(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0074629
(43) 공개일자 2022년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/54 (2006.01) *A61K 31/662* (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 9/5442 (2013.01)
A61K 31/662 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0163342
(22) 출원일자 2020년11월27일
심사청구일자 2020년11월27일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호(서빙고동, 신동아아파트)
정지원
부산광역시 동래구 중앙대로1473번길 13, 103동 4503호(온천동, 벽산아스타)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

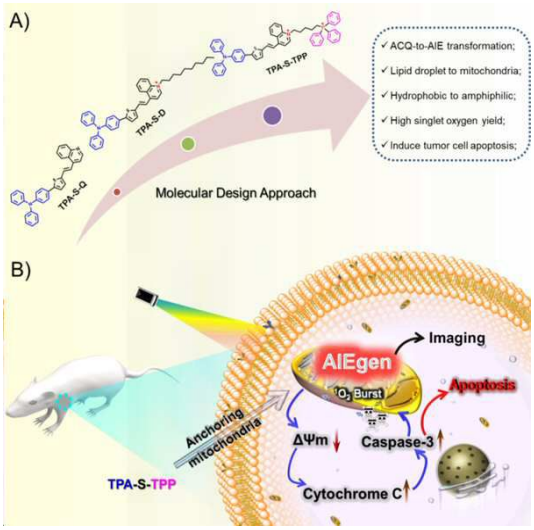
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **응집-유도 방출 특성을 갖는 화합물 및 이의 용도**

(57) 요 약

응집-유도 방출 특성을 갖는 화합물 및 이의 용도에 관한 것이다. 일 양상에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 미토콘드리아에 도달하기 전까지 형광을 띄지 않고, 지방질과 같은 친유성 부위에 축적되지 않을 뿐만 아니라, 근적외선 파장 영역에서의 응집-유도 특성에 기인하여 배경형광 대비 효율이 현저히 높다. 이를 통해, 암세포를 효과적으로 표적할 수 있어 독성이나 부작용 없이 효율적인 암 치료 효과를 달성하면서도, 광안정성이 높고 미토콘드리아 막 전위 변화에 영향을 받지 않아 기존의 형광염료보다 우수한 특성을 갖는다. 따라서, 일 측면에 따른 화합물은 형광 이미징, 광역학 진단 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도36



(52) CPC특허분류
A61K 49/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 39/06 (2018.01)
(72) 발명자
리 하이동
서울특별시 서대문구 봉원사2길 34(봉원동)

김경미
서울특별시 강서구 강서로18길 71, 1층(화곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113737
과제번호	2012R1A3A2048814
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	다차원 유기소재 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

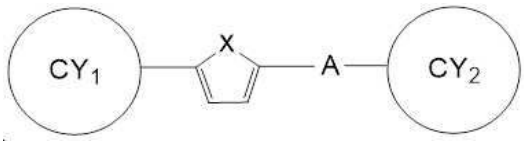
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:

<화학식 1>



상기 화학식 1에서,

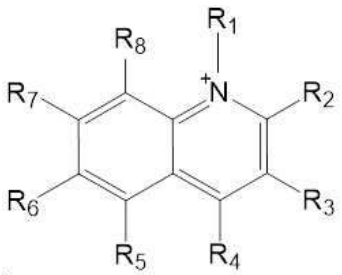
X는 O, S 또는 N이고,

A는 치환 또는 비치환된 C1-C4의 알킬기 또는 치환 또는 비치환된 C2-C4의 알케닐기이고,

CY_1은 C6-C20의 아릴 아민기이고,

CY_2는 하기 화학식 2로 표시되는 헤테로아릴기의 양이온이다.

<화학식 2>



상기 화학식 2에서,

R_1은 C1-C10의 알킬 포스포늄 양이온이고, 상기 포스포늄 양이온은 치환 또는 비치환된 C6-C20의 아릴기로 치환된 것이고,

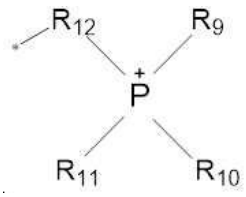
R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 C1-C4의 알킬기 또는 이들의 조합이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 화학식 2의 R_1은 하기 화학식 3으로 표시되는 C1-C10의 알킬 포스포늄 양이온인 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

<화학식 3>



상기 화학식 3에서,

R_9, R_{10} 및 R_{11}은 각각 독립적으로, 치환 또는 비치환된 C6-C20의 아릴기이고,

R_{12}는 치환 또는 비치환된 C1-C10의 알킬기이고,

*는 상기 화학식 2의 질소(N) 원소와 연결되는 부위이다.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 X는 S인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 CY_1은 트리페닐아민(Triphenylamine: TPA)인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

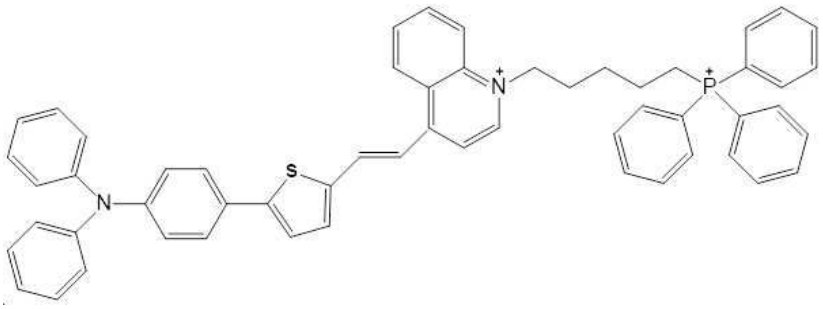
상기 A는 비닐(vinyl)기이고, 상기 CY_2는 C1-C10의 알킬 포스포늄 양이온으로 치환된 퀴놀린(quinoline) 양이온인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 CY_2는 펜틸 트리페닐포스포늄 양이온으로 치환된 퀴놀린 양이온이고, 상기 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

<화학식 4>



청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 화합물은 응집-유도 방출(Aggregation-Induced Emission: AIE) 특성을 갖는 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 화합물은 양친매성(amphipathic)인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 트리페닐포스핀기는 암세포 내의 미토콘드리아를 표적하는 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 화합물은 광 조사 하에 활성산소종(Reactive Oxygen Species: ROS)을 생성하여 암세포 사멸을 유도하는 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 광감작제.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 광감작제는 400 내지 700nm 파장의 영역에서 광 조사에 의해 활성산소종을 생성하는 것인, 광감작제.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 광감작제는 형광 이미징 및 미토콘드리아를 표적으로 하는 것인, 광감작제.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 상기 광감작제는 암세포에 축적되는 것인, 광감작제.

청구항 15

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조영제용 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

상기 조성물은 암을 특이적으로 검출하기 위한 것인, 조영제용 조성물.

청구항 17

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 광역학 진단 또는 치료용 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 광역학 진단 또는 치료는 650 내지 900 ㎚의 파장을 가지는 근적외선을 조사하여 수행되는 것인, 광역학 진단 또는 치료용 조성물.

청구항 19

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아를 표적으로 하는 암의 진단 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

청구항 19에 있어서,

상기 암은 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질

암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 21

1) 청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계; 및

2) 단계 1)의 인간을 제외한 개체에 광을 조사하는 단계를 포함하는 광역학 진단 또는 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 응집-유도 방출 특성을 갖는 화합물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화학요법, 방사선 요법 및 수술과 비교할 때 광역학 치료(Photodynamic therapy: PDT)는 약물 내성, 독성 부작용 및 높은 비용의 단점을 효과적으로 해결할 수 있다는 점에서 악성 종양에 대한 이상적인 치료 전략으로 주목받고 있다. 광역학 치료 과정에서, 광 조사 하에 광감작제(photosensitizer: PS)가 활성화되고, 여기된 광감작제는 산소 분자와 상호작용하여 활성산소종(Reactive Oxygen Species: ROS) 또는 라디칼을 생성하며, 이는 생체 분자를 산화시켜 종양 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0003] 최근 광역학 분야에서 응집-유도 방출(Aggregation-Induced Emission: AIE)을 기반으로 하는 루미노겐(luminogen), AIEgen에 대한 연구가 높은 관심을 끌고 있다. 대부분의 화합물은 저농도 용액 상태에서 응집 상태가 될 때 형광이 감소하는 경향을 보이는 반면, 몇몇 특정 화합물은 용액 상태보다 응집 또는 고체 상태에서 더 높은 광방출 효율(photoemission efficiency)을 보이는데 이를 응집-유도 방출 현상이라고 한다.

[0004] 그러나, 대부분의 전통적인 AIEgen들은 항상 켜져 있는("always on") 형광 신호로 인해 수성 환경에서 원치 않는 응집 현상을 보이거나, 또는 생체 내(*in vivo*)에서 활성 효율이 보장되지 않는다는 한계가 있다. 이는 높은 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio)를 요하는 생물학적 이미징이나 광선 치료(phototherapy)에 대한 적용에 심각한 방해요인이 된다. 또한, 대부분의 AIEgen들은 소수성 특성을 가져 목표 부위에 도달하기 전에 친유성 부위에 축적되어 가짜 신호에 의해 형광을 나타내는 경향이 있다.

[0005] 따라서, 높은 활성산소종 생산성, 높은 광안정성 특성을 가지면서도 표적 부위에 대한 축적률을 높임으로써 광역학 치료 효과를 더욱 증가시킬 수 있는 AIEgen의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 "단계별(step-by-step)" 분자 설계를 통해 친유성(lipophilic) 및 친수성(hydrophilic) 시스템 모두에서 우수한 분산성을 갖는 AIEgen을 제조하였고, 상기 화합물은 양친매성 성질을 가져 수용액 환경에서 "형광-꺼짐(fluorescence-off)" 특성을 가지며 용해될 수 있고, 미토콘드리아에 결합하기 전에는 응집되지 않아 원치 않는 응집 현상으로 인한 거짓 양성 신호가 발생하지 않으며, 세포 내 친유성 영역으로부터 성공적으로 빠져나올 수 있음을 확인하였다. 이를 통해 상기 화합물이 전통적인 AIEgen의 항상 켜져 있는 형광 특성과, 친유성 부위에서의 축적으로 인한 낮은 표적능을 극복할 수 있어 광역학 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 일 측면은 응집-유도 방출 특성을 갖는 신규한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 측면은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 광감작제를 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 측면은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 광역학 진단 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 측면은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 측면은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 이용한 광역학 진단 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0013] 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에 기재된 수치는 명시하지 않아도 "약"의 의미를 포함하는 것으로 간주한다.

[0014] 본 명세서에서 용어 "포함"은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 추가 또는/및 개재할 수 있음을 나타내도록 사용된다.

[0015] 본 명세서에서 용어 "이들의 조합"은 기재된 구성요소들 하나 이상과의 혼합 또는 조합되는 것을 의미한다.

[0016] 본 명세서에서 용어 "상호작용"은 직접 또는 간접적일 수 있고, 직접 결합을 포함하거나 또는 간접적으로 결합할 수 있으며, 결합은 다른 분자에 의해 매개될 수도 있다.

[0017] 본 명세서에서 용어 "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.

[0018] 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.

[0019] 작용기가 "선택적으로 치환된다"고 기재되는 경우에, 상기 작용기가 상술한 치환기로 치환될 수 있다는 것을 의미한다.

[0020] 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, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-(CH_3)_2C-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 및 $-(CH_3)_2C-$를 의미한다.

[0021] 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, 시클로헥실

기, 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.

[0022] 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.

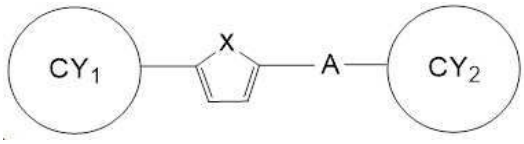
[0023] 본 명세서에서, "아릴"라는 용어는 고리 골격이 오직 탄소만을 포함하는 방향족 고리, 고리 시스템(즉, 2개의 인접하는 탄소 원자들을 공유하는 2 이상의 융합된(fused) 고리), 또는 복수의 방향족 고리가 단일결합, -O-, -S-, -C(=O)-, -S(=O)2-, -Si(Ra)(Rb)-(Ra 및 Rb는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로겐으로 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 또는 -C(=O)-NH-에 의하여 서로 연결된 고리를 의미한다. 아릴기가 고리 시스템이면, 상기 시스템에서 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.

[0024] 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 탄소수는 특별히 한정되지 않으나 탄소수 2 내지 60일 수 있다. 상기 헤테로아릴기는 예를 들어, 치환 또는 비치환된 이미다졸릴기, 치환 또는 비치환된 트리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 테트라졸릴기, 치환 또는 비치환된 옥사다이아졸릴기, 치환 또는 비치환된 옥사트리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 싸이아트리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 벤즈이미다졸릴기, 치환 또는 비치환된 벤조트리아졸릴기, 치환 또는 비치환된 피리디닐기, 치환 또는 비치환된 피리미디닐기, 치환 또는 비치환된 트리아지닐기, 치환 또는 비치환된 피라지닐기, 치환 또는 비치환된 피리다지닐기, 퀴놀린, 치환 또는 비치환된 이소퀴놀린, 치환 또는 비치환된 프탈라진, 치환 또는 비치환된 나프피리딘, 치환 또는 비치환된 퀴녹살린, 치환 또는 비치환된 퀴나졸린, 치환 또는 비치환된 아크리딘, 치환 또는 비치환된 페난트롤린 및 치환 또는 비치환된 페나진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상 또는 이들의 조합된 구조일 수 있다.

[0026] 일 측면에 따라,

[0027] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다:

[0028] <화학식 1>

[0029] 

[0030] 상기 화학식 1에서,

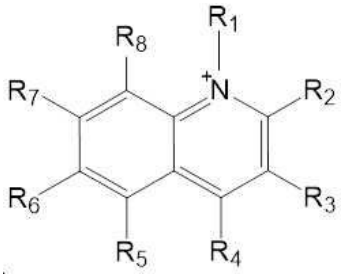
[0031] X는 O, S 또는 N일 수 있고,

[0032] A는 치환 또는 비치환된 C1-C4의 알킬기 또는 치환 또는 비치환된 C2-C4의 알케닐기일 수 있으며,

[0033] CY_1은 C6-C20의 아릴 아민기일 수 있고,

[0034] CY_2는 하기 화학식 2로 표시되는 헤테로아릴기의 양이온일 수 있다.

[0035] <화학식 2>



[0036]

[0037] 상기 화학식 2에서,

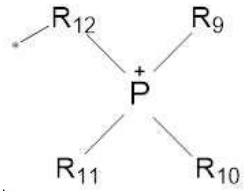
[0038] R_1은 C1-C10의 알킬 포스포늄 양이온일 수 있고, 상기 포스포늄 양이온은 치환 또는 비치환된 C6-C20의 아릴기로 치환된 것일 수 있으며,

[0039] R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 및 R_8은 각각 독립적으로, 수소, 치환 또는 비치환된 C1-C4의 알킬기 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0040] 예를 들어, 상기 화학식 2의 R_1의 포스포늄 양이온에서 치환 또는 비치환된 C6-C20의 아릴기는 -CHO, -ORa, -NRa, -NHCORa, 또는 -OCORa로 치환 또는 비치환된 C6-C30 아릴기를 포함하고, 상기 Ra는 수소, C1-C20의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기일 수 있다.

[0041] 상기 화학식 2의 R_1은 하기 화학식 3으로 표시되는 C1-C10의 알킬 포스포늄 양이온일 수 있다:

[0042] <화학식 3>



[0043]

[0044] 상기 화학식 3에서,

[0045] R_9, R_{10} 및 R_{11}은 각각 독립적으로, 치환 또는 비치환된 C6-C20의 아릴기일 수 있고,

[0046] R_{12}는 치환 또는 비치환된 C1-C10의 알킬기일 수 있고,

[0047] *는 상기 화학식 2의 질소(N) 원소와 연결되는 부위일 수 있다.

[0048] 예를 들어, 상기 화학식 3의 R_9, R_{10} 및 R_{11}에서 치환 또는 비치환된 C6-C20의 아릴기는 -CHO, -ORa, -NRa, -NHCORa, 또는 -OCORa로 치환 또는 비치환된 C6-C30 아릴기를 포함하고, 상기 Ra는 수소, C1-C20의 알킬기, 또는 C6-C20의 아릴기일 수 있다.

[0049] 상기 화학식 1에서, 상기 X는 바람직하게는 S일 수 있다. 즉, 상기 X를 포함하는 헤테로고리는 티오펜(thiophene)일 수 있다. 상기 티오펜은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염에서 CY_1; A 및 CY_2를 연결하는 티오펜 브릿지(thiophene bridge)로 존재할 수 있다.

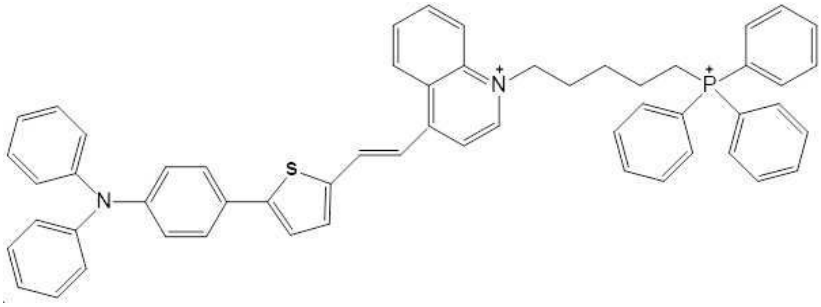
[0050] 예를 들어, 상기 CY_1은 트리페닐아민(Triphenylamine: TPA)일 수 있다. 상기 트리페닐아민은 화합물 내에서 소수성(hydrophobic) 부위이며, 전자 주개(electron donor)일 수 있다.

[0051] 또한, 상기 A는 비닐(vinyl)기이고, 상기 CY_2는 C1-C10의 알킬 포스포늄 양이온으로 치환된 퀴놀린(quinoline) 양이온일 수 있다. 상기 알킬 포스포늄 양이온으로 치환된 퀴놀린 양이온은 화합물 내에서 친수성(hydrophilic) 부위이며, 전자 받개(electron acceptor)일 수 있다.

[0052] 바람직하게는, 상기 CY_2는 펜틸 트리페닐포스포늄 양이온으로 치환된 퀴놀린 양이온일 수 있다. 따라서, 일 구현

예에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다.

