

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0093469 (43) 공개일자 2016년08월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07D 311/08 (2006.01) C07D 311/06 (2006.01) C07F 15/02 (2006.01) C07F 9/28 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(52) CPC특허분류 C07D 311/08 (2013.01) C07D 311/06 (2013.01)	(72) 발명자 김중승 경기도 성남시 분당구 내정로 152, 130동 2402호 (수내동, 파크타운롯데아파트)	
(21) 출원번호 10-2015-0014533	정효성 서울특별시 강남구 선릉로 221, 304동 1204호 (도곡동, 도곡렉슬아파트) (뒷면에 계속)	
(22) 출원일자 2015년01월29일 심사청구일자 2015년01월29일	(74) 대리인 특허법인충현	

전체 청구항 수 : 총 8 항

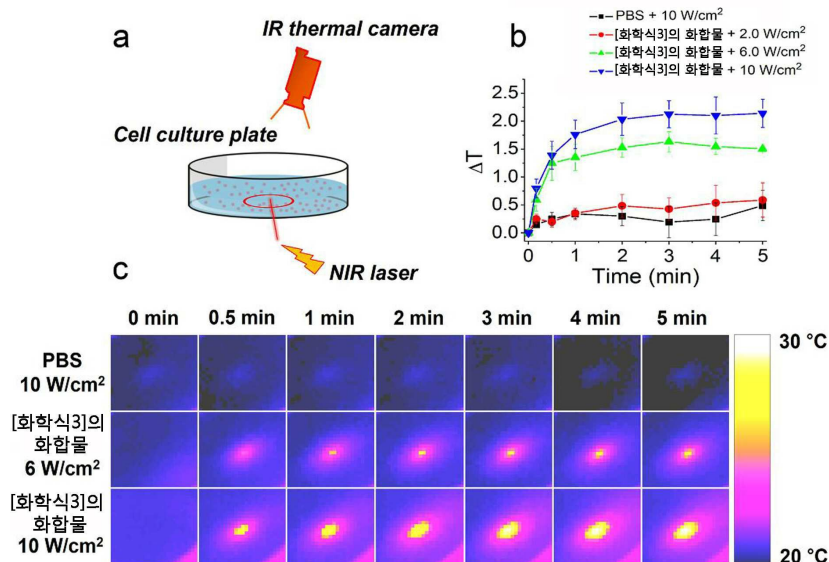
(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 표적화용 마커 및 이를 이용한 고온열 치료방법

(57) 요약

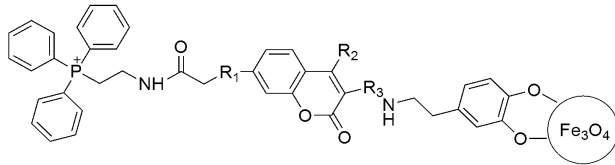
본 발명은 미토콘드리아 표적화용 마커 및 이를 이용한 고온열 치료방법에 관한 것으로 하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되고, 근적외선이 조사되면 미토콘드리아의 온도를 향상시켜 사멸시킴으로써 종양을 억제시킬 수 있다.

(뒷면에 계속)

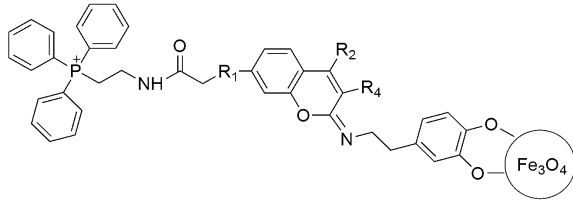
대표도 - 도8



[화학식 1]



[화학식 2]



(52) CPC특허분류

C07F 15/02 (2013.01)

C07F 9/28 (2013.01)

(72) 발명자

한지유

경기도 의정부시 통일로 451-25, 102동 1402호 (신곡동, 장암현대1차아파트)

김중훈

서울특별시 서초구 효령로23길 31, 101호 (방배동, 멤버스빌)

변경민

경기도 수원시 영통구 태장로82번길 32, 109동 1104호 (망포동, 망포마을 동수원 엘지빌리지)

정종화

경상남도 진주시 초장로14번길 29, 207동 1804호 (초전동, 진주초전푸르지오2단지)

강철훈

경기도 수원시 장안구 하물로30번길 22, 105동 704호 (천천동, 신안한일)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0081566

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 리더연구자지원_창의적연구지원사업

연구과제명 발광센서재료연구단

기 여 율 80/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9B4028636

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 [협동] 인간 전분화능 줄기세포로부터 고 기능성 간세포로의 대량 분화유도 원천기술개발 및 조직재생인자 발굴

기 여 율 10/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C7050139

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 줄기세포의 3-D 스페로이드 분화기법을 이용한 독성평가용 간세포 생산 및 공급체계 확립

기 여 율 10/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2015.09.30

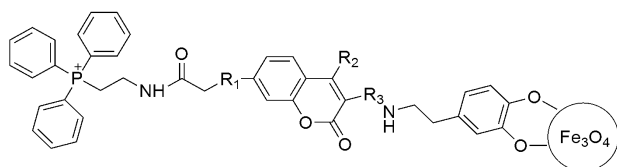
명세서

청구범위

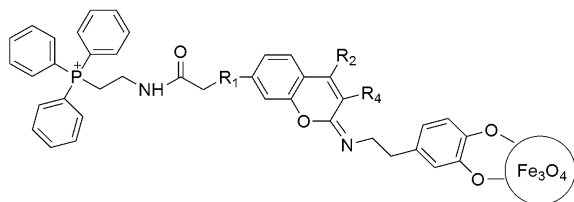
청구항 1

하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 화합물;

[화학식 1]



[화학식 2]

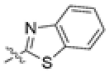


상기 [화학식 1] 및 [화학식 2]에서, 상기 R_1 은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 치환 또는 비치환된 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 R_2 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 수소 원자로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 R_3 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 카르복실기로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 R_4 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 카

르복실기 및  로 이루어진 군에서 선택됨.

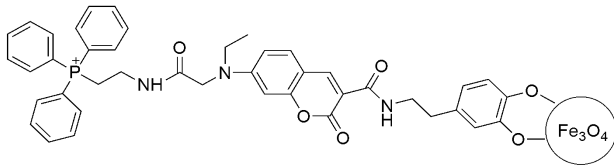
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 중수소 원자, 시아노기, 할로젠 원자, 히드록시기, 니트로기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 1 내지 40의 알콕시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬아미노기, 탄소수 6 내지 40의 아릴아미노기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴아미노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 탄소수 3 내지 40의 아릴옥시기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기, 게르마늄기, 인 및 보론으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로 치환되는 것을 특징으로 하는 화합물.

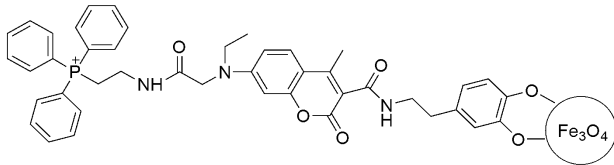
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 [화학식 3] 내지 [화학식 8]로 표시되는 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화합물;

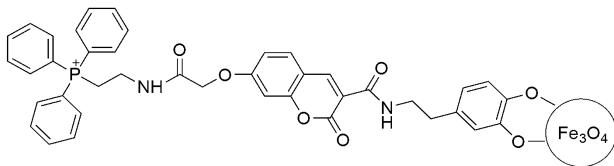
[화학식 3]



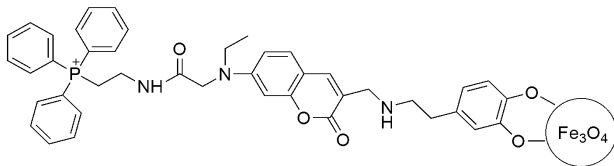
[화학식 4]



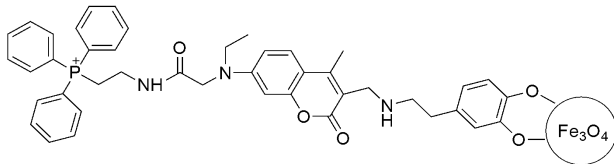
[화학식 5]



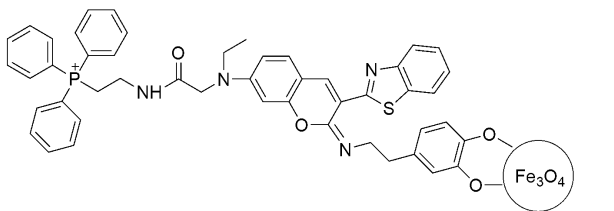
[화학식 6]



[화학식 7]



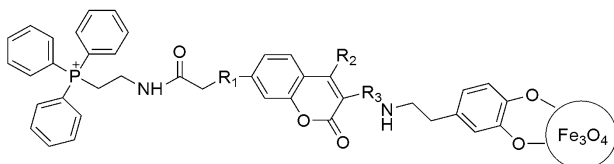
[화학식 8]



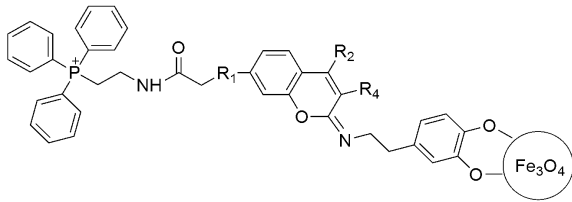
청구항 4

하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 화합물을 포함하는 미토콘드리아 표적화용 마커;

[화학식 1]



[화학식 2]

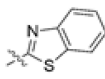


상기 [화학식 1] 및 [화학식 2]에서, 상기 R_1 은 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 치환 또는 비치환된 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 R_2 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 수소 원자로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 R_3 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 카르복실기로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 R_4 는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 카르복실기

및  로 이루어진 군에서 선택됨.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화합물은 마토콘드리아에 위치하여 근적외선이 조사되면 미토콘드리아의 온도를 5분 내에 2.0 내지 2.5 °C 상승시키는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적화용 마커.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 근적외선의 파장은 700 내지 750 nm이며, 근적외선 조사밀도는 1.8 내지 2.3 W/cm²인 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적화용 마커.

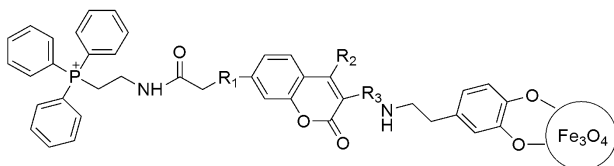
청구항 7

(a) 피검체에 하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 화합물을 주입하는 단계;

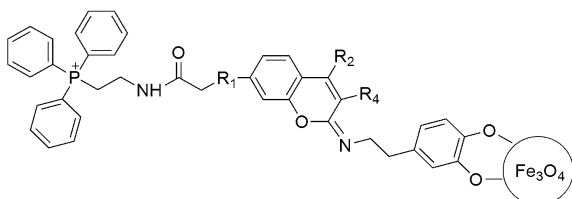
(b) 상기 화합물이 주입된 샘플에 근적외선을 조사하는 단계; 및

(c) 상기 근적외선이 조사된 샘플의 형광을 측정하는 단계를 포함하는 세포내 미토콘드리아의 세포 사멸을 유도하여 종양을 억제하는 고온열 치료방법;

[화학식 1]



[화학식 2]

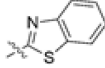


상기 [화학식 1] 및 [화학식 2]에서, 상기 R_1 은 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 치환 또는 비치환된 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 R_2 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 수소 원자로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 R_3 는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 카르복실기로 이루어진 군에서 선택되고,

상기 R_4 는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 카르복실기

및  로 이루어진 군에서 선택됨.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 근적외선의 파장은 700 내지 750 nm이며, 근적외선 조사밀도는 1.8 내지 2.3 W/cm²인 것을 특징으로 하는 종양을 억제하는 고온열 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아에 위치되어 근적외선이 조사되면 미토콘드리아의 온도를 향상시켜 사멸시킴으로써 종양을 억제시킬 수 있는 미토콘드리아 표적화용 마커 및 이를 이용한 고온열 치료방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고온열 치료(hyperthermia)는 종양 조직에서 아포토시스를 유도하는 치료적 방법으로서, 최소의 부작용을 나타내면서 열에 대하여 약한 방어기제를 갖춘 세포에 대하여 인공적으로 조직의 온도를 상승시켜 종양을 사멸시킴으로써 표준 암 치료(방사선치료 및 화학치료)에 효과적인 보완책이다.

[0003] 상기 고온열 치료에 적용하기 위하여 나노입자를 비롯하여 다양한 열 전달 물질이 항암 치료의 용도로 개발되어 왔다. 구체적으로, 상기 나노입자의 크기, 모양, 표면전하 및 코팅물질(예, 단백질, 중합체 또는 세포투과 펩티드)을 변화시킴으로써 나노입자의 고온열 치료의 효능을 향상시키는 방법에 대하여 연구가 수행되고 있다.

