



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2019년03월08일  
 (11) 등록번호 10-1956444  
 (24) 등록일자 2019년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61M 37/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/127* (2006.01) *A61L 27/26* (2006.01)  
*A61L 27/54* (2006.01) *A61L 27/58* (2006.01)

(52) CPC특허분류  
*A61M 37/0015* (2013.01)  
*A61K 39/395* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0027220  
 (22) 출원일자 2017년03월02일  
 심사청구일자 2017년03월02일  
 (65) 공개번호 10-2017-0104387  
 (43) 공개일자 2017년09월15일  
 (30) 우선권주장  
 1020160027240 2016년03월07일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌  
 KR1020110065361 A\*  
 KR1020110022554 A  
 US20090317472 A1  
 KR1020130094214 A  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**성균관대학교산학협력단**  
 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

(72) 발명자  
**정지훈**  
 경기도 성남시 분당구 정자일로 1, C동 2510호 (금곡동)  
**김낙원**  
 경기도 광명시 안현로 34, 310동 209호 (하안동, 하안3단지고층주공아파트)

(74) 대리인  
**이명진**

전체 청구항 수 : 총 15 항

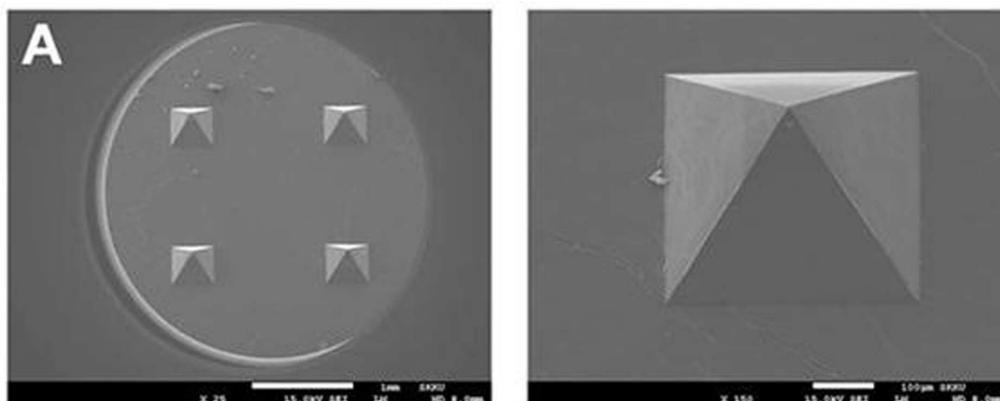
심사관 : 강연경

(54) 발명의 명칭 **자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체 및 그 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 약물을 내포하는 생체적합성 양친성 블록 공중합체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 마이크로니들 구조체는 수용성 또는 소수성 약물을 마이크로니들에 내포시켜 전달할 수 있으며, 특히 지용성 약물은 구조체의 용해와 함께 형성되는 미셀 형태의 자기조립 나노입자 내에 담지 되어 전달되므로, 수용액 상의 용해도를 크게 높일 수 있어, 기존의 흡수가 용이하지 않았던 약물을 피부를 통해 체내로 전달할 수 있다.

**대표도** - 도1a



(52) CPC특허분류

- A61K 48/00 (2013.01)
- A61K 9/0021 (2013.01)
- A61K 9/1273 (2013.01)
- A61L 27/26 (2013.01)
- A61L 27/54 (2013.01)
- A61L 27/58 (2013.01)
- A61L 2400/12 (2013.01)
- A61M 2037/0046 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2B4015056  
 부처명 미래창조과학부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 기초연구사업 (중견연구자지원사업)  
 연구과제명 자가조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 기반 패치형 백신 기술 개발  
 기여율 40/100  
 주관기관 성균관대학교 산학협력단  
 연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF2013R1A2A2A04016796  
 부처명 미래창조과학부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 중견연구자지원사업 (핵심연구 : 융합연구(공동))  
 연구과제명 이방성 폴리펩타이드 나노입자 기반 안혈관 질환 치료 제형 개발  
 기여율 40/100  
 주관기관 성균관대학교 산학협력단  
 연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0027955  
 부처명 미래창조과학부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 선도연구센터지원사업 (이공학분야 S/ERC) 2단계 2/3(6/7)  
 연구과제명 진단/치료용 고분자 소재 연구센터  
 기여율 10/100  
 주관기관 성균관대학교 산학협력단  
 연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10077704  
 부처명 산업통상자원부  
 연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원  
 연구사업명 산업기술혁신사업 (소재부품기술개발사업 (전략적핵심소재기술개발사업))  
 연구과제명 LDH와 MOF를 활용한 기능성 생리활성물질의 피부투과율 증진과 On/Off 방출 제어가 가능한 복합 소재 개발  
 기여율 10/100  
 주관기관 성균관대학교 산학협력단  
 연구기간 2017.04.01 ~ 2018.05.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

약물을 내포하는 생체적합성 양친성 블록 공중합체로 이루어지고, 생체 상피에 삽입되면 용해되어 약물을 담지한 구형의 자가 조립 나노입자를 형성하는 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 양친성 블록 공중합체는 폴리에틸렌옥시드-폴리프로필렌옥시드-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리프로필렌옥시드-폴리에틸렌옥시드-폴리프로필렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리락트산-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리락트산-폴리에틸렌옥시드-폴리락트산 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리글리콜릭산-폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리(락틱-코-글리콜릭산)-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리(락틱-코-글리콜릭산)-폴리에틸렌옥시드-폴리(락틱-코-글리콜릭산) 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리카프로락톤-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리카프로락톤-폴리에틸렌옥시드-폴리카프로락톤 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리락트산 이중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산 이중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리(락틱-코-글리콜릭산) 이중블록 공중합체, 및 폴리에틸렌옥시드-폴리카프로락톤 이중블록 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 양친성 블록 공중합체는 폴리에틸렌옥시드-폴리프로필렌옥시드-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약물은 화학약품, 면역증강제, 백신, 단백질약품, 펩타이드약품, 유전자 치료용 핵산 분자, 화장품용 효능물질, 및 의료용 향체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 약물의 함량은 건조 후 구조체의 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 구조체는 구조체 내 약물의 안정성 및 니들의 강도를 강화하는 첨가제를 추가로 포함하며,

상기 첨가제는 히알루론산, 키토산, 폴리비닐알코올, 카르복시비닐폴리머, 아크릴비닐폴리머, 텍스트란, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 산탄검, 로카스트빈검, 에틸렌-비닐아세테이트 중합체, 셀룰로스 아세테이트, 아크릴 치환 셀룰로오스 아세테이트, 폴리우레탄, 폴리카프로락톤, 폴리락틱-코-글리콜릭산, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리안하이드라이드, 폴리스티렌, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 플루오라이드, 폴리비닐이미다졸, 클로로셀포네이트 폴리올레핀, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌글리콜, 폴리메타크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 카복시메틸셀룰로오스, 및 싸이클로텍스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체.

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 자가 조립 나노입자는 직경 10 내지 2000nm인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체.

### 청구항 9

생체적합성 양친성 블록 공중합체와 약물을 용매에 용해시켜 혼합용액을 제조하는 제1단계; 및

상기 혼합용액을 주형에 투여하고 진공하에서 원심 분리하여 주형의 구멍(cavity)에 주입하고, 상기 혼합용액 주입된 주형을 건조하여 마이크로니들 구조체를 형성하고, 상기 주형으로부터 마이크로니들 구조체를 분리하여 마이크로니들 구조체를 제조하는 제2단계를 포함하는 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 용매는 물, 디클로로메탄( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 테트라하이드로퓨란, 아세토니트릴, 에틸아세테이트, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 트리플루오로알코올 또는 그 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법.

### 청구항 11

제9항에 있어서,

상기 혼합 용액 중 생체적합성 양친성 블록 공중합체의 농도는 5 내지 50%(v/v)인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법.

### 청구항 12

제9항에 있어서,

상기 생체적합성 양친성 블록 공중합체는 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드-폴리에틸렌옥사이드 삼중블록 공

중합체, 폴리프로필렌옥시드-폴리에틸렌옥시드-폴리프로필렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리락트산-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리락트산-폴리에틸렌옥시드-폴리락트산 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리글리콜릭산-폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리(락틱-코-글리콜릭산)-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리(락틱-코-글리콜릭산)-폴리에틸렌옥시드-폴리(락틱-코-글리콜릭산) 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리카프로락톤-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체, 폴리카프로락톤-폴리에틸렌옥시드-폴리카프로락톤 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리락트산 이중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산 이중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리(락틱-코-글리콜릭산) 이중블록 공중합체, 및 폴리에틸렌옥시드-폴리카프로락톤 이중블록 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법.

