



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0081154
(43) 공개일자 2019년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61K 47/32 (2017.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1273 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0183502

(22) 출원일자 2017년12월29일
심사청구일자 2017년12월29일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

웅진코웨이 주식회사

충청남도 공주시 유구읍 유구마곡사로 136-23

(72) 발명자

정봉근

경기도 과천시 관문로 143, 1110동 1004호

전향화

서울특별시 금천구 가산디지털1로 186, 1103호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최우성

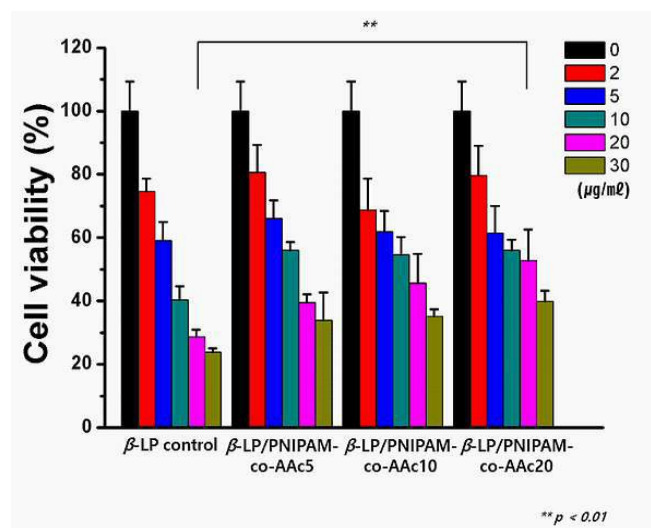
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 베타라파콘이 봉입된 폴리(엔-이소프로필아크릴아미드-코-아크릴산) 및 그 제조 방법

(57) 요약

베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)에서 아크릴산 단량체 비율을 일정 범위로 조절하여 하한임계용액온도에서 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 방출 정도를 조절하고, 세포 독성을 조절할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 47/32 (2013.01)

A61K 8/498 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

(72) 발명자

조희경

서울특별시 금천구 가산디지털1로 186, 1103호

김윤경

경기도 군포시 당정역로 9, 106동 1703호

김은중

서울특별시 마포구 백범로 35

임재현

인천광역시 부평구 부흥로293번길 24, 1002호

명세서

청구범위

청구항 1

베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 봉입하고 있는 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)에서 이소프로필아크릴아미드 및 아크릴산의 총 중량 중 아크릴산 단량체 함량이 0 초과 20 중량% 이하인 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 아크릴산 단량체 함량이 5 내지 20 중량%인 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 아크릴산 단량체 함량이 10 내지 20 중량%인 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 아크릴산 단량체 함량이 20 중량%인 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)의 하한임계용액온도가 36 내지 46℃인 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)의 하한임계용액온도가 37 내지 39℃인

것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)의 하한임계용액온도가 38℃인 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)에 봉입된 베타-라파콘 농도는 10 초과 30 μg/ml 이하인 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산).

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)을 포함하는 화장료 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)을 제조하는 방법으로서,

이소프로필아크릴아미드 및 아크릴산을 가교제를 첨가하여 공중합하여 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)를 합성하는 단계; 및

상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)에 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 알코올계 용매 하에 제공하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산) 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서는 베타-라파콘의 약물 전달체 구체적으로, 베타-라파콘(-Lapachone)이 봉입된 방출 온도 제어형 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)[이하, PNIPAM-co-AAc] 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

[0002] [이 발명을 지원한 연구개발사업]

[0003] 본 연구는 서강대학교 산학협력단의 주관 하에 코웨이(주)의 지원하에 이루어진 것으로 연구과제명은 '피부 온도 감응형 액티브 전달 소재 개발'이다(연구기간: 2017.1.1-2017.12.31)

배경 기술

[0005] 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(이하, PNIPAM라고 할 수 있다)은 양 친매성 구조로, 친수성기가 물에 녹아 있다가 하한임계용액온도(Lower Critical Solution Temperature; LCST)에서 소수성기가 모여 형성되는 나노 소재이다.

[0006] PNIPAM은 하한임계용액온도에서의 약물 방출이 가능하나, 약물방출에 영향을 미치는 하한임계용액온도가 32~34℃로 제한되어 있다. 또한, PNIPAM 기반 나노 소재는 암세포뿐만 아니라 정상 세포의 손상도 야기할 수 있다.

