(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년05월20일
(11) 등록번호 10-1623304
(24) 등록일자 2016년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/69 (2006.01) *A61K 31/4164* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/69 (2013.01)
A61K 31/4164 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0049985
(22) 출원일자 2015년04월09일
심사청구일자 2015년04월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR101510319 B1

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김종승
경기도 성남시 분당구 내정로 152 130-2402(수내동, 파크타운롯데아파트)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 송호선

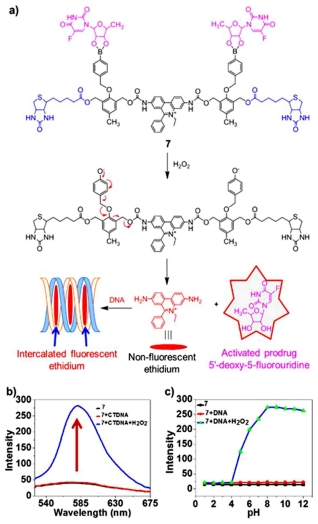
(54) 발명의 명칭 **미토콘드리아에 대한 특이적 표적화가 가능한 항암 치료진단제**

(57) 요 약

본 발명은 미토콘드리아에 대한 특이적 표적화가 가능한 항암 치료진단제에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 약물 활성화에 따른 세포괴사를 인 시투 모니터링하기 위한 형광원; 종양 조직들에 대한 특이적 표적화를 위한 종양-표적화 성분; 약물전구체를 활성화시키기 위한 약물전구체 활성화 성분; 및 상기 약물전구체 활성화 성분에 의해서 활성 약물로 변환되는 약물전구체를 포함하는 항암 치료진단제에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타내며, 활성화 시에 암 세포들의 자가-모니터링 세포괴사 및 정확한 암 치료를 가능하게 하는 치료진단제를 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/574 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014001608
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 리더연구자지원
연구과제명 발광센서재료연구단
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

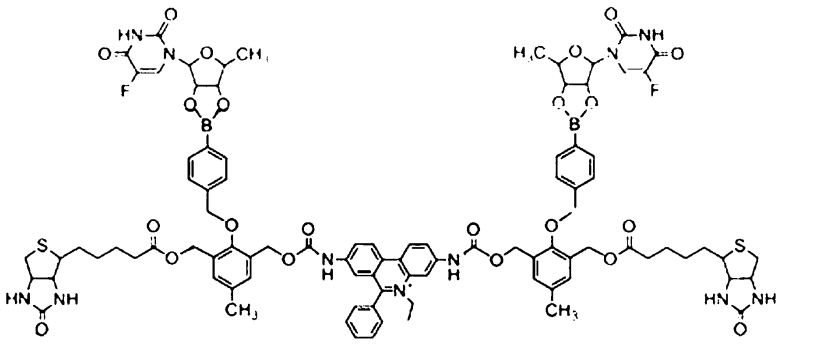
청구항 1

삭제

청구항 2

하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 항암 치료진단제:

<화학식 1>



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아에 대해서 특이적으로 표적화가 가능한 항암 치료진단제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 초기 암을 진단하고, 종양에 치료 약물들을 전달하며, 약물 방출 동력학을 모니터링할 수 있으며, 암 단계들을 시각화할 수 있는 치료진단 전략들의 개발은, 암 환자들을 위한 효과적이고 개별화된 약물 기술들을 제공한다. 암 치료를 위한 이러한 양상들을 하나로 조합함으로써, 다양한 독성 부작용들을 최소화하고, 기존 약물들의 치료 지수들을 개선할 수 있다. 이러한 치료진단 전략들은, 다양한 효소들 및 활성 산소종들 (reactive oxygen species, ROS)을 과발현하고 진단 및 치료 약물들의 활성화를 유발하는 산화환원 불균형을 보유한 암 조직들에 대해서 특히 유용하다. 적당한 치료진단제들을 고안하는 작업은 매우 어려운 것으로서, 그 개발을 위해서는 지속적인 노력이 요구된다.

[0003] 세포의 발전소라 할 수 있는 미토콘드리아는 항상성을 유지하며, 산화적 인산화 반응에 의해서 대사 에너지를 제공하고, ROS에 의해서 세포내 신호전달을 담당하며, 세포괴사 (apoptosis)를 조절한다. 미토콘드리아는 사멸 신호, 영양 인자 결핍, DNA 손상 및 생체이물들 (xenobiotics)을 포함하는 다양한 유형의 자극들에 반응하는 동시에, 미토콘드리아-매개 세포괴사 단백질들을 방출한다. 미토콘드리아는 단백질의 Bcl-2 패밀리에 의해서 조절되는 내생적 세포괴사 경로를 조절하고, 뒤이어 카스파아제-캐스케이드 (caspase-cascades)를 활성화하며, 이는 세포 사멸로 이어진다. 정상적인 세포들에서의 중대한 역할에도 불구하고, 암세포들에서 미토콘드리아는 다르게 기능하며, 종양 발생 및 암 진전에 관여한다. 미토콘드리아의 교란은 많은 세포 기능들의 조절 불가능을 야기하는데, 이에는 강화된 대사, 산화적 인산화 및 자가소화작용 (autophagy)이 포함되고, 이는 세포 생존 또는 사멸에 매우 큰 영향을 미친다.

[0004] 따라서, 미토콘드리아의 필수적이면서도 해로운 기능으로 인해서, 미토콘드리아-표적화된 항암 치료진단제들에 의한 내생적 세포괴사의 조절은, 종양 세포 박멸을 위해서 아직까지 연구된 바 없는 잠재적인 화학치료요법이 될 수 있다.

[0005] 예를 들어, 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0074177호는 미토콘드리아-표적화된 항-종양 물질을 개시하고 있으며, 이는 히트쇼크 단백질과 같은 분자 샤페론 억제자 (molecular chaperone inhibitor)와 미토콘드리아-관통성 모이어티가 결합된 구조를 갖는다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0135803호는 반응성 산소종을 생성하거나 산화촉진을 유도하는 잔기와 이러한 잔기를 미토콘드리아에 전달하는 전달 잔기를 포함하는 미토콘드리아 전달용 항암 화합물을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 미토콘드리아를 특이적으로 표적화하는 것이 가능하며, 종양 표적화, 진단 및 종양 부위로의 전구체약물 전달이 가능한 항암 치료진단제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서,

[0008] 약물 활성화에 따른 세포괴사를 인 시투 모니터링하기 위한 형광원;

[0009] 종양 조직들에 대한 특이적 표적화를 위한 종양-표적화 성분;

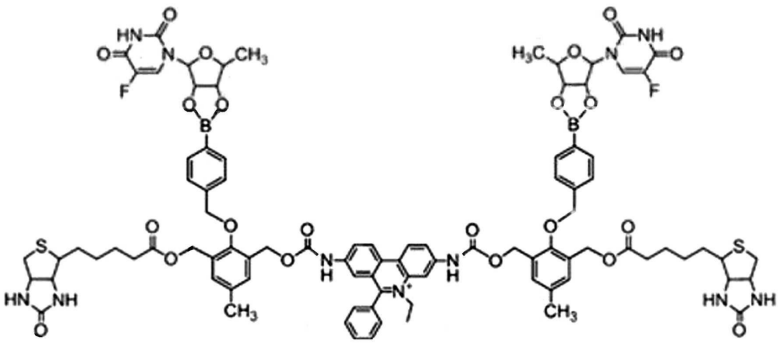
[0010] 약물전구체를 활성화시키기 위한 약물전구체 활성화 성분; 및

[0011] 상기 약물전구체 활성화 성분에 의해서 활성 약물로 변환되는 약물전구체

[0012] 를 포함하는 항암 치료진단제를 제공한다.

[0013] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 항암 치료진단제는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

화학식 1

[0014] 

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타내며, 활성화 시에 암 세포들의 자가-모니터링 세포괴사 및 정확한 암 치료를 가능하게 하는 치료진단제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1a는 H_2O_2와 반응한 이후에 약물전구체 (5'-DFUR) 및 형광원이 활성화되는 메카니즘을 나타낸 것이며, 도 1b는 우 흉선 (CT-DNA: 50 ㎍/ml) 및 H_2O_2 (500 μM)의 존재 하에서 본 발명에 따른 치료진단제 (10 μM)의 형광 스펙트럼을 도시한 것이고, 도 1c는 CT-DNA (50 ㎍/ml) 및 H_2O_2의 존재 하에서 본 발명에 대한 치료진단제 (10 μM)의 형광 증가를 pH의 함수로서 나타낸 그래프이다. λ_{max}= 500 nm, 슬릿 폭 = 5,5.

