



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월31일
(11) 등록번호 10-1759103
(24) 등록일자 2017년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/107 (2006.01) C07F 15/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/107 (2013.01)
C07F 15/0033 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0028927
(22) 출원일자 2016년03월10일
심사청구일자 2016년03월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060032050 A

(73) 특허권자
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
권태혁
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이현우
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 프렌즈드림

전체 청구항 수 : 총 6 항

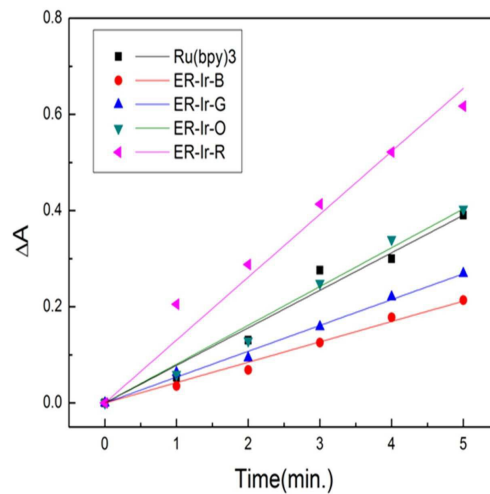
심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 단백질 가교용 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은, 단백질 가교용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이리듐 또는 로듐계의 사이클로메탈화 전이금속 착물을 이용하여 광개시제 없이 단백질 내에서 광화학적 가교결합을 유도할 수 있는, 단백질 가교용 조성물 및 상기 단백질 가교용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07F 15/0073 (2013.01)

강명균

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

남정승

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

공지예외적용 : 있음

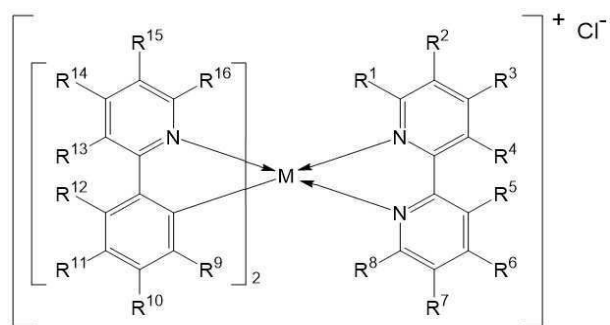
명세서

청구범위

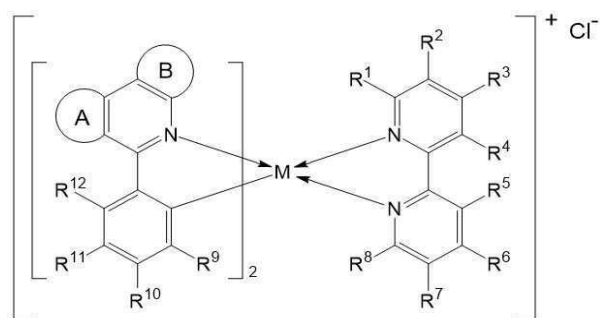
청구항 1

하기 화학식 1 또는 2로서 표시되는 사이클로메탈화 전이금속 착물을 포함하는, 단백질 가공용 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



상기 화학식 1 및 2에서,

M은 이리듐 또는 로듐이고,

R^1 내지 R^{16} 는, 각각 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, 히드록시기, 티올기, 알킬티올기, 우레아기, 알킬티올기, 시아노기, 알킬기, 알콕시기, 아릴기, 아릴옥시기, 알릴기, 비닐기, 아실기, 아지도기, 니트로기, 아미노기, 알킬아미노기, 아릴아미노기, 히드록시아미노기, 알킬암모늄, 카르복시기, 카르바모일기, 설페닐기, 설포닐기, 설페이트기, 설포네이트기, 설펜아미드기, 포스페이트기, 포스포네이트기, 및 포스피네이트기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이고,

고리 A 및 고리 B는, 각각 독립적으로, 치환 또는 비치환된 5 원 방향족 고리, 치환 또는 비치환된 6 원 방향족 고리, 치환 또는 비치환된 5 원 방향족 헤테로고리, 및 치환 또는 비치환된 6 원 방향족 헤테로고리로 이루어진 군으로부터 선택된 하나임.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 M은 이리듐인 것을 특징으로 하는, 단백질 가공용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 조성물이 단백질 내에서 광화학적 가교결합을 촉진하여 단백질을 가교하는 것을 특징으로 하는, 단백질 가교용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 광화학적 가교결합이 단백질의 친핵성 잔기들 사이에 진행되는 것인, 단백질 가교용 조성물.

청구항 5

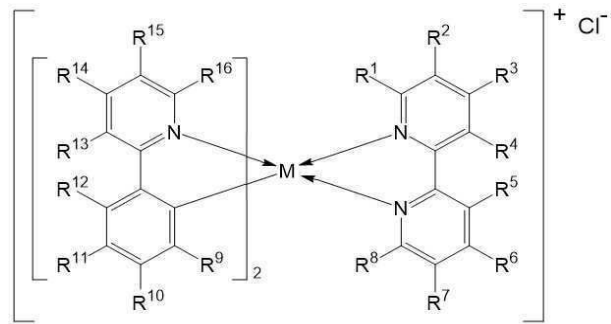
하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

$\text{IrCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 와 하기 화학식 3으로서 표시되는 출발물질 화합물을 반응시켜 하기 화학식 4로서 표시되는 중간체 착물을 제조하는 단계; 및

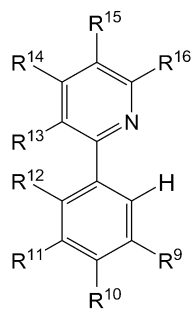
상기 중간체 착물과 2,2'-바이피리딘 (2,2'-bipyridine)을 반응시켜 하기 화학식 1로서 표시되는 사이클로메탈 화 전이금속 착물을 형성하는 단계

를 포함하는, 단백질 가교용 조성물의 제조방법:

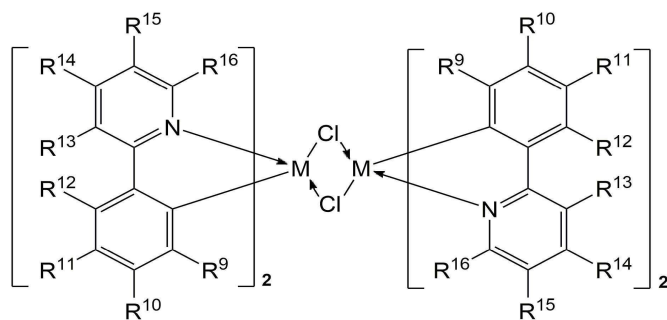
[화학식 1]



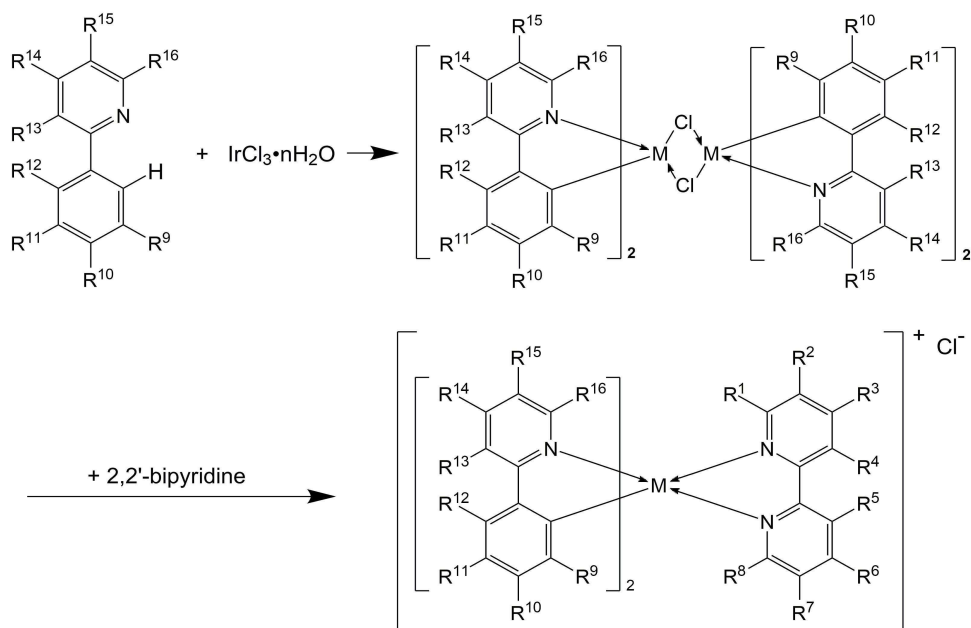
[화학식 3]



[화학식 4]



[반응식 1]



상기 식들에서,

M, R¹ 내지 R¹⁶은 각각 제 1 항에서 정의된 바와 동일함.

