



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월09일

(11) 등록번호 10-2099516

(24) 등록일자 2020년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/00 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/0009 (2013.01)

A61K 31/337 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0148095

(22) 출원일자 2018년11월27일

심사청구일자 2018년11월27일

(56) 선행기술조사문헌

KR101841362 B1

KR101741949 B1

KR101818377 B1

(73) 특허권자

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

임권택

부산광역시 부산진구 당감로 118, 105동 1202호(
부암동, 협성피닉스타운)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 13 항

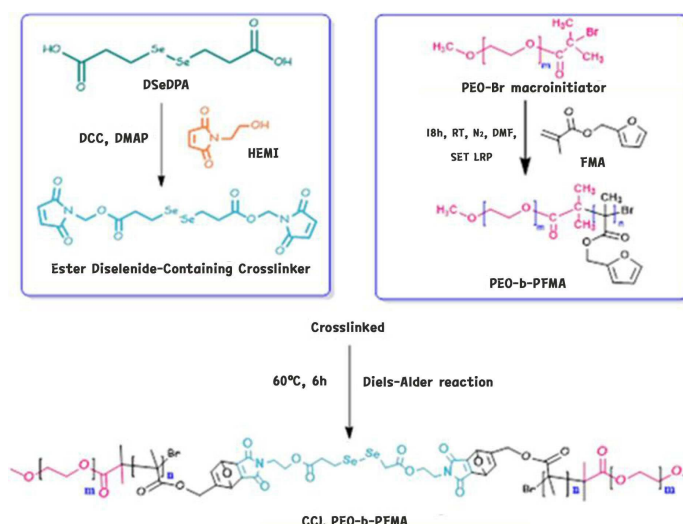
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 근적외선에 반응하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀, 이를 포함하는 약물 전달체 및
이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 근적외선에 반응하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀, 이를 포함하는 약물 전달체 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 본 발명의 외부에서 근적외선을 사용하여 약물 방출을 유도하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체는 클릭반응에 의하여 간편하게 제조될 수 있고, 암세포를 특이적으로 타겟팅하여, 외부에서 능동적으로 약물을 방출함으로써, 암세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있어, 이를 제약분야에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/573 (2013.01)

A61K 31/704 (2013.01)

A61K 9/1271 (2013.01)

A61K 9/1277 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A3A01019109

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자지원사업

연구과제명 기능성 블록 공중합체의 가교 마이셀 합성 및 자극 응답형 약물전달에의 응용

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2015.06.01 ~ 2018.05.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체;

디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제; 및

근적외선 염료(NIR dye);를 포함하고,

상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드ريد), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이도프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바이닐벤젠), 폴리(γ -아자이도-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidy), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,

상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,

여기서,

상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 말레이미딜(maleimidy)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidy) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 아지도(azido)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 알카이닐(alkynyl)이고,

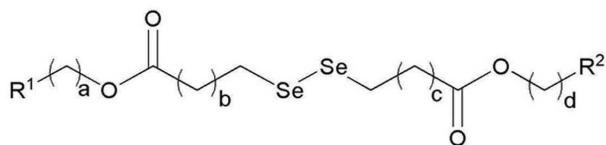
상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R^1 및 R^2 에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,

상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,

근적외선에 반응하여 가교제의 디셀레나이드 결합이 붕해되는 것을 특징으로 하는,

암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;

R¹ 및 R²는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마이셀은 친수성 쉘; 및 소수성 코어;로 이루어진 것을 특징으로 하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가교 마이셀은 가교 마이셀 내에 약물을 도입할 수 있고,

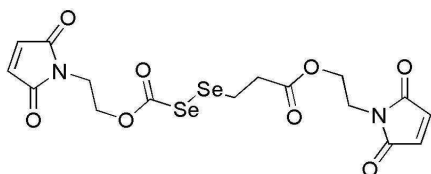
상기 약물은 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 레티노익 산(retinoic acid)계열, 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), Fluorouracil(5-FU), 도세탁셀(Docetaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 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), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 가교 마이셀.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 가교 마이셀:

[화학식 2]

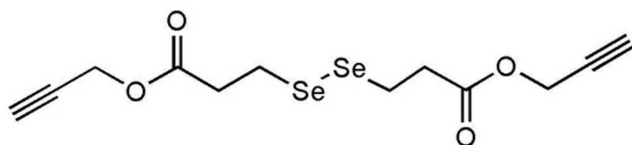


청구항 5

제1항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 가교 마이셀:

[화학식 3]



청구항 6

제1항에 있어서,

상기 공중합체는,

폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트); 또는 아지도(azido) 작용기가 도입된 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트);인 것을 특징으로 하는 가교 마이셀.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 공중합체는,

퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트); 또는 아지도(azido) 작용기가 도입된 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트); 인 것을 특징으로 하는 가교 마이셀.

청구항 8

친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체, 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제, 및 근적외선 염료(NIR dye)를 용매에 첨가하고 교반하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 준비한 혼합액을 50-80℃에서 8-16시간 반응시켜, 마이셀 코어의 가교결합을 유도하는 단계(단계 2);를 포함하고,

상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드리드), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이도프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바이닐벤젠), 폴리(γ -아자이도-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,

상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,

여기서,

상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R¹ 및 R²는 말레이미딜

(maleimidy)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidy) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 아지도(azido)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 알카이닐(alkynyl)이고,

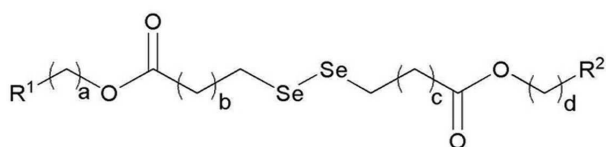
상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R^1 및 R^2 에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,

상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,

근적외선에 반응하여 가교제의 디셀레나이드 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는,

암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;

R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidy), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다).

청구항 9

제1항의 가교 마이셀; 및 상기 가교 마이셀 내에 도입된 약물을 포함하고,

상기 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(anastrozole), 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), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체.

청구항 10

친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체, 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제, 근적외선 염료(NIR dye), 및 약물을 용매에 첨가하고 교반하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 준비한 혼합액을 50-80℃에서 8-16시간 반응시켜, 마이셀 코어의 가교결합을 유도하는 단계(단계 2);를 포함하고,

상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레이크 안히드ريد), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이드 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이드 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이드프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바이닐벤젠), 폴리(γ -아자이드-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,

상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,

여기서,

상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R¹ 및 R²는 말레이미딜(maleimidyl)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R¹ 및 R²는 퓨라닐(furanyl)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R¹ 및 R²는 아지도(azido)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R¹ 및 R²는 알카이닐(alkynyl)이고,

상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R¹ 및 R²에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,

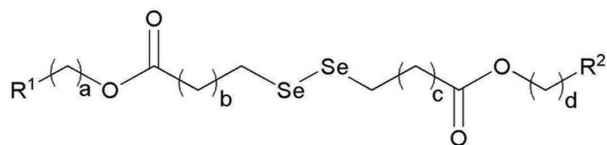
상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,

상기 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(anastrozole), 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), 텍사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,

근적외선에 반응하여 가교제의 디셀레나이드 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는,

암세포 표적기능을 갖는 약물전달체의 제조방법:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;

R¹ 및 R²는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다).

청구항 11

제10항에 있어서,

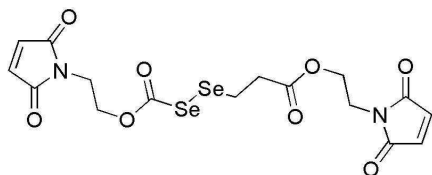
상기 양친매성 공중합체는 RAFT(Reversible Addition Fragmentation chain Trasfer) 중합반응 또는 ATRP(Atom transfer radical polymerization) 분자 조절 중합반응을 통하여 제조하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 2으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 제조방법:

[화학식 2]

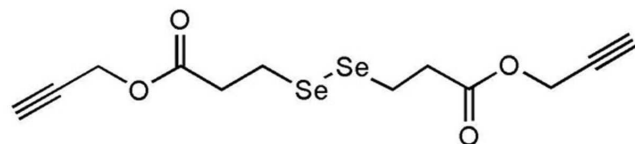


청구항 13

제10항에 있어서,

상기 가교제는 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 제조방법:

[화학식 3]



발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 근적외선에 반응하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀, 이를 포함하는 약물 전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 몇 년간 코어-셸(core-shell) 구조에 기초한 고분자 마이셀(micelle)은 그것의 장점인 소수성 약물 용해도, 장기간 순환 시간 및 특정 조직 표적성 때문에 광범위하게 연구되어 왔다. 양친매성(amphiphilic) 블록 공중합체(block copolymer)의 코어-셸 형식의 구조는 불용성 코어와 수용성 코로나(corona)로 이루어져 있다. 고분자 마이셀은 통상적으로 크기가 수십 나노미터 범위로서 증진된 투과 및 유지(Enhanced Permeability and Retention, EPR) 효과에 적합하다. EPR 효과는 40 ~ 200 나노미터 범위 크기의 분자들이 정상 세포보다 암세포에 크게 축적되는 특징이다. 다시 말하자면, 정상 세포가 있는 쪽은 혈관과의 경계가 촘촘한데 비하여 빠른 성장을 하는 암세포가 있는 쪽은 혈관과의 경계가 느슨하므로, 이러한 크기의 분자나 입자는 정상 세포 쪽은 뚫지 못하는 반면에 암조직 쪽 혈관벽은 잘 통과해서 암세포로 전달되어 축적이 되는 현상으로 암세포에 대한 약물 전달에 효과적으로 활용된다.
- [0003] 그러나 마이셀 고유의 불안정성은 많은 응용에 앞서 상당한 문제점 되어 왔다. 즉, 고분자 마이셀은 혈액순환 도중에 매우 희석된 농도에서 단일체(unimer)로 서로 떨어져 밖으로 빠져나갈 수 있다. 이것은 표적 방출을 이루지 못하고 일반 생체 조직에 독성을 일으킬 수 있다. 따라서 고분자 마이셀의 안정성 향상은 최근 많은 연구가 진행 중인 시급한 문제이다.
- [0004] 마이셀의 가교는 자기조립구조의 안정화를 위한 가장 뛰어난 방법으로 알려져 있다. 최근에 마이셀 가교화 기술의 커다란 발전에 의하여 나노운반체의 안정성을 강화시킬 뿐만 아니라 마이셀의 약물방출을 조절할 수 있다. 친수성 셸의 가교화는 약물전달 시스템의 잠행에 영향을 미치고 친수성기의 이동성에 영향을 주고, 불필요한 마이셀 간 가교화를 피할 수 없다. 반면에 마이셀의 코어 가교화는 점점 매력적인 방법이 되어가고 있는데, 이것은 산화 환원 환경에서 가교 결합이 역반응 또는 분해가 가능하여 내부 활성 물질의 방출을 향상시킨다. 코어 가교된(가교된) 마이셀은, 감광성 블록 공중합체의 UV조사와 금속-리간드 배위 결합과 같은 다양한 방법들에 의해 만들어질 수 있다. 이러한 마이셀들은 UV/NIR 광 조사, 환원제의 존재 또는 pH 변화에 따라 해가교되어 약물을 방출할 수 있다.
- [0005] 통상적인 암세포 표적성 코어 가교화 방법에서는, 먼저 소수성 약물을 고분자 마이셀의 코어부분에 물리적이거나 화학적으로 탑재함과 함께 특정한 화학구조의 가교제를 사용하여 코어 가교 반응이 수행된다. 여기서 통상적으로 사용되는 가교제는 산화환원반응이나 약산성 조건에서 분해되는 가교제이다. 따라서, 약물이 탑재된 가교마이셀이 혈액 내에 순환 시간 동안에는 약물이 마이셀 내에 유지되고 있다가 EPR효과로 암세포 목표물 조직에 도달하여 축적된 후, 암세포내의 분위기인 약산성이나 암세포에 다량 존재하는 글루타치온의 환원반응에 의하여 가교 구조가 분해함으로서 코어 내부의 약물이 쉽게 방출하여 암세포를 사멸시킨다.
- [0006] 그러나 이러한 방법은 약물전달체가 자발적으로 암세포의 내부 환경에서 응답 작용으로 약물을 방출하기 때문에 원하는 부위에서 원하는 시간에 인위적으로 약물방출을 조절할 수 없다는 단점이 있다. 따라서, 생체 외부에서 생체에 무해한 방식으로 생체 내부의 약물 방출을 제어하는 방법이 바람직하다.
- [0007] 이러한 목적을 위해 생체에 무해한 근적외선(near infrared, NIR) 광선을 외부에서 사용하여 생체내부의 원하는 부위에서 약물을 방출하는 방법이 제시되어 고분자 가교 마이셀의 약물 전달 효과를 증가시켰으며, 이것은 생체 치료학적 응용에서 높은 가능성을 보이고 있다. 이 방법을 사용하면 능동적으로 약물을 약물전달체로부터 방출할 수 있다. 이러한 방식의 약물전달체로서 디셀레나이드(diselenide) 결합을 기반으로 하는 약물 탑재 고분자는 보다 더 효과가 있다. 디셀레나이드 결합은 활성산소 감응성이 있기 때문에 생체 내에서는 상대적으로 안정적이지만, 약물과 함께 탑재한 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)이 NIR 조사에 의하여 배출한 활성산소 물질(reactive oxygen species, ROS)에 반응하면 분해하는 성질이 있다. ICG는 근적외선 노출 시 일 중항 산소, 슈퍼 옥사이드 음이온, 수산화 라디칼 등을 생성할 수 있는 트리 카보시아 염료이다. 이에 따라 디셀레나이드 결합을 보유한 가교구조가 분해하여 코어 주변의 약물을 방출한다. 디셀레나이드 결합을 통한 고분자 약물 결합은 고분자 가교의 일부로서 약물을 포함하거나 마이셀에 약물을 부착한 고분자들을 포함한다. 이러한 방법은 보다 향상된 약물 전달 능력을 가져다 줄 수 있다. 따라서, 디셀레나이드 결합을 포함한 가교제를 가교반응에 적절히 활용하여 약물과 ICG가 탑재된 가교마이셀을 합성하면 효과적으로 근적외선을 이용한 외부자극 감응형 약물전달시스템을 제조할 수 있다.
- [0008] 한편, "클릭화학(click chemistry)" 반응은 높은 반응성에 의해 저분자와의 반응뿐만 아니라 올리고머, 폴리머 등과 같은 고분자와의 반응에서도 높은 수율로 분자간 결합을 형성시킬 수 있다. 현재 클릭화학 반응은 다양한 분야에 적용되고 있는데, 예를 들면 아자이드 관능기와-알킨의 고리첨가반응(cycloaddition) 연구(Rostovtsev, VV, 등, Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596-2599, 2002); 유기합성을 통한 클릭화학의 응용(Lee, LV, 등, J. Am. Chem. Soc. 125: 9588-9589, 2003); 클릭화학을 이용한 손쉬운 표면의 관능화(Fazio, F, 등, J. Am. Chem.

