

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0043756
(43) 공개일자 2022년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 41/00 (2020.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/22 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5138 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0127526

(22) 출원일자 2020년09월29일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

정봉근

서울특별시 마포구 백범로 35

신하희

서울특별시 마포구 백범로 35

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최우성

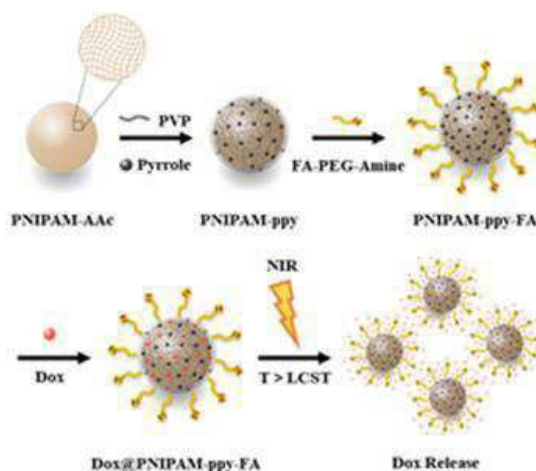
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 암 세포 표적 및 근적외선에 의한 화학-광열 치료가 가능한 온도 감응성 고분자 기반의 나노 복합체 및 그 제조 방법

(57) 요약

암 세포 표적 및 근적외선에 의한 화학-광열 치료가 가능한 온도 감응성 고분자 기반의 나노 복합체 및 그 제조 방법이 개시된다. 해당 나노 복합체는, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 나노 입자 표면에 폴리 피롤이 분산하여 결합된 것이다. 이에 따라 온도와 근적외선 자극을 통해 약물 방출을 용이하게 증폭시키고, 근적외선에 의해 광열 효과로 암 세포 사멸을 효과적으로 유도할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 41/0052 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 9/0004 (2013.01)

A61K 9/0009 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

최형우

서울특별시 마포구 백범로 35

임재현

서울특별시 마포구 백범로 35

김지운

서울특별시 마포구 백범로 35

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110045
과제번호	2019R1A2C2008863
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	다기능성 나노입자 및 3차원 마이크로칩 시스템을 이용한 신경재생 연구
기 여 율	40/100
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2020032015
과제번호	2019M3A9H2032547
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	콩팥 오가노이드 스크리닝을 위한 마이크로 시스템 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345320624
과제번호	2020R1I1A1A01068810
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	퇴행성 신경 질환 조기 진단을 위한 다기능성 나노 복합체 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

화학-광열 치료를 위한 나노 복합체로서,

폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 나노 입자; 및

상기 나노 입자 표면에 분산하여 결합된 폴리피롤;로 이루어지는 나노 입자 구조체를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)는 N-이소프로필아크릴아미드 단량체와 아크릴산의 공중합에 의하여 합성된 나노 복합체인 PNIPAM-AAc인 것을 특징으로 하는 나노 복합체.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 나노 복합체에는 암세포 표적 화합물이 결합된 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 나노 복합체에는 항암제가 담지된 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 암세포 표적 화합물은 염산을 포함하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 6

제 2 항에 있어서,

근적외선(NIR) 조사 시에 흡수한 빛을 열로 방출하여 상기 나노 복합체 PNIPAM-AAc가 LCST 이상으로 도달되는 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 7

제 4 항에 있어서,

상기 항암제는 독소루비신을 포함하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 나노복합체.

청구항 8

화학-광열 치료를 위한 나노 복합체 제조 방법으로서,

N-이소프로필아크릴아미드 단량체와 아크릴산의 공중합에 의하여 폴리(N-이소프로필아크릴아미드(PNIPAM-AAc) 나노입자를 합성하는 단계;

합성된 PNIPAM-AAc에 피롤 단량체로부터 상기 PNIPAM-AAc 나노 입자 표면에 폴리피롤이 분산하여 결합된 나노 구조체(PNIPAM-AAc-ppy)를 합성하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 복합체 제조 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 방법은, 상기 PNIPAM-AAc-ppy에 암세포 표적 물질을 도입하는 단계; 및 암세포 표적 물질이 도입된 상기 PNIPAM-AAc-ppy에 항암제를 봉입하는 단계; 중 하나 이상을 더 포함하는 나노 복합체 제조 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

피롤 단량체는 PNIPAM-AAc에 대하여 부피 기준으로 5 % 초과 내지 20% 미만으로 제공되는 것을 특징으로 하는 나노 복합체 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 명세서는 암 세포 표적 및 근적외선(NIR)에 의한 화학-광열 치료가 가능한 온도 감응성 고분자 기반의 나노 복합체 및 그 제조 방법에 관한 것이다.
- [0002] [이 발명을 지원한 국가연구개발사업 1]
- [0003] [과제고유번호] 2019R1A2C2008863
- [0004] [부처명] 과학기술정보통신부
- [0005] [연구관리 전문기관] 한국연구재단
- [0006] [연구사업명] 중견연구지원사업
- [0007] [연구과제명] 다기능성 나노입자 및 3차원 마이크로칩 시스템을 이용한 신경재생 연구
- [0008] [주관기관] 서강대학교
- [0009] [연구기간] 2020.03.01.-2021.02.28.
- [0010] [기여율] 40%
- [0011] [이 발명을 지원한 국가연구개발사업 2]
- [0012] [과제고유번호] 2019M3A9H2032547
- [0013] [부처명] 과학기술정보통신부
- [0014] [연구관리 전문기관] 한국연구재단
- [0015] [연구사업명] 바이오의료기술개발사업
- [0016] [연구과제명] 콩팥 오가노이드 스크리닝을 위한 마이크로 시스템 개발
- [0017] [주관기관] 서강대학교

- [0018] [연구기간] 2020. 3. 1. - 2020. 12. 31.
- [0019] [기여율] 30%
- [0020] [이 발명을 지원한 국가연구개발사업 3]
- [0021] [과제고유번호] 2020R1I1A1A01068810
- [0022] [부처명] 과학기술정보통신부
- [0023] [연구관리 전문기관] 한국연구재단
- [0024] [연구사업명] 창의도전연구기반지원사업
- [0025] [연구과제명] 퇴행성 신경 질환 조기 진단을 위한 다기능성 나노 복합체 개발
- [0026] [주관기관] 서강대학교
- [0027] [연구기간] 2020. 6. 1. - 2023. 05. 31.
- [0028] [기여율] 30%

배 경 기 술

- [0029] 약물 전달 시스템(Drug Delivery System: DDS)의 목적은 암을 포함하는 질병 치료를 위한 치료 타겟에 약물을 전달하기 위한 것이다. 약물 손실과 부작용 없이 신속하고 정확하게 약물을 전달하기 위하여, 나노 캐리어(nanocarriers)가 주목받고 있다.
- [0030] 나노 캐리어는 생체적합성이 양호하고, 기능화가 용이하며, 세포로의 흡수가 빠르고, 약물 로딩 용량이 크며, 상대적으로 제조가 용이하다. 대부분의 항암제는 소수성을 갖고 있어 물에 녹지 않고 인체 내 투여시 광범위한 독성 및 정상 세포에 영향을 끼쳐 부작용이 발생하기 때문에, 전술한 바와 같이 생체 적합성 등이 탁월한 나노 캐리어를 이용하면 보다 효율적인 약물 전달이 될 수 있지만, 단순히 EPR 효과(Enhanced permeability and retention 효과)에 의한 수동적 전달이라 치료 효능이 제한적이다.
- [0031] 이러한 단점을 극복하기 위해 약물 전달 나노입자에 암 세포 특이적인 항체, 펩타이드, 혹은 저분자 물질을 도입함으로써 암 조직으로 이끌게 하는 능동적 표적 지향화(active targeting) 기술이 각광받고 있다.
- [0032] 그러나, 암 세포에 도달하기 전에 나노입자 내부에서의 약물 유출이 발생하여 광범위한 독성 및 부작용이 발생할 수 있다. 이를 위해 외부 자극(온도, 빛, pH, redox, enzyme, protein등)에 의해서만 약물 방출이 발생하여 약물의 부작용을 줄이고 치료 효과를 높이는 기술이 개발되고 있다.
- [0033] 한편, 약물-광학적 치료가 가능한 표적 지향형 나노입자를 이용하여 암 세포를 치료하는 차세대 약물 전달 시스템이 개발되고 있으나, 약물의 손실을 최소화하고 암 세포에서만 약물 방출을 유도하는 기술 개발이 여전히 필요하다.
- [0034] 관련하여, 온도 감응성 고분자 중 하나인 PNIPAM은 32 ℃의 LCST에 도달하게 되면 탈수 반응이 일어나 입자의 사이즈가 줄어들게 된다. 이러한 특성을 통해 온도 조절로 인한 약물 방출 제어가 가능하지만, LCST가 인체 온도보다 낮아 인체 내 비표적 부위에서의 무분별한 약물 방출을 일으켜 항암치료의 효율을 저하시키고, LCST까지 도달하기 위한 외부 자극이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0035] (특허문헌 0001) 한국특허 제173089호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0036] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 일측면에서, 온도 변화 및 근적외선 조사에 의한 약물방출과 광열치료가

