(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0129778
(43) 공개일자 2024년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 81/02 (2006.01) *A61K 47/32* (2017.01)
A61K 47/34 (2017.01) *A61K 9/107* (2006.01)
C08F 220/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08G 81/025 (2013.01)
A61K 47/32 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0022756
(22) 출원일자 2023년02월21일
심사청구일자 2023년02월21일

(71) 출원인
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
임권택
부산광역시 부산진구 당감로 118, 105동 1202호
박상혁
경기도 수원시 영통구 웰빙타운로 50, 8503동 1002호
(74) 대리인
위병갑

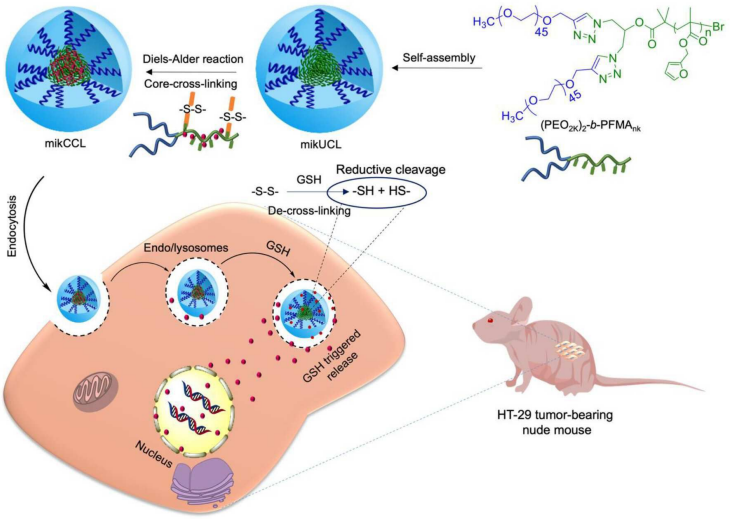
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **믹토암 공중합체 가교 마이셀 및 이를 포함하는 약물전달체**

(57) 요 약

본 발명은 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암 (miktoarm) 공중합체, 및 상기 믹토암 공중합체를 이용하여 제조한 믹토암 공중합체 가교 마이셀에 관한 것으로, 환원응답성 (redox responsive) 약물 방출 특성을 가지고 있어 암세포를 표적으로 하여 약물을 효과적으로 전달할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/34 (2013.01)
A61K 9/1075 (2013.01)
C08F 220/281 (2022.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345360483
과제번호 5199991414234
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 4단계두뇌한국21사업(R&D)
연구과제명 스마트 그린 융복합소재 인재육성 연구단
기 여 율 1/2
과제수행기관명 부경대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345346975
과제번호 2018R1D1A3B07041437
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 클릭반응을 이용한 약물전달용 고성능 고분자 임플란트 물질 합성 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 부경대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

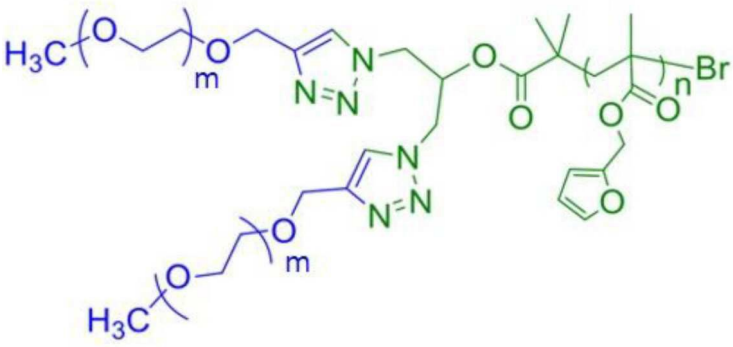
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암(miktoarm) 공중합체:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

n은 1-10,000이고,

m은 각각 1-10,000의 정수이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 믹토암 공중합체는 알킨-기능화된 폴리에틸렌옥사이드와 디아지드-기능화된 폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트)를 클릭 화학을 통해 커플링 반응시켜 제조된 것인, 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암 공중합체.

청구항 3

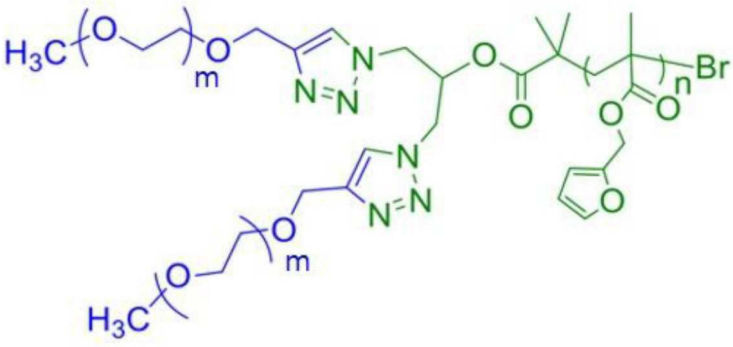
하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 믹토암 공중합체; 및

이황화 결합(disulfide bond) 또는 이셀레나이드 결합(diselenide bond)을 포함하는 가교제;를 포함하고,

Diels-Alder 반응에 의해 가교된 것인,

믹토암 공중합체 가교 마이셀:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

n은 1-10,000이고,

m은 1-10,000의 정수이다.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

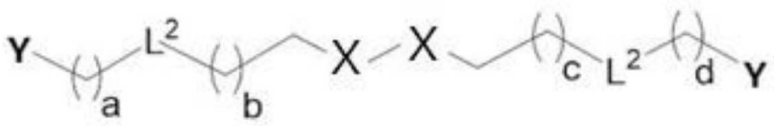
상기 믹토암 공중합체는 자기조립을 통해 비가교 마이셀을 형성하는 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,

a, b, c 및 d는 각각 0-10의 정수이고, 여기서 0일 경우는 단일결합을 의미하며,

L^2는 $-CH_2-$, 에스테르(ester) 또는 아마이드(amide) 결합이고;

X는 S 또는 Se이고,

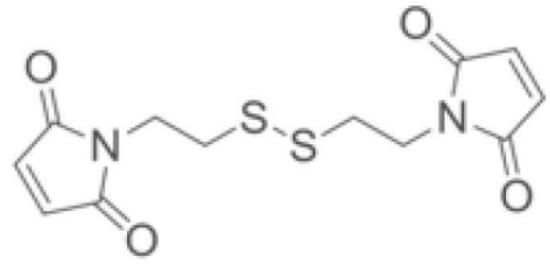
Y는 말레이미딜(maleimidyl) 유도체, 테트라지닐(tetrazinyl) 유도체 또는 아지도(azido) 유도체 중 1종의 클릭 반응 작용기이다.

청구항 6

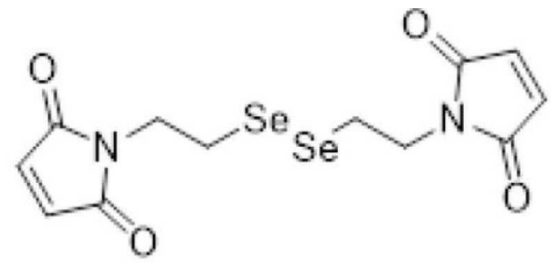
제5항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물 중 1종인 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀:

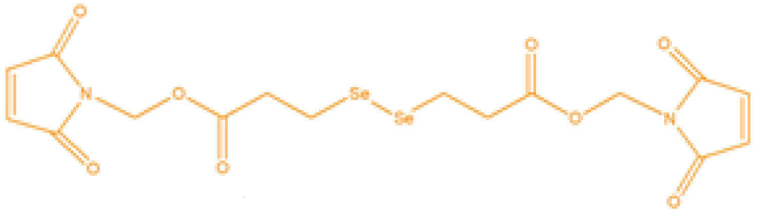
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



.

청구항 7

제 3 항에 있어서,

상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 암세포 표적형 약물방출 특성을 갖는 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀.

청구항 8

제 3 항에 있어서,

상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 환원 조건 하에서 약물을 방출하는 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀.

청구항 9

제 3 항에 있어서,

상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 친수성 쉘; 및 소수성 코어;로 이루어진 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀.

청구항 10

제 3 항에 있어서,

상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 소수성 약물을 담지하는 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 소수성 약물은 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anasterozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로에타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메슐리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀.

청구항 12

제 3 항에 있어서,

상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 소수성 코어 내로 약물이 캡슐화되는 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀.

청구항 13

제 3 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 믹토암 공중합체 가교 마이셀을 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체.

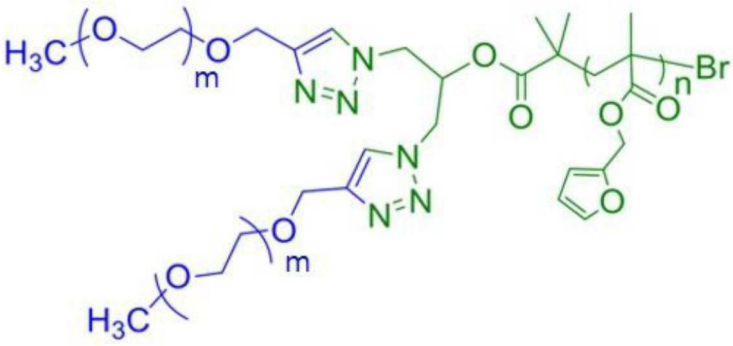
청구항 14

제 3 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 믹토암 공중합체 가교 마이셀을 포함하는 환원반응 감응형 약물 전달체.

청구항 15

알킨-기능화된 알킨-기능화된 폴리에틸렌옥사이드와 디아지드-기능화된 폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트)를 클릭 화학을 통해 커플링 반응시켜 제조된 것인, 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암 공중합체의 제조방법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

n은 1-10,000이고,

m은 1-10,000의 정수이다.

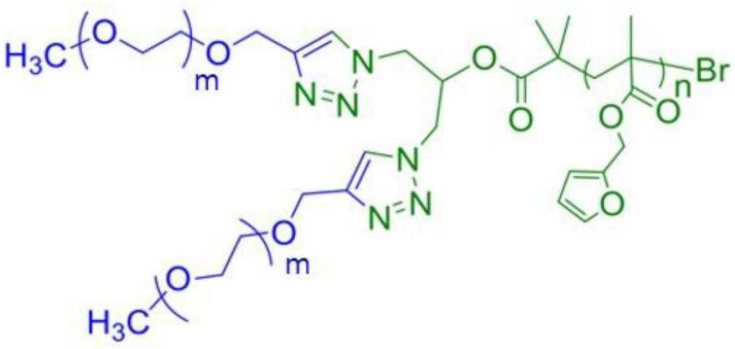
청구항 16

하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 믹토암 공중합체를 자기조립에 의해 비가교 마이셀을 형성하는 단계; 및

상기 비가교 마이셀과 이황화 결합(disulfide bond) 또는 이셀레나이드 결합(diselenide bond)을 포함하는 가교제를 혼합하여 Diels-Alder 반응에 의해 가교 반응시키는 단계;

를 포함하는 믹토암 공중합체 가교 마이셀의 제조방법:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

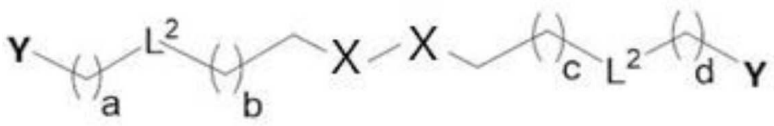
n은 1-30,000이고, m은 1-10,000의 정수이다.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀의 제조방법:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,

a, b, c 및 d는 각각 0-10의 정수이고, 여기서 0일 경우는 단일결합을 의미하며,

L^2는 $-CH_2-$, 에스테르(ester) 또는 아마이드(amide) 결합이고;

X는 S 또는 Se이고,

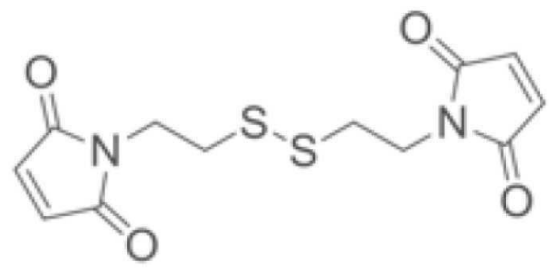
Y는 말레이미딜(maleimidyl) 유도체, 테트라지닐(tetrazinyl) 유도체 또는 아지도(azido) 유도체 중 1종의 클릭 반응 작용기이다.

청구항 18

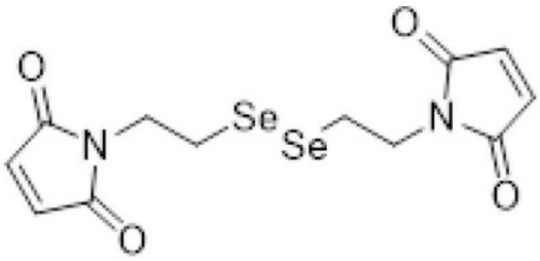
제17항에 있어서,

상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물 중 1종인 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀의 제조방법:

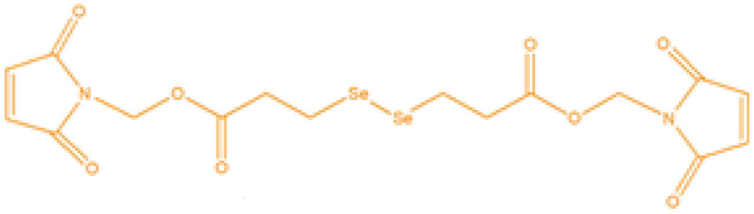
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암 (miktoarm) 공중합체, 및 상기 믹토암 공중합체를 이용하여 제조한 믹토암 공중합체 가교 마이셀에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 소수성 및 친수성 블록으로 구성된 양친매성 공중합체는 자체 조립된 나노 구조물인 마이셀 (micelle)을 형성하는 고유한 능력으로 인해 나노 의약품에서의 잠재적 응용에 대해 주목을 받고 있다. 양친매성 공중합체의 소수성 블록은 소수성 약물 탑재를 위한 구획을 형성하고 확산, 마이셀 해리 또는 폴리머 분해 메커니즘을 통해 약물의 방출을 제어한다. 반면, 친수성 블록은 수성 환경과 소수성 구획사이의 안정화 계면을 형성한다. 나노미터 범위의 양친매성 공중합체 기반 자기조립체는 치료제의 대식세포 매개 클리어런스 및 식세포화를 감소시킬 수 있으며, 이에 따라 증진된 투과 및 유지 (EPR, enhanced permeability and retention) 효과를 통해 질병 부위에 장기 순환 및 축적 현상이 개선될 수 있다. 선형 양친매성 블록 공중합체에 기반한 약물 전달 시스템은 지난 수십 년 동안 활발하게 연구되어 왔다. 그러나, 종래의 양친매성 선형 블록 공중합체에 기반한 약물 전달 시스템은 낮은 약물 로딩과 안정성의 부족 및 생체 내 빠른 초기 약물 방출로 단점을 보여왔다. 한편 비선형 블록 공중합체 범주에서는 단일 접합점에 2개 이상의 고분자 블록이 부착된 Y자형 AB2 믹토암 공중합체 (miktoarm copolymer)가 벌크/용액에서 고유한 상분리 및 자기조립 거동으로 인해 상당한 주목을 받고 있다. 자기 조립에 따른 새로운 나노 구조는 조정 가능한 화학적 구성, 구조 및 사슬 길이로 인해 약물 전달 및 진단 분석을 위한 운반체로서 잠재적인 응용을 가질 수 있다. 이러한 능력은 해당 선형 구조에 비해 상당한 이점을 가지고 있다. Soliman 등은 지체된 허혈성 신경장애에 대하여 수용성이 낮은 약물인 nimodipine의 전달을 위한 소수성 블록으로 polycaproactone(PCL)과 친수성 블록으로 poly(ethylene oxide)(PEO)를 갖는 AB2 믹토암 공중합체의 합성을 보고하였다(Soliman, G. M. et. Al., Chemical Communications 2011, 47 (34), 9572-9587). 유사한 분자량 및 유사한 조성의 선형 대응물에 비해 마이셀은 향상된 안정성, 더 작은 마이셀 크기, 더 높은 약물 로딩 효율성 및 지속적인 방출을 보였다.

