

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0121106
(43) 공개일자 2022년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 311/16 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)

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

C09K 11/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 311/16 (2013.01)

A61K 31/352 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0025126

(22) 출원일자 2021년02월24일

심사청구일자 2021년02월24일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

윤주영

서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호(서빙고동, 신동아아파트)

웅웬 반 응이어

서울특별시 서대문구 이화여대길 52(대현동)

허선예

경기도 수원시 영통구 센트럴파크로 6 (하동 힐스테이트 광고) 102동 303호

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 18 항

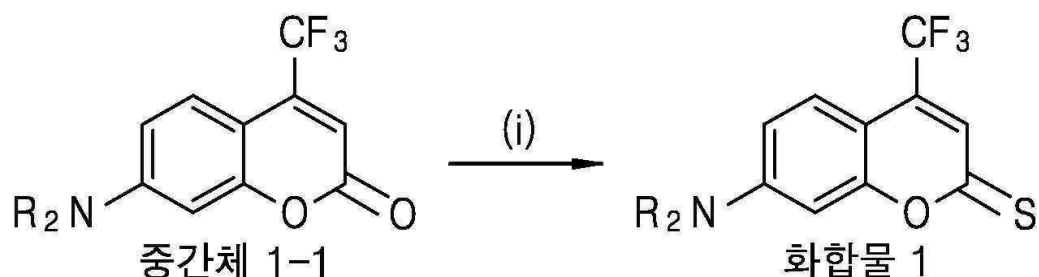
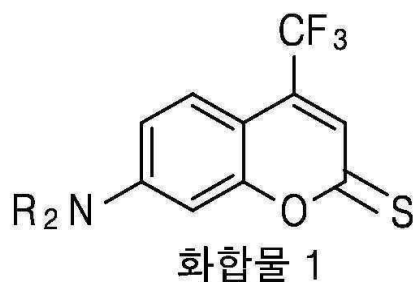
(54) 발명의 명칭 화합물, 이를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 광감각제 및 미토콘드리아를 표적으로 하는 중앙 진단 또는 치료용 조성물, 및 상기 중앙 진단 또는 치료용 조성물을 이용한 광역학 치료방법

(57) 요약

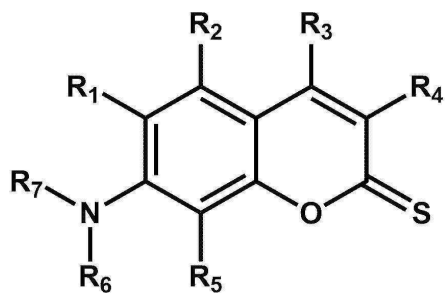
화합물, 이를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 광감각제 및 미토콘드리아를 표적으로 하는 중앙 진단 또는 치료용 조성물, 및 상기 중앙 진단 또는 치료용 조성물을 이용한 광역학 치료방법이 개시된다. 상기 화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



<화학식 1>



상기 화학식 1에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇은 각각 명세서에 개시된 바와 같다.

(52) CPC특허분류

A61K 41/0057 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C09K 11/06 (2022.01)

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

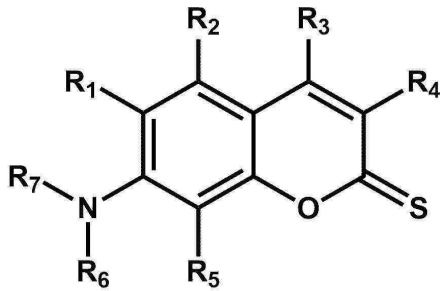
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는, 화합물:

<화학식 1>



상기 화학식 1에서,

R₃는 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환된 C₆-C₃₀ 아릴기, 또는 이들의 조합이고;

R₄는 수소, 중수소(-D), 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환된 C₆-C₃₀ 아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

R₁, R₂, 및 R₅는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D) 또는 C₁-C₁₀ 알킬기이고;

R₆ 및 R₇은 서로 독립적으로, 적어도 하나의 R_{10b}로 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬기이고;

상기 R_{10a}는 -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기이고;

상기 R_{10b}는, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 또는 니트로기이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R₃는 불소원자, 시아노기, 니트로기, 적어도 하나의 불소원자로 치환된 C₁-C₅ 알킬기인, 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 R₁, R₂, R₄, 및 R₅는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D) 또는 C₁-C₅ 알킬기인, 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

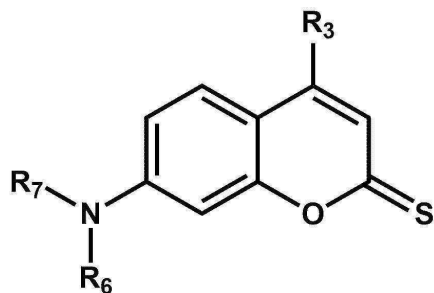
상기 R₆ 및 R₇은 서로 독립적으로, C₁-C₅ 알킬기인, 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

하기 화학식 1-1로 표시되는, 화합물:

<화학식 1-1>



상기 화학식 1-1 중,

R₃는 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환된 C₆-C₃₀ 아릴기, 또는 이들의 조합이고;

R₆ 및 R₇은 서로 독립적으로, 적어도 하나의 R_{10b}로 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬기이고;

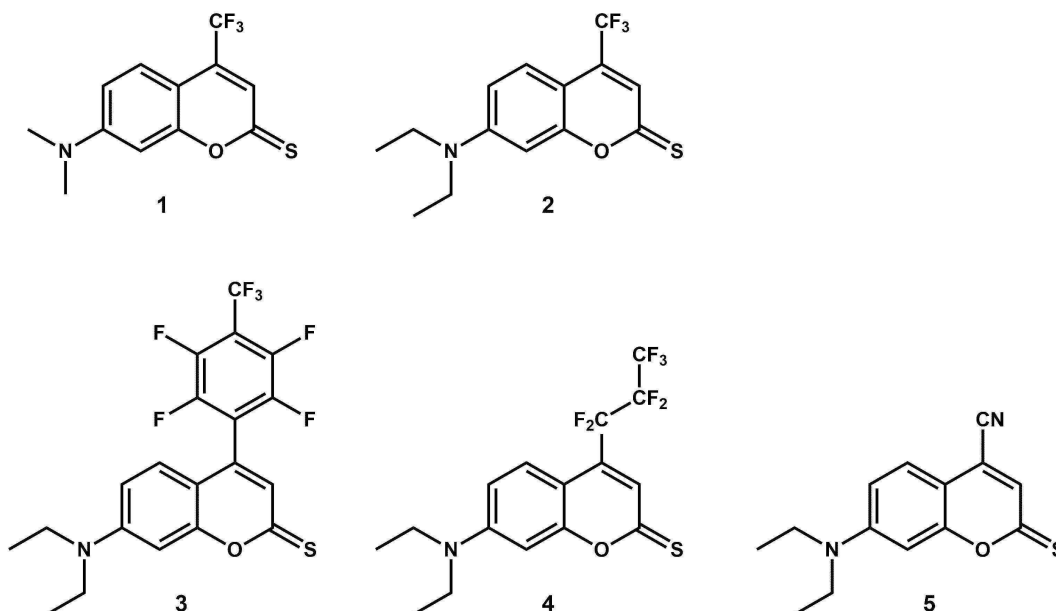
상기 R_{10a}는 -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기이고;

상기 R_{10b}는, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 또는 니트로기이다.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1 내지 5 중 적어도 하나를 포함하는, 화합물:



청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 물, 버퍼용액, 또는 유기용매;를 포함하는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 화합물은 자기조립 나노구조체(self-assembled nanostructure)를 형성하는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 자기조립 나노구조체의 평균 직경은 50 nm 내지 300 nm인, 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

세포 이미징용 형광 프로브인, 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

600 nm 내지 1000 nm의 파장 영역에서 광 조사에 의해 활성 산소를 생성하는, 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 화합물의 형광스펙트럼의 피크가 400 nm 내지 800 nm인 λ_{ex} 에서 나타나는, 조성물.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 화합물의 형광스펙트럼은 물의 부피분율이 증가함에 따라 적색 편이(red-shift)되는, 조성물.

