



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0084775

(43) 공개일자 2024년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 491/22 (2006.01) A61K 31/136 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 491/22 (2013.01)

A61K 31/136 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0169428

(22) 출원일자 2022년12월07일

심사청구일자 2022년12월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

서울특별시 성북구 안암로 145

원미애

서울특별시 성북구 안암로 145

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열, 김태훈

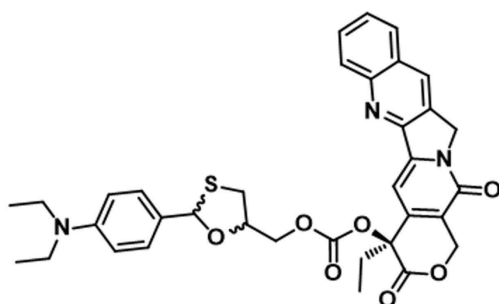
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 알데하이드 탈수소효소가 과발현된 암 줄기세포 타겟 항암 약물 전구체

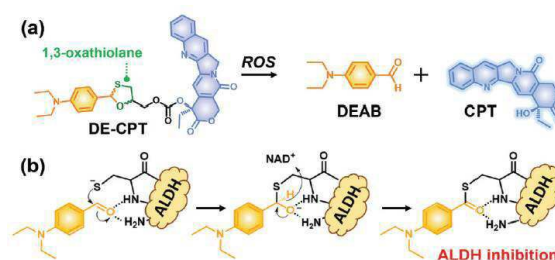
(57) 요약

본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 항암 화합물에 관한 것이다:

[화학식 1]



대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/4745 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

김지현

서울특별시 성북구 안암로 145

지명선

서울특별시 성북구 안암로 145

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132422
과제번호	2018R1A3B1052702
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스
기 여 율	85/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711156137
과제번호	2019M3E5D1A01068998
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	과학기술혁신인재양성
연구과제명	난치성 삼중음성유방암의 신규 표적치료제 상용화를 위한 프로드럭 개발
기 여 율	10/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345331323
과제번호	2019H1A2A1074096
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	4단계두뇌한국21사업(R&D)
연구과제명	암줄기세포 타겟을 위한 스마트 분자테라노시스 합성 및 개발
기 여 율	5/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

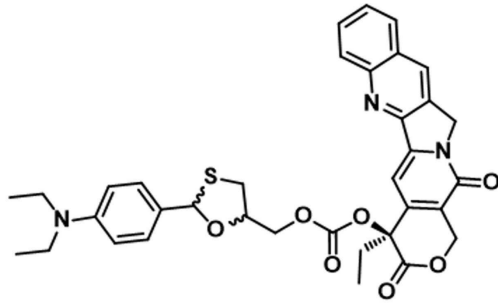
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학적 1]로 표시되는 항암 화합물:

[화학적 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물은 암 세포 또는 암 줄기세포를 표적화하는 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 암 세포 또는 암 줄기세포는 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase; ALDH)가 과발현된 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 활성화되어 ALDH 억제제와 항암제를 방출하는 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 활성산소종은 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2) 또는 차아염소산(Hypochlorous acid, $HOCl$)인 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 ALDH 억제제는 DEAB(N,N-diethylaminobenzaldehyde)인 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 항암제는 캄토테신(Camptothecin, CPT)인 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 8

제1항의 화합물 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 알데하이드 탈수소효소가 과발현된 암 줄기세포 타겟 항암 약물 전구체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암 세포 군집에는 암의 전이와 재발의 주 원인으로 알려진 암 줄기세포(cancer stem cells, CSCs)가 존재한다. 상기 암 줄기세포는 종양 재성장, 전이 및 재발에 기여하는 등, 많은 암 환자들에게 보여지는 나쁜 예후의 주요 원인으로 보고되고 있는바, 암 줄기세포의 박멸은 암 치료에 있어 주요 전략이 될 수 있다.

[0003] 또한, 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase; ALDH)는 독성 알데하이드를 카르복실산으로 전환시키는 효소로서, 그 과발현은 대표적인 CSC 바이오마커로 알려져있다(비특허문헌 1). 최근 연구에 따르면, ALDH의 높은 활성은 화학요법 약물에 대한 CSC의 내성과 관련이 있고, 따라서 ALDH 억제제가 항암제와 함께 처리되는 것이 바람직한 것으로 밝혀졌다(비특허문헌 2). 그러나 ALDH 억제제의 처리는 정상 줄기세포도 CSC와 높은 ALDH 활성을 공유하여 정상 줄기세포도 손상될 수 있기 때문에 다소 위험할 수 있다고 보고된바 있다(비특허문헌 3). 따라서, 정상 세포가 아닌 종양 조직에서 선택적으로 활성화될 수 있는 ALDH 억제제 사용을 위한 정밀하게 설계된 전구약물 시스템이 요구되고 있다.

[0004] 한편, 종양 미세환경(tumour microenvironment, TME)의 대표적인 요인은 저산소 상태, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 수준의 증가, 낮은 pH이다. 이러한 특징을 이용하여 특정 종양 환경에서 활성화될 수 있는 약물 전달 시스템(drug delivery systems, DDS)이 보고되고 있으며(비특허문헌 4), 다양한 ROS 반응 링커의 개발과 함께(비특허문헌 5), 과산화수소(H_2O_2)와 같은 ROS는 암 치료 선택성을 부여하는 중요한 유발 도구 중 하나로 부상하였다(비특허문헌 6).

[0005] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 1,3-옥사티올란(1,3-oxathiolane) 작용기가 도입된 ALDH 억제제 DEAB(N,N-diethylaminobenzaldehyde)와 항암제인 캄토테신(Camptothecin, CPT)이 연결된 구조를 갖는 신규 화합물(DE-CPT)을 합성하였으며, 상기 화합물의 1,3-옥사티올란 작용기가 ROS에 의해 먼저 반응하여 알데하이드를 방출하고, 이어서 분자내 고리화반응으로 CPT를 방출하는 활성화 메커니즘을 가지며, 이로 인해 암 줄기세포를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌**비특허문헌**

[0006] (비특허문헌 0001) P. Marcato, C. A. Dean, C. A. Giacomantonio and P. W. Lee, Cell Cycle, 2011, 10, 1378-1384.

(비특허문헌 0002) A. K. Croker and A. L. Allan, Breast Cancer Res. Treat., 2012, 133, 75-87.

(비특허문헌 0003) C. Ginestier, M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C. G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M. S. Wicha and G. Dontu, Cell Stem Cell, 2007, 1, 555-567

(비특허문헌 0004) B. Chen, W. Dai, B. He, H. Zhang, X. Wang, Y. Wang and Q. Zhang, Theranostics, 2017, 7, 538-558.

(비특허문헌 0005) P. T. Wong and S. K. Choi, Chem. Rev., 2015, 115, 3388-3432.

(비특허문헌 0006) G. Saravanakumar, J. Kim and W. J. Kim, Adv. Sci., 2017, 4, 1600124.

발명의 내용

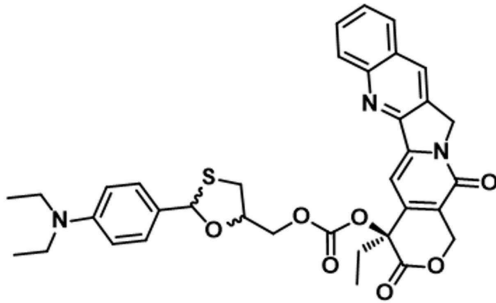
해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 ROS에 의해 활성화되어 ALDH 억제제와 항암제를 방출함으로써 ALDH가 과발현된 암 세포와 암 줄기세포를 타겟할 수 있는 항암 화합물을 포함하는 항암 약물전구체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 하기 [화학식 1]로 표시되는 항암 화합물을 제공한다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 본 발명에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 암 세포 또는 암 줄기세포를 표적화하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012] 이때, 상기 암 세포 또는 암 줄기세포는 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase; ALDH)가 과발현된 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 활성화되어 ALDH 억제제와 항암제를 방출하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 이때, 상기 활성산소종은 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2) 또는 차아염소산(Hypochlorous acid, HOCl)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0015] 또한, 상기 ALDH 억제제는 DEAB(N,N-diethylaminobenzaldehyde)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 또한, 상기 항암제는 캄토테신(Camptothecin, CPT)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0020] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면, 활성산소종에 의해 활성화되어 알데하이드 탈수소효소가 과발현된 암 세포 또는 암 줄기세포를 표적화함으로써 현저하게 향상된 항암 효과를 발휘할 수 있는 항암 화합물을 포함하는 약물 전구체를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1의 (a)는 본 발명의 [화학식 1]로 표시되는 화합물 DE-CPT의 화학 구조 및 ROS 반응성 반응에 따른 free DEAB 및 CPT 방출 메커니즘을 나타낸 것이고, (b)는 방출된 DEAB의 ALDH 억제 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 2의 (a)는 ROS 풍부한 암 세포에서 DE-CPT의 작용 방식을 나타낸 것이다. (b)는 100 eq의 H_2O_2 처리된 DE-

CPT(10 μ M)의 흡광도 스펙트럼을 나타낸 것이다. (c)는 100 eq의 H_2O_2 처리된 DE-CPT(10 μ M)의 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. 용액을 ACN/PBS(pH 7.4) 완충액(1:3) 용액에서 37°C에서 최대 3시간 동안 인큐베이션하였다. (d)는 도 2의 (c) 및 도 5의 (b)의 데이터로부터 결정된 435nm에서의 DE-CPT의 형광 변화를 나타낸 것이다. (e)는 37°C에서 10시간 동안 인큐베이션된 100 eq의 H_2O_2 처리된 DE-CPT의 HPLC 분석(absorbance at 254) 결과를 나타낸 것이다. DEAB 및 CPT의 크로마토그램도 표시되었다.

