(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월31일
(11) 등록번호 10-1741949
(24) 등록일자 2017년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 31/203* (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/488 (2013.01)
A61K 31/203 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0038932
(22) 출원일자 2016년03월31일
심사청구일자 2016년03월31일
(30) 우선권주장
1020160022941 2016년02월26일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
J.polym. science, part a: polymer chemistry, 52, 366-374, 2014.
Polym. chem., 4, 1657-1663, 2013.

기술이전 희망 : **기술양도**

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
임권택
부산광역시 부산진구 당감로 118, 105동 1202호(협성피닉스타운)
카오 수안 탕
부산광역시 남구 용소로 45 가온관 902호
(74) 대리인
위병갑

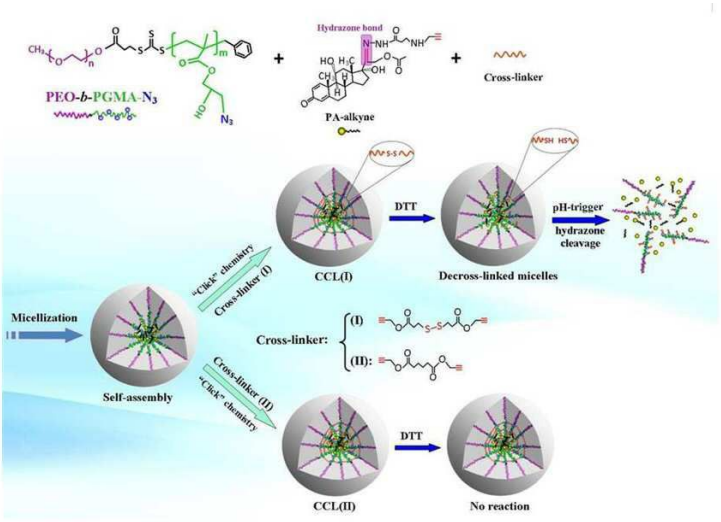
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀, 약물 전달체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀, 약물 전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀 및 약물 전달체는 원-팟 클릭반응에 의하여 간편하게 제조될 수 있고, 암세포를 특이적으로 타겟팅하여, 약물을 방출함으로써, 암세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있어, 이를 제약분야에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도13



(52) CPC특허분류
A61K 31/337 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/48169 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 22A20130012426
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 BK21 플러스사업
연구과제명 고효율 인간친화형 디스플레이 소재 인력양성 사업팀
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교
연구기간 2013.09.01 ~ 2016.02.29
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

고분자 중합체; 약물; 및 가교제를 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀로서,

상기 고분자 중합체는 폴리(에틸렌 옥사이드) 및 폴리(글리시딜 메타아크릴레이트)가 결합된 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트) 블록 공중합체이고,

상기 약물은 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate) 또는 독소루비신(doxorubicin)이며,

상기 가교제는 이황화결합을 포함하는 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트인 것을 특징으로 하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 중합체는 아자이드기를 포함하고,

상기 약물 및 상기 가교제는 알카인기를 포함하며,

상기 약물 및 상기 가교제는 상기 고분자 중합체와 알카인-아자이드(alkyne-azide) 화학결합으로 결합된 것을 특징으로 하는 가교 마이셀.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1 항의 가교 마이셀을 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체.

청구항 12

제 1 항의 가교 마이셀의 제조방법으로서,

1) 아자이드기를 포함하는 고분자 중합체를 제조하는 단계;

2) 약물에 하이드라존 링커를 통해 알카인기를 도입하는 단계;

3) 이황화결합 및 알카인기를 포함하는 가교제를 제조하는 단계; 및

4) 상기 고분자 중합체, 상기 약물 및 상기 가교제를 혼합하여 반응하는 단계;를 포함하고,

상기 고분자 중합체는 폴리(에틸렌 옥사이드) 및 폴리(글리시딜 메타아크릴레이트)가 결합된 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트) 블록 공중합체이고,

상기 약물은 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate) 또는 독소루비신(doxorubicin)이며,

상기 가교제는 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트인 것을 특징으로 하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제 12 항에 있어서,

상기 1) 단계는 RAFT 중합반응 또는 ATRP 분자 조절 중합반응을 통하여 고분자 중합체를 제조하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀, 약물 전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 몇 년간 코어-쉘(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-쉘 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 약물전달에 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 쉘의 가교화는 약물전달 시스템의 잠행에 영향을 미치고 친수성기의 이동성에 영향을 주고, 불필요한 마이셀 간 가교화를 피할 수 없다. 반면에 마이셀의 코어 가교화(Core Cross-Linked, CCL)는 점점 매력적인 방법이 되어가고 있는데, 이것은 산화 환원 환경에서 가교 결합이 역반응 또는 분해가 가능하여 내부 활성 물질의 방출을 향상시킨다. 코어 가교된 마이셀은, 감광성 블록 공중합체의 UV조사와 금속-리간드 배위 결합과 같은 다양한 방법들에 의해 만들질 수 있다. 이러한 마이셀들은 UV/NIR 광 조사 또는 pH 변화에 따라 약물을 방출할 수 있다.

[0005] 통상적인 코어 가교화 방법에서는, 먼저 소수성 약물이 마이셀 코어에 물리적으로 탑재되고, 뒤이어 코어 가교반응이 수행된다. 따라서, 코어 부분이 가교반응으로 응축됨에 따라 포획된 약물을 담을 공간이 부족하게 되고 약물 탑재 효율이 줄어들게 된다. 게다가, 종양 조직에서는 약물 투여량이 현저히 감소되는 반면에 건강한 조직에서의 두드러진 약물 농도 때문에 일부 항암제는 심각한 부작용을 일으킨다. 약물이 혈액 내 순환 시간 동안에는 마이셀 내에 유지되고 있다가 목표물 조직에 도달한 후, 결합 해리를 통해서 방출되어야 하기 때문에 약물을 마이셀 코어에 화학적 결합으로 탑재하는 것이 바람직하다. 이러한 목적을 위해 약물이 결합된 고분자 물질이 제시되어 고분자 마이셀의 약물 탑재 효율을 증가시켰으며, 이것은 생체 치료학적 응용에서 높은 가능성을 보이고 있다. 효소반응에 의한 방출, 피동적인 가수분해, 또는 산화환원 반응 응답성 방출에 의해서, 지용성 약물은 고분자로부터 방출될 수 있다. 이 중에서도 하이드라존(hydrazone) 결합을 기반으로 하는 약물 결합 고분자는 많은 관심을 얻고 있다. 하이드라존 링커는 산 감응성이기 때문에 pH 7.4의 혈액 내에서는 상대적으로 안정적이지만 암세포의 산성 환경(pH 5)에서는 분해되어 약물을 방출한다. 하이드라존 링커를 통한 고분자 약물 결합은 고분자 주쇄의 일부로서 약물을 포함하거나 마이셀 코어의 가교제에 약물을 부착한 고분자들을 포함한다. 이러한 방법은 보다 향상된 약물 탑재 능력을 가져다 줄 수 있다. 그러나, 약물 결합 고분자와 약물 미결합 고분자 사이에 분리가 어렵고, 꽤 복잡한 제조 과정을 필요로 한다. 더구나, 이러한 중합반응은 제어가 불가능하기 때문에 약물 포함 단량체를 낮은 농도에서 반응시키며 결과적으로 적은 탑재량을 가져온다. 따라서, 간편한 클릭반응을 이용하여 자극 응답형 연결을 가지는 약물을 고농도로 탑재시키는 방법이 바람직하다. 또한, 마이셀 코어의 가교화를 위한 가교제의 경우에 이황화 결합을 포함하는 가교제를 사용하면 이황화 결합이 산화환원 반응 응답성으로 환원성 분위기에서 결합이 분해되므로 탈 가교화가 원활하게 일어난다. 예를 들면, 환원제 성질을 가지는 글루타치온은 티올을 포함하는 트리펩티드로서 세포 밖의 유체보다는 세포기질에 높은 농도로 존재하며 특히, 암세포에는 훨씬 높은 수준으로 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 하이드라존 결합과 이황화 결합을 약물탑재와 가교반응에 적절히 활용하여 약물탑재 가교마이셀을 합성하면 암세포 표적성의 이중 응답형의 약물전달시스템을 제조할 수 있을 것이다.

[0006] 한편, "클릭화학(click chemistry)" 종류의 한 가지인 아자이드-알킨 고리첨가반응(Cyclo addition)으로서, 열역학적 추진력이 매우 높아(일반적으로 20 ㎉/㏖ 이상) 효율적이면서 높은 수율로 아자이드 화합물과 알킨 화합물의 탄소-헤테로원자간 결합을 형성할 수 있다. 즉, 클릭화학 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(발명자, J. Am. Chem. Soc. 124: 14397-14402, 2002) 등의 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

[0007] 이와 관련된 특허문헌을 살펴 보면 대한민국 공개특허공보 제2009-0076856호에서 '암의 진단과 치료를 동시에 수행하는 항암제'에 대하여 기재하고 있으며, 대한민국 공개특허공보 제2011-0102995 호에서 '암세포 선택성을 갖고 체내에서 장기 순환하는 미셀형 백금착물 항암제 및 그 제조 방법'에 대하여 기재하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 마이셀을 포함하는 약물 전달체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 마이셀 및 약물전달체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 구현예에서,

[0012] 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 고분자 중합체; 상기 고분자 중합체와 알카인-아자이드(alkyne-azide) 화학결합으로 결합된 약물; 및 상기 고분자 중합체와 알카인-아자이드 화학결합으로 결합되며 이황화결합을 포함하는 가교제;를 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에서,

[0014] 상기 마이셀은 친수성 쉘; 및 소수성 코어;로 이루어질 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에서,

[0016] 상기 고분자 중합체는 아자이드기를 포함하고, 상기 가교제 및 상기 약물은 알카인기를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에서,

[0018] 상기 약물은 하이드라존 링커를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에서,

[0020] 상기 고분자 중합체는 알카인기를 포함하고, 상기 가교제 및 상기 약물은 아자이드기를 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에서,

[0022] 상기 고분자 중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에서,

[0024] 상기 고분자 중합체의 소수성 부분은 폴리(글리시딜 메타아크릴레이트), 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 하나 이상일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에서,

[0026] 상기 고분자 중합체는 아자이드기 또는 알카인기를 포함하는 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트)일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에서,

[0028] 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(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 있다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에서,

[0030] 상기 가교제는 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트일 수 있다.

