



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0134935
(43) 공개일자 2014년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0055004

(22) 출원일자 2013년05월15일

심사청구일자 2013년05월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

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

(74) 대리인

특허법인충현

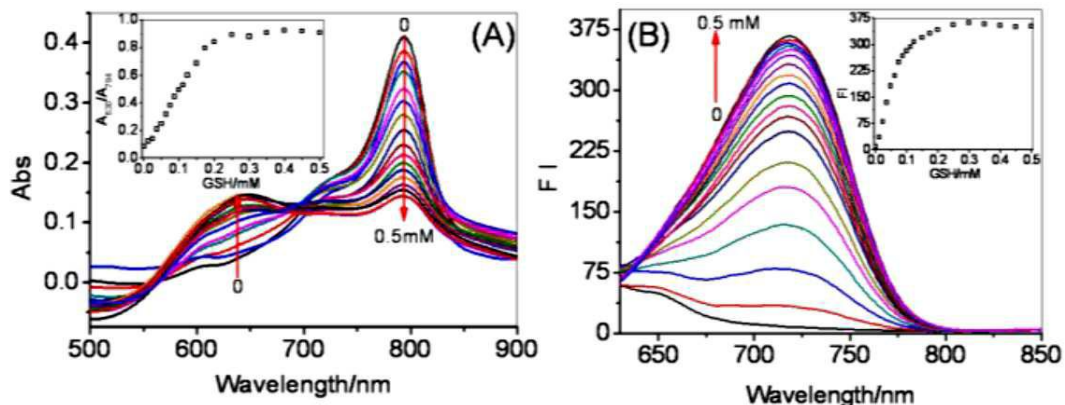
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 엽산 Cy7계 치료진단용 약물 전달 시스템 및 이것의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 근적외선 형광 모니터링을 위해서 Cy7 염료가 부착된 새로운 약물 전달 시스템 및 이것의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 특정 암세포에 효과적으로 전달될 수 있으면서도, 더욱 향상된 형광 특성을 갖기 때문에, 생체 내에서 효과적인 실시간 모니터링이 가능한 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다.

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

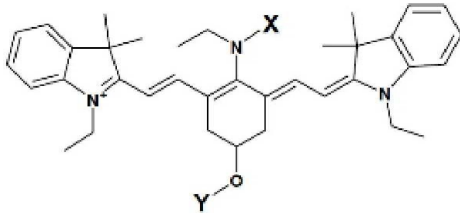
연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 표적 특이적 약물 전달 시스템으로서,

<화학식 1>



상기에서, X는 약물이고, Y는 암 특이적 리간드인 것을 특징으로 하는 표적 특이적 약물 전달 시스템.

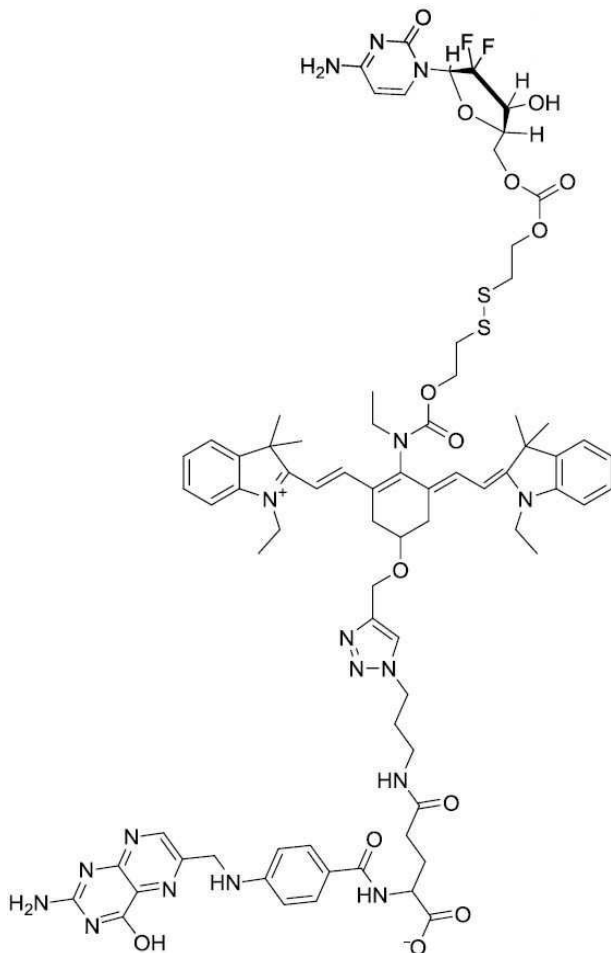
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 X는 겐시타빈(gemcitabine), 팍리탁셀(paclitaxel), sn-38 또는 독소루비신(doxorubicin)인 것을 특징으로 하는 표적 특이적 약물 전달 시스템.

청구항 3

하기 화학식 2로 표시되는 표적 특이적 약물 전달 시스템.

<화학식 2>



청구항 4

화학식 3의 화합물의 메소-위치에 클로로를 에틸아민으로 치환시킴으로써 화학식 4의 화합물을 제조하는 단계;

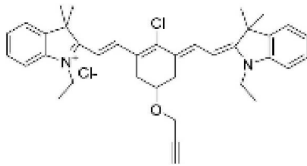
상기 화학식 4의 화합물을 포스겐 및 2,2'-히드록시에틸 디설파이드와 반응시킴으로써 화학식 5의 화합물을 제조하는 단계;

상기 화학식 5의 화합물을 포스겐 및 젤시타빈과 반응시킴으로써 화학식 6의 화합물을 제조하는 단계; 및

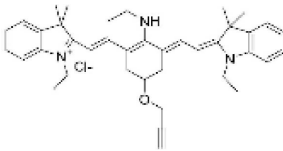
상기 화학식 6의 화합물을 아지도프로필-염산과 접합시킴으로써 화학식 2의 화합물을 제조하는 단계

를 포함하는 화학식 2로 표시되는 표적 특이적 약물 전달 시스템의 제조 방법.

