



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0085624

(43) 공개일자 2019년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C09K 11/06 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C09K 11/06 (2013.01)

A61K 49/0019 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0003712

(22) 출원일자 2018년01월11일

심사청구일자 2018년01월11일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호

아밋 샤르마

서울특별시 성북구 인촌로 45, 202호

윤병권

서울특별시 동대문구 무학로 193, 206호

(74) 대리인

정은열

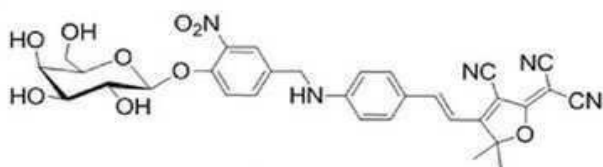
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 베타-갈락토오스 분해효소 선택성을 갖는 형광 프로브 화합물 및 이를 이용한 생체 내 베타-갈락토오스 분해효소 시각화 방법

(57) 요약

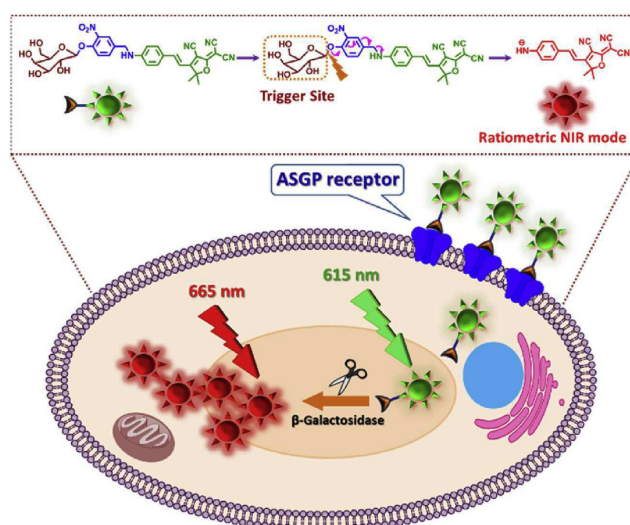
하기 [화학식 1]로 표시되는 베타-갈락토오스 분해효소 선택성을 갖는 형광 프로브 화합물에 관한 것이다:

[화학식 1]



본 발명에 따른 베타-갈락토오스 분해효소 선택성을 갖는 형광 프로브 화합물은 베타-갈락토오스 분해효소에 대해서 높은 선택성을 나타내며, 우수한 발광 특성을 보이고, 생체 내에서, 특히 간세포에서 베타-갈락토오스 분해효소를 직접적이면서도 실시간으로 시각화하는 것을 가능케 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C09K 2211/1088 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0081566

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 [이지바로] 발광센서 재료 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

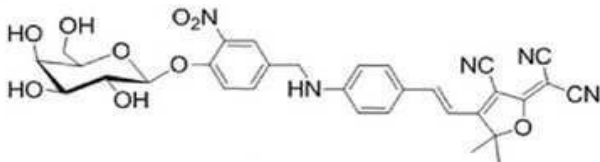
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 베타-갈락토오스 분해효소 선택성을 갖는 형광 프로브 화합물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 베타-갈락토오스 분해효소는 간세포에서 과발현되는 것을 특징으로 하는 형광 프로브 화합물.

청구항 3

제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 생체 내에 주입한 후, 방출되는 형광을 모니터링하는 단계;를 포함하는 생체 내 베타-갈락토오스 분해효소 시각화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 베타-갈락토오스 분해효소 선택성을 갖는 형광 프로브 화합물 및 이를 이용한 생체 내 베타-갈락토오스 분해효소 시각화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일부 유전적 장애를 위한 효과적인 치료는 중재가 일찍 시작된다면 유익할 수 있다. 빠르고, 비침습적인 전략에 기초한 사전 개입은 장애가 통제될 수 없게 되기 전에 장애 유형, 빠른 진단, 장애 예방 및 적절한 치료에 대한 결정에 대해 보다 나은 이해를 가능하게 할 수 있다. 비침습적인 형광 이미징화는 생체 시스템에서 다양한 생체분자들의 기능적 활성의 시각화를 위한 이상적인 도구로서 부각되고 있다(비특허문헌 1-2). 형광 탐지체에 의한 분자 이미징화는 기관 수준에서 생체내 이미징화 및 세포내 수준에서의 상이한 동적인 생물학적 사건을 탐지하기 위한 매우 민감한 접근에 해당한다(비특허문헌 3). 특히, 특정한 기관의 생체내 이미징화는 의도된 부위의 사전적인 근적외선 (NIR) 형광 탐지체의 표적화된 전달 후 특정한 환경에서 일부 생체분자에 반응한 그들의 활성에 의해 달성될 수 있다(비특허문헌 4). NIR 형광 탐지체는 그들의 감소된 조직 흡수도, 높은 광안정성, 넓은 스토크스 이동, 높은 양자 수율, 및 긴 방출 파장으로 인해 특정한 기관의 생체내 이미징화를 위한 좋은 방법이 될 수 있다(비특허문헌 5-9). 또한, NIR 형광체는 조직 내로 깊게 침투할 수 있고, 생물학적 샘플에 대해 최소의 간섭 및 광손상을 나타내므로 NIR 형광체는 고적극적인 방사성 동위원소 탐지 방법(비특허문헌 10-11)에 대한 대안으로서 가치 있고, 비침습적이며 정밀한 진단적 이미징화를 가능하게 한다.

[0003] 특정 질병의 진단 및 적용가능한 약물의 치료 반응을 향상시키기 위한 종래 방법에 대해 효율적인 대안으로서 NIR 형광 탐지체에 의한 표적화된 이미징화가 발전되어 왔다(비특허문헌 12). 항체, 펩타이드, 및 저분자량의 비펩타이드 리간드를 포함하는 모이어티에 대한 다양한 표적화가 진단시약 및/또는 약물의 전달을 위해 종양 부위를 선택적으로 표적화하기 위한 다양한 체제에 사용되고 있다. 표적-특이 담체 분자 중에, β -갈락토오스 분해효소(β -galactosidase)의 갈락토오스 잔기, 아시알로당단백질 수용체(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)의 리간드가 리포터(reporter)로 널리 사용되어 왔고, 효소를 활성화시켜 전사 조절 및 효소 면역 분석을 면밀하게 조사하였으며, 분자 및 세포 수준에서 집중적으로 연구되어 왔다(비특허문헌 13-15). 핵심적인

효소로서, β -갈락토오스 분해효소의 더 높은 발현이 다양한 암, 특히 난소암 및 직장암의 진행과 관련된 것으로 밝혀졌다. 몇 가지 형광 탐지체가 상이한 암세포에서 β -갈락토오스 분해효소의 발현을 모니터링하기 위해 발전되어 왔지만; 이들은 낮은 세포 침투성, 세포 및 조직의 배경 자가형광을 방해하는 좁은 방출 파장, 및 낮은 침투 깊이와 같은 몇 가지 제한이 있다(비특허문헌 16-24). 최근에, Zhu 등은 NIR 형광 탐지체 (DCM- β gal)를 이용한 직장 종양 모델에서 β -갈락토오스 분해효소의 생체내 추적 및 시각화를 보고한바 있고(비특허문헌 25), 또한, Urbano 등은 β -갈락토오스 분해효소의 발현을 시각화함으로써 복막 전이성 종양을 탐지하였다(비특허문헌 26).

[0004]

간세포암종 (HCC)은 전세계적으로 만성 간 질병으로 고통 받는 환자들에서 빈도가 증가된 가장 널리 알려져 있는 간암 유형이다(비특허문헌 27-29). B/C형 간염 및 아플라톡신-B₁ (AFB₁) 노출이 HCC와 관련된 일반적인 위험 요인이다(비특허문헌 30-33). 수용체인, 간세포 상의 ASGPR이 간기능 부전증의 평가로서 사용되어 왔다(비특허문헌 34). 간은 암전이와 관련된 가장 빈번한 기관에 해당한다. 따라서, 초기 단계에서의 악성 간질환의 정확한 인지가 암 치료 요법에 있어 매우 중요하다. 과발현된 ASGPR 수용체가 간세포에 선택적으로 갈락토오스 작용화된 담체를 세포내 섭취함으로써(endocytosed), 다른 기관에 대한 그의 비선택적 분배를 감소시켰다(비특허문헌 35). 결과적으로, 높은 β -갈락토오스 분해효소 발현과 관련된 간세포암종 세포는 일반적인 간 조직에 비해 시각화된다(비특허문헌 36-37). 지금까지 컴퓨터 단층촬영 (CT), 자기 공명화상법 (MRI), 양전자 방사 단층촬영 (PET), 및 초음파검사 (US)가 주요 종양 병변의 탐지를 위해 사용되어 왔지만(비특허문헌 38), HCC를 이용한 환자의 진단은 여전히 쉽지 않은 상황이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005]

