

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0076369

(43) 공개일자 2025년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07F 1/08 (2006.01) A61K 41/00 (2020.01)

A61P 35/00 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07F 1/08 (2013.01)

A61K 41/0057 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0134019

(22) 출원일자 2024년10월02일

심사청구일자 2024년10월02일

(30) 우선권주장

1020230163302 2023년11월22일 대한민국(KR)

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김도경

서울특별시 성북구 화랑로 214, 106동 802호

안종민

서울특별시 성북구 아리랑로19가길 21 정릉꿈에그린아파트 102동 405호

강지수

경기도 구리시 동구릉로129번길 23, 109동 2102호

(74) 대리인

위병갑

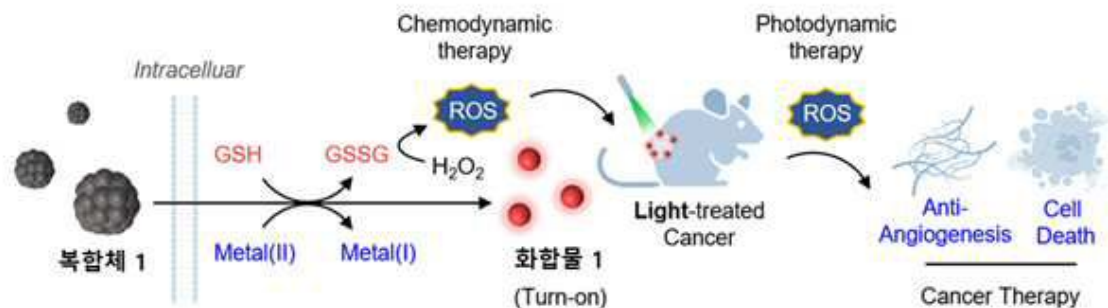
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 니트로벤젠-아미노산-금속 이온 기반 나노복합체를 유효성분으로 포함하는 암의 광역동 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 니트로벤젠-아미노산-금속 이온 기반 나노복합체를 유효성분으로 포함하는 암의 광역동 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 나노복합체는 암세포 내 글루타치온과 특이적으로 반응하여 근적외선 영상화가 가능하며, 광조사하여 생성된 활성산소종에 의한 항암 효과를 확인한 바, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

G01N 21/64 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 33/6803 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192122
과제번호	2022R1F1A1069954
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	단일-벤젠 기반 형광체 라이브러리 구축 및 이의 광물리적/생물학적 특성 규명
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345365662
과제번호	2018R1A6A1A03025124
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	경희대학교 의과학 연구소
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2710006377
과제번호	RS-2024-00418924
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	과학기술사업화진흥원
연구사업명	대학기술경영촉진(IP스타과학자 지원형)
연구과제명	광역동 메커니즘 기반 차세대 피부암 치료제 사업화 추진을 위한 IP 고도화 및 상용
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2024.04.01 ~ 2025.12.31

화

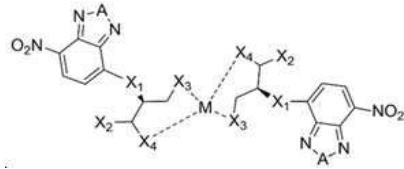
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium: Se)이고,

X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

M은 2가 양이온 금속이다.)

청구항 2

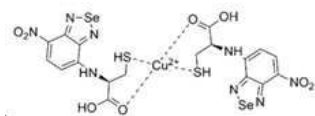
제1항에 있어서,

상기 금속은 구리(Copper)를 포함하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 나노복합체는 하기 복합체인 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.



청구항 4

제1항에 있어서,

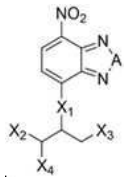
상기 나노복합체는 글루타치온(glutathione)과 특이적으로 반응하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노복합체는 글루타치온과 반응하여 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 형성하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[화학식 3]



(상기 화학식 3에서,

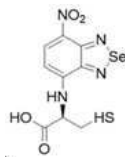
A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이다.)

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화합물인 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.



청구항 7

제5항에 있어서,

상기 화합물은 400 내지 700 nm에서 형광을 방출하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 나노복합체는 글루타치온과 반응하여 2가 양이온 금속을 1가 양이온 금속으로 환원시키는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 1가 양이온 금속은 생체분자와 반응하여 활성산소종을 생성하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 생체분자는 과산화수소, 아미노산, 단백질, 지질, 세포 대사의 부산물, 또는 산소를 포함하는 활성물질을 포함하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 활성산소종은 히드록실 라디칼(hydroxyl radical), 일중항산소(singlet oxygen), 과산화수소(hydrogen peroxide), 초과산화물(superoxide), 또는 일산화질소(nitric oxide)를 포함하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 나노복합체는 Endostatin/collagen XVIII, MMP-3, Coagulation Factor III, IL-1a, PEDF, IL-1b 또는 CD26 단백질 발현을 증가시키는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 13

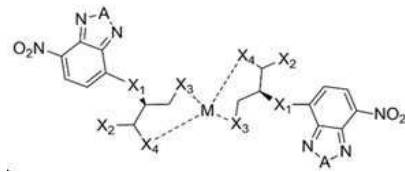
제5항에 있어서,

상기 화합물은 광조사하여 Endostatin/collagen XVIII, MMP-3, Coagulation Factor III, IL-1a, PEDF, IL-1b 또는 CD26 단백질 발현을 감소시키는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 14

하기 화학식 1로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 광역동 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 및 알콕시(alkoxy) 중 어느 하나이며,

M은 2가 양이온 금속이다.)

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 암은 뇌암(brain cancer), 척수암(spinal cancer), 폐암(lung cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 유방암(breast cancer), 피부암(skin cancer), 전립선암(prostate cancer) 또는 난소암(ovarian cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 조성물.

청구항 16

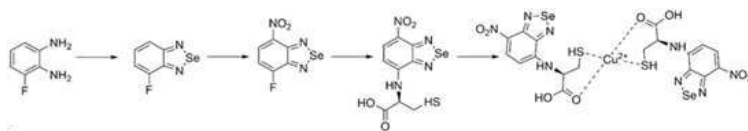
제14항에 있어서,

상기 조성물은 암의 혈관 신생을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 17

하기 반응식 1에 의해 제조되는 나노복합체의 제조 방법으로서,

[반응식 1]



유기용매에 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 및 시스테인(Cysteine)을 반응시키는 단계; 및

상기 반응물에 구리 양이온을 첨가하는 단계;를 포함하는, 나노복합체의 제조 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 유기용매는 테트라히드로퓨란(THF), 디메틸포름아미드(DMF), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 1,2-디클로로에탄($\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$), 디메틸설폭사이드(DMSO), t-부틸메틸에테르(TBME), 아세토니트릴(ACN), 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, t-부탄올, 디에틸에테르, 디페닐에테르, 디이소프로필에테르(DIPE), 디메틸아세트아마이드(DMA), 클로로벤젠, 벤젠, 톨루엔, 카본테트라클로라이드(CCl_4), 아세톤, 트리플루오로아세트산, 클로로포름(CHCl_3), 피리딘 및 이들의 수용액으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합 용액인 것인, 방법.

청구항 19

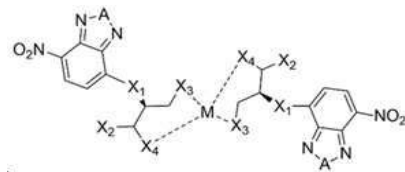
제17항에 있어서,

상기 반응은 20 내지 30 °C에서 3시간 동안 교반하는 것인, 방법.

청구항 20

하기 화학식 1로 표시되는 나노복합체를 포함하는 글루타치온 검출용 근적외선 형광 센서.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

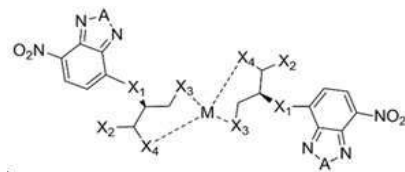
X_1 내지 X_4 는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 및 알콕시(alkoxy) 중 어느 하나이며,

M은 2가 양이온 금속이다.)