[0032] 본 발명의 다른 구현예에서,

[0033] 상기 마이셀을 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체를 제공한다.

[0035] 본 발명의 다른 구현예에서,

[0036] 상기 마이셀을 제조하는 방법에 있어서,

[0037] 1) 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하며 아자이드기를 포함하는 양친매성 고분자 중합체를 제조하는 단계;

[0038] 2) 약물에 하이드라존 링커를 통해 알카인기를 도입하는 단계;

[0039] 3) 이황화결합 및 알카인기를 포함하는 가교제를 제조하는 단계; 및

[0040] 4) 상기 고분자 중합체, 상기 약물 및 상기 가교제를 혼합하여 반응하는 단계;를 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법을 제공한다.

[0042] 본 발명의 다른 구현예에서,

[0043] 상기 마이셀을 제조하는 방법에 있어서,

[0044] 1) 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하며 아자이드기를 포함하는 양친매성 고분자 중합체를 제조하는 단계;

[0045] 2) 상기 고분자 중합체에 약물을 도입하는 단계;

[0046] 3) 이황화결합 및 알카인기를 포함하는 가교제를 제조하는 단계; 및

[0047] 4) 상기 약물이 도입된 고분자 중합체 및 상기 가교제를 혼합하여 반응하는 단계;를 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법을 제공한다.

[0049] 본 발명의 일 구현예에서,

[0050] 상기 1) 단계는 RAFT 중합반응 또는 ATRP 분자 조절 중합반응을 통하여 고분자 중합체를 제조할 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 구현예에서,

[0052] 상기 1) 단계에서 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이며, 소수성 부분은 폴리(글리시딜 메타아크릴레이트), 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 하나 이상일 수 있다.

[0053] 본 발명의 일 구현예에서,

[0054] 상기 2) 단계의 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 이상일 수 있다.

[0055] 본 발명의 일 구현예에서,

[0056] 상기 3)단계의 가교제는 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트일 수 있다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체는 원-팟(One-pot) 클릭반응에 의하여 간편하게 제조될 수 있고, 암세포를 특이적으로 타겟팅하여, 약물을 방출함으로써, 암세포를 특이적으로 사멸시킬 수 있어, 이를 제약분야에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 PEO-b-PGMA-N_3블록 공중합체의 합성 및 아자이드기 도입 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 3은 프로파길아미도프로파노하이드라자이드-프레드니솔론 21-아세테이트의 제조 방법 및 ^{1}H NMR 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 다이프로파길아디페이트의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 5는 프로파길아미도프로파노하이드라자이드-독소루비신의 제조 방법을 나타낸 도이다.

도 6은 하이드라존 링커 연결된 DOX(독소루비신)를 펜던트 (pendant)로 결합한 PEO-b-PGMA-(N_3)-DOX의 제조 방법을 나타낸 도이다.

도 7은 (a) PEO, (b) PEO-RAFT, (c) PEO-b-PGMA, (d) PEO-b-PGMA-N_3 및 (e) PEO-b-PGMA-N_3 마이셀의 FT-IR 스펙트럼 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 (a) PEO-b-PGMA, (b) PEO-b-PGMA-N3 및 (c) DMSO-d_6에서 PEO-b-PGMA-N_3 마이셀의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 9는 (a) 코어가 가교되지 않은 마이셀 및 (b) 코어가 가교된 마이셀의 역학적 직경의 변화를 DLS를 통해 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 (c) 코어가 가교되지 않은 마이셀 및 (d) 코어가 가교된 마이셀의 크기와 형태를 TEM을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 코어가 가교된 마이셀 및 가교되지 않은 마이셀의 용매((a) PBS 20mM (pH 7.4), (b) DMF)에서 희석시간에 따른 직경의 변화 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 DTT를 (c) 실시예 1 및 (d) 실시예 2의 마이셀이 포함된 PBS 용액에 첨가한 후 시간에 따라 입자 크기를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 실시예 1 및 실시예 2의 DTT에 의한 가교 결합 해리 및 약물 방출 모형을 나타낸 도이다.

도 14는 서로 다른 DTT 농도와 pH에 따른 실시예 1 및 실시예 2의 마이셀로부터 시험관내 약물의 방출 그래프를 나타낸 도이다.

도 15는 실시예 3의 가교 마이셀 제조 방법 및 GSH와 pH 5에 의한 가교 결합 해리 및 약물 방출 모형을 나타낸 도이다.

도 16은 실시예 4의 가교 마이셀 제조 방법 및 GSH와 pH 5에 의한 가교 결합 해리 및 약물 방출 모형을 나타낸 도이다.

도 17은 서로 다른 GSH 농도와 pH에 따른 실시예 3의 가교 마이셀로부터 시험관내 약물의 방출 그래프를 나타낸 도이다.

도 18은 서로 다른 GSH 농도와 pH에 따른 실시예 4의 가교 마이셀로부터 시험관내 약물의 방출 그래프를 나타낸 도이다.

도 19는 PEO-b-PGMA-PA(프레드니솔론 21-아세테이트)의 마이셀에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 24시간 동안 Hoechst 33342세포의 세포 생존율 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 20은 PA가 담지된 가교된 마이셀의 존재하에 24시간의 인큐베이션 후에 Hoechst 33342세포의 형광사진을 나타낸 도이다.

도 21은 DOX가 활성이 유지되는지 확인하기 위하여 24시간 동안 Hoechst 33342세포의 세포 생존율 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 22는 DOX-담지된 가교된 마이셀의 존재하에 24시간의 인큐베이션 후에 Hoechst 33342세포의 형광사진을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 본 발명의 실시형태를 설명한다. 그러나 본 발명의 실시형태는 여러 가지의 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시형태로만 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 명세서 전체에서 포함 또는 함유라 함은 어떤 구성 요소를 별다른 제한 없이 포함함을 지칭하며, 다른 구성 요소의 부가를 배제 또는 제외하는 것으로 해석될 수 없다.

[0061] 본 명세서 전체에서 명시적인 언급이 없는 한, 전문 용어는 단지 특정 구현예를 언급하기 위한 것이며, 본 발명을 한정하는 것을 의도하지 않는다. 또한, 여기서 사용되는 단수 형태들은 문구들이 이와 명백한 반대의 의미를 나타내지 않는 한 복수 형태들도 포함한다.

[0063] 본 발명의 일 구현예에서,

[0064] 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하는 양친매성 고분자 중합체; 상기 고분자 중합체와 알카인-아자이드 화학결합으로 결합된 약물; 및 상기 고분자 중합체와 알카인-아자이드 화학결합으로 결합되며 이황화결합을 포함하는 가교제;를 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀을 제공한다.

[0065] 상기 '알카인'은 alkyne을 의미하며 일반적으로 원자간의 삼중결합을 가진 화합물을 큰 범주에서 지칭하며 이에 한정되지 않는다.

[0066] 상기 알카인-아자이드 화학결합은 클릭반응으로 결합되며, 이에 한정되지 않는다.

[0067] 본 발명의 일 구현예에서,

[0068] 상기 마이셀은 친수성 쉘; 및 소수성 코어;로 이루어질 수 있다.

[0069] 본 발명의 일 구현예에서,

[0070] 상기 고분자 중합체는 아자이드기를 포함하고, 상기 가교제 및 상기 약물은 알카인기를 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명의 일 구현예에서,

[0072] 상기 약물은 하이드라존 링커를 포함할 수 있다.

[0073] 본 발명의 일 구현예에서,

[0074] 상기 고분자 중합체는 알카인기를 포함하고, 상기 가교제 및 상기 약물은 아자이드기를 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명의 일 구현예에서,

[0076] 상기 고분자 중합체의 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0077] 본 발명의 일 구현예에서,

[0078] 상기 고분자 중합체의 소수성 부분은 폴리(글리시딜 메타아크릴레이트), 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 하나 이상일 수 있다.

[0079] 본 발명의 일 구현예에서,

[0080] 상기 고분자 중합체는 아자이드기 또는 알카인기를 포함하는 폴리(에틸렌 옥사이드)-b-폴리(글리시딜 메타아크릴레이트)일 수 있다.

[0081] 본 발명의 일 구현예에서,

[0082] 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(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 있다.

[0083] 본 발명의 일 구현예에서,

[0084] 상기 가교제는 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트일 수 있다.

[0086] 본 발명의 다른 구현예에서,

[0087] 상기 마이셀을 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 약물 전달체를 제공한다.

[0088] 상기 약물 전달체는 통상의 방법으로 제조될 수 있으며, 약물을 체내 특정 위치에 전달할 수 있는 구성이면 특별히 제한되지 않는다.

[0090] 본 발명의 다른 구현예에서,

[0091] 상기 마이셀을 제조하는 방법에 있어서,

[0092] 1) 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하며 아자이드기를 포함하는 양친매성 고분자 중합체를 제조하는 단계;

[0093] 2) 약물에 하이드라존 링커를 통해 알카인기를 도입하는 단계;

[0094] 3) 이황화결합 및 알카인기를 포함하는 가교제를 제조하는 단계; 및

[0095] 4) 상기 고분자 중합체, 상기 약물 및 상기 가교제를 혼합하여 반응하는 단계;를 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법을 제공한다.

[0097] 본 발명의 다른 구현예에서,

[0098] 상기 마이셀을 제조하는 방법에 있어서,

[0099] 1) 친수성 부분 및 소수성 부분을 포함하며 아자이드기를 포함하는 양친매성 고분자 중합체를 제조하는 단계;

[0100] 2) 상기 고분자 중합체에 약물을 도입하는 단계;

[0101] 3) 이황화결합 및 알카인기를 포함하는 가교제를 제조하는 단계; 및

[0102] 4) 상기 약물이 도입된 고분자 중합체 및 상기 가교제를 혼합하여 반응하는 단계;를 포함하는 암세포 표적 기능을 갖는 가교 마이셀의 제조방법을 제공한다.

[0103] 본 발명의 일 구현예에서,

[0104] 상기 1) 단계는 RAFT 중합반응 또는 ATRP 분자 조절 중합반응을 통하여 고분자 중합체를 제조할 수 있다.

[0105] 상기 RAFT 중합반응은 Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer polymerization을 의미하며, ATRP 분자 조절 중합반응은 atom transfer radical polymerization를 의미한다.

