



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월13일

(11) 등록번호 10-1686341

(24) 등록일자 2016년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)

C01G 49/04 (2006.01) C01G 49/06 (2006.01)

C04B 35/26 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/48015 (2013.01)

A61K 31/337 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0120488

(22) 출원일자 2015년08월26일

심사청구일자 2015년08월26일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070088388 A

J. Nanopart. Res., 13, 6157-6167, 2011.

Intech, 203-224, 2011.

(73) 특허권자

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

김도경

대전광역시 서구 관저북로 87 원앙마을1단지아파트 106동 1903호

김민철

서울특별시 용산구 이촌로64길 15 LG한강자이아파트 103동 1202호

(74) 대리인

김대영

전체 청구항 수 : 총 1 항

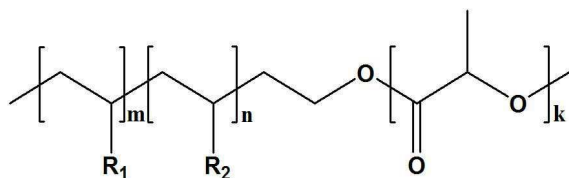
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 약물 표적화를 위한 초상자성 산화철 나노입자의 제조방법

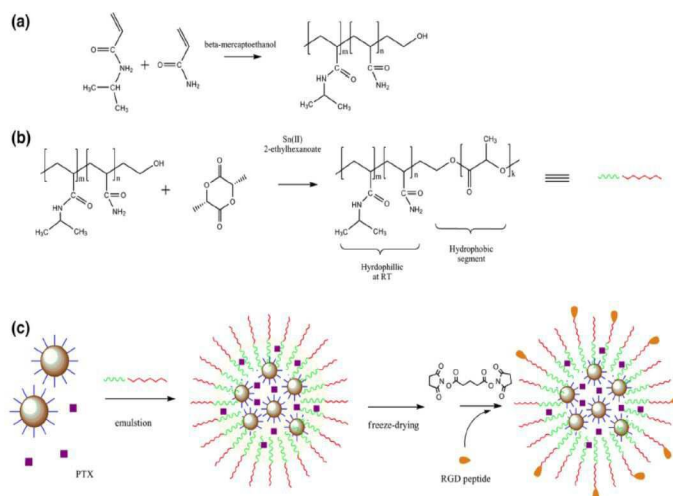
(57) 요약

본 발명은 무기물; 및 상기 나노입자의 표면에 형성된 양친매성 고분자 물질; 및 파클리탁셀을 포함하되, 상기 양친매성 고분자 물질은 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 초상자성 나노입자를 제공한다.

[화학식 1]



대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/4813 (2013.01)
A61K 47/48169 (2013.01)
A61K 47/48346 (2013.01)
A61K 47/48853 (2013.01)
C01G 49/04 (2013.01)
C01G 49/06 (2013.01)
C04B 35/265 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345233078

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (구)지역대학우수과학자지원사업(후속연구지원)

연구과제명 나노캡슐을 이용한 암치료용 지능형 테라그노시스 약물전달체 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교

연구기간 2014.06.01 ~ 2017.05.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

1) NIPAAm, AAm, β -메르캅토 에탄올(β -mercaptoethanol)을 THF에 용해한 후, BPO를 첨가하고 N₂ 분위기에서 12시간 동안 반응한 뒤 원심 분리한 후 동결건조하여 PNA를 얻고, 얻어진 PNA와 L-락티드와 주석 2-에틸헥사노에이트(stannous 2-ethyl hexanoate)를 톨루엔에 용해 후 N₂ 분위기에서 반응하여 양친매성 고분자인 PNAL을 제조하는 단계;

2) 산화철(II), 산화철(III), 코발트 페라이트, 징크 페라이트, 니켈 페라이트, 망간 페라이트 중에서 선택되는 무기물의 표면을 친수성 물질인 오레산으로 코팅하고 헥산에 용해한 뒤 에탄올로 침전시킨 후 원심분리하고 3회 이상 세척한 뒤 헥산에 재분산하여 코팅된 나노입자를 얻는 단계;

3) 상기 1) 단계에서 제조된 양친매성 고분자인 PNAL과, 2) 단계에서 제조된 코팅된 나노입자 및 파클리탁셀을 혼합하여 메틸렌클로라이드에 용해 후 수성 PVA 용액과 혼합하고, 소니케이터를 사용하여 유화시킨 후 원심분리를 수행하고 감압건조하여 PTX가 포함된 PTX-PNAL-SPIONs 형태의 나노입자를 얻는 단계;

4) 상기 3) 단계에 혼합되어 얻어진 입자를 DSG용액 및 RGD용액과 반응한 뒤 원심분리기를 사용하여 분리된 RGD 펩타이드를 제거한 후, 0.1 N HCl에 재분산한 후 원심분리를 이용하여 세척하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 초상자성 나노입자의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약물 표적화를 위한 초상자성 산화철 나노입자에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 양친매성 고분자와 초상자성 산화철 나노입자가 코어셀 형태로 제조되는 초상자성 산화철 나노입자의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대사회에서 삶의 질의 문제가 중요하게 부각되면서, 바이오-메디컬 분야의 기술 개발에 대한 요구가 끊임없이 증대되고 있다. 한편, 나노기술은 바이오-메디컬 분야의 현안들을 극복할 수 있는 중요한 도구로 인식되고 있다.

