(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월07일
(11) 등록번호 10-1945632
(24) 등록일자 2019년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/107 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1075 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0140440
(22) 출원일자 2017년10월26일
심사청구일자 2017년10월26일
(56) 선행기술조사문헌
JP2014001159 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
허강무
대전광역시 유성구 어은로 57, 131동 1503호(어은동, 한빛아파트)
오근상
대전광역시 동구 미래길 7(소제동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김성호, 박형달

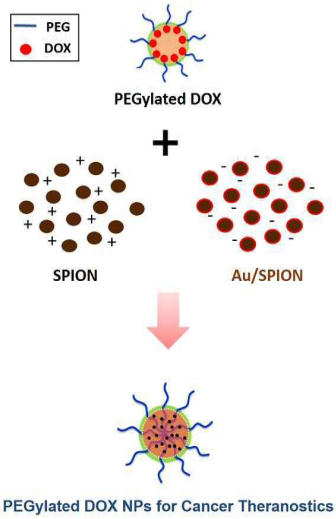
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 **폐길화된 항암 프로드럭의 자기조립형 나노 약물 전달체의 제조방법 및 그 나노 약물 전달체**

(57) 요 약

본 발명은 항암제를 포함하는 자기조립(self-assembly)형 나노 약물 전달체에 관한 것으로, 폐길화(pegylated)한 항암제를 포함하여 체내 독성이 감소됨에 따라 항암제의 부작용을 낮출 수 있고, 초상자성 자성 나노입자를 포함함으로써 외부 자기장 등을 이용하여 안전하고 효과적인 체내 약물전달이 가능하므로 다양한 질병의 진단 및 치료에 이용될 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 9/0009 (2013.01)

(72) 발명자
김유경
대전광역시 유성구 온천로 45, 알파동 1426호(봉명동)
김홍철
제주특별자치도 제주시 광평동로 66, 106동 1103호(노형동, 노형중흥에스클레스)
이지영
경기도 안성시 고수2로 20, 210동 1401호(당왕동, 대우경남아파트)
박슬기
충청남도 부여군 부여읍 성왕로161번길 10-6

(56) 선행기술조사문헌
KR1020070088392 A*
KR1020090076856 A
KR1020100000203 A
KR1020110115398 A
KR1020160036866 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415149461
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 로봇산업핵심기술개발사업
연구과제명 정밀 약물표적 및 방출기능을 갖는 외부 구동형 나노로봇 시스템 개발
기 여 율 1/1
주관기관 전남대학교산학협력단
연구기간 2016.12.01 ~ 2017.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

페길화(pegylated)된 항암제 및 자성 나노입자를 포함하는 자기조립(self-assembly)형 나노 약물 전달체로서,

상기 페길화된 항암제는 제1방법 또는 제2방법에 의해 제조되고,

상기 제1방법은,

(a21) 폴리에틸렌글리콜과 3,3'-디티오디프로피온산을 반응시켜 하기 화학식 2로 표현되는 화합물을 형성하는 단계; 및

(a22) 하기 화학식 2로 표현되는 화합물에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함하고,

상기 제2방법은,

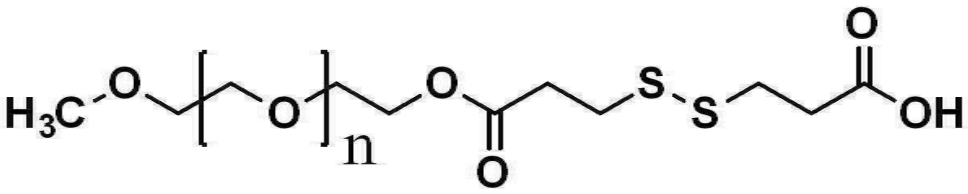
(a31) 3-머캅토프로판산과 아세톤을 반응시켜 하기 화학식 4로 표현되는 화합물을 형성하는 단계;

(a32) 하기 화학식 4으로 표현되는 화합물에 폴리에틸렌글리콜을 반응시켜 하기 화학식 5로 표현되는 화합물을 형성하는 단계; 및

(a33) 하기 화학식 5로 표현되는 화합물에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함하며,

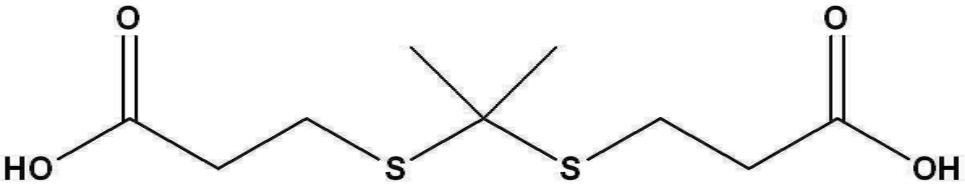
상기 자성 나노입자는 초상자성 산화철 나노입자(SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)인 것을 특징으로 하는 것인 자기조립(self-assembly)형 나노 약물 전달체.

[화학식 2]

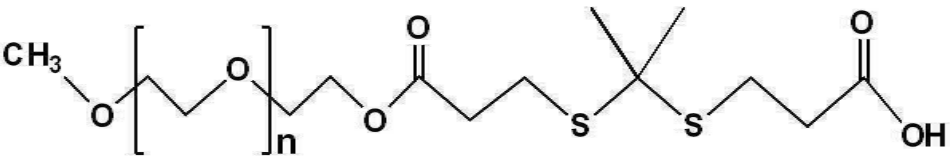


(상기 화학식 2에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

[화학식 4]



[화학식 5]



(상기 화학식 5에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항암제는 파클리탁셀(Paclitaxel), 독소루비신(Doxorubicin) 또는 독세타셀(Docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항암제는 독소루비신(Doxorubicin)인 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 자성 나노입자는 전체 나노 약물 전달체 100 중량부에 대하여 10 내지 50 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 페길화에 사용되는 폴리에틸렌 글리콜은 200 내지 40,000의 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 나노 약물 전달체의 크기는 50 내지 500nm인 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 페길화된 항암제는 pH 4.0 내지 7.0에서 가수분해되어 상기 항암제를 방출하는 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 페길화된 항암제는 활성 산소종에 의해 분해되어 상기 항암제를 방출하는 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 페길화된 항암제는 글루타치온 감응에 의해 분해되어 상기 항암제를 방출하는 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 페길화된 항암제 및 자성 나노입자가 물에서 자기조립에 의해 자발적으로 미셀 구조의 나노 약물 전달체를 형성하고,

상기 미셀 구조의 나노 약물 전달체는 상기 페길화된 항암제의 항암제 부분 및 자성 나노입자가 코어를 형성하고,

상기 페길화된 항암제의 폴리에티렌글리콜 부분이 상기 코어의 외부로 노출되어 있는 구조인 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체.

청구항 12

제1항에 따른 자기조립(self-assembly)형 나노 약물 전달체의 제조방법으로서, 상기 제조방법은

(a) 항암제를 페길화하여 페길화된 항암제를 제조하는 단계;

(b) 자성 나노입자를 제조하는단계; 및

(c) 상기 페길화된 항암제와 자성 나노입자를 혼합하는 단계;

를 포함하고,

상기 (a) 단계는 제1방법 또는 제2방법을 포함하고,

상기 제1방법은,

(a21) 폴리에틸렌글리콜과 3,3'-디티오디프로피온산을 반응시켜 하기 화학식 2로 표현되는 화합물을 형성하는 단계; 및

(a22) 하기 화학식 2로 표현되는 화합물에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함하고,

상기 제2방법은,

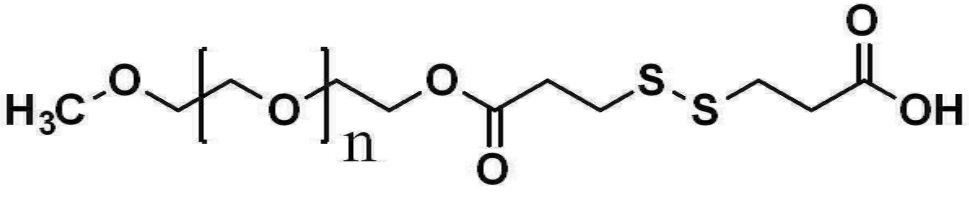
(a31) 3-머캅토프로판산과 아세톤을 반응시켜 하기 화학식 4로 표현되는 화합물을 형성하는 단계;

(a32) 하기 화학식 4으로 표현되는 화합물에 폴리에틸렌글리콜을 반응시켜 하기 화학식 5로 표현되는 화합물을 형성하는 단계; 및

(a33) 하기 화학식 5로 표현되는 화합물에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함하며,

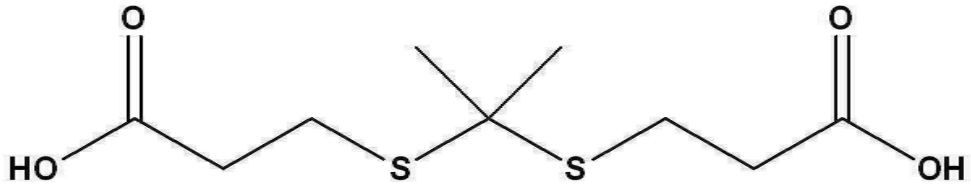
상기 자성 나노입자는 초상자성 산화철 나노입자(SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)인 것을 특징으로 하는 것인 자기조립형 나노 약물 전달체의 제조방법.

[화학식 2]

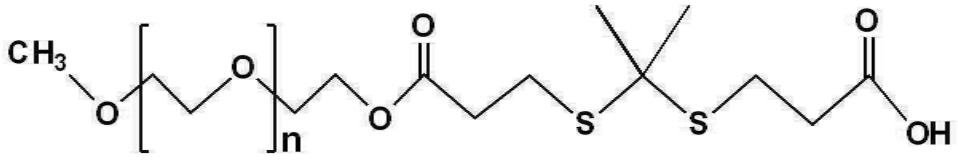


(상기 화학식 2에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

[화학식 4]



[화학식 5]



(상기 화학식 5에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 항암제는 독소루비신(Doxorubicin)인 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체의 제조방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

제12항에 있어서,

상기 페길화된 항암제와 자성 나노입자의 혼합비율은 20:80 내지 99:1의 무게비인 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암의 진단과 치료를 동시 수행이 가능한 항암 프로드럭 자기 조립형 나노 약물 전달체에 대한 것으로, 상세하게는 암을 치료할 수 있는 약물을 페길화하여 형성된 항암 프로드럭과 외부 전자기장에 반응할 수 있는 초상자성 자성 나노입자가 자기 조립을 통해 담지되어 이루어진 나노 약물 전달체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 암이라고 통칭되는 질병은, 주로 통제할 수 없는 세포의 성장(neoplasia)으로 인하여 발생하는 현상으로서 100가지 이상의 질환이다. 비정상적인 세포의 성장이 세포의 덩어리(tumor)를 이루고 이러한 세포 덩어리가 주위의 조직으로 침투하고 이어서 신체의 다른 부위로 전이(metastasis)되는 현상을 포함한다.

[0004] 질병의 치료 또는 질병 부위의 진단 효과를 발휘하는 유효 약물 성분을 인체에 투여함에 있어서 중요하게 고려해야 하는 문제는, 투여된 유효 성분이 어느 정도 질병 부위에 전달되는지 여부 문제, 즉 전달 효율의 문제이다. 유효 성분이 원하지 아니하는 정상 조직에 도달하고 작용하여 약물 부작용을 발생시키는 결과를 야기할 수 있고, 또한 정작 약물이 필요한 질병 부위에 전달 되는 약물의 양이 줄어들어 치료 효과를 거두지 못하는 문제가 발생한다.

[0005] 일부 질병에 대하여 치료 효과를 갖는 약물들 중에는 정상 조직이나 세포에 강한 독성을 나타내어 질병의 치료 효과보다 약물의 부작용이나 세포 독성이 너무 커서 문제가 되는 경우가 많다. 항암 치료제가 정상 조직 세포에도 작용하여 암 조직의 제거나 치료 효과 보다 정상 조직 세포에 나쁜 영향을 미친다.

[0006] 항암 효과를 갖는 약물은 무려 1,300여종 이상인 것으로 알려지고 있다. 그러나 이렇게 항암 효과를 나타내는 약물들은 정상적인 조직 세포에도 독성을 나타내는 경우가 많아서 항암제의 부작용의 원인이 되며, 암 세포 조직의 특징으로 인하여 항암제 유효성분이 암 조직으로의 전달의 효율이 낮아져서 부작용 대비 치료 효과가 크지 않다는 문제점을 야기한다.

[0007] 특히, 암 조직 세포의 특성이 다른 다양한 종류의 복제 종양세포를 생성하는 현상인 이종성으로 인해 나노 약물 제형에서 빈번하게 주로 활용하는, 암 세포 조직의 수용체와 나노제형 리간드 사이의 친화성을 이용한 암 세포 추적 투여 방식이 어려워짐으로써 어려워짐으로써 나노제형 항암제를 사용하여 암을 치료하기가 어렵다. 또한, 이러한 암 조직의 이질성 세포 외부 기질은 약물의 침투를 방해하여 약물에 대한 노출을 감소시키고 서서히 약물 저항성을 유발한다. 이러한 특징을 나타내는 암 조직은 세포의 이종성 특성 때문에 항체 표지자에 의한 표적 치료의 한계가 있다.