**청구항 13**

제9항에 있어서,

상기 생체적합성 양친성 블록 공중합체는 폴리에틸렌옥시드-폴리프로필렌옥시드-폴리에틸렌옥시드 삼중블록 공중합체인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법.

**청구항 14**

제9항에 있어서,

상기 제1단계에서 약물은 건조 후 구조체의 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법.

**청구항 15**

제9항에 있어서,

상기 약물은 화학약물, 면역증강제, 백신, 단백질약물, 펩타이드약물, 유전자 치료용 핵산 분자, 화장품용 효능물질 및 의료용 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법.

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

제9항에 있어서,

상기 제1단계의 혼합 용액은 구조체 내에 약물의 안정성 및 니들의 강도를 강화하는 첨가제를 추가로 포함하며, 상기 첨가제는 히알루론산, 키토산, 폴리비닐알코올, 카르복시비닐폴리머, 아크릴비닐폴리머, 텍스트란, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 산탄검, 로카스트빈검, 에틸렌-비닐아세테이트 중합체, 셀룰로스 아세테이트, 아크릴 치환 셀룰로오스 아세테이트, 폴리우레탄, 폴리카프로락톤, 폴리(락틱-코-글리콜릭산), 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리안하이드라이드, 폴리스티렌, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 플루오라이드, 폴리비닐이미다졸, 클로로설포네이트 폴리올레핀, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌글리콜, 폴리메타크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 카복시메틸셀룰로오스, 및 싸이클로덱스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합물인 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 용해에 의해 약물을 담지한 자가 조립 나노입자를 방출할 수 있는 수용해성을 지닌 구조체의 골격물질을 이용한 마이크로니들 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 일반적으로 약물을 전달하는 방법 중 하나인 피하에 직접 주입하는 방식의 바늘은, 통증을 수반하고 염증을 불러올 수 있다는 단점이 있다. 또한, 출혈이 생기며 나이나 특성에 따라 주입이 어려운 경우도 있다. 따라서 이에 대한 대안으로서 마이크로니들이 통증을 최소화할 수 있고 출혈이나 염증반응을 최소화시킬 수 있으며, 약물의 국부적인 주입을 가능하게 하여 주입을 원하는 부위에만 효과적이고 지속적으로 투입할 수 있는 장점이 있어 활발하게 연구되고 있다.

[0004] 최근에는 인체에 무해한 생분해성 물질을 이용하여 마이크로니들을 제조하려는 시도가 이루어지고 있다. 특히 다당체 또는 수용성 고분자 (예시로 젤라틴, 히알루론산 또는 히알루론산/hydroxyprophile methylcellulose 혼성물) 등을 이용하여 용해성 마이크로니들을 제조하려는 시도가 많아졌다(한국 공개특허 제10-2016-0124646호 참조).

[0005] 그러나 이러한 수용성 마이크로니들은 i) 마이크로니들 구조체의 수용성 성질에 의해 소수성 약물의 담지가 매우 제한되며, ii) 경피 투여 후 투여 위치에 침전으로 인해 확산이 제한되어 해당 부위에서 독성을 나타낼 수 있는 문제점이 있었다.

[0006] 또한, 약물을 니들에 코팅하는 경우 빠른 용해와 단순 확산에 의해 약물의 방출조절이 이루어져 생체반응을 조절하기 어렵고, 사용 후 니들 구조체가 부러지는 경우 구조체가 상피에 남아 감염의 위험이 있다.

[0007] 한편, 백신개발에는 크게 항원, 면역증강제, 백신 전달기술 세 가지 기술이 필요하다. 항원 관련기술은 면역반응을 유도하는 항원 디자인 기술과 대량생산 기술이 관련되어 있고, 면역증강제 기술은 면역반응을 충분히 높은 수준으로 오랫동안 유지하기 위한 것이며, 백신 전달기술은 백신의 접종 경로를 결정하기 위해 사용된다.

[0008] 대부분 백신의 접종은 일반적으로 주사기를 이용한 피하, 피내, 또는 근육주사 형태로 투여되어 환자의 순응도를 떨어뜨리며, 전문 의료인의 도움이 반드시 필요하다.

[0009] 초기 백신들은 주로 약독화 생균 백신이나 불활성화 사균 백신들이 주종을 이루었으나 안전성에 대한 요구의 증가로 최근에는 유전공학 기술을 사용하여 구조와 성분이 명확한 서브유닛백신이 주로 개발되었다. 그러나 서브유닛백신은 일반적으로 기존 생균 백신이나 사균 백신에 비해 면역원성이 낮아 면역반응을 증가시키기 위한 면역증강제를 백신 항원과 혼합하여 사용한다. 면역증강제는 백신에 대한 장기면역원성을 증가시켜 접종횟수를 줄일 수 있고 면역원성이 저하된 만성질환자나 고령자에서 면역반응을 증가시켜 백신접종 효과를 높일 수 있다. 가장 일반적으로 사용되는 면역증강제인 알루미늄 염은 대부분의 상용 백신에서 사용되고 있지만 주로 Th2-type 면역반응을 유도하여 항체성 면역반응활성은 우수하나 세포성 면역반응을 일으키지 못해 세포성 면역반응이 필요한 암 백신 등에는 적합하지 않은 것으로 알려졌다.

[0010] 따라서 Toll-like receptor(TRL)은 세균의 세포벽, lipopolysaccharide(LPS), 바이러스 RNA/DNA를 인식하는 대표적인 수용체로서 TRL agonist들은 면역세포에 대한 활성이 강하고 항체성 면역반응 증강작용이 우수할 뿐만 아니라 세포성 면역반응도 증강시킬 수 있어 최근 면역증강제로서 최근 많이 개발되고 있다.