청구항 14

제7항에 있어서,

미토콘드리아를 표적으로 하는, 조성물.

청구항 15

제7항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 광감각제.

청구항 16

제7항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 종양 진단 또는 치료용 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 종양은 유방암, 신장암, 고환암, 전립선암, 난소암, 자궁암, 자궁 경부암, 질암, 난관암, 직장암, 폐암, 위암, 간암, 식도암, 소장암, 췌장암, 구강암, 흑색종, 또는 육종을 포함하는, 종양 진단 또는 치료용 조성물.

청구항 18

제16항에 따른 종양 진단 또는 치료용 조성물을 인간 제외 포유류의 대상체와 접촉시키는 단계;

상기 종양 진단 또는 치료용 조성물이 목표 세포 내에 분포되기 위한 시간을 허용하는 단계; 및

상기 대상체의 목표 세포 부위에 광을 조사하는 단계;를 포함하는, 광역학 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 화합물, 이를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 광감각제 및 미토콘드리아를 표적으로 하는 종양 진단 또는 치료용 조성물, 및 상기 종양 진단 또는 치료용 조성물을 이용한 광역학 치료방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광역학치료(Photodynamic therapy, PDT)는 다양한 유형의 암 및 기타 질병의 치료를 위해 여러 국가에서 승인된 의료기술이다. 광역학치료(PDT)를 위해 광감각제(photosensitizer, PS), 빛 및 산소가 필요하다. 즉, 광조사 하에 광감광제(PS)가 활성화되고, 여기된 광감각제는 산소분자와 상호작용하여 세포독성의 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하며, 생체분자를 산화시켜 암세포를 사멸시킬 수 있다.

[0003] 최근, 독성, 삼중항 여기 수명 단축, 비용, 중원자의 미분해 등에 대한 우려로, 중원자를 도입하지 않은 PS 개발이 요구되고 있다. 황-치환된 카르보닐 형광체는 전형적인 중원자 미도입한 PS로 개발되고 있으나, 티오카보닐 형광체의 PDT로의 적용은, 티오카보닐 형광체의 특징인 효율적인 ISC 공정 및 전자 진동의 비복사 완화에 의해 형광이 완전히 소강되어, 어려움을 겪고 있다.

[0004] 이러한 관점에서, 중원자를 도입하지 않고 PDT로도 적용될 수 있는 신규한 화합물, 이를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 광감각제 및 미토콘드리아를 표적으로 하는 종양 진단 또는 치료용 조성물, 및 상기 종양 진단 또는 치료용 조성물을 이용한 광역학 치료방법에 대한 요구가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 측면은 중원자를 도입하지 않은 신규한 화합물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 측면은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또다른 측면은 상기 조성물을 포함하는 광감각제를 제공하는 것이다.

[0008] 또다른 측면은 상기 조성물을 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

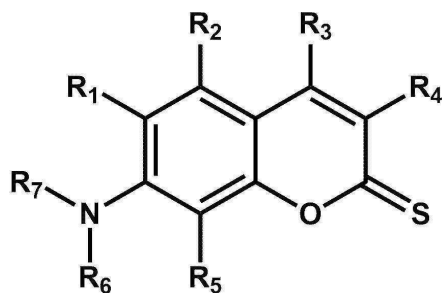
[0009] 또다른 측면은 상기 종양 진단 또는 치료용 조성물을 이용한 광역학 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 측면에 따라,

[0011] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제공된다:

[0012] <화학식 1>



[0013]

[0014] 상기 화학식 1에서,

[0015] R₃는 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환된 C₆-C₃₀ 아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

[0016] R₄는 수소, 중수소(-D), 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 할로젠원

자로 치환된 C_1-C_{10} 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a} 로 치환된 C_6-C_{30} 아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있으며; R_1 , R_2 , 및 R_5 는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D) 또는 C_1-C_{10} 알킬기일 수 있으며;

[0017] R_6 및 R_7 는 서로 독립적으로, 적어도 하나의 R_{10b} 로 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬기일 수 있으며;

[0018] 상기 R_{10a} 는 -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C_1-C_{10} 알킬기일 수 있으며;

[0019] 상기 R_{10b} 는, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 또는 니트로기일 수 있다.

[0020] 다른 측면에 따라,

[0021] 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을; 및 물, 버퍼용액, 또는 유기용매;를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0022] 상기 조성물에 포함된 화합물은 자기조립 나노구조체(self-assembled nanostructure)를 형성할 수 있다.

[0023] 상기 자기조립 나노구조체의 평균 직경은 50 nm 내지 300 nm일 수 있다.

[0024] 상기 조성물은 세포 이미징용 형광 프로브일 수 있다.

[0025] 상기 조성물은 600 nm 내지 1000 nm 파장의 영역에서 광 조사에 의해 활성산소를 생성할 수 있다.

[0026] 상기 조성물에 포함된 화합물의 형광스펙트럼의 피크가 400 nm 내지 800 nm인 λ_{ex} 에서 나타날 수 있다.

[0027] 상기 조성물에 포함된 화합물의 형광스펙트럼은 물의 부피분율이 증가함에 따라 적색 편이(red-shift)될 수 있다.

[0028] 상기 조성물은 미토콘드리아를 표적으로 할 수 있다.

[0029] 또다른 측면에 따라,

[0030] 전술한 조성물을 포함하는 광감각제가 제공된다.

[0031] 또다른 측면에 따라,

[0032] 전술한 조성물을 포함하는 종양 진단 또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0033] 상기 종양 진단 또는 치료용 조성물 중 종양은 유방암, 신장암, 고환암, 전립선암, 난소암, 자궁암, 자궁 경부암, 질암, 난관암, 직장암, 폐암, 위암, 간암, 식도암, 소장암, 췌장암, 구강암, 흑색종, 또는 육종을 포함할 수 있다.

[0034] 또다른 측면에 따라,

[0035] 전술한 종양 진단 또는 치료용 조성물을 인간 제외 포유류의 대상체와 접촉시키는 단계;

[0036] 상기 종양 진단 또는 치료용 조성물이 목표 세포 내에 분포되기 위한 시간을 허용하는 단계; 및

[0037] 상기 대상체의 목표 세포 부위에 광을 조사하는 단계;를 포함하는, 광역학 치료방법이 제공된다.

발명의 효과

[0038] 일 측면에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 중원자를 도입하지 않은 신규한 화합물이 제공될 수 있다. 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 광감각제는 광 조사에 의해 활성산소를 생성하여 형광 이미징 및 미토콘드리아를 표적으로 하는 광역학 치료에 사용될 수 있다. 상기 조성물은 미토콘드리아를 표적으로 하는 종양 진단 또는 치료에 사용될 수 있다. 상기 화합물을 포함한 조성물을 이용하여 광역학 치료방법이 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 일 구현예에 따른 화합물의 화학 구조 및 합성 경로이다.

도 2(a)는 화합물 2를 물에 1 vol%의 디메틸설폭사이드(DMSO)를 혼합한 용매에 용해한 샘플액에서 DLS으로 측정

한 화합물 2의 크기 분포 결과이고, 도 2(b)는 (화합물 2의 SEM이미지이다.

