



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0062058
(43) 공개일자 2013년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01) A61K 9/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0128466

(22) 출원일자 2011년12월02일

심사청구일자 2012년10월16일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

윤성철

경상남도 진주시 진주대로879번길 19, A동 305호
(주약동, 현대성우 트리펠리스)

최문환

경상남도 진주시 석갑로142번길 18-2 (신안동)

모호신 사

경상남도 진주시 진주대로 501, 응용생명과학부
응용미생물전공 (가좌동, 경상대학교)

(74) 대리인

김순웅

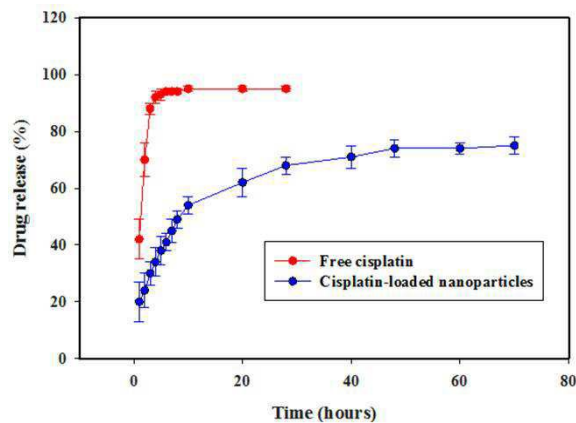
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 무정형의 P (3HV-co-4HB)-b-mPEG에 약물이 담지된 약물전달 제제

(57) 요약

본 발명은 무정형의 poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate)(P(3HV-co-4HB))-b-monomethoxy polyethylene glycol(mPEG) 공중합체에 약물이 적제된 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 제제 및 이를 이용한 타겟 특이적 약물 전달 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 소수성 약물의 담지력을 향상시킬 수 있는 약물 전달 제제 및 이를 이용한 약물 전달 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 과C6A2202

부처명 교육과학기술부

연구사업명 2단계 BK21 사업

연구과제명 농생명산업 글로벌인재 육성사업

주관기관 경상대학교

연구기간 2006.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

무정형의 폴리(3-히드록시발러레이트-코-4-히드록시부티레이트-b-모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜(poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) -b-monomethoxy polyethylene glycol) 공중합체에 약물이 적재된 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약물은 소수성 약물인 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 제제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 소수성 약물은 시스플라틴인 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 제제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약물전달 제제의 크기는 150 내지 160nm인 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 제제.

청구항 5

무정형의 폴리(3-히드록시발러레이트-코-4-히드록시부티레이트-b-모노메톡시 폴리에틸렌 글리콜공중합체에 약물을 적재하는 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 소수성 약물의 전달을 효과적으로 하기 위한 무정형의 poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate)(P(3HV-co-4HB))-b-monomethoxy polyethylene glycol(mPEG)에 약물이 적재된 약물 전달 제제 및 이를 이용한 약물 전달 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 약학 분야에서, 특히 약물 송달 시스템 및 조직 설계에 있어서의 뼈대로서 나노기술은 꾸준히 발달되어 왔다. 약물의 송달을 위해 나노입자를 사용하면 생체적합성이 높아지고 주요 치료 목적 약물의 지연 방출이 가능해진다. 여러 종류의 중합체를 나노입자를 합성하는데 사용해왔는데, 생분해가 되지 않는 중합체로 만든 나노입자를 사용하는 것은 그것이 흡수분해 및 탐식작용에 의해 혈액으로부터 빠르게 제거되므로 지연방출을 위해서는 적합하지 않다. 따라서 최근에는 생분해성 중합체 나노입자가 약물 송달 시스템으로 각광받고 있다.

[0003] 폴리히드록시알카노에이트(Polyhydroxyalkanoate, PHA)는 생분해성 열가소성 중합체로 불균형 성장 조건에서 봉입체와 같은 형태로 미생물에 의해 생산된다. 매우 다양한 생물학적 물질들이 현재까지 잠재적인 약물 송달체로 제조되어 왔지만, PHA는 여전히 선택물질이다. 미생물에 의해 생산되는 여러 종류의 PHA 단일중합체 및 공중합체가 조직 설계 물질 및 제어 방출 약물 벡터로 쓰일 수 있다. 폴리(3-히드록시부티레이트-코-3-히드록시발러레이트)(PHBV)는 생체적합성이면서 생분해성이고 독성이 없는 특성 때문에 주목을 받고 있다. 더욱이, PHA 중합체의 분해산물(단량체 및 올리고머) 역시 조직에 아무런 독성을 나타내지 않고 안전하다고 알려졌다.

