(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0008756
(43) 공개일자 2019년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 3/06 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 3/06 (2013.01)
A61K 49/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0090542
(22) 출원일자 2017년07월17일
심사청구일자 2017년07월17일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호(서빙고동, 신동아아파트)
리싱슈
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 디동 501호 (대현동, 종합과학관)
이다영
서울특별시 서대문구 봉원사길 41-7, 110호 (대신동)
(74) 대리인
리앤목특허법인

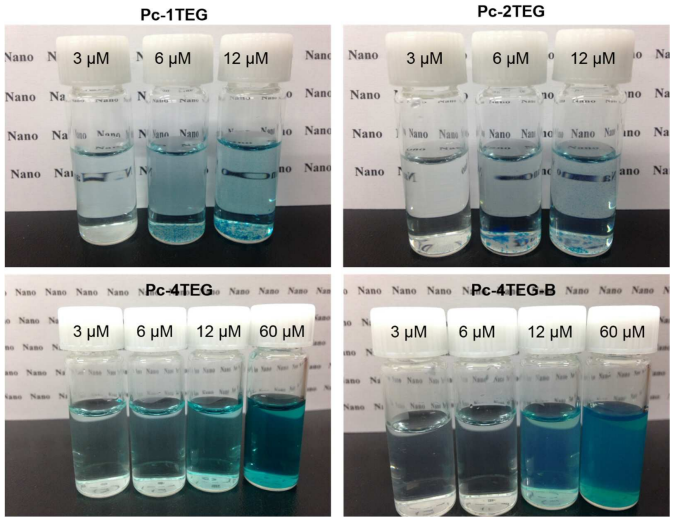
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **유기금속 화합물, 이들의 자기 조립체 및 이를 포함한 종양 진단 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

신규 유기금속 화합물, 이의 자기 조립체 및 이를 포함한 종양 진단 또는 치료용 조성물이 개시된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/574 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A3A2048814
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구
연구과제명 다차원 유기소재 연구
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2017.08.31

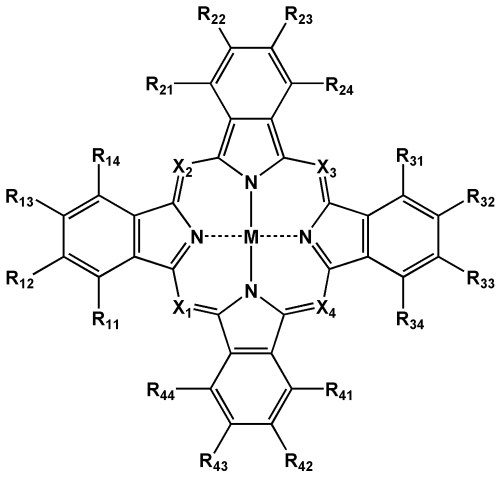
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 유기금속 화합물:

<화학식 1>



<화학식 2>

*-L-A

상기 화학식 1 중,

M은 아연(Zn), 구리(Cu), Mg(마그네슘), 납(Pb), 철(Fe), 팔라듐(Pd), 니켈(Ni), 백금(Pt), 주석(Sn), 코발트(Co), 금(Au) 또는 은(Ag)이고,

X_1은 C(R_1) 또는 N이고,

X_2은 C(R_2) 또는 N이고,

X_3은 C(R_3) 또는 N이고,

X_4은 C(R_4) 또는 N이고,

R_1 내지 R_4, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44}은 서로 독립적으로, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10}알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10}알키닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20}알콕시기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10}시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10}시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20}헤테로아릴기, $Si(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-N(Q_1)(Q_2)$, $-B(Q_1)(Q_2)$, $-C(=O)(Q_1)$, $-S(=O)_2(Q_1)$ 및 $-P(=O)(Q_1)(Q_2)$ 중에서 선택되되, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44} 중 적어도 4개는 상기 화학식 2로 표시되는 그룹이고,

L은 친수성 연결기(linker)이고,

A는 표적형 소분자 리간드고,

상기 치환된 C_1-C_{10}알킬기, 치환된 C_2-C_{10}알케닐기, 치환된 C_2-C_{10}알키닐기, 치환된 C_1-C_{10}알콕시기, 치환된 C_3-C_{10}시클로알킬기, 치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, 치환된 C_3-C_{10}시클로알케닐기, 치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, 치환된 C_6-C_{20}아릴기, 치환된 C_6-C_{20}아릴옥시기, 치환된 C_6-C_{20}아릴티오기 및 치환된 C_1-C_{20}헤테로아릴기 중 적어도 하나는,

중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, C_1-C_{10}알킬기, C_2-C_{10}알케닐기, C_2-C_{10}알키닐기, C_1-C_{10}알콕시기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, C_3-C_{10}시클로알케닐기, C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, C_6-C_{20}아릴기, C_6-C_{20}아릴옥시기, C_6-C_{20}아릴티오기, C_1-C_{20}헤테로아릴기, $-Si(Q_{11})(Q_{12})(Q_{13})$, $-N(Q_{11})(Q_{12})$, $-B(Q_{11})(Q_{12})$, $-C(=O)(Q_{11})$, $-S(=O)_2(Q_{11})$ 및 $-P(=O)(Q_{11})(Q_{12})$ 중에서 선택되고,

상기 Q_1 내지 Q_3 및 Q_{11} 내지 Q_{13}은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, C_1-C_{10}알킬기, C_2-C_{10}알케닐기, C_2-C_{10}알키닐기, C_1-C_{10}알콕시기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, C_3-C_{10}시클로알케닐기, C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, C_6-C_{20}아릴기 및 C_1-C_{20}헤테로아릴기 중에서 선택되고,

*은 이웃한 원자와의 결합 사이트이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 X_1 내지 X_4은 N인, 유기금속 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44}은 서로 독립적으로, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹 또는 수소인, 유기금속 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 L은 모노에틸렌글리콜, 디에틸렌글리콜, 1,2-프로필렌글리콜, 트리에틸렌글리콜, 테트라에틸렌글리콜, 1,3-프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 글리세롤인, 유기금속 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

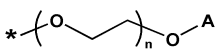
상기 A는 비오틴(biotin), 엽산(folate), 레티노산(retinoic acid), 디하이드로아스코르브산(dehydroascorbic acid) 또는 아릴술폰아미드 리간드(arylsulfonamide ligand)인, 유기금속 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 그룹은 하기 화학식 2-1로 표시되는, 유기금속 화합물:

<화학식 2-1>



상기 화학식 2-1 중,

n은 3 내지 10의 정수 중에서 선택되고,

A는 제1항에 기재된 바와 같고,

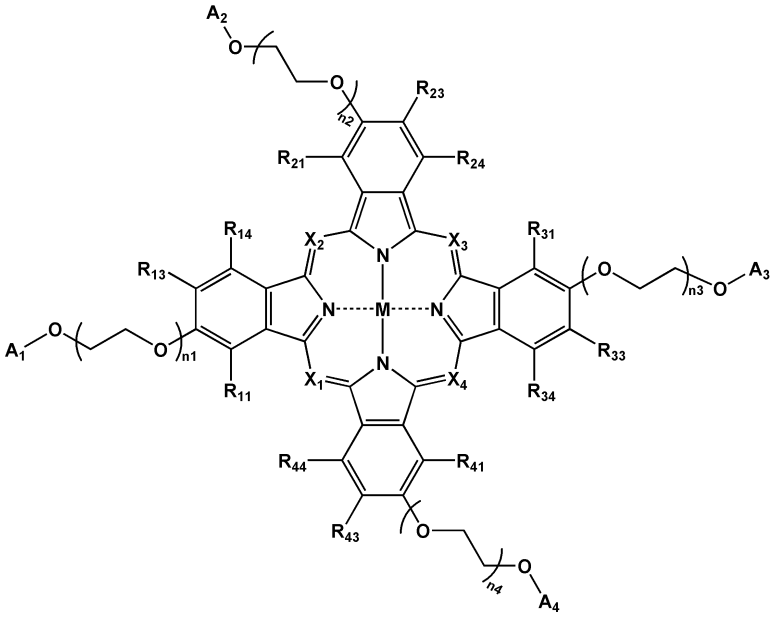
*은 이웃한 원자와의 결합 사이트이다.

청구항 7

제1항에 있어서,

하기 화학식 1-1로 표시되는 유기금속 화합물:

<화학식 1-1>



상기 화학식 1 중,

M, X_1 내지 X_4, R_{11}, R_{13}, R_{14}, R_{21}, R_{23}, R_{24}, R_{31}, R_{33}, R_{34}, R_{41}, R_{43} 및 R_{44}에 대한 설명은 각각 제1항에 기재된 바와 같고,

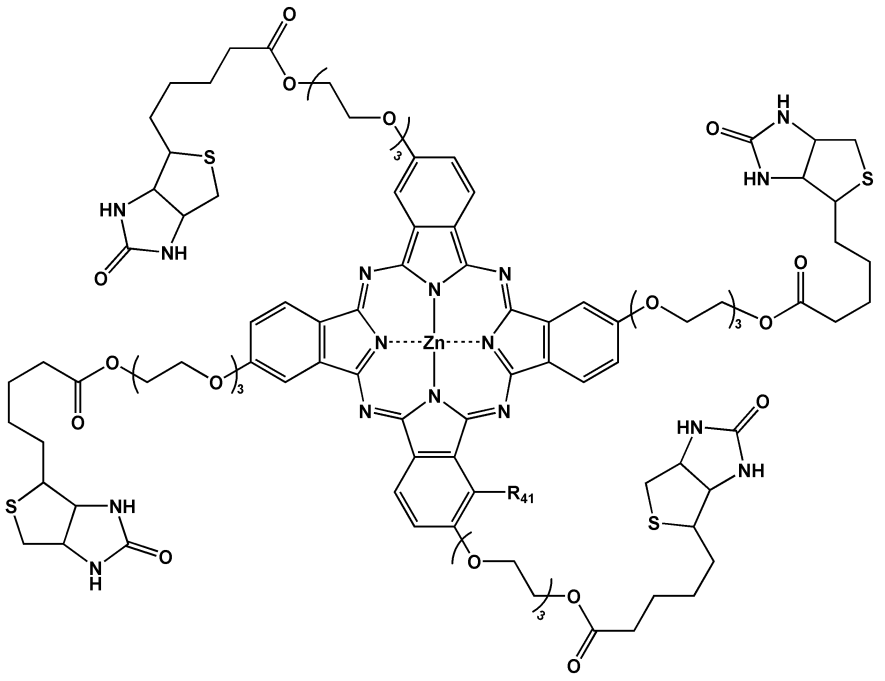
A_1 내지 A_4에 대한 설명은 각각 제1항에 기재된 A에 대한 설명을 참조하고,

n1 내지 n4는 서로 독립적으로, 3 내지 10의 정수 중에서 선택된다.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 유기금속 화합물은 하기 화합물 Pc-4TEG-B인, 유기금속 화합물:



Pc-4TEG-B

청구항 9

제1항의 유기금속 화합물이 자기 조립되어 형성된 자기 조립체.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 유기금속 화합물 또는 제9항의 자기 조립체를 유효성분으로 포함한 종양 진단 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 유기금속 화합물, 이들의 자기 조립체 및 이를 포함한 종양 진단 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오마커(biomarker)의 발현을 시각화하고 생체 내에 생리 활성 시약을 전달하는 능력은 기본적인 생물학적 연구 및 치료적 응용에 있어서 근본적으로 중요하다. 암 치료와 같은 특정 질환에 대한 치료법을 개발하는 동안, 모니터링 및 치료 능력을 동시에 보유한 테라노스틱(theranostic) 전략을 개발하는 데 상당한 관심이 모아지고 있다. 그러나, 저농도의 바이오마커를 프로빙(probing)하고, 특정 종양 조직(특히, 복합체)에 고농도로 치료제를 전달하는 것은 큰 과제이다. 현재 암 테라노스틱 전략은 종양 조직의 신호 판독 또는 치료제 페이로드(payload)의 상대적인 축적을 가능하게 하여 대조 이미징(contrast imaging) 및 표적화 치료로 이어지는 암 관련 항원에 대한 항체의 친화력을 기초로 한다. 불행하게도, 정상 조직에 비해 종양 조직에서 요구되는 신호 강도 및 치료제 농도를 감소시키기 위해 사용되는 전환 가능한(switchable) 디자인의 부재는 낮은 신호 대 배경 비 및 바람직하지 못한 부작용을 수반한 제한된 이미징 감도를 초래한다. 따라서, 암 테라노스틱을 위한 전환 가능한 디자인의 개발이 주요한 과제이다.

[0003] 단백질은 에너지 저장, 대사 반응 촉매 작용 및 세포 기능 조절을 포함한 생물체 내에서 다양한 기능을 수행하는 필수적인 생체거대분자이다. 단백질의 비정상적인 발현은 종종 암과 관련된다. 비오틴 수용체, 엽산 수용체 및 인간 탄산 탈수 효소II(hCAII)는 많은 종류의 암 세포에서 과발현된다. 따라서, 이러한 단백질은 잠재적인 암 진단 및 종양 표적 치료를 위한 유용한 바이오마커 역할을 한다. 현재, 펩티드 분자 표지, 앱타머(aptamer) 응집 유도 방출 및 초분자 접근과 같은 몇몇 전환 가능한 디자인이 암 관련 단백질 바이오마커를 검출하고 치료 시약을 전달하기 위해 개발되었다. 시각화된 신호 및 항암 활동은 친화도 표지, 정전기적 상호 작용, 소수성 리간드 결합 또는 특정 펩티드 단편 인식을 통해 표적화된 단백질을 인식하면 턴온(turn-on)될 수

있다. 이러한 테라노스틱 시스템은 모니터링 및 치료 둘 다를 달성하기 위해 사용되지만, 이들 대부분은 다른 기능들을 만들기 위해 여러 성분으로 구성되며, 심지어 이러한 시스템을 구축하고 안정화하기 위해 추가 물질을 필요로 한다. 이러한 시스템은 다단계 제조 및 낮은 시약 농도를 포함한 단점을 갖는다. 또한, 이들은 사용된 여러 성분으로 인해 복잡한 독성 조사를 필요로 하며, 잠재적으로 미래의 임상적 번역을 방해할 수 있는 분균질 제형을 포함할 수도 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 일 측면은 종양 진단 또는 치료용 조성물에 사용할 수 있는 신규 유기금속 화합물을 제공하는 것이다.

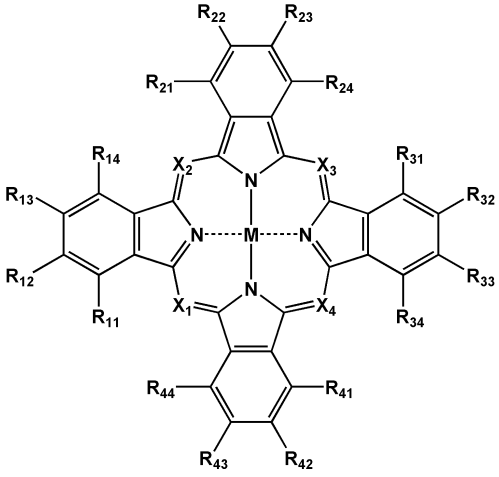
[0005] 다른 측면은 종양 진단 또는 치료용 조성물에 사용할 수 있는 신규 자기 조립체를 제공하는 것이다.