도 3(a)는 디메틸설폭사이드(DMSO)에서 화합물 1, 화합물 2, 화합물 A 및 화합물 B를 각각 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해한 샘플액의 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 스펙트럼의 분석결과이며; 도 3(b)는 화합물 2를 각각 테트라하이드로퓨란(THF)에 상이한 분율의 물(f_w , 0, 40, 60, 80, 90 vol%)을 혼합한 용매에 용해한 샘플액의 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 형광 스펙트럼의 분석 결과이며; 도 3(c)는 화합물 1, 화합물 2, 화합물 A 및 화합물 B를 각각 아세토니트릴(ACN)에 90 vol%의 분율의 물을 혼합한 용매에 용해한 샘플액의 형광 스펙트럼 분석 결과이며; 도 3(d)는 화합물 1, 화합물 2 및 에리트로신 B(erythrosine B, 표준 광감각제)를 각각 물에 1 vol%의 디메틸설폭사이드(DMSO)를 혼합한 용매에 동일한 농도(10 μ M)로 용해한 샘플액의 ROS 생성도를 디클로로플루오레스세인 디아세테이트(dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)로 검출하여 비교 분석한 결과이다.

도 4(a)는 화합물 2를 HeLa 세포와 함께 30분 및 60분 동안 배양한 후, 공초점 현미경으로 세포 이미징을 수행한 결과이며; 도 4(b)는 청색 Mito-Tracker(λ_{ex} = 405 nm; λ_{em} = 430 nm 내지 455 nm), 도 4(a)의 (화합물 2, 및 상기 청색 Mito-Tracker와 화합물 2를 각각 HeLa 세포와 함께 배양한 후에 공초점 현미경으로 세포 이미징을 수행한 결과이며; 도 4(c)는 도 4(b)에 따라 청색 Mito-Tracker 및 화합물 2를 각각 HeLa 세포와 함께 배양한 후의 형광 강도의 상관관계를 나타낸 결과이며; 도 4(d)는 청색 Mito-Tracker(λ_{ex} = 405 nm; λ_{em} = 430 nm 내지 455 nm), 도 4(a)의 화합물 A, 및 상기 청색 Mito-Tracker와 화합물 A를 각각 HeLa 세포와 함께 배양한 후에 공초점 현미경으로 세포 이미징을 수행한 결과이며; 도 4(e)는 도 4(d)에 따라 청색 Mito-Tracker 및 (화합물 A를 각각 HeLa 세포와 함께 배양한 후의 형광 강도의 상관관계를 나타낸 결과이다.

도 5(a)는 세포막 투과성 염료(JC=1, 2 μ M) 및 화합물 2를 HeLa 세포에 공동 염색한 후 사멸 세포(JC-1 단량체, 녹색 채널, λ_{em} = 490 nm 내지 590 nm), 건강한 세포(JC-1 응집체, 적색 채널, λ_{em} = 575 nm 내지 675 nm), 및 상기 사멸 세포(JC-1 단량체) 및 건강한 세포(JC-1 응집체)의 형광 이미지를 분석한 결과이며; 도 5(b)는 PDT 과정동안 미토콘드리아의 탈전극 과정의 개략도이다.

도 6(a)는 암실 또는 명실에서 HeLa 세포를 각각 화합물 2의 농도(0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μ M)에서 배양한 후 녹색 LED 조사하여 세포 생존율을 분석한 결과이며; 도 6(b)는 암실 또는 명실에서 HeLa 세포를 각각 에리트로신 B(erythrosine B, 표준 광감각제)의 농도(0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μ M)에서 배양한 후 녹색 LED 조사하여 세포 생존율을 분석한 결과이며; 도 6(c)는 HeLa 세포를 10.0 μ M 농도의 화합물 2에서 배양한 후 칼세인-AM(2.0 μ M) 및 프로피듐 요오드화물(PI, 4.0 μ M)에 염색된 HeLa 세포의 형광이미지를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 이하, 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명의 일 구현예에 따른 화합물, 이를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 광감각제 및 미토콘드리아를 표적으로 하는 종양 진단 또는 치료용 조성물, 및 상기 종양 진단 또는 치료용 조성물을 이용한 광역학 치료방법에 관하여 상세히 설명하기로 한다. 이하는, 예시로서 제시되는 것으로서 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술할 특허청구범위의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0041] 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.
- [0042] 본 명세서에서 "이들의 조합"이라는 용어는 기재된 구성요소들 하나 이상과의 혼합 또는 조합되는 것을 의미한다.
- [0043] 본 명세서에서 "약학적으로 허용가능한 염"은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 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, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 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, 벤조에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 푸마레이트, 글루세이트, 글루코네이트, 글루코로네이트, 헥사플루오로

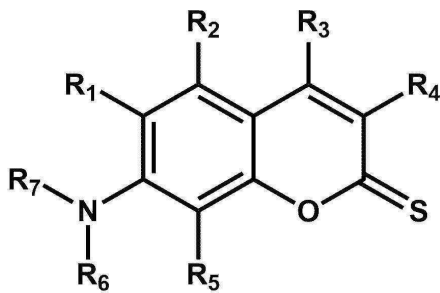
포스페이트, 바이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트일 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 "자기조립"이라는 용어는 무질서하게 존재하는 물질들이 일정한 규칙으로 인하여 제어된 구조체를 형성하거나 물질들이 일정한 양식으로 배치되는 현상을 의미한다.

[0045] 본 명세서에서 "나노구조체"라는 용어는 1에서 100나노미터(nm)의 크기를 가지면서 마이크로 사이즈 구조에서는 보기 힘든 현상들이 관찰되는 구조 물질을 의미한다.

[0046] 일 구현예에 따른 화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

[0047] <화학식 1>



[0048]

[0049] 상기 화학식 1에서,

[0050] R₃는 할로겐원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 적어도 하나의 할로겐원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환된 C₆-C₃₀ 아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

[0051] R₄는 수소, 중수소(-D), 할로겐원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 할로겐원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a}로 치환된 C₆-C₃₀ 아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있으며;

[0052] R₁, R₂, 및 R₅는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D) 또는 C₁-C₁₀ 알킬기일 수 있으며;

[0053] R₆ 및 R₇은 서로 독립적으로, 적어도 하나의 R_{10b}로 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀ 알킬기일 수 있으며;

[0054] 상기 R_{10a}는 -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 적어도 하나의 할로겐원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기일 수 있으며;

[0055] 상기 R_{10b}는, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 또는 니트로기일 수 있다.

[0056] 예를 들어, 상기 화학식 1 중 상기 R₃는 불소원자, 시아노기, 니트로기, 적어도 하나의 불소원자로 치환된 C₁-C₅ 알킬기 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환된 C₆-C₁₂ 아릴기;일 수 있고,

[0057] 상기 R_{10a}는 -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 적어도 하나의 할로겐원자로 치환된 C₁-C₁₀ 알킬기;일 수 있다.

[0058] 예를 들어, 상기 화학식 1 중 상기 R₄는 수소, 중수소(-D), 불소원자, 시아노기, 니트로기, C₁-C₅ 알킬기, 적어도 하나의 불소원자로 치환된 C₁-C₅ 알킬기 또는 적어도 하나의 R_{10a}로 치환된 C₆-C₁₂ 아릴기;일 수 있다.

[0059] 예를 들어, 상기 화학식 1 중 상기 R₄는 수소, 중수소(-D) 또는 C₁-C₁₀ 알킬기;일 수 있다.