[0053] <화학식 4>



[0054]

[0055] 상기 화학식 4로 표시되는 화합물은 퀴놀린의 질소(N) 원소와 트리페닐포스핀의 인(P) 원소가 각각 양전하를 가져, 전체 화합물에서 이중양전하(double positive) 구조를 가질 수 있다. 이러한 구조적 특성으로 인해, 상기 화학식 4로 표시되는 화합물은 양친매성(amphiphatic) 성질에 기반하여 친유성 및 친수성 시스템 모두에서 우수한 분산성을 가질 수 있다. 따라서, 상기 화합물이 바람직한 "형광-꺼짐(fluorescence-off)" 특성을 갖는 수용액에 용해되어 미토콘드리아에 도달하기 전 응집되지 않은 상태를 유지할 수 있게 한다. 또한, 상기 화학식 4로 표시되는 화합물은 퀴놀린 양이온에 알킬 포스포늄 양이온(예컨대, 펜틸 트리페닐포스포늄 양이온)이 추가적으로 도입됨에 따라 1) 암세포 내 미토콘드리아에 특이적으로 축적되고(이중양전하에 따른 상승적 효과), 2) 알킬 포스포늄 양이온이 추가적으로 도입되지 않은 분자(예컨대, TPA-S-Q)에 비해 낮은 밴드 갭(bandgap)에 기인한 근적외선(NIR) 방출능을 가질 수 있다.

[0056] 상기 화합물은 응집-유도 방출(Aggregation-Induced Emission: AIE) 특성을 가질 수 있다.

[0057] 응집-유도 방출 현상을 나타내는 형광체는 회전 또는 진동 자유도를 가진 화학구조를 보유하고 있어 저농도 용액에서는 분자가 에너지를 빛으로 방출하기보다 회전 운동이나 진동 운동을 통해 에너지를 소모한다. 그러나, 물질의 농도가 높아져 분자가 응집되거나 결정화되면 분자 운동이 제한되어 높은 발광 효율을 가진 형광 물질이 된다. 일 구현예에서, 상기 일 측면에 따른 화합물은 양친매성 성질을 가져 수용액 환경에서 "형광-꺼짐(fluorescence-off)" 특성을 가지며 용해될 수 있고, 미토콘드리아에 결합하기 전에는 응집되지 않아 원치 않는 응집 현상으로 인한 거짓 양성 신호가 발생하지 않으며, 세포 내 친유성 영역으로부터 성공적으로 빠져나올 수 있음을 확인하였다. 따라서, 일 측면에 따른 화합물은 전통적인 AIEgen의 항상 켜져 있는 형광 특성과, 친유성 부위에서의 축적으로 인한 낮은 표적능을 극복할 수 있다.

[0058] 상기 화합물에서, 트리페닐포스핀기는 암세포 내의 미토콘드리아를 표적하는 것일 수 있다.

[0059] 또한, 상기 화합물은 광 조사 하에 활성산소종(Reactive Oxygen Species: ROS)을 생성하여 암세포 사멸을 유도하는 것일 수 있다.

[0060] 상기 활성산소종은 단일항 산소(singlet oxygen, $^1O_2$) 및/또는 히드록실 라디칼(Hydroxyl radical, ·OH)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 상기 "암세포"는 비정상적으로 성장, 분열 또는 증식하는 세포를 의미하는 것으로, "종양세포"와 혼용되어 사용될 수 있다.

[0063] 다른 측면에 따라,

[0064] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 광감작제가 제공된다.

[0065] "광감작제(photosensitizer)"는 특정 파장의 빛을 조사하면 산소분자(O_2)를 단일항 산소(singlet oxygen, $^1O_2$)와 같은 활성산소종으로 변화시키거나, 새로운 라디칼을 만들거나 또는 새로운 화학종을 만들어내는 물질을 의미한다.

[0066] 상기 광감작제의 형광 여기(excitation) 파장의 범위는 약 400 내지 730 nm일 수 있고, 바람직하게는 430 내지 700 nm일 수 있고, 보다 바람직하게는 450 내지 670nm일 수 있다. 또한, 상기 광감작제의 방출(emission) 파장

의 범위는 약 550 내지 900nm일 수 있고, 바람직하게는 580 내지 880nm일 수 있고, 보다 바람직하게는 600 내지 850nm일 수 있다. 상기 발광 특성에 기인하여, 표적 조직 및/또는 세포에 대한 선택적 결합 및/또는 축적이 가능하며, 이를 통해 생체 내(*in vivo*) 또는 시험관 내(*in vitro*)의 이미징이 가능할 수 있다.

[0067] 상기 광감작제는 400 내지 700nm, 바람직하게는 430 내지 670nm의 백색광 파장 영역에서 광 조사에 의해 활성산소종(Reactive Oxygen Species: ROS)을 생성할 수 있다.

[0068] 상기 광감작제는 형광 이미징 및 미토콘드리아를 표적으로 할 수 있다.

[0069] 상기 광감작제는 암세포에 축적되는 것일 수 있다.

[0071] 또 다른 측면에 따라,

[0072] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조영제용 조성물이 제공된다.

[0073] "조영제"는 영상진단 검사 또는 시술 시 특정 조직이나 혈관이 잘 보일 수 있도록 인체에 투여하는 약물을 의미한다. 일 구현예에서, 전술한 화합물은 형광을 방출할 수 있고, 특히 암세포를 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다. 특히, 전술한 화합물은 정상세포에 대한 세포독성이 없어 안전하고 유의성 있게 암의 진단이 가능하며, 암세포에 대한 독성을 가지므로 암에 대한 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있다.

[0074] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 조영제 용도로 사용하는 경우, 상기 화합물의 형광 여기(excitation) 파장의 범위는 약 400 내지 730nm일 수 있고, 바람직하게는 430 내지 700nm일 수 있고, 보다 바람직하게는 450 내지 670nm일 수 있다. 또한, 상기 화합물의 방출(emission) 파장의 범위는 약 550 내지 900nm일 수 있고, 바람직하게는 580 내지 880nm일 수 있고, 보다 바람직하게는 600 내지 850nm일 수 있다. 상기 형광 여기 파장 및 방출 파장의 범위는 측정 대상에 따라 변경될 수 있고, 전술한 화합물 외 상기 조성물에 포함된 다른 물질에 의하여 상이하게 조절될 수 있다.

[0075] 상기 조성물은 의약 분야에서 통상 사용되는 조영제용 담체 및 비히클을 포함할 수 있다. 이는 구체적으로, 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 조성물은 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 부형제, 희석제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0076] 상기 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소디움 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예컨대, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예컨대, 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일이라면 제한 없이 사용할 수 있다.

[0078] 또 다른 측면에 따라,

[0079] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 광역학 진단 또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0080] "광역학(photodynamic) 진단 또는 치료"는 빛에 반응하는 광감작제를 투여한 뒤 특정 파장의 빛을 쏘이면 질병(예컨대, 암)을 가진 세포에만 선택적으로 빛이 축적되어 치료적 효과를 나타내는 치료요법을 의미한다.

[0081] 상기 광역학 진단 또는 치료는 650 내지 900 nm의 파장을 가지는 근적외선을 조사하여 수행되는 것일 수 있다.

[0082] 상기 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 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.

[0083] 상기 조성물은 총 중량에 대하여 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있으며, 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.

[0084] 상기 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0085] 또한, 상기 조성물은 암 조직 또는 표적 세포를 표적화하기 위한 하나 이상의 표적화 리간드 또는 모이어티(moiety)를 포함할 수 있다. 이러한 표적화 리간드로는 소분자(예컨대, 폴레이트, 염료, 등), 압타머, 항체, 항체 단편, 세포 표면의 특정 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있는 화합물 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 당업계에 알려져 있는 표적화 리간드라면 제한 없이 사용할 수 있다.

[0087] 또 다른 측면에 따라,

[0088] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 암의 진단 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0089] 본 발명에서, 암의 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 말하며, 구체적으로 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 통해 암의 발병 여부를 확인하는 것일 수 있다.

[0090] 본 발명에서, 암의 "치료"는 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 또는 이를 포함하는 조성물을 투여하여 증세가 호전되거나, 암세포가 괴사 및/또는 사멸되도록 하는 행위를 포함하며, 다른 항암제, 방사선 요법, 수술 등과 병행하여 사용될 수 있다.

[0091] 상기 암은 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 상기 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다.

[0093] 또한, 상기 약학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.

[0094] 예를 들어, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0095] 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0096] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 예시될 수

있다. 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0097] 상기 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양이 대상체에 투여될 수 있다. 상기 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0098] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용이 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0099] 상기 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여방법에는 제한이 없으며, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0100] 본 발명에서 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.

[0101] 본 발명에서 용어 "대상체"는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니 피그를 포함할 수 있다.

[0102] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로, 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직하게는, 1일 0.001 내지 100mg/체중kg으로, 보다 바람직하게는 0.01 내지 30mg/체중kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 여러번 나누어 투여할 수도 있다.

[0104] 또 다른 측면에 따라,

[0105] 1) 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 개체에 투여하는 단계; 및

[0106] 2) 단계 1)의 개체에 광을 조사하는 단계를 포함하는 광역학 진단 또는 치료방법이 제공된다.

[0107] 상기 광을 조사하는 단계는, 1분 내지 45분, 바람직하게는 5분 내지 30분 동안 400 내지 700nm 파장(백색광 파장), 바람직하게는 450 내지 670nm 파장 영역의 빛으로서 세기가 50 내지 300 mW/cm^2, 바람직하게는 100 내지 250 mW/cm^2, 보다 바람직하게는 100 내지 200 mW/cm^2인 빛을 조사할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당업자라면 목적에 따라 광 조사 조건을 적절히 달리하여 적용할 수 있다. 일 구체예에서는 세포의 경우 5분 내지 20분 동안 400 내지 700nm 파장 및 100 내지 200 mW/cm^2 세기인 광을 조사하였을 때, 동물 모델의 경우 30분 동안, 400 내지 700nm 파장 및 100 내지 200 mW/cm^2 세기인 광을 조사하였을 때 유의한 암세포 사멸 효과(광역학 치료 효과)를 나타낼 수 있음을 확인하였다. 상기 투여하는 단계는, 경구적 또는 비경구적 방법으로 수행될 수 있다.

[0108] 상기 방법은 단계 1) 및 단계 2) 사이에 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 개체의 표적 세포 및/또는 조직 내에 축적되기 위한 소정의 시간을 허용하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0109] 또한, 상기 방법은 단계 2) 이후에 개체의 표적 세포 및/또는 조직의 위치를 확인하기 위한 이미징(imaging) 단계를 더 포함할 수 있다. 이는 광 조사에 의한 형광 또는 발광 이미지를 검출하여 시각화함으로써 수행될 수 있다.

[0110] 상기 개체(subject)는 인간 또는 포유동물일 수 있다.

[0111] 상기 광역학 진단 또는 치료방법은 암을 검출 또는 진단함과 동시에 암을 예방 치료하기 위한 것일 수 있다.

[0112] 상기 방법은 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)로 수행될 수 있다. 상기 방법이 시험관 내에서 수행되

는 경우, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 개체로부터 분리된 조직, 세포 또는 그 배양물에 투여되는 것일 수 있다.

[0113] 상기 광역학 진단 또는 치료방법은 시공간 선택성, 비침습성, 및 부작용의 감소와 같은 이점을 나타낼 수 있다.

발명의 효과

[0115] 일 양상에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 미토콘드리아에 도달하기 전까지 형광을 띄지 않고, 지방질과 같은 친유성 부위에 축적되지 않을 뿐만 아니라, 근적외선 파장 영역에서의 응집-유도 특성에 기인하여 배경형광 대비 효율이 현저히 높다. 이를 통해, 암세포를 효과적으로 표적할 수 있어 독성이나 부작용 없이 효율적인 암 치료 효과를 달성하면서도, 광안정성이 높고 미토콘드리아 막 전위 변화에 영향을 받지 않아 기존의 형광염료보다 우수한 특성을 갖는다. 따라서, 일 측면에 따른 화합물은 형광 이미징, 광역학 진단 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0117] 도 1은 화합물 3의 ^{1}H NMR 스펙트럼(a), ^{13}C NMR 스펙트럼(b) 및 ESI-MS 분석 결과(c)를 나타낸 도이다.

도 2는 화합물 5의 ^{1}H NMR 스펙트럼(a), ^{13}C NMR 스펙트럼(b) 및 ESI-MS 분석 결과(c)를 나타낸 도이다.

도 3은 TPA-S-D의 ^{1}H NMR 스펙트럼(a), ^{13}C NMR 스펙트럼(b) 및 ESI-MS 분석 결과(c)를 나타낸 도이다.

도 4는 TPA-S-Q의 ^{1}H NMR 스펙트럼(a), ^{13}C NMR 스펙트럼(b) 및 ESI-MS 분석 결과(c)를 나타낸 도이다.

도 5는 화합물 8의 ^{1}H NMR 스펙트럼(a), ^{13}C NMR 스펙트럼(b), ^{31}P NMR 스펙트럼(c) 및 ESI-MS 분석 결과(d)를 나타낸 도이다.

도 6은 TPA-S-TPP의 ^{1}H NMR 스펙트럼(a), ^{13}C NMR 스펙트럼(b) 및 ESI-MS 분석 결과(c)를 나타낸 도이다.

도 7은 합성예 1~6에 의해 얻은 TPA-S-Q(화합물 1)의 광물리적 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다. A) 다양한 용매(ACN, DMSO, EtOH, DW 및 PBS)에서 TPA-S-Q(10 μM)의 형광 강도 및 최대 방출 피크, λex = 420 nm. B), C), D) 및 E)는 각각 ACN/DW(B), DMSO/DW(C), EtOH/DW(D) 및 DMSO/Toluene(E) 혼합물의 조성에서 TPA-S-Q(10 μM)의 형광 강도 및 최대 방출 피크.

도 8은 합성예 1~6에 의해 얻은 TPA-S-Q(화합물 1)의 광물리적 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다. A) TPA-S-Q(10 μM)의 CH_3CN/DW(DW 분율 f_{DW}: 0-95%) 혼합 용액에서의 형광 스펙트럼 변화, λex = 420 nm. B) TPA-S-Q(10 μM)의 DMSO/DW(DW 분율 f_{DW}: 0-95%) 혼합 용액에서의 형광 스펙트럼 변화, λex = 420 nm. C) TPA-S-Q(10 μM)의 EtOH/DW(DW 분율 f_{DW}: 0-95%) 혼합 용액에서의 형광 스펙트럼 변화, λex = 420 nm. D) TPA-S-Q(10 μM)의 DMSO/Tol(Toluene 분율 f_{Tol}: 0-95%) 혼합 용액에서의 형광 스펙트럼 변화, λex = 420 nm.

도 9는 DW에서 TPA-S-Q(10 μM)의 A) 동적광산란(DLS) 분석 결과 및 B) TEM 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 합성예 1~6에 의해 얻은 TPA-S-D(화합물 2)의 광물리적 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다. A) 다양한 용매(ACN, DMSO, EtOH, DW 및 PBS)에서 TPA-S-D(10 μM)의 형광 강도 및 최대 방출 피크, λex = 530 nm. B) DMSO/Toluene 혼합 용액에서 TPA-S-D(10 μM)의 형광 강도 및 최대 방출 피크.

도 11은 합성예 1~6에 의해 얻은 TPA-S-D(화합물 2)의 광물리적 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다. A) TPA-S-D(10 μM)의 ACN/DW(DW 분율 f_w: 0-90%) 혼합 용액에서의 형광 스펙트럼 변화, λex = 420 nm. B) TPA-S-D(10 μM)의 DMSO/DW(DW 분율 f_w: 0-90%) 혼합 용액에서의 형광 스펙트럼 변화, λex = 530 nm. C) TPA-S-D(10 μM)의 EtOH/DW(DW 분율 f_w: 0-90%) 혼합 용액에서의 형광 스펙트럼 변화, λex = 530 nm.

도 12는 DW에서 TPA-S-D(10 μM)의 A) 동적광산란(DLS) 분석 결과 및 B) TEM 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 합성예 1~6에 의해 TPA-S-TPP(화합물 3)의 광물리적 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다. A) 다양한 용매(ACN, DMSO, EtOH, DW 및 PBS)에서 TPA-S-TPP(10 μM)의 형광 강도 및 최대 방출 피크, λex = 530 nm. B) ACN/DW(DW 분율 f_w: 0-90%) 혼합 용액에서 TPA-S-TPP(10 μM)의 형광 스펙트럼 변화, λex = 530 nm. C), D) 및 E)는 각각 DMSO/DW(C), EtOH/DW(D) 및 DMSO/Toluene(E) 혼합물의 조성에서 TPA-S-D(10 μM)의 형광 스펙트럼 변화. F) DMSO/Toluene 혼합물(Toluene 분율 f_{Tol}: 0-90%)에서 TPA-S-D(10 μM) 및 TPA-S-TPP(10 μM)의 최대 형광 강도 변화.

도 14는 DW에서 A) TPA-S-D(10 μM) 및 B) TPA-S-TPP의 몰흡광계수(molar extinction coefficient, ε)를 나타낸 도이다.

도 15는 TPA-S-TPP(10 μM)의 A) 다양한 용매(DMSO, Tol 및 DW)에서의 Dyndall 효과 실험 결과 및 B) 톨루엔, 여기 파장 559 nm에서의 형광 이미지를 나타낸 도이다.

도 16은 A) 백색광(25 mW/cm^2) 조사 하에서, TPA-S-TPP(10 μM) 존재 하 ABDA(50 μM)의 흡수 스펙트럼 변화, B) 일중항 산소($^1O_2$)에 의한 ABDA 분해 과정을 나타낸 도이다.

도 17은 다양한 시간 동안(0-30분) 백색광 조사 하(25 mW/cm^2) AIEgen TPA-S-TPP(10 μM)의 안정성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 A) 백색광(25 mW/cm^2) 조사 하의 Ce6(10 μM), Rose Bengal(10 μM), TPA-S-Q(10 μM; 화합물 1), TPA-S-D(10 μM; 화합물 2) 및 TPA-S-TPP(10 μM; 화합물 3) 처리에 따른, 정규화된 ABDA(50 μM, absorbance at 378 nm)의 분해율; B) 다양한 시간 동안(0-300초) 백색광 조사 하(25 mW/cm^2) ABDA(50 μM)의 흡수 스펙트럼 변화; C), D), E) 및 F)는 다양한 시간 동안(0-300초) 백색광 조사 하(25 mW/cm^2) Ce6(10 μM, C), TPA-S-Q(10 μM, D), Rose Bengal(10 μM, E) 및 TPA-S-D(10 μM, F) 처리 시, ABDA(50 μM)의 흡수 스펙트럼 변화를 나타낸 도이다.

도 19는 암 조건 및 광 조사 하에서 TEMP + TPA-S-TPP의 전자스핀 공명 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 20은 A) 나노초 시간 분해능의 순간 흡광 스펙트럼(nanosecond time-resolved transient absorption spectrum)에 따른 TPA-S-TPP(10 μM)의 삼중항 상태의 수명시간 및 B) 광 조사 하 일중항 산소 생성 메커니즘을 나타낸 도이다.