청구항 21

하기 화학식 1로 표시되는 나노복합체를 시료에 첨가하는 단계;를 포함하는, 세포 내 글루타치온을 검출하는 방법.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

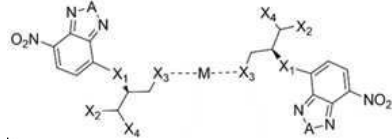
X_1 내지 X_4 는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 및 알콕시(alkoxy) 중 어느 하나이며,

M은 2가 양이온 금속이다.)

청구항 22

하기 화학식 2로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

M은 2가 양이온 금속이다.)

청구항 23

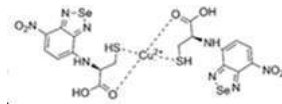
제22항에 있어서,

상기 금속은 구리(Copper)인 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 24

제22항에 있어서,

상기 나노복합체는 하기 복합체인 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.



청구항 25

제22항에 있어서,

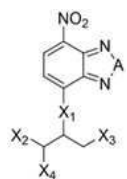
상기 나노복합체는 글루타치온(glutathione)과 특이적으로 반응하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 26

제22항에 있어서,

상기 나노복합체는 글루타치온과 반응하여 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 형성하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[화학식 3]



(상기 화학식 3에서,

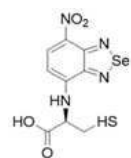
A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이다.)

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화합물인 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.



청구항 28

제26항에 있어서,

상기 화합물은 400 내지 700 nm에서 형광을 방출하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 29

제22항에 있어서,

상기 나노복합체는 글루타치온과 반응하여 2가 양이온 금속을 1가 양이온 금속으로 환원시키는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 1가 양이온 금속은 생체분자와 반응하여 활성산소종을 생성하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 생체분자는 과산화수소, 아미노산, 단백질, 지질, 세포 대사의 부산물, 또는 산소를 포함하는 활성물질을 포함하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 32

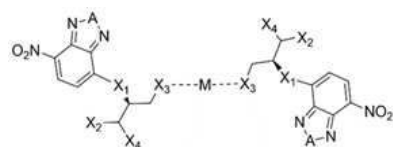
제30항에 있어서,

상기 활성산소종은 히드록실 라디칼(hydroxyl radical), 일중항산소(singlet oxygen), 과산화수소(hydrogen peroxide), 초과산화물(superoxide), 또는 일산화질소(nitric oxide)를 포함하는 것인, 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 33

하기 반응식 2에 의해 제조되는 나노복합체의 제조 방법으로서,

[반응식 2]



유기용매에 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 및 시스테인(Cysteine)을 반응시키는 단계; 및

상기 반응물에 구리 양이온을 첨가하는 단계;를 포함하는, 나노복합체의 제조 방법.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 유기용매는 테트라히드로퓨란(THF), 디메틸포름아미드(DMF), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 1,2-디클로로에탄($\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$), 디메틸설폭사이드(DMSO), t-부틸메틸에테르(TBME), 아세토니트릴(ACN), 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, t-부탄올, 디에틸에테르, 디페닐에테르, 디이소프로필에테르(DIPE), 디메틸아세트아마이드(DMA), 클로로벤젠, 벤젠, 톨루엔, 카본테트라클로라이드(CCl_4), 아세톤, 트리플루오로아세트산, 클로로포름(CHCl_3), 피리딘 및 이들의 수용액으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합 용액인 것인, 방법.

청구항 35

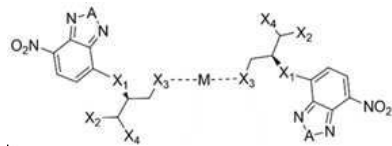
제33항에 있어서,

상기 반응은 20 내지 30 °C에서 3시간 동안 교반하는 것인, 방법.

청구항 36

하기 화학식 2로 표시되는 나노복합체를 포함하는 글루타치온 검출용 근적외선 형광 센서.

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium: Se)이고,

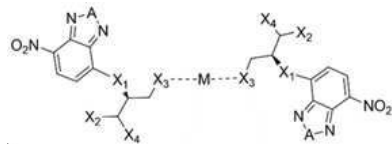
X_1 내지 X_4 는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

M은 2가 양이온 금속이다.)

청구항 37

하기 화학식 2로 표시되는 나노복합체를 시료에 첨가하는 단계;를 포함하는, 세포 내 글루타치온을 검출하는 방법.

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium: Se)이고,

X_1 내지 X_4 는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

M은 2가 양이온 금속이다.)

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 니트로벤젠-아미노산-금속 이온 기반 나노복합체를 유효성분으로 포함하는 암의 광역동 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체 활성 물질은 효소처럼 작용하거나 구조적 유사성, 가변적인 세포신호 조절과 같은 특수한 능력을 가지고 있어, 기초 과학과 임상 분야를 연결하여 그 범위를 확장하고 있다. 생체 분자를 생체 활성 물질로 개발하는 것은 임상적 사용을 위한 높은 생체 적합성을 나타내고 있다.

[0003] 생체 활성 물질의 디자인을 위한 요소 선택 시, 티올(thiol)을 포함하는 화합물은 클릭 반응(click chemistry)을 통한 쉬운 조작 및 생물 직교 화학(bioorthogonal chemistry)에 유리하여 유망하게 여겨져 왔다. 그 중에서도 티올을 포함하는 시스테인(Cysteine; Cys), 호모시스테인(Homocysteine; Hcy) 및 글루타치온(Glutathione; GSH)은 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)수준을 낮추는 과정을 통해 항산화, 항균 및 항암 특성이 있음을 밝혀내기 위해 광범위한 연구가 진행되었다. 그 결과로, 종양 미세환경(tumor microenvironment)에서 티올의 과다 발현이 확인되었고, 종양부위에 대한 특이적 선택성을 갖는 티올 활성화 치료 물질의 개발이 필수적이라는 근거가 된다.

[0004] 현재까지, 생체 적합한 금속 배위(metal-coordination) 물질은 글루타치온에 의해 조절되는 산화환원 시스템을 통해 종양 미세환경 내에서 비금속 물질보다 우수한 성능을 나타내고, 활성산소종 발생으로 암에 대한 화학역동적 치료(Chemodynamic therapy; CDT) 효과를 향상시킨다고 알려져 있다. 하지만, 금속 이온의 산화 과정은 종양 내 과산화수소의 상대적으로 낮은 농도로 인해 여전히 어렵다. 또한 종양 모니터링 시스템의 부재, 부족한 활성산소종 생성과 같은 여러 제약으로 인해 어려움이 있다. 이에 따라, 현재의 연구는 활성산소종을 증가시키는 시스템을 개발하려고 노력하고 있다.

[0005] 광역학치료(Photodynamic therapy)는 광감작제(Photo-sensitizer)의 빛 활성화를 통해 활성산소종을 형성하는 치료법이다. 이는 활성산소종의 생성을 강화할 수 있는 방법이며, 특정 부위를 정밀하게 치료할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 광역학치료는 활성산소종 생성을 강화할 수 있는 방법이며, 화학역동적 치료를 보완할 수 있는 방법이 된다.

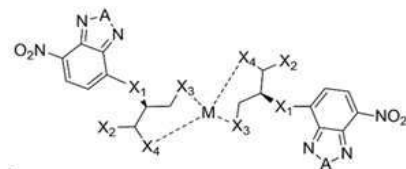
[0006] 이에, 본 발명자들은 니트로벤젠-아미노산-금속 나노입자의 글루타치온과 같은 황화물질 특이성을 이용하여, 종양 특이적 근적외선 영상화, 펜톤 반응에 기인한 화학역동적 치료 및 광역학치료가 가능한 항암제를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

[0008] [화학식 1]



[0009]

[0010] (상기 화학식 1에서,

[0011] A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

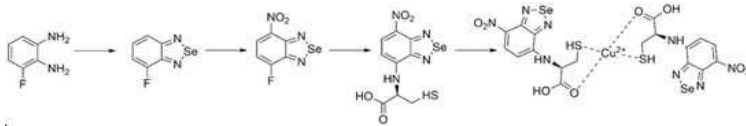
[0012] X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

[0013] M은 2가 양이온 금속이다.)

