



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월18일
(11) 등록번호 10-1809939
(24) 등록일자 2017년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/14 (2006.01) A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) A61K 47/30 (2017.01)
A61K 9/51 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/146 (2013.01)
A61K 31/282 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0123991
(22) 출원일자 2016년09월27일
심사청구일자 2016년09월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160089774 A

(73) 특허권자
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
유자형
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
로가나탄 팔라니쿠마르
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이형준

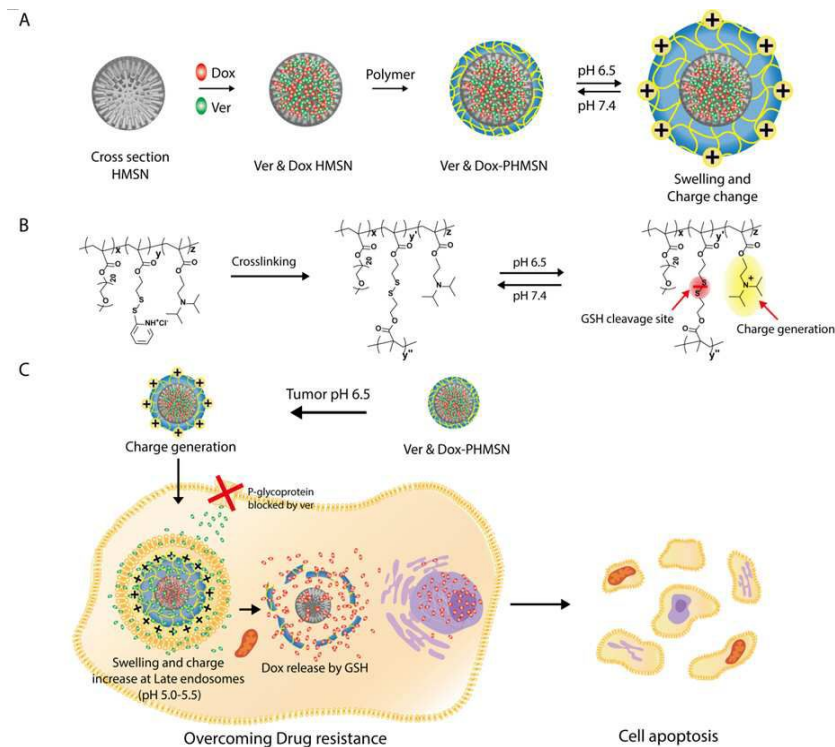
(54) 발명의 명칭 친수성 및 소수성 약물의 순차적 방출을 위한 나노 약물 전달체

(57) 요약

본 발명은 친수성 및 소수성의 이중 약물을 담지하고, pH 조건에 따라 산성 조건에서 약물을 순차적으로 방출할 수 있는 약물 전달체 및 이의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 약물 전달체는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 피리딜 디설파이드(PDS) 및 2-(디이소프로필아미노)에틸메틸아크릴레이트(DPAMA)로 이루어진 생분해성 공중합체를 표면에

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



코팅한 형태로서, 상기 생분해성 공중합체가 산성 pH 범위에서 정전기적 상호작용에 의해 팽윤되는 게이트 키퍼 (gate keeper) 층이 되는 역할을 하는 것에 기술적 특징이 있다. 본 발명의 약물 전달체 표면의 생분해성 공중합체는 주변 pH 조건에 따라 크기가 조절될 수 있으며, 초기 종양과 유사한 pH인 산성 환경에서 팽윤되어 약물의 방출을 조절할 수 있다. 특히, 이 때 약물 전달체 내부에 소수성 약물 및 친수성 약물을 함께 담지하는 경우, 친수성 약물이 먼저 방출되고 이후 소수성 약물이 방출될 수 있기 때문에 다재 내성의 암과 같이 복합적인 약물의 처치를 통한 치료가 필요한 질병에 대한 약물 전달체로서 유용하게 사용할 수 있어, 효과적이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)

A61K 47/30 (2013.01)

A61K 9/143 (2013.01)

A61K 9/5115 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A1002642

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구사업

연구과제명 합성 펩타이드의 초분자 구조 및 변형을 이용한 생체재료연구

기 여 율 30/100

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 35B-2011-1-C00024

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 학문후속세대양성지원

연구과제명 자기조립하는 생활성 나노구조체와 유기 나노파티클을 이용한 새로운 약물전달

기 여 율 70/100

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- i) 속이 빈 메조포러스 실리카 나노입자(hollow Mesoporous Silica Nanoparticles, HMSN)를 제조하는 단계;
- ii) 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 피리딜 디설파이드(pyridyl disulfide, PDS) 및 2-(디이소프로필아미노)에틸메틸아크릴레이트(2-(Diisopropylamino)ethyl methacrylate, DPAMA)로 이루어진 생분해성 공중합체를 제조하는 단계;
- iii) 상기 단계 i)에서 제조한 HMSN 및 상기 단계 ii)에서 제조한 생분해성 공중합체를 혼합하여, HMSN 표면에 생분해성 공중합체를 코팅하는 단계;
- iv) 상기 단계 iii)에서 코팅한 HMSN에 디티오프레이트(dithiothreitol, DTT)를 처리하여, 생분해성 공중합체가 가교 결합한 공중합체-HMSN(PHMSN)을 형성하는 단계; 및
- v) 상기 단계 iv)에서 형성한 PHMSN을 수득하는 단계;를 포함하는, 약물 전달체의 제조 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 iii)의 혼합은 HMSN 및 생분해성 공중합체를 1:1 내지 1:4의 중량 비율로 혼합하는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체의 제조 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단계 iv)의 DTT는 생분해성 공중합체 내의 PDS에 대하여 20 내지 50 mol%의 몰비율로 처리하는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체의 제조 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 iv)의 가교 결합은 30 내지 60 mol%의 가교 밀도로 가교 결합된 것을 특징으로 하는, 약물 전달체의 제조 방법.

청구항 5

제 1항의 방법으로 제조된, 약물 전달체로서,

상기 약물 전달체는 HMSN 내부에 독소루비신(doxorubicin), 베라파밀(Verapamil) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 친수성 약물; 캄토테신(camptothecin) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 소수성 약물; 및 이의 혼합물 중 어느 하나의 약물을 포함하는, 약물 전달체.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 5항에 있어서, 상기 약물 전달체는 표면에 가교 결합된 생분해성 공중합체가 산성 pH 범위에서 정전기적 상호작용에 의해 팽윤되는 게이트 키퍼(gate keeper) 층을 가지는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 산성 pH 범위는 초기 종양 조직의 pH 4.0 내지 6.5의 범위인 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 정전기적 상호작용은 표면의 전하가 0 이상의 양전하가 됨에 따라 나타나는 것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 12

제 5항의 약물 전달체를 유효 성분으로 포함하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 암은 항암제에 대한 내성을 가지는 다제 내성의 위암, 유방암, 폐암, 간암, 식도암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신, 시스플라틴(cisplatin), 베라파밀(Verapamil), 플루오로우라실(fluorouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토폠테칸(topotecan), 파클리탁셀(paclitaxel), 캄토테신(camptothecin), 카보플라틴(carboplatin), 겐시타빈(Gemcitabine), 메소트렉세이트(Methotrexalte), 도세탁셀(Docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이중-약물을 담지한 메조포러스 실리카 나노입자메조포러스 실리카 나노입자(hollow Mesoporous Silica Nanoparticles, HMSN)의 표면에 가교 결합된 생분해성 공중합체가 산성 pH 범위에서 정전기적 상호작용에 의해 팽윤되는 게이트 키퍼(gate keeper) 층을 가지는, 약물 전달체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 다제 내성(Multi drug Resistant)은 특히, 암에서 항암 화학요법의 치료 효과가 나타나지 않도록 하여, 항암 치료가 실패하고 90% 이상의 환자가 사망하는데 주요 원인이 된다. 항암 치료에서 MDR을 극복하기 위한 다양한 시

도들이 계속되고 있는데, 그 중 하나는 복합적으로 약물을 동시-투여하는 것이다. 그러나, 종양은 발암 위치 또는 암의 진행 시기에 따라 조직 내 또는 세포의 환경이 다양하기 때문에, 이러한 종양 환경에서 다양한 약물 투여량 및 약물의 농도는 투여된 2 종 이상의 약물에서 시너지 효과가 제한될 수 있다는 단점을 가진다. 또한, 2 종 이상의 약물을 복합적으로 투여해야 하기 때문에, 이에 따른 부작용이 증폭될 우려가 있다. 따라서, 암 위치의 표적 부위로 복합적인 약물을 순차적으로 전달하는 것은, 약물 조합을 통한 항암 화학요법의 효율을 개선하기 위해 중요한 방법이 될 수 있다(비특허문헌 2, 비특허문헌 3).

[0004] 따라서, 항암 화학요법에서 투여하는 약물은 표적 위치로 전달하여 효율적으로 약물을 투여할 수 있는, 약물 전달체를 이용하여 약물을 투여하는 것이 보다 바람직하다. 종양 세포의 선택적 표적화 및 약물분자의 종양 미세환경 내에서의 방출은 복용량을 감소시킴으로써 전통적인 화학요법의 부작용을 줄일 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 특정 자극에 반응하여 약물을 방출하는 표적화 약물 전달 시, 종양 세포의 선택적 표적화 및 약물분자의 종양 미세환경 내에서의 방출은 복용량을 감소시킴으로써 전통적인 화학요법의 부작용을 줄일 수 있다. 이러한 목표는 특정 자극에 반응하여 약물을 방출하는 표적화 약물 전달 시스템을 사용하여 조절할 수 있을 것이다.

[0005] 중합체 나노입자 또는 무기체 나노입자와 같은 나노 전달체는 혈액 순환 동안 표적 세포에 도달하기 전까지 약물을 안정적으로 보유할 수 있고, 약물의 담지량 및 방출능을 조절하여 종양 조직 또는 종양 세포 내에서 효율적으로 약물을 방출할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 약물의 부정확한 방출을 방지하고 타겟 부위에서 정확히 방출되도록 하기 위하여, 약물을 담지한 전달 비히클(delivery vehicle)은 특정 자극에 반응하여 방출을 제어하는 특성을 가져야 한다.

[0006] 최근 들어, 코어-셸 나노- 및 마이크로 입자에 기반한 약물 전달 시스템은 암 치료에서 약물을 포함하는 중합체 층의 분해를 통해 약물을 순차적으로 방출할 수 있음이 보고되고 있다. 그러나, 체내에서 혈액을 통해 순환하는 도중 적절하게 약물의 방출을 조절할 수 있는 방법이나, 캡슐화된 약물 내에서 2 가지 이상의 약물의 방출 양상을 제어하는 것이 아직 구체적으로 연구되지 않았기 때문에, 나노 전달체를 사용하는 효과적이고 순차적 치료를 이루는 것은 여전히 제한점을 가진다.

[0008] 이와 관련하여, 본 발명자들은 특정자극에 반응하여 약물을 방출할 수 있는 약물 전달체를 개발하여, 대한민국 공개특허 제 10-2016-0089774 호에서 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)-피리딜 디설파이드(pyridyl disulfide, PDS)의 생분해성 공중합체를 표면에 코팅한, 약물 담지 MSN을 공지한 바 있다. 상기 생분해성 공중합체는 가교 결합을 통해 약물을 담지한 MSN의 표면에 비-공유결합성 리간드로서 코팅할 수 있고, 환원제인 GSH에 의해 약물을 방출할 수 있음을 공지하였다. 그러나, 이러한 방법은 체내에 GSH 등에 의한 환원 반응을 통해서만 약물을 효과적으로 방출할 수 있다는 한계를 가진다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 다재 내성의 암 조직에서 시공간 특이적으로 약물을 방출 할 수 있는 약물 전달체를 제조하기 위해 노력한 결과, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 피리딜 디설파이드(PDS) 및 2-(디이소프로필아미노)에틸메틸아크릴레이트(DPAMA)로 이루어진 생분해성 공중합체를 이중-약물을 담지한 HMSN의 표면에 코팅하고 가교 결합하여 약물을 담지하는 형태의 약물 전달체(PMSN)를 제조하였다. 본 발명의 생분해성 공중합체는 주변 pH 조건에 따라 크기가 조절될 수 있으며, 초기 종양과 유사한 pH인 산성 환경에서 정전기적인 상호작용을 통해 약물을 감지한 전달체에서 약물 방출 양상을 조절할 수 있음을 확인하여, 본 발명의 약물 전달체를 소수성 약물 및 친수성 약물을 동시에 담지할 수 있는 약물 전달체로서 사용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) KR 10-2016-0089774 A (2016.07.28)

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) Zhang, Kun, et al. "Facile large-scale synthesis of monodisperse mesoporous silica nanospheres with tunable pore structure." Journal of the American Chemical Society 135.7 (2013): 2427-2430.

(비특허문헌 0002) Cao, Yang, et al. "Polymer-controlled core-shell nanoparticles: a novel strategy

for sequential drug release.” RSC Advances 4.57 (2014): 30430-30439.