[0008] 이를 해결하기 위해 최근에는 여러 기능을 동시에 갖는 나노소자 소재의 개발로 연구의 초점이 모아지면서, 나노구조를 기능성 소자로 만드는 방법과 나노구조로 만들어진 기능성 소자의 위치를 제어하고, 물리적 화학적 생물학적 특성을 조절하는 나노-바이오 공학에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 자성 나노입자(magnetic nanoparticles)는 기본적으로 일반적인 나노입자가 갖고 있는 특징들, 즉, 단위부피 당 표면적이 넓어서 소량의 대상 물질도 감지할 수 있다는 장점을 갖고 있는 것 외에, 다른 나노입자에 비해 화학적 안전성이 우수하고 바이오프로브로 사용될 때 자기장에 의해 위치 조작이 가능하다는 장점이 있다.

[0009] 이 중 산화철 나노입자는 자화되는 특성을 가지고 있어서 생의학적으로 매우 큰 활용가치를 가지고 있다. 특히, 초상자성 산화철 나노입자(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION)는, 자기공명영상(MRI) 진단, 약물 운반 및 치료와 같은 생물의학 분야에서 최근에 각광을 받고 있다. 따라서 이러한 나노입자를 이용하여 항암제 등의 약물의 부작용이 감소된 약물 전달에 관한 연구가 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1757273호(2017.07.06), "근적외선 영역에서 타겟 약물 방출 및 광열치료가 가능한 폐암 치료용 Au/Ag 중공 나노쉘"

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2016-0036871호(2016.04.05), "광역학 치료용 자기조립형 약학조성물"

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에 본 발명에서는 페길화된 항암제와 자성 나노입자를 적용한 신규한 나노 약물 전달체를 개발하여 이를 적용한 결과, 약물의 프로드럭화에 의한 체내 독성 감소로 항암제의 부작용이 줄어들고 효과적인 약물 전달 및 방출

에 의해 항암 효능을 향상시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 항암제의 부작용을 줄이고 효과적인 약물전달 문제를 해소할 수 있는 페길화된 항암제 및 자성 나노입자를 포함하는 자기조립형 나노 약물 전달체를 제공하는데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 나노 약물 전달체의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은

[0017] 페길화(pegylated)된 항암제 및 자성 나노입자를 포함하는 자기조립(self-assembly)형 나노 약물 전달체를 제공한다.

[0018] 이 때, 상기 항암제는 독소루비신(Doxorubicin)인 것을 특징으로 한다.

[0019] 이 때, 상기 자성 나노입자는 초상자성 산화철 나노입자(SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)인 것을 특징으로 한다.

[0020] 이 때, 상기 자성 나노입자는 전체 나노 약물 전달체 100 중량부에 대하여 10 내지 50 중량부를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 이 때, 상기 페길화된 항암제 및 자성 나노입자가 물에서 자기조립에 의해 자발적으로 미셀 구조의 나노 약물 전달체를 형성하고,

[0022] 상기 미셀 구조의 나노 약물 전달체는 상기 페길화된 항암제의 항암제 부분 및 자성 나노입자가 코어를 형성하고,

[0023] 상기 페길화된 항암제의 폴리에티렌 글리콜 부분이 상기 코어의 외부로 노출되어 있는 구조인 것을 특징으로 한다.

[0025] 또한, 본 발명은 자기조립(self-assembly)형 나노 약물 전달체의 제조방법으로서, 상기 제조방법은

[0026] (a) 항암제를 페길화하여 페길화된 항암제를 제조하는 단계;

[0027] (b) 자성 나노입자를 제조하는단계; 및

[0028] (c) 상기 페길화된 항암제와 자성 나노입자를 혼합하는 단계;

[0029] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체의 제조방법을 제공한다.

[0030] 이 때, 상기 (a) 단계는

[0031] (a11) 폴리에틸렌글리콜과 p-니트로페닐 클로로포르메이트 반응시켜 폴리(에틸렌글리콜)-(p-니트로페닐 클로로포메이트)를 형성하는 단계; 및

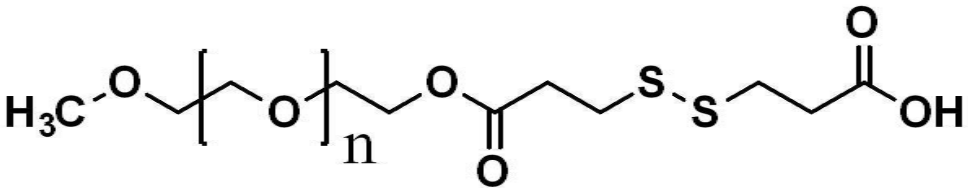
[0032] (a12) 상기 폴리(에틸렌글리콜)-(p-니트로페닐 클로로포메이트)에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0033] 이 때, 상기 (a) 단계는

[0034] (a21) 폴리에틸렌글리콜과 3,3'-디티오디프로피온산을 반응시켜 하기 화학식 2로 표현되는 화합물을 형성하는 단계; 및

[0035] (a22) 하기 화학식 2로 표현되는 화합물에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0036] [화학식 2]



[0037]

[0038] (상기 화학식 2에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

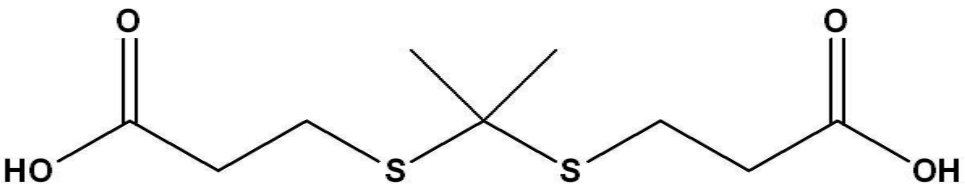
[0039] 이 때, 상기 (a) 단계는

[0040] (a31) 3-머캅토프로판산과 아세톤을 반응시켜 하기 화학식 4로 표현되는 화합물을 형성하는 단계;

[0041] (a32) 하기 화학식 4로 표현되는 화합물에 폴리에틸렌글리콜을 반응시켜 하기 화학식 5로 표현되는 화합물을 형성하는 단계; 및

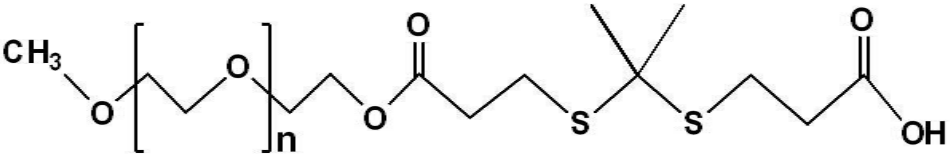
[0042] (a33) 하기 화학식 5로 표현되는 화합물에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0043] [화학식 4]



[0044]

[0046] [화학식 5]



[0047]

[0048] (상기 화학식 5에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

발명의 효과

[0051] 본 발명에 따른 자기조립형 나노 약물 전달체는 항암제를 페길화하여 프로드럭의 형태로 포함하므로 인체 독성이 큰 항암제도 제형화하여 부작용을 최소화 하거나 없앨 수 있는 효과가 있으며, 자성 나노입자와 함께 체내 환경과 같은 수용액상에서 자기조립하므로 외부 자기장 등을 이용하여 원하는 표적기관에 효과적으로 약물 전달을 할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 본 발명에 따른 페길화(PEGylated)된 항암 프로드럭의 합성 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 페길화(PEGylated)된 항암 프로드럭의 합성 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 페길화(PEGylated)된 항암 프로드럭의 합성 모식도를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 초상자성 산화철 나노입자 (SPION)의 합성 모식도를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자 (Au/SPION)의 합성 모식도를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 페길화(PEGylated)된 항암 프로드럭과 자성을 띄는 초상자성 산화철 나노입자 (SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자 (Au/SPION)가 함유되어 암의 진단/치료가 가능한 나노 약물 전달체 형성 모식도를 나타낸 것이다.

도 7은 항암 프로드럭인 페길화된 독소루비신(Doxorubicin)의 화학적 구조와 H^1-NMR 분석결과를 나타낸 것이다.

도 8은 폴리에틸렌 글리콜(Polyethyleneglycol, PEG)과 독소루비신의 화학적 결합에 의해 펩티드 결합이 형성된 것을 적외선(IR) 분광법에 의해 나타낸 그래프이다.

도 9는 항암 프로드럭인 페길화된 독소루비신(Doxorubicin)의 화학적 구조와 H^1-NMR 분석결과를 나타낸 것이다.

도 10은 폴리에틸렌 글리콜(Polyethyleneglycol, PEG)과 독소루비신의 화학적 결합에 의해 펩티드 결합이 형성된 것을 적외선(IR) 분광법에 의해 나타낸 그래프이다.

도 11은 항암 프로드럭인 페길화된 독소루비신(Doxorubicin)의 화학적 구조와 H^1-NMR 분석결과를 나타낸 것이다.

도 12는 폴리에틸렌 글리콜(Polyethyleneglycol, PEG)과 독소루비신의 화학적 결합에 의해 펩티드 결합이 형성된 것을 적외선(IR) 분광법에 의해 나타낸 그래프이다.

도 13은 투과전자현미경(TEM)을 이용한 나노 약물 전달체 내에 함유될 초상자성 산화철 나노입자 (SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자 (Au/SPION)의 형태 및 표면 원소 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 초상자성 산화철 나노입자 (SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자 (Au/SPION)가 함유된 나노 약물 전달체의 자화율을 측정한 비교 데이터를 나타낸 그래프이다.

도 15는 수용액 상에서 안정하게 분산되어 있는 초상자성 산화철 나노입자 (SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)가 함유된 나노 약물 전달체의 입자 분포도를 나타낸 그래프이다.

도 16은 열 중량 분석기 (Thermo Gravimetric Analyzer, TGA)를 이용한 나노 약물 전달체 내에 함유된 초상자성 산화철 나노입자 (SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)의 함량을 분석한 결과 데이터이다.

도 17은 자기공명영상장비(MRI)를 이용한 초상자성 산화철 나노입자 (SPION)가 함유된 나노 약물 전달체의 농도 변화에 따른 T_2-weight 음성 조영 영상을 분석한 결과 데이터이다.

도 18은 자기공명영상장비 (MRI)를 이용한 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)가 함유된 나노 약물 전달체의 농도 변화에 따른 T_2-weight 음성 조영 영상을 분석한 결과 데이터이다.

도 19는 정상 세포 (NIH3T3 cells) 및 암 세포 (HepG-2 cells)에서 초상자성 산화철 나노입자(SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자가 함유된 나노 약물 전달체의 세포 독성을 비교, 분석한 결과 데이터이다.

도 20은 암 세포에 Free DOX, PEG-DOX, SIPON 또는 Au/SPION이 포함된 나노 약물 전달체 처리 후 시간 별 세포 내로 유입 거동을 비교, 분석한 결과 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 다음의 실시예 또는 도면을 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 다음의 실시예 또는 도면에 대한 설명은 본 발명의 구체적인 실시 태양을 특정하여 설명하고자 하는 것일 뿐이며, 본 발명의 권리 범위를 이들에 기재된 내용으로 한정하거나 제한 해석하고자 의도하는 것은 아니다.

[0056] 본 발명은 항암제 및 자성 나노입자를 포함하는 자기조립(self-assembly)형 나노 약물 전달체로서, 상기 항암제는 폴리에틸렌글리콜로 페길화(pegylated)된 것을 특징으로 하는 자기조립형 나노 약물 전달체를 제시한다.

[0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 항암제는 파클리탁셀(Paclitaxel), 독소루비신(Doxorubicin) 또는 도세탁셀(Docetaxel)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 독소루비신(Doxorubicin) 일 수 있다.

[0058] 독소루비신은 안트라사이클린계 항 종양제로 불리는 계열에 속하는 항암제로서, 세포 분열에 필요한 RNA, DNA 등을 손상시켜 암세포의 비정상적인 세포분열을 멈추게 하는 작용을 하며, 독소루비신의 염산염을 아드리아마이신의 상품명으로 판매하고 있다.

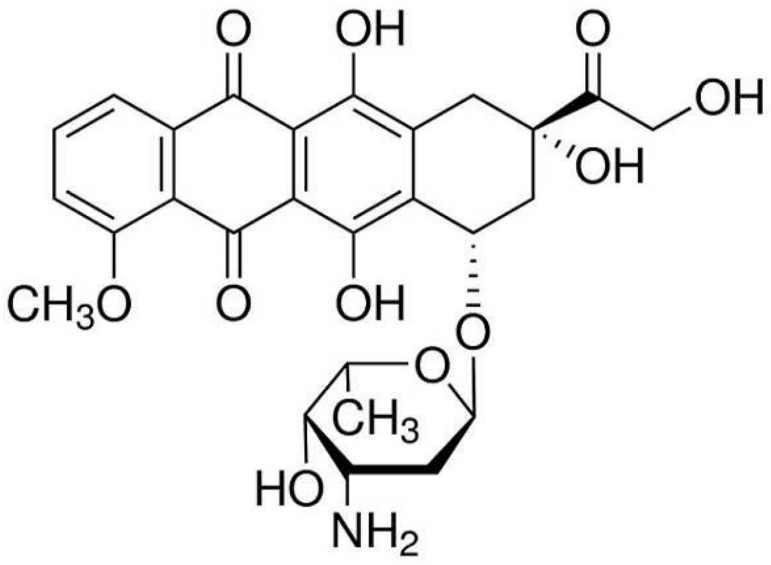
[0059] 구체적으로 항암제의 치료 대상이 되는 상기 암은 방광암, 유방암, 위암, 폐암, 난소암, 갑상선암, 자궁경부암, 중추신경암, 교아종, 간암, 피부암, 췌장암, 위암, 대장암, 직장암, 식도암, 신장암, 폐암, 상피암, 혈액암, 전

립선암, 연조직육종, 다발성 경화증 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 "암의 치료" 또는 "항암"은 암을 갖는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서, 암이 진행되는 것을 억제하거나, 암을 경감시키는 것을 의미한다.