[0003] 최근에는 여러 기능을 동시에 갖는 나노소자소재의 개발로 연구의 초점이 모아지면서, 나노구조를 기능성 소자로 만드는 방법과 나노구조로 만들어진 기능성 소자의 위치를 제어하고, 물리적 화학적 생물학적 특성을 조절하

는 나노-바이오 공학에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 자성나노입자(magnetic nanoparticles)는 기본적으로 일반적인 나노입자가 갖고 있는 특징들, 즉, 단위부피 당 표면적이 넓어서 소량의 대상 물질도 감지할 수 있다는 장점을 갖고 있는 것 외에, 다른 나노입자에 비해 화학적 안전성이 우수하고 바이오프로브로 사용될 때 자기장에 의해 위치 조작이 가능하다는 장점이 있다.

[0004] 이 중 산화철 나노입자는 자화되는 특성을 가지고 있어서 생의학적으로 매우 큰 활용가치를 가지고 있다. 특히, 초상자성 산화철 나노입자(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION)는, 자기공정명상(MRI) 진단, 약물 운반 및 치료와 같은 생물의학 분야에서 최근에 각광을 받고 있다. SPION은 그의 초상자성 특성 때문에, 종래의 상자성 Gd-계열의 조영제보다 MRI에서 높은 조영능력을 발휘할 수 있다.

[0005] 산화철 나노입자가 상기 세망내피계에 의해 탐식되어 제거되는 정도를 감소시키기 위해서는 나노입자의 크기 조절뿐만 아니라 입자표면의 개질 또한 중요한 인자라 할 수 있다. 현재 산화철 나노입자를 수용성 고분자로 코팅함으로써 체내 혈액순환시간을 증가시키기 위한 연구들이 많이 보고되고 있다.

[0006] 그러나 종래 대부분의 수용성 산화철 나노입자는 생체 내 특정 장기나 질환을 진단하기 위해서 화학적으로 고분자를 수정하여 리간드 도입 사이트를 제시해야 단계를 거쳐야 한다는 단점이 있다. 특히, 상기와 같은 고분자를 이용하여 표면 처리한 경우 여전히 간과 비장 등에 산화철 나노입자가 섭취되어 목적하는 부위에 전달되지 않거나 전달되더라도 소량에 불과하였다. 뿐만 아니라, 종래의 산화철 나노입자를 이용한 조영제의 경우 진단 용도에 국한되어 사용되었을 뿐, 치료를 동시에 할 수 있을 정도로 많은 양을 표적세포에 도달시킬 수 있는 산화철 나노입자를 이용하여 개발된 조영제는 찾아보기가 매우 어렵다. 또한 고분자를 이용한 산화철 나노입자의 표면 개질의 또 하나의 문제는 표면개질된 산화철 나노입자의 생체내에서의 운명이 어떻게 되는가 하는 것이다. 표면 개질에 이용된 고분자 자체에 대한 생체내 운명 및 독성에 대한 연구가 진행되기 어려운 점이 있어 이에 대한 연구가 일부 PEG에 대한 연구를 제외하고는 전무한 상태이다. 또한, 표면개질에 이용한 고분자가 산화철 나노입자에 그대로 컨주게이션되어 존재하는지 아니면 컨주게이션된 고분자가 생체내에서 해리되어 독자적인 생체내 분포를 가지는지에 대한 정확한 분석이 되어있지 않기 때문에 고분자가 적용된 산화철 나노입자의 생체 적합성에 대한 평가가 어렵다고 할 수 있다.

[0007] 약물전달시스템(Drug delivery system, DDS)란 치료부위에 질병 치료용 약물을 효율적으로 전달함으로써 약물의 부작용을 줄이고, 약물에 대한 환자의 순응도를 높이며 효능 및 효과를 극대화 할 수 있도록 제형을 설계하고 약물치료를 최적화하는 기술이다.

[0008] 약물전달시스템을 위해 시도되는 수단으로는 피부를 통해 약물을 전달하는 패치(patch) 제조기술, 인체 내 특정부위에만 효력을 갖도록 지질로 마이크로캡슐을 만드는 기술, 비수용성 약물을 주사액으로 만드는 기술 그리고 고체 분산체(solid dispersion), 겔제(Gel), 나노입자(Nanoparticles), 리포솜(Liposomes), 마이크로에멀전(Microemulsions), 펠렛(Pellets), 매트릭스정제(Matrix tablets), 삼투압제제(Osmotic pressure) 등이 있다.

[0009] 한편, 리포솜(liposome)은 1960년대 초반 Bangham 등이 전자 현미경을 통해 그 구조를 발견한 이후 생체막 모사 연구와 약물전달 기구의 개발에 있어서 상당히 주목받는 연구 분야가 되어왔다. 리포솜의 구조는 도 1에 도시된 바와 같이 극성 지질이 물에 분산되었을 때 자발적으로 형성되는 밀폐형 이중층막(closed bilayer membrane)과 막 내부의 수용성 공간으로 이루어져 있다. 리포솜의 이중층막은 분자성 물질들과 상호 작용하고 이들을 투과시키거나 포획할 수 있다. 소수성 분자들은 리포솜의 이중층막 사이에 분포하여 극성 부분에 까지 깊게 뺨은 사슬들에 의해 마치 닻을 내린 것처럼 고정되어 있고, 친수성 분자들은 리포솜의 수용성 공간에 포획되어 그 안에서 비교적 자유롭게 움직인다.

