



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0042960
(43) 공개일자 2019년04월25일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/14 (2006.01) A61K 41/00 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07D 401/14 (2013.01)
A61K 41/0057 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0134662</p> <p>(22) 출원일자 2017년10월17일
심사청구일자 2017년10월17일</p> | <p>(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(72) 발명자
유자형
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
아제시 피. 토마스
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김기범
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(74) 대리인
특허법인이룸리온</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 13 항

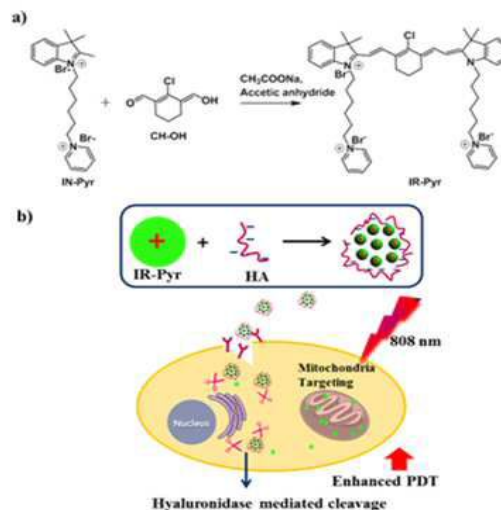
(54) 발명의 명칭 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명의 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 이의 제조방법은 수용성으로 인해 수성 매질에서의 분산이 용이하도록 하여 응집으로 인한 다양한 변형을 방지함과 동시에 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 향상시킬 수 있다.

또한, 본 발명은 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물이 마이셀 구조를 이루고 있고, 이러한 마이셀을 포함하는 조성물 제공함으로써 다양한 세포 내 효소에 의한 분해를 방지할 수 있고, 세포 내 소기관 중 하나인 미토콘드리아를 효과적으로 표적할 수 있어 질병 치료 효과를 증진시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/1075 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711050025
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 세포 소기관 표적 자기조립을 통한 새로운 항암치료 연구
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345253971
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인지초연구지원
연구과제명 암조직 침투를 위한 핵산-미셀 자기조립의 상변화 연구
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

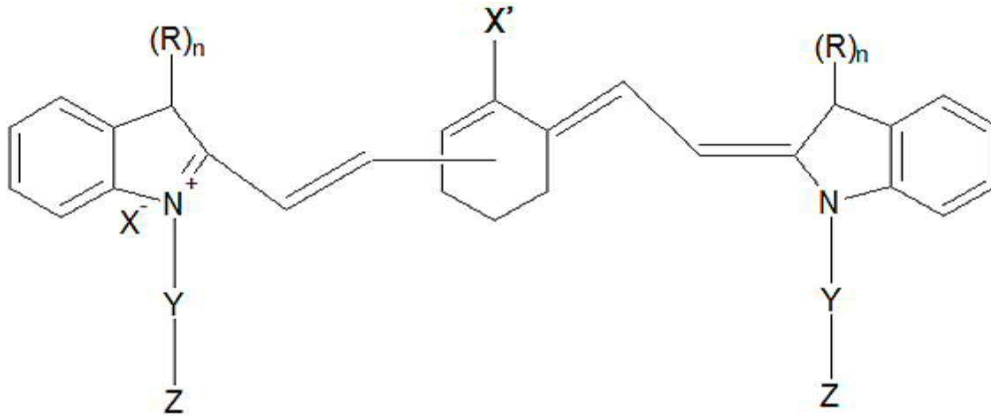
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

X 및 X'은 각각 독립적으로 할로젠 원자이고;

Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며;

Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물이고;

R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이며;

n은 0 내지 2의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 X 및 X'는 각각 독립적으로 Br 또는 Cl이며, 상기 Y는 각각 독립적으로 C₅₋₇의 알킬기인 것을 특징으로 하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Z는 각각 독립적으로 피리딘 및 이의 유도체들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이며, 상기 피리딘 및 이의 유도체들에 포함되는 헤테로 방향족 고리를 형성하는 질소가 상기 Y와 결합하는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물이 X'이 연결된 고리화합물의 이중결합을 포함하여 연속된 4개 이상의 p오비탈이 겹쳐있는 상태로 컨쥬게이션되어 있는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물.

청구항 5

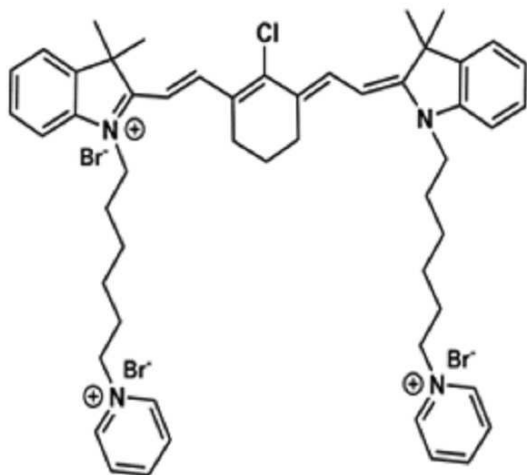
제4항에 있어서,

상기 컨쥬게이션은 올-트랜스(all-trans)형 구조로 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물.

청구항 6

하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물.

[화학식 2]



청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 수용성 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료를 위한 광역동 치료용(Photodynamic Therapy) 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 수용성 화합물을 포함하고,

상기 수용성 화합물이 코어를 형성하고, 상기 코어를 둘러싸도록 히알루론산이 쉘을 형성하여 마이셀(micelle) 구조를 이루며,

상기 마이셀이 암세포 내의 미토콘드리아를 표적하는 것을 특징으로 하는 광역동 치료용(Photodynamic Therapy) 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 마이셀은 암세포 내의 미토콘드리아 표면의 히알루론산 수용체에 결합하여 미토콘드리아를 표적하는 것을 특징으로 하는 광역동 치료용(Photodynamic Therapy) 조성물.

청구항 10

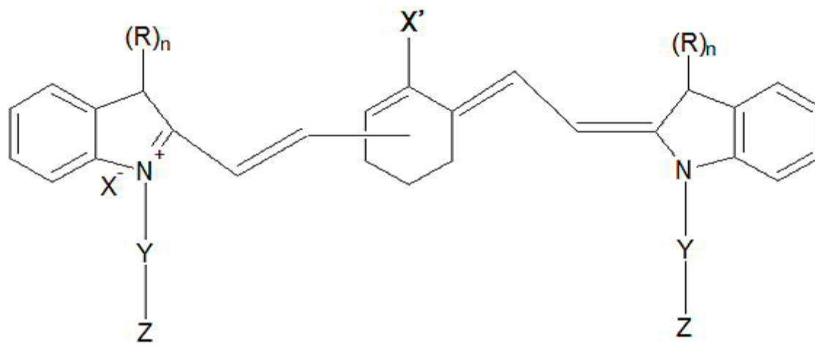
제9항에 있어서,

상기 히알루론산 수용체는 CD44인 것을 특징으로 하는 광역동 치료용(Photodynamic Therapy) 조성물.

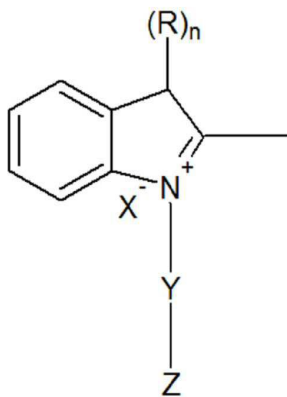
청구항 11

하기 화학식 3으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 4로 표시되는 화합물이 반응하여 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물의 제조방법.

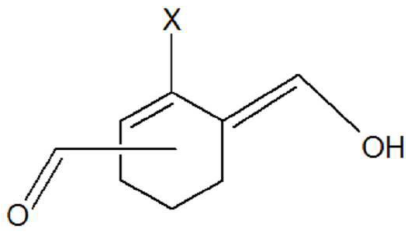
[화학식 1]



[화학식 3]



[화학식 4]



상기 화학식 1, 3 및 4에서,

X는 각각 독립적으로 할로겐 원자이고;

Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며;

Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물이고;

R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이며;

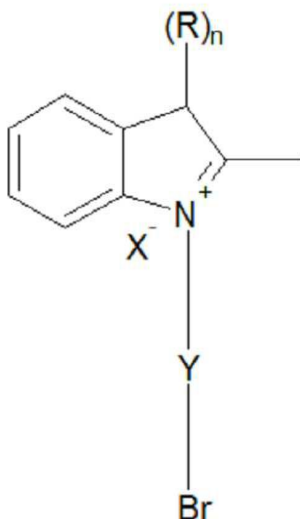
n은 0 내지 2의 정수이다.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 하기 화학식 7로 표시되는 화합물 및 Z와의 반응을 통해 제조되며, 상기 Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물인 것을 특징으로 하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물의 제조방법.

[화학식 7]



상기 화학식 7에서,

X는 할로겐 원자이고;

Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며;

R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이고;

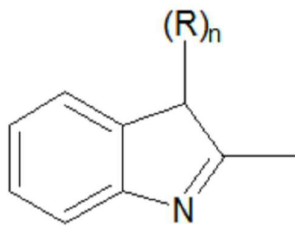
n은 0 내지 2의 정수이다.

청구항 13

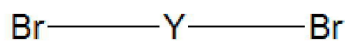
제12항에 있어서,

상기 화학식 7로 표시되는 화합물은 하기 화학식 8로 표시되는 화합물 및 하기 화학식 9로 표시되는 화합물의 반응을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물의 제조방법.

[화학식 8]



[화학식 9]



상기 화학식 8 및 9에서,

Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며;

R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이고;

n은 0 내지 2의 정수이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수용성으로 인해 수성 매질에서의 분산이 용이하며, 우수한 미토콘드리아 표적화 능력 및 광안정성을 가지는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생광물화(Biomineralization)는 하나의 중요한 생리학적 반응으로서, 유기체인 세포 내에서 무기체를 이용하는 반응으로 알려져 있다. 생광물화는 뼈 및 관절 조직이 적절한 기계적 기능을 가지도록 하는 항상성; 및 세포에 의한 무기물질의 퇴적 및 재흡수를 통한 내부적인 물질 지원;과 관련된다. 세포 내부에서의 생광물화는 근골격 조직의 항상성을 유지하기 위해 최종적으로 분화된 연골세포가 프로그래밍된 세포 사멸을 할 수 있도록 하는데 관여할 수 있다. 또한, 비정질의 인산 칼슘(amorphous calcium phosphate) 등을 이용하여 세포 내 미네랄의 침전물의 격리 및 분리는 세포 내 이온 항상성, 분해 과정(fate) 및 신호 전달을 조절할 수 있도록 한다. 이러한 생광물화 과정은 유전적 조절 경로를 통해 바람직하게 조절될 수 있으며, 무기 물질 및 세포 내외 유기물질 간의 생리학적 반응을 통해서도 조절될 수 있다. 따라서, 생리학적인 물질을 첨가하여 생광물화를 조절하는 것은 세포 기능을 조절하고 추가적인 치료방법으로의 적용을 위한 새로운 방법을 제공할 수 있다는 점에서 주목된다.

- [0003] 최근, 생체 내 및 시험관 내에서 칼슘화 및 규화와 같은 세포 외 생광물화를 사용하는 방법과 관련하여 연구들이 보고되었으며, 이를 통해 세포 내에서 이러한 생광물화를 사용하여 암 치료에 적용할 수 있을 것으로 제시하는 연구들이 보고된 바 있다. 그러나, 세포 밖에서 비정상적으로 미네랄이 축적되는 것은 미네랄 행형성의 위치 근처의 세포 손상을 야기할 수 있어, 생체 분자의 확산에 장벽을 만들고, 세포가 환경적인 변화에 대한 민감성을 잃을 수 있다. 이 때문에, 생광물화를 세포 내에서 적절한 위치에 유도하는 전략이 필요하며, 이는 원하는 치료를 위해 표적 전달능을 향상시키고 부작용을 감소시킬 수 있다는 점에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상되고 있다. 이러한 기대로 인해 엔도솜, 소포체, 골지체, 미토콘드리아 및 핵과 같이 막으로 구분된, 많은 세포 내 소기관에서 생광물화를 유도하고자 하는 목적으로 하는 연구가 보고된 바 있으나, 암세포 내 소기관을 특이적으로 표적화하여 유의적인 수준의 암세포 사멸 효과를 나타내는 물질에 대하여는 아직까지 연구가 계속되고 있다.
- [0004] 대표적인 세포 내 소기관 중 하나인 미토콘드리아는 세포 내 에너지를 생성하는 역할을 한다. 미토콘드리아는 약물에 대한 내성을 극복하고 독성 반응의 부작용을 감소시켜 항암제를 이용한 암 치료의 효과를 개선할 수 있는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 암세포의 미토콘드리아 막 전위는 ~ -220 mV 수준으로, ~ -160 mV 수준인 정상 세포의 미토콘드리아 막 전위에 비해 음 전하를 나타낸다.
- [0005] 이에 따라, 친유성의 양이온을 띄는 화합물은 암세포의 미토콘드리아를 특이적으로 표적화할 것으로 예상할 수 있다. 친유성 양이온을 띄는 화합물 중 하나로서, 트리페닐인산(triphenylphosphonium, TPP)이 사용될 수 있음에 관하여 보고된 바 있다. 이와 관련하여, 한국공개특허 10-2015-0109540에서도, TPP가 접합된 화합물을 포함하는 미토콘드리아 표적화된 항-종양 조성물을 개시하고 있다. 이러한 TPP가 접합된 화합물은 정상 세포의 미토콘드리아에 비해 암세포 미토콘드리아의 축적 효율이 10 배 이상 높은 수준으로 나타나므로, 이러한 화합물에 소분자 및 펩티드와 같은 생물활성 분자를 접합시키면, 미토콘드리아 표적의 암세포 사멸 효과가 증진될 수 있다.
- [0006] 그러나, TPP에 접합된 생물활성분자들은 1) 다양한 세포 내 효소에 의해 분해될 수 있고, 2) 소수성으로 인해 수성 매질에서 응집되어 예상치 못한 광물리적, 화학적, 생물학적 변형을 초래하며, 3) 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성이 낮아 질병 치료 효과가 저하되는 한계점이 있었다.