[0003] 그러나, 종래의 마이셀의 사용은 여전히 실용적인 적용에서 제한적이다. 자기 조립된 마이셀의 안정성이 떨어지는 것이 주요 원인이다. 고분자 마이셀은 열역학적으로 안정화된 시스템이며, 물 환경에서 유니머와 마이셀 사이의 평형을 나타내어 임계 마이셀 농도(CMC) 아래로 떨어질 때 해리된다. 정맥 투여 후, 기존의 자기 조립 마이셀은 CMC 아래로 떨어질 수 있고 유니머로 해리된다. 게다가, 저밀도 지질단백질 및 고밀도 지질단백질과 같은 혈장 단백질에 유니머의 흡착 또는 혈액 세포와의 상호 작용 또한 유니머와 마이셀 사이의 평형을 방해할 수 있다. 이러한 요인들은 종양 표적에 도달하기 전에 마이셀의 조기 붕괴와 약물의 조기 방출을 초래할 수 있다. 예를 들어, Savic 등은 근육 내 또는 피하 주사 1시간 후 PCL-b-PEO 마이셀 무결성의 손실을 보고했다(Savic, R. et. Al., Langmuir 2006, 22 (8), 3570-3578). 따라서, 최근 연구는 마이셀의 안정성을 높이기 위한 새로운

접근법에 초점을 맞추고 있으며, 가교 접근법은 이러한 목적을 위해 매우 효율적인 것으로 입증되었다. 지금까지 보고된 가교법은 코어-가교, 쉘-가교 및 쉘-코어 계면에서의 가교를 포함한다. 가교결합은 마이셀의 구조적 능력 향상과 함께 약물 방출 속도를 조절할 수 있다. 그러나 고도로 안정화된 마이셀은 치료 효과 감소를 설명하는 표적 질병 부위에 적재물이 방출되는 것을 막을 수 있다. 개선된 약물 방출을 달성하기 위해 표적 부위의 마이셀을 해 가교하기 위해, 디설파이드(disulfide, 이황화물) 결합과 같은 환원성 분해 가능한 연결구조가 종양내의 환원성 자극에 반응하는 자극 전달 시스템을 설계하기 위해 최근에 사용되었다. 종양내의 GSH 수치는 정상 조직보다 4배 더 높은 것으로 보고되었다. 또한, 사이토졸은 세포외 기질(2-20 μM)보다 높은 GSH(2-10 mM) 농도를 가지고 있다. GSH는 환원제 역할을 하는 물질이다.

[0004] 마이셀의 가교를 위한 DTME(Dithiobismaleimidoethane)는 전형적인 말레이미드 말단의 이황화물 가교제로서 Diels-Alder 반응을 통해 공중합체의 반응성 관능기와 결합할 수 있다. Diels-Alder 반응은 원자 보존, 높은 수율, 무촉매, 단순 반응 조건 및 부생성물이 없음 등 다양한 장점을 가진다. 최근 DTME의 Diels-Alder 반응을 이용하여 서로 다른 선형 양친매성 블록 공중합체의 다양한 코어-가교미셀(CCL)이 제조되고 있다. 이러한 CCL은 독소루비신(DOX) 약물을 탑재할 수 있었고, 환원 환경에서 해 가교되어 내부 약물 방출을 성공적으로 제공했으며, 암 세포에 대해 상당한 항암 활성을 보였다.

[0005] 그러나 Diels-Alder 반응에 의해 가교된 믹토암 공중합체 CCL은 지금까지 보고되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1741949호

발명의 내용

해결하려는 과제

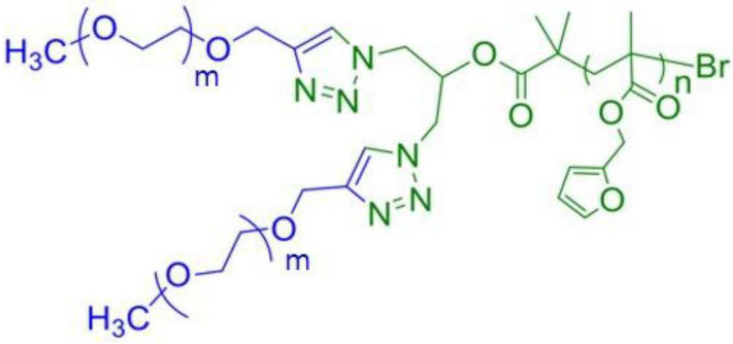
[0007] 이에, 본 발명의 발명자들은 폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) (PFMA)의 소수성 사슬 및 두 개의 친수성 사슬로 구성된 양극성 믹토암(miktoarm) 공중합체를 설계하고, 이를 이용하여 마이셀을 제조함으로써 암세포를 표적으로 하여 약물을 전달할 수 있음 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에 따라, 본 발명은 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암 (miktoarm) 공중합체, 및 상기 믹토암 공중합체를 이용하여 제조한 믹토암 공중합체 가교 마이셀을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암 (miktoarm) 공중합체를 제공한다:

[0010] [화학식 1]

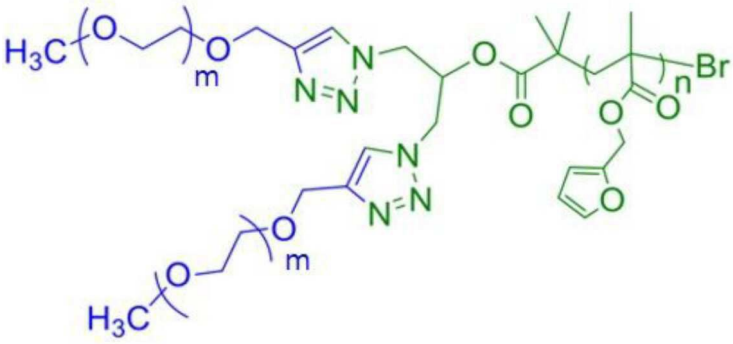
[0011] 

[0012] 상기 화학식 1에서,

[0013] n은 1-10,000이고, m은 1-10,000의 정수이다.

[0014] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 믹토암 공중합체; 및 이황화 결합(disulfide bond) 또는 이셀레나이드 결합(diselenide bond)을 포함하는 가교제;를 포함하고, Diels-Alder 반응에 의해 가교된 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀을 제공한다:

[0015] [화학식 1]

[0016] 

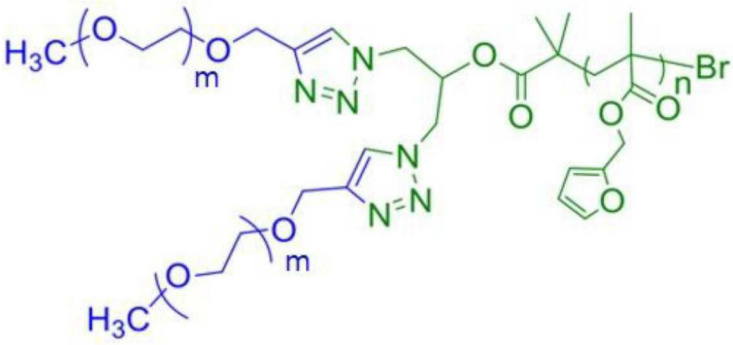
[0017] 상기 화학식 1에서, n은 1-10,000이고, m은 1-10,000의 정수이다.

[0018] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 믹토암 공중합체 가교 마이셀을 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 믹토암 공중합체 가교 마이셀을 포함하는 환원반응 감응형 약물 전달체를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 알킨-기능화된 알킨-기능화된 폴리에틸렌옥사이드와 디아지드-기능화된 폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트)를 클릭 화학을 통해 커플링 반응시켜 제조된 것인, 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암 공중합체의 제조방법을 제공한다:

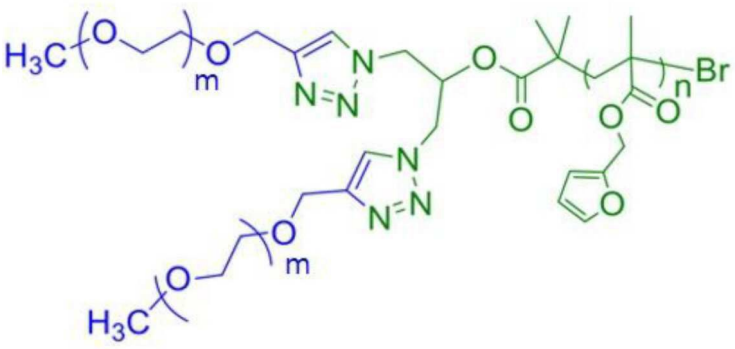
[0021] [화학식 1]

[0022] 

[0023] 상기 화학식 1에서, n은 1-10,000이고, m은 1-10,000의 정수이다.

[0024] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 믹토암 공중합체를 자기조립에 의해 비가교 마이셀을 형성하는 단계; 및 상기 비가교 마이셀과 이황화 결합(disulfide bond) 또는 이셀레나이드 결합(diselenide bond)을 포함하는 가교제를 혼합하여 Diels-Alder 반응에 의해 가교 반응시키는 단계;를 포함하는 믹토암 공중합체 가교 마이셀의 제조방법을 제공한다:

[0025] [화학식 1]



[0026]

[0027] 상기 화학식 1에서, n은 1-10,000이고, m은 1-10,000의 정수이다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 2개의 친수성 PEG 블록과 하나의 친유성 블록이 결합하여 형성된 Y자형 AB2 믹토암(miktoarm) 공중합체를 사용하기 때문에 구형 마이셀 형성이 용이하고 친유성 코어 파트에 대한 약물 탑재효율이 높다. 또한 코어 부분을 환원응답성 화학구조를 포함한 가교제로 가교함으로서 마이셀의 안정성을 높힘과 동시에 암세포내의 높은 환원전위에 의하여 자발적으로 해가교하여 내부 약물을 효과적으로 방출할 수 있는 장점이 있다. 또한 PEG셀의 스텔스 특성은 혈장 농도를 유지하고 종양의 축적을 강화하는 데 도움이 되는 단핵 식세포 시스템에 의한 검출과 후속 클리어런스를 피하는 데 도움이 된다. 이러한 새로운 구조는 인체에 부작용이 최소화된 약물 전달 기법으로 탁월한 암치료 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 믹토암 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 공중합체의 CCL에 의한 환원-반응성 세포내 약물전달을 나타낸 모식도이다.

도 2는 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 및 이의 mikUCL 및 mikCCL의 합성 공정을 나타낸 화학 모식도이다.

도 3은 PEO_{2K}-C≡H (A), 1,3-diazidopropan-2-yl 2-bromo-2-methylpropanoate (B), $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$ (C) 및, $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_n$ (D)의 NMR 스펙트럼; PEO_{2K}-C≡H, $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$), 및 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_n$ (E)의 FTIR 스펙트럼; 및 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_n$ (F)의 GPC 그래프를 나타낸 것이다.

도 4는 D_2O 중의 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ (A), 및 $CDCl_3$ (B)의 ^1H NMR; $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 농도의 함수로서 피렌의 형광 강도 비율 (I_{337}/I_{333}) (C); 및 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$의 mikUCL의 크기 분포 (D) 및 TEM 이미지 (E)를 나타낸 것이다.

도 5는 다른 가교에서 mikCCL의 ^1H NMR 스펙트럼 (A) 및 FTIR 스펙트럼 (B); 10배 DMF로의 희석 및 PBS에서 CMC 이하의 희석 후 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$)의 mikCCL (C) 및 mikUCL (D) 에서의 구조적 변화; 및 10 mM DTT/PBS에서의 인큐베이션 후 DLS (E) 및 TEM (F, G)에 의해 평가된 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$)의 mikCCL에서의 구조적 변화를 나타낸 것이다.

도 6은 (A) mikUCL, mikCCL, DOX, mikUCL/DOX, 및 mikCCL/DOX 의 UV-Vis 흡광 스펙트럼; (B) mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX 의 저장 안정성; 및 (C) *In-vitro* DOX 방출 프로필을 나타낸 것이다.

도 7은 (A) mikUCL 및 mikCCL에 의한 HEK-293 세포의 세포 생존률; DOX, mikUCL/DOX, mikCCL/DOX에 의한 HEK-293 세포 (B), HeLa 세포 (C), 및 HT-29 세포 (D)의 세포 생존률을 나타낸 그래프이다.

도 8은 HeLa 세포 (A) 및 HT-29 세포 (B)에서 6시간 및 12시간에 DOX, mikUCL/DOX, 및 mikCCL/DOX를 처리한 후 형광 이미지를 나타낸 것이다. 스케일바는 20 μm이다.

도 9는 ICG, mikUCL/ICG, 및 mikCCL/ICG 주입 24시간 후 추출된 장기의 (A) 이미지 및 (B) 형광 시그널 합산 이미지를 나타낸 것이다.

도 10은 HT-29 종양 보유 모델에서 식염수, DOX, mikUCL/DOX, 및 mikCCL/DOX의 항종양 활성 분석 결과를 나타

낸 것이다: (A) 추출된 종양 조직의 상대적 부피를 나타낸 그래프, 및 (B) 추출된 종양 조직의 이미지(스케일바는 1 cm이다).

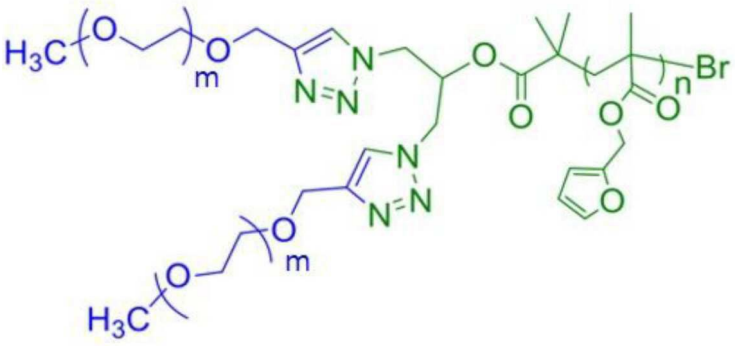
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 않으며 본 발명은 후술할 청구 범위에 의해 정의될 뿐이다.

