



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2021년 2월
석사학위 논문

세포이미징과 광역학치료를 위한 BODIPY 유도체 합성

조선대학교 대학원

화 학 과

문 선 정

세포이미징과 광역학치료를 위한 BODIPY 유도체 합성

Synthesis of BODIPY derivatives
for cell-imaging and photodynamic therapy

2021년 2월 25일

조선대학교 대학원

화 학 과

문 선 정

세포이미징과 광역학치료를 위한 BODIPY 유도체 합성

지도교수 김 호 중

이 논문을 이학석사학위신청 논문으로 제출함.

2020년 10월

조선대학교 대학원

화 학 과

문 선 정

문선정의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 범 규 (인)

위 원 조선대학교 교수 고 문 주 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 호 중 (인)

2020년 11월

조선대학교 대학원

TABLE OF CONTENTS

<u>1. Introduction</u>	1
<u>2. Experiment</u>	5
2.1 Generals	5
2.2 Synthesis	6
2.2.1 Synthesis of compound 1	10
2.2.2 Synthesis of compound 2	10
2.2.3 Synthesis of compound 3 and 5	10
2.2.4 Synthesis of compound 4,6 and 8	11
2.2.5 Synthesis of compound 7	11
2.2.6 Synthesis of M-BODIPY 1	11
2.2.7 Synthesis of M-BODIPY 2	12
2.2.8 Synthesis of M-BODIPY 3	12
<u>3. Results and Discussion</u>	13
3.1 Measurements	13
3.2 Synthesis and Characterization	13
3.3 UV-vis/UV-PL	15
3.4 NMR	19
3.5 Mass spectrometry(MS)	28
3.6 Cell-imaging	32
<u>4. Conclusion</u>	33
<u>5. Reference</u>	35

LIST OF TABLES

Table 1. M-BODIPY 1의 흡수 및 방출 파장	16
Table 2. M-BODIPY 2의 흡수 및 방출 파장	17
Table 3. M-BODIPY 3의 흡수 및 방출 파장	18

LIST OF SCHEMES

Scheme 1. Synthesis of compound 1	6
Scheme 2. Synthesis of compound 2	6
Scheme 3. Synthesis of compound 3,4 & M-BODIPY 1	7
Scheme 4. Synthesis of compound 5,6 & M-BODIPY 2	8
Scheme 5. Synthesis of compound 7,8 & M-BODIPY 3	9

LIST OF FIGURE

Figure 1. 광역학치료법의 작용 원리	4
Figure 2. 미토콘드리아 막 전위	4
Figure 3. M-BODIPY 1에 UV를 조사하였을 때 용매별 형광 세기	15
Figure 4. M-BODIPY 2에 UV를 조사하였을 때 용매별 형광 세기	15
Figure 5. M-BODIPY 3에 UV를 조사하였을 때 용매별 형광 세기	15
Figure 6. M-BODIPY 1의 흡수 파장	16
Figure 7. M-BODIPY 1의 방출 파장	16
Figure 8. M-BODIPY 2의 흡수 파장	17
Figure 9. M-BODIPY 2의 방출 파장	17
Figure 10. M-BODIPY 3의 흡수 파장	18
Figure 11. M-BODIPY 3의 방출 파장	18
Figure 12. Compound 1의 ^1H NMR	20
Figure 13. Compound 2의 ^1H NMR	21
Figure 14. M-BODIPY 1의 ^1H NMR	22
Figure 15. M-BODIPY 1의 ^{13}C NMR	23
Figure 16. M-BODIPY 2의 ^1H NMR	24
Figure 17. M-BODIPY 2의 ^{13}C NMR	25
Figure 18. M-BODIPY 3의 ^1H NMR	26
Figure 19. M-BODIPY 3의 ^{13}C NMR	27
Figure 20. M-BODIPY 1의 MS (Range : 50–2000 m/z)	28
Figure 21. M-BODIPY 1의 MS (Range : 1150–1400 m/z)	29
Figure 22. M-BODIPY 2의 MS (Range : 50–2000 m/z)	30
Figure 23. M-BODIPY 2의 MS (Range : 1200–1350 m/z)	30
Figure 24. M-BODIPY 3의 MS (Range : 50–2000 m/z)	31
Figure 25. M-BODIPY 3의 MS (Range : 1300–1550 m/z)	31
Figure 26. 염료를 주입하였을 때 HUH7세포에서의 세포이미징	32
Figure 27. 왼쪽에서부터 M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3	34

ABSTRACT

Synthesis of BODIPY derivatives for cell-imaging and photodynamic therapy

Moon Seon Joung

Advisor : Prof. Kim Ho-Joong, Ph.D.

Department of Chemistry,

Graduate School of Chosun University

Boron-dipyrromethene (BODIPY) and its derivatives are among the most well-known types of fluorescent dyes in the mitochondrial imaging field because they have high fluorescence quantum yield, excellent absorbance coefficients and good photostability. By introducing two halogen atoms, BODIPY derivatives can produce singlet oxygen effectively through the heavy-atom effect, thus serve as efficient photosensitizers (PS) for photodynamic therapy (PDT). PDT is a non-invasive treatment for various cancers. It is a form of phototherapy that involves light activation of the PS to generate reactive oxygen species (ROS) that lead to cell death. However, most BODIPYs are hydrophobic, so applications such as fluorescent imaging in aqueous environments have often been hampered. Therefore, we synthesized water-soluble BODIPY derivatives that show good performance as PDT agents as well as mitochondria-targeting fluorescent probes. As a result, the BODIPY derivatives were water-soluble and showed absorbance in the near-infrared (NIR) region of the spectrum.

1. Introduction

미토콘드리아는 양성자, 곰팡이, 식물, 동물 등 다양한 형태의 생명체를 구성하는 거의 모든 진핵세포에서 발견된다. 세포의 종류에 따라 미토콘드리아의 수는 1개에서 수천 개까지 매우 다양하다. 미토콘드리아가 하는 가장 두드러진 역할은 i) 세포의 adenosine triphosphate(ATP)를 생성시키는 역할 ii) 세포대사를 조절하는 역할이다.[1] 미토콘드리아는 에너지를 공급하는 것 외에도 다른 기능을 가지고 있으며 생리학적으로 중요한 많은 일에 참여하는데 칼슘조절, 신진대사, 세포확산과 세포주기 조절 등을 포함하는 필수적인 세포 과정에서 중요한 역할을 한다.[1,2] 생명을 유지하는데 중요한 역할을 하기 때문에 미토콘드리아의 손상과 기능장애는 종종 심각한 질병으로 이어진다. 형광 염료로 이미징된 미토콘드리아는 질병을 빠르게 진단하는 데에 유용한 정보를 제공하기 때문에 최근에 많은 사람들에게 관심 대상이 되고 있다. 미토콘드리아를 이미징하는 형광 염료에는 Rhodamine, F16, MTR, MTG 등과 같은 다양한 유기염료가 있다.[1-3] 하지만, 이들 염료들이 미토콘드리아를 선택적으로 이미징하기 위해서는 다양한 방식으로 염료의 분자구조 변형이 필요하였고, 우수한 광안정성과 생체적합성 역시 염료의 필수적인 특성이다.[4] 따라서, 많은 연구자들이 앞서 언급한 문제들을 해결한 효율적인 미토콘드리아-표적지향성 형광 탐침들을 의해 개발해 왔다. 다음과 같은 기능들은 미토콘드리아를 선택적으로 이미징하기 위해 형광 탐침들이 가져야 할 특성들이다. (1) 미토콘드리아에 대한 선택적 표적지향성 (2) 세포 환경에서의 생물학적 안정성 (3) 물에 대한 높은 용해성 (4) 수용성 매체에서의 우수한 형광 양자 수율 (5) 우수한 세포막 투과성.[1,5] 미토콘드리아에 선택적으로 결합할 수 있는 효과적인 형광 탐침의 개발은 그들의 위치, 움직임, 그리고 심지어 생물학적 반응에 대한 관찰을 가능하게 하므로 매우 중요하다. 미토콘드리아의 외막은 음이온을 띄고 있기 때문에 이미징하기 위해서는 양이온의 염료를 개발하는 것 또한 중요하다.(Fig 2.)[6]

형광 염료가 생리활성 분석과 생체이미징 분야에서 가장 중요한 도구 중

하나라는 것은 널리 알려져 있다.[7] 특히, 형광 염료로는 미토콘드리아의 수 및 형태 변화를 쉽게 감지할 수 있다. 세포이미징을 위해 사용되는 많은 형광 염료 중 하나로 boron-dipyrromethene(BODIPY) 유도체들이 있다. BODIPY 분자는 dipyrromethene group $C_9H_7N_2$ 에 boron difluoride group BF_2 가 결합되어있다. International Union of Pure and Applied Chemistry(IUPAC) 명명법으로는 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaz-indacene이며, BODIPY 유도체들은 높은 형광 효율과 흡광계수를 가지며 광안정성이 좋기 때문에 세포이미징 분야에서 많이 사용되고 있다.[2,8] 하지만 BODIPY 유도체의 대부분은 물이 아닌 유기용매에서 용해도가 좋기 때문에 수용성 환경에서 수행되는 형광 이미징에 적용이 쉽지 않았다.[4] 따라서, 세포이미징 염료로써 BODIPY 유도체의 수용성은 필수적인 항목이며, 다양한 수용성 작용기들이 적용되고 있다.

항암 약물요법을 통한 암 치료는 부작용이 많기 때문에 유전자 치료법(gene therapy), 광열치료법(photothermal therapy), 광역학치료법(photodynamic therapy) 등이 연구개발 되고 있다. 광역학치료법은 세 가지 원소(빛, 감광제, 산소)의 상호작용에 의해서 다양한 암을 치료하는 비침습적 치료법이다(Fig 1).[5,9,10] 감광제를 활성화시켜 단일항 산소를 생성하여 세포사멸로 이끄는 reactive oxygen species(ROS)를 발생시키는 것을 기본으로 한다.[11] 따라서 감광제는 암세포 사멸 및 치료의 효율을 결정하는데 중요한 역할을 한다. 감광제가 단일항 산소를 생성하기 위해서 적절한 빛의 파장에 노출되었을 때 활성화된 감광제의 singlet excited state로부터 triplet excited state로의 계간전이(intersystem crossing, ISC)가 일어난다.[12] 이때, 형광은 singlet excited state로부터의 이완을 통해 발생하므로 높은 형광양자수율은 흡수된 에너지의 많은 부분이 excited state에서 triplet state로 교차하지 않는다는 것을 의미하기 때문에 감광제로는 바람직하지 않다.[13] 종양 환경에서 감광제의 종양 선택성과 ROS 생성효율은 가장 중요한 특성이다. BODIPY 유도체는 heavy atom effect를 통하여 계간전이 효율을 증가시켜 단일항 산소 생성을 극대화시킬 수 있다.[14] BODIPY

core에 heavy atoms(예; Br, I 등)을 적절히 연결하면 spin-orbit coupling 이 강화되어 ISC를 촉진한다.[14] Heavy atom인 할로젠 원자들이 도입된 BODIPY 유도체는 효과적으로 단일항 산소를 생성할 수 있으므로 효율적인 감광제 역할을 한다.[12] Haematoporphyrin(HPD)는 최초의 광역학치료제로 개발되어, 많은 종양 분야에 사용되어 왔는데 낮은 형광효율로 인해 세포이미징이 불가능하여 표적에 전달되었는지 확인이 어려운 문제가 있다.[12] Photofrin 같은 포르피린 감광제들은 식도암, 폐암, 방광암 등과 같은 특정 유형의 임상 치료를 위해 승인되었지만 photofrin은 630nm의 적색 조명에 의해 활성화되기 때문에 이 파장의 광자는 몇 밀리미터가 넘는 조직을 관통하지 않아, 피부 종양이나 내시경/섬유 시신경을 통해 도달할 수 있는 종양에만 적합하다.[13] 일정 두께의 피부를 침투하기 위해서는 장파장의 650~800nm의 빛에 반응하는 감광제가 사용되어야 한다. Photofrin의 또 다른 단점은 인체내에서 빠르게 제거되지 않는다는 점이다.[13] 따라서, 클로린과 박테리오클로로린 같은 포르피린 유형, 시아닌 염료, squaraines 그리고 BODIPY와 같은 비포르피린 유형 등 기존의 감광제들보다 효과적인 단일한 소재의 개발은 필수적이다.[5] 또한, Near-infrared(NIR) 빛이 생물조직에 침투할 수 있기 때문에 NIR 영역에서 활성화되는 감광제의 개발은 중요하게 여겨졌다.[15]

본 논문에서는 미토콘드리아에 대해 선택적으로 형광이미징과 광역학치료 기능을 동시에 갖는 친수성의 BODIPY 유도체 3개를 합성하고 분석하였다. 음이온성을 띠는 외막을 갖는 미토콘드리아에 선택적인 인력작용을 갖는 양이온성의 BODIPY형광 염료를 개발하며 광역학치료법을 위한 감광제로 이용하고자 한다(Fig 2). BODIPY core에 bromine을 연결하여 heavy atom effect를 통한 광역학치료 기능을 강화시켰다. 또한, styryl group 연결을 통해 NIR영역에서 흡수가 일어나는 BODIPY 유도체를 합성하였다. BODIPY의 상단과 하단에서는 수용액에 대한 용해도를 높이고 미토콘드리아를 이미징할 수 있도록 각각 양이온성의 trimethylammonium salt와 친수성의 중성 triethylene glycol을 연결하였다. 합성된 BODIPY 분자들을 이용하여 미토콘드리아에 대한 세포

이미징 기능 확인과 분광학적 분석을 수행하였다.

