



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0141215
(43) 공개일자 2021년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 41/00 (2020.01) A61K 47/52 (2017.01)

A61K 47/69 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 41/0057 (2013.01)

A61K 47/52 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2020-0058592

(22) 출원일자 2020년05월15일

심사청구일자 2020년05월15일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

유자형

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

자나 바타크리쉬나

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

김상필

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(74) 대리인

리앤목특허법인

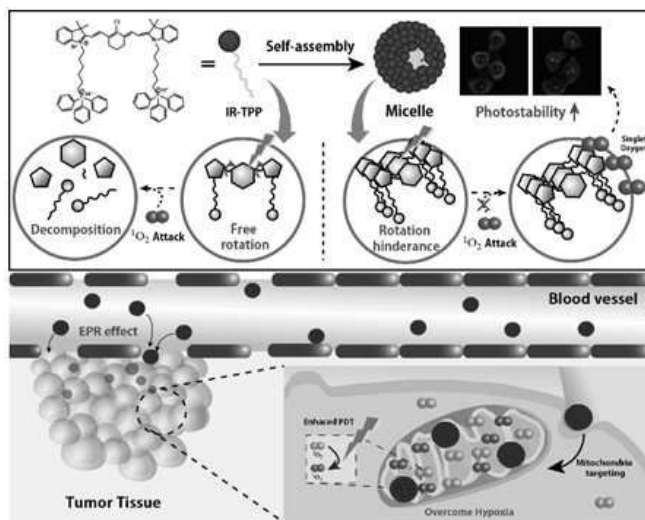
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 표적화 모이어티 및 헵타메틴 시아닌 계열 염료를 포함하는 접합체가 자기조립되어 형성된 자기조립체 및 이의 용도

(57) 요약

미토콘드리아 표적화 모이어티 및 헵타메틴 시아닌 계열 염료를 포함하는 접합체가 자기조립되어 형성된 자기조립체 및 이의 용도에 관한 것으로 일 양상에 따른 자기조립체에 의하면 암세포의 미토콘드리아 내부에서 자기조립체를 형성하여 광역학적 치료 시 활성산소종을 형성하여 세포 사멸을 유도하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/6907 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711081540
과제번호	2015H1D3A1061983
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	국제연구인력교류(R&D)
연구과제명	초분자 자기조립 원리를 이용한 지능형 나노 메디신 시스템의 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2019.01.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104733
과제번호	2016R1A5A1009405
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	다공성 플랫폼 기반 생체모방 촉매
기 여 율	1/4
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345318225
과제번호	2018R1D1A1B07050595
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	세포 핵에서의 분자 응집을 이용한 암세포 치료법 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1.200081.01
과제번호	1.200081.01
부처명	울산과학기술원
과제관리(전문)기관명	울산과학기술원
연구사업명	기초과학연구소 연구비지원사업(A유형)
연구과제명	항체모방 재조합 단백질을 이용한 습성 황반변성 혁신 바이오의약품 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

미토콘드리아 표적화 모이어티 및 헵타메틴 시아닌 계열 염료(heptamethine cyanine dyes)를 포함하는 집합체(conjugate)가 자기조립되어 형성된 자기조립체(self-assembly).

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 TPP (triphenylphosphonium)인, 자기조립체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 헵타메틴 시아닌 계열 염료는 IR780(2-[2-[2-Chloro-3-[(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-propyl-2H-indol-2-ylidene)ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]ethenyl]-3,3-dimethyl-1-propylindolium iodide), IR808(Br 2-[(E)-2-[(3E)-2-chloro-3-{2-[(2E)-3,3-dimethyl-1-pentyl-2,3-dihydro-1H-indol-2-ylidene]ethylidene}cyclohex-1-en-1-yl]ethenyl]-3,3-dimethyl-1-pentyl-3H-indol-1-ium), IR825(3-(4-carboxybenzyl)-2-((E)-2-((E)-3-((Z)-2-(3-(4-carboxybenzyl)-1,1-dimethyl-1,3-dihydro-2H-benzo[e]indol-2-ylidene)ethylidene)-2-chlorocyclohex-1-en-1-yl)vinyl)-1,1-dimethyl-1H-benzo[e]indol-3-ium bromide), IR895(Dimethyl(4-[1,7,7-tris(4-dimethylaminophenyl)-2,4,6-heptatrienylidene]-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)ammonium perchlorate), IR806(2-[2-[2-chloro-3-[2-[1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-ylidene)-ethylidene]-1-cyclopenten-1-yl]-ethenyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium hydroxide), MHI-148(2-[2-[2-Chloro-3-[2-[1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-(5-carboxypentyl)-2H-indol-2-ylidene]-ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]-ethenyl]-3,3-dimethyl-1-(5-carboxypentyl)-3H-indolium bromide)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 자기조립체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티와 헵타메틴 시아닌 계열 염료는 직접 또는 링커를 통하여 연결된 것인, 자기조립체.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 집합체는 세포의 미토콘드리아 내에서 자기조립을 형성하는 것인, 자기조립체.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 자기조립체는 미셀(micelle) 구조를 이루는 것인, 자기조립체.

청구항 7

청구항 1의 자기조립체를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 약학적 조성물은 광역학적 치료(photodynamic therapy, PDT)용인 것인, 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 암은 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양,

뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 미토콘드리아 표적화 모이어티 및 헵타메틴 시아닌 계열 염료를 포함하는 접합체가 자기조립되어 형성된 자기조립체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광역학적 치료(photodynamic therapy, PDT)는 빛과 광감작제(photosensitizer)의 조합을 이용한 의학적 치료로서, 작용기전은 크게 광감작제의 종양 선택적 축적에 대한 분자적 기전과 광감작제와 빛의 상호작용에 따른 종양 파괴기전으로 나눌 수 있다. 각 인자는 그 자체로 해롭지 않으나, 산소와 결합되는 경우, 종양 세포를 비활성화하는 치사의 세포독성 작용제를 생산할 수 있다(Sternberg ED et al. Tetrahedron, 1998, 54: 4151-4202; Kadish KM et al., The Porphyrin Handbook. 2000, Vol 6: 158-161).

[0003] 빛 조사 후, 광감작제는 광감작제의 여기 상태와 O_2 의 바닥 상태 사이의 에너지 전달로 인해 일차 독성 반응성 산소 종 (ROS) 중 하나인 일중항 산소 (1O_2)를 생성하여 암세포에 데미지를 준다. 종래의 치료법에 비하여 높은 선택성, 최소 침습성, 치료 효과 및 반복 투여에 대한 적합성을 포함한 장점으로 인해 효율적인 PDT 작용제를 개발하기 위해 광범위한 노력이 이루어졌다. 하지만, 종래의 PDT 작용제는 물에서 응집을 유발하는 낮은 물 용해성을 가지고, 광 물리학 적, 광 화학적 및 생물학적 특성을 변화시키고 광감작제의 표적화 능력이 좋지 않아 인접한 건강한 조직에 손상을 초래한다. 또한, 대부분의 광감작제는 광 흡수 후 여기 상태에서 높은 반응성으로 인해 장기간 광 노출로 광분해를 나타낸다. 종양 맥관 구조에서의 산소 공급 부족으로 인한 저산소성 종양 미세 환경은 또한 PDT의 효능을 감소시킨다. 따라서, PDT에 대한 더 나은 효능을 갖기 위해서는 이러한 문제를 극복하는 새로운 광감작제를 개발할 필요가 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점들을 해결하고자 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 미토콘드리아 표적화 모이어티 및 헵타메틴 시아닌 계열 염료(heptamethine cyanine dyes)를 포함하는 접합체(conjugate)가 자기조립되어 형성된 자기조립체(self-assembly)를 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 상기 자기조립체를 유효분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 미토콘드리아 표적화 모이어티 및 헵타메틴 시아닌 계열 염료(heptamethine cyanine dyes)를 포함하는 접합체(conjugate)가 자기조립되어 형성된 자기조립체(self-assembly)를 제공한다.