가능한 나노복합체 및 그 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0037] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 다른 일측면에서, 특히 근적외선을 효과적으로 흡수하고 열로 방출하여 LSCT로 쉽게 도달하도록 할 수 있는 구조를 가지는 나노복합체 및 그 제조 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0038] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 화학-광열 치료를 위한 나노 복합체로서, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 나노 입자; 및 상기 나노 입자 표면에 분산하여 결합된 폴리피롤로 이루어지는 나노 입자 구조체를 포함하는 나노 복합체를 제공한다.

[0039] 예시적인 일 구현예에서, 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)는 N-이소프로필아크릴아미드 단량체와 아크릴산의 공중합에 의하여 합성된 것이 바람직하다.

[0040] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체에는 암세포 표적 화합물이 결합된 것이 바람직하다.

[0041] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체에는 항암제가 담지된 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는 또한, 화학-광열 치료를 위한 나노 복합체 제조 방법으로서, N-이소프로필아크릴아미드 단량체와 아크릴산의 공중합에 의하여 폴리(N-이소프로필아크릴아미드(PNIPAM-AAc) 나노입자를 합성하는 단계; 및 합성된 PNIPAM-AAc에 피롤 단량체로부터 상기 PNIPAM-AAc 나노 입자 표면에 폴리피롤이 분산하여 결합된 나노 구조체(PNIPAM-AAc-ppy)를 합성하는 단계;를 포함하는 나노 복합체 제조 방법을 제공한다.

[0043] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은, 상기 PNIPAM-AAc-ppy에 암세포 표적 물질을 도입하는 단계; 및 암세포 표적 물질이 도입된 상기 PNIPAM-AAc-ppy에 항암제를 봉입하는 단계; 중 하나 이상을 더 포함하는 것이 바람직하다.

[0044] 예시적인 일 구현예에서, 상기 피롤 단량체는 PNIPAM-AAc에 대하여 부피 기준으로 5 % 초과 내지 20% 미만으로 제공되는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 예시적인 구현예들의 PNIPAM-AAc-ppy 나노 복합체는 PNIPAM-AAc 나노 입자 표면에 폴리피롤이 분산하여 결합된 구조를 가지는 것으로서 온도와 근적외선 자극을 통해 약물 방출을 용이하게 증폭시키고, 근적외선에 의해 광열 효과로 암 세포 사멸을 효과적으로 유도할 수 있다. 또한 표적 화합물을 도입함으로써 암세포 표적 치료가 가능하다.

[0046] 이러한 본 발명의 예시적인 구현예들의 PNIPAM 기반의 나노복합체는 효과적인 암 질환 치료를 위한 다기능 나노 플랫폼으로서 응용될 수 있으며, 다양한 암 세포의 치료에 폭넓게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 본 발명의 예시적인 일 구현예에서, 온도와 빛에 반응하는 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 합성과정을 도시하는 개략도(도 1a) 및 엽산 수용체(Folate receptor)가 과발현하는 암 세포에서의 화학-광열 치료를 나타내는 개략도(도 1b)이다.

도 2a 및 2b는 본 발명 실시예에서 제조된 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 입자 크기 및 형태 분석 결과이다. 구체적으로, 도 2a는 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 TEM 이미지이고, 도 2b는 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 DLS 분석 결과이다.

도 3a 내지 3c는 본 발명 실시예에서 제조된 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 LCST 및 크기 변화 분석 결과이다. 구체적으로 도 3a는 PNIPAM-AAc, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA의 LCST 분석 결과이다. 도 3b 및 3c는 PNIPAM-AAc, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체의 온도 변화에 따른 평균 직경 분석 결과이다.

도 4a 내지 4c는 본 발명 실시예에서 제조된 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 합성 평가 결과이다. 구체적으로 도 4a는 제타전위 분석 결과이고, 도 4b는 푸리에변환 적외선 분광법에 의한 분석 결과이며, 도 4c는 UV-vis 스펙트럼 분석 결과이다.

도 5a 내지 5e는 본 발명 실시예에서 제조된 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 광열 특성 및 효과이다. 구체적으로, 도 5a는 폴리피롤 유무 및 함량(volume ratio)에 따른 광열 효과 평가이고, 도 5b는 폴리피롤 함량(volume

ratio) 20%인 경우의 광열 효과 데이터를 추가로 표시한 것이다. 도 5c는 폴리피롤 10 %(volume ratio)로 한 경우에 나노 복합체의 농도에 따른 광열 특성 평가 결과이고, 도 5d는 폴리피롤 10 %(volume ratio) 및 0.1mg/ml 인 경우에 나노 복합체의 레이저 세기에 따른 광열 특성 평가이며, 도 5e는 폴리피롤 10 %(volume ratio) 및 0.1mg/ml인 경우에 근적외선 조사 유무에 따른 나노복합체의 광열 재현성 평가 결과이다.

도 6은 본 발명 실시예에서 제조된 나노 복합체의 온도 변화와 레이저 조사에 따른 약물 방출 거동 분석 결과로서, 도 6a는 온도에 따른 나노복합체의 약물 방출 거동 평가, 도 6b는 레이저 조사 유무에 따른 나노복합체의 약물 방출 거동 평가 결과이다.

도 7은 본 발명 실시예에서 다양한 농도에 따른 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 세포 독성 평가 결과이다(A549: Folate receptor negative cells, MDA-MB-231: Folate receptor overexpressed cells).

도 8은 본 발명 실시예에서 제조된 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체의 엽산 수용체(Folate receptor) 표적 능력 평가 결과이다.

구체적으로, PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 A549 세포의 형광 이미지이고, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 A549 세포의 형광 이미지이며, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 MDA-MB-231 세포의 형광 이미지이다.

도 9는 본 발명 실시예에서 제조된 나노 복합체의 분석 결과로서, 도 9a는 레이저 조사 유무에 관계없이 PNIPAM-AAc-ppy-FA 및 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 MDA-MB-231 세포의 생존율 분석 결과이며, 도 9b는 레이저 조사 없이 PNIPAM-AAc-ppy-FA 및 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 A549 세포의 생존율 분석 결과이다.

도 10은 본 발명 실시예에서 MDA-MB-231 세포에서 화학-광열 치료 후 Live(green)/dead(red) 형광 이미지이다. 구체적으로, 대조군의 형광 이미지, PNIPAM-AAc-ppy-FA를 처리한 후 형광 이미지이며, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA를 처리한 후 형광 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

용어 정의

본 명세서에서 나노란 100nm 이하를 의미한다.

본 명세서에서 PNIPAM (또는 폴리나이프)은 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)를 나타낸다.

본 명세서에서 PNIPAM-AAc는 NIPAM 단량체와 아크릴산을 공중합하여 PNIPAM을 합성한 것을 의미한다.

본 명세서에서 PNIPAM-AAc-ppy는 PNIPAM-AAc에 폴리피롤이 결합된 것을 의미한다.

본 명세서에서 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA는 PNIPAM-AAc-ppy에 엽산을 도입한 나노 복합체에 독소루비신이 담지된 것을 의미한다.