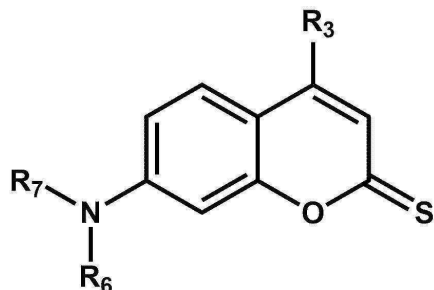
[0060] 예를 들어, 상기 화학식 1 중 상기 R₄는 수소, 중수소(-D) 또는 C₁-C₅ 알킬기;일 수 있다. 예를 들어, 상기 화학

식 1 중 상기 R_1 , R_2 , 및 R_5 는 서로 독립적으로, 수소, 중수소(-D) 또는 C_1 - C_5 알킬기;일 수 있다.

[0061] 예를 들어, 상기 화학식 1 중 상기 R_6 및 R_7 은 서로 독립적으로, C_1 - C_5 알킬기일 수 있다.

[0062] 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 1-1로 표시될 수 있다:

[0063] <화학식 1-1>



[0064]

[0065] 상기 화학식 1-1 중,

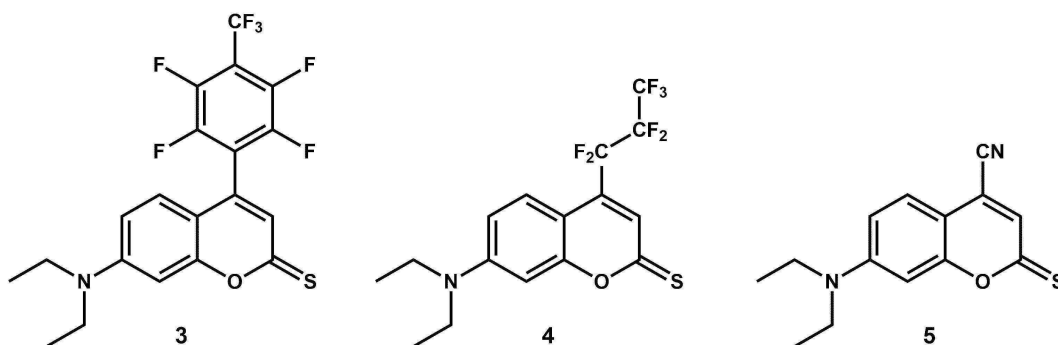
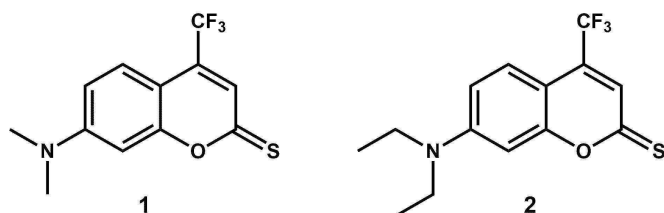
[0066] R_3 는 할로젠원자, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C_1 - C_{10} 알킬기, 적어도 하나의 R_{10a} 로 치환된 C_6 - C_{30} 아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있고;

[0067] R_6 및 R_7 은 서로 독립적으로, 적어도 하나의 R_{10b} 로 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{10} 알킬기일 수 있고;

[0068] 상기 R_{10a} 는 -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 또는 적어도 하나의 할로젠원자로 치환된 C_1 - C_{10} 알킬기일 수 있고;

[0069] 상기 R_{10b} 는, 중수소(-D), -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 또는 니트로기;일 수 있다.

[0070] 예를 들어, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1 내지 5 중 적어도 하나를 포함할 수 있다:



[0071]

[0072] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 황-치환된 쿠마린 코어를 가지므로, 단일항 및 삼중항 간 에너지 갭 차이가 감소하고, 스핀-궤도 상호작용이 증가하므로, 황-치환된 쿠마린 유도체에 효과적인 삼중항 population을 촉진시킬 수 있다. 또한, 황-치환된 쿠마린 코어의 4번 위치 탄소에 R_3 , 즉 강한 전자 끌개기(EWG)를 도입하여 LUMO 안정화 효과를 나타낼 수 있으므로, 우수한 미토콘드리아 타겟팅 능력을 보인다. 또한 상기 황-치환된 쿠마린 코어의 7번 위치 탄소에 -N(R_6)(R_7)-를 도입하여 S_1 상태에서 S_0 상태의 전이 간 진동자 강도(oscillator strength)가 0이 아니고, 응집 상태에서 분자 간 운동 및 회전 및 분자 간 상호작용을 보호 할 수 있으므로, 우

수한 형광을 보인다. 따라서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 미토콘드리아를 표적으로 하는 광감각제, 종양 진단 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.

- [0073] 다른 일 구현예에 따른 조성물은, 전술한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을; 및 물, 버퍼용액, 또는 유기용매;를 포함하는 조성물을 포함할 수 있다.
- [0074] 상기 조성물에 포함된 화합물은 자기조립 나노구조체(self-assembled nanostructure)를 형성할 수 있다.
- [0075] 상기 자기조립 나노구조체의 평균 직경은 50 nm 내지 300 nm일 수 있다.
- [0076] 도 2(a)는 화합물 2를 물에 1 vol%의 디메틸설폭사이드(DMSO)를 혼합한 용매에 용해한 샘플액에서 DLS로 측정된 화합물 2의 크기 분포 결과이고, 도 2(b)는 화합물 2의 SEM이미지이다.
- [0077] 도 2(a) 및 (b)를 참조하면, 일 구현예에 따른 조성물 중 자기조립 나노구조체는 물에 1%의 DMSO를 혼합한 용매에서 균일한 나노구조를 형성함을 알 수 있다. 예를 들어, 상기 자기조립 나노구조체의 평균 직경은 100 nm 내지 200 nm일 수 있다. 예를 들어, 상기 자기조립 나노구조체의 평균 직경은 150 nm 내지 200 nm일 수 있다.
- [0078] 상기 조성물은 세포 이미징용 형광 프로브일 수 있다.
- [0079] 상기 조성물은 600 nm 내지 1000 nm 파장의 영역에서 광 조사에 의해 활성산소를 생성할 수 있다.
- [0080] 예를 들어, 상기 조성물은 650 nm 내지 950 nm 파장의 영역에서 광 조사에 의해 활성산소를 생성할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 700 nm 내지 900 nm 파장의 영역에서 광 조사에 의해 활성산소를 생성할 수 있다.
- [0081] 상기 조성물에 포함된 화합물의 형광스펙트럼의 피크가 400 nm 내지 800 nm인 λ_{ex} 에서 나타날 수 있다.
- [0082] 예를 들어, 상기 조성물에 포함된 화합물의 형광스펙트럼의 피크가 400 nm 내지 600 nm인 λ_{ex} 에서 나타날 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물에 포함된 화합물의 형광스펙트럼의 피크가 450 nm 내지 550 nm인 λ_{ex} 에서 나타날 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물에 포함된 화합물의 형광스펙트럼의 피크가 550 nm 내지 700 nm인 λ_{ex} 에서 나타날 수 있다.
- [0083] 상기 조성물에 포함된 화합물의 형광스펙트럼은 물의 부피분율이 증가함에 따라 적색 편이(red-shift)될 수 있다.
- [0084] 도 3(a)는 디메틸설폭사이드(DMSO)에서 화합물 1, 화합물 2, 화합물 A 및 화합물 B를 각각 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해한 샘플액의 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 스펙트럼의 분석결과이다.
- [0085] 도 3(b)는 화합물 2를 각각 테트라하이드로퓨란(THF)에 상이한 분율의 물(f_w , 0, 40, 60, 80, 90 vol%)을 혼합한 용매에 용해한 샘플액의 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 형광 스펙트럼의 분석 결과이다.
- [0086] 도 3(b)를 참조하면, 일 구현예에 따른 조성물에 포함된 화합물은 물 분율이 증가할수록 적색 편이를 보임을 알 수 있다.
- [0087] 도 3(c)는 화합물 1, 화합물 2, 화합물 A 및 화합물 B를 각각 아세토니트릴(ACN)에 90 vol%의 분율의 물을 혼합한 용매에 용해한 샘플액의 형광 스펙트럼 분석 결과이다.
- [0088] 도 3(c)를 참조하면, 화합물 2의 형광 스펙트럼은 화합물 A의 형광 스펙트럼에 비하여 약 55 nm 더 적색 편이되었음을 알 수 있다.
- [0089] 또다른 일 구현예에 따른 광감각제는, 전술한 조성물을 포함할 수 있다.
- [0090] 또다른 일 구현예에 따른 종양 진단 또는 치료용 조성물은, 전술한 조성물을 포함할 수 있다.
- [0091] 상기 종양 진단 또는 치료용 조성물 중 종양은 유방암, 신장암, 고환암, 전립선암, 난소암, 자궁암, 자궁 경부암, 질암, 난관암, 직장암, 폐암, 위암, 간암, 식도암, 소장암, 췌장암, 구강암, 흑색종, 또는 육종을 포함할 수 있다.
- [0092] 또다른 일 구현예에 따른 광역학 치료 방법은, 전술한 종양 진단 또는 치료용 조성물을 인간 제외 포유류의 대상체와 접촉시키는 단계; 상기 종양 진단 또는 치료용 조성물이 목표 세포 내에 분포되기 위한 시간을 허용하는 단계; 및 상기 대상체의 목표 세포 부위에 광을 조사하는 단계;를 포함할 수 있다.