- [0004] 미생물성 폴리 (3-히드록시부티레이트)(PHB)는 동물의 조직 내에서 아무런 염증 반응을 일으키지 않고 내성을 가진다는 것이 밝혀졌다. 그러나 몇몇 경우에 화학적으로 변형시키지 않은 미생물성 PHB는 동물 조직에서 염증 반응을 악화시키는 것이 관찰되었다. 신체의 면역 반응을 유발하지 않는 약물 송달용 무독성 물질의 개발이 필요하다.
- [0005] 고분자량의 폴리에스테르는 양친성 블록 공중합체의 뼈대로 쓰이기 어려운 뿐만 아니라 약물 확산 효율을 저해하기 때문에 블록 공중합체 형태의 저분자량 폴리에스테르만이 약물 송달의 첨가물 또는 아췌반트로 쓰일 수 있다. 양친성 블록 공중합체에서 친수성 부분은 소수성 중합체와 강한 공유결합을 한다. 수용액 환경에서 중합체의 소수성 코어는 노출된 친수성 부분의 안쪽에 묻힌다. 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)은 독성이 낮고 면역반응을 일으키지 않기 때문에 PHB, 폴리(L-락티드) 및 폴리(D,L-락티드-코-글리콜리드)와 같은 소수성 생분해성 지방족 폴리에스테르와 함께 친수성 부분으로 널리 사용되고 있다. 나노입자의 표면에 친수성 mPEG(monomethoxy polyethylene glycol)기를 도입하면 옹소닌화에 대항하며, mPEG기를 도입하지 않은 나노입자에 비해 혈중 체류 시간이 길어진다. mPEG 코팅 입자가 혈중 체류 시간이 길어지는 것은 높은 분자량의 mPEG의 두께에 기인하는데, 그것이, 나노입자를 옹소닌화 및 탐식작용으로부터 보호한다. 또한, 폴리에스테르-mPEG 블록 중합체의 분해로 방출되는 mPEG은 신장을 통해 쉽게 몸 밖으로 배설된다.
- [0006] 지난 수십 년간, 효율적인 약물 송달 수단으로 사용되는 생분해성 나노입자의 분야에서 상당한 발전이 있었다.
- [0007] 여러 종류의 천연 및 합성 중합체들이 나노입자의 제조에 쓰였다. 나노입자는 1-1000nm 범위의 크기를 가지는 서브마이크론 크기의 콜로이드 입자로 그 안에 약물이 캡슐화되거나 흡수되거나 분산될 수 있다. 최근에, 약물 송달체로서 생분해성 중합체 나노입자가 각광받고 있는데, 왜냐하면 그것은 생체 적합성이 높고, 생분해성이면서 약물의 방출을 지연시킬 수 있기 때문이다. 폴리히드록시알카노에이트(Polyhydroxyalkanoate, PHA)는 생분해성 열가소성 중합체로 불균형 성장 조건에서 봉입체와 같은 형태로 미생물에 의해 생산된다. 미생물에 의해 생산되는 여러 종류의 PHA 단일 중합체 및 공중합체가 조직 엔지니어링 물질 및 조절 방출 약물 벡터로서 유용할 것이라고 여겨지고 있다. 그러나 PHA를 기초로 한 오직 몇 가지의 물질만이 오늘날까지 연구되었고 그것의 약학적 적용이 평가되었다. 폴리(3-히드록시부티레이트-코-3-히드록시발레레이트)(PHBV) 또는 PHBV 및 폴리카프롤락톤의 혼합물로 만들어진 마이크로입자가 약물의 지연 방출용으로 쓰여 왔다. 유사하게, PHBV로 만들어진 웨이퍼도 또한 항생제 방출용으로 쓰여 왔다. 폴리(3-히드록시부티레이트)(PHB)로 제조된 나노입자는 다른 물질로 덮여있을 때 안전하고 독성이 없는 생분해성 표면을 제공하기 때문에 주목을 받고 있다. 그뿐만 아니라, ISO 10993에 따르면, PHB에 대한 독성 실험에서 그 물질이 동물 내에 나노입자로 사용되었을 때 안전하다고 한다. 그러나 치료약물로 변형되지 않은 미생물성 폴리에스테르를 직접 주입하는 것은 동물 조직에서 염증반응을 일으킨다고 알려져 있다.
- [0008] 대식세포에 의해 인지됨을 피하고 혈중 체류 시간을 늘려서 캡슐화된 약물의 방출을 연장하기 위해서 무독성이면서 혈액 적합성인 물질로 중합체의 표면을 변형하는 것이 필요하다. 폴리(에틸렌글리콜)(PEG)은 독성이 낮고 면역반응을 일으키지 않기 때문에 PHB, 폴리(L-락티드) 및 폴리(D,L-락티드-코-글리콜리드)와 같은 소수성 생분해성 지방족 폴리에스테르와 함께 친수성 부분으로 널리 사용되고 있다. 나노입자의 표면에 친수성 mPEG(monomethoxy polyethylene glycol)기를 도입하면 옹소닌화(opsonization) 및 식세포 작용(phagocytosis)에 저항을 보이며 mPEG 없이 제조된 나노입자와 비교했을 때 혈중 체류 시간이 길어진다고 알려졌다. 이 무독성 물질로 중합체 표면을 변형하는 것은 변형하지 않은 중합체에 의해 생길 수 있는 부작용의 위험을 줄인다. 더욱이, PEG는 식약청에 의해 인간에 대한 사용이 허용되었으며 폴리에스테르-mPEG 블록 중합체의 분해로 생기는 mPEG은 신장을 통해 쉽게 신체로부터 제거된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 무정형의 poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate)(P(3HV-co-4HB))-b-monomethoxy polyethylene glycol(mPEG) 공중합체에 약물을 적재하여 약물의 담지력이 3배 내지 5배 증가되도록 하는 타깃 특이적 약물 전달 제제 및 이를 이용한 약물 전달 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 무정형의 poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate)(P(3HV-co-4HB))-b-monomethoxy polyethylene glycol(mPEG) 공중합체에 약물이 적재된 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 제제를 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 무정형의 (P(3HV-co-4HB))-b-mPEG 공중합체에 약물을 적재하는 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따르면, 무정형의 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG는 약물의 담지력을 높여 효과적인 약물 전달 제제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도1은 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG의 형태를 도시한다.((A)는 $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ 의 스캔 사이즈로 AFM 이미지를 도시한다; (B)는 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자의 TEM 현미경결과를 도시한다(scale bar = $0.5\ \mu\text{m}$); (C)는 확대된 단일 나노입자의 TEM 모습을 도시하며, P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자의 코어-셸 입자구조 나타낸다(scale bar = $100\ \text{nm}$); (D)는 코어-셸 구조를 간략히 그림으로 도시한다.