[0106] 본 발명의 일 구현예에서,

[0107] 상기 1) 단계에서 친수성 부분은 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜)메틸 이터 메타크릴레이트) 및 폴리(2-다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이며, 소수성 부분은 폴리(글리시딜 메타아크릴레이트), 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 하나 이상일 수 있다.

[0108] 본 발명의 일 구현예에서,

[0109] 상기 2) 단계의 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 이상일 수 있다.

[0110] 본 발명의 일 구현예에서,

[0111] 상기 3)단계의 가교제는 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트일 수 있다.

[0113] 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.

[0115] **실시예 1. PEO(폴리에틸렌옥사이드)-b-PGMA-N_3(블록 공중합체), 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트(이황화결합 포함 가교제) 및 프로파길아미도프로파노하이드라자이드-프레드니솔론 21-아세테이트(약물)를 포함하는 가교 마이셀의 제조**

[0116] 1-1. PEO-b-PGMA 블록 공중합체의 합성

[0117] PEO-b-PGMA의 블록 공중합체를 PEO-RAFT 매크로 개시제(macro initiator)를 사용한 RAFT를 통해 합성하였다. 일반적인 과정은, PEO-RAFT(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 bath안에서 7시간 동안 교반하였다. 이후, 생성물을 THF에 용해시키고, 과량의 에틸 에터(ethyl ether)에 침전시켜 정제하였다. 고분자를 40℃ 진공 오븐에서 밤새 건조시켰다(0.7g, 수율: 73%).

[0119] 1-2. PEO-b-PGMA-N_3블록 공중합체에 아자이드기 도입

[0120] PEO-b-PGMA-N_3블록 공중합체(M_n of PEO / M_n of PGMA = 1)를 PGMA 세그먼트(segments)의 에폭사이드 링-오프닝 반응(epoxide ring-opening reaction)을 통하여 제조하였다. PEO-b-PGMA(0.40 g, 에폭사이드 잔기(epoxide moieties)의 1.4 mmol), NaN_3(0.406 g, 6.3mmol), NH_4Cl(0.334 g, 6.3mmol)및 DMF(5 mL)의 혼합물을 둥근 플라스크에 50℃에서 24시간 동안 교반하였다. 필터를 통해 불용성 염을 제거시킨 후, 여과액을 24시간 동안 정제수에 투석(MW cutoff, 1 kDa)하였다. 정제수는 약 4시간 마다 교체하였다. 최종 생성물은 동결-건조(freeze-drying)하여 수득하였다(0.39 g, 97%). 상기 PEO-b-PGMA-N_3블록 공중합체의 합성 및 아자이드기 도입 과정을 도 1에 나타내었다.

[0122] 1-3. 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트(이황화결합 포함 가교제)의 합성

[0123] 이황화결합을 포함하는 가교제인 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트를 제조하기 위해서 3,3'-다이티오다이프로피오닉산(3.55 g, 16.9 mmol), 프로파길 알코올(3.3 g, 59.2 mmol) 및 p-톨루엔설폰산 모노수화물(1.6 g, 8.5 mmol)의 벤젠 용액(benzene solution)(80 mL)을 2시간 동안 환류하였다. 반응 혼합물을 포화된 수성 $NaHCO_3$와 소금물, 건조된 $MgSO_4$에 세척한 뒤 농축시켰다. 생성물을 실리카 겔상(hexane/AcOEt, 10/1, v/v)의 플래쉬 컬럼 크로마토 그래피(flash column chromatography)로 단리(2.6 g, 13.3 mmol, 79%)하였다. ^1H

NMR(400 MHz, $CDCl_3$,ppm):4.68(s,4H,$-CH_2-OCO-$),2.88-2.92(t,4H,CH_2-COO-),2.74-2.78(t,4H,$-CH_2-s-$),2.47(s,2H,$CHCCH_2-$).

[0124] 상기 합성된 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트의 ^1H NMR 스펙트럼을 도 2에 나타내었다.

[0126] 1-4. 하이드라존 링커(hydrazone linker)를 통한 프레드니솔론 21-아세테이트(prednisolone 21-acetate, PA)(약물)에 알카인기의 도입(프로파길아미도프로파노하이드라자이드-프레드니솔론 21-아세테이트의 제조)

[0127] 프로파길 아민(propargyl amine)을 마이클 첨가반응을 통하여 터트-부틸 아크릴레이트(tert-butyl acrylate)로 아크릴레이트화하였다. 실온에서 터트-부틸 아크릴레이트(0.9997 g, 7.8 mmol)이 포함된 무수 메탄올(dry methanol)(10 mL)에 프로파길 아민(0.6 g, 10.9 mmol) 용액을 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 24시간 동안 교반시켰다. 과량의 시약 및 용매는 진공을 가하여 제거하였다. ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$,ppm):3.37,3.38(s,2H,$CHCCH_2-NH$),2.84-2.87(t,2H,$NHCH_2-CH_2$),2.38-2.41(t,2H,$NHCH_2-CH_2$),2.171,2.177,2.183(s,1H,$CHCCH_2-NH$),1.39,1.40(s,9H,$(CH_3)_3-$).

[0128] 상기 조반응 혼합물(crude reaction mixture)(1.36 g, 8 mmol)을 무수 메탄올(4 mL)에 용해시키고, 하이드라진 수화물(hydrazine monohydrate)(5 mL, 82 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이후, 반응 혼합물을 50℃에서 12시간 동안 부드럽게 교반하였다. 메탄올과 부산물들은 감압 증류하여 제거시켰고, 유성 잔류물을 프로판-2-올(propan-2-ol)에 용해시켰다. 용매는 다시 감압 증류하여 제거하고, 이 절차는 미반응 하이드라진 수화물 제거를 위해서 두 번 반복하여 프로파길아미도프로파노하이드라자이드를 제조하였다. ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$,ppm):3.37-3.42(s,2H,$CHCCH_2-NH$),2.92,2.93,2.95(t,2H,$NHCH_2-CH_2$),2.33,2.35,2.36(t,2H,$NHCH_2-CH_2$),2.20,2.21(s,1H,$CHCCH_2-NH$).

[0129] 이후, 프레드니솔론 21-아세테이트(100 mg, 0.248 mmol)를 30℃의 10 mL 메탄올에 용해하였다. 상기 제조된 프로파길아미도프로파노하이드라자이드(175 mg, 1.24 mmol)를 상기 용액에 첨가하고 현탁액을 암실에서 격렬하게 교반하였다. 30분 후, 0.2mL의 아세트산을 상기 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 30℃에서 64시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하여 제거하고, 프로파길아미도프로파노하이드라자이드-프레드니솔론 21-아세테이트를 60℃에서 클로로폼-에테르(chloroform-ether)와 재결정하여 수득하였다. ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$,ppm):7.240,7.243(d,1H),6.24,6.27(d,1H),6.00(s,1H),4.81-4.99(dd,2H),4.47-4.48(m,1H),3.63(s,1H),3.48(s,1H),2.94-3.06(t,3H),2.73-2.79(t,1H),2.53-2.61(t,2H),2.31-2.35(m,1H),2.175(s,3H),2.03-2.095(m,4H),1.40-1.85(m,4H),1.24(s,3H),0.97(s,2H),0.82-0.88(m,3H).

[0130] 상기 제조과정을 하기 도 3에 나타내었다.

[0132] 1-5. PEO-b-PGMA-N_3블록 공중합체의 약물(PA) 담지 마이셀의 제조

[0133] PEO-b-PGMA-N_3(5.0mg, 아자이드 그룹의 14.3×10^{-3}mmol), 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트(0.36 mg, 1.2×10^{-3} mmol) 및 프로파길아미도프로파노하이드라자이드-프레드니솔론 21-아세테이트(3.0 mg, 5.7×10^{-3} mmol)을 무수(anhydrous) DMF(1 mL)에 균일하게 용해하였다. 이후, 30 mL의 DI는 하이드로존 결합(hydrozone bond)의 가수 분해를 피하기 위해 붕산염 완충용액(borate buffer solution)에 pH 8.5로 조절되었다. 그리고 DI를 하루 동안 격렬하게 교반하면서 적하하였다. 물(100 μL)에 구리(Ⅱ) 설페이트 펜타하이드레이트(2.2 mg, 8.8 μmol)와 물(100 μL)에 소듐 아스코베이트(sodium ascorbate)(1.75 mg, 8.8 μmol)을 순서대로 첨가하였고, 혼합물이 구리 복합체(copper complexes)의 형성으로 인하여 연노랑색으로 변하게 되었다. 용액을 실온에서 24시간동안 교반하였다. 이후 형성된 용액을 투석막 튜브(dialysis bag)(MW cutoff, 1 kDa)에 옮기고, pH가 8.5인 정제수 2 L에 넣고 4시간마다 정제수를 갈아주고 이틀 동안 투석을 하였다. 마이셀 용액을 0.45 μm 필터에 통과시키고, 동결-건조(freeze-dried)시켰다.

[0135] **실시예 2. PEO-b-PGMA-N_3(블록 공중합체), 다이프로파길아디페이트(이황화결합 비포함 가교제) 및 프로파길아미도프로파노하이드라자이드-프레드니솔론 21-아세테이트(약물)를 포함하는 가교 마이셀의 제조**

[0136] 상기 실시예 1에서 이황화결합을 포함하는 가교제인 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트를 이황화결합을 포함하지 않는 가교제인 다이프로파길아디페이트로 대체한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 가교 마이

셀을 제조하였다.

[0137] 이황화결합을 포함하지 않는 가교제인 다이프로파길아디페이트를 아디프산(2 g, 16.9 mmol), 프로파길 알코올(3.3 g, 59.2 mmol) 및 p-톨루엔설폰산 모노수화물(1.6 g, 8.5 mmol)을 기반으로 상기 실시예 1-3과 같은 방법으로 합성하였다. ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$,ppm):4.63(s,4H,-CH_2-OCO),2.43(s,2H,CHCCH_2-),2.32-2.34(t,4H,OCO-CH_2-CH_2-),1.64-1.66(m,4H,-CH_2-CH_2-CH_2-OCO-).

[0138] 상기 합성된 다이프로파길아디페이트의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 도 4에 나타내었다.

[0140] **실시예 3. PEO-b-PGMA-N_3(블록 공중합체), 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트(이황화결합 포함 가교제) 및 터트-부틸 3-(프로프-2-이닐라미노) 프로페인하이드라자이드-독소루비신(DOX)-아세테이트(약물)를 포함하는 마이셀의 제조**

[0141] 상기 실시예 1에서 프로파길아미도프로파노하이드라자이드-프레드니솔론 21-아세테이트(약물)를 터트-부틸 3-(프로프-2-이닐라미노) 프로페인하이드라자이드-독소루비신-아세테이트(약물)로 대체한 것을 제외하고는 유사한 방법으로 마이셀을 제조하였다.