도 3의 (a) 및 (b)는 MCF10A 및 BT474 세포에서 DE-CPT의 세포 생존력 측정 결과를 나타낸 것이다. (c)는 BT-474 세포에서 ROS quencher(NAC)의 부재 또는 존재 하에 DE-CPT의 세포 생존력 측정 결과를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM(n = 3)으로 표시하였다. 통계적 유의성은 사후 Bonferroni 테스트와 함께 양방향 ANOVA 테스트에 의해 결정하였다. a-g는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다(p < 0.05). (d)는 BT474 세포에서 DE-CPT의 세포 사멸 신호 과정을 나타낸 것이다. (e)는 48시간 동안 대조군(1% DMSO), DE-CPT, CPT 및 DEAB로 처리된 PI/calcein AM 염색된 BT474 세포의 형광 이미지를 나타낸 것이다. Scale bar = 50 μ m.

도 4의 (a)는 DE-CPT에 의한 스펜로이드 능력을 측정한 결과를 나타낸 것이다. Scale bar = 50 μ m. (b)는 DE-CPT의 스펜로이드 형성을 나타낸 것이다. (c)는 유동 세포 계측법에 의한 BT474 세포의 부착 또는 스펜로이드에서의 ALDH1 활성을 나타낸 것이다. (d)는 DE-CPT의 CD44(stained with FITC anti-CD 44)의 형광 이미지를 나타낸 것이다. Scale bar = 50 μ m. (e)는 30 μ M DE-CPT로 처리된 BT474 종양 스펜로이드에서 인간 OCT4, Nanog, Sox2의 CSC 마커의 mRNA 수준을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM(n = 3 in D)으로 표시하였다. 통계적 유의성은 사후 Bonferroni 테스트와 함께 one-way ANOVA 테스트에 의해 결정하였다. a-d는 통계적으로 구별되는 데이터 세트를 나타낸다(p < 0.05).

도 5는 도 2b/도 2c 데이터에서 결정된 360nm에서 DE-CPT의 흡광도 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 약산성 조건에서 DE-CPT의 DEAB 방출을 관찰한 결과로서, 100 eq의 H_2O_2 처리(a) 또는 미처리된(b) ACN/PBS(pH 6.5) 완충액(1:3) 용액 중 DE-CPT(10 μ M)의 흡광도 스펙트럼을 나타낸 것이다. (c)는 파트 a/b 데이터에서 결정된 435nm에서 DE-CPT의 형광 변화를 나타낸 것이고, (d)는 100 eq H_2O_2 의 존재 하에 pH 6.5 및 pH 7.4에서 DE-CPT 형광 변화를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 약산성 조건에서 DE-CPT의 CPT 방출을 관찰한 결과로서, 100 eq의 H_2O_2 처리(a) 또는 미처리된(b) ACN/PBS(pH 6.5) 완충액(1:3) 용액 중 DE-CPT(10 μ M)의 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. (c)는 파트 a/b 데이터에서 결정된 435nm에서 DE-CPT의 형광 변화를 나타낸 것이고, (d)는 100 eq H_2O_2 의 존재 하에 pH 6.5 및 pH 7.4에서 DE-CPT 형광 변화를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 8의 (A) 및 (B)는 100 eq의 다양한 분석물로 처리된 ACN/PBS 버퍼(1:4) 용액 중 DE-CPT(10 μ M)의 선택성을 관찰한 결과를 나타낸 것이다(1: 대조군, 2: glycine, 3: leucine, 4: tyrosine, 5: alanine, 6: methionine, 7: histidine, 8: asparagine, 9: arginine, 10: lysine, 11: serine, 12: glutamine, 13: proline, 14: aspartic acid, 15: glutamic acid, 16: GSH, 17: cysteine, 18: H_2O_2). 용액은 37°C에서 2시간 까지 인큐베이션하였다. (A)는 360 nm에서 DE-CPT의 흡광도 강도를 나타낸 것이다. (B)는 435 nm에서 DE-CPT의 형광 강도를 나타낸 것이다. (C)는 100 eq의 다양한 금속 이온 분석물로 처리된 ACN/PBS 버퍼(1:4) 용액 중 DE-CPT(10 μ M)의 선택성을 관찰한 결과를 나타낸 것으로, 435 nm에서 DE-CPT의 형광 강도를 나타낸 것이다. 용액은 37°C에서 2시간 까지 인큐베이션하였다.

도 9는 2 eq의 HOCl 또는 100 eq의 H_2O_2 처리된 ACN/PBS(pH 7.4) 완충액(1:3) 용액 중 DE-CPT(10 μ M)의 (a) 흡수 및 (b) 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. 용액은 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

도 10은 100 eq의 H_2O_2 처리된 ACN/물(1:4) 용액 중 DE-CPT(100 μ M)의 (a) 양이온 모드 및 (b) 음이온 모드 질량 스펙트럼을 나타낸 것이다. 용액은 37°C에서 6시간 동안 인큐베이션하였다.

도 11은 MDA-MB-231 세포에서 CPT 및 DE-CPT의 세포 생존력 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 MCF10A 및 BT474 세포에서 DEAB의 세포 생존력 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 도 3d와 관련된, BT-474 세포에서 DE-CPT에 의한 세포 사멸 신호 단백질의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 BT474 스펙로이드 세포에서 DE-CPT, CPT, DEAB 및 대조군으로 처리된 ALDH1의 단백질 발현 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 BT474 세포에서 DE-CPT, CPT, DEAB 및 대조군(1% DMSO)으로 처리된 CD44-FITC의 형광 이미지를 나타낸 것이다. Scale bar = 100 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0025] [실시예]

[0026] 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.

[0028] 실험 방법

[0029] 재료 및 기기

[0030] 4-Diethylaminobenzaldehyde(Alfa aesar), a-Thioglycerol(TCI), p-Toluenesulfonic acid monohydrate(Alfa aesar), 4-Nitrophenylchloroformate(Carbosynth), Camptothecin(Carbosynth), N,N-Diisopropylethylamine(Aldrich), 44-(Dimethylamino)pyridine(대정)을 구입하여 추가 정제 없이 사용하였다. TLC 실리카 겔 60 F₂₅₄, 0.25mm(Merck)를 분석 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography)에 사용하였고, PLC 실리카 겔 60 F₂₅₄, 1mm(Merck)를 분취용 박층 크로마토그래피(preparative thin layer chromatography)에 사용하였다. 컬럼크로마토그래피는 silica gel 60(Merck, 0.063~0.2mm)을 고정상으로 하여 수행하였다. ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼은 Bruker 500MHz 분광계의 NMR 용매(CDCl₃)에서 수집하였다. 모든 화학적 이동은 TMS 피크를 내부 참조로 사용하여 ppm 값으로 기록하였다. 질량 스펙트럼은 LC/MS-2020 시리즈(Shimadzu)에서 수집하였다. 분석 또는 분취 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 역상 컬럼(C18, 5mm, waters)이 장착된 YL9101S(YL-Clarity)를 사용하여 수행하였다. UV-Vis 스펙트럼은 Scinco S-3100 분광계에서 기록하였고, 형광 스펙트럼은 Shimadzu RF-5301PC 장비를 사용하여 수득하였다. DE-CPT의 스톡 용액은 DMSO에서 준비하였다. 모든 여기 및 방출 슬릿 폭은 5nm로 설정되었고, 각 샘플의 농도는 총 부피 3mL에서 10 μ M로 고정되었다.