청구항 6

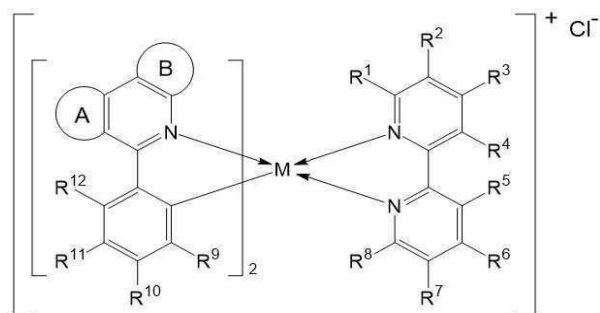
하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

IrCl₃ · nH₂O와 하기 화학식 5로서 표시되는 출발물질 화합물을 반응시켜 하기 화학식 6으로서 표시되는 중간체 착물을 제조하는 단계; 및

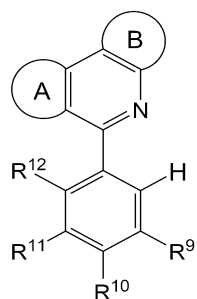
상기 중간체 착물과 2,2'-바이피리딘 (2,2'-bipyridine)을 반응시켜 하기 화학식 2로서 표시되는 사이클로메탈 화 전이금속 착물을 형성하는 단계

를 포함하는, 단백질 가교용 조성물의 제조방법:

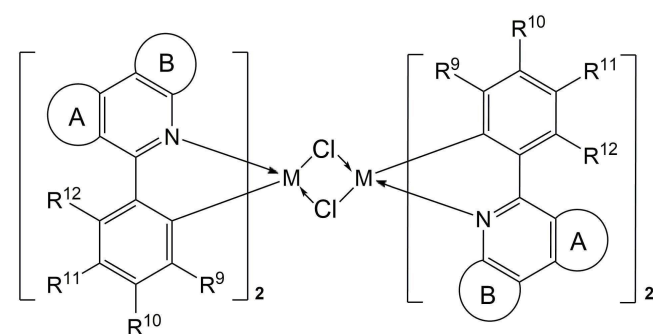
[화학식 2]



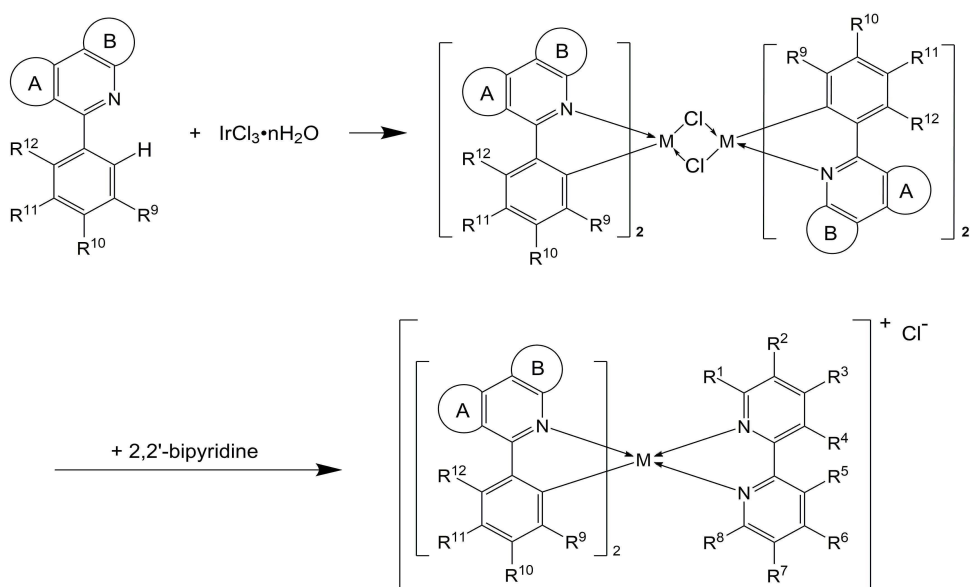
[화학식 5]



[화학식 6]



[반응식 2]



상기 식들에서,

M, R¹ 내지 R¹², 고리 A, 및 고리 B는 각각 제 1 항에서 정의된 바와 동일함.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 단백질 가교용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이리듐 또는 로듐계의 사이클로메탈화 전이금속 착물을 이용하여 광개시제 없이 단백질 내에서 광화학적 가교결합을 유도할 수 있는, 단백질 가교용 조성물 및 상기 단백질 가교용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광화학적 가교결합 (photo-crosslinking)은, 빛에 의해서 개시되는, 분자와 분자 사이 공유결합의 형성으로서, 단백질 응집을 유도하여 세포 내의 상호작용 단백질 탐침 및 질병의 작용기작 확립에 이용되고 있다. 종래의 화학적 가교결합 (chemical crosslinking) 과정은 기본적으로 친전자체 (electrophile)와 친핵체 (nucleophile) 사이의 유기화학적 반응을 통해 진행된다. 따라서, 화학적 가교결합을 통한 생화학적 적용은 단백질의 아미노산 잔기 (amino acid residue)들의 친핵도 (nucleophilicity)의 인위적인 수정 및 친전자적 외생 첨가제 (exogeneous additive)를 필요로 한다. 그러나 이런 인위적인 수정들은 굉장히 오랜 시간이 걸리는 과정일 뿐만 아니라 첨가제들은 실제 세포에 독성을 가지고 있기 때문에, 생체 내 (in vivo) 실험에는 적합하지 않으며, 생체 외 (in vitro)에만 적용이 가능하였다. 또한 이러한 가교결합 과정은 반응 시간이 오래 걸리기 때문에, 실제적으로 적용하기 어렵다는 한계점이 있다. 따라서, 단백질의 인위적인 수정 및 외생 첨가제 없이 가교결합을 빠르게 이루는 것이 실제적 생의학적 적용 (biomedical application)을 위한 필수적인 요소이다.

[0003] 종래 화학적 가교결합의 단점을 극복하기 위해, Fancy 등에 의해 광화학적 가교결합의 흡광 측매로서 루테튬 기반 금속 착물 (complex)인 Ru(bpy)₃ (여기서, bpy는 '바이피리딘' 임)를 이용하여 단백질의 인위적인 수정 없이 단백질들을 서로 수 초 안에 공유결합으로 가교시킬 수 있는 방법이 개발된 바 있다 [Fancy, D. A. & Kodadek, T. Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6020-6024, doi:10.1073/pnas.96.11.6020 (1999)]. 이러한 광화학적 가교결합의 가장 큰 작용원리는 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)을 얼마나 잘 생성하느냐에 있다. 활성산소종에는 유형1의 초과산화물 음이온 라디칼 (superoxide anion radical)과 히드록실 라디칼 (hydroxyl radical), 그리고 유형2의 단일항 산소 (singlet oxygen) 등이 있다. 단일항 산소는 에너지 전이 (energy transfer)에 의해 발생되며, 라디칼 활성산소종들은 전자 전달을 통해 생성된다. 그러나, Ru(bpy)₃ 물질의 경우에는 이러한 활성산소종의 생성능력이 다소 떨어지며, 수 초 안에 일어나는 가교결합은 세포에 독성을 가지는 과황산암모늄 (ammonium persulfate)이라는 외생 첨가제를 넣어 라디칼 반응을 유도하여야 한다. 따라서, Ru(bpy)₃를 이용한 Fancy 등의 광화학적 가교결합은 세포 독성이 있어 생체 내 실험에 적용하기 힘든 기술이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Fancy, D. A. & Kodadek, T. Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6020-6024, doi:10.1073/pnas.96.11.6020 (1999)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 목적은, 이리듐 또는 로듐계의 사이클로메탈화 전이금속 착물을 이용하여 광개시제 없이 자체적으로 빛에 의하여 단백질 내에서 광화학적 가교결합을 유도할 수 있는, 단백질 가교용 조성물을 제공하는 것이다.

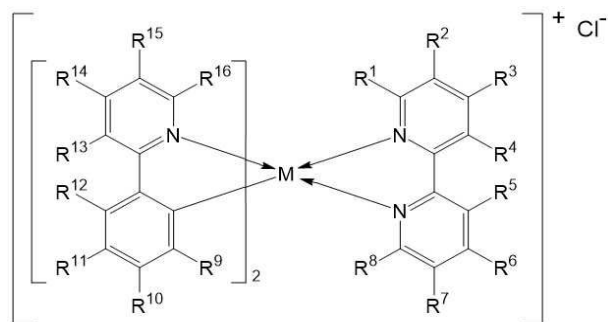
[0006] 본 발명의 다른 목적은 광개시제 없이 단백질 내에서 광화학적 가교결합을 유도할 수 있는 단백질 가교용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여,

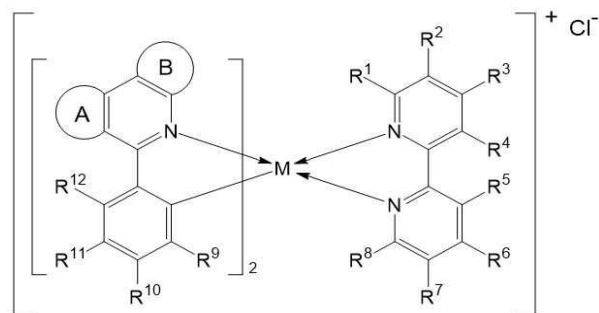
[0008] 본 발명은, 하기 화학식 1 또는 2로서 표시되는 사이클로메탈화 전이금속 착물을 포함하는, 단백질 가교용 조성물을 제공한다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] [화학식 2]



[0012]

[0013] 상기 화학식 1 및 2에서,

[0014] M은 이리듐 또는 로듐이고,

[0015] R¹ 내지 R¹⁶는, 각각 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, 히드록시기, 티올기, 알킬티올기, 우레아기, 알킬티올기, 시아노기, 알킬기, 알콕시기, 아릴기, 아릴옥시기, 알릴기, 비닐기, 아실기, 아지도기, 니트로기, 아미노기, 알킬아미노기, 아릴아미노기, 히드록시아미노기, 알킬암모늄, 카르복시기, 카르바모일기, 설펜기, 설포닐기, 설펜이트기, 설포네이트기, 설펜아미드기, 포스페이트기, 포스포네이트기, 및 포스포네이트기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이고,

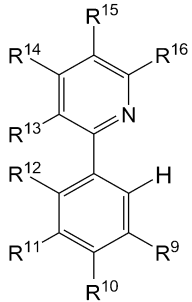
[0016] 고리 A 및 고리 B는, 각각 독립적으로, 치환 또는 비치환된 5 원 방향족 고리, 치환 또는 비치환된 6 원 방향족 고리, 치환 또는 비치환된 5 원 방향족 헤테로고리, 및 치환 또는 비치환된 6 원 방향족 헤테로고리로 이루어진 군으로부터 선택된 하나임.

