(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0142197
(43) 공개일자 2023년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 41/00* (2020.01)
A61K 49/00 (2006.01) *A61K 9/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0009 (2013.01)
A61K 41/0052 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0041138
(22) 출원일자 2022년04월01일
심사청구일자 2022년04월01일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이택승
대전시 유성구 배울2로 78, 611동 2001(관평동 대덕테크노밸리 6단지 운암아파트)
김시현
대전시 유성구 반석동로 33, 504동 802호 (반석동, 반석마을5단지아파트)
(74) 대리인
특허법인 천지

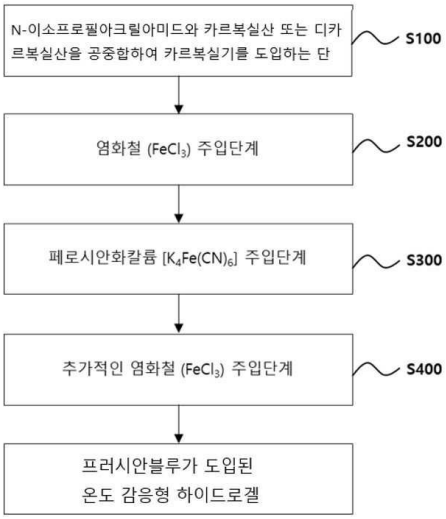
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **온도 감응형 하이드로겔, 적외선 제어 방출형 약물 전달체, 및 그 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 온도 감응형 하이드로겔, 이를 포함하는 약물 또는 염료 전달체, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 상기 온도 감응형 하이드로겔은 표면에 카르복실기가 도입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)에 층상조립을 통해 프러시안 블루를 합성함으로써 제조될 수 있으며, 상기 하이드로겔은 생체적합성이 뛰어난 적외선 제어 방출형 약물 또는 염료의 전달체로 사용될 수 있다. 본 발명의 전달체는 프러시안 블루가 고분자 표면에 층상 조립에 의해 합성됨으로써 프러시안 블루의 도입량이 증대되고, 또한 상기 프러시안 블루의 입자가 용출되는 현상의 방지가 가능하며, 약물뿐만 아니라 다양한 염료들도 방출속도를 제어할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/32 (2013.01)
A61K 49/0073 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

카르복실산 또는 디카르복실산과 공중합된, 말단 및/또는 측쇄에 카르복실기를 포함하는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 및

상기 카르복실기에 화학 결합된 프러시안 블루를 포함하는,

온도 감응형 하이드로겔.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 카르복실산 및 디카르복실산은 아크릴산, 메타크릴산, 말레산, 이타콘산, 및 비닐프로피온산으로 이루어진 군에서 선택되는, 온도 감응형 하이드로겔.

청구항 3

제1항에 기재된 온도 감응형 하이드로겔 및 상기 하이드로겔에 담지된 약물 또는 염료를 포함하는, 약물 또는 염료의 전달체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 약물 또는 염료는 상기 전달체로부터의 방출이 적외선 조사에 의해 제어되는, 약물 또는 염료의 전달체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 적외선 조사는 파장이 700 nm 이상인 적외선을 조사할 수 있는 레이저에 의해 수행되는, 약물 또는 염료의 전달체.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 약물은 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cisplatin), 플루오로우라실(fluorouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(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 적어도 1종의 소분자 약물인, 약물 또는 염료의 전달체.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 염료는 메틸렌 블루(methylene blue) 또는 브릴리안트 크레실 블루(Brilliant cresyl blue)인, 약물 또는 염료의 전달체.

청구항 8

(a) N-이소프로필아크릴아미드와 카르복실산 또는 디카르복실산을 공중합하여 말단 및/또는 측쇄에 카르복실기를 포함하는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 얻는 단계;

(b) 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 염화제이철($FeCl_3$) 용액과 혼합하여 상기 카르복실기에 철(III) 이온을 고정하는 단계;

(c) 상기 철(III) 이온이 고정된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 페로시안화칼륨 [$K_4Fe(CN)_6$] 용액과 혼합하여 프러시안 블루를 합성하는 단계; 및

(d) 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 염화제이철($FeCl_3$) 용액과 2차 혼합하여 페로시안화 이온과 철(III) 이온으로부터 프러시안 블루를 추가로 합성하는 단계를 포함하는,

온도 감응형 하이드로겔의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 카르복실산 및 디카르복실산은 아크릴산, 메타크릴산, 말레산, 이타콘산, 및 비닐프로피온산으로 이루어진 군에서 선택되는, 제조 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 N-이소프로필아크릴아미드와 카르복실산 또는 디카르복실산의 공중합시 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드, N,N'-벤질리덴비스아크릴아미드, N,N-비스아크릴아미드 아세트산, 메틸 N,N'-비스아크릴아미드 아세테이트, 및 에틸 N,N'-비스아크릴아미드 아세테이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 가교제와 함께 반응시키는, 제조 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 N-이소프로필아크릴아미드와 카르복실산 또는 디카르복실산의 양은 12~13 대 1~0.5 몰의 비인, 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 온도 감응형 하이드로겔, 이를 포함하는 적외선 제어 방출형 약물 또는 염료 전달체, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 온도변화에 감응하는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)에 적외선을 흡수하여 광열효과를 가지는 프러시안 블루를 고정시켜 상전이 온도 이하에서는 약물을 비교적 적게 방출하고, 상전이 온도 이상에서는 약물을 비교적 많이 방출하여, 전달체를 필요에 따라 적외선 조사를 통해 제어 방출할 수 있는 특징이 있다.

배 경 기 술

[0002] 광열 치료는 효과적인 치료 기법의 하나로서 광을 조사한 부분에만 치료 효과 가져 최소한의 침입성 때문에 많은 연구가 진행되고 있다. 광열 효과는 광을 조사받게 되면 빛에너지에서 열에너지로 전환시켜주는 효과를 말하고 이는 광열제의 활성에 따라서 달라진다. 그 중 적외선은 높은 투과성을 가지고 있고 진동수가 적은 만큼 파장이 길어서 물질에 닿으면 흡수가 잘된다는 장점이 있다. 따라서 많은 광열제들이 광열 치료를 위해 사용되고 있다. 그 예시로 산화철, 금 나노입자, 비스무트, 이황화 몰리브덴 등이 있으나 상기 광열제들은 생체 적합성이 낮고, 체내에서 잘 빠져나오지 않고 축적되며 독성을 보인다는 단점이 있다.

[0003] 본 발명에서는 적외선을 흡수하여 광열 효과가 있는 프러시안 블루를 사용하였다. 프러시안 블루는 짙은 청색 안료이며, 적외선 영역의 빛을 흡수하여 열을 발생시키고, 미국 식품의약품정에서 인정한 생체적합성 물질이기 때문에 광열 항암 치료, 광열 항박테리아 치료 등에 활용된다.