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 광역동 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 유기용매에 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 및 시스테인(Cystein)을 반응시키는 단계 및 상기 반응물에 구리 양이온을 첨가하는 단계를 포함하는 하기 반응식 1에 의해 제조되는 나노복합체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0016] [반응식 1]



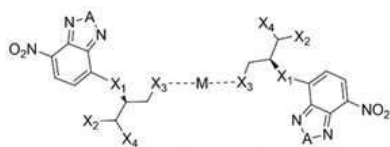
[0017]

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체를 포함하는 글루타치온 검출용 근적외선 형광 센서를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체를 시료에 첨가하는 단계를 포함하는 세포 내 글루타치온을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 하기 화학식 2로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

[0021] [화학식 2]



[0022]

[0023] (상기 화학식 2에서,

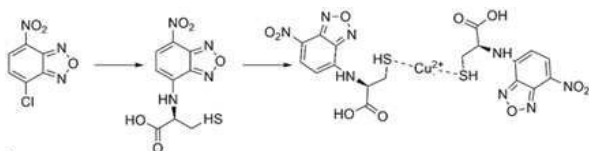
[0024] A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

[0025] X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

[0026] M은 2가 양이온 금속이다.)

[0027] 본 발명의 또 다른 목적은 유기용매에 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 및 시스테인(Cystein)을 반응시키는 단계 및 상기 반응물에 구리 양이온을 첨가하는 단계를 포함하는 하기 반응식 2에 의해 제조되는 나노복합체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0028] [반응식 2]



[0029]

[0030] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 2로 표시되는 나노복합체를 포함하는 글루타치온 검출용 근적외선 형광 센서를 제공하는 것이다.

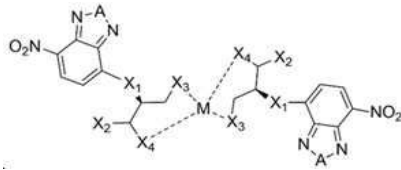
[0031] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 2로 표시되는 나노복합체를 시료에 첨가하는 단계를 포함하는 세포 내 글루타치온을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0032] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0033] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0034] [화학식 1]



[0035]

[0036] (상기 화학식 1에서,

[0037] A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium: Se)이고,

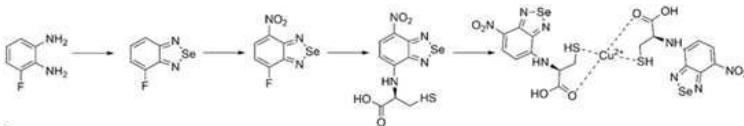
[0038] X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

[0039] M은 2가 양이온 금속이다.)

[0040] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 광역동 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 유기용매에 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 및 시스테인(Cystein)을 반응시키는 단계 및 상기 반응물에 구리 양이온을 첨가하는 단계를 포함하는 하기 반응식 1에 의해 제조되는 나노복합체의 제조 방법을 제공한다.

[0042] [반응식 1]



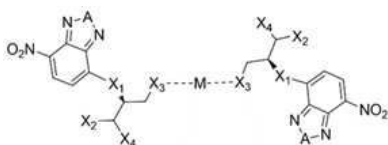
[0043]

[0044] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체를 포함하는 글루타치온 검출용 근적외선 형광 센서를 제공한다.

[0045] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체를 시료에 첨가하는 단계를 포함하는 세포 내 글루타치온을 검출하는 방법을 제공한다.

[0046] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0047] [화학식 2]



[0048]

[0049] (상기 화학식 2에서,

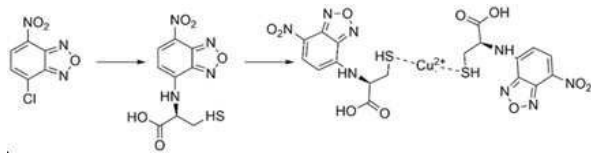
[0050] A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium: Se)이고,

[0051] X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

[0052] M은 2가 양이온 금속이다.)

[0053] 또한, 본 발명은 유기용매에 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 및 시스테인(Cysteine)을 반응시키는 단계 및 상기 반응물에 구리 양이온을 첨가하는 단계를 포함하는 하기 반응식 2에 의해 제조되는 나노복합체의 제조 방법을 제공한다.

[0054] [반응식 2]



[0055]

[0056] 또한, 본 발명은 상기 화학식 2로 표시되는 나노복합체를 포함하는 글루타치온 검출용 근적외선 형광 센서를 제공한다.

[0057] 또한, 본 발명은 상기 화학식 2로 표시되는 나노복합체를 시료에 첨가하는 단계를 포함하는 세포 내 글루타치온을 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 신규 나노복합체 NPS-Cys-Cu²⁺는, 암세포 내 글루타치온과 특이적으로 반응하여 근적외선 영상화가 가능하며, 광조사하여 생성된 활성산소종에 의한 항암 효과를 확인한 바, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 본 발명의 복합체의 배위결합 수를 증명하는 푸리에 변환 적외선 분광법의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 복합체의 바이오싸이올, 생체분자 또는 금속 이온에 대한 형광 선택성을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 복합체의 글루타치온 반응 전후의 365 nm UV 챔버 내에서의 형광 사진 및 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 복합체의 과산화수소 존재 또는 532 nm 파장의 광조사 시 발생하는 활성산소종의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 복합체의 과산화수소 존재 또는 532 nm 파장의 광조사 시 발생하는 활성산소종의 전자 상자성 공명 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 복합체의 세포 내 글루타치온 농도에 따른 세포의 형광 켜짐 현상을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 복합체의 세포 내 활성산소종 생성을 나타낸 것이다.

도 8은 중앙 세포주 이식 마우스에 피하투여를 통해 주입된 복합체 1의 광조사 유무에 따른 치료 효과를 중앙 크기 및 사진과 마우스의 무게로 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 복합체를 투여하여 치료가 끝난 중앙의 혈관신생인자 형성 수치를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 복합체가 암 조직 내에서 활성화되어 암을 치료하는 전체 과정을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

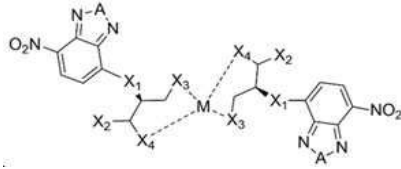
[0060] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0061] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0062] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0064] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0065] [화학식 1]



[0066]

[0067] (상기 화학식 1에서,

[0068] A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium: Se)이고,

[0069] X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

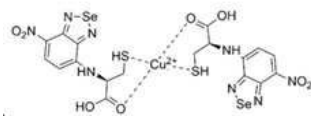
[0070] M은 2가 양이온 금속이다.)

[0071] 본 발명의 "복합체(complex)", "착물" 또는 "배위화합물(coordination compound)"은 1개의 원자 혹은 이온을 중심으로 그 주위에 몇 개의 다른 물질이 방향성을 띠고 입체적으로 배위 공유 결합을 해 하나의 원자집단을 이루는 물질이며, 비어있는 오비탈이 많은 중심 금속 이온에 리간드의 고립전자쌍이 배위결합을 통해 형성된다.

[0072] 상기 "배위 결합(coordinate covalent bond)"은 두 원자가 공유 결합을 할 때 결합에 관여하는 전자가 형식적으로 한 쪽 원자에서만 제공되어 결합된 경우를 말한다. 보통의 공유 결합과 배위결합간의 차이는 인위적으로 구분된 것이지만, 서적 등에 많이 쓰인다. 또한, 결합력과 결합에 대한 설명은 다른 극성 공유 결합과 같다. 배위결합은 루이스 염기(전자쌍 주개)가 루이스 산(전자쌍 받개)에게 전자쌍을 주는 것으로 형성된다. 전자쌍 받개가 음전하를 받아들일 때, 전자쌍 주개가 양전하를 받는다.

[0073] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 배위결합의 상기 금속은 통상적으로 2가 양이온을 가지는 모든 금속을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 구리(Copper)일 수 있다.

[0074] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노복합체는 하기 복합체인 것일 수 있다.



[0075]

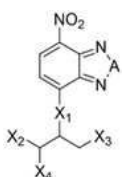
[0076] 상기 복합체는 니트로벤조셀레나디아졸-시스테인-구리(이하, "복합체 1")라 명명할 수 있다.

