(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0101063
(43) 공개일자 2021년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 5/05 (2006.01) *A61K 31/69* (2006.01)
A61K 41/00 (2020.01) *A61K 49/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C09K 11/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 5/05 (2013.01)
A61K 31/69 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0015211
(22) 출원일자 2020년02월07일
심사청구일자 2020년02월07일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호(서빙고동, 신동아아파트)
응웬 반 응이어
서울특별시 서대문구 이화여대길 52(대현동)
임유빈
서울특별시 서대문구 연세로2라길 56, 502호(창천동)
(74) 대리인
리앤목특허법인

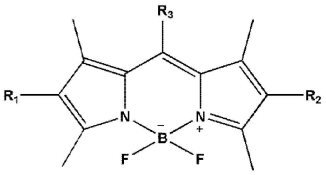
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **화합물, 이를 포함하는 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

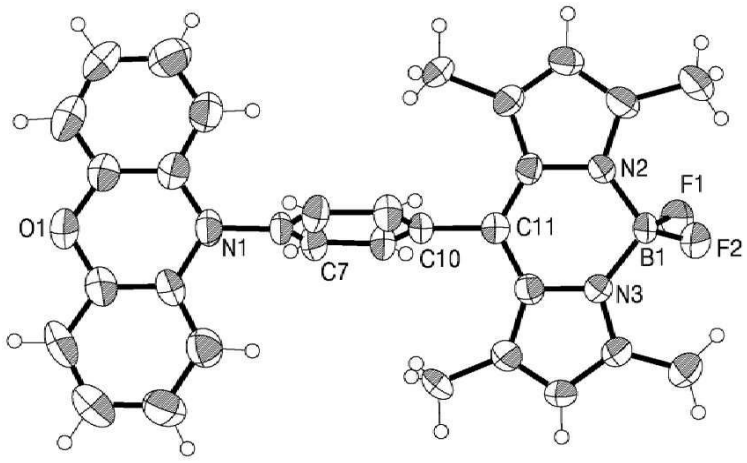
화합물, 이를 포함하는 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물이 개시된다. 상기 화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

<화학식 1>



상기 화학식 1에서, R_1, R_2, R_3는 각각 명세서에 개시된 바와 같다.

대 표 도 - 도1b



BDP-5
(화합물 5)

(52) CPC특허분류
A61K 41/0057 (2013.01)
A61K 49/0082 (2013.01)
A61K 49/0093 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C09K 11/06 (2021.01)
C09K 2211/1022 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711093991
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 다차원 유기소재 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2019.05.01 ~ 2020.02.29

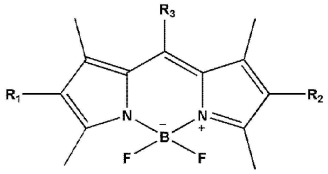
명 세 서

청구범위

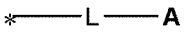
청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

<화학식 1>



<화학식 2>



상기 화학식 1에서,

R_1, R_2는 서로 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C1-C20 알킬기, $-SO_3^-$기, $-CO_3^-$기, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹, 또는 이들 조합이며; 및

R_3은 치환 또는 비치환된 페닐기, 치환 또는 비치환된 피리미딜기, 또는 이들 조합이며;

상기 화학식 2에서,

L은 비치환된 페닐렌기 또는 비치환된 피리미딜렌기이며;

A는 C6-C20의 아릴기로 치환된 아민기, 치환 또는 비치환된 N, O, S 중 적어도 하나를 함유하는 C6-C30 헤테로아릴기, 또는 이들 조합이며; 및

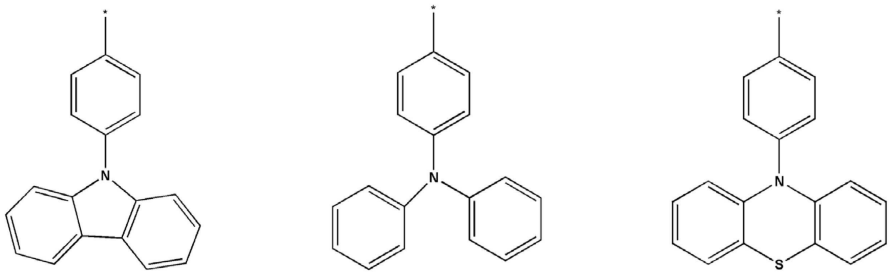
*는 이웃한 원자와의 결합 사이트이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 그룹이 화학식 2-1 내지 2-3으로 표시되는 그룹을 포함하는 화합물:

<화학식 2-1> <화학식 2-2> <화학식 2-3>



상기 화학식 2-1 내지 2-3에서,

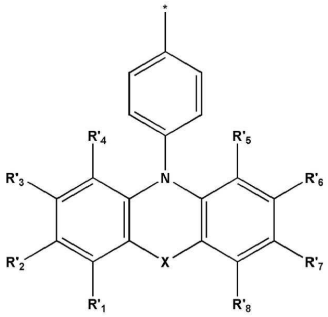
*는 이웃한 원자와의 결합 사이트이다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 R_3가 하기 화학식 3으로 표시되는 그룹을 포함하는 화합물:

<화학식 3>



상기 화학식 3에서,

X는 N(R_a), O 또는 S이고, R_a는 수소 또는 치환 또는 비치환된 C1-C10의 알킬렌 포스포늄 양이온기이며;

R'_1, R'_2, R'_3, R'_4, R'_5, R'_6, R'_7, R'_8은 서로 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C1-C20의 알킬기, 또는 이들의 조합이며; 및

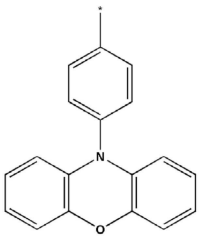
*는 이웃한 원자와의 결합 사이트이다.

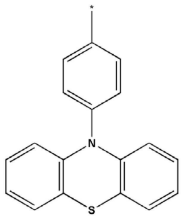
청구항 4

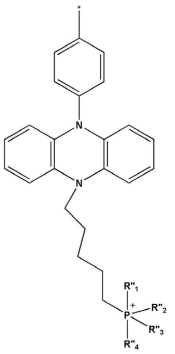
제1항에 있어서,

상기 R_3가 하기 3-1 내지 3-3으로 표시되는 그룹을 포함하는 화합물:

<화학식 3-1> <화학식 3-2> <화학식 3-3>







상기 화학식 3-1 내지 3-3에서,

$R"_1$, $R"_2$, $R"_3$, $R"_4$는 서로 독립적으로 치환 또는 비치환된 C6-C20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C6-C20의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합이며; 및

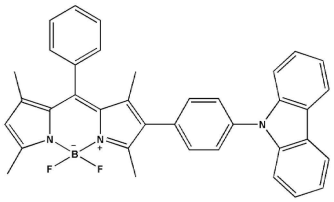
*는 이웃한 원자와의 결합 사이트이다.

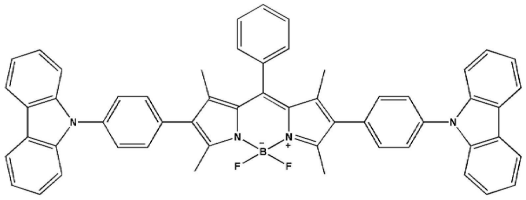
청구항 5

제1항에 있어서,

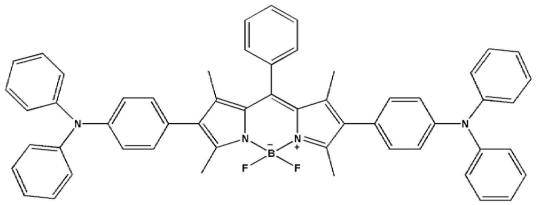
상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 하기 화합물 1 내지 5를 포함하는 화합물:

화합물 1 화합물 2



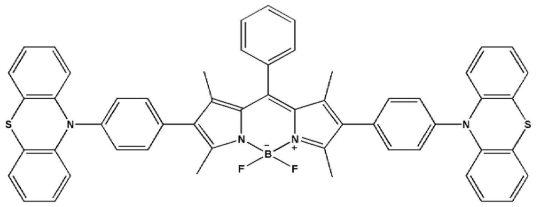


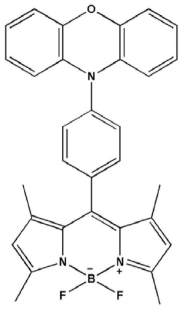
화합물 3



화합물 4

화합물 5





청구항 6

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 중원소를 도입하지 않은, 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 코어와 R_1 사이의 결합, 코어와 R_2 사이의 결합, 코어와 R_1 및 코어와 R_2 사이의 결합, 또는 코어와 R_3 사이의 결합이 트위스트된 결정 구조(twisted crystal conformation)를 갖는, 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및

용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 가장 낮은 단일항 여기상태와 가장 낮은 삼중항 상태 사이의 에너지 갭(ΔE_{S1T1})이 1.00 eV 미만인, 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 수용액 또는 유기용액에서 단일항 산소(singlet oxygen)를 발

생하는, 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 원적외선 또는 근적외선 파장 영역에서 분자 내 전하 이동에 의해 발광하는, 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 광감각제 및 바이오 이미징 프로브로 사용되는, 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 양친매성 고분자와 접합하여 형성된 마이셀 나노입자인, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 화합물, 이를 포함하는 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 광역학치료(PDT)는 전통적인 치료법과 비교하여 눈에 띄는 장점으로 인해 암 및 기타 질병의 치료에 가장 유망한 접근법 중 하나이다. 광역학치료의 중요한 구성요소로는 광조사시 반응성 산소종 (ROS)을 생성할 수 있는 광감각제(PS)이며, 현재까지 다양한 종류의 광감각제가 개발되어 왔다.

