

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0090769

(43) 공개일자 2023년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 41/00 (2020.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07F 5/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 41/0057 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2021-0179829

(22) 출원일자 2021년12월15일

심사청구일자 2021년12월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

서울특별시 성북구 안암로 145

원미애

서울특별시 성북구 안암로 145

구세영

서울특별시 성북구 안암로 145

(74) 대리인

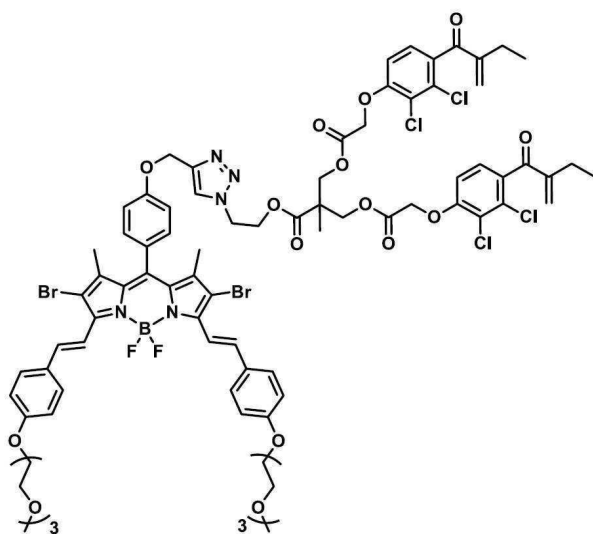
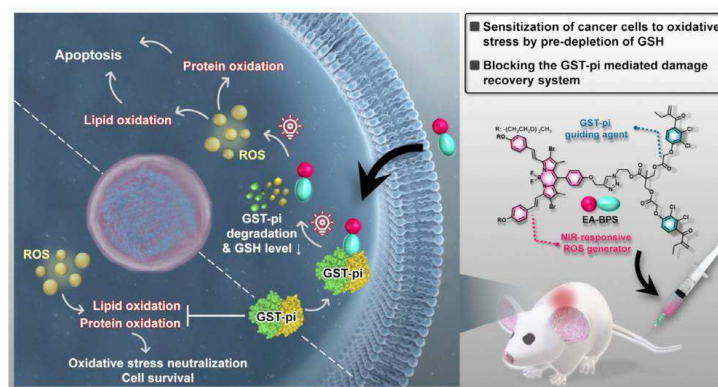
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **종양 표적화 광역학 치료제****(57) 요약**

본 발명은 하기 [화합식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 종양 표적화 광역학 치료제에 관한 것이다:

[화합식 1]

**대표도 - 도1**

(52) CPC특허분류

C07F 5/027 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132422
과제번호	2018R1A3B1052702
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	정밀 신약 구현을 위한 차세대 분자테라노시스
기 여 율	80/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132893
과제번호	2019M3E5D1A01068998
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	과학기술혁신인재양성(R&D)
연구과제명	난치성 삼중음성유방암의 신규 표적치료제 상용화를 위한 프로드럭 개발
기 여 율	10/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345323765
과제번호	2020R1A6A3A01100558
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	노화세포 표적사멸 항노화 약물전구체 개발
기 여 율	5/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345323788
과제번호	2020R1A6A3A01100551
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	세포 카니발리즘 매개의 신규 암전이 극복 표적치료제 개발
기 여 율	5/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.08.31

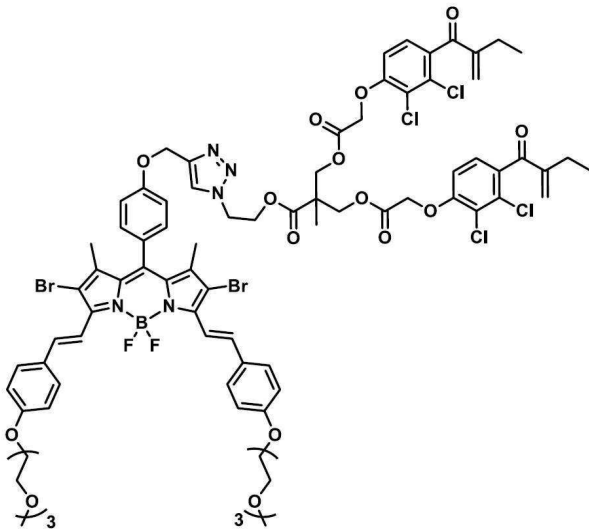
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 종양 표적화 광역학 치료제:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 Glutathione-pi(GST-pi)의 활성을 감소시키고 지질 과산화(Lipid peroxidation)를 향상시키는 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광역학 치료제.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 종양은 유방암 세포주에서 유래된 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광역학 치료제.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 유방암 세포주는 MDA-MB-231 또는 MCF7인 것을 특징으로 하는 종양 표적화 광역학 치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 종양 표적화 광역학 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

광역학 요법(Photodynamic therapy, PDT)은 반응성 산소종(ROS)을 생성하기 위해 광감응제(photosensitizers, PS)의 광 매개 활성화에 의존하는 임상적으로 확립된 종양학적 개입이다. 전부는 아니지만 많은 PS가 광조사 조건하에서, 분자 산소를 삼중항 기저 상태(triplet ground state)에서 일중항 여기 상태(singlet excited state)로 전환시키는 역할을 한다. 일중항 산소는 주요 세포 거대 분자의 산화를 촉진하고 종양 세포 사멸을 유

발할 수 있는 인정된 ROS이다(비특허문헌 1). PDT는 특정 암 유형에서 최소 침습성, 높은 위치 선택성, 낮은 전신 독성 및 장기 이환율 감소와 같은 다양한 장점을 가진다(비특허문헌 2). PDT는 또한 외과적 절제 후 잔여 종양 부담을 줄이는 보조 치료로 사용되고 있다(비특허문헌 3). 또한, 특히 암 치료의 맥락에서 PDT 광감응제의 성능을 개선하기 위해 상당한 연구가 진행되고 있다. 그러나 PDT는 산소 의존적 치료법이며, 강력한 치료 효과를 유도하기 위해 충분한 ROS를 생성하려면 종양 부위에 적절한 산소 공급이 필요한데, 이러한 산소 의존성은 고형 종양의 저산소 미세 환경에서 PDT의 유용성을 제한한다(비특허문헌 4). 이러한 제한을 피하기 위해 혈액 및 종양 조직에서 내인성 O₂ 공급을 증가시키기 위해 고압 산소(hyperbaric oxygen)가 임상적으로 사용되었다(비특허문헌 5). 그러나 이러한 접근 방식은 중추신경계와 폐에서 O₂ 유래 독성 효과를 유발할 수 있다는 문제가 있다(비특허문헌 6). PDT의 효과를 향상시키기 위한 노력의 일환으로 다양한 O₂ 운반체와 현장 O₂ 발생기가 연구되었으나, 이러한 전략은 실제 광조사 조건에서 ROS의 과잉 생산으로 이어져 다양한 부작용을 유발할 수 있다는 문제가 있다(비특허문헌 7).

[0003] 암세포는 세포 외 산화제로 인한 세포 손상을 줄이기 위해 여러 보호 메커니즘에 의존한다. 이러한 메커니즘 중 하나 이상을 억제하는 것은 저산소 PDT 조건에서 생성된 제한된 ROS의 효과적인 독성을 향상시키는 역할을 할 수 있다. 한편, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase, GST)는 항산화제와 세포 내 신호 전달에 중요한 역할을 하는 phase II 해독 효소로 분류된다(비특허문헌 8). Cytosolic GST-pi는 비효소적 활성을 통해 세포 증식을 포함한 다양한 세포 과정에 참여하는 것으로 보고되고 있고(비특허문헌 9), 여러 연구들에서 GST-pi 수치 상승과 항암 요법에 대한 내성 사이의 직접적인 상관 관계가 보고되고 있다(비특허문헌 10). PDT와 GST-pi 유전자 침묵의 조합은 간암 세포의 경우에 성공적으로 사용된바 있으며(비특허문헌 11), 또한 PDT에 대한 암세포의 반응을 조절하는 GST-pi의 역할이 연구되고 있다(비특허문헌 12). 그러나 이러한 연구들은 대부분 세포 수준의 연구에 국한되어 있으며, 본질적으로 생체 내 환경의 복잡성으로 인해 생체 외 작업의 결과를 보다 발전된 동물 연구로 변환하는 것은 쉽지 않다. 예를 들어 전달 문제, 다양한 보호 기전, 잠재적 억제제의 존재 및 기타 다양한 요인이 투여된 제제의 공간 분포 및 약동학에 영향을 미칠 수 있으며, 이러한 요소는 실제 PDT 성능을 제한할 수 있는 요인이 된다.

[0004] 한편, 이노제인 에타크린산(Ethacrynic acid, EA)은 고혈압에 널리 사용되며 심한 부종 상태의 환자에게는 금지되고 있는 약물이다(비특허문헌 13). EA는 시스테인 측쇄를 통해 환원된 글루타티온(GSH)과 공유 마이클 부가 복합체(covalent Michael addition complex)를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 이것은 GSH 수치를 낮추고 암 세포의 산화 스트레스에 대한 저항을 줄이는 역할을 한다(비특허문헌 14). EA는 약물 내성 종양의 치료 결과를 개선하기 위해 여러 화학 요법 약물과 함께 항암 강화제로 연구되었으며(비특허문헌 15), EA와 GSH의 반응으로 생성되는 EA-GSH 접합체는 상대적으로 독성이 없으나 GST의 활성에 대한 강력한 억제 효과가 있는 것으로 보고되었다(비특허문헌 16). ROS에 의한 세포 손상은 GST-pi 활성이 높은 조건에서 감소되기 때문에(비특허문헌 17), 본 발명자들은 PDT와 함께 GST-pi 억제가 시너지 효과를 일으키고 저산소 조건에서도 PDT를 통해 생성된 ROS에 더 큰 치사율을 부여할 것으로 예상하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) N. L. Oleinick, R. L. Morris, T. Belichenko, Photochem. Photobiol. Sci. 2002, 1, 1-21.
- (비특허문헌 0002) P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, J. Golab, Ca-Cancer J. Clin. 2011, 61, 250-281.
- (비특허문헌 0003) P. Baas, L. Murrer, F. A. N. Zoetmulder, F. A. Stewart, H. B. Ris, N. van Zandwijk, J. L. Peterse, E. J. T. Rutgers, Br. J. Cancer 1997, 76, 819-826.
- (비특허문헌 0004) J. M. Brown, W. R. William, Nat. Rev. Cancer 2004, 4, 437-447.
- (비특허문헌 0005) K. Stepien, R. P. Ostrowski, E. Matyja, Med. Oncol. 2016, 33, 101.
- (비특허문헌 0006) Y. L. Chen, Y. N. Zhang, Z. Z. Wang, W. G. Xu, R. P. Li, J. D. Zhang, Brain Res. 2016, 1635, 180-189.

- (비특허문헌 0007) R. R. Allison, Future Oncol. 2014, 10, 123-142.
- (비특허문헌 0008) E. Laborde, Cell Death Differ. 2010, 17, 1373-1380.
- (비특허문헌 0009) V. Adler, Z. M. Yin, S. Y. Fuchs, M. Benezra, L. Rosario, K. D. Tew, M. R. Pincus, M. Sardana, C. J. Henderson, C. R. Wolf, R. J. Davis, Z. Ronai, EMBO J. 1999, 18, 1321-1334.
- (비특허문헌 0010) K. D. Tew, Cancer Res. 2016, 76, 7-9.
- (비특허문헌 0011) V. Rapozzi, C. Lombardo, S. Cogoi, C. Comuzzi, L. Xodo, ChemMedChem 2008, 3, 565-568.
- (비특허문헌 0012) T. A. Theodossiou, C. E. Olsen, M. Jonsson, A. Kubin, J. S. Hothersall, K. Berg, Redox Rep. 2017, 12, 191-197.
- (비특허문헌 0013) G. C. Wall, D. Bigner, S. Craig, D. Moines, Arch. Intern. Med. 2003, 163, 116-117.
- (비특허문헌 0014) S. Awasthi, S. K. Srivastava, F. Ahmad, H. Ahmad, G. A. S. Ansari, Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol. 1993, 1164, 173-178.
- (비특허문헌 0015) T. Rhodes, P. R. Twentyman, Br. J. Cancer 1992, 65, 684-690.
- (비특허문헌 0016) J. H. T. M. Ploemen, B. Vanommen, J. J. P. Bogaards, P. J. Vanbladeren, Xenobiotica 1993, 23, 913-923.
- (비특허문헌 0017) N. Fujitani, A. Yoneda, M. Takahashi, A. Takasawa, T. Aoyama, T. Miyazaki, Sci. Rep. 2019, 9, 14764.

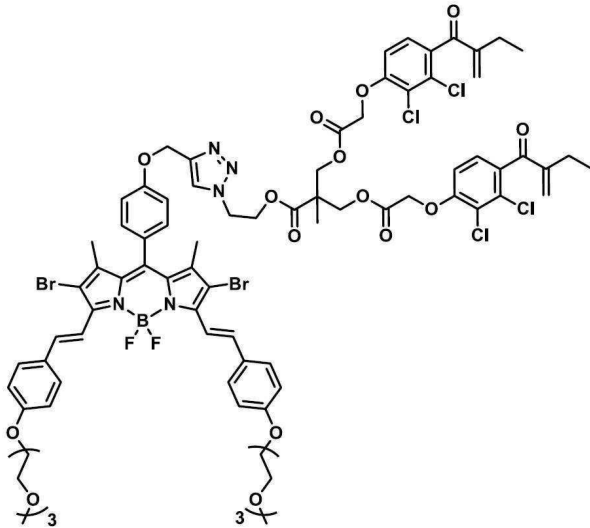
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 암세포에 내재된 내인성 항산화 방어 시스템을 방해하여 종양 미세 환경에서 이용 가능한 제한된 산소를 효과적으로 이용함으로써 치료 효과를 현저하게 향상시킬 수 있는 신규 종양 표적화 광역학 치료제를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0008] 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 종양 표적화 광역학 치료제를 제공한다:
- [0009] [화학식 1]



[0010]

[0011]

본 발명에 따르면, 상기 화합물은 Glutathione-pi(GST-pi)의 활성을 감소시키고 지질 과산화(Lipid peroxidation)를 향상시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012]

본 발명에 따르면, 상기 종양은 유방암 세포주에서 유래된 것일 수 있다.

[0013]

본 발명에 따르면, 상기 유방암 세포주는 MDA-MB-231 또는 MCF7일 수 있다.

발명의 효과

[0014]

본 발명에 따른 화합물은 Glutathione-pi(GST-pi)의 활성을 감소시키고 지질 과산화(Lipid peroxidation)를 향상시킴으로써 저산소증과 같은 광역학 치료의 한계점을 극복함과 동시에 암 치료 효율을 현저히 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015]

도 1은 본 발명에 따른 [화합식 1]로 표시되는 화합물(이하 “EA-BPS”로 표기)의 저산소 조건 하 PDT에 대한 시너지 효과를 나타낸 개략도이다.

도 2는 EA-BPS의 광역학 및 GST-pi 결합 속성을 나타낸 것이다. 도 2의 A 및 B는 각각 EA-BPS의 660 nm 광 조사(Xe-lamp, slit width 15/1.5 nm) 시, DPBF(1O_2 detection)의 흡수 스펙트럼 변화(A) 및 DCFH(ROS detection)의 형광 스펙트럼 변화(B)를 나타낸다. 도 2의 C 및 D는 각각 EA-BPS, R-BPS와 존재 또는 부존재하 광 조사(660 nm LED lamp, 100 mWcm⁻²) 시, 412 nm에서 DPBF의 흡수 강도 변화(C) 및 535 nm에서 DCFH의 형광 강도 변화(D)를 나타낸다. 도 2의 E 및 F는 GST-pi 및 GSH-EA-BPS의 결합 연구 결과로서, E는 계산된 GST-pi 결합 부위를 나타내고, F는 GST-pi의 각 잔기와 GSH-EA-BPS의 결합 자유 에너지를 나타낸다. 막대 그래프 데이터는 평균으로 표시되고 오차 막대는 평균에서 표준 편차를 나타낸다(n = 3). ** p < 0.001.