[0008] 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티와 헵타메틴 시아닌 계열 염료는 직접 또는 링커를 통하여 연결된 것일 수 있다.

[0009] 상기 접합체는 세포의 미토콘드리아 내에서 자기조립을 형성하는 것일 수 있고, 형성된 자기조립체는 미셀(micelle) 구조를 이루는 것일 수 있다.

[0010] 용어 "미셀"은 자기조립에 의해 코어/셸 구조를 가지는 수 나노 내지 수만 나노 크기의 입자를 의미할 수 있다.

[0011] 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티(moiety)는 세포 내부의 미토콘드리아로 해당 물질을 표적화 시키는 기능을 하는 것을 의미하며, 예컨대 TPP (triphenylphosphonium)일 수 있다.

[0012] 상기 헵타메틴 시아닌 계열 염료는 시아닌 염료 계열의 서브 클래스이며, 일 구체예에 있어서, 상기 헵타메틴 시아닌 계열 염료는 IR780(2-[2-[2-Chloro-3-[(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-propyl-2H-indol-

2ylidene)ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]ethenyl]-3,3-dimethyl-1-propylindolium iodide), IR808(Br 2-[(E)-2-[(3E)-2-chloro-3-{2-[(2E)-3,3-dimethyl-1-pentyl-2,3-dihydro-1H-indol-2-ylidene]ethylidene}cyclohex-1-en-1-yl]ethenyl]-3,3-dimethyl-1-pentyl-3H-indol-1-ium), IR825(3-(4-carboxybenzyl)-2-((E)-2-((E)-3-((Z)-2-(3-(4-carboxybenzyl)-1,1-dimethyl-1,3-dihydro-2H-benzo[e]indol-2-ylidene)ethylidene)-2-chlorocyclohex-1-en-1-yl)vinyl)-1,1-dimethyl-1H-benzo[e]indol-3-ium bromide), IR895(Dimethyl(4-[1,7,7-tris(4-dimethylaminophenyl)-2,4,6-heptatrienylidene]-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)ammonium perchlorate), IR806(2-[2-[2-chloro-3-[2-[1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-2H-indol-2-ylidene)-ethylidene]-1-cyclopenten-1-yl]-ethenyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium hydroxide), MHI-148(2-[2-[2-Chloro-3-[2-[1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-(5-carboxypentyl)-2H-indol-2-ylidene]-ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]-ethenyl]-3,3-dimethyl-1-(5-carboxypentyl)-3H-indolium bromide)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

- [0013] 일 구체예에 있어서, 상기 접합체를 구성하는 미토콘드리아 표적화 모이어티로 인하여 일 구체예에 따른 접합체가 세포 내부의 미토콘드리아로 표적화 될 수 있으며, 미토콘드리아의 이중막을 통과하여 상기 접합체가 미토콘드리아 내부로 들어갈 수 있다.
- [0014] 일 구체예에서 상기 접합체는 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티로 인하여 미토콘드리아로 들어갈 수 있으며, 상기 미토콘드리아 내부로 들어간 접합체는 암세포의 미토콘드리아 내부에서 자기조립체(Self-assembly)를 형성하여 광감작제로서 작용하여 광역학적 치료(photodynamic therapy, PDT) 시, 암세포 특이적으로 세포 사멸을 유도할 수 있다.
- [0015] 이에 따라, 다른 양상은 상기 자기조립체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 용어 "광역학적 치료(photodynamic therapy, PDT)"는 빛과 광감작제(photosensitizer)의 조합을 이용한 의학적 치료로서, 작용기전은 크게 광감작제의 종양 선택적 축적에 대한 분자적 기전과 광감작제와 빛의 상호작용에 따른 종양 파괴 기전을 포함하는 암의 치료 방법을 의미한다. 상기 광역학적 치료는 광감작제가 흥분 상태에 있을 때, 분자 삼중 산소와 상호작용을 통해 라디칼 및 활성 산소종을 생성하여 표적 세포에 충분한 산화적 손상을 가하는 과정을 통하여 세포 사멸을 유도할 수 있다.
- [0017] 상기 자기조립체는 저산소증에서 높은 광안정성 및 상당한 항암 활성을 보이는 근적외선(near infrared, NIR) 감작제의 미토콘드리아 표적 미셀 응집체이다. 하기 실시예에 따른 트리페닐포스포늄 양이온 결합 IR 염료 (IR-TPP)는 효율적인 미토콘드리아-표적 미셀 응집체로 자기조립된다. IR-TPP의 미셀구조의 자기 조립은 NIR 조사시 여기 상태의 인돌린 고리의 회전을 방지하는 반면, IR-TPP의 단일 분자 상태는 인돌린 고리의 회전이 가능하여 반응성 산소 종 (ROS)에 의한 디옥세탄 형성을 가능하게 한다. 따라서, IR-TPP의 미셀구조는 높은 광안정성을 나타낸다. 또한, IR-TPP의 미셀구조는 매우 효율적인 ROS 생성을 나타낸다. 따라서, 일 구체예에 따른 본 발명은 생리학적 조건 하에서 높은 광 안정성을 제공하고, 미토콘드리아를 표적으로하며, 저산소증 하에서 높은 PDT 효율을 나타낸다. 하기 실시예에 따른 동물 종양 모델에서, IR-TPP는 수동 표적화를 통해 종양 조직에 선택적으로 국재되었고, 종양 성장의 높은 억제력을 나타냈다.
- [0018] 상기 자기조립체는 약학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 산 또는 염기의 부가염 및 그의 입체화학적 이성체 형태를 모두 포함하며, 예컨대, 유기산 또는 무기산의 부가염일 수 있다. 상기 염에는 투여 대상에서 모화합물 (parent compound)의 활성을 유지하며 바람직하지 못한 효과를 유발하지 않는 염이라면 어느 것이든 포함되는 것으로, 특별히 제한되는 것이 아니다.
- [0019] 이러한 염에는 무기염과 유기염이 포함되며, 예를 들어, 아세트산, 질산, 아스파르트산, 술폰산, 설푸릭산, 말레산, 글루탐산, 포름산, 숙신산, 인산, 프탈산, 탄닌산, 타르타르산, 히드로브롬산, 프로피온산, 벤젠술폰산, 벤조산, 스테아르산, 락트산(lactic acid), 비카르본산, 비설푸릭산, 비타르타르산, 옥살산, 부틸산, 칼슘 이데트, 카르보닉산, 클로로벤조산, 시트르산, 이데트산, 톨루엔술폰산, 푸마르산, 글루세프산, 에실린산, 파모익산, 글루코닉산, 메틸니트릭산, 말론산, 히드로클로린산, 히드로요도익산, 히드록시나프톨산, 이세티온산, 락토비오닉산, 만델산, 점액산, 나프실릭산, 뮤코닉산, p-니트로메탄설폰산, 헥사믹산, 판토테닉산, 모노히드로젠인산, 디히드로젠인산, 살리실산, 술파민산, 술파닐린산, 메탄술폰산일 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 염의 형태로는, 암모늄염, 리튬염, 소듐염, 포타슘염, 마그네슘염 및 칼슘염과 같은 알칼리 및 알칼리 토금속의 염, 예를 들어, 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이드라바민 염과 같은 유기 염기를 갖는 염, 및 아

르기닌, 리신과 같은 아미노산을 갖는 염을 포함한다. 또한, 상기 염 형태는 적당한 염기 또는 산으로 처리함으로써 유리 형태로 전환될 수도 있다.

