

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0157184

(43) 공개일자 2021년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 41/00 (2020.01) A61K 47/30 (2017.01)

A61K 47/36 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)

A61K 9/107 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 41/0057 (2013.01)

A61K 47/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0075156

(22) 출원일자 2020년06월19일

심사청구일자 2020년06월19일

(71) 출원인

전남대학교산학협력단

광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

박인규

광주광역시 남구 봉선로 42 봉선로남해오네트
103-504

허강무

대전광역시 유성구 어은로 57 한빛아파트
131-1503

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 플러스

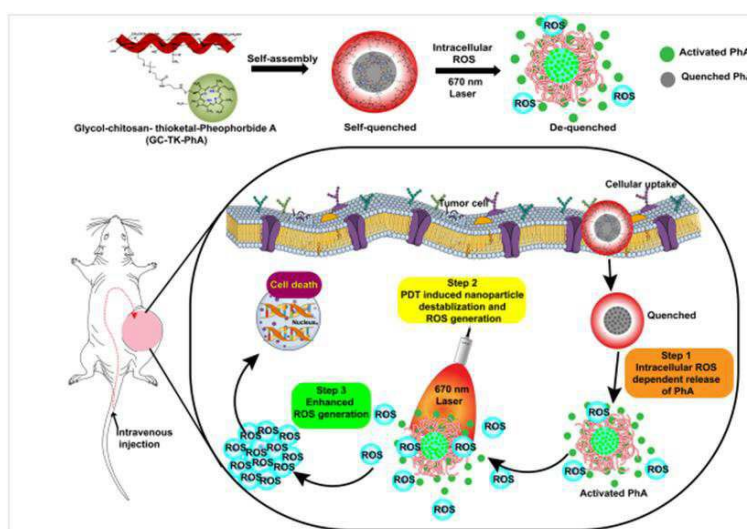
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 양친성 고분자 화합물, 이를 이용한 고분자 미셀 및 종양 치료 시스템

(57) 요약

본 발명은 양친성 고분자 화합물, 이를 이용한 고분자 미셀 및 종양 치료 시스템에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명의 양친성 고분자 화합물은 친수성 수용성 고분자의 일 측부와 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)로 공유결합됨으로써, 생체 내에서의 안정성을 향상시키고, 활성 산소종(ROS)에 민감하게 반응하여 선택적이고 효율적으로 분해됨으로써, 표적 암세포로의 선택적 축적 및 활성 산소종 발생이 우수한 광역학 치료용 고분자 미셀을 제공하는 것이다. 또한 이를 이용한 종양 치료 시스템을 제공하는 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/36 (2013.01)

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 9/1075 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

사지 우타만

전라남도 화순군 화순읍 서양로 264 전남대학교의
생명과학융합센터 기초연구동 201호

김유경

대전광역시 유성구 온천로 45 유성푸르지오시티 알
파동 1426호

이지영

경기도 안성시 고수2로 20 대우경남아파트
210-1401

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711091071
과제번호	2018R1A5A2024181
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업(선도연구센터지원사업)
연구과제명	복합암면역치료 연구센터
기 여 율	1/4
과제수행기관명	전남대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104699
과제번호	NRF-2019M3E5D1A02068573
부처명	미래부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	청각기관에 효율적 약물전달을 위한 방출제어형 주입형 약물전달 제형 및 방법 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2019.07.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415165775
과제번호	10060059
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	산업기술혁신사업
연구과제명	정밀 약물표적 및 방출기능을 갖는 외부 구동형 나노로봇 시스템 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	전남대학교산학협력단
연구기간	2015.12.01 ~ 2020.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019M3E5D1A0206808212
과제번호	2019M3E5D1A02068082
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	산소생성 막간기반 암 치료 나노플랫폼 원천기술개발 및 사업화
기 여 율	1/4
과제수행기관명	화순전남대학교병원
연구기간	2019.07.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

친수성 수용성 고분자의 일 측부와 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)로 공유결합된, 양친성 고분자 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 친수성 수용성 고분자는 폴리에틸렌글리콜계 중합체, 수용성 아크릴계 중합체, 폴리아미도아민, 수용성 폴리펩타이드, 수용성 다당체 또는 폴리글리세롤계 중합체인, 양친성 고분자 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 친수성 수용성 고분자는 아민기를 포함하는 수용성 다당체인, 양친성 고분자 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 소수성 광감작제는 포르피린계 화합물, 클로린계 화합물, 박테리오클로린계 화합물, 프탈로시아닌계 화합물, 나프탈로시아닌계 화합물 및 5-아미노레볼린 에스테르계 화합물로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것인, 양친성 고분자 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 친수성 수용성 고분자의 일 측부 및 소수성 광감작제의 일 말단은 각각 아미드기로 티오케탈 링커와 공유결합된 것인, 양친성 고분자 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 양친성 고분자 화합물은 수용성 키토산의 아민기에 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)로 공유결합된, 양친성 고분자 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항에서 선택되는 어느 한 항의 양친성 고분자 화합물이 수상에서 자기조립되어 형성된, 고분자 미셀.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 티오케탈 링커는 활성산소종에 의해 반응성을 가지는 것인 고분자 미셀.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 고분자 미셀은 병변 세포의 활성산소종에 반응하여 티오케탈링커(TK)가 분해되며 일부의 광감작제를 광활성 형태로 1차적으로 방출하고, 추가의 광조사에 의해 2차적으로 나머지 광감작제를 광활성 형태로 방출시키는

것을 특징으로 하는, 고분자 미셀.

청구항 10

근적외선 조사부 및 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 고분자 미셀을 포함하는 종양 치료 시스템.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 근적외선 조사부에서 조사되는 광은 상기 고분자 미셀에 포함되는 광감작제에 흡수되어 활성산소종을 발생시키는 것인, 종양 치료 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 양친성 고분자 화합물, 이를 이용한 고분자 미셀, 및 종양 치료 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항암 치료에 대한 최근의 유망한 접근법 중 하나는 광역학 치료 방법(Photodynamic therapy; PDT)이다.

[0003] 종래부터 일반적으로 사용되어온 화학요법은 항암제 등의 약물을 이용하여 암을 치료하는 방법으로, 암세포의 사멸과 정상세포의 생존을 위한 적절한 약물의 농도를 결정하는 데에도 많은 문제점을 가지고 있다. 암세포를 더 효과적으로 치료하기 위해 높은 농도의 항암제를 투여하게 되면 정상세포까지 세포사멸을 유도할 수 있기 때문에 낮은 농도의 항암제를 투여해도 암세포의 성장을 억제하거나 사멸을 유도할 수 있는 것이 중요하다.

[0004] 이에 반하여, 광역학 치료법(photodynamic therapy, PDT)은 각종 종양에 대해 선택성 및 광증감성이 있는 광감작제(photosensitizer, PS)에 광을 조사하여 반응성이 뛰어난 산소종인 단일항 산소($^1O_2$)를 비롯한 활성 산소종(Reactive oxygen species; ROS)를 생성하여 암세포나 각종 종양조직만을 선택적으로 공격, 궤멸시키는 방법이다. 이러한 광감작제는 암 조직에 특이적으로 축적되는 성질을 가지고 있어, 일정시간이 지난 뒤에 특정 파장의 빛을 조사하게 되면 암 조직만 괴사하고 정상조직은 보존될 수 있다. 다만, 광역학 치료법은 광의 투과성에 제한이 있고, 유도하지 않은 광에 대한 반응 등으로 인해 발생하는 광독성 등의 문제점이 있다.

[0005] 따라서 광역학 치료방법에서는 생체 내에서 우수한 안정성을 가지고, 암 세포에 대한 선택성을 높여 부작용을 현저히 저감시키면서도, 우수한 선택적 치료 효과를 얻을 수 있는 새로운 광감작제의 적용 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 제10-2019-0125007호(2019.11.06)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 양친성 고분자 화합물, 이를 이용한 고분자 미셀 및 종양 치료 시스템을 제공하는 것이다.

