



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0053521
(43) 공개일자 2024년04월24일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 15/00 (2024.01) A61K 41/00 (2020.01)
A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07F 15/0033 (2013.01)
A61K 41/0057 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0106492
(22) 출원일자 2023년08월14일
심사청구일자 2023년08월14일</p> <p>(30) 우선권주장
1020220133353 2022년10월17일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(72) 발명자
권태혁
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>이채규
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(74) 대리인
오위환, 박진기, 정기택</p> |
|--|---|

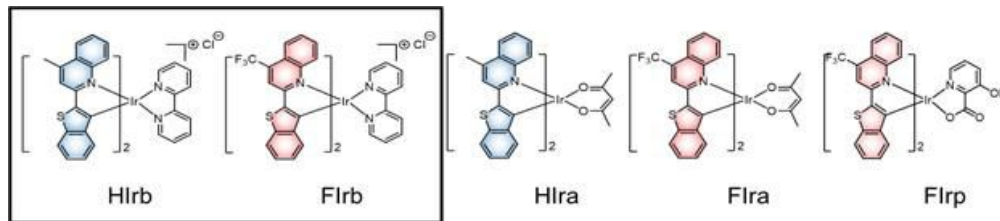
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 이리듐 복합체, 광감각제 및 광역동 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 이리듐 복합체, 광감각제 및 광역동 치료용 조성물에 관한 것으로, 양전하를 띠는 이리듐 복합체를 이용하여 세포 내 높은 축적률과 높은 활성 산소 생성 능력을 나타내며, 기존 광감각제 대비 높은 암세포 능력 뿐만 아니라 종래의 이리듐 복합체와의 시너지 효과를 나타내는 이리듐 복합체, 광감각제 및 광역동 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711161696
과제번호	2021R1A2C2009504
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	단백질 상호작용체 지도 완성을 위한 광교차결합 화학도구개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	222069301
과제번호	HA22C010100
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	국립암센터
연구사업명	암정복추진연구개발사업
연구과제명	췌장암 내막계 표적 산화를 통한 면역 활성화
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2022.04.01 ~ 2022.12.31

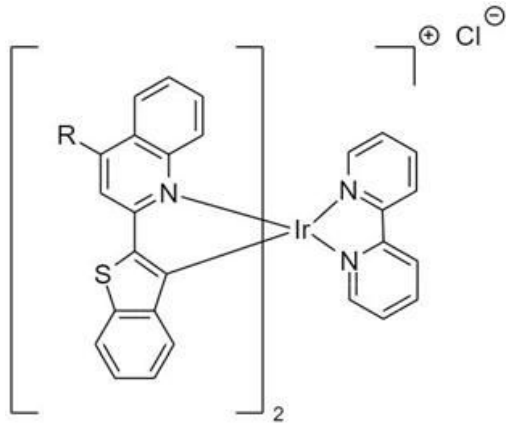
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 이리듐 복합체:

[화학식 1]



(여기서 R은 메틸기(CH₃) 또는 트리플루오로메틸기(CF₃)에서 선택된다.)

청구항 2

제1항의 이리듐 복합체를 포함하는 광감각제.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 광감각제는 양전하를 띠는 것을 특징으로 하는 광감각제.

청구항 4

제2항의 광감각제를 유효 성분으로 포함하는 광역동 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 폐암, 유방암, 위암, 흑색종, 피부암, 담도암, 신경내분비종양, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 방광암, 결장암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 치료용인 것을 특징으로 하는 광역동 치료용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 조성물은 B2 및 T1r3로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로

로 하는 광역동 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암 치료용인 것을 특징으로 하는 광역동 치료용 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 조성물은 빛 에너지의 조사에 의해 미토콘드리아 내부에 활성 산소를 생성하는 것을 특징으로 하는 광역동 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이리듐 복합체, 광감각제 및 광역동 치료용 조성물에 관한 것으로, 양전하를 띠는 이리듐 복합체를 이용함으로써 높은 세포 내 축적률 및 높은 활성 산소 생성 능력을 나타내며, 기존 광감각제 대비 높은 암세포 사멸 능력 뿐만 아니라 기존 이리듐 복합체와 시너지 효과를 나타내는 이리듐 복합체, 광감각제 및 광역동 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 광역동 치료란, 광화학 반응을 이용하여 암 환자의 고통을 최소한으로 줄일 수 있는 치료법으로, 광감각제를 환자에 투여 후 빛을 암 조직에 조사하여 광감각제가 광화학 반응을 통해 활성산소종(Reactive oxygen species)을 생성함으로써 암세포의 생체분자를 산화시켜 사멸시키는 방법이다. 이러한 치료 방법의 경우 환자의 체력적 부담이 적어 1개월 내 재치료가 가능하며, 기존 암 치료법과 병행하는 것 또한 가능하다.

[0005] 하지만 일반적으로 실제 광역동 치료에 사용되는 광감각제인 ‘포트프린(Photofrin[®])’ 과 ‘라다클로린(Radachlorin[®])’ 은 수계에서 활성산소종 생산 효율이 현저히 낮으므로 광역동 치료를 위해서 매우 강한 빛 에너지(> 200~300 J/cm²)를 가해야 한다.

[0007] 따라서, 강한 빛 에너지에 의한 부작용, 레이저 조사 시간을 최소화하기 위해서 수계에서 매우 높은 활성산소종 생산 효율을 보이는 이리듐 복합체가 광역동 치료의 광감각제로 연구되고 있으나, 이리듐 복합체의 낮은 세포 사멸 효율과 자체적인 독성에 대한 개선이 필요한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1743594호

발명의 내용

해결하려는 과제

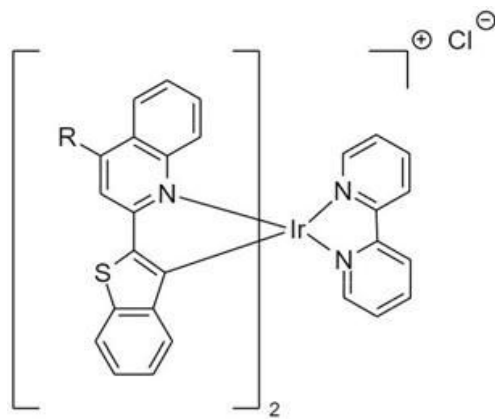
[0010] 본 발명은 양이온을 띠는 이리듐 복합체를 제공함으로써 세포 내 광감각제의 축적률을 높이고, 활성 산소의 생성 효율을 높여 암세포에 대한 세포 사멸 효율을 증가시킬 수 있는 이리듐 복합체, 광감각제 및 이를 이용한 광역동 치료용 조성물을 제공하는 것으로 목적으로 한다.

[0012] 또한 본 발명은 알려진 이리듐 복합체와의 시너지 효과를 확인함으로써 광역동 치료 시 환자의 신체적인 부담을 줄일 수 있는 이리듐 복합체, 광감각제 및 이를 이용한 광역동 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 하기 화학식 1로 표시되는 이리듐 복합체를 제공한다.

[0015] [화학식 1]



[0016] (여기서 R은 메틸기(CH₃) 또는 트리플루오로메틸기(CF₃)에서 선택된다.)

[0019] 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 상기 화학식 1로 표시되는 이리듐 복합체를 포함하는 광감각제를 제공한다.

[0021] 또한 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 광감각제는 양전하를 띌 수 있다.

[0023] 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 상기 광감각제를 유효성분으로 포함하는 광역동 치료용 조성물을 제공한다.

[0025] 또한 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 폐암, 유방암, 위암, 흑색종, 피부암, 담도암, 신경내분비종양, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 방광암, 결장암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 치료용 조성물일 수 있다.

[0027] 또한 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 B2 및 T1r3로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0029] 또한 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 자궁경부암 치료용일 수 있다.

[0031] 또한 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 조성물은 빛 에너지의 조사에 의해 미토콘드리아 내부에 활성 산소를 생성할 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 광감각제는 양이온 성질을 가져 세포 내 축적률이 높고 월등한 활성 산소 생성 효율을 기반으로 다양한 암세포 종에 대한 높은 세포 사멸 효율을 보여주는 이리듐 복합체 기반의 광감각제로 광역동 치료의 효율을 높일 수 있다.