도 3의 A는 MDA-MB-231 세포로의 EA-BPS(5 μ M)의 시간 의존적 흡수를 나타낸다. 도 3의 B는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp, 100 mWcm⁻²)의 존재 및 부재하에서 R-BPS (5 μ M for 12 h), EA-BPS (5 μ M for 12 h) and 대조군 (1% DMSO for 12 h) 처리된 세포에서 ROS burden에 대한 N-acetylcysteine (NAC, an effective ROS quencher)의 영향을 나타낸 것이다. 도 3의 C는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp, 100 mWcm⁻²)의 존재 및 부재하 및 R-BPS (5 μ M for 12 h), EA-BPS (5 μ M for 12 h)와 함께 또는 이들 없이(대조군, 1% DMSO) 처리된 MDA-MB-231 세포에서, 일중항 산소 센서 녹색(SOSG) 형광(30분 동안 5 μ M)을 나타낸 것이다. 도 3의 D는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp, 100 mWcm⁻²)의 존재 및 부재하 및 R-BPS (5 μ M for 12 h), EA-BPS (5 μ M for 12 h)와 함께 또는 이들 없이(대조군, 1% DMSO) 처리된 MDA-MB-231 세포에서, Dihydroethidium (DHE) 형광 (30 μ M for 30 min)을 나타낸 것이다. 도 3의 E는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp, 100 mWcm⁻²)의 존재 및 부재하 및 R-BPS (5 μ M for 12 h), EA-BPS (5 μ M for 12 h)와 함께 또는 이들 없이(대조군, 1% DMSO) 처리된 MDA-MB-231 세포에서, Hydroxy phenyl fluorescein (HPF) 형광(10 μ M for 30 min)을 나타낸 것이다. 도 3의 F

는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp, 100 mWcm^{-2})의 존재 및 부재하 및 R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h)와 함께 또는 이들 없이(대조군, 1% DMSO) 처리된 MDA-MB-231 세포에서, 세포 내 thiol-tracker 형광($10 \mu\text{M}$ for 30 min)을 나타낸 것이다. 데이터는 평균으로 표시되고 오차 막대는 평균에서 표준 편차를 나타낸다($n = 9$). 통계적 유의성은 사후 Bonferroni 테스트와 함께 일원 분산 분석 테스트를 사용하여 결정되었다($p < 0.05$). Scale bar= $20 \mu\text{m}$.

도 4는 리소좀 분해 의존적 방식(lysosomal degradation-dependent way)에 대한 광조사 유무에 따른 EA-BPS의 효과를 나타낸다. 도 4의 A는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp , 100 mWcm^{-2})의 존재 및 부재하에서, R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA (2 equiv), EA-ester (2 equiv) 및 R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h)와 EA 또는 EA-ester (2 equiv for 12 h)의 혼합물과 처리된 MDA-MB-231 세포에서 GST-pi 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 도 4의 B는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp , 100 mWcm^{-2})의 존재 및 부재하에서, R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA (2 equiv), EA-ester (2 equiv) 및 R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h)와 EA 또는 EA-ester (2 equiv for 12 h)의 혼합물이 처리된 MDA-MB-231 세포에서 GST 활성을 측정된 결과를 나타낸다. 도 4의 C는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp , 100 mWcm^{-2})의 존재 및 부재하에서, R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA (2 equiv), EA-ester (2 equiv) 및 R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h)와 EA 또는 EA-ester (2 equiv for 12 h)의 혼합물이 처리된 MDA-MB-231 세포에서 MDA 레벨을 측정된 결과를 나타낸다. 도 4의 D는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp , 100 mWcm^{-2})의 존재 및 부재하에서, R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h), EA (2 equiv), EA-ester (2 equiv) 및 R-BPS ($5 \mu\text{M}$ for 12 h)와 EA 또는 EA-ester (2 equiv for 12 h)의 혼합물이 처리된 MDA-MB-231 세포에서 S-glutathionylation 레벨을 측정된 결과를 나타낸다. 도 4의 E는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp , 100 mWcm^{-2})의 존재 및 부재하에서, $10 \mu\text{M}$ 클로로퀸이 처리 또는 미처리된 R-BPS 및 EA-BPS와 함께 처리된 MDA-MB-231 세포에서 GST-pi 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 표시된 값은 평균이고 오차 막대는 평균의 표준 편차를 나타낸다($n = 6$). 통계적 유의성은 사후 Bonferroni 테스트와 함께 일원 분산 분석 테스트를 사용하여 결정되었다($p < 0.05$).

도 5의 A는 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp , 100 mWcm^{-2})의 존재 및 부재하에서, 정상 산소($21\% \text{ O}_2$) 및 저산소증($2\% \text{ O}_2$) 하에서 R-BPS, EA-BPS, EA 또는 R-BPS와 EA의 혼합물과 함께 처리된 MDA-MB-231 세포의 세포 생존력을 나타낸 것이다. 도 5의 B는 유세포 분석에 의한 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp , 100 mWcm^{-2})의 존재 및 부재하에서, 12시간 동안 R-BPS 및 EA-BPS로 처리된 MDA-MB-231의 Cell population 그래프를 나타낸 것이다. 도 5의 C는 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정된 $2\% \text{ O}_2$ (hypoxia) 하에서 R-BPS 및 EA-BPS의 아포토시스 세포 사멸을 분석한 결과를 나타낸 것이다. 값은 평균이고 오차 막대는 평균의 표준 편차를 나타낸다($n = 6$). 통계적 유의성은 사후 Bonferroni 테스트와 함께 일원 분산 분석 테스트를 사용하여 결정되었다($p < 0.05$).

도 6의 A는 5 mgkg^{-1} EA-BPS (excitation at 660 nm; emission at 700 nm)의 꼬리 정맥 주사 후 24 및 48시간에서 MDA-MB-231 이종이식 마우스의 생체 내 신체 형광 이미지를 나타낸다. 도 6의 B는 5 mgkg^{-1} EA-BPS 또는 비히클 단독(PBS containing 5% DMSO)을 주사 후 48시간 뒤에 기록된 절제된 종양 및 장기의 생체외 이미지를 나타낸 것이다. 도 6의 C는 4주 동안 5 mgkg^{-1} R-BPS, EA-BPS 또는 비히클 단독 주입 후(주 1회) 6시간 뒤 광조사(660 nm , 2 Wcm^{-2} , 10 min)의 존재 및 부재하에서, MDA-MB-231 이종이식 마우스에서 측정된 생체 내 종양 부피를 나타낸 것이다. 도 6의 D는 실험 기간 동안 기록된 마우스의 체중을 나타낸다. 도 6의 E는 실험 종료 시점에서, 다양한 처리군의 대표적인 조직 슬라이스의 H&E 염색 결과를 나타낸다. 도 6의 F는 다른 처리군에서 채취한 대표적인 종양 조직 슬라이스의 면역조직화학(cleaved. caspase-3 및 Ki-67)을 나타낸다. 도 6의 G는 비색 분석을 사용하여 측정된 혈청 AST, ALT 및 크레아티닌 활성 수준을 나타낸다. 값은 평균이고 오차 막대는 평균의 표준 편차를 나타낸다. Panels C, D, G: $n=5$ mice per group, 통계적 유의성은 사후 Bonferroni 테스트와 함께 일원 분산 분석 테스트를 사용하여 결정되었다($p < 0.05$). “+” 및 “-”는 광조사의 유무를 나타낸다.

도 7은 EA-BPS 및 R-BPS의 분광 특성을 나타낸 것으로, 1% Triton X100을 포함하는 10 mM PBS 및 DMSO에서 EA-BPS 및 R-BPS(각각 $5.0 \mu\text{M}$)의 흡수(a, c) 및 방출(b, c) 스펙트럼이다. 여기 파장은 660 nm(slit width = 3/3)였다.

도 8은 EA-BPS 및 R-BPS의 분광 특성을 나타낸 것으로, 다양한 용매(THF, 아세톤, MeOH 및 ACN)에서, EA-

BPS(상단) 및 R-BPS(하단)(각각 5.0 μ M)의 흡수(a, c) 및 (b, d) 방출 스펙트럼이다. 여기 파장은 660 nm(slit width = 3/3)였다.

도 9는 (a) R-BPS, (b) EA-BPS, (c) 메틸렌 블루(MB)의 존재시 및 (d) 660 nm에서 조사 후(slit width = 15-1.5, Xe-lamp) DMSO에 PS가 없을 때 DPBF(40 μ M)의 시간 의존적 흡수 스펙트럼 변화를 나타낸 것이다. (e)는 각각 (a), (b) 및 (c)에 표시된 실험에 대해 412 nm에서 DPBF의 흡광도 변화 플롯을 나타낸 것이고, (f)는 PS들에 대한 일중항 산소 생성 결과를 요약한 것이다.

도 10은 660 nm에서 조사 시(slit width = 15-1.5, Xe-lamp), (a) R-BPS (10 μ M), (b) EA-BPS (10 μ M)의 존재 및 (c) PS의 부존재 하 DCFH(20 μ M)의 시간 의존적 방출 스펙트럼 변화를 나타낸 것이다. 모든 실험은 PBS 완충 용액(0.1 M, pH 7.4, 5% DMSO 함유)에서 수행되었다.

도 11은 광 조사 조건에서 R-BPS 및 EA-BPS 존재하에 DHR123 및 HPF를 사용한 type 1 ROS의 검출 결과를 나타낸 것이다. (a)는 660 nm에서 조사 시(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²), R-BPS (10 μ M), EA-BPS (10 μ M)의 존재 및 PS의 부존재 하 DHR123(3.3 μ M)의 시간 의존적 방출 스펙트럼 변화를 나타낸 것이다. 형광 스펙트럼은 휴지(resting(3 s, grey line) 및 광 조사(3 s, pink line) 주기를 반복하여 기록되었다. (b)는 660 nm에서 조사 시(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²), R-BPS (10 μ M), EA-BPS (10 μ M)의 존재 및 PS의 부존재 하 HPF (10 μ M)의 시간 의존적 방출 스펙트럼 변화를 나타낸 것이다. 형광 스펙트럼은 휴지(resting(10 s, grey line) 및 광 조사(10 s, pink line) 주기를 반복하여 기록되었다.

도 12는 EA-BPS-(GSH)₂와 GST-pi 간의 결합 상호작용을 나타낸 것이다.

도 13은 다양한 용액 상 조건에서 EA-BPS의 안정성을 나타낸 것으로, (a)는 254 nm(검은색 선) 및 660 nm(파란색 선)에서 기록된 10mM PBS 중 EA-BPS의 시간 의존적 HPLC 분석 결과이다. (b)는 254 nm(검은 선) 및 660 nm(파란 선)에서 기록된 RPMI 1640 media(without phenol red) 중 EA-BPS의 시간 의존적 HPLC 분석 결과이다. (c)는 254 nm(검은 선) 및 660 nm(파란 선)에서 기록된 10% FBS(without phenol red)를 포함하는 RPMI 1640 media 중 EA-BPS의 시간 의존적 HPLC 분석 결과이다.

도 14는 EA-BPS 및 EA-ester의 에스테라제 촉매 가수분해(esterase-catalyzed hydrolysis)에 대한 안정성을 나타낸 것으로, (a)는 254 nm(검은 선) 및 660 nm(파란 선)에서 기록된 에스테라제와 EA-BPS의 반응에 대한 시간 의존적 HPLC 분석 결과이고, (b)는 254 nm(검은 선) 및 660 nm(파란 선)에서 기록된 에스테라제와 EA-ester의 반응에 대한 시간 의존적 HPLC 분석 결과이다.

도 15는 MCF-7 및 MDA-MB 231 세포에서 웨스턴 블롯 분석에 의한 GST-pi의 발현을 나타낸 것이다.

도 16은 R-BPS 및 EA-BPS 형광 강도의 변화에서 추론된, MDA-MB-231 세포 및 MCF-7 세포에서 시간 의존적 방식의 R-BPS(5 μ M) 및 EA-BPS(5 μ M)의 세포 흡수를 나타낸 것이다.

도 17은 유방암 세포주에서(MDA-MB-231 세포 및 MCF-7 세포), 광조사가 없는 상태에서 결정된 R-BPS 및 EA-BPS의 세포 생존율 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 조사(irradiation)의 존재 또는 부존재하에서, R-BPS, EA-BPS 및 R-BPS와 EA-ester의 혼합물(2 equiv.)이 처리된 세포의 세포 생존율을 나타낸 것으로, 10분 동안 광조사(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²)의 존재(+) 및 부재(-) 조건에서, (a) MCF-7 및 (b) MDA-MB-231 세포주에서의 R-BPS (5 μ M for 12 h), EA-BPS (5 μ M for 12 h), 및 R-BPS (5 μ M for 12 h)와 EA-ester (2 equiv.)의 혼합물의 세포 생존율을 측정된 결과를 나타낸 것이다(*p < 0.05).

도 19는 LysoTracker®green) 및 MitoTracker®green)(500 nM, 30분)를 참조하여 결정된, MDA-MB-231 세포에서 R-BPS(12시간 동안 5 μ M) 및 EA-BPS(12시간 동안 5 μ M)의 세포 내 공동 국소화(Intracellular co-localization)를 나타낸 것이다. Scale bars: 20 μ m.

도 20은 Annexin V/PI 세포 사멸 분석 결과로서, MDA-MB-231 세포를 포함하는 FACS 분석을 통해 결정된 세포 사멸(annexin V/propidium iodide)을 나타낸 것이다.

도 21은 EA-BPS 주입 후 최대 72시간 동안 모니터링된, MDA-MB-231 이종이식 종양-보유 마우스의 오버레이된 형광 이미지를 나타낸 것이다.

도 22는 대조군(PBS 중 5% DMSO)(좌측) 및 EA-BPS(우측)로 각각 전처리된 MDA-MB-231 이종이식 종양 보유 마우스

스의 절개된 기관의 생체의 형광(상단) 및 백색광 이미지(하단)를 나타낸 것이다.

도 23은 광조사의 존재(+) 및 부재(-) 조건 하, 대조군, R-BPS 및 EA-BPS 처리군에서 9주 후 MDA-MB-231 종양 보유 마우스에서 추출한 종양 및 주요 기관(심장 및 신장)의 조직학적 H&E 염색 이미지, 다른 그룹으로 처리된 종양의 형광 이미지 및 병합 이미지를 나타낸 것이다. Color code: Blue (Hoechst), green (Ki-67), 및 red (cleaved caspase-3). Scale bar = 50 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[실시예]

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.