- [0093] 상기 광역학 치료방법은 시공간 선택성, 비침습성, 및 부작용의 감소와 같은 잇점을 나타낼 수 있다.
- [0094] 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.
- [0095] 본 명세서에서, "탄소수 a 내지 b"의 a 및 b는 특정 작용기(group)의 탄소수를 의미한다. 즉, 상기 작용기는 a 부터 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 $-(CH_3)_3C-$ 를 의미한다.
- [0096] 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.
- [0097] 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.
- [0098] 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.
- [0099] 본 명세서에서, "시클로알킬"이라는 용어는 1가 포화 탄화수소 모노시클릭을 의미한다. 시클로알킬기의 비제한적인 예로는 시클로프로필기, 시클로부틸기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 시클로헵틸기 등을 들 수 있다.
- [0100] 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-옥사트리아졸리딘yl(1,2,3,4-oxatriazolidinyl), 테트라히드로푸라닐기(tetrahydrofuranyl), 테트라히드로티오페닐기 등을 들 수 있다.
- [0101] 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.
- [0102] 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-디히드로푸라닐기, 2,3-디히드로티오페닐기 등을 들 수 있다.
- [0103] 본 명세서에서, "아릴"이라는 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_b 는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로젠으로 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(naphthacenylyl) 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0104] 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.

[0105] "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-옥사디아졸릴, 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.

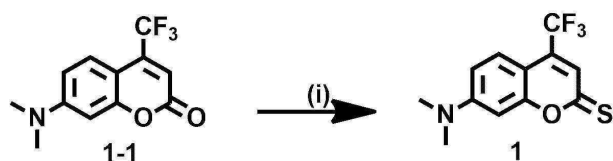
[0106] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일 실시예일뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0107] [실시예]

[0108] 모든 실험은 불활성 질소 분위기 하에 수행하였다. 무수-등급 용매(Aldrich), 분광강도-등급 용매 및 모든 상용되는 시약은 받은 그대로 사용하였다. 화합물 A 및 화합물 B는 공지된 문헌의 방법에 따라 합성하였다. Cambridge Isotope Laboratories의 중수소화 용매를 사용하였다. NMR 스펙트럼은 주변 온도에서 Bruker AM 300 (300.13 MHz for ^1H , 75.48 MHz for ^{13}C) 분광계로 기록하였다. 화학적 이동(ppm)은 외부의 Me_4Si (^1H , ^{13}C)를 기준으로 하였다. 질량 측정은 Synapt G2-HDMS 질량 분석기로 기록하였다.

[0109] 하기 합성예 1에 의해 제조된 화합물에 대한 반응스킴 1은 다음과 같다:

[0110] <반응스킴 1>



[0111]

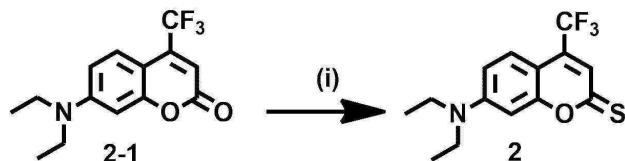
[0112] **합성예 1: 화합물 1**

[0113] 상기 반응스킴 1의 중간체 1-1(0.30g, 1.16mmol), 및 라웨슨 시약(0.94 g, 2.33 mmol)을 톨루엔(20mL)에 용해시켰다. 상기 용액을 질소 분위기 하에 19시간 동안 환류시켰다. 상기 반응물을 실온까지 식힌 후, 용매를 감압하에 증발시켰다. 잔류물을 *n*-hexane/DCM을 용리액으로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 화합물 1을 수득하였다.

[0114] ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.48 (dd, $J = 1.9, 9.2$ Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.69-6.61 (m, 2H), 3.08 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 195.9, 159.5, 153.3, 133.5, 133.0, 132.6, 132.2, 125.8, 125.8, 125.7, 125.7, 124.3, 110.9, 105.1, 97.8, 40.1. EI-MS calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{NOS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 274.0513; found: 274.0515.

[0115] 하기 합성예 2에 의해 제조된 화합물에 대한 반응스킴 2는 다음과 같다:

[0116] <반응스킴 2>



[0117]

[0118] **합성예 2: 화합물 2**

[0119] 중간체 1-1(0.30g, 1.16mmol), 및 라웨슨 시약(0.94 g, 2.33 mmol) 대신 중간체 2-1(0.20g, 0.70mmol), 및 라웨슨 시약(0.57 g, 1.40 mmol)을 사용한 것을 제외하고는, 상기 합성예 1과 동일한 방법으로 합성하여, 화합물

2를 수득하였다.

[0120] ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.55–7.51 (1H), 7.16 (s, 1H), 6.73–6.70 (m, 2H), 3.46 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 195.96, 159.91, 151.25, 133.55, 133.12, 132.69, 132.26, 126.11, 126.08, 126.05, 126.02, 124.33, 120.68, 120.57, 120.49, 120.42, 110.79, 104.96, 97.58, 45.00, 12.38. EI-MS calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NOS}$ $[\text{M}]^+$: 301.0748; found: 301.0746.

[0121] 분석예 1: UV-vis 흡수 및 광발광 스펙트럼 및 ROS 생성능 측정

[0122] UV-vis 흡수 및 광발광 (PL) 스펙트럼은 각각 Thermo Scientific Evolution 201 UV-vis 분광계와 FS-2 분광 광도계(Scinco)로 측정하였다. 희석한 샘플액(통상 10 μM)을 주변조건에서 저장액(1.0 mM)으로부터 준비하였다. 상기 용액 (10 μM)의 UV-vis 및 PL 스펙트럼은 1cm 석영 큐벳을 사용하여 측정하였다. 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 프로브로 사용하여 물에서 광감각제(PS)의 ROS 생성능을 측정하였다. 측정은 녹색 LED 광원 (520 nm)을 사용하여 수행하였다. DCFH-DA의 형광 강도는 473 nm 여기 및 520 nm 방출 파장에서 기록하였다.