[0011] 다수의 TRL agonist 면역증강제는 낮은 수용도로 인해 oil-in-water (O/W) 에멀전 형태 또는 liposome 형태로 개발되고 있다. 기존 수용해성 마이크로니들은 백신 항원의 전달에는 적합하지만 소수성 면역증강제의 경우에는 니들 구조체의 수용성 성질에 의해 구조체 제작에 어려움이 있으며, 경피에 전달한 후 투여 위치에 침전하여 이로 인해 면역 세포 내로 전달하는 것에 어려움이 있었다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 수용액과 유기 용매 모두에 녹는 성질을 지닌 생체적합성 양친성 블록공중합체를 이용하여, 소수성 약물을 별도의 제형화 없이 마이크로니들 구조체에 내포시켜, 경피에 전달한 후, 구조체 고분자 사슬의 자가 조립을 통하여 소수성 약물을 담지한 나노입자 형성을 유도할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0014] 본 발명자들은 수용성 또는 지용성 약물을 용이하게 전달할 수 있는 약물전달용 마이크로니들 구조체를 제공하기 위하여 예의 노력한 결과, 수용액과 유기용매 모두에 녹는 성질을 지닌 생체적합성 양친성 블록공중합체를 이용하여, 소수성 약물을 별도의 제형화 없이 마이크로니들 구조체에 내포시켜 경피에 투여하였을 때, 자가 조립 나노입자 형성에 의하여 수용액상 약물 용해도의 증진 및 세포 내 전달의 활성화가 가능하다는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0015] 이에, 본 발명은 수용성 또는 지용성 약물을 내포하여 용이하게 전달할 수 있는 생체적합성 양친성 블록 공중합체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 수용성 또는 지용성 약물을 내포하여 용이하게 전달할 수 있는 생체적합성 양친성 블록 공중합체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0017] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0019] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수용성 또는 지용성 약물을 내포하여 용이하게 전달할 수 있는 생체적합성 양친성 블록 공중합체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예로, 상기 생체적합성 양친성 블록 공중합체는 친수성 영역의 고분자와 소수성 영역의 고분자의 이중(di-block), 삼중(tri-block) 또는 다중(multi-block) 블록공중합체일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 친수성 영역의 고분자는 폴리아크릴릭산(Polyacrylic acid, PAA), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 폴리아크릴로니트릴(polyacrylonitrile, PAN), 폴리에틸렌옥시드(Polyethyleneoxide, PEO), 폴리비닐아세테이트(Polyvinylacetate, PVAc), 폴리비닐알콜(Polyvinylalcohol, PVA), 및 폴리메틸메타아크릴레이트(Polymethylmethacrylate, PMMA))로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 소수성 영역의 고분자는 폴리프로필렌옥시드(Polypropyleneoxide, PPO), 폴리카프로락톤(Polycaprolactone, PCL), 폴리락트산(Polylactic acid, PLA), 폴리글리콜릭산(Polyglycolic acid, PGA), 폴리(락틱-코-글리콜릭산)(Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride), 폴리오르쏘에스테르(Polyorthoester), 폴리에스테르(Polyester), 폴리에스테르아마이드(Polyesteramide), 폴리스티렌(Polystyrene), 폴리디엔(Polydiene), 폴리이소부틸렌(Polyisobutylene), 폴리이소프로필아크릴아마이드(Polyisopropylacrylamide), 폴리실록산(Polysiloxane), 폴리(2-비닐 나프탈렌)(Poly(2-vinyl naphthalene)), 폴리(비닐 피리딘 및 N-메틸 비닐 피리디늄 요오드)(Poly(vinyl pyridine and N-methyl vinyl pyridinium iodide)), 및 폴리(비닐 피롤리딘)(Poly(vinyl pyrrolidone))으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로, 바람직하게는, 상기 생체적합성 양친성 블록 공중합체는 폴록사머 (폴리에틸렌옥시드-폴리프로필렌옥시드-폴리에틸렌옥시드)(PEO-PPO-PEO) 삼중블록 공중합체, 폴록사머 (폴리프로필렌옥시드-폴리에틸렌옥시드-폴리프로필렌옥시드) (PPO-PEO-PPO) 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리락트산-폴리에틸렌옥시드(PEO-PLA-PEO) 삼중블록 공중합체, 폴리락트산-폴리에틸렌옥시드-폴리락트산(PLA-PEO-PLA) 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산-폴리에틸렌옥시드(PEO-PGA-PEO) 삼중블록 공중합체, 폴리글리콜릭산-폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산(PGA-PEO-PGA) 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리(락틱-코-글리콜릭산)-폴리에틸렌옥시드(PEO-PLGA-PEO) 삼중블록 공중합체, 폴리(락틱-코-글리콜릭산)(PLGA-PEO-PLGA) 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리카프로락톤-폴리에틸렌옥시드(PEO-PCL-PEO) 삼중블록 공중합체, 폴리카프로락톤-폴리에틸렌옥시드-폴리카프로락톤(PCL-PEO-PCL) 삼중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리락트산(PEO-PLA) 이중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리글리콜릭산(PEO-PGA)

이중블록 공중합체, 폴리에틸렌옥시드-폴리(락틱-코-글리콜릭산)(PEO-PLGA) 이중블록 공중합체, 및 폴리에틸렌 옥시드-폴리카프로락톤(PEO-PCL) 이중블록 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예로, 보다 바람직하게는, 상기 생체적합성 양친성 블록 공중합체는 폴록사머 (폴리에틸렌옥시드-폴리프로필렌옥시드-폴리에틸렌옥시드)(PEO-PP0-PEO) 삼중블록 공중합체일 수 있다.
- [0026] 또한, 상기 마이크로니들 구조체는 약물을 내포할 수 있다. 내포되는 약물에 특별한 제한은 없으며, 수용성 약물 또는 지용성 약물이 모두 사용될 수 있다. 사용가능한 약물의 예로 화학약품, 면역증강제, 백신, 단백질약품, 펩타이드약품, 유전자 치료용 핵산 분자, 화장품용 효능물질, 및 의료용 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 들 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예로, 상기 약물의 함량은 건조 후 구조체의 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 20% 중량일 수 있다. 약물의 함량은 약물의 최소효과농도(minimal effective concentration)와 마이크로니들 구조체의 형태에 따라 다양하게 설정할 수 있으며, 위의 함량에 제한되지 않고 미량의 약물이라도 함유되는 모든 경우를 포함한다.
- [0028] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 구조체는 구조체 내 약물의 안정성 및 니들의 강도를 강화하는 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 히알루론산(hyaluronic acid), 키토산(chitosan), 폴리비닐알코올, 카르복시비닐폴리머, 아크릴비닐폴리머, 텍스트란, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 산탄검, 로카스트빈검, 에틸렌-비닐아세테이트 중합체, 셀룰로스 아세테이트, 아크릴 치환 셀룰로오스 아세테이트, 폴리우레탄, 폴리카프로락톤, 폴리(락틱-코-글리콜릭산)(poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리안하이드라이드(polyanhydride), 폴리스티렌, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 클로라이드(PVC), 폴리비닐 플루오라이드(PVF), 폴리비닐이미다졸, 클로로설포네이트 폴리올레핀(chlorosulphonate polyolefins), 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리메타크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), 에틸셀룰로오스(EC), 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC), 카복시메틸셀룰로오스, 및 싸이클로덱스트린으로 이루어진 군으로 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합물일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예로, 본 발명의 마이크로니들 구조체에 포함되는 생체적합성 양친성 블록 공중합체, 약물 및 첨가제의 조성비는 전달하고자 하는 약물의 특성 또는 전달하고자하는 형태에 따라 다양하게 변화할 수 있다
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 마이크로니들 구조체는 생체 상피에 삽입되면 용해되어 고분자 사슬의 자가 조립을 통해 약물을 담지한 구형의 자가 조립 나노입자를 형성할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 자가 조립 나노입자는 미셀 형태의 직경 10 내지 2000 nm, 바람직하게는 50 내지 1000 nm인 구형의 자가 조립 나노입자일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예로, 본 발명의 마이크로니들 구조체는 수용액에 용해 시 자가 조립 나노입자를 형성함으로써 수용액상에서 안정한 구조를 유지할 수 있으며, 소수성 약물을 전달시 수용액 내 약물의 용해도를 높이는 동시에 담지 된 약물을 세포 내로 원활히 전달할 수 있어 소수성 약물 전달 또는 백신용 항원과 소수성 면역증강제(adjuvant)의 동시 경피 전달을 용이하게 할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 생체적합성 양친성 블록 공중합체과 약물을 용매에 용해시켜 혼합용액을 제조하는 제1단계; 및 상기 혼합용액을 이용해 마이크로니들 구조체를 제조하는 제2단계를 포함하는 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예로, 상기 용매는 물, 유기용매, 또는 그 혼합물일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 유기용매는 휘발성 유기용매로서 디클로로메탄(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 테트라하이드로퓨란(THF), 아세토니트릴, 에틸아세테이트, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 트리플루오로알코올(TFA)이 바람직하나, 반드시 이에 제한되지는 않는다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 혼합용액 내 생체적합성 양친성 블록 공중합체의 농도는 5 내지 50%(volume per volume; v/v)인 것이 바람직하다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 생체적합성 양친성 블록 공중합체는 전술한 바와 같다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구현예로, 본 발명의 마이크로니들 구조체는 상기 혼합용액을 이용하여 제조할 수 있으며, 그 제조방법으로 종래 공지된 방법들을 제한 없이 사용할 수 있다.

