

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0078594
(43) 공개일자 2021년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C09K 11/06 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C09K 11/06 (2021.01)

G01N 33/582 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0169480

(22) 출원일자 2019년12월18일

심사청구일자 2019년12월18일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

서울특별시 성북구 안암로 145

손수빈

부산광역시 해운대구 센텀중앙로 145, 102동 402호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열, 김태훈

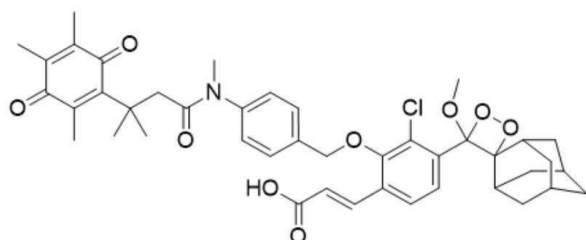
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 암 세포 검출용 발광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 암 세포 검출용 발광 센서

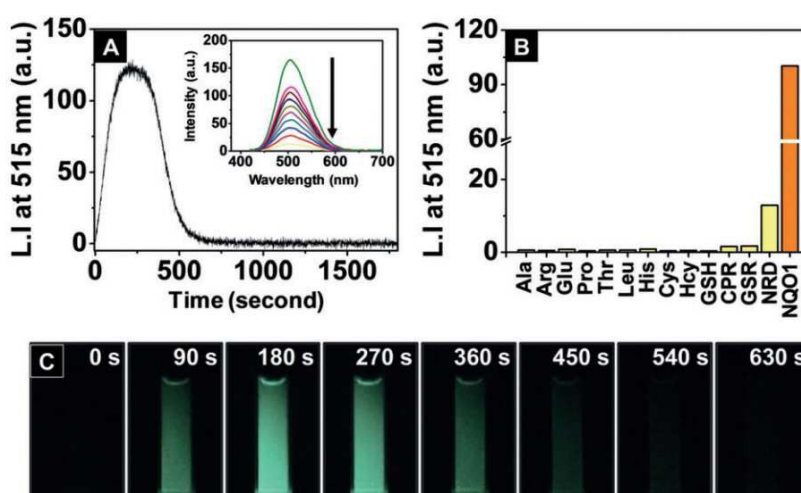
(57) 요약

본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 암 세포 검출용 발광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 암 세포 검출용 발광 센서에 관한 것이다:

[화학식 1]



대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C09K 2211/1007 (2013.01)

(72) 발명자

원미애

서울특별시 성북구 안암로 145

아밋 샤르마

서울특별시 성북구 고려대로 45, 202호

조나단 엘세슬러

더 유니버시티 오브 텍사스 앳 오스틴 디파트먼트 오브 케미스트리, 컬리지 오브 내츄럴 사이언서즈 105 이스트 24 스트리트 스톱 A5300 오스틴, 텍사스 78712, 미국

도론 샤밋

스쿨 오브 케미스트리, 로이몬드 앤드 비벌리 새클러 팩컬티 오브 이그젝트 사이언서즈, 텔 아비브 유니버시티, 텔 아비브 69978, 이스라엘

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A3B1052702

부처명 미래창조과학부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스

기 여 율 50/100

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03030062

부처명 미래창조과학부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공개인기초연구지원-기본연구

연구과제명 화학센서 기반의 신규 암 줄기세포 표적 저분자 치료제 개발 및 치료 기전 규명

기 여 율 50/100

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

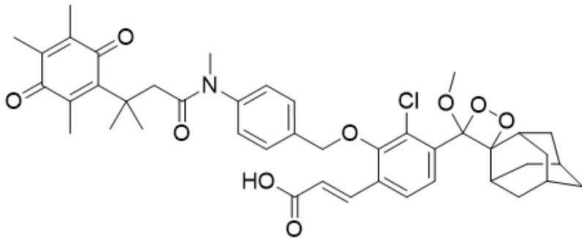
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 암 세포 검출용 발광 프로브 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암 세포는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소-1(NQO1)가 과발현된 것을 특징으로 하는 암 세포 검출용 발광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물은 NQO1에 의해 환원되어 화학 발광하는 것을 특징으로 하는 암 세포 검출용 발광 프로브 화합물.

청구항 4

제1항에 따른 발광 프로브 화합물을 포함하는 암 세포 검출용 발광 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 세포 검출용 발광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 암 세포 검출용 발광 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자극 반응 합성 구조물은 감지 및 약물 전달과 같은 응용 분야로의 적용 가능성으로 인해 점점 더 많은 관심을 받고 있다(비특허문헌 1). 특정 병리생리학적 신호에 반응할 뿐만 아니라 실제로 증폭하는 생체 반응 물질들은 의학뿐만 아니라 생물학적 연구에서도 중요한 역할을 할 수 있다. 이러한 시스템은 질병 조직과 건강한 조직 사이의 개선된 분화를 가능하게 하여 질병의 진단 및 치료를 향상시킨다(비특허문헌 2). 암 연구에서 형광(비특허문헌 3), 광음향(비특허문헌 4), 및 자기 공명(비특허문헌 5) 이미징에 의존하는 시스템은 암 바이오 마커에 특이적인 자극-응답 프로브로서 개발되었다. 이들 시스템 및 이들이 의존하는 검출 기술은 일상적으로 수행되는 종양 이미징 실험을 실질적으로 개선시켰다. 그럼에도 불구하고, 암 병변과 정상적인 건강한 조직 사이의 분화에서 높은 특이성과 충실도를 달성하는 것은 여전히 중요한 과제이며, 많은 경우 외과적 해부와 같이 충족되지 않은 의학적 요구가 남아있다. 이와 관련하여, 화학 발광은 광학 이미징의 단순성을 유지하면서 기존의 형광-기반 접근법에 비해 몇 가지 장점을 제공하는바, 큰 가능성을 갖는다. 이러한 장점에는 더 나은 침투 깊이, 더 높은 신호 대 잡음비, 자가 형광, 광산란 및 광표백에 의한 간섭 감소가 포함되며, 외부 여기 광원이 필요하지 않다는 점 또한 중요한 장점이다.

