(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0055555
(43) 공개일자 2018년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08L 65/00 (2006.01) *A61K 31/405* (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01) *C08G 61/12* (2006.01)
C08G 65/34 (2006.01) *C08L 71/02* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/545* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08L 65/00 (2013.01)
A61K 31/405 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0153509
(22) 출원일자 2016년11월17일
심사청구일자 2016년11월17일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이택승
대전광역시 유성구 배울2로 78, 611동 2001호 (관평동, 대덕테크노밸리6단지아파트)
김충호
충청남도 서산시 해미면 남문8로 7-3
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 8 항

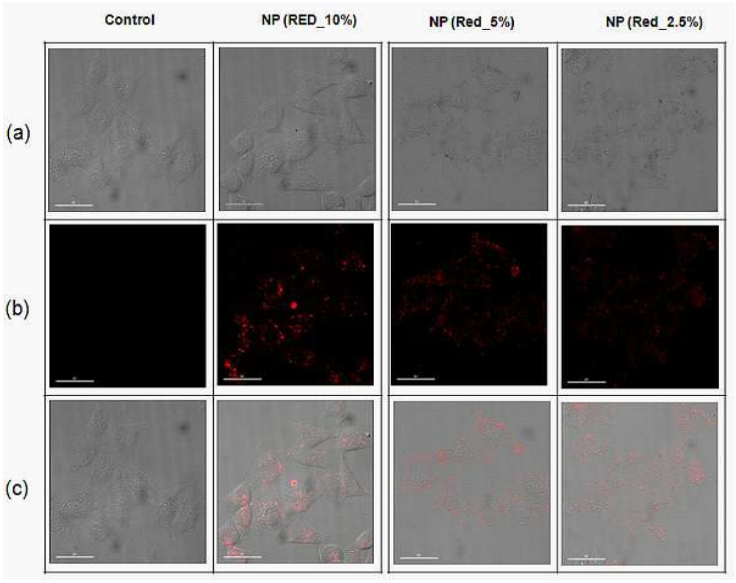
(54) 발명의 명칭 **공액화 고분자를 포함하는 나노입자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자 및 이의 용도

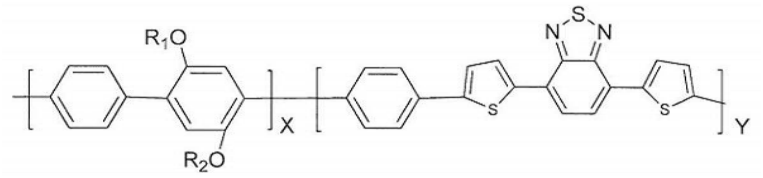
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



에 관한 것이다.

[화학식 1]



상기 식에서,

R_1 및 R_2는 각각 C_1 내지 C_{21}의 알킬기 또는 알콕시기이고,

X, Y는 각각 X+Y=1을 만족하는 0 이상의 실수이다.

(52) CPC특허분류
A61K 41/0057 (2013.01)
C08G 61/126 (2013.01)
C08G 65/34 (2013.01)
C08L 71/02 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 33/545 (2013.01)
C08G 2261/3223 (2013.01)
C08G 2261/3245 (2013.01)
C08G 2650/58 (2013.01)

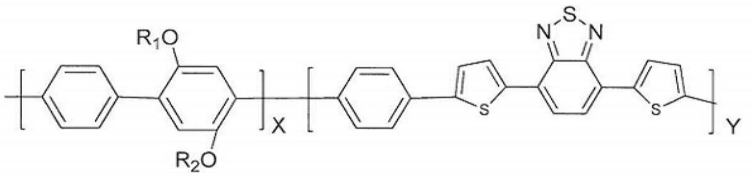
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 가지는 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자.

[화학식 1]



상기 식에서,

R_1 및 R_2는 각각 C_1 내지 C_{21}의 알킬기 또는 알콕시기이고,

X, Y는 각각 X+Y=1을 만족하는 0 이상의 실수이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 공액화 고분자는 수 평균 분자량이 3,000 내지 100,000인 것인, 나노입자.

청구항 3

제1항의 나노입자를 포함하는, 광역동 요법(Photodynamic therapy; PDT)용 약학적 조성물.

청구항 4

광역동 요법용 광감작제(photosensitizer) 로 제1항의 나노입자를 포함하는, 암의 진단 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항의 나노입자 및 탐침 물질을 포함하는, 활성산소종 측정용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 탐침 물질은 2,7-다이클로로다이하이드로플루오레세인 다이아세테이트 (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate), p-니트로소디메틸아닐린(p-nitrosodimethylaniline), 테트라니트로메탄(tetranitromethane) 및 2,9-디케틸-1,10-페난트롤린(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 활성산소종 측정용 조성물.