도 2a 내지 2f는 비오틴-수용체-포지티브 A549 세포들 및 비오틴-수용체-네거티브 WI-38 세포들의 형광 영상들을 도시한 것이며 (200x 배율), 도 2g는 다양한 화합물 조건들로 MTT 분석 중 세포 생존성의 백분율을 도시한

것이고, 도 2h는 540 nm에서 MTT 분석 중 흡광도를 표시한 그래프이며, 도 2i는 LPS (1 ㎍/ml) 존재 또는 부존재 하에서 본 발명에 따른 치료진단제의 이소타입들을 제시한 것이고, 도 2j는 Annexin V-염색 및 본 발명에 따른 치료진단제-염색의 초기 및 후기 세포사멸성 세포들에 대한 정량적 FACS 분석 결과를 도시한 것이며, 도 2k는 Annexin V-염색 및 PI-염색의 초기 및 후기 세포사멸성 세포들에 대한 정량적 FACS 분석 결과를 도시한 것이고, 도 2l은 FACS에 의한 세포 사이클 분포 분석에 대한 결과이다.

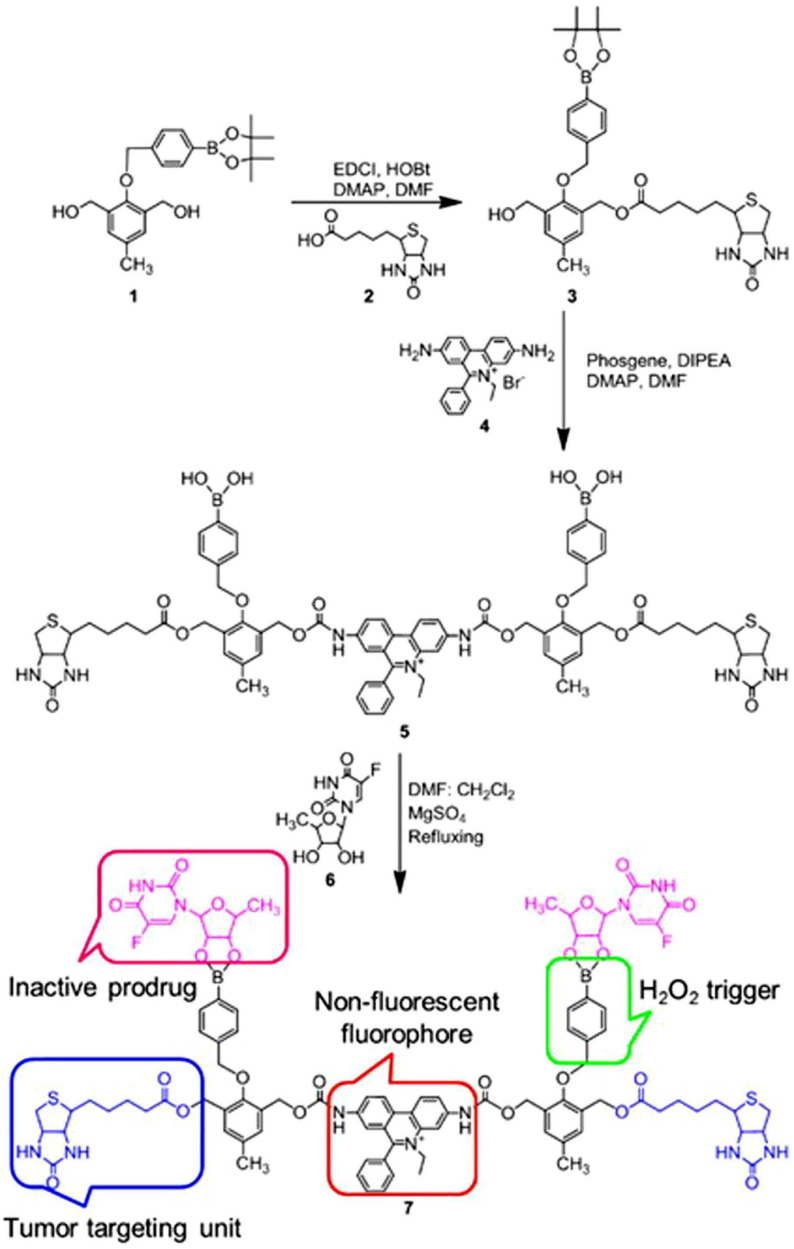
도 3a 내지 3j는 본 발명에 따른 치료진단제의 세포내 영역화 및 프로-세포사멸성 작용을 도시한 것으로서, 도 3a 내지 3f는 본 발명에 따른 치료진단제 (50 μM)가 미토-추적자, 특히 A549 세포들 중의 ER-추적자와 12 시간 동안 배양된 이후에 완전히 함께 영역화된다는 것을 보여주고 있으며, 도 2g는 약물 수송자 및 프로-세포사멸성 및 안티-세포사멸성 유전들의 발현을 역전사 중합효소 연쇄 반응에 의해서 분석한 것이고, 도 2h는 웨스턴 블랏팅에 의해서 사멸 수용체 및 미토콘드리아-매개 세포사멸성 단백질들의 변형을 확인한 것이고, 도 2i는 본 발명에 따른 치료진단제의 개략적인 작용 모드를 도시한 것이고, 도 2j는 LPS-유도체 처리된 세포들에서 대조군 vs. 치료진단제 중 미토콘드리아의 미세구조를 나타낸 것이다.

도 4a 내지 4f는 인 비보/엑스 비보 이종이식 마우스 모델들에서 본 발명에 따른 치료진단제의 화학치료적 효과들을 나타낸 도면들로서, 도 4a는 접종 4주 후 이종이식 마우스에서 본 발명에 따른 치료진단제의 대표적 형광인 비보 영상이고, 도 4b는 접종 13주 후 대조군 및 본 발명에 따른 치료진단제가 주사된 이종이식 마우스의 엑스 비보-해부된 기관들 및 광학 형광 영상들을 도시한 것이며 [간 (1 및 1'), 종양 조직 (2 및 2'), 폐 (3 및 3'), 심장 (4 및 4'), 비장 (5 및 5'), 및 신장 (6 및 6')], 도 4c 및 4d는 각각 대조군 및 본 발명에 따른 치료진단제가 주사된 이종이식 마우스로부터의 종양 저온단편들의 형광 세포내 영상이고 (배율: 200x), 도 4e는 대조군 및 본 발명에 따른 치료진단제가 주사된 이종이식 마우스에서의 인 비보 종양 진전에 대한 치료진단제의 효과를 나타낸 사진 및 실험 개시 후 9주 후에 해부된 종양 조직들의 사진이며, 도 4f는 이종이식 마우스에서의 종양들의 성장을 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 미토콘드리아 표적화 항암 치료진단제 전구체 약물의 디자인, 합성 및 개발에 관한 것이며, 본 발명에 따르면 미토콘드리아-과발현된 H_2O_2의 존재 하에서 두 가지 분자들을 전달하고, 종양 세포들에서 내부 (미토콘드리아성) 세포괴사를 유도한다. 본 발명에 따른 치료진단제는 하기 합성 개요에서 볼 수 있는 바와 같이 4가지 구성 성분들을 포함한다.

[0018] <본 발명에 따른 치료진단제의 합성 개요>



[0019]

[0020] 제1 성분은 형광원이며, 이는 약물 활성화에 따라서 내부 세포괴사를 인 시투 모니터링할 수 있다. 이러한 형광원으로는 에티듐 (ethidium)을 예로 들 수 있는데, 에티듐은 미토콘드리아 내에 선호적으로 분포할 수 있으며; 수용성 용액에서는 약하게 형광을 나타내지만 이중 나선 RNA 또는 DNA에 인터컬레이션 (intercalation)되면 강한 형광을 나타낸다.

[0021] 제2 성분은 치료진단제를 종양 조직들로 안내하는 종양-표적화 성분이다.

[0022] 제3 성분은 비정상 미토콘드리아-과발현된 ROS 활성인자로서, 이는 암 세포들에서 치료진단제를 활성화한다.

[0023] 제4 성분은 비활성 약물전구체로서, 이는 종양 세포들에 높은 농도로 존재하는 물질에 의해서 활성 약물로 전환된다. 이러한 비활성 약물전구체의 예로는, 5'-데옥시-5-플루오리딘 (5'-DFUR)을 예로 들 수 있는데, 이는 종양 세포들에 풍부하게 존재하는 티미딘 포스포릴라아제에 의해서 활성 약물인 5-플루오로우라실 (5'-FU)로 전환된다. 그러나, 5'-FU는 안전성 프로파일 및 높은 약물 내성으로 인해서 그 임상적 사용이 제한되는 바, 본 발명에서는 생이용가능성 및 활성 약물의 효율을 증가시키기 위해서 5'-FU의 전구체약물인 5'-DFUR을 활용하였다.

[0024] 본 발명에 따른 치료진단제는 종양 세포들에 의해서 선택적으로 섭취되며, 내생적으로 생산된 미토콘드리아 H_2O_2에 의해서 활성화되고, 전구체약물, 예를 들어 5'-DFUR이 종양 부위로 방출된다. 인 비트로 및 인 비보 전구체

약물 방출은 인 시투 발생된 형광 세포괴사 형광원, 예를 들어 에티듐에 의해서 모니터링된다. 미토콘드리아에서 약물 활성화가 이루어진 이후에, 본 발명에 따른 치료진단제는 종양 세포들에서 내생적 세포괴사를 유도하고, 게놈 DNA 또는 RNA-손상 경로의 활성화가 뒤를 잇는다.