[0004] 최근에는 근적외선 레이저 조사를 이용한 열-발생 시스템이 주목을 받고 있다. 상기 기술은 다른 방법에 비하여 정상 세포에 유해를 덜 가하고 덜 침습적이라는 장점이 있기 때문이다. 근적외선에 민감한 나노입자 중에서도 산화철 입자와 같은 자성 입자(MP)는 고온열 치료 항암 요법에서 우월한 후보자이다. 왜냐하면 이것들은 비독성, 생적합성, 그리고 자성 공명 이미징 기술에 적합하기 때문이다.

[0005] 근적외선에 민감한 자성 입자(MPs)로서 고온열 치료에서 높은 방사선 열 변환을 달성하기 위하여, 다량의 자성 입자(MPs)를 세포에 전달하는 방법이 있는데 이는 정상세포에 손상을 증가시킬 수 있다.

[0006] 그러므로 최소의 부작용을 위하여 열 감수성 세포 내 소기관으로 자성 입자(MPs)를 선택적으로 전달시킴으로써 열의 양에 대한 세포 독성을 향상시키는 신규한 방법이 요구되고 있다.

[0007] 한편, 미토콘드리아는 중요한 에너지-생산 세포 기관이며, 반응성 산소 종(ROS)의 생성을 통해 세포 사멸을 일으키는 열 충격에 매우 민감하다. 그러므로 상기 자성 입자(MPs)를 미토콘드리아에 전달시켜 고온열 치료로 세포독성을 향상시킬 수 있다면 부작용 없이 원하는 목표를 이룰 수 있다.

[0008] 따라서, 미토콘드리아에 선택적으로 전달되며 세포의 온도를 높여 세포 독성을 향상시키는 고온열 치료 방법에 적용할 수 있는 신규한 물질이 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 1. Yin, Y.; Alivisatos, A. P. Nature 2005, 437, 664-670.
- (비특허문헌 0002) 2. Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008, 105, 14265-14270.
- (비특허문헌 0003) 3. Bartczak, D.; Muskens, O. L.; Nitti, S.; Sanchez-Elsner, T.; Millar, T. M.; Kanaras, A. G. Small 2012, 8, 122-130.
- (비특허문헌 0004) 4. Yang, H. W.; Hua, M. Y.; Liu, H. L.; Tsai, R. Y.; Chuang, C. K.; Chu, P. C.; Wu, P. Y.; Chang, Y. H.; Chuang, H. C.; Yu, K. J.; Pang, S. T. ACS Nano 2012, 6, 1795-1805.
- (비특허문헌 0005) 5. Yuan, H.; Fales, A. M.; Vo-Dinh, T. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 11358-11361.
- (비특허문헌 0006) 6. Ahmadi, T. S.; Wang, Z. L.; Green, T. C.; Henglein, A.; El-Sayed, M. A. Science 1996, 272, 1924-1925.

발명의 내용

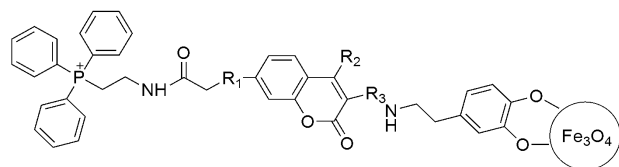
해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 미토콘드리아에 선택적으로 전달되며 근적외선이 조사되면 미토콘드리아의 온도를 향상시켜 사멸시킴으로써 종양을 억제시킬 수 있는 신규한 화합물을 제공하는데 있다.
- [0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 화합물을 포함하는 미토콘드리아 표적화용 마커를 제공하는데 있다.
- [0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규한 화합물을 이용하여 세포내 미토콘드리아의 세포 사멸을 유도하여 종양을 억제하는 고온열 치료방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

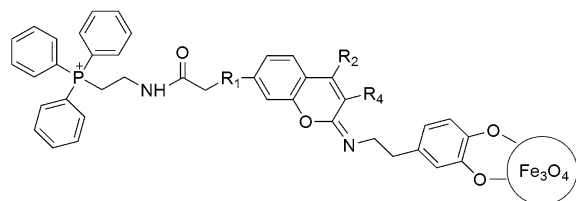
- [0013] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 신규한 화합물은 하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시될 수 있다;

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] [화학식 2]



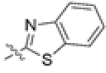
[0017]

- [0018] 상기 [화학식 1] 및 [화학식 2]에서, 상기 R₁은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 치환 또는 비치환된 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로 이루어진 군에서 선택되고,

- [0019] 상기 R₂는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 수소 원자로 이루어진 군에서 선택되며,

- [0020] 상기 R₃는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 카르복실기로 이루어진 군에서 선택되고,

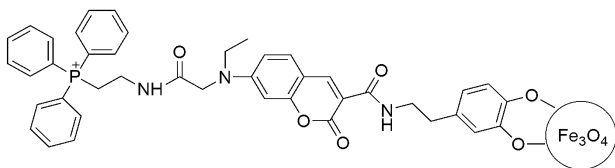
[0021] 상기 R₄는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 카

르복실기 및  로 이루어진 군에서 선택됨.

[0022] 상기 R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 중수소 원자, 시아노기, 할로젠 원자, 히드록시기, 니트로기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 1 내지 40의 알콕시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬아미노기, 탄소수 6 내지 40의 아릴아미노기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴아미노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 탄소수 3 내지 40의 아릴옥시기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기, 게르마늄기, 인 및 보론으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상으로 치환될 수 있다.

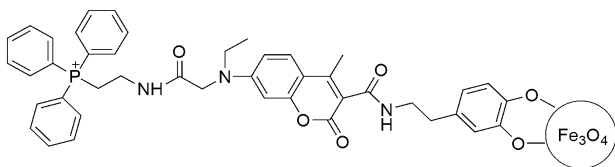
[0023] 상기 신규한 화합물은 하기 [화학식 3] 내지 [화학식 8]로 표시되는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다;

[0024] [화학식 3]



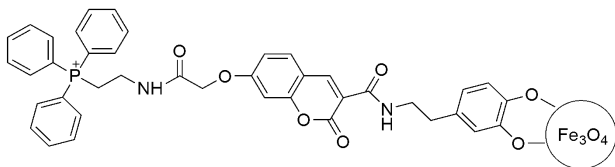
[0025]

[0026] [화학식 4]



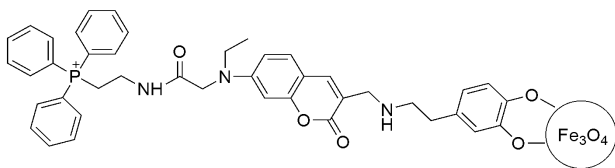
[0027]

[0028] [화학식 5]



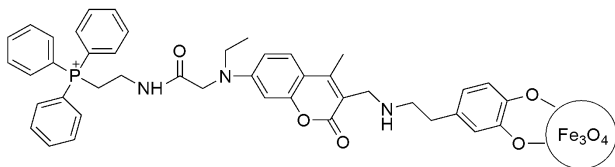
[0029]

[0030] [화학식 6]



[0031]

[0032] [화학식 7]



[0033]

도 8c는 조사시간 및 조사밀도에 따른 IR 열 이미지이다.

도 9a는 [화학식 3]의 화합물로 처리된 헬라 세포를 20분 동안 근적외선 조사 후 측정된 공초점 형광 현미경 이미지이다.

도 9b는 [화학식 3]의 화합물 및 [화학식 17]의 화합물의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

도 9c는 PBS, [화학식 3]의 화합물 및 [화학식 17]의 화합물로 처리된 헬라 세포를 20분 동안 근적외선 조사 후 측정된 공초점 형광 현미경 이미지이다.

도 10a, 10d 및 10g는 [화학식 3] 화합물, MitoTracker Red, ER-Tracker Red, 또는 LysoTracker DND-99로 처리된 헬라 세포의 공초점 형광 현미경 이미지이다.

도 10b는 633 nm의 여기와 650-700 nm 필터를 이용하여 수집된 MitoTracker Red (0.2 M)의 형광 이미지이다.

도 10c는 상기 도 10a 및 도 10b가 병합된 이미지이다.

도 10e는 600-650 nm 필터와 543 nm에서 여기(이광자 여기)를 이용하여 수집된 ER-Tracker Red(0.5 M)의 형광 이미지이다.

도 10f는 상기 도 10d 및 도 10e가 병합된 이미지이다.

도 10h는 600-650 nm 필터와 543 nm에서 여기(이광자 여기)를 이용하여 수집된 LysoTracker DND-99 (0.5 M)의 형광 이미지이다.

도 10i는 상기 도 10g 및 도 10h가 병합된 이미지이다.

도 11a, 11d 및 11g는 [화학식 17] 화합물, MitoTracker Red, ER-Tracker Red, 또는 LysoTracker DND-99로 처리된 헬라 세포의 공초점 형광 현미경 이미지이다.

도 11b는 633 nm의 여기와 650-700 nm 필터를 이용하여 수집된 MitoTracker Red (0.2 M)의 형광 이미지이다.

도 11c는 상기 도 11a 및 도 11b가 병합된 이미지이다.

도 11e는 600-650 nm 필터와 543 nm에서 여기(이광자 여기)를 이용하여 수집된 ER-Tracker Red (0.5 M)의 형광 이미지이다.

도 11f는 상기 도 11d 및 도 11e가 병합된 이미지이다.

도 11h는 600-650 nm 필터와 543 nm에서 여기(이광자 여기)를 이용하여 수집된 LysoTracker DND-99 (0.5 M)의 형광 이미지이다.

도 11i는 상기 도 11g 및 도 11h가 병합된 이미지이다.

도 12는 [화학식 3]의 화합물로 처리된 헬라 세포의 BioTEM 이미지이다.

도 13a는 PBS 또는 [화학식 3] 화합물을 이종이식 BALB/c 누드 마우스의 꼬리 정맥에 주입하고 시간에 따라 측정한 생체 내(*In vivo*) 근적외선 이미지이다.

도 13b는 PBS, IO, [화학식 3] 화합물 또는 [화학식 17] 화합물로 주입하고 6시간 후 이종이식 BALB/c 누드 마우스의 다양한 조직 내 생체 외(*Ex vivo*) 형광이미지이다.

도 13c는 다양한 조직 내 생체 외(*Ex vivo*) 형광의 정량 그래프이다.

도 13d는 ICP-AES에 의해 종양 조직에 축적된 철의 양을 나타낸 그래프이다.

도 13e는 오른쪽 종양(빨간색 원)의 740 nm 광열 치료 후 0일 및 21일에 이종이식 BALB/c 누드 마우스의 이미지이다.

도 13f는 비조사된 종양 부피에 대하여 조사된 종양 부피의 비율을 나타낸 그래프이다.

도 13g는 광열 치료 후 각 군으로부터 해부된 종양 조직이다.

도 13h는 광열 치료 후 PBS 및 [화학식 3]의 화합물이 주입된 마우스로부터 스냅 동결된 종양 냉동 부분(cryosection)의 조직화학분석이다.

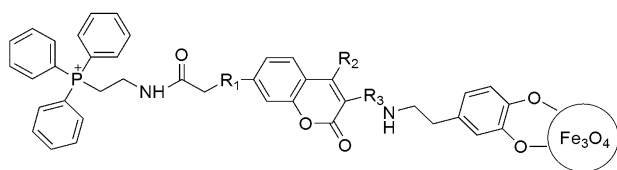
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명은 미토콘드리아에 위치되어 근적외선이 조사되면 미토콘드리아의 온도를 향상시켜 사멸시킴으로써 종양을 억제시킬 수 있는 미토콘드리아 표적화용 마커 및 이를 이용한 고온열 치료방법에 관한 것이다.

[0044] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

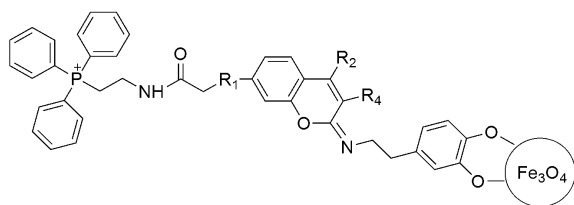
[0045] 본 발명의 화합물은 하기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되며, 이를 포함하여 미토콘드리아 표적화용 마커로 이용할 수 있다. 상기 미토콘드리아 표적화를 위한 마커는 세포 내 미토콘드리아의 세포 사멸을 측정하기 위한 형광 마커이다.