[0031] 덧붙여, 본 발명에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 본 발명의 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 '포함'한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0033] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 폴리(에틸렌옥사이드)$_2$-b-폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트) 믹토암 (miktoarm) 공중합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다:

[0034] [화학식 1]



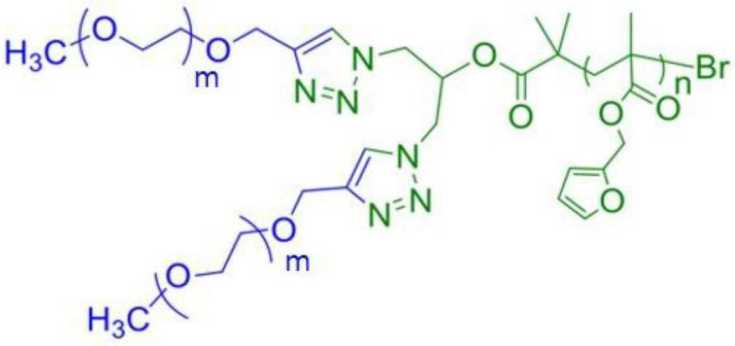
[0035]

[0036] 상기 화학식 1에서, n은 1-10,000이고, m은 1-10,000의 정수이다.

[0037] 상기 믹토암 공중합체는 알킨-기능화된 폴리에틸렌옥사이드와 디아지드-기능화된 폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트)를 클릭 화학을 통해 커플링 반응시켜 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 믹토암 공중합체; 및 이황화 결합(disulfide bond) 또는 이셀레나이드 결합(diselenide bond)을 포함하는 가교제;를 포함하고, Diels-Alder 반응에 의해 가교된 것인, 믹토암 공중합체 가교 마이셀 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0040] [화학식 1]



[0041]

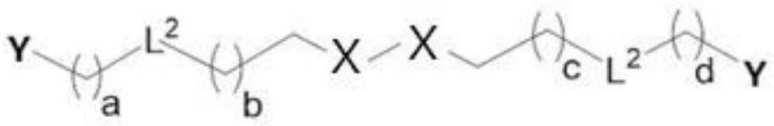
[0042] 상기 화학식 1에서, n은 1-10,000이고, m은 1-10,000의 정수이다.

[0043] 상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 상기 화학식 1로 표시되는 구조를 포함하는 믹토암 공중합체를 자기조립에 의해 비가교 마이셀을 형성하는 단계; 및 상기 비가교 마이셀과 이황화 결합(disulfide bond) 또는 이셀레나이드 결합(diselenide bond)을 포함하는 가교제를 혼합하여 Diels-Alder 반응에 의해 가교 반응시키는 단계;에 의

해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0045] [화학식 2]

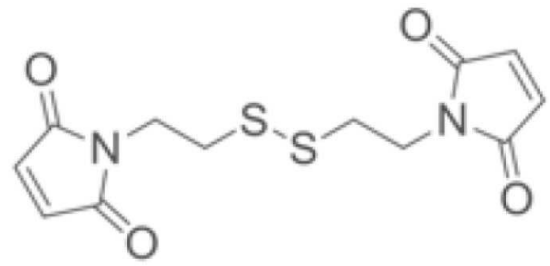


[0046]

[0047] 상기 화학식 2에서, a, b, c 및 d는 각각 0-10의 정수이고, 여기서 0일 경우는 단일결합을 의미하며; L^2는 $-CH_2-$, 에스테르(ester) 또는 아마이드(amide) 결합이고; X는 S 또는 Se이고; Y는 말레이미딜(maleimidyl) 유도체, 테트라지닐(tetrazinyl) 유도체 또는 아지도(azido) 유도체 중 1종의 클릭반응 작용기이다.

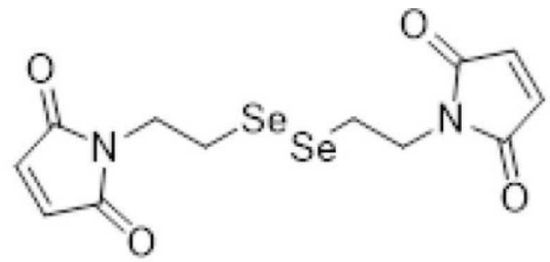
[0048] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물 중 1종일수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0049] [화학식 3]



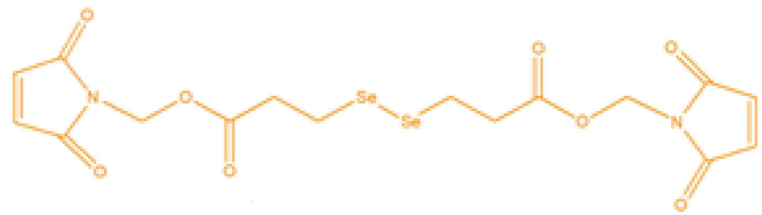
[0050]

[0051] [화학식 4]



[0052]

[0053] [화학식 5]



[0054]

[0055] 상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 친수성 쉘; 및 소수성 코어;로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 소수성 코어에 약물이 담지되어 캡슐화되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 약물은 소수성 약물일 수 있으며, 예를 들어, 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anasterozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트

(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로에타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메슐리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 암세포 표적형 약물방출 특성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 상기 믹토암 공중합체 가교 마이셀은 환원 조건 하에서 약물을 방출할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 믹토암 공중합체 가교 마이셀을 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체에 관한 것이다.

[0060] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 믹토암 공중합체 가교 마이셀을 포함하는 환원반응 감응형 약물 전달체에 관한 것이다.

[0062] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 등을 제시한다. 그러나 하기의 실시예 등은 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 등에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0064] **<실시예>**

[0065] **재료**

[0066] 수소화 나트륨 (NaH), 시스타민 디하이드로클로라이드, 1,3-디클로로-2-프로판올, 프로파르길 브로마이드, 메톡시 폴리(에틸렌 옥사이드)(methoxy-PEO_{2K}), 퍼퓨릴 메타크릴레이트 (FMA), 브롬화 구리 (CuI), 무수 말레인산, 및 피렌은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 아지드화 나트륨 및 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)은 TCI에서 구입하였다. 구리 (Cu) 와이어 및 2-브로모이소부티릴 브로마이드는 Alfa-Aesar에서 구입하였다. 무수 황산마그네슘 ($MgSO_4$), 염화암모늄 (NH_4Cl), 아세트산나트륨, 트리에틸 아민 (Et_3N), 및 수산화칼륨은 Junsei Chemical Co., Ltd에서 구입하였다. 무수 아세트산은 Fluka Chemicals에서 구입하였다. Doxorubicin hydrochloride (DOX.HCl)은 Biosynth Carbosynth (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Tris(2-(dimethylamino)ethyl)amine (Me_6TREN)은 공개된 공정에 따라 합성하였다 (Queffelec, J. et al., Macromolecules 2000, 33 (23), 8629-8639). 1,4-dithiothreitol (DTT)은 roche diagnostics (Germany)에서 구입하였다. WST-8 검정 용액은 DoGenBio (EZ-Cytox, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)은 Thermo Scientific (MA, USA)에서 구입하였다.

[0068] **실시예 1**

[0069] **1,3-디아지도프로판-2-올의 합성**

[0070] 아지드화 나트륨 (6.04 g, 93.06 mmol, 3 eq)을 0℃에서 H_2O (15 mL) 중의 1,3-디클로로-2-프로판올 (4 g, 31.02 mmol, 1 eq)의 교반 용액에 조금씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 천천히 따뜻해지게 하고 5시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 추가 아지드화 나트륨 (4.03 g, 62.04 mmol, 2 eq)을 반응 혼합물에 첨가하고 12시간 동안 80℃에서 가열하였다. 반응 혼합물을 디에틸 에테르 (50 mL X 3)로 추출하였다. 결합된 유기상을 무수 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고 용제를 증발시켜 무색 오일을 수득하였다 (3.52 g, 24.82 mmol, 80%). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ = 3.92 (q, 1H, C*H*-OH), 3.45-3.36 (m, 4H, N_3-CH_2-).

[0072] **1,3-디아지도프로판-2-일 2-브로모-2-메틸프로파노에이트 (DABM, 디아지드-개시제)의 합성**

[0073] THF (30 mL) 중의 2-브로모아이소부티릴 브로마이드 (3.54 g, 15.48 mmol, 1.1 eq) 용액을 0℃에서 THF (30 mL) 중의 1,3-디아지도프로판-2-올 (2 g, 14.07 mmol, 1 eq) 및 Et_3N (1.86 g, 18.29 mmol, 1.3 eq) 용액에 적

가하여 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 탈기 메탄올 (30 mL)을 첨가하여 과량의 산 브로마이드를 담금질하여 형성된 트리에틸암모늄 브로마이드염을 여과하여 제거하였다. 용제를 증발시키고 조 산물을 디클로로메탄 (DCM, 50 mL)에 용해시켰다. 유기층을 포화된 NH_4Cl 용액 (30 mL X 3) 및 증류수 (30 mL X 3)로 세척하였다. 유기층을 무수 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고 농축시켜 연노란색 오일 형태의 DABM을 수득하였다 (3.19 g, 10.97 mmol, 78%).

[0074] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ = 5.08 (q, 1H, C*H*-O-CO-), 3.50-3.59 (m, 4H, N_3-CH_2-), 1.97 (s, 6H, -C(CH_3)$_2$-Br). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ = 170.91, 72.51, 55.04, 50.86, 30.52.

[0076] **$(N_3)_2$-PFMA$_{nk}$ (폴리(퍼퓨릴 메타크릴레이트))의 합성**

[0077] 개시제로서 DABM을 사용하여 FMA (Furfuryl metacrylate)의 single-electron transfer living radical polymerization (SET-LRP)에 의해 $(N_3)_2$-PFMA$_{nk}$ 블록을 제조하였다. 반응물질 [개시제] : [Cu 와이어] : [Me_6TREN] : [FMA]의 몰비는 1:8:0.36:10이었다. 전형적인 중합 과정은 하기와 같다: FMA (0.570 g, 3.43 mmol), DABM (0.1 g, 0.34 mmol), 예비-활성화된 Cu 와이어 (0.174 g, 2.75 mmol), 및 DMF (6 mL)를 10 mL 바이알 내에 위치시켰다. 용액을 N_2로 탈기하고 격막으로 밀봉하였다. DMF 중의 탈기된 Me_6TREN 용액 (56.98 mg/mL, 500 μL)을 용액에 첨가하고 25 ℃에서 18 시간 동안 교반하였다. 공기에 노출시켜 중합을 중단시키고 결과적으로 생성된 혼합물을 용리제로서 DCM을 갖는 알루미나 컬럼에 통과시켜 구리 복합체를 제거하였다. 산물을 농축시키고 냉 헥산으로 침전시키고 진공에서 건조시켜 $(N_3)_2$-PFMA$_n$ 을 수득하였다 (0.6 g, 0.338 mmol, 90%). 산물을 FT-IR, ^{1}H-NMR, 및 GPC로 특성화하였다 (표 1).

[0078] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ = 7. 35 (s, nH, -C*H*-O- of furan ring), 6.31 (s, nH, O-C=C*H*-CH=C of furan ring), 6.27 (s, nH, O-C=CH-C*H*=C of furan ring), 4.84 (s, nH, O-CH_2- of PFMA), 3.35-3.48 (m, 4H, N_3-CH_2-), 1.68-1.81 (m, 2nH, -CH_2- of polymer backbone), 0.63-0.82 (m, 3nH, -CH_3 of polymer backbone). FT-IR (υ / cm^{-1}): 2106 (N=N=N stretching), 1724 (>C=O stretching of PFMA segment), 1673 (C=C stretching of furan ring), 1134 (C-O-C stretching of furan ring), 750 (C-H bending of furan ring)

[0080] **메톡시-PEO$_{2K}$ 알킨의 합성**

[0081] 메톡시-PEO$_{2K}$ (5 g, 2.5 mmol, 1 eq)을 실온에서 80 mL 드라이 THF 중의 NaH (65.95 mg, 2.75 mmol, 1.1 eq, 60 % w/w in mineral oil)의 분산액에 적가하여 첨가하였다. 가스 발생이 멈춘 후, 프로파르길 브로마이드 (0.28 mL, 2.75 mmol, 1.1 eq, 80 % in toluene)를 첨가하고 20시간 동안 교반하였다. 그런 다음 용제를 증발시키고 조 산물을 에틸 아세테이트 (150 mL)에 용해시킨 후 실리카겔 컬럼에 통과시켰다. 용제를 제거하고 잔여물을 진공 하에서 건조시켜 산물을 수득하였다 (3.67g, 1.8 mmol, 72 %).

[0082] ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 4.19 (d, 2H, O-CH_2-C≡CH), 3.62 (br, m, n-CH_2CH_2O-), 3.36 (s, 3H, -OCH_3), 2.42 (t, 1H, O-CH_2-C≡C*H*). FT-IR (υ / cm^{-1}): 3245 (≡C-H stretching), 2115 (-C≡C- stretching), 1097 (C-O-C stretching of PEG backbone). $M_{n,SEC}$ = 2010 g.mol^{-1}; $Đ$ = 1.09

[0084] **구리-촉매화 아지드-알킨 클릭 커플링에 의한 (PEO$_{2K}$)$_2$-*b*-PFMA$_{nk}$의 합성**

[0085] 메톡시-PEG$_{2K}$ 알킨 (0.84 g, 0.414 mmol, 2.1 eq), $(N_3)_2$-PFMA$_{nk}$ (0.197 mmol, 1 eq), 및 CuI (7.5 mg, 0.039 mmol, 0.2 eq)을 드라이 THF (20 mL)에 용해시키고 N_2를 제거하였다. 드라이 THF (2 mL) 중의 DBU (0.6 g,

3.94 mmol, 20 eq)를 N_2로 제거하고 용액에 첨가하였다. N_2 대기 하 50℃에서 72시간 동안 반응을 실시하였다. 결과적으로 생성된 산물을 원심분리하고 상청액을 증발시켰다. 농축물을 메탄올에 재용해시키고 중성 알루미나 컬럼에 통과시켜 구리를 제거하였다. 용리제를 농축시키고 양질(good) 용제로서 DCM 및 뒤이어 저급 용제로서 냉 디에틸에테르와 헥산을 사용하여 조 산물을 재-침전시켜 정제하였다. 여과하여 산물을 수집하고 진공 하에서 건조한 후 FT-IR, ^{1}H-NMR, 및 GPC(SEC) 분석으로 특성화하였다 (표 1).

[0086] ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.69 (s, 2H, >C=C*H*-N< of triazol ring), 7.35 (s, nH, -C*H*-O- of furan ring), 6.31 (s, nH, O-C=C*H*-CH=C of furan ring), 6.28 (s, nH, O-C=CH-C*H*=C of furan ring), 4.84 (s, nH, -O-CH_2- of PFMA), 3.58 (br, m, n-CH_2CH_2O-), 3.32 (s, 6H, 2-OCH_3), 1.68-1.84 (m, 2nH, -CH_2- of polymer backbone), 0.64-0.81 (m, 3nH, -CH_3 of polymer backbone). FT-IR (υ / cm^{-1}): 1730 (>C=O stretching of PFMA segment), 1635 (C=C stretching of furan ring), 1142 (C-O-C stretching of furan ring), 1105 (C-O-C stretching of PEG backbone), 752 (C-H bending of furan ring).