실험방법

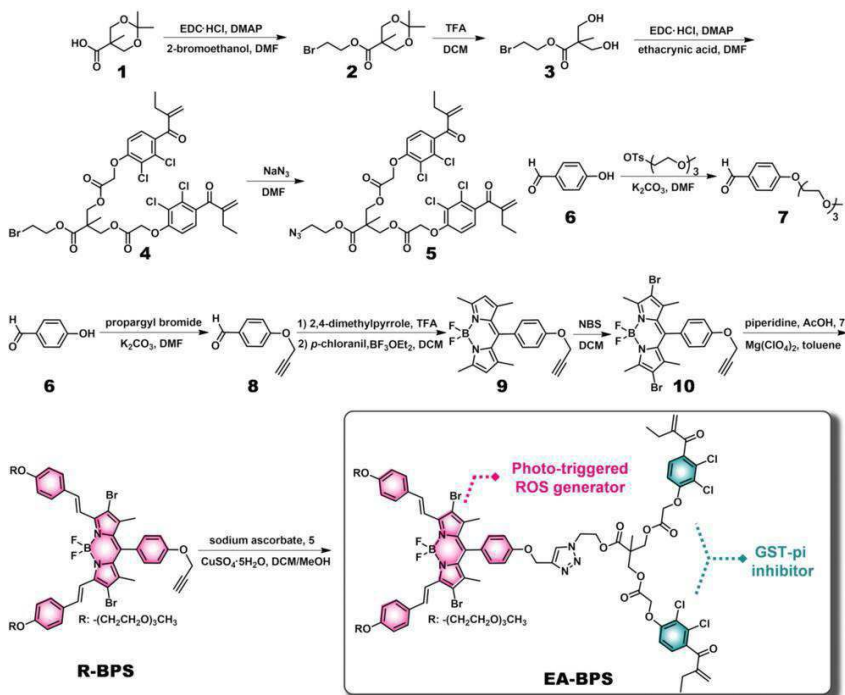
재료 및 방법

UV/Vis 및 형광 스펙트럼은 각각 Jasco V-750 분광 광도계 및 Shimadzu RF-5301PC 분광 형광계를 사용하여 기록하였다. ESI-MS 스펙트럼 및 NMR 스펙트럼은 각각 Shimadzu LCMS-2020 및 Bruker 500MHz NMR 분광기에서 수집하였다. 역상 HPLC 분석은 Young Lin HPLC 시스템(YL9100)이 있는 Dr. Maish GmbH ReproSil 100 C 18, 5 μ m(250 $\times$ 4.6mm) 컬럼을 이용하여 수행하였다. 컬럼 크로마토그래피는 고정상으로 실리카겔 60(70-230 메쉬)을 사용하여 수행하였고, 분석 박막 크로마토그래피는 실리카겔 60(0.25mm 두께의 사전 코팅된 시트)을 사용하여 수행하였다.

화합물 합성

하기 합성 경로(Scheme 1)에 따라 본 발명에 따른 화합물 EA-BBS를 합성하였다.

[Scheme 1]



(1) 화합물 1, 2, 7의 합성

종래 문헌에 기재된 절차에 따라 화합물 1, 2(J. Luczkowiak, S. Sattin, I. Sutkeviciute, J. J. Reina, M. Sanchez-Navarro, M. Thepaut, L. Martinez-Prats, A. Daggetti, F. Fieschi, R. Delgado, A. Bernardi, J.

Rajo, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1354-1365) 및 화합물 7(M. Castro-Alferez, M. I. Polo-Lopez, P. Fernandez-Ibanez, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38145)을 합성하였다.

[0028] (2) 화합물 3의 합성

[0029] 화합물 2(0.50g, 1.78mmol)를 디클로로메탄(DCM; 20mL)에 용해시키고 0℃로 냉각시켰다. 이어서, 트리플루오로아세트산(TFA; 0.5 mL)을 혼합물에 첨가하고, 밤새 교반한 후, 용매를 감압하에 증발시켰다. 톨루엔(20mL)을 첨가한 다음 증발시켜 과량의 TFA를 제거하여 화합물 3(0.35g, 83%)을 수득하였다.

[0030] ^1H NMR (CDCl_3) δ : 4.49 (td, 2H, $J_1 = 5.20$ Hz, $J_2 = 1.10$ Hz), 3.93 (d, 2H, $J = 11.4$ Hz), 3.74 (d, 2H, $J = 11.4$ Hz), 3.75 (td, 2H, $J_1 = 5.20$ Hz, $J_2 = 1.10$ Hz), 2.68 (bs, 2H), 1.11 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 175.3, 68.3, 64.0, 49.4, 28.9, 17.1.

[0031] (3) 화합물 4의 합성

[0032] 화합물 3(0.30g, 1.2mmol), EDCI(0.31g, 1.6mmol) 및 DMAP(0.31g, 2.5mmol)을 무수 디메틸포름아미드(DMF; 15mL)에 용해시키고 질소 하에 실온에서 20분 동안 교반하였다. 이어서, 에타크린산(EA; 0.75g, 2.5mmol)을 혼합물에 첨가하고 밤새 교반하였다. 휘발성 물질을 증발시키고 잔류물을 DCM과 물로 분배하였다. 수세 후, 수집된 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 증발 및 진공 건조 후, 생성된 조 생성물을 EtOAc/n-헥산(v/v, 1:4)을 용리액으로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 4(0.54g, 56%)를 수득하였다.

[0033] ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.14 (d, 2H, $J = 8.60$ Hz), 6.80 (d, 2H, $J = 8.60$ Hz), 5.94 (m, 2H), 5.60 (m, 2H), 4.77 (m, 4H), 4.41-4.28 (m, 6H), 3.51 (m, 2H), 2.46 (m, 4H), 1.25 (m, 3H), 1.16-1.12 (m, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 195.7, 171.6, 167.2, 155.1, 150.1, 133.9, 131.4, 128.8, 126.9, 123.1, 110.6, 65.9, 65.7, 64.6, 46.3, 28.8, 23.4, 17.7, 12.4.

[0034] (4) 화합물 5의 합성

[0035] 화합물 4(0.27g, 0.3mmol) 및 sodium azide(0.03g, 0.4mmol)를 DMF(10mL)에 용해시킨 후혼합물을 60℃에서 밤새 교반하였다. 휘발성 물질을 증발시키고 EtOAc를 잔류물에 첨가하였다. 남아있는 sodium azide를 여과로 제거하고 용매를 감압하에 증발시켜 화합물 5를 수득하였다.

[0036] (5) 화합물 8의 합성

[0037] *p*-Hydroxybenzaldehyde(1.0g, 8.2mmol), K_2CO_3 (6.8g, 49mmol)를 DMF(20mL)에 용해시켰다. 그 다음, Propargyl bromide(1.2 mL, 9.8 mmol)를 첨가하고 생성된 반응 혼합물을 60℃에서 밤새 교반하였다. 과량의 K_2CO_3 를 여과에 의해 제거하고 휘발성 물질을 감압하에 증발 제거하였다. 생성된 조 물질을 DCM에 용해시키고 염수로 세척하였다. 유기층을 수집하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰으며, 용리액으로 EtOAc/n-헥산(v/v, 1:5)을 사용하여 실리카겔 컬럼으로 정제하여 화합물 8(0.71g, 54%)을 수득하였다.

[0038] ^1H NMR (CDCl_3) δ : 9.89 (s, 1H), 7.81-7.87 (m, 2H), 7.09-7.06 (m, 2H), 4.77 (d, $J = 2.41$ Hz, 2H), 2.59 (t, $J = 2.41$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 190.7, 162.4, 131.9, 130.7, 115.2, 77.6, 76.4, 56.0.

[0039] (6) 화합물 9의 합성

[0040] 화합물 8(1.0g, 6.2mmol)을 DCM 중 2,4-dimethylpyrrole(1.4mL, 14mmol)과 혼합하고 TFA(3방울)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한 다음, *p*-chloranil(7.5g, 1.1mmol)을 첨가하고 생성된 반응 혼합물을 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하였다. 트리에틸아민(10mL) 및 boron trifluoride diethyl etherate(10mL)를 천천히 첨가하고 반응물을 다시 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 염수로 세척하고 유기층을 수집하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 감압하에서 휘발성 물질을 여과하고 제거한 후, 조 생성물을 EtOAc/n-헥산(v/v, 1:5)을 용리제로서 사용하여 실리카겔 상에서 정제하여 화합물 9(0.72g, 31%)를 수득하였다.

[0041] ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.21 (d, $J = 8.82$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J = 8.82$ Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.76 (d, $J =$

2.40 Hz, 2H), 2.55 (s, 6H), 2.17 (t, $J = 2.40$ Hz, 1H), 1.42 (s, 6H).

[0042] (7) 화합물 10의 합성

[0043] 화합물 9(0.40g, 1.1mmol)를 DCM:DMF(8:2mL)에 용해시키고 DCM(5mL) 중 N-bromosuccinimide(NBS)(0.39g, 2.2mmol)를 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 감압하에 휘발성을 제거한 후, 조 생성물을 EtOAc/n-헥산(v/v, 1:4)을 용리액으로 사용하여 실리카겔 상에서 정제하여 화합물 10(0.49g, 84%)을 수득하였다.

[0044] ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.19 (d, $J = 8.35$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 8.35$ Hz, 2H), 4.80 (d, $J = 2.41$ Hz, 2H), 2.62 (s, 6H), 2.59 (t, $J = 2.41$ Hz, 2H), 1.45 (s, 6H).

[0045] (8) R-BPS의 합성

[0046] 화합물 10(0.13g, 0.24mmol) 및 화합물 7(0.25g, 0.96mmol)과 소량의 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 를 톨루엔(80mL)에 혼합하였다. 이 용액에 피페리딘(2.1mL) 및 아세트산(1.7mL)을 순차적으로 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 Dean-Stark 트랩이 장착된 플라스크에서 밤새 환류 상태로 유지하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 휘발성 물질을 감압하에 제거하였다. 생성된 조 생성물을 용리액으로서 DCM/MeOH(v/v, 97:3)를 사용하여 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 R-BPS(0.11g, 45%)를 수득하였다.

[0047] ^1H NMR (CDCl_3) δ : 8.09 (d, $J = 16.3$ Hz, 2H), 7.65-7.55 (m, 6H), 7.16 (d, $J = 8.15$ Hz, 2H), 7.06 (d, $J = 8.15$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J = 8.38$ Hz, 4H), 4.72 (d, $J = 1.65$ Hz, 2H), 4.16 (m, 4H), 3.86 (m, 4H), 3.73 (m, 4H), 3.70-3.60 (m, 8H), 3.54 (m, 4H), 3.24-3.69 (s, 6H), 2.63 (t, $J = 1.65$ Hz, 1H), 1.39 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 168.5, 159.8, 158.2, 147.9, 140.7, 138.4, 138.3, 132.1, 129.6, 129.4, 128.9, 127.4, 115.8, 115.6, 114.8, 109.8, 77.8, 76.0, 71.7, 70.6, 70.4, 70.3, 69.4, 67.3, 58.8, 55.8, 47.2, 42.2, 26.2, 25.3, 24.2, 21.2, 13.7. ESI-MS calc. for $\text{C}_{50}\text{H}_{55}\text{BBBr}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1057.23, found 1059.05.

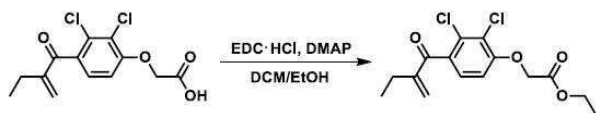
[0048] (9) EA-BPS의 합성

[0049] 둥근 바닥 플라스크에서, R-BPS(0.10g, 0.09mmol)를 DCM:MeOH(1:10mL) 중 화합물5(0.20mg, 0.27mmol) 및 아스코르브산나트륨(10 mol%)과 혼합하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 아르곤 버블링을 통해 탈기시켰다. 동시에, 8 mol%의 CuSO_4 를 0.5 mL MeOH에 용해시키고 실온에서 30분 동안 아르곤으로 버블링하여 탈기하였다. CuSO_4 용액을 주사기를 통해 원래의 플라스크에 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 감압하에 제거한 후, 생성된 조 혼합물을 용리액으로서 DCM/MeOH(v/v, 95:5)을 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 EA-BPS(0.13g, 83%)를 수득하였다.

[0050] ^1H NMR (CDCl_3) δ : 8.10 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.64-7.58 (m, 6H), 7.23-7.10 (m, 6H), 6.96 (d, $J = 8.56$ Hz, 4H), 6.82 (d, $J = 8.56$ Hz, 2H), 5.94 (s, 2H), 5.69 (s, 2H), 5.26 (s, 2H), 4.79 (s, 4H), 4.64 (t, $J = 5.06$ Hz, 2H), 4.49 (t, $J = 4.60$ Hz, 2H), 4.25 (dd, $J_1 = 11.0$ Hz, $J_2 = 13.1$ Hz, 4H), 4.19 (m, 4H), 3.89 (m, 4H), 3.78-3.66 (m, 12H), 3.58-3.55 (m, 4H), 3.39 (s, 6H), 2.46 (m, 4H), 1.46 (m, 7H), 1.25 (s, 3H), 1.18-1.12 (m., 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 195.8, 171.6, 167.4, 160.1, 159.3, 155.2, 150.2, 148.5, 144.0, 141.0, 138.9, 134.1, 132.4, 131.6, 130.7, 130.0, 129.9, 129.3, 128.9, 128.7, 127.7, 126.9, 123.5, 123.2, 116.2, 115.7, 115.2, 115.1, 114.8, 110.8, 72.0, 70.9, 70.7, 70.6, 69.7, 67.6, 66.0, 65.8, 63.1, 62.0, 59.1, 53.5, 49.0, 46.4, 29.7, 23.5, 17.7, 14.0, 12.5 ESI-MS calc. for $\text{C}_{83}\text{H}_{88}\text{BBBr}_2\text{Cl}_4\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{19}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1828.33, found 1833.10.

[0051] (10) EA-ester의 합성

[0052] 하기 합성 경로(Scheme 2)에 따라 EA-ester를 합성하였다.



[0054]

[0056] ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.13(d, 1H, $J = 8.50$ Hz), 6.77 (d, 1H, $J = 8.50$ Hz), 5.93 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.27 (q, 2H, $J = 7.10$ Hz), 2.46 (q, 2H, $J = 7.40$ Hz), 1.30 (t, 3H, $J = 7.10$ Hz), 1.14 (t, 3H, $J = 7.40$ Hz),). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 195.81, 167.71, 155.48, 150.17, 133.85, 131.48, 128.57, 126.72, 123.38, 110.79, 66.30, 61.73, 23.40, 14.10, 12.36.

[0058] 분광학 데이터

[0059] UV/Vis 및 형광 측정을 위해 R-BPS 및 EA-BPS의 1mM 디메틸 설폭사이드(DMSO) 스톱 용액을 구성하고 각 용액 상 분석에 적합한 농도로 희석하였다.

[0061] 일중항 산소(Singlet oxygen) 양자 수율(Φ_{Δ}) 계산

[0062] 광감응제(photosensitizer, PS)의 상대적 양자 수율은 DMSO 중의 기준 (R) (메틸렌 블루; MB)의 값을 0.52로 하고 계산하였다(R. W. Redmond, J. N. Gamlin, *Photochem. Photobiol.* 1999, 70, 391-475). 샘플 용액은 DMSO에 1,3-diphenylisobenzofuran(DPBF)과 PS를 혼합한 다음 DPBF와 PS의 흡광도를 각각 약 1.0 및 0.1로 조정하여 만들었다. 어둠 속에서 UV-Vis 스펙트럼을 측정한 후, 샘플은 MB와 PS에 대해 각각 100초 또는 5분 동안 660 nm에서 단색광에 노출시켰으며, 이후 UV-Vis 스펙트럼을 기록하였다. 412 nm에서 DPBF의 흡광도를 시간에 대해 플롯팅하고 기울기를 결정하였다. 일중항 산소 양자 수율(Φ_A)은 하기 [식 1]에 따라 계산하였다.

$$\Phi_{\Delta}(PS) = \Phi_{\Delta}(R) \times \left(\frac{m_{PS}}{m_R}\right) \times \left(\frac{F_R}{F_{PS}}\right) \times \left(\frac{PF_R}{PF_{PS}}\right)$$

[0063]

[0064] 여기서 m 은 PS 또는 R의 존재하에서 412 nm에서 조사시 해당 시간에서 DPBF의 흡광도도수 변화를 나타내는 플롯 기울기이고, F 는 $F = 1 - 10^{-OD}$ (OD = 조사 과정에서 광학 밀도)에 의해 결정되는 흡수 보정 계수이며, PF 는 흡수된 광 플럭스(photon flux) ($\mu_{\text{Einstein}} \text{ dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$)이다.