[0006] 또 다른 측면은 신규 종양 진단 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 유기금속 화합물이 개시된다:

[0008] <화학식 1>

[0009] 

[0010] <화학식 2>

[0011] *-L-A

[0012] 상기 화학식 1 중,

[0013] M은 아연(Zn), 구리(Cu), Mg(마그네슘), 납(Pb), 철(Fe), 팔라듐(Pd), 니켈(Ni), 백금(Pt), 주석(Sn), 코발트(Co), 금(Au) 또는 은(Ag)이고,

[0014] X_1은 C(R_1) 또는 N이고,

[0015] X_2은 C(R_2) 또는 N이고,

[0016] X_3은 C(R_3) 또는 N이고,

[0017] X_4은 C(R_4) 또는 N이고,

[0018] R_1 내지 R_4, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44}은 서로 독립적으로, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10}알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10}알키닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20}알콕시기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10}시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10}시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기,

치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20}헤테로아릴기, $Si(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-N(Q_1)(Q_2)$, $-B(Q_1)(Q_2)$, $-C(=O)(Q_1)$, $-S(=O)_2(Q_1)$ 및 $-P(=O)(Q_1)(Q_2)$ 중에서 선택되되, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44} 중 적어도 4개는 상기 화학식 2로 표시되는 그룹이고,

[0019] L은 친수성 연결기(linker)이고,

[0020] A는 표적형 소분자 리간드고,

[0021] 상기 치환된 C_1-C_{10}알킬기, 치환된 C_2-C_{10}알케닐기, 치환된 C_2-C_{10}알키닐기, 치환된 C_1-C_{10}알콕시기, 치환된 C_3-C_{10}시클로알킬기, 치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, 치환된 C_3-C_{10}시클로알케닐기, 치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, 치환된 C_6-C_{20}아릴기, 치환된 C_6-C_{20}아릴옥시기, 치환된 C_6-C_{20}아릴티오기 및 치환된 C_1-C_{20}헤테로아릴기 중 적어도 하나는,

[0022] 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, C_1-C_{10}알킬기, C_2-C_{10}알케닐기, C_2-C_{10}알키닐기, C_1-C_{10}알콕시기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, C_3-C_{10}시클로알케닐기, C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, C_6-C_{20}아릴기, C_6-C_{20}아릴옥시기, C_6-C_{20}아릴티오기, C_1-C_{20}헤테로아릴기, $-Si(Q_{11})(Q_{12})(Q_{13})$, $-N(Q_{11})(Q_{12})$, $-B(Q_{11})(Q_{12})$, $-C(=O)(Q_{11})$, $-S(=O)_2(Q_{11})$ 및 $-P(=O)(Q_{11})(Q_{12})$ 중에서 선택되고,

[0023] 상기 Q_1 내지 Q_3 및 Q_{11} 내지 Q_{13}은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, C_1-C_{10}알킬기, C_2-C_{10}알케닐기, C_2-C_{10}알키닐기, C_1-C_{10}알콕시기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, C_3-C_{10}시클로알케닐기, C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, C_6-C_{20}아릴기 및 C_1-C_{20}헤테로아릴기 중에서 선택되고,

[0024] *은 이웃한 원자와의 결합 사이트이다.

[0025] 다른 측면에 따르면, 상술한 유기금속 화합물이 자기 조립되어 형성된 자기 조립체가 개시된다.

[0026] 또 다른 측면에 따르면, 상술한 유기금속 화합물 또는 상술한 자기 조립체를 유효성분으로 포함한 종양 진단 또는 치료용 조성물이 개시된다.

발명의 효과

[0027] 상술한 신규 유기금속 화합물은 자기 조립체를 형성할 수 있고, 상기 자기 조립체는 표적화된 단백질과의 결합으로 인해 부분 분해될 수 있으며, 이러한 자기 조립 및 부분 분해에 의해 형광 전환이 가능하다. 따라서, 상술한 유기금속 화합물을 이용하여 암 테라노스틱을 위한 형광 전환이 가능해진다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 상이한 빌딩 블록들의 나노입자성 구조체의 형성 가능성을 도시한다.

도 2는 Pc-4TEG 조립체(이하, 'NanoPcT'라 함)의 평균 크기를 도시한다.

도 3은 상이한 농도(a) 및 에이징(aging) 시간(b)에서의 본 발명의 일 구현예에 따른 Pc-4TEG-B 조립체(이하, 'NanoPcTB'라 함)의 평균 크기를 도시한다.

도 4는 NanoPcT 및 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 PDI(particle distribution index)를 도시한다.

도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 수 중의 NanoPcTB 및 NanoPcT를 상이한 시간 동안 방치한 이후의 사진을 도시한다.

도 6은 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 제조 및 그들의 특성을 도시한다.

도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 레이저 조사 이후의 온도 상승을 도시한다.

도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 Pc-4TEG-B 및 Pc-4TEG의 크기 분포(a) 및 레이저 조사 후의 용액 온도(b)를

도시한다.

도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 특이적 단백질 구동 부분 분해에 기초한 NanoPcTB의 전환 가능한 광 활성을 도시한다.

도 10은 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 반응성 산소종(ROS)의 생성을 도시한다.

도 11은 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 레이저 조사 이후의 온도 변화를 도시한다.

도 12는 아비딘(avidin)의 유무에 따른 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 광음향(Photoacoustic: PA) 진폭(a) 및 2차원 PA 이미지(b)를 도시한다.

도 13은 상이한 농도의 아비딘을 포함한 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 형광 스펙트럼을 도시한다.

도 14는 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB를 정맥에 주입하기 전 및 주입한 후의 A549 종양을 보유한 마우스의 *in vivo* 형광 이미지를 도시한다.

도 15는 NanoPcT를 정맥에 주입하기 전 및 주입한 후의 A549 종양을 보유한 마우스의 *in vivo* 형광 이미징을 도시한다.

도 16은 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB 및 NanoPcT를 정맥에 주입한 후 7일째의 A549 종양을 보유한 마우스의 *ex vivo* 형광 이미징을 도시한다.

도 17은 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB를 주입하기 전 및 주입한 후, 또는 먼저 비오틴을 주입한 후 20분 뒤에 NanoPcTB을 주입하기 전 및 주입한 후의 A549 종양의 *ex vivo* 형광 이미징을 도시한다.

도 18은 본 발명의 일 구현예에 따른 NanoPcTB의 정맥 내 주입 전후의 A549 종양을 보유한 마우스의 *in vivo* 광음향 단층 촬영을 도시한다

도 19는 *in vitro* 항암 효과를 도시한다.

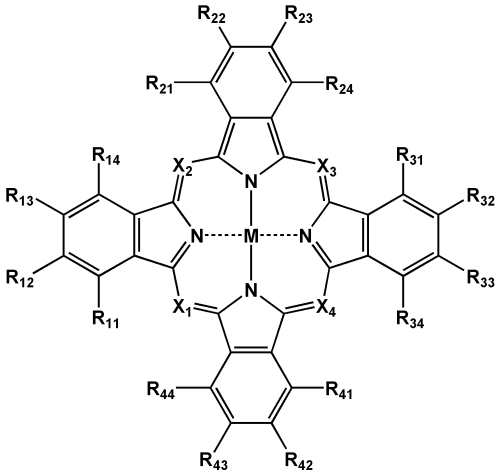
도 20은 *in vivo* 항암 효과를 도시한다.

도 21은 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling) 분석으로 검출된 치료 후 종양 괴사 또는 사멸 세포의 비교를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 일 측면에 따른 유기금속 화합물은 하기 화학식 1로 표시된다:

[0030] <화학식 1>



[0031]

[0032] 상기 화학식 1 중, M은 아연(Zn), 구리(Cu), Mg(마그네슘), 납(Pb), 철(Fe), 팔라듐(Pd), 니켈(Ni), 백금(Pt), 주석(Sn), 코발트(Co), 금(Au) 또는 은(Ag)일 수 있다. 일 구현예에 따르면, 상기 M은 Zn일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 상기 화학식 1 중, X_1은 C(R_1) 또는 N이고, X_2은 C(R_2) 또는 N이고, X_3은 C(R_3) 또는 N이고, X_4은 C(R_4) 또는 N이

며, R_1 내지 R_4에 대한 설명은 후술된다. 일 구현예에 따르면, 상기 X_1 내지 X_4는 모두 N일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 상기 화학식 1 중, R_1 내지 R_4, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44}은 서로 독립적으로, 하기 화학식 2로 표시되는 그룹, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10}알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10}알키닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20}알콕시기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10}시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3-C_{10}시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6-C_{20}아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20}헤테로아릴기, $Si(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-N(Q_1)(Q_2)$, $-B(Q_1)(Q_2)$, $-C(=O)(Q_1)$, $-S(=O)_2(Q_1)$ 및 $-P(=O)(Q_1)(Q_2)$ 중에서 선택되되, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44} 중 적어도 4개는 상기 화학식 2로 표시되는 그룹일 수 있다:

[0035] <화학식 2>

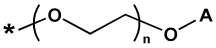
[0036] *-L-A

[0037] 상기 화학식 2 중, L은 친수성 연결기(linker)이고, *은 이웃한 원자와의 결합 사이트이다.

[0038] 일 구현예에 따르면, 상기 L은 모노에틸렌글리콜, 디에틸렌글리콜, 1,2-프로필렌글리콜, 트리에틸렌글리콜, 테트라에틸렌글리콜, 1,3-프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 글리세롤일 수 있다. 예를 들어, 상기 L은 트리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹은 하기 화학식 2-1로 표시될 수 있다:

[0040] <화학식 2-1>

[0041] 

[0042] 상기 화학식 2-1 중, n은 3 내지 10의 정수 중에서 선택되고, *은 이웃한 원자와의 결합사이트이고, A는 후술된다.

[0043] 상기 화학식 2 중, 상기 A는 표적형 소분자 리간드이다. 여기서 "표적형 소분자 리간드"란 특정 단백질(특히, 종양 세포에서 과발현되는 단백질)에 대해 친화력(affinity)(구체적으로, 능동적 표적지향(active targeting)이 가능할 정도의 친화력)이 있는 소분자 리간드를 통칭한다. 상기 표적형 소분자 리간드는 특정 단백질에 대해 친화력이 있을 뿐만 아니라, 상기 유기금속 화합물의 친수성을 향상시킬 수 있다.

[0044] 일 구현예에 따르면, 상기 A는 비오틴(biotin), 엽산(folate), 레티노산(retinoic acid), 디하이드로아스코르브산(dehydroascorbic acid) 또는 아릴술폰아미드 리간드(arylsulfonamide ligand)일 수 있다. 구체적으로, 상기 A는 비오틴일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 일 구현예에 따르면, 상기 R_1 내지 R_4, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44}은 서로 독립적으로, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10}알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2-C_{10}알키닐기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{20}알콕시기, $Si(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-N(Q_1)(Q_2)$, $-B(Q_1)(Q_2)$, $-C(=O)(Q_1)$, $-S(=O)_2(Q_1)$ 및 $-P(=O)(Q_1)(Q_2)$ 중에서 선택될 수 있고,

[0046] 상기 치환된 C_1-C_{10}알킬기, 치환된 C_2-C_{10}알케닐기, 치환된 C_2-C_{10}알키닐기, 치환된 C_1-C_{10}알콕시기, 치환된 C_3-C_{10}시클로알킬기, 치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, 치환된 C_3-C_{10}시클로알케닐기, 치환된 C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, 치환된 C_6-C_{20}아릴기, 치환된 C_6-C_{20}아릴옥시기, 치환된 C_6-C_{20}아릴티오기 및 치환된 C_1-C_{20}헤테로아릴기 중 적어도 하나는,

[0047] 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, C_1-C_{10}알킬기, C_2-C_{10}알케닐기, C_2-C_{10}알키닐기, C_1-C_{10}알콕시기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, C_3-C_{10}

시클로알케닐기, C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, C_6-C_{20}아릴기, C_6-C_{20}아릴옥시기, C_6-C_{20}아릴티오기, C_1-C_{20}헤테로아릴기, $-Si(Q_{11})(Q_{12})(Q_{13})$, $-N(Q_{11})(Q_{12})$, $-B(Q_{11})(Q_{12})$, $-C(=O)(Q_{11})$, $-S(=O)_2(Q_{11})$ 및 $-P(=O)(Q_{11})(Q_{12})$ 중에서 선택되고,

[0048] 상기 Q_1 내지 Q_3 및 Q_{11} 내지 Q_{13}은 서로 독립적으로, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, C_1-C_{10}알킬기, C_2-C_{10}알케닐기, C_2-C_{10}알키닐기, C_1-C_{10}알콕시기, C_3-C_{10}시클로알킬기, C_1-C_{10}헤테로시클로알킬기, C_3-C_{10}시클로알케닐기, C_1-C_{10}헤테로시클로알케닐기, C_6-C_{20}아릴기 및 C_1-C_{20}헤테로아릴기 중에서 선택될 수 있다.

[0049] 다른 구현예에 따르면, 상기 R_1 내지 R_4, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44}은 서로 독립적으로, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹, 수소, 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 히드록실기, 시아노기, 니트로기, 아미디노기, 히드라지노기, 히드라조노기, 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10}알킬기, $-N(Q_1)(Q_2)$, $-C(=O)(Q_1)$, $-S(=O)_2(Q_1)$ 및 $-P(=O)(Q_1)(Q_2)$ 중에서 선택될 수 있다.

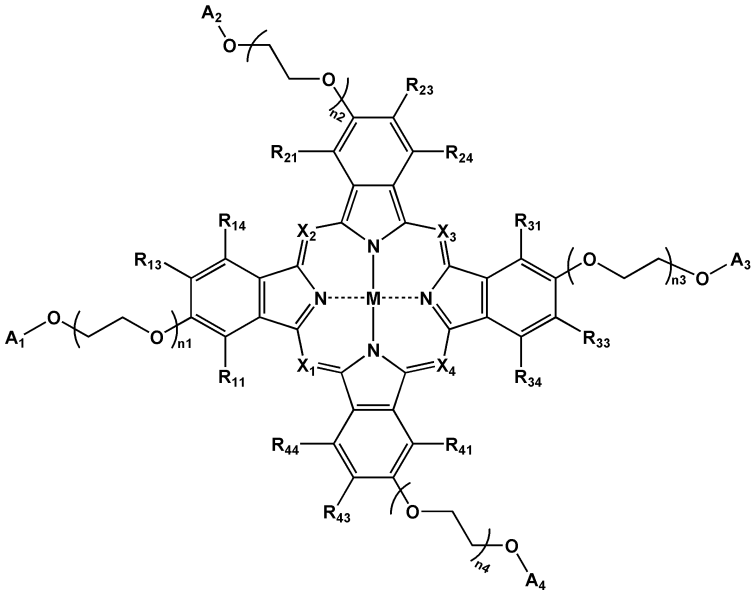
[0050] 또 다른 구현예에 따르면, 상기 R_1 내지 R_4, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44}은 서로 독립적으로, 상기 화학식 2로 표시되는 그룹 또는 수소일 수 있다.

[0051] 또 다른 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중, R_{12}, R_{22}, R_{32} 및 R_{42}은 상기 화학식 2로 표시되는 그룹이고, R_{11}, R_{13}, R_{14}, R_{21}, R_{23}, R_{24}, R_{31}, R_{33}, R_{34}, R_{41}, R_{43} 및 R_{44}은 수소일 수 있다.

[0052] 또 다른 구현예에 따르면, 상기 화학식 1 중, R_{12}, R_{22}, R_{32} 및 R_{42}은 상기 화학식 2-1로 표시되는 그룹이고, R_{11}, R_{13}, R_{14}, R_{21}, R_{23}, R_{24}, R_{31}, R_{33}, R_{34}, R_{41}, R_{43} 및 R_{44}은 수소일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 일 구현예에 따르면, 상기 유기금속 화합물은 하기 화학식 1-1로 표시될 수 있다:

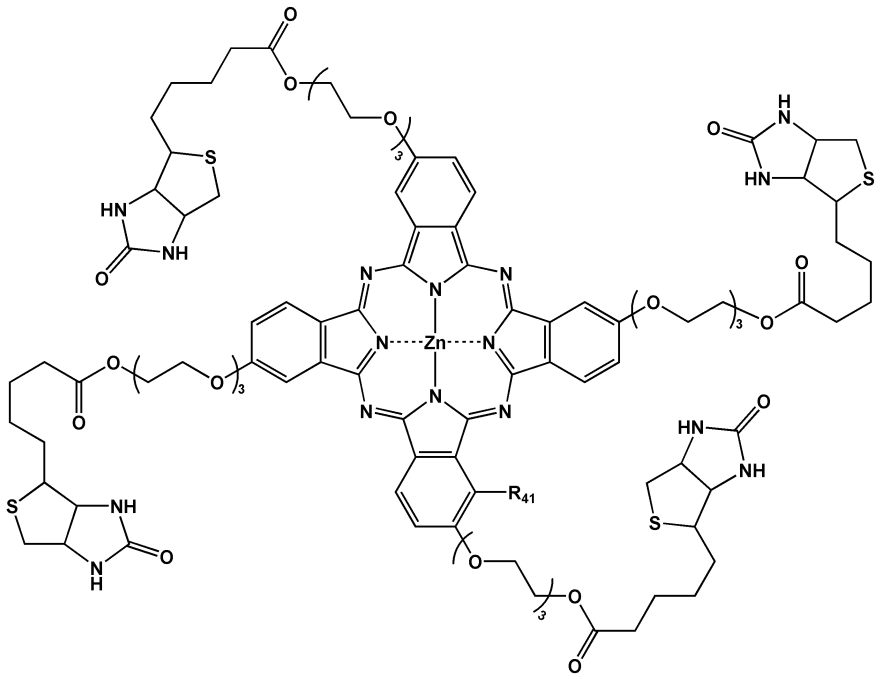
[0054] <화학식 1-1>



[0055]

[0056] 상기 화학식 1 중, M, X_1 내지 X_4, R_{11}, R_{13}, R_{14}, R_{21}, R_{23}, R_{24}, R_{31}, R_{33}, R_{34}, R_{41}, R_{43} 및 R_{44}에 대한 설명은 각각 본 명세서에 기재된 바를 참조하고, A_1 내지 A_4에 대한 설명은 각각 본 명세서에 기재된 A에 대한 설명을 참조하고, n1 내지 n4는 서로 독립적으로, 3 내지 10의 정수 중에서 선택된다.

