



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0054773
(43) 공개일자 2019년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 41/00 (2006.01) A61K 31/381 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 41/0057 (2013.01)
A61K 31/381 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0151725
(22) 출원일자 2017년11월14일
심사청구일자 2017년11월14일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
유영민
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 120동 2401호(신천동, 파크리오)
이승연
서울특별시 송파구 잠실로 62, 308동 1004호(잠실동, 트리지움)
(74) 대리인
리앤목특허법인

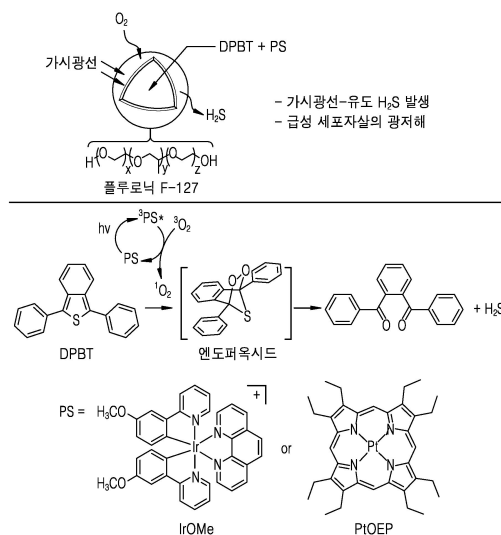
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 가시광선-감응성 황화 수소 전달용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

일 양상에 따른 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 또는 염; 및 일중항 산소(1O_2) 광감응제를 포함하는 H_2S 전달용 조성물, 약학적 조성물, 및 이를 이용한 방법을 제공한다. 이에 따르면, 가변(tunable) 광감응성과 H_2S 전구체의 매우 높은 1O_2 반응성, 특히 1O_2 PS의 선택을 통한 광조사 파장을 변형하는 능력을 제공할 수 있다. 또한, 가시광선 광조사 하에서 생성된 H_2S 의 세포내 전달 및 세포보호 작용을 통해 생물학적 유용성이 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 41/0028 (2013.01)

(72) 발명자

문유경

경상남도 사천시 사천읍 사주길 41-15, 103동 204호(사천유원리치빌)

김진주

서울특별시 노원구 석계로 49, 101동 504호(월계동, 현대아파트)

김신희

전라남도 순천시 왕궁길 95, 102동 501호(조례동, 왕지송촌프라임아파트)

김소남

경상남도 창원시 성산구 동산로 115, 109동 502호(상남동, 대동아파트)

박규립

경기도 성남시 분당구 동판교로 275, 112동 603호(삼평동, 붓들마을1단지풍성신미주아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A6A6054204

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-글로벌프론티어사업

연구과제명 스마트브레인센서네트워크

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.01 ~ 2020.08.31

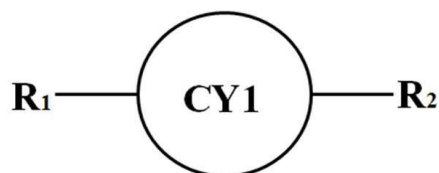
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 또는 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

CY1 고리는 S를 포함하는 융합된 방향족 고리를 형성함을 나타내고, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀의 시클릭고리기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀의 헤테로시클릭고리기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합이고,

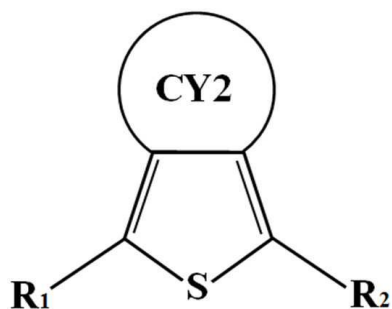
R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 수소 원자, 히드록시기, 에테르기, 아미노기, 에스테르기, 아마이드기, 카르복시산 및 카르보닐기 유도체, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀의 시클릭고리기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀의 헤테로시클릭고리기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합인 화합물; 및

일중항 산소(singlet oxygen, ¹O₂) 광감응제(photosensitizer: PS)를 포함하는 황화 수소(H₂S) 전달용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 2로 표시되는 것인 조성물:

[화합물 2]



상기 화학식 2에서,

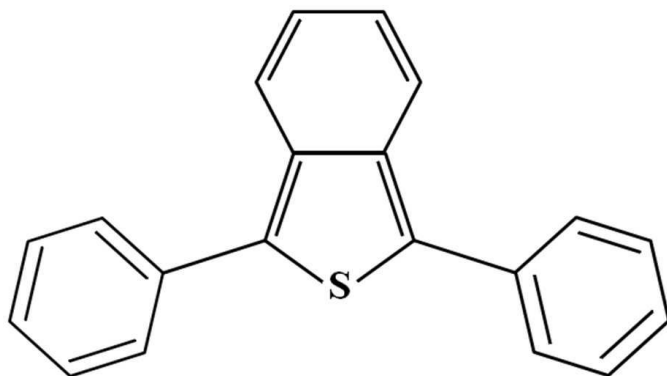
CY2 고리는 티오펜(thiophene) 고리에 융합된 방향족 고리를 형성함을 나타내고, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합이고,

R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 수소 원자, 히드록시기, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₅의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합이다.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 3으로 표시되는 것인 조성물:

[화합물 3]



청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 광감응제는 비스시클로메탈화 이리듐(biscyclometalated iridium(III)) 복합체 ([이리듐 비스(2-(3-메톡시페닐)피리디네이트)(1,10-페난트롤린)]PF₆: IrOMe), 백금(II) 옥타에틸포르핀(platinum(II) octaethylporphine: PtOEP), 헤마토포르피린(Haematoporphyrin) 유도체(포토프린(photofrin)), 5-아미노 라에불린산(amino laevulinic acid: ALA), 벤조포르피린 유도체 모노산 고리 A(benzoporphyrin derivative monoacid ring A: BPD-MA), 클로린 광감응제 주석 에티오푸르푸린(chlorin photosensitiser tin etiopurpurin), 테트라(m-히드록시페닐)클로린(tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin: mTHPC), 루테티움 텍사피린(lutetium texaphyrin), 9-아세톡시-2,7,12,17-테트라키스-(β-메톡시에틸)-포르피센(9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β-methoxyethyl)-porphycene), 아연 프탈로시아닌(zinc phthalocyanine), 나프탈로시아닌(naphthalocyanine), 메틸로-포르피린(metallo-porphyrin), 메탈로클로린(metallochloirins), 메탈로-프탈로시아닌(metallo-phthalocyanine), 메탈로-나프탈로시아닌설포벤조-포르피라진(metallo-naphthocyaninesulfobenzo-porphyrazine: M-NSBP), 및 메탈로-나프탈로시아닌(metallo-naphthalocyanine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 또는 염; 광감응제, 또는 이들의 조합은 소포(vesicle)에 봉입된 것인 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 소포는 폴리머솜(polymersome) 또는 리포솜(liposome)인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 소포는 폴리(에틸렌 글리콜)(poly(ethylene glycol): PEG), 폴리(2-메틸옥사졸린)(poly(2-methyloxazoline)), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane: PDMS), 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone: PCL), 폴리(락티드)(poly(lactide): PLA), 및 폴리(메틸 메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate: PMMA)로 이루어진 군으로부터 선택된 블록(block)을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 H₂S 전달용 조성물은 가시광선 감응성인 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 H₂S를 세포내 전달할 수 있는 것인 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 산화적 스트레스에 대해 세포 보호 활성, 세포자살(apoptosis) 저해 활성,

또는 이들의 조합을 제공하는 것인 조성물.

청구항 11

청구항 1의 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염; 및 일중항 산소($^1\text{O}_2$) 광감응제를 포함하는 파킨슨병, 다운증후군, 알츠하이머병, 당뇨병, 및 심혈관 질환으로부터 선택된 질병을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1의 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염 및 일중항 산소($^1\text{O}_2$) 광감응제를 동시 또는 순차로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 파킨슨병, 다운증후군, 알츠하이머병, 당뇨병, 및 심혈관 질환으로부터 선택된 질병을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 융합된 방향족 고리를 포함한 화합물 및 광감응제를 포함한 가시광선-감응성 황화 수소 전달용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 황화 수소(H_2S)는 기체신경전달물질(gasotransmitter)에 속하고 인체에서 다양한 병리생리학적 적용과 불가분적으로 연관되어 있다. H_2S 는 파킨슨병, 다운증후군, 알츠하이머병, 당뇨병, 및 심혈관 질환과 같은 많은 질병에서 보호 효과가 있다. H_2S 를 방출하는 약물 또는 전구약물(prodrug)의 개발에서 관심이 촉발되었다. H_2S 의 무기염, 예를 들어 NaSH 및 Na_2S 는 치료 요법을 적용하기에 부적당한데, 그 이유는 그들이 갑작스럽게 H_2S 수준을 증가시키고 급성 부작용을 유발하기 때문이다. 이 문제를 회피하기 위해, 생물학적 자극에 반응하여 H_2S 를 방출하는 유기 공여자(donor)가 개발되었다. 그러나, 자극을 제어하는 능력이 제한되어 있어서 H_2S 전달의 잠재력을 충분히 활용하지 못하고 있다.

[0003] 광반응성(Photoresponsive) H_2S 공여자는 기존 공여자에 대한 유망한 대안이다. 광자속(Photon flux)은 생물학적 자극에 대해 제어가능하고 직교(orthogonal)하고, 선택적인 H_2S 방출을 가능하게 한다. 또한, 광자를 원격 및 위치-특이적으로 전달하는 능력은 H_2S 발생에 대해 매우 높은 시공간적 제어가 가능하게 한다. 따라서, H_2S 광공여자의 개발은 연구의 초점이 되어왔다(Devarie-Baez et al., Org. Lett., 2013, vol.15, p.2786-2789). 여러 광케이지 스캐폴드(photocage scaffold)들이 o-니트로벤질, 케토프로페네이트(ketoprofenate), 및 말라카이트 그린(malachite green)의 류코(leuco) 형태를 포함한 광절단가능한 H_2S 공여자를 만드는데 이용되어 왔다. 그러나, 이러한 H_2S 광공여자들은 생물학적으로 이용하기에 단점이 있었다. 한가지 주요 단점은 자외선에 대한 요구이다. 단파장 광조사는 광독성 및 조직 내로의 UV 광의 제한된 침투 깊이 때문에 생물학적 적용에 잠재적인 문제를 야기한다.

[0004] 따라서, 가시광선 영역에서 광조사에 따라 H_2S 를 생성할 수 있는 광공여자를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 황화 수소(H_2S) 전달용 조성물을 제공한다.

[0006] H_2S 를 세포내 전달함으로써 질병을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

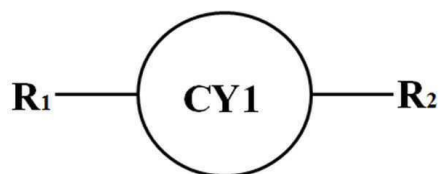
[0007] H_2S 를 세포내 전달함으로써 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 융합된 방향족 고리를 포함하는 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 또는 염; 및 일중항 산소(singlet oxygen, 1O_2) 광감응제(photosensitizer: PS)를 포함하는 황화 수소(H_2S) 전달용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:

[화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 화학식 1에서, CY1 고리는 S를 포함하는 융합된 방향족 고리를 형성함을 나타내고, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 시클릭고리기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 헤테로시클릭고리기, 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{20} 의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{20} 의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0013] 상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2 는 서로 독립적으로 수소 원자, 히드록시기, 에테르기, 아미노기, 에스테르기, 아미드기, 카르복시산 및 카르보닐기 유도체, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 시클릭고리기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 헤테로시클릭고리기, 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{20} 의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6 내지 C_{20} 의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0014] 용어 "치환" 또는 "비치환된"의 '치환'은 유기 화합물 중의 하나 이상의 수소 원자를 다른 원자단으로 치환하여 유도체를 형성한 경우 수소 원자 대신에 도입되는 것을 말하고, "치환기"는 도입된 원자단을 말한다. 상기 치환기는 할로겐원자, 할로겐원자로 치환된 C_1 내지 C_5 의 알킬기(예: CCF_3 , $CHCF_2$, CH_2F , CCl_3 등), 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미노기, 아미디노기, 아세트아미노기, 히드라진, 히드라존, 카르복실기나 그의 염, 술폰산기나 그의 염, 인산이나 그의 염, 또는 C_1 내지 C_5 의 알킬기, C_2 내지 C_5 의 알케닐기, C_2 내지 C_5 의 알키닐기, C_3 내지 C_{10} 의 시클로알킬기, C_6 내지 C_{10} 의 아릴기, C_6 내지 C_{10} 의 헤테로아릴기, C_6 내지 C_{20} 의 아릴알킬기, C_6 내지 C_{20} 의 헤테로아릴알킬기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0015] 용어 "알킬기"는 완전 포화된 분지형 또는 비분지형 (또는 직쇄 또는 선형) 탄화수소기를 의미한다. 상기 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기는 C_1 내지 C_{15} , C_1 내지 C_{10} , C_1 내지 C_5 , 또는 C_1 내지 C_3 의 알킬기일 수 있다. 상기 알킬기는 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 및 n-펜틸이다.

