(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0124131
(43) 공개일자 2024년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/54 (2006.01) *A61K 31/675* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 9/5442 (2013.01)
A61K 31/675 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0017026
(22) 출원일자 2023년02월08일
심사청구일자 2023년02월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
서울특별시 성북구 안암로 145
파라메시 장기리
서울특별시 성북구 안암로 145
김지현
서울특별시 성북구 안암로 145
(74) 대리인
정은열, 김태훈

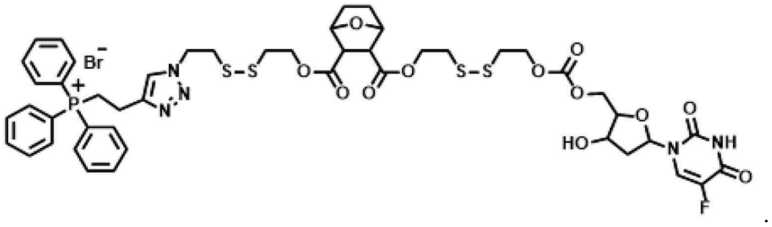
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **DNA 손상에 대한 암세포의 반응 기작을 표적하는 항암 약물전구체**

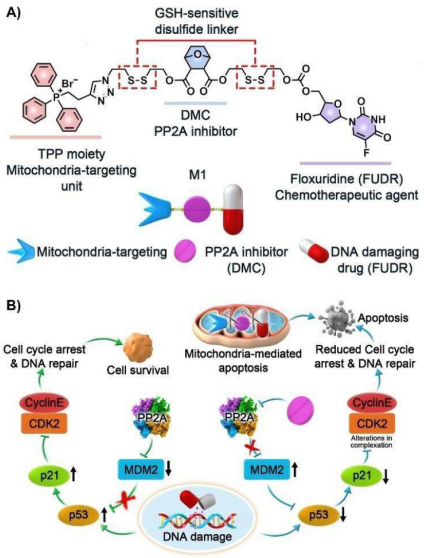
(57) 요 약

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

[화학식 1]



대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)

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 1/1
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

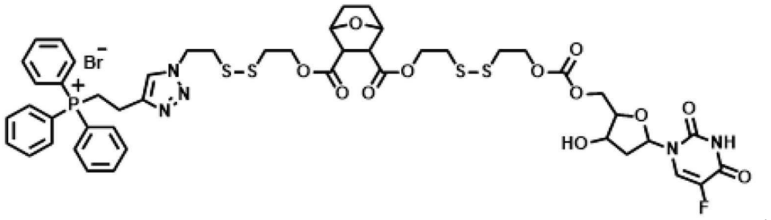
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 항암 화합물:

[화학식 1]



.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 암세포의 DNA 손상 반응(DNA-Damage-Response)을 표적하여 DNA 복구 경로를 차단하는 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화합물은 PP2A 억제를 통해 MDM2의 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 화합물은 p53-p21이 매개하는 세포주기의 G1/S 검문지점 정지의 고갈(depletion of G1/S checkpoint arrest)을 유도하는 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화합물은 글루타티온(Glutathione, GSH)에 의해 활성화되어 항암제를 방출하는 것을 특징으로 하는 항암 화합물.

청구항 6

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

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 암은 자궁경부암, 폐암, 대장암, 결장직장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 위암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DNA 손상에 대한 암세포의 반응 기작을 표적하는 항암 약물전구체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화학요법은 인간의 죽음을 야기하는 다양한 종류의 암을 치료하기 위한 치료법으로서 가장 널리 사용되고 있다. 기존 화학요법 과정에서 나타나는 항암제에 대한 내성은 암세포가 가지는 약물에 대한 방어 기작에 의해 나타나기도 한다. 따라서 항암제가 처리된 암세포의 DNA 복구 억제 및 세포 주기 검문 지점(Cell cycle checkpoint)을 포함하는 DNA 손상 반응은 이러한 화학요법에 대한 암세포의 내성 문제를 제기하고 항종양 성능을 최소화할 수 있다.

[0003] 한편, 플루오로피리미딘의 항대사물질인 플록스유리딘(2'-deoxy-5-fluorouridine 또는 FUDR)은 잘 알려진 항암제이며 이는 DNA 복제 억제 및 DNA 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러나 암세포의 방어 시스템의 일종인 '손상 복구 단백질' 이 작동할 경우 특정 종양에 대한 항암제의 독성을 저해할 수 있다.

[0004] 또한, 세린/트레오닌 단백질 탈인산화효소 2A(protein phosphatase 2A, PP2A)는 다양한 기능을 가지면서 세포내에 넓게 분포하는 단백질로 세포의 DNA가 손상될 경우 손상을 복구하기 위한 세포 반응을 매개하는 역할을 한다. 특히 화학요법 또는 방사선 항암요법으로 인한 암세포 DNA 손상 시에 DNA 손상을 복구하는 데 중추적인 역할을 한다. 따라서 종양 특이적 미세 환경에서 활성화되는 약물전달시스템을 사용하여 DNA 손상 복구를 표적하는 것은 암세포의 항암제 내성을 극복하기 위한 유용한 전략이 될 수 있다.

[0005] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 PP2A가 FUDR 처리에 반응하여 ATR-p53-p21 매개 암 세포 복구 경로를 유도한다는 사실을 확인하고, 이황화 링커를 통해 항암제인 FUDR과 PP2A 억제제(PP2A inhibitor) 및 미토콘드리아 표적화 구조인 TPP(triphenylphosphonium)가 연결된 구조를 갖는 신규 화합물(M1)을 합성하였으며, 상기 화합물이 미토콘드리아에서 특이적인 활성화를 보이며 암세포의 미토콘드리아 및 핵 DNA 손상을 극대화시켜 암세포를 효과적으로 사멸시키고, PP2A 억제를 통해 높은 수준의 MDM2 발현을 유도하여 p53-p21가 매개하는 세포주기의 G1/S 검문지점 정지의 고갈을 유발함으로써 DNA 복구 경로를 차단하고 암세포의 항암제에 대한 민감성을 높인다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

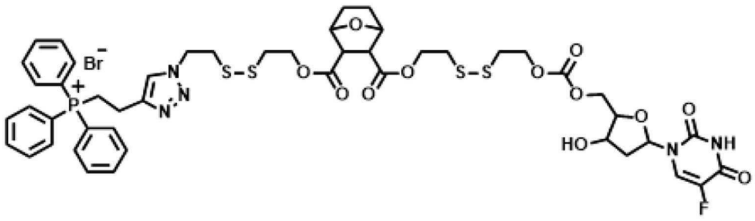
해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 DNA 손상에 대한 암세포의 반응 기작을 표적하는 신규 항암 화합물을 포함하는 항암 약물전구체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 하기 [화학식 1]로 표시되는 항암 화합물을 제공한다:

[0008] [화학식 1]



[0009] .

[0010] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0013] 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

[0014] 본 발명에 따르면, 미토콘드리아에서 특이적인 활성화를 보이며 암세포의 미토콘드리아 및 핵 DNA 손상을 극대화시켜 암세포를 효과적으로 사멸시키고, PP2A 억제를 통해 높은 수준의 MDM2 발현을 유도하여 p53-p21가 매개하는 세포주기의 G1/S 검문지점 정지의 고갈을 유발함으로써 DNA 복구 경로를 차단하고 암세포의 항암제에 대한 민감성을 높임으로써 현저하게 향상된 항암 효과를 발휘할 수 있는 항암 화합물 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1의 A)는 본 발명의 [화학식 1]로 표시되는 화합물 M1의 구조를 나타낸 것이고, B)는 미토콘드리아 및 핵 매개 세포사멸을 유도하기 위해 PP2A의 억제와 함께 DNA 복구 경로를 차단하는 M1의 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 2의 A)는 GSH의 존재 하에 접합된 모 약물(parent drugs) 및 형광단(fluorophores)을 방출하는 M1 또는 M3의 활성화 메커니즘을 나타낸 것이고, B)는 1시간 및 4시간 동안 GSH(1mM, pH 7.4, 37℃)의 부재 및 존재 하에 FUDR(50 μM) 및 M1(50 μM)의 RP-HPLC trace를 나타낸 것이며, C)는 PBS(37℃, λ_{ex}=368 nm, slit width: 5/5)에서 GSH(1mM)와 함께 인큐베이션 시 M3(10 μM)의 시간에 따른 형광 강도 변화를 나타낸 것이고, D)는 다양한 농도의 GSH (0-4 μM)와 인큐베이션 시 496 nm에서 M3(10 μM, PBS 용액, 37℃)의 형광 강도 향상(fluorescence intensity enhancement)을 나타낸 것이다. 형광은 GSH를 첨가한 지 1시간 후 각 샘플에 대해 기록하였다, λ_{ex} = 368 nm.

도 3의 A)는 다양한 암 세포주(4T1, HeLa, LoVo, HT29, SW480, Caco2, HCT116, A549 및 H1299)에서 PP2A 단백질 발현 수준에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이고, B), C), D) E)는 37℃에서 24시간 동안 대조군(1% DMSO), FUDR(20 및 40 μM), DMC(20 및 40 μM) 및 M1(5, 10, 20, 40 및 60 μM) 처리시 B) HeLa, C) HT29, D) 4T1 및 E) HCT116 세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 나타낸 것이다. WST-1 분석을 사용하여 세포 생존력을 평가하였고, 데이터는 평균±SE로 표시하였다. F)는 37℃에서 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 40 μM)과 함께 인큐베이션하고 10일 후에 HCT116 세포의 콜로니 형성을 측정한 결과를 나타낸 것이고, G) 및 H)는 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 40 μM)과 함께 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션 후 G) 세포사멸 측정을 위한 유세포 분석 및 H) HCT116 세포의 총 세포 수(%)를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 M1의 HCT116 세포의 미토콘드리아 매개 세포사멸 촉진 효과를 나타낸 것이다. A)는 HCT116 세포에서 M3의 세포내 위치 분석을 위한 공초점 현미경 이미지를 나타낸 것이다. M3(40 μM)(파란색)로 처리된 HCT116 세포는 미토콘드리아 염색 항체 TOM20-647(빨간색)로 공동 염색되었고, 세포골격 막은 FITCphalloidin(녹색)으로 공동 염색되었다. 파란색: 466nm 방출 파장(emission wavelength)으로 390nm에서 여기(Excitation); 빨간색: 668nm 방출 파장으로 652nm에서 여기; 녹색: 518nm 방출 파장으로 495nm에서 여기. 흰색 표시는 병합된 분홍색을 나타낸다. Scale bars=50 μm. N-에틸말레이미드(NEM, 25mM)는 GSH의 강력한 억제제이다. B)는 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 40 μM)로 처리 시 HCT116 세포의 미토콘드리아에서 ROS 수준 검출을 위한 DCF-DA 검정 결과를 나타낸 것이고, C) 및 D)는 각각 24시간 및 48시간에 해당하는 ROS 수준을 나타낸 것이다(* $p<0.05$ and *** $p<0.005$ relative to the corresponding FUDR-treated group). E) 및 F)는 각각 24시간 및 48시간 동안, 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 40 μM)과 함께 인큐베이션 후 HCT116 세포에서 미토콘드리아 DNA 손상 병변(DNA damage lesions) 검출을 위한 Long-range qPCR (3723 bp targets) 분석 결과를 나타낸 것이다. 데이터는 평균±SE로 표시하였다(*** $p<0.005$ relative to the corresponding FUDR-treated group. mtDNA: mitochondrial DNA). G)는 M1(40 μM)이 HCT116 세포의 미토콘드리아 형태 및 세포골격막에 미치는 영향을 나타낸 것으로, 서로 다른 시간 간격(0, 24, 36 및 48시간)에서 각각 TOM20-647 접합 항체(빨간색) 및 FITC-Phalloidin(녹색)으로 염색하여 시각화하였다[White arrows=Amplified swelling of mitochondria. Scale bar=20 μm]. H)는 미토콘드리아에서 전구약물 M1의 국소화 및 활성화 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 5의 A)는 24시간 및 48시간 동안 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 40 μM)과 함께 인큐베이션한 후 HCT116 세포의 면역형광(IF) 염색 결과를 나타낸 것이다(scale bars=50 μm). 핵과 핵 당 γfoci는 각각 DAPI (청색) 및 anti-γH2AX 항체(적색)로 염색되었다. B)는 HCT116 세포의 인비트로 DNA 손상을 8-OHdG 염색을 통해 측정한 결과를 나타낸 것이다. C) 내지 K)는 DNA 손상 복구 경로와 관련된 유전자의 상대적인 mRNA 수준의 정량적 PCR 분석 결과를 나타낸 것이다: HCT116 세포에서 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 40 μM)과 함께 24시간 인큐베이션한 후 측정하였으며, 해당 유전자는 C) ATR, D) PP2A, E) MDM2, F) p53, G) p21, H) Chk1, I) CDK2, J) cyclin D1, 및 K) cyclin E1이다. L)은 DNA 손상을 유발하는 M1의 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 6은 종양 이종이식 모델에서 M1의 치료 효과를 나타낸 것이다. A)는 마우스에서의 종양 이식(HCT116) 및 대

조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 5 mg/kg^{-1})을 포함한 다양한 처리 일정을 나타낸 것이고, B)는 24일의 처리 기간 동안 종양 부피 변화를 나타내며, C)는 종양 체적을 나타내고, D)는 24일째 종양 이미지를 나타낸 것이다. E)는 종양 보유 마우스의 상대적인 체중 변화를 나타내고, F)는 종양 섹션에서의 H&E 염색 결과를 나타내며, G)는 종양 섹션에서의 IF 염색 결과를 나타낸다. 배율: 20×. 핵은 DAPI(파란색)에 의해 염색되었고, anti-시토크롬 C 항체[EPR1327](분홍색)에 의해 미토콘드리아로부터 시토크롬 C가 방출되었으며, 세포사멸 마커 cleaved-caspase-3(녹색)에 의해 세포사멸 세포가 방출되었다. H)는 G)에 나타낸 미토콘드리아에서 방출된 시토크롬 C에 상응하는 형광 강도를 나타낸 것이고, I)는 G)에 나타낸 세포사멸 마커 cleaved-caspase-3에 상응하는 형광 강도를 나타낸다.

도 7은 M2(reference compound without DMC) 및 진단 프로브 화합물 3의 구성을 나타낸 것이다.

도 8은 화합물 M1의 합성 경로를 나타낸 것이다.

도 9는 화합물 M2의 합성 경로를 나타낸 것이다.

도 10은 화합물 M3의 합성 경로를 나타낸 것이다.

도 11은 화합물 M1의 안정성 프로파일을 나타낸 것이다. 0, 12 및 24시간에서 M1(50 μM)의 RP-HPLC 곡선에는 변화가 없다[incubation in phosphate-buffered saline (PBS) (containing DMSO), pH = 7.4 at 37℃].

도 12는 M1의 활성화 메커니즘, 및 GSH의 존재 하(1mM, pH = 7.4 at 37℃)에 M1으로부터 형성된 상응하는 생성물의 ESI-MS 스펙트럼에서의 질량 피크 값을 나타낸 것이다.

도 13의 A) 및 B)는 2시간 동안 GSH 첨가 후 GSH의 부재 및 존재(1mM GSH)하에서 M3(10 μM)의 흡광도(Absorbance)(A) 및 형광 스펙트럼(B)을 나타낸 것이다. C)는 1mM GSH의 존재 하에서 M3(110 μM)의 형광 강도를 나타낸 것이다(형광은 GSH를 첨가한 지 1시간 후 각각의 농축된 샘플에 대해 기록하였다, λ_{ex} = 368 nm).

