



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0027998
(43) 공개일자 2011년03월17일

(51) Int. Cl.

A61K 9/16 (2006.01) A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0085879

(22) 출원일자 2009년09월11일

심사청구일자 2009년09월11일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

함승주

서울특별시 마포구 상암동 월드컵파크 7단지 아파
트 706동 901호

허용민

서울특별시 광진구 광장동 현대 아파트 501-507

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

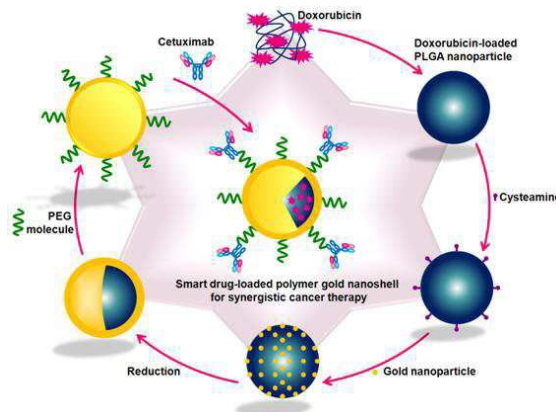
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 나노복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 나노복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 유리 전이온도가 80℃ 이하인 생체 내 분해가 가능한 나노입자를 함유하는 코어와, 상기 코어의 표면에 형성되고, 전자기과의 조사에 의해 열을 발생할 수 있는 금속 성분을 함유하는 코팅층으로 이루어진 나노복합체는 표적세포의 수용체와의 결합을 통한 세포 신호의 차단 및 전자기과 조사에 의한 광열 치료 작용을 통해 두 가지 방식의 치료 작용을 나타낼 수 있고, 치료 효과를 나타낸 후 분해됨으로써 생체 내에서 부작용을 유발하지 않으며, 유리전이 온도 이상에서 분해됨으로써 목적 부위에서 코어부에 탑재된 약물이 방출되어 특정부위에서 약효를 발현할 수 있는 나노복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

서진석

서울특별시 서초구 서초동 1436-14 (6/4) 서초동 아이

양재문

서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 제1공학관 A143호

이재원

서울특별시 관악구 봉천3동 대우 푸르지오 아파트 115동 902호

강진영

서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 제1공학관 A143호

박요셉

서울특별시 종로구 인의동 효성주얼리시티 A동 802호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-8-2115

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관

연구사업명 선도형연구중심병원

연구과제명 뇌심혈관질환 융합 연구단

기여율

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2008년 12월 01일 ~ 2009년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자를 함유하는 코어; 및

상기 코어의 표면에 형성되고, 전자기파 조사에 의해 열을 발생하는 금속 성분을 함유하는 코팅층을 포함하는 나노복합체.

청구항 2

제1항에 있어서

나노입자는 80℃ 이하의 유리전이온도를 갖는 생분해성 고분자인 나노복합체.

청구항 3

제1항에 있어서

나노입자는 60℃ 이하의 유리전이온도를 갖는 생분해성 고분자인 나노복합체.

청구항 4

제1항에 있어서

나노입자는 유기성 표면안정제를 포함하는 나노복합체.

청구항 5

제4항에 있어서

유기성 표면안정제의 분자량이 100 이상 2,000 이하인 나노복합체.

청구항 6

제4항에 있어서

유기성 표면안정제는 양이온성 계면활성제, 중성 계면활성제, 음이온성 계면활성제로 이루어진 군에서 선택되는 나노복합체.

청구항 7

제4항에 있어서

유기성 표면안정제는 알킬트리메틸암모늄 할라이드(alkyl trimethylammonium halide); 포화 지방산, 불포화 지방산, 트리알킬포스핀, 트리알킬포스핀 옥시드, 알킬 아민, 알킬 티올, 소듐 알킬 설페이트, 소듐 알킬 포스페이트, 폴리옥시에틸렌 소비탄 모노올레이트, 옥틸페닐-폴리에틸렌 글리콜, 노닐(nonyl)페닐-폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 도데실 에테르, 폴리에틸렌 글리콜 t-옥틸페닐 에테르; 소듐 콜레이트(cholate) 하이드레이트; N,N-비스[3-(D-글루코나미도)프로필]데옥시콜아마이드(deoxycholamide), N,N-비스[3-(D-글루코나미도)프로필]콜아마이드(cholamide); 사이클로헥실메틸 베타-D-말토사이드(maltoside), 2-시클로헥실메틸 베타-D-말토사이드(maltoside), 5-시클로헥실펜틸 베타-D-말토사이드(maltoside), 6-시클로헥실펜틸 베타-D-말토사이드(maltoside), 데실-베타-D-말토사이드(maltoside), 라우릴-베타-D-말토사이드, 세틸-베타-D-말토사이드, 언데실

-베타-D-말토사이드; 데실-베타-D-1-티오말토피라노사이드(maltopyranoside), 옥틸 베타-D-글루코피라노사이드, 데실-베타-D-1-티오글루코피라노사이드, 옥틸 베타-D-1-티오글루코피라노사이드, 옥틸 글루코사이드; 디기토닌; 디메틸데실포스파젠 옥사이드; N-옥타노일-N-메틸글루카민, N-노나노일-N-메틸글루카민, N-도카노일-N-메틸글루카민으로 이루어진 군에서 선택되는 나노복합체.

청구항 8

제1항에 있어서

나노입자는 직경이 1 nm 내지 500 nm인 나노복합체.

청구항 9

제1항에 있어서

코어의 표면은 아민기 및 티올기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기능기를 갖는 나노복합체.

청구항 10

제1항에 있어서

코팅층은 두께가 5 내지 30 nm인 나노복합체.

청구항 11

제1항에 있어서,

금속 성분이 금, 백금, 은, 구리, 티탄 및 크롬으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 나노복합체.

청구항 12

제1항에 있어서

전자기파는 파장이 700 nm 내지 1,000 nm인 나노복합체.

청구항 13

제1항에 있어서,

코팅층은 표적지향성 물질이 추가로 결합되어 있는 나노복합체.

청구항 14

제1항에 있어서,

평균 크기가 1 nm 내지 500 nm인 나노복합체.

청구항 15

제1항에 있어서

평균 크기가 1 nm 내지 100 nm인 나노복합체.

청구항 16

제1항에 있어서

코팅층 표면에 추가로 표적지향성 물질을 포함하는 나노복합체.

청구항 17

제16항에 있어서

표적지향성 물질은 항원, 항체, RNA, DNA, 합텐, 아비딘, 스트렙타비딘, 뉴트라비딘, 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴, 셀렉틴, 방사선 동위원소 표지 물질, 앵타머 및 종양 마커로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 나노복합체.

청구항 18

유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 전자기파 조사에 의해 열을 발생하는 금속입자를 도입하는 단계; 및

상기 금속입자를 매개로 나노입자의 표면에 코팅층을 형성하는 단계를 포함하는 나노복합체의 제조방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 금속입자를 도입하는 단계는

- i) 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 관능기를 도입하는 단계; 및
- ii) 관능기가 도입된 생분해성 나노입자와 금속입자를 접촉시키는 단계를 포함하는 나노복합체의 제조방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 코팅층 형성 단계는

- iii) 금속입자가 도입된 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자 및 코팅용액을 용매에서 혼합하는 단계; 및
- iv) 상기 금속을 환원시켜 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 코팅층을 형성하는 단계를 포함하는 나노복합체의 제조방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

코팅층이 형성된 나노입자를 표적지향성 물질과 접촉시키는 단계를 더 포함하는 나노복합체의 제조방법.

