

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0067536

(43) 공개일자 2021년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/58 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/582 (2013.01)

A61K 49/0052 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0157281

(22) 출원일자 2019년11월29일

심사청구일자 2019년11월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

서울특별시 성북구 안암로 145

비르디 하디브 썬

72 쉼거 애버뉴, 크헤하르타, 암르차르 143001, 편자브, 인도

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

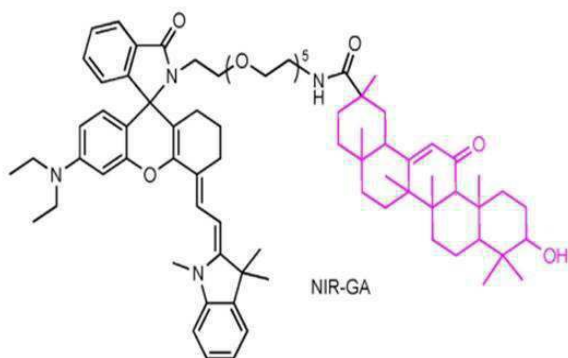
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 6 항

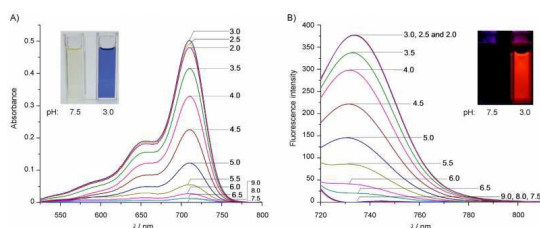
(54) 발명의 명칭 간세포성 암종 특이적 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 간세포성 암종 검출용 형광 센서

(57) 요약

본 발명은 하기 [화합식 1]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 간세포성 암종 검출용 형광 센서에 관한 것이다:



대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57438 (2019.01)

김지현

경기도 성남시 분당구 서현로 177, 104동 503호

(72) 발명자

아밋 샤르마

서울특별시 성북구 고려대로 45, 202호

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 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

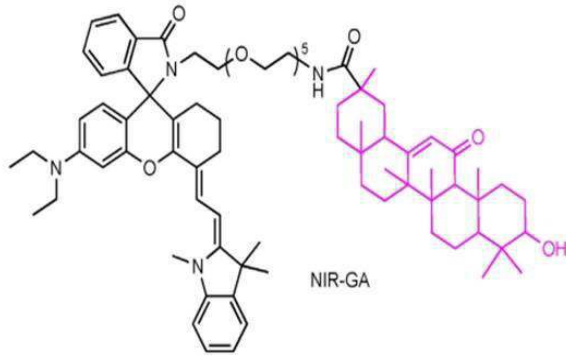
연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화합식 1]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 형광 프로브 화합물:



청구항 2

제1항에 있어서,

GA 수용체 매개 내포 경로(GA receptors-mediated endocytic pathway)를 통해 간세포성 암종 내부로 포획되는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

2 내지 6의 산성 pH 조건에서 활성화되는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 간세포성 암종의 세포 소기관 중 리소솜에서 스피로락탐 고리 개방(H^+ -triggered spirolactam ring opening)을 통해 근적외선 영역에서 형광을 방출하는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 간세포성 암종은 HepG2 또는 Huh7 세포인 것을 특징으로 하는 간세포성 암종 특이적 형광 프로브 화합물.

청구항 6

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 포함하는 간세포성 암종 검출용 형광 센서.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 간세포성 암종 특이적 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 간세포성 암종 검출용 형광 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 간세포성 암종 (Hepatocellular carcinoma, HCC)은 전세계적으로 사망률이 높은 가장 흔한 암 중 하나이다(비특허문헌 1). HCC 환자의 5년 생존률은 15% 미만으로 보고되고 있으며, 간 이식을 제외하면, 외과적 절제술이 바람직한 치료 옵션으로 여겨지지만 종종 내장된 종양의 가시성 제한으로 인해 불완전한 외과적 절제 및 그로 인한 종양 재발이 문제된다(비특허문헌 2)
- [0003] 전 세계적으로 HCC의 발생률 및 관련 사망률이 증가하고 있다는 점에서, HCC의 효과적인 검출을 위한 진단 방법의 개발이 요구되고 있다. 종래에는 양전자 방출 컴퓨터 단층 촬영(PET/CT), 자기공명영상(MRI), 초음파 및 방사선 촬영과 같은 기법이 암 검출에 이용되어 왔다. 그러나 이들은 이미징을 위해 타겟과의 상호 작용에 관계없이 신호를 지속적으로 방출하는 조영제에 의존한다는 단점이 존재한다.
- [0004] 한편, 형광 이미징 프로브는 생체 이미징 분야, 특히 세포 내 pH 변화의 측정에서, 탁월한 검출 감도와 높은 공간 분해능으로 인해 대안적이고 강력한 도구로 등장했다(비특허문헌 3). 그러나, 이 기술에서의 이미징 품질은 사용된 형광 염료의 광물리학적 파라미터에 상당히 의존한다. 최근, 근적외선(near-Infrared, NIR) 영역 (700-900 nm)에서 방출되는 형광 염료는 가시광 영역에서 방출되는 염료에 비해 2가지 주요 이점으로 인해 바이오 이미징 분야에서 큰 관심을 얻고 있다(비특허문헌 4). 첫째, 생물학적 표본은 NIR의 흡수가 감소되어 생물학적 시료에 대한 광 손상이 최소화되고 방사선에 의한 조직 침투가 더 깊어진다. 두번째로 NIR 이미징은 자가 형광의 간섭을 최소화하여 높은 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio)를 가능하게 한다. 이 방법에서 능동적 NIR 염료 (quenched state)는 종양-특이적 표적 리간드에 키패시게이트되어 의도된 작용 부위로 염료를 운반하는 것을 도운 다음, 암 미세 환경에 반응하여 염료를 활성화시킨다(비특허문헌 5). 이러한 전략은 종양 탐지 및 치료제 개발에 있어 민감도와 특이성을 크게 향상시킬 수 있다(비특허문헌 6).
- [0005] HCC의 경우, 갈락토스 유닛은 간세포에서 과발현되는 asialoglycoprotein receptor (ASGP-R)에 의해 쉽게 인식될 수 있기 때문에, 활성 간세포 표적화 리간드로서 광범위하게 연구되어왔다. 그러나 간경변과 같은 특정 병리적 조건하에서는 ASGP-R의 전반적인 결합 능력이 혈청 내의 억제제에 의해 현저하게 억제되어 그 효능이 저하될 수 있다(비특허문헌 7). 또한, Kim 등에 따르면(비특허문헌 8), ASGP-Rs는 결장암과 같은 다른 유형의 암에서도 과발현되는 것으로 나타났다. 따라서 HCC 표적화를 위한 보다 효율적인 표적 리간드의 개발이 요구된다.
- [0006] 18β-글리시레틴산 (GA)은 다양한 간 관련 질환의 치료를 위한 의약에 널리 사용되어 왔다(비특허문헌 9). 흥미롭게도 Negishi 등은 간세포 막 상에 GA에 대한 풍부한 수용체가 존재함을 입증하였으며(비특허문헌 10), 이들 수용체는 정상 세포보다 간암 세포에서 과발현된다(비특허문헌 11). 지난 몇 년 동안, 많은 연구들을 통해 GA와 접합된 담체가 비접합체보다 간세포에서 더 큰 축적을 나타낸다는 것이 보고되었다(비특허문헌 12). 그러나, GA를 활성 표적 리간드로 사용하는 이들 연구들은 대부분 나노 물질을 수반하는 담체와 약물 전달에만 초점을 두었을 뿐, 소분자 유기 화합물 기반의 GA-modified NIR 이미징 프로브에 대해서는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) A. P. Venook, C. Papandreou, J. Furuse, L. L. de Guevara, Oncologist 2010, 15, 5-13.
- (비특허문헌 0002) J. D. Yang, L. R. Roberts, Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2010, 7, 448-458.
- (비특허문헌 0003) G. Chen, Q. Fu, F. Yu, R. Ren, Y. Liu, Z. Cao, G. Li, X. Zhao, L. Chen, H. Wang, J. You, Anal. Chem. 2017, 89, 8509-8516.
- (비특허문헌 0004) S. Achilefu, Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9816-9818; Angew. Chem. 2010, 122, 10010-10012.
- (비특허문헌 0005) M. H. Lee, J. H. Han, P. S. Kwon, S. Bhuniya, J. Y. Kim, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 1316-1322.
- (비특허문헌 0006) M. H. Lee, A. Sharma, M. J. Chang, J. Lee, S. Son, J. L. Sessler, C. Kang, J. S. Kim, Chem. Soc. Rev. 2018, 47, 28-52.
- (비특허문헌 0007) R. J. Stockert, A. G. Morell, Hepatology 1983, 3, 750-757.
- (비특허문헌 0008) A. Sharma, E. J. Kim, H. Shi, J. Y. Lee, B. G. Chung, J. S. Kim, Biomaterials