[0046] [화학식 1]



[0047]

[0048] [화학식 2]



[0049]

[0050] 본 발명에 따른 [화학식 1] 또는 [화학식 2]의 화합물은 쿠마린계 형광 산화철 나노입자로서, 형광 리포터로 쿠마린 및 미토콘드리아 타겟팅 유닛으로 트리페닐포스포늄(TPP)으로 구성된다

[0051] 상기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]의 화합물은 미토콘드리아에 선택적으로 전달되며, 700 내지 750 nm의 파장 및 1.8 내지 2.3 W/cm²의 근적외선 조사밀도를 갖는 근적외선 레이저가 조사되면 암세포주(HeLa 세포)에서 세포 내 온도가 5분 내에 2.0 내지 2.5 °C가 향상된다. 예컨대, 상기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]의 화합물이 미토콘드리아에 위치하여 세포 내 미토콘드리아의 온도를 향상시키는 것이다.

[0052] 또한, 상기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]의 화합물은 근적외선을 조사하고 20분이 지나면 더욱 많은 세포 사멸이 이루어지도록 유도한다.

[0053] 이러한 화합물의 구조는 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등을 통하여 확인할 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명은 세포내 미토콘드리아의 세포 사멸을 유도하여 종양을 억제하는 고온열 치료방법을 제공한다.

[0055] 본 발명의 고온열 치료방법은 (a) 피검체에 상기 [화학식 1] 또는 [화학식 2]로 표시되는 화합물을 주입하는 단계; (b) 상기 화합물이 주입된 샘플에 근적외선을 조사하는 단계; 및 (c) 상기 근적외선이 조사된 샘플의 형광을 측정하는 단계를 포함함으로써, 인비보(*in vivo*)치료법으로 종양을 억제시킨다.

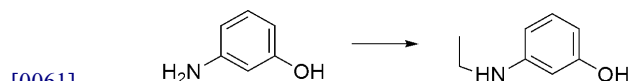
[0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0057] <실시예>

[0058] 합성예 1. [화학식 3]으로 표시되는 화합물의 합성

[0059] 1-1. [화학식 15]로 표시되는 화합물의 합성

[0060] [반응식 1]



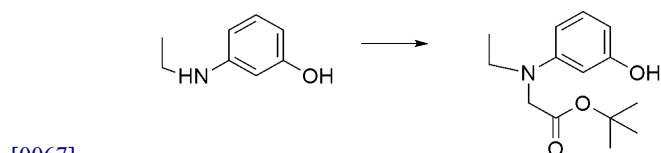
[0062] [화학식 16] [화학식 15]

[0063] [화학식 16]의 화합물에 요오도에탄(ICH_2CH_3), 탄산칼륨(K_2CO_3) 및 N,N-디메틸포름아미드(DMF)를 첨가하여 60 °C에서 2시간 동안 교반하여 [화학식 15]의 화합물(수율: 75%)을 얻었다.

[0064] 상기 [화학식 15]의 화합물에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 각각 도 1a 및 도 1b에 나타내었다.

[0065] 1-2. [화학식 14]로 표시되는 화합물의 합성

[0066] [반응식 2]



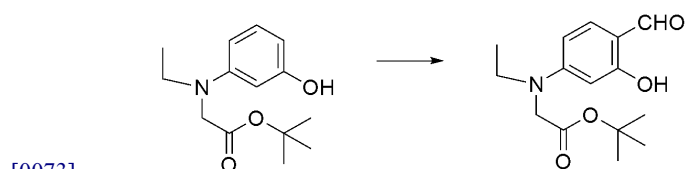
[0068] [화학식 15] [화학식 14]

[0069] [화학식 15]의 화합물(0.34 g, 2.50 mmol), *tert*-부틸브로모아세테이트(0.60 mL, 3.80 mmol), 탄산칼륨(K_2CO_3 , 1.00 g, 7.50 mmol), 요오드화나트륨(NaI , 0.04 g, 0.25 mmol)을 아세트나이트릴에 용해시킨 후 12시간 동안 환류시켰다. 용매를 증발시킨 후 디클로로메탄(50 mL) 및 물(50 mL)을 첨가하고 유기층을 수집하였다. 상기 디클로로메탄 층을 무수 MgSO_4 로 건조시킨 다음 용매를 제거하였다. 조생성물을 실리카겔(*n*-Hexane/*EtOAc*=5/1) 크로마토그래피로 정제하여 갈색오일의 [화학식 14]를 수득하였다(0.45 g, 수율: 72%).

[0070] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.05 (t, J = 8.30 Hz, 1H), 6.23-6.14 (m, 2H), 6.13 (m, 1H), 4.60 (s, 1H), 3.88 (s, 2H), 3.43 (q, J = 7.84 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.20 (t, J = 7.42 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 171.0, 157.0, 149.5, 130.2, 104.7, 104.0, 99.3, 81.8, 53.4, 46.4, 28.2, 12.6. ESI-MS calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ $[\text{M-H}]^-$ 250.15, found 250.05.

[0071] 1-3. [화학식 13]으로 표시되는 화합물의 합성

[0072] [반응식 3]



[0074] [화학식 14] [화학식 13]

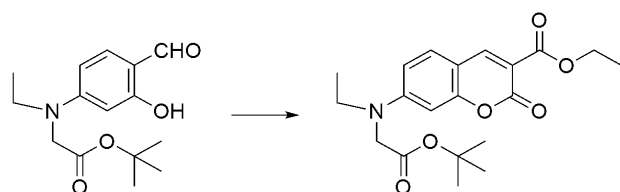
[0075] DMF(2 mL)을 실온, 질소분위기 하에서 염화포스포릴(POCl_3 , 2 mL)을 적가하고 30분 동안 교반하여 다마스쿠 용액을 수득하였다. 상기 용액을 [화학식 14]의 화합물(10 mL DMF에 용해됨)의 일부(1.74 g, 6.91 mmol)와 혼합하여 스칼렛 현탁액을 수득하였다. 상기 혼합물을 12시간 동안 60 °C에서 교반하고 100 mL의 얼음물에 부었다. 수산화나트륨(20%)을 첨가하여 침전물이 다량 생성된 혼합물의 pH를 조절하였다. 조생성물을 여과하고 물로 완전히 세척한 다음 건조시키고 무수 에탄올로 재결정하여 백색 고체인 [화학식 13]의 화합물을 수득하였다(1.41 g,

수율: 73%).

[0076] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.57 (s, 1H), 7.32 (d, J = 9.14 Hz, 1H), 6.25 (d, J = 9.14 Hz, 1H), 6.08 (s, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.53 (q, J = 7.70 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.27 (t, J = 7.36 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 192.7, 168.9, 164.3, 154.7, 135.5, 112.3, 104.6, 97.6, 82.5, 53.1, 46.9, 28.1, 12.4. ESI-MS calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 280.15, found 280.25.

[0077] 1-4. [화학식 12]로 표시되는 화합물의 합성

[0078] [반응식 4]



[0079]

[0080] [화학식 13]

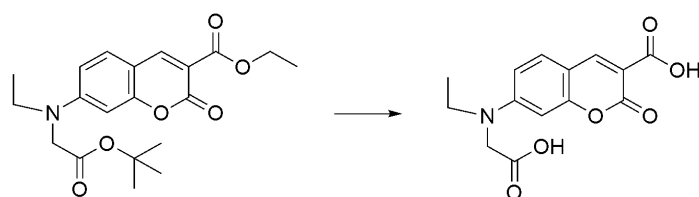
[화학식 12]

[0081] [화학식 13]의 화합물(1.40 g, 5.00 mmol), 디에틸탈로네이트(0.96 g, 6.00 mmol) 및 에탄올(5 mL)을 혼합하고 피페리딘(0.05 mL) 및 빙초산(1 방울)으로 처리한 후 3시간 동안 환류 교반하였다. 상기 반응 생성물에 10 mL의 물을 첨가하여 생성된 혼합물을 0 °C에서 냉각하였다. 생성된 결정질 고체를 여과하고 50% 차가운 에탄올(5 mL)로 세척한 후 50% 에탄올로 재결정하여 황색 고체인 [화학식 12]의 화합물을 수득하였다(1.21 g, 수율: 65%).

[0082] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.44 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.73 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 8.73 Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.37 (q, J = 14.09 Hz, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.54 (q, J = 14.73 Hz, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.39 (t, J = 7.85 Hz, 3H), 1.27 (t, J = 7.73 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 168.6, 164.0, 158.2, 158.1, 153.3, 149.2, 131.0, 110.1, 109.7, 108.5, 97.4, 82.7, 61.3, 53.1, 47.1, 28.0, 14.4, 12.2. ESI-MS calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 376.17, found 376.20.

[0083] 1-5. [화학식 11]로 표시되는 화합물의 합성

[0084] [반응식 5]



[0085]

[0086] [화학식 12]

[화학식 11]

[0087] [화학식 12]의 화합물(1.88 g, 5.00 mmol) 및 에탄올 (10 mL)을 혼합한 후 10 mL의 10% 수산화나트륨을 첨가하고 15분 동안 환류교반하였다. conc. 염산을 이용하여 pH 2 로 산성화하고 0 °C에서 냉각하여 많은 침전물을 생성하였다. 상기 생성물을 여과하고 물로 세척한 후 건조하고 무수 에탄올로 재결정하여 황색 고체인 [화학식 11]의 화합물을 수득하였다(1.01 g, 수율: 69%).

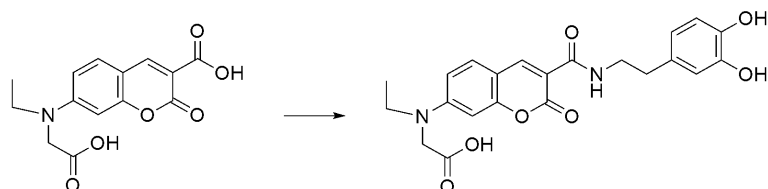
[0088] $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOH-d_4): δ 8.70 (s, 1H), 7.61 (d, J = 8.89 Hz, 1H), 6.82 (dd, J = 9.42 Hz, 1H), 6.59 (s, 1H), 4.29 (s, 2H), 3.62 (q, J = 8.24 Hz, 2H), 1.27 (t, J = 7.83 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH-d_4):

d_6): 171.1, 164.5, 157.6, 153.6, 149.5, 143.7, 131.6, 110.2, 108.5, 107.9, 96.6, 51.7, 46.2, 12.1.

ESI-MS calc. for $C_{14}H_{13}NO_6[M+H]^+$ 292.07, found 292.15.

[0089] 1-6. [화학식 10]으로 표시되는 화합물의 합성

[0090] [반응식 6]



[0091]

[0092] [화학식 11]

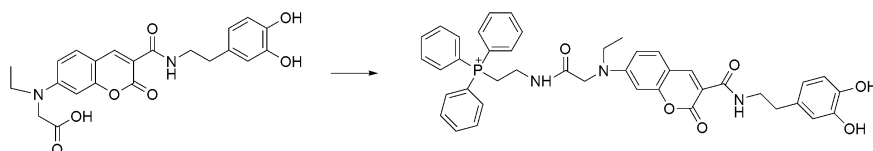
[화학식 10]

[0093] [화학식 11]의 화합물(0.23 g, 0.78 mmol), EDCI (0.18 g, 0.78 mmol), 및 DMAP(0.19 g, 1.55 mmol)을 무수 DMF에 용해시킨 후 상온에서 10분 동안 질소 분위기하에서 교반하였다. 반응이 종결되면 도파민 염산염(0.15 g, 0.78 mmol)을 첨가하여 12시간 동안 교반한 후 조생성물을 실리카겔($CH_2Cl_2/MeOH(v/v)=90/10$) 크로마토그래피로 정제하여 황색 고체인 [화학식 10]을 수득하였다(0.15 g, 수율: 45%).

[0094] 1H -NMR (300 MHz, $MeOH-d_4$): δ 8.60 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 9.37$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 9.14$ Hz, 1H), 6.73-6.67 (m, 2H), 6.63-6.55 (m, 2H), 6.48 (s, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.62-3.51 (m, 4H), 2.74 (t, $J = 7.63$ Hz, 2H), 1.25 (t, $J = 7.56$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): 178.2, 162.3, 161.9, 157.1, 153.6, 150.2, 145.4, 143.7, 131.4, 130.1, 119.4, 116.2, 115.8, 110.6, 110.5, 108.0, 96.5, 46.5, 43.6, 34.8, 22.2, 12.2. ESI-MS calc. for $C_{22}H_{22}N_2O_7[M+H]^+$ 427.14, found 427.40.