[0003] 이들 중에서, 보론 디피로메텐(BODIPY) 광감각제는 많이 주목되었다. 그러나 보론 디피로메텐(BODIPY) 광감각제는 낮은 삼중 양자 수율(triplet quantum yields)의 문제가 있었다. 이를 극복하기 위하여 보론 디피로메텐(BODIPY) 코어에 중원소를 도입하는 시도가 있었으나 독성, 비분해 및 비용 문제가 발생하였다.

[0004] 따라서 이를 해결하기 위한 신규한 구조의 화합물, 이를 포함하는 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물에 대한 요구가 여전히 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 측면은 중원자를 도입하지 않은 광감각제이면서 바이오 이미징화제 화합물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 측면은 원적외선/근적외선 파장 영역에서 발광하는 상기 화합물을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

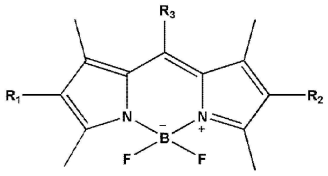
[0007] 또다른 측면은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

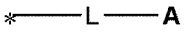
[0008] 일 측면에 따라,

[0009] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제공된다:

[0010] <화학식 1>

[0011] 

[0012] <화학식 2>

[0013] 

[0014] 상기 화학식 1에서,

[0015] R_1, R_2는 서로 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C1-C20 알킬기, $-SO_3^-$기, $-CO_3^-$기, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹, 또는 이들 조합일 수 있으며; 및

[0016] R_3은 치환 또는 비치환된 페닐기, 치환 또는 비치환된 피리미딜기, 또는 이들 조합일 수 있으며;

[0017] 상기 화학식 2에서,

[0018] L은 비치환된 페닐렌기 또는 비치환된 피리미딜렌기일 수 있으며;

[0019] A는 C6-C20의 아릴기로 치환된 아민기, 치환 또는 비치환된 N, O, S 중 적어도 하나를 함유하는 C6-C30 헤테로아릴기, 또는 이들 조합일 수 있으며; 및

[0020] *는 이웃한 원자와의 결합 사이트일 수 있다.

[0021] 다른 측면에 따라,

[0022] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및

[0023] 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 조성물이 제공된다.

[0024] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 가장 낮은 단일항 여기상태와 가장 낮은 삼중항 상태 사이의 에너지 갭(ΔE_{S1T1})은 1.00 eV 미만일 수 있다.

[0025] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 수용액 또는 유기용액에서 단일항 산소(singlet oxygen)를 발생할 수 있다.

[0026] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 원적외선 또는 근적외선 파장 영역에서 분자 내 전하 이동에 의해 발광할 수 있다.

[0027] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 광감각제 및 바이오 이미징 프로브로 사용될 수 있다.

[0028] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 양친매성 고분자와 접합하여 마이셀을 형성할 수 있다.

[0029] 또다른 측면에 따라,

[0030] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0031] 일 측면에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 중원자를 도입하지 않은 광감각제이면서 바이오 이미징화제 화합물을 제공한다. 상기 화합물을 포함하는 조성물은 원적외선/근적외선 파장 영역에서 발광할 수 있다. 상기 화합물을 포함하는 조성물은 수용액 또는/및 유기용액에서 단일항 산소(singlet oxygen)를 발생하여 종양 진단 또는/및 치료를 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1a 및 도 1b는 각각 단결정 회절법을 이용하여 합성예 1 및 합성예 5에 의해 얻은 BDP-1(화합물 1)과 BDP-

5(화합물 5)의 결정 구조를 분석한 결과이다.

도 2는 BDP 및 합성예 5에 의해 얻은 BDP-5(화합물 5)의 S_1-T_1 시스템간 교차 프로세스(intersystem crossing; ISC)를 나타낸 개략도이다.

도 3은 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자 제조의 개략도이다.

도 4는 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자에 대하여 동적 광산란 장치를 이용하여 입경을 측정한 입경 분포도 및 TEM 이미지 실험결과이다.

도 5a 및 도 5b는 각각 BDP 화합물 및 합성예 1~5에 의해 얻은 BDP-1(화합물 1), BDP-2(화합물 2), BDP-3(화합물 3), BDP-4(화합물 4), 및 BDP-5(화합물 5)에 대하여 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 광발광(PL) 스펙트럼을 분석한 결과이다.

도 6은 0, 70, 80, 90, 99 부피%의 물의 체적분율에서 THF/물 혼합용매 중에 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플액 10 μM에 대하여 광발광(PL) 스펙트럼을 분석한 결과이다.

도 7은 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플 수용액 5 μM에 대하여 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 광발광(PL) 스펙트럼을 분석한 결과이다.

도 8은 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플 수용액 30 μM에 대하여 2,7-디클로로플루오레세인 디아세테이트(2,7-dichlorofluorescin diacetate; DCFH-DA)를 프로브로 이용하여 20 mW/cm^2 녹색 LED 광원을 0, 3, 6, 9, 12, 15분 동안 각각 조사한 후에 ROS 검출을 모니터하기 위한 광발광(PL) 스펙트럼을 분석한 결과이다.

도 9(a)는 HeLa 세포를 0, 0.04, 0.16, 0.63, 2.5, 10.0 μM 농도로 각각 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플과 함께 배양하고 상기 세포에 녹색 LED (20 mW/cm^2, 20분)를 조사한 후, MTT 분석에 의해 세포 생존력을 분석한 결과이며; 도 9(b), (c)는 각각 HeLa 세포를 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플 10 μM와 함께 배양하고 녹색 LED (20 mW/cm^2, 20분)로 조사한 후, 2 μM 칼세인(Calcein, live cell marker) AM 및 4 μM 프로피듐 요오드화물(propidium iodide; PI, dead cell marker)로 함께 염색하고 공초점 현미경에 의해 얻은 형광 이미지 결과이며; 도 9(d)는 HeLa 세포를 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플과 함께 배양하고 2 ', 7'- 디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트(DCFH-DA, 10μM)/디히드로에티듐 (DHE, 10μM)으로 처리하고 녹색 LED (20 mW/cm^2, 20분)를 조사한 후, 공초점 현미경에 의해 얻은 형광 이미지 결과이다.

도 10(a)는 5 주령 암컷 BALB/c nu/nu 누드 마우스의 뒷면에 피하 주사로 약 2 X 10^6 HeLa 세포를 접종하고 종양이 대략 100 mm^3에 도달하면 상기 종양에 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자를 처리한 BDP-5 처리군과 정상 식염수가 종양에 직접 주입된 대조군에 대하여 얻은 *in vivo* 형광 이미지 결과이며; 도 10(b)는 4 주령 암컷 BALB/c nu/nu 누드 마우스에 Matrigel (50 μL의 세포 현탁액 + 50 μL의 Matrigel; 356234, BD Biosciences)과 혼합한 2x10^6 HeLa 세포를 뒷면에 피하 주사하고 종양이 대략 100 mm^3에 도달하면 상기 종양에 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자를 처리한 BDP-5 처리군과 처리하지 않은 대조군에 대하여 20분 동안 1 cm의 거리로 녹색 LED (520 nm, 20 mW/cm2)에 노출시킨 후, 얻은 *in vivo* 형광 이미지 결과이다.

도 11은 BDP-5 처리 또는 생리 식염수를 주사하고 종양 조직을 절제 및 5 ㎛ 두께의 섹션으로 절단한 후, H&E 염색 및 TUNEL 분석을 한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 일 구현예에 따른 화합물, 이를 포함하는 조성물, 및 상기 화합물을 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물에 관하여 상세히 설명하기로 한다. 이하는, 예시로서 제시되는 것으로서 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술할 특허청구범위의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0034] 본 명세서에서 "포함"이라는 용어는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 추가 또는/및 개재할 수 있음을 나타내도록 사용된다.

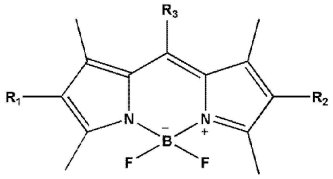
[0035] 본 명세서에서 "이들의 조합"이라는 용어는 기재된 구성요소들 하나 이상과의 혼합 또는 조합되는 것을 의미한

다.

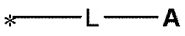
[0036] 본 명세서에서 "약학적으로 허용가능한 염"은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1 등으로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 화학식 1 등으로 표시되는 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔술폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들어, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 바이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트일 수 있다.

[0037] 일 구현예에 따른 화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

[0038] <화학식 1>

[0039] 

[0040] <화학식 2>

[0041] 

[0042] 상기 화학식 1에서,

[0043] R_1, R_2는 서로 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C1-C20 알킬기, $-SO_3^-$기, $-CO_3^-$기, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹, 또는 이들 조합일 수 있으며; 및

[0044] R_3은 치환 또는 비치환된 페닐기, 치환 또는 비치환된 피리미딜기, 또는 이들 조합일 수 있으며;

[0045] 상기 화학식 2에서,

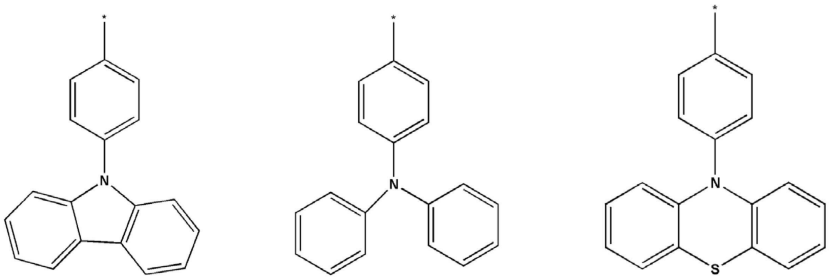
[0046] L은 비치환된 페닐렌기 또는 비치환된 피리미딜렌기일 수 있으며;

[0047] A는 C6-C20의 아릴기로 치환된 아민기, 치환 또는 비치환된 N, O, S 중 적어도 하나를 함유하는 C6-C30 헤테로아릴기, 또는 이들 조합일 수 있으며; 및

[0048] *는 이웃한 원자와의 결합 사이트일 수 있다.

