



등록특허 10-2671525



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월31일

(11) 등록번호 10-2671525

(24) 등록일자 2024년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/107 (2006.01) A61K 41/00 (2020.01)

A61K 47/12 (2006.01) A61K 47/20 (2017.01)

A61K 47/34 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1075 (2013.01)

A61K 41/0052 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0018610

(22) 출원일자 2022년02월14일

심사청구일자 2022년02월14일

(65) 공개번호 10-2023-0122224

(43) 공개일자 2023년08월22일

(56) 선행기술조사문헌

The Polymer Society of Korea 추계학술대회 연구
논문 초록집, 44(2), 1PS-76, 2019.10.09.*

KR1020190029813 A

KR1020100038384 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

김진철

강원도 춘천시 퇴계로 220-20, 302동 1301호(석사
동, 현대아파트)

김태훈

강원도 정선군 북평면 문화마을길 35-5

박수찬

강원도 춘천시 동면 후석로326번길 96, 109-702

(74) 대리인

김정현

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 한정희

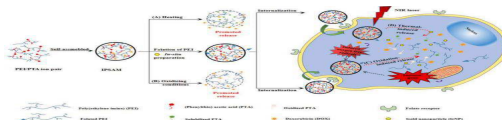
(54) 발명의 명칭 극성 양이온성 고분자, 비극성 음이온성 화합물 및 금나노입자를 포함하는 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체 및 이를 포함하는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 극성 양이온성 고분자와 소수성 잔기를 가지는 비극성 음이온성 화합물이 이온쌍을 이루어 양친매성을 가지므로 자가 조립체를 형성하는 특징이 있으며 수용액에 분산되면 음이온성 화합물의 소수성 잔기가 코어를 형성하고 양이온성 고분자의 사슬이 셸을 형성하는 미셀(micelle) 입자로 제조되어 유효성분을 탑재할 수 있는 유효성분 전달체로 사용 가능한 특징이 있다.

본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 주변 온도가 상승하거나 산화되면 복합체의 용해도가 증가하여 탑재물이 방출되는 장점이 있으며 암세포에 특이적인 리간드를 포함하여 암세포 특이적 엔도사이토시스 수행된 후 세포 내부에서 탑재물을 방출하게 되므로 급성 독성을 일으키지 않으면서도 우수한 항암 효과를 보이는 장점이 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/12 (2013.01)

A61K 47/20 (2013.01)

A61K 47/34 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345345126
과제번호	2018R1D1A1B07043439
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기본연구지원사업
연구과제명	임계용액온도 가변 고분자 기반 산화유도 팽윤성 및 붕해성 나노겔과 이를 이용한
항암제 전달 시스템 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345331632
과제번호	2018R1A6A1A03025582
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인연구역량강화사업
연구과제명	강원지역 산림바이오매스 유래 “나노셀룰로오스 융복합 응용연구 허브” 구축
기 여 율	1/2
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.02.28

공지예외적용 : 있음

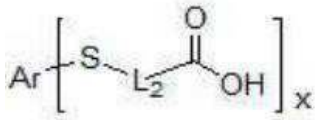
명세서

청구범위

청구항 1

반복단위에 아미노기(amino group)를 포함하는 극성 양이온성 고분자 및 하기 화학식 1:

[화학식 1]



(상기 화학식에서 1에서, Ar은 C6-C20아릴, L2는 C1-C5알킬렌이며, x는 1 내지 3의 정수이다.):

로 표시되는 비극성 음이온성 화합물; 및 금나노입자(gold nano particle)를 포함하는 온도 및 산화 응답성 이온 복합체이며,

상기 극성 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민(polyethylene imine)이며 상기 비극성 음이온성 화합물은 페닐티오아세트산(phenylthioacetic acid)인 것을 특징으로 하는 온도 및 산화 응답성 이온 복합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 극성 양이온성 고분자의 아미노기와 비극성 음이온성 화합물의 카르복실기의 몰비율이 2:8 내지 5:5인 것을 특징으로 하는 온도 및 산화 응답성 이온 복합체.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 이온 복합체는 엽산화(folated) 된 것을 특징으로 하는 포함하는 것을 특징으로 하는 온도 및 산화 응답성 이온 복합체.

청구항 6

제 1 항, 제 3항, 및 제 5 항 중 어느 한 항의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체 및 유효성분을 포함하는 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체.

청구항 7

제 6 항의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 극성 양이온성 고분자, 비극성 음이온성 화합물 및 금나노입자를 포함하는 온도 및 산화 응답성 유효 성분 전달체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 양친매성 분자가 수용액에 분산되면 열역학 제2법칙(엔트로피 구동 과정)에 따라 자발적으로 자가 조립이 형성된다. 상기 자가 조립 구조는 구성 요소인 양친매성 분자의 모양에 의해 결정된다. 양친매성 분자의 모양은 패킹 매개변수(P)는 $P=V/LA$ (여기서 V: 양친매성 분자의 소수성 꼬리의 부피, L: 소수성 꼬리의 길이, A: 친수성 헤드의 단면적)로 정의된다. 예를 들어, 상기 P값이 1에 가까우면 이중층 소포(bilayer vesicle)로 형성되고, 상기 P값이 1보다 크면 육각형상(hexagonal phase)으로 형성되고, 상기 P값이 1보다 작으면 미셀(micelle)이 형성된다.

[0004] 상기 자가 조립은 구조 내에 친수성 약물 또는 소수성 약물을 수용할 수 있기 때문에 약물 전달체로서 사용가능하다. 약물 전달체는 생체 적합성, 은폐 기능, 표적화 특성, 효율적인 조직 침투, 높은 약물 보호 능력 및 적시 방출 특성이 필요하다. 약물 운반체는 부작용 없이 약물을 표적 부위에 도달하여 전달하여야 하며 적시에 방출되어야 한다. 약물운반체의 표적 부위 특이성 및 특이적 방출 특성을 획득하는 방법으로는 약물 전달 운반체에 자극 반응성을 부여하는 방법이 있다. 약물방출을 유발하는 자극으로는 온도, pH, 전기장, 자기장, 빛, 이온, 효소, 산화, 환원 등이 사용될 수 있다.

[0005] 다중 자극 반응성 약물 전달 운반체는 하나 이상의 자극에 반응하는 특성이 있는 약물 전달 운반체를 의미한다. 최근 연구에 따르면 약물전달체로서 온도와 산화에 반응하여 내용물을 방출할 수 있는 약물운반체가 개발되고 있다.

[0006] 예를 들어, 항암제인 독소루비신(doxorubicin, DOX)은 약물운반체의 산화 조건 및 고온 조건에서 방출이 촉진되는 것이 확인되었으며; 폴리하이드록시에틸 아크릴레이트-co-페닐 비닐 설파이드(polyhydroxyethyl acrylate-co-phenyl vinyl sulfide, P(HEA-co-PVS))는 이중 반응성 미셀의 제조를 위한 온도 및 산화 반응성 양친매성 공중합체로 개발된 바 있다. 또한 페닐 비닐 설파이드(phenyl vinyl sulfide, PVS)의 산화는 공중합체의 낮은 임계 용액 온도의 증가와 양친매성 특성의 손실을 유도하여 탈미셀화(de-micellization)를 초래하므로 산화유도 방출을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이중 반응성 고분자 미셀의 제조는 미셀의 구성 성분인 공중합체가 복잡한 과정을 거쳐 합성 및 정제되기 때문에 기술적으로 어려움이 있는 실정이다.

[0007] 본 명세서에서 언급된 특허문헌 및 참고문헌은 각각의 문헌이 참조에 의해 개별적이고 명확하게 특정된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조로 삽입된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham, Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 (72) (1976) 1525.
- (비특허문헌 0002) M. Eigen, Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules, Naturwissenschaften. 58 (1971) 465-523.
- (비특허문헌 0003) J. Rodriguezhernandez, F. Checot, Y. Gnanou, S. Lecommandoux, Toward 'smart' nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution, Prog. Polym. Sci. 30 (2005) 691-724.
- (비특허문헌 0004) S. Ji, J. Ding, Spontaneous formation of vesicles from mixed Amphiphiles with dispersed molecular weight: Monte Carlo simulation, Langmuir. 22 (2006) 553-559.
- (비특허문헌 0005) V.S. Kadam, M.V. Badiger, P.P. Wadgaonkar, G. Ducouret, D. Hourdet, Synthesis and self-assembling properties of α , ω -hydroxy-poly(ethylene oxide) end-capped with 1-isocyanato-3-pentadecylcyclohexane, Polymer (Guildf) 49 (2008) 4635-4646.
- (비특허문헌 0006) R.A. Khalil, A.A. Zarari, Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates, Appl. Surf. Sci. 318 (2014) 85-89.

- (비특허문헌 0007) Y. Yan, W. Xiong, X. Li, T. Lu, J. Huang, Z. Li, H. Fu, Molecular packing parameter in Bolaamphiphile solutions: Adjustment of aggregate morphology by modifying the solution conditions, *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 2225-2230.
- (비특허문헌 0008) G.K. Bourov, A. Bhattacharya, Effect of packing parameter on phase diagram of amphiphiles: An off-lattice Gibbs ensemble approach, *J. Chem. Phys.* 127 (2007), 244905.
- (비특허문헌 0009) U. Retter, M. Tchachnikova, A. Avranas, On Packing Constraints in the Formation of Surface Micelles of Amphiphiles at the Metal/Electrolyte Interface-The Necessity of Introducing a Generalized Packing Parameter, *J. Colloid Interface Sci.* 251 (2002) 94-100.
- (비특허문헌 0010) W. Kunz, F. Testard, T. Zemb, Correspondence between curvature, packing parameter, and Hydrophilic- Lipophilic deviation scales around the phaseinversion temperature, *Langmuir* 25 (2009) 112-115.
- (비특허문헌 0011) M. Salim, H. Minamikawa, A. Sugimura, R. Hashim, Amphiphilic designer nanocarriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics, *Med. Chem. Commun.* 5 (2014) 1602-1618.
- (비특허문헌 0012) E. Kokkoli, A. Mardilovich, A. Wedekind, E.L. Rexeisen, A. Garg, J.A. Craig, Selfassembly and applications of biomimetic and bioactive peptide-amphiphiles, *Soft Matter.* 2 (2006) 1015.
- (비특허문헌 0013) Y. Zhu, X. Wang, J. Zhang, F. Meng, C. Deng, R. Cheng, J. Feijen, Z. Zhong, Exogenous vitamin C boosts the antitumor efficacy of paclitaxel containing reduction-sensitive shell-sheddable micelles in vivo, *J. Control. Release.* 250 (2017) 9-19.
- (비특허문헌 0014) J.A. Kim, D.Y. Yoon, J.-C. Kim, Oxidation-Triggerable Liposome Incorporating Poly(Hydroxyethyl Acrylate-co-Allyl methyl sulfide) as an Anticancer Carrier of Doxorubicin, *Cancers (Basel)* 12 (2020) 180.
- (비특허문헌 0015) C.L. Hedegaard, A. Mata, Integrating self-assembly and biofabrication for the development of structures with enhanced complexity and hierarchical control, *Biofabrication* 12 (2020), 032002.
- (비특허문헌 0016) X. Yang, J.J. Grailer, S. Pilla, D.A. Steeber, S. Gong, X. Shuai, Multifunctional polymeric vesicles for targeted drug delivery and imaging, *Biofabrication* 2 (2010), 025004.
- (비특허문헌 0017) R. Tong, H.D. Hemmati, R. Langer, D.S. Kohane, Photoswitchable nanoparticles for triggered tissue penetration and drug delivery, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 8848-8855.
- (비특허문헌 0018) A.A. Manzoor, L.H. Lindner, C.D. Landon, J.-Y. Park, A.J. Simnick, M.R. Dreher, S. Das, G. Hanna, W. Park, A. Chilkoti, G.A. Koning, T.L.M. ten Hagen, D. Needham, M.W. Dewhirst, Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: Triggered, intravascular release to improve drug Penetration into tumors, *Cancer Res.* 72 (2012) 5566-5575.
- (비특허문헌 0019) M. Rahimi, V. Shafiei-Irannejad, K.D. Safa, R. Salehi, Multi-branched ionic liquidchitosan as a smart and biocompatible nano-vehicle for combination chemotherapy with stealth and targeted properties, *Carbohydr. Polym.* 196 (2018) 299-312.
- (비특허문헌 0020) F.-F. An, Y.-L. Yang, J. Liu, J. Ye, J.-F. Zhang, M.-J. Zhou, X.-J. Zhang, C.-J. Zheng, X.-J. Liang, X.-H. Zhang, A reticuloendothelial system-stealthy dye-albumin nanocomplex as a highly biocompatible and highly luminescent nanoprobe for targeted in vivo tumor imaging, *RSC Adv.* 4 (2014) 6120.
- (비특허문헌 0021) S. Mao, Y. Pang, T. Liu, Y. Shao, J. He, H. Yang, Y. Mao, W. Sun, Bioprinting of in vitro tumor models for personalized cancer treatment: A review, *Biofabrication.* 12 (2020), 042001.
- (비특허문헌 0022) Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 49-60.

