



(51) 국제특허분류:

A61K 49/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/004254

(22) 국제출원일:

2018 년 4 월 11 일 (11.04.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0048783 2017 년 4 월 14 일 (14.04.2017) KR

(71) 출원인: 창원대학교 산학협력단 (CHANGWON NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 51140 경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동), Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 이용일 (LEE, Yong Ill); 51499 경상남도 창원시 성산구 원이대로 774, 503동 404호, Gyeongsangnam-do (KR). 샤리포브미르코빌 (MIRKOMIL, Sharipov); 51140 경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동), Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 김정수 (KIM, Jung Su); 05543 서울시 송파구 올림픽로 360, 5층(망이동), Seoul (KR).

(81)

(별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84)

(별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

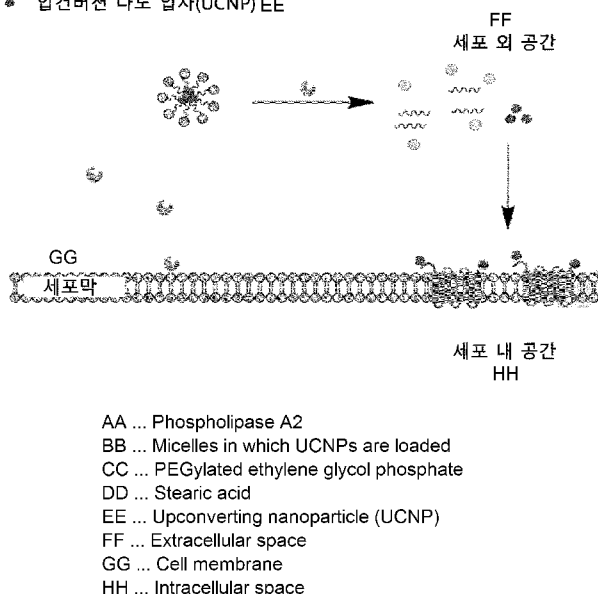
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: NANOCARRIERS FOR PROSTATE CANCER CELL TARGETED THERAPY AND/OR DIAGNOSIS THEREOF

(54) 발명의 명칭: 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체

- 포스포리파아제 A₂ AA
- UCNP 로딩된 미셀 BB
- 페그화 에틸렌 글리콜 포스페이트 CC
- 스테아르산 DD
- 업컨버전 나노 입자(UCNP) EE



(57) Abstract: The present invention relates to nanocarriers for prostate cancer cell targeted therapy and/or diagnosis thereof, characterized by micelles comprising a phosphate surfactant represented by a specific chemical formula. The micelles comprising the phosphate surfactant constituting the nanocarriers for prostate cancer cell targeted therapy and/or diagnosis thereof, according to the present invention, enables selective release, into prostate cancer cells, of therapeutic agent or diagnostic agent particles, which have been cleaved by over-expressed enzymes near the prostate cancer cells and loaded into the micelles, thereby enabling therapeutic and/or diagnostic effects to be maximized while more remarkably reducing the side effects of drugs *in vivo* than conventional technology.

(57) 요약서: 본 발명은 특정 화학식으로 표시되는 인산염(phosphate) 계면활성제로 이루어진 미셀(micelle)인 것을 특징으로 하는 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체에 대한 것으로서, 본 발명에 따른 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체를 구성하는 인산염 계면활성제로 이루어진 미셀은, 전립선암 세포 주변의 과발현된 효소에 의해 절단되어 미셀에 로딩된 치료제 또는 진단제 입자를 전립선암 세포에 선택적으로 방출하는 것이 가능하기 때문에 종래 기술에 비해 생체 내에서 약물 부작용을 현저히 감소시키면서도 치료 및/또는 진단 효과를 극대화할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체 기술분야

- [1] 본 발명은 전립선암의 치료제 및/또는 진단제를 담지하며, 전립선암 세포에 대해 높은 선택성을 가지는 나노담체에 대한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 약물을 생체 내 기관, 조직, 세포 또는 세포소기관과 같은 목적하는 표적에는 효과적으로 더 많이 축적시킬 수 있음과 동시에, 원하지 않는 비표적에는 축적되는 것을 줄임으로써 약효를 향상시키고, 부작용은 감소시킬 수 있는 기술을 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [4] 한편, 암세포의 진단, 특히, 초기 단계의 암세포 진단은 매년 전 세계적으로 천 4백만 건 이상의 암이 발병하여 연구자들의 엄청난 관심을 받았다. 간 조직과 관련된 질병을 진단하는데 사용되는 널리 알려진 조영제 나노 입자 중 하나는 텍스트란으로 코팅된 초전도 산화철 나노 입자인 페리덱스(Feridex)이다.
- [5] 그러나, 생물학적 시스템에 상기와 같이 약물 또는 영상화제 나노 입자를 적용함에 있어서 독성과 낮은 분산성이 여전히 문제가 되고 있다. 이에, 특정 종양 세포에 대한 선택성을 증가시키고 분산성을 향상시킴으로써 비암성(non-cancerous) 세포에 대한 세포 독성을 감소시키기 위해 생체 적합성 화학 물질 및 압타머, 항체, 당 및 엽산과 같은 생물학적 실체(entity)를 사용하는 것을 포함하는 나노 입자 표면 개질(surface modification)이 해결 방안으로 제시되고 있다,
- [6] 하지만, 표적에 대한 약물 또는 영상화제 나노 입자의 분배, 신진 대사 및 방출의 복잡한 방법을 고려할 때, 완벽한 전달 시스템의 설계는 여전히 해결이 쉽지 않은 복잡한 문제이다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 생체 내의 특정 위치, 구체적으로, 전립선암 세포 주변에서 치료제 및/또는 진단제 입자를 선택적으로 방출함으로써, 약물 및/또는 진단제 입자의 투여량 감소에 따른 부작용 최소화 및 치료 및/또는 진단 효과 극대화를 동시에 꾀할 수 있는 신규한 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체의 제공을 그 목적으로 한다.

[9]

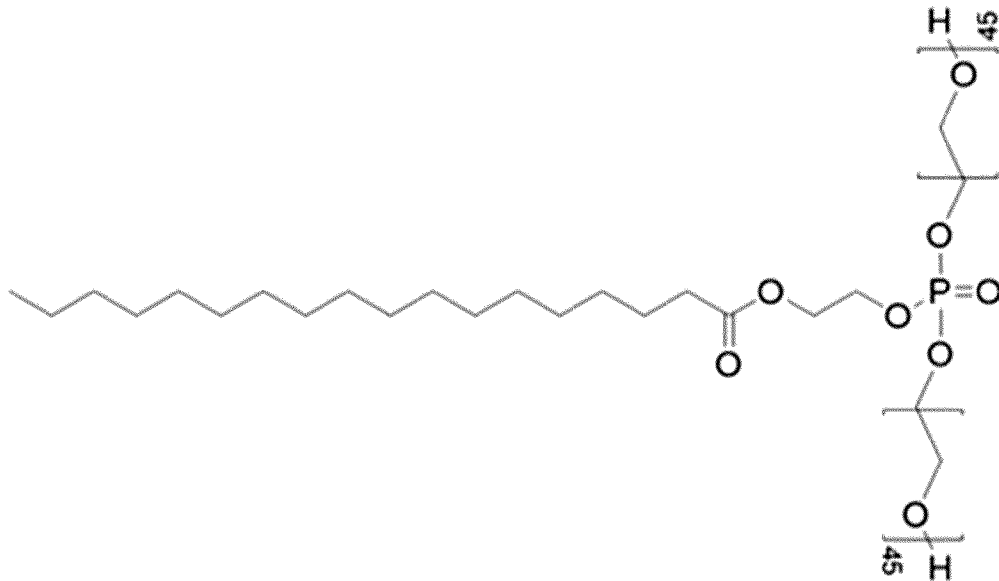
과제 해결 수단

- [10] 상기한 바와 같은 기술적 과제를 달성하기 위해서 본 발명은, 하기 화학식으로

표시되는 인산염(phosphate) 계면활성제로 이루어진 미셀(micelle)인 것을 특징으로 하는 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체를 제공한다.

[11] [화학식]

[12]



[13]

[14] 또한, 상기 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체는, 담지된 치료제 및/또는 진단제 입자를 전립선암 세포에 대해 선택적 방출(selective release)하는 것을 특징으로 한다.

[15] 또한, 상기 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체는, 전립선암 세포에서 과발현된 분비형 포스포리파아제 A2(sPLA-2)에 의해 상기 인산염(phosphate) 계면활성제에 포함된 에스테르기(ester group)가 가수분해되어 치료제 및/또는 진단제 입자를 방출하는 것을 특징으로 한다.

[16] 그리고, 본 발명은 발명의 다른 측면에서 상기 나노담체 및 상기 나노담체에 로딩된(loaded) 진단제를 포함하는 바이오 이미징용 입자를 제공한다.

[17] 또한, 상기 진단제는 형광제, 방사능제 또는 조영제인 것을 특징으로 한다.

[18] 또한, 상기 진단제는 업컨버전 형광체 나노입자인 것을 특징으로 한다.

[19] 또한, 상기 업컨버전 형광체 나노입자는, $\text{NaAF}_4\text{:B}_1\text{/B}_2\text{/B}_3$ (단, 상기 A는 란타늄족 원소이고, 상기 B_1 , B_2 및 B_3 는 서로 다른 희토류 원소임)로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[20] 또한, 상기 A는 Y, Tb, Dy, Ho, Tm, Lu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm 및 Eu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 한다.

[21] 또한, 상기 B_1 , B_2 및 B_3 는 서로 상이하며 각각 Yb, Er, Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Tm, 및 Lu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 한다.

- [22] 그리고, 본 발명은 발명의 또 다른 측면에서, 상기 바이오 이미징용 입자를 생물학적 환경(biological environment)에 배치하는 단계; 및 상기 생물학적 환경 내에 위치한 전립선암 세포 표면에 진단제 입자를 선택적으로 방출해 전달하는 단계를 포함하는 전립선암 진단 방법을 제공한다.
- [23] 그리고, 본 발명은 발명의 또 다른 측면에서, 상기 나노담체 및 상기 나노담체에 로딩된 전립선암 치료제를 포함하는 약물전달체를 제공한다.
- [24] 그리고, 본 발명은 발명의 또 다른 측면에서, 상기 약물전달체를 생물학적 환경(biological environment)에 배치하는 단계; 및 상기 생물학적 환경 내에 위치한 전립선암 세포 표면에 치료제 입자를 선택적으로 방출해 전달하는 단계를 포함하는 전립선암 치료 방법을 제공한다.
- [25] 그리고, 본 발명은 발명의 또 다른 측면에서, 상기 약물전달체를 유효성분으로 포함하는 전립선암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [26] 또한, 상기 전립선암 치료용 약학적 조성물은 주사제, 액제, 산제, 현탁제, 과립제, 시럽제, 캡슐제, 환제 또는 정제 형태의 제형인 것을 특징으로 한다.

[27]

발명의 효과

- [28] 본 발명에 따른 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체를 구성하는 인산염 계면활성제로 이루어진 미셀은, 전립선암 세포 주변의 과발현된 효소에 의해 화학결합이 절단되어 미셀에 로딩된 치료제 또는 진단제 입자를 전립선암 세포에만 선택적으로 방출하는 것이 가능하기 때문에 종래 기술에 비해 생체 내에서 약물 부작용을 현저히 감소시키면서도 치료 및/또는 진단 효과를 극대화할 수 있다.

[29]

도면의 간단한 설명

- [30] 도 1은 본 발명에 따른 바이오 이미징용 입자에 포함된 업컨버전 형광 나노 입자가 전립선암 세포에 선택적으로 전달되는 메카니즘의 일례를 보여주는 개략도이다.
- [31] 도 2는 카르복실로 관능화된 $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 업컨버전 나노 입자의 XRD 패턴이다.
- [32] 도 3은 카르복실로 관능화된 $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 업컨버전 나노 입자의 FT-IR 스펙트럼이다.
- [33] 도 4는 카르복실로 관능화된 $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 업컨버전 나노 입자의 광 발광(Photoluminescence) 스펙트럼이다.
- [34] 도 5는 카르복실로 관능화된 $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 업컨버전 나노 입자의 주사전자 현미경(SEM) 이미지를 나타낸다.
- [35] 도 6은 인산염 계면활성제의 3단계 합성 과정을 나타낸 도면이다.
- [36] 도 7은 위로부터 순서대로 에틸렌 글리콜 스테아레이트(EGS),

- 2-(포스포노옥시)에틸 스테아레이트, 및 페그화되어 최종적으로 얻어진 인산염 계면활성제의 FT-IR 스펙트럼이다.
- [37] 도 8은 위로부터 순서대로 에틸렌 글리콜 스테아레이트(EGS) 및 2-(포스포노옥시)에틸 스테아레이트에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼이다.
- [38] 도 9는 메탄올로 세척하는 시간을 1분, 5분 또는 10분으로 각각 달리할 경우에 있어서의 에틸렌 글리콜 스테아레이트의 FT-IR 스펙트럼이다.
- [39] 도 10은 에틸렌 글리콜 스테아레이트의 단일 인산화(monophosphorylation) 후의 계면활성제에 대한 EDAX 분석 결과이다.
- [40] 도 11은 인산염 계면활성제의 임계 미셀 농도(critical micelle concentration, CMC)를 결정하기 위해, 인산염 계면활성제 농도의 대수(logarithm)에 대한 형광 강도의 변화를 도시한 그래프이다.
- [41] 도 12는 인산염 계면활성제에 sPLA-2를 첨가할 때, 소화(digestion) 후의 물리적 변화를 보여주는 사진이다.
- [42] 도 13은 sPLA-2 효소에 의한 소화 전의 인산염 계면활성제의 질량 스펙트럼이다.
- [43] 도 14는 sPLA-2 효소에 의한 소화 후의 인산염 계면활성제의 질량 스펙트럼이다.
- [44] 도 15는 $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 업컨버전 나노 입자가 로딩된 미셀의 FT-IR 스펙트럼이다.
- [45] 도 16은 $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 업컨버전 나노 입자가 로딩된 미셀의 EDAX 분석 결과이다.
- [46] 도 17은 업컨버전 나노 입자 로딩 전의 미셀에 대한 투과전자 현미경(TEM) 이미지이다.
- [47] 도 18은 업컨버전 나노 입자 로딩 전의 미셀 하나에 대한 투과전자 현미경(TEM) 이미지이다.
- [48] 도 19는 업컨버전 나노 입자가 로딩된 미셀에 대한 투과전자 현미경(TEM) 이미지이다.
- [49] 도 20은 업컨버전 나노 입자가 로딩된 미셀 하나에 대한 투과전자 현미경(TEM) 이미지이다.
- [50] 도 21은 업컨버전 나노 입자가 로딩된 미셀로 처리된 22Rv1 세포에 대한 형광 이미지이다.
- [51] 도 22는 업컨버전 나노 입자가 로딩된 미셀로 처리된 HeLa 세포에 대한 형광 이미지이다.
- [52] 도 23은 업컨버전 나노 입자가 로딩된 미셀로 처리된 KB 세포에 대한 형광 이미지이다.
- [53] 도 24는 계면활성제 미셀로 캡슐화되지 않은 업컨버전 나노 입자로 처리된 HeLa 세포에 대한 형광 이미지이다.
- [54] 도 25는 계면활성제 미셀로 캡슐화되지 않은 업컨버전 나노 입자로 처리된 KB

세포에 대한 형광 이미지이다.