- [0021] 상기 자기조립체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 암 세포 내 미토콘드리아에서 자가조립체를 형성하여 PDT 치료시, 세포 사멸을 유도하는 것일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 있어서, 상기 암은 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물은 의도한 투여 방법에 적합한 임의의 형태일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 있어서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 약학적 조성물의 투여경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등을 거론할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 제공되는 약학 조성물은, 통상의 방법에 따라 제형화 된, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 현탁액, 유제, 동결건조 제제, 외용제, 좌제, 멸균 주사 용액, 이식용 제제 등의 비경구용 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0025] 상기 약학 조성물은 유효성분 (즉, 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염) 이외에 제형화에 사용 가능한 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물의 제형화에 사용될 수 있는 부형제는 담체, 비히클, 희석제, 용매, 예를 들어 1가 알코올, 예를 들어 에탄올, 이소프로판올 및 다가 알코올, 예를 들어 글리세롤 및 식용 오일, 예를 들어 대두유, 코코넛유, 올리브유, 잇꽃유, 면실유, 유성 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트, 이소프로필 미리스테이트; 결합제, 애주번트, 가용화제, 증점제, 안정화제, 붕해제, 활택제, 윤활제, 완충제, 유화제, 습윤제, 현탁제, 감미제, 착색제, 풍미제, 코팅제, 방부제, 향산화제, 가공제, 약물 전달 개질제 및 향상제(enhancer), 예를 들어 인산칼슘, 마그네슘 스테이트, 활석, 단당류, 이당류, 전분, 젤라틴, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 텍스트로스, 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린, 폴리비닐피롤리돈, 저융점 왁스, 이온 교환수지 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0028] 상기 약학적 조성물은 다양한 경구 투여 제형의 형태로 제형화 될 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제, 경·연질 캡슐제, 액제, 현탁액, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭서제(elixirs) 등의 임의의 경구 투여용 제형으로 될 수 있다. 이러한 경구 투여용 제형은 각 제형의 통상적인 구성에 따라 상기 유효 성분 외에, 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신 등의 희석제나, 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 등의 활택제 등의 제약상 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 경구 투여용 제형이 정제인 경우, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제를 포함할 수 있고, 경우에 따라, 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제나, 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 또는 감미제 등을 포함할 수도 있다.

- [0030] 상기 약학적 조성물은 비경구투여 제형의 형태로 제형화 될 수도 있는데, 이러한 경우 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 등의 비경구투여 방법에 의해 투여된다. 이때, 상기 비경구투여 제형으로 제제화 하기 위하여, 상기 약학적 조성물은 유효 성분이 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합되어 용액 또는 현탁액으로 제조되고, 이러한 용액 또는 현탁액이 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조될 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 약학적 조성물은 멸균되거나, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제를 더 포함할 수도 있고, 기타 치료적으로 유용한 물질을 더 포함할 수도 있으며, 혼합, 과립화 또는 코팅의 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.
- [0032] 상기 약학적 조성물 내의 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 약학 조성물의 사용 목적, 제형의 형태 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대, 약학 조성물의 전체 중량 기준으로 0.001 내지 99중량%, 0.001 내지 90중량%, 0.001 내지 50중량%, 0.01 내지 50중량%, 0.1 내지 50중량%, 또는 1 내지 50중량%일 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 약학적 조성물에 포함되는 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 치료상 유효량은 질환 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 환자의 질환 종류, 질환의 경중, 투여되는 유효성분의 종류, 제형의 종류, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강 상태, 식이, 약물의 투여 시간 및 투여 방법에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 사람을 포함하는 포유류에 대하여, 하루에 0.01 내지 500 mg/kg(체중)의 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 약학적 유효량은 원하는 효과, 예를 들어 암의 치료 및/또는 예방 효과를 얻을 수 있는 양에 따를 수 있다. 상기 약학적 유효량은 1 일 1 회 또는 2 회 이상 분할되어 경구 또는 비경구적 경로(예를 들어, 정맥 주사, 근육 주사 등)를 통해 투여될 수 있다.
- [0034] 상기 발명에 대해 기술한 용어 및 방법 등은 각 발명들 간에 동일하게 적용된다.

발명의 효과

- [0035] 일 양상에 따른 자기조립체에 의하면, 암세포의 미토콘드리아 내부에서 자기조립체를 형성하여 광역학적 치료 시, 활성산소종을 형성하여 세포 사멸을 유도하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 IR-TPP의 미셀구조 및 미토콘드리아를 표적하여 저산소 상태에서도 PDT 치료 시 효과가 있음을 도식화한 그림이다.
- 도 2는 IR-TPP의 합성과정을 도식화한 그림이다.
- 도 3은 임계 응집 농도(CAC) 이상에서 IR-TPP가 구형의 미셀 구조를 형성한 것을 찍은 TEM 이미지이다.
- 도 4는 IR-TPP의 광 안정성을 나타낸 그래프이다:
- 도 4a는 빛이 없는 경우의 IR-TPP (IR-TPP-L)의 암흑 안정성(dark stability)을 대조군으로 하여, 빛이 있을 때의 IR-TPP (IR-TPP+L), IR-780 (IR-780+L), 및 IR-Br (IR-Br+L)의 광 안정성을 비교한 그래프이고; 도 4b는 CAC 미만인 5 μ M 농도에서 광 안정성을 비교한 그래프이며; 도 4c는 CAC 이상인 10 μ M 농도에서 광 안정성을 비교한 그래프이다.
- 도 5는 분자들의 구조를 입체적으로 나타낸 그림이다:
- 도 5a는 IR-780-102(위) 및 디옥세탄(dioxetane)(아래)의 구조를 나타낸 것이고; 도 5b는 IR-780, IR-Br 및 IR-TPP의 이합체(dimer) 구조(왼쪽에서부터 오른쪽으로) 및 결합 에너지를 나타낸 것으로, 빨간색 및 파란색은 IR-780 모이어티를 나타내고, 노란색, 및 녹색은 각각 빨간색과 파란색을 연결하는 사슬을 나타낸다.
- 도 6은 HeLa 세포에서 시간에 따른 IR-TPP, IR-780 및 IR-Br의 광표백을 나타낸 이미지이다.
- 도 7은 HeLa 세포의 미토콘드리아에서 IR-TPP의 국소화 및 ROS 형성을 나타낸 이미지이다:
- 도 7a는 IR-TPP와 MitoTracker Green FM의 공동 국소화를 나타낸 이미지이고; 도 7b는 IR-TPP가 존재하는 상태에서 정상산소 하에서 레이저 조사하지 않은 경우 ROS 형성을 나타낸 이미지이며; 도 7c는 IR-TPP가 존재하는 상태에서 정상산소 하에서 3분동안 레이저 조사한 경우의 ROS 형성을 나타낸 이미지이고; 도 7d는 IR-TPP가 존재하는 상태에서 저산소 하에서 레이저 조사하지 않은 경우 ROS 형성을 나타낸 이미지이며; 도 7e는 IR-TPP가

존재하는 상태에서 저산소 하에서 3분동안 레이저 조사한 경우의 ROS 형성을 나타낸 이미지이다.

도 8은 HeLa 세포에서 세포독성을 본 결과 그래프이다:

도 8a는 정상산소 하에서 레이저 조사시에 IR-Br과 IR-TPP의 세포독성을 비교한 그래프이고; 도 8b는 저산소 하에서 레이저 조사시에 IR-Br과 IR-TPP의 세포독성을 비교한 그래프이다.

도 9는 저산소 하에서 HeLa 세포의 아포토시스를 유세포 분석 결과로 나타낸 그래프이고, 각각 HeLa 세포에 빛 조사만 한 대조군 (Control+L), IR-TPP 처리 후 레이저 조사하지 않은 군 (IR-TPP-L) 및 IR-TPP 처리 후 3분간 레이저 조사한 군 (IR-TPP+L)이다.

