

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0149029
(43) 공개일자 2023년10월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 255/30 (2006.01) A61K 41/00 (2020.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 255/30 (2013.01)
A61K 41/0052 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0048172
(22) 출원일자 2022년04월19일
심사청구일자 2022년04월19일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
이송이
부산광역시 부산진구 가야대로498번길 14, 208호
(개금동, 개금역 대상웰리움)
박지충
부산광역시 남구 용소로 45, B15호관 5427호(대연동, 부경대학교대연캠퍼스)
(74) 대리인
특허법인 무한

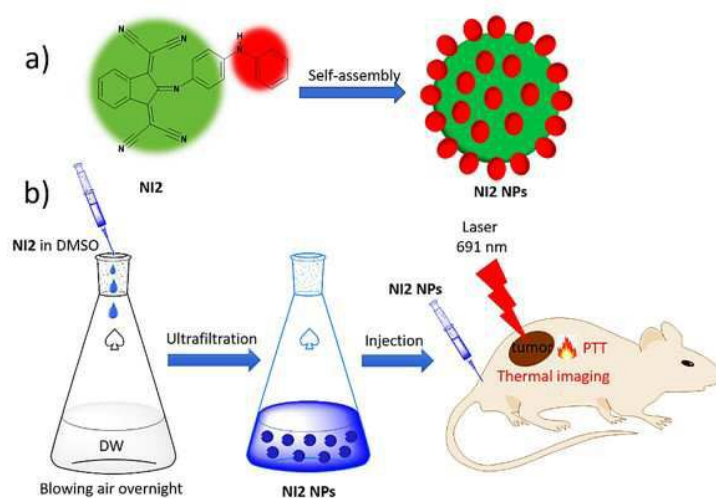
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 광열 암치료를 위한 신규한 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 광열 암치료 방법

(57) 요약

본 발명은, 광열 암치료를 위한 신규한 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 광열 암치료 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 청구항 제1항에 나타낸 인단(indan) 구조 기반의 유기 광민감제인 화합물, 이의 자가 조립체인 나노입자 및 이를 포함하는 조성물 및 이를 활용한 광열 치료 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711155678
과제번호	2022R1C1C1007740
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	광역동/광역치료의 통합적 치료를 위한 원소치환 기반 고효율 유기 감광제 개발 연
구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

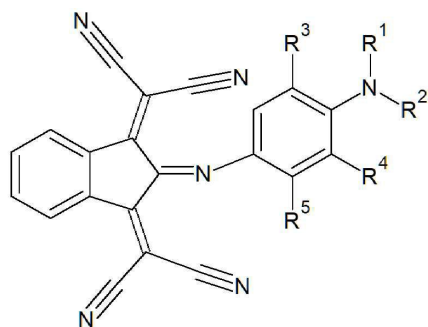
명세서

청구범위

청구항 1

하기의 화학식 1로 표시되는, 화합물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서 R^1 및 R^2 는, 각각, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기, 탄소수 1 내지 20의 알킬기, 탄소수 2 내지 20의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 20의 알키닐기에서 선택되고, 단, R^1 및 R^2 중 적어도 하나는, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기에서 선택되고,

R^3 내지 R^5 는, 각각, 수소, 할로젠, 하이드록실기, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 10의 알키닐기에서 선택된다.)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R^1 및 R^2 중 적어도 하나는,

치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 14의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 13의 헤테로 아릴기에서 선택되는 것인,

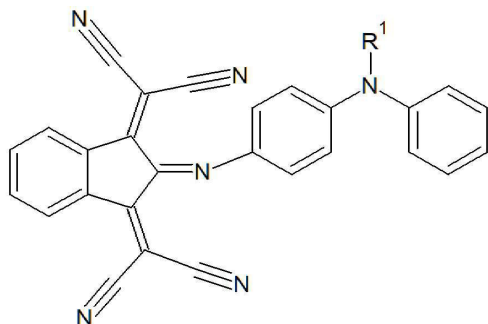
화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 화학식 1-1에서 선택되는 것인, 화합물:

[화학식 1-1]



(화학식 1-1에서 R^1 은, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 20의 헤테로 아릴기, 탄소수 1 내지 20의 알킬기, 탄소수 2 내지 20의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 20의 알키닐기에서 선택된다.)

청구항 4

제1항에 있어서,

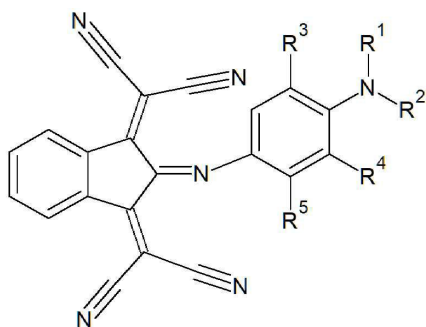
상기 화합물은 광열치료를 위한 유기 광민감제인 것인,

화합물.

청구항 5

하기의 화학식 1로 표시되는, 화합물을 포함하는 나노입자:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서 R^1 및 R^2 는, 각각, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기, 탄소수 1 내지 20의 알킬기, 탄소수 2 내지 20의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 20의 알키닐기에서 선택되고, 단, R^1 및 R^2 중 적어도 하나는, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기에서 선택되고,

R^3 내지 R^5 는, 각각, 수소, 할로젠, 하이드록실기, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 10의 알키닐기에서 선택된다.)

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 나노입자는,
수용성 용매 내에서 상기 화학식 1의 화합물이 자가조립된 나노입자인 것인,
나노입자.

청구항 7

제5항에 있어서,
상기 나노입자는 500 nm 이하의 크기를 갖고,
상기 나노입자는 광 조사에 의해 45 °C 이상의 온도로 열 발산하는 것인,
나노입자.

청구항 8

제5항에 있어서,
상기 나노입자는 광열치료를 위한 유기 광민감제인 것인,
나노입자.

청구항 9

제5항에 있어서,
상기 나노입자의 광열변환효율이 60 % 이상인 것인,
나노입자.

청구항 10

제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물, 제5항의 나노입자 또는 이 둘을 포함하는,
조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,
상기 조성물은,
광열 치료에 이용되고, 광 조사 시 열 에너지를 발산하여 표적 세포를 제거 또는 사멸시키는 것인,
조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 표적 세포는,
암세포, 종양세포 또는 과증식 세포인 것인,
조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,
상기 조성물은, 물, 유기용매 또는 이 둘을 더 포함하고,
상기 조성물 중 화합물, 나노입자 또는 이 둘은, 유효성분 함량으로 포함되는 것인,
조성물.

청구항 14

제10항의 조성물을 생체 내 또는 생체 외에서 표적 세포와 접촉시키는 단계; 및
상기 접촉된 세포 영역에 광 조사하는 단계;
를 포함하는,
광열 치료 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,
상기 광 조사하는 단계는,
1 초 이상 및 1 W/cm^2 이상의 적색광 레이저를 조사하여 표적 세포 영역의 온도를 45°C 이상 가열시키고, 표적 세포를 제거 또는 사멸시키는 것인,
광열 치료 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,
상기 광 조사하는 단계 이후에, 표적 세포 영역의 적외선 열 이미지를 획득하고 분석하는 단계;
를 더 포함하는 것인,
광열 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 광열 암치료를 위한 신규한 화합물, 이를 포함하는 조성물 및 광열 암치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지금까지 암치료에 적용되고 있는 화학요법, 방사선요법, 수술은 종종 심각한 부작용을 일으킨다. 이에 비해 광열 치료법은 낮은 부작용, 매우 낮은 약물 내성, 국소적인 종양 파괴등의 장점을 보인다. 광열 치료제는 대부분 무기 재료를 기반으로 하지만 유기 광열제는 더 나은 생체적합성을 보여준다. 유기 광열제 중 폴리머는

일반적으로 낮은 재현성으로 분자 다분산을 나타내며, 초분자는 생리 조건에서 항상 안정적이지 않으며, 모두 생분해 독성을 가진다는 단점을 가진다.