- (비특허문헌 0023) V.P. Torchilin, Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 813-827.
- (비특허문헌 0024) T.H. Kim, S.-H. Lee, J.-C. Kim, Spray-dried microparticles composed of carboxylated cellulose nanofiber and cysteamine and their oxidation-responsive release property, *Colloid Polym. Sci.* 298 (2020) 157-167.
- (비특허문헌 0025) T.H. Kim, J.-C. Kim, Thiolated alginate microparticles exhibiting redox-responsive release, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 69 (2020) 821-830.
- (비특허문헌 0026) S.H. Park, J.-C. Kim, Monoolein cubic phase containing poly(hydroxyethyl acrylate-co-propyl methacrylate-co-methacrylic acid) and its electric field-driven release property, *J. Ind. Eng. Chem.* 70 (2019) 226-233.
- (비특허문헌 0027) M. Alle, B. reddy G, T.H. Kim, S.H. Park, S.-H. Lee, J.-C. Kim, Doxorubicincarboxymethyl xanthan gum capped gold nanoparticles: Microwave synthesis, characterization, and anti-cancer activity, *Carbohydr. Polym.* 229 (2020) 115511.
- (비특허문헌 0028) S.H. Park, J.-C. Kim, Complexation-responsive monoolein cubic phase containing extract of *Bambusae Caulis* in Taeniam, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 69(2020) 44-52.
- (비특허문헌 0029) J.A. Kim, J.C. Kim, Temperature and electric field-triggerable liposomes incorporating poly(hydroxyethyl acrylate-co-hexadecyl acrylate-co-carboxyethyl acrylate), *J. Ind. Eng. Chem.* (2018).
- (비특허문헌 0030) G. He, S. Chen, Y. Xu, Z. Miao, Y. Ma, H. Qian, Y. Lu, Z. Zha, Charge reversal induced colloidal hydrogel acts as a multi-stimuli responsive drug delivery platform for synergistic cancer therapy, *Mater. Horizons.* 6 (2019) 711-716.
- (비특허문헌 0031) W. Lei, C. Sun, T. Jiang, Y. Gao, Y. Yang, Q. Zhao, S. Wang, Polydopamine-coated mesoporous silica nanoparticles for multi-responsive drug delivery and combined chemo-photothermal therapy, *Mater. Sci. Eng. C.* 105 (2019), 110103.
- (비특허문헌 0032) Kim, Alle, Kim, Oxidation- and Temperature-Responsive Poly(hydroxyethyl acrylate-co-phenyl vinyl sulfide) Micelle as a Potential Anticancer Drug Carrier, *Pharmaceutics.* 11 (2019) 462.
- (비특허문헌 0033) S.-Y. Kim, S.-J. Kim, B.-J. Kim, S.-Y. Rah, S.M. Chung, M.-J. Im, U.-H. Kim, Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes, *Exp. Mol. Med.* 38 (2006) 535-545.
- (비특허문헌 0034) M.C. Asensio-Lopez, F. Soler, D. Pascual-Figal, F. Fernandez-Belda, A. Lax, Doxorubicin-induced oxidative stress: The protective effect of nicorandil on HL-1 cardiomyocytes, *PLoS One.* 12 (2017), e0172803.
- (비특허문헌 0035) J. Chen, B. Chen, Z. Zou, W. Li, Y. Zhang, J. Xie, C. Liu, Costunolide enhances doxorubicin-induced apoptosis in prostate cancer cells via activated mitogen activated protein kinases and generation of reactive oxygen species, *Oncotarget* 8 (2017) 107701-107715.
- (비특허문헌 0036) H. Zhang, H. Xia, J. Wang, Y. Li, High intensity focused ultrasound-responsive release behavior of PLA-b-PEG copolymer micelles, *J. Control. Release.* 139 (2009) 31-39.
- (비특허문헌 0037) M.H. Wang, J.H. Jeong, J.-C. Kim, Thermo-triggerable self-assembly comprising cinnamoyl polymeric β cyclodextrin and cinnamoyl Pluronic F127, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 142 (2016) 148-158.
- (비특허문헌 0038) R.J. Lee, P.S. Low, Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1233 (1995) 134-144.
- (비특허문헌 0039) H. Zhang, F. Li, J. Yi, C. Gu, L. Fan, Y. Qiao, Y. Tao, C. Cheng, H. Wu, Folate-decorated maleilated pullulan-doxorubicin conjugate for active tumor-targeted drug delivery,

Eur. J. Pharm. Sci. 42 (2011) 517-526.

(비특허문헌 0040) M.-K. Yoo, I.-K. Park, H.-T. Lim, S.-J. Lee, H.-L. Jiang, Y.-K. Kim, Y.-J. Choi, M.-H. Cho, C.-S. Cho, Folate-PEG-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3005-3013.

(비특허문헌 0041) A.H.C. Chun, A.N. Martin, Measurement of Hydrophile-Lipophile balance of surface-active agents, *J. Pharm. Sci.* 50 (1961) 732-736.

(비특허문헌 0042) D. Chandler, Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly, *Nature* 437 (2005) 640-647.

(비특허문헌 0043) H. Zhang, J.-C. Kim, Reduction-responsive monoolein cubic phase containing hydrophobically modified poly(ethylene imine) and dithiodipropionic acid, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 506 (2016) 526-534.

(비특허문헌 0044) S.D. Fowler, P. Greenspan, Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O, *J. Histochem. Cytochem.* 33 (1985) 833-836.

(비특허문헌 0045) P. Greenspan, E.P. Mayer, S.D. Fowler, Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets, *J. Cell Biol.* 100 (1985) 965-973.

(비특허문헌 0046) I.N. Kurniasih, H. Liang, P.C. Mohr, G. Khot, J.P. Rabe, A. Mohr, Nile red dye in aqueous surfactant and micellar solution, *Langmuir* 31 (2015) 2639-2648.

(비특허문헌 0047) O. Topel, B.A. Akır, L. Budama, N. Hoda, Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering, *J. Mol. Liq.* 177 (2013) 40-43.

(비특허문헌 0048) E. De Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato, V. Bocchini, A fluorimetric method for the estimation of the critical micelle concentration of surfactants, *Anal. Biochem.* 115 (1981) 278-286.

(비특허문헌 0049) M. Alle, S.C. Park, R. Bandi, S.-H. Lee, J.-C. Kim, Rapid in-situ growth of gold nanoparticles on cationic cellulose nanofibrils: Recyclable nanozyme for the colorimetric glucose detection, *Carbohydr. Polym.* 253 (2021), 117239.

(비특허문헌 0050) H.E. Toma, V.M. Zamarion, S.H. Toma, K. Araki, The coordination chemistry at gold nanoparticles, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1158-1176.

(비특허문헌 0051) R. Muszynski, B. Seger, P.V. Kamat, Decorating Graphene Sheets with Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 5263-5266.

(비특허문헌 0052) H. Zhang, J.-C. Kim, Preparation and photothermal induced release from cubic phase containing gold nanoparticle, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 465 (2015) 59-66.

(비특허문헌 0053) R.J. Lee, P.S. Low, Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptormediated endocytosis, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3198-3204.

(비특허문헌 0054) J.C. Deutsch, P.C. Elwood, R.M. Portillo, M.G. Macey, J.F. Kolhouse, Role of the membrane-associated folate binding protein (folate receptor) in methotrexate transport by human KB cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 274 (1989) 327-337.

(비특허문헌 0055) P. Peidis, A.I. Papadakis, H. Muaddi, S. Richard, A.E. Koromilas, Doxorubicin bypasses the cytoprotective effects of eIF2 α phosphorylation and promotes PKRmediated cell death, *Cell Death Differ.* 18 (2011) 145-154.

(비특허문헌 0056) G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and Cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185-229.

(비특허문헌 0057) P. Ubezio, F. Civoli, Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells, Free Radic. Biol. Med. 16 (1994) 509-516.

발명의 내용

해결하려는 과제

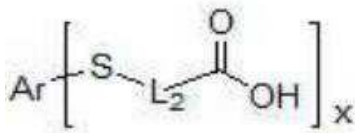
[0010] 본 발명은 극성 양이온 고분자와 비극성 음이온성 화합물이 자가 조립되어 미셀(micelle)을 형성하므로 유효성분을 탑재하여 운반 전달체로 사용 가능하고 셀에 염산 및 금나노입자가 도입되어 암세포에 특이적인 엔도사이토시스(endocytosis)가 가능 할 뿐 아니라 온도 민감성이 향상된 온도 및 산화 응답성 이온 복합체, 상기 온도 및 산화 응답성 이온 복합체 및 소수성 유효성분을 포함하는 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체, 상기 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 반복단위에 아미노기(amino group)를 포함하는 극성 양이온성 고분자 및 하기 화학식 1:

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] (상기 화학식에서 1에서, Ar은 C6-C20아릴, L2는 C1-C5알킬렌이며, x는 1 내지 3의 정수이다.):

[0017] 로 표시되는 비극성 음이온성 화합물;을 포함하는 이온 복합체를 제공한다.

[0018] 상기 극성 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민(polyethylene imine)이며 상기 비극성 음이온성 화합물은 페닐티오아세트산(phenylthioacetic acid)인 것을 특징으로 하며 상기 이온 복합체는 극성 양이온성 고분자의 아미노기와 비극성 음이온성 화합물의 카르복실기의 몰비율이 2:8 내지 5:5인 것을 특징으로 한다.

[0019] 상기 이온 복합체는 금나노입자(gold nano particle)를 포함하며 염산화(folated) 된 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명은 상기 이온 복합체 및 소수성 유효성분을 포함하는 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 제공한다.

[0021] 본 발명은 상기 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물 또는 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 극성 양이온성 고분자와 소수성 잔기를 가지는 비극성 음이온성 화합물이 이온쌍을 이루어 양친매성을 가지므로 자가 조립체를 형성하는 특징이 있으며 수용액에 분산되면 음이온성 화합물의 소수성 잔기가 코어를 형성하고 양이온성 고분자의 사슬이 쉘을 형성하는 미셀(micelle) 입자로 제조되어 유효성분을 탑재할 수 있는 유효성분 전달체로 사용 가능한 특징이 있다.

[0024] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 주변 온도가 상승하거나 산화되면 복합체의 용해도가 증가하여 탑재물이 방출되는 장점이 있으며 암세포에 특이적인 리간드를 포함하여 암세포 특이적 엔도사이토시스가 수행된 후 세포 내부에서 탑재물을 방출하게 되므로 급성 독성을 일으키지 않으면서도 우수한 항암 효과를 보이는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 PEI/PTA용액의 광학밀도를 분석한 결과를 보여준다.

도 2는 본 발명의 PEI 용액, PTA 용액, PEI/PTA(3/7) 용액의 계면장력 및 나일 레드 방출로 인한 형광강도의 변화를 분석한 결과를 보여준다.

도 3은 본 발명의 PEI, PTA, 건조 PEI/PTA(3/7), PEI/PTA(3/7)(5mM H₂O₂) 및 PEI/PTA(3/7)(5mM H₂O₂)의 FT-IR 스펙트럼 분석결과를 보여준다.

도 4는 본 발명의 PEI/PTA(a/b) 용액의 수소핵자기공명 스펙트럼을 보여준다.

도 5는 다양한 온도 조건에서 본 발명의 IPSAM(3/7)에 탑재된 나일 레드가 방출된 프로파일을 보여준다.

도 6은 본 발명의 IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7) 및 염산화 IPSAM(3/7)/GNP의 투과전자현미경 결과를 보여준다.

도 7의 패널(A)는 본 발명의 IPSAM(3/7)에 대한 근적외선 조사에 따른 현탁액의 온도 변화 프로파일과 IPSAM(3/7)에 탑재된 나일 레드의 방출 프로파일을 보여준다.

도 8은 본 발명의 염산화 IPSAM(3/7), 유리 DOX(free DOX), 염산화 IPSAM(3/7)/DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 및 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP의 근적외선 조사에 따른 in vitro KB 세포 활성 변화를 보여준다.

도 9는 본 발명의 유리 DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/DOX 및 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP로 처리한 KB 세포에 대한 유세포 분석 결과를 보여준다.

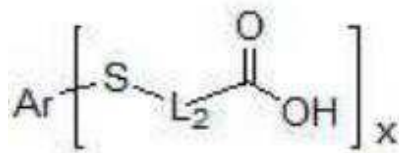
도 10은 본 발명의 유리 DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP를 처리한 KB 세포의 공초점 레이저 주사 현미경 이미지를 보여준다.

도 11은 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체의 작용기전을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 반복단위에 아미노기(amino group)를 포함하는 극성 양이온성 고분자 및 하기 화학식 1:

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] (상기 화학식에서 1에서, Ar은 C6-C20아릴, L2는 C1-C5알킬렌이며, x는 1 내지 3의 정수이다.):로 표시되는 비극성 음이온성 화합물;을 포함하는 온도 및 산화 응답성 이온 복합체를 제공한다.

[0031] 상기 극성 양이온성 고분자는 극성 및 양이온성을 가지는 고분자를 의미하며 상기 아미노기(아민기)가 반복단위에 포함되되 주쇄, 측쇄 또는 말단에 포함될 수 있다. 상기 아민기를 포함하는 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine: PEI), 폴리비닐아민(Polyvinylamine), 폴리아미도아민(Polyamidoamine), 폴리알릴아민(Polyallylamine), 폴리라이신(Poly-Llysine), 키토산(Chitosan), 아민화 메틸셀룰로오스 및 아민화 에틸셀룰로오스 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 고분자일 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine, PEI)이다.

[0032] 상기 비극성 음이온성 화합물은 비극성인 잔기를 포함하는 음이온성 화합물로서 상기 화학식 1로 표현도리 수 있다. 상기 ‘아릴’은 수소, 탄소 원자 및 적어도 1개의 방향족 고리를 포함하는 탄화수소 고리계 라디칼을 지칭하는 것으로, 6 내지 20의 탄소원자, 바람직하게 6 내지 12개의 탄소원자를 가질 수 있으며 상기 ‘알킬렌’은 1 내지 10개 바람직하게는 1 내지 8개, 보다 바람직하게는 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 분자쇄 또는 직쇄 알킬의 라디칼을 의미할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 비극성 음이온성 화합물은 페닐티오아세트산(phenylthioacetic acid)이다.

[0033] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 수용액상에서 상기 극성 양이온성 고분자와 비극성 음이온성 화합물이 이온쌍을 이루어 자가 조립체를 형성하는 특징이 있다. 바람직하게는 극성 양이온성 고분자의 아미노기와 비극성 음이온성 화합물의 카르복실기가 2:8 내지 5:5의 몰비율로 이온쌍을 이루어 자가조립체를 형성하며 보다 바람직하게는 극성 양이온성 고분자의 아미노기와 비극성 음이온성 화합물의 카르복실기가 3:7의 몰비율로

이온쌍을 이루어 자가조립체를 형성한다. 가장 바람직하게는 극성 양이온성 고분자로서 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine)을 사용하고 비극성 음이온성 화합물로서 페닐티오아세트산(phenylthioacetic acid)를 사용하되 상기 폴리에틸렌이민의 아미노기와 페닐티오아세트산의 카르복실기가 3:7의 몰비율로 이온쌍을 이루어 자가조립체를 형성한다.

[0034] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 상기 극성 양이온성 고분자의 아미노기와 상기 비극성 음이온성 화합물의 카르복실기가 이온결합하여 이온쌍을 이루게 되어 양친매성을 가지는 특징이 있다. 상기 양친매성이 감소하면 복합체의 용해도가 증가하게 되고 이는 온도 및 산화 응답성 이온 복합체가 분해된다는 것을 의미하므로 탑재된 유효성분의 방출증가로 이어지게 된다.