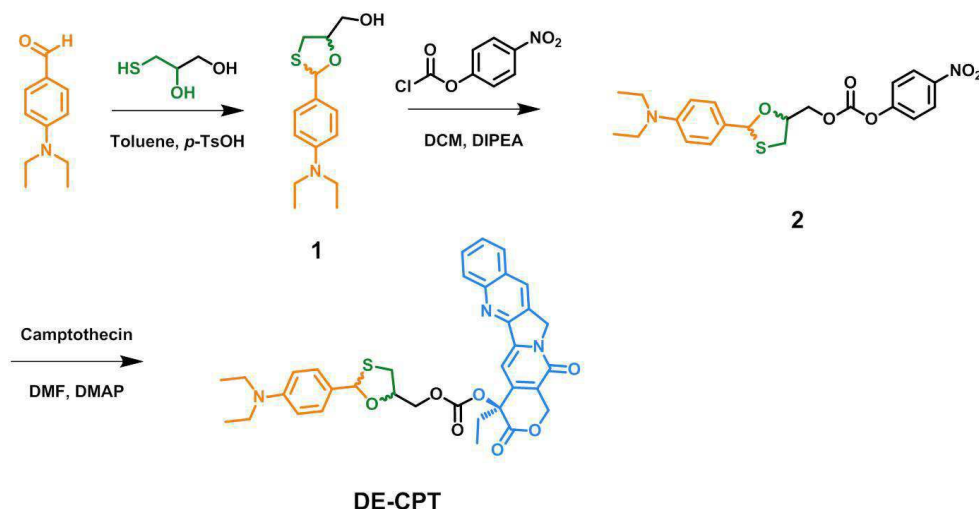
[0032] UV/Vis 및 형광 분광법

[0033] 모든 UV-vis 흡수 스펙트럼은 Jasco V-750 분광광도계를 사용하여 수득하였고, 모든 형광 스펙트럼은 Jasco FP-8500 spectrofluorometer에서 수집하였다. DE-CPT 및 기타 화합물의 10mM 스톡 용액은 ACN 또는 DMSO에서 준비하였다. 100mM 과산화수소 스톡 용액은 27% 과산화수소 용액(Alfa aesar)을 희석하여 준비하였다. 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 스톡 용액은 차아염소산나트륨과 11-15% 유효 염소 용액(Alfa aesar)을 희석하여 준비하였고, 차아염소산나트륨의 농도는 292nm($\epsilon = 350\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 또한, 금속 과염소산염(metal perchlorate) 및 아미노산과 같은 다른 분석물의 스톡 용액은 증류수에서 준비하였다.

[0035] 화합물 합성

[0036] 하기 [합성 경로]에 따라 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물 DE-CPT를 합성하였다.

[0037] [합성 경로]



[0038]

[0040] 화합물 1의 합성

[0041] 100mL 둥근 바닥 플라스크에 α-티오글리세롤(1.99g, 18.4mmol, 1.0eq) 및 4-디에틸아미노벤즈알데히드(3.58g, 20.2mmol, 1.1eq)를 톨루엔에 용해시켰다. 촉매량의 p-톨루엔설폰산 일수화물(p-toluenesulfonic acid monohydrate)(400 mg)을 용액에 첨가하였다. 그런 다음 용액을 환류시키고 밤새 교반하였다. 반응의 진행은 박층 크로마토그래피로 확인하였다. 반응 종료 후 유기용매를 제거하였다. 반응 혼합물을 에테르에 용해시키고 포화 NaHCO₃ 용액 및 염수로 세척하였다. 유기상을 무수 NaSO₄를 사용하여 건조시키고 감압하에 증발시켰다. 혼합물을 실리카 컬럼 크로마토그래피(용리액: DCM 중 1% 아세톤)로 정제하였다. 부분입체이성질체 혼합물(diastereomeric mixture)을 황적색 오일로 수득하였다(1.19g, 24%).

[0042] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(1:3.3 mixture of diastereomers): 7.39-7.30 (m, 2H), 6.68-6.64 (m, 2H), 6.12 (s, 0.24H), 6.03 (s, 0.76H), 4.61-4.56 (m, 0.24H), 4.25-4.19 (m, 0.76H), 3.96-3.74 (m, 2H), 3.35 (q, 4H, J = 7.1 Hz), 3.28-3.12 (m, 2H), 2.00-1.88 (m, 1H, -OH), 2.15 (t, 6H, J = 7.1 Hz) ppm.; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(diastereomers): 148.5(148.2), 128.7(128.3), 123.5, 111.3, 87.6(86.5), 83.5(82.4), 63.7(63.2), 44.42, 34.8(34.7) ppm.; ESI-MS: m/z calcd for C₁₄H₂₁NO₂S: 267.13; found: 268.25 [M+H]⁺

[0044] 화합물 2의 합성

[0045] 화합물 1(1.10g, 4.11mmol, 1.0 eq)을 DCM에 용해시키고 용액을 ice bath에서 냉각시켰다. 용액에 DIPEA(2.1mL, 12mmol, 3.0eq)를 첨가하고 DCM에 용해된 4-니트로페닐클로로포르메이트(4-nitrophenylchloroformate)(1.24g, 6.15mmol, 1.5eq)를 순차적으로 적가하였다. 반응의 진행은 박층 크로마토그래피로 확인하였다. 반응 종료 후 유기용매를 제거하였다. 반응 혼합물을 EtOAc에 용해시키고 포화 NaHCO₃ 용액으로 여러 번 세척하였다. 유기상을 무수 NaSO₄를 사용하여 건조시키고 감압하에 증발시켰다. 미반응 4-니트로페닐클로로포르메이트를 제거하기 위해 혼합물을 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(용리액: DCM 단독)로 정제하였다. 그런 다음 혼합물을 실리카 컬럼 크로마토그래피(용리액: EtOAc:Hexanes = 1:4)로 2차 정제하였다. 부분입체이성질체 혼합물을 황적색 오일로 얻었다(950 mg, 54%).

[0046] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ(1:2.9 mixture of diastereomers): 8.30-8.24 (m, 2H), 7.40-7.31 (m, 4H), 6.66-6.61 (m, 2H), 6.18 (s, 0.26H), 6.07 (s, 0.74H), 4.84-4.34 (m, 3H), 3.42-3.27 (m, 5H), 3.18-3.06 (m, 1H), 1.18-1.12 (m, 6H) ppm.; ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ(diastereomers): 155.4, 152.4, 148.5, 145.5, 128.6(128.3), 125.3, 123.2, 121.8, 111.3, 87.9(86.8), 79.7(78.9), 69.0(68.5), 44.4, 35.4(35.0), 12.5

ppm.; ESI-MS: m/z calcd for $C_{21}H_{24}N_2O_6S$: 432.14; found: 433.25 $[M+H]^+$

[0048] DE-CPT의 합성

[0049] 화합물 2(248mg, 0.57mmol, 1.0eq)의 DMF 용액에 캄프토테신(200mg, 0.57mmol, 1.0eq) 및 4-(디메틸아미노)피리딘(281mg, 2.3mmol, 4.0eq)을 실온에서 첨가하였다. 그런 다음 용액을 밤새 교반하였다. 반응의 진행은 박층 크로마토그래피로 확인하였다. 반응 종료 후 유기용매를 제거하였다. 반응 혼합물을 EA에 용해시키고 포화 $NaHCO_3$ 용액으로 여러 번 세척하였다. 유기상을 무수 $NaSO_4$ 를 사용하여 건조시키고 감압하에 증발시켰다. 혼합물을 실리카 컬럼 크로마토그래피(용리액: 아세톤:DCM = 1:9)로 정제하였다. 부분입체이성질체 혼합물을 황색 고체로 얻었다(110 mg, 30%).

[0050] 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (1:1.1:2.7:3.1 mixture of diastereomers): 8.39-8.31 (m, 1H), 8.24-8.19 (m, 1H), 7.96-7.90 (m, 1H), 7.86-7.80 (m, 1H), 7.69-7.64 (m, 1H), 7.37-7.09 (m, 3H), 6.60-6.42(m, 2H), 6.10 (s, 0.13H), 6.07 (s, 0.14H), 5.99 (s, 0.33H), 5.97 (s, 0.40H), 5.75-5.67(m, 1H), 5.42-5.35(m, 1H), 5.32-5.14(m, 2H), 4.76-4.17(m, 3H), 3.39-3.21(m, 5H), 3.12-2.95 (m, 1H), 2.34-2.23 (m, 1H), 2.21-2.10 (m, 1H), 1.15-1.09 (m, 6H), 1.01 (t, 3H, J = 7.6 Hz) ppm.; ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ (diastereomers): 167.3(167.2), 157.3, 153.5(153.6, 153.3), 152.2(152.3), 148.9, 148.3(148.1, 148.0), 146.5, 145.6, 131.2(131.0), 130.7(130.6), 129.7(129.8), 128.4(128.5), 128.1 (m), 123.6(125.0, 124.9, 123.4), 120.1(120.4, 120.3, 120.2), 111.1(111.2), 96.0, 87.7(87.8, 86.9, 86.5), 80.1(79.7, 79.2, 78.9), 78.2(78.1), 68.8(68.3, 68.1, 68.0), 67.1, 50.0, 44.4(44.3), 35.5(35.7, 35.1, 35.0), 31.9, 12.5(12.6), 7.7 ppm.; ESI-MS: m/z calcd for $C_{35}H_{35}N_3O_7S$: 641.22; found: 642.35 $[M+H]^+$, 664.40 $[M+Na]^+$.

[0052] 세포 배양

[0053] 인간 유방암 세포주 BT474와 비암성 세포주 MCF10A를 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하였다. BT474 세포를 RPMI 1640 배지(HyClone, Chicago, IL, USA)에서 배양하였다. MCF10A 세포는 Endothelial Cell Growth Medium Bullet Kit(Lonza)가 보충된 Mammary Epithelial Cell Growth 기본 배지(Lonza, Alpharetta, GA, USA)에서 배양하였다. 모든 배지는 10% FBS(GIBCO, Grand Island, NY, USA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO)으로 보충되었고 세포는 5% CO_2 를 포함하는 가습 분위기에서 37° C에서 배양하였다.