도 10은 IR-TPP의 항 종양 효과를 본 실험 데이터를 나타낸 것이다:

도 10a는 IR-TPP, IR-Br 및 대조군인 PBS를 마우스에 정맥 주사 한 후 24시간 뒤에 찍은 영상화 이미지 및 생체 분포 데이터를 나타낸 것이고; 도 10b는 IR-TPP, IR-Br 및 대조군인 PBS를 주사한 뒤 레이저 조사하여 시간에 따른 종양 크기를 나타낸 사진이며; 도 10c는 시간에 따른 종양 크기를 나타낸 그래프이고; 도 10d는 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 염색을 한 사진이며; 도 10e는 터널 분석을 한 결과 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 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 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0038] **실험재료 및 분광 기록, 세포 배양 방법**
- [0039] 합성을 위한 시약 및 물질은 시그마 알드리치 (Sigma Aldrich) 및 Alfa Aesar 화학물질 공급자로부터 취득하여 사용하였다. 모든 용매는 사용 전에 표준 방법으로 건조시킨 후 사용되었다. NMR 용매를 받은 그대로 사용하고 스펙트럼을 애질런트(Agilent) 400 MHz 분광계로 기록하였다. SiMe₄에 대한 잔류 용매 (CD₃OD-d₄에 대하여 ¹H δ = 3.34 및 ¹³C δ = 49.86) 공명을 사용하여 스펙트럼을 내부적으로 참조하였다. ESI-MS 스펙트럼은 Bruker, 1200 Series & HCT Basic System에서 기록되었다. 전자 흡수 스펙트럼 및 형광 스펙트럼을 각각 JASCO V-670 분광 광도계 및 히타치(Hitachi) F-7000 형광 분광 광도계로 기록하였다. 인간 자궁 경부암 (HeLa) 세포 및 인간 유방암 (SKBR3) 세포를 37 °C, 가습 대기 5 % CO₂에서 10 % 소 태아 혈청 (FBS; Life Technologies) 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (Life Technologies)이 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다.
- [0040] **실시예 1. IR-TPP의 합성**
- [0041] 본 발명에 따른 IR-TPP를 도 2과 같이 합성하였고, 대조군으로 IR-Br을 합성하였다.
- [0042] 구체적으로, 먼저 디클로로벤젠 중의 2,3,3-트리메틸 인돌린 (0.1g, 0.628mmol) 및 Br-6-TPP (0.348g, 0.691mmol)의 용액을 110 °C에서 16 시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 냉각시키고 수득된 침전물을 헥산 및 에테르로 세척하였다. 조 생성물을 CH₂Cl₂/헥산 혼합물에서 재결정화하여 IN-TPP를 수득하였다. 그 다음, CH-OH (0.15 g, 0.87 mmol), IN-TPP (1.02 g, 1.74 mmol) 및 아세트산 나트륨 (0.157 mg, 1.66 mmol)의 용액을 아세트산 무수물 (18 ml)에 용해시키고 70 °C에서 1 시간 동안 가열하였다. 형성된 녹색 용액을 실온으로 냉각시키고, NaBr의 포화 용액 (20 ml)에 부었다. 용매 제거 후, 수득된 녹색 고체를 메탄올에 용해시키고 실리카겔 칼럼을 수행한 후 HPLC (메탄올 : H₂O)로 정제하여 최종적으로 순수한 IR-TPP를 수득하였다.
- [0043] 대조군 분자 IR-Br의 합성은 상기 IR-TPP와 동일한 합성 프로토콜에 따라 수행하여 수득하였다.
- [0044] 도 2는 IR-TPP의 합성과정을 도식화한 그림이다.
- [0045] **실험예 1. IR-TPP의 물리적 특성 분석**
- [0046] IR-TPP의 물리적 특성을 분석하기 위한 실험을 수행하였다.
- [0047] IR-TPP의 수용성을 조사하고 IR-780 (시판되는 미토콘드리아-표적 광 감작제) 및 IR-Br의 수용성과 비교하였다. 그 결과, IR-780과 IR-Br은 몇 시간 후에 물에 침전되었지만 IR-TPP는 그렇지 않은 것으로 나타났다. 또한, IR-TPP가 물에서 구형 미셀로 자가 조립된 것을 발견했다. 이러한 IR-TPP의 더 높은 수용성은 자가-조립에 기인하

고, 이는 양으로 하전된 TPP 모이어티를 통해 친수성이 증가하기 때문이다.

[0048] 피렌 방출법에 의해 IR-TPP의 임계 응집 농도 (CAC)를 측정하였다. 구체적으로, IR-TPP의 임계 응집 농도 (CAC)를 탈 이온수에서 측정하였다. IR-TPP에 대한 CAC는 정상 상태 형광 피렌 방출 방법에 의해 결정되었다. 10mM DMSO 스톱 용액으로 투석하여 300 μ M의 수용액을 제조하였다. 상기 용액을 희석하여 다양한 농도의 수용액을 제조하였다. 2 μ M의 피렌을 함유하는 다른 용액의 형광 방출 스펙트럼을 얻었다. 여기 파장은 343nm로 설정되었다. 373nm 근방에서 I_1 밴드와 384nm 근방에서 I_3 밴드의 비인, I_1 / I_3 의 비율은 응집이 발생했을 때 감소했다. 로그 [IR-TPP]를 I_1 / I_3 에 대해 플롯팅하여 IR-TPP의 CAC는 물에서 5.64 μ M 인 것으로 나타났다. 또한, CAC 이상에서 투과 전자 현미경 (TEM)을 사용하여 IR-TPP를 관찰했을 때 입자 크기가 ~30 nm 인 미셀 나노 입자의 형성을 확인했다 (도 3).

[0049] 도 3은 임계 응집 농도(CAC) 이상에서 IR-TPP가 구형의 미셀 구조를 형성한 것을 찍은 TEM 이미지이다.

[0050] 실험예 2. IR-TPP의 광 안정성 분석

[0051] IR-TPP의 광 안정성 및 암흑 안정성 (dark stability)을 측정하고 IR-780 및 IR-Br과 비교하였다.

[0052] 그 결과, IR-TPP의 광 안정성은 IR-780 및 IR-Br보다 더 높은 것으로 나타났다 (도 4a). 또한, IR-TPP는 100 % 암흑 안정성을 가지고 있음을 나타냈다.

[0053] PDT 동안, 감광제는 항상 ROS에 노출되기 때문에 다양한 반응을 겪을 수 있어, 광 안정성이 문제가 된다. 이에, 다른 시간 동안 레이저 조사 후 10 μ M 농도에서 IR-TPP의 광 안정성을 측정하고, IR-Br 및 IR-780과 비교하였다. 그 결과, CAC 초과 농도에서 IR-TPP는 거의 100 %의 광 안정성을 보여 주었지만, 레이저 조사 기간이 증가함에 따라 IR-Br 및 IR-780의 광 안정성은 급격히 감소하였다. (도 4b 및 4c). 이러한 결과는 IR-TPP의 미셀 구조의 광 안정성이 분자 상태 (CAC 미만)에 비해 자기 조립 상태 (CAC 이상)에서 높다는 것을 나타낸다.

[0054] 도 4는 IR-TPP의 광 안정성을 나타낸 그래프이다:

[0055] 도 4a는 빛이 없는 경우의 IR-TPP (IR-TPP-L)의 암흑 안정성(dark stability)을 대조군으로 하여, 빛이 있을 때의 IR-TPP (IR-TPP+L), IR-780 (IR-780+L), 및 IR-Br (IR-Br+L)의 광 안정성을 비교한 그래프이고; 도 4b는 CAC 미만인 5 μ M 농도에서 광 안정성을 비교한 그래프이며; 도 4c는 CAC 이상인 10 μ M 농도에서 광 안정성을 비교한 그래프이다.