[0077] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 복합체는 글루타치온(glutathione)과 특이적으로 반응하는 것일 수 있다.

[0078] 본 발명의 "글루타치온(Glutathione; GSH)"은 글루탐산, 시스테인, 글리신의 세 가지 아미노산으로 이루어진 결정성 펩타이드이자 식물, 동물, 균류 및 일부 세균과 고균에서의 항산화제이다. 글루타치온은 자유 라디칼, 과산화물, 지질 과산화물, 중금속과 같은 활성 산소로 인한 세포의 중요 성분의 손상을 방지할 수 있다.

[0079] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 복합체는 글루타치온과 반응하여 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 형성하는 것일 수 있다.

[0080] [화학식 3]

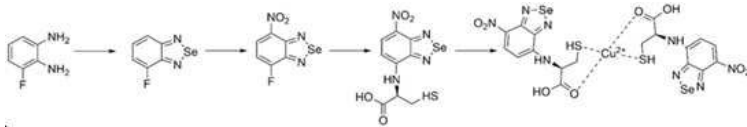


[0081]

- [0082] (상기 화학식 3에서,
- [0083] A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,
- [0084] X_1 내지 X_4 는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이다.)
- [0085] 본 발명의 "화합물(compound)"은 두 종류 이상의 화학 원소의 원자가 결합하여 만들어진 순수한 화학 물질이며, 화학 반응을 통하여 더 단순한 물질로 분리해 낼 수 있다.
- [0086] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 하기 화합물인 것일 수 있다.
-
- [0087]
- [0088] 상기 화합물은 니트로벤조셀레나디아졸-시스테인(이하, "화합물 1")이라 명명할 수 있다.
- [0089] 본 발명에서, 상기 화합물은 형광체로 이용할 수 있다.
- [0090] 본 발명의 "형광체(phosphor)" 또는 "형광단(fluorophore)"은 발광 현상을 나타내는 물질이다. 어떤 유형의 복사 에너지에 노출되면 빛을 방출한다. 자외선이나 가시광선에 노출되면 빛을 내는 형광 또는 인광 물질과 음극 선관에서 전자빔에 부딪혔을 때 빛을 내는 음극 발광 물질을 포함한다.
- [0091] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 400 내지 700 nm에서 형광을 방출하는 것일 수 있다.
- [0092] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노복합체는 글루타치온과 반응하여 2가 양이온 금속을 1가 양이온 금속으로 환원시키는 것일 수 있다.
- [0093] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 1가 양이온 금속은 생체분자와 반응하여 활성산소종을 생성하는 것일 수 있다.
- [0094] 본 발명의 "활성 산소(reactive oxygen species, ROS)" 또는 "활성 산소종"은 산소 원자를 포함하는 화학적으로 반응성 있는 분자이며, 생물체 내에서 생성되는 화합물로 생체 조직을 공격하고 세포를 손상시킬 수 있는 산화력이 강한 산소이다. 활성산소종은 정상적인 세포 내 활성 작용 과정에서 생성되며, 세포 분화, 유전자 발현, 사이토카인에 대한 반응 정도를 포함한 다양한 생물학적 과정에 연관되어 있다.
- [0095] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 생체분자는 과산화수소, 아미노산, 단백질, 지질, 세포 대사의 부산물, 또는 산소를 포함하는 활성물질을 포함하는 것일 수 있다.
- [0096] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 활성산소종은 이에 제한되지는 않으나, 히드록실 라디칼(hydroxyl radical), 일중항산소(singlet oxygen), 과산화수소(hydrogen peroxide), 초과산화물(superoxide), 또는 일산화질소(nitric oxide)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있으며, 보다 상세하게는 히드록실 라디칼 또는 일중항산소일 수 있다.
- [0097] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 세포 내 Endostatin/collagen XVIII, MMP-3, Coagulation Factor III, IL-1a, PEDF, IL-1b 또는 CD26 단백질 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0098] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 광조사되어 세포 내 Endostatin/collagen XVIII, MMP-3, Coagulation Factor III, IL-1a, PEDF, IL-1b 또는 CD26 단백질 발현을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0100] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 광역동 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0101] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.

- [0102] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0103] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0104] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0105] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0106] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.
- [0107] 본 발명의 "광역동 치료(Photodynamic therapy; PDT)"는 광과민성 물질이 레이저에 조사된 뒤 활성산소종을 생산하여 암세포를 선택적으로 사멸하는 암치료법으로서, 글루타치온이 과발현된 암세포에 광과민성 물질을 투여하여 축적되고, 광과민성 물질이 글루타치온에 의해 활성을 가지는 화합물로 전환되어 생체 내 변화를 일으킨 후, 레이저를 조사하여 암세포를 선택적으로 파괴하는 치료법이다.
- [0108] 본 발명에서, 상기 광과민성 물질은 상기 화학식 1 또는 상기 화학식 2로 표시되는 나노복합체일 수 있다.
- [0109] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 암은 이에 제한되지는 않으나, 뇌암(brain cancer), 척수암(spinal cancer), 폐암(lung cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 유방암(breast cancer), 피부암(skin cancer), 전립선암(prostate cancer) 또는 난소암(ovarian cancer)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있으며, 보다 상세하게는 뇌암 일 수 있다.
- [0110] 본 발명에서, 상기 뇌암은 악성 신경교종을 포함하는 것일 수 있다. 상기 악성 신경교종은 뇌 또는 척수를 구성하는 세포에서 발생하는 악성종양이다.
- [0111] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 암의 혈관 신생을 억제하는 것일 수 있다.
- [0112] 본 발명의 "혈관 신생(Angiogenesis)"은 암 혈관신생으로서 암 세포의 급격한 성장 속도에 따라 성장에 필요한 산소를 공급하기 위해 암 세포 또는 조직 주변으로 혈관 신생을 유도하는 물질을 분비하는 과정을 말하며, 형성된 신생혈관으로 인해 암은 다시 빠르게 성장할 수 있고, 이러한 과정은 암의 소멸과정 전까지 반복적으로 거치게 된다.
- [0114] 또한, 본 발명은 유기용매에 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 및 시스테인(Cysteine)을 반응시키는 단계 및 상기 반응물에 구리 양이온을 첨가하는 단계를 포함하는 하기 반응식 1에 의해 제조되는 나노복합체의 제조 방법을 제공한다.

[0115] [반응식 1]



[0116]

[0117] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 유기용매는 이에 제한되지는 않으나, 테트라히드로퓨란(THF), 디메틸포름아미드(DMF), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 1,2-디클로로에탄($\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$), 디메틸설폭사이드(DMSO), t-부틸메틸에테르(TBME), 아세토니트릴(ACN), 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, t-부탄올, 디에틸에테르, 디페닐에테르, 디이소프로필에테르(DIPE), 디메틸아세트아마이드(DMA), 클로로벤젠, 벤젠, 톨루엔, 카본테트라클로라이드(CCl_4), 아세톤, 트리플루오로아세트산, 클로로포름(CHCl_3), 피리딘 및 이들의 수용액으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합 용액인 것일 수 있고, 바람직하게는 THF일 수 있다.

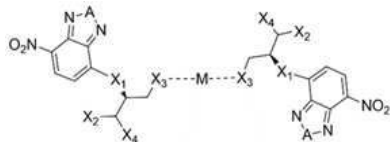
[0118] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 반응은 20 내지 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 교반하는 것일 수 있다.

[0120] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체를 포함하는 글루타치온 검출용 근적외선 형광 센서를 제공한다.

[0122] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 나노복합체를 시료에 첨가하는 단계를 포함하는 세포 내 글루타치온을 검출하는 방법을 제공한다.

[0124] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 나노복합체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0125] [화학식 2]



[0126]

[0127] (상기 화학식 2에서,

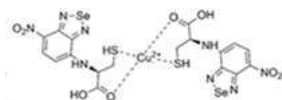
[0128] A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

[0129] X_1 내지 X_4 는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이며,

[0130] M은 2가 양이온 금속이다.)