[0003] 몇 가지 효율적인 소형 유기 광열제가 보고 되었으나, 광열 효과를 갖는 이러한 유기 광열제를 만들기 위해선 부피가 큰 사슬, 방향족 고리 등을 도입하여 여러 단계의 유기반응을 거치게 되므로 낮은 수율을 나타내어 상용화, 임상시험 및 응용에 있어 경제적 단점도 함께 발생한다. 일부 소형 유기 광열제에서 시안화물 유도체의 낮은 광안정성, 포르피린 및 프탈로시아닌의 낮은 수용성, BODIPY 유도체의 낮은 광열 변환 효율 등의 문제점이 있고, 우수한 광열 변환 효율 (η)을 획득하기 위한 나노 수준의 유기 광열제를 위한 분자 설계는 생물학적 및 임상 시험에 빠르게 접근하는 데 장애물을 발생시킬 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은, 상기 언급한 문제점을 해결하기 위해서, 합성 공정이 간단하고(예: 단일 단계의 유기 반응), 우수한 광열 변환 효율 및 우수한 생체 적합성을 갖는 광민감제이며, 광열 소재로 활용할 수 있는 신규한 화합물을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명은, 본 발명에 의한 화합물의 자가 조립으로 제조된 나노 응집 플랫폼이며, 우수한 광열 변환 효율 및 우수한 생체 적합성을 갖는 광열 소재로 활용할 수 있는 나노입자를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명은, 본 발명에 의한 화합물, 나노입자 또는 이 둘을 포함하고, 광열 치료제로 활용할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

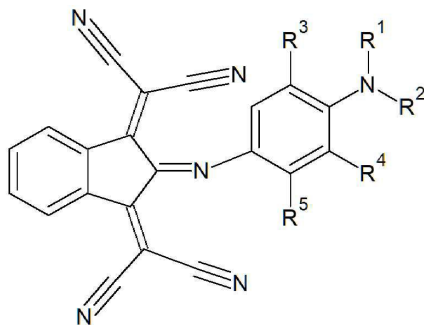
[0007] 본 발명은, 본 발명에 의한 조성물을 이용하는 광열 치료방법을 제공하는 것이다.

[0008] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 것들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 분야 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시예에 따라, 하기의 화학식 1로 표시되는, 신규한 화합물에 관한 것이다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

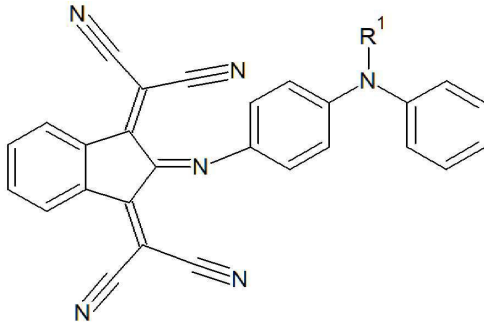
[0012] (상기 화학식 1에서 R^1 및 R^2 는 각각, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기, 탄소수 1 내지 20의 알킬기, 탄소수 2 내지 20의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 20의 알킬닐기에서 선택되고, 단, R^1 및 R^2 중 적어도 하나는, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기에서 선택되고,

[0013] R^3 내지 R^5 는 각각, 수소, 할로젠, 하이드록실기, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 10의 알킬닐기에서 선택된다.)

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 R^1 및 R^2 중 적어도 하나는, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 12의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 5의 헤테로 아릴기에서 선택되는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 화학식 1의 화합물은 화학식 1-1에서 선택되는 것일 수 있다.

[0016] [화학식 1-1]



[0017]

[0018] (화학식 1-1에서 R¹은 수소, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 6의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 6의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 12의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 12의 헤테로 아릴기, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 10의 알키닐기에서 선택된다.)

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 화합물은, 유기 광민감제이고, 상기 화합물은, 광열치료를 위한 유기 광민감제인 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 화학식 1로 표시되는, 화합물을 포함하는 나노입자에 관한 것이다.

[0021] 상기 나노입자는, 수용성 용매 내에서 상기 화학식 1의 화합물이 자가조립된 나노입자인 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 나노입자는 500 nm 이하의 크기를 갖고, 상기 나노입자는 광 조사에 의해 45 °C 이상의 온도로 열 발산하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 나노입자는 유기 광민감제이고, 상기 나노입자는 광열치료를 위한 유기 광민감제인 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 나노입자의 광열변환효율이 60 % 이상인 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명에 의한 화학식 1로 표시되는 화합물, 본 발명에 의한 나노입자 또는 이 둘을 포함하는, 조성물에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 조성물은, 광열 치료에 이용되고, 광 조사 시 열 에너지를 발산하여 표적 세포를 제거 또는 사멸시키는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 표적 세포는, 암세포, 종양세포 또는 과증식 세포인 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 조성물은 물, 유기용매 또는 이 둘을 더 포함하고, 상기 조성물 중 화합물, 나노입자 또는 이 둘은 유효 함량으로 포함되는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명의 조성물을 생체 내 또는 생체 외에서 표적 세포와 접촉시키는 단계; 및 상기 접촉된 세포 영역에 광 조사하는 단계;를 포함하는, 광열 치료 방법에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 광조사하는 단계는, 1 초 이상 및 1 W/cm² 이상의 적색광 레이저를 조사하여 표적 세포 영역의 온도를 45 °C 이상 가열시키고, 표적 세포를 제거 또는 사멸시키는 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 광조사하는 단계 이후에 표적 세포 영역의 적외선 열 이미지를 획득하고 분석하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명은, 간단한 합성방법으로 제조 가능하고, 높은 광열 변환 효율을 갖는 유기 광민감제를 제공할 수 있고, 상기 유기 광민감제는 상용화, 생물학적 응용 및 임상시험을 편리하게 진행할 수 있다. 즉, 우수한 광열 치료제로 인식되고 있는 소형 유기 광열제의 장점과 더불어 뛰어난 광열 변환 효율을 가지며 간단한 단일 단계의 유기합성을 거쳐 합성가능하기에 상용화, 생물학적 응용 및 임상시험을 편리하게 진행할 수 있다. 또한 생체안정

성과 생체적합성이 뛰어난 광열 치료제로써, 다모드의 광음향 및 유도 광열 암치료를 위한 추가적인 분자 설계에 기여하고 소형 유기 광열 진단제의 상업적 및 임상적 적용을 촉진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033]

도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명에 의한 화합물의 자가 조립 공정에 의한 나노입자 (예: NI2 NP)의 제조공정의 개념도 및 (b) 용매 내에서 자가 조립 공정에 의한 나노입자 (예: NI2 NP)의 제조 공정 및 생체 내 종양에서 나노입자(예: NI2 NP)의 광열 치료 공정을 나타낸 것이다.

도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따라, DMSO 내에 NI1 (60 μ M) 및 NI2 (40 μ M)의 UV-Vis 흡수 (검은색 선) 및 형광 방출 (Fluorescence emission, 빨간색 선) 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3은, 본 발명의 일 실시예에 따라, 1 W/cm² 및 1.5 W/cm²에서 691 nm 레이저 조사에 따른 NI2 NP의 열 반응에 관한 것으로, (a) 150초 동안 조사 (N = 4) 이후 다양한 농도 (0 for distilled water, 25, 50, 75, and 100 μ M)의 NI2 NP에서 측정된 온도 상승; (b) 레이저 조사 (ON/OFF time = 150 s/450 s; duty cycle = 25%)의 4개 ON/OFF 주기에서 NI2 NP (100 μ M)의 광열 수렴 효율 (PCE, photothermal convergence efficiency); 및 (c) 다양한 조사 시간(스케일 막대 = 5mm)에서 캡처된 NI2 NP (100 μ M)의 적외선 열 이미지를 나타낸 것이다.

도 4는, 본 발명의 일 실시예에 따라, 다양한 조건에서 NI2 NP의 *In vitro* 특성화에 관한 것으로, (a) NI2 NP (0, 25, 50, 75 및 100 μ M)에서 24시간 동안 배양된 CT26 세포의 세포 생존율, (b) “레이저” (1.5 W/cm²), “NI2 NPs” (100 μ M) 및 “laser+NI2 NPs” (laser at 1.5 W/cm² + 100 μ M of NI2 NPs)로 처리된 CT26 세포의 세포 생존율; (c) FDA/PI 염색 (Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide staining) 이후에 처리된 세포의 형광 이미지이다. 살아있는 세포와 죽은 세포를 각각 FDA (녹색) 및 PI (빨간색, scale bar = 200 μ m)로 염색하였다. (d) 녹색 및 (e) 빨간색의 상대적 형광 강도는 다양한 처리 그룹에 대해 비교되었다(그룹당 N = 4, **MU $p < 0.005$ vs. CTRL).

도 5는, 본 발명의 일 실시예에 따라, CT26 종양 베어링 모델에서 NI2NP-적용 광열 치료 (100 μ M and 1.5 W/cm² for 150 s)의 *In vivo* 열화상 평가를 나타낸 것으로, (a) 치료 중 온도의 시간적 변화 및 (b) 다양한 열 처리 시간 (N = 4 per group; CTRL = control; TM = tumor region; scale bar = 10 mm)에서 캡처된 관련 열 이미지를 나타낸 것이다. 특히 (b)의 흰색 화살표는 레이저 조사 방향을 나타낸다.

도 6은, 본 발명의 일 실시예에 따라, CT26 종양 보유 모델에 미치는 NI2 NP 보조 광열 치료 (100 μ M and 1.5 W/cm² for 150 s)의 생체 내 항종양 효과를 나타낸 것으로, (a) 치료 (TM = tumor region; D = day; scale bar = 10 mm) 후 다양한 시점에서 캡처된 평면도 이미지, (b) 처리된 동물의 체중 변화, (c) 처리된 종양의 부피 변화, 및 (d) D10 (top row = 100X and scale bar = 100 μ m; bottom row = 400X and scale bar = 30 μ m)에서 다양한 처리군에서 획득된 종양의 HE-염색 이미지이다. 특히 (d)의 검은색 화살표는 혈액 모세관의 위치를 나타낸다. 상단 이미지의 노란색 실선 상자는 하단 이미지에서 확대하였다 (N = 4 per group; **MU $p < 0.005$ vs. CTRL).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

이하 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어들은 본 발명의 바람직한 실시예를 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.