2018, 155, 145-151.

(비특허문헌 0009) M. P. Manns, H. Wedemeyer, A. Singer, N. Khomutjanskaja, H. P. Dienes, T. Roskams, R. Goldin, U. Hehnke, H. Inoue, J. Viral Hepat. 2012, 19, 537-546.

(비특허문헌 0010) M. Negishi, A. Irie, N. Nagata, A. Ichikawa, Biochim. Biophys. Acta 1991, 1066, 77-82.

(비특허문헌 0011) Z. Y. He, X. Zheng, X. H. Wu, X. R. Song, G. He, W. F. Wu, S. Yu, S. J. Mao, Y. Q. Wei, Int. J. Pharm. 2010, 397, 147-154.

(비특허문헌 0012) C. Zhang, W. Wang, T. Liu, Y. Wu, H. Guo, P. Wang, Q. Tian, Y. Wang, Z. Yuan, Biomaterials 2012, 33, 2187-2196.

발명의 내용

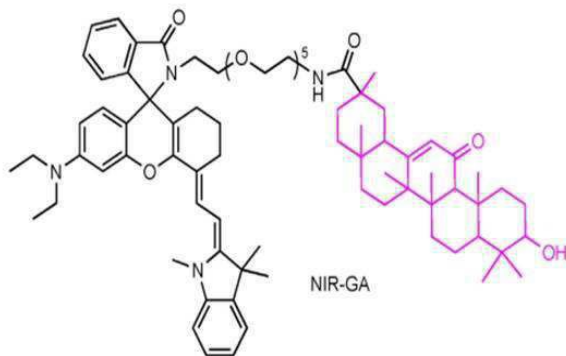
해결하려는 과제

[0008] 본 발명에서는 간세포성 암종에 고선택성을 갖는 간세포성 암종 특이적 형광 프로브 화합물 및 이를 포함하는 간세포성 암종 검출용 형광 센서를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0010] 하기 [화합식 1]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 형광 프로브 화합물을 제공한다:



[0011]

[0012] 본 발명에 따르면, 상기 형광 프로브 화합물은 GA 수용체 매개 내포 경로(GA receptors-mediated endocytic pathway)를 통해 간세포성 암종 내부로 포획되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 형광 프로브 화합물은 2 내지 6의 산성 pH 조건에서 활성화되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 형광 프로브 화합물은 상기 간세포성 암종의 세포 소기관 중 리소솜에서 스피로락탐 고리 개방(H^+ -triggered spirolactam ring opening)을 통해 근적외선 영역에서 형광을 방출하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0015] 본 발명에 따르면, 상기 간세포성 암종은 HepG2 또는 Huh7 세포인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 형광 프로브 화합물을 포함하는 간세포성 암종 검출용 형광 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물은 간세포성 암종에 대해 우수한 선택성을 가지며, 세포에 손상이나 충격을 가하지 않고 우수한 검출 감도와 높은 공간 해상도의 이미징을 가능하게 하는바, 간암 진단분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018]

도 1은 PBS(0.1 M, pH 7.4, 37 °C) 중 30% EtOH, 다양한 pH 값에서 NIR-GA(화학식 1로 표시되는 화합물) (5 μ M)의 UV/Vis(도 1의 (A)), 형광 스펙트럼(도 1의 (B))을 나타낸 것이다. 여기 및 방출 파장은 각각 709 nm 및 733 nm였다. 37 °C에서 15분 동안 인큐베이션 한 후 각 판독값을 기록하였다.

도 2의 A)는 NIR-GA의 가역성을 보여주는 pH 7.5와 5.0 사이의 형광 "오프/온"사이클을 나타낸 것이다. B)는 pH 7.5 및 5.0에서 NIR-GA의 시간 의존적 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. C)는 산에 대한 NIR-GA의 선택성을 보여주는 막대 다이어그램이다(e.g., 1=pH 3.0, 2=Zn²⁺, 3=Cu²⁺, 4=Co²⁺, 5=Ca²⁺, 6=Fe²⁺, 7=Mg²⁺, 8=Ag²⁺, 9=Ba²⁺, 10=Cd²⁺, 11=Pb²⁺, 12=Ni²⁺, 13=Hg²⁺, 14=Mn²⁺, 15=Na⁺). D)는 NIR-GA의 광 안정성을 보여주는, 조사 시간(1.5 h)에 따른 형광 강도를 나타낸 것이다. 여기 및 방출 파장은 각각 709 nm 및 733 nm였다.