[0035] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 이온쌍 자가 조립체이므로 상한 임계 용액 온도(upper critical solution temperature, UCST) 특성을 가져 온도에 따라 용해도가 변하게 된다. 또한 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 상기 비극성 음이온성 화합물에 황성분이 포함되어 있어 산화 조건에 따라 설펍사이드(sulfoxide) 및 설펴(sulfone)으로 산화되므로 이온쌍의 양친매성이 감소되어 용해도가 변하게 된다. 정리하면 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 온도 및 산화 조건이 변화되면 용해도가 변하여 탑재물의 방출이 조절된다.

[0036] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 금나노입자(gold nano particle)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 금나노입자는 근적외선(near-infrared, NIR)을 조사하게 되면 표면 플라즈몬 공명을 일으켜 열을 발생시키는 특징이 있다. 따라서 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체에 금나노입자를 도입하게 되면 근적외선을 조사하는 것만으로 복합체의 주변온도를 손쉽게 상승시킬 수 있는 장점이 있다.

[0037] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 이온 복합체는 엽산화(folated)된 것을 특징으로 한다. 상기 엽산(folic acid)이 온도 및 산화 응답성 이온 복합체에 도입되면 상기 엽산과 암세포의 수용체가 특이적으로 결합되어 암세포 내부로 엔도사이토시스(endocytosis)되므로 탑재물(유효성분)을 암세포 내부에 특이적으로 방출할 수 있게 된다. 상기 엽산화는 온도 및 산화 응답성 이온 복합체의 비극성 음이온성 화합물에 축합반응을 통해 결합되어 도입되는 것을 특징으로 하며 바람직하게는 상기 엽산이 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine)에 축합반응을 통해 도입되는 것을 특징으로 한다.

[0038] 본 발명은 상기 온도 및 산화 응답성 이온 복합체와 유효성분을 포함하는 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 제공한다.

[0039] 상기 유효성분은 항암제, 항생제, 세포막 염료, 아미노산, 광과민제(photosensitiser), 및 유전자 복합체의 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 유효성분은 온도 및 산화 응답성 이온 복합체로부터 방출되어 복합체의 산화 조건을 강화시킬 수 있는 성분인 것이 바람직하며 이온성 또는 소수성의 제한이 없다. 바람직하게는 상기 유효성분은 항암제일 수 있으며 보다 바람직하게는 세포내에서 산화조건을 강화시키는 독소루비신(doxorubicin, DOX)이다.

[0040] 본 발명은 상기 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 기재된 “조성물”은 활성 성분으로서 상기 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체와 함께 천연 또는 인공의 담체, 라벨 또는 탐지제와 같은 불활성 성분 또는 애주번트, 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친지방성 용매, 보존제와 같은 활성 성분과의 조합을 의미하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0041] 상기 담체는 약학적 부형제 및 부가적인 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물 (예를 들어, 단당류; 이당류; 삼당류; 사당류; 올리고당류; 알디톨, 알도산, 에스테르화된 설탕과 같은 설탕의 유도체, 폴리사카라이드, 또는 당 중합체 등)을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있으며, 1 내지 99.99 중량% 또는 부피%로 포함할 수 있다.

[0042] 단백질 부형제는 인간 혈청 알부민, 재조합 인간 알부민, 젤라틴, 카제인 등을 포함할 수 있으며 이에 제한되지 않는다.

[0043] 완충 역할을 할 수 있는 대표적인 아미노산 성분으로는 알라닌, 알기닌, 글리신, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 루신, 아이소루신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함할 수 있으며 이에 제한되지 않는다.

[0044] 탄수화물 부형제는 프룩토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 솔보스와 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스와 같은 이당류, 라피노스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분과 같은 다당류, 및

만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 소르비톨, 및 마이오이노시톨과 같은 알디톨 등을 포함할 수 있으며 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물은 당업자에 의해 공지의 방법으로 제제화할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 필요에 따라서 물 또는 그 외의 약학적으로 허용되는 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있으며 약학적으로 허용되는 담체 또는 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클 (vehicle), 방부제, 결합제 등과 적당 조합하여, 일반적으로 인정된 제약 실시에 요구되는 단위 용량 형태로 혼합함으로써 제제화 할 수 있다. 상기 제제화에 있어서 유효성분량은 지시받은 범위의 적당한 용량을 얻을 수 있도록 하는 것을 의미한다.

[0046] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물을 주사를 위한 무균 조성물로서 제제화 하는 경우 주사용 증류수와 같은 부형액을 이용해 통상의 제제 실시에 따라 처방할 수 있다. 주사용의 수 용액으로서는 생리 식염수, 포도당 및 그 외의 보조약을 포함한 등장용액 예를 들어, D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨을 사용할 수 있으며 적당한 용해 보조제 예를 들어, 에탄올류인 폴리 알코올, 프로필렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 글리콜과 비이온성 계면활성제류인 폴리소르베이트 80(TM), 및 HCO-50을 병용하여 사용할 수 있다. 또한 유성액으로서 참기름, 콩기름을 사용할 수 있으며 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용하여 사용할 수 있다.

[0047] 상기 주사제형의 예로서는 정맥내 주사제형, 동맥내 주사제형, 선택적 동맥내 주사제형, 근육내 주사제형, 복강내 주사제형, 피하주사제형, 뇌실내 주사제형, 뇌내 주사제형, 골수액강내 주사제형이 있으며 바람직하게는 상기 주사제형은 정맥내 주사제형이다.

[0048] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물은 약제학적 유효량의 유효성분을 포함한다. 상기 유효량의 결정은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 명세서에 개시된 내용을 기반으로 용이하게 결정될 수 있다.

[0049] 일반적으로 상기 약제학적 유효량은 유효성분을 낮은 농도로 1차 투여한 후, 대상체에서 부작용이 없으면서도 요망되는 효과를 얻을 때까지 점진적으로 증량시키는 방법으로 결정된다. 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물의 적절한 투여량이나 투여 간격을 결정하는 방법은 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman et al., eds., 11th Edition, McGraw-Hill 2005, 및 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th and 21st Editions, Gennaro and University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippencott Williams & Wilkins (2003 and 2005)에 상세히 설명되어 있다.

[0050] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물의 투여 방법은 질환의 종류, 환자의 나이, 체중, 성별, 의학적 상태, 질환의 중증도, 투여 경로, 및 별도로 투여되는 약물과 같은 다양한 인자를 고려하여 결정될 수 있다. 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물이 환자에 투여되는 양은 투여 방법, 환자의 건강 상태, 체중, 의사의 처방과 같은 많은 인자에 의하여 결정될 수 있으며, 이는 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자의 지식 범위 내에 있다.

[0051] 상기 “약”은 당해 기술 분야에서 통상적으로 관용되는 범위, 예를 들어, 평균 표준 편차 범위 내로 이해될 수 있으며 언급된 값의 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 이내로 이해될 수 있다.

[0052] 또한, 인산염 완충액, 및 초산나트륨 완충액과 같은 완충제, 염산 프로카인과 같은 무통화제, 벤질 알코올, 또는 페놀과 같은 안정제, 및 산화 방지제와 더 배합할 수 있다. 상기 조제된 주사액은 통상, 적당한 앰플에 충전시킨다. 현탁액 및 유탁액은, 담체로서, 천연 검, 한천, 알긴산 나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐알코올을 함유할 수 있다. 근육 내 주사를 위한 현탁액 또는 용액은 활성 화합물과 함께, 약학적으로 허용되는 담체 예를 들어, 멸균수, 올리브 오일, 에틸 올레에이트, 글리콜류 및 적합한 양의 리도카인 염산염을 함유할 수 있다.

[0053] 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물은 정맥 주사 (bolus injection) 또는 연속주입 (continuous infusion)으로 환자에 투여될 수 있다. 본 발명의 온도 및 산화 응답성 유효성분 전달체를 포함하는 약학적 조성물은 1시간 이하, 1시간 이상, 2시간 이상, 3시간 이상, 4시간 이상, 8시간 이상, 12시간 이상, 1일 이상, 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이상, 7일 이상, 2주 이상, 3주 이상, 4주

이상, 1개월 이상, 3개월 이상, 6개월 이상에 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 또는 적어도 5회에 걸쳐, 연속적으로, 또는 일정 시간 간격으로, 또는 임상적 판단에 의하여 결정된 시간 간격을 두고 투여될 수 있다.

[0054] 주사제는 앰플형으로, 또는 복수회 투여 용기의 단위 용량형으로 제형화 될 수 있다. 그러나 통상의 기술자는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 환자의 나이, 체중, 키, 성별, 일반적 의학적 상태 및 기존 치료 이력과 같은 다양한 인자들에 따라 변경될 수 있음을 이해할 것이다.

[0055] 하기 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다.

[0057] 실시예

[0059] 1. 실험방법

[0060] 1.1. 실험재료

[0061] 폴리에틸렌이민(polyethylene imine, PEI, 분지형, 평균분자량(MW): 2000), 염화금산($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 독소루비신(doxorubicin, DOX), 엽산(folic acid, FA), 1-에틸3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(1-ethyl3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC), 디메틸설폭시드(dimethyl sulfoxide, DMSO), N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS), 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 디아미디노-2-페닐인돌 디히드로클로라이드(diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI), 포름알데히드(formaldehyde), 트립신(trypsin), 트리즈마(trizma) 완충액, 인산완충식염수(PBS, 10배 농도, pH 7.4), 디메틸포름아미드(dimethylformamide, DMF) 및 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2-5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)는 Sigma-Aldrich Co.(St. louis, MO)에서 구입하였다. KB 세포는 한국 세포주 은행(서울, 한국)에서 제공받았다. 과산화수소(H_2O_2 , 30%)는 Daejung Chemicals & Metals Co.(한국 시흥)에서 구입하였다. 페닐티오아세트산(phenylthioacetic acid, PTA) 및 나일레드(nile red)는 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. FBS(fetal bovine serum)가 없는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지는 GibcoTM(Dublin, Ireland)에서 구입하였다.

[0063] 1.2. 상한 임계 용액 온도 분석

[0064] 14.8mg, 21.8mg 또는 30.5mg의 PEI를 20ml 바이알에서 30mM Trizma 완충액(pH 7.0) 15ml에 용해시켜 PEI 용액을 제조하였다. 상기 PEI 용액에 PTA 135.2mg, 128.2mg, 또는 119.5mg를 첨가하여 PEI 및 PTA의 농도가 10mg/ml이고 아미노기와 카르복실기의 몰비가 3:7 또는 4:6 또는 5:5인 PEI/PTA 혼합 용액을 제조하였다. 상기 바이알을 실온에서 24시간 동안 롤러 믹서로 굴려 PEI/PTA 혼합 용액을 혼합하였다. 아미노기 대 카르복실기의 몰비가 a:b인 PEI/PTA 혼합 용액은 PEI/PTA(a/b)용액으로 칭하였으며 PEI/PTA(a/b) 용액에 포함된 PEI/PTA이온쌍 및 PEI/PTA이온쌍 자가조립체는 각각 IP(a/b) 및 IPSAM(a/b)으로 명명하였다.

[0065] PEI/PTA(a/b) 용액 2.5ml을 3ml 큐벳에 넣고 온도 조절기(CW-05G, Jeio Tech, 대한민국)의 항온 큐벳 홀더에 장착 한 후 2°C/min의 승온 속도로 20°C에서 50°C로 가열하면서 UV 분광 광도계(UK 6505 UV/Vis Spectrophotometer, JENWAY, UK)로 광학밀도(600nm)를 측정하였다.

[0066] PEI/PTA(3/7)용액의 산화에 따른 광학밀도의 변화를 확인하기 위하여 H_2O_2 의 최종 농도가 0, 0.5, 1, 5, 20 및 100mM가 되도록 H_2O_2 용액을 처리하였다. PEI와 PTA는 총 10mg/ml가 되도록 하였으며 실온에서 롤러 믹서로 4시간 동안 굴려 혼합하였다. XmM H_2O_2 용액으로 처리된 PEI/PTA(3/7) 용액은 PEI/PTA(3/7) 용액(XmM H_2O_2)으로 명명하였다. PEI/PTA(3/7) 용액(XmM H_2O_2)의 광학 밀도는 전술한 바와 같이 측정하였으며 상한 임계 용액 온도(upper critical slution temperature, UCST)는 정체기 영역(plateau region)의 데이터 점을 연결하는 접선과 감소 영역(decreasing region)의 데이터 점을 연결하는 접선의 교차점으로 정의하였다.

[0068] 1.3. 계면 장력 측정

[0069] IP(3/7)의 공기/물 계면활성에 대한 산화의 영향을 조사하기 위해 PEI/PTA(3/7)용액(XmM H_2O_2)에 대하여 링 방법을 적용하여 계면 장력을 측정하였다. PEI/PTA(3/7)용액(XmM H_2O_2)은 상기과 같이 제조하되 PEI와 PTA의 농도를 달리하였다. PEI와 PTA의 총농도는 4mg/ml로 하였고 아미노기:카르복실기=3:7의 비율로 하였으며 완충액의

종류(Trizma 완충액 30mM, pH 7.0), H₂O₂ 농도(0, 0.5, 1, 5, 20, 100mM) 및 혼합 방법(볼러 믹서, 4시간)은 모두 동일하게 하였다. PEI/PTA(3/7)용액(XmM H₂O₂)과 동일한 H₂O₂농도를 갖는 30mM Trizma 완충액(pH 7.0)으로 연속 2회 희석하였다. 대조군으로 PEI와 PTA를 각각 30mM Trizma 완충액 pH 7.0에 4mg/ml 농도로 녹인 후 동일한 완충액으로 연속 2회 희석하여 순수한 PEI 용액과 순수한 PTA 용액을 얻었다. 용액의 표면장력은 계면장력계(DST 60, SEO Co., Suwon, South Korea)를 이용하여 링법으로 측정하였다.

[0071] 1.4. 임계 미셀 농도 측정

[0072] PEI/PTA(3/7) 용액(XmM H₂O₂)은 상기와 같이 제조하되 PEI와 PTA의 총농도만을 달리하였다. 임계 미셀 농도(critical micelle concentration, CMC)를 결정하기 위한 PEI+PTA의 농도는 20mg/ml이었으며 아미노기/카르복실기의 비율(3/7), 완충액의 종류(Trizma 완충 30mM, pH 7.0), H₂O₂ 농도(0, 0.5, 1, 20mM), 및 혼합 시간(4시간)은 동일하였다.