[0010] 이러한 포획능력은 수 일에서 수 주일 동안 리포솜 내에 물질을 잡아 둘 수 있게 해주며, 작은 이온들은 이중층막 사이로 확산하거나, 전달체(carriers)의 도움이나 기공(pores)을 통해 이중층막을 통과할 수 있다. 특히 리포솜은 여러 약물들과 호르몬, 효소 등을 쉽게 포획할 수 있고 이렇게 포획된 약제들은 구강이나 근육 또는 혈관주사에 의하여 신체에 투입되었을 때, 지속적으로 약물을 방출하는 지속성체제로 이용하거나, 표적부위에 약물이 도달되도록 하여 독성발현을 줄이며 약효를 증가시키는 등의 포획되지 않았을 때와는 다른 약리학성질을 갖는다. 따라서 리포솜은 생체막의 모사연구 외에도 약물전달체(drug carrier) 및 적중화(targeting) 분야에서 그 이용성이 연구되고 있다.

[0011] 한편, '온도-감응성 폴리머'란, 온도 변화에 따라 폴리머의 상이 전이되는 폴리머를 말하며, 졸(sol)에서 겔(gel) 또는 겔에서 졸로 변한다. 이때, 일정 온도 이하에서는 졸이고 그 온도를 초과하면 겔로 변할 때 이때의

온도를 LCST(Low Critical Solution Temperature)라고 한다.

[0012] 온도-감응성 폴리머는 폴리머 골격에 결합되어 있는 소수성기와 친수성기의 균형에 따라 LCST가 변하며 일반적으로 친수성기의 함량이 증가하면 상전이 온도가 올라가고 소수성기가 증가하면 반대로 상전이 온도가 내려간다. 이러한 온도-감응성 폴리머는 약물 전달 시스템을 중심으로 하는 의료용 재료분야, 환경 분야, 화장품 분야 등 다양한 분야에서 응용 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0013] 종래의 표적지향형 약물전달체로 등록특허 제10-1351331(2014.01.07.)호는 수용액 상에서 형성시킨 Fe^{3+} 이 함침된 리포솜 표면을 실리카로 코팅하고 환원함으로써 구형의 자성나노입자를 제조하고, 상기 제조된 자성나노입자 표면을 온도 감응성 폴리머와 결합시켜 표적지향적 약물전달 시스템을 구축하는 방법을 기재하였다. 하지만, 상기 발명은 자성나노입자의 크기가 400 nm 정도로 입자 크기가 크기 때문에 의료용 재료분야에 사용하기에는 문제가 발생할 수 있으며, 상기 종래발명에서는 세포독성 특성 등의 약물전달 물질로써의 효과가 기재되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1351331호

발명의 내용

해결하려는 과제

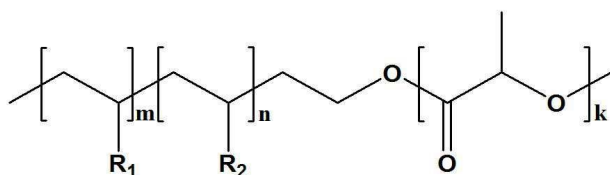
[0015] 본 발명의 첫 번째 목적은 자성체를 함유하는 나노입자의 표면에 양친매성 고분자가 결합된 초상자성 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 두 번째 목적은 양친매성 고분자가 결합된 초상자성 나노입자의 표면에 표적지향 리간드를 공유결합하여 암세포에 선택적으로 결합 가능한 초상자성 나노입자의 제조방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 무기물; 상기 나노입자의 표면에 형성된 양친매성 고분자 물질; 및 파클리탁셀을 포함하되, 상기 양친매성 고분자 물질은 [화학식 1]로 표시되는 초상자성 나노입자를 제공한다.

[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020] 상기 화학식 1에서,

[0021] R_1 및 R_2 는 $O=CH-NR'-R''$ 일 수 있고,

[0022] 여기서, R' 및 R'' 는 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 선형 또는 분지형 탄화수소일 수 있으며,

[0023] m , n , k 는 1 내지 10의 정수일 수 있다.

[0024] 일 실시예로, 상기 R_1 및 R_2 는 $O=CH-NR'-R''$ 일 수 있고,

[0025] 여기서, R' 및 R'' 는 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 선형 또는 분지형 탄화수소일 수 있으며,

[0026] m , n , k 는 1 내지 10의 정수일 수 있다.

- [0027] 일 실시예로, 상기 R_1 은 $O=CH-NR'-R''$ 일 수 있고, R_2 는 $O=CH-NR'$ 일 수 있으며, 이때, R' 는 수소이며, R'' 는 탄소수 1 내지 10의 탄화수소일 수 있다.
- [0028] 일 실시예로, 상기 자성체를 함유하는 나노입자는 산화철(II), 산화철(III), 코발트 페라이트, 징크 페라이트, 니켈 페라이트, 망간 페라이트 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0029] 일 실시예로, 상기 초상자성 나노입자는 표적지향적 리간드와 결합될 수 있다.
- [0030] 일 실시예로, 상기 초상자성 나노입자는 자성체를 함유하는 나노입자 10 내지 20 중량%, 양친매성 고분자 60 내지 80 중량%, 파클리탁셀 10 내지 20 중량%일 수 있다.
- [0031] 본 발명은 1) 양친매성 고분자를 제조하는 단계; 2) 자성체를 함유하는 나노입자의 표면을 친수성 물질로 코팅하는 단계; 3) 상기 1) 및 2) 단계에서 제조된 양친매성 고분자, 코팅된 나노입자 및 파클리탁셀을 혼합하여 반응하는 단계; 4) 상기 3) 단계에 혼합되어 얻어진 입자와 표적지향적 리간드가 결합하는 단계를 제공한다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명은 양친매성 고분자가 결합된 균일한 크기의 초상자성 나노입자를 코어셀 형태로 제조하는 방법을 제공한다.
- [0033] 또한, 본 발명에 의한 초상자성 나노입자는 초상자성 나노입자로 세포독성이 낮은 안전한 나노입자로 표적지향형 약물전체로 사용할 수 있다.

