다졸의 존재 하에서 프로브 1의 방출 향상이 PLK1 수준의 증가에 의해 유도됨을 의미한다. 또한, 프로브 1 처리 세포의 세포내 형광 강도가 동일한 조건 하에서 화합물 11로 처리한 세포보다 훨씬 더 강한 것으로 나타내었으며, 이는 SBE13의 PLK1 표적능력이 세포 내에 프로브 1의 축적을 촉발시킴을 의미한다. 또한, PLK1의 siRNA-매개 녹다운을 이용한 PLK1 감소하에서 프로브 1의 형광 반응은 도 3D 및 E에서 나타난 바와 같이, 세포내 형광이 명백하게 감소하였다. 형광에 대한 PLK1 의존성은 0.5 μM 의 화합물 1의 농도에서 명확하게 관찰되었으며, 이는 PLK1 친화성 프로브의 높은 민감도를 나타낸다(도 3F). 대조적으로, 화합물 11의 형광도는 PLK1 감소에 대해서 사실상 반응이 없었다.

[0127] 여러 종양에서 PLK1의 과발현은 결과적으로 종양 내 프로브 1의 축적을 야기하며, 이는 병원성 조직의 시각화를 가능하게 한다. 그러나 이 프로브의 짧은 흡수 및 방출 파장으로 인해 인비보 적용에 상당히 많은 비용이 예상된다. 이에, 프로브 1의 장파장 유사체로서, 강한 전자-끌기 그룹으로 3-시아노-4-페닐-2(5H)-푸라논으로 프로브 2를 제조하였다. 프로브 2와 PLK1의 자유 에너지는 -81.9 kcal/mol인 것으로 측정되었다(도 11). 두 프로브들이 모두 입체적으로 부피가 크더라도 PLK1의 활성 부위에 잘 도킹하고, 활성 크래프트(active cleft)에 위치한 L59, C67, M98 및 F183 잔기들은 EN 프로브의 결합 상호작용에 중요한 기여를 하며, 이는 PLK1과 SBE13 베어링 프로브의 분자적 인식이 중요함을 나타낸다.

[0128] 도 4에 나타난 바와 같이, 프로브 2는 PBS 중 대략 555 nm의 최대 흡수 피크 및 660 nm의 최대 방출 피크를 나타내었으며, 이는 새로운 형광단의 강한 분자 간 전하 전달(ICT) 특성의 결과로 프로브 1에 비해 극적인 장파장 이동을 나타낸 것이다. 적색 이동 방출 및 흡수에 있어, 프로브 2는 인비보 이미징을 위한 파장 조건을 충족하였으며, 105 nm의 커다란 Stokes shift로 인해 뚜렷한 대비 및 이로 인한 보다 높은 SBR 또한 예상된다. 프로브 2의 형광 강도는 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , GSH, 시스테인 및 과산화수소와 같은 생물학적으로 관련된 잠재적 간섭의 존재 및 가시광선 조사 하에서 거의 일정하게 유지되었다(도 12 및 도 13).

[0129] 앞서 설명한 프로브 1에 대한 실험과 유사하게, 프로브 2는 시험된 세포주에서 유의한 세포독성을 나타내지 않

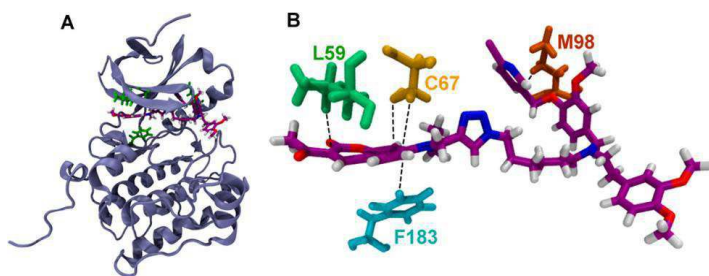
았으며 (도 14), 프로브 2가 담지된 세포는 노코다졸 처리 또는 si-RNA 의존성 PLK1 녹다운의 결과로서 형광이 증가하거나 감소하였다(도 15). SBE13 서브유닛에 관한 것이 아닌 기본 형광단 골격(화합물 16)을 음성 대조군으로 사용하였으며(도 15), 화합물 11과 같이 화합물 16에 담지된 세포의 형광은 PLK1 함량에 대해서 어떠한 의존성도 나타내지 않았다. 더불어, 이러한 결과는 PLK1 의존성 세포 이미징 에이전트로서 프로브 1과 2의 효용성을 강력하게 지지하며, 형광단 결합을 수반하더라도 SBE13의 표적능력에 영향을 미치지 않는다는 점을 확인하였다.