[55] 도 26은 22Rv1 세포, HeLa 세포, 및 KB 세포에 대한 업컨버전 나노 입자가 로딩된 미셀의 세포 독성 분석(MTT assay) 결과를 나타낸다.

[56] 도 27은 PBS 용액 내 에스트라머스틴 인산 나트륨(estrामustine phosphate sodium)의 검량선이다.

[57] 도 28은 에스트라머스틴 인산염(estrामustine phosphate)의 포집 전의 미셀에 대한 투과전자 현미경(TEM) 이미지이다.

[58] 도 29는 에스트라머스틴 인산염(estrामustine phosphate)의 포집 후의 미셀에 대한 투과전자 현미경(TEM) 이미지이다.

[59] 도 30은 활성 붕독 sPLA-2에 의한 인산염 계면 활성제 절단에 의해 유발된 estrामustine의 방출 효율 측정 결과이다.

[60] 도 31은 KB 세포주에 대한 에스트라머스틴(estrामustine) 또는 미셀 내에 포집된 에스트라머스틴(estrामustine)의 세포 독성 분석(MTT assay) 결과를 나타낸다.

[61] 도 32는 22Rv1 세포주에 대한 에스트라머스틴(estrामustine) 또는 미셀 내에 포집된 에스트라머스틴(estrामustine)의 세포 독성 분석(MTT assay) 결과를 나타낸다.

[62]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

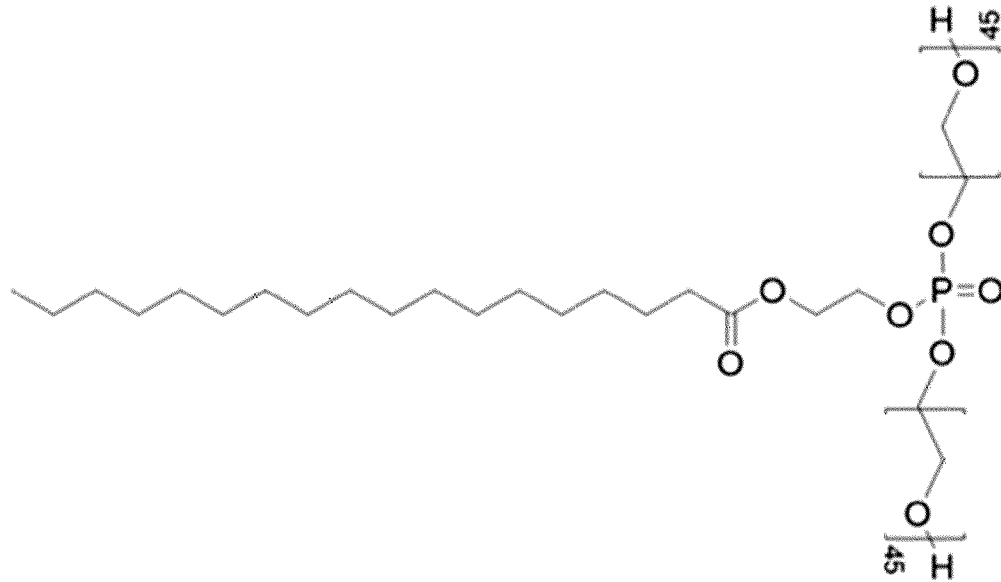
[63] 이하, 본 발명을 상세히 설명하도록 한다.

[64]

[65] 본 발명에 따른 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체는, 하기 화학식으로 표시되는 인산염(phosphate) 계면활성제로 이루어진 미셀(micelle)인 것을 특징으로 한다.

[66] [화학식]

[67]



[68]

[69] 상기 인산염(phosphate) 계면활성제는 지방산 에스테르(fatty acid ester)를 인산화(phosphorylation)한 후, 페그화(PEGylation)시켜 형성된 것으로서, 스테아르산(SA) 및 에틸렌 글리콜(EG)과 같은 생체 친화성 양친매성 화합물로부터 합성되어 생체 적합성을 갖는다.

[70]

[71] 특히, 상기 인산염 계면활성제는 생체 내 타겟 주변에 존재하는 효소(enzyme) 등에 의해 그 구조가 붕괴되어, 미셀 내부에 로딩되거나(loaded) 포집되어(entrapped) 있던 치료제 및/또는 진단제 입자를 해당 타겟 전립선암 세포 표면에서 선택적으로 방출하는 역할을 한다.

[72]

[73] 보다 구체적으로, 전립선암 세포 주변에 과발현되어 다량으로 존재하는 분비형 포스포리파아제 A2(sPLA-2)에 의해 상기 인산염(phosphate) 계면활성제에 포함된 에스테르기(ester group)가 가수분해되어 로딩 또는 포집되어 있던 전립선암 치료제 및/또는 진단제 입자가 담체로부터 선택적으로 방출되어 전립선암 세포의 사멸을 통한 치료 및/또는 진단을 위한 표지 효과를 발휘할 수 있다.

[74]

[75] 참고로, 상기 분비형 포스포리파아제 A2(sPLA-2)는 sn-2 위치에서 인지질(phospholipid) 가수분해의 촉매 작용을 해 지방산(fatty acid)과 리소포스포리피드(lysophospholipid)를 생성하는 효소인데, 그 과발현(overexpression)은 전립선암 세포의 증식에 기여한다.

[76]

[77] 상기 본 발명에 따른 나노담체는 내부에 진단제를 담지하여 전립선암의 진단을 위한 바이오 이미징용 입자를 이룰 수 있다.

[78]

[79] 상기 진단제로는 형광제, 방사능제 또는 조영제를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는, 업컨버전(upconversion) 발광 특성을 가지는 형광체 나노 입자를 사용할 수 있다.

[80]

[81] 일례로, 상기 본 발명에 따른 바이오 이미징용 입자에 포함된 업컨버전 형광 나노 입자가 전립선암 세포에 선택적으로 전달되는 메카니즘의 일례를 보여주는 도 1을 참조해 설명하면, 전립선암 세포 주변에 다량 존재하는 분비형 포스포리파아제 A2(sPLA-2)에 의해 상기 인산염(phosphate) 계면활성제에 포함된 에스테르기(ester group)가 가수분해되어 업컨버전 나노 입자가 담체로부터 선택적으로 방출되어, 전립선암 세포 영상화를 통해 전립선암에 대한 진단을 효과적으로 수행할 수 있다.

[82]

[83] 한편, 상기 업컨버전 형광체 나노입자는 $\text{NaAF}_4\text{:B}_1\text{/B}_2\text{/B}_3$ (단, 상기 A는 란타늄 원소이고, 상기 B₁, B₂ 및 B₃는 서로 다른 희토류 원소임)로 이루어질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[84]

[85] 여기서, 상기 A는 Y, Tb, Dy, Ho, Tm, Lu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm 및 Eu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있고, 또한, 상기 B₁, B₂ 및 B₃는 서로 상이하며 각각 Yb, Er, Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Tm, 및 Lu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[86]

발명의 실시를 위한 형태

[87] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[88]

[89] 그러나, 아래 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[90]

[91] <실시예 1> UNCP가 로딩된 인산염 미셀 입자의 제조

[92] (1) UCNP의 합성

[93] 먼저, 수용액을 사용하는 손쉬운 단일 단계 수열합성법(hydrothermal method)을 통해, 카르복실로 관능화된 고품질의 $\text{NaLuF}_4\text{:Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 업컨버전 나노 입자를 준비하였다. NaCl, 말론산(MA) 및 미리 제조된 RECl_3 용액을 함유하는 잘

교반 된 탈이온수 용액에 화학양론적 양의 NH_4F 를 첨가하였다. 다음으로, 상기 용액을 테프론 라이닝된 오토클레이브로 옮기고 200°C 에서 8, 12 및 24 시간 동안 가열하고, 얻어진 나노 입자를 원심 분리를 통해 수집하고, 에탄올 및 탈이온수로 수회 세척하고, 50°C 에서 24 시간 동안 건조시켰다. 특성 분석 결과, 12 시간 동안 수열 반응시켜 얻어진 업컨버전 나노 입자가 보다 적합한 것으로 나타났다.

[94]

[95] 상기 카르복실로 관능화된 고품질의 $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 업컨버전 나노 입자에 대해 XRD, FT-IR, Photoluminescence, Fe-SEM을 이용한 특성 분석이 이루어졌다.

[96]

도 2 내지 도 5에 도시된 것처럼, $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ UCNP의 XRD 패턴의 피크는 기준 입방정상 NaLuF_4 패턴(JCPDS-27-0725)으로 인덱싱되고 다른 불순물 피크는 검출되지 않았다. $\text{NaLuF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 나노 입자의 카르복실 기능화된 표면은 FT-IR 스펙트럼에 의해 확인되었다. 3435 cm^{-1} 부근의 넓은 흡수 밴드는 O-H 신장 진동에 해당한다. 1632 cm^{-1} 을 중심으로 한 날카로운 피크는 나노 입자 표면에 존재하는 카르복실기에 기인한다. 1434 cm^{-1} 의 밴드는, 카르복실기의 적색 편이를 일으키는 란탄족 이온으로 킬레이팅된 카르복실기($-\text{COO}-$)의 비대칭 신장 진동과 연관되어 있다. 말론산의 단일 $-\text{CO}$ 신장 밴드는 1125 cm^{-1} 에 위치한다. 광 발광(Photoluminescence)는 근적외선의 녹색 및 적색 발광으로의 상향 변환(upconversion)을 보여준다. 540 nm 에서의 녹색 방출은 적색 방출보다 상대적으로 강하다. Fe-SEM 사진은 UCNP의 입방정상을 확인시켜주며, 또한 UCNP의 크기는 50 nm 에서 80 nm 의 범위에 있음을 보여준다.

[97]

[98] (2) 인산염 중합체(phosphate polymer)의 합성

[99]

도 6에 도시한 바와 같이 인산염 계면활성제는 3단계 합성 과정을 통해 합성되었으며, 아래에 각 단계를 상세히 설명한다.

[100]

1) 제1 단계 : 에틸렌 글리콜 스테아레이트의 합성 및 정제

[101]

에틸렌 글리콜 스테아레이트의 합성은 카르복실산의 슈테글리히 에스테르화(Steglich esterification)를 통해 이루어졌다. 해당 방법은 낮은 반응 온도(0 내지 실온(RT)) 때문에 녹색 합성 경로(green synthesis route)로 여겨진다. 스테아르 산(SA) 0.005 몰(1.422g)을 디클로로메탄(DCM) 30 ml 에 용해시킨 후, 에틸렌글리콜(EG) 3 당량(0.9310g)을 첨가하고 빙수 조(ice-water bath)에서 교반하여 반응 매질을 냉각시켰다. 반응을 촉진시키기 위해 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)을 촉매로 사용하였다. 반응 매질을 0°C 로 냉각시킨 후, 20 ml DCM 내에 2.27g 의 디시클로헥실카르보디이미드(DCC)를 함유하는 미리 제조된 용액을 한 방울씩 첨가하였다. DCC를 모두 첨가한 후, 빙수조를 제거하고 반응 매질을 실온에서 이틀 동안 교반하였다. 반응이

멈추었을 때, 디시클로헥실우레아(DCU)에 해당하는 고체가 형성된 것이 관찰되었다. 반응 매질을 정제하기 위해 먼저 여과시킨 다음 탄산나트륨 포화 용액으로 3회 세척하였다. 각각의 세척 후에, 생성된 고체를 제거하고 유기상과 수성상의 분리를 간단하게 하기 위해 생성물을 여과했다. 그 후 생성물을 희석된 염산 용액으로 2회 세척하였다. 생성물의 재결정화는 빙수 조에서 수행되었다. 얻어진 생성물에는 DCM에도 용해될 수 있는 DCU의 흔적이 남아 있었다. 메탄올에 대한 DCU의 용해도는 매우 높은 반면, 에스테르는 메탄올에 용해되지 않기 때문에 재결정된 생성물을 메탄올로 5 분 동안 세척했다.

[102]

[103] 합성된 에틸렌 글리콜 스테아레이트의 분자 구조는 푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR)과 양성자 NMR(^1H NMR)으로 확인하였다.

[104]

[105] 도 7을 참조하면, FT-IR 스펙트럼은 1650cm^{-1} 에서 1737cm^{-1} 로 피크 이동을 나타내며, 이는 카르복실산기의 에스테르기로의 변환에 해당한다. 에틸렌 글리콜 스테아레이트의 양성자 NMR(^1H NMR)은 예상되는 구조를 확인시켜준다.

[106]

[107] 도 8에서, 에틸렌 글리콜 스테아레이트의 ^1H NMR은 1.26 내지 1.31 ppm 사이의 넓은 일중항(singlet)은 지방산으로부터의 수소를 나타내고, 0.88 ppm에서의 삼중항(triplet)은 스테아르산의 메틸기와 관련된다. 1.64 ppm에 존재하는 다중항(multiplet)은 β 탄소상의 수소와 관련이 있는 반면, α 탄소상의 수소는 2.32 ppm에서의 삼중항에 나타난다. 3.65와 4.20 ppm에서의 삼중항은 에틸렌 글리콜 부분의 메틸렌 수소와 관련 있다.

[108]

[109] 전술한 바와 같이, 디시클로헥실우레아(DCU)는 중탄산 나트륨 및 염산 희석 용액으로 세척한 후에도 생성물 중에 여전히 존재하였다. 따라서, 결정 형태로 얻어진 생성물을 메탄올로 세척하였다. DCU은 메탄올에 대해 높은 용해도를 가지지 때문에, 메탄올로 생성물을 여러 번 세척했다. 도 9는 5 분 미만으로 교반하면 DCU가 완전히 제거되지 않기 때문에 메탄올에서 5 분간 교반하는 것이 가장 적절하다는 것을 보여 주며, 5 분 이상 교반하면 역으로 생성물이 손상된다. FT-IR 스펙트럼에서 3326cm^{-1} 의 피크는 EGS의 O-H 스트레치와 중첩되는 DCU의 N-H 스트레치와 관련되어 있다.

