(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0094205
(43) 공개일자 2025년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/06 (2006.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) *A61K 31/7068* (2006.01)
A61K 33/243 (2019.01) *A61K 47/24* (2017.01)
A61K 9/51 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/06 (2013.01)
A61K 31/4745 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0184810
(22) 출원일자 2023년12월18일
심사청구일자 2023년12월18일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
유자형
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
최은실
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

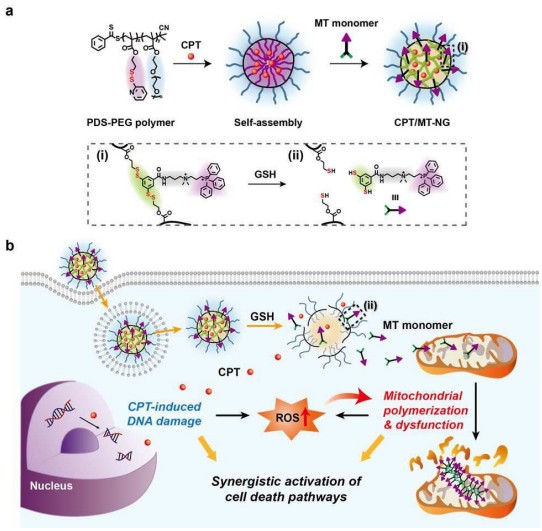
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **암세포 핵 손상 및 미토콘드리아 파괴를 모두 유도하는 약물 함유 나노겔**

(57) 요 약

본 발명은 암세포 핵 손상 및 미토콘드리아 파괴를 모두 유도하는 약물 함유 나노겔에 관한 것으로, 본 발명에 따른 나노겔은 암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는, 2중 암 세포사멸 경로를 유도하여, 항암 효능에 현저한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/7068 (2013.01)
A61K 33/243 (2022.01)
A61K 47/24 (2013.01)
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 9/5169 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자
김상필
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

최은성
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345348162
과제번호 2021R1I1A1A01044859
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 세포 노화 암치료를 위한 siRNA 전달 나노시스템
기 여 율 20/100
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711192673
과제번호 2020M3A9D8038192
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 노화세포 운명조절을 위한 노화세포 선택적 치료 실용화 방법 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711194690
과제번호 00208386
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 세포 안에서의 고분자 중합반응과 세포 운명 조절
기 여 율 30/100
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711200071
과제번호 00281553
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 나노소재기술개발
연구과제명 조직 맞춤형 세포 및 분자 인지-자가조절을 위한 인공지능 기반 약물전달 플랫폼
기 여 율 20/100
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2023.08.01 ~ 2024.01.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

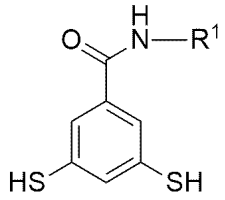
미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 단량체;

자가 가교 가능한 작용기를 포함하는 하기 화학식 2로 표시되는 중합체; 및

암세포 내 ROS 수준을 향상시키는 약리활성을 갖는 항암제;를 포함하고,

화학식 2로 표시되는 중합체의 가교 가능한 작용기와 화학식 1로 표시되는 단량체의 중합 가능한 작용기가 서로 공유결합을 형성하여 나노겔을 형성하고, 상기 나노겔 내부에 항암제가 탑재되는 것인, 나노겔.

[화학식 1]

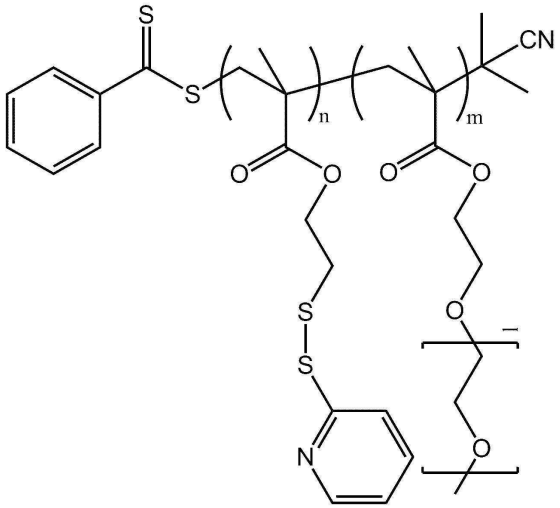


(상기 화학식 1에서,

R^1은 미토콘드리아 표적 모이어티, 또는 미토콘드리아 표적 펩타이드이고,

상기 미토콘드리아 표적 모이어티는 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인을 통해 연결될 수 있다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

n은 40-120의 정수이고,

m 및 l은 각각 10-30의 정수이다.)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미토콘드리아 표적 모이어티는 TPP(triphenylphosphonium), 데퀄리늄(dequalinium), 구아니디늄(guanidinium), 트리에틸암모늄(triethylammonium), 피리디늄(pyridinium), 3-페닐술포닐 푸록산(3-phenylsulfonyl furoxan), F16, 2,3-디메틸벤조티아졸륨 요오드(2,3-dimethylbenzothiazolium iodide), 로다민 19(rhodamine 19) 및 로다민 123(rhodamine 123) 중 1종이고,

상기 미토콘드리아 표적 펩타이드는 Leu-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Arg-Lys-Ala-Ala-Leu (LLRAALRKAAL), Met-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Ser-Thr-Ala-Arg-Arg-Gly-Pro-Arg-Leu-Ser-Arg-Leu-Leu (MLRAALSTARRGPRLSRLL), Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys (MLSLRQSIRFFK), Leu-Ser-Arg-Thr-Arg-Ala-Ala-Ala-Pro-Asn-Ser-Arg-Ile-Phe-Thr-Arg (LSRTRAAAPNSRIFTR), Met-Ile-Ala-Ser-His-Leu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Phe-Thr-Glu-Leu-Asn (MIASHLLAYFFTELN), Met-Ile-Ala-Ser-His-Leu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Phe-Thr-Glu-Leu-Asn (MIASHLLAYFFTELN), Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys (KLAKLAK), Lys-Leu-Ala-Lys-Arg-Gly-Asp (KLAKRGD) 및 Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys-Arg-Gly-Asp (KLAKLAKRGD) 중 1종이며,

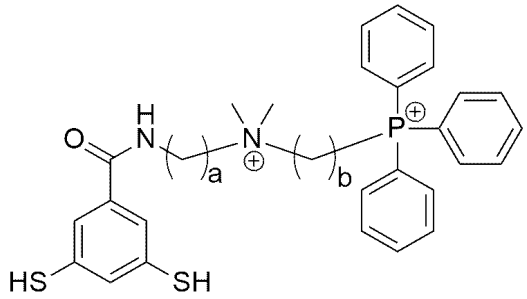
상기 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인에서, 양이온성 모이어티는 옥소늄 이온, 4차 암모늄 이온 또는 4차 포스포늄 이온인 것인, 나노겔.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 단량체는 하기 화학식 1A로 표시되는 단량체인 것인, 나노겔.

[화학식 1A]



(상기 화학식 1A에서,

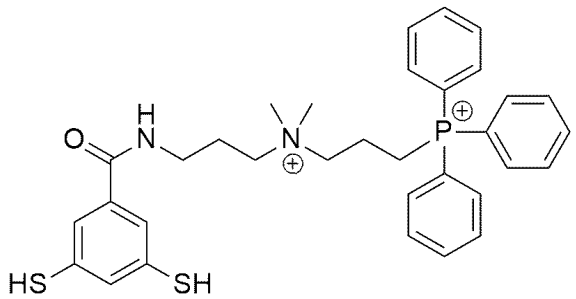
a 및 b는 1 내지 20의 정수이다.)

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 화학식 1A로 표시되는 단량체는 하기 화학식 1B로 표시되는 단량체인 것인, 나노겔.

[화학식 1B]



청구항 5

제1항에 있어서,

상기 암세포 내 ROS 수준을 향상시키는 약리활성을 갖는 항암제는 캄프토테신(camptothecin, CPT), 시스플라틴(cisplatin, CP), 젬시타빈(gemcitabine, GEM) 및 메토트렉세이트(methotrexate, MTX)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 나노겔.

청구항 6

제1항에 있어서,

암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 화학식 1로 표시되는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 화학식 1로 표시되는 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는 것인, 나노겔.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 암세포 내 산화환원 반응은 글루타티온(GSH)에 의한 것인, 나노겔.

청구항 8

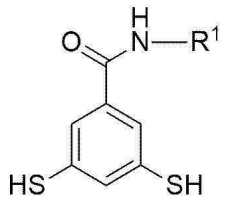
미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 단량체를 수성 용매에 첨가한 단량체 용액을 준비하는 단계(단계 1);

암세포 내 ROS 수준을 향상시키는 약리활성을 갖는 항암제를 유기용매에 첨가한 항암제 용액을 준비하는 단계(단계 2);

자가 가교 가능한 작용기를 포함하는 하기 화학식 2로 표시되는 중합체를 유기용매에 첨가한 중합체 용액을 준비하는 단계(단계 3); 및

상기 단계 3에서 준비한 중합체 용액에 상기 단계 2에서 준비한 항암제 용액을 혼합한 다음, 상기 단계 1에서 준비한 단량체 용액을 적가하여 나노겔을 제조하는 단계(단계 4);를 포함하는 나노겔의 제조방법.

[화학식 1]

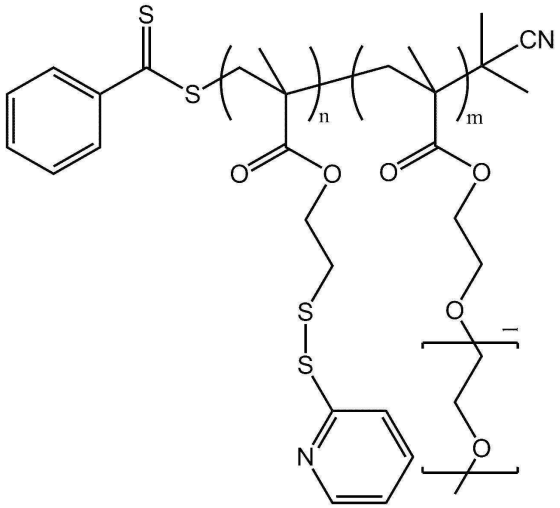


(상기 화학식 1에서,

R^1은 미토콘드리아 표적 모이어티, 또는 미토콘드리아 표적 펩타이드이고,

상기 미토콘드리아 표적 모이어티는 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인을 통해 연결될 수 있다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

n은 40-120의 정수이고,

m 및 l은 각각 10-30의 정수이다.)

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 단계 1의 수성 용매는 증류수, 탈이온수 및 인산완충생리식염수(PBS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이고,

상기 단계 2 및 단계 3의 유기용매는 각각 DMSO(dimethyl sulfoxide), DCM(dichloromethane), THF(tetrahydrofuran) 및 아세톤으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 제조방법.

청구항 10

제1항의 나노겔을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 암은 뇌암, 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강암, 부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항의 나노겔을 포함하는 약물 내성 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 약물 내성 암은 항암제에 대한 내성을 갖는 뇌암, 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강암, 부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서,

암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암세포 핵 손상 및 미토콘드리아 파괴를 모두 유도하는 약물 함유 나노겔에 관한 것으로, 본 발명에 따른 나노겔은 암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는, 2중 암 세포사멸 경로를 유도하여, 항암 효능에 현저한 효과가 있다.

배 경 기 술

[0003] 나노물질 기반 약물 전달 연구의 지속적인 발전으로 다양한 화학약물이 표적 세포에 침투하여 핵산 합성(즉, 세포사멸)을 억제함으로써 프로그램된 세포 사멸을 유도할 수 있게 되었다. 약물 전달 시스템(DDS) 개발을 위한 인기 있는 지원 재료 중 하나인 나노겔(NG)은 자가 가교 가능한 양친매성 중합체로 구성되며, 겔 형성 중에 약물을 직접 캡슐화할 수 있다. 콜로이드 안정성, 생분해성 및 호환성, 수정 가능한 화학 조성과 같은 여러 가지 매력적인 물리화학적 특성으로 인해 NG를 사용하여 많은 약물 전달 연구가 수행되고 있다.

[0005] 개발된 DDS의 치료 효능을 높이기 위해 복합 요법은 복잡한 종양 미세 환경을 처리하고 화학 요법의 한계를 극복하는 더 효과적인 전략으로 간주되고 있다. 구체적으로, 단독요법으로 악성세포를 실질적으로 제거하기 위해

서는 많은 양의 약물이 요구되는 경우가 많으며, 이로 인해 표적화되지 않은 정상세포의 비특이적 사망으로 이어질 수도 있다. 더욱이, 많은 암세포의 약물 내성은 약물 유출 및 유전적 요인을 포함한 다양한 세포 신호 전달 메커니즘에 의해 화학요법 효능을 크게 제한하는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 적절한 비화학요법제를 활용하여 항암제에 의한 세포사멸 과정과 함께 다른 방식의 세포 사멸 경로를 암 특이적으로 활성화한다면 이는 암 치료를 개선하는 유용한 방법이 될 수 있다.