[0060] 본 발명에 따른 약학적으로 유효한 양이란 약물이 동물 또는 사람에게 투여되어 목적하는 생리학적 또는 약리학적 활성을 나타내기에 충분한 양을 말한다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 투여 대상의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0062] 본 발명에 따른 독소루비신은 다음과 같은 구조의 화학식을 갖는다.

[0063] [화학식 1]



[0064]

[0065] 그러나 독소루비신은 심근병증 또는 심부전증 등의 심장독성 또는 피부독성 등의 부작용을 나타내기 때문에, 이를 해결하기 위해 나노 크기의 중합체 미셀구조, 덴드리머, 리포솜의 전달체를 사용하려는 시도가 있었다. 그러나 상기 방법에 의한 약물 전달은 낮은 약물 부하 및 전달체의 조기파열로 인한 약물 방출의 문제점이 있다.

[0066] 본 발명에서는 이에 상기 독소루비신에 폴리에틸렌글리콜을 화학결합한 페길화(pegylated)한 항암제의 프로드럭을 제안하고자 한다.

[0067] 도 7, 9 및 11은 본 발명의 일 구현예에 따른 프로드럭인 페길화된 독소루비신의 화학적 구조와 H^1-NMR 그래프를 나타낸 것이다. 도 8, 10 및 12는 폴리에틸렌 글리콜(Polyethyleneglycol, PEG)과 독소루비신의 화학적 결합에 의해 펩티드 결합이 형성된 것을 적외선 분광법에 의해 나타낸 그래프이다. 상기 도면을 참고하면 독소루비신과 폴리에틸렌글리콜이 펩티드 결합을 이루어 페길화된 것을 확인할 수 있다.

[0068] 상기 페길화는 항암제인 독소루비신(free-DOX)의 부작용을 감소시키고, 이후 자성 나노입자와 자기조립에 의한 미셀 구조 형성이 용이하도록 하기 위하여 수행한다. 상기 독소루비신은 소수성을 나타내며 페길화를 통해 친수성인 폴리에틸렌글리콜 부분은 수용액 상태에서 미셀 형성시 외부로 향하는 자기 조립을 하게 되어, 체내에서 효과적인 약물전달이 가능하게 하는 효과가 있다.

[0069] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 페길화된 항암제는 pH 4.0 내지 7.0에서 가수분해되어 상기 항암제를 방출하는 것일 수 있다. 상기 페길화된 항암제는 약물 전달에 의해 세포내 약산성의 미세 환경, 예를 들면 라이소좀(pH=4.5 ~ 5.5) 또는 엔도좀(pH=5.0 ~ 6.5)에서 산촉매 가수분해 되어 효과적을 약물을 방출시킬 수 있기 때문에 항암 효능을 증가시킬 수 있는 효과가 있다.

[0070] 본 발명의 또다른 일 구현예에 따르면 상기 페길화된 항암제는 활성 산소종에 의해 분해되어 상기 항암제를 방출하는 것일 수 있다.

[0071] 상기 페길화된 항암제는 자기 조립을 통해 초상자성 산화철 나노입자를 담지하는 단계에서 광 감응 민감제(photodynamic therapeutic agent, Protoporphyrin IX(PpIX), Chlorin e6(Ce6) 및 Pheophorbide A(PhA) 등)와 함께 담지할 경우 외부 빛을 통해 광 감응 민감제가 자극이 가능하며, 그 결과로 발생되는 활성산소종(reactive

oxygen species, ROS)에 의해 폐길화된 항암제 상의 thioketal linker가 분해 되어, 약산성의 미세환경에 가수분해되어 방출이 가능한 폐길화된 항암제에 비해 좀더 효과적으로 약물을 방출시킬 수 있어 항암 효능을 증가시킬 수 있다.

[0072] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면 상기 폐길화된 항암제는 체내 생체 물질인 글루타치온 (glutathione, GSH) 감응에 의해 분해되어 상기 항암제를 방출하는 것일 수 있다.

[0073] 생체 물질인 GSH가 세포 외 보다는 세포질 내, 정상세포보다 암세포에 더 많이 존재하기 때문에 GSH 감응형 폐길화된 항암제는 암세포 내로 축적 시, 특별한 외부 자극 원의 도움 없이도 GSH에 의해 폐길화된 항암제 상의 disulfide 결합이 쉽게 분해가 가능하기 때문에 세포 내 분해 및 약물 방출 시킬 수 있어 항암 효능을 증가시킬 수 있다.

[0074] 본 발명에 따른 폐길화는 다양한 길이로 실시할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 폐길화에 사용되는 폴리에티렌글리콜은 200 내지 40,000 의 분자량을 갖는 것일 수 있으며, 바람직하게는 1,000 내지 10,000, 가장 바람직하게는 2,000 내지 5,000 의 분자량을 가지는 것을 사용할 수 있다.

[0075] 또한 본 발명에 따른 폴리에틸렌글리콜은 메톡시폴리에틸렌글리콜(mPEG)일 수 있다.

[0076] 이와 같이 친수성을 가지는 폴리에틸렌글리콜의 길이를 조절하면, 나노입자의 극대화된 표면적의 증가로 인한 뭉침 현상을 최소화할 수 있으며, 세포내 유입되는 내세포현상(endocytosis)을 역시 조절할 수 있는 효과가 있다. 세포내 유입현상의 조절은 세포내로의 활성 타겟팅 또는 세포 표면에 대한 특이적 결합을 조절할 수 있음을 나타내므로 생물학적 응용에 매우 중요한 의미를 지닌다.

[0078] 본 발명에 따른 폐길화된 항암제는 후술할 자성 나노입자와 함께 자기조립(self-assembly)에 의해 자발적으로 미셀(micelle)구조의 나노 약물 전달체를 형성할 수 있다. 이 때 상기 미셀 구조의 나노 약물 전달체는 수용액 상태에서 폐길화된 항암제의 항암제 부분 및 자성 나노입자가 코어를 형성하고, 폐길화된 항암제의 폴리에티렌글리콜 부분이 상기 코어의 외부로 노출되어 있는 구조인 것일 수 있다.

[0079] 이 때, 상기 자성 나노입자는 초상자성 산화철 나노입자(Supermagnetic Iron Oxide Nanoparticles, SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)일 수 있다. 도 13은 투과 전자현미경(TEM)을 이용한 나노 약물 전달체 내에 함유되는 초상자성 산화철 나노입자 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자의 형태 및 에너지 분산 X-선 분광법(Energy dispersive spectrometer, EDS)에 의한 표면 원소 분석 결과를 나타낸 것이다.

[0080] 본 발명에 따른 자기조립형 나노 약물 전달체는 상기 폐길화된 항암제 및 상기 자성 나노입자를 포함하는 것 일 수 있다.

[0081] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 자성 나노입자는 전체 나노 약물 전달체 100 중량부에 대하여 10 내지 50 중량부를 포함하는 것일 수 있다. 만일 자성 나노입자의 함량이 상기 범위 미만이면 외부 자기장에 의한 영향이 미미하여 원하는 위치의 약물 전달이 어려울 수 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우에는 항암제 등의 약물 함량이 적어지기 때문에 약효를 나타내기 어려우므로 상기 범위에서 적절히 조절한다.

[0082] 본 발명에 따른 자기조립형 나노 약물 전달체는 그 크기가 50 내지 500nm의 평균 입경을 가질 수 있다.

[0084] 본 발명은 상기 자기조립형 나노 약물 전달체의 제조방법을 제공한다. 도 6을 통해 본 발명에 따른 나노 약물 전달체의 제조방법을 모식도로 나타내었다. 상기 나노 약물 전달체의 제조방법은

[0085] (a) 항암제를 폐길화하여 폐길화된 항암제를 제조하는 단계;

[0086] (b) 자성 나노입자를 제조하는 단계; 및

[0087] (c) 상기 폐길화된 항암제와 자성 나노입자를 혼합하는 단계;

[0088] 를 포함하는 것일 수 있다.

[0089] 이 때, 상기 항암제는 독소루비신(Doxorubicin)일 수 있으며, 상기 자성 나노입자는 초상자성 산화철 나노입자(SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)일 수 있다.

[0090] 이 때, 상기 (c) 단계에서 폐길화된 항암제와 자성 나노입자의 혼합비율은 20:80 내지 99:1의 부피비, 바람직하게는 1:4 내지 5:5이다. 만일 상기 범위를 벗어나는 경우 나노 약물 전달체 제조시 수득율이 저하되거나 나노

약물 전달체의 크기가 급격히 증가하는 단점이 있다.

[0092] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 항암제를 페길화하여 페길화된 항암제를 제조하는 단계는

[0093] (a11) 폴리에틸렌글리콜과 p-니트로페닐 클로로포르메이트 반응시켜 폴리(에틸렌글리콜)-(p-니트로페닐 클로로포메이트)를 형성하는 단계; 및

[0094] (a12) 상기 폴리(에틸렌글리콜)-(p-니트로페닐 클로로포메이트)에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0095] 이 때, 항암제는 독소루비신일 수 있다.

[0096] 이 때, 상기 (a11) 단계에서 폴리에틸렌글리콜을 용해시키기 위해 아세토나이트릴을 사용할 수 있다.

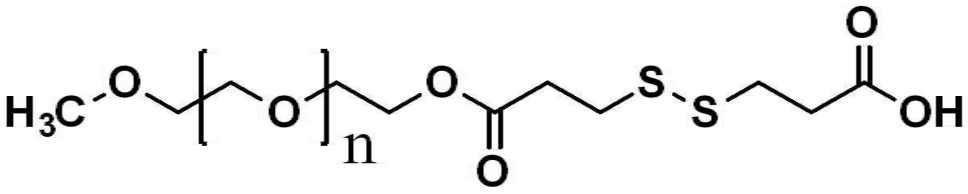
[0097] 이 때, 상기 (a11) 단계 이후 과량의 p-니트로페닐 클로로포르메이트를 제거하기 위해 디에틸에테르를 사용하여 침전시키고, 오븐에 건조시키는 과정을 추가로 거칠 수 있다. 또한 상기 (a12) 단계에서 항암제는 독소루비신 염산염(DOX·HCl)일 수 있으며, 상기 독소루비신 염산염은 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 용매로 하여 용해시킬 수 있다.

[0099] 본 발명의 또다른 일 구현예에 따르면, 상기 항암제를 페길화하여 페길화된 항암제를 제조하는 단계는

[0100] (a21) 폴리에틸렌글리콜과 3,3'-디티오디프로피온산(DTDP)을 반응시켜 하기 화학식 2로 표현되는 화합물을 형성하는 단계; 및

[0101] (a22) 하기 화학식 2로 표현되는 화합물에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0102] [화학식 2]

[0103] 

[0104] (상기 화학식 2에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

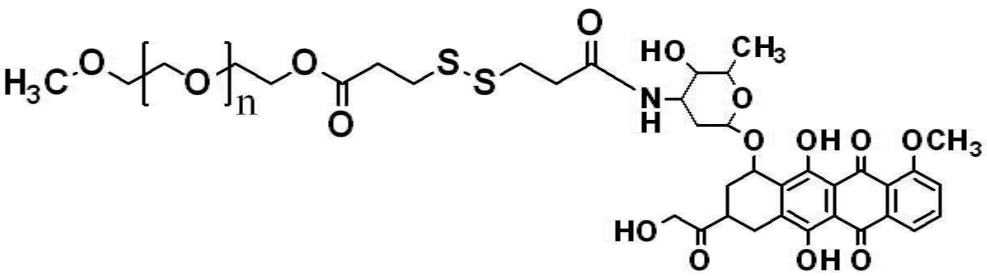
[0105] 이 때, 항암제는 독소루비신일 수 있다.

[0106] 이 때, 상기 (a21) 단계는 반응 용매로 디클로로메탄을 이용하여 진행할 수 있으며, 디사이클로헥실카르보이미드(Dicyclohexylcarbodiimide, DCC)와 4-이메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, DMAP)을 추가로 혼합하여 진행할 수 있다.

[0107] 상기 (a22) 단계는 DMSO 용매 조건에서 24시간 동안 진행하는 것일 수 있으며, 상기 (a22) 단계는 1-에틸-3-(3-이메틸아미노프로필)-카르보이미드 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (N-hydroxysuccinimide, NHS)와 함께 진행할 수 있다. 또한 상기 (a22) 단계에서 항암제는 독소루비신 염산염(DOX·HCl)일 수 있다.

[0108] 이 때, (a22) 단계를 거친 페길화된 항암제는 하기 화학식 3의 구조를 갖는 화합물일 수 있다.

