



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0065513

(43) 공개일자 2025년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 41/00 (2020.01) A61K 31/517 (2006.01)

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

C07D 209/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 41/00 (2013.01)

A61K 31/517 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0151157

(22) 출원일자 2023년11월03일

심사청구일자 2023년11월03일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

이재영

서울특별시 관악구 봉천로 387, 110동 2001호 (봉천동, 두산아파트)

강건욱

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 242동 2803호 (잠실동, 리센츠)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

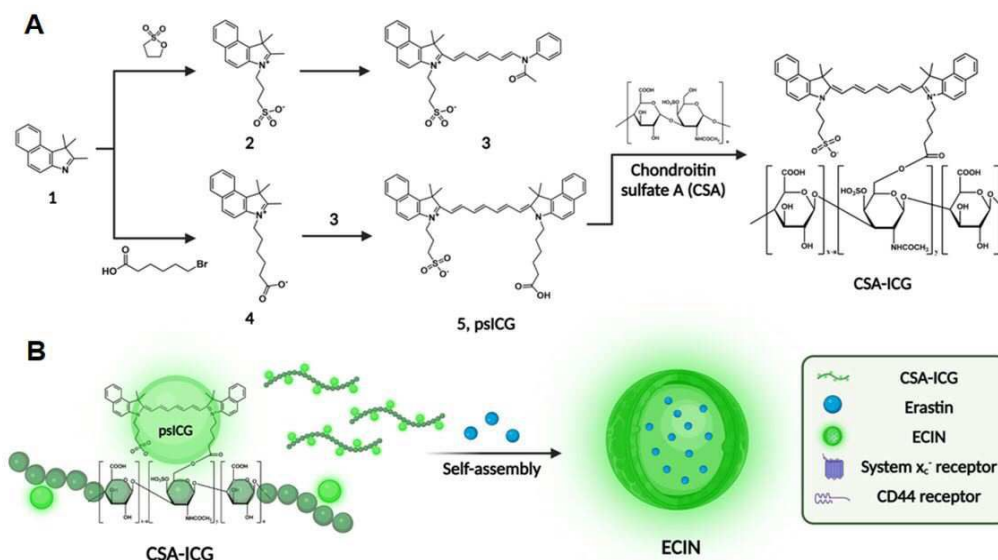
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 암 치료용 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propene sulfonate Indocyanine green, psICG) 결합 콘드로이틴 황산 A(CSA)를 포함하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 암 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 CD44 수용체를 통해 높은 안정성, 생체 적합성 및 종양 표적화 능력을 보유하여 암세포에 에라스틴을 효율적으로 전달하고 광열 및 광역학 효과를 나타내어 치료 잠재력을 더욱 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 41/0052 (2013.01)

A61K 41/0057 (2013.01)

A61K 47/6939 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07D 209/10 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

김상겸

대전광역시 유성구 엑스포로 448, (전민동 엑스포 아파트) 503동 1704호

유소열

세종특별자치시 조치원읍 섭골길 59, 107동 806호
(세종 e편한세상)

김현영

서울시 영등포구 당산로 95, 현대아파트 107동 802호

김동현

강원특별자치도 원주시 치악로 1690, 105동 405호
(단구동, 통일아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711126559

과제번호

2021R1C1C1009320

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명

종양미세환경 극복 및 암조직 표적화를 위한 재조합 히알루론산분해효소 융합단백질

기반 나노약물전달플랫폼

기 여 율

1/3

과제수행기관명

충남대학교

연구기간

2021.03.01 ~ 2026.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711137651

과제번호

2021R1A4A1021787

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

집단연구지원(R&D)

연구과제명

세포분화 대사추적 기초연구실

기 여 율

1/3

과제수행기관명

충남대학교

연구기간

2021.06.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711170690

과제번호

2022M3A9B6017654

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

바이오의료기술개발

연구과제명

대사성 섬유화증 단계별 임상-동물모델 시료 활용 다중오믹스 기반 치료기술 개발

기 여 율

1/3

과제수행기관명

서울대학교

연구기간

2022.04.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propane sulfonate Indocyanine green, psICG) 결합 콘드로이틴 황산 A(chondrotin sulfate A, CSA)를 포함하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자는 약물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 약물은 에라스틴(Erastin)인 것을 특징으로 하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자는

프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propane sulfonate Indocyanine green, psICG)을 합성하는 단계 (1 단계);

상기 1 단계에서 합성된 psICG와 콘드로이틴 황산 A(CSA)를 결합시켜 CSA-psICG를 제조하는 단계 (2 단계);

상기 2 단계에서 제조한 CSA-ICG에 에라스틴을 혼합하여 자가조립에 의하여 에라스틴이 탑재된 CSA-ICG(ECIN)를 제조하는 단계 (3 단계);를 포함하는 제조방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 psICG을 합성하는 1 단계는,

트리메틸벤조[e]인돌(trimethylbenzo[e]indole)과 1,3-프로판술포톤(1,3-propanesultone)을 1,2-디클로로벤젠(20mL)에 혼합하고 환류 하에 170° C에서 12시간 가열하여 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-일)프로판-1-술포네이트(3-(1,1,2-trimethyl-1H-benzo[e]indol-3-ium-3-yl)propane-1-sulfonate)를 합성하는 단계(1-1 단계);

6-브로모헥산산(6-iodohexanoic acid)과 요오드화나트륨(sodium iodide)을 아세토니트릴(Acetonitrile)에 혼합하고 85° C에서 반응시키고 디클로로메탄(Dichloromethane)에서 추출하여 6-요오도헥산산(6-iodohexanoic acid)을 합성하는 단계(1-2단계);

상기 1-2단계에서 얻은 6-요오도헥산을 아세토니트릴에 용해시킨 후, 트리메틸벤조[e]인돌을 첨가하고 환류 하에 85℃에서 96시간 동안 반응시켜 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오도늄 요오다이드 염(1,1,2-Trimethyl-3-(6-carboxylatehexyl)benzo[e]iodolium iodide salt)을 합성하는 단계(1-3단계);

상기 1-1단계에서 합성한 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-일)프로판-1-술포네이트 및 글루타콘알데히드디아닐 염산염(glutaconaldehydedianil hydrochloride)을 질소퍼지 하에서 무수 아세트산에 분산시킨 후, 혼합하여 140℃에서 반응시켜 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리엔일]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내염(2-[6-(N-phenyl-N-acetyl-amino)-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(3-sulfopropyl)-1H-benzo[e]indolium inner salt)을 합성하는 단계(1-4단계);

상기 1-4단계에서 합성한 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리에닐]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내염 및 상기 1-3단계에서 합성한 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오돌륨 요오다이드 염을 ACN 및 피리딘 공용매에 용해시켜 혼합하고 50℃에서 반응시켜 psICG를 얻는 단계(1-5단계);를 포함하는 것을 특징으로 하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 2 단계의 CSA-psICG를 제조시 CSA 및 psICG의 중량비가 10:1~4인 것을 특징으로 하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자는 180~270 nm의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 암 치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 암 치료용 조성물은 650 내지 850 nm의 적외선 조사에 의하여 암 치료 효과가 증가하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 암은 췌장암, 간암, 전립선암, 난소암, 대장암, 담도암, 자궁 경부암, 유방암, 평편 세포암, 위암, 신경모 세포종 종양, 다발성 골수종, 대장선종, , 직장암, 항문암, 소장암, 폐암, 혈액암, 만성 또는 급성 백혈병, 골수암, 림프구 림프종, 뼈암, 피부암, 두경부암, 피부흑색종, 안구 흑색종, 자궁육종, 난관암, 자궁내막암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 기관지암, 바렛식도(Barrett's esophagus), 자궁경부 이형성증(cervical dysplasia), 신장암 및 수노관암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 암인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 암 치료용 조성물은 암세포의 G1 단계 세포 주기를 정지시켜 종양의 크기를 감소시키는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 12

인간을 제외한 개체에 있어서의 암의 치료방법으로서,

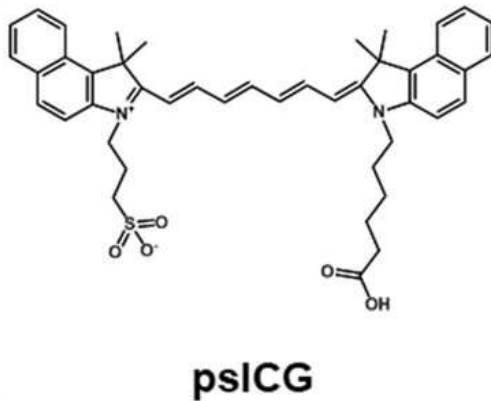
제5항의 암 치료용 조성물을 주입하는 단계; 및

650 내지 850 nm의 적외선을 조사하는 단계;를 포함하는 광역학 치료방법.

청구항 13

신규물질로서 하기 [화학식 1]로 표현되는 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propene sulfonate Indocyanine green, psICG).

[화학식 1]



청구항 14

트리메틸벤조[e]인돌(trimethylbenzo[e]indole)과 1,3-프로판술포톤(1,3-propanesultone)을 1,2-디클로로벤젠(20mL)에 혼합하고 환류 하에 170° C에서 12시간 가열하여 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-일)프로판-1-술포네이트(3-(1,1,2-trimethyl-1H-benzo[e]indol-3-ium-3-yl)propane-1-sulfonate)를 합성하는 단계(1-1단계);

6-브로모헥산산(6-iodohexanoic acid)과 요오드화나트륨(sodium iodide)을 아세토니트릴(Acetonitrile)에 혼합하고 85° C에서 반응시키고 디클로로메탄(Dichloromethane)에서 추출하여 6-요오도헥산산(6-iodohexanoic acid)을 합성하는 단계(1-2단계);

상기 1-2단계에서 얻은 6-요오도헥산을 아세토니트릴에 용해시킨 후, 트리메틸벤조[e]인돌을 첨가하고 환류 하에 85° C에서 96시간 동안 반응시켜 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오도늄 요오다이드 염(1,1,2-Trimethyl-3-(6-carboxylatehexyl)benzo[e]iodolium iodide salt)을 합성하는 단계(1-3단계);

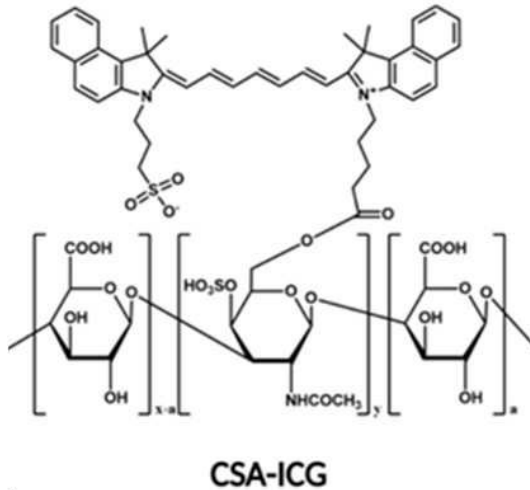
상기 1-1단계에서 합성한 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-일)프로판-1-술포네이트 및 글루타콘알데히드디아닐 염산염(glutaconaldehydedianil hydrochloride)을 질소퍼지 하에서 무수 아세트산에 분산시킨 후, 혼합하여 140° C에서 반응시켜 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리에닐]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내염(2-[6-(N-phenyl-N-acetylamin)-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(3-sulfopropyl)-1H-benzo[e]indolium inner salt)을 합성하는 단계(1-4단계);

상기 1-4단계에서 합성한 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리에닐]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내염 및 상기 1-3단계에서 합성한 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오도늄 요오다이드 염을 ACN 및 피리딘 공용매에 용해시켜 혼합하고 50° C에서 반응시켜 psICG를 얻는 단계(1-5단계);를 포함하는 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propane sulfonate Indocyanine green, psICG)의 제조방법.

청구항 15

신규물질로서 하기 [화학식 2]로 표현되는 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propane sulfonate Indocyanine green, psICG) 결합 콘드로이틴 황산 A(chondroitin sulfate A, CSA).

[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 암 치료용 조성물 및 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 전 세계적으로 사망의 주요 원인 중 하나로, 부작용을 최소화하며 효과적인 치료를 위해서는 정상 세포에 영향을 주지 않는 선택적 암 치료법의 개발이 필요하다. 암세포는 산화 스트레스에 대응하기 위해 다양한 세포 내 항산화 시스템을 보유하고 있으며, 이를 억제하면 세포 사멸을 유발할 수 있다(Dixon SJ et al., 2012). 다양한 유형의 세포 사멸 중 페로토시스(ferroptosis)는 철분에 의존하고 지질 ROS3-5의 축적을 특징으로 하는 비세포사멸 형태로, 괴사(necrosis), 발열세포사(pyroptosis), 자가포식(autophagy) 또는 세포자살(apoptosis)을 포함한 다른 세포 사멸 메커니즘과 형태학적으로나 기능적으로 구별된다. 에라스틴(Erastin)은 시스틴-글루타메이트 수송 수용체(시스템 X_c^-) 특이적으로 억제하는 잘 알려진 페로토시스 유도제로, 이러한 페로토시스에 극도로 취약한 간암, 췌장암, 전립선암, 유방암 등에서 악성 세포의 증식을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 에라스틴을 임상에 적용하는 경우, 에라스틴의 소수성으로 인한 낮은 용해도 및 표적 외 독성으로 인해 그 효과가 제한적인 문제가 있었다(Zhao J et al., 2021; Du J et al., 2021).

[0003] 한편, 인도시아닌 그린(Indocyanine green, ICG)은 미국 식품의약청(Food and Drug Administration, FDA)에서 승인한 근적외선 형광 염료로, 매력적인 물리화학적 특성, 높은 감도 및 안전성으로 인해 다양한 임상 응용 분야의 영상화제로 사용되는 시아닌 염료이다. 약 800 nm에서 최대 스펙트럼 흡수를 나타내며, 이러한 적외선 주파수는 망막 층을 관통하므로 ICG 혈관 조영술이 다른 형광 혈관 조영술보다 더 깊은 순환 패턴을 이미지화할 수 있다. 이러한 ICG는 감광성 특성으로 인해 광역학 요법(PDT) 및 광열 요법(PTT)에서 암세포를 파괴하는 것을 목표로 산소종(ROS) 또는 열을 생성하는 데 사용될 수 있어 새로운 최소 침습 암 치료법으로 주목받고 있다. 즉, 종양 부위에 ICG를 투여하고 레이저를 조사함으로써 국소적이고 제어 가능한 광선요법을 달성할 수 있다. 그러나 ICG는 상대적으로 짧은 순환 반감기, 농도 의존적 응집, 신체 내 빠른 분해 및 낮은 광안정성 등과 같은 단점으로 인해 종양학에서의 적용 가능성이 제한적이었다(Zheng et al., 2012).

[0004] 이에 따라 최근 ICG는 다양한 표면 변형 및 기능화 전략을 사용하여 폴리머 기반 나노파티클, 지질 기반 나노파티클 및 실리카 나노파티클과 같은 다양한 나노구조가 연구되고 있다(ZhuGe et al., 2019). 그러나 ICG의 혈장 단백질에 대한 비특이적 결합으로 인한 짧은 순환 반감기와 비특이적 표적화는 여전히 한계로 남아 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1686145호, 인도시아닌 그린-리포좀 복합체를 포함하는 암 치료용 조성물, 2016년12월07일 등록.
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1774859호, 인도시아닌 그린-함유 조성물의 광민감제 및 이를 포함하는 조성물, 2017년08월30일. 등록.
- (특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1630397호, 항암제-인도시아닌 그린-리포좀 복합체를 포함하는 암 치료용 조성물, 2016년06월08일. 등록.
- (특허문헌 0004) 한국등록특허 제10-2096469호, 인도시아닌그린이 결합된 만노실 혈청알부민 복합체, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 광학영상 프로브 및 키트, 2020년03월27일. 등록.

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Clutter ED, Chen LL, Wang RR. Role of photobleaching process of indocyanine green for killing neuroblastoma cells. Biochem Biophys Res Commun 2022;589:254-9.
- (비특허문헌 0002) Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell 2012;149:1060-72.
- (비특허문헌 0003) Du J, Wan Z, Wang C, Lu F, Wei M, Wang D, et al. Designer exosomes for targeted and efficient ferroptosis induction in cancer via chemo-photodynamic therapy. Theranostics 2021;11:8185-96.
- (비특허문헌 0004) Zhao J, Huang H, Zhao J, Xiong X, Zheng S, Wei X, et al. A hybrid bacterium with tumor-associated macrophage polarization for enhanced photothermal-immunotherapy. Acta Pharm Sin B 2022;12:2683-94.
- (비특허문헌 0005) Zhao J, Xu B, Xiong Q, Feng Y, Du H. Erastin-induced ferroptosis causes physiological and pathological changes in healthy tissues of mice. Mol Med Rep 2021;24.
- (비특허문헌 0006) Zheng, X., Zhou, F., Wu, B., Chen, W. R., and Xing, D. (2012). Enhanced tumor treatment using biofunctional indocyanine green-containing nanostructure by intratumoral or intravenous injection. Mol. Pharm. 9, 514-522. doi: 10.1021/mp200526m
- (비특허문헌 0007) ZhuGe, D.-L., Wang, L.-F., Chen, R., Li, X.-Z., Huang, Z.-W., Yao, Q., et al. (2019). Cross-linked nanoparticles of silk fibroin with proanthocyanidins as a promising vehicle of indocyanine green for photo-thermal therapy of glioma. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 47, 4293-4304. doi: 10.1080/21691401.2019.1699819

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 항암치료용 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propene sulfonate Indocyanine green, psICG) 결합 콘드로이틴 황산 A(CSA)를 포함하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 제공한다.

- [0009] ICG는 그 구조상 친수성/소수성을 정하기에는 불분명한 특성을 갖고 있다. 이에 따라 본 발명자들은 ICG의 양끝단에 있는 황산염(sulfate) 그룹중 하나를 카르복시산(carboxylic acid)으로 변경하고, 알킬사슬의 길이를 조절하여 변형 ICG를 새롭게 합성하였다. 이때 카르복시산을 콘드로이틴 황산염(chondroitin sulfate)과 접합하여

전체적으로 그래프트 공중합체(graft copolymer) 상에서 ICG가 소수성기로 작용할 수 있도록 하였다.

