



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0045762
(43) 공개일자 2024년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61K 41/00 (2020.01) A61K 47/40 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5161 (2013.01)

A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0125461

(22) 출원일자 2022년09월30일

심사청구일자 2022년09월30일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

정봉근

서울특별시 마포구 백범로 35

임재현

서울특별시 마포구 백범로 35

최형우

서울특별시 마포구 백범로 35

(74) 대리인

최우성

전체 청구항 수 : 총 23 항

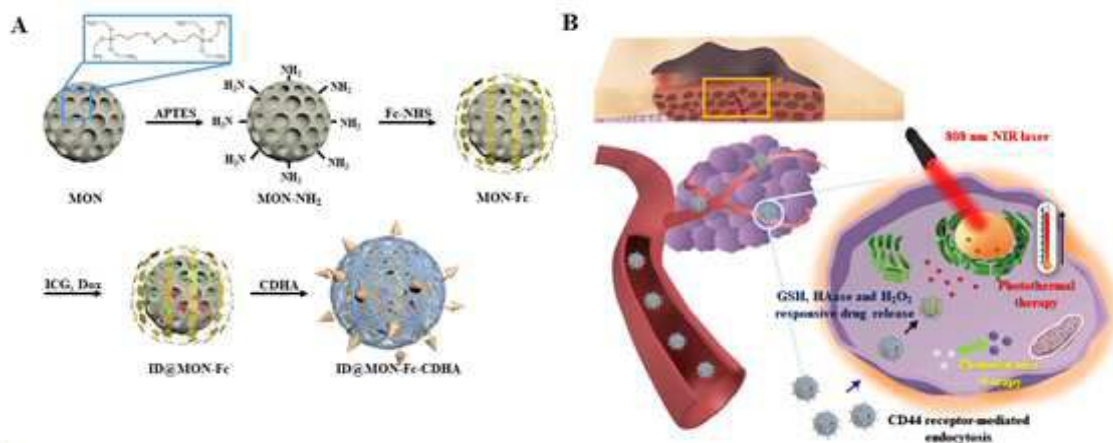
(54) 발명의 명칭 다중 자극에 의한 약물 방출 및 다중 암치료가 가능한 다공성 유기실리카 나노 복합체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 개시는 다양한 자극에 감응하여 약물방출이 가능하며, 화학-광열-광역학치료가 동시에 수행이 가능한 다공성 유기실리카 나노복합체 및 이의 제조 방법을 제공한다. 상기 나노 복합체는 글루타치온(GSH)에 반응하는 이황화 결합을 함유한 다공성 유기 실리카; 페로센; 및 베타-사이클로덱스트린 히알루론산 (β -Cyclodextrin-hyaluronic

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



acid, β CDHA)를 포함한다. 상기 다공성 유기 실리카 나노 복합체는 (a) 다공성 유기 실리카 나노입자를 제조하는 단계; (b) 페로센을 상기 나노입자에 코팅하는 단계; (c) 베타-사이클로텍스트린 히알루론산을 합성하는 단계; 및 (d) 합성된 베타-사이클로텍스트린 히알루론산을 상기 (b) 단계의 결과물에 코팅하는 단계를 포함하는, 방법을 통해 제조된다. 상기 다공성 유기 실리카 나노 복합체는 다중 자극 환경에서만 항암약물을 빠르게 방출할 뿐만 아니라 우수한 근적외선 레이저 기반의 광열-광역학 치료 특성으로 효과적인 암치료의 수행이 가능한 나노 캐리어임을 시사한다.

(52) CPC특허분류

A61K 41/0052 (2013.01)

A61K 41/0057 (2013.01)

A61K 47/40 (2013.01)

A61K 9/5115 (2013.01)

A61K 9/5192 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711155972

과제번호 2022R1A2C2003724

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구지원사업

연구과제명 기능성 전기자극칩과 다공성 나노소재를 이용한 역분화 줄기세포에서 신경세포 분화

연구

기 여 율 40/100

과제수행기관명 서강대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711174600

과제번호 00070316

부처명 과학기술정보통신부, 보건복지부

과제관리(전문)기관명 범부처재생의료기술개발사업단

연구사업명 범부처 재생의료기술개발사업(R&D)

연구과제명 유전체 변이에 의한 배양적응 전분화능줄기세포 탐지 및 제거가 가능한 안전성 확보

기술 개발

기 여 율 30/100

과제수행기관명 서울대학교산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345349060

과제번호 2020R1I1A1A01068810

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 퇴행성 신경 질환 조기 진단을 위한 다기능성 나노 복합체 개발

기 여 율 30/100

과제수행기관명 서강대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

다공성 유기 실리카; 페로센; 및 베타-사이클로덱스트린 히알루론산(β -Cyclodextrin hyaluronic acid, β -CDHA)을 포함하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다공성 유기 실리카는 분자 내에 이황화 결합을 포함하는 것인, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체는 광감각제 및 항암약물 중 하나 이상을 더 포함하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 광감각제는 인도시아닌 그린(indocyanine green)인, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 항암약물은 독소루비신(doxorubicin)인, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 나노 복합체는 다중 자극에 의해 항암약물이 방출되는 것을 특징으로 하며,

상기 다중 자극은 글루타치온(glutathione, GSH), 산화스트레스(H_2O_2) 및 히알루로나아제(hyaluronidase, HAase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 자극인, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 나노 복합체는 암에 대한 화학 치료, 광열 치료 및 광역학 치료 중 선택된 하나 이상의 용도인, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체는 세포의 CD44 수용체를 표적하는 것을 특징으로 하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체의 크기는 40 내지 60 nm인 것을 특징으로 하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체의 표면적은 380 내지 450 m^2/g 인 것을 특징으로 하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체의 기공 부피는 0.5 내지 2.5 cm^3/g 인 것을 특징으로 하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체의 기공 크기는 0.5 내지 2.5 nm인 것을 특징으로 하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 13

제3항에 있어서,

상기 나노 복합체는 나노 복합체 총 중량을 기준으로 광감각제 또는 항암약물을 독립적으로 10 내지 15 중량%로 포함하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 다공성 유기 실리카 나노 복합체를 제조하는 방법으로서,

- (a) 다공성 유기 실리카 나노입자를 제조하는 단계;
- (b) 페로센을 상기 나노입자에 코팅하는 단계;
- (c) 베타-사이클로텍스트린 히알루론산을 합성하는 단계; 및
- (d) 합성된 베타-사이클로텍스트린 히알루론산을 상기 (b) 단계의 결과물에 코팅하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 (a) 단계는 무기 실리카 전구체 및 유기 실리카 전구체를 축합반응하여 나노입자를 합성하는 것인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 유기 실리카 전구체는 분자 내에 이황화결합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 무기 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)인, 방법.

청구항 18

제15항에 있어서,

상기 유기 실리카 전구체는 비스[3-(트리에톡시실릴)프로필]테트라설파이드 (bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfide, BTES) 인, 방법.

청구항 19

제14항에 있어서,

상기 (c) 단계는,

- (i) 베타-사이클로덱스트린을 토실기화(tosylated) 시키는 단계;
- (ii) 상기 (i) 단계의 결과물을 아미노화하는 단계; 및
- (iii) 상기 (ii) 단계의 결과물을 히알루론산에 그래프트하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제14항에 있어서,

상기 방법은 광감각제 및 항암약물 중 하나 이상을 상기 (b) 단계 결과물에 봉입하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 광감각제 및 항암약물은 다공성 유기실리카와의 소수성 상호작용으로 봉입되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서,

상기 광감각제는 인도시아닌 그린인, 방법.

청구항 23

제20항에 있어서,

상기 항암약물은 독소루비신인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시는 다공성 유기 실리카; 페로센; 및 베타-사이클로덱스트린 히알루론산(β -Cyclodextrin hyaluronic acid)을 포함하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기존 항암약물은 정상세포뿐만 아니라, 정상세포 및 조직에도 영향을 주어 독성 부작용을 초래하여 치료 효율이 떨어지고 있다. 이를 극복하기 위해서 다공성 실리카를 비롯한 다양한 나노캐리어 내에 항암약물을 적재하여 암 세포까지 약물을 전달하는 기술을 고안했으나, 표적에 도달하기 전에 누출될 수 있을 뿐만 아니라, 나노캐리어 자체의 독성도 문제가 되었다. 따라서, 암세포에 도달할 때까지 약물을 누출하지 않고 전달하는 기술이 필요하다.