[0035] 또한 본 발명의 이리듐 복합체는 종래의 이리듐 복합체와의 시너지 효과를 확인함으로써 광역동 치료 시 광감각제의 양을 줄여 환자의 신체적인 부담을 줄이는 치료법에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 실시예 1 및 2의 이리듐 복합체(HIrb, FIrb) 및 비교예 1 내지 3(HIra, FIra, FIrp)의 분자 구조이다.

도 2는 실시예 1(HIrb), 비교예 4(B2) 및 비교예 5(TIr3) 이리듐 복합체 조합 사이의 시너지 상관관계 모식도 및 상기 이리듐 복합체들의 분자 구조이다.

도 3a는 이리듐 복합체의 전하에 따른 세포 내 축적률 변화를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 실시예 1의 이리듐 복합체의 세포 내 시그널(green)과 미토콘드리아 트래커(Mitotracker, red) 시그널의 병합에 관한 이미지이다.

도 4a는 빛 조사 시간에 따른 일중항 산소(singlet oxygen, 1O_2) 생성량에 따른 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid(ABDA)의 흡광 변화를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 Dihydrorhodamine 123(DHR123) 형광 물질의 Type I 활성산소에 반응하여 증가하는 형광 세기를 나타내는 그래프이다.

도 4c는 빛 조사 유무에 따른 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, 세포 내 Type I 활성산소 표지자)의 세포 내 형광 분석을 나타내는 이미지이다.

도 5는 실시예 1 및 2와 비교예 4 및 5의 이리듐 복합체와의 시너지 효과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 이리듐 복합체의 독성을 나타내는 그래프이다.

도 7은 TIr3 및 B2의 시너지 조합을 마이셀화한 모식도와 이에 관한 효과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

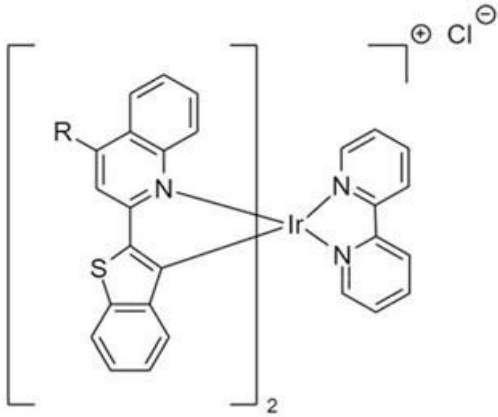
[0038] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 보다 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0040] 따라서 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0042] 본 발명은 이리듐 복합체, 광감각제 및 광역동 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 이리듐 복합체는 양이온 성질을 가져 세포 내, 특히 미토콘드리아 내에서 축적률이 높고, 높은 활성 산소의 생성 효율을 기반으로 다양한 암세포에 대한 높은 사멸 효과를 제공할 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 이리듐 복합체는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.

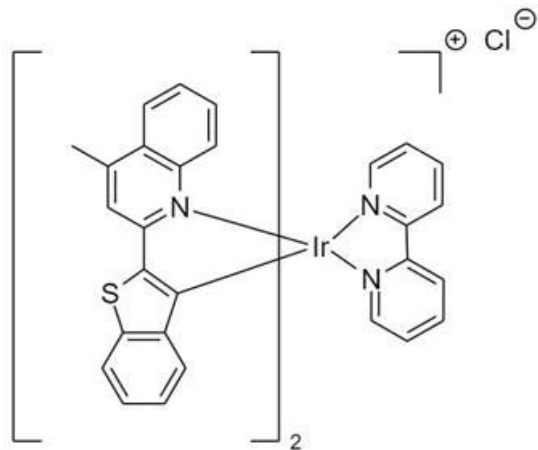
[0046] [화학식 1]



[0047] 여기서 R은 메틸기(CH₃) 또는 트리플루오로메틸기(CF₃)에서 선택될 수 있다.

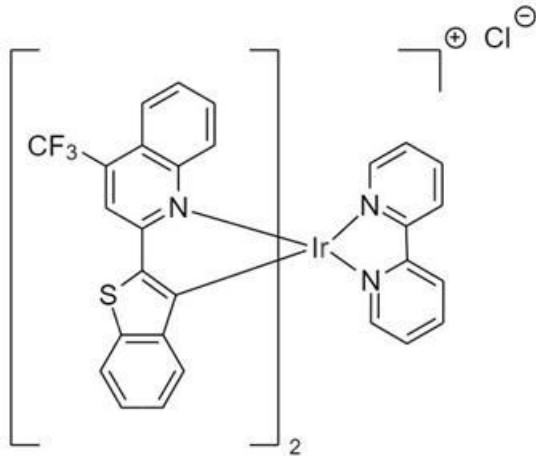
[0050] 상기 이리듐 복합체는 하기 화학식 2(HIr_b) 또는 화학식 3(FIr_b)에서 선택될 수 있다.

[0052] [화학식 2]



[0053]

[0055] [화학식 3]



[0056]

[0058] 상기 이리듐 복합체는 부리간드로 바이피리딘(bipyridine)을 채택함으로써 이리듐 복합체에 양전하를 형성할 수 있고, 이를 통해 높은 세포 내 축적률, 특히 미토콘드리아 내에 이리듐 복합체의 축적률을 향상시킬 수 있다.

[0060] 또한 본 발명은, 상기 화학식 1로 표시되는 이리듐 복합체를 포함하는 광감각제를 제공하며, 상기 광감각제는 양전하를 띌 수 있다.

[0062] 또한 본 발명은, 상기 광감각제를 유효성분으로 포함하는 광역동 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 조성물은 본 발명의 이리듐 복합체를 포함하는 광감각제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0064] 도 7은 Kolliphor HS 15 계면활성제를 이용하여 TlIr3 및 B2의 시너지 조합 (SY)을 마이셀화한 것을 나타내는 모식도이다(도 7a). 그 결과로 5%의 Kolliphor HS15를 이용하여 1 mg/mL의 농도로 TlIr3, B2 및 0.5 mg/ml TlIr3+0.5mg/ml B2 (SY) 물질을 증류수에 녹였을 때 약 10 nm 사이즈의 나노입자를 형성하는 것을 Dynamic light scattering (DLS)을 이용하여 확인하였다(도 7b). 또한 transmission electron microscopy (TEM)을 통해 SY 조합의 크기를 재확인 하였다(도 7c). 10 mg/kg의 농도로 해당 마이셀 조합을 누드마우스에 네 차례 주입하였을 때 몸무게에 큰 차이가 보이지 않았으며, 이를 통해 동물의 활성에 해당 약물 조합이 영향이 없다는 것을 확인할 수 있다(도 7d). 약물을 네 차례 투여한 후, 17일 차의 간독성 (Alanine aminotransferase, ALT) 결과는 도 7e에 나타내었다.

[0066] 상기 이리듐 복합체는 약제학적 유효량으로 포함되고, 상기 약제학적 유효량은 본 발명에 의한 이리듐 복합체가 질환 또는 질병의 진단, 예방 및 치료에 적용 시 치료적 효과를 달성하는데 충분한 양을 의미한다.