[110]

[111] 2) 제2 단계 : 2-(포스포녹시)에틸 스테아레이트(2-(phosphonooxy)ethyl stearate)의 합성 및 정제

[112]

인산염 모노 에스테르의 합성을 위해 친핵성 염기(트리부틸아민)에 의해 촉진되는, 인산과 에틸렌 글리콜 스테아레이트의 탈수 축합을 사용했다. 해당 방법은 등몰량(equimolar) 인산과 에틸렌 글리콜 스테아레이트를 직접 응축시켜

인산 모노 에스테르를 합성하는 방법이다. 높은 반응 온도는 녹색 합성(green synthesis)에는 바람직하지 않으므로 공비 용매(DMF/EtNO₂)가 선택되었다. 에틸렌 글리콜 스테아레이트(EGS) 3 mmol(1.18g)을 용매에 용해시키고 저열로 교반하여 EGS를 완전히 용해시켰다. 이후, 반응 매질에 트리부틸아민(Bu₃N) 3 mmol (0.71ml) 및 디메틸아미노피리딘(DMAP) 10 mol%(0.037g)을 첨가하였다. 마지막으로, 인산(PA) 3.04 mmol(3.46ml)을 가하고 가열 환류시켰다. Dean-Stark 장치는 물을 제거하고 결과적으로 반응 시간을 제어하는데 사용되었다. 반응 매질을 실온으로 냉각한 후, 액상의 재결정화를 수행하였다. 생성물을 에틸 아세테이트로 세척하여 미반응 2-(포스포노옥시)에틸 스테아레이트를 제거하였다.

[113]

[114] 생성물의 특성화는 FT-IR 및 ¹H NMR에 의해 수행되었다.

[115] 도 7에서 1737cm⁻¹에 나타나는 피크는 에스테르기와 연관되어 있다. 920cm⁻¹과 1088cm⁻¹ 사이에 나타나는 다른 피크는 P-O-C 결합의 존재를 확인시켜준다. 또한, 1600 cm⁻¹에서 1700 cm⁻¹ 사이에 위치한 피크는 O=P-OH기의 존재를 나타낸다.

[116] 도 8에서, 양성자 NMR은 인산염-계면 활성제의 형성을 나타낸다. 0.75 ppm의 삼중항은 스테아르산의 메틸기와 연관되고, 1.12와 1.16 ppm 사이의 넓은 일중항은 지방산으로부터의 수소를 나타낸다. 피크는 용매가 다르기 때문에 낮은 ppm으로 천이하였다.

[117]

[118] 3) 제3 단계 : 페그화된 2-(포스포노옥시)에틸 스테아레이트(PEGylated 2-(phosphonooxy) ethyl stearate)의 합성 및 정제

[119] 슈테글리히 에스테르화(Steglich esterification)를 통해 2-(포스포노옥시)에틸 스테아레이트 중합체에서 인산염기의 페그화가 이루어졌다. 스테아린산 2-(포스포노 옥시)에틸 스테아레이트 0.1 mol(0.195g)을 디클로로메탄(DCM) 30 ml에 녹인 후 폴리에틸렌글리콜(PEG) 2 당량(0.9310g)을 넣고 빙수 조에서 교반하여 반응 매질을 냉각시켰다. 반응을 촉진시키기 위해 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP) 10 mol%를 촉매로 사용하였다. 반응 매질을 0 °C로 냉각시킨 후, DCM 20 ml에 디시클로헥실카르보디이미드(DCC) 0.227g을 함유하는, 미리 제조된 용액을 한 방울씩 첨가하였다. DCC를 모두 첨가한 후, 빙수 조를 제거하고 반응 매질을 실온에서 질소 존재 하에 2일 동안 교반하였다. 이어서, 반응 매질을 여과하고, 용매를 회전 증발기로 증발시켰다. 유성(oily) 생성물을 에틸 아세테이트로 세척하여 미량의 촉매를 제거하였다.

[120]

[121] 도 7에 따르면, 성공적인 페그화가 이루어졌음을 확인할 수 있는데, 3000cm⁻¹에서 2820cm⁻¹ 사이에 위치한 강한 피크는 지방족 탄화수소 개수의 증가를 나타낸다. 1737cm⁻¹에서의 피크는 지방산과 에틸렌글리콜 사이의 에스테르기의

존재를 확인시켜준다. 1000cm^{-1} 과 1100cm^{-1} 사이에 위치한 피크는 P-O-C기의 존재와 폴리에틸렌글리콜 사슬이 인(P)에 존재함을 확인시켜준다.

폴리에틸렌글리콜 사슬이 인산염의 수산기를 대체하기 때문에 1600cm^{-1} 내지 1700cm^{-1} 의 범위에 위치한 피크는 낮은 파장으로 이동하고 강도가 감소한다.

- [122] 또한, 로다민 B(Rhodamine B)를 이용한 염료 미셀화법을 통해, 계면 활성제의 주요 특성을 나타내는 임계미셀농도(critical micelle concentration, CMC)를 측정하였다. 로다민 B 용액에 인산염 폴리머 용액을 섞은 후 각 용액에 대해 광발광(photoluminescence)을 측정하였다. 시료는 510nm 에서 여기되었다. 염료 미셀화법은 계면 활성제를 첨가한 후 염료의 형광 강도의 변화를 기반으로 한다. 계면 활성제의 농도가 증가하면 강도가 떨어진다. 도 11은 농도 $6.38 \times 10^{-4}\text{M}$ 에서 미셀이 형성되었음을 나타내며, 기존 문헌과 비교하면 새로운 단량체 계면 활성제의 CMC가 다른 단량체 계면 활성제와 비교적 유사하다는 것을 알 수 있다.

[123]

- [124] 다음으로, 상기 인산염 계면활성제에 대한 봉독 sPLA-2(bee venom sPLA-2)의 활성을 확인하기 위해 소화(digestion) 및 액체 크로마토그래피 탠덤 질량 분석(LC/MS)을 실시하였다. 활성 봉독(bee venom) sPLA-2는 중합체의 소화에 사용되었고, 이후 절단된 단편은 액체 크로마토그래피 결합 질량 분석기(LC/MS)를 통해 확인되었다. 기질(substrate)로는 폐그화된 중합체와 비교하여 더 낮은 분자량을 가지는 제2 단계의 중합체가 사용되었다.

[125]

- [126] 도 12에 따르면, 인산염-계면 활성제에 효소를 첨가한 후에 용액에서 물리적 변화가 관찰되었다. 구체적으로, sPLA-2 효소를 인산염-계면 활성제를 함유하는 용액에 첨가한 후에, 튜브의 상부로 이동하는 수분에 불용성 물질의 형성이 관찰되었으며, 이는 인산염-계면 활성제의 소화 후에, 물에 불용성이고 물에 비해 상대적으로 밀도가 낮은 스테아르산이 튜브의 위쪽으로 이동함에 따른 것으로 추정된다. 또한, LC/MS에 주입하기 전에 디클로로메탄(DCM) 내에 샘플을 추출하는 동안, 처리된 샘플의 수성상이 훨씬 더 깨끗하고 투명하다는 것을 관찰하였다. 인산염-계면 활성제가 DCM에 잘 용해되는 스테아르산으로 효소에 의해 소화된 것이다.

[127]

- [128] 도 13 및 도 14를 참조하면, 중합체만을 함유하는 용액의 질량 스펙트럼은 인산염 계면활성제에 상응하는 407.90 m/z 에서 피크를 갖는다. 노이즈 피크와 비교하여 407.90 m/z 에서의 피크의 강도는 매우 낮다. 이는 디클로로메탄(DCM) 이용해 추출하는 동안에 인산염-계면 활성제의 물에 대한 용해성 때문에 많은 양의 인산염-계면 활성제가 수성 상에 남아, 인산염 계면활성제의 농도가 매우 낮음을 의미한다. 반면, 주입 후 질량 스펙트럼은 407.90 m/z 에서의 피크가 사라짐을 보여주며, 이는 효소에 의한 인산염-계면 활성제의 가수 분해되어, 284

m/z에서 나타나는 스테아린산을 형성함을 나타낸다.

[129]

[130] **(3) UCNP의 미셀 내 캡슐화(encapsulation)**

[131] 미셀 내에 UCNP를 캡슐화하기 위해 UCNP를 인산염-계면 활성제로 30 분 동안 실온에서 간단히 초음파 처리함으로써 달성되었다. 그 후 UCNP 로딩된 미셀에 대해 FT-IR, EDAX 및 TEM을 통해 특성 분석을 실시하였다.

[132]

[133] 인산염-계면 활성제는 PEG 사슬로 인해 물에 잘 녹기 때문에 UCNP는 계면 활성제와 함께 매우 빠르게 분산된다. UCNP가 성공적으로 미셀에 로딩되었는지 확인하기 위해 FT-IR를 이용해 확인했다(도 15). 해당 FT-IR 스펙트럼은 UCNP와 인산염-계면 활성제의 작용기의 존재를 확인시켜준다. 약 3435 cm^{-1} 부근의 넓은 흡수 밴드는 UCNP에서 나오는 O-H 신장 진동에 해당하고 1737 cm^{-1} 의 피크는 인산염-계면 활성제의 에스테르기와 관련이 있다. 또한, 원소 분석(EDAX)을 실시한 결과(도 16), 예상한 대로 모든 원자에 대한 피크가 존재했다 인(P)의 백분율이 PEG와 계면 활성제의 긴 탄화수소 사슬에 비해 매우 작기 때문에, 인(P) 원자에 대한 피크는 상대적으로 낮다. 계면 활성제가 구리 테이프에 증착되어, 구리(Cu) 이온도 EDAX 스펙트럼에도 나타났다.

[134]

[135] 또한, 도 17 내지 도 20에 도시된 TEM 이미지는 입자의 표면이 메조포러스(mesoporous)인 것으로 나타나 UCNP가 미셀 내로 로딩 되었음을 확인시켜준다. TEM 이미지는 미셀의 크기가 50nm에서 200nm 사이인 반면 UCNP가 로딩된 미셀은 60nm에서 100nm의 범위에 있음을 확인시켜준다.

[136]

[137] **(4) 제조된 UCNP가 로딩된 인산염 미셀 입자를 이용한 세포 이미징**

[138] sPLA-2를 발현하는 전립선암 세포에 대한 UCNP 로딩된 미셀의 선택성을 확인하기 위해 3 개의 상이한 세포가 선택되었다. HeLa(인간 자궁 경부암, 선암)는 가장 흔하고 가장 단단한 세포주이다. 또한, 비교적 취약한 세포 인 KB 세포주(HeLa contaminant, 암종)를 택했다. 위에서 전술한 두 세포주 모두 sPLA-2 효소를 과발현하지 않는다. 반면, 22Rv1(전립선 암종) 세포주는 sPLA-2 효소를 과발현하는 것으로 알려져 있다. 실험 결과, 서로 다른 3가지 세포주에 있어서 22Rv1 세포주에 대한 나노 입자의 선택성을 볼 수 있었다. 생체 외(In vitro) 바이오 이미징 분석 결과, 캡슐화된 UCNPs는 모든 세포, 특히 sPLA-2 비발현 세포주에 대한 독성이 현저하게 감소함을 확인했다. UCNP의 방출은 HeLa 세포 및 KB 세포에서 과발현되지 않는 sPLA-2와 직접적으로 관련되기 때문에, UCNP가 로딩된 미셀은 계면 활성제로부터의 보호 쉘(shell)로 인해 이러한 유형의 세포에는 친화성이 없다. 도 22 및 도 23은 이러한 두 세포에서 매우 약한 업컨버전 형광이 나타남을 보여준다. 그러나 22Rv1 세포주는 계면 활성제를 분해 할 수 있는 sPLA-2 효소를 과발현하므로 전립선암 세포의 표면에서

UCNP를 유리시키고 강렬한 업컨버전 형광을 통해 전립선암 세포의 영상을 명확히 보여준다(도 21).

[139]

[140] 그러나, 캡슐화되지 않은 UCNP는 모든 세포에 친화도를 나타낸다. 도 24 및 도 25는 미셀 내에 캡슐화되지 않은 UCNP로 수행된 HeLa 및 KB 세포주에 대한 체내(in vitro) 바이오 이미징 결과를 도시하며, 이로부터 두 세포는 모두 UCNP로 둘러싸였으며 강한 업컨버전 형광 이미징을 나타낸다. 그러나, UCNP로 처리된 세포에서만 confluency에서 상대적인 손실이 있음이 확인되었다. 즉, UCNP가 미셀이 상대적으로 독성이 낮았다.

[141]

[142] **(5) 제조된 UCNP가 로딩된 인산염 미셀 입자 및 캡슐화되지 않은 UCNP의 세포 독성 분석(Cell Cytotoxicity Assay)**

[143] 세포 독성은 모든 새로운 나노 물질, 특히 나노 의약에 적용되는 나노 물질에서 고려되어야 할 중요한 요소이다.

[144] 아래 표 및 도 26을 참조하면, MTT 분석 결과, 3가지 상이한 세포에 대해 UCNP는 독성의 감소를 나타냈다. UCNP 300 $\mu\text{g/mL}$ 및 인산염-계면 활성제 0.002 M의 농도인 경우, 세포 독성은 HeLa, KB 및 22Rv1 세포주 각각 7.98 %, 13.16 % 및 6.47 %로 감소되었다. 그러나 22Rv1 세포주의 경우 세포 독성은 여전히 높으며, 이는 인산염-계면 활성제의 절단과 세포 표면 상에 고농도로 UCNP가 유리됨(liberation)에 따른 것으로 설명될 수 있다.

[145]

	HeLa	KB	22Rv1
UCNP로 처리	86.23%	76.49%	71.60%
UCNP 로딩된 미셀로 처리	94.21%	89.65%	78.07%

[146]

[147] **<실시예 2> 전립선암 치료제(Estramustine phosphate)가 로딩된 인산염 미셀 입자의 제조**

[148] **(1) 인산염 계면 활성제로 이루어진 미셀 안으로의 약물 포집(entrainment)**

[149] PBS 용액 내에서 상기 '실시예 1'에서 제조된 인산염 계면 활성제로 이루어진 미셀 안으로의 에스트라머스틴 인산염(estramustine phosphate)의 포집을 수행하였다.

[150] 참고로, 에스트라머스틴 인산염은, Emcyt 및 Estracyt라는 상품명으로 판매되며 전립선암의 치료에 사용되는 이중 알킬화 항종양제(즉, 화학 요법 약물) 및 에스트로겐 유형의 호르몬 항종양제이다.

[151] 구체적으로, 인산염 계면 활성제 0.022g을 4ml의 PBS에 분산시킨 후, estramustine phosphate sodium(1400 μg)을 인산염 계면 활성제 용액에 첨가하였다. 최종 용액을 37°C에서 24 시간 동안 교반하였다. 그 후, 생성물을 4000 rpm으로

20 분 동안 원심 분리하여 수집하고, 경사분리(decantation)하고, PBS 용액에서 3 회 재분산시켰다. 로딩되지 않은 estramustine phosphate을 제거하기 위해 투석(MW cutoff 3500)을 수행하였다.

[152]

[153] 그리고, 상층액(supernatant) 및 세척 용액을 수집하여, 포집된 estramustine phosphate을 215 nm에서 UV 흡광 분광법에 의해 추가로 정량화하였다.

[154]

[155] 포집 및 방출 효율 계산의 중요성을 감안해 검량선(Calibration Curve)을 작성하였으며, 이를 위해 estramustine phosphate의 농도가 다른 일련의 용액을 준비하고, estramustine phosphate sodium(0.001g)을 PBS(phosphate buffered saline x1) 용액 10mL에 용해시킨 후 1/2 희석 공정을 5회 실시하였다. 그리고, 용액에 대해 UV 흡수 스펙트럼을 수집하고 검량선을 작성했다(도 27).