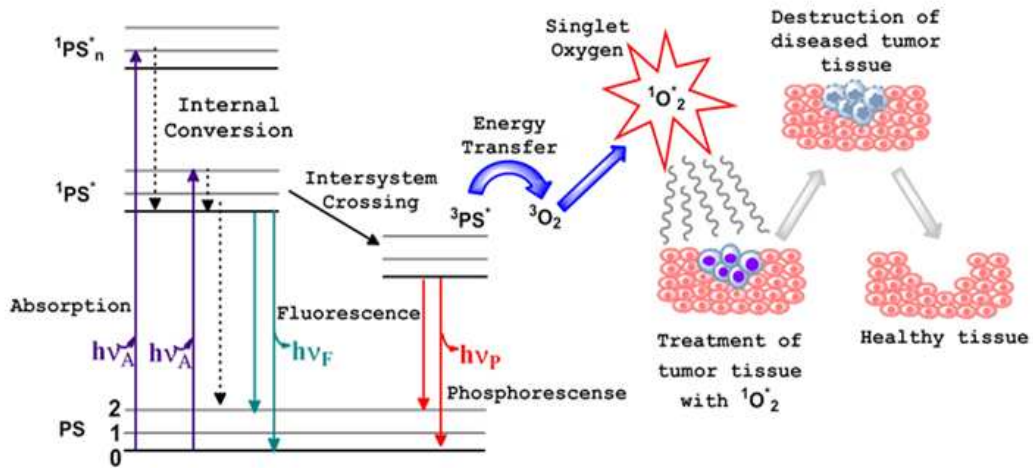


Figure 1. 광역학치료법의 작용 원리(출처: reference[9])

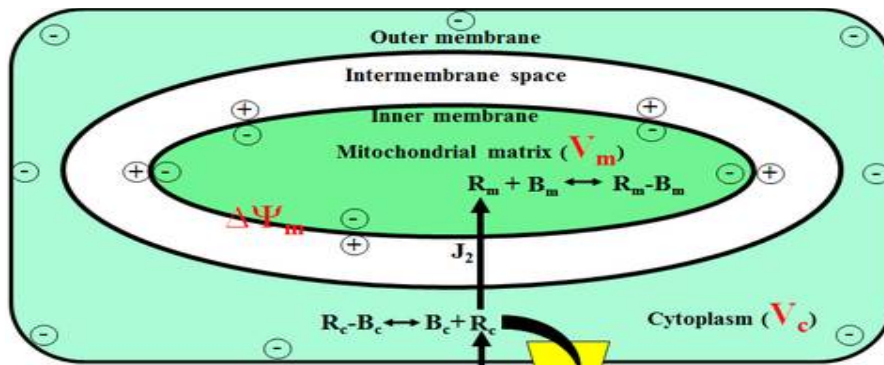


Figure 2. 미토콘드리아 막 전위(출처: reference[6])

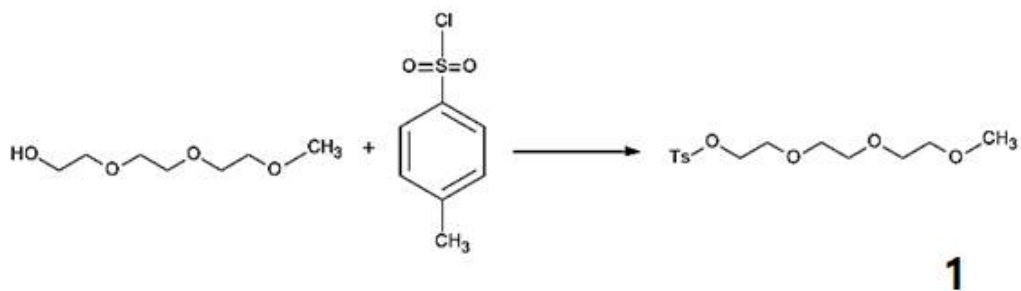
2. Experiment

2.1 Generals

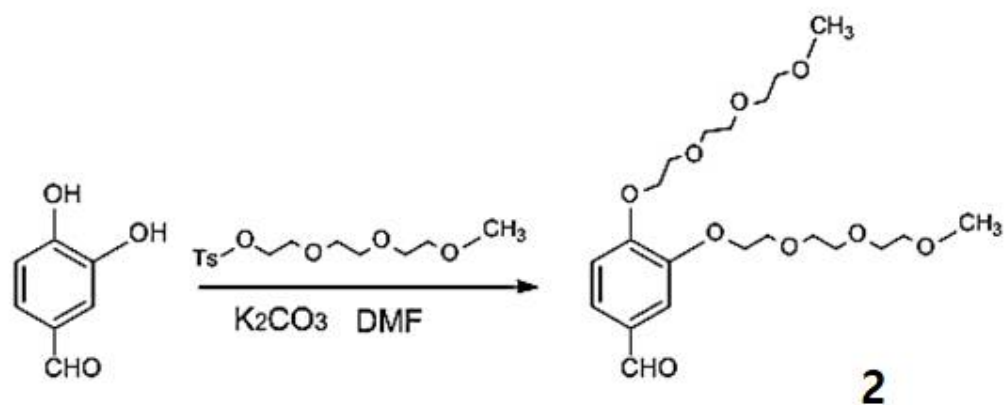
본 실험은 아르곤 기체 하에서 진행되었으며, triethylene glycol monomethyl ether 99.0%, 4-toluenesulfoyl chloride, potassium carbonate (K_2CO_3), Triethylamine, Magnesium sulfate anhydrous, iodomethane 은 DAEJUNG에서 구매하였다. Trifluoroacetic acid, 4-(dimethylamino)-benzaldehyde, Boron trifluoride diethyl etherate, piperidine은 SIGMA ALDRICH에서 구매하였다. 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, 2,4-dimethylpyrrole 97%, 3,4-benzaldehyde는 Alfa Aesar에서 구매하였다.

분자 구조의 Nuclear Magnetic Resonance(NMR) 스펙트럼은 JEOL oxford YH300 spectrometer (1H NMR - 300MHz, ^{13}C NMR - 75MHz)를 이용하여 얻었으며, NMR 용매 chloroform-d 와 methanol-d는 Cambridge Isotope Laboratories, Inc에서 구매했고 정제 없이 사용하였다. NMR peak의 화학적 이동은 part per million (δ ppm)으로 표시하였다.