Soc. 124: 14397-14402, 2002); 약물 전달 시스템 및 생체 적합 물질 설계를 위한 강력한 도구로서의 디엘스 알더(Diels-Alder) 반응(Gregoritza, M, 등, Eur. J. Pharm. Biopharm. 97, 438-453, 2015) 등의 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2009-0076856호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2011-0102995호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀을 제공하는 것이다.
[0011] 본 발명의 다른 목적은 암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법을 제공하는 것이다.
[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체를 제공하는 것이다.
[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 암세포 표적기능을 갖는 약물전달체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여,
[0015] 본 발명은 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체;
[0016] 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제; 및
[0017] 근적외선 염료(NIR dye);를 포함하고,
[0018] 상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,
[0019] 상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드ريد), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이도프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바이닐벤젠), 폴리(γ -아자이도-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,
[0020] 여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,
[0021] 상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,
[0022] 여기서,
[0023] 상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R¹ 및 R²는 말레이미딜(maleimidyl)이고,
[0024] 상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R¹ 및 R²는 퓨라닐(furanyl)이고,
[0025] 상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R¹ 및 R²는 아지도(azido)이고,

[0026] 상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 알카이닐(alkynyl)이고,

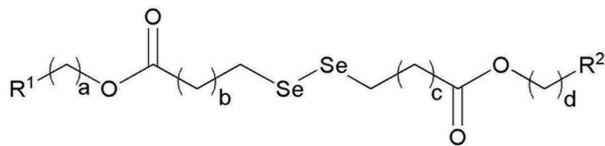
[0027] 상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R^1 및 R^2 에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,

[0028] 상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,

[0029] 근적외선에 반응하여 가교제의 디셀레나이드 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는,

[0030] 암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀을 제공한다:

[0031] [화학식 1]



[0032]

[0033] (상기 화학식 1에서,

[0034] a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;

[0035] R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다).

[0037] 또한, 본 발명은 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체, 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제, 및 근적외선 염료(NIR dye)를 용매에 첨가하고 교반하는 단계(단계 1); 및

[0038] 상기 단계 1에서 준비한 혼합액을 50-80℃에서 8-16시간 반응시켜, 마이셀 코어의 가교결합을 유도하는 단계(단계 2);를 포함하고,

[0039] 상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

[0040] 상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드리드), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이도프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바이닐벤젠), 폴리(γ -아자이도-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

[0041] 여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,

[0042] 상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,

[0043] 여기서,

[0044] 상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 말레이미딜(maleimidyl)이고,

[0045] 상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl)이고,

[0046] 상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 아지도(azido)이고,

[0047] 상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 알카이닐(alkynyl)이고,

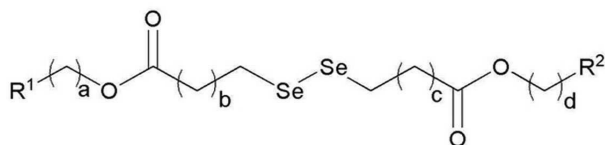
[0048] 상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R^1 및 R^2 에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,

[0049] 상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,

[0050] 근적외선에 반응하여 가교제의 디설텐라이드 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는,

[0051] 암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법을 제공한다:

[0052] [화학식 1]



[0053]

[0054] (상기 화학식 1에서,

[0055] a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;

[0056] R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다).

[0058] 나아가 본 발명은 상기 가교 마이셀; 및 상기 가교 마이셀 내에 도입된 약물을 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체를 제공한다.

[0060] 더 나아가 본 발명은 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체, 디설텐라이드 결합을 포함하는 가교제, 근적외선 염료(NIR dye), 및 약물을 용매에 첨가하고 교반하는 단계(단계 1); 및

[0061] 상기 단계 1에서 준비한 혼합액을 50-80℃에서 8-16시간 반응시켜, 마이셀 코어의 가교결합을 유도하는 단계(단계 2);를 포함하고,

[0062] 상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

[0063] 상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드리드), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이도프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바이닐벤젠), 폴리(γ -아자이도-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

[0064] 여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,

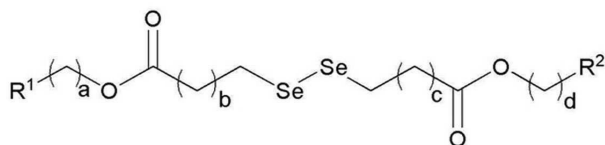
[0065] 상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,

[0066] 여기서,

[0067] 상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 말레이미딜(maleimidyl)이고,

[0068] 상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl)이고,

- [0069] 상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 아지도(azido)이고,
- [0070] 상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 알카이닐(alkynyl)이고,
- [0071] 상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R^1 및 R^2 에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,
- [0072] 상기 약물은 프레드니솔론 21-아세이트(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(anastrozole), 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), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,
- [0073] 상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,
- [0074] 근적외선에 반응하여 가교제의 디셀레나이드 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는,
- [0075] 암세포 표적기능을 갖는 약물전달체의 제조방법을 제공한다:
- [0076] [화학식 1]



- [0077]
- [0078] (상기 화학식 1에서,
- [0079] a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;
- [0080] R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다).

발명의 효과

- [0081] 본 발명의 외부에서 근적외선을 사용하여 약물 방출을 유도하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체는 클릭반응에 의하여 간편하게 제조될 수 있고, 암세포를 특이적으로 타겟팅하여, 외부에서 능동적으로 약물을 방출함으로써, 암세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있어, 이를 제약분야에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0082] 도 1은 디셀레나이드 가교제, PEO-b-PFMA(폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트)) 및 가교마이셀의 합성을 나타낸 도이다.
- 도 2는 디셀레나이드 가교제, PEO-b-PGMA- N_3 (폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트)- N_3) 및 가교마이셀의 합성을 나타낸 도이다.
- 도 3은 PEO-Br 거대개시제와 PEO-b-PFMA의 GPC 분석을 나타낸 도이다.
- 도 4는 PEO-Br 거대개시제, PEO-b-PGMA, PEO-b-PGMA- N_3 의 GPC 분석을 나타낸 도이다.

도 5는 말레이미드 작용기를 양 말단에 결합한 디셀레나이드 유도체(가교제)의 ^1H NMR 과 ^{13}C NMR스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 6은 프로파길 작용기를 양 말단에 결합한 디셀레나이드 유도체(가교제)의 ^1H NMR 과 ^{13}C NMR스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 7은 (a) PEO-b-PFMA(제조예 1)와 (b) PEO-b-PFMA의 코어가 가교된 마이셀(제조예 5)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 8은 (a) PEO-b-PFMA의 코어가 가교되지 않은 마이셀(non-CCL) 및 코어가 가교된 마이셀(CCL)의 역학적 직경의 변화를 DLS를 통해 측정한 결과와 (b) 코어가 가교된 마이셀(CCL)의 크기와 형태를 TEM을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 (a) PEO-b-PGMA- N_3 (제조예 3) 및 (b)PEO-b-PGMA- N_3 의 CCL 마이셀(제조예 6)의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 10은 DOX와 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-1)의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 11은 근적외선 조사 전 후에 있어 DOX와 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-1)의 역학적 직경의 변화를 DLS를 통해 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 (a) DOX와 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-1) 및 (b) 상기 마이셀을 근적외선 5분 조사 후 3시간 경과 및 (c) 상기 마이셀을 근적외선 5분 조사 후 30시간 경과한 상태의 크기와 형태를 TEM을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 근적외선을 조사하지 않거나 5분 동안 조사한 후의 DOX/ICG/CCL 마이셀(실시예 1-1)로부터 시험관내 약물의 방출 그래프를 나타낸 도이다.

도 14는 근적외선 조사 전 후에 있어 DOX와 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-2)의 역학적 직경의 변화를 DLS를 통해 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 15는 (a) 코어가 가교되지 않은 PEO-b-PGMA- N_3 마이셀 (b) DOX와 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-2) 및 (c) 상기 마이셀을 근적외선 5분 조사 후 24시간 경과한 상태의 크기와 형태를 TEM을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 근적외선을 조사하지 않거나 5분 동안 조사한 후의 DOX/ICG/CCL 마이셀(실시예 1-2)로부터 시험관내 약물의 방출 그래프를 나타낸 도이다.