청구항 22

제1항의 나노복합체; 및

약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 세포사멸이 요구되는 세포질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서

세포질환은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암, 대장암, 직장암, 혈액암 및 자궁경부암으로 이루어진 군에서 선택되는 약제학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 유리전이온도 이상에서 생체 내 분해가 가능한 나노입자를 함유하는 코어와, 상기 코어의 표면에 형성되고, 전자기파의 조사에 의해 열을 발생시킬 수 있는 금속 성분을 함유하는 코팅층으로 이루어진 나노복합체는 표적세포의 수용체와의 결합을 통한 세포 신호의 차단 및 전자기파 조사에 의한 광열 치료 작용을 통해 두 가지 방식의 치료작용을 나타낼 수 있고, 치료 효과를 나타낸 후 분해됨으로써 생체 내에서 부작용을 유발하지 않으며, 유리전이온도 이상에서 분해됨으로써 목적 부위에서 코어부에 탑재된 약물이 방출되어 특정부위에서 약효를 발현할 수 있는 나노복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 나노기술(NT; Nano Technology)은 물질을 원자 또는 분자 수준에서 조절 및 제어하는 기술로서 신물질이나 신소재의 창출에 적합하기 때문에, 전자, 재료, 통신, 기계, 의학, 농업, 에너지 및 환경 분야 등 매우 다양한 분야에서 응용되고 있다. 이와 같은 나노기술은 현재 다양하게 발전하고 있으며, 크게 세 가지 분야로 분류되어 있다. 첫째, 나노소재로 극미세한 크기의 새로운 물질과 재료를 합성하는 기술에 관한 것이다. 둘째, 나노소자인데 나노 크기의 재료들을 조합하거나 배열하여 일정한 기능을 발휘하는 장치를 제조하는 기술에 관한 것이다. 셋째, 나노기술을 생명공학 분야에 응용하는 나노-바이오 기술에 관한 것이다.

[0003] 한편, 일반적으로 메탈 나노셀로도 지칭되는 나노복합체는 구형 유전성 코어 나노입자; 및 상기 코어를 둘러싼 얇은 금속막으로 구성되어 있다. 이와 같은 메탈 나노셀은 표면 플라즈몬 공명(SPR; Surface Plasmon Resonance) 현상에 의해 전자기파를 흡수할 수 있고, 흡수된 전자기파는 금속막에 존재하는 전도성 전자들을 집단적으로 진동시켜 열을 발생시킨다. 상기에서, 전자기파는 파장에 따라 정도의 차이는 있지만, 생체 조직을 침투할 수 있는 특성을 가지고 있으며, 이러한 특성은 임상에서 질병을 진단하기 위한 도구로 응용되고 있다. 예를 들어, 맥반산소계측기, OCT(optical coherence tomography), 확산 촬영(diffuse tomography) 또는 레이저 도플러 영상은 전자기파의 침투 특성을 이용하고 있다. 이러한 메탈 나노셀 및 전자기파의 특성에 기초하여, 메탈 나노셀을 약물 전달 및 질병 치료 등에 적용하기 위한 연구가 수행되고 있다.

[0004] 일본 공개특허 제2003-504421호는 메탈 나노셀을 이용하여 약물을 원하는 장소에 전달하는 방법에 대해 개시하고 있다. 구체적으로, 치료 약물, 감열성 재료(ex, 하이드로겔) 및 메탈 나노셀을 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물을 투여한 후, 원하는 장소에서 전자기파를 조사하면 메탈 나노셀로부터 발생된 열이 감열성 재료를 붕괴시켜 치료 약물이 방출된다고 기재되어 있다. 그러나, 사용된 메탈 나노셀은 발열량이 적으며, 전자기파 조사에 의해 발생된 열은 감열성 재료의 붕괴에 사용되기 때문에 열을 이용한 치료 효과를 기대하기가 어렵다.

[0005] 한편, L. R. Hirsch 등은 표면 플라즈몬 공명 현상에 의해 발생한 열로 암세포를 치료하는 방법을 보고하였는데(PNAS 2003; 100; 13549-13554), 골드로 코팅된 실리카 나노 물질에 근적외선을 조사하고, 이때 발생된 열이 암세포 사멸에 유용하다는 것을 생체 내 및 생체 외 실험을 통해 제시하였다. 그러나, 상기 방법은 암세포 치료를 표면 플라즈몬 공명 현상에 의해 발생한 열에만 의지하고 있기 때문에, 근적외선의 침투량이 깊이에 따라 감소된다는 점을 고려하면 보다 깊은 곳에 위치한 암세포에 대해서는 유효한 치료 효과를 기대하기 어렵다. 또한, 투여된 나노물질이 치료 작용을 나타낸 후에 생체 내에서 잔존하여, 바람직하지 않은 면역 반응 등의 부작용을

유발할 우려가 매우 크다는 단점을 가지고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 생체 내에 투여되어 탁월한 치료 효과를 나타낸 후 분해되어 부작용을 일으키지 않고, 유리전 이온도 이상에서 분해되어 목적부위에서 탑재된 약물을 방출할 수 있는 생분해성 나노복합체 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 생분해성 나노복합체를 이용한 세포사멸이 요구되는 세포질환 치료제를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0009] 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자를 함유하는 코어; 및
- [0010] 상기 코어의 표면에 형성되고, 전자기파 조사에 의해 열을 발생하는 금속 성분을 함유하는 코팅층을 포함하는 나노복합체를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한
- [0012] 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 전자기파 조사에 의해 열을 발생하는 금속입자를 도입하는 단계; 및
- [0013] 상기 금속입자를 매개로 나노입자의 표면에 코팅층을 형성하는 단계를 포함하는 나노복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 본 발명의 나노복합체; 및
- [0015] 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 세포사멸을 요구하는 세포질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다.

효 과

- [0016] 본 발명의 나노복합체는 표적세포 상에 존재하는 수용체에 결합하여 세포의 증식 등에 관여하는 세포 신호를 차단하고, 또한 전자기파 조사 시 열을 발생하여 세포에 대한 광열 치료 작용을 나타내는 두 가지 방식에 의한 치료 작용을 동시에 나타낼 수 있다. 또한, 치료 작용을 나타낸 후 분해됨으로써 생체 내에서 부작용을 유발하지 않으며, 유리전이온도 이상에서 분해됨으로써 코어부에 탑재된 약물이 목적 부위에서 방출될 수 있도록 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0018] 본 발명은 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자를 함유하는 코어; 및 상기 코어의 표면에 형성되고, 전자기파 조사에 의해 열을 발생하는 금속 성분을 함유하는 코팅층을 포함하는 나노복합체에 관한 것이다.
- [0019] 상기 나노입자는 유리전이온도 이상에서 분해될 수 있는 생체친화성을 가진 것으로, 본 발명의 나노복합체가 표적세포(ex. 종양 세포)에 결합하여, 치료 작용을 나타낸 후에 분해됨으로써, 생체 내에서 발생할 수 있는 바람직하지 못한 면역 반응, 광열(photothermal) 작용 등의 부작용을 방지할 수 있으며, 표적 부위에 도달한 후 열

을 조사하여 유리전이온도 이상에서 분해되게 함으로써 약물을 원하는 부위로 송달하는 것이 가능하다.

[0020]

상기 코어는 유기성 표면안정제를 추가로 포함할 수 있으며, 유기성 표면안정제는 소수성기 및 친수성기를 동시에 포함하여 소수성인 약물을 안정화시키고, 수불용성인 약물의 수용성 및 수분산성을 향상시킬 수 있는 기능성 물질로서, 자성 나노복합체의 생체이용률을 극대화시키는 역할을 한다.

[0021]