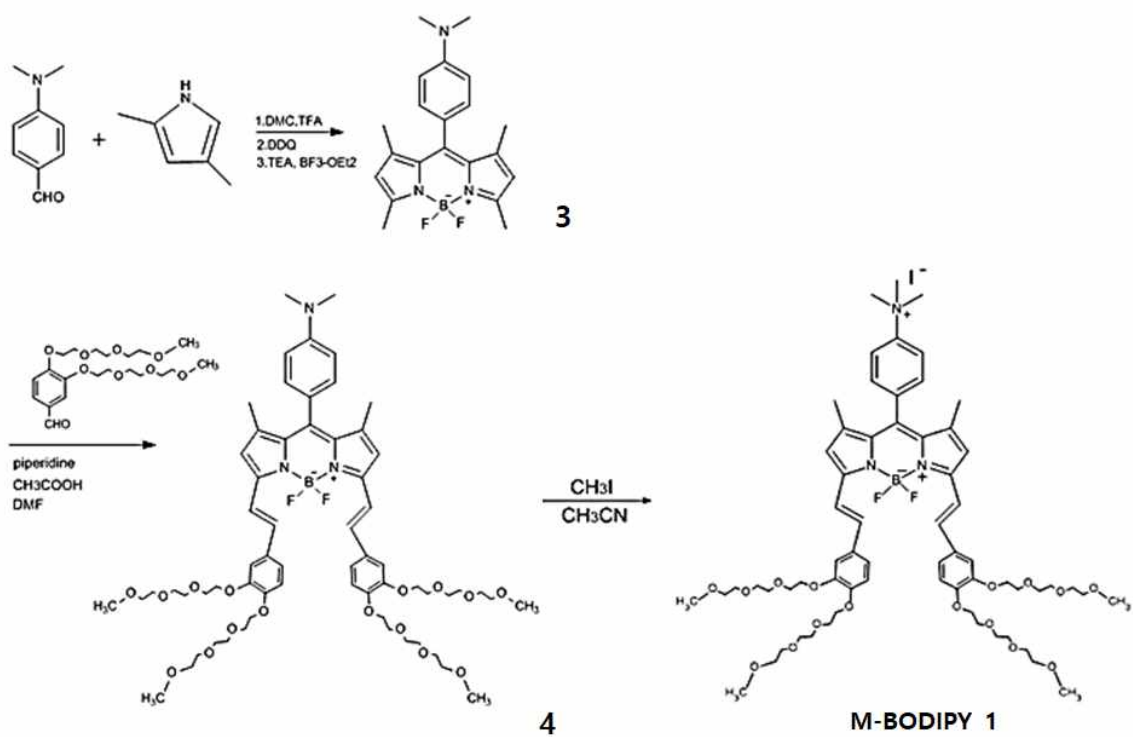
2.2 Synthesis



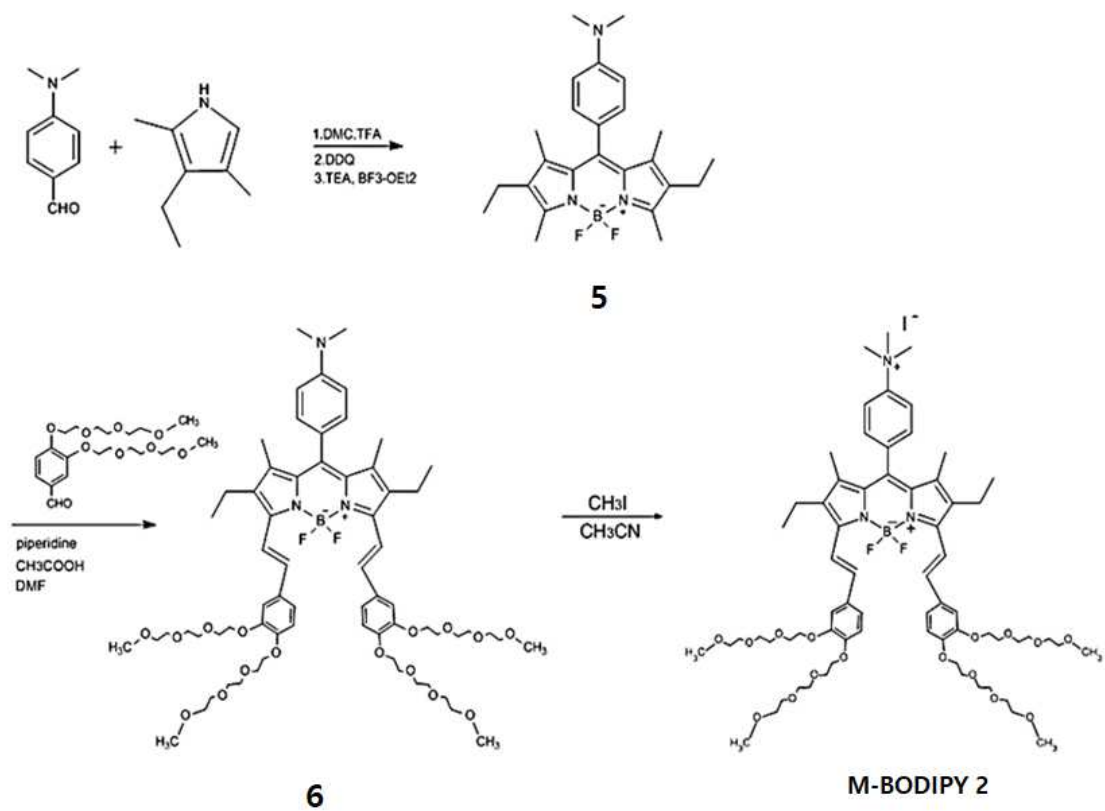
Scheme 1. Synthesis of compound 1



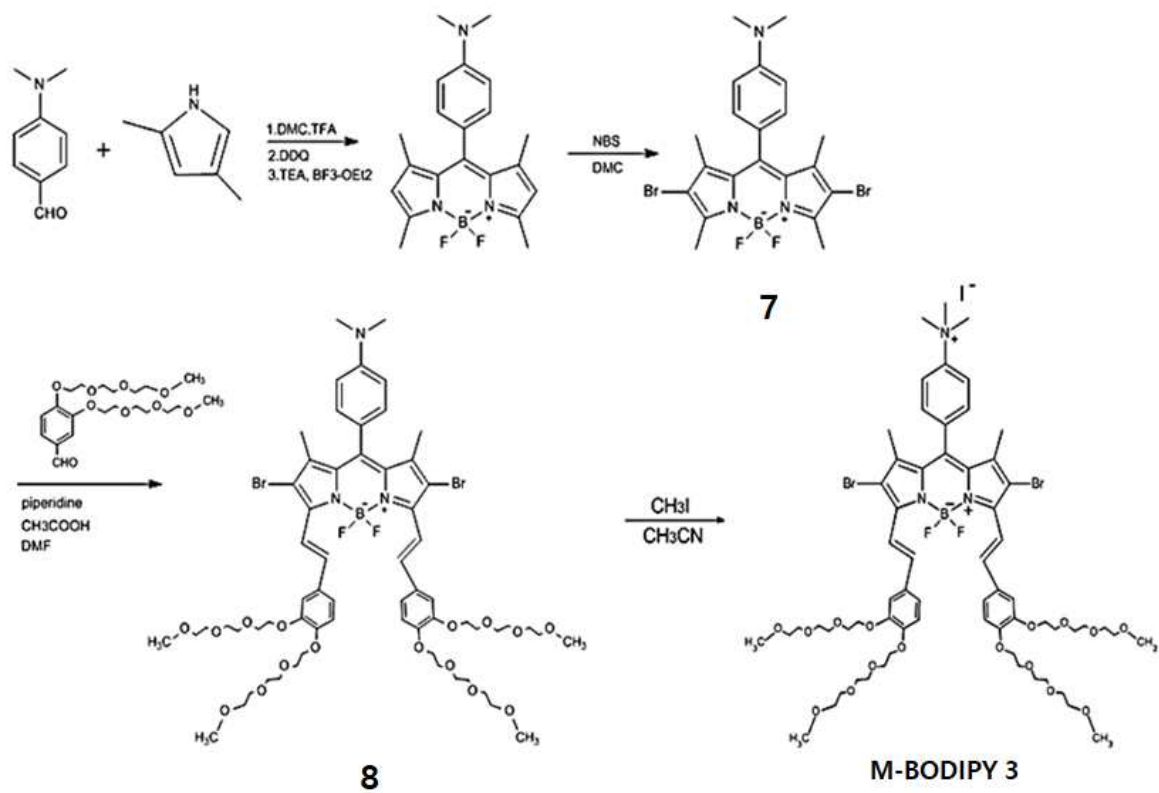
Scheme 2. Synthesis of compound 2



Scheme 3. Synthesis of compound 3,4 & M-BODIPY 1



Scheme 4. Synthesis of compound 5,6 & M-BODIPY 2



Scheme 5. Synthesis of compound 7,8 & M-BODIPY 3

2.2.1 Synthesis of compound 1

아르곤가스 하에 anhydrous pyridine(5mL)에 triethylene glycol monomethyl ether(TEGMME, 5g 0.014mol)을 녹인다. Methylene chloride(MC, 6mL)에 4-toluenesulfonyl chloride(TsCl, 2.996g 0.016mol)을 녹인다. TsCl solution을 TEGMME solution에 한 방울씩 천천히 떨어뜨려 준 후 overnight 동안 상온에서 교반해준다. 반응이 끝난 후 6N HCl 25mL를 넣어서 반응성을 낮춰준다. MC로 추출을 한 번 해주고 2N 50mL로 한 번 더 추출을 해준 후 MC와 H₂O로 3번의 추출을 추가로 해준다. 유기용매인 MC층을 얻어서 MgSO₄로 건조한 후 회전증발기를 이용하여 MC를 증발시켜 투명한 액체를 얻는다.(yield: 86%)

2.2.2 Synthesis of compound 2

아르곤가스 하에 100ml r.b.f에 3,4-dihydroxybenzaldehyde(0.79g 0.00573mol)과 K₂CO₃(3.17g 0.023mol)를 넣은 후 DMF(50mL)로 녹여준다. Compound 1을 넣어준 후 100°C에서 4일 동안 reflux한다. 2M HCl 200mL를 이용해서 추출한 후 MC와 H₂O로 한 번 더 추출한다. MgSO₄를 이용하여 건조한 후 회전증발기를 이용하여 MC를 증발시킨다. TLC 체크 후 Column chromatography (MC:Hx=20:1)을 이용하여 정제하여 노란색 액체를 얻는다.(yield: 33%)

2.2.3 Synthesis of compound 3 and 5

아르곤가스 하에서 MC(150ml)에 2,4-dimethylpyrrole(1.02g 0.0106mol)과 4-(dimethylamino)benzaldehyde(0.79g 0.0053mol)를 녹여준다. 소량의 Trifluoroacetic acid를 넣은 후 overnight 동안 실온에서 교반한다. MC에 녹인 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone(DDQ, 1.20g 0.0053mol)을 주사기를 이용하여 첨가하고 4시간 동안 실온에서 교반한다.

Triethylamine(8mL)를 주사기를 이용하여 천천히 주입하고 1시간 동안 실온에서 교반 후 Boron trifluoride diethyl etherate(BF₃-OEt₂, 9mL)를 ice-bath에서 한 방울씩 천천히 떨어뜨려준다. 첨가 후 ice-bath를 제거하고 실온에서 overnight 동안 교반을 유지한다. 반응이 끝난 후 MC와 H₂O를 이용하여 2번의

추출을 한다. 유기용매인 MC층을 받아서 $MgSO_4$ 로 건조한 후 회전증발기를 이용하여 남아있는 용매를 제거한다. Column Chromatography(MC:Hx=1:2)로 정제하여 주황색의 compound를 얻는다(yield: 18%)

Compound 5은 2,4-dimethylpyrrole 대신 3-ethyl-2,4-dimethylpyrrole을 이용하여 위와 같은 실험방법으로 진행하였다.

2.2.4 Synthesis of compound 4, 6 and 8

아르곤가스 하에 50mL r.b.f에 compound 3(0.1g 0.000272mol)를 DMF(7mL)로 녹여준 후 compound 2(0.41g 0.000952mol)를 넣어 교반한다. CH_3COOH 와 Piperidine을 주사기를 이용해서 각각 0.4mL씩 넣어주고 130°C에서 5시간 동안 reflux한다. Column chromatography (MC:MeOH=35:1)를 이용해서 정제하여 파란색의 compound를 얻는다. (yield: 33.9%)

Compound 6, 8 은 위와 같은 실험방법으로 진행하였다.

2.2.5 Synthesis of compound 7

아르곤가스 하에 compound 3(0.2g 0.54mmol)를 MC에 녹인다. MC에 N-bromosuccinimide(NBS, 0.24g 1.35mmol)를 녹인 solution을 한 방울씩 천천히 떨어뜨린 후 6시간 동안 교반한다. 회전증발기를 이용하여 용매를 제거한 후 column chromatography (MC:Hx=1:1)를 이용하여 정제된 빨간색의 compound를 얻는다.(yield: 88%)

2.2.6 Synthesis of M-BODIPY 1

아르곤 존재 하에 compound 4(0.110g)을 distilled acetonitrile에 녹인 후 1mL의 iodomethane을 넣어준다. 실온에서 overnight 동안 교반한다. 교반이 끝난 후 회전증발기를 이용하여 남아있는 용매를 제거한다. Column chromatography (MC:MeOH=30:1)를 이용하여 정제한다.(yield: 89%)

2.2.7 Synthesis of M-BODIPY 2

아르곤가스 하에 compound 6(0.220g)을 distilled acetonitrile에 녹인 후 1mL의 iodomethane을 넣어준다. 실온에서 overnight 동안 교반 후 회전증발기를 이용하여 남아있는 용매를 제거한다. Column chromatography (MC:MeOH=30:1)를 이용하여 정제한다.(yield: 98%)

2.2.8 Synthesis of M-BODIPY 3

아르곤가스 하에 compound 8(0.0595g)을 distilled acetonitrile에 녹인 후 1mL의 iodomethane을 넣어준다. 실온에서 overnight동안 교반 후 회전증발기를 이용하여 남아있는 용매를 제거한다. Column chromatography (MC:MeOH=30:1)를 이용하여 정제한다.(yield: 94%)

3. Results and Discussion

3.1 Measurements

^1H NMR과 ^{13}C NMR 데이터는 JEOL oxford YH300-300MHz spectrometer를 통해 얻었다. Mass spectrometry(MS)는 한국기초과학지원연구원 최정훈 담당자가 기기 SYNAPT G2(Waters, U.K)를 이용해서 측정하였다.

3.2 Synthesis and Characterization

BODIPY를 핵심 core로 하여 미토콘드리아-표적지향성의 광역학치료 작용을 하는 3개의 화합물 M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3를 합성하였다. BODIPY core 양쪽에 H 원자 2개가 포함된 BODIPY 유도체 M-BODIPY 1, ethyl 2개가 포함된 M-BODIPY 2, Br 원자 2개가 포함된 M-BODIPY 3으로 명명하였다. M-BODIPY 분자들의 수용성을 증가시키기 위해 하단에 친수성의 triethylene glycol을 4개씩 연결하였다. 또한, 추가적인 용해도 증가 및 미토콘드리아에 대한 표적지향성을 높이기 위해 BODIPY 상단에 양이온성인 4차암모늄을 도입하였다.

Triethylene glycol monomethyl ether와 4-toluenesulfonyl chloride를 1:1.1 비율로 tosylation 반응을 통해 compound 1을 합성하였다. Compound 1과 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 친핵성 치환반응을 통해 compound 2를 얻었다. NIR 영역에서 흡수가 일어나도록 하기 위해 compound 3과 compound 2를, compound 5과 compound 2를, compound 7과 compound 2를 Knoevenagel반응을 하여 각각 compound 4, 6, 그리고 8을 합성하였다. 최종적으로, compound 4, 6, 그리고 8을 각각 iodomethane과의 methylation 반응을 통해 양이온성의 4차 암모늄 염을 생성하여 미토콘드리아 이미징을 할 수 있는 최종결과물 M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3을 얻었다.

얻어진 화합물은 ^1H NMR Spectroscopy와 ^{13}C NMR Spectroscopy로 반응 여부를 확인하였고 M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3 모두 H_2O 에 녹는 것을 확인하였

다. 또한 UV-vis/UV-PL 측정 결과 NIR 부근에서 흡수 및 방출이 일어나는 것을 확인하였다.

M-BODIPY 3은 광역학치료 감광제로 이용하기 위해 BODIPY core에 Br 원자 2개를 포함시켰으며 heavy atom effect를 보일 것으로 생각된다. M-BODIPY 2의 BODIPY core는 ethyl기를 포함하고 있어서 M-BODIPY 1과 M-BODIPY 3 사이의 형광 효율과 광역학치료 능력을 보일 것으로 예측된다.

3.3 UV-vis / UV-PL

UV lamp는 TN-4LC를 이용하였으며 시료 농도는 $10\ \mu\text{M}$ 로 측정하였다. 아래의 사진은 각각 MC, THF, ACN, MeOH, H_2O 각각 용매에 염료를 녹였을 때 모습이다. UV를 조사하였을 때 red emission 하는 것을 알 수 있다. 또한 H_2O 의 환경에서는 quenching 되어 형광이 약해진 것을 확인할 수 있다. UV-vis/UV-PL 측정 결과를 보면 650nm 이상의 흡수파장을 보이고 있다. 이는 피부에 침투하기 쉬운 파장인 650nm~800nm에서 흡수가 일어나기 때문에 적절하게 이용 가능하다는 것을 나타내고 있다. 다른 유기 용매는 emission wavelength intensity가 높기 때문에 excited wavelength가 overlap되어 나타나지 않지만 H_2O 의 경우에는 emission wavelength intensity가 낮기 때문에 excited wavelength가 측정되어 그래프에 나타났다.