[0025] 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 치료진단제로 처리한 이후에 이종이식 마우스 모델에서 놀라운 정도의 종양 성장 억제 효과가 관찰되었다. 따라서, 본 발명에 따른 치료진단제는 활성화 시에 암 세포들의 자가-모니터링 세포괴사 및 정확한 암 치료를 가능하게 하는 최초의 미토콘드리아-표적화 항암 치료진단제라 할 수 있다.

[0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0027] 합성 재료 및 방법

[0028] 반응을 위해서 사용된 화학물질들은 Aldrich, Acros Organics, Alfa-Aesar, Carbosynth, 및 TCI로부터 구입하였으며, 더 이상의 정제 없이 사용하였다. 실리카 겔 60 (Merck, 0.063-0.2 mm)을 컬럼 크로마토그래피용으로 사용하였다. 분석 TLC는 Merck 60 F254 실리카 겔 (사전코팅된 시트, 0.25 mm 두께)을 사용하여 수행하였다. ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼을 $CDCl_3$, CD_3OD 및 DMSO 중에서 Varian 300 및 400 MHz 스펙트로미터로 측정하였으며, 이때 내부 기준 물질로는 TMS를 사용하였다. ESI-MS 스펙트럼은 전기분무 계면 (electrospray interface)을 구비한 Thermo Scientific LTQ Orbitrap Mass Spectrometer로 측정하였다.

[0029] 흡수 및 형광 측정

[0030] 삼중-증류된 물을 사용한 화합물 5, 7 및 10의 작업 용액들은 DMSO 중의 스톡 용액 (1.0 mM)으로부터 제조하였으며, 스펙트럼 측정은 생리적 조건 하에서 수행하였다 (DMSO: PBS; 0.5: 9.5, v/v, pH 7.4, 37℃). 흡수 스펙트럼은 S-3100 (Scinco) 스펙트로포토미터 상에서 20 μM의 화합물을 사용하여 기록하였다. 형광 스펙트럼은 10 μM의 화합물을 사용하여, RFPC-5301 스펙트로플루오로미터 (Shimadzu) 상의, 여기 파장 500 nm에서, 여기 및 발광 슬릿 폭 각각 5 및 5 nm에서 측정하였다. 송아지 흉선 DNA (CT-DNA)는, 삼중 증류된 물 중에 용해된 상태로 -20℃에서 보관된 것을 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 용액 테스트를 위해서, 500 μM의 활성 산소종 (ROS)을 화합물 5, 7 및 10에 투여하였다. 수퍼옥사이드 (O^{2-})는 고체 KO_2로서 사용하였으며, 과산화수소 (H_2O_2), 터트-부틸 하이드로퍼옥사이드 (TBHP), 및 하이포아염소산 이온 (OCl^-)은 상업적으로 구입가능한 30%, 70%, 및 5% 수용액으로서 사용하였다. 터트-부톡시 라디칼 (· OtBu) 및 하이드록실 라디칼 (· OH)은 각각 1 mM Fe^{2+}와 500 μM의 THBP와의 반응, 또는 500 μM의 H_2O_2와의 반응에 의해서 얻었다.

[0031] 세포 배양, 시약 및 영상화

[0032] 인간 폐 흑색종 세포들 (A549) 및 정상 폐 섬유아세포 (WI-38)는 한국 세포주 은행 (서울, 대한민국) 및 American Type Culture Collection (ATCC, Massachusetts, MA, USA)으로부터 구입하였다. 세포들은, 37 ℃, 5% CO_2 및 95% 공기 환경 중에서, 10% 우 태아 혈청 (FBS, GIBCO), 1% 페니실린 (GIBCO) 및 스트렙토마이신 (GIBCO)으로 보충된 RPMI 1640 (GIBCO BRL., Grand Island, NY, USA) 중에서 배양하였다. 세포 밀도가 70~80%의 컨플루언스 (confluence)에 도달하였을 때, 서브컬쳐를 수행하였다. 배지는 매 ~3일 이후에 교환하였다.

[0033] 세포들을 35 mm 공초점 접시 (유리 바닥 접시, SPL, 대한민국, 경기도)에 접종한 다음, 48 시간 동안 안정화시켰다. 세포 밀도는 35 mm 공초점 접시에 대해서 2.0×10^6이었다. 형광 영상들을 검사하기 이전에, FBS를 함유하지 않는 2 ml 배양 배지 중의 본 발명에 따른 치료진단제를 다양한 농도로, 비오틴-수용체 양성 A549 세포들 및 비오틴-수용체 음성 WI-38 세포들에, 24 시간 동안, 37 ℃, 5% CO_2 및 95% 공기 환경 중에서 처리하였다. 이어서, 세포들을 1 ml PBS로 2회 세척하였다. 본 발명에 따른 치료진단제 화합물 (35 mm 접시에 대해서 2 ml 배지의 10 μl DMSO 중 50 μM)을 배양 배지에 6 또는 24 시간 동안 첨가하였다. 세포들을 1 ml PBS로 2회 세척하고, 480 nm 아르곤 레이저 및 580 nm 장 통과 필터를 구비한 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Carl-Zeiss LSM 5 Exciter, Oberko, Germany)을 사용하여 형광 영상들을 얻었다. 달리 서술되지 않는 한, 세포들 및 조직들에 대한 모든 형광 영상들은 동일한 조건 하에서 기록하였다. 본 발명에 따른 화합물에 대한 형광은 500 nm에서 여기시키고 650 nm 밴드 통과 필터에 의해서 발광을 수집하였다. 미토-추적자 및 ER-추적자의 형광에 대해서는, 적색 형광을 405 nm에서 여기시키고, 발광을 545-560 nm에 의해서 수집하였다. 얻어진 데이터들을

MetaMorph Offline 소프트웨어 (Version 7.6.1, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)의 3D 디콘볼루션 (deconvolution) 과정을 사용하여 분석하였다.

[0034] 세포독성 평가

[0035] 본 발명에 따른 화합물의 감도 및 세포독성을 조사하였으며, 이를 흑색종 세포들 및 정상 세포들 사이에서 비교하였다. A549 (비오틴 양성 세포주) 및 WI-38 (비오틴 음성 세포주)을 1 ml의 PBS로 2회 세척하고, 분석 이전에 FBS-부존재 RPMI 또는 DMEM 배양 배지로 교환하였다. 본 발명에 따른 치료진단제의 세포 생존성은 제조업체의 사용지침에 따라서 MTT (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5 디페닐테트라졸륨 브로마이드, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 분석에 의해서 테스트하였다. 요약하면, A549 및 WI-38 세포들 (100 ml 배지 중 1.5 x 10^4 세포들)을 96-웰 플레이트 상으로 접종하였다. 다음날, 세포 배지를 100 ml 신선한 배지 중의 다양한 농도의 본 발명에 따른 치료진단제 (0, 20, 30, 50, 80, 및 100 μM)로 교환하고, 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 경과 후, 1 ml의 12 mM MTT 용액을 각 웰에 첨가하였다. 웰은 본 발명에 따른 치료진단제가 존재하지 않는 음대조군 및 1 ml의 배지만을 포함하는 웰을 포함하였다. 1 시간 배양 이후에, 배지를 웰들로부터 제거하고, 각 웰에 500 μl의 DMSO를 첨가한 다음, 15 분 동안 충분히 혼합하였다. 흡광은 마이크로플레이트 스펙트로미터 (PowerWave XS, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

[0036] RT-PCR

[0037] 세포들로부터의 전장 RNA는 TRIzol Reagent (Invitrogen)를 사용하여 분리하였으며, 제조자 사용지침에 따라서 역전사 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 역전사시켰다. 다양한 유전자들의 PCR 증폭은 EXT a q 중합효소 (Takara, Japan)를 사용하여, 94 ℃로 5 분, 94 ℃로 30 초 동안 35 사이클, 50 ℃-57 ℃로 30 초, 72 ℃로 30 초, 및 72 ℃에서 10 분 동안 연장의 프로그램으로 수행하였다. 하기 표 1에는 프라이머들 및 PCR 조건들을 나타내었다.