[0008] 구체적으로 본 발명의 일 목적은 친수성 수용성 고분자의 일 측부와 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)로 공유결합되어, 활성 산소종(Reactive oxygen species; ROS)에 대한 민감성이 우수한 양친성 고분자 화합물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 양친성 고분자 화합물이 자기조립되어 형성되어 우수한 세포 침투력을 가지며, 체내에서의 안정성 및 종양 세포에서의 선택적인 축적률이 우수한, 고분자 미셀을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 고분자 미셀이 1차적으로 활성 산소종에 반응하여 티오케탈링커가 분해되면서, 일부의 광감작제를 광활성 형태로 방출하고, 2차적으로 광조사에 의해 생성된 활성 산소종에 반응하여 나머지 광감작제를 광활성 형태로 모두 방출하여, 표적 종양 세포에 국부적으로 높은 농도의 활성 산소종을 발생시킴으로써, 효과적인 광역학 치료를 발현할 수 있는 고분자 미셀을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 고분자 미셀 및 근적외선 조사부를 포함하는 종양 치료 시스템을 제공하는 것이다

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명은 친수성 수용성 고분자의 일 측부와 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)로 공유결합된, 양친성 고분자 화합물인 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 일 양태로서 상기 친수성 수용성 고분자는 폴리에틸렌글리콜계 중합체, 수용성 아크릴계 중합체, 폴리아미도아민, 수용성 폴리펩타이드, 수용성 다당체 또는 폴리글리세롤계 중합체인 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 양태로서 상기 친수성 수용성 고분자는 아민기를 포함하는 수용성 다당체인 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 양태로서 상기 소수성 광감작제는 포르피린계 화합물, 클로린계 화합물, 박테리오클로린계 화합물, 프탈로시아닌계 화합물, 나프탈로시아닌계 화합물 및 5-아미노레볼린 에스테르계 화합물로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 양태로서 상기 친수성 수용성 고분자의 일 측부 및 소수성 광감작제의 일 말단은 각각 아미드기로 티오케탈 링커와 공유결합된 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 양태로서 상기 양친성 고분자 화합물은 수용성 키토산의 아민기에 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)로 공유결합된 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 일 양태는 상기 양친성 고분자 화합물이 수상에서 자기조립되어 형성된, 고분자 미셀인 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명의 일 양태로서 상기 티오케탈 링커는 활성산소종에 의해 반응성을 가지는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 양태로서 상기 고분자 미셀은 병변 세포의 활성산소종에 반응하여 티오케탈링커(TK)가 분해되며 일부의 광감작제를 광활성 형태로 1차적으로 방출하고, 추가의 광조사에 의해 2차적으로 나머지 광감작제를 광활성 형태로 방출시키는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 일 양태는 근적외선 조사부 및 상기 고분자 미셀을 포함하는 종양 치료 시스템일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 양태로서 상기 근적외선 조사부에서 조사되는 광은 상기 고분자 미셀에 포함되는 광감작제에 흡수되어 활성산소종을 발생시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 양친성 고분자 화합물은 친수성 수용성 고분자의 일 측부와 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)로 공유결합되어, 수상에서 고분자 미셀을 형성하여, 의도하지 않은 외부 자극에 의한 활성을 억제하여, 생체 내에서의 안정성이 더욱 향상된 효과를 갖는 것일 수 있다. 티오케탈 링커는 활성 산소종에 민감하게 반응하여, 선택적이고 효율적으로 분해됨으로써, 표적 세포에서의 광활성 형태의 광감작제를 의도적으로 방출시킬 수 있다. 또한, 표적 암세포로의 선택적 축적이 우수하고, 장시간 동안 체내에 누적되어 발생하는 독성과 같은 부작용을 방지할 수 있는 효과를 가질 수 있다.

[0024] 상기 고분자 미셀은 1차적으로 활성 산소종에 반응하여 티오케탈링커가 분해되면서, 일부의 광감작제를 광활성 형태로 방출하고, 2차적으로 광조사에 의해 생성된 활성 산소종에 반응하여 나머지 광감작제를 광활성 형태로 모두 방출하여, 표적 종양 세포에 국부적으로 높은 농도의 활성 산소종을 발생시킴으로써, 표적 병변 세포로의 활성 산소종의 농도를 향상시켜, 세포의 사멸 또는 활성도를 낮출 수 있다. 또한 이를 이용하여, 더욱 효과적인 광역학 종양 치료 시스템을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 실시예 2에 따른 고분자 미셀의 작용기전을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 실시예 1에 따른 양친성 고분자 화합물을 제조하는 반응식을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 실시예 1에서 제조한 글리콜키토산-TK-광감작제(GC-TK-PhA)의 $^1\text{H-NMR}$ 및 ATR-FTIR 분광법을 이용하여 측정된 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 및 ATR-FTIR 스펙트럼을 각각 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 2에서 제조된 GC-TK-PhA 미셀의 CQC, 크기분포, Fe-TEM 이미지 및 UV 흡광도를 각각 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 실시예 2에서 제조된 GC-TK-PhA 미셀의 안정성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실시예 2에서 제조된 GC-TK-PhA 미셀의 특성을 나타낸 것으로, 도 6a는 고분자 미셀의 크기 변화를 나타낸 것이고, 도 6b는 시간에 따른 크기 분포를 측정하여 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀의 일중항 산소 생성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀의 시험관내 세포 생존율을 MTS 분석을 이용하여 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀의 세포 흡수 및 활성 산소종 발생을 측정하여 나타낸 것으로, 도 9a는 GC-TK-PhA 미셀의 세포 흡수도이고, 도 9b는 세포 내 PhA 형광 강도를 나타낸 것이고, 도 9c 및 도 9c는 각각 PhA의 형광 현미경 이미지 및 형광 프로프(DCF-DA)의 형광 강도를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀의 생체 내 형광 이미징 시스템(fluorescence imaging system)을 사용하여 평가한 것을 나타낸 것으로, 도 10a는 생체 내 분포를 나타낸 것이고, 도 10b는 종양의 생체 외 형광 영상화를 나타낸 것이며, 도 10c는 GC-TK-PhA 미셀 주사 후의 시간에 따른 농도 변화를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀의 항 종양 특성을 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀의 항 종양 특성을 조직학적 변화를 TUNEL 분석하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명을 상세히 설명한다. 다음에 소개되는 도면들은 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명은 이하 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 이하 제시되는 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다.
- [0027] 또한 달리 정의되지 않는 한, 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자 중 하나에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 설명에 사용되는 용어는 단지 특정 구체예를 효과적으로 기술하기 위함이고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0028] 또한 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.
- [0029] 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 용어 '광역학 치료법'은 '광역동 치료법', '광역학 요법'과 동일한 의미로 사용된 것이다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어 '활성 산소종'은 '반응성 산소종', 'ROS' 등과 같이 반응성이 높은 산소종을 의미하며, '단일항 산소', '일중항 산소', ' $^1\text{O}_2$ '를 포함하는 개념이다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 '광역학 화합물'은 '광감작제(photosensitizer)'을 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 '암세포'는 '종양', '종양 세포', '암'과 동일한 의미로 사용된 것이다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어 '붕괴'는 화합물질의 결합부분이 '분해'되는 내용을 포함하는 개념이다.

- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 상기 '글리콜 치환 키토산'은 '글리콜 키토산'과 동일한 의미로 사용된 것이다.
- [0037] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명은 양친성 고분자 화합물, 이를 이용한 고분자 미셀 및 종양 치료 시스템을 제공한다.
- [0038] 본 발명자는 생체 내에서 안정적으로 유지되고, 표적 병변 세포에 대한 높은 축적률을 가지고, 정상세포에 대한 독성을 최소화하여, 광역학 치료법(photodynamic therapy)을 효과적으로 구현할 수 있는 광감작제에 대한 연구를 심화하였고, 친수성 수용성 고분자의 일 측부와 소수성 광감작제의 일 말단을 티오케탈 링커(TK)로 공유결합함으로써 형성된 양친성 고분자 화합물을 합성함으로써 상기와 같은 효과를 구현할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0039] 이하, 본 발명의 일 양태에 따른 양친성 고분자 화합물에 대해 상세히 설명한다.
- [0040] 본 발명의 일 양태에서 양친성 고분자 화합물은 친수성 수용성 고분자의 일 측부와 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(thioetheral linker, TK)로 공유결합된 것일 수 있다.
- [0041] 상기 친수성 수용성 고분자는 친수성을 가지며, 물에 용해성이 높은 고분자를 의미하는 것으로, 중합도(the degree of polymerization, DP)가 150 이상일 수 있고, 구체적으로는 180 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 중량 평균 분자량의 범위는 25,000 g/mol 이상일 수 있고, 구체적으로는 30,000 g/mol 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 친수성 수용성 고분자는 제한되지는 않으나, 일 예로 폴리에틸렌글리콜계 중합체, 수용성 아크릴계 중합체, 폴리아미도아민, 수용성 폴리펩타이드, 수용성 다당체, 폴리글리세롤계 중합체 또는 이들의 유도체들 등을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 아민기를 포함하는 수용성 다당체일 수 있다.
- [0042] 상기 수용성 폴리펩타이드는 제한되는 것은 아니나, 구체적으로 폴리글루타민산(polyglutamic acid), 폴리아스파르트산(polyaspartic acid), 폴리아스파르트아미드(polyaspartamide), 및 이의 공중합체에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 수용성 다당체는 구체적으로 키토산, 글리콜 치환 키토산, 히알루로산, 알긴산, 텍스트란, 펙틴, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 아세테이트 숙시네이트 및 이의 유도체 등에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 글리콜 치환 키토산(Glycol chitosan, GC)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니지만, 상기 글리콜 치환 키토산(GC)를 사용하는 경우, 치환된 글리콜기에 의하여, 수용성이 증가하여 후술하는 고분자 미셀을 형성하는 경우, 수용액상에서 입자 형태로 안정하게 유지될 수 있고, 또한, 상기 키토산의 아민기에 의하여 세포 내로 침투가 용이하여 더욱 바람직할 수 있다..
- [0044] 상기 소수성 광감작제는 광 조사시 일중항 산소를 생성하여, 상기 일중항 산소가 이웃하는 세포막과 상호작용하여 세포를 사멸시키게 하기 위한 것으로, 일반적으로 광감작제(photosensitizer, PS)로 사용되는 물질이면 제한되지 않으나, 구체적으로 포르피린계 화합물, 클로린계 화합물, 박테리오클로린계 화합물, 프탈로시아닌계 화합물, 나프탈로시아닌계 화합물 및 5-아미노레볼린 에스테르계 화합물 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0045] 상기 소수성 광감작제는 상기 친수성 수용성 고분자 100 중량부에 대하여 0.001 내지 1 중량부, 구체적으로는 0.005 내지 0.1 중량부로 반응되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 친수성 수용성 고분자와 광감작제를 연결하는 연결기는 티오케탈 링커(thioetheral linker, TK)를 이용하여 공유 결합된 것일 수 있고, 구체적으로는 상기 친수성 수용성 고분자의 일 측부 및 소수성 광감작제의 일 말단은 각각 아미드기로 티오케탈 링커와 공유결합된 것일 수 있다.
- [0047] 상기 티오케탈 링커(thioetheral linker, TK)는 활성 산소종(ROS)에 대한 민감도가 매우 높고, 정상적인 생리적 조건에서의 결합 안정성이 우수하여, 후술하는 고분자 미셀이 1차적으로 병변 세포 주변의 활성 산소종(ROS) 및 2차적으로 광 조사에 의하여 고분자 미셀이 붕괴되며 방출되는 광활성 형태의 광감작제에 의해 발생하는 활성 산소종에 대한 반응도가 활성 산소종의 발생을 가속화시킬 수 있어 바람직하다.
- [0048] 바람직하게, 상기 양친성 고분자 화합물의 구체적인 일 양태는 수용성 키토산의 아민기에 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)로 공유결합된 것일 수 있다.