[0003] 한편, 정상 세포와 종양 미세 환경 사이에는 명백한 차이가 있다. 예를 들어 고형 종양의 경우 고온 및 약산성, 높은 세포 내 글루타치온(glutathione, GSH) 수준, 히알루로나아제(hyaluronidase, HASae) 및 고농도 H_2O_2 로 인한 미토콘드리아의 산화 미세 환경이 있다. 따라서 다중 자극 약물 전달 시스템은 복잡한 미세 환경인 생체 내에서 더 잘 적응할 수 있는 가능성이 있으며, 이러한 다중 자극에 의한 약물 방출이 가능한 시스템의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) KR 10-2189426 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 일 측면에서, 다공성 유기 실리카 나노 복합체를 제공하고자 한다.
- [0006] 일 측면에서, 화학적, 광열 및 광역학 암 치료를 위한 다공성 유기 실리카 나노 복합체를 제공하고자 한다.
- [0007] 일 측면에서, 다중 자극에 의한 약물 방출이 가능한 다공성 유기 실리카나노 복합체 및 그 제조 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기한 목적을 달성하기 위하여,
- [0009] 일 측면에서, 본 발명은, 다공성 유기 실리카; 페로센; 및 베타-사이클로덱스트린 히알루론산(β -Cyclodextrin hyaluronic acid, β -CDHA)을 포함하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체를 제공한다.
- [0010] 일 측면에서, 본 발명은, 다공성 유기 실리카 나노 복합체를 제조하는 방법으로서, (a) 다공성 유기 실리카 나노입자를 제조하는 단계; (b) 페로센을 상기 나노입자에 코팅하는 단계; (c) 베타-사이클로덱스트린 히알루론산을 합성하는 단계; 및 (d) 합성된 베타-사이클로덱스트린 히알루론산을 상기 (b) 단계의 결과물에 코팅하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 다공성 유기 실리카 나노 복합체가 1) 근적외선(Near-infrared, NIR) 레이저에 노출되면 암세포를 사멸로 이끌만한 열과 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)를 형성하고, 2) 암세포 내의 과다하게 존재하는 대사산물, 효소 (GSH, HAase, H_2O_2)에 의해 급속 약물 방출이 가능하며, 3)특정 암세포만 선별하여 표적 할 수 있어서 스마트 나노 약물 전달체로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1의 (A)는 다기능성 MON-Fc-CDHA 나노복합체의 합성과정을 나타내는 모식도이고, (B)는 화학-광열-광역학 치료를 위한 ID@MON-Fc-CDHA의 GSH, HAase, H_2O_2 에 의한 독소루비신(doxorubicin, Dox)방출을 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 베타-사이클로덱스트린 히알루론산 게이트 키퍼의 합성과정을 나타낸다.
- 도 3의 (A)는 MON-Fc-CDHA 나노복합체의 TEM 이미지, (B)는 MON-Fc-CDHA의 EDX 맵핑 이미지이고, (C)는 MON-Fc-CDHA 나노복합체의 입도 분산 히스토그램이다.
- 도 4의 (A)는 MON 및 MON-Fc-CDHA의 질소흡탈착 등온곡선, (B)는 MON-Fc-CDHA 나노복합체의 제타전위 분석 데이터이며, (C)는 MON-Fc-CDHA 나노복합체의 푸리에 변환 적외선 스펙트럼이다.
- 도 5의 (A)는 ID@MON-Fc-CDHA의 UV-vis 스펙트럼, (B)는 808 nm NIR 레이저(1 W/cm^2)에 노출된 다양한 농도의 ID@MON-Fc-CDHA의 온도상승 곡선, (C)는 세기가 다른 레이저에 노출된 ID@MON-Fc-CDHA의 온도변화 분석 및 (D)는 근적외선 레이저를 ON/OFF 하였을 때, ID@MON-Fc-CDHA의 온도상승 곡선을 나타낸다.
- 도 6의 (A)는 NIR 레이저를 2분간격으로 10분간 조사한 DPBF가 함유된 ID@MON-Fc-CDHA의 스펙트럼 및 (B)는 ID@MON-Fc-CDHA의 DPBF 억제 분석결과이다.
- 도 7의 (A)는 다중 자극에 노출된 ID@MON-Fc-CDHA의 Dox 방출 프로파일이고, (B)는 다양한 자극에 노출된 ID@MON-Fc-CDHA의 TEM 이미지이다.
- 도 8은 MON-Fc-CDHA를 처리한 NIH-3T3와 B16F10 세포의 생존율 분석결과이다.
- 도 9는 다양한 약물이 봉입된 MON-Fc-CDHA 나노복합체의 CD44 수용체 표적가능을 평가하기 위한 NIH-3T3와 B16F10 세포의 레이저 공초점 주사 현미경 이미지이다.
- 도 10은 NaN_3 및 근적외선 레이저 처리 유무에 의한 ID@MON-Fc-CDHA의 세포내의 ROS 형성 분석결과이다.
- 도 11의 (A)는 근적외선 조사 및 ROS 억제제 처리하의 ID@MON-Fc-CDHA를 함유한 B16F10 세포의 생존율의 정량

분석 및 (B)는 근적외선 및 ROS 억제제 처리 유무에 따른 ID@MON-Fc-CDHA를 함유한 B16F10 세포의 live/dead의 형광이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 명세서에서 사용된 용어 "다공성"이란, 입자의 표면이나 내부에 작은 구멍(기공)이 많이 존재하는 성질이며, 메조다공성(mesoporous)을 포함한다.
- [0014] 본 명세서에 사용된 용어 "유기 실리카"란, 넓은 의미에서 유기 실리카 전구체로부터 만들어진 실리카를 의미하며, 예를 들어 유기 실리카 전구체 및 무기 실리카 전구체를 합성해 얻어진 유무기 복합실리카를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 명세서에서 사용된 용어 "게이트 키퍼"는 나노 복합체에 봉입된 물질의 누출을 방지하기 위해 표면에 코팅되는 물질로서, 예를 들어 베타-사이클로덱스트린 히알루론산일 수 있다.
- [0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명은, 일 측면에서, 다공성 유기 실리카; 페로센; 및 베타-사이클로덱스트린 히알루론산(β -Cyclodextrin hyaluronic acid, β -CDHA)을 포함하는, 다공성 유기 실리카 나노 복합체를 제공한다.
- [0019] 일 구현예에 있어서, 상기 다공성 유기 실리카는 분자 내에 이황화 결합을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 유기 실리카에 존재하는 이황화결합은 글루타치온(glutathione, GSH)에 의해 절단될 수 있다.
- [0020] 일 구현예에 있어서, 상기 베타-사이클로덱스트린 히알루론산은 산화스트레스(H_2O_2) 및/또는 히알루로나아제(hyaluronidase, HAase)에 반응하여 분해되는 것일 수 있다. 구체적으로 베타-사이클로덱스트린(β -Cyclodextrin)만으로는 H_2O_2 에만 반응하는 반면, 히알루론산에 그래프트된 베타-사이클로덱스트린(β -CDHA)는 H_2O_2 뿐만 아니라 HAase에도 반응하여 분해된다. 상기 베타-사이클로덱스트린 히알루론산(β -CDHA)은 나노 복합체의 게이트 키퍼로 작용하여 추후 봉입되는 약물의 누출 방지 및 방출 조절이 가능할 수 있다.
- [0021] 일 구현예에 있어서, 상기 페로센은 상기 다공성 유기 실리카의 표면에 코팅되는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 페로센은 다공성 유기 실리카의 표면에 형성된 아미노기에 결합하는 것일 수 있다.
- [0022] 일 구현예에 있어서, 상기 베타-사이클로덱스트린 히알루론산은 페로센이 코팅된 다공성 유기 실리카의 표면에 코팅되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 베타-사이클로덱스트린 히알루론산은 페로센과의 게스트-호스트(guest-host) 상호작용을 통해 코팅되는 것일 수 있다. 상기 게스트-호스트 상호작용은 게스트 및 호스트 물질 사이의 화학적 결합 특성뿐만 아니라 구조적 특성에 의해 형성되는 비공유결합성 상호작용으로, 가역적이고 선택적인 특성이 있다.
- [0023] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체는 광감각제 및 항암약물 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 광감각제는 근적외선 형광 염료일 수 있다. 또한 예를 들어, 상기 항암약물은 표적 항암제 또는 세포 독성 항암제일 수 있다.
- [0024] 일 구현예에 있어서, 상기 광감각제 또는 항암약물은 상기 다공성 유기 실리카 내부 봉입되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 광감각제 또는 항암약물은 다공성 유기실리카와 소수성 상호작용을 통하여 상기 나노 복합체에 봉입되는 것일 수 있다.
- [0025] 일 구현예에 있어서, 상기 광감각제는 인도시아닌 그린(indocyanine green)일 수 있다. 인도시아닌 그린은 약 800 nm의 근적외선의 스펙트럼을 흡수하는 특성을 가지고 있으며, 따라서 상기 나노 복합체에 근적외선을 조사할 경우, 인도시아닌 그린은 상기 근적외선을 흡수하여 온도를 상승시키고, 활성산소를 방출하면 암의 광열 및 광역학 치료를 가능하게 한다.
- [0026] 일 구현예에 있어서, 상기 항암약물은 독소루비신(doxorubicin)일 수 있다. 상기 항암약물은 나노 복합체로부터 방출되어 암의 화학적 치료를 가능하게 할 수 있다.
- [0027] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체는 다중 자극에 의해 항암약물이 방출되는 것을 특징으로 하며, 상기 다중 자극은 글루타치온(glutathione, GSH), 산화스트레스(H_2O_2) 및 히알루로나아제(hyaluronidase, HAase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 자극일 수 있다. 정상 세포와 종양 미세 환경 사이에는 명백한 차이가 있다.