- (비특허문헌 0001) K. Kikuchi, Design, Synthesis and Biological Application of Chemical Probes for Bio-imaging. Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 2048-2053.
- (비특허문헌 0002) J. Chan, S.C. Dodani, C.J. Chang, Reaction-based Small-molecule Fluorescent Probes for Chemoselective Bioimaging. Nat. Chem. 4 (2012) 973-984.
- (비특허문헌 0003) T. Ueno, T. Nagano, Fluorescent Probes for Sensing and Imaging. Nat. Methods. 8 (2011) 642-645.
- (비특허문헌 0004) H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. Chem. Rev. 110 (2010) 2620-2640.
- (비특허문헌 0005) R. Raghavachari, Near-Infrared Applications in Biotechnology; Ed.; Marcel Dekker: New York, 2001.
- (비특허문헌 0006) R. Weissleder, A clearer Vision of In Vivo Imaging. Nat. Biotechnol. 19 (2001) 316-317.
- (비특허문헌 0007) G.M. Fischer, E. Daltrozzo, A. Zumbusch, Selective NIR Chromophores: Bis(pyrrolopyrrole) cyanines. Angew. Chem., Int. Ed. 50 (2011) 1406-1409.
- (비특허문헌 0008) J.O. Escobedo, O. Rusin, S. Lim, R.M. Strongin, NIR Dyes for Bioimaging Applications. Curr. Opin. Chem. Biol. 14 (2010) 64-70.
- (비특허문헌 0009) J.M. Baumes, J.J. Gassensmith, J. Giblin, J.-J. Lee, A.G. White, W.J. Culligan, W.M. Leevy, M. Kuno, B.D. Smith, Storable, Thermally Activated, Near-infrared Chemiluminescent Dyes and Dye-stained Microparticles for Optical Imaging. Nat. Chem. 2 (2010) 1025-1030.
- (비특허문헌 0010) G. Blum, G. von Degenfeld, M.J. Merchant, H.M. Blau, M. Bogoy, Noninvasive Optical Imaging of Cysteine Protease Activity using Fluorescently Quenched Activity-based Probes. Nat. Chem. Biol. 3 (2007) 668-677.
- (비특허문헌 0011) W. Pham, Y. Choi, R. Weissleder, C.H. Tung, Developing a peptide-based near-infrared molecular probe for protease sensing. Bioconjugate Chem. 15 (2004) 1403-1407.

- (비특허문헌 0012) H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P.L. Choyke, Y. Urano, New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* 110 (2010) 2620-2640.
- (비특허문헌 0013) Y. Ichikawa, M. Kamiya, F. Obata, M. Miura, T. Terai, T. Komatsu, T. Ueno, K. Hanaoka, T. Nagano, Y. Urano, Selective Ablation of β -galactosidase-expressing Cells with a Rationally Designed Activatable Photosensitizer. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 6772-6775.
- (비특허문헌 0014) H.W. Lee, C.H. Heo, D. Sen, H.O. Byun, I.H. Kwak, G. Yoon, H.M. Kim, Ratiometric Two-photon Fluorescent Probe for Quantitative Detection of β -galactosidase Activity in Senescent Cells. *Anal. Chem.* 86 (2014) 10001-10005.
- (비특허문헌 0015) Peng. Lu, Gao. Meng, Cai. Xiaolei, Zhang. Ruoyu, Li. Kai, Feng. Guangxue, Tong. Aijun, Liu. Bin, A Fluorescent Light-up Probe Based on AIE and ESIPT Processes for β -galactosidase Activity Detection and Visualization in Living Cells. *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 9168-9172.
- (비특허문헌 0016) Y. Urano, M. Kamiya, K. Kanda, T. Ueno, K. Hirose, T. Nagano, Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 4888-4894.
- (비특허문헌 0017) M. Kamiya, D. Asanuma, E. Kuranaga, A. Takeishi, M. Sakabe, M. Miura, T. Nagano, Y. Urano, β -Galactosidase Fluorescence Probe with Improved Cellular Accumulation based on a Spirocyclized Rhodol Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 12960-12963.
- (비특허문헌 0018) A.Y. Louie, M.M. H?ber, E.T. Ahrens, U. Rothb?cher, R. Moats, R.E. Jacobs, S.E. Fraser, T.J. Meade, In Vivo Visualization of Gene Expression using Magnetic Resonance Imaging. *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 321-325.
- (비특허문헌 0019) P.K. Gulaka, J.X. Yu, L. Liu, R.P. Mason, V.D. Kodibagkar, Novel S-Gal® Analogs as ¹H MRI Reporters for In Vivo Detection of β -galactosidase. *Magn. Reson. Imaging* 31 (2013) 1006-1011.
- (비특허문헌 0020) S. Celen, C. Deroose, T. de Groot, S.K. Chitneni, R. Gijssbers, Z. Debyser, L. Mortelmans, A. Verbruggen, G. Bormans, Synthesis and Evaluation of ¹⁸F- and ¹¹C-labeled Phenyl-galactopyranosides as Potential Probes for In Vivo Visualization of LacZ Gene Expression using Positron Emission Tomography. *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 441-449.
- (비특허문헌 0021) L. Liu, R.P. Mason, Imaging β -galactosidase Activity in Human Tumor Xenografts and Transgenic Mice using a Chemiluminescent Substrate. *PLoS One* 5 (2010) e12024.
- (비특허문헌 0022) A.M. Broome, G. Rama-murthy, K. Lavik, A. Liggett, I. Kinstlinger, J. Basilion, Optical Imaging of Targeted β -galactosidase in Brain Tumors to Detect EGFR Levels. *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 660-668.
- (비특허문헌 0023) C.H. Tung, Q. Zeng, K. Shah, D.E. Kim, D. Schellingerhout, R. Weissleder, In Vivo Imaging of β -galactosidase Activity using Far Red Fluorescent Switch. *Cancer Res.* 64 (2004) 1579-1583.
- (비특허문헌 0024) Y.Z. Zhang, J.J. Naleway, K.D. Larison, Z.J. Huang, R.P. Haugland, Detecting LacZ gene Expression in Living Cells with New Lipophilic, Fluorogenic β -galactosidase Substrates. *FASEB J.* 5 (1991) 3108-3113.
- (비특허문헌 0025) K. Gu, Y. Xu, H. Li, Z. Guo, S. Zhu, S. Zhu, P. Shi, T. D. James, H. Tian, W. H. Zhu, Real-time Tracking and In Vivo Visualization of β -galactosidase Activity in Colorectal Tumor with a Ratiometric Near-Infrared Fluorescent Probe. *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 5334-5340.
- (비특허문헌 0026) D. Asanuma, M. Sakabe, M. Kamiya, K. Yamamoto, J. Hiratake, M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke, T. Nagano, H. Kobayashi, Y. Urano, Sensitive β -galactosidase-targeting Fluorescence Probe for Visualizing Small Peritoneal Metastatic Tumours In Vivo. *Nat. Commun.* 6 (2015) 6463.

- (비특허문헌 0027) N. Ince, J.R. Wands, The Increasing Incidence of Hepatocellular Carcinoma. N. Engl. J. Med. 340 (1999) 798-799.
- (비특허문헌 0028) J. Byam, J. Renz, J. M. Millis, Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma. Hepatobiliary Surg. Nutr. 2 (2013) 22-30.
- (비특허문헌 0029) A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global Cancer Statistics. CA Cancer J. Clin. 61 (2011) 69-90.
- (비특허문헌 0030) P.P. Anthony, Hepatocellular carcinoma: an overview. Histopathology 39 (2001) 109-118.
- (비특허문헌 0031) H.B. El-Serag, Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology 142 (2012) 1264-1273.
- (비특허문헌 0032) J.R. Wands, H.E. Blum, Primary hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med. 325 (1991) 729-731.
- (비특허문헌 0033) B. Bressac, M. Kew, J. Wands, M. Ozturk, Selective G to T Mutations of p53 gene in Hepatocellular Carcinoma from Southern Africa. Nature 350 (1991) 429-431.
- (비특허문헌 0034) Y. Yumoto, T. Yagi, S. Sato, K. Nouse, Y. Kobayashi, M. Ohmoto, E. Yumoto, I. Nagaya, H. Nakatsukasa, Preoperative Estimation of Remnant Hepatic Function using Fusion Images obtained by (99m) Tc-Labelled Galactosyl-Human Serum Albumin Liver scintigraphy and Computed Tomography. Br. J. Surg. 97 (2010) 934-944.
- (비특허문헌 0035) C.H. Lai, C.Y. Lin, H.T. Wu, H.S. Chan, Y.J. Chuang, C.T. Chen, C.C. Lin, Galactose Encapsulated Multifunctional Nanoparticle for HepG2 Cell Internalization. Adv. Funct. Mater. 20 (2010) 3948-3958.
- (비특허문헌 0036) V. Paradis, N. Youssef, D. Dargere, N. Ba, F. Bonvoust, J. Deschatrette, P. Bedossa, Replicative Senescence in Normal Liver, Chronic Hepatitis C, and Hepatocellular Carcinomas. Hum. Pathol. 32 (2001) 327-332.
- (비특허문헌 0037) R. Pacheco-Rivera, S. Fattel-Fazenda, J. Arellanes-bledo, A. Silva-Olivares, L. Aleman-Lazarini, M. Rodriguez-Segura, S. Villa-Trevino, M. Shibayama, J. Serrano-Luna, Double Staining of β -galactosidase with Fibrosis and Cancer Markers Reveals the Chronological Appearance of Senescence in Liver Carcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine. Toxicol. Lett. 241 (2016) 19-31.
- (비특허문헌 0038) M.R. Oliva, S. Saini, Liver Cancer Imaging: Role of CT, MRI, US, and PET. Cancer Imaging 4 (2004) S42-S46.