[0003] 한편, NAD(P)H:퀴논 산화환원효소-1(NQO1)은 세포 전반에 걸쳐 발현되는 효소이며, 이의 발현은 스트레스에 대

한 반응으로 상향조절된다. 이 효소는 NADH 또는 NADPH를 함께 소비하면서 퀴논 생체이물(quinone xenobiotics) 및 과산화물 음이온(superoxide anion)과 같은 다양한 독소에 대한 이전자 환원효소로 작용한다. 이러한 스트레스 유도 상향조절의 관점에서, 효소가 다양한 암성조직 내에서 과발현되는 것은 놀라운 것이 아니다(특히 간 암종의 경우 50배까지의 비율로 과발현). 게다가, NQO1 상향조절이 정상세포가 암 세포로 병리학적으로 변형되는 초기의 사건일 수 있다고 이론화되었다(비특허문헌 6).

선행기술문헌

비특허문헌

[0004]

(비특허문헌 0001) A. Roda, M. Guardigli, Anal. Bioanal. Chem. 2012, 402, 69-76.

(비특허문헌 0002) N. Hananya, O. Green, R. Blau, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat, Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 56, 11793 ? 11796; Angew. Chem. 2017, 129, 11955-11958.

(비특허문헌 0003) H. Kobayashi, P. L. Choyke, Acc. Chem. Res. 2011, 44, 83-90.

(비특허문헌 0004) Q. Q. Miao, K. Y. Pu, Bioconjugate Chem. 2016, 27, 2808-2823.

(비특허문헌 0005) D. J. Ye, A. J. Shuhendler, P. Pandit, K. D. Brewer, S. S. Tee, L. N. Cui, G. Tikhomirov, B. Rutt, J. H. Rao, Chem. Sci. 2014, 5, 3845-3852.

(비특허문헌 0006) T. Cresteil and A. K. Jaiswal, Biochem. Pharmacol. 1991, 42, 1021-1027.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005]

본 발명에서는 NQO1 효소가 과발현된 암 세포에 고선택성을 갖는 발광 프로브 화합물 및 발광 센서를 제공하고 자 한다.

과제의 해결 수단

[0006]

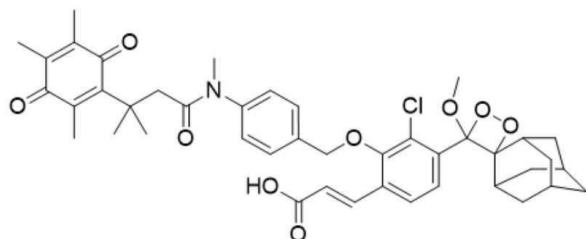
본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0007]

하기 [화학식 1]로 표시되는 암 세포 검출용 발광 프로브 화합물을 제공한다:

[0008]

[화학식 1]



[0009]

본 발명에 따르면, 상기 암 세포는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소-1(NQO1)가 과발현된 것일 수 있다.

[0011]

본 발명에 따르면, 상기 화합물은 NQO1에 의해 환원되어 화학 발광하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012]

또한, 본 발명은 상기 발광 프로브 화합물을 포함하는 암 세포 검출용 발광 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0013]

본 발명에 따른 발광 프로브 화합물은 특히 NQO1이 과발현된 암 세포에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 우수한 광물리적 특성과 낮은 세포독성을 가지고 있어 암 세포를 효과적으로 이미징할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1의 (A)는 NQ01 ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) 및 NAD(P)H ($100 \mu\text{M}$)와 함께 인큐베이션시 프로브 1 ($10 \mu\text{M}$)의 시간 의존적 화학 발광 연구 결과를 나타낸다. 515 nm에서의 강도 변화는 시간의 함수로서 모니터링되었고, inset은 기본 방출 스펙트럼을 나타낸다. (B)는 아미노산, 바이오티올, 환원 효소 등의 다양한 분석물들의 존재하에서 NQ01에 대한 프로브 1의 선택성을 나타낸 막대그래프이다: CPR: cytochrome P450 reductase, GSR: glutathione-disulfide reductase, NRD: nitroreductase. (C)는 10분에 걸친 프로브 1의 시간 경과 이미지를 나타낸다.

도 2의 (A)는 A549 세포 및 H596 세포와 함께 인큐베이션된 프로브 1의 시험관내 화학 발광 이미지 및 신호 강도 정량 결과를 나타낸 것이다. (B)는 A549 세포와 함께 인큐베이션된 프로브 1의 시간 의존적 화학 발광 강도를 나타낸 것이다. $50 \mu\text{M}$ 의 디쿠마롤의 존재(노란색) 또는 부재하에(주황색) 6시간 인큐베이션 후, A549 세포를 $10 \mu\text{M}$ 의 프로브 1로 처리하고, 화학 발광을 2시간 동안 측정하였다. 화학 발광 강도는 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다. (C)는 $Q_{\text{Me}}\text{NN}$ 과 비교한 프로브 1의 신호 대 잡음 강도 비율을 나타낸 것이다. NQ01-양성 A549 세포를 10 Mm 프로브 1 또는 $Q_{\text{Me}}\text{NN}$ 으로 처리하고, 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 프로브 1의 화학 발광 (CL) 또는 $Q_{\text{Me}}\text{NN}$ 의 형광 강도 (FL)를 시간의 함수로서 측정하였다.

도 3은 프로브 1로 처리한 후 비침습성 생물 발광 이미징 시스템을 사용하여 기록한 A549 및 H596 세포의 이중 이식 모델의 생체 내(In vivo) 및 생체 외(ex vivo) 이미지를 나타낸 것이다. (A)는 종양 보유 누드 마우스(A549- 또는 H596- 세포-유래 이중 이식편)에 프로브 1($100 \mu\text{L}$ PBS 중 $40 \mu\text{g}$, 10% DMSO) 또는 비히클(대조군)을 주사하고, 10분 후에 얻은 생체 내 화학 발광 이미지이다. (B)는 A549- 및 H596- 세포-유래 이중 이식편으로부터 절제된 종양으로 프로브 1 ($100 \mu\text{L}$ PBS 중 $40 \mu\text{g}$, 10% DMSO)을 직접 주사하고 10분 후에 기록한 생체 외 화학 발광 이미지이다. 프로브 1의 화학 발광 이미지는 생물 발광 이미징 시스템을 사용하여 측정하였다. 생체 외 이미징 연구를 위해, 초기 세포 접종 후 28일에 종양 보유 마우스로부터 종양 덩어리를 수확하였다.

도 4는 다양한 농도의 NQ01 효소 조건 하에서 보조 인자로서 NAD(P)H ($100 \mu\text{M}$)를 갖는 프로브 1 ($10 \mu\text{M}$)의 발광 강도를 나타낸 것이다($\lambda_{\text{em}} = 515\text{nm}$, 150 초의 평형 후에 기록된 데이터).