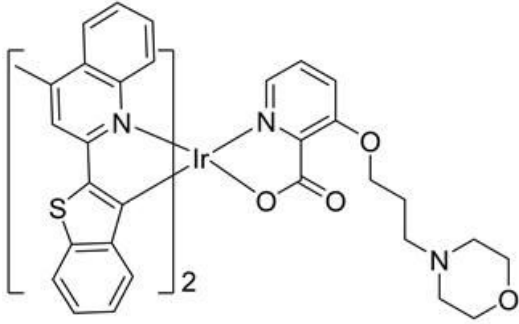
[0068] 상기 조성물 내 약제학적 유효성분으로 포함되고, 예를 들어 상기 조성물의, 100 중량부에 대하여 0.001 중량부 내지 100 중량부 미만, 0.001 중량부 내지 50 중량부 또는 0.1 중량부 내지 10 중량부로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 상기 담체는 약제학적으로 허용되는 담체인 것이 바람직하다. 예를 들어, 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로오스, 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 조성물은 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제로 이

투여된 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

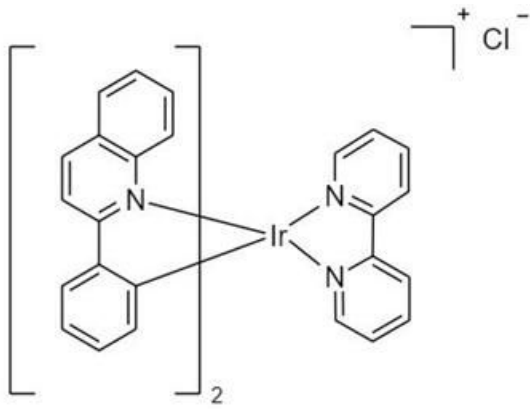
- [0072] 상기 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나, 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0074] 상기 조성물은, 경구적 또는 비경구적 투여가 가능하고, 예를 들어, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여될 수 있고, 이외에 직장 투여, 흡입 투여, 경피 투여 등이 가능할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 상기 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [0078] 상기 조성물은 광역동 치료에 적용되어 광화학 반응을 이용한 암 치료에 적용될 수 있다. 상기 암은 자궁경부암, 대장암, 췌장암, 폐암, 유방암, 위암, 흑색종, 피부암, 담도암, 신경내분비종양, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 방광암, 결장암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명은, 본 발명의 이리듐 복합체를 포함하는 광감각제를 환자에 투여한 후 암 조직에 빛을 조사하는 단계를 통해 광감각제가 광화학 반응을 일으키도록 하며, 반응을 통해 생성된 활성산소종이 암세포의 생체 분자를 산화시켜 사멸시키게 된다. 상기 빛을 조사하는 단계는, 0.001 J/cm^2 이상, 바람직하게는 0.1 J/cm^2 이상, 보다 바람직하게는 1 J/cm^2 내지 300 J/cm^2 의 빛 에너지를 1초 이상, 바람직하게는 10초 이상, 보다 바람직하게는 1초 내지 5시간 동안 조사할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명은, 본 발명에 의한 이리듐 복합체를 이용한 광역동 치료 방법에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 조성물을 대상체에 투여하는 단계; 상기 조성물이 대상체의 목표 세포 내에 축적되도록 소정의 시간을 허용하는 단계 및 상기 대상체의 목표 세포에 빛 에너지를 조사하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0084] 상기 광역동 치료 방법은, 목표 세포 내에 광감각제를 축적 시키고 빛 에너지를 조사하여 광감각제가 광화학 반응을 통해 활성 산소종을 생성함으로써, 암 세포를 사멸시키는 기전을 통해 암을 치료할 수 있다.
- [0086] 상기 투여하는 단계는, 경구적 또는 비경구적 방법으로 투여하는 것으로, 이러한 투여 방법은 상기 언급한 바와 같다.
- [0088] 상기 대상체는 포유류일 수 있으며, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 곰, 토끼, 비비 또는 붉은털 원숭이 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0090] 본 발명의 광역동 치료용 조성물은 화학식 7로 표시되는 B2 및 화학식 8로 표시되는 TlIr3로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0092] [화학식 7]



[0093]

[0095] [화학식 8]



[0096]

[0098] 본 발명의 이리듐 복합체는 상기 B2 및 TIr3와의 조합을 통해 광역동 치료에 있어서 시너지 효과를 나타내며, 이를 통해 필요한 독성 광감각제의 양을 줄일 수 있어 치료를 받는 환자의 부담을 크게 경감시킬 수 있다.

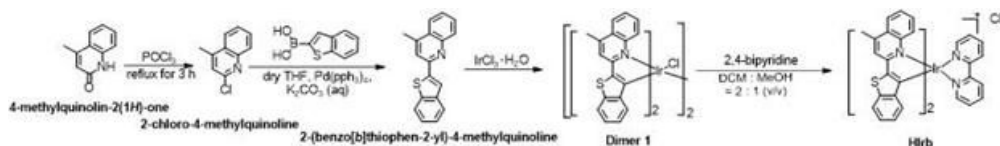
[0100] 이때, 본 발명의 이리듐 복합체와 B2 또는 TIr3와의 병용 투여 시 치료 대상이 되는 암은 자궁경부암인 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0102] 또한 본 발명의 조성물은 환자에 투여된 후 양전하를 띠는 이리듐 복합체의 특성에 따라 정전기적 인력으로 미토콘드리아 내부에 축적될 수 있으며, 빛 에너지의 조사에 따라 미토콘드리아 내부에 활성 산소를 생성함으로써 암 치료가 가능하다.

[0104] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0106] 실시예 1. HIrb 이리듐 복합체의 제조

[0107] [반응식 1]



[0108]

[0110] **2-chloro-4-methylquinoline**

[0111] 4-methylquinolin-2(1H)-one (500 mg, 3.14 mmol)을 둥근바닥 플라스크에 넣고 POCl_3 (5 mL)와 혼합하여 비활성 조건 하에서 3시간 동안 환류(reflux)시켰다. 반응 혼합물을 냉각한 다음 얼음물에 부어 넣고, 이후 2.0 M NaOH 수용액을 사용하여 중화시켰다. 침전물을 여과하고 물로 세척했다. 원료 제품은 석유에테르로부터 결정화되었다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.10 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.66 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 2.68 (s, 3H).

[0113] **2-(benzo[b]thiophen-2-yl)-4-methylquinoline**

[0114] 2-chloro-4-methylquinoline (300 mg, 1.68 mmol), benzo[b]thiophene-2-boronic acid (360.8 mg, 2.03 mmol) 및 tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (97.1 mg, 0.084 mmol)의 혼합물을 질소 기체 분위기 하에서 건조한 용매 (톨루엔/에탄올 = 3:1 (부피비))에 용해시킨 후 탈기화된 K_2CO_3 함유 수용액(2.8M, 2mL)을 주입하였다. 반응 혼합물을 환류(Reflux) 조건에서 밤새 반응시킨 후 H_2O 로 중화시켰다. 원료 제품은 에틸아세테이트로 추출하고 실리카 젤로 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다 (용매 조건: 헥산/에틸아세테이트 = 50:1). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.34 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.09 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 8.05 - 7.95 (m, 2H), 7.90 (dt, $J = 7.3, 3.6$ Hz, 1H), 7.77 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.61 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.45 - 7.36 (m, 2H), 2.75 (s, 3H).

[0116] **Dimer1**

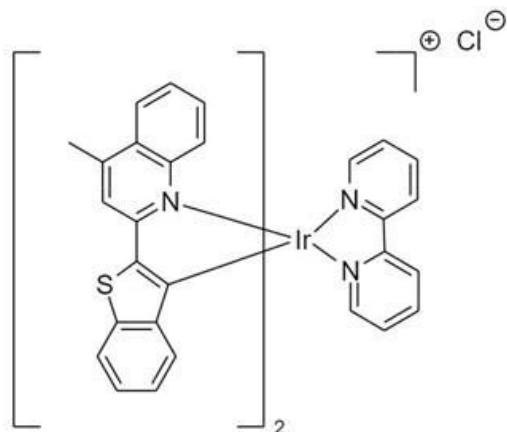
[0117] 2-(benzo[b]thiophen-2-yl)-4-methylquinoline (250 mg, 0.9 mmol)과 $\text{IrCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (135.5 mg, 0.45 mmol)를 10 mL의 용매 혼합물 (2-메톡시에탄올/물 = 3:1 부피비)에 용해시킨 후, 환류(Reflux) 조건에서 24시간 동안 반응시켰습니다. 반응 후 혼합물을 H_2O 로 중화시키고 여과하였습니다. 여과된 붉은색 이종체들을 진공 오븐에서 하룻밤 건조한 후, 추가 정제 없이 다음 단계에 사용되었습니다.