도 17은 (a) 서로 다른 농도의 PEO-b-PFMA의 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-1)에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 24시간 동안 HEK293 세포 생존율 및 (b) 서로 다른 농도의 DOX 또는 200 mW cm^{-2} , 808 nm 근적외선 레이저 광선에 의한 5분간 조사 유무에 따른 DOX가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-1)에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 24시간 동안 HepG2의 세포 생존율 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 DOX 또는 200 mW cm^{-2} , 808 nm NIR 레이저 광선에 5분간 조사한 DOX와 ISG가 담지된 PEO-b-PFMA의 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-1)의 존재하에 HepG2세포의 인큐베이션 시간을 달리하여 촬영한 형광사진으로 세포 사멸을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

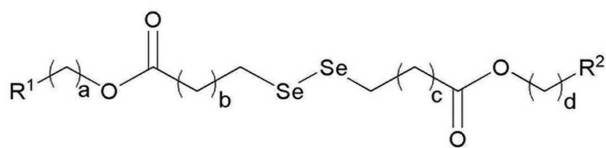
암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀

본 발명은 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체;

디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제; 및

근적외선 염료(NIR dye);를 포함하고,

- [0089] 상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,
- [0090] 상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드리드), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이도프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바이닐벤젠), 폴리(γ -아자이도-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,
- [0091] 여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,
- [0092] 상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,
- [0093] 여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 말레이미딜(maleimidyl)이고,
- [0094] 상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl)이고,
- [0095] 상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 아지도(azido)이고,
- [0096] 상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 알카이닐(alkynyl)이고,
- [0097] 상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R^1 및 R^2 에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,
- [0098] 상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,
- [0099] 근적외선에 반응하여 가교제의 디셀레나이드 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는,
- [0100] 암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀을 제공한다:
- [0101] [화학식 1]

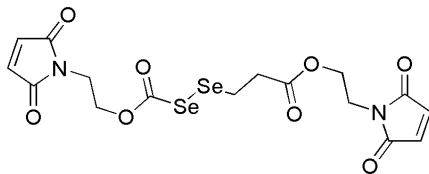


- [0102]
- [0103] (상기 화학식 1에서,
- [0104] a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;
- [0105] R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다).
- [0107] 본 발명의 일실시예에 있어서, 마이셀은 친수성 셀; 및 소수성 코어;로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0108] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교 마이셀은 가교 마이셀 내에 약물을 도입할 수 있고,
- [0109] 상기 약물은 프레드니솔론 21-아세이트(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(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크

리스틴(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), 셀레코시브(celecoxib), 발데코시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 독소루비신(doxorubicin)일 수 있다.

[0111] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다:

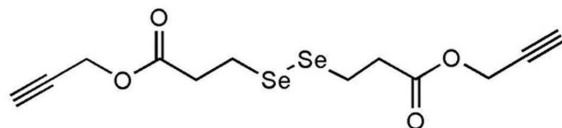
[0112] [화학식 2]



[0113]

[0115] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가교제는 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0116] [화학식 3]



[0117]

[0119] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 공중합체는, 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트); 또는 아지도(azido) 작용기가 도입된 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트);일 수 있으며, 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트); 또는 아지도(azido) 작용기가 도입된 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트);일 수 있다.

[0121] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 근적외선 염료는, 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있고, 바람직하게는 인도시아닌 그린일 수 있다.

[0123] **가교 마이셀의 제조방법**

[0124] 본 발명은 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체, 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제, 및 근적외선 염료(NIR dye)를 용매에 첨가하고 교반하는 단계(단계 1); 및

[0125] 상기 단계 1에서 준비한 혼합액을 50-80℃에서 8-16시간 반응시켜, 마이셀 코어의 가교결합을 유도하는 단계(단계 2);를 포함하고,

[0126] 상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

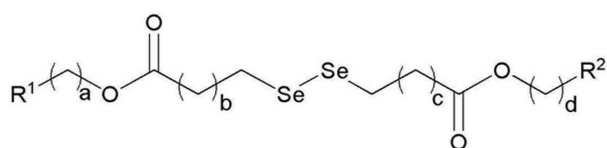
[0127] 상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드ريد), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이도프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바인일벤젠), 폴리(γ -아자이도-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,

[0128] 여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidy), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,

[0129] 상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,

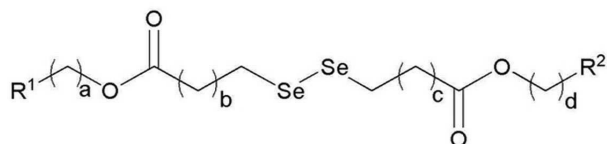
[0130] 여기서,

- [0131] 상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 말레이미딜(maleimidy)이고,
- [0132] 상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidy) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl)이고,
- [0133] 상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 아지도(azido)이고,
- [0134] 상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 알카이닐(alkynyl)이고,
- [0135] 상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R^1 및 R^2 에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,
- [0136] 상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,
- [0137] 근적외선에 반응하여 가교제의 디셀레나이드 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는,
- [0138] 암세포 표적기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법을 제공한다:
- [0139] [화학식 1]



- [0140]
- [0141] (상기 화학식 1에서,
- [0142] a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;
- [0143] R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidy), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다).
- [0145] **암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체**
- [0146] 본 발명은 상기 가교 마이셀; 및 상기 가교 마이셀 내에 도입된 약물을 포함하고,
- [0147] 상기 약물은 프레드니솔론 21-아세이트(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(anastrozole), 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), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체를 제공한다.
- [0149] **암세포 표적기능을 갖는 약물전달체의 제조방법**
- [0150] 본 발명은 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 공중합체, 디셀레나이드 결합을 포함하는 가교제, 근적외선 염료(NIR dye), 및 약물을 용매에 첨가하고 교반하는 단계(단계 1); 및
- [0151] 상기 단계 1에서 준비한 혼합액을 50-80℃에서 8-16시간 반응시켜, 마이셀 코어의 가교결합을 유도하는 단계(단계 2);를 포함하고,

- [0152] 상기 공중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,
- [0153] 상기 공중합체의 소수성 부분은 폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트), 폴리(스티렌-*alt*-말레익 안히드리드), 폴리(α -프로파길 카복실레이트- ϵ -카프롤락톤), 폴리(α -프로파길- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤-co- ϵ -카프롤락톤), 폴리(아자이도 ϵ -카프롤락톤), 폴리(γ -프로파길-글루타메이트), 폴리(5-(4-(프로프-2-아인-1-일옥시)벤질)-1,3-다이옥소란-2,4-다이온(티로신(알카인일)-OCA), 폴리(N-(프로프-2-아인-1-일)아크릴아미드), 폴리(N-(3-아자이도프로필)아크릴아미드), 폴리(1-에타인일-4-바이닐벤젠), 폴리(γ -아자이도-프로필-L-글루타메이트) 및 폴리(프로파길 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이고,
- [0154] 여기서, 상기 공중합체의 소수성 부분에는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidy), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido) 작용기를 추가로 도입한 것을 특징으로 하고,
- [0155] 상기 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고,
- [0156] 여기서,
- [0157] 상기 공중합체의 소수성 부분에 퓨라닐(furanyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 말레이미딜(maleimidy)이고,
- [0158] 상기 공중합체의 소수성 부분에 말레이미딜(maleimidy) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl)이고,
- [0159] 상기 공중합체의 소수성 부분에 알카이닐(alkynyl) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 아지도(azido)이고,
- [0160] 상기 공중합체의 소수성 부분에 아지도(azido) 작용기가 도입된 경우 상기 가교제의 R^1 및 R^2 는 알카이닐(alkynyl)이고,
- [0161] 상기 공중합체의 소수성 부분에 치환된 작용기와 상기 가교제의 R^1 및 R^2 에 치환된 작용기가 상호 클릭반응으로 결합되어 가교를 형성하는 것을 특징으로 하고,
- [0162] 상기 약물은 프레드니솔론 21-아세이트(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(anastrozole), 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), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,
- [0163] 상기 근적외선 염료는 인도시아닌 그린(ICG), 메틸렌 블루(MB), IRDye 800 CW, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, protoporphyrin IX, IR-780, IR-783, IR-808 및 MHI-148로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하고,
- [0164] 근적외선에 반응하여 가교제의 디셀레나이드 결합이 분해되는 것을 특징으로 하는,
- [0165] 암세포 표적기능을 갖는 약물전달체의 제조방법을 제공한다:
- [0166] [화학식 1]



[0167]

[0168] (상기 화학식 1에서,

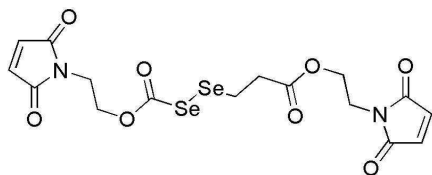
[0169] a, b, c 및 d는 각각 1-10의 정수이고;

[0170] R^1 및 R^2 는 퓨라닐(furanyl), 말레이미딜(maleimidyl), 알카이닐(alkynyl), 또는 아지도(azido)이다.

[0172] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 양친매성 공중합체는 RAFT(Reversible Addition Fragmentation chain Transfer) 중합반응 또는 ATRP(Atom transfer radical polymerization) 분자 조절 중합반응을 통하여 제조하는 것일 수 있다.

[0173] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 가교제는 하기 화학식 2으로 표시되는 화합물인 것일 수 있다:

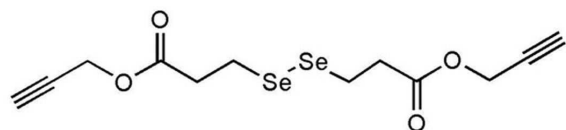
[0174] [화학식 2]



[0175]

[0177] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 가교제는 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물인 것일 수 있다:

[0178] [화학식 3]



[0179]

[0181] 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.

[0183] 제조예 1. PEO-b-PFMA 블록 공중합체의 합성

[0184] PEO-b-PFMA(폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(푸르푸릴 메타아크릴레이트))는 PEO-Br 매크로 개시제(macro initiator)를 사용하여 FMA(푸르푸릴 메타아크릴레이트)의 SET-LRP에 의해 제조되었다(도 1 우측 상단). PEO-b-PFMA 합성의 전형적인 절차에서, [단량체] : [매크로 개시제] : [구리 와이어] : [Me₆TREN]에 대해 반응물의 비율은 30 : 1 : 8 : 0.36 (몰 당량). FMA (1.881g, 11.320mmol), PEO-Br (2g, 0.377mmol), 구리 와이어 (12.5cm, d = 0.5mm, 0.205g), Me₆TREN(0.0312g, 0.1258mmol) 및 DMF를 둥근 바닥 플라스크에 넣었다. 용액을 N₂로 퍼징하고, 반응을 실온에서 18시간 동안 진행시켰다. 생성된 혼합물을 디클로로메탄에 희석하여 중성 알루미늄 나 칼럼을 통과시켜 용액으로부터 구리를 제거하였다. 생성물을 회전 증발기상에서 농축시키고 차가운 디에틸에테르로 침전시켰다. 최종 생성물을 수집하고 진공하에 실온에서 건조시켰다 (2.91 g, 수율 75 %). 상기 PEO-b-PFMA 블록 공중합체의 GPC 분석 결과를 도 3에 나타내었다.

[0186] 제조예 2. PEO-b-PGMA 블록 공중합체의 합성

[0187] PEO-b-PGMA(폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트))의 블록 공중합체를 PEO-Br 매크로 개시제(macro initiator)를 사용한 ATRP를 통해 합성하였다(도 2 우측 상단). 일반적인 과정은, PEO-Br(0.25 g, 0.11 mmol), GMA(0.711 g, 5 mmol), AIBN(0.008 g, 0.05 mmol) 및 DMF(3 mL)을 둥근 플라스크에 넣은 뒤, 30분간 질소치환하고 75℃의 오일 bath에서 7시간 동안 교반하였다. 이후, 생성물을 THF에 용해시키고, 과량의 에틸에테르(ethyl ether)에 침전시켜 정제하였다. 고분자를 40℃ 진공 오븐에서 12 시간 동안 건조시켰다(수율: 90%).