예를 들어 고형 종양의 경우 고온 및 약산성, 높은 세포 내 글루타치온(gluthathione, GSH) 수준, 히알루로나아제(hyaluronidase, HAse) 및 고농도 H_2O_2 로 인한 미토콘드리아의 산화 미세 환경이 있다. 따라서 다중 자극 약물 전달 시스템은 복잡한 미세 환경인 생체 내에서 더 잘 적응할 수 있는 가능성이 있다. 상기 언급한 바와 같이, 나노 복합체의 유기 실리카에 존재하는 이황화결합은 암세포 내에 과다 존재하는 글루타치온에 의해 절단되므로, 나노 복합체가 표적된 암세포에 의해 약물을 방출할 수 있다. 또한 나노 복합체의 베타-사이클로덱스트린 히알루론산은 H_2O_2 뿐만 아니라 HAse에도 반응하여 약물이 방출하는 역할을 한다. 따라서, 나노 복합체로부터 다중 자극에 의해 방출되는 약물의 누적 방출량은 자극이 없을 때 방출되는 약물의 누적 방출량보다 높다는 장점이 있다.

[0028] 일 구현예에 있어서, pH 6.5 내지 8.0의 용액에서 다중 자극에 의해 방출된 항암약물의 10시간 경과 후 누적 방출량은 40% 이상일 수 있다. 예를 들어서, 상기 방출 용액의 pH는 6.5 이상, 6.6 이상, 6.7 이상, 6.8 이상, 6.9 이상, 7.0 이상, 7.1 이상, 7.2 이상, 7.3 이상, 7.4 이상, 8.0 이하, 7.9 이하, 7.8 이하, 7.7 이하, 7.6 이하, 또는 7.5 이하일 수 있다. 또한 상기 항암약물의 방출 시작시간으로부터 10시간 이상 경과된 후의 누적 방출량은 40% 이상, 42.5% 이상, 45% 이상, 47.5% 이상, 50% 이상, 52.5% 이상, 55% 이상, 57.5% 이상, 60% 이상, 62.5% 이상, 65% 이상, 67.5% 이상, 70% 이상, 72.5% 이상, 75% 이상, 77.5% 이상, 80% 이상, 82.5% 이상, 85% 이상, 87.5% 이상, 90% 이상, 92.5% 이상, 95% 이상, 97.5% 이상, 또는 100% 이하일 수 있다.

[0029] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체는 암에 대한 화학 치료, 광열 치료 및 광역학 치료 중 선택된 하나 이상의 용도일 수 있다. 구체적으로, 상기 화학 치료는 나노 복합체에 봉입된 항암약물에 의한 것일 수 있고, 광열 및 광역학 치료는 나노 복합체에 봉입된 광감각제에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 인도시아닌 그린에 근적외선을 조사할 경우, 열과 활성산소를 동시에 발생시킬 수 있으며, 이를 이용해 암의 광열 및 광역학 치료가 가능하다.

[0030] 일 구현예에 있어서, 상기 광감각제를 포함하는 나노 복합체는 근적외선 조사 시, 10 내지 30 °C의 온도가 상승할 수 있다. 예를 들어, 750 내지 850 nm의 파장일 수 있고, 750 nm 이상, 760 nm 이상, 770 nm 이상, 780 nm 이상, 790 nm 이상, 800 nm 이상, 801 nm 이상, 803 nm 이상, 805 nm 이상, 808 nm 이상, 850 nm 이하, 840 nm 이하, 830 nm 이하, 820 nm 이하, 또는 810 nm 이하의 광원을 나노 복합체에 조사하는 것일 수 있다. 상기 근적외선을 조사할 경우, 예를 들어, 10 °C 이상, 11 °C 이상, 12 °C 이상, 13 °C 이상, 14 °C 이상, 15 °C 이상, 16 °C 이상, 17 °C 이상, 18 °C 이상, 19 °C 이상, 20 °C 이상, 30 °C 이하, 29 °C 이하, 28 °C 이하, 27 °C 이하, 26 °C 이하, 25 °C 이하, 24 °C 이하, 23 °C 이하, 22 °C 이하, 또는 21 °C 이하로 나노 복합체의 온도가 상승하는 것일 수 있다.

[0031] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체는 세포의 CD44 수용체를 표적하는 것일 수 있다. 구체적으로 CD44 수용체 매개 세포 내 이입 메커니즘을 통해 암세포에 내부화될 수 있다.

[0032] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체의 크기는 40 내지 60 nm일 수 있다. 예를 들어, 상기 나노 복합체는 40 nm 이상, 41 nm 이상, 42 nm 이상, 43 nm 이상, 44 nm 이상, 45 nm 이상, 46 nm 이상, 47 nm 이상, 47.5 nm 이상, 48 nm 이상, 48.1 nm 이상, 48.2 nm 이상, 48.3 nm 이상, 48.4 nm 이상, 48.5 nm 이상, 48.6 nm 이상, 48.7 nm 이상, 48.8 nm 이상, 48.9 nm 이상, 49 nm 이상, 49.5 nm 이상, 50 nm 이상, 60 nm 이하, 59 nm 이하, 58 nm 이하, 57 nm 이하, 56 nm 이하, 55 nm 이하, 54 nm 이하, 53 nm 이하, 52 nm 이하, 또는 51 nm 이하의 크기를 가질 수 있다. 상기 나노 복합체의 크기는 수화물 층을 포함하지 않는 건조상태의 크기이다. 수화물 층을 포함하는 경우, 예를 들어, 동적 광 산란(dynamic light scattering, DLS)로 측정된 상기 나노 복합체의 크기는 100 내지 150 nm일 수 있다. 예를 들어, 100 nm 이상, 105 nm 이상, 110 nm 이상, 115 nm 이상, 120 nm 이상, 125 nm 이상, 150 nm 이하, 145 nm 이하, 140 nm 이하, 135 nm 이하, 또는 130 nm 이하일 수 있다.

[0033] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체의 표면적은 380 내지 450 m^2/g 일 수 있다. 예를 들어, 380 m^2/g 이상, 385 m^2/g 이상, 390 m^2/g 이상, 395 m^2/g 이상, 400 m^2/g 이상, 405 m^2/g 이상, 406 m^2/g 이상, 407 m^2/g 이상, 408 m^2/g 이상, 409 m^2/g 이상, 410 m^2/g 이상, 411 m^2/g 이상, 411.5 m^2/g 이상, 412 m^2/g 이상, 412.5 m^2/g 이상, 413 m^2/g 이상, 413.5 m^2/g 이상, 414 m^2/g 이상, 414.5 m^2/g 이상, 415 m^2/g 이상, 415.5 m^2/g 이상, 450 m^2/g 이하, 445 m^2/g 이하, 440 m^2/g 이하, 435 m^2/g 이하, 430 m^2/g 이하, 429 m^2/g 이하, 428 m^2/g 이하, 427 m^2/g 이하, 426 m^2/g 이하, 425 m^2/g 이하, 424 m^2/g 이하, 423 m^2/g 이하, 422 m^2/g 이하, 421 m^2/g 이하, 420

m^2/g 이하, 419.5 m^2/g 이하, 419 m^2/g 이하, 418.5 m^2/g 이하, 418 m^2/g 이하, 417.5 m^2/g 이하, 417 m^2/g 이하, 416.5 m^2/g 이하, 또는 416 m^2/g 이하일 수 있다.

[0034] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체의 기공 부피는 0.5 내지 2.5 cm^3/g 일 수 있다. 예를 들어, 0.5 cm^3/g 이상, 0.55 cm^3/g 이상, 0.6 cm^3/g 이상, 0.65 cm^3/g 이상, 0.7 cm^3/g 이상, 0.75 cm^3/g 이상, 0.8 cm^3/g 이상, 0.85 cm^3/g 이상, 0.9 cm^3/g 이상, 0.95 cm^3/g 이상, 1.0 cm^3/g 이상, 1.05 cm^3/g 이상, 1.1 cm^3/g 이상, 1.15 cm^3/g 이상, 1.2 cm^3/g 이상, 1.25 cm^3/g 이상, 1.3 cm^3/g 이상, 1.35 cm^3/g 이상, 1.4 cm^3/g 이상, 1.45 cm^3/g 이상, 1.5 cm^3/g 이상, 2.5 cm^3/g 이하, 2.45 cm^3/g 이하, 2.4 cm^3/g 이하, 2.35 cm^3/g 이하, 2.3 cm^3/g 이하, 2.25 cm^3/g 이하, 2.2 cm^3/g 이하, 2.15 cm^3/g 이하, 2.1 cm^3/g 이하, 2.05 cm^3/g 이하, 2.0 cm^3/g 이하, 1.95 cm^3/g 이하, 1.9 cm^3/g 이하, 1.85 cm^3/g 이하, 1.8 cm^3/g 이하, 1.75 cm^3/g 이하, 1.7 cm^3/g 이하, 1.65 cm^3/g 이하, 1.6 cm^3/g 이하, 또는 1.55 cm^3/g 이하일 수 있다.