[0066] 활성 산소(reactive oxygen species, (ROS)) 생성에 관한 연구

[0067] DPBF 분석

[0068] 일종항 산소를 검출하기 위해 DPBF를 특정 지표로 사용하였다. DPBF 스펙트럼 변화를 기록하기 위해 DMSO에서 해당 PS(흡광도: ~ 0.1)와 DPBF(흡광도: ~ 1.0)를 혼합하여 샘플을 준비하였다. 그런 다음 DPBF의 흡수 스펙트럼 변화를 PS의 660 nm 광 조사(Xe-램프 단색 광원, 슬릿 폭 15/1.5 nm)와 함께 Jasco V-750 분광 광도계를 사용하여 기록하였다. DPBF 흡수 강도 변화를 기록하기 위해 DMSO에서 해당 PS(1 μM) 및 DPBF(100 μM)를 혼합하여 샘플을 준비하였고, 생성된 혼합물을 96웰 플레이트(333384, PS/PS, Flat Black plate; SPL)에 로딩하였다. 그런 다음 DPBF 프로브의 흡수 강도를 PS의 광 조사(660nm LED 램프, 100mW/cm²)와 함께 Hidex Sense 마이크로

플레이트 판독기(Hidex)를 사용하여 기록하였다.

[0070] DHR123 분석

[0071] 슈퍼옥사이드 라디칼을 검출하기 위해 dihydrorhodamine 123(DHR123)을 형광 센서로 사용하였다. DHR123 스펙트럼 변화를 기록하기 위해 DW에서 해당 PS(10 μ M)와 DHR123(3.3 μ M)을 혼합하여 샘플을 준비하였다. 그런 다음 DHR123 프로브의 형광 스펙트럼을 반복된 휴지(3 s, grey line) 및 광 조사(3 s, pink line) 사이클과 함께 Jasco V-750 분광 광도계(ex: 500 nm)를 사용하여 기록하였다. 광조사는 660nm LED 램프(100mW/cm²)를 사용하여 수행하였다.

[0073] HPF 분석

[0074] 하이드록실 라디칼을 검출하기 위해 hydroxyl phenyl fluorescein(HPF)을 특정 형광 센서로 사용하였다. HPF 스펙트럼 변화를 기록하기 위해 DW에서 해당 PS(10 μ M)와 HPF(10 μ M)를 혼합하여 샘플을 준비하였다. 그런 다음 HPF의 형광 스펙트럼을 반복된 휴지(10 s, grey line) 및 광 조사(10 s, pink line) 사이클과 함께 Jasco V-750 분광 광도계(ex: 490 nm)를 사용하여 기록하였다. 광조사는 660nm LED 램프(100mW/cm²)를 사용하여 수행하였다.

[0076] DCFH 분석

[0077] ROS의 생성은 2,7-디클로로디하이드로플루오레세인(DCFH)을 사용하여 측정하였다. 장기 보관 조건에서 DCFH가 자가 산화되는 경향으로 인해 DCFH의 보다 안정적인 디아세테이트 형태(DCFH-DA)를 상업적으로 구입하여 DCFH를 생산하는 데 사용하였다. DCFH 스톡 용액은 다음과 같이 DCFH-DA를 가수분해하여 새로 제조하였다: DCFH-DA의 1mM 에탄올 용액 0.1mL를 10mM 수성 NaOH 0.4mL와 혼합하고 암실에서 30분 동안 교반하였다. DCFH 관련 스펙트럼 변화를 기록하기 위해 10mM PBS 용액에서 해당 PS(5 μ M)와 DCFH(10 μ M)를 혼합하여 샘플을 준비하였다. 523 nm에서 DCFH의 형광 강도의 증가는 5분마다 660 nm(xenon lamp monochromatic light source, slit width 15/1.5 nm)에서 샘플을 조사한 후 모니터링하였다. DCFH 형광 강도 변화를 기록하기 위해 DMSO에서 해당 PS(1 μ M)와 DCFH(5 μ M)를 혼합하여 샘플을 준비하고 96웰 플레이트(333384, PS/PS, Flat Black plate; SPL)에 로딩하였다. DCFH의 형광 강도는 PS의 광 조사(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²)와 함께 Hidex Sense 마이크로플레이트 판독기(Hidex)를 사용하여 535 nm(ex: 460)에서 기록하였다.

[0079] 도킹 및 분자 역학 시뮬레이션

[0080] GST-pi 구조적 매개변수는 Protein Data Bank(PDB ID: 11GS)에서 얻었다. 그리드 박스는 0.2 Å 간격으로 PS를 덮도록 구성되었다. 도킹 파라미터는 Autodock 4.2, AutodockTools 1.5.6 및 Lamarckian 유전 알고리즘을 사용하여 각 사이클마다 50회 실행 및 2,500,000회 에너지 평가로 설정되었다. 전술한 방식으로 얻은 가장 낮은 결합 에너지를 가진 5개의 구조를 추가적인 분자 역학(MD) 시뮬레이션에 사용하였다.

[0081] EA-BPS-(GSH)₂ (리간드)에 대한 Gaff force field는 Gaussian 09 #에 의해 설정된 6-31G ** 기반으로 M06 교환 함수를 사용하여 수행된 밀도 함수 이론(DFT) 계산에 의해 생성되었다. Gaff force field에는 붕소(boron)에 대한 parameter가 없고 EA-BPS-(GSH)₂ 에서 붕소의boron의 위치가 active site에 있기 때문에, MD 시뮬레이션에서는 붕소 원자 및 관련 불소 원자를 메틸기로 대체하였다. ff14SB# force field 및 TIP3P# water 모델은 Amber14 패키지#를 사용하여 수행된 5개의 독립적인 MD 시뮬레이션과 함께 사용되었다. SHAKE 알고리즘#은 수소를 포함하는 특정 결합을 제한하기 위해 적용되었다. 비결합 컷오프 값은 12 Å로 설정되었고, 시스템과 박스 가장자리 사이의 거리는 10 Å 이상이었다. 전체 시스템은 가장 적절한 최소화 방법으로 conjugate gradient 방법을 사용하여 5000 단계에 따라 최소화되었다. 그런 다음 시스템은 표준 앙상블(NVT)에서 2.0 fs의 결합 상수로 200ps 이내에 0K에서 298.15K로 가열되었다. 일정한 압력 시뮬레이션을 위해 Berendsenbarostat를 사용하는 등온-등압 앙상블(NPT)이 200ps 동안 사용되었다. 마지막으로 60ns의 긴 프로덕션 실행이 2.0 fs 시간 단계로 수행되었다. 평형을 평가한 후, 최종 50ns만 결합 자유 에너지를 계산하는 데 사용되었다. 결합 에너지는

molecular mechanics generalized-Born surface area (MM/GBSA) 방법을 사용하여 구했다.

[0083] 역상 HPLC 분석

[0084] 배지에서 EA-BPS 안정성의 HPLC 분석: EA-BPS 수용액은 10 mM PBS(pH 7.4, with 5% DMSO) 중 EA-BPS (50 μ M), RPMI 1640 배지(without phenol red, containing DMSO 5%) 및 10% FBS(without phenol red, containing DMSO 5%)를 함유하는 RPMI 1640 배지를 혼합하여 제조하였다. 분석 전에 EA-BPS 용액을 37°C에서 인큐베이션 하였다. 각 샘플은 바이너리 구배가 있는 적절한 이동상(Solvent A: deionized water containing 0.1% TFA, Solvent B: Acetonitrile)(65%-0% of Solvent A for 12 min, then 0% of Solvent A for 13 min, then 0-65% of Solvent A for 10 min)을 사용하여 1 mL/min의 유속으로 용출되었다.

[0085] EA-BPS 및 EA-ester의 에스테라제에 대한 안정성의 HPLC 분석: EA-BPS 또는 EA-ester 수용액은 각 화합물(50 μ M)을 10mM PBS(pH 7.4, 5% DMSO 포함)에 혼합하여 제조하였다. 에스테라제(E884; Sigma Aldrich)가 있는 샘플은 10mM PBS(pH 7.4, 5% DMSO 포함) 중 에스테라제(1 μ g/mL) 및 상기 용액들(50 μ M EA-BPS or EA-ester)을 혼합하여 준비하였다. 분석 전에 반응 혼합물을 37°C에서 인큐베이션하였다. 각 샘플은 바이너리 구배를 갖는 이동상(Solvent A: deionized water containing 0.1% TFA, Solvent B: Acetonitrile)(55%-0% of Solvent A for 12 min, then 0% of Solvent A for 13 min, then 0-55% of Solvent A for 10 min)을 사용하여 1 mL/min의 유속으로 용출되었다.

[0087] 세포주 및 시약

[0088] 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 및 MCF-7 세포주는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하였다. MDA-MB-231 및 MCF-7 세포를 RPMI 1640 배지(HyClone, Chicago, IL, USA)에서 배양하였다. 모든 배지는 10% FBS(GIBCO, Grand Island, NY, USA) 및 1% penicillin/streptomycin(GIBCO)으로 보충되었고, 세포는 5% CO₂로 가습된 분위기에서 37°C에서 배양되었다.

[0090] 세포 흡수(Cell uptake) assay

[0091] 세포 흡수의 유세포 분석을 위해 MDA-MB-231(GST-pi positive) 및 MCF-7(GST-pi negative) 세포를 6웰 플레이트에 웰당 1×10^5 개 세포로 분주하고 적어도 24 시간 동안 부착되도록 하였다. 그런 다음 세포를 5 μ M R-BPS 및 5 μ M EA-BPS로 처리하거나 처리하지 않고 PBS로 세척하기 전에 1, 3, 6 및 12시간 동안 배양 하였다. 배양 후, 세포를 트립신-EDTA로 수확하고 PBS에 재현탁시켰다. 모든 세포 현탁액은 Allophycocyanin (APC: excitation, 640 nm; emission, 675/30 nm) 채널이 있는 FACS Calibur™ 유세포 분석기 및 CELLQUEST™ 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0093] 세포 생존율(Cell viability) 분석

[0094] MDA-MB-231 및 MCF-7 세포를 96웰 플레이트에 웰당 1×10^4 개 세포로 시딩하고 적어도 24시간 동안 부착되도록 하였다. 배양 후, 세포를 21% 정상산소 및 2% 저산소증 조건에서 12시간 동안 5 μ M R-BPS, 5 μ M EA-BPS, 5 μ M EA 또는 1% DMSO로 처리하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고 660 nm 광(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²)에서 5분 동안 조사하거나 빛을 가하지 않은 상태에서 유지시켰다. 세포 독성을 결정하기 위해 프로브가 있는 상태에서 제조업체의 지침에 따라 CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. 웰의 흡광도는 490 nm에서 SpectraMax Gemini EM 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 측정하였다. 세포 생존율 분석은 3회 반복 수행하였고, 세포 독성은 대조군 대비 계산된 백분율로 측정하였다.

[0096] ROS 및 라디칼 인디케이터(radical indicator) 이미징

[0097] ROS의 일반적인 레벨을 측정하기 위해 세포를 유리 바닥 접시에 뿌린 다음 5 μ M EA-BPS로 처리하였다. 세포를 6 시간 동안 인큐베이션한 후 PBS로 2회 세척하고 37°C에서 30분 동안 10 μ M CM-H2DCFDA(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 함께 추가로 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 PBS로 두 번 세척하였다. 형광 이미지는 LSM 700 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 얻었다. MDA-MB-231 세포(1×10^4 cells)를 유리 바닥 접시에 분주하고, 최소 24시간 동안 부착되도록 한 후, 660nm 광(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²)으로 5분 동안 조사하거나 조사하지 않고 5 μ M R-BPS 또는 5 μ M EA-BPS와 함께 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 처리 후, 세포를 PBS 및 5 μ M SOSG로 30분 동안 2회 세척하였다. 세포의 형광 이미지는 여기 파장이 514 nm로 설정된 LSM 700 CLSM(Carl Zeiss)을 사용하여 기록하였다. 슈퍼옥사이드와 하이드록실 라디칼을 평가하기 위해 세포를 유리 바닥 접시에 플레이팅하고 6시간 동안 5 μ M R-BPS, 5 μ M EA-BPS 또는 1% DMSO(대조군)로 처리하였다. 그런 다음, 30 μ M DHE(디히드로에티딤) 및 10 μ M HPF(히드록시페닐 플루오레세인)를 첨가하고, 세포에 660nm 광(660nm LED 램프, 100mW/cm²)을 5분 동안 조사하거나 외부 광 없이 유지하였다. 이 시간 후, 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 형광 이미징은 위와 동일한 LSM 700 CLSM(Carl Zeiss) 기기를 사용하여 수행하였다. 세포내 글루타티온(ThiolTracker™ Violet dye; T10095)(Invitrogen)을 검출하기 위해, MDA-MB-231 세포(1×10^4 cells)를 유리 바닥 접시에 시딩하고, 최소 24시간 동안 부착되도록 한 다음, 660nm 광(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²)으로 5분 동안 조사하거나 조사하지 않고 5 μ M R-BPS 또는 5 μ M EA-BPS와 6시간 동안 배양하였다. 이 처리 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고 티올이 없는 완충액에서 30분 동안 20 μ M ThiolTracker™Violet 염료와 함께 인큐베이션하였다. 세포의 형광 이미지는 여기 및 방출 파장이 404/526 nm로 설정된 LSM 700 CLSM(Carl Zeiss)을 사용하여 기록하였다.

[0099] Annexin V 분석

[0100] Apoptotic 세포를 검출하기 위해 MDA-MB-231 세포(1.5×10^6 cells)를 60mm 접시에 분주하고, 적어도 24시간 동안 부착되도록 하였다. 세포를 6시간 동안 5 μ M R-BPS, 5 μ M EA-BPS 또는 1% DMSO(대조군)로 처리하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척하고 660nm 광(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²)으로 5분 동안 조사하거나 외부 광 없이 유지하였다. Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit(BD Bioscience)를 사용하였고, apoptotic 세포는 FACS Calibur™유세포 분석기에서 정량화하고 CELLQUEST™소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0102] 세포 해독작용(Cellular detoxification) 분석

[0103] 세포 해독작용을 평가하기 위해 MDA-MB-231 세포(4×10^3 cells)를 96웰 플레이트에 분주하고 적어도 24시간 동안 부착되도록 한 후 EA-BPS(5 μ M) 또는 R-BPS(5 μ M)와 함께 6시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고 660nm 광(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²)으로 5분 동안 조사하거나 외부 광 없이 유지하였다. 지질 과산화(Lipid peroxidation)는 Lipid Peroxidation MDA Assay Kit(Abcam, Cambridge, UK)를 사용하여 측정되었으며 GST 활성은 Glutathione S-Transferase Assay Kit(Cayman Chemical)를 사용하여 정량화되었다. S-글루타티오닐화(S-glutathionylation)는 S-Glutathionylated Protein Detection Kit(Cayman Chemical)를 사용하여 측정되었다.

[0105] 세포 내 국소화(Subcellular localization)

[0106] 미토콘드리아 슈퍼옥사이드를 검출하기 위해 MDA-MB-231 세포(5×10^4 cells)를 유리 바닥 접시에 분주하고, 최소 24시간 동안 부착되도록 한 다음, R-BPS(5 μ M) 또는 EA-BPS(5 μ M)와 함께 6시간 동안 배양 하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고 660nm 광(660 nm LED lamp, 100 mW/cm²)으로 5분 동안 조사하거나 외부 광 없이 유지하였다. 12시간 동안 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 두 번 세척하고 미토콘드리아와 리소좀을 500nM MitoTracker™ Green 및 500nM LysoTracker Green DND-26(Invitrogen)을 사용하여 30분 동안 염색하였다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS x 3으로 세척하였다. LSM 700 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 형광 이미지를 얻었다.