(비특허문헌 0003) Narayanan, Sreeja, et al. “Sequentially releasing dual-drug-loaded PLGA?casein core/shell nanomedicine: Design, synthesis, biocompatibility and pharmacokinetics.” Acta biomaterialia 10.5 (2014): 2112-2124.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 이에, 본 발명자들은 PEG-PDS-DPAMA 생분해성 공중합체를 이중-약물을 담지한 HMSN의 표면에 코팅하고 가교 결합하여 약물을 담지하는 형태의 약물 전달체(PMSN)를 제조하였다. 본 발명의 생분해성 공중합체는 주변 pH 조건에 따라 크기가 조절될 수 있으며, 초기 중양과 유사한 pH인 산성 환경에서 정전기적인 상호작용을 통해 약물을 감지한 전달체에서 약물 방출 양상을 조절할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 따라서, 본 발명의 목적은 친수성 및 소수성의 이중 약물을 담지하고, pH 조건에 따라 산성 조건에서 약물을 순차적으로 방출할 수 있는 약물 전달체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명의 또다른 목적은 상기 약물 전달체를 유효성분으로 하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 약물 전달체의 제조 방법을 제공한다:
- [0020] i) 메조포러스 실리카 나노입자메조포러스 실리카 나노입자(Mesoporous Silica Nanoparticles, MSN)를 제조하는 단계;
- [0021] ii) 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 피리딜 디설파이드(pyridyl disulfide, PDS) 및 2-(디이소프로필아미노)에틸메틸아크릴레이트(2-(Diisopropylamino)ethyl methacrylate, DPAMA)로 이루어진 생분해성 공중합체를 제조하는 단계;
- [0022] iii) 상기 단계 i)에서 제조한 HMSN 및 상기 단계 ii)에서 제조한 생분해성 공중합체를 혼합하여, HMSN 표면에 생분해성 공중합체를 코팅하는 단계;
- [0023] iv) 상기 단계 iii)에서 코팅한 HMSN에 디티오프레이톨(dithiothreitol, DTT)를 처리하여, 생분해성 공중합체가 가교 결합한 공중합체-HMSN(PHMSN)을 형성하는 단계; 및
- [0024] v) 상기 단계 iv)에서 형성한 PHMSN을 수득하는 단계.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법으로 제조된 약물 전달체를 제공한다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 단계 iii)의 혼합은 HMSN 및 생분해성 공중합체를 1:1 내지 1:4의 중량 비율로 혼합하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 단계 iv)의 DTT는 생분해성 공중합체 내의 PDS에 대하여 20 내지 50 mol%의 몰비율로 처리하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 단계 iv)의 가교 결합은 30 내지 60 mol%의 가교 밀도로 가교 결합된 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 약물 전달체는 HMSN 내부에 약물 또는 생체기능 조절물을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 약물은 독소루비신(doxorubicin), 베라파밀(Verapamil), 시스플라틴(cisplatin), 플루오로우라실(flourouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토폠테칸(topotecan) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 친수성 약물; 파클리탁셀(paclitaxel), 캄토테신(camptothecin), 카보플라틴(carboplatin), 젬시타빈(Gemcitabine), 메소트렉세이트(Methotrexalte), 도세탁셀(Docetaxel) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 소수성 약물; 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 그 이상의 소분자 약물인 것일 수 있고, 상기 생체기능 조절물질은 DNA, RNA, 폴리펩티드, 비타민, 비타민 유도체, 아미노산 및 아미노산 유도체로 이루어

어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 그 이상인 것일 수 있다.

[0030] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 약물 전달체는 표면에 가교 결합된 생분해성 공중합체가 산성 pH 범위에서 정전기적 상호작용에 의해 팽윤되는 게이트 키퍼(gate keeper) 층을 가지는 것일 수 있고, 상기 산성 pH 범위는 초기 종양 조직의 pH 4.0 내지 6.5의 범위인 것일 수 있다. 또한, 상기 정전기적 상호작용은 표면의 전하가 0 이상의 양전하가 됨에 따라 나타나는 것일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 본 발명의 약물 전달체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 암은 항암제에 대한 내성을 가지는 다제 내성의 위암, 유방암, 폐암, 간암, 식도암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0034] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 항암제는 독소루비신, 시스플라틴(cisplatin), 베라파밀(Verapamil), 플루오로우라실(fluorouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 파클리탁셀(paclitaxel), 캄토테신(camptothecin), 카보플라틴(carboplatin), 겐시타빈(Gemcitabine), 메소트렉세이트(Methotrexalte) 및 도세탁셀(Docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0036] 따라서, 본 발명은 친수성 및 소수성의 이중 약물을 담지하고, pH 조건에 따라 산성 조건에서 약물을 순차적으로 방출할 수 있는 약물 전달체 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 약물 전달체는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 피리딜 디설파이드(PDS) 및 2-(디소프로필아미노)에틸메틸아크릴레이트(DPAMA)로 이루어진 생분해성 공중합체를 표면에 코팅한 형태로서, 상기 생분해성 공중합체가 산성 pH 범위에서 정전기적 상호작용에 의해 팽윤되는 게이트 키퍼(gate keeper) 층이 되는 역할을 하는 것에 기술적 특징이 있다.

[0038] 본 발명의 약물 전달체 표면의 생분해성 공중합체는 주변 pH 조건에 따라 크기가 조절될 수 있으며, 초기 종양과 유사한 pH인 산성 환경에서 팽윤되어 약물의 방출을 조절할 수 있다. 특히, 이 때 약물 전달체 내부에 소수성 약물 및 친수성 약물을 함께 담지하는 경우, 친수성 약물이 먼저 방출되고 이후 소수성 약물이 방출될 수 있기 때문에 다제 내성의 암과 같이 복합적인 약물의 처치를 통한 치료가 필요한 질병에 대한 약물 전달체로서 유용하게 사용할 수 있어, 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 본 발명의 이중-약물 담지의 PHMSN 제조 과정을 나타내는 모식도이다:

도 1a는 Verapamil hydrochloride(Ver) 및 독소루비신(Doxorubicin, Dox)의 이중 약물을 담지한 PHMSN 및 pH 조절에 따른 게이트키퍼 층의 팽윤을 나타내고;

도 1b는 본 발명의 PHMSN의 표면에 코팅하는 PEG-PDS-PDAMA 생분해성 공중합체의 구조 및 pH 조절에 따른 전하 생성을 나타내며; 및

도 1c는 본 발명의 PHMSN이 종양 세포 내에서 세포 내 흡수되어 약물을 방출하는 양상을 나타낸다.

도 2는 제조된 메조포러스 실리카 나노입자(Mesoporous Silica Nanoparticles, MSN)의 특징을 나타낸다:

도 2a는 TEM 영상으로 확인한 MSN의 형태를 나타내며;

도 2b는 HMSN 표면의 셀 두께를 확인한 결과를 나타내고; 및

도 2c는 HMSN 표면의 전체 포어 부피 및 크기를 나타낸다.

도 3은 PHMSN 표면에 코팅하기 위한 생분해성 공중합체의 합성 과정을 나타낸다:

도 3a는 본 발명의 PEG-PDS-PDPAMA의 공중합체를 합성하는 과정 및 공중합체의 구조를 나타내고; 및

도 3b는 대조군으로 사용하기 위한 종래 기술의 PEG-PDS 공중합체의 합성 과정 및 공중합체의 구조를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 PEG-PDS-PDPAMA 공중합체의 구조를 확인하기 위한 NMR 분석 결과이다.

도 5는 본 발명에서 제조한 약물-담지의 PHMSN의 특징을 나타낸다:

도 5a는 중합체층을 코팅한 PMSN의 형태를 확인한 TEM 영상 분석 결과이고;

도 5b는 중합체층의 코팅 유무에 따른 나노입자의 직경 크기 변화를 나타내며;

도 5c는 중합체층의 코팅 유무에 따른 나노입자의 표면 전하 변화를 나타내고;

도 5d는 pH 환경 변화에 따라 본 발명의 이중약물 담지 전달체(PHMSN) 및 이전 공지된 약물 전달체(PEG-PDS HMSN; 가교 밀도 33 mol%)의 표면 전하 변화를 확인한 도이며; 및

도 5e는 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN의 pH 환경 변화에 따른 직경 변화를 나타낸다.

도 6은 공중합체 게이트키퍼(gatekeeper) 층의 가교 결합을 위한 DTT 처리에 따른 PHMSN의 특징을 확인한 도이다:

도 6a는 DTT 처리 전후에 따른 나노입자 표면의 가교 결합 차이를 확인한 도이고;

도 6b는 공중합체 내 PDS에 대하여 20 mol%의 DTT를 처리한 경우에서 33 mol%의 가교 결합이 형성됨을 확인한 도이며;

도 6c는 공중합체 내 PDS에 대하여 50 mol%의 DTT를 처리한 경우에서 60 mol%의 가교 결합이 형성됨을 확인한 도이고;

도 6d는 pH 5.5 소듐 아세테이트(sodium acetate) 완충 용액에서 보관한 Dox-CPT-PHMSN의 시간의 흐름에 따른 직경 변화를 확인한 도이며;

도 6e는 pH 7.4 PBS에서 보관한 Dox-CPT-PHMSN의 시간의 흐름에 따른 직경 변화를 확인한 도이다.

도 7은 pH 변화 및 GSH(환원제) 처리에 따른 약물 방출 양상을 나타낸다:

도 7a는 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN에서 pH 변화 및 GSH 처리에 따른 약물 방출 양상을 확인한 도이고;

도 7b는 PEG-PDS 공중합체로 코팅하고 60 mol% 가교 밀도로 가교 결합한 이중약물 담지 PHMSN에서 pH 변화 및 GSH 처리에 따른 약물 방출 양상을 확인한 도이며; 및

도 7c는 60 mol% 가교 밀도로 가교 결합한, 본 발명의 PEG-PDS-PHMSN(파란색) 및 PEG-PDS 공중합체로 코팅한 이중약물 담지 PHMSN(분홍색)가 pH 변화에 따라 표면 전하의 변화를 나타냄을 확인한 도이다.

도 8은 이중 약물 또는 단일 약물이 담지된 PHMSN에서 다양한 조건에 의한 약물 방출 양상 조절 여부의 확인을 나타낸다:

도 8a는 공중합체를 코팅하지 않은 Dox-CPT 담지의 HMSN의 약물 방출 양상을 나타내는 도이며;

도 8b는 5 mM GSH 여부에 따라 pH 7.5에서 Dox-PHMSN의 약물 방출 양상을 나타내는 도이고;

도 8c는 5 mM GSH 여부에 따라 pH 7.5에서 CPT-PHMSN의 약물 방출 양상을 나타내는 도이며;

도 8d는 5 mM GSH를 처리한 pH 6.5 배지에서 Dox-PHMSN 또는 CPT-PHMSN의 약물 방출 양상을 나타내는 도이고;

도 8e는 5 mM GSH를 처리하지 않은 pH 6.5 배지에서 Dox-PHMSN 또는 CPT-PHMSN의 약물 방출 양상을 나타내는 도이며; 및

도 8f는 GSH를 처리하지 않은 pH 6.5 배지에서 PEG-PDS 공중합체 코팅의 CPT-Dox-PHMSN의 약물 방출 양상을 나타낸다.

도 9는 본 발명의 PHMSN의 세포 독성 효과를 나타낸다:

도 9a는 24 시간 동안 배양한 KB 세포에 대한 약물-비담지의 HMSN 및 Dox-CTP-PHMSN의 세포 사멸 효과를 확인한 도이며;

도 9b는 30 분 동안 pH 6.5 또는 pH 7.4 배지에서 Dox-PHMSN를 전처리한 후 신선한 배지로 교체한 환경에서 배양한 KB 세포의 세포 생존율을 나타내고; 및

도 9c는 30 분 동안 pH 6.5 또는 pH 7.4 배지에서 CPT-PHMSN를 전처리한 후 신선한 배지로 교체한 환경에서 배

양한 KB 세포의 세포 생존율을 나타낸다.

도 10은 CPT-Dox-PHMSN의 세포 내 유입 효과를 나타낸다:

도 10a는 pH 6.5 PBS 완충 용액에서 1 시간 동안 Dox-CPT-PHMSN을 처리한 KB 세포를 형광 관찰한 도이고;

도 10b는 pH 7.4 PBS 완충 용액에서 1 시간 동안 Dox-CPT-PHMSN을 처리한 KB 세포를 형광 관찰한 도이며;

도 10c는 pH 7.4(청색), pH 6.5(적색) 및 일반적인 세포 배양 배지(녹색)에서 2 시간 동안 Dox-CPT-PHMSN을 처리한 KB 세포에 대한 FACS 분석 결과이고; 및

도 10d는 pH 7.4 또는 pH 6.5에서 30 시간 동안 Dox-CPT-PHMSN을 처리한 KB 세포에 대한 세포 생존율을 확인한 도이다.

도 11은 CPT-Dox-PHMSN의 세포 내 유입 기작의 확인을 나타낸다:

도 11a는 수크로스로 전처리한 배지에서 Doc-PHMSN의 세포 내 유입 양상을 확인한 도이고;

도 11b는 amiloride로 전처리한 배지에서 Doc-PHMSN의 세포 내 유입 양상을 확인한 도이며;

도 11c는 M β CD(methyl- β -cyclodextrin)로 전처리한 배지에서 Doc-PHMSN의 세포 내 유입 양상을 확인한 도이고; 및

도 11d는 수크로즈(청색), amiloride(적색) 또는 M β CD(녹색)로 전처리한 배지에서 Doc-PHMSN의 세포 내 유입 양상을 확인한 FACS 결과이다.