[0073] PEI/PTA 용액(XmM H₂O₂)을 동일한 H₂O₂ 농도를 포함하는 30mM Trizma 완충액(pH 7.0)으로 연속 2회 희석하여 PEI+PTA의 최종 농도가 0, 0.0625, 1.25, 2.5, 5, 10, 15 및 20mg/ml이 되도록 하였다. 나일 레드(nile red) 10mg을 20ml 바이알에 담긴 메탄올 10ml에 용해시켜 나일 레드 용액을 제조하고 상기 나일 레드 용액(1mg/ml) 10μl를 5ml 바이알에 담긴 PEI/PTA용액(XmM H₂O₂) 1ml에 첨가하여 암조건 및 실온조건에서 12시간 동안 보관하였다. 상기 혼합 용액을 필터(0.45 μm)로 여과한 후, 형광 분광 광도계(Hitachi F2500, Hitachi, Japan)에서 여기 파장(556nm)를 사용하여 나일 레드의 형광 강도(613nm)를 측정하였다.

[0075] 1.5. FT-IR 분광기를 통한 PEI/PTA 이온쌍 및 산화 검사

[0076] PEI/PTA(3/7) 용액과 PEI/PTA(3/7) 용액(5mM H₂O₂)을 동결건조한 후 PEI/PTA(3/7), PEI/PTA(3/7)(5mM H₂O₂), PEI 및 PTA를 각각 KBr과 혼합하여 혼합분말을 제조한 후 막자사발로 균질화하였다. 상기 균질화한 혼합분말을 틀에 넣고 프레스를 이용하여 압착한 후 푸리에 변환 적외선 분광광도계(FTIR, FT-3000-Excalibur, Varian Inc., CA, USA)를 이용하여 FT-IR 스펙트럼을 얻었다.

[0078] 1.6. 1H NMR 분광법을 이용한 PEI/PTA 상호작용 분석

[0079] 수소핵자기공명분광법을 이용하여 PEI와 PTA의 상호 작용을 분석하였다. PEI와 PTA의 이온 결합 반응은 D₂O로 제조된 완충용액에서 수행되었으며 24시간 후 분석을 수행하였다. 수소핵자기공명스펙트럼은 Bruker Avance 400MHz 분광계(강원대학교 중앙연구소)를 이용하여 취득하였다.

[0081] 1.7. 온도 및 산화 반응 방출

[0082] 온도 및 산화반응성 방출 조사를 위해 나일 레드를 포함한 IPSAM(3/7)을 하였다. 1.5ml 30mM Trizma 완충액(pH 7.0, H₂O₂농도: 0, 0.5, 1, 또는 5mM)을 큐벳(3ml)에 넣은 후 상기 큐벳을 UV 분광광도계(UK 6505 UV /Vis 분광 광도계, JENWAY, 영국)에 장착하고 완충액의 온도를 25.5℃, 37℃, 또는 43℃로 조절하였다. 나일 레드를 포함하는 IPSAM(3/7) 현탁액 1ml을 상기 온도가 조절된 Trizma 완충액이 들어 있는 큐벳에 주입한 후 형광 분광 광도계(Hitachi F2500, Hitachi, Japan)에서 여기 파장(556nm)으로 실시간 파장(613nm)을 측정하였다. 탑재물의 방출율(Release %)은 다음 식을 사용하여 계산하였다: $\text{Release}\% = (1 - F_t / F_0) \times 100$ (여기서, F_t 는 특정 시간의 형광강도를 의미하며, F_0 는 초기 형광강도를 의미한다).

[0084] 1.8. 엽산화 PEI의 제조

[0085] 엽산화 PEI는 알려진 축합 반응(condensation reaction)을 이용하여 제조하였다. 엽산(folic acid) 0.11g을 10 ml 바이알에서 DMSO 5ml에 용해시켜 엽산용액을 제조하였다. EDC 0.042g와 NHS 0.025g를 상기 엽산용액에 녹인 후 상온에서 3시간 동안 교반하여 카르복실기를 활성화하였다. PEI 1g을 50ml 바이알에서 증류수 25ml에 용해시켜 PEI 용액을 제조하였다. 상기 활성화된 엽산 용액을 PEI 용액에 천천히 넣고 실온에서 밤새 교반하여 반응시켰으며 상기 반응 혼합물은 투석막(MWCO 1,000)을 이용하여 3일 동안 증류수로 투석하였다. 상기 합성한 엽산화 PEI는 D₂O에 용해시켜 수소핵자기공명 스펙트럼(Bruker Avance 400MHz, 강원대학교 중앙연구소)을 얻었다.

[0087] 1.9. 금나노입자를 포함하는 엽산 IPSAM의 제조

[0088] 온도 및 산화 반응성 방출 분석을 위하여 엽산화 IPSAM(3/7)을 제조하되 PEI와 엽산화 PEI의 총질량이 총 함량의 2%(w/w)가 되도록 하였다. 엽산화 PEI, PEI 및 PTA의 총농도는 20mg/ml이었으며 아미노기/카르복실기의 비율

(몰비)은 약 3/7이었으며, 30mM Trizma 완충액(pH 7.0)을 사용하였다. in-situ 합성방법을 통해 금나노입자(GNP)를 염산화 IPSAM(3/7)에 도입하였다. HAuCl₄를 IPSAM 현탁액에 농도가 0.5mM이 되도록 용해한 후 실온에서 24시간 방치하여 GNP가 형성되어 염산화 IPSAM(3/7)에 도입되도록 하였다. GNP가 도입된 IPSAM(3/7)은 IPSAM(3/7)/GNP로 지칭하였다.

[0090] 1.10. 투과 전자 현미경

[0091] IPSAM(3/7) 현탁액, 염산화 IPSAM(3/7) 현탁액 및 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 현탁액을 등량비로 우라닐 아세테이트(1.2%(w/v))와 혼합한 후 실온에서 어두운 조건에서 3시간 동안 방치하였다. 포름바르/구리 코팅 그리드(Formvar/copper-coated grid)를 현탁액에 담그어 표면에 IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 나노입자가 증착되도록 한 후 실온에서 건조시켰다. 투과전자현미경(LEO-912AB OMEGA, LEO, Germany)을 이용하여 TEM 사진, SAED(selected area electron diffraction) 패턴, GNP의 고해상도 TEM(HR-TEM)을 획득하였다.

[0093] 1.11. 염산화 IPSAM/GNP에서 탑재물의 방출

[0094] 탑재물(나일 레드 또는 DOX)을 염산 IPSAM(3/7)/GNP에 탑재시켰다. 나일 레드는 근적외선조사에 따른 유도방출을 분석하기 위해 사용되었으며 DOX는 시험관 내 항암 효능을 분석하기 위해 사용되었다. 나일 레드 용액(1mg/ml, 메탄올) 또는 DOX 용액(10mg/ml, DMSO) 10 μ l과 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 현탁액(20mg/ml) 1ml을 5ml 바이알에 담은 후 실온에서 12시간 동안 암실에 두었다. DOX 용액과 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 현탁액의 혼합물을 투석막(MWCO 3000)을 사용하여 30mM Trizma 완충액(pH 7.4)으로 24시간 동안 투석하면서 탑재되지 않은 여분의 DOX를 제거하였다. 상기 투석 후, DOX가 탑재된 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 현탁액을 동결 건조하였다. DOX의 정확한 탑재량(%)을 확인하기 위해 상기 동결건조한 DOX 탑재 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 5mg을 DMF 1ml에 용해시키고 22,000rpm에서 30분 동안 초원심분리하여 상등액을 획득하였다. 상기 상등액에 대하여 형광분광광도계(Hitachi F2500, Hitachi, Japan) 분석을 실시하여 DOX의 형광강도를 분석하였다. 상기 형광분광광도계분석의 여기 및 방출 파장은 각각 485nm 및 550nm이었다. DOX의 양은 보정 곡선을 통하여 결정되었다. 특정 DOX 탑재량(%)은 IPSAM에 로딩된 DOX의 질량 퍼센트로 정의하였다. DOX 탑재 염산화 IPSAM(3/7)/GNP는 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP로 명명하였다.

[0096] 1.12. 제타 전위 측정

[0097] IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7)/DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 및 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP 나노 입자의 표면 전위를 분석하기 위하여 제타 전위(zeta potential)를 측정하였다. 상기 IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7)/DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 또는 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP의 현탁액을 30mM Trizma 완충액(pH 7.0)으로 희석하여 광산란 강도가 50 내지 100Kcps가 되도록 하였다. 제타 전위는 동적 광산란 장비(ZetaPlus 90, Brookhaven Instrument Co., U.S.A.)를 사용하여 실온(20-23℃)에서 측정하였다.

[0099] 1.13. 근적외선 유도 방출 분석

[0100] 시험관(직경 1cm 및 길이 10cm)에 GNP가 포함된 나일 레드 IPSAM(3/7) 또는 GNP가 포함되지 않은 나일 레드 IPSAM(3/7) 현탁액 10ml을 넣었다. PEI와 PTA의 총농도는 20mg/ml가 되도록 하였으며 GNP의 농도는 0.5mM으로 하였다. 상기 시험관을 스티로폼으로 절연한 후 현탁액 표면으로부터 22cm 떨어진 광원을 이용하여 근적외선(2W, 808nm)을 조사하였으며 일정 시간 간격으로 현탁액의 온도를 측정하고 현탁액(0.6ml)을 획득하였다. 상기 획득한 현탁액 시료는 22,000rpm에서 10분간 초원심분리한 후 상등액을 획득하여 나일 레드의 형광강도를 측정하고, 나일 레드의 방출율(%)을 결정하였다. 대조군으로서 근적외선 조사를 수행하지 않은 GNP가 포함된 나일 레드 IPSAM(3/7) 또는 GNP가 포함되지 않은 나일 레드 IPSAM(3/7) 현탁액의 방출율(%)을 사용하였다.

[0101] 1.14. 항암 효능 평가

[0102] 염산화 PSALM(3/7)/DOX 현탁액 또는 염산화 PSALM(3/7)/DOX/GNP 현탁액을 10mM PBS(pH 7.4)로 희석하여 DOX 농도가 10 μ g/ml이 되도록 하였다. 양성 대조군으로서 염산화 IPSAM(3/7) 및 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 현탁액을 사용하였으며 IPSAM의 농도는 염산화 IPSAM(3/7)/DOX 및 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP 현탁액과 동일하게 조절하였다. 다른 양성 대조군으로서 10 μ g/ml 유리 DOX 용액(10mM PBS, pH7.4)을 사용하였으며 음성 대조군으로서 10mM PBS(pH 7.4)를 사용하였다. 1x10⁴ cells/ml KB 세포(200 μ l)을 96-well plate에 넣고 CO₂ 배양기에서 37℃의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 FBS가 포함되지 않은 RPMI 1640 배양 배지(180 μ l)와

상기 시료(20 μ l)를 각 well에 넣고 동일한 조건에서 12시간 동안 더 배양하였다. 상기 96-well plate로부터 30 cm 떨어진 거리에서 근적외선을 1시간 동안 조사하고 추가로 12시간 동안 더 배양하였다. 배양 후 배지는 제거하고 10mM PBS(pH 7.4)로 세포를 세척한 후 5mg/ml MTT 시약(20 μ l)을 넣어 4시간 동안 배양하였다. 원심분리 후 각 well의 상층액을 제거하고 DMSO(200 μ l)를 넣어 살아있는 세포에서 형성된 포르마잔(formazan)을 용해시켰다. 마이크로플레이트 판독기(N10588, Thermo Fisher Scientific, USA)에서 웰에 존재하는 포르마잔의 흡광도(540 nm)를 분석하였다. 세포 생존율은 완충 용액으로 얻은 포르마잔 흡광도에 대한 시험 시료 또는 대조군으로 얻은 포르마잔 흡광도를 비교하여 백분율로 나타내었다.

[0104] 1.15. DOX가 탑재된 엽산화 IPSAM과 암세포의 상호작용

[0105] 3×10^4 cells/ml KB 세포 현탁액(1ml)을 12-well plate에 넣고 CO₂ 배양기에서 37℃의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 10mM PBS(pH 7.4)로 세포를 세척한 후 미리 제조한 FBS-free RPMI 1640 배양 배지(0.5ml)와 시험시료(0.5ml, free DOX 용액, 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX 및 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP)의 혼합액을 각 웰에 넣어 준 후 CO₂ 배양기에서 37℃의 조건으로 4시간 동안 더 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 10mM PBS(pH 7.4)로 세포를 세척한 후, 트립신/EDTA 용액을 넣어 세포를 분리시켰다. 상기 세포 현탁액을 튜브에 넣고 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 원심분리한 튜브에 침전된 세포는 10mM PBS(400 μ l, pH 7.4, 4℃)을 넣어 현탁액으로 제조하고 유세포 분석기(fluorescence-activated cell sorting, FACS, Calibur, Becton Dickinson, USA; 강원대학교)를 사용하여 470nm에서 여기 시키면서 여기 DOX의 형광 강도(560nm)를 측정하였다. 공초점 레이저 주사 현미경(CLSM)을 이용하여 유리 DOX 또는 DOX 탑재 IPSAM과 KB 세포 사이의 상호작용을 분석하였다. 상기와 동일한 조건에서 세포를 배양한 후 세포가 유리 DOX 또는 DOX 탑재 IPSAM과 상호작용하도록 배양한 후 포름알데히드 용액(2.5%(v/v))을 사용하여 세포를 고정하였다. 고정된 세포는 10mM PBS(pH 7.4)로 세척한 후 DAPI염색을 수행하고 공초점 레이저 주사현미경(LSM 880 with Airyscan, Carl Zeiss; 강원대학교 중앙연구소)으로 형광 이미지를 촬영하였다.

[0107] 2. 결과

[0108] 2.1. 상한 임계 용액 온도 분석결과

[0109] 도 1의 패널(A)는 본 발명의 PEI/PTA(5/5) 용액, PEI/PTA(4/6) 용액, PEI/PTA(3/7) 용액의 20 내지 50℃ 온도 범위에서의 광학밀도를 분석한 결과를 보여준다.