[0108] 면역블롯팅 분석

[0109] GST-pi (610718), HIF1-a (610959), cleaved caspase-3 (#9661), LC3 (sc-376404), 및 β 액틴(sc-47778)에 특이적인 항체를 사용하여 면역블롯 분석을 수행하였다. 간단히 말해서, 부착된 세포를 ice-cold PBS로 3회 세척하고 긁어내어 세포 펠렛을 수집하였다. PBS 제거 후, 50 mM Tris/HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% 나트륨 도데실 설페이트(SDS), 1% Triton X-100, 1% 나트륨 데옥시콜레이트를 함유하는 방사성면역침전 분석(RIPA) 용해 완충액, 및 제조사(Biosesang, Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 제공한 프로테아제 억제제 혼합물을 세포 펠렛에 첨가하여 단백질 용해물을 얻었다. 각 샘플의 단백질 농도를 측정하기 위해 BCA assay(bicinchoninic acid assay)를 수행하였다. 각 세포주로부터의 단백질(30 μ g/lane)을 나트륨 도데실 설페이트 폴리-아크릴아미드 겔 전기영동 겔(SDS-PAGE)에 로딩하여 단백질을 밴드로 분리하였다. 분리된 단백질 밴드를 PVDF(Polyvinylidene difluoride) 막(Merk Millipore, Burlington, MA, USA)으로 옮겼다. 막을 항체와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 인큐베이션하였다. 생성된 막을 Tris-buffered saline 0.1% tween-20 (TBS-T)으로 세척한 다음 antimouse horseradish peroxidase (HRP)-접합 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology; sc-2357) 및 anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-접합 이차 항체(GTX213110-01; GeneTex, Irvine, CA, USA)를 실온에서 2 시간 동안 처리하였다. 면역반응성 단백질 밴드를 검출하기 위해, 제조사의 지침에 따라 향상된 화학발광 시약(Luminate; Merk Millipore)을 사용하였다.

[0111] 동물 연구

[0112] 5주령 면역결핍 누드마우스(nu/nu) (Orient Bio, Inc., Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)를 반복 조절 조명(12h dark; 12h light), 멸균된 물과 식품에 대한 무제한 접근이 가능한 조건 하 가압 환기 케이지에서 유지시켰다 (Cat no: 1314Fort; Altromin Spezialfutter GmbH & Co. Kg, Lage, North Rhine-Westphalia, Germany). 모든 동물 연구는 한국 동물보호법에 의거하여 고려대학교 동물연구소 동물관리위원회(# KUIACUC-2018-57)의 승인을 받아 수행되었다. 50 μ L Matrigel@Basement Membrane Matrix(CORNING, Corning, NY, USA)가 포함된 50 μ L PBS 중 MDA-MB-231 세포(1×10^6)를 각 누드 마우스의 양쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양 부피가 100 mm³에 도달했을 때, 마우스를 6개의 처리 그룹으로 무작위화하였다; 비히클 대조군(PBS 중 5% DMSO), R-BPS, EA-BPS (n = 5 마우스, n = 그룹당 종양 5개)(with or without irradiation). 마우스는 4주 동안 매주 1회 0.5mL 주사기 (BD Biosciences)를 사용하여 100 μ L PBS 중 관심 화합물(5mg/kg, PBS 중 5% DMSO) 또는 비히클(PBS 중 5% DMSO)을 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 종양 부위는 주입 3시간 후 660nm 레이저 조사(2 W/cm², 10 min)를 받거나 주변 광 이외의 다른 것으로부터 보호되었다. 종양 성장을 주기적으로 모니터링하고 수정된 타원체 공식을 사용하여 종양 부피(V)를 계산하였다: $V = 1/2 \times \text{length} \times (\text{width})^2$.

[0114] 생체 내(In vivo) 및 생체 외(ex vivo) 형광 이미징

[0115] 생체 내 및 생체 외에서 종양 표적 특이성과 EA-BPS의 기관 분포를 평가하기 위해, MDA-MB-231 세포를 마우스에 피하 주사하였다. 종양이 감지 가능한 크기에 도달했을 때, 마우스를 단일 정맥 주사를 통해 EA-BPS(5 mg/kg) 또는 비히클(5% DMSO)로 처리하였다. 3일 후, 동물은 CO₂ 질식을 통해 안락사시켰고, 이종이식 종양을 절제하고 사진을 찍었다. 대조군 및 주사된 마우스의 종양 및 기관의 생체 외 형광 이미지를 기록하고 Maestro2 기기(여기 및 방출 파장: 각각 650 및 750-800 nm)를 사용하여 정량화하였다. 그런 다음 다중 여기 스펙트럼 분석 기능 및 기기와 함께 제공된 소프트웨어(Maestro 소프트웨어 버전 2.4; CRi, Woburn, MA, USA)를 사용하여 형광 이미지 및 자동 형광을 디컨볼루션하였다.

[0117] 간독성(Hepatotoxicity) 및 신독성(renal toxicity) 분석

[0118] 각 마우스의 혈액 샘플을 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 3,000 rpm으로 원심분리하여 혈청 샘플을 생성하였다. 혈청 내 ALT 및 AST 활성은 제조업체의 지침에 따라 AST 및 ALT 활성 분석 키트(MAK055, MAK052; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 분석하였다.

[0120] **H&E 염색 및 면역조직화학**

[0121] 조직을 추출하고 냉동 섹션 화합물(Leica Microsystems AG, Wetzlar, Hessne, Germany)에 포매하였다. Leica cryotome CM3050S를 사용하여 중앙 절편(5 μ m 두께)을 생성하고 슬라이드에 고정하고 슬라이드를 -70° C에서 보관하였다. H&E 염색을 위해 슬라이드를 재수화하고 Gill's Hematoxylin과 0.5% Eosin Y로 대조 염색하였다. 면역조직화학은 anticleaved caspase-3(# 9661; Cell Signaling) 및 anti-Ki-67(ab15580; abcam)을 사용하여 수행하였다.

[0123] **통계 분석**

[0124] 모든 통계 분석은 알파 레벨이 0.05인 post-hoc Bonferroni 테스트가 포함된 일원 분산 분석 및 SAS 버전 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0126] **결과 및 고찰**

[0127] EA-BPS 및 R-BPS는 상기 Scheme 1에 따라 합성하였다. 간략하게, 디올 보호된 산 중간체 화합물 1을 디메틸포름아미드(DMF) 중 1-에틸-3(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 염산염(EDC · HCl) 및 N,N'-디메틸아미노피리딘(DMAP)의 존재 하에 2-브로모에탄올과 커플링하여 화합물 2를 수득하였다. 또한, EDC · HCl, DMAP 및 DMF 존재하에서 에타크린산(EA)을 사용한 디올 탈보호 및 커플링을 통해 화합물 4를 수득하였으며, 화합물 4를 DMF 중 아지드화나트륨으로 처리하여 화합물 5를 수득하였다. 동시에, 종래 문헌(H. S. Jung, J. Han, H. Shi, S. Koo, H. Singh, H. J. Kim, J. L. Sessler, J. Y. Lee, J. H. Kim, J. S. Kim, J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 7595-7602.)에 기재된 방법에 따라 화합물 8 및 2,4-디메틸피롤로부터 화합물 10을 수득하였다. 중간체 R-BPS는 화합물 7과 화합물 10 사이의 Knoevenagel 축합에 의해 수득하였다. 마지막으로, 메탄올/디클로로메탄(10:1)에서 중간체 화합물 5와 R-BPS 사이의 CuI 매개 알킨-아조 클릭 반응(CuI-mediated alkyne-azo click reaction)을 통해 표적 화합물 EA-BPS를 수득하였다. 합성된 화합물의 특징은 ¹H NMR, ¹³C NMR 및 ESI-MS 분석을 통해 확인하였다.

[0128] 다음으로 DMSO(디메틸 설펍사이드)에서 R-BPS와 EA-BPS의 흡수 및 방출 특성을 조사하였다. 브롬화 BODIPY 코어(BPS)에 해당하는 강한 흡광도 밴드가 R-BPS(molar extinction coefficient, ϵ = 6.45 $\times 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹ at 667 nm)와 EA-BPS(ϵ = 7.35 $\times 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹ at 667 nm) 모두에서 관찰되었다(도 7). R-BPS와 EA-BPS의 형광 스펙트럼은 698 nm를 중심으로 방출 피크를 나타내었다(도 7의 b). R-BPS와 EA-BPS의 형광 방출은 용매 극성(p)이 증가함에 따라(tetrahydrofuran, p: 4.0 < acetone, p: 5.1 = methanol, p: 5.1 < acetonitrile, p: 5.8), hypsochromic shifts(최대 40 nm)를 나타내었다(도 8). 본 발명에서는 또한 PBS(10 mM, pH 7.4, 1% Triton X100)에서 R-BPS 및 EA-BPS의 흡광도 및 방출 특성을 테스트하였다. 그 결과, 두 화합물은 유기 용매에서 측정된 결과와 유사한 흡수(671 nm) 및 방출(693 nm) 특성을 나타내었다(도 7). 그러나, 이러한 접합체들은 방출성이 있지만 광감응제 서브유닛에 무거운 원자(브롬)를 포함한다는 점을 인식하는 것이 중요하다; 이것은 여기된 삼중항 상태로 시스템 간 교차(inter-system crossing ISC)를 촉진하여 형광 양자 수율을 낮추는 역할을 한다.

[0129] 다음으로 R-BPS 및 EA-BPS에 대해 예상되는 ISC 속도의 향상이 PDT에 매력적인 기능으로 변환되는지 여부를 조사하였다. 이를 위해 1,3-디페닐이소벤조푸란(DPBF)이 광감응 조건에서 일중항 산소(Type 2 ROS)에 대한 화학 프로브로 사용되었다. EA-BPS와 DPBF의 혼합물을 660 nm 빛으로 조사한 결과 30분에 걸쳐 DPBF의 함량이 급격히 감소하는 것으로 나타났다(도 2A, C). 다른 동일한 실험 조건에서 R-BPS에 대해 유사한 결과가 얻어졌지만, 이러한 BPS 유도체가 없는 경우 DPBF 함량은 변경되지 않은 상태로 유지되었다(도 2C 및 도 9). R-BPS 및 EA-BPS에 대한 일중항 산소 양자 수율(Φ_Δ)은 표준으로 메틸렌 블루(MB)에 의존하는 프로토콜(MB: Φ_Δ = 0.52 in DMSO)을 사용하여 결정되었다(R-BPS 및 EA-BPS에 대해 각각 0.14 및 0.13)(도 9).

[0130] 이와는 별도로 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 ROS 지시약으로 사용하였다. R-BPS와 EA-BPS는 모두 연장된 시간 동안 조사(660 nm) 시 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)에 기인하는 523 nm에서 시간 의존적 형광 향상을 생성하였다(도 2B, D). 대조적으로, DCFH-DA가 R-BPS 또는 EA-BPS가 없는 상태에서 광조사 대상이 되었을 때 523 nm에서의 형광 증가는 무시할 수 있는 수준으로 판명되었다(도 10). 더욱이, R-BPS와

EA-BPS는 광조사에 따라 각각 $O_2^{\cdot -}$ 및 $HO\cdot$ 의 지표인 디하이드로로다민 123(DHR123)과 하이드록실 페닐 플루오레세인(HPF)의 형광 스펙트럼 변화를 일으켰다(도 11). 종합적으로, 이러한 결과는 광감응 조건에서 R-BPS와 EA-BPS가 DMSO와 수성 매체 모두에서 ROS 생산을 촉진할 수 있다는 주장을 뒷받침한다(도 9-11).

[0131] 활성 부위를 확인하고 GST-pi와 EA-BPS-(GSH)₂(EA-BPS와 GSH 사이에 형성된 것으로 추정되는 분자 접합체) 간의 추정된 상호작용을 확인하기 위해, 도킹 및 분자 역학(MD) 시뮬레이션을 수행하였다(도 2E, F). GST-pi와 EA-BPS-(GSH)₂ 사이의 결합 자유 에너지는 MD 시뮬레이션에서 -65.1 kcalmol⁻¹로 계산되었다. 연관된 분해 자유 에너지 값 -2.9, -2.4, -4.2, -1.9 및 -2.3 kcalmol⁻¹에 반영된 바와 같이 5개의 잔기(Chain A: F7, W37 and Y107; Chain B: Y107 및 A120)가 활성 부위에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 그 중 활성 부위에 Y107 잔기가 존재한다는 점을 통해 EA-BPS-(GSH)₂가 하나가 아닌 두 개의 ethacrynic 서브유닛을 통해 GST-pi 효소 포켓과 상호작용하고 있음을 확인할 수 있었다(도 12).

[0132] 생물학적 환경에서 약제의 안정성은 치료 개발의 맥락에서 고려해야 하는 중요한 문제이다. EA-BPS에 에스테르 작용기가 있어 생물학적 매체에서 안정성이 낮아질 수 있다는 사실을 감안할 때(예를 들어 esterase에 대해 반응성이 있음), 본 발명에서는 다양한 용액 상 조건에서 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 EA-BPS 조성의 시간 의존적 변화를 모니터링하였다. 도 13에 나타난 바와 같이, EA-BPS에 해당하는 24.6분의 체류 시간을 갖는 피크는 10 mM PBS, RPMI 1640 및 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640에서 6시간 동안 인큐베이션 후에도 변하지 않은 채로 유지되었다. 또한, EA-BPS는 에스테라제의 존재하에서 현저하게 가수분해되는 것으로 확인되지 않은 반면, EA의 카르복실산 에틸 에스테르 형태인 EA-ester는 동일한 조건에서 빠르게 가수분해되었다(도 14). 이를 바탕으로 본 발명에 따른 화합물 EA-BPS는 추가 생물학적 연구를 허용할 만큼 충분히 안정적임을 확인하였다.

[0133] GST-pi 억제제가 PDT 효능의 개선으로 이어지는지 여부를 테스트하기 위해 R-BPS 및 EA-BPS의 세포 흡수 거동 및 세포 독성을 조사하였다. 먼저, 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231(GST-pi positive) 및 MCF7(GST-pi negative)에서 GST-pi의 내인성 발현을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다. 예상대로, MDA-MB-231에서 GST-pi 발현은 MCF7 세포주에서 보다 상당히 더 높은 것으로 입증되었다(도 15).

[0134] 다음으로, MDA-MB-231 및 MCF7 세포주에서 화합물 R-BPS 및 EA-BPS의 세포 흡수를 평가하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 도 3A 및 도 16에 도시된 바와 같이, EA-BPS가 R-BPS보다 더 효과적으로 흡수되었으며, MDA-MB-231 세포주에 대해 더 큰 흡수가 나타났으며, 두 세포주에서 모두 시간 의존적임을 확인하였다. 이 두 화합물의 구조적 특징을 고려할 때, EA-BPS의 더 큰 흡수는 R-BPS와 비교하여 더 친유성 특성 때문일 수 있다.

[0135] R-BPS 및 EA-BPS의 치료 가능성을 평가하기 위해 MCF7 및 MDA-MB-231 암세포주를 사용하여 방사선 조사(test of dark toxicity) 없이 세포 생존력 분석을 수행하였다. R-BPS는 두 세포주에서 최대 50 μ M까지 세포독성을 나타내지 않았지만 동일한 농도의 EA-BPS는 MCF7 및 MDA-MB-231 세포주에서 세포 생존율을 각각 21% 및 42% 감소시켰다(도 17). 10분간 광조사 수행 시(660 nm, LED lamp, 100 mWcm⁻²), 5 μ M 농도의 R-BPS 및 EA-BPS를 사용한 경우에도 독성 차이(R-BPS vs. EA-BPS or MCF7 vs. MDA-MB-231)가 향상되었다(도 18). EA-BPS는 MCF7 세포(31%)와 MDA-MB-231(70%)에서 세포 생존력의 현저한 감소를 초래한 반면 R-BPS는 유사한 조건에서 세포 생존력을 약간 감소시킬 뿐이었다. 이러한 결과들은 광조사 조건에서 GST-pi 활성의 EA 기반 차단이 GSTpi 항산화 시스템에 특히 의존하는 세포에 대해 세포독성을 증가시킨다는 것을 뒷받침한다.