도 12는 CPT-Dox-PHMSN의 세포질로의 방출 기작의 확인을 나타낸다:

도 12a는 pH 6.5 완충용액에서 1 시간 동안 Dox-PHMSN 또는 CPT-PHMSN을 처리하고 신선한 배지로 교환하여 배양한 KB 세포에서 엔도솜 및 약물을 형광 영상화 분석한 도이고; 및

도 12b는 pH 6.5 완충용액에서 1 시간 동안 Dox-PHMSN 또는 CPT-PHMSN을 처리하고 신선한 배지로 교환하여 배양한 KB 세포에서 리소솜 및 약물을 형광 영상화 분석한 도이다.

도 13은 CPT-Dox-PHMSN의 세포질로의 방출 기작의 확인을 나타낸다:

도 13a는 pH 6.5 완충용액에서 1 시간 동안 Dox-CPT-PHMSN을 처리하고 신선한 배지로 교환하여 4 시간 동안 배양한 KB 세포를 형광 영상화 분석한 도이고;

도 13b는 pH 6.5 완충용액에서 1 시간 동안 Dox-CPT-PHMSN을 처리하고 신선한 배지로 교환하여 6 시간 동안 배양한 KB 세포를 형광 영상화 분석한 도이다.

도 14는 Dox 내성의 위암 세포주에 대한 Dox-CPT-PHMSN의 시너지 세포 사멸 효과의 확인을 나타낸다:

도 14a는 Free-Dox, Dox-PHMSN 또는 Dox-CPT-PHMSN을 pH 6.5 용액에서 6 시간 동안 처리한 다음, 신선한 배지로 교환하여 48 시간 동안 배양한 세포의 세포 사멸 효과를 확인한 도이고;

도 14b는 Dox-PHMSN 또는 Dox-CPT-PHMSN을 pH 6.5 용액에서 2 시간 또는 6 시간 동안 처리한 다음, 신선한 배지로 교환하여 48 시간 동안 배양한 세포에서 유입된 약물의 양상을 확인한 도이다.

도 15는 Dox 내성의 위암 세포주에 대한 Dox-Ver-PHMSN의 시너지 세포 사멸 효과의 확인을 나타낸다:

도 15a는 Free-Dox 또는 Dox-Ver-PHMSN을 pH 6.5 용액에서 6 시간 동안 처리한 다음, 신선한 배지로 교환하여 48 시간 동안 배양한 세포의 세포 사멸 효과를 확인한 도이고; 및

도 15b는 Free-Dox 또는 Dox-Ver-PHMSN을 pH 6.5 용액에서 2 시간 동안 처리한 다음, 신선한 배지로 교환하여 2 시간 동안 배양한 세포에서 유입된 약물의 양상을 확인한 도이다.

도 16은 다제 내성 암세포주에서 본 발명의 약물 전달체 처리에 따른 세포 내 약물의 유입 양상을 나타낸다:

도 16a는 Dox-PHMSN 및 Free Dox를 처리한 세포에서 세포 내 약물의 유입 양상을 확인한 도이며; 및

도 16b는 Free-Ver를 30분 동안 전처리한 다음, Dox-PHMSN을 처리하고 배양한 암세포주에서 시간의 흐름에 따른 약물의 유입 양상을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하, 본 발명의 상세하게 설명한다.
- [0043] 상술한 바와 같이, 다재 내성 암에서의 치료 효과를 얻기 위해서 복합적인 항암 치료 방법이 요구되고 있어 이러한 복합적인 약물의 방출을 조절할 수 있는 약물 전달체의 개발이 요구되고 있으나, 캡슐화된 약물 전달체 내에서 2 가지 이상의 약물의 방출 양상을 제어하는 것이 아직 구체적으로 연구되지 않았기 때문에, 나노 약물 전달체를 사용하는 효과적이고 순차적 치료를 이루는 것은 여전히 제한점을 가진다.
- [0045] 본 발명의 약물 전달체 표면의 생분해성 공중합체는 주변 pH 조건에 따라 크기가 조절될 수 있으며, 초기 종양과 유사한 pH인 산성 환경에서 팽윤되어 약물의 방출을 조절할 수 있다. 특히, 이 때 약물 전달체 내부에 소수성 약물 및 친수성 약물을 함께 담지하는 경우, 친수성 약물이 먼저 방출되고 이후 소수성 약물이 방출될 수 있기 때문에 다재 내성의 암과 같이 복합적인 약물의 처치를 통한 치료가 필요한 질병에 대한 약물 전달체로서 유용하게 사용할 수 있다.
- [0047] 따라서, 본 발명은 이중-약물을 담지한 메조포러스 실리카 나노입자메조포러스 실리카 나노입자(hollow Mesoporous Silica Nanoparticles, HMSN)의 표면에 가교 결합된 생분해성 공중합체가 산성 pH 범위에서 정전기적 상호작용에 의해 팽윤되는 게이트 키퍼(gate keeper) 층을 가지는 약물 전달체를 제공한다.
- [0048] 본 발명의 “약물 전달체”는 HMSN 내부에 약물 또는 생체기능 조절물을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0049] 상기 약물은 독소루비신(doxorubicin), 베라파밀(Verapamil), 시스플라틴(cisplatin), 플루오로우라실(fluorouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin) 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토폠테칸(topotecan) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 친수성 약물; 파클리탁셀(paclitaxel), 캄토테신(camptothecin), 카보플라틴(carboplatin), 젬시타빈(Gemcitabine), 메소트렉세이트(Methotrexalte), 도세탁셀(Docetaxel) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 소수성 약물; 및 이의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 그 이상의 소분자 약물인 것이 바람직하고, 보다 구체적으로 독소루비신, 베라파밀 및 캄토테신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않고, 다재 내성 암의 치료에서 복합적으로 사용하였을 때 시너지 효과가 있을 것으로 당업계에 알려져 있는 약물의 조합이라면 어떤 것이든 사용할 수 있다.
- [0050] 보다 바람직하게는, 본 발명의 약물 전달체에 담지될 수 있는 약물들은 소수성 약물 및 친수성 약물로 이루어지는 조합일 수 있다. 본 발명의 약물 전달체 중 속이 빈 메조포러스 실리카 나노입자(HMSN)에 약물이 담지 또는 포획되는데, 이 중 친수성 약물은 높은 주입 용량을 가지는 HMSN 내부 공간에 주입될 수 있고, 이후 소수성 약물은 물리적 흡착에 의해서 HMSN의 표면에 주입될 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 “약물 전달체”의 생체기능 조절물질은 NA, RNA, 폴리펩티드, 비타민, 비타민 유도체, 아미노산 및 아미노산 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 그 이상인 것일 수 있다. 상기 생체기능 조절물질 또한, 소수성 물질 및 친수성 물질의 조합으로 담지 또는 포획될 수 있으며, 이 중 친수성 물질은 HMSN 내부에 담지되고 소수성 물질은 HMSN의 표면에 물리적 흡착으로 주입될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 “약물 전달체”에 담지되는 상기 약물 또는 상기 생체기능 조절물질은 제조 과정에서 HMSN을 포함하는 용액에 단순히 혼합하여 교반함으로서 HMSN에 효과적으로 담지될 수 있다. 따라서, 화학적 결합반응 또는 복잡한 정제 분리과정을 필요로 하지 않고 효과적으로 약물을 전달체에 담지할 수 있으므로 저렴한 비용으로 단순한 공정을 통해 약물 전달체를 제조할 수 있을 것이다.
- [0053] 본 발명의 “약물 전달체”는 표면에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 피리딜 디설파이드(pyridyl disulfide, PDS) 및 2-(디이소프로필아미노)에틸메틸아크릴레이트(2-(Diisopropylamino)ethyl methacrylate, DPAMA)로 이루어진 생분해성 공중합체가 가교 결합으로 코팅되는 것이 바람직하다. 상기 가교 결합된 생분해성 공중합체가 산성 pH 범위에서 정전기적 상호작용에 의해 팽윤되는 게이트 키퍼(gate keeper) 층으로 약물을 보호 또는 방출할 수 있다.
- [0054] 상기 산성 pH 범위는 초기 종양 조직의 pH 환경인 것이 바람직하며, 구체적으로 pH 4.0 내지 7.0 범위인 것이 바람직하고, 더욱 구체적으로 pH 4.5 내지 6.5 범위인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 정전기적 상호작용은 중합체로 코팅된 약물-담지 HMSN(PHMSN)의 표면 전하가 0 이상의 양전하가 됨에 따라 나타날 수 있다.

- [0056] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 본 발명자들은 pH 변화 및 환원 유도에 의하여 약물의 방출을 조절할 수 있는 약물 전달체를 제조하기 위해(도 1), 먼저 메조포러스 실리카 나노입자(MSN)을 제조하였다(도 2). 또한, 양전하의 중합체를 제조하고자, PEG-PDS-PDAMA 공중합체를 제조하였다(도 3 및 도 4).
- [0057] 또한, 본 발명자들은 제조한 HMSN 내부에 독소루비신(Dox) 및 캠프테신(CPT)을 담지하고, 상기 PEG-PDS-PDAMA 공중합체로 HMSN을 코팅하고(표 1 및 도 5a 내지 도 5c), 코팅한 공중합체 층은 DTT를 처리하여 가교 결합하여, Dox-CPT-PHMSN을 제조하였다(도 6a 내지 도 6c).
- [0058] 또한, 본 발명자들은 이중 약물을 담지한 PHMSN에서 pH 변화에 따른 약물의 순차적 방출 효과 확인하기 위해, Dox-CPT-PHMSN을 다양한 pH 환경에서 분산하여 약물의 방출 양상을 확인한 결과, 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN은 장 기 보관에 대한 안정성을 가지고 있으며(도 6d 및 도 6e), pH가 감소하여 산성 환경이 됨에 따라 점차적으로 표면 전하가 양전하로 변하여 생성된 정전기적 상호작용으로 인해 직경이 증가하는 것을 확인하였다(도 5d, 도 5e 및 도 7c).
- [0059] 또한, 본 발명자들은 이러한 Dox-CPT-PHMSN의 특징이 나노 입자 표면에 가교 결합되어 코팅된 생분해성 공중합체에 의한 효과이기 때문에, 이황화 결합 환원제인 GSH를 처리하였을 때 약물의 방출이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 7a, 도 7b 및 도 8).
- [0061] 따라서, 본 발명의 약물 전달체는 표면에 코팅되어 가교 결합된 생분해성 공중합체의 특징에 의해 주변 pH 조건에 따라 크기를 조절할 수 있으며, 초기 종양과 유사한 pH인 산성 환경에서 팽윤되어 약물의 방출을 조절할 수 있고, 환원제를 통해 공중합체 간 가교 결합의 이황화 결합을 분해하였을 때 보다 약물의 방출이 증가하도록 조절할 수 있으므로, 본 발명의 약물 전달체는 pH 조절을 통한 약물의 방출을 제어할 수 있는 환경으로 약물을 전달하기 위한 나노입자로서 유용하게 사용할 수 있다.
- [0063] 또한, 본 발명은 하기 i) 내지 v)의 단계를 포함하는, 상기 약물 전달체의 제조 방법을 제공한다:
- [0064] i) 메조포러스 실리카 나노입자메조포러스 실리카 나노입자(Mesoporous Silica Nanoparticles, MSN)를 제조하는 단계;
- [0065] ii) 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 피리딜 디설파이드(pyridyl disulfide, PDS) 및 2-(디이소프로필아미노)에틸메타아크릴레이트(2-(Diisopropylamino)ethyl methacrylate, DPAMA)로 이루어진 생분해성 공중합체를 제조하는 단계;
- [0066] iii) 상기 단계 i)에서 제조한 HMSN 및 상기 단계 ii)에서 제조한 생분해성 공중합체를 혼합하여, HMSN 표면에 생분해성 공중합체를 코팅하는 단계;
- [0067] iv) 상기 단계 iii)에서 코팅한 HMSN에 디티오프레이톨(dithiothreitol, DTT)를 처리하여, 생분해성 공중합체가 가교 결합한 공중합체-HMSN(PHMSN)을 형성하는 단계; 및
- [0068] v) 상기 단계 iv)에서 형성한 PHMSN을 수득하는 단계.
- [0069] 본 발명의 제조방법의 단계에 있어서, 상기 단계 i)에서 제조된 MSN의 표면 전하는 음전하를 나타내는 것이 바람직하고, 상기 단계 ii)에서 제조된 생분해성 공중합체는 양전하를 나타내는 것이 바람직하므로, 상기 단계 iii)에서 이들을 혼합하여 HMSN 표면에 생분해성 공중합체를 코팅하는 것은 정전기적 상호작용으로 인해 음전하의 나노입자 표면에 양전하의 공중합체가 코팅될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 iii)의 혼합은 HMSN 및 생분해성 공중합체를 1:1 내지 1:4의 중량 비율로 혼합하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 보다 바람직하게는, 음전하인 HMSN 표면에 양전하인 공중합체가 코팅된 후의 표면 전하가 0 이하의 음전하가 될 수 있는 범위에서 공중합체를 첨가하는 것이 바람직하다.
- [0071] 본 발명의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 iv)의 DTT는 생분해성 공중합체 내의 PDS에 대하여 20 내지 50 mol%의 몰비율로 처리하는 것이 바람직하며, 이 때 DTT에 의해서 공중합체가 가교 결합될 수 있고, 가교 결합은 30 내지 60 mol%의 가교 밀도로 가교 결합될 수 있다. 상기 가교 밀도는 DTT의 처리 농도에 비례하여 증가할 수 있으므로, 약물 전달체 내부에 담지하는 약물 및/또는 약물 전달체를 사용하고자 하는 표적 기관의 pH 환경에 따라 당업자가 적절하게 선택하여 조절할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 약물 전달체는 표면에 코팅되어 가교 결합된 생분해성 공중합체의 특징에 의해 주변 pH 조건에 따라 크기를 조절할 수 있으며, 초기 종양과 유사한 pH인 산성 환경에서 팽윤되어 약물의

방출을 조절할 수 있고, 환원제를 통해 공중합체 간 가교 결합의 이황화 결합을 분해하였을 때보다 약물의 방출이 증가하도록 조절할 수 있으므로, 본 발명의 제조 방법은 pH 조절을 통한 약물의 방출을 제어할 수 있는 환경으로 약물을 전달하기 위한 약물 전달체를 제조하기 위한 방법으로서 유용하게 사용할 수 있다.