[0095] 1-7. [화학식 9]로 표시되는 화합물의 합성

[0096] [반응식 7]



[0097]

[0098] [화학식 10]

[화학식 9]

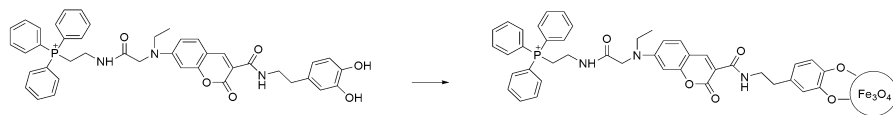
[0099] 무수 DMF(15 mL)에 [화학식 10]의 화합물(0.21 g, 0.48 mmol)을 용해시킨 후 $-30^\circ C$ 의 질소 분위기 하에서 냉각시켰다. N-메틸모르포린(80.0 μL , 0.72 mmol) 및 이소부틸클로로카보네이트(94.0 μL , 0.72 mmol)를 첨가하여 2시간 동안 교반한 후 $PPh_3(CH_2)_2NH_2Cl$ (0.29 g, 0.85 mmol) 및 N-메틸모르포린(80.0 μL , 0.72 mmol)을 첨가하여 $-15^\circ C$ 에서 1시간 동안 교반한 다음 실온까지 천천히 가온하여 12시간 동안 교반하였다. 반응이 종료된 반응물의 용매를 증발시킨 후 디클로로메탄(50 mL) 및 물(50 mL)을 첨가하고 유기층을 수집하였다. 상기 디클로로메탄층을 무수 $MgSO_4$ 로 건조시킨 다음 용매를 제거하였다. 조생성물을 실리카겔($CH_2Cl_2/MeOH=95/5$) 크로마토그래피로 정제하여 황색 고체의 [화학식 9]를 수득하였다(0.18 g, 수율: 52%).

[0100] 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 9.63 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.86-7.71 (m, 15H), 7.40 (d, $J = 9.01$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J = 6.77$ Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.66 (d, $J = 6.65$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 6.59$ Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.82-3.65 (m, 4H), 3.60 (q, $J = 7.21$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 8.03$ Hz, 2H), 2.59 (m, 2H), 1.21 (t, $J = 6.72$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): 170.1, 163.1, 162.7, 159.8,

157.2, 153.2, 148.3, 144.5, 143.2, 135.6, 133.6, 133.5, 130.9, 130.7, 120.7, 118.1, 117.2, 116.2, 110.9, 109.3, 97.6, 66.0, 54.1, 47.3, 41.6, 26.5, 15.5, 12.1. ESI-MS calc. for $C_{42}H_{41}N_3O_6P[M]^+$ 714.27, found 714.50.

[0101] 1-8. [화학식 3]으로 표시되는 화합물의 합성

[0102] [반응식 8]



[0103]

[0104] [화학식 9]

[화학식 3]

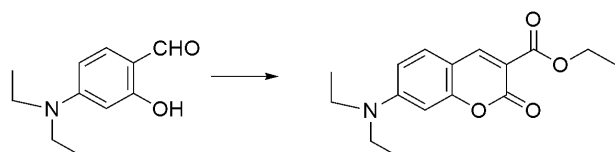
[0105] [화학식 9]의 화합물(0.05 g, 0.07 mmol)을 무수 톨루엔(5 mL)에 용해시킨 후 Fe_3O_4 나노입자(0.05 g)를 첨가하였다. 상기 혼합물은 24시간 동안 질소 하에서 환류교반하여 혼합한 후 수집된 고체를 디클로로메탄 및 아세톤으로 여러번 세척하고 진공으로 건조시켜 [화학식 3]의 화합물을 수득하였다. [화학식 3]의 화합물은 IR (도 2c), XPS (도 3c), TGA (도 4a) 및 TEM (도 6a)로 측정하였다.

[0106] <비교예>

[0107] 합성예 2. [화학식 17]로 표시되는 화합물의 합성

[0108] 2-1. [화학식 20]으로 표시되는 화합물의 합성

[0109] [반응식 9]



[0110]

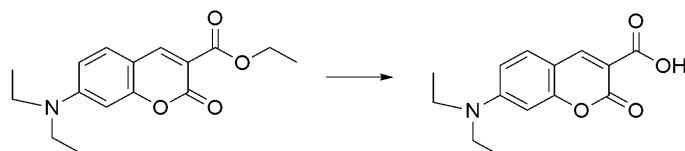
[0111] [화학식 21]

[화학식 20]

[0112] [화학식 21]의 화합물(1.40 g, 5.00 mmol), 디에틸말로네이트(0.96 g, 6.00 mmol) 및 에탄올(5 mL)을 혼합하고 피페리딘(0.05 mL) 및 빙초산(1 방울)으로 처리한 후 3시간 동안 환류 교반하였다. 상기 반응 생성물에 10 mL의 물을 첨가하여 생성된 혼합물을 0 °C에서 냉각하였다. 생성된 결정질 고체를 여과하고 50% 차가운 에탄올(5 mL)로 세척한 후 50% 에탄올로 재결정하여 황색 고체인 [화학식 20]의 화합물을 수득하였다(1.21 g, 수율: 65%).

[0113] 2-2. [화학식 19]로 표시되는 화합물의 합성

[0114] [반응식 10]



[0115]

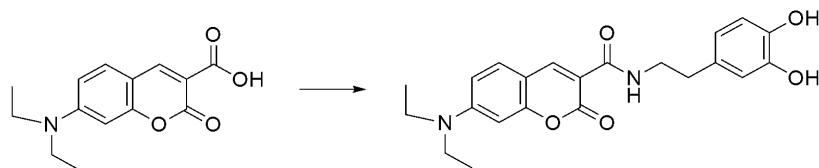
[0116] [화학식 20]

[화학식 19]

[0117] [화학식 20]의 화합물(1.88 g, 5.00 mmol) 및 에탄올 (10 mL)을 혼합한 후 10 mL의 10% 수산화나트륨을 첨가하고 15분 동안 환류교반하였다. conc. 염산을 이용하여 pH 2 로 산성화하고 0 °C에서 냉각하여 많은 침전물을 생성하였다. 상기 생성물을 여과하고 물로 세척한 후 건조하고 무수 에탄올로 재결정하여 황색 고체인 [화학식 19]의 화합물을 수득하였다(1.01 g, 수율: 69%).

[0118] 2-3. [화학식 18]로 표시되는 화합물의 합성

[0119] [반응식 11]



[0120]

[0121] [화학식 19]

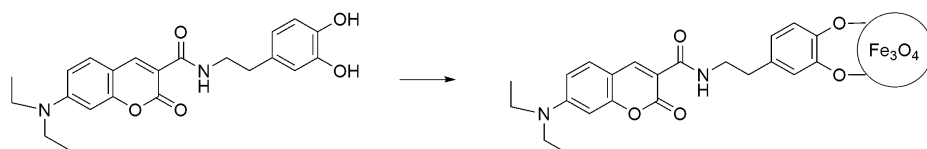
[화학식 18]

[0122] [화학식 19]의 화합물(0.20 g, 0.78 mmol), EDCI (0.18 g, 0.78 mmol), 및 DMAP(0.19 g, 1.55 mmol)을 무수 DMF에 용해시킨 후 상온에서 10분 동안 질소하에서 교반하였다. 반응이 종결되면 도파민 염산염(0.15 g, 0.78 mmol)을 첨가하여 12시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시킨 후 디클로로메탄(50 mL) 및 물(50 mL)을 첨가하고 유기층을 수집하였다. 상기 디클로로메탄 층을 무수 $MgSO_4$ 로 건조시킨 다음 용매를 제거하였다. 조생성물을 실리카겔($CH_2Cl_2/MeOH(v/v)=97/3$) 크로마토그래피로 정제하여 황색 고체인 [화학식 18]을 수득하였다(0.22 g, 수율: 72%).

[0123] 1H -NMR(400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.92 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 9.02$ Hz, 1H), 6.84-6.80 (m, 2H), 6.69-6.63 (m, 2H), 6.48 (s, 1H), 5.64 (s, 2H), 3.68-3.61 (q, $J = 8.46$ Hz, 2H), 3.49-3.42 (q, $J = 8.88$ Hz, 4H), 2.83-2.78 (t, $J = 8.04$ Hz, 2H), 1.26-1.22 (t, $J = 7.54$ Hz, 6H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): 162.1, 161.7, 157.2, 152.4, 147.7, 145.1, 143.6, 131.6, 130.0, 119.3, 116.0, 115.6, 110.1, 109.4, 107.7, 95.9, 44.4, 40.8, 34.6, 12.3. ESI-MS calc. for $C_{22}H_{24}N_2O_5[M+H]^+$ 397.17, found 397.30.

[0124] 2-4. [화학식 17]로 표시되는 화합물의 합성

[0125] [반응식 12]



[0126]

[0127] [화학식 18]

[화학식 17]

[0128] [화학식 18]의 화합물(0.05 g, 0.12 mmol)을 무수 톨루엔(5 mL)에 용해시킨 후 Fe_3O_4 나노입자(0.05 g)를 첨가하였다. 상기 혼합물은 24시간 동안 질소 하에서 환류교반하여 혼합한 후 수집된 고체를 디클로로메탄 및 아세톤으로 여러번 세척하고 진공으로 건조시켜 [화학식 17]의 화합물을 수득하였다. [화학식 17]의 화합물은 IR (도 2b), XPS (도 3b), TGA (도 4b) 및 TEM (도 5b)로 측정하였다.

[0129] <시험예>

[0130] 미토콘드리아를 표적화하는 트리페닐포스포늄(TPP)의 임무를 입증하기 위하여 비교예로 TPP가 없는 [화학식 17]의 화합물을 제조하였다.

[0131] 시험예 1. [화학식 3] 화합물의 특성

[0132] 도 6a는 [화학식 3] 화합물의 TEM이미지이고, 도 6b는 [화학식 3] 화합물 및 [화학식 9] 화합물의 UV-vis 흡수 스펙트럼이며, 도 6c는 [화학식 3] 화합물의 TEM 맵핑 이미지이다: (i) 명시야 이미지, (ii) 철, (iii) oxygen, (iv) 질소, 및 (v) 포스포르스.