Figure 3. M-BODIPY 1에 UV를 조사하였을 때 용매별 형광 세기



Figure 4. M-BODIPY 2에 UV를 조사하였을 때 용매별 형광 세기



Figure 5. M-BODIPY 3에 UV를 조사하였을 때 용매별 형광 세기

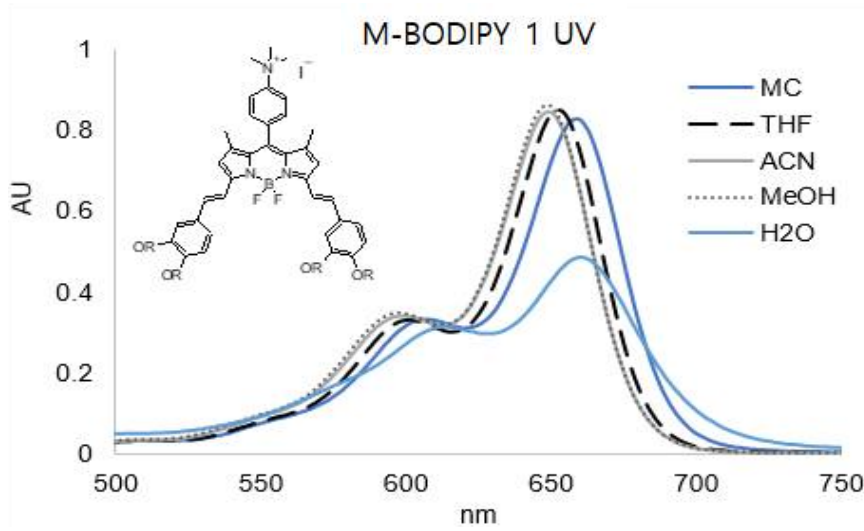


Figure 6. M-BODIPY 1의 흡수 파장

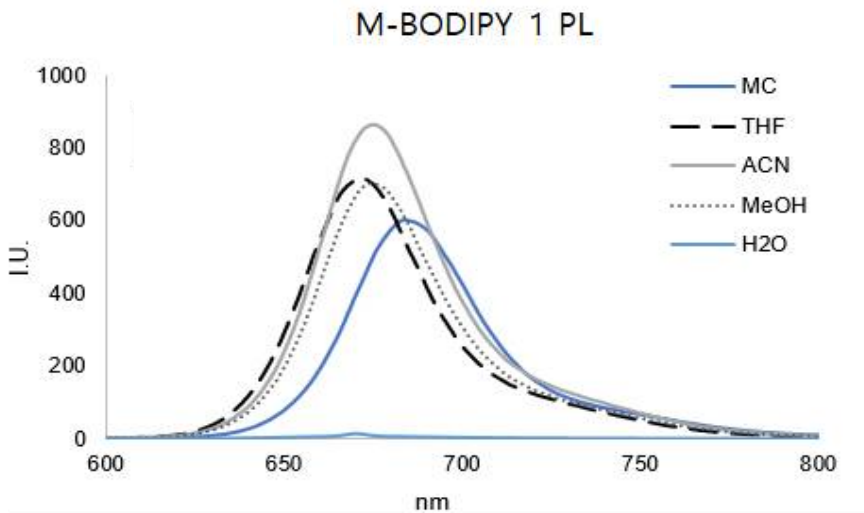


Figure 7. M-BODIPY 1의 방출 파장

종류	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{ex}} / \text{nm}$
MC	659nm	683nm	
THF	653nm	671nm	
ACN	649nm	675nm	
MeOH	649nm	674nm	
H2O	660 nm		670nm

Table 1. M-BODIPY 1의 흡수 및 방출 파장

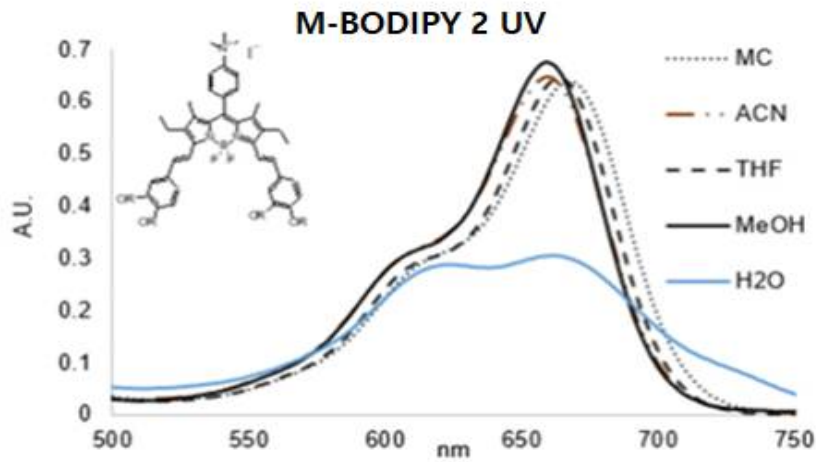


Figure 8. M-BODIPY 2의 흡수 파장

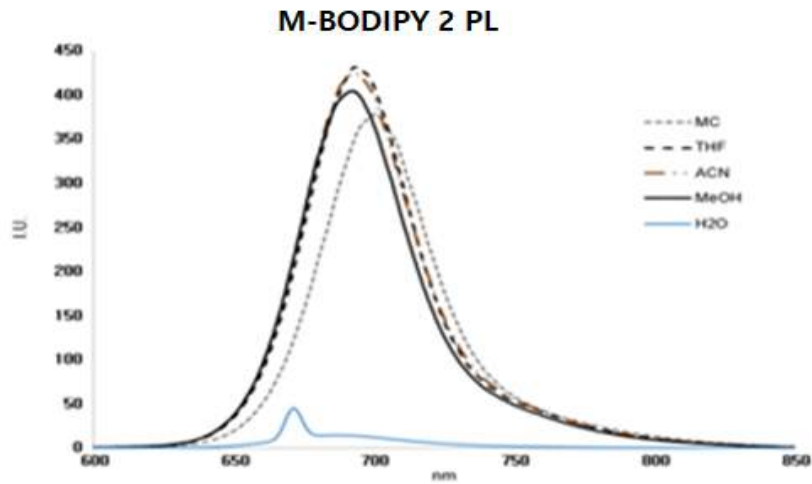


Figure 9. M-BODIPY 2의 방출 파장

종류	λ_{abs} /nm	λ_{em} /nm	λ_{ex} /nm
MC	667nm	700nm	
THF	664nm	693nm	
ACN	660nm	692nm	
MeOH	660nm	691nm	
H2O	662nm		671nm

Table 2. M-BODIPY 2의 흡수 및 방출 파장

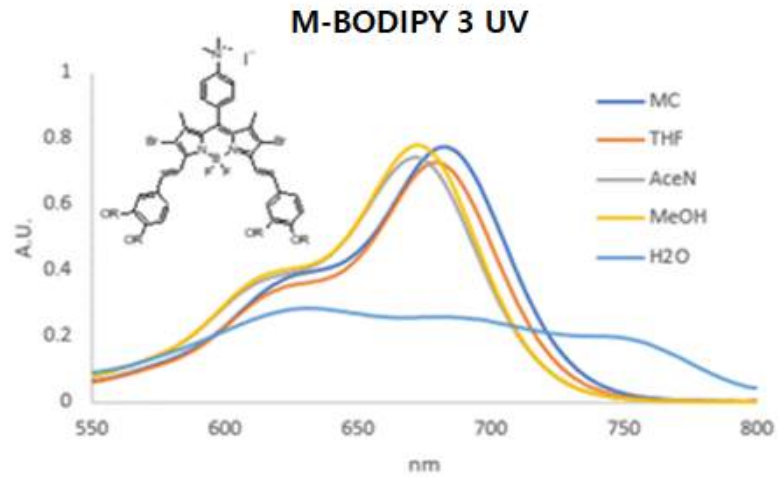


Figure 10. M-BODIPY 3의 흡수 파장

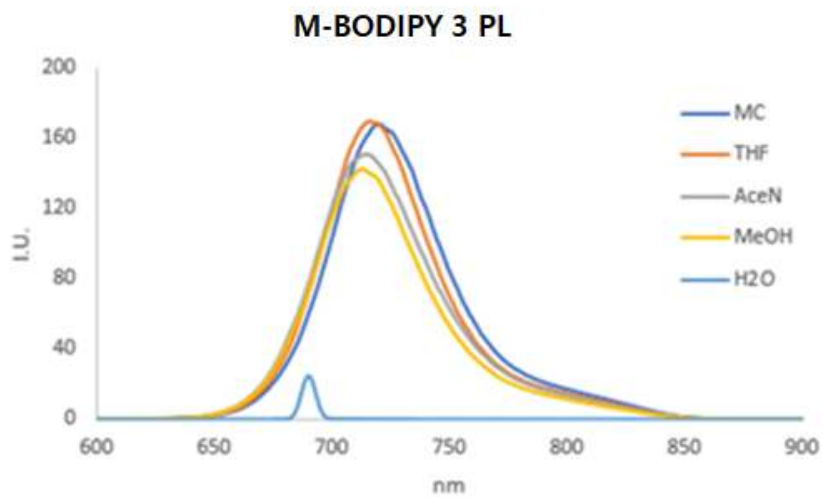


Figure 11. M-BODIPY 3의 방출 파장

종류	$\lambda_{abs} / \text{nm}$	λ_{em} / nm	λ_{ex} / nm
MC	686nm	719nm	
THF	680nm	716nm	
ACN	671nm	714nm	
<u>MeOH</u>	673nm	713nm	
H2O	670nm ~		690nm

Table 3. M-BODIPY 3의 흡수 및 방출 파장

3.4 NMR

각 compound의 ^1H NMR을 나타냈으며 M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3의 경우에는 ^1H NMR 과 ^{13}C NMR을 함께 나타냈다. Compound 5는 compound 3과 비교했을 때 약 δ 2.60 과 δ 0.85에서 ethyl 2개의 H 원자들이 나타남을 확인하면 된다. Compound 7는 BODIPY core의 H 원자 2개를 나타내는 singlet peak가 나타나지 않음을 확인하면 된다.

Compound 1

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) : δ 7.80 (d , 2H), 7.37 (d , 2H), 4.15 (t , 2H) 3.68 (t , 2H), 3.60–3.35 (m , 8H), 3.36 (s , 3H), 2.44 (s , 3H)

Compound 2

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) : δ 9.84 (s , H), 7.46 (s , H), 7.44 (s , H) 7.02 (s , 2H), 4.26 (m , 4H), 3.92 (m , 4H), 3.88–3.55 (m , 16H) 3.38 (s , H)

Compound 3

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) : δ 7.08 (d , 2H), 6.79 (d , 2H), 5.97 (s , 2H) 3.02 (s , 6H), 2.55 (s , 6H), 1.50 (s , 6H)

Compound 4

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) : δ 7.59 (s , H), 7.54 (s , H), 7.24 (s , H) 7.19 (s , H), 7.13 (d , 5H), 6.95 (d , 2H), 6.81 (d , 2H), 6.61 (s , 2H) 4.24 (m , 8H), 3.90 (s , 8H), 3.78–3.54 (m , 32H), 3.39 (d , 12H) 3.03 (s , 6H), 1.55 (s , 6H)