[0075] 또한, 본 발명은 상기 약물 전달체를 유효성분으로 포함하는, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0076] 본 발명의 "약학적 조성물"에 있어서, 상기 암은 항암제에 대한 내성을 가지는 다재 내성의 위암, 유방암, 폐암, 간암, 식도암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하며, 구체적으로 위암 또는 유방암인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0077] 상기 항암제는 독소루비신, 시스플라틴(cisplatin), 베라파밀(Verapamil), 플루오로우라실(fluorouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 파클리탁셀(paclitaxel), 캄토테신(camptothecin), 카보플라틴(carboplatin), 겐시타빈(Gemcitabine), 메소트렉세이트(Methotrexalte) 및 도세탁셀(Docetaxel)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0079] 본 발명의 또다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 배지 pH 환경에 따른 Dox-CPT-PHMSN의 세포 내 흡수 정도를 비교한 결과, pH가 낮을수록 세포 유입 수준이 증가하는 것을 확인하였으며(도 9a 및 도 9b), 세포질에 Dox가 먼저 방출되고 이후 CPT가 방출되어, 순차적으로 약물이 방출되므로 암세포가 사멸될 수 있을 것으로 확인하였다(도 9). 또한, 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN, Dox-PHMSN 및 CPT-PHMSN은 처리 농도에 의존적으로 세포 사멸 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 초기 30분 동안 이들 약물 전달체를 처리한 이후 신선한 배지를 교환하여도, 유의적인 암세포 사멸 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다(도 10).

[0080] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 약물 전달체는 클라트린-의존적인 내포작용 및 대음세포작용을 통해 세포 내로 유입될 수 있음을 확인하였고(도 11), 세포 내에 엔도솜 및 리소솜의 형태로 유입되어, pH 변화에 의해 세포질 내로 방출될 수 있음을 확인하였다(도 12 및 도 13).

[0081] 또한, 본 발명자들은 약물 내성의 암세포에서 Dox-CPT-PHMSN에 의해 세포 내로 전달된 Dox 및 CPT 약물의 시너지 효과를 확인한 결과, Dox-CPT-PHMSN을 처리한 경우에서 농도 의존적으로 세포 생존률이 감소하여 유의적인 독성 효과를 나타내는 것을 확인하였으며(도 14a 내지 도 14c), 이는 세포 내 유입 초기에 Dox가 세포질로 방출되고 이후 순차적으로 CPT가 방출됨에 따라 이들의 시너지 효과로 세포 사멸 효과가 증가할 수 있음을 확인하였다(도 14d).

[0082] 아울러, 본 발명자들은 다재 약물에 대한 내성을 나타내는 암세포주에서, p-glycoprotein의 활성을 억제할 수 있는 칼슘 통로 길항제(calcium channel antagonist)인 Verapamil hydrochloride(Ver)를 본 발명의 PHMSN에 담지하여 세포에 투여하였을 때, 유의적인 항암 효과를 나타낼 수 있는지 여부를 확인한 결과, Ver-Dox-PHMSN은 Dox 내성의 유방암 세포에 잘 흡수될 수 있고, 시간의 흐름에 따라 점차 세포질 내의 Dox 농도가 증가하여 유의적인 암세포 사멸 효과를 나타냄을 확인하였다(도 15 및 도 16).

[0084] 따라서, 본 발명의 약물 전달체는 소수성 약물 및 친수성 약물을 함께 담지하였을 때, 산성 pH를 나타내는 종양 세포에 효과적으로 흡수되어 순차적으로 약물을 방출할 수 있다. 또한, 이중-약물의 순차적인 방출을 통해 항암제에 대하여 내성을 가지는 암세포에서도 시너지 효과가 나타나, 약물 내성을 극복하면서 암 세포에 대한 사멸 효과가 유의적으로 증가할 수 있어, 본 발명의 복합적으로 약물을 담지한 약물 전달체는 항암제에 대하여 내성을 가지는 다재 내성 암의 치료 및 예방을 위한 약학적 조성물의 유효 성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

[0086] 본 발명의 이중-약물을 담지한 약물 전달체는 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(Nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다. 본 발명의 이중-약물을 담지한 약물 전달체를 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0087] 즉, 본 발명의 이중-약물을 담지한 약물 전달체는 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명의 이중-약물을 담지한 약물 전달체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(Carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(Ascorbic acid) 또는 글루타치온(Glutathione)과 같은 항산화제(Antioxidants), 킬레이트화제(Chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(Stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0089] 본 발명의 이중-약물을 담지한 약물 전달체의 유효용량은 0.01 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 mg/kg 이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

[0090] 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 이중-약물을 담지한 약물 전달체의 총 유효량은 볼루스(Bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(Infusion) 등에 의해 단일 투여량(Single does)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(Multiple does)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(Fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 이중-약물을 담지한 약물 전달체의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[0092] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0094] 메조포러스 실리카 나노입자(Mesoporous Silica Nanoparticles, MSN)의 제조

[0095] <1-1> 속이 빈 MSN(hollow Mesoporous Silica Nanoparticles, HMSN)의 제조

[0096] 본 발명에서 약물을 담지하는 약물전달체로 사용하기 위해, HMSN을 제작하였다. HMSN은 이전 공지된 바를 따라 제조하였다(비특허문헌 1, 특허문헌 1).

[0097] 구체적으로, 2 M NaOH 수용액 3.5 mL을 정제수 480 mL와 혼합한 다음, CTAB (hexadecyltrimethyl-ammonium bromide)를 첨가하여 교반하면서 80 °C로 가열하였다. CTAB가 완전히 용해되면, TEOS(Tetraethyl orthosilicate) 4.67 g을 천천히 가하면서 2 시간 동안 80 °C에서 교반하였다. 교반 후, 생성된 침전물을 여과하고 정제수도 3 회 세척한 다음 60 °C에서 밤새 건조하였다. 건조한 시료를 수득하고 550 °C에서 5시간 동안 공기 중에서 하소(calcine)시켜 HMSN을 수득하였다.

[0098] 수득한 HMSN의 구조적 특징을 분석하기 위해, 200 kV의 가속 전압에서 투과전자현미경(TEM)(JEOL-2100, JEOL)을 이용하여 분석하고, 기공의 입자 크기별 분포도확인하였다. 또한, 질소 흡착 분석기(BEL BELSORP-Max system)를 이용하여 -196°C에서 측정한 질소 흡수-방출 등전점 측정(Nitrogen adsorption-desorption isotherm measurements)을 수행하여, HMSN의 전체 포어 부피 및 크기를 확인하였다.

[0099] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 제조한 MSN은 속이 빈 형태이고 잘 짜여진 메조포러스 셸의 형태인, HMSN임을 확인하였다(도 2a). 이 HMSN의 셸 두께는 15 nm이며 평균 직경이 100 nm임을 확인하였다(도 2a 및 도 2b). 또한, 브루나우어-에메트-텔러(Bruaner-Emmette-Teller, BET) 표면적을 분석하여, HMSN은 1.56 cm³/g의 전체 포어 부피 및 2.4 nm의 포어 크기를 가짐을 확인하였다(도 2c).

[0101] <1-2> 양전하의 중합체의 제조

[0102] 본 발명에서 중합체와 결합된 HMSN(polymer HMSN, PHMSN)의 형태를 제조하기 위해서, HMSN 표면에 중합체의 게이트키퍼(gatekeeper)를 구축하도록 하고자 하였다. HMSN의 표면은 음전하를 가지고 있으므로, 이와 정전기적 상호작용을 통해 비-공유결합(non-covalent)으로 가교 결합(cross-linked)될 수 있는 양전하의 공중합체(copolymer)를 제조하였다(도 3).

[0103] 본 발명에서 제조한 공중합체는 PEG-PDS-DPAMA 및 PEG-PDS의 두 가지 공중합체이다. 먼저, PEG-PDS-DPAMA를 제조하였다. 2-cyano-2-propyl benzodithioate(RAFT reagent, 4.72 L, 0.025 mmol), poly(ethylene glycol)methacrylate(1.02 g, 2.15 mmol), PDSEMA(549 mg, 2.15 mmol), 2-(Diisopropylamino)ethyl methacrylate(849.5 mg, 4.26 mmol) 및 AIBN(7 mg, 0.043 mmol)을 L(-)-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid(THF)

용액에 용해하고, 아르곤 가스를 가하여 탈가스하였다. 반응 용기(reaction vessel)를 봉인한 후, 70 °C로 예열한 오일 욕조(oil bath)에서 12 시간 동안 가열 반응하였다. 반응되지 않은 단량체(monomer)를 제거하고 중합체를 정제하기 위해서, 반응 혼합물을 디에틸 에테르에서 석출하여 랜덤 공중합체를 수득하였다. 수득된 PEG-PDS-DPAMA 공중합체를 ^1H NMR 분석하여, 구조를 확인하였다(도 4): ^1H NMR (600 MHz, cdCl_3): δ 8.46, 7.68, 7.11, 4.21, 4.07, 3.82, 3.55-3.52, 3.37, 2.97, 2.61, 1.85-1.86, 1.81. GPC (PMMA standard): Mn 78 kDa, Mw 132 kDa 및 PDI 1.69.

[0104] 다음으로, PEG-PDS 공중합체를 제조하였다. 2-Cyano-2-propyl benzodithioate (RAFT reagent, 9.44 μl , 0.05 mmol), PDSEMA (1 g, 3.92 mmol), poly(ethylene glycol) methacrylate (931 mg, 0.98 mmol) 및 AIBN (2.4 mg, 0.0146 mmol)를 혼합한 다음, 위와 동일한 방법을 수행하여 랜덤 공중합체를 수득하였다. 수득한 PEG-PDS 공중합체를 ^1H NMR 분석하여, 구조를 확인하였다: ^1H NMR (600 MHz, cdCl_3): δ 8.46, 7.68, 7.11, 4.50-4.01, 3.72-3.58, 3.38, 3.03, 2.15-1.71, 1.13-0.79. GPC (PMMA standard): Mn 9.8 kD, Mw 14.4 kD 및 PDI 1.47.

실시예 2

[0106] 약물을 담지한(loaded) PHMSN의 제조

[0107] <2-1> 이중 약물을 담지한 PHMSN의 제조

[0108] 본 발명에서는 항암제에 대하여 내성을 가지는 암세포를 사멸하는 것을 목적으로 하여 이에 효과적인 약물을 이중으로 담지할 수 있는 PHMSN을 제조하였다.

[0109] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 HMSN 5 mg을 정제수 1 ml에 첨가하고 초음파분쇄하여, 균일한 콜로이드 용액(colloidal solution)이 될 때까지 입자를 분산시켰다. 그런 다음, 2.5 mg, 5.0 mg 또는 7.5 mg의 camptothecin(CPT)을 용해한 DMSO를 상기 콜로이드 용액에 용해하고 상온에서 24 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 교반한 현탁액을 원심분리하여 CPT를 담지한 나노입자를 수득하고 상등액에 남은 잔여 약물의 농도를 확인하였다. 나노입자에서 DMSO를 제거하기 위해, CPT를 담지한 나노입자를 진공 건조한 다음, 정제수로 3회 세척하고 동결건조로 보관하였다. CPT가 담지된 나노입자의 분자량은 상층액 및 세척액을 이용하여 계산하였다. 담지된 CPT의 양을 계산하기 위해서 $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$ 및 $42,282 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 분자 흡수 계수(molar absorption coefficient)로 설정된 UV-Vis 분광광도계를 사용하여 스펙트럼 분석하였다. 그런 다음, 나노입자는 다시 1 ml 정제수에 현탁하고, 2.5 mg, 5.0 mg 또는 7.5 mg의 독소루비신(doxorubicin, Dox)을 현탁한 반응 용액에 가하여 상온에서 24 시간동안 교반하였다.