[0016] 용어 "시클릭고리기"는 고리원자가 탄소이고 포화 또는 부분적으로 불포화된 비방향족 유기 화합물을 말한다. 상기 시클릭고리기는 C_3 내지 C_{20} , C_1 내지 C_{15} , C_1 내지 C_{10} , C_1 내지 C_5 , 또는 C_1 내지 C_3 의 시클릭고리기일 수 있다. 상기 시클릭고리기는 예를 들어 시클로펜틸, 시클로헥센, 시클로헥실, 및 보르닐이다.

[0017] 용어 "헤테로시클릭고리기"는 N, O, P 또는 S 중에서 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 고리이고, 나머지 고리원자가 탄소인 비방향족 유기 화합물인 것을 말한다. 상기 헤테로시클릭고리기는 C_3 내지 C_{20} , C_1 내지 C_{15} , C_1 내지 C_{10} , C_1 내지 C_5 , 또는 C_1 내지 C_3 의 헤테로시클릭고리기일 수 있다. 상기 헤테로시클릭고리기는 예를 들어 테트라히드로피란, 및 테트라히드로피리딘이다.

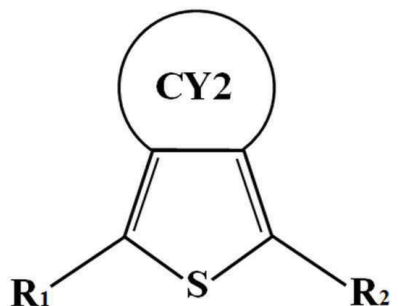
[0018] 용어 "아릴기"는 단독 또는 조합하여 사용되어, 하나 이상의 고리를 포함하는 방향족 시스템을 말한다. 상기 아릴기는 C_6 내지 C_{20} , C_6 내지 C_{15} , C_6 내지 C_{10} , 또는 C_6 내지 C_8 의 아릴기일 수 있다. 상기 아릴기는 예를 들어 페닐, 나프틸, 테트라히드로나프틸이다.

[0019] 용어 "헤테로아릴기"는 N, O, P 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하고, 나머지 고리원자가 탄소인 모노시클릭(monocyclic) 또는 바이시클릭(bicyclic) 유기 화합물을 말한다. 상기 헤테로아릴기는 예를 들어 1 내지 5개의 헤테로원자를 포함할 수 있고, 5 내지 10 고리 멤버(ring member)를 포함할

수 있다. 상기 S 또는 N은 산화되어 여러 산화 상태를 가질 수 있다. 상기 헤테로아릴기는 C₆ 내지 C₂₀, C₆ 내지 C₁₅, C₆ 내지 C₁₀, 또는 C₆ 내지 C₈의 헤테로아릴기일 수 있다. 상기 헤테로아릴은 예를 들어 티에닐, 푸릴, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티아졸릴, 및 이소티아졸릴이다.

[0020] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 2로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0021] [화합물 2]



[0022]

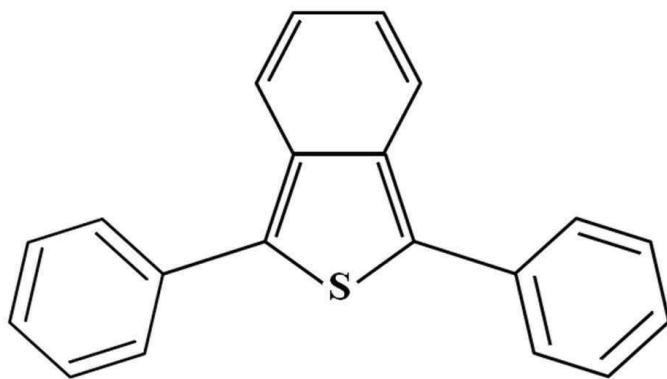
[0023] 상기 화학식 2에서, CY2 고리는 티오펜(thiophene) 고리에 융합된 방향족 고리를 형성함을 나타내고, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0024] 상기 화학식 2에서, R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 수소 원자, 히드록시기, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₅의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C₆ 내지 C₂₀의 헤테로아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0025] 상기 알킬기, 아릴기, 및 헤테로아릴기는 전술한 바와 같다.

[0026] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 3으로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0027] [화합물 3]



[0028]

[0029] 상기 화학식 3의 화합물은 1,3-디페닐이소벤조티오펜(1,3-diphenylisobenzothiophene: DPBT)이다.

[0030] 용어 "입체이성질체(stereoisomer)"는 분자식 및 구성원자의 연결 방법도 같으나 원자 사이의 공간적 배치가 다른 화합물을 말한다. 상기 입체이성질체는 부분입체 이성질체(diastereomer) 또는 거울상 이성질체(enantiomer)일 수 있다. 거울상 이성질체는 왼손과 오른손의 관계처럼 그 거울상과 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하고, 광학 이성질체(optical isomer)라고도 한다. 거울상 이성질체는 키랄 중심 탄소에 4개 이상의 치환기가 서로 다른 경우 R(Rectus: 시계방향) 및 S(sinister: 반시계 방향)로 구분한다. 부분입체이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하고, 원자의 공간 배열이 달라 생기는 시스(cis)-트랜스(trans) 이성질체로 나뉠 수 있다.

[0031] 용어 "유도체(derivative)"는 상기 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 말한다.

[0032] 용어 "염(salt)"은 화합물의 무기산염, 유기산염, 또는 금속염의 부가염을 말한다. 상기 염은 세포에 투여되어 세포에 독성이나 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 염일 수 있다. 상기 무기산염은 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염, 또는 이황산염일 수 있다. 상기 유기산염은 포름산염,

초산염, 아세트산염, 프로피온산염, 젖산염, 옥살산염, 주석산염, 말산염, 말레인산염, 구연산염, 푸마르산염, 베실산염, 캄실산염, 에디실염, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산염, 벤조산염, 글루콘산염, 메탄술폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔술폰산염, 갈록투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산, 또는 아스파르트산염일 수 있다. 상기 금속염은 칼슘염, 나트륨염, 마그네슘염, 스트론튬염, 또는 칼륨염일 수 있다.

[0033] 용어 "일중항 산소(singlet oxygen, 1O_2)"는 여기 일중항 상태에 있는 O_2 분자를 말한다. 보통 분자의 바닥상태가 일중항인데 비해 O_2 분자의 바닥상태는 3중항 산소(3O_2)이며, O_2 분자의 일중항 상태는 들뜬 상태이다.

[0034] 용어 "광감응제(photosensitizer: PS)"는 빛에 민감한 반응을 나타내는 물질을 말하고, 광감작제라고도 불린다. 상기 광감응제는 광조사(photoirradiation)에 의해 빛을 흡수하여 여기 상태가 된 후 들뜬 에너지의 이동으로 기질 분자를 들뜬 상태로 하거나 기질 분자와의 전자 이동으로 라디칼 이온종을 생성하는 것 등으로 기질에 반응을 일으킬 수 있다. 상기 광감응제는 빛(예를 들어, 가시광선)에 의해 3중항 산소를 일중항 산소로 촉매할 수 있다. 상기 광감응제는 비스시클로메탈화 이리듐(biscyclometalated iridium(III)) 복합체 ([이리듐 비스(2-(3-메톡시페닐)피리디네이트)(1,10-페난트롤린)]PF₆: IrOMe), 백금(II) 옥타에틸포르핀(platinum(II) octaethylporphine: PtOEP), 헤마토포르피린(Haematoporphyrin) 유도체(포토프린(photofrin)), 5-아미노 라에불린산(amino laevulinic acid: ALA), 벤조포르피린 유도체 모노산 고리 A(benzoporphyrin derivative monoacid ring A: BPD-MA), 클로린 광감응제 주석 에티오프루핀(chlorin photosensitiser tin etiopurpurin), 테트라(m-히드록시페닐)클로린(tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin: mTHPC), 루테티움 텍사피린(lutetium texaphyrin), 9-아세톡시-2,7,12,17-테트라키스-(β-메톡시에틸)-포르피센(9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β-methoxyethyl)-porphycene), 아연 프탈로시아닌(zinc phthalocyanine), 나프탈로시아닌(naphthalocyanine), 메탈로-포르피린(metallo-porphyrin), 메탈로클로린(metallochlores), 메탈로-프탈로시아닌(metallo-phthalocyanine), 메탈로-나프탈로시아닌술폰벤조-포르피라진(metallo-naphthocyaninesulfobenzoporphyrine: M-NSBP), 및 메탈로-나프탈로시아닌(metallo-naphthalocyanine)로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0035] 상기 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 염; 광감응제, 또는 이들의 조합은 소포(vesicle)에 봉입된 것일 수 있다.

[0036] 용어 "소포(vesicle)" 또는 "소낭"은 지질 이중층으로 둘러싸인 막 구조를 말한다. 상기 소포는 폴리머솜(polymersome) 또는 리포솜(liposome)일 수 있다. 폴리머솜은 블록(block) 공중합체를 포함한 인공적인 소포를 말한다. 상기 리포솜은 천연 지질을 함유한 지질 이중층으로 이루어진 인공적으로 제조된 소포를 말한다. 리포솜은 유니라멜라 소포(unilamellar vesicle) 또는 멀티소포성 소포(multivesicular vesicles)일 수 있다. 상기 소포는 폴리(에틸렌 글리콜)(poly(ethylene glycol): PEG), 폴리(2-메틸옥사졸린)(poly(2-methylloxazoline)), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane: PDMS), 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone: PCL), 폴리(락티드)(poly(lactide): PLA), 및 폴리(메틸 메타크릴레이트)(poly(methyl methacrylate: PMMA)로 이루어진 군으로부터 선택된 블록(block)을 포함할 수 있다. 상기 소포는 폴록사머(poloxamer)를 포함할 수 있다. 폴록사머는 친수성 비-이온성 계면활성제로서, 폴리(에틸렌글리콜)(2개의 블록)과 폴리프로필렌글리콜(1개의 블록)의 트리블록(triblock) 공중합체이다. 상기 폴록사머는 플루로닉(pluronic) F-127 또는 플루로닉 F-68일 수 있다.

[0037] 상기 소포의 직경은 예를 들면 직경 약 5 nm 내지 약 100 nm, 약 10 nm 내지 약 90 nm, 약 10 nm 내지 약 80 nm, 약 10 nm 내지 약 70 nm, 약 10 nm 내지 약 60 nm, 약 10 nm 내지 약 50 nm, 약 10 nm 내지 약 40 nm, 또는 약 10 nm 내지 약 20 nm일 수 있다. 상기 소포의 직경은 광조사 전에 비해 광조사 후 증가할 수 있다. 광조사 전 상기 소포의 평균 직경은 약 10 nm 내지 약 30 nm, 약 10 nm 내지 약 25 nm, 약 10 nm 내지 약 20 nm, 또는 약 17 nm일 수 있다. 광조사 후 상기 소포의 평균 직경은 약 10 nm 내지 약 40 nm, 약 10 nm 내지 약 30 nm, 약 10 nm 내지 약 25 nm, 약 15 nm 내지 약 25 nm, 또는 약 19 nm일 수 있다.

[0038] 상기 H₂S 전달용 조성물은 가시광선 감응성일 수 있다. 용어 "가시광선(visible light)"은 사람의 눈이 감지할 수 있는 빛의 영역을 말한다. 상기 가시광선의 파장은 약 380 내지 약 700 nm, 약 380 내지 약 650 nm, 약 380 내지 약 600 nm, 약 380 내지 약 550 nm, 약 380 내지 약 500 nm, 약 400 내지 약 550 nm, 약 450 내지 약 550 nm, 또는 약 500 내지 약 550 nm일 수 있다.

[0039] 상기 조성물은 H₂S를 세포내 전달할 수 있다. 상기 조성물은 세포내로 전달되어, 세포 내에서 광감응성으로 H₂S

를 전달할 수 있다. 용어 "전달"은 발생 또는 생성을 포함한다.