- [0007] 한편, 베타-라파콘(-Lapachone)은 라파초 트리(lapacho tree, *Tabebuia avellanedae*)로부터 얻어지는 천연 퀴논 물질로서, 다양한 식물로부터 추출되며, 항암 효과, 항종양 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다. 그 뿐만 아니라, 베타-라파콘은 콜라겐 합성 촉진을 통한 주름 개선과 항노화 효과가 밝혀져 있다(특허문헌 1).
- [0008] 그러나, 본 발명자들의 연구에 의하면, 베타-라파콘의 세포 독성으로 인하여 약물 용도 적용이 제한적인 문제가 있고 보관 및 유통도 용이하지 않다는 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1528265호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 일측면에서, 베타-라파콘의 약물 방출 정도와 이에 따른 세포 독성을 조절할 수 있는 베타-라파콘의 약물 전달체 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 다른 일측면에서, 약물 방출 온도를 조절하여 베타-라파콘의 보관 유통 등에서도 약물 방출이 지연되도록 조절할 수 있는 베타-라파콘의 약물 전달체 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 봉입하고 있는 베타-라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)[PNIPAM-co-AAc]을 제공한다. 이때, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)에서 이소프로필아크릴아미드 및 아크릴산의 총 중량 중 아크릴산 단량체 함량이 0 초과 20 중량% 이하일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 또한, 상기 베타-라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)를 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 또한, 상기 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)의 제조 방법으로서, 이소프로필아크릴아미드 및 아크릴산을 가교제를 첨가하여 공중합하여 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)를 합성하는 단계; 및 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)에 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 알코올계 용매 하에 제공하는 단계;를 포함하는 베타라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)를 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, NIPAM 단량체에 AAc 비율이 다르게 부착된 나노 소재를 이용해 하한임계용액온도를 조절할 수 있다. 이런 PNIPAM-co-AAc 나노소재는 34℃에서 46℃까지 하한임계용액온도를 폭넓게 조절하여 크기 수축효과를 볼 수 있다. 특히, 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc는 AAc 비율에 따라 하한임계용액온도에서 방출되는 정도를 조절할 수 있고, 세포 독성을 조절할 수 있다.
- [0019] 이에 따라, 베타-라파콘 약물 적용시 세포 독성을 낮추면서도 적용성을 높일 수 있다. 또한, 약물 방출 온도를 조절하여 베타-라파콘의 보관, 유통 등에서도 약물 방출을 지연시킬 수 있도록 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 예시적인 일 구현예에서, 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 봉입하고 있는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)[PNIPAM-co-AAc]을 나타내는 개략도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc5 ((NIPAM: AAc = 95: 5 (중량비))의 TEM 이미지를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc의 함량 변화에 따른 FT-IR 분광학적 분석 그래프로서, 각각 AAc 0 (도 3a), AAc 5 (도 3b), AAc 10 (도 3c), AAc 20(도 3d)를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc 20((NIPAM: AAc = 80: 20 (중량비))의 UV-vis를 이용한 흡광도 분석 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc의 함량 변화에 따른 DSL를 이용한 하한임계용액온도 분석 그래프로서, 각각 AAc 0 (도 5a), AAc 5 (도 5b), AAc 10 (도 5c), AAc 20 (도 5d)를 나타낸다.
- 도 6은 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc의 함량 변화에 따른 제타전위를 이용한 표면 전하 분석 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc의 각 함량에서의 온도에 따른 베타-라파콘의 방출량을 나타내는 그래프(도 7a 내지 7c) 및 이를 정리한 표(도 7d)이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예에서, 베타-라파콘과 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc5, PNIPAM-co-AAc10, PNIPAM-co-AAc20의 방출효능에 따른 세포독성분석 결과 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 실시예에서, 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc20의 방출효능에 따른 세포 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 용어 정의
- [0023] 본 명세서에서, 'PNIPAM-co-AAc숫자(N)'는 PNIPAM-co-AAc 에서 NIPAM와 AAc의 총 중량 중 AAc의 퍼센티지를 나타낸다. 따라서, NIPAM: AAc의 비율(중량비)이 100-N : N이 된다. 예컨대 PNIPAM-co-AAc20은 PNIPAM-co-AAc 에서 NIPAM: AAc 비율(중량비)이 80:20이라는 것이다.
- [0024] 본 명세서에서 나노란 1000nm 이하를 의미한다.
- [0026] 예시적인 구현예들의 설명
- [0027] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들을 상세히 설명한다.
- [0028] 도 1은 본 발명의 예시적인 일 구현예에서, 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 봉입하고 있는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)[PNIPAM-co-AAc]을 나타내는 개략도이다.
- [0029] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)[PNIPAM-co-AAc] 봉입하여 베타-라파콘 약물 전달체로 이용한다(도 1 참조). 이때 N-이소프로필아크릴아미드 (NIPAM) 단량체에 대한 아크릴산(AAc) 단량체의 첨가 비율에 따라 하한임계용액온도를 조절하고, 이에 따라 약물 방출 온도와 세포 독성을 조절할 수 있다.
- [0030] 구체적으로, 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 봉입하고 있는 PNIPAM-co-AAc을 제공한다.
- [0031] 예시적인 일 구현예에서, PNIPAM-co-AAc 에서 NIPAM와 AAc의 총 중량 중 AAc 함량이 0 초과 20 중량% 이하가 되도록 한다.
- [0032] 후술하는 실험예로부터 알 수 있듯이, 세포배양 온도에서 방출된 베타-라파콘에 의해 나타나는 세포 독성은, 베타-라파콘 약물 농도가 일정 수준을 넘어 많아지게 되면 베타-라파콘 자체를 이용한 경우와 달리 베타-라파콘을 PNIPAM-co-AAc에 봉입한 경우, 감소하는 경향을 보이며, 이러한 경향은 AAc가 증가할수록 더욱 크게 나타났다.
- [0033] 한편, AAc 함량이 PNIPAM-co-AAc에서 NIPAM와 AAc의 총 중량 중 20%를 넘어 (즉, NIPAM: AAc의 중량 비율 8:2 보다 AAc가 많은 경우) 지나치게 많아지는 경우 pH 감소의 문제점과, zeta potential 절대값의 증가로 세포에

부착이 어려워 적용하기가 힘들게 되는 문제가 있다.

- [0034] 아울러, 특히 화장 시료로 사용했을 경우 사이즈에 민감하게 작용하는 화장 시료의 촉감 때문에 AAc의 비율이 높아져 사이즈가 커질 경우 1 μ m 이상의 결과물이 얻어져서 화장시료로 사용하기 부적합하게 될 수 있다.
- [0035] 예시적인 일 구현예에서, AAc 함량은 바람직하게는 5 내지 20 중량%, 더 바람직하게는 10 내지 20중량%이고, 특히 20중량%인 것이 바람직하다.
- [0036] 예시적인 일 구현예에서, 상기 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 봉입하고 있는 PNIPAM-co-AAc의 하한임계용액온도는 36 내지 46 $^{\circ}$ C일 수 있으며, 바람직하게는 36 내지 40 $^{\circ}$ C 또는 37 내지 39 $^{\circ}$ C 또는 특히 세포 배양 온도인 38 $^{\circ}$ C이다.
- [0037] 예시적인 일 구현예에서, 상기 PNIPAM-co-AAc에 봉입된 베타-라파콘 농도는 약물 방출량 대비 세포 독성 저감 측면에서 10 μ g/ml 초과, 예컨대 10 초과 30 μ g/ml 이하일 수 있다.
- [0038] 즉, PNIPAM-co-AAc 에 봉입된 베타-라파콘 농도가 줄어들수록 세포 독성은 줄어들기 때문에 세포 독성이 낮으려면 즉, Cell Viability가 높으려면 베타-라파콘 함량 자체가 작으면 된다. 그러나, 베타-라파콘의 약물 활성을 위하여 약물 양을 높일 필요가 있으므로, 약물 양을 높이면서도 세포 독성을 낮추는 것이 필요하다. 아래 실험에서도 보듯이, 베타-라파콘 농도가 일정 농도를 넘어서게 되면 PNIPAM-co-AAc 에 봉입된 경우 특히 AAc 함량이 높은 경우 세포 독성이 낮아지고 Cell Viability가 높아지는 것을 알 수 있다.
- [0039] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 또한, 상기 베타-라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)를 포함하는 화장료 조성물을 제공한다. 상기 화장료 조성물은 베타-라파콘을 유효 성분으로 하며 주름 개선 및 항노화 용도로 사용될 수 있다. 특히, 상기 화장료 조성물은 주름 개선용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 다양한 공지의 제형으로 사용될 수 있다.
- [0040] 예시적인 일 구현예에서, 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc을 포함하는 예컨대 화장료 조성물을 구성하는 경우에도 위와 같은 방출량 대비 세포 독성 저감 측면에서, PNIPAM-co-AAc에 봉입된 베타-라파콘 농도는 10 초과 30 μ g/ml이 되도록 할 수 있다.
- [0041] 한편, 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 상기 베타-라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)의 제조 방법으로서, 이소프로필아크릴아미드 및 아크릴산을 가교제를 첨가하여 공중합하여 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)를 합성하는 단계; 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)에 베타-라파콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 알코올계 용매 하에 제공하는 단계;를 포함하는 베타-라파콘이 봉입된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드-co-아크릴산)를 제공한다.
- [0042] 예시적인 일 구현예에서, 상기 합성 시 아크릴산 함량을 바람직하게는 5 내지 20 중량%, 더 바람직하게는 10 내지 20중량%이고, 특히 20중량%가 되도록 한다.
- [0043] 이상과 같이 베타-라파콘 또는 그 약학적으로 허용가능한 염의 전달체로 PNIPAM 기반의 나노 소재를 이용하되, 공중합하는 AAc 단량체의 함량을 조절함으로써 하한임계용액온도에서의 약물 방출 정도와 세포 독성을 조절할 수 있다.
- [0045] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 구체적인 실시예를 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며 첨부된 특허청구범위 내에서 다양한 형태의 실시예들이 구현될 수 있고, 단지 하기 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 함과 동시에 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 실시를 용이하게 하고자 하는 것임이 이해될 것이다.
- [0047] [실시예]
- [0048] 베타-라파콘을 전달하기 위한 약물 전달체로 우선 PNIPAM-co-AAc 나노 소재를 합성하였다. 즉, PNIPAM-co-AAc 나노 소재는 NIPAM(N-isopropylamide)와 가교제인 MBA(N,N-methylenebisacrylamide), 단량체인 AAc(Acrylic acid)를 첨가하여 질소기체 하에 교반하여 획득하였다. 획득한 PNIPAM-co-AAc에 약물 베타-라파콘을 에탄올 용매 하에 봉입 시켰다. 여기서, PNIPAM-co-AAc에서 AAc의 함량을 0중량%, 5중량%, 10중량%, 20중량%로 다양하게 변화시켰다.