도 3은 NIR-GA의 세포 내 흡수 결과로서, 다양한 농도의 NIR-GA와 함께 인큐베이션 된 정상 세포 (섬유 아세포) 및 간암 세포 (HepG2 및 Huh7)의 형광 현미경 이미지를 나타낸 것이다. 여기 및 방출 파장은 각각 709 nm 및 733 nm였다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=3).

도 4는 free GA가 NIR-GA의 세포 흡수 거동에 미치는 영향을 나타낸 것이다. A)는 20 μ M NIR-GA로 처리하기 전에, 다양한 농도의 free GA [(1) 내지 (4): 0, 5, 10 및 25 μ M]로 전처리 된 Huh7 세포의 형광 현미경 이미지이다. B)는 Huh7 세포에서 측정된 NIR-GA의 상응하는 평균 형광 강도를 나타낸 것이다. 여기 파장은 639nm이고 방출은 700-1000nm 범위에서 수집되었다. 이미지 J 소프트웨어를 사용하여 이미지를 획득하였다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=3).

도 5는 섬유 아세포, Huh7 및 HepG2 세포주에 대한 NIR-GA의 세포 독성 평가를 위한 MTT 분석 결과를 나타낸 것이다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=3).

도 6은 NIR-GA, Mito-, ER-, 및 Lyso-Tracker green으로 처리된 Huh7 세포의 공초점 형광 현미경 이미지를 나타낸 것이다. 세포를 20 μ M NIR-GA 및 5 μ M의 각 소기관 마커로 공동 표지하였다. 오른쪽 상단의 플롯은 병합된 이미지에서 관심 영역 (흰색 막대로 표시)의 강도 프로파일을 보여준다. 공초점 형광 현미경으로 60 배율로 이미지를 획득하였다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=3).

도 7은 다양한 pH 값에 대한 5 μ M NIR-GA의 흡광도 플롯을 나타낸 것이다. 스펙트럼은 PBS(pH 7.4, 37 °C 중 30% EtOH에서 기록하였다.

도 8은 pH 값에 따른 5 μ M NIR-GA의 형광 강도 플롯을 나타낸 것이다. 스펙트럼은 PBS(pH 7.4, 37 °C 중 30% EtOH에서 기록하였다. 여기 및 방출 파장은 각각 709 nm 및 733 nm였다.

도 9는 다양한 분석물들의 존재하에서 산성 pH에 대한 NIR-GA의 선택적 반응을 나타내주는 막대 그래프이다: (1) pH = 3.0, (2) L-ascorbic acid, (3) L-Glutamic acid, (4) NADH, (6) cysteine (7) Homo-cysteine (8) L-Glutathione, (9) H₂O₂, (10) hypochlorite ion (OCl⁻), (11) hydroxyl ions (OH⁻). 모든 스펙트럼은 PBS(pH 7.4, 37 °C 중 30% EtOH에서 기록하였다. 여기 및 방출 파장은 각각 709 nm 및 733 nm였다.

도 10은 산성 및 염기성 pH 사이에서 염료의 형광 온-오프 스위칭 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 11은 서로 다른 산성 pH 값에서 프로브 NIR-GA의 화학 구조를 나타낸 것이다.

도 12는 20 μ M NIR 및 DPAI (핵 염색)로 공동 표지된 섬유 아세포 및 Hih7 세포의 3D 재구성된 공초점 현미경 이미지를 나타낸 것이다. 60X 배율에서 공초점 형광 현미경을 사용하여 이미지를 획득하였다.

도 13은 20 μ M NIR-GA 및 5 μ M의 각 소기관 마커와 공동표지 된 Huh7 세포의 확대된 공 초점 현미경 이미지로서, 리소솜에서 프로브 NIR-GA의 공동-국소화를 보여준다. 60X 배율에서 공초점 형광 현미경을 사용하여 이미지를 획득하였다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=3).

도 14는 Changsha 염료의 세포 내 흡수 결과로서, 20 μ M의 Changsha 염료와 함께 인큐베이션 된 정상 세포 (섬유 아세포) 및 간암 세포 (HepG2 및 Huh7)의 형광 현미경 이미지를 나타낸 것이다. 여기 및 방출 파장은 각각 709 nm 및 733 nm였다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=3).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 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.
- [0021] **실험 방법**
- [0022] 재료, 방법 및 기기장치
- [0023] 모든 시약 및 용매는 Sigma Aldrich, Alfa Aesar, TCI Korea 및 Merck에서 구입하여 추가 정제없이 사용하였다. 실리카겔 60 (70 ~ 230 메쉬)을 고정상으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피 정제를 수행하였다. 분석 박층 크로마토그래피(Analytical thin-layer chromatography, TLC)는 60 실리카 겔을 사용하여 수행하였다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker 500 NMR 기기에서 기록하였다. 화학적 쉬프트(δ 는 ppm으로 기록되며 커플링 상수는 Hz로 표시된다. 질량 스펙트럼은 IonSpecHiRes ESI Shimadzu LC/MS-2020 질량 분석기로 기록하였다. 모든 형광 및 UV-Vis 스펙트럼은 RF-5301PC 및 S-3100 분광 광도계에서 각각 기록하였다. 순수한 DMSO에서 NIR-GA (5 mM)의 스톱 용액을 제조하였다. 용액 연구를 위해, 스톱 용액을 EtOH (30 %)를 함유하는 PBS (pH 7.4, 37 °C)로 희석하여 최종 작업 용액의 농도를 5 μM 농도로 만들었다. 용액의 총 부피는 3.0 mL로 고정되었다. 실험에서 여기 파장은 709 nm 였고, 모든 여기 및 방출 슬릿 폭은 5 nm 였으며, 방출은 733 nm에서 수집되었다. 형광 변화를 모니터링하기 위해, 먼저 NIR-GA (5 μM)의 작업 용액을 5분 동안 37 °C에서 서로 다른 pH 값 하에서 인큐베이션 시키고, 해당 형광 스펙트럼을 기록하였다.
- [0025] 세포 배양 및 공초점 현미경 이미징
- [0026] 두 가지 다른 간세포 세포주 (HepG2 및 Huh7, 한국 세포주 은행)와 인간 피부 섬유 아세포 세포주 (HDFn, Invitrogen)를 실험에 사용하였다. HepG2, Huh7 및 섬유 아세포 세포주(각 세포 수가 1×10^5 cells)를 35 mm 공초점 접시 (유리 바닥 접시, SPL Life Sciences, 대한민국)에 시딩하였고, 태아 소 혈청 (FBS, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, 10%) 및 페니실린/스트렙토 마이신(P/S, Hyclone, 1%)이 보충된 고-글루코스 둘베코변형이글배지 (DMEM, GE Hyclone, Logan, UT, USA)에서 37 °C, 5% CO_2 분위기에서 배양하였다. 세포가 75-80 % 컨플루언스(confluence)에 도달할 때, 다양한 농도 (0, 5, 20, 40 μM)의 NIR-GA로 처리하였다. 15시간 동안 배양한 후, 세포를 PBS로 세척하고, 파라포름알데히드 (PFA, 4 %)로 고정하고, 추가 분석이 이루어질 때까지 48 °C에서 보존하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Carl Zeiss LSM 700 Exciter, Germany)을 사용하여 공초점 형광 이미지를 획득하였다. 여기 파장은 5mW에서 639nm였으며 방출은 700-1000nm의 롱패스필터를 사용하여 수집하였다. Zen 이미징 소프트웨어 (ZEISS, Oberko, Germany)를 사용하여 이미지를 분석하였다.
- [0028] Free GA를 이용한 경쟁 억제 분석(Competitive inhibition assay)
- [0029] Huh7 및 섬유 아세포를 35 mm 유리 바닥 공초점 접시에 1×10^5 cells의 세포 밀도로 시딩하였다. 24 시간 동안 인큐베이션 한 후, 세포를 NIR-GA (20 μM)로 처리하기 전에 1시간 동안 다양한 농도(0, 5, 10 및 25 μM)의 free GA(a pharmacological inhibitor)와 함께 인큐베이션 시켰다. 추가적인 24시간의 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 3회 세척하고 PFA (4 %)로 고정시키고, 상응하는 공초점 형광 이미지를 기록하였다.
- [0031] NIR-GA의 세포내 국소화 (co-localization study)
- [0032] NIR-GA의 세포 내 위치를 확인하기 위해, 세포를 NIR-GA (20 μM)와 함께 인큐베이션하기 전에 세포 기관 트래커 (Invitrogen) Mito-Track Green, Lyso-Tracker Green 및 ER-Tracker Green을 함유하는 배지로 전처리 하였다. Huh7 세포를 35 mm 공초점 접시 (유리 바닥 접시, SPL Life Sciences)에 시딩하였다. 세포 밀도가 약 80% 컨플루언스에 도달했을 때, 세포를 PBS로 2회 세척하고 15시간 동안 NIR-GA (20 μM)와 함께 인큐베이션 시켰다. 세포를 다시 PBS로 2회 세척하고 세포 기관 트래커 (Mito-, ER- 및 Lyso-tracker, 100 nM)를 함유하는