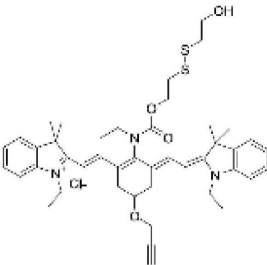
<화학식 3>



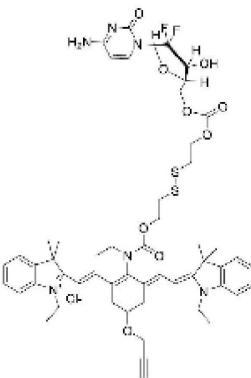
<화학식 4>



<화학식 5>



<화학식 6>



명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 근적외선 형광 모니터링을 위해서 Cy7 염료가 부착된 새로운 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[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. 대표적인 표적 특이적 약물 전달 시스템은 약물 전구체 및 표적화 유닛으로 이루어지며, 양자는 세포내 티올, 효소 또는 pH 변화 등에 의해서 절단가능하다. 그러나, 이러한 약물 전달 시스템의 약물 전달 기작에 대해서는 거의 알려진 바가 없는데, 이는 대부분의 항암제 약물들이 본질적으로 비형광성이기 때문이다. 종래 쿠마린, 파이렌 등과 같은 몇몇 형광체들이 리포터 화합물로 사용된 바 있으나, 이들은 동물 등에 사용되는 경우, 광이 조직을 통과하지 못하는 결정적인 단점을 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

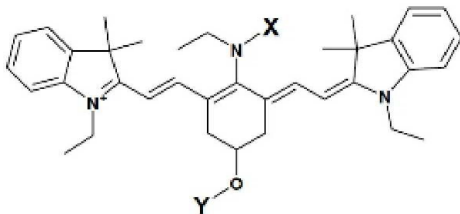
[0003] 전술한 문제점을 인식하여 본 발명에서는 항암 약물인 젬시타빈을 표적 암세포에 효과적으로 전달할 수 있으면서도, 강한 형광성을 나타내기 때문에 실시간 형광 영상화에 의해서 모니터링이 가능한 약물 전달 시스템을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명에 따른 약물 전달시스템은 3개의 부분으로 구성된다. 제1 부분은 암 특이적 리간드의 역할을 한다. 제2 부분은 Cy7(heptamethine cyanines) 유닛이고, 이것은 근적외선 형광 리포터의 역할을 한다. 제3 부분은 약물전구체로서, 질병의 치료 또는 진단에 적절한 약물전구체가 적용될 수 있다.

[0005] 본 발명의 일 구체에는 화학식 1로 표시되는 Cy7 계 유닛을 포함하는 표적 특이적 약물 전달 시스템을 제공한다.

[0006] [화학식 1]

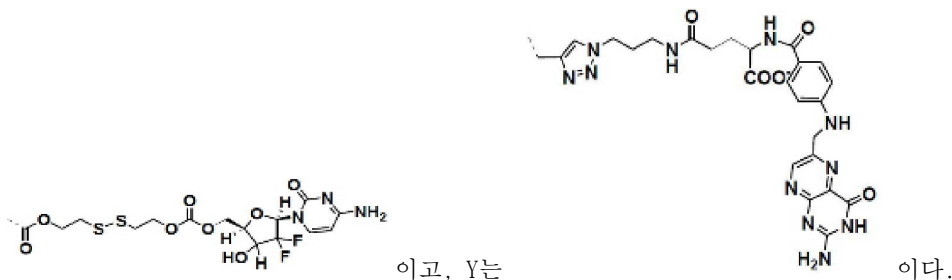


[0007]

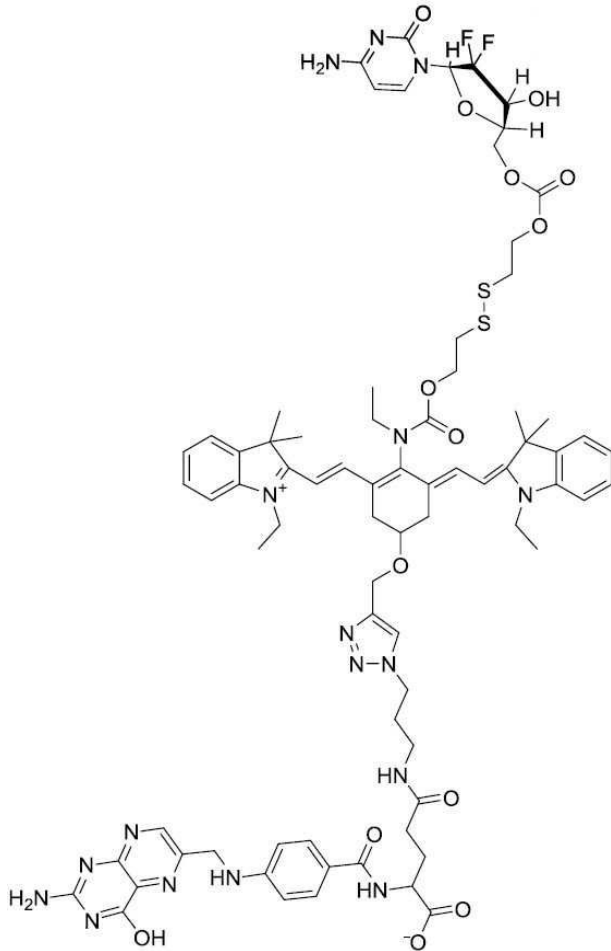
[0008] 상기에서, X는 약물전구체이고, Y는 암 특이적 리간드이다.