- [0040] 상기 조성물은 산화적 스트레스에 대해 세포 보호 활성, 세포자살(apoptosis) 저해 활성, 또는 이들의 조합을 제공할 수 있다. 상기 산화적 스트레스는 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)에 의한 자극일 수 있다. 상기 활성산소종은 산소원자를 포함한, 화학적으로 반응성 있는 분자를 말한다. 활성산소종은 예를 들어 H_2O_2 , $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, $OC1^-$, $t-BuOOH$, $t-BuO\cdot$, $GSNO$, NO , HNO , 및 $ONOO^-$ 이다. 용어 "세포자살(apoptosis)"은 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태를 말한다. 상기 세포자살은 세포 내적 스트레스 또는 외부 신호에 의해 세포가 사멸될 수 있다. 상기 조성물은 급성 세포자살에 대해 저해 활성을 제공할 수 있다.
- [0041] 다른 양상은 일 양상에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염; 및 일중항 산소(1O_2) 광감응제를 포함하는 파킨슨병, 다운증후군, 알츠하이머병, 당뇨병, 및 심혈관 질환으로부터 선택된 질병을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [0042] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이성질체, 유도체, 일중항 산소, 및 광감응제는 전술한 바와 같다.
- [0043] 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 화합물의 무기 및 유기산 부가염을 말한다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 염일 수 있다. 상기 무기산염은 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염, 또는 이황산염일 수 있다. 상기 유기산염은 포름산염, 초산염, 아세트산염, 프로피온산염, 젖산염, 옥살산염, 주석산염, 말산염, 말레인산염, 구연산염, 푸마르산염, 베실산염, 캄실산염, 에디실염, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산염, 벤조산염, 글루콘산염, 메탄술폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔술폰산염, 갈락투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산, 또는 아스파르트산염일 수 있다.
- [0044] 용어 "예방"은 질병의 발생을 억제하는 것을 포함한다. 용어 "치료"는 질병의 발진의 억제, 경감, 또는 제거를 포함한다. 상기 질병은 H_2S 의 세포 보호 효과 또는 세포자살 저해 효과에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 질병을 포함한다. 상기 질병은 파킨슨병, 다운증후군, 알츠하이머병, 당뇨병, 및 심혈관 질환으로부터 선택될 수 있다. 상기 심혈관 질환은 심근경색, 심장허혈, 협심증, 심근증, 심내막염, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0045] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제는 당업계에 알려진 것일 수 있다. 상기 담체 또는 희석제는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물(예를 들면, 식염수 또는 멸균수), 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 링거액, 완충제, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 또는 이들의 조합을 더 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 약학적 조성물은 당업자에게 알려진 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수 있고, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 수성 매질은 생리식염수 또는 PBS를 포함하는 것일 수 있다.
- [0047] 다른 양상은 일 양상에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염 및 일중항 산소(1O_2) 광감응제를 동시 또는 순차로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 파킨슨병, 다운증후군, 알츠하이머병, 당뇨병, 및 심혈관 질환으로부터 선택된 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0048] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이성질체, 유도체, 일중항 산소, 광감응제, 질병, 예방, 및 치료는 전술한 바와 같다.
- [0049] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염 및 일중항 산소(1O_2) 광감응제는 동시에 투여되거나 순차로 투여될 수 있다. 예를 들어, 개체에 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 투여한 후, 상기 광감응제를 투여할 수 있다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염과, 상기 광감응제는 상이한 투여

경로로 투여될 수 있다.

[0050] 상기 개체는 쥐, 마우스, 개, 토끼, 말, 및 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[0051] 상기 투여는 경구 또는 비경구 투여일 수 있다. 상기 비경구 투여는 예를 들면, 정맥내 투여, 피하, 근육내, 체강내(복강, 관절, 또는 안강), 또는 직접 주사에 의하여 투여될 수 있다. 직접 주사는 병증의 부위 예를 들면, 종양 부위에 직접 주사하는 것일 수 있다. 상기 리포솜은 정맥과 같은 혈액 내에 투여하고, 혈류에 의하여 종양 부위와 같은 표적 부위에 전달될 수 있다. 상기 표적 부위는 리키한(leaky) 특성을 갖는 것일 수 있다. 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 투여량은 예를 들면, 0.001 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 "포함"이라는 용어는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 추가 또는/및 개재할 수 있음을 나타내도록 사용된다.

[0053] 도 1a는 일 양상에 따른, 일중항 산소(1O_2) 광감응제(photosensitizer: PS) 및 1,3-디페닐이소벤조티오펜(1,3-diphenylisobenzothiophene: DPBT)로 이루어진 H_2S 전달 시스템의 모식도이다. 이 시스템에서, 가시광선 광조사 하에서, 1O_2 PS는 어디에나 존재하는 분자 디옥시젠(dioxygen)을 1O_2 로 변환시키고, DPBT는 그 다음에 1O_2 와 반응하여 불안정한 엔도퍼옥사이드(endoperoxide)를 형성한다. 엔도퍼옥사이드는 즉시 후속 단편화를 거쳐 2-벤조일벤조페논(2-benzoylbenzophenone)과 H_2S 를 생성한다.

발명의 효과

[0054] 일 양상에 따른 화합물, 이의 입체이성질체, 유도체, 또는 염; 및 일중항 산소(1O_2) 광감응제를 포함하는 H_2S 전달용 조성물, 약학적 조성물, 및 이를 이용한 방법에 따르면, 가변(tunable) 광감응성과 H_2S 전구체의 매우 높은 1O_2 반응성, 특히 1O_2 PS의 선택을 통한 광조사 과장을 변형하는 능력을 제공할 수 있다. 또한, 가시광선 광조사 하에서 생성된 H_2S 의 세포내 전달 및 세포보호 작용을 통해 생물학적 유용성이 있다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1a는 광유도된 H_2S 생성 과정을 나타내는 모식도이고, 도 1b는 H_2S 공여자가 세포 내에서 산화적 스트레스를 억제하는 것을 나타내는 모식도이다.

도 2a는 DPBT를 합성하는 반응식을 나타내고, 도 2b 및 도 2c는 각각 DPBT의 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) 스펙트럼 및 $^{13}C\{^1H\}$ NMR (126 MHz, CD_2Cl_2) 스펙트럼을 나타낸다.

도 3은 DPBF 및 DPBT의 1O_2 반응성을 비교하는 그래프이다.

도 4a는 DPBT가 1O_2 에 의해 H_2S 및 2-벤조일벤조페논으로 단편화되는 것을 HPLC로 확인한 결과를 나타낸다(*: IrOMe의 피크).

도 5a는 광 산란 실험에서 광조사 전후 폴리머졸의 직경의 분포를 나타내는 그래프이고((a): 광조사 전, (b): 광조사 후), 도 5b는 광조사 전후 폴리머졸의 광안정성을 나타내는 FE SEM 이미지이다((a): 광조사 전, (b): 광조사 후).

도 6a는 상이한 1O_2 광감응제를 사용한 H_2S -선택적 프로브의 형광 스펙트럼 변화를 나타내는 그래프((a) 및 (b)) 및 광생성의 조건에 따른 통합된 H_2S 의 광발광 강도(au: 임의 단위)를 나타내는 그래프(c)이고, 도 6b는 0.2 wt% DPBT, 0.01 wt% IrOMe, O_2 및 광조사($\lambda_{irr} = 380$ nm, 60 분)의 조건의 유무에 따른 H_2S 의 광발광 강도(au)를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 납 아세테이트 분석법을 이용하여 총 황화물의 농도를 나타내는 비색 결과의 이미지이고, 도 7b는 메틸

렌 블루 분석법을 이용하여 광조사 시간(분)에 따른 H_2S 의 농도(μM)를 나타낸 그래프이다.

도 8은 DPBT의 존재 유무에 따른, 광조사 시간(시)에 따른 전류의 변화(nA)를 나타내는 그래프이다(점선: DPBT 불포함, 실선: DPBT 포함).

도 9는 황성산소종에 따른 H_2S 의 농도(μM)의 그래프이다.

도 10은 광조사 전후, 폴리머층으로부터 광생성된 세포내 H_2S 의 형광 이미지이다((a): 광조사 전, (b): 광조사 후, 막대 눈금: $50\ \mu\text{m}$).

도 11은 광조사에 의해 생성된 H_2S 의 세포 보호 효과를 나타내는 이미지이다((a): H_2S 발생하지 않음, (b): 광생성된 H_2S , 막대 눈금: $100\ \mu\text{m}$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 실시예 1. 광유도성 H_2S 의 생성

[0058] 1. $^1\text{O}_2$ 에 대한 DPBT 반응성의 평가

[0059] (1) 1,3-디페닐이소벤조티오펜의 준비

[0060] 1,3-디페닐이소벤조티오펜(diphenylisobenzothiophene: DPBT)는 Lin et al.(Hsu et al., J. Org. Chem. 2009, 74, p.9180-91871)에 의해 보고된 방법을 변형하여, 3-디페닐이소벤조퓨란(1,3-diphenylisobenzofuran: DPBF)(TCI)로부터 2단계로 합성하였다(도 2a).

[0061] 구체적으로, 1,3-디페닐이소벤조퓨란(diphenylisobenzofuran) (3.70 g, 13.7 mmol) 및 Irppy(11.3 mg, 13.7 μmol)(Woo et al., J. Am. Chem. Soc. 2013, vol.135, p.4771-4787)를 250 mL 1-목 둥근 바닥 플라스크에 가하였다. 그 플라스크에 CH_2Cl_2 (150 mL)를 가한 후, 용액을 365 nm로 연속적인 광조사 및 유산소 조건 하에서 2일 동안 교반하였다. 혼합물을 진공에서 농축시켰다. 용리액으로 헥산:EtOAc = 3:1 (v/v)을 사용하고 실리카겔로 컬럼 정제를 수행하여 백색 가루인 2-벤조일벤조페논(benzoylbenzophenone)을 64% 수율로 수득하였다.

[0062] $R_f = 0.5$ (헥산:EtOAc = 3:1, v/v). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.38 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.52 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.62 (s, 4H), 7.70 (m, 4H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm): 128.47, 129.81, 129.97, 130.50, 133.14, 137.32, 140.16, 196.72(도 2b 및 도 2c).

[0063] 2-벤조일벤조페논(2-benzoylbenzophenone)(0.500 g, 1.75 mmol) 및 P_2S_5 (0.389 g, 1.75 mmol)를 50 mL의 2-목 둥근 바닥 플라스크에 가하였다. 피리딘 무수물(20 mL)를 아르곤 기체 하에서 그 플라스크에 가한 후, 반응 혼합물을 115°C 에서 24 시간 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 용액을 감압하에서 농축시켰다. 컬럼 정제는 실리카겔에서 용리액으로 헥산(hexane):EtOAc = 19:1 (v/v)를 사용하여 수행하여, 황색을 띠는 백색 가루의 DPBT를 76% 수율로 수득하였다. $R_f = 0.6$ (헥산:EtOAc = 4:1, v/v). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.10 (m, 2H), 7.39 (t, $J = 3.9$ Hz, 2H), 7.48 (t, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.70 (m, 4H), 7.84 (m, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CD_2Cl_2) δ (ppm): 121.61, 124.83, 128.06, 129.61, 129.70, 134.66, 134.78, 135.75. HR MS (FAB, 양이온, m-NBA): $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 예측값: 287.0894; 실제값: 287.0848.

[0064] (2) $^1\text{O}_2$ 에 대한 DPBT의 반응

[0065] (i) UV-가시광선 흡수 스펙트럼의 확인

[0066] DPBF 및 DPBT의 일중항 산소에 대한 반응성을 비교하기 위해, 100 μM IrOMe, 및 10 μM DPBF 또는 10 μM DPBT를 함유한, O_2 -포화된 DMSO 용액은 350 nm (350 nm 대역투과필터를 장착한 제논(Xenon) 램프)로 광조사하였

다. 420 nm에서 흡광도(ΔAbs)의 감소(DPBF 및 DPBT)를 연속적인 광조사 동안 모니터링하였다. 광조사 시간의 함수로서 ΔAbs 의 그래프를 작성하고, 초기 4개의 데이터 점을 직선으로 맞추었다. DPBT에 대한 DPBF 선형 그래프에서 기울기 값의 비율은 13이었다. DPBT와 일중항 산소의 반응에 대한 속도 상수를 그 비율 및 DPBF와 일중항 산소의 반응에 대한 속도 상수의 계산값(literature value)을 기반으로 산출하였다($9.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

[0067] DPBT는 이소벤조티오펜(isobenzothiophene) 단위 내의 $\pi-\pi^*$ 전이로 인해 398 nm에서 명백한 흡수 밴드를 나타낸다. 이 밴드의 흡광도의 감소는 $^1\text{O}_2$ 와의 반응으로 인해 10 μM DPBT 및 100 μM IrOMe를 함유한 O_2 -포화 아세토니트릴 용액의 연속 광조사 동안 관찰되었다(도 3).