- [0049] 상기 소수성 광감작제는 상기 수용성 키토산의 글루코사민(glucosamine) 유닛 100개에 대하여 치환되는 개수는 평균 1 내지 20개일 수 있고, 구체적으로는 1 내지 10개일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 1.5 내지 5.5개일 수 있다.
- [0051] 이하, 본 발명의 일 양태에 따른 고분자 미셀 및 이를 이용한 종양 치료 시스템에 대해 상세히 설명한다.
- [0052] 본 발명의 일 양태에서 고분자 미셀은 전술한 바와 같이, 상기 친수성 수용성 고분자의 일 측부와 소수성 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(thioetal linker, TK)로 공유 결합된 양친성 화합물이 수상에서 자기조립(Self-assembly)되어 형성되는 것일 수 있다.
- [0053] 바람직한 일 양태로서, 상기 수용성 고분자의 일 측부와 광감작제의 일 말단이 티오케탈 링커(TK)에 의해 결합되는 경우, 수상에서 형성하는 고분자 미셀은 열역학적으로 균일하고 안정하며, 광에 비활성인 자기 켄칭(self-quenching) 특성을 구현하는 것일 수 있다.
- [0054] 상기 고분자 미셀은 친수성 셀부와 소수성 코어부로 이루어지며, 상기 소수성 광감작제의 노출을 최소화하고, 자유 에너지를 낮추기 위해, 상기 소수성 광감작제가 미셀의 코어에 위치하면서 소수성 코어부를 형성하는 것일 수 있다.
- [0055] 상기와 같은 고분자 미셀은 자기 켄칭(self-quenching) 효과를 구현하여, 생체 내에서 순환 중에는 광에 대하여 비활성인 상태로 안정적으로 존재할 수 있다. 또한, 고분자 미셀이 위치하는 수상의 환경에 대한 민감도가 우수하여, 표적 선택성 및 방출성이 우수한 기능성을 구현할 수 있어 바람직하다.
- [0056] 상기 범위에서 고분자 미셀의 동적 광산란법(DLS) 분석을 사용하여 측정된 수력학적 직경이 1 내지 1,000 nm일 수 있고, 구체적으로 50 내지 500 nm, 더욱 구체적으로는 100 내지 250 nm인 것일 수 있다.
- [0057] 상기 광역학 화합물에 조사되는 광은 광역학 화합물을 활성화시킬 수 있는 파장대의 광이면 제한되지는 않으나, 바람직하게는 근적외선(Near-infrared, NIR) 일 수 있다. 상기 근적외선은 조직에 대한 침투력이 깊고, 적은 산란과 매우 낮은 광독성을 가짐으로 바람직하다.
- [0058] 본 발명에 따른 약물전달체의 바람직한 일 양태에 따르면, 소수성 광감작제가 활성산소종에 분해성(ROS-labile)을 가지는 티오케탈 링커(TK)를 통해 친수성 수용성 고분자와 결합되어, 상술한 바와 같이 광에 비활성의 자기 켄칭(self-quenching) 특성을 갖는 안정적인 고분자 미셀을 형성한다. 상기 티오케탈 링커(TK)는 고분자 미셀이 위치하는 주변 환경의 병변 세포로부터 발생하는 활성 산소종(ROS)에 반응하여 쉽게 분해될 수 있다. 상기 분해 반응에 의해 1차적으로 소수성 광감작제가 광활성 형태로 분리됨에 따라, 고분자 미셀은 양친성을 상실하게 되며, 콜로이드 안정성은 급격히 감소되어 붕괴될 수 있다. 한편, 고분자 미셀이 위치하는 병변 조직 부위에 근적외선을 조사할 경우, 광활성 형태로 분리된 광감작제가 조사된 근적외선을 흡수하여 활성 산소종을 발생시키면서, 2차적으로 티오케탈링커(TK)가 분해되며, 분리되지 않은 소수성 광감작제가 광활성 형태로 모두 분리 방출되고, 조사되는 근적외선에 의하여 추가의 활성 산소종의 발생량을 급격히 향상시키는 것이다.
- [0059] 즉, 병소에 광을 조사하는 경우, 추가로 생성되는 활성 산소종(ROS)에 의하여 붕괴되지 않고 남아 있던 고분자 미셀이 즉각적으로 분해되면서 코어 부분의 소수성 광감작제가 광활성 형태로 분리되면서, 짧은 시간 내에 대량으로 방출되어, 표적 암 세포 내에서 국부적으로 높은 농도의 활성 산소종을 발생시킴으로써, 효과적으로 암세포의 활성을 저감시키거나 사멸시킬 수 있어 더욱 바람직하며, 효과적인 종양 치료제로 적용 가능한 것이다.
- [0060] 상기와 같은 특성을 가지는 본 발명의 일 양태에 따른 약물 전달체는 근적외선 조사부와 함께 구비되어 바람직한 종양 치료 시스템으로 사용될 수 있다.
- [0061] 이하 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명한다. 아래에서 설명하는 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명이 실시예에 한정되지 않는다.
- [0062] 이하 실시예 및 비교예를 바탕으로 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예 및 비교예는 본 발명을 더욱 상세히 설명하기 위한 하나의 예시일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 비교예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0064] [실험방법]