[0009] 상기 약물 전구체로는 젬시타빈(gemcitabine) 뿐만 아니라, 팍리탁셀(paclitaxel), sn-38 또는 독소루비신(doxorubicin)과 같은 항암제를 사용할 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 구체에는 하기 화학식 2로 표시되는 약물 전달 시스템을 제공한다. 화학식 2로 표시되는 약물 전달 시스템은 상기 화학식 1의 골격 구조를 가지고, X는 젬시타빈을 갖고, Y는 엽산을 갖는다. 즉, X는



[0011] <화학식 2>



[0012]

[0013] 또한, 본 발명의 다른 구체예는 화학식 2로 표시되는 표적 특이적 약물 전달 시스템의 제조 방법을 제공한다. 이 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다:

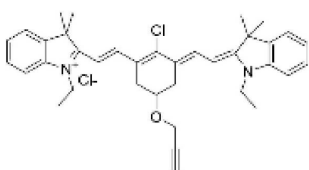
[0014] 화학식 3의 화합물의 메소-위치에 클로로기를 에틸아민으로 치환시킴으로써 화학식 4의 화합물을 제조하는 단계;

[0015] 상기 화학식 4의 화합물을 포스겐 및 2,2'-히드록시에틸 디설파이드와 반응시킴으로써 화학식 5의 화합물을 제조하는 단계;

[0016] 상기 화학식 5의 화합물을 포스겐 및 겐시타빈과 반응시킴으로써 화학식 6의 화합물을 제조하는 단계; 및

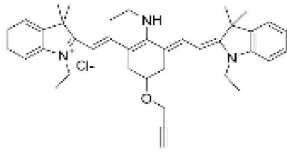
[0017] 상기 화학식 6의 화합물을 아지도프로필-엽산과 접합시킴으로써 화학식 2로 표시되는 표적 특이적 약물 전달 시스템을 제조하는 단계.

[0018] <화학식 3>



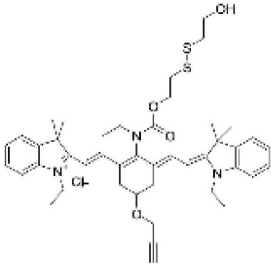
[0019]

[0020] <화학식 4>



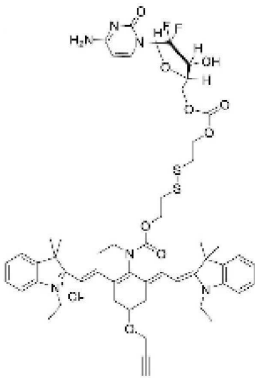
[0021]

[0022] <화학식 5>



[0023]

[0024] <화학식 6>



[0025]

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따르면, 특정 암세포에 효과적으로 전달될 수 있으면서도, 더욱 향상된 형광 특성을 갖기 때문에, 생체 내에서 효과적인 실시간 모니터링이 가능한 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 화학식 2의 화합물의 흡수 및 형광 스펙트럼 변화를 보여주는 그래프이다.

도 2는 화학식 2의 화합물로 처리된 KB 및 A549 세포의 공초점 현미경 이미지이다.

도 3는 화학식 2의 화합물 및 Lyso-Sensor Blue DND-167 또는 ER-tracker Red로 처리된 KB 세포의 공초점 레이저 형광 현미경 이미지이다.

도 4는 KB 및 A549 세포주의 세포 생존능 분석 그래프이다. 여기서 검정 그래프(1)는 화학식 2의 화합물로 처리된 것이고, 적색 그래프(2)는 엽산기가 없고 젤시타빈만 갖는 화학식1의 화합물로 처리된 것이다.

도 5은 화학식 2의 화합물을 투여한 KB 암 보유 쥐에서 암 조직 부분의 이미지이다.

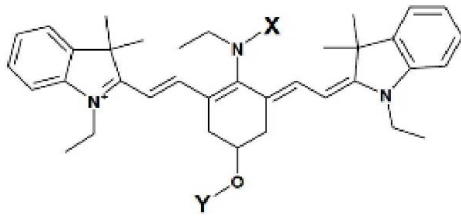
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하에서, 본 발명에 대하여 상세하게 설명하고자 한다.

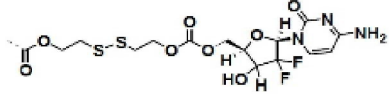
[0029] 본 발명은 근적외선 모니터링이 가능한 Cy7계 염료를 포함하는 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

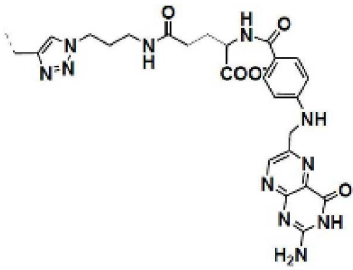
[0030] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 표적 특이적 약물 전달 시스템에 관한 것이다.

[0031] [화학식 1]