[0068] 도 3에서 (a)는 350 nm에서 연속 광조사에 따른 10 μM DPBF 및 100 μM IrOMe를 함유한 O_2 -포화 아세토니트릴 용액의 UV-가시광선 흡수 스펙트럼의 변화를 나타내고, (b)는 350 nm에서 연속 광조사에 따른 10 μM DPBT 및 100 μM IrOMe를 함유한 O_2 -포화 아세토니트릴 용액의 UV-가시광선 흡수 스펙트럼의 변화를 나타내고, (c)는 광조사 시간에 대한 흡광도 변화의 함수로서, 420 nm에서 DPBF(사각형) 및 DPBT(원)의 그래프를 나타낸다. 도 3의 (c)에서, 사각형을 연결한 선 및 실선은 초기 4개의 데이터 점을 선으로 연결한 것이다. 두 선의 기울기의 비율(DPBF/DPBT)은 13이었다.

[0069] DPBF 및 $^1\text{O}_2$ 간의 2분자 반응에 대한 속도 상수는 $9.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 알려져 있기 때문에, DPBT 및 $^1\text{O}_2$ 간의 2분자 반응에 대한 속도 상수는 $7.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 추정되었다. 따라서, DPBT 반응 속도를 DPBF 반응 속도를 비교한 결과, DPBT와 $^1\text{O}_2$ 간의 2분자 반응에 대한 속도 상수가 $7.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 더 작았다.

[0070] (ii) HPLC 기법을 이용한 모니터링

[0071] DPBT와 광감응된 $^1\text{O}_2$ 의 반응을 HPLC 기법을 이용하여 추가로 모니터링하였다. 1.0 mM DPBT 및 100 μM IrOMe 함유된, O_2 -포화된 CH_3CN 용액(10 mL)을 380 nm에서 제논 램프로 광조사하였다. 1.0 mL의 분액을 그 용액에서 5 분 간격으로 수득하고, HPLC-전자분무이온화(Electrospray ionization: ESI)-MS 분석법(EC-C18 ($2.1 \times 100 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$)(Poroshell)가 장착된 6120DW LC/MSD(Agilent); 용리 조건: $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 50:50$ 에서 100% CH_3CN)을 수행하였다. DPBT, IrOMe, 및 DPBT의 $^1\text{O}_2$ -산화 생성물을 각각 14.67, 1.67, 및 4.00 분의 용리 시간에서 관찰하였다. HPLC 분석 결과를 도 4a에 나타내고(*: IrOMe의 피크), 질량 분광 분석(ESI MS, 양이온 모드) 결과를 도 4b에 나타내었다. 도 4b에서, 화학식은 2-벤조일벤조페논이고, 삽입된 그래프는 2-벤조일벤조페논의 양성자화된 형태의 측정값과 계산값의 비교를 나타내는 그래프이다.

[0072] 도 4a에 나타난 바와 같이, 5 분 간격으로 얻은 액체 크로마토그램은 짧은 용출 시간에서 새로운 밴드의 증가와 함께, 약 30 분 내에 DPBT의 완전한 고갈을 나타내었다.

[0073] 도 4b에 나타난 바와 같이, 그 밴드의 질량 분광 분석은 287.2 amu의 m/z 값을 나타내었고, 이는 2-벤조일벤조페논의 양성자화된 종류에 해당한다. 2-벤조일벤조페논의 형성은 H_2S -방출 메커니즘과 연관된다. 종합하면, 이 결과는 $^1\text{O}_2$ 에 대한 DPBT의 매우 높은 반응성을 입증한다.

[0074] 2. H_2S 광전달용 공여자의 제작

[0075] (1) 폴리머솜의 준비

[0076] 수성 매질 중 H_2S 의 광생성은 생체적합성 플루로닉(Pluronic) F-127의 폴리머솜(polymerosome)을 사용하여 달성되었다.

[0077] 폴리머솜을 준비하기 위해, 736 mg 플루로닉 F-127(Sigma-Aldrich), 500 μL 10 mM DPBT 용액(CH_2Cl_2 중), 및 10 μL 의 10 mM $^1\text{O}_2$ PS 용액(CH_2Cl_2 중)을 20 mL 유리 바이알에 가하고, 10 mL의 CH_2Cl_2 에 완전히 용해시켰다. 플루로닉 F-127 중합체 중 DPBT 및 $^1\text{O}_2$ PS의 비율은 각각 0.2 wt% 및 0.01 wt%이었다. 20 μL 의 10 mM SF4 용액(DMSO 중, 0.01 wt%)를 H_2S 의 형광 검출을 위해 가하였다. 회전증발기를 사용하여 CH_2Cl_2 를 서서히 증발시켜, 얇

은 필름의 중합체 단단한 용액을 수득하였다. 그 후, 10 mL의 완충 수용액(pH 7.4; 10 mM PBS(Sigma-Aldrich) + 1.0 mM 세트리모늄 브로마이드(cetrimonium bromide: CTAB, Sigma-Aldrich)을 그 바이알에 가하였다. 용액을 10 분 동안 격렬하게 볼텍싱하고, 탁한 현탁액을 H₂S 광생성 실험을 위해 사용하였다.

[0078] (2) 광조사된 폴리머즘의 크기

[0079] 실시예 1.2(1)에 기재된 바와 같이, 중합체 베지클을 플루로닉 F-127 중합체에 0.2 wt% DPBT 및 0.01 wt% ¹O₂ PS를 분자적으로 분산시켜 준비하였다. 준비된 폴리머즘에, 74 mg · mL⁻¹의 완충 수용액(pH 7.4; 10 mM 인산염 완충 염수(phosphate buffered saline: PBS, Sigma-Aldrich) + 1.0 mM 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide: CTAB, Sigma-Aldrich))을 가한 후 단단한(solid) 용액을 격렬하게 볼텍싱하였다.

[0080] 동적 광 산란(dynamic light scattering: DLS) 실험에서, 광조사($\lambda_{irr} = 350$ nm; 24 분) 전후 10 μ M 폴리머즘 현탁액의 직경의 분포는 ELS-Z1000 기기(Photol Otsuka Electronics, Japan)를 사용하여 실온에서의 측정하였다. 데이터 분석은 제조자가 제공한 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 광조사 전후 폴리머즘의 직경의 분포를 도 5a에 나타내었다((a): 광조사 전, (b): 광조사 후). 도 5a에 나타난 바와 같이, 광조사 전에는 폴리머즘의 평균 직경이 약 17 nm이고, 광조사 후에는 폴리머즘의 평균 직경이 약 19 nm였다.

[0081] 또한, 전계-방출 스캐닝 현미경(Field-Emission Scanning Electron Microscopy: FE SEM) 실험을 위해, 폴리머즘 현탁액의 분액을 1 cm × 1 cm 유리 기판에 떨어뜨리고, 어두운 곳에서 건조시켰다. 광조사($\lambda_{irr} = 350$ nm; 24 분) 전후 폴리머즘을 FE SEM(100 k × 2.00 kV)으로 확인하였다. 폴리머즘의 FE SEM 사진은 EM ACE200(Leica, Austria)를 사용하여 백금 코팅(120초)한 후, SUPRA 55VP 장치(Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 얻었다. 광조사 전후 폴리머즘의 이미지를 도 5b에 나타내었다((a): 광조사 전, (b): 광조사 후).

[0082] 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, 베지클 현탁액은 ~ 10 nm 직경의 구형 입자의 형성을 나타내었다. 베지클 현탁액은 안정적이었고, 3 개월 동안 응집이나 침전이 관찰되지 않았다.

[0083] (3) 광생성된 H₂S의 모니터링

[0084] 광생성된 H₂S의 시간적 모니터링을 위해, H₂S를 위한 형광 턴온(turn-on) 프로브(SF4)(Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, vol.110, p,7131-7135)를 폴리머즘(0.01wt%) 내부에 포함(integration)시켰다.

[0085] 상이한 ¹O₂ 광감응제를 사용한 H₂S의 광생성을 나타내는 그래프를 도 6a의 (a) 및 (b)에 나타내었다((a): ¹O₂ 광감응제로서 IrOMe의 이용, 및 (b) ¹O₂ 광감응제로서 PtOEP의 이용). 도 6a에서, (a) 및 (b)는 0.2 wt% DPBT, 0.01 wt% SF₄, 및 0.01 wt% IrOMe($\lambda_{irr} = 380-500$ nm) 또는 0.01 wt% PtOEP(Sigma-Aldrich)($\lambda_{irr} = 500-550$ nm)이 첨가된 플루로닉 F-127 중합체 베지클을 함유한 O₂-포화 완충액(pH 7.4; 10 mM PBS + 1.0 mM CTAB)의 연속적인 광조사를, H₂S-선택적 프로브인 SF₄의 형광 스펙트럼 변화를 나타낸다. 도 6a의 (a) 및 (b)에서, * 및 **로 표시된 피크는 각각 여기(excitation) 광선 및 PtOEP 방출로 인한 것이다.

[0086] 광발광(photoluminescence) 스펙트럼은 Quanta Master 400 스캐닝 분광형광계(Photon Technology International, Edison, NJ, USA)를 사용하여 실온에서(유기 용액) 또는 37℃(완충된 수용액)에서 측정하였다. 온도는 순환 수조를 사용하여 유지하였다. SF₄ 형광을 기록하기 위한 여기 파장은 496 nm였다. 측정된 광조사된 용액의 광발광 스펙트럼은 SF₄ 방출 범위($\lambda_{ems} = 500-650$ nm)에서 기록되었다. UV-가시광선 흡수 스펙트럼은 Cary 300 분광광도계(Agilent)로 실온에서 수집하였다. 달리 언급하지 않는 한, 2 μ M 또는 10 μ M 용액을 측정 에 사용하였다.

[0087] 도 6a의 (a)에 나타난 바와 같이, IrOMe를 함유한 폴리머즘 현탁액의 광조사 ($\lambda_{irr} = 380-500$ nm)는 SF₄에서 거대한 형광 증가 반응을 일으켰다. 이 반응은 IrOMe에 의한 광자 흡수로 인한 것이고, 이것은 광화학적 H₂S 생성에 대한 양자 수율을 광조사 파장의 함수로 플로팅한 광화학적 작용 스펙트럼은 IrOMe의 UV-가시광선 흡수 스펙트럼과 완벽하게 중첩되었다. H₂S의 광생성에 필요한 조건을 확인하기 위해, 0.2 wt% DPBT, 0.01 wt% IrOMe, O₂ 및 광조사($\lambda_{irr} = 380$ nm, 60 분)의 조건을 하나씩 제거한 결과, H₂S 생성이 중단되었다(도 6b). 따라서, DPBT,

IrOMe, O₂ 및 광자 공급원은 H₂S의 광생성에 필요한 조건이고, 이 결과는 ¹O₂의 광감응이 H₂S 생성을 담당한다는 강력한 증거를 제공한다.

[0088] 이 공여자의 가장 큰 장점은 ¹O₂ PS를 선택함으로써 얻어지는, 광조사 파장의 가변성이다. 이 시스템의 다양성은 IrOMe 대신에 PtOEP로 폴리머를 제조함으로써 입증되었다. PtOEP의 강한 가시광선 흡수는 녹색 광조사($\lambda_{irr} = 500-550 \text{ nm}$)를 사용하여 H₂S를 생성하는 것이 가능하게 하였다. 도 6a의 (b)에 나타난 바와 같이, 광생성된 H₂S로 인한 거대한 형광 증가가 관찰되었다. 반응의 범위와 속도는 IrOMe를 사용하여 얻은 것보다 더 컸다.

[0089] 광생성된 H₂S는 표준 곡선을 이용하여 통합된 형광 강도를 H₂S의 농도([H₂S])로 전환하여 정량하였다.

[0090] 통합된 광발광 강도 곡선을 H₂S 농도로 전환하기 위한 검정 곡선을 작성하기 위해, 20 μM SF4(10 mM PBS 및 1.0 mM CTAB를 함유한 완충 용액; pH 7.4)의 광발광 스펙트럼을 Na₂S(TCI) 농도를 증가시키면서 가한 후에 $\lambda_{ems} = 500-650 \text{ nm}$ 으로 통합시켰다. H₂S의 농도([H₂S])는 하기 양성자 첨가 평형을 고려하여 계산하였다:

[0091] $\text{H}_2\text{S}(\text{aq}) \leftrightarrow \text{HS}^-(\text{aq}) + \text{H}^+(\text{aq}) \text{ pK}_{a1} = 7.0$

[0092] $\text{HS}^-(\text{aq}) \leftrightarrow \text{S}^{2-}(\text{aq}) + \text{H}^+(\text{aq}) \text{ pK}_{a2} > 14.0$

[0093] S²⁻의 pK_{a2}가 pK_{a1} 보다 유의하게 크기 때문에, S²⁻의 생성은 무시하였다.

[0094] 첫번째 양성자화에 대한 평형 상수와 총 황화물 (즉, [Na₂S]첨가 = [H₂S] + [HS⁻] + [S²⁻])에 대한 물질 균형식 (mass balance equation)을 조합하여 pH 7.4에서 [H₂S]에 대한 하기 식을 산출하였다.