FBS 배지 (2.5%)에서 60분 동안 인큐베이션 시켰다. 마지막으로, 세포를 PBS로 2회 세척하였다. NIR-GA의 경우 여기 파장은 5mW에서 639nm였으며 방출은 700-1000nm의 롱패스필터를 사용하여 수집하였다. 세포 기관 트래커의 경우 여기 파장은 5mW에서 488nm였으며, 방출은 500-600nm 밴드패스 필터를 사용하여 수집하였다.

[0034] NIR-GA의 용량 의존적 세포 내 흡수

[0035] HepG2, Huh7 및 섬유 아세포 세포주(각 세포 수가 1×10^5 cells)를 35mm 유리 바닥 공초점 접시 (SPL Life Science, 대한민국 경희)에 시딩하고, 24 시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 다양한 농도(0, 5 및 20 μ M)의 NIR-GA로 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C, CO₂ (5%)하에 처리하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 형광 이미지를 시각화하였다.

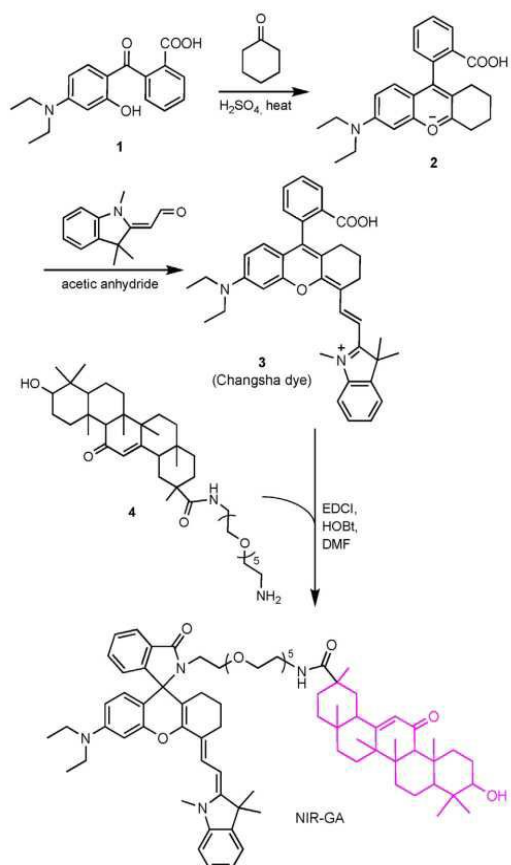
[0037] 세포 생존력 분석 (MTT)

[0038] 세포 생존력에 대한 NIR-GA의 효과를 측정하기 위해, MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 세포독성 분석을 수행하였다. CytoTox96 비방사성 세포 독성 분석 키트 (Promega, USA)를 사용하여 세포 생존력을 평가 하였다. HepG2, Huh7 및 섬유 아세포 세포주 (각 세포 수가 1×10^5 cells)를 96-웰 플레이트에 분주하고, 다양한 농도의 NIR-GA로 24시간 동안 처리하였다. 이어서, MTT 시약 (5 mgmL⁻¹)을 각 웰에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 570 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더 (Sense, Hidex, Finland)로 측정하였다. 모든 실험은 3회 수행하였다.

[0040] 화합물 합성

[0041] 하기 합성 경로에 따라 본 발명에 따른 [화학식 1](NIR-GA로 표시)의 화합물을 합성하였다.

[0042] [합성 경로]



[0043]

[0044] 화합물 3의 합성

[0045] 종래 문헌(Anal. Chem. 2016, 88, 9746-9752)에 보고된 절차에 따라 화합물 3(Changsha dye)을 합성하였다.

[0047] 화합물 4의 합성

[0048] DMF (10 mL) 중 글리시레틴산 (GA, 0.2g, 0.43mmol), EDC (0.1g, 0.52mmol), 1-하이드록시-1H-벤조트리아 졸 (HOBt; 0.07g, 0.52mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP, 0.06g, 0.52mmol)의 혼합물을 질소하에 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 이어서 17-Azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-amine (0.16 g, 0.52 mmol)을 첨가 하고, 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 DMF를 증발시켜 조 생성물을 얻었고, 이를 CH₂Cl₂중 MeOH (5%)를 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 아자이드 유도체(azide derivative)를 72% 수율로 얻었다.