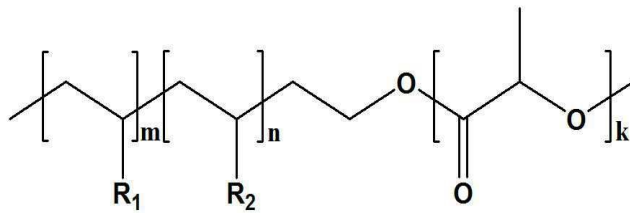
도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 초상자성 나노입자의 제조방법을 나타낸 모식도를 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 초상자성 나노입자의 투과전자 현미경 사진을 도시한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 초상자성 나노입자의 FT-IR 스펙트럼을 도시한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 초상자성 나노입자의 세포 생존율을 도시한 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 초상자성 나노입자의 세포독성결과를 도시한 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 초상자성 나노입자의 세포 흡수율을 도시한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 초상자성 나노입자의 종양세포 성장 억제력을 확인하기 위한 세포 생존율을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있는 바람직한 실시 예를 포함한 발명의 구성을 상세히 설명한다. 본 발명의 각 도면에 있어서, 구조물들의 사이즈나 치수는 본 발명의 명확성을 기하기 위하여 실제보다 확대하거나 축소하여 도시한 것이고, 특징적 구성이 드러나도록 공지된 구성들은 생략하여 도시하였으므로 도면으로 한정하지는 아니한다. 본 발명의 바람직한 실시 예에 대한 원리를 상세하게 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0036] 본 발명에서 도 1은 초상자성 나노입자의 제조방법을 간략하게 나타낸 것으로, 무기물, 상기 나노입자의 표면에 결합되는 양친매성 고분자 물질 및 파클리탁셀을 포함한다. 이때, 상기 양친매성 고분자 물질은 [화학식 1]로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 상기 화학식 1에서,

[0040] R_1 및 R_2 는 $O=CH-NR'-R''$ 일 수 있고,

[0041] 여기서, R' 및 R'' 는 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 선형 또는 분지형 탄화수소일 수 있으며,

[0042] m , n , k 는 1 내지 10의 정수일 수 있다.

[0043] 바람직하게는 상기 화학식 1에서 R_1 은 $O=CH-NR'-R''$ 이고, R_2 는 $O=CH-NR'$ 일 수 있으며, 이때, R' 는 수소이며, R'' 는 탄소수 1 내지 10의 탄화수소일 수 있다. 여기서 상기 R_1 은 친수성이고, R_2 는 소수성으로 양친매성 고분자 일 수 있다.

[0044] 보다 바람직하게는 상기 화학식 1의 양친매성 고분자 물질은 친수성이 서로 다른 N-isopropylacrylamide(NIPAAm)와 acrylamide(AAM)의 공중합체일 수 있다.

[0045] 여기서, 상기 NIPAAm는 온도 감응성 폴리머로, 온도 변화에 따라 폴리머의 상이 전이되는 폴리머이며, 졸에서 겔 또는 겔에서 졸로 변한다. 일반적으로 온도 감응성 폴리머는 수용액 상에서 저임계 용액온도(LCST)가 나타나며, 친수성기와 소수성기가 균형을 이루고 있다. 또한, 온도 감응성 고분자는 온도의 변화에 민감하게 반응하는 성질을 가지고 있기 때문에 약물 전달 시스템에 있어서 매우 중요한 고분자이다.

[0046] 본 발명에서 상기 무기물은 자성나노입자 또는 자성나노클러스터일 수 있으며, 예로는 금속물질, 자성물질 또는 자성합금이 포함될 수 있다. 상기 금속물질의 예로는 Pt, Pd, Ag, Cu 및 Au로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있고, 자성물질의 예로는 Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo, MxMy(상기에서 M 및 M'은 각각 독립적으로 Co, Fe, Ni, Mn, Zn, Gd 또는 Cr을 나타내고, x 및 y 은 각각 식 「 $0 < x \leq 3$ 」 및 「 $0 < y \leq 5$ 」를 만족한다.)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있으며, 자성 합금의 예로는 CoCu, CoPt, FePt, CoSm, NiFe 및 NiFeCo로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 바람직하게는 상기 무기물은 표면에 수산기를 가지고 있으며 외부 자장 하에서 자성특성을 띠는 초상자성 물질을 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 산화철(II), 산화철(III), 코발트 페라이트, 징크 페라이트, 니켈 페라이트, 망간 페라이트 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며 보다 바람직하게는 철 산화물일 수 있다.

[0048] 또한 본 발명에서 제조되는 초상자성 나노입자는 표적지향적 리간드와 결합될 수 있으며, 상기 표적지향 리간드는 하일루론산, RGD 펩타이드, NGR 아미노펩타이드, 트랜스페린, 폴레이트, 갈락토사민, 칼락토사민과 같은 비항체형과 항체형인 Anti-VEGFR, Anti-ERBB2, Anti-CD20, 22, 19, 33, 25, Anti-HLA-DR10베타, Anti-tenascin, Anti-CEA, Anti-MUC1, ANti-TAG72 중 선택되는 어느 하나일 수 있고, 상기 활성화제는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC), 1-알킬-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(1-alkyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), 1-에틸-3-(3-(트리메틸아미노)프로필)카보디이미드(1-ethyl-3-(3-(trimethylammonio)propyl)carbodiimide, ETC), 1-싸클로헥실-3-(2-모르폴리노에틸)카보디이미드(1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide, CMC) 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 하일루론산, RGD 펩타이드, NGR 아미노펩타이드, 트랜스페린, 폴레이트, 갈락토사민 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 RGD 펩타이드일 수 있고, 보다 바람직하게는 RGD 펩타이드일 수 있다.