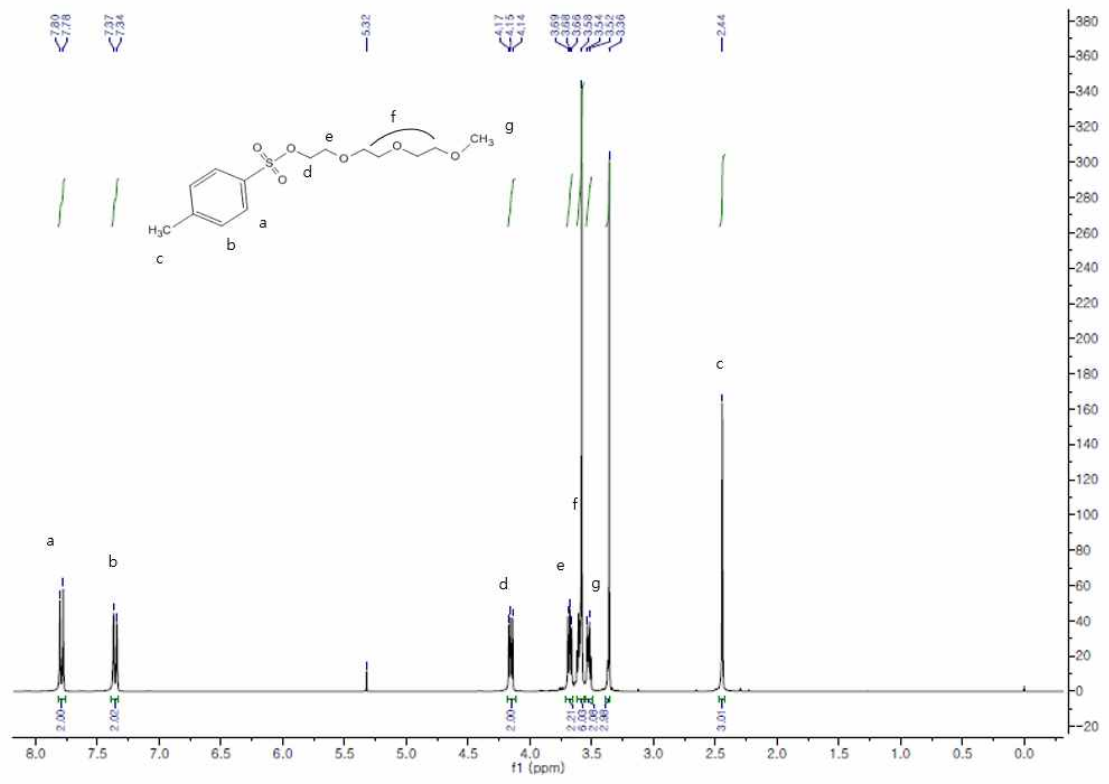


Figure 12. Compound 1의 ¹H NMR

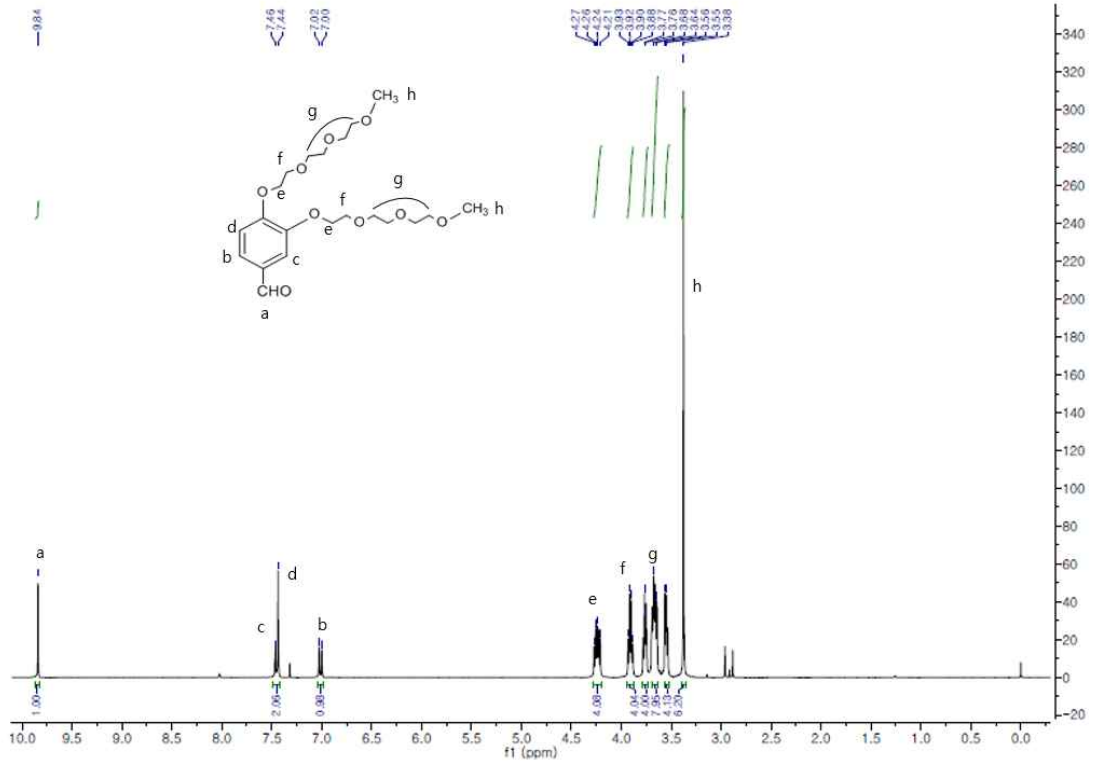


Figure 13. Compound 2의 ^1H NMR

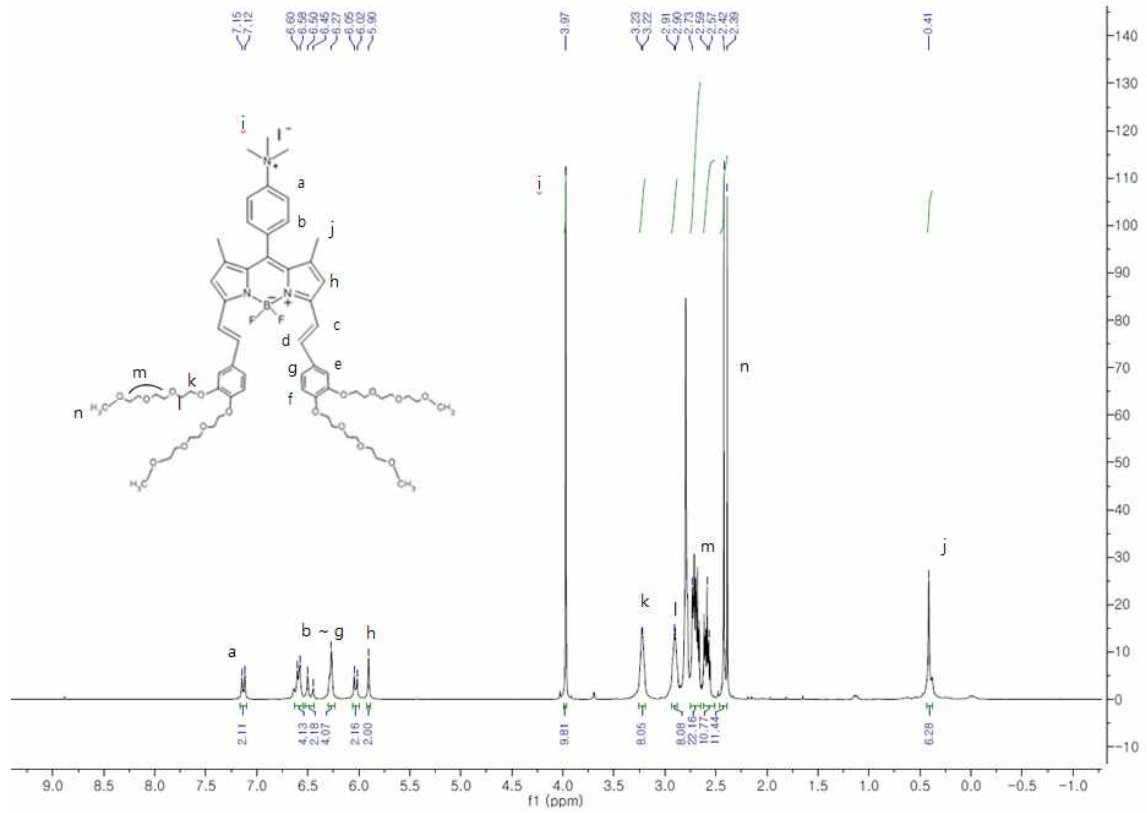


Figure 14. M-BODIPY 1의 ¹H NMR

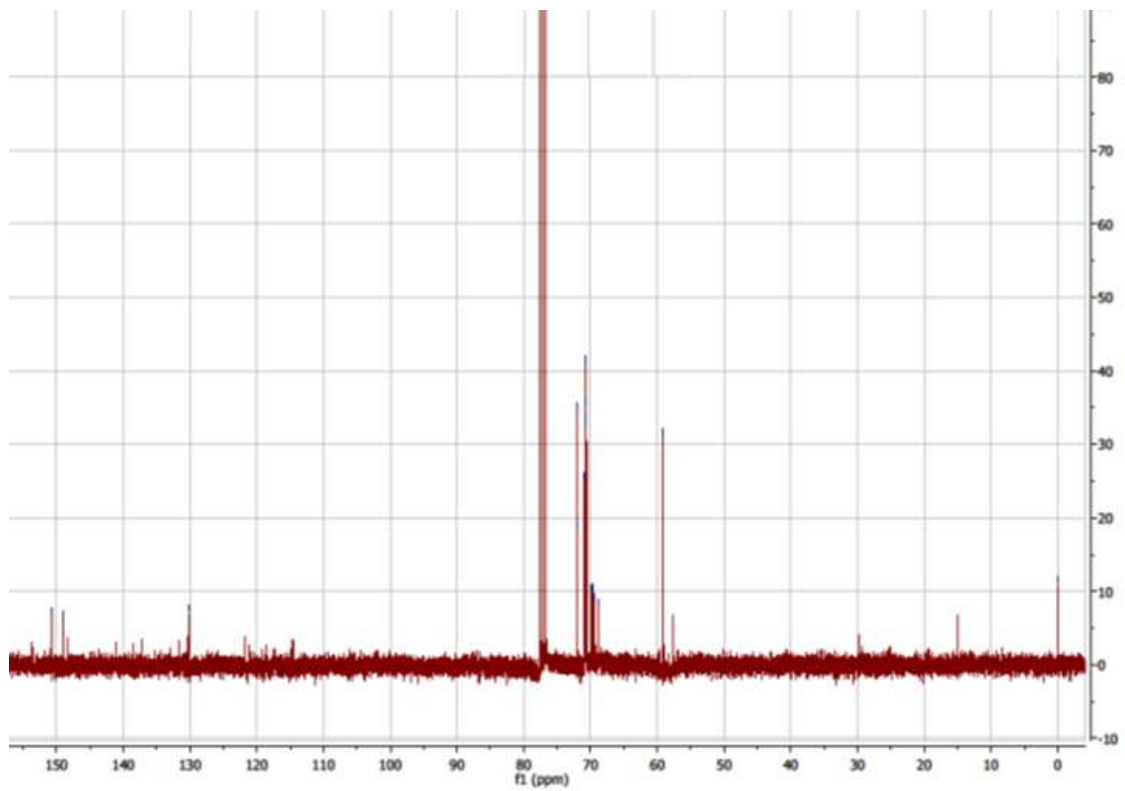


Figure 15. M-BODIPY 1의 ^{13}C NMR

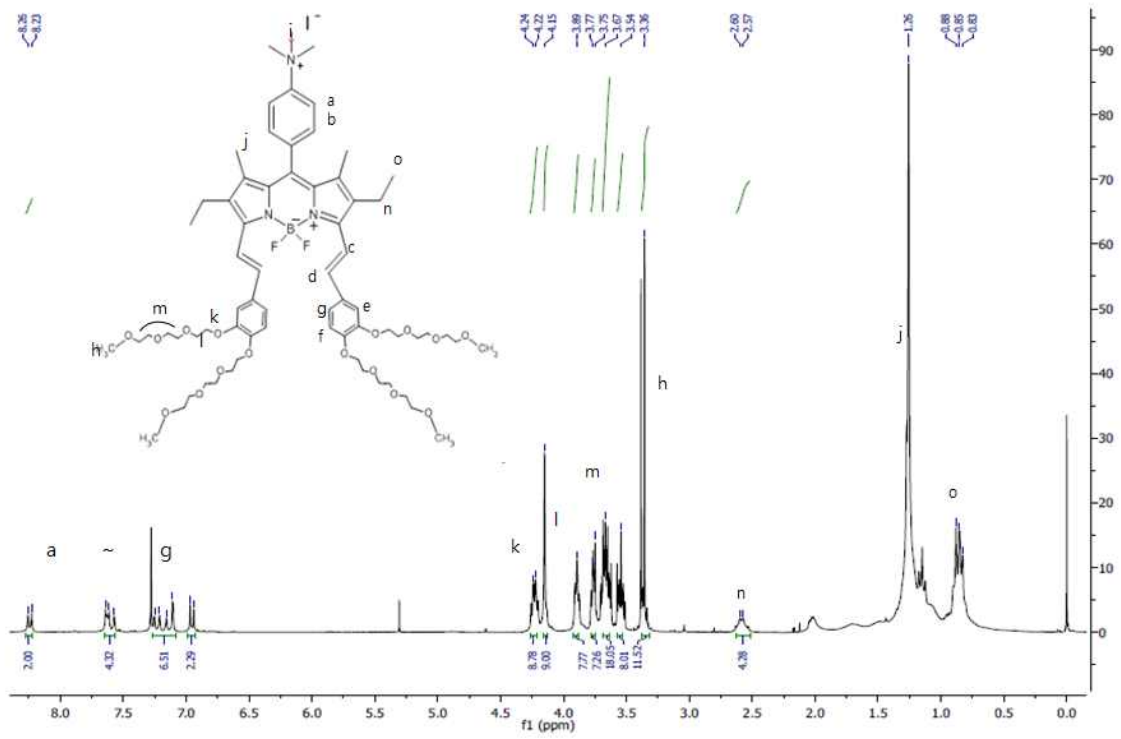


Figure 16. M-BODIPY 2의 ^1H NMR

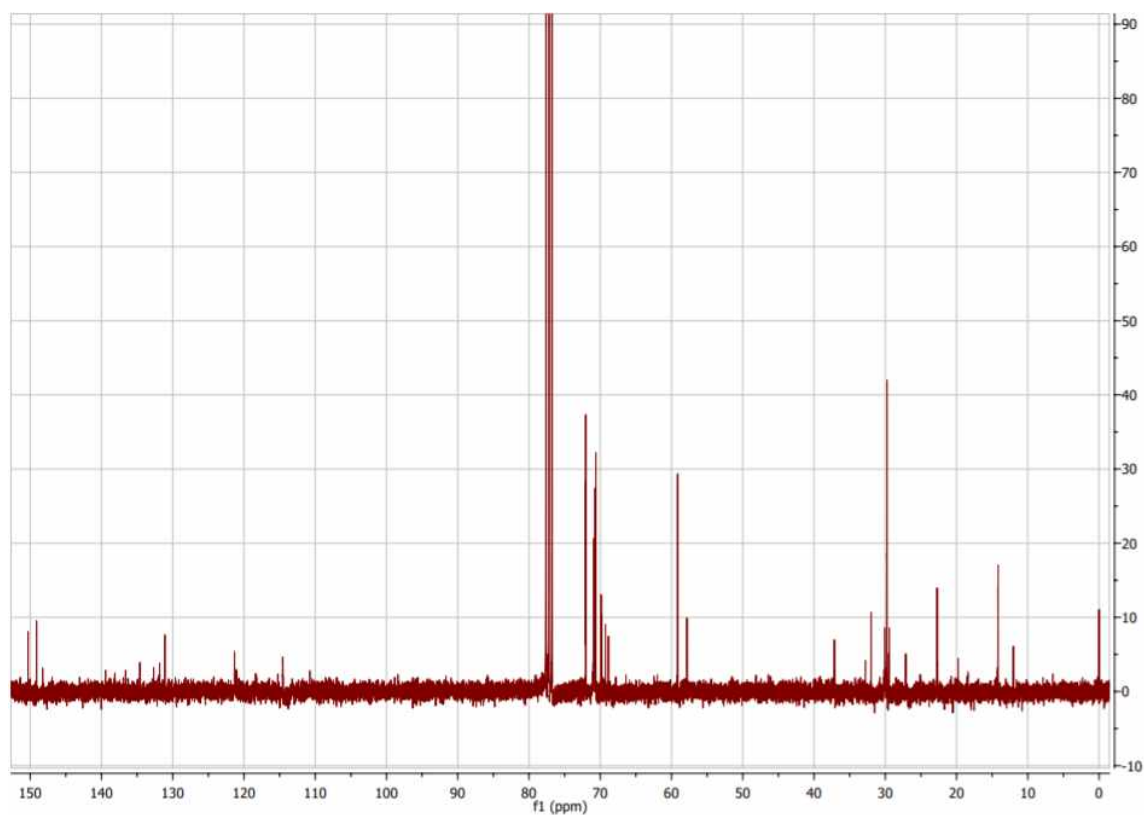