발명의 내용

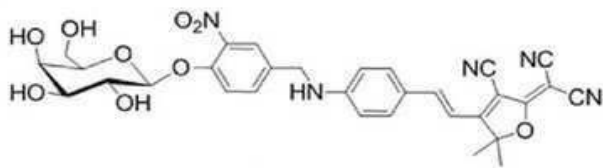
해결하려는 과제

- [0006] 본 발명에서는 베타-갈락토오스 분해효소에 대해서 높은 선택성을 나타내며, 우수한 발광 특성을 보이고, 특히, 생체 내에서 직접적으로, 또한 실시간으로 베타-갈락토오스 분해효소를 시각화할 수 있는 베타-갈락토오스 분해효소 선택성을 갖는 형광 프로브 화합물을 제공하고자 한다.
- [0007] 또한, 본 발명에서는 상기 형광 프로브 화합물을 이용한 생체 내 베타-갈락토오스 분해효소 시각화 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 베타-갈락토오스 분해효소 선택성을 갖는 형광 프로브 화합물을 제공한다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 본 발명에 따르면, 상기 베타-갈락토오스 분해효소는 간세포에서 과발현되는 것일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 제1항에 따른 형광 프로브 화합물을 생체 내에 주입한 후, 방출되는 형광을 모니터링하는 단계;를 포함하는 생체 내 베타-갈락토오스 분해효소 시각화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 베타-갈락토오스 분해효소 선택성을 갖는 형광 프로브 화합물은 베타-갈락토오스 분해효소에 대해서 높은 선택성을 나타내며, 우수한 발광 특성을 보이고, 생체 내에서, 특히 간세포에서 베타-갈락토오스 분해효소를 직접적이면서도 실시간으로 시각화하는 것을 가능케 한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 β-갈락토오스 분해효소와 만났을 때 본 발명에 따른 형광 프로브 화합물(DCDHF-βgal)의 개념적인 반응식 및 이에 따른 형광 변화를 나타낸 것이다.

도 2는 (a) β-갈락토오스 분해효소(50 U)를 첨가한 DCDHF-βgal (20 μM)의 흡수 스펙트럼을 나타내고, (b)는 다양한 양의 β-갈락토오스 분해효소 (0 U-50 U)에서 DCDHF-βgal (5 μM)의 형광 방출을 나타내며, (c 및 d)는 β-갈락토오스 분해효소 (50 U)가 첨가된 DCDHF-βgal (5 μM)의 시간 의존성 형광 스펙트럼을 나타낸다(0-30분). 모든 스펙트럼은 37 °C, λ_{ex} = 580 nm에서 PBS 완충액 (pH 7.4) 중에서 기록되었다.

도 3은 DCDHF-βgal의 세포 특이적 표적화를 나타낸 것으로, HepG2, A549, 및 KB 세포 중 DCDHF-βgal의 세포 형광 이미지이다. 세포들은 10 μM의 DCDHF-βgal로 24시간 동안 처리되었다. 필터 세트: Texas-Red (Yellow, λ_{ex}:589/λ_{em}: 610), mPlum (Red, λ_{ex}:588/λ_{em}:649), Hoechst (Blue, λ_{ex}:359/λ_{em}:457) 스케일바: 20 μm.

도 4는 β-갈락토오스 분해효소의 양에 의해 강화된 DCDHF-βgal의 형광 강도를 나타낸 것이다. (a)는 β-갈락토오스 분해효소로 과발현된 HepG2 세포에서의 DCDHF-βgal의 세포 형광 이미지이다. pCMV-LacZ로 형질주입한 후, 세포들을 4 μM의 DCDHF-βgal로 12시간 동안 처리하였다. 필터 세트: mPlum (Red, λ_{ex}:588/λ_{em}:649), Hoechst (Blue, λ_{ex}:359/λ_{em}:457) 스케일바: 20 μm. DCDHF-βgal-처리된 HepG2 및 pCMV-LacZ로 형질주입된 HepG2 세포의 형광 강도의 비교가 막대그래프 플롯 (b) 및 유동 세포 분석법의 평균 형광값 (c)에 제시되어 있다.

도 5는 DCDHF-βgal의 생체내 형광 이미지화 결과이다. β-갈락토오스 분해효소를 과발현시키는 HepG2 이종이식 종양을 갖는 마우스 내로 DCDHF-βgal (1 mg/kg)를 정맥 내 주입하거나 하지 않았다. 24시간 후에, Maestro 생체내 이미지화 시스템을 이용하여 종양 부분의 형광 이미지(a)를 얻었다. (b)는 동결절편된 종양으로부터 수득한 현미경 이미지이다. 필터 세트: mPlum (Red, λ_{ex}:588/λ_{em}:649), DAPI (Blue, λ_{ex}:405/λ_{em}:450-490) 스케일바: 20 μm.

도 6은 다양한 pH에서 DCDHF-βgal (5 μM)의 형광 스펙트럼을 나타낸다. 모든 스펙트럼은 β-갈락토시다제를 첨가한 후에 수득하였고, λ_{ex} = 580 nm인 PBS 완충액에서 기록하였다.

도 7은 다양한 티올 (각각 10 mM) 및 활성 산소 (ROS) (각각 200 μM) 에스테라아제 (100U), 리소자임 (100U), 셀룰라아제 (100U)에 대한 DCDHF-βgal(5 μM) 형광 반응을 나타낸 막대 그래프이다; (1) control, (2) glutathiol (GSH), (3) cysteine, (4) homocysteine, (4) Na₂S (5) superoxide (O₂²⁻), (6) tert-butyl hydroperoxide (TBHP), (7) Hydroxyl radical (OH[•]), (8) hypochlorite ion (OCl⁻), (9) Esterase (10) Lysozyme (11) Cellulase and (12) Galactosidase. 모든 스펙트럼은 37 °C, PBS 완충액 (10 mM, pH = 7.4)에서

분석 물을 첨가한 후 1 시간에 획득하였다. $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 615nm/665nm$

도 8은 HepG2 세포에서 DCDHF- β gal의 세포 생존 능력을 나타낸 것이다. HepG2 세포를 24 시간동안 다양한 농도의 DCDHF- β gal로 처리하였다.

도 9는 HepG2 세포에서 DCDHF- β gal의 세포 형광 이미지를 나타낸 것이다. 세포를 1, 2, 6 및 12 시간동안 10 μ M의 DCDHF- β gal로 처리하였다. 필터 세트: Texas-Red (황색, $\lambda_{ex}:589/\lambda_{em}:610$), mPlum (적색, $\lambda_{ex}:588/\lambda_{em}:649$), Hoechst (청색, $\lambda_{ex}:359/\lambda_{em}:457$) 스케일바: 20 μ m

도 10은 유동 세포 계측법을 이용한 경쟁 분석 결과를 나타낸 것이다. HepG2 세포는 10 mM의 갈락토오스 전처리 (적색 선) 또는 전처리 없이(파란색 선), 6 시간 동안 10 μ M의 DCDHF- β gal로 처리하였다.

도 11은 유동 세포 계측법을 이용한 표적 세포 흡수를 측정한 결과이다. KB, A549 및 HepG2 세포에서 DCDHF- β gal의 (a) 도트 플롯 및 (b) 형광 강도 비교 결과이다. 세포를 10 μ M의 DCDHF- β gal로 24 시간 동안 처리하였다.

도 12는 β -갈락토시다제를 과발현하는 형질 감염되지 않은 HepG2 세포의 Western blot 분석 결과이다. β -갈락토시다제 과발현은 monoclonal anti- β -갈락토시다제로 Western blotting하여 평가하였다. α -tubulin을 loading control로 사용하였다.

도 13은 DCDHF- β gal의 생체 내 형광 이미징 결과이다. β -갈락토시다제를 과발현하는 HepG2 이중 이식 종양이 있는 마우스에 DCDHF- β gal (1 mg / kg)을 정맥 주사하였다. 4 시간과 24 시간 후 마우스의 전신 (a)과 해부 된 종양 조직 (b)의 형광 이미지를 Maestro 생체 내 이미징 시스템을 사용하여 얻었다. (c)는 β -갈락토시다아제-과발현 및 대조군 종양으로부터의 생체 외 형광에서 신호 대 배경 비(background ratio)의 비교결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0017] 실험방법

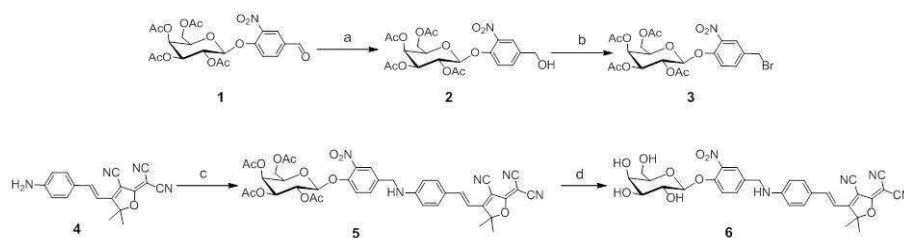
[0018] 재료 및 기기장치

[0019] 4-하이드록시-3-나이트로벤즈알데하이드 (Aldrich), 산화은 (Aldrich), 아세트브로모- α -D-갈락토오스 (Aldrich), 소듐 보로하이드라이드 (Aldrich), 포스포러스 트리브로마이드 (Aldrich), 요오드화 구리(I) (Aldrich), 4-포르밀페닐보론산 (Aldrich), 소듐 아자이드 (Aldrich), 트리페닐포스핀 (Aldrich), 3-하이드록시-3-메틸-2-부탄온 (Aldrich), 말론나이트릴 (Aldrich), 포타슘 카보네이트 (Aldrich), 소듐 메톡사이드 (Aldrich)가 정제 없이 그대로 사용되었다. 갈락토오스 모이어티 및 형광체가 하기 보고된 절차에 의해 합성되었다. 칼럼 크로마토그래피는 실리카 겔 60을 사용하여 화합물을 정제하는 데 사용되었다. 반응 진행은 박층 크로마토 그래피 (TLC)에 의해 60 실리카 겔을 사용하여 모니터링 하였다. 질량 및 NMR 스펙트럼은 Ion Spec Hi Res ESI 질량 분석기 및 300 및 400 MHz 분광기 (AS400, 300, Varian, US)를 사용하여 획득하였다.