[0109] [화학식 3]

[0110] 

[0111] (상기 화학식 3에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

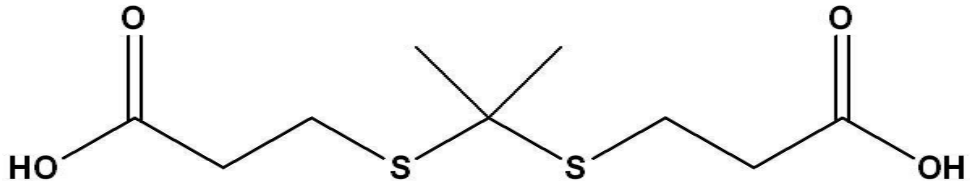
[0113] 본 발명의 또다른 일 구현예에 따르면, 상기 항암제를 페길화하여 페길화된 항암제를 제조하는 단계는

[0114] (a31) 3-머캅토프로판산과 아세톤을 반응시켜 하기 화학식 4로 표현되는 화합물을 형성하는 단계;

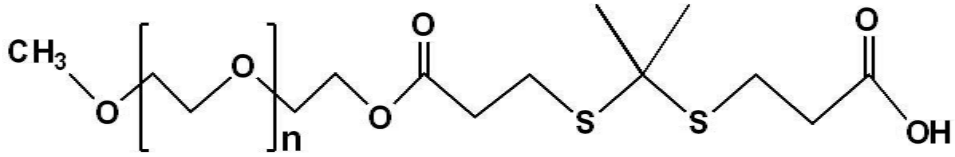
[0115] (a32) 하기 화학식 4으로 표현되는 화합물에 폴리에틸렌글리콜을 반응시켜 하기 화학식 5로 표현되는 화합물을 형성하는 단계; 및

[0116] (a33) 하기 화학식 5로 표현되는 화합물에 항암제를 넣어 페길화된 항암제를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0117] [화학식 4]

[0118] 

[0120] [화학식 5]

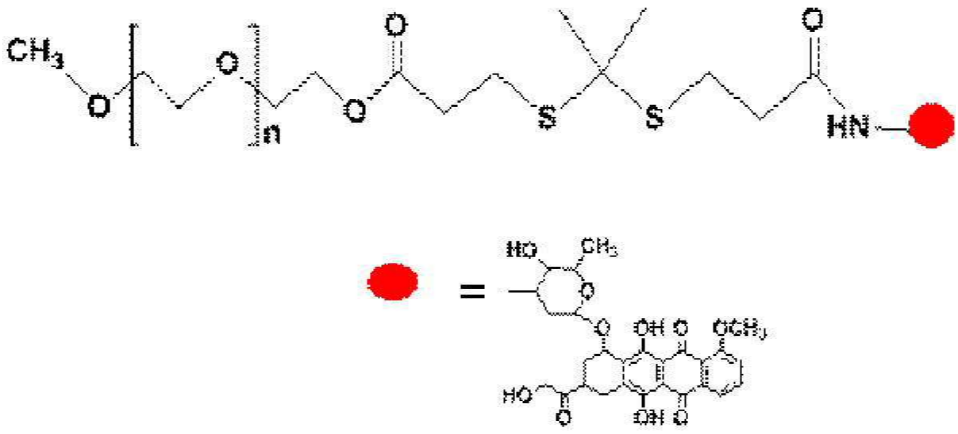
[0121] 

[0122] (상기 화학식 5에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

[0124] 이 때, 상기 (a31) 단계는 기체상의 염산조건에서 진행할 수 있으며, 상기 (a32) 단계는 디사이클로헥실카르보이미드(Dicyclohexylcarbodiimide, DCC)와 4-이메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, DMAP)을 추가로 혼합하여 진행할 수 있다. 상기 (a33) 단계는 1-에틸-3-(3-이메틸아미노프로필)-카르보이미드 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (N-hydroxysuccinimide, NHS)와 함께 진행할 수 있다. 또한 상기 (a33) 단계에서 항암제는 독소루비신 염산염(DOX·HCl)일 수 있다.

[0125] 이 때, (a33) 단계를 거친 페길화된 항암제는 하기 화학식 6의 구조를 갖는 화합물일 수 있다.

[0127] [화학식 6]

[0128] 

[0129] (상기 화학식 6에서 n은 1≤n≤2,000의 정수이다)

[0131] 이하, 본 발명의 효과에 대한 이해를 돕기 위하여 실시예, 비교예 및 실험예를 기재한다. 다만, 하기 기재는 본 발명의 내용 및 효과에 관한 일 예에 해당할 뿐, 본 발명의 권리 범위 및 효과가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0133] **실시예 1. 페길화된 독소루비신 프러드럭 제조(1)**

[0134] 상온에서 20 mL의 아세토나이트릴에 메톡시폴리에틸렌글리콜(methoxy polyethyleneglycol, mPEG) 5 mmol을 혼합하여 용해시킨 다음, p-니트로페닐클로로포르메이트(p-nitrophenyl chloroformate, pNC) 62.5 mmol을 혼합하여 충분히 용해시킨 후 트리에틸아민(tri-ethylamine, TEA)을 넣고 질소 분위기에서 24 시간 반응시켰다.

[0135] 24 시간 후 반응이 끝난 용액은 과량의 pNC를 제거하기 위해 디에틸에테르를 사용하여 침전시키고, 오븐에 건조시켜 폴리(에틸렌글리콜)-(p-니트로페닐 클로로포메이트)(mPEG-pNC)를 얻었다. 다음으로 10 mL 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 독소루비신의 염산염(DOX·HCl) 0.92 mmol을 넣어 용해시키고 TEA 2.8 mmol을 넣어 30분 동안 혼합 후, 20 mL DMSO에 mPEG-pNC 0.92 mmol을 녹인 용액을 첨가하여 24시간 동안 반응시켰다.

[0136] 다음으로 화학적 결합이 되지 않은 독소루비신을 제거하기 위해 48시간 동안 3차 증류수 하에서 투석막(Spectra/Por; MWCO: 1,000 Da)을 사용하여 분리 및 제거하였으며 마지막으로 동결 건조를 통해 고체 형태의 PEG-DOX 프러드럭 고분자를 얻었다. 이렇게 생성된 프러드럭 고분자는 실험 목적에 따라 다양한 용매인 3차 증류수, PBS, $CDCl_3$ 또는 DMSO 등에 분산시켜 분석을 수행하였다.

[0138] 본 발명에 따른 페길화(PEGylated)된 항암 프로드럭의 합성 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0140] 합성된 페길화된 독소루비신에 대해 H^1-NMR과 적외석(IR) 분광법을 이용하여 분석하고, 그 측정 결과를 각각 도 7과 도 8에 나타내었다. 도 7 및 도 8을 보면, 항암제인 독소루비신에 폴리에틸렌글리콜이 펩티드 결합을 이루어 페길화된 것을 확인할 수 있었다.

[0142] **실시예 2. 페길화된 독소루비신 프러드럭 제조(2) - 글루타치온 감응형 PEG-ss-DOX**

[0143] 상온에서 20mL 디클로로메탄(dichloromethane, DCM)에 메톡시폴리에틸렌글리콜(methoxy polyethyleneglycol, mPEG) 2 mmol을 혼합하여 용해시킨 다음, N,N'-디사이클로헥실카르보이미드(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide, DCC) 3.6 mmol과 4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 0.3 mmol을 혼합하여 충분히 용해 시키고, 3,3'-디티오디프로판산(3,3'-Dithiodipropionic acid, DTDP) 3 mmol을 넣은 후 질소 분위기에서 24시간 반응시켰다.

[0144] 24 시간 후 과량의 DTDP, DMAP, DCC와 부산물인 디사이클로헥실유레아(dicyclohexyl urea, DCU)는 필터를 사용하여 제거하고, 물과 DCM을 부피비로 1:1로 혼합한 용액에서 DCM 층을 추출하는 과정을 반복하여 화학식 2로 표현되는 화합물인 PEG-ss-COOH를 얻는다.

[0145] 다음으로 10 mL DMSO에 독소루비신 염산염 0.94 mmol을 넣어 용해시키고 TEA 2.8 mmol을 넣어 30 분 동안 혼합한 후 20 mL DMSO에 화학식 2로 표현되는 화합물인 PEG-ss-COOH 0.94 mmol과 EDC 0.94 mmol 및 NHS 1.12 mmol을 녹인 용액을 첨가하여 상온에서 24시간 반응시켰다.

[0146] 다음으로 화학적 결합이 되지 않은 독소루비신을 제거하기 위해 3차 증류수 하에서 투석막(Spectra/Por; MWCO: 1,000 Da)을 사용하여 분리 및 제거하였으며 마지막으로 동결 건조를 통해 화학식 3으로 표현되는 화합물인 고체 형태의 PEG-ss-DOX 프러드럭 고분자를 얻었다.

[0147] 본 발명에 따른 페길화(PEGylated)된 항암 프로드럭의 합성 모식도를 도 2에 나타내었다.

[0148] 합성된 페길화된 독소루비신에 대해 H^1-NMR과 적외석(IR) 분광법을 이용하여 분석하고, 그 측정 결과를 각각 도 9와 도 10에 나타내었다. 도 9 및 도 10을 보면, 항암제인 독소루비신에 폴리에틸렌글리콜이 펩티드 결합을 이루어 페길화된 것을 확인할 수 있었다.

[0150] **실시예 3. 페길화된 독소루비신 프러드럭 제조(3) - 활성산소종에 의해 분해가 가능한 PEG-TK-DOX**

[0151] 20 mL DCM에 mPEG 2 mmol을 용해시킨 다음, DCC 3.6 mmol과 DMAP 0.3 mmol을 혼합하여 충분히 용해 시킨 후, 화학식 4로 표현되는 화합물인 thioketal linker(TK) 3 mmol을 넣고 상온에서 24 시간 동안 반응시켰다.

[0152] 24시간 후 과량의 thioketal linker, DMAP, DCC와 부산물인 DCU 는 필터를 사용하여 제거하고, 물과 DCM 1:1 혼합용액에서 DCM 층을 추출하는 과정을 반복하여 화학식 5로 표현되는 화합물인 PEG-TK-COOH를 얻었다.

[0153] 다음으로 10 mL DMF에 독소루비신 염산염 0.9 mmol을 넣어 용해시키고 TEA 2.8 mmol을 넣어 30분 동안 혼합 후, 20 mL DMF에 화학식 5로 표현되는 화합물인 PEG-TK-COOH 0.9 mmol과 EDC 0.9 mmol 및 NHS 1.1 mmol을 녹인 용액을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 반응시켰다.

[0154] 다음으로 화학적 결합이 되지 않은 독소루비신을 제거하기 위해 3차 증류수 하에서 투석막(Spectra/Por; MWCO: 1,000 Da)을 사용하여 분리 및 제거하였으며 마지막으로 동결 건조를 통해 고체 형태의 활성산소종에 의해 분해가 가능한 화학식 6으로 표현되는 화합물인 PEG-TK-DOX 프러드럭 고분자를 얻었다.

[0155] 본 발명에 따른 페길화(PEGylated)된 항암 프로드럭의 합성 모식도를 도 3에 나타내었다.

[0156] 합성된 페길화된 독소루비신에 대해 H^1-NMR과 적외석(IR) 분광법을 이용하여 분석하고, 그 측정 결과를 각각 도 11과 도 12에 나타내었다. 도 11 및 도 12를 보면, 항암제인 독소루비신에 폴리에틸렌글리콜이 펩티드 결합을 이루어 페길화된 것을 확인할 수 있었다.

[0158] **실시예 4. 초상자성 나노입자인 SPION 및 Au/SPION의 합성**

[0159] (1) 수용액 내에서 표면전하가 양이온성을 띄는 SPION 제조

[0160] 450 mL 증류수를 반응 용기에 넣고, 80℃ 가 되도록 가열시킨 후, 먼저 25 mL 증류수에 녹아있는 0.235g의 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.18 mmol을 혼합하였다. 상기 온도에서 30분 동안 계속 유지시킨 후, $FeCl_2 \cdot 4\ H_2O$ 와 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 의 몰 비가 1:2 비율이 되도록 증류수 25 mL에 0.639g 의 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2.36 mmol가 녹아 있는 용액을 첨가하고 다시 상기 온도에서 30분 동안 유지하였다.

[0161] 다음으로 상기 혼합 용액에 2.6 mL의 NH_4OH(7 % (v/v))를 주사기를 사용하여 서서히 첨가하였다. 반응이 시작되면 처음 연한 갈색의 혼합용액이 점차 진한 갈색으로 바뀌다가 콜로이드가 형성되면서 침전물이 발생함을 확인하였다. 반응이 끝난 후 실온으로 냉각시켜 반응을 종결시키고, 수용액에서 재 분산시키기 위해 초음파 분쇄기(25kHz, 80W)로 분산시켰다. 분산되지 않고 응집된 SPION을 제거하기 위해, 원심 분리 (4,000 rpm, 30 분)하고 최종적으로 상층액의 안정하게 분산된 SPION을 회수하였다.

[0162] 본 발명에 따른 산화철 나노입자 (SPION)의 합성 모식도를 도 4에 나타내었다.

[0164] (2) 수용액 내에서 표면전하가 음이온성을 띄는 Au/SPION 제조

[0165] 상기 (1)에서 제조된 수용액 상에서 안정하게 분산되어 있는 50 mL의 산화철 나노입자(SPION)를 반응 용기에 넣고 80℃ 가 되도록 가열하였다. 그 다음 3 mL의 금염 $HAuCl_4$, 1mM을 첨가한 후 상기 온도에서 30 분간 다시 유지하였다. 상기 혼합액에 환원제로 3 mL의 구연산나트륨($Na_3C_6H_5O_7$, 1 w/w %)을 혼합하였다. 시간이 지남에 따라 SPION에 Au가 증착되면서 밝은 갈색을 띄게 되며, 반응과정에서 발생된 불안정한 응집물을 제거하기 위해 원심분리(4,000 rpm, 30 분)하고 최종적으로 상층액의 안정하게 분산된 Au/SPION를 회수하였다.

[0166] 본 발명에 따른 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자 (Au/SPION)의 합성 모식도를 도 5에 나타내었다.