[0007] 이러한 이유로 세포 소기관 표적 치료법은 화학 요법과 함께 사용하기에 좋은 선택이 될 수 있다. 특히, 미토콘드리아는 에너지원(adenosine triphosphate, ATP)을 생산하고 활성산소종(ROS)과 연관되어 세포 신호전달 경로를 조절함으로써 세포의 운명을 결정하는 데 중요한 역할을 하기 때문에 탁월한 표적 세포내 소기관이 될 수 있다.

[0009] 현재까지 약물의 도움 없이 초분자 시스템을 이용하여 미토콘드리아에 국한된 항암제를 개발하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 이러한 시스템은 자가조립(self-assembly), 응집(aggregation), 중합(polymerization) 또는 광물화(mineralization)를 통해 암성 미토콘드리아 내부에서만 제형화되어 세포 사멸을 위한 미토콘드리아 기능을 방해한다.

[0011] 본 발명에서는 향상된 암 치료를 위한 세포사멸 경로에서 효율적으로 상호 연결될 수 있도록 화학약물과 미토콘드리아 표적화 단량체(MT 단량체)의 나노겔(NG) 동시 전달을 제시한다. 항암제 캄프토테신(CPT)과 MT 단량체를 안정적으로 캡슐화하고 글루타티온(GSH)이 존재하는 암 환경에서 이를 신속하게 방출하기 위해 산화환원 민감성 나노겔(NG) 시스템이 사용되었다. 결과는 CPT/MT 단량체가 함유된 NG(CPT/MT-NG)가 암세포에 의해 성공적으로 흡수된 후 방출된 단량체가 화학요법 CPT의 도움으로 미토콘드리아에서 ROS 반응 중합을 효율적으로 진행하여 세포내 산화 스트레스를 증가시키는 것으로 나타났다. 미토콘드리아 기능 장애 결과는 MT 단량체가 없는 CPT 로딩 NG를 사용한 단일 치료 결과와 비교하여 세포 사멸률을 눈에 띄게 증가시키는 것으로 나타났다. CPT/MT 단량체 활성화 세포 사멸은 세포 내 ROS 생성 및 미토콘드리아 손상을 시각화하고, 암성, 정상 및 약물 내성 세포의 생존 가능성을 정량화하고 일련의 세포사멸 분석을 수행함으로써 체계적으로 확인되었다. 본 발명에서 제시된 병용 요법은 세포 운명을 보다 정교하게 제어하고 다양한 질병 치료를 위한 나노 규모 DDS의 효능을 향상시킬 수 있는 큰 잠재력을 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적 1은 2중 암 세포사멸 경로를 유도하는 나노겔을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 목적 2는 상기 나노겔의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 목적 3은 상기 나노겔을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 목적 4는 상기 나노겔을 포함하는 약물 내성 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] **2중 암 세포사멸 경로를 유도하는 나노겔**

[0019] 본 발명은 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 단량체;

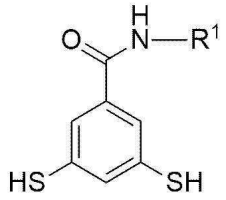
[0020] 자가 가교 가능한 작용기를 포함하는 하기 화학식 2로 표시되는 중합체; 및

[0021] 암세포 내 ROS(reactive oxygen species) 수준을 향상시키는 약리활성을 갖는 항암제;를 포함하고,

[0022] 화학식 2로 표시되는 중합체의 가교 가능한 작용기와 화학식 1로 표시되는 단량체의 중합 가능한 작용기가 서로

공유결합을 형성하여 나노겔을 형성하고, 상기 나노겔 내부에 항암제가 탑재되는 것인, 나노겔을 제공한다.

[0023] [화학식 1]



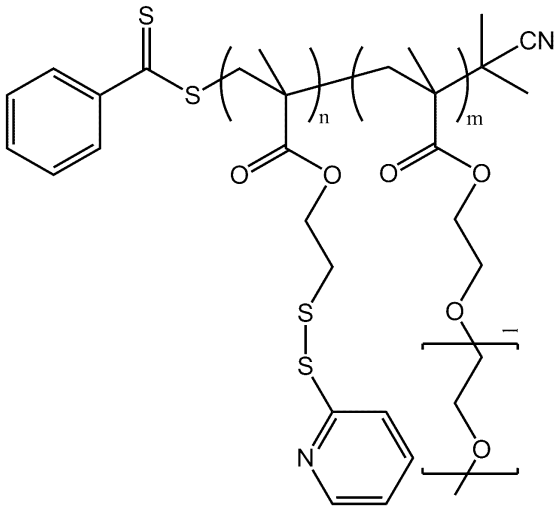
[0024]

[0025] 상기 화학식 1에서,

[0026] R^1은 미토콘드리아 표적 모이어티, 또는 미토콘드리아 표적 펩타이드이고,

[0027] 상기 미토콘드리아 표적 모이어티는 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인을 통해 연결될 수 있다.

[0029] [화학식 2]



[0030]

[0031] 상기 화학식 2에서,

[0032] n은 40-120, 바람직하게 60-100, 더욱 바람직하게 70-90의 정수이고,

[0033] m 및 l은 각각 10-30, 바람직하게 13-27, 더욱 바람직하게 15-25의 정수이다.

[0035] 상기 미토콘드리아 표적 모이어티는 TPP(triphenylphosphonium), 데퀄리늄(dequalinium), 구아니디늄(guanidinium), 트리에틸암모늄(triethylammonium), 피리디늄(pyridinium), 3-페닐술포닐 푸록산(3-phenylsulfonyl furoxan), F16, 2,3-디메틸벤조티아졸륨 요오드(2,3-dimethylbenzothiazolium iodide), 로다민 19(rhodamine 19), 로다민 123(rhodamine 123) 등일 수 있고,

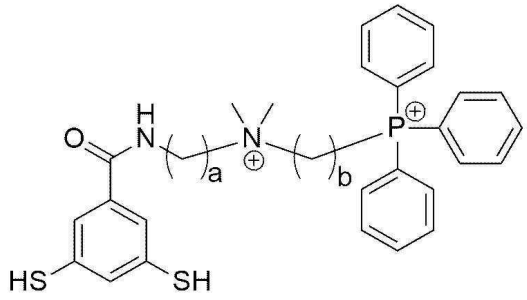
[0036] 상기 미토콘드리아 표적 펩타이드는 Leu-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Arg-Lys-Ala-Ala-Leu (LLRAALRKAAL), Met-Leu-Arg-Ala-Ala-Leu-Ser-Thr-Ala-Arg-Arg-Gly-Pro-Arg-Leu-Ser-Arg-Leu-Leu (MLRAALSTARRGPRLSRLL), Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys (MLSLRQSIRFFK), Leu-Ser-Arg-Thr-Arg-Ala-Ala-Ala-Pro-Asn-Ser-Arg-Ile-Phe-Thr-Arg (LSRTRAAAPNSRIFTR), Met-Ile-Ala-Ser-His-Leu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Phe-Thr-Glu-Leu-Asn (MIASHLLAYFFTELN), Met-Ile-Ala-Ser-His-Leu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Phe-Thr-Glu-Leu-Asn (MIASHLLAYFFTELN), Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys (KLAKLAK), Lys-Leu-Ala-Lys-Arg-Gly-Asp (KLAKRGD), Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Ala-Lys-Arg-Gly-Asp (KLAKLAKRGD) 등일 수 있으며,

[0037] 상기 양이온성 모이어티를 포함하는 C2-20의 알킬레닐 체인에서, 양이온성 모이어티는 옥소늄 이온, 4차 암모늄

이온 또는 4차 포스포늄 이온 등일 수 있다.

[0039] 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 단량체는 하기 화학식 1A로 표시되는 단량체일 수 있다.

[0040] [화학식 1A]

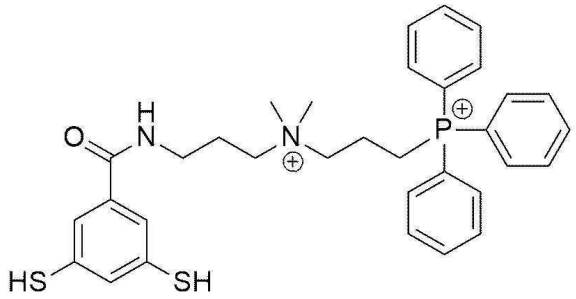
[0041] 

[0042] 상기 화학식 1A에서,

[0043] a 및 b는 1 내지 20의 정수이다.

[0045] 구체적으로, 상기 화학식 1A로 표시되는 단량체는 하기 화학식 1B로 표시되는 단량체일 수 있다.

[0046] [화학식 1B]

[0047] 

[0049] 상기 암세포 내 ROS 수준을 향상시키는 약리활성을 갖는 항암제는 캄프토테신(camptothecin, CPT), 시스플라틴(cisplatin, CP), 젬시타빈(gemcitabine, GEM), 메토트렉세이트(methotrexate, MTX) 등을 사용할 수 있다. 여기서, 상기 CPT 및 CP는 암세포 핵에 손상을 가하여 세포내 ROS 수준을 향상시킬 수 있고, GEM 및 MTX는 암세포 내 ROS 수준을 향상시킬 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 나노겔은 암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 화학식 1로 표시되는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 화학식 1로 표시되는 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는, 2중 암 세포사멸 경로를 유도한다. 여기서, 상기 암세포 내 산화환원 반응은 글루타티온(GSH)에 의해 유발될 수 있다.

[0053] **나노겔의 제조방법**

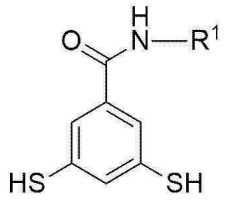
[0054] 본 발명은 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 단량체를 수성 용매에 첨가한 단량체 용액을 준비하는 단계(단계 1);

[0055] 암세포 내 ROS 수준을 향상시키는 약리활성을 갖는 항암제를 유기용매에 첨가한 항암제 용액을 준비하는 단계(단계 2);

[0056] 자가 가교 가능한 작용기를 포함하는 하기 화학식 2로 표시되는 중합체를 유기용매에 첨가한 중합체 용액을 준비하는 단계(단계 3); 및

[0057] 상기 단계 3에서 준비한 중합체 용액에 상기 단계 2에서 준비한 항암제 용액을 혼합한 다음, 상기 단계 1에서 준비한 단량체 용액을 적가하여 나노겔을 제조하는 단계(단계 4);를 포함하는 나노겔의 제조방법을 제공한다.

[0058] [화학식 1]

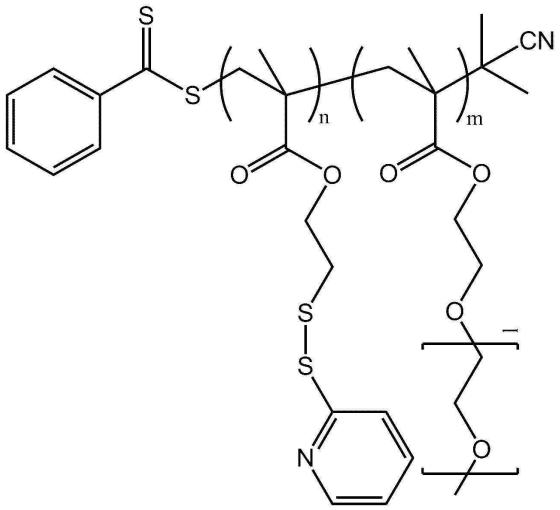
[0059] 

[0060] (상기 화학식 1에서,

[0061] R^1은 미토콘드리아 표적 모이어티, 또는 미토콘드리아 표적 펩타이드이고,

[0062] 상기 미토콘드리아 표적 모이어티는 양이온성 모이어티를 포함하는 C_{2-20}의 알킬레닐 체인을 통해 연결될 수 있다.)

[0064] [화학식 2]

[0065] 

[0066] (상기 화학식 2에서,

[0067] n은 40-120의 정수이고,

[0068] m 및 l은 각각 10-30의 정수이다.)

[0070] 상기 단계 1의 수성 용매는 증류수, 탈이온수, 인산완충생리식염수(PBS) 등을 단독으로 또는 2종 이상 합하여 사용할 수 있고,

[0071] 상기 단계 2 및 단계 3의 유기용매는 각각 DMSO(dimethyl sulfoxide), DCM(dichloromethane), THF(tetrahydrofuran), 아세톤 등을 단독으로 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.

[0073] **암 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

[0074] 본 발명은 상기 나노겔을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0076] 상기 암은 뇌암, 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강암, 부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병, 악성림프종 등일 수 있다.

[0078] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는, 2중 암 세포사멸 경로를 유도한다. 여기서, 상기 암세포 내 산화환원 반응은 글루타티온(GSH)에 의해 유발될 수 있다.

[0080] **약물 내성 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

[0081] 본 발명은 상기 나노겔을 포함하는 약물 내성 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0083] 상기 약물 내성 암은 항암제에 대한 내성을 갖는 뇌암, 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강암, 부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병, 악성림프종 등일 수 있다.

[0085] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는, 2중 암 세포사멸 경로를 유도한다. 여기서, 상기 암세포 내 산화환원 반응은 글루타티온(GSH)에 의해 유발될 수 있다.