청구항 7

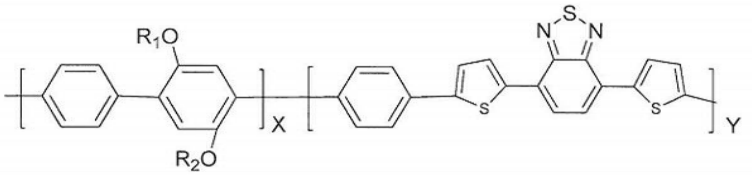
제5항에 있어서,

상기 활성산소종은 수산화 라디칼, 수퍼옥사이드 라디칼 및 과산화수소로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 활성산소종 측정용 조성물.

청구항 8

a) 하기 화학식 1의 구조를 가지는 공액화 고분자를 제조하는 단계; 및

[화학식 1]



상기 식에서,

R_1 및 R_2는 각각 C_1 내지 C_{21}의 알킬기 또는 알콕시기이고,

X, Y는 각각 X+Y=1을 만족하는 0 이상의 실수이다.

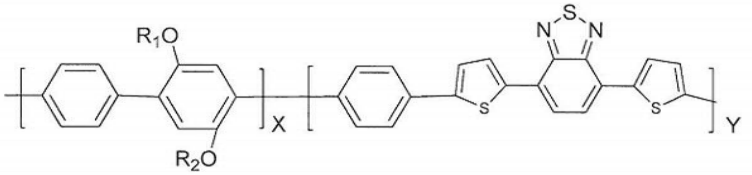
b) 상기 제조된 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 혼합하는 단계를 포함하는, 제1항의 나노입자 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자 및 이의 용도에 관한 것이다.

화학식 1

[0002] 

[0003] 상기 식에서,

[0004] R_1 및 R_2는 각각 C_1 내지 C_{21}의 알킬기 또는 알콕시기이고,

[0005] X, Y는 각각 X+Y=1을 만족하는 0 이상의 실수이다.

배 경 기 술

[0006] 현대인의 삶에서 가장 중요시되는 부분 중 하나는 건강이다. 최근, 현대인의 건강을 위협하는 요소 중 하나인 암 질환은 치료가 어려운 질병 중 하나이며, 이러한 암 질환을 치료하기 위하여 전 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0007] 암세포는 정상 세포와 비슷한 특성도 가지고 있어 구분이 어려운 면이 있으며, 발견되더라도 치료 과정에서 정상 세포에 악영향을 미칠 수 있는 치료과정을 거쳐야 하기 때문에 암 질환의 치료는 어려운 편이다. 또한, 암세포는 정상 세포에 비하여 세포 증식이 빨라 전이되는 경우가 자주 발생하여 치료에 어려움이 있다.

[0008] 또한, 암세포까지 치료제를 적재하여 운반하는 데는 한계가 있어 약물 전달 과정에서 정상 세포에 영향을 미칠 수 있고, 암세포에 따라 단일 약물만으로는 치료가 어려울 수 있다. 이러한 약물 적재, 약물 전달 시스템의 한계로 인하여 최근 광열 치료, 광역동 치료와 같은 방법들이 부가적으로 사용되기도 한다. 이 중 광역동 치료는 광감각제를 인체에 투여하고 암세포에 이동시킨 후 암세포에 특이적이고 적절한 파장의 빛을 조사하는 것으로 이루어진다.

[0009] 그러나, 기존의 사용되고 있는 광감각제 물질들은 상대적으로 큰 크기를 가지고 있어서 치료 후 몸에서 배설, 제거되는데 어려움이 있을 뿐 아니라, 생체 내에 오래 잔존함으로써 조직과 비특이적 세포독성 작용을 일으키는 문제가 있다.

[0010] 또한, 기존의 나노입자는 치료와 진단 중 한 가지 목적에 집중하여 개발되는 것이 통상적이었으나, 최근 암세포

의 진단과 치료를 동시에 할 수 있는 나노입자에 관한 연구 및 개발이 진행되고 있다. 그러나, 가혹한 생체 내 환경에서 효율적인 암 제거 방법을 개발함에 있어 어려움이 많은 실정이다.