[0168] 합성된 SPION 및 Au/SPION을 300 kV에서 작동하는 투과전자현미경(TEM, Tecnai G2 F30, FEI Company, USA)을 이용하여 그 형태를 측정하였으며, 에너지 분산 X-선 분광법을 이용하여 표면 원소 분석하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0170] **실시예 5. 외부 전자기장을 이용하여 암 정밀 진단/치료를 위한 SPION 또는 Au/SPION 이 담지된 자기조립형 나노 약물 전달체 제조**

[0171] 10 mL의 DMSO에 상기 실시예 1에서 제조된 100 mg의 PEG-DOX 고분자를 용해시키고, 상기 실시예 4에서 제조된 SPION 또는 Au/SPION을 PEG-DOX 고분자 대비 10~50 중량비에 해당하는 용액을 상온에서 3시간 동안 함께 혼합한다.

[0172] 그 다음 DMSO를 제거하기 위해 48시간 동안 3차 증류수 하에서 투석막 (Spectra/Por; MWCO: 1,000 Da)을 사용하여 분리 및 제거하였고, 응집된 SPION 또는 Au/SPION을 제거하기 위해 원심 분리(4,000 rpm, 30 분)하고 최종적으로 동결건조를 통해 고체상태의 SPION 또는 Au/SPION 이 담지된 자기조립형 나노 약물 전달체를 제조하였다. 이렇게 생성된 고분자는 하기 실험 목적에 따라 다양한 용매인 3차 증류수, PBS, $CDCl_3$ 또는 DMSO 등에 분산시켜 분석을 수행하였다.

[0174] **실시예 6. 나노 약물 전달체의 자기적 성질 분석 - 자력 곡선**

[0175] 제조된 나노 약물 전달체가 초상자성의 특징을 갖는지를 확인하기 위해서 외부자기장에 대한 나노 약물 전달체의 자기력을 초전도 양자 간섭계(Superconducting Quantum Interference Devices, SQUID) 및 자력계(MPMS5, Quantum Design)를 통해 측정하여 그 결과를 도 14에 나타내었다. 그 결과 본 발명에 따른 나노 약물 전달체는 초상자성의 특징을 갖는 자성 물질임을 확인할 수 있었다.

[0177] **실시예 7. 나노 약물 전달체의 물리화학적 특성**

[0178] 본 발명에 따른 나노 약물 전달체 내의 페길화된 독소루비신과 자성 나노입자 함량과 나노 약물 전달체 평균 입

자의 크기를 아래 표 1에 나타내었다. 또한 수용액 상에서 안정하게 분산되어 있는 자성 나노입자의 입자 분포도를 25℃에서 동적 광산란기기(dynamic light scattering, DLS) (Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments, Malvern, UK))를 사용하여 측정하고, 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[0179] 열중량분석기를 이용하여 샘플 번호 4번 및 8번의 나노 약물 전달체 내 포함된 자성 나노입자의 함량을 분석하여 도 16에 나타내었다.

표 1

[0180]

No.	Sample	DOX loading content (%)	SPION loading content (%)	Average diameter (nm) (mean ± S.D.)
1	Fe10	12.94	9.58	81.3 ± 5.41
2	Fe20	11.29	20.13	132.6 ± 4.73
3	Fe30	11.15	26.08	165.4 ± 17.2
4	Fe50	11	40	75.0 ±5.49
5	Au10	11.53	10.55	116.1 ± 10.5
6	Au20	10.67	17.11	113.6 ± 3.93
7	Au30	10.38	21.43	108.6 ± 3.15
8	Au50	8.98	45	118.8±3.45

[0181] (Fe10 내지 Fe50은 SPION을 포함하는 나노 약물 전달체, Au10 내지 Au50은 Au/SPION을 포함하는 나노 약물 전달체를 의미함)

[0183] **실시예 8. T_2-weight 음성 조영 영상을 분석**

[0184] Conventional T2-weighted gradient (GRE) sequence (repetition time msec/echo time msec: 400/10.4; flip angle: 30°)을 사용하는 4.7 T Bruker Biospin imager (Bruker Medical Systems, Karlsruhe, Germany)를 사용하여 본 발명에 따른 나노 약물 전달체의 MRI 검사를 수행하여 그 결과를 도 17 및 도 18에 나타내었다.

[0185] 도 17 및 도 18은 농도변화에 따른 자성 나노입자를 포함하는 나노 약물 전달체의 T_2-weight 음성 조영 영상을 분석한 결과이다. T_2-weight 음성 조영 영상은 조영제로 사용되는 산화철이 신호의 간섭을 일으키므로, 산화철의 농도가 진할수록 해당 부분의 이미지가 어둡게 나오는 특성을 갖는다.

[0186] 자성 입자로 초상자성 산화철 나노입자(SPION) 또는 금이 증착된 초상자성 산화철 나노입자(Au/SPION)를 사용한 경우, 나노 약물 전달체 내의 함량이 증가할수록 T_2-weight 음성 조영 영상이 어둡게 나오는 것을 확인하여 본 발명에 따른 나노 약물 전달체가 해당 질병의 진단 및 치료에 적합하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0188] **실시예 9. NIH3T3 정상 세포 및 HepG-2 Cancer 세포에서의 세포 독성 평가 - 세포 생존율 분석(MTT assay 및 IC_{50} 측정)**

[0189] 제조된 나노 약물 전달체가 세포에 미치는 독성을 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 분석 방법을 이용하여 평가하였다. 이 방법은 살아있는 세포의 미토콘드리아의 숙시닐디하이드로게나아제(succinyl dehydrogenase)라는 효소에 의해 테트라졸(tetrazole)이 가수분해되면 비수용성 보라색의 산물인 formazan이 형성되는 원리이다. 즉, 살아있는 세포가 많을수록 대사산물인 테트라졸의 양이 많아진다. 이때, 테트라졸은 비수용성이므로 DMSO로 수용화시켜 흡광도를 측정한다.

[0190] NIH3T3 정상 세포를 96-웰 플레이트에서 농도 1 x 10^4 cells/웰로 24 시간 동안 배양하였다. 나노 약물 전달체로 SIPON과 Au/SPION이 각각 포함된 나노 약물 전달체(0.2 ㎍/㎕)를 Free DOX, PEG, PEG-DOX, 나노 약물 전달체 각각과 사용 전 30분 동안 착물을 형성시켰다. 형성된 착물을 100 ㎕의 혈청 없는 배양액(serum-free medium)과 함께 NIH3T3 세포에 처리하고 4 시간 후 배양액을 200 ㎕ 의 10% 혈청이 포함된 배양액으로 교체하여 20 시간 동안 세포를 배양하였다. 그 후 MTT 용액(20 ㎕, 5 mg/mL)을 투입하고, 세포를 4 시간 동안 더 배양하고 매질을 제거한 후, 150 ㎕ DMSO를 각 웰에 투입하여, 세포와의 반응을 통해 형성된 보라색 formazan 결정을 용해시켰다. 각 웰에서 100 ㎕를 분취하여 준비해 둔 96-웰 플레이트로 옮겼다. 570 nm 에서 마이크로플레이트 스펙트로플로로미터(microplate spectrofluorometer; VICTOR 3 V Multilabel Counter, Perkin Elmer Wellesley, MA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 NIH3T3 세포에 대한 활성을 100%

로 하여 상대적인 생존율을 평가하였다.

[0191] 위와 같은 방법으로 HepG-2 Cancer 세포에 나노 약물 전달체가 미치는 독성을 평가하여 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0192] 도 19를 보면 자성 나노입자를 포함하는 나노 약물 전달체는 세포독성을 거의 나타내지 않아 생체내 안정한 물질임을 확인하였다. 또한 페길화된 독소루비신의 경우 단독의 독소루비신과 달리 10㎍/㎖ 농도 이하에서는 세포독성이 크게 감소하여 약물의 체내 부작용을 줄일 수 있는 것을 확인하였다.

[0193] 또한 물질에 따른 초기 배양된 세포 수의 50%가 감소되는 농도인 IC_{50}(Half maximal inhibitory concentration)을 측정하여 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0194]

Cell type	Samples	IC_{50} (㎍/mL)
NIH3T3 normal cells	Free DOX	0.12
	PEG	N.D.
	PEG-DOX	9.65
	SPION-loaded NPs	N.D.
	Au/SPION-loaded NPs	N.D.
HepG2 cancer cells	Free DOX	0.45
	PEG	N.D.
	PEG-DOX	3.72
	SPION-loaded NPs	N.D.
	Au/SPION-loaded NPs	N.D.

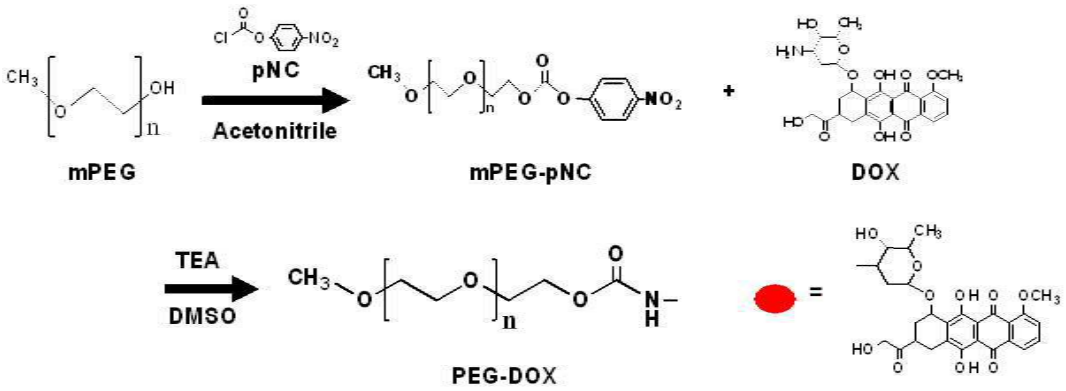
[0195] 표 2를 보면, 프로드럭인 페길화된 독소루비신의 HepG2 암세포의 치료 효과가 감소하지 않음을 알 수 있었다.

[0197] **실시예 10. 나노 약물 전달체의 세포내 유입 거동**

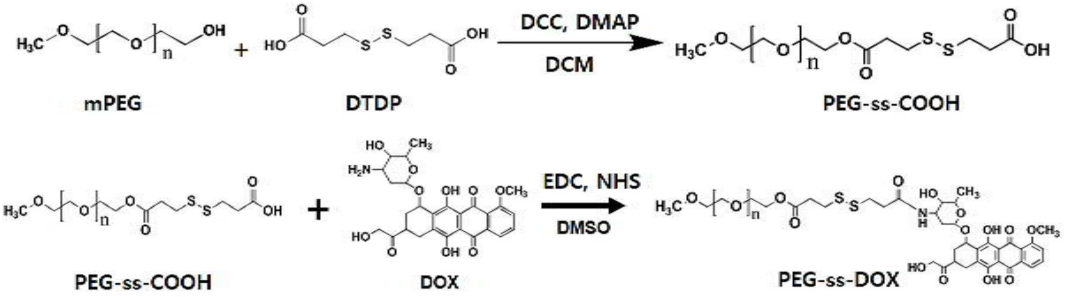
[0198] HepG2 암세포에 Free DOX, PEG-DOX, SIPON 또는 Au/SPION이 포함된 나노 약물 전달체 각각을 처리하여 시간별로 세포내 물질의 유입거동을 관찰하여 그 결과를 도 20에 나타내었다. 도 20을 보면, 항암제인 독소루비신이 세포 내 핵에서 발현되는 것을 확인하여 본 발명에 따른 약물 전달이 잘 이루어진 것을 알 수 있었다.