[0035]

명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.

[0036]

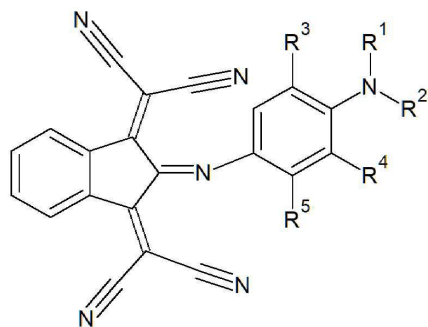
명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0037]

본 발명은, 신규한 유기 광민감제 화합물에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 화합물은 하기의

화학식 1로 표시되는 인단 구조 기반의 유기 광민감제 화합물일 수 있다.

[화학식 1]



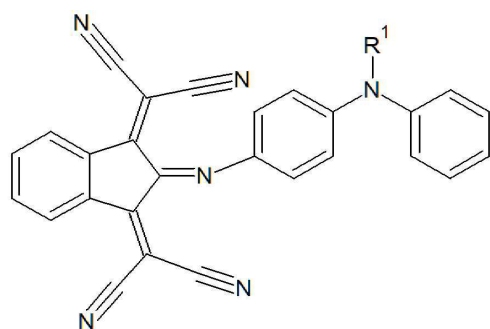
본 발명의 일 예로, 상기 화학식 1에서 R^1 및 R^2 는, 각각, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기, 탄소수 1 내지 20의 알킬기, 탄소수 2 내지 20의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 20의 알키닐기에서 선택될 수 있다.

본 발명의 일 예로, R^1 및 R^2 중 적어도 하나는 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 20의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기에서 선택되는 고리일 수 있다. 어떤 예에서 R^1 및 R^2 중 하나는 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 30의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 30의 헤테로 아릴기에서 선택되고, 나머지는 수소, 탄소수 1 내지 20의 알킬기, 탄소수 2 내지 20의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 20의 알키닐기에서 선택될 수 있다. 어떤 예에서 R^1 및 R^2 중 적어도 하나는 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 14의 아릴기에서 선택될 수 있다.

본 발명의 일 예로, R^3 내지 R^5 는, 각각, 수소, 할로젠, 하이드록실기, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 10의 알키닐기에서 선택될 수 있다. 어떤 예에서, R^3 내지 R^5 는, 각각, 수소 및 할로젠에서 선택될 수 있다. 어떤 예에서, R^3 내지 R^5 는 수소일 수 있다.

본 발명의 일 예로, 상기 화학식 1의 화합물은 화학식 1-1에서 선택될 수 있다.

[화학식 1-1]



본 발명의 일 예로, 상기 화학식 1-1에서 R^1 은 수소, 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 6의 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 3 내지 6의 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 14의 아릴기, 치환 또는 비치환된 탄소수 5 내지 14의 헤테로 아릴기, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기 및 탄소수 2 내지 10의 알키닐기에서 선택될 수 있다.

본 발명의 일 예로, 예를 들어, 상기 알킬은, 탄소수 1 내지 20; 탄소수 1 내지 10; 또는 탄소수 1 내지 5의 알킬이고, 직쇄 또는 분지쇄일 수 있다.

예를 들어, 상기 알케닐은, 탄소수 2 내지 20; 탄소수 2 내지 10; 또는 탄소수 2 내지 5의 알케닐이고, 직쇄 또는

는 분지쇄일 수 있다.

- [0049] 예를 들어, 상기 알킬닐은, 탄소수 2 내지 20; 탄소수 2 내지 10; 또는 탄소수 2 내지 5의 알킬닐이고, 직쇄 또는 분지쇄일 수 있다.
- [0050] 예를 들어, 상기 시클로알킬은, 탄소수 3 내지 20; 탄소수 4 내지 20; 또는 탄소수 5 내지 8의 시클로알킬이며, 치환 또는 비치환될 수 있다.
- [0051] 예를 들어, 상기 시클로알케닐은, 탄소수 3 내지 20; 탄소수 4 내지 20; 또는 탄소수 5 내지 8의 시클로알케닐이며, 치환 또는 비치환될 수 있다.
- [0052] 예를 들어, 상기 아릴은, 탄소수 6 내지 30; 탄소수 6 내지 20; 탄소수 6 내지 14; 탄소수 6 내지 12; 또는 탄소수 6 내지 10의 아릴일 수 있다. 예를 들어, 상기 아릴은, 융합된 방향족 고리 또는 바이아릴일 수 있다. 예를 들어, 페닐, 톨릴, 크실렌, 비페닐, 나프틸, 안트릴, 페난트릴 등일 수 있다.
- [0053] 예를 들어, 상기 헤테로아릴은, 탄소수 5 내지 30; 탄소수 5 내지 20; 탄소수 5 내지 14; 또는 탄소수 5 내지 10의 헤테로아릴일 수 있다.
- [0054] 예를 들어, 상기 헤테로아릴은, 각각, 각 고리 내에 적어도 1 내지 3개의 헤테로 원자를 포함하고, 상기 헤테로 원자는, 질소(N), 산소(O) 및 황(S) 헤테로 원자에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0055] 예를 들어, 상기 할로젠은, -F, -Br, -Cl 및 -I에서 선택될 수 있다.
- [0056] 예를 들어, 상기 치환은, 탄소수 1 내지 5의 알킬, 탄소수 2 내지 5의 알케닐, 탄소수 2 내지 5의 알킬닐, 할로젠 원자 등에 의해 이루어질 수 있다.
- [0057] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 화합물은, 유기 광민감제이고, 상기 화합물은, 광열치료를 위한 유기 광민감제 (예: 유기 광열제)로 적용될 수 있다. 즉, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 도 1에 나타난 바와 같이, 인단 기본 구조를 갖는 화합물과 단일 유기 반응에 의해서 합성될 수 있다. 이는 더 나아가 용매 내에 자가조립과 같은 간단한 공정으로 나노 응집체로 제조될 수 있다. 이는 높은 광열 변환 효율, 높은 생체 적합성 및 합성 공정의 경제성을 갖는 광열 치료 소재를 제공할 수 있다.
- [0058] 본 발명은, 본 발명에 의한 유기 광민감제를 포함하는 나노입자에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 유기 광민감제는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 나노입자는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 중 적어도 하나 이상의 자가조립체일 수 있다. 예를 들어, 도 1을 참조하면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 자가 조립체이며, 광 조사 (예: 레이저 조사)에서 반응하여 열을 발산하는 유기 광민감제일 수 있다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 용매 내에서 자가조립된 것으로, 예를 들어, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 용해된 제1 용매를 포함하는 제1 용액을 제2 용매에 투입하여 자가조립을 통해 나노입자를 제조할 수 있다. 상기 제1 용매는 상기 화학식 1을 용해시키는 용매이며, 예를 들어, 탄소수 1 내지 4의 알코올, DMSO (dimethylsulfoxide), THF 등일 수 있다. 상기 제2 용매는 상기 화학식 1의 낮은 용해도를 갖거나 거의 용해되지 않는 용매일 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 용매는 물일 수 있다. 즉, 상기 나노입자는 단일 단계의 유기반응을 거쳐 합성이 간단하며, 물 속에서 간단한 공정으로 자가조립하는 나노 자가응집체이며, 이는 높은 광열 변환 효율을 나타내는 광열 치료제로 활용될 수 있다. 이는 생체적합성이 뛰어나 광열 치료제로써 표적 세포 (예: 암 또는 종양 세포) 성장을 효율적으로 억제하고 제거, 감소 및/또는 사멸시킬 수 있다.
- [0060] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 나노입자는 유기 광민감제의 기능을 가지며, 이는 광열 치료를 위한 유기 광열 소재로 활용될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 일 예로, 상기 나노입자는 광 조사에 의해 열 에너지를 발산하며, 예를 들어, 생체 외 또는 생체 내에서 45 °C 이상의 온도로 열을 발산시킬 수 있다. 이는 생체 외 또는 생체 내에서 광열치료를 위한 유기 광열 소재로 활용될 수 있으며, 표적 세포 (예: 암 또는 종양 세포) 또는 이들이 분포하는 영역에 주입한 상태에서 광 조사에 의해 열 에너지를 발산하고 이러한 열 에너지에 의해서 표적 세포를 제거, 사멸 및/또는 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 나노입자는 광열 변환 효율이 60 % 이상; 70 % 이상; 80 % 이상; 90 % 이상; 92 % 이상; 또는 95 % 이상일 수 있다. 예를 들어, 광조사는 0.5 W/cm² 이상; 1 W/cm² 이상; 1.25 W/cm²; 1.5 W/cm²; 2 W/cm² 이상; 또는 1 W/cm² 내지 1.5 W/cm² 세기 및/또는 600 nm 내지 1100 nm; 600 nm 내지 1000 nm; 또는 600 nm 내지 800 nm 파장 범위의 광원, 예를 들어, 600 nm 내지 700 nm의 적색광 영역의 레이저를 이용하고, 이