[156]

[157] 상기 검량선과 다음 방정식을 사용하여 포집 효율(EE%)을 계산할 결과, 포집 효율은 초기 농도대비 81,432%인 것으로 나타났으며, 또한, 약물 포집 전후의 미셀에 대한 TEM 이미지는 미셀 내로 에스트라머스틴 인산염이 성공적으로 포집되었음을 보여줬다(도 28 및 도 29).

[158]

[159]

$$EE\% = \frac{Total_{Drug} - Free_{Drug}}{Total_{Drug}} \times 100$$

[160]

[161] (2) 제조된 에스트라머스틴이 포집된 미셀에 대한 에스트라머스틴 인산염의 방출 효율(Release efficiency) 측정 및 분석

[162] 약물 전달 시스템의 또 다른 중요한 특성은 촉발(triggering)을 통한 포집된 약물의 방출 효율이다. 본 발명에 따른 인산 계면활성제는 sPLA-2에 의해 절단될 수 있기 때문에, 활성 봉독 물질인 sPLA-2를 촉발제(triggering agent)로 사용해 약물 방출 실험을 실시하였다.

[163]

[164] 구체적으로, 약물 방출을 자극하기 위해, 6-24 U/L의 활성 봉독 sPLA-2 및 2 mM CaCl₂를 함유하는 4 ml PBS 용액에 상기 실시예에서 제조한 에스트라머스틴 인산염이 로딩된 미셀을 분산시켰다. 용액을 37 °C에서 10 분 동안 교반 한 후, 용액을 원심 분리하여 s-PLA 및 미셀을 함유하는 펠렛으로부터 방출된 약물을 함유하는 용액을 분리 하였다. 그 후, 미셀을 sPLA-2의 용액에 다시 분산시키고 다시 20, 60, 180 분 동안 교반하였다.

[165]

- [166] sPLA-2가 있는 상태에서 에스트라머스틴 인산염이 로딩된 미셀로부터의 에스트라머스틴의 누적 방출량은 도 30에 나타났다. 방출된 에스트라머스틴염의 누적량은 pH 7.4 및 37 °C에서 24 시간 배양한 후 85.12%에 도달했다. 흥미롭게도, 처음의 1 시간 경과 후에 약물의 84.12%가 방출되었으며, 이는 방출 개시 후 약 1시간 동안 로딩된 에스트라머스틴 인산염의 거의 전부가 미셀로부터 방출되었음을 의미한다.
- [167]
- [168] (3) 제조된 에스트라머스틴이 포집된 미셀 입자 및 에스트라머스틴(estramustine)의 세포 독성 분석(Cell Cytotoxicity Assay)
- [169] 세포 독성은 모든 새로운 나노 물질, 특히 나노 의약에 적용되는 나노 물질에서 고려되어야 할 중요한 요소이다.
- [170]
- [171] 본 실험예에서는 MTT (3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을 이용하여 KB 세포주(HeLa contaminant, 암종) 및 22Rv1 (인간 전립선 암, 암종) 세포주에 대해 암세포의 세포 생존 능력(cell viability)을 확인하였다.
- [172]
- [173] 이를 위해, 세포를 MEM(Minimum Eagle's medium) 및 RPMI 1640 배지(ATCC modification)에서 각각 성장시켰다. 모든 배지에 37 °C 및 5% CO₂에서 10% FBS(태아 소 혈청) 및 5 mL의 Pen/Strep (10.000 µg/mL, 10.000 units/mL)을 보충했다. 22Rv1과 KB 세포를 96-well 세포 배양 플레이트에 10⁴/L/well로 접종하고, 5% CO₂ 하에서 37 °C에서 24 시간 동안 정착시켰다.
- [174]
- [175] 다음으로, 실시예에서 제조한 에스트라머스틴 인산염이 포집된 미셀을 RPMI 1640(ATCC modification) 및 MEM 배지에 분산시켰다. 이와 별도로, 미셀에 포집되지 않은 에스트라머스틴 인산염만을 RPMI 1640(ATCC modification) 및 MEM 배지에 각각 분산시켰다. 이들 용액을 처리군(treatment group)의 웰에 첨가하고, 용액을 첨가하지 않은 배지를 음성 대조군으로 하였다.
- [176]
- [177] 그리고, 37°C, 5% CO₂ 하에서 24 시간 동안 세포를 배양하였다. 이어서 MTT(5mg/mL) 100µL를 96-well 분석 플레이트의 처리군 및 음성 대조군 웰 각각에 첨가하고 5% CO₂하에 37 °C에서 추가로 4 시간 동안 배양하였다. DMSO-에탄올 용액(1:1) 100 µL/well을 첨가 한 후, 분석 플레이트를 실온에서 15 분간 유지하였다. Tecan Infinite M200 단색화기(monochromator-based) 기반의 다기능 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 540 nm에서 배경 분리(background subtraction)를 통해 각 웰의 OD 570(Abs 값)을 측정했다.
- [178]
- [179] 도 31 및 도 32는 각각 KB 세포주 및 22Rv1 세포주에 대한 에스트라머스틴

또는 미셀 내에 포집된 에스트라머스틴의 세포 독성 분석(MTT assay) 결과를 나타낸다.

[180]

[181] 도 31 및 도 32를 참조하면, 미셀 내에 포집되지 않은 에스트라머스틴과 비교해 포집된 에스트라머스틴으로 처리된 KB 세포주의 세포 생존력이 증가했음을 확인할 수 있다.

[182]

미셀에 포집되지 않은 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 의 에스트라머스틴의 경우, 22Rv1 세포주에서는 25.58%의 세포 생존도를 나타낸 반면 KB 세포주는 78.50%의 세포 생존도를 나타내 KB 세포주에 대해 독성이 더 낮음을 주목할 필요가 있다.

[183]

그러나, 에스트라머스틴 인산염이 로딩된 미셀로 처리한 KB 세포주의 세포 생존도는 95.1%로 증가해 미셀에 의한 에스트라머스틴의 포집을 확인시켜 주었다.

[184]

반면, 에스트라머스틴 인산염이 로딩된 미셀로 처리한 22Rv1 세포주는 세포 생존도에 변화를 보이지 않았다.

[185]

결론적으로, 상기 결과는 sPLA-2 효소를 과발현하는 22Rv1 세포주가 미셀의 절단을 유도하고 세포에서 에스트라머스틴 인산염 추가 방출을 유도함을 확인시켜 준다.

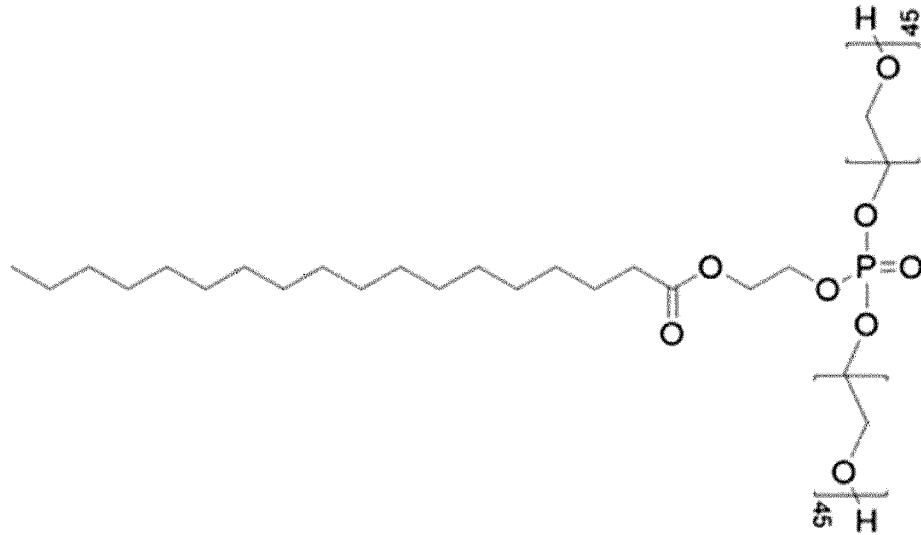
[186]

산업상 이용가능성

[187]

본 발명에 따른 나노담체는, 전립선암 세포 표면에서 치료제 및/또는 진단제 입자를 선택적으로 방출할 수 있고 생체 내에서 향상된 분산성을 가져, 전립선암 치료 및/또는 진단을 위한 약물전달체, 영상화제 조성물의 유효 성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

[화학식]

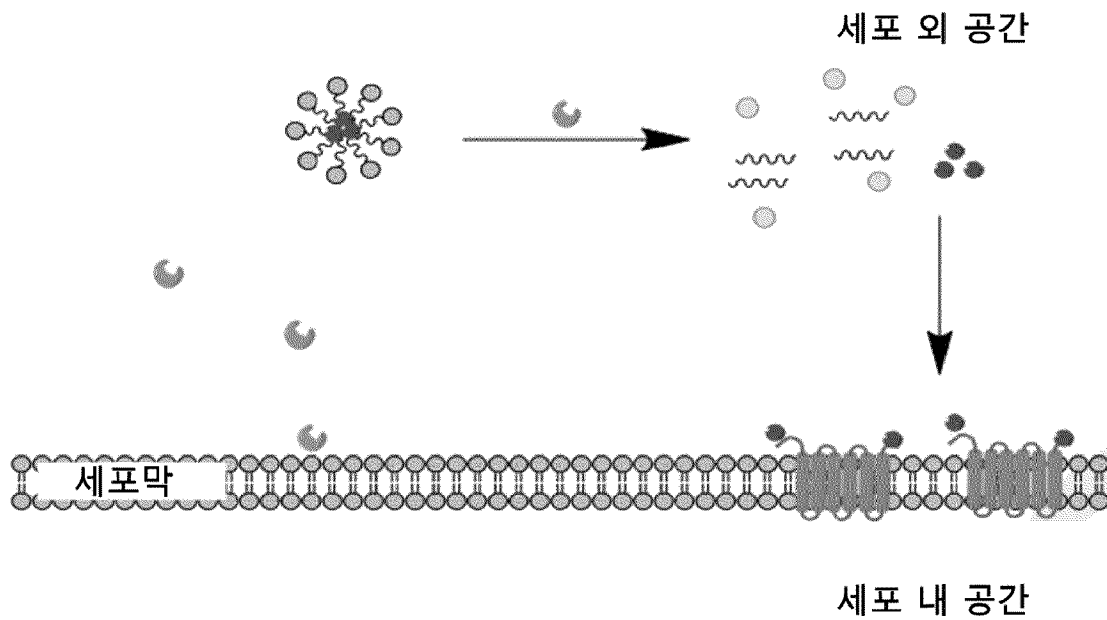


- [청구항 2] 제1항에 있어서,
담지된 치료제 및/또는 진단제 입자를 전립선암 세포에 대해 선택적 방출(selective release)하는 것을 특징으로 하는 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
전립선암 세포에서 과발현된 분비형 포스포리파아제 A2(sPLA-2)에 의해 상기 인산염(phosphate) 계면활성제에 포함된 에스테르기(ester group)가 가수분해되어 치료제 및/또는 진단제 입자를 방출하는 것을 특징으로 하는 전립선암 세포 표적 치료 및/또는 진단용 나노담체.
- [청구항 4] 제1항의 나노담체; 및
상기 나노담체에 로딩된(loaded) 진단제를 포함하는 바이오 이미징용 입자.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 진단제는 형광제, 방사능제 또는 조영제인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 입자.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 진단제는 업컨버전 형광체 나노입자인 것을 특징으로 하는 바이오

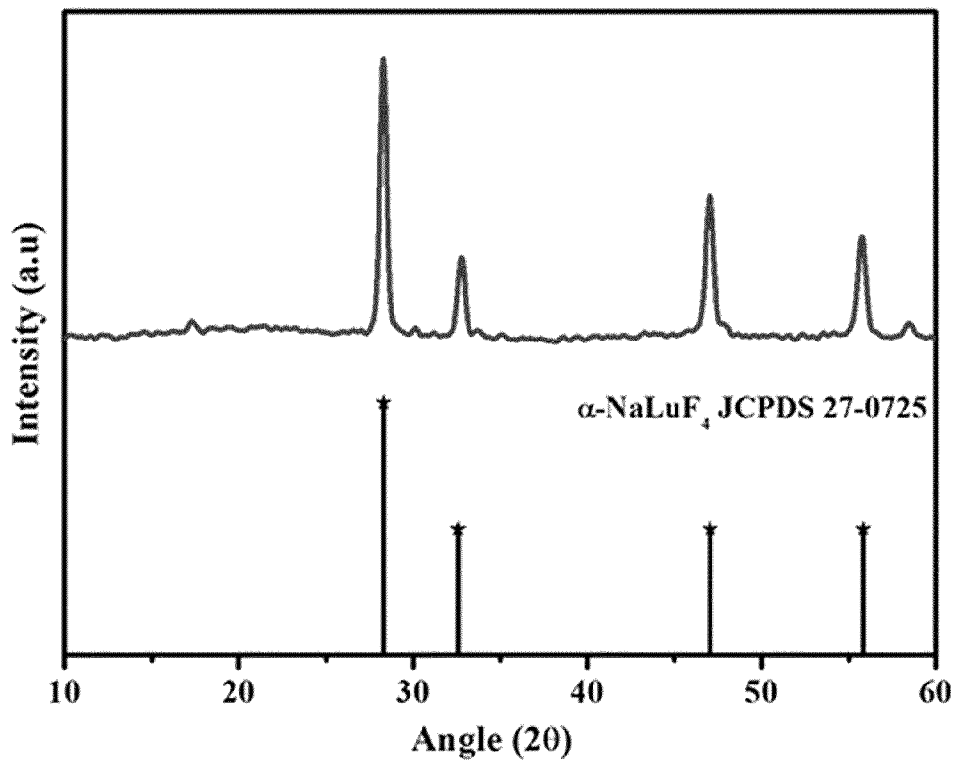
- 이미징용 입자.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 업컨버전 형광체 나노입자는, $\text{NaAF}_4\text{:B}_1\text{/B}_2\text{/B}_3$ (단, 상기 A는 란타늄 원소이고, 상기 B_1 , B_2 및 B_3 는 서로 다른 희토류 원소임)로 이루어진 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 입자.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 A는 Y, Tb, Dy, Ho, Tm, Lu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm 및 Eu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 입자.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 B_1 , B_2 및 B_3 는 서로 상이하며 각각 Yb, Er, Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Tm, 및 Lu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 입자.
- [청구항 10] 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 바이오 이미징용 입자를 생물학적 환경(biological environment)에 배치하는 단계; 및
상기 생물학적 환경 내에 위치한 전립선암 세포 표면에 진단제 입자를 선택적으로 방출해 전달하는 단계를 포함하는 전립선암 진단 방법.
- [청구항 11] 제1항의 나노담체; 및
상기 나노담체에 로딩된 전립선암 치료제를 포함하는 약물전달체.
- [청구항 12] 제11항의 약물전달체를 생물학적 환경(biological environment)에 배치하는 단계; 및
상기 생물학적 환경 내에 위치한 전립선암 세포 표면에 치료제 입자를 선택적으로 방출해 전달하는 단계를 포함하는 전립선암 치료 방법.
- [청구항 13] 제11항의 약물전달체를 유효성분으로 포함하는 전립선암 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
주사제, 액제, 산제, 현탁제, 과립제, 시럽제, 캡슐제, 환제 또는 정제 형태의 제형인 것을 특징으로 하는 전립선암 치료용 약학적 조성물.