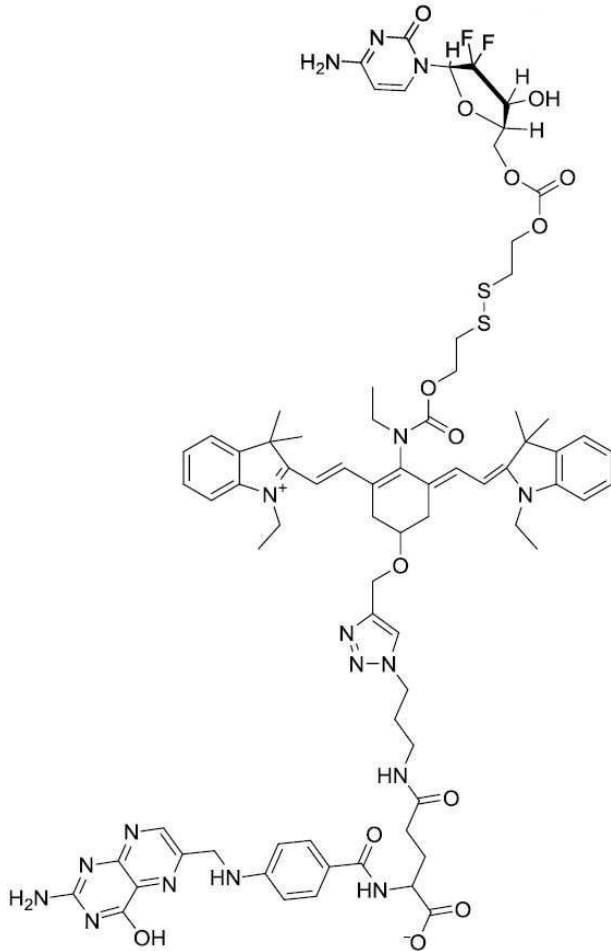
[0032]

[0033] 상기에서, X는  이고, Y는

[0034]  이다.

[0035] 또한, 본 발명의 다른 구체예는 화학식 2로 표시되는 표적 특이적 약물 전달 시스템을 제공한다.

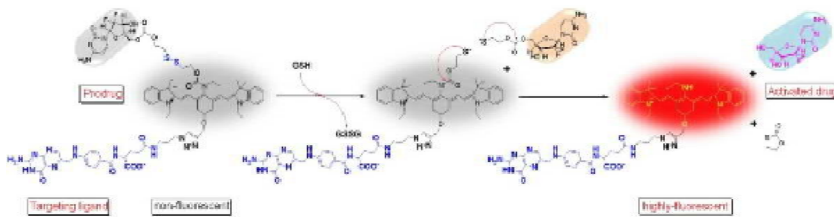
[0036] <화학식 2>



[0037]

[0038] 본 발명의 약물전달시스템은 반응식 1과 같은 반응에 의하여 형광을 나타내게 된다.

[0039] [반응식 1]



[0040]

[0041] 반응식 1에서는 약물로서 젬시타빈을 갖는 본 발명에 따른 약물 전달 시스템이 예시되었다. 본 발명에 따른 약물 전달 시스템은 L-글루타티온(GSH)과 같은 티올기가 절단되면서, 본 발명에 따른 약물 전달 시스템은의 이황화 결합은 티올을 형성한다. 이황화 결합의 절단에 따라 황화물 음이온이 생성되고, 이것이 젬시타빈의 5'-히드록시기 및 Cy7의 메소-위치에서 카르바민산염의 세포내 고리화를 만든다. 그리고 아미드기 및 젬시타빈을 분해시킨다. 이와 동시에 Cy7 형광의 강도가 증가된다. 결국, 본 발명의 약물 전달 시스템은 젬시타빈과 함께 암세포로 이동하여, in vitro 및 in vivo 실시간 형광 이미지에 의한 모니터링을 가능하게 만든다.

[0042] 이하, 실시예 및 도면 등을 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0043] 시료 제조

[0044] 모든 반응은 무수 조건하에서 건조된 신선하게 증류된 용매로 아르곤 분위기하에서 수행되었다. 실리카 겔(100-

200 메쉬)은 정제를 위하여 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 사용되었다. 모든 실험에서 사용된 물은 Milli-Q-시스템 장치에서 2중 정제시켰다. 화합물의 용액은 DMSO 중 1.0 mM 저장 용액으로 통상 제조되었다.

[0045] 세포 배양

[0046] KB 세포(HeLa 감염균, KCLB, 서울, 한국)는 페니실린(100 유닛/ml), 스트렙토마이신(100 ug/mL) 및 10% FBS(웰진)으로 보충된 RPMI(웰진, 서울, 한국)에서 배양시켰다. 촬영 2일 전, 세포를 계대배양하고, 유리바닥 그릇에 플레이트하였다. 모든 세포들은 37°C의 5/95(v/v) 비율의 CO₂/공기의 습기 분위기로 유지하였다. 표지 (labelling)를 위하여, 성장 배지를 제거하고, FBS가 없는 RPMI로 교환하였다. 이 세포들은 30분 동안 5% CO₂하 37°C에서 화합물(젬시타빈 등)과 함께 항온처리하였다. 이 세포들은 포스페이트 완충된 식염수(PBS, Gibco)로 3회 세척한 후, 15분간 무색의 무혈청 배지에서 추가로 항온처리하였다.

[0047] 이광자 형광 현미경 촬영

[0048] 표지된 세포 및 조직의 이광자 형광 현미경 이미지를 촬영하기 위하여, 공초점 및 다중 광자 현미경(Leica TCS SP2)을 사용하였다. 이광자 형광 현미경 이미지는 모드-잠금된 티타늄-사파이어 레이저 광원(Coherent 카멜레온, 90 MHz, 200 fs) 세트로 프로브를 여기시켜 출력 1260 mW 및 파장 740 nm에서 DM IRE2 현미경(Leica)를 사용하여 얻었다. 650-750 nm 범위의 이미지는 800 및 400 Hz 스캔 속도에서 각각 8 비트 부호없는 512×512 및 1024×1024 픽셀에서 시그널을 수집하도록 내부 PMT를 사용하였다.