[0131] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 배위결합의 상기 금속은 통상적으로 이가 양이온을 가지는 모든 금속을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 구리(Copper)일 수 있다.

[0132] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노복합체는 하기 복합체인 것일 수 있다.



[0133]

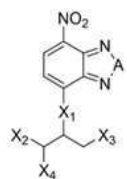
[0134] 상기 복합체는 니트로벤조퓨라잔-시스테인-구리(이하, "복합체 2")라 명명할 수 있다.

[0135] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노복합체는 글루타치온(glutathione)과 특이적으로 반응하는 것일 수 있다.

[0136] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노복합체는 글루타치온과 반응하여 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물

을 형성하는 것일 수 있다.

[0137] [화학식 3]



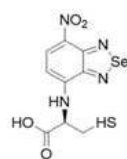
[0138]

[0139] (상기 화학식 3에서,

[0140] A는 산소(Oxygen: O) 또는 셀레늄(Selenium; Se)이고,

[0141] X₁ 내지 X₄는 각각 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 히드록시(hydroxy), 티올(thiol), 아민(amine), 카보닐(carbonyl), 카르복시(carboxy), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl) 또는 알콕시(alkoxy)이다.)

[0142] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 하기 화합물인 것일 수 있다.



[0143]

[0144] 상기 화합물은 니트로벤조퓨라잔-시스테인(이하, "화합물 2")라 명명할 수 있다.

[0145] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 400 내지 700 nm에서 형광을 방출하는 것일 수 있다.

[0146] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노복합체는 글루타치온과 반응하여 2가 양이온 금속을 1가 양이온 금속으로 환원시키는 것일 수 있다.

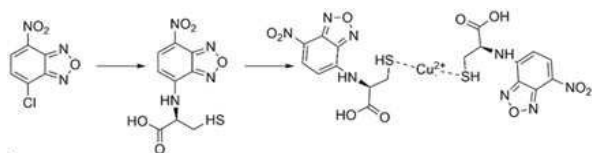
[0147] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 1가 양이온 금속은 생체분자와 반응하여 활성산소종을 생성하는 것일 수 있다.

[0148] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 생체분자는 과산화수소, 아미노산, 단백질, 지질, 세포 대사의 부산물, 또는 산소를 포함하는 활성물질을 포함하는 것일 수 있다.

[0149] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 활성산소종은 이에 제한되지는 않으나, 히드록실 라디칼(hydroxyl radical), 일중항산소(singlet oxygen), 과산화수소(hydrogen peroxide), 초과산화물(superoxide), 또는 일산화질소(nitric oxide)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 히드록실 라디칼 또는 일중항산소일 수 있다.

[0151] 또한, 본 발명은 유기용매에 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 및 시스테인(Cysteine)을 반응시키는 단계 및 상기 반응물에 구리 양이온을 첨가하는 단계를 포함하는 하기 반응식 2에 의해 제조되는 나노복합체의 제조 방법을 제공한다.

[0152] [반응식 2]



[0153]

[0154] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 유기용매는 이에 제한되지는 않으나, 테트라히드로퓨란(THF), 디메틸포름아미드(DMF), 디클로로메탄(CH₂Cl₂), 1,2-디클로로에탄(CH₂ClCH₂Cl), 디메틸설폭사이드(DMSO), t-부틸메틸에테르(TBME), 아세토니트릴(ACN), 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, t-부탄올, 디에틸에테르, 디페닐에테르, 디이소프로필에테르(DIPE), 디메틸아세트아마이드(DMA), 클로로벤젠, 벤젠, 톨루엔, 카본테트라클로라이드(CCl₄), 아세

톤, 트리플루오로아세트산, 클로로포름(CHCl_3), 피리딘 및 이들의 수용액으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합 용액인 것일 수 있고, 바람직하게는 THF일 수 있다.

[0155] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 반응은 20 내지 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 교반하는 것일 수 있다.

[0157] 또한, 본 발명은 상기 화학식 2로 표시되는 나노복합체를 포함하는 글루타치온 검출용 근적외선 형광 센서를 제공한다.

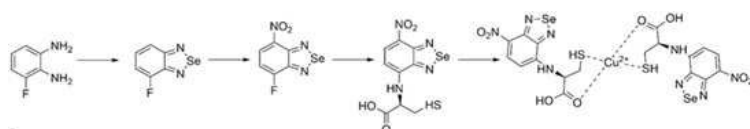
[0159] 또한, 본 발명은 상기 화학식 2로 표시되는 나노복합체를 시료에 첨가하는 단계를 포함하는 세포 내 글루타치온을 검출하는 방법을 제공한다.

[0161] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0163] <제조예 1> 니트로벤조셀레나디아졸-시스테인-구리 (복합체 1) 제조

[0164] 본 발명의 니트로벤조셀레나디아졸-시스테인-구리 복합체를 합성하기 위하여, 하기 반응식 1을 이용하였다.

[0165] [반응식 1]



[0166]

[0167] <1-1> 4-플루오로-벤조셀레나디아졸 제조

[0168] 3-플루오로벤젠-1,2-다이아민(3-fluorobenzene-1,2-diamine) 50 mg(0.3964 mmol) 및 이산화셀레늄(selenium dioxide; SeO_2) 52.78 mg(0.4757 mmol)을 에탄올 6.94 mL에 첨가한 후, 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 천천히 환류 가열하였다. 반응 종료 후, 혼합물을 25 $^{\circ}\text{C}$ 까지 냉각하고, 에틸 아세테이트(ethyl acetate; EA) 및 증류수(DI H_2O)를 첨가하여 유기층 및 수층으로 분리하였다. 상기 유기층을 증류수로 3회 세척하고, 무수 황산나트륨(sodium sulfate; Na_2SO_4)으로 건조하고 용매를 여과한 후, 여과액을 감압증발하였다. 상기 혼합물을 플래시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(flash silica gel column chromatography)에서 EA/n-hex=1:9 부피비의 혼합용매로 정제하여 백색 분말의 4-플루오로(fluoro)-벤조셀레나디아졸 45 mg (90% 수율)을 수득하였다.

[0169] $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$); δ 7.70(d, J = 9.1, 7.3, 5.6 Hz, 1H), 7.31(ddd, J = 10.8, 7.4 Hz, 1H).

[0170] $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$); δ 162.18, 155.24, 153.16, 152.01(d, JC-H = 15.12 Hz), 129.88(d, JC-N = 7.56 Hz), 120.73(d, JC-N = 6.3 Hz), 111.92(d, JC-H = 16.38 Hz), 80.20(d, JC-F = 34.02, 32.76 Hz). 8 MHz.9(d).

[0172] <1-2> 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 제조

[0173] 4-플루오로(fluoro)-벤조셀레나디아졸 50 mg(0.2486 mmol)을 0 $^{\circ}\text{C}$ 에서 농축 황산(concentrated sulfuric acid)(conc. H_2SO_4 , 0.003 mmol) 4 mL에 용해시킨 후, 교반하면서 농축 질산(concentrated nitric acid)(conc. HNO_3 , 3.730 mmol) 0.16 mL을 적가한 후, 30분 동안 교반하였다. 차가운 증류수 10 mL를 첨가하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 반응을 종료하였다. 그 후, 노란 침전물을 Whatman® Grade 1 여과지로 여과하고, 여과액을 감압농축하여 노란색 분말의 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 44.5 mg(수율 89%)을 수득하였다.

[0174] $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.61 (dd, $J = 8.4, 4.7$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J = 9.7, 8.4$ Hz, 1H).

[0175] $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$); δ 157.75, 155.60, 152.40, 151.51, 138.11, 129.65 (d, $\text{JC-N} = 10.08$ Hz), 110.25 (d, $\text{JC-H} = 18.9$ Hz), 79.76 (t, $\text{JC-F} = 34.02, 32.76$ Hz).