[0017] 또한, 본 발명은, (i) 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 다음의 단계를 포함하는 단백질 가교용 조성물의 제조방법을 제공한다:

[0018] $\text{IrCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 와 하기 화학식 3으로서 표시되는 출발물질 화합물을 반응시켜 하기 화학식 4로서 표시되는 중간체 착물을 제조하는 단계; 및

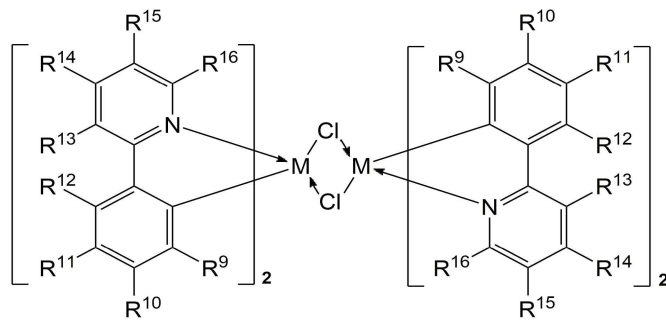
[0019] 상기 중간체 착물과 2,2'-바이피리딘 (2,2'-bipyridine)을 반응시켜 화학식 1로서 표시되는 사이클로메탈화 전 이금속 착물을 형성하는 단계;

[0020] [화학식 3]



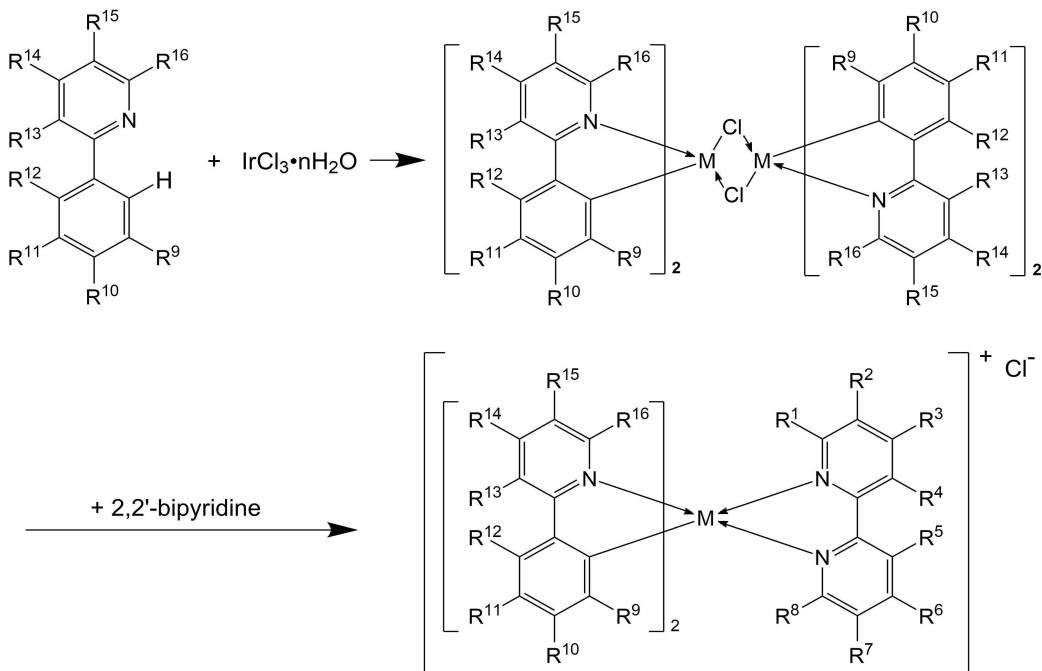
[0021]

[0022] [화학식 4]



[0023]

[0024] [반응식 1]



[0025]

[0026] 상기 식들에서,

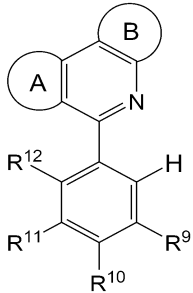
[0027] M, R¹ 내지 R¹⁶은 앞서 정의된 바와 동일함.

[0028] 아울러, 본 발명은, (ii) 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이, 다음의 단계를 포함하는 단백질 가교용 조성물의 제조방법을 제공한다:

[0029] $\text{IrCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 와 하기 화학식 5로서 표시되는 출발물질 화합물을 반응시켜 하기 화학식 6으로서 표시되는 중간체 착물을 제조하는 단계; 및

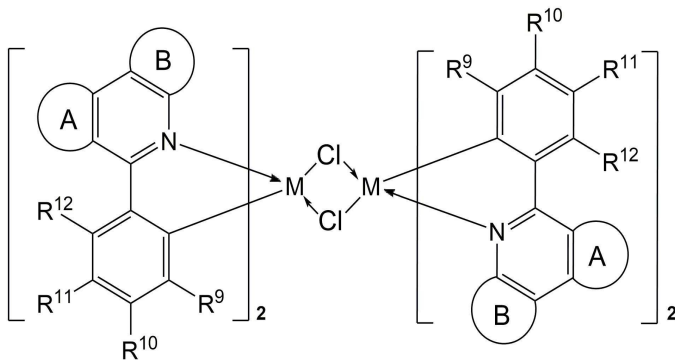
[0030] 상기 중간체 착물과 2,2'-바이피리딘 (2,2'-bipyridine)을 반응시켜 화학식 2로서 표시되는 사이클로메탈화 전 이금속 착물을 형성하는 단계;

[0031] [화학식 5]



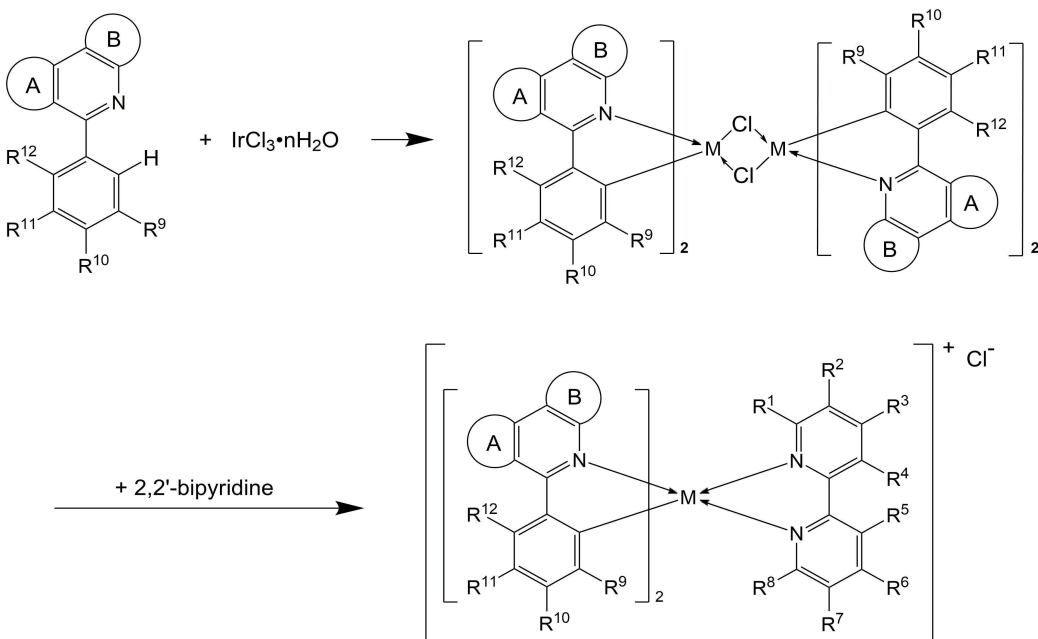
[0032]

[0033] [화학식 6]



[0034]

[0035] [반응식 2]



[0036]

[0037] 상기 식들에서,

[0038] M , R^1 내지 R^{12} , 고리 A, 및 고리 B는 각각 앞서 정의된 바와 동일함.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 외생 첨가제 및 추가적인 단백질 아미노산 잔기 변형 없이 이리듐 또는 로듐계의 사이클로메탈화 전이금속 착물만을 이용하여 효율적으로 광화학적 가교결합을 유도할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 외생 첨가제에 의한 독성을 피할 수 있어, 살아있는 세포 내에서 단백질 응집을 인위적으로 발생시키기 위해 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 사이클로메탈화 전이금속 착물의 유형2 활성화소종 생성 정도를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 사이클로메탈화 전이금속 착물의 유형1 활성화소종 생성 정도를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 사이클로메탈화 전이금속 착물의 광화학적 가교결합 결과를 나타내는 이미지이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 사이클로메탈화 전이금속 착물의 세포 독성을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0043] 본 발명의 명세서 및 청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정 해석되지 아니하며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0044] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0045] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, "A 및/또는 B"는, A 또는 B, 또는 A 및 B를 의미한다.

[0046] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 화학식들, 반응식들 및 스킴에서의 원자와 원자 사이의 결합선은 공유결합, 이온결합뿐만 아니라, 비공유전자쌍에 의한 결합, 반데르발스힘, 할로겐결합, 친금성 등의 약한 비공유 결합을 편의상 알기 쉽게 표시한 것으로, 당업자라면 용이하게 이해할 수 있는 정도로 나타낸 것이다. 특히, 화살표로 나타낸 결합선은 한쪽의 원소에 존재하는 2개의 전자를 다른쪽의 원소에 공여하는 방식으로 결합된 배위결합을 의미하는 것이다. 이러한 결과로, 화학식들, 반응식들 및 스킴에 나타낸 각 원소의 결합전수는 원자가전자수에 맞지 않을 수 있지만, 이는 당업자라면 용이하게 이해할 수 있는 것이다. 아울러, 특별히 표시한 것을 제외하고, 탄소 및 수소의 표기는 생략하였다.

