



등록특허 10-2245336



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월28일

(11) 등록번호 10-2245336

(24) 등록일자 2021년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/50 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5089 (2013.01)

A61K 9/5021 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0083761

(22) 출원일자 2019년07월11일

심사청구일자 2019년07월11일

(65) 공개번호 10-2020-0006943

(43) 공개일자 2020년01월21일

(30) 우선권주장

1020180080663 2018년07월11일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

W02017074262 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

홍진기

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교

최다희

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교

(74) 대리인

특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 11 항

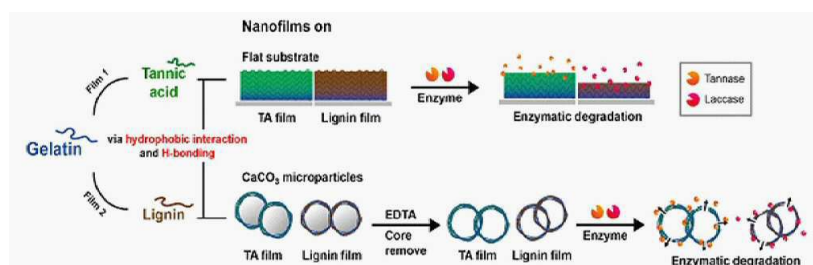
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 효소를 포함하는 약물전달체 키트

(57) 요약

본 발명은 효소를 포함하는 약물전달 키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로 코어 및 코팅층을 포함하는 약물전달체와 상기 코팅층에 대한 분해활성을 가지는 효소를 포함하는 약물전달체 키트를 이용한 약물전달 시스템에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711068692
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	전략공모
연구과제명	피부세포의 노화억제를 위한 산화질소 나노전달체 개발에 관한
연구(2/6)(2017.11.1~2022.10.31)	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

약물을 담지한 코어 및 상기 코어를 둘러싸며 이온성 폴리펩타이드를 포함하는 제1고분자 전해질 및 리그닌을 포함하는 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 코팅층을 포함하는 약물전달체 및 락카아제 효소를 포함하며,

상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질은 정전기적 상호작용 및 소수성 상호작용으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 인력에 의해 복합화되는 것을 특징으로 하는 약물전달체 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락카아제 효소는 상기 약물전달체의 코팅층에 대한 분해활성을 가지는 약물전달체 키트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약물전달체의 코어는 다공성 무기입자를 포함하는 약물전달체 키트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약물전달체의 코어는 속이 빈 중공형 코어를 포함하는 약물전달체 키트.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 약물전달체는 락카아제 효소와 접촉 시, pH 6.5 내지 9의 범위에서는 약물 방출이 억제되고, pH 4 내지 6의 범위에서 약물이 신속히 방출되는 것을 특징으로 하는 약물전달체 키트.

청구항 8

(a) 다공성 무기입자의 표면에 이온성 폴리펩타이드를 포함하는 제1고분자 전해질 및 리그닌을 포함하는 제2고분자 전해질을 교차 적층하여 다층박막 코팅층이 형성된 복합입자를 제조하는 단계; 및

(b) 상기 복합입자로부터 상기 다공성 무기입자를 용해하여 중공형 코어를 형성하는 단계;를 포함하는 중공형 약물전달체의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 다공성 무기입자는 탄산칼슘(CaCO_3)을 포함하는 중공형 약물전달체의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 중공형 약물전달체의 제조방법은 상기 다공성 무기입자의 기공에 약물을 함유시키는 단계를 더 포함하는 중공형 약물전달체의 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 (b) 단계는 상기 복합입자에 킬레이트제를 처리하여 이루어지는 중공형 약물전달체의 제조방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 락카아제 효소는 약물전달체 내에 포함된 것인 약물전달체 키트.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 락카아제 효소는 독립적으로 투여되는 것인 약물전달체 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소를 포함하는 약물전달체 키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로 코어 및 코팅층을 포함하는 약물 전달체와 상기 코팅층에 대한 분해활성을 가지는 효소를 포함하는 약물전달체 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 약물전달 시스템 분야의 연구들은 특정 타겟 영역으로의 효율적이고도 선택적인 약물 방출거동을 나타내는 약물 전달체를 이용하여, 담지된 약물의 조기 누출을 막고, 타겟 영역 외에 다른 조직에 대한 부작용을 방지하는 연구에 집중해왔다.

[0003] 최근 이러한 약물전달체로써, 셀룰로오스, 알지네이트, 겔, 펙틴 등과 같은 식물 유래 고분자를 사용하려는 연구가 시도되고 있다. 상기 식물유래 고분자는 자연에 풍부한 양으로 존재하여 가격경쟁력을 가지며, 세포무독성 및 자연분해능 등의 장점으로 인해 차세대 약물전달체로 각광받고 있다. 일반적으로 식물 세포는 동물 세포와 달리 세포벽이 있기 때문에 팽압 및 삼투압 등의 압력을 견딜 수 있어, 이러한 식물 세포에서 추출된 식물 유래 고분자는 안정성이 매우 높다. 이에 따라 식물 유래 고분자를 물리적 안정성이 요구되는 약물전달체로 사용함으로써 저분자의 화합물부터 고분자의 단백질 약물까지 다양한 약물을 표적 부위까지 안정적으로 전달할 수 있다.

[0004] 한편, 이상적인 약물전달 시스템은 약물의 전달효율을 높임과 동시에 부작용을 낮추는 것이 매우 중요하다. 구체적으로, (1) 약물의 방출을 조절할 수 있어야 하고, (2) 표적 부위까지 약물을 안정하게 전달해야 하고, (3) 표적 부위에 도달하였을 때는 약물을 방출하여 약효가 드러나야 하며, (4) 약물전달체가 세포 독성이 없어야 한다.

[0005] 종래 식물 유래 고분자를 이용한 약물전달체 연구로, 카르복시메틸셀룰로오스 유래의 다층 필름을 제조하고, 이를 화학적으로 개질하는 방법을 통해 다층 필름 내부에 가교를 진행, 이에 따른 구조적, 화학적 변화로 인한 약

물방출의 변화를 확인하였다(S. Park et al., Mol. Pharm. 2017, 14, 3322-3330). 또한, 중국의 Deling Kong 연구진은 알지네이트를 이용하여 나노입자를 제조하고, 입자의 항암효과를 확인하기 위해 내부에 독소루비신을 담지, 빛과 산화-환원반응에 의해 입자 내부에 담지된 약물이 방출되는 연구를 진행하였다(C. Zhang et al., Nanoscale 2017, 9, 3304-3314). 스웨덴 및 덴마크의 연구진들은 세포벽 유래 물질인 셀룰로오스 나노섬유와 펙틴을 이용하여 중공 셀을 제조하고, 염의 농도에 따른 중공 셀의 침투 정도에 따른 약물방출 정도의 조절가능성을 확인하였다(T. Paulraj et al., Biomacromolecules 2017, 18, 1401-1410).

[0006] 하지만 종래 연구들은 식물 유래 고분자 중 셀룰로오스 및 알지네이트 유래 소재들만을 적용하였는데, 이들은 약물전달체에 다양한 특성을 부여하기에 제한이 많으며, 실제 이를 이용하여 약물의 치료 효과를 확인한 예는 극히 드물다.

[0007] 특히, 상기와 같은 식물 유래 고분자를 이용한 약물전달체 경우, 제조방법이 복잡하고, 체내 투입 후에 빛, 산화-환원 반응 또는 염의 농도와 같이 약물방출을 조절할 수 있는 자극을 체내에서 조절하기가 매우 어려운 문제가 있다.

[0008] 이에, 이상적인 약물전달 시스템을 구현하기 위해서는 높은 안정성을 가지고 독성이 없으며, 체내에서 원하는 병변 부위에서 약물이 방출될 수 있는 약물전달 시스템을 설계하는 것이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) S. Park et al., Drug loading and release behavior depending on the induced porosity of chitosan/cellulose multilayer Nanofilms. Molecular Pharmaceutics 2017, Vol.14, No.19, pp.3322-3330

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 종래 식물 유래 고분자를 이용한 약물전달체의 한계점을 극복하고, 스마트한 약물 방출을 구현하는 약물전달체 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 또한 본 발명의 목적은 가격경쟁력이 우수하고 독성이 없으며, 표적 위치까지 안정적으로 약물의 전달이 가능한 약물전달체 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 또한 본 발명의 목적은 높은 약물 담지량을 가지며, 표적 지점에서 효소에 따른 약물의 방출 조절이 가능한 약물전달체 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 또한 본 발명의 다른 목적은 효소에 따른 약물방출 조절이 가능한 중공형 약물전달체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 또한 본 발명의 다른 목적은 약물전달체를 병변 부위로 전달하고 약물을 방출시켜 질병을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 양태에 따른 약물전달체 키트는 코어 및 상기 코어를 둘러싸며 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 코팅층을 포함하는 약물전달체 및 효소를 포함하며, 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질은 정전기적 상호작용 및 소수성 상호작용으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 인력에 의해 복합화되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 일 양태에서, 상기 효소는 상기 약물전달체의 코팅층에 대한 분해활성을 가지는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 양태에서, 상기 약물전달체의 코어는 다공성 무기입자를 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 양태에서, 상기 약물전달체의 코어는 속이 빈 중공형 코어를 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 양태에서, 상기 제1고분자 전해질은 이온성 폴리펩타이드를 포함하고, 제2고분자 전해질은 효소

분해성 페놀계 고분자를 포함하는 것일 수 있다.