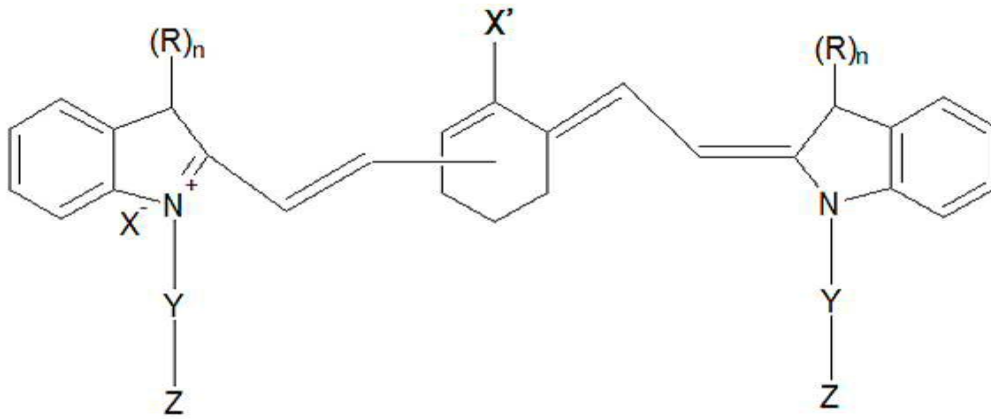
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 수용성으로 인해 수성 매질에서의 분산이 용이하도록 하여 예상치 못한 광물리적, 화학적, 생물학적 변형을 방지하여 우수한 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 가지는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 다양한 세포 내 효소에 의한 분해를 방지할 수 있고, 세포 내 소기관 중 하나인 미토콘드리아를 효과적으로 표적할 수 있어 질병 치료 효과를 증진시킬 수 있는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물이 마이셀 구조를 이루고 있고, 이러한 마이셀을 포함하는 조성물 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 상술한 과제를 해결하기 위하여, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물을 제공한다.
- [0010] [화학식 1]



상기 화학식 1에

서, X 및 X'은 각각 독립적으로 할로젠 원자이고, Y는 각각

독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며, Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물이고, R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이며, n은 0 내지 2의 정수이다.

본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 X 및 X'는 각각 독립적으로 Br 또는 Cl이며, 상기 Y는 각각 독립적으로 C₅₋₇의 알킬기일 수 있다.

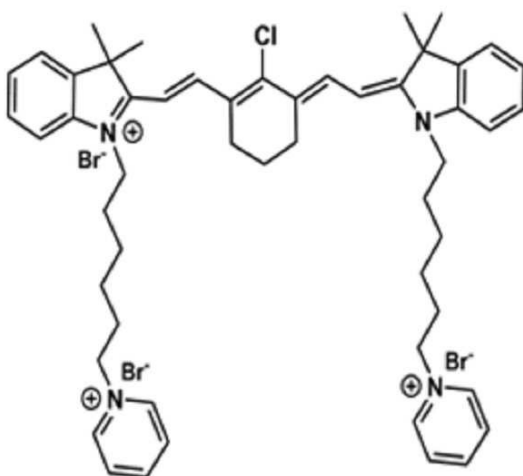
본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 Z는 각각 독립적으로 피리딘 및 이의 유도체들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이며, 상기 피리딘 및 이의 유도체들에 포함되는 헤테로 방향족 고리를 형성하는 질소가 상기 Y와 결합할 수 있다.

본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물이 X'이 연결된 고리화합물의 이중결합을 포함하여 연속된 4개 이상의 p오비탈이 겹쳐있는 상태로 컨쥬게이션되어 있을 수 있다.

본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 컨쥬게이션은 올-트랜스(all-trans)형 구조로 형성되어 있을 수 있다.

또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물을 제공한다.

[화학식 2]



또한, 본 발명은 상기 어느 하나의 수용성 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료를 위한 광역동 치료용 (Photodynamic Therapy) 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 어느 하나의 수용성 화합물을 포함하고, 상기 수용성 화합물이 코어를 형성하고, 상기 코어를 둘러싸도록 히알루론산이 쉘을 형성하여 마이셀(micelle) 구조를 이루며, 상기 마이셀이 암세포 내의 미

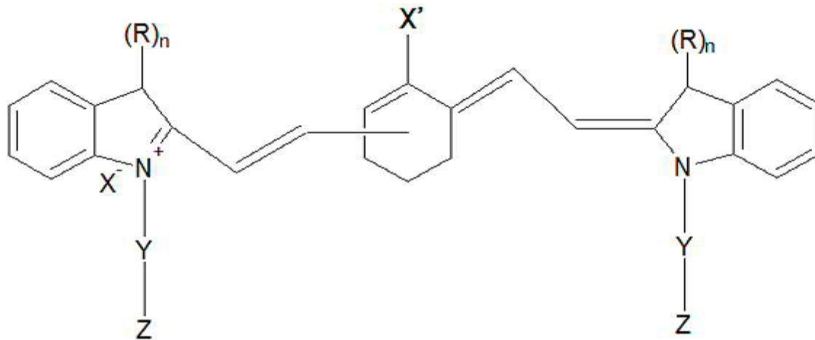
토콘드리아를 표적하는 것을 특징으로 하는 광역동 치료용(Photodynamic Therapy) 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 마이셀은 암세포 내의 미토콘드리아 표면의 히알루론산 수용체에 결합하여 미토콘드리아를 표적할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 히알루론산 수용체는 CD44일 수 있다.

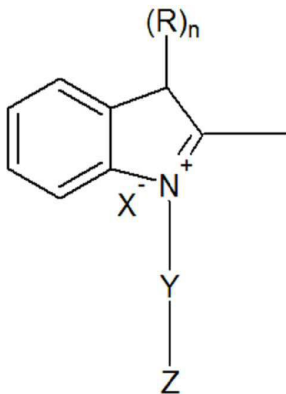
[0024] 나아가 본 발명은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 4로 표시되는 화합물이 반응하여 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0025] [화학식 1]



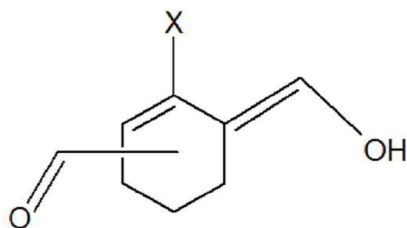
[0026]

[0027] [화학식 3]



[0028]

[0029] [화학식 4]

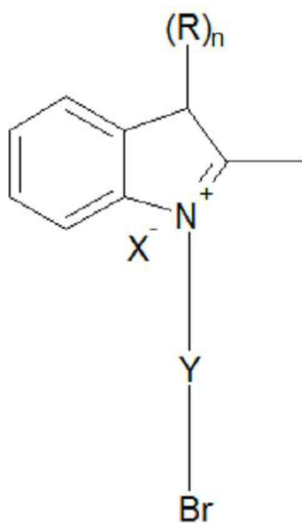


[0030]

[0031] 상기 화학식 1, 3 및 4에서, X는 각각 독립적으로 할로젠 원자이고, Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며, Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물이고, R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이며, n은 0 내지 2의 정수이다.

[0032] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 하기 화학식 7로 표시되는 화합물 및 Z와의 반응을 통해 제조되며, 상기 Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물일 수 있다.

[0033] [화학식 7]

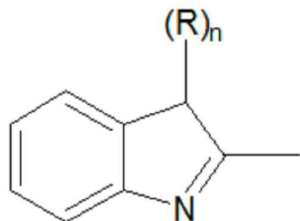


[0034]

[0035] 상기 화학식 7에서, X는 할로젠 원자이고, Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며, R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이고, n은 0 내지 2의 정수이다.

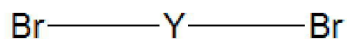
[0036] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 화학식 7로 표시되는 화합물은 하기 화학식 8로 표시되는 화합물 및 하기 화학식 9로 표시되는 화합물의 반응을 통해 제조될 수 있다.

[0037] [화학식 8]



[0038]

[0039] [화학식 9]



[0040]

[0041] 상기 화학식 8 및 9에서, Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며, R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이고, n은 0 내지 2의 정수이다.

[0042] 이하, 본 명세서에서 사용된 용어에 대해 간략히 설명한다.

[0043] 용어 "알킬"은 지방족 탄화수소 그룹을 의미한다. 알킬 부위는 어떠한 알켄이나 알킨 부위를 포함하고 있지 않음을 의미하는 "포화 알킬(saturated alkyl)" 그룹일 수 있다. 알킬 부위는 적어도 하나의 알켄 또는 알킨 부위를 포함하고 있음을 의미하는 "불포화 알킬(unsaturated alkyl)" 부위일 수도 있다. "알켄(alkene)" 부위는 적어도 두 개의 탄소원자가 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합으로 이루어진 그룹을 의미하며, "알킨(alkyne)" 부위는 적어도 두 개의 탄소원자가 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합으로 이루어진 그룹을 의미한다. 포화이든 불포화이든 간에 알킬 부위는 분지형, 직쇄형 또는 환형일 수 있다. 또한, 알킬은 "치환 또는 비치환 알킬

” 을 모두 포함한다.

[0044] 용어 "헤테로알킬"은 알킬그룹의 탄소원자 중 하나 이상이 다른 헤테로 원자로 치환된 형태를 의미한다.

[0045] 용어 "미토콘드리아에 표적화되는"은 본 발명에 의해 제공되는 화합물의 일부 작용기 또는 원자가 세포 내의 미토콘드리아 표면 또는 내부에 화학적 또는 물리적으로 결합하여 미토콘드리아를 표지할 수 있음을 의미한다.

[0046] 용어 "탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물"은 탄소수가 4~5개이고, 상기 탄소 원자 외에 다른 헤테로 원자를 더 포함하는 방향족 화합물로, 수용성의 성질을 가지는 화합물을 의미한다. 이 때 탄소수 4~5란 방향족 화합물의 모체 고리를 구성하는 탄소의 수를 의미한다.

[0047] 용어 "수용성"이란 물과의 혼합이 용이하거나, 물에 용해되는 성질을 의미한다.

[0048] 용어 "피리딘의 유도체"는 피리딘을 구성하는 탄소 및 질소에 수소 외에 다른 헤테로 원자 또는 작용기가 결합되어 있는 화합물을 의미한다.

발명의 효과

[0049] 본 발명의 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 이의 제조방법은 수용성으로 인해 수성 매질에서의 분산이 용이하도록 하여 응집으로 인한 다양한 변형을 방지함과 동시에 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물이 마이셀 구조를 이루고 있고, 이러한 마이셀을 포함하는 조성물 제공함으로써 다양한 세포 내 효소에 의한 분해를 방지할 수 있고, 세포 내 소기관 중 하나인 미토콘드리아를 효과적으로 표적할 수 있어 질병 치료 효과를 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 a) 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물의 합성과정 및 b) 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물의 미토콘드리아에 대한 표적화를 메커니즘을 나타낸 개략도이다.

도 2는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물 및 IR-780 염료 조성물의 (a) 광 안정성 그래프 (b) 다크안정성(dark stability) 그래프 (c) TEM 이미지 (d) DLS 그래프이다.

도 3은 IR 780 염료 화합물의 (a) 암세포 (c) 정상세포 내에서의 미토콘드리아 표적에 대한 공초점 이미지(confocal image) 및 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물의 (b) 암세포 (d) 정상세포 내에서의 미토콘드리아 표적에 대한 공초점 이미지(confocal image)이다.

도 4는 본 발명의 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조과정을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물의 a) 암세포 및 b) 정상세포 내에서의 미토콘드리아 표적에 대한 공초점 이미지(confocal image)이다.

도 6은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물을 이용한 a) TMRM을 이용한 미토콘드리아 막의 탈분극 분석 b) 광 세포 독성 관측 c) 광역동 치료(Photodynamic Therapy) 후 암세포 생존력 분석 그래프 e) 유동 세포 계측 분석 그래프이고, d) IR-780 염료 조성물의 광역동 치료(Photodynamic Therapy) 후 정상세포 생존력 분석 그래프이다.