도 5는 PBS에서 NQ01 ($40 \mu\text{g/mL}$) 및 NADH ($100 \mu\text{M}$)와 함께 인큐베이션하기 전에 기록된 프로브 1 ($10 \mu\text{M}$)의 RP-HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다(적색선: 프로브 1, 청색선: 벤조에이트 (분해), 흑색선: 벤조화 유도체 (합성)).

도 6은 A549, H596 및 WI-38 세포에서 프로브 1의 세포 생존력을 나타낸 것이다. A549 (NQ01-양성, 암), H596 (NQ01-음성, 암) 및 WI-38 (NQ01-음성, 정상 폐) 세포를 0, 1, 5, 10, 30 및 $50 \mu\text{M}$ 의 프로브 1로 처리한 후 24시간 동안 인큐베이션 하였다. 데이터 값은 평균 $\pm$ S.D로 표시된다($n = 3$). * $p < 0.05$.

도 7은 H596, A549 및 WI-38 세포에서 NQ01의 단백질 발현을 나타낸 것으로, H596, A549 및 WI-38 세포의 NQ01 발현 수준을 보여주는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 8은 $50 \mu\text{M}$ 의 디쿠마롤의 존재 또는 부재하에서 A549 세포와 함께 2시간 동안 인큐베이션된 프로브 1에 대한 화학 발광 이미지 및 신호 강도 정량 결과를 나타낸 것이다. 다중 발광 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 화학 발광 강도를 측정하였다.

도 9는 디쿠마롤의 존재 또는 부재 하에서 프로브 1과 함께 인큐베이션 된 NQ01 음성 (H596 및 WI-38) 세포의 시험관내(In Vitro) 이미지를 나타낸 것이다. (A)는 프로브 1과 함께 인큐베이션된 H596 세포의 화학 발광 이미지 및 신호 강도 정량 결과를 나타낸 것이다. 화학 발광 이미지는 생물 발광 이미징 시스템을 사용하여 측정하였다. (B)는 프로브 1과 함께 인큐베이션된 H596 세포의 화학 발광 강도를 나타낸 것이다. $400 \mu\text{M}$ 디쿠마롤의 존재 또는 부재하에 6 시간 동안 인큐베이션 한 후, H596 세포를 2시간 동안 $10 \mu\text{M}$ 프로브 1로 처리하였다. (C)는 프로브 1과 함께 인큐베이션된 WI-38 세포의 화학 발광 강도를 나타낸 것이다. $400 \mu\text{M}$ 디쿠마롤의 존재 또는 부재하에 6 시간 동안 인큐베이션 한 후, WI-38 세포를 2시간 동안 $10 \mu\text{M}$ 프로브 1로 처리하였다. 다중 발광 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 화학 발광 강도를 측정하였다.

도 10은 NQ01 ($40 \mu\text{g/mL}$) 및 NADH ($100 \mu\text{M}$)와 함께 인큐베이션 시 $Q_{\text{Me}}\text{NN}$ ($10 \mu\text{M}$)의 시간 의존적 형광 연구 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0017] 실험 방법

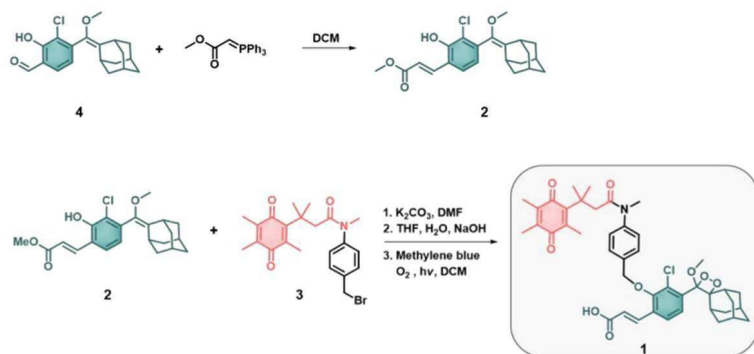
[0018] 재료, 방법 및 기기장치

[0019] 달리 언급되지 않는 한, 반응은 실온에서 수행하였다. 용매는 Duksan Pure Chemical Co., Ltd.의 분석 시약을 사용하였다. 박막 크로마토그래피 (TLC)는 실리카겔 플레이트 Merck 60 F254상에서 수행하였다. 실리카겔 60 (particle size 0.040-0.063 mm)을 고정상으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피 정제를 수행하였다. HPLC 분석은 역상 컬럼(C18, 5mm, Waters)이 장착된 YL9101S(YL-Clarity) 기기를 사용하여 수행하였다. 분석에 사용된 용리제는 5.0 mL/분 유속의 물-아세트니트릴 구배 (0-20분; 아세트니트릴 70 내지 100%)였다. UV-vis 검출기 (365 nm)가 사용되었다. 형광 및 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 각각 Shimadzu RF-5301PC 및 Agilent 8453 분광 광도계로 기록하였다. LC/MS-2020 시리즈 (Shimadzu)를 사용하여 ESI 질량 스펙트럼 분석을 수행하였다. 스펙트럼 및 생물학적 연구에 사용된 DMSO 및 다이쿠마롤(dicoumarol)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)에서 구매하였다. H₂O를 탈이온화시켰다. RPMI1640 배지 및 태아 소 혈청 (FBS)은 각각 Welgene (Gyeongsan-si, South Korea) 및 Gibco BRL Life Technologies (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Terrell™ 액체 (isoflurane)는 Piramal Critical Care, Inc. (Bethlehem, PA, USA)에서, Matrigel™은 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다. 마이크로 플레이트 및 마우스 (생체 외 및 생체 내)의 화학 발광 이미지는 Spectral Lago X 광학 이미징 시스템 (Spectral Instruments Imaging; AZ, USA, Tucson) 및 IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer; Waltham, MA, USA)을 사용하여 획득하였다.

[0021] 화합물 합성

[0022] 하기 합성 경로에 따라 본 발명에 따른 [화합식 1](화합물 1로 표시)의 화합물을 합성하였다.

[0023] [합성 경로]



[0024]

[0025] 화합물 2의 합성

[0026] 화합물 4 (200mg, 0.6mmol) 및 methy(triphenylphosphoranylidene)acetate (220mg, 0.66mmol)를 DCM (2ml)에 용해시켰다. TLC (Hex : EtOAc 90:10)로 모니터링하면서 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 반응 완료 후 반응 혼합물을 EtOAc (100 mL)로 희석하고, 0.5M HCl (50 mL) 및 염수 (50 mL)로 세척하였다. 잔류물을 실리카 겔상에서의 컬럼크로마토 그래피 (Hex : EtOAc 85:15)로 정제하여, 담황색 고체 화합물 2를 수득하였다 (211 mg, 수율 91%).