도 14는 GSH의 존재하에서 접합된 DMC 및 7-아미노-4-트리플루오로메틸 쿠마린 형광단을 방출하는, M3의 활성화 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 15는 HCT116 세포에서 BAX 수준의 발현에 대한 M1의 효과를 나타낸 것이다. 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 40 μM)로 처리된 HCT116 세포는 미토콘드리아 염색 항체 TOM20-647(적색)로 공동 염색하고, 핵은 DAPI(청색)로 공동 염색하였다. BAX 수준(녹색)은 37 º에서 12시간 및 24시간 동안 분석하였다. (Scale bars =20 μm).

도 16은 각각 대조군, FUDR, DMC 및 M1 처리된 HCT116 세포의 BrdU 염색에 의한 증식 분석 결과로, 24시간 동안 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 40 μM)과 함께 인큐베이션한 후, BrdU 동시 염색(적색)한 HCT116 세포의 공초점 이미지 및 상응하는 BrdU 양성 세포(%)를 나타낸 것이다(scale bars = 50 μm). 핵과 세포골격막은 각각 DAPI(파란색)와 FITC-팔로이딘(녹색)으로 염색되었다.

도 17은 각각 대조군, M2 및 M1 처리된 HCT116 세포의 BrdU 염색에 의한 증식 분석 결과로, 24시간 동안 대조군(1% DMSO), M2 및 M1(각각 40 μM)과 함께 인큐베이션한 후, BrdU 동시 염색(적색)한 HCT116 세포의 공초점 이미지 및 상응하는 BrdU 양성 세포(%)를 나타낸 것이다(scale bars = 50 μm). 핵과 세포골격막은 각각 DAPI(파란색)와 FITC-팔로이딘(녹색)으로 염색되었다.

도 18은 HCT116 종양 보유 마우스의 종양 성장에 대한 FUDR, DMC 및 M1의 생체 내 효과를 나타낸 것이다: A) 대조군(1% DMSO), B) FUDR, C) DMC, D) M1 (각각 5mg/kg).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

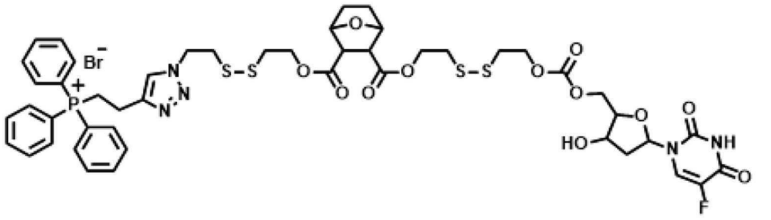
[0016] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 본 발명자들은 PP2A가 FUDR 처리에 반응하여 ATR-p53-p21 매개 암 세포 복구 경로를 유도한다는 사실을 확인하고, 이황화 링커를 통해 항암제인 FUDR과 PP2A 억제제(PP2A inhibitor) 및 미토콘드리아 표적화 구조인 TPP(triphenylphosphonium)가 연결된 구조를 갖는 신규 화합물(M1)을 합성하였으며, 상기 화합물이 미토콘드리

아에서 특이적인 활성화를 보이며 암세포의 미토콘드리아 및 핵 DNA 손상을 극대화시켜 암세포를 효과적으로 사멸시키고, PP2A 억제를 통해 높은 수준의 MDM2 발현을 유도하여 p53-p21가 매개하는 세포주기의 G1/S 검문지점 정지의 고갈을 유발함으로써 DNA 복구 경로를 차단하고 암세포의 항암제에 대한 민감성을 높인다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0019] 따라서, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 항암 화합물을 제공한다:

[0020] [화학식 1]

[0021] 

.

[0022] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 암세포의 DNA 손상 반응(DNA-Damage-Response)을 표적하여 DNA 복구 경로를 차단하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0023] 이때, 상기 화합물은 PP2A 억제를 통해 MDM2의 발현을 유도하고, 53-p21이 매개하는 세포주기의 G1/S 검문지점 정지의 고갈(depletion of G1/S checkpoint arrest)을 유도함으로써 암세포의 DNA 복구 경로를 차단할 수 있다.

[0024] 본 발명에 따르면, 상기 화합물은 글루타티온(Glutathione, GSH)에 의해 활성화되어 모약물 즉 항암제를 방출하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명은 또한, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0027] 이때, 상기 암은 자궁경부암, 폐암, 대장암, 결장직장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 위암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 암 질환의 예방 또는 치료용으로 알려진 다른 약물과 함께 복합 제제의 형태로 투여되거나, 또는 담체, 희석제, 보조제 및 안정화제 등과 같은 기타 성분을 포함할 수도 있다.

[0029] 또한, 본 발명에 따른 조성물의 형태는 투여하고자 하는 모드에 따라서 다양하게 선택될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 정제, 환약, 분말, 캡슐, 겔, 연고, 유체 또는 현탁액 등의 고상, 반고상 또는 액상의 투약 형태일 수 있고, 정확한 투약량의 단독 투여에 적절한 단위 투약 형태로 투여될 수 있으며, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 등으로 투여할 수 있다.

[0030] 또한, 상기 조성물은 인간 투여를 위한 약학 조성물을 제형화하는데 일반적으로 사용되는 수성-기제 운반제로 정의되는 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 보조제, 안정화제를 원하는 제형에 의존하여 포함할 수 있다.

[0031] 담체 (carrier)라 함은 세포 또는 조직 내로 화합물의 부가를 용이하게 하는 물질을 의미하고, 예를 들어, 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물 (예: 락토스, 아밀로스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스, 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아고무, 식물성 기름 (예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 희석제(diluent)라 함은 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키는 물에서 희석되는 물질로 정의되는 것으로 예를 들어, 희석제로는 증류수, 생리 식염수, 링거액, 포도당 용액, 및 행크스(Hank's) 용액 등일 수 있다. 안정화제는 단백질, 당질, 완충제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 또한, 이러한 담체, 희석제, 보조제 및 안정화제 등과 같은 기타 성분의 유효량은 성분의 용해성, 생물학적 활

성 등으로 환산하여 약학적으로 허용 가능한 제형을 획득하는데 유효한 양이다.

[0034] [실시예]

[0035] 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.

[0037] **실험 방법**

[0038] **화합물 합성**

[0039] 하기 도 8 내지 도 10의 합성 경로에 따라 화합물 M1, M2, M3를 합성하였다.

[0040] 화합물 1, 2, 3, 8의 합성

[0041] 종래 문헌에 보고된 절차에 따라 화합물 1(D. Baraniak, D. Baranowski, P. Ruszkowski, J. Boryski, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2016**, *35*,178-194), 화합물 2(S.-Y. Lim, M -J. Na, H.-J. Kim, *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *185*, 720-724), 화합물 3(X. Tan, X. Lu, F. Jia, X. Liu, Y. Sun, J. K. Logan, K. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1083410837) 및 화합물 8(T. Tokunaga, B. Watanabe, S. Sato, J. Kawamoto, T. Kurihara, *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28, 20772085)을 합성하였다.

[0043] 화합물 4의 합성

[0044] 7-Oxabicyclo[2.2.1]heptane-2,3-dicarboxylic anhydride(노르칸타리딘)(1.00g, 5.95mmol)을 실온에서 아세토니트릴(10mL) 중 화합물 2(1.60g, 5.95mmol)와 트리에틸아민(0.83mL, 5.95mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 4시간 동안 교반한 후 반응 혼합물을 진공에서 농축하고 생성된 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(0-5% MeOH/DCM)로 정제하여 무색 액체의 화합물 4(2.47g, 95%)를 수득하였다.

[0045] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.97 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 4.39-4.27 (m, 2H), 3.92-3.81 (m, 2H), 3.02 (dd, *J* = 30.4, 9.5 Hz, 2H), 2.93-2.87 (m, 2H), 2.87-2.75 (m, 2H), 1.88-1.78 (m, 2H), 1.59-1.48 (m, 2H), 0.89 (s, 9H), 0.09 (s, 6H).

[0046] ESI-MS: m/z calcd for $C_{18}H_{32}O_6S_2Si$ 436.14; found 459.20 $[M + Na]^+$.

[0048] 화합물 5의 합성

[0049] 무수 톨루엔(5mL) 중 화합물 4(1.46g, 3.35mmol)의 교반된 용액에 Et_3N(1.95mL, 13.95mmol) 및 2,4,6-트리클로로벤조일 클로라이드(0.52mL, 3.35mmol)를 첨가하고, 내용물을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 혼합 무수물의 형성이 완료된 후(indicated by TLC), DMAP(0.34g, 2.79mmol) 및 톨루엔 중 알코올 화합물 3(0.50g, 2.79mmol) 용액을 첨가하고 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. H_2O를 첨가하여 반응을 켄칭하고 EtOAc(3 x 10mL)로 추출하였다. 합한 유기상을 포화 $NaHCO_3$(10mL) 및 염수(10mL)로 세척하고 무수 Na_2SO_4로 건조하고 감압하에 증발시켰다. 미정제 잔류물을 컬럼 크로마토그래피(실리카 겔, 100-200 메쉬, 10-20% EtOAc/hexane)로 정제하여 무색 액체의 화합물 5(1.00g, 60%)를 수득하였다.

[0050] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.94-4.89 (m, 2H), 4.39-4.28 (m, 4H), 3.85 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.02-2.96 (m, 2H), 2.93 (dt, *J* = 6.5, 1.5 Hz, 1H), 2.90 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 2.84 (dt, *J* = 18.4, 6.7 Hz, 4H), 1.85-1.78 (m, 2H), 1.55-1.49 (m, 2H), 0.89 (s, 9H), 0.07 (s, 6H).

[0051] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.78, 170.75, 78.57, 78.53, 62.84, 62.63, 61.74, 52.05, 51.96, 49.96, 41.45, 37.48, 36.99, 36.95, 29.07, 29.05, 25.87, 18.31, -5.26.

[0052] ESI-MS: m/z calcd for $C_{22}H_{39}N_3O_6S_4Si$ 597.15; found 620.25 $[M + Na]^+$.

[0054] 화합물 6의 합성

[0055] 화합물 5(0.80g, 1.34mmol)를 MeOH(10mL)에 용해시키고 amberlyst 15를 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 amberlist 15를 여과하고 용매를 감압하에서 제거하였다. 미정제 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(30-50% EtOAc/hexane)로 정제하여 담황색 액체 화합물 6(0.60g, 93%)을 수득하였다.

[0056] ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.97-4.85 (m, 2H), 4.42-4.26 (m, 4H), 3.86 (dd, *J* = 10.9, 5.4 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.05-2.96 (m, 2H), 2.95-2.89 (m, 4H), 2.87 (dt, *J* = 11.9, 3.8 Hz, 4H), 2.34 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 1.84-1.77 (m, 2H), 1.56-1.49 (m, 2H). ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 4.97-4.85 (m, 1H), 4.42-4.26 (m, 2H), 3.86 (dd, *J* = 10.9, 5.4 Hz, 1H), 3.59 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.05-2.96 (m, 1H), 2.95-2.89 (m, 2H), 2.87 (dt, *J* = 11.9, 3.8 Hz, 2H), 2.34 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 1.84-1.77 (m, 1H), 1.56-1.49 (m, 1H).

[0057] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.80, 170.75, 78.50, 78.45, 62.64, 62.60, 60.33, 52.04, 51.85, 49.84, 41.34, 37.40, 36.87, 36.79, 28.93.

[0058] ESI-MS: m/z calcd for $C_{16}H_{25}N_3O_6S_4$ 483.06; found 506.50 $[M + Na]^+$.

[0060] 화합물 7의 합성

[0061] Carbonyl-di-(1,2,4-triazole)(80mg, 0.49mmol)을 디클로로메탄(DCM)(10mL) 중 화합물 6(200mg, 0.41mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반한 후, 포화 $NaHCO_3$ 용액(10mL)을 첨가하고 DCM(2 x 10mL)으로 추출하였다. 유기층을 포화 $NaHCO_3$ 용액(3 x 10 mL)으로 재세척하고 무수 Na_2SO_4로 건조시킨 후 감압 농축하고 추가 정제 없이 다음 단계에 그대로 사용하였다. 화합물 1(148mg, 0.41mmol)과 위에서 얻은 중간체를 무수 DCM(10mL)에 용해시켰다. Et_3N(85μL, 0.61mmol) 및 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO)(67μL, 0.61mmol)을 반응 혼합물에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후(indicated by TLC), 진공에서 농축하고, 생성된 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(50-80% EtOAc/hexane)로 정제하여 화합물 7(288 mg, 80%)을 수득하였다.

[0062] ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.67 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 6.27 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.44-4.25 (m, 10H), 4.05 (dd, *J* = 6.5, 3.1 Hz, 1H), 3.57 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.03-2.97 (m, 2H), 2.96-2.88 (m, 6H), 2.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.36-2.27 (m, 1H), 2.15-2.06 (m, 1H), 1.85-1.74 (m, 2H), 1.52 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 0.87 (s, 9H), 0.07 (s, 6H).

[0063] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.76, 156.88, 156.67, 154.42, 148.74, 141.47, 139.58, 124.02, 123.74, 85.42, 84.73, 78.51, 78.49, 71.46, 66.42, 66.04, 62.61, 51.93, 49.88, 40.91, 37.42, 36.93, 36.80, 36.58, 28.99, 25.59, 17.83, -4.76, -4.98.

[0064] ESI-MS: m/z calcd for $C_{32}H_{48}FN_5O_{12}S_4Si$ 869.19; found 892.25 $[M + Na]^+$.

[0066] 화합물 9의 합성

[0067] DCM/MeOH(1:1, total = 10 mL) 용액 중 화합물 7(50mg, 0.057mmol) 및 화합물 8(23mg, 0.065mmol)의 교반 혼합물에 아스코르브산나트륨(10mol%)을 첨가하였다. 계속 교반하면서 Ar 가스를 퍼징하여 반응 혼합물을 30분 동안 탈기시켰다. 그동안, CuSO4 · $5H_2O$(5mol%)를 MeOH(0.5 mL)에 녹인 후 Eppendorf 튜브에 넣고 Ar 가스를 퍼징하여 탈기시켰다. 30분 후, 탈기된 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 용액을 반응 혼합물에 첨가하고 추가 6시간 동안 계속 교반하였다. 반응 완료 후(indicated by TLC), 용매를 진공에서 증발시키고, 생성된 미정제물을 짧은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(MeOH/DCM = 2:98 to 5:95)에 직접 통과시켜 화이트폼(white foam)으로서 화합물 9(64 mg, 87%)를 수득하였다.

[0068] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.12 (brs, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.89-7.77 (m, 9H), 7.74-7.67 (m, 7H), 6.26 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.87 (dd, *J* = 8.8, 4.1 Hz, 2H), 4.63 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.45-4.36 (m, 4H), 4.35-4.22 (m, 5H), 4.10-4.00 (m, 3H), 3.24-3.14 (m, 4H), 3.02 (dt, *J* = 9.4, 8.1 Hz, 2H), 2.97-2.86 (m, 6H), 2.31 (ddd, *J* = 13.0, 5.9, 3.7 Hz, 1H), 2.13 (dtd, *J* = 8.9, 6.5, 2.4 Hz, 1H), 1.80-1.74 (m, 2H), 1.59-1.49 (m, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.08 (d, *J* = 1.0 Hz, 6H).

[0069] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 170.88, 156.93, 156.72, 154.38, 148.68, 142.82, 141.41, 139.52, 135.15, 133.65, 133.57, 130.55, 130.45, 128.54, 125.86, 124.06, 123.79, 117.92, 117.23, 85.41, 84.72, 78.57, 78.45, 71.53, 66.47, 66.00, 62.55, 62.44, 51.83, 51.74, 48.92, 45.98, 40.79, 37.40, 36.95, 36.74, 36.58, 29.57, 28.94, 25.58, 22.21, 17.79, -4.76, -4.99.

[0070] ESI-MS: m/z calcd for $C_{54}H_{68}FN_5O_{12}PS_4Si$ 1184.32; found 1184.35 $[M]^+$.