도 7은 SCC7 종양이 이종 이식된 마우스에 대한 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물 (1), 이를 포함하는 조성물 (2), IR-780 염료 (3) 및 식염수 (4)를 정맥 주사한 후의 광학 이미지이다.

도 8a는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물의 광역동 치료(Photodynamic Therapy) 효과를 나타낸 사진이고, 도 8b는 광역동 치료(Photodynamic Therapy)에 의한 종양 크기 변화를 나타낸 사진이며, 도 8c는 광역동 치료(Photodynamic Therapy) 수행 중의 몸무게 변화 및 종양 부피 그래프이다.

도 9는 (a) 레이저 부재 하 (b) 레이저 존재 하의 식염수, (c) 레이저 부재 하 (d) 레이저 존재 하의 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물로 처리한 후의 종양의 H 및 E의 염색 부분 이미지이다.

도 10a는 본 발명에 따른 화학식 7로 표시되는 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼이며, 도 10b는 ^{13}C NMR 스펙트럼이고,

도 10c는 분자량을 확인하기 위한 ESI-MS 결과이다.

도 11a는 본 발명에 따른 화학식 2로 표시되는 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼이며, 도 11b는 ^{13}C NMR 스펙트럼이고, 도 11c는 분자량을 확인하기 위한 ESI-MS 결과이다.

도 12a는 본 발명에 따른 화학식 5로 표시되는 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼이며, 도 12b는 ^{13}C NMR 스펙트럼이고, 도 12c는 분자량을 확인하기 위한 ESI-MS 결과이다.

도 13a는 본 발명에 따른 화학식 6으로 표시되는 화합물의 ^1H NMR 스펙트럼이며, 도 13b는 ^{13}C NMR 스펙트럼이고, 도 13c는 분자량을 확인하기 위한 ESI-MS 결과이다.

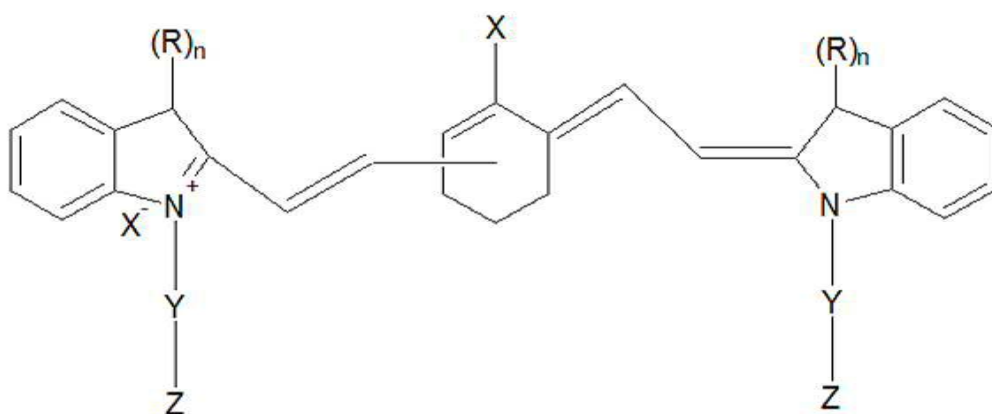
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세하게 설명한다. 다만, 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0053] 상술한 바와 같이, 기존의 소수성 화합물 또는 TPP가 접합된 화합물은 정상 세포의 미토콘드리아에 비해 암세포의 미토콘드리아에 대한 축적 효율이 현저히 높고, 생물활성 분자의 접합을 통해 암세포 사멸 효과를 증진시켜 질병 치료 효과가 있으나, 여전히 다양한 세포 내 효소에 의해 분해될 수 있고, 소수성으로 인해 수성 매질에서 응집되어 예상치 못한 광물리적, 화학적, 생물학적 변형을 초래하며, 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성이 낮아 질병 치료 효과의 효과가 저하되는 한계점이 있었다.

[0054] 이에 본 발명의 발명자는 암세포 내의 미토콘드리아를 효과적으로 표적화할 수 있으면서도, 이와 동시에 수용성을 가져 수성 매질에서의 응집을 방지하여 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 향상시킬 수 있는 방안을 모색하였고, 그 결과 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물을 제공하여 상술한 한계점의 극복방안을 제공할 수 있게 되었다.

[0055] [화학식 1]



[0056]

[0057] 상기 화학식 1에서, X는 각각 독립적으로 할로젠 원자이고, Y는 각각 독립적으로 C_{4-8} 의 알킬기이며, Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물이고, R은 각각 독립적으로 C_{1-3} 의 알킬기이며, n은 0 내지 2의 정수이다. 이 때, 상기 n이 0인 경우는 탄소에 R기가 결합하지 않고 수소가 결합함을 의미한다.

[0058] 상기 화합물은 암세포 내 소기관 중 세포 사멸의 중요한 조절 인자인 미토콘드리아를 효과적으로 표적화할 수 있어 질병 치료 효과를 증진시킬 수 있는 장점이 있다. 또한, 미토콘드리아는 하이폭시아(hypoxia)를 극복할 수 있어 미토콘드리아를 표적하는 경우 질병 치료의 효능을 보다 향상시킬 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 화합물은 양 말단에 Z를 포함하고 있고, 상기 Z는 각각 독립적으로 수용성 화합물로 존재할 수 있어 상기 화합물은 수용성의 성질을 가진다. 이러한 수용성으로 인해 수성 매질에서의 분산이 용이하도록 하여 응집으로 인한 다양한 변형을 방지함과 동시에 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 향상시킬 수 있는 것이다.

[0059] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 본 발명의 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있

으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가 염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, ?-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

- [0060] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 본 발명의 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동량의 미토콘드리아 표적화된 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0061] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0062] 또한, 본 발명의 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.
- [0063] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 X는 각각 독립적으로 Br 또는 Cl이며, 상기 Y는 각각 독립적으로 C₅₋₇의 알킬기일 수 있다.
- [0065] 상기 Y를 적절한 탄소수를 가지는 알킬기로 선택함으로써 수용성 화합물인 Z를 상기 화합물의 양 말단에 효과적으로 연결할 수 있다. 상기 알킬기의 탄소수가 지나치게 많은 경우에는 소수성이 증가되어 수용성이 저하되어 수성 매질 내에서의 효과적인 분산이 어려운 문제점이 발생할 수 있다. 또한, 상기 알킬기의 탄소수가 지나치게 적은 경우에는 너무 낮은 소수성에 의해 마이셀을 형성 하지 않는 현상이 발생하는 문제점이 발생할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 Z는 각각 독립적으로 피리딘 및 이의 유도체들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이며, 상기 피리딘 및 이의 유도체들에 포함되는 헤테로 방향족 고리를 형성하는 질소가 상기 Y와 결합할 수 있다.
- [0067] 이를 통해 상기 화합물의 양 말단에 수용성의 피리딘 또는 피리딘 유도체를 포함하게 되어, 상기 화합물이 수용성을 가지게 된다. 즉, 피리딘의 경우 물과 혼합이 용이하고 수용성이므로, 상기 화합물의 양 말단에 연결되어 상기 화합물이 수용성의 성질을 가지도록 하여, 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 화합물이 수성 매질에서 용이하게 분산되어 응집되는 것을 방지할 수 있다. 이에 따라 응집에 의한 예기치 못한 물리적, 화학적, 생물학적 변형 등을 방지할 수 있어 미토콘드리아에 대한 표적화 능력 및 광 안정성이 향상될 수 있는 것이다.
- [0068] 구체적으로, 공지된 미토콘드리아를 표적하는 TPP 등 소수성의 화합물이 결합된 화합물들은 생체 내 투여 시에 혈액 순환 등에 의해 미토콘드리아를 표적하기도 전에 응집이 발생하여 표적화 능력 및 광 안정성이 저하되는

문제가 있었다. 그러나, 본 발명의 상기 화합물은 피리딘 또는 이의 유도체를 포함함으로써, 물에 대한 용해도가 현저히 향상되어 수성 매질에서의 용해가 잘 일어나고, 그에 따라 생체 내 투여 시 혈액 순환에 의한 응집이 발생하지 않아 상술한 문제를 극복할 수 있는 장점이 있다.

[0069] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물이 X'이 연결된 고리화합물의 이중결합을 포함하여 연속된 4개 이상의 p오비탈이 겹쳐있는 상태로 컨쥬게이션 되어 있을 수 있다.

[0070] 이를 통해 컨쥬게이션으로 안정화된 화합물을 얻을 수 있어, 생체 내에서 미토콘드리아를 표적화하기 전까지 안정하게 존재할 수 있으며, 이에 따라 향상된 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 가질 수 있다.

[0071] 구체적으로 상기 연속된 4개 이상의 p오비탈이 겹쳐있는 상태로 컨쥬게이션 되어 있다는 것은 탄소사슬에 이중결합이 단일결합과 교대로 4개 이상 포함될 수 있음을 의미하며, 예를 들어 이중결합-단일결합-이중결합-단일결합-이중결합-단일결합-이중결합-..의 순서로 이중결합이 4개 이상 포함될 수 있음을 의미한다.

[0072] 바람직하게는 상기 컨쥬게이션은 X'이 연결된 사이클로헥센에 포함되어 있는 이중결합을 포함하여 형성될 수 있으며, 이를 통해 화학식 1의 좌측에 표시되어 있는 벤젠고리와 함께 공명구조를 이룰 수 있어 보다 안정한 화합물을 얻을 수 있는 장점이 있다.

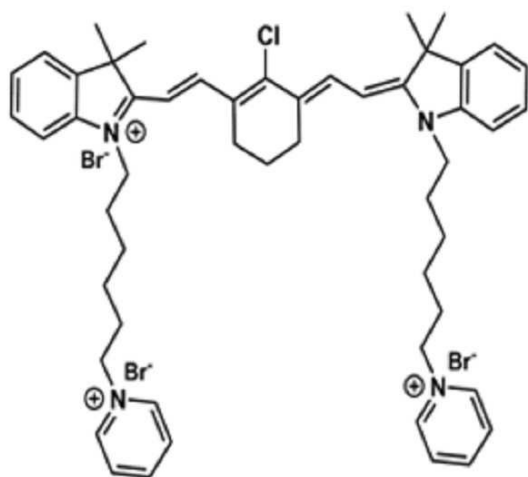
[0073] 또한, 바람직하게는 상기 화학식 1에서의 컨쥬게이션은 올-트랜스(all-trans)형 구조로 형성되어 있을 수 있다. 이는 탄소사슬에 이중결합이 단일결합과 교대로 4개 이상 포함되며, 모두 트랜스 형으로 화합물의 구조가 결정되는 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 화학식 1에서 X'이 연결된 고리화합물인 사이클로헥센의 이중결합을 포함하여 컨쥬게이션이 형성되고, 상기 사이클로헥센에 연결된 탄소사슬(화학식 1에 표시된 고리형 화합물은 제외)에 포함되는 이중결합들이 모두 트랜스 형으로 형성되는 것을 의미한다.

[0074] 이를 통해 보다 안정한 화합물을 얻을 수 있고, 본 발명에 따른 수용성 화합물이 생체 내에서 미토콘드리아를 표적화하기 전까지 안정하게 존재할 수 있으며, 이에 따라 향상된 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 가질 수 있다.

[0075] 한편, 본 발명의 미토콘드리아 표적화된 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0076] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물을 제공한다.

[0077] [화학식 2]



[0078]

[0079] 이를 통해, 암세포 내부에 존재하는 미토콘드리아를 효과적으로 표적할 수 있음과 동시에 생체 내부에서 용이하게 분산될 수 있는 수용성 화합물을 제공할 수 있다.

[0080] 구체적으로 상기 화학식 2를 살펴보면, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 인도시아닌 염료 유도체에 알킬기가 치환된 피리딘기를 연결한 것임을 알 수 있는데, 상기 인도시아닌 염료 유도체는 미토콘드리아 표적화 능력이 우수한 감광제이다. 또한 수용성의 성질을 가지는 피리딘기 양 말단에 포함하고 있으므로, 상기 화합물은 수용

성의 성질을 가진다. 따라서, 본 발명을 통해 제공하는 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 인도시아닌 염료 유도체의 우수한 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 가짐과 동시에 피리딘기의 수용성에 의해 생체 내에서 응집되지 않고 용이하게 분산될 수 있는 효과를 가진다. 즉, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 미토콘드리아 표적을 통한 암 치료에 가장 적합하며, 현저히 향상된 치료 효능을 가진다.

[0081] 구체적으로, 도 1은 a) 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물의 합성과정 및 b) 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물의 미토콘드리아에 대한 표적화를 메커니즘을 나타낸 개략도이다. 상기 도면을 참조하면, 인도시아닌 염료 유도체의 우수한 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 가짐과 동시에 피리딘기의 수용성에 의해 생체 내에서 응집되지 않고 용이하게 분산될 수 있는 효과를 가지는 수용성 화합물(IR-Pyr)을 제조하였고, 이를 이용하면 미토콘드리아 표적 능력을 향상시켜 암 치료를 위한 광역동 치료에 적합함을 알 수 있다.