러한 광조사는 1초 이상; 1분 이상; 2 분 이상; 3 분 이상; 5분 이상; 10분 이상; 또는 30 분 내지 1 시간 동안 진행할 수 있다. 예를 들어, 45 °C 이상; 48 °C 이상; 50 °C 이상; 60 °C 이상; 또는 60 °C 내지 70 °C으로 열 에너지를 발산하고, 표적 세포, 또는 표적 세포 영역을 상기 온도로 가열시킬 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 예로, 상기 나노입자의 크기는 500 nm 이하; 400 nm 이하; 300 nm 이하; 200 nm 이하; 100 nm 이하; 50 nm 이하; 1 nm 내지 200 nm; 10 nm 내지 100 nm; 또는 20 nm 내지 100 nm일 수 있다. 상기 크기는 나노입자의 형태에 따라 직경, 두께, 길이 등을 의미할 수 있다. 상기 크기 범위 내에서 광열 치료를 위한 광민 감제로의 성능이 우수하고, 생체내 주입이 용이하고 높은 광열변환 효율을 갖는 광열 치료를 위한 소재로 활용될 수 있다. 예를 들어, 상기 나노입자는 구형, 코어셸 입자, 니들, 나노섬유, 나노튜브, 다각형 등의 형태를 가질 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 실시예에 따라, 본 발명에 의한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 중 적어도 하나 이상; 상기 나노입자 또는 이 둘을 포함하는 조성물을 제공할 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 예로, 상기 조성물은 광조사에 의해서 열 에너지를 발산시키고, 표적 세포를 가열하여 세포 제거, 사멸 및/또는 감소 기능을 제공할 수 있다. 이는 광열 치료를 위한 제제로 활용할 수 있으며, 예를 들어, 생체 내 또는 생체 외에서 암세포, 종양세포 또는 과증식 세포의 제거 또는 감소시킬 수 있다.

[0065] 본 발명의 일 예로, 상기 조성물은 질병, 질환 또는 장애의 치료에 이용되고, 암세포, 종양세포 또는 과증식 세포 관련 질병, 질환 또는 장애이며, 예를 들어, 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 췌지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인 두암, 비강암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉 선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대 장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 대장암, 결장암 및 신경아교종 등의 고형암; 및 백혈병, 악성림프종, 다발성골수종 또는 재생불량성 빈혈 등의 혈액암; 등과 같은 암 치료 또는 암 세포 및/또는 종양 세포의 감소, 제거 및/또는 사멸시키는 광열 치료에 적용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 본 발명의 일 예로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 자가 조립체인 나노입자 또는 이 둘은 약제학적으로 유효 성분으로 포함될 수 있다. 어떤 예에서, 상기 조성물 중 0 % 초과 내지 99 %; 0.0001 % 내지 99 %; 0.001 % 내지 99 %; 0.01 % 내지 90%; 0.1 % 내지 70 %; 1 % 내지 50 %; 1 % 내지 20%; 또는 1 % 내지 5 % (질량 기준)로 포함될 수 있다. 어떤 예에서, 1×10^{-5} M (몰) 이상, 바람직하게는 1×10^{-5} M (몰) 내지 1×10^{-2} M (몰), 더 바람직하게는 1×10^{-4} M (몰) 내지 1×10^{-2} M (몰)의 농도로 포함될 수 있다. 상기 범위를 적용하여 표적 세포의 분포 영역의 크기, 범위 등을 고려하여 적절한 광열 효과를 제공하고, 표적 세포의 제거 및/또는 소멸 효율을 향상시킬 수 있다.

[0067] 본 발명의 일 예로, 상기 조성물의 pH는 5 내지 8; 6 내지 8; 7 내지 8 또는 약 7이고, 이는 버퍼 용액으로 조절할 수 있다.

[0068] 본 발명의 일 예로, 상기 조성물은 담체를 더 포함하고, 상기 담체는 본 발명의 목적을 벗어나지 않는다면 본 발명의 기술분야에서 이용되는 성분을 적용할 수 있다.

[0069] 본 발명의 일 예로, 상기 담체는 용매를 포함하고, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 용해 및/또는 희석시키거나, 상기 나노입자를 분산시킬 수 있는 물, 유기용매 또는 이 둘을 포함하고, 상기 용매는 약제학적으로 허용 가능하거나 광열 치료용 조성물에 적용 가능한 것이라면 제한없이 적용될 수 있다. 어떤 예에서, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올, DMSO (dimethylsulfoxide) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 어떤 예에서, 상기 담체는, 상기 나노입자를 분산시키기 위해서 약제학적으로 허용 가능한 계면활성제를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 계면활성제는 소르비탄 지방족산 에스테르, 글리세린 지방족산 에스테르, 폴리글리세린 지방족산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방족산 에스테르 등 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 천연 계면활성제 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0070] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 조성물은, 고상 (예: 파우더), 겔, 에멀전, 서스펜션, 액상 (예: 주사액), 또는 성형품으로 적용될 수 있다.

[0071] 본 발명은, 본 발명에 의한 화학식 1로 표시되는 화합물, 나노입자 또는 이 둘을 이용하는 광열 치료 방법에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 조성물을 이용하고, 광열 암 치료에 관련될 수 있다. 상기 암

종류는 상기 조성물에서 언급한 바와 같다.

[0072] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 나노입자 또는 이 둘과 표적 세포를 접촉시키는 단계; 상기 접촉된 세포 영역에 광조사하는 단계; 를 포함할 수 있다.

[0073] 본 발명의 일 예로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 상기 나노입자 또는 이 둘과 표적 세포를 접촉시키는 단계는, 생체 외 또는 생체 내에서 표적 세포 영역에 상기 조성물을 주입 또는 투입할 수 있다. 상기 표적 세포는 암 세포, 종양 세포 및 과증식 세포 중 적어도 하나 이상일 수 있다. 상기 표적 세포는 생체 내 또는 생체 외 또는 포유류 또는 인간 제외 포유류 세포일 수 있다.

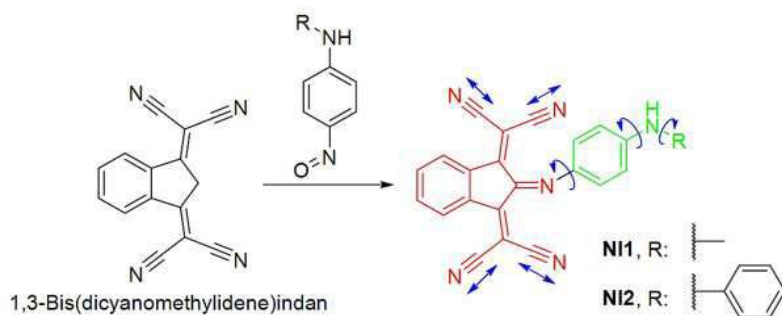
[0074] 본 발명의 일 예로, 상기 광조사하는 단계는 표적 세포 영역에 광조사하여 표적 세포를 제거, 사멸 및/또는 감소시킬 수 있다. 본 발명의 일 예로, 상기 표적 세포는 앞서 언급된 세포일 수 있다. 즉, 광조사에 의해서 열 에너지를 발산하고 이러한 열 에너지에 의해서 표적 세포가 제거, 사멸 및/또는 감소될 수 있다.

[0075] 본 발명의 일 예로, 상기 광조사하는 단계에서 상기 광조사는 0.5 W/cm^2 이상; 1 W/cm^2 이상; 1.25 W/cm^2 ; 1.5 W/cm^2 ; 2 W/cm^2 이상; 또는 1 W/cm^2 내지 1.5 W/cm^2 세기 및/또는 600 nm 내지 1100 nm; 600 nm 내지 1000 nm; 또는 600 nm 내지 800 nm 파장 범위의 광원, 예를 들어, 600 nm 내지 700 nm의 적색광 영역의 레이저를 이용하고, 이러한 광조사는 1초 이상; 1분 이상; 2 분 이상; 3 분 이상; 5분 이상; 10분 이상; 또는 30 분 내지 1 시간 동안 진행할 수 있다. 예를 들어, 상기 광조사하는 단계는 상기 광조사에 의해서 표적 세포 영역의 온도를 45°C 이상; 48°C 이상; 50°C 이상; 60°C 이상; 또는 60°C 내지 70°C 으로 가열시키고, 이는 표적 세포를 제거, 사멸 및/또는 감소시킬 수 있다.