[0136] 다음으로, 광조사 조건 하 MDA-MB-231 암세포 내부에서 ROS를 생성하는 R-BPS와 EA-BPS의 능력을 조사하였다. 세포는 산화제-민감성 ROS 프로브(DCFH-DA, green)의 존재 하에 R-BPS, EA-BPS 및 1% DMSO(대조군)와 인큐베이션하였다. 광조사 시(660 nm, 100 mWcm⁻², 10 min), DCF의 형성(the oxidized, fluorescent form of the DCFH-DA probe)에 해당하는 강렬한 녹색 형광 신호가 R-BPS 및 EA-BPS와 함께 처리된 세포에서 관찰되었다. 정량적 분석은 EA-BPS로 처리된 세포의 형광 신호 강도가 해당 R-BPS 그룹의 형광 신호 강도보다 큰 것으로 나타났다(도 3B). 대조적으로, 대조군(1% DMSO)에서는 형광 신호가 관찰되지 않았다. N-아세틸시스테인(NAC, an effective ROS quencher)으로 세포를 사전 인큐베이션 하면 동일한 실험 조건에서 녹색 형광이 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 R-BPS와 EA-BPS가 빛 활성화 시 세포 내 ROS 생성을 유발하며, ROS 생성 정도는 R-BPS보다 EA-BPS가 1.4배 더 크다는 것을 확인하였다(도 3B).

[0137] 일반적으로 PDT 광감응제는 Type I (radical ions formed by the abstraction of an electron/hydrogen atom

from a substrate by a photoexcited PS) 또는 Type II (photoexcited PS serving to promote the conversion of triplet ground state molecular oxygen ($^3\text{O}_2$) to reactive singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)) 메커니즘을 통해 광 매개 ROS 생성을 촉진하는지 여부에 따라 분류된다. EA-BPS의 경우 이러한 제한 메커니즘 중 어느 것이 지배적일 수 있는지 확인하기 위해 먼저 광조사 조건에서 $^1\text{O}_2$ 가 세포에서 생성되는지 여부를 결정하였다. 이를 위해 SOSG(Singlet Oxygen Sensor Green)를 지표로 사용하였다. 위와 같이 R-BPS 및 EA-BPS와 함께 인큐베이션된 세포의 조명은 SOSG 프로브에 기인하는 높은 수준의 녹색 형광을 특징으로 한다(도 3C). 이러한 결과는 이 두 PS가 일중항 산소 형성을 촉진할 수 있다는 주장을 뒷받침한다.

[0138] R-BPS와 EA-BPS가 Type I 메커니즘을 통해 ROS를 생성할 수 있는지 여부를 테스트하기 위해 세포 내 O_2 검출에 널리 사용되는 형광 분석법인 dihydroethidium(DHE)을 지표로 사용하였다. 도 3D에 나타난 바와 같이 산화된 DHE에 기인한 형광 강도는 R-BPS 또는 EA-BPS 처리된 세포에 대해 유사한 것으로 입증되었으며, 이는 광조사 시 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 생성을 나타낸다. 다음으로, 하이드록실 라디칼 및 퍼옥시니트라이트 음이온의 검출에 사용되는 화학 센서인 하이드록실 페닐 플루오레세인(HPF)을 사용하여 유사한 연구를 수행하였다. 그 결과, EA-BPS 처리된 세포로부터의 산화된 HPF 신호는 R-BPS 처리된 세포의 경우보다 3.6배 더 높은 것으로 밝혀졌고(도 3E), 이를 통해 하이드록실(또는 퍼옥시니트라이트) 라디칼이 형성되고 있다는 것을 확인하였다. 생체 내에서 하이드록실 라디칼의 반감기는 매우 짧지만(10^{-9} s) 높은 반응성으로 인해 탄수화물, 지질 및 심지어 아미노산을 포함한 많은 거대 분자의 산화를 매개할 수 있다. 또한, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제에 의해 중화될 수 있는 슈퍼옥사이드와 달리 하이드록실 라디칼은 효소적 과정을 통해 제거되는 것으로 알려져 있지 않다. 따라서 다른 ROS와 함께 하이드록실(또는 퍼옥시니트라이트) 라디칼을 생성하는 능력은 R-BPS에 비해 EA-BPS에서 보이는 더 큰 세포독성을 설명할 수 있다.

[0139] EA-BPS에 존재하는 EA 모이어티의 잠재적인 이점을 추가적으로 확인하기 위해, 티올 추적기인 Thiol-tracker™ Violet을 사용하여 광조사 유무에 따른 GSH 발현 수준을 모니터링하였다. 광조사가 없는 상태에서는 EA-BPS 처리된 세포에서 GSH 수준의 약간(약 15%)의 감소가 관찰된 반면, R-BPS 처리된 세포는 대조군(1% DMSO)과 거의 동일한 수준을 나타내었다. 그러나 광조사 조건에서는 R-BPS 처리된 세포와 비교하여 EA-BPS 처리된 세포에서 GSH 수준이 7.3배 감소하는 것으로 나타났다(도 3F). 이러한 결과를 통해, EA-BPS의 EA 모이어티가 빛과 결합될 때 내인성 GSH 수준을 감소시키는 역할을 한다는 것을 확인하였다.

[0140] 다음으로, GST-pi에 대한 EA-BPS의 억제 효과를 조사하기 위해 GST-pi의 효소 활성 및 단백질 수준을 측정하였다(도 4A, B). EA-BPS 접합체의 효과를 평가하기 위해 R-BPS와 EA를 함께 처리하는 대조군 실험을 수행하였다. EA에 세포막을 통한 투과성을 제한하는 역할을 할 수 있는 카르복실산 작용기가 존재한다는 점을 감안할 때, EA의 카르복실산 에틸 에스테르 형태(EA-ester)를 제조하고 테스트하였다. 도 4A에 도시된 바와 같이, EA-BPS 처리군의 광조사는 GST-pi 단백질 수준의 현저한 감소를 초래하였다. 이러한 결과에 따라 EA-BPS는 광조사 시 GST-pi 활성을 58%까지 줄이는 역할을 하였다(도 4B). 대조적으로, R-BPS 및 R-BPS와 EA 또는 EA-ester의 혼합물은 유사한 조건에서 GST-pi 활성을 5-20%만 감소시키는 것으로 나타났다(도 4B).

[0141] 그런 다음 다운스트림 이벤트에 대한 이러한 감소 효과를 연구하였다. GST-pi는 퍼옥시다제 활성을 갖는 퍼옥시레독신 VI(Prdx6)의 활성화에 의해 과산화지질의 해독 및 제거를 촉진하는 것으로 보고된바 있다(Y. Manevich, S. I. Feinstein, A. B. Fisher, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 3780-3785.). 이에, 지질 과산화의 최종 생성물 중 하나인 말론디알데하이드(MDA)를 분석 키트를 이용하여 광조사 유무에 따라 R-BPS 및 EA-BPS의 존재하에서 측정하였다(도 4C). 그 결과, GST-pi 활성화에 대한 효과와 일관되게, EA-BPS는 R-BPS 및 R-BPS와 EA 또는 EA-ester의 혼합물 대비 MDA 수준의 증가를 촉진하는 것을 확인하였다.

[0142] GST-pi는 또한 손상된 단백질의 S-글루타티오닐화를 촉진하는 것으로 보고된바 있다(I. Dalle-Donne, R. Rossi, G. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani, Trends Biochem. Sci. 2009, 34, 85-96). 따라서 R-BPS, EA-BPS 및 R-BPS와 EA 또는 EA-ester의 혼합물의 존재하에 광조사 조건 하에서 단백질 S-글루타티오닐화된 정도를 모니터링하였다. 그 결과, EA-BPS는 S-글루타티오닐화된 단백질 수준을 대략 50%까지 낮추는 것으로 밝혀진 반면, R-BPS 및 R-BPS와 EA 또는 EA-ester의 혼합물의 경우에 나타난 감소는 훨씬 더 완만한 것으로 나타났다(도 4D).

[0143] 광조사 조건에서 EA-BPS에 의해 매개되는 GST-pi 분해 메커니즘을 조사하기 위해 MDA-MB-231 세포를 3 μM 의 클로로퀸(CQ)(리소좀 억제제)으로 전처리하였다. LC3(자가포식 마커) 단백질 발현은 EA-BPS의 존재 하에 광조사 조건에서 통계적으로 유의한 방식으로 감소하는 것으로 나타났다(도 4E). CQ 처리는 또한 GST-pi 발현을 유도하

었다. 이러한 결과는 EA-BPS가 리소좀 분해 경로를 촉진하고 GST-pi 활성을 억제한다는 개념을 뒷받침한다(도 4E). BPS 서브유닛에 기인하는 적색 형광과 LysoTrackerU 및 MitoTrackerU 프로브로 인한 녹색 형광 사이의 중첩은 광조사 후 EA-BPS가 리소좀뿐만 아니라 미토콘드리아에도 국소화되어 있음을 나타낸다(도 19).

[0144] 종양 미세 환경에서 EA-BPS의 광-유도 독성을 평가하기 위해 MDA-MB-231 세포를 정상 산소 및 저산소 조건에서 사전 인큐베이션하였다. 세포는 이후에 광조사의 존재 또는 부재하에서 R-BPS, EA-BPS, EA 단독 및 R-BPS와 EA를 함께 처리하였다. 도 5A에 나타난 바와 같이, R-BPS, EA 단독 또는 R-BPS와 EA를 함께 처리한 MDA-MB-231 세포가 저산소 조건에서 광조사 대상이 되었을 때 인지할 수 있는 독성은 거의 나타나지 않았다. 대조적으로, EA-BPS 처리 시 정상산소(21% O₂) 및 저산소 조건(2% O₂)에서 광조사된 세포에서 현저한 세포독성이 관찰되었다.

[0145] 광조사 조건에서 EA-BPS로 처리된 세포에 대한 세포 사멸 신호 전달 메커니즘을 아넥신 V 및 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다(도 5B, C). annexin-V/propidium iodide (PI) 염색 분석 결과, 광조사 조건에서 EA-BPS가 다른 테스트 그룹에 비해 아넥신 V-양성 세포사멸 세포의 개체군을 증가(to 50%)시키는 것으로 나타났다(도 5B 및 도 20: ≤ 8%). 절단된 caspase-3 수준의 증가는 저산소 조건에서 광조사 시에도 관찰되었다. 이를 통해, MDA-MB-231 세포를 EA-BPS로 처리하면 GST-pi 단백질의 발현이 감소하고(도 5C), 이러한 치료 효능의 개선은 GST-pi 매개 내인성 항산화 방어 시스템의 방해에 기인한다는 것을 확인하였다.

[0146] MDA-MB-231 종양 이종이식편 보유 마우스를 사용하여 저산소 종양 미세 환경 모델에서 PDT 광감응제로서의 EA-BPS의 효능을 테스트하였다.

[0147] 이들 연구에서, EA-BPS(5 mgkg⁻¹ in PBS containing 5% DMSO)는 꼬리 정맥 주사를 통해 정맥내 투여되었다. 쉽게 식별할 수 있는 형광 신호가 투여 후 최대 48시간까지 종양 부위에서 관찰되었다(도 6A 및 도 21). EA-BPS(투여 후 48시간)로 처리된 마우스로부터 수집된 절개된 기관의 생체의 이미지는 관찰된 형광 신호가 종양 부위에 해당함을 확인하는 역할을 하였다. 다른 기관(간, 심장, 신장, 비장, 고환 및 폐)에서는 형광이 거의 나타나지 않았다(도 6B 및 도 22). EA-BPS(5 mgkg⁻¹ in PBS containing 5% DMSO)로 처리하고 종양 부위에 광조사(2 Wcm⁻², 10 min, once a week for 4 weeks)를 받은 마우스에서는 종양 성장 및 종양 부피가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(도 6C). 또한, 동물 체중의 경우 EA-BPS 테스트 그룹과 다양한 대조군들 모두에서 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(도 6D).

[0148] 생체내 광치료 효과는 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 및 면역조직화학(IHC) 분석을 통해 시험군 및 대조군 동물의 종양 및 조직 절편을 조사함으로써 확인하였다. EA-BPS로 처리하고 광조사를 받은 이종이식 마우스에서 채취한 H&E 염색 종양 절편은 특징적인 세포사멸 세포를 보여주었지만 다른 그룹에서는 그러한 효과가 나타나지 않았다(도 6E). 절단된 caspase-3(빨간색) 수준은 EA-BPS로 처리하고 광조사를 받은 마우스에서 더 높았다. 또한, Ki-67 발현 수준(녹색)이 하향 조절되어 EA-BPS 처리된 마우스에서 세포 증식의 극적인 감소가 나타났다(도 6F 및 도 23). R-BPS로 처리된 동물 또는 대조군(PBS 중 5% DMSO)에서 채취한 종양 절편에서는 이러한 효과가 관찰되지 않았다. 또한, 실험 중 또는 종료 시점에서 시험군 및 대조군에서 명백한 임상적 부작용은 관찰되지 않았다. 마지막으로 AST(aspartate transaminase), ALT(alanine aminotransferase) 및 creatinine 활성 수준은 정상 범위 내로 확인되었다(도 6G). 종합적으로, 이러한 결과를 통해 EA-BPS가 생체 적합성이며 허용 가능한 안전성 프로파일의 이점을 얻을 수 있음을 확인하였다.