- [0020] 본 발명의 일 양태에서, 상기 제2고분자 전해질은 리그닌을 포함하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 양태에서, 상기 약물전달체는 효소와 접촉 시, pH 6.5 내지 9의 범위에서는 약물 방출이 억제되고, pH 4 내지 6의 범위에서 약물이 신속히 방출되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 양태는 (a) 다공성 무기입자의 표면에 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질을 교차 적층하여 다층박막 코팅층이 형성된 복합입자를 제조하는 단계; (b) 상기 복합입자로부터 상기 다공성 무기입자를 용해하여 중공형 코어를 형성하는 단계;를 포함하는 중공형 약물전달체의 제조방법이다.
- [0023] 본 발명의 일 양태에서, 상기 다공성 무기입자는 준금속 탄산화물을 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 양태에서, 상기 중공형 약물전달체의 제조방법은 상기 다공성 무기입자의 기공에 약물을 함유시키는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 양태에서, 상기 (b) 단계는 상기 복합입자에 킬레이트제를 처리하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양태는 코어 및 상기 코어를 둘러싸며 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 코팅층을 포함하며, 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질은 정전기적 상호작용 및 소수성 상호작용으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 인력에 의해 복합화되는 것을 특징으로 하는 약물전달체를 투여하여 병변 부위에 전달하는 단계; 및 상기 약물전달체를 효소로 처리하는 단계;를 포함하는 질병의 치료방법이다.
- [0027] 본 발명의 일 양태에서, 상기 효소는 상기 약물전달체의 코팅층에 대한 분해활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 양태에서, 상기 질병은 암, 염증성 질병, 피부 질병, 대사성 질병에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 따른 약물전달체 키트는 독성이 없으며, 체내에서 높은 안정성을 가지며 병변 부위로 약물을 전달할 수 있어, 약물의 조기 누출을 방지하고 병변 부위 외의 다른 조직에 대한 부작용을 최소화하는 장점이 있다.
- [0030] 또한 본 발명에 따른 약물전달체 키트는 높은 약물 담지량을 가지는 동시에, 약물전달체에 대한 분해활성을 가지는 효소를 이용한 약물의 선택적인 방출이 가능하여 치료효과를 더욱 극대화시킬 수 있는 장점이 있다.
- [0031] 특히, 본 발명에 따른 약물전달체 키트는 약산성 범위에서 분해활성을 가지는 효소를 이용하여 약물전달체로부터 약물을 효과적으로 방출시킬 수 있어, 약산성을 띄는 암세포에 적용하여 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 약물전달체의 제조방법 및 제조된 약물전달체를 효소로 처리하는 과정을 나타낸 도식도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 약물전달체의 형광 및 SEM(Scanning Electron Microscope) 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 약물전달체의 표면전위를 측정한 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 약물전달체의 pH 및 효소에 따른 분해 정도를 나타내는 그래프 및 형광 사진이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 약물전달체 내부에 약물을 함유시킨 후의 형광 사진 및 약물의 방출량을 측정한 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 약물전달체의 세포독성 시험 결과이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 약물의 농도 및 pH에 따른 세포독성 시험 결과이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 약물전달체 키트의 효소 농도 및 pH에 따른 세포독성 시험 결과이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 약물전달체 키트의 항암효과 시험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명을 상세히 설명한다. 다음에 소개되는 도면들은 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명은 이하 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 이하 제시되는 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 명세서에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.
- [0035] 또한 본 발명의 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.
- [0036] 또한 본 발명의 명세서에서 특별한 언급 없이 사용된 단위는 중량을 기준으로 하며, 일 예로 % 또는 비의 단위는 중량% 또는 중량비를 의미한다.
- [0037] 또한 본 발명의 명세서에서 다른 정의가 없는 한, 입자의 평균입경은 입도 분석기를 통해 얻어진 D50을 의미한다.
- [0038] 또한 본 발명의 명세서에서 사용되는 수치 범위는 하한치와 상한치와 그 범위 내에서의 모든 값, 정의되는 범위의 형태와 폭에서 논리적으로 유도되는 증분, 이중 한정된 모든 값 및 서로 다른 형태로 한정된 수치 범위의 상한 및 하한의 모든 가능한 조합을 포함한다. 일례로서 분자량이 100 내지 10,000이고, 구체적으로 500 내지 5,000으로 한정된 경우 500 내지 10,000 또는 100 내지 5,000의 수치범위도 본 발명의 명세서에 기재된 것으로 해석되어야 한다. 본 발명의 명세서에서 특별한 정의가 없는 한 실험 오차 또는 값의 반올림으로 인해 발생할 가능성이 있는 수치범위 외의 값 역시 정의된 수치범위에 포함된다.
- [0039] 또한 본 발명의 명세서에서, “포함한다”는 표현은 “구비한다”, “함유한다”, “가진다” 또는 “특징으로 한다” 등의 표현과 등가의 의미를 가지는 개방형 기재이며, 추가로 열거되어 있지 않은 요소, 재료 또는 공정을 배제하지 않는다. 또한 “실질적으로...로 구성된다”는 표현은 특정된 요소, 재료 또는 공정과 함께 열거되어 있지 않은 다른 요소, 재료 또는 공정이 발명의 적어도 하나의 기본적인 신규한 기술적 사상에 허용할 수 없을 만큼의 현저한 영향을 미치지 않는 양으로 존재할 수 있는 것을 의미한다. 또한 “구성된다”는 표현은 기재된 요소, 재료 또는 공정만이 존재하는 것을 의미한다.
- [0040] 또한 본 발명의 명세서에서 친수성(hydrophilic) 및 소수성(hydrophobic)은 물을 좋아하는 성질 및 물을 싫어하는 성질을 의미하지만, 친수성과 소수성이 동시에 사용될 경우에는 상대적 개념을 의미한다. 구체적인 일례로 히드록실기(-OH)와 알킬기의 경우 히드록실기가 친수성기이며 알킬기가 소수성기를 의미한다.
- [0042] 본 발명은 독성이 없고 체내에서 높은 안정성을 가지며, 약물전달체에 대한 분해활성을 가지는 효소를 이용하여 약물의 방출 조절이 가능한 약물전달체 키트에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명에 따른 약물전달체 키트는 코어 및 상기 코어를 둘러싸며 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 코팅층을 포함하는 약물전달체 및 효소를 포함하며, 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질은 정전기적 상호작용 및 소수성 상호작용으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 인력에 의해 복합화되는 것을 특징으로 한다.
- [0044] 본 발명의 일 양태에서, 상기 약물전달체의 코어는 표면에 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 코팅층을 형성하기 위한 것으로, 바람직하게는 다공성 무기입자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 다공성 무기입자는 복수 개의 1차 무기입자가 응집되어 형성된 2차 무기입자인 것일 수 있으며, 상기 1차 무기입자가 응집되며 무기입자 간 다수의 공극이 형성되어 다공성을 가질 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 다공성 무기입자는 금속 및 준금속의 산화물 또는 탄산화물일 수 있으며, 예를 들면, CaCO_3 , SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 , MgO , Fe_2O_3 , ZrO_2 , SnO_2 , CeO_2 , BaTiO_3 , HfO_2 및 SrTiO_3 에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합 다공성 무기입자일 수 있다. 바람직하게 상기 다공성 무기입자는 준금속 탄산화물을 포함하는 것일 수 있으며, 평균입경은 0.1 내지 100 μm , 구체적으로 1 내지 50 μm , 보다 구체적으로 2 내지 10 μm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0046] 본 발명의 다공성 무기입자로 바람직하게는, 상기 범위의 평균입경을 가지는 다공성 탄산칼슘(CaCO_3)을 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게 다공성 탄산칼슘은 10 nm 내지 500 nm의 직경을 가지는 1차 탄산칼슘 입자가 응집된 2차 탄산칼슘 입자일 수 있다. 상기 다공성 상기 다공성 탄산칼슘(CaCO_3)은 공지의 공침법(co-precipitation method)으로 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 다공성 탄산칼슘(CaCO_3)의 제조방법으로 제한하는 것은 아니나, 구체적인 예를 들면 염화칼슘(CaCl_2) 및 탄산나트륨(Na_2CO_3) 용액을 교반하여 CaCO_3 1차 입자가 응집된 2차 입자를 형성하고, 이를 몇 원심분리, 세척 및 건조하여 다공성의 CaCO_3 입자를 얻을 수 있다. 이 때, 상기 염화칼슘(CaCl_2) 및 탄산나트륨(Na_2CO_3) 용액의 농도 및 교반속도에 따라 다공성 CaCO_3 입자의 입자 크기 및 형태를 조절할 수 있으며, 재결정화를 방지하기 위해 세척 후 동결건조하는 과정을 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 다공성 무기입자를 포함하는 코어는 다수의 기공을 포함함에 따라, 기공 내로 다량의 약물을 함유할 수 있는 동시에, 코어 표면에도 높은 비표면적을 부여함으로써, 코어층 표면에서 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질의 교차 적층을 보다 효과적으로 유도할 수 있다. 이에 따라, 충분한 두께를 갖는 코팅층의 형성이 가능하며, 약물전달체의 코어 내부뿐만 아니라 코팅층에도 약물을 담지할 수 있어 약물의 담지량을 보다 향상시킬 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 양태에 있어, 상기 코팅층의 두께는 1 내지 1,000 nm, 구체적으로 10 내지 500 nm, 보다 구체적으로 20 내지 100 nm인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 범위의 코팅층 두께를 가짐에 따라, 체 내에서 약물전달체가 안정적인 구조로 표적 부위까지 도달할 수 있으며, 높은 약물 담지량을 가질 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 양태에 있어, 상기 약물전달체의 코어는 다공성 무기입자를 용해하여 형성된, 속이 빈 중공형 코어를 포함하는 것일 수 있다. 상기 속이 빈 중공형 코어는 코어 표면에 코팅층을 형성한 후, 공지의 킬레이트제로 처리하여 코어를 제거하여 제조될 수 있다. 상기 속이 빈 중공형 코어의 제조 방법으로서 제한하는 것은 아니나, 구체적으로 예를 들면, 상기 다공성 CaCO_3 입자를 포함하는 코어 표면에 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질을 교차 적층하여 다층박막 코팅층이 형성된 복합입자를 제조한 후, 킬레이트제를 포함하는 수용액으로 상기 복합입자를 처리하여 코어 내 칼슘(Ca^{2+}) 이온을 킬레이트 결합시킴으로써 다공성 CaCO_3 입자를 용해하여 제조할 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 킬레이트제로서 예를 들면 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 및 디에틸렌트리아민펜타아세트산(diethylenetriamine pentaacetic acid, DTPA)에서 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합 킬레이트제일 수 있으나 이에 제한받지 않는다.
- [0051] 본 발명의 일 양태에 따른 약물전달체는 상기의 속이 빈 중공형 코어를 포함함에 따라, 코어 내 약물의 담지량이 현저히 향상될 수 있으며, 담지된 약물은 코팅층에 의해 안정적으로 체내에서 이동이 가능하여 표적 부위로 충분한 양의 약물을 도달시킬 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 양태에 따른 약물전달체의 코팅층은 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 것으로서, 효소에 의해 분해되어 코어 및 코팅층에 담지된 약물을 약물전달체로부터 방출하는 것일 수 있다.
- [0053] 구체적으로, 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질은 서로 다른 전하를 갖는 이온성 고분자일 수 있으며, 선택적으로 분자 내 소수성 잔기를 포함하는 것일 수 있다. 상기의 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질을 코어 표면에 교차하여 적층시킴에 따라, 정전기적 상호작용 및 소수성 상호작용으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 인력에 의해 두 전해질이 복합화되어 코팅층을 형성할 수 있다. 바람직하게, 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질은 서로 다른 전하를 가지는 동시에 분자 내 소수성 잔기를 포함하는 것일 수 있으며, 이 경우 두 전해질 간의 정전기적 상호작용 및 소수성 상호작용에 따른 인력으로 인해 코팅층이 보다 조밀하게 형성될 수 있다. 이에 따라, 효소에 의한 코팅층의 분해가 일어나기 전까지 약물전달체는 체내에서 안정적인 구조를 유지하며 약물의 조기 방출을 현저히 억제시킬 수 있다. 또한, 상기 소수성 잔기에 의해 형성된 코팅층 내의 복수개의 소수성 도메인에 소수성 약물을 효과적으로 담지할 수 있어, 약물의 담지량을 더욱 향상시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0054] 본 발명의 바람직한 일 양태에서, 상기 제1고분자 전해질은 이온성 폴리펩타이드(polypeptide)를 포함하고, 제2