- [0133] 도 6에 도시된 바와 같이, [화학식 3] 화합물의 TEM 이미지로 확인한 결과 직경은 ~15 nm이고 좁은 분포를 보이는 구형입자인 것으로 확인하였으며, 고해상도 TEM 이미지에 의해 고유한 격자무늬 패턴의 높은 결정성을 나타내는 것으로 확인되었다(도 6a).
- [0134] 상기 [화학식 3] 화합물을 IR 스펙트럼으로 확인한 결과, [화학식 9]의 화합물로부터 유래되어 300, 2922, 2848, 1692, 1614, 1576, 1511, 1432, 1260, 1224, 및 1015 cm^{-1} 에서 강한 새로운 밴드를 보인다(도 2). 또한, [화학식 3] 화합물의 XPS 스펙트럼으로 [화학식 9] 화합물의 존재를 확인하고, 질소원자의 증가를 보여주는 것을 확인하였다(도 3).
- [0135] 또한, 상기 [화학식 3] 화합물은 67.5%의 탄소, 5.6%의 질소, 22.7%의 산소 및 4.1%의 인으로 구성되는데, TEM 매핑 결과 [화학식 3] 화합물이 탄소, 산소, 질소, 인 및 철을 포함하는 것으로 확인되었다(도 6c).
- [0136] 상기 [화학식 3] 화합물 및 [화학식 17] 화합물의 수성 분산은 UV-vis 흡수 스펙트럼에서 광범위하고 지속적인 흡수 및 증가된 근적외선 흡수로 표시된다(도 5b 및 도 6b).
- [0137] **시험예 2. [화학식 3] 화합물의 광열 변환 효율**
- [0138] 도 7a는 2.0 W/cm^2 의 조사밀도로 근적외선을 조사 시 다양한 [화학식 3] 화합물의 농도(0, 0.3, 1.4, 및 7.0 mg/mL)로 PBS 용액에 분산된 [화학식 3] 화합물의 고온열 가열 곡선이며, 도 7b는 1.4 mg/mL 의 [화학식 3] 화합물 농도에 다양한 조사밀도($0.3, 2.0, 6.0$, 및 10 W/cm^2)로 근적외선을 조사시 PBS 용액에 분산된 [화학식 3] 화합물의 고온열 가열 곡선이다.
- [0139] 도 7에 도시된 바와 같이, 2.0 W/cm^2 에서 740 nm 근적외선 레이저로 조사될 때, 분산된 용액의 온도가 농도와 함께 서서히 증가하는 것을 확인하였다(도 7a). 또한, 7.0 mg/mL 용액에서 2분 동안 온도가 $\sim 13\text{ }^{\circ}\text{C}$ 증가하는 것을 보였으며, 반면 [화학식 3] 화합물이 없는 PBS 용액은 온도변화가 없는 것을 확인하였다.
- [0140] 또한, 1.4 mg/mL 로 분산된 용액의 온도는 0.3 W/cm^2 에서 10 W/cm^2 로 레이저 조사밀도의 증가에 따라 현저히 증가되는 것이 확인되었다(도 7b).
- [0141] 이러한 결과는 가열이 우수한 광열 변환 효율과 함께 [화학식 3] 화합물의 근적외선 조사에 의해 발생하는 것을 보여준다.
- [0142] **시험예 3. 헬라세포(HeLa cells) 내에서 [화학식 3] 화합물의 광열 변환 효율**
- [0143] 도 8a는 델타 T접시에 로드된 헬라 세포에 근적외선 레이저로 조사시의 과정을 나타낸 개략도이며(빨간색 원은 레이저 조명의 영역을 보여주며, 영역의 온도 변화는 IR 열 카메라를 이용하여 측정됨), 도 8b는 근적외선 조사 밀도($2.0, 6.0$, 및 10 W/cm^2)에 따른 고온열 가열 곡선이고, 도 8c는 조사시간 및 조사밀도에 따른 IR 열 이미지이다.
- [0144] 도 8에 도시된 바와 같이, [화학식 3] 화합물이 전달된 헬라 세포의 온도는 적외선 열화상 카메라를 사용하여 일정한 근적외선 조사하에서 모니터링되었다(도 8a). 조사 지점에서의 국부 온도가 레이저 조사밀도의 증가로 증가된다(도 8b 및 8c). 특히, 740 nm 근적외선 레이저로 10 W/cm^2 조사함에 따라 [화학식 3] 화합물이 전달된 헬라 세포의 온도는 5분 동안 $2.14 \pm 0.25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 가 상승되었으나, [화학식 3] 화합물이 없는 세포는 동일한 조건에서 온도변화가 일어나지 않는 것을 확인하였다(약 $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 머무름).
- [0145] 이러한 결과는 [화학식 3]의 화합물이 근적외선 조사시 세포 온도를 상승시킬 수 있음을 입증하는 것이다. 다음으로, [화학식 3]의 화합물 기반 고온열 치료가 세포 사멸을 유도할 수 있는지 여부를 시험한다.
- [0146] **시험예 4. 세포 독성 확인**
- [0147] 도 9a는 [화학식 3]의 화합물로 처리된 헬라 세포를 20분 동안 근적외선 조사(740 nm , 0.04 W/cm^2) 후 측정된 공초점 형광 현미경 이미지이며, 도 9b는 [화학식 3] 화합물 및 [화학식 17] 화합물의 세포 독성을 나타낸 그래

프리고, 도 9c는 PBS, [화학식 3]의 화합물 및 [화학식 17]의 화합물로 처리된 헬라 세포를 20분 동안 근적외선 조사(740 nm, 0.04 W/cm²) 후 측정된 공초점 형광 현미경 이미지이다. 이때 살아있는 세포는 그린, 죽은 세포는 레드이다(칼세인 AM/PI). * $P < 0.05$.

- [0148] [화학식 3]의 화합물 또는 [화학식 17]의 화합물이 전달된 헬라 세포는 요오드화 프로피듐(PI) 및 칼세인 AM으로 염색된다.
- [0149] 도 9에 나타난 바와 같이, [화학식 3]의 화합물이 전달된 세포의 근적외선 조사는 PI로 얼룩진 세포의 비율에 의해 그린 칼세인 AM과 레드 PI-형광 영역 사이에 명확한 경계를 보여주며, 이로 인하여 근적외선 조사가 실제로 세포 독성에 중요한 요소임을 나타낸다(도 9a).
- [0150] 형광 현미경 결과는 비교예인 [화학식 17]의 화합물에 비하여 실시예인 [화학식 3]의 화합물이 더욱 신속하고 광범위한 세포 사멸이 이루어지는 것을 확인하였다(도 9c). [화학식 3]의 화합물에 의한 세포 독성은 20분 이내에 $89.90 \pm 7.72\%$ 에 달했으며, 반면 [화학식 17]의 화합물은 동일한 실험 조건에서 $42.58 \pm 5.09\%$ 이었다.
- [0151] [화학식 3]의 화합물 및 [화학식 17]의 화합물로 처리된 헬라 세포의 형광 강도(FI)는 거의 동일하다(FI = 각각 14.15 ± 0.18 및 14.98 ± 0.27).
- [0152] [화학식 3] 화합물 또는 [화학식 17] 화합물의 세포로 전달된 양의 차이는 [화학식 17] 화합물의 우수한 세포 독성을 의미하지 않는다. 즉, [화학식 3] 화합물 자체가 우수한 세포 독성을 갖는다.
- [0153] 상기 [화학식 3] 화합물의 우수한 세포 독성 효과는 미토콘드리아 표적화 유닛인 TPP 잔기에 기인하는 것이다.
- [0154] 따라서, 상기 [화학식 3] 화합물의 고온열 치료 세포 독성이 세포 내의 다양한 부위 중에서도 미토콘드리아에서 우수한 세포 독성을 보인다.

[0155] **시험예 5. 형광 세포기관 추적자와 [화학식 3] 화합물 및 [화학식 17] 화합물의 공존**

- [0156] 도 10a, 10d 및 10g는 [화학식 3] 화합물, MitoTracker Red, ER-Tracker Red, 또는 LysoTracker DND-99로 처리된 헬라 세포의 공초점 형광 현미경 이미지이다. 740 nm에서 여기되고(이광자 여기), 450-550 nm에서 수집된 헬라 세포에서 [화학식 3] 화합물의 형광 이미지이다. 도 10b는 633 nm의 여기와 650-700 nm 필터를 이용하여 수집된 MitoTracker Red (0.2 M)의 형광 이미지이고, 도 10c는 상기 도 10a 및 도 10b가 병합된 이미지이며(피어슨 계수: 0.871), 도 10e는 600-650 nm 필터와 543 nm에서 여기(이광자 여기)를 이용하여 수집된 ER-Tracker Red(0.5 M)의 형광 이미지이고, 도 10f는 상기 도 10d 및 도 10e가 병합된 이미지이며(피어슨 계수: 0.550), 도 10h는 600-650 nm 필터와 543 nm에서 여기(이광자 여기)를 이용하여 수집된 LysoTracker DND-99 (0.5 M)의 형광 이미지이고, 도 10i는 상기 도 10g 및 도 10h가 병합된 이미지이다(피어슨 계수: 0.664).
- [0157] 또한, 도 11a, 11d 및 11g는 [화학식 17] 화합물, MitoTracker Red, ER-Tracker Red, 또는 LysoTracker DND-99로 처리된 헬라 세포의 공초점 형광 현미경 이미지이다. 740 nm에서 여기되고(이광자 여기), 450-550 nm에서 수집된 헬라 세포에서 [화학식 17] 화합물의 형광 이미지이다. 도 11b는 633 nm의 여기와 650-700 nm 필터를 이용하여 수집된 MitoTracker Red (0.2 M)의 형광 이미지이며, 도 11c는 상기 도 11a 및 도 11b가 병합된 이미지이고(피어슨 계수: 0.763), 도 11e는 600-650 nm 필터와 543 nm에서 여기(이광자 여기)를 이용하여 수집된 ER-Tracker Red (0.5 M)의 형광 이미지이며, 도 11f는 상기 도 11d 및 도 11e가 병합된 이미지이고(피어슨 계수: 0.833), 도 11h는 600-650 nm 필터와 543 nm에서 여기(이광자 여기)를 이용하여 수집된 LysoTracker DND-99 (0.5 M)의 형광 이미지이며, 도 11i는 상기 도 11g 및 도 11h가 병합된 이미지이다(피어슨 계수: 0.592).
- [0158] 또한, 도 12는 [화학식 3]의 화합물로 처리된 헬라 세포의 BioTEM 이미지이다. [화학식 3]의 화합물(검은색 점)은 미토콘드리아로 캡슐화되었다(M:미토콘드리아).
- [0159] 상기 [화학식 17]의 화합물의 세포내 영역을 확인하기 위하여, 세포기관 추적기(Mito-, ER-, 및 LysoTracker Red)를 이용한 TEM 이미지 및 형광 공존 실험을 수행하였다.
- [0160] 상기 [화학식 3] 화합물의 형광 영역은 MitoTracker(피어슨 계수 [Pearsons coefficient, PC] 0.871)이지만, Lyso- (PC 0.550) 또는 ER-Tracker (PC 0.664)와 부분적으로 중복된다(도 10). 이는 [화학식 3] 화합물이 미토콘드리아에 편재되었음을 나타낸다(도 10c).
- [0161] 비교 데이터로, 상기 [화학식 17]의 화합물은 소포체(ER, PC 0.833)에 주로 편재되었음을 나타내었다(도 11).

또한, 이들의 직경에 의해 식별된 어두운 산화철 나노입자가 미토콘드리아에 존재하는지를 공개한 TEM에 의해 [화학식 3] 화합물의 미토콘드리아 영역을 확인하였다(도 12).

[0162] 이러한 결과는 [화학식 3] 화합물의 TPP 유닛이 미토콘드리아에 우선 편재화되는 원인이 된다는 것을 보여준다.

[0163] 시험예 6. 인 비보(In vivo) 이중이식 종양 이미지 및 치료

[0164] 동물 모델인 이중이식 BALB/c 누드 마우스에서 [화학식 3] 화합물의 인 비보(In vivo) 이중이식 종양 표적화 특이성 및 치료 가능성을 조사하였다.

[0165] 도 13a는 PBS 또는 [화학식 3] 화합물을 이중이식 BALB/c 누드 마우스의 꼬리 정맥에 주입하고 1, 3, 및 6시간 후 측정된 생체 내(In vivo) 근적외선 이미지도; 도 13b는 PBS, IO, [화학식 3] 화합물 또는 [화학식 17] 화합물로 주입하고 6시간 후 이중이식 BALB/c 누드 마우스의 다양한 조직(i: 간, ii: 신장, iii: 종양, iv: 심장, v: 폐, 및 vi: 비장) 내 생체 외(Ex vivo) 형광이미지이고; 도 13c는 다양한 조직(i: 간, ii: 신장, iii: 종양, iv: 심장, v: 폐, 및 vi: 비장) 내 생체 외(Ex vivo) 형광의 정량(ROI: 개별 픽셀로 관심의 영역) 그래프이고; 도 13d는 ICP-AES에 의해 종양 조직에 축적된 철의 양을 나타낸 그래프이며; 도 13e는 오른쪽 종양(빨간색 원)의 740 nm 광열 치료 후 0일 및 21일에 이중이식 BALB/c 누드 마우스의 이미지이고(왼쪽 종양인 파란색 원은 레이저를 조사하지 않은 대조구); 도 13f는 비조사된 종양 부피에 대하여 조사된 종양 부피의 비율을 나타낸 그래프이며(* $P < 0.05$); 도 13g는 광열 치료 후 각 군으로부터 해부된 종양 조직이고; 도 13h는 광열 치료 후 PBS 및 [화학식 3]의 화합물이 주입된 마우스로부터 스냅 동결된 종양 냉동 부분(cryosection)의 조직화학분석이다. 광열 사멸 세포는 H&E 염색 패널에서 검은 점선 영역으로 표시되며, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색과 PCNA(Proliferating cell nuclear antigen)는 세포증식을 나타낸다. 프러시안 블루는 세포내 철 축적을 나타낸다. 배율: 200X.

[0166] 상기 IO는 TPP 및 쿠마린 잔기가 없는 산화철 나노입자를 의미한다.

[0167] 도 13에 도시된 바와 같이, PBS(대조구) 또는 [화학식 3]의 화합물을 마우스 꼬리의 정맥에 주입하고, [화학식 3]의 화합물 그룹에서 유도된 신호가 점진적으로 유도된다.

[0168] 종양부위에서의 최대 신호강도는 마우스 꼬리의 정맥에 주입하고 6시간 후에 관찰되었으며, [화학식 3]의 화합물은 표적화된 종양의 생체 내(in vivo)에서 확인되었다(도 13a).

[0169] 생체 외(ex vivo) 형광 바이오-분포 실험은 [화학식 3]의 화합물과 [화학식 17]의 화합물이 종양 부위에 우선적으로 축적된 것으로 나타났다(정상의 간, 신장, 심장, 폐 및 비장 조직 보다 10배 이상 더 많이 축적됨; $P < 0.05$)(도 13b 및 13c).