도2는 자유 시스플라틴과 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자에 적재된 시스플라틴의 in vitro 방출 실험의 결과를 나타낸다.

도3은 DU145 전립선 암세포에서, P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자에 적재된 시스플라틴의 항증식 효과 평가 결과(in vitro)를 나타낸다. 세포는 1, 2.5, 5, $10\ \mu\text{g/ml}$ 농도 범위로 24시간 동안 동일 농도의 자유 시스플라틴 또는 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자에 적재된 시스플라틴으로 처리되었다. 세포독성은 MTT 에세이로 평가되었으며, 결과값은 $\text{mean} \pm \text{SE}$, $n = 4$ 로 도시한다.

도4는 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노입자의 세포 내재화 현미경 결과를 도시한다. (A)는 자유로다민(rhodamine) 123을 12시간 동안 처리한 DU145의 CLSM 이미지를 나타낸다; (B)는 로다민-담지 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자로 12시간 동안 처리한 세포를 도시한다(scale bar $10\ \mu\text{m}$); (C)는 6시간 동안 배양된 DU145 세포에서 나노 입자 흡수를 TEM 이미지로 도시한다(scale bar = $100\ \text{nm}$); (D)는 12시간 배양된 세포에서의 결과를 도시한다(scale bar = $200\ \text{nm}$). 화살표는 내재화된 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자를 가르킨다.

도 5는 medium, P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자, 자유 시스플라틴 및 시스플라틴이 담지된 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자, P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자를 동일한 농도($5\ \mu\text{g/ml}$)로 24시간 처리 시 DU145 세포의 세포주기의 변화를 flow cytometry로 분석한 결과를 도시한다. 데이터는 3개의 각각 실험을 나타내며($n=3$), M1, M2, M3와 M4는 세포주기에서 sub-G0/G1, G0/G1, S 및 G2/M을 각각 나타낸다.

도6은 자유 시스플라틴과 및 시스플라틴이 담지된 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자를 아포토시스 유도 단백질의 활성화에 처리한 효과를 DU145세포에서 웨스턴 블랏으로 분석한 결과를 도시한다. 배지, P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자, 자유 시스플라틴 및 시스플라틴이 담지된 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자, P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자를 동일한 농도($5\ \mu\text{g/ml}$)로 24시간 처리하였다. Bax의 유도와 caspase-3 및 PARP-1의 절단이 DU145에서 웨스턴 블랏으로 분석되었다. lane 1: 전체 세포 용해물의 면역염색; lane 2: P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자 처리 세포; lane 3: 시스플라틴 처리 세포; lane 4: 시스플라틴이 담지된 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자 처리 세포를 각각 도시한다. 데이터는 3번의 단독 실험에 의하여($n=3$)나타났으며, β -Actin이 단백질 로딩량의 기준을 보여주기 위하여 사용되었다.

도7은 시스플라틴 담지 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자의 anti-proleferative efficacy를 보여주는 CLSM 이미지를 도시한다. A는 DAPI염색이 파란 형광으로 나타나며 B는 녹색에서 핵이 특이적으로 염색된 TUNEL로부터 얻어지는 이미지이고, C는 DAPI 와 TUNEL 염색의 이미지를 합친 것을 나타낸다. 모든 공초점 연구는 동일한 시스플라틴 농도($5\ \mu\text{g/ml}$)로 DU145세포에서 수행되었다.

도8은 암세포에 의한 엔도시토시스에 의하여 PEGylated P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자의 세포 내 흡수 과정을 간략하게 도식화한다. 리소좀 효소에 의하여 내부의 세포성 사이토플라즘 엔도솜은 분해되고 약물을 사이토플라즘에서 방출되어 세포핵의 DNA를 공격할 수 있다. 결과적으로 아포토시스 마커를 활성화 시킨다. 이로 인하여 타겟 암세포의 죽음이 일어나게 된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 무정형의 poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate)(P(3HV-co-4HB))-b-monomethoxy polyethylene glycol(mPEG) 공중합체에 약물이 담지된 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 제제에 관한 것이다.

[0015] 본 발명은 안정적인 약물 전달을 위하여 무정형의 PHA(Polyhydroxyalkanoate)-mPEG 공중합체를 이용할 수 있으며, 상기 PHA로는 폴리[3-히드록시부티레이트](PHB) 또는 폴리(β -히드록시 산); 폴리[(4-히드록시부티레이트](PHB); 폴리[3-히드록시발레레이트](PHV); 폴리[3-히드록시부티레이트]-코-폴리[3-히드록시발레레이트](PHBV); 폴리[3-히드록시헥사노에이트](PEEx); 폴리[3-히드록시헵타노에이트] (PHHp); 및 상기 폴리(히드록시알카노에이트)의 혼합물이 포함될 수 있고, 가장 바람직하게는 poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate)(P(3HV-co-4HB))일 수 있다.