본 발명에서, 유기성 표면안정제는 분자량이 100 내지 2,000인 것을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 분자량이 100 미만이면, 항암제의 적재 효율이 떨어지거나, 복합체의 수용성 및 수분산성이 저하될 우려가 있으며, 2,000을 초과하면, 복합체 내에서 높은 항암제의 함량을 구현하기 어려워지거나, 크기 조절이 어려워질 우려가 있다. 상기 유기성 표면안정제로는 계면활성제(surfactant)를 사용할 수 있고, 구체적으로는 알킬트리메틸암모늄 할라이드(alkyl trimethylammonium halide)(ex. cetyl trimethylammonium bromide:CTAB)를 포함하는 양이온성 계면활성제; 올레산(oleic acid), 라우르산(lauric acid) 또는 도데실산(dodecylic acid)와 같은 포화 또는 불포화 지방산, 트리옥틸포스핀 옥시드(trioctylphosphine oxide: TOPO), 트리옥틸포스핀(trioctylphosphine: TPO) 또는 트리부틸포스핀(tributylphosphine)과 같은 트리알킬포스핀 또는 트리알킬포스핀 옥시드, 도데실아민, 올레익아민(oleic amine), 트리옥틸아민(trioctyl amine) 또는 옥틸아민과 같은 알킬 아민(alkyl amine) 또는 알킬 티올(alkyl thiol)을 포함하는 중성 계면활성제; 및 소듐 알킬 설페이트(sodium alkyl sulfate)(ex. sodium dodecyl sulfate:SDS) 또는 소듐 알킬 포스페이트(sodium alkyl phosphate)를 포함하는 음이온성 계면활성제를 들 수 있다. 본 발명에서는 또한 폴리옥시에틸렌소비탄 모놀리에이트(monooleate) 계열, 옥틸페닐-폴리에틸렌 글리콜 계열, 노닐(nonyl)페닐-폴리에틸렌 글리콜 계열, 폴리에틸렌 글리콜 도데실 에테르 계열 또는 폴리에틸렌 글리콜 t-옥틸페닐 에테르 계열의 계면활성제; 소듐 콜레이트(cholate) 하이드레이트; N,N-비스[3-(D-글루코나미도)프로필]데옥시콜아마이드(deoxycholamide) 또는 N,N-비스[3-(D-글루코나미도)프로필]콜아마이드(cholamide)와 같은 아마이드; 사이클로헥실메틸 베타-D-말토사이드(maltoside), 2-시클로헥실메틸 베타-D-말토사이드(maltoside), 5-시클로헥실펜틸 베타-D-말토사이드(maltoside), 6-시클로헥실펜틸 베타-D-말토사이드, 데실-베타-D-말토사이드, 라우릴-베타-D-말토사이드, 세틸-베타-D-말토사이드 또는 언데실-베타-D-말토사이드와 같은 말토사이드; 데실-베타-D-1-티오말토피라노사이드(maltopyranoside), 옥틸 베타-D-글루코피라노사이드(pyranoside) 또는 데실-베타-D-1-티오글루코피라노사이드, 옥틸 베타-D-1-티오글루코피라노사이드와 같은 피라노사이드, 옥틸 글루코사이드; 디기토닌; 디메틸데실포스파젠 옥사이드; 및 N-옥타노일-N-메틸글루카민, N-노나노일-N-메틸글루카민 및 N-도카노일-N-메틸글루카민과 같은 글루카민으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유기성 표면안정제를 사용할 수 있다. 본 발명에서는 특별히 한정되지 않고, 전술한 유기성 표면안정제 중에서 적절한 종류를 선택, 사용할 수 있으나, 자성 나노입자의 안정화 및 균일한 크기 분포 달성의 관점에서, 포화 또는 불포화 지방산 또는 알킬아민을 사용하는 것이 바람직하다.

[0022]

상기 생분해성 고분자로는 폴리락티글리콜릭애시드; 폴리카프로락톤(Polycaprolactone), 폴리카프로락톤 디올(Polycaprolactone diol), 또는 폴리카프로락톤 트리올(Polycaprolactone triol) 등과 같은 폴리카프로락톤계 고분자; 폴리테트라히드로푸란(polytetrahydrofuran); 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol); 폴리락타이드(polylactide); 폴리에틸렌옥시드(polyethylene oxide); 폴리[(R)-3-히드록시부티르산](Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]) 또는 폴리[(R)-3-히드록시부티르산-코-(R)-3-히드록시발레르산](Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-(R)-3-hydroxyvaleric acid]) 등과 같은 히드록시부티르산계 고분자; 폴리글리콜산(Polyglycolic acid), 폴리글리콜라이드(Polyglycolide), 폴리락트산(Polylactic acid), 폴리(DL-락타이드)(Poly(DL-lactide)), 폴리(L-락타이드)(Poly(L-lactide)), 폴리(DL-락타이드-코-카프로락톤)(Poly(DL-lactide-co-caprolactone)), 폴리(L-락타이드-코-카프로락톤-코-글리콜라이드)(Poly(L-lactide-co-caprolactone-co-glycolide)) 또는 폴리[(락타이드-코-에틸렌글리콜)-코-에틸옥시포스페이트](Poly[(lactide-co-ethylene glycol)-co-ethoxyphosphate]) 등과 같은 글리콜라이드계; 폴리[1,6-비스(p-카복시페녹시)헥산](Poly[1,6-bis(p-carboxyphenoxy)hexane]), 폴리[(1,6-비스(p-카복시페녹시)헥산)-코-세바스산](Poly[(1,6-bis(p-carboxyphenoxy)hexane)-co-sebacic acid]), 폴리[1,4-비스(히드록시에틸)테레프탈레이트-알트-에틸옥시포스페이트](Poly[1,4-bis(hydroxyethyl)terephthalate-alt-ethoxyphosphate]), 폴리[1,4-비스(히드록시에틸)테레프탈레이트-알트-에틸옥시포스페이트]-코-1,4-비스(히드록시에틸)테레프탈레이트-코-테레프탈레이트(Poly[1,4-bis(hydroxyethyl)terephthalate-alt-ethoxyphosphate]-co-1,4-bis(hydroxyethyl)terephthalate-co-terephthalate), 폴리(1,4-부틸렌 아디페이트-코-폴리카프로락탐)(Poly(1,4-butylene adipate-co-polycaprolactam)) 또는 폴리(세바스산)(Poly(sebacic acid), diacetoxy terminated) 등과 같은 폴리안하이드라이드(polyanhydride); 폴리(비스(4-카복시페녹시)포스파젠)(Poly(bis(4-carboxyphenoxy)phosphazene)), 폴리(비스(1,4-

디옥사펜틸)포스파젠)(Poly(bis(1,4-dioxapentyl)phosphazene)), 폴리(비스(1-(에톡시카보닐)메틸아미노)포스파젠)(Poly(bis(1-(ethoxycarbonyl) methylamino)phosphazene)) 또는 폴리[비스(1-(에톡시카보닐)2-페닐에틸아미노)포스파젠](Poly[bis(1-(ethoxycarbonyl)-2-phenylethylamino)phosphazene]) 등과 같은 폴리포스파젠(polyphosphazene); 폴리[1,4-비스(히드록시에틸)테레프탈레이트-알트-에틸옥시포스페이트](Poly[1,4-bis(hydroxyethyl)terephthalate-alt- ethyloxyphosphate]), 폴리[1,4-비스(히드록시에틸)테레프탈레이트-알트-에틸옥시포스페이트]-코-1,4-비스(히드록시에틸)테레프탈레이트-코-테레프탈레이트(Poly[1,4-bis(hydroxyethyl)terephthalate-alt-ethyloxyphosphate]-co-1,4-bis(hydroxyethyl)terephthalate-co-terephthalate) 또는 폴리[(락타이드-코-에틸렌글리콜)-코-에틸옥시포스페이트](Poly[(lactide-co-ethylene glycol)-co-ethyloxyphosphate]) 등과 같은 포스포에스테르(phosphoester); 또는 이들의 공중합체 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0023] 상기 공중합체의 예로는 폴리카프로락톤-블록-폴리테트라히드로푸란-블록-폴리카프로락톤(Polycaprolactone-block-polytetrahydrofuran-block-polycaprolactone), 폴리에틸렌글리콜메틸에테르-블록-폴리락타이드(Poly(ethylene glycol)methyl ether-block-poly(lactide)), 폴리에틸렌글리콜-블록-폴리(ϵ -카프로락톤)메틸에테르(Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) methyl ether), 폴리에틸렌글리콜-블록-폴리락타이드 메틸 에테르(Poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide) methyl ether), 폴리에틸렌옥사이드-블록-폴리카프로락톤(Poly(ethylene oxide)-block-polycaprolactone), 폴리에틸렌옥사이드-블록-폴리락타이드(Poly(ethylene oxide)-block-poly(lactide)) 또는 폴리락타이드-블록-폴리에틸렌글리콜-블록-폴리락타이드(Poly(lactide)-block-poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide)) 등을 사용할 수 있다.

[0024] 또한, 상기 코어의 표면은 아민기, 또는 티올기 등의 관능기로 표면이 개질되어 코팅층과 결합될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 나노복합체는 생분해성 나노입자를 함유하는 코어를 둘러싸고 있으며, 전자기파의 조사에 의해 열을 발생할 수 있는 금속 성분을 함유하는 코팅층을 포함한다. 이때, 상기 코팅층은 코어를 전체적으로 완전히 피복하고 있는 것이 바람직하며, 이에 따라 본 발명의 나노복합체는 코어-셸(core-shell) 구조를 가질 수 있다.

[0026] 상기 코팅층에 함유된 금속 성분은 전자기파, 바람직하게는 레이저 조사 시 표면 플라즈몬 공명(SPR; Surface Plasmon Resonance) 현상에 의해 열을 발생시키고 이를 주변으로 발산시켜 외부 영역(ex. 종양 세포)에 영향을 주게 된다. 이에 따라, 본 발명의 나노복합체를 표적세포로 이동시킨 후 전자기파를 조사하면, 상기 나노복합체가 분포된 부위에 국소적으로 온도를 상승시킬 수 있다. 본 발명의 나노복합체는 세포 내 온도를 국소적으로 40℃ 이상 상승시킬 수 있으며, 이러한 온도는 단백질의 3차 또는 4차 구조를 비가역적으로 변성시켜 세포를 사멸 시키기에 충분하여 종양 세포 등에 대한 광열 치료(photothermal therapy) 작용을 나타낼 수 있다.