[0047] 본원 명세서 전체에서, 용어 "방향족 고리" 또는 "아릴" 은 적어도 하나의 방향족 탄화수소기를 포함하는 것을 의미하며, 용어 "방향족 헤테로고리" 는 적어도 하나의 방향족 탄화수소기와 적어도 하나의 헤테로 원자를 포함하는 것을 의미하는 것으로서, 상기 방향족 탄화수소기의 적어도 하나의 탄소 원자가 헤테로 원자에 의해 치환된 것을 나타낸다. 상기 방향족 고리(아릴) 또는 방향족 헤테로 고리가 복수환을 포함하는 경우, 상기 방향족 고리 또는 상기 방향족 헤테로 고리는, 하나의 방향족 고리를 포함하고 부가적인 고리로서 방향족 고리 또는 비방향족 고리를 포함하는 것일 수 있다. 이때, 상기 복수환은 적어도 하나의 방향족 고리와 부가적인 고리가 하나의 원자를 통해 결합된 것 또는 둘 이상의 원자를 통해 융합된 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지

않을 수 있다.

[0048] 본원 명세서 전체에서, 용어 "헤테로"는 탄소 및 수소 원자 이외의 원자를 포함하는 것을 의미하며, 예를 들어, 상기 탄소 및 수소 원자 이외의 원자는 Si, Se, N, O, S, P, As, F, Cl, Br 및 I로 이루어진 군에서 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

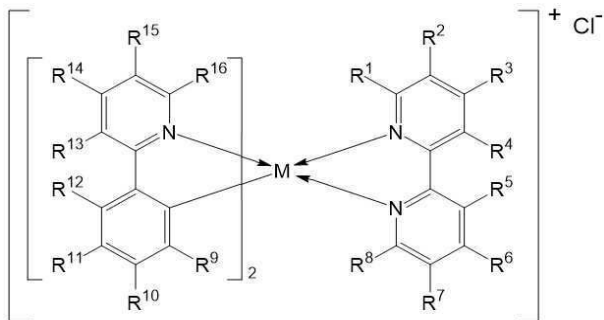
[0049] 본원 명세서 전체에서, 용어 "알킬기" 또는 "알킬"은 통상적으로, 1 내지 20 개의 탄소 원자, 1 내지 10 개의 탄소 원자, 1 내지 8 개의 탄소 원자, 1 내지 5 개의 탄소 원자, 또는 1 내지 3 개의 탄소 원자를 갖는, 선형 또는 분지형의 알킬기를 나타내며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵실, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 도데실, 트리데실, 테트라데실, 펜타데실, 헥사데실, 헵타데실, 옥타데실, 노나데실, 에이코사닐, 또는 이들의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 알킬기가 알킬기로 치환되는 경우, 이는 "분지형의 알킬기"로도 상호교환하여 사용된다. 상기 알킬기에 치환될 수 있는 치환기로는, 할로 (예를 들어, F, Cl, Br, I), 할로알킬 (예를 들어, CCl_3 또는 CF_3), 알콕시, 알킬티올, 히드록시, 카르복시 ($-C(O)-OH$), 알킬옥시카르보닐 ($-C(O)-O-R$), 알킬카르보닐옥시 ($-O-C(O)-R$), 아미노 ($-NH_2$), 카르바모일 ($-NHC(O)OR-$ 또는 $-O-C(O)NHR-$), 우레아 ($-NH-C(O)-NHR-$) 및 티올 ($-SH$)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0050] 본원 명세서 전체에서, 용어 "할로젠" 또는 "할로"는 주기율표의 17 족에 속하는 할로젠 원자가 작용기의 형태로서 화합물에 포함되어 있는 것을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 염소, 브롬, 불소 또는 요오드일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

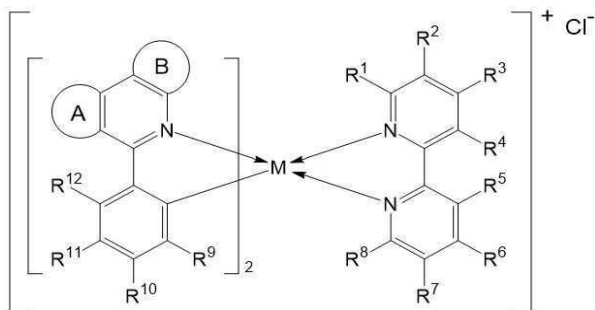
[0051] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명을 구체적으로 설명하였으나, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명은, 하기 화학식 1 또는 2로서 표시되는 사이클로메탈화 전이금속 착물을 포함하는, 단백질 가공용 조성물을 제공한다:

[0053] [화학식 1]



[0055] [화학식 2]



[0057] 상기 화학식 1 및 2에서,

[0058] M은 이리듐 또는 로듐이고,

[0059] R^1 내지 R^{16} 는, 각각 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, 히드록시기, 티올기, 알킬티올기, 우레아기, 알킬티올기, 시아노기, 알킬기, 알콕시기, 아릴기, 아릴옥시기, 알릴기, 비닐기, 아실기, 아지도기, 니트로기, 아미노기, 알킬

아미노기, 아릴아미노기, 히드록시아미노기, 알킬암모늄, 카르복시기, 카르바모일기, 설펜기, 설폰기, 설페이트기, 설포네이트기, 설펜아미드기, 포스페이트기, 포스포네이트기, 및 포스포네이트기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이고,

[0060] 고리 A 및 고리 B 는, 각각 독립적으로, 치환 또는 비치환된 5 원 방향족 고리, 치환 또는 비치환된 6 원 방향족 고리, 치환 또는 비치환된 5 원 방향족 헤테로고리, 및 치환 또는 비치환된 6 원 방향족 헤테로고리로 이루어진 군으로부터 선택된 하나임.

[0061] 상기 M은 이리듐인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0062] 상기 R¹ 내지 R¹⁶, 그리고 고리 A 및 고리 B가 치환된 경우는, 앞선 정의에 기재된 치환기가 F, Cl, Br, I, 히드록시기, 티올기, 알킬티올기, 우레아기, 시아노기, 알킬기, 알콕시기, 아릴기, 아릴옥시기, 알릴기, 비닐기, 아실기, 아지도기, 니트로기, 아미노기, 알킬아미노기, 아릴아미노기, 히드록시아미노기, 알킬암모늄, 카르복시기, 카르바모일기, 설펜기, 설폰기, 설페이트기, 설포네이트기, 설펜아미드기, 포스페이트기, 포스포네이트기, 및 포스포네이트기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나로 치환된 것을 의미한다.

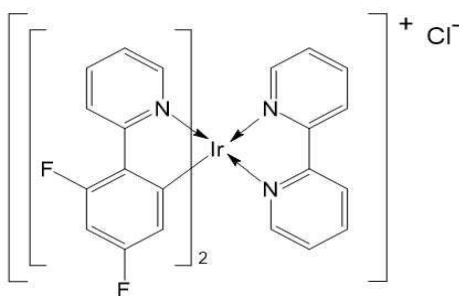
[0063] 상기 단백질 가교용 조성물은 단백질 내에서 광화학적 가교결합을 촉진하여 단백질을 가교하는 것일 수 있다. 상기 단백질은 살아있는 세포 내의 단백질을 포함할 수 있다. 상기 단백질 가교용 조성물은 광개시제와 같은 외생 첨가제 없이도 상온에서 광화학적 가교결합을 촉진할 수 있고, 세포 독성이 없으므로, 살아있는 세포의 단백질에서 사용될 수 있다.

[0064] 이때, 상기 광화학적 가교결합은 단백질의 아미노산 잔기의 인위적인 수정 없이도 가능하며, 예를 들어, 단백질의 친핵성 잔기들 사이에서, 특히, 티로신 잔기 및/또는 시스테인 잔기의 사이에서 진행될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0065] 상기 단백질은 소포체 내의 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

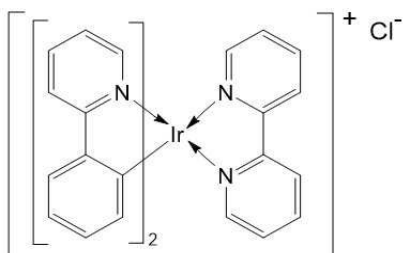
[0066] 본 발명의 일 구현예에 따른 단백질 가교용 조성물에 포함될 수 있는 사이클로메탈화 전이금속 착물은, 이리듐을 중심 금속으로 갖는 착물, 예를 들어, 하기 화학식 7 내지 10의 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0067] [화학식 7]



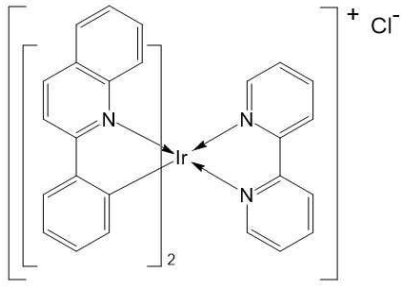
[0068]

[0069] [화학식 8]



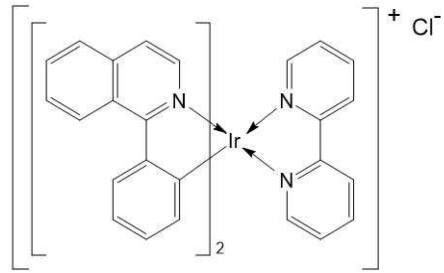
[0070]

[0071] [화학식 9]



[0072]