[0110] 그런 다음, 수득한 이중 약물을 담지한 HMSN에 중합체 게이트키퍼를 코팅하기 위해, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 PEG-PDS-DPA 공중합체 10 mg를 가하여 밤새 추가 교반하였다. 표면을 감싼 공중합체를 가교 결합하기 위해, 상기 교반한 반응액에 dithiothreitol(DTT)를 첨가하고 상온에서 3 시간 동안 교반하였다. 상기 DTT는 공중합체를 구성하고 있는 PDS 기에 대하여 20 mol% 또는 50 mol%의 몰비율로 첨가하였다. 이중 약물을 담지한 PHMSN은 원심분리로 수집한 다음 pH 7.4의 인산염 완충용액 및 증류수로 세척하여, 최종적으로 CPT 및 Dox를 담지한 PHMSN(Dox-CPT-PHMSN)을 수득하였다.

[0111] 수득한 Dox-CPT-PHMSN에서 가교 결합의 밀도는 가교 결합 형성시 부산물로서 생성되는 pyridothione의 농도를 확인하여 계산하였다. pyridothione의 몰 흡광 계수(molar extinction coefficient)는 343 nm 에서 $8.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 인 것으로 알려져 있다. Dox-CPT-PHMSN에 담지된 Dox의 양(중량%)은 초기 용액에 첨가된 약물의 총 량으로부터 최종 반응 용액 내 잔여 Dox의 양을 사용하여 계산하였다. 용액 내 Dox의 양은 $11,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 몰 흡광계수를 사용하여 UV-Vis 흡광광도계를 사용하여 분석하였다. 분석한 후 하기 [수학식 1] 및 [수학식 2]를 사용하여 약물의 담지 효율(loading capacity) 및 포획 효율(Entrapment efficiency)을 계산하였다.

[0113] [수학식 1]

[0114] Drug loading capacity (%) = Mass of the drug in MSN/Mass of MSN $\times$ 100

[0115] [수학식 2]

[0116] Entrapment efficiency (%) = Mass of the loaded drug/Initial mass of the drug $\times$ 100

[0118] 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 TEM 영상에서 중합체 코팅을 통해 HMSN이 복합체로 형성되지 않은 나노입

자로 제조되었으며, 평균 직경이 100 nm에서 130 nm로 증가하는 것을 확인하였으며, 200 nm 이내의 입자 크기를 가져, 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN를 체내에 투여하여도 장기간 순환 후 체내에서 분해 및 제거될 수 있음을 확인하였다(도 5a 및 도 5b). 또한, 이중 약물이 담지된 Dox-CPT-PHMSN은 하기 [표 1]과 같이 CPT 및 Dox의 혼합 농도에 따라 담지 효율 및 포획 효율이 상이하여 Dox의 담지 효율이 36 wt%까지 증가하였고 이 때 CPT의 담지 효율은 80 wt%를 나타내어, Dox 및 CPT의 담지 비율이 약 1:2의 비율로 나타나는 것을 확인하였다(표 1). Dox-CPT-PHMSN의 표면 전사를 확인한 결과, 중합체 코팅 이전에 -40 mV의 높은 음전하를 나타내었으나 중합체 게이트키퍼를 코팅한 이후 표면 전하가 -2 mV로 중화되는 것을 확인하였다(도 5c).

표 1

PHMSN 내 Dox 및 CPT의 이중약물을 담지하기 위한 약물의 담지 효율 및 포획 효율의 비교

약물 농도(feeding)	Dox 담지 효율% (포획 효율%)	CPT 담지 효율(%) 포획 효율(%)
2.5 mg/ml	15% (30%)	23% (46%)
5.0 mg/ml	32% (32%)	60% (60%)
7.5 mg/ml	36% (24%)	80% (54%)

<2-2> 중합체 가교 결합을 위한 가교제 처리 농도에 따른 PHMSN의 특징 확인

본 발명의 Dox-CPT-PHMSN 제조 과정에서 표면 공중합체 게이트키퍼의 가교 결합을 통한 코팅 과정을 통해 약물 유출을 조절할 수 있으므로, 공중합체의 가교 결합을 위해 처리한 가교 결합 유도제(DTT)의 농도에 따라 PHMSN의 특징이 달라지는지 여부를 확인하였다. 상기 실시예 <2-1>에서 공중합체를 구성하고 있는 PDS 기에 대하여 20 mol% 또는 50 mol%의 몰비율로 첨가하여 공중합체 가교 결합을 유도하였으므로, 이에 따른 표면 가교 결합 밀도를 확인하였다.

그 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이 PDS기 에 대하여 20 mol%의 DTT를 처리하여 가교 결합하였을 때의 최종 밀도는 약 33 mol%였고, 50 mol%의 DTT를 처리하여 가교 결합하였을 때의 최종 밀도는 약 60 mol%를 나타내는 것을 확인하였다(도 6a 내지 도 6c).

<2-3> 단일 약물을 담지한 Dox-PHMSN의 제조

본 발명에서 제조한 CPT-Dox-PHMSN과 비교하기 위해, 단일 약물을 담지한 PHMSN으로서 Dox-PHMSN을 제조하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 HMSN 5 mg을 정제수 1 ml에 첨가하고 초음파분쇄하여, 균일한 콜로이드 용액(colloidal solution)이 될 때까지 입자를 분산시켰다. 그런 다음, 2.5 mg, 5.0 mg 또는 7.5 mg의 Dox를 상기 콜로이드 용액에 용해하고 상온에서 24 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 교반한 현탁액을 원심분리하여 Dox를 담지한 나노입자를 수득하고 상등액에 남은 잔여 약물의 농도를 확인하였다. 나노입자에서 DMSO를 제거하기 위해, 정제수 및 pH 7.4의 인산염 완충용액 및 증류수로 세척하고 원심분리하여 단일 약물인 Dox를 담지한 PHMSN(Dox-PHMSN)을 수득하였다. 위의 과정에서 잔여 상등액은 모두 하나로 모아서 잔여 Dox의 농도를 계산하고, 이를 이용하여 포집 효율 및 담지 효율을 계산하였다. Dox-PHMSN에 담지된 Dox의 양(중량%)은 초기 용액에 첨가된 약물의 총량으로부터 최종 반응 용액 내 잔여 Dox의 양을 사용하여 계산하였다.

그런 다음, 건조한 Dox-HMSN를 1 ml 증류수에 현탁한 다음, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 PEG-PDS-DPA 공중합체 10 mg를 가하여 밤새 추가 교반하였다. 표면을 감싼 공중합체를 가교 결합하기 위해, 상기 교반한 반응액에 dithiothreitol(DTT)를 첨가하고 상온에서 3 시간 동안 교반하였다. 상기 DTT는 공중합체를 구성하고 있는 PDS 기에 대하여 20 mol%의 몰비율로 첨가하였다. 교반 후Dox-HPHMSN은 원심분리로 수집한 다음 pH 7.4의 인산염 완충용액 및 증류수로 세척하여, 최종적인 Dox-PHMSN을 수득하였다.

<2-4> 단일 약물을 담지한 CPT-PHMSN의 제조

본 발명에서 제조한 CPT-Dox-PHMSN과 비교하기 위해, 단일 약물을 담지한 PHMSN으로서 CPT-PHMSN을 제조하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 HMSN 5 mg을 정제수 1 ml에 첨가하고 초음파분쇄하여, 균일한 콜로이드 용액(colloidal solution)이 될 때까지 입자를 분산시켰다. 그런 다음, 2.5 mg, 5.0 mg 또는 7.5 mg의 Dox를 상기 콜로이드 용액에 용해하고 상온에서 24 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <2-3>과 동일한 과정을 수행하여, 최종적인 CPT-PHMSN을 수득하였다.

[0135] <2-5> 대조군으로 이용하기 위한 PEG-PDS 공중합체 코팅 약물전달체 제조

[0136] 본 발명의 대조군으로 사용하기 위해, 종래 기술을 통해 공지된 바 있는 생분해성 공중합체 코팅의 PHMSN을 제조하였다(비특허문헌 1).

[0137] 구체적으로, 생분해성 공중합체로는 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 PEG-PDS를 사용하였고, CPT 및 Dox의 이중 약물을 담지한 PHMSN을 상기 실시예 <2-1>과 동일한 과정을 수행하여 대조군-이중약물-PHMSN을 제조하였다. 공중합체 가교 결합을 위한 DTT는 PDS 기에 대하여 50 mol%의 몰비율로 첨가하였다.

실시예 3

[0139] 이중 약물을 담지한 PHMSN에서 pH 변화에 따른 약물의 순차적 방출 효과 확인

[0140] <3-1> pH 환경에 따른 PHMSN의 약물 방출 효과 확인

[0141] 본 발명에서 제조한 이중 약물을 담지한 PHMSN이 주변 pH 환경에 의해 약물을 방출할 수 있는지 확인하였다.

[0142] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 Dox-CPT-PHMSN 5 mg을 pH 4 내지 pH 8.5의 다양한 pH 조건의 완충 용액에 현탁한 다음, 72 시간 동안 보관하였다. 보관 개시 5 시간 후에, Dox-CPT-PHMSN의 표면 전하 및 나노입자의 크기를 측정하였다. 이후, 보관 개시 24, 48 및 72 시간 후에도 나노입자의 크기를 측정하여 시간의 흐름에 따라 나노입자의 크기가 변하는지 여부를 확인하였다.

[0143] 아울러, 동일한 Dox-CPT-PHMSN가 포함된 주변 환경의 pH가 변함에 따라 약물 방출의 효과를 나타낼 수 있는지 확인하기 위해, Dox-CPT-PHMSN 5 mg을 pH 7.4의 인산 완충용액에서 5 시간 동안 보관한 다음, pH 5.5의 소듐 아세테이트 완충 용액으로 옮겨 10 시간 동안 추가 보관하고, 이후 1 mM Glutathione(GSH)을 완충 용액에 첨가하여 17 시간 동안 추가 보관하였다. 시간의 흐름에 따른 약물 방출 양상은 Dox 및 CPT 모두에 대하여 확인하였으며, Shimadzu RFPC 5430 분광광도계를 사용하여 480 nm 및 360 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다. 대조군으로서, 상기 실시예 <2-5>에서 제조한 대조군-이중약물-PHMSN을 상기 실시예 <3-1>과 동일한 조건에서 보관하여 나노입자 표면의 전하를 측정하였다.

[0144] 그 결과, 도 6d 및 도 6e에서 나타난 바와 같이 72시간 동안 Dox-CPT-PHMSN을 보관하였을 때 pH 5.5 및 pH 7.4 환경 모두에서 입자의 크기가 변화하지 않는 것을 확인하여, Dox-CPT-PHMSN를 사용할 때 보관 및 사용시 안정하게 형태를 유지할 수 있음을 확인하였다(도 6d 및 도 6e).

[0145] 또한, 다양한 pH의 조건에 따른 Dox-CPT-PHMSN의 크기 변화에 대하여는, 도 5d 및 도 5e에서 나타난 바와 같이 pH가 감소하여 산성 환경이 됨에 따라 점차적으로 Dox-CPT-PHMSN 표면의 전하가 음전하에서 양전하로 변화하는 것을 확인하였다. 이는 pH가 낮아져 산성화됨에 따라 PEG-PDA-DPA 공중합체의 디-이소프로필 기(di-isopropyl group)가 양성화(protonation)되는 것으로 나타나는 현상인 것으로 예측할 수 있다(도 2b). 게이트키퍼로 코팅된 PEG-PDA-DPA 공중합체 중 PDA에서, pH가 낮아지면서 아민 기가 양성화되고, 생성된 4차 아민기 사이에서 정전기적인 반발이 생성되어 게이트키퍼의 코팅층이 팽창 유도되는 것으로 예측할 수 있다. 이에 따라, pH가 낮은 산성 환경이 되면서 Dox-CPT-PHMSN의 크기가 증가하여 pH 7.5에서 130 nm 직경을 가지는 나노입자가 pH 4.5에서는 300 nm 직경으로 증가하는 것을 확인하였다(도 5d 및 도 5e).

[0146] 이를 통해, 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN이 주변 환경의 pH 조건이 산성 환경이 됨에 따라 Dox-CPT-PHMSN 표면을 코팅하는 중합체의 크기가 커질 수 있음을 예상할 수 있었으며, 도 7a 및 도 7b에서 나타난 바와 같이 가교 결합된 공중합체 게이트키퍼 코팅층을 이황화 결합 환원제인 GSH 처리를 통해 분해하였을 때, 약물 방출의 양상이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 7a). 33 mol%의 가교 밀도를 가지는 Dox-CPT-PHMSN에서 두 약물 중 친수성인 Dox의 방출 속도가 소수성인 CPT보다 빠르게 나타나는 것을 확인하였다. pH 5.5 완충 용액에 Dox-CPT-PHMSN을 분산하였을 때, Dox의 방출 속도는 70% 이상을 나타내었으며, 이에 비해 CPT의 방출은 유의적으로 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이후, GSH를 처리하였을 때 CPT의 방출 속도가 증가하여, 최종적으로 40% 이상의 CPT가 방출되는 것을 확인하였다. 이러한 약물 방출의 양상은 60 mol%의 가교 밀도를 가지는 경우, 33 mol%의 가교 밀도를 가지는 경우보다 낮은 수준의 약물 방출 현상을 나타내므로(도 7b), 이를 통해 pH 조절의 변화로 인해 약물 방출되는 것은 PHMSN 표면에 가교 결합으로 코팅된 공중합체 게이트키퍼의 영향인 것을 확인하였다.