[0011] 이에, 정상 세포에의 부작용을 최소화 할 수 있는 광역동 치료에서의 광감각제 물질 및 암세포의 진단 및 치료에 관한 효율성을 증진시킨 나노입자의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov, J. Controlled Release, 82, 189-212, 2002

(비특허문헌 0002) Highly fluorescent and bioresorbable polymeric nanoparticles with enhanced photostability for cell imaging, S. Huang, S. Liu, K. Wang, C. Yang, Y. Luo, Y. Zhang, B. Cao, Y. Kang, M. Wang, Nanoscale, 7, 889-895, 2015

(비특허문헌 0003) A narrow-bandgap benzobisthiadiazole derivative with high near-infrared photothermal conversion efficiency and robust photostability for cancer therapy, S. Huang, R. K. Kannadorai, Y. Chen, Q. Liu, M. Wang, Chem. Commum., 51, 4223-4226, 2015

(비특허문헌 0004) Amplified singlet oxygen generation in semiconductor polymer dots for photodynamic cancer therapy, S. Li, K. Chang, K. Sun, Y. Tang, N. Cui, Y. Wang, W. Qin, H. Xu, C. Wu, ACS Appl. Mater. Interfaces, 8, 3624-3634, 2016

(비특허문헌 0005) Conjugated-polyeletrolyte-based polyprodrug: targeted and image-guided photodynamic and chemotherapy with on-demand drug release upon irradiation with a single light source, Y. Yuan, J. Liu, B. Liu, Angew. Chem., 126, 7291-7296, 2014

(비특허문헌 0006) Conjugated polymer-coated bacteria for multimodal intracellular and extracellular anticancer activity, C. Zhu, Q. Yang, F. Lv, L. Liu, S. Wang, Adv. Mater., 25, 1203-1208, 2013

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자 을 제공하는 것이다.

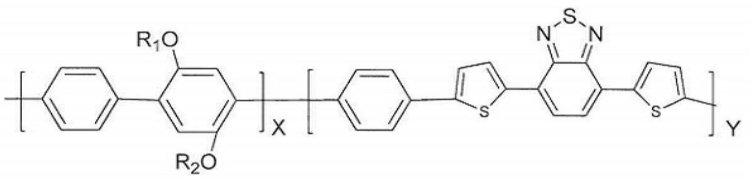
[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노입자를 포함하는 광역동 요법(Photodynamic therapy; PDT)용 약학적 조성물, 암의 광역학 진단 또는 치료용 조성물 및 활성산소종 측정용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자를 제공한다.

[0017] [화학식 1]

[0018] 

[0019] 상기 식에서,

[0020] R_1 및 R_2는 각각 C_1 내지 C_{21}의 알킬기 또는 알콕시기이고,

[0021] X, Y는 각각 X+Y=1을 만족하는 0 이상의 실수이다.

[0022] 구체적으로, 상기 공액화 고분자는 수 평균 분자량이 3,000 내지 100,000인 것일 수 있으며, 그 용도에 요구되는 특성에 따라 상기 범위는 적절히 조절하여 사용될 수 있다. 또한, 구체적으로 상기 플루로닉 고분자는 플루로닉 F127고분자일 수 있다.

[0023] 상기 공액화 고분자를 나노입자로 제조하고, 암세포 내에 도입하기 위해서 공액화 고분자 나노입자의 표면 처리를 실시하는데, 표면 처리 물질로는 생체적합성이 우수하고 암세포와 상호작용이 있는 물질을 사용해야 한다.

[0024] 상기와 같은 표면 처리 물질 중 플루로닉(pluronic) 계열의 고분자는 미국 Wyandotte Chemicals Corporation에서 제조한 비이온활성제의 상품명으로, 분자량 900이상인 폴리프로필렌 글리콜에 산화에틸렌을 중합하여 제조된다. 이러한 플루로닉 고분자는 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide, PEO)-폴리프로필렌옥사이드(polypropylene oxide, PPO)-폴리에틸렌옥사이드(PEO)의 반복구조로 양친매성 특징을 나타내어 약물에 대한 용해도, 대사 안정성, 우수한 생체적합성을 가지므로 약물 전달 시스템에 이용될 수 있다.

[0025] 따라서, 본 발명의 나노입자는 상기 화학식 1의 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 혼합하여 제조하면서 공액화 고분자 나노입자 표면을 플루로닉 고분자로 표면 개질된 구조를 가질 수 있다.