[0016] 본 발명은 소수성 약물을 담지하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 소수성 약물은 본래 소수성인 약물(예, 적어도 2의 로그 P(log P)를 가지는)뿐만 아니라 적절한 변형(예, 지방산 및/또는 지질과 결합)에 의해서 소수성으로 변경되는 친수성 의약품을 포함한다(로그 P는 옥탄올-물 또는 버퍼 분산 계수의 로그값으로 정의되고, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 다양한 방법을 이용하여 결정할 수 있다. 로그 P 값이 높을수록 친유성(lipophilicity)은 증가하고 따라서 관심있는 화합물의 지질용해도는 증가한다.) 바람직하게는 본 발명의 소수성 약물은 시스플라틴일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 무정형의 (P(3HV-co-4HB))-b-mPEG 공중합체에 약물을 적재하는 것을 특징으로 하는 타겟 특이적 약물 전달 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면 약물의 담지력은 기존 약물 전달체에 비하여 3배 내지 5배 증가할 수 있다.

[0018] 또한 본 발명의 약물전달 제제의 크기는 바람직하게는 150 내지 160nm인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 디블록 중합체의 합성 및 특징분석

[0021] 중합체는 3단계 배양 방법을 사용하여 *Hydrogenophaga pseudoflava* 33668을 배양함으로써 얻어진다. 모노메톡시 폴리에틸렌글리콜, mPEG[number-average molecular weight (M_n) = 5,000], bis(2-ethylhexanoate) tin catalyst, sodium deoxycholate, dichloromethane (DCM), dimethylformamide (DMF)과 시스플라틴은 Sigma-Aldrich Korea Ltd에서 구입하였다. Polyester P(3HV-co-58 mol% 4HB)는 세포들에서 추출하였고 진공, 50° C의 조건에서 건조시켜 하룻밤동안 두었다. 추출은 뜨거운 클로로폼을 이용하여 6시간 동안 수행하였다.

[0022] P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 디블록 중합체는 변형된 방법의 에스테르 교환방법을 사용하였다. P(3HV-co-4HB)을 mPEG (molecular weight 5000)와 150 °C에서 20 내지 30분 동안 반응시켰다. 이 반응을 통해 고분량 PHA 중합체가 분해되어 저분자량의 매크로분자가 된다. 낮은 분자량의 매크로분자는 bis(2-ethylhexanoate) tin 존재하에서 mPEG와 반응하여 에스테르 교환방법을 통해 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 디블록 중합체를 형성한다. 최종의 순수한 중합체를 얻기 위하여 정제과정을 수행하며 최종적으로 순수한 중합체를 얻기위하여 동결 건조를 수행하였다.

[0023] P(3HV-co-4HB)의 카르복실 말단과 mPEG의 하이드록시 말단의 화학적인 커플링을 Bruker-DRX-500 MHz 분광계로 ¹H NMR을 이용하여 확인하였다. 디블록 중합체의 열전이는 nitrogen purging하에서 differential scanning calorimeter (DSC) 분석법을 이용하여 수행하였으며 Q200 (TA Instruments, New Castle, DE)를 사용하였다. DSC 커브는 단일 내부열피크를 53.5도에서 나타냈다. 이는 mPEG와 관련있는 피크이며, P(3HV-co-4HB) 중합체 블록은 무정형의 특징때문에 melting endotherm이 없는 것으로 관찰되었다.

2. 시스플라틴 담지 나노 입자 제조 및 특징 분석

[0025] 시스플라틴 담지 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노입자(이하, 시스플라틴 담지 나노입자)는 변형된 유제화 용매 증발법을 이용하여 제조되었다. 시스플라틴(5 mg)은 DMF(500 μ l)에 녹이고, 용액은 DCM(typically 50 mg polymer in 2 ml solvent)에 있는 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 용액으로 옮겨졌다. 유기상은 sodium deoxycholate (20 ml, 12 mM) 수용액으로 옮겨졌고 혼합물은 2분동안 15W에서 프로브 초음파 처리하였다. 만들어진 o/w 유제를 상온의 홈 후드에서 부드럽게 저어서 유기 용매가 완전히 증발되도록 하였다. 15, 000 rpm으로 20분간 원심분리하여 나노입자를 정제하였고 결합되지 않은 약물과 초과된 유화액 제거를 위하여 증류수로 2번 세척하였다.

[0026] 표1은 이를 통해 제조된 입자의 크기, 입자 분산, 제타 포텐셜, 약물 담지, 최종 수득량을 나타낸다.