[도1]

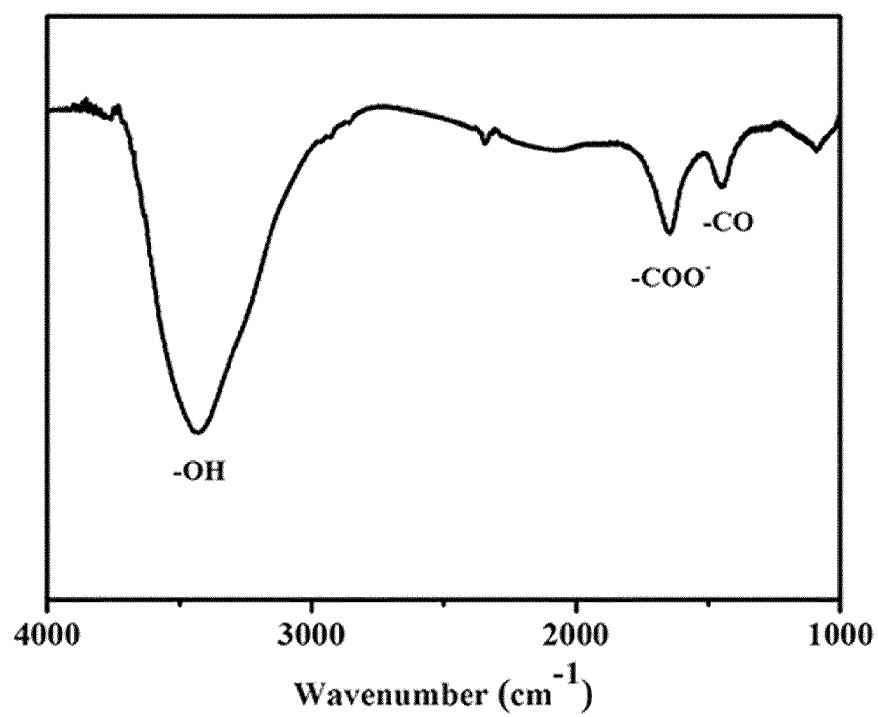
- 포스포리파아제A₂
- UCNP 로딩된 미셀
- 페그화 에틸렌 글리콜 포스페이트
- ~~~~~ 스테아르산
- 업컨버전 나노 입자(UCNP)



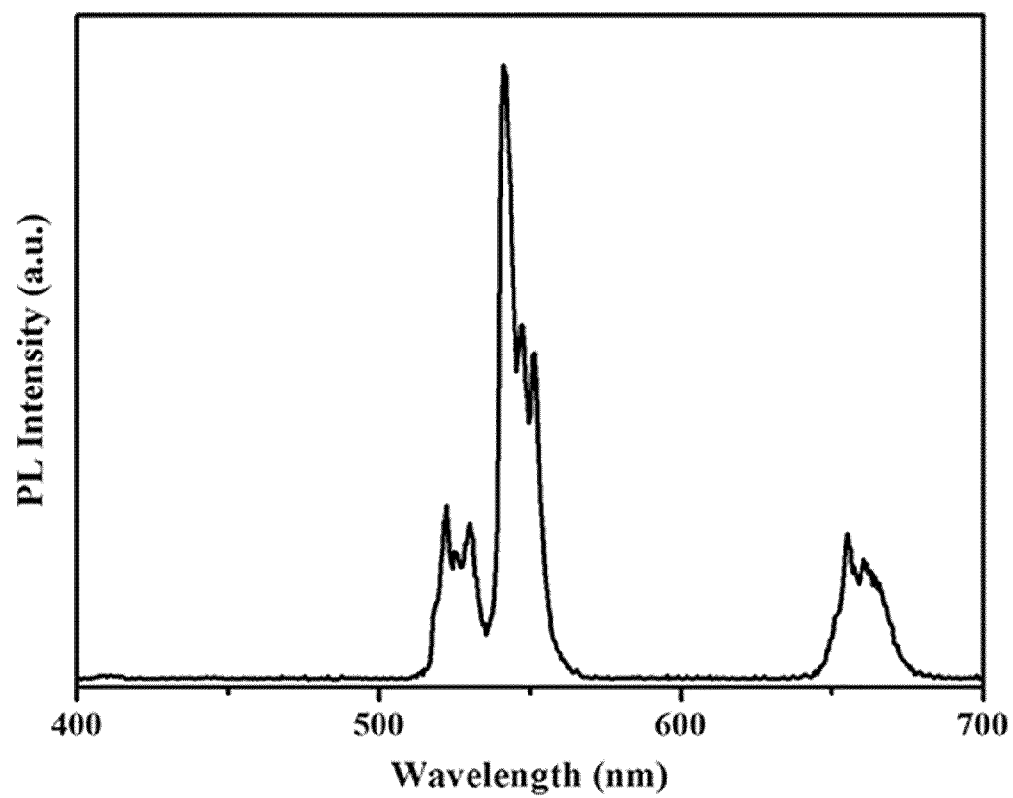
[도2]



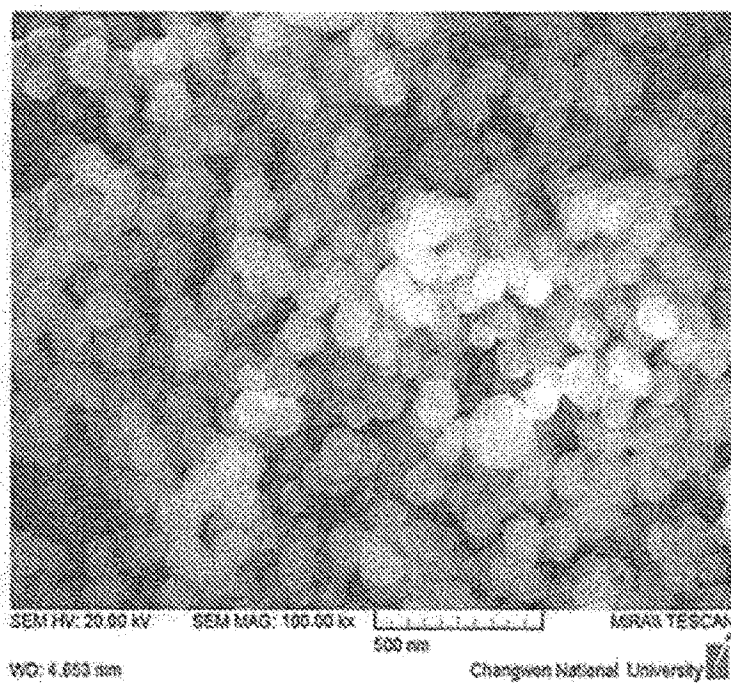
[도3]



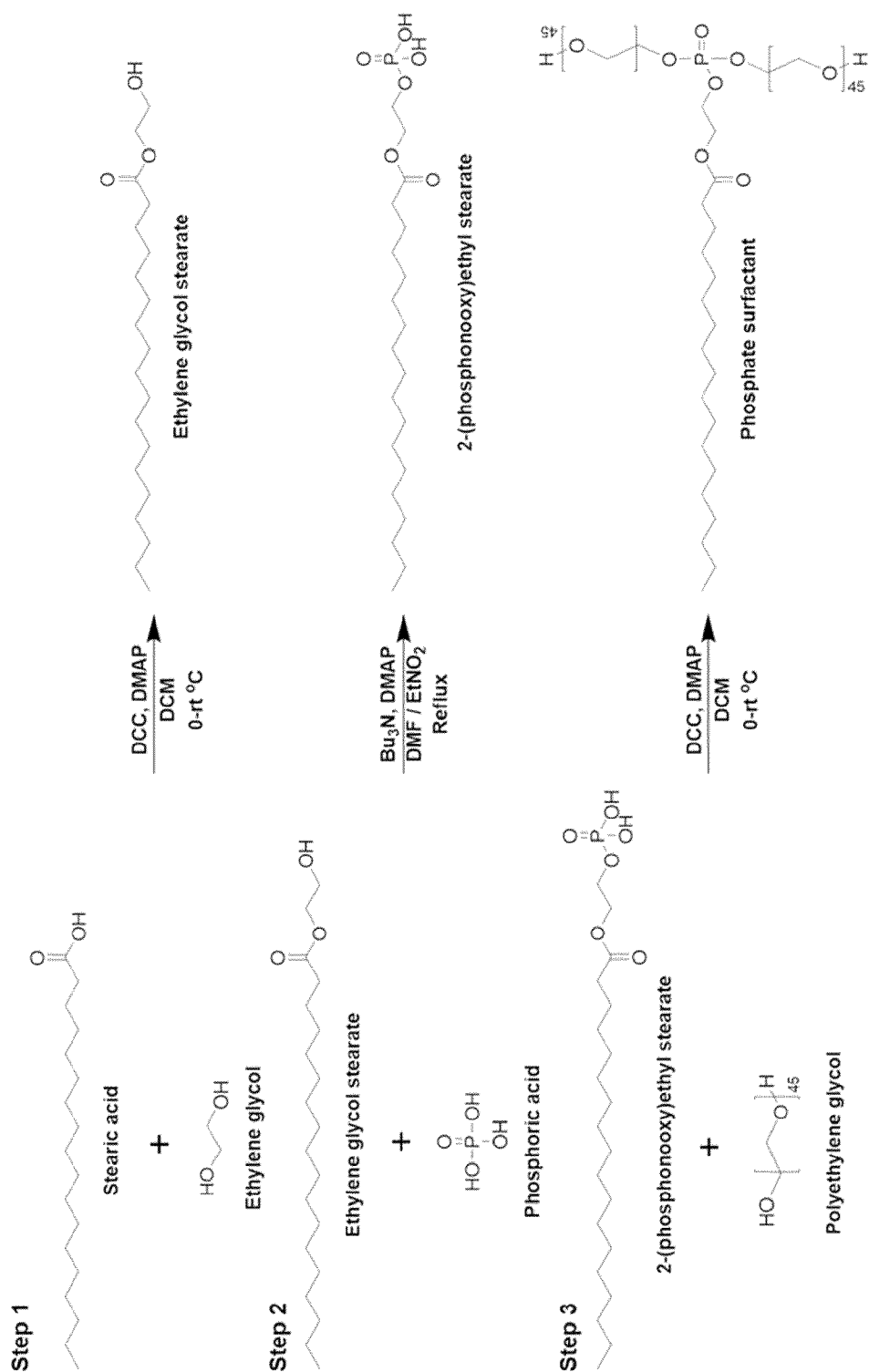
[도4]



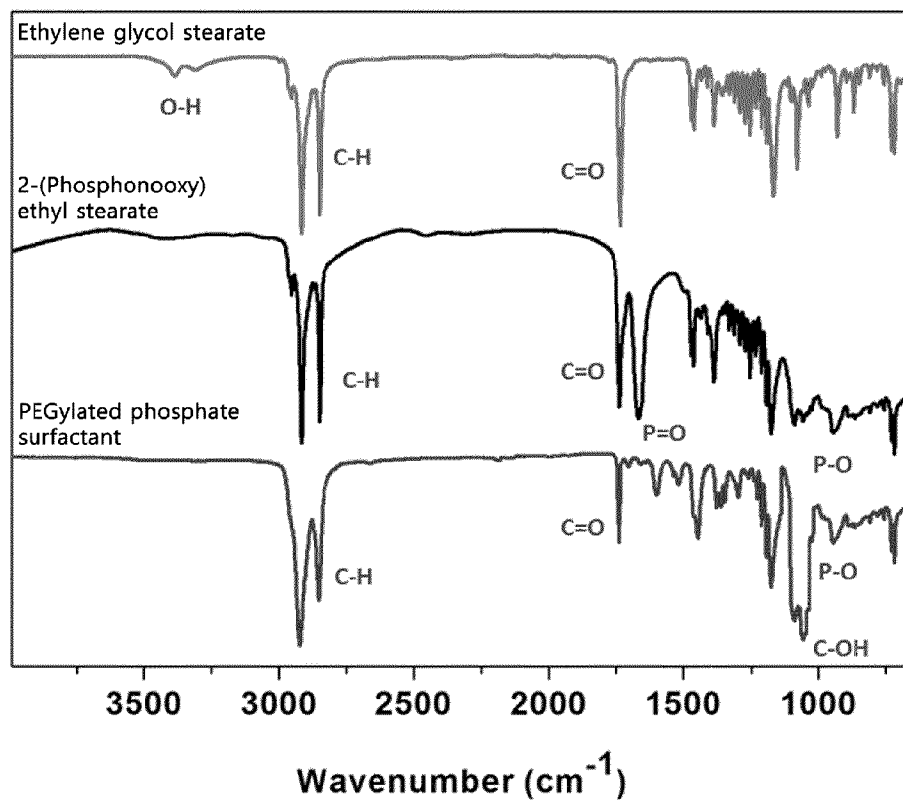
[도5]



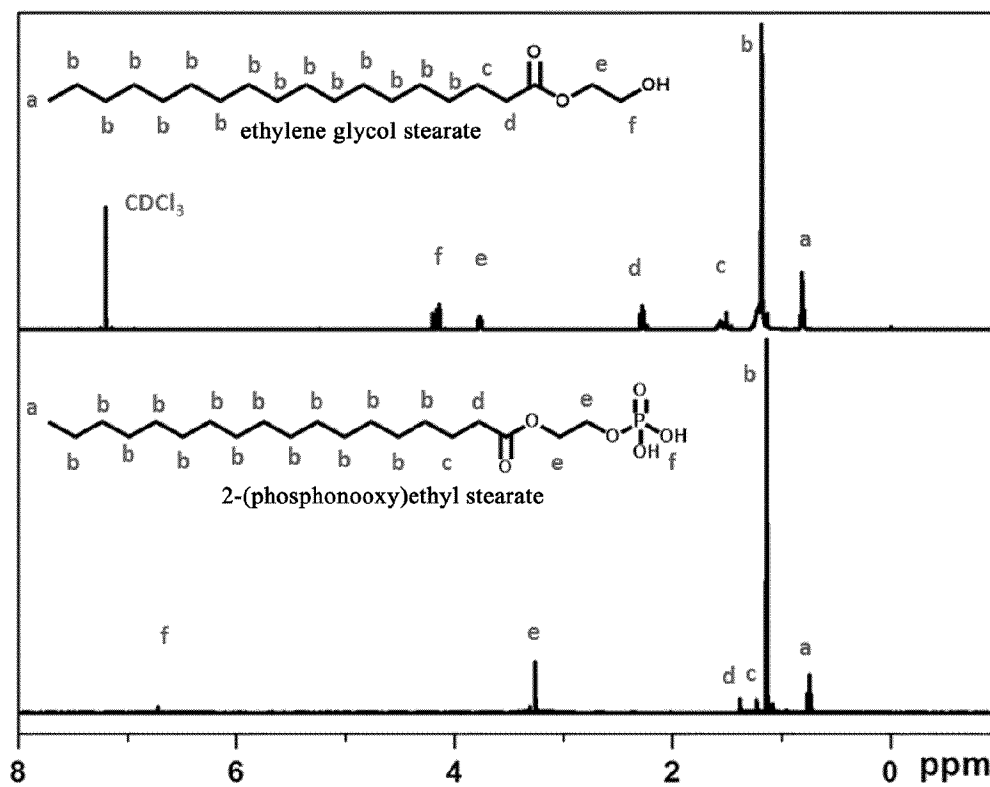
[도6]



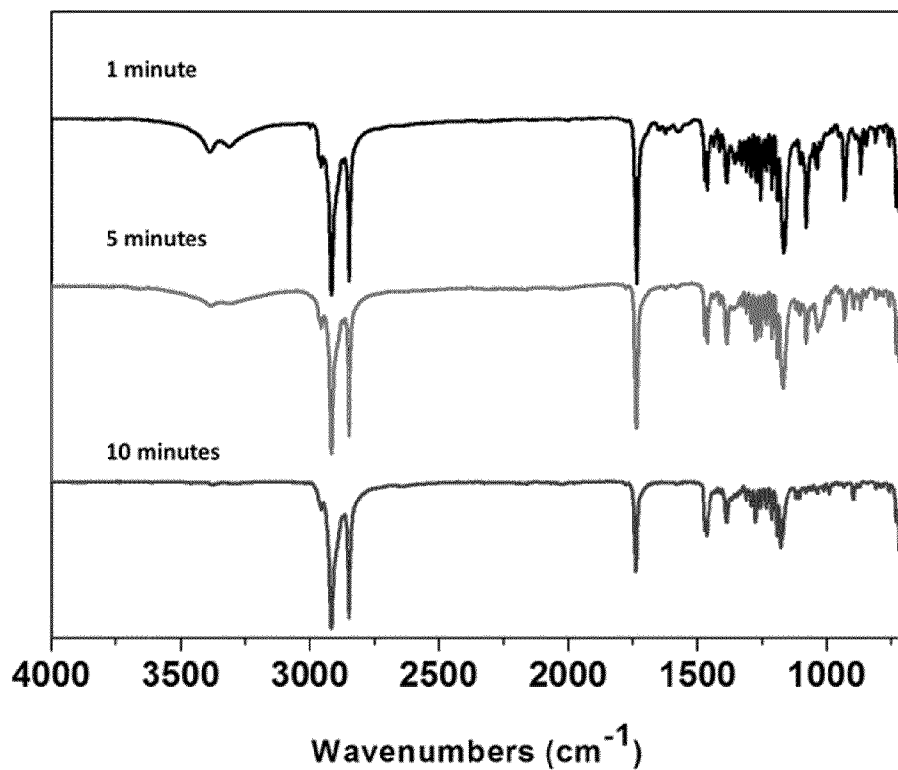
[도7]



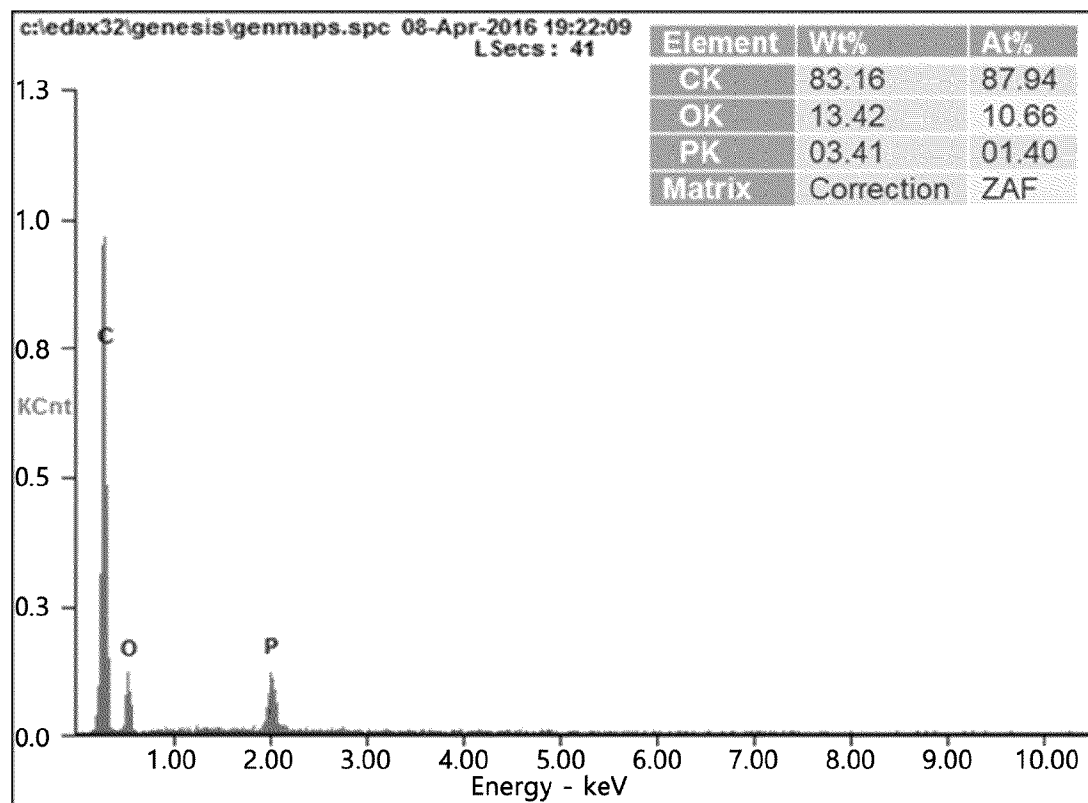
[도8]

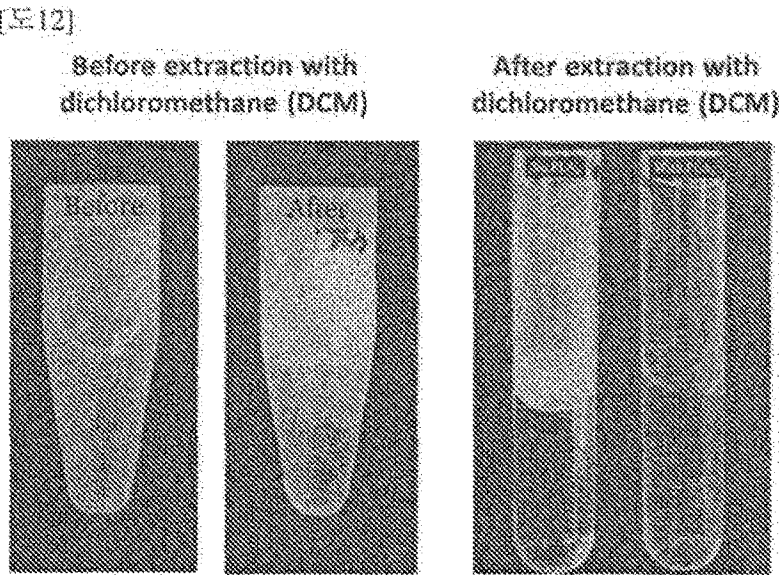
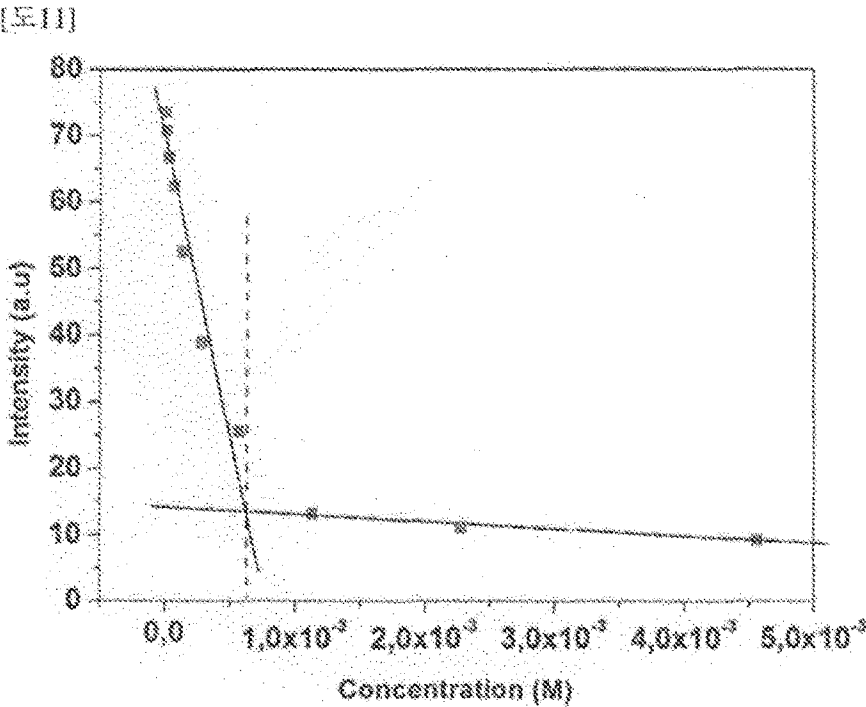


[도9]

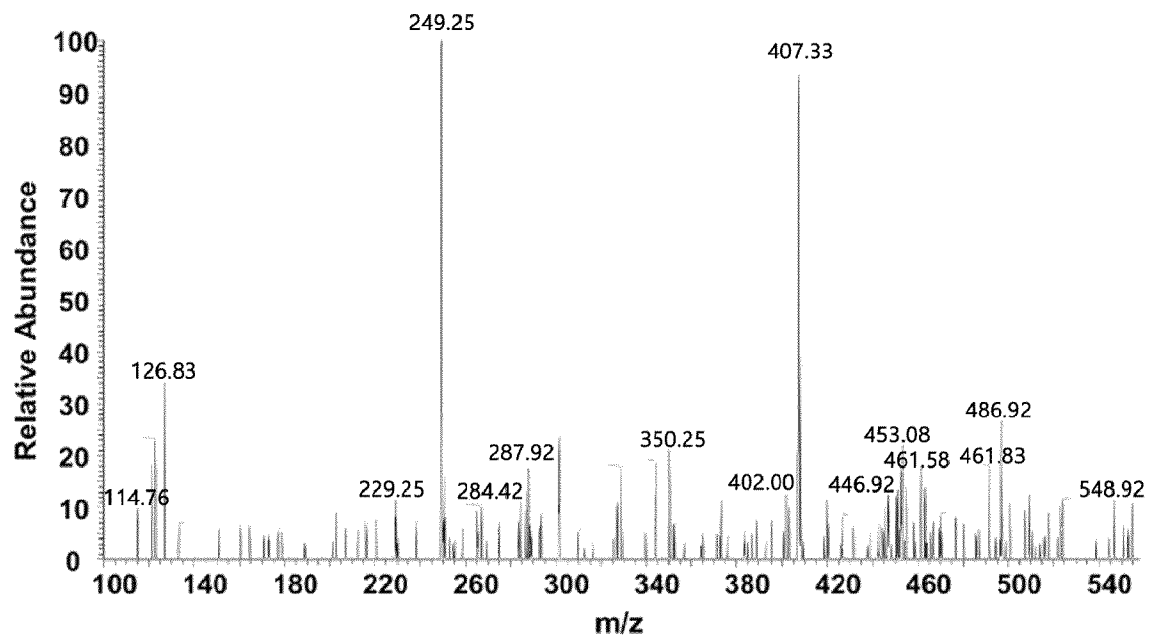


[도10]

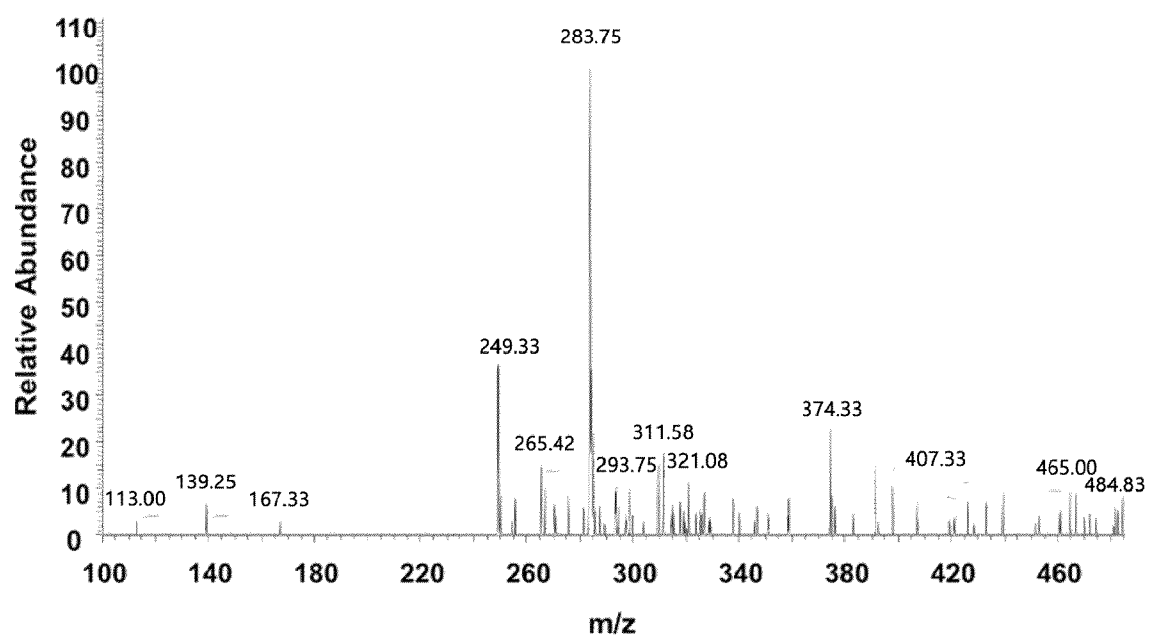




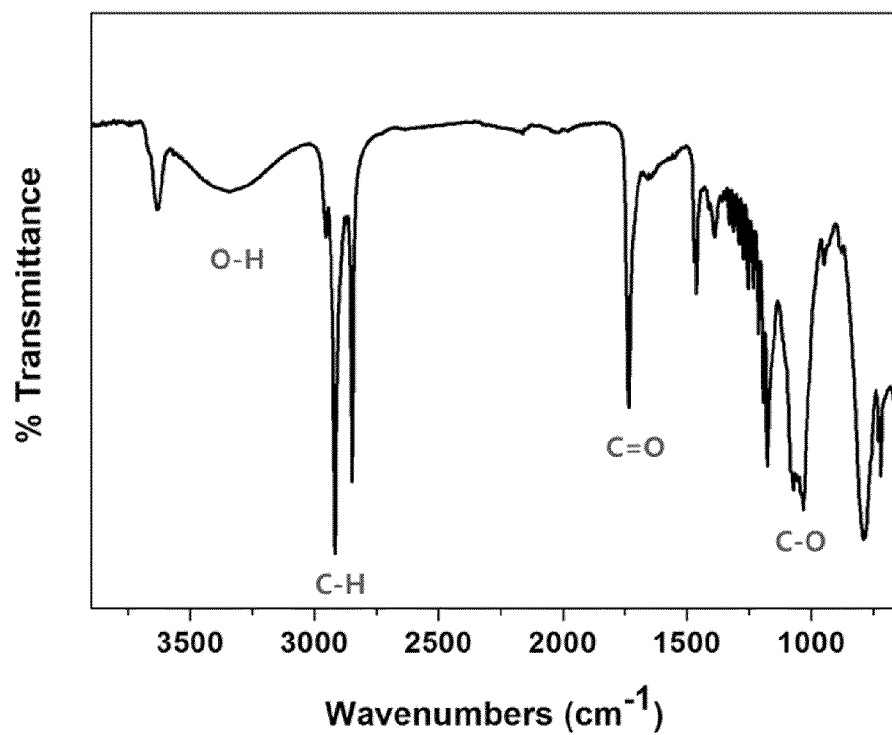
[도13]



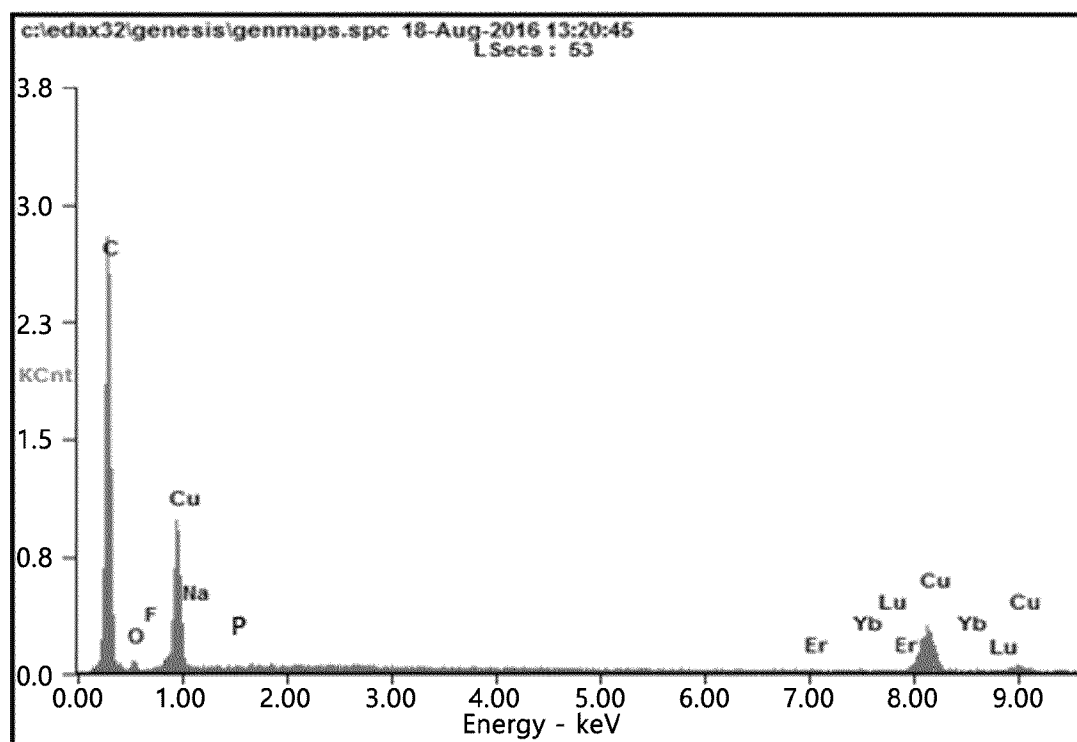
[도14]



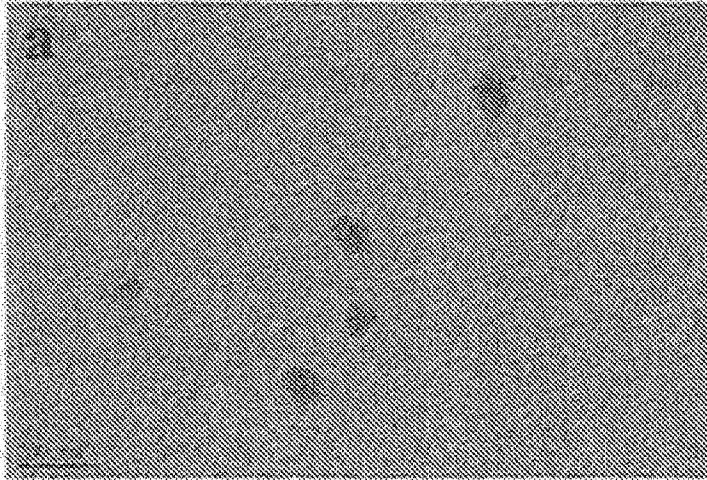
[도15]



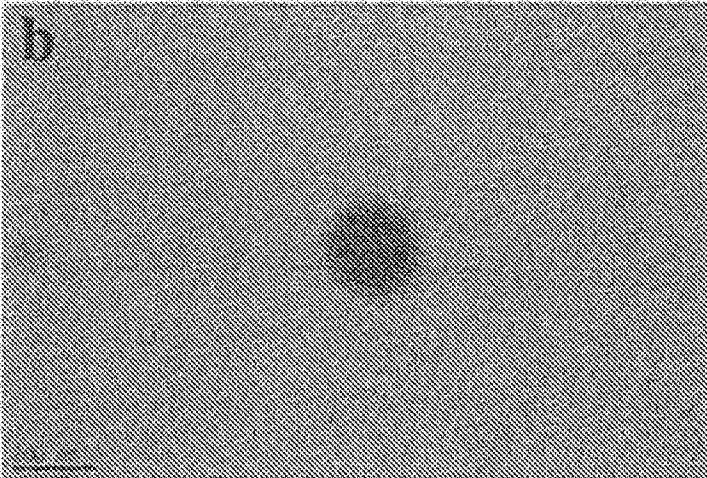
[도16]



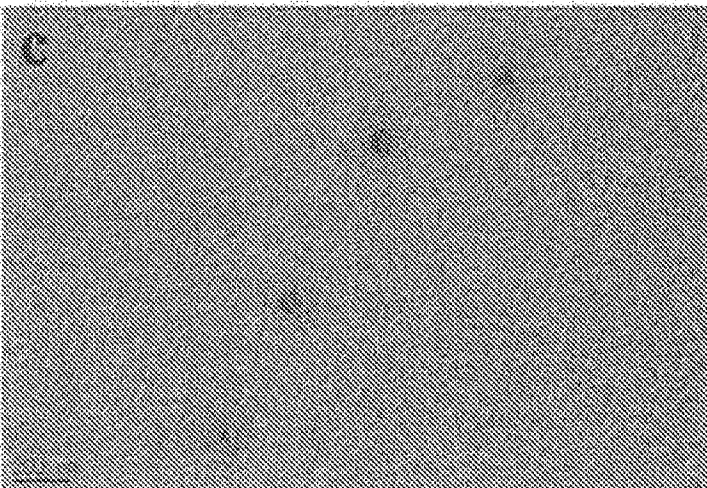
[도17]



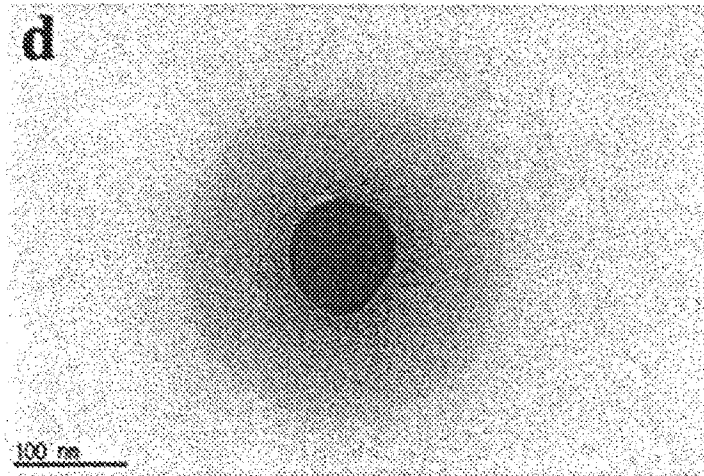
[도18]



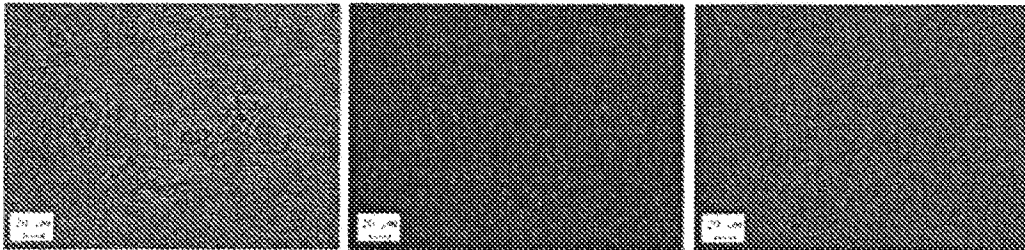
[도19]



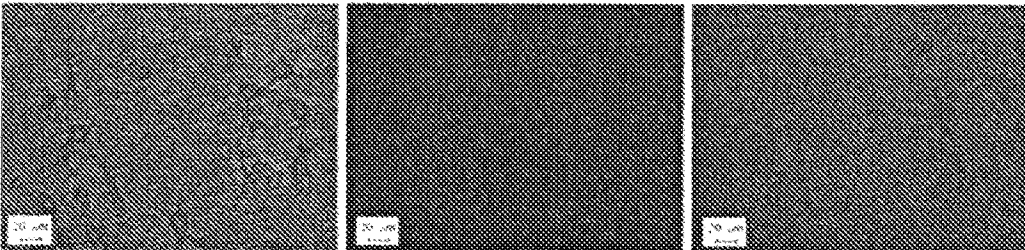
[도 20]



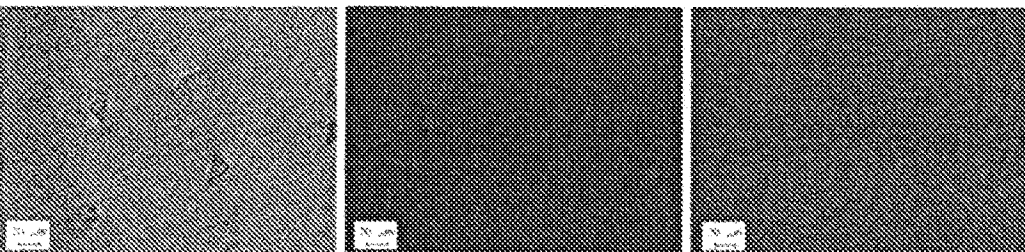
[도 21]



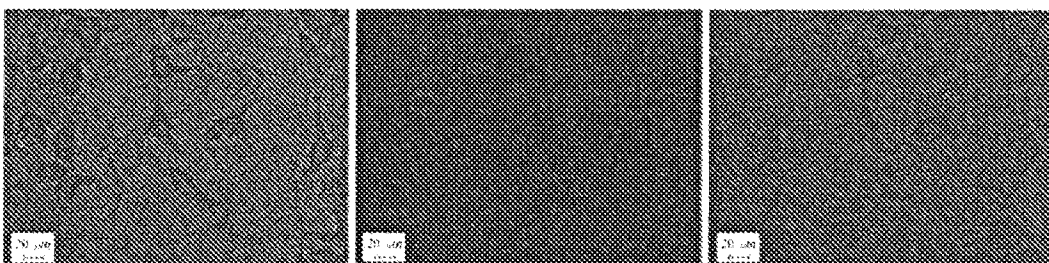
[도 22]



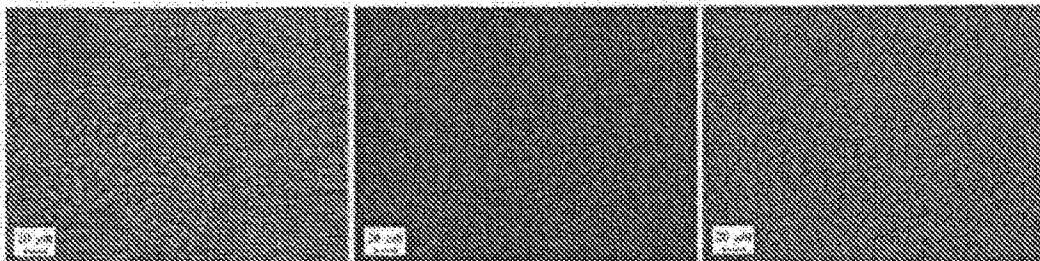
[도 23]



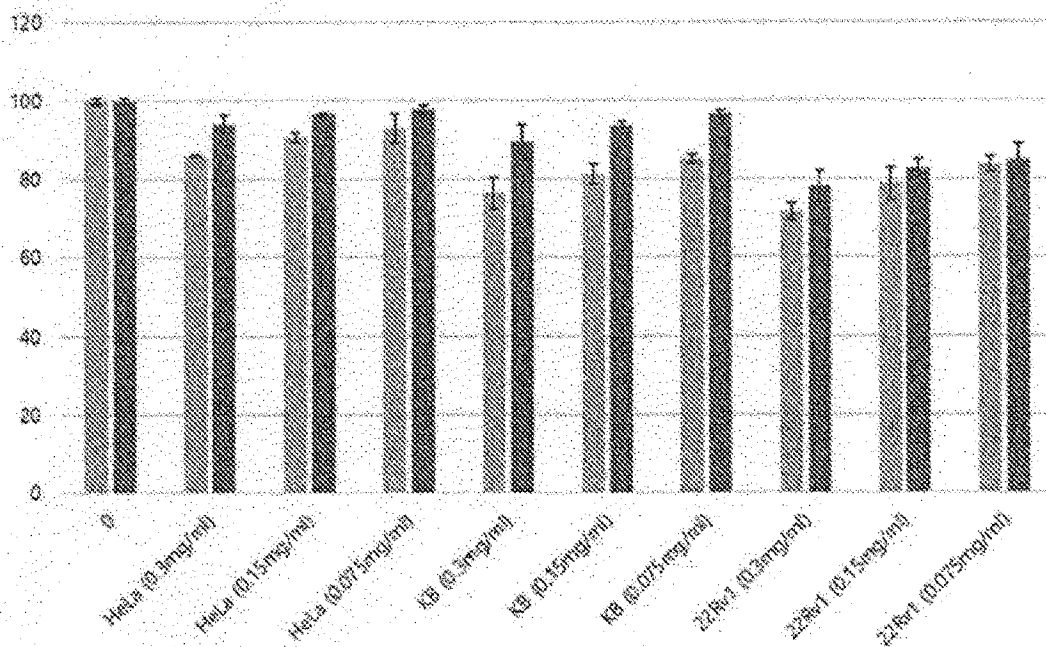
[도 24]



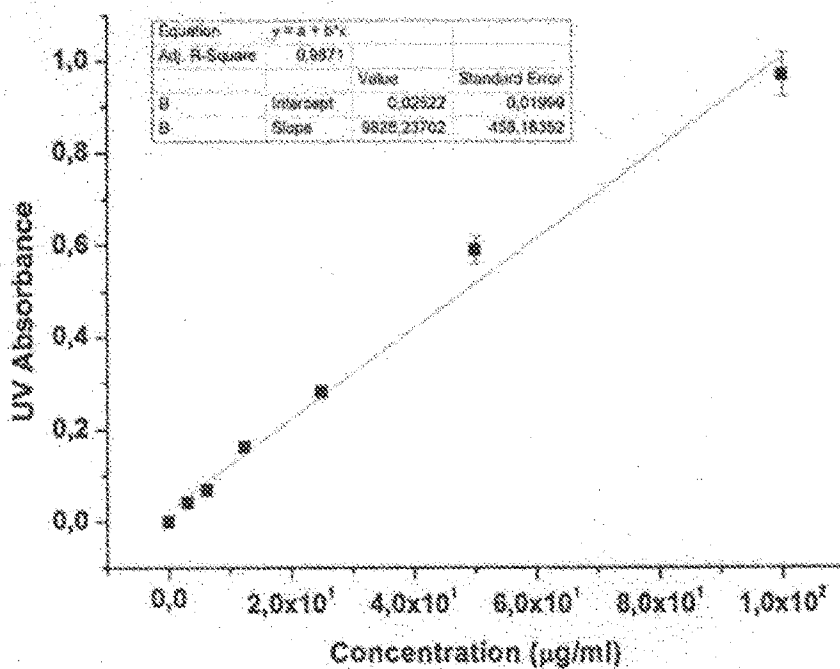
[도25]



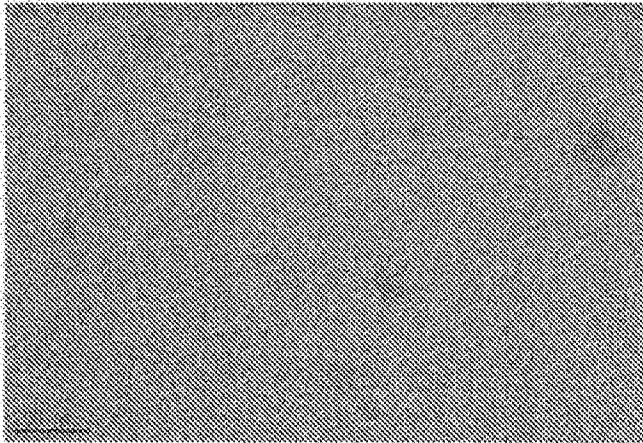
[도26]



