(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0041862
(43) 공개일자 2021년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) *A61K 31/37* (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01) *A61K 47/54* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07D 311/16* (2006.01)
C07H 15/26 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A61K 31/37 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0124605
(22) 출원일자 2019년10월08일
심사청구일자 2019년10월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
서울특별시 성북구 안암로 145
비르디 하디브 씽
72 쉥거 애버뉴, 크헤하르타, 암르차르 143001, 펀자브, 인도
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 4 항

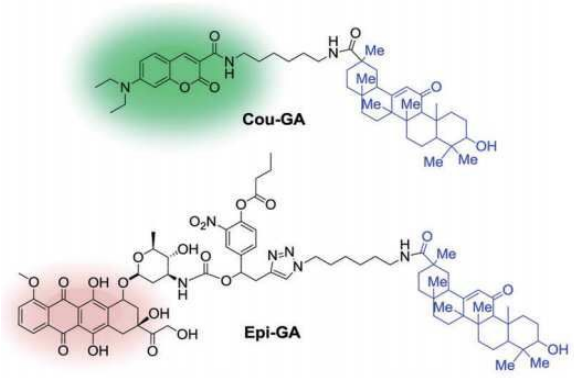
(54) 발명의 명칭 **간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제**

(57) 요 약

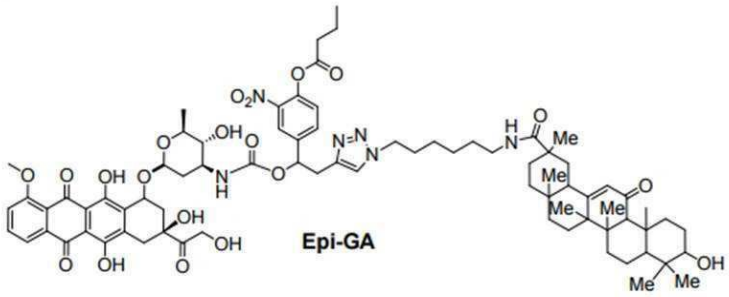
본 발명은 하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제에 관한 것이다:

(뒷면에 계속)

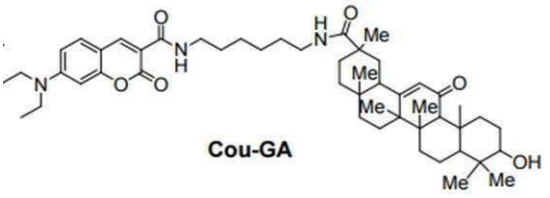
대 표 도 - 도1



[화학식 1]



[화학식 2]



(52) CPC특허분류
A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/542 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07D 311/16 (2013.01)
C07H 15/26 (2013.01)

(72) 발명자
아밋 샤르마
서울특별시 성북구 고려대로 45, 202호
김원영
서울특별시 마포구 손기정로 24, 5층
강철훈
경기도 수원시 장안구 하률로30번길 22, 105동 704호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018R1A3B1052702
부처명 미래창조과학부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명 정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0081566
부처명 미래창조과학부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구
연구과제명 발광센서 재료 연구단
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

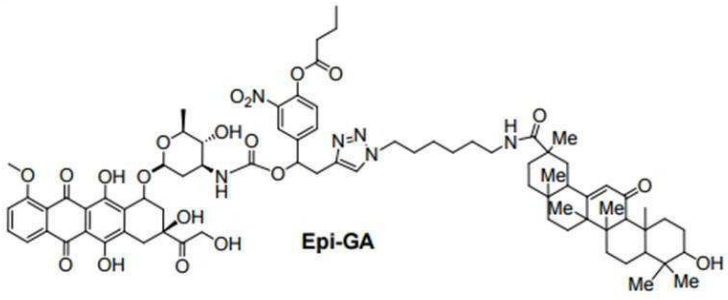
명 세 서

청구범위

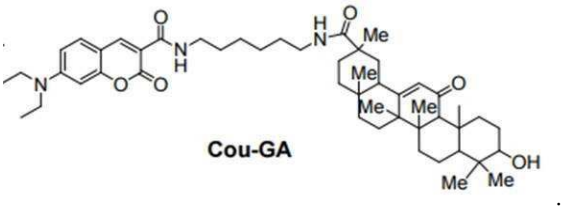
청구항 1

하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 카르복실 에스테라제에 의해 가수분해되어 약물이 방출 및 활성화되는 것을 특징으로 하는 항암 치료진단제.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 약물은 에피루비신(epirubicin, Epi)인 것을 특징으로 하는 항암 치료진단제.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 간세포성 암종은 Chang 간세포 또는 HepG2인 것을 특징으로 하는 항암 치료진단제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간세포성 암종 (Hepatocellular carcinoma, HCC)은 전세계적으로 사망률이 높은 다섯 번째로 흔한 암이자 사망의 두 번째 주요 원인으로 보고되고 있다(비특허문헌 1). 외과적 절제술을 제외하면, 화학 요법이 현재의 주요 치료 옵션이다. 그러나 현재의 화학 요법 치료제는 낮은 수 용해도(aqueous solubility), 높은 전신 독성 및 비

특이성과 같은 결점 및 정상 조직에 대한 부작용이 문제된다(비특허문헌 2). 따라서, 약물의 표적 외 효과를 극복하고 치료 효능을 향상시킬 수 있는 새로운 표적 약물 전달 시스템(drug delivery systems, DDSs)의 개발이 요구되고 있다.

[0003] 지난 10년 동안, 표적 약물 전달 시스템은 특히 약물을 특정 조직 또는 기관으로 효율적으로 운반할 수있는 적합한 활성 표적 리간드의 도입을 통해 치료제의 성능을 향상시켜왔다. HCC의 경우, 특히, 갈락토스(galactose)는 간암에서 과발현되는 asialoglycoprotein receptor (ASGP-R)에 의해 쉽게 인식될 수 있기 때문에, 활성 간세포 표적화 리간드로서 광범위하게 조사되어왔다(비특허문헌 3). 그러나, 간경변과 같은 특정 병리적 조건하에서는 ASGP-R의 전반적인 결합 능력이 혈청 내의 억제제에 의해 현저하게 억제되어 그 효능이 저하될 수 있다(비특허문헌 4). 또한 Kim 등에 따르면(비특허문헌 5), ASGP-Rs는 결장암과 같은 다른 유형의 암에서도 과발현되는 것으로 나타났다. 따라서, HCC 표적화를 위한 보다 효율적인 표적 리간드의 개발이 요구된다.

[0004] 18β-글리시레틴산 (GA)은 30년 넘게 많은 아시아 국가들이 간 관련 질병 치료에 활용해온 우수한 약리학적 특성을 가지고 있다(비특허문헌 6). 흥미롭게도 Negishi 등의 보고서(비특허문헌 7)는 쥐 간세포의 표면이 단백질 키나아제 c (protein kinase c, PKC)α와 관련된 GA-결합 능력을 가지고 있음을 보여주었다. 이와 관련하여, 정상 세포에서 보다 간암 세포에서의 PKC의 과발현은 이를 HCC에 대한 효율적인 표적 리간드로서 이용할 가능성을 높여준다(비특허문헌 8). 지금까지, HCC 표적 약물 전달 응용을 위해 GA를 이용한 다양한 나노 물질이 연구되어왔다(비특허문헌 9). 그러나 상기 나노 물질들은 많은 이점에도 불구하고, 낮은 안정성, 구조적 복잡성, 입자 크기 제어의 어려움, 비특이적 세포 흡수 등의 여러 문제점이 존재한다(비특허문헌 10).

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) J. Bruix, K. H. Han, G. Gores, J. M. Llovet and V. Mazzaferro, J. Hepatol., 2015, 62, S144-S156.

(비특허문헌 0002) O. C. Farokhzad and R. Langer, ACS Nano, 2009, 3, 16-20.

(비특허문헌 0003) S. Dongbang, H. M. Jeon, M. H. Lee, W. S. Shin, J. K. Kwon, C. Kang and J. S. Kim, RSC Adv., 2014, 4, 18744-18748.

(비특허문헌 0004) R. J. Stockert and A. G. Morell, Hepatology, 1983, 3, 750-757.

(비특허문헌 0005) A. Sharma, E. J. Kim, H. Shi, J. Y. Lee, B. G. Chung and J. S. Kim, Biomaterials, 2018, 155, 145-151.

(비특허문헌 0006) M. P. Manns, H. Wedemeyer, A. Singer, N. Khomutjanskaja, H. P. Dienes, T. Roskams, R. Goldin, U. Hehnke and H. Inoue, J. Viral Hepatitis, 2012, 19, 537-546.

(비특허문헌 0007) M. Negishi, A. Irie, N. Nagata and A. Ichikawa, Biochim. Biophys. Acta, 1991, 1066, 77-82.

(비특허문헌 0008) Z. Y. He, X. Zheng, X. H. Wu, X. R. Song, G. He, W. F. Wu, S. Yu, S. J. Mao and Y. Q. Wei, Int. J. Pharm., 2010, 397, 147-154.

(비특허문헌 0009) G. Chen, J. Li, Y. Cai, J. Zhan, J. Gao, M. Song, Y. Shi and Z. Yang, Sci. Rep., 2017, 7, 44210.