도면

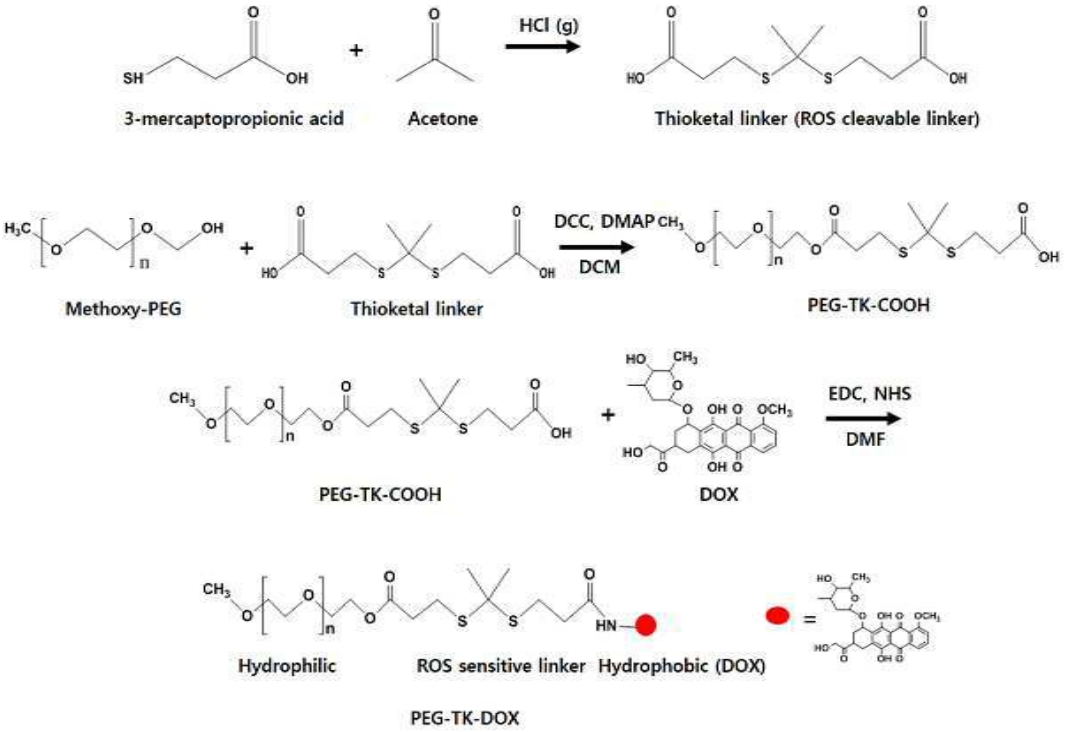
도면1



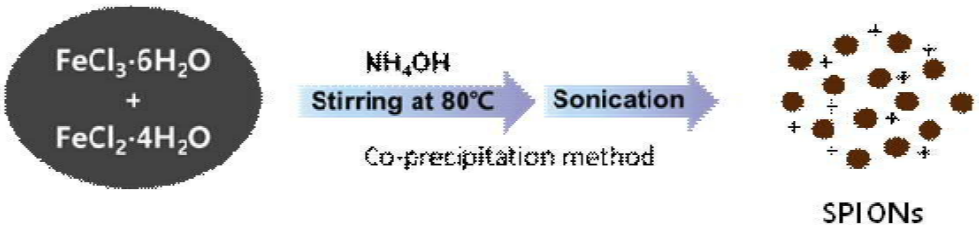
도면2


DCC, DMAP
DCM
mPEG
DTDP
PEG-ss-COOH
EDC, NHS
DMSO
PEG-ss-COOH
DOX
PEG-ss-DOX

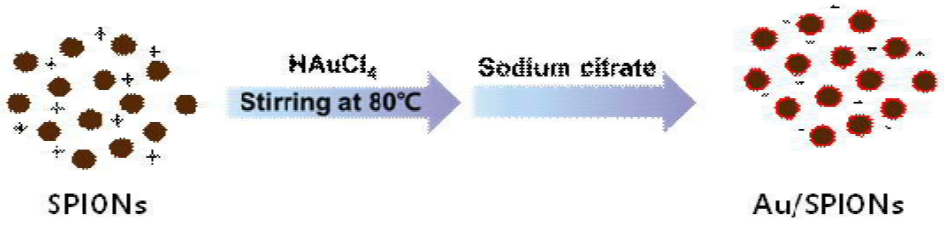
도면3


HCl (g)
3-mercaptopropionic acid
Acetone
Thioketal linker (ROS cleavable linker)
DCC, DMAP
DCM
Methoxy-PEG
Thioketal linker
PEG-TK-COOH
EDC, NHS
DMF
PEG-TK-COOH
DOX
Hydrophilic
ROS sensitive linker
Hydrophobic (DOX)
PEG-TK-DOX

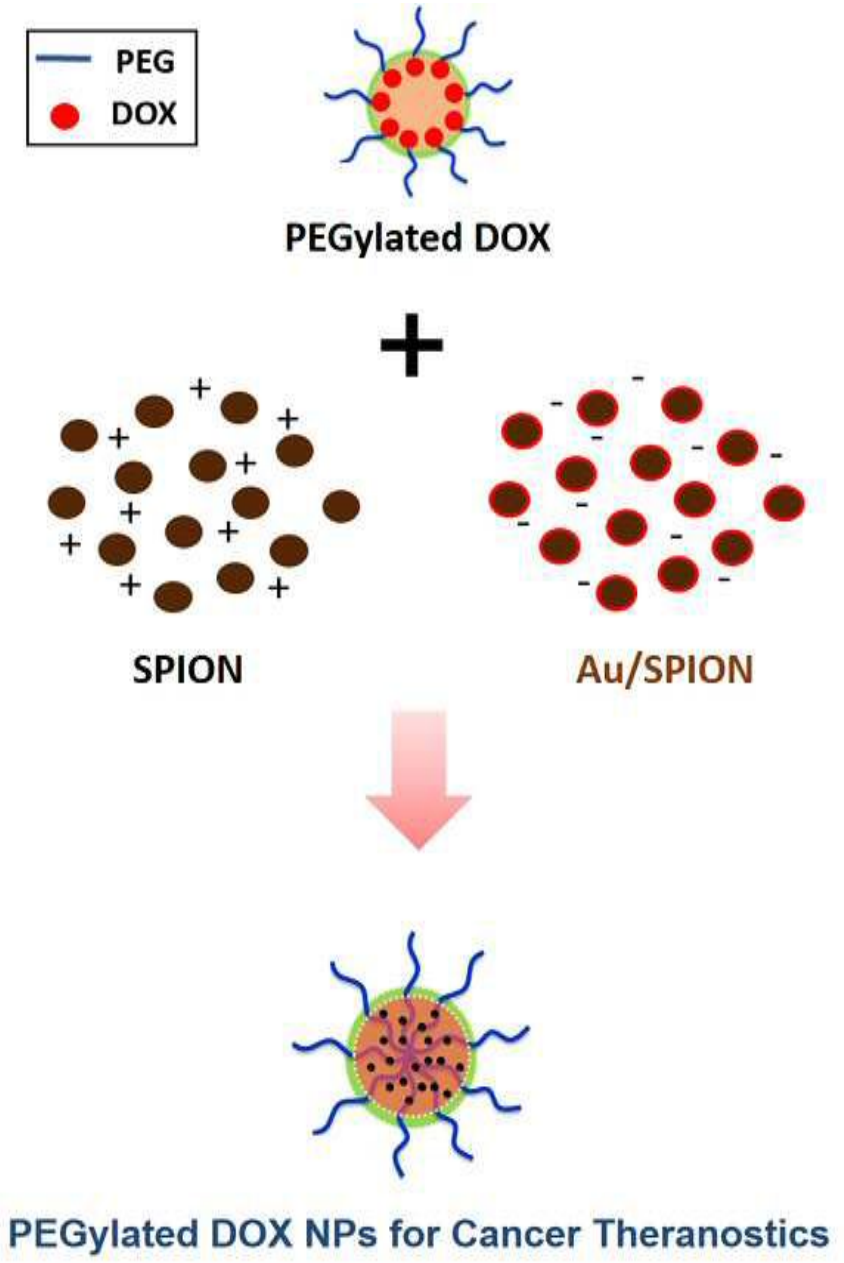
도면4


FeCl3·6H2O
+
FeCl2·4H2O
NH4OH
Stirring at 80°C
Sonication
Co-precipitation method
SPIONs

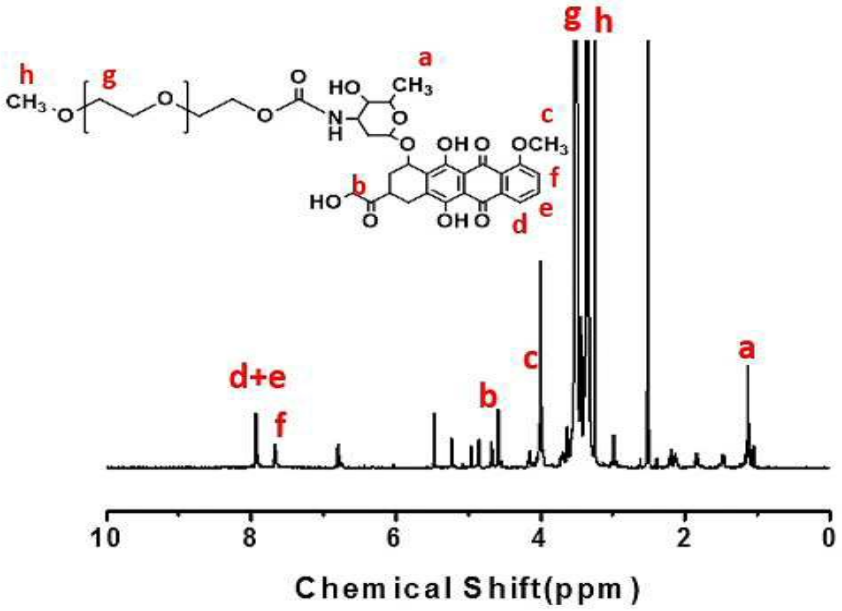
도면5


HAuCl4
Stirring at 80°C
Sodium citrate
SPIONs
Au/SPIONs

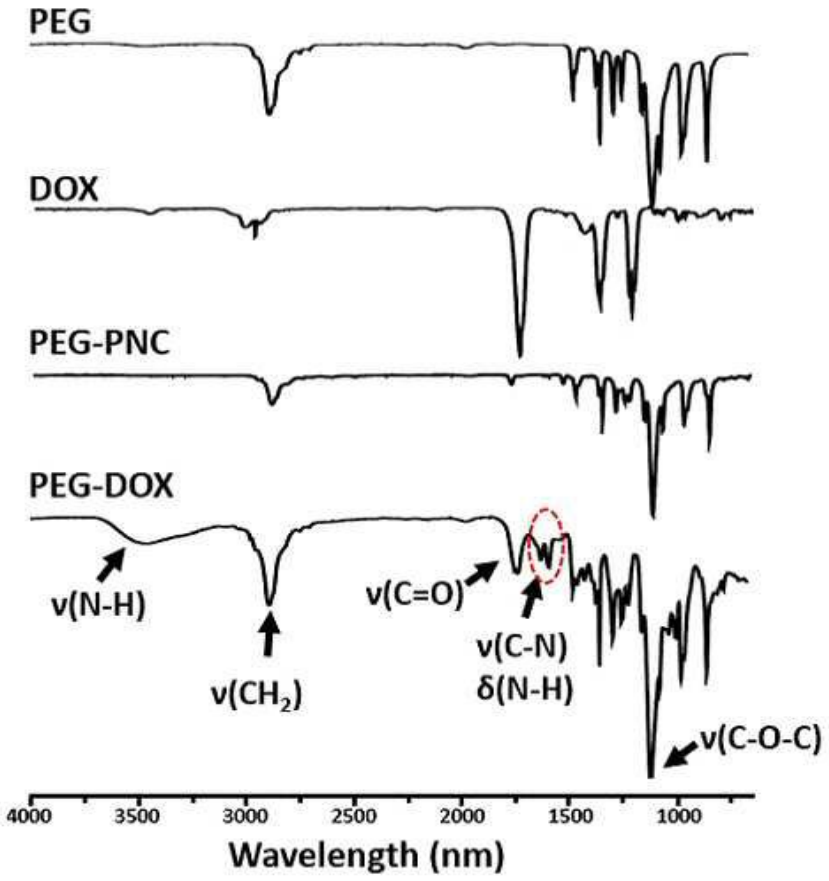
도면6


PEG
DOX
PEGylated DOX
SPION
Au/SPION
PEGylated DOX NPs for Cancer Theranostics

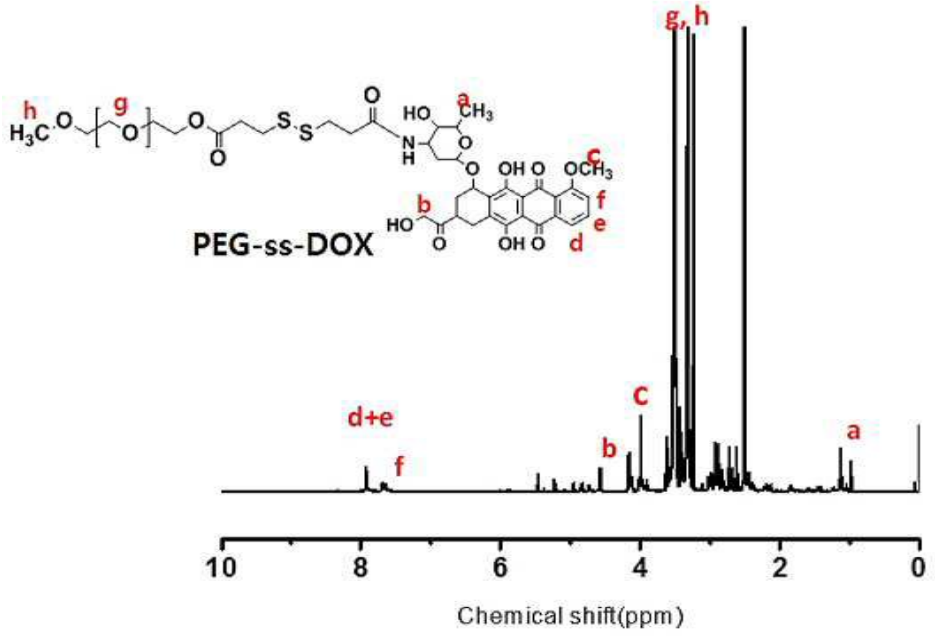
도면7


g h
a
h
g
c
b
f
e
d
d+e
f
b
c
a
10
8
6
4
2
0
Chemical Shift(ppm)

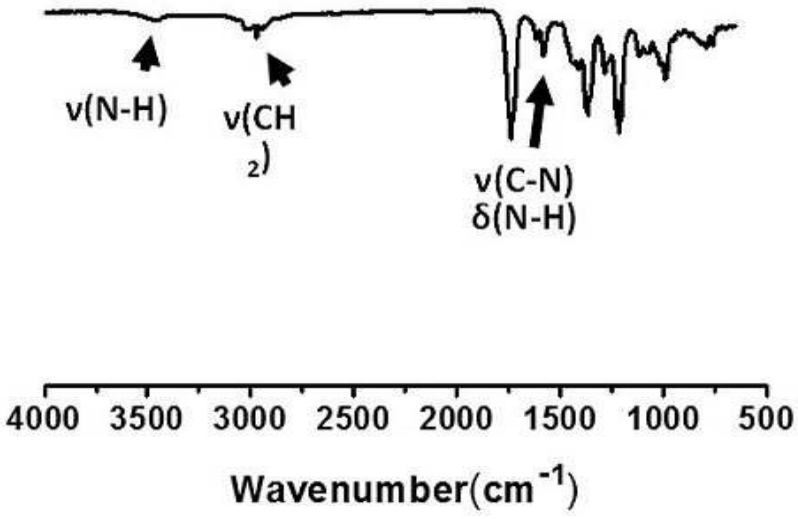
도면8


PEG
DOX
PEG-PNC
PEG-DOX
ν(N-H)
ν(CH2)
ν(C=O)
ν(C-N)
δ(N-H)
ν(C-O-C)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wavelength (nm)