[0049] 예를 들어, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹은 화학식 2-1 내지 2-3으로 표시되는 그룹을 포함할 수 있다:

[0050] <화학식 2-1> <화학식 2-2> <화학식 2-3>

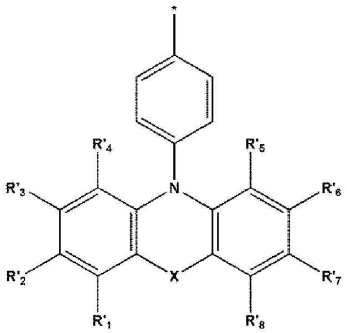
[0051] 

[0052] 상기 화학식 2-1 내지 2-3에서,

[0053] *는 이웃한 원자와의 결합 사이트일 수 있다.

[0054] 예를 들어, 상기 R_3은 하기 화학식 3으로 표시되는 그룹을 포함할 수 있다:

[0055] <화학식 3>

[0056] 

[0057] 상기 화학식 3에서,

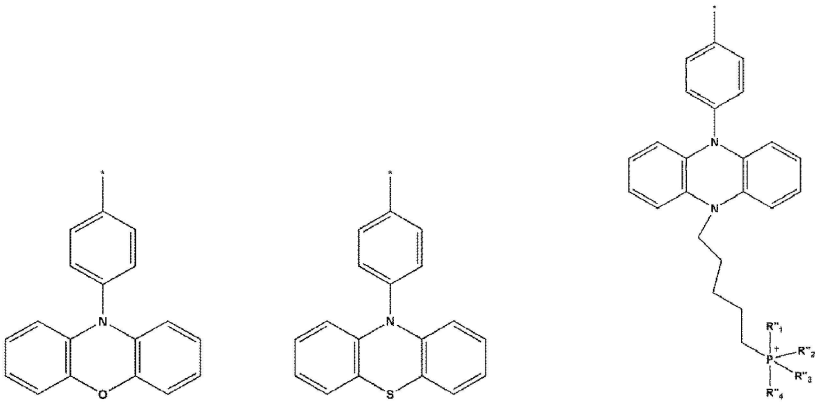
[0058] X는 N(R_a), O 또는 S일 수 있고, R_a는 수소 또는 치환 또는 비치환된 C1-C10의 알킬렌 포스포늄 양이온기일 수 있으며;

[0059] R'_1, R'_2, R'_3, R'_4, R'_5, R'_6, R'_7, R'_8은 서로 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 C1-C20의 알킬기, 또는 이들의 조합일 수 있으며; 및

[0060] *는 이웃한 원자와의 결합 사이트일 수 있다.

[0061] 예를 들어, 상기 R_3은 하기 3-1 내지 3-3으로 표시되는 그룹을 포함할 수 있다:

[0062] <화학식 3-1> <화학식 3-2> <화학식 3-3>

[0063] 

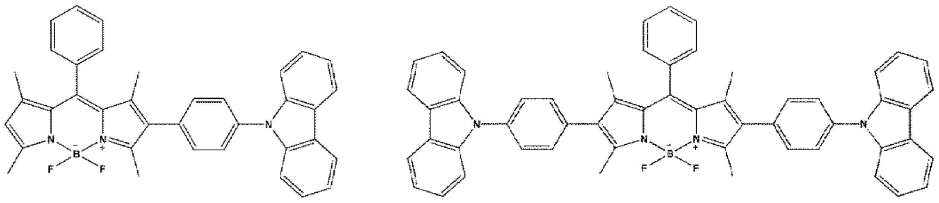
[0064] 상기 화학식 3-1 내지 3-3에서,

[0065] $R"_1$, $R"_2$, $R"_3$, $R"_4$는 서로 독립적으로 치환 또는 비치환된 C6-C20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C6-C20의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있으며; 및

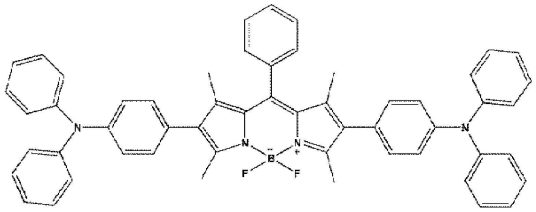
[0066] *는 이웃한 원자와의 결합 사이트일 수 있다.

[0067] 예를 들어, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1 내지 5를 포함할 수 있다:

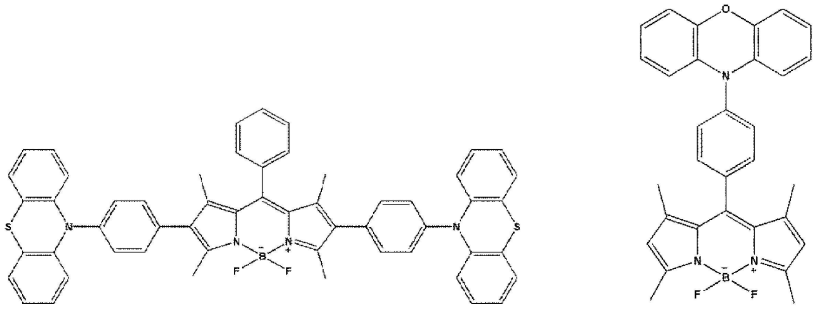
[0068] 화합물 1 화합물 2

[0069] 

[0070] 화합물 3

[0071] 

[0072] 화합물 4 화합물 5

[0073] 

[0074] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 보론 디피로메텐(BODIPY) 코어가 페닐 또는 피리미딜 링커에 의해 강한 전자 공여기의 도입을 갖는 구조로서 중원소를 도입하지 않은 화합물이다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 중원소, 예를 들어 Br, I 와 같은 할로겐 원소를 도입하지 않은 까닭에 독성, 비분해 및 비용 문제를 극복할 수 있어 생물학적 응용에 적합하다. 이에 의해, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 중원자를 도입하지 않은 광감각제이면서 바이오 이미징화제를 제공할 수 있다.

[0075] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 코어와 R_1 사이의 결합, 코어와 R_2 사이의 결합, 코어와 R_1 및 코어와 R_2 사이의 결합, 또는 코어와 R_3 사이의 결합이 트위스트된 결정 구조(twisted crystal conformation)를 가질 수 있다. 다르게 말하면, 보론 디피로메텐(BODIPY) 코어가 페닐 또는 피리미딜 링커 사이의 결합이 트위스트된 결정 구조를 가질 수 있다. 트위스트된 결정 구조를 갖는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 단결정 회절법을 이용한 후술하는 도 1a 및 도 1b에 의해 확인할 수 있다.

[0076] 다른 일 구현예에 따른 조성물은 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 또는 상기 조성물은 시료(sample)와 혼합될 수 있다. 상기 시료는 미생물(microorganism), 세포(cell), 및 조직(tissue) 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 생물학적 시료일 수 있으나, 반드시 이들로 한정되지 않으며 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[0077] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 가장 낮은 단일항 여기상태와 가장 낮은 삼중항 상태 사이의

에너지 갭(ΔE_{S1T1})은 1.00 eV 미만일 수 있다. 보론 디피로메텐(BODIPY)의 ΔE_{S1T1}은 1.00 eV인데 반해, 예를 들어, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 ΔE_{S1T1}은 0.92 eV 이하일 수 있거나 0.65 eV 이하일 수 있거나 0.63 eV 이하일 수 있거나 0.44 eV 이하일 수 있다. 이는 후술하는 도 2로부터 확인할 수 있다. 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 ΔE_{S1T1}이 낮은 이유는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 코어와 R_1 사이의 결합, 코어와 R_2 사이의 결합, 코어와 R_1 및 코어와 R_2 사이의 결합, 또는 코어와 R_3 사이의 결합, 즉 보론 디피로메텐(BODIPY) 코어가 페닐 또는 피리미딜 링커 사이의 결합이 트위스트된 결정 구조(twisted crystal conformation)를 가지기 때문이다.

[0078] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 수용액 또는 유기용액에서 단일항 산소(singlet oxygen)를 발생할 수 있다.

[0079] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 원적외선 또는 근적외선 파장 영역, 예를 들어 400 ~ 800 nm 파장 영역에서 분자 내 전하 이동에 의해 발광할 수 있다.

[0080] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 광감각제 및 바이오 이미징 프로브로 사용될 수 있다.

[0081] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 양친매성 고분자와 접합하여 마이셀을 형성할 수 있다. 상기 양친매성 고분자로서는, 예를 들어 플루로닉 F127 등을 이용할 수 있다. 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 후술하는 도 3에서 보이는 바와 같이, 양친매성 고분자가 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 캡슐화하는 매트릭스로 기능하여 마이셀을 형성할 수 있다.

[0082] 상기 마이셀의 평균직경(mean size)은 1 nm 내지 200 nm일 수 있다. 예를 들어, 상기 마이셀의 평균직경(mean size)은 5 nm 내지 190 nm일 수 있거나 10 nm 내지 180 nm일 수 있거나 20 nm 내지 170 nm일 수 있거나 30 nm 내지 150 nm일 수 있다.

[0083] 또다른 일 구현예에 따른 조성물은 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다. 상기 조성물은 *in vitro* 및 *in vivo* 모두에서 암 치료 및 바이오 이미징을 가능하게 한다.