[0027] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.27 (d, J = 4.9 Hz, 1H),

2.12 (s, 1H), 2.02-1.66 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 232.43, 206.72, 173.51, 167.74, 150.65, 139.23, 136.60, 132.96, 126.80, 123.82, 123.70, 121.97, 121.54, 119.77, 95.27, 57.41, 51.86, 39.19, 38.89, 37.09, 32.95, 32.03, 29.78, 28.37, 24.44. MS (ES⁻): m/z calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClO}_4$: 388.14; found: 387.4 [MH]⁻.

[0029] 화합물 3의 합성

[0030] 0 °C에서 N-(4-(히드록시메틸)페닐)-3-메틸-3-(2,4,5-트리메틸-3,6-디옥소시클로헥사-1,4-디엔-1-일)부탄아마이드(1.35 g, 3.98 mmol)와 메틸렌 클로라이드 (30 ml) 중의 카본 테트라브로마이드(3.96 g, 11.9 mmol)의 혼합물에 Ph3P (1.30 g, 4.77 mmol)를 첨가하고, 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 용리액으로서 헵탄/에틸 아세테이트를 사용하여 실리카 크로마토그래피로 정제하여 화합물 3을 수득하였다(수율 72%).

[0032] 프로브 화합물 1의 합성

[0033] 화합물 2 (50 mg, 0.13 mmol) 및 K_2CO_3 (35 mg, 0.26 mmol)을 DMF (1 mL)에 용해시키고 10분 동안 교반한 후 화합물 3 (66 mg, 0.13 mmol)을 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고 TLC 분석 (Hex/EtOAc : 90:10)에 의해 반응 진행을 모니터링하였다. 반응이 완료된 시점에 휘발물을 감압하에서 증발시켰다. 이어서 THF, H_2O 및 NaOH (10 mg, 0.26 mmol)의 혼합물을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 추가 1시간 동안 80 °C에서 교반하였다. TLC 분석 (Hex:EtOAc, 60:40)에 기초하여 완전한 가수 분해를 확인한 후, 혼합물을 EtOAc (100mL)로 희석하고 0.5M HCl (50mL)로 세척하였다. 유기층을 분리하고, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고 감압 하에서 증발시켰다. 이어서, 미정제 잔류물을 DCM (20 mL)에 용해시킨 후, 메틸렌 블루 (~1 mg)를 첨가하였다. 용액에 황색 빛을 조사하면서 산소를 버블링시켰다. 반응을 RP-HPLC (수중 ACN의 구배, 0.1% TFA)에 의해 모니터링하였다. 반응 완료 후(약 20분), 혼합물을 감압하에 농축시키고, 생성물을 RP-HPLC (수중 ACN의 구배, 0.1% TFA)에 의해 정제하여 옅은 녹색 고체의 프로브 화합물 1을 수득하였다(57 mg, 수율 59%).

[0034] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.00 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.23 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.52 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.23 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 3.02 (s, 1H), 2.75 (s, 2H), 2.31 (d, J = 12.5 Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.98 (m, 6H), 1.93 (s, 3H), 1.87-1.54 (m, 9H), 1.46 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 1.29 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 191.3, 187.8, 172.3, 170.9, 154.7, 154.4, 144.4, 143.6, 140.2, 138.0, 136.5, 135.9, 135.5, 131.3, 130.3, 129.4, 127.8, 125.7, 121.1, 111.8, 96.5, 77.5, 77.2, 76.9, 75.7, 49.8, 47.8, 38.2, 37.3, 36.7, 34.0, 33.7, 32.8, 32.3, 31.6, 29.8, 28.6, 26.2, 25.9, 14.2, 12.8, 12.2, 2.0. MS (ES⁻): m/z calc. for $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{ClNO}_9$: 757.3; found: 756.6 [M-H]⁻.

[0036] LOD determination

[0037] 검출 한계는 0-1 ($\mu\text{g/mL}$) 범위에서 NQ01 효소에 대한 발광 강도의 선형 회귀로부터 결정되었다(하기 식 1 참조).

[0038] [식 1]

[0039] $y = mX + C$ as

[0040] $I = 43.450[\text{NQ01}] + 1.0937$

[0041] Hence $\text{LOD} = 3.3 \times 0.6695/43.450 = 0.051$ ($\mu\text{g/mL}$) using formula $\text{LOD} = 3.3 \times \sigma/m$