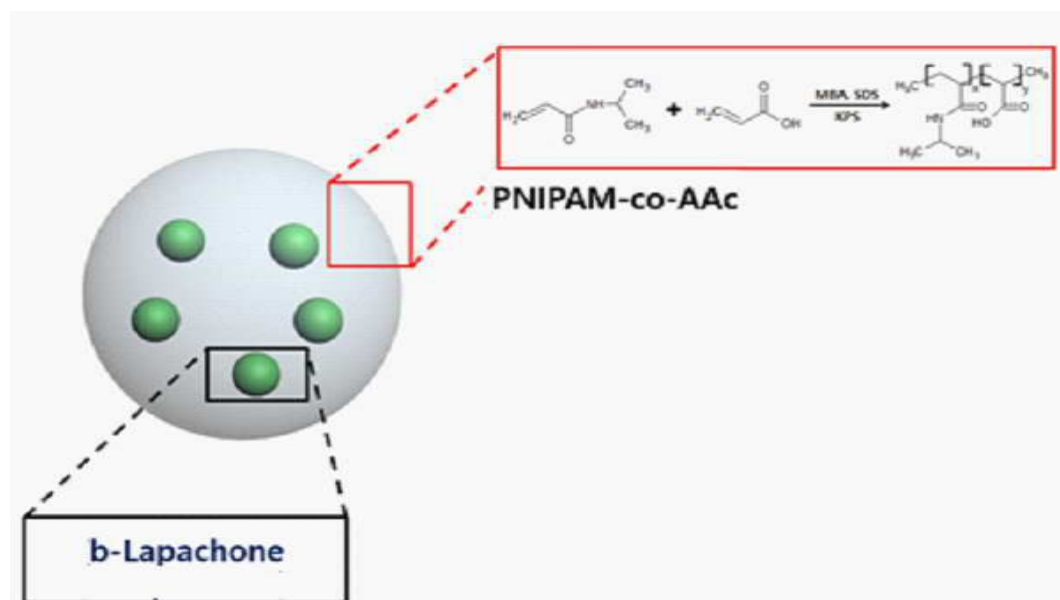
- [0049] 참고로, 도 2는 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc5 ((NIPAM:AAc = 95:5 (중량비))의 TEM 이미지를 나타낸다.
- [0050] 한편, 도 3은 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc의 함량 변화에 따른 FT-IR 분광학적 분석 그래프로서, 각각 AAc 0 (도 3a), AAc 5 (도 3b), AAc 10 (도 3c), AAc 20 (도 3d)를 나타낸다.
- [0051] 본 실시예에서 제조된 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc 나노 소재의 정성 분석을 위해 FT-IR(푸리에변환 적외선 분광법)을 통해 파장에 따라 작용기를 확인하였다. PNIPAM-co-AAc의 스펙트럼에서 $3300\sim3400\text{cm}^{-1}$ 의 피크를 통해 N-H 결합을 확인하였고, $2900\sim3000\text{cm}^{-1}$ 의 피크를 통해 C-H 결합과 C=O 결합을 확인할 수 있다. AAc 단량체의 비율이 증가함에 따라 카르복실기의 C=O peak의 증가를 확인하여 AAc의 결합을 확인하였다. 또한, $1600\sim1700\text{cm}^{-1}$ 에서 C=O 결합을 확인하였다.
- [0052] $1500\sim1600\text{cm}^{-1}$ 피크를 통해 CH_2 결합을 확인하였고, $1300\sim1400\text{cm}^{-1}$ 피크를 통해 NIPAM의 이소프로필기를 확인할 수 있다. $1100\sim1200\text{cm}^{-1}$ 의 피크를 통해 C-N 결합을 확인하였다.
- [0053] 한편, UV-vis(적외선-가시광선 분광법)으로 특정 파장의 흡광도를 통해 화합물 구조에 대한 작용기를 분석할 수 있다.
- [0054] 도 4는 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc 20 ((NIPAM:AAc = 80:20 (중량비))의 UV-vis를 이용한 흡광도 분석 결과이다.
- [0055] PNIPAM-co-AAc의 파장과 대비하여 주름 개선 및 항노화를 위한 약물인 베타-라파콘이 봉입된 스펙트럼은 250cm^{-1} 대의 특유의 파장을 띄어 베타-라파콘이 PNIPAM-co-AAc에 봉입 되어 있음을 확인하였다.
- [0056] 도 5는 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc의 함량 변화에 따른 DSL를 이용한 하한임계용액온도 분석 그래프로서, 각각 AAc 0 (도 5a), AAc 5 (도 5b), AAc 10(도 5c), AAc 20(도 5d)를 나타낸다.
- [0057] 도 5에서 알 수 있듯이, DLS(동적 빛 산란 입도분석기)를 통해 나노 소재의 크기 변화를 확인할 수 있다. AAc의 함량 비율이 증가함에 따라 음전하의 반발로 인해 나노 소재의 크기가 증가하였다.
- [0058] 하한임계용액온도는 $30^{\circ}\text{C}\sim50^{\circ}\text{C}$ 구간에서의 수축효과로 확인할 수 있다. PNIPAM-co-AAc 나노소재가 $32^{\circ}\text{C}\sim34^{\circ}\text{C}$ 에서 크기가 수축하면서 AAc 단량체가 가까워져 음전하 반발이 일어난다. 음전하 반발로 인해 나노 소재의 크기가 수축 하는 것을 방지하다가, 소수성상호작용의 힘이 더 커져 다시 수축을 시작한다.
- [0059] AAc 함량 비율 0중량%, 5중량%, 10중량%, 20중량%에 따라 하한임계용액온도 34°C , 38°C , 39°C , 46°C 에서의 크기 수축효과를 확인하였다.
- [0060] 도 6은 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc의 함량 변화에 따른 제타전위를 이용한 표면 전하 분석 그래프이다.
- [0061] 제타전위는 입자간의 반발력과 인력의 크기를 나타낸 것으로, AAc 비율이 증가함에 따라 음전하가 증가해 제타전위가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0062] 도 7은 본 발명의 실시예에서, PNIPAM-co-AAc의 각 함량에서의 온도에 따른 베타-라파콘의 방출량을 나타내는 그래프(도 7a 내지 7c) 및 이를 정리한 표(도 7d)이다.
- [0063] 도 7에서와 같이, UV-vis로 베타-라파콘의 약물 방출 동태를 확인할 수 있다. 온도가 상온에서 38°C , 46°C 로 증가할수록 약물 방출이 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 또한, 같은 온도에서는 AAc 비율이 높을수록 하한임계용액온도가 증가하여 크기수축효과가 상대적으로 감소해 약물방출이 감소하게 됨을 확인할 수 있다.
- [0064] 한편, 도 8은 본 발명의 실시예에서, 베타-라파콘과 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc5, PNIPAM-co-AAc10, PNIPAM-co-AAc20의 방출효능에 따른 세포독성분석 결과 그래프이다.
- [0065] 세포 배양 온도인 38°C 에서 PNIPAM-co-AAc에 봉입된 베타-라파콘의 방출에 의한 세포 생존율을 비교 평가하기 위해 베타-라파콘과 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc을 다양한 농도조건 ($0\sim30\text{ }\mu\text{g/ml}$)[PNIPAM-co-AAc에 봉입된 베타-라파콘 농도]에서 평가하였다.
- [0066] 3시간 동안 배양하고, 세포 배양액으로 수세한 후, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide) 시약을 처리하여 4시간 배양하였다.