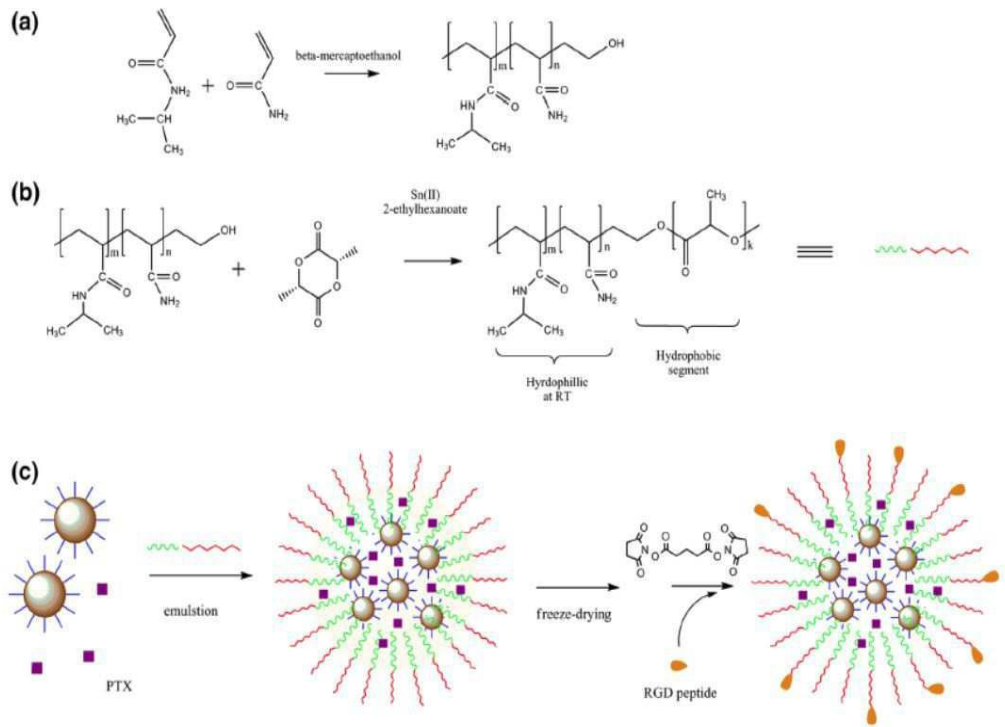
[0049] 일반적으로 RGD 펩타이드는 종양광 관련된 혈관생성과 성장에 관여하는 단백질을 나타내며, 이 부분을 인지하는 수용체가 암세포 표면에 풍부하여 효과적인 암세포 표적지향체로 작용함으로써, 약물전달체계에서 표적 부위에 선택적으로 작용하여 약물의 흡수를 도와줄 수 있다.

- [0050] 본 발명에서, 초상자성 나노입자는 1) 양친매성 고분자를 제조하는 단계, 2) 무기물의 표면을 친수성 물질로 코팅하는 단계, 3) 상기 1) 및 2) 단계에서 제조된 양친매성 고분자, 코팅된 나노입자 및 파클리탁셀을 혼합하여 반응하는 단계, 및 4) 상기 3) 단계에 혼합되어 얻어진 입자와 표적지향적 리간드가 결합하는 단계로 제조될 수 있다.
- [0051] 자세하게는, 상기 1) 단계에서 양친매성 고분자는 앞서 설명된 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있고, 상기 2) 단계에서 무기물은 산화철(II), 산화철(III), 코발트 페라이트, 징크 페라이트, 니켈 페라이트, 망간 페라이트 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 친수성 물질은 카르복실산일 수 있으며, 보다 바람직하게는 오레산으로 무기물의 표면을 코팅할 수 있다.
- [0052] 또한, 상기 3) 단계에서 양친매성 고분자는 60 내지 80 중량%, 나노입자 10 내지 20 중량%, 파클리탁셀 10 내지 20 중량%일 수 있고, 보다 자세하게는 중량 대비 6:1:1일 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 상기 4) 단계에서 표적지향적 리간드는 하일루론산, RGD 펩타이드, NGR 아미노펩타이드, 트랜스페린, 플레이트, 갈락토사민 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 RGD 펩타이드일 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 상기 방법에 의해서 제조된 초상자성 나노입자의 지름은 5 내지 20 nm이 바람직하다.
- [0055] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 자세히 설명한다.
- [0056] (실시예)
- [0057] **실시예 1. 양친매성 고분자 합성**
- [0058] 실시예 1.1 PNA 합성
- [0059] 4.5g NIPAAm, 0.5 g AAm, 0.075 g β -메르캅토 에탄올(β -mercaptoethanol)을 15 ml THF에 용해한다. 0.047 g BPO를 첨가하고, N₂ 분위기, 70℃의 온도에서 12시간 동안 반응한다. 종료 후 4000 rpm으로 원심 분리한 후, 8 시간 동안 동결건조하여 XX g의 PNA를 얻는다.
- [0060] 실시예 1.2 PNAL 합성
- [0061] 상기 실시예 1.1에서 얻어진 PNA 1 g, 5 g L-락티드, 0.22 g 주석 2-에틸헥사노에이트(stannous 2-ethyl hexanoate)을 톨루엔에 용해 후, N₂ 분위기, 110℃의 온도에서 7시간 동안 반응하여 XX g의 PNAL을 얻는다.
- [0062] 실시예 1.3 자성 나노입자 처리
- [0063] 올레산이 코팅된 초상자성 철 산화물 나노입자(이하 OA-SPIONs라 함.) XX g을 5 ml 헥산에 용해한 후, 10 ml 에탄올로 침전시킨 후, 14,000 rpm으로 10 분 동안 원심분리한 후, 3회 이상 세척한다. 이후 얻어진 자성 나노입자를 5 ml 헥산에 재분산한 후 4℃에서 보관한다.
- [0064] 실시예 1.4 PTX-PNAL-SPIONs 제조
- [0065] 상기 실시예 1.2에서 얻어진 PNAL 6 mg, 실시예 1.3에서 제조된 OA-SPIONs 1 mg, 파클리탁셀(이하 PTX라 함.) 1 mg을 400 μ l 메틸렌클로라이드에 용해 후 5 ml 수성 PVA 용액과 혼합한다.
- [0066] 혼합물을 30 초 동안 소니케이터를 사용하여 유화시킨 후, 6000 rpm으로 30초 동안 원심분리한 후 감압 동결건조하여 PTX가 포함된 PTX-PNAL-SPIONs 형태의 나노입자를 얻는다.
- [0067] 실시예 1.5 RGD-PNAL-SPIONs 제조
- [0068] 11 μ l DSG 용액, 30 μ l RGD 용액, 그리고 상기 실시예 1.2에서 얻어진 PNAL 5 mL(실시예 1.5), PTX-PNAL-SPIONs 5mL(실시예 1.6)을 혼합 후 상온에서 4시간 동안 반응한다. 이후 원심분리기를 사용하여 분리된 RGD 펩타이드를 제거한 후, 0.1 N HCl에 재분산한 후 원심분리를 이용하여 세척 후 RGD-PNAL-SPIONs(또는 RGD-PTX-PNAL-SPIONs)를 회수한다.
- [0069] (실험예)
- [0070] 투과전자 현미경을 이용한 입경 분석
- [0071] 본 발명의 상기 실시예를 통해 제조된 초상자성 나노입자를 투과전자 현미경 JEOL 2100F (200 kV)을 이용하여 관찰하였으며, 이는 도 2에 나타내었다.