[0056] 또한, IR-TPP의 광 안정성을 조사하기 위해, 1O_2 에 의해 좌우되는 IR-780의 산화를 조사하였다. 광 안정성은 1O_2 에 대한 화학적 안정성과 관련이 있다. TeraChem 소프트웨어에서 구현된 앙상블 밀도 기능 이론 접근 방식 (ensemble density functional theory)을 사용하여 이중으로 축퇴된 1O_2 전자 상태의 전자 상관을 설명했다. 1O_2 가 IR-780의 C = C 결합을 공격하면, 약하게 결합된 IR-780- 1O_2 복합체와 화학적으로 결합된 디옥세탄이라는 두 가지 안정된 생성물을 얻을 수 있다 (도 5a). 에너지적으로, 디옥세탄은 $E \cong -4.80$ kcal/mol로서 IR-780- 1O_2 복합체보다 더 안정적이다. IR-780- 1O_2 복합체에서 IR-780의 구조는 IR-780 단독과 유사하지만, 디옥세탄은 인돌린 고리가 거의 90 ° 회전하여 더 안정한 구조를 형성한다. 디옥세탄은 추가 화학 반응 후 퀀칭을 유발할 수 있는 반응성 종으로 알려져 있다. 나노 입자 형성 또는 나노 입자 내부의 캡슐화 후 IR-TPP는 입체 장애에 의해 디옥세탄 형성이 억제됨에 따라 향상된 광 안정성을 나타냈다. 실제로, 결합 에너지 분석은 IR-TPP가 수용액에서 자가 응집을 선호하지만 IR-780 및 IR-Br은 그렇지 않다는 것을 나타냈다 (도 5b).

[0057] 도 5는 분자들의 구조를 입체적으로 나타낸 그림이다:

[0058] 도 5a는 IR-780- 1O_2 (위) 및 디옥세탄(dioxetane)(아래)의 구조를 나타낸 것이고; 도 5b는 IR-780, IR-Br 및 IR-TPP의 이합체(dimer) 구조(왼쪽에서부터 오른쪽으로) 및 결합 에너지를 나타낸 것으로, 빨간색 및 파란색은 IR-780 모이어티를 나타내고, 노란색, 및 녹색은 각각 빨간색과 파란색을 연결하는 사슬을 나타낸다.

[0059] 또한, 세포 내 IR-TPP의 광 안정성은 살아있는 인간 자궁 경부암 세포주 (HeLa)에서의 광표백에 의해 조사되었다.

[0060] 구체적으로, 하나의 well 당 20000개의 암세포를 배양 후 다양한 농도의 IR-TPP, IR-Br, IR-780를 4시간 동안

처리하였다. 그 후 새 배지 세척을 하여 세포 내에 들어가지 않은 분자들을 제거 후 0, 3, 5, 8, 10 분동안 레이저로 광조사 후 Carl Zeiss LSM 780 NLO 다광자 현미경을 사용하여 공동-국소화를 주기적으로 모니터링하였다. 감광제에 대해 720 nm에서의 여기 및 730-900 nm 사이의 방출로 설정하였다.

[0061] 그 결과, 레이저 조사 기간이 다른 IR-TPP의 발광 강도에는 변화가 없었다. 그러나, IR-Br 및 IR-780 둘 모두의 발광 강도는 레이저 조사 기간이 증가함에 따라 거의 퀀칭(quenching)되었다 (도 6). 이러한 결과는 IR-Br 및 IR-780에 비해 IR-TPP의 높은 광 안정성을 나타낸다.

[0062] 도 6은 HeLa 세포에서 시간에 따른 IR-TPP, IR-780 및 IR-Br의 광표백을 나타낸 이미지이다.

[0063] 실험예 3. 광 역학 요법 (PDT)에서의 IR-TPP의 효능 분석

[0064] 미토콘드리아를 표적으로 하는 PDT 작용제는 미토콘드리아의 생물학적 활성을 방해하고 암 세포의 세포 자멸(apoptosis)을 유도할 수 있다. 따라서 먼저, HeLa 세포를 IR-TPP와 인큐베이션 한 후 형광 현미경 및 MitoTracker Green FM을 이용하여 HeLa 세포에서의 IR-TPP의 미토콘드리아 국소화를 분석했다.

[0065] 구체적으로, 미토-트래커 그린을 이용한 IR-TPP의 공동-국소화 연구를 위해, HeLa 세포를 8-웰 유리 커버 글래스 (Lab Tek II, Thermo Scientific)에 처리 전날 파종 밀도 20000 세포/웰로 파종하였다. 이어서, 세포를 4 시간 동안 IR-TPP (6 μ M)로 처리하였다. 세포를 새로운 배지로 세척하고 미토-트래커 그린과 함께 인큐베이션 하였다. 그 후 세포를 신선한 배지로 세척하고 CO₂ 배양기에 연결된 Carl Zeiss LSM 780 NLO 다광자 현미경을 사용하여 공동-국소화를 주기적으로 모니터링하였다. 감광제에 대해 720 nm에서의 여기 및 730-900 nm 사이의 방출로 설정하고 미토-트래커 녹색 FM 설정에 대해서는 488 nm에서의 여기 및 500-550nm 사이의 방출로 설정하였다.

[0066] 그 결과, 형광 현미경 이미지 (도 7a)로부터, 4 시간의 인큐베이션 후 HeLa 세포에서 MitoTracker Green FM (Pearson Correlation co-efficient-0.83)으로 적색 염색된 IR-TPP의 명확한 공동-국소화가 있음을 관찰했고, 이는 IR-TPP의 흡수가 높음을 나타낸다. 또한, 첨가된 양이온성 트리페닐포스포늄 (TPP) 모이어티로 인해 미토콘드리아에 특이적으로 축적되어, 광 감광제가 미토콘드리아로 향하게 하였다.

[0067] 그 다음, 암 세포에서 PDT에 대한 IR-TPP의 효능을 시험하였다.

[0068] MitoSOX는 미토콘드리아 표적 염료이다. 이는 미토콘드리아 과산화물에 의해 산화되고 적색 형광을 나타낸다. ¹O₂의 존재 하에서 강화된 적색 형광은 세포에서 102 생성에 대한 정성적 측정으로 사용될 수 있다. HeLa 세포를 10 % FBS, 100 μ g mL⁻¹ 스트렙토마이신 및 100 U mL⁻¹ 페니실린이 보충된 DMEM 배지에서 20000 세포/웰의 파종 밀도로 Lab Tek II 챔버 커버 글라스 상에 파종하고 5 % CO₂, 37 °C에서 하루 동안 배양하였다. 그 후 세포를 IR-TPP (10 μ M)와 함께 4 시간 동안 배양했다. 이어서, 세포를 새로운 DMEM으로 세척하고 Hoechst와 함께 배양하여 30 분 동안 핵을 염색시켰다. 세포를 세척하고 빛으로부터 보호된 37 °C에서 10 분 동안 5 μ M MitoSox와 배양하였다. 최종적으로 세포를 세척하고 808 nm 레이저 (200 mW cm⁻²)로 3 분 동안 조사하였다. 이어서 세포를 Carl Zeiss LSM 780 NLO 다광자 현미경으로 분석하였다. 저산소증 하에서의 ROS 생성 연구를 위해, 세포를 20000 세포/웰의 파종 밀도로 Lab Tek II 챔버 커버 글라스 상에 파종하고 저산소증 챔버에서 몇 시간 동안 유지시켰다. 이어서, 세포를 저산소증 챔버에서 4 시간 동안 IR-TPP (10 μ M)로 처리한 후 Hoechst 처리하였다. 그 후 정상산소증 상태의 경우와 동일한 절차를 따랐다. 미토콘드리아 ROS 센서인 MitoSOX를 사용하여 808 nm 레이저 (200 mW cm⁻²)로 3 분 동안 광 조사 전후 IR-TPP-처리된 HeLa 세포에서 미토콘드리아 ROS 수준을 측정하였다. 그 결과, 레이저 조사 후 IR-TPP로 처리된 HeLa 세포에 대해 강한 적색 형광이 나타났다 (도 7b, 7c). 이러한 결과는 IR-TPP의 존재하에 암 세포에서 광-유도된 미토콘드리아 ROS의 생성이 발생함을 나타낸다. MitoSox를 사용하여 저산소증 하에서의 미토콘드리아 ROS 수준 측정은 정상산소증 하에서와 유사한 결과를 나타냈다 (도 7d, 7e). 이는 저산소증 조건 하에서 IR-TPP의 미토콘드리아 ROS 생성 능력을 나타낸다.