[0057] 일 구현예에 따르면, 상기 유기금속 화합물은 하기 화합물 Pc-4TEG-B일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다:

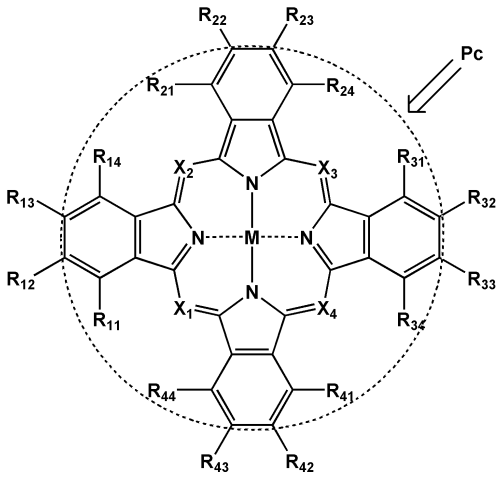


[0058] Pc-4TEG-B .

[0059] 다른 측면에 따르면, 상술한 유기금속 화합물이 자기 조립되어 형성된 자기 조립체가 개시된다.

[0060] 하기 화학식 1'으로 표시된 금속 프탈로시아닌 유도체(이하, 'Pc'라 함)는 소수성을 갖고, 하기 R_1 내지 R_4, R_{11} 내지 R_{14}, R_{21} 내지 R_{24}, R_{31} 내지 R_{34} 및 R_{41} 내지 R_{44} 중 적어도 4개는 친수성 연결기를 갖는 상기 화학식 2로 표시되는 그룹을 가지므로, 상기 유기금속 화합물은 양친매성을 띠며, 수용액 중에서 구형의 자기 조립체를 형성할 수 있다:

[0061] <화학식 1'>



[0062] .

[0063] 일 구현예에 따르면, 상기 자기 조립체는 구형일 수 있다. 예를 들어, 상기 자기 조립체는 100 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 구형의 나노구조체일 수 있다.

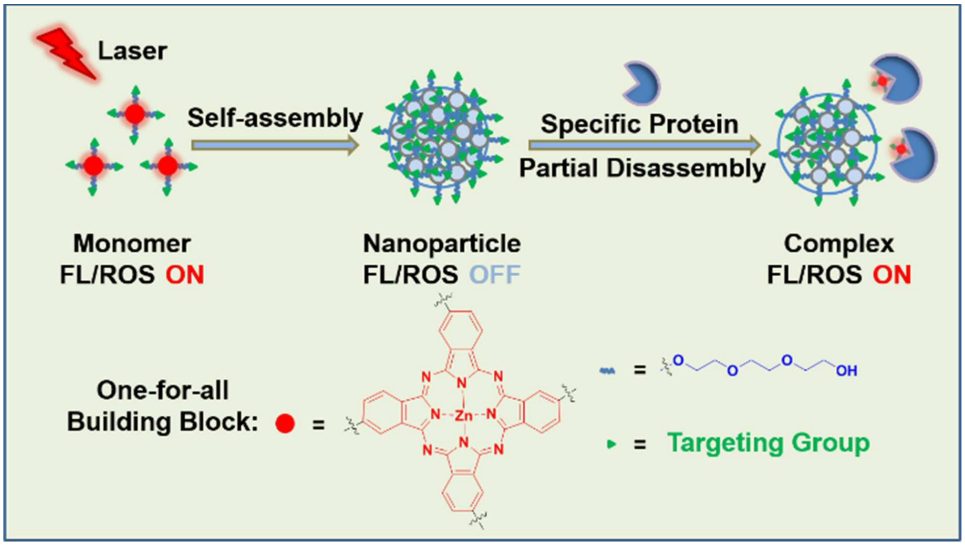
[0064] 일 구현예에 따르면, 상기 자기 조립체는 광열 특성 및/또는 광음향 특성을 가질 수 있다.

[0065] 또 다른 측면에 따르면, 상술한 유기금속 화합물 또는 상술한 자기 조립체를 유효성분으로 포함한 종양 진단 또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0066] 이론에 구속되고자 하는 것은 아니나, 예를 들어 하기 스킴 1에 도시한 바와 같이, 상술한 유기금속 화합물들은 광(예를 들어, 레이저) 조사에 의해 여기되어 형광을 방출하고 그 결과 반응성 산소종을 생성할 수 있다. 그러나, 이들이 수용액 중에서 자기 조립되어 자기 조립체를 형성하게 되면 형광이 퀀칭되고, 그 결과 반응성 산소종을 더 이상 생성하지 않게 된다. 그러나, 상기 자기 조립체가 표적화된 단백질(예를 들면, 비오틴 수용체)과

결합하여 복합체를 형성하면, 상기 자기 조립체의 부분 분해(partial disassembly)가 일어나고, 그 결과 다시 형광을 방출하고, 반응성 산소종을 다시 생성할 수 있게 된다.

[0067] <스킴 1>

[0068] 

[0069] 상기 스킴 1 중, FL은 형광, ROS는 반응성 산소종을 나타낸다.

[0070] 일 구현예에 따르면, 종양 진단 또는 치료용 조성물은 광열 치료용 조성물일 수 있다. 여기서, '광열'이란 광을 조사했을 때 열이 발생함을 의미하고, '광열 치료'는 혈관에 감광성 물질을 포함하는 약물을 주입하여 고열 요법이 필요한 위치에 상기 감광성 물질을 축적시킨 다음, 빛을 쪼여 상기 감광성 물질에 열 발생을 유도함으로써 주변의 악성 세포를 사멸시키는 치료 방법이다. 이 때, 상기 감광성 물질은 빛을 흡수하여 열을 발생하는 물질이다.

[0071] 다른 구현예에 따르면, 종양 진단 또는 치료용 조성물은 광음향 이미징용 조성물일 수 있다. 즉, 상술한 유기 금속 화합물 및/또는 상술한 자기 조립체는 광음향 조영제로서 사용될 수 있다.

[0072] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0073] **[실시예]**

[0074] **재료 및 측정 기기**

[0075] N,N-디메틸 포름아미드(DMF), n-펜타놀, 디메틸술폭시드(DMSO), 탄산칼륨, 1,8-디아자비시클로-[5.4.0]운데크-7-엔(DBU), 아세트산아연, 비오틴, 아비딘, N,N'-디시 클로헥실카보디이미드(DCC), 4-(디메틸아미노)피리딘(DMAP), 실리콘(IV) 프탈로시아닌 디클로라이드, 1,3-디페닐이소벤조푸란(DPBF), 2,7-디클로로플루오레신 디아세테이트(DCF), 및 3-(4,5-디메틸 2-티아졸릴)-2,5-디페닐-2H-테트라졸륨 브로마이드(MTT)는 Sigma-Aldrich Korea로부터 구입하였다.

[0076] SP2000 분광기를 사용하여 KBr 펠렛 방법으로 FT-IR(Fourier transform infrared) 스펙트럼을 측정하였다.

[0077] Bruker 300 MHz를 사용하여 ^{1}H NMR 스펙트럼을 기록하였다.

[0078] Exactive Plus Orbitrap(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 HRMS(high-resolution mass spectra)을 결정하였다.

[0079] Nano-ZS(Malvern)을 사용하여 DLS(dynamic light scattering)을 측정하였다.

[0080] JSM-6700F(JEOL)을 사용하여 SEM을 관찰하였다.

[0081] JEM-2100F (JEOL)를 사용하여 TEM을 관찰하였다.

[0082] **시험 방법**

[0083] **소수성-친수성 특성 시험.** n-옥타놀(1 mL) 및 물(1 mL)을 튜브에서 혼합한 후, 40 μL의 샘플(DMSO 중의 1 m

M)을 첨가하였다. 상기 튜브를 30분 동안 흔들고, 24시간 동안 방치하였다. 상기 샘플의 옥타놀/물 분배 계수를 상기 2상(two phases)으로부터 추출한 후 형광 세기를 사용하여 계산하였다.

[0084] ***in vitro* 치료 효과 시험.** HeLa 세포를 DMEM 배지를 갖는 96-웰 플레이트 안에 분주하였다. 24시간 후, 상기 세포를 2시간 동안 샘플(0 μM, 3 μM 또는 6 μM)과 함께 배양한 다음 HBSS로 세척하였다. 655 nm 레이저(0 W/cm^2, 0.22 W/cm^2 또는 2.5 W/cm^2)를 5분간 조사한 후, 상기 세포를 24시간 동안 더 배양했다. 상기 세포의 생존력을 Spectramax Microwell plate reader를 사용하여 MTT 방법으로 평가하였다.

[0085] ***in vitro* ROS 생성 시험.** A549, HeLa 및 WI38-VA13 세포를 2시간 동안 샘플(0 μM 또는 3 μM)과 함께 배양하고, 20분 동안 DCF(5 μM)로 염색한 다음, HBSS로 세척하였다. 655 nm 레이저(0 W/cm^2 또는 0.22 W/cm^2)를 5분간 조사한 후, 공초점 레이저 주사 현미경(Fluoview 1200, Olympus, Japan)을 사용하여 세포 이미지를 얻었다. ROS 프로브(probe)는 473 nm에서 여기되었고, 490 내지 590 nm에서 관찰되었다.

[0086] ***in/ex vivo* 형광 이미징.** 모든 동물 시험 절차는 건국대학교의 동물실험관리위원회(Institutional Animal Care Committee)의 승인을 받아 수행하였다. 수컷 BALB/c 누드 마우스에 A549 암세포(마우스당 약 1 x 10^7 세포)를 피하에 주입하였다. 종양의 부피가 약 400 mm^{3}에 도달하면 샘플(60 μM, 200 μL)을 마우스의 정맥에 주입하였다. *in/ex vivo* 형광 이미지를 동물 광학 이미징 시스템(IVIS, Caliper Life Sciences)을 사용하여 샘플 주입 후 상이한 시점에서 포착하였다. 상기 샘플을 680 nm에서 여기시켰고, 690 내지 730 nm에서 모니터링하였다.

[0087] **광음향(PA) 기기.** 모든 PA 실험에 암시야(dark-field) 광음향 이미징(photoacoustic imaging: PAI) 시스템을 사용하였다. PAI 시스템은 주로 광범위한 범위의 파장을 생성하는 OPO 레이저(Surelite OPO PLUS, Continuum) 및 레이저 펌핑을 위한 Q-스위치 ND:YAG 레이저(Surelite III-10, Continuum)로 구성된다. 상기 레이저는 4 ns의 펄스 폭과 10Hz의 반복률을 제공한다. 본래의 레이저 공급원은 둥근 원추형 렌즈 및 광학 콘덴서를 통해 도넛 형상의 빔으로 변형된다. 대상물에서 생성된 PA 신호는 중심 주파수가 5 MHz이고 초점 길이가 1 인치인 단일 요소 구형 초음파 변환기(V308, Olympus NDT)로 감지된다. 초음파 펄스/수신기(5072PR, Olympus NDT)는 감지된 PA 신호를 증폭하는 데 사용되고, 오실로스코프(MSO 5204, Tektronix)는 증폭된 PA 신호를 디지털화한다. 1회의 레이저 펄스 여기 후, 변환기는 1차원 깊이-분해 PA 신호(z 축)를 감지한다. 이후, 2D PA 이미지(B-스캔 이미지, x 및 z 축)가 래스터 스캐닝에 의해 생성된다. 도 5에서 생성된 PA 이미지는 미가공(raw) 3D PA 데이터로부터 얻은 2D 맵 이미지이다(일련의 B-스캔).

[0088] ***in vitro* 광음향(PA) 시험.** 2회의 *in vitro* PA 시험을 수행하였다. NanoPcTB의 PA 스펙트럼을 얻고 이를 메틸렌 블루(methylene blue: MB)의 PA 스펙트럼과 비교하기 위해 3개의 실리콘 튜브를 제조하여 첫 번째 시험을 수행하였다. 1개의 튜브를 MB(200 μM)로 채우고, 다른 튜브를 탈이온수로 희석한 NanoPcTB(200 μM)로 채우고, 또 다른 튜브를 탈이온수만으로 채웠다. 3개의 실리콘 튜브를 아크릴 프레임에 고정하였다. 3개의 샘플로부터 PA 스펙트럼을 얻기 위해, 680, 700, 730, 750, 800, 850, 900 및 950 nm의 8개의 레이저 파장을 근적외선 영역의 광 여기자로서 사용하였다. PA 진폭 신호를 각 물질(MB, NanoPcTB 및 탈이온수)에 대한 상위 30%의 고진폭 신호로 평균화하였다. 아비딘을 NanoPcTB에 첨가하기 전 및 첨가한 후의 PA 신호를 비교하기 위해 두 번째 시험을 수행하였다. 1개의 튜브를 NanoPcTB(20 μM)로 채웠고, 다른 튜브를 NanoPcTB + 아비딘(25 μM)으로 채웠고, 또 다른 튜브를 탈이온수만으로 채웠다. 후속 실험을 위한 절차는 상술한 바와 동일하다.

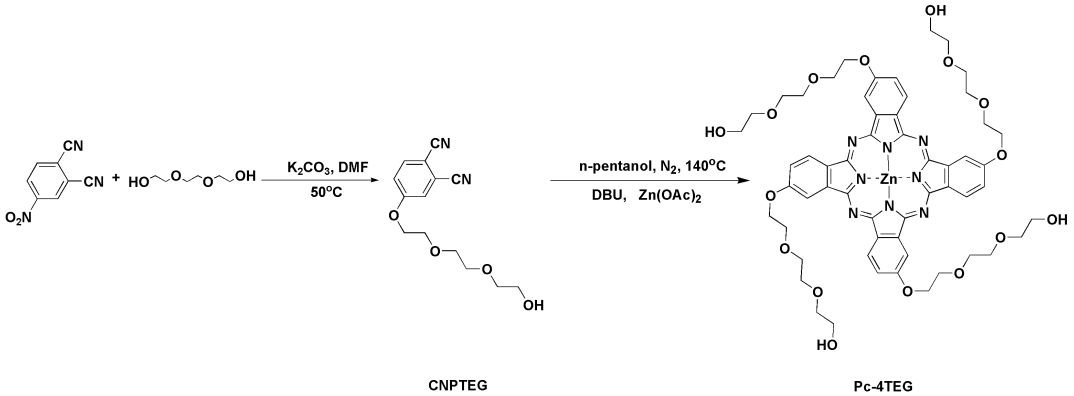
[0089] ***In vivo* 광음향(PA) 단층 촬영.** 수컷 BALB/c 누드 마우스의 피하에 A549 암세포(마우스당 약 1 x 10^7 세포)를 주입하였다. 종양의 부피는 약 400 mm^{3}이었다. 먼저 물질을 주입하기 전에 680 및 850 nm에서의 PA 이미지를 대조 이미지로서 얻었고, 이미지 범위는 0.4 mm의 x 및 y 스텝 크기를 갖는 65 mm x 40 mm이었다. 샘플(200 μM, 150 μL)을 주입한 후, 동일한 위치에서 매 시간마다 PA 이미지를 촬영했다. *in vivo* 실험에서 PA 동안 기화된 이소플루란 시스템으로 마우스를 마취시켰다. 상기 실험은 포항공과대학교(POSTECH)의 모든 동물 실험의 실험 동물의 관리 및 사용에 관한 지침을 만족시켰다.