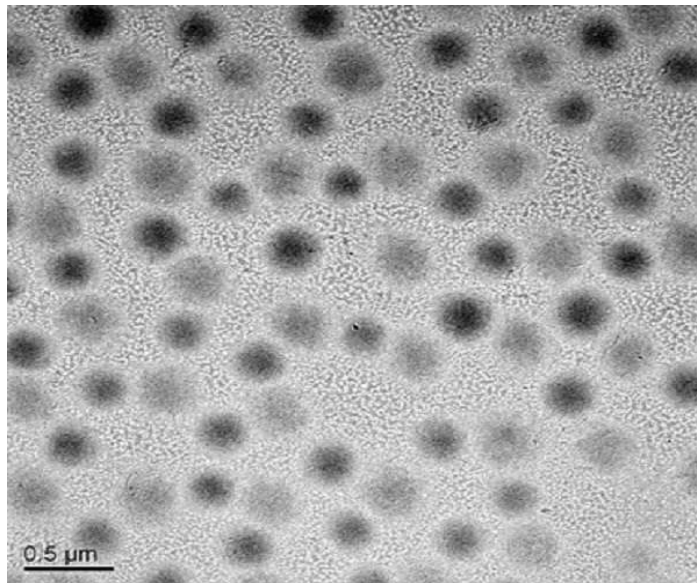
- [0067] 보라색으로 염색된 세포에 세포분쇄액 (Solubilization buffer)을 넣은 후, 세포를 모두 녹인 다음 마이크로플레이트 리더기에서 590 nm로 측정하여, 농도에 따른 각 그룹의 세포 생존율을 평가하였다.
- [0068] 베타-라파콘만 처리한 그룹과 베타-라파콘을 봉입한 PNIPAM-co-AAc에서 세포배양 온도인 38℃에서 방출된 베타-라파콘에 의해 나타나는 세포 생존율은 농도에 따라 감소함을 확인할 수 있었다.
- [0069] 아울러, 특히 10 초과 30 $\mu\text{g/ml}$ 특히 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 농도에서는 베타-라파콘만 처리한 그룹과 PNIPAM-co-AAc에 함유된 베타-라파콘 그룹간에 유의적인 세포 생존율의 차이를 보였으며, 이것은 앞서 살펴본 바와 같이 온도에 따른 각 그룹간 베타-라파콘 방출량의 차이와 일치하는 결과이다.
- [0070] 즉, 세포 독성은 베타-라파콘 약물의 농도가 줄어들었을 때 독성이 줄어든다. 그런데, 베타-라파콘 약물 농도가 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 넘어서는 경우에는 PNIPAM-co-AAc에 봉입된 베타-라파콘의 경우, 그중에서도 특히 AAc 비율이 높은 경우가, 세포 독성이 낮고 Cell Viability 가 높다.
- [0071] 한편, 베타-라파콘 농도 20 $\mu\text{g/ml}$ 인 경우 약물방출과 관련하여 방출 효과 대비 세포독성이 매우 높은데(방출량이 높을수록 세포가 많이 사멸하게 되는 경향성이 높아지는데), PNIPAM-co-AAc에 봉입하게 되면 그 중에서도 AAc 비율이 높은 것에 봉입하게 되면, 세포 독성이 낮아지고 Cell Viability 가 높아지는 것이 더욱 뚜렷해진다.
- [0072] 또한, 도 9는 본 발명의 실시예에서, 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc20의 방출효능에 따른 세포 이미지가 다. 전술한 결과는 도 9에서의 Live/Dead 세포 이미지 결과로도 뒷받침될 수 있다.
- [0073] 세포 생존율의 정성평가를 위해 베타-라파콘과 베타-라파콘이 봉입된 PNIPAM-co-AAc5, 10, 20을 20 $\mu\text{g/mL}$ 으로 섬유아세포 (NIH3T3)를 처리 후 2시간 동안 배양한 뒤 Calcein AM과 Ethidium homodimer-1을 이용하여 생존한 세포와 사멸한 세포를 초록 형광과 빨간 형광으로 염색하여, 형광현미경을 통해 평가하였다. 그 결과, 베타-라파콘만 처리된 세포가 많이 죽은 반면, PNIPAM-co-AAc5, PNIPAM-co-AAc10, PNIPAM-co-AAc20에 봉입된 베타-라파콘은 죽은 세포가 감소한 것을 확인할 수 있었다.