고분자 전해질은 효소 분해성 페놀계 고분자를 포함하는 것일 수 있다.

- [0055] 상기 이온성 폴리펩타이드는 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 물질로서, 구체적으로 예를 들면 젤라틴(gelatin), 콜라겐(collagen), 피브리노겐(fibrinogen), 실크피브로인(silk fibroin), 카세인(casein), 엘라스틴(elastin), 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin) 및 폴리-L-리신(poly-L-lysine)에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있으며, 바람직하게는 젤라틴을 사용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 이온성 폴리펩타이드는 물에서 해리되어 이온성을 띄는 것으로서, 예를 들어 상기 젤라틴을 제1고분자로 사용하는 경우 pH 7 미만, 구체적으로 pH 5 내지 7의 수용액에서 양이온성을 띄며, 음이온성을 띄는 제2고분자 전해질 내 효소 분해성 페놀계 고분자와 정전기적 상호작용을 통한 코팅층을 형성할 수 있다. 반면, pH 7 이상, 구체적으로 7 내지 9의 수용액에서는 젤라틴이 약한 양이온성을 띄는데, 이 경우 젤라틴 분자 내 프롤린(proline) 아미노산 구조와 상기 효소 분해성 페놀계 고분자 간의 소수성 상호작용에 의해 코팅층을 형성할 수 있다.
- [0056] 상기 제2고분자 전해질은 효소에 의해 분해되는 효소 분해성 페놀계 고분자(enzymatically degradable phenolic polymer)를 포함하는 것으로, 약물전달체가 효소와 접촉 시 코팅층 내 효소 분해성 페놀계 고분자가 분해됨에 따라 약물전달체의 코어 및 코팅층 내 담지된 약물을 빠르게 방출시킬 수 있다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 일 양태에서, 상기 제2고분자 전해질은 리그닌(lignin) 또는 탄닌산(tannic acid)을 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 알칼리 처리된 수용성 리그닌을 포함하는 것일 수 있다. 상기 리그닌 및 탄닌산은 식물 유래 고분자로서 자연에 풍부한 양으로 존재하고 저렴한 것은 물론, 환경 친화적이고 인체 안전성이 우수하여 세포독성 없이 안전성이 뛰어난 약물전달체를 제공할 수 있다.
- [0058] 또한, 상기 리그닌 및 탄닌산은 분자 내 히드록시기를 다량 포함함에 따라 상기 양이온성 폴리펩타이드와 정전기적 상호작용에 의한 교차 적층이 효과적으로 수행될 수 있으며, 이를 통해 보다 안정적인 코팅층의 형성이 가능하다.
- [0059] 특히 제2고분자 전해질이 상기 리그닌을 포함하는 경우, 탄닌산 대비 제조되는 약물전달체의 코팅층이 비교적 얇고 균일하게 형성될 뿐만 아니라, 코팅층 형성 후 킬레이트제로 처리하여 속이 빈 중공형 코어를 가지는 약물전달체로 제조 시 코팅층의 구조가 더욱 안정적이며 높은 약물 담지량을 가진다.
- [0060] 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질을 이용하여 코팅층을 형성하는 방법으로서 구체적인 예를 들면, 제1고분자 전해질인 이온성 폴리펩타이드 수용액에 코어를 첨가하여 상기 코어 표면에 제1고분자를 부착시킨 후, 이를 제2고분자 전해질 수용액에 첨가하여 제2고분자를 부착시킴으로써 정전기적 상호작용에 의해 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질이 교차 적층되어 복합화된 약물전달체를 제조할 수 있다. 이 때, 상기 제1고분자 및 제2고분자가 소수성 잔기를 포함하는 경우, 소수성 상호작용에 의해 코팅층이 보다 조밀하게 형성될 수 있어 약물전달체의 구조적 안정성을 더욱 향상시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 또한, 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질을 이용한 교차 적층은 1회 이상, 구체적으로 2 내지 10회 반복 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 교차 적층을 통해 코어 및 상기 코어를 둘러싸는 다층 박막으로 이루어진 코팅층을 포함하는 약물전달체를 제조할 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 제2고분자의 중량평균분자량은 1,000 g/mol 이상, 구체적으로 5,000 내지 1,000,000 g/mol, 보다 구체적으로 10,000 내지 500,000 g/mol일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 범위의 제2고분자를 사용하는 경우, 제1고분자와의 상호작용이 우수하여 더욱 조밀한 코팅층의 형성이 가능하고, 이에 따라 약물전달체가 체내 표적 부위에 도달하기까지 약물의 조기 누출 없이 높은 안정성을 유지하면서 약물을 전달할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 일 양태에서, 상기 효소는 약물전달체 코팅층에 대한 분해활성을 가지는 것으로서, 약물전달체가 표적 부위에 도달 시 이를 효소 처리함에 따라 코팅층의 분해를 유발하여 담지된 약물의 방출을 가능하게 한다. 상기 효소로서 구체적인 예를 들면, 각각 리그닌 및 탄닌산에 분해활성을 가지는 락카아제(laccase) 및 탄나아제(tannase)를 들 수 있으며, 상기 효소는 세포독성이 없고 인체에 무해하다. 구체적으로, 상기 락카아제는 리그닌의 히드록시기를 빠르게 산화시키며, 탄나아제는 탄닌산의 에스테르 결합을 가수분해시켜 갈산(gallic acid) 및 글루코오스(glucose)로 분해한다. 이에 따라, 상기 리그닌 또는 탄닌산을 포함하는 코팅층이 효소에 의해 신속히 분해됨으로써 표적 부위에서의 빠른 약물 방출이 가능하다.
- [0064] 본 발명에 따른 약물전달체 및 효소를 포함하는 약물전달체 키트는 식물 유래 고분자인 리그닌 또는 탄닌산을 사용하여 코어를 둘러싸는 조밀한 코팅층을 형성함에 따라, 약물전달체가 체내에서 자연적으로 분해되지 못하고 표적 부위에 도달하기까지 약물의 누출을 방지하는 효과가 우수하다. 뿐만 아니라, 상기 코팅층에 대한 분해활