[0110] PEI/PTA(5/5) 용액의 광학 밀도는 23℃ 부근에서 감소하기 시작하여 36℃에서 0에 도달하는 것으로 확인되었다. PTA는 카르복실기를 포함하며 PEI는 아미노기를 포함하므로 PTA와 PEI는 이온결합이 가능하다. 상기 형성된 PEI/PTA 이온쌍(IP(5/5))은 PTA가 비극성(non-polar) 분자이고 PEI가 극성(polar) 분자이기 때문에 양친매성(amphiphilic)인 동시에 표면 활성(surface-active)을 가질 가능성이 높다. 저온에서 광학 밀도가 높은 이유는 이온쌍이 양친매성 특성으로 인하여 자가 조립되기 때문으로 판단된다. 이온쌍이 수용액에 분산되면 PTA의 페닐 그룹은 소수성 상호 작용을 통해 서로 결합하므로 코어가 형성되고 PEI 사슬은 상기 코어를 둘러싸는 셸을 형성하는 방법으로 미셀 입자를 형성하게 된다.

[0111] 가시광선은 상기 형성된 IPSAM(IPSAM(5/5))에 의해 산란되므로 높은 광학 밀도를 생성할 수 있다. 이온쌍 용액의 온도가 상승하게 되면 PTA의 용해도가 증가하고 PTA 분자의 페닐기 간의 소수성 인력이 약해져 IPSAM은 분해되기 쉬워진다. 상기와 같은 IPSAM의 온도 유도 분해는 온도가 증가함에 따라 광학 밀도가 감소하는 주요 원인인 것으로 판단된다.

[0112] 광학 밀도는 온도가 증가함에 따라 현저하게 감소하며 특히 23℃ 부근에서 급격히 감소하기 시작한다. 따라서 PEI/PTA(5/5)용액의 이온쌍(IP(5/5))은 상한 임계 용액 온도(upper critical solution temperature, UCST) 거동을 보이는 것으로 판단되며 PEI/PTA(5/5)용액의 UCST는 약 23℃인 것으로 판단된다. PEI/PTA(4/6) 용액의 광학 밀도는 25℃에서 31℃로 증가하는 동안 약간 감소하였으며 31℃ 이후에 급격히 감소하였다. 따라서 PEI/PTA(4/6) 용액(IP(4/6))의 이온쌍은 31℃ 부근에서 UCST를 나타내는 것으로 판단된다. PEI/PTA(3/7) 용액의 광학 밀도 프로파일은 상기와 유사하게 27 내지 37℃ 범위에서 약간 감소한 후 급격히 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 PEI/PTA(3/7) 용액(IP(3/7))의 이온쌍은 약 37℃에서 UCST를 나타내는 것으로 분석되었다.

[0113] UCST는 PTA의 함량에 비례하는 것으로 확인되었다. PTA 함량이 증가할수록 PTA 분자의 페닐 그룹 사이의 소수성 인력이 더 광범위하게 작용하므로 IPSAM을 분해하는 데 더 많은 열에너지가 필요하게 된다. IP(3/7)의 UCST는 체온인 37℃와 유사하므로 IP(3/7)와 IPSAM(3/7)을 선택하여 추가적인 실험을 진행하였다.

[0114] 도 1의 패널(B)는 본 발명의 PEI/PTA(3/7) 용액(0mM, 0.5mM, 1mM, 5mM, 20mM 및 100mM H₂O₂)을 20 내지 50℃의 온도 범위에서 가열한 결과를 보여준다. 먼저 PEI/PTA 용액(0mM H₂O₂)은 온도가 25 내지 37℃로 증가하게 되면 광학 밀도가 점차적으로 감소하게 되고 37℃ 이후 급격히 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 H₂O₂ 처리를 하지 않은 IP(3/7)의 UCST는 37℃ 부근인 것으로 판단된다. PEI/PTA(3/7) 용액(0.5mM H₂O₂)의 광학 밀도에 관한 온도의 의존적 프로파일은 PEI/PTA(3/7) 용액(0mM H₂O₂)과 유사한 것으로 확인되었다. 그러나 PEI/PTA(3/7) 용액(0mM H₂O₂)의 광학 밀도가 급격히 감소하기 시작한 온도는 PEI/PTA(3/7) 용액(0.5mM H₂O₂)의 광학 밀도가 감소한 온도보다 약 4℃ 낮았다.

[0115] PTA의 황화물은 H₂O₂에 의해 산화되어 설펡사이드(sulfoxide)와 설펡(sulfone)이 될 수 있다. PTA가 산화되면 극성과 물에 대한 용해도가 증가하여 더 낮은 온도에서도 쉽게 용해될 수 있다. 이러한 이유로 1mM H₂O₂ 용액으로 처리한 IP(3/7)의 UCST는 H₂O₂를 처리하지 않은 IP(3/7)보다 더 낮을 것으로 판단되었다. 다른 1, 5 및 20mM H₂O₂ 농도에서 처리된 PEI/PTA(3/7) 용액은 상기와 유사하게 온도가 증가함에 따라 광학 밀도가 변화하는 것으로 확인되었다. 본 발명의 분석결과 PEI/PTA(3/7) 용액(1mM H₂O₂), PEI/PTA(3/7) 용액(5mM H₂O₂), 및 PEI/PTA(3/7) 용액(20mM H₂O₂)에 함유된 IP(3/7)의 UCST는 약 31℃, 27℃, 23℃로 상기 예측과 일치하는 결과를 확인하였다. 이에 반하여, PEI/PTA(3/7) 용액(100mM H₂O₂)은 전체 온도 범위에서 광학 밀도가 거의 0에 가까웠다. 상기 결과는 100mM H₂O₂로 처리된 IP(3/7)의 UCST가 20℃보다 훨씬 낮기 때문으로 판단된다.

[0116] 정리하면 IP(3/7)의 UCST는 H₂O₂ 농도가 증가함에 따라 감소한다.

[0118] 2.2. 계면장력 분석결과

[0119] 도 2의 패널 (A)는 PEI 용액(0, 0.5, 1, 5, 20 또는 100mM H₂O₂), PTA 용액(0, 0.5, 1, 5, 20 또는 100mM H₂O₂) 및 PEI/PTA(3/7) 용액(0, 0.5, 1, 5, 20 또는 100mM H₂O₂)의 계면 장력을 분석한 결과를 보여준다.

[0120] PEI 용액의 경우 계면 장력은 거의 변화가 없었으나 농도는 4mg/ml로 증가한 것이 확인되었다. PEI는 수용성 고분자로서 양친매성이 적어 계면활성을 거의 나타내지 않는다. PTA 용액의 계면 장력은 73에서 68 dyne/cm로 약간 감소한 반면 농도는 4mg/ml로 증가한 것이 확인되었다. PTA는 소수성 페닐기와 친수성 카르복실기를 가지고 있어 어느 정도의 계면활성을 가질 수 있다. H₂O₂ 처리하지 않은 PEI/PTA 혼합용액의 계면 장력은 포화상태에서 46 dyne/cm로 감소한 반면, PEI와 PTA의 농도는 4mg/ml로 증가하였다. 포화 방식으로 계면 장력이 감소하는 것은 계면활성제의 전형적인 패턴이다.

[0121] PTA는 카르복실기를 포함하고 있으며 PEI는 아미노기를 포함하고 있으므로 PTA와 PEI는 이온결합이 가능하다. 상기 생성된 PEI/PTA 이온쌍(IP(3/7))은 PTA가 비극성 분자이고 PEI가 극성 분자이기 때문에 양친매성 및 표면활성을 가질 가능성이 높다. 상기 결과는 PTA/PEI 혼합 용액의 계면 장력이 농도가 증가함에 따라 효과적으로 감소하는 이유를 설명해 준다. H₂O₂ 처리된 PEI/PTA 용액 예를 들어, PEI/PTA(3/7) 용액(0.5, 1, 5, 20, 또는 100mM H₂O₂)의 계면 장력은 상기와 유사한 방식으로 감소하였으나 PEI와 PTA의 농도는 4mg/ml로 증가하는 것이 확인되었다. 그러나 계면 장력의 감소 정도는 H₂O₂ 처리를 하지 않은 PEI/PTA 혼합용액보다 낮은 것으로 확인되었으며 H₂O₂의 농도에 반비례하는 것으로 확인되었다. 예를 들어, H₂O₂의 농도가 0mM, 0.5mM, 1mM, 5mM, 20mM 및 100mM인 경우 4mg/ml에서의 계면 장력은 각각 46dyne/cm, 49.5dyne/cm, 51.5dyne/cm, 54.2dyne/cm, 56dyne/cm 및 64dyne/cm인 것으로 확인되었는데 이는 IP(3/7)의 계면활성이 H₂O₂의 농도가 증가함에 따라 감소한다는 것을 의미한다.

[0122] 정리하면 H₂O₂의 농도가 높으면 PTA가 더 쉽게 산화될 수 있으므로 상기 IP(3/7)는 양친매성 및 계면 활성이 보다 낮아지게 되는 것이다.

[0124] 2.3. 임계 미셀 농도 분석

[0125] 도 2의 패널(B)는 본 발명의 PEI와 PTA의 농도 변화에 따른 PEI/PTA(3/7) 용액(0, 0.5, 1, 20mM H₂O₂)에 함유된 나일 레드(nile red)의 형광 강도 변화를 보여준다.

- [0126] 상기 형광 강도는 상대적으로 낮은 농도 범위에서는 보다 약한 것으로 확인되었으며 농도가 어느 정도 증가하더라도 형광 강도는 더 이상 증가하지 않고 거의 일정한 것으로 확인되었다. 상기 결과는 나일 레드가 저농도 범위의 극성 수용액에만 존재하고 비극성 환경에서는 존재하지 않는다는 것을 의미한다.
- [0127] 나일 레드는 극성(polar) 환경에서 형광을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다. PEI+PTA의 농도가 증가하여 특정 값에 도달하게 되면 형광 강도가 증가하기 시작하는데 이는 해당 농도에서 비극성 환경이 형성된다는 것을 의미한다. IP(3/7)는 양친매성을 가지므로 특정 농도(임계 미셀 농도, critical micelle concentration, CMC)에서 미셀을 형성할 수 있으며 상기 형성된 미셀에서 PTA의 폐닐기는 미셀 코어를 형성하게 되고 상기 코어는 비극성 환경을 제공할 수 있게 된다. 나일 레드는 미셀의 비극성 코어에 용해되어 들어가기 쉬우므로 강한 형광강도를 나타낸다. 따라서 형광이 증가하기 시작한 농도를 시료의 임계 미셀 농도(CMC)로 판단할 수 있다. 상기 CMC는 형광 상수 범위의 데이터 포인트를 연결하는 직선과 형광 증가 범위의 데이터 포인트를 연결하는 직선의 교차점에 있는 농도에 해당한다. 두 직선의 교점을 이용하여 얻은 CMC는 PEI/PTA(3/7) 용액의 H_2O_2 농도가 0mM, 0.5mM, 1mM일 때 각각 약 4.70mg/mL, 6.59mg/mL, 9.40mg/mL인 것으로 확인된다. H_2O_2 농도가 20mM인 경우 형광이 증가하는 범위에 해당하는 데이터 포인트가 1 내지 2개 밖에 없었기 때문에 직선을 그려 분석하는데 어려움이 있었으나 나일 레드의 형광값이 로그(log)값 1과 1.2 사이에서 증가하기 시작하면서 CMC가 10mg/mL에 해당한다는 것을 산출할 수 있었다.
- [0128] 정리하면 PEI/PTA(3/7) 용액에 포함된 H_2O_2 농도가 증가하게 되면 CMC는 증가하게 되며 H_2O_2 농도가 증가함에 따라 PTA의 산화도가 증가하여 비극성이 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 산화 후 미셀이 형성되려면 더 많은 IP(3/7)가 필요할 것으로 판단된다.
- [0130] **2.4. FT-IR 분광기를 통한 PEI/PTA 이온 쌍 및 산화 분석**
- [0131] 도 3의 패널(A)는 본 발명의 PEI, PTA, 건조 PEI/PTA(3/7)의 FT-IR 스펙트럼 결과를 보여준다. PEI의 아미노기는 $3300cm^{-1}$ 부근에서 강하고 넓은 피크로 확인되었으며 PTA 카르복실기의 카르보닐기는 $1700cm^{-1}$ 부근에서 강하고 날카로운 피크로 확인되었다. PEI/PTA(3/7)의 스펙트럼에서는 아미노기의 신호가 거의 사라졌으며 카르복실기의 카르보닐기 신호 또한 그 강도가 현저히 낮아진 것이 확인되었으며 카르복실산염(COO^-)의 신호가 1573 내지 $1406cm^{-1}$ 부근에서 나타난 것으로 확인되었다. 상기 결과는 PEI의 아미노기와 PTA의 카르복실기가 이온화 되었다는 것을 의미하며 PEI가 PTA와 상호 작용하여 이온쌍을 형성할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0132] 도 3의 패널(B)는 PEI/PTA(3/7)(5mM H_2O_2)와 PEI/PTA(3/7)(5mM H_2O_2)의 FT-IR 스펙트럼을 보여준다. H_2O_2 처리로 인해 형성된 설폭사이드(sulfoxide)는 $1034cm^{-1}$ 에서 확인되며, 설폰(sulfone)은 $1271cm^{-1}$ 에서 발견되는데 이는 PTA가 H_2O_2 에 의해 쉽게 산화된다는 것을 의미한다.
- [0134] **2.5. 수소핵자기공명분광법을 통한 PEI/PTA 이온쌍 분석**
- [0135] 도 4의 패널(A)는 본 발명의 PEI/PTA(a/b) 용액의 수소핵자기공명 스펙트럼을 보여준다. PTA의 방향족 양성자(proton)는 7.42ppm에서 7.27ppm으로 상향 이동하였고 메틸렌 양성자(methylene proton)는 3.75ppm에서 3.65ppm으로 상향 이동하는 것이 확인된다. PTA 함량이 증가함에 따라 피크의 상향 이동 및 폭 변화가 더 분명해졌는데 이는 PTA의 폐닐기 사이에 강한 소수성 상호작용이 일어났다는 것을 의미한다. 또한 PEI의 양성자가 2.65ppm에서 3.08ppm으로 하향 이동한 것이 관찰되었는데 이는 PEI와 PTA의 이온 상호 작용과 PTA 분자 간의 소수성 상호 작용 때문인 것으로 판단된다.
- [0137] **2.6. 온도 및 산화 반응 방출 분석**
- [0138] 도 5의 패널(A)는 25.5℃ 조건에서 본 발명의 IPSAM(3/7)에 탑재된 나일 레드가 방출된 프로파일을 보여준다.
- [0139] H_2O_2 농도가 0mM인 IPSAM(3/7)의 경우 나일 레드의 방출율은 거의 0%이었다. PEI/PTA(3/7) 용액에서 IP(3/7)의 UCST는 H_2O_2 농도가 0mM인 경우 약 37℃인 것으로 확인되었다(도 1의 패널(B) 참조). 따라서 상기 실험 조건은 UCST보다 훨씬 낮은 온도인 25.5℃이므로 IPSAM(3/7)은 무결성이 유지되어 나일 레드가 전혀 방출되지 않는 것으로 판단된다. 또한 상기 IPSAM(3/7)은 온도 25.5℃의 경우 모든 H_2O_2 농도 조건에서 탑재물의 방출이 거의 없는 것으로 확인되었다.