[0042] $m = \text{slope of calibration curve (43.450)}$

- [0043] σ = standard deviation of blank readings (0.6695)
- [0045] 세포 배양
- [0046] A549 (human lung epithelial adenocarcinoma) 및 H596 (human lung adenosquamous carcinoma) 세포를 37℃, 5% CO₂를 함유한 습한 분위기에서 FBS, 100 IU/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 있는 RPMI1640에서 성장시켰다.
- [0048] 세포 생존력 평가
- [0049] 대략 2x10⁴ 세포를 96 웰 마이크로 플레이트 (SPL Life Science)에 시딩하고 24시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후, 세포를 대조군으로서 DMSO로 처리하거나, 또는 24시간 동안 프로브 화합물 1로 처리하였다. 프로브 화합물 1의 존재 및 부재 하에서 세포의 세포 생존력을 분석하기 위해, 제조사의 지시에 따라 CytoTox96® 비방사능성 세포 독성 분석 키트 (Promega)를 사용하였다. SPECTRA MAX GEMINI EM 마이크로 플레이트 리더 (Molecular Devices)를 사용하여 형광 레벨을 측정하였다. 파장은 490nm로 설정되었다. 세포 생존력 분석을 3회 수행하고, 생존력(%)을 대조군 세포에 대한 측정된 흡광도의 백분율로 표현하였다.
- [0051] 웨스턴 블롯팅 분석
- [0052] 웨스턴 블롯팅에 의해 NQ01의 단백질 발현 수준을 측정하였다. 간략하게, 해당 세포주의 부착된 세포를 차가운 PBS로 3회 세척하고 굵어 세포 펠렛을 수집하였다. PBS를 제거한 후, 제조자 (Up-State)에 의해 제공된 프로테아제 억제제를 함유하는 방사선 면역 침전 분석 (RIPA) 용해 완충액을 세포 펠렛에 첨가하여 단백질을 용해물을 획득하였다. BCA 분석을 수행하여 각 세포주의 단백질 농도를 측정한 다음, 각 세포주의 단백질 (30 µg/lane)을 SDS-PAGE에 로딩하여 단백질을 밴드로 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF 멤브레인 (Merck Millipore)으로 옮겼다. 상기 멤브레인을 1/1000에서 NQ01 항체 (Santa Cruz Biotechnology), 또는 1/1000에서 GAPDH 항체 (Santa Cruz Biotechnology)와 함께 또는 4 °C에서 밤새 희석하여 배양하였다. 생성된 막을 트윈-20(TBS-T)을 함유한 트리스-버퍼 식염수로 세척한 다음, HRP(anti-rabbit horseradish peroxidase)-접합된 이차 항체 (Santa Cruz Biotechnology)와 함께 2시간 동안 실온에서 인큐베이션 하였다. 면역 반응성 단백질 밴드를 검출하기 위해, 강화된 화학 발광 시약 (Luminate, Merck Millipore)을 제조사의 지시에 따라 사용하였다.
- [0054] 인비트로(In vitro) 화학발광 이미징
- [0055] A549 및 H596 세포를 24 웰 플레이트에 시딩하였다. 24시간 동안 인큐베이션 한 후, 세포를 NQ01 억제제인 50 µM 디쿠마롤 (1.04 mM NaOH)의 존재 또는 부재하에 6시간 동안 인큐베이션 하였다. 이어서, RPMI1640 배지에서 10 µM의 프로브 1을 각 웰에 첨가하였으며, 생물발광 이미징 시스템을 이용하여 화학 발광 이미지 (chemiluminescence image)를 획득하였다.
- [0057] 인비보(In vivo) 화학발광 이미징
- [0058] 특정 병원체가 없는 5주령 암컷 BALB/c 누드 마우스 (Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan)를 제어된 온도 (22±2 °C) 조건하에 수용하고, 12시간 동안 명/암 사이클을 거치도록 하였다. 병원체가 없는 특정 조건하의 고려대학교 동물 시설에서 마우스를 유지하고 고려 대학교 동물 동물 관리위원회 지침에 따라 인도 주의적 관리를 받았다. 50 % MatrigelTM을 함유하는 무혈청 배지 중 A549 및 H596 세포 (5x10⁵ cells/100 µL)를 피하 주사하였다. 마우스를 각 세포주에 대해 2개의 그룹 (그룹당 n=5)으로 무작위화 하였다. 28 일째에, 마우스를 TerrellTM 액체 (이소플루란)로 마취시키고, 종양 내 주사 한 후, 10분 동안 100% PBS, 10% DMSO 중의 프로브 1 (40 µg)의 용액을 10분 동안 주사하여 생체 발광 이미지를 획득하였다. 대조군의 경우, 마우스를 100 µL PBS, 10% DMSO 비히클로 처리하였다. Spectral Lago X 광학 이미징 시스템을 사용하여 프로브 1 및 음성 대조군의 생체 내 화학 발광 이미지를 획득하였다.

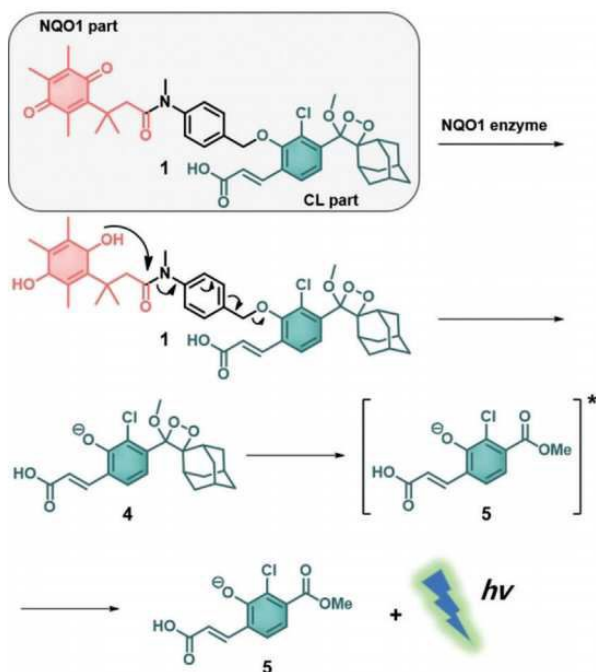
[0060] 엑스비보(Ex vivo) 화학발광 이미징

[0061] 프로브 화합물 1을 이용한 엑스비보(Ex vivo) 영상 연구는 전술한 종양 이종 이식 모델을 사용하여 수행하였다. 접종 후 28 일째에, 마우스를 희생시키고 종양 조직을 신체에서 즉시 제거 하였다. 그런 다음 10% DMSO, PBS 중 프로브 화합물 1(40 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)을 종양 덩어리에 직접 주입하였다. 대조군의 경우에 DMSO/PBS (1:9) 비히클을 사용하여 유사한 주사를 수행하였다. 생체 외 화학 발광 이미지는 Spectral Lago X 이미징 시스템을 사용하여 수득하였다.

[0063] **결과 및 고찰**

[0064] 본 발명에서는 다양한 암 세포에서 NQO1 활성의 차등 검출을 가능하게 하는 신규 화학 발광 화합물(프로브 1)을 합성하였으며, 상기 프로브 1의 다양한 암 세포에서의 NQO1 검출 가능 여부를 시험하였다. 프로브 1의 화학적 구조 및 NQO1-매개 화학 발광 메커니즘은 각각 상기 [합성 경로] 및 [하기 화학 발광 메커니즘]에 나타내었다.

[0065] [프로브 1의 화학 발광 메커니즘]



[0066]

[0067] 본 발명에 따른 화합물 1은 파라-아미노벤질 알코올 자가-축합 링커를 통해 트리메틸-락킹 퀴논에 공유 결합된 아크릴산-치환 페녹시-디옥세탄으로 구성된다. 페녹시-디옥세탄 모이어티는 화학 발광을 생성하도록 설계되었다: 페놀레이트는 생리학적 조건하에서 형성되며, 이는 자발적으로 화학 발광 공정을 거쳐 녹색광을 생성시킨다. 프로브 1의 경우 필수 유리 페놀레이트는 퀴논의 NQO1-매개 환원시 생성되며, 이어서 분자 내 락톤화 및 벤질아닐린 테더의 제거가 일어난다.