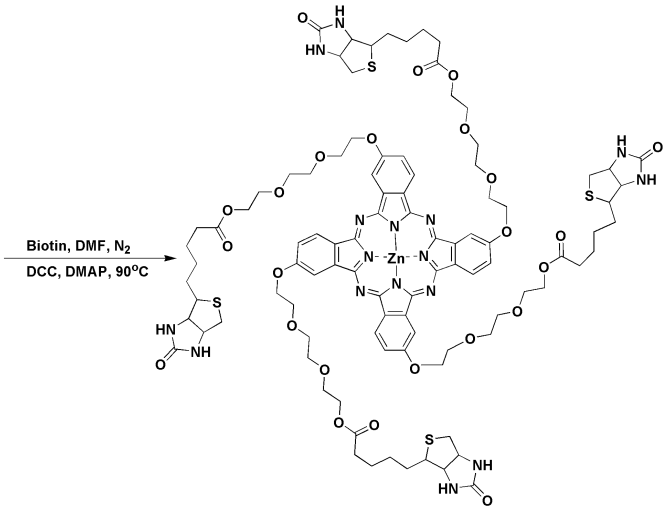
[0090] ***In vivo* 치료 효과 시험.** 수컷 BALB/c 누드 마우스의 피하에 A549 암세포(마우스당 약 1 x 10^7 세포)를 주입하였다. 종양의 부피가 약 400 mm^{3}에 이르면, 두 그룹의 마우스(그룹당 8 마리)의 정맥 내에 NaPcTB(60 μM, 200 μL)를 주입하였다. 동일한 부피의 식염수로 처리한 두 그룹의 마우스를 대조군으로 사용하였다. 24시간 후, 두 그룹의 마우스에 655 nm 레이저(2.0 W/cm^{2}로 1분 후, 0.22 W/cm^{2}로 5분)를 조사하였다. 종양 크기는 캘리퍼

(caliper)를 사용하여 측정하고, 16일 동안 측정하였다. 크기를 하기 식을 사용하여 계산하였다: 부피 = (종양 길이) x (종양 폭)^2 x 0.5.

[0091] **조직학 및 TUNEL 분석.** 처리 후 16일째에, 마우스를 희생시키고, 수확한 종양을 10% 중화된 포스페이트 완충된 포르말린에 고정시킨 다음, 파라핀에 넣었다. 얇은 절편(5 μm)에 H & E 염색법 또는 제조사의 지침에 따른 TUNEL 분석법(click-iT® Plus TUNEL Assay, Life Technologies)을 수행하였다. TUNEL 양성(적색 염색) 세포를 사멸 세포로 특정하였으며, 각 그룹에서 무작위로 선택된 5개의 현미경 영역(microscopic field)(x 400)을 조사하여 TUNEL 양성 세포의 개수를 계산하였다.

[0092] **실시예 1: 화합물 Pc-4TEG-B의 합성**





[0093]

[0094] **CNPTEG의 합성**

[0095] DMF(20 mL) 중의 트리에틸렌글리콜(5.5 mL, 30 mmol), 4-니트로프탈로니트릴(1.73 g, 10 mmol) 및 무수 K_2CO_3(2.76 g, 20 mmol)의 혼합물을 50℃에서 48시간 동안 질소 분위기 하에서 교반하였다. 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 용리액으로서 아세톤/헥산(1:1, v/v)을 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 황색 분획물을 수집하고 농축시킨 다음, 진공 건조시켰다. 상기 생성물을 황색 고체 형태로 수득하였다(1.3g, 47.1%)

[0096] IR (KBr, cm^{-1}): 3395 (O-H); 3084 (Ar-H); 2228 (C≡N); 2924, 2867 ($-CH_2-$); 1576, 1482, 1453 (-C=C-); 1282 (Ar-O-C); 1124, 1093, 1052 (C-O-C).

[0097] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.69 (d, J = 8.7 Hz, 1 H), 7.29 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 7.23 (dd, J = 2.7 Hz, J = 8.7 Hz, 1 H), 4.21 (t, J = 4.5 Hz, 2 H), 3.86 (t, J = 4.5 Hz, 2 H), 3.63-3.67 (m, 6 H), 3.55 (t, J = 5.1 Hz, 2 H) , 3.63-3.67 (m, 6 H), 2.91 ppm (s, 1 H).

[0098] HRMS (ESI): m/z Calcd for $C_{14}H_{17}N_2O_4$ $[M+H]^+$ 277.1188, found 277.1184.

[0099] **Pc-4TEG의 합성**

[0100] n-펜타놀(20 mL) 중의 CNPTEG(1 g, 3.62 mmol)를 질소 분위기 하에 90℃에서 30분 동안 교반한 후, 아세트산아연(0.66 g, 3.62 mmol) 및 1,8-디아 자비시클로-[5.4.0]운데크-7-엔(DBU)(1 mL, 6.7 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 140℃에서 36시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질(volatiles)을 진공 하에서 제거한 후, 먼저 잔류물을 용리액으로서 에틸아세테이트/DMF(4:1, v/v)를 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 청록색(bluish green) 조 생성물(crude)을 수득하였다. 상기 혼합물을 감압 하에서 농축시키고, 용리액으로서 DMF를 사용하여 Bio-Beads S-X3 컬럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. 조 생성물을 THF 및 헥산의 혼합물로부터 재결정화시켜 청록색 고체를 수득하였다(160 mg, 15.2%).

[0101] IR (KBr, cm^{-1}): 3432 (O-H); 2929, 2850 ($-CH_2$); 1658, 1609, 1477, 1444 (C=C, C=N); 1242 (Ar-O-C); 1103, 1041 (C-O-C).

[0102] ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.07-9.12 (m, 4 H), 8.66-8.73 (m, 4 H), 7.69-7.75 (m, 4 H), 4.66-4.68 (m, 8 H), 4.09 (s, 8 H), 3.79-3.82 (m, 8 H), 3.72-3.73 (m, 8 H), 3.51-3.62 ppm (m, 16 H).

[0103] HRMS (ESI): m/z Calcd for $C_{56}H_{65}N_8O_{16}Zn$ $[M+H]^+$ 1171.3773, found 1171.3776.

[0104] **Pc-4TEG-B의 합성**

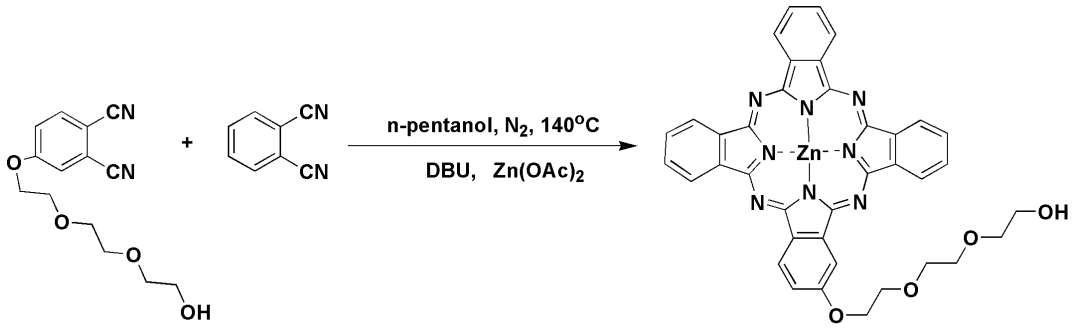
[0105] 가열함으로써 비오틴(122 mg, 0.5 mmol)을 100 mL 둥근 바닥 플라스크 내의 건조 DMF(10 mL) 중에 용해시켰다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, DCC(206 mg, 1 mmol), DMAP(35 mg, 0.26 mmol)를 비오틴 용액에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. DMF 5 mL에 용해된 Pc-4TEG(60 mg, 0.051 mmol)를 상기 혼합물에 천천히 첨가하고, 90℃에서 48시간 동안 질소 분위기 하에서 교반하였다. 휘발성 물질을 진공 하에서 제거한 후, 먼저 잔류물을 용리액으로서 에틸아세테이트/DMF(10:4, v/v)를 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 청록색 조 생성물을 얻었다. 이어서, 조 생성물을 용리액으로서 DMF를 사용하여 Bio-Beads S-X3 컬럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피로 정제하여 Pc-4TEG-B를 청록색 고체 형태로 수득하였다(30 mg, 28.5%).

[0106] IR (KBr, cm^{-1}): 3305 (N-H); 2924, 2855 ($-CH_2$); 1710 (O=C-O-); 1680 (O=C-N-); 1604, 1488, 1450 (C=C, C=N); 1236 (Ar-O-C); 1091, 1058 (C-O-C).

[0107] ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.18-9.21 (m, 4 H), 8.79-8.85 (m, 4 H), 7.74-7.78 (m, 4 H), 6.28-6.35 (m, 8 H), 4.65-4.72 (m, 8 H), 4.08-4.20 (m, 24 H), 3.68-3.93 (m, 32 H), 3.52-3.61 (m, 4 H), 2.26-2.31 (m, 8 H), 1.22-1.51 ppm (m, 24 H).

[0108] HRMS (ESI): m/z Calcd for $C_{96}H_{119}N_{16}O_{24}S_4Zn$ $[M-H]^-$, 2071.6763; found 2071.6766.

[0109] **참고예 1: 화합물 Pc-1TEG의 합성**



CNPTEG Pc-1TEG

[0110]

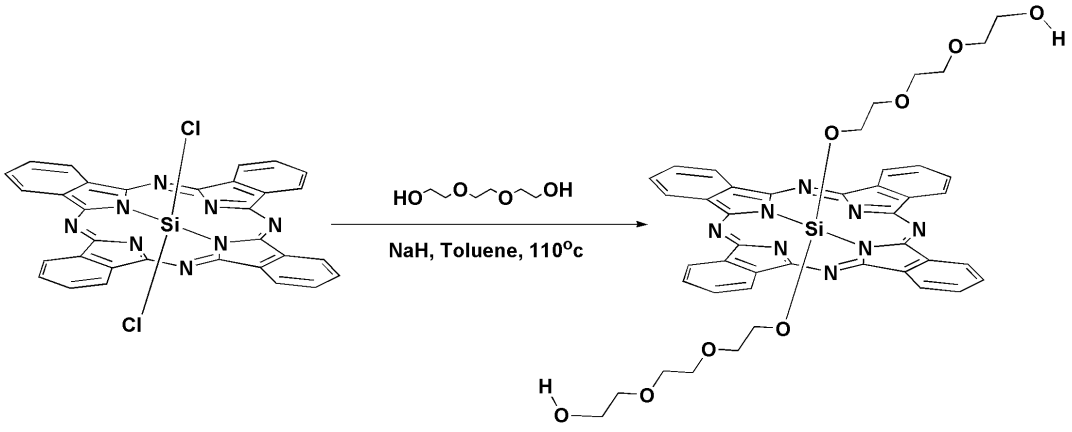
[0111] n-펜타놀(40 mL) 중의 CNPTEG(1 g, 3.62 mmol) 및 프탈로니트릴(2.78 g, 21.72 mmol)을 90℃에서 30분 동안 질

소 분위기 하에서 교반한 다음 아세트산아연(3.32 g, 18.10 mmol) 및 1,8-디아자비시클로-[5.4.0]운데크-7-엔(DBU)(2 mL, 13.4 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 140℃에서 36시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 진공 하에서 제거한 후, 먼저 잔류물을 용리액으로서 에틸아세테이트/DMF(5:1, v/v)를 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 청색 조 생성물을 수득하였다. 혼합물을 감압 하에서 농축시키고, 용리액으로서 DMF를 사용하여 Bio-Beads S-X3 컬럼 상에서 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. 조 생성물을 THF 및 헥산의 혼합물로부터 재결정 화시켜 청색 고체 형태로 수득하였다(297 mg, 11.3%).

[0112] ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.09-9.24 (m, 6 H), 8.86 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 8.42 (s, 1 H), 8.13-8.21 (m, 6 H), 7.59 (dd, J = 2.1 Hz, J = 8.4 Hz, 1 H), 4.63 (t, J = 3.5 Hz, 2 H), 4.10 (t, J = 3.5 Hz, 2 H), 3.83-3.86 (m, 2 H), 3.74-3.77 (m, 2 H), 3.51-3.58 (m, 4 H).

[0113] HRMS (ESI): m/z Calcd for $C_{38}H_{29}N_8O_4Zn$ $[M+H]^+$ 725.1598, found 725.1571.

[0114] **참고예 2: 화합물 Pc-2TEG의 합성**



[0115] **Pc-2TEG**

[0116] 톨루엔(30 mL) 중의 실리콘(IV) 프탈로시아닌 디클로라이드(200 mg, 0.33 mmol), 트리에틸렌글리콜(196 mg, 1.31 mmol) 및 NaH(31.4 mg, 1.31 mmol)의 혼합물을 48시간 동안 환류시켰다. 휘발성 물질을 진공 하에서 제거한 후, 잔류물을 용리액으로서 디클로로메탄/헥산(1:1, v/v)을 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 청색 조 생성물을 수득하였다. 조 생성물을 클로로포름 및 헥산의 혼합물로부터 재결정화시켜 청색 고체 형태로 수득하였다(60 mg, 21.9%).

[0117] ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 9.67-9.70 (m, 8 H), 8.51-8.54 (m, 8 H), 4.28 (t, J = 5.7 Hz, 2 H), 3.09-3.12 (m, 4 H), 2.79 (t, J = 5.1 Hz, 4 H), 2.32 (t, J = 5.1 Hz, 4 H), 1.58 (t, J = 5.1 Hz, 4 H), 0.32 (t, J = 5.4 Hz, 4 H), -2.05 (t, J = 5.4 Hz, 4 H).

[0118] HRMS (ESI): m/z Calcd for $C_{44}H_{42}N_8NaO_8Si$ $[M+Na]^+$ 861.2787, found 861.2695.

[0119] **평가예 1**

[0120] 먼저, 상이한 빌딩 블록들인 Pc-1TEG, Pc-2TEG, Pc-4TEG 및 Pc-4TEG-B를 각각 DMSO에 용해시킨 뒤, 상이한 농도를 갖도록 물로 희석한 후, 2시간 동안 에이징시켰다.

[0121] 도 1은 에이징 후의 결과를 보여주는 사진으로서, 상이한 빌딩 블록들의 나노입자성 구조체의 형성 가능성을 보여준다. 도 1에 도시된 바와 같이, Pc-1TEG 및 Pc-2TEG는 심한 응집으로 인해 나노입자성 구조체의 형성에 적합하지 않음을 확인할 수 있다.

[0122] 도 2는 2시간 동안 에이징한 이후 DLS로 측정한 상이한 농도(3, 6, 12, 60 μM)에서의 수 중의 Pc-4TEG 조립체(이하, 'NanoPcT'라 함)의 평균 크기를 나타낸다. 도 2에 도시된 바와 같이, Pc-4TEG는 그것의 농도를 제어함으로써 나노크기의 분산물을 형성할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0123] 도 3(a)는 2시간 동안 에이징한 이후 DLS로 측정한 상이한 농도(3, 6, 12, 60 μM)에서의 수 중의 Pc-4TEG-B

조립체(이하, 'NanoPcTB'라 함)의 평균 크기를 도시하며, 도 3(b)는 에이징한 이후 상이한 시간 동안 DLS로 측정한 NanoPcTB(3 μM)의 평균 크기를 도시한다. 도 4는 2시간 동안의 에이징 이후 DLS로 측정한 상이한 농도(3, 6, 12, 60 μM)에서의 수 중의 NanoPcT 및 NanoPcTB의 PDI를 도시한다. 상기 도 3 및 4에 도시된 바와 같이, Pc-4TEG에 비해 Pc-4TEG-B는 100 내지 200 nm 범위의 평균 유체역학 직경(mean hydrodynamic diameter)을 갖는 보다 균일한 분산물을 형성할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0124] 도 5는 상이한 시간 동안 방치해 둔 이후의 수 중의 NanoPcTB 및 NanoPcT의 사진을 도시한다. 도 5에 도시된 바와 같이, 수 중의 Pc-4TEG-B 조립체(NanoPcTB)는 Pc-4TEG 조립체(NanoPcT)보다 훨씬 더 안정하고, 특히 고농도에서 훨씬 더 안정함을 확인할 수 있다.

[0125] 표 1은 Pc-TEG 빌딩 블록들의 소수성-친수성 특성을 나타낸다.

표 1

[0126]

화합물	Log $P_{O/W}$ [a]	화합물	Log $P_{O/W}$ [a]
Pc-1TEG	1.26 ± 0.02	Pc-4TEG	-0.80 ± 0.05
Pc-2TEG	1.34 ± 0.05	Pc-4TEG-B	0.23 ± 0.07

[0127] [a] 옥타놀/물 분배 계수.