[0147] 또한, 도 5d 및 도 7c에서 나타난 바와 같이, 33 mol% 및 60 mol%의 가교 밀도를 가지는 경우 모두, 산성 pH 조건에서 각각 +45 mV 및 +43 mV의 높은 양전하를 생성하는 것을 확인하였으며, 중성 pH 조건에서는 -5 mV 및 -14 mV의 음전하를 가지는 것을 확인하였다(도 5d 및 도 7c). 이는 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN이 주변 pH 환경에 영향

을 받으면서 표면 전하가 변하게 되고, 결과적으로 팽윤을 통해 담지된 약물이 방출될 수 있도록 함을 나타낸다. 이에 비해, 대조군으로 사용된 PEG-PDA 공중합체를 게이트키퍼로 코팅한 대조군-이중약물-PHMSN의 경우, pH의 변화에도 불구하고 표면 전하가 유의적으로 변하지 않는 것을 확인하였다.

[0149] <3-2> 이중 약물 또는 단일 약물이 담지된 PHMSN에서 다양한 조건에 의한 약물 방출 양상 조절 여부의 확인

[0150] PEG-PDA-DPA를 게이트키퍼 공중합체로 사용하는 본 발명의 PHMSN 약물 전달체에서, 이외 조건을 변경함을 통해 약물 방출 양상을 조절할 수 있는지의 가능성을 확인하였다.

[0151] 구체적으로, 상기 <실시예 2>에서 제조한 이중 약물이 담지된 PHMSN 또는 단일 약물이 담지된 PHMSN을 제조하였다. 그런 다음, 하기 [표 2]에서 제시된 조건으로 PHMSN을 분산시켜 약물 방출 양상의 차이를 확인하였다.

표 2

[0152] 다양한 조건에서 PHMSN의 약물 방출 양상 변화의 확인

시료 번호	게이트키퍼 여부	담지 약물	GSH 처리여부	배지 pH
1	없음	Dox or CPT	×	pH 7.5
2	PEG-PDA-DPA	Dox	5 mM GSH 처리 및 GSH 미처리	pH 7.5
3		CPT	5 mM GSH 처리 및 GSH 미처리	pH 7.5
4		Dox	5 mM GSH 처리	pH 6.5
5		CPT	×	pH 6.5
6	PEG-PDA	Dox or CPT	×	pH 6.5

[0154] 그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이 다양한 조건에서 PHMSN를 분산시키는 것은, PHMSN에 담지된 약물 방출 양상을 조절할 수 있음을 확인하였다. 먼저, 공중합체 게이트키퍼가 존재하지 않는 경우, PHMSN에 담지된 Dox 및 CPT의 방출은 빠른 속도로 나타나는 것을 확인하였다(도 8a). 또한, 이중 약물이 담지된 Dox-CPT-PHMSN에서 나타난 바와 유사하게 pH 7.4 및 pH 6.5 환경에서 Dox-PHMSN 또는 CPT-PHMSN을 분산한 결과, pH 7.5 보다 pH 6.5 환경에서 약물 방출이 보다 높은 양상으로 나타나는 것을 확인하였으며, 가교 결합의 환원제인 5 mM의 GSH를 처리하였을 때 약물 방출의 효과가 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 8b 내지 도 8e). 대조군으로는 PEG-PDA 공중합체를 게이트키퍼로 하는 PHMSN을 사용하였으며, pH 6.5에서도 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN과 비교하였을 때 유의적인 약물 방출이 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 8f).

실시예 4

[0156] Dox-CPT-PHMSN의 세포 내 흡수 효과 확인

[0157] <4-1> 배지 pH 환경에 따른 Dox-CPT-PHMSN의 세포 내 흡수 정도 비교

[0158] 본 발명에서 제조한 Dox-CPT-PHMSN이 주변 환경 pH에 의해 약물 방출이 조절될 수 있음을 확인하였으므로, 세포 내로 유입되는 것에 있어서 Dox-CPT-PHMSN의 효율을 확인하였다.

[0159] 구체적으로, 비인두 표피암 조직 유래의 암세포주인 KB 세포를 RPM 1640 배지에서 배양하였다. 멸균한 단일 웰의 글래스 플레이트(Lab Tek II, Thermo Scientific)에, KB 세포를 2×10^5 세포/웰의 농도로 접종한 다음, 5% CO₂의 37℃ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 세포 생존율을 확인하기 위하여, 배양한 세포의 배양 배지를 pH 6.5 또는 pH 7.5의 PBS 배지로 교체한 다음, Dox-CPT-PHMSN을 Dox 및 CPT의 최종 농도가 10 g/ml이 되도록 처리하고 2 시간 동안 배양하였다. 배양 후, PBS 배지를 신선한 배지로 교체하고, 세포에 커버 글래스(Lab Tek II glass chamber coverglass, Thermo Fisher Scientific Inc)를 덮어서 CO₂ 배양기에 연결된 Olympus FV1000 형광 현미경으로 세포를 관찰하였다. 적색의 형광 신호는 Dox의 분포를 나타내며, 청색의 형광 신호는 CPT의 분포를 나타내는 것으로 판단하였다.

[0160] 또한, 유세포 분석(FACS)을 수행하기 위해, pH 6.5 또는 pH 7.4의 PBS 배지를 포함하는 24 웰 플레이트에 KB 세포를 5×10^4 세포/웰의 농도로 접종하였다. 24 시간 동안 전배양한 다음, Dox-CPT-PHMSN을 처리하고 2 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, FACS 분석기(FACS caliber, BD Bioscience)를 사용하여 세포 내 Dox의 유입량을 분

석하였다.

[0161] 그 결과, 도 9a 및 도 9b에서 나타난 바와 같이, pH 7.4의 배지보다 pH 6.5 배지에서 Dox-CPT-PHMSN을 처리한 경우에서 보다 높은 수준의 세포 유입량을 나타내는 것을 확인하였다(도 9a 및 도 9b). 특히, pH 6.5 배지에서 세포 내로 흡수된 Dox-CPT-PHMSN중에서, 적색 형광을 발색하는 Dox는 세포질에 넓게 분포하고 있으며, 처리 1 시간 동안 청색 형광을 발색하는 CPT는 PHMSN 내에 응집되어 있는 것을 확인하였다. 이를 통해, 세포 내 유입 초기에 pH 의존적으로 PHMSN에서 Dox가 방출됨을 확인하였다. 이는 세포질로 약물이 유입된 후에 산성 조건의 엔도솜에서 Dox가 먼저 방출되며, CPT는 이후 방출될 수 있는 것으로 확인하여, 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN은 세포 내로 내재화(internalization)된 후, 순차적으로 약물을 방출하여 암세포를 사멸할 수 있는 것으로 예상하였다.

[0162] 또한, 유세포 분석을 통해 각기 다른 pH 조건에서 배양된 KB 세포 내로 나노입자가 흡수되는 양상의 차이를 다시 한번 확인하였다(도 9c). 이는 pH 의존적인 흡수가 나타나, 동일한 PHMSN 나노 입자가 pH 7.5보다 pH 6.5에서 세포 유입이 증가할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0164] <4-2> 본 발명의 PHMSN의 생체 적합성 확인

[0165] 본 발명의 Dox-CPT-PHMSN이 pH 조건에 따라 약물 방출을 효과적으로 조절할 수 있으며 세포 내로도 효과적으로 유입될 수 있음을 확인하여, 본 발명의 PHMSN의 생체 적합성을 확인하고자 KB 세포에 대한 세포독성을 확인하였다.

[0166] 구체적으로, 멸균한 96-웰 Nunc(Thermo Fisher Scientific Inc.)의 마이크로플레이트에, KB 세포를 5×10^3 세포/웰의 농도로 접종한 다음, 5% CO₂의 37℃ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 pH 6.5 또는 pH 7.5의 PBS 배지로 교체한 다음, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 HMSN, 상기 <실시예 2>에서 제조한 Dox-CPT-PHMSN, Dox-PHMSN 또는 CPT-PHMSN을 다양한 농도로 각각의 웰에 처리하였다. 처리 30 분 후, PBS 배지를 제거한 후 RPM 1640 배지로 교체하여 48 시간 동안 추가 배양하였다. 최종적으로 배양 종료 후, Alamar Blue 분석법으로 전체 접종한 세포에 대한 생존 세포의 비율을 확인하여 이를 세포 생존률(%)로 나타내었다. 각 웰당 형광광도를 측정하는 것은 플레이트 리더기(Tecan Infinite Series, Germany)를 사용하여 자극 파장(excitation wavelength) 565 nm 및 방출 파장(emission wavelength) 590 nm 조건으로 설정하여 확인하였다.

[0167] 그 결과, 도 10에서 나타난 바와 같이 약물을 담지한 Dox-CPT-PHMSN, Dox-PHMSN 및 CPT-PHMS 처리군의 경우, PHMSN 처리 농도에 의존적으로 세포의 사멸이 증가하는 것을 확인하였다(도 10a 내지 도 10d). 이에 반해, 약물을 담지하지 않은 HMSN의 경우에는 처리 농도가 증가하여도 세포의 유의적인 사멸이 나타나지 않는 것을 확인하여, HMSN은 약물 전달을 위한 전달체로서 사용할 수 있는 세포 적합성을 가지는 것을 확인하였다(도 10a). 또한, 약물을 담지한 PHMSN을 처리한 초기 30분 이후에 신선한 배지로 교환하여도, 초기 30분의 pH 차이에 의해 최종적(48 시간 이후)인 세포 생존률에서 유의적으로 차이를 나타내는 것을 통해, 초기 종양의 pH 조건에서 본 발명의 약물 담지 PHMSN이 높은 세포 독성을 나타낼 수 있음을 확인하였다(도 10b 내지 도 10d).

실시예 5

[0169] PHMSN의 세포 내 유입 및 세포질 방출 기작의 확인

[0170] <5-1> Dox-CPT-PHMSN의 세포 내 유입 기작의 확인

[0171] 본 발명의 PHMSN이 효과적인 생체 적합성을 나타내고 빠르게 세포 내 유입될 수 있음을 확인하였으므로, 세포 및 세포 내부 수준에서 나노입자의 흡수 기작을 확인하고자 하였다. 주변 환경의 pH에 따라 표면 전하가 변화하여 세포 내로 흡수될 수 있는 조건이 성립되는 이후, 본 발명의 PHMSN가 세포 내로 들어가는 과정이 어떤 기작을 통해 이루어질 수 있는지 확인하였다.

[0172] 구체적으로, KB 세포를 단일 웰의 커버 글래스에 2×10^5 세포/웰의 농도로 접종하였다. 수용성 의존성 세포내 섭취에 관여하는 단백질인 클라트린(clathrin) 또는 단백질의 수송에 관여하는 막단백질인 카베올린(caveolin)에 의존적인 내포 작용(endocytosis); 또는 대음세포작용(macropinocytosis)을 억제하기 위해서, 접종한 KB 세포에 450 mM 수크로즈(sucrose) 또는 10 mM methyl-β-cyclodextrin을 30 분 동안 처리하여 전배양하거나, 3 mM amiloride를 15 분 동안 처리하여 전배양하였다. 전배양 후, 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법을 수행하여 pH 6.5의 PBS 배지의 KB 세포에 Dox-CPT-PHMSN을 처리하고 2 시간 동안 배양한 다음, 형광 현미경으로 Dox의 분포를 확인하였다. 또는, pH 6.5의 PBS 배지에서 1 시간 동안 KB 세포를 배양한 다음 신선한 배지로 교체하여 2

시간 동안 추가 배양(총 3 시간 배양)한 후, FACS 분석으로 형광 발색 세포를 정량 계수하였다.

[0173] 그 결과, 도 11에서 나타난 바와 같이, 수크로즈 또는 amiloride로 전처리한 KB 세포에서는 Dox-CPT-PHMSN의 세포 내 유입이 저해되는 반면, M β CD(methyl- β -cyclodextrin)로 전처리한 KB 세포에서는 PHMSN의 세포 내 유입이 그대로 유지되는 것을 확인하였다(도 11a 내지 도 11c). 유세포 분석을 통해, 상기 억제제가 존재하는 환경에서 수크로즈(청색) 및 amilorin(적색)에 의해 Dox의 세포 내 유입이 저해되었고, M β CD(녹색) 처리에서는 세포 내로 Dox가 유입되는 것을 다시 한번 확인하였다(도 11d). 수크로즈는 클라트린(clathrin)의 억제제이고, amiloride은 대음세포작용의 억제제이며, M β CD는 카베올린(caveolin) 억제제로서 알려져 있으므로, 이를 통해 본 발명의 PHMSN은 클라트린-의존적인 내포작용 및 대음세포작용을 통해 세포 내로 유입될 수 있음을 확인하였다.

[0175] <5-2> Dox-CPT-PHMSN의 세포질로의 방출 기작 확인

[0176] 클라트린-의존적인 내포작용 및 대음세포작용으로 세포 내 유입된 PHMSN이 세포질 내로 방출되는 기작을 확인하고자 하였다.