[0084] 본 명세서에서, 치환기는 치환되지 않는 모그룹(mother group)에서 하나 이상의 수소가 다른 원자나 작용기를 교환됨에 의하여 유도된다. 다르게 기재하지 않으면, 어떠한 작용기가 "치환된"것으로 여겨질 때, 그것은 상기 작용기가 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 2 내지 40의 알케닐기, 탄소수 2 내지 40의 알키닐기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알킬기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알케닐기, 탄소수 7 내지 40의 아릴기에서 선택된 하나 이상의 치환기로 치환됨을 의미한다. 작용기가 "선택적으로 치환된다"고 기재되는 경우에, 상기 작용기가 상술한 치환기로 치환될 수 있다는 것을 의미한다.

[0085] 본 명세서에서, "탄소수 a 내지 b"의 a 및 b는 특정 작용기(group)의 탄소수를 의미한다. 즉, 상기 작용기는 a부터 b까지의 탄소원자를 포함할 수 있다. 예를 들어, "탄소수 1 내지 4의 알킬렌기"는 1 내지 4의 탄소를 가지는 알킬렌기, 즉, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-(CH_3)_2C-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ and $-(CH_3)_2C-$를 의미한다.

[0086] 본 명세서에서, 본 명세서에서, "알킬"이라는 용어는 분지된 또는 분지되지 않은 지방족 탄화수소를 의미한다. 일 구현예에서 알킬기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 알킬기는 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, 펜틸기, 헥실기, 시클로프로필기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 시클로헵틸기 등을 포함하나 반드시 이들로 한정되지 않으며, 이들 각각은 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 일 구현예에서 알킬기는 1 내지 6의 탄소원자를 가질 수 있다. 예를 들어, 탄소수 1 내지 6의 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소-부틸, sec-부틸, 펜틸, 3-펜틸, 헥실 등일 수 있으나 반드시 이들로 한정되지 않는다.

[0087] 본 명세서에서, "알케닐"이라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 의미한다. 알케닐기의 비제한적인 예로는 비닐, 알릴, 부테닐, 이소프로페닐, 또는 이소부테닐 등을 들 수 있다.

[0088] 본 명세서에서, "알키닐"이라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 말한다. 알키닐기의 비제한적인 예로는 에티닐, 부티닐, 이소부티닐, 이소프로피닐 등을 들 수 있다.

[0089] 본 명세서에서, "시클로알킬"이라는 용어는 1가 포화 탄화수소 모노시클릭을 의미한다. 시클로알킬기의 비제한적인 예로는 시클로프로필기, 시클로부틸기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 시클로헵틸기 등을 들 수 있다.

[0090] 본 명세서에서, "헤테로시클로알킬"이라는 용어는 N, O, Si, P 및 S 중에서 선택된 적어도 하나의 헤테로 원자를 고리-형성 원자로서 포함한 1가 모노시클릭을 의미한다. 헤테로시클로알킬기의 비제한적인 예로는 1,2,3,4-옥사트리아졸리디닐기(1,2,3,4-oxatriazolidinyl), 테트라히드로퓨라닐기(tetrahydrofuranyl), 테트라히드로티오페닐기 등을 들 수 있다.

[0091] 본 명세서에서, "시클로알케닐"이라는 용어는 1가 모노시클릭으로서, 고리 내에 적어도 하나의 이중 결합을 가지거나, 방향족성(aromaticity)을 갖지 않는 것을 의미한다. 시클로알케닐기의 비제한적인 예로는 시클로펜테닐기, 시클로헥세닐기, 시클로헵테닐기 등을 들 수 있다.

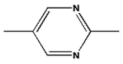
[0092] 본 명세서에서, "헤테로시클로알케닐"이라는 용어는 N, O, Si, P 및 S 중에서 선택된 적어도 하나의 헤테로 원자를 고리-형성 원자로서 포함한 1가 모노시클릭으로서, 고리 내에 적어도 하나의 이중결합을 갖는 것을 의미한다. 헤테로시클로알케닐기의 비제한적인 예로는, 4,5-디히드로-1,2,3,4-옥사트리아졸일기, 2,3-디히드로퓨라닐기, 2,3-디히드로티오페닐기 등을 들 수 있다.

[0093] 본 명세서에서, "아릴"라는 용어는 고리 골격이 오직 탄소만을 포함하는 방향족 고리, 고리 시스템(즉, 2개의 인접하는 탄소 원자들을 공유하는 2 이상의 융합된(fused) 고리), 또는 복수의 방향족 고리가 단일결합, -O-, -S-, -C(=O)-, $-S(=O)_2-$, $-Si(R_a)(R_b)-$(R_a 및 R_b는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로겐으로 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 또는 -C(=O)-NH-에 의하여 서로 연결된 고리를 의미한다. 아릴기가 고리 시스템이면, 상기 시스템에서 각각의 고리는 방향족이다. 예를 들어, 아릴기는 페닐기, 비페닐기, 나프틸기, 페날트레닐기(phenanthrenyl), 나프타세닐기(naphthacenyl) 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0094] 본 명세서에서, "헤테로아릴"이라는 용어는 N, O, P 또는 S 중에서 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 나머지 고리원자가 탄소인 모노시클릭(monocyclic) 또는 바이시클릭(bicyclic) 유기 화합물을 의미한다. 상기 헤테로아릴기는 예를 들어 1-5개의 헤테로원자를 포함할 수 있고, 5-10 고리 멤버(ring member)를 포함할 수 있다. 상기 S 또는 N은 산화되어 여러가지 산화 상태를 가질 수 있다.

[0095] "헤테로아릴"의 비제한적인 예로는, 티에닐, 푸릴, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 1,2,3-옥사디아졸릴, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴, 1,3,4-옥사디아졸릴기, 1,2,3-티아디아졸릴, 1,2,4-티아디아졸릴, 1,2,5-티아디아졸릴, 1,3,4-티아디아졸릴, 이소티아졸-3-일, 이소티아졸-4-일, 이소티아졸-5-일, 옥사졸-2-일, 옥사졸-4-일, 옥사졸-5-일, 이소옥사졸-3-일, 이소옥사졸-4-일, 이소옥사졸-5-일, 1,2,4-트리아졸-3-일, 1,2,4-트리아졸-5-일, 1,2,3-트리아졸-4-일, 1,2,3-트리아졸-5-일, 테트라졸릴, 피리드-2-일, 피리드-3-일, 2-피라진-2일, 피라진-4-일, 피라진-5-일, 2- 피리미딘-2-일, 4- 피리미딘-2-일, 또는 5-피리미딘-2-일 등을 들 수 있다.

[0096] 본 명세서에서, "페닐렌"이라는 용어는 $-C_6H_4-$로 페닐 양단의 탄소원자에서 수소원자가 하나씩 빠진 형태를 의미한다.

[0097] 본 명세서에서, "피리미딜렌"이라는 용어는  으로 피리미딜 양단의 탄소원자에서 수소원자가 하나씩 빠진 형태를 의미한다.

[0098] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일 실시예일뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0099] [실시예]

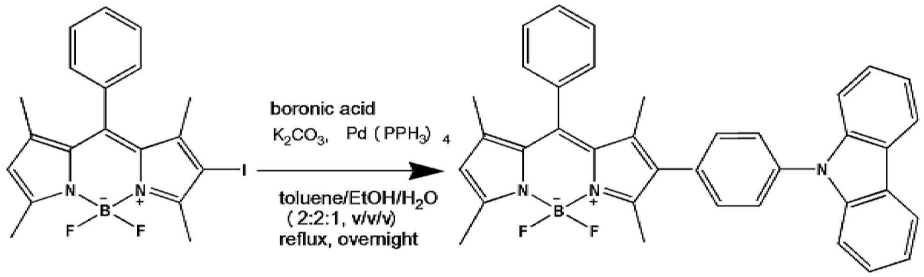
[0100] 모든 작업은 표준 Schlenk 기술을 사용하여 불활성 질소분위기 하에서 수행되었다. 무수 용매는 Aldrich사로부터 구입하였다. 분광 광도계 용매는 Daejung사에서 구매하여 받은 그대로 사용하였다. 상용 시약은 구매 후 추가 정제 없이 사용하였다. BDP-I_1, BDP-I_2, 10-(4-(4,4,5,5- 테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)-10H-페노티아진, BDP-2 및 BDP-3은 *J. Org. Chem.* 2012, *77*, 6166-6178, *Chem. Asian J.* 2017, *12*, 2278-2283, *Anal. Chem.* 2019, *91*, 3467-3474, 및 *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, *10*, 14956-14965에 기재된 방법에 따라 각각 합성하였다. NMR 측정 샘플은 케임브리지 동위원소 실험실의 중수소화된 용매를 사용하여

준비하였다. NMR 스펙트럼은 주변온도에서 Bruker AM 300(^{1}H의 경우 300.13 MHz, ^{13}C의 경우 75.48 MHz) 분광계로 기록하였다. 화학적 시프트(shifts)는 외부 Me_4Si(^{1}H, ^{13}C)를 기준으로 ppm단위로 측정되었다. Korea Basic Science Institute(대구)에서 FAB(fast atom bombardment) 질량스펙트럼을 얻기 위해 Jeol JMS 700 고해상도 질량분석기를 사용하였다. 동적 광산란(DLS)은 Nano-ZS (Malvern)를 사용하여 측정하였다. TEM 이미지는 200 kV에서 작동하는 JEOL-2100F 전자현미경으로 확보하였다.