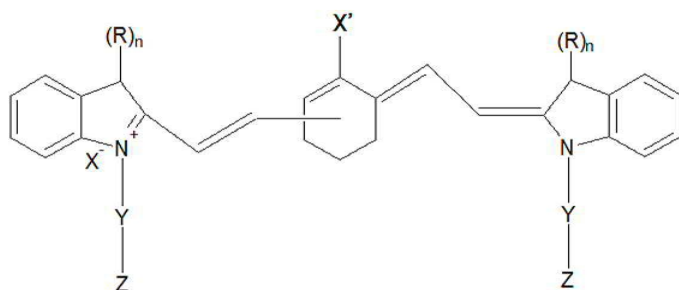
[0082] 또한, 도 2는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물 및 IR-780 염료 조성물의 a) 광안정성 그래프 b) 다크안정성(dark stability) 그래프 c) TEM 이미지 d) DLS 그래프이다. 상기 도면을 참조하면, 본 발명에 따른 수용성 화합물(IR-Pyr) 및 종래의 IR-780염료의 처리에 따른 결과를 확인할 수 있고, 구체적으로 a)를 참조하면, 본 발명에 따른 화합물의 광 안정성이 시간의 흐름에 따라 비교적 적게 감소하여 25 시간 이상의 시간이 흐른 후에도 40% 이상의 광 안정성을 가짐을 알 수 있다. 반면, IR-780 염료의 경우 광안정성이 시간의 흐름에 따라 급격히 감소하여 25시간 이상의 시간이 흐른 후에는 약 0%로 수렴하여 본 발명의 화합물의 광 안정성이 현저히 우수함을 알 수 있다. 또한, b)를 참조하면 본 발명에 따른 화합물은 다크 안정성이 현저히 적게 감소하는 반면, IR-780 염료의 경우에는 급격히 감소하여 50시간의 이상의 시간이 흐른 후에는 20% 이하의 현저히 감소된 값을 나타냄을 알 수 있다. 이를 통해 본 발명의 의 경우 현저히 우수한 다크 안정성을 가짐을 확인할 수 있다.

[0083] 또한, 도 3은 IR-780 염료 화합물의 (a) 암세포 (c) 정상세포 내에서의 미토콘드리아 표적에 대한 공초점 이미지(confocal image) 및 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물의 (b) 암세포 (d) 정상세포 내에서의 미토콘드리아 표적에 대한 공초점 이미지(confocal image)이다. 이를 통해 세포 내에서의 화합물의 축적 정도를 확인할 수 있는데, IR-780 염료 화합물에 비하여 본 발명에 따른 수용성 화합물이 보다 많이 축적될 수 있음을 알 수 있다.

[0084] 또한, 본 발명은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 4로 표시되는 화합물이 반응하여 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물의 제조방법을 제공한다.

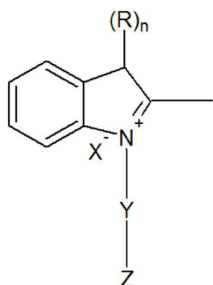
[0085] 이를 통해 암세포 내 소기관 중 세포 사멸의 중요한 조절 인자인 미토콘드리아를 효과적으로 표적할 수 있어 질병 치료 효과를 증진시킬 수 있는 장점이 있고, 수용성의 화합물을 제공할 수 있어 상기 화합물의 수용성으로 인해 수성 매질에서의 분산이 용이하도록 하여 응집으로 인한 다양한 변형을 방지함과 동시에 미토콘드리아 표적화 능력 및 광 안정성을 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

[0086] [화학식 1]



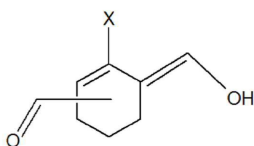
[0087]

[0088] [화학식 3]



[0089]

[0090] [화학식 4]



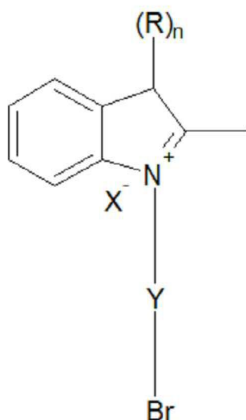
[0091]

[0092] 상기 화학식 1, 3 및 4에서, X는 각각 독립적으로 할로겐 원자이고, Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며, Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물이고, R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이며, n은 0 내지 2의 정수이다.

[0093] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물과 화학식 4로 표시되는 화합물의 반응은 50 ~ 90℃, 보다 바람직하게는 60 ~ 80℃ 온도 조건 하에서 0.5 ~ 2시간 동안의 가열 반응을 통해 수행될 수 있다. 또한, 상기 화학식 3 및 4로 표시되는 화합물의 함량비는 바람직하게는 1 : 1 ~ 1 : 3의 몰비일 수 있고, 보다 바람직하게는 1 : 1.5 ~ 1 : 2.5의 몰비일 수 있다.

[0094] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 하기 화학식 7로 표시되는 화합물 및 Z와의 반응을 통해 제조되며, 상기 Z는 각각 독립적으로 탄소수 4~5의 수용성 헤테로 방향족 화합물일 수 있다.

[0095] [화학식 7]



[0096]

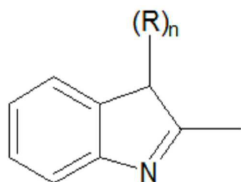
[0097] 상기 화학식 7에서, X는 할로겐 원자이고, Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며, R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이고, n은 0 내지 2의 정수이다.

[0098] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 반응은 상기 화학식 7로 표시되는 화합물을 과량의 Z 화합물에 투입하여 진행될 수 있으며, 바람직하게는 70 ~ 110℃, 보다 바람직하게는 80 ~ 100℃ 온도 조건 하에서 12 ~ 36시간 동안 가열하여 수행할 수 있다. 또한, 상기 화학식 7로 표시되

는 화합물과 Z 화합물의 반응 시의 함량비는 Z 화합물을 과량으로 사용하여 반응을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 1 : 5 ~ 20, 보다 바람직하게는 1 : 7.5 ~ 15의 질량비일 수 있다.

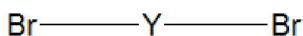
[0099] 한편, 상기 화학식 7로 표시되는 화합물은 상술한 화학식을 만족하는 화합물을 생성하기 위한 다양한 반응을 통해 제조될 수 있으나, 바람직하게는 하기 화학식 8로 표시되는 화합물 및 하기 화학식 9로 표시되는 화합물의 반응을 통해 제조될 수 있다.

[0100] [화학식 8]



[0101]

[0102] [화학식 9]



[0103]

[0104] 상기 화학식 8 및 9에서, Y는 각각 독립적으로 C₄₋₈의 알킬기이며, R은 각각 독립적으로 C₁₋₃의 알킬기이고, n은 0 내지 2의 정수이다.

[0105] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 화학식 8로 표시되는 화합물과 화학식 9로 표시되는 화합물의 반응은 90 ~ 130℃, 보다 바람직하게는 100 ~ 110℃ 온도 조건 하에서 1 ~ 3시간 동안의 가열 반응을 통해 수행될 수 있다. 또한, 상기 화학식 8로 표시되는 화합물과 화학식 9로 표시되는 화합물의 반응 시의 함량비는 화학식 9로 표시되는 화합물을 과량으로 사용하여 반응을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 1 : 3 ~ 7, 보다 바람직하게는 1 : 4 ~ 6의 몰비일 수 있다.

[0106] 한편, 상술한 반응 수행 시 사용할 수 있는 용매는 해당 기술분야에서 통상적으로 사용할 수 있는 것이면 제한이 없으나, 바람직하게는 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 또는 아세토니트릴 등을 사용할 수 있다.

[0107] 나아가, 본 발명은 상기의 수용성 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 치료를 위한 광역동 치료용(Photodynamic Therapy) 조성물을 제공한다.

[0108] 이를 통해 암세포의 미토콘드리아를 효과적으로 표적하여 암 치료 효능을 향상시킬 수 있다. 구체적으로 미토콘드리아는 세포의 생존을 위한 필수 세포 기관이면서 세포 사멸의 주요 소기관이므로, 암세포의 미토콘드리아를 표적하여 정상적인 미토콘드리아의 기능을 방해함으로써 효과적인 암 치료가 가능하도록 할 수 있다.

[0109] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 어느 하나의 수용성 화합물을 포함하고, 상기 수용성 화합물이 코어를 형성하고, 상기 코어를 둘러싸도록 히알루론산이 셸을 형성하여 마이셀(micelle) 구조를 이루며, 상기 마이셀이 암세포 내의 미토콘드리아를 표적할 수 있다.

[0110] 이를 통해 상기 수용성 화합물을 히알루론산으로 캡슐화하는 효과를 기대할 수 있으며, 표적화 대상인 미토콘드리아에 상기 수용성 화합물이 우수한 효율로 축적될 수 있는 장점이 있다. 즉, 상기 마이셀 구조를 형성하여 미토콘드리아를 표적함으로써 상기 화합물이 암세포 내의 미토콘드리아에 우선적으로 축적될 수 있는 것이다.

[0111] 또한, 상기 히알루론산이 코어를 둘러싸는 셸을 형성하는 경우, 암세포 내부에 발견되어 있는 히알루론산 수용체로 인해 우수한 미토콘드리아 표적화 능력을 가지며, 생체 적합성이 우수하여 암 치료에 효과적인 조성물을 제공할 수 있다.

[0112] 또한, 상기 마이셀은 바람직하게는 암세포 내의 미토콘드리아 표면의 히알루론산 수용체에 결합하여 미토콘드리아를 표적할 수 있다. 이를 통해 상기 수용성 화합물이 암세포 내부에 보다 다량으로 축적될 수 있다.

[0113] 상기 히알루론산 수용체는 암세포 내부의 미토콘드리아 표면에 존재하며 상기 수용성 화합물과 결합할 수 있는 것이면 제한이 없으며, 상기 결합은 물리적 또는 화학적 결합을 불문하고 미토콘드리아에 연결되어 미토콘드리아

아를 표적할 수 있는 것이면 제한이 없다.

- [0114] 상기 히알루론산 수용체는 바람직하게는 CD44일 수 있다. 상기 CD44는 암세포 내에서 과다하게 발현될 수 있으므로 암세포에 대한 선택적 약물 전달에 유용한 장점이 있다. 이에 따라 본 발명에 따른 히알루론산 셸이 포함된 마이셀과 미토콘드리아 표면에 존재하는 히알루론산 수용체 간의 결합이 높은 선택성으로 발생할 수 있어 표적화 능력이 향상될 수 있고, 그 결과 효과적인 암 치료가 가능하다.
- [0115] 한편, 상기 마이셀의 평균입경은 히알루론산 수용체와 결합하여 미토콘드리아를 효과적으로 표적할 수 있는 정도이면 제한이 없으나, 바람직하게는 10~80nm일 수 있고, 보다 바람직하게는 20~70nm일 수 있다. 만일 본 발명에 따른 마이셀의 평균입경이 상기 범위를 만족하지 못하는 경우에는 히알루론산 수용체와의 결합이 용이하지 못하여 효과적인 표적이 불가능한 문제점이 발생할 수 있다.
- [0116] 또한, 상기 마이셀 형성 시에 본 발명에 따른 수용성 화합물과 히알루론산의 함량비는 바람직하게는 1 : 1 ~ 4의 중량비, 보다 바람직하게는 1 : 1 ~ 3의 중량비, 가장 바람직하게는 1 : 1.5 ~ 2.5의 중량비로 포함될 수 있다.
- [0117] 또한, 상기 조성물의 용매는 통상적으로 해당 분야에서 널리 이용되는 것이면 제한 없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 정제수를 사용할 수 있다. 또한, 상기 조성물에 포함되는 용매와 마이셀의 함량비는 바람직하게는 1 : 1000 ~ 3000 중량비, 보다 바람직하게는 1 : 1500 ~ 2500 중량비, 가장 바람직하게는 1 : 1800 ~ 2200 중량비로 포함될 수 있다.
- [0118] 상기 조성물은 해당 기술분야에서 통상적으로 추가적으로 첨가하는 각종 화합물들을 본 발명이 목적하는 바를 달성할 수 있는 범위 내에서 포함할 수 있다.
- [0119] 구체적으로, 상술한 도 1 b)를 참조하면, 본 발명의 수용성 화합물(IR-Pyr)을 제조한 후, 상기 수용성 화합물이 코어를 형성하고 상기 코어를 둘러싸도록 히알루론산이 셸을 형성하여 마이셀(micelle) 구조를 이루는 것을 확인할 수 있다. 이러한 마이셀구조가 암세포 내 미토콘드리아 표면에 존재하는 히알루론산 수용체인 CD44에 결합하여 미토콘드리아를 표적할 수 있고, 이를 통해 용이하게 광역동 치료(Photodynamic Therapy)를 수행하여 암을 치료할 수 있음을 알 수 있다.
- [0120] 또한, 상술한 도 2를 참조하면, 본 발명에 따른 수용성 화합물(IR-Pyr), 이를 포함하는 조성물(HA-IR-Pyr) 및 종래의 IR-780염료의 처리에 따른 결과를 확인할 수 있고, 구체적으로 a)의 경우, 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 조성물의 광 안정성이 시간의 흐름에 따라 비교적 적게 감소하여 25시간 이상의 시간이 흐른 후에도 40% 이상의 광 안정성을 가짐을 알 수 있다. 반면, IR-780 염료의 경우 약 0%로 수렴하여 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물의 광 안정성이 현저히 우수함을 알 수 있다. 또한, b)를 참조하면 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 조성물의 경우엔 다크 안정성의 감소가 일절 발생하지 않음을 알 수 있다. 반면, IR-780 염료의 경우에는 20% 이하의 현저히 감소된 값을 나타냄을 알 수 있다. 이를 통해 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물의 경우 현저히 우수한 다크 안정성을 가짐을 확인할 수 있다. 또한, 도 c) 및 d)를 통해 본 발명의 조성물에 포함되는 마이셀의 평균입경이 약 20~70nm임을 확인할 수 있고, 일정시간 안정적으로 크기를 유지할 수 있음을 알 수 있다.
- [0121] 또한, 상술한 도 3을 참조하면, 본 발명에 따른 화합물이 IR-780에 비하여 세포 내에 더 많이 축적될 수 있음을 알 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 수용성 화합물만으로는 암세포(HeLa cell)와 정상세포(HeK-293T cell)에서의 축적량은 차이가 없어 암 치료용으로서의 적합성이 다소 떨어짐을 알 수 있다.
- [0122] 이와 관련하여, 도 5는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물의 a) 암세포 및 b) 정상세포 내에서의 미토콘드리아 표적에 대한 공초점 이미지(confocal image)이다. 이를 통해, 본 발명에 따른 조성물이 암세포(HeLa cell) 내에서 현저히 다량 축적되는 반면, 정상세포(HeK-293T cell) 내에서는 전혀 축적되지 않음을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 화합물이 마이셀 구조를 형성하여 미토콘드리아를 표적하는 경우, 암세포에 대해 선택적으로 다량 축적될 수 있으므로 암 치료 효능이 현저히 우수함을 알 수 있다.
- [0123] 즉, 본 발명에 따른 수용성 화합물의 경우에도 미토콘드리아 표적화 능력이 우수하지만, 이를 포함하는 조성물의 경우에는 암세포 내부의 미토콘드리아에 대한 선택적인 표적화 능력 및 생체 내의 안정성이 현저히 우수하여 보다 암 치료 효능이 우수한 장점이 있다.
- [0124] 구체적으로, 도 6은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물을 이용한 a) TMRM을 이용한 미토콘드리아 막의 탈분극 분석 b) 광 세포 독성 관측 c) 광역동 치료(Photodynamic Therapy) 후 암세