[0119] **HIrb**

[0120] Dimer1 (50 mg, 0.0322 mmol)와 2,2'-bipyridine (15.1 mg, 0.097 mmol)을 10 mL의 용매 혼합물 (메탄올/디클로로메탄 = 1:1 부피비)에 용해시킨 후, 환류(Reflux) 조건에서 밤새 반응시켰다. 용매는 감압 하에서 제거되었고, 남은 고체 물질을 작은 양의 에탄올(약 5 mL)에 용해시킨 후 여과하였다. 여과액을 진공으로 농축하고 1 mL의 디클로로메탄과 20 mL의 헥산으로 침전시켰다. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.29 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.96 (dd, $J = 17.2, 8.2$ Hz, 4H), 7.75 - 7.71 (m, 2H), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.93 (dt, $J = 15.6, 8.7$ Hz, 4H), 6.65 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 6.21 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 2.90 (s, 6H).

[0122] 상기 제조 방법을 통해 하기 화학식 2의 HIrb 이리듐 복합체를 제조하였다.

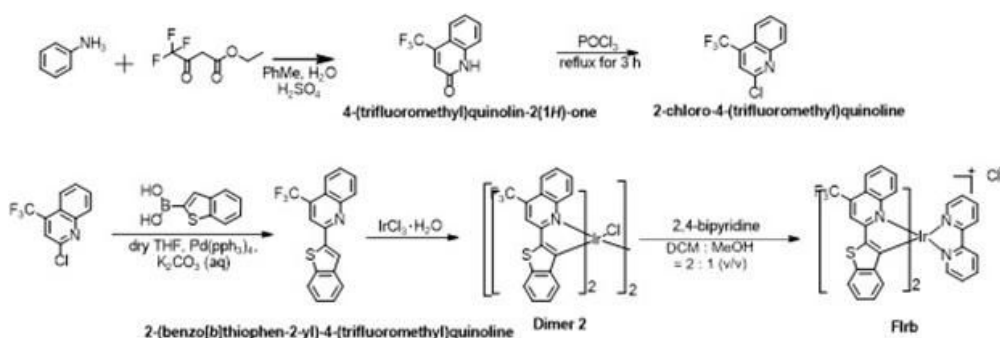
[0124] [화학식 2]



[0125]

[0127] 실시예 2. FIrb 이리듐 복합체의 제조

[0128] [반응식 2]



[0129]

[0131] 4-(trifluoromethyl)quinolin-2(1H)-one

[0132] Aniline (3.2 g, 33 mmol)과 2-chloro-4-(trifluoromethyl)quinoline (6.2 g, 39 mmol)의 혼합물을 탈기화된 톨루엔 (100 mL)에 용해시킨 후, 10분 동안 환류(Reflux)하였다. 작은 양의 물 (500 μ L)을 추가한 후, 반응 혼합물을 밤새 환류하고, 이어서 농축 및 증류하였다. 농축된 원료 제품을 가열된 80 $^{\circ}$ C의 H_2SO_4 에 점적으로 주입하고 동일한 온도에서 1시간 동안 교반하였다. 냉각한 후, 반응 혼합물을 얼음이 담긴 비커에 부었다. 생성된 고체 형태의 제품을 여과하고 건조 에테르로 세척하였다. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 12.33 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.63 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.30 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H).

[0134] 2-chloro-4-(trifluoromethyl)quinoline

[0135] 4-(trifluoromethyl)quinolin-2(1H)-one (1 g, 4.69 mmol)을 둥근바닥 플라스크에 넣고 $POCl_3$ (10 mL)와 혼합하여 비활성 조건 하에서 3시간 동안 환류(reflux)시켰다. 반응 혼합물을 냉각한 다음 얼음물에 부어 넣고, 이후 2.0 M NaOH 수용액을 사용하여 중화시켰다. 침전물을 여과하고 물로 세척했다. 원료 제품은 석유에테르로부터 결정화되었다. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.22 - 8.02 (m, 3H), 7.99 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.86 (t, J = 7.7 Hz, 1H).

[0137] 2-(benzo[b]thiophen-2-yl)-4-(trifluoromethyl)quinoline

[0138] 2-chloro-4-(trifluoromethyl)quinoline (220 mg, 0.95 mmol), benzo[b]thiophene-2-boronic acid (203 mg, 1.14 mmol) 및 tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) (54.9 mg, 0.048 mmol)의 혼합물을 질소 기체 분위기 하에서 건조한 용매 (톨루엔/에탄올 = 3:1 (부피비))에 용해시킨 후 탈기화된 K_2CO_3 함유 수용액(2.8M, 2mL)을 주입하였다. 반응 혼합물을 환류(Reflux) 조건에서 밤새 반응시킨 후 H_2O 로 중화시켰다. 원료 제품은 에틸 아세테이트로 추출하고 실리카 젤로 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다 (용매 조건: 헥산/에틸아세테이트 = 50:1). 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.64 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 8.18 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.07 - 7.98 (m, 1H), 7.98 - 7.85 (m, 2H), 7.80 (t, 1H), 7.50 - 7.36 (m, 2H).

[0140] **Dimer2**

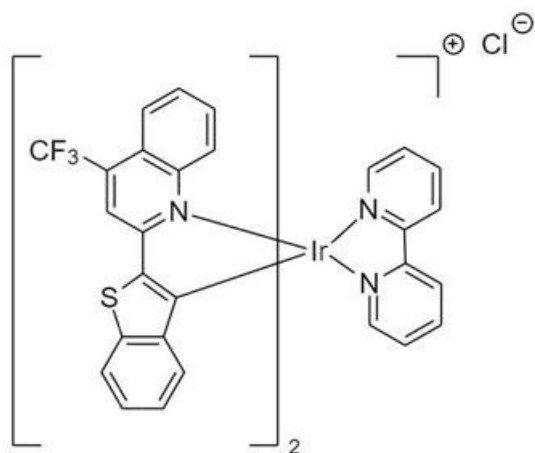
[0141] 2-(benzo[b]thiophen-2-yl)-4-(trifluoromethyl)quinoline (175 mg, 0.532 mmol)과 $IrCl_3 \cdot H_2O$ (79.3 mg, 0.266 mmol)를 10 mL의 용매 혼합물 (2-메톡시에탄올/물 = 3:1 부피비)에 용해시킨 후, 환류(Reflux) 조건에서 24시간 동안 반응시켰습니다. 반응 후 혼합물을 H_2O 로 중화시키고 여과하였습니다. 여과된 붉은색 이종체들을 진공 오븐에서 하룻밤 건조한 후, 추가 정제 없이 다음 단계에 사용되었습니다.

[0143] **FIrb**

[0144] Dimer2 (63 mg, 0.0819 mmol)와 2,2'-bipyridine (39 mg, 0.2496 mmol)을 12 mL의 용매 혼합물 (메탄올/디클로로메탄 = 1:1 부피비)에 용해시킨 후, 환류(Reflux) 조건에서 밤새 반응시켰다. 용매는 감압 하에서 제거되었고, 남은 고체 물질을 작은 양의 에탄올(약 5 mL)에 용해시킨 후 여과하였다. 여과액을 진공으로 농축하고 1 mL의 디클로로메탄과 20 mL의 헥산으로 침전시켰다. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.67 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.38 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.34 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.15 - 8.04 (m, 2H), 7.95 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.74 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 7.49 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 7.24 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.08 (dt, J = 15.8, 8.7 Hz, 2H), 6.77 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 8.3 Hz, 1H).

[0146] 상기 제조 방법을 통해 하기 화학식 3의 FIrb 이리듐 복합체를 제조하였다.

[0148] [화학식 3]



[0149]

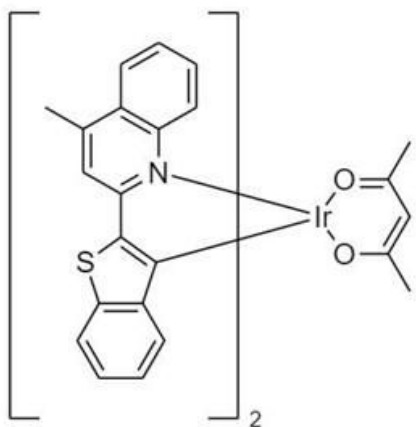
[0151] 비교예 1. HIra 이리듐 복합체의 제조

[0152] **HIra**

[0153] Dimer1 (50 mg, 0.032 mmol)와 sodium carbonate (34.13 mg, 0.322 mmol)을 10 mL의 1,2-dichloroethane 용매에 용해시킨 후, acetyl acetone (16.1 mg, 0.161 mmol)을 넣고 환류(Reflux) 조건에서 12시간 반응시켰다. 용매는 감압 하에서 제거되었고, 남은 물질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하였다 (eluent: DCM: Hex = 2:1 v/v). ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d^6) δ 8.06 – 8.02 (m, 2H), 7.94 – 7.89 (m, 4H), 7.84 – 7.76 (m, 2H), 7.48 – 7.43 (m, 2H), 7.38 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.04 – 6.98 (m, 2H), 6.54 (dd, J = 8.3, 7.1 Hz, 2H), 6.15 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 2.98 – 2.96 (m, 6H), 1.47 (s, 6H).