- [0010] 본 발명에서 콘드로이틴 황산염(chondroitin sulfate, CS)은 글리코사미노글리칸 계열에 속하는 천연 음이온성 뮤코다당류로, 인간과 동물의 연골에서 발견되며 다양한 유기체의 세포외 기질(ECM)의 주요 요소로 작용하는 물질이다. CS는 β -1,3 연결 N-아세틸 갈락토사민(GalNAc)과 β -1,4-연결된 D-글루쿠론산(GlcA)을 갖는 이당류의 반복 단위로 구성된다. 본 발명에서 CS는 황화물의 위치와 정도에 따라 CS-A(콘드로이틴-4-황산염), CS-B(콘드로이틴-2,4-황산염), CS-C(콘드로이틴-6-황산염), CS-D(콘드로이틴-2,6-황산염), CS-E(콘드로이틴-4,6-황산염)이 포함되며, 바람직하게는 CS-A(콘드로이틴-4-황산염)이다. CS는 매우 낮은 독성 등의 유익한 특성을 지닌 자연적으로 획득된 생체 거대분자이다. 이러한 콘드로이틴 황산염(CS)은 CD44와 결합하는 특성으로 CD44 표현 세포의 타겟팅에 이용될 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 CD44는 히알루론산의 주수용체인 세포막의 당단백으로 세포와 세포사이, 세포와 세포외 기질사이의 상호작용에 관여하여 암세포의 부착 및 이동에 중요한 역할을 하는 대표적 세포 부착 분자로 알려져 있으며, 특히 암 줄기 세포를 포함한 여러 세포 유형에서 과발현되며 암 발생 및 진행에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. CD44는 암 증식, 침윤, 전이 및 치료 저항성을 조절하는 다양한 필수 신호 전달 경로의 조절에 관여하며 대표적으로 췌장암, 간암, 전립선암, 난소암, 대장암, 담도암, 자궁 경부암, 유방암, 평편 세포암, 위암, 신경모세포종 종양, 다발성 골수종 등에서 암줄기세포의 분리를 위해 CD44가 표지자로 사용되고 있다.
- [0012] 이에 따라 본 발명의 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 항암치료용 조성물은 상기 췌장암, 간암, 전립선암, 난소암, 대장암, 담도암, 자궁 경부암, 유방암, 평편 세포암, 위암, 신경모세포종 종양, 다발성 골수종의 치료에 사용할 수 있으며, 그외 대장선종, 직장암, 항문암, 소장암, 폐암, 혈액암, 만성 또는 급성 백혈병, 골수암, 림프구 림프종, 뼈암, 피부암, 두경부암, 피부흑색종, 안구 흑색종, 자궁육종, 난관암, 자궁내막암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 기관지암, 바렛식도(Barrett's esophagus), 자궁경부 이형성증(cervical dysplasia), 신장암 및 수뇨관암에 사용할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자는 적외선, 구체적으로는 650 내지 850 nm의 적외선을 조사에 의하여 암 치료 효과를 현저히 증가될 수 있다.
- [0014] 상기 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자는
- [0015] 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propane sulfonate Indocyanine green, psICG)을 합성하는 단계 (1 단계);
- [0016] 상기 1 단계에서 합성된 psICG와 콘드로이틴 황산 A(CSA)를 결합시켜 CSA-psICG를 제조하는 단계 (2 단계);
- [0017] 상기 2 단계에서 제조한 CSA-ICG에 에라스틴을 혼합하여 자가조립에 의하여 에라스틴이 탑재된 CSA-ICG(ECIN)를 제조하는 단계 (3 단계);를 포함하는 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0018] 상기 psICG를 합성하는 1 단계는,
- [0019] 트리메틸벤조[e]인돌(trimethylbenzo[e]indole)과 1,3-프로판술포톤(1,3-propanesultone)을 1,2-디클로로벤젠(20mL)에 혼합하고 환류 하에 170° C에서 12시간 가열하여 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-yl)프로판-1-술포네이트(3-(1,1,2-trimethyl-1H-benzo[e]indol-3-ium-3-yl)propane-1-sulfonate)를 합성하는 단계(1-1 단계);
- [0020] 6-브로모헥산산(6-iodohexanoic acid)과 요오드화나트륨(sodium iodide)을 아세토니트릴(Acetonitrile)에 혼합하고 85° C에서 반응시키고 디클로로메탄(Dichloromethane)에서 추출하여 6-요오도헥산산(6-iodohexanoic acid)을 합성하는 단계(1-2단계);
- [0021] 상기 1-2단계에서 얻은 6-요오도헥산을 아세토니트릴에 용해시킨 후, 트리메틸벤조[e]인돌을 첨가하고 환류 하에 85°C에서 96시간 동안 반응시켜 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오도륨 요오다이드 염(1,1,2-Trimethyl-3-(6-carboxylatehexyl)benzo[e]iodolium iodide salt)을 합성하는 단계(1-3단계);
- [0022] 상기 1-1단계에서 합성한 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-yl)프로판-1-술포네이트 및 글루타콘알데히드디아닐 염산염(glutaconaldehydedianil hydrochloride)을 질소퍼지 하에서 무수 아세트산에 분산시킨 후, 혼합하여 140°C에서 반응시켜 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리엔닐]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내염(2-[6-(N-phenyl-N-acetyl-amino)-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(3-sulfopropyl)-1H-benzo[e]indolium inner salt)을 합성하는 단계(1-4단계);
- [0023] 상기 1-4단계에서 합성한 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리엔닐]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-

벤조[e]인돌륨 내염 및 상기 1-3단계에서 합성한 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오돌륨 요오다이드 염을 ACN 및 피리딘 공용매에 용해시켜 혼합하고 50℃에서 반응시켜 psICG를 얻는 단계(1-5단계);를 포함할 수 있다.

[0024] 또한 상기 2 단계의 CSA-psICG를 제조시 CSA 및 psICG의 중량비는 10:1~4일 수 있으며, 바람직하게는 10:3이다.

[0025] 본 발명은 에라스틴을 담지한 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자(ECIN)를 제공한다. 본 발명의 ECIN은 180~270 nm의 직경을 가지며, 나노입자 내에 에라스틴을 포함하지 않는 경우 220 ~ 330 nm 범위일 수 있다. 에라스틴 캡슐화에 의하여 입자크기가 180~270 nm로 작아질 수 있다. 본 발명에 따른 ECIN의 다분산지수는 0.3 미만으로 정맥 주사에 적합할 수 있다. 에라스틴 캡슐화 효율은 87%이상이며, CSA 및 psICG의 중량비가 10:3인 ECIN의 에라스틴 캡슐화 효율은 92%이상이다.

[0026] 본 발명에 따른 상기 암 치료용 조성물은 암세포의 G1 단계 세포 주기를 정지시켜 종양의 크기를 감소시킬 수 있다.

[0027] 본 발명은 인간을 제외한 개체에 있어서의 암의 치료방법으로서,

[0028] 본 발명의 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 암 치료용 조성물을 주입하는 단계; 및

[0029] 650 내지 850 nm의 적외선을 조사하는 단계;를 포함하는 광역학 치료방법을 제공한다.

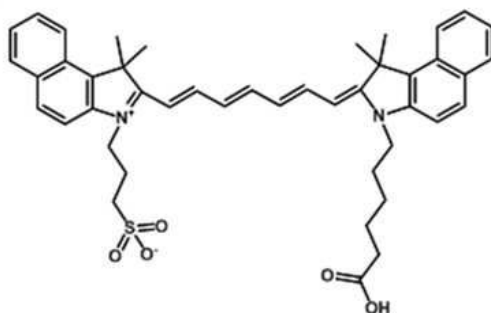
[0030] 상기 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 암 치료용 조성물은 에라스틴을 담지한 ECIN일 수 있으며, 대상 개체에 일정한 간격으로 수차례 반복 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 수 있다. 이러한 여러 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다. 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200 mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물 투여 후, 650 내지 850 nm의 적외선을 조사함으로써 조성물의 항암 효과를 현저히 증가시킬 수 있다. 상기 암 치료용 조성물은 암세포의 G1 단계 세포 주기를 정지시켜 종양의 크기를 감소시킬 수 있다.

[0033] 본 발명은 신규물질로서 하기 [화학적 1]로 표현되는 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propene sulfonate Indocyanine green, psICG)을 제공한다.

[0034] [화학적 1]



psICG

[0035] 

[0036] 본 발명은 트리메틸벤조[e]인돌(trimethylbenzo[e]indole)과 1,3-프로판술포톤(1,3-propanesultone)을 1,2-디클로로벤젠(20mL)에 혼합하고 환류 하에 170° C에서 12시간 가열하여 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-일)프로판-1-술포네이트(3-(1,1,2-trimethyl-1H-benzo[e]indol-3-ium-3-yl)propane-1-sulfonate)를 합성하는

단계(1-1단계);

[0037] 6-브로모헥산산(6-iodohexanoic acid)과 요오드화나트륨(sodium iodide)을 아세토니트릴(Acetonitrile)에 혼합하고 85°C에서 반응시키고 디클로로메탄(Dichloromethane)에서 추출하여 6-요오도헥산산(6-iodohexanoic acid)을 합성하는 단계(1-2단계);

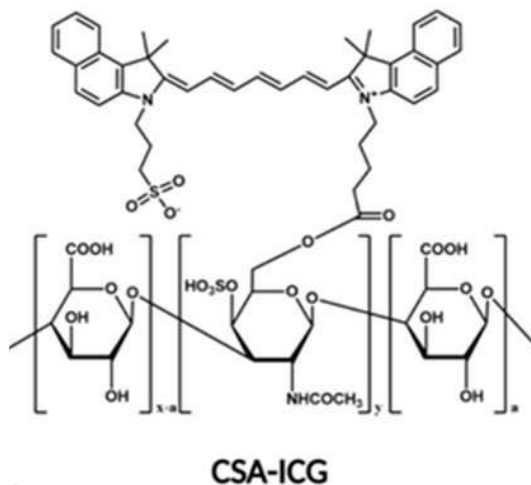
[0038] 상기 1-2단계에서 얻은 6-요오도헥산을 아세토니트릴에 용해시킨 후, 트리메틸벤조[e]인돌을 첨가하고 환류 하에 85°C에서 96시간 동안 반응시켜 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오도늄 요오다이드 염(1,1,2-Trimethyl-3-(6-carboxylatehexyl)benzo[e]iodolium iodide salt)을 합성하는 단계(1-3단계);

[0039] 상기 1-1단계에서 합성한 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-일)프로판-1-술포네이트 및 글루타콘알데히드디아닐 염산염(glutaconaldehydedianil hydrochloride)을 질소퍼지 하에서 무수 아세트산에 분산시킨 후, 혼합하여 140°C에서 반응시켜 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리에닐]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내염(2-[6-(N-phenyl-N-acetyl amino)-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(3-sulfopropyl)-1H-benzo[e]indolium inner salt)을 합성하는 단계(1-4단계);

[0040] 상기 1-4단계에서 합성한 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리에닐]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내염 및 상기 1-3단계에서 합성한 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오도늄 요오다이드 염을 ACN 및 피리딘 공용매에 용해시켜 혼합하고 50°C에서 반응시켜 psICG를 얻는 단계(1-5단계);를 포함하는 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propene sulfonate Indocyanine green, psICG)의 제조방법을 제공한다.

[0041] 본 발명은 신규물질로서 하기 [화학식 2]로 표현되는 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propene sulfonate Indocyanine green, psICG) 결합 콘드로이틴 황산 A(chondroitin sulfate A, CSA).

[0042] [화학식 2]



[0043]

발명의 효과

[0045] 본 발명은 프로판 술포네이트 인도시아닌 그린(propene sulfonate Indocyanine green, psICG) 결합 콘드로이틴 황산 A(CSA)를 포함하는 레이저 감응성 콘드로이틴 황산염 나노입자를 포함하는 암 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 CD44 수용체를 통해 높은 안정성, 생체 적합성 및 종양 표적화 능력을 보유하여 암세포에 에라스틴을 효율적으로 전달하고 광열 및 광역학 효과를 나타내어 치료 잠재력을 더욱 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 ECIN의 합성 과정 및 암세포 내 항암 활성을 나타낸 모식도이다. (A) psICG 및 CSA-ICG의 합성 과정. (B) ECIN의 합성 과정.

도 2는 ICG, bsICG 및 psICG의 분자구조(A) 및 ESOL, Ali 및 SILICOS-IT 약동학 모델에서의 상대적 예상 용해

도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 CSA 및 psICG를 다양한 중량비(10:1, 10:2, 10:3 및 10:4)로 결합시킨 CSA-psICG의 psICG의 치환 수율(A), Earstin@CSA와 ECIN의 수용액의 시각적 외관(B) 및 DLS로 측정된 earstin@CSA 및 ECIN의 크기 분포(C)를 나타낸 결과이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD)

도 4는 TEM 관찰을 통한 CIN(A) 및 ECIN(B)의 형태를 보여주는 사진이다.

도 5는 ICG, psICG, CIN 및 ECIN의 흡수(A) 및 형광 스펙트럼(B)을 나타낸 그래프이다.

도 6은 pH 7.4, 6.8 및 5.5일때 PBS 및 FBS에서 ECIN의 콜로이드 안정성을 나타낸 그래프이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD)

도 7은 120시간 동안 pH 6.7 및 7.4의 NBCS에서 ECIN의 누적 에라스틴 방출 프로파일을 나타낸 그래프이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD)

도 8은 ECIN의 광열 및 광역학 성능 분석 결과이다. (A) 광열 가열 곡선 (B) NIR 레이저 조사(808 nm; 0.7 W/cm²) 하에서 5분 동안 ICG, psICG, CIN 및 ECIN(ICG 또는 psICG로서 20 μ g/mL)의 적외선 열 이미지. (C) 8분 동안 NIR 레이저 조사(808 nm; 0.7 W/cm²) 하에서 일중항 산소의 형광 강도(Δ FI)의 차이로 표시되는 광역학적 성능(마이크로플레이트 관독기의 매개변수: 510 nm에서 여기 및 560 nm에서 방출). (데이터는 평균 $\pm$ SD (n = 3))

도 9는 Huh-7 및 SK-HEP-1 세포에서 CD44 및 xCT 발현의 웨스턴 블롯 분석(A) 및 Huh-7 세포에 대한 CD44 및 xCT 발현 수준(B)을 측정한 그래프이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD, **** p < 0.0001) (n = 5)

도 10은 ECIN의 CD44 매개 세포흡수를 나타낸 결과이다. (A) 유세포분석(n = 3)을 통하여 측정된 SK-HEP-1 세포에서의 시간별 sICG, CIN 및 ECIN의 세포 흡수 (B) Huh-7 및 SK-HEP-1 세포를 DCIN과 함께 배양한 후 공초점 레이저 주사현미경(CLSM) 이미지. (녹색 : CD44, 파란색: DAPI, 빨간색: DCIN)(데이터는 평균 $\pm$ SD)

도 11은 SK-HEP-1 세포에서 ECIN의 시험관 내 세포독성을 나타낸 결과이다. (A) psICG, 유리 에라스틴 및 ECIN의 농도별 세포생존율(n=4) (B) 유리 에라스틴, (C) CIN, 및 (D) ECIN의 48시간 동안의 세포 컨플루언시 변화(n = 5-6). (데이터는 평균 $\pm$ SD, * p < 0.05, **** p < 0.0001)

도 12는 ECIN의 에라스틴 유도 페로토시스를 확인한 결과이다. (A) 페로토시스 특정 억제제 페로스타틴-1(ferrostatin-1, Fer-1; 5 μ M)을 추가하여 ECIN(에라스틴으로 4 μ g / mL)에 의한 세포 컨플루언시 변화를 확인한 결과(n = 5-6). (B) Huh-7 및 SK-HEP-1 세포(n = 4)에서 유리 에라스틴 또는 ECIN에 의해 유도된 지질 과산화물을 평가(C11 BODIPY 581/591 분석) 결과. (데이터는 평균 $\pm$ SD)

도 13은 NAC(2mM)를 첨가에 따른 ECIN(에라스틴으로서 3 μ g/mL)의 48시간 동안의 세포 컨플루언시 변화(n = 5) (A) 및 유동 세포 계측법에 의한 SK-HEP-1 세포의 세포주기 분포 분석 결과(n = 3) (B) 이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD, *** p < 0.001)

도 14는 SK-HEP-1 세포(n = 3)에서 세포 주기 조절인자 Cyclin D1 및 CDK2 발현의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD, *p < 0.05, ** p < 0.01)

도 15는 psICG, 유리 에라스틴 및 ECIN 농도에서 레이저 조사(808 nm; 0.7W/cm²) 존재 하에서 SK-HEP-1 세포의 세포 생존율을 평가한 그래프(A) 및 형광 마이크로플레이트 리더를 사용하여 세포내 ROS 생성 효율을 평가한 그래프이다. (n = 4) (데이터는 평균 $\pm$ SD, *** p < 0.001.)

도 16은 SK-HEP-1 세포를 psICG, CIN 또는 ECIN으로 4시간 동안 처리하고 5분간 조사한 후 공초점 레이저 주사현미경(CLSM) 이미지이다. (녹색 : DCF, 파란색 : DAPI, 스케일 바: 50 μ m)

도 17은 SK-HEP-1 세포 이중 이식 마우스 모델 구축 및 관련 실험의 모식도이다.

도 18은 psICG 또는 ECIN을 24시간 동안 정맥 주사한 후 시간 경과에 따른 전신 NIRF 스캐닝 이미지(A) 및 psICG 또는 ECIN의 주사 후 경과 시간에 따른 종양 부위의 평균 RE(Radiant efficiency)RE 이다. (데이터는 평

균 $\pm$ SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

도 19는 psICG 또는 ECIN 주사 후 24시간에 주요 장기(간, 비장, 신장, 심장 및 폐) 및 종양의 대표적인 생체의 NIRF 이미지(A), 및 평균 RE 값(B)을 보여주는 결과이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD, ** $p < 0.01$)

도 20은 유리 에라스틴 또는 ECIN($n = 3$)의 경구(10 mg/kg) 또는 정맥 주사(5 mg/kg) 후 시간에 따른 혈장 에라스틴 농도 (A) 및 2일 간격($n = 8$)으로 유리 에라스틴 또는 ECIN(5 mg/kg)을 총 13회 주사한 후 질량 분석법을 사용하여 주요 기관 및 종양의 에라스틴 농도를 나타낸 결과이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$)

도 21은 이종이식 마우스 모델에 5일 간격($n = 3$)으로 유리 에라스틴 또는 ECIN(3 mg/kg)을 총 5회 주사한 후 종양 내 GSH 농도 (A), 생리식염수(NS) 및 ECIN을 정맥 주사한 후, 레이저 조사(808 nm; 0.7 W/cm²) 하에서 5분 동안 광열 가열 곡선($n = 5$) 및 열 화상 이미지(C)이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.)

도 22는 SK-HEP-1 이종이식 마우스 모델에서 ECIN의 생체 내 항종양 효과를 확인하기 위한 실험 절차의 개략도이다. (Biorender.com으로 생성)

도 23은 비히클, 유리에라스틴, ECIN 및 ECIN 투여 후, 지정일에 레이저 조사한 SK-HEP-1 이종이식 마우스 모델의 종양부피(A), 마우스 체중(B) 및 마우스 희생 후 적출한 종양 중량(C)을 나타낸 그래프이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD, ** $p < 0.01$)

도 24는 SK-HEP-1 이종이식 마우스 모델에서 시간 경과에 따른 전신 NIRF 스캐닝 이미지 (8일, 12일, 16일, 20일 및 24일 ECIN 투여 직전 결과, 점선으로 표시된 노란색 원과 흰색 원은 각각 종양과 정상 조직 영역을 나타냄) (A) 및 경과 시간에 따른 종양 및 정상 조직 영역의 평균 RE (B)를 나타낸 그래프이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

도 25는 SK-HEP-1 이종이식 마우스 모델에서 ECIN 투여 25일차 주요 장기(간, 비장, 신장, 심장 및 폐) 및 종양의 대표적인 생체의 NIRF 이미지(A) 및 해당 평균 RE (H) 값을 나타낸 그래프이다. (데이터는 평균 $\pm$ SD)

도 26은 본 발명에 따른 ECIN의 종양 특이적 화학 광선요법 메커니즘을 나타내는 개략도이다.(BioRender.com를 이용하여 생성)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] ICG는 약 808 nm에서 최대 스펙트럼 흡수를 나타내며, 이러한 적외선 주파수는 망막 층을 관통하므로 ICG 혈관 조영술이 다른 형광 혈관 조영술보다 더 깊은 순환 패턴을 이미지화할 수 있다. 이 과정에서 ICG는 기본적으로 열 및 활성산소를 발생하여 기능광열치료 및 광역학치료 활성을 나타내는데, 이는 진단만을 목적으로 한다는 면에서는 양자수율(quantum yield)이 우수한 최신 형광 염료들에 비하면 오히려 불필요한 기능이다. 본 발명자는 ICG의 이러한 부수적인 기능에 집중하여, 이를 항암치료의 보조수단으로 활용하였다. 먼저, ICG와 콘드로이틴 A(CSA)의 화학적 결합을 위한 용해도 향상을 위해 술폰기 대신 카르복실기를 도입하고 술폰 함유 탄소 사슬의 탄소수를 줄여 프로판술폰산염 ICG(propanesulfonate ICG, psICG)을 합성하였다. psICG는 CSA에 화학적으로 결합되어 자가 조립을 통해 CSA-psICG 나노입자를 제조하여 감광제를 종양에 직접 전달할 수 있도록 하였다. 이후, 에라스틴이 탑재된 황산 콘드로이틴 A-프로판술폰네이트 인도시아닌 그린(CSA-psICG) 나노입자(erastin-loaded chondroitin sulfate A-propansulfonate indocyanine green nanoparticles, ECIN)를 개발함으로써 화학-광선요법을 진단하고 사용할 수 있는 치료진단 나노입자를 완성하게 되었다.