[0076] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 광조사하는 단계 이후에 광학적 특성 변화를 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 광조사하는 단계 이후 광조사된 세포 영역의 형광 이미지를 획득하거나 또는 광조사된 세포 영역의 열 이미지(예: 적외선 열 이미지)를 획득하여 광열 치료 과정, 수준 및/또는 완료 시점 등을 모니터링하고, 치료 과정을 제어할 수 있다. 상기 분석은, 본 발명의 기술 분야에서 알려진 생체 내 적용 가능한 분석 방법을 적용할 수 있으며, 본 명세서에는 구체적으로 언급하지 않는다.

[0077] 하기와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하지만, 해당 기술 분야의 통상의 기술자는 하기의 특허 청구의 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

[0078] [스킴 1]



[0079]

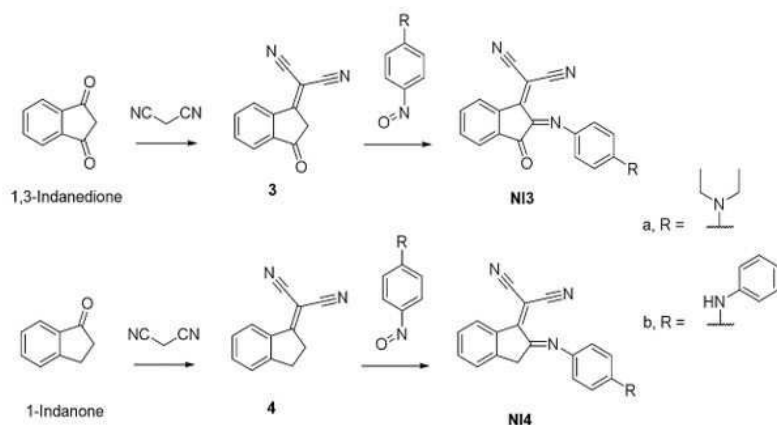
[0080] NI1 및 NI2 화합물의 합성

[0081] 스킴 1에 따라 합성 공정을 진행하였다. 인단디온 (Indandione) 유도체 (1.0 mmol) 및 니트로소 (nitroso) 화합물 (1.2 mmol)을 에탄올 (20 mL)에 용해시켰다. 혼합물을 4 h 동안 환류시키고, 밤새 냉장고에 보관하였다. 이를 여과하고 차가운 에탄올로 세척하여 청색 분말을 획득하였다. 생성물은 헥산/에틸 아세테이트 (4/1-2/1)를 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제한 후 수집하였다 (수율 50 % - 90 %).

[0082] NI2는 컬럼 크로마토그래피 공정 없이 획득하였다. 각 생성물은 아래 ^1H NMR, ^{13}C NMR 및 질량 분석 결과에서 확인할 수 있다.

[0083] NI3 및 NI4 화합물의 합성

[0084] [스킴 2]



[0085]

[0086] 스킴 2에 따라 알려진 방법으로 NI3 및 NI4를 합성하였다. NI4b는 컬럼 크로마토그래피 공정 없이 획득하였다. 각 생성물은 아래 ^1H NMR, ^{13}C NMR 및 질량 분석 결과에서 확인할 수 있다.

[0087] **NI1:** ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 8.56 - 8.48 (m, 2H), 8.01 - 7.92 (m, 2H), 7.51 - 7.44 (m, 2H), 6.89 - 6.80 (m, 2H), 3.03 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, ACETONE- D_6) δ 155.90, 154.45, 151.96, 143.33, 138.41, 137.38, 134.61, 131.37, 128.84, 128.77, 125.41, 124.70, 120.03, 114.41, 113.39, 113.18, 112.96, 73.47; ESI HRMS m/z = 359.1046 $[\text{M}-\text{H}]^+$, calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{11}\text{N}_6$ = 360.11.

[0088] **NI2:** ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.40 (s, 1H), 8.50 - 8.38 (m, 2H), 8.04 - 7.95 (m, 2H), 7.42 - 7.34 (m, 4H), 7.26 - 7.21 (m, 2H), 7.19 - 7.15 (m, 2H), 7.06 (tt, J = 7.3, 1.2 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- D_6) δ 156.35, 148.05, 147.24, 141.01, 139.60, 137.45, 135.80, 130.05, 127.89, 125.96, 123.46, 120.50, 118.28, 116.41, 114.65, 113.39, 56.57; ESI HRMS m/z = 423.1360 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{15}\text{N}_6$ = 422.13.

[0089] **NI3a:** ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.60 (dt, J = 7.8, 0.9 Hz, 1H), 8.37 - 8.29 (m, 2H), 7.89 - 7.84 (m, 1H), 7.78 - 7.66 (m, 2H), 6.77 - 6.68 (m, 2H), 3.53 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM- D) δ 161.18, 159.81, 152.86, 135.28, 134.32, 125.03, 124.40, 111.95, 45.57, 12.94; ESI HRMS m/z = 377.1373 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$ = 354.15.

[0090] **NI4a:** ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.51 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.57 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.51 - 7.39 (m, 4H), 6.72 - 6.62 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.19 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM- D) δ 163.04, 154.10, 148.87, 145.35, 135.55, 135.22, 134.51, 128.88, 128.44, 125.89, 125.77, 115.69, 114.79, 111.77, 44.84, 36.66, 29.80, 12.78; ESI HRMS m/z = 341.1759 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_4$ = 340.17.

[0091] **NI3b:** ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.70 - 8.63 (m, 1H), 8.24 - 8.17 (m, 2H), 7.93 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.79 (dtd, J = 26.5, 7.5, 1.2 Hz, 2H), 7.43 - 7.32 (m, 2H), 7.23 (d, J = 1.1 Hz, 2H), 7.16 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.05 - 6.98 (m, 2H), 6.54 (s, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM- D) δ 149.64, 134.93, 133.52, 129.82, 125.41, 124.99, 124.90, 124.81, 121.98, 114.82; ESI HRMS m/z = 373.1095 $[\text{M}-\text{H}]^+$, calc. for $\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$ = 374.12.

[0092] **NI4b:** ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.58 - 8.51 (m, 1H), 7.60 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.52 -

7.44 (m, 2H), 7.36 - 7.28 (m, 4H), 7.19 - 7.12 (m, 2H), 7.11 - 7.06 (m, 2H), 7.05 - 7.00 (m, 1H), 6.01 (s, 1H), 3.88 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 135.13, 129.65, 128.74, 126.71, 126.15, 125.90, 122.78, 119.67, 116.68, 36.05; ESI HRMS m/z = 359.1298 $[\text{M-H}]^+$, calc. for $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_4$ = 360.14.

[0093] **나노입자 제조**

[0094] DMSO (2.0 mM) 내의 NI1 및 NI2의 용액 1 mL를 에어 블로잉된 10 mL DW를 포함하는 Erlenmeyer flask에 천천히 적가하였다. 획득한 청색 용액은 밤새 에어 블로잉하면서 보관하였다. 최종 NI1 NP 또는 NI2 NP를 200 nm 시린지 필터를 사용하여 한외여과에 의해 수집하였다.

[0095] **세포 배양**

[0096] 쥐의 결장암 CT26 세포는 한국 세포주 은행에서 얻었고 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Corning, NY) 및 1 % 항생제-항진균제 (Gibco, Grand Island, NY)로 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Corning, NY) 내에서 세포를 배양하였다. 상기 세포는 5 % CO_2 및 37 °C의 가습 인큐베이터에서 유지하였다.

[0097] **세포독성**

[0098] CT26 세포를 완전 배지에서 2×10^4 cells/well로 96-웰 세포 배양 플레이트에 시딩하고, 밤새 배양하여 플레이트에 세포가 완전히 부착되도록 하였다. 완전 배지에서 다양한 농도의 NI2 NP (0, 25, 50, 75, 및 100 μM)를 세포에 접종하고 24시간 동안 인큐베이션하였다. 다음으로, 표준 2-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT, 2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 어세이를 수행하여 NI2 NP의 세포독성을 평가하였다.

[0099] 요약하면, 1 mg/ml MTT 용액을 각 웰 플레이트에 첨가하고 37 °C에서 4시간 동안 유지하였다. 다음으로, DMSO (dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 형성된 포르마잔 (formazan)을 추가로 20분 동안 용해시켰다. 흡광도는 540 nm의 파장에서 마이크로플레이트 분광광도계로 측정하였고, 4개의 독립적인 MTT 분석을 수행하였다. 선량 측정 테스트를 기반으로 100 μM 의 NI2 NP가 추가 *in vitro* 내 및 *in vivo* 연구에 사용되었다.

[0100] **살아있는/죽은 세포 염색**

[0101] CT26 세포를 96-well plate 에 2×10^4 cells/well의 밀도로 시딩하고, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 100 μM 의 NI2 NP 용액 및/또는 691 nm 레이저 조사로 1.5 W/cm^2 에서 150초 동안 처리하여 4개의 그룹 (CTRL, Laser, NI2 NP 및 Laser+NI2 NP)을 제조하였다.