[0189] 제조예 3. PEO-b-PGMA-N₃ 블록 공중합체의 합성

[0190] PEO-b-PGMA의 PGMA 세그먼트(segments)의 에폭사이드 개환반응(epoxide ring-opening reaction)을 통하여 PEO-b-PGMA-N₃(폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트)-N₃)의 블록 공중합체를 제조하였다(도 2 우측 상단). PEO-b-PGMA(0.40g, 에폭사이드 잔기(epoxide moieties)의 1.4mmol), NaN₃(0.406g, 6.3mmol), NH₄Cl(0.334g, 6.3mmol) 및 DMF(5mL)의 혼합물을 둥근 플라스크에 50℃에서 24시간 동안 교반하였다. 필터를 통

해 불용성 염을 제거시킨 후, 여과액을 24시간 동안 증류수에 투석(MW cutoff, 1kDa)하였다. 증류수는 약 4시간마다 교체하였다. 최종 생성물은 동결-건조(freeze-drying)하여 수득하였다(0.39g, 97%). 상기 PEO-b-PGMA-N₃ 블록 공중합체의 GPC 분석 결과를 도 4에 나타내었다.

[0192] **제조예 4. 디셀레나이드 작용기를 포함하는 가교제의 합성**

[0193] **<4-1> 3,3'-디 셀란 디일 디 프로피온산(DSeDPA)의 합성**

[0194] 질소 분위기하의 플라스크에 20mL의 탈 이온수와 셀레늄 분말(4.73g, 60mmol)을 넣었다. 그리고 NaBH₄(4.54g, 120mmol)를 탈 이온수 50mL에 녹인 다음 셀레늄 현탁액에 적가하였다. 0℃에서 혼합물이 완전한 용해를 나타내는 무색의 용액이 될 때까지 교반하였다. 30분 후에 또 다른 양의 셀레늄(4.73g, 60mmol)을 용액에 첨가하였다. 갈색 용액이 형성될 때까지 상기 혼합물을 30분 동안 105℃까지 가열하였다. 3-브로모 프로피온산(18.36g, 120mmol)을 30mL의 탈 이온수에 용해시키고, 탄산나트륨으로 pH를 8로 조정된 다음, 상기 갈색 용액에 첨가하고, 혼합물을 질소 대기하에 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 이어서, 혼합물을 여과하고 얻어진 황색 여과물을 1M HCl 용액으로 산성화시키고, 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 추출물은 에틸 아세테이트에서 2회 재결정하여 얻어진 황색 분말을 건조시켜 11.3g의 DSeDPA(62% 수율)를 수득하였다.

[0196] **<4-2> 디셀레나이드 함유 디말레이미드 가교제의 합성**

[0197] 디셀레나이드결합을 포함하는 디말레이미드 가교제를 합성하기 위해서, 먼저 히드록시 에틸 말레이미드(HEMI, 5g, 0.035mol), DCC(8.04g, 0.039mol) 및 DMAP (47.61mg, 0.0039mol)을 10mL의 무수 디클로로메탄에 용해시키고, 30분 동안 0℃로 냉각시켰다. 그 후, 5mL의 디클로로메탄에 녹인 상기 제조예 2의 DSeDPA(5.17g, 0.017mol)을 용액에 적가하고, 혼합물을 0℃에서 30분 동안 더 교반하였다(도 1 좌측 상단). 이어서, 반응물을 실온으로 방치하고, 24시간 동안 추가로 교반하였다. 부산물을 여과해 내고 생성물 용액을 농축시켰다. 생성물을 실리카 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 최종적으로 분리시켜 디셀레나이드 함유 디말레이미드 가교제를 2.52g (75% 수율) 수득하였다. 상기 합성된 디셀레나이드 결합을 포함하는 디말레이미드 가교제의 ¹H-NMR와 ¹³C-NMR 스펙트럼을 도 5에 나타내었다.

[0199] **<4-3> 디프로파길 3,3-디셀레늄디프로피오네이트(디셀레나이드함유 디프로파길 가교제)의 합성**

[0200] 디셀레나이드결합을 포함하는 가교제인 디프로파길 3,3-디셀레늄디프로피오네이트를 제조하기 위해서 프로파길 알코올(propagyl alcohol, 1.11g, 20mmol), DCC(4.13g, 20mmol) 및 DMAP(0.24mg, 2mmol)을 THF 10 mL에 용해시키고 icebath에서 30분 동안 냉각시켰다. 5mL THF에 상기 실시예 1-2의 DSeDPA(3.05 g, 10 mmol)을 녹여 상기 혼합물에 적가한 후 icebath에서 30분 동안 교반하였다(도 2 좌측 상단). 이어서, 반응물을 실온으로 방치하고, 24시간 동안 추가로 교반하였다. 침전된 백색 부산물을 여과하고 생성물을 농축시켜 디클로로메탄에 용해시켰다. 생성물 용액을 물로 세척하고, MgSO₄로 건조시킨 후, 회전 증발기에서 농축시켰다. 생성물은 실리카 플래시 컬럼 크로마토그래피 (ethyl acetate:hexane = 1:1)로 분리하여 디프로파길 3,3-디셀레늄디프로피오네이트 2.60g(68.5 % 수율)을 수득하였다. 상기 합성된 디프로파길 3,3-디셀레늄디프로피오네이트의 ¹H-NMR와 ¹³C-NMR 스펙트럼을 도 6에 나타내었다.

[0202] **제조예 5. 디엘스 알더 클릭 반응에 의한 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀 제조**

[0203] 도 1에 디셀레나이드 함유 디말레이미드 가교제(Ester Diselenide-containing Crosslinker), PEO-b-PFMA 및 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀(CCL PEO-b-PFMA)의 제조에 사용된 합성 경로를 나타내었다.

[0204] 디엘스 알더 클릭 반응(Diels-Alder reaction)에 의한 PEO-b-PFMA의 가교 결합 반응은 아세트니트릴 1mL에 PEO-b-PFMA 블록 공중합체(50mg, 푸르푸릴 잔기 0.013mmol)와 디셀레나이드 함유 디말레이미드 가교제(38.5 mg, 0.07 mmol)를 용해시킨 후 격렬히 교반하면서 여분의 물을 상기 용액에 1시간 동안 적가 하였다. 이어서, 용액을 6시간 동안 60℃로 가열하여 마이셀 코어의 가교 결합을 유도하였다(도 1 하단).

[0206] **제조예 6. 알카인-아자이드 클릭 반응에 의한 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀 제조**

[0207] 도 2에 디프로파길 3,3-디셀레늄디프로피오네이트 가교제, PEO-b-PGMA-N₃ 및 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀의 제조에 사용된 합성 경로를 나타내었다.

[0208] 알카인-아자이드 클릭 반응(Alkyne-Azide Click reaction)에 의한 PEO-b-PGMA-N₃의 가교 결합 반응은 아세트니

트릴 5mL에 공중합체(50mg, 아자이드 잔기 0.013mmol)와 디프로파길 3,3-디셀레늄디프로피오네이트 가교제 (26.6mg, 0.07mmol)를 용해시킨 후 격렬히 교반하면서 50mL의 물을 상기 용액에 24시간 동안 적가 하였다. 이어서, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.5mg, 10 μmol) 와 소듐아스코베이트(Sodium ascorbate, 2.0mg, 10 μmol)수용액을 첨가한 후 상온에서 24시간 동안 교반하여 마이셀 코어의 가교 결합을 유도하였다(도 2 하단).

실시예 1. 공중합체, 가교제, 인도시아닌 그린 및 독소루비신(약물)을 포함하는 가교 마이셀의 제조

<1-1> PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀 내부에 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)과 독소루비신(DOX)의 담지

DOX.HCl에서 아미노 그룹의 탈 중성화를 위하여, 1:3 몰 비율을 갖는 DOX.HCl과 트리 에틸아민(TEA)을 DMF에 용해시킨 후, DOX 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. ICG를 1mg/mL의 농도로 인산 완충액(pH 7.4)에 용해시켰다. DOX와 ICG를 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀에 캡슐화하기 위해 PEO-b-PFMA(20mg), 디셀레나이드 가교제(2mg, 3.8×10^{-3} mmol), DOX(350 μL 용액, 3.5mg) 및 ICG(100 μL 용액, 0.18mg)를 2mL의 아세트니트릴에 균일하게 용해시켰다. 상기 용액에 1시간 동안 격렬하게 교반하면서 PBS(pH 7.4, 5.0mL, 10mM)를 적가하였다. 이어서, 용액을 60℃에서 12시간 동안 가열하여 마이셀 코어의 가교 결합을 유도하였다. CCL 용액을 투석막(MW 컷오프, 3 kDa)으로 옮기고 증류수 1L에 대해 투석하였다. 증류수는 2시간마다 24시간 동안 치환하였다. 그런 다음 CCL 나노 입자를 2500 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 담지되지 않은 DOX와 ICG를 제거하여 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀 내부에 DOX와 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-1, CCL/ICG/DOX)을 제조하였다.

<1-2> PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀 내부에 ICG와 DOX의 담지

DOX.HCl에서 아미노 그룹의 탈 중성화를 위하여, 1:3 몰 비율을 갖는 DOX.HCl과 트리 에틸아민(TEA)을 DMF에 용해시킨 후, DOX 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. ICG를 1mg/mL의 농도로 인산 완충액(pH 7.4)에 용해시켰다. DOX와 ICG를 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀에 캡슐화하기 위해 PEO-b-PGMA-N₃(20mg), 디셀레나이드 가교제(5mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1mg)와 소듐아스코베이트(0.8mg), DOX(350 μL 용액, 3.5mg) 및 ICG(100 μL 용액, 0.18mg)를 2mL의 아세트니트릴에 균일하게 용해시켰다. 상기 용액에 1시간 동안 격렬하게 교반하면서 PBS(pH 7.4, 5.0mL, 10mM)를 적가하였다. 이어서, 용액을 60℃에서 12시간 동안 가열하여 마이셀 코어의 가교 결합을 유도하였다. CCL 용액을 투석막(MW 컷오프, 3 kDa)으로 옮기고 증류수 1L에 대해 투석하였다. 증류수는 2시간마다 24시간 동안 치환하였다. 그런 다음 CCL 나노 입자를 2500rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 담지되지 않은 DOX와 ICG를 제거하여 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀 내부에 DOX와 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 1-2)을 제조하였다.

실시예 2. 공중합체, 가교제 및 인도시아닌 그린을 포함하는 가교 마이셀의 제조

<2-1> PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀 내부에 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG) 담지

ICG를 1mg/mL의 농도로 인산 완충액(pH 7.4)에 용해시켰다. ICG를 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀에 캡슐화하기 위해 PEO-b-PFMA(20mg), 디셀레나이드 가교제(2mg, 3.8×10^{-3} mmol), 및 ICG(100 μL 용액, 0.18mg)를 2mL의 아세트니트릴에 균일하게 용해시켰다. 상기 용액에 1시간 동안 격렬하게 교반하면서 PBS(pH 7.4, 5.0mL, 10mM)를 적가하였다. 이어서, 용액을 60℃에서 12시간 동안 가열하여 마이셀 코어의 가교 결합을 유도하였다. CCL 용액을 투석막(MW 컷오프, 3 kDa)으로 옮기고 증류수 1L에 대해 투석하였다. 증류수는 2시간마다 24시간 동안 치환하였다. 그런 다음 CCL 나노 입자를 2500 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 담지되지 않은 ICG를 제거하여 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀 내부에 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 2-1)을 제조하였다.