표 1

[0038]

유전자명	전방 프라이머 서열	후방 프라이머 서열	어닐링 Tm (℃) 산물 크기 (bp)
MRP1	GGC CTA ATG CCG AAC ACA TT	CAG CGT CTG GCC CTT CTTC	59 (149)
MRP2	ACAGAGGCTGGTGGCAAC C	GGGACCCTGCGCATGAACCTG	56 (348)
MRP3	TAGGCAAGTCCAGCATCTCTGG	ACCATTACCTTGTCACTGTCCATGA	61 (226)
MRP5	AGC ACG AGT CTT CTG ACG TG	GGT CGG GCA GAA GAT CCA C	59 (431)
BCRP	AGT TCC ATG GCA CTG GCC ATA	TCA GGT AGG CAA TTG TGA GG	59 (379)
FADD	GGACCCGTTCCTGGTGCTGC	GTCTAGGCCGCTCTGCACGC	60 (130)
TRAIL	GCGCAGCGAGTGGGACAGAG	GGCACTGGGTCCGTGCTGTC	60 (130)
FAS	TCTGGTTCTTACGTCTGTTGC	CTGTGCAGTCCCTAGCTTTCC	60 (130)
FASL	GGATTGGGCCTGGGGATGTTTCA	TTGTGGCTCAGGGGCAGGTTGTTG	58 (334)
NOXA	GCAAGAACGCTCAACCGAG	TCTGCCGGAAGTTCAGTTTG	60 (130)
PUMA	GCGGACGACCTCAACGCACA	GGCTCCATCTCGGGGGCTCT	60 (130)
BID	AACACCAGCCGGTCGGAGGA	GGCGTGTGACTGGCCACCTT	60 (130)
BAK	CTGCAACCTAGCAGCACCAT	TGCTGGTAGACGTGTAGGGC	55 (130)
BAX	CCCTTTTGCTTCAGGGTTTC	GCCACTCGGAAAAAGACCTC	50 (119)
CASPASE-3	TGGTGTTGATGATGACATGGCGTG	AGCATGGCACAAAGCGACTGGA	60 (130)
CASPASE-9	TCGAGGACATCCAGCGGGCA	GCCAGCATGTCCTGGCCTGT	60 (130)
p53	GAGGTTGGCTCTGACTGTACC	TCCGTCCCAGTAGATTACCAC	60 (130)
BCL-XL	AGGGACTGAATCGGAGATGG	CCTCAGCGCTTGCTTTACTG	55 (130)
GAPDH	TTCAGTGGTGGACCTGACCT	CACCACCCTGTTGCTGTAGC	60 (256)

[0039] 웨스턴 블랏팅

[0040] 세포들로부터의 단백질 (~80% 융합성 (confluent))을, 얼음 냉각된 PBS로 2회 세척하고, 프로테아제 억제제들의 칵테일 태블릿 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)을 함유하는 100 ㎕의 RIPA 용균 완충용액 (Upstate, Lake Placid, NY, USA) 중에서, 용균시켰다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 분석 키트 (Bio-Rad)를

사용하여 브래드포드 분석을 수행함으로써 측정하였다. 동일한 양의 단백질 (60 ㎍/레인)을, 12% 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 겔들 (SDS-PAGE)에 의해서 분리하였으며 (mini precast TDX-gel, Bio-Rad), 니트로셀룰로오스 막으로 전기-이송하였다 (Schleicher & Schull, Dassel, Germany). 상기 막을 트리스-완충 식염수 및 Tween 20 (TBST) 중의 5% 탈지 드라이 밀크 중에서 1 시간 동안 블록킹하였으며, 하기 표 2에 서술된 일차 항체와 함께 4 ℃에서 밤새도록 배양하였다.

표 2

[0041]

항체	회사	기원	희석 비율
FAS	Santa Cruz	토끼	1:200
FASL	BD	마우스	1:100
BAX	Santa Cruz	토끼	1:200
CYTO C	BD	마우스	1:150
PUMA	Santa Cruz	염소	1:200
GAPDH	Santa Cruz	토끼	1:200

[0042] 막들을 TBST (0.1% Tween 20 함유) 중에서 10 분동안 3회 세척하였으며, 실온에서 1.5 시간 동안 퍼옥시다아제-접합 2차 항체와 함께 배양하였다 (1:2000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA). 막들을 TBST로 10분 동안 3회 세척하고, 고성능 화학발광 검출 시스템 (Amersham Bioscience, NJ, USA)을 사용하여 검출하였다.

[0043] 투과 전자 현미경 (TEM)

[0044] A549 세포들을, 4℃에서, 2 시간 동안, 0.1 M 포스페이트 완충용액 (pH 7.4) 중의 2.5% 글루타르알데히드-2% PFA 중에서 고정시켰다. 0.1 M 포스페이트 완충용액으로 세척한 이후에, 세포들을, 암조건에서 1 시간 동안, 0.1 M 포스페이트 완충용액 중의 1% OsO_4 중에서 후-고정시켰다 (post-fixed). 이어서, 후-고정된 세포들을 탈수시키고, 프로필렌으로 적신 다음, Epon812 혼합물 중에 함입시켰다. 블럭들을 Ultracut UCT (Leica, Germany)를 사용해서 초박 단편들 (60 nm)로 절단하였다. 우라닐 아세테이트 및 시트르산 납으로 염색한 이후에, 단편들을 가속 전압 80 kV에서 H-7600 투과 전자 현미경 (Hitachi, Japan)을 사용하여 검사하였다.

[0045] 마우스 이종이식 모델

[0046] 본 발명에 따른 화합물의 화학치료적 효과 및 치료진단적 영상을 종양 조직들 중에서 검사하기 위해서, 6 내지 8 주령의 BALB/c 누드 마우스를 RaonBio (Kayonggido, Yonginsi, South Korea)로부터 구입하였다 (대조군 이종이식체, n = 8; 처리 주사된 이종이식체, n = 8). 모든 동물들은 실험 이전에 적어도 48 시간 동안 동물 시설에 적응시켰으며, NIH에 의해서 발간된 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals에 따라서 유지하였다. 동물들은 HEPA 여과 하의 장벽 내에 수용되었으며, 임의로 살균 음식 및 물을 공급해 주었다. 동물 시설은 30-40% 습도의 21 ± 2 ℃의 실온에서 12 시간 광/암 사이클로 유지하였다. 대략 5.0×10^6 마리의 A549 세포들을 354234-매트리겔 (BD, San Jose, California, USA)과 혼합하였으며, 우측 및 좌측 옆구리에 피하 주사하였다.

[0047] 인 비보 및 엑스 비보 형광 영상

[0048] 본 발명에 따른 화합물의 종양 표적 특이성 및 기관 분포를 평가하기 위해서, A549 접종된 이종이식 마우스를 사용해서 인 비보 및 엑스 비보 실험들을 수행하였다. 인 비보 스펙트럼 형광 영상들은 Maestro2™을 사용하여, 접종 4주 시점들에서 본 발명에 따른 화합물을 투여하고 4.5 시간 경과한 후 획득하였다. 하나의 종양 부위에서, 마우스들에 복강내 주사에 의해서 10 ㎕ (1 ㎍/ml)의 LPS를 투여하였으며, 4.5 시간 경과 후에, 마우스 1 마리 당 0.1 ml PBS 중의 2 mM의 본 발명에 따른 화합물을, 꼬리-정맥 주사에 의해서 주사하였다. 치료진단적 효과를 검증하기 위해서, 0.1 ml PBS 중 2 mM의 본 발명에 따른 화합물을, 4주 동안 1 주일에 1회 이종이식 마우스의 꼬리-정맥에 주사하였다. 본 발명에 따른 화합물을 주사한 후 9주 경과 후에, 대조군 및 주사된 마우스들의 종양 조직들 및 다른 기관들 (폐, 심장, 간, 신장 및 비장)을 해부하고, Maestro2™을 사용하여 엑스 비보 영상화하였다. 인 비보 및 엑스 비보 영상화 모두에 대해서 세팅된 필터는 청색이었으며: 여기 및 발광 파장은 500 내지 650 nm였다. 스펙트럼 및 자가형광으로 구성되는 형광 영상들을 상업용 소프트웨어 (Maestro software ver. 2.4, Cri, Woburn, MA, USA)를 사용하여 분리하였으며, 이때 다중-여기 스펙트럼 분석 기능을

사용하였다.

[0049] 엑스 비보 영상들을 획득한 이후에, 이식된 종양 조직들 및 다른 기관들 (폐, 심장, 간, 신장 및 비장)을, 저온절단 (cryosection)을 위해서 Tissue-Tek 100% 최적 절단 온도 화합물 (O.C.T., Sakura Finetek, USA) 중에 침지시켰다. 이어서, 신선한 조직을 액체 질소 내에 위치시킴으로써 신속하게 급속 냉동시켰으며, 추가적인 분석을 수행할 때까지 -80℃ 냉장고에서 보관하였다. 신선하게 저온보존된 조직들을 -25℃ 울트라-마이크로톰 (Leica CM 3050 S, Wetzlar, Germany)을 사용하여 절단하였다 (6 ㎛ 두께). 각각의 단편을 접착 현미경 유리 슬라이드 상에 수집하고 (Paul Mariendeld GmbH & Co.KG, Lauda-Konigshofen, Germany), PBS로 2회 O.C.T. 화합물을 조심스럽게 세척하였다. 절편들을 2 mM의 본 발명에 따른 화합물 및 DAPI 카운터 염색과 함께 2 시간 동안 배양하고, 형광 슬라이드 커버 유리로 덮었다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Carl-Zeiss LSM 5 Exciter, Oberko, German을 사용하여 형광 영상들을 얻었다.