[0128] 이론에 구속되고자 하는 것은 아니나, 소수성 용매와 물 사이의 Pc-4TEG-B의 보다 균형 잡힌 분배 능력(partition ability) (Log $P_{O/W}$ = 0.23 ± 0.07)은 Pc-4TEG-B를 나노구조체로 자기 조립하는 데 더 적합하게 만들 수 있다. 또한 유연한 TEG-비오틴 사슬은 그들의 친수성으로 인해 물속으로 스트레칭되거나, 수소 결합이나 금속 배위로 인해 Pc 거대 고리로 적층(stacked)되는 데, 이는 TEG-비오틴이 양친매성 모이어티이기 때문이다. 그 결과, NanoPcTB의 분자내 및 분자간 상호 작용이 더욱 증가하고, 이로 인해 보다 안정한 나노구조체가 생성된다.

[0129] 도 6(a)는 SEM으로 측정한 NanoPcTB의 모폴로지를 도시하고, 도 6(b)는 TEM으로 측정한 NanoPcTB의 모폴로지를 도시한다. 도 6(b)에 삽입된 2개의 사진은 각각 NanoPcTB의 분산 및 그것의 틴들(Tyndall) 현상을 도시한다. 도 6(a) 및 6(b)에 도시된 바와 같이, NanoPcTB는 약 100 nm 크기의 균일한 구형상을 가짐을 확인할 수 있다.

[0130] 도 6(c)는 DMSO 중의 Pc-4TEG-B 블록(1 μM) 및 수 중의 NanoPcTB(3 μM)의 전자 흡수를 도시한다. 도 6(c)에 도시된 바와 같이, 청색 전이(Blueshifting) 및 폭 증가(broadening)는 DMSO 중의 Pc-4TEG-B에 비해 수 중의 NanoPcTB의 흡수 스펙트럼에서 Soret 및 Q 밴드에서 발견되었으며, 이는 Pc 거대 고리의 π-적층 결합(π-stacking interactions)이 나노구조체의 형성뿐만 아니라, 소수성 효과에도 기여하였음을 보여준다.

[0131] 도 6(d)는 DMSO 중의 Pc-4TEG-B 블록(1 μM) 및 수 중의 NanoPcTB(3 μM)의 형광 스펙트럼(610 nm에서 여기됨, 슬릿 5/5 nm)을 도시한다. 도 6(d)에 도시된 바와 같이, 형광 스펙트럼은 수 중의 NanoPcTB의 형광 방출이 수퍼-퀀칭(super-quenched)되었음을 보여준다.

[0132] Pc의 전형적인 광 물리적 활성 과정에 따르면, 형광 방출과 계간 교차 효과가 억제되었고, 이는 광열제(photothermal agent)로서의 NanoPcTB의 높은 가능성을 보여준다.

[0133] 도 6(e)는 655 nm 레이저(2.5 W/cm^2)의 조사 후 수 중의 NanoPcTB의 온도 증가를 도시한다. 도 7은 상이한 출력을 갖는 655 nm 레이저로 조사한 이후 수 중의 NanoPcTB(3 μM)의 온도 상승을 도시한다(1: 대조군으로서, 0.22 W/cm^2 출력으로 물에 조사, 2: 0.22 W/cm^2, 3: 1.0 W/cm^2, 4: 2.0 W/cm^2, 5: 2.5 W/cm^2). 도 6(e) 및 도 7에 도시된 바와 같이, 조립체의 온도 증가는 농도 및 광 세기에 의존하였다. 예를 들어, 2.5 W/cm^2에서 655 nm 레이저로 1분간 조사한 후, 12 μM(나노구조체화된 Pc 조립체의 농도는 자기 조립된 블록의 농도를 나타냄)에서의 수 중의 NanoPcTB의 온도는 67℃까지 증가한 반면, 순수한 물의 온도는 34℃까지 증가하였다. 이는 NanoPcTB가 광 에너지를 효과적이고 신속한 방식으로 열로 변환시킬 수 있음을 보여주며, 이는 상기 NanoPcTB가 광열 치료법(photothermal therapy: PTT)에 적합하다는 것을 보여준다.

[0134] 도 8(a)는 DLS로 검출한 DMSO 중의 Pc-4TEG-B 및 Pc-4TEG의 크기 분포를 도시한다. 도 8(b)는 655 nm 레이저(2.5 W/cm^2, 2분)로 조사한 후의 용액(오직 DMSO, DMSO 중의 Pc-4TEG, 및 DMSO 중의 Pc-4TEG-B)의 온도를, 열

카메라로 이미지화한 것이다. 이때, 샘플의 농도는 3 μM였다. 도 8을 통해 Pc-4TEG-B 블록이 광열 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0135] 하기 표 2는 Pc-4TEG 및 Pc-4TEG-B에 대한 광 물리적 및 광 화학적 데이터를 나타낸다.

표 2

[0136]

화합물	λ_{max} (nm)	λ_{em} (nm)[a]	$\varepsilon x10^5$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	ϕ_F[b]	ϕ_Δ[c]
Pc-4TEG	678	685	2.16	0.26	0.67
Pc-4TEG-B	679	686	2.39	0.27	0.57

[0137] [a] 610 nm에서 여기됨.

[0138] [b] 형광 양자 수율은 DMF 중의 비치환된 아연(II)프탈로시아닌(ZnPc)을 기준(reference)으로 사용하여 결정하였다(ϕ_F = 0.28).

[0139] [c] 일중항 산소 양자 수율은 프로브로서 1,3-디페닐이소벤조푸란(DPBF)을 사용하고, 기준으로서 DMF 중의 ZnPC를 사용하여 결정하였다(ϕ_Δ = 0.56).

[0140] 상기 표 2는 Pc-4TEG 및 Pc-4TEG-B의 광열 효과가 그들의 강력한 형광 방출 및 ROS 생성과 상관 관계가 있음을 보여준다.

[0141] 광음향(PA) 신호는 광열 팽창과 높은 상관 관계가 있기 때문에, NanoPcTB는 강력한 PA 신호를 생성할 수 있다.

[0142] 도 6(f)는 수 중의 NanoPcTB(200 μM) 및 수 중의 메틸렌블루(MB, 200 μM)의 광음향(PA) 스펙트럼을 도시한다. 도 6(f)에 도시된 바와 같이, 임상적으로 사용되는 조영제인 메틸렌 블루(MB)와 비교할 때, NanoPcTB는 동일한 농도(200 μM)에서 680 nm에서 훨씬 더 강한 PA 신호(약 7배)를 생성하였다.

[0143] **평가예 2: *in vitro* 반응 특성 평가**

[0144] *in vitro* 설정에서의 반응 특성을 평가하기 위해, 비오틴 수용체를 시뮬레이션하기 위한 표적 단백질로서 아비딘을 사용하였다.

[0145] 도 9는 NanoPcTBs의 특이적 단백질 구동 부분 분해(specific protein-driven partial disassembly)에 기반한 전환 가능한 광활성을 도시한다.

[0146] 도 9(a) 및 9(b)는 각각, 아비딘(3 μM) 및 비오틴(12 μM)의 존재 및 부재 하에서의 수 중의 NanoPcTB(도 9(a)) 및 NanoPcT(3 μM) (도 9(b))의 형광 스펙트럼(610 nm에서 여기, 슬릿 10/10 nm)을 도시한다. 도 9(a)에 도시된 바와 같이, 수 중의 NanoPcTB의 형광 방출은 아비딘을 첨가함에 따라 극적으로 증가하였다. 그러나, 증가되는 형광은 여분의 비오틴을 첨가함으로써 후속적으로 퀀칭될 수 있다. 도 9(b)에 도시된 바와 같이, NanoPcT가 비오틴 모이어티를 함유하지 않을 때 형광의 증가는 관찰되지 않았다.

[0147] 도 9(c)는 다양한 단백질에 대한 수 중의 NanoPcTB의 형광 강도(696 nm) 반응을 도시한다(1: 블랭크(blank); 2: 아비딘, 3: BSA, 4: HAS, 5: 프로테아제, 6: 헤모글로빈, 7: 리소자임, 8: 트립신, 9: IgG, 10: 트랜스페린, 11: 피브리노겐). 도 9(c)에 도시된 바와 같이, NanoPcTB의 형광의 현저한 변화는 다양한 다른 단백질의 존재 하에서는 관찰되지 않았는데, 이는 아비딘에 대한 상기 조립체의 높은 선택성을 보여준다. 이러한 결과는 형광 턴온이 비오틴 리간드와 아비딘의 결합 포켓 사이의 특이적인 인식에 의해서만 유발된다는 것을 보여주며, 따라서 NanoPcTB는 적어도 *in vitro* 설정에서 아비딘에 대한 이상적인 형광 프로브임을 확인할 수 있다.

[0148] 도 9(d)는 아비딘의 존재 및 부재 하에서 수 중의 NanoPcTB의 ROS 생성을 비교 도시한다. 수 중의 2,7-디클로로플루오레신 디아세테이트의 ROS 프로브를 대조군으로서 사용하였다. 도 10은 프로브로서 2,7-디클로로플루오레신 디아세테이트(12 μM)를 사용하여 검출된 아비딘(3 μM)의 존재 및 부재 하에서의 수 중의 NanoPcTB(3 μM)의 ROS 생성을 도시한다((a) 대조군으로서, 수용액 중 2,7-디클로로플루오레신 디아세테이트, (b) 2,7-디클로로플루오레신 디아세테이트 및 NanoPcTB, (c) 2,7-디클로로플루오레신 디아세테이트, NanoPcTB 및 아비딘).

ROS 프로브는 504 nm에서 여기되었다. 도 9(d) 및 도 10에 도시된 바와 같이, 방출 스펙트럼은 ROS가 아비딘의 부재 하에서는 NanoPcTB에 의해 생성되지 않는다는 것을 보여준다. 그러나, 아비딘을 첨가한 후에는, ROS 생성이 명확하게 회복되었다. ROS 생성은 형광 방출과 매우 상관 관계가 있다. 이러한 전환 가능한 감광 능력은 NanoPcTB가 활성화 가능한 광역학 치료(photodynamic therapy: PDT)에 매우 적합함을 시사하며, 이는 부작용이 적기 때문에 전형적인 PDT보다 암 치료에 훨씬 더 유망할 것임을 실증한다.

[0149] 상술한 바와 같이, Pc의 형광 방출 및 ROS 생성 능력은 그들의 광열 효과에 영향을 미치고, 이에 따라 PA 신호를 변화시킨다. 단백질에 반응하는 Pc의 광열 특성을 직접 평가하기 위해, 우리는 그들의 아비딘 첨가 전후의 열적 거동을 비교했다.

[0150] 도 11은 655 nm 레이저(2.5 W/cm^2)에 노출된 물, 수 중의 NanoPcTB(3 μM), 및 아비딘(3 μM)을 포함한 수 중의 NanoPcTB(3 μM)의 온도 변화 곡선을 도시한다. 도 11에 도시된 바와 같이, NanoPcTB의 온도 상승의 크기는 아비딘을 첨가한 후에 감소하지만, 온도 증가는 대조군의 온도 증가보다 여전히 더 높았다.

[0151] 도 12(a)는 수 중의 아비딘(25 μM)의 존재 및 부재 하에서의 NanoPcTB(25 μM)의 광음향(PA) 진폭을 도시한다. 도 12(b)는 680 nm에서의 아비딘의 존재 및 부존재 하에서의 NanoPcTB의 2차원 PA 이미지를 도시한다(① 오직 물(대조군), ② 아비딘이 부재하는 수 중의 NanoPcTB, ③ 아비딘이 존재하는 수 중의 NanoPcTB). 도 12에 도시된 바와 같이, 도 11과 유사한 반응이 PA 신호 비교에서도 관찰되었다. 이러한 결과는 NanoPcTB가 광열 및 PA 조영제로 응용 가능하며, 그들이 심지어 아비딘에 의에 자극될 때 그들의 형광 방출 및 ROS 생성까지도 회복됨을 보여준다.

[0152] 이후, 이러한 아비딘 반응 과정의 가능성 있는 메커니즘을 조사하였다. DMSO(또는 DMF) 중의 Pc-4TEG-B 블록의 광활성에 비해, 동몰량의 아비딘을 갖는 NanoPcTB의 형광 방출은 부분적으로만 회복되었고, 그들의 광열 효과는 부분적으로 감소되었다.

[0153] 도 13은 상이한 농도의 아비딘(3, 12, 30 μM)을 갖는 NanoPcTB(3 μM)의 형광 스펙트럼(610 nm에서 여기, 슬릿 10/10 nm)을 도시한다. 도 13에 도시된 바와 같이, NanoPcTB의 회복 형광 강도는 증가하는 아비딘/NanoPcTB 몰비에 비례하지는 않았다. 10/1의 높은 몰비(아비딘:NanoPcTB) 하에서도, NanoPcTB의 회복 형광 강도는 Pc-4TEG-B 블록의 형광 강도보다 여전히 낮았다. 따라서, 비오틴 모이어티와 아비딘 사이의 강한 결합 친화력으로 인해 나노입자의 표면 상에서 소수의 Pc-4TEG-B 단위가 제거될 수 있다고 여겨진다. 그러나, 내부 비오틴 모이어티는 은폐되어 더 강한 분자내 및 분자간 상호 작용을 형성하였으며, 이는 내부 나노구조체를 안정화시키고, 내부 구조체가 완전히 분해되는 것을 방지한다.

[0154] 도 9(e)는 TEM을 사용하여 결정한 아비딘의 첨가 전후, 및 24시간 동안의 방치 이후의 NanoPcTB 모폴로지 변화를 도시한다. 가장 우측 열은 모폴로지 변화에 대하여 제안한 메커니즘을 보여준다. 도 9(e)에 도시된 바와 같이, 상술한 부분 분해 과정을 TEM 이미지에서 확인할 수 있었다. 종양 조직 또는 암 세포의 국소 영역에서 과발현되나 제한되는 비오틴 수용체 농도를 감안할 때, NanoPcTB는 *in vivo* 다중모달(multimodal) 광자 이미징 및 암 표적 치료에서 잠재적인 응용 가능성을 가질 것으로 보인다.

[0155] **평가예 3: *in vivo* 형광 이미징 및 광음향 단층 촬영**

[0156] *in vivo* 형광 이미징에서의 NanoPcTBs의 응용 가능성을 연구하기 위해, 이를 A549 종양을 보유한 마우스의 정맥에 주입하였다.

[0157] 도 14는 NanoPcTB를 정맥에 주입하기 전 및 주입한 후의 A549 종양을 보유한 마우스의 *in vivo* 형광 이미지를 도시한다.

[0158] 주입 후 24시간 뒤, 높은 종양 형광이 관찰되었는 데, 이는 NanoPcTB가 종양에 축적되어 턴온되었기 때문이다.

[0159] 일반적으로, 비오틴 수용체는 유방암(4T1), 자궁 경부암(HeLa), 폐암(A549), 난소암(Ov2008), 결장암(Colo-26) 및 신장암(RD0995) 세포 라인을 포함한 많은 암 세포 표면에서 과발현된다. 따라서, 이러한 낮은 배경(low-background) *in vivo* 형광 이미징은 잠재적으로 NanoPcTB의 부분 분해를 유도하는 증진된 투과 및 유지 효과(enhanced permeability and retention effect: EPR 효과) 및 비오틴 수용체 매개 엔도시토시스에 의해 야기된다.

[0160] 도 15는 NanoPcT(200 μL, 60 μM)를 정맥에 주입하기 전 및 주입한 후의 A549 종양을 보유한 마우스의 *in vivo* 형광 이미징을 도시한다. 화살표는 종양 부위를 나타낸다. 도 16은 NanoPcTB 및 NanoPcT(200 μL, 60

μM)를 정맥에 주입한 후 7일째의 A549 종양을 보유한 마우스의 *ex vivo* 형광 이미징을 도시한다. 도 15 및 도 16에 도시된 바와 같이, 표적지향 구동 트리거된 형광(targeting-driven triggered fluorescence)의 가능성이 NanoPcTB 및 NanoPcT를 주입한 마우스의 *in/ex vivo* 형광 이미지를 비교했을 때 훨씬 더 잘 설명되는 데, 이는 NanoPcTB를 주입한 마우스에서만 높은 종양 형광이 관찰되었기 때문이다.

[0161] 도 17은 NanoPcTB(20 μL, 60 μM)의 주입하기 전 및 주입한 후, 또는 먼저 비오틴(20 μL, 600 μM)을 주입한 후, 20분 뒤에 NanoPcTB(20 μL, 600 μM)을 주입하기 전 및 주입한 후의 A549 종양의 *ex vivo* 형광 이미징을 도시한다. 도 17에 도시된 바와 같이, 종양 조직에 먼저 비오틴을 주입한 다음 NanoPcTB를 주입한 경우의 종양이, NanoPcTB만을 주입한 경우의 종양에 비해 형광 강도가 분명하게 감소했다. 이러한 결과는 NanoPcTB가 비오틴 수용체에 의해 트리거된 *in vivo* 형광을 나타냄을 보여준다.