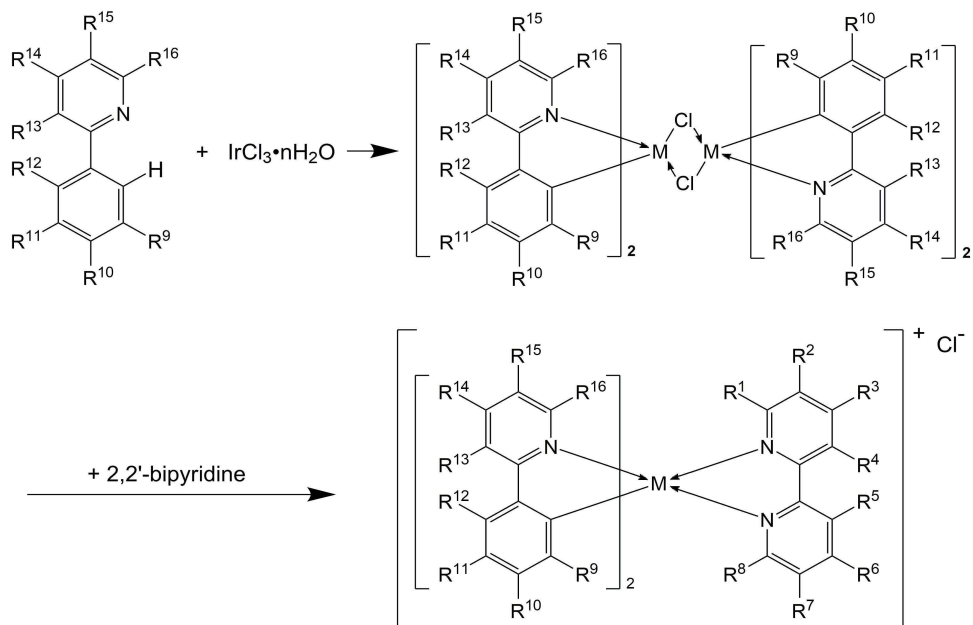
[0073] [화학식 10]



[0074]

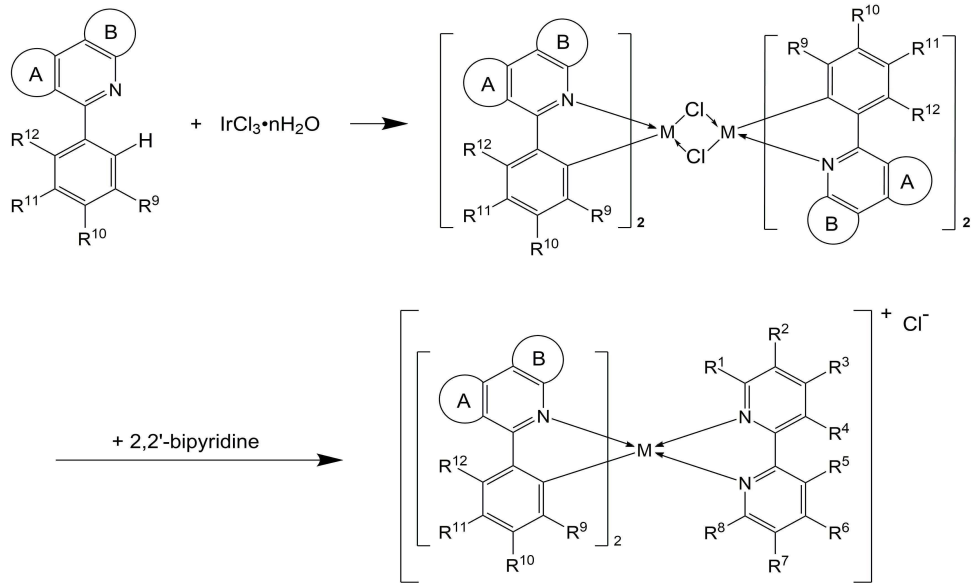
[0075] 아울러, 본 발명은 하기 반응식 1 또는 2에 나타낸 바와 같이, 2 단계를 통해 화학식 1 또는 2로서 표시되는 사이클로메탈화 전이금속 착물을 형성하는 것을 포함하는, 단백질 가공용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0076] [반응식 1]



[0077]

[0078] [반응식 2]



[0079]

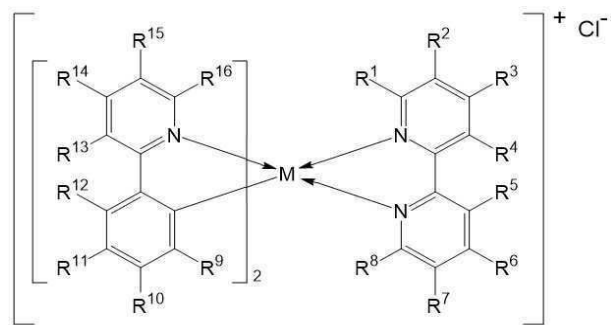
[0080] 상기 식들에서,

[0081] M, R¹ 내지 R¹⁶, 고리 A, 및 고리 B는 각각 앞서 정의된 바와 동일함.

[0082] 구체적으로,

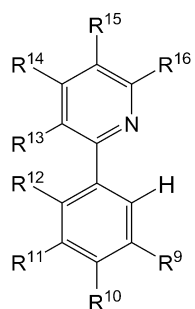
[0083] 반응식 1은, IrCl₃·nH₂O와 하기 화학식 3으로서 표시되는 출발물질 화합물을 반응시켜 하기 화학식 4로서 표시되는 중간체 착물을 제조하는 단계, 및 상기 중간체 착물과 2,2'-바이피리딘을 반응시켜 하기 화학식 1로서 표시되는 사이클로메탈화 전이금속 착물을 형성하는 단계를 포함한다:

[0084] [화학식 1]



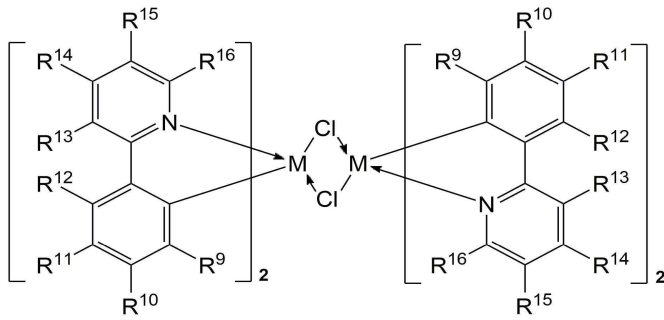
[0085]

[0086] [화학식 3]



[0087]

[0088] [화학식 4]



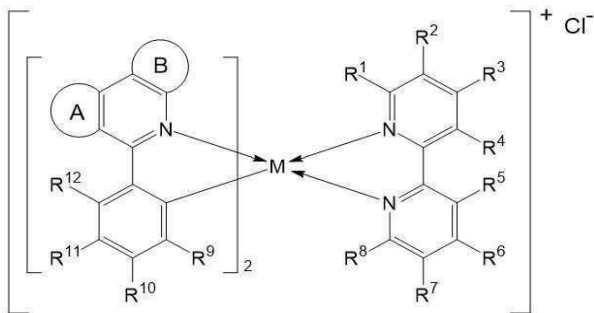
[0089]

[0090] 상기 식들에서,

[0091] M, 및 R⁹ 내지 R¹⁶은 각각 앞서 정의된 바와 동일함.

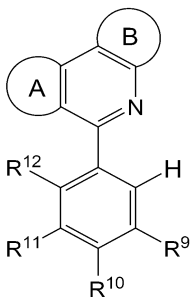
[0092] 또한, 반응식 2는, IrCl₃ · nH₂O와 하기 화학식 5로서 표시되는 출발물질 화합물을 반응시켜 하기 화학식 6으로서 표시되는 중간체 착물을 제조하는 단계, 및 상기 중간체 착물과 2,2'-바이피리딘을 반응시켜 하기 화학식 2로서 표시되는 사이클로메탈화 전이금속 착물을 형성하는 단계를 포함한다:

[0093] [화학식 2]



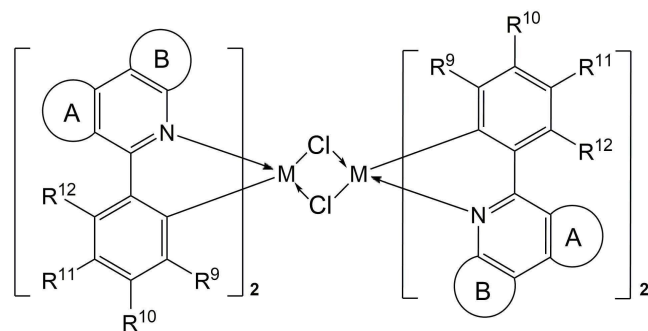
[0094]

[0095] [화학식 5]



[0096]

[0097] [화학식 6]



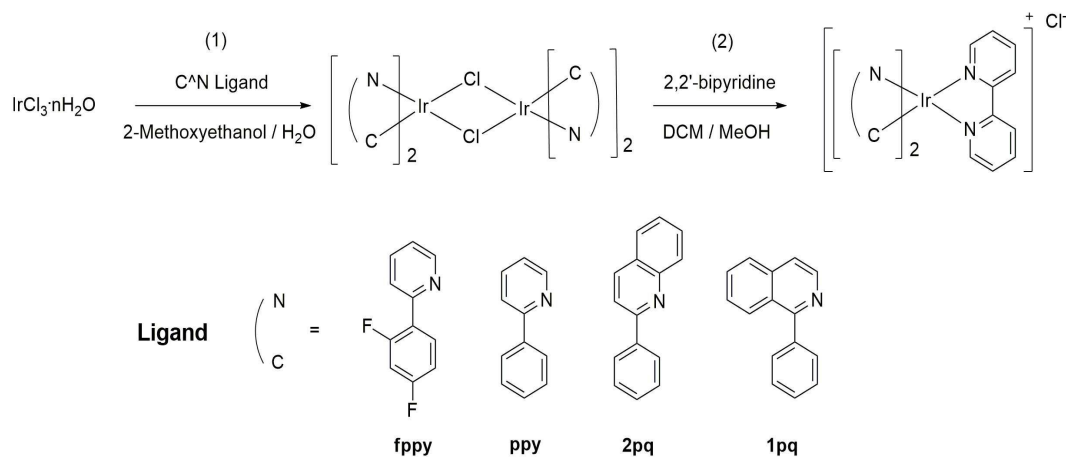
[0098]