[0072] 화합물 M1의 합성

[0073] MeCN(10mL) 중 화합물 9(50mg, 0.040mmol)의 용액에 3M 수성 HCl(1mL)을 0℃에서 첨가하였다; 반응 진행을 모니터링하여 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 완료 후(6시간) 혼합물을 수성 $NaHCO_3$(5mL)로 중화하고 DCM(2 x 10mL)으로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고 무수 Na_2SO_4로 건조시켰다. 용매를 증발시킨 후 잔류물을 짧은 컬럼 크로마토그래피(MeOH/DCM = 5:95에서 10:90)로 정제하여 화이트폼(white foam)으로서 화합물 M1(38mg, 95%)을 수득하였다.

[0074] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.64 (S, 1H), 7.92-7.76 (m, 9H), 7.76-7.64 (m, 7H), 6.24 (s, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.63 (dd, *J* = 14.7, 7.3 Hz, 2H), 4.49 (s, 1H), 4.46-4.22 (m, 9H), 4.04 (m, 2H), 3.22-3.14 (m, 4H), 3.02 (q, *J* = 9.5 Hz, 2H), 2.98-2.87 (m, 6H), 2.44-2.39 (m, 1H), 2.15-2.06 (m, 1H), 1.80-1.75 (m, 2H), 1.54 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H).

[0075] ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl3) δ 170.91, 170.89, 157.41, 156.19, 154.43, 149.01, 144.18, 141.37, 139.50, 135.13, 133.63, 133.56, 130.51, 130.41, 128.89, 128.08, 124.19, 123.89, 117.96, 117.28, 85.28, 84.29, 78.55, 78.43, 70.41, 67.30, 65.76, 62.57, 62.41, 53.37, 51.77, 51.65, 48.81, 37.38, 37.02, 36.85, 36.79, 29.54, 28.91, 22.54.

[0076] ESI-MS: m/z calcd for $C_{48}H_{54}FN_5O_{12}PS_4^+$ 1070.24; found 1070.20 $[M]^+$.

[0078] 화합물 10의 합성

[0079] Carbonyl-di-(1,2,4-triazole)(56mg, 0.34mmol)을 디클로로메탄(DCM, 10mL) 중 화합물 3(50mg, 0.28mmol)의 교반 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 교반한 후, 포화 $NaHCO_3$ 용액(10mL)을 첨가하고 DCM(2 x 10mL)으로 추출하였다. 유기층을 포화 $NaHCO_3$ 용액(3 x 10mL)으로 재세척하고 무수 Na_2SO_4로 건조하고 감압 하에 농축하여 정제 없이 다음 단계에 그대로 사용하였다. 화합물 1(101mg, 0.28mmol)과 위에서 얻은 중간체를 무수 DCM(10mL)에 녹였다. Et_3N(58 μL, 0.42mmol)과 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane(DABCO)(46 μL, 0.42mmol)을 상기 반응

혼합물에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 완료 후(indicated by TLC), 진공에서 농축하고 생성된 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(50-80% EtOAc/hexane)로 정제하여 화합물 10(128 mg, 81%)을 수득하였다.

[0080] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.24 (s, 1H), 7.70 (dd, *J* = 6.4, 0.8 Hz, 1H), 6.27 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.50-4.17 (m, 6H), 4.05 (dd, *J* = 5.9, 2.8 Hz, 1H), 3.55-3.45 (m, 1H), 3.42 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.34 (ddd, *J* = 13.2, 5.8, 4.5 Hz, 1H), 2.18-2.06 (m, 1H), 1.99-1.89 (m, 2H), 0.88 (d, *J* = 0.9 Hz, 8H), 0.07 (d, *J* = 1.1 Hz, 5H).

[0081] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 157.09, 156.88, 154.53, 148.85, 141.51, 139.63, 124.04, 123.76, 85.43, 84.68, 71.23, 66.22, 65.42, 47.71, 41.01, 27.98, 25.59, 17.84, -4.77, -5.01. ESI-MS: m/z calcd for $C_{20}H_{32}FN_5O_7S_2Si$ 565.15; found 604.15 $[M + K]^+$.

[0083] 화합물 M2의 합성

[0084] DCM/MeOH(1:1, total = 6 mL) 용액 중 화합물 10(30mg, 0.053mmol) 및 화합물 8(21mg, 0.053mmol)의 교반 혼합물에 아스코르브산나트륨(10mol%)을 첨가하였다. 계속 교반하면서 Ar 가스를 퍼징하여 반응 혼합물을 30분 동안 탈기시켰다. 그동안, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$(5mol%)를 MeOH(0.5 mL)에 녹인 후 Eppendorf 튜브에 넣고 Ar 가스를 퍼징하여 탈기시켰다.30분 후, 탈기된 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 용액을 반응 혼합물에 첨가하고 추가 6시간 동안 계속 교반하였다. 반응 완료 후(indicated by TLC) 용매를 진공에서 증발시켰다. 생성된 잔류물을 짧은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피(MeOH/DCM = 2:98 to 5:95)에 직접 통과시켜 화이트폼(white foam)으로서 TBDMS-보호된 화합물 M2를 수득하였다. MeCN(5mL) 중 상기 TBDMS-보호된 화합물 M2의 용액에 3M aq HCl(1mL)을 0℃에서 첨가하였다; 반응 진행을 모니터링하여 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응 완료 후(5-6h) 혼합물을 수성 $NaHCO_3$(5mL)로 중화하고 DCM(2 x 10mL)으로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고 무수 Na_2SO_4로 건조시켰다. 용매를 증발시킨 후 잔류물을 짧은 컬럼 크로마토그래피(MeOH/DCM = 5:95 to 10:90)로 정제하여 화이트폼(white foam)으로서 순수한 화합물 M2[37 mg, 83% (over two-steps)]를 수득하였다.

[0085] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.08 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.87-7.79 (m, 9H), 7.70 (td, *J* = 7.6, 3.4 Hz, 6H), 6.21-6.16 (m, 1H), 4.73 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.60 (dd, *J* = 11.6, 1.8 Hz, 1H), 4.49-4.41 (m, 2H), 4.40-4.29 (m, 2H), 4.09-4.04 (m, 2H), 4.02-3.94 (m, 1H), 3.54-3.45 (m, 1H), 3.23-3.12 (m, 2H), 2.48 (dt, *J* = 14.2, 7.2 Hz, 1H), 2.30-2.23 (m, 2H), 2.16-2.06 (m, 1H), 2.06-1.83 (m, 2H).

[0086] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 156.91, 156.69, 154.38, 148.53, 141.26, 139.39, 135.20, 135.18, 133.78, 133.70, 130.61, 130.56, 130.51, 130.46, 124.90, 124.62, 118.11, 117.42, 85.18, 83.81, 67.88, 65.68, 63.83, 53.40, 46.32, 40.13, 29.66, 28.84, 25.66.

[0087] ESI-MS: m/z calcd for $C_{36}H_{38}BrFN_5O_7PS_2$ 845.11; found 846.00 $[M + H]^+$.

[0089] 화합물 11의 합성

[0090] 무수 톨루엔(5 mL) 중 7-amino-4-(trifluoromethyl)coumarin) 용액에 DMAP(30mg, 0.249 mmol)를 첨가한 후 교반하면서 5분 동안 70-80℃로 가열하고 트리포스겐(49mg, 0.166mmol)을 첨가하였다. 그런 다음 혼합물을 5시간 동안 환류시켰다. 상온으로 식힌 후 감압 하에서 용매를 제거하였다. 이어서 반응 혼합물을 무수 DCM(5mL)에 용해시키고, 0℃에서 무수 DCM(5mL) 중 화합물 6(40mg, 0.083mmol) 및 TEA(23 μL, 0.166mmol)의 용액에 적가하였다. 실온에서 밤새 교반한 후, 용매를 증발시키고 생성된 잔류물을 실리카 겔 크로마토그래피(EtOAc/hexane: 1/1)로 정제하여 화합물 11(39mg, 64%)을 수득하였다.

[0091] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.9, 1.7 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.97 (dd, *J* = 5.0, 1.9 Hz, 2H), 4.46 (td, *J* = 5.6, 3.3 Hz, 2H), 4.44-4.26 (m, 4H), 3.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.04 (s, 2H), 3.01 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.00-2.86 (m, 4H), 2.83 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.87-1.80 (m, 2H), 1.59-1.53 (m, 2H).

[0092] ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 171.46, 170.87, 159.32, 155.43, 152.59, 143.02, 125.88, 125.86, 115.46, 113.26 (q, J_{C-F} = 5.8 Hz), 108.64, 106.26, 78.58, 78.52, 63.56, 62.74, 62.30, 52.14, 52.03, 49.90, 37.87, 37.47, 36.90, 35.99, 29.09, 29.01.

[0093] ESI-MS: m/z calcd for $C_{27}H_{29}F_3N_4O_9S_4$ 738.08; found 761.00 $[M + Na]^+$.

[0095] 화합물 M3의 합성

[0096] DCM/MeOH(1:1, total = 8mL) 용액 중 화합물 11(36mg, 0.049mmol) 및 화합물 8(19mg, 0.049mmol)의 교반 혼합물에 아스코르브산나트륨(10mol%)을 첨가하였다. 계속 교반하면서 Ar 가스를 퍼징하여 반응 혼합물을 30분 동안 탈기시켰다. 그동안, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$(5mol%)를 MeOH(0.5 mL)에 녹인 후 Eppendorf 튜브에 넣고 Ar 가스를 퍼징하여 탈기시켰다. 30분 후, 탈기된 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 용액을 반응 혼합물에 첨가하고 추가 6시간 동안 계속 교반하였다. 반응 완료 후(indicated by TLC), 용매를 진공에서 증발시키고 생성된 미정제물을 짧은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(MeOH/DCM = 5:95 to 10:90)에 직접 통과시켜 담황색폼(pale-yellow foam)으로서 화합물 M3(47mg, 86%)를 수득하였다.

[0097] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.02 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.85-7.77 (m, 10H), 7.70 (td, *J* = 7.8, 3.4 Hz, 6H), 7.61 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.8, 1.4 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.90 (dd, *J* = 11.5, 3.7 Hz, 2H), 4.62 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.42 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.39-4.24 (m, 4H), 4.03-3.94 (m, 2H), 3.27-3.10 (m, 4H), 3.05 (q, *J* = 9.5 Hz, 2H), 2.99 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.97-2.86 (m, 4H), 1.83-1.74 (m, 2H), 1.55 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H).

[0098] ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 171.27, 171.03, 159.41, 155.25, 153.06, 143.67, 135.25, 135.23, 133.66, 133.58, 130.60, 130.50, 130.41, 125.59, 117.90, 117.22, 115.79, 112.79 (q, J_{C-F} = 5.6 Hz), 108.21, 106.17, 78.61, 78.51, 63.09, 62.71, 62.52, 53.39, 51.91, 51.79, 48.96, 37.43, 36.97, 36.49, 29.61, 28.99, 28.95.

[0099] ESI-MS: m/z calcd for $C_{49}H_{49}F_3N_4O_9PS_4$ 1053.21; found 1053.15 $[M]^+$.

[0101] 재료 및 기기

[0102] 모든 용매 및 시약은 TCI Korea, Alfa Aesar, SigmaAldrich 및 Merck를 포함한 여러 화학물질 공급업체로부터 구매한 후 정제 없이(until specified) 사용하였다. Jasco V-750 및 Shimadzu RF5301PC 분광광도계를 사용하여 각각 UV-Vis 흡수 및 FL 스펙트럼을 기록하였다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 각각 500MHz 및 125MHz Bruker 분광계(solvent: CDCl3 with TMS as a reference solvent)를 사용하여 기록하였다. ESI-MS 스펙트럼을 얻기 위해 LC/MS2020 시리즈(Shimadzu) 기기를 사용하였다. 인간 자궁경부암 세포주 HeLa(ATCC®CCL-2™), 인간 비소폐암 세포(NSCLC) A549(ATCC®CCL-185™) 및 H1299(ATCC®CRL-5803), 인간 결장암 세포주 HCT116(ATCC®CCL-247™), SW480(ATCC®CCL-228™), LoVo(ATCC®CCL-229™), Caco2(ATCC®HTB-37™) 및 HT29(ATCC®HTB-38™) 및 마우스 유방암 세포주 4T1(ATCC®CRL-2539™)은 ATCC로부터 입수하였다. 1차 항체: 재조합 Alexa Fluor®647 Anti-TOMM20 항체 [EPR15581-54]-미토콘드리아 마커(Cat#ab209606), cytochrome C 항체[EPR1327](Cat#ab133504), BrdU 항체(Cat#ab6326) 및 PP2A 항체 (Cat#ab32104)는 Abcam에서 구입하였다. β-액틴(Cat#4967), GAPDH(Cat#5174), cleaved-caspase3(Cat#9664), Bax(Cat#89477) 및 Phospho-Histone H2AX(Ser139)(Cat#80312)는 CST에서 구입하였다. CLSM 실험에 사용된 이차 항체에는 Alexa Fluor 488 Goat-anti Rabbit IgG(Thermo,

catalog no. A-11034) 및 Alexa Fluor 647 Goat-anti Mouse IgG(Thermo, catalog no. A-28181)가 포함된다. Alexa Fluor 488®Phalloidin(catalog no. A-11034)은 Invitrogen에서 구입하였고, BrdU, thymidine analog(ab142567)는 Abcam에서 입수하였다.

[0104] UV-Visible, FL 스펙트럼 및 HPLC

[0105] 전구약물 M1 또는 M3(1mM) 및 GSH(1M)의 스톡 용액을 각각 DMSO 및 PBS 용액(pH = 7.4, 37℃에서 제조하였다. UV-Vis 흡수 및 FL 스펙트럼을 위한 110 μM의 작업 용액을 1% DMSO를 포함하는 PBS 용액(Ph = 7.4, 37℃)에서 예비 실험을 위해 제조하였다. 여기 파장은 FL 스펙트럼(슬릿 폭: ex/em = 5/5 nm)에 대해 368 nm로 설정되었다. HPLC 분석을 위해 UV-Vis 검출기(370nm)가 포함된 YL9101S(YL-Clarity) 기기가 장착된 역상 컬럼(C18-E, 5μm, Waters)을 사용하였다. H_2O-CH_3CN gradient 용리액(035 min; CH3CN from 0% to 60%)을 각 분석에 대해 1.0mL/분의 유속으로 사용하였다.

[0107] 세포 배양

[0108] Hela 세포는 EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium)에서 배양하였고 A549, H1299 및 4T1 세포는 Rosewell Park Memorial Institute(RPMI 1640)에서 배양하였다. HCT116, HT29, LoVo 및 Caco2는 McCoy's 5A에서 배양하였다. 배지에는 스트렙토마이신과 페니실린 및 10% 태아 소 혈청(FBS)(catalog no. 184590, Australia)이 보충되었다. 세포는 37℃ 인큐베이터에서 95% 공기 및 5% CO_2하에서 인큐베이션하였다. 인간 결장암 세포주 SW480은 37℃, 5% CO_2의 습도 조절 배양기를 이용하여 10% 태아 소 혈청(FBS) 및 1% 항생제(100 Units mL-1 penicillin and 100 μg mL-1 streptomycin)가 포함된 Leibovitz의 L-15 배지에서 배양하였다.

[0110] Alamar Blue™ 분석

[0111] 상이한 화합물 처리된 세포의 세포독성을 Alamar Blue™분석을 통해 측정하였다. 간략하게, 세포(5~8×10^3 cells/well)를 96-웰 플레이트에서 24시간 또는 48시간 동안 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1과 함께 상이한 용량으로 인큐베이션하였다. 기존 배지를 제거한 후, 1/10 부피의 Alamar Blue 시약을 세포 배양 배지와 함께 첨가하였다. 그런 다음 세포를 추가로 1시간 동안 인큐베이션하였다(37℃; dark). 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 웰의 형광 값을 기록하였다(ex/em: 570/585 nm).