(비특허문헌 0010) Y. X. J. Wang and J. M. Idee, Nanoscale, 2015, 7, 16146-16150.

발명의 내용

해결하려는 과제

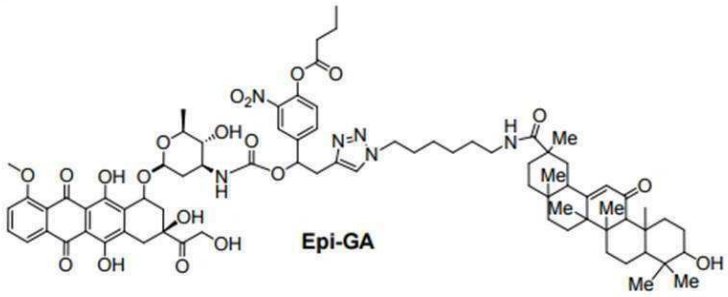
[0006] 본 발명에서는 간세포성 암종을 특이적으로 표적화하여, 진단 및 종양 부위로의 전구약물 전달이 가능한 항암 치료진단제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

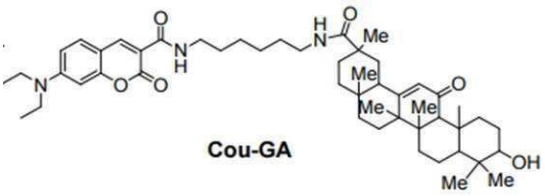
[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0008] 하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 간세포성 암종 특이적 항암 치료진단제를 제공한다:

[0009] [화학식 1]

[0010] 

[0012] [화학식 2]

[0013] 

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 카르복실 에스테라제에 의해 가수분해되어 약물이 방출 및 활성화되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0015] 이때, 상기 약물은 에피루비신(epirubicin, Epi)일 수 있다.

[0016] 본 발명에 따르면, 상기 간세포성 암종은 Chang 간세포 또는 HepG2일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, 간세포성 암종 표면에 특이적으로 발현되어 있는 단백질 키나아제 C의 리간드인 글리시레틴산(glycyrrhetinic acid, GA)을 이용하여 간세포성 암종(hepatocellular carcinoma, HCC)의 선택적인 진단과 치료를 동시에 할 수 있는 소분자 기반의 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 글리시레틴산을 도입한 약물 전구체는 간세포성 암종에 효과적으로 축적될 뿐만 아니라 암세포 내에서 활성화되어 우수한 치료효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 전구 약물 Epi-GA 및 Cou-GA의 화학 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 서로 다른 시간 간격 동안 5 μM Cou-GA와 함께 배양된 간암 세포 (HepG2 및 Chang 간 세포)의 형광 현미경 이미지를 나타낸 것이다. 여기 및 방출 파장은 각각 410, 455 nm이었다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=3).

도 3의 (a)는 PBS에서(pH 7.4, 37 ℃)에서 카르복실 에스테라제 (5 U/3 mL)와 함께 배양할 때 관찰된 Epi-GA (5.0 μM)의 형광 반응 결과를, (b)는 558 nm에서 상이한 시간에 대해 기록된 시간 의존적 형광 변화를 나타낸다. 형광 변화는 free Epi 방출과 직접적으로 관련이 있다. 여기 파장(λ_{ex})는 495 nm였다.

도 4는 37 ℃에서 24시간 동안 (a) Epi-GA 및 (b) free Epi로 처리된 상이한 암 세포주 (HepG2, Chang 간, A549, MCF7, HeLa 및 HCT116 세포)에서의 세포 생존율의 비교한 MTT 분석 결과를 나타낸다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=5)(* $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$).

도 5는 Epi-GA 및 약물 Epi에 의해 유도된 세포 아폽토시스/네크로시스(apoptosis/necrosis)를 나타낸다. (a)는 Epi-GA, 및 free 에피루비신 (Epi) (각 5 μM)과 함께 배양된 HepG2의 형광 현미경 이미지이다(아폽토시스 마커인 Annexin V (5 μM) 및 PI (1 μM)로 염색). Annexin V 및 PI stain에 각각 상응하는 녹색 및 적색 신호는 Epi-GA의 존재하에서 관찰되었으며, 이는 Epi-GA에 의한 상당한 세포 아폽토시스/네크로시스 효과를 나타낸다. (b)와 (c)는 Epi-GA 및 free Epi에 의한 apoptotic/necrotic 세포(HepG2, HeLa, A549)의 정량적 평가 결과를 나타낸다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n=5)(* $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$).

도 6은 HepG2 접종 이종 이식 모델에서의 Epi-GA의 항종양 효과를 나타낸다. (a) HepG2 세포를 athymic nu/nu 마우스에 주사하고, Epi 및 Epi-GA(arrowhead) 투여 전 6일 동안 성장시켰다. Epi 및 Epi-GA를 28일 동안 매 3일 마다 투여하였다(vehicle (PBS), 1 mg Epi and Epi-GA per kg body weight per injection). 종양 크기는 부피로 표시된다(n = 7 mice per group, * $P < 0.05$ 및 and **$P < 0.005$). (b) 28일 후, HepG2-driven 종양 조직을 제거한 후, 무게를 재고 사진을 찍었다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n > 5 mice per group, * $P < 0.05$ 및 and **$P < 0.005$).

도 7은 PBS(pH 7.4, 37 ℃)에서 Cou-GA (5 μM)의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 8은 PBS(pH 7.4, 37 ℃)에서 Cou-GA (5 μM)의 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다(여기 파장 λ_{ex}는 415 nm).

도 9는 카르복시 에스테라아제(5 U/3 mL)의 존재하에서 Epi-GA (5 μM)의 흡수 스펙트럼 변화를 나타낸 것이다. 스펙트럼은 PBS(pH 7.4, 37 ℃)에서 기록하였다.

도 10은 다양한 분석물들의 존재하에서 카르복실 에스테라제에 대한 Epi-GA의 선택적 반응을 나타낸 막대그래프이다: (1) carboxylesterase, (2) L-ascorbic acid, (3) L-Glutamic acid, (4) NADH, (5)Pepsin, (6) cysteine (7) Homo-cysteine (8) L-Glutathione, (9) H_2O_2, (10) hypochlorite ion (OCl^-). 모든 스펙트럼은 PBS(pH 7.4, 37 ℃)에서 기록하였다(여기 파장 λ_{ex}는 495 nm).

도 11은 카르복실 에스테라제(CE)에 의해 유발되는 약물 활성화 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 12는 PBS(pH 7.4, 37 ℃)에서 카르복실 에스테라제 및 free 에피루비신 (Epi, 5 μM)의 존재 및 부재 하에서 Epi-GA (5 μM)의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다(여기 파장 λ_{ex}는 495 nm).

도 13은 Cou-GA의 세포 선택적 흡수를 나타낸 것으로 (a)는 37 ℃에서 상이한 시간 간격 동안 5 μM의 Cou-GA와 함께 배양된 다양한 세포주의 공초점 현미경 이미지이고, (b)는 각 세포주에서 측정된 상응하는 평균 형광 강도를 나타낸 것이다. 여기 파장은 410 nm이고 방출은 455 nm에서 수집되었다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n = 3).

도 14는 Cou-GA의 세포 흡수 거동에 대한 free GA의 영향을 나타낸 것으로, (a) 내지 (d)는 5 μM Cou-GA와 함께 배양시 상이한 농도의 free GA (0, 0.1, 0.2 및 0.3 mM)로 전처리된 HepG2 세포의 형광 현미경 이미지이고, (e)는 서로 다른 세포주(HepG2, HeLa, MCF7, A549)에서 측정된 Cou-GA의 상응하는 평균 형광 강도를 나타낸다. 기 파장은 410 nm이고 방출은 455 nm에서 수집되었다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n = 5).

도 15는 Cou-GA의 세포 흡수 거동에 대한 free GA의 영향을 나타낸 것으로, (a)는 5 μM Cou-GA와 함께 배양시 상이한 농도의 free GA (0, 0.1, 0.2 및 0.3 mM)로 전처리 된 세포주 (HepG2, HeLa, MCF-7, A549)의 형광 현미경 이미지이고, (b)는 HepG2 세포를 포함한 다른 세포주에서 측정된 Cou-GA의 상응하는 평균 형광 강도를 나타낸다. 여기 파장은 410 nm이고 방출은 455 nm에서 수집되었다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n = 9)(*$P < 0.05$ 및 **$P < 0.01$).

도 16의 (a)는 37 ℃에서 48 시간 동안 GA (0, 10, 50, 100, 200 μM)로 처리 된 암 세포주 (HepG2, Chang liver, A549, MCF7, HeLa 및 HCT116 세포)의 세포 생존율을 비교한 MTT 분석 결과이다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n = 6). (b)는 37 ℃에서 48시간 동안 free GA (다양한 농도) 및 Epi-GA (2 μM)로 처리된 암 세포주 (HepG2, Chang liver, A549, MCF7, HeLa 및 HCT116 세포)의 세포 생존율을 비교한 MTT 분석 결과이다. 데이터는 평균±S.D로 표시된다(n = 6).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] [실시예]

[0020] 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.