[0155] 상기 제조 방법을 통해 하기 화학식 4의 HIra 이리듐 복합체를 제조하였다.

[0157] [화학식 4]



[0158]

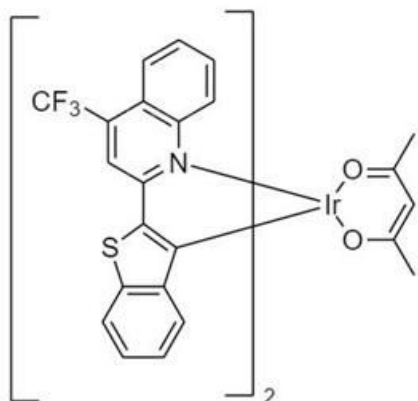
[0160] 비교예 2. FIra 이리듐 복합체의 제조

[0161] **FIra**

[0162] Dimer2 (50 mg, 0.028 mmol)와 sodium carbonate (29.68 mg, 0.28 mmol)을 10 mL의 1,2-dichloroethane 용매에 용해시킨 후, acetyl acetone (14 mg, 0.14 mmol)을 넣고 환류(Reflux) 조건에서 12시간 반응시켰다. 용매는 감압 하에서 제거되었고, 남은 물질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하였다 (eluent: DCM: Hex = 3:1 v/v). ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d^6) δ 8.33 (s, 2H), 8.03 (s, 2H), 7.89 (dd, J = 12.5, 8.4 Hz, 5H), 7.52 (dt, J = 27.9, 8.0 Hz, 4H), 7.10 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.66 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 6.20 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.73 (s, 1H), 1.21 (s, 6H).

[0164] 상기 제조 방법을 통해 하기 화학식 5의 FIra 이리듐 복합체를 제조하였다.

[0166] [화학식 5]



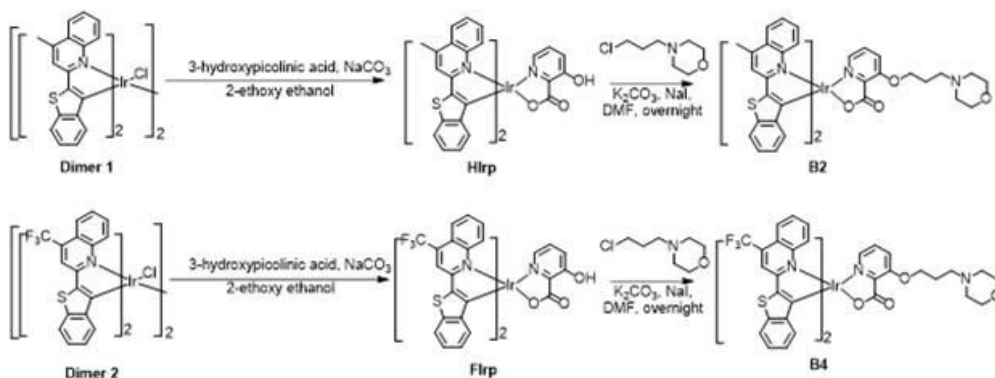
[0167]

[0169] 비교예 3. FIrp 이리듐 복합체의 제조

[0170] FIrp

[0171] Dimer2 (450 mg, 0.254 mmol)과 hydroxyl picolinic acid (106.14 mg, 0.763 mmol), sodium carbonate (269.61 mg, 2.544 mmol)을 넣고 ethoxy ethanol 30 mL에 용해시킨다. 밤새도록 환류하여 반응을 보낸다. Ethyl acetate로 반응물을 추출하고 컬럼 크로마토 그래피를 통해 정제한다 (eluent: DCM).

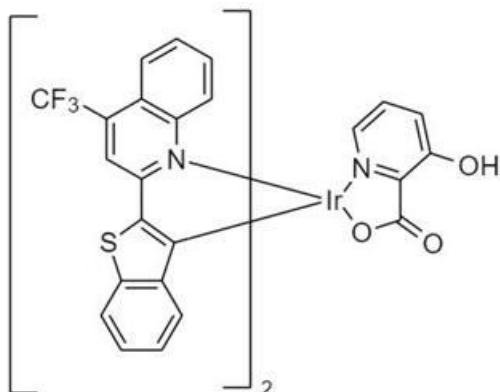
[0172] [반응식 3]



[0173]

[0175] 상기 제조 방법을 통해 하기 화학식 6의 FIrp 이리듐 복합체를 제조하였다.

[0177] [화학식 6]



[0178]

[0180] 비교예 4. B2 이리듐 복합체의 제조

[0181] HIrp

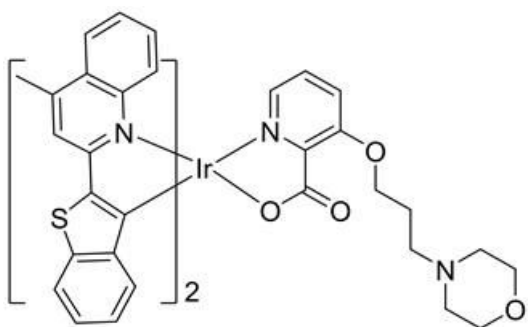
[0182] 1 당량의 Dimer1 과 3 당량의 hydroxyl picolinic acid, 10 당량의 sodium carbonate을 넣고 ethoxy ethanol 30 mL에 용해시킨다. 밤새도록 환류하여 반응을 보낸다. Ethyl acetate로 반응물을 추출하고 컬럼 크로마토 그래피를 통해 정제한다 (eluent: DCM).

[0183] B2

[0184] 1 당량의 HIrp와 2.2 당량의 K_2CO_3 의 혼합물을 질소 기체 분위기 하에서 탈기화된 건조한 DMF에 용해시킨 후, 실온에서 30분간 교반하였다. DMF에 용해된 1.5 당량의 나트륨 아이오딘화물 과 1.5 당량의 4-(3-chloropropyl)morpholine 을 반응 혼합물에 주입하고, 이어서 밤새 환류시켰다. 원료 제품은 에틸아세테이트로 추출하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다 (용매조건: 디클로로메탄/메탄올 = 10:1 부피비).

[0185] 상기 제조 방법을 통해 하기 화학식 7의 B2 이리듐 복합체를 제조하였다.

[0187] [화학식 7]

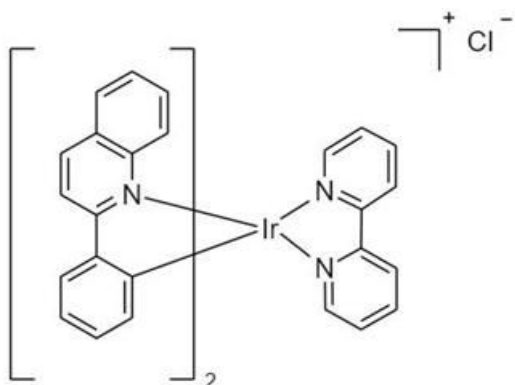


[0188]

[0190] 비교예 5. TlIr3 이리듐 복합체의 제조

[0191] 2 당량의 $IrCl_3 \cdot nH_2O$ (Strem Chemicals, USA)와 4 당량의 C^N 리간드 (C^N Ligand 2pq: Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 염소로 연결된 이리듐 이합체 (중간체 착물)를 제조하였다. 디클로로메탄(dichloromethane, DCM: 삼전화학, 한국)과 메탄올 (MeOH: 삼전화학, 한국)의 혼합 용매 (DCM:MeOH = 1:1 부피비)에 상기 제조된 염소로 연결된 이리듐 이합체 1 당량과 2,2'-바이피리딘 (Sigma Aldrich, USA) 2 당량을 용해시킨 후, 불활성 기체인 N_2 분위기에서 12 시간 동안 환류 반응시켰다. 그 후 DCM과 헥세인 (n-hexane: 삼전화학, 한국)을 이용하여 석출을 하였으며, 헥세인을 이용한 추가적인 세척 과정을 통해 화학식 8의 TlIr3 이리듐 복합체를 제조하였다.