[0027] 본 발명의 코팅층에 포함되는 금속 성분은 전자기파 조사 시 표면 플라즈몬 공명에 의해 열을 발생시킬 수 있는 공지의 금속으로부터 임의로 선택될 수 있어 특별히 제한하지는 않으며, 예를 들어, 금(Au), 백금(Pt), 은(Ag), 구리(Cu), 티탄(Ti), 또는 크롬(Cr) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명에서 상기 금속 성분에 의해 흡수되는 전자기파의 파장 범위 및 표면 플라즈몬 공명에 의해 발생하는 열의 정도는 사용된 금속의 종류, 코팅층의 두께, 및/또는 나노복합체의 형상 등에 의해 조절될 수 있으며, 당업자는 목적하는 효과에 따른 적절한 금속 성분 및 코팅층의 두께를 용이하게 선택할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명에서 상기 금속에 의해 흡수될 수 있는 파장의 범위는 다양하고, 이들은 제한 없이 본 발명에 사용될 수 있다. 이로 제한되는 것은 아니나, 바람직하게 금속에 의해 흡수되는 파장은 생체 조직에 의한 흡수가 적으면서도 높은 침투율을 나타내는 근적외선 내지 중간영역 적외선 영역의 파장일 수 있으며, 보다 바람직하게는 700 nm 내지 1,000 nm일 수 있다.

[0030] 또한, 상기 코팅층은 두께가 5 nm 내지 30 nm, 바람직하게는 7 nm 내지 15 nm일 수 있다. 상기 코팅층의 두께가 5 nm 미만이면, 전자기파 조사 시에 광열 치료 작용이 효과적으로 발휘되지 않을 우려가 있고, 30 nm를 초과하면, 나노복합체의 생체로의 적용성이 저하될 우려가 있다.

- [0031] 또한, 본 발명의 나노복합체는 코팅층의 표면에 표적지향성 물질을 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용하는 용어 "표적지향성 물질"은 특정 표적 물질(ex. 종양 세포)과 특이적으로 결합할 수 있는 바이오 분자 또는 기타 화합물질 등을 의미하는 것으로서, 그 예로 항원, 항체, RNA, DNA, 합텐(hapten), 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin), 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴(lectin), 셀렉틴(selectin), 방사선동위원소 표지 물질, 앵타머(aptamer) 및 종양 마커(tumor marker)와 특이적으로 결합할 수 있는 물질 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0033] 상기 표적지향성 물질의 구체에 중, 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질은 본 발명의 나노복합체가 종양과 관련된 다양한 질병, 예를 들어 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암 또는 자궁경부암 등의 치료에 적용될 경우에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0034] 상기에서 사용하는 용어 "종양 마커"는 정상 세포에서는 거의 또는 전혀 생산되지 않는 반면, 종양 세포에서는 특이적으로 발현 또는 분비되는 특정 물질을 의미한다. 그러한 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 본 발명의 나노복합체에 도입할 경우, 종양 진단에 유용하게 이용될 수 있다. 당업계에는 다양한 종양 마커뿐만 아니라 이들과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이 공지되어 있다.
- [0035] 종양 마커가 항원인 경우에는 상기 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 본 발명의 나노복합체에 도입할 수 있으며, 그 예로는 상기 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 수용체 또는 항체를 들 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 이용 가능한 항원 및 이와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체 또는 항체의 예로는 EGF(epidermal growth factor)와 anti-EGFR(ex. cetuximab 또는 erbitux), 시냅토타그민의 C2(synaptotagmin의 C2)와 포스포티딜세린, 아넥신 V(annexin V)와 포스포티딜세린, 인테그린(integrin)과 이의 수용체, VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)와 이의 수용체, 안지오펜티오텐(angiotensin)과 Tie2 수용체, 소마토스타틴(somatostatin)과 이의 수용체 또는 바소인테스티날 펩타이드(vasointestinal peptide), 암성 태아성 항원(carcinoembryonic antigen - 대장암 표지 항원)과 허셉틴(Genentech, USA), HER2/neu 항원(HER2/neu antigen - 유방암 표지 항원)과 허셉틴, 전립선 특이 항원 (prostate-specific membrane antigen - 전립선암 표지 항원)과 리투산(IDCE/Genentech, USA) 이의 수용체 등이 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 종양 마커가 "수용체"인 대표적인 예로는 난소암 세포에서 발현되는 폴산 수용체가 있다. 상기 수용체와 특이적으로 결합할 수 있는 물질(폴산 수용체의 경우에는 폴산)이 본 발명에 따른 나노복합체에 도입될 수 있으며, 그 예로는 상기 수용체와 특이적으로 결합할 수 있는 항원 또는 항체를 들 수 있다.
- [0038] 상술한 바와 같이 항체는 본 발명에 있어서 특히 바람직한 조직 특이적 결합 물질이며, 본 발명에 있어서 항체는 다클론항체(polyclonal antibody), 단일클론항체(monoclonal antibody) 및 항체 단편을 포함한다. 항체는 특정 대상과만 선택적이고 안정적으로 결합하는 성질을 갖고 있으며, 항체의 Fc 영역에 있는 리신의 -NH₂, 시스테인의 -SH, 아스파라긴산 및 글루탐산의 -COOH는 항체가 본 발명의 나노복합체에 결합하는데 유용하게 이용될 수 있다. 이러한 항체는 상업적으로 입수하거나 이 분야에서 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0039] 한편, 상기 "핵산"은 전술한 항원, 항원, 수용체 또는 이의 일부분을 코딩하는 RNA 및 DNA를 포함한다. 핵산은 상보적인 서열 간에 염기쌍(base pair)을 형성하는 특징을 가지고 있기 때문에 특정 염기서열을 갖는 핵산은 상기 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 핵산을 이용하여 검출할 수 있다. 상기 효소, 항원, 항원 또는 수용체를 코딩하는 핵산과 상보적인 염기서열을 갖는 핵산을 본 발명에 따른 나노복합체에 도입할 수 있다. 핵산은 5' - 및 3' - 말단에 -NH₂, -SH 또는 -COOH 등의 작용기를 가지고, 상기 작용기는 본 발명의 나노복합체로의 핵산 도입에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0040] 이러한 핵산은 당업계에 공지된 표준 방법, 예를 들면 자동 DNA 합성기(예, 바이오써치, 어플라이드 바이오시스 템스 등으로부터 구입할 수 있는 것)를 사용하여 합성할 수 있다. 예로서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 문헌(Stein *et al.* *Nucl. Acids Res.* 1988, vol.16, p.3209)에 기술된 방법에 의해 합성할 수 있다. 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오타이드는 조절된 유리 중합체 지지체를 사용하여 제조할 수 있다(Sarin *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, vol.85, p.7448).
- [0041] 또한, 본 발명의 나노복합체는 평균 크기가 1 nm 내지 500 nm, 보다 바람직하게는 20 nm 내지 200 nm일 수

있다. 상기 크기가 1 nm 미만이면, 나노복합체의 광열 치료 효과 등이 저하될 우려가 있고, 500 nm를 초과하면, 투입된 나노복합체가 혈관을 막는 등 생체로의 적용성이 저하될 우려가 있다.