[0026] 본 발명에서, “나노입자(nanoparticle)”는 천만분의 1 미터 이하의 크기를 가지는 입자로서, 약물 전달체로서 선택적 표적부위 전달을 위한 방법 중 하나로 활용되고 있으며, 임상, 의학연구, 진단 및 치료 등 다양한 목적에 맞게 적절한 입자크기 및 크기분포를 가지면서 개발되고 있다.

[0027] 본 발명의 구체적인 일례로, 상기 화학식 1의 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자는 광역동 요법에 활용될 수 있고, 구체적으로 암 질환에 대한 진단 및 치료용도로 활용될 수 있다. 또한, 상기 나노입자에 특정 파장의 빛을 조사하였을 때 나타나는 광역동 효과에 의해 발생한 활성산소를 탐침 물질을 이용하여 측정할 수도 있다.

[0028] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 나노입자를 포함하는 광역동 요법(Photodynamic therapy; PDT)용 약학적 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에서, “광역동 요법(Photodynamic therapy; PDT)”은 빛에 반응하는 광감작제를 투여한 뒤 특정 파장의 빛을 쏘이면 질병을 가진 세포에만 선택적으로 빛이 축적되어 치료적 효과를 나타내는 치료요법을 말한다. 광역동 요법은 암의 진단과 치료, 자가골수이식, 항생제, AIDS 치료, 피부이식 수술 또는 관절염에 적용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명 일 실시예에서는 상기 화학식 1이 고분자 및 플루로닉 고분자를 혼합하여 제조한 나노입자를 암세포에 도입하고, 상기 고분자의 흡수영역인 254nm의 빛을 쪼였을 때, 활성산소가 생성되는 것을 확인하였으며(실시예 6), 상기와 같이 생성된 활성산소에 의해 암세포가 괴사되는 것을 확인함으로써(실시예 7), 본 발명의 나노입자에 의한 광역동 치료 효과가 있음을 확인하였다.

[0031] 본 발명의 또 다른 일 측면은 광역동 요법용 광감작제(photosensitizer) 로 상기 나노입자를 포함하는 암의 진단 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명에서, “광감작제(photosensitizer)”는 특정 파장의 빛을 조사하면 산소분자(O_2)를 일항산소(singlet oxygen, $^1O_2$)와 같은 활성산소종으로 변화시키거나, 새로운 라디칼을 만들거나 또는 새로운 화학종을 만들어내는 물질을 말한다. 광감각제의 구체적인 일례로, 상기 화학식 1의 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자일 수 있다.

[0033] 본 발명 일 실시예에서는 형광 공액화 고분자인 화학식 1의 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자를 암세포에 도입하고 세포를 배양한 후, 360nm 파장의 빛을 조사하였을 때 붉은색의 형광을 나타내는 것을 확인하였는바, 이를 이용하여 암세포를 이미징(imaging)함으로써 진단해낼 수 있음을 확인하였다(실시예 5).

[0034] 또한, 본 발명 일 실시예에서는 상기 나노입자를 암세포에 도입하고 254nm 파장의 빛을 조사하였을 때 활성산소가 생성되고, 이에 따라 암세포가 괴사하는 것을 확인하였는바, 암에 대한 치료용 조성물로 활용될 수 있음을 확인하였다(실시예 6 및 실시예 7).

[0035] 이에 따라, 본 발명에서, 암의 “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 말하며, 구체적으로 상기 나노입자를 통해 암의 발명 여부를 확인하는 것일 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명에서, 암의 “치료”는 본 발명의 나노입자를 포함하는 조성물을 투여하여 증세가 호전되거나, 암세포가 괴사 및/또는 사멸되도록 하는 행위를 포함하며, 다른 항암제, 방사선 요법, 수술 등과 병행하여 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명에서, “암세포”는 비정상적으로 성장, 분열 또는 증식하는 세포를 의미하는 것으로, “종양 세포”와 혼용되어 사용될 수 있다.