[0069] 도 7은 HeLa 세포의 미토콘드리아에서 IR-TPP의 국소화 및 ROS 형성을 나타낸 이미지이다:

[0070] 도 7a는 IR-TPP와 MitoTracker Green FM의 공동 국소화를 나타낸 이미지이고; 도 7b는 IR-TPP가 존재하는 상태에서 정상산소 하에서 레이저 조사하지 않은 경우 ROS 형성을 나타낸 이미지이며; 도 7c는 IR-TPP가 존재하는 상태에서 정상산소 하에서 3분동안 레이저 조사한 경우의 ROS 형성을 나타낸 이미지이고; 도 7d는 IR-TPP가 존재하는 상태에서 저산소 하에서 레이저 조사하지 않은 경우 ROS 형성을 나타낸 이미지이며; 도 7e는 IR-TPP가

존재하는 상태에서 저산소 하에서 3분동안 레이저 조사한 경우의 ROS 형성을 나타낸 이미지이다.

[0071] 실험예 4. IR-TPP의 세포 독성 분석

[0072] 메틸 티아졸일테트라졸륨 (MTT) 분석을 사용하여 정상 산소증 및 저산소증 조건 하에서 HeLa 세포의 세포 생존 능력을 조사했다.

[0073] 구체적으로, HeLa 세포에서 IR-TPP 및 IR-Br의 세포 생존율을 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 분석에 의해 측정하였다. 암흑 독성을 위해, 세포를 밤새 웰당 5×10^3 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 파종하였다. 이어서, 세포를 24 시간 동안 10 % FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 상이한 농도의 IR-TPP로 개별적으로 처리하였다. 이어서, 세포를 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT)와 인큐베이션하고, 결정화된 포르마잔을 ELISA 플레이트 판독기로 595 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량화 하였다. 결과는 생존율 (%) = [(A550 (처리된 세포)-배경)/(A550 (처리되지 않은 세포)-백그라운드)] x 100으로 표현되었다. 정상 산소증에서의 세포 독성에 대해, 세포를 서로 다른 농도의 IR-TPP 및 IR-Br로 12 시간 동안 처리한 후, 배지를 교체하고 세포에 각각 3 분 동안 808nm 레이저 (200mW cm^{-2})를 조사하고 24 시간 동안 유지시켰다. 저산소증 하에서 세포 독성에 대해서는, 세포를 96 웰 플레이트에 파종하고 저산소증 챔버에서 몇 시간 동안 유지시켰다. 이어서, 저산소 챔버에서 12 시간 동안 IR-TPP 및 IR-Br로 세포를 처리한 후, 배지를 교체하고 세포에 각각 3 분 동안 808nm 레이저 (200mW cm^{-2})를 조사하고 저산소증 챔버에서 24시간 동안 유지시킨 뒤, MTT 분석에 의한 독성 분석을 하였다.

[0074] 그 결과, 각각 IC50 값이 ~ 6 및 ~ 8 μM 인 정상 산소증 및 저산소증 조건 하에서 농도 의존적 방식으로 IR-TPP에 의한 HeLa 세포의 현저한 사멸을 나타냈다. IR-Br의 유의한 PDT 효과는 정상 산소증 또는 저산소 상태에서 발견되지 않았다 (도 8a 및 8b). 이러한 결과는 저산소 상태에서도 IR-TPP의 상당한 PDT 효능을 나타낸다.

[0075] 도 8은 HeLa 세포에서 세포독성을 본 결과 그래프이다:

[0076] 도 8a는 정상산소 하에서 레이저 조사시에 IR-Br과 IR-TPP의 세포독성을 비교한 그래프이고; 도 8b는 저산소 하에서 레이저 조사시에 IR-Br과 IR-TPP의 세포독성을 비교한 그래프이다.

[0077] 실험예 5. IR-TPP의 HeLa 세포에서의 유세포 분석

[0078] IR-TPP를 사용한 PDT 후 HeLa 세포의 아포토시스 (apoptosis)는 FITC-아넥신 V/PI 염색 분석을 사용한 유세포 분석에 의해 측정되었다.

[0079] 구체적으로, 10 % FBS 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM (Life Technologies)의 HeLa 세포 (2×10^5 세포/웰)를 6-웰 플레이트에서 5 % CO_2 , 37 °C에서 밤새 배양하였다. 그런 다음 세포를 저산소증 챔버에서 몇 시간 동안 유지한 다음 저산소증 상태에서 12 시간 동안 IR-TPP (10 μM)를 처리하였다. 이어서, 배지를 교체하고 세포를 각각의 웰에 3 분 동안 808nm 레이저 (200mW cm^{-2})로 조사하고 18 시간 동안 유지시켰다. 세포를 세척한 후, 트립신 처리하고 원심 분리로 수집하였다. 1X 아넥신-결합 완충액으로 세척한 후, 세포를 5 μL 의 요오드화 프로피듐 (PI) (스톡 농도는 50 $\mu\text{g/mL}$) 및 5 μL 의 아넥신 V (스톡 농도 200 $\mu\text{g/mL}$)를 함유하는 1X 아넥신-결합 완충액의 100 μL 용액으로 37 °C에서 15 분 동안 배양하였다. 그 후, 또 다른 400 μL 의 1X 아넥신-결합 완충액을 세포에 첨가하고 530 및 610 nm에서 방출 필터를 사용하여 BD FACSVerser 유세포 분석기로 분석하였다. 온전한 세포 (FITC- / PI-)와 비교하여 괴사성(necrotic) (FITC- / PI+) 및 아포토시스 세포 ((이른 (early) 아포토시스 (FITC+ / PI-) 또는 후기 아포토시스 (FITC + / PI +)) 집단의 백분율을 계산하였다.

[0080] 그 결과, 광 조사후 IR-TPP로 처리된 HeLa 세포의 90 %가 저산소증 조건 하에서 아포토시스성임을 확인하였다 (도 9).

[0081] 도 9는 저산소 하에서 HeLa 세포의 아포토시스를 유세포 분석 결과로 나타낸 그래프이고, 각각 HeLa 세포에 빛 조사만 한 대조군 (Control+L), IR-TPP 처리 후 레이저 조사하지 않은 군 (IR-TPP-L) 및 IR-TPP 처리 후 3분간 레이저 조사한 군 (IR-TPP+L)이다.

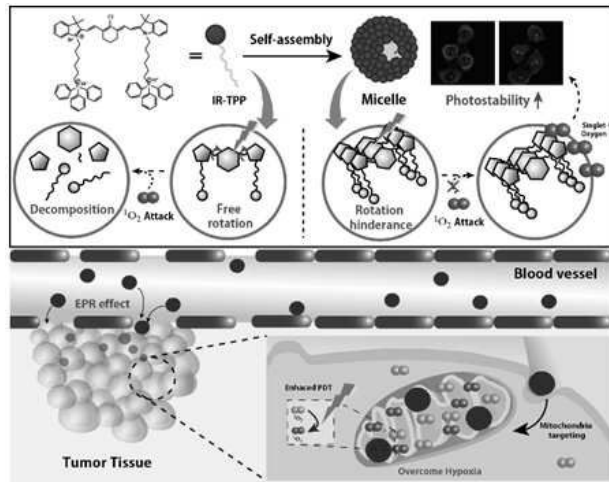
[0082] 실험예 6. IR-TPP의 항 종양 효능 분석

[0083] IR-TPP가 암 세포주에서 유망한 PDT 효과를 확인함에 따라, IR-TPP의 항 종양 효능을 조사하였다. 전체 동물 NIR 이미징을 통해 누드 마우스에서 IR-TPP의 종양 표적화 능력을 탐구했다.