[0004] 또한, 광열 치료 효과의 향상을 위해 온도 감응성 고분자를 복합 후, 약물을 고분자 안에 담지시켜서 광열과 약물치료 효과의 시너지를 활용하여 암세포를 더욱 효과적으로 사멸시킬 수 있다. 상기 광열제와 복합시킬 수 있

는 온도 감응성 물질 중 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)가 있으며 체온과 비슷한 범위(약 32 ~ 35 É에서 저임계용액온도를 가진다.

[0005] 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)는 수용액상에서 저임계용액온도(Lower critical solution temperature, 이하 LCST) 이하에서는 친수성을 가져 확장된 사슬형태로 완전히 수화되나 LCST 이상에서는 소수성을 가져 탈수화되는 특징이 있다. 이러한 성질을 가지는 이유는 고분자 사슬내에 친수성기와 소수성기가 둘 다 존재하는데 LCST 이하에서는 친수성기가 물 분자와 상호작용하여 수화 상태에 있지만 LCST 이상에서는 N-이소프로필아미노 치환기끼리 상호작용을 하므로 탈수화 상태가 된다.

[0006] 따라서, 본 발명에서는 광열 효과와 생체적합성을 가지는 프러시안 블루와 신체온도 범위에서 온도 감응성을 나타내는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 복합화하여 적외선 조사 때문에 담지된 약물을 방출하는 약물 전달체를 제시하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 기존에 언급했던 광열 재료의 한계점인 낮은 생체적합성, 체내축적 및 독성의 문제, 결합 안정성을 보다 향상시키고 광열 치료의 효과를 높이기 위하여 온도 감응성 고분자인 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)와 복합함으로써 하이드로겔을 제조하고 상기 하이드로겔에 약물 또는 염료를 담지하여 적외선 제어 방출을 가능하게 만든 약물 또는 염료의 전달체, 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해서 본 발명의 일 양태에 따르면, 카르복실산 또는 디카르복실산과 공중합된, 말단 및/또는 측쇄에 카르복실기를 포함하는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 및 상기 카르복실기에 화학 결합된 프러시안 블루를 포함하는, 온도 감응형 하이드로겔이 제공된다.

[0009] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 카르복실산 및 디카르복실산은 아크릴산, 메타크릴산, 말레산, 이타콘산, 및 비닐프로피온산으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 전술한 온도 감응형 하이드로겔 및 상기 하이드로겔에 담지된 약물 또는 염료를 포함하는, 약물 또는 염료의 전달체가 제공된다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 약물 또는 염료는 상기 전달체로부터의 방출이 적외선 조사에 의해 제어될 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 적외선 조사는 파장이 700 nm 이상인 적외선을 조사할 수 있는 레이저에 의해 수행될 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 약물은 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cisplatin), 플루오로우라실(fluorouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(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 적어도 1종의 소분자 약물일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 염료는 메틸렌 블루(methylene blue) 또는 브릴리안트 크레실 블루(Brilliant cresyl blue)일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또다른 일 양태에 따르면, (a) N-이소프로필아크릴아미드와 카르복실산 또는 디카르복실산을 공중합하여 말단 및/또는 측쇄에 카르복실기를 포함하는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 얻는 단계; (b) 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 염화제이철($FeCl_3$) 용액과 혼합하여 상기 카르복실기에 철(III) 이온을 고정하는 단계; (c) 상기 철(III) 이온이 고정된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 페로시안화칼륨 [$K_4Fe(CN)_6$] 용액과 혼합하여 프러시안 블루를 합성하는 단계; 및 (d) 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 염화제이철($FeCl_3$) 용액과 2차 혼합하여 페로시안화 이온과 철(III) 이온으로부터 프러시안 블루를 추가로 합성하는 단계를 포함하

는, 온도 감응형 하이드로겔의 제조 방법이 제공된다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 카르복실산 및 디카르복실산은 아크릴산, 메타크릴산, 말레산, 이타콘산, 및 비닐프로피온산으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 (a) 단계에서 상기 N-이소프로필아크릴아미드와 카르복실산 또는 디카르복실산의 공중합시 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드, N,N'-벤질리덴비스아크릴아미드, N,N-비스아크릴아미드 아세트산, 메틸 N,N'-비스아크릴아미드 아세테이트, 및 에틸 N,N'-비스아크릴아미드 아세테이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 가교제와 함께 반응시킬 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 (a) 단계에서 상기 N-이소프로필아크릴아미드와 카르복실산 또는 디카르복실산의 양은 12~13 대 1~0.5 몰의 비일 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 온도 감응형 하이드로겔은 고분자 주쇄에 아크릴산과 같은 카르복실산 또는 디카르복실산의 카르복실기가 도입되어 프러시안 블루의 전구체인 Fe(III) 이온과 페로시안화 이온 $[(Fe(CN)_6]^{4-}$과의 결합을 증대시켜 프러시안 블루의 도입량을 더욱 증진함으로써 광열 효과가 증대되는 효과를 갖는다. 또한, 상기 온도 감응형 하이드로겔을 포함하는 약물 또는 염료의 전달체는 상기 고분자 주쇄에 프러시안 블루가 화학적으로 결합되어 적외선 조사과정에서 상기 프러시안 블루가 용출되어 소모되는 것을 방지할 수 있다. 그리고 본 발명에 따른 적외선 제어 방출형 전달체는 모두 생체친화적 재료로 제조됨으로써, 높은 생체안정성을 나타낸다. 그리고 본 발명에 따른 하이드로겔은 크기가 매우 작기 때문에 세포에 침투도 잘되고, 친수성을 갖기 때문에 수분산성이 우수하고, 이에 따라 친수성 약물 방출에 유용하게 적용할 수 있는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명에 따른 온도 감응형 하이드로겔의 제조방법에 대한 흐름도이다.

도 2는 본 발명에 따른 온도 감응형 하이드로겔의 제조방법의 공정도이다.

도 3은 본 발명에 따른 온도 감응형 하이드로겔의 제조방법의 공정도이다.

도 4는 본 발명에 따른 적외선 제어 방출형 약물 또는 염료의 전달체가 적외선을 받았을 때 생기는 형태 변환을 나타내는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한, 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다. 도면들에 있어서, 예를 들면, 제조 기술 및/또는 공차(tolerance)에 따라, 도시된 형상의 변형들이 예상될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 도시된 영역의 특정 형상에 제한된 것으로 해석되어서는 아니 되며, 예를 들면 제조상 초래되는 형상의 변화를 포함하여야 한다.

[0023] **온도 감응형 하이드로겔 및 이를 포함하는 약물 또는 염료의 전달체**

[0024] 본 발명의 일 양태에 따르면, 카르복실산 또는 디카르복실산과 공중합된, 말단 및/또는 측쇄에 카르복실기를 포함하는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드); 및 상기 카르복실기에 화학 결합된 프러시안 블루;를 포함하는, 온도 감응형 하이드로겔이 제공된다.