[0095] $[\text{H}_2\text{S}] = [\text{Na}_2\text{S}]_{\text{첨가}} / (1+10^{0.4})$

[0096] 통합된 형광 강도는 검정 곡선을 사용하여 [H₂S]로 전환시켜, PtOEP(삼각형) 또는 IrOMe(원)을 이용하여 광생성된 H₂S의 농도를 광조사 시간의 함수로 나타내고, 그 그래프를 도 6a의 (c)에 나타내었다.

[0097] 도 6a의 (c)에 나타난 바와 같이, [H₂S] 값은 광선량-의존적 증가를 나타내었다. [H₂S]는 PtOEP를 함유한 폴리머의 2 시간 광조사 후 24 μM 에 도달했다(삼각형). IrOMe으로부터 H₂S의 생성은 PtOEP에서 얻은 것보다 상당히 느렸다(원). IrOMe에 비해 PtOEP에 의한 빠른 생성은 더 큰 광자 흡수의 결과로 간주될 수 있다(즉, PtOEP에 대해 532 nm에서 $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 대 IrOMe에 대해 432 nm에서 $\epsilon = 1900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

[0098] **(4) H₂S의 추정된 수준의 유효성**

[0099] H₂S의 추정된 수준의 유효성(농도로 몇 마이크로몰)은 납 아세테이트(lead acetate: Pb(OAc)₂) 분석법, 또는 N,N-디메틸아닐린(dimethylaniline) 및 FeCl₃를 이용한 메틸렌 블루 분석법을 사용한 화학적 분석법을 이용하여 확인하였다.

[0100] Pb(OAc)₂ 분석법에서, 여과지(Whatman)를 Pb(OAc)₂(Sigma-Aldrich)로 포화된 3.0 mL 밀리-Q 등급의 물에 침지시켰다. 여과지를 대류식 오븐에서 건조시켰다. 황화물에 대한 비색(colorimetric) 반응은 상이한 농도의 Na₂S(0, 250, 500, 및 1000 μM)를 갖는 밀리-Q 등급의 물에 여과지를 담귀 시각화시켰다(도 7a). 도 7a에 나타난 바와 같이, 처리된 여과지의 시각적 검사는 반응이 [Na₂S]첨가 > 250 μM 에서 볼 수 있다는 것을 나타내었다. Pb(OAc)₂-처리된 여과지를 사용하여, 0.2 wt% DPBT 및 0.01 wt% IrOMe가 첨가된 폴리머를 함유하고 광조사된 ($\lambda_{irr} = 380 \text{ nm}$; 630 분) 수용액 중 황화물의 농도를 추정하였다.

[0101] 메틸렌 블루 분석법에서, 0.2 wt% DPBT 및 0.01 wt% IrOMe가 첨가된 폴리머를 함유한 수성 완충 용액(pH 7.4, 10 mM PBS + 1.0 mM CTAB)을 380 nm에서 60 분 동안 광조사하였다. 광조사하는 동안 500 μL 의 용액을 취하고, 150 μL 의 20 mM N,N-디메틸아닐린(7.2 M HCl) 및 150 μL 의 30 mM FeCl₃(1.2 M HCl)과 함께 20 분 동안

인큐베이션하였다. 670 nm에서 흡광도 변화를 기록하고, 그 값을 H_2S 의 농도로 변환하였다. 광조사 시간(분)에 따른 H_2S 의 농도(μM)의 그래프를 도 7b에 나타내었다. 도 7b에 나타난 바와 같이, 광조사 시간에 따라 H_2S 의 농도가 증가함을 확인하였다.

[0102] **3. H_2S 의 가시광선-매개 생성의 확인**

[0103] H_2S 의 가시광선-매개 생성은 전류 측정을 통해 추가로 평가되었다.

[0104] 전류 측정은 ISO- H_2S -100 마이크로센서(World Precision Instruments)를 사용하여 측정하였다. 측정에 앞서, 전류측정기(amperometer)를 PBS로 완충된 수용액(pH 7.2; 10 mL)을 사용하여 Na_2S 의 농도를 증가시키면서 검정하였다.

[0105] 0.2 wt% DPBT 및 0.01 wt% IrOMe를 함유한 O_2 -포화된 폴리머졸 현탁액(5 mL)을 고무마개로 막은 20 mL 바이알에 가하였다. 마이크로센서를 바이알 마개의 바늘구멍을 통해 삽입하여 외부와 기체 교환을 막았다. H_2S 에 대한 전류측정 반응을 Lab-Trax-4/16(World Precision Instruments)로 기록하는 동안, 폴리머졸 현탁액을 광조사하였다. 0.2 wt% DPBT 및 0.01 wt% IrOMe가 첨가된 플루로닉 F-127 폴리머졸을 함유한 O_2 -포화 완충액 (pH 7.4; 10 mM PBS + 1.0 mM CTAB)을 전류측정 동안 청색 광선하에서 광조사하였다. 또한, DPBT를 함유하지 않는 폴리머졸의 대조군 용액을 동일하게 처리하였다. 광조사 시간(시)에 따른 전류의 변화(nA)를 도 8에 나타내었다(점선: DPBT 불포함, 실선: DPBT 포함). 도 8에서, 삽입된 사진은 광조사된 중합체 베지클 용액으로 침지된 H_2S -선택적 전극을 나타낸다.

[0106] 도 8에 나타난 바와 같이, 중합체 베지클(0.2 wt% DPBT 및 0.01 wt% IrOMe)를 함유한 O_2 -포화 완충액의 광조사는 H_2S -선택적 전극을 통한 전류의 증가를 야기하였다. 이러한 증가는 DPBT를 함유하지 않은 베지클에서는 관찰되지 않았고, H_2S 가 DPBT로부터 유래되었다는 것을 확인하였다.

[0107] **4. H_2S 생산이 $^1\text{O}_2$ 에 의해 선택적으로 매개되는지 여부의 조사**

[0108] 활성산소종에 따른 H_2S 의 생성을 확인하기 위하여, 하기와 같이 활성산소종을 준비하였다.

[0109] 1) H_2O_2 : 30 wt% H_2O_2 (Sigma-Aldrich)의 수성 용액을 밀리-Q 등급의 물에 희석하여 500 μM 의 농도로 준비하였다. H_2O_2 의 몰 흡광도 $\epsilon = 44 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 농도를 결정하였다.

[0110] 2) $\cdot\text{OH}$: 500 μM 의 H_2O_2 용액을 2.5 mM $\text{FeSO}_4(\text{aq})$ 와 혼합하고, 혼합물을 10 분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션된 용액을 추가적인 처리 없이 사용하였다.

[0111] 3) $\text{O}_2^{\cdot-}$: KO_2 를 밀리-Q 등급의 물에 용해시켜 500 μM 의 농도로 준비하였다.

[0112] 4) OCl^- : NaOCl 용액(Sigma-Aldrich)을 밀리-Q 등급의 물을 사용하여 500 μM 의 농도로 희석하였다. 농도는 몰 흡광도 $\epsilon = 360 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 농도를 결정하였다.

[0113] 5) $t\text{-BuOOH}$: Luperox® TBH70X, $t\text{-BuOOH}$ 용액(Sigma-Aldrich)을 밀리-Q 등급의 물을 사용하여 500 μM 의 농도로 희석하였다.

[0114] 6) $t\text{-BuO}\cdot$: 500 μM 의 $t\text{-BuOOH}$ 용액을 2.5 mM $\text{FeSO}_4(\text{aq})$ 와 혼합하고, 혼합물을 10 분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션된 용액을 추가적인 처리 없이 사용하였다.

[0115] 7) GSNO: GSNO(Sigma-Aldrich)를 밀리-Q 등급의 물에 용해시켜 500 μM 의 농도로 준비하였다.

[0116] 8) NO: 디에틸아민 NONO에이트 소듐 염 수화물(Diethylamine NONOate sodium salt hydrate, Sigma-Aldrich)을 밀리-Q 등급의 물에 용해시켜 500 μM 의 농도로 준비하였다.

[0117] 9) HNO: 안젤리 염(Angeli's salt, Calbiochem)을 밀리-Q 등급의 물에 용해시켜 500 μM 의 농도로 준비하였다.

- [0118] 10) ONOO^- : 0.6 M $\text{NaNO}_2(aq)$ 를 0.6 M HCl 로 산성화시키고, 그 후 1.5 M $\text{KOH}(aq)$ 를 가하였다. 과량의 MnO_2 를 첨가한 후, 용액을 추가적인 처리 없이 사용하였다.
- [0119] 0.2 wt% DPBT를 함유한 폴리머즘을 준비된 활성산소종과 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, H_2S 의 농도를 측정하여, $^1\text{O}_2$ -선택적 H_2S 생성을 확인하였다. 활성산소종에 따른 H_2S 의 농도(μM)의 그래프를 도 9에 나타내었다.
- [0120] 도 9에 나타난 바와 같이, 각 인큐베이션된 시료에 적용된 형광 H_2S 분석법은 H_2S 생성이 오직 $^1\text{O}_2$ 때문이라는 것을 나타내었다. 이 결과는 도 1a 및 도 1b에 나타난 작동 메커니즘과 일치하였다. $^1\text{O}_2$ 선택성은 어두운 상태의 H_2S 방출을 억제하는데 유리하고, 이것은 $^1\text{O}_2$ 가 산소 대사를 통해서 내생적으로 유의한 양이 생성되지 않기 때문이다.
- [0121] **실시예 2. H_2S 광전달용 공여자의 생물학적 유용성**
- [0122] **1. H_2S 광전달용 공여자의 세포내 H_2S 생성**
- [0123] H_2S 광생성능을 확인한 후, 공여자의 생물학적 유용성을 입증하려고 시도했다. 폴리머즘 현탁액(0.2 wt% DPBT 및 0.01 wt% PtOEP 함유)을 무혈청 RPMI (Gibco)에 1:10 비율(v/v)로 희석하였다. DMSO(Sigma-Aldrich, 생명공학 등급) 중 10 mM SF4 용액을 준비하였다. 이미지화하기 하루 전날, HeLa 세포를 유리 바닥 배양 접시(SPL Life Sciences, Korea)에 이동하였다. 세포를 세척하고 PBS(Welgene, Korea)로 보충하였다. 무혈청 RPMI에 희석된 폴리머즘을 배양 접시에 가하고, 세포를 15 분 동안 37°C 에서 배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하여 남아있는 폴리머즘을 제거하였다.
- [0124] 이 배지에서 배양한 HeLa 세포는 MTT 분석법을 이용하여 생존능이 있는 것으로 확인되었고, 이것은 공여자가 세포독성이 낮다는 것을 나타낸다.
- [0125] 세포를 10 μM SF4로 15 분 동안 37°C 에서 더 처리하고, PBS로 세척하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Confocal laser-scanning microscopy)을 녹색-LED 광조사($\lambda_{\text{irr}} \sim 500 \text{ nm}$, 1 W, 20 분) 전후로 수행하였다. LSM 510 META 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Carl Zeiss)를 사용하여 형광 이미지를 취득하였다. 여기 광선(excitation beam, 488 nm)를 접시에 맞추고, 신호를 410-691 nm 범위를 커버하는 30 방출 채널을 통해 얻었다($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{obs}} = 503\text{-}546 \text{ nm}$). 형광 이미지 및 평균 강도는 LSM 510 버전 4.0 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 광조사 전후 세포의 형광 이미지를 도 10에 나타내었다.
- [0126] 도 10에 나타난 바와 같이, 세포질 내에서 밝은 반점의 형광이 생성되었다. 형광 H_2S 시각화는 우리의 H_2S 공여자가 세포-투과성이고 가시광선 광조사 하의 세포 환경 내에서 H_2S 를 생성할 수 있다는 것을 뒷받침하는 강력한 증거를 제공하였다.
- [0127] **2. 산화 스트레스에 대한 광생성된 H_2S 의 세포 보호 작용**
- [0128] 생물학적 유용성에 대한 마지막 증명으로서, 산화 스트레스에 대한 광생성된 H_2S 의 세포 보호 작용을 평가하였다.
- [0129] 형광 세포자살 마커인, 아넥신 V-FITC, 및 형광 세포괴사 마커인 프로피디움 요오드화물(propidium iodide: PI)을 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. HeLa 세포를 폴리머즘으로 처리하고, 위에서 기재한 형광 H_2S 시각화 실험과 동일한 방법을 수행하였다. PBS로 2회 세척한 후, 1.0 mL 무혈청 RPMI 및 102 μL 결합 완충액(Sigma-Aldrich)을 가하였다. 그후, 세포를 녹색 LED(1 W)를 사용하여 5 분 동안 $\lambda_{\text{irr}} \sim 500 \text{ nm}$ 에서 광조사하였다. 5 μL (7 nM) 아넥신 V-FITC 및 10 μL (2 μM) PI를 배양 접시에 가하고, 세포를 어두운 곳에서 10 분 더 배양하였다. 0.2 wt% H_2O_2 (Sigma-Aldrich, 30 wt%)를 접시에 가하여 급성 세포자살을 유도하였다. 대조군 세포는 폴리머즘의 처리를 제외하고 동일하게 준비하였다. 형광 현미경사진은 LSM 510 META 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Carl Zeiss Carl Zeiss)을 사용하여 얻었다(도 11). 형광 방출은 아넥신 V-FITC에 대해 $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ 및 $\lambda_{\text{obs}} = 538\text{-}546 \text{ nm}$ 에서 얻었고, PI에 대해 $\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ 및 $\lambda_{\text{obs}} = 625\text{-}634 \text{ nm}$ 에서 얻었다. 형광 이미지는 LSM 510