- [0040] 바람직하게는, 상기 제2단계는 약물 및 생체적합성 양친성 블록 공중합체의 혼합용액을 주형에 투여하고 진공 하에서 원심 분리하여 주형의 구멍(cavity)에 주입하는 단계; 상기 약물 및 생체적합성 양친성 블록 공중합체의 혼합용액이 주입된 주형을 건조하여 마이크로니들 구조체를 형성하는 단계; 및 상기 주형으로부터 마이크로니들 구조체를 분리하는 단계일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 주형은 공지된 소프트 리소그래피(soft lithography) 기술로 제조된 PDMS(polydimethylsiloxane)와 같은 탄성체 몰드일 수 있다. PDMS 몰드를 제조하는 기술은 일종의 플라스틱 가공기술로서 캐스팅(casting), 인젝션(injection), 핫-엠보싱(hot-embossing) 등의 다양한 방법으로 원하는 몰딩구조를 얻을 수 있다. 일 실시예에서는, 실리콘웨이퍼, 글래스 등의 기판상에 감광물질을 코팅하고 포토마스크를 이용하여 패터닝하여 마스터(master) 몰드를 제조한 후, 이를 주형으로 PDMS를 캐스팅하고 소결시켜, 스탬프 기능을 하는 PDMS 몰드를 완성할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약물에 특별한 제한은 없으며, 수용성 약물 또는 지용성 약물이 모두 사용될 수 있다. 사용가능한 약물의 예로 화학약물, 면역증강제, 백신, 단백질약물, 펩타이드약물, 유전자 치료용 핵산 분자, 화장품용 효능물질, 및 의료용 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 들 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약물은 건조 후 구조체의 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 20 중량%로 사용될 수 있다. 약물의 함량은 약물의 최소효과농도(minimal effective concentration)와 마이크로니들 구조체의 형태에 따라 다양하게 설정할 수 있으며, 위의 함량에 제한되지 않고 미량의 약물이라도 함유되는 모든 경우를 포함한다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 제1단계의 혼합용액은 구조체 내에 약물의 안정성 히알루론산(hyaluronic acid), 키토산(chitosan), 폴리비닐알코올, 카르복시비닐폴리머, 아크릴비닐폴리머, 텍스트란, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 산탄검, 로카스트빈검, 에틸렌-비닐아세테이트 중합체, 셀룰로스 아세테이트, 아크릴 치환 셀룰로오스 아세테이트, 폴리우레탄, 폴리카프로락톤, 폴리(락틱-코-글리콜릭산)(poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리안하이드라이드(polyanhydride), 폴리스티렌, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐 클로라이드(PVC), 폴리비닐 플루오라이드(PVF), 폴리비닐이미다졸, 클로로설포네이트 폴리올레핀(chlorosulphonate polyolefins), 폴리에틸렌옥사이드, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리메타크릴레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), 에틸셀룰로오스(EC), 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC), 카복시메틸셀룰로오스, 및 싸이클로텍스트린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합물일 수 있다.
- [0045] 상기 건조과정은 약물 및 블록공중합체 및 용매의 특성에 따라 진공 하에서 4℃ 내지 500℃의 온도로 가열하는 단계일 수 있다. 건조 온도는 약물, 블록 공중합체 및 용매의 특성에 따라 조절될 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

**발명의 효과**

- [0049] 본 발명은 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명자들은 수용성 또는 지용성 약물을 용이하게 전달할 수 있는 약물전달용 마이크로니들 구조체를 제공하기 위하여 예의 노력한 결과, 수용액과 유기 용매 모두에 녹는 성질을 지닌 생체적합성 양친성 블록공중합체를 이용하여, 소수성 약물을 별도의 제형화 없이 마이크로니들 구조체에 내포시켜 경피에 투여하였을 때, 자가 조립 나노입자 형성에 의하여 수용액상 약물 용해도의 증진 및 세포 내 전달의 활성화가 가능하다는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0050] 본 발명에 따르면 수용성 또는 소수성 약물을 마이크로니들에 내포시켜 전달할 수 있으며, 특히 지용성 약물은 구조체의 용해와 함께 형성되는 미셀 형태의 자기조립 나노입자 내에 담지 되어 전달되므로, 수용액 상의 용해도를 크게 높일 수 있어 기존의 흡수가 용이하지 않았던 약물을 피부를 통하여 체내로 전달할 수 있는바, 향후 백신 항원 및 소수성 백신 면역증강제의 동시 전달 수행 효율을 증진시키는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

**도면의 간단한 설명**

[0052] 도 1은 하기 실시예 1에서 제작한 용해성 마이크로니들의 구조를 나타낸 것으로서, 도 1a는 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM) 이미지이고, 도 1b는 소수성 모델약물인 1,1'-디옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸인도디카르보시아닌, 4-클로로벤젠술포산 염 (1,1' - Dioctadecyl - 3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine iodide; DiD)을 담지한 마이크로니들의 실체현미경(위) 및 형광현미경(아래)의 이미지이며, 도 1c는 소수성 면역증강제(adjuvant)인 Resiquimod(R848)를 담지 한 마이크로니들의 실체현미경(위) 및 형광현미경(아래)의 이미지이다.

도 2는 용해성 마이크로니들이 수용액 상에서 용해되어  $33 \pm 8.73$  nm 크기의 구형 자가 조립 나노입자를 형성한 것을 나타낸 것으로서, 도 2a는 주사전자현미경(SEM) 이미지이고, 도 2b는 광분산법으로 분석한 입자의 크기 분포이다.

도 3은 용해성 마이크로니들로부터 오브알부민(ovalbumin; OVA) 및 R848의 방출양상을 나타낸 것으로서, 도 3a는 OVA만 포함한 마이크로니들(OVA-loaded MN)과 OVA/R848을 포함하는 마이크로니들(OVA-R848 loaded MN)에서의 OVA의 방출양상을 나타낸 것이며, 도 3b는 R848만 포함한 마이크로니들(R848-loaded MN)과 OVA/R848을 포함하는 마이크로니들(OVA-R848 loaded MN)에서의 R848의 방출양상을 나타낸 것이다.

도 4는 마이크로니들로부터 용해되어 자가 조립으로 형성된 나노입자의 세포내 전달 효과를 나타낸 것으로서, 도 4a는 공초점형광현미경 이미지이며, 도 4b는 시간(incubation time)에 따른 형광 물질의 세포내 전달 효과를 관찰한 결과이다.

도 5a는 박피 된 쥐 상피에 마이크로니들을 적용한 후의 피부 구조(광학현미경 및 주사전자현미경 이미지)를 나타낸 것이고, 도 5b 및 도 5c는 소수성 형광물질(DiD)과 FITC(fluorescein isothiocyanate; FITC)로 표지된 친수성 오브알부민(OVA)이 담지 된 용해성 마이크로니들을 마우스 상피에 30분간 투여한 후, 생체 내(in vivo) 광학 이미징 장비를 이용하여, 시간에 따른 DiD 형광(도 5b)과 FITC-OVA(도 5c)의 상피 내 분포 및 소실을 관찰한 결과이다.

도 6은 오브알부민(OVA) 특이적 면역글로불린의 생성에 있어 용해성 마이크로니들(microneedle; MN)의 사용과 면역증강제(R848)의 항체 형성 효과를 나타낸 것이다(subcutaneous injection using hypodermic syringe; SC).

도 7은 마우스 종양모델에서 오브알부민(OVA) 및 R848을 담지한 용해성 마이크로니들의 항종양효과 검증한 결과로서, 도 7a는 OVA 항원을 표지한 E.G7-OVA 세포 xenograft 마우스에서의 종양 크기 변화를 나타낸 것이고, 도 7b는 제형의 항종양 효과에 따른 종양 xenograft 마우스의 생존 곡선을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0053] 본 발명은 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명자들은 수용액과 유기 용매 모두에 녹는 성질을 지닌 생체적합성 양친성 블록공중합체를 이용하여, 소수성 약물을 별도의 제형화 없이 마이크로니들 구조체에 내포시켜 경피에 투여하였을 때, 자가 조립 나노입자 형성에 의하여 수용액상 약물 용해도의 증진 및 세포 내 전달의 활성화가 가능하다는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0054] 이에, 본 발명은 수용성 또는 지용성 약물을 내포하여 용이하게 전달할 수 있는 생체적합성 양친성 블록 공중합체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0055] 또한, 본 발명은 수용성 또는 지용성 약물을 내포하여 용이하게 전달할 수 있는 생체적합성 양친성 블록 공중합체로 이루어진 것을 특징으로 하는, 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체의 제조방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0057] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0059] 본 발명의 일 실시예에서는 양친성 삼중블록공중합체(tri-block copolymer)로서, 수용액상에서 구형의 자가조립체 미셀 나노입자를 형성할 수 있는 Pluronic F127을 사용하여 마이크로니들을 제작하였다(실시예 1 참조).