[0048] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 여기서 소개되는 내용은 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0050] <재료 및 방법>

[0051] 화학물질 및 재료

[0052] 콘드로이틴 A(CSA, ~37 kDa, 소의 기관에서 분리함), ICG, 1,3-프로판술폰 및 폴리에틸렌 글리콜 400(PEG400)

은 Sigma-Aldrich Co.(미국 미주리주 세인트루이스)에서 구입했다. 에라스틴(Erastin)은 MedChem Express(미국 뉴저지주 Monmouth Junction)에서, 6-브로모헥산산, 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 1,1,2-트리메틸벤조[e]인돌은 Alfa Aesar(Haverhill, MA, USA)에서 구입했다. 글루타콘알데히드디아닐 염산염, N,N'-디시클로헥실카르보디이미드(DCC) 및 트윈 80은 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입했습니다. 1,2-디클로로벤젠, 에틸아세테이트(EA), 메탄올(MeOH), 무수아세트산, 톨루엔, 에테르, 아세토니트릴(ACN), 디클로로메탄(DCM), 요오드화나트륨, 클로로포름, 포름아미드, N,N-디메틸포름아미드는 삼전화학(대한민국 평택)에서 구입했다.

[0054] ICG 카르복실산의 인실리코 비교

[0055] 카르복실기의 반대기가 프로판 술포네이트(psICG) 또는 부탄 술포네이트(bsICG)인 두 가지 유형의 ICG 카르복실산을 원래 ICG와 비교하였다. SwissADME 웹 도구(<http://www.swissadme.ch/index.php>)를 사용하여 흡수, 분포, 대사 및 배설, 물리화학, 약물 유사성, 약동학 및 의약화학 친화성 특성을 평가했다. 용해도는 ESOL, Ali 및 SILICOS-IT의 3 가지 방법을 통해 예측하였다.

[0057] psICG 카르복실산의 합성 및 특성 규명

[0058] 도 1A에 나타난 바와 같이 ICG-ATT 합성 방법을 기반으로 프로판술포산염 ICG(propanesulfonate ICG, psICG)을 합성하였다. 먼저, 트리메틸벤조[e]인돌(trimethylbenzo[e]indole, 1g, 4.78mmol; 화합물 1)과 1,3-프로판술포(1,3-propanesultone, 0.88g, 7.18mmol)을 1,2-디클로로벤젠(20mL)에 혼합하고 환류 하에 170° C에서 12시간 가열하여 3-(1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌-3-ium-3-일)프로판-1-술포네이트(3-(1,1,2-trimethyl-1H-benzo[e]indol-3-ium-3-yl)propane-1-sulfonate, 화합물 2)를 합성하였다. 상기 화합물 2가 포함된 용액을 냉각시킨 후, 침전을 위해 EA(200 mL)를 첨가하였다. 침전된 화합물을 종이필터를 이용하여 여과하고 EA(50 mL)로 3회 세척하였다. 얻어진 연한 회색 고체(1.5 g, 4.51 mmol, 94%)를 박층 크로마토그래피(TLC)와 전자분무 이온화 질량분석법(ESI-MS)(API-3200, AB Sciex LLC, Framingham, USA)으로 분석하였다.

[0059] 6-요오도헥산산(6-iodohexanoic acid)을 제조하기 위해, 6-브로모헥산산(6-iodohexanoic acid, 0.92g, 4.6mmol)과 요오드화나트륨(sodium iodide, 1g, 6.6mmol)을 아세토니트릴(Acetonitrile, ACN, 20mL)에 혼합하고 85° C에서 환류하에 24시간 동안 가열했다. 이후, ACN을 증발시킨 다음, 노란색 분말을 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM, 20mL)에서 추출했다. 이후, 살구색 DCM을 증발시키고 냉각시켜 황색 결정인 6-요오도헥산산(1.14 g, 4.6 mmol)을 얻었다. 이는 즉시 ACN으로 재구성하여 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조[e]요오도늄 요오다이드 염(1,1,2-Trimethyl-3-(6-carboxylatehexyl)benzo[e]iodolium iodide salt, 화합물 3)을 합성하였다. 1,1,2-트리메틸벤조[e]인돌(0.76 g, 3.63 mmol, 화합물 1)을 ACN(20 mL)에 용해된 6-요오도헥산산에 첨가하고 환류 하에 85℃에서 96시간 동안 반응시켜 생성된 진한 녹색 용액을 증발시킨 다음, 메탄올(MeOH, 1 mL)에 용해시켰다. 이후, 에테르(200 mL)로 침전시킨 다음, 연녹색 분말을 이중 탈이온수(DDW)로 3회 세척하여 잔류 NaI를 제거하고 밝은 녹색 고체(화합물 3) (0.625g, 1.39mmol, 38%)를 TLC 및 ESI-MS로 분석했다.

[0060] 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리에닐]-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내염(2-[6-(N-phenyl-N-acetyl amino)-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(3-sulfopropyl)-1H-benzo[e]indolium inner salt, 화합물 4)을 합성하기 위하여, 1,1,2-트리메틸-1H-벤조[e]인돌륨-3-일)프로판술포네이트(1,1,2-trimethyl-1H-benzo[e]indolium-3-yl)propanesulfonate, 0.78g, 2.35mmol; 화합물 2) 및 글루타콘알데히드디아닐 염산염(glutaconaldehydedianil hydrochloride, 1g, 3.51mmol)을 질소퍼지 하에서 무수 아세트산에 분산시킨 후, 실온(RT)에서 30분 동안 교반했다. 이후, 온도를 천천히 140℃까지 올리고 용액을 2시간 동안 반응시켰다. 이를 냉각 후, 톨루엔(50 mL)을 용액에 첨가하고 혼합물을 증발시켰다. 건조된 혼합물을 메탄올(MeOH, 10 mL)에 재구성하고 생성된 용액을 에테르(200 mL)에 부어 화합물을 침전시켰다. 이때 진한 빨간색의 분말(1.24g, 정량적; 화합물 4)을 얻었으며, TLC 및 ESI-MS로 확인했다.

[0061] 2-[7-[1,3-디히드로-1,1-디메틸-3-(3-술포프로필)-2H-벤조[e]인돌-2-일리덴]-1,3,5-헵타트리에닐]-1,1-디메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)-1H-벤조[e]인돌륨 내부 염(2-[7-[1,3-dihydro-1,1-dimethyl-3-(3-sulfopropyl)-2H-benzo[e]indol-2-ylidene]-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(6-carboxylatehexyl)-1H-benz[e]indolium inner salt, 화합물 5, psICG)을 얻기 위해, 상기에서 준비한 1,1,2-트리메틸-3-(6-카르복실레이트헥실)벤조

[e]인돌륨 요오다이드 염(1,1,2-Trimethyl-3-(6-carboxylatehexyl)benzo[e]indolium iodide salt, 255 mg, 0.567 mmol; 화합물 4) 및 2-[6-(N-페닐-N-아세틸아미노)-1,3,5-헵타트리엔일]-1,1-디메틸-3-(3-설포프로필)-1H-벤조[e]인돌륨 내부 염(2-[6-(N-phenyl-N-acetylamino)-1,3,5-heptatrienyl]-1,1-dimethyl-3-(3-sulfopropyl)-1H-benzo[e]indolium inner salt, 300mg, 0.567mmol; 화합물 3)을 ACN 및 피리딘 공용매(1:1 v/v, 20mL)에 용해시켰다. 이후, 실온에서 30분 동안 교반한 다음, 용액을 50℃로 올리고 2시간 동안 반응시켰다. 이후, 용매를 증발시키고, 잔류물을 클로로포름:MeOH 5:1, 이어서 10:1을 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 진한 녹색 고체(5)(100mg, 0.140mmol, 25%)를 얻었다. 최종 생성물인 psICG는 TLC, 자외선-가시광선(UV-Vis) 플레이트 판독기, 수소-1 핵자기공명(¹H-NMR; Avance III-600; Bruker, Billerica, MA, USA) 및 ESI-MS를 통해 확인하였다.

[0063] psICG 결합 CSA의 합성 및 특성 규명

[0064] 도 1A에 나타난 바와 같이, psICG 결합 CSA(이하 CSA-psICG)는 스테글리치(steglich) 에스테르화 반응을 통해 합성되었다. CSA와 psICG의 결합 조건 최적화를 위해 10:1, 10:2, 10:3, 10:4의 중량비로 각각 결합하여 준비하였다. 간략하게, CSA(100 mg)를 포름아미드(20 mL)에 70° C에서 3시간 동안 용해시키고 실온으로 냉각시킨 후, 4개의 차광 바이알에 동일하게 나누었다. psICG(25 mg), DCC(17.99 mg) 및 DMAP(1.28 mg)는 몰비 1:2.5:0.3으로 DMF(1.743 mL; psICG로서 0.02 M)에 용해시켰다. 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하여 psICG의 카르복실산기를 활성화시켰다. 이후, 활성화된 psICG 용액을 4가지 CSA 용액의 각 비율에 천천히 첨가했다. 그 다음, 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반한 후, DDW와 MeOH의 혼합물에 대하여 반투과성 백(분자량 컷오프 [MWCO]: 3.5 kDa; Cellu-Sep; Membrane Filtration Products, Inc., Seguin, TX, USA)을 사용하여 투석했다. 이때 DDW와 MeOH의 혼합물은 총 3일에 걸쳐 DDW의 비율을 25, 50, 75, 100%(v/v)로 변경하였다. 이후, 투석된 반응 혼합물을 -80° C에서 동결건조했다. 생성된 녹색 분말인 CSA-psICG는 나중에 사용할 때까지 2~8° C에서 보관했다.

[0065] CSA와 psICG 사이의 화학적 결합은 ¹H-NMR(Avance III-600, Bruker)을 사용하여 확인하였다. CSA와 CSA-psICG를 디메틸 설펡사이드-d₆(DMSO-d₆)와 중수(D₂O)(5:3, v/v)의 혼합물에 용해시켜 NMR 샘플을 준비했다. ICG 치환 수율(%)을 결정하기 위해 psICG의 농도를 UV-Vis 분광 광도계(Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 793 nm의 파장에서 정량하였다. ICG 치환 수율은 하기 [식 1]을 사용하여 계산되었다.

[0066] [식 1]

[0067] $ICG \text{ 치환 수율}(\%) = C_0/C_T \times 100$

[0068] (C₀와 C_T는 각각 정량화된 ICG와 이론적인 ICG의 농도를 나타냄)

[0070] 1.5 에라스틴이 탑재된 CSA-psICG 나노입자(ECIN)의 제조 및 특성 규명

[0071] 도 1B에 ECIN의 제조과정을 모식화하여 나타내었다. 에라스틴이 탑재된 CSA-psICG 나노입자(erastin-loaded CSA-psICG nanoparticles, ECIN)은 다양한 CSA 대 psICG 중량비로 제조되었다. 에라스틴(1 mg)은 DMSO(500 μL)에 녹이고 CSA-psICG(10 mg)는 탈이온 증류수(DDW; 300 μL)에 녹인 후 둘을 혼합하고 1분간 볼텍싱한 후 -80 °C에서 동결건조하였다. 생성된 약물 및 고분자 복합 필름에 DDW(1 mL)를 첨가하고 얼음 속에서 1.5분간 진폭 20%, 펄스 주기 2초 온, 3초 오프로 초음파 처리(VC-750; Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)하여 재구성했다. 용액을 주사기 필터(pore size: 0.2 μm; Minisart RC 15; Sartorius, Göttingen, Germany)를 사용하여 여과하여 로드되지 않은 침전된 에라스틴을 제거했다. 에라스틴 용액 대신 DMSO만을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 대조군(Blank) CSA-psICG 나노입자(CIN)를 제조하였다.

[0072] ICG, psICG, CIN 및 ECIN의 흡광도 및 방출 스펙트럼은 각각 500-1000 nm의 파장에서 UV-Vis 분광 광도계(Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc.)와 600-1100 nm의 파장에서 시간 상관 단일 광자 계수를 갖는 고감도 분광 광도계(Fluorolog3; HORIBA, Ltd., Kyoto, Japan)를 사용하여 얻었다.

[0073] ECIN의 평균 직경, 다분산 지수 및 제타 전위 값은 Zetasizer Ultra(Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK)를 사용하여 동적 광 산란(DLS) 및 레이저 도플러 전기 영동 기술로 각각 평가되었다. CIN과 ECIN의 형태는 투

과전자현미경(TEM; Tecnai G2 F30; FEI company, Hillsboro, OR, USA)을 사용하여 관찰되었다. 에라스틴의 포획 효율(entrapment efficiency, EE) 및 약물 함량(drug content, DC)은 역상 컬럼(Kinetex C18, 4.6×100 mm, $2.6 \mu\text{m}$; Phenomenex, Torrance, CA, USA) 및 가드 컬럼(C18, 4×2.0 mm; Phenomenex)이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템(Agilent 1260 infinity; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 측정되었다. ECIN 샘플은 ACN(희석배수: 50)으로 희석하고, 이동상은 ACN과 DDW(70:30, v/v)로 구성되었다. 유속과 주입량은 각각 $1.0\text{mL}/\text{min}$ 과 $20 \mu\text{L}$ 로 설정되었으며, 에라스틴의 컬럼 온도와 검출 파장은 각각 25°C 와 230 nm 로 설정되었다. 머무름 시간과 총 실행 시간은 각각 1.9분과 4.0분이었다. ECIN의 EE와 DC는 하기 [식 2] 및 [식 3]로 계산되었다.

[식 2]

$$\text{EE}(\%) = (\text{ECIN 내 포획된 에라스틴 질량} / \text{에라스틴의 처음 질량}) \times 100$$

[식 3]

$$\text{DC}(\%) = (\text{ECIN 내 에라스틴 질량} / \text{에라스틴 담지된 ECIN의 질량}) \times 100$$

ECIN의 콜로이드 안정성 및 시험관 내 약물 방출 확인

ECIN의 콜로이드 안정성은 20%(v/v) FBS 및 FBS를 함유한 인산염 완충 식염수(PBS, WELGENE Inc., 대한민국 경산)에서 평가되었다. 먼저, 인산을 사용하여 각각 pH 7.4, 6.8 및 5.5로 조정한 용액을 제조하였다. ECIN을 흔들리는 수조(37°C , 50rpm)에서 유지하고 Zetasizer Ultra(Malvern Instruments Ltd.)를 사용하여 유지 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 및 48시간에 각각의 평균 직경을 모니터링했다.

ECIN로부터의 에라스틴 방출 패턴은 투석 방법을 사용하여 조사했다. ECIN(에라스틴 $0.5\text{ mg}/\text{mL}$, $150 \mu\text{L}$)을 미니-GeBAflex 튜브(MWCO: 6-8 kDa, Gene Bio-Application Ltd., Yavne, Israel)에 넣고 방출 매체(2 mL , Newborn Calf Serum, NBCS; pH 6.7 및 7.4)에 담가 진탕 수조(37°C , 50rpm)를 사용하여 인큐베이션하였다. ECIN이 채워진 튜브를 배양 1, 2, 4, 8, 12, 25, 49, 72, 96 및 120시간에 새로운 방출 매체(2 mL)로 채워진 새 용기로 옮기고 방출된 에라스틴의 양을 방출 매질의 약물 농도를 분석하여 결정하였다. 수집된 배지의 분취($20 \mu\text{L}$)를 내부 표준(IS; 카르바마제핀, $100\text{ ng}/\text{mL}$)이 포함된 ACN($380 \mu\text{L}$)과 5분 동안 볼텍스 혼합하여 탈단백질화했다. 그런 다음 혼합물을 $16,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하고 생성된 상층액(분석 샘플)을 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석법(LC-MS/MS) 시스템을 사용하여 분석했습니다. 크로마토그래피 분리는 역상 컬럼(Kinetex C18, $100 \times 4.6\text{ mm}$, $2.6 \mu\text{m}$; Phenomenex) 및 가드 컬럼(C18, $4 \times 2.0\text{ mm}$; Phenomenex)이 장착된 Shimadzu Nexera XR Modular HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하여 수행되었으며, 용출은 $0.3\text{ mL}/\text{min}$ 의 유속으로 등용매 조건에서 수행되었다. 이동상은 ACN(0.1% 포름산, v/v)과 DDW(0.1% 포름산, v/v)(70:30, v/v)로 구성되었다. 주입량과 정량 하한은 각각 $5 \mu\text{L}$ 및 $200\text{ ng}/\text{mL}$ 이었으며, 이온화된 분자는 API 3200(SCIEX, Framingham, MA, USA)을 사용하여 검출되었다. 이온화 모드, 이온 스프레이 온도 및 이온 스프레이 전압은 각각 전기분무 이온화 포지티브 모드, 600°C 및 5500 V 였다. 다중 반응 모니터링 모드에서 최적화된 매개변수는 하기 표 1에 요약하였다. 누적 방출(F ; %) 대 시간(t)은 F_{max} , 히구치(Higuchi), 코스마이어-페파스(Korsmeyer-Peppas), 히슨-크로웰(Hixson-Crowell) 및 페파스-살린(Peppas-Sahlin) 모델을 사용한 0차 및 1차 모델을 사용하여 플롯 및 보정하였다. 이 중 수학적 모델 방정식은 하기 식과 같다.

[식 4]

$$0\text{차 모델} : F = k_0 t$$

[식 5]

$$1\text{차 모델} : F = F_{\text{max}}(1 - e^{-k_1 t})$$

[식 6]

$$\text{히구치 모델} : F = k_H t^{1/2}$$

[식 7]

[0089] 코스마이어-페파스 모델 : $F = k_{KP} t^{k_{KP}}$

[0090] [식 8]

[0091] 허슨-크로웰 모델 : $F = 100 \times [1 - (k_{HC} t)^3]$

[0092] [식 9]

[0093] 페파스-살린 모델 : $F = k_1 t^{k_1} + k_2 t^{2k_2}$

[0094] (여기서 $F_{\max}$ 는 최대 누적 방출이고 k_0 , k , k_H , k_{KP} , k_{HC} , k_1 및 k_2 는 해당 모델의 방출 속도 상수임)

[0096] 시험관 내 광열 효과

[0097] ICG, psICG, CIN 및 ECIN의 광열 거동은 각 샘플(1mL; ICG 또는 psICG의 경우 20 μ g/mL)의 온도 변화를 감지하여 평가되었다. 샘플을 근적외선(NIR) 레이저(808nm, 0.7W/cm²)에서 5분 동안 조사했으며, 실시간 온도는 적외선 열화상 카메라(FLIR-E6390; Teledyne FLIR LLC., Wilsonville, OR, USA)를 사용하여 10초마다 측정하였다.

[0099] 시험관 내 일중항 산소 생성

[0100] ICG, psICG, CIN 및 ECIN에 의한 일중항 산소 생성은 SOSG(Singlet Oxygen Sensor Green) 시약(Thermo Fisher Scientific Inc.)을 사용하여 정량하였다. 샘플을 SOSG 용액으로 희석하여 ICG 또는 psICG로서 최종 농도가 20 μ g/mL가 되도록 했다. 샘플을 6웰 플레이트에 분배하고 NIR 레이저(808 nm; 0.7 W/cm²)를 조사하면서, 조사 중 일중항 산소 측정을 위해 조사된 샘플 100 μ L를 채취했다. SOSG 엔도퍼옥사이드의 형광 신호 강도는 마이크로 플레이트 판독기(Infinite 200 Pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland)를 사용하여 510 nm에서의 여기 및 560 nm에서의 방출로 측정하였다.

[0102] 세포 배양

[0103] 인간 간세포암종(HCC) 세포주인 SK-HEP-1 및 Huh-7은 한국세포주은행(대한민국, 서울)으로부터 입수하였다. SK-HEP-1 및 Huh-7 세포를 10% 태아 소 혈청(FBS, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM; WELGENE Inc., 경산, 대한민국 또는 Hyclone, Logan, UT, USA)에서 37° C, 5% CO₂의 가습된 분위기로 배양했다.