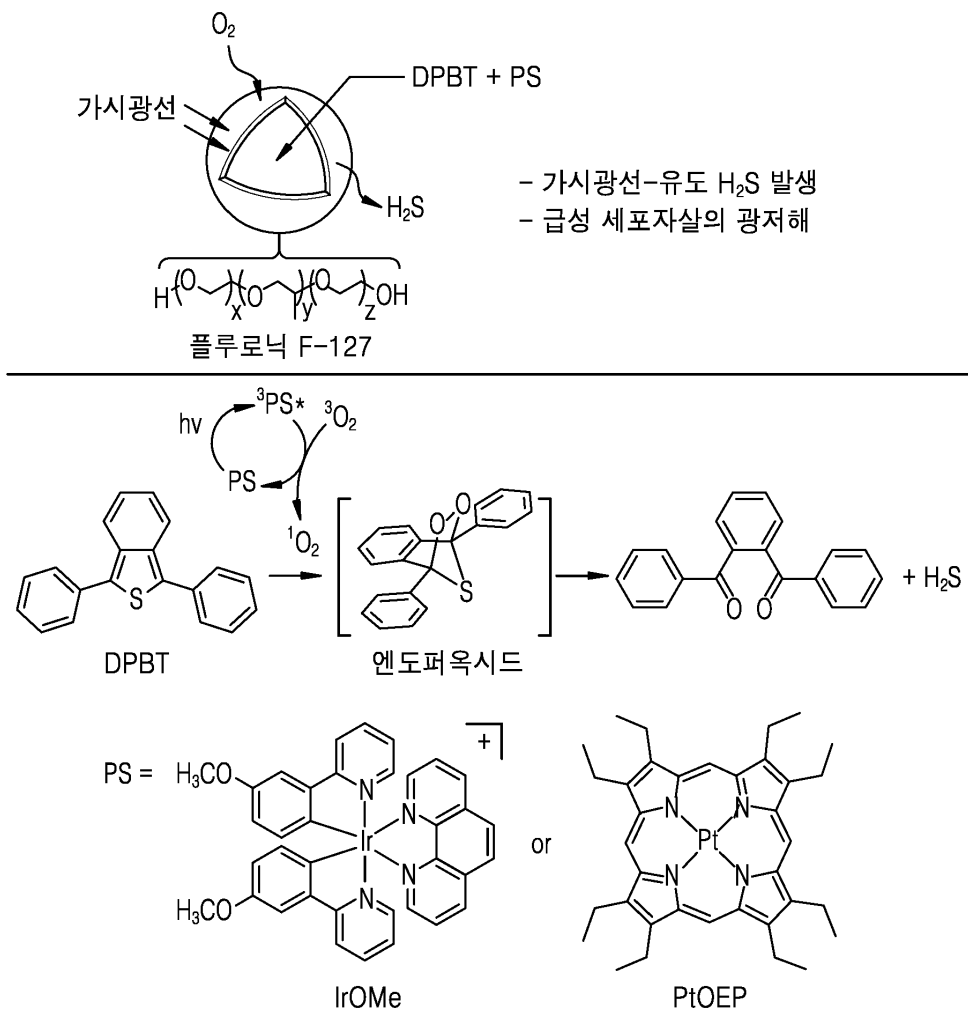
버전 4.0 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0130]

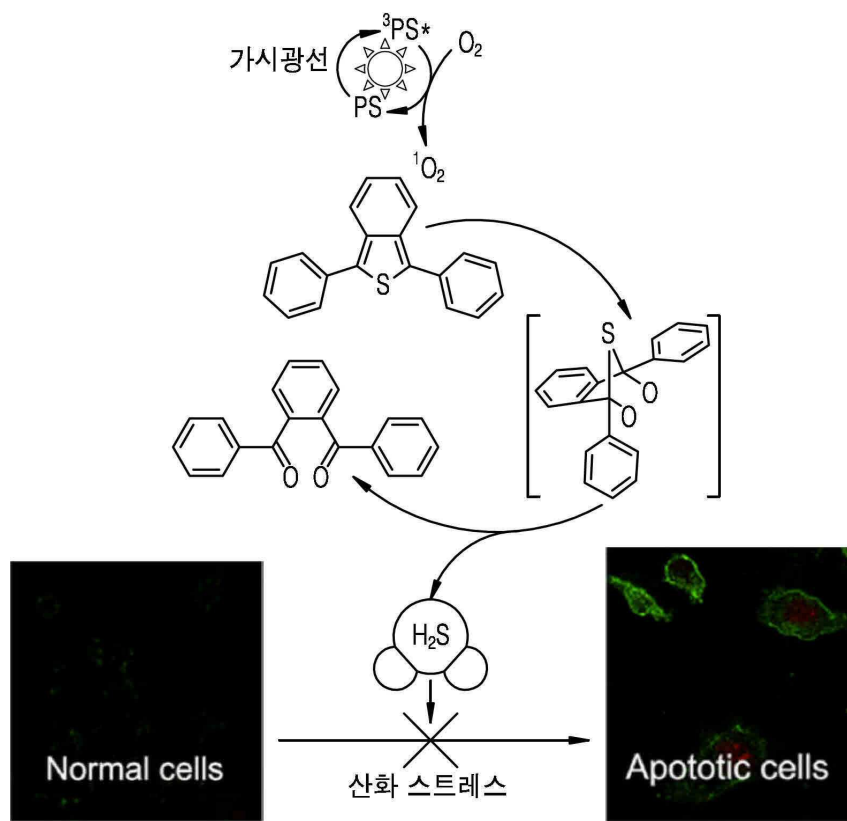
도 11에 나타난 바와 같이, 대조군 세포(즉, H_2S 가 광생성되지 않음)는 세포자살 마커(7 nM 아넥신 V-FITC)로 인한 강한 녹색 형광 신호가, 세포괴사 마커(2 μ M 프로피디움 요오드화물(propidium iodide))로 인한 약한 적색 형광과 함께, 나타났다. 대조적으로, 광조사된 세포(즉, H_2S 가 광생성됨)는 세포자살 및 세포괴사 마커 모두로부터의 형광 신호의 현저한 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 가시광선에 의해 유도된 H_2S 생성이 산화적 스트레스에 의해 시작된 급성 세포자살을 억제할 수 있음을 나타내었다. 전체적으로, 상기 실험을 통해 H_2S 공여자의 생물학적 유용성을 성공적으로 입증하였다.