표 1

[0027] Diblock copolymer	Particle size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Drug loading (%)	Yield (%)
P(3HV-co-4HB)-b-mPEG	155 $\pm$ 5	0.154 $\pm$ 0.004	-25 $\pm$ 2	9.58 $\pm$ 1	71 $\pm$ 3

[0028] 형성된 나노입자의 형태를 관찰하기 위해서 atomic force microscopy (AFM), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) 및 transmission electron microscopy (TEM) 관찰을 수행하였다(도1) AFM 이미징은 100-200nm 평균지름을 가진 구형의 원을 나타냈다(도1A). TEM 과 FE-SEM은 나노입자가 이러한 형태라는 것을 다시 한번 확인하였다(도1B). TEM 을 높은 배율에서 관찰한 결과 코어-셸 구조를 확인할 수 있었다(도1C). 외부의 노출된 어두운 부위는 친수성 크리스탈라인 mPEG 부분인 것으로 생각되었으며, 내부의 밝은 부위는 내부 소수성 무정형의 코어인 것으로 생각되었다. 이러한 코어-셸 구조의 나노 입자를 도1D에 간략하게 도식화하였다.

[0029] 시스플라틴과 나노입자의 물리적 상호 작용은 FR-IP 및 X-RAY 회절을 이용하여 결정하였다. X-RAY 회절분석은 시스플라틴과 나노입자의 상호작용을 추가적으로 확인하였다. 결과적으로 약물 결합 나노 입자의 고체상은 나노입자의 포켓 또는 코어 위치에서 약물의 분산 피막형성에 효율적인 것을 확인할 수 있었다.

[0030] 입자크기의 평균과 제타 포텐셜은 각각 DLS 및 ELS analysis로 분석하였다. 나노 입자의 평균지름은 DLS로 측정 한 결과 154nm로 측정되었으며, 이러한 관찰은 AFM, TEM, FE-SEM에 의한 분석 결과에 의해서도 뒷받침되었다. 제타 포텐셜은 ELS를 사용하여 측정하였고 -25mV였다. 표 1은 이러한 값들을 보여준다.

[0031] 3. 약물 담지와 in vitro 약물 방출 실험

[0032] 시스플라틴은 양친성 나노입자의 약물전달체제로써의 잠재성을 평가하기 위한 캡슐화된 항암제의 하나의 예로 사용되었다. 담지되는 시스플라틴의 양은 9.58 $\pm$ 1%로 설정하였다. 약물 포함도를 평가하기 위하여 308nm에서 흡광도를 측정하였다. 평형 상수는 나노입자에서 약물 담지량을 결정하는 데 사용되었다.

[0033] Drug loading (%) = $W_d / W_{NPs} \times 100$,

[0034] W_d 는 약물의 양이며(mg), W_{NPs} 는 지질화된 나노 입자의 양이다. 약물의 농도는 방출 미디움 샘플의 308nm의 흡광도와 검량선(calibration curve)을 사용하여 결정하였다. 시스플라틴의 방출은 시간의 흐름에 따라 나타났다.

[0035] 도2는 나노입자로부터 시스플라틴이 방출되는 것을 도시한다. 초기 과다 방출 이후 지연 방출되는 시스플라틴의 약물 동태를 관찰할 수 있다. 이는 시스플라틴 담지 나노입자가 잠재적인 약물 전달체로 사용될 수 있음을 의미하는 것이다. 반면에 거의 모든 자유 시스플라틴은 2시간 동안 지속적으로 배지로 방출되는 것을 확인할 수 있었다(도2). 따라서, 본 발명의 시스플라틴 담지 나노입자를 이용하는 경우 약물을 체내에서 적절한 속도로 지연 방출 시킬 수 있어 약물 전달에 유용한 것을 확인할 수 있었다.

[0036] 4. In Vitro 세포독성 실험

[0037] 사람 전립선 암 DU145 세포에서 자유 시스플라틴과 시스플라틴 담지 나노입자의 세포독성을 in vito에서 MTT에 세이를 통하여 측정하였다. 세포들은 1 x 10⁴ cells/well로 분주 되고 약물 농도를 1 에서 10 μ g/ml까지 높여

가며 24시간 동안 5% 이하의 CO₂, 37 ° C 조건에서 배양되었다. 자유 시스플라틴 또는 시스플라틴 담지 나노 입자에서 DU 145세포의 생존율이 점차적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도3). 그러나 시스플라틴 담지 나노입자를 처리하여 배양한 경우 자유 시스플라틴을 처리한 세포와 비교하여 더 높은 세포 독성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0038] 자유 나노입자의 in vitro 세포독성도 평가되었으나 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않았다. DU145세포를 시스플라틴 또는 시스플라틴 담지 나노입자와 배양한 경우 약물의 농도가 1, 2.5, 5, and 10 µg/ml로 증가할수록 자유 시스플라틴에서 세포의 생존율이 77 ± 4%, 68 ± 5%, 57 ± 6%, 41 ± 4%로 변화되는 것을 확인할 수 있었으며, 시스플라틴 담지 나노입자에서는 71 ± 4%, 59 ± 5%, 44 ± 4%, 27 ± 3%로 생존율이 변화되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 약물을 본 발명의 나노 입자에 담지하는 경우 약물만을 처리하는 것보다 강화된 세포 독성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 침투력의 강화 및 세포 내부의 세포질에 위치하여 지속되는 성질 때문인 것으로 생각되었다. 세포 성장의 절반을 억제하는 약물의 농도는 5 µg/ml인 것으로 나타났으며, 이를 이후의 in vitro 실험의 농도로 사용하였다.