[0105] 웨스턴 블롯 분석

[0106] SK-HEP-1 및 Huh-7 세포를 cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail(Indianapolis, IN, USA) 및 포스파타제 억제제(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 포함하는 RIPA 완충액에서 용해시켰다. 용해물을 16,200g, 4° C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 얻었다. 용해물의 단백질 농도는 Pro-Measure(iNtRON Biotechnology, 서울, 한국)를 사용하여 측정하였고, 용해물을 SDS(sodium dodecylsulfate) 시료 완충액에 희석하여 웨스턴 블롯 분석을 실시했다. 간략하게 설명하면, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 사용하여 단백질을 분리하고 니트로셀룰로오스 막(GE Healthcare, Madison, WI, USA)으로 옮긴 후, 막을 5% 탈지유로 1시간 동안 차단한 다음, 4° C에서 1차 항체와 함께 밤새 배양했다. 이후, 호스래디쉬 퍼옥시다제 결합 IgG 항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 2시간 배양한 후, Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(Merck Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 면역 복합체를 검출했다.

[0108] 시험관 내 세포 흡수 연구

[0109] psICG, CIN 및 ECIN의 세포내 축적은 유세포 분석을 사용하여 정량화하였다. SK-HEP-1 세포를 6웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰 로 시딩하고 24시간 동안 배양했다. 이후, psICG, CIN 및 ECIN을 psICG 농도 $10 \mu\text{g/mL}$ 가 되도록 1시간 또는 4시간 동안 처리했다. 각각 처리한 세포를 PBS로 3회 부드럽게 행구고 트립신 처리한 후 $200 \times \text{g}$ 에서 5분간 원심분리했다. 이후, 세포 펠릿을 2% FBS가 포함된 PBS에 재현탁시키고 psICG의 형광 강도를 유세포 분석기(NovoCyte, Agilent Technologies Inc.)로 측정했다. 형광 프로브인 1,1'-디옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸인도카르보시아닌 과염소산염(DiI, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 CIN의 세포 흡수를 평가했다. DiI-로딩된 CSA-psICG 나노입자(DCIN)는 상기 ECIN 제조에 사용된 방법에 따라 준비하였으며, 에라스틴 대신 DiI가 CIN에 로드되었다. 정량화를 위해 DMSO에 희석된 DCIN의 DiI 함량을 측정하여 DCIN의 농도를 결정했다. 이때 최대 흡광도 파장 559 nm 에서의 흡광도는 UV-Vis 분광 광도계(Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 측정되었다. SK-HEP-1 또는 Huh-7 세포(5×10^4 세포/글래스)를 18 mm 직경의 커버 유리에 뿌리고 DCIN(DiI로서 $3 \mu\text{g/mL}$)과 함께 1시간 동안 배양했다. 이후, 세포를 면역형광 염색하였다. 세포를 실온에서 15분 동안 4% 파라포름알데히드 용액에 고정시키고 0.1% TritonX-100을 사용하여 투과화시켰다. 고정된 세포를 10% 말 혈청으로 1시간 동안 블로킹하고 CD44 1차 항체와 함께 밤새 4°C 에서 배양했다. 그 다음, PBS로 3회 세척한 후 세포를 Alexa Fluor-488 접합 2차 항체(Thermo Fisher Scientific Inc.)와 함께 2시간 동안 배양했다. 이후, 세포를 4',6-디아미노-2-페닐인돌(DAPI)로 염색하고 ProLong™ Gold Antifade Mountant(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 슬라이드에 장착시켰다. 형광은 Leica TCS SP8 MP(Leica, Wetzlar, Germany) 공초점 현미경을 사용하여 검출하였다.

[0111] 시험 관내 세포 독성 분석

[0112] SK-HEP-1 세포(1.0×10^4 개 세포/웰)를 96웰 플레이트에 시딩하고 24시간 동안 배양했다. 세포 독성 분석을 위해 세포를 psICG, 유리 에라스틴 또는 ECIN을 다양한 농도(psICG로서 0.12, 0.24, 0.60, 1.2, 2.4, 6.0, 12, $24 \mu\text{g/mL}$ 및 에라스틴으로서 0.10, 0.20, 0.50, $1.0 \mu\text{g/mL}$)로 1시간 동안 처리했다. 레이저 처리된 그룹에 NIR 레이저(808 nm ; 0.7 W/cm^2)를 5분간 조사한 후 23시간 동안 추가로 배양하였다. 다른 그룹은 레이저 처리 없이 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배양 배지를 $10 \mu\text{L}$ 의 CCK-8을 함유한 $100 \mu\text{L}$ 의 새로운 배양 배지로 교체하고, 세포를 추가로 3시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 UV-Vis 분광 광도계(Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[0114] IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System을 사용한 세포 증식 분석

[0115] SK-HEP-1 및 Huh-7의 세포 증식은 세포 컨플루언시(cell confluency)의 위상 기반 정량화로 모니터링하였다. SK-HEP-1 세포와 Huh-7 세포를 각각 96웰 플레이트에 2×10^3 세포/웰 및 3×10^3 세포/웰 로 접종하였다. 이후, 밤새 인큐베이션한 후, 세포를 10% FBS 존재 하에 유리 에라스틴 또는 ECIN으로 처리하고, IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System(Sartorius, Ann Arbor, MI, 미국).

[0117] C11 BODIPY™ 581/591 분석

[0118] SK-HEP-1 또는 Huh-7 세포에서 에라스틴 유도 페롭토시스는 지질 과산화 센서인 C11 BODIPY™ 581/591 염료(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 평가하였다. SK-HEP-1 세포(2×10^4 세포/웰) 또는 Huh-7 세포(4×10^4 세포/웰)를 24웰 플레이트에 시딩하고 10% FBS가 보충된 페놀이 없는 DMEM(Hyclone, Logan, UT, USA)에서 에라스틴 또는 ECIN(1 또는 $3 \mu\text{g/mL}$)을 처리한 후, 녹색 형광의 통합 강도와 세포의 함량을 Incucyte™ Live-Cell Imaging System을 사용하여 모니터링했다. 페로토시스의 정도는 세포 함류에 의해 표준화된 통합 형광 강도를 사용하여 비교하였다.

[0120] 세포주기 정지 분석

[0121] SK-HEP-1 세포 및 Huh-7 세포를 6웰 플레이트(3×10^5 개 세포/웰)에 시딩하고 에라스틴 또는 ECIN으로 처리했다. 12시간 배양 후, 차가운 PBS를 사용하여 세포를 수확하고, -20°C 에서 70% 에탄올에 24시간 동안 고정하였다. 그 후, 세포를 0.1% RNase A 용액(Invitrogen, CA, USA), 0.1% 트리톤-X100(Sigma-Aldrich, MO, USA) 및 0.2% 프로피듐 아이오다이드 용액(Sigma-Aldrich, MO, USA)에서 30분 동안 암실 배양하였다. 세포주기는 유세포 분석기(Novocyte, Agilent Technologies Inc.)를 사용하여 DNA 함량을 분석으로 결정하였다.

[0123] 세포 내 ROS 검출

[0124] 세포 내 활성산소종(ROS) 수준은 DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS Assay Kit(Abcam, Cambridge, UK)를 사용하여 측정하였다. SK-HEP-1 세포(1.0×10^5 개 세포/웰)를 4웰 배양 슬라이드에 시딩하고 밤새 배양했다. 이후, 배양액을 제거하고 디클로로디하이드로플루오레스세인 디아세테이트(dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFDA) 용액($20 \mu\text{M}$)을 세포에 첨가하고 차광 조건에서 30분간 배양하였다. 그 다음, 세포를 세척하고, 비히클이나 유리 CSA(5 mg/mL)와 1시간 사전배양 또는 공배양 후, psICG, CIN 또는 ECIN(psICG로서 $10 \mu\text{g/mL}$, $500 \mu\text{L}$)으로 4시간 동안 처리했다. 이후, NIR 레이저(808 nm ; 0.7 W/cm^2)를 5분간 조사한 다음, 세포를 4%(v/v) 파라포름알데히드로 5분간 고정시켰다. 세포를 DAPI(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)가 포함된 마운팅 배지와 함께 마운팅하고 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM; LSM 880 with Airyscan; Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 DAPI와 DCF의 형광 신호를 관찰했다. 정량 실험을 위해 세포를 1.0×10^4 세포/웰에 시딩하고 DCFDA 용액과 함께 45분간 배양한 후 psICG, CIN 및 ECIN(psICG로서 $1 \mu\text{g/mL}$)으로 처리했다. 세포 내 ROS 생성은 485 nm 에서 여기되고 540 nm 에서 방출되는 마이크로플레이트 판독기(Infinite 200 Pro, Tecan Group Ltd.)를 사용하여 정량하였다.

[0126] 이종이식 모델

[0127] 4주령 BALB/c 누드마우스는 나라바이오텍(대한민국 서울) 또는 오리엔트바이오(대한민국 시흥)에서 구입하여 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $40 \pm 5\%$ 의 조명조절실에서 사육하였다. 마우스에게 음식과 물을 자유롭게 제공했으며, 사용 전 적어도 1 주일 동안 상기 조건에서 적응시켰다. 연구 프로토콜은 충남대학교 실험동물의 윤리적 사용위원회(승인번호: 202103A-CNU-085) 또는 서울대학교 동물기관사용위원회(승인번호: SNU-210625-4)의 승인을 받았다. 이소성 이종 이식 모델을 확립하기 위해 SK-HEP-1 세포(1.0×10^7 개 세포)를 마우스의 오른쪽 옆구리 부위에 피하 접종했습니다. 종양 부피(V, mm^3)는 하기 [식 10]으로 측정하였다.

[0128] [식 10]

$$[0129] V = V_L \times V_S^2 \times 0.5$$

[0130] (여기서 V_L 과 V_S 는 각각 종양의 가장 긴 직경과 가장 짧은 직경을 나타냄. 종양 부피는 캘리퍼를 사용하여 이를 마다 측정하여 종양 성장 곡선을 그림)

[0132] 생체 내 실시간 및 생체 외 분포확인

[0133] psICG 및 ECIN의 생체 내 분포는 SK-HEP-1 이종이식 마우스에서 정맥 주사 후 0, 1, 2, 4, 8, 16 및 24시간에 평가되었다. 종양 부피가 약 150 mm^3 에 도달하면 마우스를 무작위로 두 그룹($n = 3$)으로 나누고 psICG 또는 ECIN(psICG로서 5 mg/kg)을 투여했다. 전신 형광 영상과 관심 부위의 형광 강도는 CleVue™ 소프트웨어(Viewworks)가 탑재된 VISQUE® InVivo Smart(Viewworks, Anyang, Republic of Korea)를 이용하여 마취 하에 측정하였다. 생체 외 분석을 위해, 주사 24시간 후에 마우스를 희생시키고, 간, 비장, 신장, 심장, 폐 및 종양을 적출하고 VISQUE® InVivo Smart(Viewworks)를 사용하여 분석했다.

[0135] 약동학 연구

[0136] 유리 에라스틴 및 ECIN 에라스틴의 혈장 약동학적 특성은 수컷 BALB/c 마우스(9주령, 20.2~24.7g)에서 평가되었다. 마우스를 유리 에라스틴(경구투여, po, 10 mg/kg), 유리 에라스틴(정맥 내 주사, IV, 5 mg/kg) 및 ECIN(IV, 5 mg/kg) 처리를 위하여 무작위로 세 그룹(n = 3)으로 나누었다. 유리 에라스틴은 비히클(DMSO/PEG400/tween80/DDW [5:25:2.5:67.5, v/v/v/v] 혼합물)에 용해시켰다. 상기 조건으로 각각 투여 후 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 및 240분에 혈액샘플을 채취하였고, 분석용 내부기준으로 카바마제핀을 함유한 메탄올을 혈액샘플 20μL에 대해 4배 부피로 혼합하여 단백질 침전을 실시하였다. 이를 원심분리 후, 상등액을 양성 다중 반응 모니터링(MRM) 모드에서 4000 QTRAP LC-MS/MS 시스템으로 분석했다. 분석 데이터는 Analyst TM1.6.3(Applied Biosystems, Concord, Canada)을 사용하여 처리하였다. 최대 관찰 농도 시간(T_{max}), T_{max} 에서의 최대 관찰농도(C_{max}), 0~240분까지의 혈장 농도 대 시간 곡선 아래 면적(AUC_{last}), 0~무한대까지의 혈장 농도 대 시간 곡선 아래 면적(AUC_{inf}), 시간 평균 전신 청소율(CL), 항정상태에서의 겔보기 분포 용적(V_{ss}), 말기 단계 기반 분포 용적(V_z), 말기 반감기($t_{1/2}$), 무한대로 외삽된 평균 체류 시간(MRT_{inf}) 및 생체 이용률(F)은 KineticaTM 4.4.1(Thermo Fisher Scientific Inc.)을 사용하여 혈장 농도-시간 프로파일의 비구획 분석을 통해 얻었다.

[0138] 에라스틴과 GSH의 정량 분석

[0139] 간, 비장, 신장, 심장, 폐 및 종양 조직을 2부피의 HPLC 등급 얼음물에서 균질화하고 4 부피의 아세토니트릴을 균질액에 첨가했다. 이후, 샘플을 $10,000 \times g$, 4°C에서 10분간 원심분리하고 상등액을 4배 부피의 80% 아세토니트릴로 희석하였다. 정량분석은 LC-MS/MS를 이용하여 수행하였다. LC-MS/MS 시스템은 병렬 LC-20ADXR 펌프, 자동 샘플러 및 컬럼 오븐(Shimadzu)을 갖춘 Prominence™ UFLC 시스템과 Turbo V IonSpray source (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 갖춘 an API 4000 LC-MS/MS 시스템으로 구성되었다. 에라스틴은 C18 ACQUITY UPLC® HSS T3(2.1mm $\times$ 100mm, 1.8 μ m)에서 분리되었다. 이동상은 0.25 mL/min의 유속으로 용매 A(0.1% 포름산을 함유한 탈이온수) 및 용매 B(0.1% 포름산을 함유한 아세토니트릴)의 구배를 따랐다. 질량 분석기는 양이온 전기분무 모드의 MRM에서 작동되었다. 에라스틴의 경우 m/z 547 $\rightarrow$ 267, 내부 표준 카바마제핀의 경우 m/z 237 $\rightarrow$ 194에서 MRM 모드로 피크가 검출되었다. 에라스틴의 농도는 내부 표준을 사용하여 표준 검량선에 의해 계산되었다.

[0140] 종양 균질액의 총 GSH 및 시스테인 농도는 형광 검출기(RF-10AXL, Shimadzu)가 장착된 HPLC(Shimadzu 20AD-XR; Shimadzu) 시스템으로 암모늄-7-플루오로벤조-2-옥사-1,3-디아졸-4-술폰산 유도체화 방법을 사용하여 385 nm에서 여기하고 515 nm에서 방출하여 측정하였다.

[0142] 생체 내 광열 효과 분석

[0143] 광열 효과는 SK-HEP-1 이종이식 마우스에서 평가되었다. 종양 부피가 약 130 mm³에 도달하면 마우스를 무작위로 두 그룹(n = 5)으로 나누고 정맥 주사를 통해 생리 식염수(NS) 또는 ECIN(에라스틴으로서 5mg/kg)을 투여했다. 주사 1시간 후, 마우스의 종양 부위에 근적외선(NIR) 레이저(808nm, 0.7W/cm²)를 5분간 국소적으로 조사했다. 적외선 카메라 영상은 0, 0.5, 1, 3, 5분에 촬영하였고, 종양 부위의 실시간 온도를 적외선 열화상 카메라(FLIR-E6390; Teledyne FLIR LLC.)를 이용하여 30초마다 측정하였다.

[0145] 생체 내 항종양 효과

[0146] 생체 내 화학-광열 및 광역학 요법은 SK-HEP-1 이종이식 마우스에서 수행되었다. 종양 부피가 약 100 mm³에 도달하면 마우스를 무작위로 4개 그룹(n = 7 또는 8)으로 나누었다; 비히클(대조군), 유리 에라스틴(5mg/kg), 레이저 그룹이 있거나 없는 ECIN(에라스틴으로서 5mg/kg). 마우스에게 비히클, 유리 에라스틴 또는 ECIN을 이틀마다 13회 정맥 주사했다. 레이저 그룹을 사용한 ECIN의 경우 4일, 6일, 12일, 14일, 16일에 정맥주사하고, 주입 후 1시간 후에 NIR 레이저(808nm; 0.7W/cm²)를 5분 동안 종양에 조사했다. 레이저 조사 동안, 마우스를 이소플루란으로 마취시켰다. 반복 투여 후 ECIN의 생체분포를 관찰하기 위해, 해당일 투여 직전에 VISQUE® InVivo Smart를 사용하여 6일 후부터 이틀 간격으로 관심 부위의 형광 강도를 측정했다. 25일째에, 마우스를 희생시키고, 종양을 적출하여 무게를 측정하였으며, 간, 비장, 신장, 심장 및 폐를 포함한 주요 장기를 수득하여 형광

강도를 결정했다.

[0148] 통계 분석

[0149] 본 발명의 모든 실험은 최소 3회 이상 수행되었다. 통계적으로 유의미한 차이는 양측 t -검정 또는 일원 분산 분석(ANOVA)과 Tukey의 다중 비교 테스트를 사용하여 분석되었다. 데이터는 $p < 0.05$ 로 설정된 유의성을 갖는 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)로 표시되었다. 각 실험에 대한 p 값은 각 도면 범례에 표시하였다.

[0151] <실험예 1 CSA-psICG의 준비 및 특성화>

[0152] CSA는 리간드로서 CD44 수용체와 상호작용하며 CD44를 과발현하는 종양 세포를 선택적으로 표적으로 삼아 약물 전달 수단으로 사용될 수 있다. 그러나 효과적인 약물 전달에 필요한 특징인 소수성 기공을 생성할 수 없기 때문에 종래에는 CSA의 약물 전달 시스템으로서의 사용이 제한적이었다. 본 발명자는 이 문제를 해결하기 위해 FDA 승인 이미징 에이전트 ICG를 사용하여 타겟 전달 모델을 개발하였다.

[0153] ICG와 CSA의 결합은 소수성 공극의 생성을 촉진하여 나노입자의 형성을 유도하고, ICG를 단독으로 사용하거나 단순히 캡슐화하여 전달하는 경우 발생하는 간접적인 추적 방법에 의존하기보다는 제제 자체의 직접적인 추적을 가능하게 한다. 그러나, ICG를 직접 사용하는 경우, 에라스틴 담지 및 나노입자의 형성에 어려움이 있으며, 이에 직접적인 접합을 달성하기 위해 ICG의 설폰 사슬 중 하나를 카르복실 사슬로 전환한 다음 CSA의 수산기와 에스테르화하는 방법을 개발하였다.

[0154] 먼저, 입체 장애를 최소화하기 위해 카르복실 사슬의 탄소 원자 수를 6으로 고정했다. 또한, 합성 효율성을 높이기 위해 스위스 ADME 프로그램과의 *in silico* 비교를 사용하여 설폰네이트 사슬의 길이를 최적화했다. 그리고 합성을 위한 최상의 옵션을 결정하기 위해 ESOL, Ali 및 SILICOS-IT 모델을 사용하여 ICG의 예상 용해도를 프로필-설폰네이트 사슬(psICG) 및 부틸-설폰네이트 사슬(bsICG)(도 2A)의 용해도와 비교했다. 도 2B에서 보는 바와 같이, psICG의 예상 용해도는 모든 모델에서 bsICG의 용해도보다 높았으며 실제 ICG의 용해도와 유사했다. 따라서 CSA와 결합에 psICG를 선택하였다.

[0155] 상기 질량 분석으로 측정한 최종 생성물의 질량은 716.3으로 psICG의 질량과 정확히 동일했다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 을 사용하여 추가로 psICG가 합성되었음을 확인하였다. 이때 psICG의 특징적인 피크(1.9ppm의 $-\text{CH}_3$; 6.2~8.2ppm의 $-\text{CH}$)가 확인되었다.

[0156] CSA와 psICG의 결합 반응 효율을 최적화하기 위하여 CSA와 psICG는 DCC와 DMAP를 사용한 스테글리치 에스테르화를 통해 CSA와 psICG의 다양한 중량비(10:1, 10:2, 10:3 및 10:4)로 결합시켰다. CSA와 psICG 사이의 결합은 $^1\text{H-NMR}$ 에 의해 확인하였으며, CSA($-\text{CH}_3$ 의 1.8ppm)와 psICG의 특징적인 피크로 확인하였다. ICG 치환 수율은 UV-Vis 분광법을 사용하여 계산하여 도 3A에 나타내었다. 여기서 각 샘플은 793 nm에서 최대 흡수 파장(λ_{max})을 나타냈다. 도 3A에서 보는 바와 같이, 10:3의 중량비(CSA:psICG)의 경우, $71.97 \pm 1.09\%$ 의 최고 수율을 나타내었다.