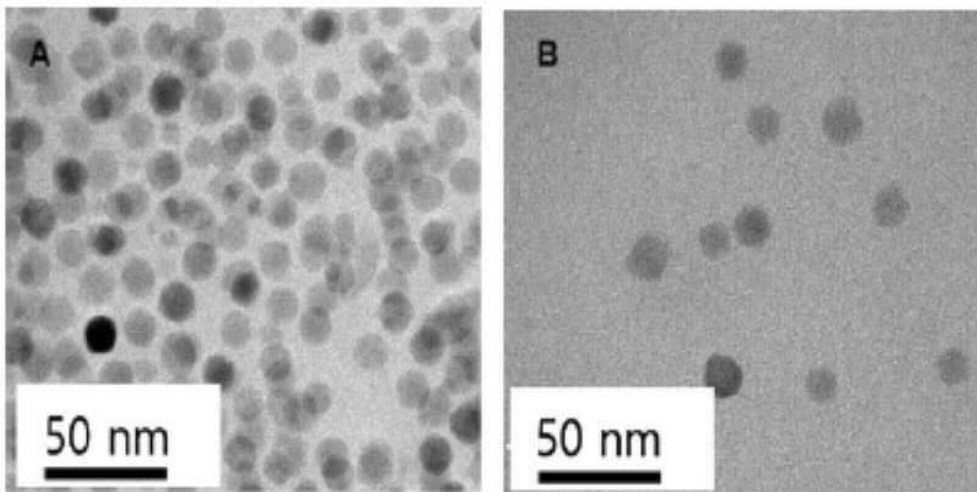
- [0072] 도 2 (a)는 올레산이 코팅된 초상자성 철 산화물 나노입자(OA-SPIONs)이고, 도 2 (b)는 실시예 1.4에서 얻어진 PNL-SPIONs로 평균크기는 10nm의 구형 형상인 것을 확인 할 수 있다.
- [0073] FTIR을 이용한 표면의 작용기 활성화 및 결합여부 측정
- [0074] 본 발명에서는 실시예 1을 통해 얻어진 자성 나노입자의 FT-IR 스펙트럼 (Bruker Alpha FTIR)로 밴드값을 측정한 결과를 도 3에 나타냈다.
- [0075] 결과적으로 PNL-SPIONs 스펙트럼에서 보면 1760cm^{-1} 에서 나타나는 C=O 스트레칭, $1130 \sim 1100\text{cm}^{-1}$ 에서 나타나는 C-O 스트레칭은 PNL과 연관된 피크이며, $2930 \sim 2820^{-1}$ 에서 나타나는 CH_2 피크는 OA-SPIONs와 관련된 것을 확인할 수 있다. 한편, PNA 스펙트럼에서 확인할 수 있는 $1648 \sim 1460\text{cm}^{-1}$ 범위에서의 피크가 PNL-SPIONs 스펙트럼에서 확인되지 않는 것을 통해 PNL의 합성이 제대로 이루어진 것으로 사료될 수 있다.
- [0076] 세포 분석
- [0077] 본 발명의 실시예 1에서 제조된 초상자성 나노입자의 세포독성을 측정한 것으로, 자궁경부암 세포인 헤라 세포 (Hela cell)에 본 발명의 실시예에서 얻어진 초상자성 나노입자를 투입하여 헤라 세포의 생존율 및 세포독성을 실험을 하였으며, 이는 도 4 및 5에 나타냈다.
- [0078] 도 4는, PNL, PNL-SPIONs, RGD-PNL-SPIONs를 포함하는 헤라 세포의 배양시간에 따른 생존율을 나타냈으며, 24시간 이후부터는 세포 생존율은 90 내지 110 % 범위로, 본 발명의 초상자성 나노입자는 세포 독성이 적은 안전한 물질임을 확인할 수 있다.
- [0079] 또한, 도 5는 MMT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
- [0080] diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 용액을 사용한 세포 독성 실험으로 PNL-SPIONs, RGD-PNL-SPIONs의 경우 녹색의 점이 더 많이 보이는 것으로 세포 독성이 적은 것을 알 수 있다.
- [0081] 본 발명의 도 6은 세포의 흡수율을 측정한 것으로, RGD-PNL 및 PNL-SPIONs의 경우 유사한 세포 흡수율을 나타내며, RGD-PNL-SPIONs의 경우 15% 범위의 세포 흡수율을 확인할 수 있다. 이를 통해 코어셀 형태의 RGD-PNL-SPIONs가 암세포에 선택적으로 흡수될 뿐만 아니라, 약물 표적자가 있는 핵 주위로 약물을 정확히 전달할 수 있도록 하여 치료 효과를 극대화할 수 있을 것으로 사료된다.
- [0082] 본 발명의 도 7은 세포의 생존율을 측정한 것으로, 파크리탁셀(PTX)이 본 발명의 실시예를 통해 얻어진 초상자성 나노입자에 캡슐화된 나노입자와 헤라 세포를 배양하여 배양시간에 따른 세포의 생존율을 확인하였다.
- [0083] 도 7에서 알 수 있듯이 PTX-RGD-PNL-SPIONs의 경우에서 헤라 세포의 생존율이 가장 낮은 것을 확인 할 수 있다.