[0021] [화합식 1]로 표시되는 화합물(DCDHF- β gal)의 합성

[0022] 하기 [합성 경로]에 표시된 방법에 따라, 본 발명의 [화합식 1]로 표시되는 화합물(DCDHF- β gal, 화합물 6)을 합성하였다.

[0023] [합성 경로]



[0024]

[0025] a) NaBH₄, MC/MeOH, 0 °C; b) PBr₃, MC, 1 h; c) K₂CO₃, DMF, RT, 2 days; d) Sodium methoxide, MeOH, RT, 24 h.

[0027] (1) 화합물 1의 합성

[0028] 무수 아세토니트릴(173 mL) 중의 아세토브로모-β-D-갈락토오스 (6.9g, 16mmol)가 자기적으로 교반된 용액에 4-하이드록시-3-나이트로벤즈알데하이드 (4.0g, 24mmol) 및 산화은 (5.6 g, 24 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 어두운 곳에서 실온에서 22 시간 동안 자기적으로 교반하였으며, 침전물을 셀 라이트를 사용하여 용액을 여과하여 완전히 제거하였다. 용매를 증발시킨 후, 고체를 에틸 아세테이트에 용해시킨 후 용액을 소듐 바이카보네이트 용액 및 염수로 세척하였다. 유기층을 MgSO₄상에서 건조시키고 증발시켰다. 이 조(crude) 생성물을 헥산으로 세척 및 여과시켜 백색 고체의 화합물 1을 수득하였다(7.0g, 88% 수율). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.03 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 4.14-4.28 (m, 3H), 5.13 (dd, 1H, *J* = 10.4, 3.4 Hz), 5.21 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.50 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 5.60 (dd, 1H, *J* = 10.7, 7.9 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.07 (dd, 1H, *J* = 8.6, 2.1 Hz), 8.31 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 9.99 (s, 1H).

[0030] (2) 화합물 2의 합성

[0031] CH₂Cl₂/MeOH (95:5, 200 mL) 중 상기 화합물 1(2.0 g, 4.02 mmol)의 용액에 소듐 보로하이드라이드 (0.3 g, 8.04 mmol)를 첨가하였다. 용액을 실온에서 1 시간 동안 자기적으로 교반하였으며, 반응을 냉수 (200 mL)로 쿨링시키고, 용매를 증발시켰다. 생성물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고 MgSO₄상에서 건조시켰다. 용매를 제거하고, 잔류물을 디에틸에테르로 세척하여 백색 고체의 화합물 2를 수득하였다(1.42 g, 71% 수율). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 4.03-4.28 (m, 3H), 4.73 (d, 2H, *J* = 5.56 Hz), 5.05 (d, 1H, *J* = 7.96), 5.10 (dd, 1H, *J* = 10.66, 3.32 Hz), 5.47 (d, 1H, *J* = 3.32 Hz), 5.55 (dd, 1H, *J* = 10.58, 7.88 Hz), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.72 Hz), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8.42, 2.39 Hz), 7.81 (d, 1H, *J* = 1.85 Hz).

[0033] (3) 화합물 3의 합성

[0034] 화합물 2 (1.0 g, 2.00 mmol)을 질소 가스 하 디클로로메탄 (10 mL)에 용해시켰다. 포스포러스 트리브로마이드 (0.2 mL)를 용액에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 자기적으로 교반 하였다. 반응 용매를 진공에서 증발시켰다. 생성물을 용리액으로서 에틸 아세테이트 및 헥산 (1:1)을 사용하는 실리카 겔 크로마토 그래피로 정제하여 화합물 3을 수득하였다(1.0g, 88% 수율). ESI-MS *m/z* (*M*⁺) calcd 561.05 found 584.25 (*M*+Na⁺). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.00 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 4.08-4.27 (m, 3H), 4.46 (s, 2H), 5.07-5.12 (m, 2H), 5.46 (d, 1H, *J* = 2.69 Hz), 5.53 (dd, 1H, *J* = 10.53, 7.99 Hz), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.72 Hz), 7.54 (dd, 1H, *J* = 8.57, 2.18 Hz), 7.82 (d, 1H, *J* = 2.25 Hz). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 20.78, 20.83, 20.88, 31.05, 61.58, 66.92, 67.94, 70.67, 71.67, 100.69, 120.00, 125.84, 133.96, 134.48, 141.14, 147.30, 169.54, 170.30, 170.37, 170.49 ppm.

[0036] (4) 화합물 4의 합성

[0037] 종래 문헌에 보고된 방법(Lord, S. J.; Conley, N. R.; Lee, H. L.; Samuel, R.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 9204-9205.)에 따라 보라색 고체의 화합물 4를 합성하였다.

[0039] (5) 화합물 5의 합성

[0040] 화합물 1 (0.32 g, 1.0 mmol), 포타슘 카보네이트 (0.24 g, 1.7 mmol) 및 디메틸포름아미드 (13 mL)를 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 다음으로, 화합물 4 (0.65 g, 1.2 mmol)를 플라스크 내의 디메틸 포름아미드 (6 mL)에 용해시키고, 반응 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2일 동안 교반하였다. 생성물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고 $MgSO_4$ 상에서 건조시켜 조(crude) 화합물 5를 수득하였다(1.1 g, 122% 수율). ESI-MS m/z (M^+) calcd 783.24 found 806.25 ($M+Na^+$), 782.10 ($M - H^+$). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.81 (s, 6H), 2.01 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 4.10 (m, 1H), 4.16-4.19 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.29 (m, 1H), 5.11-5.15 (m, 2H), 5.17 (s, 2H), 5.49-5.50 (m, 1H), 5.56-5.59 (m, 1H), 6.92-6.95 (m, 1H), 7.04 (m, 2H), 7.42 (m, 1H), 7.60-7.67 (m, 4H), 7.92 (s, 1H), 7.92 (s, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 20.58, 20.65, 20.67, 20.69, 30.95, 61.28, 66.69, 67.81, 68.49, 70.49, 71.45, 97.68, 100.66, 110.50, 111.14, 111.84, 113.00, 115.86, 116.01, 119.93, 124.17, 127.43, 128.49, 128.59, 130.39, 131.43, 131.97, 132.12, 132.56, 141.30, 147.00, 149.15, 161.99, 169.40, 170.13, 170.33, 174.21, 175.58 ppm.

[0042] (6) 화합물 6(DCDHF- β gal)의 합성

[0043] Crude 화합물 5 (0.36 g, 0.46 mmol)를 질소 가스하에 메탄올 (6 mL)에 용해시켰다. 메탄올 중 0.5N 나트륨 메톡사이드 (0.4mL)를 용액에 첨가하였다. 혼합물을 어두운 곳에서 실온에서 24시간 동안 자기적으로 교반하였다. 양이온 교환 수지 (H^+)를 첨가하고 여과하고 MeOH로 세척하였다. 용매를 진공하에 증발시켰다. 생성물을 HPLC (C18, 5 μ m, 고정상 250 x 10 mm; 완충액 A, H_2O , 완충액 B, 이동상 CH_3CN)를 이용하여 정제하여 화합물 6(DCDHF- β gal)을 수득하였다(63 mg, 8.9% 수율). ESI-MS m/z (M^+) calcd 615.20 found 638.30 ($M+Na^+$), 614.15 ($M - H^+$). 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1.79 (s, 6H), 3.36-3.39 (m, 1H), 3.40-3.42 (m, 2H), 3.48-3.70 (m, 5H), 4.12-4.13 (m, 1H), 4.66-4.70 (m, 2H), 5.05 (d, 1H, $J = 5$ Hz), 5.21 (s, 2H), 7.11 (d, 1H, $J = 16.45$ Hz), 7.18 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 7.46 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.73 (m, 1H), 7.91-7.94 (M, 3H), 7.99 (M, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$): 25.68, 49.07, 54.16, 60.72, 68.45, 68.54, 70.45, 73.79, 98.16, 99.69, 101.47, 111.56, 112.48, 113.32, 113.56, 116.22, 117.65, 117.68, 124.65, 127.98, 129.53, 130.52, 132.34, 132.35, 132.37, 134.08, 140.36, 147.98, 147.99, 149.85, 162.16, 176.09, 177.72, 177.74 ppm.

[0045] UV/Vis 및 형광 분광법

[0046] PBS 완충 용액 (pH=7.4) 중에 DCDHF- β gal의 저장 용액을 제조하였다. 580 nm에서 여기를 수행하였고, 모든 여기 및 방출 슬릿 폭은 5 nm이었다. 각각의 β -갈락토오스 분해효소의 농도, pH는 달리 하였으나, 총 부피는 3.0 mL로 고정하였다.