포 생존력 분석 그래프 e) 유동 세포 계측 분석 그래프이고, d) IR-780 염료 조성물의 광역동 치료(Photodynamic Therapy) 후 정상세포 생존력 분석 그래프이다. 광역동 치료에 따른 미토콘드리아의 손상 여부는 광 조사에 따른 이의 막 전위 관측을 통해 알 수 있는데, 상기 도면을 통해 암세포(HeLa cell)의 미토콘드리아의 막 전위가 감소한 것을 통해 미토콘드리아가 손상되었음을 확인할 수 있다. 또한 c), d)를 참조하면, 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 조성물의 경우 농도가 향상될 수 록 암세포(HeLa, MDA-MB-231 및 HEK293T cell)의 세포 생존률이 급격히 저하되지만, 종래 IR-780 염료의 경우 암세포의 생존률이 그대로 유지됨을 알 수 있다. 이를 통해 본 발명이 효과적으로 미토콘드리아를 표적할 수 있으며, 이에 따라 현저히 우수한 암 치료 효능을 가짐을 알 수 있다.

[0125] 또한, 도 7은 SCC7 종양이 이종 이식된 마우스에 대한 본 발명의 바람직한 일실시에 따른 수용성 화합물 (1), 이를 포함하는 조성물 (2), IR-780 염료 (3) 및 식염수 (4)를 정맥 주사한 후의 광학 이미지이다. 이를 통해 본 발명에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물이 미토콘드리아 표면에 존재하는 수용체에 의해 우수한 미토콘드리아 표적화 능력을 가지므로, 종양에 현저히 많이 축적됨을 알 수 있다.

[0126] 또한, 도 8a는 본 발명의 바람직한 일실시에 따른 수용성 화합물을 포함하는 조성물의 광역동 치료(Photodynamic Therapy) 효과를 나타낸 사진이고, 도 8b는 광역동 치료(Photodynamic Therapy)에 의한 종양 크기 변화를 나타낸 사진이며, 도 8c는 광역동 치료(Photodynamic Therapy) 수행 중의 몸무게 변화 및 종양 부피 그래프이다. 이를 통해 본 발명에 따른 화합물 및 이를 포함하는 조성물을 투여하거나, 이에 더하여 광조사를 하는 경우 종양 크기 및 부피가 현저히 작아지며, 실험마우스의 몸무게가 원래대로 유지됨을 알 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 화합물 및 이를 포함하는 조성물을 이용한 광역동 치료를 수행하는 경우 암 치료 효능이 현저히 우수함을 확인할 수 있다.

[0127] 또한, 본 발명의 암 치료를 위한 광역동 치료용 조성물에 있어서, 상기 암은 전립선, 자궁경부암, 유방암, 간암, 위암, 식도암, 비인두암, 피부암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 항암제로 치료 대상이 될 수 있는 암이라면 제한 없이 적용할 수 있다.

[0128] 상술한 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 본 발명의 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0129] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효 성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0130] 본 발명의 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 본 발명의 화합물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0131] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 60 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이며, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0132] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0133] **실시예 1-1. 미토콘드리아에 표적화되는 수용성 화합물의 제조**

[0134] (1) IN-Br의 합성

[0135] 2,3,3-트리메틸인돌린(2 g, 12.56 mmol)을 자기 교반 막대가 있는 50ml 둥근 바닥 플라스크에서 과량의 1,6-디브로모헥산(15.32g, 62.8mmol)과 혼합 하였다. 상기 혼합물을 110℃에서 2시간 동안 가열하였다. 상기 혼합 용액을 실온에 보관하여, 형성된 침전물을 수집하고 디에틸에테르 및 헥산으로 수회 세척하여 미반응 출발 물질을 제거하였다. 그 후, 세척된 침전물을 진공에서 밤새 건조시켜, IN-Br을 85% 수율로 수득하였다. 수득된 화합물을 대상으로 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 및 ESI-MS 분석을 수행하여 분자량 및 분자 구조를 분석하였고(도 10a 내지 도 10c), 그 결과 하기 [화학식 7]의 구조를 가진 화합물인 것을 확인하였다.

[0136] [화학식7]



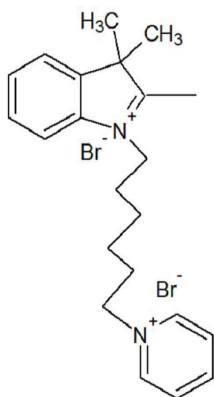
[0137]

[0138] NMR 및 ESI-MS 분석 결과는 다음과 같다: ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , 298K) : δ = 7.70 (d, 2H), 7.49-7.53 (m, 4H), 4.69 (t, 2H), 2.76 (t, 2H), 1.90-1.93 (m, 2H), 1.78-1.81 (m, 2H), 1.58 (s, 6H), 1.47-1.55 (m, 4H); ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) : δ = 196.08, 141.6, 140.94, 130.65, 129.49, 123.27, 117.53, 115.44, 54.61, 49.41, 33.76, 33.68, 32.46, 32.21, 27.98, 27.64, 27.24, 25.86, 23.12, 22.63, 16.43. ESI-MS : m/z $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{BrN}^+$ 에 대한 계산값 = 322.12; 실측값 = 323.65.(도 10a 내지 10c 참조)

[0139] (2) IN-Pyr의 합성

[0140] 둥근 바닥 플라스크에서 IN-Br(1g, 2.48mmol)에 10ml의 피리딘을 첨가하고, 상기 용액을 90℃에서 밤새 가열하였다. 과량의 용매를 로토 증발기(ROTO evaporator)에서 제거하고, 헥산 및 에틸아세테이트로 3회 세척하였다. 고진공에서 건조하여 90% 수율로 IN-Pyr을 수득하였다. 수득된 화합물을 대상으로 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 및 ESI-MS 분석을 수행하여 분자량 및 분자 구조를 분석하였고(도 11a 내지 도 11c), 그 결과 하기 [화학식 5]의 구조를 가진 화합물인 것을 확인하였다.

[0141] [화학식 5]



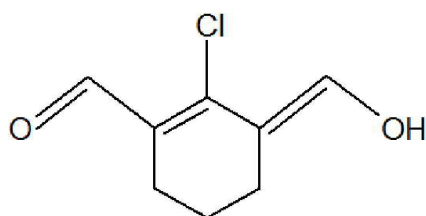
[0142]

[0143] NMR 및 ESI-MS 분석 결과는 다음과 같다: ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , 298K): δ = 9.22-9.21 (d, 4H), 8.68-8.66 (m, 2H), 8.21-8.17 (m, 4H), 7.67-7.65 (dd, 1H), 4.82-4.77 (m, 4H), 4.72 (s, 2H), 4.63-4.59 (t, 1H),

2.14-2.10 (m, 5H), 1.64 (s, 6H), 1.55 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 196.46, 145.47, 144.54, 141.96, 141.65, 141.02, 129.79, 129.09, 128.11, 127.28, 123.22, 115.05, 61.44, 54.52, 30.72, 27.22, 25.64, 25.28, 21.32. ESI-MS: m/z $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{22}^+$ 에 대한 계산값 = 322.49; 실측값 = 322.06. (도 11a 내지 11c 참조)

[0144] (3) CH-OH의 합성

[0145] 건조한 디메틸포름아미드(DMF)와 디클로로메탄(CH_2Cl_2)을 1 : 1 비율로 혼합하였다(각각 10ml). 혼합물을 아이스 베스에서 0°C 로 냉각시켰다. 포스포러스 옥시클로라이드(9 ml)를 10 ml의 CH_2Cl_2 에 용해시키고 일정하게 저어주면서 0°C 에서 혼합물에 천천히 첨가하였다. 15분 후, 사이클로헥산온(2.5g, 25.4 mmol)의 용액을 첨가하였다. 아이스 베스를 제거하여 용액을 실온에서 방치하였다. 그 후, 3시간 동안 환류시킨 다음, 얼음 50g이 들어있는 비커에 부어 실온이 되도록 하였다. 분별 깔대기를 사용하여 하층을 뽑아 내고, 수성층의 화합물을 진공 펌프를 사용하여 여과하였다. 차가운 물로 황색 침전물을 여러번 세척하여 CH-OH를 40% 수율로 수득하였다. 수득된 화합물을 대상으로 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 및 ESI-MS 분석을 수행하여 분자량 및 분자 구조를 분석하였고(도 12a 내지 도 12c), 그 결과 하기 [화합식 6]의 구조를 가진 화합물인 것을 확인하였다.



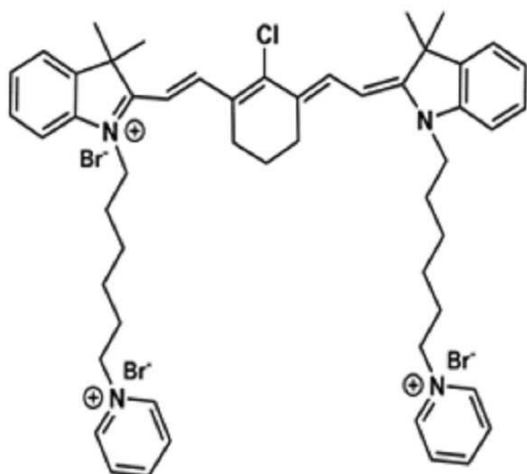
[0146]

[0147] NMR 및 ESI-MS 분석 결과는 다음과 같다: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 298K): δ = 9.94 (s, 1H), 9.74 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 2.24(d, 2H), 2.13(t, 2H), 1.43-1.40(m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 190.62, 152.65, 145.63, 129.56, 114.59, 24.19, 23.93, 20.22. ESI-MS: m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClO}_2$ 에 대한 계산값 = 172.6; 실측값 = 171.82. (도 12a 내지 12c 참조)

[0148] (4) IR-Pyr의 합성

[0149] CH-OH(0.15 g, 0.87mmol), IN-Pyr(0.924mg, 1.66mmol) 및 아세트산 나트륨(0.157mg, 1.66mmol)의 용액을 무수 아세트산(18ml)에 용해시키고 70°C 에서 1시간 동안 가열하였다. 형성된 녹색 발색 용액을 실온으로 냉각시키고, NaBr(20 ml)의 포화 용액에 첨가하였다. 용매를 제거한 후, 수득된 녹색 고체를 메탄올에 용해시키고 실리카 겔 컬럼을 수행한 다음 HPLC(메탄올 : H_2O)로 정제하여 45% 수율로 IR-Pyr을 수득하였다. 수득된 화합물을 대상으로 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 및 ESI-MS 분석을 수행하여 분자량 및 분자 구조를 분석하였고(도 13a 내지 도 13c), 그 결과 하기 [화합식 2]의 구조를 가진 화합물인 것을 확인하였다.