도면

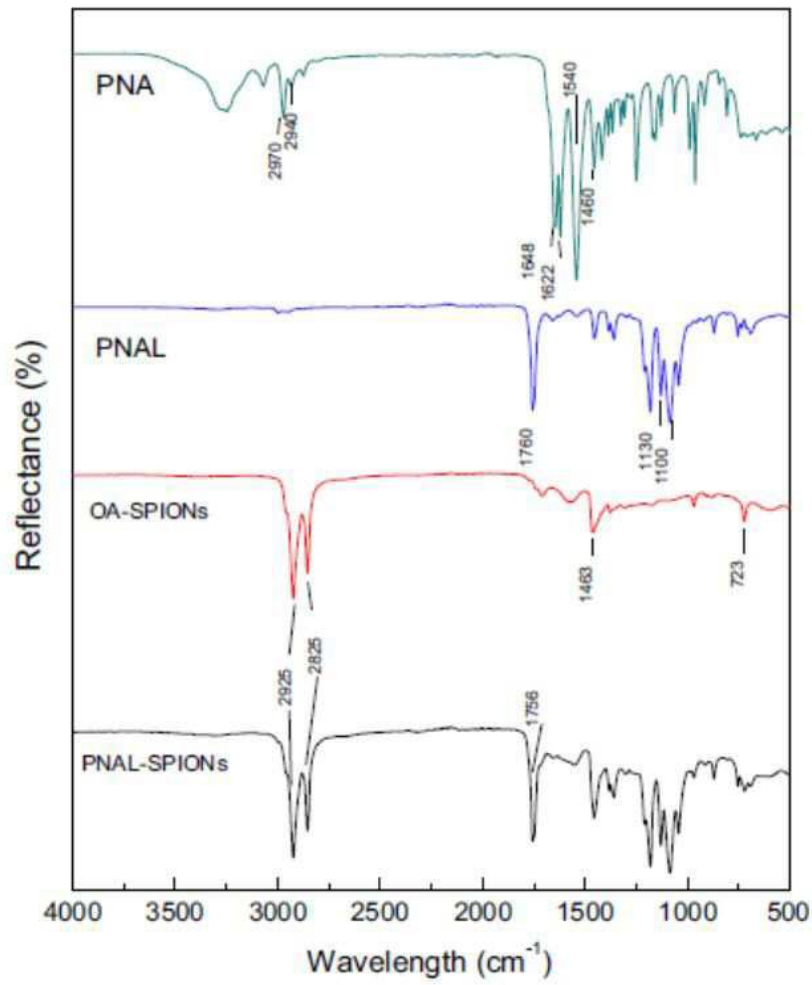
도면1



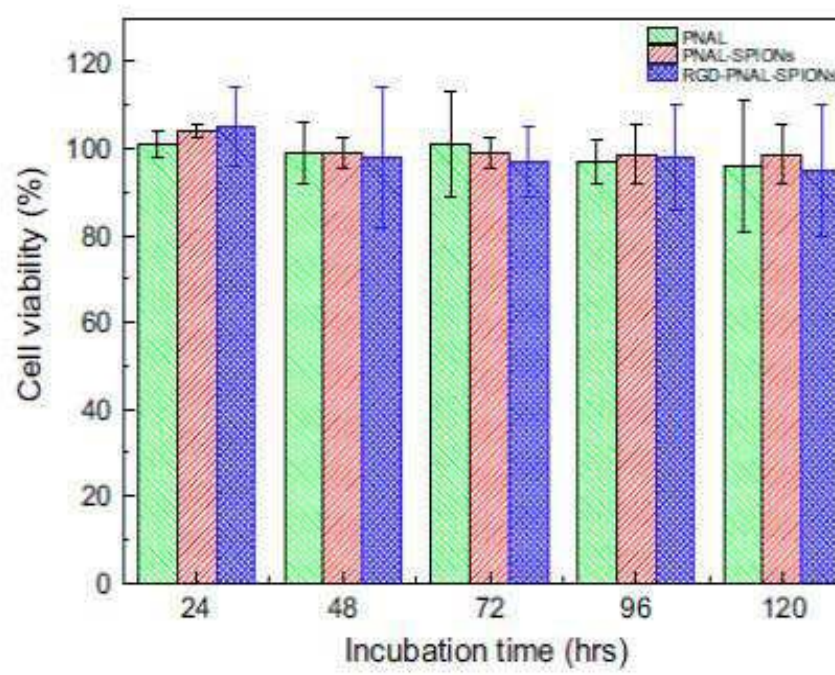
도면2