[0170] 또한, 유도 결합된 플라즈마 원자 방출 분광법(ICP-AES)에 의해 [화학식 17] 화합물의 종양 레벨을 측정하고, 축적된 철의 양_{amount}/중량_{weight} (g/g)이 IO, [화학식 3]의 화합물 및 [화학식 17]의 화합물이 주입된 그룹 간에 유사한 것을 발견하였다(각각 8.288 ± 0.919 , 11.2552 ± 1.774 , 및 $8.939 \pm 0.982 (X10^{-5})$)(도 13d).

[0171] 그러나, 철은 대조군의 종양 부위에서 검출되지 않았다($P < 0.05$).

[0172] 종양 이식 모델에서 근적외선 조사시 IO, [화학식 3]의 화합물 및 [화학식 17]의 화합물의 치료효과를 조사하였다(도 13e).

[0173] 이식된 종양 영역의 일측에 근적외선 조사와 6번 투여 후, [화학식 3]의 화합물군에서 조사된 종양 부피가 비조사 종양 부피에 비하여 상당히 감소하였다(도 13f, $P < 0.05$). 특히, [화학식 3]의 화합물로 처리하면 28일 후 종양 부피가 더욱 극적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 13g).

[0174] 또한, 조직화학분석은 PBS군에서 관찰된 것에 비하여 광열치료 후 [화학식 3]의 화합물 주입 군의 종양 조직에서 증가된 세포 사멸이 여러 영역에서 발견되었다(도 13h, 아래쪽 왼쪽 패널에서 검정 점선의 내부 영역). 뿐만 아니라, 증식세포 핵항원(PCNA)은 종양 저온부에 염색되고 또한 확산이 [화학식 3]의 화합물 처리된 군에서 증가되는 것을 보였다. 그리고 프러시안 블루(Prussian blue)는 PBS군에 비하여 [화학식 3] 화합물이 주입된 군의 종양에서 철이 증가하였다(도 13h).

[0175] 종양 부위에 위치를 알아내도록 축적된 산화철의 유사한 양을 고려하여(도 13d), [화학식 3]의 화합물의 우수한 항종양 효능은 TPP 잔기에 기인하는 것을 확인하였다. 동물 모델에서 [화학식 17] 화합물의 치료 효과와 생체

내(*in vitro*) 독성 결과 사이의 결과는 직접적 미토콘드리아 치료가 종양 치료에 더 효과적이라는 것을 시사한다.

[0176] 상기 [화학식 3]의 화합물을 이용한 열발생 시스템은 암 치료시 고온열요법의 치료적 효능을 상승시키므로 신규한 광열(photothermal) 치료법의 개발이 가능하다.

[0177] [합성물질 및 방법]

[0178] 모든 시약은 알드리치(Aldrich)에서 구입하여 사용하였으며, 모든 용매는 덕산 화학에서 구입하였다.

[0179] 실리카겔 60(Merck, 70 내지 230 mesh)은 컬럼크로마토그래피의 정지상으로 사용되며, 분석용 박막 크로마토그래피는 실리카겔 60(0.25 mm 두께로 프리코트된 시트)을 사용하여 수행하였다.

[0180] UV/Vis 흡수 및 정량 스펙트럼은 각각 신코 S-3100분광 광도계 및 시마즈 LCMS-2020으로 기록되었으며, NMR 스펙트럼은 Varian 300 또는 Varian 400 MHz의 분광계로 수집되었다. 또한, IR 스펙트럼은 시마즈 FTIR 8400S 장치로 400-4000 cm^{-1} 범위에서 KBr 펠렛을 사용하여 측정되었다.

[0181] 상기 [화학식 3] 화합물과 같은 나노 입자는 100 kV의 가속 전압 및 16 mm 작동 거리를 사용하여 200 kV에서 JEOL JEM-2010 투과형 전자 현미경으로 측정하였다.

[0182] 표면분석은 단색의 Al K α (1486.7 eV) X-선 광원부와 X-선 광전자 분광법(XPS, 스그마 프로브, Thermo-VG, 영국)에 의해 측정되며, 열중량분석(TGA) 데이터는 TA 인스트루먼트 Q-50으로 얻는다.

[0183] [산화철 나노입자(iron oxide)의 합성]

[0184] 나노입자는 종래의 공지방법으로 합성되었다.

[0185] 산화-올레이트 착물의 합성을 위하여, 철(III) 클로라이드 헥사하이드레이트(10.8 g, 40 mmol) 및 나트륨 올레이트(36.5 g, 120 mmol)가 혼합된 용매(80 ml 에탄올, 60 ml 증류수 및 140 ml 헥산)상에서 용해시킨 후 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 동안 가열하였다. 반응이 종결되면 상부 유기층을 50 ml 증류수로 3회 세척하고 유기층을 회수한 다음 용매의 증발시키고 철-올레이트 착물을 왁시 고체로서 수득하였다.

[0186] 12 nm의 입자 크기를 갖는 단분산의 산화철 나노입자를 제조하기 위하여, 철-올레이트 착물(36.0 g, 40 mmol) 및 올레산(5.7 g, 20 mmol)은 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1-옥타데센(200 g)에 단계적으로 첨가하였다. 반응 혼합물은 30분 동안 3.3 $^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 가열 속도로 320 $^{\circ}\text{C}$ 까지 가열하고 반응 온도가 320 $^{\circ}\text{C}$ 에 도달하면, 강한 반응이 일어나서 처음의 투명 용액은 혼탁해져서 갈색빛의 검정이 된다. 나노입자를 포함하는 반응 혼합물을 25 $^{\circ}\text{C}$ 까지 식히고, 침전물을 에탄올(200 ml x 3)로 세척하여 과량의 올레이트를 제거하였으며, 나노입자를 원심분리에 의하여 분리하였다.

[0187] [세포 배양 및 공초점 현미경 분석]

[0188] 헬라 세포를 10% FCS가 첨가된 DEME(인비트로젠)에서 배양하였다. 세포를 24-웰 평평한 플레이트에 시딩하고 1일 경과 후 공초점 이미징 실험을 수행하였다. 1일 후, [화학식 3]의 화합물(1.40 mg/mL) 및 [화학식 17]의 화합물(1.22 mg/mL)을 세포에 처리하고 세포에서의 위치를 확인하였다.

[0189] 세포에서 [화학식 17]의 화합물의 위치를 확인하기 위하여, 상기 세포는 [화학식 17]의 화합물로 20분 동안 배양하고 PBS 완충용액으로 3번 세척하기 전에 미디어를 함유하는 세포기관 추적기(각각 Mito- (0.2 M), Lyso- (0.5 M), 및 ER (0.5 M) 추적기)로 전처리된다.

[0190] 세포기관 추적기 및 [화학식 17]의 화합물로 배양된 헬라 세포는 Leica TCS-SP2 공초점 형광 다광자 현미경에 의해 측정된다.

[0191] 세포 독성을 모니터링하기 위하여, 요오드화 프로피듐(PI, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS 완충용액, Aldrich) 및 칼세인AM (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS 완충용액, Aldrich)이 사용된다.

[0192] 헬라 세포는 PI 및 칼세인 AM이 함유된 미디어로 배양하기 전에 [화학식 17]의 화합물 또는 [화학식 17]의 화합

물 없이 20분 동안 배양한 후 20분 동안 0.04 W/cm^2 의 전력밀도를 갖는 740 nm 펄스 레이저 노광(exposure)(1.3 mW, 200 fs, 90 MHz)을 실시하였다.

[0193] 헬라 세포에서 세포 독성 결과는 Leica TCS-SP2 공초점 형광 다광자 현미경으로 모니터하였다.

[0194] [광열 변환 효율의 측정]

[0195] 광열 변환 효율은 농도 및 근적외선 조사밀도의 함수에 의하여 연구되었다.

[0196] 광열 변환 효율을 조사하기 위하여, pH 7.4 PBS 용액에 [화학식 3]의 화합물 용액의 시리즈(각각 0, 0.3, 1.4, 및 7.0 mg/mL 농도)는 5분 동안 2.0 W/cm^2 전력밀도를 갖는 740 nm 펄스 레이저 노광(1.3 mW, 200 fs, 90 MHz)으로 조사되었다.

[0197] 근적외선 레이저의 전력밀도 기능을 확인하기 위하여, pH 7.4 PBS에 [화학식 3]의 화합물 용액은 상이한 근적외선 전력밀도(0.3, 2.0, 6.0 및 10 W/cm^2)로 조사되었다. 상기 온도 변화는 5분에 걸쳐 IR 열 카메라(A300, FLIR, Boston, MA)로 측정되었다. 상기 카메라는 색상으로 용액의 온도를 표시화상의 시계열로 잡았다. 모든 실험은 실온에서 수행되었다.

[0198] [*In vitro* 광열 변환 효율의 측정]

[0199] 헬라 세포는 [화학식 3]의 화합물(1.4 mg/mL)로 배양된 후 5분에 걸쳐 상이한 전력 밀도(0.3, 2.0, 6.0 및 10 W/cm^2)를 갖는 740 nm 펄스 레이저 노광(1.3 mW, 200 fs, 90 MHz)으로 수행된다.

[0200] 근적외선 레이저가 노출되는 동안, 서모그래피(thermographic) 이미지는 5분의 과정 동안 10초의 시간 간격으로 FLIR 열 카메라로 측정되고, 헬라 세포의 온도는 FLIR R&D 소프트웨어를 이용한 데이터로부터 계산된다. 모든 실험은 실온에서 수행되었다.

[0201] [바이오-TEM 이미지 측정]

[0202] 헬라 세포는 CELLocate 커버슬립으로 MatTek Petri 접시에 성장되고 [화학식 3]의 화합물로 20분 동안 배양되어 PBS 완충용액으로 3번 세척하였다. 미토콘드리아 추적기 레드(0.2 μM)는 미토콘드리아의 염색에 사용되었다. 이미지는 Leica TCS-SP2 공초점 형광 다광자 현미경으로 측정된다.

[0203] 이러한 관찰 후, 세포는 상온에서 2.5% 글루타르알데하이드가 함유된 0.1 M 포스페이트(pH 7.3)로 1시간 동안 고정되었다. 이어서, 세포는 어두운 곳 4 °C에서 1시간 동안 1% OsO₄ plus 1.5% 포타슘 페로시안 화합물이 함유된 0.1 M 포스페이트 완충용액(pH 7.3)으로 처리되고, 에탄올 및 프로필렌 옥사이드 계에서 탈수 후 Epon 812에 매설하였다. 중합을 2일 동안 70 °C에서 순수한 수지를 사용하여 수행하였다.

[0204] 초슬립 영역(70 nm)은 100-mesh 구리 그리드상에 수집된 초마이크로톰(ultramicrotome, UltraCut-UCT, Leica, Austria)으로 얻었다. 2% 우라닐 아세테이트(15 min) 및 납 시트르산으로 5분 동안 염색한 후, 염색한 부분은 120 kV을 갖는 TEM(transmission electron microcopy, JEM-1400Plus, JEOL, Japan)에 의해 검사되었다.

[0205] [종양 조직 내부에 산화철 나노 입자의 보유율 측정]

[0206] 종양이 있는 마우스의 꼬리 정맥에 70 μl PBS에 함유된 PBS, 3.36 mg/ml IO, 7.00 mg/ml [화학식 3]의 화합물 및 7.47 mg/ml [화학식 17]의 화합물을 주입하였다. 6시간 후 종료하고, 종양 조직(0.1 g)은 0.5 mL 물에 침지되고 해부되었다.

[0207] 조직 분쇄기로 분쇄하고 0.5 g 왕수를 첨가하여 침지되고, 10일 후 조직 샘플은 원심분리되고, 상층액은 수집되어 9 mL 물로 희석되었다.

[0208] 상기 용액 내의 철 농도는 한국기초과학연구원(KBSI)에서 ICP-AES(유도 결합 플라즈마 원자 방출 분광법, PerkinElmer Optima 4300 DV, USA)에 의해 3회 반복 측정되었으며, 3개의 독립적 배양은 평균 철 농도를 계산

하는데 사용하였다.

[0209] [마우스 이중이식 모델]

[0210] 종양 조직에서 [화학식 3] 화합물 및 [화학식 17] 화합물의 치료 효과 및 이미지를 검사하기 위하여, 6~8 주령의 BALB/c 누드 마우스는 RaonBio(경기도 용인시)(제어 이중이식, $n = 8$; 치료제 주입을 위한 이중이식, $n = 8$)에서 구입하였다. 모든 마우스는 NIH에서 발행된 실험동물의 관리 및 사용에 대한 가이드에 따라 실험하기 전에 최소 48시간 동안 동물 시설에 적응하고 유지되었다. 그들은 임의로 멸균 음식 및 물을 제공하였다.