[0150] [화학적식 2]



[0151]

[0152] NMR 및 ESI-MS 분석 결과는 다음과 같다: ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , 298K): δ = 9.00(t, 4H), 8.60-8.57(m, 2H), 8.46-8.42 (dd, 2H), 8.10 (t, 4H), 7.53-7.51 (dd, 2H), 7.43-7.40 (dd, 2H), 7.34-7.28 (m, 4H), 6.3-6.26 (d, 2H), 4.66-4.62 (m, 4H), 4.19(t, 4H), 2.72 (t, 4H), 2.06-2.04 (m, 4H), 1.95 (t, 2H), 1.85-1.89 (m, 4H), 1.71 (d, 12H), 1.56-1.47 (m, 8H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 172.80, 160.23, 159.86, 145.45, 144.51, 142.19, 141.18, 128.62, 128.48, 128.39, 128.09, 126.55, 125.17, 122.13, 117.50, 110.87, 100.92, 61.54, 49.22, 43.35, 30.87, 26.91, 26.88, 26.08, 25.94, 25.59, 22.8, 20.71, 19.9; ESI-MS: m/z $\text{C}_{52}\text{H}_{64}\text{ClN}_{43}^+$ 에 대한 계산값 = 259.83; 실측값 = 260.00. 446.4 ($\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{ClN}_2$) $^+$.

[0153] 실시예 1-2. HA-IR-Py의 제조

[0154] 히알루론산 1mg을 정제수 1ml에 녹여 히알루론산 용액을 준비하였다. 상기 용액에, 정제수 1ml에 0.5mg IR-PYR이 용해되어 있는 용액을 교반 하에 천천히 첨가하였다. 모든 IR-PYR용액을 첨가한 후 상온에서 12시간 동안 교반하여 HA-IR-Py를 제조하였다. 상기 제조과정에서 생기는 불순물을 제거하기 위하여, 3.5KD 투석 백(dialysis bag)을 사용하여 불순물을 제거하였다.

[0155] 실시예 2. 세포 배양 및 세포 생존율 관측

[0156] 자궁 경부암 HeLa 세포 및 정상세포인 섬유아세포(fibroblast)인 HeK293T 세포를 10%의 태아소혈청(FBS), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 스트렙토마이신 및 100U mL^{-1} 의 페니실린(penicillin)을 무균 상태로 배양(DMEM 배지 사용) 96-웰(well) Nunc(Thermo Fisher Scientific Inc.) 마이크로타이터 플레이트를 5×10^3 cell/well의 접종 밀도로 접종하고, 37°C 및 5% CO_2 에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 생존율을 관측하기 위해, 세포를 Ir-780, Ir-Pyr 및 HA-Ir-Pyr (2.5, 5.0, 10.0 및 20 μM)의 상이한 농도로 처리하고, 12시간 동안 배양하고, 세척하여, 새 배지로 교체하여 200mW.cm에서 3분 후 레이저 조사하여 590nm에서의 여기에 의한 발광현상을 모니터링하고, 565nm에서 여기 파장을 설정하고 알라마르 블루 염료 분석(the alamar blue dye assay)을 사용하여 또 다른 12시간 배양 후 세포 생존력을 관측하였다.

[0157] 실시예 3. 세포 흡수 분석

[0158] HeLa 및 HeK 293T 세포를 2×10^5 cell/well의 파종 밀도(seeding density)로 1 개의 유리 커버(Lab Tek II, Thermo Scientific)에 파종하였다. 24 시간 후, 세포를 2.5 μM 로 4 시간 동안 처리하고, 새로운 배지로 교체하였다. 세포 흡수는 CO_2 배양기에 연결된 Carl Zeiss LSM 780 NLO Multiphoton 현미경을 사용하여 720nm에서 여기를 설정하고 725~758nm 사이의 방출을 설정하며, 485nm에서 미토트래커(mitotracker) 녹색 FM 설정 자극과 500~500nm의 방출을 설정하여 세포 공존 분석을 수행하였다.

[0159] 실시예 4. 세포 식균작용(Endocytic) 경로 분석

[0160] 엔도시토시스(Endocytosis) 매개 흡수를 확인하기 위해, HeLA 세포를 커버 유리에 파종하고 혈청 내에서 수크로 오스(clathrin-mediated uptake, 400 nM), 메틸-베타 시토크스트린(caveolae mediated uptake) 및 amilorin (macropinocytosis)을 포함한 다른 엔도시토시스(Endocytosis) 억제제로 1시간 동안 무혈청 DMEM에서 전처리하고 신선한 배지로 교체하였다. 그 후, 4시간 동안 2.5 μ M에서 HA-Ir-Pyr에 대한 흡수 경로를 측정하고, 720nm에서 여기를 설정하고 725 ~ 758 nm 사이에서 방출이 설정된 CO₂ 배양기에 연결된 Carl Zeiss LSM 780 NLO Multiphoton 현미경을 사용하여 분석을 수행하였다.

[0161] **실시예 5. MitoSOX ROS 세대 분석**

[0162] HeLA와 HeK293T 세포는 10% FBS, 100 μ g mL⁻¹ 스트렙토마이신 및 100 U mL⁻¹의 페니실린(penicillin)으로 보충된 DMEM 배지에서 90% 합류 하에서 Lab Tek II 챔버 커버 유리에 파종하고 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 제조사의 프로토콜 (MitoSOX, M36008)에 따라 다른 시간 간격으로 2.5 μ M의 HA-Ir-Pyr과 함께 배양 한 후; 세포 배양 배지를 접착성 세포를 커버하기 위해 5 μ M MitoSOX 시약을 포함하는 용액을 함유하는 배지로 교체하였다. 그 후 세포를 37°C에서 10분동안 배양하고, 빛으로부터 보호하며, 200 mW.cm⁻¹을 사용하여 광조사하였다. 이어서, 세포를 FV1000 레이저 공초점 주사 현미경으로 분석하였다.

[0163] **실시예 6. TMRM 탈분극 분석**

[0164] HeK 293T 및 HeLA 세포에서 TMRM 탈분극의 공초점 이미징은 30 분 동안 200nM의 TMRM을 사전 배양하고 2.5 μ M의 HA-Ir-Pyr를 함께 배양한 다음, FV1000 레이저 공초점 스캐닝 현미경을 사용하여 상이한 시간 간격으로 분석하였다.

[0165] **실시예 7. 종양 이중 이식을 이용한 생체 내 이미징**

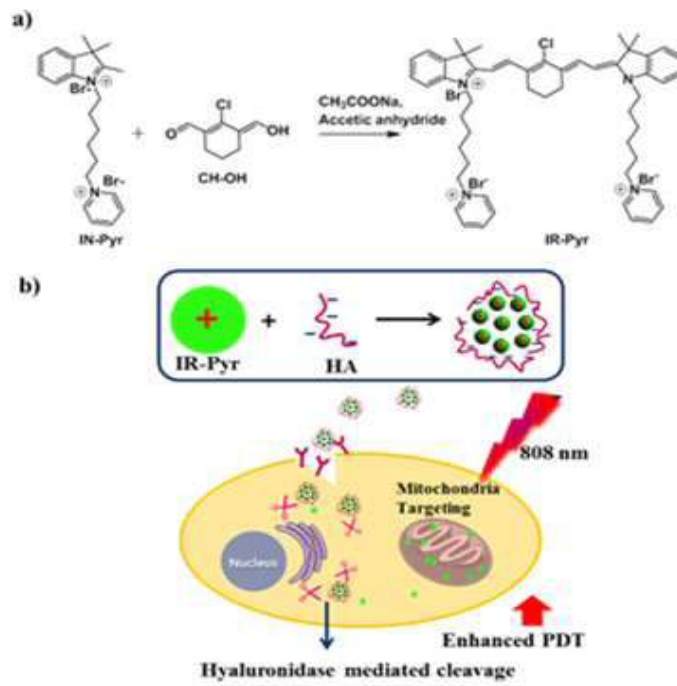
[0166] SCC7 암에 걸린 누드 마우스(종양 체적 ~100 mm³)에 PBS(100 μ L), IR-780 (10 μ g/100 μ L), Ir-Pyr(10 μ g/100 μ L) 및 HA-Ir-Pyr(10 μ g/100 μ L)을 포함한다. 그 후, 일정한 간격으로 표준 X 선 배경과 함께 방출을 여기와 마찬가지로 760~830 nm에서 설정하여 생체 내 광학 이미징 시스템(Bruker Xtreme 모델)을 사용하여 이미지화하였다.

[0167] **실시예 8. 암 이중 모델 제작 및 광선 요법**

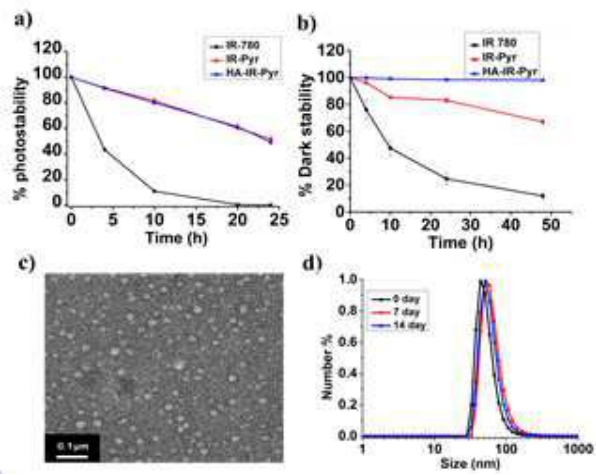
[0168] Orient bio, Korea에서 Balb/c 누드 암컷 마우스를 구입하여 모든 동물 실험을 울산 국립 연구소의 동물 실험 관리위원회의 승인 하에 수행하였다. 각 누드 마우스의 오른쪽 옆구리 부위에 SCC7 세포(0.1mL, 1x10⁷ cells/100 μ L in 1x PBS)를 피하 주사하여 마우스 편평 세포암(SCC7)을 이중 이식하였다. 주기적으로 종양의 성장을 디지털 캘리퍼(digital caliper)를 사용하여 모니터링하였다. 체적 = (종양 길이)x(종양 폭)²/2에 의해 계산된 종양 크기가 100mm³를 만족하는 마우스를 선택하였다. 4 개의 대표적인 마우스 그룹을 선택하여 PBS (-L), PBS (+L), HA-Ir-Pyr (-L) 및 HA-Ir-Pyr (+L)을 정맥 주사하였다. 그 후, 마우스는 동량의 PBS (100 μ L) 및 μ g/100 μ L로 처리하였다. PDT 치료를 위해, 정맥주사 8시간 후에, 마우스 (+ 레이저) 그룹은 NIR 레이저 (808nm, 200mW/cm²)를 3분 동안 조사하였다.