발명의 효과

[0087] 본 발명에 따른 나노겔은 암세포 내 산화환원 반응에 의해 나노겔이 붕괴되면서 항암제 및 미토콘드리아 표적 모이어티 및 중합 가능한 작용기를 포함하는 단량체가 방출되고, 상기 항암제는 암세포 내 ROS 수준을 향상시키고, 상기 단량체는 미토콘드리아에 선택적으로 축적되고 ROS에 의해 자가 중합되어 거대 중합체를 형성해 미토콘드리아를 파괴하는, 2중 암 세포사멸 경로를 모두 유도하여, 항암 효능에 현저한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0089] 도 1은 화학요법과 미토콘드리아 기능 장애의 조합 효과로 암을 보다 효율적으로 치료하기 위한 CPT/MT 단량체 함유 나노겔(NG) 시스템(CPT/MT-NG) 제제에 대한 개략도이다. NG는 PDS-PEG 공중합체의 자가 조립에 의해 제제화되고, 자가조립되는 동안 소수성 캄프토테신(CPT)는 생성된 응집체 내부에 위치하고 미토콘드리아 표적화 단량체(MT 단량체)는 이황화물(SS) 형성에 의해 PDS(pyridine disulfide)에 접합된다. 세포 흡수 후 CPT와 MT 단량체는 SS 결합을 분리하는 GSH(glutathione)에 반응하여 NG에서 즉시 방출된다. TPP(triphenylphosphonium)

기능화된 MT 단량체는 암세포의 미토콘드리아에 선택적으로 축적되어 주변 ROS에 의한 중합을 겪을 수 있으며, 이 수준은 CPT에 의해 유발된 DNA 손상에 의해 증가되어 결과적인 미토콘드리아 기능 장애 및 세포 사멸 과정을 촉진하게 된다.

도 2a는 캄프토테신(CPT) (0-1 μM), CPT+MT 단량체(5μM) 및 CPT+MT 단량체(10μM), 3종 시료와 함께 배양된 HeLa 세포의 생존율을 측정한 결과이다.

도 2b는 독소루비신(DOX) (0-1 μM), DOX+MT 단량체(5μM) 및 DOX+MT 단량체(10μM), 3종 시료와 함께 배양된 HeLa 세포의 생존율을 측정한 결과이다.

도 2c는 파클리탁셀(PTX) (0-1 μM), PTX+MT 단량체(5μM) 및 PTX+MT 단량체(10μM), 3종 시료와 함께 배양된 HeLa 세포의 생존율을 측정한 결과이다.

도 2d는 CPT/MT-NG(실시예 1)의 TEM 이미지이다.

도 2e는 CPT/MT-NG(실시예 1) 및 CPT-NG(비교예 3)에서 제조한 나노겔에 대한 유체역학적 입자 크기를 측정한 결과이다.

도 2f는 CPT/MT-NG(실시예 1), NG(비교예 1), MT-NG(비교예 2) 및 CPT-NG(비교예 3)에서 제조한 나노겔에 대한 표면 제타 전위를 측정한 결과이다.

도 3a는 CPT/MT-NG(실시예 1)이 GSH에 반응하여 SS 결합이 분리되는 원리 대한 개략도이다.

도 3b 및 3c는 GSH가 존재하는 PBS 또는 일반 PBS 용액에 3일 동안 분산시킨 후 CPT/MT-NG의 TEM 이미지이다.

도 3d 및 3e는 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 PBS 용액으로 CPT(d) 및 MT 단량체(e)의 GSH 의존적 방출율을 시간별로 측정한 결과이다.

도 4a는 CPT/MT-NG(실시예 1)의 세포내 내재화에 대한 개략도이다.

도 4b는 CPT/MT-NG(실시예 1)을 HeLa 세포와 4시간 동안 배양하는 동안 시간경과에 따른 나노겔의 엔도솜 탈출을 확인한 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30 μm).

도 4c는 CPT/MT-NG(실시예 1)을 HeLa 세포와 24시간 동안 배양하는 동안 시간 경과에 따른 방출된 MT 단량체의 미토콘드리아 축적을 확인한 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30 μm).

도 5는 적색 형광염료 DiD를 탑재한 NG(비교예 1)를 HeLa 세포와 4시간 동안 배양하는 동안 시간경과에 따른 나노겔의 엔도솜 탈출을 확인한 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30 μm).

도 6은 CPT/MT-NG(실시예 1)을 HeLa 세포와 6시간 동안 배양하는 동안 시간 경과에 따른 CPT의 세포 흡수 효율을 측정한 유세포분석 결과이다.

도 7a 내지 7c는 NG(비교예 1), MT-NG(비교예 2), CPT-NG(비교예 3) 및 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 제조한 나노겔을 DCFDA(a), Mitotracker(b) 또는 JC-1(c) 염료로 염색하고, HeLa 세포와 배양한 후의 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = a와 c의 경우 80μm, b의 경우 30μm).

도 7d는 NG(비교예 1), MT-NG(비교예 2), CPT-NG(비교예 3) 및 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 제조한 나노겔을 HeLa 세포와 배양한 샘플에서 미토콘드리아 내 중합체의 GPC 감지 신호이다.

도 8은 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 제조한 나노겔을 HeLa 세포와 배양한 다음 TMRM으로 염색한 샘플의 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30μm).

도 9는 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 제조한 나노겔을 HeLa 세포와 배양한 다음 AM-tracked 세포내 칼슘 이온(Ca^{2+})인 Rhod-2으로 처리한 샘플의 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30μm).

도 10a 내지 10c는 CPT/MT-NG(실시예 1) 또는 CPT-NG(비교예 3)와 함께 3종의 세포를 48시간 배양한 후 암성 HeLa 세포(a), 정상 NIH3T3 세포(b) 및 약물 내성 MDA-MB-231/ADR 세포(c)의 세포 생존율을 각각 측정한 결과이다. 세포 생존율은 평균±표준편차(n = 3)로 표시하였다.

도 10d는 세포사멸 억제제인 Z-VAD-FMK 또는 괴사 억제제인 Nectastatin-1(Nec-1)의 존재 하에서 CPT/MT-NG(실시예 1) 처리된 HeLa 세포의 생존율 측정 결과이다. 세포 생존율은 평균±표준편차(n = 3)로 표시하였다.

도 10e 내지 10g는 CPT/MT-NG(실시예 1) 처리된 HeLa 세포의 웨스턴블롯 분석(e), 동역학 카스파제-3/7 분석(f) 및 유세포 세포사멸 분석(g) 결과이다.

도 11은 NG(비교예 1) 또는 MT-NG(비교예 2)와 함께 암성 HeLa 세포를 48시간 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0090] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0092] **약학적 조성물**

[0093] 본 발명의 유효물질은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0094] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 유효물질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0095] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0096] 또한, 본 발명의 유효물질의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001-100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01-35 mg/kg/일이다. 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07-7000 mg/일이며, 바람직하게는 0.7-2500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0098] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0100] **재료**

[0101] 나노겔(NG) 합성을 위한 모든 시약은 달리 설명하지 않는 한 Sigma-Aldrich로부터 구입한 대로 사용되었다. Mitotracker™ Deep Red, JC-1 염료, Rhod-2, AM, TMRM, MitoSOX, 3-(4,5-디메틸-티조일-2-일)-2,5-디페닐-2H-테트라졸륨 브로마이드(MTT), DCFDA , caspase-3/7 분석 키트 및 Annexin V-FITC 및 PI가 포함된 Dead Cell Apoptosis 키트는 Thermo Fisher Scientific에서 구입했다.

[0103] **나노겔(NG) 분해 및 CPT/MT 단량체 방출**

[0104] GSH에 의해 유발된 NG의 구조적 분해를 조사하기 위해 CPT/MT-NG를 10mM GSH(TCI Chemicals)가 포함된 PBS 용액(0.1mg/mL)에 현탁시키고 37℃에서 3일 동안가볍게 교반하며 배양하였다. 그런 다음 입자를 JEM-1400(JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 TEM으로 이미지화했다. 나노겔 탑재물 방출을 검출하기 위해 CPT/MT-NG를 GSH 함유 PBS 용액(1mg/mL)에 분산시켰다. 시간에 따른 CPT 방출은 ASCO V-670 UV-Vis 분광 광도계(JASCO, Tokyo, Japan)를 사용하여 흡광도(λ=365 nm)를 측정하여 분석되었다. 방출된 MT 단량체는 C18 역상 컬럼(λ=254 nm)이 장착된 HPLC(Agilent Technologies, USA)를 사용하여 검출되었다.

[0106] **세포 배양**

[0107] HeLa, NIH3T3, MDA-MB-231/ADR 세포(한국세포은행, 한국)를 10% 소태아혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium)에서 배양하였다. 세포를 5% CO_2가 함유된 가습 인큐베이터에서 37℃로 배양했다. 약물 내성 MDA-MB-231/ADR 세포는 15mL 배지가 채워진 플라스크에 5×10^5 세포를 시딩하고 이를 15일 동안 매일 10nM DOX로 처리하고 추가 10일 동안 20nM DOX로 처리하여 준비했다.

[0109] **유리 약물/단량체 혼합물을 이용한 세포 생존 능력 평가**

[0110] HeLa 세포를 96웰 플레이트(5 x 10^3 cells/well)에서 24시간 동안 배양하고 최대 1μM 농도의 유리 약물(CPT, PTX 또는 DOX)로만 처리하거나 유리 MT 단량체(5 또는 10μM)와 함께 처리했다. 24시간 배양 후, 세포독성을 MTT 분석으로 분석했다.

[0112] **세포 흡수 평가**

[0113] HeLa 세포를 8웰 플레이트(1×10^4 cells/well)에 시딩하고 24시간 동안 배양했다. 세포를 형광 DiD가 캡슐화된 MT-NG(200 μg/mL)로 처리하고 4시간 동안 배양했다. 그런 다음 세포를 차가운 PBS로 3회 세척하고 LysoTracker(제조사: Invitrogen)로 염색한 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경(제조사: ZEISS, 모델명: LSM 7800)으로 영상화했다. 물질의 미토콘드리아 위치를 영상화하기 위해 형광성 NBD(제조사: Acros Organics) 태그가 붙은 MT 단량체를 CPT/MT-NG 준비에 사용하고 이 젤로 처리된 세포를 Mitotracker™ Deep Red로 염색했다. 세포 흡수의 유세포 분석을 위해 세포를 6웰 플레이트(1×10^4 cells/well)에 접종했다. 24시간 배양 후, 세포를 1-6시간 동안 CPT/MT-NG로 처리하고 CPT-형광 세포 집단을 유세포 분석기(FACSealibur, BD Biosciences)로 검출했다.

[0115] **세포 내 ROS 수준 및 미토콘드리아 기능 장애 평가**

[0116] HeLa 세포를 8웰 플레이트(1×10^4 cells/well)에 파종하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 내 ROS 수준, 미토콘드리아 밀도 및 미토콘드리아 막 손상 각각을 시각화하기 위해, 100μg/mL의 NG, MT-NG, CPT-NG 또는 CPT/MT-NG와 함께 추가로 24시간 동안 배양한 후 DCFDA, Mitotracker™ Deep Red 또는 JC-1 염료로 세포를 처리했다. 각 세포 이미지는 공초점 레이저 스캐닝 현미경(ZEISS, LSM 7800)을 통해 획득되었다. 미토콘드리아 기능 장애는 각각 Rhod-2, AM, TMRM 및 MitoSOX를 가진 세포에 의해 추가로 조사되었다.

[0118] **세포 사멸률 및 메커니즘 평가**

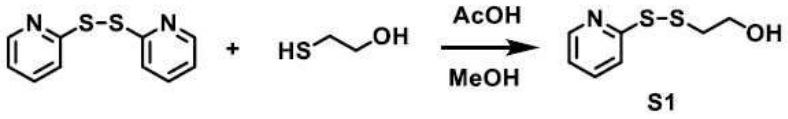
[0119] 세포를 96-웰 플레이트(5×10^3 cells/well)에 시딩하고 24시간 동안 배양하였다. 세포를 다양한 NG(0-100 μg/mL)와 함께 추가 48시간 동안 지속적으로 배양하고 흡광도 측정을 위해 MTT 시약을 사용하여 생존력을 정량적으로 결정했다(λ=595 nm). 세포사멸 억제제 Z-VAD-FMK(MedChem express) 또는 괴사 억제제 Necrostatin-1로 세포를 전처리한 후에도 동일한 실험을 수행하였다. 정량적 세포사멸 분석을 위해 세포를 6웰 플레이트(1×10^4 cells/well)에서 배양하고 100 μg/mL의 CPT/MT-NG와 함께 48시간 동안 배양했다. 세포사멸 세포는 Annexin V-FITC 및 PI가 포함된 Dead Cell Apoptosis 키트를 사용하여 표지하고 유세포 분석기(FACSealibur, BD Biosciences)로 분석했다.