[0025] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 전술한 온도 감응형 하이드로겔 및 상기 하이드로겔에 담지된 약물 또는 염료를 포함하는, 약물 또는 염료의 전달체가 제공된다.

[0027] 상기 프러시안 블루는 적외선 영역의 빛을 흡수하여 열을 발생시키는 생체적합성 물질이다. 한편, 상기 폴리

(N-이소프로필아크릴아미드)는 온도 감응성 고분자로서 체온과 비슷한 범위(약 32 ~ 35℃에서 저임계용액온도(Lower critical solution temperature, 이하 LCST)를 가진다.

[0028] 이에, 상기 프러시안 블루가 도입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 하이드로겔은 적외선 조사에 따라 프러시안 블루의 광열 효과로 빛에너지를 열에너지로 전환시켜주고, 그 전환된 열에너지에 의해 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 하이드로겔이 LCST 거동을 일으켜 수축하게 된다. 이 때 상기 하이드로겔이 약물 또는 염료 등을 담지하고 있으면 수축 과정에서 담지된 물질이 방출될 수 있게 한다. 구체적으로, 본 발명에 따른 하이드로겔에 약물을 담지하고, 그 후 적외선을 조사하지 않았을 때에는 상기 약물을 방출하지 않다가, 적외선을 조사하면 상기 하이드로겔이 수축하면서 담지하고 있던 약물을 방출하게 된다.

[0029] 본 발명에서는 N-이소프로필아크릴아미드를 카르복실산 또는 디카르보실산과 공중합하여 말단 및/또는 측쇄에 카르복실기를 도입한 공중합체를 합성하고, 상기 카르복실기를 링커로 하여 프러시안 블루를 화학 결합하여 적외선에 의해 제어가능한 온도 감응형 하이드로겔을 제공한다. 프러시안 블루가 카르복실기 링커를 통해 고분자에 화학 결합하고 있으므로, 후술하는 바와 같이 약물 또는 염료의 도입량이나 방출 유지 특성 등이 우수해지는 효과가 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 카르복실기의 도입을 위해 사용될 수 있는 상기 카르복실산 및 디카르복실산은 비닐기와 같은 불포화 관능기를 추가로 더 포함하는 것이 바람직하며, 예를 들어 아크릴산, 메타크릴산, 말레산, 이타콘산, 및 비닐프로피온산으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0032] 한편, 전술한 바와 같이 상기 온도 감응형 하이드로겔 및 상기 하이드로겔에 담지된 약물 또는 염료를 포함하는 약물 또는 염료의 전달체에서 상기 약물 또는 염료의 방출은 적외선 조사에 의해 제어된다.

[0033] 또한, 상기 적외선 조사는 파장이 700 nm 이상, 예를 들어 800 nm 이상인 적외선을 조사할 수 있는 광원, 예를 들어 레이저에 의해 수행될 수 있다. 특히, 복사에너지가 1 W/cm^2 이며, 파장(λ)이 808 nm 이상인 적외선을 조사할 수 있는 레이저를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0034] 본 발명의 온도 감응형 하이드로겔을 포함하는 적외선 제어 방출형 약물 또는 염료의 전달체는 도 4에 도시된 바와 같이 약물 또는 염료를 담지하고, 적외선 조사에 의해 상기 약물 또는 염료를 방출할 수 있다.

[0035] 본 발명의 온도 감응형 하이드로겔을 포함하는 적외선 제어 방출형 전달체는 약물뿐만이 아니라 염료등도 담지 및 방출이 가능하다.

[0036] 본 발명의 온도 감응형 하이드로겔을 포함하는 전달체에 담지 및 방출될 수 있는 약물의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 항암제, 항생제, 심혈관계 약물, 신경계 약물, 위장관계 약물, 호르몬제 등을 들 수 있다.

[0037] 상기 항암제로는 예를 들어 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cisplatin), 플루오로우라실(fluorouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(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 적어도 1종의 소분자 약물을 들 수 있다.

[0038] 본 발명의 온도 감응형 하이드로겔을 포함하는 전달체에 담지 및 방출될 수 있는 염료의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 메틸렌 블루 (methylene blue, 이하, MB), 브릴리안트 크레실 블루(Brilliant cresyl blue) 등을 들 수 있다.

[0039] 상기와 같은 약물 및 염료를 본 발명의 하이드로겔에 도입하여 전달체를 제조하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 적절한 용매 내에서 하이드로겔 및 상기 약물 또는 염료를 함께 혼합하는 방법을 들 수 있다.

[0040] 또한, 상기 본 발명의 약물 전달체가 적용될 수 있는 질병의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 담도암, 결장암, 및/또는 자궁경부암 등을 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 약물 전달체의 용도는 상기 질병에 한정되지 않고, 내부에 함유되는 약물을 다양하게 조절하여, 각종 용도로 사용될 수 있다.

[0042] **온도 감응형 하이드로겔의 제조방법**

[0043] 본 발명의 온도 감응형 하이드로겔의 제조방법은 도 1에 표시된 바와 같이, N-이소프로필아크릴아미드와 카르복실산 또는 디카르복실산을 공중합하여 말단 및/또는 측쇄에 카르복실기를 포함하는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 얻는 단계 (S100); 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 염화제이철($FeCl_3$) 용액과 혼합하여 상기 카르복실기에 철(III) 이온을 고정하는 단계(S200); 상기 철(III) 이온이 고정된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 페로시안화칼륨 [$K_4Fe(CN)_6$] 용액과 혼합하여 프러시안 블루를 합성하는 단계(S300); 및 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 염화제이철($FeCl_3$) 용액과 2차 혼합하여 미반응 페로시안화 이온과 철(III) 이온으로부터 프러시안 블루를 추가로 합성하는 단계(S400)를 포함한다.

[0045] 또한 제조방법은 크게, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 공중합체 제조와, 층상조립을 통한 프러시안 블루의 도입 단계로 구성될 수 있다.

[0047] 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 공중합체의 제조

[0048] 본 발명에 따른 온도 감응형 하이드로겔을 제조하기 위해 도2에 제 1단계에서는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드(PNIPAAm)의 단량체인 N-이소프로필아크릴아미드 (이하 NIPAAm)과 카르복실산 또는 디카르복실산을 함께 공중합한다(S100).

[0049] 상기 카르복실산 및 디카르복실산은 비닐기와 같은 불포화 관능기를 추가로 더 포함하는 것이 바람직하며, 예를 들어 아크릴산, 메타크릴산, 말레산, 이타콘산, 및 비닐프로피온산으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0050] 상기 N-이소프로필아크릴아미드, 및 카르복실산 또는 디카르복실산 이외에도 가교제를 더 첨가하여 공중합을 실시할 수 있다. 상기 가교제로는 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드(N,N'-methylenebisacrylamide, 이하 BIS), N,N'-벤질리덴비스아크릴아미드, N,N-비스아크릴아미드 아세트산, 메틸 N,N'-비스아크릴아미드 아세테이트, 에틸 N,N'-비스아크릴아미드 아세테이트 등을 들 수 있다.