[0050] 통계적 분석

[0051] 수치들은 3중으로 수행된 3회의 독립적인 실험들의 평균의 표준 오차 (standard error of the mean, SEM)의 평균으로서 표시하였다. 통계적 유의성은 SAS 프로그램 (version 8.2, Cary, NC, USA)의 분산의 일-방향 분석 (ANOVA)를 사용하여 결정하였다. ANOVA가 유의미한 차이를 나타내는 경우에는 평균들을 비교하기 위해서 Paired Student's t-tests를 수행하였다. P-values가 0.05 미만인 경우에 유의미한 것으로 간주하였다.

[0052] 결과분석

[0053] 본 발명에 따른 화합물은 상기 합성 개요에 나타낸 바와 같은 합성 공정에 의해서 제조되었다. 상기 합성 개요를 참조하면, 보론 에스터 1과 비오틴 2를 DMF 중에서 EDCI 커플링 반응시킴으로써 화합물 3이 55%의 수율로 얻어졌다. 이어서, 포스겐 존재 하에서, 화합물 3을 에티듐 브로마이드 4와 반응시킴으로써 화합물 5를 제조하였다 (37%). 최종적으로, $MgSO_4$ 존재 하에서, 화합물 5를 5'-DFUR과 컨주게이션시킴으로써 본 발명에 따른 화합물 7을 27%의 수율로 제조하였다. 비교 화합물 10은, 포스겐 존재 하에서, 에티듐 브로마이드 4를 4-(히드록시메틸)페닐보론산 8과 반응시킨 다음, $MgSO_4$ 존재 하에서 5'-DFUR과 컨주게이션시킴으로써 제조하였다. 모든 화합물들은 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트로스코피, 일렉트로스프레이 이온화-질량 스펙트로메트리 (MS), 및 FAB-MS 분석들에 의해서 특성화하였다.

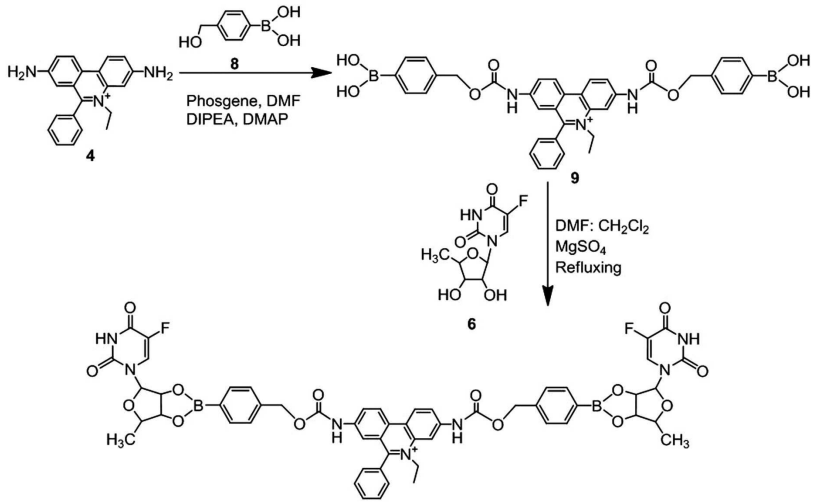
[0054] 종양 부위에서의 효율적인 약물 방출을 위해서, 본 발명에서는 약물 전구체를 형광원 및 표적화 유닛과 컨주게이션시키기 위해서 보론 에스테르 결합을 이용하였다. 보론 에스테르는 H_2O_2와 반응하는데, 이는 종양 세포들에서는 상승된 농도로 존재하고 (5 μM - 1.0 mM), 약물 전구체 활성화를 위한 이상적인 타겟이다. 몇몇 종래기술들이 ROS-활성화 약물 전구체 전략을 보고한 바 있으나 (Kuang, Y.; Balakrishnan, K.; Gandhi, V.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19278-19281), 이들 중 어느 것도 치료진단제 활성화에 대해서 언급한 바는 없다.

[0055] 본 발명에 따른 치료진단제의 H_2O_2에 대한 특이성 및 약물 전구체 활성화는 생리적 조건 하에서 자외선-가시광선 및 형광 스펙트로스코피를 통해서 스펙트럼 변화를 관찰함으로써 조사하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 치료진단제는 285 nm에서 강한 흡광을 나타내고, 400 nm 부근에서 약한 밴드를 나타내었다. H_2O_2를 본 발명에 따른 치료진단제 및 우 흉선 DNA (CT-DNA) 용액에 첨가해주는 경우, 285 nm에서의 흡광 밴드가 증가하였다. 예상한 바대로, 본 발명에 따른 치료진단제는 CT-DNA의 존재 및 부존재 하에서 매우 약한 형광을 나타내었는데, 이는 에티듐 염료의 아미노기를 적절한 보호기로 가두는 것에 의해서 DNA-결합 능력이 방해를 받기 때문이다.

[0056] 그러나, H_2O_2 (500 μM)를 본 발명에 따른 치료진단제 (10 μM) 및 CT-DNA (50 ㎍/ml) 용액에 첨가해주게 되면, 590 nm에서의 형광이 현저하게 증가하였다 (Figure 1b 참조). H_2O_2로 인해서, 본 발명에 따른 치료진단제의 보론 에스테르기가 산화 및 가수분해되어 대응되는 페놀이 생성된다. 이어서, 일련의 반응들이 진행되고, 5'-DFUR 및 에티듐이 방출되는데, 이러한 에티듐은 CT-DNA와 인터컬레이션되어 강한 형광을 발생시킨다 (도 1a 및 b 참조). 590 nm에서의 시간의존성 형광 강화는 치료진단제로부터 방출되는 약물의 양에 직접적으로 관련되며, 이는 24 시간 이후에 최대값을 나타내었다. 다양한 티올류 및 다른 활성산소종 존재하에서는 치료진단제의 형광 스펙트럼에 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았는데, 이는 본 발명에 따른 치료진단제가 H_2O_2에 대해서 매우 큰 선택성을 나타낸다는 것을 의미한다.

[0057] 더 나아가, 본 발명에 따른 치료진단제는 생리적 pH 조건 하에서도 안정하였고 (2 - 10), 5 - 8의 pH 범위 내에서 H_2O_2에 의해서만 활성화되었다 (도 1c). 전술한 비교화합물 5 (도 1 참조) 이외에도 하기 합성개요에 따라서 비교화합물 10을 제조하였으며,

[0058] <비교화합물 10의 합성 개요>



[0059]

[0060] 비교화합물 5 및 10은 CT-DNA 및 H_2O_2와 유사한 형광 특성을 나타내었다. H_2O_2 와의 반응 이후에 5'-DFUR 및 에티듐이 본 발명에 따른 치료진단제로부터 방출되는 현상은 급속 원자 폭격 MS (fast atom bombardment MS)로 조사하였으며, 그 결과 두 개의 MS 피크들이 245.1 $(M-H)^+$ 및 314.2 $(M)^+$에서 관찰되었고, 이는 각각 5'-DFUR 및 에티듐에 해당하는 것들이다. 이러한 결과들은 본 발명에 따른 치료진단제가 H_2O_2에 의해서 활성화되고, 5'-DFUR 및 에티듐이 방출되는 것을 입증해주는 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 치료진단제는 인 비트로 및 인 비보에서 효과적인 약물 전달 시스템이 될 수 있다.

[0061] 인 비트로 연구를 위해서, 비오틴 수용체-포지티브 (A549 인간 폐암 세포들) 및 비오틴 수용체-네거티브 (WI-38 인간 정상 배아 폐 섬유아세포) 세포들을 사용하였으며, 이들을 본 발명에 따른 치료진단제와 함께 6 시간 동안 배양하였다.

[0062] 도 2a 내지 2k는 A549 및 WI-38 세포들 내에서의 본 발명에 따른 치료진단제의 세포독성 및 세포사멸성 염료로서 형광-활성화 세포 분류 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 정량 분석을 위한 본 발명에 따른 치료진단제의 효능을 도시한 것이다. 치료진단제의 세포독성은 H_2O_2 유도자로서 리포폴리사카라이드 (LPS, 1 ㎍/ml) 존재 또는 부존재 하에서, 다른 농도들로 측정하였다 (0, 20, 30, 50, 80, 및 100 μM). 세포들은 24 시간 동안 배양하였으며, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 분석을 수행하였다.