[0060] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 실시예의 방법으로 제작한 마이크로니들을 500  $\mu$ l의 증류수가 들어있는

petridish( $\varnothing = 30 \text{ mm}$ ) 수면에 띄워 용해 시킨 후, 해당 용액을 취해 TEM grid(formvar coated)에서 건조 시켜 구형입자의 형성을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0061] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 실시예의 방법으로 제작한 용해성 마이크로니들로부터 오브알부민(OVA) 및 Resiquimod(R848)이 방출되는 양상을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0062] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 실시예의 방법에 따라 세포막 염색에 사용되는 소수성 형광물질인 DiD(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 담지한 용해성 마이크로니들을 제작하여, 상기 마이크로니들로부터 생성된 나노입자가 세포의 엔도사이토시스에 의해 소수성 물질(약물)의 세포 내 전달을 매개할 수 있음을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0063] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 실시예의 방법으로 제작한 용해성 마이크로니들을 동물 상피에 투여하였을 때 소수성 약물의 상피 내 전달양상을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0064] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 상기 실시예의 방법에 따라 오브알부민(OVA) 및 Resiquimod(R848)을 담지한 용해성 마이크로니들을 제작하여 총 항-오브알부민 항체(anti-OVA antibody)의 생성 정도를 확인하였다(실시예 6 참조).

[0065] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 암 면역 치료 모델 실험을 위하여, 상기 실시예의 방법에 따라 오브알부민(OVA) 및 Resiquimod(R848)을 담지한 용해성 마이크로니들을 제작한 후, 실험대상인 마우스를 투여하는 약물 및 투여경로에 따라 각 그룹으로 분류하여, 종양 백신의 치료효과를 측정하였다(실시예 7 참조).

[0066] 상기 결과들로 비추어 볼 때, 본 발명에 따른 자가 조립 나노입자 방출형 용해성 마이크로니들 구조체로서, 수용액과 유기 용매 모두에 녹는 성질을 지닌 생체적합성 양친성 블록공중합체를 이용해 제작한 마이크로니들 구조체는, 백신 항원 및 소수성 백신 면역증강제의 동시 전달 수행 효율을 증진시키는 등 다양한 목적 및 용도로 사용될 수 있다.

[0068] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0070] **[실시예]**

[0071] **실시예 1: 마이크로니들의 제작**

[0072] 삼중블록공중합체(tri-block copolymer)인 Pluronic F127을 최종농도 15%로 에탄올에 녹인 후, 에탄올에 녹인 소수성 분자 (1,1'-디옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸인도디카르보시아닌, 4-클로로벤젠술포산 염 (1,1'-Dioctadecyl - 3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine iodide; DiD) 또는 Resiquimod(R848)) 용액을 균일하게 혼합시킨 다음, 회전증발농축기(Rotary evaporator)를 이용하여 용액 내에 존재하는 에탄올 용매를 제거하였다.

[0073] 필름을 얻은 후, 질소로 남아있는 용매를 완전히 증발시켜 제거하고, 상기 형성된 필름에 폴리에틸렌 글리콜(PEG MW 6000) 및 친수성 분자인 오브알부민(OVA)을 함유하는 수용액을 제조하여 첨가한 다음, 초음파분산기(Sonicator)를 이용해 필름을 수용액 속으로 균일하게 분산시켰으며, 용해되지 않은 물질을 제거하기 위해 수용액을 필터에 여과시켰다.

[0074] 실온에서 0.15ml의 수용액을 1cm x 1cm 크기의 재사용이 가능한 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS) 마이크로니들 음각 주형에 투여한 후, swing bucket 로터를 사용하여 4°C, 2,000 rpm에서 10분 간 원심 분리하였고, 진공 트랩이 설치된 vacuum oven에서 진공 하에 건조해 용해성 마이크로니들을 제작하였다.

[0075] 건조한 마이크로니들의 base plate에 2cm x 2cm의 접착테이프를 부착하였다 떼어냄으로써, 도 1에 나타난 바와 같이, 완성된 마이크로니들을 얻을 수 있었다.

[0077] **실시예 2: 마이크로니들의 용해**

[0078] 상기 실시예 1의 Pluronic F127은 양친성 삼중블록공중합체로서, 수용액상에서 구형의 자가조립체 미셀 나노입자를 형성할 수 있다(도 2a의 Polymeric micelles 참조).

[0079] 스티로폼 지지대 위에 파라핀필름(Parafilm<sup>®</sup>)을 깔고, 필름 위에 마이크로니들을 적용하여 수직으로 압력을 가한 후, 필름과 마이크로니들을 스티로폼 지지체에서 분리하였다. 그 후, 상기 마이크로니들에 의해 천공된 필름과 마이크로니들을 500  $\mu\text{l}$ 의 증류수가 들어있는 petridish( $\varnothing = 30 \text{ mm}$ ) 수면에 띄워 마이크로니들을 용해 시켰

고, 30분이 지난 후 해당 용액을 취하여 TEM grid(formvar coated)에서 건조 시켰다. 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 투과전자현미경으로 구형입자의 형성을 확인할 수 있었다.

[0080] 또한, 도 2b에 나타낸 바와 같이, 광분산법(light scattering)으로 분석한 용액 내 미셀의 크기가  $33 \pm 8.73$  nm의 크기를 지니는 것을 관찰할 수 있었다.

[0082] **실시예 3: 오브알부민(OVA) 및 Resiquimod(R848)의 방출양상**

[0083] 상기 실시예 1의 방법으로 제작한 용해성 마이크로니들로부터 오브알부민(OVA) 및 Resiquimod(R848)이 방출되는 양상을 관찰하기 위하여, 상기 용해성 마이크로니들을 인산염 완충 식염수 (PBS, pH 7.4) 상에 투여한 후, 37°C에서 보관해, 미리 정해진 시간 간격(0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 60, 90분)으로 샘플을 채취하였으며, 동일한 부피의 새로운 방출용액으로 교체하였다.

[0084] 그 결과, 590nm에서 비신 코닌 산(BCA) 분석법 (마이크로 플레이트 리더기, Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland)으로 측정하여, 도 3a에 나타낸 바와 같이, OVA만 포함한 마이크로니들(OVA-loaded MN)과 OVA/R848을 포함하는 마이크로니들(OVA-R848 loaded MN)에서의 각 OVA의 방출양상을 확인할 수 있었다.

[0085] 또한, 자외선-가시광선(UV-Vis) 스캔(TECAN Infinite M500 마이크로 플레이트 리더기)은 327nm에서 R848에 대한 흡광도를 산출하여 정량하였는데, 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이, R848만 포함한 마이크로니들(R848-loaded MN)과 OVA/R848을 포함하는 마이크로니들(OVA-R848 loaded MN)에서의 각 R848의 방출양상을 확인할 수 있었다.

[0087] **실시예 4: 용해성 마이크로니들로부터 생성된 나노입자의 세포 내 전달**

[0088] 나노입자는 세포의 엔도사이토시스 기전에 의해 세포질(cytosol) 내로 전달이 가능한 바, 상기 실시예 2의 방법으로 생성된 나노입자의 세포내 전달 여부를 관찰하였다.

[0089] 이를 위해 실시예 1의 방법에 따라 세포막 염색에 사용되는 소수성 형광물질인 DiD(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 담지한 용해성 마이크로니들을 제작하였다. 그 후, 실시예 2의 방법에 따라 마이크로니들을 용해 시킨 용액을 세포(HCT-116)에 처리하였고, 4시간이 지난 후, 상기 용해성 마이크로니들로부터 생성된 나노입자의 세포 내 전달을 공초점형광현미경(confocal fluorescence microscope)를 이용하여 관찰하였다.

[0090] 그 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이, 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)에 녹인 DiD는 세포막을 염색 한 반면, 마이크로니들로부터 생성된 미셀 나노입자는 세포질 내로 전달될 수 있음을 확인하였으며, 또한, 도 4b에 나타낸 바와 같이, 시간(incubation time)에 따른 형광 물질의 세포 내 전달 효과를 확인하였다.

[0091] 상기 결과들을 통해, 마이크로니들로부터 생성된 나노입자는 세포의 엔도사이토시스에 의해 소수성 물질(약물)의 세포 내 전달을 매개할 수 있음을 알 수 있다.

[0093] **실시예 5: 용해성 마이크로니들의 동물 상피 주사 실험**

[0094] 마이크로니들을 동물상피에 투여한 후, 소수성 약물의 상피 내 전달양상을 관찰하기 위하여, 상기 실시예 1의 방법에 따라 세포막 염색에 사용되는 소수성 형광물질인 DiD(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 형광물질(FITC)이 접합 된 친수성 물질인 오브알부민(FITC-OVA)을 담지한 용해성 마이크로니들을 제작하였다.