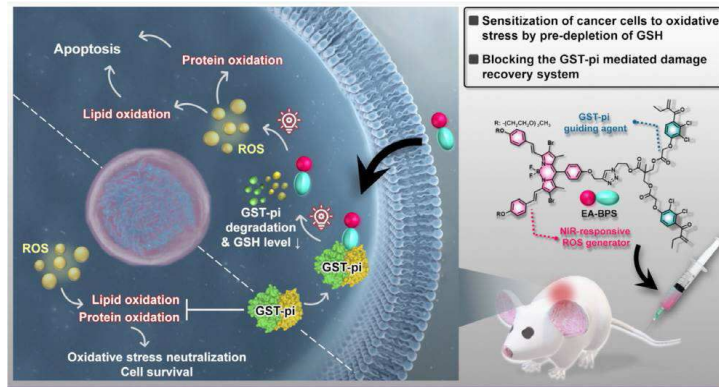
[0150] 결론적으로, 본 발명에서는 저산소 조건에서 PDT의 항암 성능을 향상시킬 수 있는, EA와 브롬화 BODIPY 기반 광감응제(BODIPY-based photosensitizer, BPS)가 공유 결합된 접합체 EA-BPS를 제공한다. EA-BPS는 EA를 전달하여 GSH를 제거하고 동시에 GST-pi 활성을 하향 조절하도록 설계되었다(도 1). 본 발명의 결과는 BPS에 접합된 EA가 생체 외 MDA-MB-231 세포 및 해당 동물 종양 모델 모두에서 PDT와 시너지 효과를 발휘한다는 결론을 뒷받침한다. 또한, 생체 외 연구를 통해 다양한 대조군과 비교하여 본 발명에 다른 EA-BPS가 추정된 리소좀 분해 경로를 통해 GST-pi 활성을 유의하게 감소시키고 지질 과산화를 향상시키는 것을 확인하였다. 또한, EA-BPS는 저산소 조건에서 PDT 기반 세포독성을 개선하며, 관련된 pro-apoptotic 유전자의 단백질 발현 수준을 조절한다. MDA-MB-231 종양 이종이식 마우스 모델의 사용을 포함하는 생체 내 연구는 BPS 단독에 비해 우수한 치료 효과를 나타냈으며, 따라서 GST-pi 활성의 억제가 저산소 조건에서 종양 미세 환경에서 이용 가능한 제한된 산소를 효과적으로 이용하는 PDT 기반 프로토콜로 이어질 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0152]

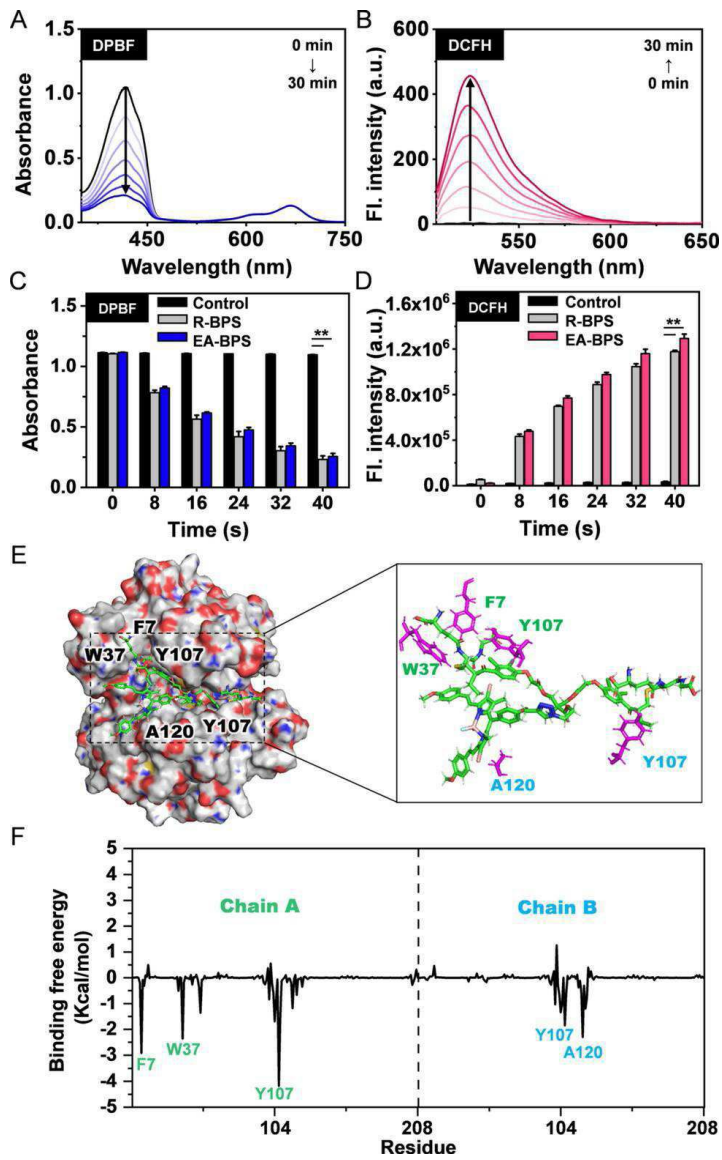
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