[0063] 암-가이드기 (비오틴)의 존재로 인해서, 비오틴 수용체-포지티브 A549 세포들에 의해서 본 발명에 따른 치료진단제가 선호적으로 흡수되었으며, 이는, 비오틴 수용체-네거티브 WI-38 세포들 (도 2d)에 비해서, 현저하게 강한 형광 (도 2c)으로 나타난다. 이는 비오틴이 현저한 종양-표적화 효과를 갖는다는 것을 의미하며, 이러한 효과로 인해서 종양 세포들 상의 비오틴 수용체-포지티브 세포들 (A549)과 상호작용하게 된다. 또한, A549 세포들의 증가된 형광 강도는 어떠한 외부 유도자 없이도, 종양 세포들 중의 내생적 H_2O_2로 인해서 본 발명에 따른 치료진단제가 효과적으로 활성화된다는 것을 의미한다. 현재까지, 오직 소수의 프로브들만이 외부 유도자 없이도 종양 세포들 내에서 내생적으로 생성된 H_2O_2 를 검출할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Lee, D.; Khaja, S.; Velasquez-Castano, J. C.; Dasari, M.; Sun, C.; Petros, J.; Taylor, W. R.; Murthy, N. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 765-769). 더 나아가, 리포폴리사카라이드 (LPS)에 의한 A549 세포 자극은 세포 내에서 H_2O_2 생성을 증가시키며, 이는 형광 강도를 증가시키고, 이러한 사실은 본 발명에 따른 치료진단제가 급성 염증에 대해서 매우 효과적이라는 점을 의미한다 (도 2e 및 2f).

[0064] 본 발명에 따른 치료진단제, 비교 화합물 5 (약물 부존재) 및 비교 화합물 10 (비오틴 부존재)의 A549 및 WI-38

세포들에 대한 인 비트로 세포독성을 평가하기 위해서, LPS 존재 또는 부존재 하의 세포 생존성 실험들을 수행하였다. 주목할 만하게도, 본 발명에 따른 치료진단제는 비오틴 수용체-포지티브 흑색종 세포들 (A549)에 대해서만 현저하게 높은 세포독성을 나타내었으며, 비오틴 수용체-네거티브 정상 세포들 (WI-38)에 대해서는 세포독성을 나타내지 않았다 (도 2g 및 2h 참조). 더 나아가, 치료진단제의 농도가 50 μM에서 100 μM로 증가함에 따라서, 세포독성이 급격하게 증가하였다. 부가적으로, 비교 화합물 5 (약물 부존재)는 A549 또는 WI-38 세포 어느 것에 대해서도 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다. 비교 화합물 10 (비오틴 부존재)은 흑색종 및 정상 세포들 양자 모두에 대해서 세포독성을 나타내었으며, 어느 세포에 대한 선호성을 나타내지 않은 바, 이는 이러한 화합물이 단순 확산 방법에 의해서 세포로 흡수된다는 것을 의미한다. 그러나, 50 μM에서 5'-FU의 세포독성은 정상 세포들의 생존성을 현저하게 감소시켰다 (대략 52%). 상기 사실들을 종합하면, 본 발명에 따른 치료진단제가 암세포들로 선택적으로 흡수되고, 상업적 5'-FU에 비해서 약 20% 증가된 세포독성을 나타내어 세포사멸을 야기한다는 점이 입증된다.

[0065] 이후, 본 발명에 따른 치료진단제를 사용하여 세포사멸성 세포들의 정량적 분석을 수행하였는 바, 이러한 분석은 형광-활성화된 세포 분류 방법을 이용하였고, 이러한 방법에서는 내생적 H_2O_2 활성화 이후에 본 발명에 따른 치료진단제로부터 방출되는 에티듐을, 프로피듐 요오드화 프로피듐 (propidium iodide, PI) 대신 이용하는 바. PI는 후기 세포사멸 세포들을 염색하기 위한 핵 형광 염료로 널리 사용되는 물질이다 (Rieger, A. M.; Nelson, K. L.; Konowalchuk, J. D.; Barreda, D. R. *J. Vis. Exp.* **2011**, *50*, e2597). 실험 결과, 아넥신 V-포지티브 세포들에 관계 없이, 본 발명에 따른 치료진단제로 염색된 세포사멸성 세포들에 대해서 12.83%, PI로 염색된 세포들에 대해서 10.87%의 수치가 얻어졌다 (도 2j 및 2k). 이러한 결과들은 종양 부위에서 약물 활성화가 이루어진 이후에, 세포사멸을 자가-모니터링하기 위한 디자인 전략이 효과적임을 입증하는 것이다.

[0066] 종양-특이적 전달 및 A549 암 세포 번식의 억제에 기초하여, 본 발명에 따른 치료진단제의 세포내 위치 및 그 세포사멸-유도 활성을 평가하였다 (도 3). 본 발명에 따른 치료진단제는 적색으로 나타났으며 (도 3a 및 3d), Mito-추적자 및 ER-추적자는 녹색으로 나타났다 (도 3b 및 3e). 본 발명에 따른 치료진단제의 세포소기관-특이적 위치는 치료진단제 및 추적자들의 병합된 영상들로부터 확인된다 (도 3c 및 3f). 병합된 영상 (c)는 (f) 영상들에 비해서 확연한 황색 영역을 보여주는데, 이는 본 발명에 따른 치료진단제가 미토콘드리아 내에 영역화되며, 여기에서 H_2O_2 및 방출된 5'-DFUR에 의해서 활성화된다는 것을 의미한다.

[0067] 5'-FU 작용의 주된 모드는 티미딜레이트 합성효소 (thymidylate synthase)를 비가역적으로 억제함으로써 DNA 합성 및 수리를 억제하는 것이며, 따라서 종양 성장을 늦추게 된다. 부가적으로, DNA 및 RNA 구조들 내부로 통합된 5'-FU 대사산물들은 세포사멸을 더욱 유도하게 된다. 흥미롭게도, 5'-FU의 약물전구체 5'-DFUR을 함유하는 본 발명에 따른 치료진단제의 작용 모드는 현저하게 개선된 항암 효율로 변화되었다. 본 발명에 따른 치료진단제는 세포질 또는 핵 내에서 활성화되기 보다는 미토콘드리아 내에서 공-영역화 및 활성화됨으로써 (도 3a-3f), 다른 작용 모드들을 야기하게 된다.

[0068] 작용의 다른 모드를 확인하기 위해서, 본 발명에서는 중합효소 연쇄 반응 및 웨스턴 블랏팅에 의해서 미토콘드리아 매개 세포사멸 유전자들 [NOXA, 세포사멸의 p53-상승조절된 조절자 (p53-upregulated modulator of apoptosis, PUMA), BID, BAX, 및 BAK]의 발현에 대한 본 발명에 따른 치료진단제의 항암 효과를 조사하였다. 세포사멸 유전자들은 본 발명에 따른 치료진단제에 의해서 상승조절되었으며, LPS 유도자에 의해서 더욱 강화되었다 (도 3g 및 3h). 이러한 유전자들은 Bcl-2 수퍼패밀리의 BH3-only pro-세포사멸성 단백질의 멤버들이며, 이는 Bcl-2 상동성 (BH) 도메인들 (BH1 내지 BH4)을 보유한다. NOXA는 미토콘드리아성 단편화를 야기하는 BH3-only pro-세포사멸성 단백질이며, BID, BIM, 및 PUMA는 BAX/BAK-유도된 미토콘드리아성 세포사멸을 촉진하는데 중요하다. 이러한 상승-조절된 유전자들은 미토콘드리아성 이상기능 및 세포사멸 촉진에 있어서 중요한 역할들을 담당한다.

[0069] 흥미롭게도, LPS 유도자 존재/부존재 하에서 p53의 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다 (도 3g). 세포사멸에 대한 p53의 가장 중요한 기여는 BAX, NOXA, PUMA, 및 BID를 포함하는 Bcl-2 패밀리 유전자들의 중요 서브세트의 전사적 활성화에 의존한다. 이에 부합되게, 본 발명에 따른 데이터는 p53-의존성 세포사멸이 미토콘드리아 경로를 활성화하고, Bcl-xL을 길항하며, 궁극적으로 미토콘드리아 구조를 파괴한다는 사실을 뒷받침한다 (도 3j, 적색 화살표). 따라서, 본 발명에 따른 치료진단제는 DNA 합성 및 수리 억제 이전에, 세포사멸의 미토콘드리아-매개 경로를 유도한다.

[0070] 미토콘드리아-매개 세포사멸 유전자들 이외에도, 미토콘드리아로부터 막간 간격 단백질인 Cyt C의 상승조절이 관찰되었으며 (도 3h), 이는 연이어 카스파아제-의존성 세포사멸을 활성화하였다. 부합되게, 카스파아제-3 및

-9 발현은 본 발명에 따른 치료진단제에 의해서 현저하게 상승-조절되었다 (도 3g). 이러한 결과들은 본 발명에 따른 치료진단제가, 미토콘드리아-매개 경로에 의해서, 또한 암 세포들의 핵 RNA 및 DNA 내로 통합됨으로써, 암 세포들에서 내생적 세포사멸 유도를 일으킨다는 점을 의미한다.

[0071] 더 나아가, 본 발명에 따른 치료진단제는 FADD, FAS, FASL, 및 TRAIL 수용체들과 같은 세포 표면 사멸 수용체들의 발현을 증가시키며, 이들 역시 세포사멸 신호 경로를 더욱 유도한다 (도 3g). 이러한 사실들은 세포 표면 사멸 수용체들에 대한 5'-FU의 작용 모드를 이해하는데 매우 중요한데, 이러한 작용 모드는 잘 알려진 바가 없다. 부가적으로, 항암제 약물에 의해서 야기되는, 종양 세포들에서의 TRAIL 수용체 신호의 굴절은 약물의 화학민감성, 종양 쇠퇴의 감소 및 클리어런스를 결정한다. 세포사멸에 대한 증가된 TRAIL 및 FasL의 잠재적 효과들을 입증하기 위해서 더욱 많은 분석들이 필요하지만, 본 발명에 따른 치료진단제가 5'-FU의 화학민감성을 현저하게 증가시키는 것을 추측된다.