[0049] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ=6.28 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 3.66-3.55 (m, 18H), 3.39 (t, J=4.6 Hz, 2H), 3.24-3.20 (m, 1H), 2.78 (d, J=12.0 Hz, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.17 (d, J=12.0 Hz, 2H), 2.04-1.58 (m, 13H), 1.37 (brs, 8H), 1.13 (s, 9H), 1.00 (s, 4H), 0.81 (s, 6H), 0.70 ppm (d, J=12.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ=200.19, 176.02, 169.44, 128.60, 78.87, 70.85, 70.82, 70.77, 70.71, 70.63, 70.36, 70.29, 70.22, 62.00, 55.14, 50.84, 48.23, 45.54, 43.75, 43.36, 41.96, 39.33, 39.31, 37.67, 37.23, 32.94, 32.05, 32.04, 31.63, 29.63, 28.73, 28.32, 27.43, 26.67, 26.60, 23.57, 18.84, 17.66, 16.56, 15.82 ppm; MS (ESI): m/z calcd for C₄₂H₇₀N₄O₈ : 758 [M+Na]⁺; found: 781.

[0050] 이어서 아자이드 유도체 (0.5 g, 0.66 mmol)를 톨루엔/H₂O 혼합물 (1:1, 20 mL)에 용해시킨 후, HCl (5 %, 10 mL)을 첨가하였다. THF (5 mL)에 용해된 트리페닐포스핀 (PPh₃, 0.21 g, 0.79 mmol)을 상기 용액에 천천히 적가 하였다. 유백색 현탁액을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 수성층을 분리하고, 톨루엔으로 3-4회 세척 하였다. 이어서, pH가 10에 도달 할 때까지 수성층을 NaOH (2N)로 처리하였다. 생성물을 에틸 아세테이트로 추출하고, 유기층을 제거하고, 무수 NaSO₄상에서 건조시키고, 진공 하에서 농축시켜 화합물 4를 63%의 수율로 수득하였다.

[0052] NIR-GA의 합성

[0053] DMF (5 mL) 중 창사 염료 (화합물 3; 0.1 g, 0.18 mmol), EDC (0.04 g, 0.23 mmol), HOBt (0.03 g, 0.23 mmol) 및 DMAP (0.03 g, 0.23 mmol)의 혼합물을 질소하에 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 아민 유도체 화합물 4 (0.16 g, 0.22 mmol)를 첨가하고, 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 DMF를 증발시켜 조 생성물을 얻었고, 이것을 CH₂Cl₂ (5%) 중 MeOH를 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 68% 수율로 NIR-GA를 수득하였다.

[0054] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ=7.85-7.83 (m, 1H), 7.48-7.40 (m, 3H), 7.19-7.15 (m, 3H), 6.84 (t, J=7.6 Hz, 1H), 6.62 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.51 (brs, 1H), 6.32-6.24 (m, 3H), 5.68 (s, 1H), 5.37 (d, J=12.4 Hz, 1H), 3.62-3.60 (m, 12H), 3.55-3.52 (m, 7H), 3.37-3.42 (m, 6H), 3.24-3.20 (m, 2H), 3.15 (s, 2H), 2.78-2.74 (m, 1H), 2.58 (brs, 1H), 2.43 (brs, 2H), 2.32 (brs, 1H), 2.19-2.15 (m, 2H), 2.04-2.00 (m, 2H), 1.94 (d, J=10.4 Hz, 2H), 1.85-1.81 (m, 3H), 1.74-1.70 (m, 6H) 1.66-1.58 (m, 7H), 1.36 (s, 9H), 1.25 (s, 3H), 1.17 (t, J=6.8 Hz, 7H), 1.12-1.11 (m, 8H), 1.00 (s, 4H), 0.80-0.79 (m, 6H), 0.69 ppm (d, J=11.2 Hz, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ= 200.30, 200.28, 176.18, 169.59, 169.57, 168.80, 168.79, 157.90, 152.88, 157.89, 148.81, 148.07, 145.53, 139.03, 132.42, 131.90, 128.64, 128.59, 128.29, 127.90, 123.61, 122.98, 121.74, 120.35, 119.75, 119.46, 108.51, 105.87, 105.17, 103.60, 97.93, 92.17, 78.87, 77.62, 77.30, 76.98, 70.68, 70.61, 70.60, 70.57, 70.54, 70.33, 70.24, 68.23, 67.03, 62.05, 55.13, 48.21, 45.63, 45.55, 44.55, 43.76, 43.37, 41.95, 39.39, 39.33, 39.30, 39.16, 37.69, 37.23, 32.94, 32.04, 31.60, 29.90, 29.63, 29.33, 28.76, 28.68, 28.47, 28.32, 27.44, 26.67, 26.61, 25.51, 23.59,

23.10, 22.39, 18.52, 17.67, 16.58, 15.84, 12.76 ppm; MS (ESI): m/z calcd for $C_{79}H_{108}N_4O_{10}$: 1272 $[M+Na]^+$; found: 1295.

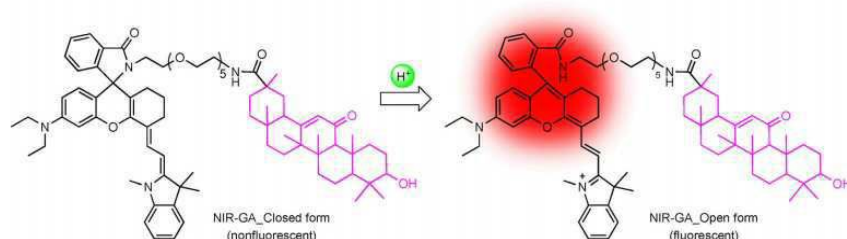
[0056] 결과 및 고찰

[0057] 본 발명에서는 폴리에틸렌 글리콜 링커를 통해 GA를 Changsha 염료(pH-sensitive NIR fluorophore)에 접합시킨 pH-반응성 소분자 NIR 이미징 프로브 화합물 NIR-GA를 합성하고, 인비트로 결과를 통해 NIR-GA가 세포 생존력 (낮은 세포 독성)을 손상시키지 않으면서 간암 세포에 의해 쉽게 흡수될 수 있음을 입증 하였다. 또한, 산성 매 질에서, NIR-GA는 H^+ 트리거된 스피로락탐 고리 개방(H^+ -triggered spirolactam ring opening)을 통해 NIR 영역에서 강한 방출을 나타내며, 높은 pH 선택성과 광안정성을 나타내며, 세포 소기관 중 리소좀에 주로 위치하여 리소좀 pH(lysosomal pH)의 비침습적 모니터링을 가능하게 함을 확인하였다.

[0058] 본 발명에 따른 화합물인 NIR-GA는 상기 [합성 경로]에 따라 합성하였다. 간략하게, Changsha 염료를 GA-접합된 아민 유도체 화합물 4와 커플링하여 NIR-GA를 합성하였다. 합성된 화합물의 존재는 질량분석계, 1H NMR/ ^{13}C NMR 을 통해 확인하였다.