[0051] 또한, 상기 N-이소프로필아크릴아미드, 및 카르복실산 또는 디카르복실산 이외에도 계면활성제 및 개시제를 더 첨가하여 공중합을 실시할 수 있다. 상기 계면활성제로는 황산도데실나트륨(sodium dodecyl sulfate, 이하 SDS)를 들 수 있고, 상기 개시제로는 과황산암모늄(ammonium persulfate, 이하 APS)을 들 수 있다.

[0052] 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 공중합체는, 예를 들어, NIPAAm, 카르복실산 또는 디카르복실산, 가교제인 BIS, 계면활성제 SDS를 넣고 교반한 뒤, 예를 들어 70℃에서, 개시제인 APS를 이용하여, 예를 들어 4시간 동안, 공중합시켜 카르복실기를 도입함으로써 제조될 수 있다.

[0053] 이때 상기 공중합체의 제조에 사용되는 NIPAAm 과 카르복실산 또는 디카르복실산의 양은 12~13 대 1~0.5 몰의 비일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 NIPAAm 과 카르복실산 또는 디카르복실산과 가교제의 양은 12~13 대 1~0.5 대 0.1 내지 0.3 몰의 비일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, NIPAAm, 카르복실산 또는 디카르복실산, 가교제, 계면활성제, 개시제의 양은 각각 12 내지 13 (예를 들어 12.64) : 1 내지 0.5 (예를 들어 0.70) : 0.1 내지 0.3 (예를 들어 0.18) : 1 : 0.9 내지 1.5 (예를 들어 1.19) 몰의 비일 수 있으나, 그 양이 특별히 이와 같이 제한되는 것은 아니다.

[0055] 층상조립(layer-by-layer assembly)을 통한 PB의 도입

[0056] 상기와 같이 카르복실기가 도입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 공중합체 (하이드로겔)은 이후에 층상조립(layer-by-layer assembly)을 통해 프러시안 블루(PB)를 도입하게 된다.

[0057] 상기 층상조립(Layer-by-Layer Assembly)은 인접한 구성층 사이의 계면에서 작용기들의 상호작용을 기반으로 견고한 다층 박막을 제작할 수 있으며, 화학적 조절을 손쉽게 가능하게 하는 효과적인 방법이다. 또한, 구조적으로 안정하고 박막을 형성하고자 하는 표면의 크기나 형태와 관계없이 다층의 초박막을 형성할 수 있다.

[0059] 상기 PB를 구조 내로 도입하기 위해 도 3에 도시된 바와 같이 카르복실기기가 도입된 공중합체 하이드로겔을 $FeCl_3$ 수용액에 침지시켜, 예를 들어 12시간 동안 상온에서, 교반한다. 상기와 같이 카르복시기 치환기로 개질된 공중합체 하이드로겔을 $FeCl_3$ 수용액에 침지함으로써, 상기 공중합체 하이드로겔에 먼저 도입된 카르복실산 또는 디카르복실산의 구조에 포함된 카르복실기와 $FeCl_3$ 수용액의 Fe(III) 이온과 배위결합을 형성하게 된다.

[0060] 상기와 같이 Fe(III)이온이 배위결합된 개질된 하이드로겔은 이후에 헥사시아노퍼레이트(II) 트리하이드레이트(potassium hexcaynofetrrate(II) trihydrate) 수용액에 첨가하여. 예를 들어 상온에서 2 시간 동안, 교반하면 MSF의 표면에 도입된 Fe(III) 이온과 페로시안화 이온이 반응하여 PB를 합성하면서 상기 MSF의 표면에 PB층(Layer)를 형성하게 된다.

[0061] 상기와 같이 표면에 PB층이 형성된 하이드로겔을 원심분리기를 이용하여 예를 들어 10분간 14,000 rpm으로, 회수한 뒤, 다시 $FeCl_3$ 수용액에 침지하면 하이드로겔의 표면에 존재하는 미반응 페로시안화 이온과 Fe(III) 이온과 결합하여 PB가 추가로 형성하게 된다.

[0062] 상기와 같이 표면에 PB층이 형성된 하이드로겔을 $FeCl_3$ 수용액에 다시 침지함으로써 층상조립에 의해 PB의 도입량을 더욱 증진함으로써 광열 효과에 증대에 따른 광열 치료 효율의 향상시킨다.

[0064] 이하, 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 살펴본다. 그러나 본 발명은 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

[0066] **(제조예 1) 온도 감응형 고분자 약물전달체 P(NIPAAm-co-AAc) 하이드로겔의 제조**

[0067] 100 mL 3구 플라스크에 N-이소프로필아크릴아미드(NIPAAm) 1.43 g과 가교제인 BIS 27 mg 및 계면활성제인 도데실황산나트륨(SDS) 288 mg을 3차 증류수 95 mL에 용해시키고 30분 도안 초음파 처리하여 완전히 용액으로 만든다. 이후에 상기 용액을 교반하에 70℃까지 승온시키는 1시간 동안 아르곤 기체로 퍼징(Purging)시킨다. 그 다음 마이크로피펫으로 아크릴산(AAc) 51 mg을 가열된 상기 용액에 첨가한다. 첨가 후, 개시제인 과황산암모늄(APS) 272 mg을 3차 증류수 5 mL에 녹인 뒤, 가열된 상기 용액에 첨가하여 4시간 동안 반응을 진행시킨다. 반응 후, 반응 혼합물을 여과하여 임의의 큰 응집물을 제거한다. 그런 다음, 여과액을 3차 증류수 100 mL로 수세한 뒤 25℃에서 14,000 rpm의 속도로 원심분리하여 미반응 단량체와 올리고머(oligomer) 등을 제거한다.

[0068] 상기와 같이 회수된 온도 감응형 P(NIPAAm-co-AAc) 하이드로겔을 3차 증류수에 100 mL에 분산시켜 5회 세척한다. 최종적으로, 생성된 침전물에 3차 증류수 30 mL를 첨가하여 동결건조시켜서 온도 감응형 P(NIPAAm-co-AAc) 하이드로겔을 제조하였다.

[0070] **(제조예 2) PB 도입**

[0071] 제조예 1에서 제조된 P(NIPAAm-co-AAc) 하이드로겔 (이하 microgel) 0.1 g을 $FeCl_3$ 수용액(100 mM) 20 mL에 12시간 동안 교반한다. 상기 반응의 종료 후 Fe(III) 이온이 배위 결합된 microgel를 원리분리해낸 뒤, 헥사시아노퍼레이트(II) 트리하이드레이트의 수용액(50 mM) 20 mL에 Fe(III) 이온이 배위 결합된 microgel를 2시간 동안 침지하여 PB를 형성시켜 PB가 도입된 micrgel을 제조하였다. 상기 제조예2로 만들어진 층상조립으로 만들지 않은 microgl@PB의 PB 도입량은 10.1 wt%이다.