도 21은 TPA-S-D(5 μM, A-G) 및 TPA-S-TPP(5 μM, I-O)와 함께 다양한 시간 동안 배양된 HeLa 세포의 시간-의존적 형광 이미지를 나타낸 도이다(A, I: 대조군; B, J: 0.5h; C, K: 1.0h; D, L: 1.5h; E, M: 2.0h; F, N: 3.0h; G, O: 4.0h). 도 22의 H) 및 P)는 HeLa 세포 이미지에서의 형광 강도를 나타낸 도이다. λex(여기 파장) = 559 nm, λem(방출 파장) = 655-755 nm. Scale bar = 40 μm.

도 22는 Hochest 33342(Q1), Lyso-tracker green(R1), Mito-tracker green(S1) 및 BODIPY 493/503(T1)를 이용한 AIEgen TPA-S-TPP의 공동 국소화 이미징 결과를 나타낸 도이다. Merged images: Q3, R3, S3 및 T3. 피어슨 상관계수(Pearson's coefficient): Q4, R4, S4 및 T4. Scale bar = 10 μm. CCCP (10 μM, 20분간 처리)에 따른 미토콘드리아 막 전위 변화를 확인하기 위한 HeLa 세포의 공초점 현미경 이미징 결과. U-W) 서로 다른 처리에 따른 HeLa 세포의 형광 이미징(U: 대조군; V: Mito-tracker Red 또는 TPA-S-TPP 처리; W, CCCP로 배양 후, Mito-tracker Red 또는 TPA-S-TPP 처리. Scale bar = 30 μm. X, Y) HeLa 세포 이미징 결과를 바탕으로 정규화된 형광 강도 분석 결과(U-W). 각 채널(Mito-tracker Red, V1 및 AIEgen TPA-S-TPP, V3)의 픽셀 강도는 각각 1.0으로 정의되었다.

도 23은 TPA-S-Q로 처리한 HeLa 세포의 형광 이미징 결과를 나타낸 도이다. Ex = 405 nm, Em = 490-540 nm. Scale bar = 20 μm.

도 24는 상기 도 23을 기준으로(3961.54~3952.84 μm, step size = 0.58 μm) longitudinal Z axis에 따른, 여기 파장 405 nm에서 TPA-S-Q로 처리한 HeLa 세포의 형광 이미징 결과를 나타낸 도이다. Scale bar = 20 μm.

도 25는 TPA-S-Q(Ex = 405 nm, Em = 490-540 nm) 및 A) mito-tracker deep red(Ex = 633 nm, Em = 655-755 nm), B) lyso-tracker deep red(Ex = 633 nm, Em = 655-755 nm) 또는 C) nile red(Ex = 473 nm, Em = 575-675

nm)와 함께 배양된 HeLa 세포의 공초점 형광 이미지를 나타낸 도이다. Scale bar = 10 μm.

도 26은 TPA-S-TPP로 전처리 후 CCCP를 첨가한 HeLa 세포의 형광 이미징 결과를 나타낸 도이다. Scale bar = 30 μm.

도 27은 A) 지속적인 광 조사 하에서 mito-tracker green 및 AIEgen TPA-S-TPP로 처리된 HeLa 세포의 공초점 형광 이미지(Scale bar = 20 μm) 및 B) 다른 채널의 HeLa 세포의 정규화된 형광 강도(F/F0)를 나타낸 도이다.

도 28은 DMSO 및 DW에서 mito-tracker(5 μm 및 10 μM)의 형광 강도 변화를 나타낸 도이다. λem = 480 nm.

도 29의 A) 내지 E)는 DCF-DA 염료를 사용한 서로 다른 처리 후 HeLa 세포의 활성산소종(ROS) 생성 결과를 나타낸 도이다. Scale bar = 30 μm. F) 및 G)는 암 조건 또는 백색광 조사 하에서, 서로 다른 농도의 TPA-S-Q 및 TPA-S-TPP(0, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 μM)를 처리하는 경우의 HeLa 세포의 MTT 분석 결과를 나타낸 도이다. H) 내지 K)는 서로 다른 처리 후 Annexin V-FITC 및 PI로 공동-염색한 HeLa 세포의 공초점 형광 이미징 결과를 나타낸 도이다(H: 광 조사만 30 min; I: TPA-S-TPP + dark; J: TPA-S-TPP + light 10 min; K: TPA-S-TPP + light 30 min). Scale bar = 100 μm. L) 세포에서 향상된 광역학 치료 효과를 나타내는 TPA-S-TPP의 광역학 치료 기전을 나타낸 개략도이다. M) 내지 O)는 JC-1 염료를 사용한 HeLa 세포에서의 미토콘드리아 막전위 측정 결과를 나타낸 도이다. P) 내지 S)는 광 조사와 함께(Q: 5 min; R: 10min; S: 20 min) 또는 광 조사 없이(P) AIEgen TPA-S-TPP에 노출된 HeLa 세포의 면역형광 이미징 분석 결과를 나타낸 도이다. Scale bar = 30 μm. T) 면역형광 이미징(P-S)에 따른 녹색 형광 강도를 나타낸 도이다. U) 웨스턴 블롯에 따른 세포 내 상향 조절된 cleaved caspase 3 단백질의 발현 결과를 나타낸 도이다. 1, blank + light (7 min); 2, blank + light (15 min); 3, TPA-S-TPP + dark; 4, TPA-S-TPP + light (7 min); 5, TPA-S-TPP + light (15 min).

도 30은 활성산소종(ROS) 생성에 대한 형광 이미지로부터의 형광 강도를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 31은 암 조건 또는 백색광 조사 하 다양한 농도(0, 2, 4, 6, 8 및 10 μM)의 TPA-S-D로 처리된 HeLa 세포의 MTT 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 32는 서로 다른 처리를 수행한 HeLa 세포에 대한 annexin V-FITC 및 PI 공동-염색 결과를 나타낸 도이다. A, 광 조사만 30 min; B, TPP-S-TPP + dark; C, TPA-S-TPP + light 10 min; D, TPA-S-TPP + light 30 min. Scale bar = 100 μm.

도 33은 JC-1의 형광 이미지에 따른 F_{Green}/F_{red} 값을 나타낸 도이다.

도 34는 서로 다른 처리를 수행한 HeLa 세포에 대한 Calcein AM 및 PI 염료 공동-염색 결과를 나타낸 도이다(공초점 형광 이미지). A, 광 조사만 10 min; B, 광 조사만 30 min; C, TPP-S-TPP + dark; D, TPA-S-TPP + light 10 min; E, TPA-S-TPP + light 30 min. Scale bar = 80 μm.

도 35는 A) AIEgen TPA-S-TPP 및 PBS(대조군)가 주입된, 4T1 종양세포를 포함하는 Balb/c 마우스의 생체 내(*in vivo*) 이미지, B) 주요 기관(비장: Sp; 종양: Tu; 신장: Ki; 간: Li; 폐: Lu; 심장: He)의 생체 외(*ex vivo*) 이미지, C) 서로 다른 처리를 수행한 Balb/c 마우스의 종양 부피 변화(n = 5), D) 14일간의 치료 후 마우스의 종양 사진, E) 서로 다른 처리를 수행한 Balb/c 마우스의 체중 변화, F) 각 그룹에서의 마우스의 생존율, G) 14일간의 치료 후 각 그룹의 주요 기관 절편(심장, 간, 비장, 폐 및 신장)에 대한 H&E 염색 결과를 나타낸 도이다.

도 36은 프로브 TPA-S-Q, TPA-S-D 및 TPA-S-TPP를 설계하기 위한 "단계별(step-by-step)" 분자 설계 전략(a) 및 광 조사 하에서 미토콘드리아에 고정된(anchored) AIEgen TPA-S-TPP의 종양 세포 사멸 기작(b)을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0118] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

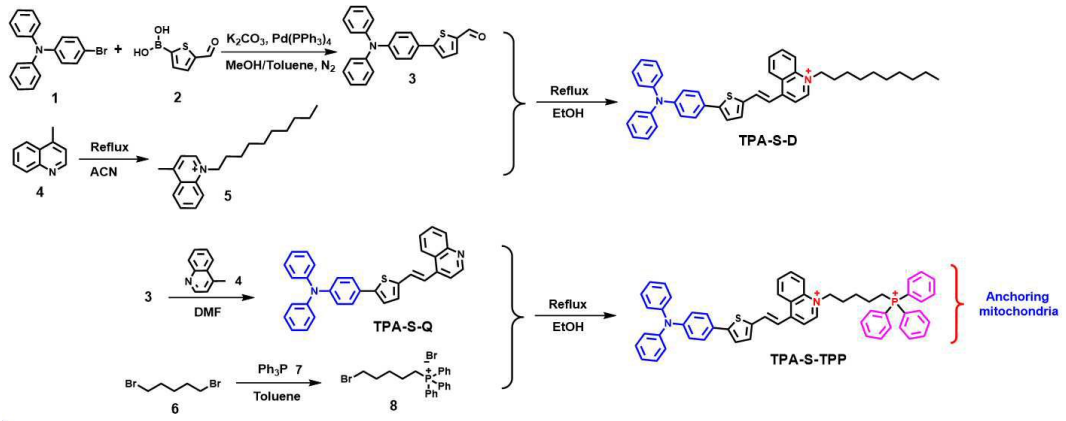
[0120] [실시예]

[0121] 모든 화학약품은 추가 정제없이 상업 공급업체로부터 구입하여 사용하였다. 사용된 용매들은 표준 방법에 의해

정제하였다. ^{1}H, ^{13}C 및 ^{31}P-NMR 스펙트럼은 Bruker 300 MHz 분광광도계로 측정하였다. 화학적 이동(δ)은 ppm으로 기록하였다. 형광 스펙트럼은 FS-2 형광 분광광도계(Scinco)를 사용하였다. 여기(Excitation) 및 방출(emission) 슬릿 너비는 형광 강도를 적절한 범위로 조절하기 위해 적절히 변경하여 사용하였다. 흡수 스펙트럼은 Thermo Scientific Evolution 201 UV-Vis 분광광도계로 기록하였다. 질량 스펙트럼을 얻기 위해 SYNAPT G2(Waters, U.K.)를 사용하였다. 동적광산란(DLS)은 Nano-ZS(Malvern)를 사용하여 측정하였다. EPR 분석은 EMX-plus equipment(Bruker)로 수행하였다. TEM 이미지는 100 kV에서 작동하는 JEOL-2100F 전자현미경으로 확보하였다. 세포 이미징은 Olympus FV 1200 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Olympus, Japan)에서 수행하였다. 증류된 탈이온수(DW)는 초여과(ultrafiltarion)으로 준비하였다.

[0123] 하기 합성예에 의해 제조된 화합물에 대한 반응스킴 1은 다음과 같다:

[0124] <반응스킴 1>

[0125] 

[0126] 반응스킴 1에서와 같이, 전자 주개(donor)이자 소수성인 트리페닐아민(TPA, 화합물 1)을 공액(conjugated) 티오펜 브릿지로 전자 받개(acceptor)이자 친수성인 퀴놀린(quinoline) 양이온에 연결시켜 양친매성 AIEgen(TPA-S-TPP)을 합성하였다.

[0128] **합성예 1. 화합물 3**

[0129] 상기 반응스킴 1의 화합물 1(1.94 g, 6 mM), 화합물 2(1.12 g, 7.2 mM), K_2CO_3(2.48 g, 18 mM) 및 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(346 mg, 0.3 mM)을 N_2 분위기하에 MeOH/톨루엔(v/v = 1:1, 100 mL) 혼합 용액에 첨가하여 환류(reflux)하는 조건으로 24시간 동안 교반한 후, 실온까지 냉각시켰다. 압력을 감소시켜 용매를 증발시키고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 3을 노란색 고체로서 수득하였다(1.15 g, yield 54%).

[0130] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.85 (s, 1H), 7.71 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.57-7.47 (m, 2H), 7.35-7.23 (m, 5H), 7.18-7.00 (m, 8H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 182.64, 154.61, 149.17, 146.99, 141.34, 137.78, 129.52, 127.28, 126.15, 125.20, 123.91, 122.90, 122.39. ESI-MS: m/z calcd for $C_{23}H_{17}NOS^{+}$ $[M]^{+}$ 355.1031, found: 355.1026; m/z calcd for $C_{23}H_{17}NONaS^{+}$ $[M+Na]^{+}$ 378.0923, found: 378.0923.

[0132] **합성예 2. 화합물 5**

[0133] 상기 반응스킴 1의 화합물 4(1.43 g, 10 mM) 및 1-아이오도데칸(2.68 g, 10 mM)을 N_2 분위기하에 무수 CH_3CN(20 mL)에 첨가하여 85℃에서 12시간 동안 교반한 후 실온까지 냉각시켰다. 압력을 감소시켜 용매를 증발시키고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 5를 끈적한 액체로서 수득하였다(2.75 g, yield 67%).

[0134] ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ = 9.46 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.66-8.52 (m, 2H), 8.33-8.21 (m, 1H), 8.07 (ddd, *J* = 8.0, 6.5, 0.7 Hz, 2H), 5.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.08-1.80 (m, 2H), 1.55-1.04 (m, 14H), 0.84 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ = 159.00, 148.83, 137.19, 135.59, 130.07, 129.45, 127.66, 123.14, 119.87, 57.42, 55.45, 31.73, 29.93, 29.32, 29.11, 28.95, 26.21, 22.55, 20.24, 14.43. ESI-MS: m/z calcd for $C_{20}H_{30}ON^{+}$ $[M]^{+}$ 284.2373, found: 284.2378.

[0136] **합성예 3. TPA-S-D**

[0137] 상기 반응스킴 1의 화합물 3(106.5 mg, 0.3 mM), 화합물 5(123 mg, 0.3 mM) 및 피페리딘(1~3 방울)을 N_2 분위기하에 무수 에탄올 20mL에 첨가하여 85℃에서 밤새 교반한 후 실온까지 냉각시켰다. 압력을 감소시켜 용매를 증발시키고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 61 mg의 TPA-S-D를 수득하였다(yield 27%).

[0138] ^{1}H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 9.73 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.34-8.12 (m, 3H), 8.03-7.92 (m, 1H), 7.69-7.51 (m, 4H), 7.39-7.30 (m, 5H), 7.21-7.13 (m, 5H), 7.13-7.06 (m, 3H), 5.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.16-2.03 (m, 2H), 1.59-1.49 (m, 2H), 1.32 (m, 12H), 0.90 (t, *J* = 5.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 152.69, 150.15, 148.82, 147.01, 139.05, 138.01, 136.93, 135.59, 135.07, 129.47, 129.30, 129.07, 126.88, 126.75, 126.32, 126.15, 125.19, 123.89, 123.74, 123.24, 122.30, 118.36, 116.21, 116.09, 57.34, 31.85, 29.86, 29.47, 29.40, 29.25, 29.13, 26.54, 22.66, 13.88. ESI-MS: m/z calcd for $C_{43}H_{45}N_2S^{+}$ $[M]^{+}$ 621.3298, found: 621.3303.

[0140] **합성예 4. TPA-S-Q**

[0141] 상기 반응스킴 1의 화합물 3(710 mg, 2 mM), 화합물 4(572 mg, 4 Mm) 및 염화벤조일(394 mg, 2 mM) 용액을 N_2 분위기하에 무수 DMF 5mL에 첨가하여 60℃에서 8시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 반응 혼합물을 물에 넣고 DCM으로 추출한 후 무수 Na_2SO_4로 건조시켰다. 압력을 감소시켜 용매를 증발시키고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 163 mg의 TPA-S-Q를 수득하였다(yield 17%).

[0142] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.90 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.28-8.14 (m, 2H), 7.74 (ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 11.4, 7.4, 3.2 Hz, 3H), 7.53-7.39 (m, 3H), 7.34-7.23 (m, 4H), 7.16 (m, 6H), 7.12-7.03 (m, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 149.81, 148.41, 147.86, 147.35, 145.17, 142.79, 142.43, 140.35, 129.97, 129.85, 129.75, 129.54, 129.44, 128.25, 128.19, 127.64, 126.61, 126.19, 124.79, 123.43, 123.29, 122.85, 120.99, 116.36. ESI-MS: m/z calcd for $C_{33}H_{25}N_2S^{+}$ $[M+H]^{+}$ 481.1733, found: 481.1737.

[0144] **합성예 5. 화합물 8**

[0145] 상기 반응스킴 1의 화합물 6(2.28 g, 10 mM) 및 화합물 7(2.62 g, 10 mM)을 N_2 분위기하에 무수 톨루엔 20mL에 첨가하여 110℃에서 밤새 교반하고 실온까지 냉각시켰다. 압력을 감소시켜 용매를 증발시키고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 2.55 g의 화합물 8을 수득하였다(yield 53%).

[0146] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.81 (m, 6H), 7.77-7.72 (m, 3H), 7.66 (m, 6H), 3.87-3.72 (m, 2H), 3.31 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.81 (m, 4H), 1.67-1.60 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 135.11, 135.07, 133.74, 133.60, 130.63, 130.47, 118.76, 117.62, 33.51, 32.00, 28.92, 23.08, 21.88. ^{31}P NMR (122 MHz,

$CDCl_3$): δ = 24.28. ESI-MS: m/z calcd for $C_{23}H_{25}BrP^+$ $[M]^+$ 411.0877, found: 411.0877.

[0148] **합성예 6. TPA-S-TPP**

[0149] TPA-S-Q(192 mg, 0.4 mM) 및 화합물 8(147 mg, 0.3 mM)을 N_2 분위기하에 무수 1,2-디클로로벤젠 5mL에 첨가하여 130℃에서 밤새 교반하고 실온까지 냉각시켰다. 압력을 감소시켜 용매를 증발시키고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 55 mg의 TPA-S-TPP 을 수득하였다(yield 19%).

[0150] ^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 9.10 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.17 (dt, *J* = 15.9, 7.7 Hz, 3H), 7.94-7.79 (m, 7H), 7.79-7.67 (m, 10H), 7.54-7.43 (m, 3H), 7.36-7.23 (m, 5H), 7.11-7.05 (m, 6H), 6.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.56-3.43 (m, 2H), 2.08 (br, 2H), 1.76 (br, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ = 153.05, 149.83, 148.63, 147.03, 146.19, 139.24, 138.12, 136.45, 135.09, 134.89, 134.85, 133.56, 133.52, 133.43, 133.38, 130.24, 130.08, 129.28, 129.03, 126.65, 126.58, 126.43, 126.01, 124.90, 123.70, 123.62, 121.97, 119.15, 119.02, 118.65, 118.00, 117.87, 116.44, 115.19, 56.49, 28.76, 27.21, 21.87, 20.96. ESI-MS: m/z calcd for $C_{56}H_{49}BrN_2PS^+$ $[M]^+$ 891.2532, found: 891.2537.