[0059] 다음으로, UV/Vis 및 형광 분광법을 통해 다양한 pH 값에서 NIR-GA의 광학 거동을 조사하였다. 염기성 및 생리학 pH 값 (9 내지 7.4)에서, NIR-GA 프로브는 PBS(0.1 M, pH 7.4, 37 °C) 중 30% EtOH에서 흡수 밴드를 나타 내지 않는다. 그러나 pH가 7.4에서 3.0으로 점진적으로 감소하면, 650nm에서 솔더 밴드가 형성되면서 709nm에서 현저한 흡광도 향상을 나타낸다(도 1A). 더욱이, 이러한 변화는 용액의 황색에서 진한 보라색으로의 급격한 색 상 변화를 동반하였다(도 1A, insert). 이러한 결과는 산성 조건하에서 창사 염료의 스피로락탐 고리가 개방되 어, p-electron π -electron 클라우드의 컨주게이션 연장에 의한 것이다(Scheme 1 참조). 흥미롭게도, 3.0 미 만의 pH 값의 추가 감소는 흡수 감소를 야기하였는데, 이러한 비정상적인 거동에 대한 가능한 설명은 매우 낮은 pH에서 염료의 3차 아민기가 양성자화되어 염료의 전하 불균형이 더 커질 수 있다는 것이다(도 11).

[0060] [Scheme 1] 산성 환경에서 염료 활성화 메커니즘



[0061]

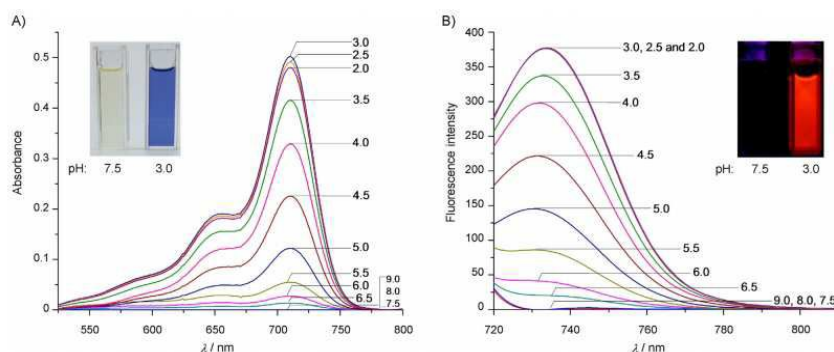
[0063] 유사하게, NIR-GA의 형광 거동을 다양한 pH 값에서 평가하였다. 도 1B에 도시된 바와 같이, 프로브는 염기성 pH 에서 비형광성인 반면, pH 값이 7.5에서 3.0으로 감소함에 따라 형광 강도의 점진적인 향상이 관찰되었으며, pH 가 3.0에서 2.0으로 더 감소할 때, 강도는 일정하게 유지되었다. 또한, pH 3.0과 pH 7.5 사이의 형광 강도의 변 화는 가역적인 것으로 확인되었는바(도 2A), 이는 NIR-GA의 가역적 감지 능력을 암시한다. 도 2B에 도시된 시간 -의존적 형광 스펙트럼을 통해, 산성 pH에서 형광은 8분 후 최대값에 도달할 때까지 인큐베이션 시간에 따라 선 형으로 증가한 후 일정하게 유지됨을 확인하였다. 또한, NIR-GA는 pH 변화에 대해 높은 감도를 나타냈으며, 생 물학적으로 관련된 금속 이온 (도 2C) 또는 기타 분석 물질 (도 9) 존재시에도 형광 스펙트럼이 교란되지 않았 다. 다음으로, NIR-GA의 광 안정성을 측정하였으며, 도 2D에 나타난 바와 같이, NIR-GA의 강도는 5.6%만 감소하 는 것으로 나타났는바, NIR-GA의 광안정성이 우수함을 확인하였다.

[0064] 다음으로, 공초점 형광 현미경을 이용하여 NIR-GA의 간암 세포주 (HepG2 및 Huh7)에 의한 GA-매개 세포 흡수에 대해 평가하고, 정상 세포주 (섬유 아세포)와 비교하였다. 모든 세포를 37 °C에서 24시간 동안 다양한 농도의 NIR-GA와 함께 인큐베이션하고, 상응하는 공초점 현미경 이미지를 수집하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, 간암 세포주 Huh7 및 HepG2 세포 모두 최대 강도가 모두 최대 강도가 관찰되는 적색 형광 신호를 나타내었다. 또한, NIR-GA의 농도가 5에서 20 μM 로 증가함에 따라, 상응하는 세포의 형광 강도도 증가하였다.