[0158] <실험예 2. ECIN 준비 및 특성 분석>

[0159] CD44가 세포막에서 시스템 xc^- 와 상호작용한다는 이전 보고서를 바탕으로 효과적인 종양 억제제를 촉진하기 위해 시스템 xc^- 억제제인 에라스틴을 CSA-psICG 전달 시스템에 로드하여 ECIN을 제조하였다. 먼저, CSA-psICG와 에라스틴을 DMSO와 DDW 공용매에 서로 다른 중량비로 혼합한 후 동결건조하여 균질한 고체 분산액을 생성하였다. 이어서 동결건조된 생성물을 초음파 처리에 의해 DDW에 분산시키고, 캡슐화되지 않은 에라스틴을 여과에 의해 제거하여 균질한 ECIN 현탁액을 얻었다. 대조군으로는 에라스틴이 포함된 CSA-psICG와 동일한 방법으로 에라스틴을 첨가하지 CIN을 제조하였다.

[0160] 도 3B는 에라스틴@CSA 및 다양한 중량비로 결합된 CSA-psICG로 제조한 ECIN의 외관을 보여주는 사진이다. 도 3B에서 보는 바와 같이, 여과 전 CSA(erastin@CSA)와 혼합된 에라스틴과 달리, CSA-psICG에 로드된 에라스틴은 투명하게 나타났으며, 이는 CSA에 대한 ICG 접합이 에라스틴의 용해도를 극적으로 증가시켰음을 나타낸다. 이 결

과는 CSA-psICG가 소수성 기공을 형성하여 에라스틴을 효과적으로 전달할 수 있음을 시사한다. 대조적으로, 에라스틴의 대부분은 erastin@CSA에 용해되지 않았고 여과에 의해 제거되었으며, 이는 HPLC로 측정된 $5.91 \pm 0.03\%$ 의 낮은 캡슐화 효율로도 확인되었다. 그러나 ECIN 솔루션의 경우, 80%가 넘는 캡슐화 효율을 보였다. 하기 표 1에 Erastin@CSA 및 CSA와 psICG의 다양한 중량비로 제조된 ECIN의 평균 직경, 다분산성, 제타전위, 캡슐화 효율 및 약물 함량을 나타내었다. 표 1에서 보는 바와 같이, ECIN은 CSA-psICG와 에라스틴의 합성 질량비가 10:3일 때 $92.98 \pm 0.79\%$ 의 가장 높은 캡슐화 효율을 보였다.

표 1

조성	평균직경 (nm)	다분산성 지수	제타 전위 (mV)	캡슐화 효율 (%) ^a	약물 함량 (%) ^b
Erastin@CSA	432.7 ± 9.4	0.11 ± 0.02	-47.28 ± 1.52	5.91 ± 0.03	0.54 ± 0.00
ECINs (10:1)	209.9 ± 3.3	0.23 ± 0.01	-32.63 ± 4.32	87.61 ± 1.06	7.96 ± 0.10
ECINs (10:2)	265.5 ± 6.7	0.29 ± 0.01	-25.14 ± 3.12	87.52 ± 1.61	7.96 ± 0.15
ECINs (10:3)	186.7 ± 1.1	0.19 ± 0.02	-39.79 ± 0.44	92.98 ± 0.79	8.45 ± 0.07
ECINs (10:4)	236.0 ± 0.5	0.22 ± 0.01	-38.04 ± 1.78	83.79 ± 0.88	7.62 ± 0.08

데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차(n = 3)로 표시됨
a 캡슐화 효율(%) = (ECIN 내 에라스틴의 실제 양) / (ECIN 내 에라스틴의 이론적인 양) $\times$ 100.
b 약물 함량(%) = (ECIN의 에라스틴 양) / (ECIN의 총량) $\times$ 100.

도 3C에 erastin@CSA 및 ECIN의 크기 분포를 나타내었다. 도 3C에서 보는 바와 같이, 각 제형의 입자 크기 분포는 단봉 분포를 보여주었으며, 이는 자기 조립이 성공적으로 이루어졌음을 나타낸다. CIN의 물리화학적 특성을 조사한 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

조성비 (중량비율)	평균 직경 (nm)	다분산성 지수
CSA	370.0 ± 9.2	0.15 ± 0.01
CINs (10:1)	272.3 ± 2.9	0.19 ± 0.02
CINs (10:2)	325.9 ± 3.3	0.30 ± 0.02
CINs (10:3)	302.5 ± 3.1	0.32 ± 0.02
CINs (10:4)	226.8 ± 2.7	0.26 ± 0.02

상기 표 2에서 보는 바와 같이, CIN의 경우, ICG의 결합은 370.0 ± 9.2 nm의 CSA 입자 크기와 220 ~ 330 nm 범위의 CIN에서 알 수 있듯이 더 작은 입자의 형성에 기여했으며, 표 1에서 보는 바와 같이, 입자 내 에라스틴의 캡슐화로 인해 180~270 nm 범위의 더 작은 입자 크기가 생성되었다. 또한, 테스트된 ECIN의 다양한 중량 비율 중에서 10:3은 186.7 ± 1.1 nm의 가장 작은 입자 크기와 가장 높은 ICG 치환 수율, 가장 큰 에라스틴 캡슐화 효율 및 좁은 입자 크기 분포(다분산 지수 < 0.3)를 나타내었다. 따라서, 정맥 주사에 대한 적합성을 나타내는 이러한 결과를 바탕으로 10:3 제제를 선택하여 이후 실험에 사용하였다.

도 4에는 TEM 관찰을 통한 CIN 및 ECIN의 형태를 보여주는 사진이다. 도 4A 및 도 4B에서 보는 바와 같이, TEM 이미지는 DLS로 측정한 입자 크기와 일치하는 ECIN 및 CIN 제제의 구형 입자 모양을 확인하였다.

도 5A 및 도 5B에는 ICG, psICG, CIN 및 ECIN의 흡수 및 형광 스펙트럼을 나타내었다. 시아닌 구조로 인해 ICG, psICG, CIN 및 ECIN은 $\lambda_{\max}$ 가 793nm이고 최대 방출 파장(λ_{em})이 846nm인 유사한 흡수 및 방출 스펙트럼을 나타내었다. CSA가 psICG에 결합한 후 $\lambda_{\max}$ 또는 λ_{em} 의 유의한 저색소성 또는 수변색성 이동이 없다는 것은 psICG의 발색단이 공유 접합에 의해 영향을 받지 않았음을 의미한다. 따라서 psICG가 CSA에 결합되기 전후에 $n-\pi^*$ 및 $\pi-\pi^*$ 전이가 변하지 않았음을 유추할 수 있다.

콜로이드 안정성은 PBS 또는 20%(v/v) FBS를 포함하는 PBS에서 다양한 pH 값(pH 5.5, 6.8 및 7.4)으로 48시간 동안 처리하고, 시간 경과에 따른 ECIN의 입자 크기를 모니터링하여 평가하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 보는 바와 같이, 어떠한 pH 에서도 ECIN은 침전이나 응집을 나타내지 않았다. 특히, FBS에서 ECIN의 평균 직경은 300 nm 미만으로 유지되었으며, 이는 정맥 주사 후 혈청 성분의 자기 응집 또는 비특이적 흡착이 무시할 수 있음을 나타낸다. 이러한 결과는 표 1의 ECIN(10:3)의 제타 전위 값이 -39.79 ± 0.44 mV로, 입자의

높은 콜로이드 안정성을 나타내는 것과 일치한다.

[0168] ECIN의 Erastin 방출은 생리학적으로 관련된 설정에서 평가하도 도 7에 나타내었다. 방출 매체의 pH 수준은 각각 중앙 미세환경(TME)의 산성 조건과 혈장 조건에 해당하는 pH 6.7 또는 7.4로 조정하였다. 도 7에서 보는 바와 같이, 두 pH 조건 모두에서 ECIN은 지속적인 약물 방출 패턴을 나타냈으며, 120시간에 ECIN에서 약물의 누적 방출은 pH 6.7에서 $89.6 \pm 0.3\%$, pH 7.4에서 $86.5 \pm 2.1\%$ 였다. 이는 ECIN의 에라스틴이 정상 조직보다 TME에 더 많이 축적된다는 것을 의미한다.

[0169] 약물 방출 패턴을 추가로 조사하기 위해 각 방출 프로파일에 맞게 6개의 서로 다른 방출 동역학 모델을 사용하여 그 결과를 표 3에 나타내었다. pH 6.7에서 에라스틴 방출 프로파일에 가장 잘 맞는 방출 동역학 모델은 1차 모델이었으며, 이는 TME의 ECIN이 단순 해리 모델을 사용하여 일정한 속도로 에라스틴을 방출한다는 것을 시사한다. 반면, pH 7.4에서의 에라스틴 방출 프로파일은 페파스-살린 모델과 일치할 때 가장 높은 상관 계수(R²)를 나타냈는데, 이는 피키언(Fickian) 확산과 사례 II 이완이 모두 약물 방출을 조절한다는 것을 나타낸다. 이 두 모델은 각각 ECIN으로부터 에라스틴의 확산과 에라스틴 제거로 인한 나노입자의 동시 분해를 나타낸다.

표 3

Models	0차		F _{max} 를 사용한 1차			히구치		코스마이어-페파스			힉슨-크로웰		페파스-살린			
	R ²	K ₀	R ²	k	F _{max}	R ²	k _H	R ²	k _{HP}	n	R ²	k _{HC}	R ²	k ₁	k ₂	m
pH 7.4	0.930	0.821	0.993	0.015	103.9	0.957	7.50	0.990	3.654	0.672	0.988	0.004	0.994	-13.72	13.78	0.240
pH 6.8	0.938	0.862	0.997	0.014	111.9	0.942	7.84	0.985	3.312	0.703	0.996	0.005	0.992	-16.06	14.733	0.242

R²: 결정계수, F_{max}: 최대 누적 방출, k₀, k, k_H, k_{HP}, k₁, k₂, m은 각 모델의 방출율 상수

[0172] <실험예 3. ECIN의 광열 및 광역학 성능 분석>

[0173] ICG는 감광제로 널리 사용되지만 psICG의 광열 및 광역학 효과는 잘 확립되어 있지 않다. 따라서 psICG와 psICG가 결합된 나노입자의 광열 및 광역학 효과를 검증하기 위한 실험을 수행했다. ICG, psICG, CIN 및 ECIN에 NIR 레이저를 5분간 조사하여 광열 효과를 측정하여 도 8A에 나타내었다. 모든 그룹에서 주목할만한 광열 효과가 관찰되었으며, 레이저 노출 후 ICG, psICG, CIN 및 ECIN의 최종 온도는 각각 53.5℃, 54.7℃, 55.4℃ 및 54.3℃였다. 이때 적외선 카메라를 사용하여 얻은 광열 이미지를 도 8B에 나타내었으며, psICG, CIN 및 ECIN 모두 상당한 광열 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 NIR 레이저 조사에 따라 ICG, psICG, CIN 및 ECIN의 일중항 산소(¹O₂) 생산 효율을 SOSG 시약을 사용하여 평가하여 광역학 효과를 평가하여 도 8C에 나타내었다. 도 8C에서 보는 바와 같이, 808nm 레이저를 조사하면 psICG, CIN 및 ECIN 모두에서 상당한 ¹O₂ 생성이 유도되었으며, ECIN은 최고 수준의 ¹O₂를 생성했다. 이러한 결과는 psICG가 ICG와 유사한 광열 및 광역학 효과를 생성할 수 있으며 psICG가 CSA에 결합되어 있고 CSA-psICG가 에라스틴을 캡슐화하는 경우에도 감광 효과를 유지할 수 있음을 시사한다.

[0175] <실험예 4. 시험관 내 CD44 매개 세포 흡수 및 ECIN의 항 종양 효과>

[0176] CD44와 xCT(시스틴/글루타메이트 수송체)의 물리적 상호작용을 고려할 때, ECIN은 CD44 발현 암세포에 축적되고 에라스틴과 함께 xCT를 보다 효율적으로 억제하여 페롭토시스를 유도하고 궁극적으로 항암 효과를 가져올 것으로 예상할 수 있다. 따라서 시험관 내에서 ECIN의 효과를 평가하기 위해 CD44 발현이 높은 SK-HEP-1 및 CD44 발현이 낮은 Huh-735 HCC 세포주를 선택하여 실험하였다.

[0177] 웨스턴 블롯 분석을 통하여 CD44 및 xCT 발현을 확인한 결과를 도 9A 및 도 9B에 나타내었다. 도 9A 및 도 9B에서 보는 바와 같이, CD44와 xCT 발현은 Huh-7보다 SK-HEP-1에서 23.5배 및 2.6배 더 높았다. 실제로 Huh-736에 비해 SK-HEP-1에서는 변종 CD44(CD44v)와 CD44가 모두 높게 발현되는 것으로 보고되었다. 따라서 CD44v의 안정

화 효과로 인해 세포 표면에서 xCT의 발현 수준이 증가했을 가능성이 있다.

[0178] CD44 매개로 인한 세포 흡수를 확인하기 위하여 psICG, CIN 및 ECIN을 SK-HEP-1에 각각 처리하고, 유동 세포 계측법으로 CIN 및 ECIN의 흡수를 측정하여 도 10A에 나타내었다. 도 10A에서 보는 바와 같이, 유리 psICG의 흡수보다 CIN 및 ECIN의 흡수가 현저히 높은 것을 확인하였다. CD44 매개 세포 흡수를 추가로 관찰하기 위해 DiI가 로드된 CSA-psICG 나노입자(DCIN)를 Huh-7 및 SK-HEP-1 세포에 처리하고 CD44, DAPI 및 DiI의 형광강도를 측정하여 도 10B에 나타내었다. CD44 및 DiI 형광 이미지는 CD44와 DiI의 형광 강도가 SK-HEP-1 세포에서 상당히 높았다는 것을 보여주었다. 이는 CD44와의 상호작용을 통해 다량의 DCIN이 세포 내로 흡수되었음을 시사한다.

[0179] ECIN의 효과를 평가하기 위해 다양한 농도에서 세포 생존력과 컨플루언시를 평가하여 도 11A에 나타내었다. 도 11A에서 보는 바와 같이, 실험 농도 범위 내에서 psICG는 무독성인 반면, 유리 에라스틴과 ECIN은 모두 독성을 나타냈다. 표 4에는 레이저 조사의 유무에 따른 psICG, 유리 에라스틴 및 ECIN의 IC₅₀을 나타내었다. 표 4에서 보는 바와 같이, ECIN(IC₅₀: 13.0 µg/mL)의 독성은 유리 에라스틴(IC₅₀: 22.2 µg/mL)의 독성보다 더 큰 것으로 나타났다.

표 4

그룹	레이저 조사	IC ₅₀ 에라스틴으로서 (µg/mL)	IC ₅₀ psICG로서 (µg/mL)
psICG	○	-	5.84 (95% CI: 5.35-6.36)
유리 에라스틴	×	22.2 (95% CI: 18.7-27.5)	-
유리 에라스틴	○	21.1 (95% CI: 16.8-29.1)	-
ECINs	×	13.0 (95% CI: 11.5-14.8)	15.6 (95% CI: 13.9-17.8)
ECINs	○	0.60 (95% CI: 0.57-0.63)	0.72 (95% CI: 0.69-0.75)

[0181] 도 11B 내지 도 11D에 유리 에라스틴, CIN 및 ECIN의 컨플루언시 측정 결과를 나타내었다. 컨플루언시에서는 유리 에라스틴이 2 µg/mL에서 세포 증식을 억제하는 반면, ECIN은 1 µg/mL에서도 억제되는 것으로 나타났다. 이는 ECIN이 유리 에라스틴보다 세포 증식을 억제하는 데 더 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0182] 페로토시스가 ECIN에 의한 세포 성장 억제의 메커니즘인지 여부를 조사하기 위해 생성된 알록실 라디칼을 제거하고 지질 ROS37을 감소시키는 ferroptosis 억제제인 ferrostatin-1(Fer-1)을 사용하여 ECIN 존재 또는 부재시 세포 컨플루언시를 확인하여 도 12A에 나타내었다. 놀랍게도 Fer-1 처리 유무에 관계없이 ECIN의 효과에는 차이가 없었으며, 이는 페로토시스가 ECIN에 의한 세포 성장 억제 메커니즘이 아니라는 것을 뒷받침한다. 또한, 페로토시스의 특징 지표인 C11 BODIPY 염색을 사용하여 Huh-7 및 SK-HEP-1 세포에서 지질 ROS 수준을 측정하여 도 12B에 나타내었다. 유리 에라스틴으로 처리한 경우 SK-HEP-1 세포는 Huh-7 세포에 비해 지질 ROS 생성이 크게 증가한 것으로 나타났으며 이는 SK-HEP-1 세포에서 CD44-xCT 축의 더 높은 발현과 일치한다. 그러나 ECIN 처리는 극적인 지질 ROS 생성을 유도하지 않았으며 이는 ECIN에 의해 유도된 세포 성장 억제 메커니즘이 페로토시스가 아닐 수 있음을 시사한다. 따라서 이후, ECIN의 세포 성장 억제 메커니즘을 조사하기 위해 추가 실험을 수행했다.

[0184] <실험예 5. SK-HEP-1 및 광선요법에 대한 ECIN의 비강자성 메커니즘>

[0185] ROS를 제거하는 일반적인 항산화제 역할 외에도 N-아세틸시스테인(NAC)은 글루타티온 합성을 위한 시스테인을 제공하는 역할을 한다. NAC는 페로토시스뿐만 아니라 세포 주기 정지, 괴사 및 세포사멸도 완화할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 NAC를 함께 처리하는 경우, SK-HEP-1 세포에 대한 ECIN의 항증식 효과가 폐지되지 관찰하고 그 결과를 도 13A에 나타내었다. 도 13A에서 보는 바와 같이, ECIN의 항증식 효과는 NAC의 처리에 의하여 폐지되었다.

[0186] 페로토시스 이외의 세포 성장 억제 효과에 대한 ECIN의 메커니즘을 조사하기 위해 PI 염색을 사용하여 SK-HEP-1 세포의 세포주기 분포를 평가하고 그 결과를 도 13B에 나타내었다. 도 13B에서 보는 바와 같이, ECIN으로 24시간 처리한 후 G1 단계의 세포 비율이 증가하고 G2 및 S 단계의 세포 비율이 감소하는 것을 관찰했다. 또한 NAC와의 병용 치료는 ECIN에 의해 유발된 G1 축적을 크게 역전시켰다.

[0187] 이러한 G1 정지 메커니즘을 밝히기 위해 세포주기 관련 단백질 cyclinD1과 CDK2의 발현 수준을 웨스턴블롯으로

확인하여 도 14에 나타내었다. 도 14에서 보듯이, CyclinD1 및 CDK2 발현 수준은 ECIN 처리 후 크게 감소했다.

[0188] 이전 실험에서 ECIN의 광열 및 광역학 효과를 확인했다. 세포주기 정지와 psICG의 광열 및 광역학 효과를 통해 ECIN의 세포 억제 효과를 극대화하기 위해 SK-HEP-1 세포에 근적외선 레이저를 5분간 조사하고 세포생존율을 도 15A에 나타내었다. 도 15A 및 상기 표 4에서 보는 바와 같이, ECIN(IC₅₀: 0.60 µg/mL)의 세포독성 효과는 레이저 치료(IC₅₀: 13.0 µg/mL) 후에 강화되었으며, 유리 에라스틴(IC₅₀: 21.1 µg/mL)보다 유의하게 증가된 효능을 보여주었다.