[0152] **분석예 1. 광물리적(photophysical) 특성 분석**

[0153] 합성예 1~6에 의해 얻은 TPA-S-Q(화합물 1), TPA-S-D(화합물 2) 및 TPA-S-TPP(화합물 3)에 대하여 형광 발광 스펙트럼 분석을 수행하였다. 형광 발광 스펙트럼은 FS-2 분광광도계(Scinco)로 기록하였다.

[0154] 도 7의 (a)을 참조하면, TPA-S-Q는 유기용매(CAN, DMSO 및 EtOH)에서 밝은 형광을 보인 반면, 수용액(DW 및 PBS)에서는 소광 현상(quenched)을 보였으며, 이는 전형적인 응집성 소광(aggregation-caused quenching: ACQ) 현상과 일치함을 확인할 수 있다.

[0155] TPA-S-Q의 이러한 특성을 다양한 물 체적 분율(water volume fraction: fDW)을 갖는 ACN/DW, DMSO/DW 및 EtOH/DW와 같은 이성분계 용매에서 확인하였다. 도 7의 (b)~(d)를 참조하면, TPA-S-Q의 형광 강도는 DW 체적 분율이 증가함에 따라 현저히 감소하였음을 확인할 수 있다. 또한, 도 8의 (a)~(c)를 참조하면, 방출 피크는 청색편이 되었음을 확인할 수 있다. 한편, 도 7의 (e) 및 도 8의 (d)를 참조하면, DMSO/Tol 혼합 용액의 경우 TPA-S-Q의 방출 피크가 청색편이 되는 것은 동일하나, 형광 강도에는 유의한 변화가 없음을 확인할 수 있다.

[0156] 상기 TPA-S-Q(화합물 1)에 대하여 TEM 이미지 분석 및 동적광산란(DLS) 분석을 수행하여 수용액에서의 나노입자 형성을 확인하였다. 도 9의 (a) 및 (b)를 참조하면, TPA-S-Q의 ACQ 현상은 상기 과정에서 평면 퀴놀린의 π-δ 적층 효과가 우세한 것에 기인함을 확인할 수 있다.

[0158] TPA-S-Q와 달리, 퀴놀린 양이온이 도입된 AIEgen TPA-S-D는 다양한 용액에서 "형광-꺼짐(fluorescence-off)" 특성을 나타내었다. 도 10의 (a)를 참조하면, TPA-S-D는 유기용매 및 수용액 모두에서 형광을 보이지 않음을 확인할 수 있다. 또한, 도 11의 (a)~(c)를 참조하면, TPA-S-D는 ACN/DW, DMSO/DW 및 EtOH/DW에서 DW 체적 분율이 증가하더라도 형광이 관측되지 않음을 확인할 수 있다. 도 12의 (a) 및 (b)를 참조하면, 이는 제한된 회전 운동 없이, DW 내에서 TPA-S-D의 느슨한 응집 상태에 기인함을 확인할 수 있다.

[0159] AIEgen이 톨루엔, n-헥산 및 에테르와 같은 저극성 용매에 불용성임을 고려하여, DMSO/Tol 혼합 용액에서 AIE 특성을 분석하였다. 도 10의 (b)를 참조하면, AIE 형광은 혼합 용매의 fDW가 80%를 초과할 때 발생함을 확인할 수 있다.

[0161] 트리페닐포스핀 양이온이 도입된 TPA-S-TPP는 양친매성이 강화되어 증가된 형광-꺼짐 특성을 나타내었다. 도 13의 (a)를 참조하면, TPA-S-TPP는 소광 효과가 증가하고, 도 14의 (a) 및 (b)를 참조하면, DW에서의 몰흡광계수(molar extinction coefficient)가 1.65 X 10^4 에서 2.60 X 10^4로 증가하여 광자 흡수능이 증가하였음을 확인

할 수 있다.

[0162] 도 13의 (b) 내지 (d)를 참조하면, TPA-S-TPP는 ACN/DW, DMSO/DW 및 EtOW/DW에서 DW 체적 분율이 증가하더라도 형광이 관측되지 않음을 확인할 수 있다. 이는 AIEgen의 양친매성 특성, 우수한 분산능 및 회전 자유도를 가짐을 의미한다. 또한, 도 13의 (e)를 참조하면, TPA-S-TPP는 fTol이 80%를 초과할 때 단단한 나노 응집체(nanoaggregates)를 형성하여 고유한 근적외선(NIR) 형광 신호가 급격히 증가함을 확인할 수 있다. 도 15(a) 및 (b)를 참조하면, 이와 같은 효과는 Dyndall 효과 실험 및 형광 현미경 이미징으로도 확인됨을 알 수 있다. 도 13(f)를 참조하면, TPA-S-TPP는 이의 증가된 친수성 특성으로 인해 TPA-S-D에 비해 형광 강도가 현저히 증가하였음을 확인할 수 있다.

[0164] **분석예 2. 세포 내 일중항 산소($^1O_2$) 검출 이미징**

[0165] 9,10-안트라세네디일-비스(메틸렌)디말로닉산(ABDA, 50 μM)을 일중항 산소(singlet oxygen) 인디케이터로 사용하여, 빛 조사 하의 Ce6(10 μM), Rose Bengal(10 μM), TPA-S-Q(10 μM; 화합물 1), TPA-S-D(10 μM; 화합물 2) 및 TPA-S-TPP(10 μM; 화합물 3)의 일중항 산소의 생성 정도를 분석하였다. 시료 혼합물(ABDA + 용액 내 프로브)에 백색광(25 mW/cm^2)을 10초 간격으로 30초간 조사한 후, Thermo Scientific Evolution 201 UV-visible 분광광도계로 ABDA(50 μM)의 흡광도를 측정하였다. 또한, 다양한 조사 시간(0-300s)에서 378nm에서의 ABDA(50 μM)의 흡광도를 측정하여 광감작 과정의 감소율(decay rate)을 분석하였다.

[0166] 도 16의 (a) 및 (b)를 참조하면, 조사 시간이 증가함에 따라 ABDA는 일중항 산소로 인해 분해 과정을 거치면서 흡수 피크가 급격히 감소함을 확인할 수 있다. 반면, 도 17을 참조하면, TPA-S-TPP의 흡수 피크는 유의한 변화를 보이지 않았으며, 이를 통해 TPA-S-TPP는 높은 일중항 산소 생성능 및 높은 광안정성(photostability)을 가짐을 확인할 수 있다.

[0167] 추가적으로, 상업용 감광제인 Ce6 및 Rose Bengal(RB)을 포함하는 다른 화합물의 일중항 산소 생성능에 대하여 실험하였다. 도 18의 (a)~(f)를 참조하면, 상업용 감광제와 비교할 때 TPA-S-TPP가 현저히 우수한 광역학 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.

[0169] **분석예 3. 전자스핀 공명 및 순간 흡광 스펙트럼**

[0170] 2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리디놀(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinol: TEMP)을 일중항 산소 포획제(trapper)로 사용하여, 빛 조사 하에서의 TPA-S-TPP의 일중항 산소 생성능을 전자스핀 공명(electron spin resonance: ESR) 분석으로 확인하였다. 도 19를 참조하면, 암 조건과 비교하여 빛 조건에서 TPA-S-TPP + TEMP 용액의 ESR 신호가 현저히 높게 검출됨을 확인할 수 있다.

[0171] AIEgen의 일중항 산소 생성 메커니즘을 증명하기 위해, 레이저 플래시 광분해(laser flash photolysis) 분석을 수행하여 TPA-S-TPP의 삼중항(triplet) 상태의 수명시간을 확인하였다. 구체적으로, Home-made ultrafast pump-probe setup을 사용하여 AIEgen TPA-S-TPP의 펨토초 순간 흡광 스펙트럼(femtosecond transient absorption spectrum)을 측정하였다. 펌프 빔(pump beam)의 파장은 355 nm으로 선택하고, 시료는 실온에서 DMSO 중 10 μM 농도로 사용하였다. 그 결과, 도 20(a)을 참조하면, TPA-S-TPP의 삼중항 수명은 11.43 μs로 측정됨을 확인할 수 있다. 도 20(b)에서 참조할 수 있는 바와 같이, 이는 AIEgen에서 화학 물질로의 에너지 전달이 선호되어, 빛 조사 하에 일중항 산소 생성 효율이 증가함에 기인한다.

[0173] **분석예 4. 시험관 내(*in vitro*) 세포 이미징**

[0174] **4-1. 세포 배양**

[0175] HeLa(human cervix adenocarcinoma) 세포를 Korean Cell Line Bank(Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 4T1 유방암세포를 중국 중의연구원(Chinese Academy of Medical Sciences)의 nstitute of Basic Medical Sciences로부터 구입하였다. 상기 세포들을 10% FBS(Invitrogen)가 보충된 배지를 사용하여 공초점 배양 디쉬에서 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건으로 24시간 동안 배양하였다.

[0177] **4-2. 세포 이미징**

[0178] HeLa 세포(1 x 10^5 cells/mL)를 배양 플레이트에 시딩(seeding)한 후, 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건 배양기에 24시간 동안 두었다. 배양 배지를 제거하고, TPA-S-D(5 μM) 및 TPA-S-TPP(5 μM)를 포함하는 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)를 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건에서 0, 0.5 시간, 1.0 시간, 1.5 시간, 2.0 시간, 3.0 시간 및 4.0 시간 동안 첨가한 다음, DPBS로 3회 세척하였다. AIEgen의 공초점 형광 이미지는 60 x 렌즈를 사용하여, 559 nm에서의 여기(excitation) 및 655-755 nm에서의 방출(emission)에서 얻었다(FV 1200, Olympus).

[0179] 도 21을 참조하면, 양친매성 TPA-S-TPP로 HeLa 세포를 처리하면 2시간 배양 후 높은 신호 대 잡음비로 NIR 형광 신호가 나타남을 확인할 수 있다(도 21의 M, P). 이를 통해, TPA-S-TPP가 세포 내에 성공적으로 침투하였음을 알 수 있다. 반면, TPA-S-D로 처리된 HeLa 세포는 낮은 형광 신호를 보였으며, 이를 통해 TPA-S-D는 암세포 내로 침투가 어려움을 확인할 수 있다(도 21의 A~H). TPA-S-D의 이와 같은 낮은 세포 흡수율은 긴 소수성 알킬기가 세포막 통과를 제한했기 때문일 것으로 예상되었다.

[0181] **4-3. 공동-국소화 분석**

[0182] HeLa 세포(1 x 10^5 cells/mL)를 배양 플레이트에 시딩한 후, 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건 배양기에 24시간 동안 두었다. 배양 배지를 제거하고, TPA-S-TPP(5 μM)를 포함하는 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)를 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건에서 1.5 시간 동안 첨가한 다음, commercial Hochest 33342, Lyso-tracker green 및 Mito-tracker green을 각각 세포에 첨가하였다. 30분의 추가 배양 후, HeLa 세포를 DPBS로 2회 세척하고 FV 1200 공초점 현미경으로 이미지를 얻었다.

[0183] 도 22를 참조하면, 양친매성 TPA-S-TPP에 의한 빨간색 형광 신호(도 22의 S2)와 미토콘드리아 염료의 녹색 형광 신호(도 22의 S1)가 거의 완벽하게 겹치는 것을 확인할 수 있다(도 22의 S3). 이 때 피어슨 계수는 0.86으로, 이는 핵(P=0.32; 도 22의 Q1-Q4), 리소좀(P=0.45; 도 22의 R1-R4) 및 지질 방울(P=0.34; 도 22의 T1-T4)보다 현저히 높으며, 선택적으로 미토콘드리아에 축적된 트리페닐포스핀 및 퀴놀린의 이중 양전하에 따른 상승적 효과에 기인한다. 상기 결과를 통해, TPA-S-TPP가 미토콘드리아에 대한 우수한 표적화 특성을 가짐을 확인하였다.

[0184] 반면, 도 23 및 24를 참조하면, TPA-S-Q로 처리된 HeLa 세포는 공초점 현미경으로 관찰 시 밝은 노란색 반점을 보임을 확인할 수 있고, 이는 TPA-S-Q의 친유성으로 인해(높은 Log*P* 값으로 관측됨) 세포질의 지질 방울에 축적됨에 기인하는 것으로 예상되었다. 도 25를 참조하면, 미토콘드리아 염료(Mito-tracker), 산성 소포체인 리소좀에 대한 염료(lyso-tracker) 및 지질 방울에 대한 Nile Red 염료 처리에 따른 이미징 분석 결과로 상기 예상이 검증됨을 확인할 수 있다.

[0185] 상기 결과를 통해, 일 측면에 따른 TPA-S-TPP(화합물 3)는 리소좀에서 미토콘드리아에 이르는 살아있는 세포의 하위기관(suborganelles) 사이를 오가며 기능할 수 있음을 알 수 있었다.

[0187] 한편, 상기 오일-물 분배계수(Oil-water Partition-coefficient, Log*P*)는 Shake-flask 방법으로 측정하였다. 물과 옥탄올을 혼합하고 완전히 흔들어 평형 상태로 만든 후, 두 층을 분리하여 물로 포화된 옥탄올과 옥탄올로 포화된 물을 얻었다. 시료를 물로 포화된 옥탄올 1mL에 용해시킨 다음, 여기에 9mL의 옥탄올로 포화된 물을 첨가하였다. 상기 혼합물을 37℃에서 24시간 동안 격렬하게 흔들었다. 그런 다음 Uv-Vis 분광법으로 시료의 농도를 기록하고 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

[0188] $\text{Log}P_{o/w}$ = Log([solute]octanol/[solute]water)

[0190] **분석예 5. CCCP에 의한 AIEgen의 미토콘드리아 국소화**

[0191] 광감작제에 의해 생성되는 일중항 산소는 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential: MMP)를 감소시키고, 이는 광감작제의 오프-타겟(off-target)을 야기하며 결과적으로 광역학 치료에 있어서 항암 효과를

감소시키게 된다. 이에, AIEgen TPA-S-TPP가 미토콘드리아에 영구적으로 위치할 수 있는지 확인하기 위해, 미토콘드리아 막전위를 탈분극시키는 카르보닐 시아니드 3-클로로페닐하이드라존(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone: CCCP)을 사용하여 미토콘드리아 국소화 실험을 수행하였다.

[0192] 구체적으로, HeLa 세포(1 x 10^5 cells/mL)를 배양 플레이트에 시딩한 후, 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건 배양기에 24시간 동안 두었다. 배양 배지를 제거하고, TPA-S-TPP(5 μM)를 포함하는 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)를 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건에서 2 시간 동안 첨가한 다음, CCCP(10 μM)를 첨가하여 20분 동안 추가 배양하였다. 세포들을 DPBS로 2회 세척하고 FV 1200 공초점 현미경으로 이미지를 얻었다. 이와 동일하되, CCCP를 먼저 첨가한 다음 프로브를 첨가하도록 순서만 바꾸어 동일한 실험을 수행하였다.

[0193] 도 22를 참조하면, HeLa 세포를 Mito-tracker Red로 20분 동안 처리했을 때 형광 신호가 선명하게 관찰되었다(도 22의 V1). 반면, CCCP를 먼저 처리하고 mito-tracker Red를 처리한 경우, 형광 신호는 거의 검출할 수 없는 수준으로 현저히 감소함을 확인할 수 있다(도 22의 W1, X). 상기 결과를 통해, 상업용 미토콘드리아 염료가 미토콘드리아 막 전위에 대해 높은 의존성을 가짐을 확인할 수 있다. 대조적으로, 처리되지 않은 세포들과 유사하게, 먼저 CCCP와 함께 배양된 후 TPA-S-TPP 처리된 HeLa 세포의 경우, 현저한 형광 방출이 관찰됨을 확인할 수 있다(도 22의 W3, Y).

[0194] 한편, 도 26을 참조하면, 놀랍게도 먼저 TPA-S-TPP와 배양된 후 CCCP를 처리한 HeLa 세포의 경우 형광 강도가 유지되며, 이는 TPA-S-TPP만을 처리한 그룹(도 22의 V3)과 일치하는 결과임을 확인하였다. 즉, TPA-S-TPP는 감소된 미토콘드리아 막 전위에 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 이는 미토콘드리아 막에 단단히 고정될 수 있을 뿐만 아니라, 이중 전하 효과도 갖는 TPA-S-TPP의 고유한 특성에 기인하는 것으로 예상되었다.

[0195] 상기 결과를 통해, 미토콘드리아를 표적으로 하는 기존의 광감작제의 경우 미토콘드리아 막 전위 감소에 따라 미토콘드리아로부터 누출되는 한계가 있었던 반면, 일 측면에 따른 TPA-S-TPP는 이와 같은 한계를 극복하고 미토콘드리아에 영구적으로 고정될 수 있어 종양 세포 특이적인 광역학 치료를 가능하게 함을 확인하였다.

[0197] **분석예 6. 광안정성 평가**

[0198] 지속적인 레이저 조사 조건에서 TPA-S-TPP의 광안정성을 평가하였다. 대조군으로는 상업용 미토콘드리아 염료를 사용하였다.

[0199] 도 27을 참조하면, 약 7분 동안 지속적인 광 조사 후 미토콘드리아 염료(녹색)는 과도한 광표백(photobleaching) 현상으로 형광 신호가 검출되지 않았다. 또한, 도 28을 참조하면, 이의 고유한 ACQ 특성도 바이오이미징에 도움이 되지 않음을 확인할 수 있다. 반면, TPA-S-TPP의 경우 20분 동안의 지속적인 광 조사에도 형광 강도의 손실이 거의 관찰되지 않았으며, 미토콘드리아 염료의 형광 강도가 원래의 15%로 감소한 것과 대조적으로 지속적인 광 조사 후에도 원래의 100%의 강도를 유지함을 확인하였다. 상기 결과를 통해, TPA-S-TPP는 높은 광안정성 특성을 가짐을 확인하였다.

[0201] **분석예 7. 세포 내 일중항 산소($^1O_2$) 및 세포생존율 분석**

[0202] **7-1. 세포 내 일중항 산소 검출**

[0203] 세포 내 일중항 산소 생성능은 AIEgen 광감작제를 사용한 광역학 치료의 효과를 결정하는 요소이다. 2,7-디클로로디하이드로플루오레세신 디아세테이트(2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate, DCF-DA)를 사용하여 백색광 조사 하에서 세포 내 일중항 산소를 측정하였다. HeLa 세포를 공초점 배양 플레이트에 시딩한 후, 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건 배양기에 24시간 동안 두었다. 배양 배지를 제거하고, TPA-S-TPP(5 μM)를 포함하는 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)를 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건에서 1 시간 동안 첨가한 다음, DCF-DA (10 μM)를 20분 동안 추가 배양하였다. 세포들을 DPBS로 2회 세척하고 백색광에(60 mW/cm^2) 다양한 시간(0, 5분, 10분)으로 노출시켰다. 또한, 광 조사 전에 NaN_3 (50 μM)을 첨가하여 활성산소종(ROS) 생성 소모량을 측정하였다. 대조군으로는 DCF-DA(10 μM)만 처리한 세포를 사용하였다. 공초점 형광 이미지는 473 nm에서의 여기 및 490-540 nm에서의 방출에서 얻었다(FV 1200, Olympus).