[0048] 형광 이미지화 및 유동세포 분석법에 의한 세포내 흡입 연구

[0049] 10% 소태아혈청 (Hyclone, Thermo Scientific, Logan, UT, USA) 및 $1 \times$ 항생제/항진균제 (Gibco, Life

Technologies, Grand Island, NY, USA)로 강화된 둘베코수정이글배지 (DMEM, Gibco, Life Technologies, NY, USA)를 간의 간세포암종 (HepG2), 폐 선암종 (A549), 및 경구암 (KB) 세포를 배양하는 데 사용되었다. 2×10^4 세포/웰의 농도를 갖는 8 웰 μ -슬라이드 (ibidi, Martinsried, Germany) 내로 세포를 뿌렸고, 5% CO₂하에서, 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 다음에, 1, 2, 6, 12 및 24시간 동안 10 μ M의 DCDHF- β gal로 세포를 처리하였다. 인산완충식염수 (PBS)로 3회 세척 및 4% 파라포름알데하이드 수용액으로 고정 후에, 세포핵의 시각화를 위해 NucBlue[®] Fixed Cell Stain Ready Probe[™] 시약 (Molecular probe, Life Technologies, OR, USA)을 사용하여 세포를 대비염색하였다 (counterstain). 형광 이미지화를 수행하기 위해 공초점 주사레이저 현미경 (LSM 710, Carl Zeiss, Germany)을 사용하였다. 세포 이미지화에 더하여, HepG2 세포에 대해 유동 세포 분석법 (flow cytometry)에 기초한 경쟁 분석을 수행하였다. 웰 당 1×10^5 세포 수로 세포를 12-웰 배양 플레이트에 24시간 동안 뿌린 후에, 세포에 10 mM 갈락토오스를 12시간 동안 사전처리하였다. 그 다음에, 10 μ M의 DCDHF- β gal를 세포에 6시간 동안 첨가하였다. PBS로 세척 후에, 유동 세포 분석법 (Attune acoustic focusing cytometer, Applied Biosystems, USA)에 의해 고정된 세포를 분석하였다.

[0051] **β -갈락토오스 분해효소 과발현된 HepG2 세포에서 비울척도적 형광 분석**

[0052] HepG2 세포 중에 β -갈락토오스 분해효소를 과발현시키기 위해, β -갈락토오스 분해효소의 과발현을 위해 설계된 pCMV-LacZ 벡터 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA)를 형질 주입 (transfection)을 위해 사용하였다. 세포 이미지화를 위한 8-웰 챔버 또는 유동 세포 분석법을 위한 6-웰 플레이트 내로 각각, HepG2 세포를 뿌리고 70% 융합성 (confluent)이 될 때까지 배양하였다. 그 다음에, 제조자의 지시에 따라, Lipofectamine[®] 3000 키트 (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA)를 사용하여, HepG2 세포 내로 1 μ g의 pCMV-LacZ 벡터를 형질주입시켰다. 형질전환 된 HepG2 세포의 β -갈락토오스 분해효소 활성을 확인하기 위한 Western blotting을 시행하기 위해 PBS로 세척한 후 단백질을 분해 효소 억제제 각테일 (Sigma, MO, USA)이 들어 있는 RIPA lysis buffer (iNtRON Biotechnology, Korea)로 얼음 위에서 녹였다. 10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리 한 Bradford 분석법 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 세포 용해액의 총 단백질 농도를 측정하고 폴리 비닐리덴플루오라이드 (PVDF) 멤브레인 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)으로 옮겼다. 차단 후, 막을 마우스 단일 클론 anti- β -갈락토시다제 및 anti- α -튜불린 항체 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)로 처리한 후, HRP- 접합 된 2 차 항체 (Santa Cruz Biotechnology)와 함께 배양 하였다. 증폭된 화학 발광 (ECL) 검출 시약 (Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 단백질 밴드를 관찰 하였다. pCMV-LacZ-형질주입된 HepG2 세포를 4 μ M의 DCDHF- β gal로 12시간 동안 처리한 후에, 공초점 현미경 (LSM 710)을 사용하여 형광 세포 이미지를 관찰하였고, 유동 세포 분석법 (Attune acoustic focusing cytometer)에 의해 형광 강도를 얻었다.

[0054] **세포독성 분석법**

[0055] 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이하닐 테트라졸륨 브로마이드 (MTT, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 검정을 사용하여 DCDHF- β gal 의 세포독성을 측정하였다. 96-웰 플레이트 중 1×10^4 세포/웰의 마이크로플레이트에서 HepG2 세포를 12시간 동안 배양하였다. 그 다음에, 증식 배지를 제거하고 새로운 배양 배지로 교체하였다. 상이한 농도의 DCDHF- β gal의 첨가 후에, 세포를 24시간 동안 배양하였다. 그 다음에, 10 μ l의 MTT 시약을 각각의 웰에 첨가하였고, 플레이트를 4시간 동안 배양하였다. 가용화 완충액의 첨가로 바이올렛 포르마잔 결정체 (violet formazan crystals)를 용해시켰고, 마이크로플레이트 리더 (xMark[™], Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡수율을 측정하였다.

[0057] **마우스 이중이식 종양 모델에서 DCDHF- β gal의 생체내 시각화**

[0058] 생체내 이미지화를 위해, β -갈락토오스 분해효소-과발현된 HepG2 세포를 종양 이중이식 마우스 모델을 수립하는 데 사용하였다. 모든 동물 실험들은 National Institutes (U.S.) guidelines for Health 및 우리 기관의 동물 연구 위원회의 제안에 따라 수행되었다. 지역 기관의 검토 위원회는 동물 보호에 대한 프로토콜 (KBSI-AEC1009)을 승인하였다. 리포펙타민 3000 시약 (Invitrogen)을 사용하여 LacZ 발현 벡터로 HepG2 세포를 형질

주입시켰고, 37 °C에서 2일 동안 배양하였다. 그 다음에, HepG2 세포 및 컨트롤 (control) HepG2 세포를 과발현시키는 1.2×10^7 β -갈락토오스 분해효소를 6주령 수컷 Balb/c nu/nu 마우스 (Orient Bio, Seungnam, Gyeonggi-do, South Korea)의 양쪽 옆구리 내로 피하 투여시켰다. 접종 7일 후에, 생체내 형광 이미지화 시스템 (Maestro, CRi Inc., Woburn, MA, USA)을 사용하여 1.5 mg/kg의 DCDHF- β gal를 정맥주사한 후, 종양을 갖는 마우스에서 생체내 형광 이미지화를 4시간 및 24시간에 수행하였다. 70% N₂O/30% O₂ 혼합용액 중 2.5% 아이소플루레인으로 마취된 마우스로부터 진신 이미지를 얻었고, Maestro 2.4 소프트웨어로 분석하였다. 절개된 종양 조직의 생체외 형광 이미지를 24시간 회생시킴에 따라 얻었고, 공초점 현미경 (LSM 710)을 통해 동결-절편된 (cryo-sectioned) 종양 조각의 광학 이미지화를 수행하였다. 현미경 이미지에서 종양 형광의 정량화는 이미지 처리 소프트웨어, ImageJ를 사용하여 분석하였다.

[0060] 결과 및 고찰

[0061] DCDHF- β gal의 합성

[0062] 전술한 합성 경로 및 방법에 따라 DCDHF- β gal를 제조하였다. 먼저, ASGPR-표적화된 갈락토오스 및 링커를 합성하였다 (Supporting Information, SI) [N.H. Ho, R. Weissleder, C.H. Tung, A Self-immolative Reporter for Beta-galactosidase Sensing. ChemBioChem. 8 (2007) 560-566.]. 다음으로, 종래 문헌에 보고된 방법을 적용하여 형광체를 합성하였다(P. Gopalan, H.E. Katz, D.J. McGee, C. Erben, T. Zielinski, D. Bousquet, D. Muller, J. Grazul, Y. Olsson, Star-shaped Azo-based Dipolar Chromophores: Design, Synthesis, Matrix Compatibility, and Electro-optic Activity. J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 1741-1747., S.J. Lord, N.R. Conley, H.L. Lee, R. Samuel, N. Liu, R.J. Twieg, W.E. Moerner, A Photoactivatable Push-pull Fluorophore for Single-Molecule Imaging in Live Cells. J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 9204-9205.). NIR 형광체 (화합물 4)의 갈락토오스 삽입된 링커 (화합물 3)과의 치환반응을 통해 아세테이트 보호된 화합물 (화합물 5)을 생성하고, NaOMe/MeOH를 사용하여 아세테이트 작용화기의 탈보호를 수행한 후 양이온 교환 수지 처리로 최종 생성물인 화합물 6(DCDHF- β gal)를 수득하였다. 합성된 화합물들을 ¹H NMR, ¹³C NMR, 및 ESI-MS에 의해 확인하였다.