예시적인 구현예들의 설명

도 1은 본 발명의 예시적인 구현예들에서, 온도와 빛에 반응하는 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 합성과정을 도시하는 개략도(도 1a) 및 엽산 수용체(Folate receptor)가 과발현하는 암 세포에서의 화학-광열 치료를 나타내는 개략도(도 1b)이다.

도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 인체 내에서 무분별한 약물 방출을 막기 위해 PNIPAM의 합성 공정에 아크릴산을 넣어 PNIPAM-AAc를 제조함으로써 LCST를 상승시키는 한편, 상승된 LCST까지 유도하기 위하여 폴리피롤 나노입자를 결합시키되 PNIPAM-AAc 표면에 폴리피롤 나노 입자가 분산 결합되도록 하였다.

이때 PNIPAM-AAc 표면에 폴리피롤 나노 입자가 분산 결합되도록 하기 위하여, PNIPAM-AAc 나노 입자에 피롤 단량체를 제공하여 표면에서 피롤 단량체가 폴리 피롤로 중합하면서 표면에 균일하게 분산하면서 결합하도록 한다.

이와 같이 PNIPAM-AAc 표면에 분산 결합된 해당 폴리피롤(ppy)에 의하여 근적외선(NIR) 조사 시에 균일하게 빛을 흡수하고 열로 방출하여 PNIPAM-AAc를 LCST 이상으로 용이하게 도달하도록 할 수 있다. ,

- [0059] 아울러, 엽산을 도입하여 엽산 수용체(Folate receptor)가 과발현 하는 특정 암 세포를 표적하고, 항암제를 담지하여, PNIPAM 기반의 나노복합체로 항암치료 효과를 높일 수 있다.
- [0060] 이하, 각 과정을 보다 상세히 설명한다.
- [0061] 우선 PNIPAM의 합성 시 아크릴산을 넣고 PNIPAM의 LCST (Lower critical solution temperature)를 32 °C도에서 42 °C로 상승시켰다. 아크릴산의 함량 은 특별히 제한되지 않지만, 10중량% 아크릴 산(PNIPAM-AAc 총 100 중량 중 10중량%) 이 적절할 수 있다. 아크릴 산 함량에 따른 LCST는 5 중량%의 아크릴산 (LCST 37 °C, 10 중량% 아크릴산 LCST 39-42 °C 20 중량%의 아크릴산 (LCST 45 °C일 수 있다. 체내에서의 자발적 약물 방출 측면에서 5중량% 초과 내지 20%중량 미만의 범위 예컨대 6~18중량%, 7~15중량%, 8~12중량%, 또는 10중량%를 사용할 수 있다.
- [0062] 또한, 폴리피롤 나노입자는 근적외선 조사 시에 흡수한 빛을 열로 방출하여 PNIPAM-AAc을 LCST 이상으로 도달하게 하여 약물 방출을 유도하고 광열 치료 효과를 높이도록 한다. 이때 폴리피롤 나노 입자를 PNIPAM-AAc에 균일하게 분산하여 결합되도록 하면 근적외선(NIR) 조사 시에 균일하게 빛을 흡수하고 열로 방출하여 PNIPAM-AAc을 LCST 이상으로 용이하게 도달하도록 할 수 있다.
- [0063] 이와 같이 폴리피롤 나노 입자가 PNIPAM-AAc 표면에 분산 결합된 PNIPAM-AAc-ppy는 외부 자극에 의하여 약물 방출 조절이 가능하고, LCST를 높여 약물 부작용을 최소화할 수 있다. 또한 표적 화합물 및/또는 항암제를 담지함으로써 광열 치료와 화학치료의 시너지 효과로 인하여 항암 효과를 극대화할 수 있다.
- [0064] 예시적인 일 구현예에서, 폴리피롤은 PNIPAM-AAc의 총 부피를 기준으로 할 때 부피 비율이 5% 초과 20% 미만 (참고로, 예컨대 PNIPAM-AAc의 1ml에 대하여 피롤 단량체가 50 μL인 경우 5%가 된다), 바람직하게는 6~18% 또는 7~15%, 또는 8~12%이고, 가장 바람직하게는 9~11% 또는 10%이다.
- [0065] 5% 이하의 폴리피롤의 경우 피롤 양의 제한으로 온도 상승이 LCST까지 오르지 않게 될 수 있고, 20% 이상인 경우 PNIPAM-AAc 표면에 폴리피롤의 불균일성 (표면에 불지않고 자기들끼리 입자형성)이 나타날 수 있고, 이에 따라 약물 담지 능력이 떨어질 수 있다. 아울러, 폴리피롤의 양이 증가할 경우 PNIPAM-AAc 표면에 폴리피롤로 인해 온도 증가에 따른 약물 방출 거동의 제약이 발생할 수 있다.
- [0066] 아울러, 암 세포 표적 능력을 부여하기 위해 나노복합체의 카르복실 그룹에 엽산 등과 같은 표적 화합물을 접합시켜 엽산 수용체(Folate receptor)와 같은 표적 화합물 수용체가 과발현 되는 특정 암 세포에 용이하게 들어가도록 유도하였다.
- [0067] 이상과 같이 합성된 나노복합체를 투과 전자 현미경(TEM) 및 자외선-가시광선 분광법(UV-vis spectroscopy) 등을 통해 특성을 분석하였고, 약물 방출 실험을 통해 근적외선 조사 시에 폴리피롤의 광열 효과로 인해 나노 복합체의 온도 변화 유도 및 약물 방출이 효과적으로 일어나는 것을 확인할 수 있었다.
- [0068] 또한, 세포 실험을 통해 표적 화합물 수용체가 과발현 되는 암 세포에만 선택적으로 나노복합체가 내재화 되고, 화학-광열 요법을 통해 암 치료 효능이 향상될 수 있음을 확인하였다.
- [0069] 한편, 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 전술한 나노 복합체 제조 방법으로서, N-이소프로필아크릴아미드 단량체와 아크릴산의 공중합에 의하여 폴리(N-이소프로필아크릴아미드(PNIPAM-AAc) 나노입자를 합성하는 단계; 및 합성된 PNIPAM-AAc에 피롤 단량체로부터 상기 PNIPAM-AAc 나노 입자 표면에 폴리피롤이 분산하여 결합된 나노 구조체(PNIPAM-AAc-ppy)를 합성하는 단계;를 포함하는 나노 복합체 제조 방법을 제공한다.
- [0070] 이러한 합성 방식에 의하여 전술한 바와 같이 PNIPAM-AAc 나노 입자 표면에 폴리피롤이 분산하여 결합된 구조를 제공할 수 있다.
- [0071] 한편, 전술한 바와 같이, 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은, 상기 PNIPAM-AAc-ppy에 암세포 표적 물질을 도입하는 단계; 및 암세포 표적 물질이 도입된 상기 PNIPAM-AAc-ppy에 항암제를 봉입하는 단계; 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [0072] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 구체적인 실시예를 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며 첨부된 특허청구범위 내에서 다양한 형태의 실시예들이 구현될 수 있고, 단지 하기 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 함과 동시에 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 실시를 용이하게 하고자 하는 것이임이 이해될 것이다.
- [0073] **[실시예]**