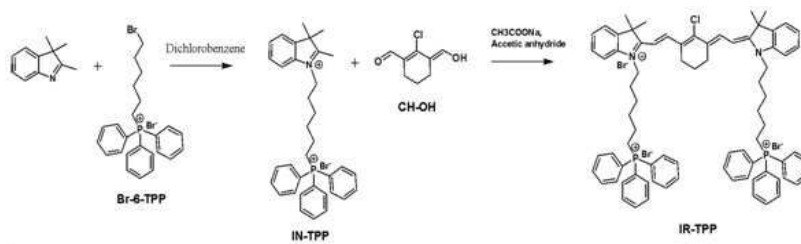
- [0084] 구체적으로, Balb/c 누드 암컷 마우스는 한국의 Orient bio에서 구입했으며 모든 동물 실험은 울산 과학 기술원 (UNIST)의 기관 동물 관리 및 사용위원회가 승인한 프로토콜에 따라 수행되었다. SKBR3 세포주를 사용하여 누드 마우스의 우측 측면에 종양 이종 이식편 모델을 확립하였다. 종양 부피가 $\sim 200 \text{ mm}^3$ 에 도달하면, 각각의 마우스에 IR-TPP (100 μL ; 40 μg / 100 μL), IR-Br (100 μL ; 40 μg / 100 μL) 및 PBS (100 μL)를 개별적으로 정맥 내 주사하고 주기적인 간격으로 표준 X-선 백그라운드를 갖는 760 nm 및 830 nm의 여기를 방출로 설정하여 생체 내 광학 이미징 시스템 (Bruker Xtreme 모델)을 사용하여 상이한 시간 간격으로 이미지를 촬영하였다.
- [0085] 그 결과, IR-TPP의 축적은 생체 내 영상화 데이터로부터 관찰된 바와 같이, 바람직하게는 종양 부위 근처에서 시간이 지남에 따라 증가하였다; 주사 후 24 시간에 가장 높은 축적이 발생하였다. 종양 부위에서의 IR-TPP의 특이적 축적은 생체 분포 연구에 의해 추가로 확인되었다 (도 10a).
- [0086] 다음으로, 인간 유방암 (SKBR3) 세포주를 사용하는 누드 마우스에서 종양 이종 이식편 모델을 사용하여 생체 내 치료 효능을 조사하였다.
- [0087] 구체적으로, Balb/c 누드 암컷 마우스는 한국의 Orient bio에서 구입했으며 모든 동물 실험은 울산 과학 기술원 (UNIST)의 기관 동물 관리 및 사용위원회가 승인한 프로토콜에 따라 수행되었다. SKBR3 세포 (0.1 mL, 1X PBS 중 3×10^6 세포/100 μL)를 각각의 누드 마우스의 우측 측면 영역에 피하 주사하여 종양 이종 이식편 모델을 생성하였다. 디지털 캘리퍼를 사용하여 주기적으로 종양 성장을 모니터링 하였다. 종양 부피는 부피 = (종양 길이) $\times$ (종양 폭) 2 /2의 공식에 의해 계산되었다. 3 개의 대표적인 마우스 그룹 (i) PBS + L (광 조사), (ii) IR-Br + L (광 조사) 및 (iii) IR-TPP + L (광 조사)을, 종양 크기가 200 mm^3 에 도달했을 때 n=5로 선별하였다. 이보다 크거나 작은 종양을 가진 마우스는 선택되지 않았다. 이어서, 마우스에 IR-TPP (100 μL ; 40 μg / 100 μL), IR-Br (100 μL ; 40 μg / 100 μL) 및 PBS (100 μL)를 서로 다른 그룹으로 정맥 내 주사하였다. PDT 치료를 위해, 24 시간의 정맥 주사 후 5 분 동안 NIR 레이저 (808 nm, 200 mWcm^{-2})를 사용하여 마우스 (+ 레이저) 그룹에 조사하였다. 이 패턴은 2일마다 최대 3 주까지 반복되었다. 모든 그룹에서 주기적으로 종양 크기 및 체중을 측정하였다.
- [0088] 그 결과, IR-TPP+L 군에서 종양 크기, 부피 및 중량의 현저한 감소가 대조군과 비교하여 관찰되었다 (도 10b, 10c).
- [0089] IR-TPP 유도된 종양 세포 사멸의 모드는 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 염색 및 터널 분석 (TUNEL 분석 키트, 널리 사용되는 아포토시스 마커)에 의해 조사되었다. 이 둘의 결과는 IR-TPP 처리군 (도 10d 및 10e)에서 핵 응축 (H & E 염색 데이터) 터널 양성 세포에 의한 병리학적 손상 (녹색 형광, 터널 분석으로 나타남)은 IR-TPP에 의한 유도임을 확실하게 나타낸다. 이러한 결과는 IR-TPP가 유의한 종양 억제 효과를 갖는다는 것을 분명히 나타낸다.
- [0090] 도 10은 IR-TPP의 항 종양 효과를 본 실험 데이터를 나타낸 것이다:
- [0091] 도 10a는 IR-TPP, IR-Br 및 대조군인 PBS를 마우스에 정맥 주사 한 후 24시간 뒤에 찍은 영상화 이미지 및 생체 분포 데이터를 나타낸 것이고; 도 10b는 IR-TPP, IR-Br 및 대조군인 PBS를 주사한 뒤 레이저 조사하여 시간에 따른 종양 크기를 나타낸 사진이며; 도 10c는 시간에 따른 종양 크기를 나타낸 그래프이고; 도 10d는 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 염색을 한 사진이며; 도 10e는 터널 분석을 한 결과 사진이다.