[0123] 도 3(a)는 디메틸설폭사이드(DMSO)에서 화합물 1, 화합물 2, 화합물 A 및 화합물 B를 각각 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해한 샘플액의 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 스펙트럼의 분석결과이다.

[0124] 도 3(b)는 화합물 2를 각각 테트라하이드로퓨란(THF)에 상이한 분율의 물(f_w , 0, 40, 60, 80, 90 vol%)을 혼합한 용매에 용해한 샘플액의 자외선 가시광 흡수(UV-vis absorption) 및 형광 스펙트럼의 분석 결과이다.

[0125] 도 3(b)를 참조하면, 합성예 2에 의해 얻은 화합물 2는 물 분율이 증가할수록 적색 편이를 보임을 알 수 있다.

[0126] 도 3(c)는 화합물 1, 화합물 2, 화합물 A 및 화합물 B를 각각 아세토니트릴(ACN)에 90 vol%의 분율의 물을 혼합한 용매에 용해한 샘플액의 형광 스펙트럼 분석 결과이다.

[0127] 도 3(c)를 참조하면, 합성예 2에 의해 얻은 화합물 2의 형광 스펙트럼은 화합물 A의 형광 스펙트럼에 비하여 약 55 nm 더 적색 편이되었음을 알 수 있다. 이는 상기 화합물 2의 황-치환된 쿠마린 코어의 4번 위치 탄소에 도입된 강한 전자 끌개기, 즉, CF_3 의 도입으로 LUMO 안정화 효과가 나타남을 알 수 있다. 또한, 화합물 B는 용액 및 응집 상태 모두에서 형광을 보이지 않는 데, 이는 상기 화합물 2의 황-치환된 쿠마린 코어의 7번 위치 탄소에 도입된 디에틸아민기가 응집 유도 방출-활성 쿠마린 형광체(fluorophore) 효과를 나타남을 알 수 있다.

[0128] 도 3(d)는 화합물 1, 화합물 2 및 에리트로신 B(erythrosine B, 표준 광감각제)를 각각 물에 1 vol%의 디메틸설폭사이드(DMSO)를 혼합한 용매에 동일한 농도(10 μM)로 용해한 샘플액의 ROS 생성도를 디클로로플루오레스세인 디아세테이트(dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)로 검출하여 비교 분석한 결과이다.

[0129] 도 3(d)를 참조하면, 화합물 1, 화합물 2 및 에리트로신 B(erythrosine B, 표준 광감각제) 용액은 각각 녹색 LED(520 nm)에서 상이한 시간(0분, 30분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분) 동안 조사되었고, 형광 강도를 측정하였다. 화합물 1 및 화합물 2의 ROS 생성능은 에리트로신 B (Erythrosine B, 표준 광감각제)의 ROS 생성능보다 우수함을 알 수 있다. 이는 응집 상태의 화합물 1 및 화합물 2의 이중 기능적 특성, 즉, 상당한 ROS 생산능 및 밝은 적색 방출능이 각각 티오카보닐 형광체의 효율적인 삼중항 population 특성 및 비복사 붕괴 경로의 제한에 의한 것임을 알 수 있다.

[0130] 분석예 2: 공초점 현미경 세포 이미징 및 세포 생존율

[0131] (1) *In vitro* 세포 이미징 분석

[0132] HeLa (human cervix adenocarcinoma) 세포를 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 상기 세포를 10% 태아혈청, 100 U/ml 페니실린, 및 100 U/ml 스트렙토마이신이 보충된 최소필수배지 이글 (Minimum Essential Medium Eagle; MEM)에서 성장시켜 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 에 유지하였다. 배양배지에서 접시 당 3×10^5 세포 밀도로 35-mm 유리바닥 접시에 세포를 시딩(seeding)하였다. 하룻밤 배양한 후, HeLa 세포를 상기 합성예 2에서 수득한 10.0 μM 화합물 2 또는 화합물 A와 함께 1시간 동안 배양한 후, 상기 세포를 녹색 LED(20 mW/cm^2 , 20분)에 조사하였다. 그 후 3 μM 칼세인-AM 및 4 μM 프로피듐 요오드화물(PI)에 30분 동안 염색하였다. DPBS로 워싱한 후, 공초점 현미경(Olympus Fluoview FV1200)에 의해, 형광 이미징 결과를 얻었다. 청색

Mitotracker로는 청색 Mitotracker(MitoView™ 405, Biotium) 또는 청색 lysotracker (LysoTracker™ Blue, Invitrogen)을 사용하였다.