[0038] “암”은 형질전환된 세포의 억제되지 않는 분열 또는 증식, 무질서한 성장 결과로 빚어지는 복합적인 질환을 일컫는다. 구체적으로, 본 발명에서는 광역동 요법을 적용하기 위한 고형암을 대상으로 할 수 있다. 상기 고형암으로는 뇌종양(Brain Tumor), 양성성상세포종(Low- grade astrocytoma), 악성성상세포종(High-grade astrocytoma), 뇌하수체 선종(Pituitary adenoma), 뇌수막종(Meningioma), 뇌림프종(CNS lymphoma), 핍지교종(Oligodendroglioma), 두개내인종 (Craniopharyngioma), 상의세포종(Ependymoma), 뇌간종양(Brain stem tumor), 두경부 종양(Head & Neck Tumor), 후두암(Larygeal cancer), 구인두암(Oropgaryngeal cancer), 비강/부비동암(Nasal cavity/PNS tumor), 비인두암(Nasopharyngeal tumor), 침샘암(Salivary gland tumor), 하인두암(Hypopharyngeal cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 구강암(Oral cavity tumor), 흉부종양(Chest Tumor), 소세포성 폐암(Small cell lung cancer), 비소세포성 폐암(NSCLC), 흉선암(Thymoma), 종격동 종양(Mediastinal tumor), 식도암 (Esophageal cancer), 유방암(Breast cancer), 남성유방암(Male breast cancer), 복부종양(Abdomen-pelvis Tumor), 위암(Stomach cancer), 간암(Hepatoma), 담낭암 (Gall bladder cancer), 담도암(Billiary tract tumor), 췌장암(pancreatic cancer), 소장암 (Small intestinal tumor), 대장암(Large intestinal tumor), 항문암(Anal cancer), 방광암 (Bladder cancer), 신장암(Renal cell carcinoma), 전립선암(Prostatic cancer), 자궁경부암(Cervix cancer), 자궁내막암(Endometrial cancer), 난소암(Ovarian cancer), 자궁육종(Uterine sarcoma), 피부암(Skin Cancer) 등을 포함할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 경구 투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[0040] 또한, 상기 암 진단 또는 치료용 약학적 조성물의 제형은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 나노입자 및 탐침 물질을 포함하는, 활성산소종 측정용 조성물을 제공한다.

[0042] 구체적으로, 상기 탐침 물질은 2,7-다이클로로다이하이드로플루오레세인 다이아세테이트 (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate), p-니트로소디메틸아닐린(p-nitrosodimethylaniline), 테트라니트로메탄 (tetranitromethane) 및 2,9-디케틸-1,10-페난트롤린(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0043] 또한 구체적으로, 상기 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 수산화 라디칼, 수퍼옥사이드 라디칼 및 과산화수소로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 이와 같은 활성산소종은 화학적으로 반응성이 아주 높은 분자로 산화력이 강하여 생체 조직내 세포막, DNA, 그 외의 모든 세포 구조를 손상시키고 손상의 범위에 따라 세포가 기능을 잃거나 사멸되도록 하는 것으로 알려져 있다.

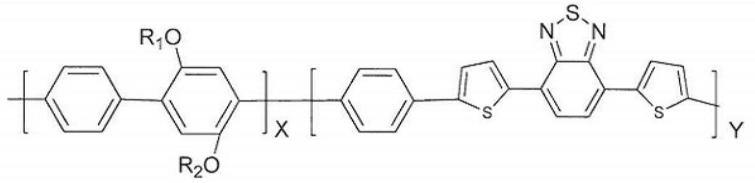
[0044] 본 발명의 나노입자에 포함되어 있는 공액화 고분자에 특정 영역 대의 빛에너지를 조사하면 바닥상태에 있는 전자들이 들뜬 상태로 되었다가 다시 원래 상태인 바닥상태로 돌아감에 따라 형광 에너지를 방출하게 된다. 이 때 공액화 고분자가 방출하는 에너지는 주위에 존재하는 산소 원자에 영향을 미치게 되며, 이러한 에너지를 받은 산소원자는 활성산소로 바뀌게 된다.

[0045] 구체적인 본 발명 일 실시예에서는 벤조싸이아다이아졸계 형광 공액화 고분자를 포함하는 나노입자에 특이적인 파장인 254nm의 빛을 조사하였을 때 발생한 활성산소가 활성산소에 특이적인 염료 중 하나인 2,7-다이클로로다이하이드로플루오레세인 다이아세테이트와 반응하여 535nm 부근 녹색 형광을 발생시키고, 활성산소의 발생정도

에 따라 형광강도가 달리 나타나는 것을 관찰함으로써 활성산소의 생성을 측정할 수 있음을 확인하였다(실시예 6).