[0063] DCDHF- β gal를 합성한 후에, β -갈락토오스 분해효소에 대한 선택성을 흡수율 및 형광 분광법을 사용하여 시험하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, β -갈락토오스 분해효소에 의한 DCDHF- β gal의 갈락토오스 유닛이 절단되어 세포 내부의 β -갈락토오스 분해효소를 선택적으로 검출할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서, 갈락토오스 유닛과 형광단 유닛 사이의 글리코 시드 결합은 내인성으로 생성된 β -갈락토오스 분해효소에 의해 절단될 것으로 예상되었다. DCDHF- β gal은 PBS 완충액 (pH 7.4, 37 °C, 도 2a) 중 540nm에서 강한 흡수 밴드를 보였다. DCDHF- β gal(20 μ M)의 시험 용액에 첨가되는 β -갈락토오스 분해효소의 양이 증가함에 따라(0-50 U), 540 nm에서 흡수가 감소되고 595 nm에서 새롭게 편이된 밴드가 형성되었다. 새로운 흡수 밴드는 β -갈락토오스 분해효소에 의한 갈락토오스 유닛의 쪼개짐 뒤에 음이온 중 모이어티의 형성(도 2a)에 기인한 것이다. 또한, DCDHF- β gal의 형광 스펙트럼을 β -갈락토오스 분해효소의 존재하에 분석하였다. DCDHF- β gal (5 μ M, 도 2b)의 흡수 스펙트럼 피크에 따라 580 nm의 여기 파장에서 형광 적정을 수행하였고, 615 nm에서 강한 형광 밴드를 나타내었다. 탐지체 DCDHF- β gal (5 μ M)의 용액에 첨가되는 β -갈락토오스 분해효소의 양이 증가함에 따라(0-50U) 615 nm에서 방출 밴드는 현저하게 감소되었다 (도 2b). 동시에, β -갈락토오스 분해효소의 비율척도적 탐지를 입증하는 665 nm에서의 새로운 방출 밴드 형성이 관찰되었다. 탐지 범위를 향상시키고 환경적 간섭을 최소화하는 비율척도적 형광 탐지체의 합리적인 신호 출력으로 인해 비율척도적 형광 탐지체(Ratiometric fluorescent probes)가 보통 선호된다. 자유 리간드의 665 nm와 615 nm에서의 형광 방출의 상대적 강도비율 (I_{665}/I_{615})은 0.12이었고, 이는 50 U의 β -갈락토오스 분해효소의 첨가에 따라 1.26으로 10.7배 증가하였다. 또한, 형광의 증가는 시간 함수(도 2c 및 2d)로서 측정되었고, 이는 665 nm에서 최대로 강화된 형광이 β gal (50 U)의 첨가 20 분 후에 얻어졌음을 보여준다. 이는 DCDHF- β gal에 의해 의한 β -갈락토오스 분해효소의 고감도 검출을 나타낸다.

[0064] 또한, DCDHF- β gal과 β -갈락토오스 분해효소의 활성화를 질량 스펙트럼을 통해 확인하였다. DCDHF- β gal은 614.15의 m/z 값에서 ESI-MS 질량 피크를 나타내었고, 이는 ($M-H^+$)와 대응되는 것이다. β -갈락토오스 분해효소의 첨가 후에, 342.25 ($M+K^+$)에서 새로운 질량 피크가 발견되었다. 이러한 질량 분석은 또한 DCDHF- β gal과 β -갈락토오스 분해효소의 활성화를 가리킨다. β -갈락토오스 분해효소 매개된 쪼개짐 단계의 pH 의존성을 또한 조

사하였다(도 6). DCDHF- β gal는 3-10의 pH 범위 내에서 안정하다. 하지만, DCDHF- β gal는 이러한 pH 범위 (3-10) 내에서 β -갈락토오스 분해효소와 즉시 반응한다. 이러한 발견은 또한 pH 효과에 의한 간섭 없는 생물적 조건 하에서의 β -갈락토오스 분해효소의 탐지를 위한 DCDHF- β gal의 유용성을 나타낸다. 추가로, DCDHF- β gal의 반응성에 대한 다른 생물적 피분석물의 간섭 또한 시험하였다. 200 등가물의 환원 효소, 에스테라제, 리소자임, 시스테인, 글루타티온, 다이티오프레이톨 (dithiothreitol), 황화 수소 및 과산화수소의 처리에 의해 현저한 형광성의 변화가 관찰되지 않았다 (도 7).

[0065] 또한, DCDHF- β gal의 세포독성을 HepG2 세포를 이용한 MTT 분석에 의해 평가하였다 (도 8). 세포가 DCDHF- β gal로 처리되고, 24시간 동안 추가로 배양되는 경우, DCDHF- β gal가 상이한 농도에서 HepG2 세포에 대해 낮은 세포독성을 가짐을 관찰하였다. 종래 연구에서 다른 간세포암 세포계를 포함한 다양한 암세포계 중에 HepG2 세포계가 ASGPR을 매우 과발현시키는 것으로 보고된 바 있다(J.H. Han, Y.K. Oh, D.S. Kim, C.K. Kim, Enhanced Hepatocyte Uptake and Liver Targeting of Methotrexate using Galactosylated Albumin as a Carrier. Int. J. Pharm. 188 (1999) 39-47.). 종합해보면, DCDHF- β gal은 확연한 세포독성 없이 그의 갈락토오스 모이어티를 사용하여 간세포암종 세포를 효율적으로 표적화하는 능력을 가진다.

[0067] DCDHF- β gal의 세포 및 효소 특이성

[0068] 아시알로당단백질 수용체-매개된 세포내 섭취 (endocytosis)를 이용하여 간세포에 대한 DCDHF- β gal의 표적화된 세포 흡입을 조사하기 위해, 몇몇의 암세포계를 DCDHF- β gal로 처리하였다. 세포내 흡입은 공초점 이미지화 및 유동 세포 분석법에 의해 측정하였다. ASGPR을 발현시키는 HepG2 세포를 다양한 시간 (1, 2, 6, 12시간)별로 10 μ M의 DCDHF- β gal와 함께 배양시켰고, HepG2 세포에 의해 방출된 형광은 어떠한 간섭 없이 610 nm 및 649 nm에서 측정되었다 (도 9). 측정 결과, 둘 모두의 방출 스펙트럼으로부터의 형광은 2시간에 현저히 나타나기 시작했고, 6시간에 최대로 나타났다. 또한, 배양 24시간이 경과된 이후에도 형광 신호가 A549 및 KB, ASGPR 음성 세포계에서는 탐지되지 않았고, 오직 HepG2 세포에서만 탐지되었다 (도 3). 이 결과는 DCDHF- β gal로 처리 한 세포의 유동 세포 계측법 분석에 의해 뒷받침되었다 (도 10). 또한, 이러한 결과는 10 mM 갈락토오스의 사전처리 후에 DCDHF- β gal (10 μ M)로 라벨링된 HepG2 세포를 이용한 유동 세포 분석법에 의해 확인되었다 (도 3). HepG2 세포의 표면 상의 ASGPR에 대한 DCDHF- β gal의 갈락토오스 결합을 차단할 수 있는 HepG2 세포가 과량의 갈락토오스로 사전-첨가된 경우, 형광 막대그래프 플롯에서 감소된 세포 흡입이 관찰되었다. 이러한 세포 흡입 연구는 DCDHF- β gal가 ASGPR에 대한 표적화 능력을 통해 높은 선택성을 가짐을 의미한다.

[0069] DCDHF- β gal가 선택적으로 β -갈락토오스 분해효소에 대한 비울적도적 형광 탐지체가 될 수 있는지 여부를 추가로 조사하기 위해, 처음에 HepG2 세포에서 pCMV-LacZ 벡터 및 과발현된 β -갈락토오스 분해효소를 이용하여 형질주입 실험을 수행하였다. 음성 대조군 HepG2 세포와 과발현된 β -갈락토오스 분해효소를 지닌 양성 HepG2 세포를 각각 12시간 동안 DCDHF- β gal (4 μ M)으로 처리하였고, 약 650 nm에서 상대적 형광 강도를 현미경 및 유동 세포 분석법으로 평가하였다. 도 4a에 나타나는 바와 같이, 강화된 형광은 대조군 세포보다는 오히려 β -갈락토오스 분해효소-과발현된 세포에서 관찰되었다. 이것은 웨스턴 블랏 분석 (도 12)에 의해 더 설명되었다. 또한, 유동 세포 분석법의 막대그래프 플롯은 과발현된 β -갈락토오스 분해효소를 지닌 HepG2 세포에서 증가된 형광을 보여주었고, 이들의 평균 형광 강도는 대조군 세포보다 2배 이상 높았다 (도 4b, 및 c). 이러한 결과들은 DCDHF- β gal이 형질주입된 세포에서 다량의 β -갈락토오스 분해효소에 의해 적절하게 쏘개졌고, 650 nm에서 증가된 형광 신호를 나타나게 했음을 시사하는 것이다.

[0071] DCDHF- β gal의 생체내 표적화 능력

[0072] 과발현된 β -갈락토오스 분해효소 HepG2 세포를 갖는 이중이식 모델을 이용하여 DCDHF- β gal의 종양-특이적 표적화 능력을 조사하였다. 플라스미드 형질주입 방법에 의해 과발현된 β -갈락토오스 분해효소를 지닌 HepG2 세포를 제조한 후에, 과발현된 β -갈락토오스 분해효소 및 대조군 HepG2 세포를 마우스의 양쪽 옆구리에 피하 점종시킴으로써 종양을 갖는 마우스 이중이식을 수립하였다. 도 5a에 나타나는 바와 같이, 양쪽 종양에 24시간 동안 정맥내 주입된 DCDHF- β gal (1 mg/kg)의 축적은 600-700 nm에서 방출이 있는 생체내 전신 형광 이미지화에 의해 명백하게 가시화되었다. DCDHF- β gal가 HepG2 종양 상의 ASGPR의 선택적인 전달을 위해 효율적인 표적화 리간드 (갈락토오스)를 이용함에 따라, 상대적으로 이른 시간 지점 (주입 후 4시간, 도 13)에서 두 종양 모두 명백한 형광 신호가 탐지되었다. Maestro 이미지화 시스템에 의해 수행된 생체외 형광 평가는 대조군 종양 보다

는 과발현된 β -갈락토오스 분해효소를 지닌 HepG2 세포에서 생성된, 절제된 종양 조직에서 650 nm 내지 700 nm 범위의 형광 방출 스펙트럼의 강도가 현저히 높다는 것을 보여주었다(도 13 (b), (c), 표 1).