[0095] 상기 마이크로니들을 마우스(mouse)의 상피에 적용하고 고정하여 30분이 지난 후, in situ optical imaging 장비(Optix MX3)를 이용해 시간에 따른 형광의 분포 정도를 관찰하였다.

[0096] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 상기 마이크로니들은 마우스의 상피층을 성공적으로 투과할 수 있으며(도 5a), 마우스 상피에 직접 투여된 후 30분 이내에 상기 마이크로니들이 분해되어, 소수성 약물(DiD)(도 5b) 및 친수성 약물(OVA)(도 5c)을 상피 내로 방출할 수 있으며, 상피 내에 도달될 수 있음을 확인하였다.

[0098] **실시예 6: 친수성 OVA와 소수성 R848을 포함한 용해성 마이크로니들에서의 항 OVA 특이적 면역글로블린의 생성**

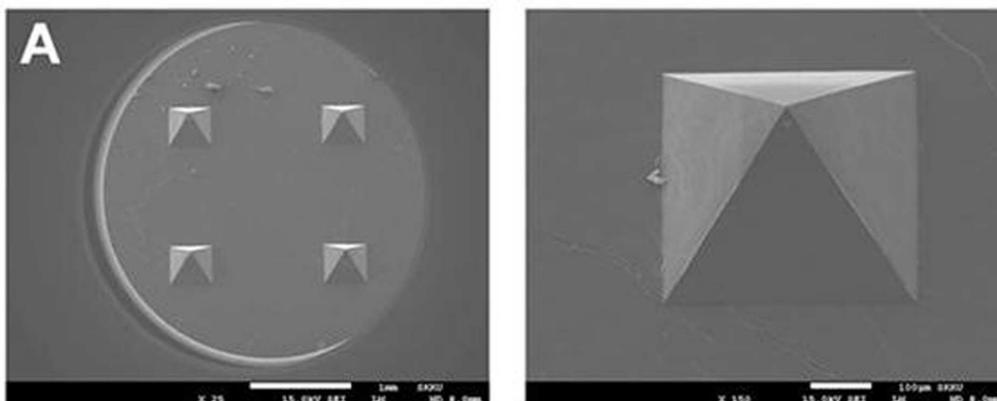
[0099] 효소면역분석법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA)을 사용하여 총 항-오브알부민 항체(anti-OVA antibody)의 생성 정도를 평가하였다.

[0100] 이를 위해 상기 실시예 1의 방법에 따라 오브알부민(OVA) 및 Resiquimod(R848)을 담지한 용해성 마이크로니들을 제작하였다.

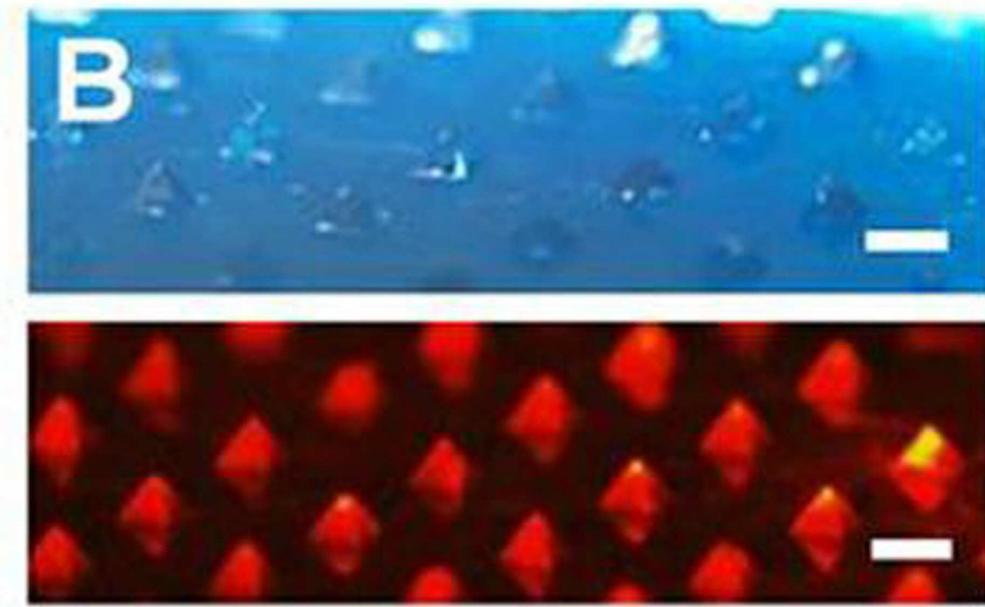
- [0101] 항원(OVA)의 경피 전달을 위해 마이크로니들을 적용한 마우스 그룹에서 세 번째 접종으로부터 7일이 지난 후, 혈액 샘플을 채취하였으며, 접종은 일주일에 한 번 실시되었다. 시간 경과에 따른 항체 생성의 차이를 확인하기 위해 각 최종 주입으로부터 1, 2 및 4주가 지난 후에 혈청 샘플을 수집하였고, ELISA를 이용하여 OVA특이적 면역글로불린의 형성을 관찰하였다.
- [0102] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 면역증강제(R848)가 함께 담지 된 마이크로니들 접종 시, 더욱 우수한 항체 형성 효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0104] **실시예 7: OVA와 R848를 담지한 마이크로니들의 항 종양 면역 치료 효과**
- [0105] 암 면역 치료 모델 실험을 위하여, 상기 실시예 1의 방법에 따라 오브알부민(OVA) 및 Resiquimod(R848)을 담지한 용해성 마이크로니들을 제작하였다.
- [0106] 상기 실험을 위하여, 마우스를 PBS로 처리한 그룹(Blank), 100  $\mu\text{g}$ 의 OVA을 2가지의 투여경로(피하주사기를 이용한 피하주사(subcutaneous injection; SC)와 마이크로니들(microneedle; MN) 주사)로 전달한 그룹, 100 $\mu\text{g}$ 의 OVA과 50 $\mu\text{g}$ 의 R848을 함께 2가지의 투여경로(피하주사기를 이용한 피하주사(subcutaneous injection; SC)와 마이크로니들(microneedle; MN) 주사)로 전달한 그룹으로, 각각 분류하여 실험을 수행하였다.
- [0107] 종양 백신의 치료효과를 측정하기 위해  $1 \times 10^6$  밀도의 E.G7-OVA 세포를 C57BL/6 마우스 등 조직의 오른쪽 부분에 피하 주사하였고, 종양의 부피가 약  $100\text{mm}^3$ 에 도달하였을 때, 상기 각 제형을 주기적(2, 4, 6, 8, 12 및 14일)으로 투여하여 치료를 수행하였다. 버니어 캘리퍼를 사용해 종양 크기를 측정하고, 종양의 부피(V)는  $V = 0.5 \times W^2 \times L$ 의 수식을 이용하여 수치화하였다. 여기서, 상기 W와 L은 각각 종양의 단축 및 장축의 길이를 의미한다.
- [0108] 도 7에 나타난 바와 같이, OVA 항원을 표지한 E.G7-OVA 세포 xenograft 마우스에서의 종양의 크기 변화를 관찰하였으며, 고형 종양의 부피 및 상기 마우스의 체중을 3일마다 측정하여 종양의 형태, 크기 및 마우스의 체중을 기록하였다(도 7a 참조). 제형의 항종양 효과에 따른 종양 xenograft 마우스의 생존 곡선(Kaplan-Meier curve)은 Graph Pad Prism 프로그램을 사용하여 계산하였다(도 7b 참조).
- [0109] 상기 결과들을 통해, OVA와 R848을 담지 한 용해성 마이크로니들은 우수한 종양 성장 저해효과를 나타내며, OVA와 R848을 담지한 마이크로니들 제형을 적용한 마우스는 모두 60일간 생존하였음을 알 수 있다.