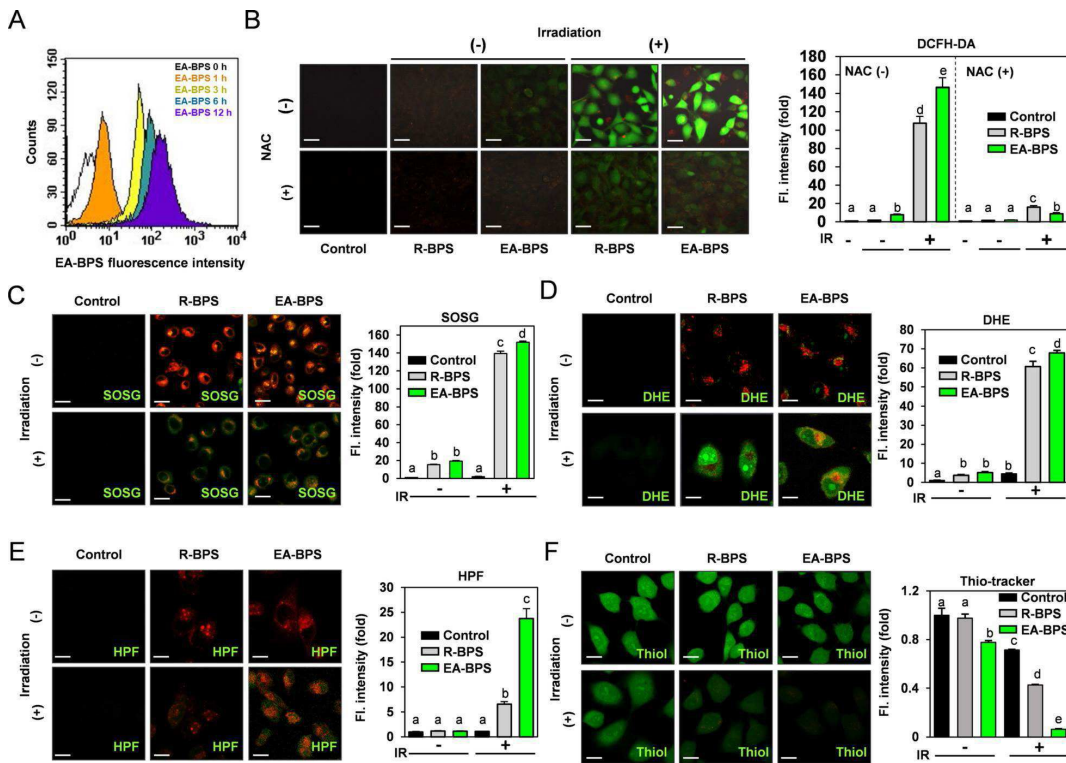
도면1



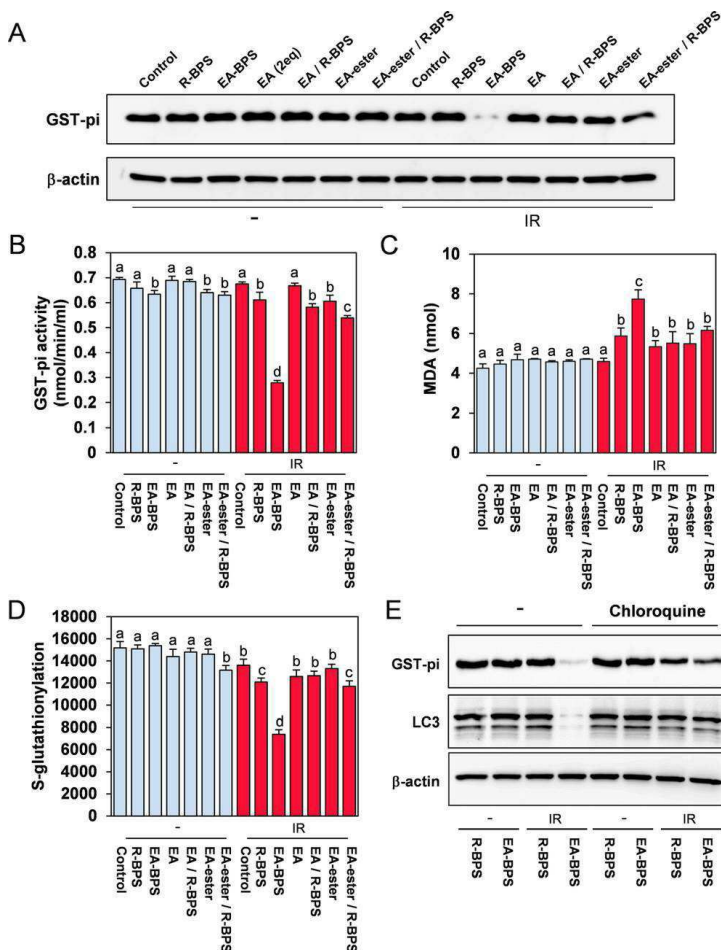
도면2



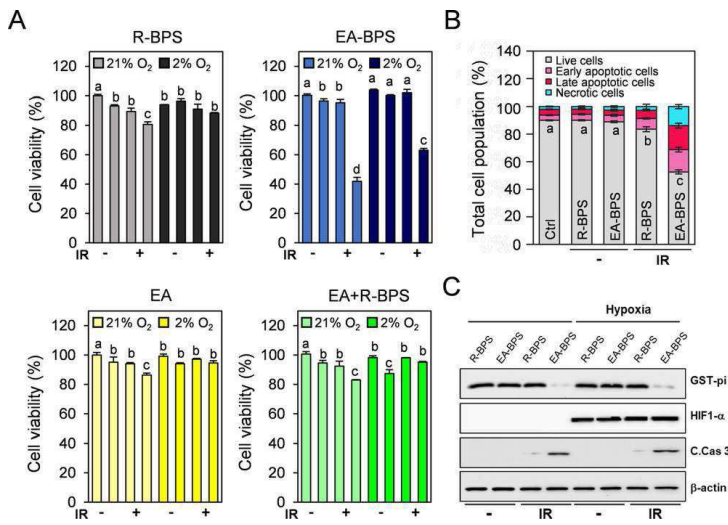
도면3



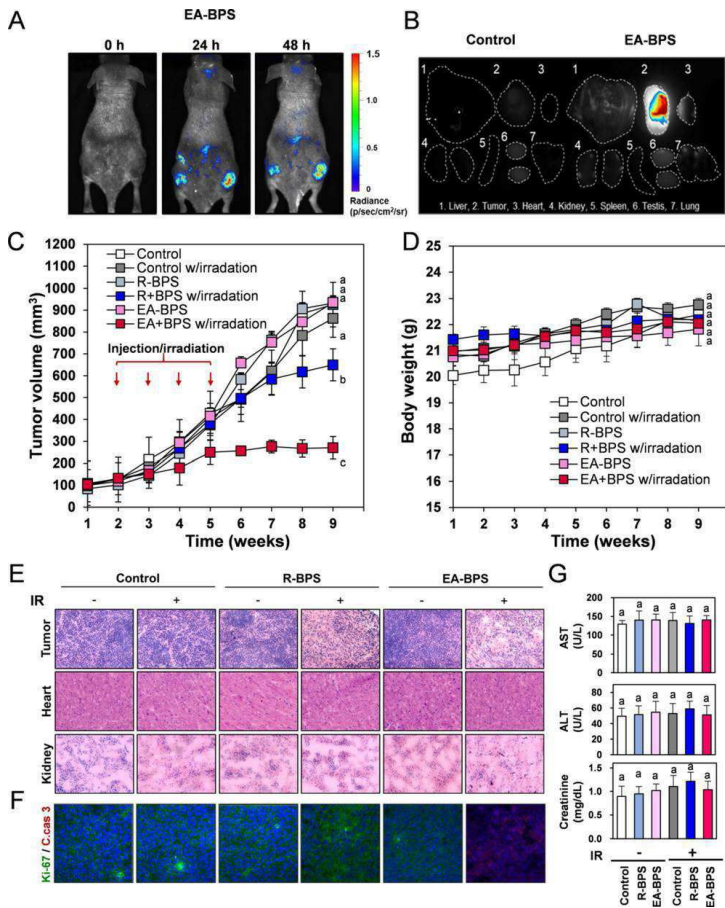
도면4



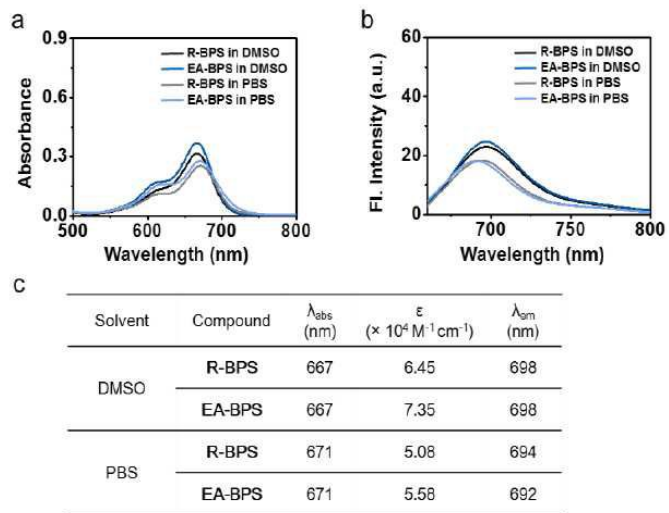
도면5



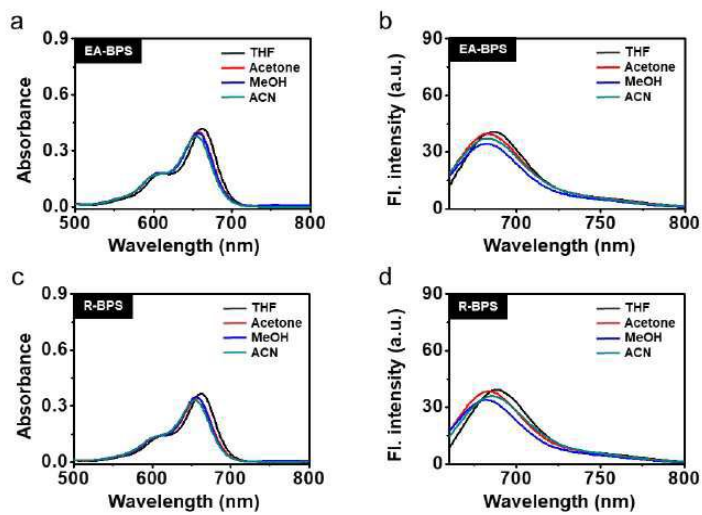
도면6



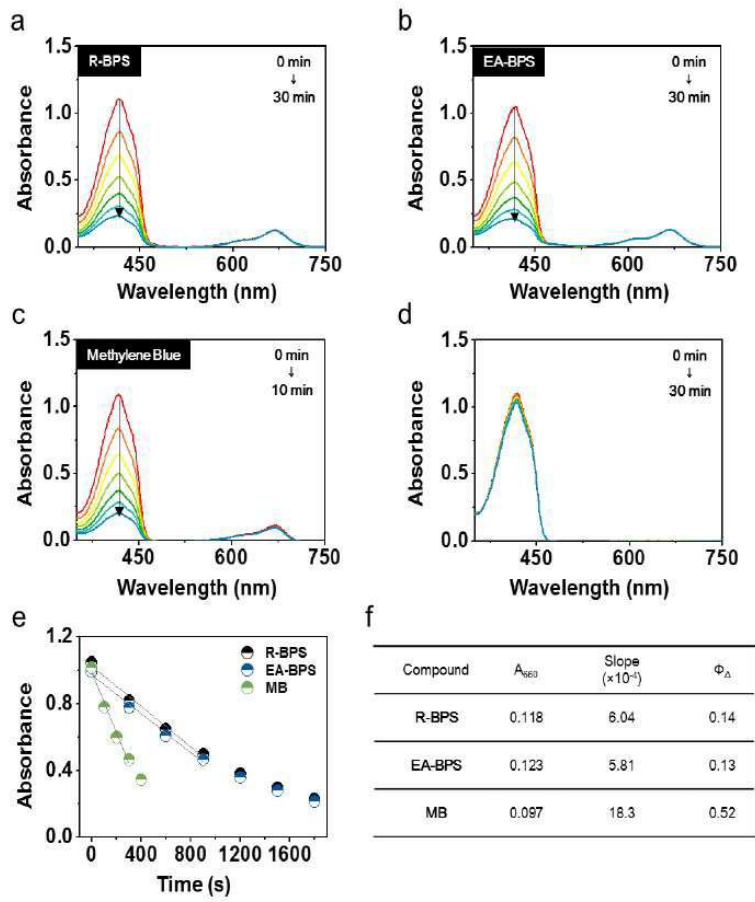
도면7



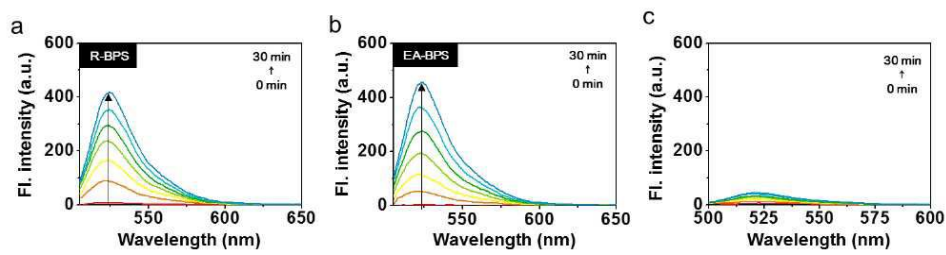
도면8



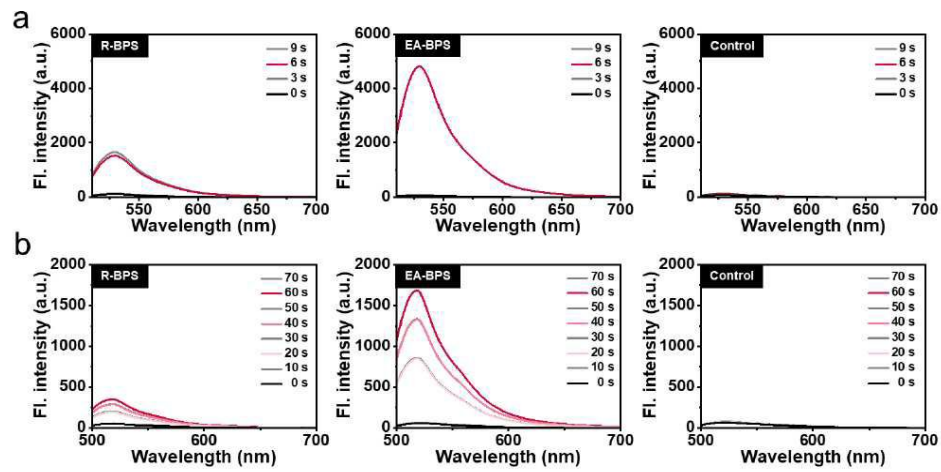
도면9



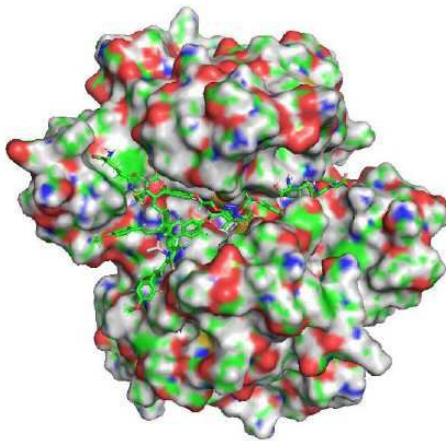
도면10



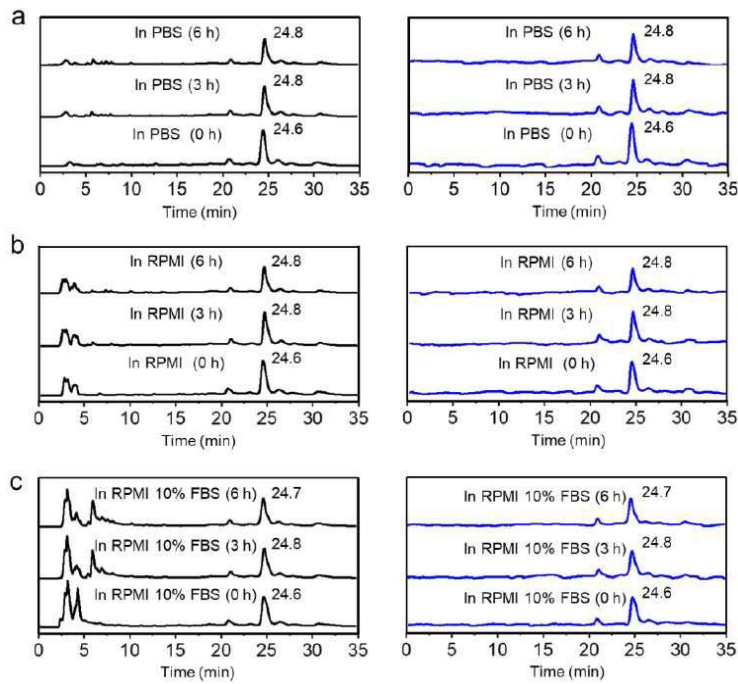
도면11



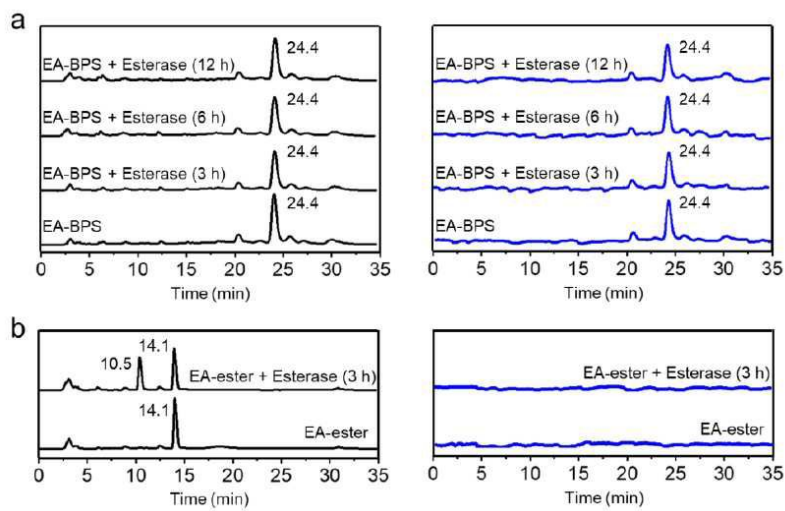
도면12



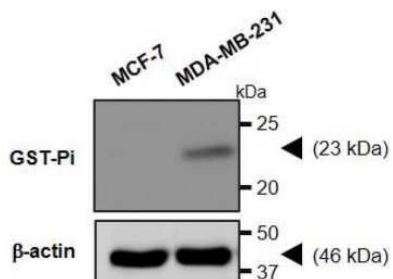
도면13



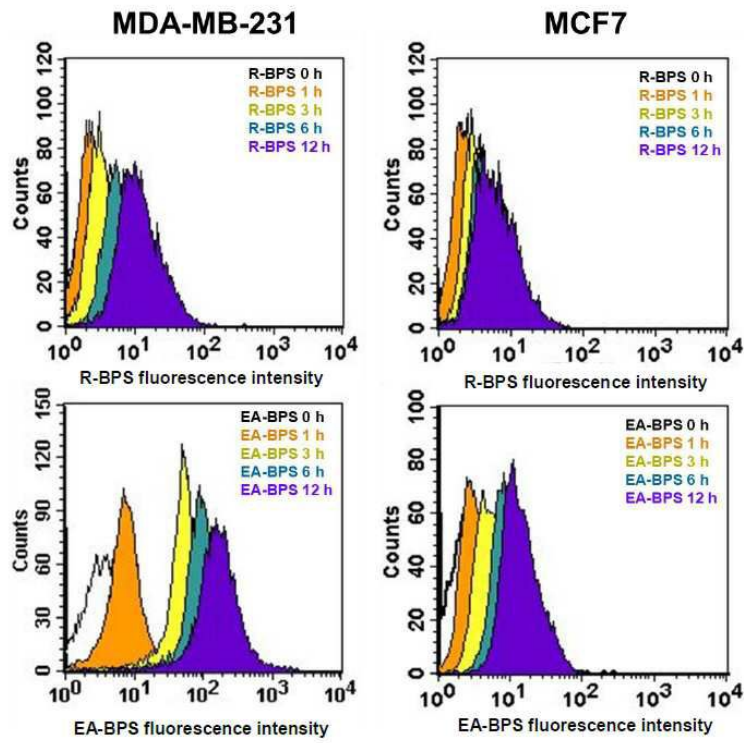
도면14



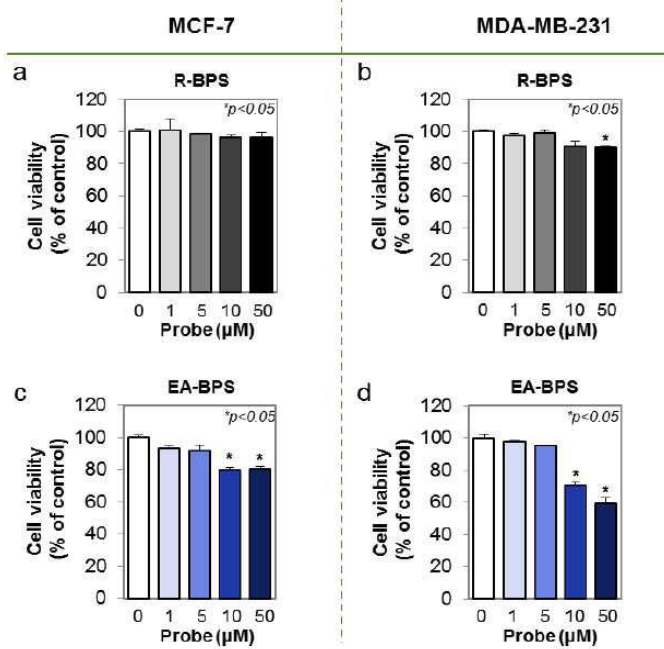
도면15



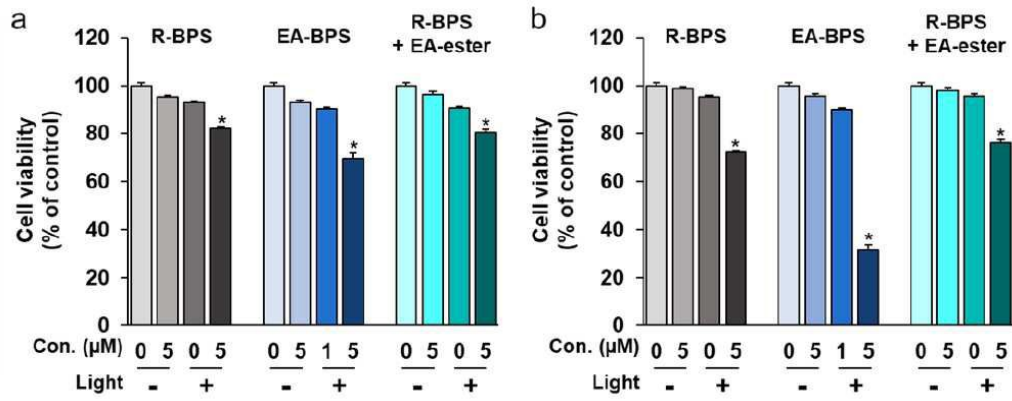
도면16



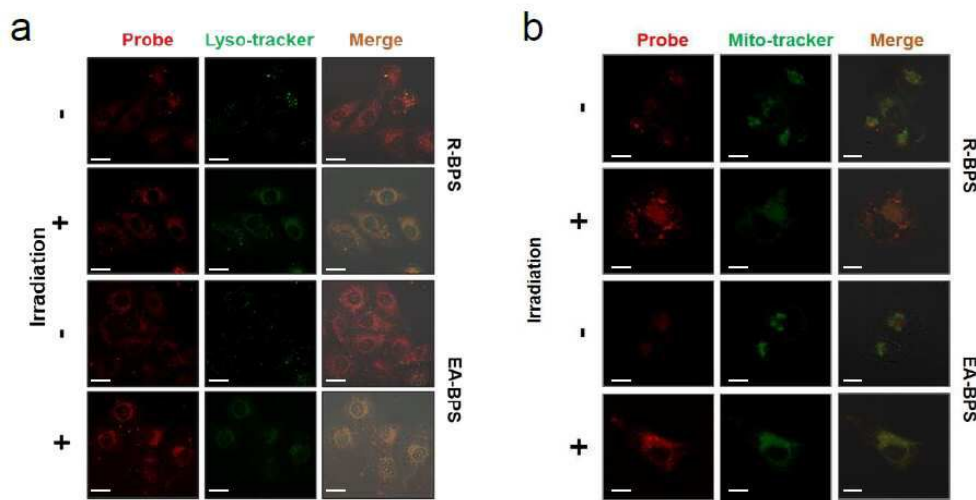
도면17



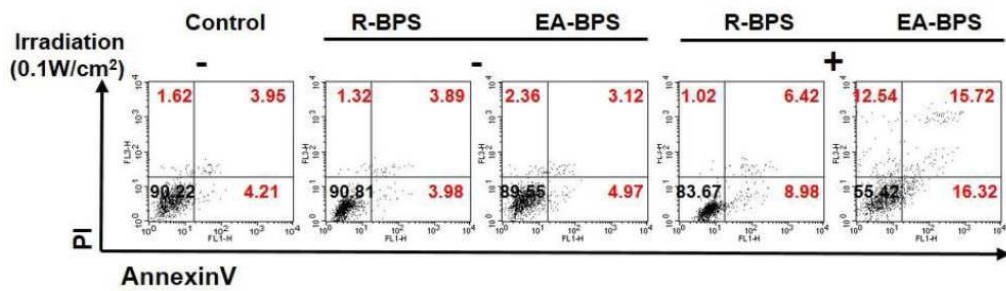
도면18



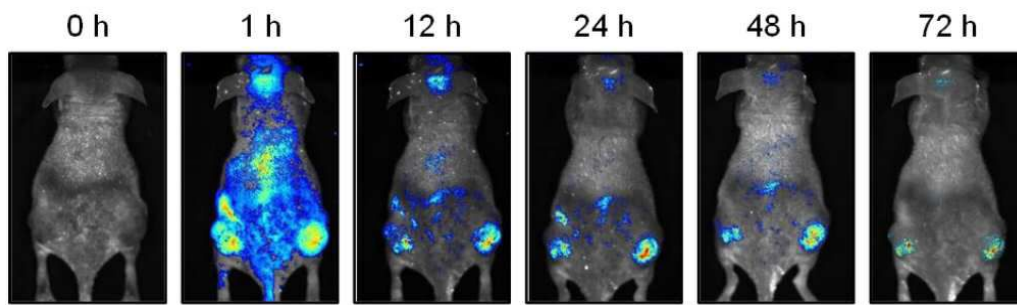
도면19



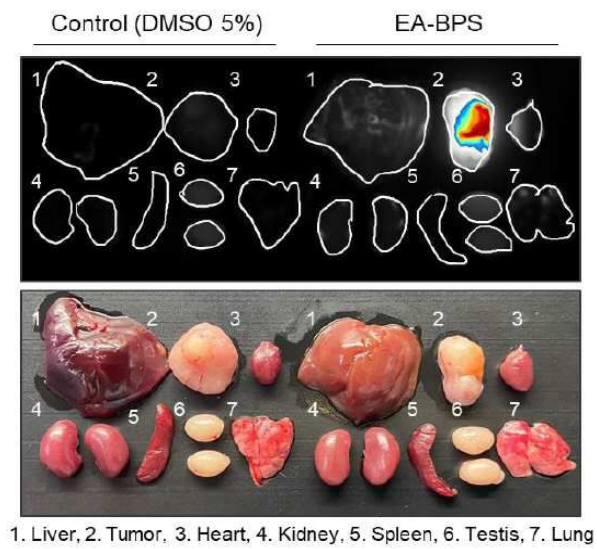
도면20



도면21



도면22



도면23