표 1

<i>Ex vivo</i> tumors		Scaled counts/s	$\times 10^6$ phot/cm ² /s
—	Background	24.1126 $\pm$ 0.0032	125073.0000 $\pm$ 16.6822
	Signal	0.4768 $\pm$ 0.0002	2449.1600 $\pm$ 0.8176
β -Gal. overexpressed	Background	51.3965 $\pm$ 0.0051	268151.0000 $\pm$ 26.8199
	Signal	1.1112 $\pm$ 0.0002	6309.9700 $\pm$ 1.2022

700 nm 부근에서 측정된 이러한 비율척도적 형광 탐지는 종양 조직에서 증가된 β -갈락토오스 분해효소의 효소 활성에 의해 유발될 수 있다. 또한, 이러한 결과는 650 nm 부근의 방출 파장에서 동결-절편된 종양 조직의 형광 이미징에 의해 평가되었고, 과발현된 β -갈락토오스 분해효소를 지닌 종양에서 형광 신호의 현저한 증가를 나타내었으며(도 5b), 이는 종양 형광 이미징의 정량 분석에 의해 뒷받침된다(도 5c).

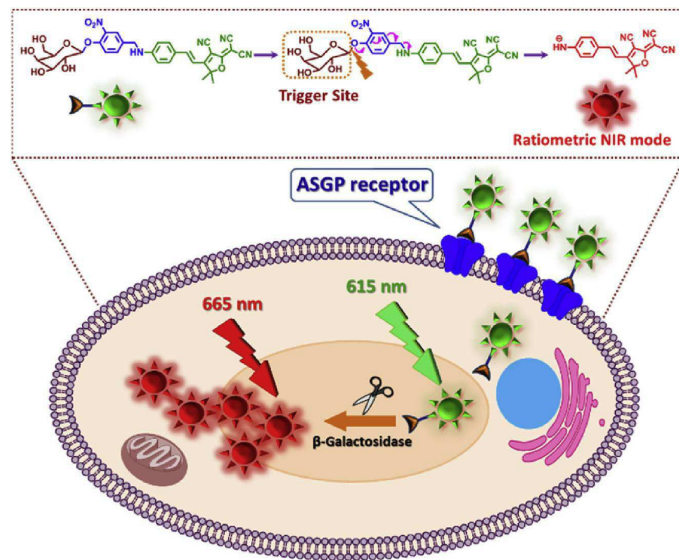
세포의 β -갈락토오스 분해효소 또는 그의 효소 활성의 이미징화를 위한 형광 탐지체가 있더라도, 낮은 파장 형광 신호 또는 표적화된 전달과 같은 현실적인 어려움이 내시경 형광 이미징화 또는 β -갈락토오스 분해효소 탐지를 위한 상업적인 종양-표적화 시약을 이용하는 실시간 추적을 통한 그들의 생체내 적용을 방해하였다. 본 발명에서 다른 DCDHF- β gal은 생체내 종양-표적화된 형광 이미징화뿐만 아니라 임의의 수정 없이 β -갈락토오스 분해효소에 대한 비율척도적 형광 반응을 가능하게 하였다. 게다가, 665 nm에서의 표적화된 탐지체의 NIR 형광 방출은 간세포암종으로부터 유래된 종양에서 β -갈락토오스 분해효소의 비침습성 생체내 시각화를 달성할 수 있게 해주었다.

결론

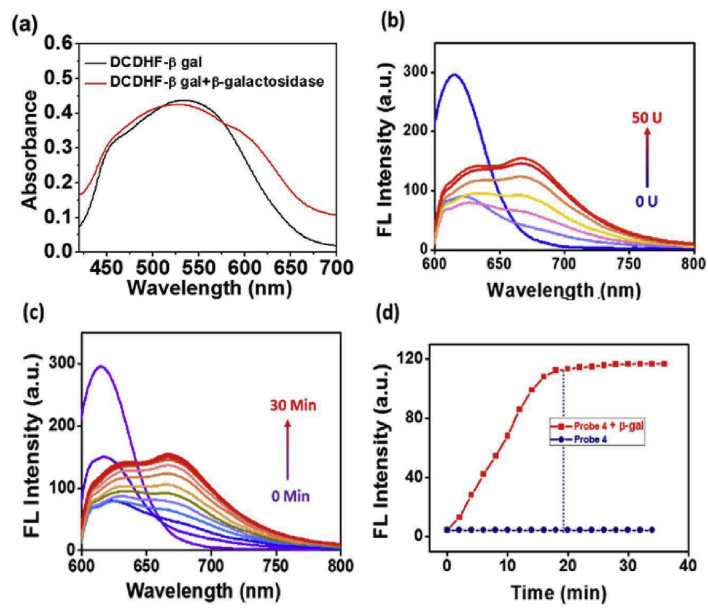
본 발명에서는 간세포-표적화된 이미징화, 및 β -갈락토오스 분해효소-특이 활성에 대해 이중적인 잠재력이 있는, 신규의 NIR 비율척도적 형광 프로브 화합물인 DCDHF- β gal을 제공한다. 본 발명에 따른 DCDHF- β gal은 비율척도적 형광 반응을 지니고 간세포 상의 ASGPR에 대한 뚜렷한 표적화 능력 및 β -갈락토오스 분해효소에 대한 높은 민감성을 나타내었다 (도 1). DCDHF- β gal 용액에 첨가되는 β -갈락토오스 분해효소의 양을 증가시킬 때, 615 nm에서 방출 밴드의 감소가 일어났으며, 동시에 pH 효과에 의한 간섭 없이 β -갈락토오스 분해효소의 비율척도적 탐지를 입증하는 665 nm에서 새로운 방출 밴드의 형성이 관찰되었다. 이러한 비율척도적 탐지체는 적은 세포 독성과 함께, 간세포암종, HepG2 세포계 내로의 매우 특이적인 ASGPR-매개된 흡입을 나타내었다. DCDHF- β gal의 이러한 종양-표적화 능력 및 NIR 방출은 DCDHF- β gal이 간세포암종 이종이식 마우스 모델에서 생체내 표적화된 이미지를 위해 유용한 탐지체가 될 수 있음을 의미한다. 따라서, DCDHF- β gal은 ASGPR-매개된 세포 흡수에 이어 β -갈락토오스 분해효소에 대해 이작용성 비율척도적 형광 반응을 나타내었고, 생체내 표적화된 시각화 및 치료적 접근을 위한 훌륭한 이미징화 플랫폼이 될 수 있을 것이다.