**도면**

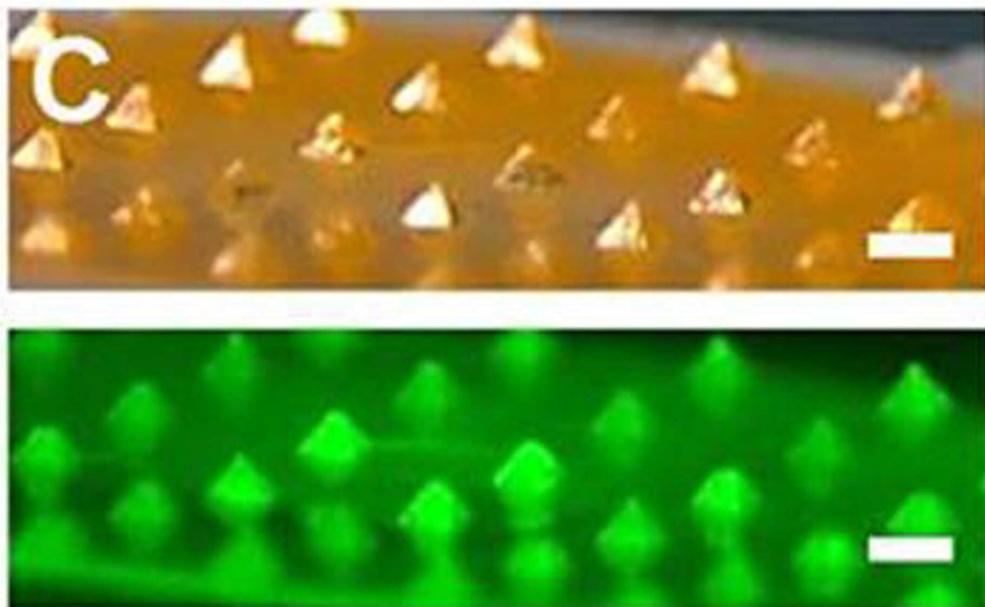
**도면1a**



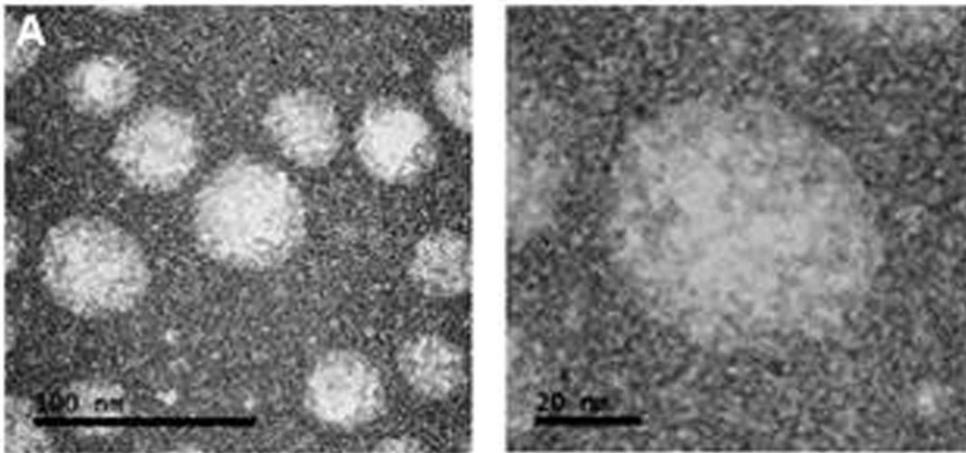
도면1b



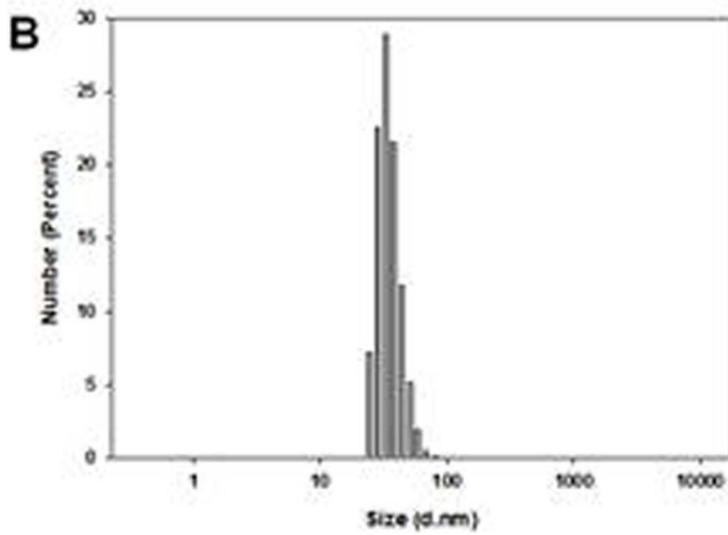
도면1c



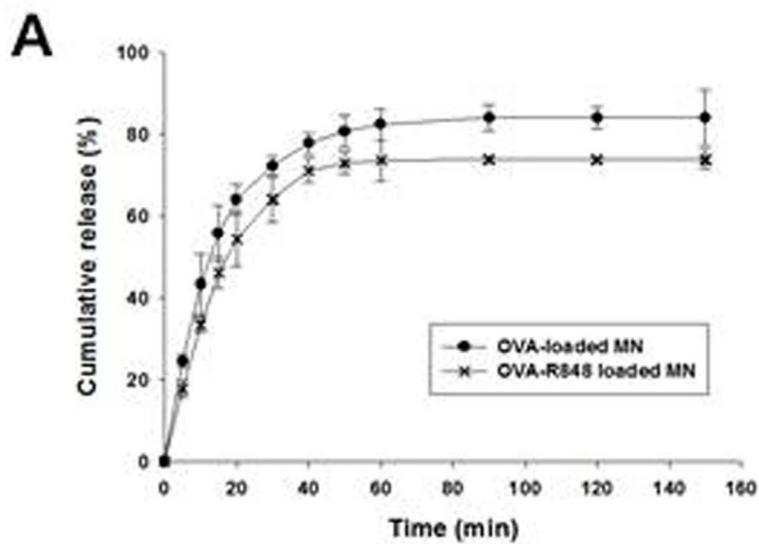
도면2a



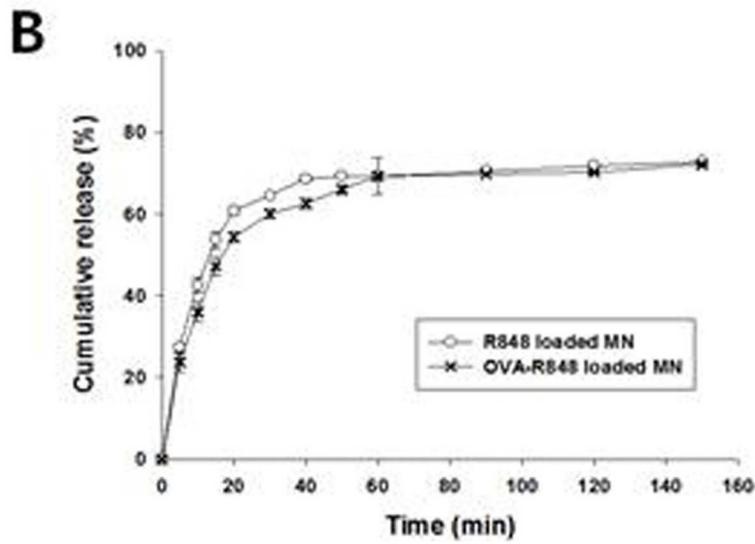
도면2b



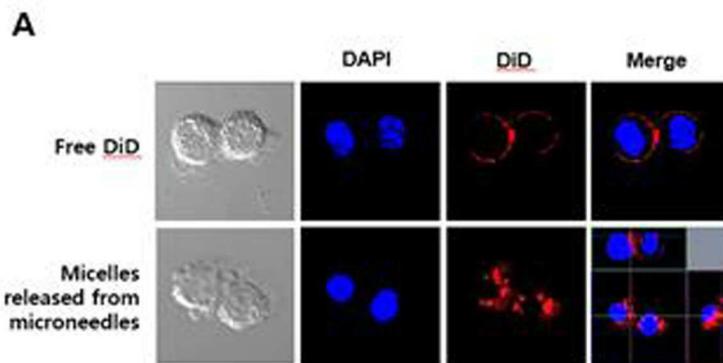
도면3a