- [0065] 1. 물리화학적 특성 측정
- [0066] GC, TK, TK-PhA, GC-PhA 및 GC-TK-PhA는 용매로서 D₂O 및 DMSO-d₆를 사용하여, ¹H-NMR 분광법(AVANCE III 600, Bruker, US; 600 MHz)에 의해 분석하였다.
- [0067] Nicolet iS 6 분광계(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 ATR-FTIR 스펙트럼을 측정하였다. UV-vis 분광 광도계(V-730, ASCO, 대한민국)을 사용하여, PhA의 커플링 비율을 측정하였고, PhA의 표준 곡선 669 nm를 기준으로 PhA의 함량을 계산하였다.
- [0068] 각 농도를 0.5 mg/L 에서 1.5×10^{-3} mg/L의 CG-PhA 및 GC-TK-PhA 용액을 피렌 용액과 혼합하여, 최종 피렌의 농도가 2.5×10^{-5} M로 제조한 후, 형광 분광계(FS-2 SINCO, Korea)를 이용하여 350 ~ 500 nm의 여기 파장에서 형광 발광 스펙트럼을 측정하였다.
- [0069] 2. 수력학적 입경 평가
- [0070] 5 %의 phosphate-buffered saline (PBS)에 NP를 용해시키고, 632nm의 He-Ne 레이저를 광원으로한 DLS 분광법(Dynamic light scattering)으로 평균 유체 역학적 직경을 측정하였다.
- [0071] 3. 티오케탈링커(TK)의 분해 측정
- [0072] 400 mM H₂O₂ 및 3.2 μM CuCl₂(펜톤 시약)를 함유하는 수용액을 사용하여 ROS 환경을 모방하였다. GC-TK-PhA 미셀을 37 °C에서 펜톤 시약을 함유 한 수용액에 분산시키고 GC-TK-PhA 미셀의 평균 유체 역학적 직경의 변화를 DLS를 사용하여 평가하였다. 티오케탈링커(TK)의 피크는 ¹H-NMR을 통해 확인하였다.
- [0073] 또한, self-quenching 특성을 확인하기 위하여, GC-PhA NP, GC-TK-PhA NP 및 유리된(free) PhA를 PBS 및 DMSO에 용해시켜, 흡광도 스펙트럼을 측정하였다.
- [0074] 4. 일중항 산소 생성(singlet oxygen generation, SOG)의 측정
- [0075] 1 mL의 1,3-디페닐이소벤조푸란(1,3-diphenylisobenzofuran, DPBF) (DMSO 중 5 mg/mL)를 200 mL의 GC-TK-PhA, GC-PhA (0.5 mg /mL)와 각각 혼합하고 670 nm의 광을 100 mW cm⁻² 세기로 다른 시간 간격으로 조사하였다. 세포 내 ROS 농도를 모방하기 위해, 100 μM H₂O₂에 샘플을 첨가하고 상기와 동일하게 광을 조사하여실험을 수행 하였다. 각 시점에서 404 nm에서 DPBF 흡광도 감소를 SPARK 10M 마이크로 플레이트 리더 (Tecan, Grodig, Austria)를 사용하여 측정 하였다.
- [0076] 5. 세포 흡수 및 생세포 이미징 측정
- [0077] Lab-Tek®챔버 슬라이드에 1×10^4 CT-26 세포 / 웰을 시딩함으로써 세포 내 흡수 및 GC-TK-PhA의 방출을 조사 하였다. 24 시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 PhA(1 μg/mL) 및 GC-TK-PhA (31 μg/mL)를 첨가하고, 세포를 추가 6 시간 동안 배양 하였다. 배지를 흡인하고 신선한 배지를 첨가 한 후, 2 분 동안 670 nm 레이저 (100 mW/cm²)로 세포를 조사 하였다.
- [0078] 이어서 배양 후, 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 3 회 세척하고, 4 % paraformaldehyde 로 고정시키고, 4' ,6-diamidino-2-phenylindole로 염색 하였다.
- [0079] 공초점 레이저 스캐닝 현미경(confocal laser scanning microscopy)을 사용하여 샘플로부터 수득 된 형광을 가시화하고, 세포에 의한 PhA 흡수를 1 % sodium dodecyl sodium를 사용하여 세포를 용해시키고, DMSO 중에 희석 하여 PhA를 추출함으로써 평가 하였다. PhA에 대한 형광 강도는 각각 415 nm 및 673 nm의 여기 및 방출 파장에서 측정하였다.
- [0080] 6. 세포 내 ROS 추적 특성 측정
- [0081] 세포 내 ROS를 측정하기 위해, 형광 프로브로 2' ,2'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCF-DA)를 사용하였다. 간략하게, CT-26 세포(1×10^4 세포 / 웰)을 시딩하고, 상이한 시간 간격 동안 샘플 및 레이저 조사와 함께 인큐베이션 한 후, 세포를 D-Hanks 용액에서 25 μM DCF-DA로 처리하고 20 분 동안 추가로 배양하였다. 배양 후, 세포의 형광 스펙트럼을 434 nm의 여기 파장 및 535 nm의 방출 파장에서 측정하였다. 세포의 형광 이미지는

형광 현미경(Evos FL Auto 2, Thermo Fisher Scientific, USA) 하에서 관찰하였다.

7. 생체 내(In vivo) 분포 측정

모든 동물 실험은 한국 전남 대학교 의과 대학과 전남대학교 병원(CNU IACUC-H-2018-59)의 제도법에 따라 수행되었다. 5 주령의 수컷 근친 Balb / c 누드 마우스 (한국 성남시 Orient Bio Inc.)를 1.0×10^6 의 CT-26 세포로 측면에 피하 주사하였다. 종양 부피가 대략 100 mm³에 도달하면, 마우스를 무작위로 분류하여 유리된(free) PhA (5 mg / kg), GC-TK-PhA (5 mg / kg PhA) 및 GC-TK-PhA NP (5 mg / kg의 PhA)의 3가지 그룹으로 나누어, 정맥 내(i.v.)주사하였다. 형광 표지된 유기체 생물 영상 장치(fluorescence-labeled organism bio-imaging instrument, FOBI; 한국 경기도 Neo-Science)를 사용하여 상이한 시간 간격으로 광학 영상화를 통해 생체 분포 프로파일을 측정하였다. 주사 24 시간 후에 마우스를 희생시키고, 모든 주요 기관 및 종양을 수집하였다. 해부된 정상 기관 (간, 폐, 비장, 심장 및 신장과 같은) 및 종양의 형광 강도 및 이미지를 측정하였다.

8. 종양이 있는 쥐에 대한 광역학 치료법

80 내지 100 mm³의 종양 부피를 갖는 CT-26 종양 보유 마우스를 화학-광 역학 연구에 사용하였다. 종양 보유 마우스를 각 그룹에 5 마리의 마우스를 갖는 4 개의 그룹으로 분류하였다. (4개 그룹은 PBS, PhA + 레이저, GC-TK-PhA 및 GC-TK-PhA + 레이저) 대조군 및 샘플 그룹을 정맥 내 주사하였다. 1, 4 및 6일에 5 mg/kg에 상응하는 용량으로 주사하고, 24 시간 이후, 종양 영역을 15 분 동안 100mW cm⁻²의 670 nm 레이저를 조사하였다. 각 동물의 종양 부피 및 전신 체중을 교대로 2일마다 측정하였다.

9. 면역 조직 화학 분석(Immunohistochemistry analysis)

모든 주요 기관 및 절제된 종양을 10 % neutral formaldehyde에 고정하고, 파라핀에 담지하였다. 두께가 5 μm인 조직 부분을 hematoxylin/eosin (H&E)으로 염색하였다. 제조사의 설명서(DeadEnd™ Fluorometric TUNEL system, Promega, USA)에 따라 TUNEL 분석을 수행하였고, 이미지는 형광 현미경으로 측정하였다.

[실시예 1] 양친성 고분자 화합물을 이용한 고분자 미셀의 제조

도 2에서와 같이 Step 1 내지 Step 3의 과정을 통하여 글리콜키토산-TK-광감작제(GC-TK-PhA)을 제조하였다.

Step 1: 티오케탈링커(TK)의 제조

49 mmol의 3-머캅토프로피온산(3-mercaptopropionic acid)을 98 mmol의 아세톤에 용해시키고, HCl 가스를 퍼지하며 37 °C에서 6시간 동안 일정하게 교반하면서 생성된 생성물을 결정화 될 때까지 냉각시켰다. 결정화된 생성물을 여과하고, n-헥산(n-hexane)으로 세척하고, 이후 차가운 증류수로 한 번 더 세척한 후, 동결건조시켰다.

Step 2: 티오케탈링커 접합된 광감작제(TK-PhA)의 합성

상기 step 1에서 제조된 티오케탈링커(TK) 3 mM과 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC] 6 mm 및 N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) 6 mM를 20 mL의 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO)에 용해시키고, 23 °C에서 12 시간 동안 교반 한 다음, 1 mM의 DMSO에 아민화된 PhA(PhA NH₂)를 첨가하였다. EDC에 NHS가 혼합된 1 mM의 용액을 추가로 보충한 후, 16시간 동안 교반하였다. 교반 후, 혼합 용액을 증류수에 대해 molecular cut-off(MWCO)가 1,000인 조건에서 투석하여 반응 부산물을 제거한 다음, 동결건조시켜 티오케탈링커가 접합된 광감작제(TK-PhA)를 제조하였다.

Step 3: 글리콜키토산-TK-광감작제(GC-TK-PhA) 제조

상기 Step 2에서 제조한 10 mL의 DMSO 중 1 mM의 TK-PhA를 23 °C에서 6 시간 동안 3 mM의 NHS의 존재하에 3 mM의 EDC와 교반하였다. 이후 증류수(DW): DMSO 혼합용액(3 : 2, v/v) 에 용해된 4 mg/mL 글리콜키토산(Glycol chitosan, GC; DP ≥ 200)를 적가하고, 적가한 후, 48 시간 동안 반응시킨 후 용액을 증류수에 대해 molecular cut-off(MWCO)가 2,000인 조건에서 48 시간 동안 투석하고, 1,400 rpm에서 20분 동안 원심 분리 한 후 0.80 μm의 주사기 필터를 이용하여 여과한 후, 동결건조하여, 글리콜키토산-TK-광감작제(GC-TK-PhA)를 제조하였다.

[실시예 2]

상기 실시예 1에서 제조한 글리콜키토산-TK-광감작제(GC-TK-PhA) 1 mg을 증류수 1 mL에 3시간 동안 용해시켜,

GC-TK-PhA 미셀을 형성하였다.