[0068] 다음으로, 시간의 함수로서 프로브 1의 화학 발광 방출을 NQO1의 존재하에서 시험하였다. 달리 지시되지 않는 한, 모든 무세포 실험은 37 $^{\circ}\text{C}$, PBS(pH 7.4, 0.5% DMSO)에서 수행되었다. 프로브 1 자체는 비방출형이다. 그러나 NQO1 (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$)으로 처리할 경우 NAD(P)H (100 μM)의 존재하에, 130배 증가된 신호 강도와 함께 전형적인 화학 발광 반응이 515 nm에서 관찰되었다(도 1A). NQO1에 대한 프로브 1의 최소 검출 한계 (LOD)는 51 ng mL^{-1} 인 것으로 나타났다(도 4). 예상한 바와 같이, 처음 5분 동안 신호 강도의 급격한 증가가 관찰되었고, 화학 발광 출력이 느리게 감소하였다(도 1C).

[0069] 다음으로, 중심 테더(central thther)의 절단 및 활성 페놀레이트 형태의 방출을 초래할 것으로 예상되는 다른 생물학적으로 풍부한 아미노산, 바이오-티올 및 환원 효소의 존재 하에서 NQO1에 대한 프로브 1의 선택성을 시험하였다. 시험 결과, 도 1B에 나타난 바와 같이, 프로브 1은 NQO1의 존재 하에서만 화학 발광을 나타내었고,

다른 추정 화학 또는 생물학적 트리거에 노출될 때에는 화학 발광을 나타내지 않았다.

[0070] 다음으로, 프로브 1의 화학 발광 메커니즘 확인을 위해, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여, NQ01 및 NAD(P)H의 존재하에서 프로브 1로부터 생성된 물질을 분석하였다(도 5). 프로브 1 자체는 HPLC 크로마토그램에서(C18 column; 70-100% gradient of acetonitrile in water, 0.1% TFA) $t = 13$ 분에서의 피크가 관찰되었으며, NQ01 및 NAD(P)H와 30분 동안 인큐베이션 한 후에는 하이드록시 벤조에이트(화합물 5)에 상응하는 피크가 독점적으로 관찰되었다(프로브 1의 화학 발광 메커니즘 참고). 이러한 결과를 통해, 상기 화학 발광 메커니즘에 나타난 바와 같이, 프로브 1이 NQ01 및 NAD(P)H로 구성된 혼합물에 대한 효과적인 기질로 작용하여, 관찰된 녹색 발광에 상응하는 최종 화학 종을 생성하기 위해 효율적인 효소 환원 및 신속한 분해를 겪는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0071] 다음으로, NQ01 매개 화학 발광 반응을 생성하는 프로브 1의 능력을 시험관내(in vitro) 모델에서 추가로 조사하였다. 이들 연구를 위해, A549 (인간 폐상피 선암종), H596 (인간 폐선 종양 암종) 및 WI-38 (정상 폐) 세포주를 선택하였다. 표준 배양 조건(세포 생존력 분석)에서 프로브 1은 최대 50 μM 농도까지 유의한 세포 독성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 시험된 모든 세포주에서 나타났으며, 이를 통해, 본 발명에 따른 프로브의 안전성을 확인할 수 있었다(도 6). 다음으로, 이들 세포주에서 웨스턴 블롯 분석을 통해 NQ01의 단백질 발현 수준을 측정하였다(도 2B 및 도 7). 먼저, 종래 보고된 바와 같이(E. A. Bey, M. S. Bentley, K. E. Reinicke, Y. Dong, C. R. Yang, L. Girard, J. D. Minna, W. G. Bornmann, J. M. Gao, D. A. Boothman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104, 11832-11837), NQ01 수준은 A549, H596 및 WI-38 세포주 사이에서 실질적으로 상이하였으며, A549 세포에서 대략 10배 더 높은 것으로 밝혀졌다. 이러한 차이는 NQ01이 시험관에서 프로브 1에 의해 생성된 화학 발광 수준을 매개하는 역할을 하는지를 시험 할 수 있게 하였다.

[0072] 다음으로, A549, H596 및 WI-38 세포를 10 μM 의 농도로 10분 동안 프로브 1과 함께 인큐베이션 하고, 생물 발광 이미지를 사용하여 이미지화 하였다. 도 2A 및 도 8에 도시된 바와 같이, 방출 반응의 최대 34배 증가가 관찰되는 A549 세포로부터 강한 신호가 관찰되었다. 화학 발광 신호 강도는 분석의 처음 5분 동안 증가한 다음 약 10분 동안 지속된 후, 40-60분 동안 천천히 감소하였다(도 2B). 반면, NQ01 수준이 낮은 (또는 NQ01-음성) H596 및 WI-38 셀의 경우 그러한 방출 반응이 관찰되지 않았다(도 2A 및 도 9). 이러한 결과는 웨스턴 블롯팅 실험으로부터 추론된 A549 세포에서 NQ01 수준의 과발현 결과와 일치하며, 이 효소가 프로브 1의 활성화에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 이는 A549 세포를 디쿠마롤 (화학 NQ01 억제제)과 사전 배양한 후 프로브 1로 처리한 실험에서 화학 발광 강도가 현저하게 감소하는 결과를 통해서도 입증되었다(도 2B, 도 8-9).

[0073] 프로브 1의 발광 방출을 A549 세포에서 NQ01 활성 모니터링에 사용되어온 종래 나프탈이미드 기반 프로브인 Q_{Me}NN(G. G. Dias, A. King, F. de Moliner, M. Vendrell, E. N. da Silva, Chem. Soc. Rev. 2018, 47, 12-27)의 형광 반응과 비교하였다(도 10). 도 2C에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 화학 발광 프로브 1은 120분에 걸쳐 형광 프로브 Q_{Me}NN보다 상당히 높은 신호대 잡음비를 발생시켰다. 종합적으로, 이들 결과는 프로브 1이 NQ01이 과발현된 암성 병변의 영상화에 유용할 수 있고, NQ01 양성 종양과 NQ01의 발현 수준이 낮은 정상 조직 또는 종양과 차별화할 수 있음을 암시한다.

[0074] 생체 내(in vivo)에서 NQ01 활성을 시각화하는 프로브 1의 능력을 시험하기 위해, A549 및 H596 세포주로부터 유래된 분리된 이종 이식편을 BALB/c 누드 마우스의 우측 측면에 피하 성장시켰다. 프로브 1 (100 μL PBS 중 40 μg , 10 % DMSO 함유)을 종양 내 주사하였다. 생체 내 화학 발광 이미지는 생물 발광 이미징 시스템을 사용하여 515-575 nm에서 수집하였다. 도 3A에 도시된 바와 같이, A549-종양 보유 마우스의 경우 종양 영역에 걸쳐 강한 화학 발광 방출이 나타났다. 상응하는 NQ01-음성 H596-세포주 유래 이종 이식편의 경우에는 식별 가능한 신호가 관찰되지 않았다. A549 종양의 생체 외(Ex vivo) 영상 분석도 수행되었다. 그 결과, 화학 발광 신호는 A549 종양에만 존재하는 반면, 다양한 대조군들에서는 눈에 띄는 신호가 관찰되지 않았다(도 3B).