- [0099] 상기 식들에서,
- [0100] M , R^9 내지 R^{12} , 고리 A, 및 고리 B는 각각 앞서 정의된 바와 동일함.
- [0101] 상기 단백질 가교용 조성물의 제조방법에 의해 제조된 사이클로메탈화 전이금속 착물은 중심 금속이 이리듐인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 단백질 가교용 조성물의 제조방법에 의해 제조된 사이클로메탈화 전이금속 착물은, 예를 들어, 화학식 7 내지 10의 화합물일 수 있다.
- [0102] 본 발명의 일 구현예에 따른 단백질 가교용 조성물은 상온에서 빛에 반응하여 광화학적 가교결합을 촉진할 수 있다.
- [0103] 예를 들어, 상기 화학식 7 내지 10의 화합물인 사이클로메탈화 전이금속 착물은 루테튬 착물과 비교했을 때 훨씬 더 강한 금속 유도 스핀-오비탈 상호작용 (spin-orbital coupling)으로 삼중항 상태 (triplet state)의 방사사이완 (radiative relaxation)을 가능하게 하는 단일항-삼중항 혼합 (singlet triplet mixing)을 효율적으로 이끈다. 게다가, 본 발명의 일 구현예에 따른 사이클로메탈화 전이금속 착물들은 좋은 전자 전달 (electron transfer) 능력을 가지고 있다.
- [0104] 그 결과 상기 사이클로메탈화 전이금속 착물은 빛에 반응하여 유형1과 유형2의 활성산소종을 굉장히 잘 생성하였으며, 이러한 증진된 활성산소종 생성능력 및 금속 복합체 기반 촉매작용의 상승효과를 통해 외생 첨가제 없이 1 분 안에 단백질의 광화학적 가교작용을 이루어 낼 수 있다.
- [0105] 이러한 상승효과를 이용하여 광화학적 가교결합의 흡광 촉매로서 상기 사이클로메탈화 전이금속 착물을 이용할 경우, 루테튬 금속의 경우보다 광화학적 가교결합을 촉진할 수 있다.
- [0106] 이하, 본원에 대하여 실시예를 이용하여 좀더 구체적으로 설명하지만, 하기 실시예는 본원의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것일 뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예: 이리듐 기반 사이클로메탈화 전이금속 착물의 합성

[0109] 이리듐 기반 사이클로메탈화 전이금속 착물 (이하, 이리듐 착물 또는 Ir(III) 착물)의 합성과정은 하기 스킴 (scheme)에 나타낸 바와 같다:



- [0110]
- [0111] 합성 과정에서, 2 당량의 $\text{IrCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Strem Chemicals, USA)와 4 당량의 C^{N} 리간드 (C^{N} Ligand: Sigma

Aldrich, USA)를 이용하여 염소로 연결된 이리듐 이합체 (중간체 착물)를 제조하였다. 디클로로메탄 (dichloromethane, DCM: 삼전화학, 한국)과 메탄올 (MeOH: 삼전화학, 한국)의 혼합 용매 (DCM:MeOH = 1:1 부피 비)에 상기 제조된 염소로 연결된 이리듐 이합체 1 당량과 2,2'-바이피리딘 (Sigma Aldrich, USA) 2 당량을 용해시킨 후, 불활성 기체인 N₂ 분위기에서 12 시간 동안 환류 반응시켰다. 그 후 DCM과 헥세인 (n-hexane: 삼전화학, 한국)을 이용하여 석출을 하였으며, 헥세인을 이용한 추가적인 세척 과정을 통해 화학식 7 (ER-Ir-B로 약칭함), 화학식 8 (ER-Ir-G로 약칭함), 화학식 9 (ER-Ir-O로 약칭함), 화학식 10 (ER-Ir-R로 약칭함)의 화합물을 각각 합성하였다.

[0112] 실험예 1: 화학식 7 내지 10 화합물을 이용한 광화학적 가교

[0113] (1) 클로닝 (Cloning)

[0114] 소포체에 발현되는 Sec61B단백질 (mGFP-Sec61B 유전자로부터 발현된 단백질임)을 발현시키기 위해 BglII와 HindIII가 포함된 프라이머 (primer: Macrogen)를 이용하여 Sec61B 유전자를 PCR 기기 (Macrogen)를 이용해 증폭시키고 제한효소를 이용하여 GFP (green fluorescent protein)가 포함된 mGFP 벡터 (vector)의 플라스미드 (plasmid)에 재조합시켰다 (mGFP와 Sec61B는 직접 클로닝하여 사용하였음). 재조합된 플라스미드는 대장균 (E.coli: invitrogen, C404003)에 열충격 (heat shock)을 가하는 방법으로 형질전환 (transformation) 되었으며 박테리아는 카나마이신 (kanamycin: AMRESCO, 0408) 항생제를 포함한 배지 (바이오세상, L3006)에서 길러졌다. 길러진 박테리아와 DNA 추출 키트를 이용하여 정제된 플라스미드를 얻을 수 있었다.

[0115] (2) 세포 배양과 이리듐 착물 처리

[0116] 실시예에서 제조된 이리듐 착물 각각의 가교결합 실험을 위하여, HEK-293T이라는 인간 배아신장 세포 (human embryonic kidney: 한국세포주은행)를 사용하였다. 상기 세포는 16 시간 동안 FBS (fetal bovine serum, 소태아혈청)가 첨가된 MEM (Minimum Eessential Media: Gibco, 10370-021)에서 길러진 뒤 24 시간 동안 형질전환제인 lipofectamine 2000 (invitrogen, 11668-019)을 이용하여 단백질을 발현시켰다. 그 뒤 세포는 2 μ M 농도의 이리듐 착물로 30 분 동안 처리되었다. 그 후 미디어를 제거한 뒤 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 3 번 세척된 세포에 빛을 1 분 동안 가했다. 다시 DPBS로 2번 세척해주어 죽은 세포를 제거한 뒤 라이시스 버퍼 (lysis buffer: 바이오세상, R2002: RIPA 버퍼와 프로테아제 억제인자의 혼합물)로 세포막을 제거하여 회전속도 13200 rpm의 원심분리기를 이용해 10 분 동안 세포 소기관들을 가라앉히고 상층액을 얻었다.

[0117] (3) 웨스턴 블랏을 이용한 가교결합 확인

[0118] 위에서 얻어진 상층액은 SDS 로딩버퍼(바이오세상, S2002)와 섞은 뒤 5 분 동안 95℃에서 가열되었고 다시 5 분 동안 얼음 위에 올려놓았다. 냉각된 샘플들은 10% SDS-PAGE 겔 (Novex)을 통해 크기에 따라 분리가 되었으며 충분히 분리된 뒤 겔에 있는 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인 (nitrocellulose membrane: PALL Life Sciences, 66485)으로 옮겼다. 그 후 상기 멤브레인을 2% BSA (AMRESCO, 9048-46-8)로 1 시간 동안 처리를 하였으며, 그 뒤 GFP 항체가 첨가된 2% BSA로 다시 1 시간 동안 처리를 하였다. 항체가 코팅된 멤브레인은 TBST (Tris-buffered saline과 Tween 20의 혼합물)에 의해 4 번 세척되었으며 다시 anti-rabbit-HRP가 첨가된 2% BSA 용액 (AMRESCO, 9048-46-8)을 이용하여 30 분 동안 처리하고 전 과정과 마찬가지로 4번 세척해주었다. 그 뒤 루미놀 (luminol: Bio-rad, 1705061)과 과옥사이드 (peroxide: Bio-rad, 1705061)가 혼합된 용액을 이용하여 HRP를 활성화 시켜 웨스턴 블랏 이미지를 얻었다.

[0119] <결과 및 분석>

[0120] 광화학적 가교결합의 정도는 활성산소종을 얼마나 잘 생성하느냐와 연관되어 있다. 따라서, 먼저 유형2 활성산소종인 단일항 산소 (¹O₂)를 감지할 수 있는 물질인 9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA: Sigma Aldrich, USA, 75068)를 이용하여, 각 이리듐 착물들의 단일항 산소 생성 능력을 테스트하였다. 단일항 산소 양자효율에 대한 기준은 [Ru(bpy)₃]Cl₂로서 버퍼 없는 순수 물 조건에서 $\Phi_s=0.18$ 임이 알려져 있다.

[0121] 본 실험에서 진행된 ABDA 분석 방법은 다음과 같다:

[0122] 10 mM의 각 물질들의 수용액을 2 mL씩 준비하여 100 mM의 ABDA를 1000:1 부피비에 해당하는 2 mL를 넣어 섞어주어 샘플을 준비하였다. 그 뒤 태양광 측정 장비 (IQE-200, Newport Co.)를 이용해 350 W의 세기로 맞춘 빛을 총 6개의 샘플에 대해 각각 0 분, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분 동안 쬔어주었다. 각 간격마다 샘플의 단일항 산소에 의해 감소된 ABDA의 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0123] 도 1은, 화학식 7 내지 10의 각 이리듐 착물을 이용했을 때 시간에 따른 ABDA 흡광도 감소 정도를 보여주는 그래프로서, 이 그래프로부터 흡광도 감소정도는 ER-Ir-B (화학식 7의 화합물), ER-Ir-G (화학식 8의 화합물), ER-Ir-O (화학식 9의 화합물) 그리고 ER-Ir-R (화학식 10의 화합물)순으로 점차적으로 커짐을 알 수 있다.