도면

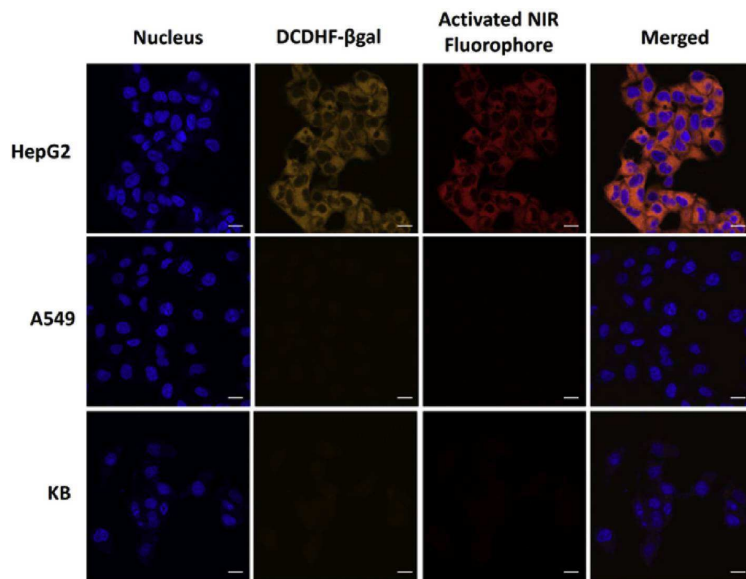
도면1



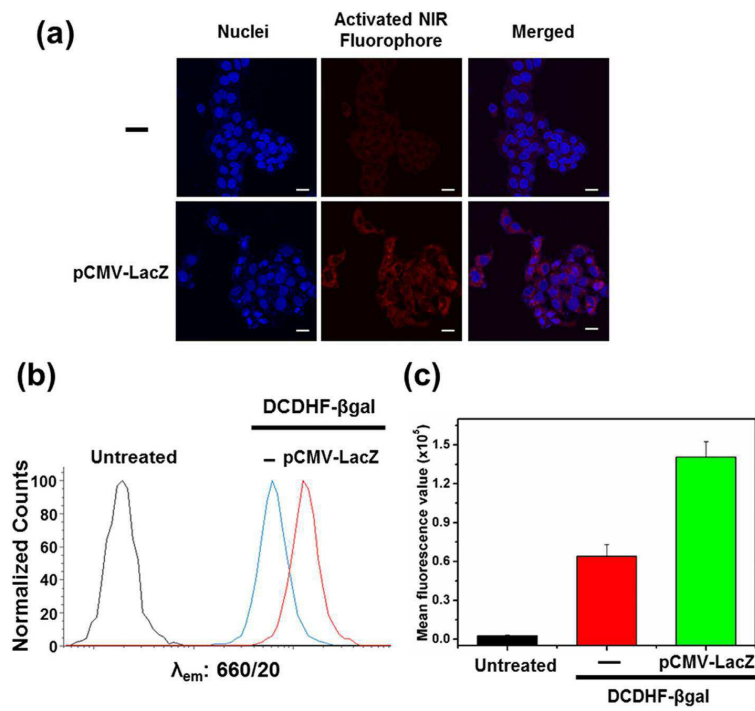
도면2



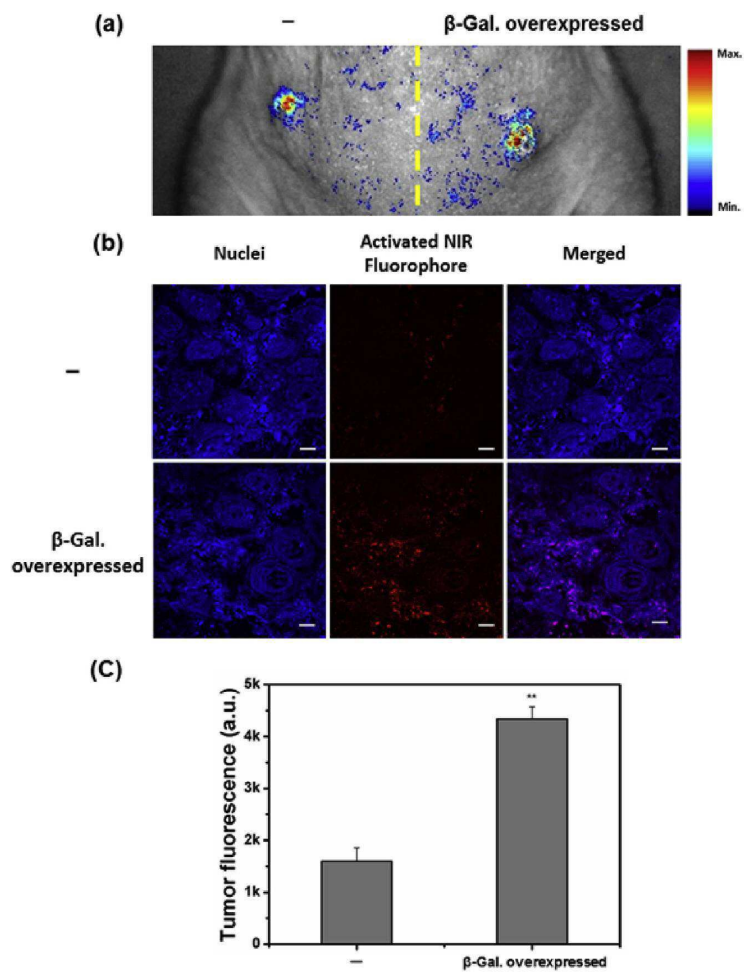
도면3



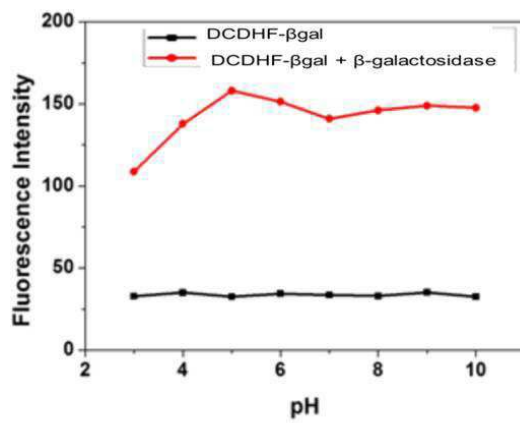
도면4



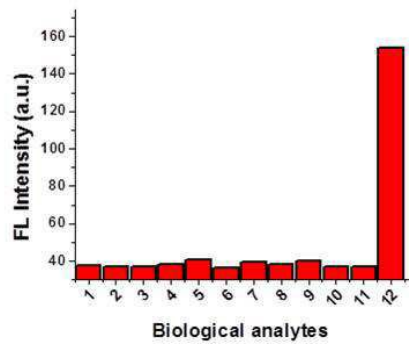
도면5



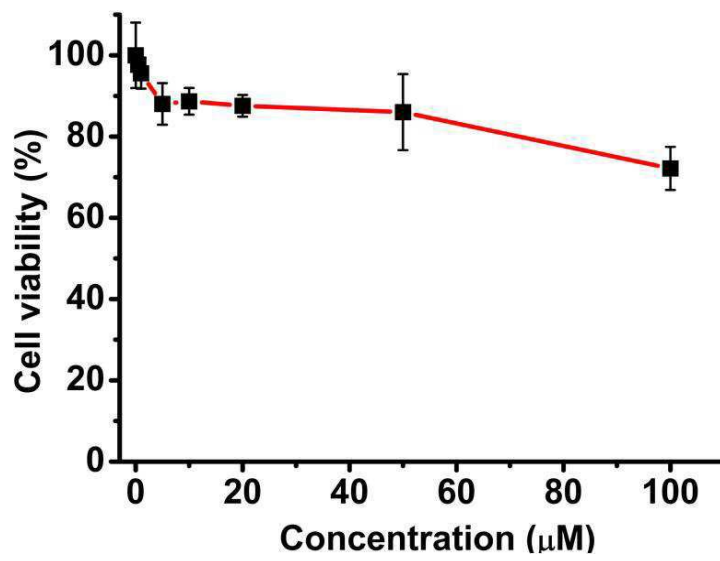
도면6



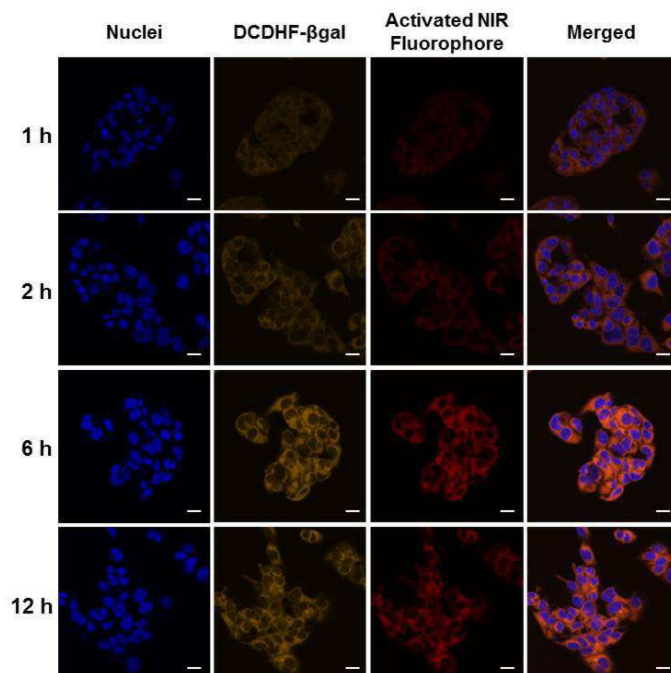
도면7



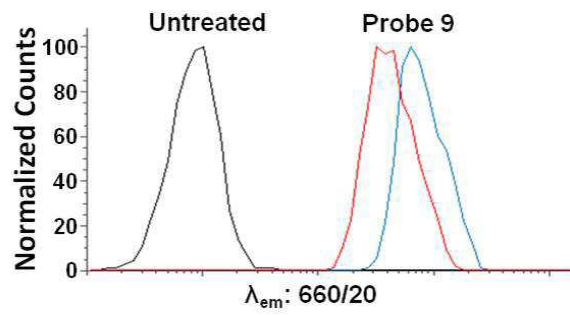
도면8



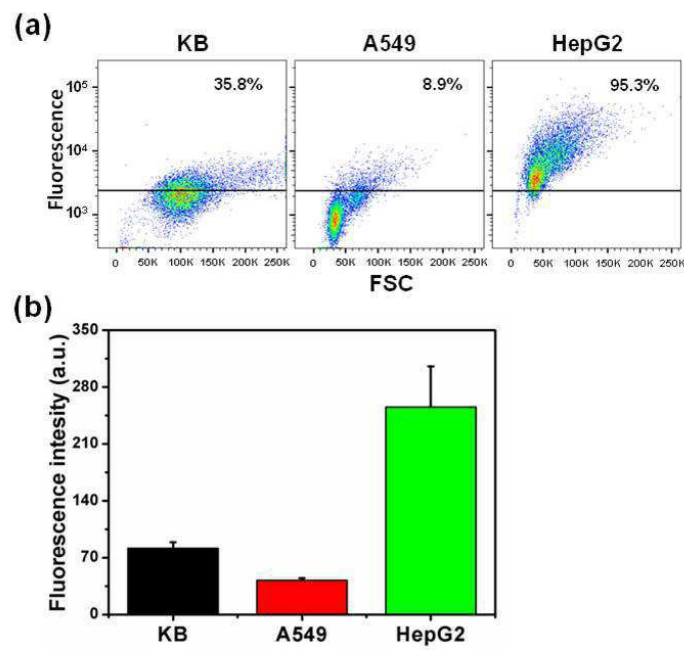
도면9



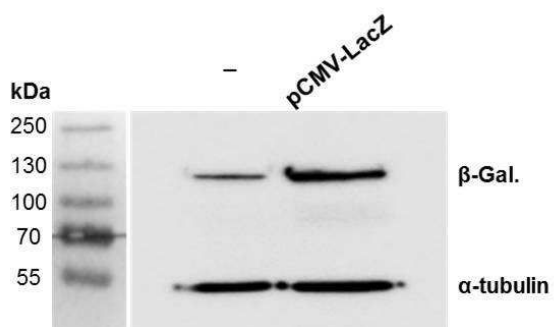
도면10



도면11



도면12



도면13