[0022] **실험 방법**

[0023] 재료, 방법 및 기기장치

[0024] 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 크로마토그래피는 60 실리카 겔을 사용하여 수행하였다. ^{1}H 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 Epi-GA 및 Cou-GA (각각, 5mM)의 스톡 용액을 제조하였다. 용액 연구를 위해, 각 스톡 용액을 10% DMSO를 함유하는 PBS(pH 7.4, 37 ℃ 용액으로 희석하여 최종 작업 용액을 5 μM의 농도로 만들었다. 용액의 총 부피는 3.0 ml로 고정되었다. 모든 실험에서 여기 파장은 494 nm (Epi-GA) 및 414nm (Cu-GA) 였고, 여기 및 방출 슬릿 폭은 5 nm이었다. 약물 방출을 모니터링하기 위해, 먼저 Epi-GA (5 μM)의 작업 용액을 37 ℃에서 서로 다른 시간 간격으로 에스테라제 (10 units)와 함께 인큐베이션 시키고, 해당 형광 스펙트럼을 기록하였다.

[0026] 세포 배양 및 공초점 현미경 이미징

[0027] 인간 결장 선암 HCT-116, Chang 간세포 및 인간 자궁경부암종 HeLa 세포주를 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Gibco)에서 배양하고, 인간 간세포 암종 HepG2, 인간 유방암종 MCF7 및 인간 폐암종 A549 세포를 RPMI 1640 배지 (Gibco, CA, USA)에서 배양하였다. 두 배지 모두 10% 소 태아혈청 (FBS, Gibco) 및 1% 페니실린/스트렙토 마이신 (Gibco)을 포함한다. 세포들은 37 ℃에서 가습 및 5% CO_2 분위기에서 배양하였다.

[0028] 공초점 현미경 이미지화를 위해, 먼저, 세포를 Coverglass Bottom Dish (SPL Lifesciences Co., Ltd.)에 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 세포를 12시간 동안 프로브(Epi-GA 또는 Cou-GA)를 함유하는 배양 배지로 교체하고, annexin V (5 μL) 및 propidium iodide (1 μM)를 15분 동안 처리한 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Zeiss LSM 510, Zeiss, Oberko, Germany)을 사용하여 공초점 이미지를 수득하였다. Zen 이미징 소프트웨어 (ZEISS, Oberko, Germany)를 사용하여 이미지를 분석하였다.

[0030] 형광 이미징

[0031] 다양한 세포주를 35 mm 유리 바닥 접시에 도말하고, 프로브를 세포 배양액에 5 μM의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 37 ℃5 % CO_2 에서 배양하였다. 이미지를 촬영하기 전에, 세포를 PBS로 세척하였다. 형광 현미경 (Neo Science Co., Ltd., Suwon, Korea)은 400-410 nm에서 여기시켰다(long pass emission 455 nm filter). Zen 이미징 소프트웨어 (ZEISS, Oberko, Germany)를 사용하여 형광 이미지를 분석하였다.

[0033] MTT 분석

[0034] 세포 생존력에 대한 Epi-GA 및 에피루비신(epirubicin)의 효과를 측정하기 위해, MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 세포독성 분석을 수행하였다. 먼저, 0.5 $\times 10^4$ 의 HepG2 세포, Chang 간 세포, A549 세포, MCF7 세포, HeLa 세포 및 HCT116 세포를 96-웰 플레이트에 분주하고, 다양한 농도의 Epi-GA 및 에피루비신으로 48시간 동안 처리하였다. 세포를 50분 동안 0.5 mg/mL MTT를 함유하는 100 μL 배지로 교체하였다. 570 nm에서의 흡광도를 VICTOR ™X3 ELISA Multilable Plate Reader (PerkinElmer Inc, Waltham, USA)를 사용하여 측정하였다.

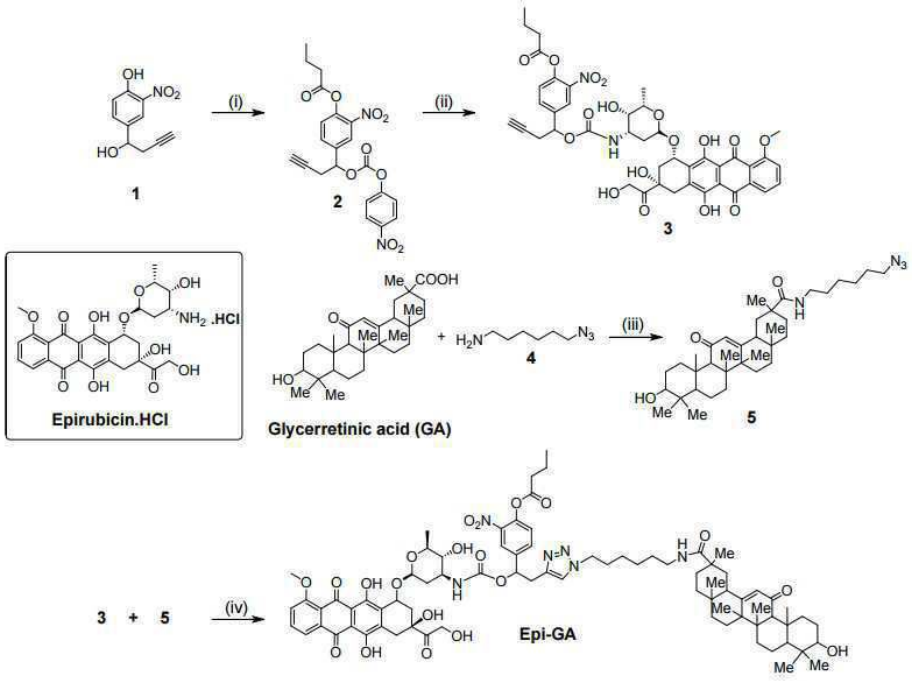
[0036] 동물 연구

[0037] 모든 동물 실험은 울산대학교 의과대학 동물 관리위원회(IACUC)의 승인을 동물 보호법에 따라 수행하였다. 종양 이종 이식 모델의 경우, 마우스를 이소플루란 가스 (N_2O:O_2/70%:30%)의 흡입에 의해 마취시킨 후, PBS에서 50% Matrigel (BD Bioscience) 용액에 현탁 된 HepG2 세포 (1×10^6 세포)를 피하 주사하였다. 종양을 확립하고, 마우스를 무작위 배정하였다. 세포 주사 6일 후에 PBS (vehicle) 에피 루비신 (Epi) 및 GA-접합된 에피루비신 (Epi-GA) 화합물을 3일마다 반복적으로 복강 내 투여하였다. 종양의 직경을 캘리퍼로 측정하였으며, 종양의 부피는 $V = axb^2/2$에 따라 계산하였다(이때, a, b는 각각 더 길고 짧은 표면 직경을 나타냄).

[0039] **화합물 합성**

[0040] 하기 합성 경로 1에 따라 본 발명에 따른 [화학식 1](Epi-GA로 표시)의 화합물을 합성하였고, 하기 합성 경로 2에 따라, 본 발명에 따른 [화학식 2](Cou-GA로 표시)의 화합물을 합성하였다.

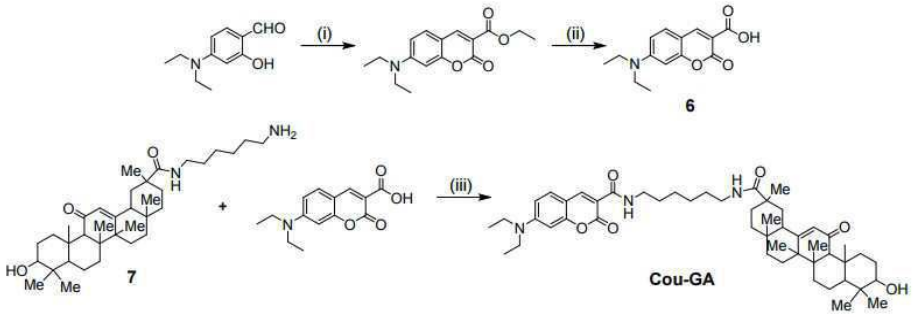
[0041] [합성 경로 1]



[0042]

[0043] (i) Butyryl chloride, Et_3N, THF, RT, (ii) (a) p-Nitrochloroformate, Et_3N, THF, r.t.; (b) Epirubicin.HCl, Et_3N, DMF, RT, (iii) EDC, HOBt, DMAP, DMF, RT, (iv) Sodium ascorbate, $CuSO_4.5H_2O$, DMF, RT.

[0045] [합성 경로 2]



[0046]

[0047] (i) Diethyl malonate, piperidine, EtOH, reflux, (ii) NaOH, EtOH, RT, (iii) EDC, HOBt, DMAP, DMF, RT.

[0049] 화합물 1, 4, 6, 7의 합성

[0050] 종래 문헌에 보고된 절차에 따라 화합물 1(T. Legigan, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. L. Pape, S. Lerondel, and S. Papot, Angew. Chem., Int. Ed., 2012, 51, 11606-11610), 화합물 4(A. Junker, R. Balasubramanian, A. Ciancetta, E. Uliassi, E. Kiselev, C. Martiriggiano, K. Trujillo, G. Mtchedlidze, L. Birdwell, K. A. Brown, T. K. Harden, and K. A. Jacobson, J. Med. Chem., 2016, 59, 6149-6168), 화합물 6(Y. Ma, W. Luo, P. J. Quinn, Z. Liu and R. C. Hider, J. Med. Chem. 2004, 47, 6349-6362), 화합물 7(R. Cha, T. Du, J. Li and Z. Yuan, Polym. Int., 2006, 55, 1057-1062)을 합성하였다.