[0193] [화학식 8]



[0194]

[0196] 실험예 1. 이리듐 복합체 전하에 따른 세포 내 축적률 비교 실험

[0197] HeLa 세포를 60 π 세포 배양용 접시에 파종한 후 70-80% 정도로 성장하도록 배양하였다. 이러한 세포들에게는 10 μM의 각 이리듐 복합체가 함유된 DMEM이 처리되었으며, 이 처리는 2시간 동안 이루어졌다. 그 후 따뜻한 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세 번 행군 뒤, 트립신을 이용하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포 (1 mL)의 개수를 세아린 후 유리 용기로 옮겼으며, 이후 세포 용액에 65% HNO₃ (TraceMetal™ Grade, Thermo Fisher) 1 mL를 추가하여 90 ° C에서 1시간 동안 가열하였다. 소화된 용액은 초순수물 (4 mL)로 희석하고, 이후 유도 결합 플라즈마-광전자분광법 (ICP-OES) (700-ES, Varian Inc.)를 이용하여 이리듐 원소의 양을 분석하였다.

[0198] 결과를 바탕으로 한 세포당 함유한 이리듐 원소의 농도를 계산함으로써 세포 내 축적률을 비교하였다.

[0200] 도 3a는 Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) 분석법을 이용해 얻은 이리듐 복합체 실시예 2(FIrb) 및 비교예 2(FIra)의 전하에 따른 세포 내 축적률 변화를 나타내는 그래프이고, 도 3b는 공초점 현미경을 통해 얻은 실시예 1(HIrb) 이리듐 복합체의 세포 내 시그널(green)과 미토콘드리아 트래커 (Mitotracker, red) 시그널의 병합에 관한 세포 이미지이다.

[0202] 음전하를 띠는 세포막 인지질 층으로 인해 약물이 양전하를 띠면 세포 내 축적률을 높일 수 있다. 본 발명의 이리듐 복합체는 부리간드로 바이피리딘(bipyridine)을 채택하여 이리듐 복합체에 양전하를 형성하는 방법을 통해, 부리간드로 아세틸아세톤(acetyl acetone) 또는 피콜린산(picolinic acid) 등을 사용하여 전하를 띠지 않는 이리듐 복합체에 비해 높은 세포 내 축적률을 확보하였다.

[0204] 구체적으로 미토콘드리아 내부의 강한 음전압으로 인해 지용성 양이온들은 혈장 및 미토콘드리아 막을 쉽게 통과하며 미토콘드리아 내부에 직접적으로 섭취된다. 이에 양전하를 가진 본 발명의 이리듐 복합체가 미토콘드리아에 정전기적 인력으로 인해 많은 양이 축적되는 것을 확인하였다(도 3b).

[0206] 실험예 2. 활성산소 생성 능력 비교 실험

[0207] 도 4a는 빛 (0.25 sun, 25 mW/cm²) 조사 시간에 따른 일중향 산소 (singlet oxygen, ¹O₂) 생성량에 따른 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA)의 흡광 변화에 관한 그래프이다. 100mM의 ABDA 고용량 용액을 4 μM의 이리듐 복합체 용액에 투여하여 최종 농도가 100 μM ABDA와 4 μM 이리듐 복합체인 시료를 만들었다. 준비된 시료들은 1 sun, 25 mW/cm²에 의해 0, 2.5, 7.5, 및 15분간 조사되었으며, 384 nm에서 ABDA 흡

광도는 마이크로플레이트 판독기를 통해 측정되었다. 도 4b는 Dihydrorhodamine 123(DHR123) 형광 물질의 Type I 활성산소에 반응하여 증가하는 형광 세기 (빛 조건: 1 sun, 100 mW/cm², 60 s)를 나타내는 그래프이다. DHR 123 고용량 용액 (4 mM)을 4 μM 이리듐 복합체 용액과 1000:1 부피 비율로 혼합하여 최종 농도가 4 μM TlR3와 DHR 123인 시료를 얻었다. 각각의 시료는 1 sun, 100 mW/cm²에 의해 0 및 10 분간 조사되었으며, 로다민 123로부터의 녹색 형광은 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 각 시료마다 기록되었다 (λ (흡수) = 507 nm 및 λ (발광) = 529 nm). 도 4c는 빛 조사 (0.25 sun, 25 mW/cm², 1 min) 유무에 따른 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, 세포 내 Type I 활성산소 표지자)의 세포 내 형광 분석을 나타내는 이미지이다. 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA)는 살아있는 세포 내에서 작용하는 ROS 지시체이다. 세포의 혼잡도가 60%에 도달할 때까지 공초점 현미경용 접시에 배양한 후, 4 μM의 이리듐 복합체로 2시간 동안 처리하였다. DPBS로 여러 차례 세척한 후 HeLa 세포는 10 μM DCFH-DA를 함유하는 DMEM으로 30분간 처리되었다. 그 후 세포들은 각 이리듐 복합체의 흡광영역에 해당하는 LED 어레이가 방출하는 광선에 노출되었고, 활성화된 DCFH-DA의 형광은 LSM780 멀티포톤 Confocal 현미경을 통해 기록되었으며, 세포들의 형광 강도 적분값은 Zen blue 소프트웨어를 사용하여 감지되었다.

[0209] 이를 통해 부리간드로 바이피리딘을 가지는 본 발명의 실시예 1 및 2의 이리듐 복합체들(Hlrb, Flrb)이 비교예 1 내지 3의 이리듐 복합체들(Hlra, Flra, Flrp)에 비하여 높은 활성 산소 생성 능력을 보임을 확인할 수 있다.

[0211] 실험예 3. 암세포 사멸 능력 비교 실험

[0212] 96구 플레이트에 1.5×10^4 개의 세포를 파종한 후, 37° C, 5% 이산화탄소 조건에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그 후, 세포에 이리듐 복합체를 처리하고, 2시간 동안 배양한 후 배지를 신선한 배지로 교체하였다. 세포는 1 sun 시뮬레이터 (100 mW/cm², PEG-L01, Pecell)로 30초 동안 조사된 후, 추가적으로 37° C에서 5% 이산화탄소를 함유하는 보습 환경의 배양기에서 24시간 동안 추가 배양하였다. 세포의 생존율은 MTT (테트라졸리움 염 (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드)) 분석법을 사용하여 측정되었다. 각 구에 MTT 시약을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후 생존한 세포에서 생성된 포르마잔 결정을 DMSO로 용해시키고 흡광도를 570 nm에서 측정하였다.

[0214] 이러한 실험을 통해, 본 발명의 실시예 1 및 2와 비교예 1 내지 3의 이리듐 복합체의 동일 빛 조건에서의 IC₅₀ 값(빛 조건: 1 sun, 3 J/cm²)은 하기 표 1과 같다. 이때, 상기 IC₅₀ 값은 단일 약물로 암세포에 광역동 치료를 실시하였을 때 50%의 암세포가 사멸하는 농도를 의미한다.

표 1

	실시예 1 Hlrb	실시예 2 Flrb	비교예 1 Hlra	비교예 2 Flra	비교예 3 Flrp
A549	0.16±0.00	0.98±0.05	>32	>32	>32
HeLa	0.22±0.02	0.85±0.23	>32	>32	>32
PANC-1	0.99±0.07	0.53±0.04	>32	>32	>32

[0218] 암세포 내 축적률이 높고 활성산소 생성 능력 또한 뛰어난 실시예 1 및 2의 이리듐 복합체들은 비교예 1 내지 3의 이리듐 복합체들 대비 같은 조도(light intensity) 및 동일 약물 농도에서 암세포 사멸 효율에 극명한 차이를 보였다.