[0143] 3-1. 하이드라존 링커(hydrazone linker)를 통한 독소루비신(DOX)에 알카인기의 도입(프로파길아미도프로파노하이드라자이드-독소루비신의 제조)

[0144] 프로파길 아민(propargyl amine)을 마이클 첨가반응을 통하여 터트-부틸 아크릴레이트(tert-butyl acrylate)로 아크릴레이트화하였다. 실온에서 터트-부틸 아크릴레이트(0.9997 g, 7.8 mmol)이 포함된 무수 메탄올(dry methanol)(10 mL)에 프로파길 아민(0.6 g, 10.9 mmol) 용액을 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 24시간 동안 교반시켰다. 과량의 시약 및 용매는 진공을 가하여 제거하였다. ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$,ppm):3.37,3.38(s,2H,CHCCH_2-NH),2.84-2.87(t,2H,NHCH_2-CH_2),2.38-2.41(t,2H,NHCH_2-CH_2),2.171,2.177,2.183(s,1H,CHCCH_2-NH),1.39,1.40(s,9H,(CH_3)$_3$-).

[0145] 상기 조반응 혼합물(crude reaction mixture)(1.36 g, 8 mmol)을 무수 메탄올(4 mL)에 용해시키고, 하이드라진 수화물(hydrazine monohydrate)(5 mL, 82 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이후, 반응 혼합물을 50℃에서 12시간 동안 부드럽게 교반하였다. 메탄올과 부산물들은 감압 증류하여 제거시켰고, 유성 잔류물을 프로판-2-올(propan-2-ol)에 용해시켰다. 용매는 다시 감압 증류하여 제거하고, 이 절차는 미반응 하이드라진 수화물 제거를 위해서 두 번 반복하여 프로파길아미도프로파노하이드라자이드를 제조하였다. ^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$,ppm):3.37-3.42(s,2H,CHCCH_2-NH),2.92,2.93,2.95(t,2H,NHCH_2-CH_2),2.33,2.35,2.36(t,2H,NHCH_2-CH_2),2.20,2.21(s,1H,CHCCH_2-NH).

[0146] 이후 DOX (20 mg, 0.034 mmol)을 24℃의 6 mL 메탄올에 용해하였다. 그리고 10분후 프로파길아미도프로파노하이드라자이드(Propargylamidopropanohydrazide) (70 mg, 0.496 mmol)를 용액에 첨가하였고, 현탁액을 어둠 속에서 격렬하게 교반 하였다. 30분 후, 0.1mL의 아세트산을 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 24℃에서 48시간동안 교반하였다. 용매는 감압하여 제거한 뒤 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 침전시키고 나서 원심분리 시켜 프로파길아미도프로파노하이드라자이드-독소루비신 (DOX-alkyne)을 제조하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform): 8.87 (s, 3H), 7.69 (s, 4H), 7.59 (s, 2H), 7.24 (s, 3H), 6.60 (s, 3H), 5.40 (s, 3H), 4.65 (s, 3H), 4.47 - 4.42 (m, 6H), 3.88 - 3.83 (m, 9H), 3.68 (d, 6H), 3.54 (d, 6H), 3.37 (d, 6H), 3.00 (s, 3H), 2.87 (d, 6H), 2.73 (s, 3H), 2.60 - 2.54 (m, 6H), 2.43 (s, 3H), 2.15 (d, 6H), 1.95 (d, 12H), 1.76 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.39 - 1.23 (m, 15H).

[0147] 상기 제조과정을 하기 도 5에 나타내었다.

[0149] 3-2. PEO-b-PGMA-N_3블록 공중합체의 약물(DOX) 담지 마이셀의 제조

[0150] PEO-b-PGMA-N_3(M_n of PEO / M_n of PGMA = 1.16)(5.0mg, 아자이드 그룹의 14.3×10^{-3}mmol), 다이프로파길 3,3'-다이티오다이프로피오네이트(0.36 mg, 16.1×10^{-3} mmol) 및 DOX-알카인 (1.0 mg, 1.42×10^{-3} mmol)을 무수(anhydrous) DMF(1 mL)에 균일하게 용해하였다. 이후, 20mL의 DI는 하이드로존 결합(hydrozone bond)의 가수

분해를 피하기 위해 붕산염 완충용액(borate buffer solution)에 pH 8.5로 조절되었다. 그리고 DI를 하루 동안 격렬하게 교반하면서 적하하였다. 물(100 μL)에 구리(Ⅱ) 설페이트 펜타하이드레이트(1.1 mg, 4.4 μmol)와 물(100 μL)에 소듐 아스코베이트(sodium ascorbate)(1.75 mg, 8.8 μmol)을 순서대로 첨가하였고, 혼합물이 구리 복합체(copper complexes)의 형성으로 인하여 연노랑색으로 변하게 되었다. 용액을 실온에서 24시간동안 교반하였다. 이후 형성된 용액을 투석막 튜브(dialysis bag)(MW cutoff, 1 kDa)에 옮기고, pH가 8.5인 정제수 2L에 넣고 4시간마다 정제수를 갈아주고 이틀 동안 투석을 하였다. 마이셀 용액을 0.45 μm 필터에 통과시키고, 동결-건조(freeze-dried)시켰다.

[0152] **실시예 4. 하이드라존 링커 연결된 DOX를 펜던트로 결합한 PEO-b-PGMA-N_3(블록 공중합체)와 다이프로파길 3,3-다이티오다이프로피오네이트(이황화결합 포함 가교제) 포함하는 가교 마이셀의 제조**

[0154] 4-1. 하이드라존 링커 연결된 DOX를 펜던트 (pendant)로 결합한 PEO-*b*-PGMA-(N_3)-DOX의 제조

[0155] PEO-*b*-PGMA-N_3 (M_n of PEO / M_n of PGMA = 1.16) (200mg, 수산화그룹의 64.4^{-2} mmol)와 트리에틸아민 (triethyl amine) (0.306mL, 3mmol) 을 DMF (5 mL) 에 균일하게 용해하였다. 혼합물을 파라니트로페닐 클로로포메이트 (*p*-Nitrophenyl chloroformate) (*p*-NPC) (350 mg, 1.73 mmol, 2.7 equiv)가 녹아 있는 DMF (5 mL) 용액에 1시간 동안 적하하였다. 이후, 반응을 빛을 차단한 상태로 48시간 동안 교반하면서 진행하였다. 반응 종료 후 과량의 메탄올을 사용하여 미반응의 *p*-NPC을 제거하고, 용매는 회전증발기로 제거하였다. 생성물을 찬 에틸 에터에 침전시키고 걸러서 건조하여 다음 반응에 사용하였다.

[0156] PEO-*b*-PGMA-(N_3)-*p*NPC (300 mg, 1.09 mmol)을 DMF (7 mL)에 녹인 용액을 하이드라진 수화물(hydrazine monohydrate)(2 mL, 22.3 mmol)이 녹아 있는 DMF (2 mL)에 천천히 적하하여 빛을 차단한 상태에서 12시간 동안 교반하였다. 얻어진 생성물은 정제수로서 투석하였다. 정제수를 제거한 다음, 잔류물과 DOX (4 mg, 0.007 mmol)를 DMF (10 mL)에 함께 용해하였다. 혼합물을 60 °C에서 48 시간 동안 교반하였다. 얻어진 생성물을 pH 9로 조절된 정제수에서 12 시간 동안 투석하여 잔류 용매와 미반응 DOX를 제거하였다. 정제된 PEO-*b*-PGMA-(N_3)-DOX 는 동결 건조하였다. PEO-*b*-PGMA-N_3 에 대한 DOX의 결합 비율은 UV-Vis Optizen POP 분광기를 사용하여 485 nm에서의 UV 흡광도를 측정하여 결정하였다. 이를 위하여 순차적으로 희석된 농도의 DOX 용액들을 보정곡선을 만드는데 사용하였다.

[0157] 상기 PEO-*b*-PGMA-(N_3)-DOX 의 제조는 도 6에 나타내었다.

[0159] 4-2. 하이드라존 링커 연결된 DOX를 펜던트로 결합한 PEO-*b*-PGMA-(N_3)-DOX를 사용한 담지 가교 마이셀의 제조

[0160] PEO-b-PGMA-(N_3)-DOX (8.0mg, 아자이드 그룹의 21.6^{-3}mmol)와 다이프로파길 3,3-다이티오다이프로피오네이트 (1.0 mg, 3.5^{-3} mmol) 을 무수DMF(1 mL)에 균일하게 용해하였다. 이후, 20mL의 정제수는 하이드로존 결합(hydrozone bond)의 가수 분해를 피하기 위해 탄산나트륨 (sodium carbonate)과 탄산수소나트륨 (sodium bicarbonate)의 완충 용액으로 pH 9.0로 조절되었다. 그리고 완충용액을 빛을 차단한 상태로 DMF 균일용액에 하루 동안 격렬하게 교반하면서 적하하였다. 상기 혼합액에 구리(Ⅱ) 설페이트 펜타하이드레이트(8.75 mg, 0.035 mmol) 수용액 100 μL와 소듐 아스코베이트(sodium ascorbate)(34.7 mg, 0.175 mmol) 수용액 100 μL을 순서대로 첨가하였고, 이것을 실온에서 빛을 차단한 상태로 24시간 동안 교반하였다. 이후 형성된 가교 마이셀 용액을 투석막 튜브(dialysis bag)(MW cutoff, 3.5 kDa)에 옮기고, pH가 9.0인 정제수 2L에 넣고 4시간마다 정제수를 갈아주고 이틀 동안 투석을 하였다. 마이셀 용액을 0.45 μm 필터에 통과시키고, 동결-건조(freeze-dried)시켰다. 상기 마이셀의 제조는 도 16에 나타내었다.

[0162] **실험예 1. 실시예 1의 마이셀에 대한 FT-IR 분광 분석**

[0163] 고분자 합성과 마이셀 형성을 확인하기 위하여 FT-IR 분광 분석을 하였다. (a) PEO, (b) PEO-RAFT, (c) PEO-b-PGMA, (d) PEO-b-PGMA-N_3 및 (e) PEO-b-PGMA-N_3 마이셀의 FT-IR 스펙트럼 결과를 도 7에 나타내었다.