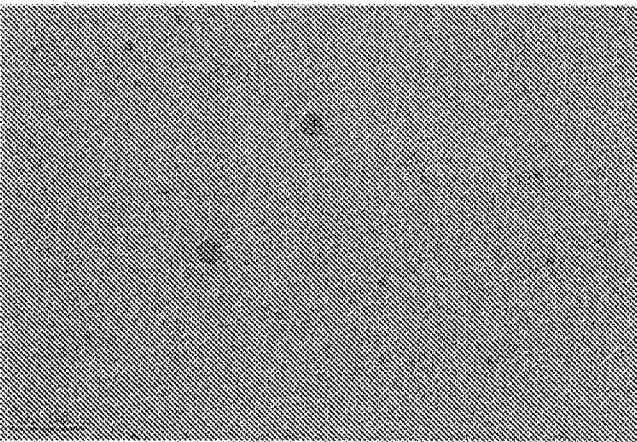
[도27]



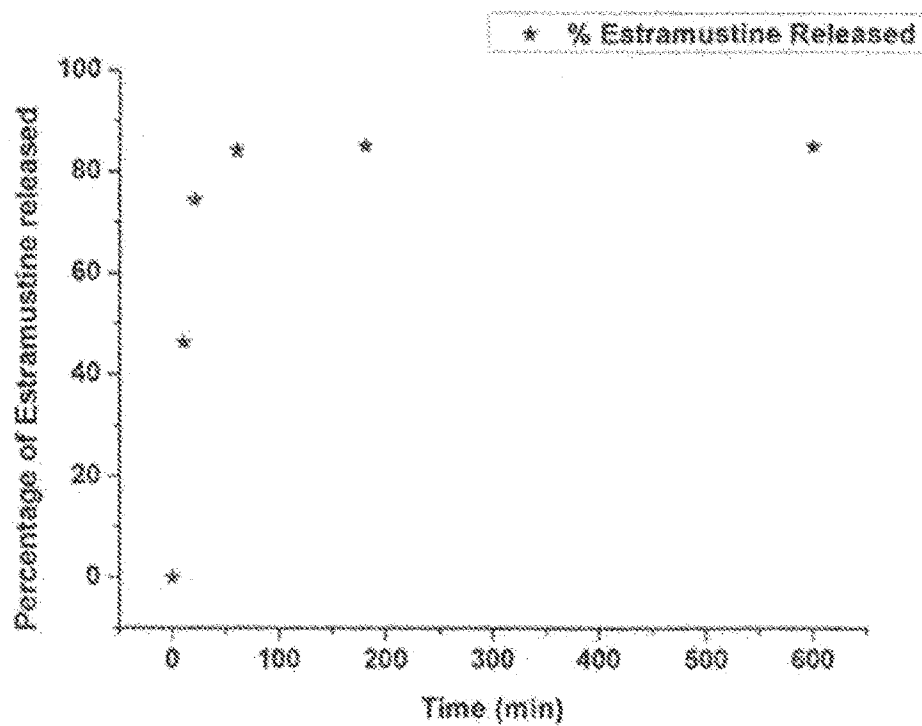
[도28]



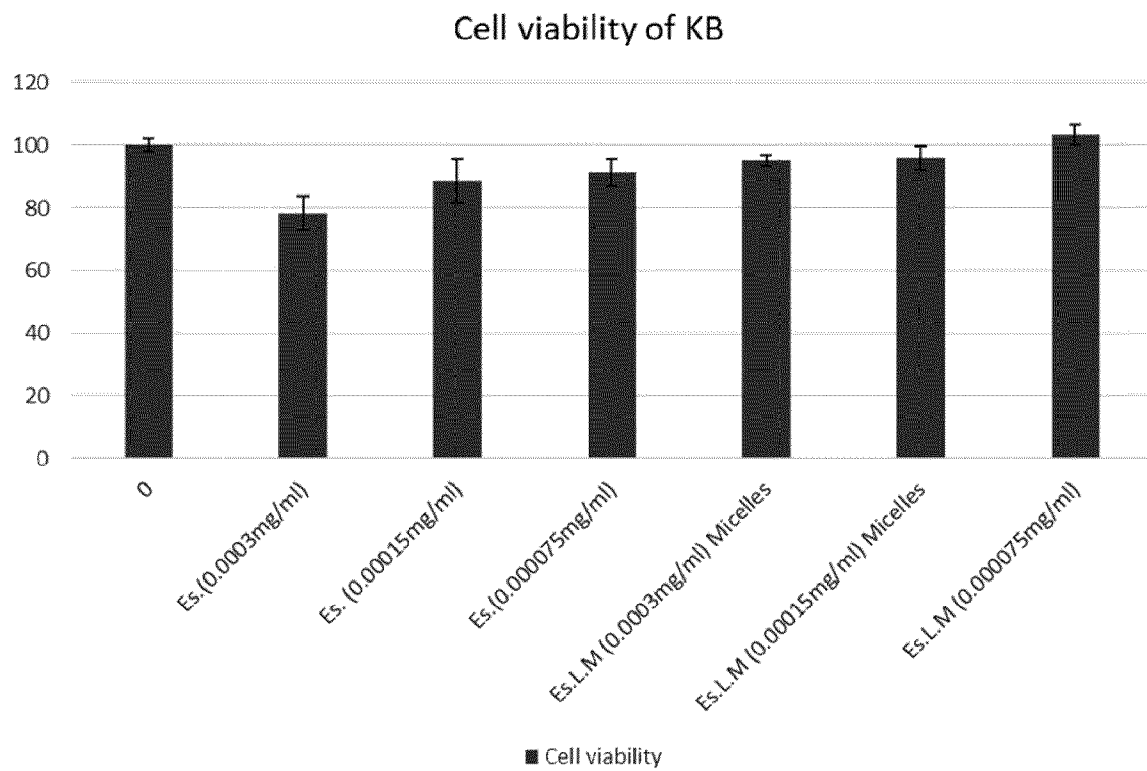
[도29]



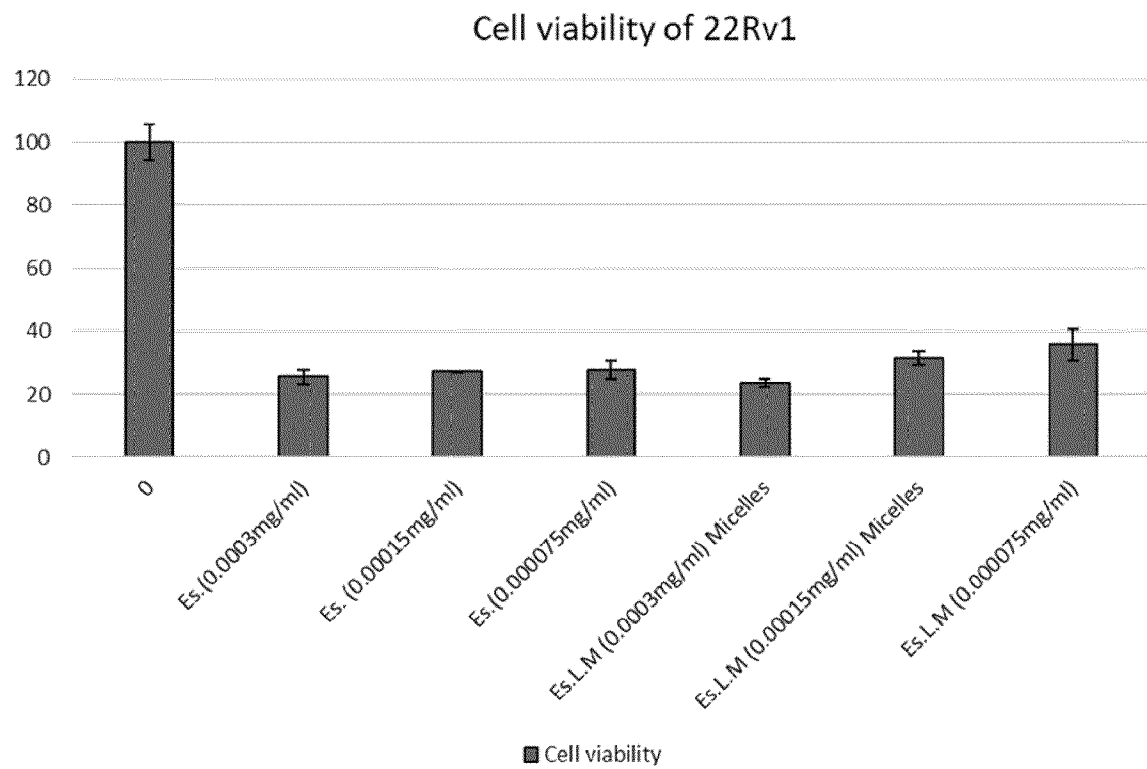
[도30]



[도31]



[도32]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 49/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 49/00; A61K 9/50; A61K 41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: phosphate surfactant, upconversion fluorescent nanoparticle, prostate cancer, phospholipase A2, bio imaging, drug carrier

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CEN, Yao et al., "Phospholipid-modified Upconversion Nanoprobe for Ratiometric Fluorescence Detection and Imaging of Phospholipase D in Cell Lysate and in Living Cells", Analytical Chemistry, 2014, vol. 86, no. 14, pages 7119-7127 See abstract; page 7122; and Scheme 1.	1-14
Y	SVED, Paul et al., "Oncogenic Action of Secreted Phospholipase A2 in Prostate Cancer", Cancer Research, 2004, vol. 64, no. 19, pages 6934-6940 See abstract.	1-14
A	YU, Yongjiang et al., "In-vitro and in-vivo Imaging of Prostate Tumor Using NaYF ₄ : Yb, Er Up-converting Nanoparticles", Pathology & Oncology Research, 2014, vol. 20, no. 2, pages 335-341 See abstract; and pages 339-340.	1-14