[0039] 5. 세포성 흡수

[0040] 로다민을 담지하여 나노입자의 흡수를 평가하기 위하여 전립선 암 DU145세포에서 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM), 투과전자현미경(TEM) 실험을 수행하였다.

[0041] 이를 위하여 로다민-담지 나노입자를 이용하였으며, 세포들은 CLSM 로 관찰되었다 (도4A 및 도 4B). 준비된 로다민-123을 나노입자에 0.1 mg/ml로 담지하고 세포 배양액과 혼합하였다. 그리고 2-well 커버클래스 챔버에서 전배양된 세포 전배양액에 추가한 후 12시간 동안 배양하였다. 배양된 세포들은 세번 PBS로 세척하고 4%의 파라포름알데히드로 고정하였으며, 다시 PBS로 세척하였다. 글래스 커버슬립을 슬라이드글라스에 올리고 CLSM을 이용하여 형광 이미지를 확인하였다. 세포 내부의 형광패턴에서 라벨의 효과를 확인하기 위하여 대조실험군은 자유 로다민으로 실험을 수행하였다.

[0042] 도4에서 도시하는 바와 같이 로다민 담지 나노 입자들은 DU145세포에 의하여 내재화되었다. 로다민 담지 나노입자가 세포질에 위치함으로써 붉은색 형광을 관찰할 수 있었고 자유 로다민을 처리했을 때보다 더욱 강한 형광을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 4A 및 도 4B). 12시간동안 나노입자를 배양했을 때 세포의 세포질에서 클러스터를 관찰하였으며, 이로부터 형광신호가 강화되었다. 반면에 자유 로다민을 처리한 경우의 세포는 동일한 흡수를 보였다. 따라서, 본 발명의 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG에 담지하는 경우 세포 내부로 더욱 용이하게 흡수되는 것을 확인할 수 있었다.

[0043] TEM은 세포성 흡수화 내세포성 위치분석을 위하여 사용되었다. 나노 입자 처리된 DU145 세포의 TEM관찰은 도4C 및 도4D에 도시되었다. 흥미롭게도 나노 입자가 흡수되고 세포질에 자리잡음을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 세포질에서의 나노 입자의 수는 세포를 더 오랜 시간 배양할수록 더 많아졌다(도 4C, 도4D). 그러므로 공초점 이미지와 TEM 결과는 DU145 세포에서 나노 입자가 더욱 용이하게 세포로 흡수되어 세포질에 자리잡음을 뚜렷하게 보여주었다. 이러한 결과는 본 발명의 약물 전달 제제를 사용하는 경우 원하는 타겟으로 흡수되어 약물이 방출될 수 있음을 보여주는 것이다.

[0044] 6. 아포토시스에 미치는 영향 측정

[0045] 6.1 자유 시스플라틴과 또는 시스플라틴이 담지된 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자에 세포가 노출된 후 24시간 후에 PI로 염색하여 아포토시스를 측정하였다. Flow cytometry 결과, 자유 시스플라틴 또는 시스플라틴이 담지된 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자 모두 세포 주기 분포에 영향을 주는 것으로 나타났다(도 5). Go/G1, S 및 G2/M주기의 비율은 시스플라틴을 담지한 나노입자에서 뚜렷하게 감소하였으며 이는 DU145 세포에서 성장을 억제함을 의미한다. 시스플라틴 담지 나노입자에서의 G0/G1 phase (25.8%), S phase (5.2%), 및 G2/M phase (9.3%)의 비율은 표2에 나타났다. 시스플라틴 담지 나노 입자에서 G0/G1, S 및 G2/M 의 감소와 같은 결과는 자유 시스플라틴 처리 시에도 관찰되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 시스플라틴이 담지된 나노 입자와 비교하여 뚜렷하게 낮은 정도의 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 세포 사이클의 분포는 약물이 담지되지 않은 나노 입자 또는 대조 배지로 처리한 세포에서는 변화를 관찰할 수 없었다(도5). 표2는 자유 시스플라틴과 시스플라틴이 담지된 나노 입자를 처리할 경우 세포 사이클의 분포 변화를 비교하여 나타낸다.

표 2

Modulation of Cell Cycle Progression and Apoptosis in DU145 Cells by Treatment with Cisplatin

Treatment	G0/G1	S	G2/M	% apoptotic cells ^a
Untreated	71.1 ± 2.4	11.7 ± 1.3	10.7 ± 1.7	6.6 ± 2.1
Blank NPs	57.5 ± 2.7	26.6 ± 2	8.6 ± 2.1	7.1 ± 1.7
Cisplatin	31.4 ± 2.6	5.5 ± 0.4	11.6 ± 1.3	12.4 ± 1.8
Cisplatin-loaded NPs	25.8 ± 3.2	5.2 ± 0.2	9.3 ± 0.8	17.4 ± 1.2

^a % apoptotic cells in the table is indicative of sub-G0/G1 phase of the cell cycle.

6.2 아포토틱 마커의 유도

시스플라틴이 담지된 나노 입자의 분자적 특징을 살피기 위하여 아포토틱 마커(Bax, caspase-3 및 poly (ADP-ribose polymerase) (PARP-1))의 발현을 웨스턴 블랏을 통하여 모니터링하였다. 도6은 프로 아포토틱 마커인 Bax가 시스플라틴이 담지된 나노 입자에서 자유 시스플라틴보다 뚜렷하게 유도되는 것을 보여준다. 대조군으로써 배지와 약물이 담지되지 않은 나노 입자를 사용하였다.