[0162] 새로운 비침습적 이미징 모달리티로서, 광음향 단층 촬영은 PA 효과를 사용하여 생물학적 깊이 조직의 다중스케일 고해상도 이미징을 가능하게 한다. NanoPcTB가 *in vivo* PA 단층 촬영에 적합한지 여부를 조사하기 위해, A549 종양을 보유한 마우스의 정맥에 NanoPcTB(200 μM, 150 μL)를 주입하고, PA 신호를 PA 단층 촬영을 사용하여 검출하고, 마우스의 전신 *in vivo* PA 이미지를 스캐닝한 후 상이한 시점의 데이터를 사용하여 생성하였다.

[0163] 도 18은 NanoPcTB의 정맥 주입 전후의 A549 종양을 보유한 마우스의 *in vivo* 광음향 단층 촬영을 도시한다((a) 마우스의 사진 및 680 nm에서의 상대 측면도 및 평면도 2D-MAP 이미지 사진, (b) 시간의 함수로서 일정한 PA 강도(0.5)보다 큰 종양 영역의 픽셀수). 도 18 중, 빨간색 점선 상자(도 18(a))는 스캔 영역을 나타낸다. NanoPcTB를 주입하기 전에, 측면(y 축을 따라) 및 수직(z 축을 따라) 투사(projections)를 통해 대조(도 18(a), 사전 주입 이미지)의 PA 최대 진폭 투사(maximum-amplitude-projection: MAP) 이미지를 얻었다. 대조 PA MAP 이미지는 680 nm에서 주요 혈관을 명확하게 보여준다. 대조 이미지의 추정된 종양 영역의 PA 신호에 비하여 증가한 PA 신호(도 18(b))는 NanoPcTB가 활성 및 수동 표적화를 통해 종양 조직에 시간 의존적 방식으로 축적되었음을 보여준다. 따라서, NanoPcTB는 그들의 특유한 자체 퀀칭 및 나노구조체화된 특성을 기초로 신호 대 배경 비가 높은 광음향 단층 촬영 및 표적지향 트리거된 형광 이미징에 본질적으로 적합함을 확인할 수 있다.

[0164] **평가예 4: NanoPcTB의 암 치료 효과**

[0165] 치료 효과 평가를 위해 먼저 A549 세포(비오틴 수용체 양성), HeLa 세포(비오틴 수용체 양성) 및 WI38-VA13 세포(비오틴 수용체 음성)에서 NanoPcTB의 *in vitro* 항암 효과를 조사했다. 도 6a에 도시된 바와 같이, 암 조건하에서는 NanoPcTB 및 NanoPcT 둘 다에서 유의미한 독성이 관찰되지 않았다. 그러나, 655 nm 레이저 조사 하에서 NanoPcTB 및 NanoPcT에 의해 유발된 세포 사멸 효과는 크게 달라다. 2.5 W/cm^2 레이저 조사 하에서 3 μM의 농도에서 NanoPcTB에 의해 유도된 HeLa 세포 억제는 약 54%였고, 이는 NanoPcT(약 21% 세포 억제)보다 2배 이상 높은 수치였다. 또한, 심지어 낮은 레이저 전력 조사(0.22 W/cm_2) 하에서도 NanoPcTB는 여전히 약 30%의 HeLa 세포 사멸을 유도했지만, NanoPcT는 무시할 만큼의 효과를 나타냈다. 두 샘플의 상이한 세포 손상 메커니즘을 설명하기 위해 처리 후 세포 온도 변화 및 ROS 생성을 평가했다.

[0166] 도 19는 *in vitro* 항암 효과를 도시한다. 도 19(a)는 655 nm 레이저 조사(각각 0.22 W/cm^2 또는 2.5 W/cm^2, 5분)의 부재 또는 존재 하에서 NanoPcT 및 NanoPcTB(각각 3 μM 또는 6 μM)와 함께 배양된 HeLa 세포의 세포 독성 효과를 도시하고, 도 19(b)는 상기 HeLa 세포의 온도를 도시한다. 데이터는 평균 ± 표준 편차(n = 3)로 표현된다. 도 19(c)는 레이저 조사(655 nm, 0.22 W/cm^2, 5분)의 존재 하에서 A549, Hela 및 WI38-VA13 세포에서의 NanoPcT 및 NanoPcTB(3 μM)에 의해 유도된 ROS 생성을 도시한다. 스케일 바는 20 μm이다. 도 19에 도시된 바와 같이, NanoPcTB와 NanoPcT는 유의미한 가열 효과를 나타냈지만, NanoPcTB만이 비오틴 수용체 양성 세포(A549와 HeLa)에서 명백한 ROS 생성을 유도했다. 이러한 결과는 NanoPcTB가 A549 및 HeLa 세포에서 과발현된 비오틴 수용체에 의해 유도된 부분 분해에 의해 향상된 결합 PDT 및 PTT 효과를 가짐을 보여준다. 또한, 비오틴 수용체 음성 세포(WI38-VA13)에서 NanoPcTB에 의해 유도된 훨씬 더 낮은 ROS 생성은 NanoPcTB의 암 세포 특이적 광 치료 효과를 더욱 확인시켜 준다.

[0167] NanoPcTB의 *in vivo* 광자 치료 잠재력을 실증하기 위해, 암의 광 치료를 위해 NanoPcTB를 사용하여 예비 실험을 수행했다. 4개의 그룹의 A549 종양 보유 마우스(1 그룹당 8 마리)를 식염수(saline) 주입, 식염수 주입 후 레이저 조사, NanoPcTB 주입, 및 NanoPcTB 주입 후 레이저 조사하였다.

[0168] 도 20은 *in vivo* 항암 효과를 도시한다. 도 20(a)는 상이한 처리 이후의 A549 이종 이식을 갖는 마우스의 종양

성장 곡선을 도시한다: 레이저 조사를 포함하지 않은 식염수의 정맥 내 주입(검은 곡선), 레이저 조사를 포함한 식염수의 정맥 내 주입(녹색 곡선), 레이저 조사를 포함하지 않은 NanoPcTB의 정맥 내 주입(청색 곡선), 및 레이저 조사를 포함한 NanoPcTB의 정맥 내 주입(적색 곡선). 약물 투여량: 200 μL, 60 μM. 레이저 조건: 655 nm, 2.0 W/cm^2, 1분 이후에 655 nm, 0.22 W/cm^2, 5분. 약물 광 간격(drug light interval): 24시간. * $P < 0.05$. 도 20(b)는 *in vivo* 항암 연구 종료시의 종양의 대표 사진을 도시한다. 도 20(a) 및 도 20(b)에 도시된 바와 같이, NanoPcTB로 처리되고 이후 조사된 마우스에서 16일 후에 약 40%의 종양 성장이 억제되었음을 확인할 수 있다. 대조적으로, 조사없이 NanoPcTB로 처리된 마우스는 현저한 수준의 종양 성장을 나타냈으며, 이는 식염수로 처리한 후 조사하거나, 조사하지 않은 마우스에서의 성장과 유사한 수준이었다.

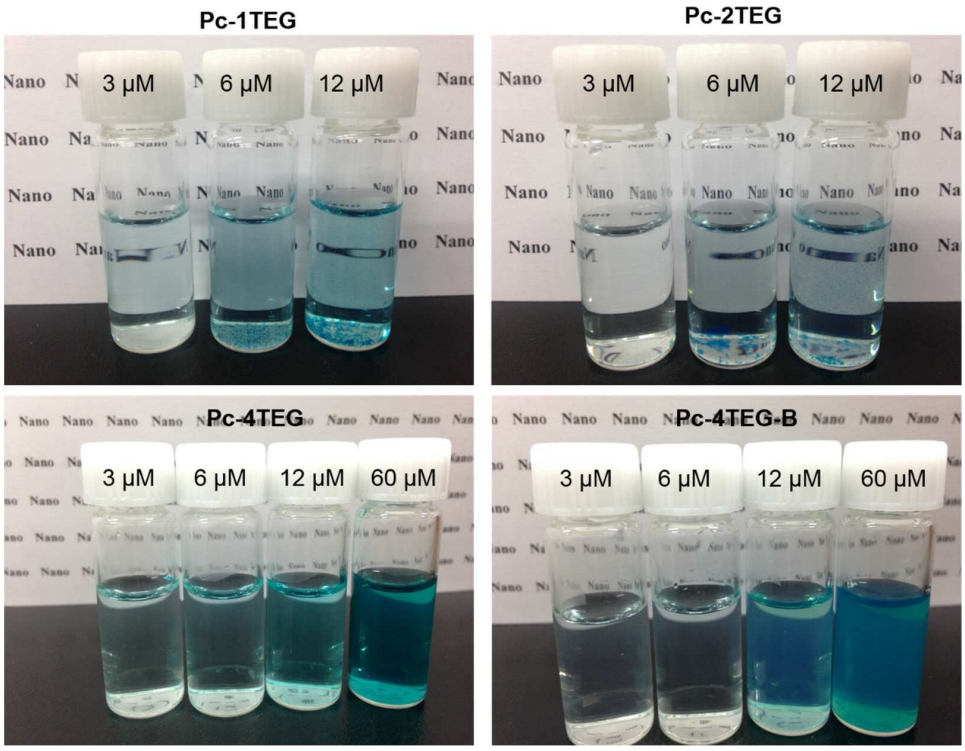
[0169] *in vivo* 광 치료 효과를 추가로 확인하기 위해, 이러한 치료 후에, 헤마톡실린 및 에오신(H & E) 염색 및 TUNEL 분석을 사용하여 종양 절편(tumor sections)을 조사하였다.

[0170] 도 20(c)는 처리 후 마우스의 종양 절편의 H & E 염색 및 TUNEL 분석 결과를 도시한다. 도 20(c)에 도시된 바와 같이, NanoPcTB로 처리하고 레이저 조사한 H & E 염색한 종양은 어둡게 염색되고 응축된 염색질(chromatin)을 포함한 특유의 사멸 세포를 나타냈으며, 이는 다른 그룹의 종양에서는 관찰되지 않았다.

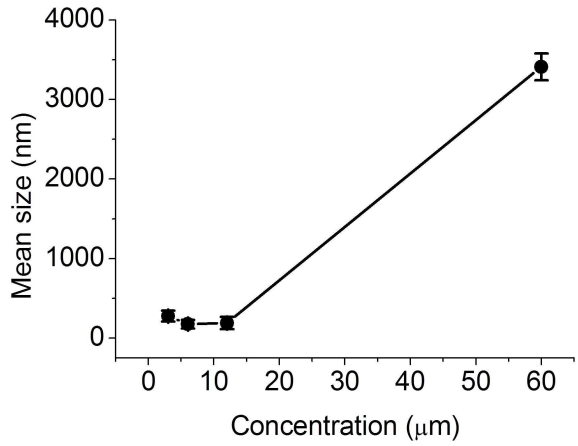
[0171] 도 21은 TUNEL 분석으로 검출된 치료 후 종양 괴사 또는 사멸 세포의 비교를 도시한다. 도 21에 도시된 바와 같이, TUNEL 분석 결과는 NanoPcTB로 처리하고 레이저 조사한 종양에서 사멸 염색질 양의 상당한 증가를 보였다. 대조적으로, NanoPcTB 또는 레이저 조사만으로 처리한 종양 절편에서는 무시할 만큼의 괴사 또는 사멸 종양 세포가 관찰되었다.

도면

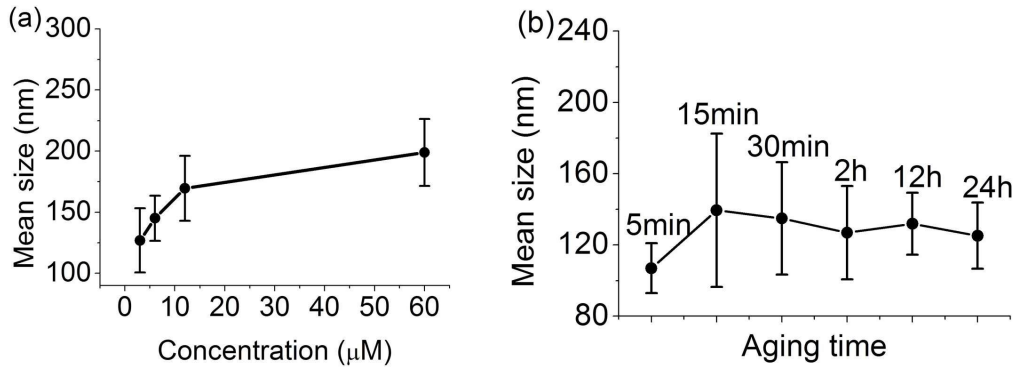
도면1



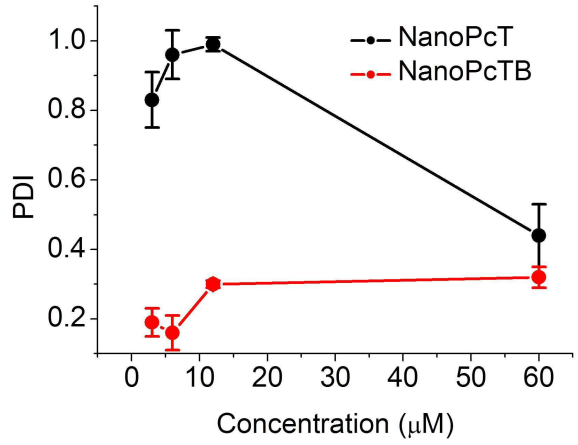
도면2


4000
3000
2000
1000
0
Mean size (nm)
0
10
20
30
40
50
60
Concentration (μm)

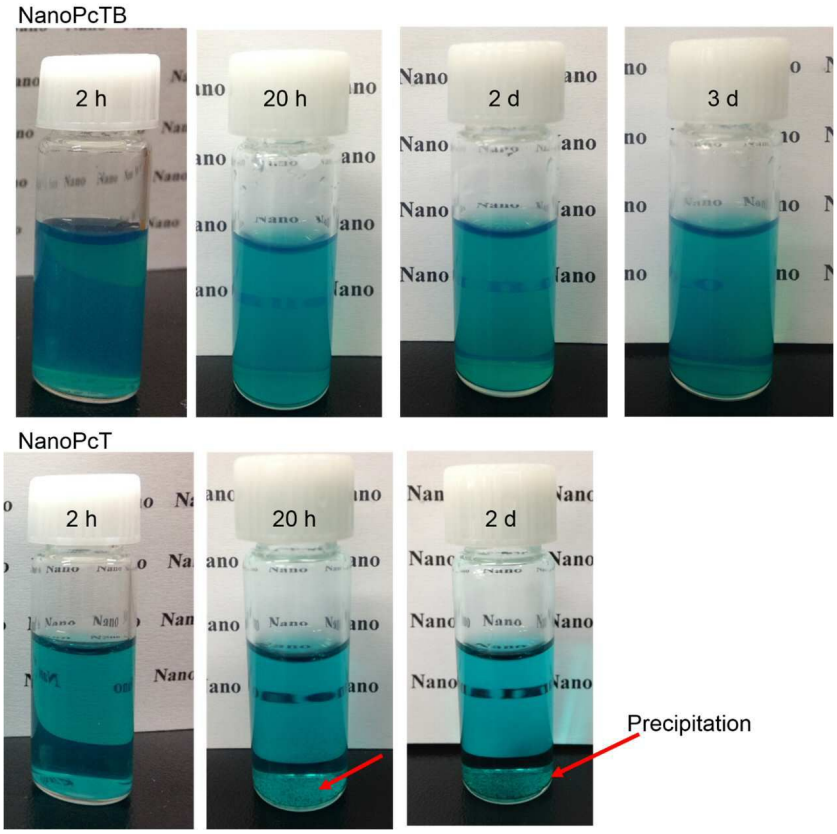
도면3


(a)
300
250
200
150
100
Mean size (nm)
0
10
20
30
40
50
60
Concentration (μM)
(b)
240
200
160
120
80
Mean size (nm)
15min
30min
2h
12h
24h
5min
Aging time