[0035] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체의 기공 크기는 0.5 내지 2.5 nm일 수 있다. 예를 들어, 0.5 nm 이상, 0.55 nm 이상, 0.6 nm 이상, 0.65 nm 이상, 0.7 nm 이상, 0.75 nm 이상, 0.8 nm 이상, 0.85 nm 이상, 0.9 nm 이상, 0.95 nm 이상, 1.0 nm 이상, 1.05 nm 이상, 1.1 nm 이상, 1.15 nm 이상, 1.2 nm 이상, 1.25 nm 이상, 1.3 nm 이상, 1.35 nm 이상, 1.4 nm 이상, 1.45 nm 이상, 1.5 nm 이상, 2.5 nm 이하, 2.45 nm 이하, 2.4 nm 이하, 2.35 nm 이하, 2.3 nm 이하, 2.25 nm 이하, 2.2 nm 이하, 2.15 nm 이하, 2.1 nm 이하, 2.05 nm 이하, 2.0 nm 이하, 1.95 nm 이하, 1.9 nm 이하, 1.85 nm 이하, 1.8 nm 이하, 1.75 nm 이하, 1.7 nm 이하, 1.65 nm 이하, 1.6 nm 이하, 또는 1.55 nm일 수 있다.

[0036] 일 구현예에 있어서, 상기 나노 복합체는 나노 복합체 총 중량을 기준으로 광감각제 또는 항암약물을 독립적으로 10 내지 15 중량%로 포함할 수 있다. 예를 들어, 광감각제를 10 중량% 이상, 10.1 중량% 이상, 10.2 중량% 이상, 10.3 중량% 이상, 10.4 중량% 이상, 10.5 중량% 이상, 10.6 중량% 이상, 10.7 중량% 이상, 10.8 중량% 이상, 10.9 중량% 이상, 11 중량% 이상, 11.1 중량% 이상, 11.2 중량% 이상, 11.3 중량% 이상, 11.4 중량% 이상, 11.5 중량% 이상, 11.6 중량% 이상, 11.7 중량% 이상, 11.8 중량% 이상, 11.9 중량% 이상, 12 중량% 이상, 12.1 중량% 이상, 12.2 중량% 이상, 12.3 중량% 이상, 12.4 중량% 이상, 12.5 중량% 이상, 15 중량% 이하, 14.9 중량% 이하, 14.8 중량% 이하, 14.7 중량% 이하, 14.6 중량% 이하, 14.5 중량% 이하, 14.4 중량% 이하, 14.3 중량% 이하, 14.2 중량% 이하, 14.1 중량% 이하, 14 중량% 이하, 13.9 중량% 이하, 13.8 중량% 이하, 13.7 중량% 이하, 13.6 중량% 이하, 13.5 중량% 이하, 13.4 중량% 이하, 13.3 중량% 이하, 13.2 중량% 이하, 13.1 중량% 이하, 13 중량% 이하, 12.9 중량% 이하, 12.8 중량% 이하, 12.7 중량% 이하, 또는 12.6 중량% 이하로 포함할 수 있다.

[0037] 또한 예를 들어, 상기 광감각제의 함량과는 독립적으로 상기 항암약물을 10 중량% 이상, 10.1 중량% 이상, 10.2 중량% 이상, 10.3 중량% 이상, 10.4 중량% 이상, 10.5 중량% 이상, 10.6 중량% 이상, 10.7 중량% 이상, 10.8 중량% 이상, 10.9 중량% 이상, 11 중량% 이상, 11.1 중량% 이상, 11.2 중량% 이상, 11.3 중량% 이상, 11.4 중량% 이상, 11.5 중량% 이상, 11.6 중량% 이상, 11.7 중량% 이상, 11.8 중량% 이상, 11.9 중량% 이상, 12 중량% 이상, 12.1 중량% 이상, 12.2 중량% 이상, 12.3 중량% 이상, 12.4 중량% 이상, 12.5 중량% 이상, 15 중량% 이하, 14.9 중량% 이하, 14.8 중량% 이하, 14.7 중량% 이하, 14.6 중량% 이하, 14.5 중량% 이하, 14.4 중량% 이하, 14.3 중량% 이하, 14.2 중량% 이하, 14.1 중량% 이하, 14 중량% 이하, 13.9 중량% 이하, 13.8 중량% 이하, 13.7 중량% 이하, 13.6 중량% 이하, 13.5 중량% 이하, 13.4 중량% 이하, 13.3 중량% 이하, 13.2 중량% 이하, 13.1 중량% 이하, 13 중량% 이하, 12.9 중량% 이하, 12.8 중량% 이하, 12.7 중량% 이하, 또는 12.6 중량% 이하로 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명은, 일 측면에서, 다공성 유기 실리카 나노 복합체를 제조하는 방법으로서, (a) 다공성 유기 실리카 나노입자를 제조하는 단계; (b) 페로센을 상기 나노입자에 코팅하는 단계; (c) 베타-사이클로텍스트린 히알루론산을 합성하는 단계; 및 (d) 합성된 베타-사이클로텍스트린 히알루론산을 상기 (b) 단계의 결과물에 코팅하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.

[0039] 일 구현예에 있어서, 상기 (a) 단계는 무기 실리카 전구체 및 유기 실리카 전구체를 축합반응하여 나노입자를 합성하는 것일 수 있다.

- [0040] 일 구현예에 있어서, 상기 유기 실리카 전구체는 분자 내에 이황화결합을 포함하는 것일 수 있다. 암세포에 과다존재하는 글루타치온(GSH)에 의해 상기 이황화결합이 절단되어 약물이 방출될 수 있다.
- [0041] 일 구현예에 있어서, 상기 무기 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)일 수 있다.
- [0042] 일 구현예에 있어서, 상기 유기 실리카 전구체는 비스[3-(트리에톡시실릴)프로필]테트라설파이드 (bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfide, BTES)일 수 있다.
- [0043] 일 구현예에 있어서, 상기 (b) 단계는 (a) 단계의 결과물인 유기 실리카 표면을 아미노화한 후 수행되는 것일 수 있다.
- [0044] 일 구현예에 있어서, 상기 (c) 단계는, (i) 베타-사이클로텍스트린을 토실기화(tosylated) 시키는 단계; (ii) 상기 (i) 단계의 결과물을 아미노화하는 단계; 및 (iii) 상기 (ii) 단계의 결과물을 히알루론산에 그래프트하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0045] 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 광감각제 및 항암약물 중 하나 이상을 상기 (b) 단계 결과물에 봉입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0046] 일 구현예에 있어서, 상기 광감각제 및 항암약물은 다공성 유기실리카 나노입자와의 소수성 상호작용으로 봉입되는 것일 수 있다.
- [0047] 일 구현예에 있어서, 상기 광감각제는 인도시아닌 그린일 수 있다.
- [0048] 일 구현예에 있어서, 상기 항암약물은 독소루비신일 수 있다.
- [0050] 이하, 실시예 등을 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 청구범위에 기재된 기술적 사상과 실질적으로 동일한 구성을 갖고 동일한 작용 효과를 이루는 것은 어떠한 것이라도 본 발명의 기술적 범위에 포함된다.
- [0052] [제조예]
- [0053] **1. 다공성 유기 실리카 나노 입자(Mesoporous organosilica nanoparticle, MON) 제조**
- [0054] 염화세트리모늄(Cetrimonium chloride, CTAC) 2 mL와 테트라에틸아민(trimethylamine, TEA) 53 μ L를 20 mL의 탈이온수(DW)에 넣고 95 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 교반하였으며, 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS, Sigma-Aldrich) 1.06 mL와 비스[3-(트리에톡시실릴)프로필]테트라설파이드 (bis[3-(triethoxysilyl)propyl]tetrasulfide, BTES, Gelest) 1.6 mL를 적하하여 4시간 동안 반응하였다. 상온에서 냉각한 후, 생성된 생성물은 중심 삼투압에 의해 회수된 후 에탄올(EtOH)과 DW로 여러 번 세척되었다. 나노입자에 잔류하는 CTAC 템플릿을 1 중량%의 NaCl 용액을 사용하여 제거하고 메탄올(MeOH)로 행구었다. 다공성 유기 실리카 나노입자는 오븐에서 건조를 통해 얻었다.
- [0055] **2. 유기 실리카-페로센(MON-Fc) 복합체 제조**
- [0056] 페로센(Fc)기를 도입하기 전에, MON의 아미노화가 먼저 수행되었다. EtOH에 용해된 MON(50 mg)을 10분 동안 초음파 처리하였다. 이어서, 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane, APTES) 500 μ L를 MON 용액에 투입하고 85 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 교반하였다. 아미노화된 MON(MON-NH₂)을 EtOH와 DW로 원심분리하여 정제하였으며, 10 mg의 Fc-NHS와 10 mg의 MON-NH₂를 PBS(pH 5.7)에 분산시킨 후 18시간 동안 교반하였다. 상기 MON-Fc는 원심분리하여 MeOH로 세척한 후 80 $^{\circ}$ C에서 건조하였다.
- [0057] **3. β -CDHA 합성**
- [0058] 4.0 g의 β -CD에 NaOH 용액(0.5 M) 50 mL와 4-톨루엔설폰일 클로라이드(4-Toluenesulfonyl chloride, TsCl) 3.0 g을 0 $^{\circ}$ C에서 강하게 교반하였다. 1시간 후, 미반응 TsCl을 여과한 후, 0.1 M HCl을 이용하여 여과물을 중화시켜 토실화된(Tosylated) β 를 침전물로 얻었다. 둘째, Ts- β 를 40 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 에틸렌디아민 20 mL와 반응시켰다. 그 후 아세톤으로 처리하여 아미노화된 β 를 침전시켰다. 마지막으로 EDC(100 mg)와

NHS(100 mg)를 첨가하고 PBS(pH 5.7)에 용해된 HA 50 mg에 소닉하였다. 1시간 후 β 50 mg을 18시간 동안 혼합하였으며, β 는 투석막(MWCO: 6-8 kDa)을 이용하여 투석하고 동결건조하였다(도 2).