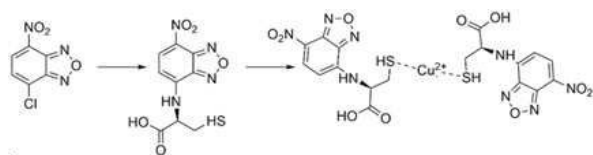
[0177] <1-3> 니트로벤조셀레나디아졸-시스테인-구리 복합체 제조

[0178] 4-플루오로-니트로벤조셀레나디아졸 58 mg(0.25 mmol)을 테트라히드로퓨란 (THF) 0.5 mL에 녹이고, 시스테인 30.3 mg(0.25 mmol) 및 수산화나트륨 수용액 2.5 mL(0.25 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 25 °C에서 3시간 동안 교반한 후, CuCl_2 수용액 2.5 mL(0.25 mmol)에 적가하였다. 자가 조립을 통한 나노 복합체를 형성하기 위하여 반응을 5분 동안 유지하였다. 혼합물을 증류수로 3회 세척하여, 반응하지 않은 나머지 구리 이온을 제거하고, -70 °C에서 24 시간 동안 건조하여 니트로벤조셀레나디아졸-시스테인-구리 복합체 32 mg를 수득하였다.

[0180] <제조예 2> 니트로벤조퓨라잔-시스테인-구리 (복합체 2) 제조

[0181] 본 발명의 니트로벤조퓨라잔-시스테인-구리 복합체를 합성하기 위하여, 하기 반응식 2를 이용하였다.

[0182] [반응식 2]



[0183]

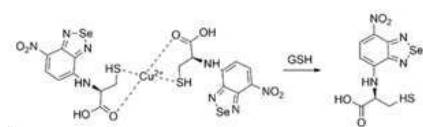
[0184] <2-1> 니트로벤조퓨라잔-시스테인-구리 복합체 제조

[0185] 4-클로로-7-니트로벤조퓨라잔 49.8 mg(0.25 mmol)을 테트라히드로퓨란 0.5 mL에 녹이고, 시스테인 30.3 mg(0.25 mmol) 및 수산화나트륨 수용액 2.5 mL(0.25 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 25 °C에서 3시간 동안 교반한 후, CuCl_2 수용액 2.5 mL(0.25 mmol)에 적가하였다. 자가 조립을 통한 나노 복합체를 형성하기 위하여 반응을 5분 동안 유지하였다. 혼합물을 증류수로 3회 세척하여, 반응하지 않은 나머지 구리 이온을 제거하고, -70 °C에서 24 시간 동안 건조하여 니트로벤조퓨라잔-시스테인-구리 복합체 35 mg를 수득하였다.

[0187] <제조예 3> 형광 프로브 샘플 제조

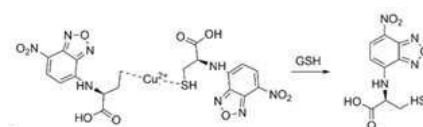
[0188] 하기 반응식 3 및 반응식 4에 나타난 바와 같이, 상기 복합체 1 또는 복합체 2를 글루타치온(glutathione; GSH)과 반응시켜, 니트로벤조셀레나디아졸-시스테인(화합물 1) 및 니트로벤조퓨라잔-시스테인(화합물 2)의 형광 프로브 샘플을 제조하였다.

[0189] [반응식 3]



[0190]

[0191] [반응식 4]



[0192]

[0193] 구체적으로, 메탄올(MeOH) 용매에 4 °C로 보관된 상태의 복합체 1 또는 복합체 2를 각각 증류수로 3회 세척하고, 글루타치온 6 mg 및 증류수 2 mL를 첨가하고 25 °C 에서 5 분 동안 반응시킨 후, 원심분리기

(Eppendorf Centrifuge model 54, Eppendorf) 3750 rcf로 3분 동안 25 ℃에서 원심분리한 다음, 각각의 상층액 1 mL를 증류수 9 mL에 첨가하여 화합물 1 샘플 및 화합물 2 샘플을 제조하였다.

[0194] 본 발명의 나노복합체를 이용한 암세포 내 광역동 치료 과정의 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0196] <실시예 1> 나노복합체의 중심금속 배위수 분석

[0197] 본 발명의 복합체 1 및 복합체 2의 구리 이온에 대한 배위결합 수를 확인하기 위하여, 푸리에 변환 적외선 분광(Nicolet™ iS™ 5 FT-IR spectrometer, Thermo Scientific)을 이용하여 FT-IR 스펙트럼을 측정하였다.

[0198] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 시스테인(cysteine)의 스펙트럼과 비교하여, 복합체 1 및 복합체 2 모두 나노복합체의 형성을 나타내는 티올(thiol) 그룹에 해당하는 2550 내지 2600 cm^{-1} 파수에서 피크를 확인하였다. 또한, 복합체 1의 경우, 복합체 2와 비교하여 C=O 결합 주위의 전자 밀도가 감소하여 C=O 결합에 해당하는 피크가 1575.5 cm^{-1} 에서 1611.8 cm^{-1} 로 이동하였으며, 이는 복합체 1의 C=O 그룹이 2가 구리 이온과 배위결합하여 4배위 구조를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0200] <실시예 2> 특이적 형광 검출 물질 분석

[0201] 다양한 생체분자 또는 금속 이온에 대한 복합체 1 또는 복합체 2의 형광 세기를 비교하여 선택성을 확인하였다.

[0202] 구체적으로, 생체분자로써 글루타치온(glutathione; GSH), 시스테인(cysteine), 호모시스테인(homocysteine) 및 황화수소(hydrogen sulfide), 시트룰린(citrulline), 아르지닌(alanine), 글루타민(glutamine), 글리신(glycine), 인간 혈청 알부민(human serum albumin), 과산화수소 및 에틸렌-다이아민-테트라아세트산(Ethylenediaminetetraacetic acid)을 사용하였으며, 금속 이온 염으로써 염화 아연(zinc chloride), 염화 구리(copper(II) chloride), 염화 코발트(cobalt(II) chloride), 염화 카드뮴(cadmium chloride), 염화 나트륨(sodium chloride), 염화 마그네슘(magnesium chloride), 염화 철(iron(III) chloride), 염화 칼륨(potassium chloride) 및 질산 수은(mercury(II) nitrate)을 사용하여, 나노복합체와 반응시킨 후의 형광 세기를 측정하였다.

[0203] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 복합체 1 또는 복합체 2 모두 글루타치온, 시스테인, 호모시스테인 또는 황화수소를 첨가하였을 때 형광 커짐을 확인하였으며, 특히 글루타치온과의 반응에서 가장 높은 형광 세기를 나타내는 것을 확인하였다.

[0205] <실시예 3> 형광 방출 특성 분석

[0206] 복합체 1 또는 복합체 2의 글루타치온(glutathione; GSH) 특이적 형광 검출 반응 여부를 확인하였다.

[0207] 구체적으로, 복합체 1 또는 복합체 2의 샘플을 표준 석영 셀(1 cm, Hellma Analytics, Germany)에 적용하고, 형광 측정 장비(Spectro-fluorophotometer; Shimadzu Corp. RF-6000, Kyoto, Japan)를 이용하여 형광 방출 스펙트럼을 측정했다. 또한, 육안으로 형광 변화를 확인하기 위하여, 365 nm 여기 파장을 가진 챔버(WUV-L10, DAIHAN Scientific)를 사용하였다.

[0208] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 복합체 1 및 글루타치온이 반응하여 생성된 화합물은 파장 600 nm 내지 650 nm에서 형광 세기가 증가하는 것을 확인하였으며, 복합체 2 및 글루타치온이 반응하여 생성된 화합물은 파장 520 nm 내지 580 nm에서 형광 세기가 증가하는 것을 확인하였다.

[0210] <실시예 4> 활성산소종 확인

[0211] <4-1> 과산화수소 및 광조사에 의한 활성산소종 생성 여부 확인

[0212] 복합체 1 또는 복합체 2가 글루타치온과 반응하여 생성된 Cu(I) 이온이 과산화수소와 반응하여 활성산소종 생성, 및 글루타치온 반응 후 구리가 제거된 화합물 1 또는 화합물 2의 광조사를 통한 활성산소종 생성 여부는

활성산소종 측정을 위한 표준 시약인 1,3-다이페닐이소벤조퓨란을 이용하여 확인하였다.