[0204] 도 29를 참조하면, DCF-DA 분석 결과 대조군과 비교하여(도 29의 A, B) 광 조사 하에서 TPA-S-TPP로 전처리된 HeLa 세포는 뚜렷한 녹색 형광 신호를 나타냄을 확인할 수 있다(도 29의 C, D). 또한, 일중항 산소의 대표적인 제거제(scavenger)인 NaN_3 존재 하에서, HeLa 세포의 녹색 형광 신호는 약해짐을 확인할 수 있다(도 29의 E). 도 30을 참조하면, 이는 NaN_3가 HeLa 세포에서의 일중항 산소 생성을 효과적으로 억제함에 기인한 것임을 확인할 수 있다. 상기 결과를 통해, 양친매성 TPA-S-TPP는 세포 투과능 및 광 조사에 의해 조절되는 일중항 산소 생성능 및 이에 따른 세포 사멸능을 가짐을 확인하였다.

[0206] **7-2. 세포생존율 분석**

[0207] AIEgen의 세포 독성을 확인하기 위해 MTT 분석을 수행하였다. 구체적으로, 10% FBS를 포함하는 100 μL 배지에서 HeLa 세포(1 x 10^5 cells/mL)를 96-웰 플레이트에 시딩한 후, 24시간 동안 두어 플레이트에 부착시켰다. 100 μL/well PBS로 플레이트를 세척 후, 세포들을 다양한 농도의 프로브를 포함하고, FBS가 없는 배지에서 37℃, 2시간 동안 배양하였다. 그 후, 10% FBS가 보충된 배지로 교체하고 백색광(100 mW/cm^2)을 30분 동안 조사하였다. 24시간 동안 추가 배양 후, 각 웰에 MTT 용액(5 mg/mL)을 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건에서 4시간 동안 첨가하였다. 이후 배지를 조심스럽게 제거하고, 100 μL DMSO에 purple crystal을 15~20분 동안 용해시킨 다음, 마이크로플레이트 리더를 사용하여 650 nm에서 용액의 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(cell viability)은 대조군 배양값에 대한 백분율로 표시하였고, 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

[0208] 세포 생존율(%) = $(OD_{dye} - OD_{blank})/(OD_{control} - OD_{blank})$ X 100

[0209] 도 29를 참조하면, AIEgen 농도가 증가함에 따라 HeLa 세포의 세포 생존율은 약 90%의 매우 높은 수준으로 유지되나, 30분 동안 백색광 조사 시 세포 생존율이 현저히 감소하였음을 확인할 수 있다(도 29의 G). 이는 AIEgen 자체는 낮은 세포 독성을 가지나, 광 조사 시에는 암세포에 대한 높은 세포 독성을 가짐을 의미한다. 상기 결과를 통해, 일 측면에 따른 TPA-S-TPP는 광역학 치료에 있어서 AIE 광감작제로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0210] 한편, TPA-S-Q(화합물 1) 및 TPA-S-D(화합물 2)에 대하여도 동일한 실험을 수행하였다. 도 29 및 도 31을 참조하면, HeLa 세포에 TPA-S-Q 및 광 조사 시 세포 생존율은 약 78.49%(도 29의 f) 및 약 78,74%(도 31)로 감소함을 확인할 수 있다. 이를 통해, 세포 수준에서 이상적인 광역학 효과를 나타낼 수 있는 것은 TPA-S-TPP(화합물 3)임을 다시 한 번 확인하였다.

[0212] **분석예 8. Annexin V-FITC/PI 염색**

[0213] 세포 사멸이 일어나면 세포막의 안쪽에 존재하던 포스파티딜 세린(phosphatidyl serine)이 세포막의 바깥으로 노출되며, 이는 포스파티딜 세린과 높은 친화력을 갖는 Annexin V-FITC로 검출할 수 있다. PI는 세포막이 완전히 손상된 괴사 세포(necrosis) 또는 말기 사멸 세포(late apoptotic cell)의 세포막은 통과하여 핵을 염색할 수 있다. 이에, Annexin V-FITC/PI 염색을 통해 광역학 치료 과정에서의 세포 사멸을 평가하였다.

[0214] 구체적으로, HeLa 세포를 공초점 배양 디쉬에서 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 그런 다음, 세포들을 다음과 같이 처리하였다: 그룹 1, 백색광을 30분간 조사(Control); 그룹 2, TPA-S-TPP(5 μM)과 함께 37℃, 2시간 동안 배양(Dark); 그룹 3, TPA-S-TPP(5 μM)과 함께 37℃, 2시간 동안 배양 후 백색광을 10분간 조사(TPA-S-TPP + light 10 min); 그룹 4, TPA-S-TPP(5 μM)과 함께 37℃, 2시간 동안 배양 후 백색광을 30분간 조사(TPA-S-TPP + light 30 min). 처리 후, HeLa 세포를 Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit로 염색하고 공초점 형광 이미지를 얻었다(FV 1200, Olympus).

[0215] 도 29를 참조하면, 대조군(도 29의 H)과 비교하여 TPA-S-TPP로 전처리된 HeLa 세포는 암 조건에서 형광 신호를 나타내지 않았지만(도 29의 I), 광 조사 하 Annexin V-FITC 채널에서 강한 녹색 형광 신호(도 29의 J1, K1) 및 PI 채널에서 강한 빨간색 신호(도 20의 J2, K2)를 나타냄을 확인할 수 있다. 또한, 도 32를 참조하면 TPA-S-TPP로 전처리 및 광 조사된 HeLa 세포는 공초점 현미경 이미징 결과 세포막이 완전히 파괴되었음을 확인할 수 있다. 상기 결과를 통해, TPA-S-TPP가 광 조사 하에서 암세포의 세포 사멸을 효과적으로 유도함을 확인하였다.

[0217] **분석예 9. 미토콘드리아 막 전위(MMP) 분석**

[0218] **9-1. JC-1 염색**

[0219] HeLa 세포를 공초점 배양 플레이트에서 37℃, 습윤, 5% CO_2 조건으로 배양한 후, DPBS로 세척하고 TPA-S-TPP(5 μM)를 포함하는 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)와 함께 2시간 동안 배양하였다. 세포들을 다시 한 번 DPBS로 세척하고, 신선한 세포 배양 배지를 추가한 다음, 백색광(100 mW/cm^2)을 20분 동안 조사하였다. 30분 동안 배양 후, 37℃에서 HeLa 세포에 형광 프로브인 JC-1(2 μg/mL)을 포함하는 신선한 세포 배양 배지를 처리하였다. 세포들을 DPBS로 3회 세척하고 공초점 형광 이미지를 얻었다(FV 1200, Olympus).

[0220] JC-1은 미토콘드리아 막 전위가 정상이면 붉은색을, 감소하면 녹색을 나타낸다. 도 29를 참조하면, 광 조사 시 TPA-S-TPP와 함께 배양된 HeLa 세포의 녹색 형광 신호는 강해지고(도 29의 M2), 빨간색 형광 신호는 약해짐을 확인할 수 있다(도 29의 N2). 도 33을 참조하면, 이는 암 조건에서 TPA-S-TPP를 처리한 그룹("TPA-S-TPP + dark")에 비해 녹색-대-빨간색의 형광 강도 비율이 6.14배로 증가한 것으로, 상기 결과를 통해 TPA-S-TPP로 전처리 및 광 조사에 의해 MMP가 감소하였음을 확인하였다.

[0222] **9-2. Cleaved caspase 3 면역형광분석**

[0223] 미토콘드리아 손상은 시토크롬 C의 방출을 촉진하여 caspase 3의 활성화와 같은 세포사멸 연속반응(apoptotic cascade)을 개시한다. 이에, cleaved caspase 3 항체를 사용하여 caspase 3 활성화를 분석하였다.

[0224] 구체적으로, HeLa 세포를 슬라이드에서 24시간 동안 배양하고 TPA-S-TPP로 2시간 동안 처리한 뒤 빛을 조사(0, 5, 10, 20 분)하였다. 이를 PBS로 세척한 다음 4% 파라포름알데히드로 15분 고정하고, 이어서 0.1% Triton X-100을 포함하는 PBS로 실온에서 15분간 투과과정(permeabilization)을 거쳤다. 그런 다음, 세포를 블로킹 버퍼(10% 정상 염소 혈청을 첨가한 PBS)를 이용하여 1시간 동안 배양하고, 1.5% 정상 염소 혈청 중의 1차 항체(Cell Signaling Tech.)로 4℃에서 밤새 배양하였다. 잉여 1차 항체를 제거하기 위해 세포를 PBS, 5분 간격으로 3회 세척하였다. Alexa Fluor 488(Cell Signaling Tech.)이 결합된 2차 항체를 세포에 첨가하여, 실온에서 1시간 동안 암실에서 배양하였다. 그런 다음, HeLa 세포들을 PBS, 5분 간격으로 3회 세척하고 UltraCruz Mounting Medium with DAPI(Santa Cruz Biotech.)를 사용하여 마운팅하였다. 형광 이미지는 공초점 현미경(FV1200, Olympus)으로 DAPI(ex. 405 nm/em. 430-455 nm), Alexa Fluor 488(ex. 473 nm/em. 490-590 nm)에서 얻었다.

[0225] 도 29를 참조하면, AIEgen TPA-S-TPP와 함께 배양된 HeLa 세포의 녹색 형광 신호(도 29의 Q)가 암 조건에서 배양된 대조군(도 29의 P)에 비해 현저히 강함을 확인할 수 있다. 또한, 이들의 평균 형광 강도는 세포 이미징 결과와 일치하였다(도 29의 P~T).

[0227] **9-3. 웨스턴 블로팅**

[0228] 상기 결과를 웨스턴 블로팅으로 확인하였다. 구체적으로, HeLa 세포를 6 웰-플레이트에서 24시간 동안 배양하고 다음과 같이 처리하였다: 그룹 1, blank + 빛(7분); 그룹 2, blank + 빛(15분); 그룹 3, TPA-S-TPP(3 μM) + 암실; 그룹 4, TPA-S-TPP(3 μM) + 빛(7분); 그룹 5, TPA-S-TPP(3 μM) + 빛(15분). 그런 다음, PBS로 린스하고 RIPA 버퍼(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.4)로 용해시키고, 30분 동안 얼음 위에 놓은 후 4℃, 13,000 rpm, 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 수집하고 BCA protein assay kit(Thermo Scientific)를 사용하여 단백질 농도를 정량화하였다. 동량의 단백질(35 μg)을 SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 막으로 이동시켰다. 막을 블로킹 버퍼(5% nonfat dry milk in TTBS (0.1% Tween 20-TBS))로 1시간 동안 블로킹하고 TTBS로 세척한 뒤 블로킹 버퍼에 용해된 1차 항체를 처리하여 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 후, 막을 TTBS로 3회 세척하고 2차 항체와 2시간 동안 배양한 뒤 Pierce ECL Western blotting substrate(Thermo Scientific)를 사용하여 단백질 밴드를 확인하였다. 1차 항체, caspase-3, β-actin 및 anti-rabbit IgG HRP에 연결된 2차 항체는 모두 Cell signaling Tech에서 구매하여 사용하였다.

[0229] 도 29를 참조하면, "TPA-S-TPP + light" 그룹에서 세포 내 cleaved caspase 3 발현이 상향 조절되었음을 확인할 수 있다(도 29의 U). 상기 결과를 통해, TPA-S-TPP는 광 조사 하에서 일중항 산소 생성에 의해 미토콘드리아 막 전위를 감소시켜 시토크롬 C의 방출을 촉진하고, 이어서 caspase 3을 활성화시켜 미토콘드리아에 의해 매개

되는 세포 사멸을 효율적으로 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0231] **분석예 10. 생존/사멸 분석**

[0232] HeLa 세포를 공초점 배양 플레이트에서 37℃ 습윤, 5% CO_2 조건으로 배양한 후, 다음과 같이 처리하였다: 그룹 1, 백색광으로 10분간 조사(Control + light 10 min); 그룹 2, 백색광으로 30분간 조사(Control + light 30min); 그룹 3, TPA-S-TPP(5 μM)와 함께 37℃, 2시간 동안 배양(TPA-S-TPP + Dark); 그룹 4; TPA-S-TPP(5 μM)와 함께 37℃, 2시간 동안 배양 후 백색광을 10분간 조사(TPA-S-TPP + light 10 min); 그룹 5, TPA-S-TPP(5 μM)과 함께 37℃, 2시간 동안 배양 후 백색광을 30분간 조사(TPA-S-TPP + light 30 min). 처리 후, HeLa 세포를 Calcein AM(3 μM, Ex = 473 nm, Em = 490-540 nm) 및 Propidium Iodide(15 μg, Ex = 559 nm, Em = 575-675 nm)로 염색하고 공초점 형광 이미지를 얻었다(FV 1200, Olympus).

[0233] 도 34를 참조하면, 대조군 및 "TPA-S-TPP + dark" 그룹 모두에서 강한 녹색 형광 신호가 관찰되었으며, 이를 통해 세포에 손상이 없음을 확인할 수 있다(도 34의 A2, B2, C2). 반면, TPA-S-TPP 처리와 함께 광 조사된 암세포는 광조사로 사멸하였고, PI는 심각하게 손상된 세포막을 가로질러 핵으로 들어가 빨간색 형광 신호를 생성하였다(도 34의 D3, E3). 이 때, 녹색 형광 신호는 현저히 감소하였다(도 34의 D2, E2). 상기 결과를 통해, TPP-S-TPP는 광역학 치료 시 일중항 산소의 생성에 의해 세포사멸을 효과적으로 유도할 수 있음을 다시 한 번 확인하였다.

[0235] **분석예 11. 생체 내 이미징 및 광선치료 효과 분석**

[0236] 동물실험은 대련 기술대학의 동물 윤리 위원회의 승인 하에 수행하였다(Certificate number/Ethics approval no. 2018-043). 6~8주령의 암컷 BALB/c 마우스는 대련 의과대학의 SPF 실험동물 센터에서 구입하였고, 4T1 종양 세포(1 x 10^6개 세포/마우스)를 이식한 마우스 종양 모델을 제조하여 사용하였다.

[0237] 종양 부피가 약 150 mm^3로 커진 시점에서, 생체 내(*in vivo*) 이미징 및 광선치료(phototherapy)를 수행하였다. 마우스를 마취시키고 AIEgen TPA-S-TPP (200 μM, 100 μL)를 in situ 주사한 후, 소동물 이미징 장비(NightOWL II LB983)를 사용하여 다양한 시간대에서(1, 2, 3, 4, 6, 12, 24 및 48시간) NightOWL II LB983) 550 nm에서의 여기 레이저 및 700 nm의 방출 필터를 통해 이미지를 얻었다. 광선치료의 경우, 마우스들을 다음 4개 그룹으로 무작위 분리하여 수행하였다(그룹 당 5마리): 1, "PBS + dark"; 2, "PBS + light"; 3, "TPA-S-TPP + dark"; 4, "TPA-S-TPP + light". TPA-S-TPP(200 μM, 100 μL)의 종양내 주사(intratumor injection) 후, 종양 부위를 550 nm Xe lamp(200 mW/cm^2)에 30분간 노출시키고, 캘리퍼를 사용하여 14일 동안 2일마다 종양 부피를 측정하였다. 종양 부피는 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

[0238] V (mm^3) = a (mm) X a (mm) Xb (mm)/2

[0239] (V, 종양 부피; a, 종양 너비(width); b, 종양 길이(length)를 나타냄.)

[0240] 도 35를 참조하면, 마우스의 종양 부위에서 NIR 형광 신호는 대조군에 비해 점진적으로 증가하여 12시간 후 최고점에 도달했으며, 48시간 후에도 뚜렷한 형광 신호가 관찰됨을 확인할 수 있다(도 35의 A). 생체 외(*ex vivo*) 기관 이미징에서도 동일한 결과를 확인하였다(도 35의 B). 또한, 그룹 1, 2 및 3의 경우 14일간의 치료 후 종양 성장이 일정하게 증가함을 확인하여, 광 조사 자체 또는 TPA-S-TPP 단독 처리로는 암 치료 효과가 나타나지 않음을 알 수 있었다(도 35의 C). 반면, AIEgen과 함께 광선치료를 수행한 경우, 종양 성장은 현저히 억제되었다. 종양의 크기를 육안으로 확인 시에도 상기와 동일한 결과를 확인할 수 있었다(도 34의 D). 상기 결과를 통해, TPA-S-TPP는 광선치료에 사용 시 종양 성장을 현저히 억제시켜 높은 광역학 치료 효과를 달성할 수 있음을 확인하였다.

[0242] **분석예 12. H&E 염색**

[0243] 상기 분석예 11과 동일한 방법으로 실험한 후, 마우스들을 안락사시키고 주요 기관(심장, 간, 비장, 폐 및 신장)을 수득하여 파라핀 절편으로 만든 다음, H&E 염색을 통해 조직학적 분석을 수행하였다. 마우스 체중은 전

자 저울(analytical balance)을 사용하여 측정하였다.