[0099] [비교예 1] 글리콜키토산-광감작제(GC-PhA) 제조

[0100] 1 mM의 PhA, 3 mM의 EDC 및 3 mM의 NHS를 20 mL의 DMSO에 용해시킨 후, 23 °C에서 6 시간 동안 교반 하였다. 이후, 증류수(DW): DMSO 혼합용액(3 : 2, v/v) 에 용해된 4 mg/mL GC를 적가하고, 적가한 후, 48 시간 동안 교반 한 다음, 증류수에 대해 molecular cut-off(MWCO)가 2,000인 조건에서 48 시간 동안 투석하고, 1,400 rpm에서 20분 동안 원심 분리 한 후 0.80 μ m의 주사기 필터를 이용하여 여과한 후, 동결건조하여, 글리콜키토산-광감작제(GC-PhA)를 제조하였다.

[0101] [비교예 2]상기 비교예 1에서 제조한 글리콜키토산-광감작제(GC-PhA) 1 mg을 증류수 1 mL에 3시간 동안 용해시켜, GC-PhA 미셀을 형성하였다.

[0103] 상기 실시예들 및 비교예들에 대해 하기와 같이 특성을 평가하였다.

[0104] [실험예 1] 양친성 고분자 화합물의 생성 확인

[0105] 상기 실시예 1에서 제조한 GC-TK-PhA의 조성을 확인하기 위하여 ^1H -NMR 및 ATR 분광법을 이용하여 측정된 ^1H -NMR 스펙트럼 및 ATR 스펙트럼을 각각 도 3a 및 도 3b에 나타내었다.

[0106] 도 3a에서 GC-TK-PhA의 티오케탈링커(TK)는 1.5 ppm에서 관찰되었고, 도 3b에서 아마이드 결합(1569 cm^{-1})이 형성된 것을 확인할 수 있었다. 이는 양친성 고분자 화합물이 성공적으로 합성됨을 시사한다.

[0107] [실험예 2] 고분자 미셀의 자가조립 및 자가 **퀸칭** 특성 확인

[0108] 상기 실시예 2 및 비교예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀 및 GC-PhA 미셀을 피렌(pyrene)을 형광 프로브로 사용하여, PhA 치환도, 크기, 임계 자가-**퀸칭** 농도(critical self-quenching concentrations, CQC) 및 다분산성 지수(Polydispersity, PDI)를 측정하여, 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0109]	공급 물비 (PhA/Glucosamine residues)	DS* (단위: %)	CQC (단위: mg/L)	크기 (단위: nm)	제타전위 (단위: mV)	PDI
실시예1 (GC-TK-PhA)	0.1	3.2	63.1	194.5	26.93 $\pm$ 3.7	0.218
비교예1 (GC-PhA)	0.1	3.0	50.1	202.8	27.13 $\pm$ 2.8	0.228
* DS: UV-vis spectra에 의해 측정된, GC의 100개의 glucosamine 유닛 당 치환된 PhA 개수의 백분율을 나타냄.						

[0110] 상기 실시예 2 및 비교예 2에서 제조된 고분자 미셀의 임계 자체-**퀸칭** 농도(CQC), 크기분포, Fe-TEM 이미지 및 UV 흡수 스펙트럼을 각각 도 4a, 4b, 4c 및 4d에 나타내었다. 상기 표 1 및 도 4에서 알 수 있듯이, 실시예 2에서 제조된 GC-TK-PhA 미셀은 비교예 1의 GC-PhA 미셀 보다 PhA의 치환도가 높고, 생성되는 미셀의 크기가 더 작으며 PDI 값도 작은 것을 확인할 수 있다. 이는, 티오케탈링커(TK)로 광감작제인 PhA를 글리콜키토산(GC)을 결합하는 경우, 더 많은 광감작제를 결합시킬 수 있으며, 제조되는 미셀의 크기가 작고, 더욱 안정성이 우수한 것을 나타내는 것이다.

[0111] 또한, 도 4a에서 실시예 2에서 제조된 고분자 미셀의 경우, 수성 기반에서 소수성인 PhA가 내부의 코어 부분으로 위치하면서, 피렌의 형광 강도가 피렌 분자와 PhA 분자 사이의 강한 π - π 스택킹 작용으로 인하여, 급격한 FRET-기반 **퀸칭** (quenching)효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0112] 더욱이, 도 4d는 자가 **퀸칭** 효과를 확인하기 위해, 실시예 1에서 제조한 GC-TK-PhA와 비교예 1에서 제조한 GC-PhA를 각각 DMSO 및 PBS에 분산시켜, UV 흡광도를 측정하여 나타낸 것으로, DMSO에서의 UV-vis 스펙트럼과 비교하여, PBS에서의 GC-TK-PhA 미셀은 소수성인 코어 부분에서 PhA의 자가 **퀸칭** 효과로 인해 bathochromic의 이

동으로 PhA 피크의 낮은 흡광도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. PBS에서 GC-TK-PhA 미셀의 스펙트럼 패턴은 PBS에서 단독 PhA와 유사하지만 피크 강도가 증가 하였는데, 이는 수용성 GC와의 접합에 의한 소수성 PhA의 가용화 효과에 기인 하는 것을 시사하는 것이다.

- [0113] [실험예 3] 고분자 미셀의 안정성 측정
- [0114] 상기 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀 5 %의 FBS를 포함하는 PBS에서 최대 120 시간 동안 모니터링 하여, 도 5에 나타내었다.
- [0115] 도 5에서와 같이, GC-TK-PhA 미셀은 5일 이상의 시간 동안 크기 변화가 없이 안정한 것을 확인할 수 있었다.
- [0116] [실험예 4] 고분자 미셀의 활성산소종(ROS)에 의한 티오케탈링커(TK) 분해 거동 측정
- [0117] 상기 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀 및 비교예 2에서 제조한 GC-PhA 미셀을 각각 400 mM H₂O₂와 3.2 μ M CuCl₂의 혼합용액에 2일 동안 배양한 후의 미셀의 크기 변화 및 시간에 따른 크기 분포를 DLS를 이용하여 측정 하여 각각 도 6a 및 도 6b에 나타내었다. 또한, ¹H NMR 스펙트럼 값을 도 6c에 나타내었다.
- [0118] 도 6a에서와 같이, GC-TK-PhA 미셀은 ROS 환경 하에서 입자의 크기가 12 시간 이후부터 급격한 증가를 보이는 반면, GC-PhA 미셀의 경우, 48 시간 동안 크기의 변화가 없는 것을 확인할 수 있었고, 도 6b에서 확인할 수 있듯, ROS에 노출된 경우, 입자크기 분포 역시, 유니모달(unimodal) 패턴에서 멀티모달(multimodal) 패턴으로 변화하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 6c에서와 같이 ROS에 노출된 GC-TK-PhA 미셀은 TK 링커 피크의 완전한 소실을 확인할 수 있었다. 이는 활성산소종(ROS)에 노출될 경우, GC-TK-PhA 미셀의 TK 링커가 분해되면서, 입자의 크기가 증가하고, 동시에 입자의 분해(dissociation)가 발생하여 입자의 분포가 다분산성으로 변화하는 것을 의미하는 것이다.
- [0119] [실험예 5] 일중항 산소 생성(SOG) 측정
- [0120] DPBF를 프로프로 사용하여, 상기 실시예 2 및 비교예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀 및 GC-PhA 미셀의 일중항 산소 생성을 측정하여 도 7에 나타내었다.
- [0121] 도 7에서와 같이, ROS가 존재하지 않는 환경에서는 GC-TK-PhA 미셀 및 GC-PhA 미셀 모두 시간에 따라 DPBF 흡광도의 점진적인 감소를 나타내었다. 이는 상기 두 미셀 모두 자가 **퀀칭** 효과로 인해, 일중항 산소 생성(SOG) 특성이 발현되지 않는 것을 의미하는 것이다. 그러나 ROS가 존재하는 환경에서는, GC-PhA 미셀과 달리 GC-TK-PhA 미셀은 더욱 급격한 DPBF 흡광도 값의 감소를 나타내었다. 이는 GC-TK-PhA 미셀에서의 TK 링커의 분해에 따라, 광활성 형태의 PhA의 방출량이 증가하여, 미셀의 불안정화를 극대화시키고, 방출된 PhA는 광역학 반응에 따라 더 많은 일중항 산소를 생성하는 후속반응을 일으키는 것이다.
- [0122] [실험예 6] In vitro 조건에서의 세포 생존력 및 광역학 요법 측정
- [0123] 상기 실시예 2 및 비교예 2에서 제조한 미셀의 MTS 분석을 이용하여 측정한 시험 관내 세포 생존율을 도 8에 나타내었다. 이때, 도 8에서 P.C는 positive control로 처리하지 않은 세포를 나타내고, N.C는 negative cells로 0.1% triton X-100 처리한 세포를 나타내는 것이다.
- [0124] 도 8a에서와 같이, GC-TK-PhA 미셀 및 GC-PhA는 세포 생존율이 일정하게 유지되는 것을 통해 상기 두 미셀 모두 비독성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 8b 및 도 8c에서 확인할 수 있듯이, GC-TK-PhA 미셀은 광 조사시, GC-PhA 미셀과 비교하여 세포 생존율이 약 5배 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 GC-TK-PhA 미셀의 광 조사에 의한 광 활성 형태로의 PhA의 방출이 증가하며, 미셀이 불안정해지면서 신속하게 광활성 형태의 PhA의 방출량이 증가함에 따라 생성되는 활성산소종의 증가에서 기인한 것을 나타내는 것이다. 더욱이 도 8e에서와 같이, GC-TK-PhA 미셀의 경우, 시간이 지남에 따라 세포 사멸율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 GC-TK-PhA 미셀이 암세포에 대해 향상된 광역학 활성을 나타낼 수 있는 것을 시사하는 것이다.
- [0125] [실험예 7] In vitro 조건에서의 세포 흡수 및 활성 산소종(ROS)의 생산
- [0126] 상기 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀의 세포 흡수 및 활성 산소종 발생을 측정하여 도 9에 나타내었다. 도 9a는 공초점 현미경으로 측정한 GC-TK-PhA 미셀의 세포 흡수도이고, 도 9b는 세포 내 PhA 형광 강도(여기과장 = 415 nm, 방출과장 = 673 nm)를 나타낸 것이다. 또한, 도 9c 및 도 9c는 각각 PhA의 형광 현미경 이미지 및 형광 프로프(DCF-DA)의 형광 강도를 나타낸 것이다.