- [0074] **재료**
- [0075] *N*-이소프로필아크릴아미드 (NIPAM, 97 %), *N,N'*-메틸렌비스아크릴아미드 (MBA), 과황산칼륨(KPS, 99 %), *N*-(3-디메틸아미노프로필)-*N'*-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 *N*-하이드록시석신이미드 (NHS) 은 시그마 알드리치 사로부터 입수하였다.
- [0076] 폴리비닐피롤리돈 (PVP) 및 피롤 (98 %) 은 Alfa aesar사로부터, 아크릴산(AAc) 은 대정순약으로부터, FA-PEG-NH₂ 는 Nanocs, 독소루비신은 도쿄화학공업(Tokyo Chemical Industry)로부터 입수하였다.
- [0077] **나노 복합체 합성**
- [0078] 유방암 세포 표적을 위한 온도 감응성 고분자에 의한 약물방출 및 광열치료가 가능한 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체를 합성하였다.
- [0079] 먼저 나이팜 모노머에 MBA를 넣고 증류수에 녹여준 후, 아크릴산을 넣고 질소 분위기에서 교반하여 PNIPAM-AAc 나노입자를 합성하였다.
- [0080] 합성된 PNIPAM-AAc에 폴리비닐피롤리돈(PVP)과 피롤 단량체를 넣고 12시간 교반한 뒤, 과황산칼륨 (KPS)를 넣고 24시간 교반하여 PNIPAM-AAc-ppy를 얻었다.
- [0081] PNIPAM-AAc 10 mg/ml 농도에 피롤 단량체 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L (volume ratio: 5 %, 10 %, 20 %) 넣어 합성하였다. 5 % 폴리피롤의 경우 피롤 양의 제한으로 온도 상승이 LCST까지 오르지 않을 수 있으며, 20 %의 폴리피롤의 경우 폴리피롤의 강한 중합 반응 (polymerization)으로 인해 약물 담지 능력이 떨어지는 것으로 생각된다. 20%의 피롤 단량체를 사용한 경우 LCST 이상의 온도에서 약물 방출 실험을 통해 10 %의 피롤 단량체를 사용한 경우 보다 방출 거동이 떨어지는 것을 실험을 통해 확인할 수 있었다. 이에 후술하는 실험에는 피롤 단량체 10%가 함유된 PNIPAM-AAc-Pyrrole 10을 사용하였다.
- [0082] 유방암 세포 표적을 위한 엽산(Folic acid, FA)은 EDC-NHS 반응을 통해 나이팜-폴리피롤 나노 복합체의 카르복실 그룹에 접합 되었다.
- [0083] 마지막으로 항암제(Doxorubicin)를 봉입하고 24시간 교반한 뒤 동결건조 하여 Dox@PNIPAM-AAc-PPy-FA를 얻었다.
- [0084] 이렇게 합성된 나노복합체는 엽산 수용체가 과다 발현되는 암 세포 표적이 가능하며, NIR 레이저를 조사했을 때 폴리피롤의 광열 효과로 인한 온도 상승으로 나노 복합체의 크기가 줄어들어 항암제 방출로 인한 화학적 치료 및 808 nm 근적외선에 의한 광열 치료가 가능하다.
- [0085] **평가**
- [0086] 도 2a 및 2b는 본 발명 실시예에서 제조된 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 입자 크기 및 형태 분석 결과이다. 구체적으로, 도 2a는 PIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 TEM 이미지이고, 도 2b는 PIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 DLS 분석 결과이다.
- [0087] 도 2a 및 2b에 도시된 바와 같이 TEM (Transmission electron microscopy, 200kV)을 통해 나노복합체의 형태 및 크기 분석을 평가하였다. PNIPAM-AAc 나노입자는 약 274 nm인 균일한 형태를 나타냈다. 폴리피롤을 도입한 PNIPAM-ppy와 엽산을 접합한 PNIPAM-ppy-FA는 약 275 nm 및 285 nm의 유사한 크기를 나타냈으며, 나노입자 내부의 검은 점을 통해 폴리피롤이 잘 합성되었음을 확인하였다.
- [0088] 약물을 담지한 Dox@PNIPAM-ppy-FA는 290 nm로 증가하여 항암제가 나노복합체에 담지 되었음을 나타낸다 (도 2a). 그리고 DLS (Dynamic light scattering) 분석을 통해 PNIPAM-AAc, PNIPAM-ppy, PNIPAM-ppy-FA 및 Dox@PNIPAM-ppy-FA의 직경은 각각 432, 450.7, 468.6 및 486.7 nm로 나타남을 확인 하였으며, 나노복합체 각각의 직경은 TEM 보다 크지만 나노복합체의 입자 크기 및 분포는 유사한 경향을 나타냈다(도 2b).
- [0089] 도 3a 내지 3c는 본 발명 실시예에서 제조된 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 LCST 및 크기 변화 분석 결과이다. 구체적으로 도 3a는 PNIPAM-AAc, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA의 LCST 분석 결과이다. 도 3b 및 3c는 PNIPAM-AAc, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체의 온도 변화에 따른 평균 직경 분석 결과이다.
- [0090] 도 3에 도시된 바와 같이, PNIPAM-AAc에 중합된 폴리피롤의 영향을 조사하기 위해, PNIPAM-AAc 및 Dox@PNIPAM-ppy-FA의 LCST를 DLS를 통해 측정하였다(도 3a). PNIPAM-AAc는 45 $^{\circ}$ C로 나타났고, Dox@PNIPAM-ppy-FA의 LCST는 42 $^{\circ}$ C로 PNIPAM-AAc 보다 낮은 온도로 나타났다. 다음으로 온도에 변화에 따른 나노복합체의 크기 변화를 DLS을

통해 분석하였다. 온도가 증가함에 따라 PNIPAM-AAc의 크기는 436 nm에서 177 nm로 감소하였고, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA의 크기는 630 nm에서 420 nm로 감소하였다(도 3b 및 3c).

- [0091] 이러한 결과는 PNIPAM 기반 나노 복합체에서 폴리피롤과 암 세포 타겟팅 리간드는 화학-광열 치료를 위한 약물 전달 시스템의 적용에 큰 영향을 미치지 않음을 보여준다.
- [0092] 도 4a 내지 4c는 본 발명 실시예에서 제조된 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 합성 평가 결과이다. 구체적으로 도 4a는 제타전위 분석 결과이고, 도 4b는 푸리에변환 적외선 분광법에 의한 분석 결과이며, 도 4c는 UV-vis 스펙트럼 분석 결과이다.
- [0093] 한편, 도 4a 내지 4c에 도시된 바와 같이 나노복합체의 합성 평가를 위한 제타 전위 분석 결과 PNIPAM-AAc 나노 입자는 -37 mV를 나타냈으며, PNIPAM-AAc-ppy, PNIPAM-AAc-ppy-FA의 값은 -29 mV, -15 mV로 폴리피롤 표면의 아민과 FA-PEG-NH₂가 나노복합체에 성공적으로 합성되었음을 보여준다. 약물을 담지한 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA의 제타 전위는 다시 -28 mV로 바뀌는 것을 확인하였다(도 4a).
- [0094] 도 4b는 나노복합체의 FT-IR (Fourier-transform infrared spectroscopy) 분석 결과로, PNIPAM-AAc의 C=O, NH 및 COOH에 상응하는 피크가 1545, 1645 및 1750 cm⁻¹에서 관찰되었다.
- [0095] PNIPAM-AAc-ppy와 PNIPAM-AAc-ppy-FA에서 폴리피롤(polypyrrole)의 고유 피크인 935와 1050 cm⁻¹에서 추가적인 피크가 관찰되었다. 또한, PNIPAM-AAc-ppy-FA의 스펙트럼에서, 1107 및 2880 cm⁻¹의 피크는 PEG 사슬의 C-O-C 피크를 나타낸다.
- [0096] 나노복합체의 광학 특성과 FA의 합성 여부를 평가하기 위해 0.1 mg/mL의 농도로 증류수에 분산 시킨 뒤 400 - 1100 nm의 파장대로 UV-vis (Ultraviolet-visible) 분광법을 통해 흡광도를 분석하였다.
- [0097] PNIPAM-AAc는 아무런 흡광도를 나타내지 않았으며, PNIPAM-AAc-ppy, PNIPAM-AAc-ppy-FA 및 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 모두 폴리피롤로 인한 근적외선 영역에서 흡광도를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0098] PNIPAM-AAc-ppy-FA는 280 nm에서 FA 고유의 추가적인 흡광도를 나타냈으며, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA에서도 280 nm와 480 nm에서 FA와 Dox 고유의 흡광도를 나타낸 것을 확인하였다(도 4c).
- [0099] 도 5a 내지 5e는 본 발명 실시예에서 제조된 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 광열 특성 및 효과이다. 구체적으로, 도 5a는 폴리피롤 유무 및 함량(부피 비(volume ratio))에 따른 광열 효과 평가이고, 도 5b는 폴리피롤 함량(부피 비(volume ratio)) 20%인 경우의 광열 효과 데이터를 추가로 표시한 것이다.
- [0100] 도 5a 및 5b를 함께 참조하면, 5 %의 피롤 단량체를 사용한 경우 근적외선을 조사한 결과 약 7도 가량 온도 상승을 보이지만 10 %의 피롤 단량체를 사용한 경우 14.5 도까지 온도 상승하였다. 20 %의 피롤 단량체를 사용한 나노복합체의 온도 상승은 10 %에 비해 오히려 떨어지는 것을 확인하였다. 이는 폴리피롤끼리 응집하여 구조체를 형성하기 때문일 것으로 예상된다.
- [0101] 도 5c는 폴리피롤 10 %(volume ratio)로 한 경우에 나노 복합체의 농도에 따른 광열 특성 평가 결과이고, 도 5d는 폴리피롤 10 %(volume ratio) 및 0.1mg/ml인 경우에 나노 복합체의 레이저 세기에 따른 광열 특성 평가이며, 도 5e는 폴리피롤 10 %(volume ratio) 및 0.1mg/ml인 경우에 근적외선 조사 유무에 따른 나노복합체의 광열 재현성 평가 결과이다.
- [0102] 808 nm 레이저 노출에 의한 광열 효과를 평가하였다. 광열 효과 최적화를 위해 나노복합체의 폴리피롤 함성 유무에 따른 온도 변화를 측정하였으며, 폴리피롤 10 %(volume ratio)로 한 경우인 Dox@PNIPAM-ppy-10-FA에서 온도 상승이 높게 나타남을 확인하였다(도 5a 내지 5c).
- [0103] 최적화된 폴리피롤 함량인 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-10-FA 조건으로 농도와 레이저 세기에 따른 온도 변화를 측정한 결과, 예상대로 농도와 레이저 세기가 증가할수록 온도 상승률이 높음을 확인하였다(도 5c, 5d).
- [0104] 합성한 나노복합체의 광열 안정성을 평가하기 위해 15분 간격으로 레이저에 조사한 결과, 매 사이클마다 약 33 °C까지 오르는 것을 확인하였다(도 5e).
- [0105] 이하에서는 폴리피롤 10 %(volume ratio) 및 0.1mg/ml인 경우 나노 복합체를 기준으로 실험하였다.
- [0106] 도 6은 본 발명 실시예에서 제조된 나노 복합체의 약물 방출 거동 분석 결과로서, 도 6a는 온도에 따른 나노복