[0101] **합성예 1: BDP-1 화합물**

[0102] BDP-I (0.30 g, 0.67 mmol), 4-(9H-카르바졸-9-일)페닐보론산 (0.29 g, 1.01 mmol), K_2CO_3 (0.93 g, 6.70 mmol) 및 $Pd(PPh_3)_4$ (0.04 mg, 0.03 mmol)을 톨루엔/에탄올/물 (30 mL, v/v/v = 2:2:1)의 혼합용매에 용해하여 혼합물을 수득하였다. 상기 혼합물을 질소 분위기하에 18시간 동안 환류하였다. 그 후, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후 DCM(dichloromethane, 20 mL x 3)으로 추출하였다. 유기층을 Mg_2SO_4상에서 건조하였다. 용매를 감압 하에 증발시키고, 잔류물을 용리액으로서 n- 헥산/DCM (2:1, v/v)을 사용하여 실리카 겔상에서 컬럼 크로마토 그래피로 정제 하였다. 진공에서 건조시켜 BDP-1 분말 (0.30 g, 79 %)을 수득하였다. DCM/ n- 헥산 용액을 천천히 증발시켜 X-선 구조 결정에 적합한 단결정을 수득하였다 (반응스킴 1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 8.18 (dt, J =7.8, 1.1 Hz, 2H), 7.63-7.30 (m, 15H), 6.06 (s, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 1.44 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 156.3, 153.4, 143.8, 142.1, 140.8, 139.0, 136.5, 135.2, 132.9, 132.6, 132.0, 131.6, 131.0, 129.3, 129.1, 128.0, 126.8, 125.9, 123.4, 121.7, 120.3, 120.0, 109.8 (Ar-*C*), 14.7, 14.5, 13.5, 12.8. FAB-MS calcd for $C_{37}H_{30}BF_2N_3$ $[M]^+$, 656.2501; found, 656.2499.

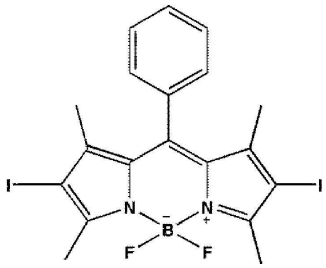
[0103] <반응스킴 1>

[0104] 

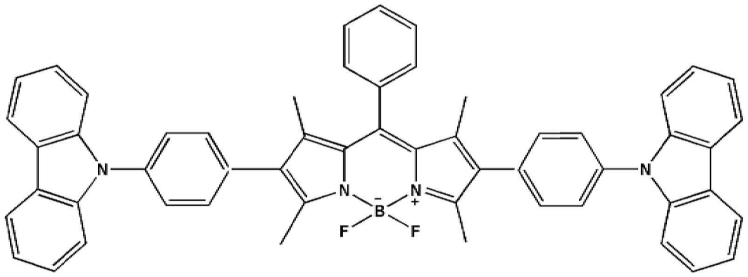
[0105] $BDP\text{-}I_1$ BDP-1 (화합물 1)

[0106] **합성예 2: BDP-2 화합물**

[0107] $BDP\text{-}I_1$ (0.30 g, 0.67 mmol) 대신 하기 $BDP\text{-}I_2$ (0.15 g, 0.26 mmol)를 사용한 것을 제외하고는, 합성예 1과 동일한 방법을 수행하여 BDP-2 분말을 수득하였다.

[0108] 

[0109] $BDP\text{-}I_2$

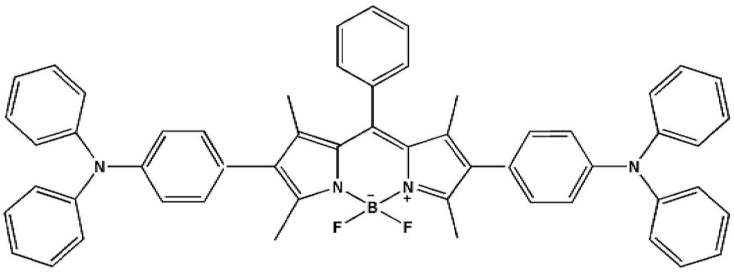


[0110]

[0111] BDP-2(화합물 2)

[0112] **합성예 3: BDP-3 화합물**

[0113] BDP-I_1 (0.30 g, 0.67 mmol) 대신 상기 BDP-I_2 (0.15 g, 0.26 mmol)과 4-(9H-카르바졸-9-일)페닐보론산 (0.29 g, 1.01 mmol) 대신 4-디페닐아미노페닐보론산(0.29 g, 1.01 mmol)를 사용한 것을 제외하고는, 합성예 1과 동일한 방법을 수행하여 BDP-3 분말을 수득하였다.

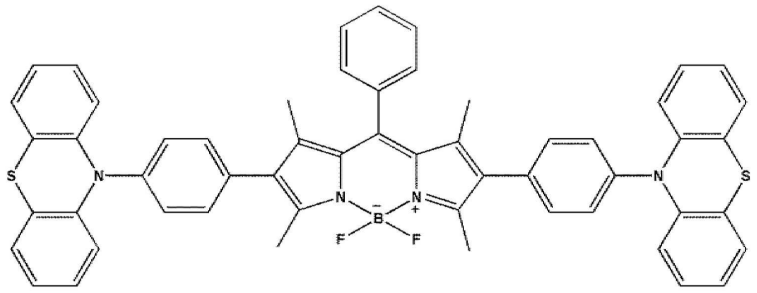


[0114]

[0115] BDP-3(화합물 3)

[0116] **합성예 4: BDP-4 화합물**

[0117] BDP-I_1 (0.30 g, 0.67 mmol) 대신 상기 BDP-I_2 (0.15 g, 0.26 mmol)과 4-(9H-카르바졸-9-일)페닐보론산 (0.29 g, 1.01 mmol) 대신 10-(4-(4-(4, 4, 5, 5-테트라메틸-1, 3, 2-디옥사보롤란)을 사용하여 ACN/CH_2Cl_2 용액 (0.12 g, 55 %)을 천천히 증발시킨 것을 제외하고는, 합성예 1과 동일한 방법을 수행하여 BDP-4 분말을 수득하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.56-7.52 (m, 3H), 7.45-7.36 (m, 10H), 7.07 (dd, J = 7.2, 1.9 Hz, 4H), 6.97-6.79 (m, 8H), 6.32 (dd, J = 5.9, 1.6 Hz, 4H), 2.68 (s, 6H), 1.43 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 154.2, 144. 1, 142.5, 140.1, 139.5, 135.3, 134.3, 133.3, 132.9, 132.4, 130.0, 129.3, 129.2, 128.0, 126.9, 122.7, 121.1, 116.6, 111.0 (Ar-*C*), 13.6, 13.0. FAB-MS calcd for $C_{55}H_{41}BF_2N_4S_2$ $[M]^+$, 870.2834; found, 870.2904.



[0118]

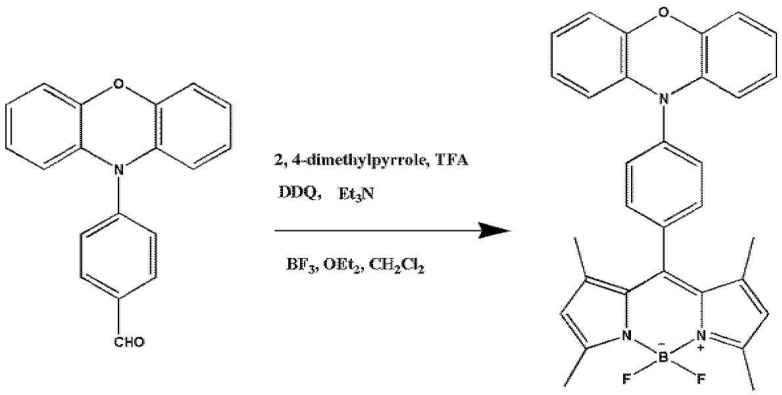
[0119] BDP-4(화합물 4)

[0120] **합성예 5: BDP-5 화합물**

[0121] 2,4-디메틸피롤 (0.46 g, 4.88 mmol) 및 10-(4-포밀페닐)페녹사진 (0.70 g, 2.44 mmol)을 N_2 분위기 하에 CH_2Cl_2 (200 mL)에 용해하였다. 트리플루오로아세트산(TFA) 한 방울을 첨가하고 용액을 실온에서 2 시간 동안 교

반하였다. 50 mL CH_2Cl_2에 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논 (DDQ) (0.55 g, 2.44 mmol)의 용액을 첨가하고, 1 시간 동안 교반 한 후 Et_3N (3.4 mL, 2.465 g, 24.39 mmol) 및 BF_3OEt_2 (2.4 mL, 2.766 g, 19.508 mmol)를 첨가하였다. 30 분 후, 반응 혼합물을 CH_2Cl_2로 추출하였고 유기층을 무수 Na_2SO_4로 건조하였다. 용매를 감압 하에서 증발시켜 조 생성물을 수득하였으며, 이를 용리제로서 디클로로메탄/헥산 (1:1, v/v)을 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피로 정제하여 BDP-5 (0.12 g, 66 %)를 수득하였다. CH_2Cl_2/n-헥산 용액을 천천히 증발시켜 X-선 구조 결정에 적합한 단결정을 수득하였다(반응스킴 2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 7.57-7.48 (m, 4H), 6.71-6.62 (m, 6H), 6.05 (s, 2H), 5.91 (s,br, 2H), 2.59 (s, 6H), 1.56 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 156.0, 144.0, 142.6, 140.5, 139.6, 135.4, 133.9, 132.0, 131.2, 131.1, 123.3, 121.7, 121.6, 115.7, 112.9 (Ar-*C*), 14.7, 14.6. FAB-MS calcd for $C_{31}H_{26}BF_2N_3O$ $[M]^+$, 505.2137; found, 505.2143.

[0122] <반응스킴 2>



[0123]

[0124] BDP-5(화합물 5)

[0125] **분석예 1: X선 결정 분석**

[0126] 합성예 1 및 합성예 5에 의해 얻은 BDP-1(화합물 1)과 BDP-5(화합물 5)의 결정 구조를 분석하기 위해 단결정 회절법을 이용하여 도 1a 및 도 1b에 각각 나타내었다.

[0127] 단결정 회절법을 이용한 결정 구조의 분석방법은 다음과 같다.