[0130] 마지막으로, 마우스 종양 이중이식 분석법을 사용하여 인비보에서 종양을 검출하는 프로브 2의 능력을 평가하였다. 종양 생성을 유도하기 위해, 생후 4주된 면역 결핍 마우스(nu/nu)에 5×10^6 HCT116 세포를 피하 주입하였다. 가시적인 종양 성장의 2주 후에, DMSO 또는 노코다졸(5 mg/kg)을 복강 내로 주입하였고, 프로브 2를 마우스의 정맥 내에 주입하였다 (5 mg/kg). 도 5A에 나타난 바와 같이, 프로브 2 주입 마우스의 종양 조직에 부위-특이적 형광이 현저하게 검출되었으며, 노코다졸을 사전-투여한 경우에 형광 강도가 유의하게 증가하였다. 또한, 절단한 기관 조직의 비교 분석 결과, 종양 부위에서만 강한 형광이 방출된 반면 심장, 신장 또는 비장은 약한 형광만을 나타내었는바, 이는 종양 조직에서 PLK1의 수준이 정상 장기에서보다 훨씬 높다는 것을 암시한다. 중요한 점은, 생체 이물 대사를 위한 중요 기관인 간에서조차 형광 강도가 매우 약했다는 것이다(도 5B). $F_{\text{tumor}}/F_{\text{liver}}$ 의 형광 강도비는 노코다졸-사전처리 마우스에서 최대 17.6에 달했지만, 이러한 값은 프로브 2-주입 마우스에서는 3.3인 것으로 나타났다 (도 5C). 친화성-기반 프로브 2로 이미징처리된 마우스의 조직에서 관찰된 우수한 SBR은 매우 드문 경우이며, 대부분의 친화성-기반 상시 프로브들은 간 및 신장과 같은 다른 정상 기관에서 프로브가 축적되어 배경 형광(background fluorescence)에 시달리며 이러한 배경 형광은 프로브의 응용가능성을 현저하게 제한한다. 프로브 2 주입 마우스에서 종양-무게 관련 형광 변화가 관찰되었으며 (도 5D), 이러한 결과는 보다 큰 크기의 종양에서 프로브 2의 보다 높은 수준에서 기인하는 것이다.

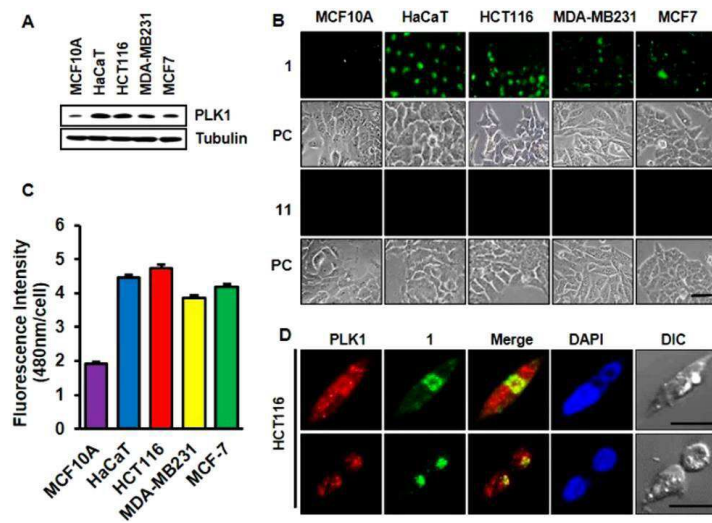
[0131] 결론적으로, 본 발명에서는 단백질 결합 리간드로서 PLK1 억제제인 SBE13를 포함하는 2가지의 PLK1-표적 쿠마린-기반 형광 이미징화제 화합물들(프로브 1 및 2)을 제공한다. PLK1에 결합하기 위한 프로브의 능력은 도킹 연구를 통해 입증하였으며, 이들 화합물들은 비 세포독성이었고, 다양한 인간 세포에서의 그들의 형광 강도는 PLK1에 대해서 민감한 반응을 나타내었다. 또한 근적외선 방출을 나타내는 프로브 2는 우수한 SBR으로 마우스 종양 이중이식 모델에서 선택적 종양 이미징에 성공적으로 적용될 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물들은 PLK1을 선택적으로 감지함으로써 종양을 효과적으로 이미징하기 위한 효율적인 도구로 활용될 수 있으며, 친화성-기반 형광 이미징화제가 적절한 세포 인자를 표적하는 경우 높은 SBR로 선택적 종양 인식을 달성할 수 있음을 제시하였는바, 종양 진단 및 정밀 치료에 있어 새로운 이점을 제공할 수 있다.