[0213] 구체적으로, 복합체 1 또는 복합체 2(4 mg/mL)를 증류수로 3회 세척하고, 글루타치온(12.5 mM)을 첨가하여 각 상층액을 100 배로 희석한 후, 희석액 및 1,3-다이페닐이소벤조퓨란(100 μ M) 디메틸설폭사이드(DMSO) 용액을 증류수에 혼합하여 샘플을 제조하였으며, 각 샘플에 60초간 광조사(532 nm, 45 mW $\cdot$ cm⁻²)하여 1,3-다이페닐이소벤조퓨란의 흡수 스펙트럼을 360초까지 측정하였다.

[0214] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 복합체 1에 글루타치온을 첨가한 샘플은 과산화수소 또는 광조사를 통한 활성산소종의 증가로 인하여 파장 400 내지 500 nm에서 흡광도가 감소하는 것을 확인하였으며, 복합체 2에 글루타치온을 첨가한 샘플은 과산화수소를 통한 활성산소종의 증가로 인하여 파장 400 내지 700 nm에서 흡광도가 감소하는 것을 확인하였다.

[0216] <4-2> 활성산소종 검출

[0217] 전자 상자성 공명(Electron Paramagnetic Resonance; EMXplus-9.5/12/P/L System, Germany) 분석기기를 이용하여, 복합체 1 또는 복합체 2에 대한 활성산소종 검출을 확인하였다.

[0218] 구체적으로, 복합체 1 (4 mg/mL) 또는 복합체 2 (4 mg/mL)에 글루타치온 수용액 (50 mM)을 첨가하여 5분 동안 교반한 후, 혼합액의 상층액을 수득하고, 일중항 산소(¹O₂) 탐지제로써 2,2,6,6-테트라메틸피페리딘(2,2,6,6-Tetramethylpiperidine; TEMP) 및 활성산소종 탐지제로써 5,5-디메틸-1-피롤린 *N*-옥사이드(5,5-Dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide; DMPD)를 이용하여, 글루타치온과의 반응물 샘플, 글루타치온 반응 및 과산화수소 첨가 샘플, 및 글루타치온 반응 및 광조사 샘플에 각각 첨가한 후, 각 샘플에 대하여 일중항 산소 생성량을 측정하였다.

[0219] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 복합체 1 또는 복합체 2에 글루타치온을 첨가한 샘플은 과산화수소 하에서 일중항 산소 및 활성산소종 생성량이 증가하는 것을 확인하였으며, 화합물 1에서만 광조사에 의한 일중항 산소 및 하이드록실 라디칼이 발생하는 것을 확인하였다.

[0221] <실시예 5> 세포 내 형광 이미징

[0222] <5-1> 세포 내 글루타치온 형광 검출

[0223] 종양 세포 내에서 복합체 1 또는 복합체 2의 글루타치온 특이적 검출 및 형광 이미징을 확인하였다.

[0224] 구체적으로, U87 MG(인간 뇌종양 세포주) 세포주에 글루타치온 억제제인 *N*-에틸말레이미드(*N*-Ethylmaleimide; NEM) (50 μ M)를 30분 동안 전처리하여 세포 내 글루타치온 수준을 감소시킨 실험군 1, 상기 실험군 1에 추가적으로 글루타치온(500 μ M)을 처리하여 세포 내에 글루타치온이 풍부한 실험군 2, 및 글루타치온 억제제를 첨가하지 않은 대조군에, 각각 복합체 1 또는 복합체 2를 100 μ g/mL 농도로 1시간 전처리 및 배양한 후, 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscope; LSM800, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 세포 내 형광을 측정하였다.

[0225] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 글루타치온이 억제된 실험군 1에 복합체 1 또는 복합체 2를 처리할 경우 형광 방출 세기가 모두 감소하였으며, 글루타치온이 풍부한 실험군 2 및 종양세포 대조군에 복합체 1 또는 복합체 2를 처리할 경우 형광 방출 세기가 증가하는 것을 확인하였다.

[0227] <5-2> 세포 내 활성산소종 검출

[0228] 복합체 1 또는 복합체 2의 세포 내 글루타치온 특이적 반응에 의한 활성산소종 생성 능력을 확인하였다.

[0229] 구체적으로, 인간 신장 세포인 HEK293 세포주 및 종양 세포인 U87 MG 세포주에 형광 프로브인 2',7'-디클로로플루오레세인 디아세테이트(2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFDA) 용액을 처리하고, 복합체 1 또는 복합체 2를 100 μ g/mL 농도로 각각 처리하고 90분 동안 배양한 후, 1분간 광조사(532 nm, 45 mW $\cdot$ cm⁻²)하여 발생하는 활성산소종을 모니터링하였다.

[0230] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 정상세포 군에서는 형광을 나타내지 않는 반면, 복합체 1이 처리된 U87 MG 종양 세포군에서 녹색 형광을 나타냈으며, 특히 광조사 처리된 군에서 형광 세기가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0231] 따라서, 정상 세포 대비 높은 농도의 암 세포 내 글루타치온으로 인하여, 복합체 1이 처리된 종양 세포군에서 활성산소종이 유의적으로 발생하는 것을 확인할 수 있다.

[0233] <실시예 6> *In vivo* 항암 효능

[0234] <6-1> 종양 크기 분석

[0235] 종양 이식(xenograft) 마우스 모델에서 복합체 1의 암 특이적 치료 효능을 확인하였다.

[0236] 구체적으로, 마우스 모델의 종양을 유도하기 위하여 BALB/c 누드 마우스의 우측 허벅지에 U87 MG 세포주를 삽입하고, 종양 부위에 피하 주사로 복합체 1 (10 mg/kg) 단독 투여, 또는 복합체 1 (10 mg/kg) 투여 및 광조사 처리 (532 nm, 45 mW · cm⁻², 1분) 후 4일간 휴식 기간을 포함하는 투여 주기를 20일 동안 5회 반복하여, 체중 변화 및 징후 등을 모니터링하였다.

[0237] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 복합체 1을 단독으로 투여한 군, 또는 복합체 1 및 광조사 처리한 군에서 종양 크기가 각각 70.59 mm³에서 62.51 mm³로, 63.96 mm³에서 42.03 mm³로 감소하였으며, 체중 변화는 일정하게 유지되는 것을 확인하였다.

[0239] <6-2> 종양 항혈관 신생 관련 단백질 분석

[0240] 20일째에 U87 MG 이식 마우스 모델을 희생한 후, 수술로 종양을 제거하여 종양 크기 감소에 기여하는 요인을 분석하였다.

[0241] 구체적으로, PBS(대조군), 복합체 1 단독 투여군, 복합체 1 투여 및 광조사 처리군의 종양에 대하여, 종양 항혈관 신생 관련 단백질 정량화는 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA)를 사용하였고, 종양 조직은 Proteome Profiler Mouse 혈관신생 어레이 키트 (R&D Systems, Inc., USA)를 사용하였으며, 샌드위치-항원-항체 방법론을 기반으로 수행하였다. 마지막 단계에서, 항원-항체 혼합물을 항체가 코팅된 패널에 적용하고, 이후 강화된 화학발광(ECL) 용액을 사용하여 분석하였다.

표 1

	복합체 1 단독 투여군	복합체 1 투여 및 광조사 처리군
단백질 발현 증가	Endostatin/collagen XVIII, MMP-3, Coagulation Factor III, IL-1a, PEDF, IL-1b, CD26	-
단백질 발현 감소	-	Endostatin/collagen XVIII, MMP-3, Coagulation Factor III, IL-1a, PEDF, IL-1b, CD26

[0243] 그 결과, 도 10 및 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 단백질 발현 heat-mapping 분석은 PBS 대조군과 비교하여, 복합체 1을 단독으로 투여한 세포 군에서는 Endostatin/collagen XVIII, MMP-3, Coagulation Factor III, IL-1a, PEDF, IL-1b, CD26 단백질 발현이 증가하여 혈관 생성의 잠재적인 촉진을 나타낸 반면, 복합체 1 투여 및 광조사 처리 군에서는 상기 혈관 신생 인자의 단백질 수준이 감소하는 것을 확인하였다.