[0177] 구체적으로, 멸균한 96-웰 Nunc의 마이크로플레이트에, KB 세포를 5×10^3 세포/웰의 농도로 접종한 다음, 5% CO₂의 37℃ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 pH 6.5의 PBS 배지로 교체한 다음, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 HMSN, 상기 <실시예 2>에서 제조한 CPT-PHMSN, Dox-PHMSN 또는 Dox-CPT-PHMSN을 웰에 처리하고 1 시간 동안 배양하고 신선한 배지로 교체하여, 총 20 시간 동안 배양하면서 공초점 레이저 현미경(Confocal Laser Scanning Microscope)으로 세포를 관찰하였다. 후기 엔도솜(late endosome) 또는 리소솜(lysosome)을 관찰하기 위해 적절한 트래커(tracker)를 첨가하여, 녹색 형광 파장으로 확인하였다. CPT는 청색 형광 파장으로, Dox는 적색 형광 파장으로 확인하였다.

[0178] 그 결과, 도 12에서 나타난 바와 같이 약물을 단독으로 포함하는 CPT-PHMSN 및 Dox-PHMSN를 처리하고 배양한 세포의 경우, 후기 엔도솜의 녹색 형광 신호의 위치와 Dox와 적색 형광과 일치하지 않아, Dox는 초기에 엔도솜에서 탈출하여 세포질 내로 방출할 수 있음을 확인하였고, CPT 역시 배양 개시 8 시간 이후에 방출되어 세포질 내로 분비되는 것을 확인하였다(도 12a). 또한, 리소솜에서 역시 엔도솜과 유사하게, Dox의 방출은 배양 초기에 나타나며 배양 개시 6 시간 이후부터 CPT 또한 리소솜에서 방출되어 세포질 내로 분비되는 것을 확인하였다(도 12b).

[0179] 또한, 도 13에서 나타난 바와 같이 이중-약물을 포함하는 Dox-CPT-PHMSN를 처리하고 배양한 세포에서도 마찬가지로 Dox는 리소솜으로부터 방출되었고, CPT는 배양 개시 6 시간 이후에 방출되는 것을 확인하였다(도 13). 즉, 이를 통하여 PHMSN은 세포 내에 엔도솜 및 리소솜의 형태로 유입되어, pH 변화에 의해 세포질 내로 방출될 수 있음을 확인하였다.

실시예 6

[0181] 약물 내성 암세포에 대한, 이중 약물의 PHMSN의 시너지 효과 확인

[0182] <6-1> Dox 내성의 위암 세포주에 대한 Dox-CPT-PHMSN의 시너지 효과 확인

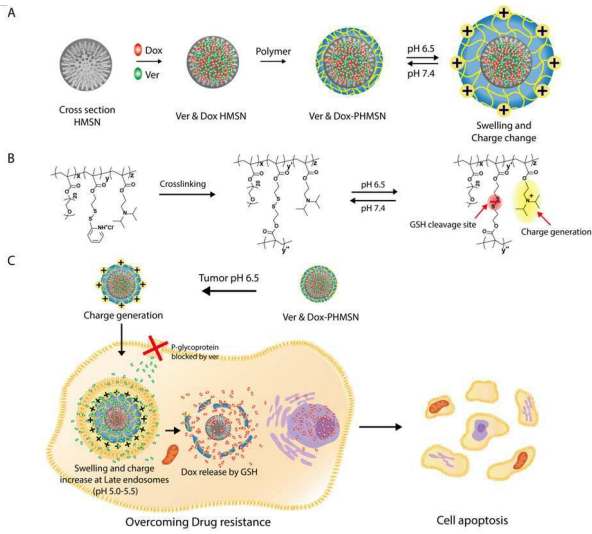
[0183] 암세포에서, MDK(midkine) 단백질을 과발현하는 세포는 Dox, 5-fluorouracil 및 cisplatin과 같은 약물에 대한 내성을 나타낸다. 이에, 본 발명에서는 MDK를 과발현하는 위암 세포에서 Dox에 대한 내성을 극복하기 위해, Dox-HCl 및 CPT의 이중-약물을 담지하는 PHMSN을 사용하여, 약물 내성 위암세포에서 효과적으로 항암 활성을 나타낼 수 있는지 확인하였다.

[0184] 구체적으로, Dox에 대한 내성을 가지는 위암세포주인 SNU-620-ADR/300 세포를 멸균한 96-웰 Nunc(Thermo Fisher Scientific Inc.)의 마이크로플레이트에, 5×10^3 세포/웰의 농도로 접종한 다음, 5% CO₂의 37℃ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 pH 6.5의 PBS 배지로 교체한 다음, free-Dox-HCl, 상기 <실시예 2>에서 제조한 Dox-CPT-PHMSN 또는 Dox-PHMSN을 각각의 웰에 처리하였다. 처리 6 시간 후, PBS 배지를 제거한 후 신선한 RPM 1640 배지로 교체하여 48 시간 동안 추가 배양하였다. 최종적으로 배양 종료 후, Alamar Blue 분석법으로 전체 접종한 세포에 대한 생존 세포의 비율을 확인하여 이를 세포 생존률(%)로 나타내었다. 각 웰당 형광 광도를 측정하는 것은 플레이트 리더기(Tecan Infinite Series, Germany)를 사용하여 자극 파장(excitation wavelength) 565 nm 및 방출 파장(emission wavelength) 590 nm 조건으로 설정하여 확인하였다.

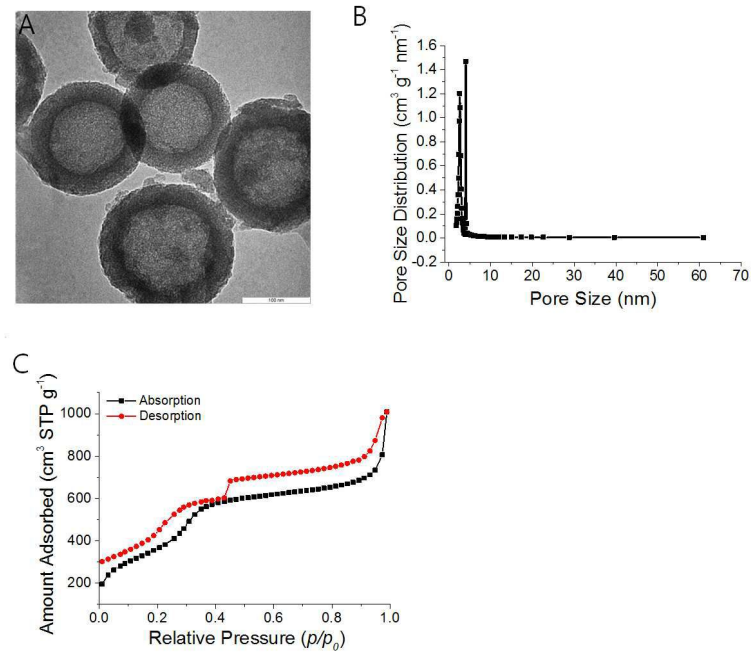
- [0185] 그 결과, 도 14에서 나타난 바와 같이 약물 전달체에 담지되지 않은 Dox 및 PHMSN에 담지된 Dox는 72 시간 동안 배양하여도 MDK에 의한 약물 내성으로 인해 SNU-620-ADR/300 세포에 대하여 낮은 독성을 나타내는 것을 확인하였으나, 이에 비해 CPT-Dox의 이중 약물을 담지한 PHMSN 처리군에서는 처리 농도 의존적으로 세포 생존률이 감소하므로, 유의적인 독성 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 14a). 72 시간 동안 배양한 후, Dox-CPT-PHMSN은 SNU-620-ADR/300 세포주에 대하여 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었다. 상기 값은 CPT-PHMSN 및 Dox-PHMSN이 가지는 각각의 IC_{50} 값인 4.2 및 2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 낮은 수준이므로, Dox-CPT-PHMSN이 Dox 내성의 위암세포에 대하여 유의적으로 증가한 세포 사멸 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0186] 또한, 세포 내로 유입된 약물전달체를 시간의 흐름에 따라 형광현미경 분석한 결과, 1 시간에서 6 시간 동안 시간의 흐름에 따라 세포질 내의 Dox 신호 형광 감도가 점차 증가하였고, CPT의 강도는 일정하게 유지되는 것을 확인하였다(도 14b). 이를 통해, CPT 및 Dox의 이중 약물 투여를 통해 Dox 내성의 위암 세포주에서 유의적인 시너지 효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0188] <6-2> P-glycoprotein 의존적인 약물 내성 암세포주에서 이중-약물의 PHMSN에 의한 암세포 사멸 효과의 확인
- [0189] 암세포에서, 약물에 대한 내성을 나타내기 위해 P-glycoprotein 또는 topoisomerase II와 같은 단백질이 과발현되어 있음이 잘 알려져 있다. 암세포에서 P-glycoprotein이 과발현되는 것은 세포막 바깥으로 약물을 방출시켜서, 세포질 내의 약물 농도를 감소시키고, 이를 통해 항-종양 효과를 감소시킬 수 있다. 따라서, 다제 약물에 대한 내성을 나타내는 암세포주에서, p-glycoprotein의 활성을 억제할 수 있는 칼슘 통로 길항제(calcium channel antagonist)인 Verapamil hydrochloride(Ver)를 본 발명의 PHMSN에 담지하여 세포에 투여하였을 때, 유의적인 항암 효과를 나타낼 수 있는지 여부를 확인하였다.
- [0190] 구체적으로, 먼저 Ver 및 Dox의 이중 약물을 담지한 PHMSN을 제조하였다. 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 HMSN 5 mg을 소수성 Dox 용액(DCM 내에 2.5 mg을 용해함)에 분산시키고 24 시간 동안 실온에서 교반하였다. 24 시간 후, 약물을 담지한 나노입자를 원심분리로 수득하고, 상층액을 분리 보관하여 약물 담지 효율을 확인하기 위하여 사용하였다. 약물을 담지한 나노입자를 진공 건조한 다음, 정제수로 세척하고 동결건조로 보관하였다. 나노입자는 다시 1 ml 정제수에 현탁하고, 2.5 mg의 verapamil hydrochloride(Ver)을 현탁한 반응 용액에 가하여 상온에서 24 시간 동안 교반하였다.
- [0191] 그런 다음, 수득한 이중 약물을 담지한 HMSN에 중합체 게이트키퍼를 코팅하기 위해, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 PEG-PDS-DPA 공중합체 10 mg를 가하여 밤새 추가 교반하였다. 표면을 감싼 공중합체를 가교 결합하기 위해, 상기 교반한 반응액에 dithiothreitol(DTT)를 첨가하고 상온에서 3 시간 동안 교반하였다. 상기 DTT는 공중합체를 구성하고 있는 PDS 기에 대하여 20 mol%의 몰비율로 첨가하였다. 이중 약물을 담지한 PHMSN은 원심분리로 수집한 다음 pH 7.4의 인산염 완충용액 및 증류수로 세척하여, 최종적으로 Ver 및 Dox를 담지한 PHMSN(Ver-Dox-PHMSN)을 수득하였다.
- [0192] 그런 다음, 항암제에 대한 다제 내성을 가지는 암세포주인 MCF-7/ADR 세포를 멸균한 96-웰 Nunc(Thermo Fisher Scientific Inc.)의 마이크로플레이트에, 5×10^3 세포/웰의 농도로 접종한 다음, 5% CO_2 의 37°C 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 pH 6.5의 PBS 배지로 교체한 다음, Ver-CPT-PHMSN; 또는 Dox-CPT-PHMSN 및 5 μM free Ver를 처리하고 48 시간 동안 추가 배양하였다. 배양하면서, Alamar Blue 분석법으로 전체 접종한 세포에 대한 생존 세포의 비율을 확인하여 이를 세포 생존률(%)로 나타내었다. 각 웰당 형광 광도를 측정하는 것은 플레이트 리더기(Tecan Infinite Series, Germany)를 사용하여 자극 파장(excitation wavelength) 565 nm 및 방출 파장(emission wavelength) 590 nm 조건으로 설정하여 확인하였다.
- [0193] 그 결과, 도 15에서 나타난 바와 같이 Ver-Dox-PHMSN에서 Dox의 담지 용량은 최대 21 wt%이고 Ver 담지 용량은 최대 9 wt% 범위로 설정하여, Ver 및 Dox의 담지 비율은 1:2가 되도록 설정하였다. Ver 및 Dox를 함께 담지한 PHMSN은 MCF7/ADR 세포에 대하여 높은 세포 독성을 나타내어, Free Dox를 처리하는 경우와 비교하였을 때 현저하게 암세포에 대한 사멸 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 15c). 또한, Ver-Dox-PHMSN은 MCF-7/ADR 세포에 잘 흡수될 수 있고, 시간의 흐름에 따라 점차 세포질 내의 Dox 농도가 증가하였다(도 15b 및 도 16).