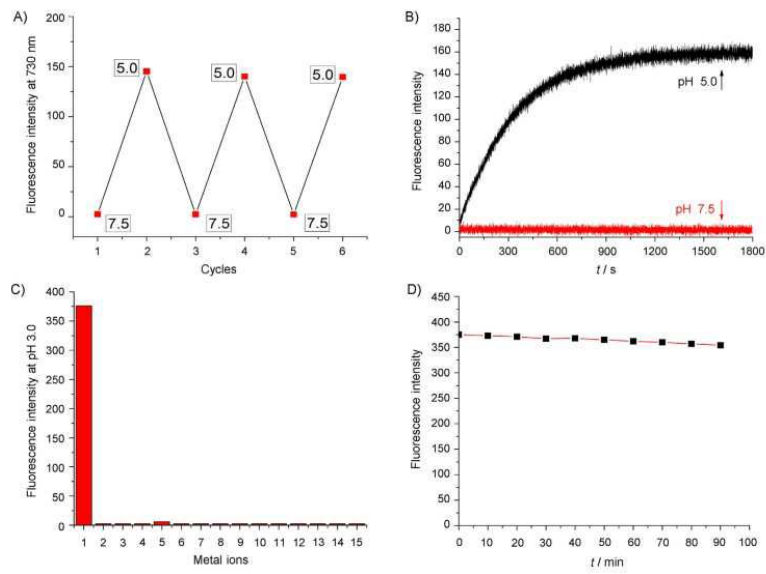
- [0065] 그러나 섬유 아세포 (정상 세포주)는 동일한 농도에서 매우 약한 형광 신호만을 나타내었다. 이러한 결과는 암 세포(Huh7 및 HepG2)의 산성 미세 환경에 의한 Changsha 염료의 활성화에 기인하는 것일 수 있다. 섬유 아세포의 미세 환경은 중성이므로, Changsha의 활성화가 없거나 매우 약한 형광 신호가 관찰되었다.
- [0066] 또한 GA 컨쥬게이션없이 세포를 Changsha 염료와 함께 인큐베이션 하는 대조 실험을 수행하였다. 그 결과, 20 μ M의 염료 농도에서도 어느 세포주도 유의한 형광 강도를 보이지 않았으며 (도 14), 이는 간암 세포에 대한 NIR-GA의 능동적인 표적화 능력을 시사한다.
- [0067] 또한, 추정되는 GA-매개 세포 흡수를 확인하기 위해 억제 분석(inhibition assay)을 수행하였다(도 4). Huh7 세포를 24시간 동안 다양한 농도 (0, 5, 10 및 25 μ M)의 GA로 전처리한 후, 20 μ M의 NIR-GA와 함께 인큐베이션 하였다. 상응하는 공초점 이미지는 GA의 농도가 증가함에 따라 GA 결합 부위의 경쟁적 억제에 의한 형광 강도의 상당한 억제 효과가 있음을 보여주었다 (도 4A 및 B). Free GA는 Huh7 세포의 표면에 존재하는 GA 수용체를 포화시켜, 더이상 NIR-GA에 결합 부위를 이용할 수 없게 한다. 이러한 결과는 간암 세포에서 NIR-GA의 향상된 세포 흡수가 GA-매개 세포 내 경로에 기인한다는 것을 나타낸다.
- [0068] 다음으로, MTT 분석을 통해 섬유 아세포, Huh7 및 HepG2 세포에 대한 NIR-GA의 세포 독성을 확인하였다. Huh7 세포를 다양한 농도 (0, 10, 20, 40, 80, 160 μ M)의 NIR-GA로 처리하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, NIR-GA는 40 μ M 농도까지 유의한 세포 독성을 나타내지 않았다. 그러나 세포 독성은 더 높은 농도, 즉 80 및 160 μ M에서 관찰되었으며, 이때, 세포의 생존력은 각각 60% 및 33%로 감소되었다. 이러한 결과를 통해, NIR-GA는 40 μ M 미만의 농도에서 우수한 생체 적합성을 나타냄을 확인하였다.
- [0069] 마지막으로, NIR-GA의 소기관-특이적 위치를 평가하기 위하여 형광 공존 실험(fluorescence co-localization experiment)을 수행하였다. 미토콘드리아, 소포체 및 리소좀에 대한 소기관 마커로서 Mito-, ER-, 및 Lyso-Tracker green을 각각 사용하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, 20 μ M의 NIR-GA와 함께 인큐베이션된 Huh7 세포의 이미지는 Mito 및 ER-Tracker와 비교했을 때 Lyso-Tracker와 잘 겹쳤으며 눈에 띄는 노란색 영역이 나타났다. 이러한 결과를 통해 프로브 NIR-GA가 리소좀에 대부분 편재되어 있음을 확인하였다.
- [0071] 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