[0052] 화합물 2의 합성

[0053] 무수 DCM (10 ml) 중 화합물 1 (1.0 g, 4.83 mmol) 및 Et_3N (0.61 g, 6.03 mmol)의 차가운 혼합물에 부티릴 클로라이드 (0.64 g, 6.03 mmol)를 연속 교반하면서 적가하였다. 1 시간 후, 혼합물을 냉수로 켄칭하였다. DCM 층을 분리하고, 염수로 세척하고, Na_2SO_4상에서 건조시키고, 최종적으로 농축시켜 미정제물을 수득한 후, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 2(70% 수율)를 수득하였다.

[0054] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.14 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.95 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 2.68-2.61 (m, 4H), 2.12 (s, 1H), 1.85-1.76 (m, 2H), 1.05 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ171.54, 143.74, 141.67, 132.14, 125.50, 123.43, 79.53, 72.34, 70.97, 36.06, 29.67, 18.22, 13.84.

[0056] 화합물 5의 합성

[0057] 15 ml DMF 중 글리시레틴산 (GA) (0.5 g, 1.06 mmol), EDCI (0.25 g, 1.32 mmol), HOBt (0.18 g, 1.32 mmol) 및 DMAP (0.16 g, 1.32 mmol)의 혼합물을 질소 분위기 및 실온(RT)에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 아민 유도체 화합물 5 (0.19 g, 1.32 mmol)를 첨가하고 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 DMF를 증발시켜 미정제물을 얻은 후, 60% EtOAc/헥산을 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 5(65% 수율)를 수득하였다.

[0058] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 5.66 (s, 1H), 5.59 (t, J = 10.0 Hz, 1H), 3.32-3.23 (m, 5H), 2.83-2.79 (m, 1H), 2.35 (s, 1H), 2.19-2.15 (m, 1H), 2.09-2.03 (m, 1H), 1.95 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 1.88-1.82 (m, 1H), 1.75 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 1.67-1.64 (m, 3H), 1.61-1.59 (m, 5H), 1.57-1.51 (m, 2H), 1.44-1.35 (m, 10H), 1.30-1.26 (m, 2H), 1.23-1.20 (m, 1H), 1.15-1.14 (m, 9H), 1.02 (s, 5H), 0.82 (d, J = 5.0 Hz, 6H), 0.71 (d, J = 15 Hz, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ 200.13, 175.67, 169.40, 128.36, 78.64, 61.81, 54.94, 51.31, 48.21, 45.36, 43.53, 43.22, 41.78, 39.29, 39.18, 39.14, 37.48, 37.05, 32.74, 31.88,

31.45, 29.68, 29.38, 28.72, 28.51, 28.12, 27.22, 26.47, 26.45, 26.37, 26.35, 23.33, 18.66, 17.46, 16.33, 15.61. MS (ESI): m/z calcd. for $C_{36}H_{58}N_4O_3$: 594 Found:593 $[M-1]^+$.

[0060] Cou-GA의 합성

[0061] 15 ml DMF 중 화합물 6 (0.5 g, 1.91 mmol), EDCI (0.45 g, 2.39 mmol), HOBt (0.32 g, 2.39 mmol) 및 DMAP (0.29 g, 2.39 mmol)의 혼합물을 질소 분위기 및 실온(RT)에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 아민 유도체 화합물 7 (1.35 g, 2.39 mmol)을 첨가하고 밤새 교반하였다. 반응 완료 후 DMF를 증발시켜 미정제물을 얻은 후, 5% MeOH/DCM을 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 Cou-GA(68% 수율)를 수득하였다.

[0062] ^1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 8.81 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.44 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.65 (dd, J = 5.0 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.74 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 5.68 (s, 1H), 3.51-3.43 (m, 7H), 3.29-3.25 (m, 3H), 2.82-2.78 (m, 1H), 2.34 (s, 1H), 2.21-2.18 (m, 1H), 2.09-2.04 (m, 1H), 1.94 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 1.88-1.78 (m, 2H), 1.72 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 1.68-1.59 (m, 8H), 1.56-1.51 (m, 2H), 1.44-1.38 (m, 11H), 1.27-1.21 (m, 9H), 1.15-1.14 (m, 8H), 1.02 (s, 4H), 0.82 (d, J = 10.0 Hz, 6H), 0.71 (d, J = 10.0Hz, 1H); ^{13}C NMR (CDC13, 125 MHz) δ 200.09, 175.60, 169.25, 163.11, 162.81, 157.58, 152.46, 148.01, 131.10, 128.51, 110.37, 109.92, 108.38, 96.53, 78.75, 61.80, 54.93, 48.06, 45.33, 45.07, 43.54, 43.20, 41.82, 39.32, 39.27, 39.14, 37.51, 37.07, 32.76, 31.90, 31.55, 29.71, 29.64, 29.50, 28.54, 28.11, 27.29, 26.46, 26.45, 26.42, 23.38, 18.68, 17.48, 16.37, 15.60, 12.43; MS (ESI): m/z calcd. for $C_{50}H_{73}N_3O_6$: 812 Found: 812 $[M]^+$

[0064] 화합물 3의 합성

[0065] 10 ml 건조 DCM 중 화합물 2 (0.2 g, 0.72 mmol) 및 Et_3N (0.086 g, 0.86 mmol)의 차가운 혼합물에 5 ml 건조 DCM 중 4- 니트로페닐 클로로포메이트 (0.17 g, 0.86 mmol)의 용액을 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 질소하에 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 0.5 N $NaHCO_3$로 세척한 다음 염수로 세척하였다. DCM 층을 분리하고, Na_2SO_4상에서 건조시키고, 최종적으로 농축시켜 미정제물을 얻었다. 상기 미정제물을 5ml 무수 DMF에 용해시키고 약물 에피루비신 하이드로 클로라이드 (0.41mg, 0.72mmol)를 첨가한 후 과량의 Et_3N (0.5ml)을 첨가하였다. 반응이 완료 될 때까지 혼합물을 실온에서 교반하였다. 용매를 감압 하에서 증발시켜 미정제물을 얻은 후 5% MeOH/DCM을 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 3(58% 수율)을 수득하였다.

[0066] ^1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 8.11-8.07 (m, 1H), 8.03-8.00 (m, 1H), 7.81-7.77 (m, 1H), 7.63-7.54 (m, 1H), 7.42-7.39 (m, 1H), 7.21-7.08 (m, 1H), 5.78-5.67 (m, 1H), 5.48 (br s, 1H), 5.27 (br s, 1H), 5.03-4.98 (m, 1H), 4.77 (br s, 2H), 4.58-4.54 (m, 1H), 4.10 (s, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.84-3.80 (m, 1H), 3.67 (br s, 1H), 3.37 (br s, 1H), 3.26-3.12 (m, 2H), 3.07 (br s, 1H), 2.97-2.92 (m, 1H), 1.27-2.70 (m, 2H), 2.64-2.57 (m, 2H), 2.37 (d, J = 15 Hz, 1H), 2.19-2.16 (m, 2H), 2.10-2.06 (m, 1H), 2.00-1.97 (m, 1H), 1.82-1.74 (m, 3H), 1.72-1.66 (m, 1H), 1.37-1.34 (m, 3H), 1.27 (br s, 1H), 1.07-1.01 (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ 213.78, 186.63, 128.25, 171.125, 160.88, 156.08, 155.33, 154.70, 143.75, 141.46, 138.06, 135.77, 135.13, 133.69, 133.58, 133.17, 132.89, 127.78, 125.18, 123.74, 122.95, 120.45, 120.04, 119.71, 118.49, 111.27, 111.12, 100.04, 78.38, 72.71, 72.10, 71.85, 70.04, 69.60, 65.44, 56.60, 56.59, 50.52, 35.75, 33.65, 26.27, 17.93, 17.74, 13.59; MS (ESI): m/z calcd. for $C_{42}H_{42}N_2O_{17}$: 846 Found: 869 $[M+23]^+$.

[0068] Epi-GA의 합성

[0069] 5ml DMF 중 화합물 3 (0.10g, 0.12mmol), 화합물 5 (0.08g, 0.13mmol) 및 아스코르베이트 나트륨 (10 mol%)의

혼합물을 15분 동안 실온에서 교반하였다. 이어서, 2 ml DMF 중 5 mol%의 $CuSO_4$를 첨가하고 반응 혼합물을 5분 동안 질소로 퍼지 하였다. 이어서, 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 감압 하에서 용매를 제거한 후, 미정제 혼합물을 5% MeOH/DCM을 사용하여 실리카 겔상에서 정제하여 고체 화합물 Epi-GA(52% 수율)를 수득하였다.