[0128] 합성예 1 및 합성예 5에 의해 얻은 BDP-1(화합물 1)과 BDP-5(화합물 5)의 적색 블록 결정/노란색 블록 결정을 파라톤 오일로 찾았다. 각각의 결정을 흑연-단색화 Mo Kα(λ = 0.71073 Å) 방사원 및 질소 냉각 스트림 (-50 ℃)이 장착된 Bruker D8 Venture PHOTON 100 CMOS 회절계에 장착하였다. SMART APEX2 (Bruker, 2012) 및 SAINT (Bruker, 2012)를 사용하여 데이터 수집 및 통합을 수행하였고 SADABS에서 구현된 다중 스캔법으로 흡수 보정을 수행하였다. 구조는 직접법에 의해 얻었고 SHELXTL을 사용하여 F^2에 대한 비희소 행렬 최소 제곱에 의해 개선하였다. 모든 비수소 원자는 이방성이었고, 수소 원자는 기하학적으로 이상적인 위치에 추가하였다. 각각의 무질서한 용매분자는 더 나은 구조개선을 위해 PLATON SQUEEZE 프로그램을 사용하여 처리하였다. 전체 잠재적 용매 접근성 공극의 부피는 166 Å^3(10.6 %의 단위셀 부피)이다. 공극 내에서 추정된 전자의 수는 단위셀 당 42 개의 전자이다.

[0129] 도 1a를 참조하면, 합성예 1에 의해 얻은 BDP-1(화합물 1)은 코어의 2- 위치에 카르바졸이 약 53.5° 트위스트된 결정 구조임을 확인할 수 있다. 도 1b를 참조하면, 합성예 2에 의해 얻은 BDP-5(화합물 5)는 코어의 8- 위치에 페녹사진이 약 90° 트위스트된 결정 구조임을 확인할 수 있다.

[0130] **분석예 2: 동적 광산란 및 TEM 사진**

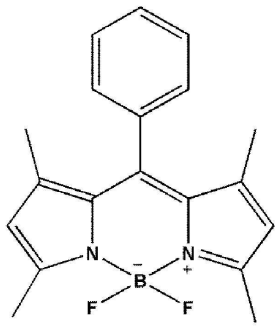
[0131] 합성예 5에 의해 얻은 BDP-5(화합물 5, 1mg) 및 플루로닉 F127 (10mg)을 1mL THF에 용해하였다. 상기 유기용액을 10mL 증류수에 적하하였고, 마이크로팁이 장착된 프로브 초음파기로 초음파 처리하였다(3분 동안 40 % 진폭). THF의 증발을 위해 혼합물 용액을 밤새 교반하였다. 추가 사용을 위해 220 nm 시린지 필터를 통해 여과하

여 최종 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자를 수득하였다. 상기 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자에 대하여 동적 광산란 장치(Nano-ZS, Malvern)를 이용하여 입경을 측정하였고 TEM 이미지 실험(200 kV, JEOL-2100F)을 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0132] 도 4를 참조하면, 상기 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자의 평균입경이 약 40 nm이고 구에 가까운 형상을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0133] **분석예 3: 자외선 가시광 흡수 및 광발광 스펙트럼**

[0134] 하기 BDP 화합물 및 합성예 1~5에 의해 얻은 BDP-1(화합물 1), BDP-2(화합물 2), BDP-3(화합물 3), BDP-4(화합물 4), 및 BDP-5(화합물 5)에 대하여 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 광발광(PL) 스펙트럼 분석을 수행하여 도 5a 및 5b에 각각 나타내었다.

[0135] 

[0136] BDP

[0137] 상기 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 광발광(PL) 스펙트럼은 thermo scientific evolution 201 UV/vis 분광계 및 FS-2 분광 광도계(Scinco)로 기록하였다. 희석한 샘플액(통상 5 μM)을 주변조건에서 저장액(1.0 mM)으로부터 준비하였다. 상기 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 광발광(PL) 스펙트럼은 1 cm 석영 큐벳을 사용하여 유기용액 (5 μM)으로부터 얻었다.

[0138] 도 5a 및 도 5b를 참조하면, 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 광발광(PL) 스펙트럼에서 합성예 1~5에 의해 얻은 BDP-1(화합물 1), BDP-2(화합물 2), BDP-3(화합물 3), BDP-4(화합물 4), 및 BDP-5(화합물 5)은 BDP 화합물과 비교하여 모두 오른쪽으로 시프트(적색 편이) 되었음을 확인할 수 있다.

[0139] 0, 70, 80, 90, 99 부피%의 물의 체적분율(f_w)에서 THF/물 혼합용매 중에 상기 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플액 10 μM에 대하여 광발광(PL) 스펙트럼 분석을 수행하여 도 6에 나타내었다.

[0140] 도 6을 참조하면, 상기 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플액은 광발광(PL) 스펙트럼에서 물의 체적분율이 높아질수록 광발광(PL) 피크강도가 세짐을 확인할 수 있다. 이로부터, 상기 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자의 광발광(PL) 피크강도는 분자 내 회전이 제한되는 것에 영향받음과 트위스트된 결정 구조는 근적외선 영역으로의 적색 편이 및 응집성 소광(aggregation caused quenching; ACQ)를 최소화하는데 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

[0141] 상기 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플 수용액 5 μM에 대하여 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 광발광(PL) 스펙트럼 분석을 수행하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0142] 도 7을 참조하면, 상기 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플액은 물에서 강한 흡수 피크($ë_{abs}$=~500 nm) 및 밝은 원적외선/근적외선을 방출 (λ_{em} = ~ 686nm)함을 확인할 수 있다.

[0143] 상기 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플 수용액 30 μM에 대한 ROS 검출을 모니터하기 위해 2,7-디클로로플루오레세인 디아세테이트(2,7-dichlorofluorescin diacetate; DCFH-DA)를 프로브로 이용하여 광발광(PL) 스펙트럼 분석을 수행하여 도 8에 나타내었다.

[0144] 상기 샘플에 대하여 20 mW/cm^2 녹색 LED 광원을 0, 3, 6, 9, 12, 15분 동안 각각 조사하였다. 상기 광원에 의한 조사 후에 상기 샘플에 대하여 504 nm에서 여기되고 400-800nm에서 측정하여 광발광(PL) 스펙트럼 분석을 수행하였다.

[0145] 도 8을 참조하면, 상기 캡슐화된 BDP-5(화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플액은 광 조사 시간이 길어질수록 우수

한 활성산소종(ROS) 생성 능력을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0146] **분석예 4: 세포 생존율 및 *In vitro* 세포 이미징**

[0147] (1) 세포 생존력(%) 분석

[0148] HeLa 세포를 2 시간 동안 0, 0.04, 0.16, 0.63, 2.5, 10.0 μM 농도로 각각 상기 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플과 함께 배양하였다. DPBS로 세척한 후, 세포에 녹색 LED (20 mW/cm^2, 20 분)를 조사하고 24 시간 더 배양하였다. 대조군은 세포 배양배지에서만 배양되었다. 세포 생존력은 MTT 분석에 의해 수행하여 도 9(a)에 나타내었다.

[0149] 도 9(a)를 참조하면, 20 mW/cm^2의 낮은 강도의 녹색광에 노출된 후, 반-최고치 억제농도(half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})가 약 0.40 μM로 낮고 용량의존성 세포독성을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0150] HeLa 세포를 2 시간 동안 상기 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플 10 μM와 함께 배양하고 녹색 LED (20 mW/cm^2, 20분)로 조사한 후, 2 μM 칼세인 (Calcein, live cell marker) AM 및 4 μM 프로피듐 요오드화물(propidium iodide; PI, dead cell marker)로 30분 동안 함께 염색하였다.. DPBS로 세척한 후, 공초점 현미경 (Ofompus Fluoview FV1200)에 의해 형광 이미지를 얻어 도 9(b), (c)에 나타내었다.

[0151] HeLa 세포를 2시간 동안 상기 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플 10μM와 함께 배양하고 2 ', 7'- 디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트 (DCFH-DA, 10μM)/디히드로에티듐 (DHE, 10μM)으로 30 분 동안 처리하였다. DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline; DPBS, Gibco사 제조)로 세척한 후, 세포에 녹색 LED (20 mW/cm^2, 20분)를 조사하고 공초점 현미경 (Olympus Fluoview FV1200)에 의해 형광이미지를 얻어 도 9(d)에 나타내었다.

[0152] 도 9(b), (c)를 참조하면, 암세포에 대한 BDP-5 (화합물 5) 나노입자의 우수한 광세포 독성은 살아있는 세포 마커 및 죽은 세포 마커를 사용하는 공초점 형광 영상화에 의해 확인할 수 있다. 도 9(d)를 참조하면, HeLa 세포 내에서 BDP-5 (화합물 5) 나노입자에 의해 유도된 세포 내 높은 ROS 생성 효율을 확인할 수 있다.

[0153] **분석예 5: *In vivo* 세포 이미징**

[0154] 5 주령 암컷 BALB/c nu/nu 누드 마우스의 뒷면에 피하 주사로 약 2 X 10^6 HeLa 세포를 접종하였다. 종양이 대략 100 mm^3에 도달하면, 마우스를 상기 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플로 처리할 BDP-5 처리군과 대조군 (각각 n = 5) 두 그룹으로 무작위로 나누었다. 처리군에는 100 ㎕의 300 M BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 종양에 주사되었고 대조군에는 정상 식염수가 종양에 직접 주입되었다. 주사 후 24시간 후에, 동물 광학 이미징 시스템(IVIS, Caliper Life Sciences)을 사용하여 *in vivo* 형광 이미지를 캡처하였다. 상기 샘플들을 473 nm에서 여기하고 730 nm에서 모니터링하여 도 10(a)에 나타내었다.