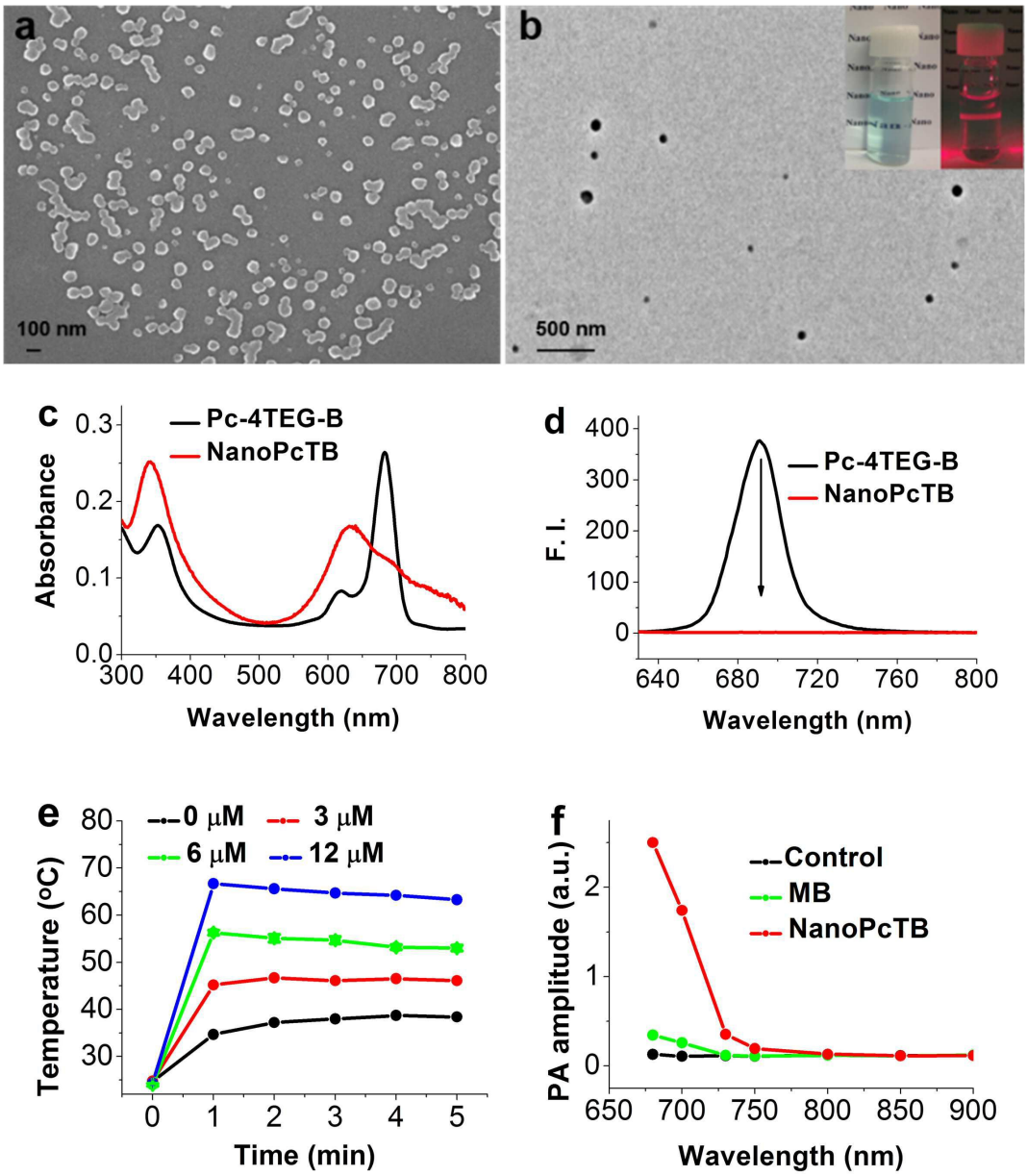
도면4


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
PDI
NanoPcT
NanoPcTB
0
10
20
30
40
50
60
Concentration (μM)

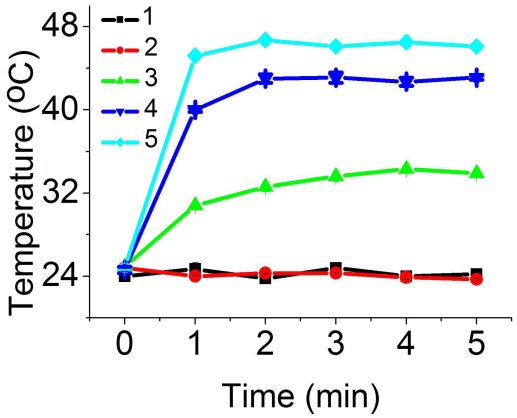
도면5



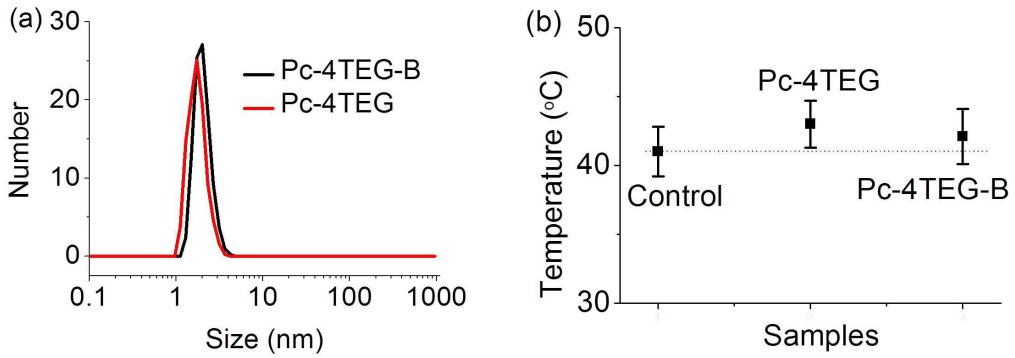
도면6


a
100 nm
b
500 nm
c
Absorbance
Pc-4TEG-B
NanoPcTB
Wavelength (nm)
d
F. I.
Pc-4TEG-B
NanoPcTB
Wavelength (nm)
e
Temperature (°C)
0 μM
3 μM
6 μM
12 μM
Time (min)
f
PA amplitude (a.u.)
Control
MB
NanoPcTB
Wavelength (nm)

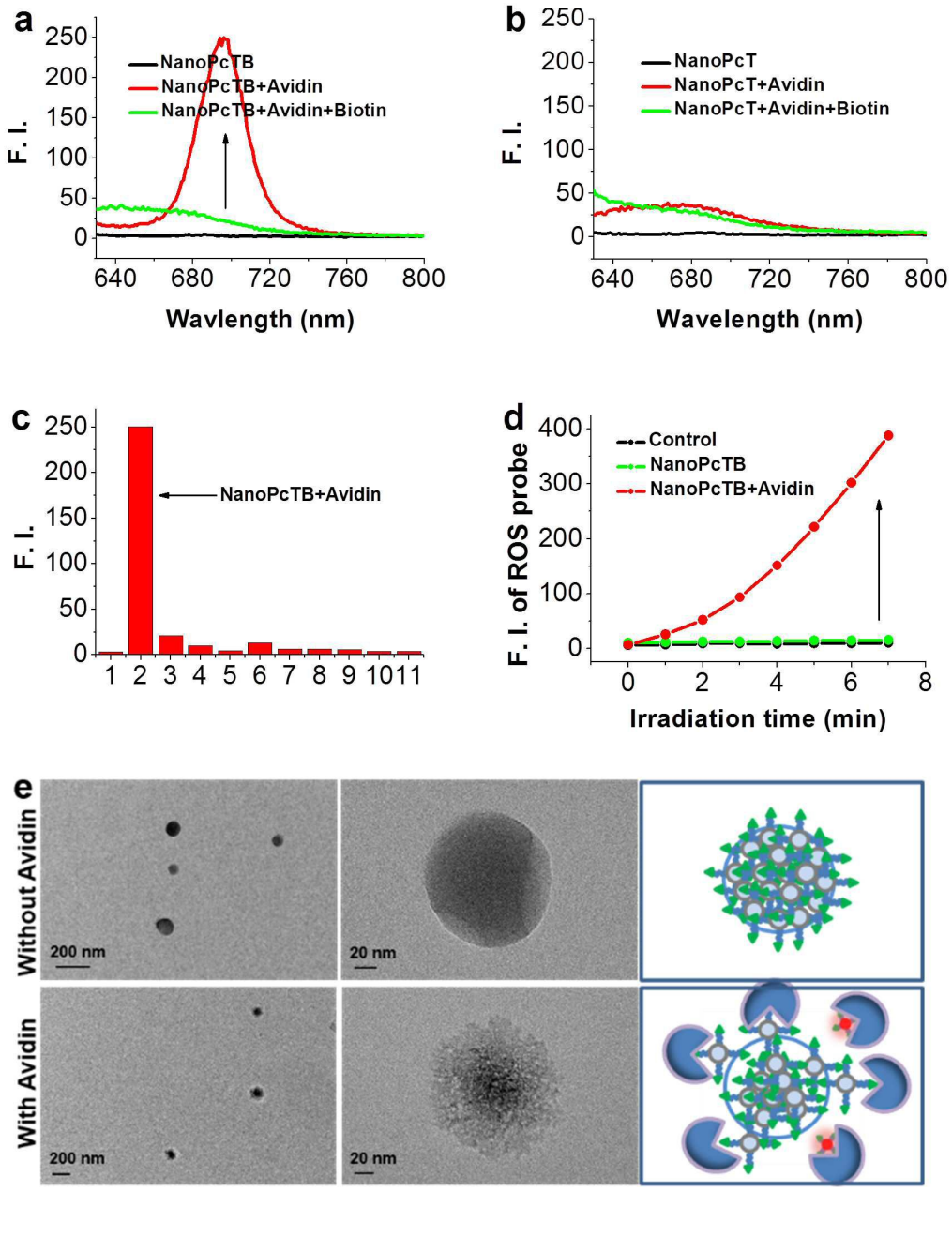
도면7


Temperature (°C)
1
2
3
4
5
Time (min)

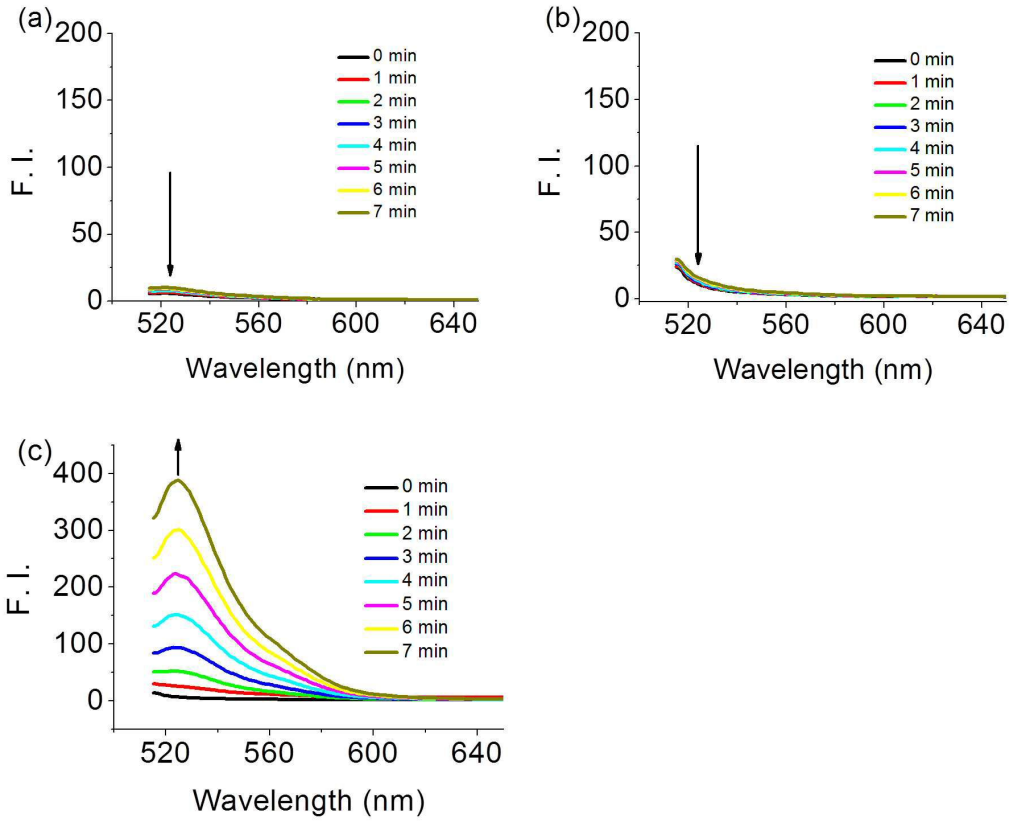
도면8


(a)
Number
Size (nm)
Pc-4TEG-B
Pc-4TEG
(b)
Temperature (°C)
Samples
Control
Pc-4TEG
Pc-4TEG-B

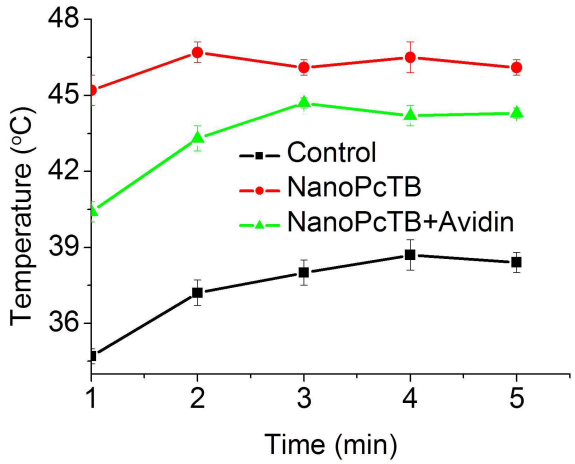
도면9


a
F. I.
Wavlength (nm)
NanoPcTB
NanoPcTB+Avidin
NanoPcTB+Avidin+Biotin
b
F. I.
Wavelength (nm)
NanoPcT
NanoPcT+Avidin
NanoPcT+Avidin+Biotin
c
F. I.
NanoPcTB+Avidin
d
F. I. of ROS probe
Irradiation time (min)
Control
NanoPcTB
NanoPcTB+Avidin
e
Without Avidin
With Avidin
200 nm
20 nm

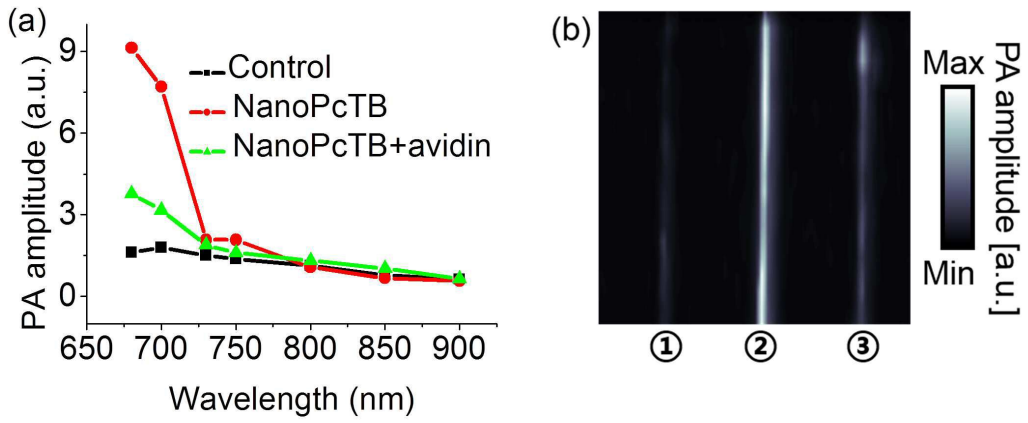
도면10


(a)
F. I.
Wavelength (nm)
0 min
1 min
2 min
3 min
4 min
5 min
6 min
7 min
(b)
F. I.
Wavelength (nm)
(c)
F. I.
Wavelength (nm)