[0164] 도 7에 나타난 바와 같이, RAFT 제제의 잔기는 1730cm^{-1}의 카르보닐 바이브레이션 밴드(carbonyl vibration band)에 의해서 식별될 수 있었다. PEO-b-PGMA 공중합체의 에폭시 고리 바이브레이션 밴드는 844 및 993cm^{-1}에

서 나타났다. 2800-3000cm^{-1}에서 보이는 흡수 밴드는 PGMA 부분의 메틸렌(methylene)과 메틸(methyl) 수소 결합의 진동으로 판단된다. 그러나, 이러한 밴드 특징들은 PEO-RAFT 매크로 개시제의 메틸렌 진동과 함께 중첩되어서 FT-IR스펙트럼에서 독립적으로 관찰할 수는 없다. PEO-b-PGMA의 아자이드화 반응은 PGMA-N_3 잔기에서 기인한, 아자이드 작용기의 원자가 진동으로 암시되는, 새로운 흡수 파장대인 2095cm^{-1}의 밴드로 증명된다. 개환된 에폭시 고리는 3450cm^{-1}에서 강하고 넓은 밴드의 하이드록실(hydroxyl) 작용기를 만들어 내고, 반면에 844와 993cm^{-1}에서 나타났던 고리의 특성밴드는 사라졌다. 클릭 반응 후 마이셀의 FT-IR 스펙트럼에서는 아자이드 특성 밴드의 강도가 줄어들어 아자이드 작용기가 가교제의 알카인 작용기와 반응하였음을 확인하였다.

[0166] **실험예 2. 실시예 1의 마이셀에 대한 ^{1}H NMR 스펙트럼 분석**

[0167] 실시예 1의 마이셀 고분자의 구조를 ^{1}H NMR 스펙트럼을 통해 확인하였다. (a) PEO-b-PGMA, (b) PEO-b-PGMA-N_3 및 (c) DMSO-d6에서 PEO-b-PGMA-N_3 마이셀의 ^{1}H NMR 스펙트럼을 도 8에 나타내었다.

[0168] 도 8에 나타난 바와 같이, 3.51 ppm에서 PEO 주사슬의 메틸렌 양성자 피크가 나타났으며, 그리고 3.21, 2.81, 2.67 ppm에서의 피크는 에폭시 고리의 메틸렌 양성자 (s, t)에 해당되고 4.31, 3.73, 1.89, 1.82, 1.20, 0.98, 0.81 ppm에서 나타나는 피크는 PGMA 부분의 메틸렌 (r, p)와 메틸 (q) 양성자와 관련이 있다. 개환 반응은 분광분석으로 에폭시 고리에 결합된 양성자 피크의 변화로 확인할 수 있다. PGMA 부분의 피크가 변화되더라도 PEO 부분의 특성 피크는 그대로 유지되었다. 여기서, 열린 고리의 새로운 피크는 5.51, 3.88ppm에서 나타나고 이것은 CH-O (s'), CH2-O (r'), CH_2-N_3 (t')의 양성자를 의미한다. 반면에 에폭시 고리의 양성자 피크는 4.31, 3.73, 3.21, 2.81, 2.67ppm에서 사라졌다. 이 결과는 아자이드 작용기가 PGMA부분의 주쇄에 고정된 것을 보여준다. 디알카인 가교제와 PGMA-N_3 부분의 아자이드 작용기 사이의 클릭 반응으로 PEO 쉘과 가교된 PGMA-N_3의 코어의 구성으로 이루어진 가교된 마이셀이 형성된다. 이것의 ^{1}H NMR 스펙트럼에서 마이셀 코어에 존재하는 PGMA-N_3 블록의 양성자들은 PEO 코로나에 의해서 자기 공명으로부터 가려져 극히 떨어진 신호를 나타낸다. 그 결과, r', s', t', p, q의 가교된 PGMA-N_3의 양성자 신호는 가교되지 않은 블록공중합체의 PGMA-N_3 부분과 비교하여 상당히 감소되었다.

[0170] **실험예 3. PEO-b-PGMA-N_3 블록 공중합체의 임계 마이셀 농도(CMC) 측정**

[0171] PEO-b-PGMA-N_3 공중합체의 임계 마이셀 농도(critical micelle concentration, CMC)는 소수성 탐침으로 피렌을 사용한 형광 분광 광도계로 측정하였다. 간단히, 아세톤(6.0×10^{-6} M)내의 피렌용액은 튜브에 첨가한 뒤 그리고 아세톤은 60에서 완전히 증발되었다. 10에서 150 mg/L의 범위의 농도를 가지는 PEO_{2k}-b-$PGMA_{2k}$-N_3용액은 최종 피렌 농도인 6.0×10^{-7} M를 만들기 위해서 각각의 튜브에 첨가되었다. 그리고, 이 용액은 실온에서 밤새 교반하였다. 피렌 형광 분석은 333 nm의 여기 파장을 가지는 형광 분광 광도계로 측정하였고 373 및 384 nm대역에서 방출 형광을 관찰하였다. 373nm (I373)피크에서 384nm (I384)피크의 강도 비는 CMC를 계산하기 위하여 분석하였다.

[0173] **실험예 4. 코어가 가교된 마이셀(실시예 1의 마이셀) 및 코어가 가교되지 않은 마이셀에 대한 DLS 및 TEM 측정**

[0174] 가교된 소수성 코어의 추가적인 확인을 위해서 DLS를 통해 코어가 가교된 마이셀 및 코어가 가교되지 않은 마이셀의 역학적 직경의 변화를 측정한 결과를 도 9에 나타내었다.

[0175] 도 9에 나타난 바와 같이, 가교되지 않은 마이셀은 82nm, 가교된 마이셀은 78nm의 입자 크기 분포를 가지고 있음을 확인할 수 있다. 가교 후의 입자 크기는 가교된구조의 소형화와 조밀화가 강화되어 약간 감소하였다.

[0176] 또한 코어가 가교된 마이셀 및 코어가 가교되지 않은 마이셀의 크기와 형태를 TEM을 통해 확인한 결과를 도 10에 나타내었다.

[0177] 도 10에 나타난 바와 같이, TEM 사진에서 가교되지 않은 마이셀과 가교된 마이셀 모두 균일한 구형 분포를 보였다. 가교되지 않은 마이셀의 평균 직경은 대략 75 nm이고 가교된 마이셀의 평균직경은 약 65 nm였다. TEM측정으로부터 얻은 크기는 TEM샘플 제조과정 중에 마이셀의 건조에 의한 수축 때문에 DLS로부터 얻은 값보다 작았다.

[0179] **실험예 5. 코어가 가교된 마이셀(실시예 1의 마이셀) 및 가교되지 않은 마이셀의 용매에서 희석시간에 따른 직경의 변화 분석**

[0180] 코어가 가교된 마이셀 및 가교되지 않은 마이셀을 5, 10, 30배의 용매로 희석시켰다. DMF는 PEO와 PGMA-N_3블록 모두에 대한 양용매로서 선택되었고, 반면 포스페이트 완충 용액(phosphate buffer solution, PBS)은 PGMA-N_3블록에 대한 빈용매로 선택되었다. 용매의 희석시간에 따른 직경의 변화를 도 11에 나타내었다.

[0181] 도 11에 나타난 바와 같이, 가교되지 않은 마이셀의 직경은 PBS(pH 7.4)와 DMF에 희석됨에 따라 완전히 변화되었다. 30분 동안 희석시킨 후, 가교되지 않은 마이셀의 유체 역학적 평균 직경은 유니머(unimer) 용액을 나타내는 5 nm 이하였다. 이는 블록 공중합체 용액 농도가 단지 5배만 희석되어도 마이셀의 해리를 야기하는 임계 마이셀 농도(CMC)값(54.954 mg/L) 이하에 도달한다는 것을 의미한다. 가교되지 않은 마이셀과는 다르게 가교된 마이셀의 입자 크기는 PBS 희석에서 78에서 88nm로 DMF 희석에서 78에서 103nm로 약간 증가하였다. 즉, 가교된 마이셀은 여전히 코어-쉘 구조를 유지하고 있으며 용액 희석을 하더라도 불용성의 코어가 붕괴되지 않고 단지 팽윤된 상태임을 나타낸다.

[0183] **실험예 6. 다이티오트레이톨(DTT) 내에서의 실시예 1 및 실시예 2의 마이셀의 분해도 분석**

[0184] 마이셀 코어 내의 다이설파이드 가교 구조가 산화 환원 반응에 의하여 분해되는지 여부를 조사하기 위해, 과량의 DTT를 가교된 마이셀의 DMF 용액에 첨가하였다. 그 결과 마이셀의 유체역학적 지름이 유니머 용액을 암시하는 크기인 5 nm 이하대로 관찰되었으며, 이것은 가교구조가 산화 환원 응답성의 결합임을 의미한다. DTT(10 mM)를 실시예 1 및 실시예 2의 마이셀이 포함된 PBS 용액에 첨가한 후 시간에 따라 입자 크기를 측정한 결과를 도 12에 나타내었다.

[0185] 도 12에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 마이셀의 유체역학적 직경은 상당히 증가되었고 입자 크기 분포가 넓어졌으나, 실시예 2의 마이셀의 크기는 눈에 띄게 변하지 않았다. 이것은 다음과 같이 설명될 수 있는데, S-S 결합이 없는 실시예 2의 마이셀은 환원제에 영향을 받지 않는 반면 S-S결합이 있는 실시예 1의 마이셀은 DTT에 의해 분해되어 해리된다. 가교된 실시예 1의 마이셀의 분해율은 시간에 따라 증가하고 마이셀의 코어구조는 느슨해지고, 궁극적으로 응집체의 크기는 비교적 큰 소수성 부분의 형성으로 인하여 증가하였다.

[0186] 실시예 1 및 실시예 2의 DTT에 의한 가교 결합 해리 및 약물 방출 모형을 도 13에 나타내었다.