[0055] 세포 생존력(Cell viability)

[0056] BT474 및 MCF10A 세포를 96웰 플레이트에 웰당 1×10^4 개 세포로 접종하고 최소 24시간 동안 부착되도록 하였다. 인큐베이션 후, 세포를 DE-CPT, CPT, DEAB 또는 1% DMSO(대조군)로 72시간 동안 처리하였다. 세포독성을 확인하기 위해 Cellomax Cell Viability Kit(Precaregene, Hanam, Gyeonggi-do, Korea)를 제조사의 지시에 따라 연구 중인 세 가지 시험물질이 있는 상태에서 사용하였다. 웰의 흡광도는 Hidex Sense 마이크로플레이트 판독기(Hidex, Cranbourne, Victoria, AU)에 의해 450nm에서 검출하였다. 세포 생존능 검정을 3회 수행하고, 세포독성을 대조군에 비해 처리된 세포에 대해 계산된 백분율로 기록하였다.

[0058] 웨스턴 블롯 분석

[0059] ALDH1, gH2A.X, 절단된 PRAP(cleaved PRAP) 및 절단된 카스파제 3(cleaved caspase 3)의 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 측정하였다. 간략하게, BT-474 세포를 60 mm 접시에 3×10^5 세포의 밀도로 시딩하고 24시간 동안 배양하였다. 부착된 세포를 30 μ M DE-CPT, CPT, DEAB 또는 1% DMSO(대조군)로 48시간 동안 처리하였다. 처리 후, 세포를 얼음처럼 차가운 PBS로 세 번 세척하고 긁어내어 세포 펠렛을 만들었다. PBS를 제거한 후, 제조사(Biosesang, Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 제공하는 프로테아제 억제제(protease inhibitor)r를 포함하는 RIPA(radioimmunoprecipitation assay) lysis buffer를 세포 펠렛에 첨가하여 단백질

용해물(protein lysate)을 얻었다. 각 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하기 위해 Bradford 분석을 수행하였다. 그런 다음 각 세포 용해물의 단백질($30 \mu\text{g}/\text{lane}$)을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에 로딩하여 단백질을 개별 밴드로 분리하였다. 분리된 단백질 밴드를 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막(Merck Millipore)으로 옮기고 이들 막을 ALDH1 항체(Cell Signaling technology; #54135, 1:1000), gH2A.X 항체(Cell Signaling technology; #9718, 1:1000), 절단된 PARP 항체(Cell Signaling technology; #5625, 1:1000), 절단된 카스파제 3 항체(Cell Signaling technology; #9664, 1:1000) 및 β 액틴(Santa Cruz Biotechnology; SC-47778, 1:1000)과 함께 밤새 인큐베이션하였다. 생성된 막을 Tween-20(TBS-T)을 함유하는 Tris-완충 식염수로 세척한 다음 항-토끼 HRP(horseradish peroxidase)-접합된 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology) 및 항-마우스 HRP(horseradish peroxidase)-접합된 이차 항체(GeneTex, Irvine, CA, USA)와 함께 4°C 에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 면역 반응성 단백질 밴드를 검출하기 위해 제조업체의 지침에 따라 강화된 화학발광 시약(Luminata, Merk Millipore)을 사용하였다.

[0061] 세포 사멸을 위한 PI/Annexin V 염색

[0062] Apoptotic 세포는 calcein-AM 및 PI(각각 calcein acetoxymethyl ester 및 propidium iodide)로 동시 염색된 형광 이미징으로 평가하였다. 이를 위해 BT-474 세포(3×10^4 세포)를 공초점 35mm 디쉬에 시딩하고 최소 24시간 동안 부착되도록 하였다. 세포를 $30 \mu\text{M}$ DE-CPT, CPT, DEAB 또는 대조군(1% DMSO)으로 48시간 동안 처리한 후 calcein-AM($4 \mu\text{M}$) 및 PI($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)로 이중 염색하였다. 30분의 인큐베이션 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 살아있는/죽은(live/dead) 세포에 대한 형광 신호는 각각 녹색/적색으로 착색되었다. 여기 파장은 $488/530 \text{ nm}$ 이고, 형광 방출은 $500-600/600-700 \text{ nm}$ 스펙트럼 범위에서 필터로 수집되었다.

[0064] 스페로이드 형성(Spheroid formation)

[0065] 종양 스페로이드 형성을 정량화하기 위해 간단히 BT-474 세포(seeding density at the first day of tumor spheroid formation was 1×10^4 cells/ml) 초저 부착 24웰 플레이트(CORNING, Corning, NY, USA)에 플레이팅하고, B27(1:50, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), $10 \text{ ng}/\text{mL}$ bFGF(basic fibroblast growth factor)(Invitrogen), $20 \text{ ng}/\text{mL}$ EGF(human epidermal growth factor)(Invitrogen), 1% antibiotic agent 및 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin이 보충된 RPMI1640(Gibco)에서 배양하였다. 그런 다음 종양 스페로이드를 PBS로 두 번 세척하였다. 신선한 CSC 배양 배지에서 종양 스페로이드를 $30 \mu\text{M}$ DE-CPT, CPT, DEAB 또는 대조군(1% DMSO)으로 처리하고, 신선한 CSC 배양 배지에서 인큐베이션하였다. 종양 스페로이드의 수는 직경이 $150 \mu\text{m}$ 보다 큰 회전 타원체 크기를 기준으로 Olympus X53 도립 현미경으로 측정하였다.

[0067] 알데플루오르 분석(Aldefluor assay)

[0068] BT474(3×10^5 또는 $1 \times 10^4/\text{mL}$) 세포를 부착 세포용 60mm 디쉬 및 스페로이드용 초저 부착 24웰 플레이트에 시딩하였다. 24시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 $30 \mu\text{M}$ DE-CPT, CPT, DEAB 또는 대조군(1% DMSO)으로 72시간(adhesion) 및 5일(spheroids) 동안 전처리하고, ALDEFLUOR™분석 키트(StemCell Technologies, Duham, NC, USA)을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 ALDH1 활성을 평가하였다. 간략하게, 세포를 ALDH 단백질 기질 BODIPY-aminoacetaldehyde(BAAA, 0.5×10^6 세포당 $1 \mu\text{M}$)를 함유하는 aldefluor 분석 완충액에서 37°C , 45분 동안 인큐베이션하였다. ALDH1의 특정 억제제로서 50 mM diethylamino-benzaldehyde (DEAB)를 사용하여 알데플루오르 양성 집단을 정의하였다. 알데플루오르 염색된 세포를 유세포 분석기로 분석하였다.

[0070] RNA 추출 및 실시간 qPCR 분석(RNA extraction and realtime q-PCR analysis)

[0071] 제조업체의 지침에 따라 PureLink™총 RNA 분리 키트(Invitrogen) 및 TRIzol 시약(Invitrogen)으로 세포주의 총 RNA를 분리하였다. iScript™ cDNA 합성 키트(BioRad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA로의 역전사를 수행하였다. 실시간 PCR에 사용된 모든 cDNA는 GAPDH로 정규화되었다. 정량적 실시간 PCR은 iQTM SYBR Green Supermix(BioRad)를 사용하여 수행하였다. 유전자 발현은 델타-델타-CT 방법으로 정량화하였고, 실시간 PCR은

CFX-96 열 순환기(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 검출 시스템에서 수행하였다. 인간 표적 유전자에 대한 다음 프라이머를 실시간 PCR에 사용하였다: GAPDH sense 5'-AACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3' and antisense 5'-GAGTCCTCCACGATACCAAA-3'; OCT4 sense 5'-TGGGCTCGAGAAGGATGTG-3' and antisense 5'-GCATAGTCGCTGCTTGATCG-3'; Nanog sense 5'-TGAGCTGGTTGCCTCATGTTAT-3' and antisense 5'-GAAGGAAAAGTATCAAGAAATTGGGATA-3' and SOX2 sense 5'-AGGATAAGTACACGCTGCCC-3' and antisense 5'-TAACTGTCCATGCGCTGGTT-3'.

[0073] 통계 분석

모든 데이터는 평균값±SEM으로 나타내었다. 통계분석은 SAS 9.4 프로그램과 다중비교를 위한 one-way 또는 two-way ANOVA test와 Bonferroni's test를 이용하여 수행하였다.

[0076] 결과 및 고찰

본 발명에서는 H₂O₂ 반응성 1,3-옥사티올란 모이어티를 갖는, ALDH를 표적으로 하는 전구약물 DE-CPT를 제공한다. 본 발명에 따른 전구약물 DE-CPT는 ROS에 의해 활성화되어 ALDH 억제제(DEAB)와 항암제(CPT)를 동시에 방출할 수 있다(도 1).