[0076] 요약하면, 본 발명에서는 NQ01 효소 환원에 따라 가시화하기 쉬운 광방출 반응을 생성하는 새로운 화학 발광 프로브 1을 제공한다. 전술한 시험에서, 프로브 1은 생리학적 pH에서 NQ01과 NAD(P)H의 조합으로 처리될 때 거의 즉각적인 반응을 나타내었다. 블랭크 컨트롤과 비교할 때 이들 조건 하에서 프로브 1에서는 최대 130 배의 발광 강도의 향상이 나타났다. 이러한 반응은 귀는 잔기의 생물-환원에 이어 활성 화학 발광 폐녹시디옥세탄을 방출하기 위한 고리화에 기인한다. 또한, 일반적인 바이오 분석 물질들에 대해서는 화학 발광 반응이 일어나지 않은 결과로부터, 효소 환원은 프로브 1의 기능에 결정적인 것임을 확인할 수 있었다. 또한, 여러 시험 관내 및 생체

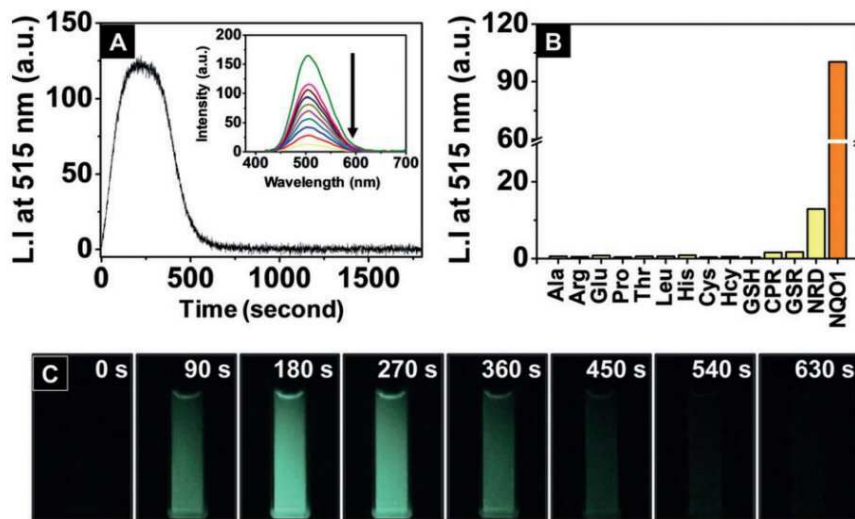
내 연구를 통해, 상이한 수준의 NQO1 활성을 갖는 인간 폐암을 구별하는 프로브 1의 능력을 확인하였다. 특히, 프로브 1은 NQO1 효소가 높은 수준으로 발현된 A549 세포 및 마우스 이중 이식편에서 강한 반응을 생성하는 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, NQO1-음성 H596 세포주 및 이중 이식 마우스 종양에서는 눈에 띄는 반응이 보이지 않았다. 이러한 결과들을 통해, 본 발명에 따른 프로브 1은 전임상 환경에서 NQO1 활성의 광학적 모니터링에 유용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명에 따른 프로브 1은 NQO1이 과발현된 폐암의 조기 진단, 외과적 또는 임상적 병변의 식별 등에 유용할 것으로 기대된다.

[0078]

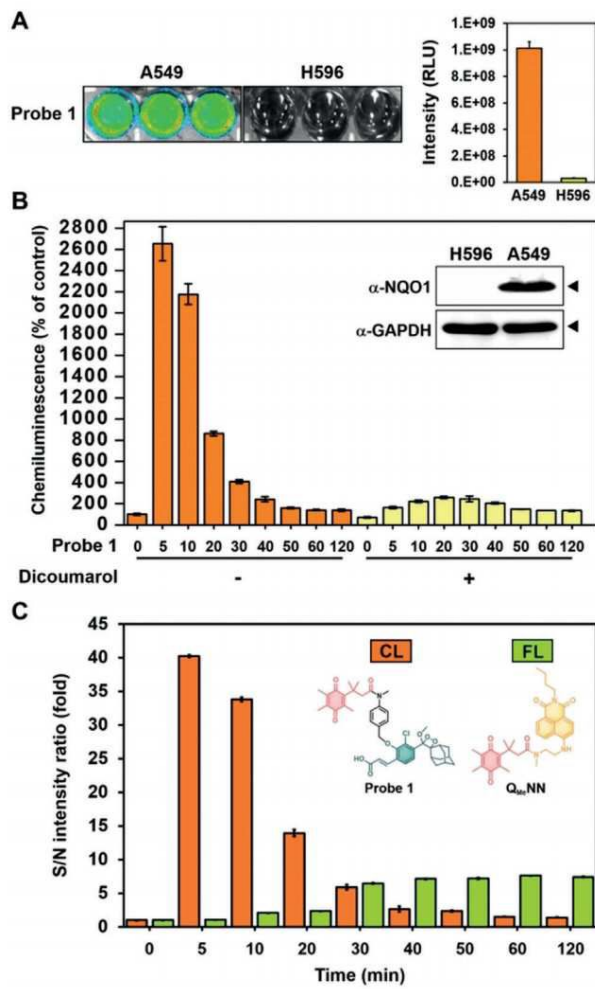
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