<2-2> PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀 내부에 ICG 담지

ICG를 1mg/mL의 농도로 인산 완충액(pH 7.4)에 용해시켰다. ICG를 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀에 캡슐화하기 위해 PEO-b-PGMA-N₃(20mg), 디셀레나이드 가교제(2mg, 3.8×10^{-3} mmol), Cu, 및 ICG(100 μL 용액, 0.18mg)를 2mL의 아세트니트릴에 균일하게 용해시켰다. 상기 용액에 1시간 동안 격렬하게 교반하면서 PBS(pH 7.4, 5.0mL, 10mM)를 적가하였다. 이어서, 용액을 60℃에서 12시간 동안 가열하여 마이셀 코어의 가교 결합을 유도하였다. CCL 용액을 투석막(MW 컷오프, 3 kDa)으로 옮기고 증류수 1L에 대해 투석하였다. 증류수는 2시간마다 24시간 동안 치환하였다. 그런 다음 CCL 나노 입자를 2500 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 담지되지 않은 ICG를 제거하여 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀 내부에 ICG가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 2-2)을 제조하였다.

- [0224] 실시예 3. 공중합체, 가교제 및 독소루비신(약물)을 포함하는 가교 마이셀의 제조
- [0225] <3-1> PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀 내부에 독소루비신(DOX)의 담지
- [0226] DOX.HCl에서 아미노 그룹의 탈 중성화를 위하여, 1:3 몰 비율을 갖는 DOX.HCl과 트리 에틸아민(TEA)을 DMF에 용해시킨 후, DOX 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. DOX를 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀에 캡슐화하기 위해 PEO-b-PFMA(20mg), 디셀레나이드 가교제(2mg, 3.8×10^{-3} mmol) 및 DOX(350 μ L 용액, 3.5mg)를 2mL의 아세트니트릴에 균일하게 용해시켰다. 상기 용액에 1시간 동안 격렬하게 교반하면서 PBS(pH 7.4, 5.0mL, 10mM)를 적가하였다. 이어서, 용액을 60℃에서 12시간 동안 가열하여 마이셀 코어의 가교 결합을 유도하였다. CCL 용액을 투석막(MW 컷 오프, 3 kDa)으로 옮기고 증류수 1L에 대해 투석하였다. 증류수는 2시간마다 24시간 동안 치환하였다. 그런 다음 CCL 나노 입자를 2500 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 담지되지 않은 DOX를 제거하여 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀 내부에 DOX가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 3-1, CCL/DOX)을 제조하였다.
- [0228] <3-2> PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀 내부에 DOX의 담지
- [0229] DOX.HCl에서 아미노 그룹의 탈 중성화를 위하여, 1:3 몰 비율을 갖는 DOX.HCl과 트리 에틸아민(TEA)을 DMF에 용해시킨 후, DOX 용액을 밤새 실온에서 교반하였다. DOX를 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀에 캡슐화하기 위해 PEO-b-PGMA-N₃(20mg), 디셀레나이드 가교제(5mg), CuSO₄ · 5H₂O(1mg)와 소듐아스코베이트(0.8mg) 및 DOX(350 μ L 용액, 3.5mg)를 2mL의 아세트니트릴에 균일하게 용해시켰다. 상기 용액에 1시간 동안 격렬하게 교반하면서 PBS(pH 7.4, 5.0mL, 10mM)를 적가하였다. 이어서, 용액을 60℃에서 12시간 동안 가열하여 마이셀 코어의 가교 결합을 유도하였다. CCL 용액을 투석막(MW 컷 오프, 3 kDa)으로 옮기고 증류수 1L에 대해 투석하였다. 증류수는 2시간마다 24시간 동안 치환하였다. 그런 다음 CCL 나노 입자를 2500rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 담지되지 않은 DOX를 제거하여 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀 내부에 DOX가 담지된 코어가 가교된 마이셀(실시예 3-2)을 제조하였다.
- [0231] 실험예 1. 디엘스 알더 클릭 반응에 의한 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀(제조예 5)의 분석 및 특성
- [0232] 도 7에 PEO-b-PFMA(제조예 1) 및 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀(제조예 5)의 ¹H-NMR을 나타내었다. PEO-b-PFMA 공중합체(제조예 1)의 스펙트럼(도 7 (a))에서 PEO의 메틸렌 그룹의 양성자는 3.55 ppm으로 나타나고 PFMA의 푸르푸릴 메틸렌 양성자는 4.92 ppm에서 나타났다. 그러나 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀(제조예 5)의 스펙트럼(도 7 (b))에서는 친수성 셀 영역인 PEO의 메틸렌 그룹의 양성자만 나타났다.
- [0233] DLS 분석으로부터 PEO-b-PFMA 마이셀과 PEO-b-PFMA CCL 마이셀의 수력학적 직경을 비교하였다. 도 8 (a)에 도시된 바와 같이, PEO-b-PFMA 마이셀의 직경은 112 nm이나 코어가교된 PEO-b-PFMA CCL 마이셀의 직경은 약 91nm이었다. 이것은 가교 결합으로 인한 핵심 부분의 수축에 기인한 것이다. CCL 마이셀의 형태는 TEM에 의해 관찰되었으며(도 8 (b)), 구형 모양으로 크기는 DLS 결과와 잘 일치하는 100 nm의 평균 크기로 나타났다.
- [0235] 실험예 2. 알카인-아자이드 클릭 반응에 의한 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀(제조예 6)의 분석 및 특성
- [0236] 도 8에 PEO-b-PGMA-N₃(제조예 3) 및 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀(제조예 6)의 ¹H-NMR을 나타내었다. PEO-b-PGMA-N₃ 공중합체(제조예 3)의 스펙트럼(도 9 (a))에서 PEO의 메틸렌 그룹의 양성자는 3.55 ppm으로 나타나고 PGMA-N₃의 메틸 양성자는 0.7 - 1.0 ppm에서 나타났다. 그러나 PEO-b-PGMA-N₃의 CCL 마이셀(제조예 6)의 스펙트럼(도 9 (b))에서는 친수성 셀 영역인 PEO의 메틸렌 그룹의 양성자만 나타났다.
- [0238] 실험예 3. PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀의 ICG 및 DOX 담지 효율 분석
- [0239] 상기 실시예 1-1, 실시예 2-1 및 실시예 3-1의 PEO-b-PFMA의 CCL 마이셀(CCL/ICG/DOX, CCL/ICG 및 CCL/DOX)에 담지된 ICG 및/또는 DOX를 UV-vis 분광 광도계로 분석하여, 도 10에 나타내었다. 마이셀 내의 담지된 DOX와 ICG의 질량은 485nm 및 780nm에서의 표준 검량선을 갖는 자외선-가시광 분광법을 사용하여 결정하였다. 약물담재량(DLC) 및 약물담재율(DLE)은 각각 다음 식에 의하여 계산하였고, PEO-b-PFMA CCL 마이셀에 대한 ICG와 DOX의 담재 성질을 하기 표 1에 나타내었다.
- [0240]
$$DLC (\%) = (\text{나노 입자에 담지된 약물의 중량} / \text{약물이 담지된 나노 입자의 총 중량}) \times 100$$
 및
- [0241]
$$DLE (\%) = (\text{나노 입자에 담지된 약물의 중량} / \text{첨가된 약물의 중량}) \times 100.$$

표 1

Samples	DLE of DOX (%)	DLC of DOX(%)	DLE of ICG (%)	DLC of ICG (%)
CCL/DOX	62.38	9.92	-	-
CCL/ICG	-	-	50.91	0.41
CCL/ICG/DOX	76.11	11.83	60.56	0.48

[0242] 도 10에 도시된 바와 같이, DOX 및 ICG의 특성 흡수 피크는 각각 490nm 및 780nm에서 나타났다. DOX가 CCL에 탑재되었을 때(CCL/DOX), 490nm에서 505nm로의 적색 변이는 DOX가 CCL 마이셀에 성공적으로 탑재되었음을 나타낸다. 또한, 적색 편이는 780nm에서 803nm로 이동한 CCL/ICG 피크 신호에서도 나타났다. 특히, CCL 마이셀 구조에서 ICG와 DOX의 동시 탑재(CCL/ICG/DOX, 실시예 1-1)는 상기 표 1에 요약된 ICG와 DOX의 개별 탑재(CCL/ICG(실시예 2-1) 또는 CCL/DOX(실시예 3-1))와 비교하여 탑재 용량을 획기적으로 향상시켰다. 예를 들어, 공동 탑재 후에 DOX의 DLE는 14.97% 및 ICG의 DLE는 11.46% 증가했다.

[0246] 실험예 4. 근적외선 조사에 의한 PEO-b-PFMA/ICG/DOX 마이셀의 약물 방출 양상 분석

[0247] 상기 실시예 1-1의 PEO-b-PFMA/ICG/DOX 마이셀(CCL/ICG/DOX)에서 DOX의 in vitro 약물 방출은 투석 방법으로 조사하였다. DOX가 담지된 마이셀(1mg mL^{-1}) 3 mL의 용액을 투석막(MW cutoff, 13 kDa)에 옮기고 15mL의 PBS(0.01 M, pH 7.4) 또는 아세트이트 완충액(0.01 M, pH 5.0)에 대하여 5분간의 근적외선(NIR) 조사(200mW cm^{-2} , 808nm)와 함께 37°C에서 투석을 진행시켰다. 미리 결정된 시간 간격에서 투석액(3 mL)을 빼내어 같은 양의 신선한 완충 용액으로 보정하였다. 약물 방출량은 485nm에서의 UV-Vis 흡광도에 의해 결정되었으며, 이것은 나노 캐리어의 총 DOX에 대한 투석막 외부의 누적 DOX의 백분율로 기술하였다.

[0248] 근적외선을 조사한 CCL/ICG/DOX 마이셀의 크기 변화에 대하여 DLS로 측정된 크기 분포 그래프와 TEM 사진을 도 11과 도 12에 각각 도시하였다.

[0249] 도 13에는 pH 5 및 pH 7.4에서 근적외선 조사에 따른 DOX 약물 방출량을 나타내었다. 도 13에 나타나듯이 CCL/ICG/DOX 마이셀(실시예 1-1)은 근적외선 조사(+NIR)에 의하여 DOX의 방출이 크게 증가되었다. 방사선 조사가 없는 경우(-NIR)에는, DOX의 누적 방출량은 초기 적재 값에서 25% 미만이었다. 대조적으로, 근적외선 조사(+NIR)에 의하여 배양 30시간 후 DOX는 pH 5에서 약 65% 방출되었고, pH 7.4에서 약 42% 방출되었다. pH 5에서 더 높은 방출 성능을 보이는 것은 산성 환경에서 DOX의 우수한 용해도 때문이다. 근적외선에 의하여 ICG는 ROS를 생성하고 이것이 마이셀의 코어의 디셀레나이드 결합을 절단하여 내부에 탑재된 DOX 방출을 초래한다. 동일한 조건에서 근적외선 조사가 없으면, CCL 구조의 조밀함과 견고함으로 약물 방출이 억제된다. 이러한 결과는 CCL 마이셀이 혈액 내(7.4에 가까운 pH)에서는 DOX의 방출이 없는 반면, 표적 암세포(pH 5-5.5)에 진입한 후에는 CCL 마이셀로부터 DOX가 방출될 수 있음을 시사한다.