- [0042] 한편, 본 발명의 나노복합체의 형태는 특별히 한정되지 않으나, 타원 형상을 가지는 것이 바람직하다. 전술한 바와 같이, 본 발명의 나노복합체는 나노입자를 포함하는 코어; 및 상기 코어를 둘러싸고 있는 코팅층을 포함하여, 코어-셀 구조를 가질 수 있는데, 이러한 본 발명의 나노복합체가 타원 형상을 가질 경우, 타원 형상의 가로축 및 세로축을 따라서 발생하는 전자의 진동(oscillation) 및 코팅층의 내부 표면과 외부 표면에서의 혼성 플라즈몬(hybridized plasmon)에 기인하는 두 가지 플라즈몬 특성(plasmonic property)의 조합에 의해 낮은 투여량으로도 탁월한 광열 작용을 나타낼 수 있다.
- [0043] 본 발명은 또한 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 전자기파 조사에 의해 열을 발생하는 금속입자를 도입하는 단계; 및 상기 금속입자를 매개로 나노입자의 표면에 코팅층을 형성하는 단계를 포함하는 나노복합체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0044] 상기 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 금속입자를 도입하는 단계는
- [0045] i) 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 관능기를 도입하는 단계; 및
- [0046] ii) 관능기가 도입된 나노입자와 금속입자를 접촉시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0047] 상기 i) 단계는 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 금속입자가 흡착할 수 있는 영역을 제공하기 위하여 나노입자의 표면이 관능기를 함유하도록 개질하는 단계이다.
- [0048] 상기 관능기는 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자와 관능기 함유 화합물을 접촉시킴으로써 나노입자의 표면에 도입될 수 있다.
- [0049] 상기 관능기 함유 화합물은 도입하고자 하는 관능기의 종류, 또는 나노입자의 종류 등을 고려하여 자유롭게 선택될 수 있다. 예를 들어, 나노입자에 아민기를 도입하고자 할 경우에는, 아미노알킬트리알콕시 실란(ex. 아미노프로필트리메톡시 실란 또는 아미노프로필트리에톡시 실란 등) 등의 실란계 화합물을 사용할 수 있으며, 티올기를 도입하고자 하는 경우에는, 머캅토알킬 트리알콕시 실란(ex. 3-머캅토프로필 트리메톡시실란 또는 3-머캅토프로필 트리에톡시실란 등) 등을 사용할 수 있다.
- [0050] 또한, 상기 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자의 표면에 관능기를 도입하는 방법은 특별히 제한하지는 않으며, 예를 들어, 적절한 용매(ex. 물) 내에 상기 관능기 화합물을 분산시킨 후에, 소정의 조건에서 나노입자를 침지시키는 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0051] 상기 ii) 단계는 표면이 개질된 생분해성 나노입자를 금속입자와 접촉시켜 상기 금속입자를 나노입자에 도입하는 단계이다.
- [0052] 상기 금속입자는 금속 나노입자를 말하는 것으로, 금속의 구체적인 종류는 전술한 바와 같으며, 금속 나노입자는 통상의 합성방법, 예를 들어, 환원법 등으로 합성될 수 있다.
- [0053] 상기 환원법에 사용할 수 있는 금속의 전구체의 예로는 소듐 테트라클로로아우레이트, 소듐 테트라브로모아우레이트, 테트라클로로아우르산, 테트라브로모아우르산, 포타슘 테트라클로로아우레이트, 포타슘 테트라브로모아우레이트, 테트라클로로아우르산 수화물 또는 테트라브로모아우르산 수화물 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 또한, 상기 환원법은 이 분야에서 공지되어 있는 각종의 환원제를 사용하여 수행될 수 있으며, 이와 같은 환원제의 예로는 수산화나트륨, 아스코르브산, 또는 포름알데히드 등을 들 수 있다.
- [0055] 상기와 같은 환원 공정은, 예를 들면, 공지의 각종 용매 내에서 수행될 수 있으며, 이러한 용매의 예로는 옥틸 에테르(octyl ether), 부틸 에테르(butyl ether), 헥실 에테르(hexyl ether) 또는 데실 에테르(decyl ether)와 같은 에테르계 화합물; 헤테로고리화합물; 피리딘 또는 테트라하이드로퓨란(THF)과 같은 헤테로고리화합물; 톨루엔, 자일렌, 메시틸렌 또는 벤젠과 같은 방향족화합물; 디메틸설폭사이드(DMSO)와 같은 설폭사이드화합물; 디메틸포름아마이드(DMF)와 같은 아마이드화합물; 옥틸알코올 또는 데칸올과 같은 알코올; 펜탄, 헥산, 헵탄, 옥

탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸 또는 헥사데칸과 같은 탄화수소; 또는 물 등을 들 수 있다.

- [0056] 상기 금속입자를 생분해성 나노입자에 부착하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 적절한 용매(ex. 물) 내에 금속 입자 등을 분산시킨 후에, 코어에 포함되는 나노입자를 침지시키는 방법 등을 사용할 수 있다. 이와 같은 과정을 거치게 되면 나노입자 상에 존재하는 관능기 및 금속 입자와의 전하밀도(electric charge density)의 차이에 의해 금속 입자가 효과적으로 나노입자에 부착할 수 있다.
- [0057] 또한, 상기 코팅층 형성 단계는 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자에 도입된 금속입자를 매개로 상기 생분해성 나노입자의 표면에 코팅층을 형성하는 단계로,
- [0058] iii) 금속입자가 도입된 유리전이온도 이상에서 분해되는 생분해성 나노입자 및 코팅용액을 용매에서 혼합하는 단계; 및
- [0059] iv) 상기 금속을 환원시켜 생분해성 나노입자의 표면에 코팅층을 형성하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0060] 상기 코팅용액은 코어의 표면을 둘러싸는 코팅층을 형성할 수 있는 금속의 전구체를 뜻하는 것으로, 상기 금속의 전구체의 종류는 전술한 바와 같다.
- [0061] 또한, 상기 용매는 금속의 환원 공정을 수행할 수 있는 용매로, 용매의 종류는 전술한 바와 같다.
- [0062] 또한, 금속의 환원 공정은 전술한 바와 같은 공지의 환원제를 사용하여 수행할 수 있다. 특히, 상기 iv) 단계에서 나노입자에 도입되어 있는 금속입자는, 상기 나노입자(코어) 상에 연속적이고, 균일한 코팅층(셀)을 형성할 수 있도록 하는 결정핵생성 영역을 제공할 수 있다.
- [0063] 또한, 본 발명의 나노복합체의 제조방법은 코팅층이 형성된 나노입자를 표적지향성 물질과 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 표적지향성 물질의 구체적인 종류는 전술한 바와 같다.
- [0065] 상기 표적지향성 물질을 코팅층에 도입하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어, PBS 등의 적절한 용매를 매개로 상기 나노복합체 및 표적지향성 물질을 접촉시키는 방법을 사용할 수 있다.
- [0066] 본 발명은 또한 본 발명의 나노복합체; 및
- [0067] 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 세포사멸이 요구되는 세포질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명의 나노복합체가 약제학적 조성물로 사용될 경우, 상기 조성물은 크게 두 가지 방식에 의한 치료 효과를 나타낼 수 있다. 구체적으로, 표면에 표적지향성 물질이 도입된 본 발명의 나노복합체가 생체 내로 도입될 경우, 목적하는 표적세포 상에 존재하는 수용체와 특이적으로 결합되어, 상기 수용체로부터 매개되는 세포 신호를 부분적 또는 전체적으로 저해할 수 있다. 또한, 본 발명의 나노복합체는 표적세포에 존재하는 수용체에 의해 매개된 내포 작용(receptor-mediated endocytosis)에 의해 상기 표적세포 내부로 흡수될 수 있고, 이때 상기 나노복합체로 특정 과장의 전자기파를 조사할 경우에, 코팅층에 포함된 금속 성분에 의해 유발되는 열에 의해 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있게 된다. 특히, 상기와 같은 표적세포가 종양 세포일 경우, 상기 내포 작용에 의해 흡수된 나노복합체가 세포 내의 리소좀(lysosome)과 결합하면, 주위 환경이 산성 조건으로 변화하게 되는데, 이 경우, 나노복합체가 치료 작용을 나타낸 후에, 생분해성 나노입자가 분해됨으로써, 바람직하지 못한 면역 작용 또는 광열 작용 등의 부작용을 억제할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 약제학적 조성물이 적용될 수 있는 세포 질환의 대표적인 예로는 암을 들 수 있고, 보다 구체적으로는 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암, 대장암, 직장암, 혈액암 및 자궁경부암 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 조성물에서 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의학 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완

충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이소나트륨, 인산수소암모늄, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0071] 본 발명의 조성물은 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조될 수 있다. 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[0073] 본 발명의 조성물의 다른 바람직한 양태는 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비휘발 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용될 수 있다.

[0074] 상기와 같은 본 발명의 약제학적 조성물을 치료에 적용하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 상기 방법은 본 발명에 따른 약제학적 조성물을 생체에 투여하는 단계; 및 상기 생체에 전자기파를 조사하는 단계를 포함할 수 있다. 이와 같은 방법에서, 상기 약제학적 조성물을 생체에 주입하는 단계는 의약 분야에서 통상적으로 이용되는 경로를 통해 투여될 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하고 예를 들어 정맥내, 복강내, 근육내, 피하 또는 국부 경로를 통하여 투여할 수 있다.