[0072] 5'-FU 치료법의 많은 장점들에도 불구하고, 암에 대한 그 전반적 반응 속도는 상대적으로 낮은데 (단지 10% - 30%), 이는 이리노테칸 (irinotecan) 및 옥살리플라틴 (oxaliplatin)과 같은 다른 항암 약물들과 함께 투여되는 경우에도 그러하고 (50%), 그 이유는 화학내성으로 이어지는 증가된 약물 유출 때문이다. 따라서, 다중약물 내성 단백질들 (MRP) 및 유방암 내성 단백질 (BCRP)와 같은 약물 유출 수송자들의 발현을 조사하였다. MRP2 및 BCRP는 본 발명에 따른 치료진단제로 발현이 증가되었으나, MRP1 및 MRP3는 그렇지 않았다 (도 3g). 5'-FU는 대장암 및 유방암에서 MRP5 발현을 유도하였지만, 폐암 세포들에서는 BCRP 및 MRP2를 상승조절하는 것으로 보고된 바가 없으며, 이는 약물 내성 메카니즘을 이해하는데 있어서 중요하다. BCRP 및 MRP2 상승조절에도 불구하고, 본 발명에 따른 치료진단제는 5'-FU 단독에 비해서 강한 항암 효과를 나타내는 바, 이는 그 암 표적화 효과, 내생적 세포사멸 유도 및 세포 누출을 방지하는 큰 분자량에 기인한 것이다.

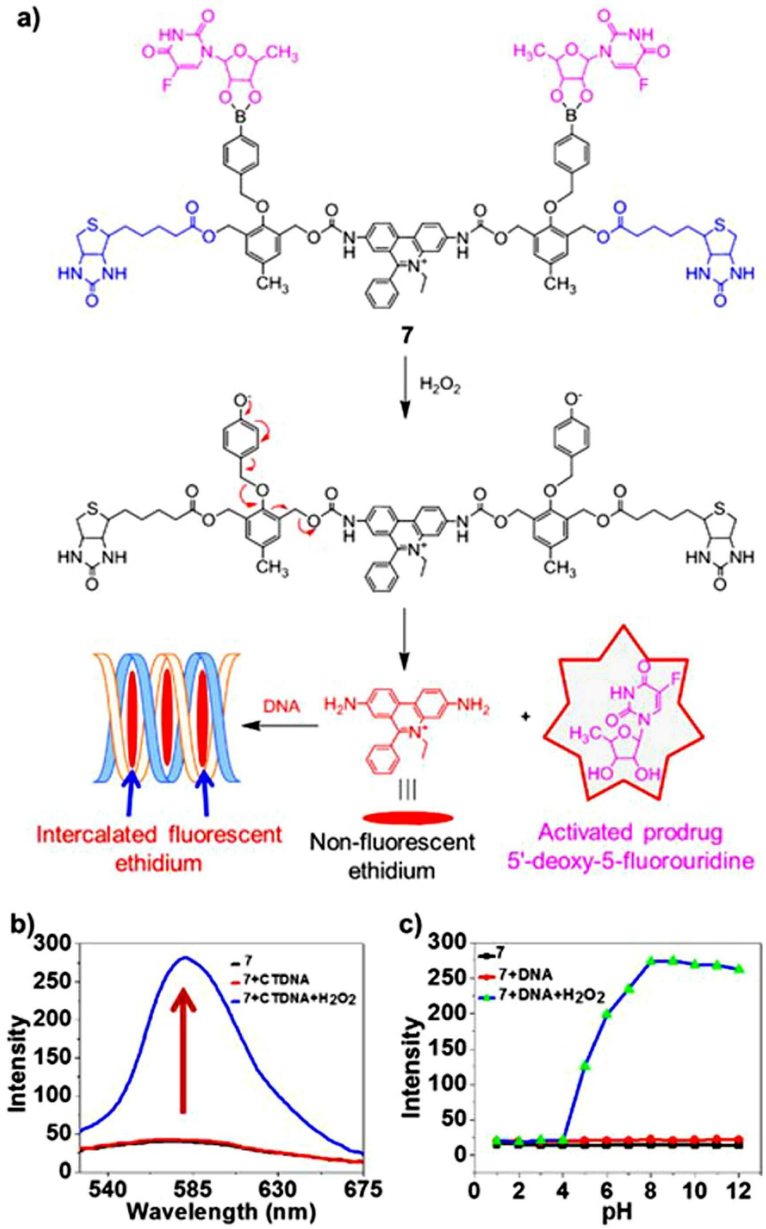
[0073] 최종적으로, 4 주령의 A549-접종된 이종이식 마우스를 사용하여, 본 발명에 따른 치료진단제의 암 표적화 특이성, 기관 분포, 및 항암 활성을 평가하기 위해서, 인 비보 연구를 수행하였다. 이종이식된 마우스에 꼬리-정맥 주사를 통해서 본 발명에 따른 치료진단제를 투여하였으며, 4.5 시간 이후에 영상들을 비침습적으로 획득하였다. 내생적 H_2O_2에 의해서 활성화된 종양 조직 중에서 강한 형광 신호들이 관찰되었으며, 이는 강력한 종양-표적화 효과를 반증한다. 형광 신호들은, 본 발명에 따른 치료진단제가 꼬리-정맥 주사된지 1시간 경과 후, LPS (10 ㎕, 1.0 ㎍/ml)를 우측의 종양 조직 내로 직접 주사한 경우에 증가하였다 (도 4a). 본 발명에 따른 치료진단제의 표적화 효과 및 장기 수준에서 그 활성화를 확인하기 위해서, 대조군 및 본 발명에 따른 치료진단제가 주사된 마우스의 종양 및 정상 조직들을 해부하였다. 엑스 비보 영상화는 본 발명에 따른 치료진단제의 특이적 흡수, 및 간, 폐, 심장, 비장 및 신장을 포함하는 다른 장기들에 걸친 종양 부위들에서의 그 활성화를 명확히 보여준다 (도 4b). 더 나아가, 대조군 종양 조직들보다 본 발명에 따른 치료진단제가 주사된 마우스의 저온-절단된 종양 조직들에서 강하고 고르게 분포하는 형광 신호들이 관찰되었다 (도 4c 및 4d). 종양 형광 강도는 정상 조직들의 그것보다 대략 7배 정도였다. 상기 데이터는 본 발명에 따른 치료진단제가 정상 조직들에 비해서 종양을 효과적으로 표적화하는 효과가 있음을 명확하게 보여주는 것이다.

[0074] 항암 효과를 보여주기 위해서, 본 발명에 따른 치료진단제 (마우스 당 0.1 ml PBS 중 2 mM)를 A549-접종된 이종이식 마우스 내로, 꼬리-정맥 주사에 의해서 매주 13회 투여하고, 종양 성장을 관찰하였다. 종양 성장은 대조군들에 비해서 본 발명에 따른 치료진단제로 처리한 경우에 현저하게 억제되었다 (도 4e). 본 발명에 따른 치료진단제의 항암 효과는 매우 강해서, 마우스의 왼쪽 허벅지 상에 존재하는 종양이 완전히 억제되었고, 오른쪽 허벅지 상의 종양은 현저하게 감소하였다. 더 나아가, 본 발명에 따른 치료진단제가 주사된지 8주 경과 후에는 종양 성장이 현저하게 억제되었다 (도 4f). 종합하면, 본 발명에 따른 치료진단제는 표적 부위를 선호적으로 표적화하며, 그곳에 축적 및 가시화되고, 내생적 H_2O_2에 의해서 활성화됨으로써, 전구체약물을 암 세포들에 전달하였다. 이어서, 상기 전구체약물은 암세포들 내에서 특이적으로 활성 약물로 변환되어 세포사멸을 야기하며, 궁극적으로는 인 비보 종양 모델들에서 종양 성장을 억제하게 된다.