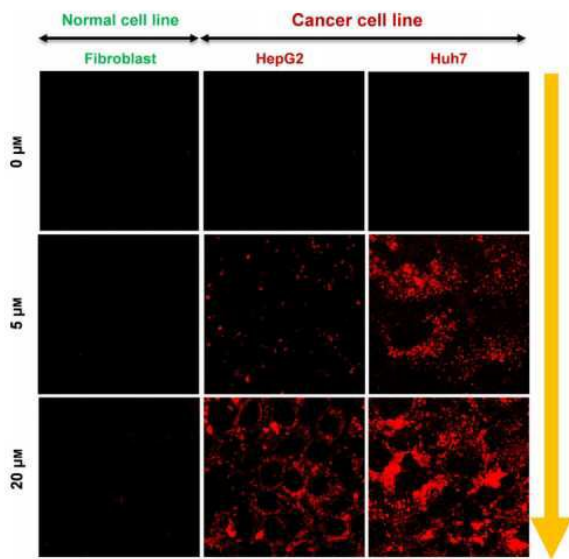
도면1



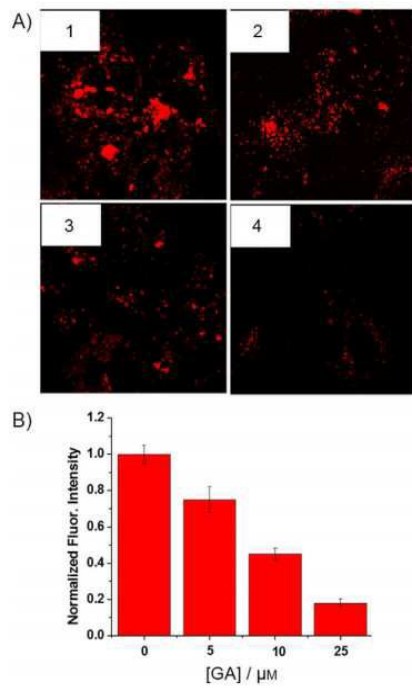
도면2



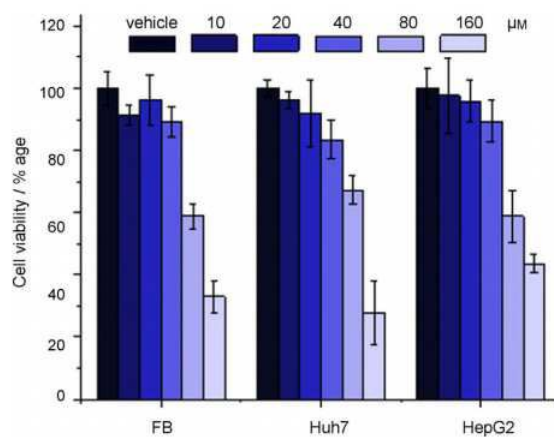
도면3



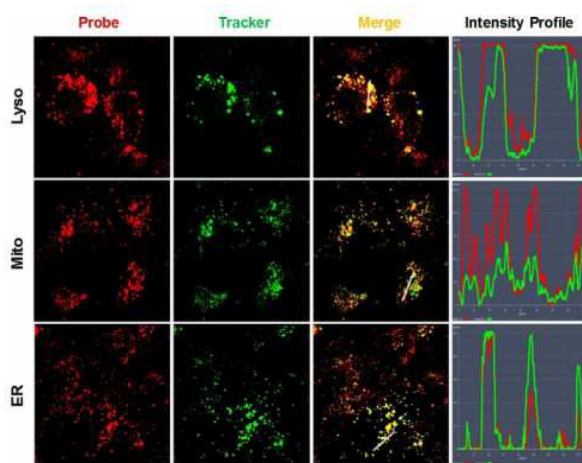
도면4



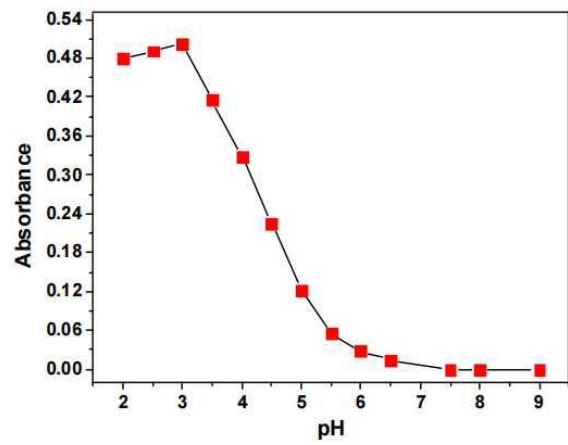
도면5



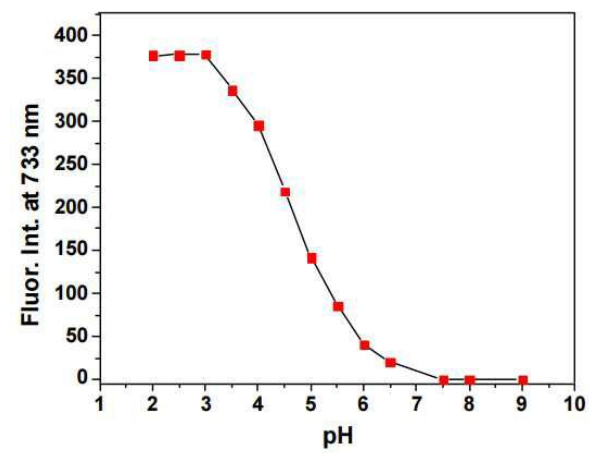
도면6



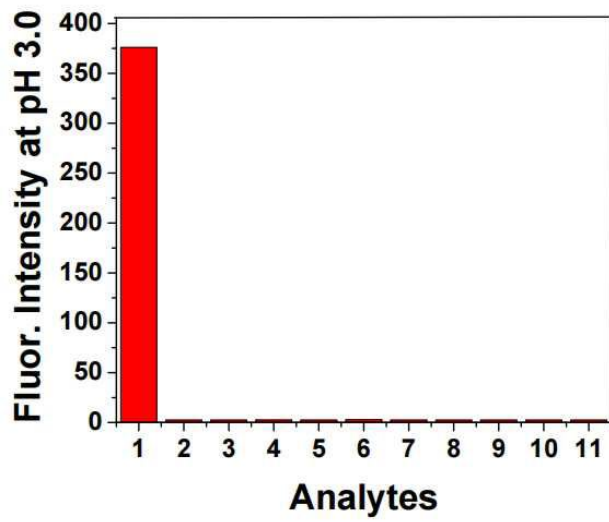
도면7



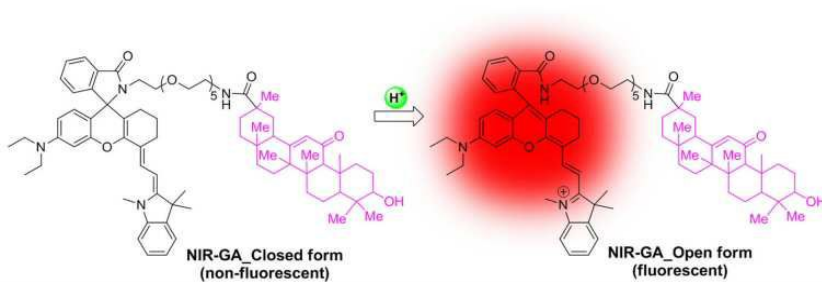
도면8



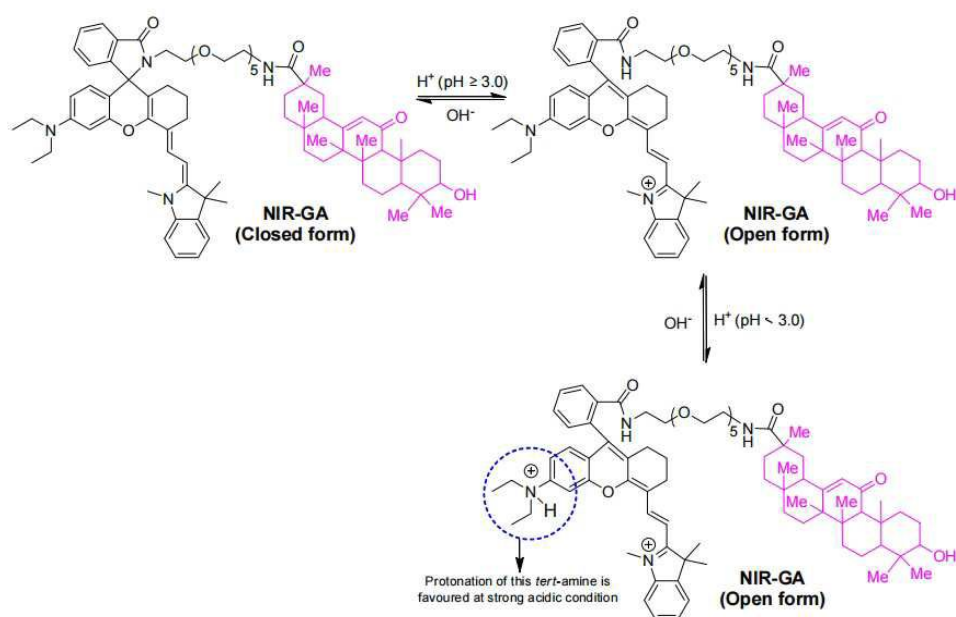
도면9



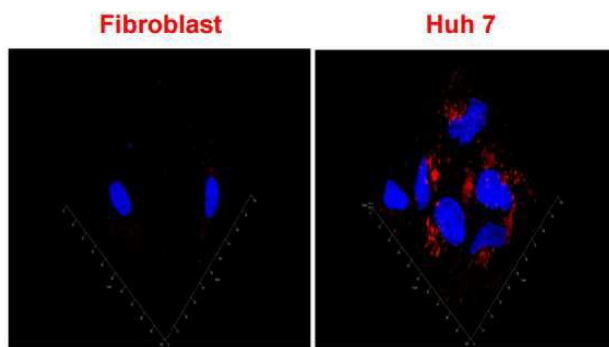
도면10



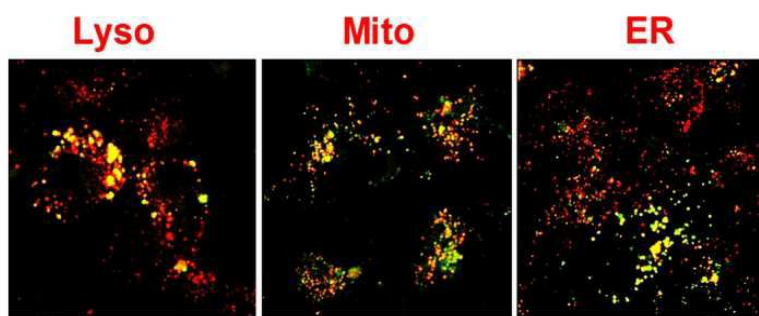
도면11



도면12



도면13



도면14