[0121] **<제조예 1> PDS-PEG 중합체의 제조**

[0122] 첫 번째 단계로 이황화물 단량체(S1)의 합성을 위해 TCI(2,2'-dipyridyl disulfide)(5.00g, 22.7mmol)를 메탄올(MeOH)(50mL)에 용해시켰다. 2-머캅토에탄올(1.60mL, 22.7mmol)을 아세트산 3방울과 함께 이 용액에 첨가하고

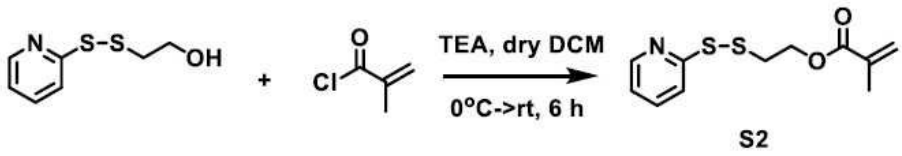
밤새 실온에서 교반하였다. 생성물을 회전 증발기를 사용하여 증발시키고 디클로로메탄(DCM)으로 3회 추출하였다. 조 생성물을 실리카 겔 및 에틸 아세테이트/헥산(1:4 v/v)을 사용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 투명한 액체로 수집하였다.

[0123] ^{1}H NMR: 8.48(d,1H), 7.56(d,1H), 7.39(d,1H), 7.13(d,1H), 5.69(br,1H), 3.78(t,2H) 및 2.93(t,2H)ppm.

[0124] 

[0126] 다음으로, S1(1.84g, 9.82mmol)을 50mL DCM에 용해시키고 트리에틸아민(2.06mL, 14.7mmol)과 혼합했다. 이 혼합 용액을 0℃로 냉각하고 아르곤 분위기 하에서 메타크릴로일 클로라이드(1.54 g, 14.7 mmol)를 적가하였다. 용액을 실온에서 6시간 동안 교반하고 생성물을 DCM으로 3회 추출하고 $MgSO_4$를 통해 여과하였다. 조생성물(S2)을 에틸 아세테이트/헥산(1:4 v/v)을 사용하는 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제하고 얻었다.

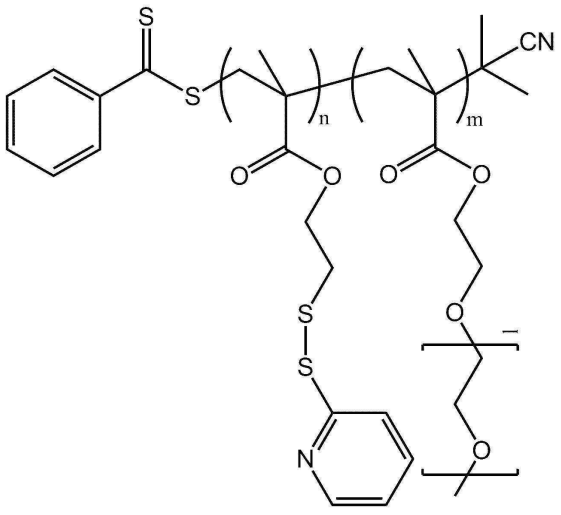
[0127] ^{1}H NMR: 8.47 (d,1H), 7.69(d,1H), 7.63(d,1H), 7.10(d,1H), 6.13(s,1H), 5.59(s,1H), 4.40(t,2H), 3.10(t,2H), 5.59(t,2H) 및 1.94(s,3H)ppm.

[0128] 

[0130] 마지막으로, S2(500mg, 1.96mmol), 폴리(에틸렌 글리콜) 메틸 에테르 메타크릴레이트(465.5mg, 0.49mmol), 2-시아노-2-프로필 벤조디티오에이트(5.41mg, 0.025mmol) 및 아조비스이소부티로니트릴(AIBN)(1.21mg, 0.0074 mmol)을 5 mL 무수 THF에 용해시키고 아르곤 가스로 탈기시켰다. 반응 혼합물을 밀봉하고 70℃로 예열된 오일 배스에 넣고 12시간 동안 교반하였다. 차가운 디에틸 에테르에서 3회 침전시켜 'PDS-PEG 중합체'를 얻었다.

[0131] ^{1}H NMR: 8.50, 7.79, 7.22, 7.13, 4.23, 3.64, 3.38, 3.07, 2.06-1.76 및 1.12-0.81ppm.

[0133] [PDS-PEG 중합체]

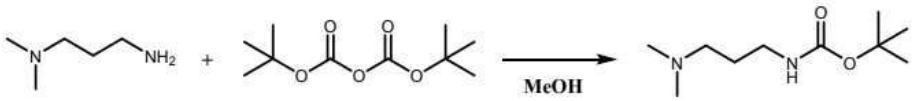
[0134] 

[0135] n: 78-82 정수

[0136] m: 19-21의 정수

[0137] l: 17-19의 정수

[0139] **<제조예 2> 미토콘드리아 표적화 단량체(MT 단량체)의 제조**

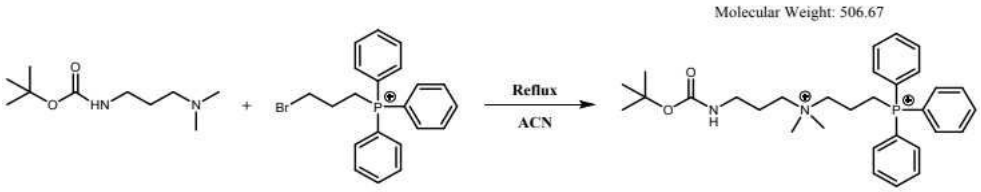


[0140] **S1**

[0141] S1: 0℃에서 메탄올 10mL에 용해된 N,N-디메틸아미노 프로필아민(1g, 9.787mmol) 용액에 Ditert-부틸디카보네이트(3.17g, 14.7mmol)를 첨가하였다. 그 후, 용액을 실온으로 가온하고 밤새 교반하였다. 그 후, 용매를 증발시키고 남은 생성물에 DIW를 첨가하였다. 생성물을 클로로포름(30 mL x 3)으로 추출하였다. 무수 Na_2SO_4로 건조시킨 후, 용매를 증발시켰다. 생성물을 백색 분말로 얻고 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0142] 수율: 1.6g(76%)

[0143] ^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ 1.42(s, 9H), 1.5(br,2H), 2.2(s,6H), 2.3(t,2H), 3.14(br,2H).

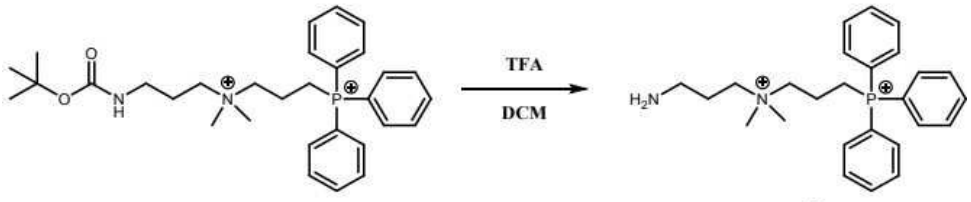


[0145] **S2**

[0146] S2: S1(1g, 4.94mmol) 및 3-브로모-프로필-트리페닐포스포늄(2g, 4.94mmol)을 ACN(20mL)에 용해시켰다. 그 다음, 혼합물을 48시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 HPLC(메탄올:H_2O)로 정제하여 75% 수율로 순수한 화합물을 얻었다. 생성물은 노란색 오일이었다.

[0147] 수율: 1.5g(60%).

[0148] ^{1}H NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ 1.42(s,9H), 2.2(t,2H), 2.3(m,2H), 3.1(t,2H), 3.3(s,6H), 3.5(t,2H), 3.8(t,2H), 4.4(t,2H), 7.67-7.81(m,15H).

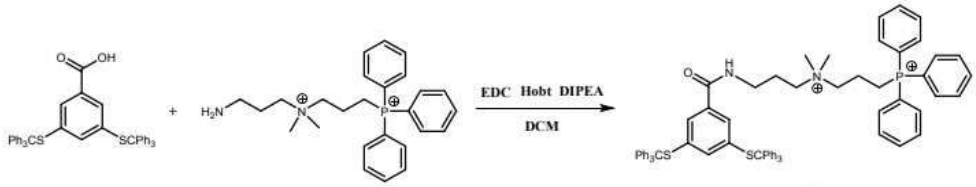


[0150] **S3**

[0151] S3: S2(1.5g, 2.96mmol) 및 10% 트리플루오로아세트산을 DCM(10mL)에 용해시켰다. 이어서, 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고 생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에 활용하였다.

[0152] 수율: 1g(95%).

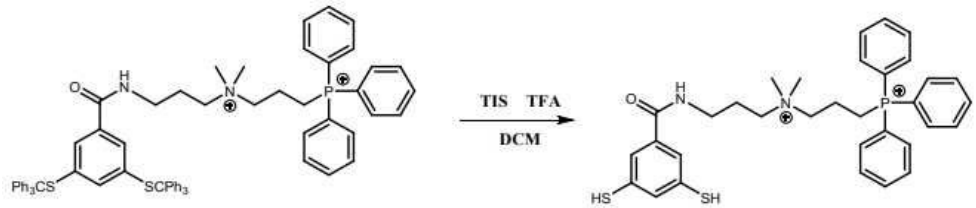
[0153] ^{1}H NMR(400MHz, MeOD): 2.2(t,2H), 2.3(m,2H), 3.1(t,2H), 3.3(s,6H), 3.5(t,2H), 3.8(t,2H), 4.4(t,2H), 7.67-7.81(m,15H).



S4

[0155]

[0156] S4: 3,5-비스(트리틸티오)벤조산은 다음 방법으로 합성하였다. 3,5-비스(트리틸티오)벤조산(0.2g, 0.3mmol), EDC·HCl(0.056g, 0.36mmol) 및 Hobt(0.126g, 0.81mmol)를 건조 DCM에 용해시켰다. 이어서, DCM에 용해된 S3(0.122g, 0.3mmol) 및 DIPEA(1.01g, 2.28mmol)의 혼합물을 혼합물 용액에 조심스럽게 첨가하였다. 실온에서 밤새 교반한 후 생성물을 침전시키고 에테르로 세척하였다. 생성물을 추가 정제 없이 활용하였다.



Mito-1

[0158]

[0159] Mito-1: S4(0.2g, 0.348mmol), TIS(0.1mL) 및 TFA(1mL)를 DCM(5mL)에 용해시켰다. 실온에서 1시간 동안 교반한 후 생성물이 침전되었고 에테르로 세척되었다. 생성물을 HPLC로 정제하였다.

[0160] 수율: 0.1g(50%).

[0161] ^{1}H NMR(400MHz, MeOD): δ2.04(m,2H), 2.16(m,2H), 3.07(s,6H), 3.39(t,2H), 3.50(m,4H), 3.57(t,2H), 7.45(s,1H), 7.59(s,1H), 7.67-7.81(m,16H).

[0162] ^{13}C NMR(400MHz, MeOD): δ15.81, 22.20, 36.59, 49.48, 62.33, 117.1, 118.05, 130.25, 133.42, 135.23, 138.33, 166.38.

[0163] MALDI-TOF: 287.43[M/Z]

[0165] 본 제조예 2에서 제조한 Mito-1을 미토콘드리아 표적화 단량체(이하 'MT 단량체'라고 함)로 사용하였다.

[0167] **<실시예 1> 캄프토테신(CPT) 및 미토콘드리아 표적화 단량체(MT 단량체)를 포함하는 나노겔의 제조 (이하, 'CPT/MT-NG'라고 함)**

[0168] 제조예 2에서 제조한 MT 단량체 5.83 mg을 40 μL의 탈이온수에 용해시켰다. 다음으로, 캄프토테신(CPT, Ontario Chemicals Inc.) 2 mg을 DMSO 20 μL에 녹였다. 제조예 1에서 얻은 PDS-PEG 중합체 10 mg을 200 μL의 DCM에 용해시키고 교반시킨 후 3차 증류수 1 mL을 추가한 후 4시간동안 교반하였다. 다음으로, CPT 용액과 혼합하고 4시간 동안 교반했다. 이 혼합 용액에 MT 단량체 용액을 계속 교반하면서 적가하였다. 12시간 동안 교반한 후, 생성된 생성물을 24시간 동안 투석(MWCO = 3500)하여 정제하고 동결건조하여 회수하였다.

[0170] **<비교예 1> 나노겔의 제조 (이하, 'NG'라고 함) (CPT 및 MT 단량체 미포함)**

[0171] 제조예 1에서 얻은 PDS-PEG 중합체 10 mg을 200 μL의 DCM에 용해시키고 교반시킨 후 3차 증류수 1 mL을 추가한 후 4시간동안 교반하였다. 디티오트레이톨 1.02 mg을 40 μL의 탈이온수에 용해시켰다. PDS-PEG 중합체 용액에 디티오트레이톨 용액을 교반하면서 적가하였다. 생성된 생성물을 24시간 동안 투석(MWCO = 3500)하여 정제하고

동결건조하여 회수하였다.

[0172] 여기서, 상기 디티오트레이톨은 실시예 1의 MT 단량체 대신 사용하였고, PDS-PEG 중합체와 이황화 결합을 통해 나노겔 구성요소로 포함된다.