[0211] 동물 시설은 21 ± 2 °C의 온도, 3040%의 습도에서 12시간씩 빛/어둠을 반복하였다. A549의 약 5.0×10^6 세포는 354234-마트리겔(BD, San Jose, California, USA)과 혼합되고 좌우 측면 피하에 주입된다.

[0212] [생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*ex vivo*) 이미지 측정]

[0213] 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*ex vivo*) 연구는 A549 접종된 이중이식 마우스를 이용하여 [화학식 3] 화합물 및 [화학식 17] 화합물의 종양 표적화 특이성 및 세포 기관 분포를 평가하기 위해 조사된다.

[0214] 상기 화합물로 접종 4-5 주 후, 이중이식 마우스는 4개의 그룹으로 나뉘어지고 3.36 mg/ml Iron oxide 나노입자, 7.00 mg/ml [화학식 3] 화합물, 및 7.47 mg/ml [화학식 17] 화합물과 함유된 70 μ l PBS를 마우스의 꼬리 정맥에 투여하여 6시간 동안 관리하였다. 대조군은 70 μ l PBS를 주입하였다.

[0215] 화합물을 꼬리 정맥에 주입 후, 생체 내 형광 이미지는 생체 내(*in vivo*) 이미지 시스템(IVIS) 스펙트럼(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)을 이용하여 종양의 오른쪽에 10분 동안 2.0 W/cm^2 전력밀도를 갖는 740 nm 펄스 레이저 노광(1.3 mW, 200 fs, 90 MHz) 후 취득된다.

[0216] 치료 효과를 확인하기 위하여, 처음 종양 부피 및 크기는 매주 디지털 캘리퍼스로 측정되고, 4개 그룹의 각 이중이식 마우스에 6번 주입되고 위에서 설명된 것과 같이 레이저가 조사되어 수행된다. 최종 종양 부피, 크기 및 종양 양 측면의 중량은 최종 주입 및 조사한 주(week)에 측정되었다.

[0217] 치료 2주 후, 모든 동물의 종양 조직 및 다른 기관(폐, 심장, 간, 신장 및 비장)은 IVIS 스펙트럼을 사용하여 생체 외(*ex vivo*) 이미지를 위하여 해부한다. 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*ex vivo*) 이미지에 대한 필터 세트는 블루이다: 여기 및 방출; 430 내지 500 nm.

[0218] 스펙트럼 및 자가형광으로 구성된 형광 이미지는 상용 소프트웨어(Living Image software for IVIS Spectrum/200, ver. 4.1, Waltham, MA, USA)와 섞인 것이 없다.

[0219] [조직화학 분석 측정]

[0220] 생체 외(*ex vivo*) 이미지 후, 이식된 종양 조직 및 다른 기관(폐, 심장, 간, 신장 및 비장)은 냉동 부분(cryosection)에 대한 조직테크(Tissue-Tek) 100% 최적 절단 온도 화합물(O.C.T., Sakura Finetek, USA)에 해부되고 매설된다. 다음으로 새로운 조직을 신속하게 액체 질소에 넣어 냉동하고 추가 분석할 때 까지 -80 °C 냉동고에 저장한다.

[0221] 새로운 냉동 보관된 조직은 -25 °C 울트라-마이크로톰(Leica CM 3050 S, Wetzlar, Germany)을 이용하여 절단된다(6 M thick). 각 영역은 접착 현미경 유리 슬라이드(Paul Mariendeld GmbH & Co.KG, Lauda-Knigshofen, Germany)에 놓여지고 PBS로 2번 O.C.T 화합물을 세척하였다. 조직을 냉동한 부분은 헤마톡실린(Merck, Readington Township, NJ, USA) 및 에오신(H&E)(BBC Biochemical, Mt. Venom, WA, USA)으로 염색되었다.

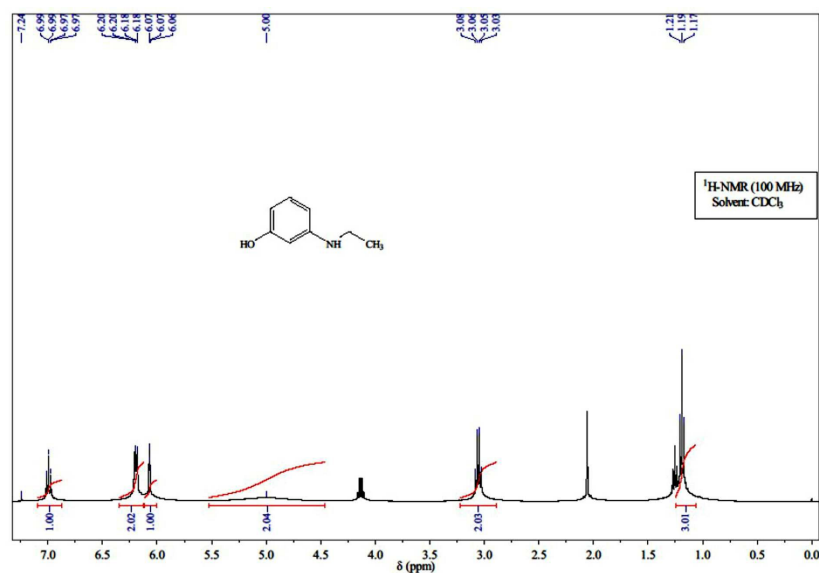
[0222] 종양을 냉동한 부분의 PCNA 면역조직화학에 대하여, 스냅 냉동 종양 절편은 PBS로 세척하고, PBS에서 10% 염소 또는 당나귀 혈청을 차단한다. 다음으로 조직 절편은 10% 염소 또는 당나귀 혈청이 함유된 PBS로 희석된 항-PCNA 항체(Abcam, Cambridge, MA, USA)와 함께 4 °C에서 밤새 배양하였다. 다음날, 조직 절편은 PBS로 세척하고 해당 2차 항체(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 1시간 동안 상온에서 배양된다.

[0223] 세포핵은 5분 동안 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 표지된다. 5분

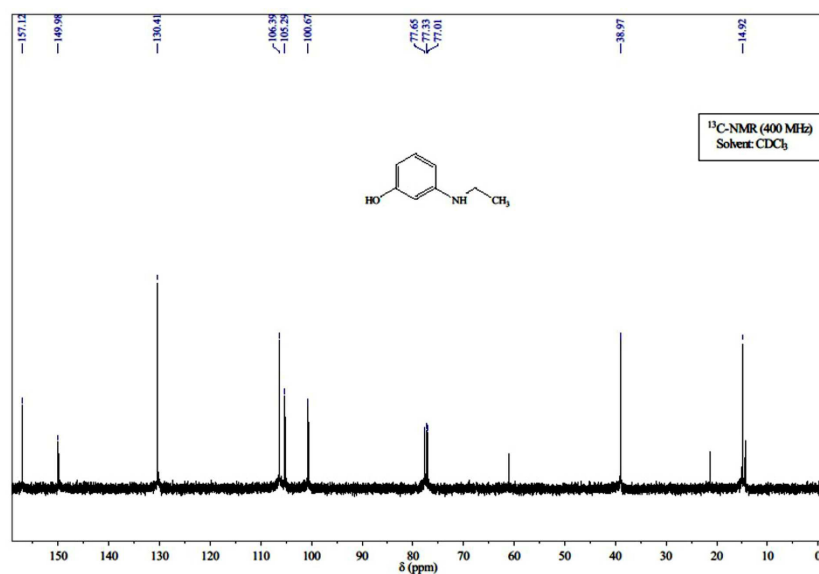
동안 70% 에탄올로 세척 후, 조직 절편은 부정확한 양성 신호를 방지하기 위해 5분 동안 자가형광 제거기 시약 (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 처리하였다. 마지막으로, 조직 절편은 세척되고 글로불린 마운트 (Thermo, Waltham, MA, USA)에 장착하며, Axiovert 200M 형광 현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 측정된다.