도면

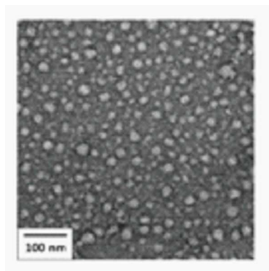
도면1



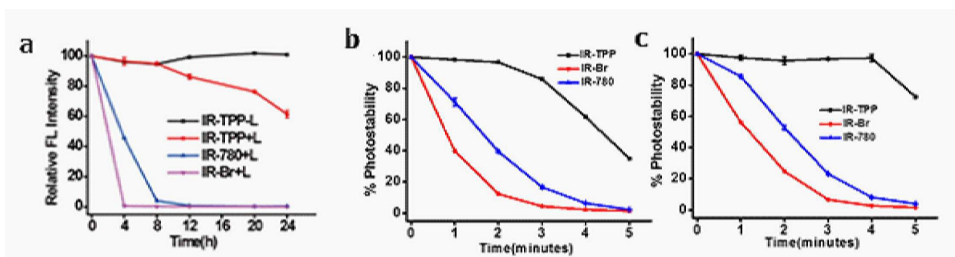
도면2



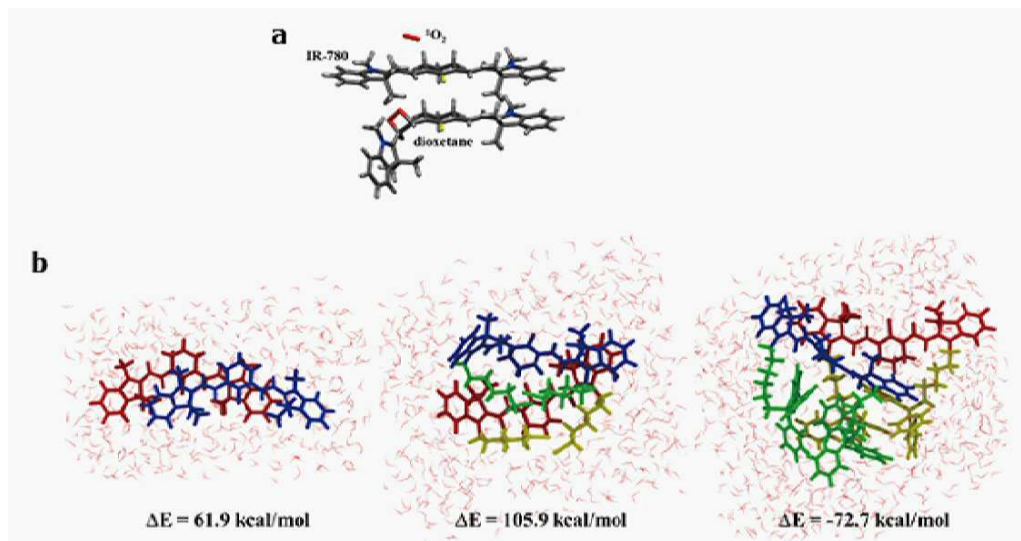
도면3



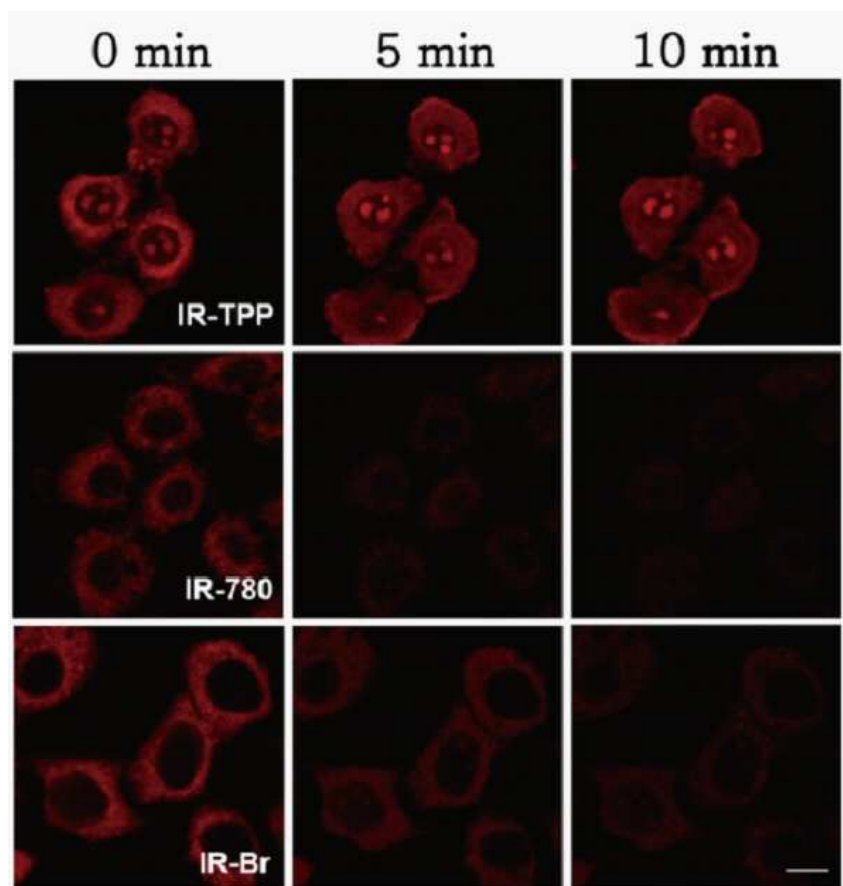
도면4



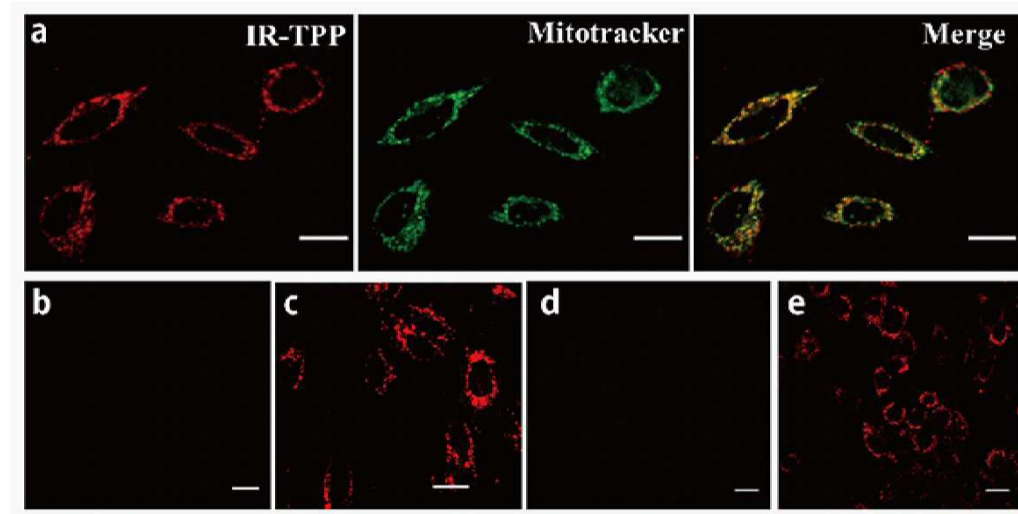
도면5



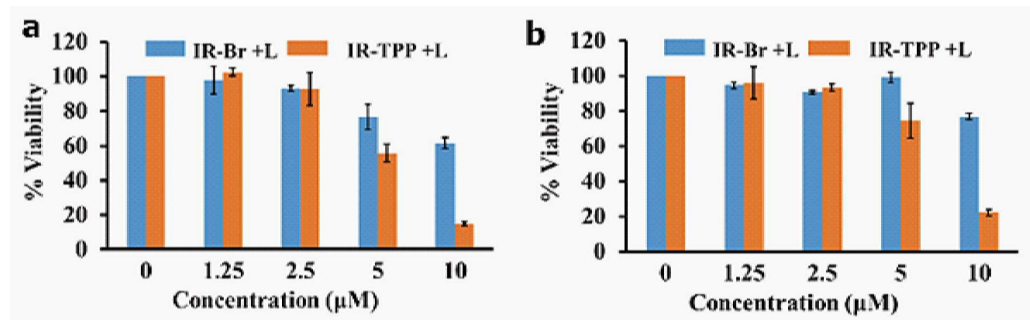
도면6



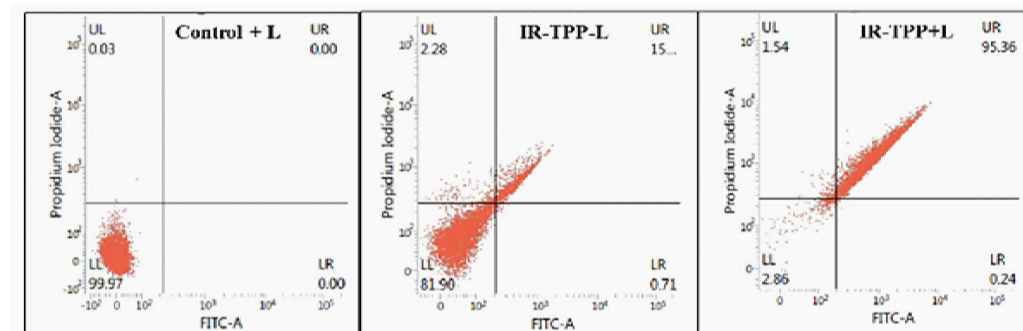
도면7



도면8



도면9



도면10