[0102] 이후, 처리된 세포를 fluorescein diacetate (FDA, fluorescein diacetate)와 propodeum iodide (PI)를 모두 사용하여 염색하였다. 5mg의 FDA (C7521, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US)를 1 ml의 아세톤에 용해시키고, PI (P4170, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US)를 PBS 내 2 mg/ml 농도로 제조하였다. 다음으로, FDA/PI염색 용액은 5 ml의 무혈청 배지, 8 μl 의 FDA 용액 및 50 μl PI용액과 혼합하였다. 모든 세포를 염색 용액으로 처리하고 37 °C에서 5분간 배양하였다. 다음으로, 세포를 PBS로 2회 세척하고 형광 현미경 (CKX53, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 녹색과 빨간색의 상대적 강도를 ImageJ (National Institute of the Health, Bethesda, MD, USA).를 사용하여 측정하였다. 녹색과 빨간색은 각각 생존 가능한 세포 및 죽은 세포를 나타낸다.

[0103] **마우스 모델**

[0104] 16 balb/c mice (5 weeks old, female)는 암 모델 구축을 위해 하나바이오텍 (대한민국 수원)으로부터 입수하였다.

[0105] 모든 동물은 표준 조건에서 동물 연구 시설에서 유지되었다. CT26 종양 모델의 경우, CT26 세포 현탁액 (1.5×10^6 cells/ml)을 각 마우스의 등에 피하 주사하고 병원체가 없는 케이지에서 일주일 동안 유지하여 종양을 제조하였다. 다음으로, CT26 종양 보유 마우스 (volume = 200 mm^3)를 CTRL, 레이저, NI2 NP, 레이저+ NI2 NP의 4개 그룹 (그룹당 N = 4개)으로 무작위로 분류하였다. 실험 전에 동물을 산소 (0.6 L/min)와 함께 3% isoflurane (TerrellTM isoflurane, Piramal Critical Care, Bethlehem, PA, USA)으로 마취하였다. 모든 동물 연구는 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 국립 보건원 (NIH)의 지침을 준수하였다.

[0106] ***In Vitro* 광열치료(Photothermal treatment)**

[0107] 암세포에 대한 PTT(*Photothermal therapy*) 효과를 조사하기 위해 (1) 대조군(CTRL), (2) 레이저 단독(Laser), NI2 NP단독 (NI2 NP), (4) NI2 NP-도입된 PTT(Laser+NI2 NPs)의 4가지 다른 그룹을 테스트하였다. CT26 세포를 2×10^4 cells/well로 96-well plate 내에서 미리 배양하고, 24시간 동안 가습 인큐베이터에 두었다. 각 그룹에 대해, CT26 세포를 100 μ M의 NI2 NP를 포함하는 새로운 배양 배지 또는 배지 단독으로 처리하고, 150초 동안 1.5 W/cm^2 에서 691 nm 레이저로 조사하거나 레이저를 조사하지 않았다. 각 테스트 플레이트를 24시간 동안 인큐베이션한 다음 MTT 분석을 수행하여 각 처리 이후 세포 생존율을 측정하였다.

[0108] ***In Vivo* 광열치료**

[0109] 종양 (tumor)의 성장을 진행한 1주일 후, CT26 종양에 식염수 또는 100 μ M의 NI2 NP를 종양 내 주사하고 마취 하에 691nm 레이저 (150초 동안 1.5 W/cm^2)에 노출시켰습니다. IR 열화상 카메라를 사용하여 레이저 조사 중 종양 부위의 온도 변화를 모니터링하였다. 모든 동물에 단일 처리를 적용하고 광섬유의 빔 크기를 조정하여 전체 종양 영역을 덮도록 하였다. 그 후, 각 처리 이후 0 일 (D0), 3 일 (D3), 7일 (D7), 및 10일(D 10)의 4종류의 시간 지점에서 디지털 카메라 (D5100, Nikon, Tokyo, Japan)를 사용하여 모든 마우스 그룹을 모니터링하고 사진을 측정하였다. 각 그룹의 종양 부피는 식 (tumor volume = length x width²)을 사용하여 10일 동안 측정되었다.

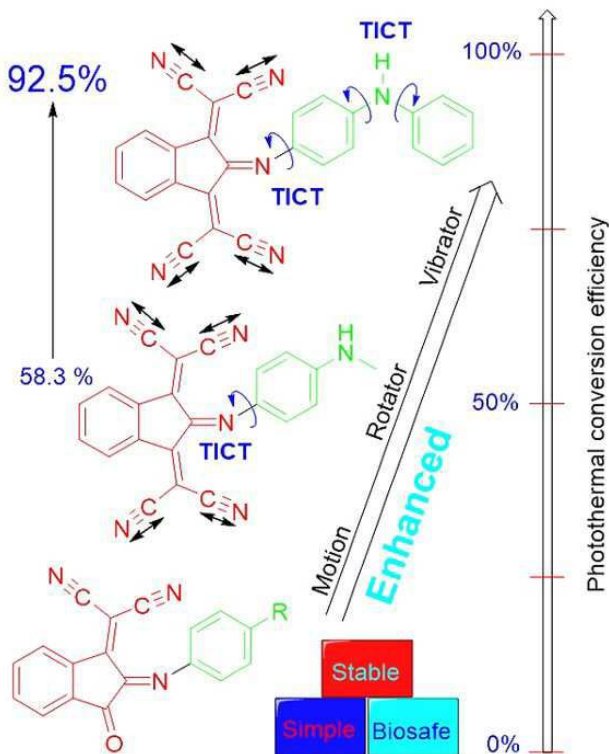
[0110] 표 1은 NI1 내지 NI4의 광물리 및 광열 특성을 나타낸 것이다. ^a DMSO 내에서 흡수 파장; 물 흡수 계수 (ϵ , molar absorption coefficient); HOMO 및 LUMO 레벨 (E_g) 간의 에너지 갭 (E_g); 광열변환효율 (η , photothermal conversion efficiency)(%).

표 1

[0111]

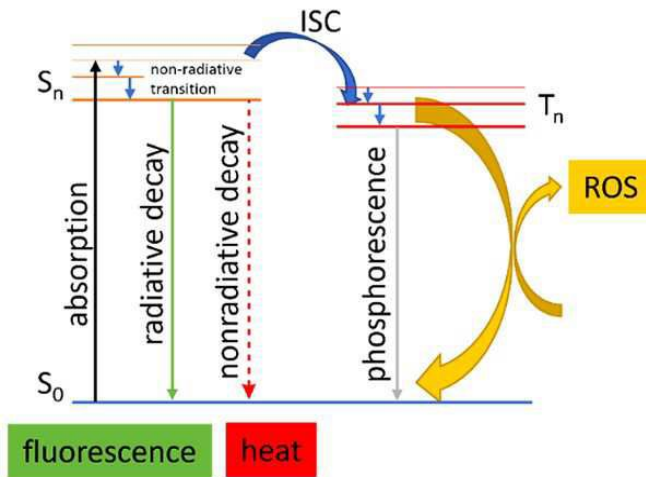
	λ_{abs}^a (nm)	ϵ ($\times 10^3$)	E_g (eV)	η (THF)	η (DMSO)	η (NPs)
NI1	728	12.0	2.23	31.4	50.3	58.3
NI2	690	15.6	2.10	32.4	52.1	92.5
NI3a	624	28.9	2.57	—	—	11.6
NI3b	619	32.3	2.52	—	—	46.4
NI4a	596	16.8	2.56	—	—	7.24
NI4b	568	20.1	2.54	—	—	29.6

[0113] [메커니즘 1]



[0114]

[0116] [자브론스키 다이어그램 (Jablonski diagram)]



[0117]

[0118] 상기 표 1, 상기 메커니즘 및 여기된 형광단의 3종류의 에너지 소산 관련 자브론스키 다이어그램을 참조하면, 본 발명에 의한 N12 화합물은 92.5 %의 높은 광열 변환 효율(η)을 나타내고 있으며, 이러한 큰 광열 효과는 (1) ISC 과정 (intersystem crossing process)에 의한 방사성 붕괴 (radiative decay) 및 ROS (reactive oxygen species) 생성을 통한 형광 방출이 완전히 억제된 꼬여진 C=N 결합 유래 비 방사성 붕괴(non-radiative decay)에서 비롯된다. 또한, (2) 상승적인 TICT (twisted intramolecular charge transfer) 효과, 강력한 D-A 힘, 다양한 분자내 진동 (intramolecular vibrator) 및 회전자 (rotator)에 의해 향상될 수 있다. J-aggregated NP의 형성은 확장된 π -공유계이션을 유도하는, π - π 상호작용 및 스택킹 (stacking)에 의한 분자 내 D-A 구조를 강화시킬 수 있다.