본 발명에 따른 화합물 DE-CPT는 상기 [합성 경로]에 따라 합성하였다. 간략하게, 알데하이드를 보호하기 위해 α-티오글리세롤과 DEAB의 반응을 통해, 1,3-옥사티올란을 도입하였다. 다음으로, 추가 변형을 위해 유리 히드록실 작용기(free hydroxyl functional group)를 *p*-니트로페닐 클로로포르메이트와 반응시켰다. 마지막으로, 중간체 화합물 2를 CPT와 반응시켜 DE-CPT를 합성하였다. 합성 화합물의 존재 및 특성은 질량분석계, ¹H NMR/¹³C NMR을 통해 확인하였다(도면 미도시).

DE-CPT의 활성화 메커니즘은 도 2a에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, DE-CPT의 1,3-옥사티올란에 있는 황은 ROS에 의해 산화되고, 이어서 탈보호된 DEAB가 방출된다. 중간 설폰산 분자에서 남아있는 하이드록시 그룹은 인접한 카보네이트 작용기를 공격한 후 고리화 반응을 일으켜 CPT 약물을 방출한다. DEAB의 방출은 360nm에서 흡광도의 증가를 통해 확인하였다(도 2b, 도 5a). 또한, 유리 CPT의 방출은 435 nm에서의 형광 강화를 통해 모니터링하였다(도 2c 및 도 2d). ROS 활성화 메커니즘을 기반으로, H₂O₂ 조건에서 DEAB 및 CPT가 DE-CPT에서 방출되는 반면, H₂O₂가 없을 때 스펙트럼의 변화가 관찰되지 않음을 확인하였다. 또한, HPLC 분석을 통해 DEAB 및 CPT의 전체 릴리스(full release)에서 반응 완료를 확인할 수 있었다(도 2e 및 도 6b). 구체적으로, DE-CPT 피크는 2시간 이내에 사라지고 DEAB 및 중간 피크는 소량의 CPT와 함께 나타나며 DEAB 방출이 CPT 방출 전에 완료됨을 확인하였다. 또한, 중간 피크는 10시간 이내에 사라지는 것으로 확인되었다. 이를 통해, 중간체가 CPT를 포함하는 설폰산 분자라고 가정하였다. 다음으로, 약산성 조건(pH 6.5)에서 DE-CPT 반응성을 추가로 확인하였다. 이러한 조건에서 반응성은 약간 감소했지만 DEAB와 CPT 모두 방출될 수 있음을 확인하였다(도 6 및 도 7). H₂O₂에 대한 반응성을 기반으로 DE-CPT의 선택성 연구를 수행하여 아미노산 및 금속 이온과 같은 다른 분석물에 의한 간섭을 확인하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, H₂O₂는 흡광도와 형광성을 독립적으로 변경할 수 있다. 높은 친핵성 GSH와 시스테인의 경우 형광의 작은 증가가 관찰되었지만 H₂O₂를 사용했을 때와 비교하여 형광의 변화는 미미하였다. 다음으로, DE-CPT의 HOC1에 대한 반응성을 조사하였다. H₂O₂와 비교할 때 상대적으로 적은 양의 HOC1은 상당한 양의 DEAB와 캄프토테신을 방출할 수 있는 것으로 확인되었다(도 9). 이러한 결과를 통해, DE-CPT가 생물학적 시스템에서 또 다른 중요한 ROS인 HOC1 하에서도 반응할 수 있음을 확인하였다.

DE-CPT가 티올 산화를 통해 활성화될 수 있다는 추가 증거를 확보하기 위해, DE-CPT와 H₂O₂의 6시간 반응 후 ESI-MS 스펙트럼을 측정하였다(도 10). 방출된 DEAB의 [M + H]⁺ 피크(m/z: 178.20)가 포지티브 스캔 모드에서 검출되었다. 또한, 네거티브 스캔 모드에서 방출된 캄프토테신(CPT)의 [M - H]⁻ 피크(m/z: 346.95)가 관찰되었으며, 이는 흡수 및 방출 스펙트럼 결과와 일치하였다. 또한, 기본적으로 두 개의 원하는 피크인 중간체의 [M - H]⁻ 피크(m/z: 582.95)와 고리화 반응 부산물(m/z: 180.90)도 확인할 수 있었다(도 10). 이러한 결과를 통해, DE-CPT가 티올 산화를 통해 활성화되는 도 2a의 메커니즘과 일치함을 확인하였다.

- [0081] 다음으로, 세포 기반 생체외(in vitro) 실험을 수행하였다. 먼저, 본 발명에 따른 DE-CPT 전구약물 시스템이 암 세포에서 효율적으로 작용하는지 여부를 평가하기 위해 세포 생존력을 측정하였다. DE-CPT와 CPT의 세포 생존력을 비교한 결과, DE-CPT의 암세포 선택성을 확인하였으며, 또한, DE-CPT가 동일한 농도에서 CPT에 비해 정상 세포(MCF10A)에 경미한 손상을 일으킨다는 점을 확인하였다(도 3a). 반대로 DE-CPT는 동일한 농도에서 CPT 처리된 세포보다 유방암 세포(BT474 및 MDA-MB-231)에 더 독성이 있는 것을 확인하였다(도 3b 및 도 11).
- [0082] DE-CPT 활성화가 암 세포의 내인성 ROS에 의해 유발되는지 여부를 확인하기 위해 세포를 ROS scavenger N-아세틸시스테인(NAC)으로 전처리하였다(도 3c). 그 결과, NAC를 처리한 세포는 NAC를 처리하지 않은 세포에 비해 세포 독성이 현저히 감소하는 것으로 나타났고, 이를 통해, DE-CPT 활성화가 암세포의 ROS 수준이 높기 때문임을 확인하였다. 동시에 DEAB는 화학요법 약물이 아닌 억제제이기 때문에 고농도에서도 독성이 없음을 확인하였다(도 12). 이러한 결과는 암세포의 ROS가 DEAB를 방출하는 DE-CPT를 활성화시켜 ALDH를 억제함으로써 암세포가 CPT에 민감하게 만든다는 것을 시사한다. 세포 사멸 신호를 확인하기 위해, 다음으로 γ 절단된 폴리 ADP-리보스 폴리머라제(poly ADP-ribose polymerase, PARP) 및 절단된 caspase3 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다. 높은 수준의 절단된 PARP 및 인산화된 H2A.X의 결과로부터 DE-CPT의 세포사멸 유도 능력이 CPT의 능력과 유사함을 확인하였다(도 3d 및 도 13). 이들은 암세포와 CSC의 DNA 손상 복구를 위한 마커 단백질이다. Caspase 의존적 다운스트림 캐스케이드(절단된 caspase-3)의 축적은 세포 사멸 신호(apoptotic cell death signaling) 또한 나타낸다. 세포 손상을 추가적으로 확인하기 위해, BT474 세포를 30 μ M DE-CPT로 48시간 동안 인큐베이션한 후, PI 및 calcein-AM으로 공동 염색하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)을 사용한 형광 이미징 결과에서 볼 수 있듯이, 도 3e에서 빨간색으로 채워진 영역은 살아있는 세포에서 약한 calcein-AM 신호를 가진 DE-CPT 및 CPT에서의 죽은 세포를 나타낸다.
- [0083] DE-CPT가 ALDH 억제제가 결합된 항암제의 전구약물이라는 점을 감안하여 암 줄기세포의 특성을 감소시키는 치료 효과가 있는지 여부를 실험하였다. CSC는 종양 형성을 유발하여 3차원 스페로이드를 형성하는 것으로 간주된다. 구형 형성 효율(Sphere-forming efficiency, SFE)은 종종 CSC의 제거 정도를 결정하기 위해 평가된다. BT474 세포를 CSC 배지를 사용하여 초저부착 플레이트(ultra-low attached plate)에 시딩하고, 둘째 날 DE-CPT, CPT, DEAB 또는 대조군(1% DMSO)으로 처리하였다. 5일 후, 구형 형태 및 150 μ m 이상의 크기를 갖는 보유된 구형의 수를 세었다. CPT 처리군과 비교하여, DE-CPT(30 μ M) 처리된 세포는 도 4a 및 4b에서와 같이 거의 완전한 손상(495%)으로 회전 타원체 형성 능력이 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 CSC population 억제에 대한 강력한 증거를 제공한다. 다음으로, BT474 접착 세포 및 스페로이드 세포의 ALDH 양성 분획을 유동 세포측정법으로 정량하였다. 대조군(1% DMSO) 및 CPT 처리군과 비교하여 ALDH 양성 소집단은 DE-CPT에 의해 극적으로 감소하였다(도 4c). 이는 CSC 강화를 나타내는 두 가지 전형적인 유방 CSC 바이오마커, 즉 ALDH1 및 CD44의 상당한 감소와 일치하였다($p < 0.05$, 도 4d 및 도 14 및 도 15).
- [0084] 다음으로, 활성화된 DE-CPT에 의한 CSC 능력 억제 능력을 확인하기 위해, mRNA 발현의 줄기세포 마커 유전자를 조사하였다. Human Oct4, Nanog, Sox2는 암 줄기세포의 대표적인 발현 유전자로 암 줄기세포의 약물내성, 증식, 전이를 담당한다. 다른 처리군에 비해 DE-CPT 처리된 스페로이드에서 3개의 줄기세포 관련 유전자 마커의 현저한 감소가 관찰되었다. 종합하면, CPT는 DE-CPT만큼 접착 세포에 독성이 있지만(도 3b), CSC 분율 감소에는 거의 영향을 미치지 않는 반면, DE-CPT는 상용화된 화학요법제인 CPT보다 CSC 개체군 감소에 유의미한 영향을 보임을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, DE-CPT가 CSC에서 ROS 활성화에 의한 세포사멸, 카스파제 활성화 및 DNA 손상 유도를 통해 항-CSC 효능을 유도함을 확인하였다.
- [0086] 요약하면, 본 발명에서는 ROS에 의해 활성화되어 ALDH 억제제와 CPT를 동시에 방출할 수 있는 H₂O₂ 반응성 1,3-옥사티올란 모이어티를 갖는 ALDH를 표적으로 하는 전구약물 DE-CPT를 합성하였다. 본 발명의 DE-CPT 합성을 위해, 먼저 DEAB의 알데하이드 작용기를 1,3-옥사티올란 작용기를 보호기로서 도입하였다. 암 세포에서 DE-CPT는 1,3-옥사티올란 작용기가 ROS에 의해 먼저 반응하여 알데하이드를 방출하고, 이어서 분자내 고리화반응으로 CPT를 방출하는 활성화 메커니즘을 가지며, 상기 실험들을 통해, ALDH를 표적으로 하는 DE-CPT는 정상 세포에 비해 암세포에 대한 선택성에서 명확한 이점을 가짐을 확인하였다. 또한, ALDH 억제제(DEAB)와 항암제(CPT)의 병용 약물 방출에 의한 시너지 효과는 최적화된 암세포 사멸을 유도하였다. 또한, DE-CPT는 ALDH 양성 분획(ALDH positive fraction), CSC 마커 유전자 및 대표적인 표면 마커 CD44를 감소시킴으로써 CSC 분획을 현저하게 축소시킬 수 있는 반면, CPT 처리된 세포에서는 유의하지 않음을 확인하였다. 결론적으로, 본 발명에 따른 ALDH를 표적으로 하는 전구약물 DE-CPT는 암 세포 및 암 줄기 세포 치료에 대한 유망한 전략을 제공할 것으로