성을 가지는 효소를 이용함으로써 약물전달체의 약물 거동을 조절할 수 있다.

- [0065] 종래 EGCG(epigallocatechin gallate)와 같은 저분자 페놀계 물질을 코팅층으로 포함하는 약물전달체의 경우 체 내에서 쉽게 분해됨에 따라 표적 부위에 도달하기 전에 약물이 모두 방출되거나, 표적 부위에 도달하더라도 약물전달체에 자극을 가하기 어려웠다. 그러나 본 발명에 따른 약물전달체 키트는 약물의 빠른 방출(burst effect)을 억제하고, 병변 부위에서 약물 방출의 조절이 어려운 문제점을 해결하며, 효소의 투입을 통한 약물의 방출 조절이 가능한 스마트한 약물 방출을 구현하는 약물전달 시스템을 제공한다.
- [0066] 또한 본 발명에 따른 약물전달체는 저분자 페놀계 물질이 아닌, 상기 범위의 중량평균분자량 범위를 가지는 비교적 고분자량의 효소 분해성 페놀계 물질을 사용함에 따라, 이온성 펩타이드와의 정전기적 상호작용 및 소수성 상호작용이 증대되며, 이를 코어 표면에 교차 적층시켜 다층박막을 형성함으로써 매우 조밀한 코팅층의 형성이 가능하다. 이에 따라, 약물전달체가 표적 부위에 도달하기 전까지 약물 방출을 억제하는 효과가 보다 향상된다.
- [0067] 더욱이, 상기와 같은 식물 유래의 효소 분해성 페놀계 고분자를 사용함에 따라, 약물전달체가 생체 내에서 자발적으로 분해되지 않고 효소 처리 시에만 분해되므로, 표적 부위에 도달하기 전까지는 약물 방출이 이루어지지 않으면서 효소 처리 시에는 상기 효소 분해성 페놀계 고분자가 분해되면서 담지된 약물이 한꺼번에 방출될 수 있어, 치료효과를 극대화시킬 수 있다.
- [0068] 본 발명의 바람직한 일 양태에 따른 약물전달체는 제2고분자 전해질 내 효소 분해성 페놀계 고분자의 종류에 따라, 젤라틴을 포함하는 제1고분자 전해질 및 리그닌을 포함하는 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 코팅층이 코어를 둘러싼 제1양태; 또는 젤라틴을 포함하는 제1고분자 전해질 및 탄닌산을 포함하는 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 코팅층이 코어를 둘러싼 제2양태;일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 일 양태에 따른 약물전달체 키트는 상기 제1양태의 약물전달체 및 락카아제 효소를 포함하는 것으로, 상기 약물전달체가 효소와 접촉 시 pH 6.5 내지 9의 범위에서는 약물 방출이 억제되고, pH 4 내지 6의 범위에서 약물이 신속히 방출되는 것을 특징으로 하는 것이다.
- [0070] 상기 락카아제 효소는 비교적 산성 조건에서 리그닌에 대한 분해활성이 우수하며, 이에 따라 pH 4 내지 6, 구체적으로 pH 4.5 내지 5.5 범위에서 리그닌을 포함하는 코팅층을 분해하고 담지된 약물을 신속히 방출한다. 반면, 비교적 염기성 조건인 pH 6.5 내지 9, 구체적으로 pH 7 내지 8 범위에서는 리그닌에 대한 효소의 분해활성이 낮아 코팅층의 분해 없이 약물전달체가 안정적인 구조를 유지하며, 이에 따라, 약물의 방출이 억제되고 충분한 양의 약물을 표적 부위에 효과적으로 전달할 수 있다.
- [0071] 또한, 상기 제2양태의 약물전달체 및 탄나아제 효소를 포함하는 약물전달체 키트는 상기 제1양태의 약물전달체와 동일하게, 탄나아제 효소와 접촉 시 pH 6.5 내지 9의 범위에서는 약물 방출이 억제되고, pH 4 내지 6의 범위에서 약물이 신속히 방출되는 것을 특징으로 한다. 또한, 제2양태의 약물전달체 내 탄닌산의 경우, pH 7 이상에서 스스로 산화(self-oxidation)되는 특성을 가짐에 따라 상기 pH 범위에서 코팅층이 자체 분해되어 약물을 방출할 수 있다.
- [0072] 상기 효소는 비한정적인 일 예로, 약물전달체 내부에 포함될 수 있다. 약물전달체 내부에 효소가 포함됨으로써 약물전달체가 산성 환경에 노출될 경우 효소가 분해활성을 가지게 되며, 약물전달체의 코팅층의 분해를 유발하여 담지된 약물의 방출을 가능하게 할 수 있다. 다른 비한정적인 일 예로, 상기 효소는 경구 및 비경구 등의 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들면, 경구, 경피, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 예를 들어, 약물전달체 및 효소로 이루어진 약물전달체 키트를 경구 투입하는 경우, 중성 조건을 가지는 구강 내에서는 제1양태의 약물전달체가 안정적인 구조를 유지하며 식도를 통해 위에 도달할 수 있다. 위에 도달한 약물전달체 키트는 산성 조건인 위에서 효소의 분해 활성이 발현됨에 따라 약물전달체의 코팅층이 분해되며 약물을 방출할 수 있다. 상기 약물전달체 키트는 위염 등 위 관련 질병을 치료하는 경구 투여약으로 적용되어 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0073] 또한, 약물전달체 키트의 비경구 투여 방법으로 예를 들어, 정맥 주사를 통해 약물전달체 키트를 체내에 투입하는 경우, 약물전달체가 혈관을 따라 이동하면서 pH 6.5 내지 7인 일반 조직 세포에서는 코팅층의 분해에 따른 약물의 조기 방출 없이 안정적인 구조를 유지할 수 있다. 반면, 상기 약물전달체가 비교적 산성 조건인 pH 5 내지 6의 암 조직 세포에 도달하였을 경우에는 효소의 분해 활성이 발현되면서 코팅층이 분해되어 약물을 신속히 방출할 수 있다. 이를 통해, 암에 표적 지향성을 가지는 약물전달체 키트로 사용되어 암 세포의 선택적인 사멸을 유도하고, 항암제의 부작용을 최소화하는 동시에 암치료 효과를 극대화시킬 수 있다.
- [0074] 이 때, 상기 효소는 약물전달체와 동시에 투입될 수 있고, 또는 약물전달체에 봉입될 수 있으며, 또는 약물전달

체의 투입 후에 투입되는 것일 수 있다. 상기 효소의 생체 이용율을 향상시키기 위해 효소에 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol)을 공유결합, 즉 페길레이션(PEGylation)시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이를 통해 효소의 체내 소실율을 감소시키고 안정성을 높여 질병에 대한 치료를 효과적으로 수행할 수 있다.