A	YUAN, Yingying et al., "A Facile Supramolecular Approach to Fabricate Multifunctional Upconversion Nanoparticles as a Versatile Platform for Drug Loading, in Vivo Delivery and Tumor Imaging", Journal of Materials Chemistry B, 27 February 2017, vol. 5, no. 13, pages 2425-2435 See the entire document.	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 JULY 2018 (24.07.2018)

Date of mailing of the international search report

24 JULY 2018 (24.07.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004254

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015-140160 A1 (FUNDACIN CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES CARLOS III et al.) 24 September 2015 See the entire document.	1-14
PX	SHARIPOV, Mirkomil et al., "Phospholipase A2-responsive Phosphate Micelle-loaded UCNPs for Bioimaging of Prostate Cancer Cells", Scientific Reports, 22 November 2017, vol. 7, no. 1, 16073, inner pages 1-9 See inner pages 1, 8; and figure 1.	1-14

Information on patent family members

PCT/KR2018/004254

23/09/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 49/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 49/00; A61K 9/50; A61K 41/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 인산염 계면활성제, 업컨버전 형광체 나노입자, 전립선암, 포스포리파아제 A2, 바이오 이미징, 약물전달체

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	CEN, YAO 등, 'Phospholipid-modified upconversion nanoprobe for ratiometric fluorescence detection and imaging of phospholipase d in cell lysate and in living cells', Analytical Chemistry, 2014, 86권, 14호, 페이지 7119-7127 요약; 페이지 7122; 및 Scheme 1 참조.	1-14