- [0127] 도 9a에서와 같이, GC-TK-PhA 미셀의 경우, 광 조사시 적색 형광 신호가 CT-26 세포의 세포질 전체에 분포된 것을 확인할 수 있었다. GC-TK-PhA 미셀로 처리된 세포에서 높은 세포 흡수를 가져, 더 강한 적색 형광 신호를 나타내는 것을 확인하였다. 이는 양으로 하전된 GC-TK-PhA와 음으로 하전된 세포막 사이의 강한 상호 작용의 결과를 나타내는 것이다.
- [0128] 도 9b 및 도 9c에서 확인할 수 있듯이, 광조사 하는 경우, GC-TK-PhA 미셀 처리된 세포에서 형광 강도 및 ROS 발생량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 세포 내 ROS에 반응하여 GC-TK-PhA 미셀의 티오케탈링커(TK)의 분해에 의해 광활성 형태의 PhA가 방출되고, 광 조사에 의하여, 세포 내 ROS 수준이 증가하면서, GC-TK-PhA 미셀의 붕괴를 증가시킴에 따른, ROS 발생량의 증가를 나타내는 것이다.
- [0129] 또한, 도 9d에서 확인할 수 있듯이, 광조사가 GC-TK-PhA 미셀의 ROS 방출을 현저히 향상시키는 것을 알 수 있다. 즉, 세포 내 수준의 ROS의 증가는 TK 링커의 더 빠른 분해 및 GC-TK-PhA 미셀의 효율적인 붕괴를 초래하여, 효과적인 광역학 치료를 가능하게 하는 것을 의미한다.
- [0130] [실험예 8] 생체 내 고분자 미셀의 분포 측정
- [0131] 상기 실시예 2 및 비교예 2에서 제조한 미셀과 유리(free) PhA의 종양 표적화 특성을 생체 내 형광 이미징 시스템(fluorescence imaging system)을 사용하여 평가하여, 도 10에 나타내었다.
- [0132] 도 10 a는 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀을 CT26 종양을 가지는 쥐의 정맥에 주사하여, 생체 내 분포를 나타낸 것이고, 도 10b는 종양의 생체 외 형광 영상화를 나타낸 것이다. 도 10c는 GC-TK-PhA 미셀 주사 후의 시간에 따른 농도 변화를 나타낸 것이다.
- [0133] 도 10a에서 도시된 바와 같이 GC-TK-PhA 미셀의 종양에 대한 축적률 우수한 점을 알 수 있다. 이는 GC-TK-PhA 미셀의 생체 내 순환 안정성이 우수하고, 향상된 투과성을 가지며, 정상 세포 보다 종양에서의 축적률이 우수한 점을 나타내는 것이다.
- [0134] 또한, 도 10b 및 10c에서 GC-TK-PhA 미셀은 종양에서의 ROS에 반응해, TK 링커의 신속한 분해에 의해, ROS 생성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0135] 즉, GC-TK-PhA 미셀은 종양에 특이 적으로 축적되고, 종양 영역 내에서 PhA를 순차적으로 방출하여 레이저 조사시 ROS 생성을 향상시킬 수 있음을 시사한다.
- [0136] [실험예 9] In vivo 조건에서의 광역학 요법 측정
- [0137] 상기 실시예 2에서 제조한 GC-TK-PhA 미셀의 항 종양 특성을 도 11 및 도 12에 나타내었다.
- [0138] 도 11a는 GC-TK-PhA 미셀을 주사한 CT-26 종양 보유 쥐의 종양의 부피 변화를 측정하여 나타낸 것이고, 도 11b는 GC-TK-PhA 미셀을 주사한 CT-26 종양 보유 쥐의 체중 변화를 나타낸 것이다.
- [0139] 도 12는 GC-TK-PhA 미셀을 주사한 CT-26 종양 보유 쥐의 주요 기관 및 종양 조직을 절제하여, 조직학적 변화를 TUNEL 분석하여 나타낸 것이다.
- [0140] 도 11a 및 11b에서와 같이, 광 조사가 없는 경우 GC-TK-PhA 미셀을 주입한 그룹들과 다른 그룹들의 종양 무게가 큰 차이가 나지 않으나, 광 조사를 병행하는 경우, 종양의 무게가 광 조사 전에 비하여 약 2배 정도 감소하는 것을 확인할 수 있었다 이는 도 11에서 광조사에 의하여 PhA의 ROS의 생성이 증가하는 점을 확인할 수 있고, 이는 GC-TK-PhA 미셀의 붕괴가 가속화 됨으로 인한 효과인 것을 확인할 수 있다. 더욱이, GC-TK-PhA 미셀을 주사한 그룹의 쥐들의 체중의 변화가 크지 않는 것을 통하여, 생체 내 독성이 낮은 것을 알 수 있었다.
- [0141] 도 12a 및 12b에서 광 조사시 세포 증식이 억제됨을 확인할 수 있었고, 다른 주요 기관도 정상적인 조직학적 구조를 확인할 수 있었다.
- [0142] 상기 실험 결과들로부터 본 발명의 양친성 고분자 화합물로 형성된 고분자 미셀은 생체 조건인 혈액 내에서 자가 켄칭 효과로 인해 안정성이 향상되며, 표적 세포 내의 국지적인 축적률이 우수한 점을 확인하였다. 더욱이 본 발명의 고분자 미셀은 광독성 부작용을 최소화하며, 광 조사를 통하여, 대조군 대비 약 2배 이상의 종양 세포의 성장 억제 및 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.
- [0143] 이로부터, 본 발명의 양친성 고분자 화합물을 이용하여 제조된 고분자 미셀은 표적 암세포 타겟팅이 우수한 광역학 치료제로서 우수한 효과를 가지는 것을 확인하였고, 이를 이용한 종양 치료 시스템은 효과적인 항암 치료

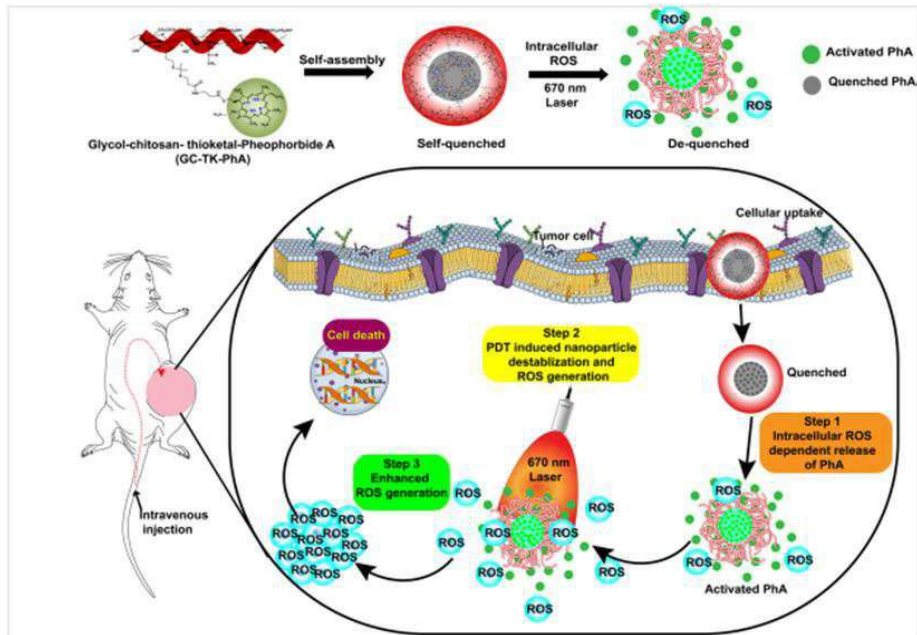
효과를 가지는 것 역시 확인하였다.