[0070] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 10.42 (s, 1H), 8.06-8.04 (m, 1H), 7.89 (s, 1H),7.82-7.78 (m, 1H), 7.48-7.40 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.02 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.85-5.72 (m, 2H), 5.62-5.61 (m, 1H), 5.41 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.27 (br s, 1H), 5.05 (br s, 1H), 4.79 (br s, 2H), 4.69 (brs, 1H), 4.30 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 4.11 (s, 2H), 4.09 (s, 1H), 3.84-3.81 (m, 1H), 3.49 (q, J = 10.0 Hz, 1H), 3.32-3.13 (m, 6H), 3.05-3.01 (m, 3H), 2.77-2.70 (m, 2H), 2.40-2.33 (m, 2H), 2.31 (s, 1H), 2.19 (s, 1H), 2.17-1.95 (m, 4H), 1.86-1.84 (m, 3H), 1.75 (br s, 2H), 1.64-1.60 (m, 8H), 1.53-1.44(m, 5H), 1.41-1.37 (m, 10H), 1.27 (s, 3H), 1.23 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 1.14 (d, J = 10.0 Hz, 8H), 1.07 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 1.02 (br s, 4H), 0.90 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 0.82 (br s, 6H), 0.70 (t, J = 10.0 Hz, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ 214.17, 214.00, 200.44, 186.94, 186.54, 176.00, 175.75, 169.91,161.00, 156.27, 155.59, 154.56, 154.53, 135.87, 135.79, 135.75, 135.37, 133.83, 128.23, 128.20, 122.62, 120.71, 120.15, 119.77, 118.50, 111.39, 111.21, 100.31, 78.65, 64.48, 65.46, 61.84, 56.64, 54.94, 54.91, 48.31, 45.42, 45.41, 43.55, 43.28, 43.26, 41.88, 41.87, 39.18, 39.13, 37.46, 37.09, 35.79, 32.73, 31.90, 31.37, 30.32, 29.68, 29.57, 29.50, 29.48, 29.33, 29.21, 28.54, 28.11, 27.20, 26.47, 26.37, 26.01, 25.96, 25.64, 23.34, 23.30, 18.67, 17.96, 17.46, 17.45, 16.39, 15.61, 13.59; MS (ESI): m/z calcd. for $C_{78}H_{100}N_6O_{20}$: 1441 Found: 1464 $[M+23]^+$.

[0072] **결과 및 고찰**

[0073] 본 발명에서는 쿠마린 기반 형광단과 GA를 결합시킨 형광 프로브로서 Cou-GA를 합성하고(도 1), 다양한 유형의 세포주에서 세포 유형 선호도를 평가하였다. 본 발명의 인비트로 결과를 통해 Cou-GA가 간암 세포주 (HepG2 및 Chang 간암 세포)에 의해 선택적으로 흡수되는 것을 증명하였다. 또한, free GA를 이용한 억제 분석 결과는 Cou-GA의 흡수가 GA 선택적 세포 내 경로에 기인할 수 있다는 결론을 지지하였다. 또한, 본 발명에서는 전구 약물 Epi-GA를 합성함으로써 치료적 접근법으로 GA를 사용하였다. HepG2 및 Chang 간 세포에 대한 Epi-GA의 선택적 세포 독성 결과는 GA 활용이 실제로 HCC에 대한 타겟팅 기능을 향상시킨다는 결과를 뒷받침한다.

[0074] 본 발명에 따른 화합물인 프로브 Cou-GA 및 Epi-GA는 상기 [합성 경로 1, 2]에 따라 합성하였다. 다음으로, 프로브 Cou-GA의 광 물리적 특성을 시험하였다. 형광 프로브 Cou-GA는 PBS(pH 7.4, 37 1C)에서 각각 415nm 및 537nm에서 흡수 및 방출 밴드를 나타내었다(도 7, 8).

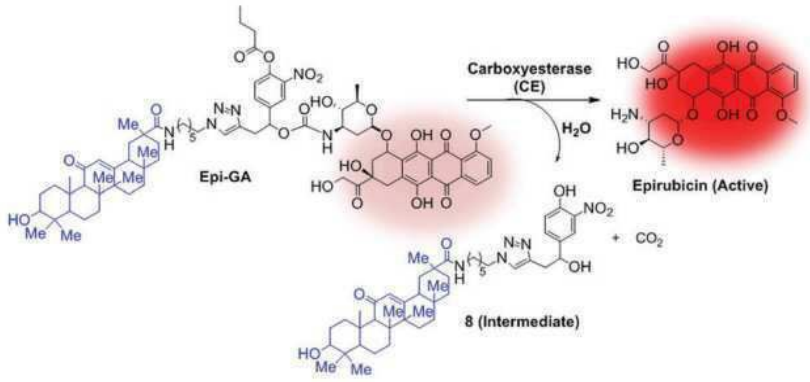
[0075] 다음으로, HepG2, Chang 간 세포 (간암), A549 (폐암), MCF7 (유방암), HeLa (자궁 경부암) 및 HCT116(결장암)과 같은 다양한 암 세포주에서 형광 현미경을 사용하여 Cou-GA의 GA-매개 세포 내 흡수에 대해 실험하였다. 모든 세포를 상이한 시간 간격 동안 5 μM Cou-GA와 함께 인큐베이션하고 상응하는 현미경 이미지를 기록하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, HepG2 및 Chang 간 세포는 쿠마린 형광단에 해당하는 455 nm에서 강한 녹색 형광 신호를 나타내었고, 이는 배양 시간이 0분에서 60분으로 증가함에 따라 강화되었다. 대조적으로, 다른 암 세포들은 동일한 조건에서 비교적 약한 신호를 나타냈다 (도 13). 이러한 결과는 통해 선택적인 GA 세포 내 경로에 의해 세포 흡수가 달성될 수 있음을 암시한다. 또한 간세포에 대한 GA의 선택적 흡수를 확인하기 위해, 배지에서 상이한 농도의 free GA의 존재하에서 억제 분석(inhibition assay)을 수행하였다. 형광 이미지는 GA의 농도가 증가함에 따라 HepG2 세포에서 상응하는 형광 강도가 감소함을 보여주었다 (도 14). 그러나 다른 세포주에서 형광 강도는 GA 농도에 의해 크게 영향을 받지 않았다 (도 15). GA 세포 흡수는 무작위 확산보다는 선택적인 세포 내 경로에 의존하기 때문에, 이러한 결과는 HepG2 세포에 대한 GA의 능동적 표적화 능력을 나타낸다.

[0076] 다음으로, 본 발명에 따른 약물 전달 시스템이 간암 세포주에 대해 선택적 독성을 유도할 수 있는지를 평가하였다. 이와 관련하여, HCC에 대한 강력한 항암제 인 에피루비신 (Epi)의 표적화된 전달을 위해 전구약물 Epi-GA를 합성하였다. 상기 전구약물은 활성 약물 Epi의 약리학적 비활성 변이체로, 종양 특이적 미세 환경의 풍부한 에스테라제 활성을 이용함으로써 우선적으로 활성화된다. 구조적으로, Epi-GA는 카르복실 에스테라제 선택적 트리거로서 에스테르 작용기, HCC에 대한 활성 표적 리간드로서 GA, 및 항암제인 Epi로 구성되며, 도 1에 도시된 바

와 같이, 모든 유닛은 중앙 자가-희생기 링커(central self-immolative linker) 주위에 연결된다. 약물 Epi는 카바메이트 링커를 통해 이를 접합시킴으로써 불활성화되었다. 전구약물은 효소 카르복실 에스테라제 (CE)에 의한 에스테르 모이어티의 가수 분해에 이어 1,6-제거 경로를 통해 활성 약물의 자가-희생기 방출에 의해 활성화된다.

[0077] CE는 HCC를 포함한 다양한 암 아형에서 상향 조절되는 것으로 알려져있기 때문에(G. Xu, W. H. Zhang, M. K. Ma and H. L. McLeod, Clin. Cancer Res., 2002, 8, 2605-2611), Epi-GA는 간암 세포 (HepG2 및 Chang liver)에 대해 더 강한 세포 독성을 나타낼 것으로 예상되었다. 그전에, 시간 의존적 형광 스펙트럼 및 LC 질량 분석법을 이용하여 Epi GA의 CE 트리거 활성화 프로필을 조사하였다. 도 3a에 도시된 바와 같이, 전구약물 Epi-GA는 PBS(pH 7.4, 37 ℃)에서 558nm (여기 파장 λ_{ex} 496nm)에서 예리한 방출 밴드를 나타내었다. PBS에서 최대 24시간 후에 Epi-GA의 유의미한 분해가 관찰되지 않았는바, 생리학적 조건하에서 안정성이 입증되었다. PBS (37 ℃)에서 에스테라제 (5 U/3 mL)와 함께 Epi-GA (5 μM)를 인큐베이션한 결과, 에스테르 그룹의 절단에 이어 1,6- 제거를 통한 Epi 자가-희생기 방출(Scheme 1 및 도 11)이 일어나고, 558 nm에서 동시 형광 강화 현상이 관찰되었다(도 3a 및 b). 암 세포와 정상 세포 모두에서 다른 생체 활성 대사 산물의 이질성과 존재를 확인하기 위해, Epi-GA의 선택성을 상이한 조건하에서 평가하였다. 그 결과, 세포 내 환원 효소, 즉 GSH, 다양한 반응성 산소종 (ROS), 아미노산 등을 포함한 다른 생물학적 관련 대사 산물과 Epi-GA를 인큐베이션 할 경우 유의한 형광 반응이 관찰되지 않았다 (도 10).