[0174] **<비교예 2> 미토콘드리아 표적화 단량체(MT 단량체)를 포함하는 나노겔의 제조 (이하, 'MT-NG'라고 함) (CPT 미포함)**

[0175] 제조예 2에서 제조한 MT 단량체 5.83 mg을 40 μL의 탈이온수에 용해시켰다. 제조예 1에서 얻은 PDS-PEG 중합체 10 mg을 200 μL의 DCM에 용해시키고 교반시킨 후 3차 증류수 1 mL을 추가한 후 4시간동안 교반하였다. PDS-PEG 중합체 용액에 MT 단량체 용액을 계속 교반하면서 적가하였다. 12시간 동안 교반한 후, 생성된 생성물을 24시간 동안 투석(MWCO = 3500)하여 정제하고 동결건조하여 회수하였다.

[0177] **<비교예 3> 캄프토테신(CPT)를 포함하는 나노겔의 제조 (이하, 'CPT-NG'라고 함) (MT 단량체 미포함)**

[0178] 디티오트레이톨 5.83 mg을 40 μL의 탈이온수에 용해시켰다. 캄프토테신(CPT, Ontario Chemicals Inc.) 2 mg을 DMSO 20 μL에 녹였다. 제조예 1에서 얻은 PDS-PEG 중합체 10 mg을 200 μL의 DCM에 용해시키고 교반시킨 후 3차 증류수 1 mL을 추가한 후 4시간동안 교반하였다. 다음으로, CPT 용액과 혼합하고 4시간 동안 교반했다. 이 혼합 용액에 디티오트레이톨 용액을 계속 교반하면서 적가하였다. 12시간 동안 교반한 후, 생성된 생성물을 24시간 동안 투석(MWCO = 3500)하여 정제하고 동결건조하여 회수하였다.

[0179] 여기서, 상기 디티오트레이톨은 실시예 1의 MT 단량체 대신 사용하였고, PDS-PEG 중합체와 이황화 결합을 통해 나노겔 구성요소로 포함된다.

[0181] **<실험예 1> 항암제 3종 및 MT 단량체의 항암 효능 평가**

[0182] 암 치료용 나노겔(NG) 시스템을 준비하기 전에 먼저 세포사멸 기전에서 MT 단량체와 상호작용할 수 있는 특정 항암제를 선택하는 연구를 수행하였다.

[0183] 구체적으로, 인간 자궁경부 HeLa 암세포를 사용하여 세 가지 다른 화학약물인 캄프토테신(**CPT**), 파클리탁셀(**PTX**) 또는 독소루비신(**DOX**)을 테스트했다. 세포를 이들 유리 약물 분자 각각과 함께 또는 유리 MT 단량체와 동시에 24시간 동안 배양하고, 이들의 생존력을 MTT 시약을 사용하여 분석했다.

[0185] 도 2a는 캄프토테신(CPT) (0-1 μM), CPT+MT 단량체(5 μM) 및 CPT+MT 단량체(10 μM), 3종 시료와 함께 배양된 HeLa 세포의 생존율을 측정한 결과이다.

[0186] 도 2b는 독소루비신(DOX) (0-1 μM), DOX+MT 단량체(5 μM) 및 DOX+MT 단량체(10 μM), 3종 시료와 함께 배양된 HeLa 세포의 생존율을 측정한 결과이다.

[0187] 도 2c는 파클리탁셀(PTX) (0-1 μM), PTX+MT 단량체(5 μM) 및 PTX+MT 단량체(10 μM), 3종 시료와 함께 배양된 HeLa 세포의 생존율을 측정한 결과이다.

[0188] 도 2d는 CPT/MT-NG(실시예 1)의 TEM 이미지이다.

[0189] 도 2e는 CPT/MT-NG(실시예 1) 및 CPT-NG(비교예 3)에서 제조한 나노겔에 대한 유체역학적 입자 크기를 측정한 결과이다.

[0190] 도 2f는 CPT/MT-NG(실시예 1), NG(비교예 1), MT-NG(비교예 2) 및 CPT-NG(비교예 3)에서 제조한 나노겔에 대한 표면 제타 전위를 측정한 결과이다.

[0192] 도 2에 나타난 바와 같이, 유리 CPT 단독이 최대 1 μM의 테스트 농도에서 세포에 독성이 없지만 농도 의존적으로 공동 배양된 MT 단량체와 함께 세포 생존율을 감소시킬 수 있음을 보여주었다(도 2a). 반면, DOX는 동일한 조건에서 세포에 큰 영향을 미치지 않았으며, PTX는 단량체에 관계없이 세포 사멸을 유도했다(도 2b-c). 이러한

결과로부터 CPT와 MT 단량체가 세포 사멸 메커니즘과 상관관계가 있다고 추측되었으며, CPT/MT 단량체 조합을 NG에 캡슐화하여 구체적으로 CPT/MT 단량체 조합의 암 치료 효과를 연구하기로 결정했다.

[0193] CPT/MT-NG는 두 가지 치료 성분이 있는 상태에서 에멀젼이 없는 중합체 전구체 방법으로 생산되었다. 고분자 전구체로 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 피리딘 이황화물 염산염(PDS)과 함께 사용했는데, 이는 안정적인 약물 캡슐화를 위해 SS 결합 형성을 통해 자체 가교할 수 있다. 계속 교반하면서 CPT와 MT 단량체를 PDS-PEG 공중합체가 용해된 용액에 순차적으로 첨가하는 동안 소수성 CPT 분자는 자기조립된 고분자 응집체 내부에 위치하게 된다. 한편, 티올 함유 MT 단량체는 공중합체의 PDS에 접합되어 SS 브리지를 형성하고 양으로 하전된 TPP 단위가 외부 NG 표면에 노출된다.

[0194] 생성된 CPT/MT-NG(실시예 1)는 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 바와 같이 증류수에서 분산성이 좋은 구형 형태를 나타냈다(도 2d). CPT/MT-NG(실시예 1)는 ~100 nm의 유체역학적 크기(도 2e)와 강력한 양성 표면 전하(29±0.7mV)(도 2f)를 나타냈는데, 이는 MT 단량체만 로드된 나노겔(MT-NG, 비교예 2, 12±0.7mV)에 대해서도 표시된 것처럼 TPP 부분에 기인한다. 이 결과는 탑재물 적재가 없는 NG(비교예 1, -16±0.6mV) 또는 CPT 탑재만 있는 NG(CPT-NG, 비교예 3, -19±2mV)와 다르게 나타난다.

[0195] 추가로, UV/Vis 흡수 분광분석으로 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 CPT 및 MT 단량체 양이 나노겔 총 질량에 대해 각각 약 5중량% 및 10중량%인 것으로 확인되었다.

[0197] **<실험예 2> 산화환원 반응에 의한 나노겔의 파손 및 탑재물 방출 평가**

[0198] 본 실험예에서 CPT/MT-NG(실시예 1)은 SS 결합 중합체와 MT 모노머로 구성되었기 때문에 SS 환원제인 GSH에 반응하여 그 구조가 파괴되어 결과적으로 캡슐화된 CPT와 접합되어 있던 MT 모노머가 방출된다(도 3a).

[0199] 구체적으로, 이를 확인하기 위해 CPT/MT-NG(실시예 1)를 중성 PBS(0.1mg/mL)에 현탁시키고 GSH(10mM)를 포함하거나 포함하지 않고 온화한 교반하에 3일 동안 배양한 후 형태 변화를 TEM으로 검사했다.

[0201] 도 3a는 CPT/MT-NG(실시예 1)이 GSH에 반응하여 SS 결합이 분리되는 원리 대한 개략도이다.

[0202] 도 3b 및 3c는 GSH가 존재하는 PBS 또는 일반 PBS 용액에 3일 동안 분산시킨 후 CPT/MT-NG의 TEM 이미지이다.

[0203] 도 3d 및 3e는 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 PBS 용액으로 CPT(d) 및 MT 단량체(e)의 GSH 의존적 방출율을 시간별로 측정한 결과이다.

[0205] 도 3b 및 3c에 나타난 바와 같이, CPT/MT-NG(실시예 1)는 PBS에 포함된 GSH에 지속적으로 노출되는 동안 크게 변형되고 서로 융합되었으며 초기 구형 모양은 3일째에 거의 구별할 수 없게 되었다(도 3b). 반대로, CPT/MT-NG(실시예 1)는 순수 PBS에서 3일째에도 원래 형태가 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다(도 3c). 추가로, CPT/MT-NG(실시예 1)는 순수 PBS에서 4일 동안 유체역학적 크기에 유의미한 변화가 나타나지 않아 콜로이드 안정성이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0207] 다음으로, CPT/MT-NG(실시예 1)에 탑재된 CPT 및 MT 단량체의 방출을 확인하였다. 구체적으로, CPT/MT-NG(실시예 1)를 중성 PBS(1 mg/mL)에 현탁시키고 GSH 포함 여부를 달리하며 온화한 교반하에 3일 동안 배양한 후, CPT 및 MT 단량체의 방출을 UV/Vis 분광분석(λ=365 nm) 및 고성능액체크로마토그래피(HPLC)(λ=254 nm)로 검출하여 조사하였다.

[0209] 도 3d 및 3e에 나타난 바와 같이, CPT/MT-NG(실시예 1)는 GSH 10 mM 포함 PBS에서 나노겔 형태가 변형되면서 48시간 동안 ~67% 수준으로 CPT 방출 누적 비율이 나타났고, 반면에 GSH 미포함 PBS에서는 나노겔로부터 CPT 방출(48시간 동안 ~3%)이 거의 일어나지 않았다(도 3d). 다음으로, GSH 농도(0, 5, 10mM)가 증가함에 따라 MT 단량체 방출이 더 많이 검출되었다(도 3e). 이러한 결과는 CPT/MT-NG가 조기 누출 없이 구조가 안정적이지만, 산화환원 환경에 민감하게 반응하여 탑재물을 방출할 수 있음을 입증하였다.

[0211] **<실험예 3> 세포 내재화 및 미토콘드리아 축적 평가**

[0212] MT 단량체와 적색 형광염료(1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, DiD)을 함유한 200 μg/mL의 나노겔로 HeLa 세포를 처리하여 세포 흡수를 평가했다.

[0214] 도 4a는 CPT/MT-NG(실시예 1)의 세포내 내재화에 대한 개략도이다.

[0215] 도 4b는 CPT/MT-NG(실시예 1)을 HeLa 세포와 4시간 동안 배양하는 동안 시간경과에 따른 나노겔의 엔도솜 탈출을 확인한 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30 μm).

[0216] 도 4c는 CPT/MT-NG(실시예 1)을 HeLa 세포와 24시간 동안 배양하는 동안 시간 경과에 따른 방출된 MT 단량체의 미토콘드리아 축적을 확인한 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30 μm).

[0217] 도 5는 적색 형광염료 DiD를 탑재한 NG(비교예 1)를 HeLa 세포와 4시간 동안 배양하는 동안 시간경과에 따른 나노겔의 엔도솜 탈출을 확인한 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30 μm).

[0218] 도 6은 CPT/MT-NG(실시예 1)을 HeLa 세포와 6시간 동안 배양하는 동안 시간 경과에 따른 CPT의 세포 흡수 효율을 측정한 유세포분석 결과이다.

[0220] 도 4b, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 세포의 공초점 형광 이미지는 시간이 지남에 따라(1, 2, 4시간) 더 강한 DiD 신호를 나타냈으며, 이는 NG가 세포에 성공적으로 진입했음을 증명한다(도 4b). DiD 형광은 4시간에 세포질에서만 관찰되었으며 리소트래커로 염색된 엔도솜과 훨씬 덜 겹쳐졌다. 적색 형광염료 DiD를 탑재한 NG(비교예 1, MT 단량체(TPP) 미포함)를 HeLa 세포와 4시간 동안 배양하는 동안 시간경과에 따른 나노겔의 엔도솜 탈출을 확인한 공초점 형광 이미지(도 5)와 비교하여 보면, 이 엔도솜 탈출은 아마도 강한 양전하를 갖는 NG 표면 노출 TPP 부분에 의해 촉진되었을 것으로 예상할 수 있다. 또한, 이러한 세포 흡수 효율의 시간에 따른 증가는 유세포분석으로도 입증되었다(도 6).

[0222] 다음으로, 세포 내재화 MT 단량체의 미토콘드리아 표적화 및 축적은 형광성 4-클로로-7-니트로벤조푸라잔(NBD) 염료 태그 MT 단량체가 로드된 나노겔(NBD-MT-NG)과 함께 HeLa 세포를 24시간 동안 배양하여 조사하였다.

[0224] 도 4c에 나타난 바와 같이, 5시간부터 NBD 형광은 미토콘드리아와의 점진적인 공동 위치로 관찰되었다. 이 결과는 세포 내부의 SS 연결을 끊는 GSH에 반응하여 MT 단량체가 나노겔에서 세포질로 방출된 다음, MT 단량체에 포함된 표적화 모이어티인 TPP에 의해 미토콘드리아로 이동할 수 있음을 명확히 증명한다.