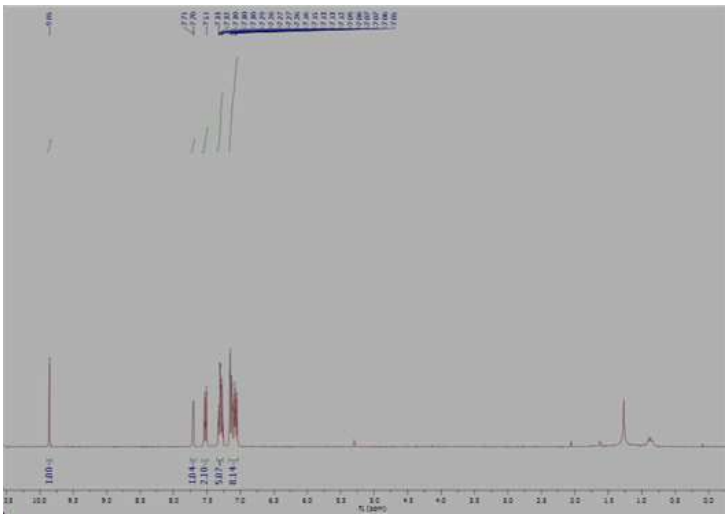
[0244] 도 35를 참조하면, "TPA-S-TPP + light" 그룹과 다른 그룹 사이에 마우스 체중에 유의한 차이가 없었고(도 35의 E), 치료 과정에서 마우스 사망이 발생하지 않았음을 확인할 수 있다(도 35의 F). 또한, 조직학적 분석 수행 결과 어떤 기관에서도 눈에 띄는 염증이나 세포 괴사 병변이 관찰되지 않음을 확인할 수 있다(도 35의 G). 상기 결과를 통해, TPA-S-TPP는 높은 생물학적 안정성을 가지며, 따라서 생체 적합성이 우수한 효율적인 AIE 광감작제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0246] 상기 분석예들로부터, 일 측면에 따른 화합물은 암세포 미토콘드리아에 오래 머물러 있어 광안정성이 우수하고, 광 조사 시 표적 부위(암세포)에 대해서만 부작용 없이 효과적인 치료가 가능함을 확인하였다. 또한, 근적외선 파장 영역에서의 응집-유도 특성에 기인하여 배경형광 대비 효율이 현저히 높고, 미토콘드리아 막 전위 변화에 영향을 받지 않아 기존의 형광염료, 광감작제의 단점을 극복할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 일 측면에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 형광 이미징, 광역학 진단 및 치료, 암을 비롯한 다양한 질병의 치료에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

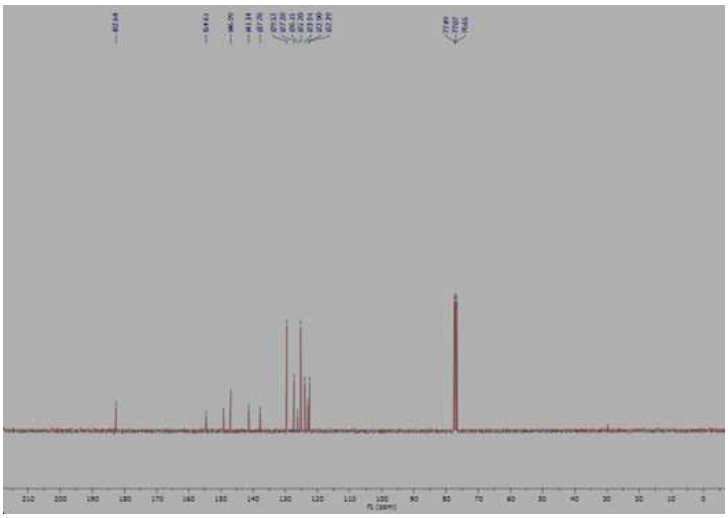
[0248] 전술한 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