도면

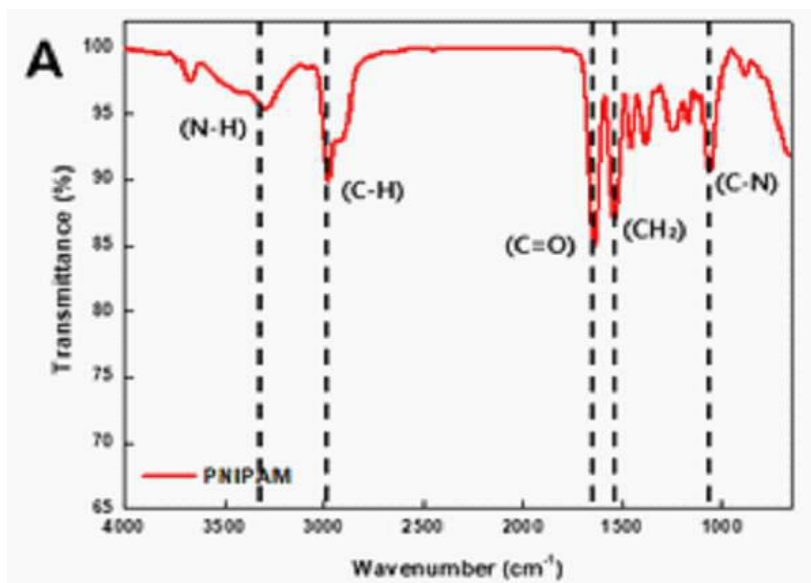
도면1



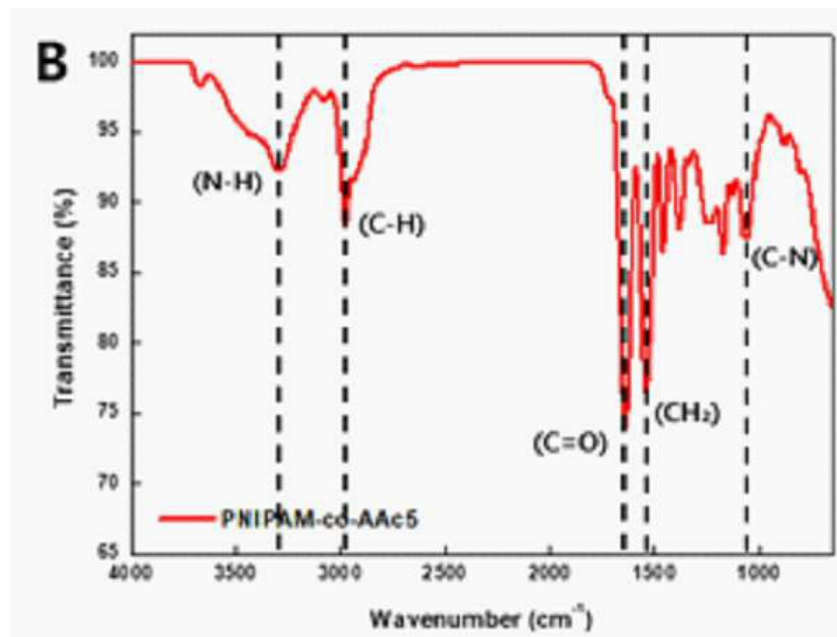
도면2



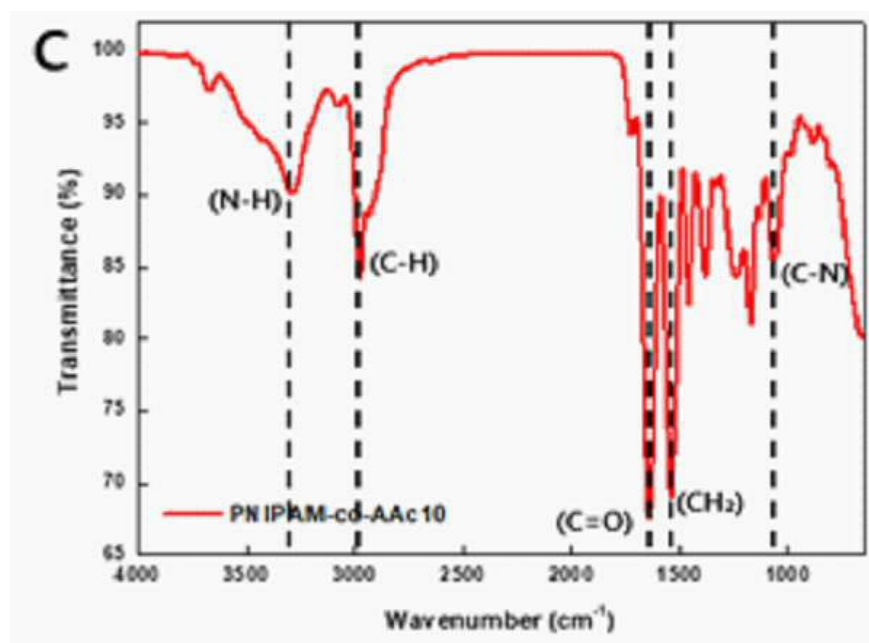
도면3a



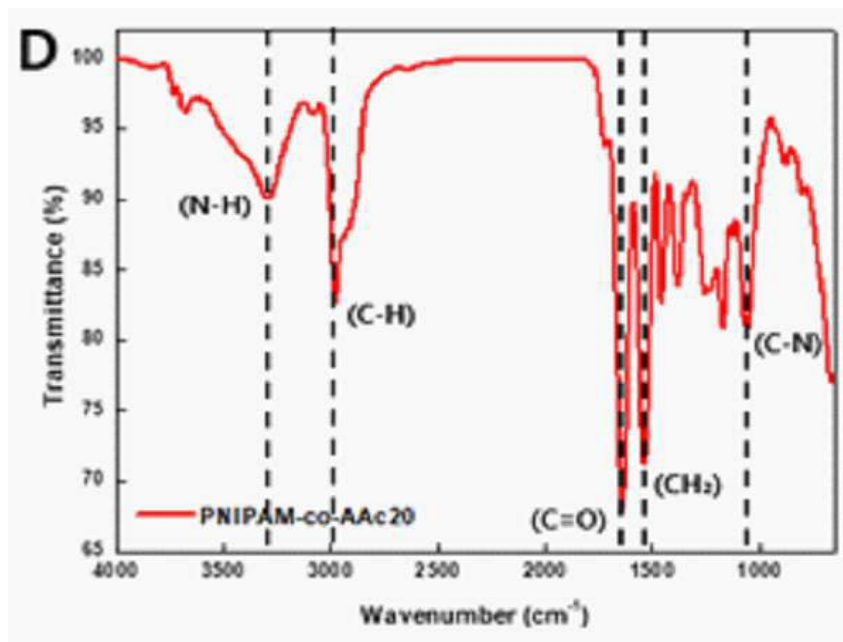
도면3b



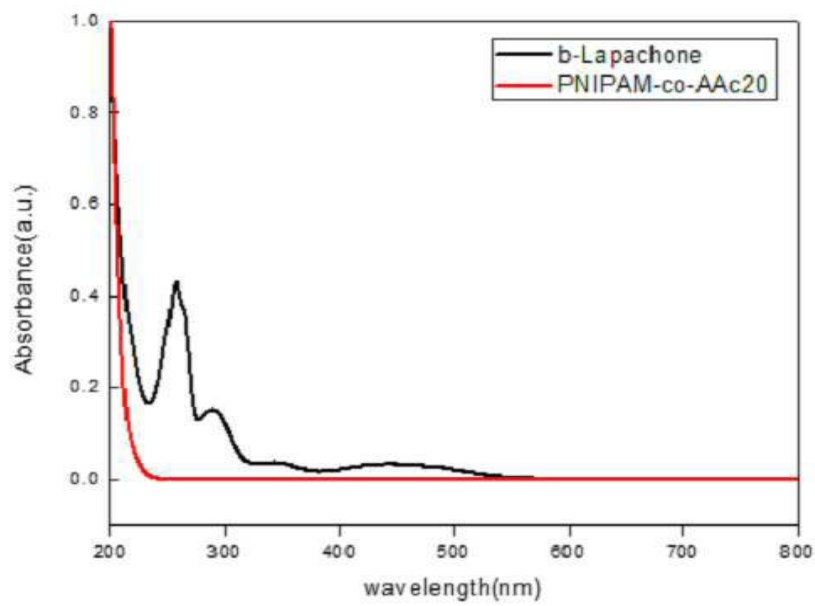