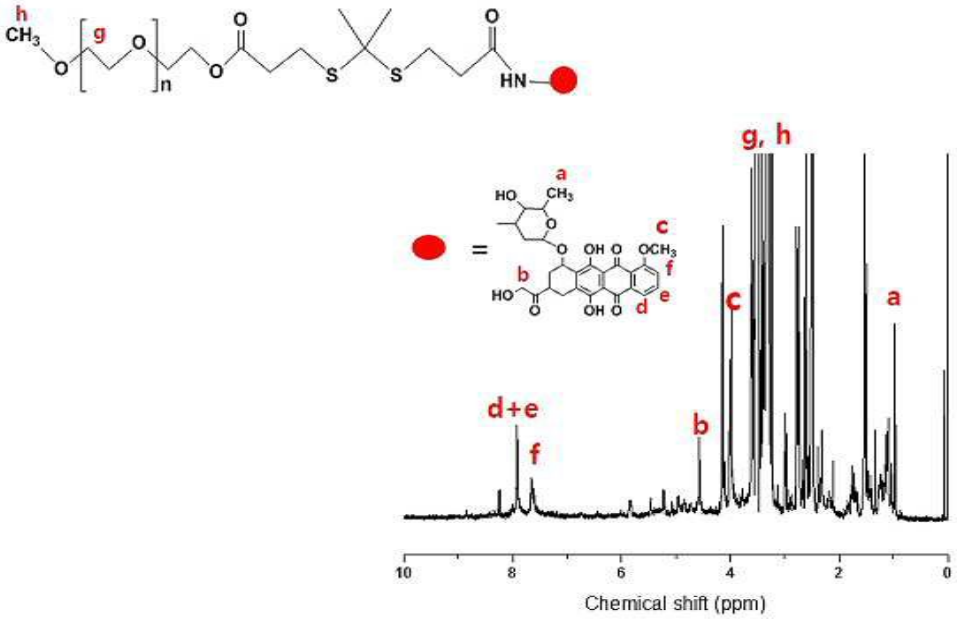
도면9


PEG-ss-DOX
g, h
a
c
b
d+e
f
10
8
6
4
2
0
Chemical shift(ppm)

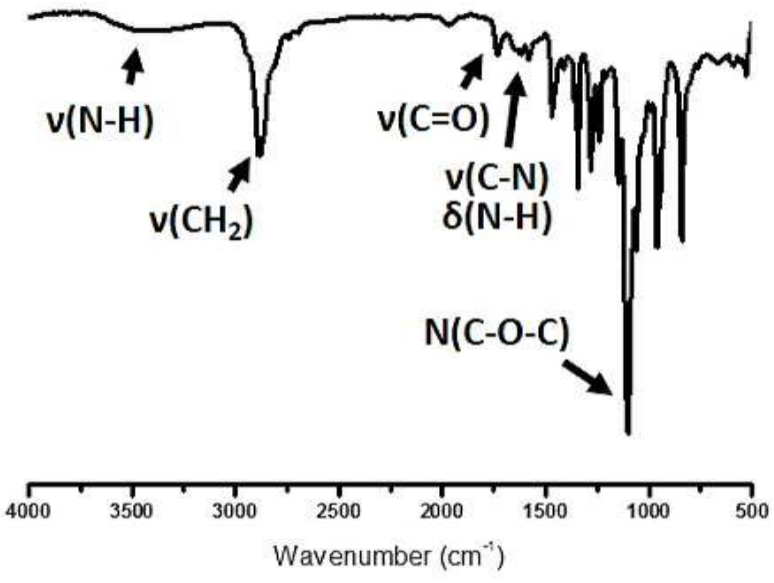
도면10


ν(N-H)
ν(CH2)
ν(C-N)
δ(N-H)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber(cm-1)

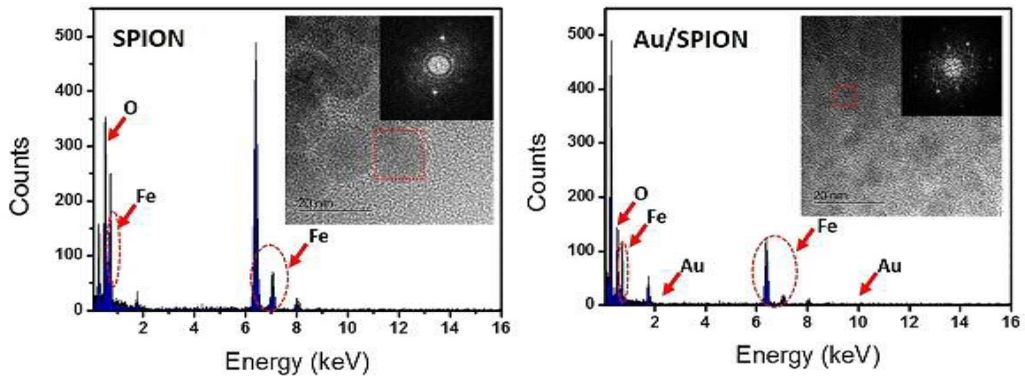
도면11


h
CH3
g
O
n
O
O
S
S
O
HN
a
HO
CH3
c
OH O
OCH3
f
b
HO
e
d
OH O
g, h
c
a
d+e
f
b
10
8
6
4
2
0
Chemical shift (ppm)

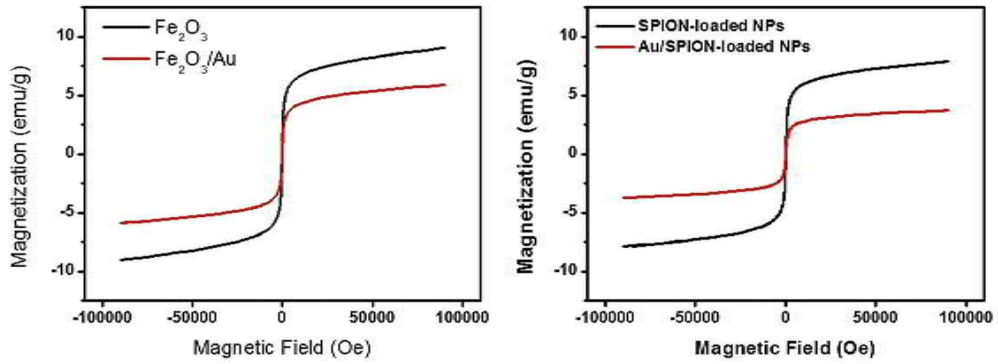
도면12


ν(N-H)
ν(CH2)
ν(C=O)
ν(C-N)
δ(N-H)
N(C-O-C)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber (cm-1)

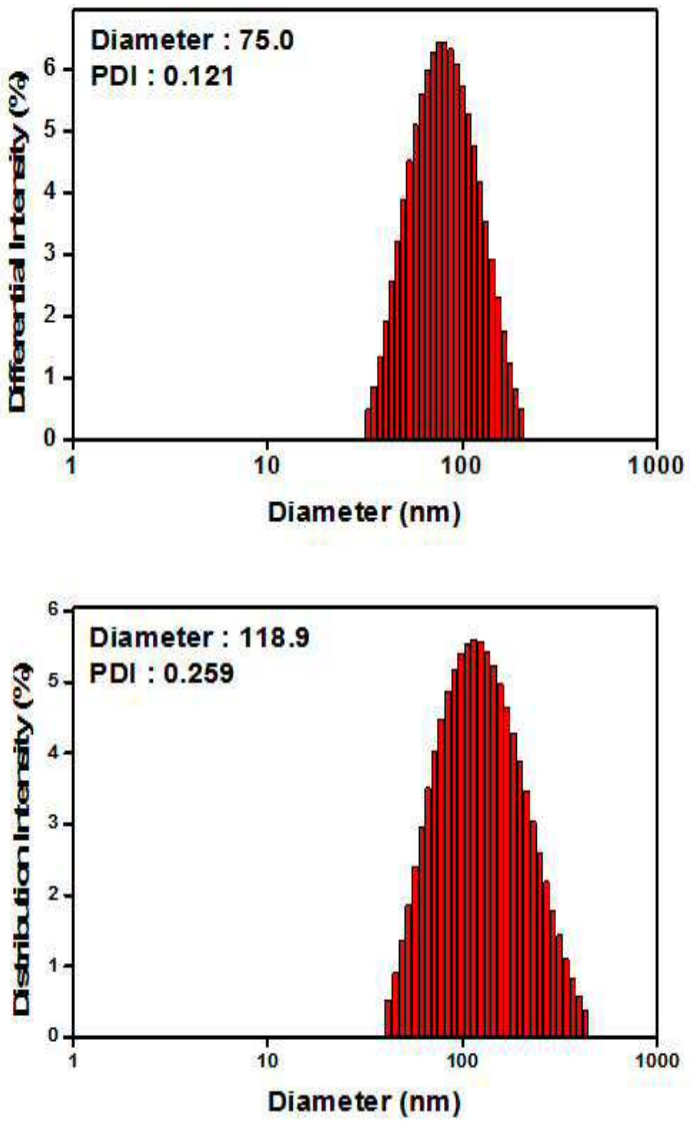
도면13


SPION
O
Fe
Fe
Counts
Energy (keV)
Au/SPION
O
Fe
Fe
Au
Au
Counts
Energy (keV)

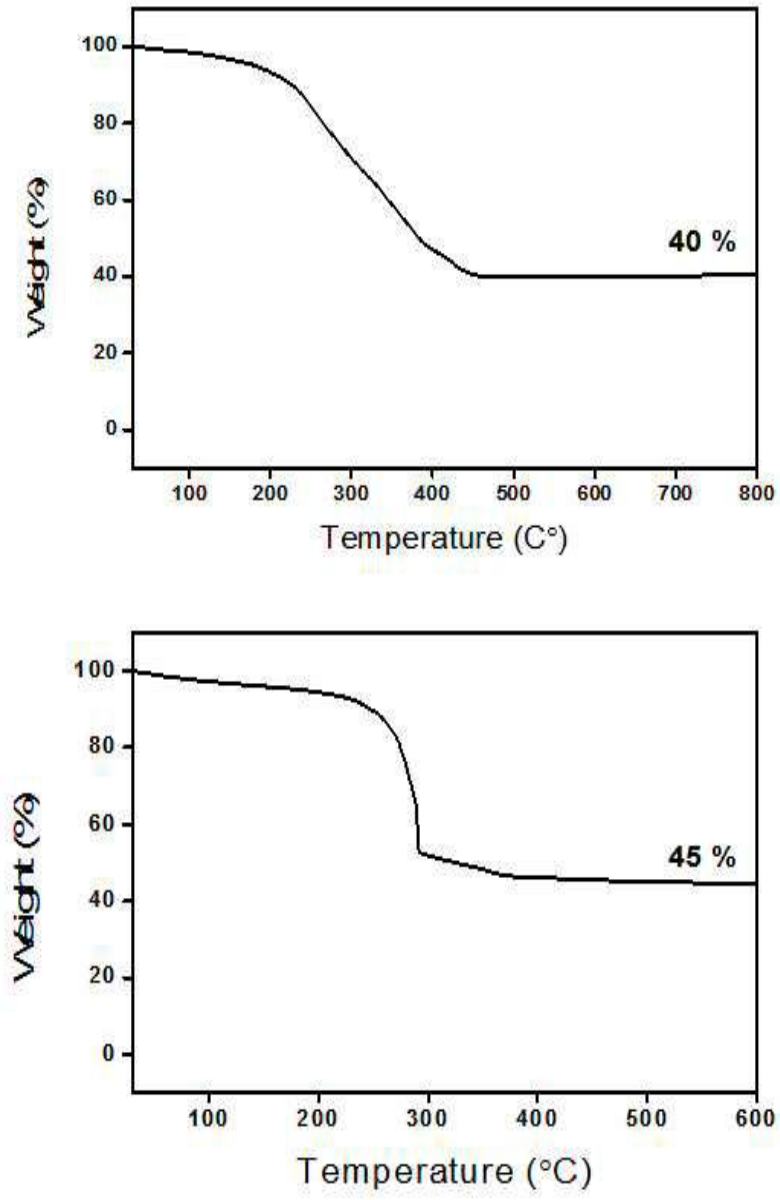
도면14


Fe2O3
Fe2O3/Au
Magnetization (emu/g)
Magnetic Field (Oe)
SPION-loaded NPs
Au/SPION-loaded NPs
Magnetization (emu/g)
Magnetic Field (Oe)