[0226] **<실험예 4> 미토콘드리아 중합 및 기능장애**

[0227] 앞선 실험예에서 CPT/MT 단량체 공동 전달을 확인한 후, CPT의 화학요법 활성과 관련된 미토콘드리아 중합 및 기능장애를 계속 조사하였다. 즉, 미토콘드리아의 ROS에 의해 MT 단량체가 중합될 수 있으며, 그에 따라 미토콘드리아의 기능이 저하될 수 있다. 한편, CPT는 세포사멸을 위해 세포핵을 손상시키고 세포내 ROS 수준을 상승시켜 미토콘드리아 중합 및 기능장애를 촉진할 것으로 예상하였다.

[0228] 먼저, ROS 생성을 평가하기 위해 HeLa 세포를 100 μg/mL의 CPT/MT-NG(실시예 1)와 함께 24시간 동안 배양하고 형광 ROS 프로브인 2,7-디클로로플루오레세인 디아세테이트(DCFDA)로 처리하였다.

[0230] 도 7a 내지 7c는 NG(비교예 1), MT-NG(비교예 2), CPT-NG(비교예 3) 및 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 제조한 나노겔을 DCFDA(a), Mitotracker(b) 또는 JC-1(c) 염료로 염색하고, HeLa 세포와 배양한 후의 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = a와 c의 경우 80 μm, b의 경우 30 μm).

[0231] 도 7d는 NG(비교예 1), MT-NG(비교예 2), CPT-NG(비교예 3) 및 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 제조한 나노겔을 HeLa

세포와 배양한 샘플에서 미토콘드리아 내 중합체의 GPC 감지 신호이다.

[0233] 도 7a에 나타난 바와 같이, CPT를 포함하지 않는 NG(비교예 1), MT-NG(비교예 2)는 형광을 방출하지 않았는데, 이는 ROS 생성이 없음을 나타낸다. 반면에, CPT-NG(비교예 3)는 세포에 약간의 형광성을 부여하여 화학약물(CPT)이 암 치료에서 산화 스트레스를 유도하는 것으로 나타났다(도 7a). 중요한 것은 형광 방출이 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 훨씬 더 강하다는 것이다(도 7a). 현재 실험 조건에서 MT-NG가 스스로 ROS 생성을 유도할 수 없다는 점을 고려하면, 이러한 결과는 CPT로 인한 ROS 생성이 분명히 미토콘드리아 내 MT 단량체의 중합 유발 요인으로 기능하고 결과적인 미토콘드리아 기능장애가 세포 내 ROS 수준을 더욱 높인다는 것을 시사한다.

[0235] 다음으로, 겔 성능 크로마토그래피(GPC)로 세포 용해물을 분석하여, 도 7d의 화살표로 표시된 대로 CPT/MT-NG 배양 세포에서 ~7.5kDa의 분자량을 갖는 중합체가 제형화되었음을 확인하였다. 그에 따른 미토콘드리아 손상은 다양한 탐침 분자로 세포를 염색하여 시각화했다.

[0236] 도 7b에 나타난 바와 같이, Mitotracker로 세포를 염색함으로써 미토콘드리아 밀도의 급격한 감소가 확인되었다.

[0238] 또한, JC-1 분석을 이용하여 미토콘드리아 막의 탈분극을 조사하였다.

[0240] 도 7c에 나타난 바와 같이, CPT가 없는 대조 세포 샘플은 JC-1 응집체로부터 적색 형광만을 나타냈다. 대조적으로, JC-1 단량체 유래 녹색 형광은 CPT-NG 또는 CPT/MT-NG 배양 세포 샘플에 대해 포착되었다. 예상대로 후자의 방출 강도가 더 높았다.

[0242] 추가로, 손상된 미토콘드리아 막은 테트라메틸로다민 메틸 에스테르(TMRM)를 사용하여 추가로 관찰하였다.

[0244] 도 8은 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 제조한 나노겔을 HeLa 세포와 배양한 다음 TMRM으로 염색한 샘플의 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30㎛).

[0245] 도 9는 CPT/MT-NG(실시예 1)에서 제조한 나노겔을 HeLa 세포와 배양한 다음 AM-tracked 세포내 칼슘 이온(Ca^{2+})인 Rhod-2으로 처리한 샘플의 공초점 형광 이미지이다(스케일바 = 30㎛).

[0247] 도 8에 나타난 바와 같이, 이 중 CPT/MT 단량체 공동 전달로 인해 형광이 약해졌다.

[0248] 도 9에 나타난 바와 같이, 손상된 막을 통해 방출되는 AM 추적 세포내 칼슘 이온(Ca^{2+})인 Rhod-2는 미토콘드리아 기능에 대한 CPT/MT 단량체 조합 효과를 일관되게 입증하였다.

[0250] **<실험예 5> 암세포 사멸의 상승효과**

[0251] 나노겔 처리된 HeLa 세포를 48시간 동안 배양한 후 MTT 시약을 사용하여 결과적인 세포 생존율을 정량적으로 평가하였다.

[0253] 도 10a 내지 10c는 CPT/MT-NG(실시예 1) 또는 CPT-NG(비교예 3)와 함께 3종의 세포를 48시간 배양한 후 암성 HeLa 세포(a), 정상 NIH3T3 세포(b) 및 약물 내성 MDA-MB-231/ADR 세포(c)의 세포 생존율을 각각 측정한 결과이다. 세포 생존율은 평균±표준편차(n = 3)로 표시하였다.

[0254] 도 10d는 세포사멸 억제제인 Z-VAD-FMK 또는 괴사 억제제인 Nectastatin-1(Nec-1)의 존재 하에서 CPT/MT-NG(실

시예 1) 처리된 HeLa 세포의 생존율 측정 결과이다. 세포 생존율은 평균±표준편차(n = 3)로 표시하였다.

[0255] 도 10e 내지 10g는 CPT/MT-NG(실시예 1) 처리된 HeLa 세포의 웨스턴블롯 분석(e), 동역학 카스파제-3/7 분석(f) 및 유세포 세포사멸 분석(g) 결과이다.

[0256] 도 11은 NG(비교예 1) 또는 MT-NG(비교예 2)와 함께 암성 HeLa 세포를 48시간 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과이다.

[0258] 도 11에 나타난 바와 같이, CPT 미탑재 NG(비교예 1)와 MT-NG(비교예 2)는 모두 최대 200μg/mL의 농도에서 세포 생존에 해롭지 않았다.

[0260] 도 10a에 나타난 바와 같이, 100μg/mL 농도의 CPT-NG(비교예 3) 및 CPT/MT-NG(실시예 1)는 세포 생존율을 각각 ~58% 및 ~34%로 감소시켜 시너지 효과가 있는 세포 사멸을 증명하였다.

[0262] 도 10b에 나타난 바와 같이, 특이하게 정상 세포(NIH3T3)의 생존에는 훨씬 적은 영향을 미쳤다. 100μg/mL 농도의 CPT-NG(비교예 3) 및 CPT/MT-NG(실시예 1)는 세포 생존율을 각각 ~78% 및 ~89% 살아 있었다. 이는 정상 세포의 GSH 결핍 환경에서 탑재물 방출을 위한 구조적 파손 없이 나노겔이 매우 안정적으로 유지되었음을 의심할 여지없이 설명할 수 있다.

[0264] 치료 효과는 약물 내성 인간 유방 MDR-MB-231/ADR 암세포에서도 테스트하였다.

[0266] 도 10c에 나타난 바와 같이, 약물내성 유방암 세포(MDR-MB-231/ADR)를 유리 CPT로 처리한 경우 세포 생존율 감소에 유의미한 감소가 없었지만, 이와 비교하여 CPT/MT-NG(실시예 1)로 처리한 경우 세포 생존율이 뚜렷하게 감소하는 것을 확인하였다.

[0268] 도 10a 내지 10c의 결과는 CPT/MT-NG(실시예 1) 나노겔이 암세포에만 선택적으로 CPT 및 MT 단량체를 동시 전달함에 따라서, 정상 세포에 대한 부작용과 암세포의 약물 내성을 최소화할 수 있음을 입증한다.

[0270] 다음으로, 세포사멸 억제제인 Z-VAD-FMK 또는 괴사 억제제인 Nectastatin-1(Nec-1)의 존재 하에서 CPT/MT-NG(실시예 1) 처리된 HeLa 세포의 생존 가능성을 분석함으로써 세포사멸 메커니즘을 보다 구체적으로 이해하려고 시도하였다.

[0272] 도 10d에 나타난 바와 같이, 각 억제제를 사용하면 세포 생존율이 비슷한 수준에 도달했으며(Z-VAD-FMK의 경우 ~49%, Nec-1의 경우 ~47%), 억제제 처리가 없는 경우(~34%) 보다 약간 높았다.

[0274] 도 10e에 나타난 바와 같이, 절단된 caspase-3 및 9의 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 카스파제가 현재의 세포사멸 경로에 관여하고 있음을 보여준다. 또한, 손상된 DNA의 복구를 가능하게 하는 PARP(poly(ADP-ribose) polymerase)의 발현이 하향조절되었다는 점도 주목할만하다.

[0275] 도 10f에 나타난 바와 같이, 동역학 카스파제-3/7 분석에 따르면 CPT/MT-NG(실시예 1) 처리에 따라 시간 의존적으로 활성화가 증가하는 것을 확인하였다.

[0277] 마지막으로, 아포토시스 세포의 집단은 Annexin V-FITC/요오드화 프로피듐(PI) 염색 후 세포 샘플의 유세포분석에 의해 정량화하였다.

[0278] 도 10g에 나타난 바와 같이, 예상대로 암성 HeLa 세포 샘플은 annexin V-FITC와 PI 양성이 모두 상당 부분(~96%)인 것으로 밝혀졌으나 정상 NIH3T3 세포 샘플은 이러한 염료로 거의 염색되지 않았으며 이는 세포사멸 유도를 위한 CPT/MT-NG의 암세포 특이적 작동을 뒷받침한다.

[0280] 종합하면, 항암제와 MT 단량체는 산화환원 반응성을 갖는 나노겔에 의해 암세포에 공동 전달될 수 있으며, 세포사멸 경로에서 상호 연결되어 미토콘드리아 중합 및 기능장애를 공동으로 촉진하여 시너지 효과가 강화된 병용요법을 수행할 수 있다.

[0281] 나노겔에 탑재되는 화학약물 CPT와 MT 단량체의 동시 전달이 세포사멸 경로에서 협력적인 상호작용을 가능하게 함으로써 암을 보다 효율적으로 치료하는데 유리하게 활용될 수 있음을 입증했다. CPT/MT-NG(실시예 1)는 세포내 GSH에 반응하여 형태학적 파열을 겪고 치료 활성을 위해 함께 탑재된 CPT 및 MT 단량체를 즉시 방출하도록 만들어졌다. MT 단량체는 ROS에 의한 중합에 의해 미토콘드리아 손상을 일으키는 것으로 입증되었고, 이는 CPT에 의해 유도된 세포내 ROS 수준의 증가로 쉽게 진행되었다.

[0283] 암세포 핵에 손상을 가하여 세포내 ROS 수준을 향상시키는 항암제의 일례인 캄프토테신(CPT) 대신에 동일한 약리활성을 타나내는 다른 항암제를 본 발명에 따른 나노겔에 탑재하여도, 유사한 시너지 효과가 나타날 것을 알 수 있다.

[0285] **<약제 제조예 1> 산제의 제조**

[0286] 유효물질 2 g

[0287] 유당 1 g

[0288] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0290] **<약제 제조예 2> 정제의 제조**

[0291] 유효물질 100 mg

[0292] 옥수수전분 100 mg

[0293] 유 당 100 mg

[0294] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0295] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0297] **<약제 제조예 3> 캡슐제의 제조**

[0298] 유효물질 100 mg

[0299] 옥수수전분 100 mg

[0300] 유 당 100 mg

[0301] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0302] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0304] **<약제 제조예 4> 주사제의 제조**

[0305] 유효물질 10 ㎍/㎖

[0306] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지

[0307] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ㎖

[0308] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명에 따른 유효물질을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ㎖ 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120 ℃에서 15 분 이상 오토클래이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0310] **<약제 제조예 5> 경비흡수제 (Nasal spray)의 제조**

[0311] 유효물질 1.0 g

[0312] 아세트산나트륨 0.3 g

[0313] 메틸파라벤 0.1 g

[0314] 프로필파라벤 0.02 g

[0315] 염화나트륨 적량

[0316] HCl 또는 NaOH pH 조정 적량

[0317] 정제수 적량

[0318] 통상의 경비흡수제의 제조방법에 따라, 염수 (0.9% NaCl, w/v, 용매는 정제수) 1 mL당 유효물질 3 mg이 포함되도록 제조하고, 이를 불투명한 스프레이 용기에 충진하고 멸균시켜 경비흡수제를 제조하였다.