[0073] **(제조예 3) 층상조립(layer-by-layer assembly)을 통한 PB의 도입**

[0074] 본 발명에 따른 PB의 추가적인 도입을 위하여 제조예 2에서 제조된 약물전달체를 $FeCl_3$ 수용액 용액(100 mM) 20 mL에 다시 30분 동안 침지하여 PB의 완전한 형성을 유도하였다. 그 다음 25℃에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 및 세척을 3회 반복하여 층상조립을 통한 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체(microgel@PB)를 제조하였다. 상기 제조예3로 만들어진 층상조립으로 만든 microgl@PB의 PB 도입량은 27.3 wt%이다.

[0076] **(비교예 1) 아크릴산이 없는 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체**

[0077] 100 mL 3구 플라스크에 NIPAAm 1.43 g과 가교제인 BIS 27 mg 및 계면활성제인 SDS 288 mg을 3차 증류수 95 mL에 용해시키고 30분 동안 초음파 처리하여 완전히 용액으로 만든다. 이후에 상기 용액을 교반하에 70℃까지 승온시키는 1시간 동안 아르곤 기체로 퍼징(Purging)시킨다. 그 다음 개시제인 APS 272 mg을 3차 증류수 5 mL에 녹인 뒤, 가열된 상기 용액에 첨가하여 4시간 동안 반응을 진행시킨다. 반응 후, 반응 혼합물을 여과하여 임의의 큰 응집물을 제거한다. 그런 다음, 여과액을 3차 증류수 100 mL로 수세한 뒤 25℃에서 14,000 rpm의 속도로 원심분리하여 미반응 단량체와 올리고머(oligomer) 등을 제거한다.

[0078] 상기와 같이 회수된 온도 감응형 P(NIPAAm-co-AAc) 하이드로겔을 3차 증류수에 100 mL에 분산시켜 5회 세척한다. 최종적으로, 생성된 침전물에 3차 증류수 30 mL를 첨가하여 동결건조시켜서 아크릴산이 없는 온도 감응형 PNIPAAm 하이드로겔을 제조하였다.

[0079] 상기와 같이 제조된 PNIPAAm hydrogel 0.1 g을 $FeCl_3$ 수용액(100 mM) 20 mL에 12 시간 동안 교반한다. 상기 반응의 종료 후 Fe(III) 이온이 배위 결합된 microgel를 원심분리해낸 뒤, 헥사시아노퍼레이트(II) 트리하이드레이트의 수용액(50 mM) 20 mL에 Fe(III) 이온이 배위 결합된 microgel를 2시간동안 침지하여 PB를 형성시켜 PB가 도입된 micrgel을 제조하였다.

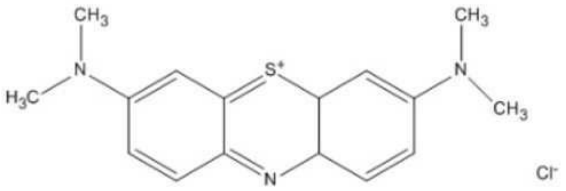
[0080] 본 발명에 따른 PB의 추가적인 도입을 위하여 제조예 2에서 제조된 약물전달체를 $FeCl_3$ 수용액(100 mM) 20 mL에 다시 30분 동안 침지하여 PB의 완전한 형성을 유도하였다. 그 다음 25℃에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리 및 세척을 3회 반복하여 층상조립을 통해 아크릴산이 없는 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체(hydrogel@PB)를 제조하였다.

[0082] 이하에서는 상기 제조예에 의해 제조된 본 발명의 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체(microgel@PB)와 비교예에 의해 제조된 아크릴산이 없는 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체(hydrogel@PB)를 이용하여 염료담지와 방출 및 약물담지와 방출 실험을 진행하였다.

[0084] **(실시예 1) 염료 담지 평가**

[0085] Microgel@PB 가 염료 전달 능력이 있는지 확인하기 위하여 상업적으로 구매할 수 있는 염료인 아래의 <화학식 1>과 같은 메틸렌블루(MB) 수용액을 1000 ppm의 농도로 제조한 뒤, 20 mL 바이알에 MB 수용액 10 mL씩 넣고 제조예 3에서 제조한 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체 10 mg을 상기 염료용액에 넣어 24시간 교반하여 담지시켰다.

[0086] <화학식 1>

[0087] 

[0088] 상기 microgel@PB에 담지된 염료의 양은 교반 전과 교반 후의 MB 염료용액의 흡수스펙트럼으로 측정하였고, 담지 효율(%)과 담지율(%)은 아래의 <식 1>과 <식 2>를 이용하여 계산하였다.

[0089] MB 염료의 최대흡수파장은 666 nm이다.

$$\text{담지 효율(\%)} = \frac{\text{초기 염료 용액의 염료 무게 - 담지 후 남아있는 염료의 무게}}{\text{초기 염료 용액의 염료 무게}} \times 100 \cdots\cdots \text{<식 1>}$$

$$\text{담지율(\%)} = \frac{\text{총 담지된 염료의 무게}}{\text{적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체의 무게}} \times 100 \cdots\cdots \text{<식 2>}$$

[0091]

[0093] **(비교 실시예 1)**

[0094] 비교 실시예 1은 상기 비교예1에서 제조한 hydrogel@PB 를 이용하여 실시예 1과 동일한 조건 하에서 실험하였다. 실시예 1과 비교실시예 1에서 수행한 염료 담지결과는 다음 표 1과 같다.

표 1

[0096]

	메틸렌블루 (MB)	
	담지 효율 (%)	담지율 (%)
실시예 1	65.9	65.9
비교실시예 1	11.4	11.4

[0098] 표 1로부터 본 발명에 따른 microgel@PB의 경우에 hydrogel@PB 보다 더 높은 담지 효율(%)과 담지율(%)로 염료가 담지되는 것을 알 수 있다.

[0100] **(실시예 2) 염료가 담지된 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체의 온도에 따른 염료 방출 평가**

[0101] 온도에 따른 LCST 거동을 확인하기 위해 20 mL 바이알에 PBS (pH=7.4) 8 mL를 넣고, 상기 실시예1에 의해 MB가 담지된 microgel@PB (0.1 wt%) 2 mL 분산액을 투석 튜브(분획 분자량 124,000)에 넣는다. 그리고 그 투석 튜브를 20 mL 바이알에 넣고 각각 25℃와 45℃에서 2시간 동안 염료 방출실험을 진행한다. 이때 microgel@PB로부터 방출되는 염료의 양은 염료가 녹아있는 용액의 흡수 스펙트럼으로 측정하였고, 아래의 <식 3>에 의거하여 염료의 방출량(%)을 계산하였다.

$$\text{염료의 방출량(\%)} = \frac{\text{방출된 염료의 무게}}{\text{담지된 염료의 무게}} \times 100 \cdots\cdots \text{<식 3>}$$

[0102]

[0104] **(비교 실시예2)**

[0105] 비교실시예 2는 상기 비교예1에서 제조한 hydrogel@PB를 이용하여 실시예 2와 동일한 조건하에서 실험하였다. 실시예 2와 비교실시예2에서 수행한 MB 염료의 방출량(%) 결과는 다음 표 2와 같다.