도면

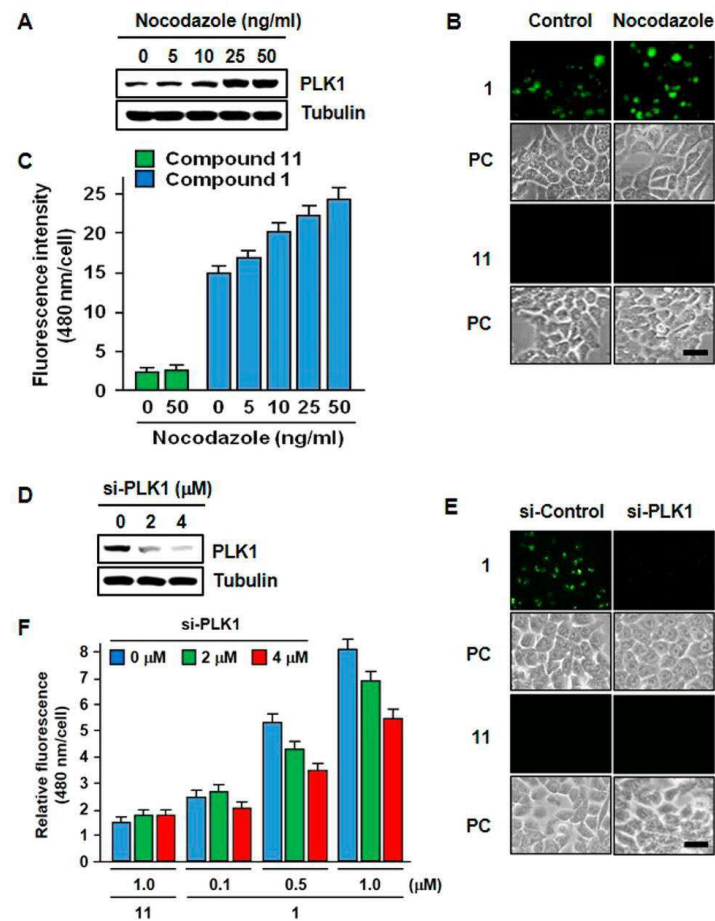
도면1



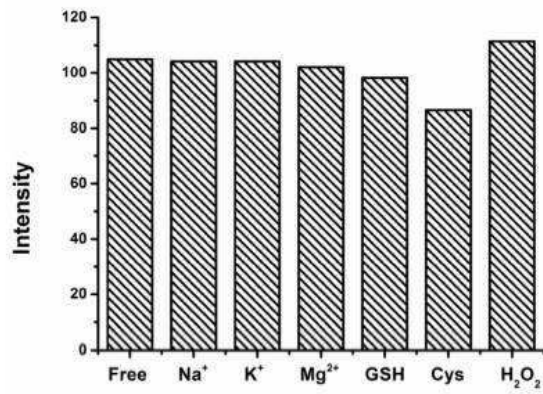
도면2



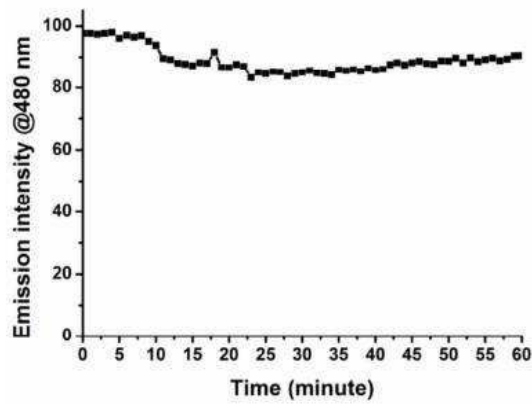
도면3



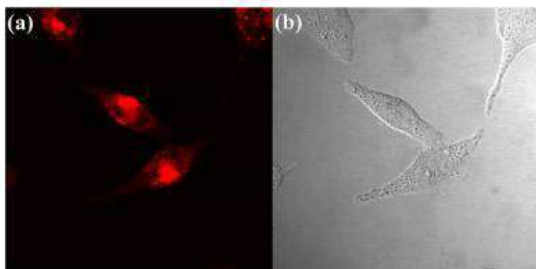
도면7



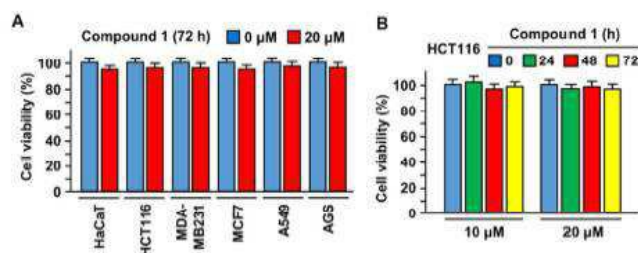