도면

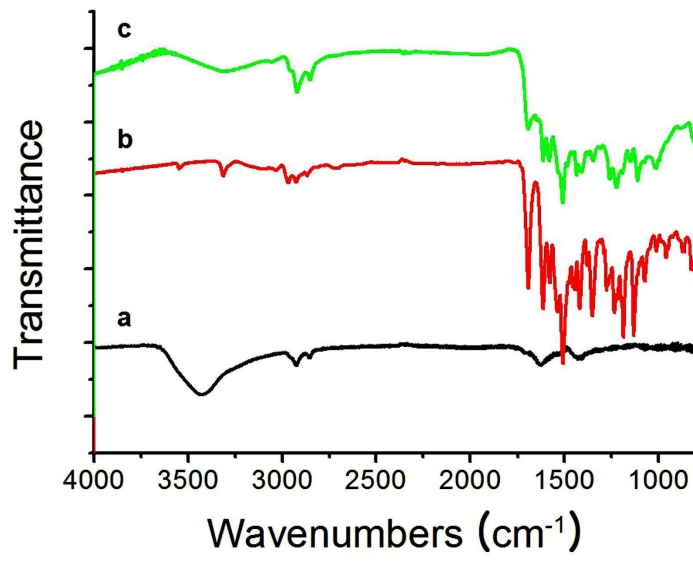
도면1a



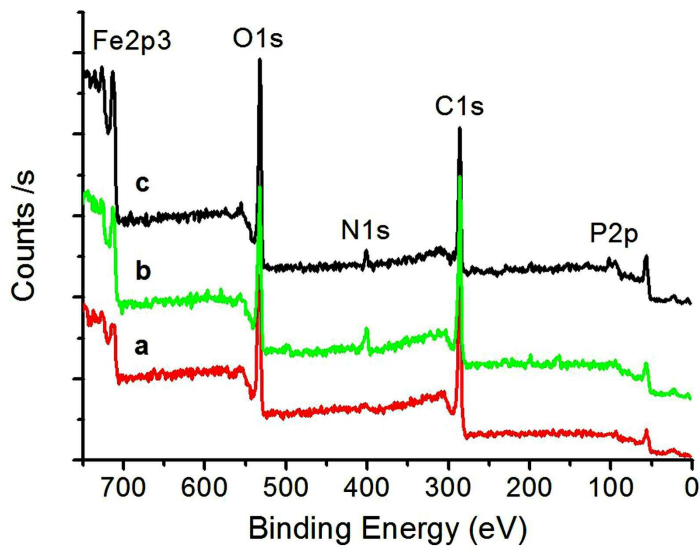
도면1b



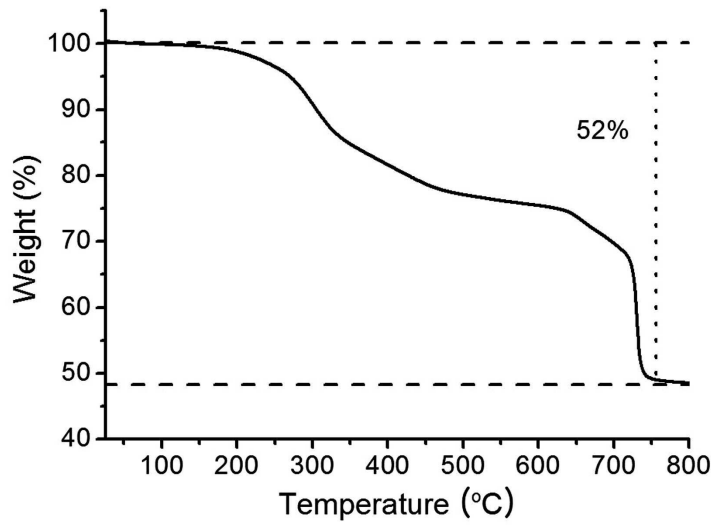
도면2



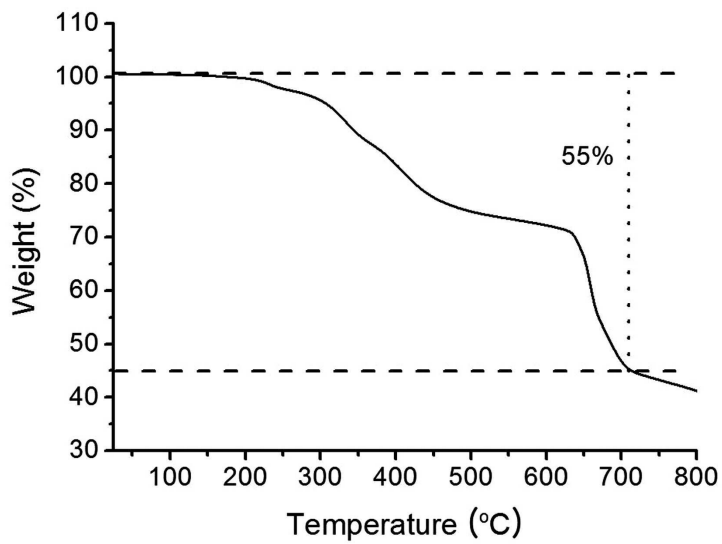
도면3



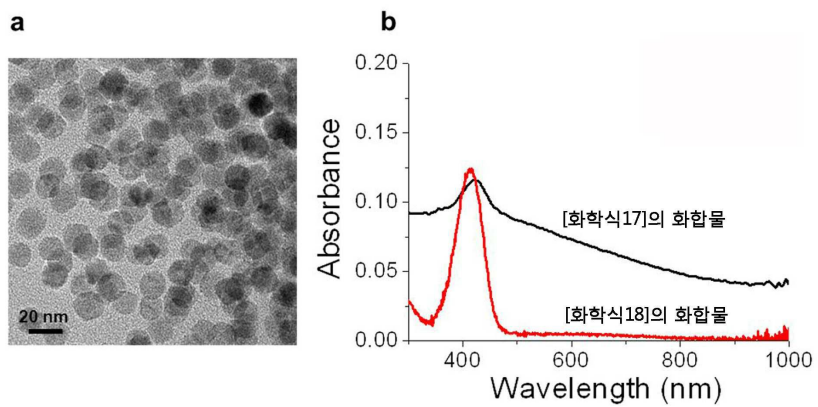
도면4a



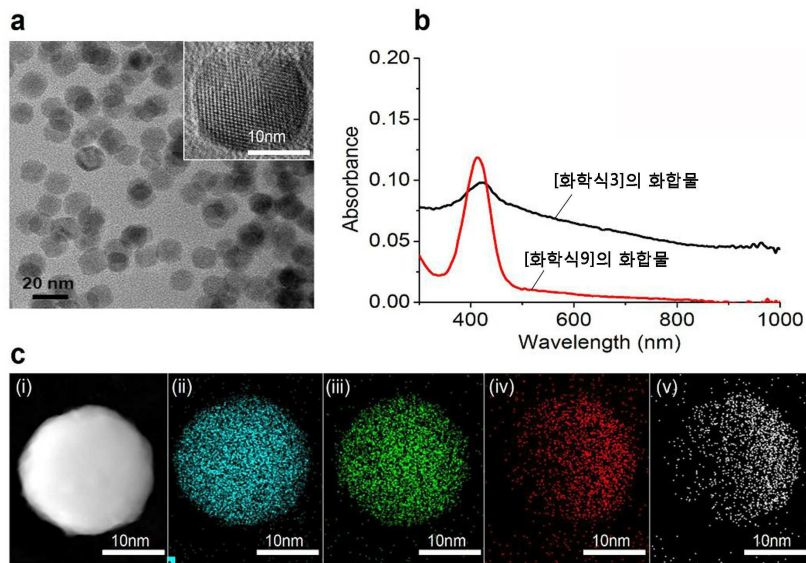
도면4b



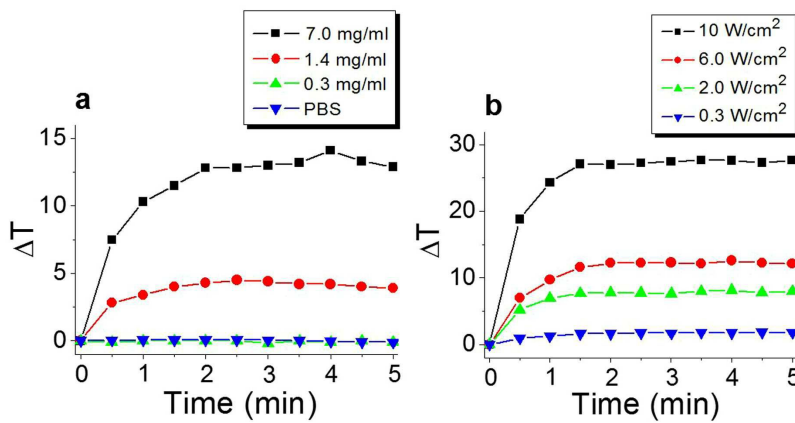
도면5



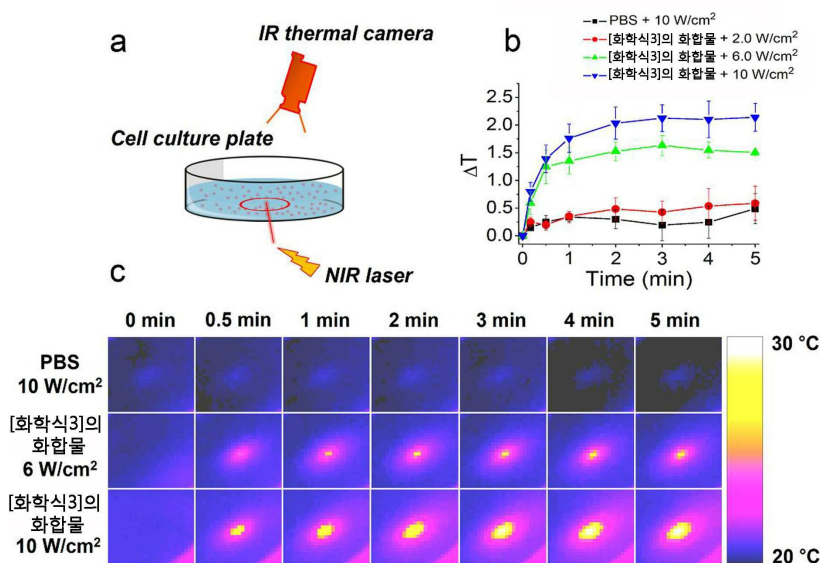
도면6



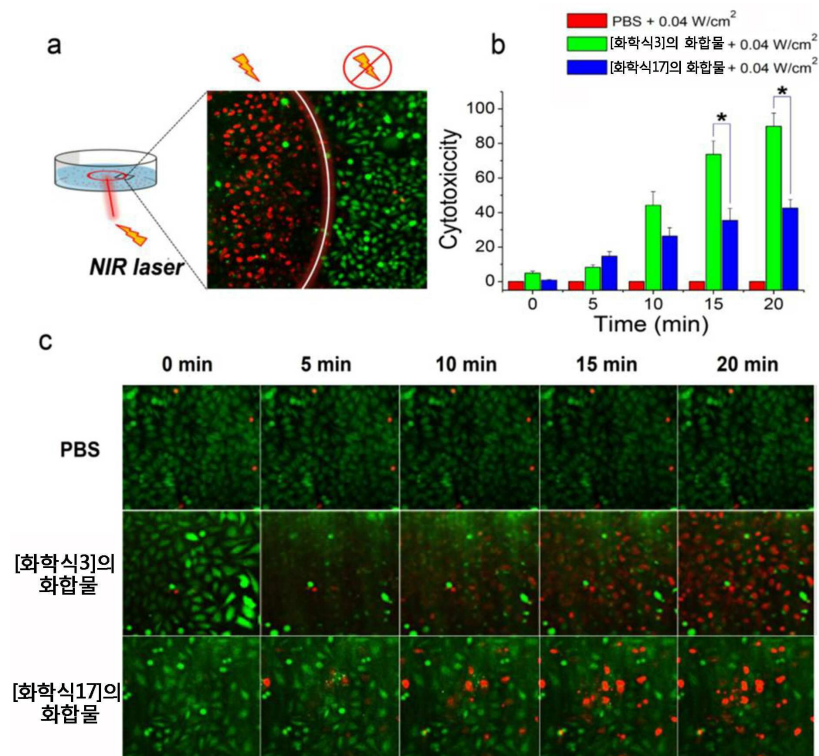
도면7



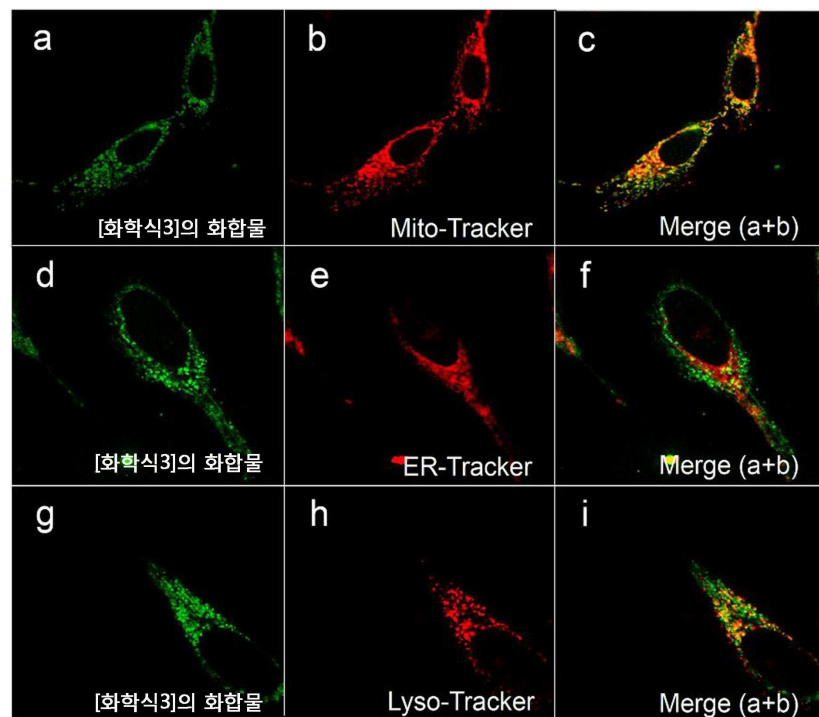
도면8



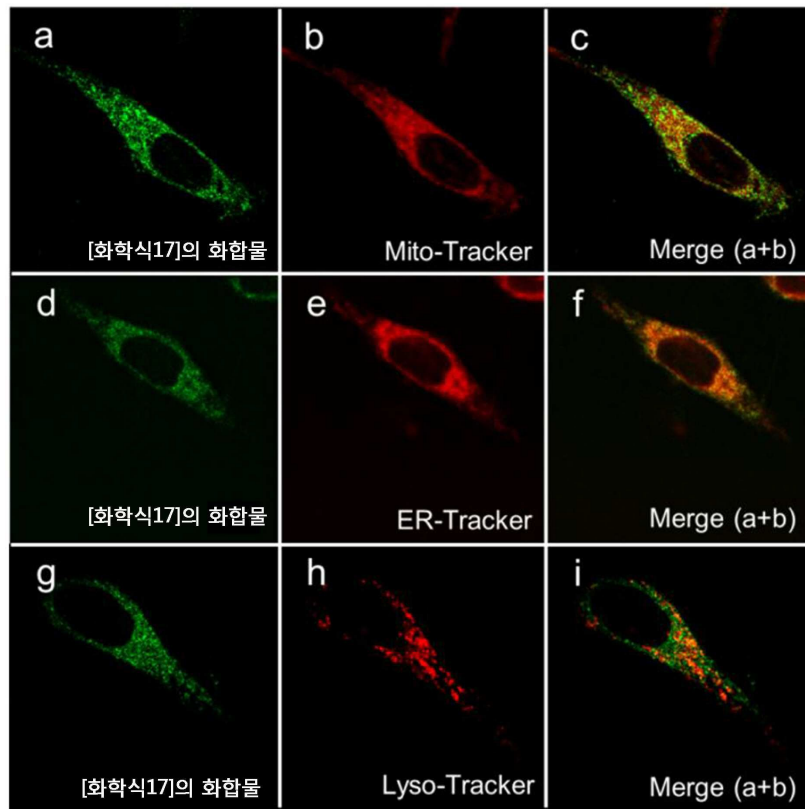
도면9



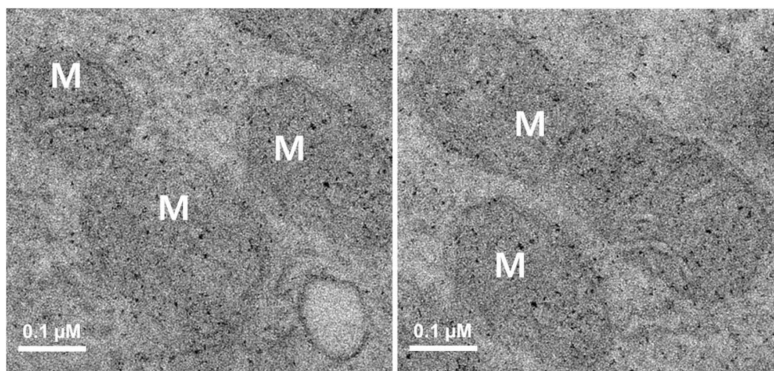
도면10



도면11



도면12



도면13