[0113] 콜로니 형성 분석(Colony formation assay)

[0114] 연질 한천 콜로니 형성 분석(soft agar colony formation assay)을 통해 세포 증식 능력을 측정하였다. 세포를 대조군, FUDR, DMC 및 M1으로 처리하였다. 그런 다음 세포를 완전 배지(complete medium)에 희석된 0.36% 아가로스(Invitrogen)에 현탁하고, 0.75% 미리 형성된 아가로스 층을 포함하는 저밀도(~1000 cells per well)에서 6-웰 플레이트에 다시 시딩하고 10일 동안 인큐베이션하였다. 세포를 메탄올로 고정하고 콜로니가 육안으로 보일 때 0.1% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 그런 다음 이미징을 위해 세 개의 필드를 선택하고 개별 콜로니를 세었다.

[0116] 인비트로 세포사멸 검출

[0117] 프로피디움 아이오다이드(PI) 결합 FITC Annexin V 세포사멸 검출 키트(BD Biosciences)를 사용하여 세포의 세포사멸을 검출하였다. 간략하게, 세포(1x10^6)를 6-웰 플레이트에 시딩하고 밤새 부착한 후 대조군, FUDR, DMC 및 M1으로 24시간 동안 처리하였다. 부착된 모든 세포는 배지에 부유하는 세포와 함께 하베스팅하고, PBS로 2회 세척하고, 1X 결합 완충 용액에 분산시켰다. 5μL의 FITC Annexin V와 5μL의 PI를 100μL의 세포 현탁액과 혼합하였다. 혼합물을 실온(rt)에서 15분 동안 암실에서 인큐베이션하고, FACS Calibur Flow Cytometer(BD Biosystems)를 사용하여 분석을 수행하였다.

[0119] 면역형광분석

[0120] 전처리된 세포 또는 마우스 조직을 실온에서 15분 동안 파라포름알데히드(Electron Microscopy Sciences)로 고정한 후, 0.2% Triton X-100-PBS에서 10분 동안 투과화(permeabilization)시켰다. 샘플을 블로킹 버퍼(blocking buffer)[containing normal goat serum (2%), BSA (2%), and gelatin (0.2%)]화 함께 가습 챔버에서 1시간(rt) 동안 추가로 배양하였다. 그 후, 샘플을 블로킹 버퍼에서 1차 항체와 함께 인큐베이션하고 다른 1시간 동안 섹션(rt)에서 인큐베이션하였다. Triton X-100(0.15%)을 포함하는 PBS로 세척한 후, 샘플을 블로킹 버퍼(rt)에 희석(1:200)한 형광 태그 항체(2차)와 함께 1시간 동안 인큐베이션한 다음, DAPI(Molecular Probes-Invitrogen, 1:20000 dilution in PBS)에서 20분간 인큐베이션하였다. 그런 다음 샘플을 Prolong Gold antifade mounting medium(Life Technologies)을 사용하여 슬라이드에 장착하였다. TOM20, γ시토크롬 C 및 절단된 카스파제-3(1:200으로 희석됨)에 대한 1차 항체가 본 실험에 사용되었다. 면역 형광 검출에 사용된 이차 항체에는 Alexa Fluor®488 Goat-anti Rabbit IgG 및 Alexa Fluor®647 Goat-anti Mouse IgG가 포함되었다. F-액틴은 FITC-Phalloidin(Invitrogen)으로 염색하였다.

[0122] 반응성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 검출

[0123] ROS 레벨의 세포 내 검출은 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate(H2DCF-DA)를 사용하여 수행하였다. 비극성 화합물인 H2DCF-DA는 세포에 들어간 후 세포 에스테라아제의 영향을 받아 비형광 및 막 비투과성 극성 화합물(H2DCF)로 전환될 수 있다. 일단 세포내 ROS와 상호작용하면, 비형광 H2DCF는 FCM이 쉽게 감지하는 형광 디클로로플루오레세인(DCF)으로 산화된다. 세포 내 ROS 레벨의 양은 DCF의 형광 강도에 비례한다.

[0125] 미토콘드리아 DNA 손상 정량화

[0126] 미토콘드리아 DNA 손상 정량화를 위해 long-range qPCR 기술을 이용하였다. 긴 미토콘드리아 타겟 3723bp(accession no: NC_012920; 11492-15214bp)를 앰플리콘(amplicon) 타겟으로 설정하고, 짧은 내부 앰플리콘에 대한 정합 역방향 프라이머도 설계하였다(NCBI):

[0127] Mitochondrial large forward 5′ -3′ : CGCCTCACACTCATTCTCAA

[0128] Mitochondrial large reverse 5′ -3′ : AATGTATGGGATGGCGGATA

[0129] Mitochondrial small reverse 5′ -3′ : CAAGGAAGGGGTAGGCTATG

[0130] SYBR Green 염료(Qiagen, Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit)를 사용하여 실시간 PCR 검출 장비(Qiagen, Rotor-Gene Q 시리즈)에서 long-range qPCR을 수행하였다. 50ng DNA 템플릿, 1μM 프라이머 희석액 및 10μL의 2x Roter-Gene SYBR Green PCR Master Mix를 포함하는 혼합물 20μL를 각 PCR 반응에 사용하였다. 형광 신호는 50 사이클 동안 각 사이클의 endpoint에서 기록하였다. 증폭된 영역의 경우, 일반적인 2ΔΔ방법을 사용하여(Nucleic Acids Res. 2014 Apr;42(6):e41) 10kb당 검출된 DNA 손상 비율(lesion rate)을 계산하였다.

[0132] 8-OhdG DNA 손상 정량화

[0133] 8-OHdG는 산화적 DNA 손상 검출을 위한 마커로 널리 사용된다. 8-OHdG DNA Damage Quantification Direct Kit(EpiQuik™Colorimetric, USA)의 제조업체 지침에 따라 8-OHdG(1mg)를 최종 농도 100ng/μL로 작업 용액으로 준비하였다. 그런 다음 anti-8-OHdG 및 이차 Alexa 488 항체를 물에 희석하였다. HCT116 세포를 24시간 또는 48시간 동안 각각의 시험 대상 화합물로 전처리하였다. 그 후, Genomic DNA Extraction Kit(Promega Corporation, Madison, USA)를 이용하여 세포로부터 genomic DNA를 추출하였다. 그런 다음 오비탈 쉐이커(500rpm, rt)에서 1시간 동안 anti-8-OHdG 항체와 함께 인큐베이션하였다. 다음으로, 혼합 용액에 2차 항체를 첨가한 후 오비탈 쉐이커에서 1시간 더 인큐베이션하였다. 이어서 검출 항체, 인핸서 용액(enhancer solution) 및 발색 용액(color developing solution)을 첨가한 후 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 신호를 검출 및 정량화하였다.

[0135] qRT-PCR(Quantitative real-time polymerase chain reaction)

[0136] Trizol(Invitrogen, USA)을 사용하여 세포 및 조직의 RNA를 추출하였다. SuperScript@ III Reverse Transcriptase Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 1μg RNA를 cDNA로 전사하였다. 그런 다음 SYBR Green 염료(Ambion, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 Bio-Rad CFX96 시스템(Bio-Rad, USA)으로 qRT-PCR을 수행하였다(열순환 존건: pre-denatured for 15s at 95℃, 40 cycles of denatured for 5s at 95℃, and re-natured for 30s at 60℃). 각 반응은 10μL 시스템에서 수행되었다. 반응이 완료되었을 때 주기 임계값(cycle threshold, CT) 데이터를 결정하기 위해 고정 임계값 설정(fixed threshold setting)이 사용되었다. 비교 CT 방법(comparative CT method)을 사용하여 카피 수(copy number)를 분석하고 2ΔΔCt 방법을 사용하여 표적 mRNA의 상대적 수준(relative levels)을 계산하였다. 유전자의 발현 수준을 표준화하기 위해 GAPDH를 내부 대조군 유전자로 사용하였다. qRT-PCR 분석을 위한 프라이머는 다음과 같다.

표 1

[0137]

Gene	Forward primer 5′-3′	Reverse primer 5′-3′
ATR	GGAGATTTCCTGAGCATGTTCGG	GGCTTCTTTACTCCAGACCAATC
PP2A	GGTGGTCTCTCGCCATCTATAG	CTGGATCTGACCACAGCAAGTC
MDM2	TGTTTGGCGTGCCAAGCTTCTC	CACAGATGTACCTGAGTCCGATG
p53	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC
p21	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
CHK1	GTGTCAGAGTCTCCCAGTGGAT	GTTCTGGCTGAGAACTGGAGTAC
CDK2	CCAGGAGTTACTTCTATGCC	ATAGTGCAGCATTTGCGA
CyclinD1	GCGGAGGAGAACAAACAGAT	TGAACTTCACATCTGTGGCA
CyclinE1	TGTGTCCTGGATGTTGACTGCC	CTCTATGTCGCACCACTGATACC
GAPDH	GCCTCAAGATCATCAGCAAT	TTCAGCTCAGGGATGACCTT

[0139] 웨스턴 블롯 분석

[0140] 세포의 총 단백질(total proteins)을 1 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 1 mM의 phosphatase inhibitor를 포함하는 lysis buffer를 사용하여 추출하였다. 단백질 농도를 측정하고, 20ug의 단백질을 8%-12% Tris-Tricine Ready Gel SDS-PAGE(Bio-Bad)로 분리하였다. 밴드를 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막으로 옮긴 후 블로킹 단계(blocking step)를 수행하였다. 막을 1차 및 2차 항체 용액에서 추가로 인큐베이션하였다. 밴드 밀도는 정량화를 위해 ImageJ 1.62(ImageJ, RRID: SCR_003070) 겔 플로팅 매크로에 의한 광학 밀도 방법으로 측정되었으며, 타겟 단백질은 동일한 샘플의 지표에 대해 정규화되었다.

[0142] 인비보 항종양 효능 분석(In vivo anti-tumor efficacy assay)

[0143] 5주령의 암컷 누드 마우스에 HCT116 세포 1×10^{6}개를 피하 이종 이식하였다. 종양의 크기가 ~80 mm^{3}에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 4개 그룹(n = 3)으로 나누고, 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1을 각각 5 mg/kg^{-1}로 처리하였다. 마우스에 3일마다 총 4번 종양내 주사하였고, 종양 크기는 3일마다 모니터링하였고, 종양 부피는 다음의 공식을 이용하여 계산하였다: $4\pi/3 \times (\text{tumor length}/2) \times (\text{tumor width}/2)^{2}$. 동물 프로토콜은 Brigham and Women 's Hospital과 Harvard Medical School의 기관 동물 관리 및 사용위원회의 승인을 받았다. 모든 생체 내 연구는 National Institutes of Health 동물 관리 지침에 따라 수행하였고, 동물 연구는 Brigham and Women's Hospital의 동물 시설에서 엄격한 규정과 병원균이 없는 조건에서 수행되었으며 동물 프로토콜(2020N000055)을 따랐다. 무흉선 암컷 누드 마우스(4~6주령)는 Charles River Laboratories에서 구입하였다.

[0145] 통계 분석

[0146] GraphPad Prism 8로 통계 분석을 수행하여 양측 검정(two-tailed t-test)를 수행하였다. 달리 명시되지 않는 한 모든 연구는 적어도 세 번 수행하였다. 오류 막대는 표준 편차(SD)를 나타낸다(standard deviation, SD).

[0148] **결과 및 고찰**

[0149] 본 발명에서는 암세포의 DNA 손상 반응을 표적으로 삼도록 설계된 새로운 다기능 구조 화합물 M1을 제공한다. 상기 M1은 내인성 GSH에 의해 절단 가능한 이황화 링커(disulfide linkers)를 통해 FUDR(*floxuridine)*과 PP2A 억제제인 DMC(Demethyl cantharidin)가 결합된 구조를 가지며, 트리페닐포스포늄(TPP) 모이어티의 추가적인 컨쥬게이션은 M1이 미토콘드리아 GSH에서 특이적으로 활성화되도록 하고, 암세포의 미토콘드리아 및 핵 DNA 손상을 극대화 시켜 암세포 사멸을 일으킬 수 있다(도 1). 또한, PP2A의 억제는 높은 수준의 MDM2 발현을 일으키고, p53-p21가 매개하는 세포주기의 G1/S 검문지점 정지(check point arrest) 고갈을 유발하여 DNA 복구 경로를 차단하고 암세포의 FUDR/5-플루오로우라실(5-FU) 요법에 대한 민감성을 높인다(도 1B).

[0150] 전구약물(prodrug) M1, M2(DMC가 없는 참조 화합물) 및 M3(7-아미노-4-트리플루오로메틸 쿠마린 형광단을 갖는 화합물)(도 7)는 각각 하기 도 8 내지 도 10에 나타낸 [합성 경로]에 따라 합성하였다. 간략하게, MeCN 중 Et_3N의 존재 하에 알코올 화합물 2와 DMC의 무수물 고리 사이의 반응을 통해 화합물 4를 합성하였다. 다음으로, M1 및 M3 합성을 위한 기본 링커인 화합물 6의 합성을 위해, 톨루엔 중 2,4,6-트리클로로벤조일 클로라이드, Et_3N 및 DMAP의 존재 하에 알코올 화합물 3과 카르복실산 화합물 4의 Yamaguchi-에스테르화 반응을 수행하였고, MeOH 중 Amberlyst 15를 사용하여 TBDMS 탈보호(deprotection)를 진행하였다. 다음으로, DCM 중 carbonyl-di-(1,2,4-triazole)과 화합물 6을 반응시킨 다음, DCM 중 Et_3N 및 DABCO의 존재 하에 화합물 1과 반응시켜 화합물 7을 합성하였다. 다음으로, 화합물 7과 화합물 8 사이의 클릭 화학 반응($CuSO_4$ 및 sodium ascorbate)을 수행한 후, MeCN 중 산성 조건(3M HCl)에서 TBDMS 탈보호를 수행하여 M1을 수득하였다. 또한, DCM 중 carbonyl-di-(1,2,4-triazole)과 화합물 3을 반응시킨 다음, DCM 중 Et_3N 및 DABCO의 존재 하에 화합물 1과 반응시켜 화합물 10을 합성하였다. 다음으로, 화합물 7과 화합물 8 사이의 클릭 화학 반응($CuSO_4$ 및 sodium ascorbate)을 수행한 후, MeCN 중 산성 조건(3M HCl)에서 TBDMS 탈보호를 수행하여 M2를 수득하였다. 또한, 7-아미노-4-트리플루오로메틸 쿠마린을 톨루엔 중 포스겐 및 DMAP와 순차적으로 반응시키고, 이어서 DCM 중 Et_3N의 존재 하에 화합물 6을 첨가하여 화합물 11을 생성하였다. 다음으로, DCM/MeOH 혼합물에서 화합물 11과 화합물 8 사이의 클릭 화학 반응($CuSO_4$ 및 sodium ascorbate)을 수행하여 M3를 수득하였다. 합성 화합물의 존재 및 특성은 질량분석계, ^{1}H NMR/^{13}C NMR을 통해 확인하였다(도면 미도시).

[0151] 전술한 바와 같이, 본 발명에서는 M1, M2, M3에서, 종양 부위에서의 효과적인 약물 방출을 위해 GSH-민감성 절단 가능한 이황화 링커를 사용하여 모약물(parent drugs)/형광단(fluorophores)를 접합하였다. 전구약물 활성화(prodrug activation)를 확인하기 위해, 먼저, PBS 용액(pH 7.4, 37℃)에서 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 통해 M1의 안정성 테스트를 수행하였다. M1은 GSH에 노출될 때까지 PBS에서 상당한 안정성을 보였다(도 11). GSH는 세포에서 가장 풍부한 티올에 해당하기 때문에 thioredoxin (Trx), cysteine (Cys), 및 homocysteine (Hcy)을 포함한 생물학적으로 관련된 다른 티올이 아닌, GSH만을 활용하여 M1의 활성화 거동을 조사하였다.