표 2

[0107]

	MB 염료의 방출량(%)	
	25℃	45℃
실시예 2	35.0	69.2
비교실시예 2	3.50	8.05

[0109] 표2의 실시예 2를 살펴보면, 본 발명에 따른 microgel@PB의 경우에는 45℃에서 LCST거동에 따른 70%에 가까운

염료를 방출하는 것으로 나타낸다.

[0110] 또한, 표 2의 비교실시예 2의 경우에는 hydrogel@PB의 경우에는 LCST이상에서도 방출되는 염료의 방출량(%)이 매우 적은 것을 알 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 microgel@PB 더 많은 염료를 담지하였기 때문에 더 많은 염료를 방출하는 것을 확인하였다. 또한, 25℃ 보다 45℃에서 LCST거동에 의한 약물전달체의 수축으로 인해 더 많은 염료를 방출하는 것을 확인하였다.

[0112] **(실시예 3) 염료가 담지된 micrgoel@PB의 적외선 제어 염료 방출 평가**

[0113] 20 mL 바이알에 PBS (pH=7.4) 8 mL를 넣고, 상기 실시예1에 의해 MB가 담지된 microgel@PB (0.1 wt%) 2 mL 분산액을 투석 튜브 (분획 분자량 124,000)에 넣는다. 그리고 그 투석 튜브를 20 mL 바이알에 첨가한다. 이후에 808 nm의 파장을 가지는 레이저를 바이알과 5 cm 떨어진 거리에서 1 W/cm^2의 에너지로 2 시간 동안 방출실험을 진행 후 MB염료의 방출량(%)을 계산하였다. 결과는 다음 표 3와 같다.

[0115] **(비교 실시예 3)**

[0116] 20 mL 바이알에 PBS (pH=7.4) 8 mL를 넣고, 상기 실시예 1에 의해 MB가 담지된 microgel@PB (0.1 wt%) 2 mL 분산액을 투석 튜브 (분획분자량 124,000)에 넣는다. 그리고 그 투석 튜브를 20 mL 바이알에 첨가한다. 이후에 적외선을 조사하지 않는 상태에서 2시간 동안 단순 교반후 MB 염료의 방출량(%)을 계산하였다. 실시예 3과 비교실시예 3에서 수행한 결과는 다음 표 3와 같다.

표 3

[0118]

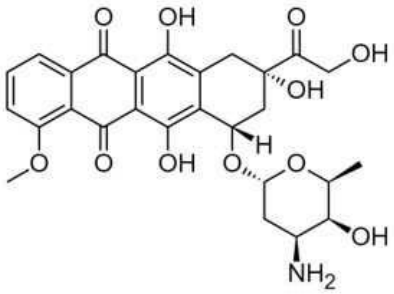
	염료의 방출량 (%)
실시예 3	63%
비교실시예 3	35%

[0120] 표 3의 실시예 3에서 방출량이 비교실시예 3보다 2배에 가까운 염료를 방출하는 것을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 micrgel@PB가 적외선의 조사와 함께 염료전달 분야에 유용하게 응용할 수 있음을 확인하였다.

[0122] **(실시예 4) 약물이 담지된 microgel@PB의 약물담지 평가**

[0123] 본 발명의 microgel@PB의 약물 전달 능력을 평가하기 위하여 아래의 <화학식 2>와 같은 독소루비신(Doxorubin, 이하 Dox)과 같은 수용액을 500 ppm의 농도로 제조한 뒤, 20 mL 바이알에 Dox 수용액 10 mL씩 넣고 제조예 3에서 제조한 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체 10 mg을 상기 약물용액에 넣어 24시간 교반하여 담지시켰다.

[0125] <화학식 2>

[0126] 

[0127] 담지된 약물의 양은 교반 전과 교반 후의 약물의 흡수 스펙트럼으로 측정하여 평가하였고, 담지 효율(%)과 담지율(%)은 하기 <식 4>와 <식 5> 를 통해서 계산하였다.

[0128] 이때 Dox의 최대흡수파장은 480 nm이다.

$$\text{담지 효율(\%)} = \frac{\text{초기 약물 용액의 약물 무게 - 담지 후 남아있는 약물의 무게}}{\text{초기 약물 용액의 약물 무게}} \times 100 \cdots\cdots \text{<식 4>}$$

[0130]
$$\text{담지율(\%)} = \frac{\text{총 담지된 약물의 무게}}{\text{적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체의 무게}} \times 100 \cdots\cdots \text{<식 5>}$$

[0132] 상기 실시예4에서 수행한 Dox의 담지 효율(%)과 담지율의 결과는 아래의 표 4 와 같다.

표 4

[0134]

	Dox	
	담지 효율 (%)	담지율 (%)
실시예 4	65.7%	32.8%

[0136] **(실시예 5) 약물이 담지된 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체의 온도에 따른 약물 방출 평가**

[0137] 온도에 따른 LCST 거동을 확인하기 위해 20 mL 바이알에 PBS (pH=7.4) 13.5 mL를 넣고, 상기 실시예4에 의해 Dox가 담지된 microgel@PB (0.1 wt%) 1.5 mL 분산액을 투석 튜브(분획분자량 124,000)에 넣는다. 그리고 그 투석 튜브를 20 mL 바이알에 넣고 각각 25℃와 45℃에서 5시간 동안 약물 방출실험을 진행한다. 이때 microgel@PB로부터 방출되는 약물의 양은 약물이 녹아있는 용액의 흡수 스펙트럼으로 측정하였고, 아래의 <식 6>에 의거하여 약물의 방출량(%)을 계산하였다.

[0139]
$$\text{약물의 방출량(\%)} = \frac{\text{방출된 약물의 무게}}{\text{담지된 약물의 무게}} \times 100 \cdots\cdots \text{<식 6>}$$

[0141] 상기 실시예5에서 수행한 약물 방출량(%)의 결과는 다음 표 5와 같다.

표 5

[0142]

	Dox 약물의 방출량(%)	
	25℃	45℃
실시예 5	24.9%	71.4%

[0144] 표 5의 실시예 5를 살펴보면, 본 발명에 따른 microgel@PB의 경우에는 45℃에서 LCST 거동에 따른 70%가 넘는 약물을 방출하는 것으로 나타낸다. 그에 반에 온도가 낮은 25℃에서는 24.9%의 약물이 방출된다. 즉, LCST 거동에 의한 microgel@PB의 수축이 약물 방출을 가속화시킨다는 것을 확인하였다.