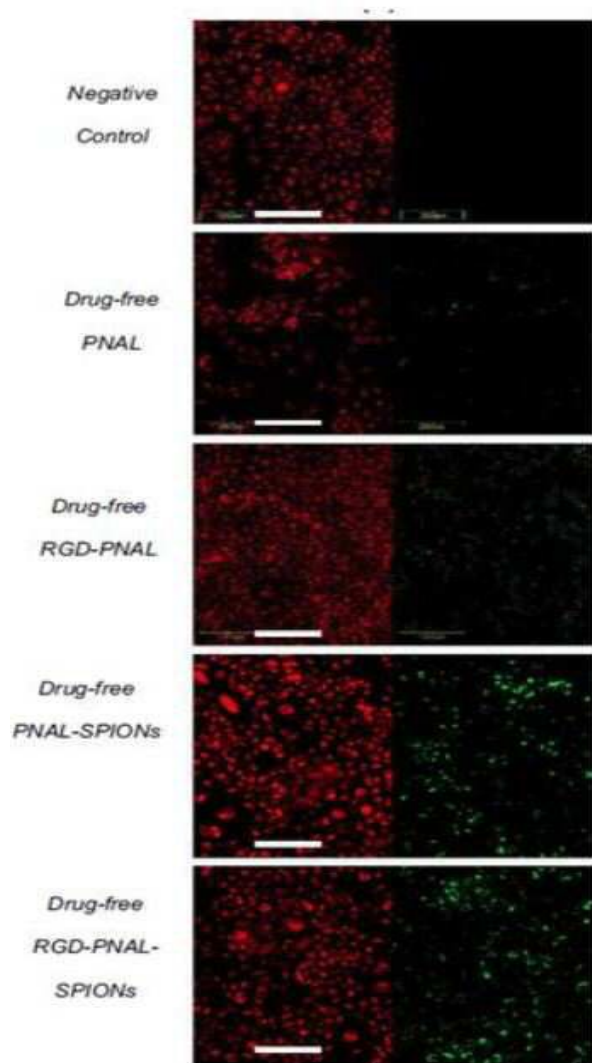
도면3



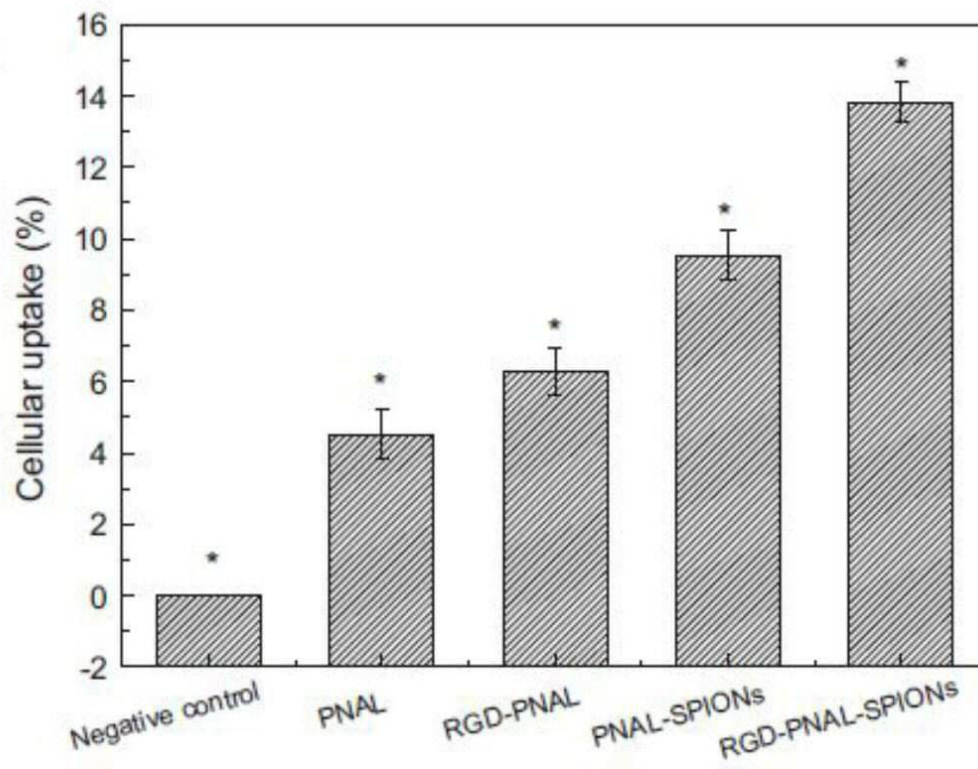
도면4



도면5



도면6



도면7