Figure 17. M-BODIPY 2의 ^{13}C NMR

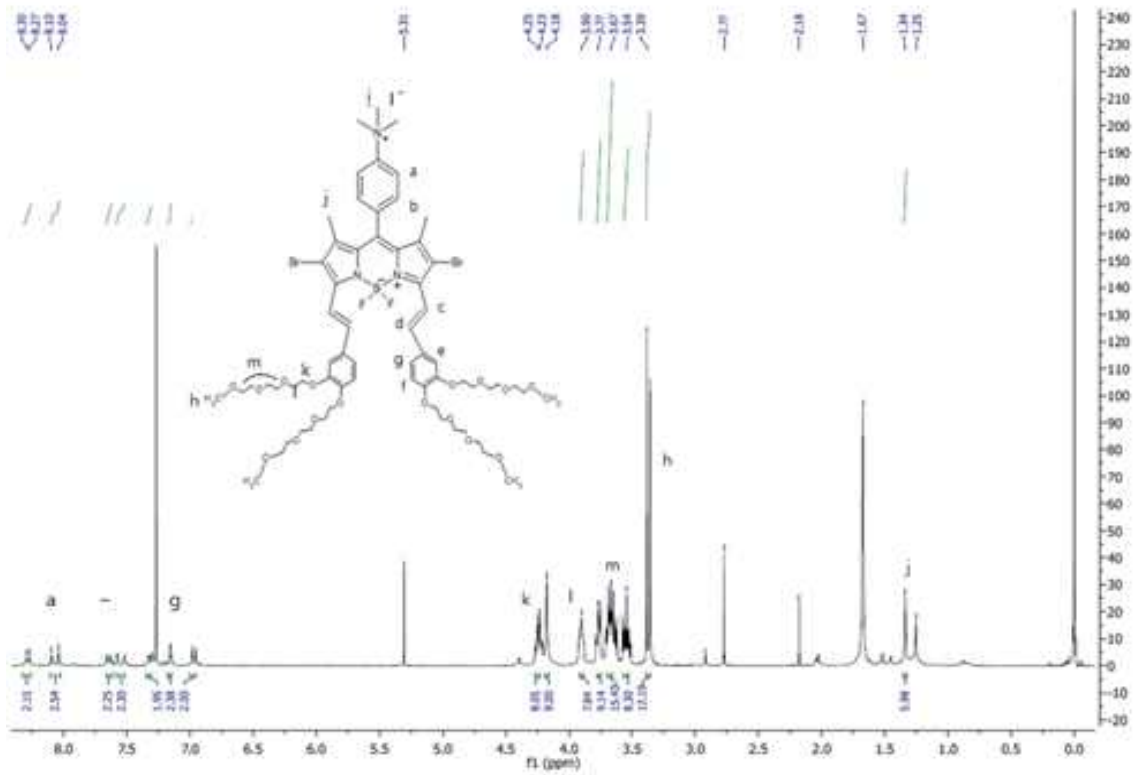


Figure 18. M-BODIPY 3의 ^1H NMR

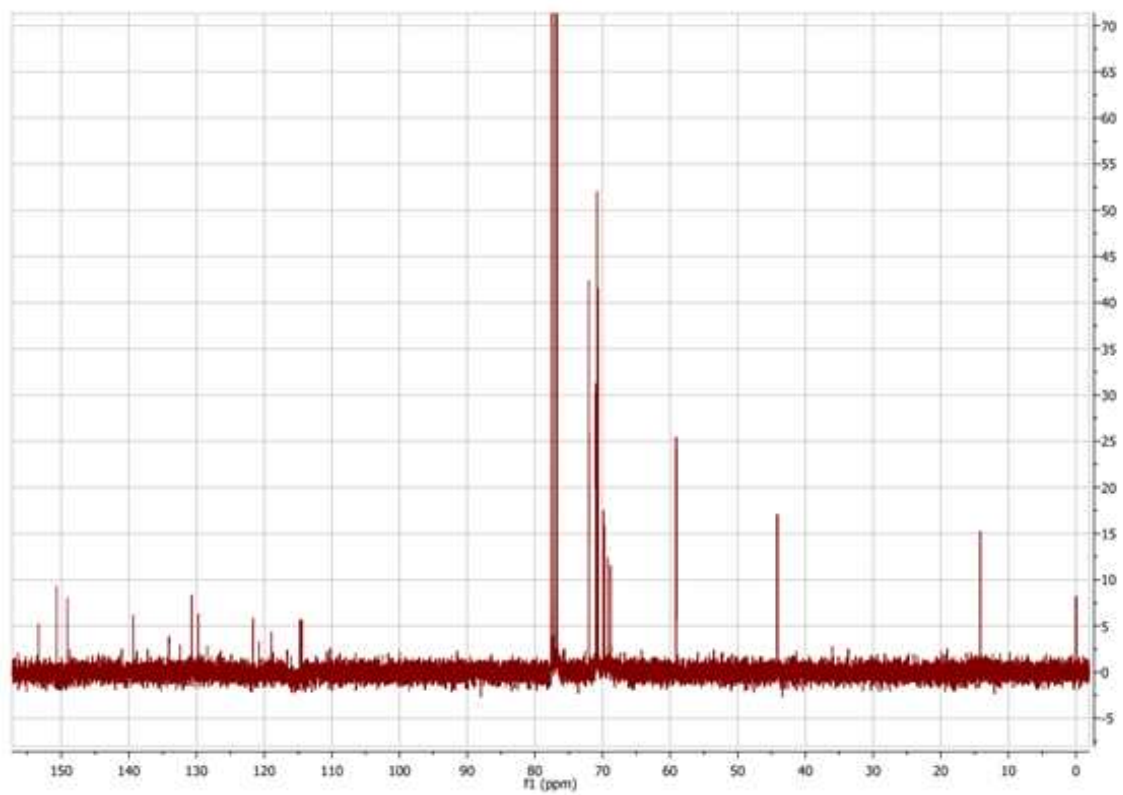


Figure 19. M-BODIPY 3의 ^{13}C NMR

3.5 Mass spectrometry(MS)

분석기기 SYNAPT G2(Water, U.K)를 이용해서 측정하였다. 다음 Figure들은 M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3의 측정 결과를 보여주고 있다.

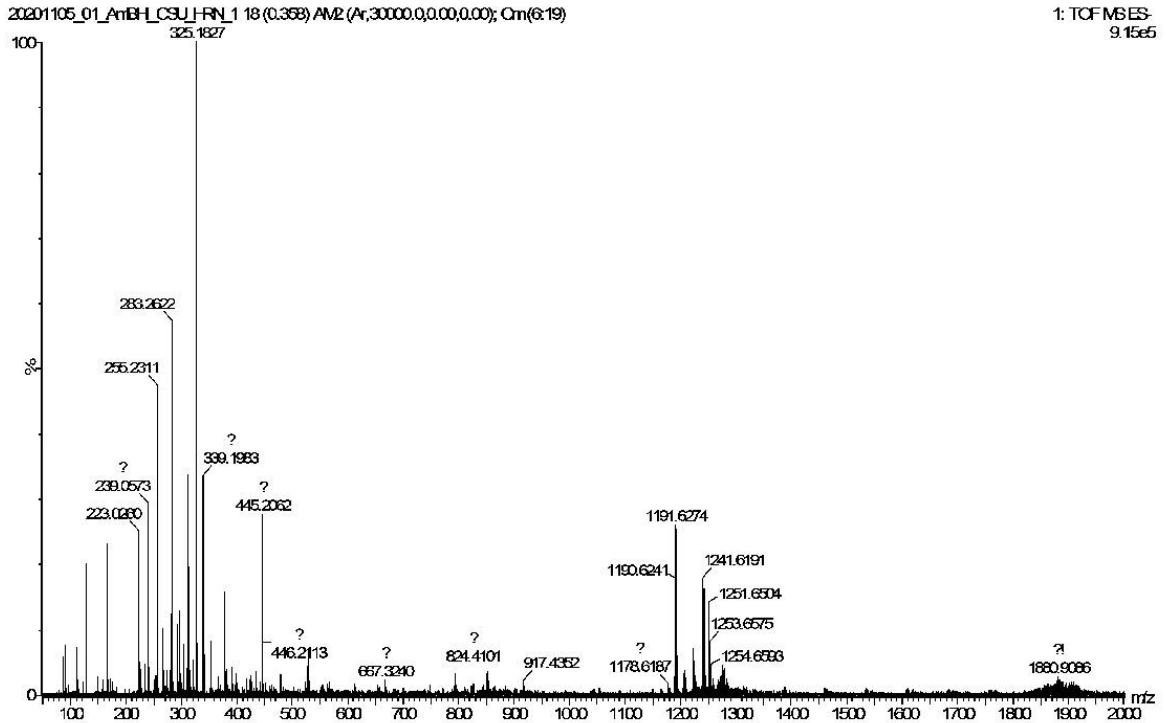


Figure 20. M-BODIPY 1의 MS (Range : 50-2000 m/z)