[0146] **(실시예 6) 약물이 담지된 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체의 적외선 제어 약물방출 평가**

[0147] 20 mL 바이알에 PBS (pH=7.4) 13.5 mL를 넣고, 상기 실시예 4에 의해 Dox가 담지된 microgel@PB (0.1 wt%) 1.5

mL 분산액을 투석 튜브 (분획분자량 124,000)에 넣는다. 그리고 그 투석 튜브를 20 mL 바이알에 첨가한다. 이후에 808 nm의 파장을 가지는 레이저를 바이알과 5 cm 떨어진 거리에서 1 W/cm^2의 에너지로 15분 간격으로 레이저의 전원을 끄고 켜는 반복하며 5 시간 동안 방출실험을 진행 후 이때 방출되는 Dox 약물의 방출량(%) 계산하였다. 결과는 다음 표 6와 같다.

표 6

[0149]

시간	적외선 조사 유무	Dox 방출량	변화량
15 분	Off	15.3	15.3
30 분	**On**	**22.6**	**7.3**
45 분	Off	23.1	0.5
60 분	**On**	**30.2**	**7.1**
75 분	Off	31.0	0.8
90 분	**On**	**35.7**	**4.7**
105 분	Off	36.0	0.3
120 분	**On**	**38.5**	**2.4**
135 분	Off	39.3	0.8
150 분	**On**	**43.8**	**4.5**
165 분	Off	43.9	0.2
180 분	**On**	**49.5**	**5.6**
195 분	Off	50.6	1.1
210 분	**On**	**54.0**	**3.4**
225 분	Off	54.2	0.2
240 분	**On**	**54.8**	**0.6**
255 분	Off	55.0	0.1
270 분	**On**	**55.9**	**1.0**
285 분	Off	56.1	0.2
300 분	**On**	**56.6**	**0.5**

[0151] 표 6를 살펴보면, 본 발명에 따른 microgel@PB는 적외선을 조사하는 경우에만 급격하게 약물 방출량이 증가하는 것을 확인하였다. 반면에 적외선을 조사하지 않는 경우에는 약물의 방출량이 매우 적은 것을 알 수 있다.

[0152] 즉, 본 발명에 따른 microgel@PB는 적외선의 조사와 함께 약물전달 분야에 유용하게 응용할 수 있음을 확인하였다.

[0154] **(실시예 7) 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체의 세포 독성 평가**

[0155] 본 발명의 microgel@PB의 생체적합성을 평가하기 위하여 실험용으로 사용하는 암세포주는 자궁경부암 세포인 HeLa을 배양하여 사용하였다. HeLa세포를 0.1% 폴리-L-리신(poly-L-lysine)이 코팅된 커버슬립에 성장시키고 10, 20, 30, 40, 50 ug/mL의 microgel@PB로 처리하였다. Microgel@PB로 처리하고 24시간 후, 세포를 4 wt% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)가 포함된 PBS로 15분 동안 고정시킨 뒤, 10 uL의 WST-1로 염색하여 형광 세기로 세포 생존력(cell viability)을 확인하였다. 결과는 다음 표 7과 같다.

표 7

[0157]

ug/mL	0	10	20	30	40	50
Cell Viability	100	92.6	94.09	93.7	84.3	84.0

[0159] **(실시예 8) 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체 시험관내 항종양 활성 평가**

[0160] 본 발명의 항종양 활성을 평가하기 위해 암세포주는 자궁경부암 세포인 HeLa을 96 웰 플레이트 (웰당 $5x10^3$ 세포)에 37 ℃에서 24시간 배양한다. 그후, Dox (3 ug/mL), microgel@PB (10 ug/mL), Dox이 담지된 microgel@PB (9 ug/mL, Dox는 32.8wt% 포함)를 각각의 웰 플레이트에 넣고 4시간동안 인큐베이션 후, 세포를 808 nm 레이저 (1 W/cm^2)로 15분간 조사한다. 그리고 20 시간 후, 세포 배양 배지를 제거하고 4 wt% 파라포름알데히드가 포함된 PBS로 15분 동안 고정시킨 뒤, 10 uL의 WST-1로 염색하여 형광 세기로 세포 생존력(cell viability)를 확인하였다. 결과는 다음 표 8과 같다.

표 8

[0162]

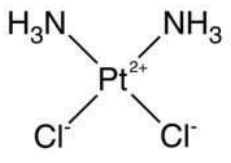
Cell viability	100	97.9	93.4	37.5	48.3	68.2	21.5
적외선 유무	X	O	X	O	X	X	O
Microgel@PB 유무	X	X	O	O	X	O	O
Dox 유무	X	X	X	X	O	O	O

[0164] 이상으로 살펴본 바와 같이, 본 발명에 microgel@PB 약물전달체는 아크릴산의 공중합으로 카르복실기가 도입되고, 층상조립(layer-by-layer assembly)을 통하여 PB의 도입량이 향상되고, 이에 따라 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체를 제조하여 약물 뿐만 아니라 다양한 염료들도 전달할 수 있는 효과를 갖는 것을 알 수 있다. 그 뿐만 아니라, 생체적합성이 뛰어난 소재를 사용하였기 때문에 신체 내에도 사용할 수 있고 약물의 방출속도를 제어할 수 있어 약물 전달체로서 유용하게 사용될 수 있다.

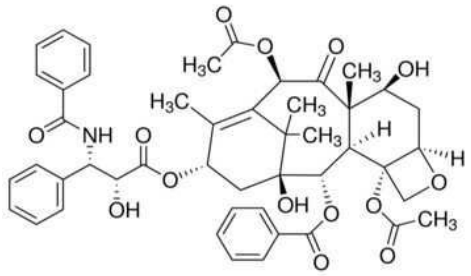
[0166] **(실시예 9) 약물이 담지된 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체의 적외선 제어 약물방출 평가**

[0167] 본 발명의 microgel@PB의 적외선 제어 약물 전달 능력을 평가하기 위하여 상기의 <화학식 2>와 같은 독소루비신 외에 아래의 <화학식3>와 같은 시스플라틴(Cisplatin), <화학식 4>와 같은 파클리탁셀(Paclitaxel), <화학식 5>와 같은 젬시타빈(Gemcitabin) 수용액을 500 ppm의 농도로 제조한 뒤, 20 mL 바이알에 상기 약물을 각각 10 mL 씩 넣고 제조예 3 에서 제조한 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체 10 mg을 상기 약물 수용액에 각각 투입하고 24시간 교반하였다. 그 이하는 상기 실시예 4와 동일하다.