[0078] [Scheme 1]



[0079]

[0080] [카르복실 에스테라제 (CE)에 의해 유발되는 Epi-GA의 활성화 메커니즘]

[0082] 다음으로, MTT 분석법을 이용하여 Epi-GA의 세포 독성을 확인하였다. 다양한 세포주(HepG2, Chang liver 세포, A549, MCF7, HeLa 및 HCT116 세포)에 대해, 37 ℃에서 48시간 동안 0 내지 2 μM 범위의 다양한 농도의 Epi-GA 및 free Epi로 전처리하였다. Epi-GA 및 Epi는 모두 유사한 용량 의존적 세포 독성 거동을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (도 4a 및 b). 그러나, Epi-GA로 처리된 세포의 경우, HepG2 및 Chang liver 세포의 생존력은 다른 암 세포주에 비해 현저하게 감소되었다. 대조적으로, Epi의 경우 모든 유형의 세포주가 감소된 생존성을 나타내었는바, 낮은 특이성을 보였다. free GA 자체는 유사한 조건하에서 세포 독성을 나타내지 않았으며 Epi-GA의 세포 독성에 영향을 미치지 않았다 (도 16). 이러한 결과는 GA 컨쥬 게이션이 간암 세포에 대한 Epi-GA의 표적화 능력을 향상시키고, 그 후 과발현된 에스테라제에 의한 이의 활성화는 활성 약물 Epi를 효율적으로 방출하여 세포 독성을 유도할 수 있음을 암시한다.

[0083] 다음으로, Epi-GA의 간세포성 암종에 치료 가능성을 확인하기 위해, Annexin V-propidium iodide (PI) 염색을 이용한 형광 현미경 분석을 수행하였다(여기서 Annexin V와 PI는 각각 apoptosis와 necrosis의 마커로 사용됨). 도 5a에 도시된 바와 같이, Epi-GA와 함께 배양된 HepG2 세포의 형광 이미지는 free Epi 및 미처리 세포 (대조군)와 비교하여 강렬한 녹색 (Annexin V) 및 적색 (PI 염색) 형광 신호를 나타내었으며, 이는 Epi-GA가 free drug Epi보다 HepG2 세포에서 후기 아폽토시스를 더 크게 유도함을 나타낸다. 도 5b 및 c에 나타낸 바와 같이, Epi-GA 처리된 HepG2 세포의 경우, 세포 집단의 약 53.7%가 말기 아폽토시스(late stage apoptosis)인 것으로 확인된 반면, free Epi의 경우 해당 값은 20%에 불과한 것으로 나타났다.

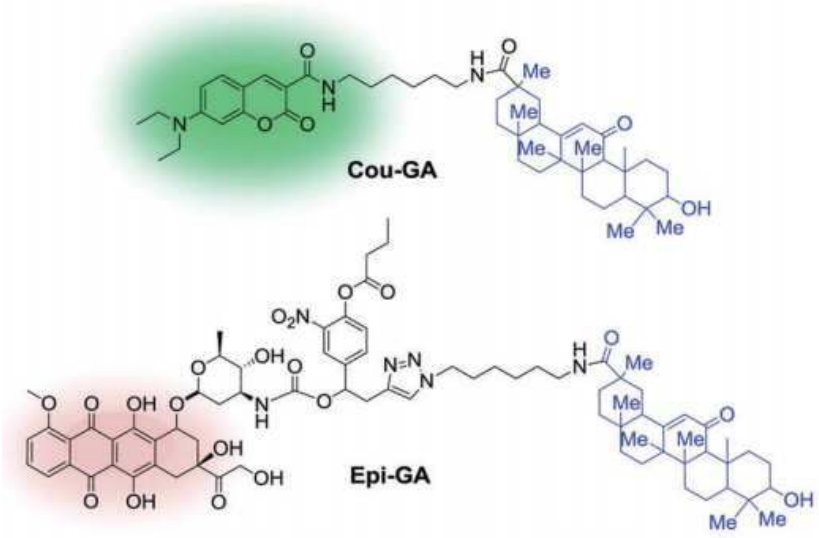
[0084] 마지막으로, Epi-GA의 치료 효능을 시험하기 위해, HepG2 암 세포를 접종한 이종 이식 모델에 대해 생체 내 연

구를 수행하였다. 접종 6일 후, 마우스에 PBS (the vehicle), Epi-GA 및 Epi (the i.p. route)를 별도로 투여하였다. Epi-GA의 종양 억제 효과를 확인하기 위해, 처리 후 동물을 희생시키고 생체 외에서 종양 질량 및 중량을 측정하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, Epi-GA 처리군 (83.5%)에서는 Epi (39.8%) 및 PBS만 처리한 경우에 비해 종양 부피 및 종양 무게가 모두 유의하게 억제되는 것으로 확인되었다. 이를 통해 Epi-GA가 효율적으로 Epi를 전달하며, 종양을 효과적으로 표적화할 수 있음을 확인하였다.

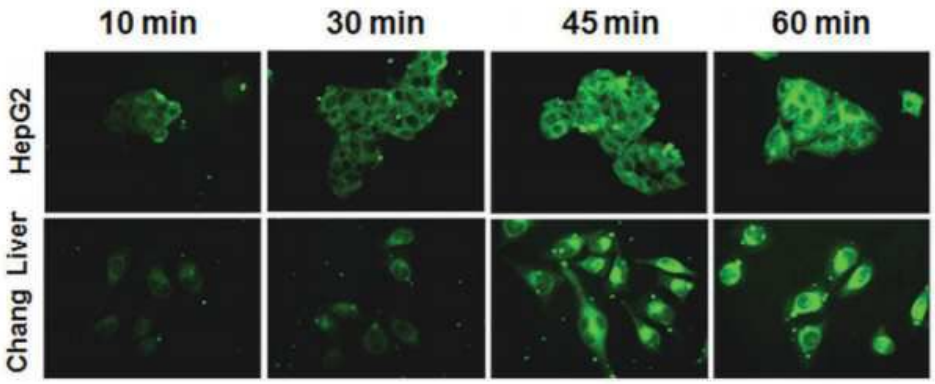
[0086] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