[0124] 이를 통한 단일항 산소 양자효율 (Φ_s)은 하기 수학적 1에 의해서 구해지며, 각 물질에 대한 S 값 (Slope)과 F 값 (F value)은 표 1에 나타내었다.

수학적 1

$$\Phi_s = \Phi_{s,ref} \left(\frac{S}{S_{ref}} \right) \left(\frac{F_{ref}}{F} \right)$$

[0125]

[0126] F는 $1-10^{-O.D.}$ 이고

[0127] O.D.는 흡광도 (optical density) 임.

표 1

	Ru(bpy) ₃	ER-Ir-B	ER-Ir-G	ER-Ir-O	ER-Ir-R
S 값	0.0781	0.04237	0.05374	0.08072	0.1308
O.D.	0.094352	0.052084	0.039761	0.024874	0.046524
F 값	0.20	0.11	0.09	0.056	0.10
Φ_s	0.18	0.18	0.28	0.66	0.60

[0128]

[0129] 유형1 활성산소인 초과산화물 라디칼에 대한 양적인 비교 또한 Dihydrorhodamine 123 (Sigma Aldrich, USA, D1054)이라는 라디칼 감지 센서물질을 통해 진행되었다. 상기 실험은 10 mM의 각 물질들의 수용액 2 mL에 10 mM의 Dihydrorhodamine 123을 1000:1 부피비로 넣어주어 샘플을 준비하였다. 샘플은 ABDA 분석과는 다르게 빛의 세기를 1 sun (100 mW/cm², AM1.5)조건에서 쬔어주었다. 빛을 쬔어준 용액과 쬔어주지 않은 용액을 형광 분광 광도계 (Fluorometer, Cary Eclipse)를 이용하여 변화를 관찰하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0130] 도 2는, 실시예에서 제조된 이리듐 착물인 화학식 7 내지 10의 화합물에 따른 초과산화물 라디칼의 발생 정도를 발광 세기를 통해 보여주고 있다.

[0131] 또한, 각 이리듐 착물의 활성산소 발생 정도를 확인한 뒤에, 이를 통해 실제 세포 안에서 존재하는 단백질들끼리 광화학적 가교결합이 일어나는지를 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법 (SDS-PAGE)를 통해서 확인하였으며, 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0132] 도 3을 참조하면, 1번과 3번 줄을 제외한 나머지 줄은 각각에 해당하는 사이클로메탈화 전이금속 착물을 처리하

였고, 2번 줄은 빛을 쏘아주지 않았다. 1번과 2번 줄을 제외한 나머지 줄은 태양광측정 장비 (IQE-200, Newport Co.)를 이용해 빛의 세기를 1 sun (100 mW/cm^2 , AM1.5) 조건에서 1 분간 쏘아주었다. 그 결과, 이리듐 착물을 이용하여 빛을 쏘아준 4번, 5번, 6번, 7번 줄은 단백질들이 광화학적 가교결합이 일어난 것으로 확인되었다. 그 중에서도 활성산소종을 많이 발생시키는 이리듐 착물인 ER-Ir-O와 ER-Ir-R의 경우에는 더 높은 차원의 가교결합까지 발생한 것을 알 수 있다. 루테튬 금속 착물인 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 를 이용한 8번 줄은 과황산암모늄과 같은 라디칼 반응 개시제의 존재가 없기 때문에 광화학적 가교결합의 정도가 미미했으며, 라디칼 반응 개시제를 사용했을 경우 (9번 줄)에도 실제 셀 내부에서는 큰 효과가 없었다.

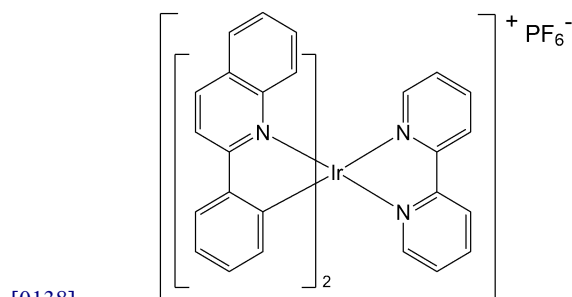
[0133] 한가지 중요한 점은, ER-Ir-B와 ER-Ir-G는, $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 와 비교했을 때, 활성산소 생성 정도가 크게 차이가 나지 않음에도 불구하고 광화학적 가교결합을 잘 일으키는 것을 4번, 5번과 8번 줄을 통해 알 수 있다. 이는 이리듐 착물의 경우에는 루테튬착물과는 다르게 활성산소의 발생 정도가 상대적으로 낮아도 추가적인 이리듐의 촉매적 특성으로 인해 가교결합의 능력을 향상시킨다는 결론을 보여주고 있다. 따라서, 광화학적 가교결합에 있어서 사용하고자 하는 물질이 활성산소를 얼마나 잘 생성할 수 있는지와 얼마나 좋은 촉매적 특징을 가지고 있는지가 중요한 두 가지 요소로서 작용한다.

[0134] 실험예 2: 세포 독성

[0135] 세포 독성 분석을 위하여, HEK-293라는 인간 배아신장 세포 (human embryonic kidney: 한국세포주은행)를 사용하였다. 모든 세포들은 5% (v/v) FBS (Sigma)와 1% (v/v) 페니실린 (penicillin: GIBCO)이 첨가된 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium: GIBCO) 배양액에서 37°C 와 5% CO_2 환경에서 길러졌다. 화학식 7 내지 10의 각 이리듐 착물들과, 이들 착물의 구조에서 Cl^- 음이온 대신에 PF_6^- 음이온을 각각 가지는 이리듐 착물들의 세포 생존능력 (Cell viability)은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석을 통해 확인되었다.

[0136] 셀들은 96 well 판에 각각 심어지며 ($150,000 \text{ cells in } 100 \text{ mL per well}$), 그 후 각 농도별 ($1, 5, 10 \text{ }\mu\text{M}$; final 1% v/v DMSO)로 이리듐 착물을 각각 로딩하였다. 빛이 차단된 상태로 37°C 에서 24 시간 동안 배양한 뒤, 25 mL MTT [바이오세상, 한국: PBS (phosphate buffered saline) 중 5 mg/mL 의 농도, pH 7.4; GIBCO]를 각 well에 처리하였다. 처리 후에 또 다시 빛이 차단된 상태로 37°C 에서 4 시간 동안 배양하였다. 셀에 의해서 생성된 포르마잔 (formazan)이 상온에서 DMF (N,N-dimethylformamide: 50% v/v 수용액, pH 4.5)와 SDS (sodium dodecyl sulfate: 20% w/v)를 포함하는 가용화 완충제의 첨가에 의해 하룻밤 동안 용해되었다. 용해된 포르마잔의 흡광은 SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 측정되었다. 분석을 위한 샘플링 과정에서 세포에 소량의 빛이 가해질 수 있지만, 셀이 빛에 최대한 노출되지 않도록 주의하였다. 세포 생존 능력은 동일한 양의 DMSO (dimethylsulfoxide)를 포함하는 셀과 비교군으로 놓고 결정되었다. 오차 막대는 세 개의 독립적인 실험들로부터의 표준오차로서 계산되었다. 이리듐 착물들 중 화학식 9의 화합물 (Cl^- 양이온 함유)과 하기 화학식 11과 같이 PF_6^- 음이온이 배워되어 있는 화합물을 각각 HEK-293에 처리했을 때의 세포 생존능력을 확인하여 도 4에 나타내었다:

[0137] [화학식 11]



[0139] 도 4를 참조하면, 이리듐 착물에 배워된 음이온의 종류에 따라 세포 독성에 차이가 있음을 확인할 수 있으며,

PF_6^- 음이온이 배워되어 있는 이리듐 착물에 비해 본 실시예에 따른 이리듐 착물들과 같이 Cl^- 양이온이 배워된 화합물을 처리했을 때 세포의 생존율이 더 높다는 것을 알 수 있다. 따라서, 실시예에서 제조된 이리듐 착물은 빛이 없는 조건에서 세포 독성이 거의 없으므로, 살아있는 세포에 적용하기에 적합하다.