아포토시스의 유도는 caspase-3 및 PARP-1의 절단에 의하여 더욱 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 도 6에서 도시는 바와 같이 35 kDa 폴리펩타이드로부터 17kDa 폴리펩타이드로의 절단이 시스플라틴 담지 나노 입자로 처리할 경우, 시스플라틴 단독 처리시 보다 뚜렷하게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

아포토시스에서 caspase-3의 절단은 DNA 수선 효소 중 하나인 PARP-1에 의하여 더욱 확실하게 확인할 수 있다. 이 효소의 절단은 세포성 아포토시스의 마커로서 사용된다. 도 6은 PARP-1 폴리펩타이드가 116 kDa에서 ~85이하 및 ~29 kDa 이하의 작은 폴리펩타이드로 분해되는 것을 도시한다. PARP-1의 절단은 자유 시스플라틴을 처리하는 것과 비교하여 시스플라틴 담지 나노입자에서 뚜렷하게 증가함으로써, 본 발명의 P(3HV-co-4HB)-b-mPEG 나노 입자에 약물을 담지하는 경우 더욱 효과적으로 암세포에서 아포토시스를 유발할 수 있음을 더욱 명확하게 보여준다.

배지와 약물이 담지 되지 않은 나노입자 역시 Bax를 유도하고 caspase-3와 PARP-1을 절단하는 것을 확인할 수 있으나, 시스플라틴과 시스플라틴 담지 나노입자에서는 그 정도가 더욱 높은 것을 확인할 수 있었으며 이러한 결과를 통해서 나노 입자를 이용하는 경우 더욱 효과적으로 암세포에서 시스플라틴의 높은 축적을 유발하므로써 아포토틱 세포 죽음을 강화할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

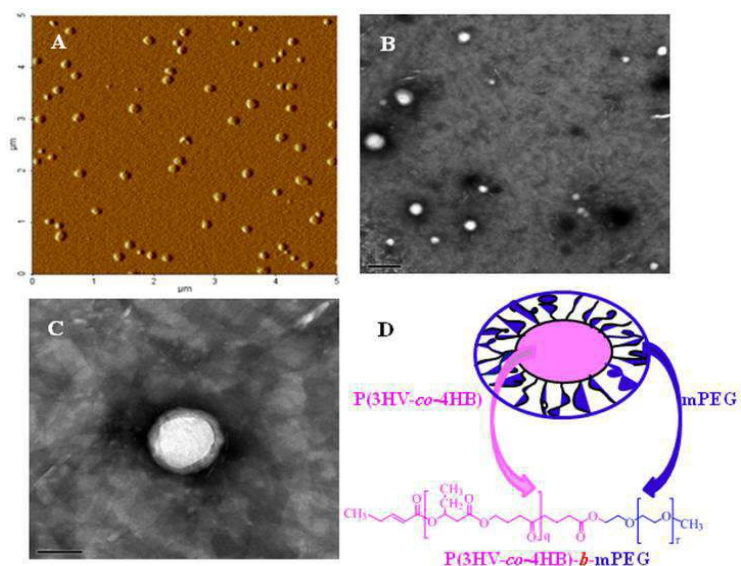
6.3 In vitro에서의 항 증식 및 아포토틱 유도 활성

무정형 시스플라틴 담지 나노 입자의 항종양 효과를 CLSM을 이용하여 세포성 죽음을 관찰함으로써 수행하였다. DNA 손상의 시각화는 TUNEL 염색법을 이용하였으며, DNA 손상 연구는 자유 3' 말단의 효소 표지법을 이용하여 수행하였다.

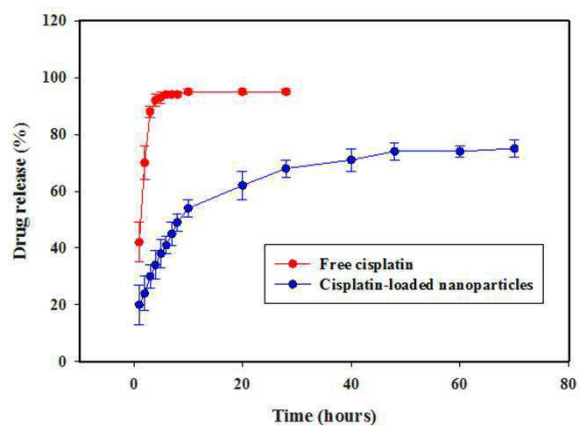
DU145세포의 핵 무정형은 TUNEL 및 DAPI 염색을 이용하여 측정하였고 결과는 도7에 도시되어 있다. DAPI 염색은 A열에서 푸른색 형광으로 도시하였고 TUNEL 염색으로 얻어진 핵의 녹색은 B열에 도시하였다. C열에서는 두 개의 이미지를 병합한 결과를 도시하였다. 도 7에서 나타나듯이 DU145 대조 세포군과 나노 입자로 처리된 세포군은 일반적인 핵의 모양을 나타냈다. 그러나 시스플라틴 또는 시스플라틴 담지 나노 입자로 처리한 경우 뚜렷한 DNA 손상을 확인할 수 있었다. 약물만 처리한 경우와 비교하여 더 많은 아포토틱 세포들이 약물 담지 나노 입자 처리에 의하여 관찰이 가능했다. 따라서, 약물을 담지한 나노입자의 경우 더욱 효과적으로 타겟이 되는 암세포에 아포토시스를 유발할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