[0144] 이상과 같이 본 발명에서는 특정된 사항들과 한정된 실시예에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.

[0145] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

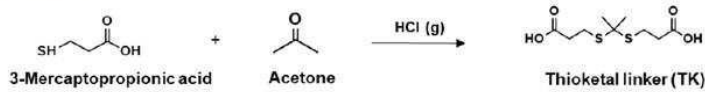
도면

도면1

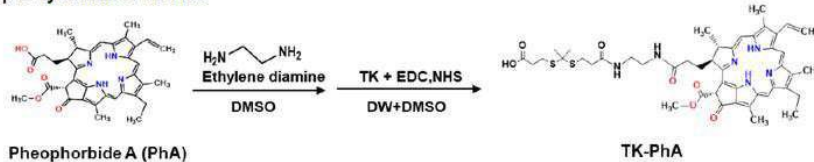


도면2

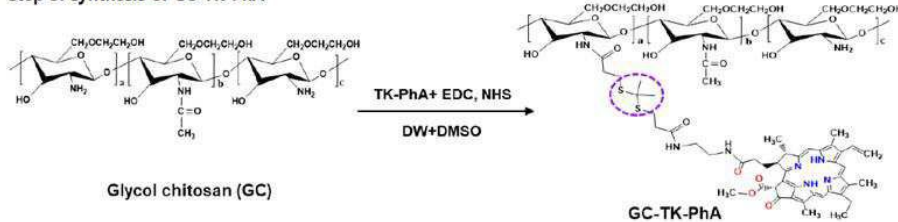
Step 1: Synthesis of TK



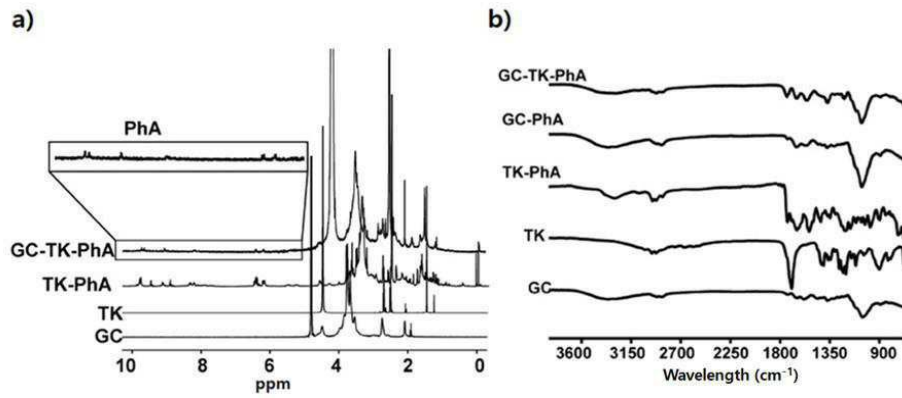
Step 2: Synthesis of TK-PhA