- [0140] 도 5의 패널(B)는 37℃ 조건에서 본 발명의 IPSAM(3/7)에 탑재된 나일 레드가 방출되는 프로파일을 보여준다. H₂O₂ 농도가 0mM인 경우 처음 2시간 동안 약 9.6%가 방출되었으며 그 이후에는 나일 레드의 방출이 거의 일정하게 유지되는 것이 확인되었다. PEI/PTA(3/7) 용액(0mM H₂O₂)에서 IP(3/7)의 UCST는 약 37℃였다(도 1의 패널(B) 참조). 따라서 H₂O₂ 농도가 0mM인 조건이라 하여도 37℃에서는 IPSAM(3/7)이 어느 정도 분해되어 상당한 방출이 발생하게 되는데 이는 실험 온도가 UCST(약 37℃)와 거의 동일하기 때문으로 판단된다.
- [0141] H₂O₂ 농도가 0.5mM인 IPSAM(3/7)의 경우 방출정도는 H₂O₂ 농도 0mM에서와 같이 시간 경과에 따라 포화 방식으로 증가하는 것이 확인되었다. 그러나 최대 방출율은 약 30.4%로 0mM에서 관찰된 것보다 약 20% 더 높았다. IP(3/7)의 UCST는 0.5mM에서 약 33℃로 나타났으며, 방출배지(37℃)의 온도는 UCST보다 높았다(도 1의 패널(B) 참조). 실제로, H₂O₂ 농도가 0.5mM인 경우 37℃의 광학 밀도는 약 45% 감소하여 IPSAM(3/7)이 상당히 분해된 것으로 확인되었다(도 1의 패널(B) 참조).
- [0142] 광학 밀도는 IPSAM(3/7)의 양에 비례해야 하며 방출율은 광학 밀도의 감소 정도와 밀접한 관련이 있다. 상기 방출율은 H₂O₂ 농도와 비례하여 증가하는 것으로 판단된다.
- [0143] 예를 들어, H₂O₂ 농도가 1mM 및 5mM인 경우 최대 방출율은 각각 54.4% 및 69.9%인 것으로 확인되었다. UCST는 H₂O₂ 농도가 증가함에 따라 감소하므로 IPSAM(3/7)은 H₂O₂ 농도에 비례하여 산화 유도 분해가 증가할 것으로 판단된다. 실제로 H₂O₂ 농도가 1 및 5mM인 경우 37℃에서 광학 밀도는 각각 약 72% 및 89% 감소했다.
- [0144] 도 5의 패널(A)는 43℃ 조건에서 본 발명의 IPSAM(3/7)에 탑재된 나일 레드 방출되는 프로파일을 보여준다.
- [0145] 43℃에서 관찰된 나일 레드의 방출율은 37℃에서 관찰된 것과 유사하게 시간이 경과함에 따라 포화 방식으로 증가하였으며 H₂O₂ 농도에 비례하여 증가하였다. 예를 들어, H₂O₂ 농도가 0mM, 0.5mM, 1mM 및 5mM인 경우 방출율은 각각 약 50.4%, 72%, 88% 및 92%였다. 상기에서 설명한 바와 같이 IPSAM은 H₂O₂ 농도가 증가함에 따라 UCST가 감소하기 때문에 더 높은 H₂O₂ 농도에서 더 쉽게 산화-유도 분해를 받게 될 것으로 판단된다(도 1의 패널(B) 참조). 모든 H₂O₂ 농도에서 탑재물의 방출은 43℃>37℃>25.5℃의 순서로 광범위한 것으로 확인되었다.
- [0146] IPSAM(3/7)은 IP(3/7)의 UCST 거동으로 인하여 온도가 높을수록 더 쉽게 분해될 가능성이 있다. 실제로 상기 광학 밀도는 H₂O₂ 농도가 0mM, 0.5mM, 1mM, 및 5mM일 때 각각 약 62%, 89%, 96%, 및 99%만큼 감소하였는데 이는 IPSAM(3/7)이 43℃ 보다 더 낮은 온도에서 쉽게 용해된다는 것을 의미한다.
- [0147] 상기 결과는 온도 상승으로 인해 탑재물의 방출이 촉진된 이유를 설명해 준다. 체온조건인 경우 상기 방출은 H₂O₂ 농도에 반응하여 수행된다. 그러나 IPSAM(3/7)에 탑재된 탑재물의 H₂O₂ 농도에 대한 방출 민감성은 생체 내에서 작동할 만큼 높지 않은 것으로 판단되는데 그 이유는 생체내에서 산화를 유도할 수 있는 산화제의 양이 방출을 유도하는 최소 H₂O₂ 농도인 약 0.5mM 수분보다 훨씬 낮기 때문이다.
- [0148] 본 발명의 결과에 따르면 상기 탑재물의 방출은 산화 반응을 이용하기 보다는 온도 반응을 이용하는 것이 보다 나은 것으로 판단되는데 그 이유는 근적외선과 같은 외부 자극을 통해 IPSAM(3/7) 주변의 온도를 쉽게 증가시킬 수 있기 때문이다.
- [0149] 본 발명에서는 상기 IPSAM(3/7)에 금나노입자를 도입하였다. 또한 PEI를 염산화하여 IPSAM이 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 암 세포에 침투 할 수 있도록 하였다.
- [0151] **2.7. 염산화 PEI의 수소핵자기공명 분석**
- [0152] 염산화 PEI의 수소핵자기공명 스펙트럼을 분석하였다. 분석결과 PEI의 에틸렌기는 2.40 내지 2.85ppm사이에서 확인되며, 염산의 신호와 관련하여 아미드 결합 부근의 메틸렌 양성자는 2.05 및 2.15ppm에서 발견되며, 2차 아미노기에 인접한 메틸렌 양성자는 4.3ppm에서 확인되며, 카복실기 부근의 메틴 양성자는 4.6ppm에서 확인되며, 페닐 양성자는 6.83 및 7.73 ppm에서 확인되며, 아미드 양성자는 8.5ppm에서 확인되며 1차 아미노기의 양성자는 8.6ppm에서 확인되었다.
- [0153] PEI의 에틸렌 양성자 및 염산의 메틴 양성자 피크의 적분값을 이용하여 PEI의 에틸렌 이민 단위에 대한 염산의 몰비를 계산한 결과 1:0.022인 것으로 확인되었다. PEI에 도입된 염산에 대한 PEI의 몰비는 약 1:0.92인 것으로

확인되었는데 이는 PEI의 평균 분자량이 1,800이기 때문에 판단된다.

2.8. 투과 전자 현미경 분석결과

도 6은 본 발명의 IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7) 및 염산화 IPSAM(3/7)/GNP의 투과전자현미경 결과를 보여준다.

IPSAM(3/7)은 거의 원형에 가까운 형태인 것으로 확인되었으며 직경은 30 내지 40nm인 것으로 확인되었다. 본 발명의 IP(3/7)는 양친매성 및 표면 활성을 가지며 엔트로피 구동 프로세스에 의해 수용액에서 구형 미셀로 자가 조립된다. 염산화 IPSAM(3/7)은 IPSAM(3/7)와 모양과 크기가 유사한 것으로 확인되었으며 PEI의 2%만이 염산화되어 물성 변화가 거의 없는 것으로 확인되었다.

금나노입자(GNP)는 작고 검은 점으로 확인된다(도 6의 패널(C) 및 (D) 참조). 금 이온은 환원제에 의해 GNP로 환원될 수 있다. 본 발명의 PEI 아미노기의 질소 원자의 경우 고립 전자쌍을 가지므로 PEI에 대한 환원제로 작용할 수 있다 따라서 실험을 위한 추가적인 환원제를 첨가할 필요가 없었다. GNP는 직경이 9nm 미만이었으며 대부분 IPSAM에 결합되어 있는 것으로 확인되었다. 고해상도 투과전자현미경 분석결과 격자 간격은 0.24nm인 것으로 확인되었으며 입자의 SAED 패턴에서 감지된 날카로운 회절 반점이 확인된 것으로 보아 GNP의 순수한 결정질 특성을 보이는 것으로 판단되었다.

GNP는 고립전자쌍을 갖는 화합물과 배위결합을 가질 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 상기 GNP는 PEI의 질소 원자 고립 전자쌍으로 인해 PEI와의 배위 결합을 하는 방법으로 IPSAM에 결합되는 것으로 판단된다.

2.9. 염산화 IPSAM/GNP의 탑재

DMF에 용해된 DOX의 보정은 하기의 방정식과 같다: $Y=1050.5X+20.4(R^2=0.9998)$.

상기 X는 DOX 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)를 의미하고 상기 Y는 형광 강도를 의미한다. IPSAM(3/7)에 탑재된 DOX의 양은 IPSAM 현탁액에 첨가된 DOX의 약 91%였으며 특정 탑재는 0.455%인 것으로 산출되었다. IPSAM는 PEI와 PTA가 PEI(1.97 mgPEI/mL):PTA(18.03mgPTA/mL)=1:9.16의 질량비로 포함되어 있으므로 일종의 소수성 코어-풍부 마이셀로 구분할 수 있다. 본 발명에서는 DOX:PTA=1:91.6의 질량비가 되도록 IPSAM 현탁액에 DOX를 첨가하여 탑재시켰으며 상기 DOX는 주로 PTA로 구성된 코어에 쉽게 탑재되는 것으로 판단된다.

2.10. 제타 전위 측정

IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7), 염산화 IPSAM(3/7)/DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 및 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP의 제타 전위는 각각 +49.3mV, +49.7mV, +46.5mV, +21.2mV, 및 +24.3mV인 것으로 확인되었다. IPSAM에 포함된 PEI 사슬은 양전하를 띠며 극성을 가져 수성 벌크상으로 향할 가능성이 있다. 양이온성 고분자 사슬은 표면 전위에 많은 영향을 미치며 결과적으로 강한 양의 제타 전위를 보이게 된다. 염산화 IPSAM(3/7)의 제타 전위는 IPSAM(3/7)의 제타 전위와 매우 유사한 것으로 호가인되었다. 핵자기공명분석법에 따르면 PEI 1분자(molecule)에는 염산 1분자(molecule)가 부착된 것으로 확인되었다. 염산화 PEI를 IPSAM에 도입한 결과 PEI+염산 PEI의 총합량이 IPSAM 질량의 2%(w/w) 수준에 불과한 것으로 확인되었다. 추가적으로 염산화 PEI의 염산 잔기는 아미노기를 포함하는 것으로 확인되었는데 이는 염산 PEI가 IPSAM의 제타 전위에 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 염산화 IPSAM(3/7)/DOX의 제타 전위는 염산화 IPSAM(3/7)보다 약간 낮은 것으로 확인되었다.

DOX는 양이온성 항암제이며 IPSAM에는 적은 양이 탑재된다. 상세하게는 IPSAM에 특정 탑재된 DOX의 함량은 0.455%에 불과하다. 따라서 상기 탑재된 DOX는 양으로 하전된 IPSAM의 제타 전위에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

염산화 IPSAM(3/7)/GNP의 제타 전위는 염산화 IPSAM(3/7)보다 훨씬 낮은 것으로 확인되었다. GNP는 음전하를 띤 나노입자로서 IPSAM의 양전하를 중화하므로 제타 전위를 감소시키게 된다. 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP의 제타 전위는 염산화 IPSAM(3/7)/GNP보다 약간 높았는데, 이는 아마도 양전하를 가지는 DOX가 탑재되었기 때문에 판단된다.

2.11. 근적외선 유도 방출 분석

도 7의 패널(A)는 본 발명의 IPSAM(3/7)에 대한 근적외선 조사에 따른 현탁액의 온도 변화 프로파일을 보여준다.