도면3c



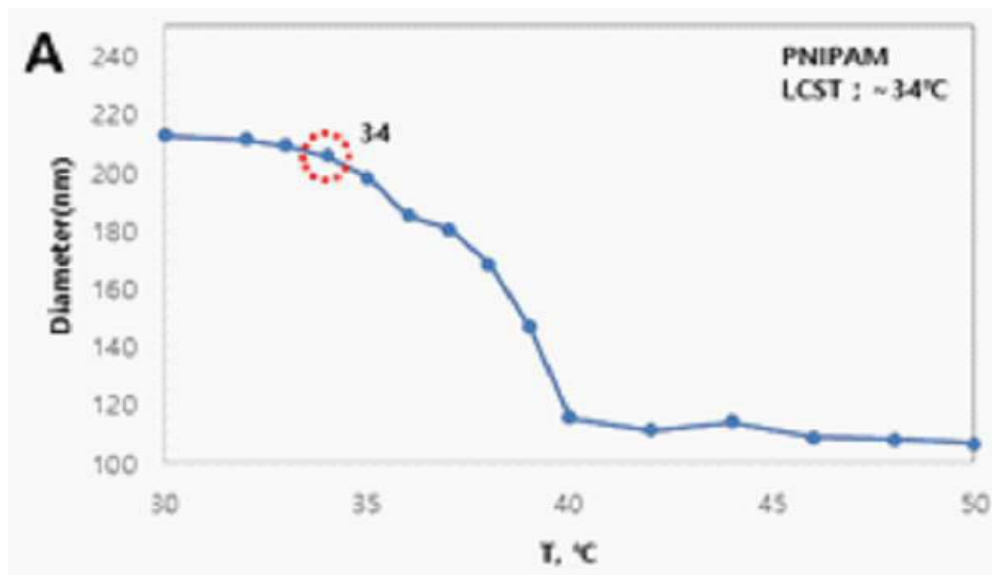
도면3d



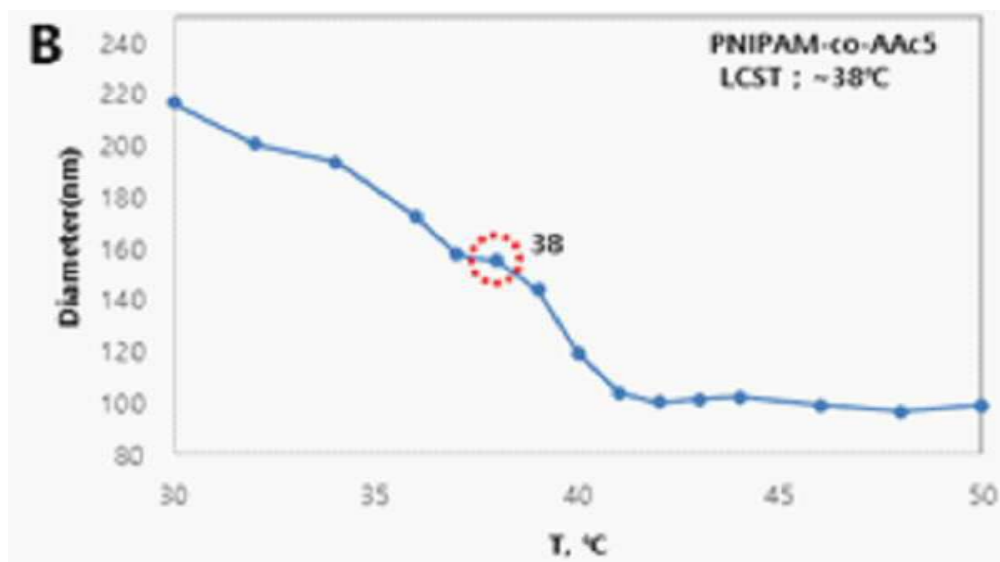
도면4



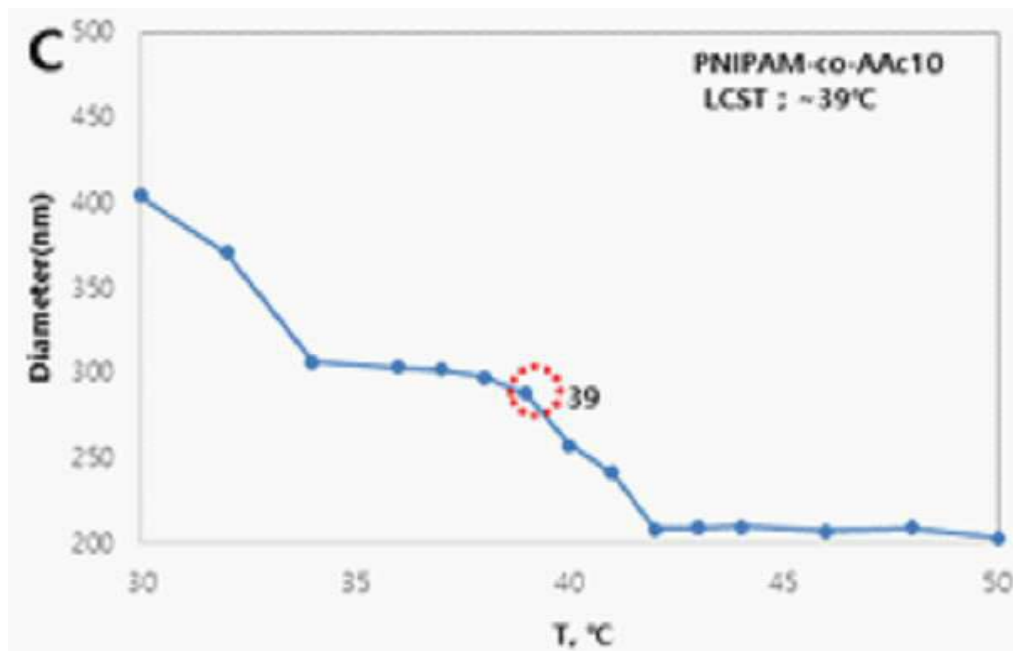
도면5a



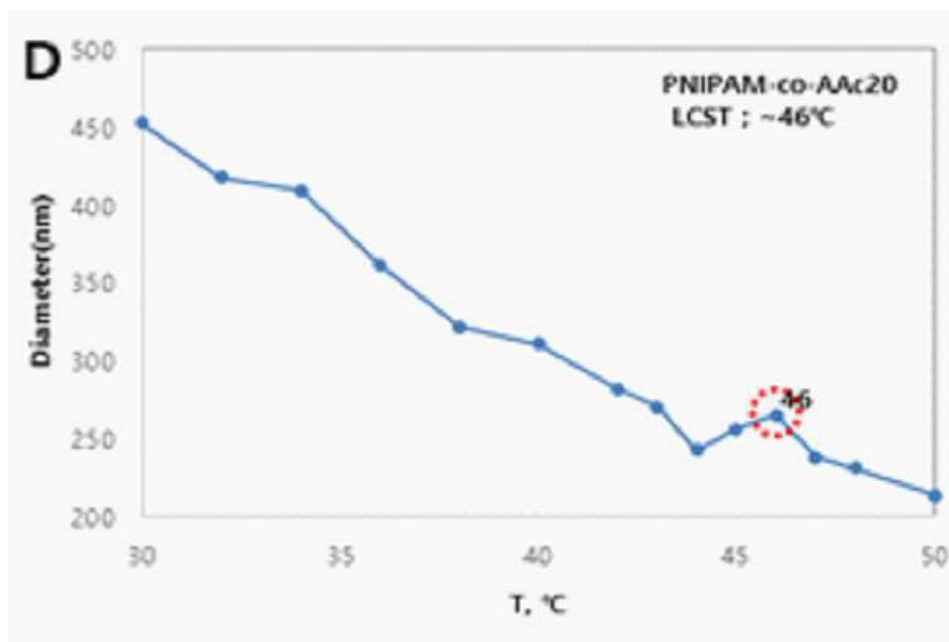
도면5b