도면

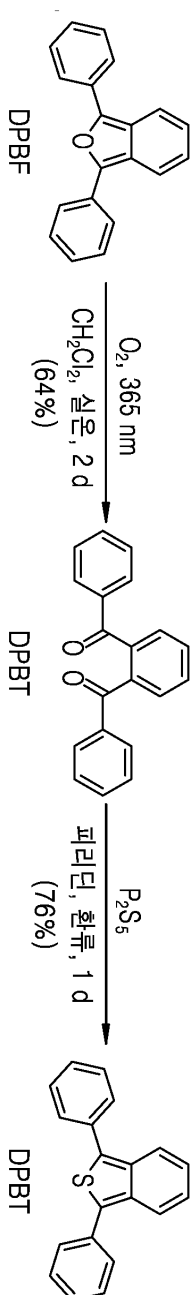
도면1a



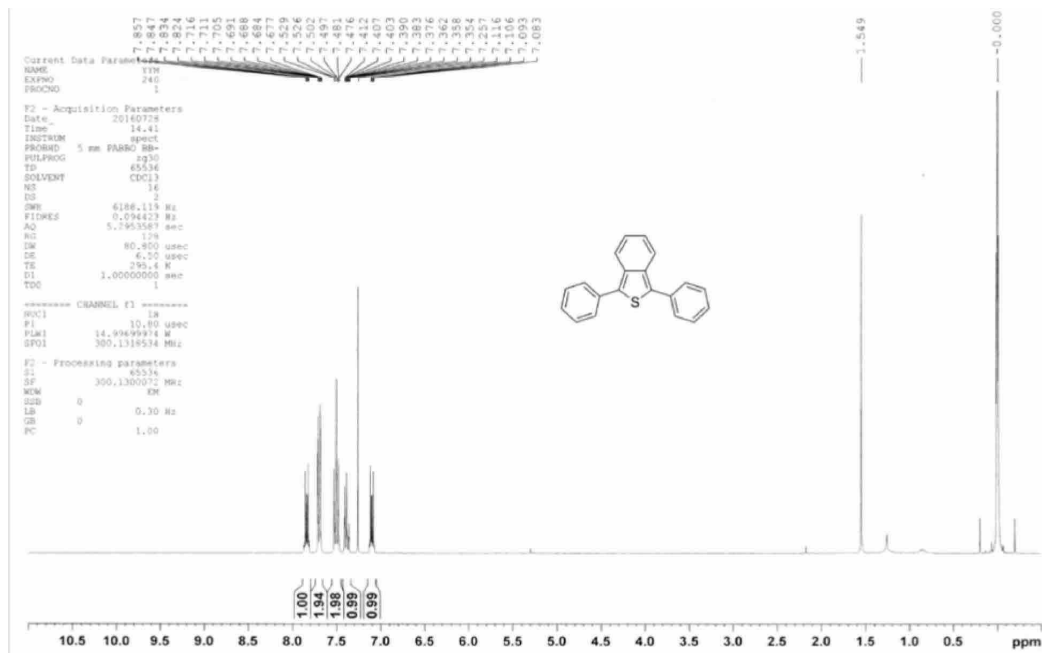
도면1b



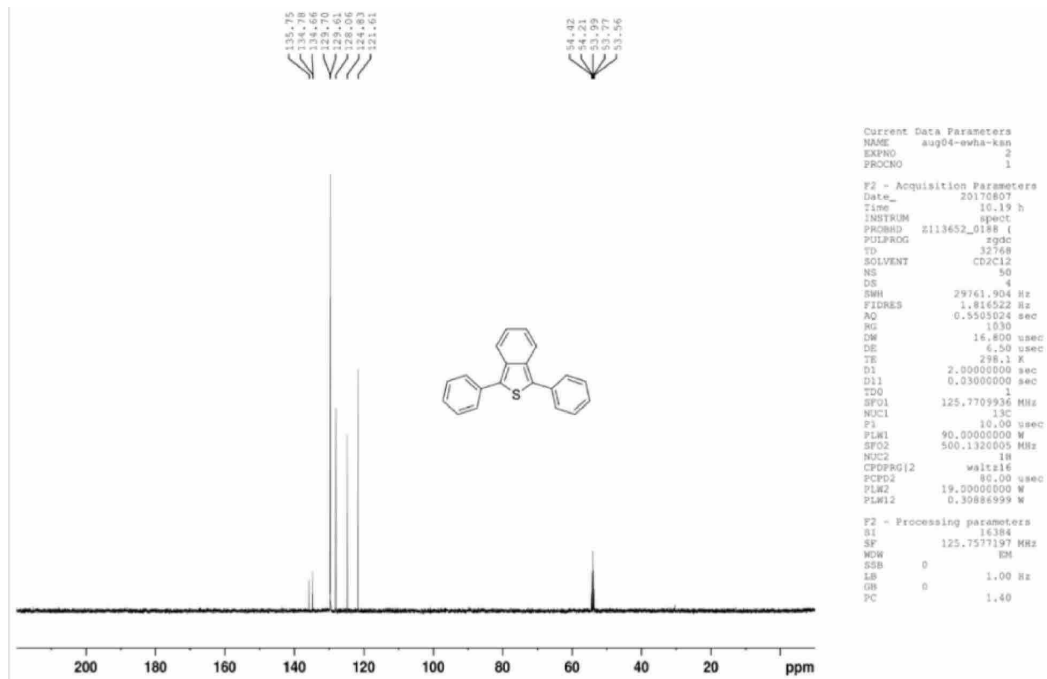
도면2a



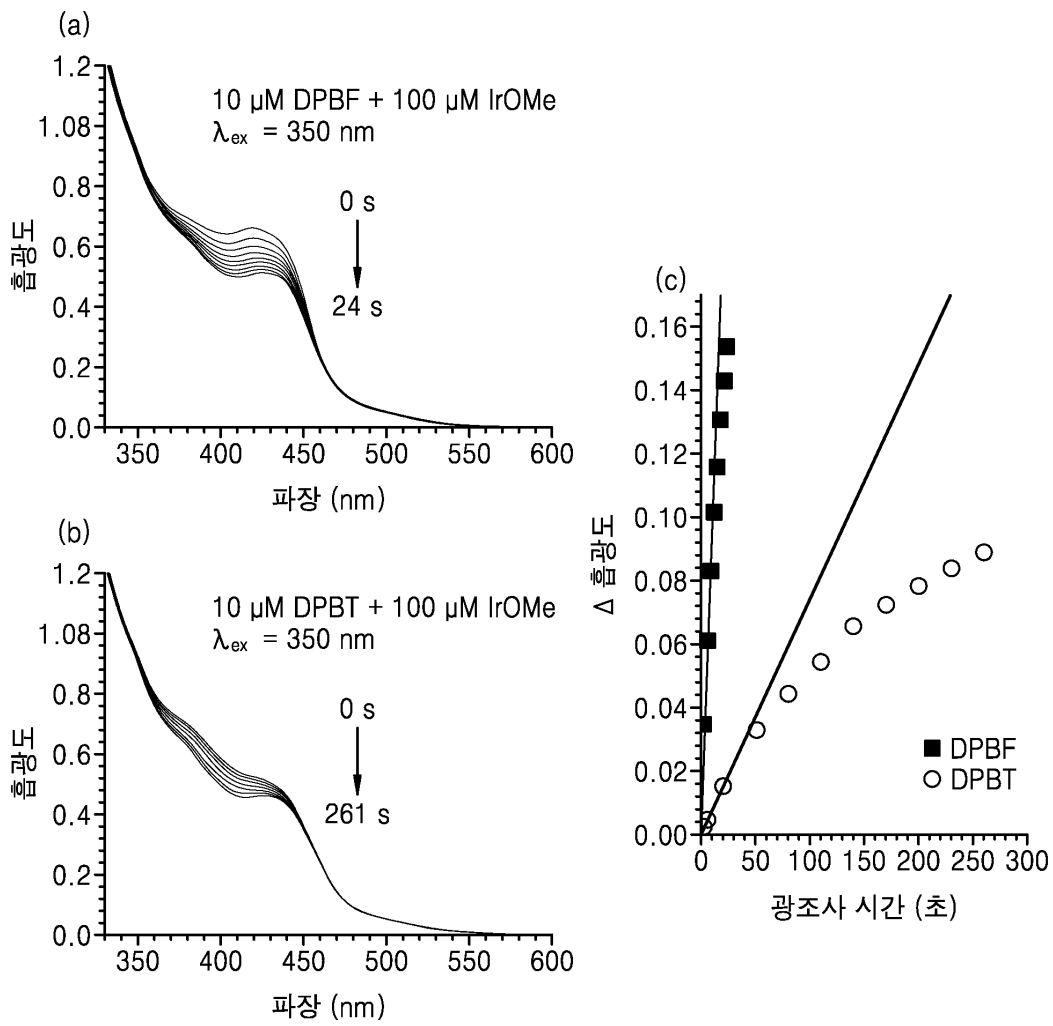
도면2b



도면2c

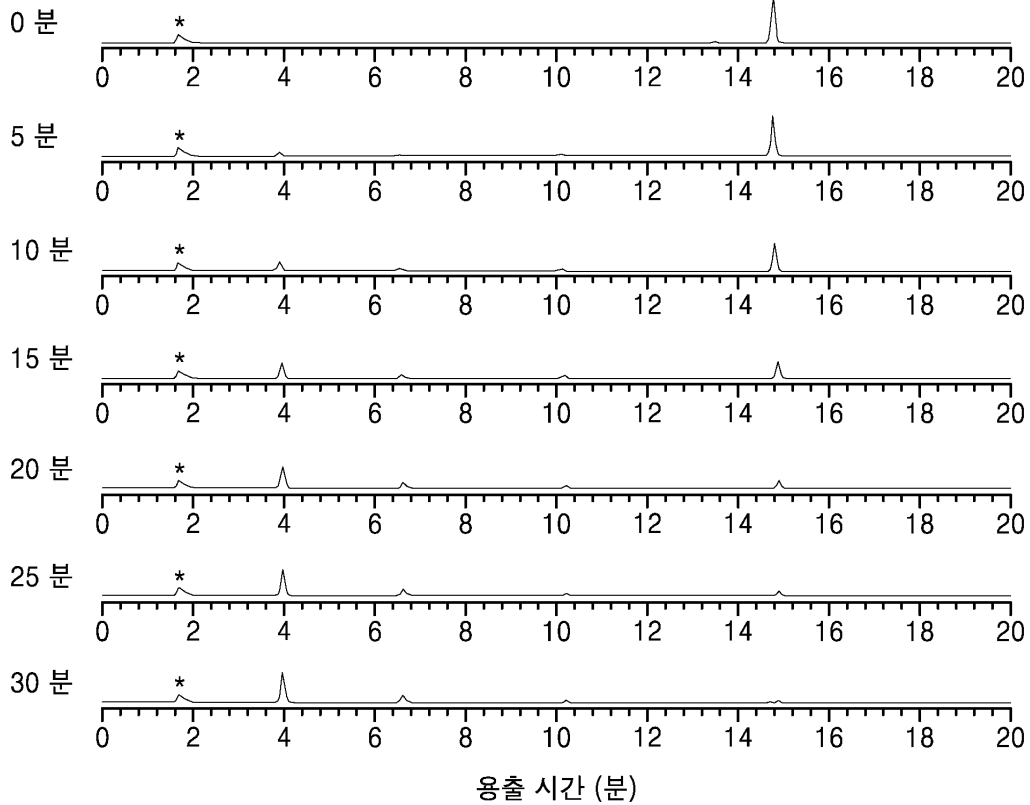


도면3

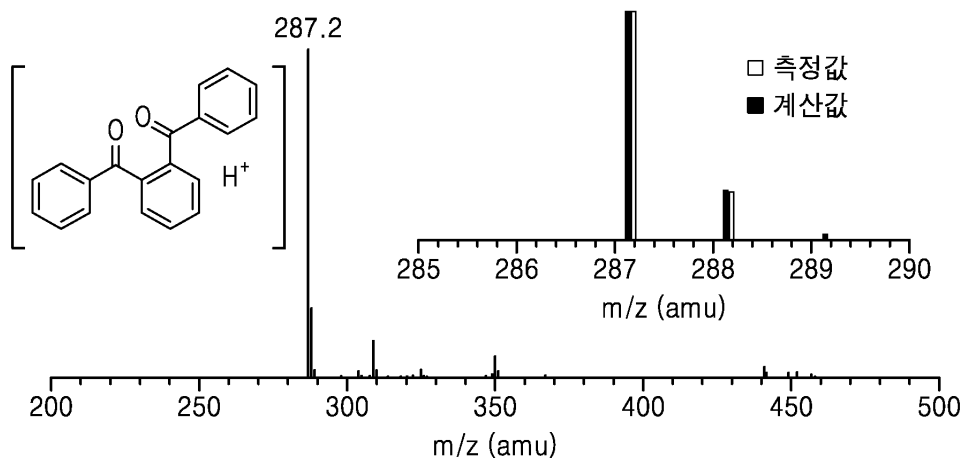


도면4a

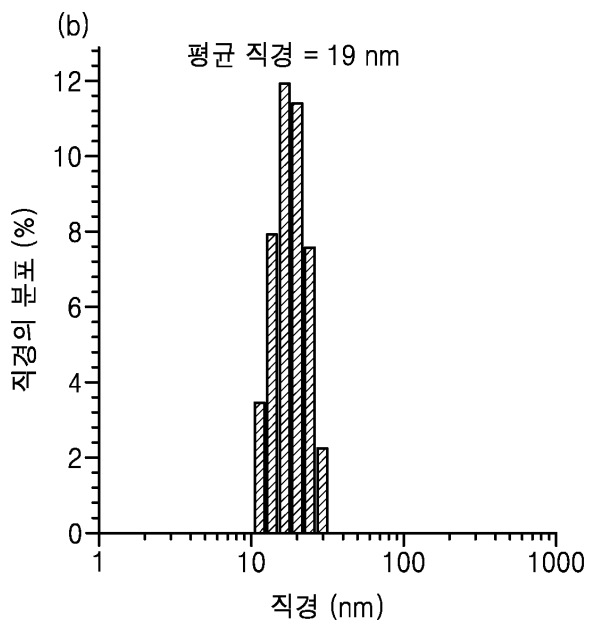
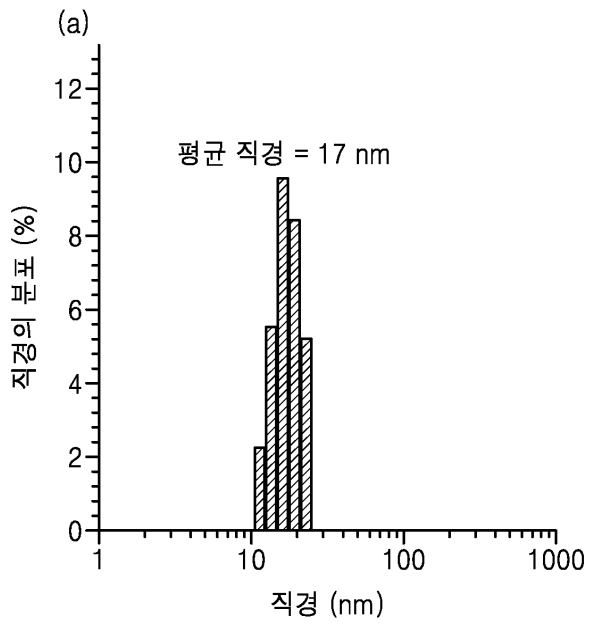
광조사 시간