합체의 약물 방출 거동 평가, 도 6b는 레이저 조사 유무에 따른 나노복합체의 약물 방출 거동 평가 결과이다.

- [0107] 도 6a 및 6b에서 보듯이, 온도 및 NIR 레이저 자극에 의한 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체로부터의 약물 방출 거동을 평가하였다. 25 °C, 37 °C 및 50 °C에서 72시간 동안 약물 방출 거동을 관찰하였고, 약물의 누적 방출은 각각 15 %, 42 % 및 67 %로 50 °C에서 가장 높은 약물 방출을 나타냈다(도 6a).
- [0108] 이러한 결과는 온도 감응성 고분자 기반의 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체가 온도 제어를 통한 약물 방출이 가능한 것을 나타낸다.
- [0109] 레이저 조사에 의한 나노복합체의 약물 방출 거동을 평가한 결과, 25 °C, 37 °C보다 37 °C에서 NIR 레이저를 조사한 그룹에서 약물 방출이 더 높게 나타나는 것을 확인하였다(도 6b).
- [0110] 이는 NIR 레이저 조사 시에 나노복합체 내부에 존재하는 폴리피롤의 광열효과로 인해 나이팜의 LCST 보다 더 높은 온도로 초래하고, 나노복합체로부터의 약물 방출을 빠르게 유도함을 나타낸다.
- [0111] 도 7은 본 발명 실시예에 있어서 MTT assay에서 다양한 농도에 따른 PNIPAM-AAc-ppy 나노복합체의 세포 독성 평가 결과이다(A549: Folate receptor negative cells, MDA-MB-231: Folate receptor overexpressed cells).
- [0112] 도 7에서 보듯이, 나노복합체의 생체적합성 평가를 위해 항암제를 담지하지 않은 PNIPAM-AAc-ppy-FA를 폐암(A549) 및 유방암(MDA-Mb-231) 세포에 24시간 동안 배양하여 MTT assay로 세포 독성을 평가하였다.
- [0113] 그 결과 PNIPAM-ppy-FA 나노복합체는 고농도 (100 μ g/mL)에서도 85 % 이상의 세포 생존율을 통해 약물 전달을 위한 나노 복합체로서 우수한 생체 적합성을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0114] 도 8은 본 발명 실시예에서 제조된 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체의 엽산 수용체(Folate receptor) 표적 능력 평가 결과이다.
- [0115] 구체적으로, PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 A549 세포의 형광 이미지이고, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 A549 세포의 형광 이미지이며, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 MDA-MB-231 세포의 형광 이미지이다.
- [0116] 도 8에서는 나노복합체의 Folate receptor가 과발현된 암 세포 표적 능력을 평가하기 위해 CLSM (Confocal laser scanning microscopy)을 통해 분석한 것이다. 그 결과, PNIPAM-ppy-FA, Dox@PNIPAM-ppy-FA를 처리한 A549 (Folate receptor negative cells) 세포에서는 적색 형광이 관찰되지 않았다(도 8). Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA를 처리한 MDA-MB-231 (Folate receptor positive cells) 세포에서는 강한 적색 형광이 관찰 되었다(도 8).
- [0117] 이러한 결과는 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체가 수용체-매개 세포 내 이입 경로를 통해 엽산 수용체(Folate receptor)가 과발현 되는 암 세포에만 내재화 될 수 있음을 나타낸다.
- [0118] 도 9는 본 발명 실시예에서 제조된 나노 복합체의 분석 결과로서, 도 9a는 레이저 조사 유무에 관계없이 PNIPAM-AAc-ppy-FA 및 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 MDA-MB-231 세포의 생존율 분석 결과이며, 도 9b는 레이저 조사 없이 PNIPAM-AAc-ppy-FA 및 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 처리한 A549 세포의 생존율 분석 결과이다.
- [0119] 도 9는 나노복합체의 화학-광열 치료 효능을 확인하기 위해, NIR 레이저 조사 유무에 따른 MDA-MB-231 세포의 세포 독성을 관찰한 것이다. 약물이 없는 PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체만 처리한 대조군에서는 95 % 이상의 높은 생존율을 보였고, 나노복합체에 레이저를 조사한 그룹에서는 피롤의 광열 효과로 인해 세포 생존율이 약간 감소함을 나타냈다.
- [0120] 약물을 담지한 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체를 37 °C에서 배양한 조건에서는 37 °C에서의 약물 방출로 인해 세포 생존율이 50 %까지 감소함을 나타내었고, 같은 조건에서 레이저를 조사한 그룹에서는 세포 생존율이 25 %까지 급격히 감소함을 나타낸다(도 9a).
- [0121] 도 9b는 A549 세포에 NIR 레이저 조사 없이 약물 담지 유무에 따른 세포 독성을 평가한 것이다. A549 세포는 엽산 수용체(Folate receptor)가 과발현 하지 않는 세포로, 나노 입자가 세포 안으로 내재화 되지 않기 때문에 85 %이상의 높은 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA 나노복합체가 엽산 수용체(Folate receptor)가 과발현 하는 MDA-MB-231 세포에만 내재화 되고, NIR 레이저 조사 시에 화학-광열 치료로 인한 시너지 효과를 나타냄을 보여준다.
- [0122] 도 10은 본 발명 실시예에서 MDA-MB-231 세포에서 화학-광열 치료 후 Live(green)/dead(red) 형광 이미지이다.