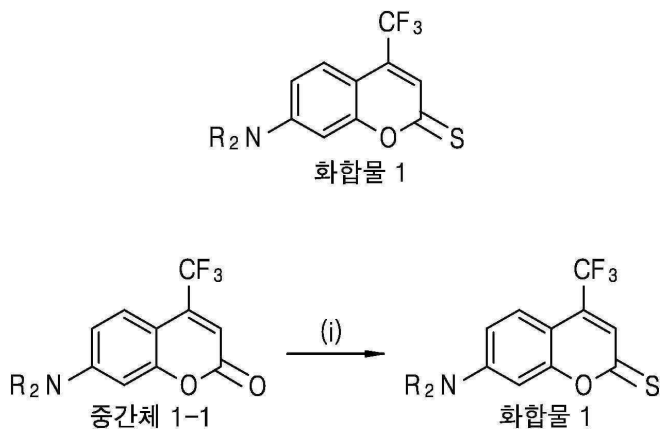
- [0133] 미토콘드리아 표적능을 측정하기 위해서, 하룻밤 배양된 HeLa 세포를 상기 합성에 2에서 수득한 10.0 μM 화합물 2와 함께 1시간 동안 배양한 후, DPBS로 워싱하고, 상기 세포를 녹색 LED(20 mW/cm^2 , 20분)에 조사하였다. 그 후 JC-1(2 μM)로 15분 간 처리하였다. 공초점 현미경(Olympus Fluoview FV1200)에 의해, 형광 이미징 결과를 얻었다.
- [0134] 도 4(a)는 화합물 2를 HeLa 세포와 함께 30분 및 60분 동안 배양한 후, 공초점 현미경으로 세포 이미징을 수행한 결과이며; 도 4(b)는 청색 Mito-Tracker($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$ 내지 455 nm), 도 4(a)의 화합물 2, 및 상기 청색 Mito-Tracker와 화합물 2를 각각 HeLa 세포와 함께 배양한 후에 공초점 현미경으로 세포 이미징을 수행한 결과이며; 도 4(c)는 도 4(b)에 따라 청색 Mito-Tacker 및 화합물 2를 각각 HeLa 세포와 함께 배양한 후의 형광 강도의 상관관계를 나타낸 결과이며; 도 4(d)는 청색 Mito-Tracker($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$ 내지 455 nm), 도 4(a)의 화합물 A, 및 상기 청색 Mito-Tracker와 화합물 A를 각각 HeLa 세포와 함께 배양한 후에 공초점 현미경으로 세포 이미징을 수행한 결과이며; 도 4(e)는 도 4(d)에 따라 청색 Mito-Tacker 및 화합물 A를 각각 HeLa 세포와 함께 배양한 후의 형광 강도의 상관관계를 나타낸 결과이다.
- [0135] 도 4(a) 내지 4(e)를 참조하면, 화합물 2는 강한 적색광 방출로 HeLa 세포에 빠르게 내재화됨을 알 수 있어, 이로부터 상기 화합물 2가 세포 이미징용 형광 프로브로 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0136] 미토콘드리아 표적능을 측정하기 위해, 세포막 투과성 염료인 JC-1을 사용하여, 암세포에서 미토콘드리아의 막 전위 변화(MMP)를 관찰하였다.
- [0137] 도 5(a)는 세포막 투과성 염료(JC-1, 2 μM) 및 화합물 2를 HeLa 세포에 공동 염색한 후 세포사멸 세포(JC-1 단량체, 녹색 채널, $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ 내지 590 nm), 건강한 세포(JC-1 응집체, 적색 채널, $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ 내지 675 nm), 및 상기 세포사멸 세포(JC-1 단량체) 및 건강한 세포(JC-1 응집체)의 형광 이미지를 분석한 결과이다.
- [0138] 도 5(a)를 참조하면, PDT 과정에서 적색의 높은 막 전위 변화(MMP)를 보이고 건강한 세포인 JC-1 응집체와 녹색의 낮은 막 전위 변화(MMP)를 보이고 세포사멸 세포인 JC-1 단량체 간 가역적인 형광 변화를 관찰할 수 있었다. 이는 화합물 2의 미토콘드리아 표적능이 우수함을 알 수 있었다.
- [0139] (2) 세포 생존율(%) 분석
- [0140] HeLa 세포를 96-웰 플레이트에 시딩(seeding)하였다. 하룻밤 배양한 후, 상기 HeLa 세포를 상기 합성에 1에서 수득한 화합물 2와 서로 다른 농도에서 1시간 동안 배양하였다. DPBS로 워싱한 후, 상기 세포를 녹색 LED(20 mW/cm^2 , 20분)에 조사하고, 24시간 동안 계속 배양하였다. 세포 생존율은 MTT(메틸티아졸릴테트라졸륨) 분석으로 시험하였다. 상기 세포에 4시간 동안 0.5 mg/mL MTT (Sigma) 배지를 첨가하고, 생성된 포르마잔을 0.1mL의 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해시키고 Spectramax Microwell plate reader로 OD 650 nm에서 측정하였다. 상기 처리가 없었던 세포의 생존율은 세포의 생존율은 100 % 살아있는 것으로 계산하였다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 및 표준 편차 (SD)로 표시하였다.
- [0141] 잠재적인 광 치료제로서 화합물 2의 사용 가능성을 보기 위하여, MTT 분석을 통해 HeLa 세포에 대한 화합물 2의 항암 효능을 조사하였다.
- [0142] 도 6(a)는 암실 또는 명실에서 HeLa 세포를 각각 화합물 2의 농도(0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μM)에서 배양한 후 녹색 LED 조사하여 세포 생존율을 분석한 결과이며; 도 6(b)는 암실 또는 명실에서 HeLa 세포를 각각 에리트로신 B(erythrosine B, 표준 광감각제)의 농도(0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μM)에서 배양한 후 녹색 LED 조사하여 세포 생존율을 분석한 결과이다.
- [0143] 도 6(a) 및 6(b)를 참조하면, 광 조사 하에서 HeLa 세포의 생존율은 화합물 2의 농도가 증가함에 따라 점차 감소하는데, 이로써 화합물 2의 HeLa 세포에서 높은 광 세포 독성이 있음을 알 수 있다. 최대 억제 농도 (IC₅₀, ca. 10 μM)에서 화합물 2의 치료 효능은 에리트로신 B(erythrosine B)과 유사했으나, 암실 조건에서 화합물 2는 HeLa 세포에 대해 거의 독성이 없음을 알 수 있었다.
- [0144] 도 6(c)는 HeLa 세포를 10.0 μM 농도의 화합물 2에서 배양한 후 칼세인-AM(2.0 μM) 및 프로피듐 요오드화물 (PI, 4.0 μM)에 염색된 HeLa 세포의 형광이미지를 분석한 결과이다.

[0145] 도 6(c)를 참조하면, 화합물 2의 높은 광 세포 독성은 살아있는 세포 및 죽은 세포 마커로 각각 칼세인-AM 및 프로피듐 요오드화물(PI)를 사용하여 공초점 형광 이미징을 통해 시각화하였다. 또한, ROS 프로브로 DCFH-DA를 사용하여 세포 내 ROS 생산능을 시각화했으며, 이는 ROS가 세포 사멸을 유발하는 중요한 역할을 알 수 있었다.

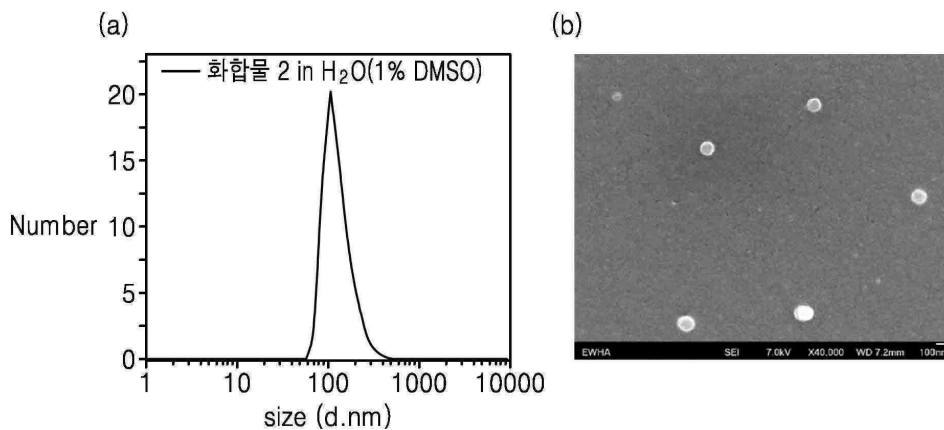
[0146] 이로부터, 본 발명의 일 구현예에 따른 화합물이 암치료를 위한 치료제로서 사용될 수 있음을 알 수 있다.