[0059] 4. 인도시아닌 그린 및 독소루비신 담지

[0060] 항암 효과와 광치료 효과를 제공하기 위해, MON-Fc(10 mg)를 인도시아닌 그린(ICG) 5 mg와 독소루비신(Dox) 5 mg가 포함된 DW에 현탁시키고 24시간 동안 교반하였다. 인도시아닌 그린 및 독소루비신이 담지된 다공성 유기 실리카-페로센 복합체(이하, ID@MON-Fc)는 원심분리법으로 채취하여 DW로 세척하였다.

[0061] 5. β -CDHA 게이트 키퍼 코팅

[0062] 암 표적형 및 자극 반응형 ID@MON-Fc 나노복합체를 만들기 위해 ID@MON-Fc와 β CDHA를 DW에 1:1 질량비로 분산시킨 후 24시간 동안 반응하였다. 반응하지 않은 화학물질은 원심분리에 의해 제거되고 DW로 행구었다. 인도시아닌 그린 및 독소루비신이 담지된 다공성 유기 실리카-페로센- β CDHA 나노 복합체(이하, ID@MON-Fc-CDHA)는 추후 사용을 위해 동결건조되었다. 이렇게 합성한 나노복합체는 피부암세포인 B16F10에 CD44 수용체 매개 세포 내 이입을 통해 이입이 가능하며, 암세포 내에 과량으로 존재하는 GSH, HAase, H2O2에 반응하여 신속한 약물방출을 할 수 있을 뿐만 아니라, 808 nm NIR 레이저에 의해 열과 활성산소를 동시에 발생시킬 수 있다 (도 1).

[0064] [실험예]

[0065] 1. MON-Fc-CDHA 사이즈 및 형태 분석

[0066] MON-Fc-CDHA 나노 복합체의 사이즈, 형태를 투과전자현미경(TEM, JEOL)를 이용하여 확인하였다 (도 3A). MON, MON-Fc, MON-Fc-CDHA 나노복합체 모두 구 형태의 다공성 입자임을 확인하였으며, 평균 크기는 42.8 ± 1.29 , 46.6 ± 3.54 , 48.6 ± 1.14 nm 로 측정되었다. 도 3B는 MON-Fc-CDHA를 에너지분산 X선 분광법 맵핑(EDX mapping)을 하여 원소분석을 수행한 것을 나타낸다. Mapping 이미지를 보면 Si, O, Fe, S의 신호가 감지되는 것을 보아, 나노 복합체의 실리카 안에 sulfur와 CDHA 게이트 키퍼와 결합하는 Fc가 존재하는 것을 확인하였다. 추가적으로 MON-Fc-CDHA과 중간 반응물의 Size distribution을 동적 광산란(DLS, Malvern)를 이용하여 확인하였다. 도 3C를 보면 MON, MON-Fc, MON-Fc-CDHA의 크기는 약 77.8, 99.9 126.6 nm로 측정되었다. TEM과 DLS 데이터에서 나노 복합체의 크기가 차이나는 것은 TEM으로 측정된 크기는 건조 상태에서 측정된 것으로 수화물 층을 포함하지 않기 때문이다.

[0067] 2. MON-Fc-CDHA 기공 특성 분석

[0068] 질소가스 흡탈착 등온곡선을 이용하여서 MON과 MON-Fc-CDHA의 기공특성을 확인하였다 (도 4A). MON은 $919.15\text{m}^2/\text{g}$ 의 표면적, $4.035\text{cm}^3/\text{g}$ 의 기공 부피 및 5.6 nm의 평균 기공 크기로 잘 정의된 기공을 가지고 있다. 게이트 키퍼 후에는 표면적, 기공 부피 및 기공 크기가 각각 $416.7\text{m}^2/\text{g}$, $1.501\text{cm}^3/\text{g}$, 1.4 nm로 크게 감소한 것을 확인할 수 있는데, 이는 나노 복합체의 중간 기공이 CDHA 게이트 키퍼에 의해 차단되었음을 보여준다.

[0069] 3. MON-Fc-CDHA 표면 개질 특성 분석

[0070] MON-Fc-CDHA 나노복합체의 합성과 표면 개질을 제타전위 측정 (ZS90, Malvern)과 푸리에 변환 적외선 분광법(Vertex70, Bruker)을 이용하여 확인하였다. 도 4B를 보면 MON, MON-NH₂, MON-Fc, ID@MON-Fc, ID@MON-Fc-CDHA의 제타 전위는 각각 -18.4 ± 0.9 , 9.03 ± 1.5 , 25.9 ± 0.1 , -22.9 ± 0.751 , -33.8 ± 0.416 mV로 측정되었다. 이러한 변화는 성공적으로 아민화, Fc 분자의 도입, CDHA가 도입된 것을 시사한다.

[0071] 도 4C는 MON, MON-Fc 및 MON-Fc-CDHA의 FTIR 스펙트럼을 보여준다. MON의 스펙트럼에서 800, 960 및 1090cm^{-1} 에서 눈에 띄는 피크는 해당 Si-O-Si의 대칭 및 비대칭 신축 진동에 해당하고, BTES의 C-H 신축으로 인해 2935cm^{-1} 에서 새로운 피크가 관찰되었다. Fc 접합 후 아마이드 I 및 II는 각각 1540 , 1640cm^{-1} 에서 나타났다. 마지막으로, MON-Fc-CDHA의 스펙트럼은 1410 및 1620cm^{-1} 에서 새로운 진동 피크를 보여주었으며, 이는 HA의 C=O 스트레칭에 해당된다.

[0072] 4. ICG 및 Dox 담지 분석

[0073] MON-Fc-CDHA 내의 ICG와 Dox의 존재를 확인하기 위해 UV-vis 스펙트럼(UV1800, Shimadzu)을 측정하였다 (도

5A). ID@MON-Fc-CDHA 스펙트럼을 보면 ICG, Dox의 특징적인 피크인 480, 780 nm가 보였다. 이는 ICG와 Dox가 성공적으로 캡슐화된 것을 시사한다. 또한, MON-Fc-CDHA 나노복합체 내 ICG 및 Dox의 담지 용량은 각각 12.8 및 12.6 중량%으로 계산되었다.

[0074] **5. 나노 복합체의 in vitro 광열 특성 평가**

[0075] 나노복합체의 광열 특성을 평가하기 위해서 다양한 농도와 레이저 환경에 노출된 ID@MON-Fc-CDHA의 온도를 측정하였다. 우선 808 nm NIR 레이저에 노출된 다양한 농도 (50-200 $\mu\text{g/mL}$)의 ID@MON-Fc-CDHA 나노복합체의 온도 변화를 측정하였다 (도 5B). 농도가 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 으로 증가할수록, 온도는 각각 11.9, 19.3, 26.3 $^{\circ}\text{C}$ 상승하는 것을 확인하여, 농도의 변화가 온도상승에 의존함을 알 수 있었다. 나노복합체의 농도를 50 $\mu\text{g/mL}$ 로 고정한 뒤, 레이저의 에너지 출력을 다르게 하여 온도의 상승을 모니터링 하였다 (도 5C). 레이저 세기도 농도와 같이 레이저가 세질수록 온도가 빠르게 올라가는 것을 확인하였다. 추가적으로, 10분간의 레이저 조사와 10분간의 냉각을 실시하여, 나노 복합체의 광열 안정성을 확인하였다 (도 5D). 매 사이클마다 온도 변화가 11 $^{\circ}\text{C}$ 까지 도달함을 관측하였다. 이러한 결과들은 ID@MON-Fc-CDHA 나노복합체는 광열치료에 우수한 후보임을 시사한다.