[0251] 실험예 5. 근적외선 조사에 의한 PEO-b-PGMA/ICG/DOX 마이셀의 약물 방출 양상 분석

[0252] 상기 실시예 1-2의 PEO-b-PGMA/ICG/DOX 마이셀(CCL/ICG/DOX)에서 DOX의 in vitro 약물 방출은 투석 방법으로 조사하였다. DOX가 담지된 마이셀(1mg mL^{-1}) 3 mL의 용액을 투석막(MW cutoff, 13 kDa)에 옮기고 15mL의 PBS(0.01 M, pH 7.4) 또는 아세트이트 완충액(0.01 M, pH 5.0)에 대하여 5분간의 근적외선(NIR) 조사(200mW cm^{-2} , 808nm)와 함께 37°C에서 투석을 진행시켰다. 미리 결정된 시간 간격에서 투석액(3 mL)을 빼내어 같은 양의 신선한 완충 용액으로 보정하였다. 약물 방출량은 485nm에서의 UV-Vis 흡광도에 의해 결정되었으며, 이것은 나노 캐리어의 총 DOX에 대한 투석막 외부의 누적 DOX의 백분율로 기술하였다.

[0253] 근적외선을 조사한 CCL/ICG/DOX 마이셀의 크기 변화에 대하여 DLS로 측정된 크기 분포 그래프와 TEM 사진을 도 14과 도 15에 각각 도시하였다.

[0254] 도 16에는 pH 5 및 pH 7.4에서 근적외선 조사에 따른 DOX 약물 방출량을 나타내었다. 도 16에 나타나듯이 CCL/ICG/DOX 마이셀(실시예 1-2)은 근적외선 조사(+NIR)에 의하여 DOX의 방출이 크게 증가되었다. 방사선 조사가 없는 경우(-NIR)에는, DOX의 누적 방출량은 초기 적재 값에서 25% 미만이었다. 대조적으로, 근적외선 조사(+NIR)에 의하여 배양 30시간 후 DOX는 pH 5에서 약 60% 방출되었고, pH 7.4에서 약 40% 방출되었다. pH 5에서 더 높은 방출 성능을 보이는 것은 산성 환경에서 DOX의 우수한 용해도 때문이다. 근적외선에 의하여 ICG는 ROS

를 생성하고 이것이 마이셀의 코어의 디셀레나이드 결합을 절단하여 내부에 탑재된 DOX 방출을 초래한다. 동일한 조건에서 근적외선 조사가 없으면, CCL 구조의 조밀함과 견고함으로 약물 방출이 억제된다. 이러한 결과는 CCL 마이셀이 혈액 내(7.4에 가까운 pH)에서는 DOX의 방출이 없는 반면, 표적 암세포(pH 5-5.5)에 진입한 후에는 CCL 마이셀로부터 DOX가 방출될 수 있음을 시사한다.

[0256] **실험예 6. PEO-b-PFMA/ICG/DOX 마이셀의 세포 독성 분석**

[0257] 일반세포 HEK293(인간 배아 신장)와 암세포 HepG2(인간 간세포 암종)는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC; Manassas, VA, USA)으로부터 제공되었다. 세포를 배양하고 MEM 배지에서 유지시켰다. 배지는 10% FBS 및 1% 항생제(페니실린-스트렙토 마이신)로 보충되었다. 배양세포를 37℃에서 5% CO₂ 가습 분위기로 배양하였다. HEK293에 대한 PEO-b-PFMA CCL 마이셀(제조예 5)의 독성 효과 및 HepG2 세포에 대한 CCL/ICG/DOX 마이셀(실시예 1-1)의 세포 독성 효과를 결정하기 위해 세포 생존능 분석을 수행하였다. HEK293 및 HepG2 세포를 96 웰 플레이트의 각 웰에 1.0×10^4 세포 밀도로 접종하고 37℃에서 24시간 동안 5% CO₂ 가습 분위기에서 배양하였다. 다음으로, 세포를 상이한 농도의 CCL 마이셀(5.0, 10, 50, 100, 150, 250 및 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 및 CCL/ICG/DOX 및 DOX(0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 및 15 $\mu\text{g/mL}^{-1}$)로 처리하였다. 약물 방출을 위해 NIR 레이저(200mW cm^{-2} 의 808 nm NIR)에 5분간 노출시킨 약물담지 가교마이셀(CCL/ICG/DOX)을 HepG2 세포에 처리하였다. 흡광도는 ELISA 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 460nm에서 측정하였다. 세포 독성은 블랭크 대조군에 대한 세포 생존률의 백분율로 나타내었다.

[0258] 도 17 (a)는 CCL 마이셀이 0 내지 100 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 의 농도에서는 24시간 인큐베이션한 후 HEK293 세포에 독성이 없음을 나타낸다. 그리고 150, 250, 500 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 농도에서 91.5, 84.3 및 76.1 %로 약간 감소된 세포 생존능을 보인다. 이 결과는 150 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 농도까지 CCL 마이셀을 약물 전달을 위한 나노 캐리어로 안전하게 사용할 수 있음을 보여주며, 생체 적합성을 가진다. 도 17 (b)는 DOX가 탑재된 CCL 마이셀을 근적외선 조사(5분)한 다음 인간 간세포 암종(HepG2) 세포에 대한 세포 독성 효과를 MTT 분석으로 평가한 그래프이다. 0.1, 0.5, 1, 5, 10 및 15 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 농도의 근적외선 조사가 없는 자유 DOX와 같은 농도의 5분간 근적외선 조사를 행한 CCL/ICG/DOX 마이셀에서 세포 생존은 농도 의존적으로 감소하였다. 대조적으로, 근적외선 조사를 하지 않은 CCL/ICG/DOX 마이셀은 HepG2 세포에 미미한 독성 효과를 나타내었다. 즉, 근적외선이 조사된 CCL/ICG/DOX 마이셀의 경우 0.1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 까지 유의한 세포 사멸은 없지만 1, 5, 10 및 15 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 에서 84.16, 79.14, 67.4 및 62.56%에 사멸률에 도달했다. 반면 NIR 레이저 조사가 없는 CCL/ICG/DOX 마이셀은 5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 농도에서 사멸률이 97.57, 96.6 및 95.08 %로 무시할 수 있는 세포 독성 효과를 나타냈다. 이 결과는 CCL/ICG/DOX 마이셀이 근적외선 조사에 의하여 HepG2 세포에 대한 세포 사멸을 유도함을 보여준다.

[0260] **실험예 7. DAPI 염색법에 의한 PEO-b-PFMA/ICG/DOX 마이셀에 의한 세포 사멸 분석**

[0261] HepG2 세포의 핵 형태는 DAPI 염색법을 사용하여 형광 현미경으로 모니터링하였다. 1.0×10^4 cells mL^{-1} 의 밀도를 가진 HepG2 세포(500 μL)를 coverslip 바닥 접시에 넣고 5% CO₂ 가습 분위기에서 24시간 동안 37℃에서 배양했다. 다음 날, NIR 레이저로 5분간 조사한 상기 실시예 1-1의 CCL/ICG/DOX를 함유한 1mL의 MEM 배지로 세포를 처리하고 37℃와 5% CO₂에서 배양하였다. 인큐베이션 후, 세포를 차가운 PBS로 세척하고, 1mL의 DAPI 용액(메탄올 중 1 $\mu\text{g/mL}$)을 첨가하였다. 플레이트는 빛 노출을 방지하기 위해 알루미늄 호일에 싸서 인큐베이터에서 20분간 배양했다. 마지막으로, 세포를 찬 PBS로 두 번 세척하고 ProLong® Gold Antifade 시약(10 μL)을 사용하여 coverslip에 고정시켰다. 세포의 핵 형태는 Laser Scanning Confocal Microscope(Carl Zeiss LSM700, Jena, Germany)로서 관찰하였다.

[0262] DAPI 염색 후, 자유 DOX 및 CCL/ICG/DOX 마이셀(실시예 1-1)로 처리한 HepG2 세포에서 염색질 응축과 세포 사멸사의 전형적인 특징을 관찰하였다(투여량: 15 $\mu\text{g/mL}^{-1}$). 도 18은 HepG2 세포의 DAPI 염색된 핵을 나타낸다. 자유 DOX 및 DOX 탑재된 CCL 마이셀은 전형적인 세포 사멸사를 유도하였다. 자유 DOX로 처리된 세포는 8시간 및 16시간 동안 배양 후 HepG2 세포에서 강한 DOX 형광을 나타냈다. 한편, 근적외선으로 조사한 CCL/ICG/DOX 마이셀로 처리된 HepG2 세포의 경우에는 핵에서 약간 적은 강도의 DOX 형광을 나타내지만 세포질에서는 높은 강도를 나타냈다. 이것은 약물이 탑재된 마이셀이 내포작용(endocytosis)을 통해 자유 DOX에 비해 천천히 세포에 들어

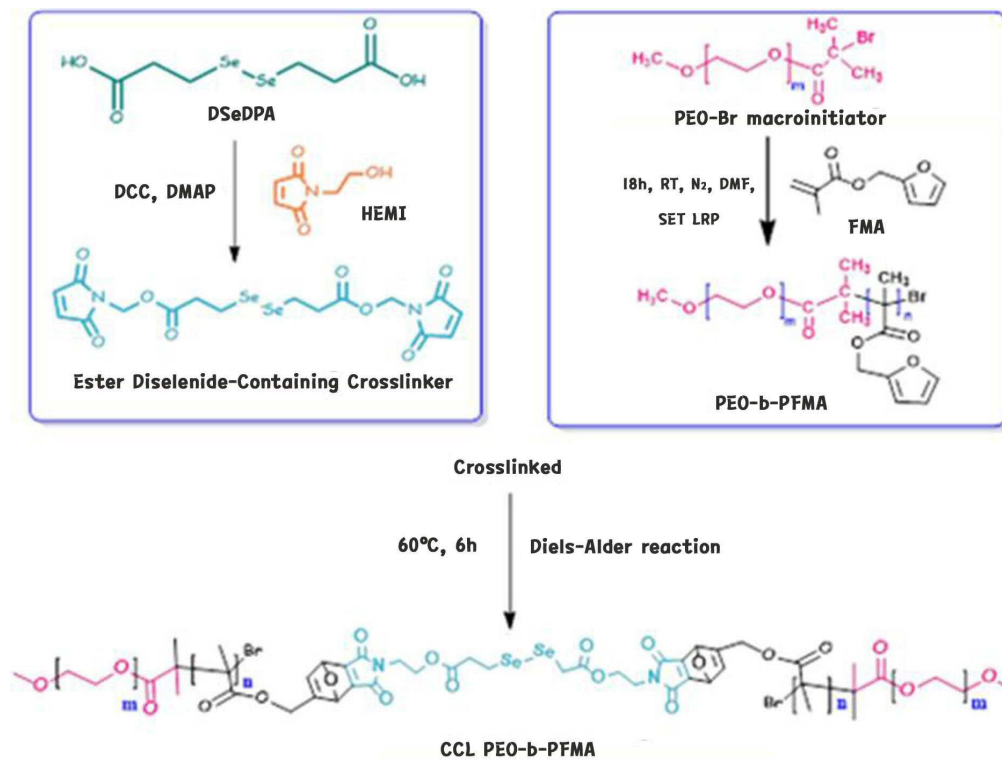
가 코어의 약물이 방출되는 것을 나타낸다. 본 결과는 CCL/ICG/DOX 마이셀이 근적외선 조사에 의하여 DOX를 방출하고 HepG2 세포의 사멸을 야기함을 보여준다.