도면

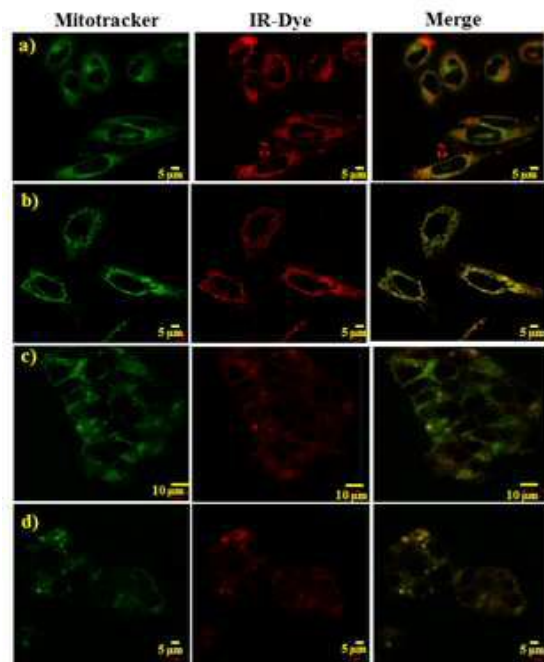
도면1



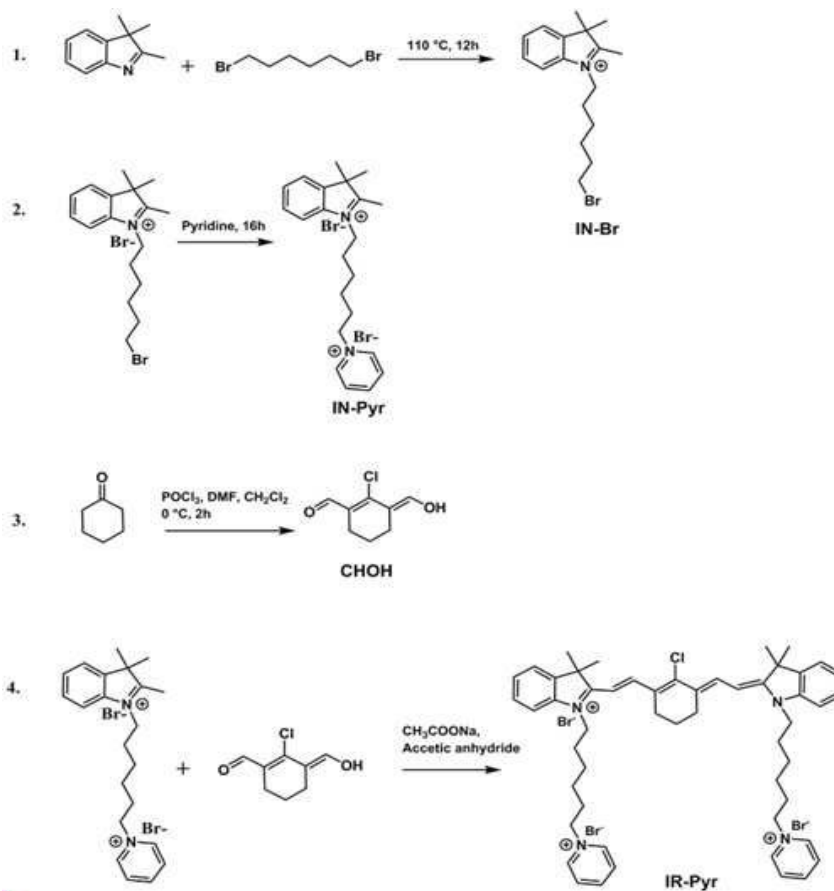
도면2



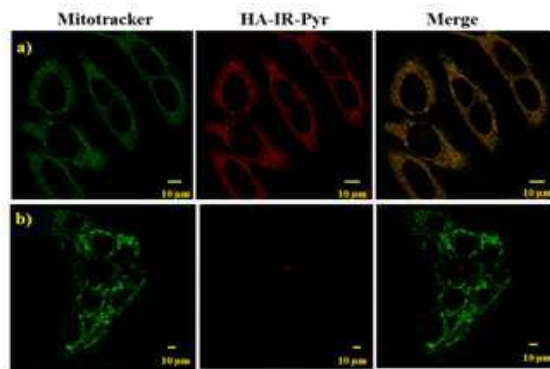
도면3



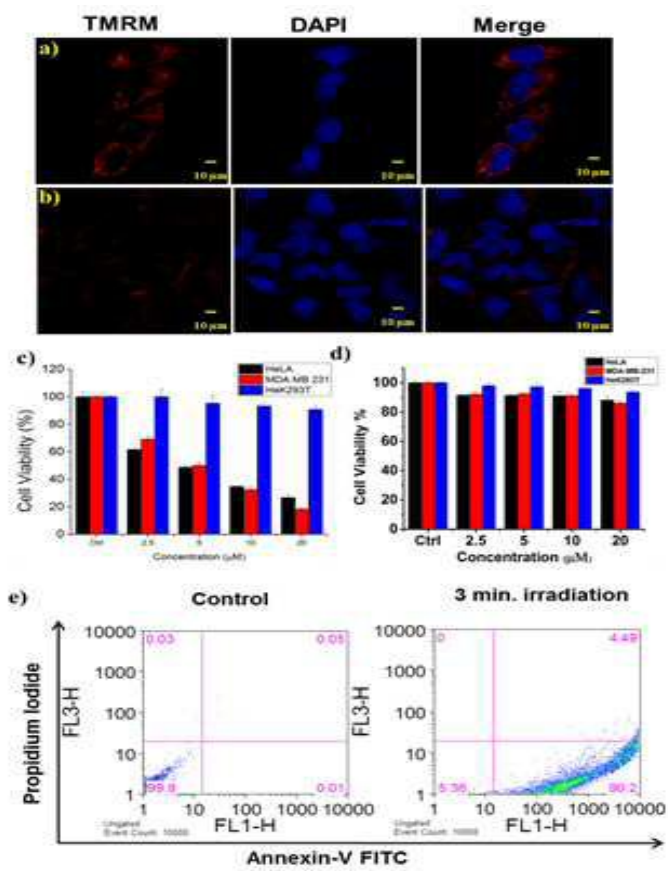
도면4



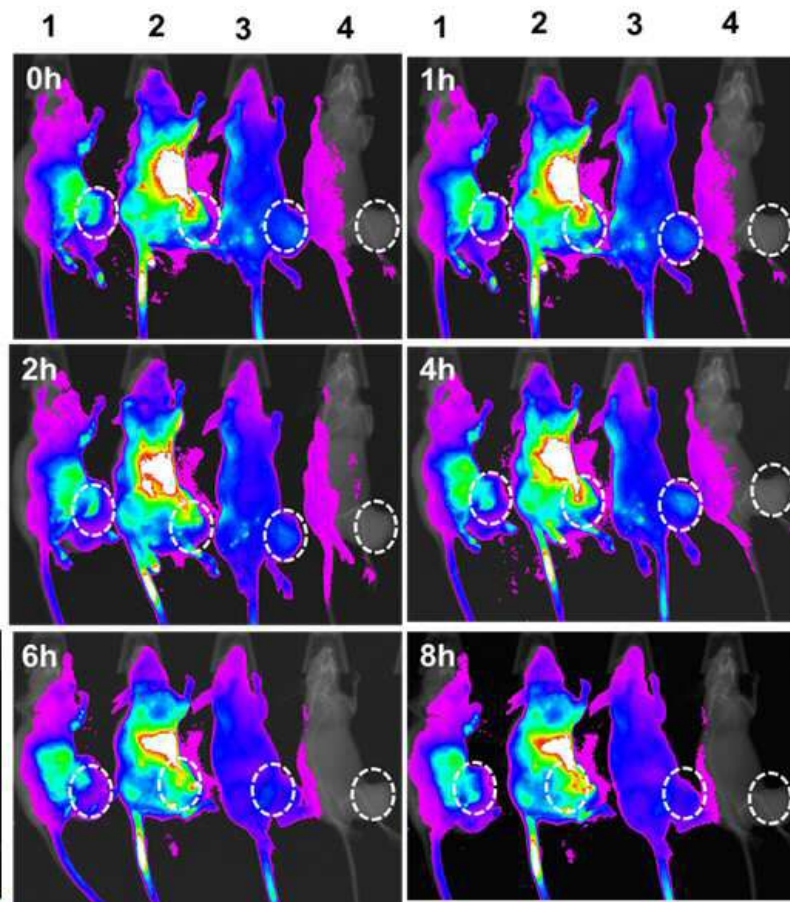
도면5



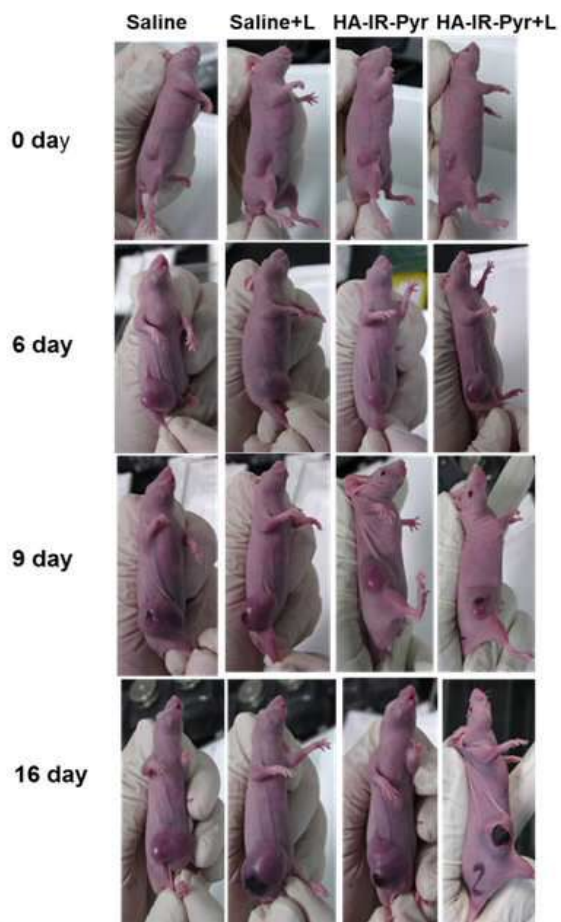
도면6



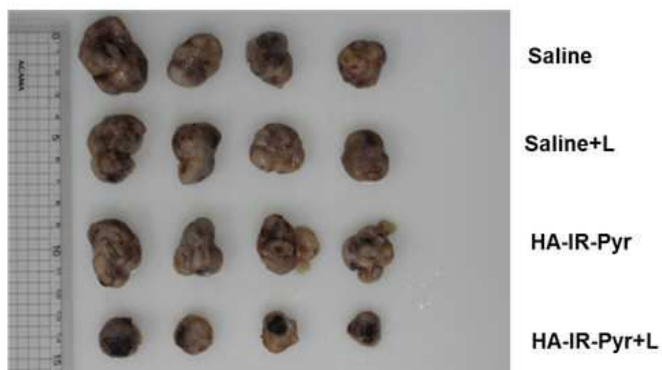
도면7



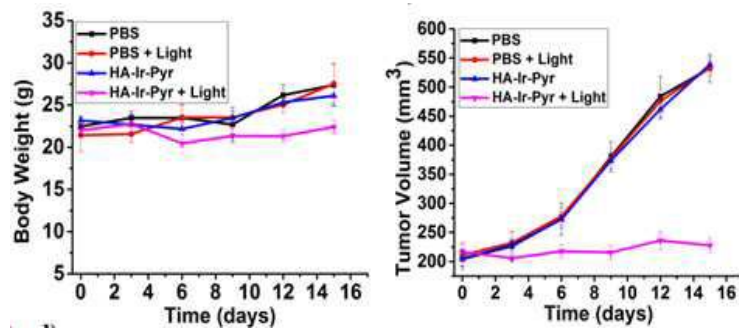
도면8a



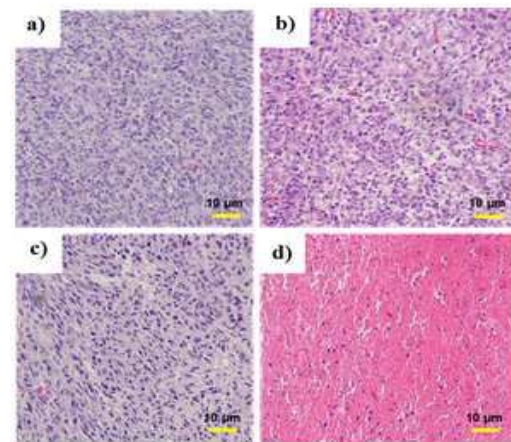
도면8b



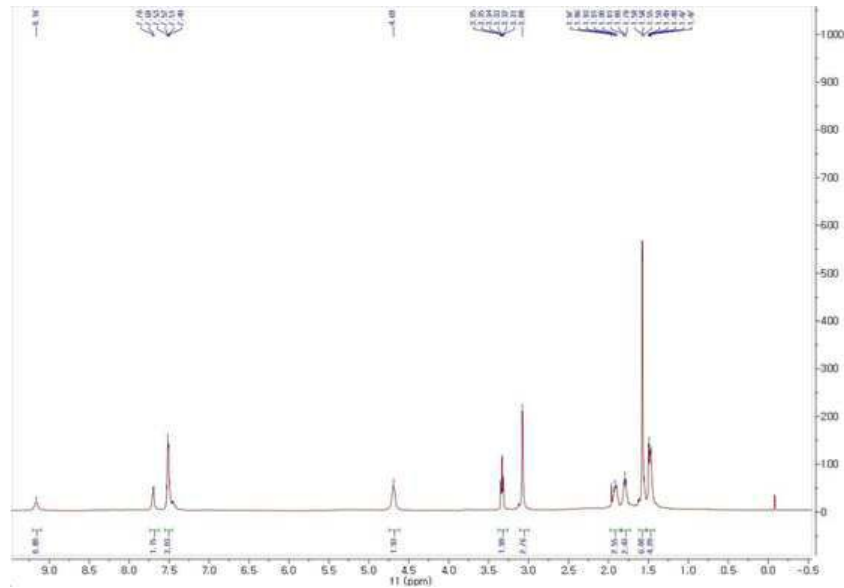
도면8c



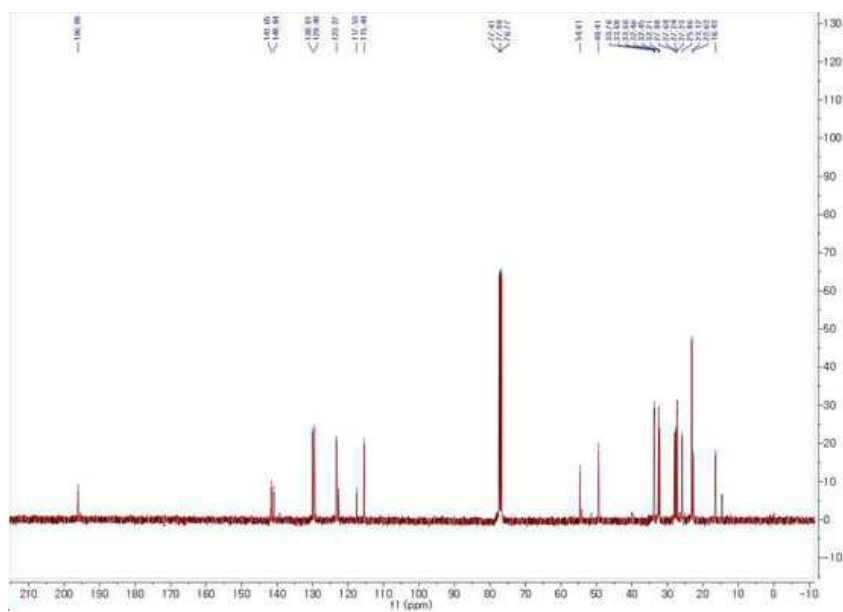