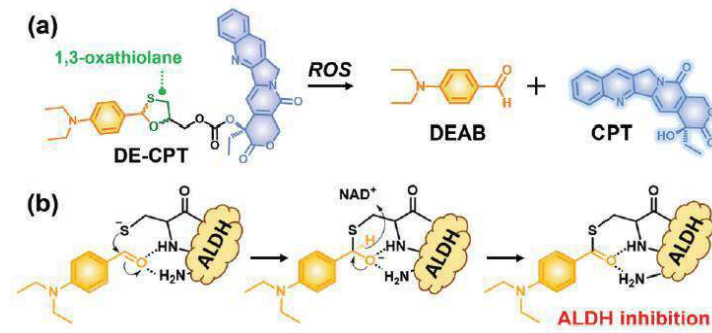
기대된다.

[0088]

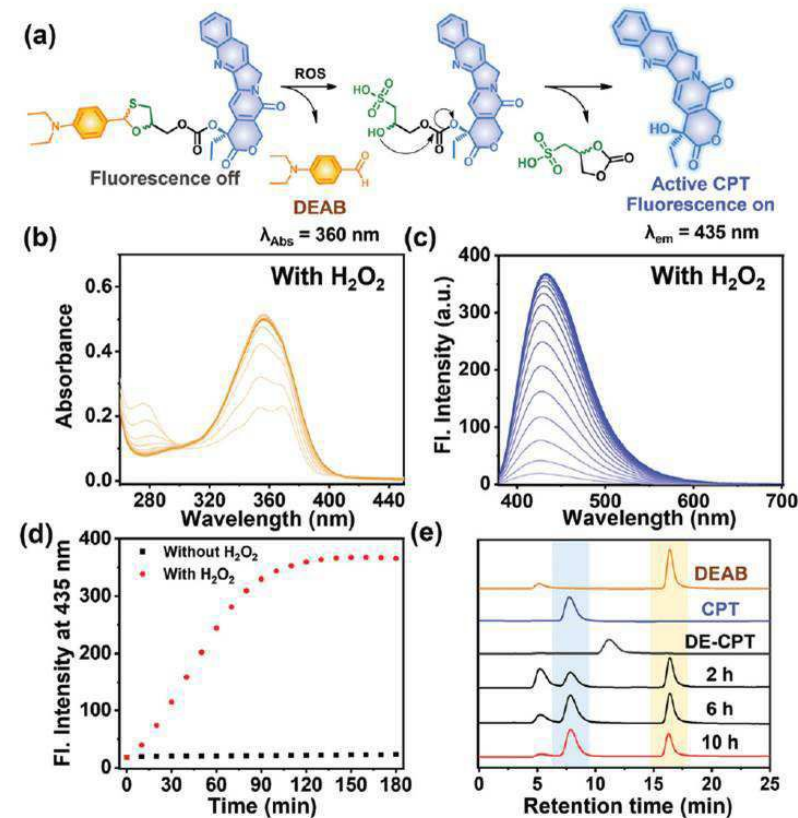
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