[0189] ECIN의 광역학적 효과를 확인하기 위해 H2DCF-DA 프로브를 사용하여 레이저 조사 전후의 ROS 수준을 측정하였다. SK-HEP-1 세포를 psICG, CIN 또는 ECIN으로 4시간 동안 처리하고 5분간 조사한 후 마이크로플레이트 리더를 사용하여 형광 강도를 측정하여 도 15B에 나타내고, ROS 수준의 형광 이미지를 도 16에 나타내었다. 도 15B에서 보는 바와 같이, ROS 수준은 CIN 및 ECIN 처리 세포 모두에서 레이저 치료 후 유의하게 상승했다. 또한, 동일한 레이저 조건에서 CINs 및 ECINs 처리 세포는 psICG 처리 세포보다 1.45배 및 1.43배 더 높은 형광 강도를 나타냈다. 또한 도 16에서 보는 바와 같이, ROS 수준의 형광 이미지는 CSA와 CIN 또는 ECIN의 동시 처리가 형광 강도를 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 CIN과 ECIN이 CD44 수용체를 통해 세포에 들어가기 위해 CSA와 경쟁한다는 것을 의미한다. 종합하면, ECIN이 페로토시스보다는 G1 단계에서 세포 주기 정지를 유도함으로써 암세포를 억제하고 광선요법과의 병용을 통하여 효과적인 암 치료 가능성을 나타내는 것을 의미한다.

[0191] <실험예 5. 이종이식 마우스에 대한 ECIN의 효과>

[0192] 이종 이식 마우스 모델을 사용하여 ECIN의 생체 내 생체 분포 및 효과를 평가했다. 형광 염료를 캡슐화하여 생체 분포를 간접적으로 모니터링하는 다른 화합물과 달리 ECIN은 자체 형광을 방출하여 분포를 직접 관찰할 수 있다. 도 17에 SK-HEP-1 세포 이종 이식 마우스 모델 구축 및 관련 실험의 모식도를 나타내었다. 먼저, psICG 또는 ECIN을 마우스에 정맥 주사한 후 NIRF 이미징 장비를 사용하여 전신 이미징을 수행하여 도 18A에 나타내었다. 또한 종양부위의 이미지를 정량화하여 도 18B에 나타내었다. 도 18A 및 도 18B에서 보는 바와 같이, 실험 동안 ECIN은 psICG에 비해 종양 영역에 훨씬 더 많이 축적되어 ECIN이 종양을 표적으로 삼을 수 있음을 확인할 수 있다. ECINs 그룹의 종양 부위의 형광 강도는 주사 후 1시간 후에 psICG 그룹보다 1.9배 더 컸지만, 주사 후 24시간 후에는 6.0배 더 높았다.

[0193] 또한, psICG 또는 ECIN을 주입한 이종이식 마우스의 주요 기관인 간, 비장, 신장, 심장, 폐 및 종양의 형광강도를 비교하여 도 19A 및 도 19B에 나타내었다. 종양의 형광 강도는 ECIN 주입 후 24시간 후에 생체 외 영상 분석을 사용하여 측정되었다. 도 19A 및 도 19B에서 보는 바와 같이, 향상된 투과성 및 체류 효과와 같은 나노입자의 특성으로 인해 ECIN이 종양 부위에 축적되었음을 나타낸다.

[0194] 다음으로, 이종이식 마우스 모델에서 유리 에라스틴 또는 ECIN을 단회 투여한 후 약동학을 조사하여 도 20A 및 표 5에 나타내었다. 유리 에라스틴은 10mg/kg의 용량으로 경구 투여되거나 5mg/kg의 용량으로 정맥 내로 투여되었으며, ECIN은 5mg/kg의 에라스틴에 해당하는 용량으로 정맥 내로 투여되었다.

표 5

파라미터	유리 에라스틴 (PO)	유리 에라스틴(IV)	ECINs (IV)
Dose (mg/kg)	10	5	5
t _{max} (hr)	0.08 ± 0.00	NA ^a	NA
C _{max} (ng/mL)	296.3 ± 152.5	NA	NA
AUC _{last} (ng hr/mL)	227.9 ± 137.3	2249.1 ± 136.4	2136.0 ± 71.0
AUC _{inf} (ng hr/mL)	238.9 ± 145.4	2295.2 ± 156.0	2173.7 ± 86.5
CL (L/hr/kg)	NA	2.19 ± 0.15	2.30 ± 0.09
V _{ss} (L/kg)	NA	1.53 ± 0.12	1.50 ± 0.29
V _z (L/kg)	NA	2.75 ± 0.26	2.82 ± 0.44
t _{1/2} (hr)	0.88 ± 0.08	0.88 ± 0.11	0.85 ± 0.16
MRT _{inf} (hr)	1.00 ± 0.20	0.70 ± 0.07	0.65 ± 0.13
F (%) ^b	5.21 ± 3.17	NA	NA

^a NA: 해당없음
^b F : AUC _{inf} 를 사용하여 계산됨 (IV group)

- [0196] 표 5에서 보는 바와 같이, 유리 에라스틴의 경구 생체 이용률(F)은 $5.21 \pm 3.17\%$ 로 경구 투여가 불가능함을 나타내었다. 또한 도 20A에서 보는 바와 같이, 유리 에라스틴과 ECIN은 정맥 주사 후 유사한 약동학적 프로파일을 나타냈다. 그러나 반복 투여 후 각각의 에라스틴 농도는 도 20B에서 보는 바와 같이 유리 에라스틴 투여군과 ECIN 투여군 간에 유의미한 차이를 보였다. 도 18 및 도 19에 나타난 바와 같이, ECIN은 종양 내에 실질적으로 축적되며, 반복 투여 후 간, 비장, 신장, 심장 및 폐의 에라스틴 농도는 ECIN 그룹에 비해 유리 에라스틴 그룹에서 유의하게 더 높았다. 구체적으로, 에라스틴의 농도는 ECIN 그룹에 비해 유리 에라스틴 그룹에서 비장에서 19.1배, 폐에서 203배 더 높았다. 유리 에라스틴 그룹의 에라스틴 대부분은 소수성으로 인해 폐에 침전 및 침착되었을 가능성이 있는 반면, 종양 내 ECIN 그룹에서는 2.2배 더 높은 농도를 보였다. 이는 ECIN이 에라스틴을 적절하게 용해시켜 비표적 장기에 침착을 줄여 부작용을 줄이고 종양에 미치는 영향을 극대화할 수 있음을 시사한다.
- [0197] 또한 ECIN이 종양에 미치는 영향을 평가하기 위해 5일 간격($n = 3$)으로 유리 에라스틴 또는 ECIN(3 mg/kg)을 총 5회 주사한 후 절제된 종양에서 질량 분석기를 사용하여 GSH 수준을 정량화하여 도 21A에 나타내었다. 도 21A에서 보는 바와 같이, 유리 에라스틴 그룹에서 종양 내 GSH 농도는 대조군에 비해 19.8배 낮았으며, 이는 에라스틴이 종양에서 xCT를 억제하여 GSH를 고갈시켜 페로토시스 및 종양 억제를 유도한다는 종래 보고를 뒷받침한다. 그러나 ECIN 그룹의 GSH 수준은 대조군보다 2.2배 낮은 GSH 수준을 나타냈는데, 이는 페로토시스가 ECIN에 의한 종양 억제의 주요 메커니즘이 아니라는 것을 뒷받침한다. 이전 결과에서 본 바와 같이, ECIN의 종양 억제 메커니즘 중 하나는 세포 주기 정지이다. 이 메커니즘은 세포 사멸을 유발하는 화학요법제와 비교할 때 완전히 분화된 정상 세포에 부작용이 더 적다. 실제로 최근 에라스틴에 의한 페로토시스가 건강한 조직에 병리학적 변화를 일으킬 수 있다는 것이 보고되었다(Zhao J. et al., 2022). 이러한 맥락에서 ECIN은 비-페로토시스 메커니즘을 통합하고 특히 종양 세포를 표적으로 삼기 때문에 정상 조직에 부작용이 적고, 더 안전한 치료 옵션을 제공할 것으로 예상된다.
- [0198] ECIN의 종양 표적화 능력 외에도 광열 효과를 생체 내에서 평가하였다. SK-HEP-1 이종이식 마우스의 종양 부피가 약 130mm^3 에 도달하면 마우스를 무작위로 두 그룹($n = 5$)으로 나누고 정맥 주사를 통해 생리 식염수(NS) 또는 ECIN(에라스틴으로서 5mg/kg)을 투여하였다. 주사 1시간 후, 마우스의 종양 부위에 근적외선(NIR) 레이저(808 nm , $0.7\text{W}/\text{cm}^2$)를 5분간 국소적으로 조사하여 적외선 열화상 카메라(FLIR-E6390; Teledyne FLIR LLC.)를 이용하여 종양 부위의 실시간 온도를 30초마다 측정하여 도 21B에 나타내고, 적외선 열화상 카메라(FLIR-E6390; Teledyne FLIR LLC.)를 이용한 이종이식 마우스 모델의 대표적인 열 화상 이미지를 도 21C에 나타내었다. 도 21B 및 도 21C에서 보는 바와 같이, ECIN 투여군에서는 방사선 조사 후 30초 이내에 종양 부위의 온도가 $43.4 \pm 0.9^\circ\text{C}$ 까지 상승하였고, 5분에 $49.3 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 까지 상승하여 2.1% 증가하여 5분 동안 조사한 대조군보다 2배 더 높았다($p < 0.001$). 이는 ECIN이 종양에 효과적으로 축적될 수 있으며, 생체 내에서 레이저 조사 시 광열 효과를 유도하여 치료 효과를 향상시킬 수 있음을 보여준다.
- [0200] <실험예 5. ECIN의 생체 내 항종양 효과>
- [0201] ECIN의 생체내 항종양 효과는 SK-HEP-1 이종이식 BALB/c 누드 마우스 모델을 사용하여 평가되었다. 도 22에 ECIN의 생체내 항종양 효과 실험의 개략도를 나타내었다. 종양이 유도된 마우스를 비히클(대조군), 유리 에라스틴, ECIN 및 레이저 조사를 포함하는 ECIN의 네 그룹($n = 7$ 또는 8)으로 나누고, 종양이 약 100 mm^3 에 도달하면 비히클(대조군), 유리 에라스틴 또는 ECIN을 25일 동안 2일마다 총 13회 반복 투여했다. 레이저 그룹을 사용한 ECIN의 경우 주입 후 1시간 후인 4일, 6일, 12일, 14일, 16일에 NIR 레이저(808nm ; $0.7\text{W}/\text{cm}^2$)를 5분 동안 종양에 조사하고 25일째에, 마우스를 희생시킨 다음, 종양을 적출하여 부피를 측정하여 도 23A에 나타내었다. 종양 부피 및 체중은 2일마다 측정하였다. 도 23A에서 보는 바와 같이, 유리 에라스틴 및 레이저 조사 하지 않은 ECIN의 종양 부피는 대조군과 비교하여 통계적으로 유의미하지는 않았지만 각각 1.31배 및 1.39배 감소했다. 도 20B에서 본 바와 같이, ECIN의 반복 투여 그룹에서 종양의 에라스틴 농도가 더 높음에도 불구하고, 유리 에라스틴 그룹과 유사한 효과를 나타냈다. 즉, 유리 에라스틴과 비교하여 ECIN의 생체 내 항종양 효과가 적은 것으로

보여지며, 이는 ECIN의 독특한 종양 억제 메커니즘에 기인할 수 있다. 그럼에도 불구하고, ECIN은 종양 부위에 고도로 축적되었다. 이때 레이저를 조사하는 경우, ECIN의 항종양 효능이 현저히 향상되었다. ECIN 투여 후 레이저 치료를 실시한 결과 대조군에 비해 종양 부피가 3.37배 감소했으며, 유리 에라스틴 투여군에 비해 더 강력한 항종양 효능이 확인하였다. 실험 기간 동안 체중 변화를 도 23B에 나타내었다. 실험 기간 중 각 그룹의 마우스 체중에는 큰 변화가 없었으며 이는 ECIN이 전신 독성이 무시할 수 있는 수준임을 의미한다. 마우스 희생 후 종양무게는 도 23C에 나타내었다. 도 23C에서 보는 바와 같이, 희생 당시 측정된 종양 무게는 대조군에 비해 레이저 치료와 ECIN을 모두 받은 그룹의 종양 무게가 2.00배 유의하게 감소한 것으로 나타났다.

[0202]

종양 조직 근처의 약물 전달 시스템의 분포를 확인하기 위해 2차 처리 후 2일마다 생체 내 생체 분포 이미징을 수행하여 도 24A에 나타내었다. 도 24A에서 보는 바와 같이, 종양 부위 근처의 형광 강도는 배경 조직의 형광 강도보다 상당히 높았다. 레이저 조사 시 광표백으로 인해 형광 강도가 감소했다. 실제로, 이전 연구에서는 광표백된 ICG가 세포 증식을 억제할 가능성이 있음을 보고했으며(Clutter ED et al., 2022), 본 발명에서는 광표백이 관찰된 종양 억제 효과에 기여한 것으로 사료된다(도 24A, 24B). 이후, 마우스를 희생시키고 생체 외 이미징을 수행하여 도 25A 및 도 25B에 나타내었다. 레이저 조사로 인한 광표백에도 불구하고 종양과 다른 장기(비장, 심장 및 폐) 사이의 형광 강도에는 상당한 차이가 있어 종양 내 ECIN의 표적 효과가 입증되었다(도 25A, 25B).

[0203]

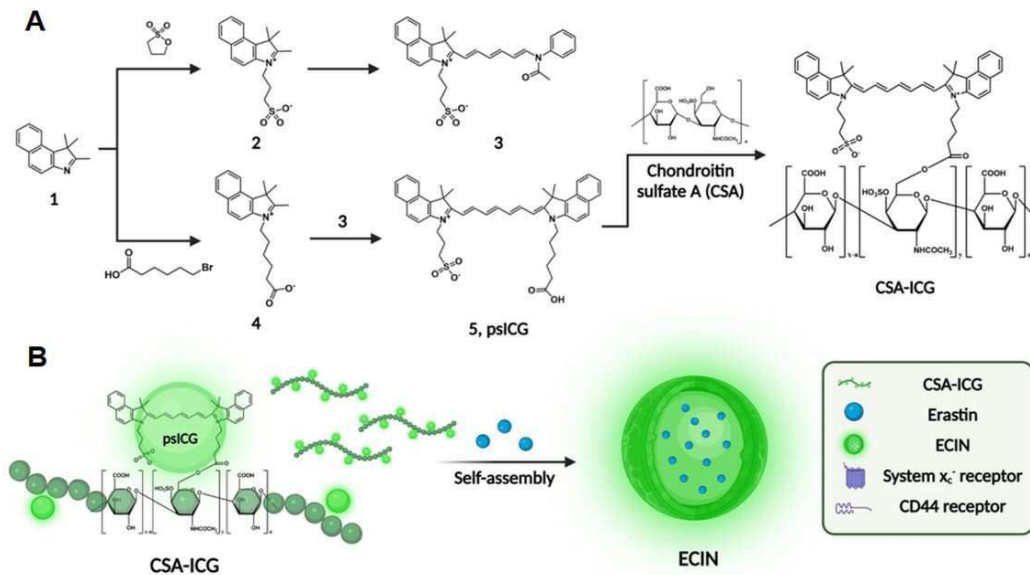
종합적으로, 본 발명은 ECIN 투여와 레이저 치료의 조합이 세포 주기를 국부적으로 억제하고 광열 및 광역학 효과를 유도함으로써 강력한 종양 억제 효과를 나타내면서 표적을 벗어난 기관의 독성과 부작용을 최소화한다는 것을 확인하였다. 특히, 레이저 치료는 ECIN의 종양 억제 효과를 크게 향상시켰으며, 이는 레이저 치료를 사용하여 ECIN의 효능을 높이는 동시에 표적 외 독성과 부작용을 최소화할 수 있음을 시사한다.

[0205]

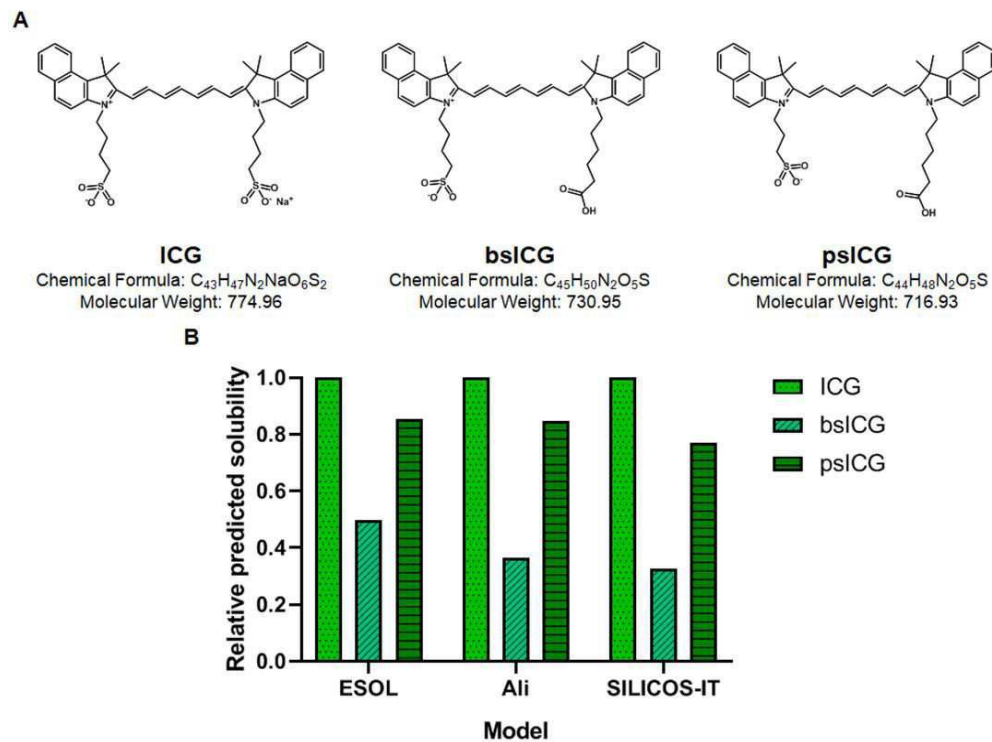
요약하면, 본 발명은 유망한 표적 암 치료제로서 에라스틴이 함유된 콘드로이틴 황산 나노캐리어(ECIN)를 제공한다. 도 26은 본 발명에 따른 ECIN의 종양 특이적 화학 광선요법 메커니즘을 보여준다. 즉, 본 발명의 ECIN은 정맥 내 투여된 후 CD44 수용체 상호작용을 통해 암세포에 효율적으로 흡수되어 세포에 축적되며, 종양 부위에 국소적으로 조사되는 레이저에 의해 잠금 해제되고 광선요법과 결합하여 세포주기 억제를 통해 항암 활성을 나타낸다. 상기 실험을 통하여 본 발명의 ECIN은 CD44 수용체를 통해 높은 안정성, 생체 적합성 및 종양 표적화 능력을 보유하여 암세포에 에라스틴을 효율적으로 전달할 수 있음을 확인하였다. 또한 ECIN은 psICG의 존재로 인해 광열 및 광역학 효과를 나타내어 치료 잠재력을 더욱 향상시킬 수 있다. 시험관 내 연구에 따르면 ECIN은 G1 단계 세포 주기 정지를 유도하고 유리 에라스틴과 비교하여 세포 증식에 대한 탁월한 억제 효과를 나타낸다. 생체 내 생체분포 및 약동학 연구에서 ECIN은 종양 부위에 상당히 축적되는 동시에 표적을 벗어난 기관에서 에라스틴의 축적을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, 우리의 생체 내 항종양 효능 연구는 ECIN이 종양 부피를 크게 줄이는 능력을 확인했으며 레이저 조사는 이러한 효능을 향상시켰다. 전체적으로, 우리의 연구 결과는 ECIN이 국소 광열 및 광역학 요법을 사용하는 효과적이고 안전한 표적 암 치료제로서 큰 가능성을 가지고 있음을 시사한다.