[0244] 따라서, 세포 내 복합체 1은 광조사에 의한 활성산소종 생성으로 인해 혈관 신생 관련 단백질 발현이 감소하여 항혈관 신생 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0246] 따라서, 본 발명의 나노복합체 NPS-Cys-Cu²⁺는, 암세포 내 글루타치온과 특이적으로 반응하여 근적외선 영상화가 가능하며, 글루타치온과의 반응에 의해 환원된 Cu⁺가 과산화수소와 반응하여 활성산소종을 생성함으로써 혈관 신

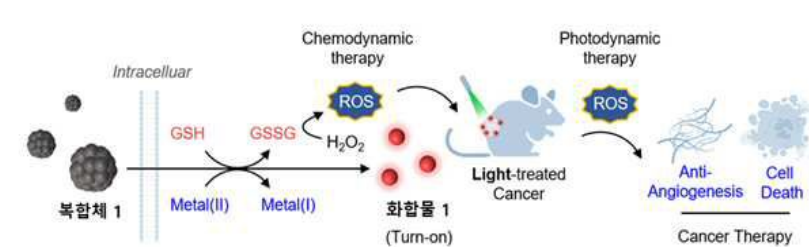
생 관련 단백질 발현이 증가하는 효과를 확인하였다. 또한, 복합체 및 글루타치온 반응에 의해 형성된 화합물 NPS-Cys를 광조사하여 활성산소종을 생성함으로써 혈관 신생 관련 단백질 발현을 감소시켜 항암 효과를 확인하였다.

[0248]

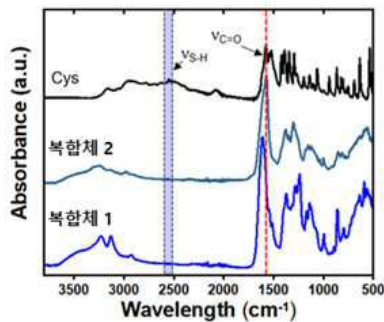
이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

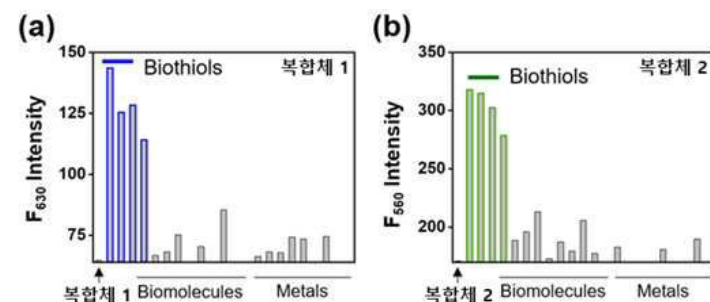
도면1



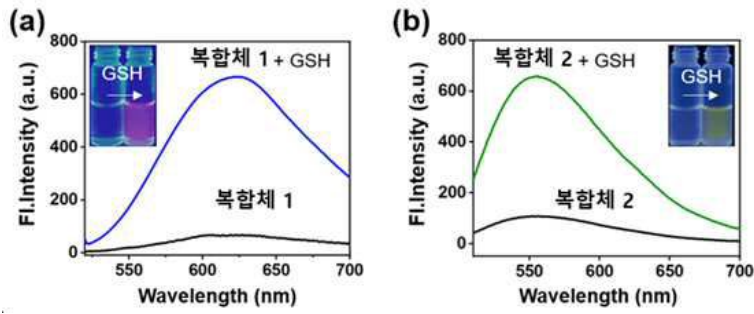
도면2



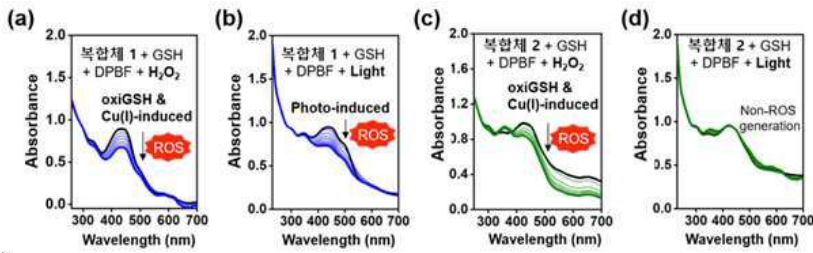
도면3



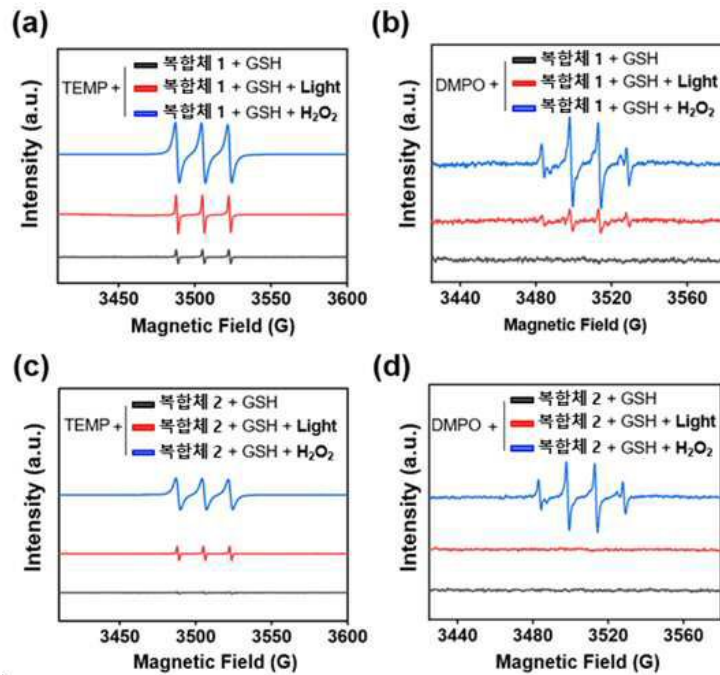
도면4



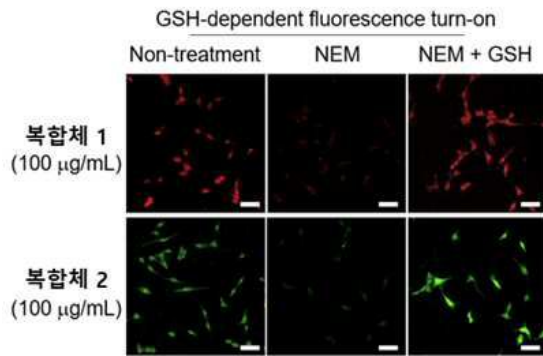
도면5



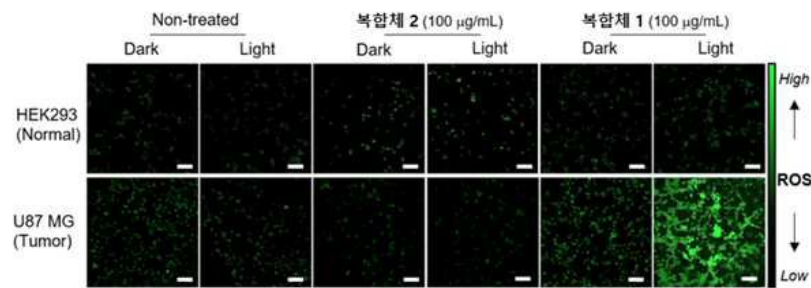
도면6



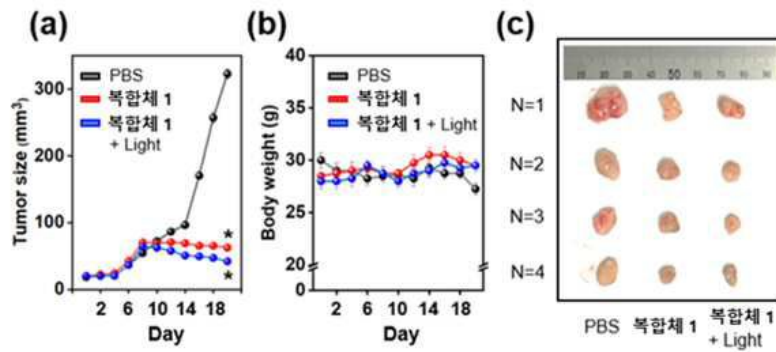
도면7



도면8



도면9



도면10