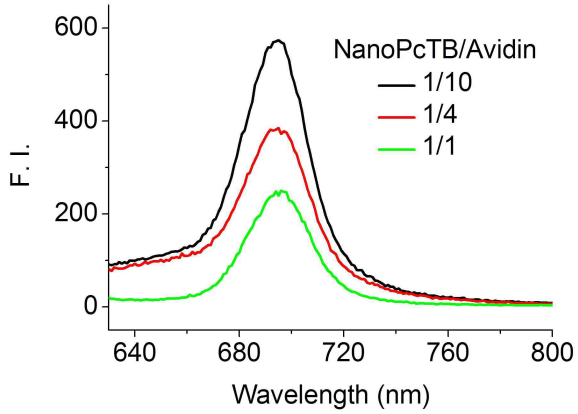
도면11


Temperature (°C)
Time (min)
Control
NanoPcTB
NanoPcTB+Avidin

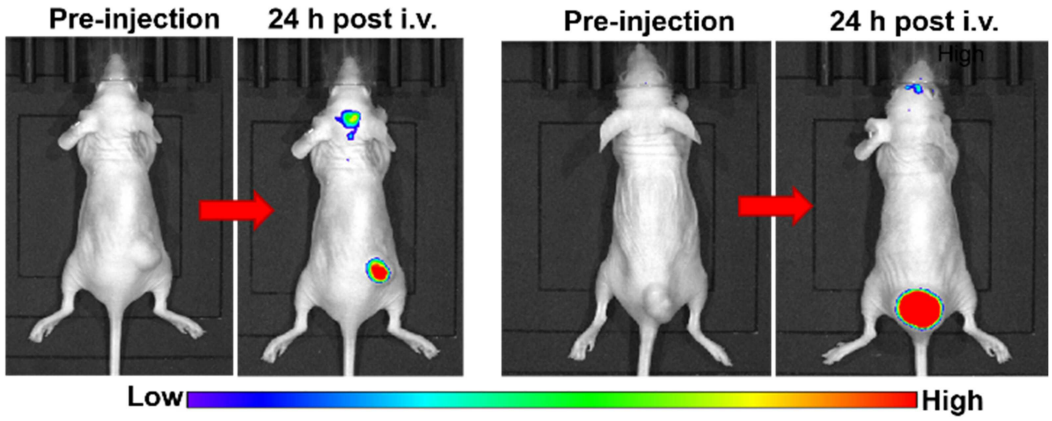
도면12



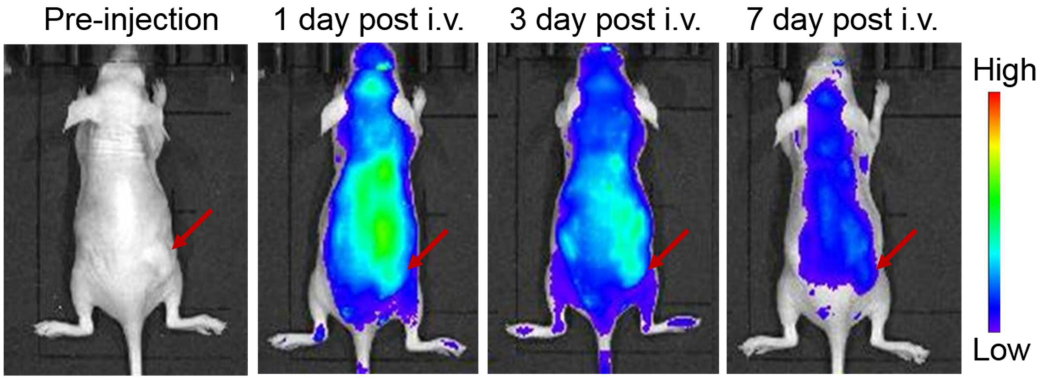
도면13



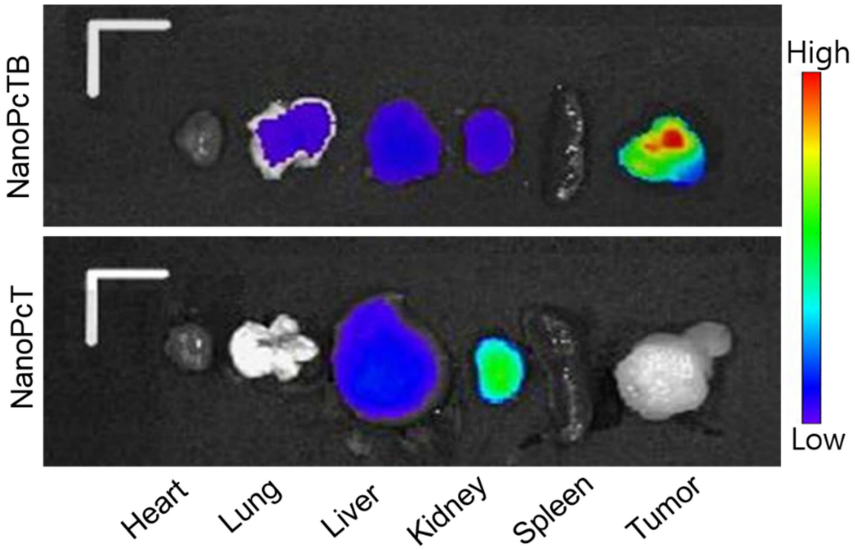
도면14



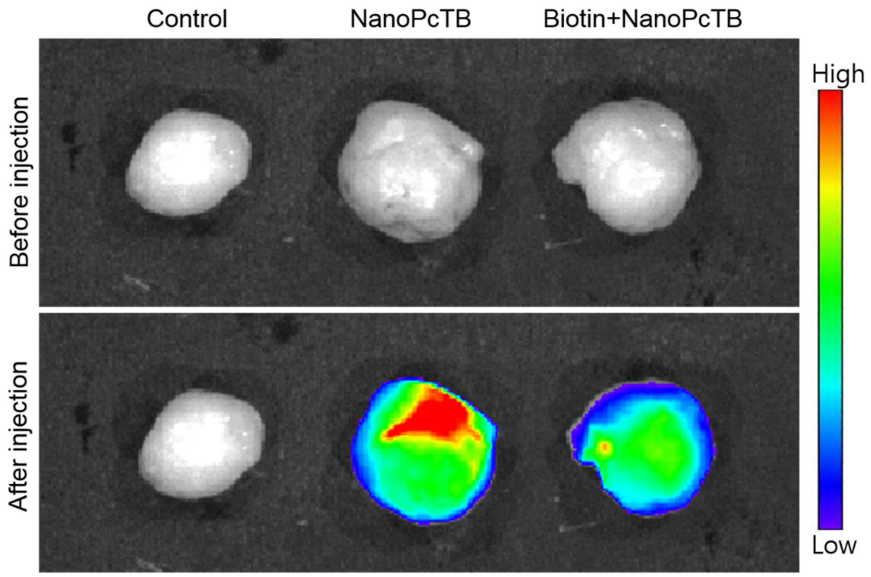
도면15



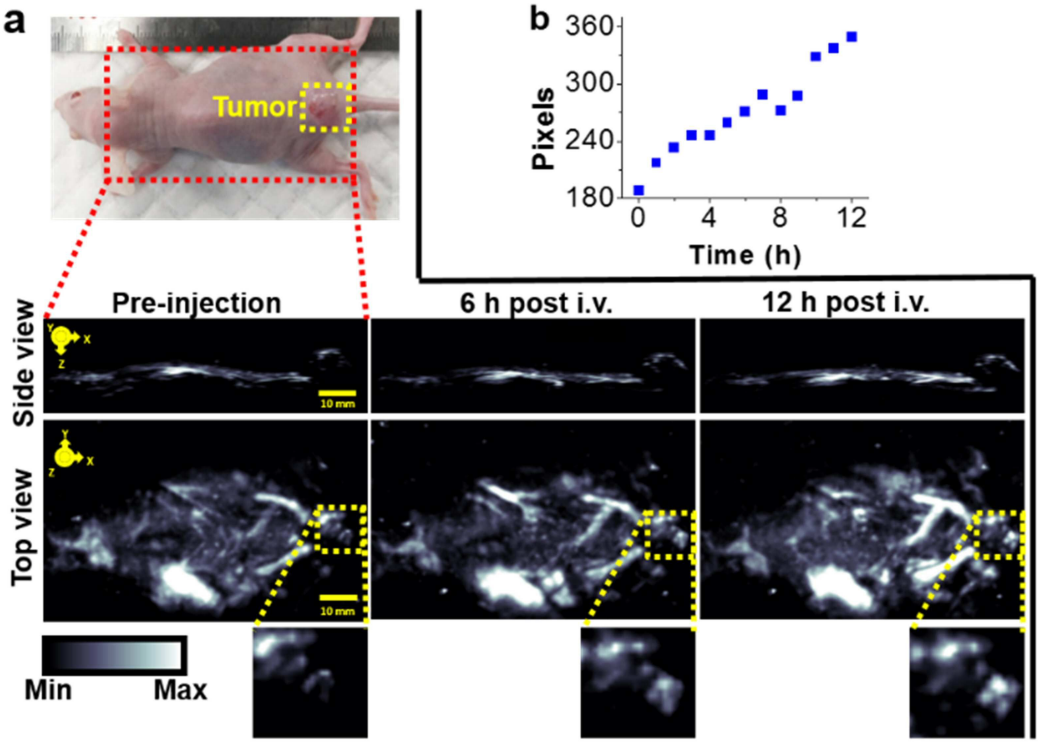
도면16



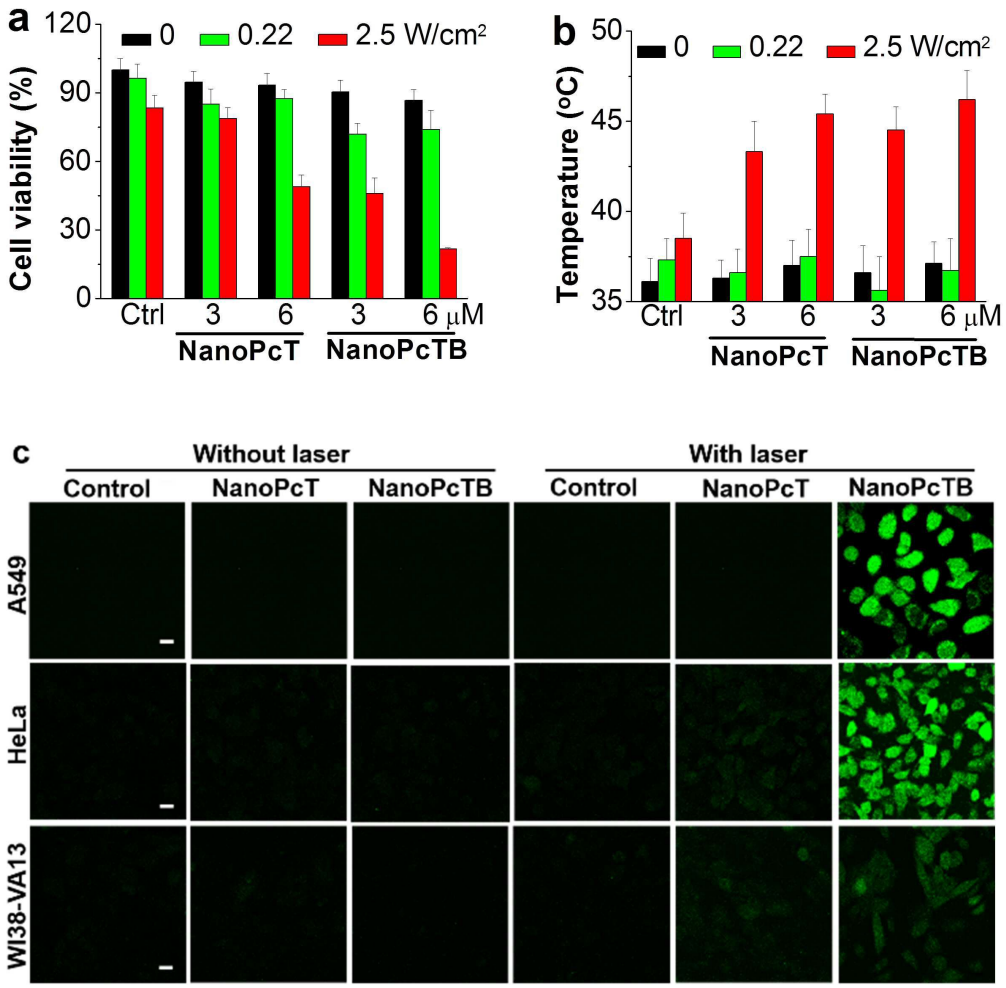
도면17



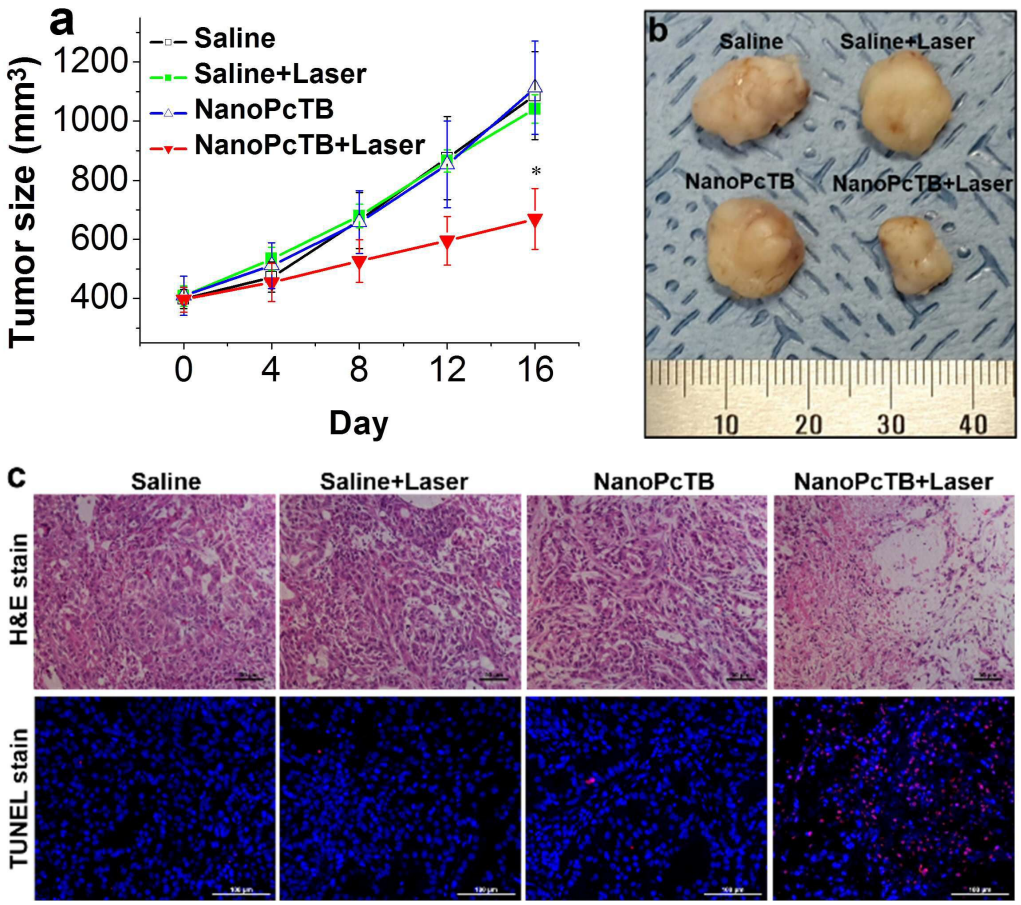
도면18


a
Tumor
b
Pixels
360
300
240
180
0
4
8
12
Time (h)
Pre-injection
6 h post i.v.
12 h post i.v.
Side view
Top view
10 mm
10 mm
Min
Max

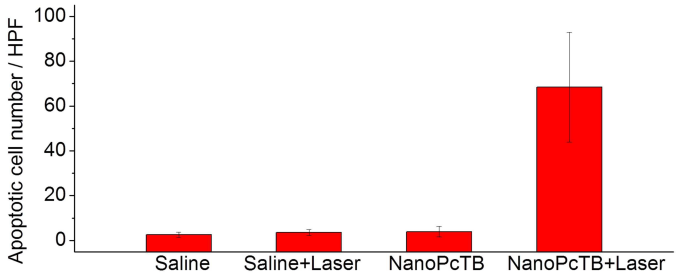
도면19


a
Cell viability (%)
120
90
60
30
0
0
0.22
2.5 W/cm²
Ctrl
3
6
3
6 μM
NanoPcT
NanoPcTB
b
Temperature (°C)
50
45
40
35
0
0.22
2.5 W/cm²
Ctrl
3
6
3
6 μM
NanoPcT
NanoPcTB
c
Without laser
With laser
Control
NanoPcT
NanoPcTB
Control
NanoPcT
NanoPcTB
A549
HeLa
WI38-VA13

도면20


a
Saline
Saline+Laser
NanoPcTB
NanoPcTB+Laser
Tumor size (mm³)
1200
1000
800
600
400
0
4
8
12
16
Day
*
b
Saline
Saline+Laser
NanoPcTB
NanoPcTB+Laser
10
20
30
40
c
Saline
Saline+Laser
NanoPcTB
NanoPcTB+Laser
H&E stain
TUNEL stain

도면21


Apoptotic cell number / HPF
100
80
60
40
20
0
Saline
Saline+Laser
NanoPcTB
NanoPcTB+Laser