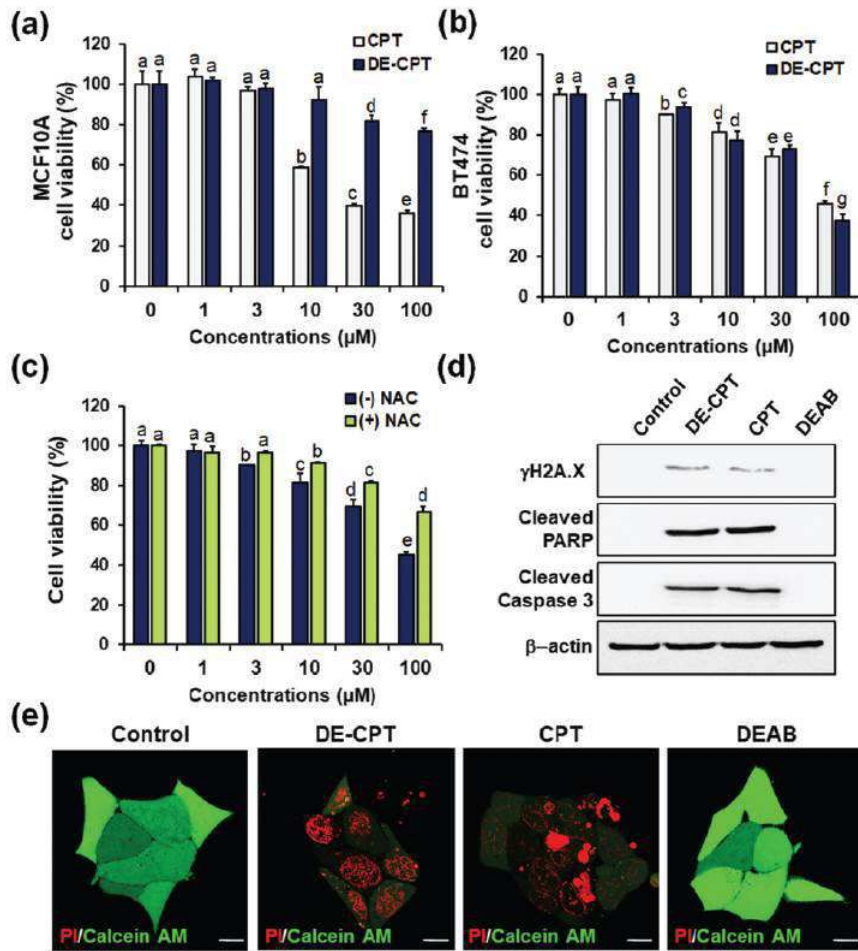
도면1



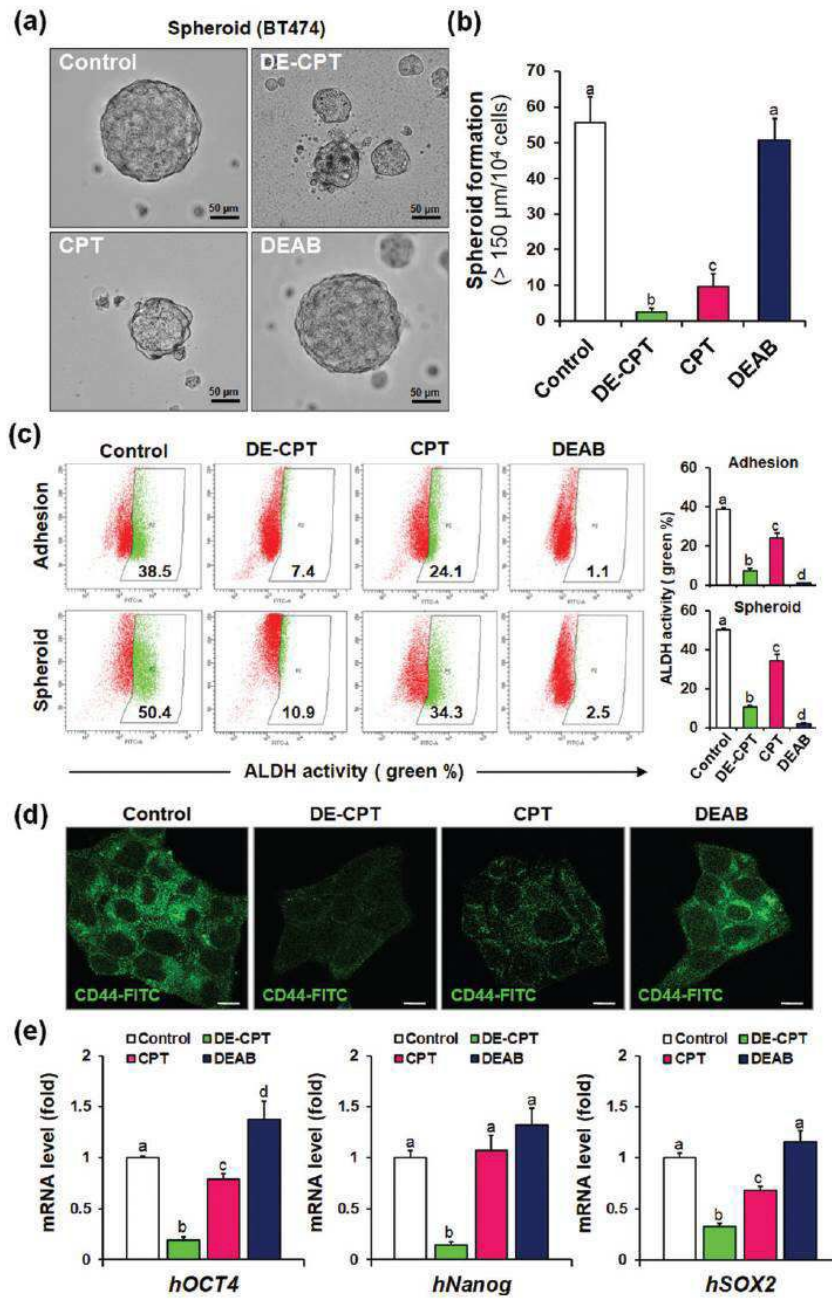
도면2



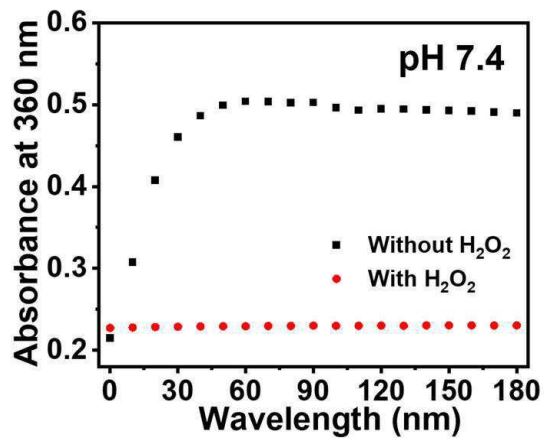
도면3



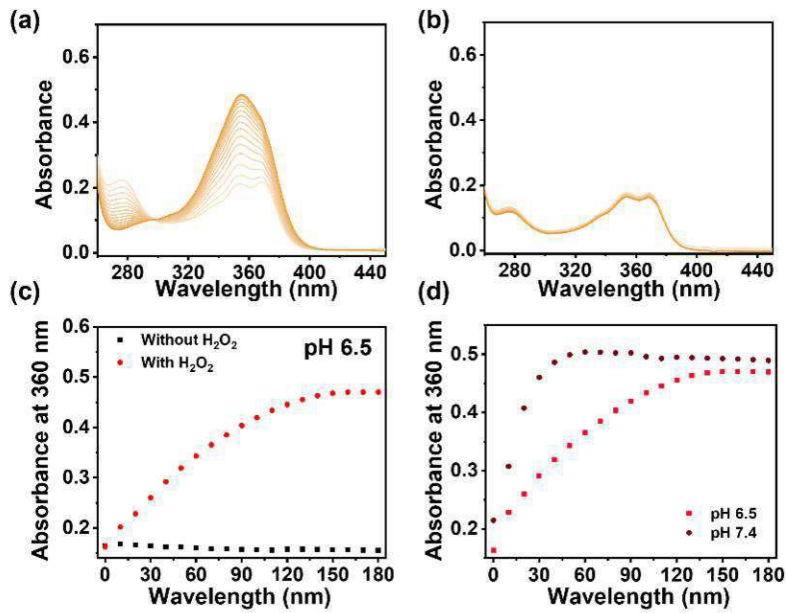
도면4



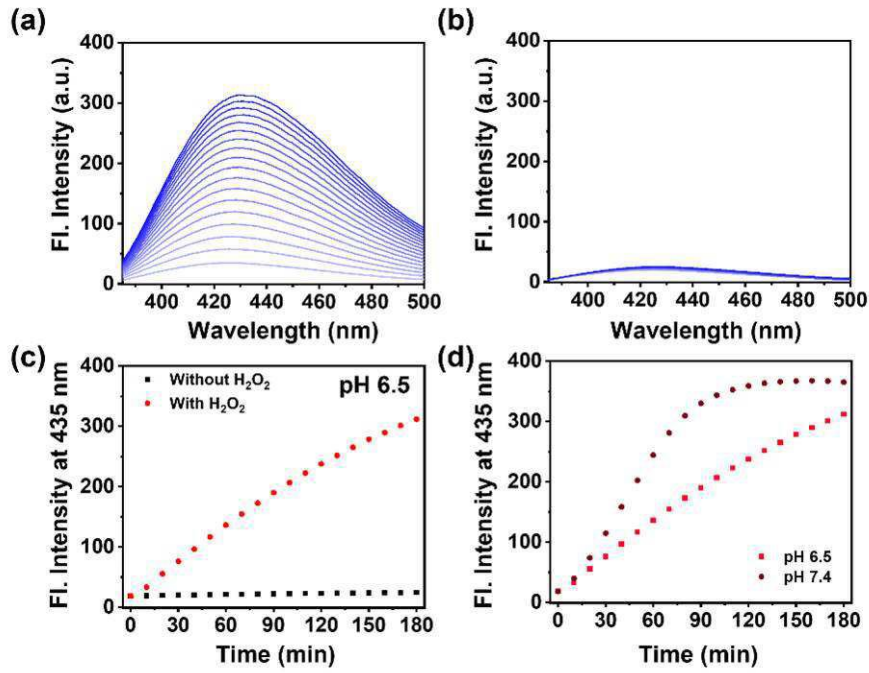
도면5



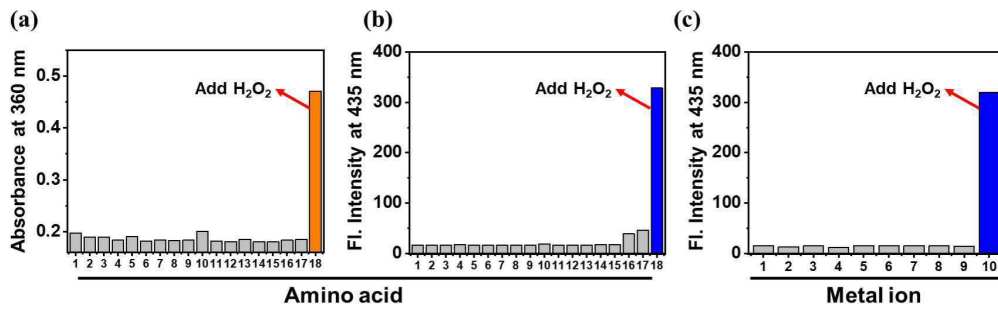
도면6