[0075] 상기 약물은 친수성, 소수성, 수용성 및 지용성 약물 등을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 저분자 합성 화합물, 저분자 천연 화합물, 펩타이드, 단백질, 항체, 치료용 DNA, SiRNA 또는 상기 약물과 다른 화합물과의 복합체일 수도 있다. 상기 복합체는 저분자 합성 화합물과 부형제와의 혼합물, 저분자 합성 화합물과 고분자와의 물리적 복합체(complex) 또는 화학적 복합체(polymer-drug conjugate), 펩타이드와 합성 고분자와의 정전기적 복합체(polyion complex), 엑소좀에 함유된 단백질, 치료용 DNA와 양이온성 고분자와의 정전기적 복합체(polyion complex) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0076] 또한, 본 발명은 중공형 약물전달체의 제조방법을 제공한다.

[0077] 본 발명에 따른 중공형 약물전달체의 제조방법은, (a) 다공성 무기입자의 표면에 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질을 교차 적층하여 다층박막 코팅층이 형성된 복합입자를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 복합입자로부터 상기 다공성 무기입자를 용해하여 중공형 코어를 형성하는 단계;를 포함한다.

[0078] 상기 (a) 단계는 다공성 무기입자로 이루어진 코어 표면에 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질을 이용하여 코팅층을 형성하는 단계로, 제1고분자 전해질에 다공성 무기입자를 투입하고 혼합하여 상기 다공성 무기입자 표면에 제1고분자를 부착시키는 것일 수 있다. 구체적으로 예를 들어, 다공성 CaCO_3 입자를 코어로 사용하는 경우, 표면이 음전하를 띄는 CaCO_3 입자를 제1고분자 전해질인 젤라틴 수용액에 첨가하고 공지의 셰이커를 사용하여 혼합함으로써, 코어 표면에 양이온성 젤라틴을 부착시킬 수 있다.

[0079] 이어서, 젤라틴이 부착된 코어를 원심분리 및 세척한 후 제2고분자 전해질인 리그닌 또는 탄닌산 수용액에 투입 및 혼합하여 리그닌 또는 탄닌산을 적층시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 리그닌 및 탄닌산 내 히드록시기와 표면에 부착된 젤라틴의 양이온기와 정전기적 상호작용 및 리그닌 및 탄닌산의 페놀기와 젤라틴의 프롤린간의 소수성 상호작용에 의한 복합화를 통해, 젤라틴과 리그닌 또는 탄닌산이 교차 적층된 다층박막의 코팅층을 형성할 수 있다. 이 때, 상기 교차 적층은 1회 이상, 구체적으로 2 내지 10회 반복 수행될 수 있으나, 상기 방법으로 제한되는 것은 아니다.

[0080] 또한, 상기 (a) 단계는 pH를 조절하여 수행되는 것일 수 있으며, 예를 들어 본 발명의 제1양태에 따른 약물전달체의 경우, pH 7 내지 9에서 젤라틴은 전하를 띄지 않고 리그닌은 히드록시기에 따른 약한 음전하를 나타내므로, 상기 pH 범위에서 젤라틴과 리그닌 간의 소수성 상호작용에 의한 복합화를 통해 코팅층을 형성할 수 있다.

[0081] 또한, 본 발명의 제2양태에 따른 약물전달체의 경우, pH 4.5 내지 5.5에서 코팅층 내 젤라틴은 양전하를 띄며, 탄닌산은 음전하를 띄므로, 상기 pH 범위에서 젤라틴과 탄닌산 간의 정전기적 상호작용에 의한 복합화를 통해 코팅층을 형성할 수 있다.

[0082] 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질의 농도는 0.1 내지 10 mg/mL, 구체적으로 0.5 내지 5 mg/mL인 것일 수 있으며, 제조된 복합입자는 다공성 무기입자 100 중량부에 대하여 제1고분자 및 제2고분자를 각각 1 내지 10 중량부, 구체적으로 2 내지 5 중량부 포함하는 것일 수 있으나, 상기 범위로 제한되는 것은 아니다.

[0083] 상기 (b) 단계는 킬레이트제를 이용하여 다공성 무기입자를 용해하여 속이 빈 중공형의 코어로 제조하는 단계로서, 구체적인 예를 들면 킬레이트제를 포함하는 수용액으로 상기 복합입자를 처리하여 CaCO_3 입자 내 칼슘(Ca^{2+}) 이온을 킬레이트 결합시켜 다공성 CaCO_3 입자를 용해하는 것일 수 있다. 이 때, 상기 킬레이트 수용액의 농도는 0.01 내지 10 M, 구체적으로 0.1 내지 5 M인 것일 수 있으며, pH 6.5 내지 8인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 킬레이트 수용액을 이용한 다공성 무기입자의 용해 후 원심분리 및 세척을 통해 중공형 코어 및 제1고분자와 제2고분자가 교차 적층된 다층박막의 코팅층을 포함하는 중공형 약물전달체 입자를 제조할 수 있다. 본 발명의 일 양태에 따른 약물전달체는 상기 속이 빈 중공형 코어를 포함함에 따라, 코어 내 약물의 담지량을 현저히 향상시킬 수 있으며, 담지된 약물은 코팅층에 의해 안정적으로 체내에서 이동이 가능하여 표적 부위로 충분한 양의 약물을 도달시킬 수 있다.

[0084] 상기 중공형 약물전달체의 제조방법은 상기 다공성 무기입자의 기공에 약물을 함유시키는 단계를 더 포함하는

것일 수 있다. 구체적으로, 다공성 무기입자의 기공에 약물을 함유하는 단계는 상기 (a) 단계 이전에 수행하는 것일 수 있으며, 이 경우 소수성 약물이 분산된 용액에 다공성 무기입자를 투입하여 교반함으로써 소수성 상호작용에 의해 약물이 다공성 무기입자 기공에 담지될 수 있다. 이어서, 상기 약물이 담지된 다공성 무기입자를 이용하여 (a) 단계에서 다공성 무기입자 표면에 코팅층을 형성하여 복합입자를 제조한 후, (b) 단계에서 다공성 무기입자를 용해시킴에 따라, 코어에 소수성 약물이 담지된 중공형 약물전달체 입자를 제조할 수 있으나, 상기 방법으로 제한하는 것은 아니다.

[0085] 또한, 약물이 친수성인 경우, (a) 및 (b) 단계를 통해 중공형 코어를 형성시킨 후 이를 친수성 약물이 분산된 수용액에 투입하여 교반함으로써 약물을 중공형 코어 및 코팅층에 담지시킬 수 있다. 또한, 상기 약물이 분산된 용액 및 수용액 내 약물의 함량은 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.01 내지 3 중량%인 것일 수 있으나, 상기 범위로 제한되는 것은 아니다.

[0086] 또한 본 발명은 코어 및 상기 코어를 둘러싸며 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질이 교차 적층된 다층박막으로 이루어지는 코팅층을 포함하며, 상기 제1고분자 전해질 및 제2고분자 전해질은 정전기적 상호작용 및 소수성 상호작용으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 인력에 의해 복합화되는 것을 특징으로 하는 약물전달체를 투여하여 병변 부위에 전달하는 단계; 및 상기 약물전달체를 효소로 처리하는 단계;를 포함하는 질병의 치료방법을 제공한다.

[0087] 구체적으로, 상기과 같이 약물을 담지한 약물전달체를 효소와 함께 경구 및 비경구 등 다양한 경로로 체내에 투입하거나, 상기 약물전달체와 효소를 각각 투입하여 병변 부위로 전달한 후, 병변 부위에서의 pH 변화에 따라 발현되는 효소의 코팅층 분해를 이용하여 약물의 방출을 유도할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 약물전달체는 체내의 pH 6.5 내지 9의 범위를 가지는 부위에서는 안정적인 구조를 유지함에 따라 약물 방출이 억제되어 약물의 부작용을 최소화하고, pH 4 내지 6의 범위를 가지는 병변 부위에서는 분해활성을 가지는 효소에 의해 코팅층이 분해되어 약물이 신속히 방출됨에 따라 질병의 치료효과를 향상시킬 수 있다.