[0046] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 하기 화학식 1의 구조를 가지는 공액화 고분자를 제조하는 단계; 및

[0047] [화학식 1]

[0048] 

[0049] 상기 식에서,

[0050] R_1 및 R_2는 각각 C_1 내지 C_{21}의 알킬기 또는 알콕시기이고,

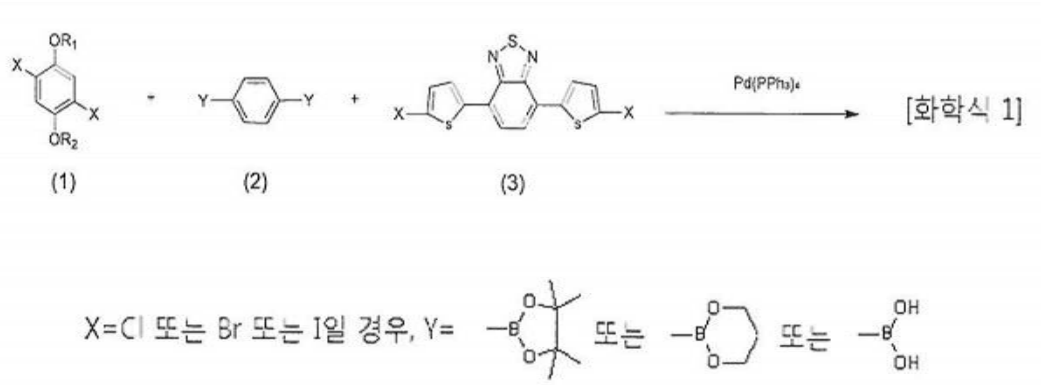
[0051] X, Y는 각각 X+Y=1을 만족하는 0 이상의 실수이다.

[0052] b) 상기 제조된 공액화 고분자 및 플루로닉 고분자를 혼합하는 단계를 포함하는, 상기 나노입자 제조방법을 제공한다.

[0053] 상기 화학식 1의 구조를 가지는 공액화 고분자는 페닐렌계 고분자 주쇄에 벤조싸이아다이아졸기를 가지는 것으로, 하기와 같은 스즈키 커플링 반응에 의해 합성이 가능하며, 상기 반응에 한정되어 제조되는 것은 아니다.

[0054] 일 예로, 상기 공액화 고분자는 하기 [반응식 1]의 벤조싸이아다이아졸계 단량체 (3)의 용해도 향상을 위한 단량체 (1), (2)와 함께 테트라키스(트리페틸포스핀)팔라듐 촉매 존재 하에서 스즈키 커플링 반응에 의해 제조될 수 있다.

[0055] [반응식 1]



[0056]

[0057] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 상기 나노입자를 세포 내로 도입하는 단계; 및 b) 광 조사 후 광학 이미징(imaging) 기법으로 이미지를 획득하는 단계를 포함하는, 암의 광역학 진단 방법을 제공한다.

[0058] 본 발명 일 실시예에서는 형광 공액화 고분자인 화학식 1의 고분자 및 플루로닉 고분자를 포함하는 나노입자를 암세포에 도입하고 세포를 배양한 후, 360nm 파장의 빛을 조사하였을 때 붉은색의 형광을 나타내는 것을 확인하였는바, 이를 이용하여 암세포를 이미징(imaging)함으로써 진단해낼 수 있음을 확인하였는바(실시예 5), 상기와 같은 방법을 이용하여 암의 광역학 진단이 가능하다.

[0059] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 상기 나노입자를 세포 내로 도입하는 단계; 및 b) 상기 세포에 광 조사 후 활성산소를 발생시키는 단계를 포함하는, 광역동 치료요법을 제공한다. 구체적으로 상기 광역동 치료요법은 암을 치료하기 위한 것일 수 있다.

[0060] 본 발명 일 실시예에서는 상기 화학식 1이 고분자 및 플루로닉 고분자를 혼합하여 제조한 나노입자를 암세포에 도입하고, 상기 고분자의 흡수영역인 254nm의 빛을 쪼였을 때, 활성산소가 생성되는 것을 확인하였으며(실시예 6), 상기와 같이 생성된 활성산소에 의해 암세포가 괴사되는 것을 확인하였는바(실시예 7), 상기와 같은 방법을

적용 또는 필요에 따라 변형하여 사용함으로써 광역동 치료요법에 적용할 수 있다.

발명의 효과

[0061] 본 발명의 나노입자는 형광을 나타낼 수 있는 공액화 고분자 및 양친매성 플루로닉 고분자를 포함함으로써 암세포 내에 도입되어 형광 이미징을 통해 암을 진단해낼 수 있으며, 특이적인 파장의 빛을 조사함으로써 암세포에 특이적으로 광역동 치료를 할 수 있다. 또한, 본 발명의 나노입자는 세포에 독성을 나타내지 않는 바, 진단 및 치료용 조성물로 활용함에 있어서 안전성이 우수하다.