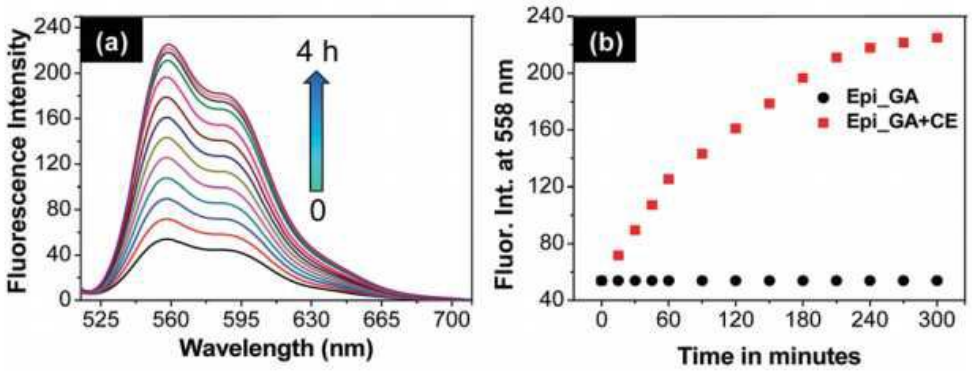
도면1



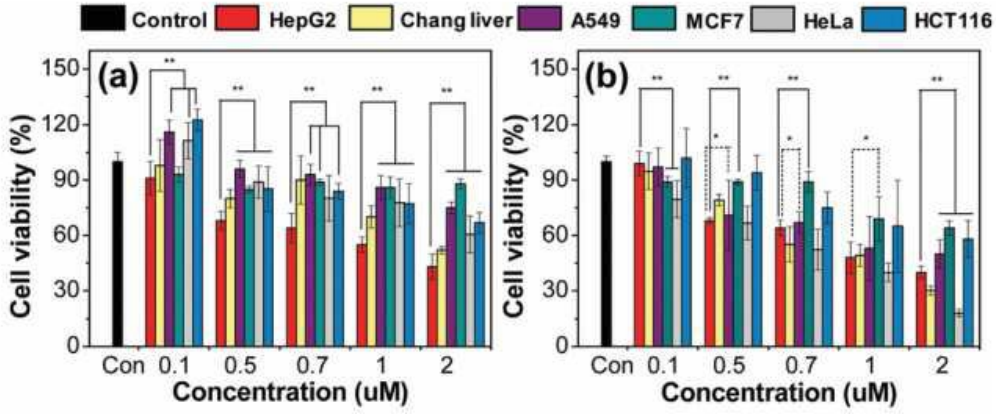
도면2



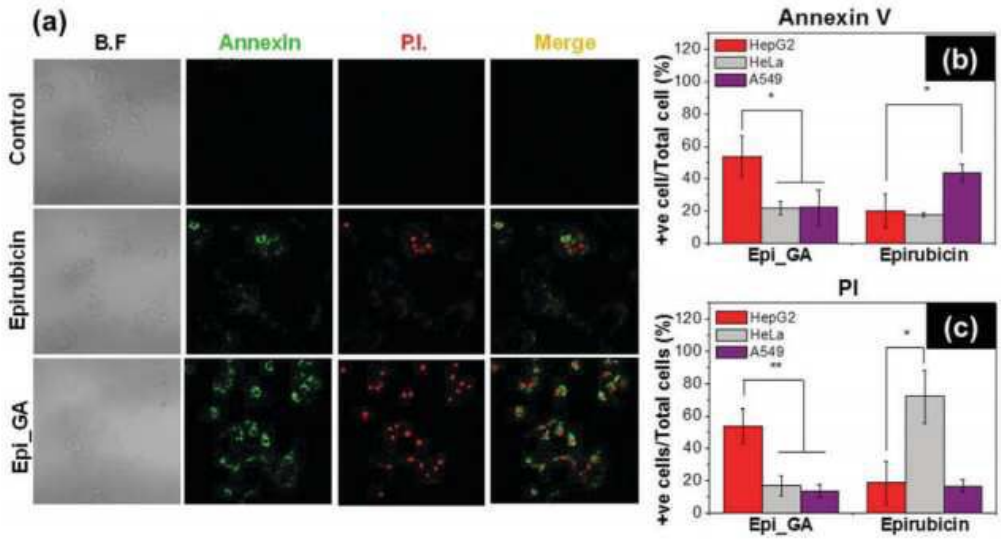
도면3


(a)
4 h
0
Fluorescence Intensity
Wavelength (nm)
(b)
Epi_GA
Epi_GA+CE
Fluor. Int. at 558 nm
Time in minutes

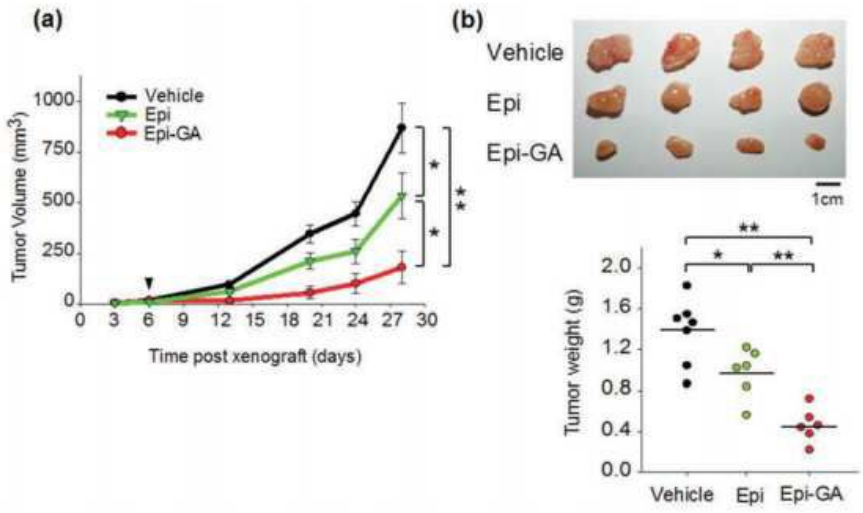
도면4


Control
HepG2
Chang liver
A549
MCF7
HeLa
HCT116
(a)
(b)
Cell viability (%)
Con 0.1 0.5 0.7 1 2
Concentration (uM)

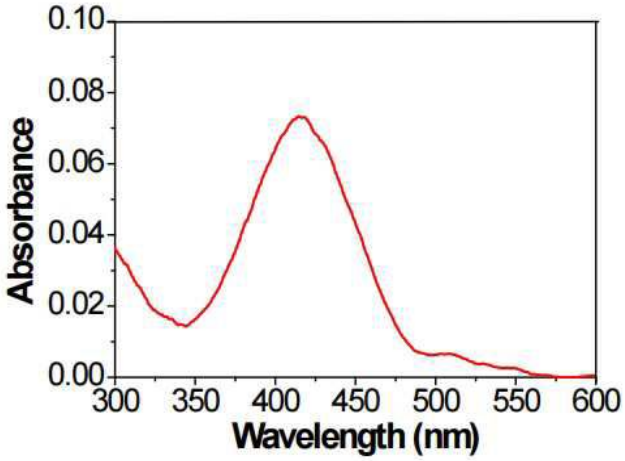
도면5


(a)
B.F
Annexin
P.I.
Merge
Control
Epirubicin
Epi_GA
Annexin V
(b)
HepG2
HeLa
A549
+ve cell/Total cell (%)
Epi_GA
Epirubicin
PI
(c)
+ve cells/Total cells (%)

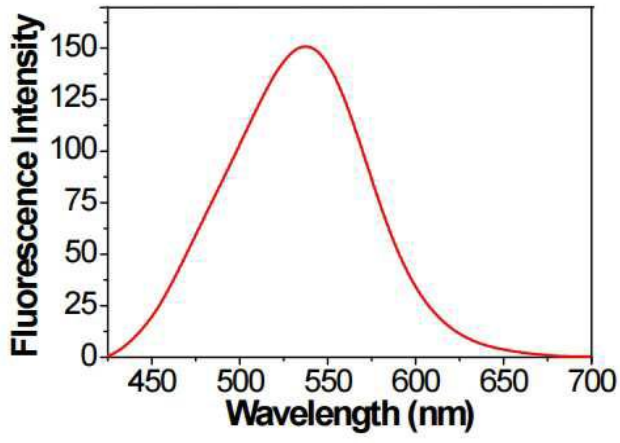
도면6


(a)
Vehicle
Epi
Epi-GA
Tumor Volume (mm3)
1000
750
500
250
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
Time post xenograft (days)
*
**
*
(b)
Vehicle
Epi
Epi-GA
1cm
**
*
**
Tumor weight (g)
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
Vehicle
Epi
Epi-GA

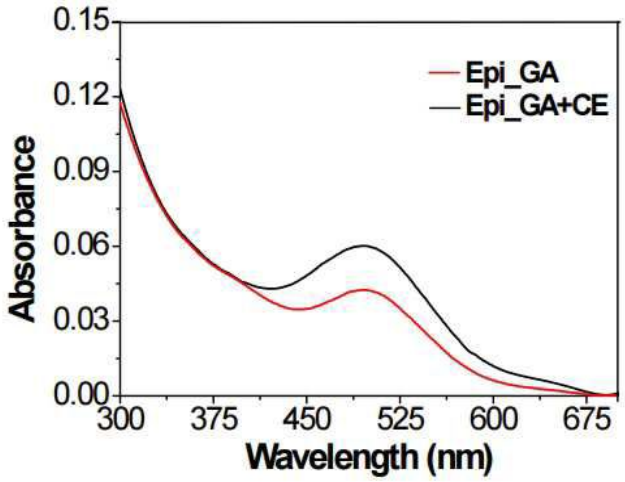
도면7


Absorbance
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
300 350 400 450 500 550 600
Wavelength (nm)

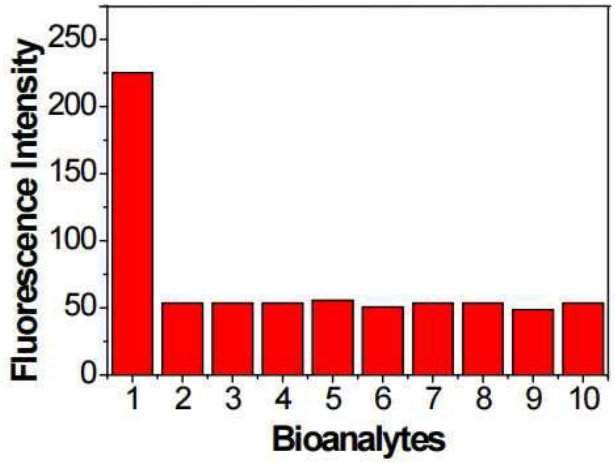
도면8


Fluorescence Intensity
150
125
100
75
50
25
0
450 500 550 600 650 700
Wavelength (nm)