[0088] 상기 질병은 암, 염증성 질병, 피부 질병, 대사성 질병에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으며, 바람직하게는 비교적 산성 pH 범위를 갖는 암 조직 세포에 적용, 암을 치료하는데 활용될 수 있다. 상기 암으로서 구체적인 예를 들면, 피부암, 흑색종, 위암, 식도암, 결장암, 직장결장암, 췌장암, 대장암, 직장암, 담관암, 간암, 뇌종양, 백혈병, 육종, 골암, 유방암, 갑상선암, 폐암, 자궁암, 자궁경부암, 자궁내막암, 전립선암, 두경부암, 방광암, 내분비선암, 요도암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 전립선암 및 림프종 등을 들 수 있다. 상기과 같이 약물전달체를 암 치료에 적용하는 경우, pH 6.5 내지 7인 일반 조직 세포에서는 약물의 조기 방출 없이 안정적으로 약물을 전달하고, 비교적 산성 조건인 pH 5 내지 6의 암 조직 세포에 도달 시에는 pH 변화에 따라 효소의 분해 활성이 발현되면서 코팅층이 분해되어, 약물을 신속히 방출하는 특성을 나타낼 수 있다. 이를 통해, 암에 표적 지향성을 가지는 약물전달체로 사용되어 암 세포의 선택적인 사멸을 유도하고, 항암제의 부작용을 최소화하는 동시에 암 치료 효과를 극대화시킬 수 있다.

[0090] 이하 실시예 및 비교예를 바탕으로 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예 및 비교예는 본 발명을 더욱 상세히 설명하기 위한 하나의 예시일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 비교예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0092] [제조예 1] 다공성 무기입자의 제조

[0093] 다공성 무기입자는 공침법(co-precipitation method)를 이용하여 제조하였다. 0.33 M의 CaCl_2 (Sigma-Aldrich) 및 Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich) 수용액을 1:1 부피비로 혼합하고, 30 초간 600 rpm으로 교반하였다. 이어서, 10,000 rpm에서 2 분간 원심분리한 후, 증류수로 2 번 세척하여 미반응 이온 및 잔류물을 제거하여 다공성의 CaCO_3 입자를 얻었다. 이어서, 다공성 CaCO_3 입자를 1 일간 감압 하에 동결건조하여 재결정화를 방지하였으며, 이를 통해 얻어진 다공성 CaCO_3 입자는 평균입경이 4 μm 이었다.

[0095] [제조예 2] 평면 기재 상 약물전달체의 제조-1

[0096] 다이메틸설폭시드(DMSO) 1 mL에서 20 mg/mL 농도의 젤라틴(돼지 피부 유래 젤라틴, Type A, Sigma-Aldrich) 용액(pH 11) 및 FITC를(fluorescein isothiocyanate isomer I, Sigma-Aldrich)를 37°C에서 밤새 격렬하게 교반한 후, PBS(phosphate-buffered saline, PBS)에서 5일 간 투석시켜 FITC-접합된(conjugated) 젤라틴을 제조하였다.

[0097] 도 1과 같이, QCM(Quartz Crystal Microbalance)용 실리콘 웨이퍼를 2 분간 산소 플라즈마로 처리하여 음으로

대전된 표면을 형성시킨 후, 실리콘 웨이퍼를 1 mg/mL 농도의 FITC-접합된 젤라틴 수용액 100 mL에 5 분간 침지시켜 젤라틴 층을 형성시킨 후, 탈이온수(DI water)로 1 분씩 2회 세척하였다. 이어서, 젤라틴 층이 적층된 기재를 1 mg/mL 농도로 1X phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)에 용해된 알칼리 리그닌(lignin, 중량평균분자량: 20,000 g/mol, Sigma-Aldrich)에 5 분간 침지시켜 젤라틴 층과 소수성 상호작용으로 형성된 리그닌 층(제조예 2)을 적층시킨 후, 동일하게 세척하였다. 이어서, 젤라틴 및 리그닌을 3회 교차 적층시켜 다층박막으로 이루어진 코팅층을 제조하였다.

[0099] [제조예 3] 평면 기재 상 약물전달체의 제조-2

[0100] 상기 제조예 2에서, 알칼리 리그닌을 1 mg/mL 농도로 탈이온수(pH 5)에 용해된 탄닌산(tannic acid, TA, 중량평균분자량: 1,701 g/mol, Sigma-Aldrich)으로 변경한 것을 제외하고는 동일하게 실시하여, 실리콘 웨이퍼 기재에 젤라틴 및 탄닌산이 정전기적 상호작용으로 3회 교차 적층되어 형성된 다층박막으로 이루어진 코팅층을 제조하였다.

[0102] [제조예 4] 중공형 약물전달체의 제조-1

[0103] 상기 제조예 1의 다공성 CaCO_3 입자 40 mg을 1 mg/mL 농도의 FITC-접합된 젤라틴 수용액 100 mL에 투입하여 2,000 rpm에서 5 분간 마이크로 튜브 웨이커를 이용하여 상기 입자 표면에 젤라틴을 부착시켰다. 이어서, 젤라틴층이 형성된 입자를 10,000 rpm에서 2 분간 원심분리 한 후 상등액을 제거하고, 탈이온수로 1 분간 2회 세척하였다. 이를 1 mg/mL 농도로 1X phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)에 용해된 알칼리 리그닌(lignin, 중량평균분자량: 175,000 g/mol, Sigma-Aldrich)에 5 분간 침지시켜 젤라틴층과 소수성 상호작용을 통한 리그닌층을 형성시킨 후 동일하게 세척하였다. 상기 젤라틴 및 리그닌층의 적층을 3회 반복하여 젤라틴 및 리그닌이 3회 교차 적층된 다층박막으로 이루어진 코팅층 형성, 다공성 CaCO_3 입자로 이루어진 코어 및 이를 둘러싸는 코팅층을 포함하는 약물전달체를 제조하였다.

[0104] 이어서, 0.2 M의 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, Sigma-Aldrich) 용액(pH 7.4)을 이용하여 약 3 분간 처리하여 코어 내 칼슘을 킬레이트시켜 다공성 CaCO_3 입자를 제거하여 속이 빈 중공형의 약물전달체를 얻었다. 얻어진 중공형 약물전달체는 10,000 rpm에서 2 분간 원심분리 후, EDTA를 제거하기 위해 증류수로 2회 세척하였으며, 이를 SEM 분석 및 형광 분석으로 확인한 결과, 도 2와 같이 CaCO_3 코어 입자는 다공성 구조를 가지며 대략 3 내지 5 μm 의 크기의 구형인 것을 확인할 수 있다. 또한, 코어 표면에 젤라틴 및 리그닌이 교차 적층되어 형성된 코팅층의 경우, 두꺼운 필름 형태로 제조되어 코어 표면이 덮여 사라진 것을 확인할 수 있다. 특히, 리그닌을 사용한 경우 표면이 매끈한 코팅층으로 형성되었으며, 코어를 제거하고 중공형 약물전달체로 제조한 후에도 코팅층이 붕괴되지 않고 안정한 구조를 가지는 것을 확인하였다.

[0105] 또한, 도 3과 같이 SZ-100(Horiba, Japan)를 이용하여 제타포텐셜(zeta-potential)을 측정한 결과, 코어의 표면전위는 마이너스 값을 가지며, 양의 전하를 띄는 젤라틴이 쉽게 흡착될 수 있는 것을 확인하였다. 또한, 코팅층이 교차 적층됨에 따라 표면전위가 반복적으로 변화하는 것을 통해 코팅층이 안정적으로 적층되었음을 알 수 있다. 구체적으로, 젤라틴의 경우에는 양의 전하가 크지 않아 높은 양의 전위값을 나타내진 않지만, 리그닌의 경우에는 분자구조 내 풍부한 히드록시기이 존재하여 젤라틴 및 리그닌의 두 층의 표면전위는 분산성이 매우 안정적인(30~40 mV) 음의 전위값을 가지는 것을 확인하였다.