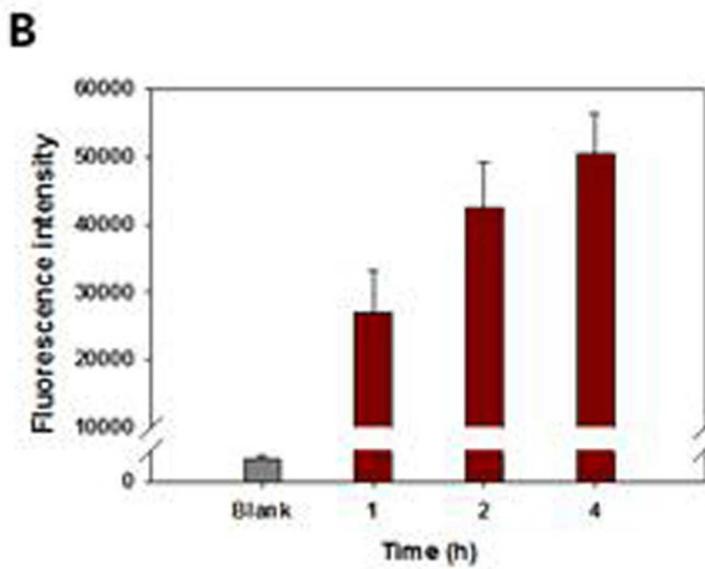
도면3b



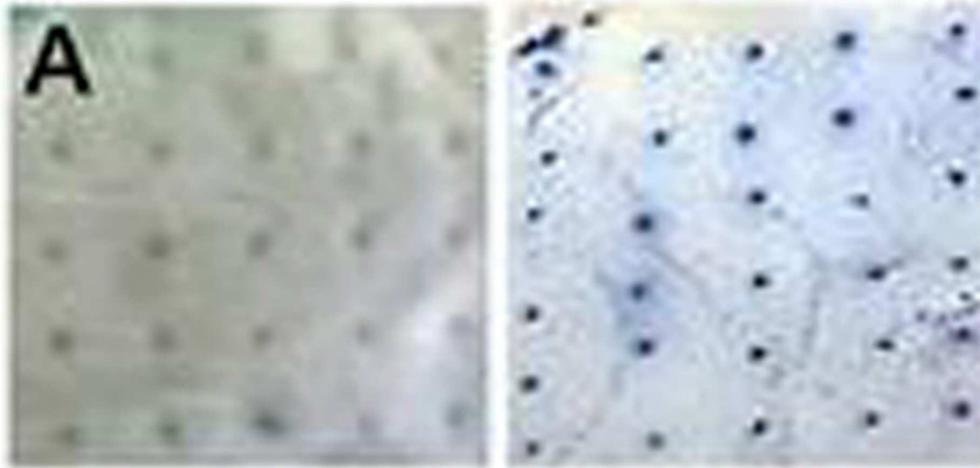
도면4a



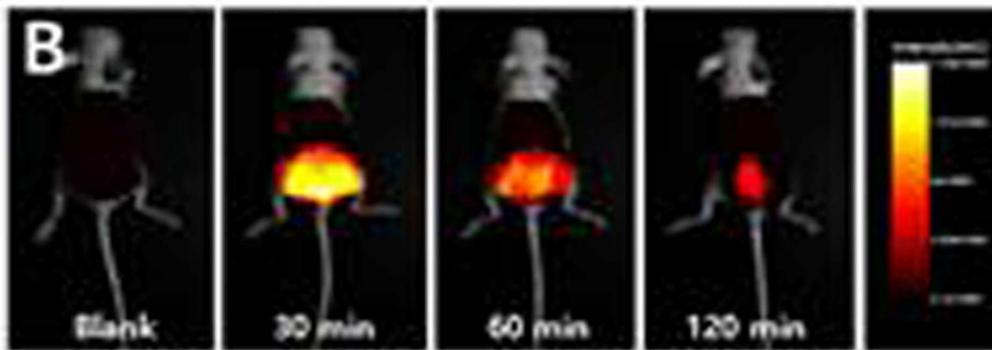
도면4b



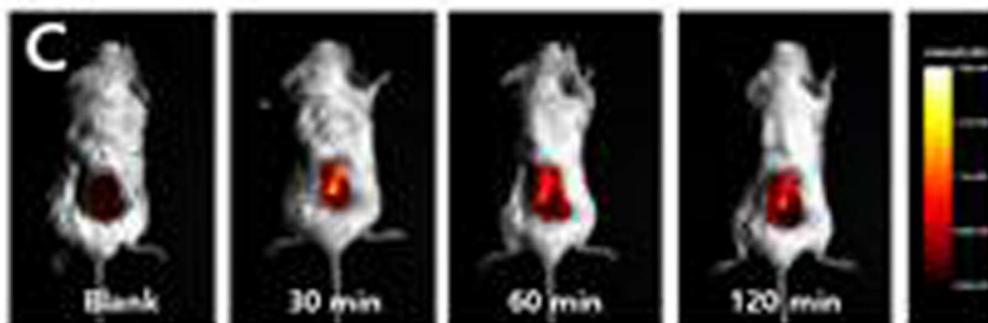
도면5a



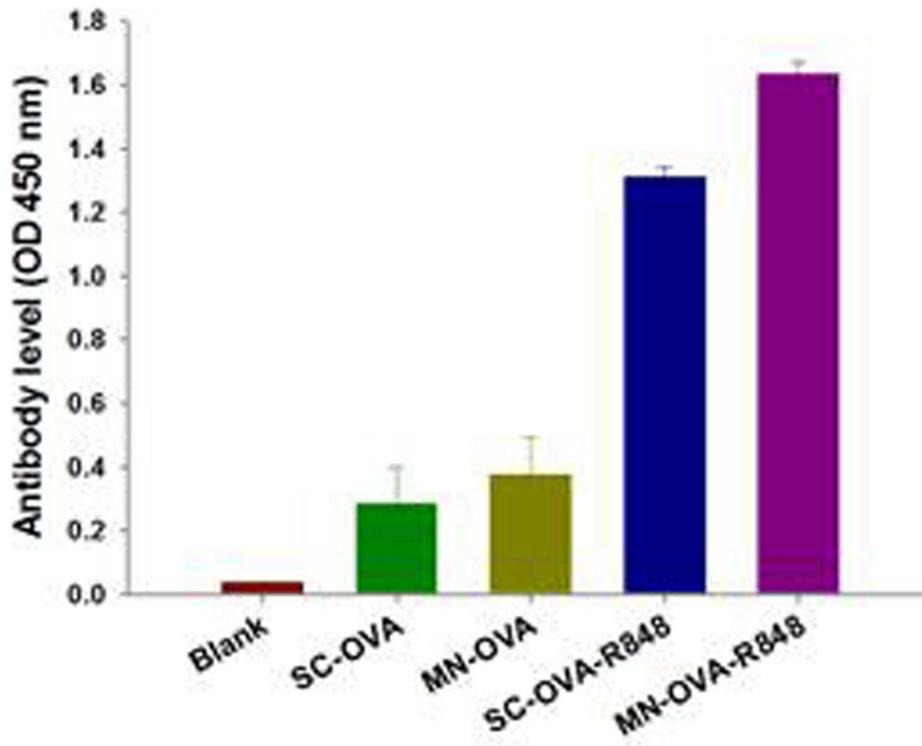
도면5b



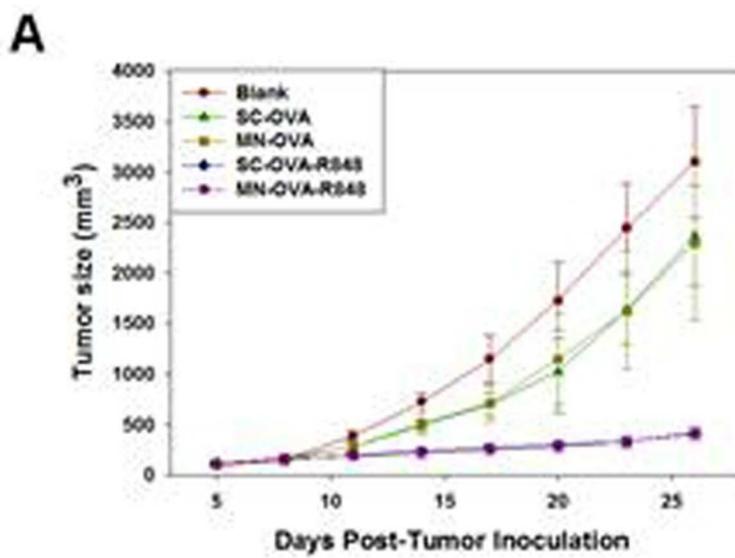
도면5c



도면6



도면7a



도면7b