[0088] **이황화물 가교제 DTME (Dithiobismaleimidoethane)의 합성**

[0089] DTME는 이전 논문에 공개된 공정에 따라 합성하였다 (Dispinar, T. et al., Macromolecular bioscience 2012, 12 (3), 383-394).

[0090] ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 7.03 (s, 4H, 2-C*H*=C*H*-), 3.68 (t, 4H, N-CH_2-CH_2), 및 2.89 (t, 4H, -CH_2-CH_2-S).

[0092] **실시예 2.**

[0093] **마이셀 형성 및 임계 마이셀 농도 (CMC)**

[0094] mikUCL을 용매 치환법으로 제조하였다. 우선, 8.0 mL의 탈이온수를 25℃에서 중간 정도로 교반하면서 적하하여 (0.5 mL/min) 아세토니트릴 (20 mg/mL) 중의500 μL의 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 용액에 첨가하였다. 결과적으로 생성된 mikUCL 분산액을 탈이온수 (1 L)에 대하여 24시간 동안 광범위하게 투석하여 (MWCO = 3500 Da) 아세토니트릴을 제거하고 비가교 마이셀(mikUCL)을 수득하였다.

[0095] 수성 용액 중의 mikUCL의 CMC를 실온에서 프로브로서 피렌을 사용하여 평가하였다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$의 농도는 탈이온수 중 1.0 X 10^{-4} 내지 1.0 mg/mL로 다양하였으며, 최종 피렌 농도는 각 샘플에서 6.0 X 10^{-7} M로 고정하였다. 여기 스펙트럼을 5 nm 슬릿 너비를 사용하여 394 nm의 방출 파장에서 280-300 nm로부터 기록하였다. I_{337} 내지 I_{333}의 여기 강도 비율은 공중합체 농도의 로그에 대하여 플롯팅하였다.

[0097] **마이셀의 가교, 안정성, 및 환원응답성 분해**

[0098] $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$의 이황화물 mikCCL을 제조하기 위해, 25℃에서 온건하게 교반하면서 8.0 mL의 탈이온수 (0.5 mL/min)를 적가하여 DTME (10-30 mol% of FMA moieties)를 함유하는 아세토니트릴 (20 mg/mL) 중의 500 μL의 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 용액에 첨가하였다. 60℃에서 12시간 동안 결과적으로 생성된 mikUCL를 가열하여 가교 반응을 진행하였다. 가교마이셀 (mikCCL) 분산액을 24시간 동안 탈이온수 (1L)에 대하여 광범위하게 투석하여 (MWCO = 3500 Da) 정제하고 아세토니트릴을 제거하였다. mikCCL를 동결건조하고 $CDCl_3$에서 FTIR 분석 및 NMR 분석을 사용하여 가교를 확인하였다.

[0099] $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 mikUCL 및 mikCCL의 안정성을 희석 검정을 사용하여 확인하였다. 우선, mikUCL 및 mikCCL (1 mg/mL)의 수성 용액을 10-배 DMF 및 1000-배 PBS (CMC 이하)로 희석하고 25℃에서 4시간 동안 교반하였다. 크기의 변화를 DLS를 사용하여 분석하였다.

[0100] 환원제 DTT에 반응하는 mikCCL의 구조적 변화를 DLS로 분석하였다. mikCCL 용액 (0.5 mg/mL)을 N_2로 15분간 탈기하고 DTT를 용액에 첨가하여 10 mM의 최종 DTT 농도를 얻었다. 용액을 밀봉하고 37℃ 및 200 rpm에서 인큐베이션하였다. 24시간 후 마이셀의 크기 변화를 DLS로 평가하였다.

[0101]

[0102] **약물 담지 및 환원응답성 방출**

[0103] DOX를 나노-침전 방법으로 mikUCL 및 mikCCL에 담지하였다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ (10 mg) 및 DTME (30 mol% of FMA moieties)를 10 mL 바이알에서 DMF (250 μL)에 용해시켰다. 그런 다음, DOX.HCl (1 mg) 및 등몰 농도의 TEA를 용액에 첨가하고 30분간 교반하였다. PBS 버퍼 (10 mL)를 적당히 교반하면서 적가하여 (1 mL/min) 용액에 첨가하고 12시간 동안 교반을 지속하여 자기조립 및 소수성 DOX의 코어 내 캡슐화가 되도록 하였다. DOX-담지된 mikUCL (mikUCL/DOX)를 60℃에서 12시간 동안 가열하여 가교 반응을 진행하였다. mikCCL/DOX 분산액을 원심분리하고 (2000 rpm, 10 min), 24시간 동안 탈이온수 (1 L X 3)에 대해 광범위하게 투석하여 (MWCO = 3500 Da) 정제하고 DMF 및 캡슐화되지 않은 DOX를 제거하였다. DOX-담지 mikUCL (mikUCL/DOX) 또한 DTME의 첨가 없이 유사한 공정으로 제조하였다. mikCCL/DOX 및 mikUCL/DOX의 담지 효율 (LE) 및 담지 함량 (LC)을 UV/가시광선 분광기로 측정하였다. 탈이온수 중의 DOX (R^2 = 0.9985)의 검정 곡선을 485 nm에서 결정하였다. mikCCL/DOX 및 mikUCL/DOX의 수성 분산의 흡광 스펙트럼을 습득하여 미리-결정된 검정 곡선에 기반하여 DOX 농도를 평가하였다.

[0104] mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 *In vitro* DOX 방출 거동을 투석 방법으로 평가하였다. mikUCL/DOX를 PBS (0.01 M, pH 7.4) 및 아세테이트 버퍼 (0.01 M, pH 5.0) 내에서 조사하고, mikCCL/DOX를 10 mM DTT 유무 조건 하에서 PBS (0.01 M, pH 7.4) 및 아세테이트 버퍼 (0.01 M, pH 5.0) 내에서 조사하였다. 우선, 3 mL의 DOX-담지 마이셀 용액 (1 mg/mL)을 투석 백 (MWCO = 3500 Da)으로 옮겼다. 상응하는 버퍼 용액 (20 mL)에 투석 백을 넣고 온욕조 (37℃)에서 70 rpm으로 진탕하여 DOX 방출을 개시하였다. 방출된 배지 (1.0 mL)를 회수하고 동일 부피의 새로운 배지를 보충하였다. mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX로부터 방출된 DOX의 양은 동일 배지에서 검정 곡선에 근거하여 485 nm에서의 흡광도로부터 계산하였다.

[0106] **세포내 약물 방출 및 *in vitro* 세포 생존도**

[0107] 인간 배아 신장 정상세포주 (HEK-293), 인간 자궁암세포주 (HeLa), 및 인간 결장 선암 세포주 (HT-29) 각각의 배지를 포함하는 배양 접시에 성장시켰다 (HEK-293: DMEM + 1% antibiotic-antimycotic + 10% FBS; HeLa 및 HT-29: RPMI + 1% antibiotic-antimycotic + 10% FBS). 모든 세포는 37℃, 5% CO_2에서 유지하였다.

[0108] HeLa (30,000 cells/well) 및 HT-29 (1,00,000 cells/well) 암세포를 공초점 배양 접시에 접조한 후 배양 배지에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. DOX, mikUCL/DOX, 및 mikCCL/DOX (10 μg/mL DOX 농도)를 각 웰에 첨가하고, 6시간 및 12시간 후에 HeLa 세포를 PBS로 3회 세척하고 4% 파라포름알데하이드 용액으로 고정하였다. 처리된 HeLa 세포의 핵을 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 용액으로 염색하고 20분간 인큐베이션한 후, 400X 배율 및 20 μm 스캐일로 형광 현미경을 사용해 세포의 형태를 관찰하였다 (Axio-Observer 5, Carl Zeiss, Oberkonchen, Germany).

[0109] HeLa, HT-29, 및 HEK-293 세포를 48-웰 플레이트에 24시간 동안 접종하였다 (50,000 cells/well). 인큐베이션 후 배양 배지를 제거하고, 세포를 다른 농도의 mikUCL 및 mikCCL (0-1000 μg/mL), mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX (0-10 μg/mL DOX 농도), 및 DOX (0-10 μg/mL)로 처리하였다. 24시간 후, WST-8 용액을 각 웰에 첨가하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 오렌지색 형성 흡광도를 450 nm에서 마이크로플레이트 리더를 사용하여 기록하였다.

[0111] ***In vivo* 생물학적 분배**

[0112] Athymic 누드 마우스 (female, aged 4-6 weeks, weight: 18-20 g)를 실험 동물 공급처 (KOATECH, Gyeonggi-do, KOREA)로부터 구입하였다. 1 X 10^7 cells의 독자 생존 가능한 HT-29 세포를 모든 마우스의 측면에 피하 접종하

였다. 종양 부피가 약 100 mm^3이 된 후에, 마우스에게 indocyanine green (ICG), mikUCL/ICG, 및 mikCCL/ICG (ICG: 3.5 mg/kg, 200 μL)를 정맥내 주입하였다. 24시간 후에 마우스를 희생시켜 심장, 폐, 간, 비장, 종양 및 신장을 수집하고 FOBI *in vivo* 이미징 시스템 (CELLGENTEK, Daejeon, KOREA)을 사용하여 즉시 스캔하였다.

[0114] ***In vivo* 항종양 효율**

[0115] HT-29 종양 발생 마우스를 하기 4개 그룹을 나누었다 (n= 4 mice/group): (a) 식염수 (대조), (b) DOX (5 $mg.kg^{-1}$), (c) mikUCL/DOX (DOX 5 $mg.kg^{-1}$), 및 (d) mikCCL/DOX (DOX 5 $mg.kg^{-1}$). 샘플을 3일마다 꼬리 정맥에 주입하였다. 종양 크기를 caliper 를 사용하여 3일마다 계산하였다 (Volume = 0.5 X L X W^2, 여기에서 L 및 W은 종양의 길이 및 너비임). 상대 종양 부피는 V/V_0 X 100 (여기에서, V = 각 시간의 종양 부피, 및 V_0 = 주입이 시작되었을 때의 종양의 부피)에 따라 계산하였다. 체중은 전체 투여 기간 동안 동일한 주입 시점에서 매 3일마다 측정하였다. 마지막으로, 마우스를 안락사시키고 종양 무게를 측정하였다.

[0117] **측정**

[0118] UV 흡광 스펙트럼을 UV/Vis-spectrophotometer (Optizen-POP, Daejeon, South Korea)로 측정하였다. NMR 스펙트럼을 NMR spectrometer (JNM-ECP, JEOL, 400 MHz, Akishima, Japan)로 기록하였다. 블록 공중합체의 분자량을 25℃에서 용리제 (폴리스티렌 표준에 의해 분자량 계산됨)로서 THF를 사용하여 PL 겔 컬럼 (10^2-10^4 Å; 5 μm)을 갖는 겔 SEC (Agilent Technologies, USA)로 평가하였다. 크기 분포 및 유체역학적 크기를 He-Ne laser (633 nm) 및 광학 측정 조절을 위한 90° 에서의 ELS 콘트롤러가 장착된 Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern, UK)을 사용하여 dynamic light scattering (DLS)으로 평가하였다. TEM 샘플을 Hitachi JED-2300 시스템 (Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다.

[0120] **통계분석**

[0121] 모든 데이터는 평균 ± 표준 편차 (SD)로 나타냈다. 추가적으로, GraphPad Prism software를 데이터 분석 및 통계학적 유의성 테스트에 사용하였다 (P^* ≤ 0.05, P^{**} ≤0.01, 및 P^{***} ≤0.001).

[0123] **실시예 3**

[0124] **A_2B 타입 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 믹토암 블록 공중합체의 합성**

[0125] A_2B 타입 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 믹토암 블록 공중합체를 도 2에 도시된 바와 같이 클릭 화학을 통한 일반적인 커플링 공정으로 제조하였다. 우선 클릭 화학에 의해 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$을 얻기 위해 PEO_{2K}-C≡H 및 $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$를 합성하였다. NaH의 존재 하에서 프로파길 브로마이드와 반응시켜 알킨기를 메톡시-PEO_{2K}에 부착하였다. δ 4.19 ppm 및 δ 2.42 ppm에서의 특징적인 ^{1}H NMR 시그널은 각각 메틸렌 양자 및 말단 알킨 양자에 의한 것이고, δ 3.62 ppm 및 δ 3.36 ppm에서의 PEO의 시그널은 각각 n-CH_2CH_2O- 골격 및 말단 메톡시 양자에 의한 것으로, 이는 PEO_{2K}-C의 합성을 확인해 주었다 (도 3A). 또한, 산물의 FTIR 스펙트럼에서 ≡C-H 및 -C≡C- 결합의 특징적인 스트레칭 밴드가 3245 cm^{-1} 및 2115 cm^{-1}에서 관찰되었다.

[0126] 디아지드-개시제인 DABM를 1,3-디클로로-2-프로판올에서 디클로라이드의 친핵성 치환으로 1,3-디아지도프로판-2-올을 형성한 후 1,3-디아지도프로판-2-올을 2-브로모이소부티릴 브로마이드로 아실화하여 합성하였다. δ 5.08 ppm, δ 3.50-3.59 ppm, 및 δ 1.97 ppm에서의 특징적인 ^{1}H NMR 시그널은 각각 에테르기 주위의 메틴 양자, 아지드기 주위의 메틸렌 양자 및 말단 메틸 양자에 의한 것으로, 이는 DABM가 합성되었음을 보이는 것이다 (도 3B).