[0106] 또한, pH 및 효소에 따른 코팅층의 분해를 확인하기 위하여 방출된 FITC-접합된 젤라틴이 검출되는 정도로 코팅층의 분해 정도를 확인하였다. 이 때 사용된 효소는 *Trametes versicolor*($\geq 0.5\text{U/mg}$) 유래의 락카아제(Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 또한, Na_2HPO_4 및 시트르산에 의해 pH가 각각 5 및 7로 조정된 McIlvaine 완충액 중에서 처리하여 총 4개의 군으로 나누어 실험하였다. 각각의 실험군을 37℃ 배양기에서 7 일간 보관하여 미리 정해진 시간에 따라 상등액을 추출하였고, 광발광(PL; PF-8300, Jasco, Easton, MD, USA)을 통한 형광 강도의 방출을 측정하였으며, 잔류하는 형광 강도를 공초점 현미경(Leica, Germany)으로 평가하였다.

[0107] 그 결과, 도 4와 같이 pH 5에서 락카아제 처리한 코팅층이 가장 분해가 빠른 것을 확인할 수 있었고, 락카아제를 처리하지 않은 경우와 pH 7에서는 코팅층의 분해가 크게 일어나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이는 형광 이미지에서도 확인할 수 있는데, pH 5에서 락카아제를 처리한 코팅층의 형광 신호가 가장 약하게 나타난 것을 확인할 수 있으며, 효소를 처리하지 않은 경우에는 코팅층의 형태 및 형광 강도가 안정적으로 7 일간 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, pH 7 대비 pH 5에서 락카아제의 효소활성이 높아 코팅층의 분해가 용이한 것을 확인하였다.

- [0109] [제조예 5] 중공형 약물전달체의 제조-2
- [0110] 상기 제조예 4에서, 코팅층 형성 시 알칼리 리그닌을 1 mg/mL 농도로 탈이온수(pH 5)에 용해된 탄닌산(tannic acid, TA, 중량평균분자량:1,701 g/mol, Sigma-Aldrich)으로 변경한 것을 제외하고는 동일하게 실시하여, 젤라틴층과 정전기적 상호작용을 통한 탄닌산층을 형성하였으며, 3회 교차 적층 및 킬레이트 결합을 통해 속이 빈 중공형의 약물전달체를 동일하게 얻었다.
- [0111] 이를 SEM 분석 및 형광 분석으로 확인한 결과, 도 2와 같이 젤라틴과 탄닌산이 교차 적층되어 형성된 코팅층이 제조예 4 대비 매우 거친 표면을 가졌으며, 코어를 제거하고 중공형 약물전달체로 제조한 후에도 코팅층이 붕괴되지 않고 안정한 구조를 가지는 것을 확인하였다.
- [0112] 또한, 도 3과 같이 SZ-100(Horiba, Japan)를 이용하여 제타포텐셜(zeta-potential)을 측정한 결과, 코팅층이 안정적으로 적층되었음을 알 수 있었고, 탄닌산의 경우분자구조 내 풍부한 히드록시기이 존재하여 젤라틴 및 탄닌산의 두 층의 표면전위는 분산성이 매우 안정적인(40~60 mV) 음의 전위값을 가지는 것을 확인하였다.
- [0113] 또한, pH 및 효소에 따른 코팅층의 분해를 확인한 결과, 도 4와 같이 pH 5에서 탄나아제를 처리하지 않은 경우에는 7 일간 코팅층의 분해가 전혀 일어나지 않았으며, 탄나아제를 처리한 경우와 pH 7에서는 코팅층이 빠르게 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 7 일 후 형광이 남아있는 정도를 확인했을 때, pH 5의 경우 가장 형광 강도가 높은 것을 확인할 수 있고, 나머지의 경우에는 분해가 많이 일어나 형광 정도가 많이 약해진 것을 확인할 수 있다. 이를 통해, pH 5에서 탄나아제의 효소활성이 가장 높아 코팅층의 분해가 용이하였고, pH 7에서는 탄나아제의 효소활성이 높지 않으므로 효소에 의해 코팅층이 분해된 것이 아닌 것으로 확인되었다. 이는 pH가 높아짐에 따라 탄닌산이 스스로 산화되어 쿼논 구조를 가지게 되며, 하이드록시 라디칼을 생성하는데, 이로 인해 pH 7에서 탄닌산이 스스로 분해되면서 젤라틴과의 인력이 소멸되어 코팅층이 분해된 것으로 확인되었다.
- [0115] [실험예 1] 약물 방출 시험
- [0116] 0.5 mg/mL 농도의 독소루비신 하이드로클로라이드(doxorubicin hydrochloride, DOX-HCl, Sigma-Aldrich) 1 mL를 첨가하여 1,000 rpm으로 1 일간 교반하여 제조예 4 및 5의 다공성 CaCO₃ 입자의 기공 및 코팅층에 약물을 담지시킨 후, 킬레이트 결합을 통한 중공형 약물전달체를 제조하여 약물 방출량을 확인하였다. 구체적으로, 1 mg/mL의 락카아제(제조예 4) 또는 탄나아제(제조예 5)를 포함하는 pH 5 및 7 완충액과 상기 효소를 포함하지 않는 pH 5 및 7 완충액에 중공형 약물전달체 5 mg을 분산시켰다. 제조된 약물전달체를 10,000 rpm에서 2 분 동안 원심분리시켜 DOX가 방출된 상등액을 제거하고 동일 용량의 새로운 완충액을 첨가하였다. 방출된 DOX의 양을 PF-8300(Jasco, Easton, MD, USA)로 측정하고 누적된 방출량을 계산하였다.
- [0117] 이를 공초점 현미경으로 분석한 결과, 도 5와 같이 DOX(빨간색 형광)는 약물전달체(초록색 형광)의 코팅층과 코어 내부에 모두 담지된 것을 확인할 수 있다. DOX가 코팅층에 담지된 것은 DOX의 소수성 부분과 코팅층 내 탄닌산 또는 리그닌의 소수성 부분이 서로 소수성 상호작용에 의해 일부 결합된 결과로 볼 수 있다.
- [0118] 다음으로 각 pH 별, 효소처리 별 DOX의 방출 정도를 확인한 결과, 도 5의 그래프에 나타난 결과와 같이, 제조예 4에 락카아제 처리 시 DOX가 mediator로 작용하여 락카아제의 중합 효율을 높임에 따라 pH 5에서의 약물 방출을 저해하는 것으로 추정된다.
- [0119] 또한, 제조예 5에 탄나아제 처리 시 락카아제 처리한 것과는 달리 pH 5에서 가장 빠른 약물방출 효율을 보였으며, pH 7에서는 DOX가 탄닌산의 self-oxidation을 방해하여 약물 방출이 낮은 것을 확인하였다.
- [0121] [실험예 2] 세포 독성 시험 및 항암 효과 확인
- [0122] HeLa 세포를 5% CO₂ 배양기에서 100mm 배양접시(SPL, 포천시, 한국)에 2~3 일간 배양하여 95 %의 세포가 증식하였을 때, 트립신-EDTA 처리를 통해 세포를 떼어낸 후 독성실험을 위해 24웰 플레이트에 7,000 cell/well로 접종하였다. 세포를 부착시키기 위해 1 일간 배양하였으며, 세포독성 및 항암분석을 위해, 배양 배지 중 효소, DOX, DOX가 없는 중공형 약물전달체가 세포를 개별적으로 처리하는데 사용되었다. 상기 재료로 1 일간 배양한 후, 세포독성을 (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨브로마이드)(MTT) 분석에 의해 측정하였다. 배양기에서 2 시간 동안 세포를 처리하기 위해 PBS 중 MTT 용액(5mg/mL)을 사용하였고, 세포를 DMSO에 용해시켰으며 플레이트 판독기(SpectraMax 340 PC; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.
- [0123] 세포독성 실험을 통해 DOX가 결합된 약물전달체의 항암효과를 조사하였으며, 이 때 1 µg의 DOX가 결합된 제조예

4 및 5의 중공형 약물전달체를 사용하였다. 세포배양 배지는 90 % Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin-glutamine으로 구성되었다. 모든 제품은 GibcoLife Technologies(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium의 pH를 5.5로 조정하기 위해 아세트산을 사용하였다.

[0124] 제조예 4 및 5의 중공형 약물전달체의 세포독성 실험 결과, 도 6과 같이 90% 이상의 세포 생존율을 가지고 있어 독성이 없음을 확인하였다.