[0188] **실험예 7. 실시예 1의 마이셀의 약물 탑재 효율 분석**

[0189] 물에서 매우 낮은 용해도를 가지는 항 염증 약물인 프레드니솔론 아세테이트(PA)를 소수성 코어 내에 탑재하는 시범 약물로 사용하였다. 하이드라존 결합과 알카인 작용기로 기능화된 PA를 코어 가교반응과 동시에 클릭 반응으로 마이셀 코어에 공유결합시켰다. 아자이드: 가교제: PA-알카인을 1: 0.14: 0.66 몰 비율로 주입한 결과 PA 탑재 효율은 83%로 측정되었다. 이 결과는 통상 6-32%의 효율을 보여주는 물리적 탑재 시스템보다 훨씬 높은 값이다. 즉, 알카인-아자이드 클릭 반응을 통하여 마이셀에 대한 약물 탑재에 탁월한 성능을 상승시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0191] **실험예 8. 실시예 1 및 실시예 2의 마이셀의 약물 방출 양상 분석**

[0192] 본 발명의 마이셀이 약물의 조기 방출을 효과적으로 방지하고 pH와 환원 반응의 이중 응답성을 가진 것을 증명하기 위하여 프레드니솔론 아세테이트 방출 양상을 분석하였다. PA가 적재된 가교된 마이셀을 DTT의 첨가 또는 없는 상태에서 pH 7.4 또는 5인 37℃의 PBS에서 배양하였다. 37℃에서 서로 다른 DTT 농도와 pH에 따른 실시예 1 및 실시예 2의 마이셀로부터 시험관내 PA 방출 그래프를 도 14에 나타내었다.

[0193] 도 14에 나타난 바와 같이, pH 7.4에서 PA는 트리아졸 (triazole) 고리로 알려진 PA와 PGMA-N_3코어사이의 공유결합으로 인하여 초기 방출이 거의 없었다. DTT의 농도가 10 mM로 증가되면, 72시간 후의 PA 방출양은 초기 탑재 값의 약 21%로 측정되었다. 이와 대조적으로, PA 방출은 pH 5에서 상당히 증가되었다. 앞서 언급한 것처럼 산 응답성의 하이드라존 결합은 pH 5에서 분해되어 PA가 마이셀의 코어로부터 쉽게 확산되어 방출된다. 높은 DTT 농도에서는 pH 7.4와 5에서 많은 수의 다이설파이드 결합의 분해에 의하여 다량의 PA가 방출되는데, 이것은 환원 응답성의 PA 방출 특성을 가리킨다. pH 5에서 10 mM의 DTT 존재 하에 72시간 후의 PA 방출값은 80%에 도달하였다.

[0195] **실험예 9. 실시예 3 및 실시예 4의 가교 마이셀의 약물 방출 양상 분석**

[0196] 실시예 3 및 실시예 4의 가교 마이셀 제조 방법 및 pH 5에서 GSH에 의한 가교 결합 해리 및 약물 방출 모형을 도 15와 16에 나타내었다.

[0197] 본 발명의 가교 마이셀이 약물의 조기 방출을 효과적으로 방지하고 pH와 환원 반응의 이중 응답성을 가진 것을 증명하기 위하여 DOX 방출 양상을 분석하였다. DOX가 적재된 가교된 마이셀을 글루타치온 (glutathione, GSH)의 첨가 또는 없는 상태에서 37°C 의 pH 7.4 PBS 완충용액 또는 pH 5 아세테이트 완충용액에서 배양하였다. 용액을 투석막(MW cutoff, 3.5 kDa)을 사용하여 주어진 시간에 방출되는 DOX를 UV 485nm 흡광도를 분석하는 방식으로 측정하였다. 실험은 각각 3회씩 수행하여 평균값을 취하였다. 용액을 37°C에서 서로 다른 GSH 농도와 pH에 따른 실시예 3 및 실시예 4의 마이셀로부터 시험관내 DOX 방출 그래프를 도 17과 18에 나타내었다. 두 가지 경우 모두, pH 5와 PSH 존재 하에서만 다량의 DOX 방출 효과를 나타냄으로 산과 환원 이중 응답성의 특성을 잘 보여준다.

[0199] **실험예 10. 실시예 1 및 실시예 3의 마이셀의 세포독성 실험**

[0200] 실시예 1의 마이셀의 세포 생존율은 표준 MTT 분석을 통해서 평가하였다. 세포를 12 mm의 커버슬립을 포함하는 6-웰 플레이트(웰 당×5^4)에 시딩한 후 고분자와 DMSO(200 μl)로 처리하고 나서 24시간 동안 인큐베이션 하였다. 상기 세포 시료를 PBS로 씻고, 실온에서 1시간동안 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 방치하였다. 그리고 이것을 PBS로 세 번 더 씻은 후에 5분 동안 0.1%(w/v) Triton X-100에서 투과시킨 뒤에 PBS로 다시 씻고 나서 20분 동안 200 μg/ml의 4', 6-다이아미디노-2-페닐인돌(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(MTT, 시그마-알드리치)에 인큐베이션하여 착색시켰다. 착색된 세포를 형광 현미경(fluorescence microscope)으로 분석하였다.

[0201] MTT분석은 PEO-b-PGMA-PA의 가교된 마이셀에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 사용되었다. 24시간 동안 Hoechst 33342세포의 세포 생존율 분석 결과를 도 19에 나타내었다.

[0202] 도 19에 나타난 바와 같이, 최대 10 μg/mL의 마이셀 농도에서 75% 세포 생존율을 보여주며 이것은 무시할만한 세포독성을 가지는 것을 의미한다. 이것은 PEO와 PGMA-N_3 세그먼트의 생체 적합성 때문인 것으로 판명된다. 그러나 10 μg/mL 의 PA를 가지는 자유 PA와 PA-담지된 가교된 마이셀로 Hoechst 33342세포를 처리시 세포 생존율은 각각 ~50%와 ~60%로 급격히 감소하였다. 현재의 연구에서 PA-담지된 가교된 마이셀이 인큐베이션 도중 방출된 약물에 인해 높은 세포독성을 가지고 있음을 주목할 필요가 있다.

[0203] PA가 담지된 가교된 마이셀의 존재하에 24시간의 인큐베이션 후에 Hoechst 33342세포의 형광사진을 도 20에 나타내었다.

[0204] 도 20에 나타난 바와 같이, 독점적으로 푸른빛을 내는 Hoechst 3342와 함께 착색된 세포 핵 내에서 PA의 강렬한 푸른 형광을 관측할 수 있었다. 이 결과는 PA-담지된 가교된 마이셀의 효율적인 활용과 세포 내 효과적인 약물 방출과 세포 핵 안의 PA의 현저한 축적을 나타낸다

[0205] 또한 실시예 3의 마이셀의 세포 생존율은 표준 MTT 분석을 통해서 평가하였다. 세포는 웰 당 2^4의 밀도를 가지는 96 웰 플레이트(well plate)에 배양시켰다. 앞서 말한 농도대로 마이셀을 처리한 후, 4', 6-다이아미디노-2-페닐인돌(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (MTT, 시그마-알드리치)을 각각의 세포(최종 농도 0.5 mg/mL)가 담긴 웰에 첨가 하였고, 95% 공기/5% CO_2의 습한 상태와 37도씨의 조건에서 1.5시간 동안 인큐베이션 하였다. 2-아이소프로판올(2-isopropanol)용매 내에 0.08N HCl이 첨가된 용액은 푸른 빛의 MTT-포르마잔(formazan) 생성물을 용해시키기 위해 첨가한 후, 실온에서 30분 더 인큐베이션하였다. 그리고 세포들을 형광 현미경(fluorescence microscope)으로 분석하였다.

[0206] PEO-b-PGMA-DOX 마이셀의 시험관 내 효능은 인간의 자궁경부암 Hoechst 33342 세포주를 이용한 세포 생존율 분석을 통해 연구하였다. 수정된 MTT 분석은 DOX가 활성이 유지되는지 확인하기 위하여 Hoehst 33342세포를 방출을 통해서 수행하였다. 24시간 동안 Hoechst 33342세포의 세포 생존율 분석 결과를 도 21에 나타내었다.

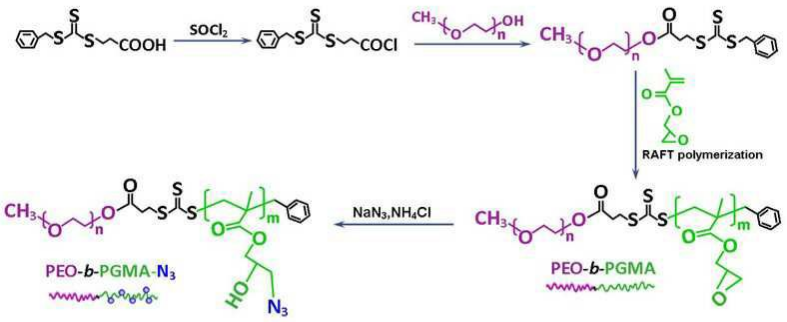
[0207] 도 21에 나타난 바와 같이, PEO-b-PGMA-DOX 마이셀은 Hoechst 33342 세포내에서 상당한 세포독성을 유발하는 반면에 PEO-b-PGMA-N_3처리된 세포들은 전 영역에서 걸친 테스트를 통하여 사실상 독성이 없는 것을 나타냈다. PEO-b-PGMA-DOX의 일반적인 친수성 공중합체는 매우 생체 적합적이고 독성이 없어 본 시스템에서 요구하는 특징을 충족시킴을 확인할 수 있었다.

[0208] PEO-b-PGMA-DOX 마이셀의 세포 흡수 효율은 공초점 레이저 형광 현미경(confocal laser fluorescence microscopy)을 통해 측정하였다. Hoechst 33342세포는 일반적인 PEO-b-PGMA-DOX 고분자와 동일한 투여량으로 4 시간 동안 인큐베이션 하였다. DOX-담지된 가교된 마이셀의 존재하에 24시간의 인큐베이션 후에 Hoechst 33342 세포의 형광사진을 도 22에 나타내었다.

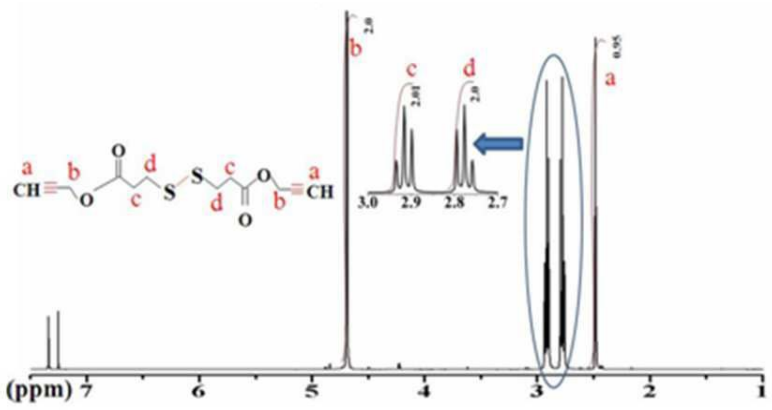
[0209] 도 20에 나타난 바와 같이, 세포내 마이셀의 성공적인 담지화를 나타내는 것으로, DOX-담지된 마이셀 처리된 세포에서 DOX존재를 적색 형광으로 나타낸다. PEO-b-PGMA-DOX 마이셀은 제어된 방식으로 분해된 DOX를 방출하여 엔도솜(endosomal) 운반체 내에 초기에 존재한 것으로 보인다.