실시예 1

[0049] **본 발명에 따른 약물 전달 시스템(화학식 2의 화합물) 합성**

[0050] (1) 화학식 4의 화합물 합성

[0051] 종래 방법에 의하여 제조된 화학식 3의 화합물(0.15 g, 0.25 mmol)을 건조된 100 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고 50 mL 무수 아세트니트릴을 추가하였다. 상기 용액에 톨루엔 용액의 에틸아민(2 M, 1.5 mL)을 추가하였다. 상기 용액을 빛이 없는 50°C에서 교반하고, TLC로 모니터링하여 출발 물질인 화학식 3의 화합물이 완전히 소비되면, 실온에서 냉각시키고, 진공에서 용매를 제거하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(DCM/메탄올 100/0-95/5 v/v)를 통하여 정제하여 금속성 광채를 갖는 파란 고체 물질을 수득하였다. 수득한 고체를 메틸렌 클로라이드에 용해시키고 등압 깔대기를 통하여 여과시켜 메탄올에 용해된 실리카를 제거하였다. 용매를 증류시키고 진공하에서 건조시켜 0.12 g의 화학식 4의 화합물을 수득하였다(0.12 g, 수율 80%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.77 (CH, 2H, d, J = 12 Hz); 7.27 (ArH, 2H, d, J = 8 Hz); 7.25 (ArH, 2H, t, J = 8 Hz); 7.06 (ArH, 2H, t, J = 8 Hz); 6.85 (ArH, 2H, t, J = 8 Hz); 5.57 (CH, 2H, d, J = 12 Hz); 4.28 (CH, 2H, s); 3.96 (CH, 1H, m, J = 6 Hz); 3.88 (CH₂, 6H, m, J = 6 Hz); 2.90 (CH₂, 2H, dd, J = 6 Hz); 2.46 (CH, 1H, t, J = 6 Hz); 2.42 (CH₂, 2H, dd, J = 6 Hz); 1.67 (CH₃, 12H, s); 1.52 (CH₃, 6H, t, J = 6 Hz); 1.33 (CH₃, 3H, t, J = 6 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 167.55, 142.52, 140.24, 128.33, 122.87, 122.10, 116.41, 108.40, 93.54, 82.16, 79.79, 74.85, 73.04, 56.43, 48.16, 45.52, 31.48, 29.45, 17.50, 11.54. MS (ESI): m/z calcd M⁺ for C₃₉H₄₈N₃O⁺, 574.38 found, 574.35.

[0052] (2) 프로파릴옥시-아미노-Cy7(화학식5의 화합물) 합성

[0053] 에틸아미노-Cy7(화학식 4의 화합물)(0.12 g, 0.2 mmol)을 50 mL 건조 메틸렌 클로라이드에 용해시키고 1 mL DIPEA를 첨가하였다. 상기 혼합물을 얼음 부스에서 방치하여 냉각시켰다. 톨루엔 중 포스겐(2 M, 2mL)을 질소 분위기하에서 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 3시간 동안 교반하여 용액이 녹색으로 변하면, 진공하에서 용매를 제거하여 CICON-Cy7을 수득하였다. CICON-Cy7을 건조 메틸렌 클로라이드 50 mL로 용해하고 1mL 무수 피리딘을 염료 용액에 첨가하였다. 2,2'-디설파테디일디에탄올(0.6 g, 4 mmol)을 상기 혼합물에 첨가한 후, 반응 혼합물을 빛이 없는 실온에서 교반하였다. TLC는 반응 과정을 모니터링하여, 출발 물질이 완전히 소비되면 교반을 중단시켰다. 용매를 진공 증발로 제거시키고, 잔류물을 디에틸 에테르로 세척하여 DIPEA, DMAP 및 일부 불순물을 제거하였다. 수득한 고형 잔류물을 메틸렌 클로라이드와 메탄올의 점진적 용출제를 이용하여 실리카 겔 크로마토그래피를 통하여 정제하였다. 용매는 진공에서 제거하고 수득한 고체는 메틸렌 클로라이드에서 용해하고 등압 깔대기를 통하여 여과하여 메탄올에 용해된 실리카를 제거하였다. 용매를 증발시켜 진공하에서 건조한 후, 화학식 5의 화합물을 수득하였다(15.8 mg, 수율 10%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.70 (CH, 2H, d, J = 12 Hz); 7.40 (ArH, 2H, t, J = 8 Hz); 7.37 (ArH, 2H, d, J = 8 Hz); 7.28 (ArH, 2H, t, J = 8 Hz);

7.19 (ArH, 2H, d, $J = 8$ Hz); 6.19 (CH, 2H, d, $J = 12$ Hz); 4.54 (CH₂, 2H, s); 4.36 (CH, 1H, m, $J = 6$ Hz); 4.28 (CH₂, 4H, m, $J = 6$ Hz); 4.19 (CH₂, 2H, q, $J = 8$ Hz); 3.75 (CH₂, 4H, q, $J = 6$ Hz); 3.27- 3.15 (CH₂, 2H, m); 3.08-3.00 (CH₂, 2H, m); 2.93-2.80 (CH₂, 4H, m); 2.46 (CH, 1H, t, $J = 6$ Hz); 1.65 (CH₃, 12H, s); 1.46 (CH₃, 6H, t, $J = 6$ Hz); 1.31 (CH₃, 3H, t, $J = 6$ Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) $d =$ 172.09, 171.64, 171.48, 155.45, 153.80, 143.06, 142.70, 142.35, 141.91, 141.16, 129.20, 125.53, 125.04, 122.40, 110.98, 101.06, 80.49, 74.66, 71.99, 70.76, 64.23, 62.42, 60.38, 56.75, 49.48, 46.56, 41.70, 40.27, 37.60, 31.30, 30.59, 29.84, 28.82, 28.40, 28.21, 27.88, 14.72, 14.32, 12.65. MS (ESI): m/z calcd M⁺ for C₄₃H₅₆N₃O₄S₂⁺, 754.37; found, 754.35