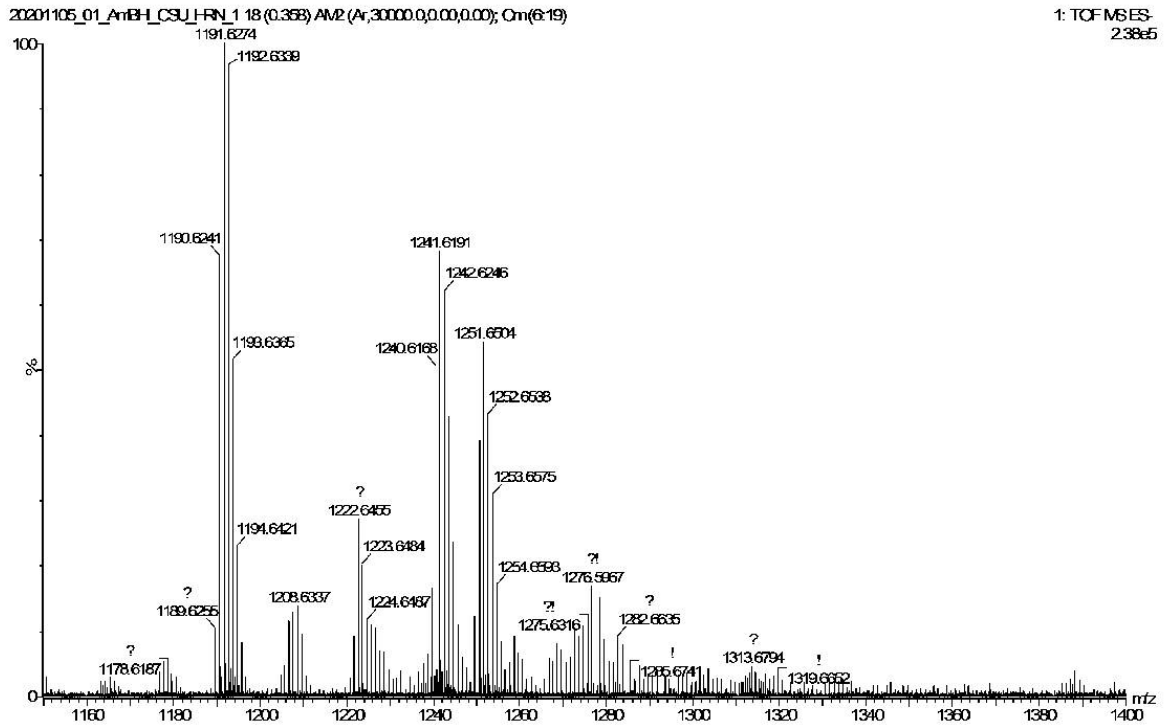


Figure 21. M-BODIPY 1의 MS (Range : 1150-1400 m/z)

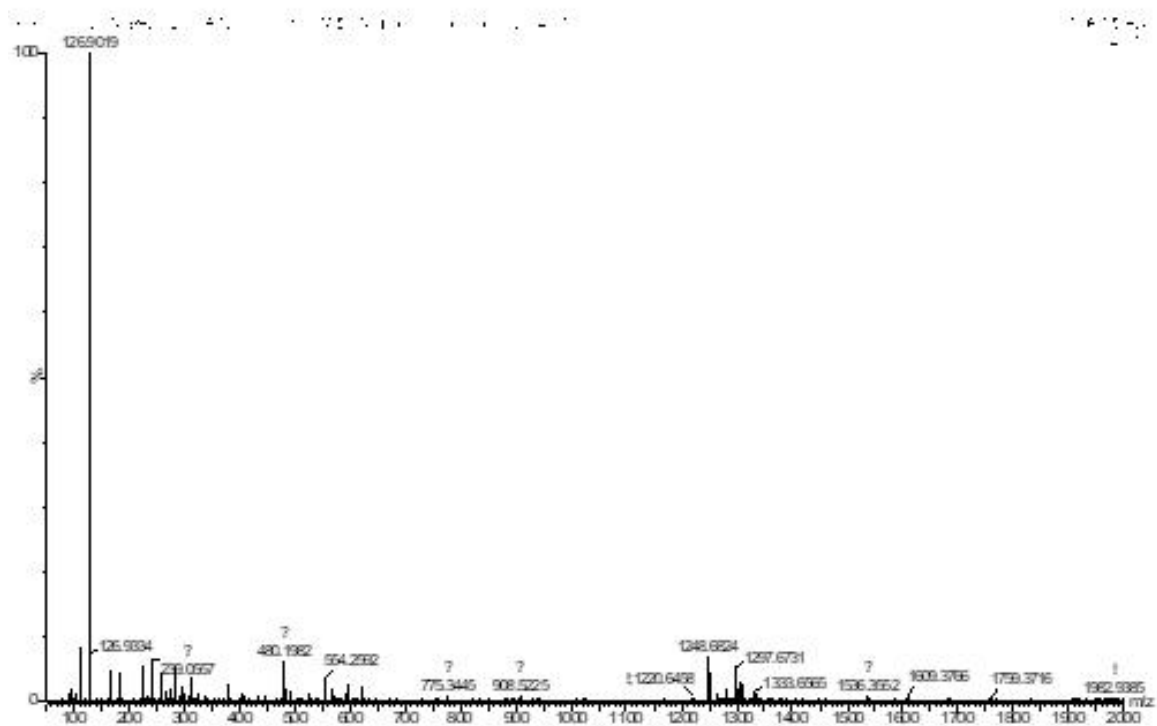


Figure 22. M-BODIPY 2의 MS (Range : 50-2000 m/z)

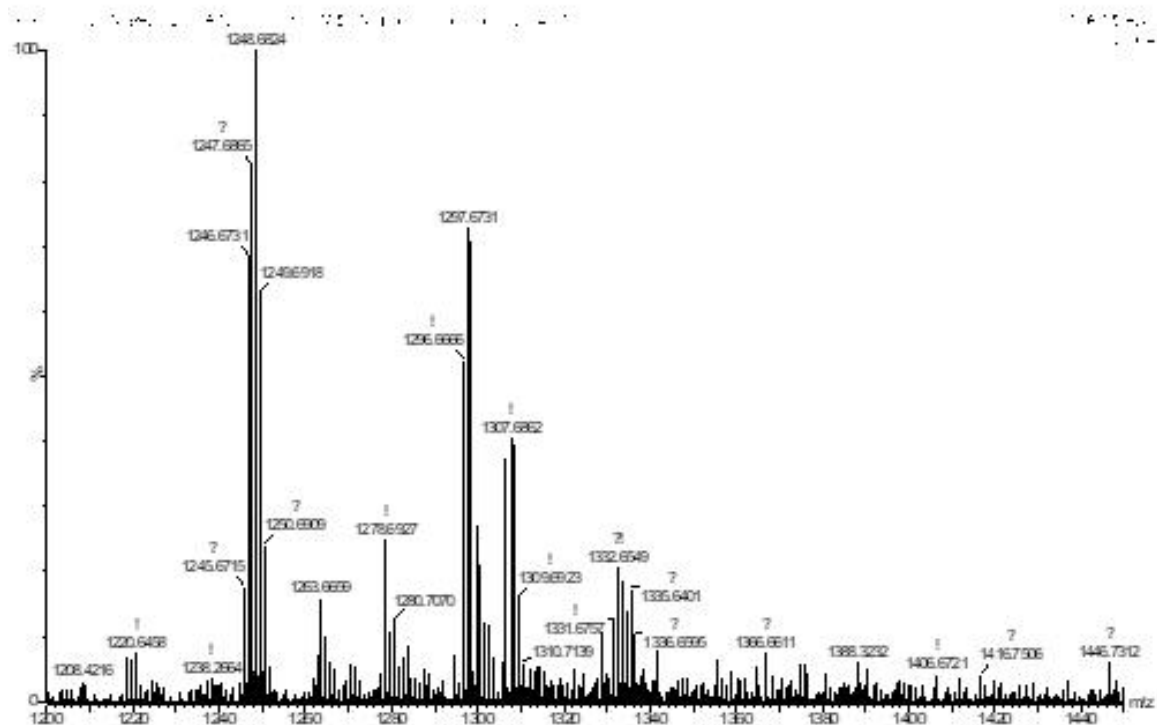


Figure 23. M-BODIPY 2의 MS (Range : 1200-1350 m/z)

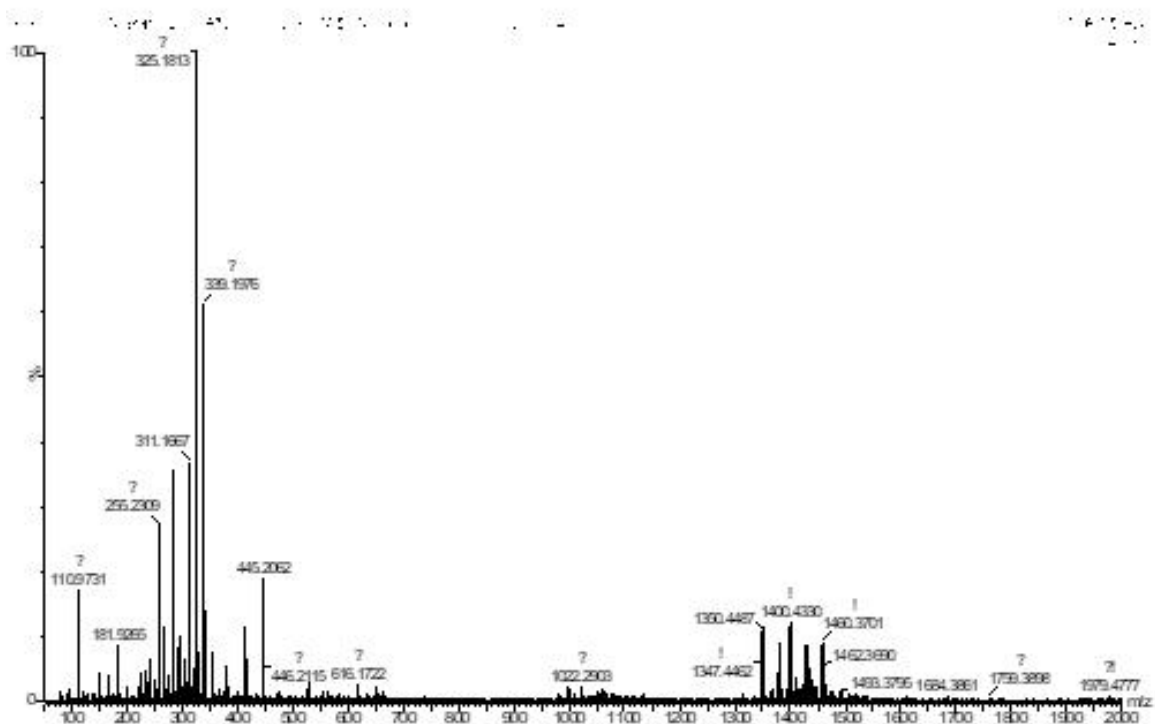


Figure 24. M-BODIPY 3의 MS (Range : 50-2000 m/z)