[0076] **6. 나노 복합체의 in vitro 광역학 특성 평가**

[0077] 나노복합체를 암세포의 광역학치료에 활용하기 위해서는 우선적으로 활성산소(ROS) 형성능력의 평가가 먼저 수행되어야 한다. 따라서 ID@MON-Fc-CDHA의 ROS 형성능력을 1,3-Diphenylisobenzofuran(DPBF)를 이용하여 평가하였다 (도 6A, 6B). ID@MON-Fc-CDHA(0.1 mg/mL)를 DPBF 용액에 균일하게 혼합한 후 NIR 레이저 808 nm NIR 레이저로 2분마다 노출시켰을 때, 808 nm NIR 조사 하에서 DPBF의 흡수 경향은 ID@MON-Fc-CDHA의 존재하에 808 nm NIR 조사에서 지속적으로 균일하게 감소했으며, 이는 나노 복합체의 ICG가 DPBF를 분해하기 위해 ROS를 생성할 수 있음을 시사했다. 반면, 순수 DPBF의 흡수는 NIR 레이저 노출에 관계없이 거의 변화가 없어 ROS 생산이 부족함을 나타냈다. 따라서 ID@MON-Fc-CDHA 나노복합체의 우수한 광열 및 광역학적 특성은 NIR 매개 광선 요법에 활용될 수 있다.

[0078] **7. 다중 자극에 의한 약물 방출 평가**

[0079] 다중 자극에 의한 약물 방출을 평가하기 위해 GSH(1.2 mg/mL), HAase(1 mg/mL), H_2O_2 (1%) 각각 및 GSH-HAase- H_2O_2 복합 환경에서 노출시킨 ID@MON-Fc-CDHA으로부터 방출된 Dox를 정량하였다. 자극이 없을 때 누적 Dox 양은 12시간 동안 29.2%였다. 그러나 GSH, HAase 및 H_2O_2 를 PBS(pH 7.4)에 처리한 후 누적 방출은 각각 47.4%, 65.4%, 51.5%로 증가하였다 (도 7A). 나노복합체를 3중 자극(GSH + HAase + H_2O_2)에 노출시켰을 때, 단일 자극 환경에 비해 방출량이 최대 98%까지 획기적으로 향상되었다. 또한, 다중 자극에 노출된 후 MON-Fc-CDHA의 형태를 TEM으로 관찰하였다 (도 7B). GSH에 노출된 ID@MON-Fc-CDHA의 경우 GSH에 의해 tetrasulfide 결합이 절단되어 메조포러스 구조가 완전히 분해되었다. HA 처리 후에도 메조포어와 외부층이 여전히 보였다. HA 층은 효소에 의해 분해되지만, 나노복합체에는 β -CD가 남아 있는 것으로 추정된다. 반면, β CDHA 층이 H_2O_2 에 의해 분해되었기 때문에 외층은 관찰되지 않았다. 다중 자극 환경에서 나노 복합체는 완전히 파괴되었다. 이러한 약물 방출 프로파일과 TEM 이미지는 MON-Fc-CDHA 나노복합체가 다중 자극 약물 방출 특성을 가짐을 시사한다.

[0080] **8. 나노 복합체의 세포독성 평가**

[0081] MON 기반 나노 복합체의 우수한 생체적합성은 치료적 효능 평가에 앞서 평가되어야 하며, 무독성은 반드시 보장되어야 한다. MTT 분석을 사용하여 NIH-3T3 및 B16F10 세포에 대한 MON-Fc-CDHA의 세포독성을 평가했다(도 8). 모든 세포는 24시간 동안 MON-Fc-CDHA의 인큐베이션 후 높은 생존율을 나타냈다. 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 최대 농도에서도 세포 활성이 85% 이상을 유지하여 이 나노 복합체가 우수한 생체적합성을 가짐을 나타낸다.

[0082] **9. 나노 복합체의 암세포 표적 능력 평가**

[0083] MON-Fc-CDHA 나노복합체의 CD44 과발현 암세포에 대한 표적화를 시각화하기 위해 다양한 나노 복합체(I@MON-Fc-CDHA, D@MON-Fc-CDHA 및 ID@MON-Fc-CDHA)를 CD44 음성 세포주(NIH-3T3)와 양성 세포주(B16F10)에 나노 복합체를 6시간 동안 처리하고, 그 결과를 레이저 공초점 주사 현미경으로 관찰하였다 (도 9). ICG와 Dox를 각각 포함하는 나노 복합체를 처리하였을 때 ICG는 주로 세포질에 분포하였고 Dox는 세포핵에 위치하였다. ID@MON-Fc-CDHA의 경우 세포질과 핵에서 ICG와 Dox 형광 신호가 모두 검출되었다. 대조적으로, CD44 음성 세포주인 NIH-3T3에서는 ID@MON-Fc-CDHA의 ICG 및 Dox 형광 신호가 나타내지 않았다. 따라서 이러한 결과는 MON-Fc-CDHA 나

노복합체가 CD44 매개 세포 내 이입 메커니즘을 통해 B16F10 세포에서 내부화되었음을 입증했다.

10. 나노 복합체의 암세포에 대한 광역학 치료 효과 평가

암의 광역학 치료에서 산화 스트레스는 암세포의 세포사멸에 필수적인 역할을 하기 때문에 치료 효과를 평가하기 전에 세포에서 ROS의 생성이 평가되어야 한다. B16F10 세포에서 ROS 생산은 녹색 형광을 가진 ROS 지표인 프로브 DCFDA를 사용하여 확인하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, 아무것도 처리되지 않은 세포는 근적외선 조사와 상관없이 녹색형광을 띄지 않았으며, 레이저 조사 없이 ID@MON-Fc-CDHA만 처리한 세포는 녹색형광이 나타나지 않았다. 반면 ID@MON-Fc-CDHA가 함유된 세포에 근적외선을 조사하였을 때, 녹색 형광 신호가 증가하였다. 또한 ROS 제거에 탁월한 성능을 가지는 NaN_3 를 처리하여 ID@MON-Fc-CDHA에 의한 ROS 생성을 입증하였다. ROS 소광제를 처리한 뒤 녹색형광이 눈에 띄게 억제되었다. 이를 통해 ID@MON-Fc-CDHA가 종양 표적 광역학 치료에 사용할 수 있다는 것을 확인하였다.

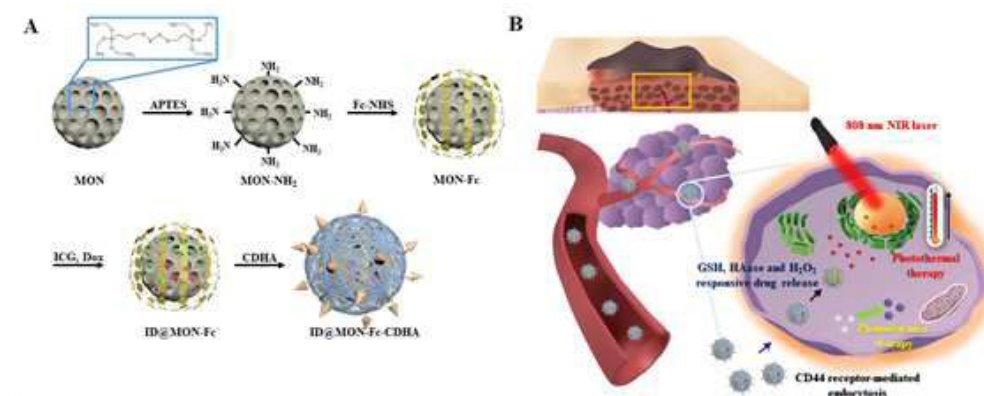
11. 나노 복합체의 암세포에 대한 화학-광열-광역학 치료 효과 평가

화학-광열-광역학치료의 효과를 확인하기 위해서, B16F10 세포에 ID@MON-Fc-CDHA를 6시간동안 배양하고, 세포독성이 MTT assay에 의해 평가되었다. 화학치료로써, 근적외선 조사 없이 ID@MON-Fc-CDHA를 처리하였을 때, 세포 생존율은 51 %까지 감소하였다. 화학-광열치료를 확인하기 위해서, NaN_3 환경하에 ID@MON-Fc-CDHA와 근적외선을 처리하였을 때, 20%의 B16F10 세포만 살아남았다. 화학-광열-광역학치료의 경우엔, NaN_3 없이 나노복합체와 근적외선을 처리시 세포생존율은 극적으로 감소하여 9% 가량 살아남았다.