[0054] (3) 프로파길옥시-아미도-Cy7-부착된 켄시타빈(화학식 6의 화합물) 합성

[0055] 2-히드록시에틸 디설파이드 부착된 아미도-Cy7(화학식 5의 화합물)(151 mg, 0.2 mmol)을 고무 스톱퍼로 봉인된 50 mL 둥근 바닥 플라스크의 25 mL 건조 메틸렌 클로라이드에 용해시키고, 0.5 mL DIPEA를 상기 용액에 첨가한 후, 상기 혼합물을 아르곤 분위기하 얼음 배스에서 냉각시켰다. 그리고 톨루엔 중 포스겐(2 M, 0.4 mL)을 상기 용액에 주입하였다. 반응 혼합물을 약 3시간 동안 얼음 배스에서 교반하고, 반응용액으로 아르곤 버블링하여 과도한 포스겐을 제거하였다. 그리고 DIPEA(0.1 mL) 및 DMAP(6.1 mg, 0.05 mmol)을 반응 용액에 첨가하였고, 무수 DMF(10 mL) 중 켄시타빈(130 mg, 0.5 mmol)을 상기 용액으로 이동시켰다. 상기 용액은 0°C에서 30분간 교반하였고, 얼음 배스를 제거하여, 천천히 실온으로 승온시켰다. 상기 혼합물을 24시간동안 교반하였다. 500 mL 디에틸 에테르로 혼합물을 붓고, 밤새 냉장고에 방치하였다. 용액은 버리고 바닥 위에 건조 침전물을 생성시켰다. 수득한 고형 잔류물을 메틸렌 클로라이드와 메탄올(50/1, v/v)의 혼합 용출제로 실리카 겔 크로마토그래피를 통하여 정제하였다. 용매는 진공하에서 제거하고, 수득한 고체는 메틸렌 클로라이드에서 용해되었고 등압 깔대기를 통하여 여과되어 메탄올에 용해된 실리카를 제거하여, 마침내 용매를 증발시키고 진공하에서 건조하여 화학식(6)의 화합물을 수득하였다(137 mg, 수율 63.5%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃). $d =$ 8.62, 8.60, 8.52, 8.43, 8.39, 8.38, 8.35, 7.70, 7.67, 7.65, 7.42, 7.40, 7.38, 7.36, 7.35, 7.26, 7.22, 7.20, 7.17, 7.14, 6.24, 6.21, 6.15, 6.11, 6.06, 4.64, 4.52, 4.45, 4.39, 4.32, 4.26, 4.17, 4.15, 4.14, 4.04, 4.03, 4.01, 3.97, 3.95, 3.77, 3.75, 3.73, 3.05, 3.01, 2.97, 2.85, 2.82, 2.80, 2.66, 2.62, 2.60, 2.58, 2.56, 1.64, 1.62, 1.45, 1.44, 1.31, 1.30, 1.28, 1.25. MS (ESI): m/z calcd M⁺ for C₅₄H₆₅F₂N₆O₉S₂⁺, 1043.42; found, 1043.60.

[0056] (4) 화학식 2의 화합물 합성

[0057] 화학식 6의 화합물(110 mg, 0.1 mmol) 및 아지도프로필 염산(28 mg, 0.5 mmol)을 DMF(10 mL) 중에 용해하였다. 상기 용액을 1시간동안 아르곤 버블링에 의하여 탈기시키고, 구리 포클로레이트(Cu(CIO₄)₂, 6.5 mg, 0.025 mmol), 나트륨 아스코르베이트(10 mg, 0.05 mmol)를 5 mL DMF 중에 용해하였고, 이 용액은 1시간동안 아르곤 버블링에 의하여 탈기하였다. 용액의 색깔이 갈색에서 연한 황색으로 변하였다. 구리(I) 용액을 시린지를 통하여 Cy7 용액으로 이동하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 교반하였다. TLC로 반응 과정을 모니터링하여 출발 물질이 완전히 소비되면 교반을 멈추고, 반응용액을 대량의 디에틸에테르에 붓고, 반응물을 밤새 냉장고에 방치하였다. 그리고 저층 고체를 수집한 후, 메탄올로 이것을 세척하고, 원심분리기에 의하여 고체를 회수하였다. 이 과정을 녹색이 메탄올에서 관찰되지 않을 때까지 반복하였다. 그리고 고체를 물로 세척하고 이것을 다시 원심분리기로 회수하여, 과량의 염산과 촉매를 제거하기 위하여 세척을 반복하였다. 고체를 메탄올로 5회 세척하여 물을 제거하고 원심분리기에 의하여 생성물을 회수하였다. 수득한 고체는 진공하에서 건조되어 화학식 2의 화합물을 제조하였다(35 mg, 수율 22.3%). MS (Fabs-ESI): m/z calcd [M+H]⁺ for C₇₆H₉₀F₂N₁₇O₁₄S₂⁺, 1566.63; found, 1566.7.

실시예 2

[0058] 화학식 2의 화합물의 스펙트럼 측정

[0059] 도 1은 GSH를 포함하는 티올 함유 분자와의 반응에 따라 화학식 2의 화합물의 스펙트럼 변화를 보여준다. 이황화 결합은 티올에 의하여 신속하게 절단된다. 화학식 2의 화합물은 용매와 혼합되어 GSH에서 상당한 변화를 나타낸다. GSH와의 반응에 따라 794 nm에서 약물전구체의 흡수가 감소하고 새로운 피크가 동시에 630 nm에서 나타난다(도 1A). 흡수 비율(A_{630}/A_{794})의 점진적 증가는 GSH 농도에서 정제기를 나타낸다. Cy7(735 nm)의 방출 강도는 42배 향상되었다. 이러한 결과는 반응식 1에 나타난 약물 방출 모델과 일치한다. 이황화 결합의 절단에 따라 황화물 음이온이 생성되고, 이것이 켄시타빈의 5'-히드록시기 및 Cy7의 메소-위치에서 카르바민산염의 세포내

고리화를 만든다.