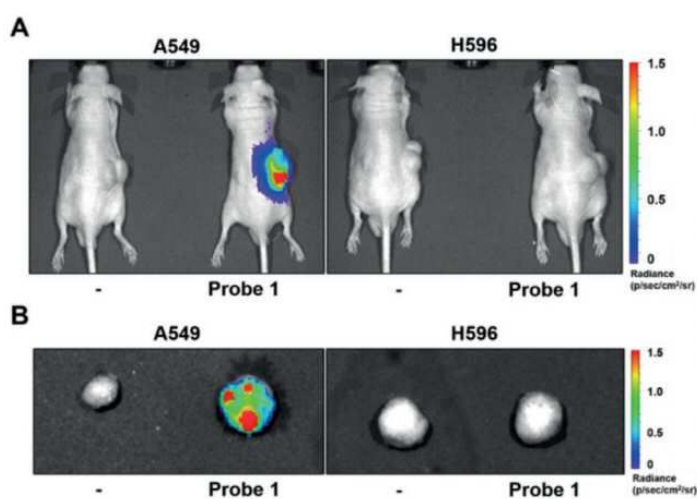
도면1



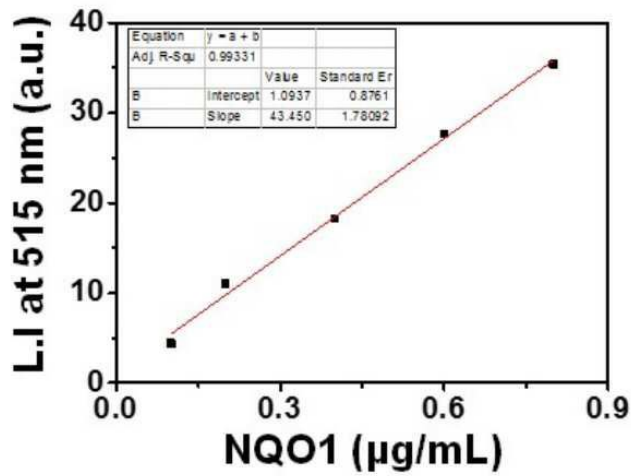
도면2



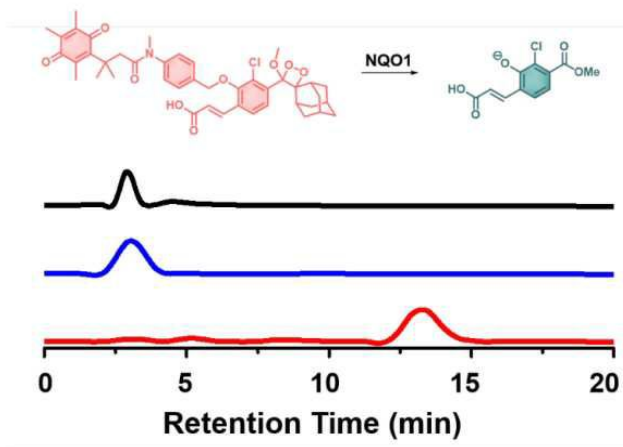
도면3



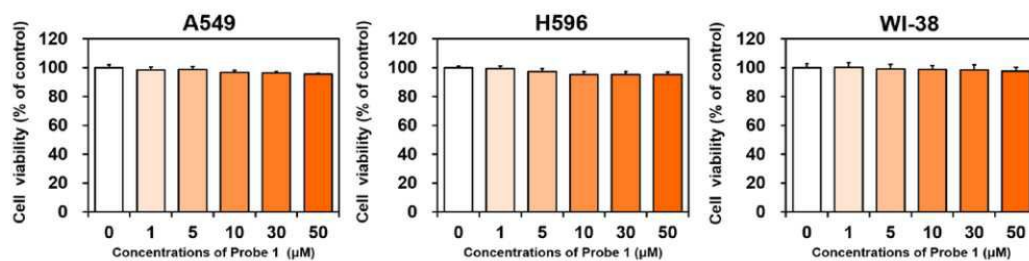
도면4



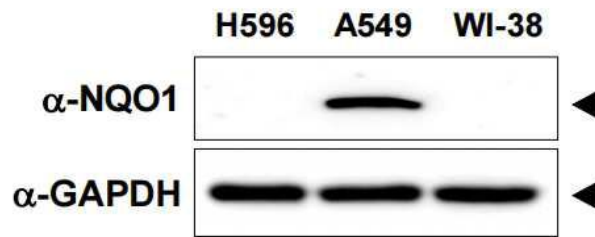
도면5



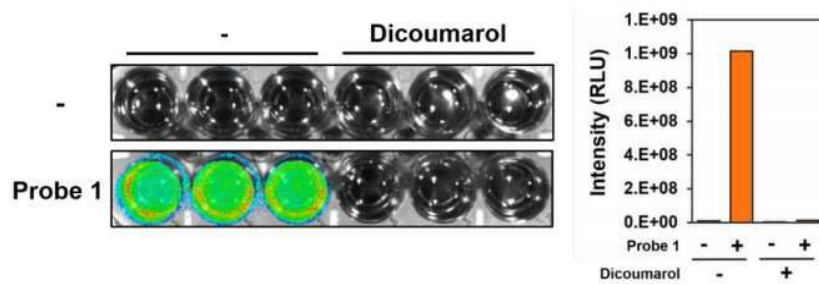
도면6



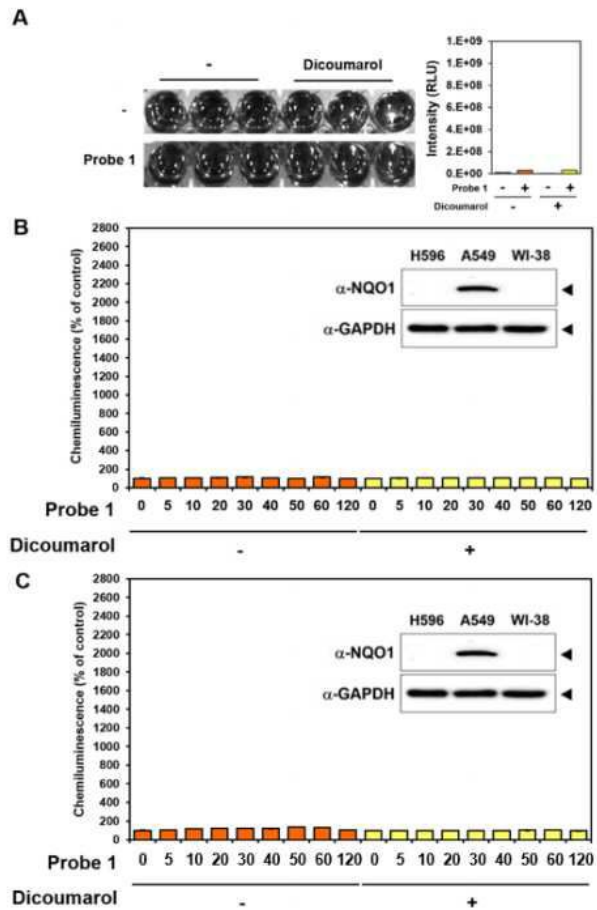
도면7



도면8



도면9



도면10