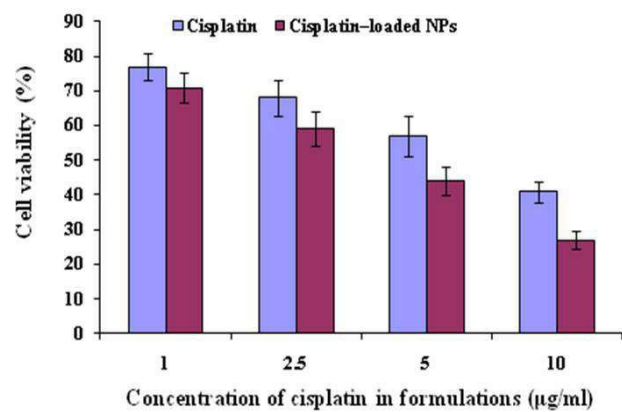
도면1



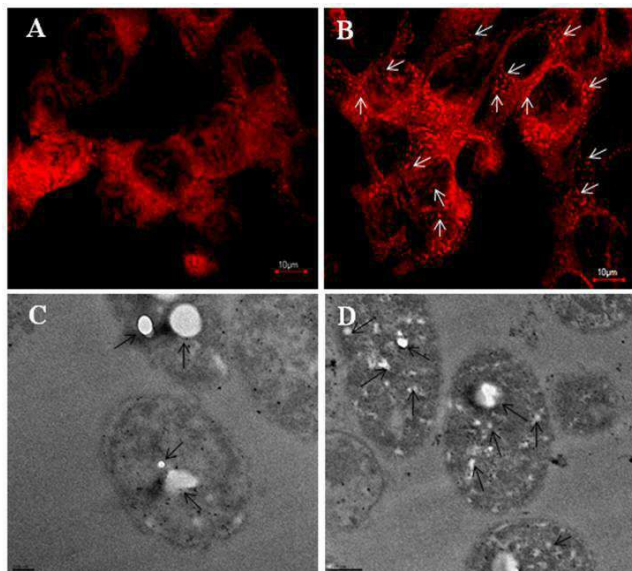
도면2



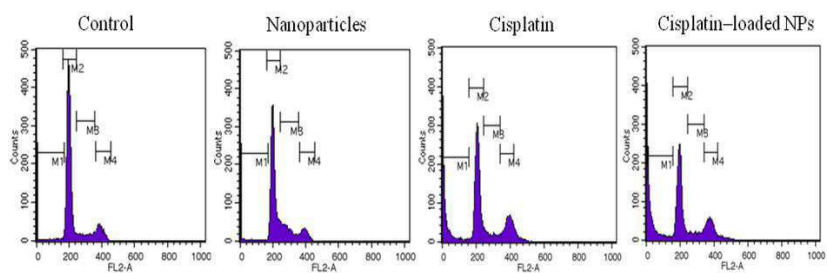
도면3



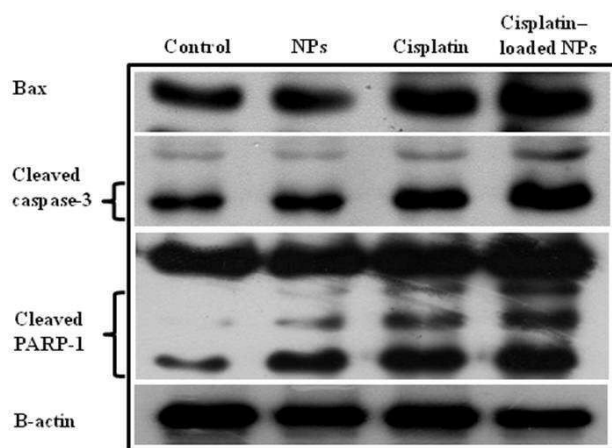
도면4



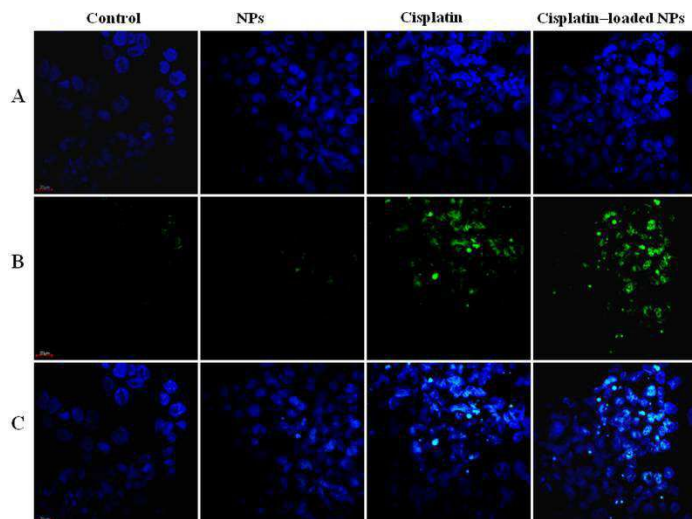
도면5



도면6



도면7



도면8