[0152] 분석 조건 하에서 HPLC에서 M1의 27.2분의 머무름 시간(retention time)에 상응하는 특성 피크는, 4시간 동안 GSH(1mM)의 인큐베이션과 함께 사라졌다. 새로운 피크는 8.2분 및 16.2분에 형성되었습니다(free FUDR drug and byproduct, respectively)(도 2B). 또한, GSH가 추가된 ESI-MS 스펙트럼에서 M1의 관찰된 질량 피크[186.05, 247.10 및 417.95, 각각 free DMC, FUDR 및 부산물에 해당(도 12)]는 도 2A에서와 같이 GSH에 의해 유발된 M1의 활성화에 대한 추가 증거를 제공한다.

[0153] M1의 활성화 거동을 더 증명하기 위해, 광물리적 특성의 변화를 관찰하여, 7-아미노-4-트리플루오로메틸 쿠마린 형광단과 결합된, M1과 밀접하게 관련된 유사체인 프로브 화합물 M3의 GSH 트리거 활성화(GSH-triggered activation)를 조사하였다. 345nm에서 M3의 흡수 밴드는 GSH(1mM)와 함께 인큐베이션 후 359nm로 이동하였다(도 13A). 또한, GSH(1mM)에 노출시 447nm에서 M1의 약한 형광 방출 밴드가 494nm에서 강한 방출 밴드로 전환됨으로써 쿠마린 유도체의 소멸된 형광이 회복되었는데, 이는 free 7-amino-4-trifluoromethyl 쿠마린 형광단의 특징적인 피크이다(도 13B). 또한 인큐베이션 시간(0-2h)(도 2C), GSH 농도(0-4 μM)(도 2D), M1 농도(1-10 μM)(도

13C)가 증가함에 따라 494nm에서 M1의 피크 강도 증가가 나타났다. 종합적으로, HPLC 크로마토그램(도 2B), ESI-MS 분석(도 12) 및 형광 현미경(도 2C, D 및 도 13)에서 얻은 결과들을 통해, M1이 먼저 GSH의 -SH에 의해 티올 분해되고, 나중에 형성된 티올 중간체는 화학적 변형을 거쳐 유리형(free form)의 약물 분자를 방출한다는 도 2A의 M1 활성화 메커니즘과 일치함을 확인하였다.

[0154] 전술한 바와 같이, 본 발명의 전구약물 M1은 FUDR(DNA damaging drug)과 DMC(PP2A inhibitor)로 구성되며, 암 세포의 자기 방어 메커니즘(DNA 손상 반응)을 표적으로 삼도록 설계되었다. PP2A는 항암제에 대한 암 세포의 민감화에 대한 잠재적 표적이므로, PP2A 단백질 발현이 암 세포의 DNA 복구 능력을 변경할 수 있다고 판단하였다. 이를 평가하기 위해, M1이 PP2A 의존성 세포 독성 활성을 유도하는지 여부를 다양한 PP2A 단백질 발현을 가진 다른 암 세포주를 사용하여 세포 생존력 분석을 수행하였다. PP2A 단백질 발현이 낮은 세포(즉, HeLa 및 HT29 세포, 도 3A)에서 M1, FUDR 또는 DMC 처리시, 현저한 세포 독성 효과는 나타나지 않았다(도 3B, C). 또한, PP2A 발현이 높은 세포(즉, 4T1 및 HCT116, 도 3A)에서의 FUDR 처리는 세포 생존력에 영향을 미치지 않았다; 그러나, DMC 처리는 4T1 및 HCT116 세포의 증식을 약간 감소시켰다(도 3D, E). 대조적으로, 예상대로 4T1 및 HCT116 세포(high PP2A expression)에서 M1 처리는 FUDR 또는 DMC 처리에 비해 세포 생존력을 크게 감소시켰다(도 3D-F). 또한, 용량 의존적 세포 억제 및 M1과 PP2A 발현 사이의 양의 상관관계가 관찰되었다.

[0155] HCT116 세포 사멸 정도를 확인하기 위해, FITC(fluorescein isothiocyanate) 분석을 이용한 유세포 분석을 수행하였다. 그 결과, M1과 함께 인큐베이션된 세포에서 세포 집단의 대략 38% 및 12.8%가 각각 초기 및 후기 세포사멸 단계에 있는 것으로 확인되었으며, FUDR 처리된 세포의 경우 7.6% 및 3.4%, DMC 처리된 세포의 경우 16.2% 및 7.7%에 불과하였다(도 3G,H). 이러한 결과를 통해, FUDR과 DMC가 접합된 전구약물인 M1은 FUDR 또는 DMC 단독에 비해 세포 사멸을 현저하게 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[0156] 또한, 본 발명의 전구약물 M1은 미토콘드리아 GSH 하에서 특정 활성화를 위한 미토콘드리아를 표적으로 하는 TPP 모이어티를 포함하여 유리 약물(free drugs)을 방출한다. M1이 미토콘드리아에 위치한다는 것을 확인하기 위해, 7-아미노-4-트리플루오로메틸 쿠마린 형광단을 방출하도록 설계된, M1과 밀접하게 관련된 유사체인 M3의 공초점 이미징 분석을 수행하였다(도 14). 도 4A에 나타난 바와 같이, M3에서 방출된 7-아미노-4-트리플루오로메틸 쿠마린 형광단에서 유래하는 청색 형광과 TOM20-647(미토콘드리아-염색 항체)로부터의 적색 형광이 병합된 밝은 분홍색 형광이 인큐베이션 시간(0-36시간)에 따라 증가하였다. 또한 HCT116 세포에서 M3의 형광 생성에 대한 GSH의 기여도를 확인하기 위해, GSH 억제제인 NEM(N-ethylmaleimide)을 사용하여 공초점 현미경 공동 위치 연구(confocal microscopic co-localization study)를 수행하였다. HCT116 세포의 밝은 분홍색 형광은 NEM 처리 후 크게 감소하였다(도 4A). 이러한 결과는 HCT116 세포에서 미토콘드리아 국소화 및 GSH에 의해 유발된 M3의 활성화를 촉진하는 TPP에 기인하는 것이다.

[0157] 다음으로, M1이 미토콘드리아 DNA 손상을 통해 미토콘드리아 매개 세포사멸(mitochondria-mediated apoptosis)을 촉진하는지 여부를 조사하였다. 여러 항균제 또는 화학요법 약물이 반응성 산소종(ROS) 생성으로 인해 미토콘드리아 손상을 일으키는 것으로 알려져있다. 따라서, HCT116 세포에서 ROS 생산에 대한 M1의 영향을 조사하였다. 이를 위해, 플루오레세인 기반 산화 스트레스 지표(DCF-DA)를 사용하였다. 도 4B에 도시된 바와 같이, 시간 의존적 방식으로 M1으로 처리된 세포에서 상승된 DCF-DA 녹색 형광이 관찰되었다(24시간에서 43.4 및 48시간에서 74.9). 이러한 향상된 형광은 미토콘드리아에서 증가된 ROS 생산에 기인한다(도 4C, D). 대조적으로, FUDR 또는 DMC 단독 처리는 낮은 ROS 생성으로 인해 DCF-DA 형광 향상이 더 낮았다(FUDR의 경우 24시간에 14.8, 48시간에 18.2%, DMC의 경우 24시간에 24.6, 48시간에 32.5%)(도 4B-D). 이것은 FUDR 또는 DMC 단독의 미토콘드리아 표적 가능성이 부족하기 때문일 수 있다. 다음으로, long-range qPCR (3723 bp targets) 분석을 통해, M1의 mtDNA 돌연변이 유발성을 조사하였다. M1은 미토콘드리아 DNA 손상 병변(DNA damage lesions)의 시간 의존적 향상을 유도한 반면, 대조적으로, FUDR 및 DMC는 현저한 미토콘드리아 DNA 손상을 나타내지 않았다(도 4E, F).

[0158] M1의 미토콘드리아 매개 세포사멸을 더 검증하기 위해, 내인성 pro-apoptotic 유전자의 미토콘드리아 매개 핵심 조절자인 BAX의 발현 수준에 대한 M1의 효과를 조사하였다. 도 15에 나타난 바와 같이, HCT116 세포에 M1을 추가하면 BAX 수준(강한 녹색)이 시간에 따라 증가하는 반면, FUDR 또는 DMC 단독으로 처리하면 동일한 분석 조건에서 BAX 발현이 낮아졌다. 다음으로, M1이 HCT116 세포의 미토콘드리아 및 세포골격의 형태에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 미토콘드리아 형태 및 세포골격막을 각각 TOM20-647 및 FITC-팔로이딘으로 염색하여 시각화하였다. 도 4G에 나타난 바와 같이, HCT116 세포에서 M1의 인큐베이션은 미토콘드리아 및 세포골격의 기능장애를 초래하였다; 이 효과는 배양 시간이 길어질수록 더 두드러졌다(흰색 화살표로 표시됨). 이는 M1에 의한 미토콘드리아 손상으로 인한 미토콘드리아의 점진적 팽윤(gradual swelling) 때문이다. 미토콘드리아 팽윤은 미토콘드리아 외막의 파열 및 세포사멸 촉진 단백질 사이토크롬 C의 방출을 유

발한다. 종합하면, 상기 도 4 및 도 15의 결과를 통해, 본 발명의 전구약물 M1은 미토콘드리아에 위치하고, 국소적으로 풍부한 GSH가 이를 활성화하여 ROS 수준을 증가시켜 미토콘드리아 DNA 손상을 유발한다는 것을 확인하였다(도 4H).

[0159] 다음으로, M1이 HCT116 세포의 게놈 DNA(genomic DNA)에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. γ-H2AX(DNA 손상 마커)를 사용하여 핵 내 DNA 손상 수준을 육안으로 관찰하기 위해 면역형광(IF) 염색법을 수행하였다. 그 결과, HCT116 세포에서 M1의 처리가 γ의 명백한 발현을 유도했음을 확인하였고, 또한 장기간 인큐베이션시 현저하게 증가된 DNA 손상 수준에 더 많은 영향을 미침을 확인하였다(도 5A). 대조적으로, FUDR 또는 DMC의 단독 처리는 HCT116 세포에서 낮은 γ발현을 유도하였다. 또한 산화적 DNA 손상 바이오마커인 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)을 사용하여 HCT116 세포에서 핵 DNA 손상을 확인하였다. 도 5B에 나타난 바와 같이, M1의 처리는 8-OHdG의 현저하게 높은 발현을 초래하였고, 이는 게놈 DNA에 대한 M1의 심각한 영향에 기인하는 것이다. 동시에, FUDR 또는 DMC의 단독 처리는 8-OHdG 발현이 낮은 수준으로 나타난바, DNA 손상에 대해 낮은 영향을 미침을 확인하였다. 핵 DNA 손상에 대한 M1의 영향은 유리 약물의 핵으로의 전위(translocation) 및 5-FU에 의한 게놈 DNA 또는 RNA 손상 경로의 활성화 때문일 수 있다. 또한 DMC는 PP2A를 억제하여 DNA 손상 반응을 감소시킬 수 있으며, 이는 HCT116 세포를 5-FU에 민감하게 만들어 M1의 효과를 더욱 유도할 수 있다.

[0160] 다음으로 유리 약물 FUDR 및 DMC와 비교하여 HCT116 세포의 증식에 대한 M1의 영향을 평가하였다. 세포 증식에 대한 효과를 시각적으로 검출하기 위해 증식 세포에 대해 BrdU를 사용하여 IF 염색 분석을 수행하였다. 그 결과, M1의 처리가 낮은 수준의 BrdU 양성 세포와 함께 세포 증식에 명백한 영향을 미친다는 것을 확인하였다. 동시에 FUDR과 DMC는 무시할만한 효과를 보였다(도 16). 또한, HCT116 세포의 증식 감소에 있어 M1에서 DMC의 역할을 평가하기 위해, M1과 M2(DMC가 없는 참조 화합물)에 의한 증식을 비교하기 위한 실험을 수행하였다. 도 17에 나타난 바와 같이, M2는 M1보다 HCT116 세포의 증식에 더 낮은 영향을 미쳤으며 이러한 결과를 통해 DMC가 M1의 치료 효과에 중요한 역할을 수행함을 확인하였다.

[0161] DNA 손상 동안 세포는 G1, S 및 G2/M과 같은 세포 주기 체크포인트를 활성화하여 세포 주기 진행을 중지하고 불완전하게 복제되거나 손상된 염색체의 전달을 방지하여 손상된 DNA를 복구할 시간을 허용한다. 복제 스트레스를 유도하고 γ활성화에 따른 DNA 손상에 반응하여 세포는 DNA 손상 신호를 ATM 또는 ATR과 같은 DNA 복구 키나아제에 전달한다. DNA 손상 반응에서 p53 종양 억제인자의 기능은 잘 확립되어 있다. DNA 손상 물질에 대한 반응으로 ATR은 p53을 인산화한다. p53은 전사 인자로서 p21(p53의 하위 표적 유전자)을 활성화하여 CDK2/cyclin E(cyclindependent kinase2/cyclin E) 복합체를 억제하여 세포 주기 진행을 차단하고 손상된 DNA를 복구한다. Cyclin E는 CDK2에 결합하고 G1 및 G1/S 단계 전환에서 중요한 역할을 하며 세포 주기 진행을 보다 효율적으로 자극할 수 있다. ATR은 또한 보상 경로로서 Chk1 경로를 통해 세포 주기 정지를 유도할 수 있다. 본 발명자들은 FUDR 및 DMC와 결합할 때 Chk1 저발현 종양에서 DNA 복구가 실패할 것이라고 추측하였다. PP2A 억제제 DMC는 PP2A에서 MDM2 억제를 해제하여 p53을 분해할 수 있다.

[0162] M1이 PP2A를 억제하여 DNA 손상을 유도하는 메커니즘을 규명하기 위해, qRT-PCR 분석을 통해, DNA 손상 복구 경로와 관련된 유전자의 상대적인 mRNA 수준을 평가하였다. FUDR 단독 처리된 HCT116 세포에서 FUDR 촉진 DNA 손상에 대한 반응으로 ATR, p53, p21, Chk1 및 cyclin E1의 증가된 mRNA 수준은 CDK2/cyclin E1에 의한 G1/S 체크포인트에서의 세포 주기 정지와 함께 ATR-p53-p21 매개 복구 경로를 밝혔다(도 5C, F, G, H, 및 K). 또한, 관찰된 높은 PP2A 수준 및 낮은 MDM2 mRNA 수준은 PP2A가 HCT116 세포에서 p53 수준을 증가시킴으로써 이 복구 경로를 유도할 수 있다는 제안을 강력하게 뒷받침하였다(도 5D, E). 대조적으로, M1에서 DMC의 PP2A 억제 특성은 PP2A로부터 MDM2 억제를 해제하여 MDM2의 발현 수준을 증가시킨 다음 p53 및 p21의 수준을 감소시키는 것으로 밝혀졌다(도 5D-G). M1은 ATR 및 Chk1 발현 수준에도 영향을 미쳤다(도 5C, H). 결과적으로 CDK2/cyclin E1 유전자 복합체의 상당한 변화로 인해 G1/S 체크포인트 정지가 고갈되었다(도 5I-K). 결과적으로 DNA 손상 복구 실패는 대량 세포 사멸을 증가시킨다. FUDR 처리된 세포에서 DNA 손상 복구 경로와 관련된 유전자의 상대적 mRNA 수준은 M1과 역전되었으며(도 5L), 이는 M1에 접합된 DMC가 암 세포를 FUDR 요법에 민감하게 만든다는 가설을 뒷받침한다.