[0075] 또한, 상기와 같은 방법을 통해 주입된 나노복합체에 전자기파를 조사하는 방법 역시 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면, 이 분야에서 공지된 의학적으로 허용되는 레이저 장치를 사용하여 조사하면 된다. 이 때 전자기파는 생체의 전신 영역 또는 병소로 판단되는 국소 영역으로 나누어 조사될 수 있다.

[0076] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0077] <실시예 1>

[0078] 도 1에 도시된 과정에 따라 본 발명의 일 태양에 따른 나노복합체를 합성하고, 그 치료 효과 및 치료 작용 후의 생분해성을 측정하였다.

[0079] <제조예 1> 고분자 나노입자(DPNs; Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles)의 합성

[0080] 고분자 나노입자 (DPNs)는 수용상에서 안정화시켰으며, 수분산성이 우수한 자성 나노복합체는 나노에멀션(nanoemulsion)법을 사용하여 합성하였다.

[0081] 구체적으로는, 폴리머인 폴리락티드글리콜릭애시드 (100mg)과 항암제 (3.4 μ M) 및 트리에틸아민을 다이클로로메테인 (7.0 μ M)을 다이클로로메테인 (10 mL)에 용해시킨 후, 상기를 유기성 표면안정제인 폴리비닐알코올 (600mg)을 포함하는 PBS (phosphate-buffered saline)(10 mM, pH 7.4)(Gibco)에 각각 첨가하였다. 상기 유기상(다이클로로메테인) 및 연속상(PBS)을 상호 포화(mutual saturation)시킨 후, 200 W의 초음파 처리(ultrasonification)를 통하여 유화시켰다. 용매 내에서 응집체(cluster)의 용매화 자유 에너지(solvation free energy)는 개개의 소수성 입자(항암제)의 총 용매화 자유 에너지보다 낮기 때문에, 열역학적으로 개개의 소수성 자성 나노입자는 물 내에서 입자를 형성하는 경향이 있으며, 이에 따라 수용상 내에서 고분자 나노입자가 생성되었다. 위와 같은 과정을 거친 후, 용매를 증발시키고, 원심 분리(15,000 rpm)하여 고분자 나노입자를 정제하였다. 분리된 나노입자는 phosphate buffer saline (3ml, 10 mM and pH 7.4)에 분산되었다. 제조된 입자의 투과현미경(TEM) 사진을

도 2의 a)에 나타내었다.

[0082] <제조예 2> 금 나노입자(GNPs; gold nanoparticle)의 합성

[0083] 금 나노입자(GNRs, ~2 nm)는 환원제로서 수산화 나트륨(Sigma-Aldrich Chemicals(제))(1M, 0.5 mL) 및 테트라 키스(히드록시메틸)포스포니움 클로라이드 용액(Sigma-Aldrich Chemicals(제))(12 μ L)의 존재 하에, 상온에서 7 분 동안 테트라클로로아우레이트(III) 트리히드레이트(tetrachloroaurate(III) trihydrate) (Sigma-Aldrich Chemicals(제))(1.0 wt%, 2 mL)를 환원시켜 제조하였다.

[0084] <제조예 3> 관능기가 도입된 고분자 나노입자(DPNs-SH)의 합성

[0085] DPN에 존재하는 카르복실 그룹을 티올 그룹으로 개조하였다. 구체적으로는, 고분자 나노입자 (DPN, 70mg)이 분 산된 인산완충식염수 (phosphate buffer saline) (5ml, 10 mM and pH 7.4)에 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로 필)-카르보디이미드 (21 μ mol), N-하이드록시숙신이미드 (21 μ mol), 및 시스테인 (21 μ mol)을 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 후, 티올로 개조된 DPN을 원심분리 (15,000 rpm)를 통해 분리하여 분리된 DPN-SH를 0.5 mL 의 인산완충식염수 (phosphate buffer saline) (10 mM and pH 7.4)에 분산시켰다.

[0086] <제조예 4> 금 나노입자가 도입된 고분자 나노입자(DPNs-SH-GNPs)의 합성

[0087] 제조예 1에서 제조된 DPN-SHs (40 mg)을 증류수(5mL)에 넣고, 광량의 GNPs(7×10^{14} particles/5 mL)를 넣고 반응시켜, 정전기적 상호 작용을 통해 GNPs를 DPNs에 도입하여, DPNs-SH-GNPs를 합성하였다. DPNs-SH-GNPs의 투과현미경(TEM) 사진을 도 2의 b)에 나타내었다.

[0088] <실시예 2> 금 코팅층이 형성된 고분자 나노복합체(DPGNs; DOX-loaded PLGA gold nano-shell nanocomposites)의 합성

[0089] 탄산 칼륨(potassium carbonate)(Sigma-Aldrich Chemicals(제))(25 mg)을 테트라클로로아우레이트(III) 트리히 드레이트(Sigma-Aldrich Chemicals(제))(0.02 wt%, 50 mL)에 첨가하여 금염(gold salt) 용액을 제조하였다. 이 어서, DPNs-SH-GNPs를 포함하는 용액(200 μ L)을 금염 용액(4 mL) 및 포름알데히드(Sigma-Aldrich Chemicals(제))(80 μ L)와 5 분 동안 혼합하였다. 이 때, DPNs-SH의 표면에 결합된 GNPs는 포름알데히드에 의한 금의 환원의 결정 핵생성 위치(nucleation site)를 제공하고, 이에 따라 DPNs-SH의 코어부를 둘러싸는 연속적인 금 코팅층을 형성할 수 있다. 상기와 같은 금 환원 과정을 2회에 걸쳐 수행한 후, 제조된 나노복합체(DPGNs)를 원심분리(15,000 rpm, 20분)한 후, 증류수로 정제하는 과정을 여러 차례 반복하였다. 제조된 나노복합체는 투과 현미경(TEM)으로 확인하였으며, 그 결과를 도 2의 c) (scale bar = 100 nm)에 나타내었다. 도 3을 통하여, 상기 과정에서 제조된 DPGNs의 Au 원소 분석을 에너지-분산형 X선 측정기(Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy)를 통해 표면에 생성된 금 코팅층을 확인할 수 있다. 또한, 분광 광도계를 사용하여 평가한 UV-vis 영역에서의 DPNs, DPNs-SH-GNPs 및 DPGNs의 흡수 스펙트럼은 도 4에 나타내었다. 도 4로부터, DPN-SH-GNPs가 DPGNs으로 변 화되면서, 표면에 형성된 금 코팅층의 표면 플라즈몬 공명(SPR) 효과에 의해, 최대 흡수 파장이 530 nm에서 800 nm로 시프트된 것을 확인할 수 있었다.

[0090] <실시예 3>

[0091] 실시예 1에서와 동일한 방법으로 제조된 DPGNs에 표적지향성 물질로서 치료용 항체인 얼비투스(Erbitux[®], anti-EGFR antibody)(Roche Pharmacuetical(제))를 도입하였다. 구체적으로, 헤테로 관능기를 가진 폴리에틸렌 글리콜 (5 μ mol, SH-PEG-COOH)을 링커로서 DPGNs (3mg per 500 μ L of phosphate buffer saline)의 표면에 부 착시켰다. 부착되지 않은 폴리에틸렌글리콜은 원심분리 (15,000 rpm)를 통해 제거하였다. PEGylated-DPGNs (13mg), 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카르보디이미드 (21 μ mol), N-하이드록시숙신이미드 (21 μ mol) 및 얼비투스 (2.7 μ M)을 버퍼 용액(10ml, phosphate buffered saline, PBS, 10 mM, pH 7.4)(Hyclone(제))에 넣고 4℃에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후에, 치료용 항체가 도입된 DPGNs(이하, 「ERB-DPGNs」)은

Sephacryl S-300 컬럼(Amersham Bioscience(제))을 이용해 정제하였다. 한편, 인간 면역 글로불린(irrelevant(IRR) human immunoglobulin G(IgG))이 도입된 고분자 나노복합체(이하, 「IRR-DPGNs」)도, 상기와 같은 방법으로 함께 합성하였다.