[0127] SET-LRP은 중합 후 말단기 변형 또는 마크로개시제 (macroinitiator) 사용에 의해 말단기 기능성을 도입할 수

있다. 그러나, 전자의 방법은 중합을 조절하여 최소화할 수는 있지만 죽은 사슬-말단의 존재 때문에 불완전한 기능화가 일어날 수 있다. 따라서, 미리 기능화된 디아지드-개시제 DABM은 FMA의 SET-LRP에 사용하여 본 발명의 $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$ 블록을 제조하였다. SET-LRP은 실온에서 DMF 내에서 촉매시스템으로 cu wire/Me_6TREN의 존재하에 실행하였다 (도 2). 각각 9, 12, 15의 중합 정도 (DP)를 갖는 M_n ~1780, 2280, 및 2780 g mol^{-1}의 3개 $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$ 블록을 표1에 도시된 바와 같이 합성하였다. 아지드기의 존재를 FTIR에서 2106 cm^{-1}에서의 특징적인 시그널로 확인하였다 (도 3E). 또한, PFMA 분절과 관련된 시그널 또한 각각 PFMA 분절의 >C=O 스트레칭 및 푸란 고리의 C=C 스트레칭, C-O-C 스트레칭, 및 C-H 벤딩에 의해 1724, 1673, 1134, 및 750 cm^{-1}에서 관찰되었다. PFMA 성분의 ^{1}H NMR 시그널은 δ 7.35 ppm (-C*H*-O- of furan ring), δ 6.31 ppm (O-C=C*H*-CH=C of furan ring), δ 6.27 ppm (O-C=CH-C*H*=C of furan ring), 및 δ 4.84 ppm (O-CH_2- of PFMA)에서 나타나고, 아지드기 (N_3-CH_2-) 주위의 메틸렌 양자의 ^{1}H NMR 시그널 (multiplet)은 δ 3.35-3.48 ppm에서 나타났으며, 이는 $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$ 블록의 합성을 확인하는 것이다(도 3C). $M_{n,NMR}$ 수치를 하기 식 (1)에 따라 δ 3.35-3.48 ppm에서 아지드기 (N_3-CH_2-) 주위의 메틸렌 양자의 인테그랄 (I_a)과 δ 7.35 ppm (-C*H*-O- of furan ring)에서 PFMA 성분의 인테그랄 (I_a)을 비교하여 계산하였다:

[0128] $$M_{n,NMR}\ ((N_3)_2\text{-}PFMA_{nk}) = M_{FMA} \times (4I_b/I_a) + M_{initiator} \quad (1)$$

[0129] 위 식에서, M_{FMA} 및 $M_{initiator}$는 각각FMA 및 DABM의 몰질량이다. $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$ 블록의 $M_{n,NMR}$ 수치가 THF에서 SEC 분석에 의해 추정된 $M_{n,SEC}$ 와 상당히 일치하므로 주목할만하다.

[0130] 그런 다음, PEO_{2K}-C≡H 및 $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$ 사이의 THF에서 클릭 반응을 질소 대기 하 50℃에서 CuI/DBU 'CuAAC' 클릭 화학을 통해 촉매 시스템으로 CuI/DBU을 사용하여 실시하였다. 약간 과량의 PEO_{2K}-C≡H (2.1 eq.)를 사용하여 완전한 커플링 반응이 일어나도록 하였다. FTIR에서 2106 cm^{-1}에서의 디아지드기에 의해 강한 특징적인 시그널이 소실되었으며, 이는 반응이 완전히 일어났음을 확인해준다. 반응 혼합물을 원심분리하여 고형 부산물을 제거하고 중성 알루미나 컬럼 후 디에틸에테르에서의 침전을 통해 정제하여 백색 고형물을 수득하였다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$의 특성을 FTIR, NMR, 및 SEC 분석으로 분석하였다 (표 1).

표 1

PEO_{2K}–C≡CH[a] and $(N_3)_2$-$PFMA_n$[b]						$(PEO_{2K})_2$-$PFMA_n$[c]			
Sample	$M_{n,th}$[d] (100% conv.)	$M_{n,NMR}$[e] (g.mol^{-1})	DP $_{NMR}$[e]	$M_{n,SEC}$[f] (g.mol^{-1})	Đ[g]	Sample	$M_{n,NMR}$[e] (g.mol^{-1})	$M_{n,SEC}$[f] (g.mol^{-1})	Đ[g]
PEO_{2K}-alkyne	2038	2038	-	2010	1.09	-	-	-	-
$(N_3)_2$-$PFMA_{1.5K}$	1946	1780	9	1700	1.22	$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{1.5K}$	5860	5730	1.21
$(N_3)_2$-$PFMA_{2K}$	2778	2280	12	2220	1.27	$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2K}$	6360	6210	1.25
$(N_3)_2$-$PFMA_{2.5K}$	3278	2780	15	2710	1.25	$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5K}$	6860	6730	1.23

[a]Synthesized by reacting methoxy-PEO_{2K} with propargyl bromide in the presence of NaH.
[b]Synthesized by SET-LRP of FMA using novel diazido-macroinitiator in the presence of Cu wire/Me_6TREN as a catalytic system in DMF at RT.
[c]Synthesized using click chemistry with CuI/DBU as catalytic system in THF at 50 °C N_2 atmosphere.
[d]$M_{n,th} = [([M]/[I] \times M_{FMA} \times \text{conversion})/100] + M_{initiator}$.
[e]Determined using ^{1}H NMR peak intensity ratio. $M_{n,NMR}\ ((N_3)_2\text{-}PFMA_{nk}) = M_{FMA} \times (4I_b/I_a) + M_{initiator}$.
[f]Determined using SEC with THF eluent, calibrated against polystyrene standards.
[g]Đ = dispersity.

[0131]

[0132] 도 3E에 도시된 바와 같이, 2106 cm^{-1}에서 $(N_3)_2$-$PFMA_{2.5K}$의 FTIP 스펙트럼에서의 아지드기에 의한 특징적인 시그

널은 완전히 사라졌으며, 이는 $(PEO_{2K})_2$-$PFMA_{2.5K}$ 믹토암 블록 공중합체에서 반응하지 않은 아지드기의 부재를 시사하는 것이다. PFMA 분절과 관련된 시그널 또한 PFMA 분절의 >C=O 스트레칭 및 푸란 고리의 C=C 스트레칭, C-O-C 스트레칭, 및 C-H 벤딩에 의해 각각 1730, 1635, 1142, 및 753 cm^{-1}에서 약간 시프트됨이 관찰되었다. 또한, PEG 분절과 관련된 시그널 또한 PEG 골격의 C-O-C 스트레칭에 의해 1097 cm^{-1}에서 약간 시프트되어 존재하였다.

[0133] 커플링 반응을 통한 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nK}$의 합성을 ^1H NMR 분광분석으로 추가 확인하였다. ^1H NMR 스펙트럼은 δ 7.35 ppm (-C*H*-O- of furan rings), δ 6.31 ppm (O-C=C*H*-CH=C of furan rings), δ 6.27 ppm (O-C=CH-C*H*=C of furan rings), 및 δ 4.84 ppm (O-CH_2- of PFMA)에서 PFMA 성분의 시그널 및 δ 3.58 ppm (n-CH_2CH_2O-) 및 δ 3.32 ppm (-OCH_3)에서의 PEO 성분의 시그널, 및 δ 7.69 ppm (메틴 양자)에서 티아졸 고리의 시그널을 보였다 (도 3D). $(PEO_{2K})_2$-$PFMA_{nK}$의 $M_{n,NMR}$ 수치는 THF에서의 SEC 분석에서 추정된 $M_{n,SEC}$ 수치와 잘 일치하였다 (표 1). 따라서, $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nK}$의 믹토암 블록 공중합체의 합성은 클릭 화학을 통한 커플링에 의해 성공적으로 이루어진 것으로 확인되었다.

[0134] SEC 피크는 PEO_{2K}-C≡H로부터 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nK}$까지 더 높은 분자량으로의 시프트를 명확히 보였으며, 이는 클릭 커플링 반응과 일치하는 것이다 (도 3F). 낮은 분산도를 갖는 단정 피크가 모든 경우에서 관찰되었다 ($1.09 \leq Đ \leq 1.25$). 이는 각 단독중합체가 존재하지 않음을 확인하는 것이다. 최종 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nK}$ 모두 및 이들의 각 $(N_3)_2$-$PFMA_{nk}$ 블록의 분자량 사이의 차이가 약 4000 $g.mol^{-1}$임을 주목하였다. 이러한 수치들은 시작 PEO_{2K}-C≡H의 분자량의 거의 2배에 해당하였다.

[0136] **$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$의 마이셀화**

[0137] $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$의 마이셀화를 용매 치환법으로 실시하였다. 우선 공중합체를 PEO 및 PFMA 블록 둘 다에 적합한 용제인 아세토니트릴에 용해시켰다. 그런 다음 온건하게 교반하면서 탈이온수를 첨가하여 mikUCL를 형성하고 투석을 통해 아세토니트릴을 제거하였다. 수득된 mikUCL은 2개의 도메인을 포함한다: 내부 코어에 형성된 소수성 PFMA 블록 및 표면 코로나에 형성된 친수성 PEO 블록. mikUCL의 형성은 D_2O에서 ^1H NMR 스펙트럼으로 확인하였다 (도 4A). $CDCl_3$에서 존재하는 PFMA와 연관된 모든 양자 시그널 (도 4B)이 D_2O에서 사라졌으며, mPEO와 관련된 모든 양자 시그널은 δ 3.62-3.81 ppm (n-CH_2CH_2O-) 및 δ 3.39 ppm (-OCH_3)에서 남아있었다. 이는 마이셀 코어에 형성된 PFMA 블록이 ^1H NMR에 의해 검출되지 않음을 시사하는 것이다. 그러나, 외부 코로나에 형성되고 용매화된 상태로 남아있는 mPEO 블록은 ^1H NMR 스펙트럼에서 나타났다.

[0138] 형광 프로부로서 폴리사이클릭 방향족 탄화수소인 피렌을 사용하여 형광분석법으로 마이셀의 형성을 확인하였다. 도 4C는 다양한 농도의 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 394 nm의 방출 파장에서 기록된 피렌의 여기 스펙트럼을 나타낸 것이다. 피렌의 방출 강도는 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 농도 증가에 따라 강해졌으므로, 마이셀의 형성을 입증하였으며 CMC 확인에서 충분한 감수성을 제공하는 피렌의 적용성을 보였다. 피렌은 $(PEO_{2K})_2$*b*-$PFMA_{2.5k}$ 농도 증가에 따라 친수성에서 소수성 환경으로 전이되어 형광 강도에서 레드 시프트를 보였다. 도 4C는 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$ 농도의 로그로서 피렌의 여기 강도 비율 (I_{337}/I_{333})의 플롯에 대한 S자 곡선을 나타냈다. I_{337}/I_{333}의 비율은 저농도의 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$에도 거의 변화가 없었으며, 이는 상대적인 극성의 수성 환경에서 피렌의 국소화를 나타내는 것이다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 농도가 증가함에 따라, I_{337}/I_{333} 비율은 실질적으로 증가하였으며, 이는 피렌이 소수성 코어로 통합됨을 나타내는 것이다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 공중합체 모두의 CMC를 기울기에서 급격한 변화의 크로스오버점으로부터 확인하였으며, 그 결과를 표 2에 나타냈다. CMC 수치는 공중합체 샘플에 따라 달라졌으며 소수성 분절에 대한 의존성을 보였다. 예상한 바와 같이, CMC 수치는 PFMA 분절의 증가에 따라 감소하였다 ($0.0049>0.0034>0.0029$ $mg.mL^{-1}$). $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$의 수득된 CMC 수치는 이전에 공개된 선형 PEO-*b*-

PFMA 블록 공중합체의 CMC 수치보다 낮았다. 더 낮은 CMC 수치는 mikUCM가 더 낮은 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 농도에서 형성될 수 있음을 나타내는 것이다. mikCCL은 공유 S-S 결합을 통한 mikCCL의 안정화에 의해 CMC보다 낮은 공중합체 농도에서도 더 적합할 수 있어, 인장, 압축력 및 전단응력과 같은 외부 기계력을 견디는데 도움이 될 수 있으므로 혈류에서의 치료제의 이른 방출을 방지할 수 있다.

표 2

	mikUCL			mikCCL	
Copolymer	CMC[a] (mg.mL^{-1})	D_h[b](nm)	PDI[c]	D_h[b] (nm)	PDI[c]
$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{1.5K}$	0.0049	25±6	0.198	22±6	0.240
$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2K}$	0.0034	30±8	0.197	24±9	0.213
$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5K}$	0.0029	33±10	0.187	26±9	0.196

[a] Critical micelle concentration (CMC) of copolymers in water.
[b] Hydrodynamic diameter (D_h, nm) of mikUCL and mikCCL.
[c] Polydispersity index (PDI) of mikUCL and mikCCL.

[0139]

[0140] 크기는 마이셀 내부의 약력학 및 약물동력학 특성을 조절하는 결정요인이다. 최적 크기 (10 - 200 nm)를 갖는 마이셀은 EPR 효과를 통해 누출 암 조직에서 축적되는 경향이 있다. 그러나, 너무 크거나 (서브미크론 크기) 너무 작은 (< 5 nm) 마이셀은 정맥내로 체내에 투여되어도 단핵성 포식세포 시스템 및 요배설을 통해 신속하게 제거된다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{1.5k}$, $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2k}$, 및 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$로부터 수득된 mikUCL의 DLS은 각각 25, 30, 및 33 nm로 소수성 PFMA 함량에 따라 크기가 증가함을 나타냈다 (도 4D). 선형 및 믹토암 공중합체의 마이셀에 대한 다른 보고서에서도 유사한 발견이 있었다 (Soliman, G. M. et al., *Biomaterials* 2010, *31* (32), 8382-8392) (McRae Page, S. et al., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2010, *21* (2), 567-574). $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 mikUCL의 TEM 이미지는 구형 형태 (29±8 nm)를 보였으며 (도 4E) 격자 상에서 깔끔하게 분산되었다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 mikUCL의 TEM 이미지는 DLS 결과를 뒷받침하였다. 또한, TEM 측정으로 확인된 약간 감소된 크기는 mikUCL의 탈수 및 샘플 제조 동안 PEO 코로나의 위축 때문일 것이다.

[0142] **마이셀의 가교, 안정성, 및 환원응답성 분해**

[0143] 앞서 논의된 바와 같이, mikUCL의 가교는 혈류에서 높은 희석 하에서 안정성을 증가시킬 수 있다. mikUCL은 이황화물 브릿지, 즉 DTME와의 연결된 말단 말레이미드-함유 가교제의 도움으로 PFMA 코어 분절의 푸란 성분과의 Diels-Alder 반응을 통해 가교되었다. 간략하게, 마이셀화 과정 동안 온건하게 교반하면서 DTME (10, 20, 및 30 mol% of PFMA moiety)를 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$와 첨가하면 이의 소수성 성질 때문에 마이셀의 코어 내부에 축적된다. Diels-Alder 반응은 추가 시약을 필요로 하지 않으며 열탕으로 가열하는 것으로 개시될 수 있다. 코어 내부에 DTME를 함유하는 상기 마이셀 용액을 12시간 동안 60℃로 가열하여, 소수성 PFMA 코어 분절이 DTME의 말단 말레이미드기 (dienophile) 및 PFMA의 푸란 고리 (conjugated diene) 사이의 고리모양 전자반응에 의해 닫히게 되어, 치환된 사이클로헥센의 형성을 야기한다. 코어-가교가 되었는지를 확인하기 위해, 동결건조된 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 mikCCL를 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 블록 모두에 적합한 용제인 $CDCl_3$에 현탁하고, ^{1}H NMR 스펙트럼을 기록하였다 (도 5A). 10 mol% 및 20 mol% DTME가 사용되었을 때 mikCCL에서 PFMA와 관련된 모든 양자 시그널의 감소된 강도가 관찰되었으며, 이는 코어에서 가교된 PFMA 분절의 감소된 이동성 때문일 것이다. 30 mol% DTME가 사용되었을 때 mikCCL 코어에서 PFMA와 관련된 모든 양자 시그널이 거의 사라졌으며, 이는 코어에서 가교된 PFMA 분절의 이동성 부족때문일 수 있으며, 유기 용제에서도 완전한 마이셀 구조를 나타내는 것이다. 그러나, mPEO와 관련된 시그널은 여전히 δ 3.38-3.79 ppm (n-CH_2CH_2O-) 및 δ 3.31 ppm (-OCH_3)에서 유지되었다. FTIR 분석 또한 이러한 결과를 뒷받침하며 (도 3B), 가교의 증가에 따라, C-H 벤딩이 감소되므로 PFMA의 푸란 고리와 관련된 시그널이 753 cm^{-1}에서 관찰되었다. 1702 cm^{-1}에서의 새로운 시그널이 가교에서 관찰되었으며, 이는 DTME의 말레이미드 고리의 -C=O 스트레칭, 및 가교에 따라 증가된 강도로 추론된다. 그러나, C=C 스트레칭

에 의한 1635 cm^{-1}에서의 시그널은 모든 경우에서 거의 사라졌다. 따라서, 30 mol% DTME로 가교된 mikCCL를 추가 연구에 사용하였다.