도면

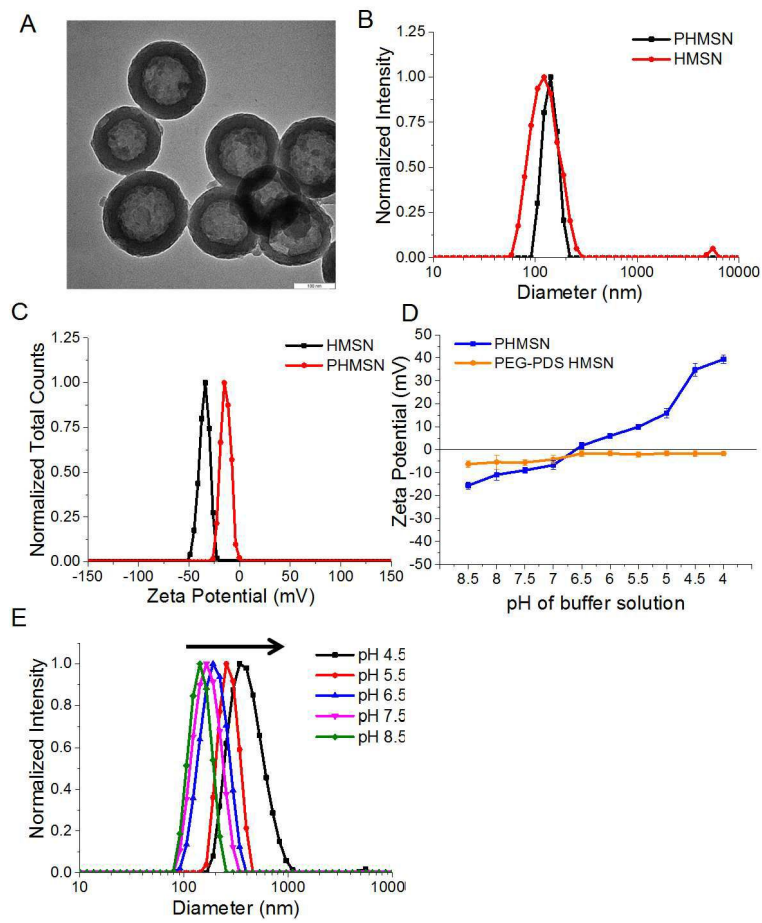
도면1



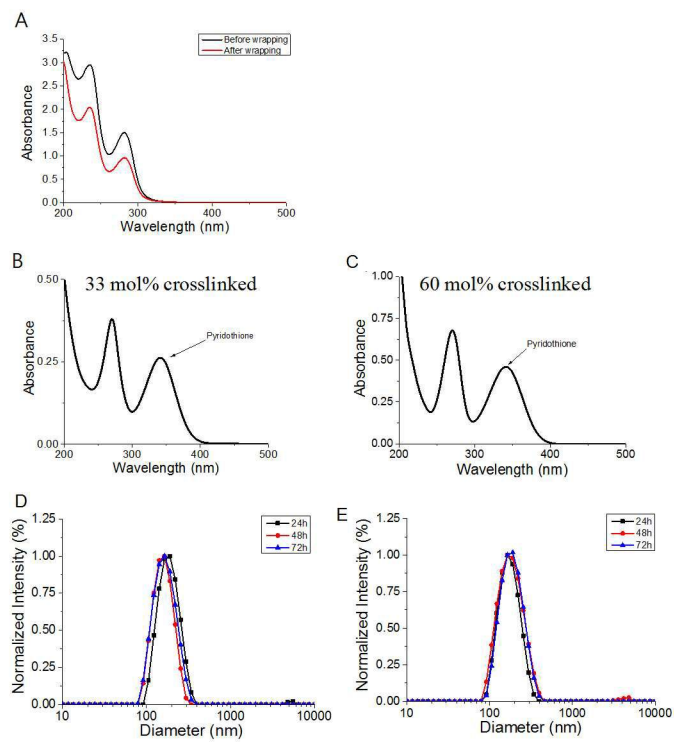
도면2



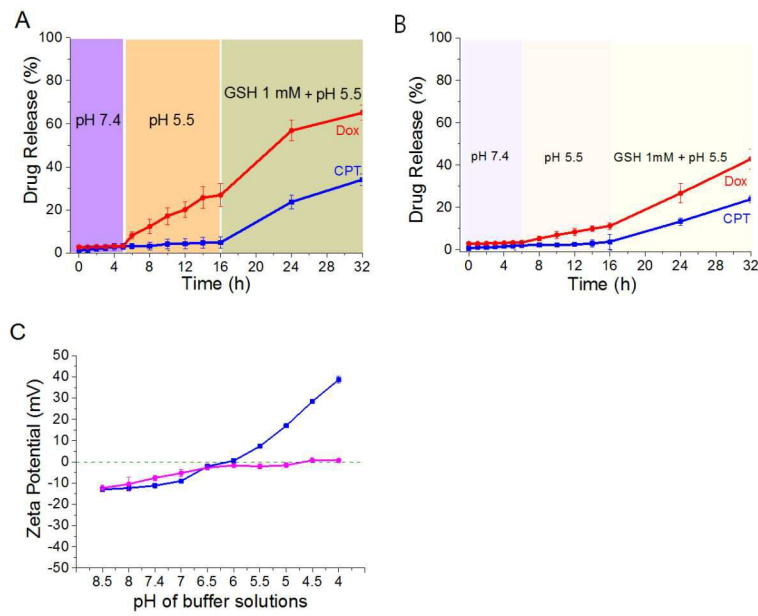
도면5



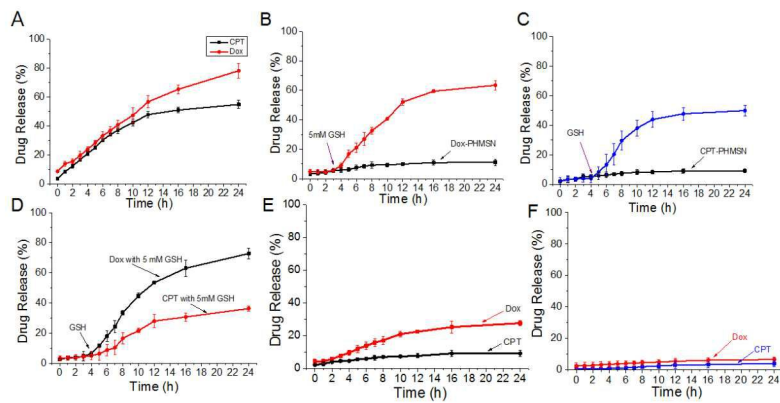
도면6



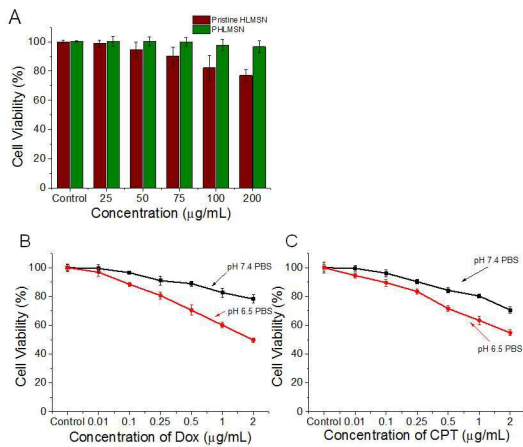
도면7



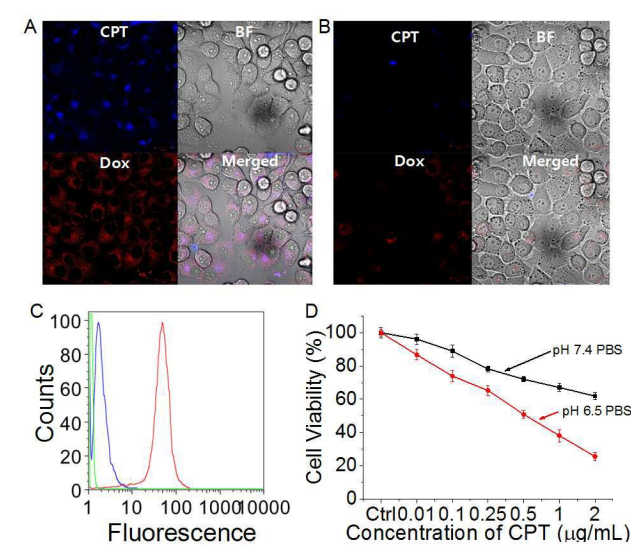
도면8



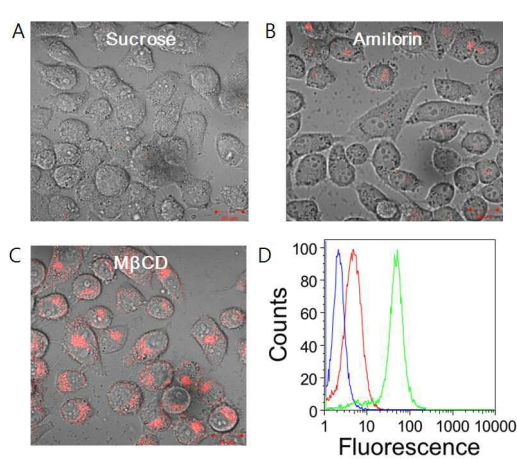
도면9



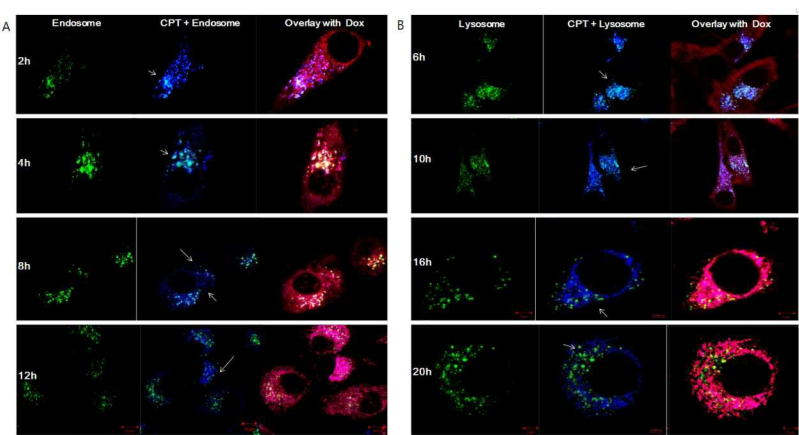
도면10



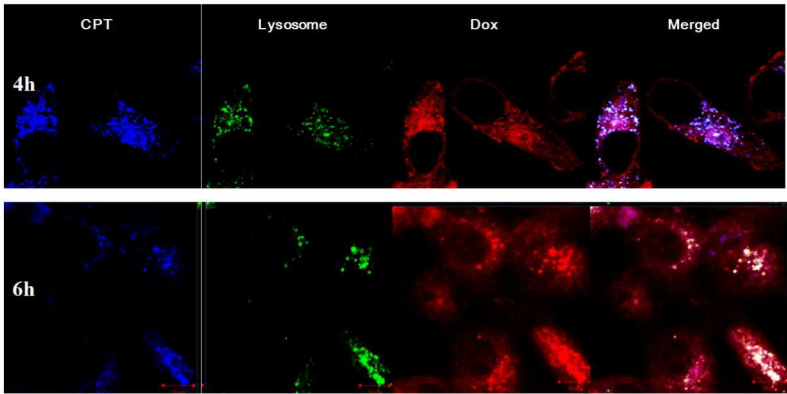
도면11



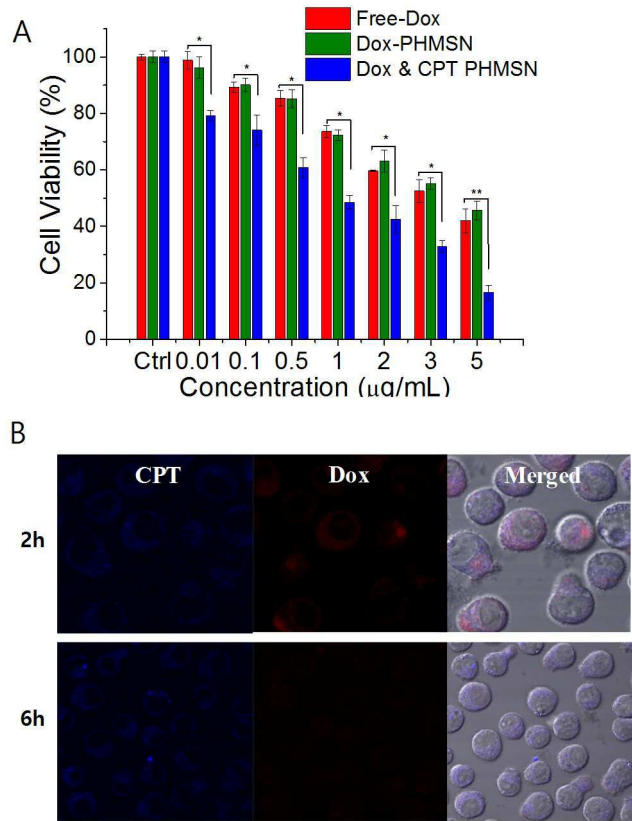
도면12



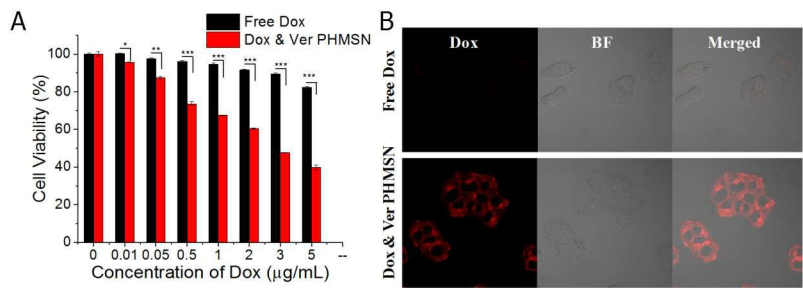
도면13



도면14



도면15



도면16