실시예 3

[0060] Cy7 염료의 약물 방출 측정

[0061] 화학식 2의 화합물의 약물 방출 작용을 구체적으로 조사하기 위하여, 엽산 부분이 엽산 수용체-양성 암세포 또는 엽산 수용체-음성 암세포에 우선적으로 프로브를 가이드 할 수 있는지 시험하였다. 화학식 2의 화합물은 엽산 수용체-양성 KB 세포 및 엽산 수용체-음성 A549 세포로 항온처리하였다. 도 2에서 보는 바와 같이, KB 세포는 화학식 2의 화합물로 20분 항온처리하여 강한 형광 강도를 나타냈다. 그러나, A549 세포는 비슷한 조건하에서 형광 신호를 나타내지 않았다. 화학식 2의 화합물은 엽산 수용체로 엽산 부분의 상호작용에 의하여 조력받아 세포로 진입할 수 있다.

실시예 4

[0062] 젬시타빈의 세포내 위치 확인

[0063] 화학식 2의 화합물에 의하여 젬시타빈 방출의 세포내 위치를 확인하기 위하여, 위치 확인(colocalization) 실험을 공초점 레이저 현미경을 사용하여 수행하였고 그 결과는 도3에 나타나 있다. Lyso-sensor Blue DND-167(A) 및 ER-tracker Red(D)는 적색에서 녹색(B) 및 프로브(E)로 시각화될 수 있다. 합쳐진 이미지(C 및 F)의 노란색 부분은 프로브와 세포소기관 선택적 추적자가 동시에 존재하는 위치를 의미한다. 합쳐진 이미지로부터 (F)의 노란 영역은 (C)의 노란 영역과 비교할 때 훨씬 현저함을 알 수 있다. 따라서, 화학식 2의 화합물의 티올-유도된 이황화결합의 절단은 소포체에서 일어나는 것을 알 수 있으며, 이에 따라 젬시타빈을 방출하여, 세포 핵으로 분산될 것이다.

실시예 5

[0064] 세포 생존력 분석 실험

[0065] 세포의 생존력 분석 실험이 화학식 2의 화합물의 세포독성을 이해하기 위하여 수행되었다. 도 4에서 나타난 바와 같이, 화학식 2의 화합물(검정 그래프 1) 및 엽산이 없고 젬시타빈만 부착된 화학식 1의 화합물(적색 그래프 2)은 KB 및 A549 세포에 각각 적용된다. 젬시타빈만 부착된 화학식 1의 화합물로의 처리는 A549 세포 보다 KB 세포에서 훨씬 독성이 높았다(도 4). 그러나, 약물 민감도의 차이는 화학식 2의 화합물의 처리 하에서 더욱 현저하였다. 이는 KB 암세포 상에 엽산 수용체의 존재를 명확히 보여주는 것이다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 엽산 부분은 화학식 2의 화합물을 수용체-매개된 엔도사이토시스에 의하여 가이드하고 수용체-매개된 엔도사이토시스가 일어나서 젬시타빈 약물 전달에 의하여 아포토시스가 일어날 수 있다.