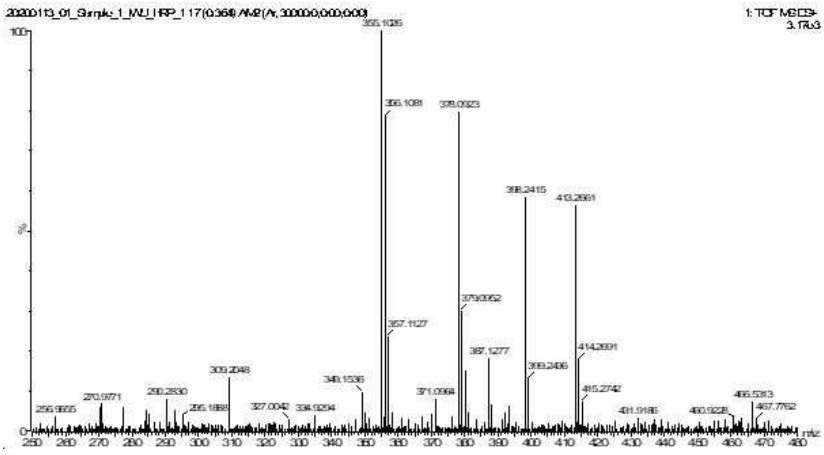
도면1a



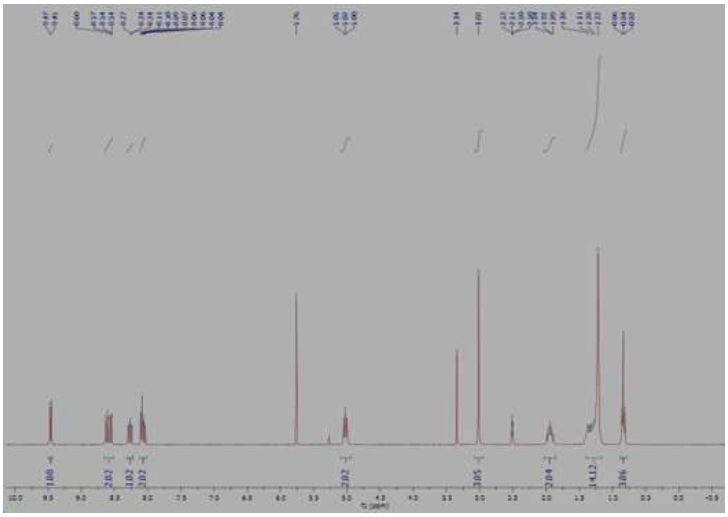
도면1b



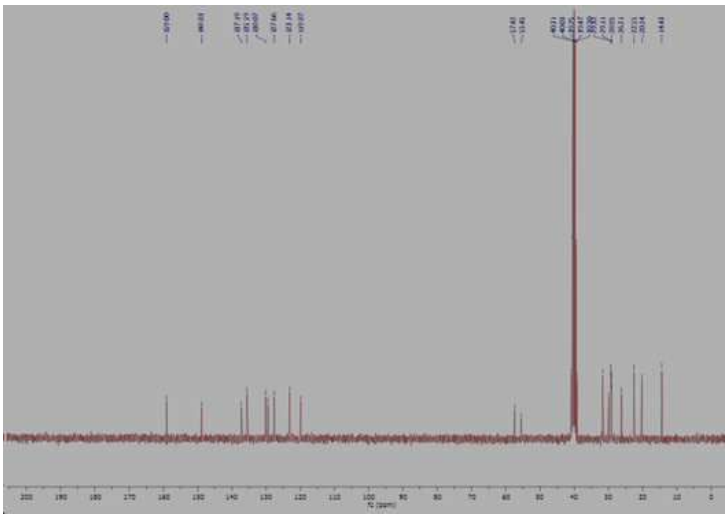
도면1c



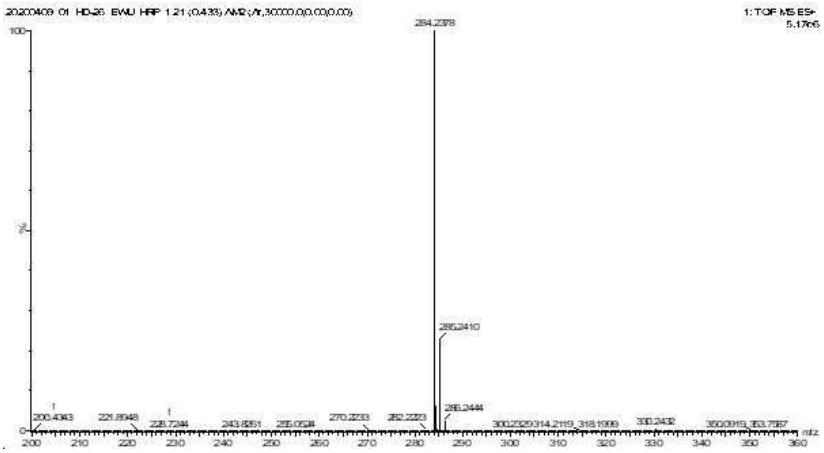
도면2a



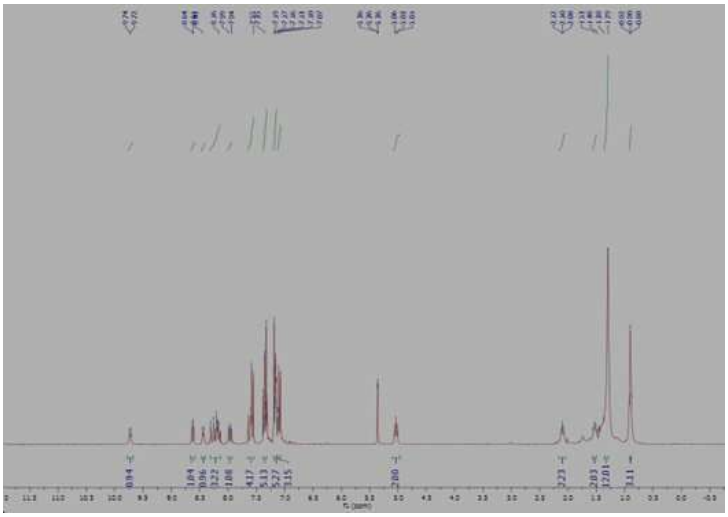
도면2b



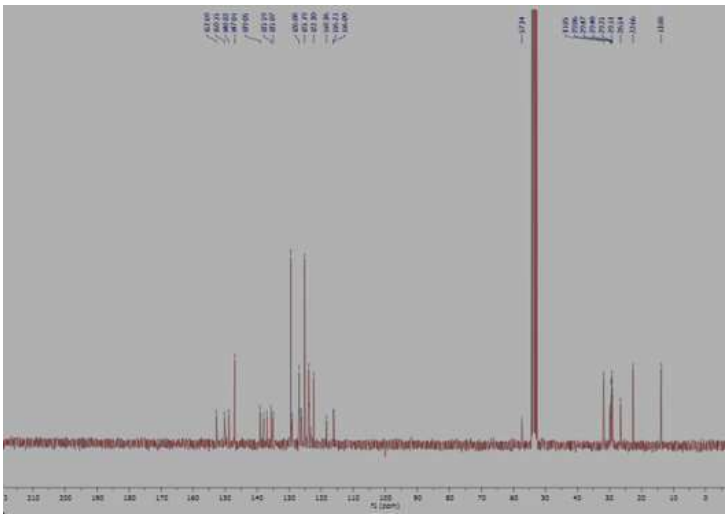
도면2c



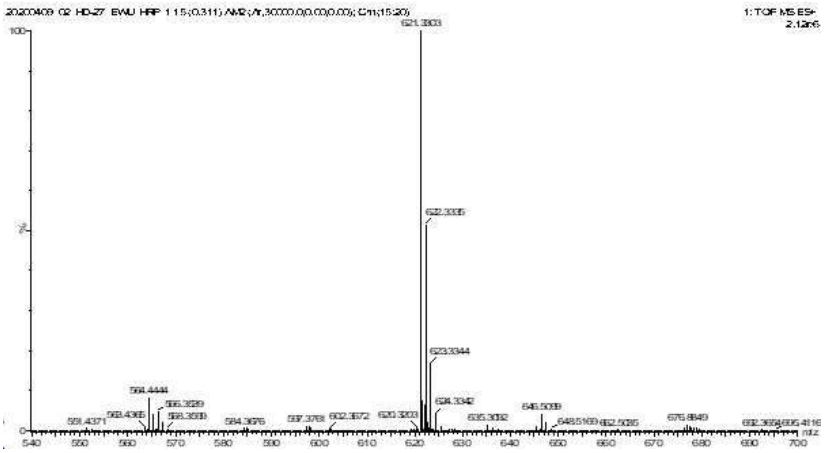
도면3a



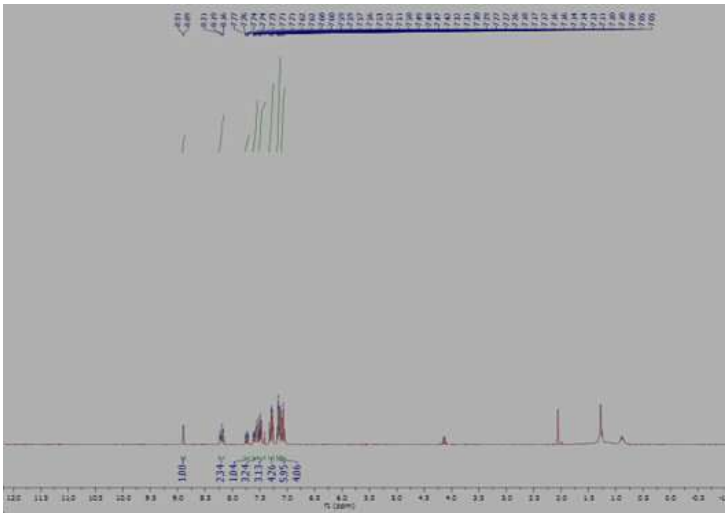
도면3b



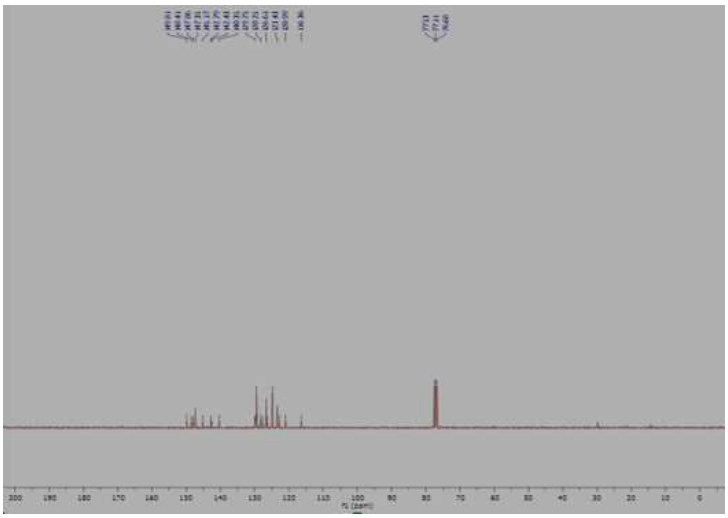
도면3c



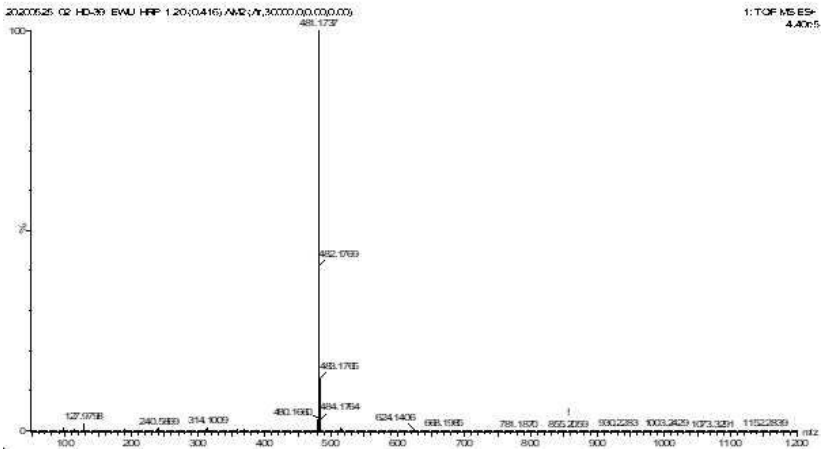
도면4a



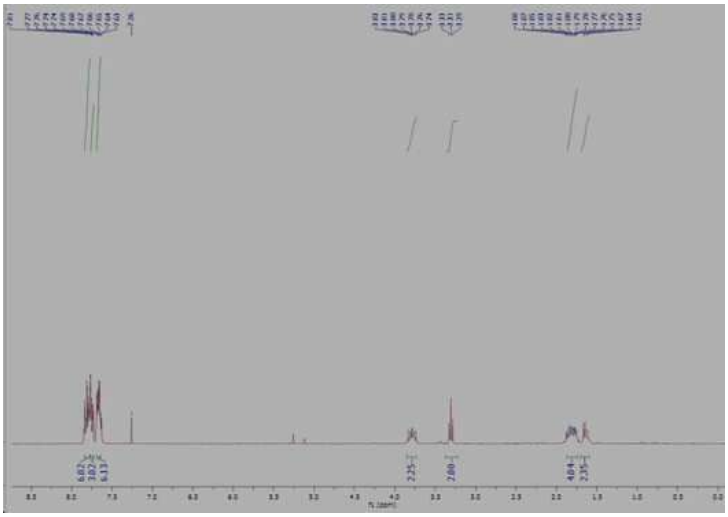
도면4b



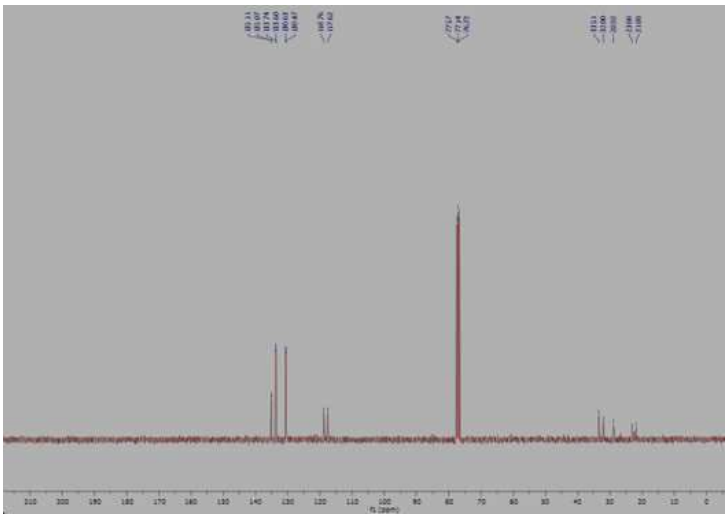
도면4c



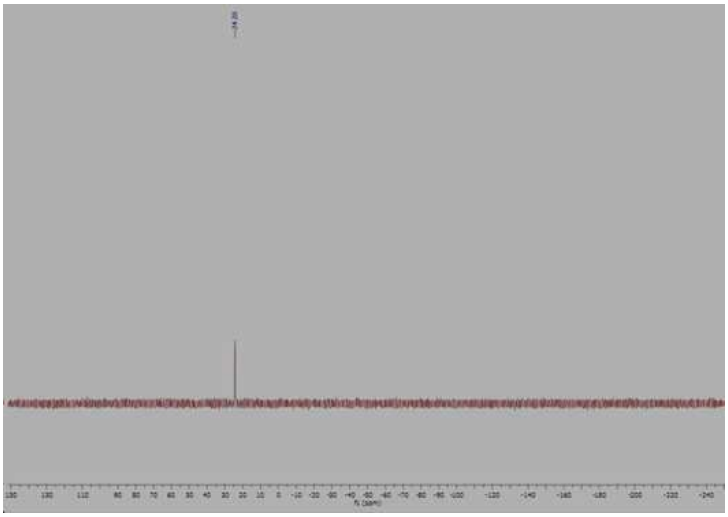
도면5a



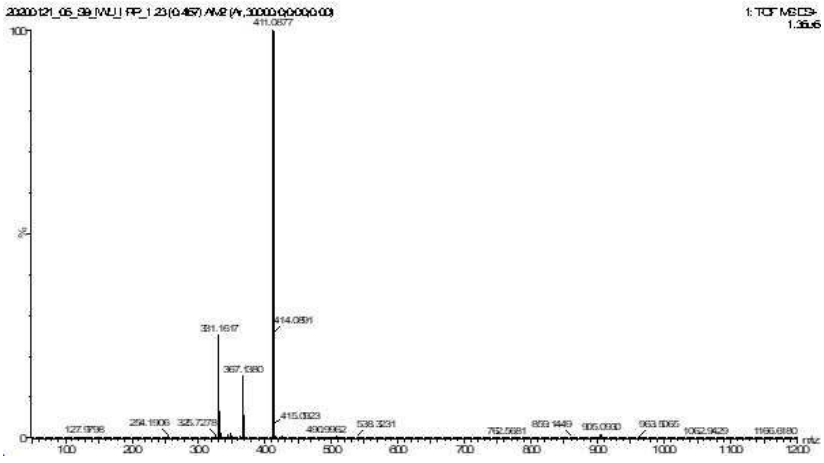
도면5b



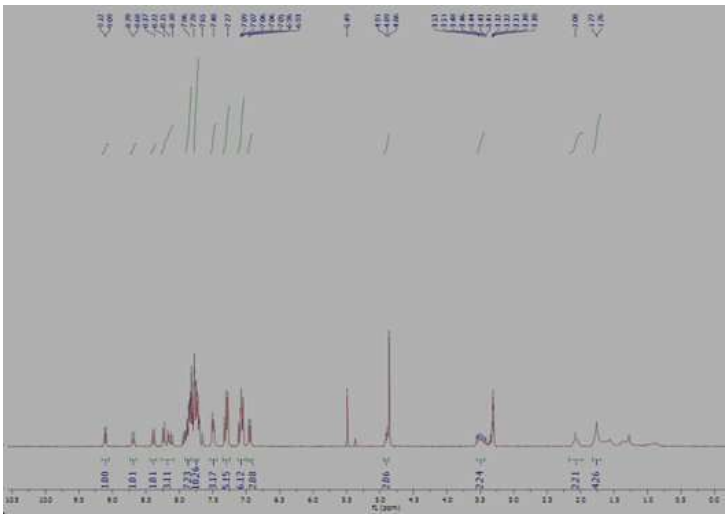
도면5c



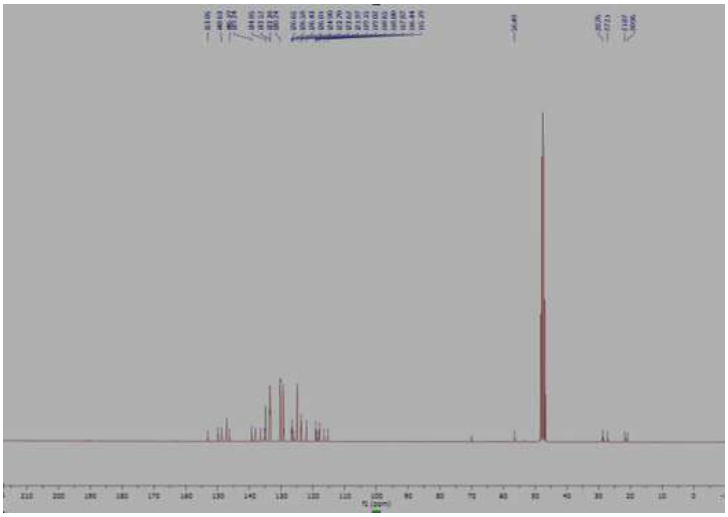
도면5d



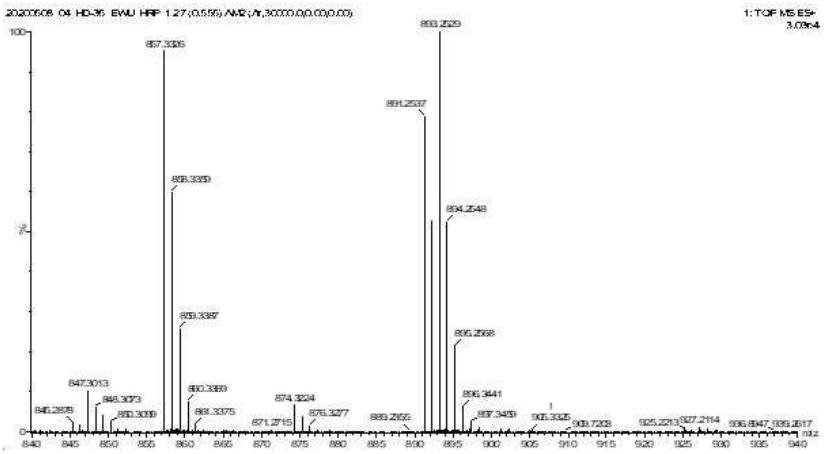
도면6a



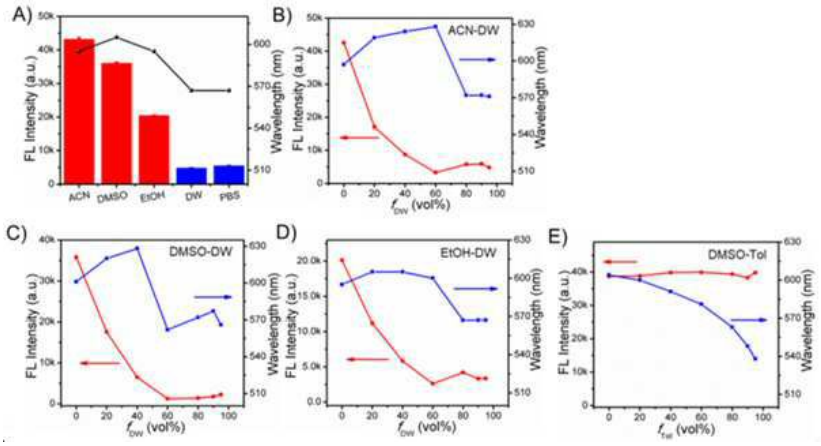
도면6b



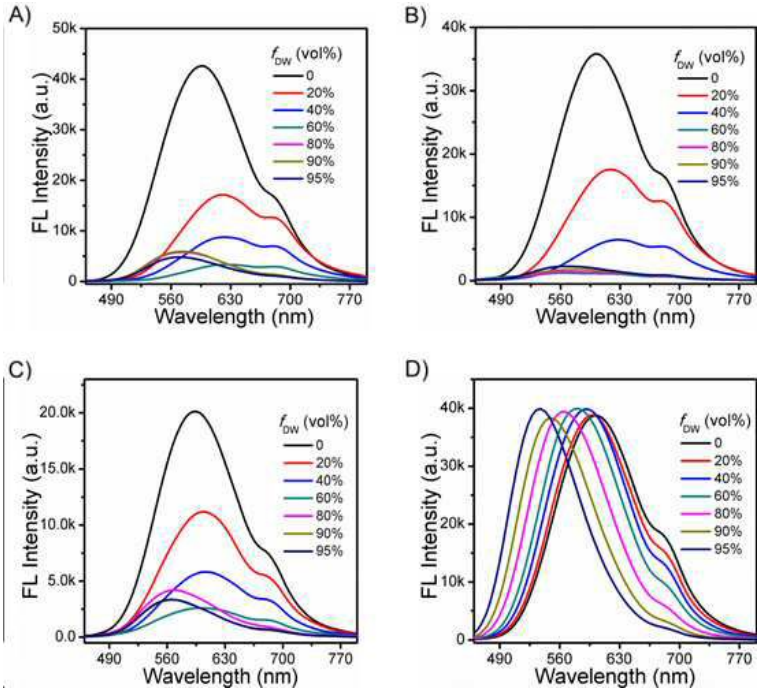
도면6c



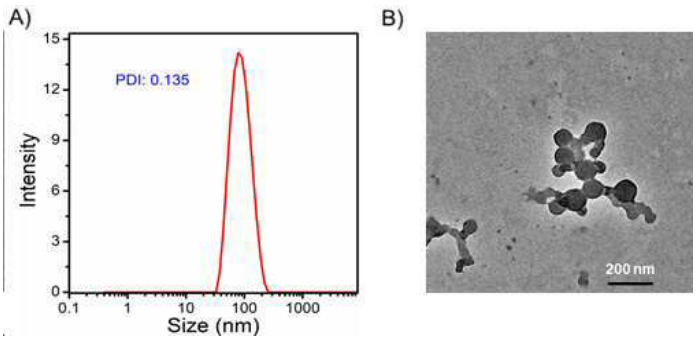
도면7


A)
B)
ACN-DW
C)
DMSO-DW
D)
EtOH-DW
E)
DMSO-Tol
FL Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
ACN
DMSO
EtOH
DW
PBS

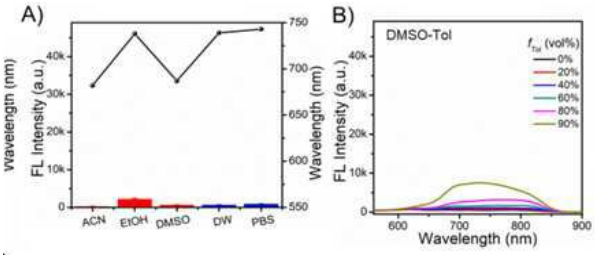
도면8


A)
B)
C)
D)
FL Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
f_{DW} (vol%)
0
20%
40%
60%
80%
90%
95%