[0169] <화학식 3>

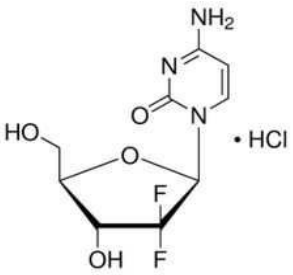
[0170] 

[0171] <화학식 4>



[0172]

[0173] <화학식 5>



[0174]

[0176] **(실시예 10) 약물이 담지된 적외선 제어 약물 방출형 고분자 약물전달체의 적외선 제어 약물방출 평가**

[0177] 20 mL 바이알에 PBS(pH=7.4) 13.5 mL를 넣고, 실시예 9에 의해 약물이 담지된 microgel@PB(0.1 wt%) 1.5 mL 분산액을 투석 튜브(분획분자량 124,000)에 넣는다. 그리고 그 투석 튜브를 20 mL 바이알에 첨가한다. 이후에 808 nm의 파장을 가지는 레이저를 바이알과 5 cm 떨어진 거리에서 1 W/cm^2의 에너지로 5 시간 동안 방출실험 진행 후 이때 방출되는 약물의 양(%)을 계산하였다. 결과는 다음 표 9와 같다.

표 9

[0179]

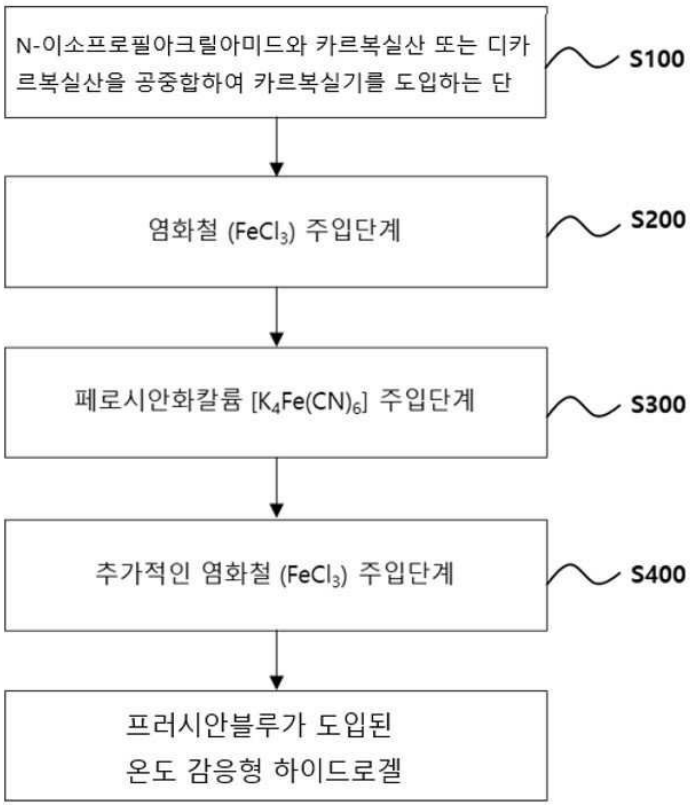
	808 nm 조사 전 방출량	808 nm 조사 후 방출량
시스플라틴	25	97.1
파클리탁셀	6.8	60.6
젬시타빈	12.2	78.3

[0181] 표 9를 살펴보면, 본 발명에 따른 microgel@PB는 적외선을 조사하는 경우가 그렇지 않은 경우보다 최대 97.1%까지 약물 방출량이 증가하는 것을 확인하였다. 즉, LCST 거동에 의한 microgel@PB의 수축이 약물 방출을 가속화시킨다는 것을 확인하였다.

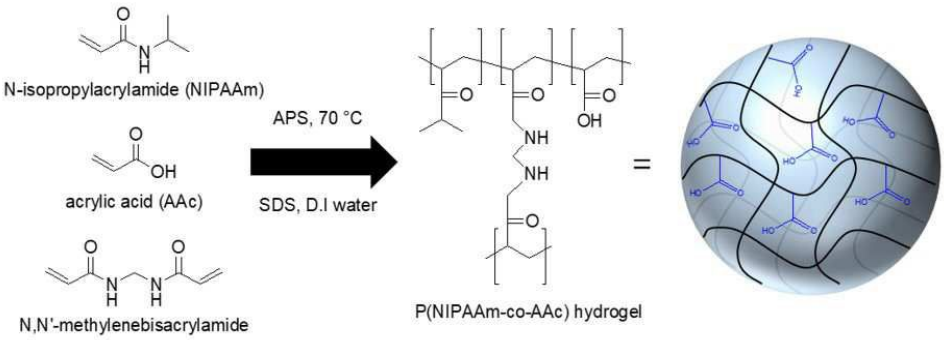
[0183] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

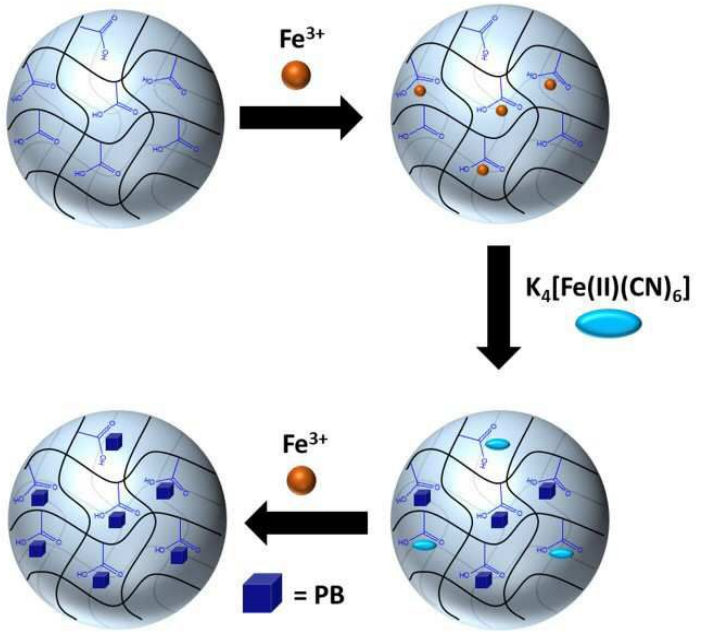
도면1


N-이소프로필아크릴아미드와 카르복실산 또는 디카르복실산을 공중합하여 카르복실기를 도입하는 단
S100
염화철 ($FeCl_3$) 주입단계
S200
페로시안화칼륨 [$K_4Fe(CN)_6$] 주입단계
S300
추가적인 염화철 ($FeCl_3$) 주입단계
S400
프러시안블루가 도입된
온도 감응형 하이드로겔

도면2


N-isopropylacrylamide (NIPAAm)
acrylic acid (AAc)
N,N'-methylenebisacrylamide
APS, 70 °C
SDS, D.I water
P(NIPAAm-co-AAc) hydrogel

도면3



도면4