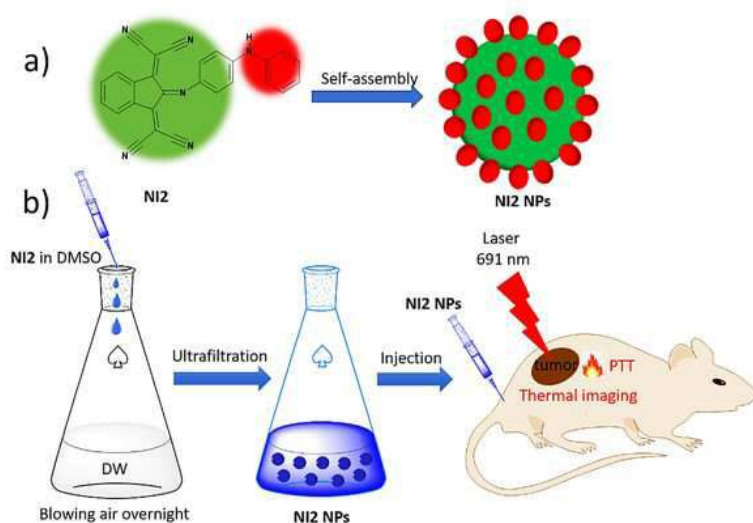
[0119] 더욱이, 도 1에 나타난 바와 같이, N12 화합물을 물 내에서 간단한 방법으로 자가조립하여 획득한 나노 응집체는 마우스 종양 모델에서 우수한 생체적합성으로 PTT 처리 10일 후 종양 성장을 효율적으로 억제시킬 수 있다.

- [0120] 도 2 및 표 1의 UV-Vis 스펙트럼에서 NI1의 흡수 피크는 유기 용매 내에서 NI2 ($\lambda_{\text{abs}} = 690 \text{ nm}$, in DMSO)와 비교하여 적색 이동 흡수 (red-shift absorption, $\lambda_{\text{abs}} = 728 \text{ nm}$, in DMSO) 경향을 갖는다. 또한, 40 μM 의 NI2 용액 (in DMSO)에서 약 690 nm의 흡광을 가지는 반면 형광은 나타내지 않는다. NI1의 몰 흡수 계수 (ϵ)는 NI2 보다 상대적으로 낮고, 이는 NI2 내에서 페닐기의 도입에 의해서 -NH 기의 자유 전자 쌍에 공주게이트가 발생하고, NI1와 비교하여 전자 도너 기에서 전자 억셉터 기까지의 ICT 효과를 줄일 수 있다.
- [0121] 도 3은, NI2 나노입자의 691 nm 레이저 (1 W/cm^2 및 1.5 W/cm^2) 조사에서 다양한 농도 및 레이저 조사 시간에 따른 NI2 나노입자의 광열 특성 및 광열 변환 효율에 대한 정량 분석 결과에 관한 것으로, NI2 용액 (in D.W.)의 농도를 0~100 μM 로 변화시켰을 때 150 초 동안 흡광 후 NI2 용액의 온도 변화를 측정하였을 때 농도에 비례하여 온도가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 즉, 도 3의 (a)에서 150 초 조사 ($R^2 = 0.98 \sim 0.99$) 이후 온도 증가 (ΔT)는 선형적으로 변화되는 것을 확인할 수 있고, NI2 NP의 최대 온도는 100 μM 에서 1 W/cm^2 및 1.5 W/cm^2 각각에 대해 $42.8 \pm 2.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 및 $54.4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 이다. 도 3의 (b)에서 691 nm 조사에서 4회 사이클에서 광열 안정성을 확인할 수 있다. 도 3의 (c)에서 온도 영역에서 “spatio-temporal distribution” 을 보여주는 캡처된 연속적인 열화상 이미지에서 확인할 수 있다.
- [0122] 도 4에서 암세포 CT26에 매우 적은 온도 변화를 주는 CTRL을 주입하였을 때 암세포에 변화가 없고, 암세포 CT26에 레이저 빛 조사를 조사하였을 때 암세포에 변화가 없다. 도 4에서 NI2-NP 유기 광열 암치료제에 대한 체외 시험 결과에서 암세포 CT26에 레이저 빛 조사 및 NI2-NP 주입하였을 때 암세포가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 즉, 도 4의 (a)에서 CT26 쥐 암 세포에서 NI2 NP의 세포 독성은 표준 MTT 어세이를 사용하여 농도의 함수로 테스트한 것으로, 24시간 동안 배양 후, NI2 NP는 레이저 조사 없이 100 μM 의 최고 농도에서도 CT26 세포에서 유의한 세포 독성을 나타내지 않으며, 90 % 이상의 세포 생존율을 가지므로, 세포 수준에서 우수한 생체 적합성을 가지며, 이는 추가 시험관 및 생체 내 테스트를 위해 최대 NI2 NP 농도로 100 μM 을 선택하였다. 도 4의 (b)에서 “Laser+NI2 NPs” 에서 세포 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있다($p < 0.005$ vs. CTRL).
- [0123] “Laser+NI2 NPs” 는 선명한 적색 형광 (PI로 염색됨)을 나타내어 결합 처리 후 생존할 수 없는 세포를 나타내고, 도 4의 (c)에서 측정된 녹색 및 빨간색 강도는 CT26 세포에 대한 NI2 NP 보조 PTT의 독특한 항종양 효과를 확인했습니다 (도 4의 (d) 및 (e), $p < 0.05$ vs. CTRL).
- [0124] 도 5 및 도 6에서 생쥐에 존재하는 암세포 CT26에 매우 적은 온도 변화를 주는 CTRL을 주입하였을 때 열 영상에서 암세포에 변화가 없다. 생쥐에 존재하는 암세포 CT26에 레이저 빛 조사를 조사하였을 때 열 영상에서 암세포에 변화가 없다. 생쥐에 존재하는 레이저 빛 조사 및 NI2 NP 주입하였을 때 열 영상에서 암세포가 감소하였다 (참조: NI2-NP의 유기 광열 암치료제에 대한 체내 시험).
- [0125] 즉, 도 5는 NI2 NP의 CT26 tumor-bearing mouse model으로 광열 효율을 어세이한 것으로, 상이한 처리 조건 (CTRL, Laser, 및 Laser+NI2 NPs (100 μM 의 NI2 NP 및 1.5 W/cm^2 /150 s)에서 NI2 NP는 레이저 조사 전에 각 동물에 종양 내 투여하였다. 691 nm 레이저 광은 NI2 NP 주입 및그리고 주입 없이 종양 부위에 수직으로 광섬유를 통해 전달되었습니다. Laser 및 Laser+NI2 NPs의 경우 초기에 조사 시간에 따라 종양의 표면 온도가 상승했지만 각각 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 및 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 부근에서 포화 상태가 된다(도 5의 (a) Laser+NI2 NPs는 Laser보다 1.5배 더 높은 최대 온도 (최대 $61.3 \pm 3.2 \text{ }^\circ\text{C}$)를 수반하며, 이는 비가역적 종양 괴사의 임계값을 초과한 것이다. Laser 그룹이 피부 조직과 혈액에 의한 고유한 빛 흡수로 인해 종양 온도를 높였지만 최대 온도는 전체 종양에 돌이킬 수 없는 손상을 일으키기에 충분하지 않고, CTRL은 무시할 수 있는 온도 변화를 보여준다. 도 5의 (b)는 세 가지 조건에서 다양한 치료 시간에 따른 종양의 연속적인 열화상 영상을 나타낸 것으로, Laser와 Laser+NI2 NPs는 모두 온도 필드의 가우스 프로파일과 함께 종양 표면에서 눈에 띄는 온도 증가를 보여준다. 조사 종료 (150초)에서 Laser+NI2 NPs는 Laser (43.5°C)보다 더 높은 최대 온도 (61.3°C)를 발생시키고, “CTRL” 및 “NI2 NP” 모두 종양 부위에서 온도 변화를 유도하지 않는 것으로 확인되었습니다 (데이터는 표시되지 않음).
- [0126] 도 6은, 4가지 다른 치료 조건 (CTRL, Laser, 및 Laser+NI2 NPs)에서 4가지 다른 날 지점 (D0, D3, D7 및 D10)에서 생체 내 모델의 실험 후 결과를 나타낸 것으로, 도 6의 (a)에서 치료된 종양의 평면도에서 CTRL, Laser 및 NI2 NPs 그룹은 각 치료 후 명백한 종양 성장을 포함했습니다. 반면에, Laser+NI2 NPs 그룹은 상처 회복과 함께 명백한 종양 절제를 확인할 수 있다. 모든 그룹은 처리 후 10일 동안 유의한 체중 감소를 나타내지 않는다(도 6의 (b)).