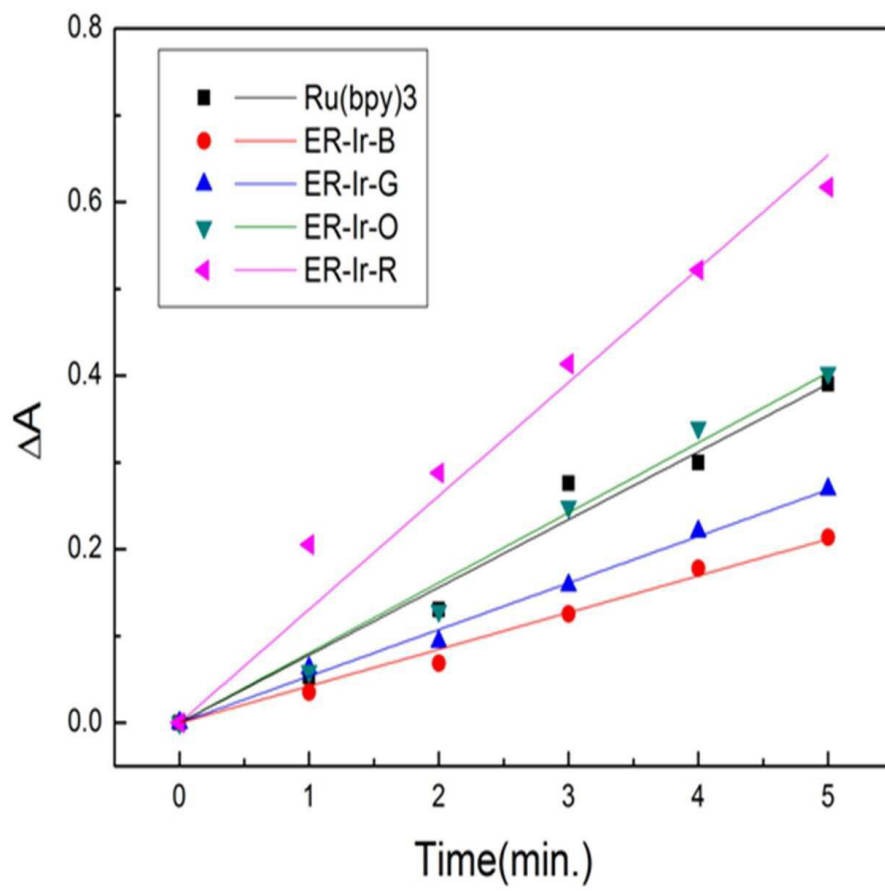
[0140] 종합해보면, 본 실시예에 따른 화학식 7 내지 10의 화합물인 이리듐 착물이 생체 내에 존재하는 단백질에 대해서 광화학적 가교결합을 일으킬 경우, 앞서 서술한 것처럼 이리듐에 의해 활성화된 산소 (ROS)의 작용과 빛에 의해 활성화된 이리듐 착물의 촉매적 작용, 이 두 가지의 동시다발적인 작용이 광화학적 가교에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 가교결합이 이루어지는 부분은 단백질의 타이로신 잔기가 주된 부분이고, 그 이외에도 시스테인 잔기도 친핵체로서 작용하여 반응에 참여할 수 있는 것으로 확인되었으며, 본 실시예에 따른 이리듐 착물은 Cl^- 음이온이 결합되어 있어 세포 독성이 거의 없으므로 살아있는 세포 내 적용이 가능하다. 본 발명의 단백질 가교용 조성물은 빛이 차단된 상태에서는 단백질 가교가 일어나지 않으므로, 빛을 제어하여 단백질 가교 진행을 조절할 수 있다.

[0141] 전술한 바와 같이, 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적이지 않은 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

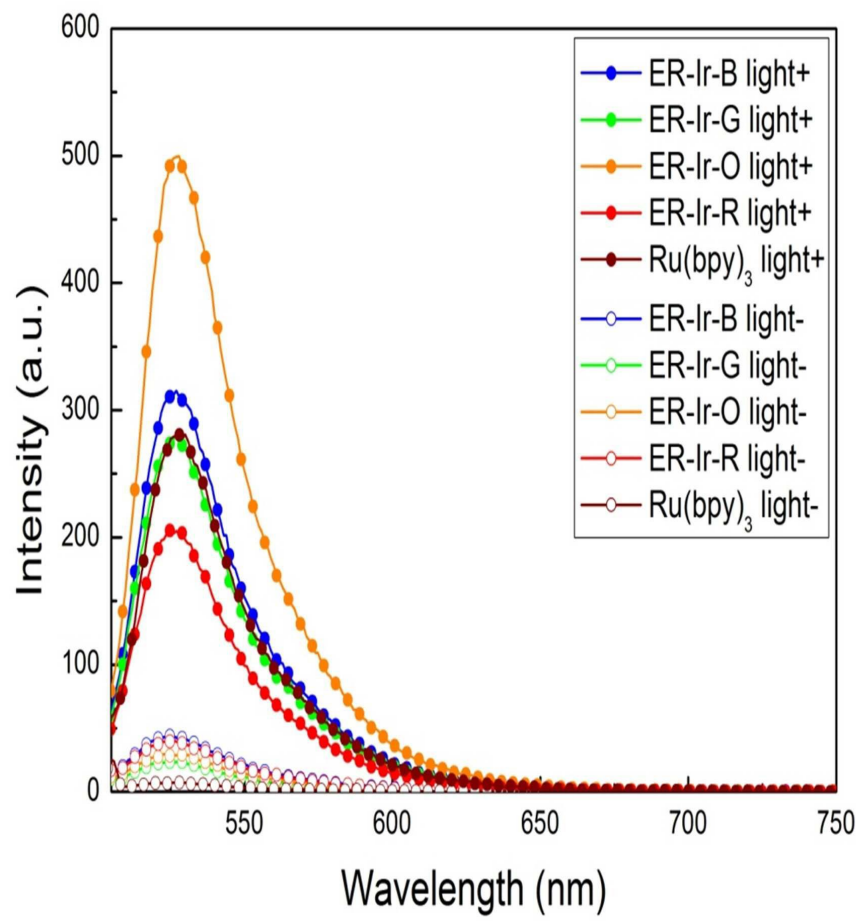
[0142] 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

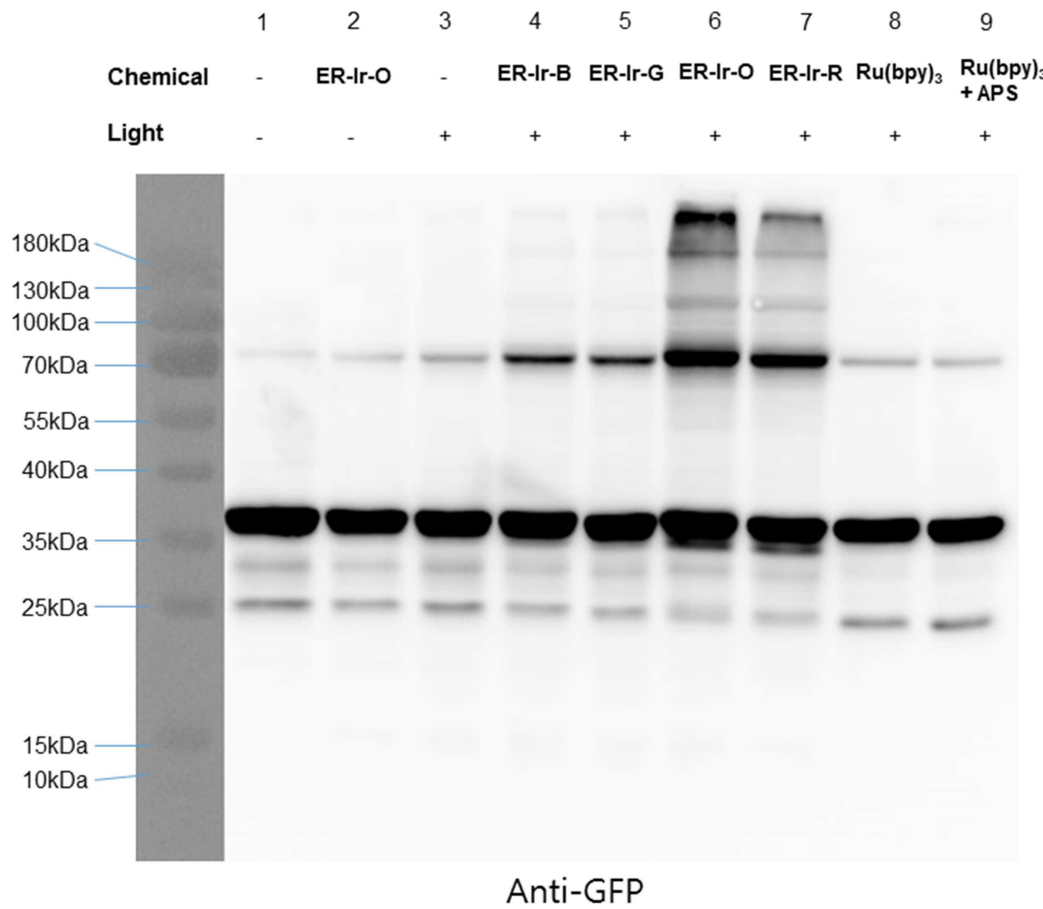
도면1



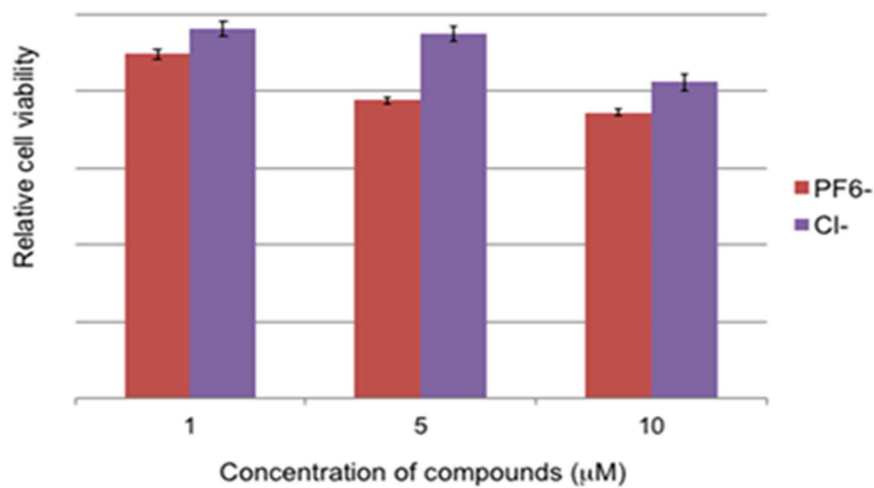
도면2



도면3



도면4



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

사이클로메틸탈

【변경후】

사이클로메탈화