[0163] 다음으로, M1이 효과적인 생체 내 이종이식 모델인지 여부를 평가하였다. HCT116 세포 이종이식 마우스는 대조군(1% DMSO), FUDR, DMC 및 M1(각각 0, 3, 6 및 9일에 $5mgkg^{-1}$)으로 처리하였고, 종양은 24일째에 수거하였다(도 6A). 그 결과, M1으로 처리된 마우스에서 상당한 종양 성장 퇴행이 관찰된 반면, 대조군, FUDR- 및 DMC 처리군에서는 종양 성장이 상대적으로 약간의 감소만 관찰되었다(도 6B, C 도 18). 또한, 안락사된 마우스에서 절제된 종양의 부피는 M1 처리에 의해 현저하게 감소한 반면(도 6D), FUDR 또는 DMC 처리 그룹에서는 절제된 종양

의 현저한 감소는 관찰되지 않았다. 또한, 처리기간 동안 큰 체중 변화는 관찰되지 않았으며, 이는 M1의 처리시 부작용 또한 없음을 확인할 수 있었다(도 6E).

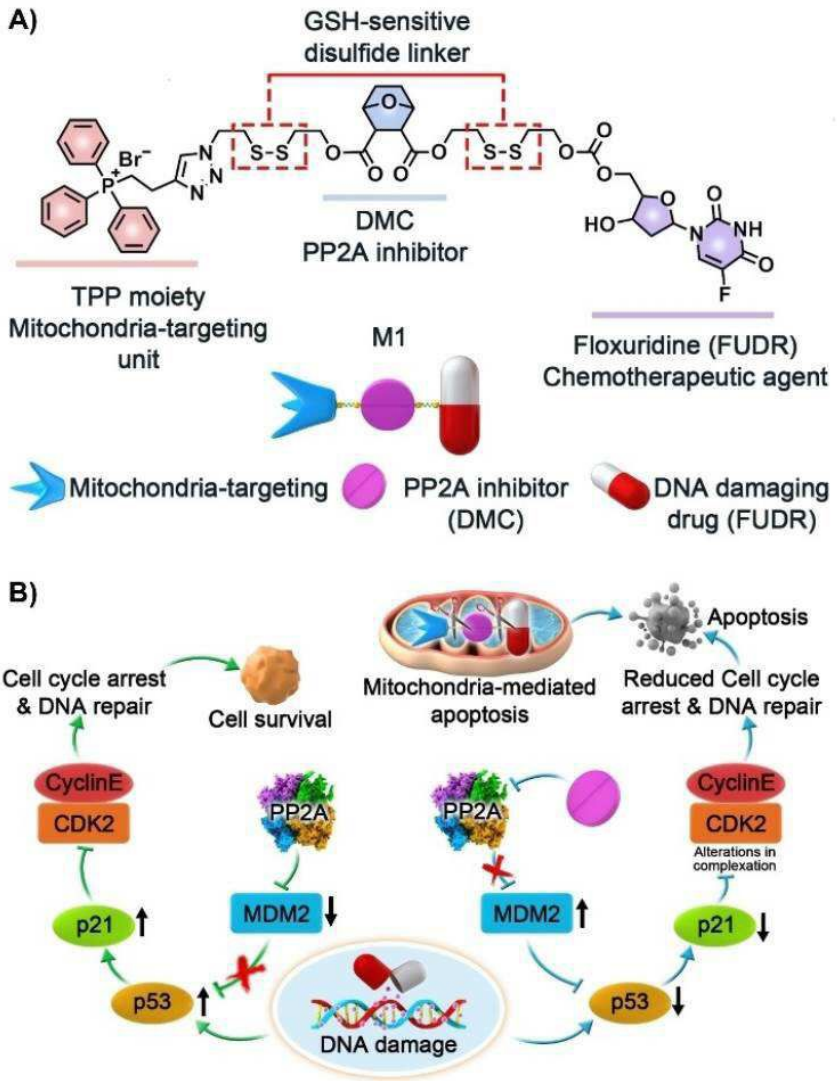
[0164] 다음으로, H&E 염색 및 면역조직화학적(IHC) 분석을 통해 생체 내 항종양 효과를 평가하였다. 도 6F에 도시된 바와 같이, M1-처리군의 H&E-염색된 종양 절편에서는 특징적인 세포사멸이 관찰된 반면, 대조군 또는 FUDR- 또는 DMC-처리군에서는 이러한 효과가 나타나지 않았다. 또한, M1으로 처리된 마우스에서는 더 높은 수준의 세포사멸 세포에 해당하는, 절단된 카스파제-3(cleaved caspase-3)(녹색)의 수준이 증가하는 것으로 나타난 반면, 다른 처리군에서는 그러한 효과가 나타나지 않았다(도 6G, I). 마지막으로, IHC 분석을 사용하여 proapoptotic protein cytochrome C의 수준을 평가하였다. 미토콘드리아에서 시토크롬 C의 방출은 미토콘드리아 손상에 이어 미토콘드리아 막을 파열시키는 팽윤(swelling)으로 인해 발생한다. 종양 절편에서 M1을 처리한 결과, 시토크롬 C(분홍색) 수치가 가장 크게 증가했으며, 이는 도 4에 표시된 세포 기반 미토콘드리아 세포사멸 연구와 일치하였다. 대조적으로, 시토크롬 C의 눈에 띄는 방출은 다른 대조군으로 처리된 조직 섹션에서는 관찰되지 않았다(도 6G, H). 종합적으로, 대조군에 비해 M1은 생체적합적으로, 현저하게 개선된 항종양 효능을 가짐을 확인하였다.

[0166] 결론적으로, 본 발명에서는 암 세포주에서 GSH 유발 활성화 행동과 PP2A 의존성 세포독성 활성을 나타내는 새로운 다기능 구조의 전구약물 M1을 제공한다. 5-FU 요법에 대해 반응률이 낮은 HCT116 세포는 M1에 대해 상당한 세포독성을 보였다. M1의 TPP 모이어티는 전구약물을 암세포의 미토콘드리아로 유도할 수 있는데, 여기서 GSH가 풍부하기 때문에 M1 활성화가 발생하여 ROS 수준이 증가하고 미토콘드리아 DNA 손상이 발생한다. 특히, 유리 약물이 핵으로 전달된 후 전구약물 M1은 HCT116 세포의 게놈 DNA 손상에 상당한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한, FUDR 요법에서 PP2A 유도 p53-p21 매개 세포 주기 정지 경로는 DMC를 통해 PP2A를 억제함으로써 p53 수준을 감소시키는 M1에 의해 억제된다. 마지막으로, H&E 염색으로 얻은 종양 성장 퇴행 및 세포사멸 분석의 생체 내 결과와 HCT116 세포 이종이식편 보유 마우스에서 IHC 분석으로 얻은 절단된 카스파제-3 수준의 증가를 통해 M1의 항종양 효능을 확인하였다. 전반적으로 본 발명에서는 DMC와 FUDR로 구성된 다기능 구조 M1이 미토콘드리아에서 특정 활성화를 보여 미토콘드리아 매개 세포 사멸을 유발하고 게놈 DNA에 영향을 미친다는 것을 확인하였다. 중요한 것은 이러한 결과가 FUDR 치료 중 DNA 손상 복구 경로에 대한 중요한 역할을 확인하고 암세포를 화학 요법에 민감하게 만드는 이러한 경로의 억제 역할을 강조했다는 것이다. 이러한 결과를 통해, 종양 특이적 미세환경 활성화 시스템을 활용한 DNA 손상 반응 표적화 전략의 중요성을 확인하고, 약물내성 극복과 암세포의 DNA 손상 반응을 정복함에 있어, 본 발명의 전구약물 M1이 잠재적 도구로 활용될 수 있음을 확인하였다.

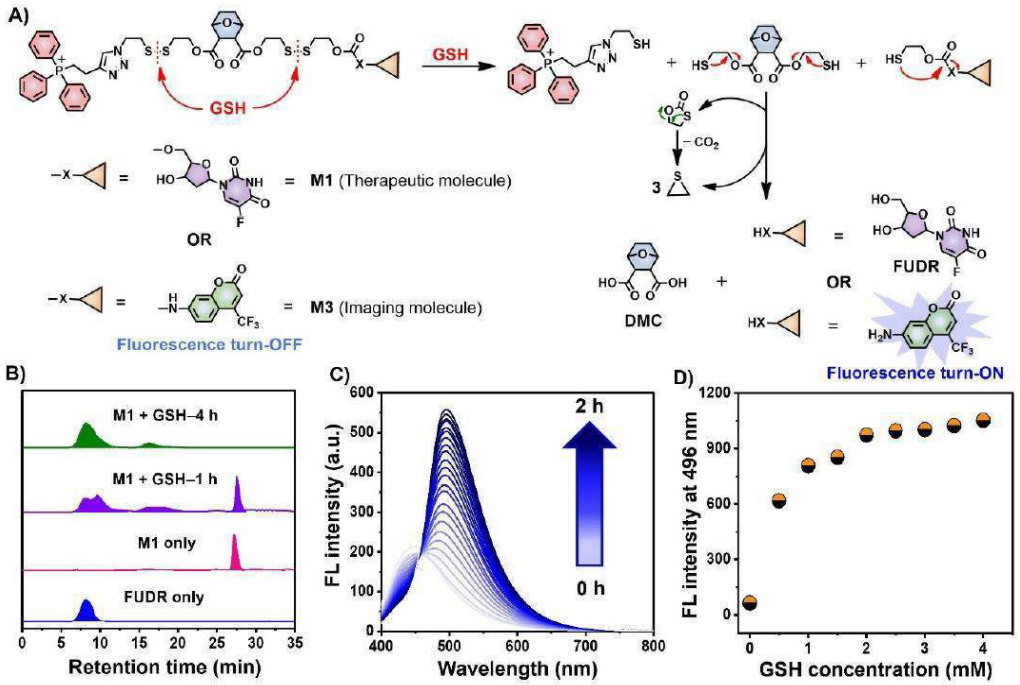
[0168] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

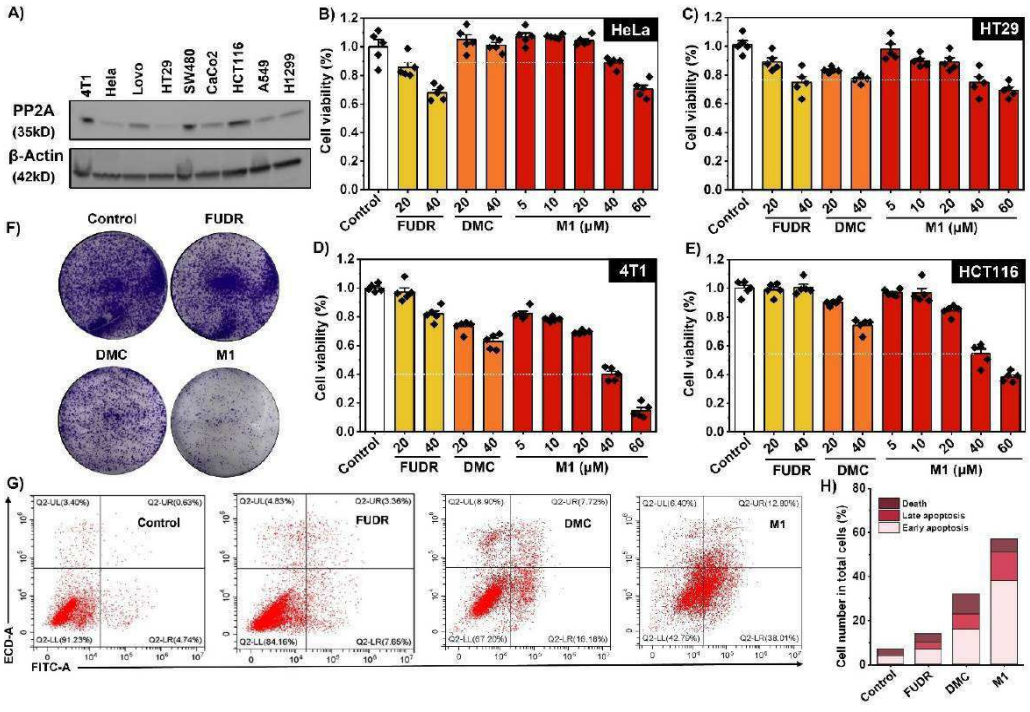
도면1


A)
GSH-sensitive
disulfide linker
DMC
PP2A inhibitor
TPP moiety
Mitochondria-targeting
unit
M1
Floxuridine (FUDR)
Chemotherapeutic agent
Mitochondria-targeting
PP2A inhibitor
(DMC)
DNA damaging
drug (FUDR)
B)
Cell cycle arrest
& DNA repair
Cell survival
Mitochondria-mediated
apoptosis
Apoptosis
Reduced Cell cycle
arrest & DNA repair
CyclinE
CDK2
PP2A
MDM2
p21
p53
DNA damage
Alterations in
complexation

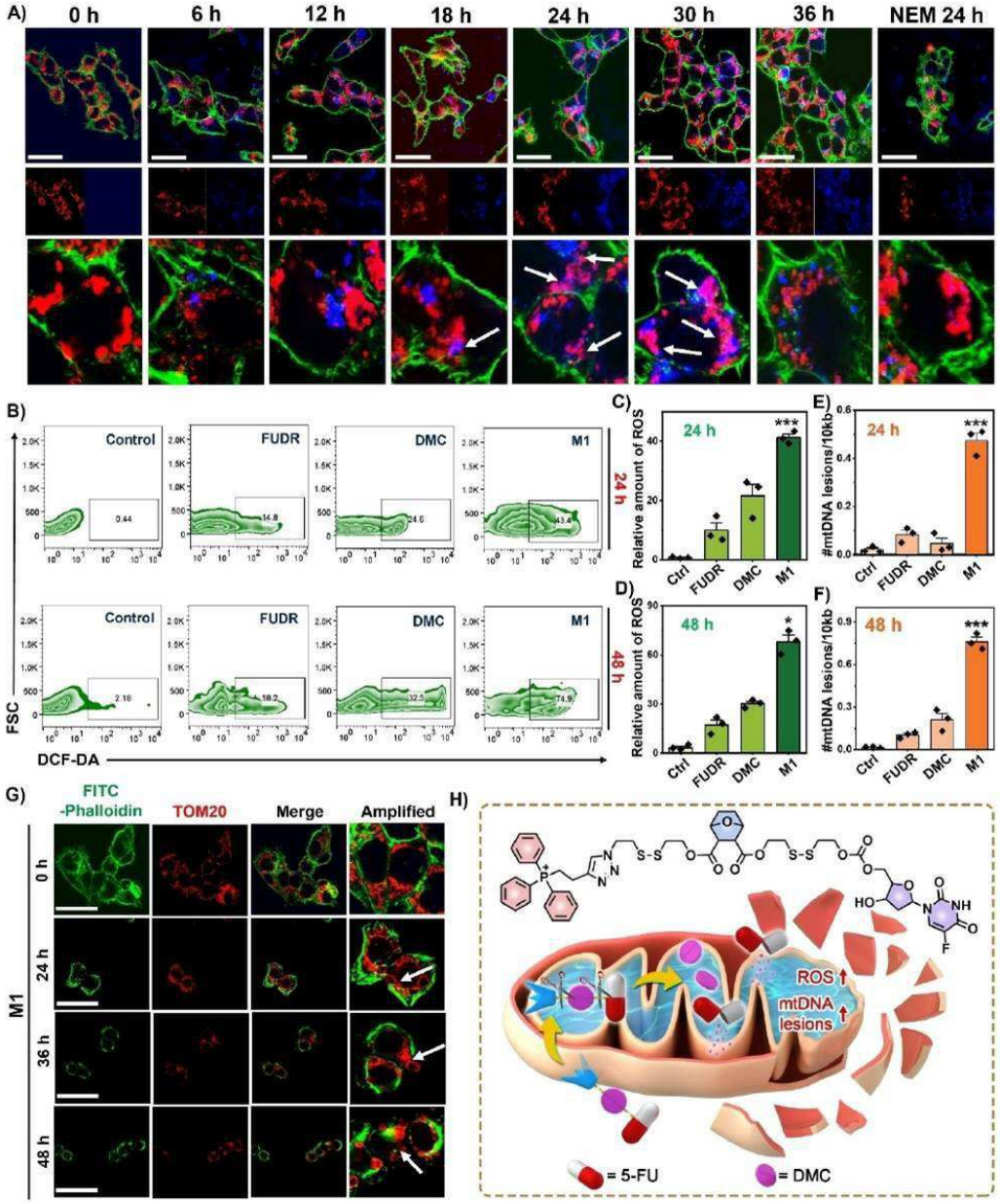
도면2


A)
GSH
GSH
M1 (Therapeutic molecule)
OR
M3 (Imaging molecule)
Fluorescence turn-OFF
DMC
FUDR
OR
Fluorescence turn-ON
B)
M1 + GSH–4 h
M1 + GSH–1 h
M1 only
FUDR only
Retention time (min)
C)
2 h
0 h
FL intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
D)
FL intensity at 496 nm
GSH concentration (mM)