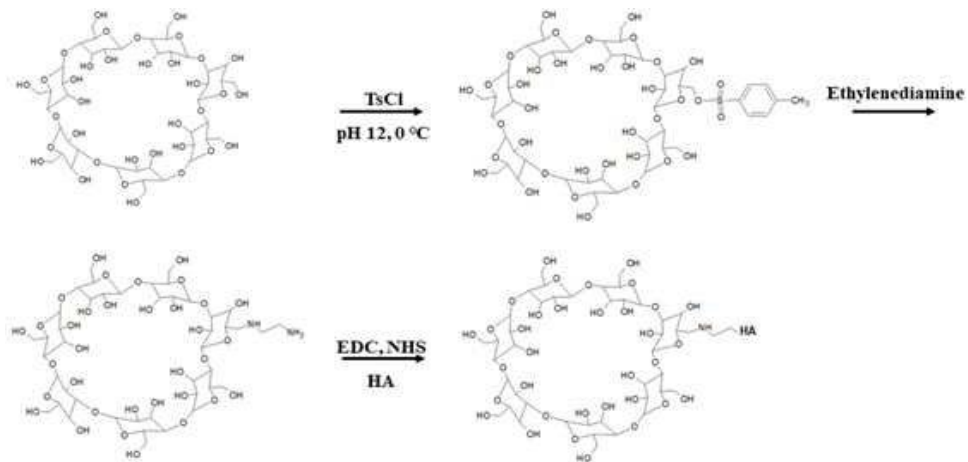
추가로, 치료 효능을 시각적으로 평가하기 위해 다양한 처리를 한 B16F10 세포를 calce-in-AM(live, green) 및 ethidium homodimer-1(dead, red) 2색 염색 분석으로 테스트 하였다(도 11B). 나노 복합체가 처리되지 않은 대조군에서 808 nm NIR 조사에 관계없이 강한 녹색 형광이 검출되었다. 반면 ID@MON-Fc-CDHA로 처리된 B16F10 세포는 나노 복합체로부터의 Dox 방출로 인해 적색 형광 신호를 나타냈다. ID@MON-Fc-CDHA를 NaN_3 및 NIR 레이저와 함께 적용한 후 적색 형광 점이 증가하여 ROS 생성 억제로 인한 ID@MON-Fc-CDHA 매개 화학 광열 효과를 암시한다. 또한, Chemo-PTT-PDT(ID@MON-Fc-CDHA 나노복합체, 근적외선 레이저 조사, NaN_3 미처리)그룹에서는 다른 그룹에 비해 적색 형광점의 수가 급격히 증가하였다. MTT 결과와 live/dead 형광이미지는 유사한 경향으로 향상된 항암효과를 보였다. 따라서 이러한 결과는 ID@MON-Fc-CDHA 나노복합체가 시너지 화학-광열-광역학 요법에 의해 종양 세포를 박멸하는 가장 강력한 능력으로 수행될 수 있음을 입증했다.