[0062] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 고분자 나노입자가 HeLa 세포에 들어가 형광을 나타내는 것을 확인한 세포 형광 사진을 나타낸 것이다 (control; 대조군, NP; 본 발명 고분자 나노입자, (a); 명시 야상 이미지(bright-field), (b) 형광이미지 (fluorescent channels) (c) 오버레이 이미지(overlay image).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

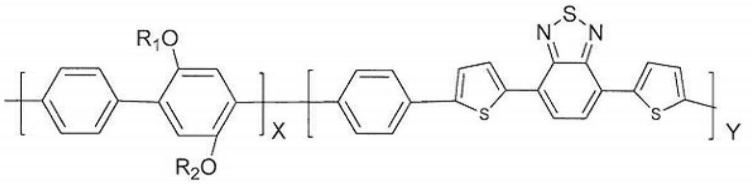
[0064] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0065] **실시예 1. 공액화 고분자 화합물의 제조**

[0066] 질소 분위기 하에서 1,4-다이브로모-2,5-비스(옥틸옥시)벤젠 0.214g(0.435mmol)과 1,4-벤젠다이보론산비스(피나콜)에스터 0.231g(0.7mmol), 4,7-비스(5-브로모싸이오펜-2-일)벤조-2,1,3-싸이다이아졸 0.085g(0.186mmol) 및 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 촉매 0.040g(0.035mmol)을 습기가 제거된 20ml THF(Tetrahydrofuran) 와 6ml의 2M K_2CO_3 혼합용액에 용해시키고 앨리컷(Aliquat) 336을 2~3방울 넣고 30시간 동안 90℃에서 환류시켰다.

반응 후 냉각시키고 메탄올에 부어 석출시킨 다음, 석출물을 여과하였다. 여과하여 얻어진 고체를 속슬렉(Soxhlet)을 이용하여 메탄올과 아세톤으로 촉매와 염, 단량체 및 올리고머를 추출 제거한 후, 클로로포름을 이용하여 고분자를 용해하고 농축시킨 후, 농축된 고분자 용액을 메탄올 용액에 부어 결정을 석출시킨 다음, 석출물을 여과하였다. 얻어진 고체를 건조하여 수 평균 분자량 8730g/ml, 중량 평균 분자량 9030g/mol인 형광 공액화 고분자 화합물을 얻었다.

[0067] [화학식 1]

[0068] 

[0069] ^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ=8.2~7.3 (3H, 방향족), 7.2~6.8 (2H, 방향족), 4.0 (4H, 알킬기), 2.7~1.7 (8H, 알킬기), 2.0-1.5 (16H, 알킬기), 0.8~0.6 (6H, 알킬기) ppm.

[0070] **실시예 2. 플루로닉 고분자를 혼합한 공액화 고분자 나노입자 제조**

[0071] 상기 실시예 1에서 제조한 형광 공액화 고분자와 양친매성 고분자인 플루로닉 F127고분자를 혼합사용하여 나노입자를 제조하였다. 플루로닉 F127 고분자와 형광 공액화 고분자를 혼합하기 위하여, THF 2ml에 형광 공액화 고분자 2mg 및 플루로닉 F127 고분자 83mg을 넣어 녹인 다음, 증류수 10ml에 빨리 넣으며 30분 동안 초음파 분해하였다. 용액 내 존재하는 THF를 제거하기 위해 48시간 동안 셀룰로오스 투과막을 사용하여 증류수에서 투석하였다. 균일한 크기의 나노입자를 얻기 위해 상기 나노입자 용액을 0.45um 시린지 필터를 이용해 걸러주었다. 그 후 원심분리기를 사용하여 고분자 나노입자를 분리하여 입도 분석기로 입자크기를 측정한 결과, 198nm의 직경을 나타내는 것을 확인하였다.

[0072] **실시예 3. 공액화 고분자 나노입자의 광조사에 따른 활성산소 생성**

[0073] 상기 실시예 2에서 제조한 고분자 나노입자 20ul 를 증류수 1ml에 넣은 후, 활성산소 방출을 감지할 수 있는 파라-나이트로소-다이메틸아닐린 50ul를 넣었다. 상기 물질은 활성산소가 검출되면 440nm 부근의 흡수가 감소하는 특징을 갖는다. 따라서, 형광 공액화 고분자의 흡수영역인 254nm의 빛을 각각10, 30, 60, 120 및 180분 동안 상기 수용액에 조사하면 440nm 부근이 흡수가 초기 흡수에 비해 각각 2.86, 3.87, 7.07, 14.84 및 21.71% 감소하는 것을 UV-vis 스펙트로미터로 확인하였다. 이로부터 광조사에 의해 활성산소가 생성되는 것을 알 수 있었다.