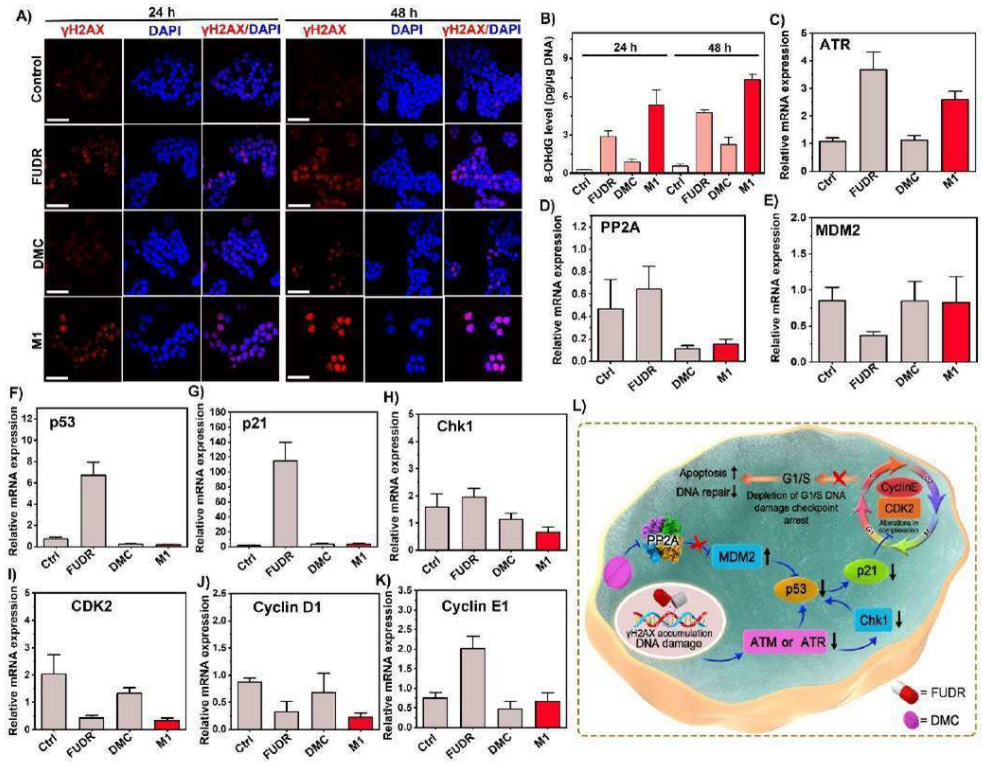
도면3


A)
4T1
Hela
Lovo
HT29
SW480
CaCo2
HCT116
A549
H1299
PP2A (35kD)
β-Actin (42kD)
B)
HeLa
C)
HT29
D)
4T1
E)
HCT116
Cell viability (%)
Control
FUDR
DMC
M1 (μM)
F)
Control
FUDR
DMC
M1
G)
Control
FUDR
DMC
M1
ECD-A
FITC-A
H)
Death
Late apoptosis
Early apoptosis
Cell number in total cells (%)

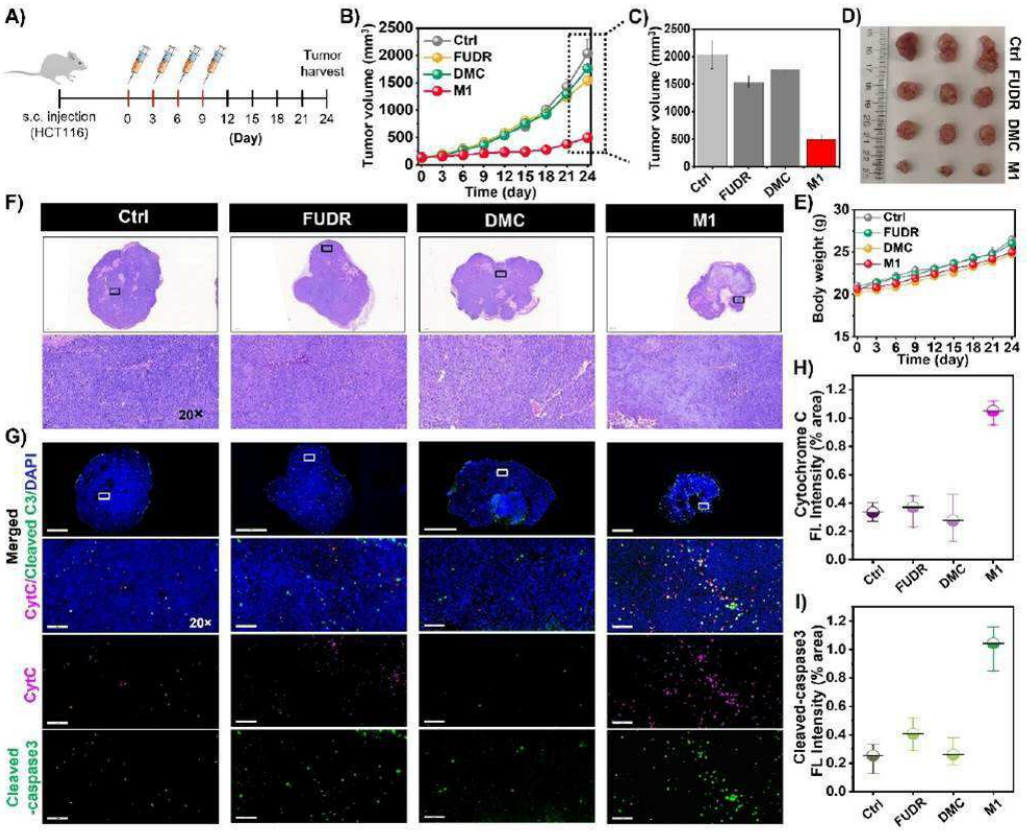
도면4


A)
0 h
6 h
12 h
18 h
24 h
30 h
36 h
NEM 24 h
B)
Control
FUDR
DMC
M1
24 h
48 h
FSC
DCF-DA
C)
24 h
Relative amount of ROS
Ctrl
FUDR
DMC
M1
D)
48 h
E)
#mtDNA lesions/10kb
F)
G)
FITC
-Phalloidin
TOM20
Merge
Amplified
M1
H)
ROS
mtDNA
lesions
= 5-FU
= DMC

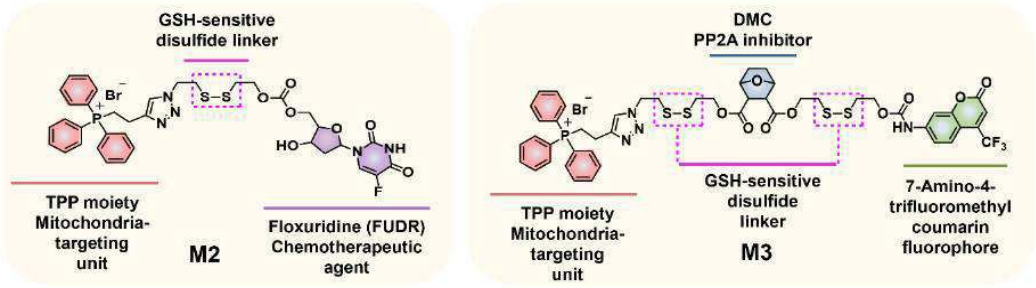
도면5


A)
24 h
48 h
γH2AX
DAPI
γH2AX/DAPI
Control
FUDR
DMC
M1
B)
8-OHdG level (pg/μg DNA)
C)
ATR
D)
PP2A
E)
MDM2
F)
p53
G)
p21
H)
Chk1
I)
CDK2
J)
Cyclin D1
K)
Cyclin E1
Relative mRNA expression
Ctrl
FUDR
DMC
M1
L)
Apoptosis
DNA repair
G1/S
Depletion of G1/S DNA damage checkpoint arrest
CyclinE
CDK2
PP2A
MDM2
p21
p53
Chk1
γH2AX accumulation DNA damage
ATM or ATR
= FUDR
= DMC

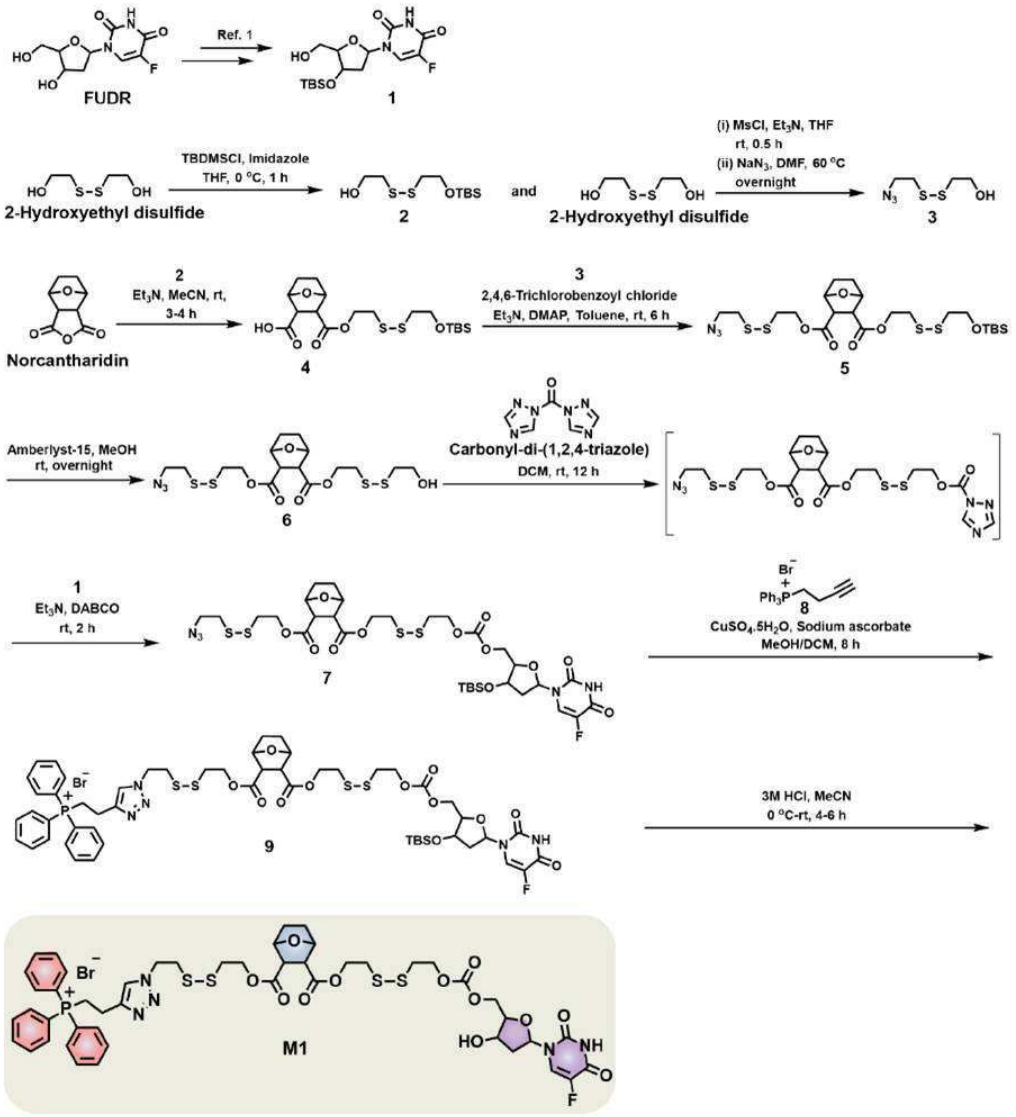
도면6


A)
s.c. injection (HCT116)
Tumor harvest
(Day)
B)
Tumor volume (mm³)
Time (day)
Ctrl
FUDR
DMC
M1
C)
D)
E)
Body weight (g)
F)
20×
G)
Merged
CytC/Cleaved C3/DAPI
CytC
Cleaved -caspase3
H)
Cytochrome C FL Intensity (% area)
I)
Cleaved-caspase3 FL Intensity (% area)

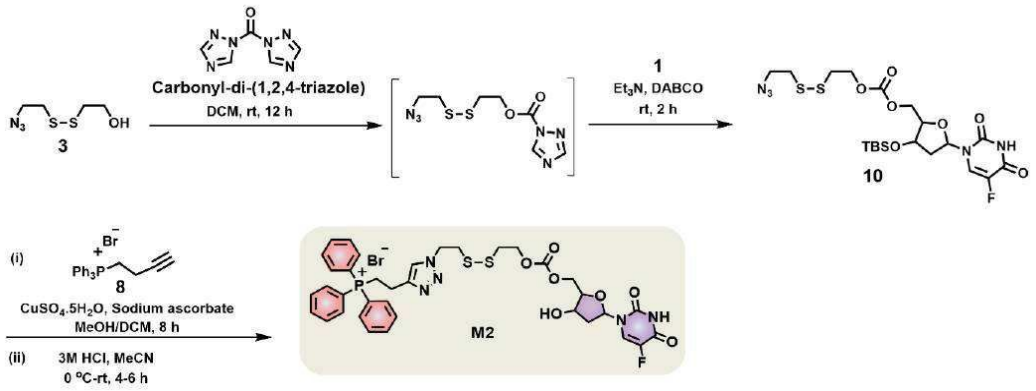
도면7


GSH-sensitive
disulfide linker
TPP moiety
Mitochondria-
targeting
unit
M2
Floxuridine (FUDR)
Chemotherapeutic
agent
DMC
PP2A inhibitor
TPP moiety
Mitochondria-
targeting
unit
GSH-sensitive
disulfide
linker
M3
7-Amino-4-
trifluoromethyl
coumarin
fluorophore

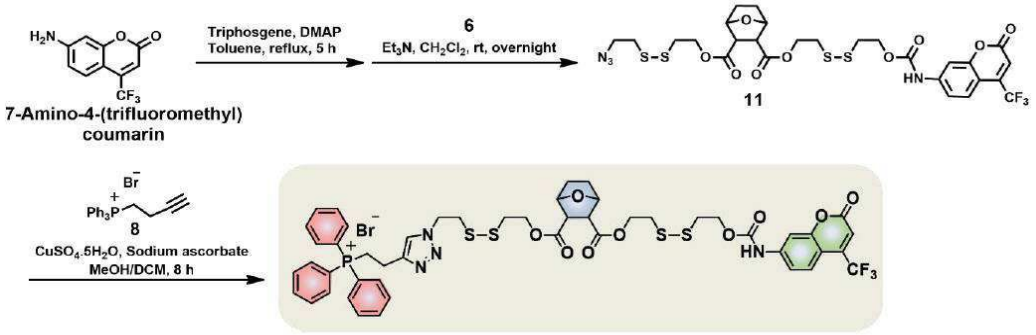
도면8


FUDR
Ref. 1
1
TBDMSCl, Imidazole
THF, 0 °C, 1 h
2-Hydroxyethyl disulfide
2
and
(i) MsCl, Et3N, THF
rt, 0.5 h
(ii) NaN3, DMF, 60 °C
overnight
2-Hydroxyethyl disulfide
3
Norcantharidin
2
Et3N, MeCN, rt,
3-4 h
4
3
2,4,6-Trichlorobenzoyl chloride
Et3N, DMAP, Toluene, rt, 6 h
5
Amberlyst-15, MeOH
rt, overnight
6
Carbonyl-di-(1,2,4-triazole)
DCM, rt, 12 h
1
Et3N, DABCO
rt, 2 h
7
8
CuSO4.5H2O, Sodium ascorbate
MeOH/DCM, 8 h
9
3M HCl, MeCN
0 °C-rt, 4-6 h
M1