[0320] **<약제 제조예 6> 액제의 제조**

[0321] 유효물질 100 mg

[0322] 이성화당 10 g

[0323] 만니톨 5 g

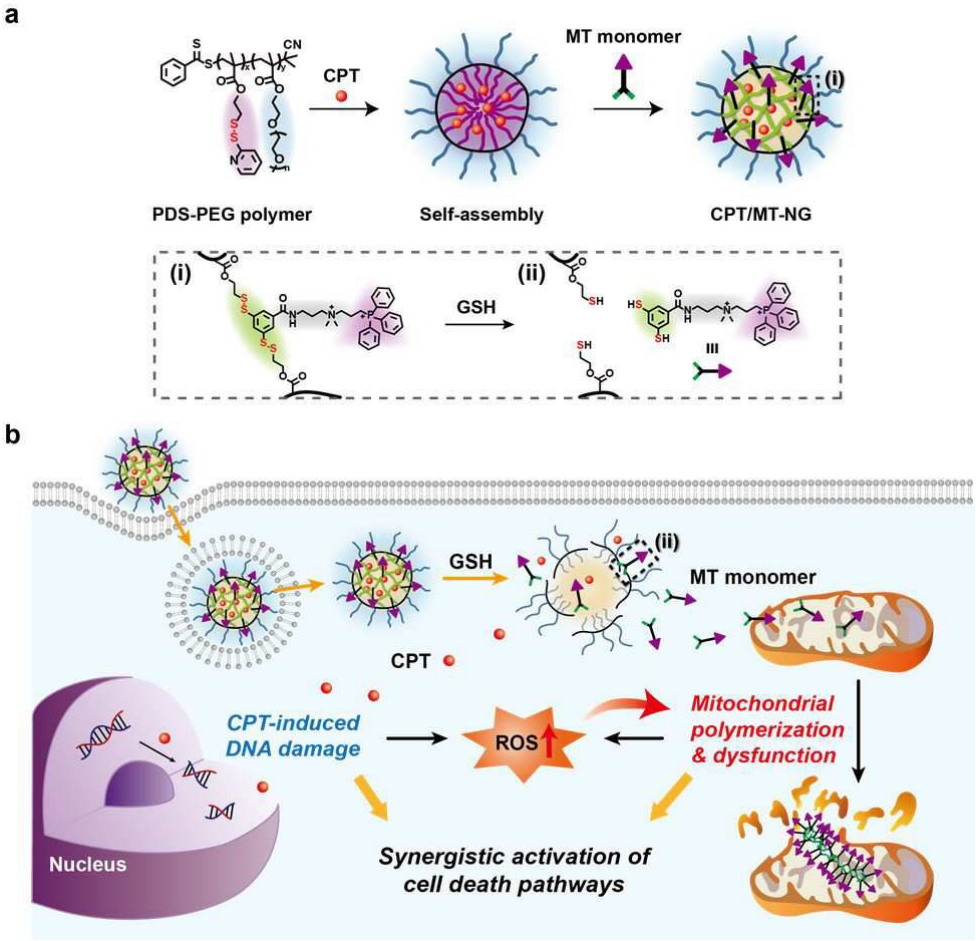
[0324] 정제수 적량

[0325] 통상의 액제의 제조방법에 따라, 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체 100 mL로 조절한 후 갈색 병에 충진하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

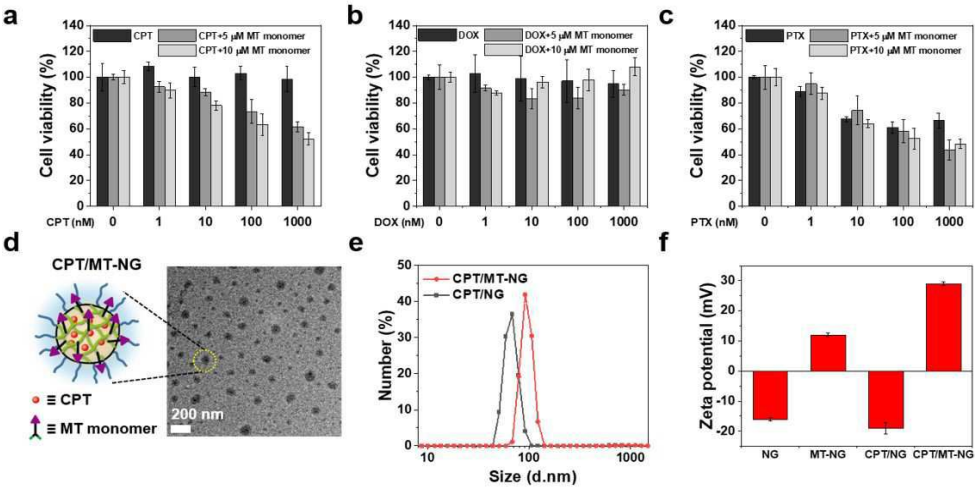
[0327] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

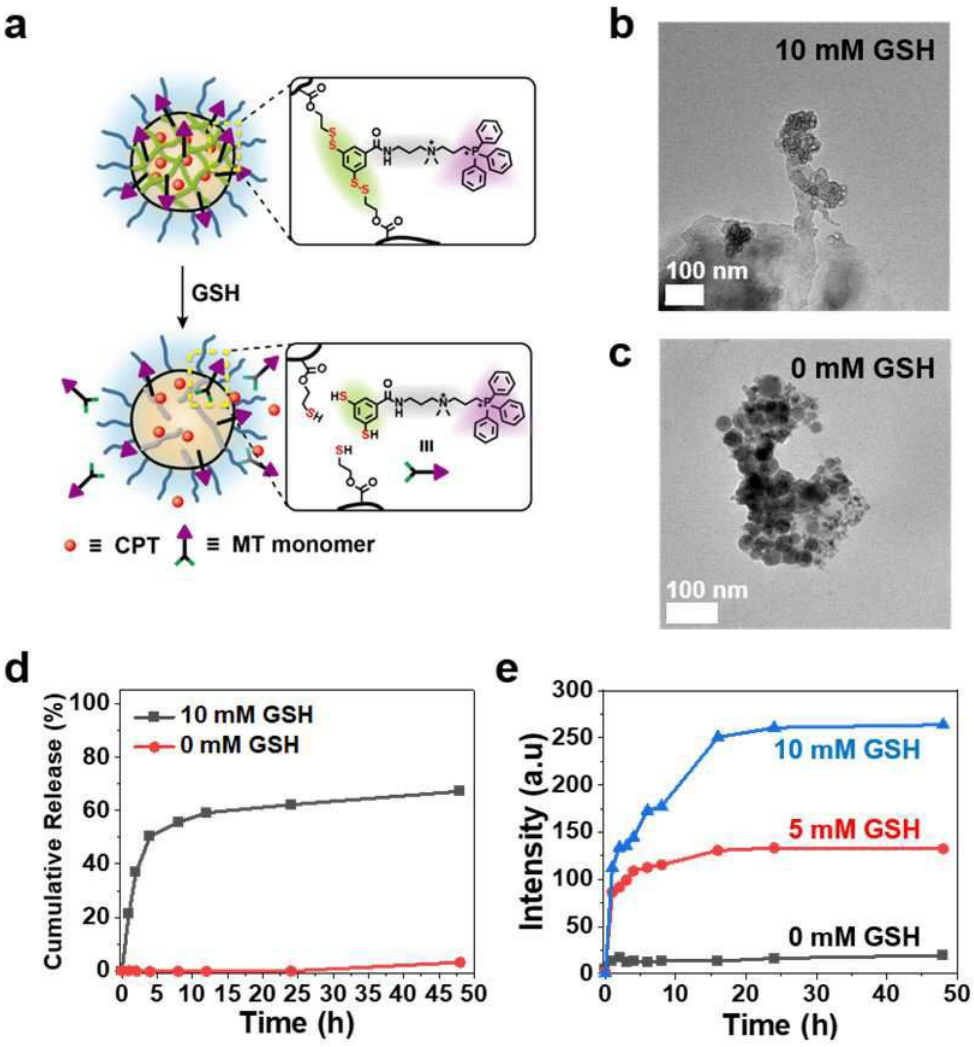
도면1


a
CPT
MT monomer
(i)
PDS-PEG polymer
Self-assembly
CPT/MT-NG
(i)
GSH
(ii)
III
b
GSH
(ii)
MT monomer
CPT
CPT-induced
DNA damage
ROS
Mitochondrial
polymerization
& dysfunction
Nucleus
Synergistic activation of
cell death pathways

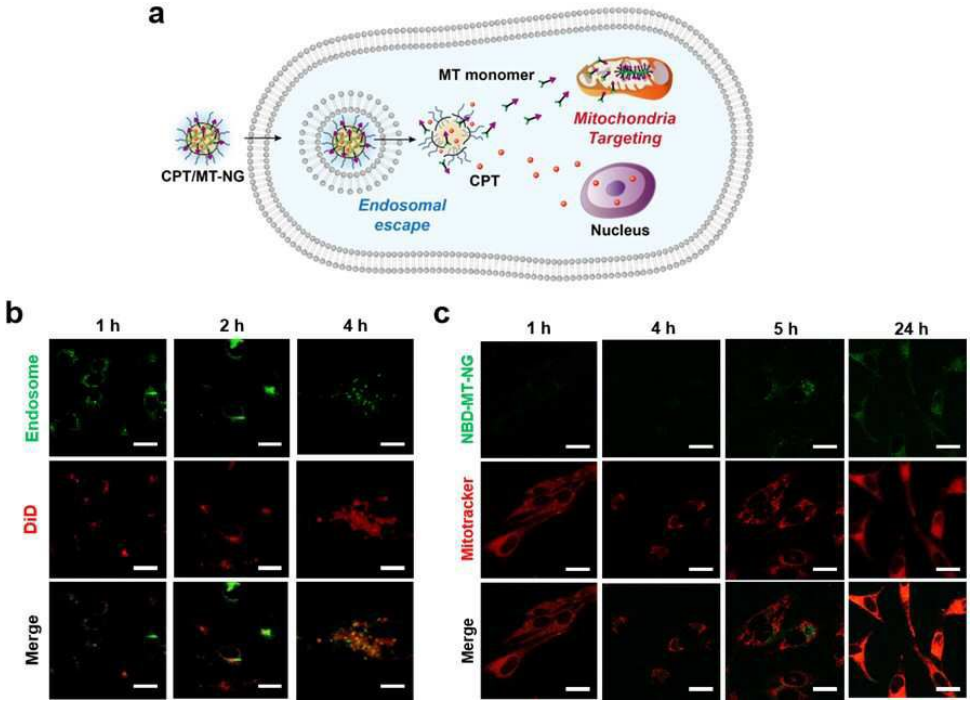
도면2


a
CPT
CPT+5 μM MT monomer
CPT+10 μM MT monomer
Cell viability (%)
CPT (nM)
b
DOX
DOX+5 μM MT monomer
DOX+10 μM MT monomer
DOX (nM)
c
PTX
PTX+5 μM MT monomer
PTX+10 μM MT monomer
PTX (nM)
d
CPT/MT-NG
≡ CPT
≡ MT monomer
200 nm
e
CPT/MT-NG
CPT/NG
Number (%)
Size (d.nm)
f
Zeta potential (mV)
NG
MT-NG
CPT/NG
CPT/MT-NG

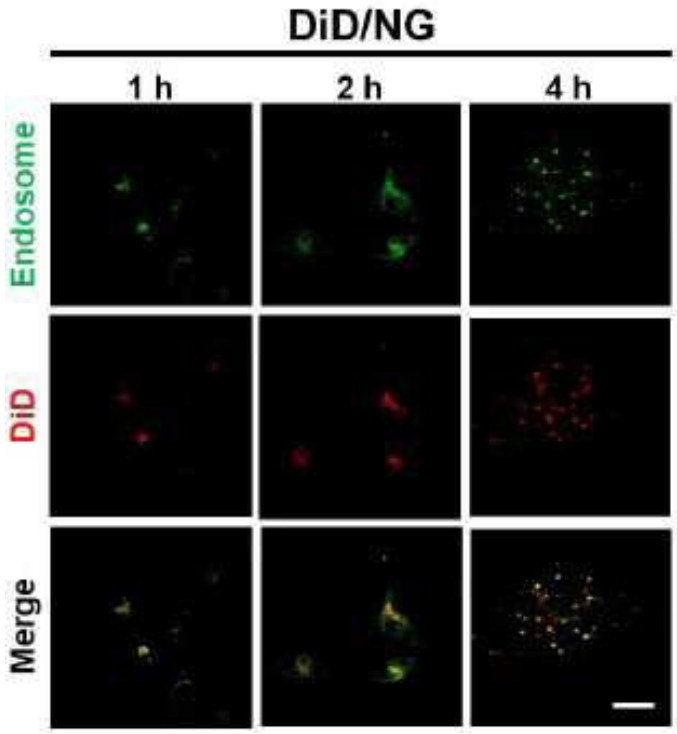
도면3


a
GSH
≡ CPT
≡ MT monomer
b
10 mM GSH
100 nm
c
0 mM GSH
100 nm
d
Cumulative Release (%)
10 mM GSH
0 mM GSH
Time (h)
e
Intensity (a.u)
10 mM GSH
5 mM GSH
0 mM GSH
Time (h)