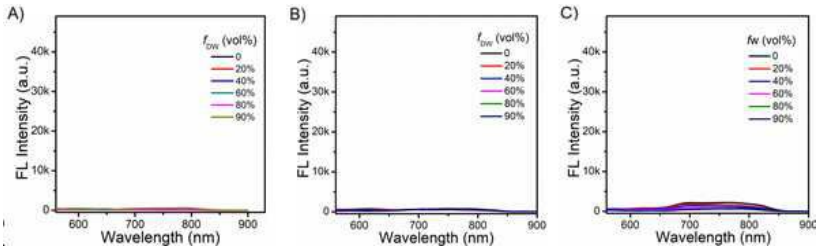
도면9


A)
B)
PDI: 0.135
Intensity
Size (nm)
200 nm

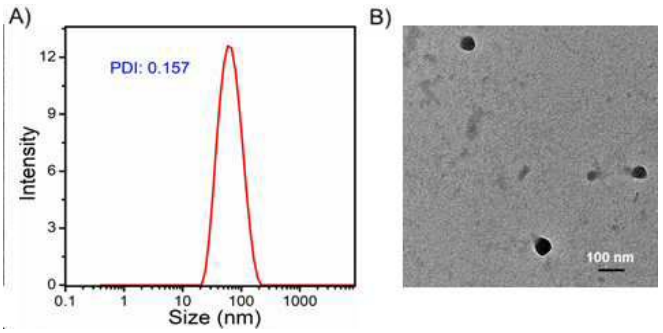
도면10



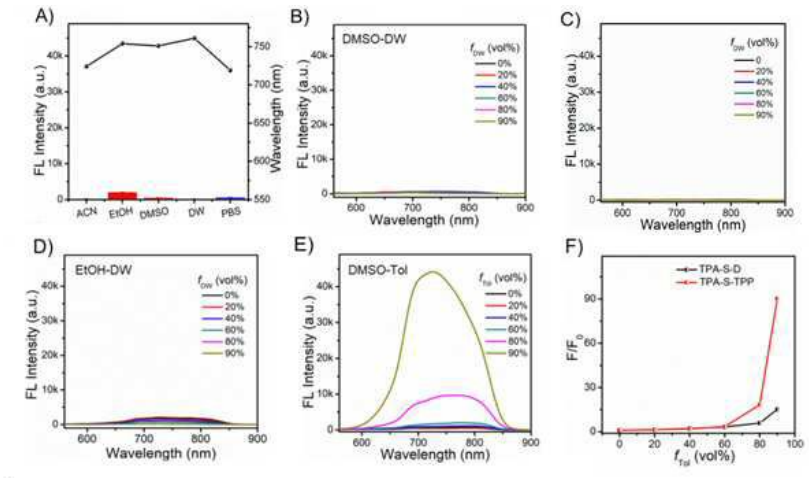
도면11



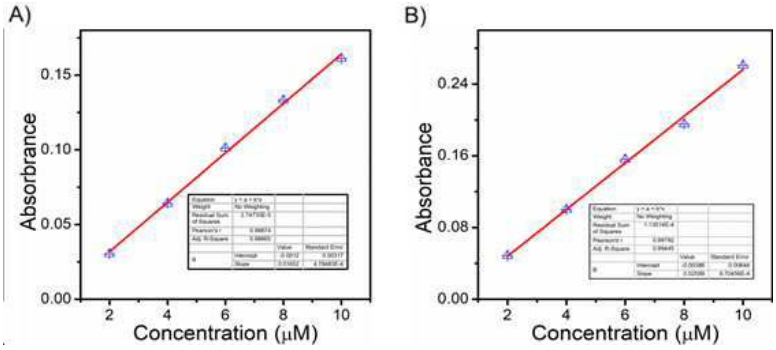
도면12



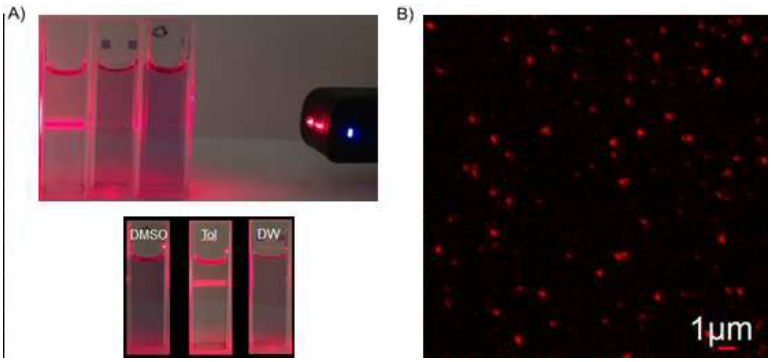
도면13



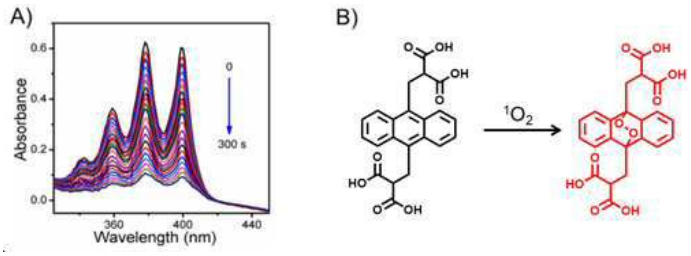
도면14



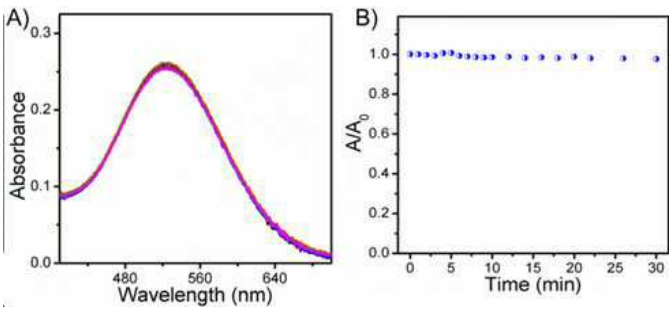
도면15



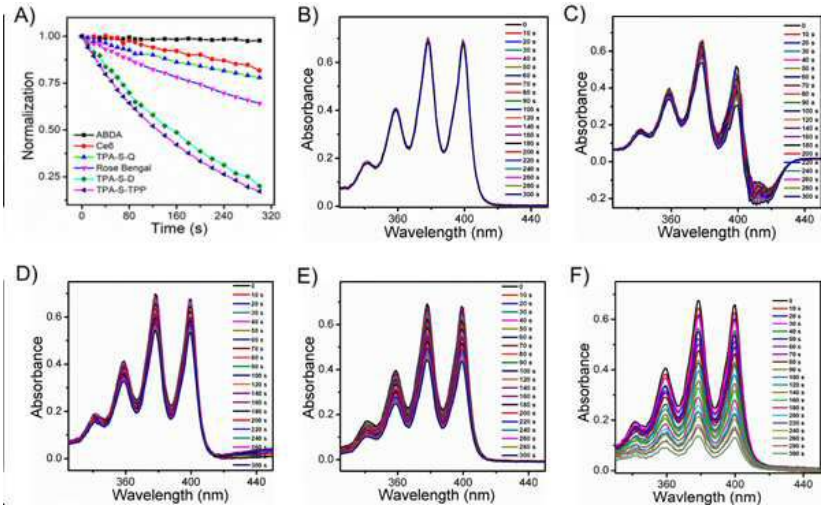
도면16



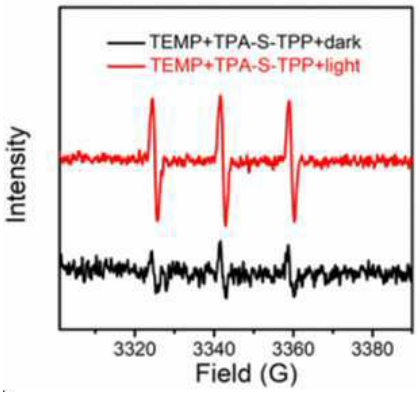
도면17



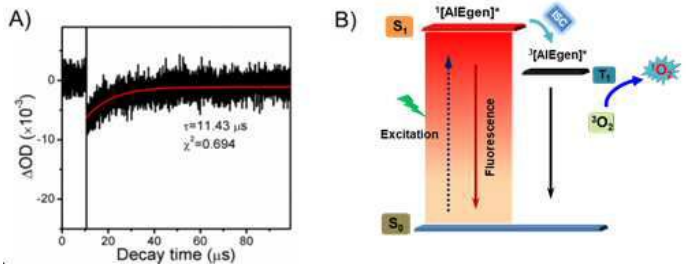
도면18



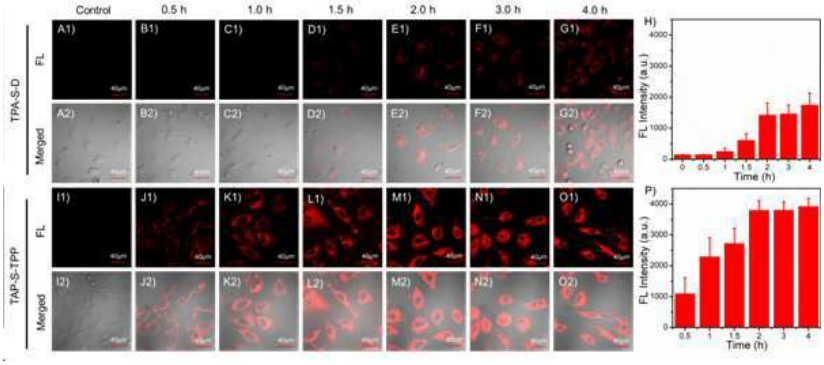
도면19



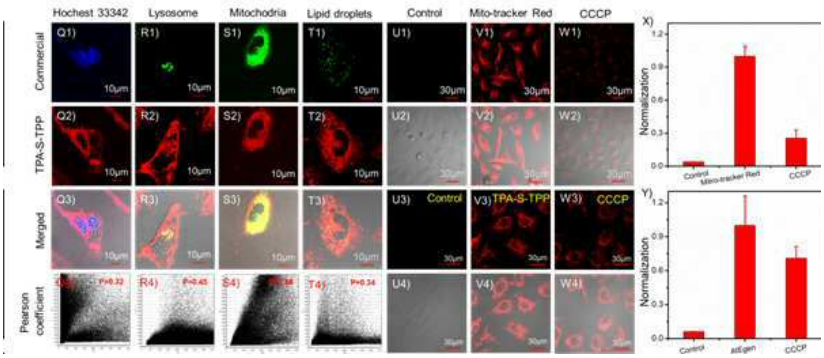
도면20



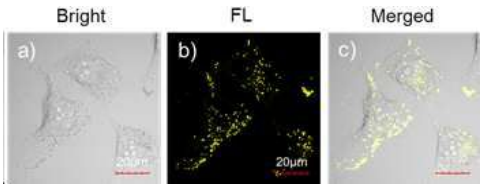
도면21



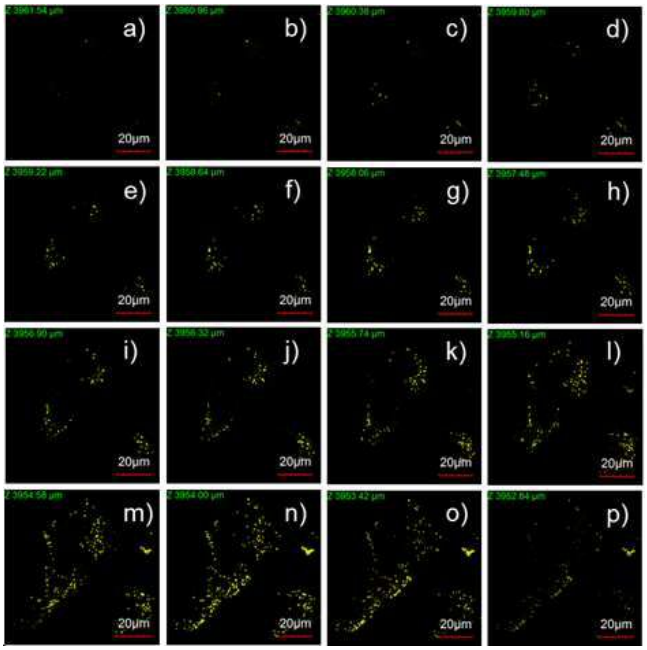
도면22



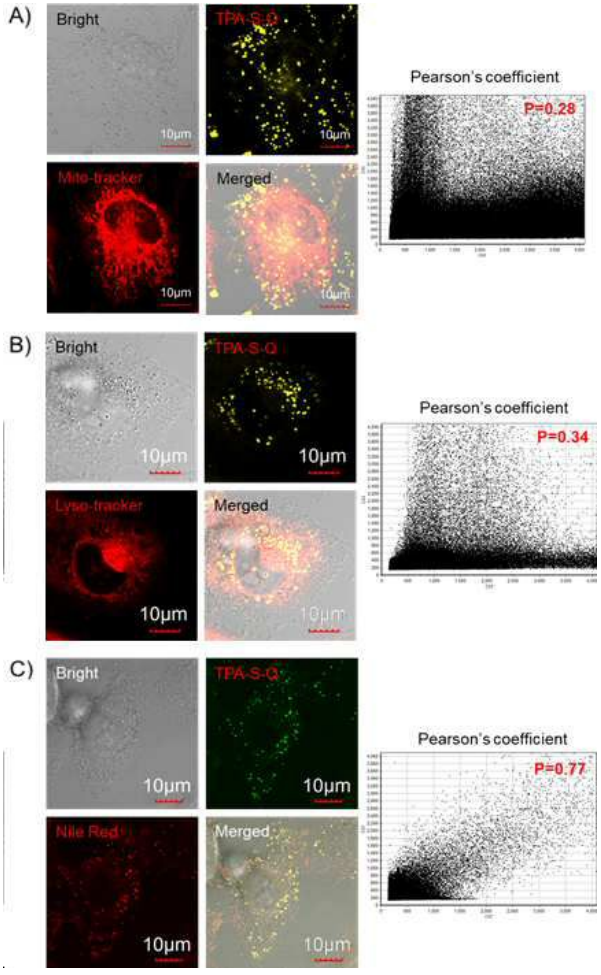
도면23



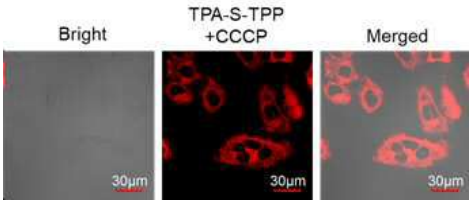
도면24


a)
b)
c)
d)
e)
f)
g)
h)
i)
j)
k)
l)
m)
n)
o)
p)
20μm

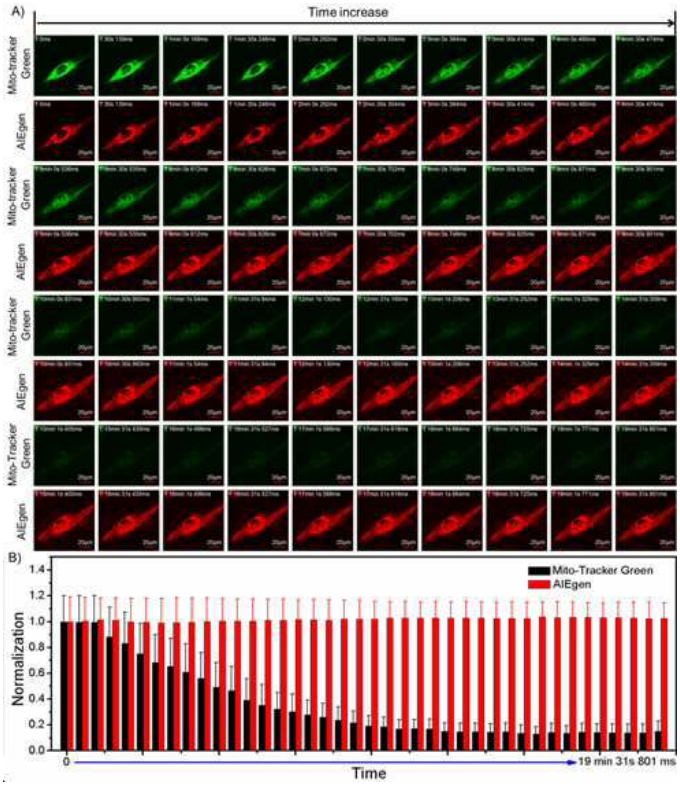
도면25


A)
Bright
TPA-S-Q
Pearson's coefficient
P=0.28
Mito-tracker
Merged
B)
Bright
TPA-S-Q
Pearson's coefficient
P=0.34
Lyso-tracker
Merged
C)
Bright
TPA-S-Q
Pearson's coefficient
P=0.77
Nile Red
Merged
10μm

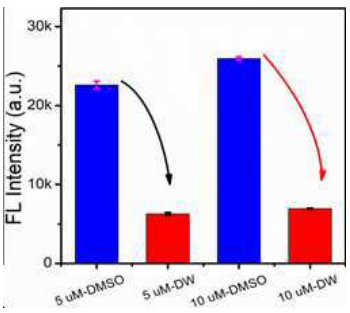
도면26



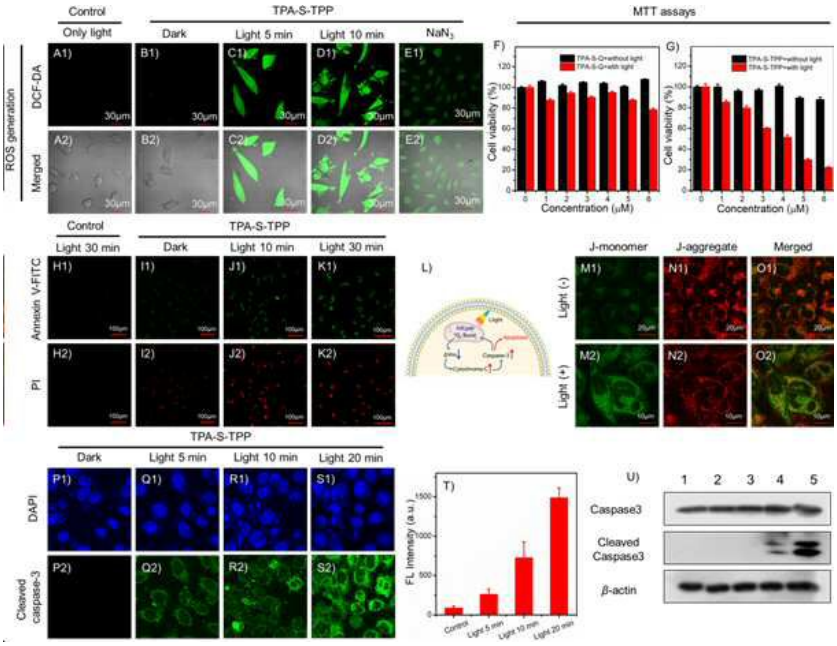
도면27



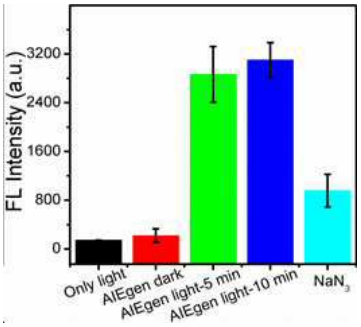
도면28



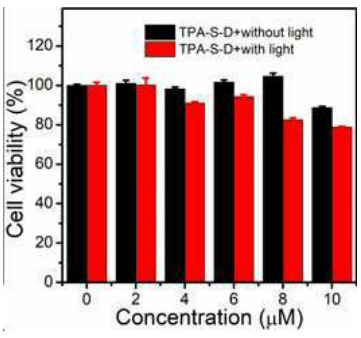
도면29



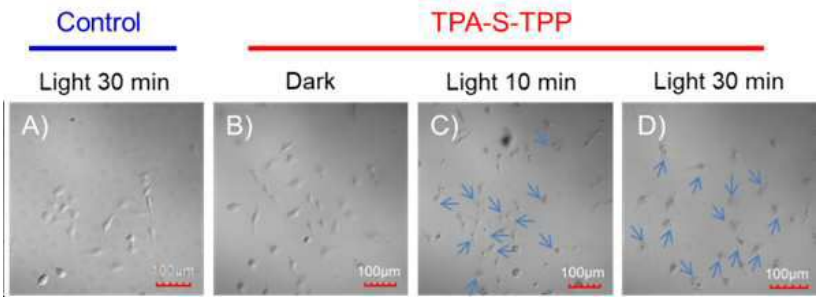
도면30



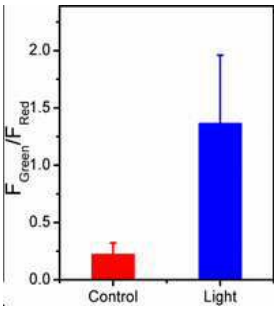
도면31



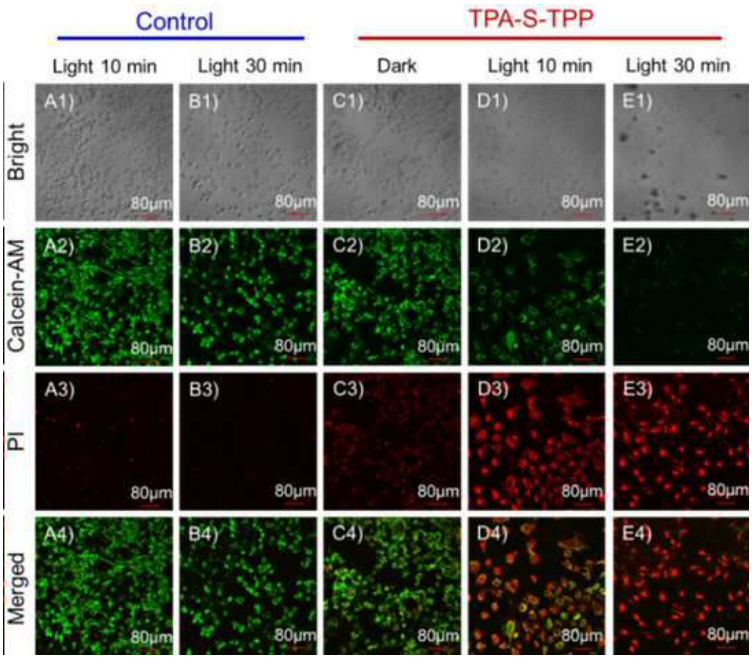
도면32



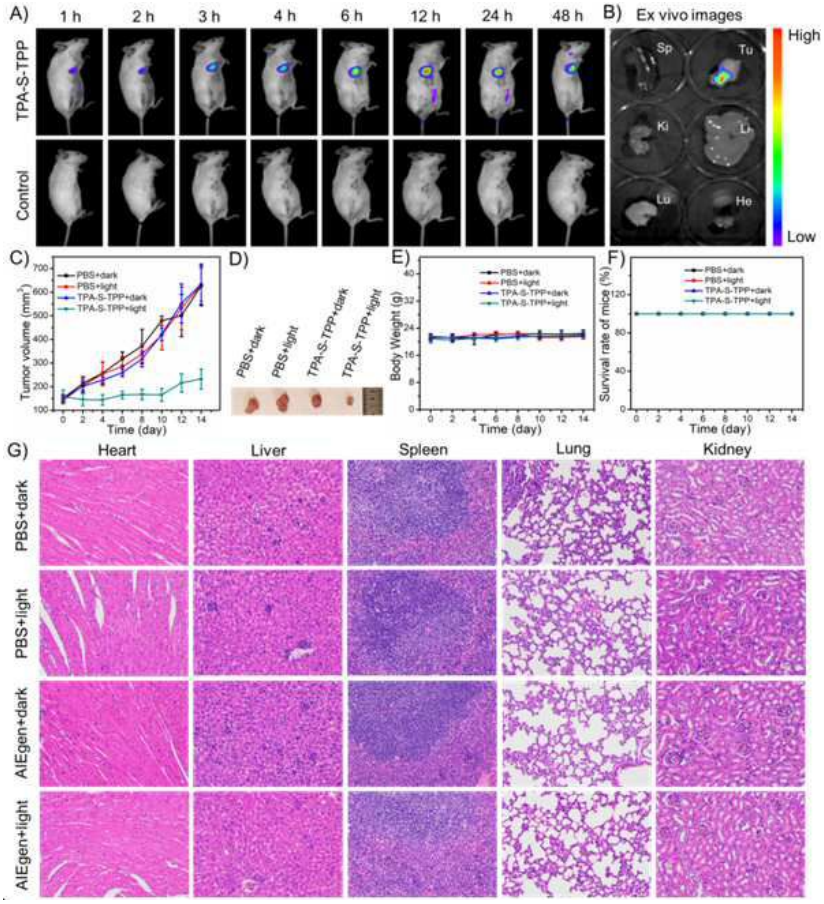
도면33



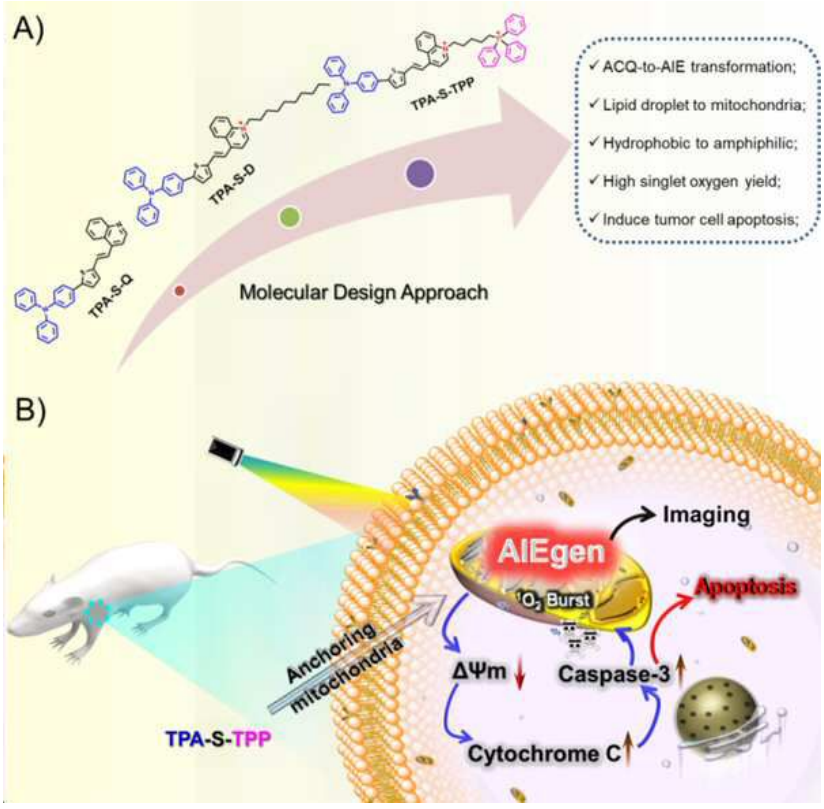
도면34



도면35


A)
1 h
2 h
3 h
4 h
6 h
12 h
24 h
48 h
TPA-S-TPP
Control
B) Ex vivo images
Sp
Tu
Ki
Li
Lu
He
High
Low
C)
Tumor volume (mm³)
Time (day)
PBS+dark
PBS+light
TPA-S-TPP+dark
TPA-S-TPP+light
D)
E)
Body Weight (g)
F)
Survival rate of mice (%)
G)
Heart
Liver
Spleen
Lung
Kidney
PBS+dark
PBS+light
AIEgen+dark
AIEgen+light

도면36


A)
TPA-S-TPP
TPA-S-D
TPA-S-Q
✓ ACQ-to-AIE transformation;
✓ Lipid droplet to mitochondria;
✓ Hydrophobic to amphiphilic;
✓ High singlet oxygen yield;
✓ Induce tumor cell apoptosis;
Molecular Design Approach
B)
Imaging
AIEgen
$^1O_2$ Burst
Apoptosis
Anchoring mitochondria
ΔΨm
Caspase-3
TPA-S-TPP
Cytochrome C