도면

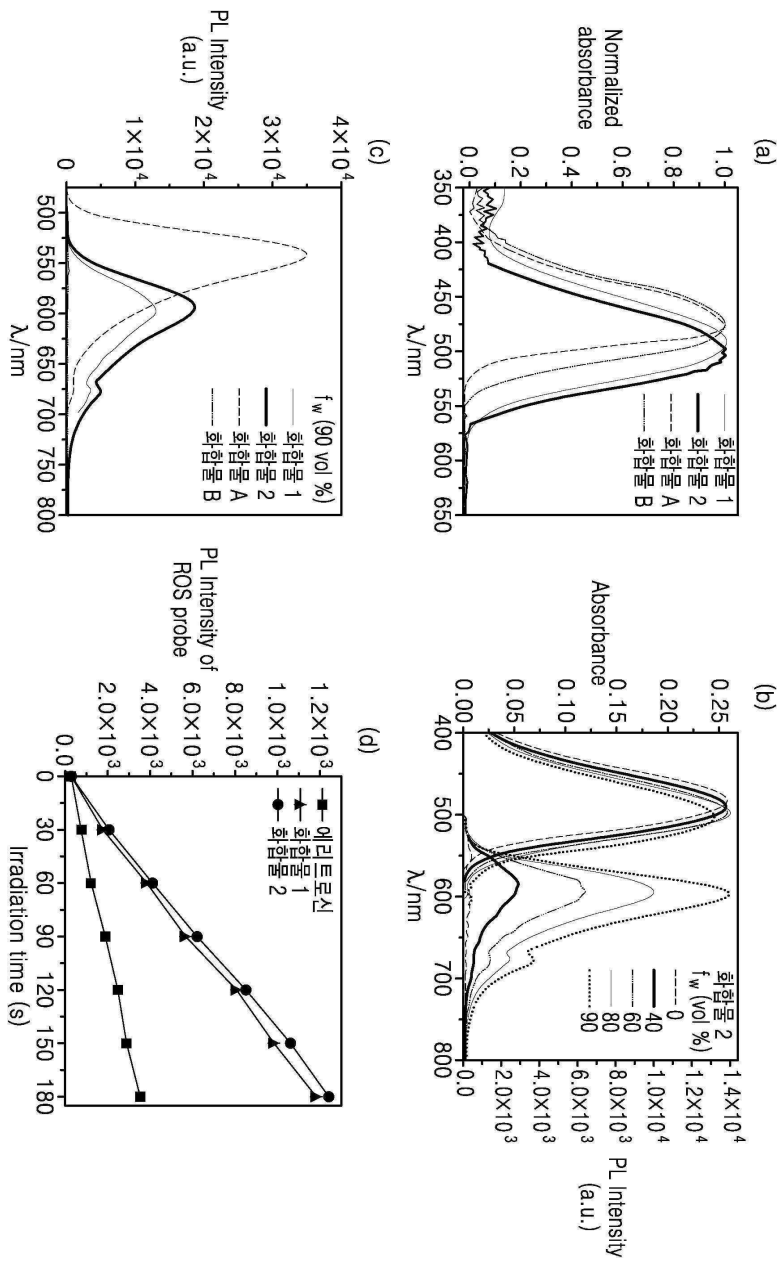
도면1



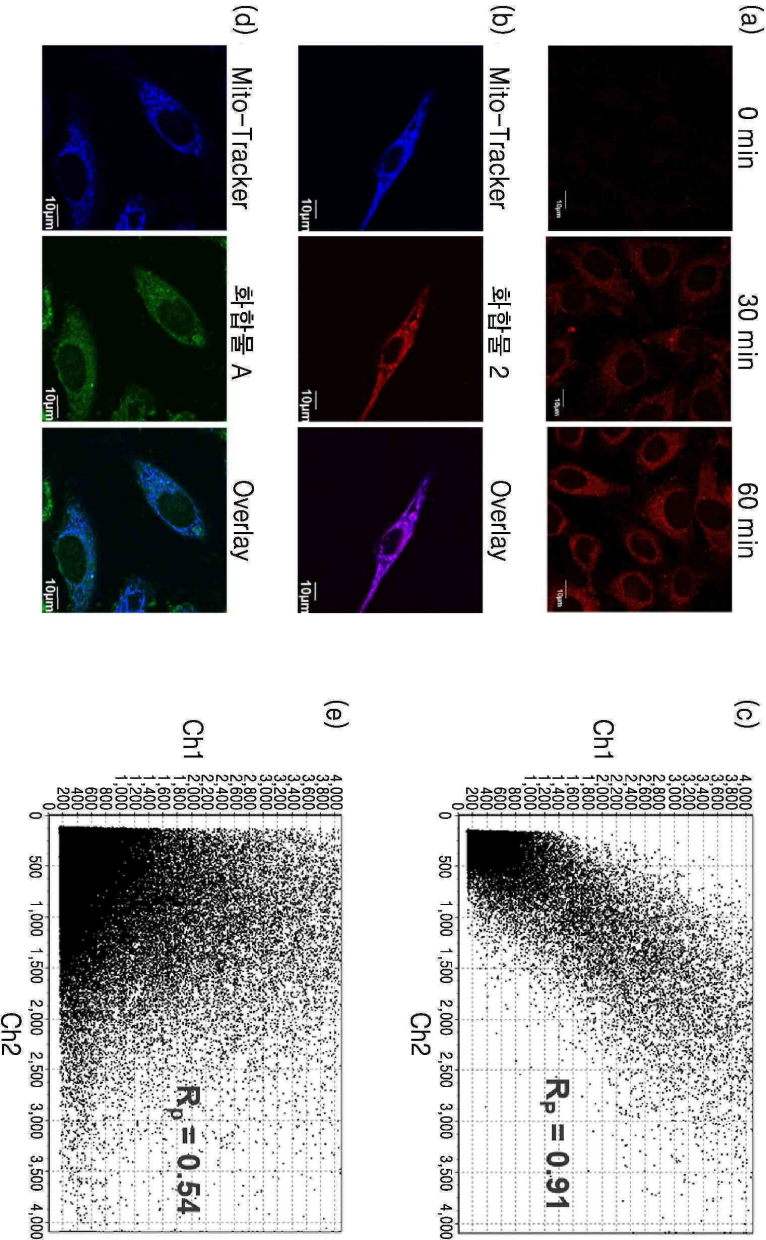
도면2



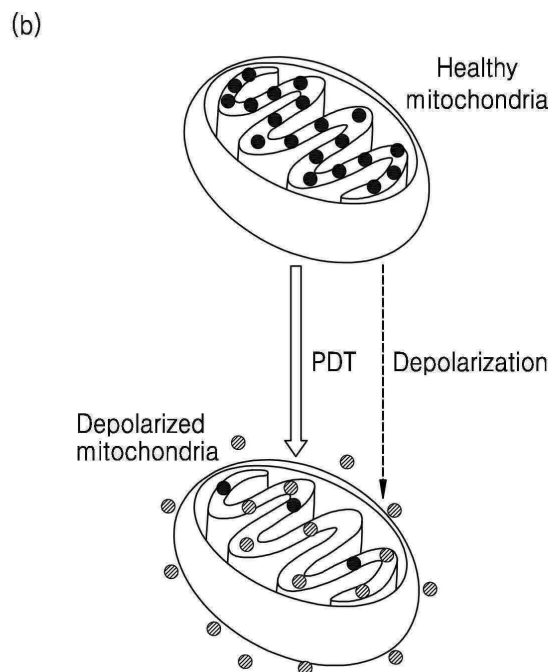
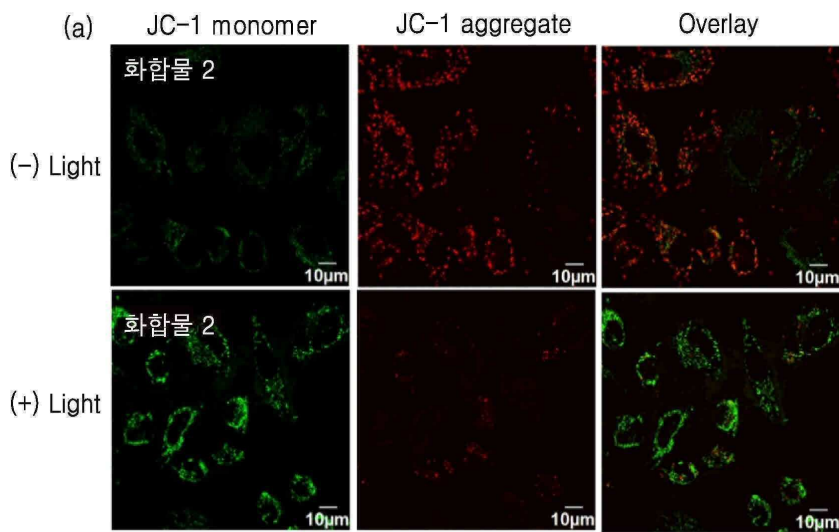
도면3



도면4



도면5



도면6