도면

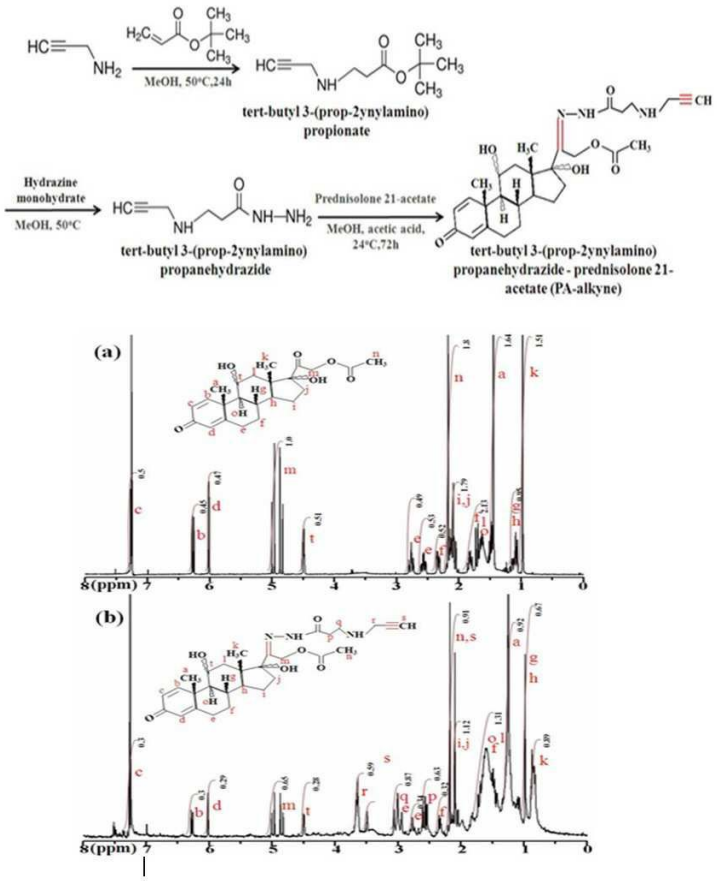
도면1



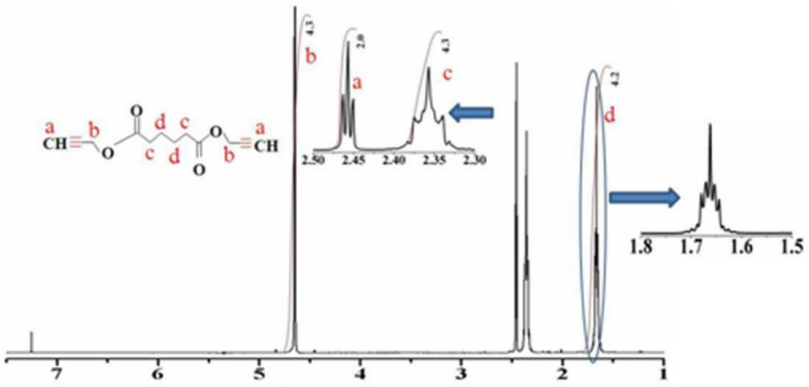
도면2



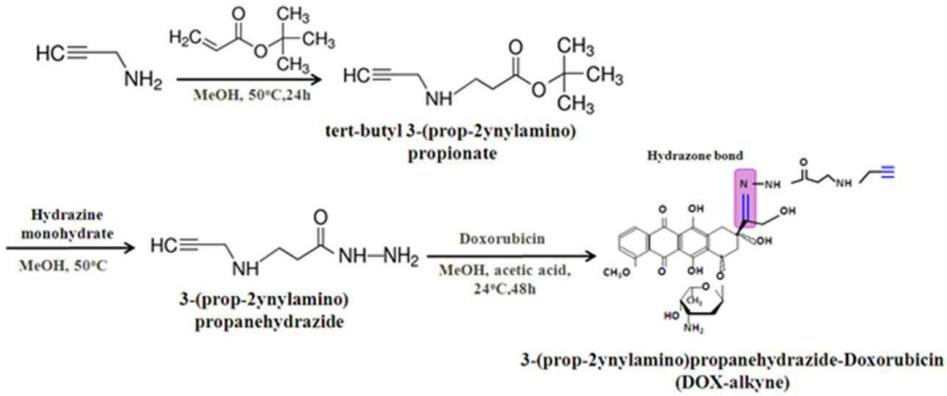
도면3


MeOH, 50°C,24h
tert-butyl 3-(prop-2ynylamino) propionate
Hydrazine monohydrate
MeOH, 50°C
tert-butyl 3-(prop-2ynylamino) propanehydrazide
Prednisolone 21-acetate
MeOH, acetic acid, 24°C,72h
tert-butyl 3-(prop-2ynylamino) propanehydrazide - prednisolone 21-acetate (PA-alkyne)
(a)
(b)
δ(ppm)

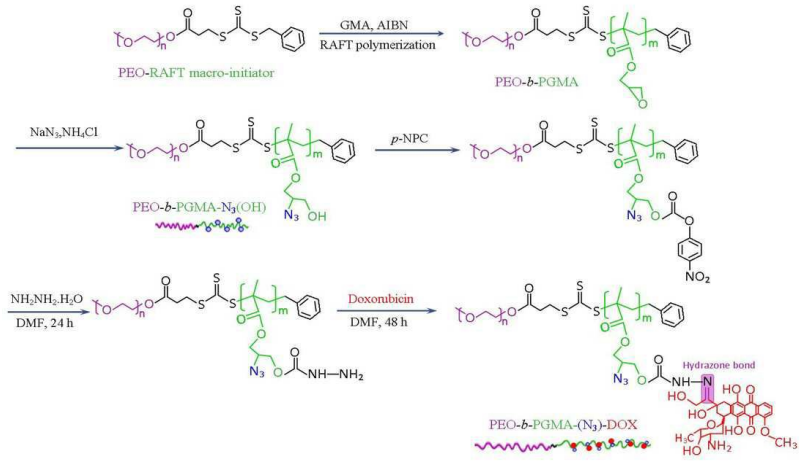
도면4


2.50 2.45 2.40 2.35 2.30
1.8 1.7 1.6 1.5

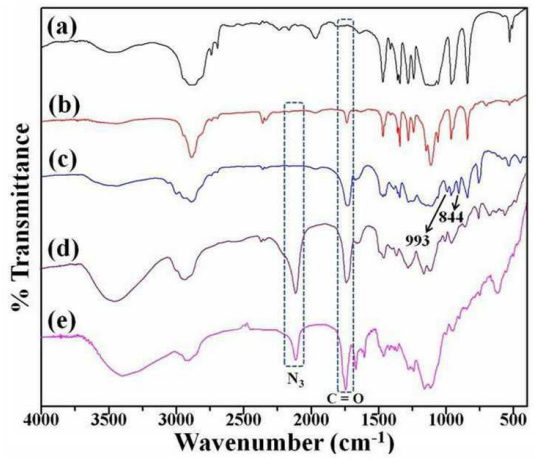
도면5


MeOH, 50°C,24h
tert-butyl 3-(prop-2ynylamino) propionate
Hydrazine monohydrate
MeOH, 50°C
3-(prop-2ynylamino) propanehydrazide
Doxorubicin
MeOH, acetic acid, 24°C,48h
Hydrazone bond
3-(prop-2ynylamino)propanehydrazide-Doxorubicin (DOX-alkyne)

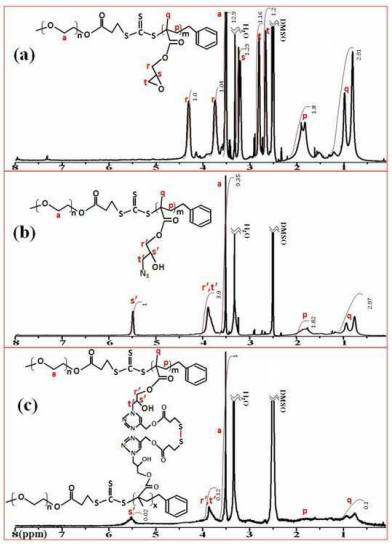
도면6


PEO-RAFT macro-initiator
GMA, AIBN
RAFT polymerization
PEO-b-PGMA
NaN3,NH4Cl
PEO-b-PGMA-N3(OH)
p-NPC
NH2NH2.H2O
DMF, 24 h
Doxorubicin
DMF, 48 h
Hydrazone bond
PEO-b-PGMA-(N3)-DOX

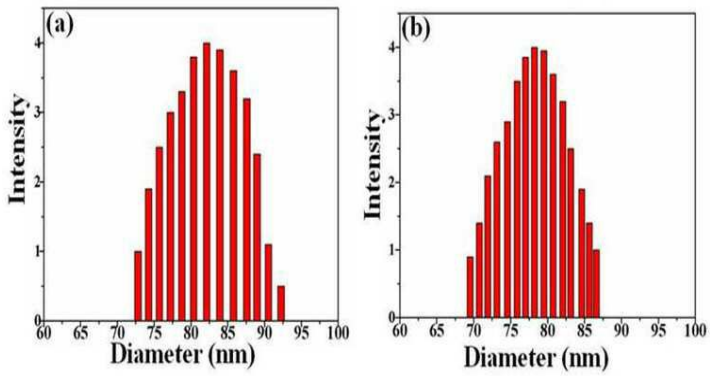
도면7


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
844
993
N3
C=O
% Transmittance
Wavenumber (cm-1)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500