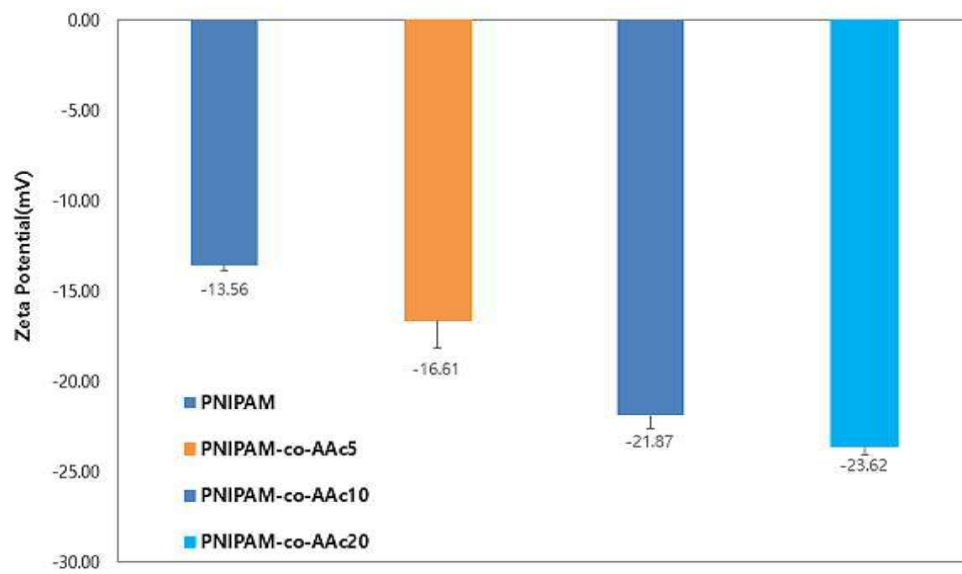
도면5c



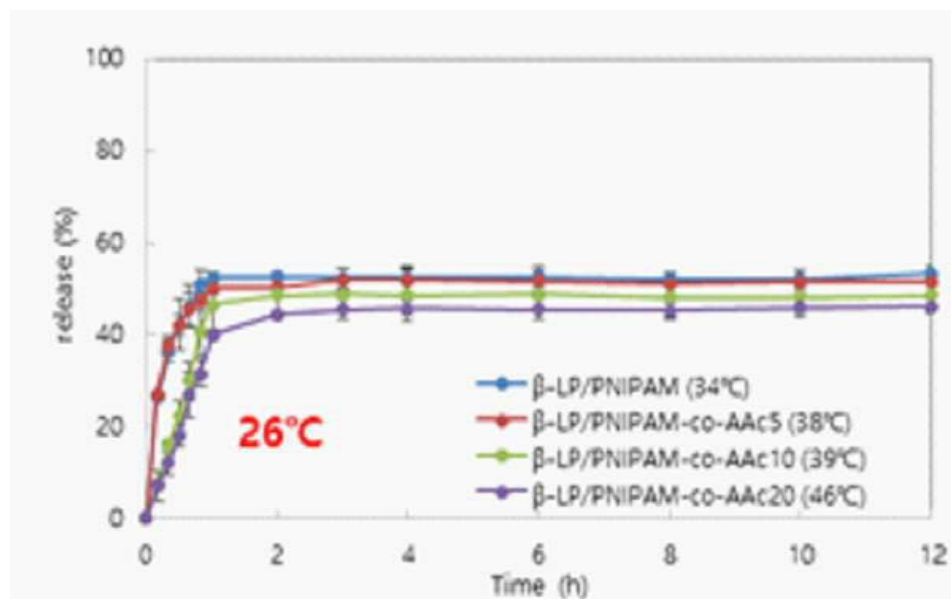
도면5d



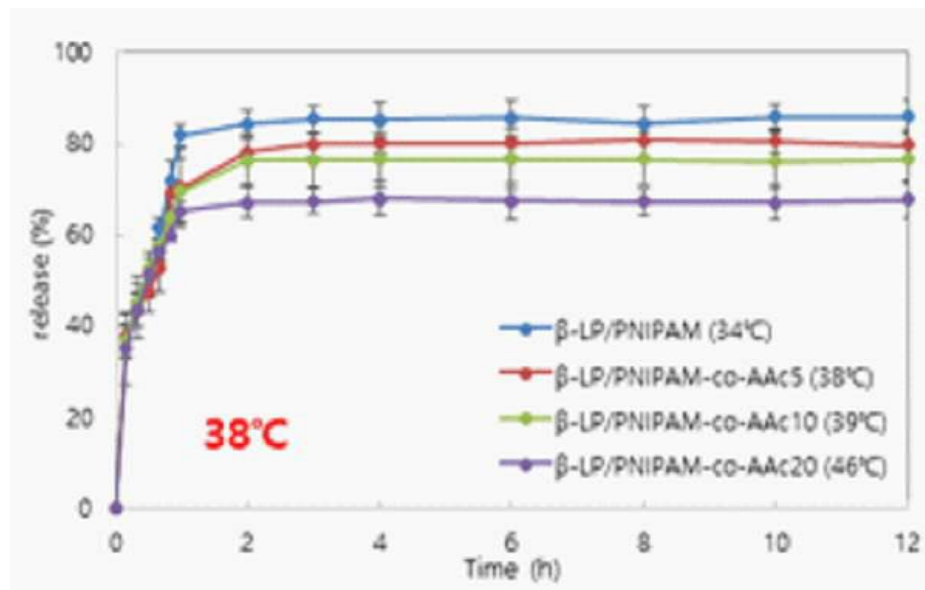
도면6



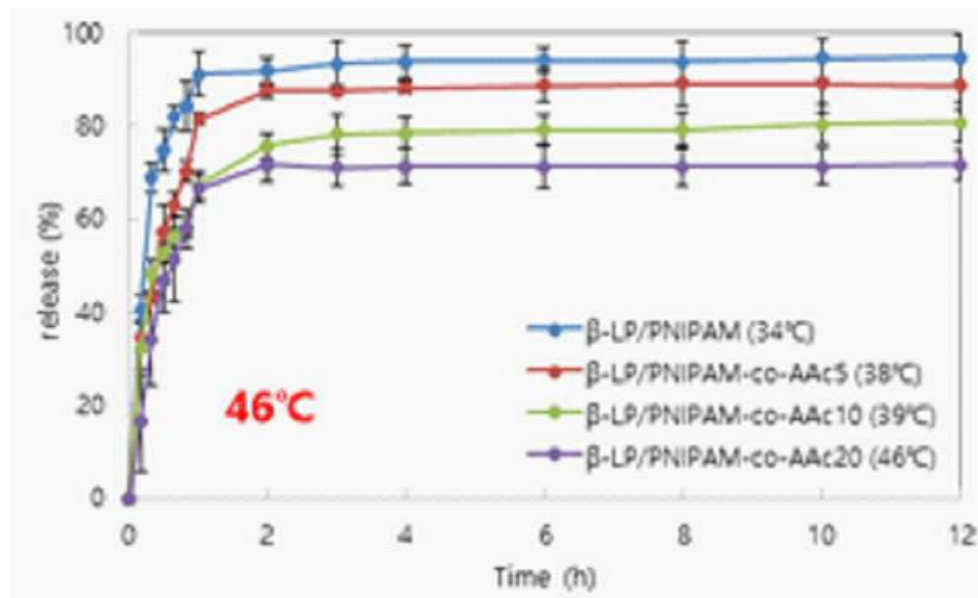
도면7a



도면7b