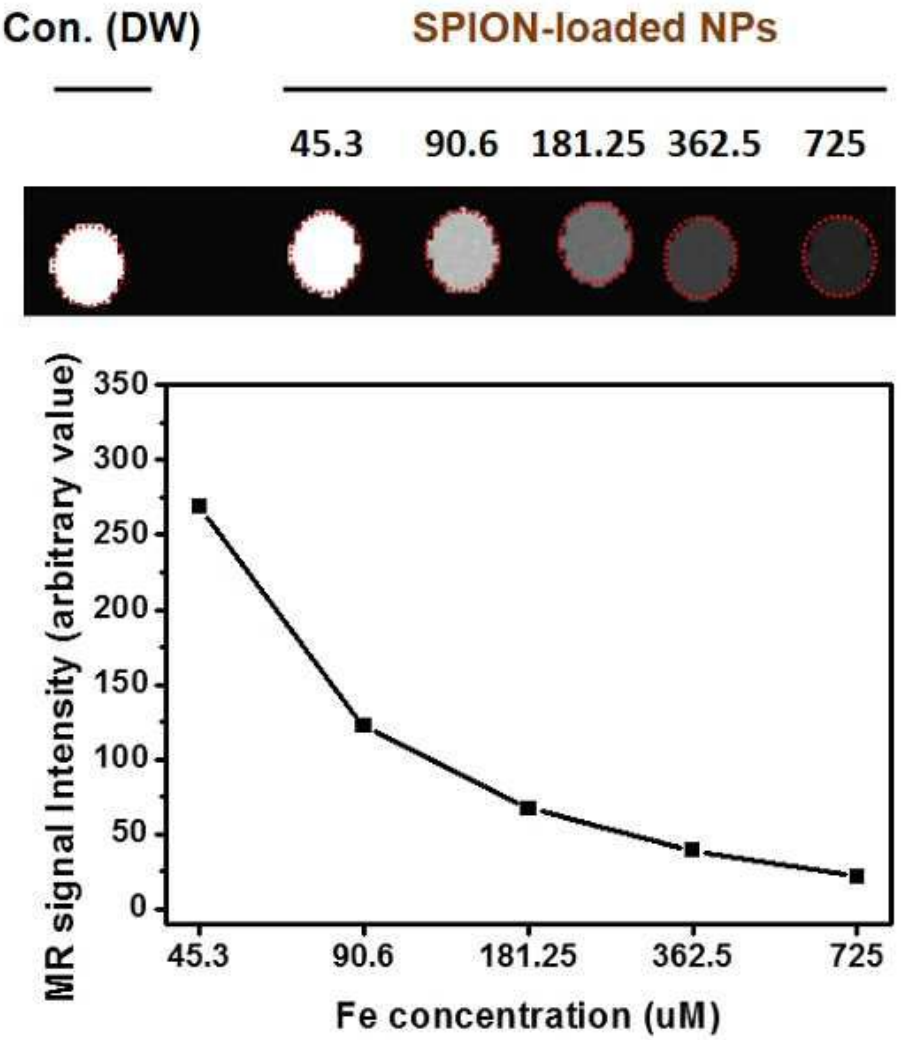
도면15


Diameter : 75.0
PDI : 0.121
Differential Intensity (%)
Diameter (nm)
Diameter : 118.9
PDI : 0.259
Distribution Intensity (%)
Diameter (nm)

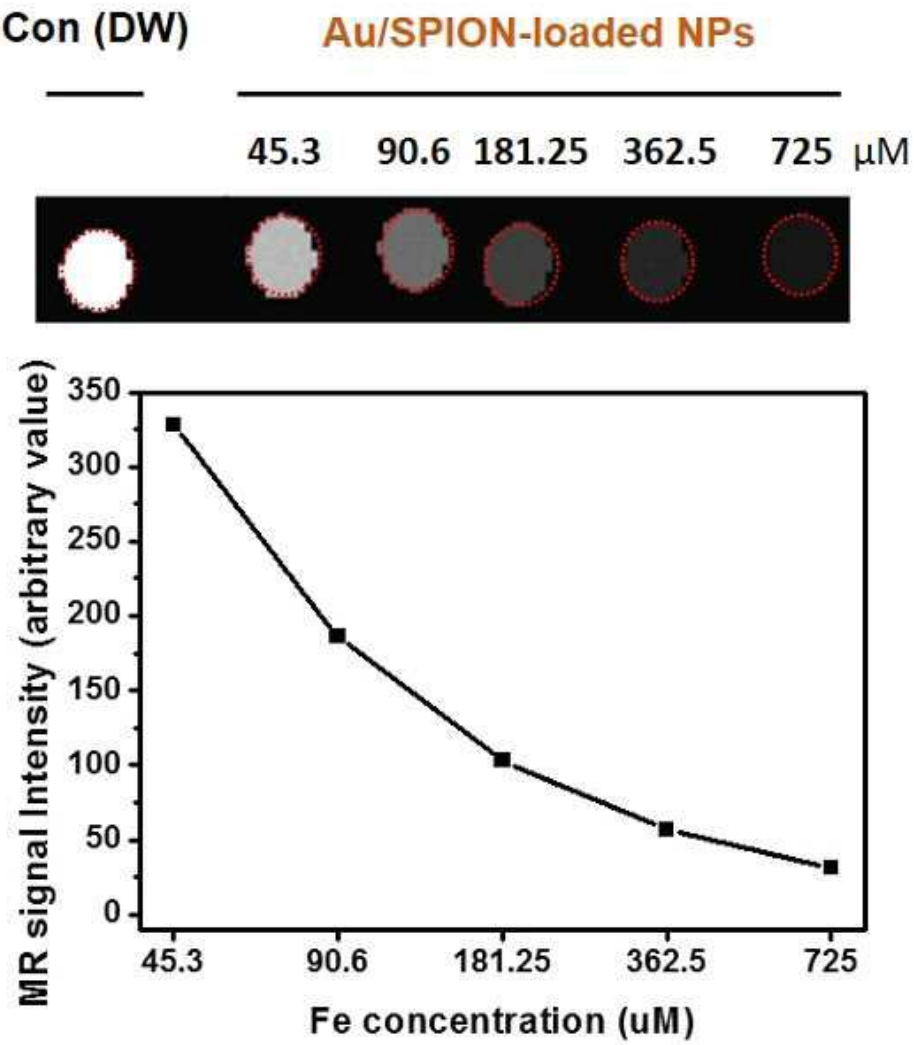
도면16


Weight (%)
100
80
60
40
20
0
40 %
100
200
300
400
500
600
700
800
Temperature (C°)
Weight (%)
100
80
60
40
20
0
45 %
100
200
300
400
500
600
Temperature (°C)

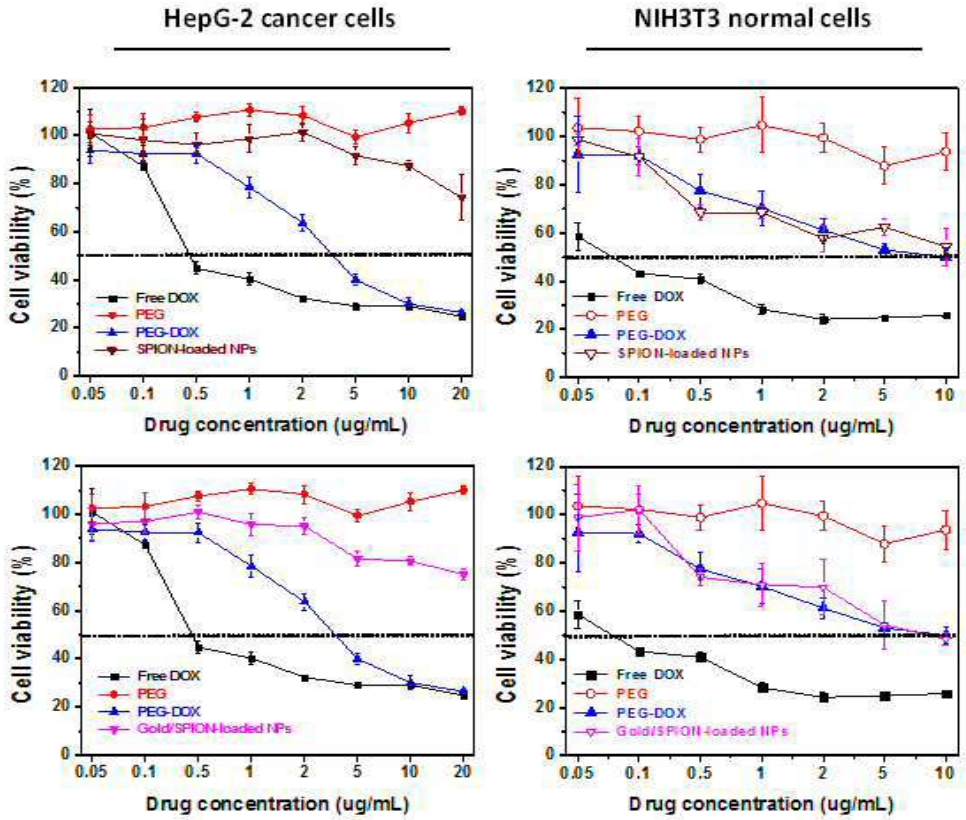
도면17


Con. (DW)
SPION-loaded NPs
45.3
90.6
181.25
362.5
725
MR signal Intensity (arbitrary value)
350
300
250
200
150
100
50
0
45.3
90.6
181.25
362.5
725
Fe concentration (uM)

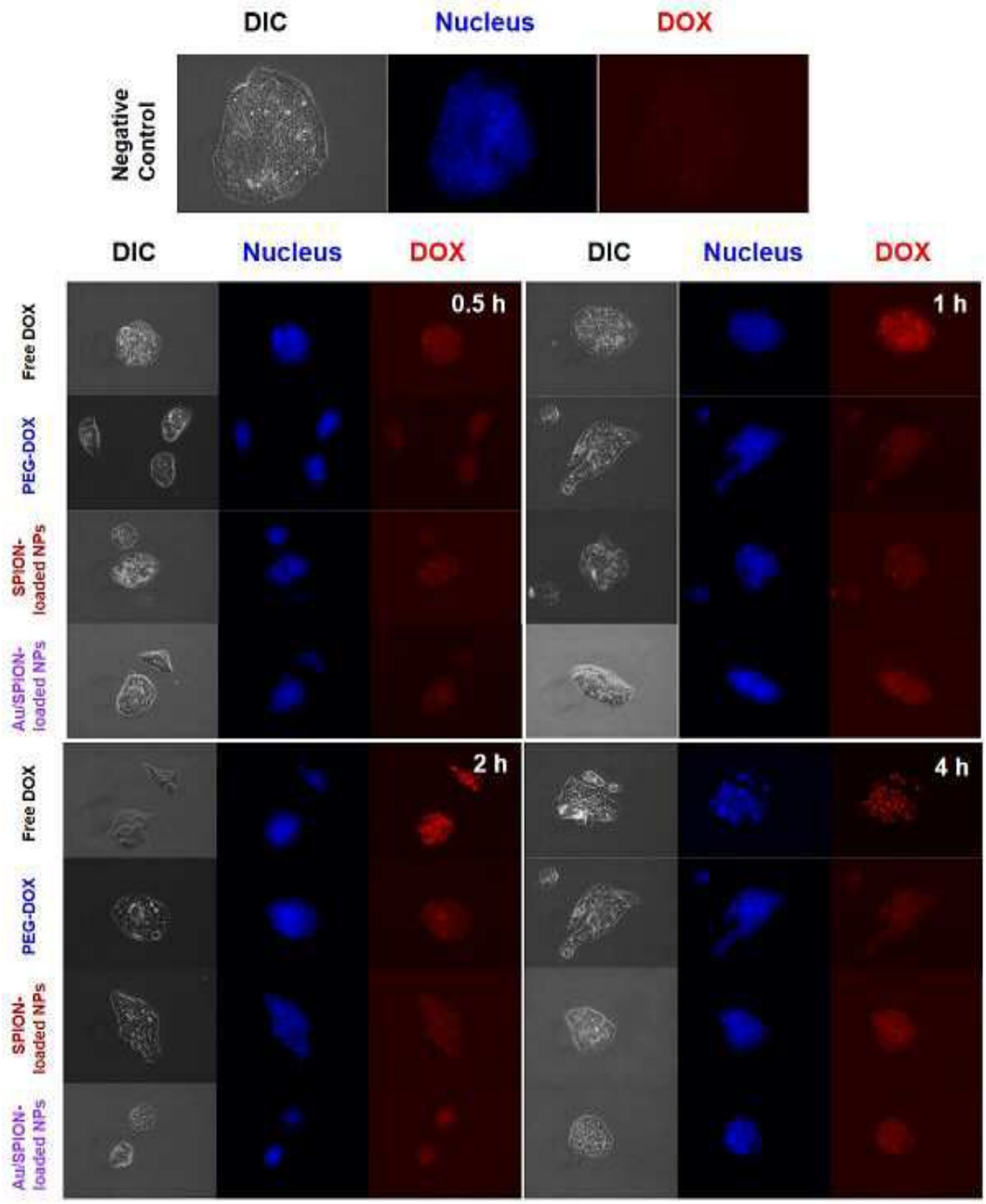
도면18


Con (DW)
Au/SPION-loaded NPs
45.3
90.6
181.25
362.5
725 μM
MR signal Intensity (arbitrary value)
350
300
250
200
150
100
50
0
45.3
90.6
181.25
362.5
725
Fe concentration (uM)

도면19


HepG-2 cancer cells
NIH3T3 normal cells
Cell viability (%)
Drug concentration (ug/mL)
Free DOX
PEG
PEG-DOX
SPION-loaded NPs
Gold/SPION-loaded NPs

도면20


DIC
Nucleus
DOX
Negative Control
DIC
Nucleus
DOX
DIC
Nucleus
DOX
Free DOX
PEG-DOX
SPION-loaded NPs
Au/SPION-loaded NPs
0.5 h
1 h
Free DOX
PEG-DOX
SPION-loaded NPs
Au/SPION-loaded NPs
2 h
4 h