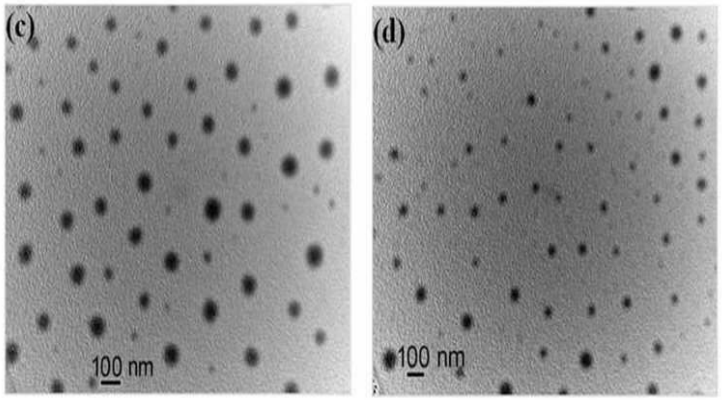
도면8


(a)
(b)
(c)
δ(ppm)

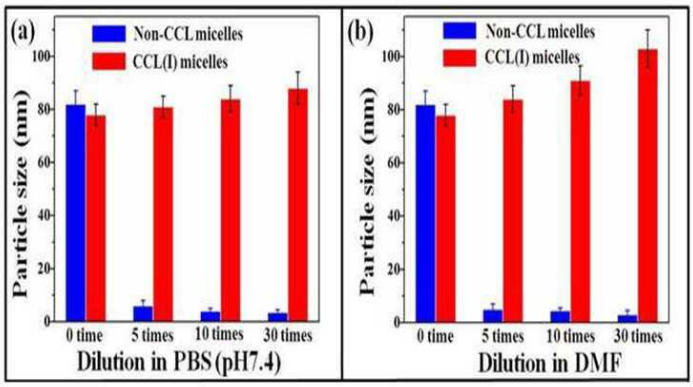
도면9


(a)
Intensity
Diameter (nm)
(b)
Intensity
Diameter (nm)

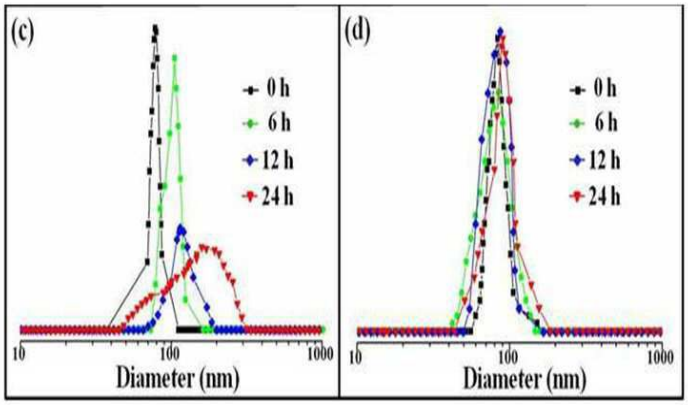
도면10


(c)
100 nm
(d)
100 nm

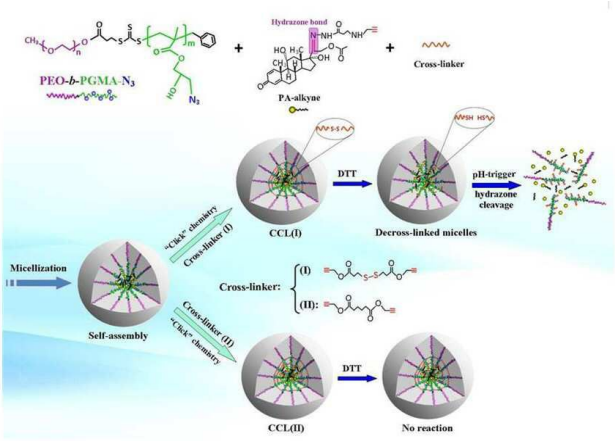
도면11



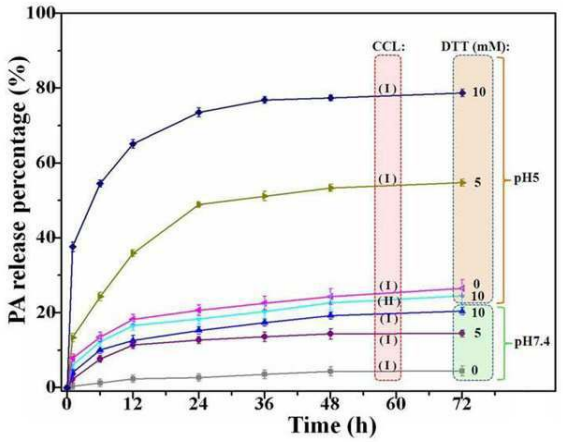
도면12



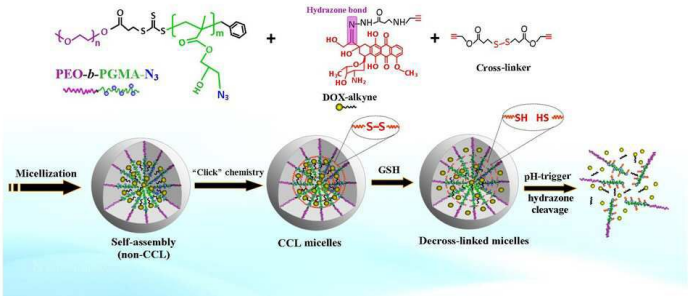
도면13



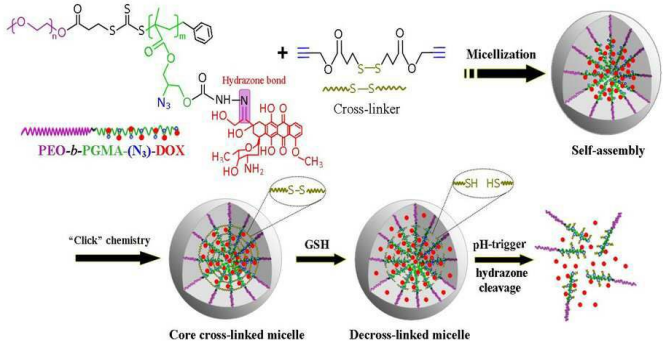
도면14



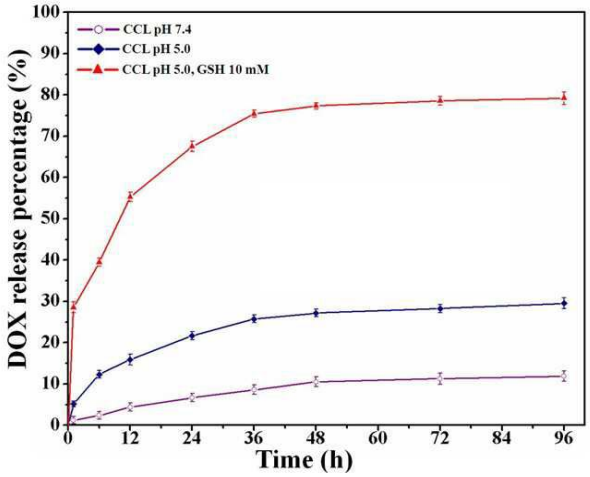
도면15



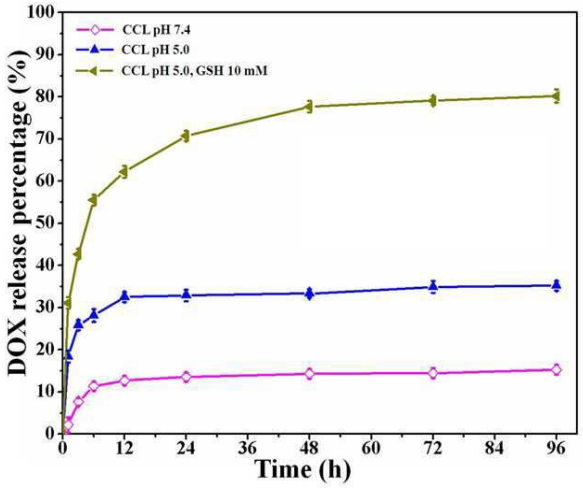
도면16



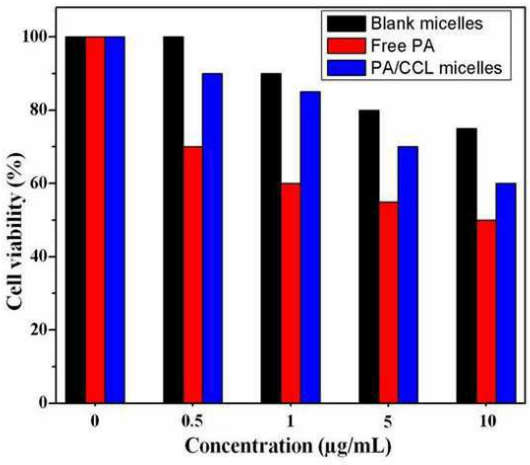
도면17



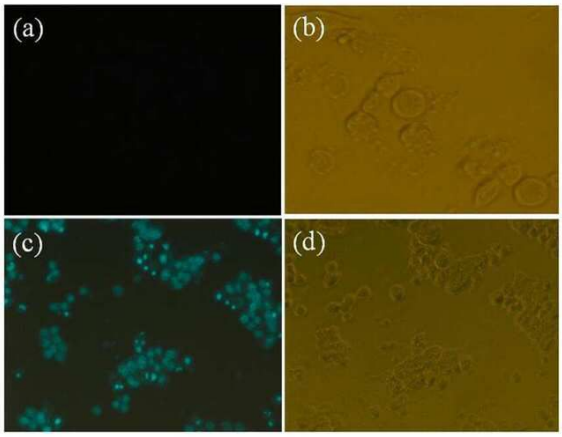
도면18



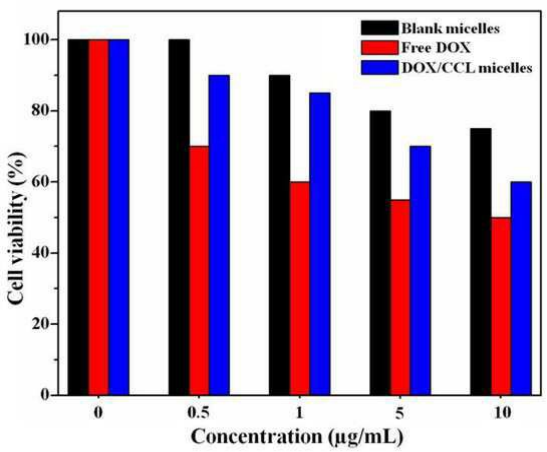
도면19



도면20



도면21



도면22