도면9



도면10a



도면10b



도면10c

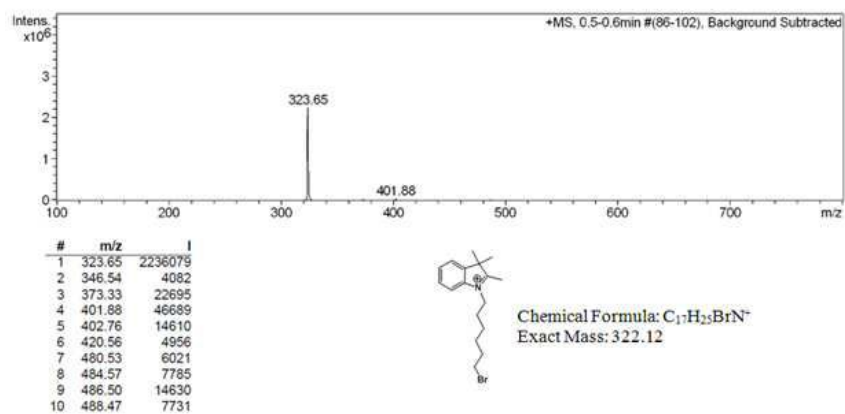
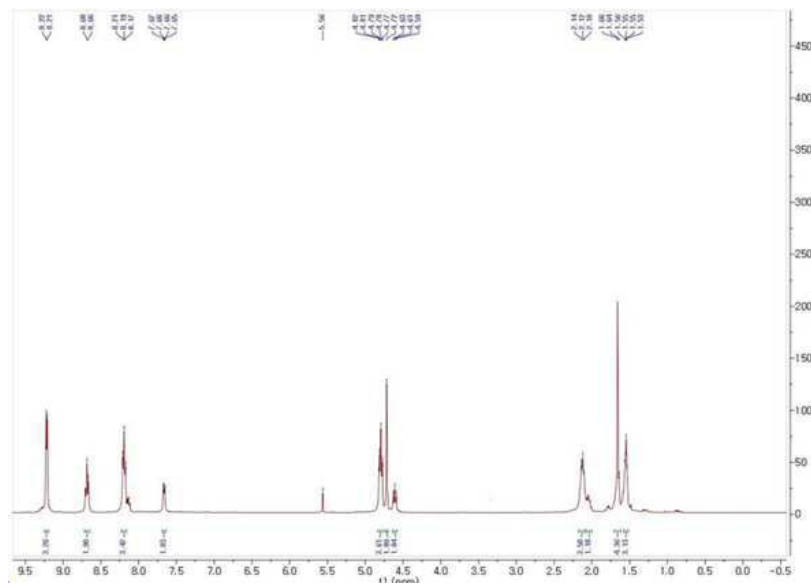
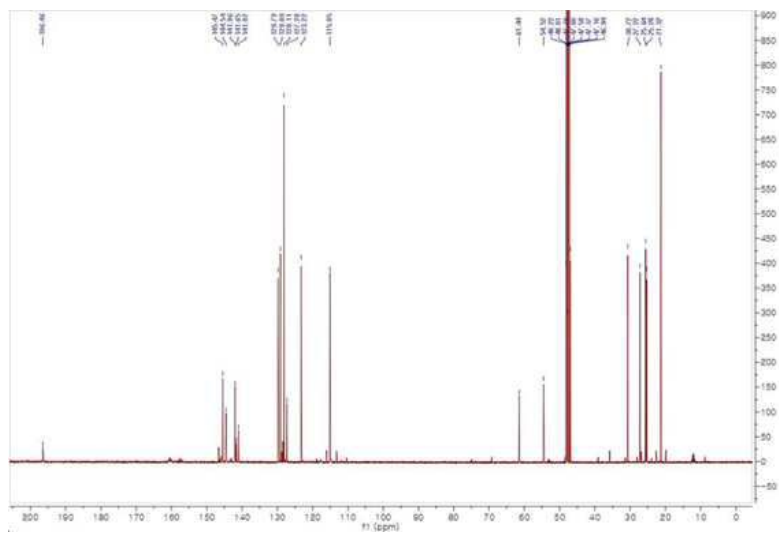


Figure S9. ESI-MS spectrum of IN-Br.

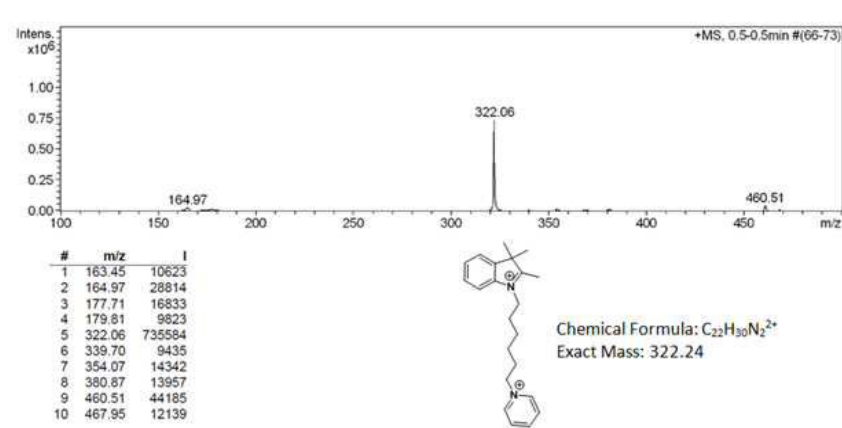
도면11a



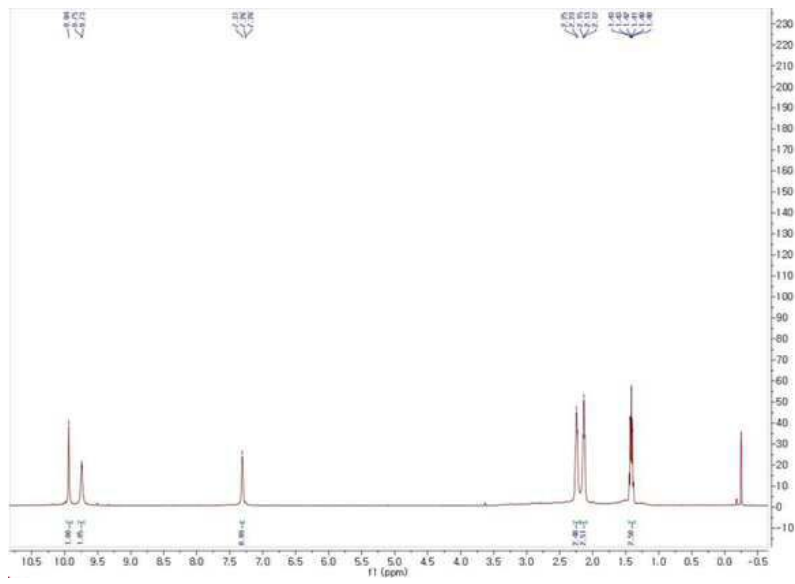
도면11b



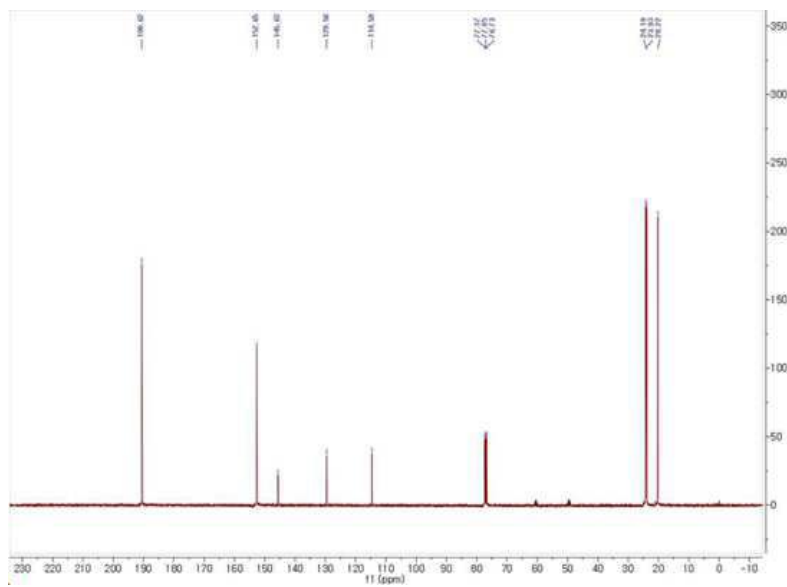
도면11c



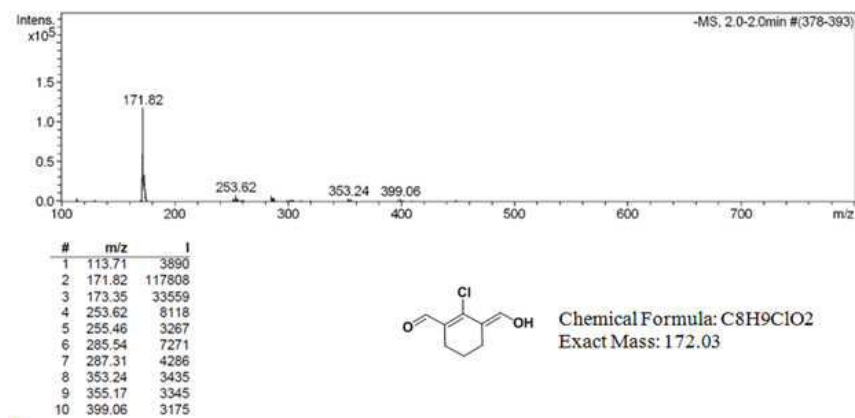
도면12a



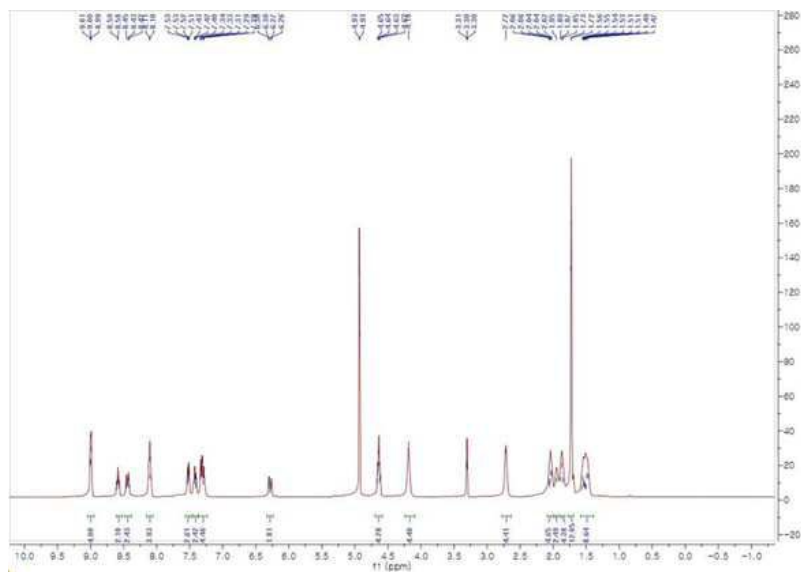
도면12b



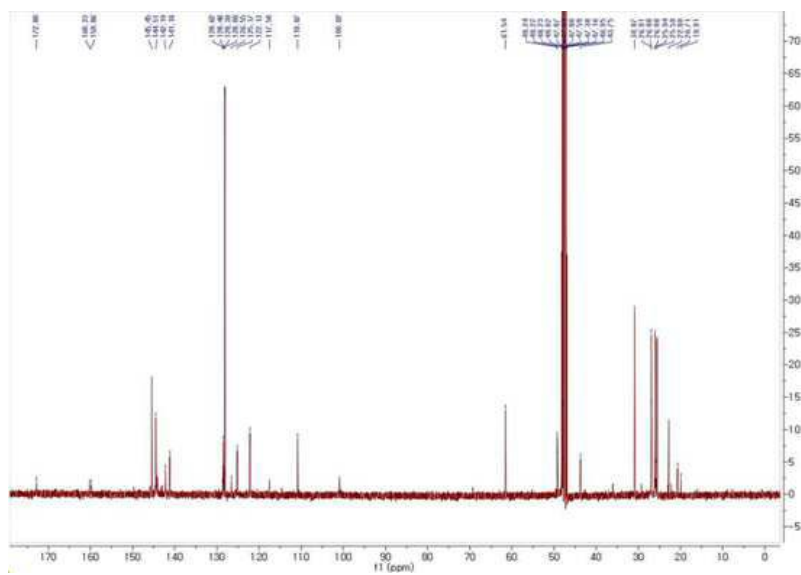
도면12c



도면13a



도면13b



도면13c