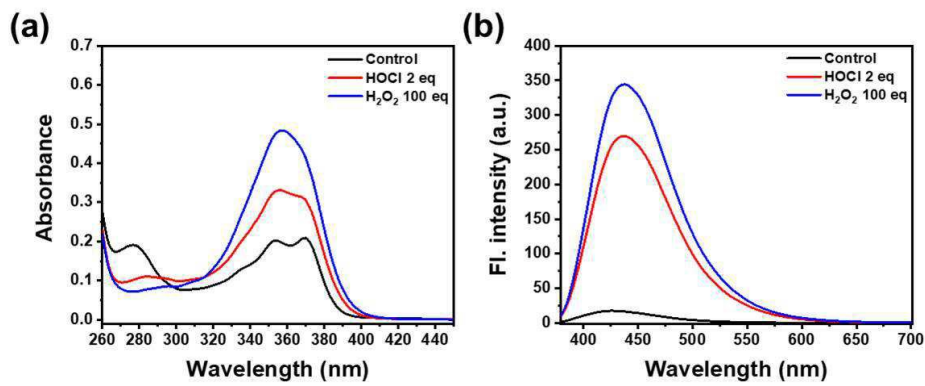
도면7



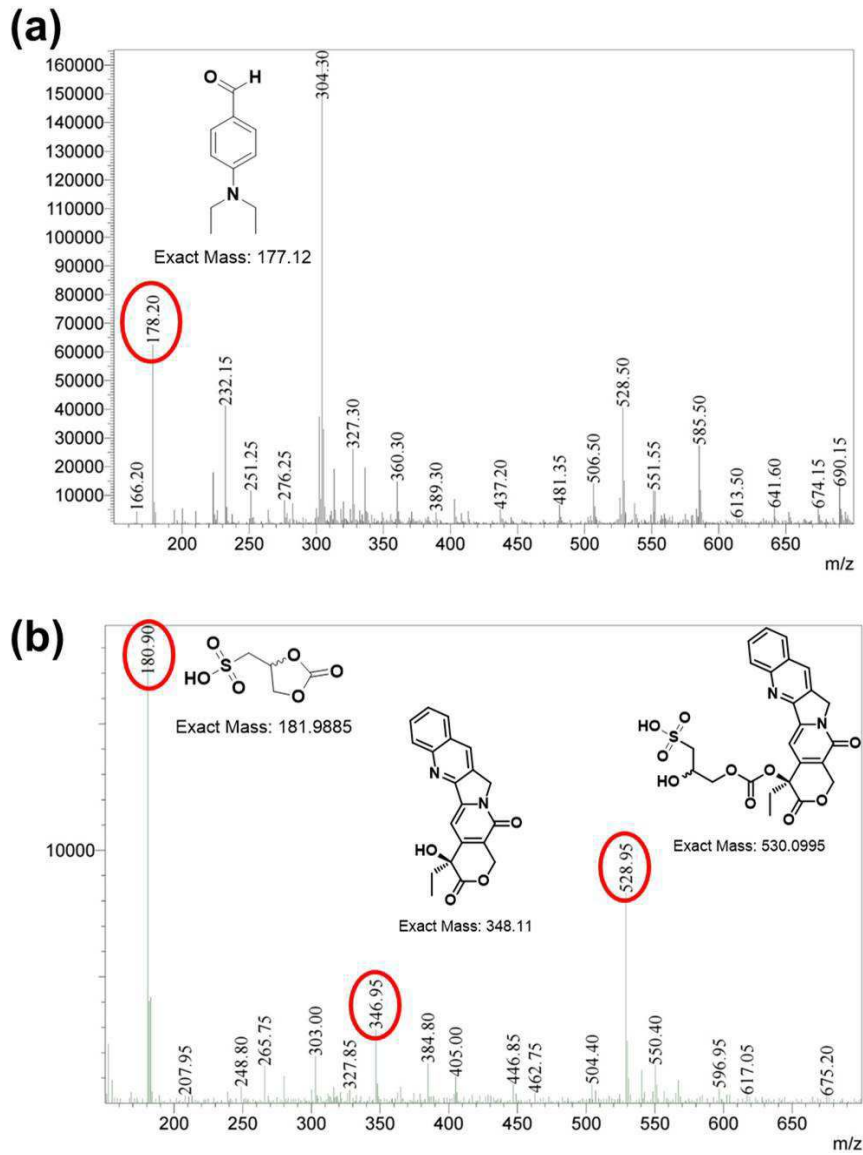
도면8



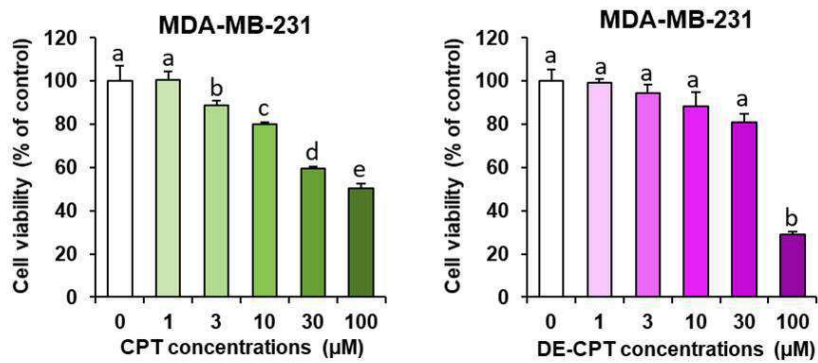
도면9



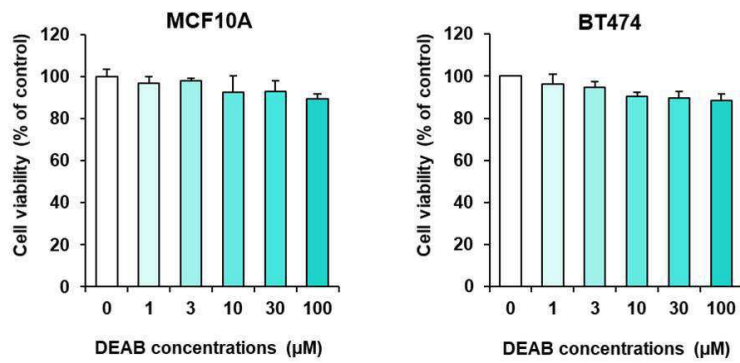
도면10



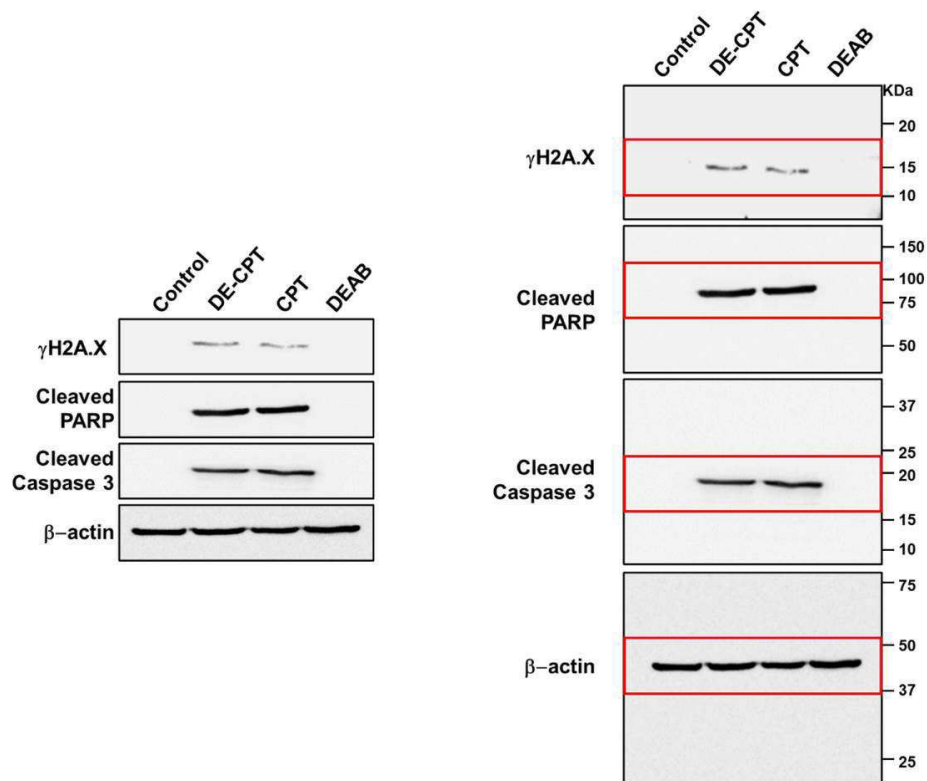
도면11



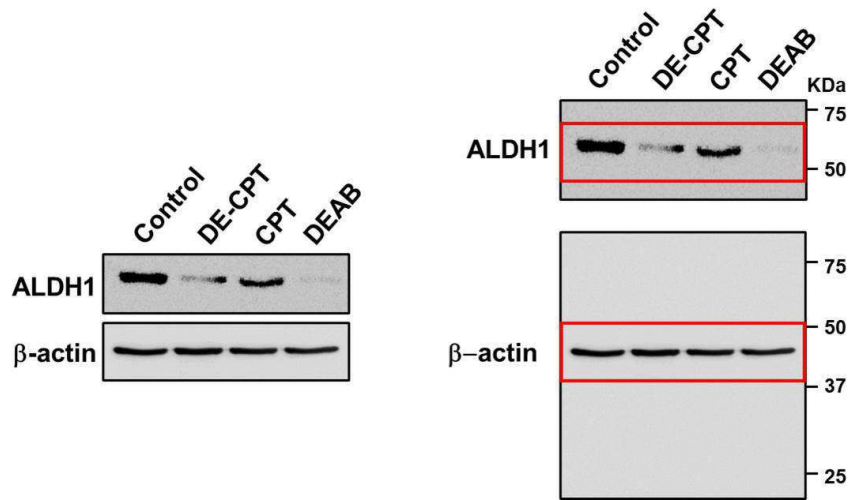
도면12



도면13



도면14



도면15