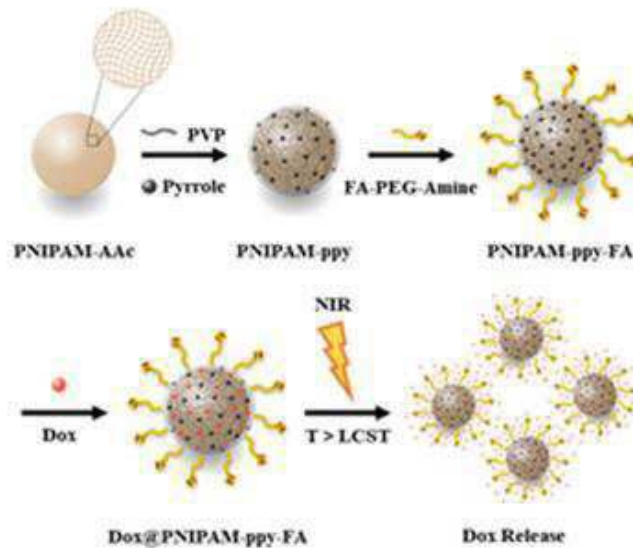
구체적으로, 대조군의 형광 이미지, PNIPAM-AAc-ppy-FA를 처리한 후 형광 이미지이며, Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA를 처리한 후 형광 이미지이다.

[0123] 도 10은 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA를 이용한 MDA-MB-231 세포에서의 화학-광열 치료 효과를 관찰하기 위해 live/dead assay kit를 통해 녹색/적색으로 시각화한 것이다. 그 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군과 NIR을 처리한 대조군에서는 세포 사멸을 나타내지 않았으며, NIR 레이저 조사는 세포 생존에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(도 10). 약물이 없는 PNIPAM-AAc-ppy-FA에서는 레이저 조사 시에 약간의 적색 형광(세포 사멸)을 통해 나노복합체로 인한 광열 효과를 나타냈다(도 10). 약물이 있는 Dox@PNIPAM-AAc-ppy-FA에서는 레이저 조사가 없음에도 불구하고 약물 방출로 인한 세포 사멸을 나타내었고, 레이저를 조사 했을 때는 더 많은 적색형광과 세포가 사멸해 떨어져 나감을 관찰하였다(도 10).

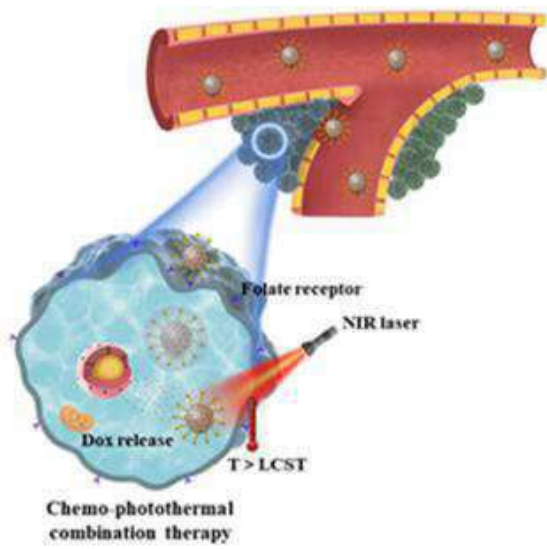
[0124] 이러한 결과는 Dox-PNIPAM-AAc-ppy-FA가 훌륭한 화학-광열 치료용 나노복합체임을 의미한다.