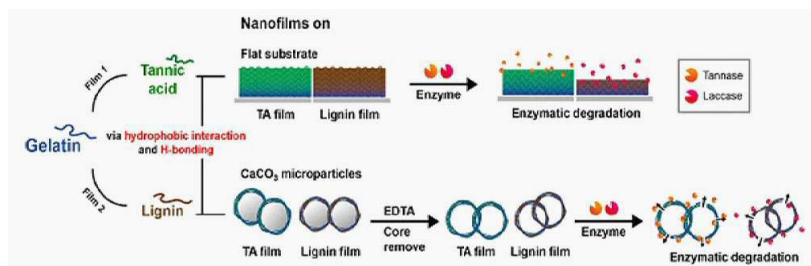
[0125] 또한, 도 7 및 도 8은 사용한 DOX 및 효소의 세포독성을 확인한 그래프이다. DOX는 1 μ g의 양에도 매우 높은 독성을 가지는 것을 확인할 수 있으며, 효소의 세포독성을 확인했을 때, pH 5.5의 락카아제 외에는 매우 높은 효소 농도인 1 mg/mL에서도 모두 독성이 없는 것을 확인하였다.

[0126] 따라서, 본 발명에서는 약물방출을 위한 효소 처리 양을 락카아제의 경우 100 μ g, 탄나아제의 경우 250 μ g으로 정하였으며, 각각 제조예 4 및 5에 적용하여 항암효과를 확인하였다.

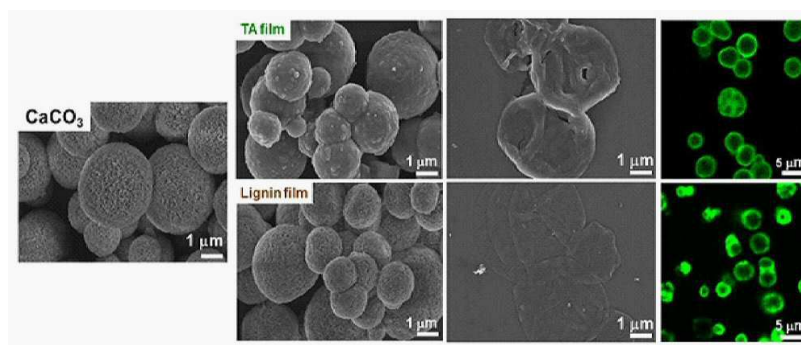
[0127] 그 결과, 도 9와 같이 제조예 4의 경우 락카아제 처리된 약물전달체가 우수한 항암효과를 나타내었으며, 제조예 5의 경우 탄나아제 처리된 pH 7.4에서 우수한 항암효과를 나타내어, 약물방출 정도에 따라 원하는 대로 항암효과를 조절할 수 있음을 확인하였다.

도면

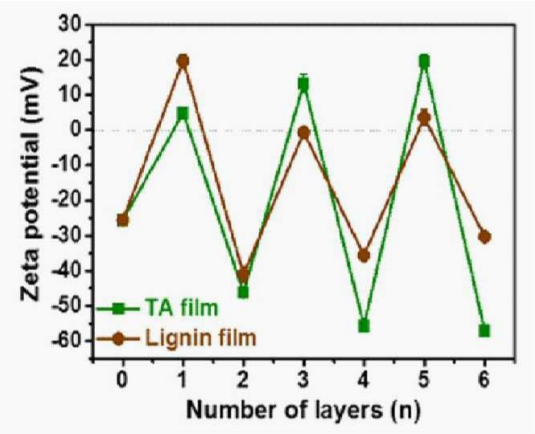
도면1



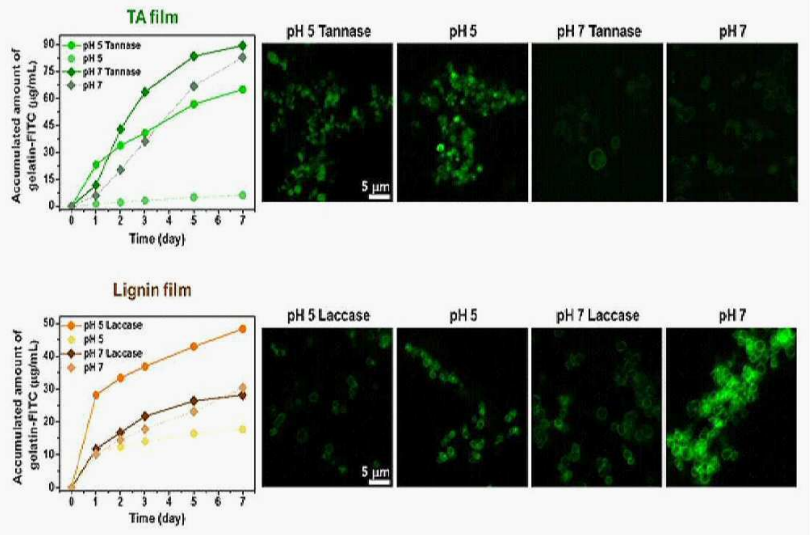
도면2



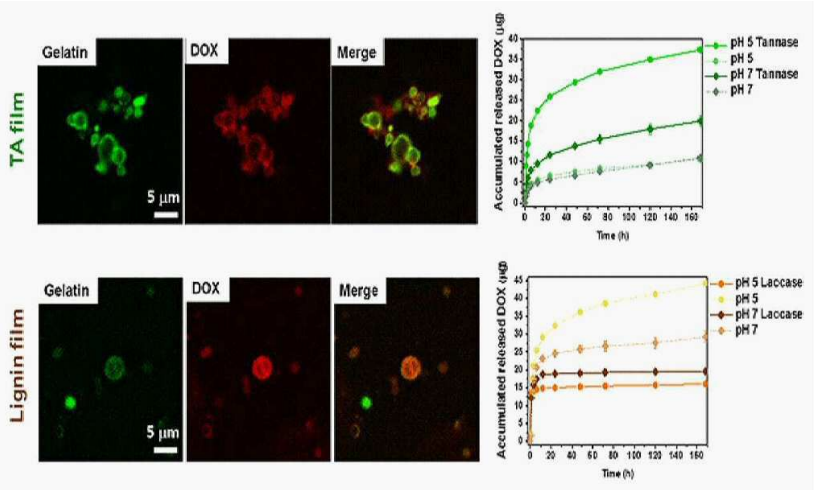
도면3



도면4



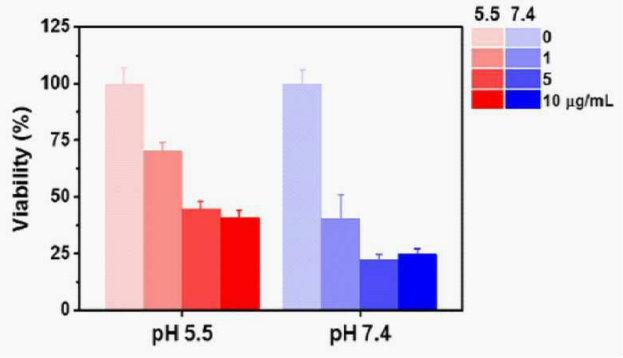
도면5



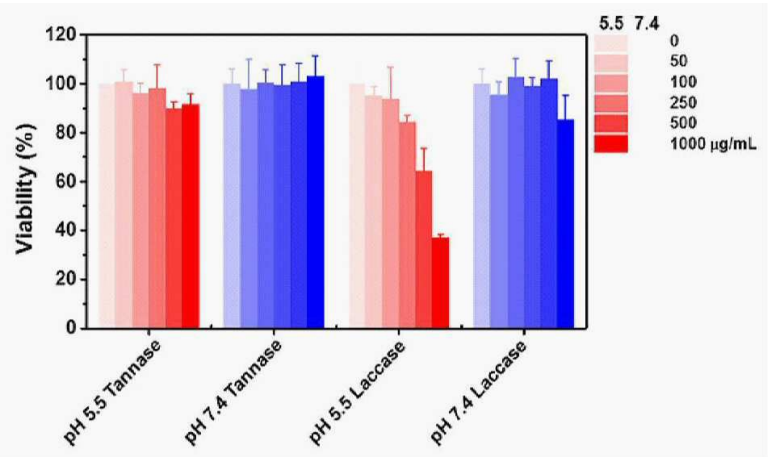
도면6

Viability (%)		
Control (5.5)	TA film	Lignin film
100 ± 2.24	93.53 ± 1.83	97.93 ± 5.31
Control (7.4)	TA film	Lignin film
100 ± 3.82	100.7 ± 1.16	93.37 ± 1.35

도면7



도면8



도면9

Anticancer effect (%)				
	pH 5.5 w/ enzyme	pH 5.5	pH 7.4 w/ enzyme	pH 7.4
TA film	64.24 ± 0.46	85.02 ± 1.89	80.49 ± 3.50	76.63 ± 1.24
Lignin film	76.45 ± 4.52	72.38 ± 0.96	78.59 ± 3.50	64.22 ± 8.75