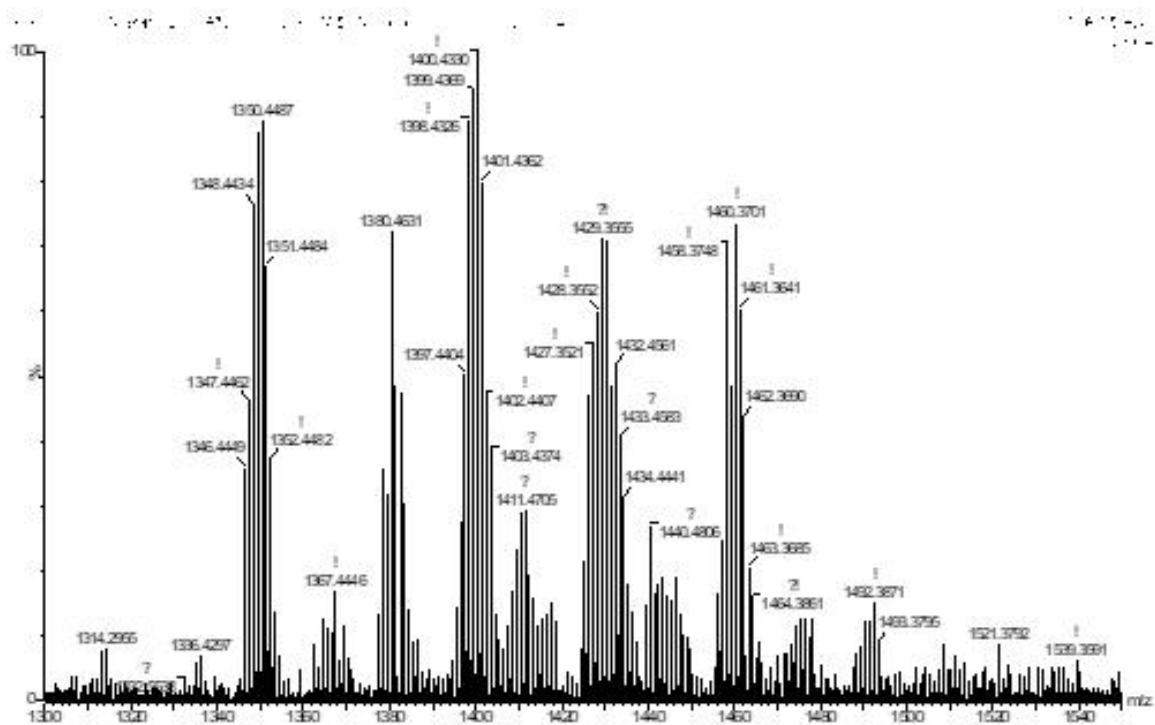


Figure 25. M-BODIPY 3의 MS (Range : 1300-1550 m/z)

3.6 Cell-imaging

2 μ M 농도로 24h incubation시키고 overnight 동안 염료를 주입하였을 때 HUH7 세포에서의 세포이미징을 보여주고 있다. BODIPY dyes의 경우 수용성 환경에서 잘 녹으며 세포막 통과가 잘 되어 세포질을 균일하게 이미징 할 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한 DAPI로 파랗게 염색된 핵과 차별되게 세포질을 붉게 염색하여 세포-이미징에 적용 가능성을 보여주고 있다.

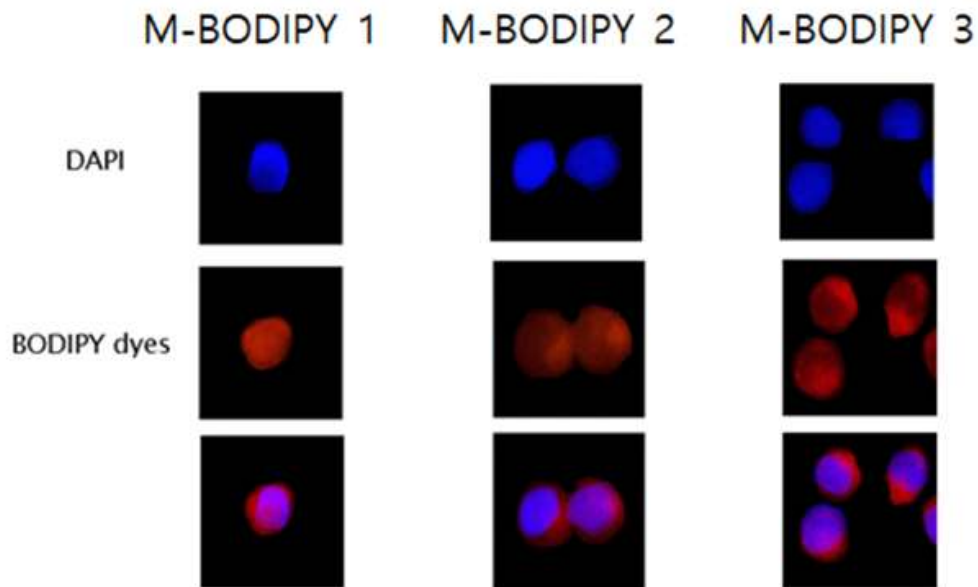


Figure 26. 염료를 주입하였을 때 HUH7세포에서의 세포이미징

4. Conclusion

미토콘드리아가 진핵생물에 있어 에너지 발생, 신진대사 등 중요한 역할을 하고 있으며 형광염료가 표적화되어있을 때 질병에 관한 정보를 제공해 줄 수 있다. 미토콘드리아를 표적화하는 염료들이 많이 개발되었지만 낮은 형광 효율과 낮은 생체적합성 등의 문제점들을 가지고 있기 때문에 이러한 문제점들을 해결할 수 있는 새로운 염료의 개발은 중요하다. 여러 형광염료 중에 BODIPY가 높은 형광효율 및 우수한 분광학적 특성의 이점을 가지고 있기 때문에 새로운 형광염료 개발을 위해 연구되고 있다. 하지만 BODIPY는 수용성 환경에서보다 유기용매 환경에서 용해도가 좋기 때문에 친수성의 BODIPY가 합성되어야 한다. 또한 미토콘드리아의 외막이 음이온을 띠기 때문에 양이온성을 띠는 BODIPY가 미토콘드리아에 표적화될 수 있다.

최근에는 항암약물치료가 다양한 부작용을 초래하기 때문에 산소, 빛, 감광제의 상호작용으로 암을 치료할 수 있는 광역학치료가 관심대상이 되었다. BODIPY 유도체들에 heavy atom을 도입함으로써 효율적인 감광제로 이용할 수 있다.

본 논문에서는 BODIPY를 기반으로 하는 미토콘드리아-표적지향성의 광역학 치료 작용을 하는 3개의 감광제 M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3를 합성하였다. M-BODIPY 1은 BODIPY core 양쪽에 H 원자 2개가 포함된 BODIPY 유도체이며, M-BODIPY 2는 ethyl 2개가 포함된 유도체이며, M-BODIPY 3은 Br 원자 2개가 포함된 유도체이다. BODIPY 유도체를 생체 내에 사용하기 위해서는 수용성 환경에서 용해도가 우수해야하며 피부침투를 위해 흡수 파장이 650~800nm에서 일어나야 한다. 따라서, 수용성 환경에서 이용하기 위해서 triethylene glycol monomethyl ether를 합성에 이용하였으며 Knoevenagel 반응을 통하여 650nm 이상에서의 빛을 흡수 및 방출하도록 하였으며, 이것을 UV-vis/UV-PL을 통해서 확인하였다. BODIPY 상부의 dimethylamine과 iodomethane과의 반응으로 4차 암모늄 염을 생성하여 미토콘드리아에 대한 표적지향성을 도입할 수 있었다. 직접 H₂O에 녹인 사진을 통해서 합성된 분자들의 용해도가 우수함을 확인할 수 있었고, 세포이미징 실험을 통해서

M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3 분자 모두 세포이미징이 가능함을 보여주었다.

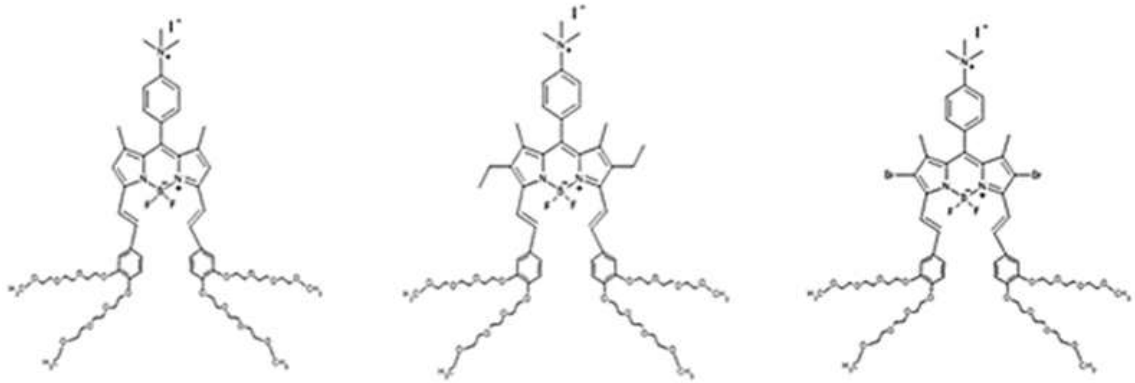


Figure 27. 왼쪽에서부터 M-BODIPY 1, M-BODIPY 2, M-BODIPY 3

5. Reference

[1] Sui, Binglin; Tang, Simon; Woodward, Adam W.; Kim, Bosung; Belfield, Kevin D. (2016). A BODIPY-Based Water-Soluble Fluorescent Probe for Mitochondria Targeting. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016(16), 2851-2857.

[2] Gao, Tao; He, Huan; Huang, Rong; Zheng, Mai; Wang, Fang-Fang; Hu, Yan-Jun; Jiang, Feng-Lei; Liu, Yi (2017). BODIPY-based fluorescent probes for mitochondria-targeted cell imaging with superior brightness, low cytotoxicity and high photostability. *Dyes and Pigments*, 141(), 530-535.

[3] Fan, Gang; Yang, Le; Chen, Zhijian (2014). Water-soluble BODIPY and aza-BODIPY dyes: synthetic progress and applications. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 8(4), 405-417.

[4] *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 555 A BODIPY-based fluorescent dye for mitochondria in living cells, with low cytotoxicity and high photostability

[5] Dr. Jianguang Wang ; Prof. Yuanjun Hou; Dr. Wanhua Lei; Dr. Qianxiong Zhou; Dr. Chao Li; Prof. Baowen Zhang; Prof. Xuesong Wang (2012). DNA Photocleavage by a Cationic BODIPY Dye through Both Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical: New Insight into the Photodynamic Mechanism of BODIPYs. , 13(11),

[6] Gan, Z.; Audi, S. H.; Bongard, R. D.; Gauthier, K. M.; Merker, M. P. (2011). Quantifying mitochondrial and plasma membrane potentials in intact pulmonary arterial endothelial cells based on extracellular disposition

of rhodamine dyes. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(5), L762-L772

[7]Liu, Xue-Liang; Niu, Li-Ya; Chen, Yu-Zhe; Zheng, Mei-Ling; Yang, Yunxu; Yang, Qing-Zheng (2017). A mitochondria-targeting fluorescent probe for the selective detection of glutathione in living cells. *Org. Biomol. Chem.*, 15(5), 1072-1075.

[8]Molupe, Nthabeleng; Babu, Balaji; Oluwole, David O.; Prinsloo, Earl; Mack, John; Nyokong, Tebello (2018). The investigation of *in vitro* dark cytotoxicity and photodynamic therapy effect of a 2,6-dibromo-3,5-distyryl BODIPY dye encapsulated in Pluronic® F-127 micelles. *Journal of Coordination Chemistry*, (), 1-23.

[9]James, Nadine S.; Ohulchanskyy, Tymish Y.; Chen, Yihui; Joshi, Penny; Zheng, Xiang; Goswami, Lalit N.; Pandey, Ravindra K. (2013). Comparative Tumor Imaging and PDT Efficacy of HPPH Conjugated in the Mono- and Di-Forms to Various Polymethine Cyanine Dyes: Part - 2. *Theranostics*, 3(9), 703-718.

[10]Gorman, Aoife; Killoran, John; O'Shea, Caroline; Kenna, Tony; Gallagher, William M.; O'Shea, Donal F. (2004). In Vitro Demonstration of the Heavy-Atom Effect for Photodynamic Therapy. , 126(34), 10619-10631

[11]Yimin Zhou, Ying-Kit Cheung, MA Chao, Shirui Zhao, Di Gao, PuiChi Lo, Wing-Ping Fong, Kam Sing Wong, and Dennis K. P. Ng 22 Apr 2018
Endoplasmic Reticulum-Localized Two-Photon-Absorbing Boron Dipyrrromethenes as Advanced Photosensitizers for Photodynamic Therapy

[12]Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364.

[13]Kamkaew, Anyanee; Lim, Siang Hui; Lee, Hong Boon; Kiew, Lik Voon; Chung, Lip Yong; Burgess, Kevin (2013). BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 42(1), 77-.

[14]Turksoy, Abdurrahman; Yildiz, Deniz; Akkaya, Engin U. (2017). Photosensitization and controlled photosensitization with BODIPY dyes. *Coordination Chemistry Reviews*, (), S0010854517303764-.

[15]Jorge O Escobedo; Oleksandr Rusin; Soojin Lim; Robert M Strongin (2010). NIR dyes for bioimaging applications. , 14(1), 64-70.