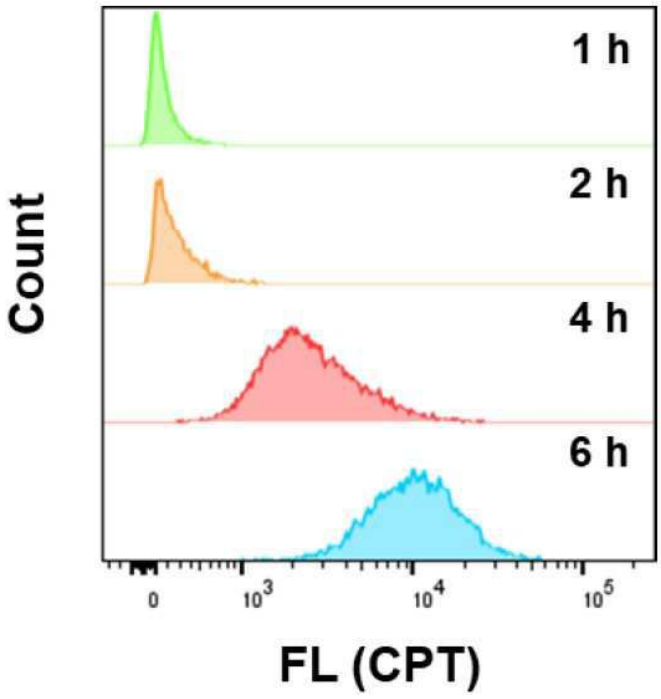
도면4


a
MT monomer
Mitochondria Targeting
CPT/MT-NG
CPT
Endosomal escape
Nucleus
b
1 h
2 h
4 h
Endosome
DiD
Merge
c
1 h
4 h
5 h
24 h
NBD-MT-NG
Mitotracker
Merge

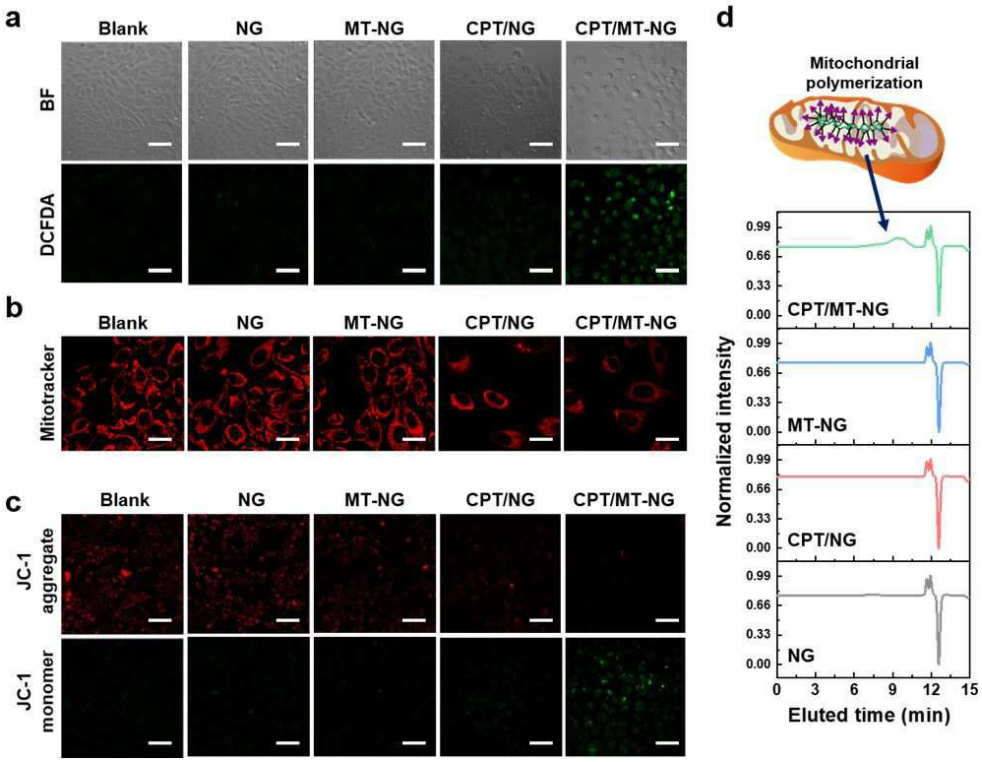
도면5


DiD/NG
1 h
2 h
4 h
Endosome
DiD
Merge

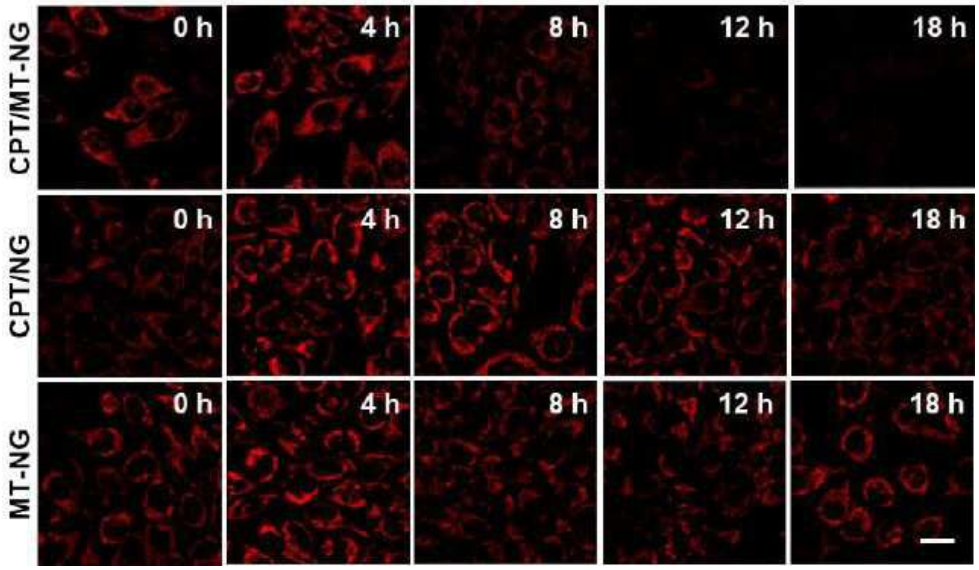
도면6


1 h
2 h
4 h
6 h
Count
0
10^3
10^4
10^5
FL (CPT)

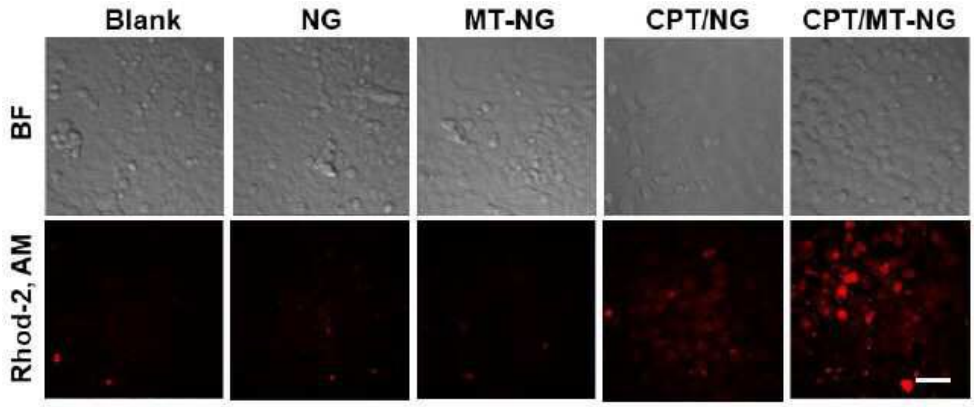
도면7


a
Blank
NG
MT-NG
CPT/NG
CPT/MT-NG
BF
DCFDA
b
Mitotracker
c
JC-1 aggregate
JC-1 monomer
d
Mitochondrial polymerization
Normalized intensity
0.99
0.66
0.33
0.00
CPT/MT-NG
MT-NG
CPT/NG
NG
0
3
6
9
12
15
Eluted time (min)

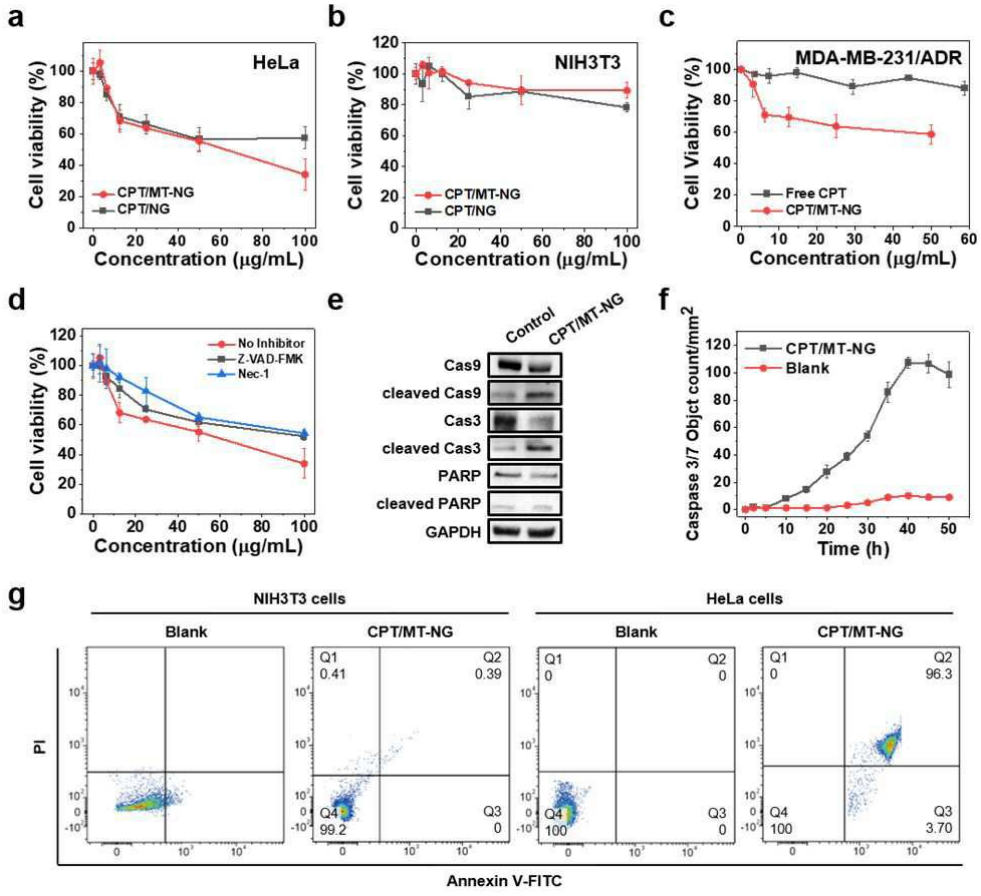
도면8


CPT/MT-NG
CPT/NG
MT-NG
0 h
4 h
8 h
12 h
18 h

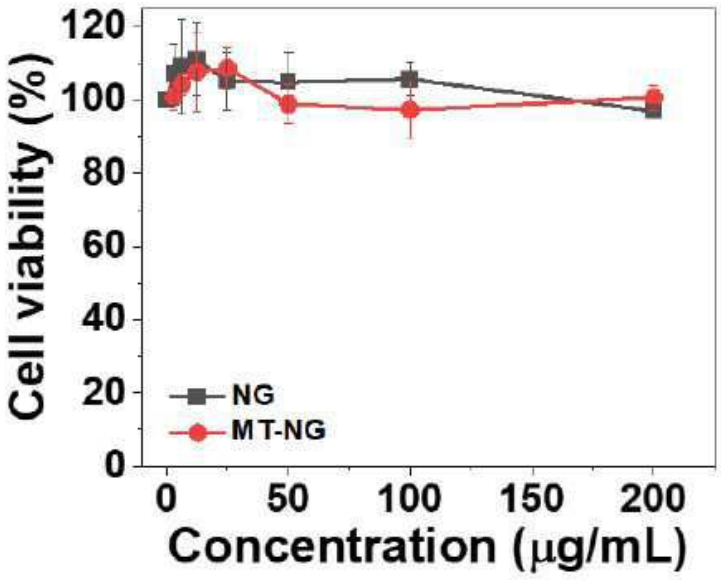
도면9


Blank
NG
MT-NG
CPT/NG
CPT/MT-NG
BF
Rhod-2, AM

도면10


a
HeLa
Cell viability (%)
CPT/MT-NG
CPT/NG
Concentration (μg/mL)
b
NIH3T3
Cell viability (%)
CPT/MT-NG
CPT/NG
Concentration (μg/mL)
c
MDA-MB-231/ADR
Cell Viability (%)
Free CPT
CPT/MT-NG
Concentration (μg/mL)
d
Cell viability (%)
No Inhibitor
Z-VAD-FMK
Nec-1
Concentration (μg/mL)
e
Control
CPT/MT-NG
Cas9
cleaved Cas9
Cas3
cleaved Cas3
PARP
cleaved PARP
GAPDH
f
Caspase 3/7 Objct count/mm2
CPT/MT-NG
Blank
Time (h)
g
NIH3T3 cells
HeLa cells
Blank
CPT/MT-NG
PI
Annexin V-FITC
Q1 0.41
Q2 0.39
Q4 99.2
Q3 0
Q1 0
Q2 0
Q4 100
Q3 0
Q1 0
Q2 96.3
Q4 100
Q3 3.70

도면11


Cell viability (%)
NG
MT-NG
Concentration (μg/mL)