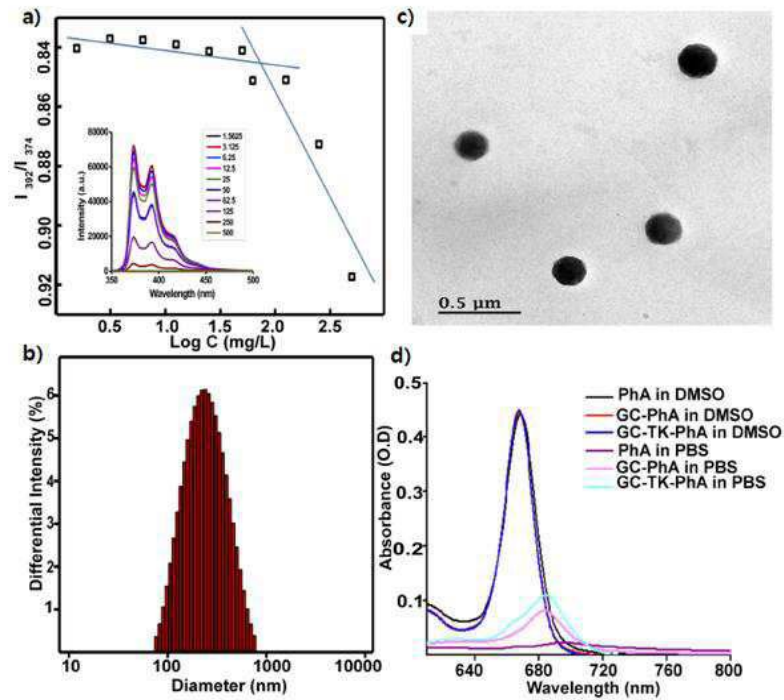
Step 3: Synthesis of GC-TK-PhA



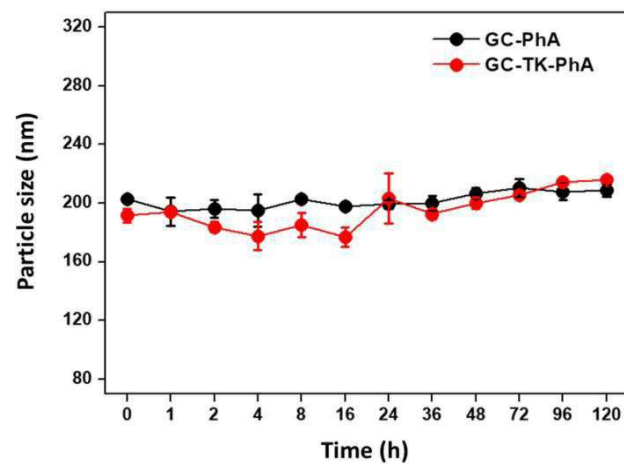
도면3



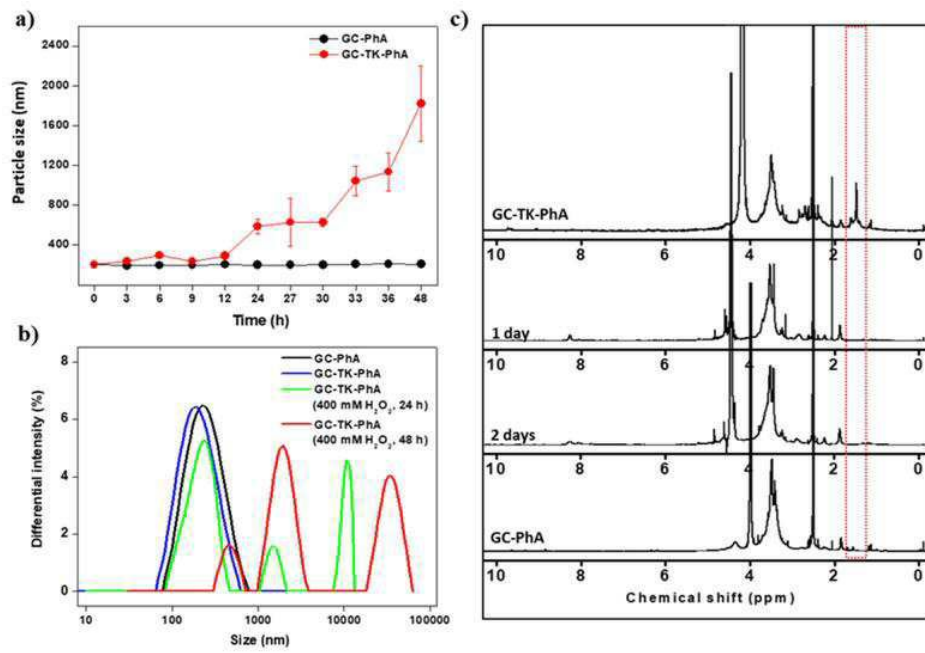
도면4



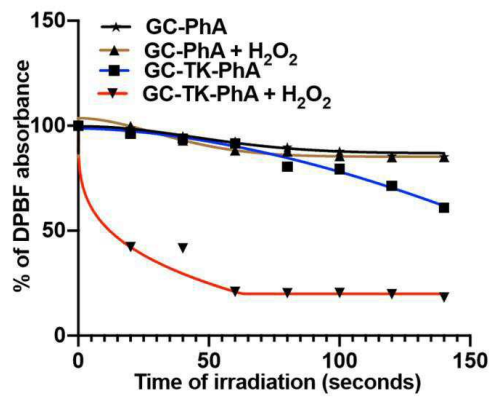
도면5



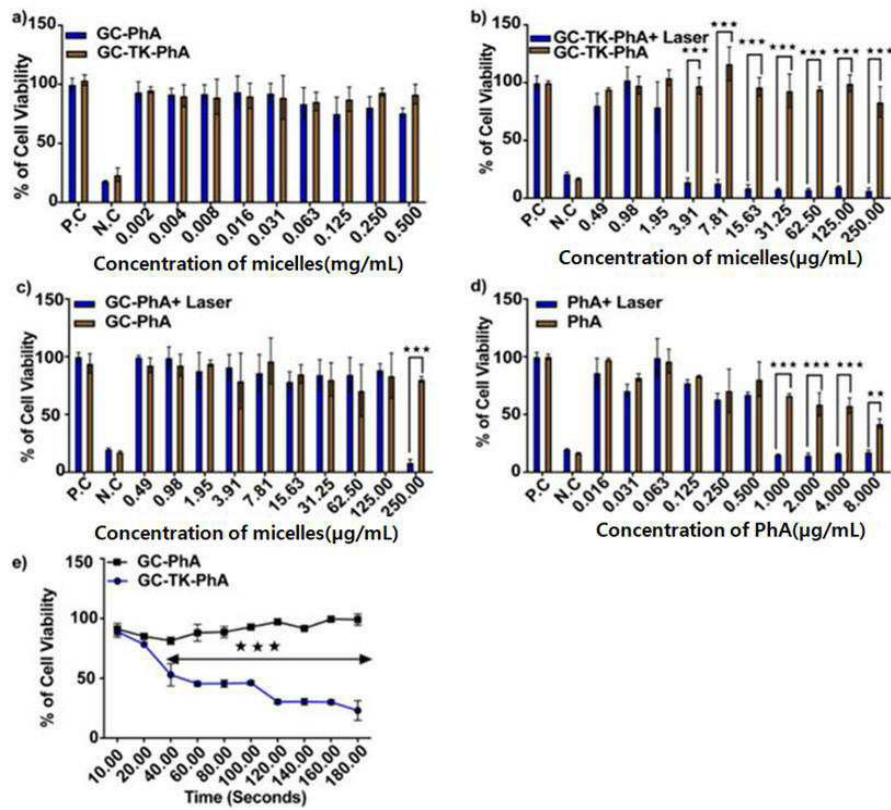
도면6



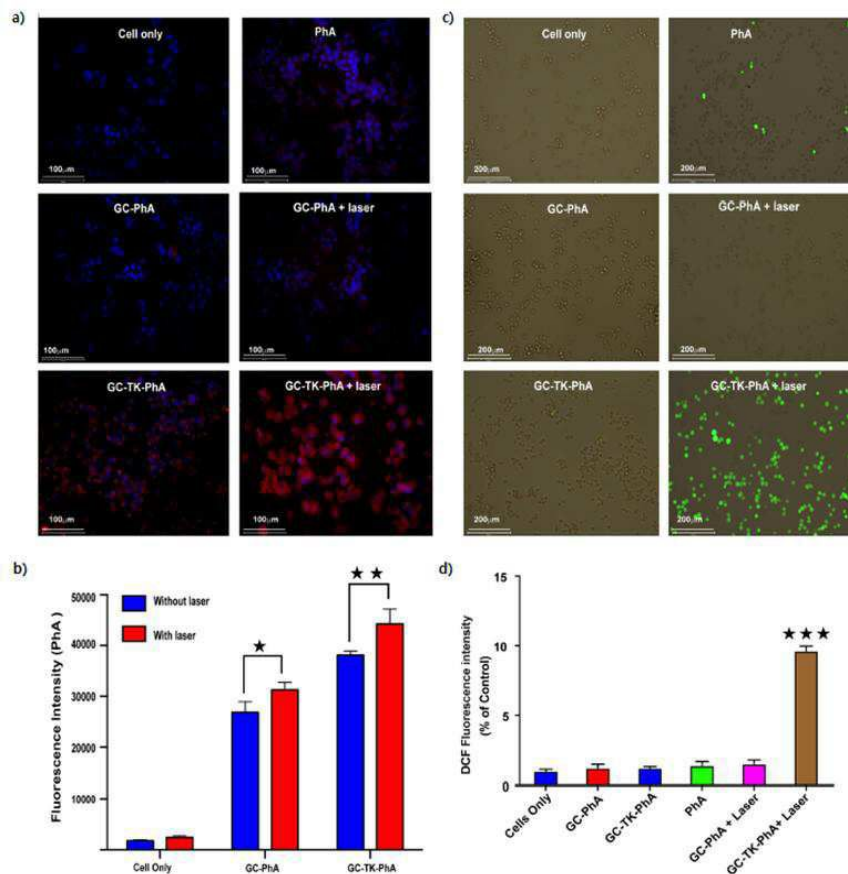
도면7



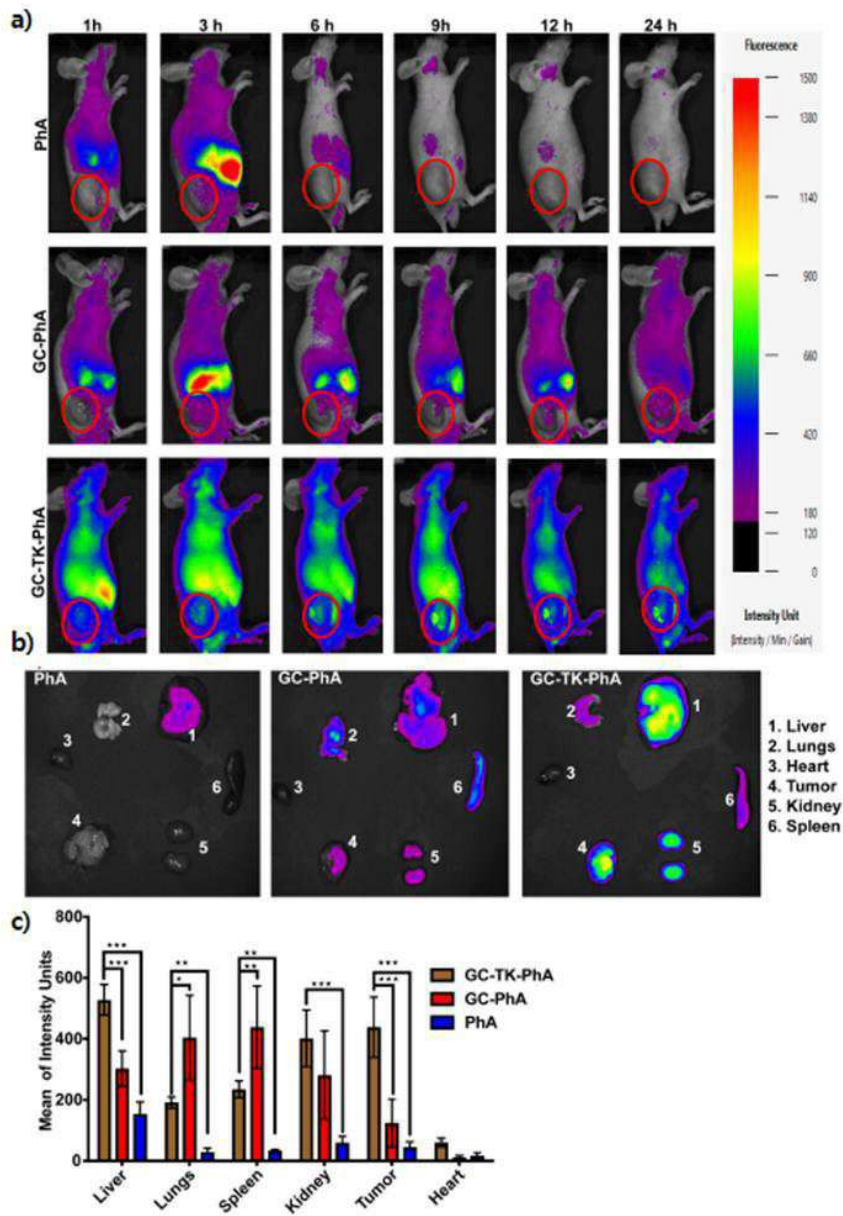
도면8



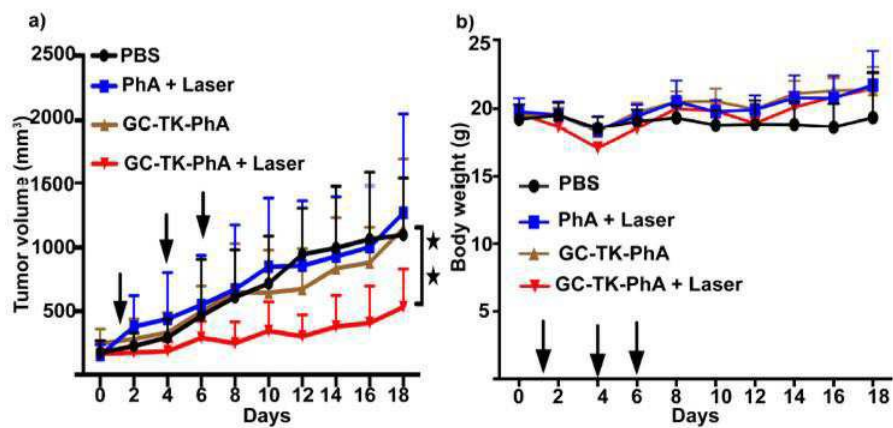
도면9



도면10



도면11



도면12