[0155] 도 10(a)를 참조하면, BDP-5 처리군은 대조군과 비교하여 종양 크기가 확연히 줄어들었음을 확인할 수 있다.

[0156] 4 주령 암컷 BALB/c nu/nu 누드 마우스 10 마리를 오리엔트 바이오(주)에서 구입하였다. 상기 마우스에 Matrigel (50 μL의 세포 현탁액+ 50 μL의 Matrigel; 356234, BD Biosciences)과 혼합한 2x10^6 HeLa 세포를 뒷면에 피하 주사하여 접종하였다. 종양이 대략 100 mm^3에 도달하면, 마우스를 2 개의 그룹, 상기 분석예 2의 캡슐화된 BDP-5 (화합물 5) 나노입자가 함유된 샘플로 처리한 BDP-5 처리군 및 대조군(각각 n = 5)으로 무작위로 나누었다. 이어서, 마취되지 않은 마우스를 주입 부위에서 20 분 동안 1 cm의 거리로 녹색 LED (520 nm, 20 mW/cm2)에 노출시켰다. 녹색 LED에 노출시킨 후, 동물을 3 일 동안 자체 케이지에 보관한 후 분석에 사용하여 도 10(b)에 나타내었다.

[0157] 도 10(b)를 참조하면, BDP-5 처리군은 대조군과 비교하여 괴사성 병변(necrotic lesions)을 나타냄을 확인할 수 있다.

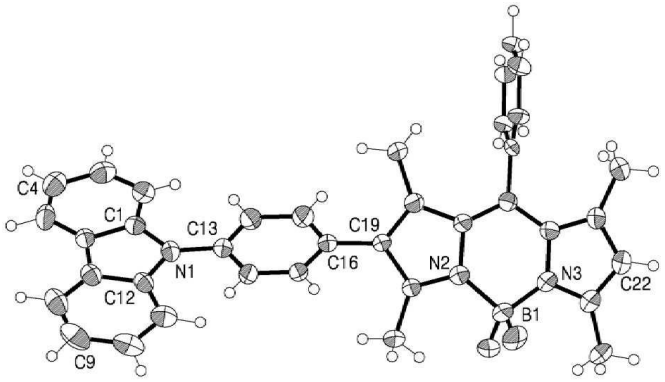
[0158] BDP-5 처리 또는 생리 식염수를 주사하고 3일 후, 모든 동물을 CO_2 챔버 내에서 희생시켰다. 종양을 절제하고 10 % 중화된 포스페이트 완충 포르말린으로 고정한 다음 파라핀에 임베딩하였다. 조직을 5 ㎛ 두께의 섹션으로 절단하였다. 상기 섹션을 슬라이드에 장착하고, 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin, H & E)으로 염색 및 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제-매개 dUTP 닉-엔드 라벨링 (terminal deoxynucleotidyl transferase-

mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)으로 분석하였다(click-iT® Plus TUNEL Assay, Life Technologies). TUNEL-양성 세포(적색)는 DAPI-양성 일반 세포 (청색)에 대한 세포사멸 세포(apoptotic cells)로서 특성화되었다. TUNEL-양성 세포의 수를 계산하기 위해 각각의 마우스에서 3 개의 무작위로 선택된 X400 고전력 현미경 필드 (HPF)를 검사하여 도 10(c)에 나타내었다.

[0159] 도 10(c)를 참조하면, BDP-5 처리군은 대조군과 비교하여 우수한 종양치료 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.

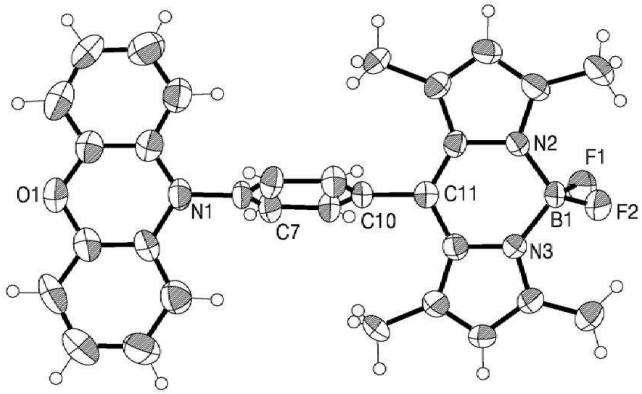
도면

도면1a



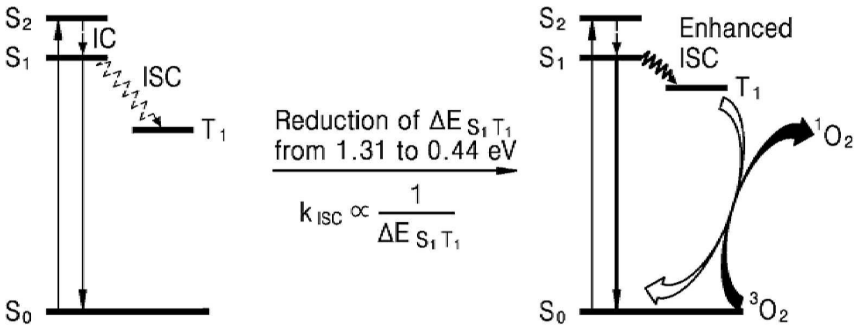
BDP-1
(화합물 1)

도면1b

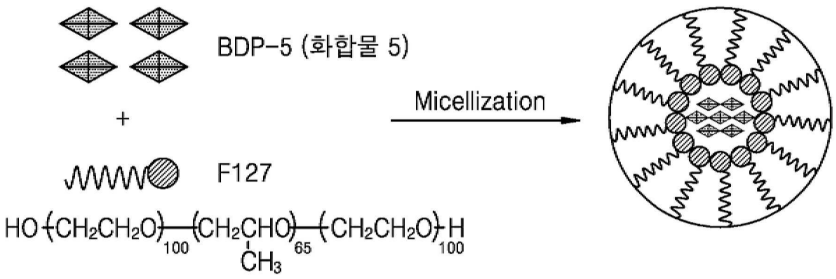


BDP-5
(화합물 5)