[0092] <실험예 1> 광학열효과

[0093] 도 5를 통해 DPGNs의 광학열효과를 관찰하였다. 근적외선(NIR, 820 nm and 15 W/cm² for 10 minutes)에의 노출 동안, 온도 분포 데이터(thermographic data)를 열화상 카메라(Thermographic System, AXT100)로, 1초 간격으로 5분 동안 기록하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 온도는 이미지로부터 온도 분포 시스템 소프트웨어(Thermographic System Software)를 사용하여 계산하였다. 비교 분석 결과 DPGNs가 포함된 용액의 경우 DPGNs가 없는 경우에 비해 온도가 14.3°C 증가하였다. 이를 이미지화 하여 붉은색(DPGNs) 대비 파란색(pure water)으로 관찰하여 차이를 뚜렷이 하였다(도 5 a) 참조). NIR 레이저 조사를 통한 DPGNs의 광학열 효과는 국소부위 암세포 사멸에 대한 가능성을 보여주었으며, 폴리락틱글리콜릭애시드의 유리전이온도(45°C)를 넘어서는 온도 증가를 보여 고분자의 변형을 촉진하며 약물 방출의 급격한 증가를 보였다. 도 5 b)는 NIR 레이저(820 nm and 15 W/cm² for 10 minutes) 조사에 따른 DPGNs의 방출된 DOX의 양의 급격한 증가를 보여준다.

[0094] <실험예 2> 세포 적합성 테스트

[0095] 합성된 나노복합체의 세포 적합성을 검증하기 위하여, 상피암 세포인 A431 및 MCF7 세포주(American Tissue Type Culture, ATCC, Rockville, MD)를 배양하고, 즉시 상기 세포(1×10^5 cells/mL)를, 1% 항생제 및 10% FBS(Fetal Bovine Serum)로 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium으로 100 Φ 코팅 배양 접시(Corning culture dish)(10 mL/dish)에 시딩하고, 5% CO₂로 구성된 가습 환경(humidified atmosphere) 하 37°C에서 배양하였다. 제조된 나노복합체의 상기 세포에 대한 친화도를 확인하기 위하여, FACS 분석(Fluorescence-activated cell sorting analysis)을 수행하였다. 구체적으로, 배양된 세포를 완충액(2% FBS 및 0.02% NaN₃ in PBS)으로 세척한 후, ERB-DPGNs 및 IRR-DPGNs와 함께 4°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 배양 시에는 수용체에 의해 매개된 흡수(receptor-mediated uptake)가 아닌 내포 작용(endocytosis)을 통한 비특이적 결합이 일어나는 것을 방지하기 위하여, 온도를 4°C로 유지하였다. 처리된 세포를 3번 세척하고, FITC-라벨된 염소 항인간 IgG(FITC-labeled goat anti-human IgG)를 넣어준 다음, 암실에서 45분간 4°C로 유지하였다. 최종적으로, 세포를 버퍼(400 μl PBS)에 분산시킨 다음, 유세포분리기(fluorescent activated cell sorter)(Becton Dickinson, Mountain View, California, USA)를 이용해서 분석하고, 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다. 도 6의 a)는 A431 세포에 대한 ERB-DPGNs 및 IRR-DPGNs의 분석 결과를 나타내며, b)는 MCF7 세포에 대한 ERB-DPGNs 및 IRR-DPGNs의 분석 결과를 나타낸다. 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, ERB-DPGNs의 A431에 대한 표적 특이성은, ERB의 EGFR로의 결합 친화성(*p<0.01)로 인해, IRR-DPGNs에 비해 더 높게 나타났고, ERB-DPGNs에 의해 처리된 A431 세포는, EGFR 발현 수준의 차이(**p<0.01)에 의하여, ERB-DPGNs에 의해 처리된 MCF7 세포에 비하여 강한 형광 강도를 나타내었다. 또한, 세포 친화도를 영상화하기 위해 공초점현미경(confocal microscope)을 이용하여, ERB-DPGNs이 처리된 세포를 분석하여, 그 결과를 도 7 b)에 나타내었다. 이로부터 알 수 있는 바와 같이, ERB-DPGNs의 경우, 수용체에 의해 매개된 내포 작용(receptor-mediated endocytosis)에 의해 A431 세포 내로 삽입되었으며, 이에 따라 ERB-DPGNs의 녹색 형광은 4',6-아미디노-2-페닐인돌로 염색된 핵(nuclei)의 주변에서 관찰되었다.

[0096] <실험예 3> 나노복합체의 치료 효과 검증

[0097] A431 및 MCF7 세포(10^4 cells/well)를 96-웰 플레이트에서 24 시간 동안 배양하였다. 표적 세포를 ERB-DPGNs 또는 IRR-DPGNs(1 mg/mL, 100 μl)와 37°C에서 배양하였다. 4 시간 후에 동일 부피의 10% FBS를 각 웰에 첨가하고, 세포를 추가적으로 72 시간 동안 배양하였다. 근적외선 레이저 노출(820 nm, 25 W/cm², 5분) 후에, 세포를 37°C에서 2 시간 동안 배양하였다. calcein AM (Molecular Probes(제))으로의 염색 후에, 생존 세포 및 사멸 세포의 분포를 형광 현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에서 형광을 나타내는 것

은 생존 세포이며, 그 반대는 사멸 세포에 해당한다. 치료 효율은 처리 조건 및 비처리 조건 하에서의 세포 생존율(cell viability)의 차이를 계산하여 결정하였다. 관찰 결과, DPGNs에 결합된 엘비투스 항체가 타겟으로 하는 수용체가 과발현된 A431 세포의 경우, 정상적으로 자라지 않았으며, 레이저 조사 시에는 국부적인 치료가 가능함을 확인할 수 있었다. 또한, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole)를 이용하여, 각 샘플에서의 전체적인 세포 생존력을 분석하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9로부터 알 수 있는 바와 같이, A431 세포 상에 레이저를 조사하지 않은 경우, CET-PGNS와 CET-DPGNS는 각각 $91.5 \pm 4.9\%$ (CVCET-PGNS), $86.7 \pm 5.3\%$ (CVCET-DPGNS)였다. 이는 24시간 동안 방출된 DOX의 양이 암세포의 증식을 억제하기에는 너무도 낮은 양이었기 때문이다. 그러나 레이저가 조사된 후의 CET-PGN와 CET-DPGNS는 각각 55.1% ((CVCET-PGNS - CVCET-PGNS + laser)/CVCET-PGNS)와 69.8% ((CVCET-DPGNS - CVCET-DPGNS + laser)/CVCET-DPGNS)를 치료 효율을 보였다. 주목할 점은 CET-DPGNS의 치료효율을 CET-PGNS에 대비해 계산한 결과 ((CVCET-PGNS + laser - CVCET-DPGNS + laser)/CVCET-PGNS + laser) 36.2% 의 효과를 더 보여주었음을 관찰하였다. 이는 레이저 조사로 인한 DPGNs에서의 DOX 약물의 급격한 방출 효과라 할 수 있다. 반대로, CET-DPGNs 또는 IRR-DPGNs으로 처리된 MCF7 세포의 경우, 레이저의 조사 후에도 눈에 띄는 치료 효과를 보이지 않았다.

[0098] 또한 24시간 대비 72시간 후의 A431 세포생존율을 조사한 결과 CET-DPGNS의 효과가 41.2% ((CV24H - CV72H)/CV24H, *p < 0.05)의 급격한 증가를 보였음을 알 수 있다 (도 10). 이는 레이저를 조사하지 않은 CET-DPGNS의 24시간 대비 72시간 치료 효과에 비해 (11.9% ; (CVCET-PGNS - CVCET-DPGNS)/CVCET-PGNS at 72 hours) 4배나 높은 목표지정 광학열 치료 효과 및 약물방출 효과임을 알려준다.

도면의 간단한 설명

[0099] 도 1은 본 발명의 일 태양에 따른 실시예에서 나노복합체를 합성하는 과정을 나타내는 모식도이다.

[0100] 도 2는 본 발명의 실시예에서 제조된 고분자 나노입자, 금 나노입자가 결합된 고분자 나노입자 및 금 코팅층이 형성된 고분자 나노입자의 투과전자현미경 사진이다.

[0101] 도 3은 본 발명의 실시예에서 제조된 금 코팅층이 형성된 고분자 나노입자의 광전자분석 스펙트럼 분석 결과이다.

[0102] 도 4는 본 발명의 실시예에서 제조된 고분자 나노입자, 금 나노입자가 결합된 고분자 나노입자 및 금 코팅층이 형성된 고분자 나노입자의 UV-vis 영역에서의 흡수 스펙트럼 분석 결과이다.

[0103] 도 5는 근적외선 레이저를 10분간 조사하는 동안의 평균 온도 분포를 근적외선 열화상 카메라를 통해 분석한 결과 및 광학열을 통한 약물 방출 효과 실험 결과이다.

[0104] 도 6은 및 도 7a)는 유세포 분리법을 통해 본 발명의 나노복합체의 세포 친화도를 분석한 결과이다.