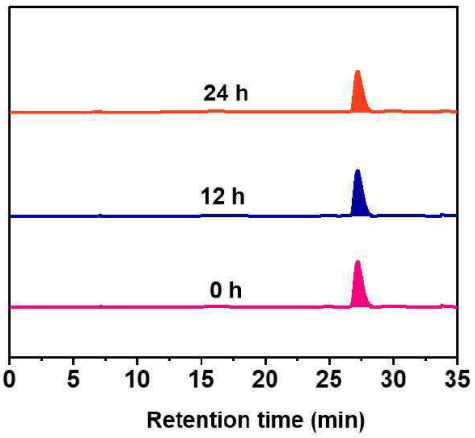
도면9



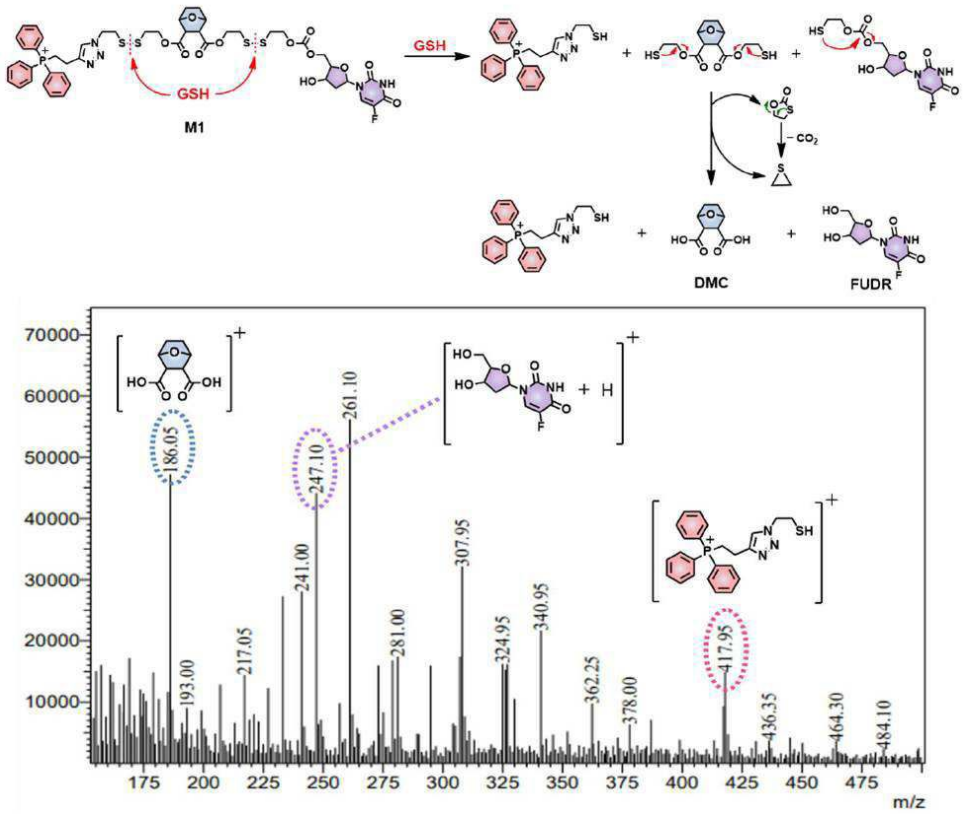
도면10



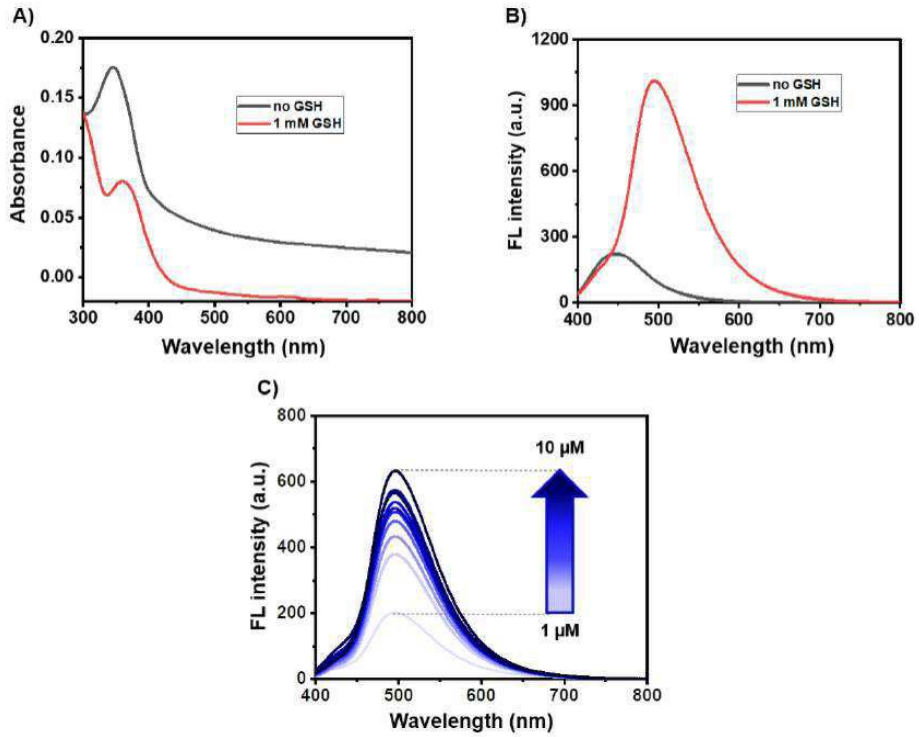
도면11



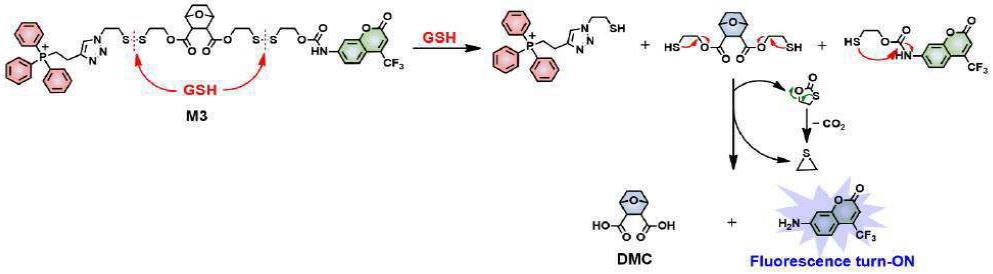
도면12


GSH
M1
GSH
DMC
FUDR
186.05
247.10
261.10
307.95
241.00
340.95
281.00
324.95
217.05
193.00
362.25
378.00
417.95
436.35
464.30
484.10
m/z

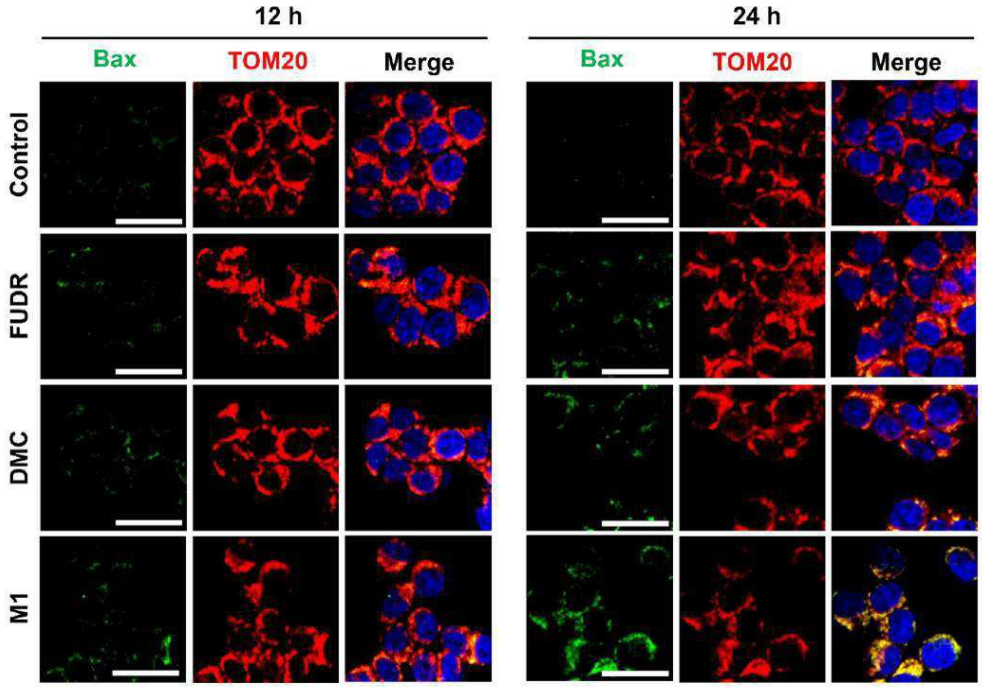
도면13


A)
Absorbance
no GSH
1 mM GSH
Wavelength (nm)
B)
FL intensity (a.u.)
no GSH
1 mM GSH
Wavelength (nm)
C)
FL intensity (a.u.)
10 μM
1 μM
Wavelength (nm)

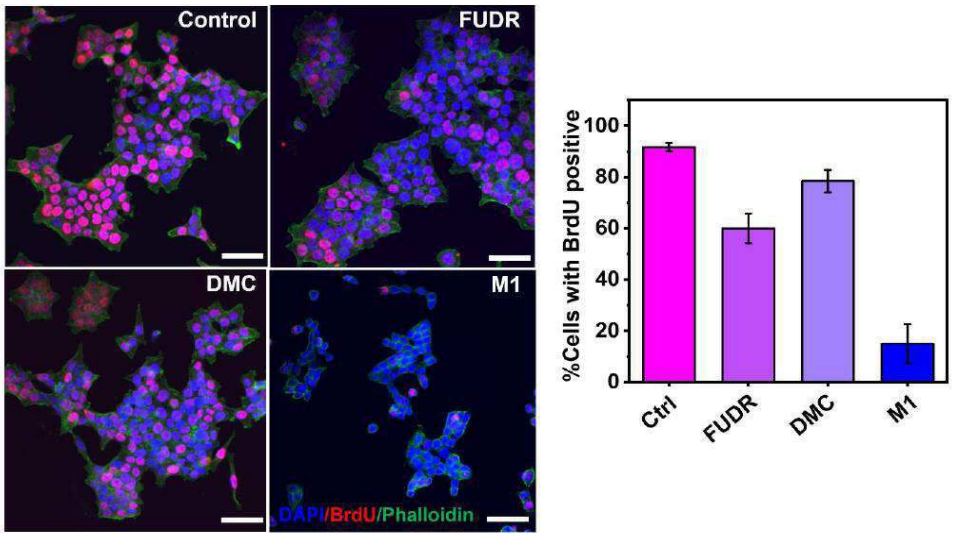
도면14



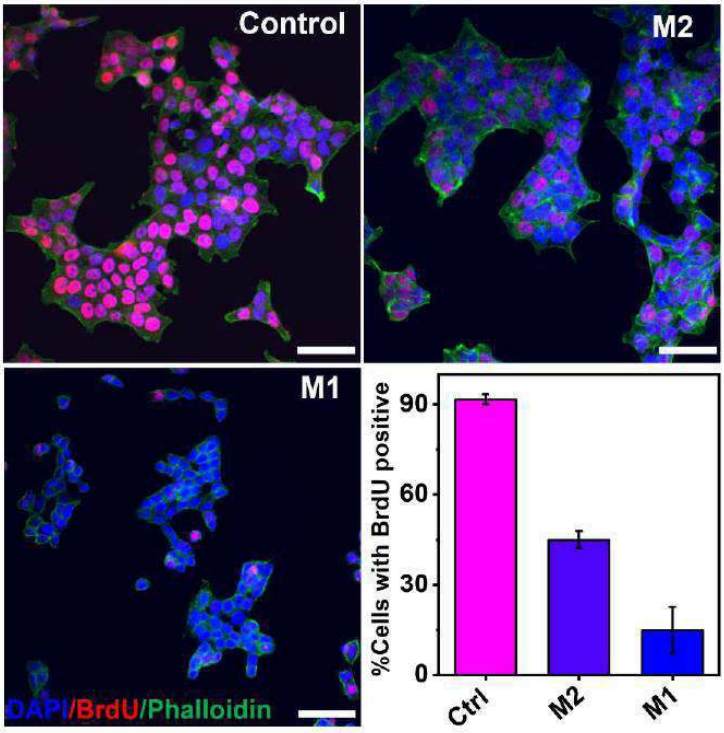
도면15



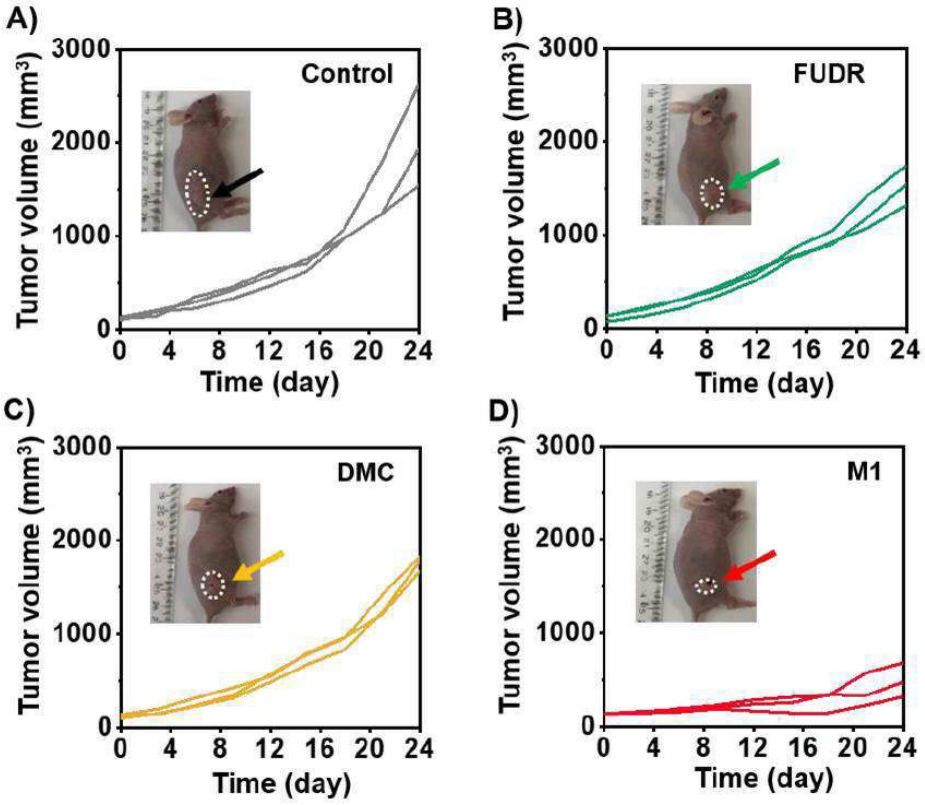
도면16



도면17


Control
M2
M1
DAPI/BrdU/Phalloidin
%Cells with BrdU positive
90
60
30
0
Ctrl
M2
M1

도면18


A)
Control
Tumor volume (mm³)
3000
2000
1000
0
0 4 8 12 16 20 24
Time (day)
B)
FUDR
C)
DMC
D)
M1