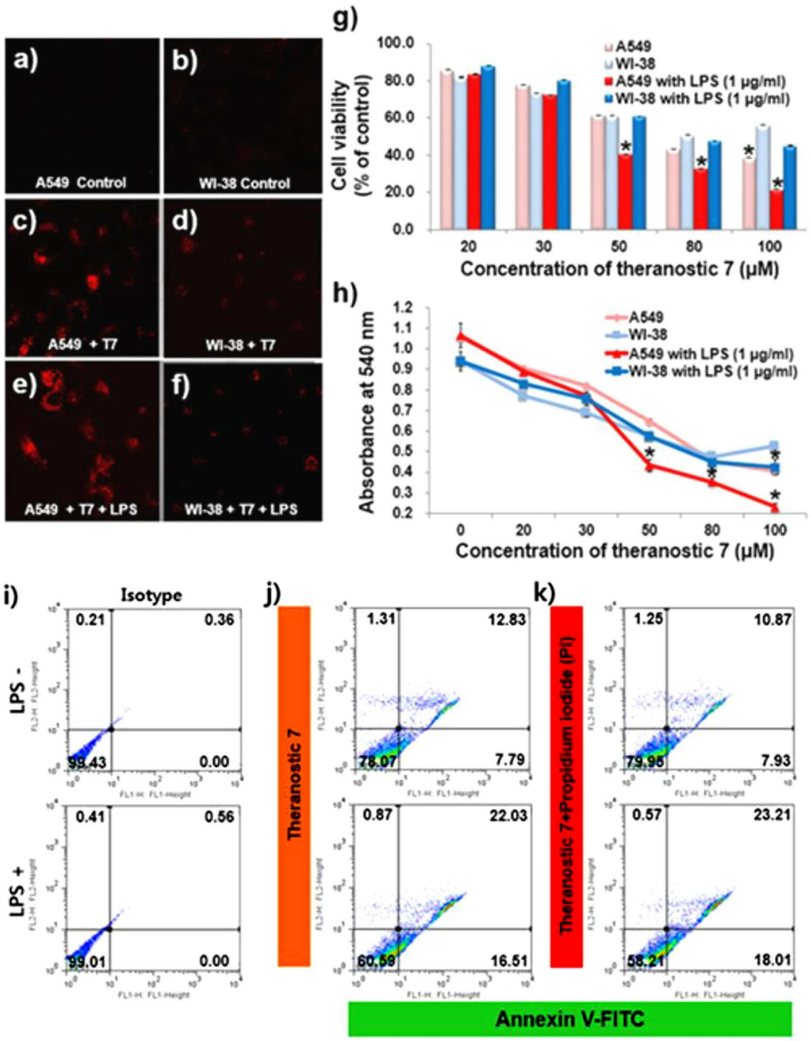
[0075] 요약하면, 본 발명에서는 종양 표적화, 진단 및 종양 부위로의 전구체약물 전달이 가능한 효과적인 치료진단제를 개발하는데 성공하였다. 인 비보 세포실험 결과들은 이러한 치료진단제가 매우 향상된 항암 효과를 가지며, 종양 세포들에서 연속적이고 상승적인 세포사멸 경로들을 유도한다는 점을 보여준다. 인 비보 및 엑스 비보 이종이식 마우스 모델은 종양 억제 효과를 나타내었고, 실험 동물들은 치유되었다.

도면

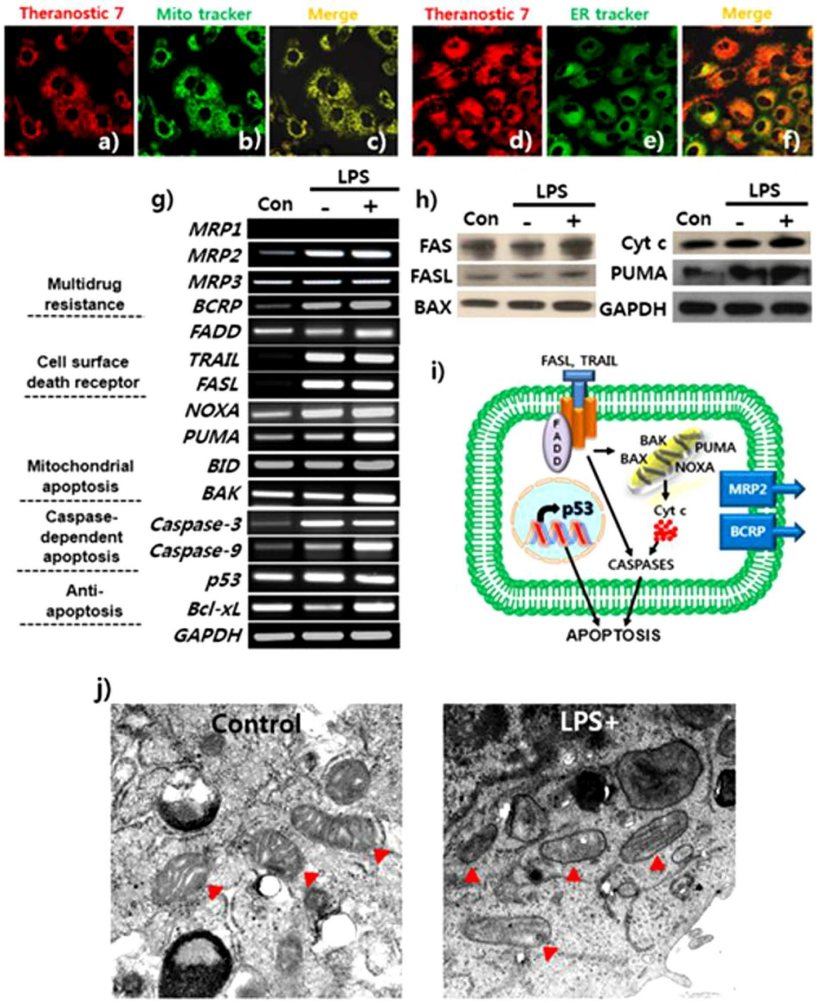
도면1


a)
7
H_2O_2
DNA
Intercalated fluorescent ethidium
Non-fluorescent ethidium
Activated prodrug 5'-deoxy-5-fluorouridine
b)
Intensity
Wavelength (nm)
7
7+CTDNA
7+CTDNA+H2O2
c)
Intensity
pH
7
7+DNA
7+DNA+H2O2

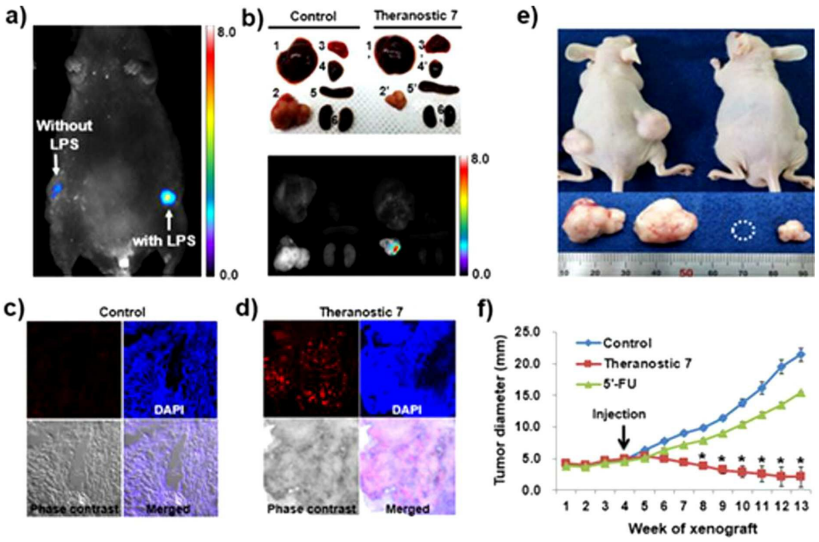
도면2


a)
A549 Control
b)
WI-38 Control
c)
A549 + T7
d)
WI-38 + T7
e)
A549 + T7 + LPS
f)
WI-38 + T7 + LPS
g)
Cell viability (% of control)
A549
WI-38
A549 with LPS (1 μg/ml)
WI-38 with LPS (1 μg/ml)
Concentration of theranostic 7 (μM)
h)
Absorbance at 540 nm
A549
WI-38
A549 with LPS (1 μg/ml)
WI-38 with LPS (1 μg/ml)
Concentration of theranostic 7 (μM)
i)
Isotype
LPS -
LPS +
j)
Theranostic 7
k)
Theranostic 7+Propidium Iodide (PI)
Annexin V-FITC

도면3


Theranostic 7
Mito tracker
Merge
Theranostic 7
ER tracker
Merge
a)
b)
c)
d)
e)
f)
g)
Con
LPS
- +
MRP1
MRP2
MRP3
BCRP
FADD
TRAIL
FASL
NOXA
PUMA
BID
BAK
Caspase-3
Caspase-9
p53
Bcl-xL
GAPDH
Multidrug resistance
Cell surface death receptor
Mitochondrial apoptosis
Caspase-dependent apoptosis
Anti-apoptosis
h)
Con
LPS
- +
FAS
FASL
BAX
Cyt c
PUMA
GAPDH
i)
FASL, TRAIL
FADD
BAK
BAX
PUMA
NOXA
MRP2
BCRP
p53
Cyt c
CASPASES
APOPTOSIS
j)
Control
LPS+

도면4


a)
Without LPS
with LPS
8.0
0.0
b)
Control
Theranostic 7
8.0
0.0
e)
c)
Control
DAPI
Phase contrast
Merged
d)
Theranostic 7
DAPI
Phase contrast
Merged
f)
Tumor diameter (mm)
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Control
Theranostic 7
5'-FU
Injection
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Week of xenograft