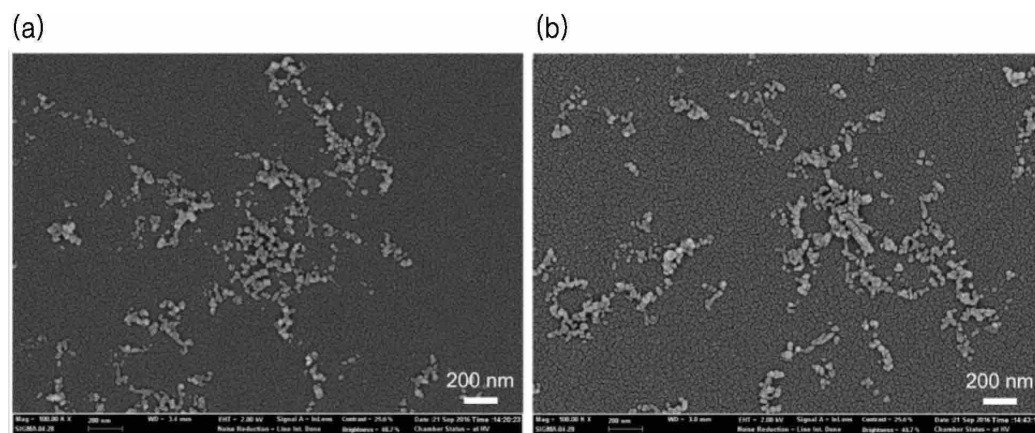
도면4b



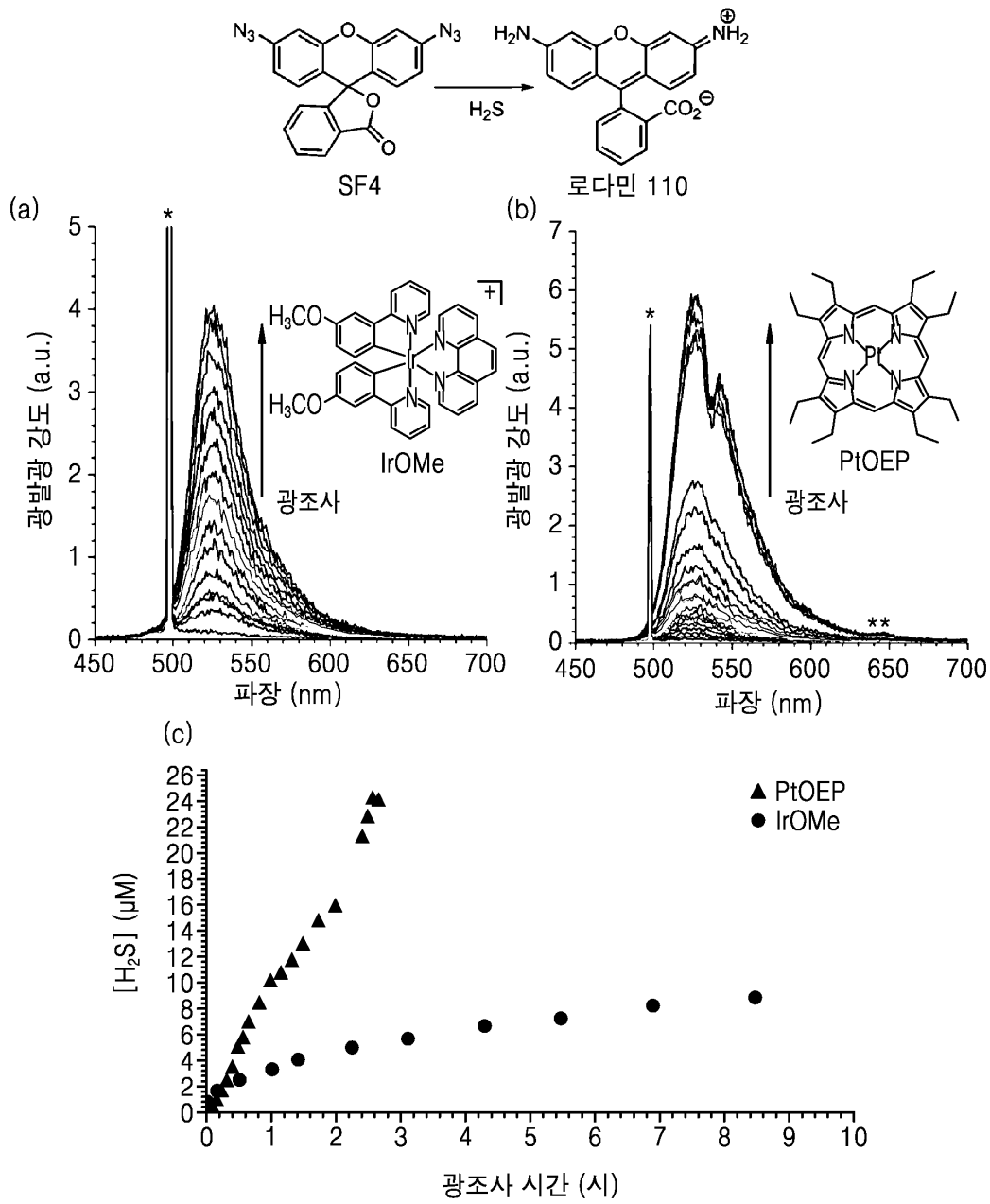
도면5a



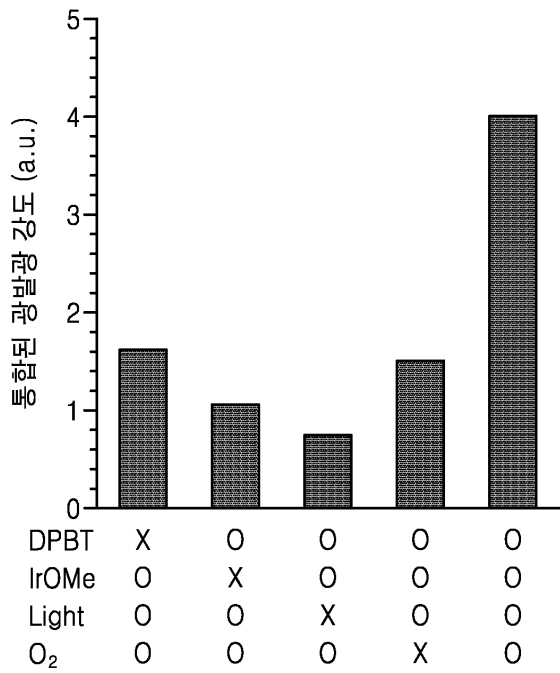
도면5b



도면6a

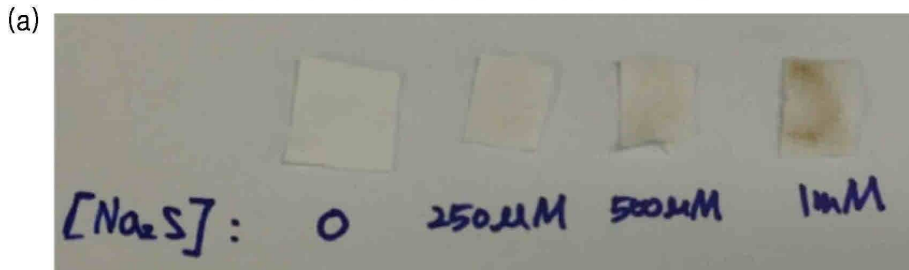


도면6b

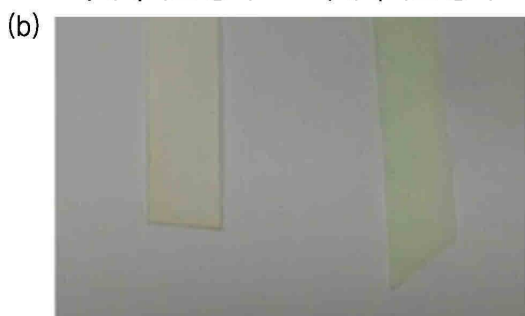


도면7a

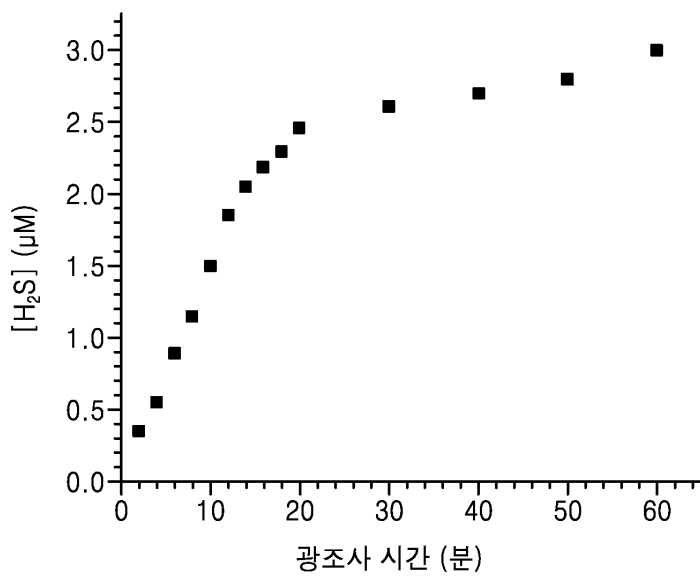
Na₂S의 농도 증가에 따른 납 아세테이트 종이의 비색 반응



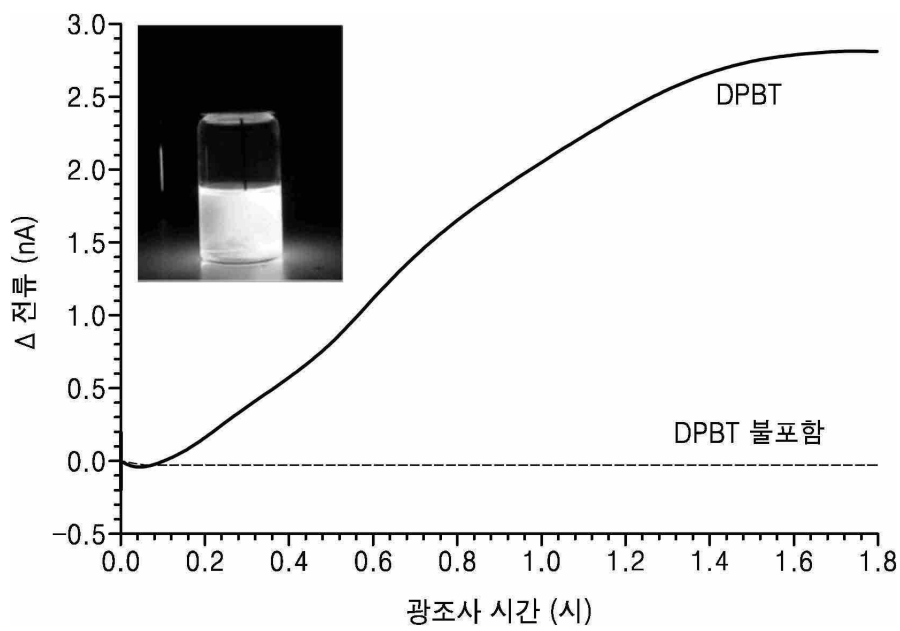
미처리된 납 아세테이트 종이 광조사된 나노입자 현탁액에 침지된 납 아세테이트 종이



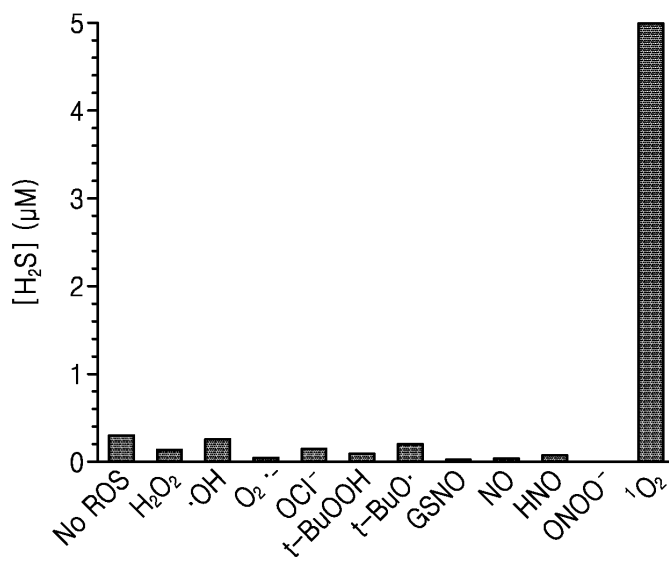
도면7b



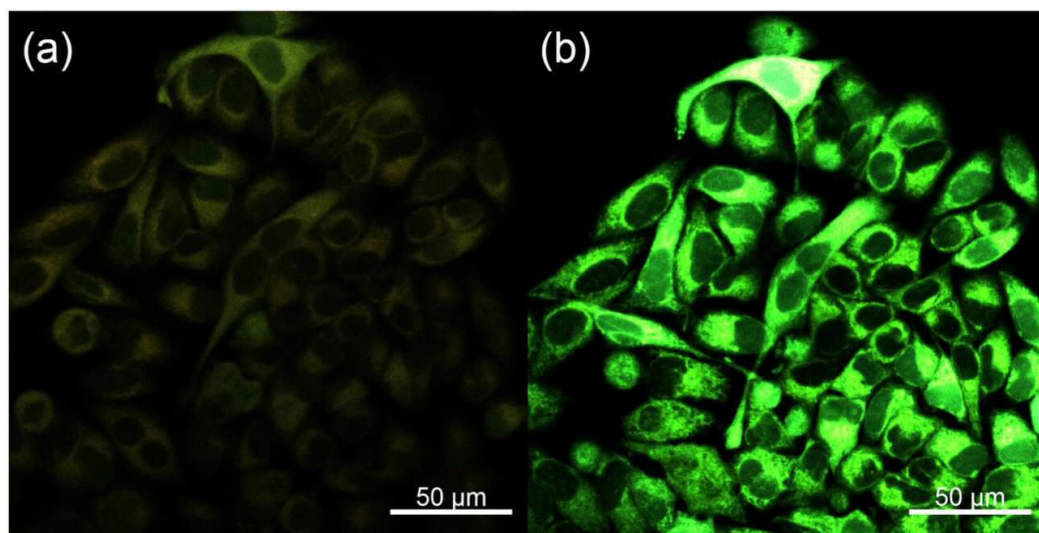
도면8



도면9

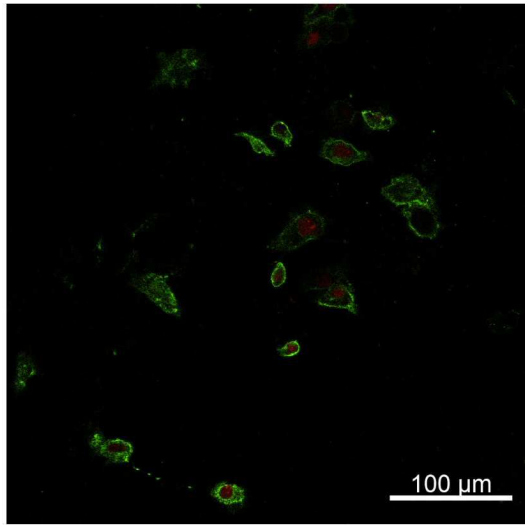


도면10



도면11

(a) No H_2S



(b) 광조사된 H_2S