[0220] 비교예 1 내지 3의 이리듐 복합체의 경우 32 μM 농도에서도 100%의 세포 생존률을 보이는(암세포 사멸효율이 0

에 가까움) 반면, 실시예 1(HIrb)의 이리듐 복합체의 경우 HeLa(자궁경부암)에 대하여 $0.22 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 에서도 암세포가 50% 사멸하는 것을 확인하였고, FIrb의 경우 $0.51 \pm 0.30 \mu\text{M}$ 에서 IC_{50} 값을 보임을 확인하였다.

[0222] 이러한 본 발명의 암세포 사멸에 관한 효과는 HeLa(자궁경부암) 뿐만 아니라 A549(폐암) 및 PANC-1(췌장암)에서도 일관된 경향성을 보임을 확인하였다.

[0224] 실험예 4. 이리듐 복합체 간 시너지 효과 실험

[0225] 시너지 효과를 확인하기 위해서 ‘Frontiers in bioscience (Elite edition), 2010, 2(1), 241-249’ 선행연구에서 제시된 식을 사용하여 약물의 효과 농도를 비교하였다(수학식 1).

[0227] [수학식 1]

$$\text{IC}_{50} \text{ Equiv.} = \frac{\text{Conc. (A)}}{\text{IC}_{50}(\text{A})} + \frac{\text{Conc. (B)}}{\text{IC}_{50}(\text{B})}$$

[0228]

[0230] HIrb, B2 및 TIr3 이리듐 복합체가 각각의 광감각제로 투여된 암세포에 대해 동일한 빛(1 sun , 3 J/cm^2)을 조사했을 때 각각의 광감각제에 대한 IC_{50} 값을 먼저 계산한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0232]

	<i>hv</i> -			<i>hv</i> +		
	실시예 1 HIrb	비교예 4 B2	비교예 5 TIr3	실시예 1 HIrb	비교예 4 B2	비교예 5 TIr3
A549	13.35 ± 1.65	>32	19.76 ± 1.99	0.16 ± 0.00	3.80 ± 1.30	3.12 ± 0.20
HeLa	10.14 ± 1.84	>32	8.77 ± 0.73	0.22 ± 0.02	2.40 ± 0.08	1.53 ± 0.07
MDA-MB-231	11.57 ± 0.64	>32	7.51 ± 0.84	0.11 ± 0.04	0.89 ± 0.10	0.89 ± 0.02
PANC-1	26.31 ± 2.81	>32	10.69 ± 0.39	0.99 ± 0.07	11.72 ± 2.02	3.86 ± 0.18
Caco-2	9.23 ± 0.16	>32	7.88 ± 0.13	0.12 ± 0.03	0.68 ± 0.01	0.89 ± 0.09
MKN45	17.54 ± 2.69	>32	16.30 ± 0.17	0.40 ± 0.12	0.86 ± 0.03	0.55 ± 0.06

[0233] 이후 IC_{50} 비율에 맞춰 시너지 효과를 확인하고자 하는 두 약물을 섞어주고 암세포에 투여하였다. (구체적 실험 방법: 96구 플레이트에 1.5×10^4 개의 세포를 파종한 후, 37°C , 5% 이산화탄소 조건에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그 후, 세포에 이리듐 복합체 조합을 처리하고, 2시간 동안 배양한 후 배지를 신선한 배지로 교체하였다. 세포는 1 sun 시뮬레이터 (100 mW/cm^2 , PEG-L01, Peccell)로 30초 동안 조사된 후, 추가적으로 37°C 에서 5% 이산화탄소를 함유하는 보습 환경의 배양기에서 24시간 동안 추가 배양하였다. 세포의 생존율은 MTT (테트라졸리움 염 (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드)) 분석법을 사용하여 측정되었다. 각 구에 MTT 시약을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후 포르마잔 결정을 DMSO로 용해시키고 흡광도를 570 nm 에서 측정하였다.)

[0235] 이 과정에서 이리듐 복합체 조합 간의 약물의 농도는 μM 의 단위가 아닌 IC_{50} 값의 상대값인 $\text{IC}_{50} \text{ equivalent}$ 로 표현하였다(수학식 1 및 도 5). 이때 두 약물의 조합의 $\text{IC}_{50} \text{ equivalent}$ 값이 단일 약물 ($\text{IC}_{50} \text{ equivalent} = 1$) 조건 보다 낮게 나온다면 이 조합의 경우 시너지 작용 관계가 있다고 설명할 수 있고(도 5a 및 5b), IC_{50}

equivalent 값이 크다면 길항 작용 관계라고 표현할 수 있다(도 5c 및 5d).

[0237] 이상과 같이 더 높은 암세포 사멸 효율을 확보하기 위해 HIRb 이리듐 복합체와 시너지 효과를 낼 수 있는 조건을 모니터링 하였으며, 이러한 실험 결과를 도 5a 내지 5e에 나타내었다. 구체적으로, 도 5a 내지 5d는 수학적 1로 계산한 IC₅₀ equivalent 값에 따른 세포 생존율을 나타낸 것으로, HeLa 자궁경부암 세포주에 HIRb 및 리소좀 타겟 이리듐 복합체인 B2의 조합을 투여한 경우(도 5a), HIRb 및 소포체 타겟 이리듐 복합체인 TIR3의 조합을 투여한 경우(도 5b), A549 폐암 세포주에 HIRb 및 B2의 조합을 투여한 경우(도 5c), HIRb 및 TIR3의 조합을 투여한 경우(도 5d)를 그래프로 나타내었다. 또한 다양한 암세포주 (MDA-MB-231, 유방암; A549, 폐암; HeLa, 자궁경부암; Caco-2, 대장암; PANC-1, 췌장암; MKN45, 위암)에 대한 각각의 조합 (B2+TIR3, HIRb+B2, HIRb+TIR3)의 시너지증 정도를 도 5e에 도식화 하였다.

[0239] 그 결과, 리소좀과 소포체를 각각 타겟하는 이리듐 복합체 B2 및 TIR3에 비해 높은 광역동 치료 효율을 보이는 이리듐 복합체 HIRb는 자궁경부암인 HeLa 세포주에서 상기 B2 및 TIR3 각각의 조합에서 시너지 효과를 보여주었다(도 5a 및 5b).

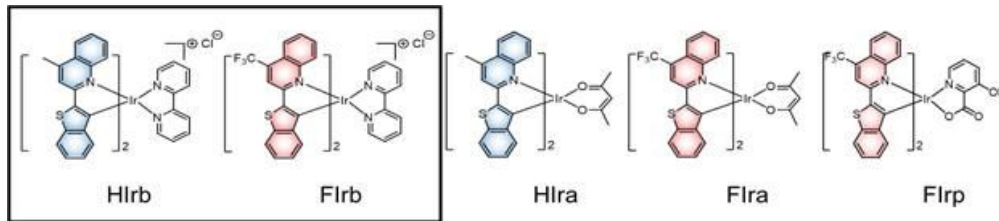
[0241] 시너지 효과가 있는 약물 조합은 자체 독성이 있는 광감각제에 대해 매우 의미가 있다. 이는 같은 효율의 광역동 치료 효과를 위해서 필요한 독성 광감각제의 양이 절반 이하로 감소될 수 있음을 의미하기 때문이다. 따라서 상기 표 2에서와 같이 HeLa 세포주에 대해 약 10 μ M의 IC_{50, dark}를 보이던 독성 HIRb가 32 μ M까지 무독한 광감각제인 B2와 시너지 효과를 보이는 것은 HIRb의 높은 암세포 치료 효율은 보존하면서 필요한 약물의 양을 줄여 궁극적으로는 환자의 신체 부담을 줄이는 치료법의 발견이라고 볼 수 있다.