도면

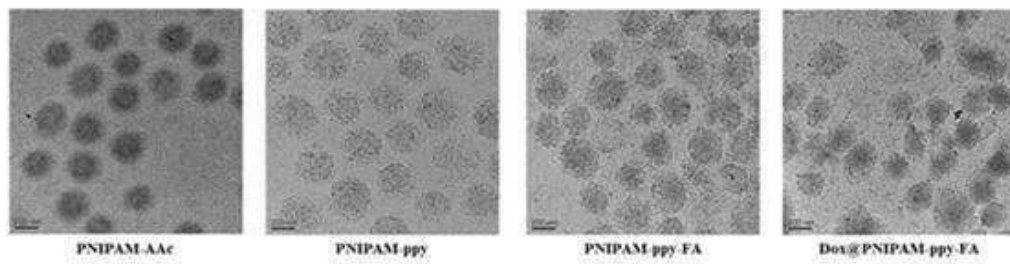
도면1a



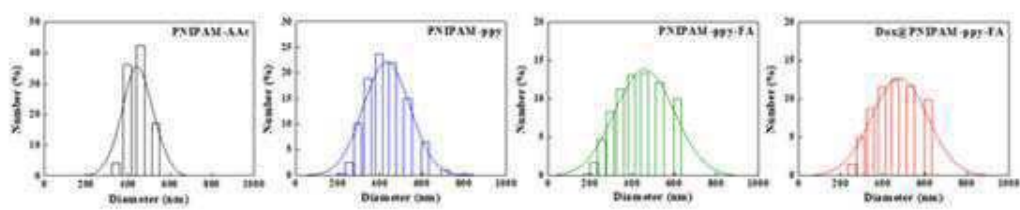
도면1b



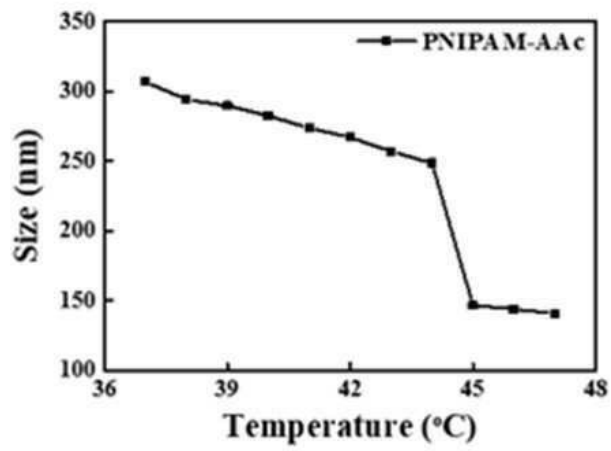
도면2a



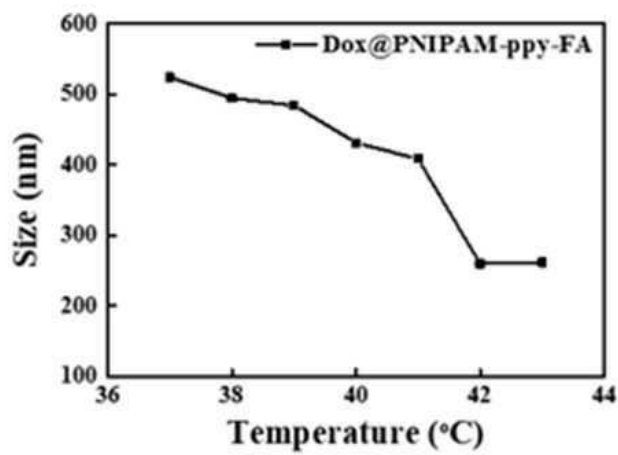
도면2b



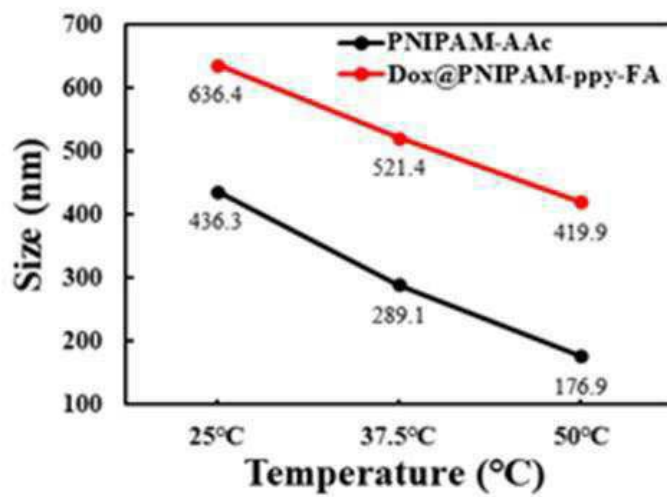
도면3a



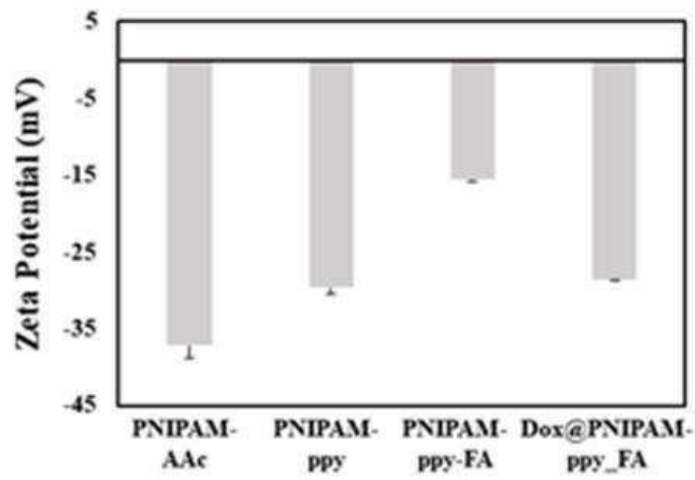
도면3b



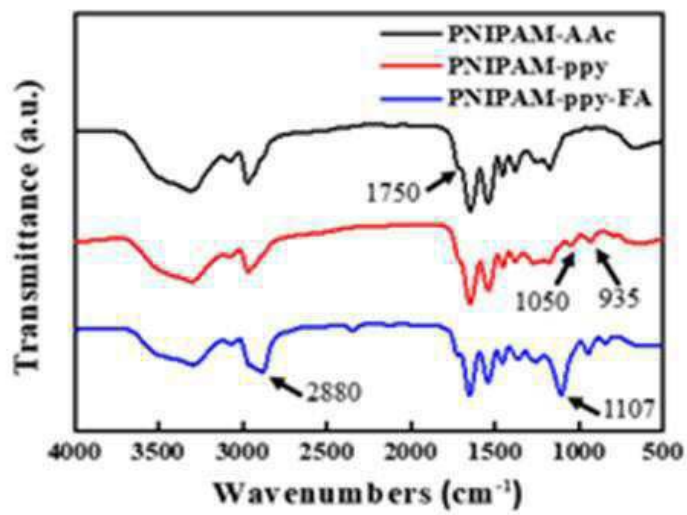
도면3c



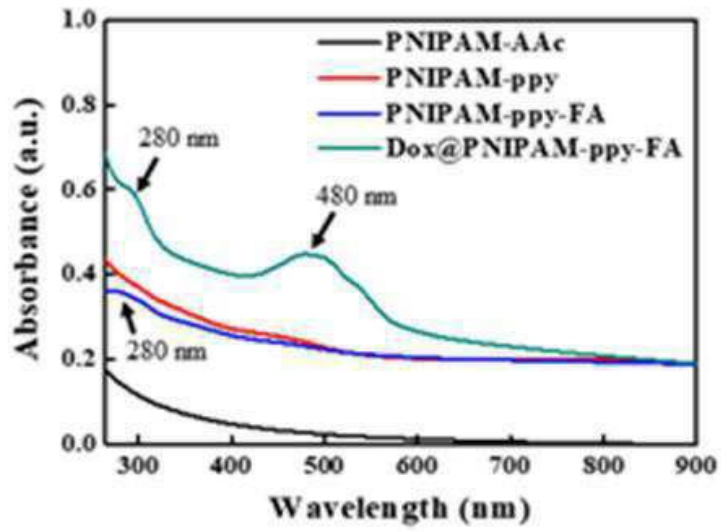
도면4a



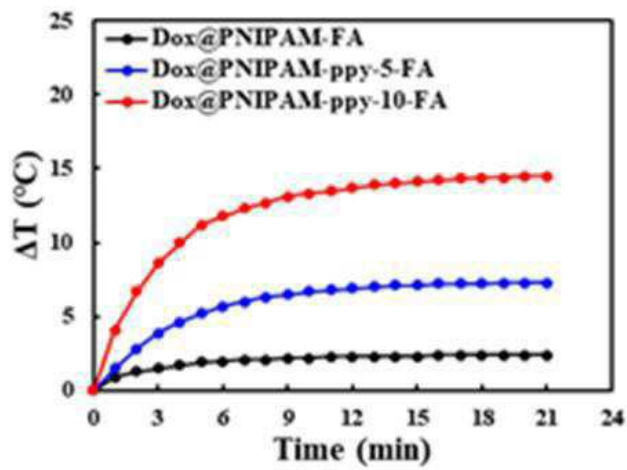
도면4b



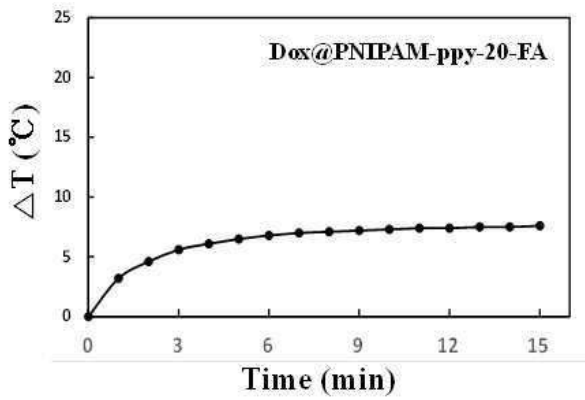