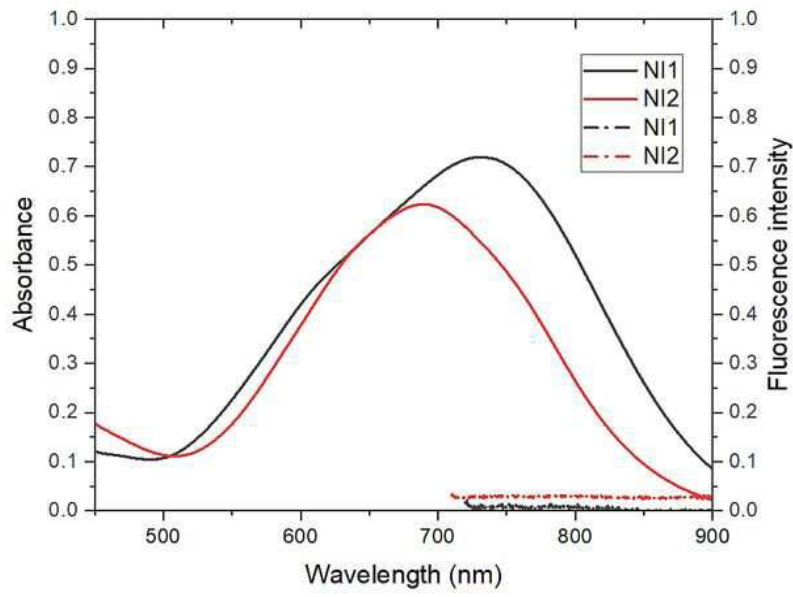
- [0127] 도 6의 (c)에 따르면 CTRL, 레이저 및 NI2 NP의 경우 시간이 지남에 따라 종양 부피가 크게 증가하여 무시할 수 있는 치료 효능을 가지지만, Laser+NI2 NPs는 완전한 종양 제거를 확인할 수 있다(D10에서 다른 그룹에 비해 $p < 0.005$).
- [0128] 도 6의 (d)에서 D10에서 NI2 NP 보조 PTT의 효능을 평가하기 위해 처리된 모든 샘플에 대해 조직학적 검사를 수행하였다. Laser+NI2 NPs로 처리한 샘플은 종양 부위에서 발견되는 모세혈관 없이 독특한 조직 손상을 확인할 수 있다. 반대로, 다른 치료 그룹은 종양 조직의 고유한 형태와 핵 구조를 유지한다. 불완전한 치료 후 종양 세포의 과도한 증식으로 인해 많은 종양 세포와 모세 혈관이 종양 부위에 조밀하게 분포되어 있다.
- [0129] 본 발명은, 단일 단계 반응 (one step reaction)에 의해 D-A structured NI1 및 NI2를 합성하였으며, 특히 아미노-페닐 그룹이 특정 형태를 획득하는 트위스트를 위한 전자-공여 모이어티 및 분자 회전자 역할을 하는 반면에, 1,3-bis(dicyanomethylidene)indan은 특정 분자내 운동 (certain intramolecular motion)을 유지하기 위해 전자 수용체 모이어티 (electron- acceptor moiety)와 분자내 스트레칭 진동의 강력한 제공자로 역할을 할 수 있다. 강한 D-A 힘과 다양한 분자내 진동기 및 회전자를 갖는 이러한 꼬인 구조 (twisted structures, NI1 및 NI2)는 C=N 결합으로 인한 형광 방출 및 ISC 프로세스의 비설정을 보여주며, 이는 비방사성 에너지(non-radiative energy dissipations)를 통한 열 비활성화(thermal deactivation)의 잠재적 후보가 될 수 있다. NI1 및 NI2 나노응집체 (NI1 NP 및 NI2 NP)는 각각 58.3% 및 92.5%의 우수한 광열 변환 효율 (η , photothermal conversion efficiency)을 나타낸다. *in vivo* 실험에서 NI2 NP가 종양의 열화상 및 광열 요법에 서 현저한 효과를 제공할 수 있다.
- [0130] 본 발명에서 NI2-NP는 기존의 일부 소형 유기 광열제가 가지는 단점 (예: 시안화물 유도체의 낮은 광안정성, 포르피린 및 프탈로시아닌의 낮은 수용성, BODIPY 유도체의 낮은 광열 변환 효율 등)도 극복하여 여러 소형 유기 광열제에 비해 우수한 광열 변환 효율 (예: 90 % 이상)을 보이며, 생체 내 실험 결과에서 NI2-NP는 종양의 열 영상 및 광열 치료에 현저하게 효과적인 결과를 제공할 수 있다.
- [0131] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다. 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

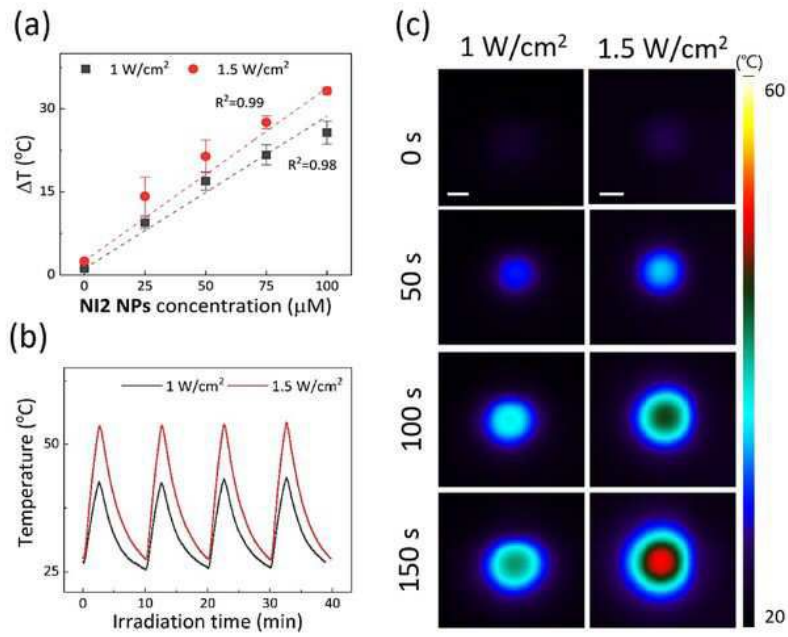
도면1



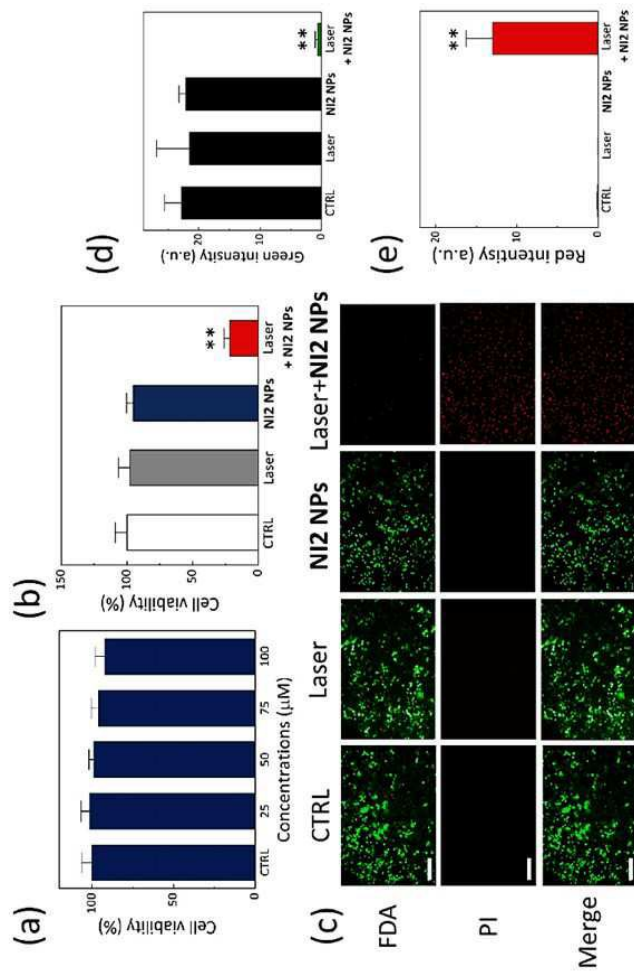
도면2



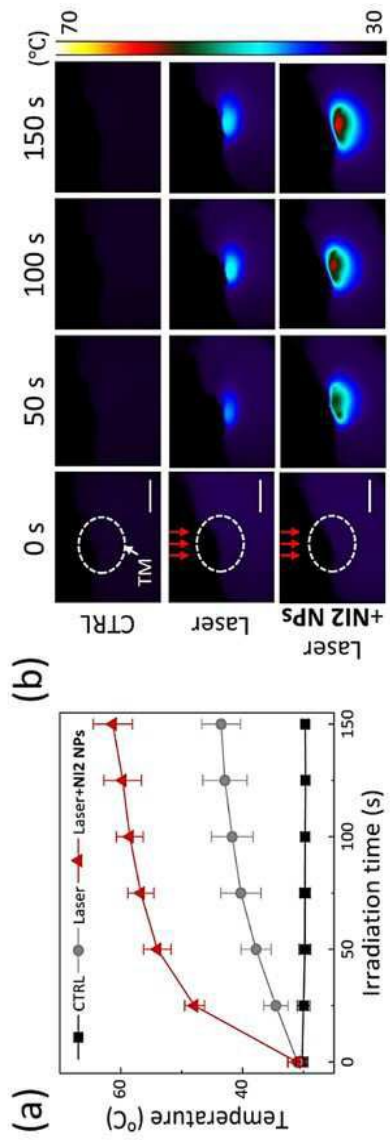
도면3



도면4



도면5



도면6