[0105] 도 7b)는 본 발명의 나노복합체에 의해 처리된 A431 세포의 공초점 현미경 사진이다.

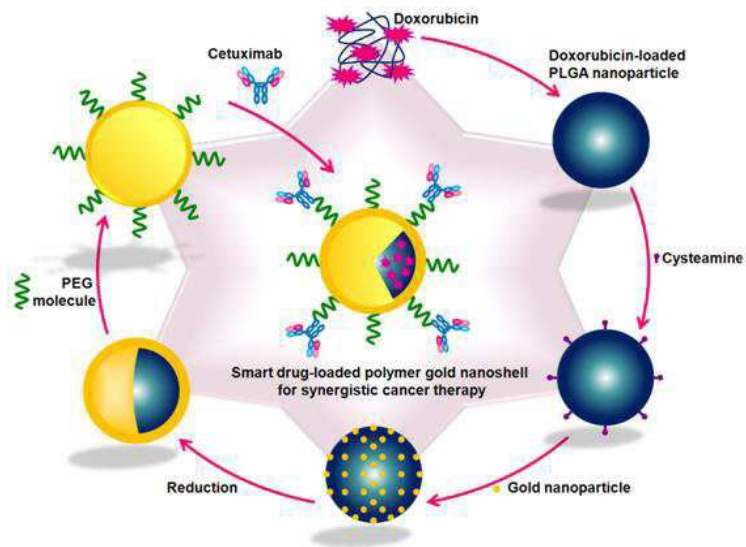
[0106] 도 8은 근적외선 레이저를 조사한 후에 세포 생존 여부 분포를 확인한 형광현미경 사진이다.

[0107] 도 9는 MTT 분석을 통한 치료 효과 분석 결과를 나타내는 도면이다.

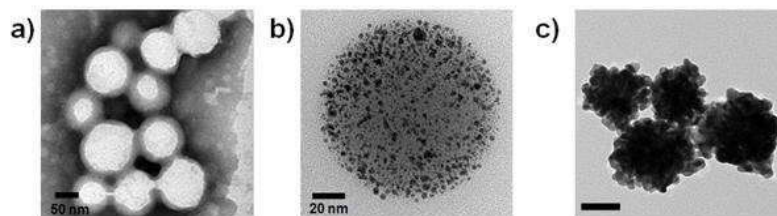
[0108] 도 10은 MTT 분석을 통한 국소 부위 및 화학 치료 효과 분석 결과를 나타내는 도면이다.

도면

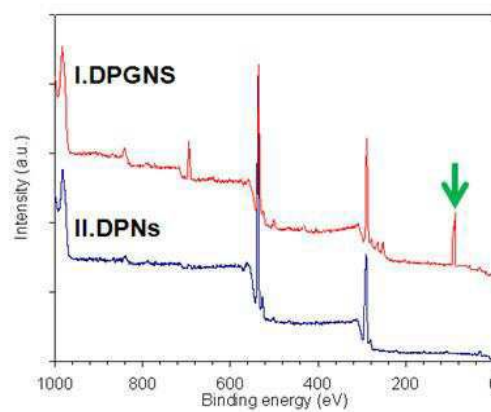
도면1



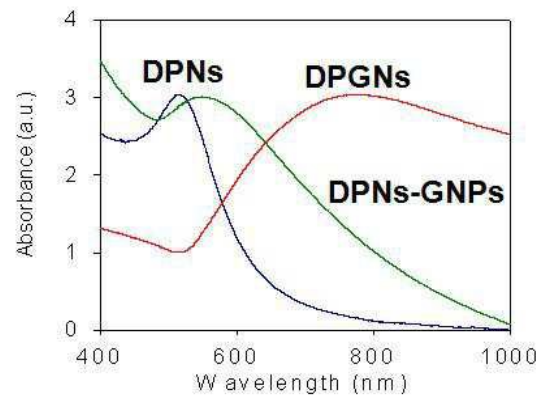
도면2



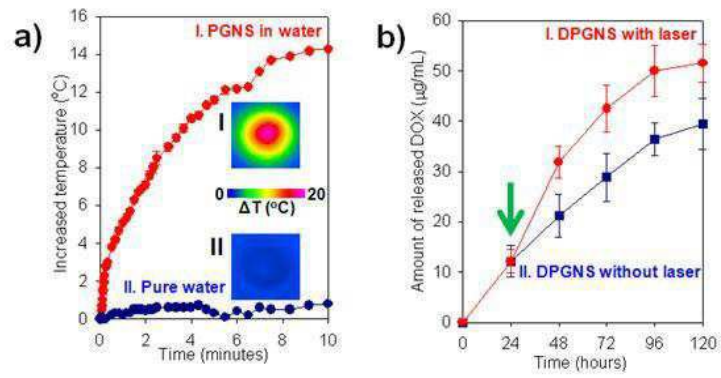
도면3



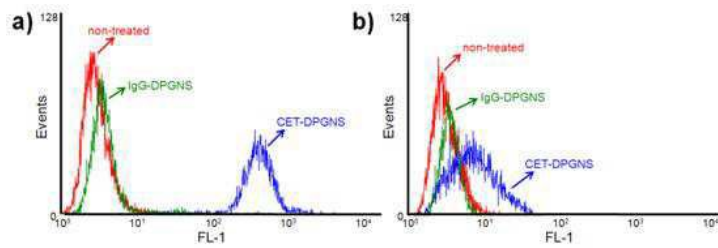
도면4



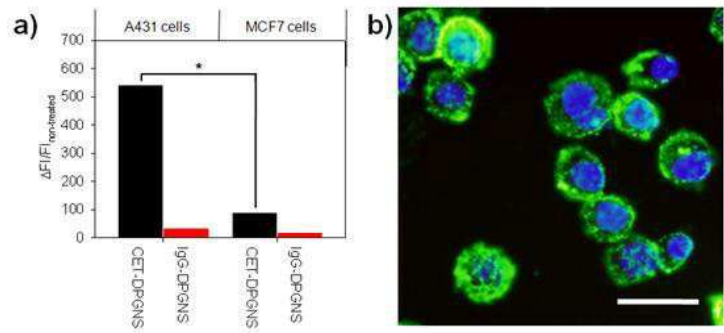
도면5



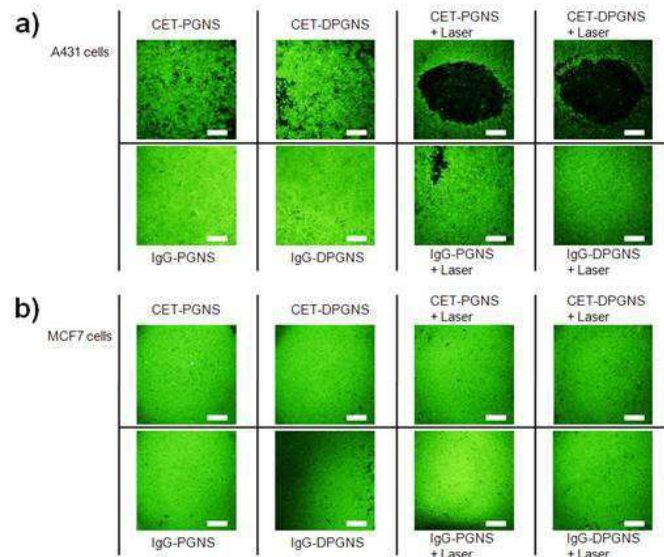
도면6



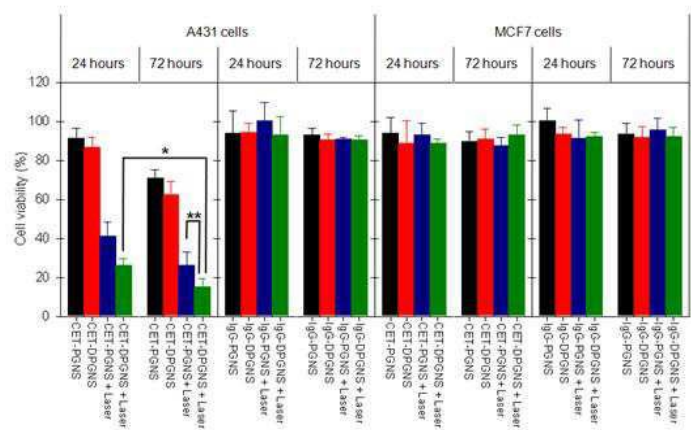
도면7



도면8



도면9



도면10