[0144] 가교 후 모든 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 마이셀의 크기 변화를 DLS 분석으로 확인하였다. 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{1.5k}$, $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2k}$, 및 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 mikCCL의 D_h 는 각각 21, 24, 및 26 nm이었다. mikUCL 및 mikCCL 사이의 명백한 D_h 차이는 마이셀의 PFMA 코어 분절의 가교에 의한 것일 수 있으며, 친수성 및 소수성 부분 사이의 접촉면에서 위축이 발생하여, 더 작은 마이셀 구조를 야기한다. 단분산된 mikCCL은 모든 경우에서 관찰되었으며, 이는 가교 과정 동안 mikCCL의 응집의 원인인 마이셀간 결합이 형성되지 않음을 의미하는 것이다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$의 mikCCL의 TEM 현미경 사진(도 5F) 또한 구형 형태를 나타냈다.

[0145] mikUCL 및 mikCCL 사이의 구조적 차이를 추가 분석하기 위해, 희석 검정을 실시하였다. $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$ mikUCL 및 mikCCL을 10-배 DMF으로 희석하고 이들의 D_h를 DLS를 사용하여 측정하였다 (도 5C 및 5D). $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$ mikCCL은 DMF에 의한 소수성 PFMA 코어의 팽창 경향에 의해 26 내지 40 nm의 크기 증가를 보였다. 이러한 결과는 또한 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$ 마이셀의 성공적인 가교를 나타내는 것이다. 반대로, $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$ mikUCL은 ~4.5 nm의 D_h를 나타냈으며, 이는 분자적으로 용해된 유니머로의 마이셀의 붕괴를 입증하는 것이다. 뿐만 아니라, 광범위한 희석에 대한 mikUCL 및 mikCCL의 안정성도 DLS로 연구하였다 (도 5C 및 5D). mikCCL은 1000배 희석 (CMC 이하) 후 26에서 35 nm까지 약간의 크기 증가를 보였으며, 낮은 PDI (0.158)를 유지하였는데, 이는 mikCCL이 CMC 이하의 농도에서도 적합함을 의미하는 것이다. 반대로, mikUCL은 동일 조건 하에서 유니머 (~ 7 nm)로 완전히 분리되었다.

[0146] $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ mikCCL은 이들의 PFMA 코어에서 환원-민감성 이황화물 가교를 갖는다. 이들 이황화물 가교는 세포내 환원 환경에 반응하면 티올기 (-SH)로 쉽게 해-가교(de-crosslinking)될 수 있다. 여기에서, 37℃에서 24시간 후 PBS 내의 10 mM DTT에 대한 반응으로 크기 변화를 분석하여 $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5k}$ mikCCL의 환원-민감성을 연구하였다 (도 5E). DTT로 처리 후 mikCCL의 크기는 26에서 35 nm로 증가하였으며, 이는 이황화물 결합의 -SH기로의 전환에 의한 소수성 PFMA 코어의 해가교를 시사하는 것이다. DTT-처리 mikCCL의 TEM 이미지 또한 크기의 증가를 보였다 (도 5G). 이러한 결과는 mikCCL이 정상적인 생리학적 조건 하에서 우수한 콜로이드 안정성을 가지며, 세포질 및 암 세포의 핵과 유사한 환원 조건 하에서 빠르게 해가교될 수 있어 치료제의 증가된 방출 능력을 제공할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0148] **DOX의 담지, 저장 안정성, 및 *in vitro* 방출**

[0149] 중합 마이셀의 전략적 역할은 이들의 코어 내부로 유효량의 소수성 화학치료제를 담지하여 원하는 부위에서 의도한 항종양 활성을 나타낼 수 있도록 하는 것이다. DOX를 모델 화학치료제로서 사용하여 mikUCL 및 mikCCL로 물리학적 담지를 실시하였다. 간략하게, $(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{nk}$ 및 DTME를 DMF에 용해하고, 동몰의 DOX.HCl 및 TEA를 용액에 추가한 후 교반하면서 PBS 버퍼를 첨가해 자기조립 및 코어 내부로의 DOX의 캡슐화가 일어나도록 하였다. PFMA 및 DTME 사이의 가교 반응은 결과적으로 생성된 DOX 캡슐화 마이셀을 가열하여 실시해 mikCCL/DOX를 수득하였다. mikUCL/DOX를 공중합체와 함께 DTME를 투여하는 것을 제외하고 유사한 공정으로 제조하였다. LE, LC, 크기, 및 PDI와 같은 mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 특징은 표 3에 나타냈다. mikUCL/DOX (512 nm) 및 mikCCL/DOX (510 nm)의 UV 흡광에서 상당한 레드 시프트는 mikUCL 및 mikCCL 둘 다에서 DOX가 성공적으로 캡슐화됨을 나타내는 것이다 (도 6A). mikUCL 및 mikCCL 둘 다의 LC 및 LE는 소수성 PFMA 함량의 증가에 따라 증가하였으며, 이는 DOX와 PFMA 코어의 증가된 pi-pi 및 소수성 상호작용에 의한 것이다. mikUCL 및 mikCCL은 각각 66.8% 및 76.0%의 가장 높은 LE 및 8.4% 및 9.5%의 LC를 나타냈다. 이러한 결과는 마이셀의 가교 구조가 증가된 소수성 상호작용에 의해 DOX의 담지를 증가시킬 수 있으며 정제를 위한 투석 과정 동안 DOX의 누출을 감소시킬 수 있음을 시사하는 것이다. mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 DLS 측정은 DOX 담지 후 마이셀의 크기 증가를 나타냈으며, 이는 대부분 DOX-담지 소수성 구획의 증가된 부피에 의한 것이다. 모든 mikUCL 및 mikCCL의 PDI 수치는 0.15-0.26의 좁은 범위로 유지되었다.

표 3

[0150]

Copolymer	mikUCL/DOX				mikCCL/DOX			
	D_h (nm)	PDI	%LC	%EE	D_h (nm)	PDI	%LC	%EE
$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{1.5K}$	33±12	0.263	6.8	54.7	30±8	0.212	8.6	68.1
$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2K}$	35±12	0.155	7.9	63.9	34±10	0.158	9.2	73.2
$(PEO_{2K})_2$-*b*-$PFMA_{2.5K}$	42±15	0.228	8.4	66.8	36±12	0.152	9.5	76.0

[0151] 다음으로, 생리학적 조건 하에서 mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 저장 안정성을 비교하였다. 마이셀을 pH 7.4의 PBS (1 mg/mL)에 분산시키고 20일간 보관하였다. 도 6B는 저장 기간에 따른 mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 크기를 나타낸 것이다. mikCCL/DOX는 20일간의 저장 후 36에서 40 nm로의 미미한 크기 변화를 보였으나, mikUCL/DOX의 크기는 같은 기간 동안 42에서 61 nm로 증가하였으며, 이는 mikCCL/DOX가 mikUCL/DOX에 비해 더 높은 안정성을 보임을 의미하는 것이다. 이러한 결과는 DOX-담지 mikCCL가 더 높은 약물 담지 효율을 가지면서 우수한 안정성을 갖도록 쉽게 제조할 수 있음을 나타낸다. mikCCL/DOX의 우수한 안정성은 중합 사슬 분절의 이동성을 제한하고 마이셀 구조를 고정하는 중합체 네트워크의 가교에 의한 것이다.

[0152] mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 DOX 방출 거동을 10 mM DTT (reducing stimuli) 유무 하에서 PBS (pH 7.4) 및 아세테이트 버퍼 (pH 5.0)에서 확인하였다. mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX로부터의 누적 DOX 방출 백분율 대 시간을 도 6C에 나타냈다. mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX은 pH 7.4에서 48시간 후에 각각 35% 및 12%의 DOX 방출을 보였다. mikUCL/DOX와 비교하면, mikCCL/DOX로부터의 DOX 방출률이 10 mM DTT 없이 pH 7.4에서 효과적으로 억제되었다. 이러한 방출 거동은 정상적인 생리학적 조건에서 적은 DOX 누출을 보이는 mikCCL/DOX가 mikUCL/DOX에 비해 더 이점이 있음을 나타낸다. mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX로부터의 누적 DOX 방출 백분율은 pH 5.0에서 증가하여 각각 63% 및 22%에 이르렀는데, 이는 산성 배지에서 DOX의 용해성 증가 때문이다. mikCCL/DOX로부터의 DOX의 누적 방출은 CCL 마이셀의 가교 네트워크의 조밀도에 의해 동일 pH (7.4 또는 5.0)에서 mikUCL/DOX보다 낮았다. mikCCL/DOX는 pH 및 환원 자극에 반응하며, 10 mM DTT와 함께 인큐베이션했을 때 pH 7.4 및 pH 5.0에서 각각 29% 및 60%의 누적 DOX 방출을 보였다. 10 mM DTT의 존재시 pH 5.0에서 mikCCL/DOX로부터의 DOX의 급격한 방출은 DTT에 의한 이황화물 결합의 분열로 인해 DOX가 쉽게 코어로부터 확산되는 것 및 산성 배지에서 DOX의 더 높은 용해성 때문이다. 대부분의 종양의 세포외 pH는 6.5 - 7.2 범위인 반면, 건강한 조직의 세포외 pH는 7.4이다. 또한, pH도 엔도사이토시스를 통해 변할 수 있으며 6.4 - 5.0로 감소할 수 있다 (엔도솜 및 리소좀). 따라서, 제조된 mikCCL/DOX는 정상적인 생리 조건에서 이른 DOX 방출을 최소화하고 종양의 생리학적 조건 하에서 DOX 방출을 상당히 증가시킬 수 있다. 이는 DOX 투여의 독성 및 횟수를 감소시킬 수 있으며 전체적으로 개선된 치료제 효과를 야기할 수 있다.

[0154] ***In vitro* 세포독성 및 세포내 흡수**

[0155] 중합 마이셀의 세포양립성은 생의학적 적용의 전제조건이다. HEK-293 세포를 mikUCL/mikCCL와 함께 배양하고 WST-8 검정을 사용하여 0 내지 500 μg/mL 농도 범위에서의 세포독성을 평가하였다. 도 7A에 도시된 바와 같이, HEK-293 세포는 24시간 동안 모든 공동-배양 농도에서 거의 100%의 세포 생존률을 보였다. 이러한 결과는 세포가 500 μg/mL까지의 mikUCL 및 mikCCL의 처리로 인해 영향을 받지 않음을 나타내는 것이다. mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 세포독성을 평가하기 위해, 세포 생존도 검정을 HEK-293, HeLa, 및 HT-29 세포에서 실시하였으며, 결과를 DOX 그룹과 비교하였다. 도 7B에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 세포 유형에서 DOX-처리 그룹은 24시간 동안 투여량 의존적으로 생존률이 감소하였다. HEK-293, HeLa, 및 HT-29 세포에 대한 DOX IC_{50}은 각각 0.15, 5, 및 19 μg/mL이었다. 이러한 결과는 DOX가 암세포 (HeLa 및 HT-29)에 비해 정상 세포 (HEK-293)에 더 심각한 영향을 미침을 확인하는 것이다. 그러나, mikUCL 및 mikCCL에 의해 캡슐화된 DOX는 모든 유형의 세포에서 더 높은 세포 생존률을 보였다. 특히, HEK-293 세포의 생존률이 DOX-처리 그룹에 비해 상당히 증가하였으며, 이는 mikCCL/DOX에서의 공유 가교가 DOX 방출을 효율적으로 막았고 세포내 GSH 수준이 정상 세포에서 극도로 낮았기 때문으로 여겨진다. 5 μg/mL의 mikCCL/DOX가 처리됐을 때 HEK-293 세포는 ~80% 생존률을 보였다. 반대로, HeLa 및 HT-29 세포의 생존률은 mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX에 의해 상당히 감소하였다 (도 7C 및 7D). mikUCL/DOX는 mikCCL/DOX에 비해 약간 감소되었지만 비슷한 세포 생존률을 보였다. 세포 생존률에서의 이러한 적은 차이는 내부 DOX를 방출시키는 mikCCL/DOX의 탈가교를 야기하는 환원응답성 분열의 비율의 차이에 기인한

것일 수 있다. mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 in vitro 세포 생존능력이 in vitro DOX 방출 프로파일과 일치함에 주목하였다. 본 발명의 데이터는 mikUCL 및 mikCCL이 정상 세포를 보호하고 암세포에 약물을 방출할 수 있는 효과적인 약물 전달체가 될 수 있음을 입증하였다.

[0156] mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX의 내재화 및 시간-의존적 DOX 방출을 형광 현미경을 사용하여 HeLa 및 HT-29 세포에서 연구하였다. 약물의 방출을 관찰하기 위해, 세포를 6 및 12시간에 처리한 후 DOX의 내재된 형광으로 추척하였다. 도 8A 및 8B에서 볼 수 있는 바와 같이, DOX 형광 강도는 6시간에 mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX 둘 다에서는 약했다. DOX 처리 세포의 경우에는 동일 시간에 비교적 높은 DOX 형광 강도가 관찰되었으며, 이는 수동적 분산을 통해 HeLa 및 HT-29 세포의 사이토졸 내로 효과적으로 내재화되었지만 DOX 캡슐화 마이셀은 흡수될 필요가 있음을 의미하는 것이다. 12시간에서는 mikUCL/DOX, mikCCL/DOX, 및 DOX로 처리된 HeLa 세포에서 증가된 DOX 형광 강도가 관찰되었다. mikUCL/DOX 및 mikCCL/DOX 처리 HeLa 및 HT-29 세포 중 DOX 형광 강도에서의 약간의 변화는 이황화물 결합의 환원응답성 분해의 비율 차이로 인한 것일 수 있다.