도면8



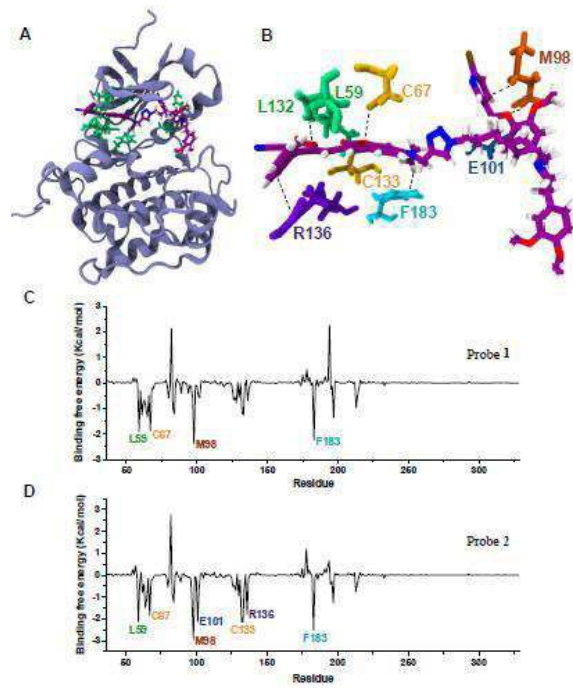
도면9



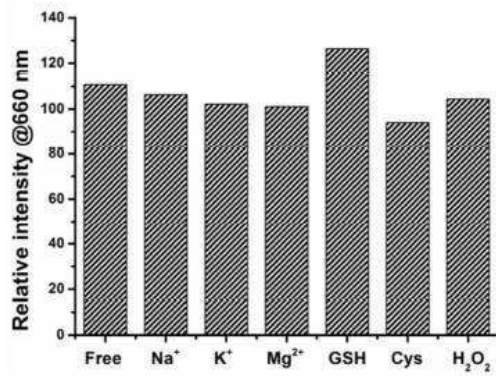
도면10



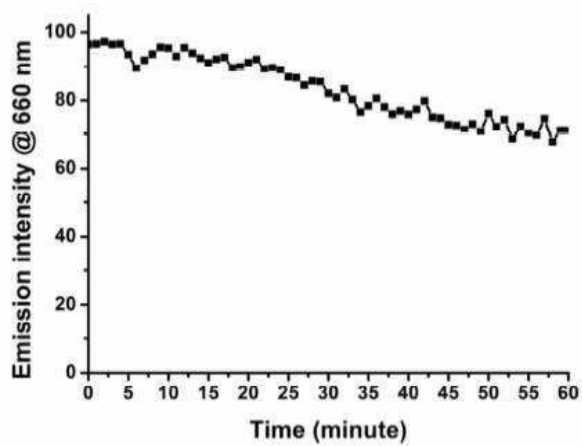
도면11



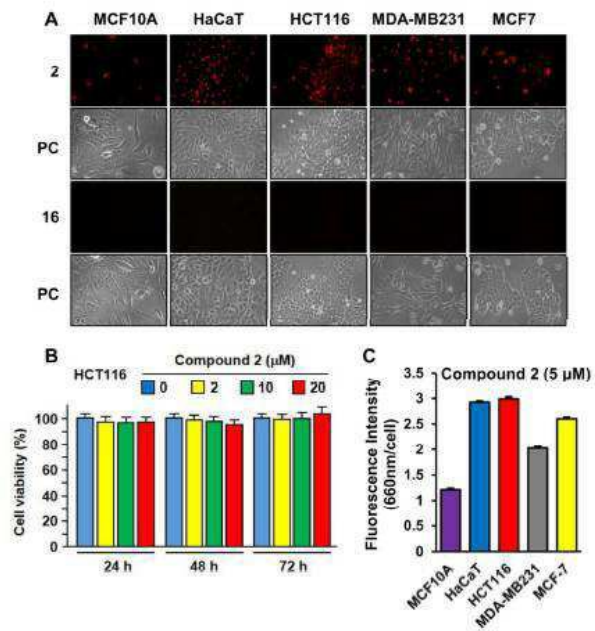
도면12



도면13



도면14



도면15