[0264]

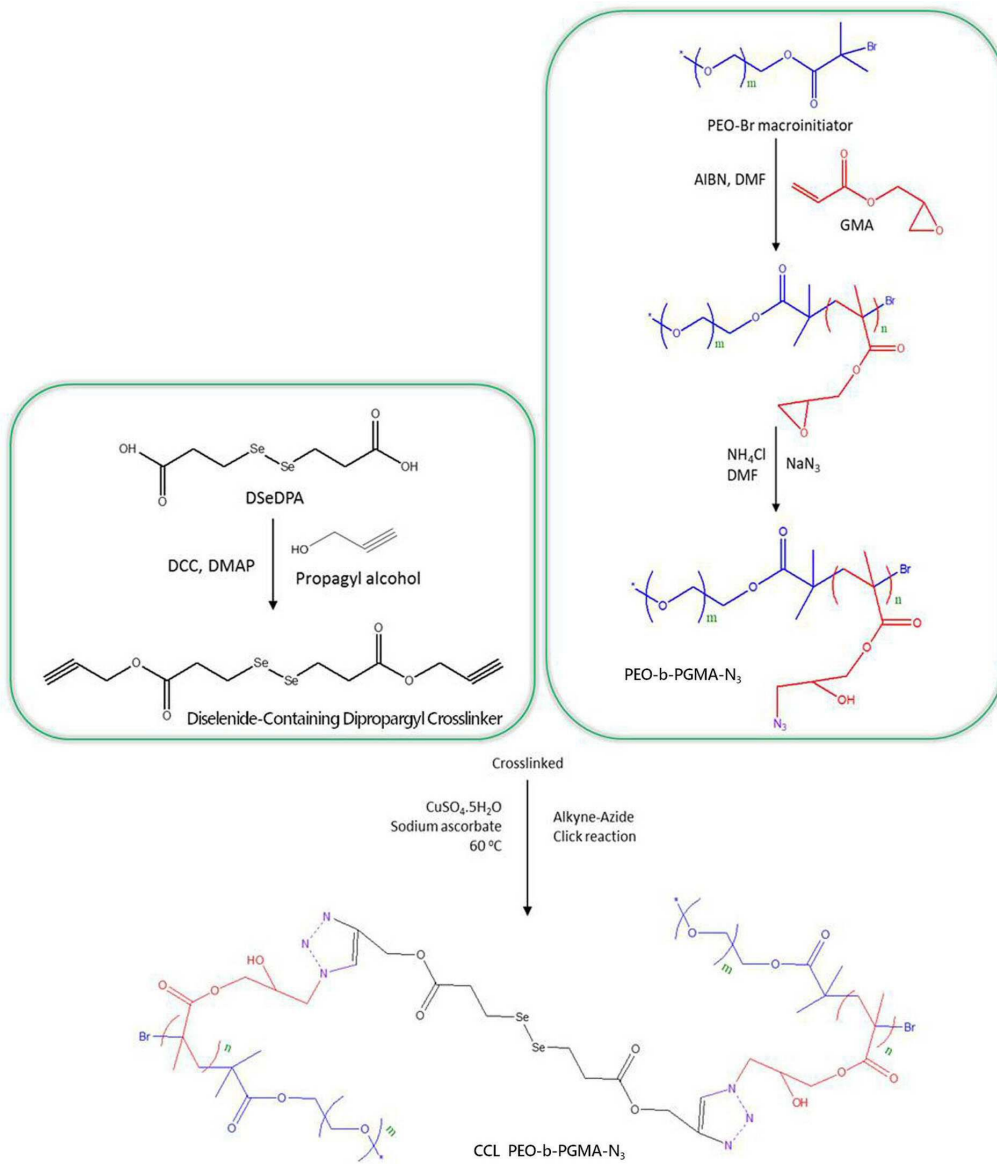
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