도면

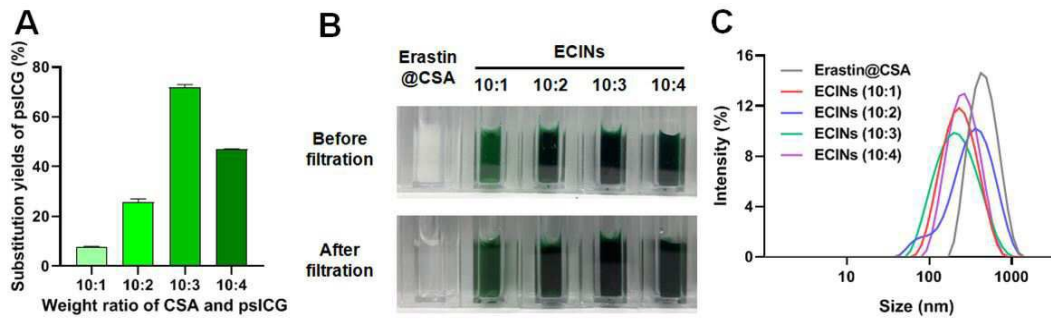
도면1



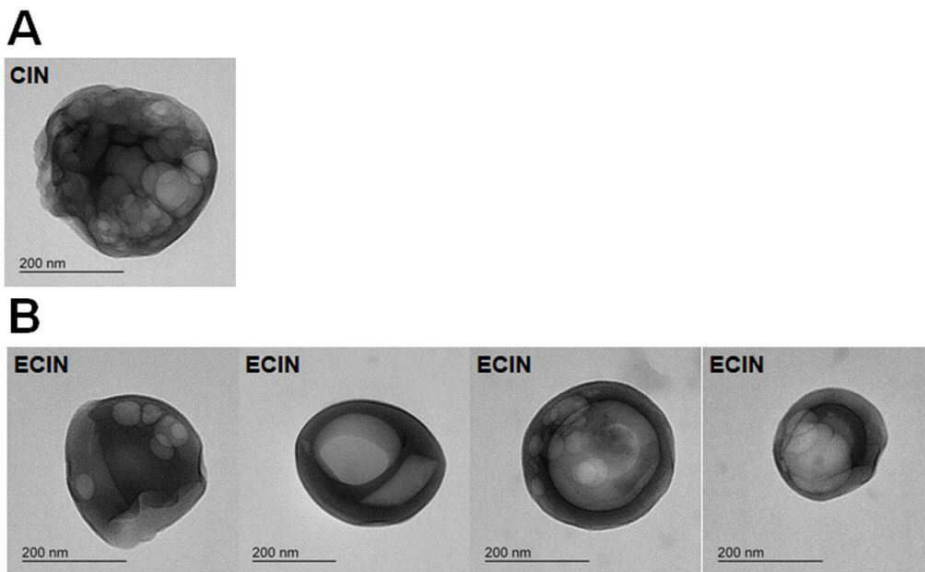
도면2



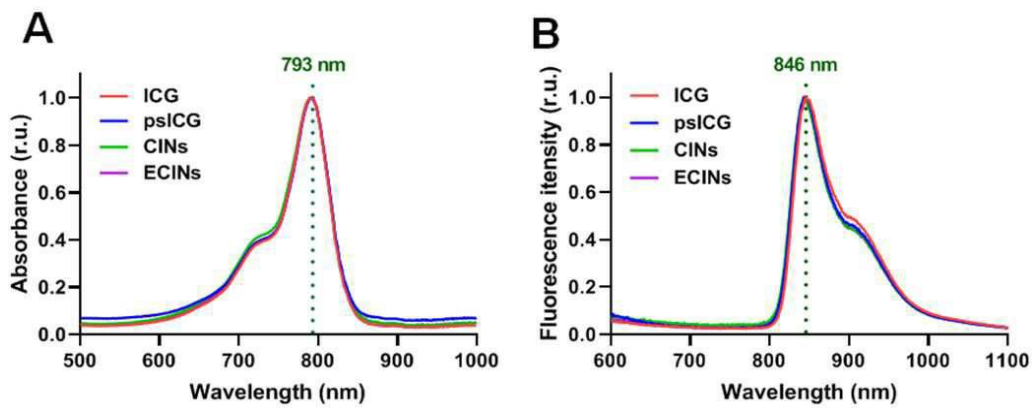
도면3



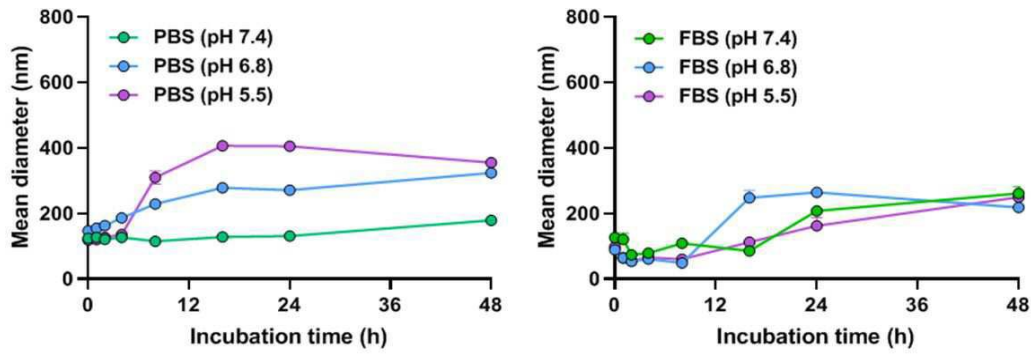
도면4



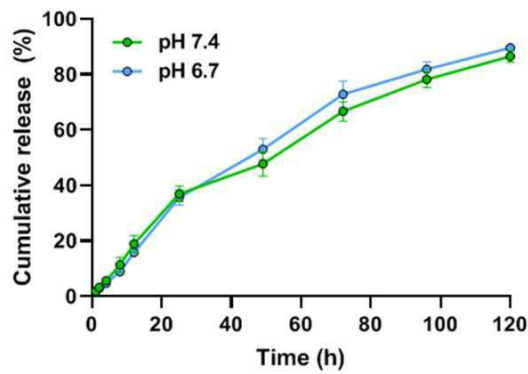
도면5



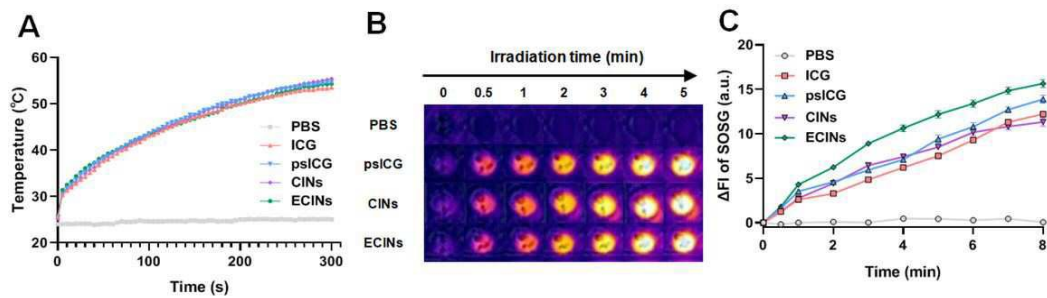
도면6



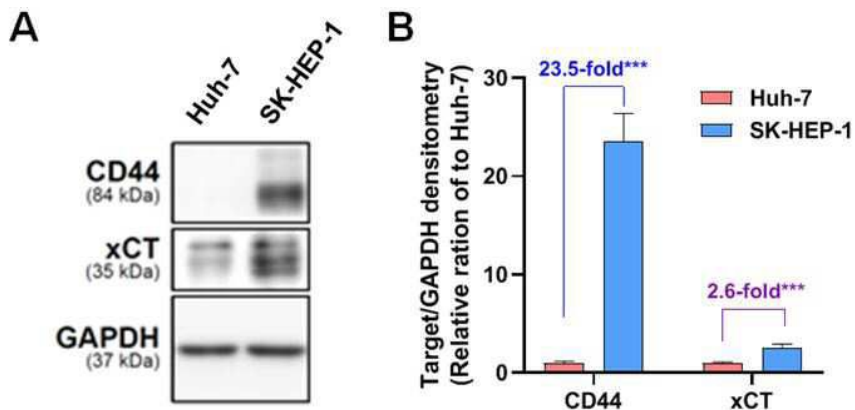
도면7



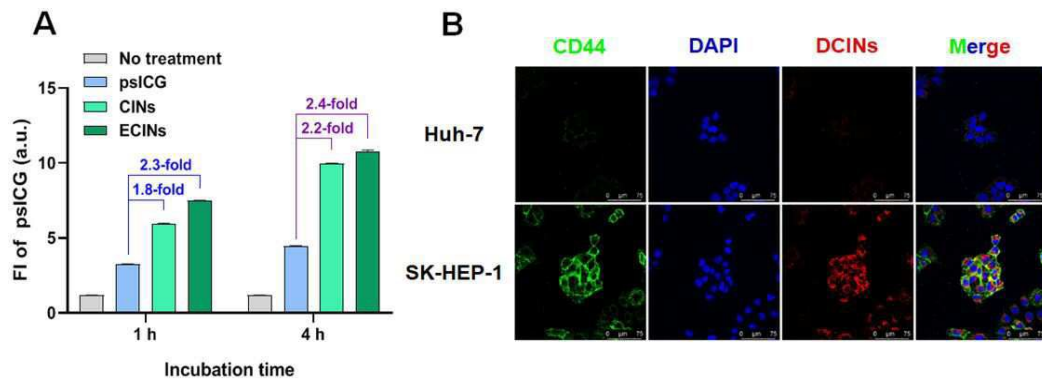
도면8



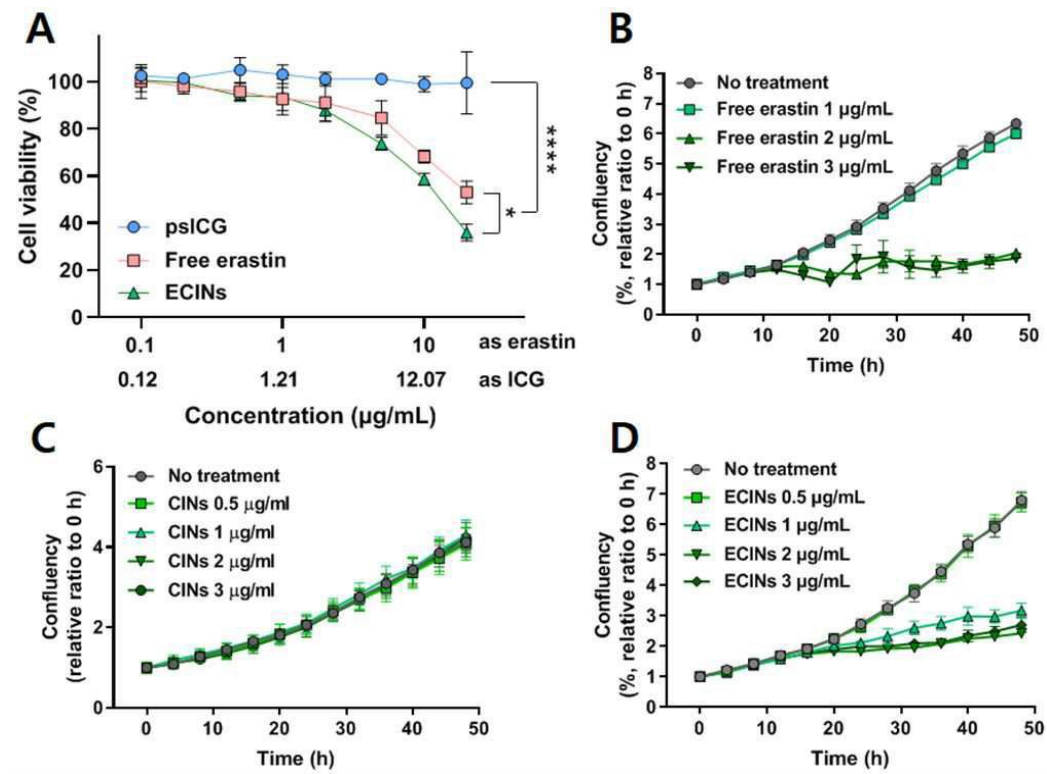
도면9



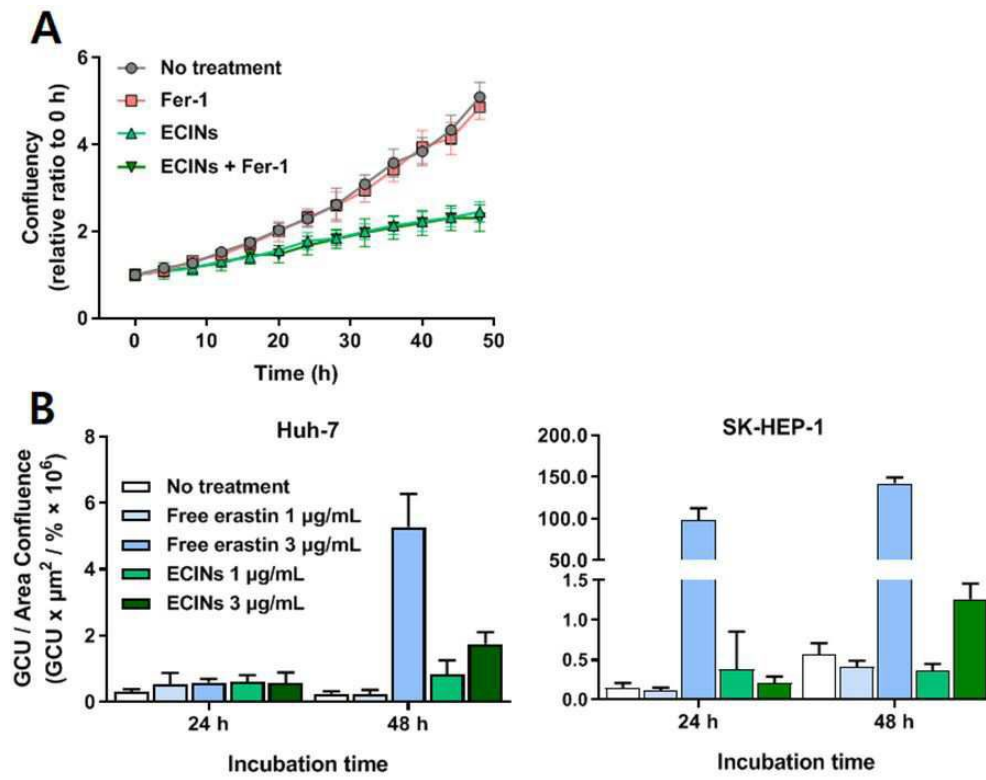
도면10



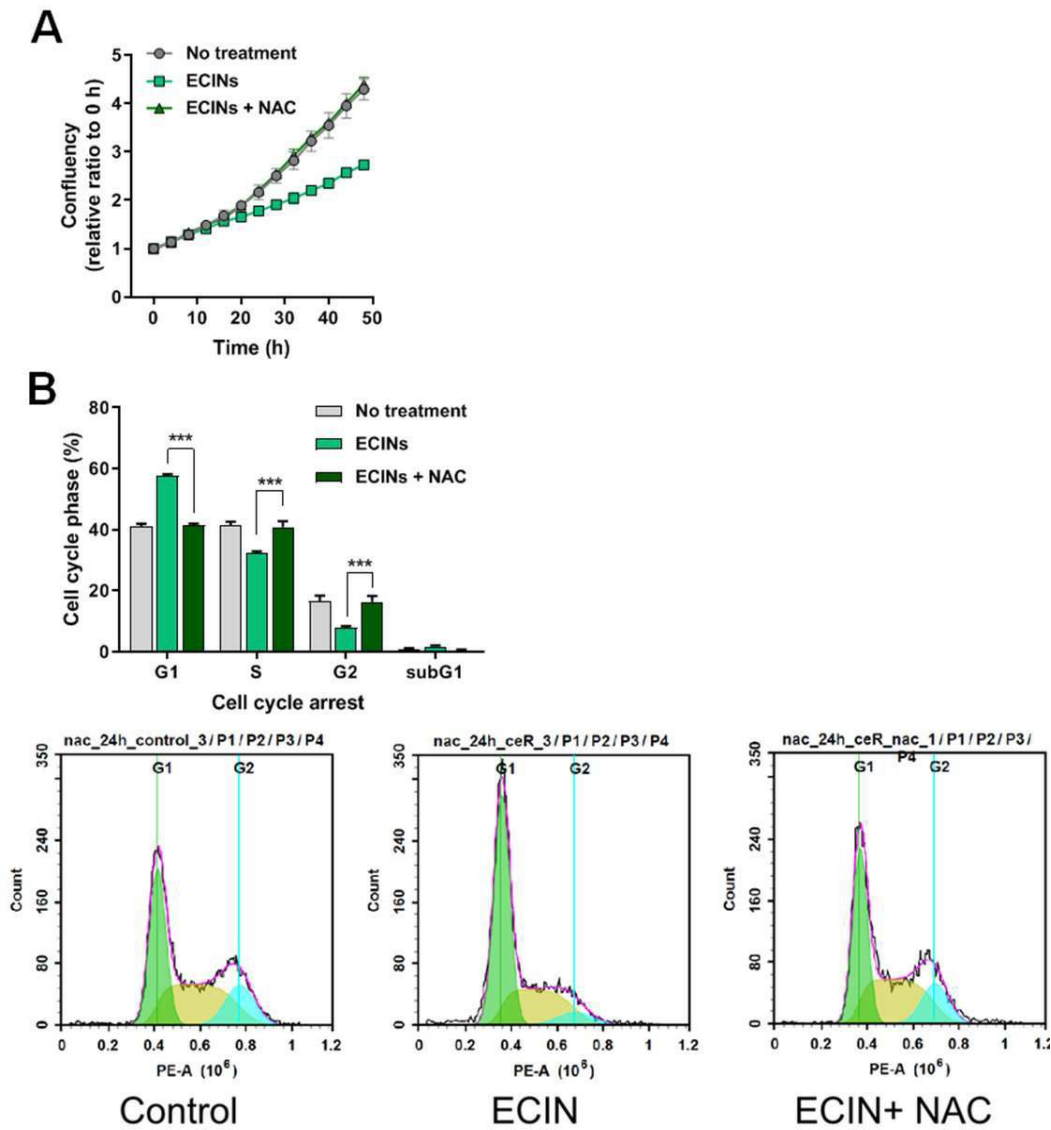
도면11



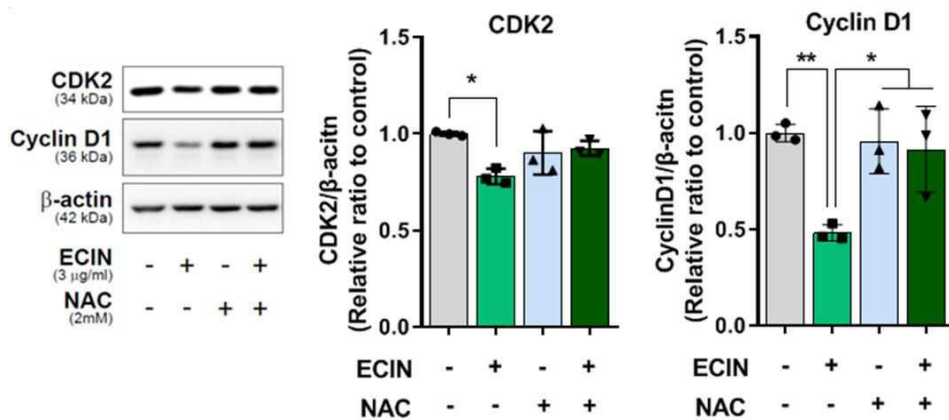
도면12



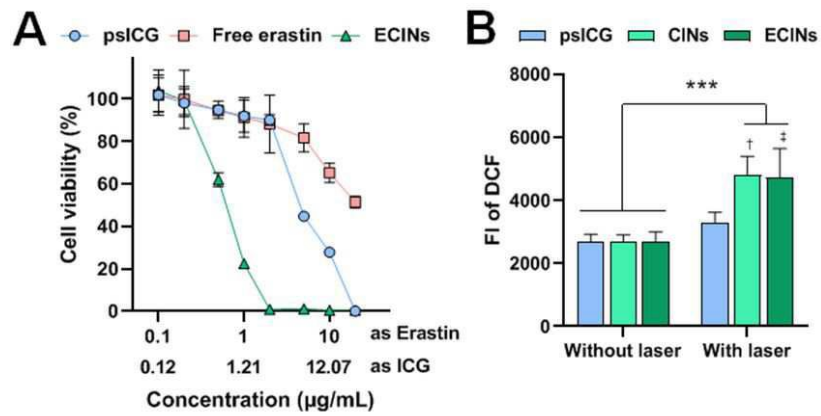
도면13



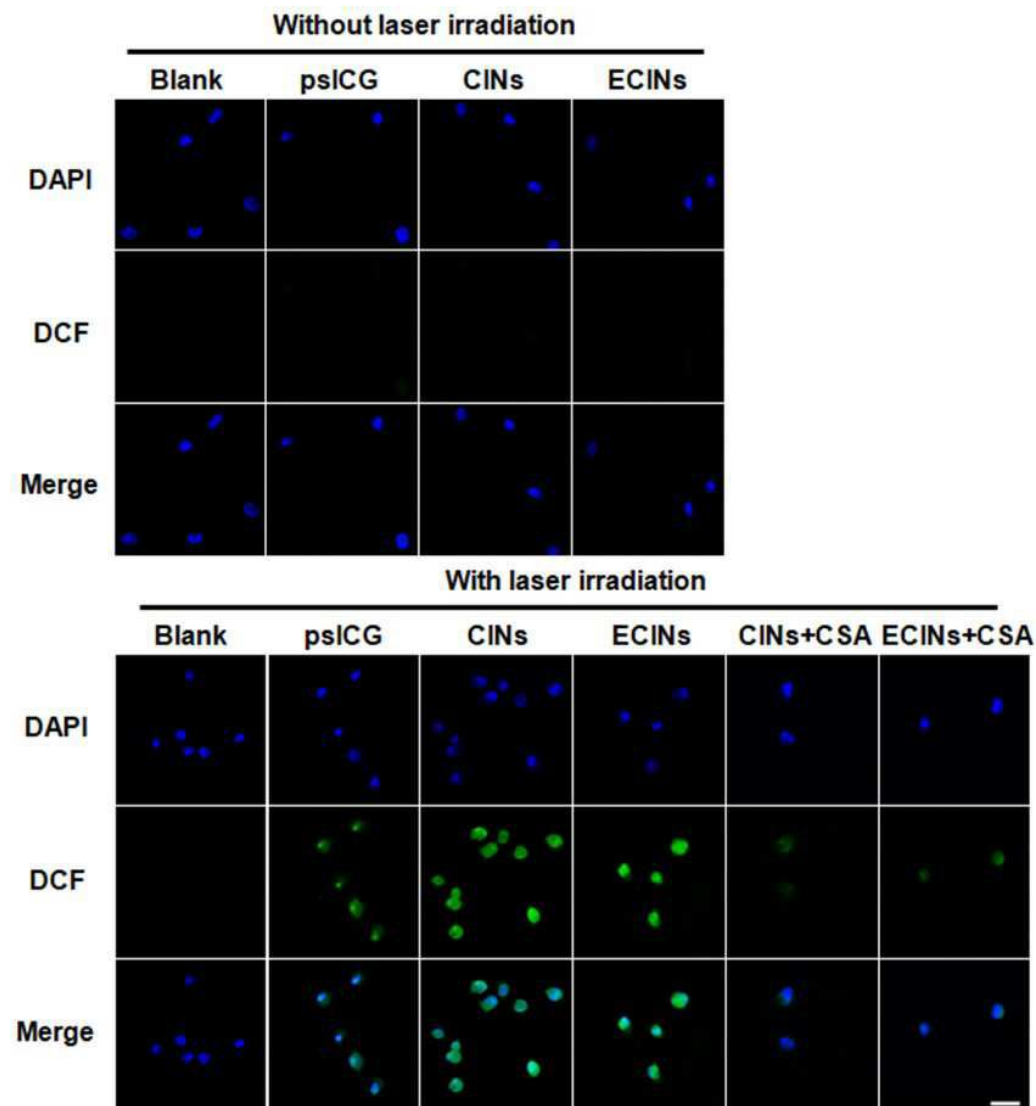