- [0172] GNP가 포함되지 않은 IPSAM(IPSAM(3/7))에 근적외선을 조사한 경우 현탁액의 온도가 13분 만에 25℃에서 약 34℃로 증가했으며 그 이후에는 유의한 증가가 없었다. 빛 에너지는 분산되어 서스펜션 온도를 높이는 것으로 판단된다. IPSAM(3/7)/GNP에 근적외선을 조사한 경우 현탁액의 온도는 33분 만에 48℃까지 상승하였으며 그 이후에는 유의한 증가가 없었다. 상기 GNP는 근적외선이 조사되면 표면 플라즈몬 공명을 일으켜 열을 발생시킨다. 이에 반하여 근적외선이 조사되지 않은 경우 GNP의 포함과 상관없이 현탁액의 온도가 변하지 않았다.
- [0173] 도 7의 패널(B)는 본 발명의 근적외선 조사로 인한 IPSAM(3/7)에 탑재된 나일 레드의 방출 프로파일을 보여준다.
- [0174] 근적외선 조사 없는 경우 GNP의 포함여부와 상관없이 1시간동안 IPSAM의 나일레드 방출이 확인되지 않았다. 이에 반하여 근적외선이 조사되는 경우 GNP가 포함되지 않은 IPSAM은 처음 10분 동안 유의미한 나일 레드 방출을 보이지 않았으나 40분 및 60분 후 각각 5%, 및 7.5%의 나일 레드 방출율을 보였다. 근적외선 조사하에서 GNP가 없는 IPSAM 현탁액에 근적외선을 조사하게 되면 현탁액의 온도는 최초 10분 동안은 33℃로 증가한다. 그러나 상기 10분의 시간만으로는 충분한 방출이 일어나지 않았다. 15분간 근적외선을 조사하게 되면 온도가 최대 34℃에 도달하였으며 그 이후에는 변화하지 않았다(도 7의 패널(A) 참조). 25 내지 35℃ 범위에서 PSAM 현탁액의 광학 밀도는 온도 증가에 따라 약간의 감소만을 보였다(도 1의 패널(A) 참조). 상기 IPSAM의 부분적 분해는 10분 근적외선 조사 후 발생한 탑재물의 방출을 설명해 준다.
- [0175] IPSAM(3/7)/GNP는 근적외선이 조사되면 탑재물의 방출율(%)이 급격히 향상된다. 상세하게는 근적외선 조사 후 최초 5분 동안 IPSAM(3/7)/GNP의 방출율은 약 0.5% 증가하였으며 그 이후 상당히 증가하여 60분에는 방출율이 약 32%까지 급격히 증가하는 것으로 확인되었다. IPSAM(3/7)/GNP 현탁액의 온도는 근적외선 조사 5분만에 약 37℃로 높아졌으며, 10분후에는 약 43℃로 높아졌으며 그 후 더 높아져 최대온도인 48℃에 도달하였다(도 7의 패널(A) 참조).
- [0176] IPSAM(3/7)/GNP 현탁액 온도는 근적외선 조사 5분 만에 IP(3/7)의 UCST인 37℃에 도달하였으나 탑재물을 방출은 시간이 더 오래 걸렸다(도 7의 패널(A) 및 도 5 참조). 상기 결과는 IPSAM(3/7)의 방출율이 최초 5분 동안 매우 낮았던 이유를 설명하여 준다(도 7의 패널(B) 참조). 정리하면 IPSAM(3/7)의 탑재물 방출율은 온도에 비례하므로 근적외선을 조사하여 온도가 증가하게 되면 방출율의 향상이 가속화된다.
- [0178] **2.12. In-vitro 항암 효능 분석**
- [0179] 도 8은 본 발명의 염산화 IPSAM(3/7), 유리 DOX(free DOX), 염산화 IPSAM(3/7)/DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/GNP 및 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP의 근적외선 조사에 따른 in vitro KB 세포 활성 변화를 보여준다.
- [0180] 염산화 IPSAM(3/7)은 근적외선 조사에 관계없이 암세포(KB 세포)의 생존율에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 상기 결과는 염산화 IPSAM 또는 근적외선 조사가 암세포의 활성에 아무런 영향을 주지 않은 것을 의미한다. 항암제로 잘 알려진 유리 DOX(free DOX)는 암세포 성장 억제에 상당한 효능을 보였으나, 근적외선 조사에 따른 항암 효과의 차이는 보이지 않았다. 염산화 IPSAM(3/7)/DOX는 유리 DOX보다 더 높은 암세포 성장 억제 효능을 보였다. 염산 수용체는 암세포(KB 세포)에서 과발현되는 것으로 알려져 있다. 따라서 염산이 도입된 IPSAM은 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 암세포로 쉽게 침투될 수 있다. 상기 결과는 염산화 IPSAM(3/7)/DOX는 유리 DOX보다 더 높은 암세포 성장 억제 효능을 보이는 이유를 설명해 준다. 염산화 IPSAM(3/7)과 유리 DOX의 항암 효과와 마찬가지로 염산화 IPSAM(3/7)/DOX 또한 근적외선 조사에 의해 암세포 성장 억제효과가 거의 영향 받지 않았다.
- [0181] 한편, 염산화 IPSAM(3/7)/GNP는 근적외선 조사가 없는 경우 세포 생존율에 거의 영향을 미치지 않았지만, 근적외선 조사에서는 세포 성장을 유의하게 억제하였다. GNP는 근적외선을 흡수하고 표면 플라즈몬 공명을 통해 열로 발산 할 수 있다. 상기 GNP에 의해 생성된 열은 세포 성장을 억제할 수 있다. 염산화 IPSAM(3/7)/DOX와 마찬가지로 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP는 DOX의 항암 특성으로 인해 암세포 성장을 억제하는 데 상당한 효능을 나타내는 것으로 확인되었다. 근적외선을 조사하며 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP를 처리한 경우 암세포의 활성이 현저하게 감소한 것으로 확인된다. 정리하면 본 발명의 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP는 근적외선이 조사된 조건에서 광열효과(photothermal effect)에 의해 세포 성장을 억제하는 효과가 있을 뿐 아니라 상기 열로 인해 IPSAM가 분해되고 이로 인해 탑재물인 DOX이 방출되어 암세포의 활성을 저하시키는 것이다.
- [0183] **2.13. DOX가 탑재된 염산화 IPSAM과 암세포의 상호작용**
- [0184] 도 9는 본 발명의 유리 DOX, 염산화 IPSAM(3/7)/DOX 및 염산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP로 처리한 KB 세포에 대한

유세포 분석 결과를 보여준다.

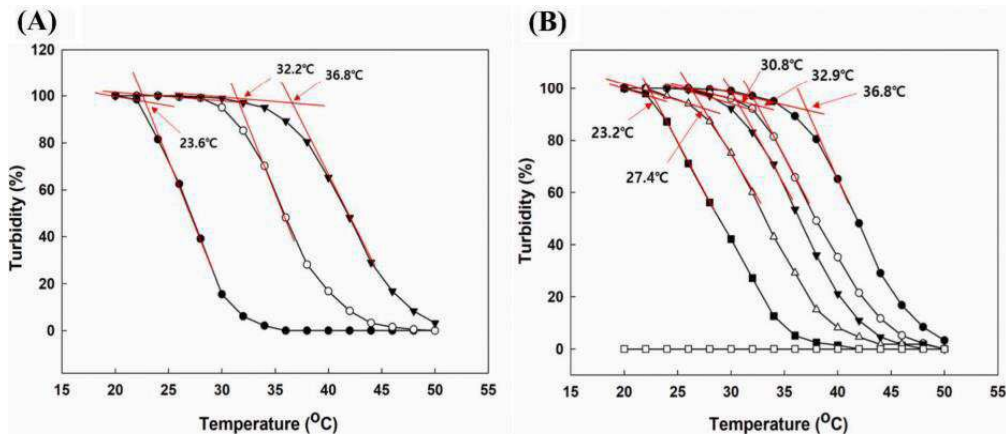
- [0185] 유리 DOX를 처리한 KB 세포는 상대적으로 낮은 형광 강도(GMFI=364.3)를 보이는 것으로 확인되었으며 상기 형광은 DOX에 의한 것이므로 항암제(DOX)가 세포내로 전달된 것으로 판단된다.
- [0186] 상기 유리 DOX의 전달은 단순 확산에 의한 것으로 판단된다. 이에 반하여 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX로 처리된 암세포의 경우 유리 DOX(GMFI=364.3)로 처리된 암세포보다 훨씬 강한 형광 강도(GMFI=1701.3)를 보였다. 엽산 수용체는 KB 세포에서 과발현되는 것으로 알려져 있다. 따라서 엽산 수용체를 매개로 한 엔도사이토시스에 의해 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX가 KB 세포 내로 내부화되어 강한 형광 강도를 발생시키는 것으로 판단된다. 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP로 처리된 KB 세포 또한 리간드-수용체 상호작용 및 수용체 매개 엔도사이토시스에 의해 강한 형광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0187] 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP로 처리한 KB 세포의 GMFI는 1403.9로 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX로 처리한 KB 세포(GMFI=1701.3)보다 다소 낮았는데 이는 DOX 형광의 일부가 GNP에 의해 흡수되었기 때문으로 판단된다.
- [0188] 수용체 매개 엔도사이토시스에 더하여, IPSAM과 암세포 사이의 정전기적 상호작용은 세포 내로 나노입자의 내재화를 촉진할 것으로 판단된다. 상세하게는 IPSAM의 양의 제타 전위(엽산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP=+24.3mV, 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX=+46.5mV)는 정전기적 상호작용을 통해 IPSAM의 정착 및 세포 내로의 진입을 촉진할 수 있는 것으로 판단된다.
- [0189] 유세포 분석 결과에 따르면 엽산 나노입자에 의해 암세포로 전달되는 DOX의 양은 유리 DOX보다 훨씬 많은 것으로 확인되었다. 상기 결과는 엽산화 IPSAM에 로딩된 DOX가 유리 DOX보다 더 높은 항암 효능을 나타내는 이유를 설명해준다(도 8 참조).
- [0190] 도 10은 본 발명의 유리 DOX, 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX, 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP를 처리한 KB 세포의 공초점 레이저 주사 현미경(CLSM) 이미지를 보여준다.
- [0191] DAPI로 염색된 핵은 10mM PBS(pH 7.4)를 처리한 KB 세포의 영상에서 파란색으로 확인된다. DOX 형광은 적색으로 표시되는데 DOX 형광은 핵 주변뿐만 아니라 핵내에서도 발견되었다. 상기 결과는 DOX가 세포에 의해 흡수된 후 핵으로 전달되어 DNA 가닥의 이중 나선에 삽입되었다는 것을 의미하며 이로 인해 단백질의 생합성이 억제되어 암세포의 사멸이 유도되었다는 것을 의미한다.
- [0192] 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX로 처리한 암세포의 DOX 형광 강도는 유리 DOX로 처리한 암세포보다 훨씬 강한 것으로 확인되었다. 본 발명의 엽산화는 엔도사이토시스를 통한 DOX 형광의 강도 향상에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP로 처리한 암세포는 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX로 처리한 암세포와 유사한 수준의 강한 DOX 형광을 나타냈다. IPSAM에 엽산과 같은 리간드를 도입하게 되면 수용체 매개 엔도사이토시스를 유도하여 상기 IPSAM을 쉽게 암세포 내부로 침투시킬 수 있게 된다. 추가적으로 수용체 매개 엔도사이토시스와 함께 IPSAM과 암세포 사이의 정전기적 상호작용 또한 IPSAM의 엔도사이토시스를 촉진한 것으로 판단된다.
- [0193] 본 발명의 FACS 분석결과 및 CLSM 분석결과는 본 발명의 in vitro 항암 효능 분석결과(도 8 참조)의 결과와 잘 일치하였는데 이는 DOX의 세포 흡수가 많을수록 항암 효과가 높다는 것을 의미한다(도 8, 9, 및 10 참조).
- [0194] IPSAM(3/7)은 세포 내에서 산화되면 탑재물을 방출하게 된다. 그러나 세포에 내재된 ROS로는 IPSAM에 탑재된 DOX의 방출을 유도하기에 불충분할 것으로 판단된다. 그 이유는 상기 IPSAM의 산화 민감도가 충분하지 않기 때문이다(도 5 참조). DOX는 세포내에서 산소 자유 라디칼을 생성하는 것으로 알려져 있으며 이는 세포내에 침투한 IPSAM 역시 산화할 수 있을 것으로 판단된다. 상기 결과는 GNP가 포함되지 않았으며 항암제(DOX)가 나노입자에 싸여 있는 IPSAM(엽산화 IPSAM(3/7)/DOX 및 엽산화 IPSAM(3/7)/DOX/GNP)이 세포내에 침투하여 DOX 항암 활성을 발휘할 수 있는 이유를 설명해 준다(도 8 참조).
- [0195] 정리하면 GNP가 포함된 IPSAM(3/7)에 근적외선을 조사하게 되면 온도 상승으로 인해 IPSAM의 분해가 촉진되고 이는 DOX의 방출을 촉진하여 보다 높은 항암 활성으로 이어지게 된다(도 8 참조).
- [0197] **3. 결론**
- [0198] 본 발명의 PEI는 PTA와 이온쌍을 형성할 수 있고 상기 이온쌍은 양친매성 및 표면 활성 특성으로 인해 수용액에서 나노 입자 즉, IPSAM으로 자가 조립될 수 있다.
- [0199] 상기 IPSAM은 UCST 거동을 나타냈으며, 상세하게는 아미노기:카복실기 비율이 3:7인 IPSAM(IPSAM(3/7))의 경우 pH 7.0에서 약 37°C의 UCST를 보였고 H2O2 농도가 증가함에 따라 치료에 사용되는 IPSAM(3/7)의 양이 감소하

였다.

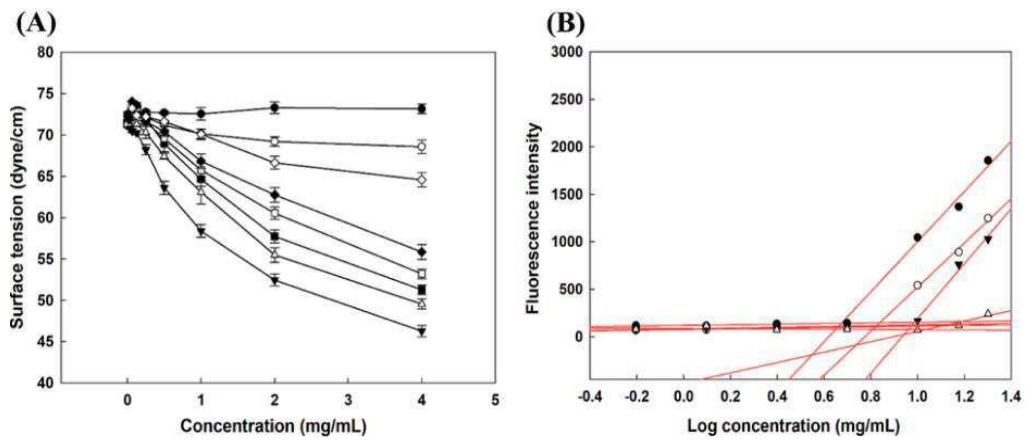
- [0200] 본 발명의 IPSAM은 산화 및 온도에 반응하여 탑재물을 방출하는 특성을 보였다. H_2O_2 농도가 증가함에 따라 탑재물인 나일 레드의 방출율이 현저하게 증가하였다.
- [0201] 본 발명의 IPSAM이 산화되면 이온쌍(IP(3/7))의 계면 활성이 감소하고 CMC가 증가하게 된다. 따라서 IPSAM(3/7)의 UCST는 감소하게 되고 이는 IPSAM의 분해 및 탑재물의 방출로 이어진다.
- [0202] 본 발명의 IPSAM에 열을 가하여 온도가 UCST보다 높아지면 IPSAM은 분해되고 이는 강렬한 탑재물의 방출로 이어진다.
- [0203] GNP를 포함하는 IPSAM에 탑재된 나일 레드는 근적외선 조사에 의해 방출이 급격히 증가하게 된다.
- [0204] GNP의 표면 플라즈몬 공명에 의해 생성된 열은 IPSAM을 분해하고 강화된 방출을 유도할 수 있다.
- [0205] 염산화 IPSAM(3/7)에 로딩된 DOX는 유리 DOX보다 KB 세포에 대한 In vitro 항암 활성이 유의하게 더 높은 것으로 확인되었다.
- [0206] 염산화 IPSAM에 적재된 DOX는 FACS 및 CLSM에 의해 입증된 바와 같이 유리 DOX보다 더 암세포에 내재화되는 비율이 더 높았다.
- [0207] GNP가 포함된 IPSAM에 근적외선을 조사하게 되면 항암 활성이 보다 증가하는데 이는 IPSAM의 분해가 촉진되어 DOX의 방출이 촉진되었기 때문이다.
- [0208] 본 발명의 IPSAM은 처음으로 개발된 약물전달체이며 산화, 열 및 근적외선 조사에 반응하여 탑재물을 방출하는 특징을 가진다.
- [0209] 본 명세서에서 설명된 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현에 또는 예시를 대표하는 의미이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되지는 않는다. 본 발명의 변형과 다른 용도가 본 명세서 특허청구범위에 기재된 발명의 범위로부터 벗어나지 않는다는 것은 당업자에게 명백하다.