[0158] ***In vivo* 생물학적 분배**

[0159] 이황화물 가교 마이셀의 조직 분포 및 생리학적 안정성을 평가하기 위해, 형광 발현 ICG 염료를 마이셀 내에 캡슐화하였다. ICG, mikUCL/ICG, 및 mikCCL/ICG를 HT-29 종양-보유 마우스에게 주입하고 24시간 후에 *in vivo* 이미징 장비로 추출된 장기를 관찰하였다 (도 9). ICG, mikUCL/ICG, 및 mikCCL/ICG가 주입된 마우스의 종양 조직에서 형광 시그널이 검출되었다. 특히, mikUCL/ICG 처리 마우스에 비해 mikCCL/ICG 처리 마우스에서 종양 부위에 더 높은 형광 강도가 관찰되었다. 이러한 결과는 마이셀이 *in vivo*에서 증가된 구조적 안정성을 가지고 있어, 종양 내에서 마이셀이 축적될 수 있음을 시사하는 것이다. 나노운반체는 EPR 효과에 의해 종양 조직에서 축적되는 것으로 알려져 있으며, 혈류에서의 이들의 안정성은 축적을 위해서는 필수적인 것이다. 마이셀의 가교는 혈액 희석에 의한 클리어런스, 약물 누출 및 염-유도 수집을 방지할 수 있으므로, UCL에 비해 더 많은 양의 약물이 담지된 더 많은 CCL이 종양에 축적될 수 있다. 중합 마이셀에 비해 시스템으로부터의 ICG의 급격한 클러어런스로 인해 ICG-주입 마우스는 형상 시그널을 거의 보이지 않았다. 다른 장기에 비해 상대적으로 더 높은 간에서의 ICG, mikUCL/ICG, 및 mikCCL/ICG의 흡수는 세망내피계 시스템 (RES)에 의한 이들의 비특이적 클리어런스에 의한 것으로 보인다.

[0161] ***In vivo* 항종양 연구**

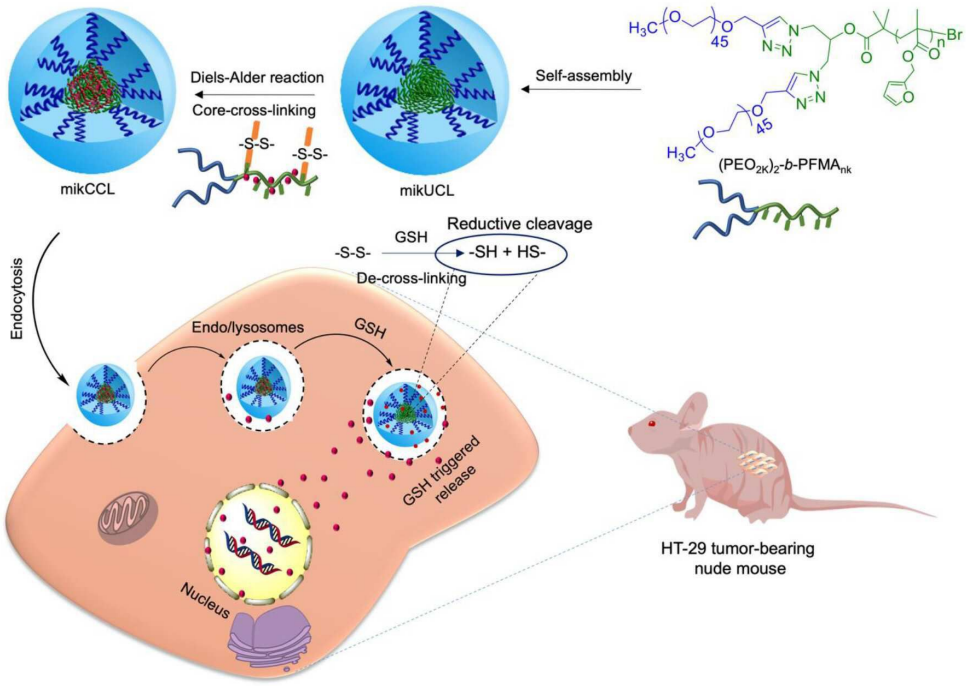
[0162] mikCCL/DOX의 항종양 효과를 평가하기 위해, HT-29 종양 보유 마우스의 식염수, DOX, 및 mikUCL/DOX 처리 그룹에서 종양 부피를 측정하고 이를 비교하였다 (도 10A). DOX, mikUCL/DOX, 및 mikCCL/DOX로 처리된 모든 그룹은 식염수 처리 그룹에 비해 HT-29 종양의 성장이 더 많이 저해되었다. 특히, 5 $mg.kg^{-1}$의 mikCCL/DOX의 HT-29 종양 성장 속도는 5 $mg.kg^{-1}$의 DOX 및 mikUCL/DOX 처리 마우스 그룹보다 더 느렸다. mikCCL/DOX는 이들의 더 낮은 in vitro 세포독성과 관계없이 HT-29 종양에서 개선된 *in vivo* 치료 효과를 보였다. 이는 mikCCL/DOX의 연장된 순환 시간이 더 많은 종양 축적을 야기하기 때문일 것이다. 종양 부위, 특히 세포 내부로 도달한 후, 상승한 GSH 수준이 CCL로부터 캡슐화된 DOX의 방출을 촉진하여 세포사를 증가시키는 것으로 예상된다 (도 1). 그러나, UCL 마이셀로부터의 비특이적이고 더 빠른 DOX-방출 거동은 감소된 *in vivo* 치료 효능 및 적절하지 않은 전신성 독성을 야기한다. HT-29 종양 보유 마우스를 24일에 희생시키고 종양을 수집하여 항종양 활성을 분석하였다 (도 10B). DOX 및 mikUCL/DOX 처리 그룹의 종양 부피는 식염수 처리 그룹보다 현저히 감소하였다. mikCCL/DOX 처리 그룹은 모든 그룹 중에서 가장 적은 종양 부피를 보였다. 육안 관찰에서, 일부 종양은 모든 그룹에서 비슷한 부피를 갖는 것으로 보였는데, 이는 각 마우스가 각각 다른 약물 민감성을 가지고 있어 종양 성장에 영향을 주므로 종양 조직이 다른 크기로 성장하기 때문으로 여겨진다. 시간-의존적 측정 결과에서, mikCCL/DOX 처리 그룹이 상당히 감소된 종양 성장 속도를 보였다. 이러한 결과는 mikCCL/DOX가 HT-29 종양 보유 마우스에서 상당히 감소된 전신성 독성, 개선된 관용성 및 증가된 종양 저해를 가짐을 확인한 것이다. 이황화물 가교 믹토암 $(PEO_{2K})_2$-b-$PFMA_{2.5k}$로 구성된 mikCCL/DOX의 쉬운 합성, 증가된 약물 담지, 더 높은 안정성 및 종양 미세환경-매개 방출은 항암 치료의 매력적인 플랫폼을 제공할 수 있을 것이다.

[0164] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통

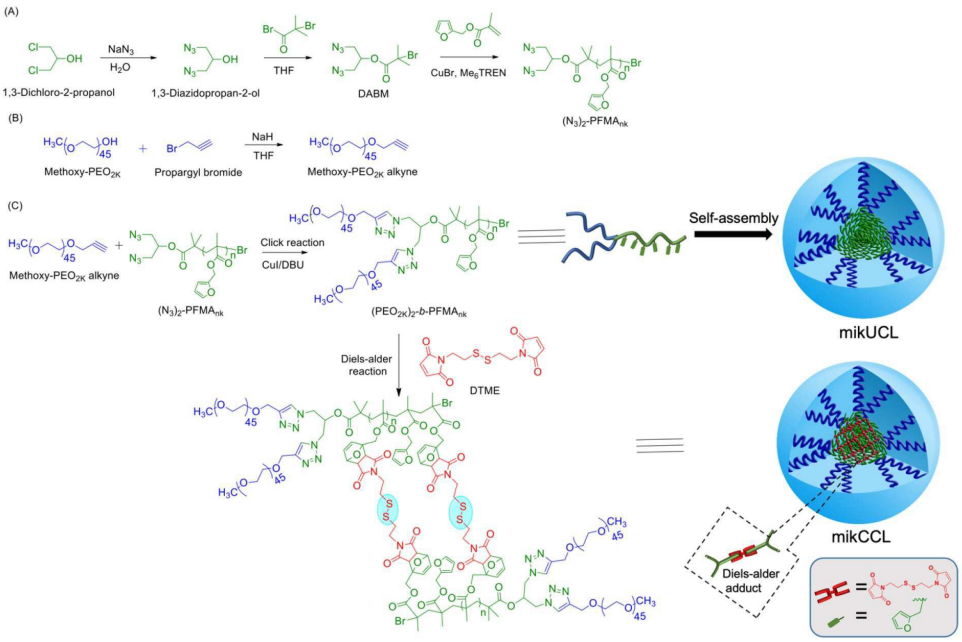
상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

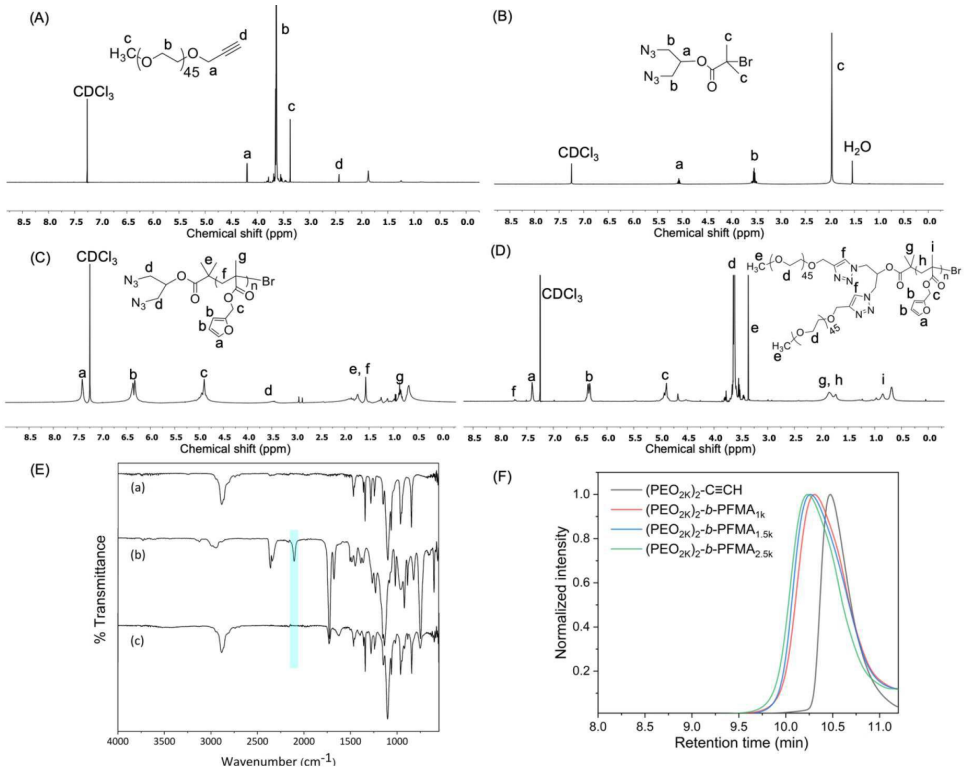
도면1



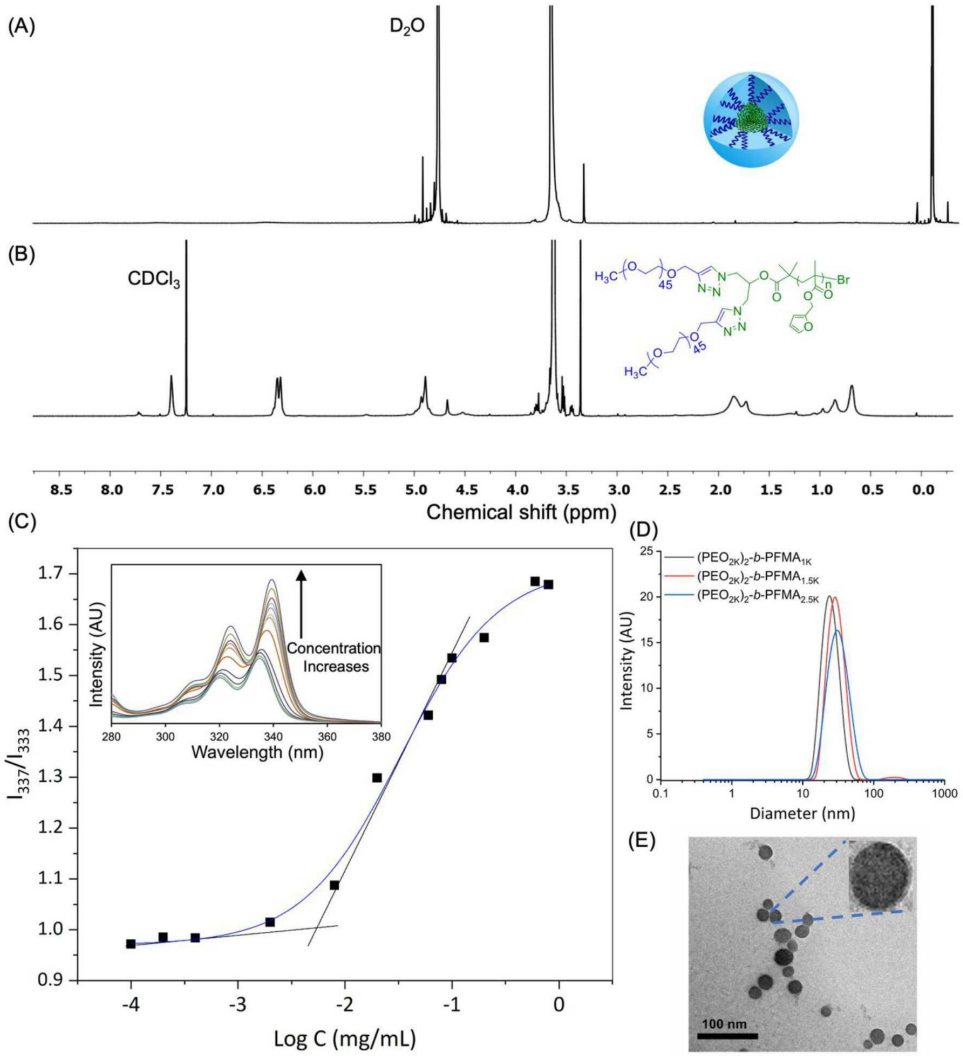
도면2



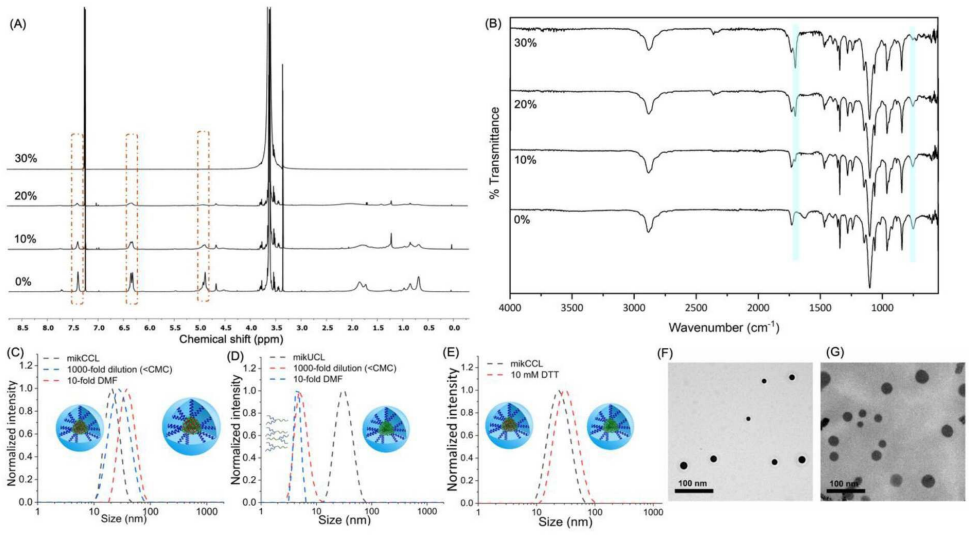
도면3


(A)
CDCl3
Chemical shift (ppm)
(B)
CDCl3
H2O
Chemical shift (ppm)
(C)
CDCl3
Chemical shift (ppm)
(D)
CDCl3
Chemical shift (ppm)
(E)
(a)
(b)
(c)
% Transmittance
Wavenumber (cm-1)
(F)
(PEO2k)2-C≡CH
(PEO2k)2-b-PFMA1k
(PEO2k)2-b-PFMA1.5k
(PEO2k)2-b-PFMA2.5k
Normalized intensity
Retention time (min)