도면14



도면15

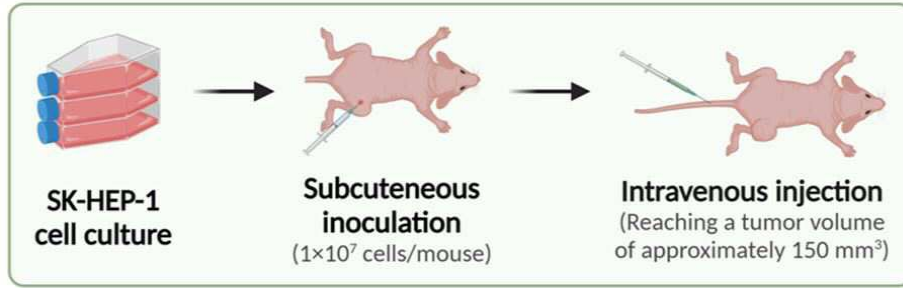


도면16



도면17

Preparation of xenograft mouse model



In vivo biodistribution study

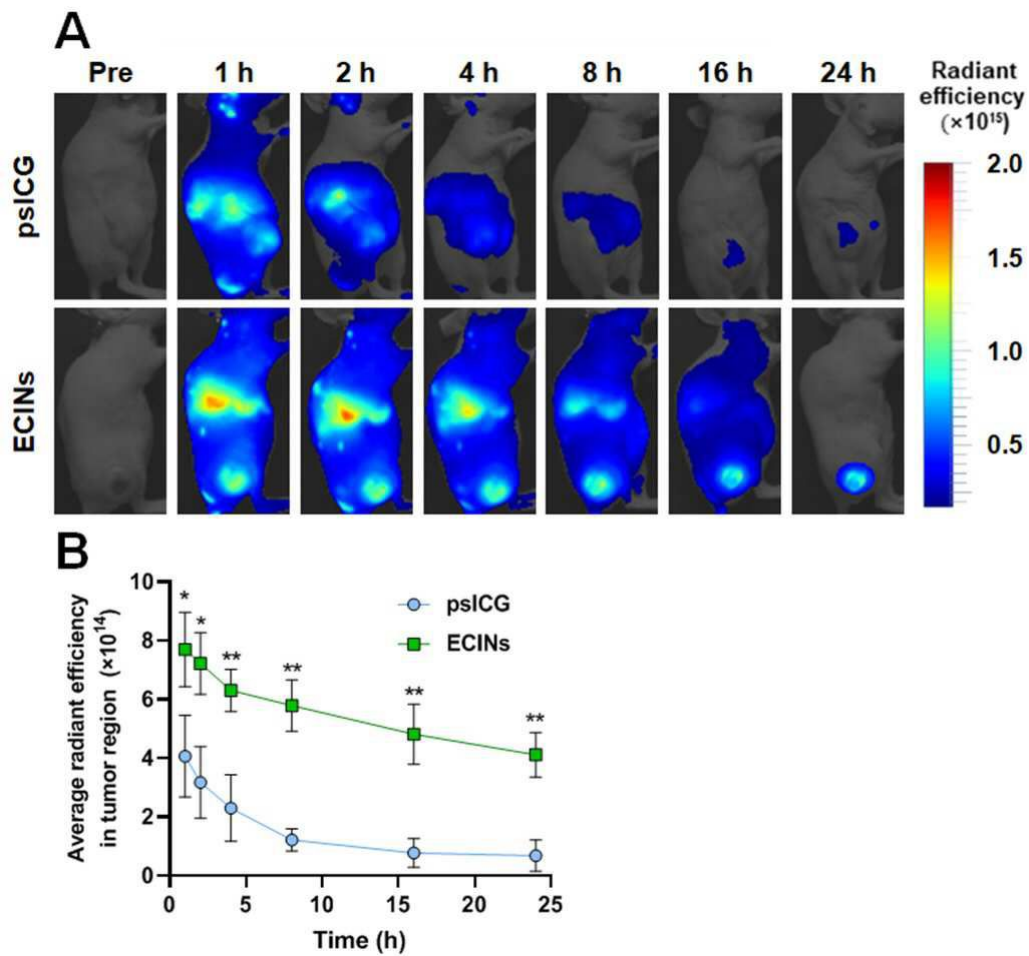
- 5 mg/kg as psICG

In vivo photothermal performance

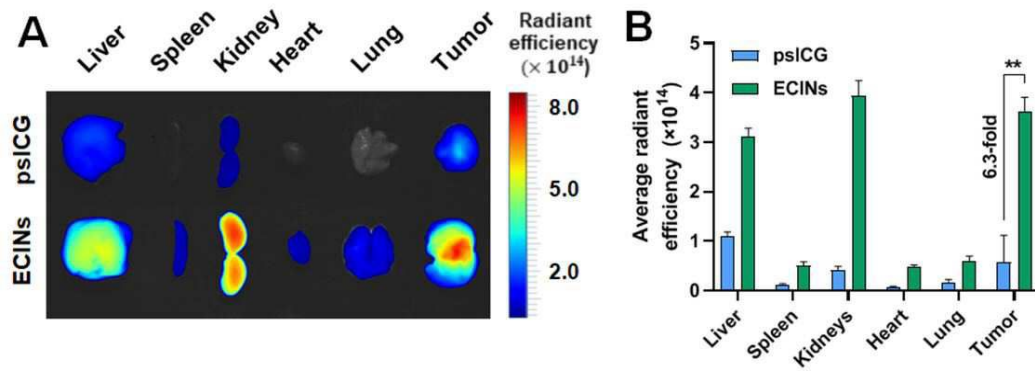
- 808 nm laser irradiation (0.7 W/cm^2) for 5 min



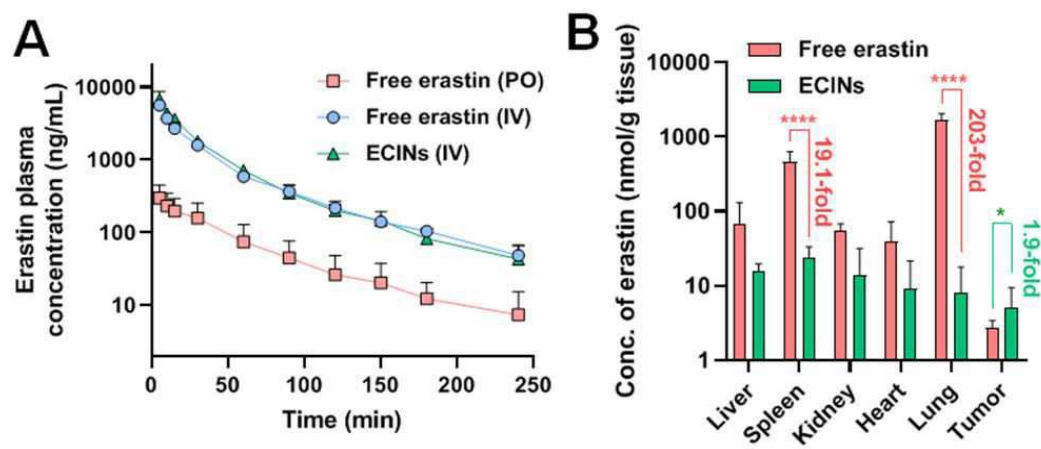
도면18



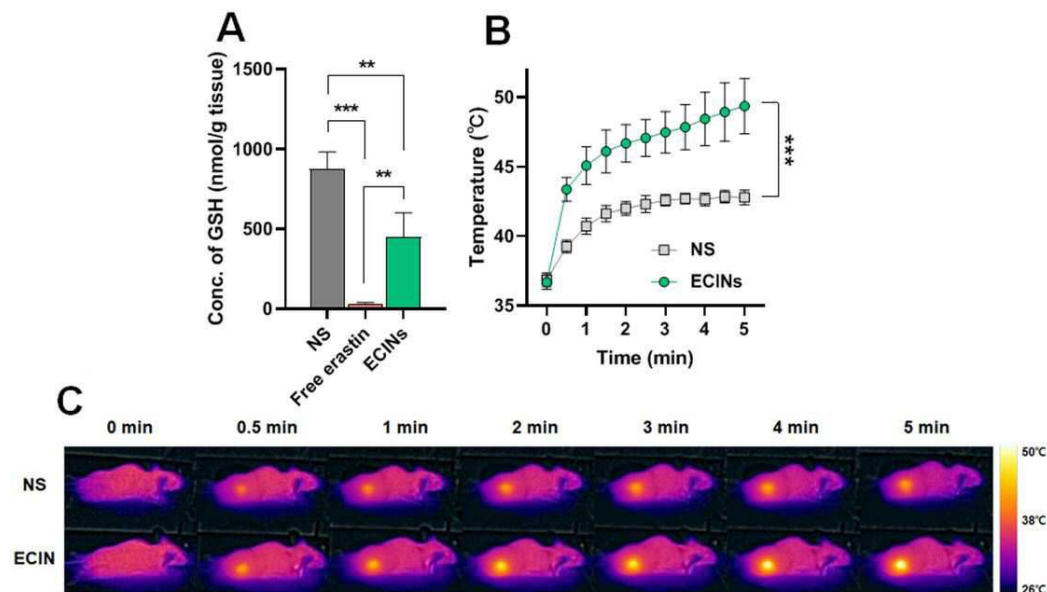
도면19



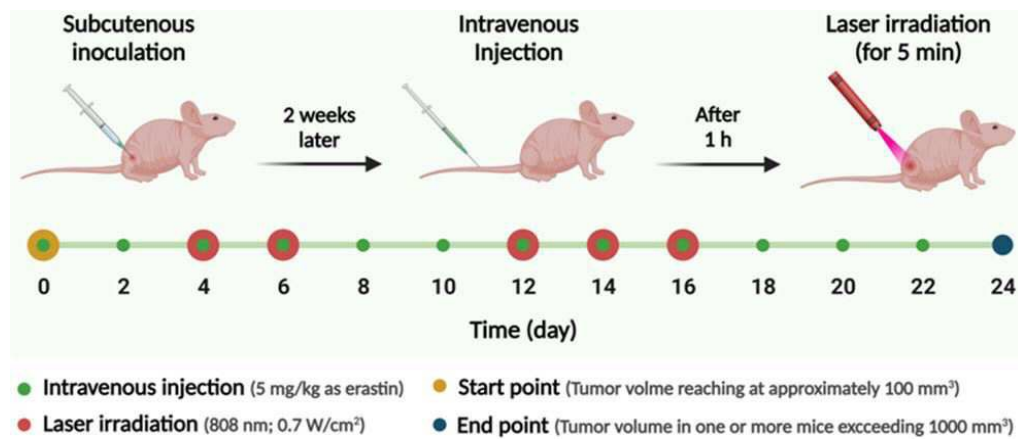
도면20



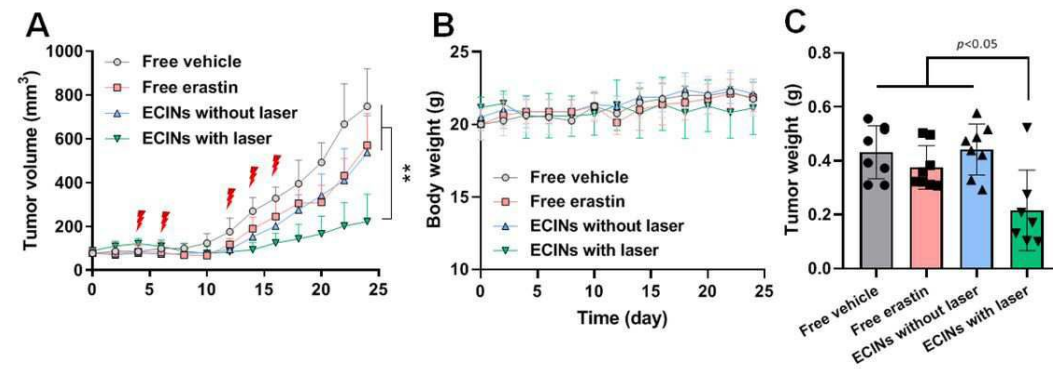
도면21



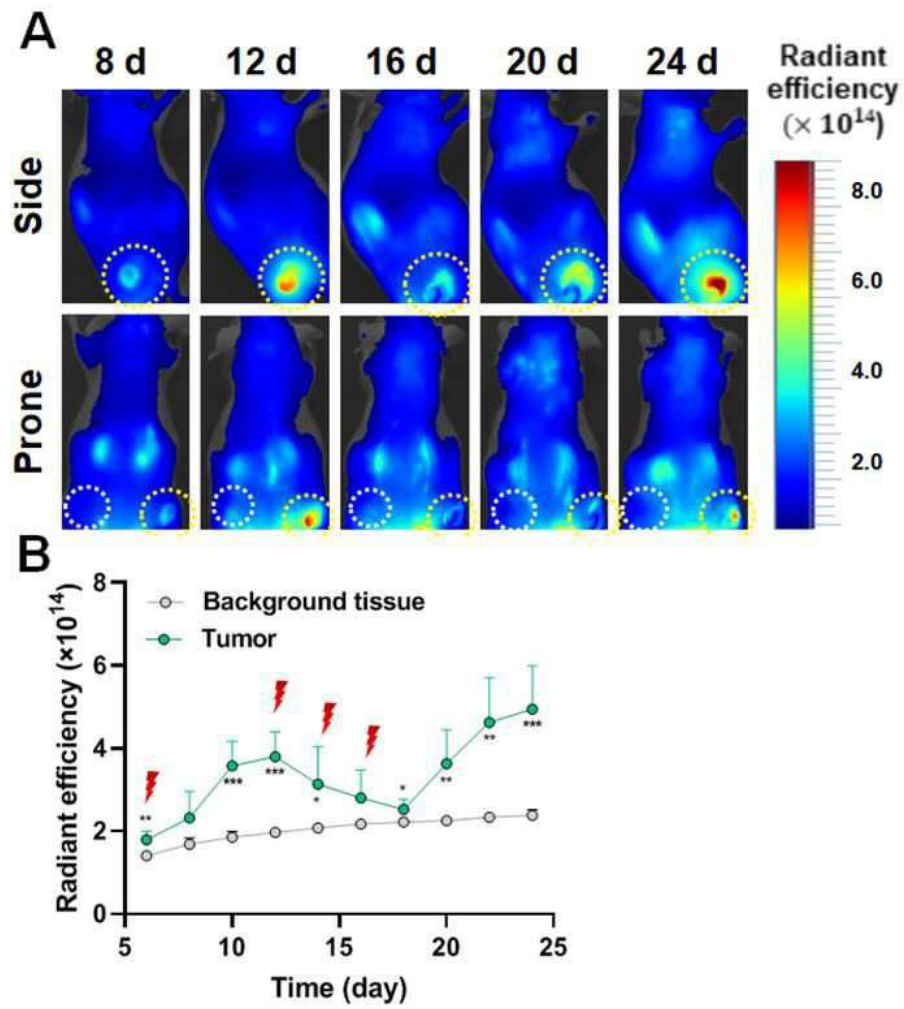
도면22



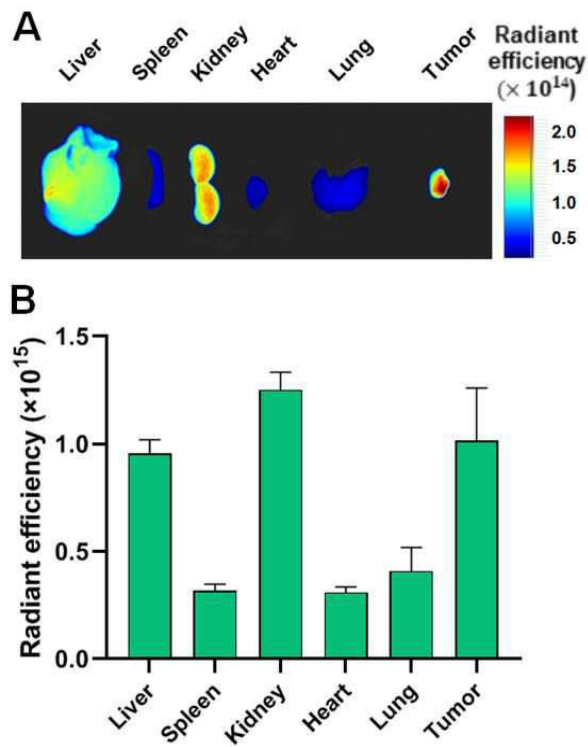
도면23



도면24



도면25



도면26