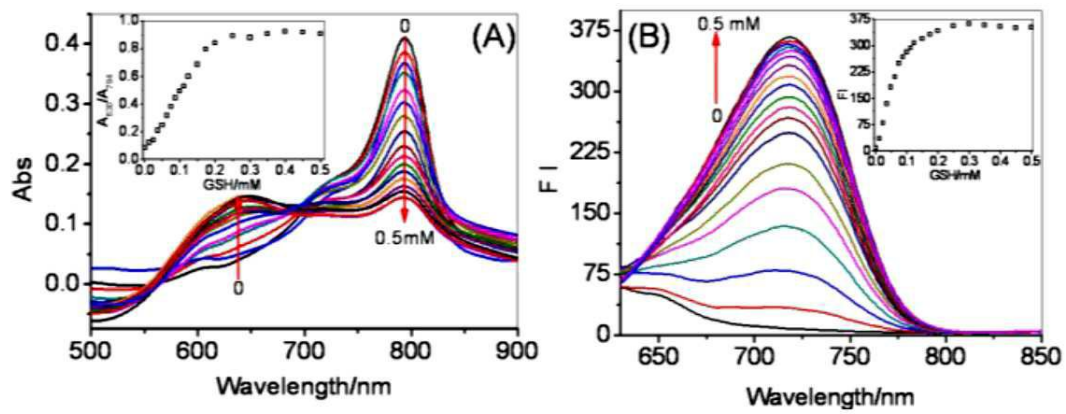
실시예 6

[0066] 동물 내에서 Cy7 염료의 형광성 측정

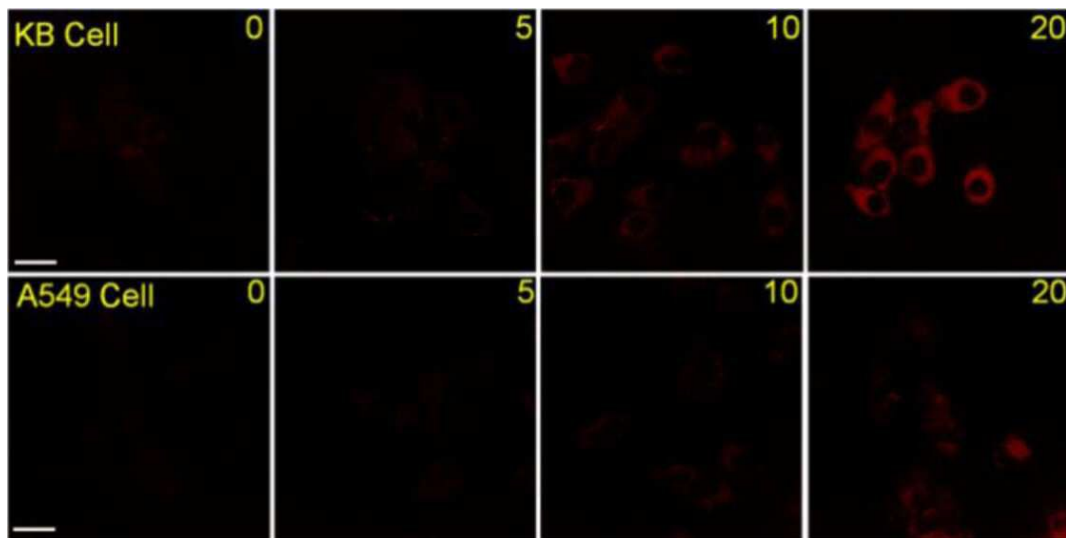
[0067] 화학식 2의 화합물의 형광성 측정은 이중이식 암 동물 모델로 약물전구체를 정맥 주사한 후 조사하였다. 암 보유 쥐는 KB 및 A549를 피하 주사하여 준비하였다. 암 항온처리의 10일 후 0.1 mg/kg(DMSO: PBS=50:50)의 화학식 2의 화합물을 꼬리 정맥을 통하여 투여하고 암은 24시간 후에 마우스로부터 적출하였다. 7 um 두께의 크리오섹션된 암 조직의 형광 이미지는 도 6에 나타났다. 암조직 부위에서 형광 신호는 KB 암 세포를 보유한 조직에서만 검출되었다. 이는 화학식 2의 화합물이 암 표적능을 가지며, 살아있는 쥐의 KB 암에 젬시타빈을 성공적으로 운반하였음을 보여준다.

도면

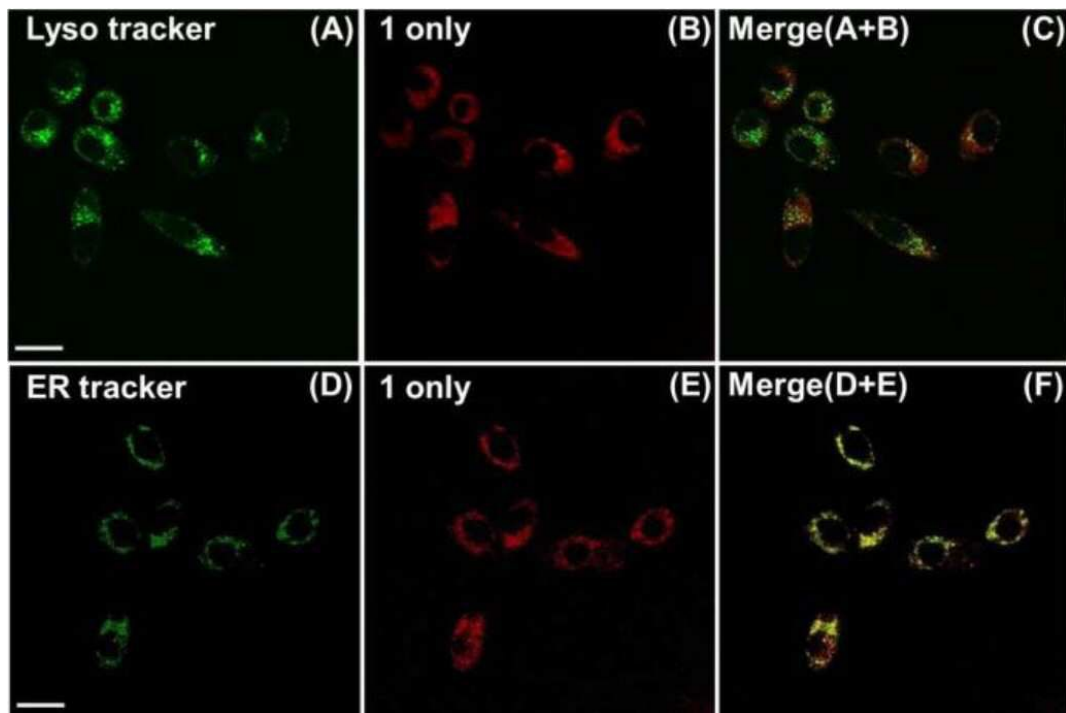
도면1



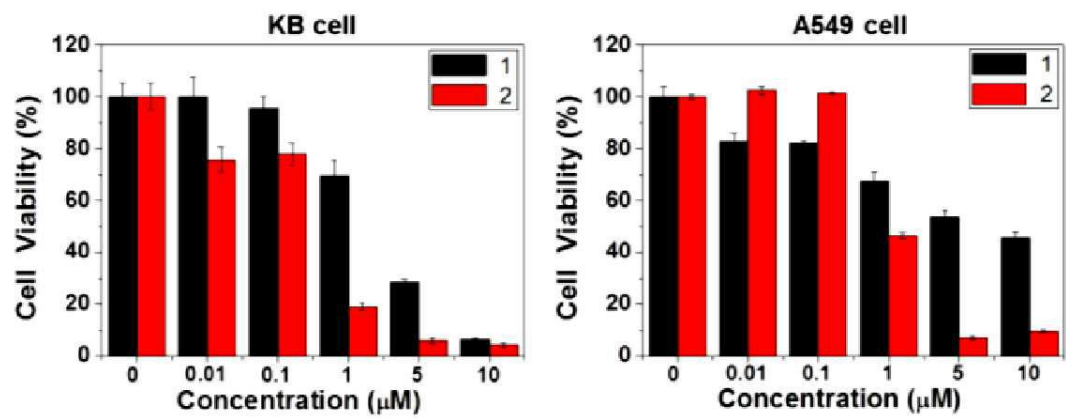
도면2



도면3



도면4



도면5