[0243] 또한, 이리듐 복합체 자체 독성에 관한 실험 결과를 도 6에 나타내었다. 자체 독성을 의미하는 데이터는 빛을 주지 않은 조건 (hv-)에서의 세포 생존율을 통해 확인할 수 있다. 도 6의 실험결과는 모두 빛을 주지 않은 조건에서의 각각에 대한 세포 생존율을 나타내고 있으며, M은 MDA-MB-231, A는 A549, H는 HeLa, C는 Caco-2, P는 PANC-1의 세포주를 각각 의미한다. 도 6a, 6b 및 6c는 각각의 세포주에 각 물질을 2 시간 투여하고 새로운 미디어로 교체해준 뒤, 24시간 추가 배양하였을 때의 세포 생존율을 의미한다. 도 6d의 경우, 췌장암 세포인 PANC-1에 TIR3 및 B2를 각각 농도만큼 그리고 두 가지를 섞은 조합 (TIR3+B2)의 농도만큼 투여하였을 때 세포 생존율 그래프이다. 낮은 세포 생존율을 보이는 TIR3에 비해 생체적합성이 우수한 B2와 섞은 조합의 경우 각 농도에서 (특히, 16, 32 μ M) 세포 생존율이 올라간 것을 확인할 수 있다. 도 6e 및 6f는 빛의 조사 유무에 따라 TIR3 단일 조건과 TIR3+B2 조합 조건에서의 세포생존율 변화를 MDA-MB-231 유방암 세포주에서 확인한 결과이다. TIR3+B2 조합에서 유의미한 변화가 관측되는 것을 통해 광감각제의 빛에 의한 독성 ON-OFF를 확보할 수 있어 향후 전임상 실험을 진행할 때, 빛이 도달하지 않은 정상세포와 빛이 도달한 암세포 사이의 세포 생존율 변화를 극대화할 수 있다.

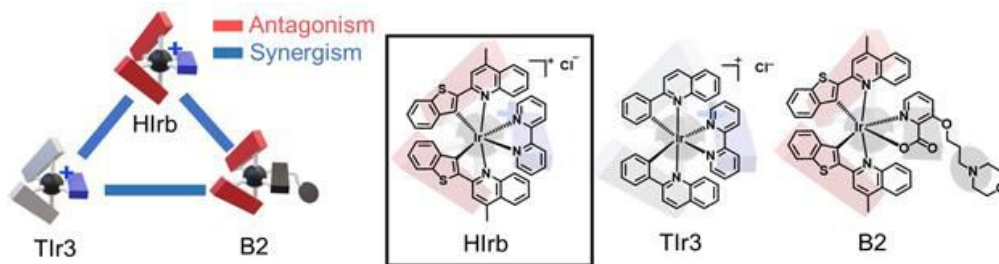
[0245] 이상의 설명은 본 발명을 예시적으로 설명한 것이고, 명세서에 게시된 실시예는 본 발명의 기술사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이므로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 그러므로 본 발명의 보호범위는 청구범위에 기재된 사항에 의해 해석되고, 그와 균등한 범위 내에 있는 기술적 사항도 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

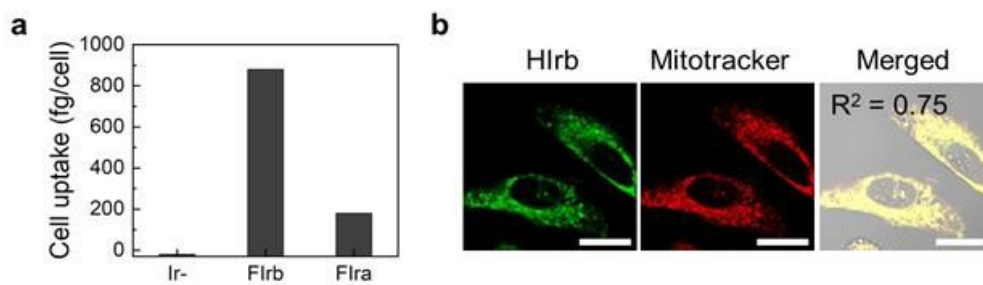
도면1



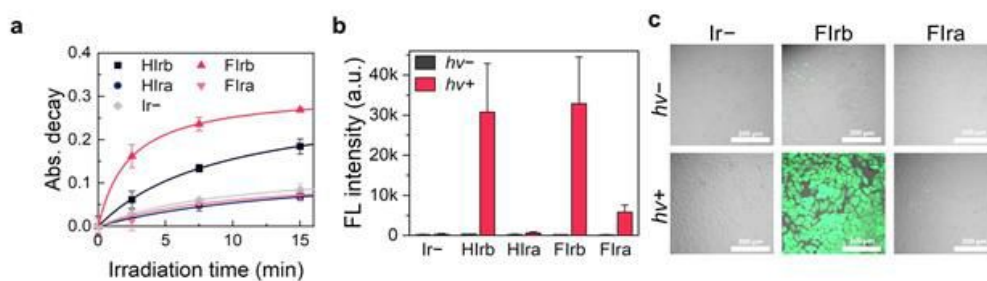
도면2



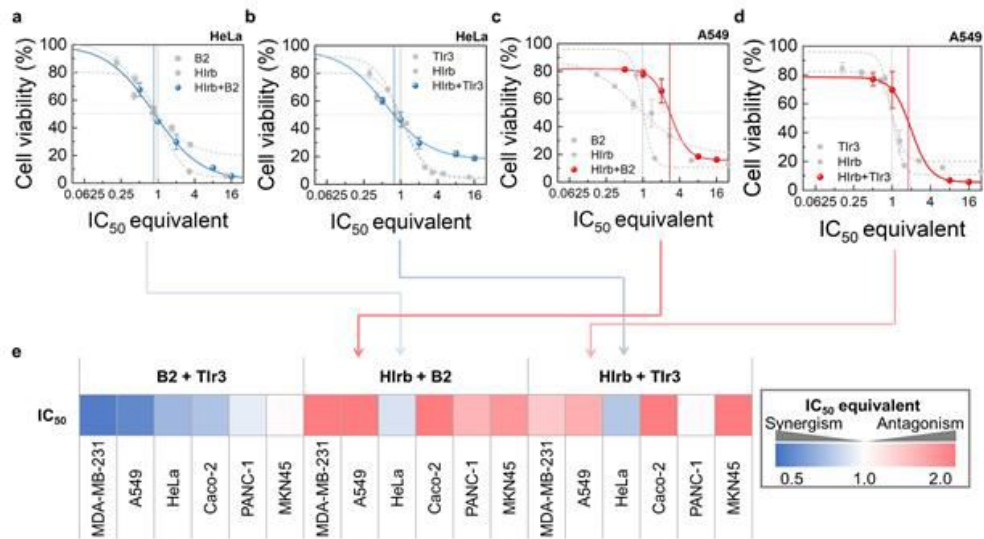
도면3



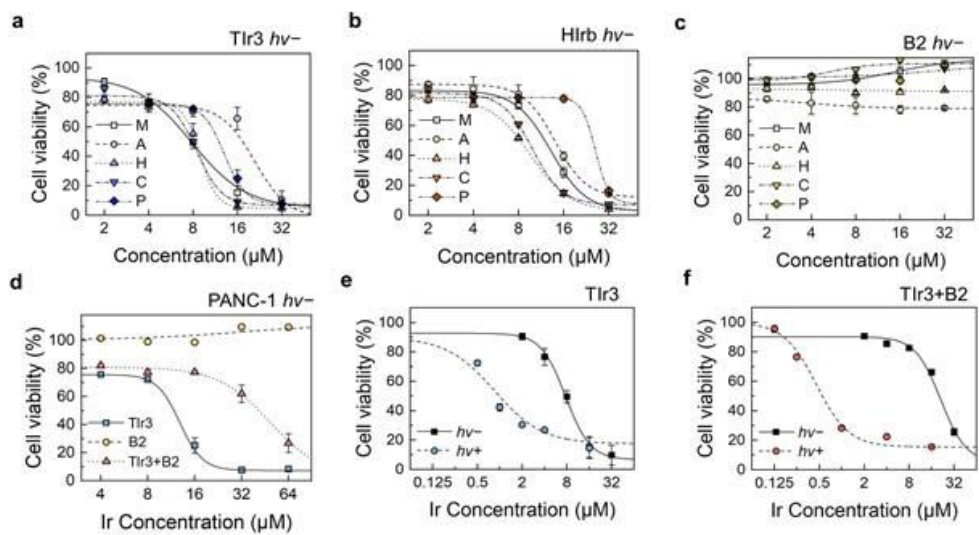
도면4



도면5



도면6



도면7