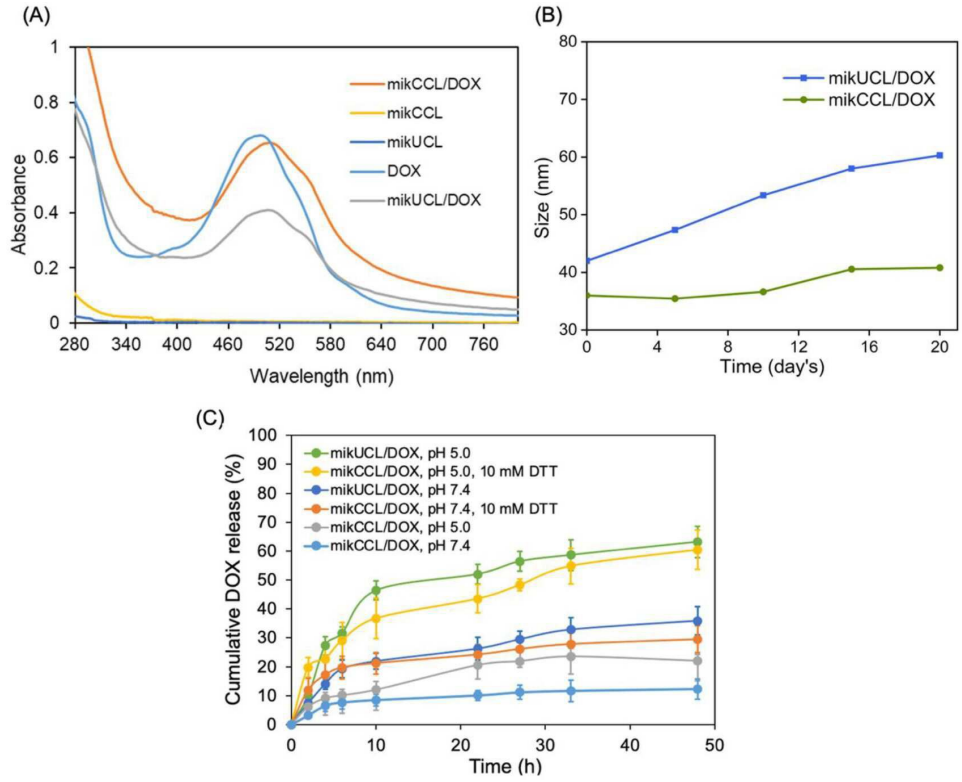
도면4


(A)
D2O
(B)
CDCl3
Chemical shift (ppm)
(C)
I337/I333
Log C (mg/mL)
Intensity (AU)
Concentration Increases
Wavelength (nm)
(D)
(PEO2K)2-b-PFMA1K
(PEO2K)2-b-PFMA1.5K
(PEO2K)2-b-PFMA2.5K
Intensity (AU)
Diameter (nm)
(E)
100 nm

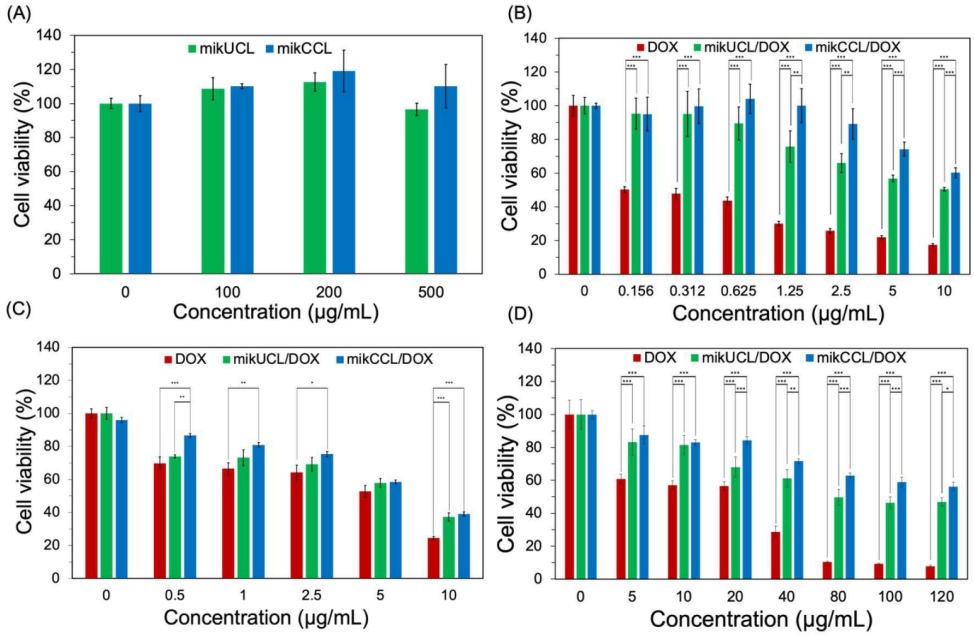
도면5


(A)
30%
20%
10%
0%
Chemical shift (ppm)
(B)
% Transmittance
Wavenumber (cm-1)
(C)
mikCCL
1000-fold dilution (<CMC)
10-fold DMF
Normalized intensity
Size (nm)
(D)
mikUCL
1000-fold dilution (<CMC)
10-fold DMF
(E)
mikCCL
10 mM DTT
(F)
(G)
100 nm

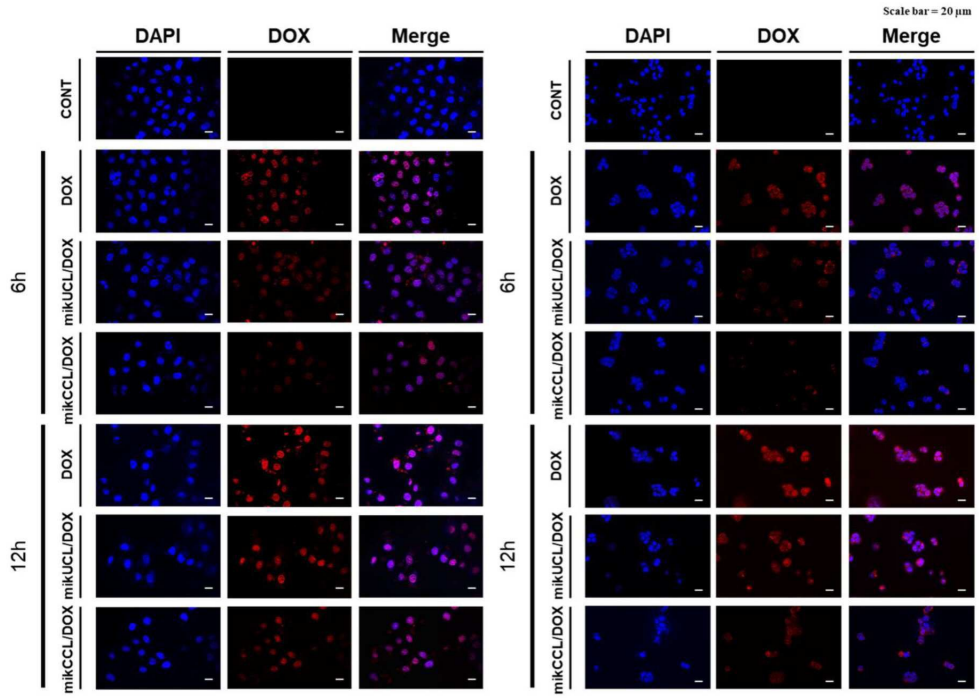
도면6


(A)
Absorbance
Wavelength (nm)
mikCCL/DOX
mikCCL
mikUCL
DOX
mikUCL/DOX
(B)
Size (nm)
Time (day's)
mikUCL/DOX
mikCCL/DOX
(C)
Cumulative DOX release (%)
Time (h)
mikUCL/DOX, pH 5.0
mikCCL/DOX, pH 5.0, 10 mM DTT
mikUCL/DOX, pH 7.4
mikCCL/DOX, pH 7.4, 10 mM DTT
mikCCL/DOX, pH 5.0
mikCCL/DOX, pH 7.4

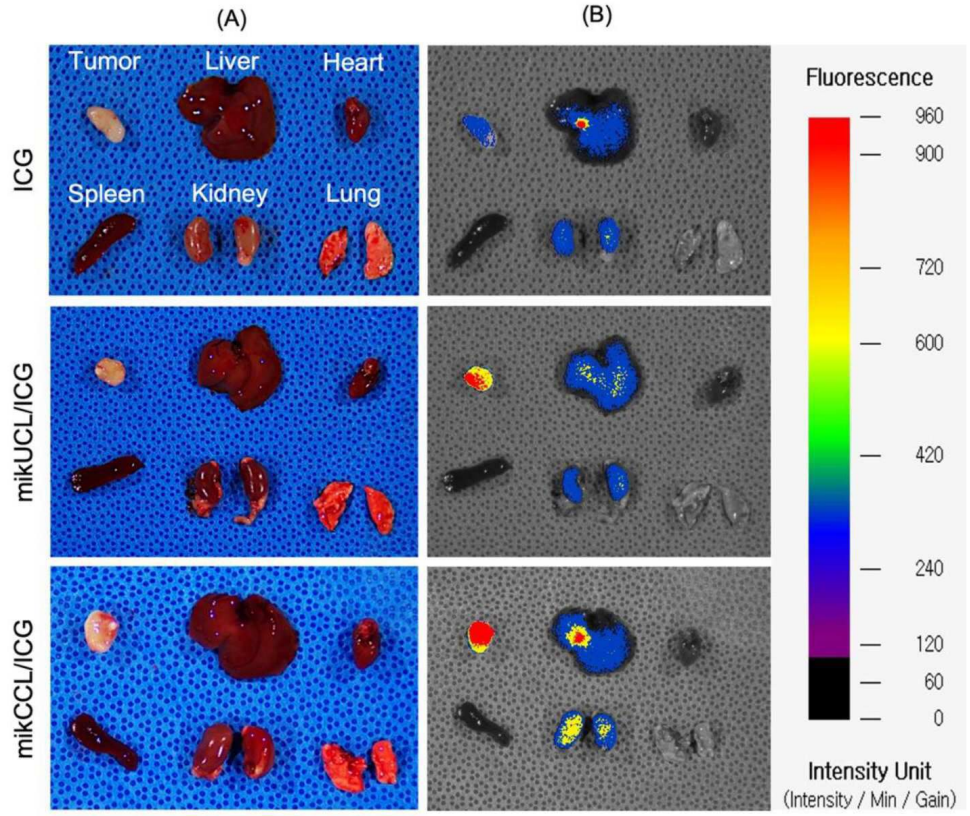
도면7


(A)
Cell viability (%)
mikUCL
mikCCL
Concentration (μg/mL)
(B)
Cell viability (%)
DOX
mikUCL/DOX
mikCCL/DOX
Concentration (μg/mL)
(C)
Cell viability (%)
DOX
mikUCL/DOX
mikCCL/DOX
Concentration (μg/mL)
(D)
Cell viability (%)
DOX
mikUCL/DOX
mikCCL/DOX
Concentration (μg/mL)

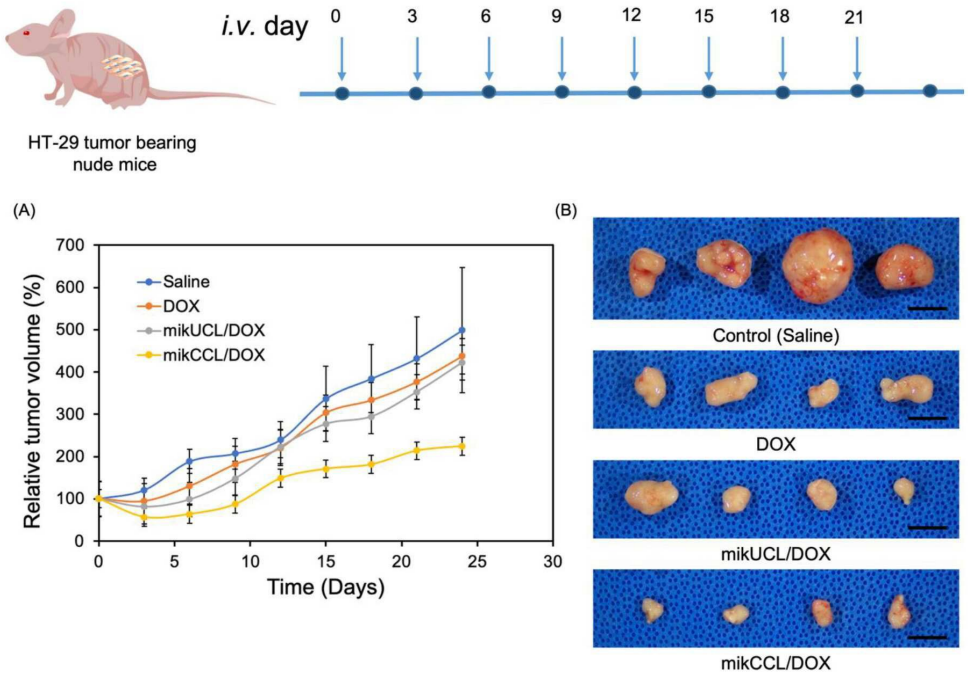
도면8


Scale bar = 20 μm
DAPI
DOX
Merge
CONT
6h
12h
DOX
mikUCL/DOX
mikCCL/DOX

도면9


(A)
(B)
ICG
mikUCL/ICG
mikCCL/ICG
Tumor
Liver
Heart
Spleen
Kidney
Lung
Fluorescence
960
900
720
600
420
240
120
60
0
Intensity Unit
(Intensity / Min / Gain)

도면10


i.v. day
0
3
6
9
12
15
18
21
HT-29 tumor bearing
nude mice
(A)
Relative tumor volume (%)
Time (Days)
Saline
DOX
mikUCL/DOX
mikCCL/DOX
(B)
Control (Saline)
DOX
mikUCL/DOX
mikCCL/DOX