Y	SVED, PAUL 등, 'Oncogenic action of secreted phospholipase A2 in prostate cancer', Cancer Research, 2004, 64권, 19호, 페이지 6934-6940 요약 참조.	1-14
A	YU, YONGJIANG 등, 'In-vitro and in-vivo imaging of prostate tumor using NaYF4: Yb, Er up-converting nanoparticles', Pathology & Oncology Research, 2014, 20권, 2호, 페이지 335-341 요약; 및 페이지 339-340 참조.	1-14
A	YUAN, YINGYING 등, 'A facile supramolecular approach to fabricate multifunctional upconversion nanoparticles as a versatile platform for drug loading, in vivo delivery and tumor imaging', Journal of Materials Chemistry B, 2017.02.27, 5권, 13호, 페이지 2425-2435 전체 문헌 참조.	1-14

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 07월 24일 (24.07.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 07월 24일 (24.07.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



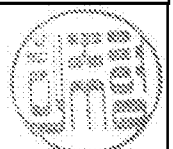
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2015-140160 A1 (FUNDACION CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES CARLOS III 등) 2015.09.24 전체 문헌 참조.	1-14
PX	SHARIPOV, MIRKOMIL 등, 'Phospholipase A2-responsive phosphate micelle-loaded UCNPs for bioimaging of prostate cancer cells', Scientific Reports, 2017.11.22, 7권, 1호, 16073, 내부페이지 1-9 내부페이지 1, 8; 및 도면 1 참조.	1-14

국제출원번호
PCT/KR2018/004254

PCT/KR2018/004254

공개일

2015/09/23