[0074] **실시예 4. 공액화 고분자 나노입자의 독성(세포 생존율) 실험**

[0075] 상기 실시예 2에서 제조한 고분자 나노입자 20ul 를 37℃에서 HeLa 세포에 도입 후 24 시간, 48 시간 동안 각각 배양시켰다. 또한, 살아있는 세포의 양을 색 변화를 통해 알 수 있는 3-(4,5-다이메틸사이아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드 염료 20ul 를 넣고 배양하였다.

[0076] 살아있는 세포의 경우, 세포 내의 미토콘드리아에 의해 상기 염료 물질이 염색되어 600nm 부근의 흡수를 나타낸다. 상기 염료를 24 시간, 48 시간 동안 HeLa세포와 함께 배양시킨 후 600nm 부근의 흡수를 비교한 결과, 24시간 및 48시간 후의 세포 생존율은 초기 세포 생존율에 비해 각각 101% 및 88%를 나타내었다. 나노입자를 도입하더라도 세포가 지속적으로 증식하여 24시간 후에는 101%의 생존율을 나타내었으며, 세포가 계속하여 살아가기 위한 공간 및 영양분이 부족한 *in vitro* 조건 하에서도 48 시간 경과 후에도 88%의 높은 생존율을 나타냄을 확인하였다. 이로부터 상기 실시예 2에서 제조된 공액화 고분자 나노입자에 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] **실시예 5. 공액화 고분자 나노입자의 HeLa 세포 이미징**

[0078] 상기 실시예 2에서 제조한 고분자 나노입자 20ul 를 37℃에서 HeLa 세포에 도입 후 24 시간, 48 시간 동안 각각 배양한 후, 세포 형광 사진을 통해 암세포 이미지를 확인하였다. 그 결과, 고분자 나노입자가 HeLa 세포에 들어가 형광을 나타내는 것을 확인하였다(도 1).

[0079] 벤조싸이아다이아졸계 형광 공액화 고분자는 360nm 빛을 조사하였을 때 붉은색을 발하는 특성을 나타내는바, 상기 공액화 고분자를 포함하는 나노입자를 암세포에 도입한 후 형광 공액화 고분자의 흡수영역인 360nm의 빛을 조사함으로써 나타나는 붉은색의 형광을 통해 암세포를 이미징 할 수 있다.

[0080] **실시예 6. 암세포 내에서 광조사에 따른 공액화 고분자 나노입자의 활성산소 생성 확인**

[0081] 상기 실시예 2에서 제조한 고분자 나노입자 20ul 를 37℃에서 HeLa 세포에 도입 후 24시간 배양한 후, 세포 내에서 활성산소 생성을 확인시켜주는 염료인 2,7-다이클로로다이하이드로플루오레세인 다이아세테이트 5M을 넣고 30분 동안 배양하였다. 상기 염료는 세포 내에서 활성산소가 생성됨에 따라 535nm 부근 녹색 형광을 발생시킨다.

[0082] 형광 공액화 고분자의 흡수영역인 254nm의 빛을 각각 1, 5, 10, 15 및 30분 동안 조사하였을 때, 고분자 나노입자가 활성산소를 생성하여 세포의 녹색 형광강도가 초기 형광강도에 비해 각각 1.35, 1.92, 6.34, 7.44 및 15.35배로 증가하는 것을 확인하였다. 상기와 같은 결과로부터 광조사에 의해 세포 내에서 활성산소가 생성됨을 알 수 있었다.

[0083] **실시예 7. 암세포 내에서 광조사에 따른 공액화 고분자 나노입자에 의한 세포 생존율 확인(광역동 효과 확인)**

[0084] 상기 실시예 2에서 제조한 고분자 나노입자 20ul 를 37℃에서 HeLa 세포에 도입 후 24시간 배양한 후, 살아있는 세포의 양을 색 변화를 통해 알 수 있는 3-(4,5-다이메틸사이아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드 염료 20ul 를 추가하고 배양하였다.

[0085] 형광 공액화 고분자의 흡수영역인 254nm의 빛을 1, 5 및 10분 동안 조사하였을 때, 고분자 나노입자에 의해 생성된 활성산소에 의해 세포가 괴사됨으로써 세포 생존율이 각각 59, 62 및 59%로 감소하는 것을 확인하였다. 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 공액화 고분자 나노입자에 의한 광역동 치료 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0086] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0087] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으

로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