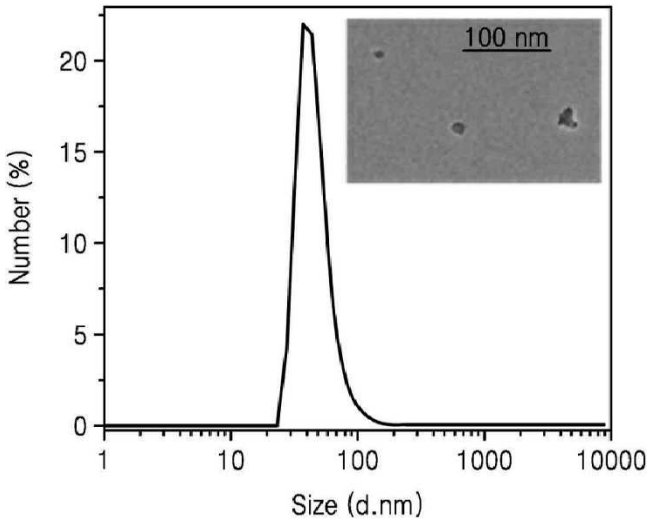
도면2



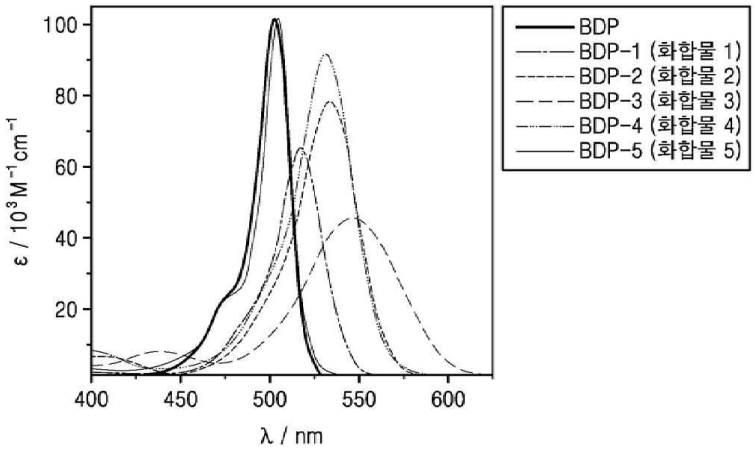
도면3


BDP-5 (화합물 5)
Micellization
F127
HO(CH2CH2O)100(CH2CHO)65(CH2CH2O)100H
CH3

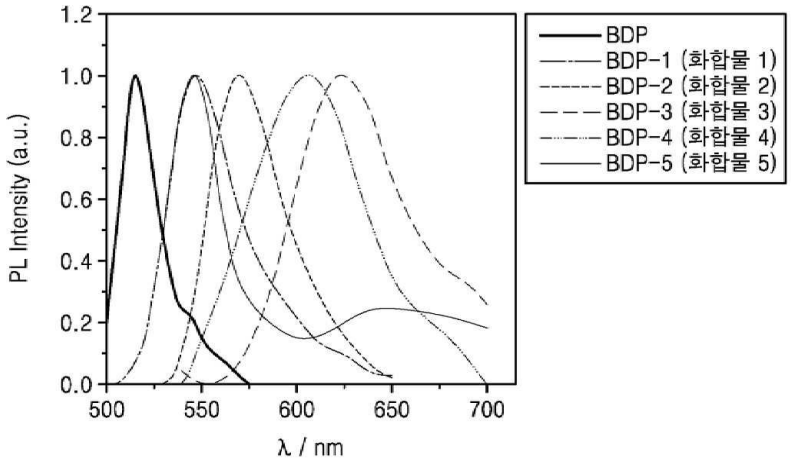
도면4


100 nm
Number (%)
Size (d.nm)
0
5
10
15
20
1
10
100
1000
10000

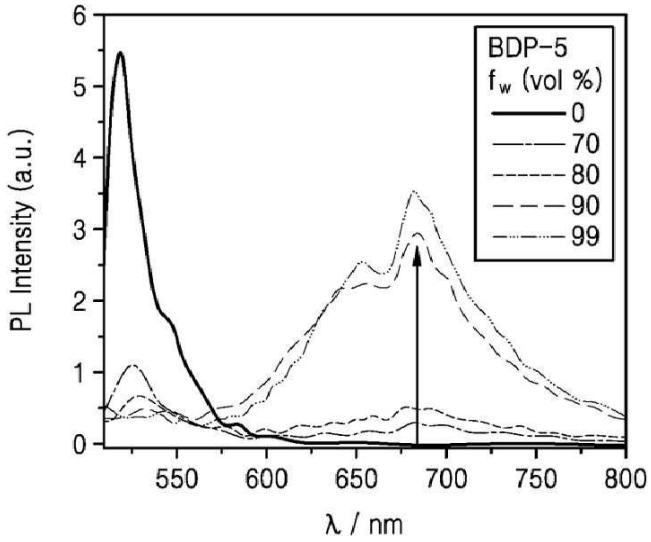
도면5a


BDP
BDP-1 (화합물 1)
BDP-2 (화합물 2)
BDP-3 (화합물 3)
BDP-4 (화합물 4)
BDP-5 (화합물 5)
ε / 10³M⁻¹cm⁻¹
λ / nm
20
40
60
80
100
400
450
500
550
600

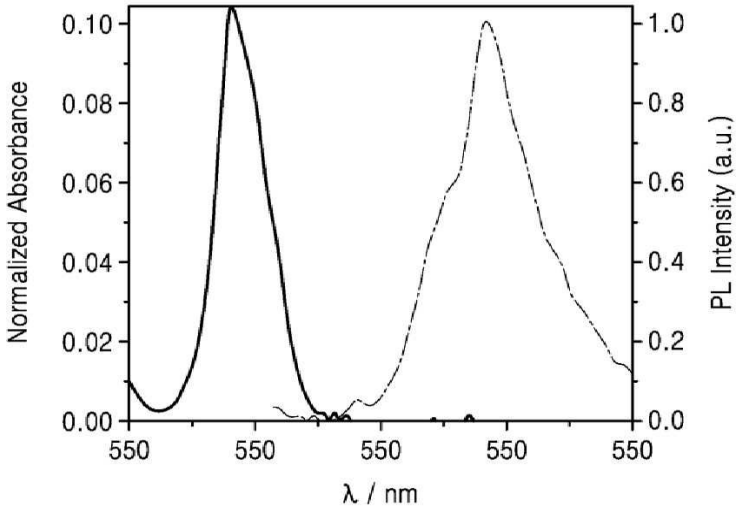
도면5b


BDP
BDP-1 (화합물 1)
BDP-2 (화합물 2)
BDP-3 (화합물 3)
BDP-4 (화합물 4)
BDP-5 (화합물 5)
PL Intensity (a.u.)
λ / nm

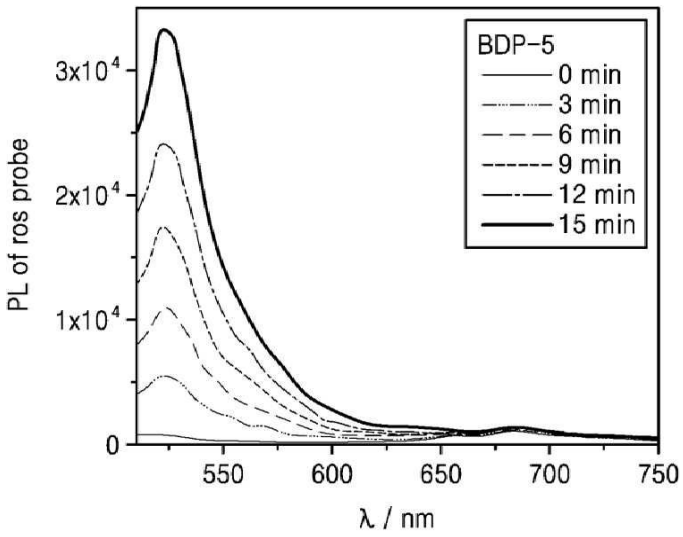
도면6


BDP-5
f_w (vol %)
0
70
80
90
99
PL Intensity (a.u.)
λ / nm

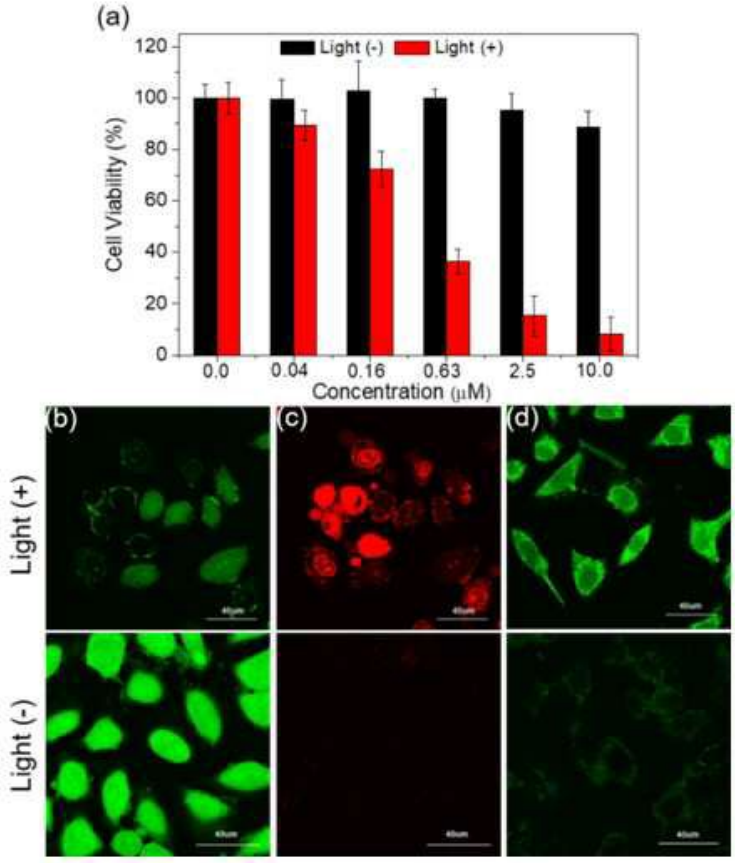
도면7


Normalized Absorbance
PL Intensity (a.u.)
λ / nm

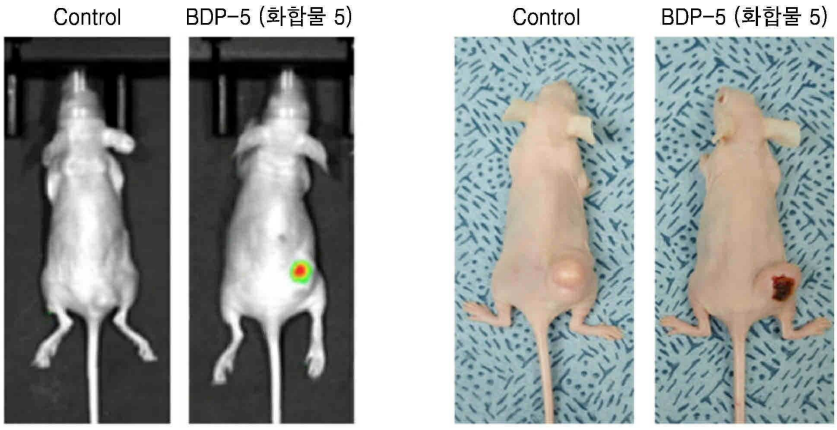
도면8


BDP-5
0 min
3 min
6 min
9 min
12 min
15 min
PL of ros probe
3x10^4
2x10^4
1x10^4
0
550
600
650
700
750
λ / nm

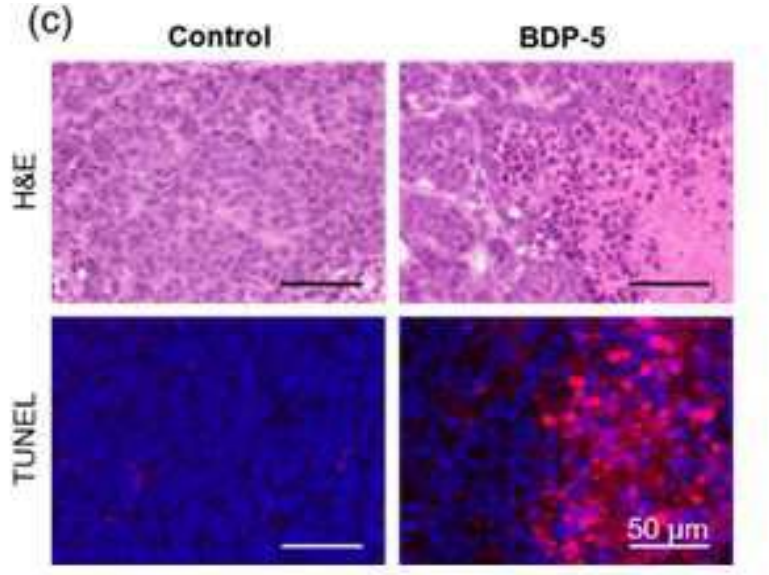
도면9


(a)
Light (-)
Light (+)
Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0.0
0.04
0.16
0.63
2.5
10.0
Concentration (μM)
(b)
(c)
(d)
Light (+)
Light (-)

도면10


Control
BDP-5 (화합물 5)
Control
BDP-5 (화합물 5)

도면11


(C)
Control
BDP-5
H&E
TUNEL
50 μm