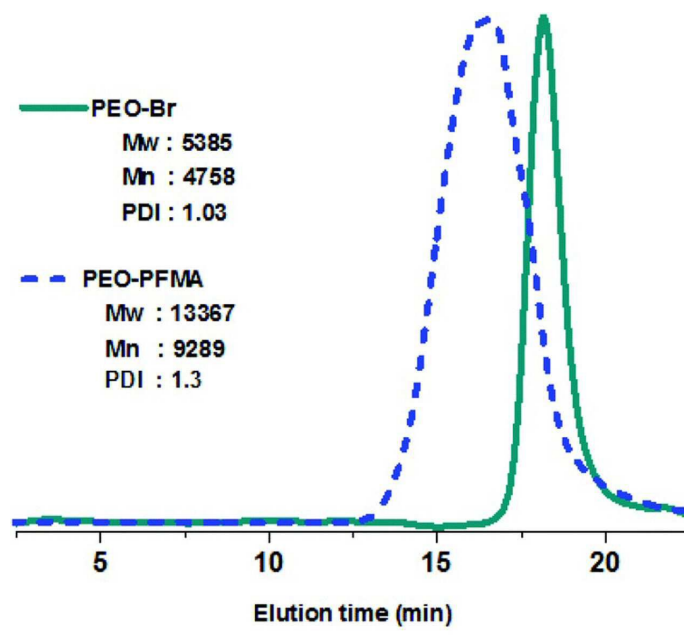
도면1



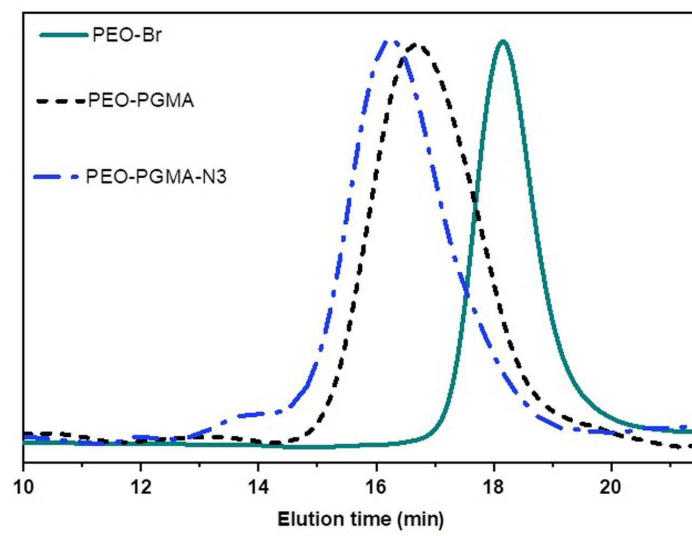
도면2



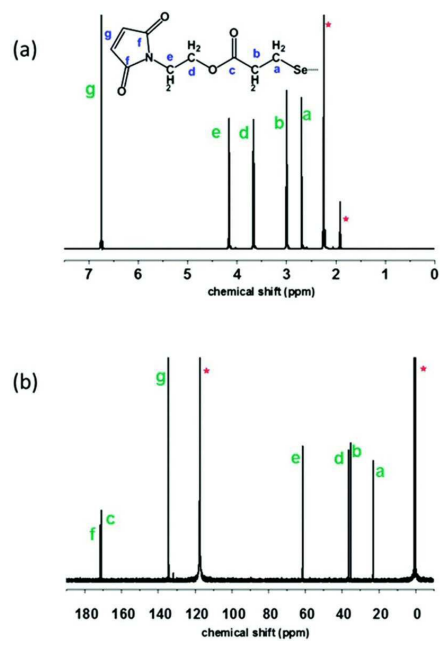
도면3



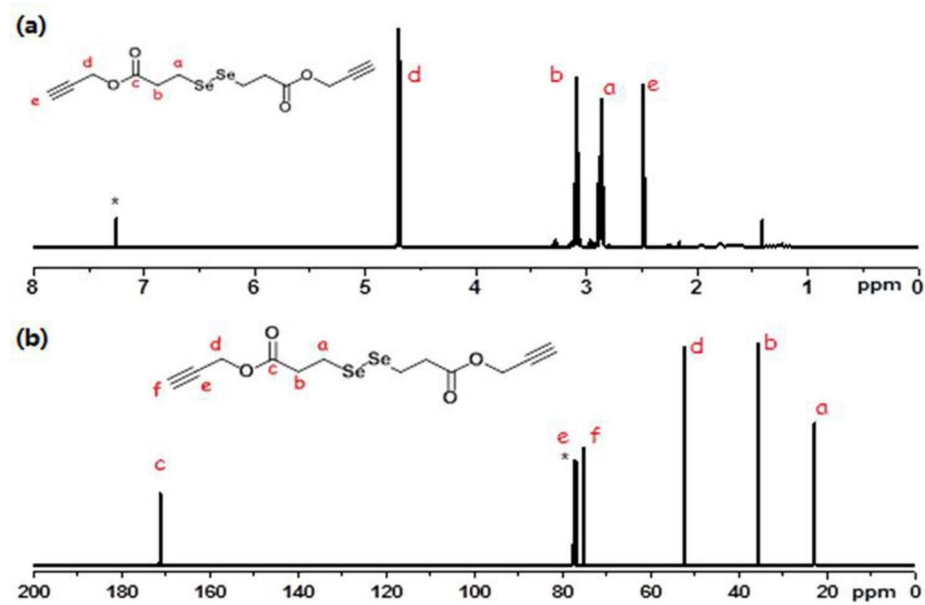
도면4



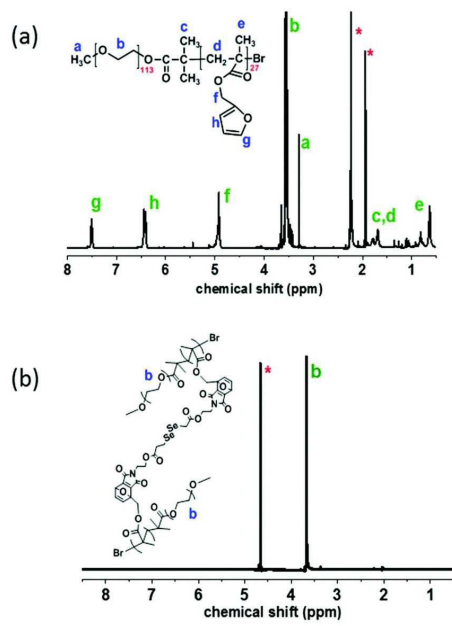
도면5



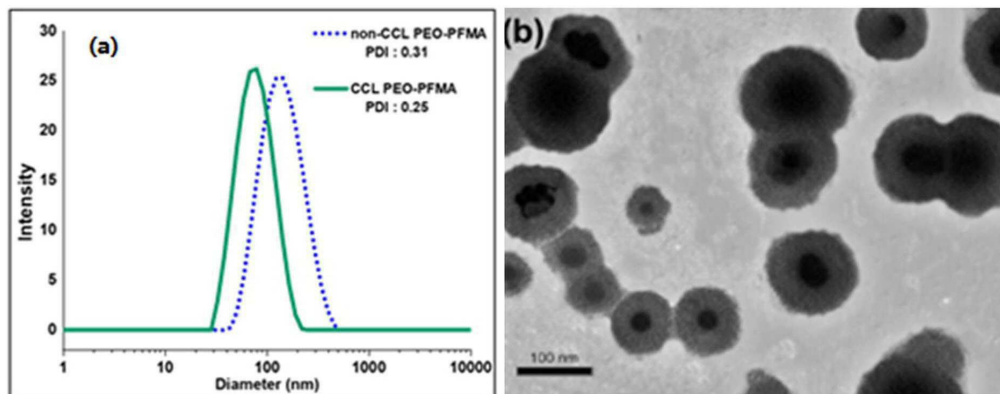
도면6



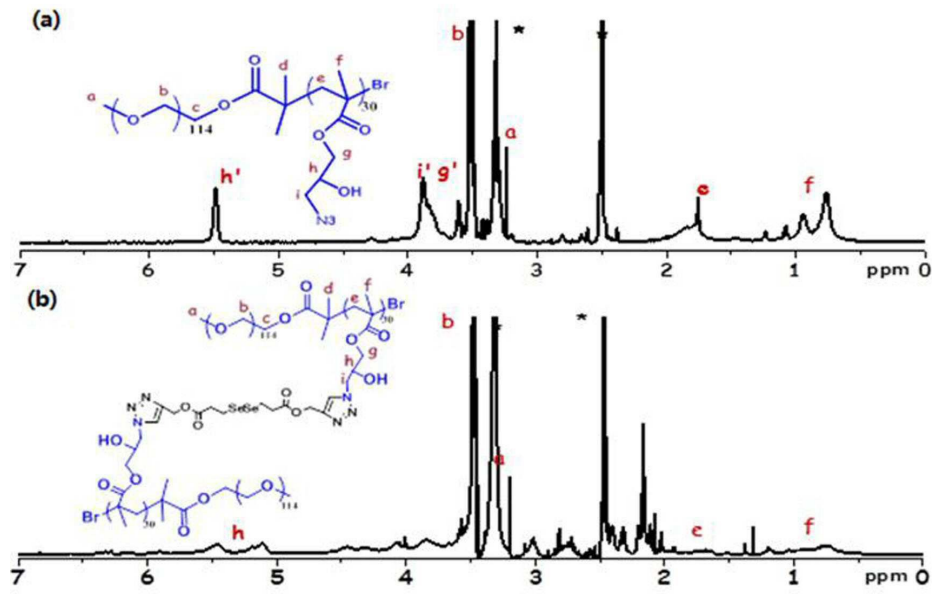
도면7



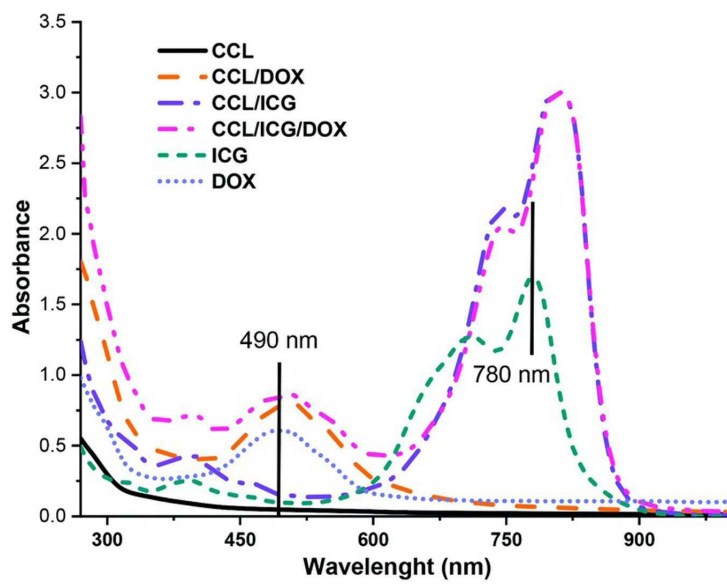
도면8



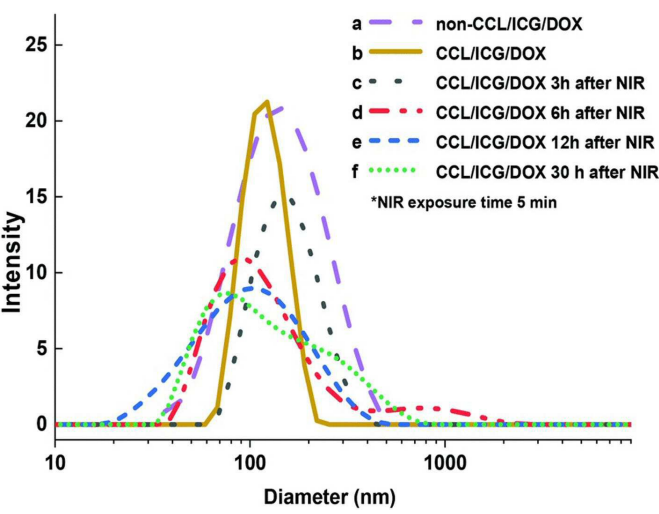
도면9



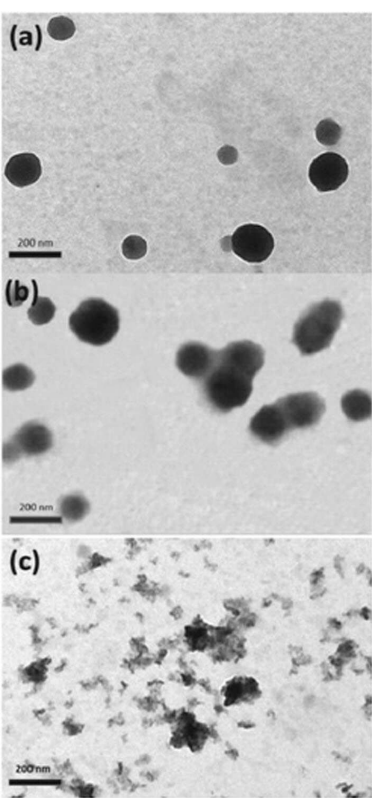
도면10



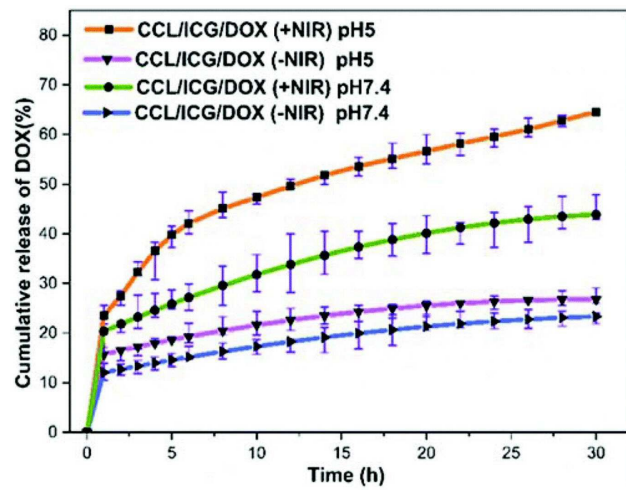
도면11



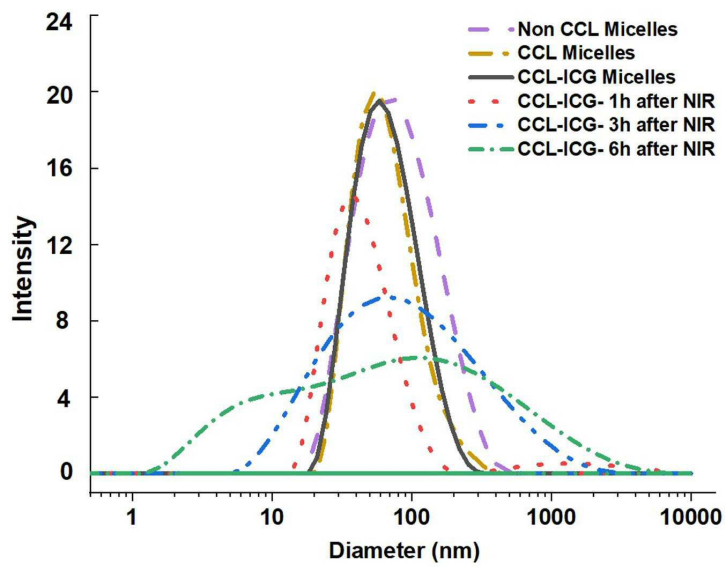
도면12



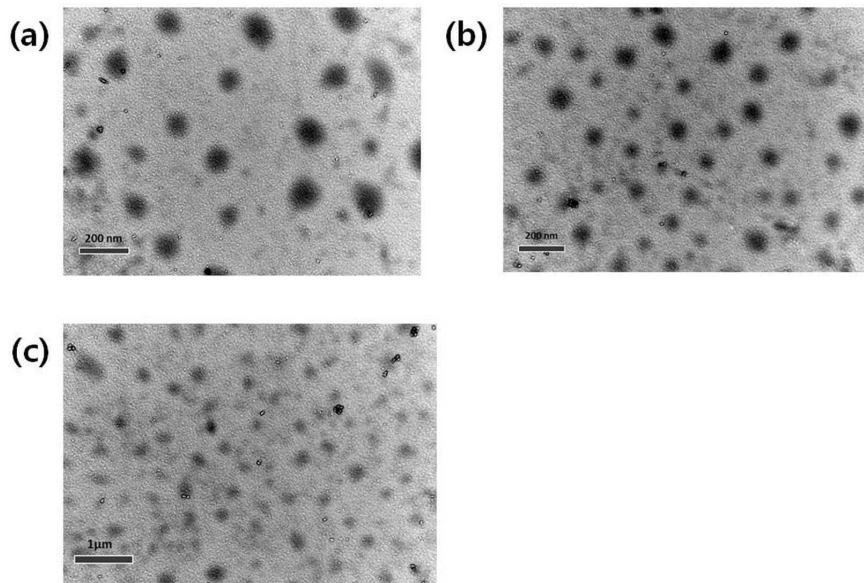
도면13



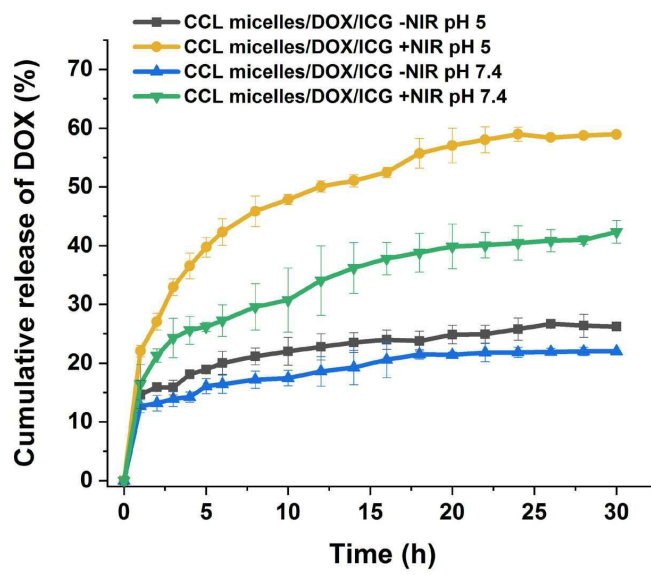
도면14



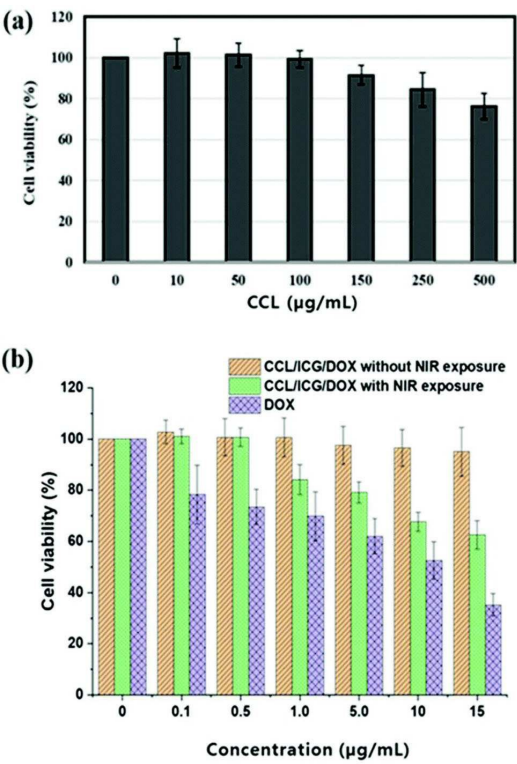
도면15



도면16



도면17



도면18