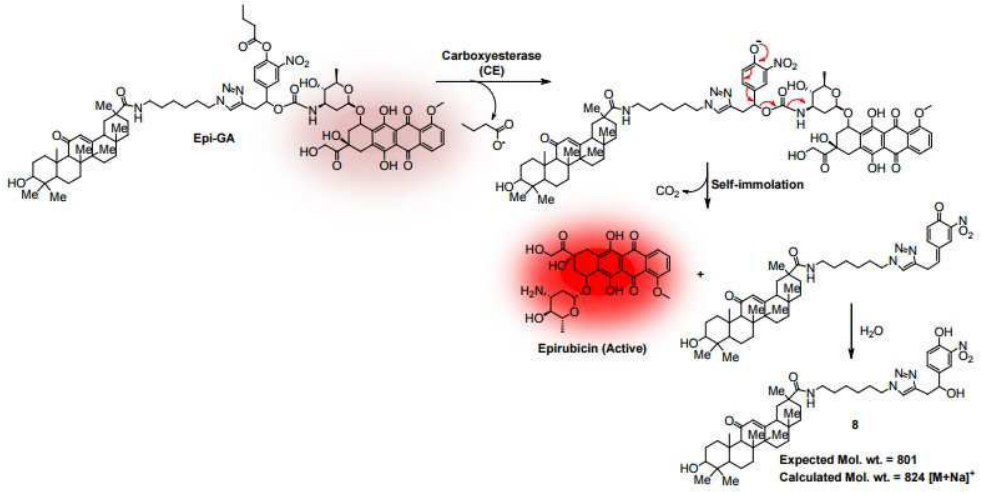
도면9



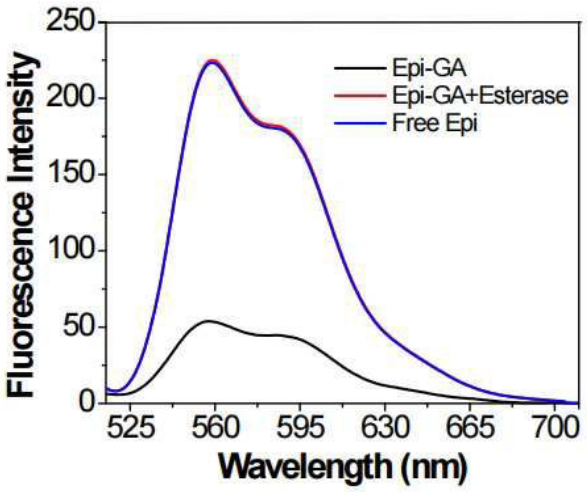
도면10



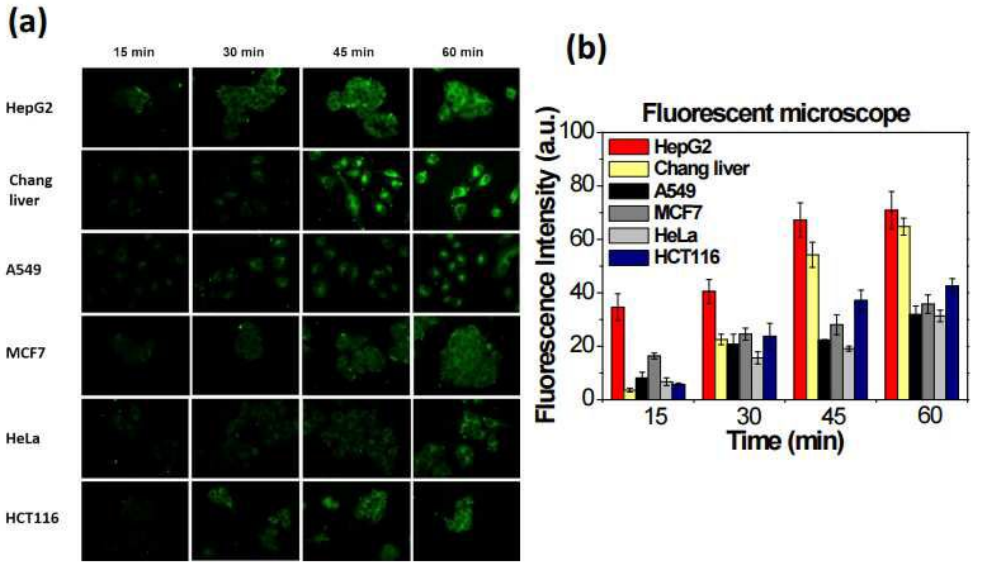
도면11



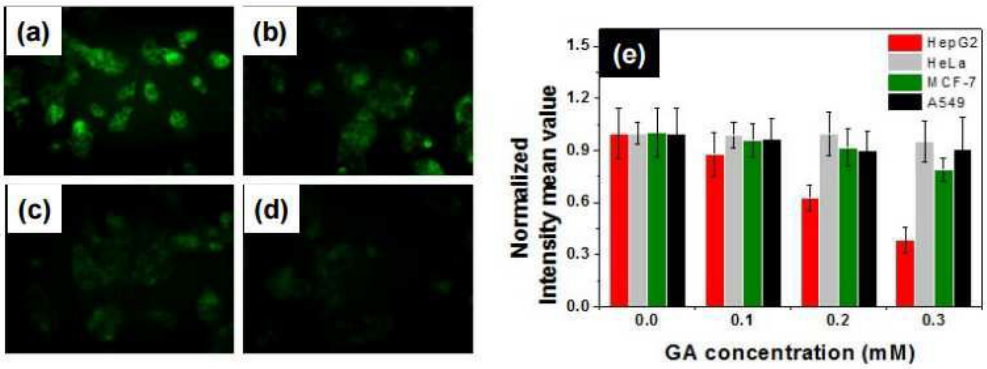
도면12



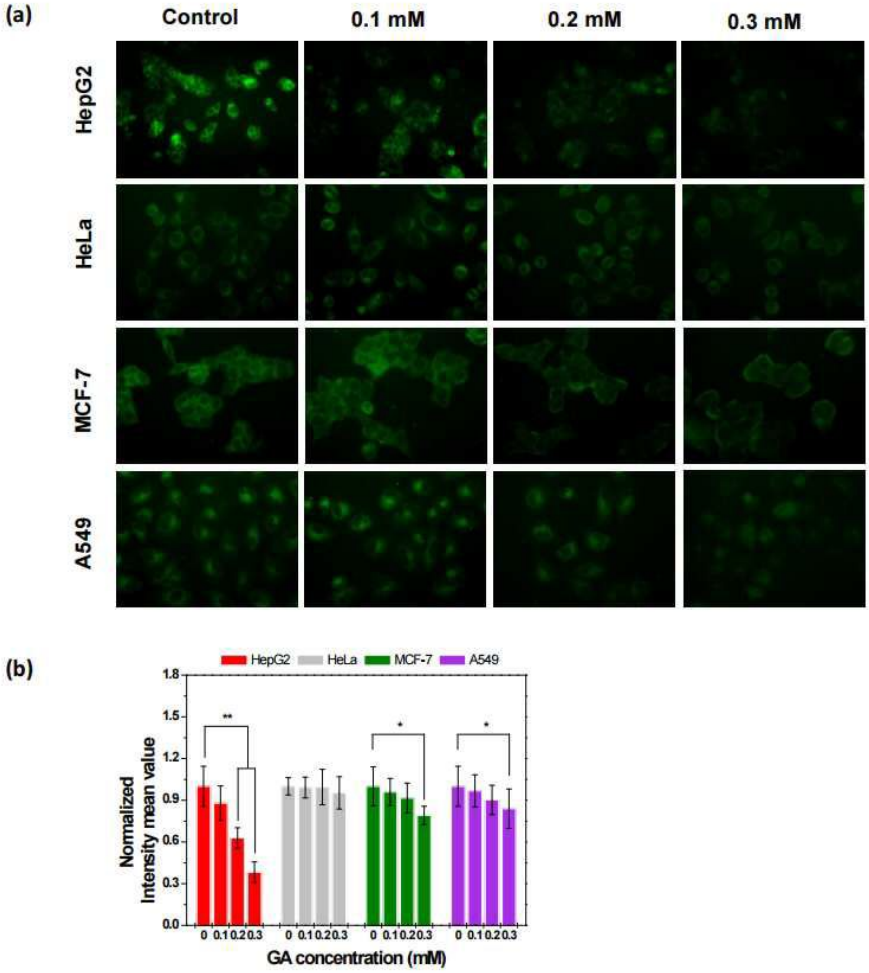
도면13



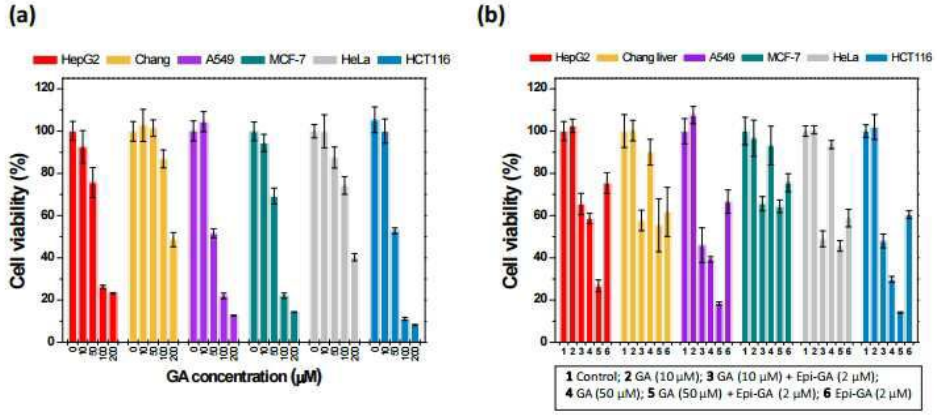
도면14



도면15


(a)
Control
0.1 mM
0.2 mM
0.3 mM
HepG2
HeLa
MCF-7
A549
(b)
HepG2
HeLa
MCF-7
A549
Normalized Intensity mean value
GA concentration (mM)

도면16


(a)
HepG2
Chang
A549
MCF-7
HeLa
HCT116
Cell viability (%)
GA concentration (μM)
(b)
HepG2
Chang liver
A549
MCF-7
HeLa
HCT116
Cell viability (%)
1 Control; 2 GA (10 μM); 3 GA (10 μM) + Epi-GA (2 μM);
4 GA (50 μM); 5 GA (50 μM) + Epi-GA (2 μM); 6 Epi-GA (2 μM)