도면

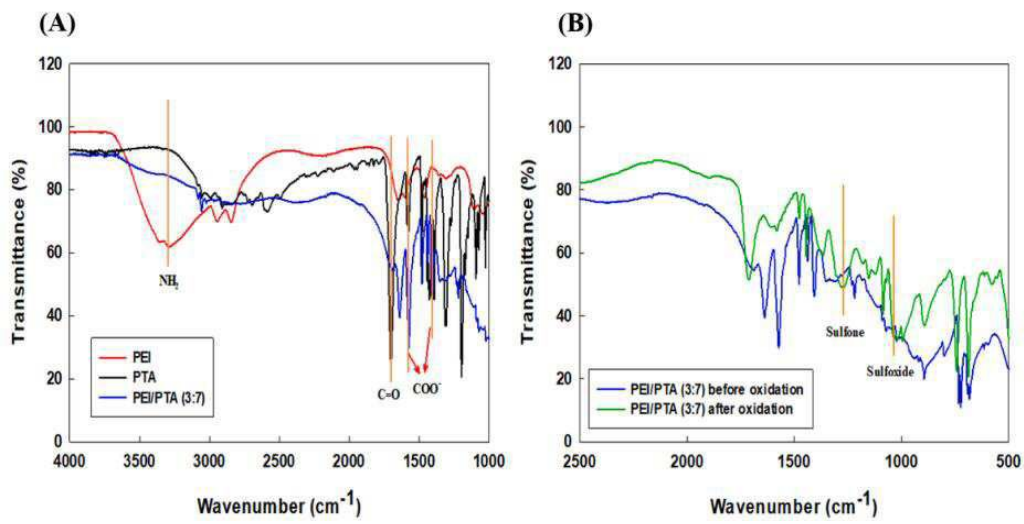
도면1



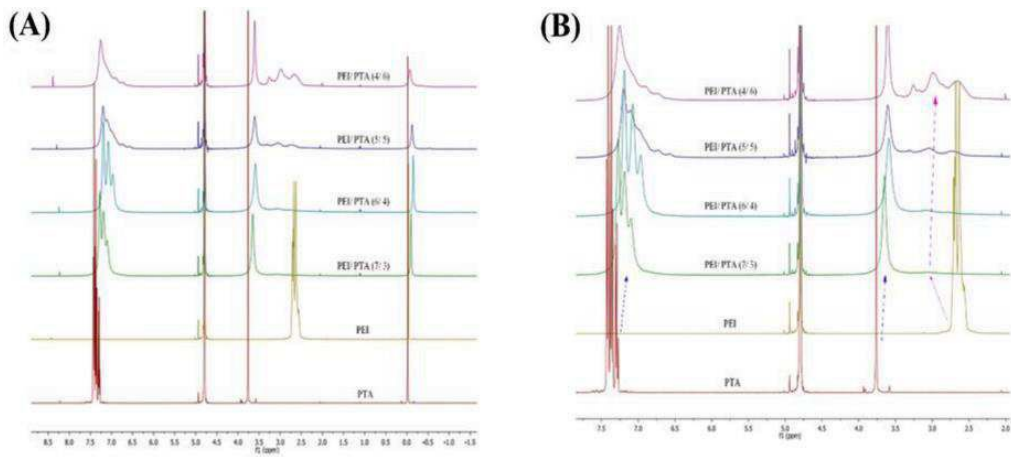
도면2



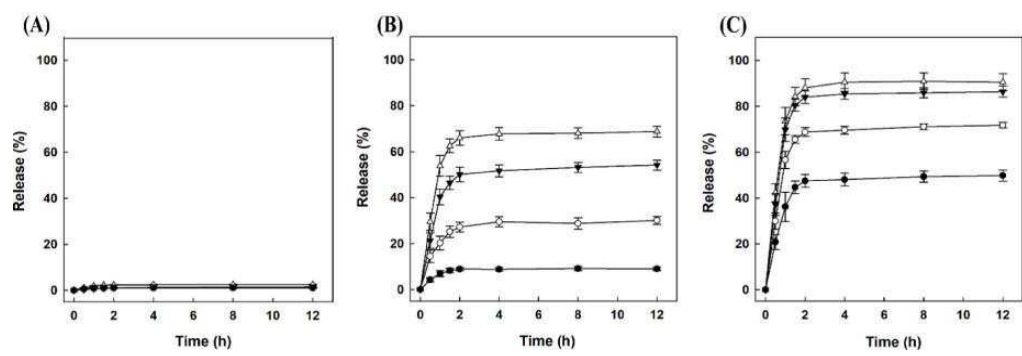
도면3



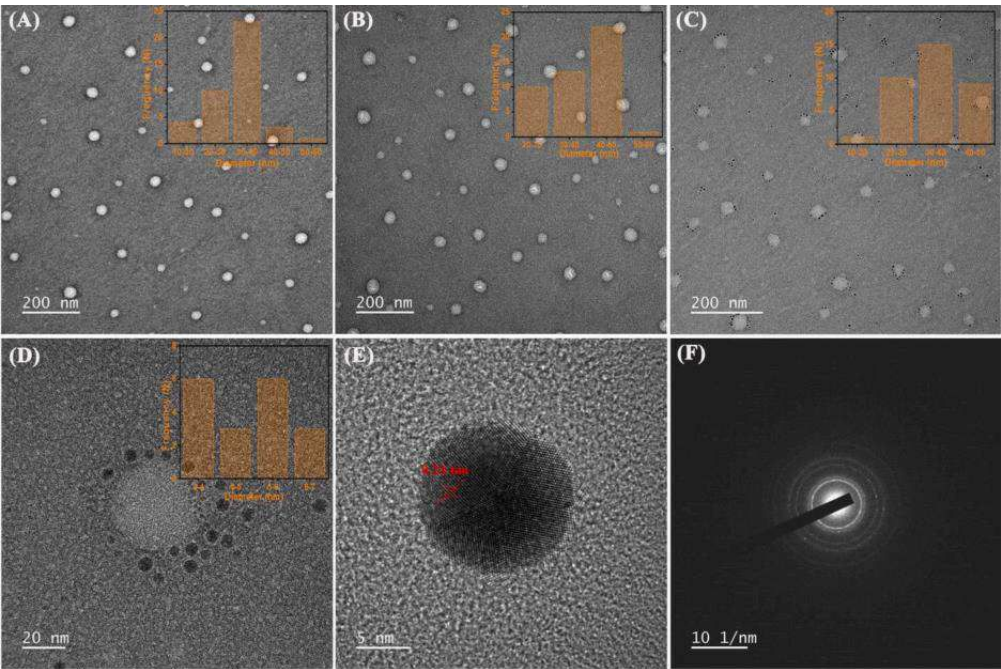
도면4



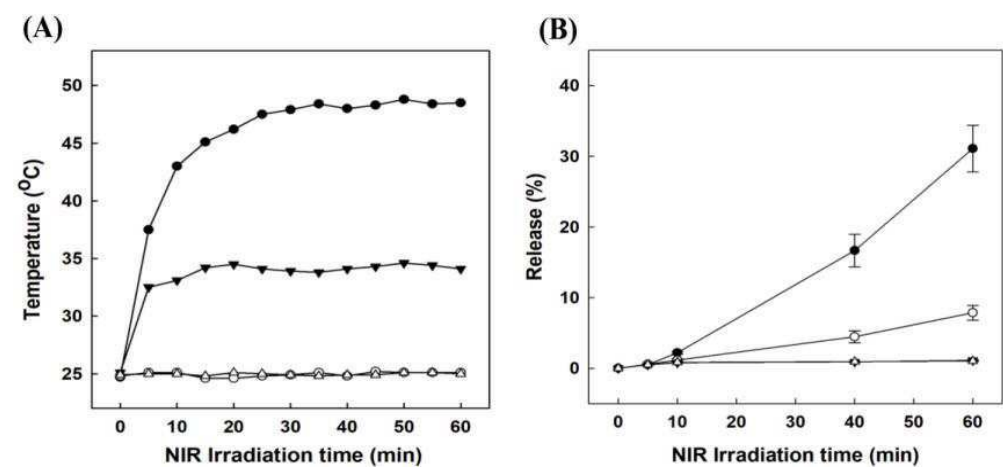
도면5



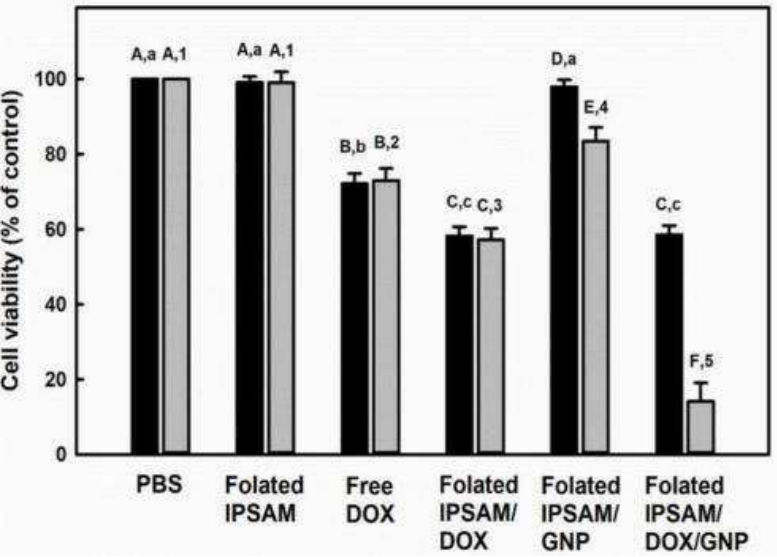
도면6



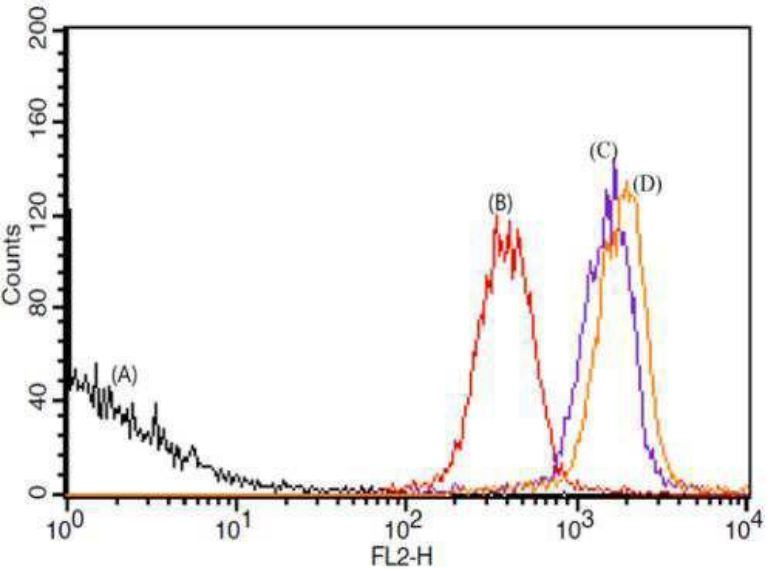
도면7



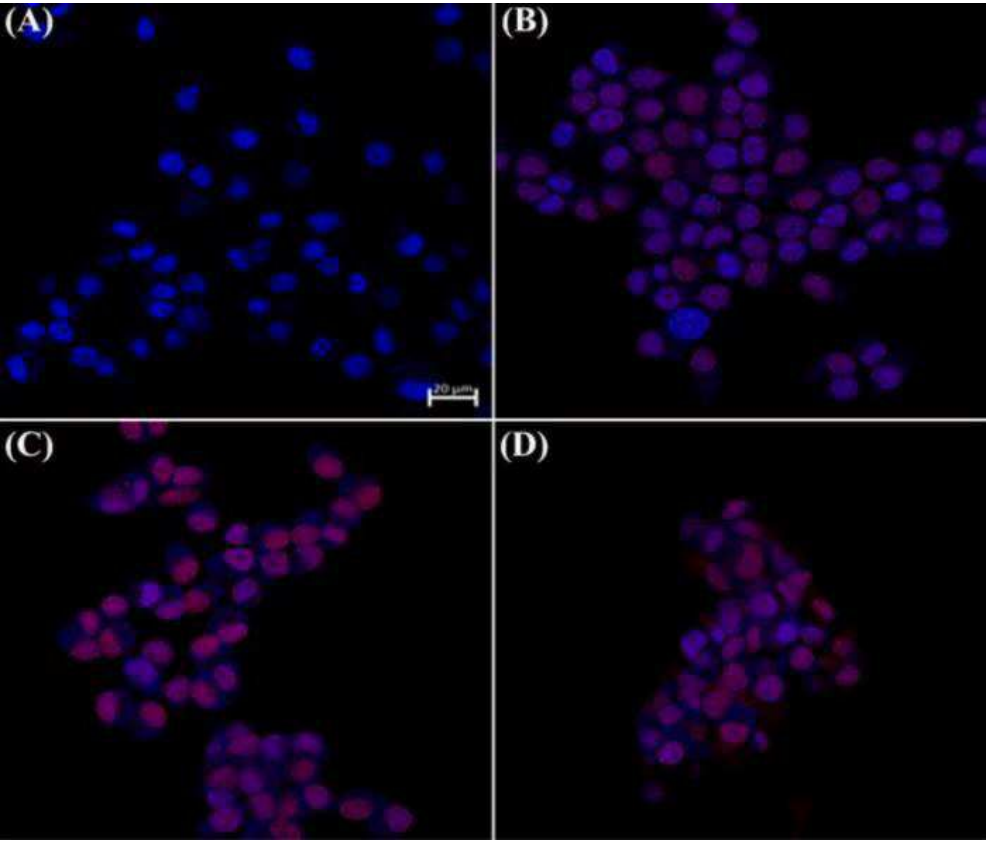
도면8



도면9



도면10



도면11