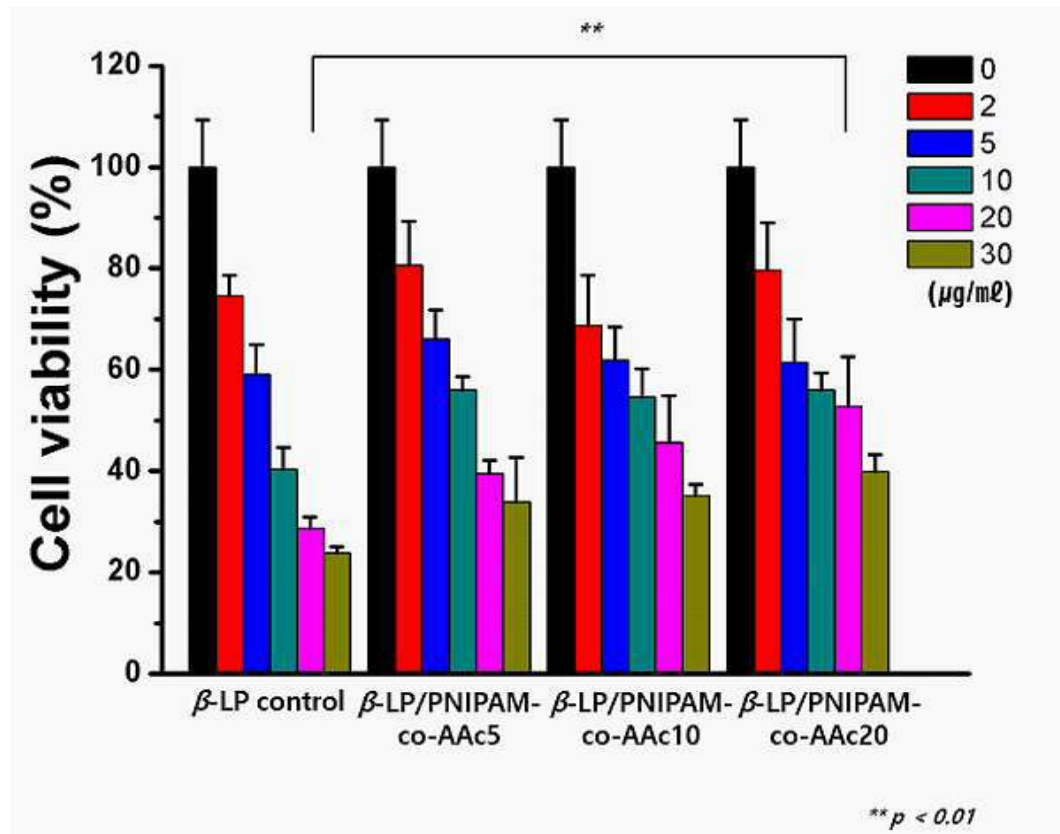
도면7c



도면7d

	LCST	26°C	38°C	46°C
β -LP/PNIPAM	34°C	53%	85%	94%
β -LP/PINAM-co-AAc5	38°C	48%	79%	88%
β -LP/PINAM-co-AAc10	39°C	48%	76%	80%
β -LP/PINAM-co-AAc20	46°C	46%	67%	71%

도면8



도면9