도면4c



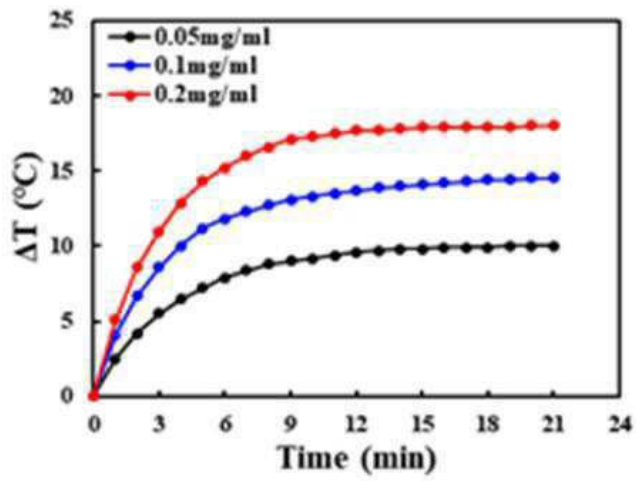
도면5a



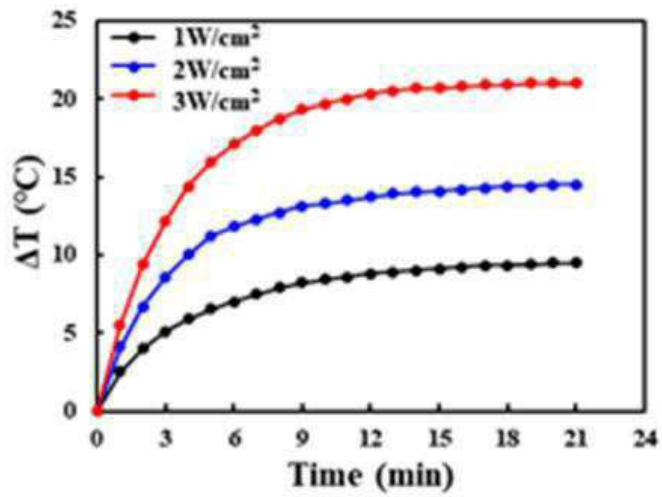
도면5b



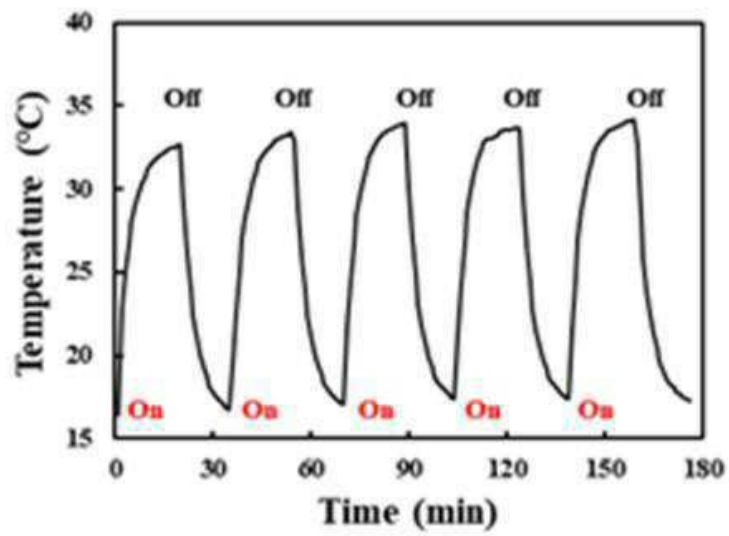
도면5c



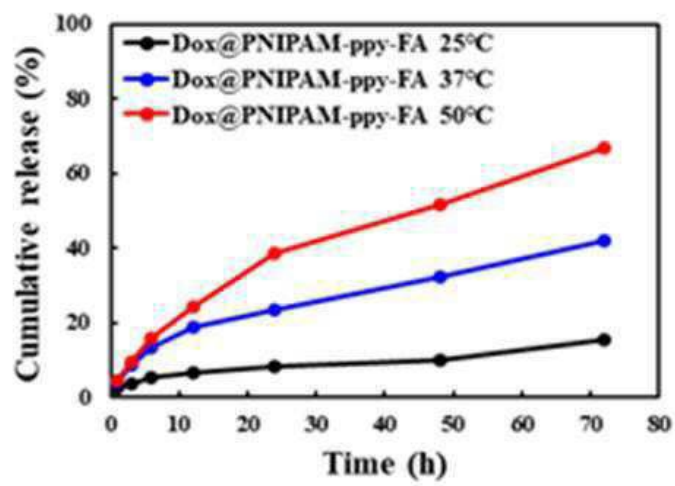
도면5d



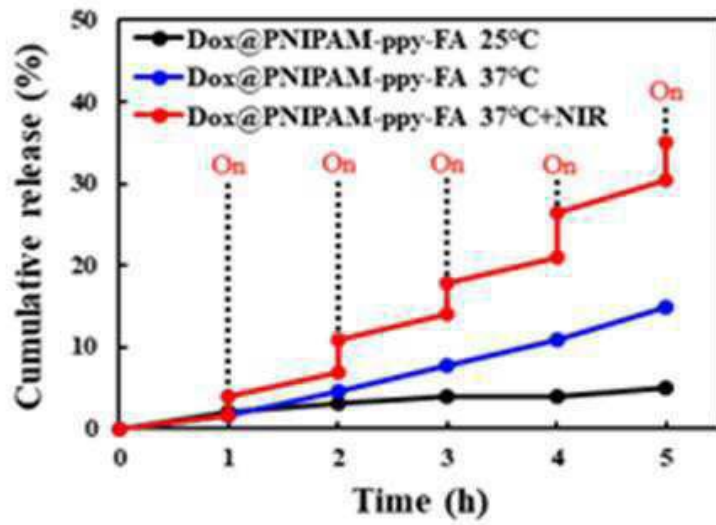
도면5e



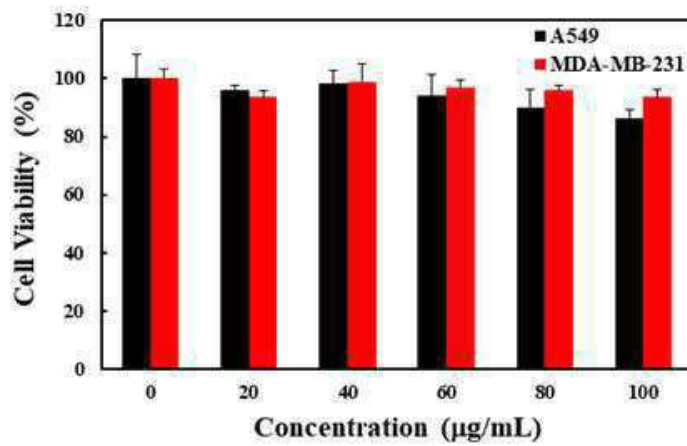
도면6a



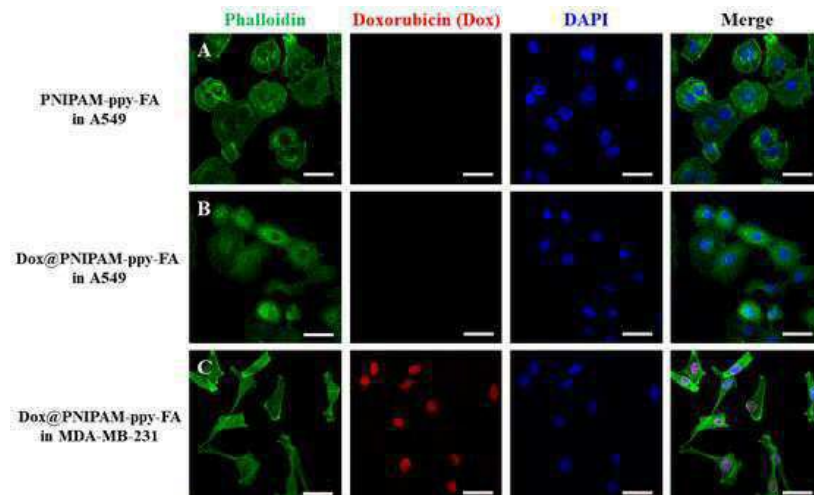
도면6b



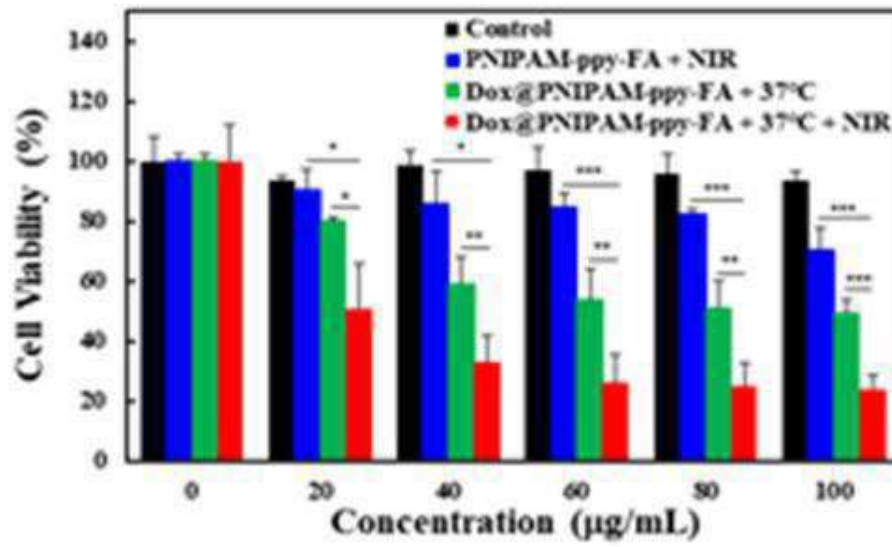
도면7



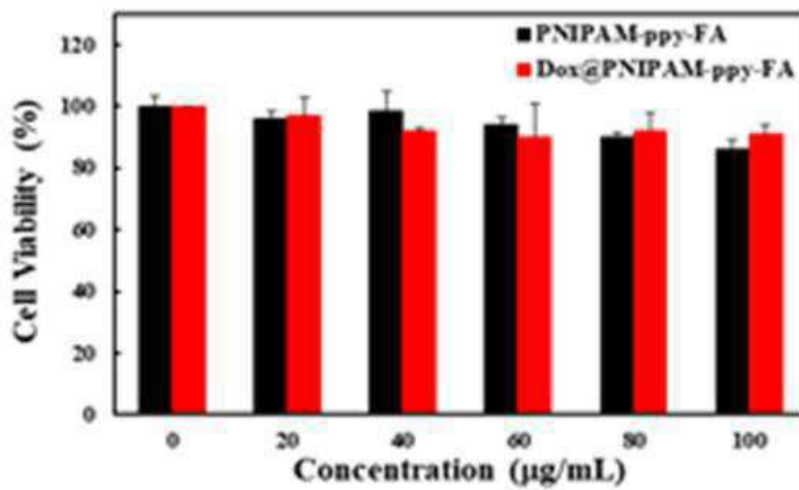
도면8



도면9a



도면9b



도면10