도면

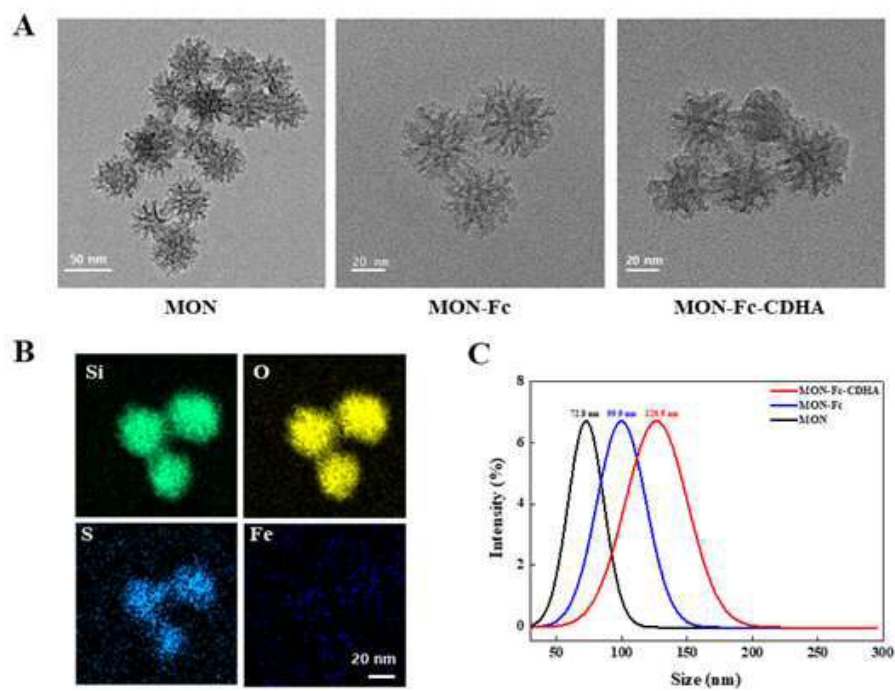
도면1



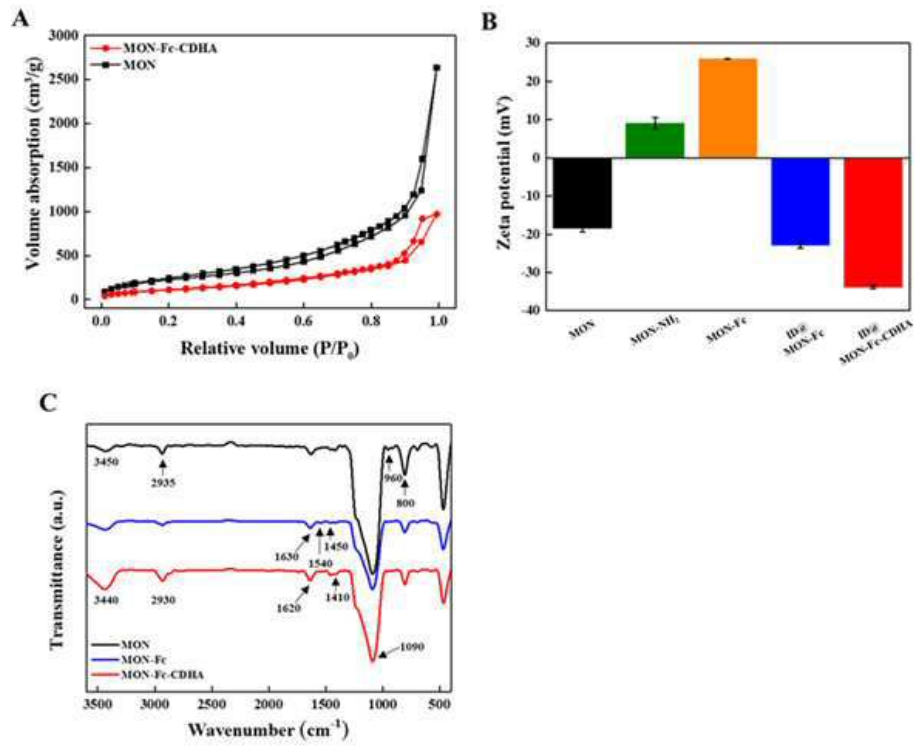
도면2



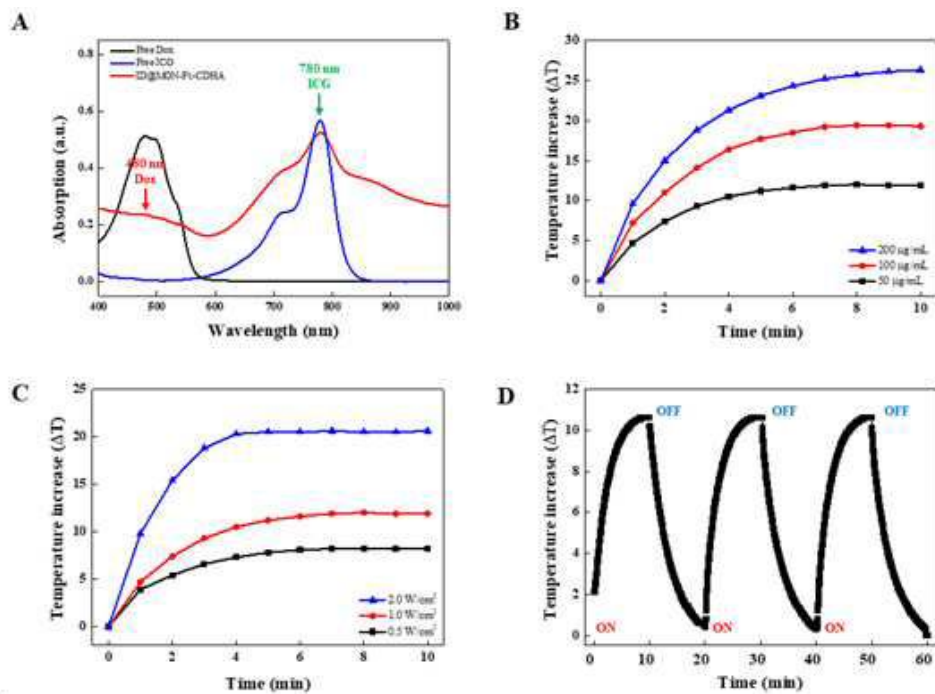
도면3



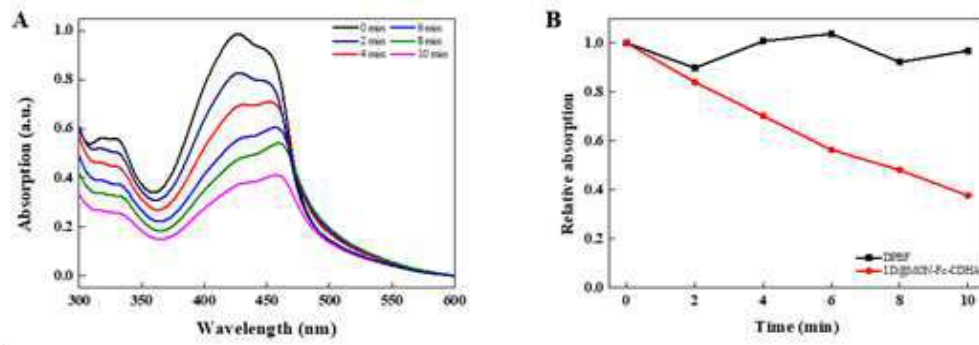
도면4



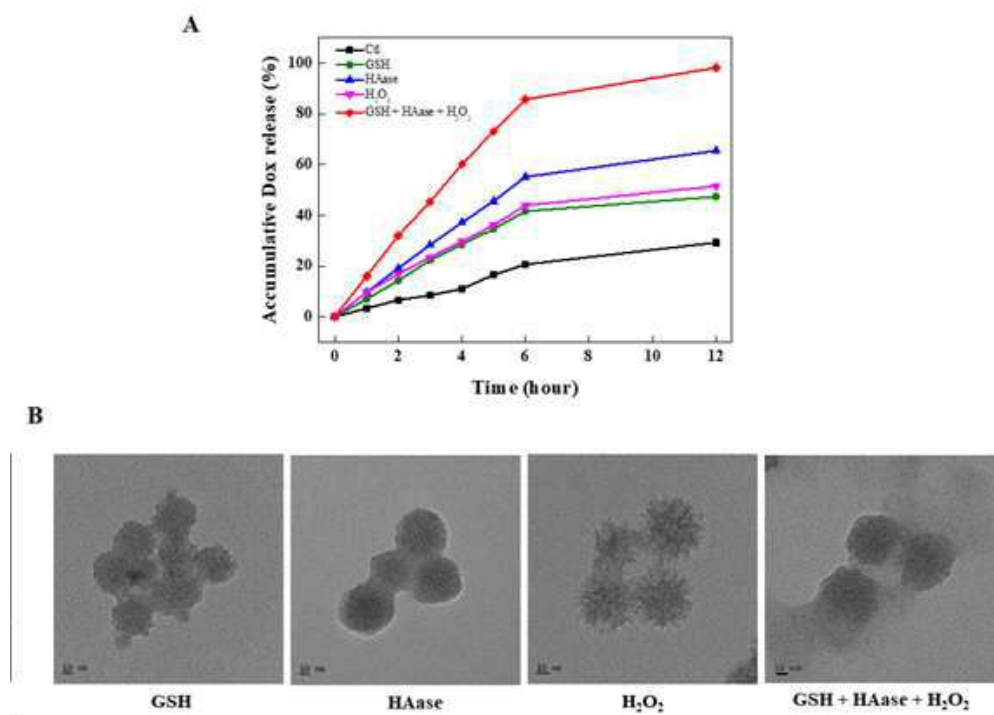
도면5



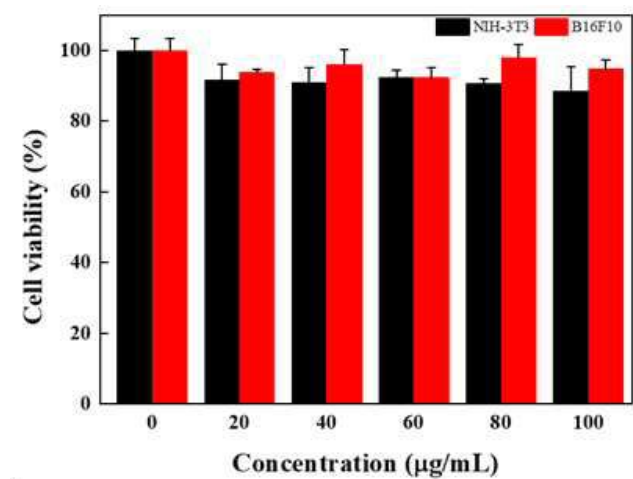
도면6



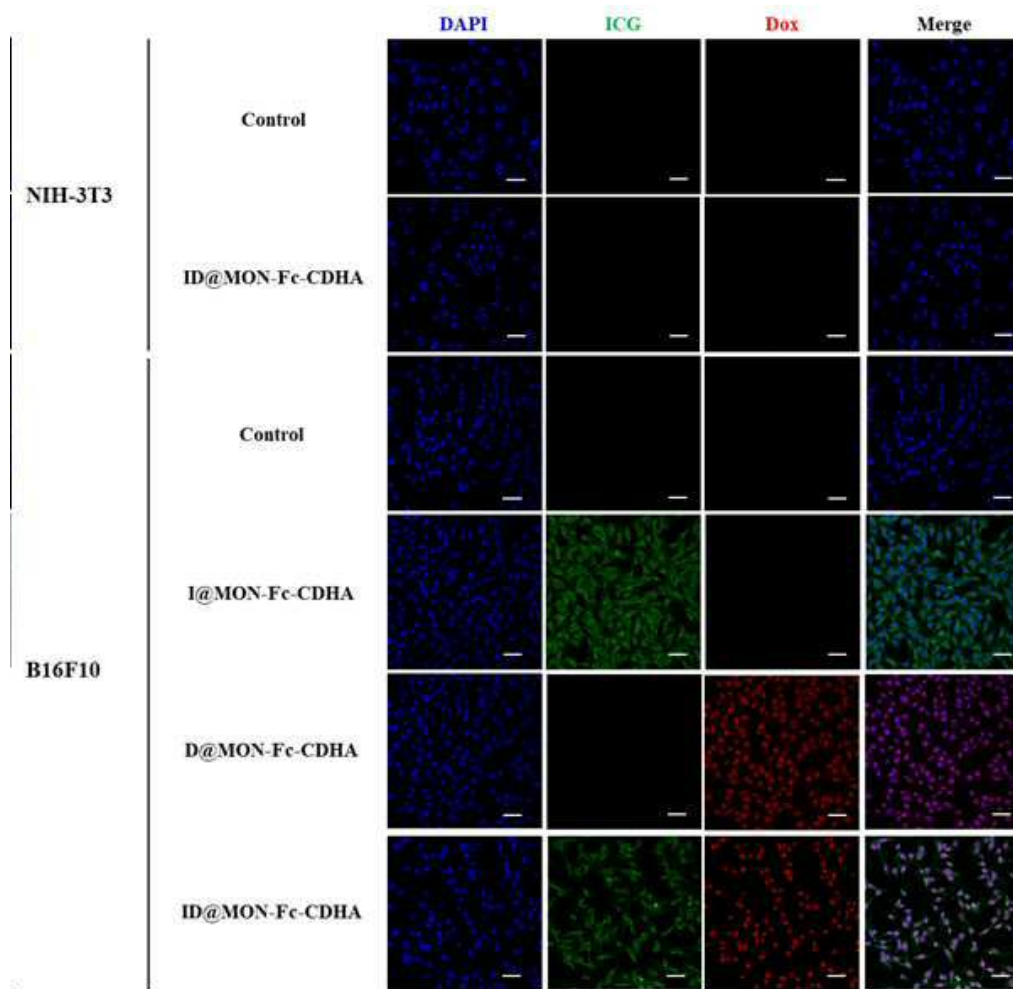
도면7



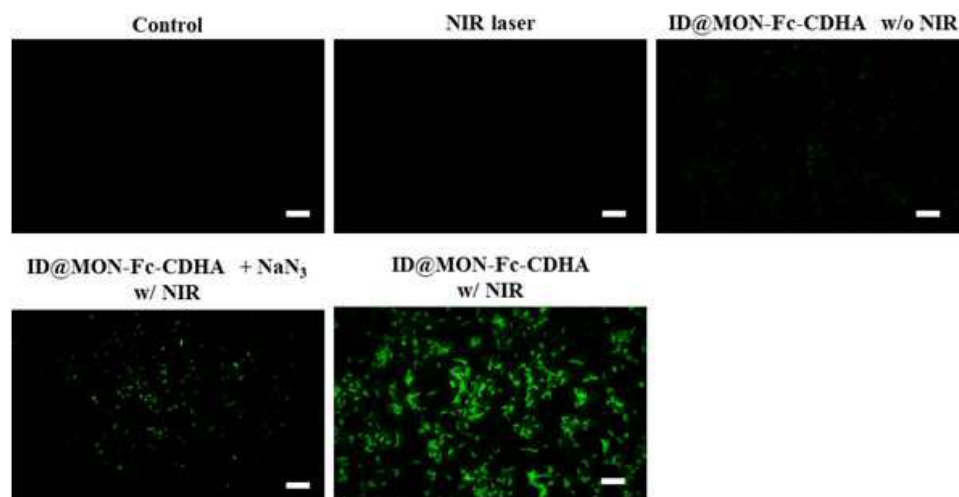
도면8



도면9



도면10



도면11

