



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0143174
(43) 공개일자 2016년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/30 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/30 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0079399

(22) 출원일자 2015년06월04일

심사청구일자 2015년06월04일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

한국교원대학교산학협력단

충청북도 청원군 강내면 태성탐연로 250

(72) 발명자

유자형

울산광역시 울주군 범서읍 구영로 75-26, 105동
2006호 (제일풍경채아파트)

최인성

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학
기술원)

양성호

충청북도 청주시 흥덕구 강내면 태성탐연로
314-8, 라동 104호 (교수아파트)

(74) 대리인

제일특허법인

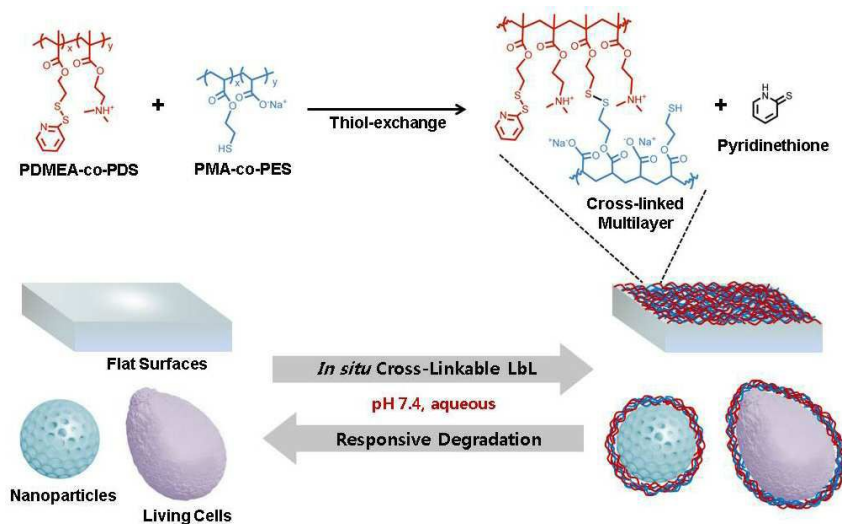
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 생체 적합성 다층 조립체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포의 표면에 형성된 것으로서, 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 및 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체가 교차 결합된 다층 조립체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 다층 조립체는 안정할 뿐만 아니라 생체 자극에 의해 분해가 용이하므로 약물 전달 시스템, 생물센서, 생물의학 장치 등의 다양한 용도에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0012 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345224103

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구조성

연구과제명 자기조립하는 생활성 나노구조체와 유기 나노파티클을 이용한 새로운 약물전달체 개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포의 표면에 형성된 것으로서, 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 및 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체가 교차 결합된 다층 조립체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 기재가 실리콘 웨이퍼, 유리 및 금속으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 다층 조립체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 양전하성 공중합체가 폴리(디메틸아미노에틸메타크릴레이트-co-피리딜디설파이드에틸메타크릴레이트)(PDMEA-co-PDS)인 것을 특징으로 하는 다층 조립체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 음전하성 공중합체가 폴리(아크릴산-co-머캅토에틸 메타크릴레이트)(PMA-co-PES)인 것을 특징으로 하는 다층 조립체.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 다층 조립체가 폴리(디메틸아미노에틸메타크릴레이트-co-피리딜디설파이드에틸메타크릴레이트) 및 폴리(아크릴산-co-머캅토에틸 메타크릴레이트)가 교차 결합된 것임을 특징으로 하는 다층 조립체.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 나노 입자가 약물 또는 기능성 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 다층 조립체.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 기능성 물질이 DNA, RNA, 폴리펩타이드, 비타민 및 이의 유도체, 아미노산 및 이의 유도체, 단백질, 독소(toxin) 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 다층 조립체.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 다층 조립체의 두께가 1 nm 내지 10 μm 인 것을 특징으로 하는 다층 조립체.

청구항 9

기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포를,

1) 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 수용액에 침지시킨 후 세정하는 단계;

2) 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체 수용액에 침지시킨 후 세정하는 단계; 및

3) 상기 단계 1) 및 2)를 반복하는 단계를 포함하는, 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 따른 다층 조립체의 제조방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 단계 1) 내지 3)이, 완충액을 이용하여 pH를 5 내지 10으로 조절하여 4 내지 40℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 다층 조립체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 기재, 나노입자 또는 살아 있는 세포의 표면에 다층 조립법으로 형성된 생체 적합성 다층 조립체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다층 조립법(Layer-by-layer(LbL) assembly)은 재료 과학 및 공학 분야에서 다양한 목적으로 지지체, 플랫폼 및 주형으로서 광범위하게 사용되어 온 다양한 폴리머성 박막의 제조 방법으로서(P. T. Hammond, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1271), 두께 대비 나노미터 수준으로 간단하게 제어할 수 있는 능력, 수성 용액에서의 생체 적합적 가공성, 및 다양한 기능성화와 같은 많은 장점이 있다. 대부분, LbL 막은 상반되게 하전된 고분자 전해질들을, 또는 수소결합 공여체와 수용체들을 벌키 플레이트, 마이크로비드 및 나노 물질은 물론 생세포와 같은 특정 유형의 기질 상에 교번적으로 적층시킴으로써 형성된다.

[0003] 최근, 공유 결합을 간층(interlayer)으로 도입하여 LbL 시스템에 기계적 견고성과 화학적 안정성을 제공하는 방법이 제안되었는데, 이는 통상적인 LbL 막들이 이온 강도나 산성도/염기도(pH)의 급변에 의해 쉽게 파괴되기 때문으로, 이러한 것은 막 사이의 정전기적 상호작용이나 수소 결합을 약하게 하고, 결국 막의 안정성과 기능성을 저하시키게 된다. 비록 공유결합적으로 교차된 LbL 시스템들이 EDC 커플링 반응(I. Drachuk, *et al.*, *ACS Nano* **2012**, *6*, 4266), 카테콜-기반 상호작용(J. Lee S. *et al.*, *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 1351), 클릭 화학(click chemistry)(C. J. Ochs, *et al.*, *ACS Nano*, **2010**, *4*, 1653) 및 디설파이드 결합(A. N. Zelikin, *et al.*, *ACS Nano* **2007**, *1*, 63)과 같은 다양한 방법에 의해 제조되었지만, 이러한 방법들은 대부분, 공유 결합의 형성에 있어서의 많은 어려움: 즉, 추가적인 후처리 작업, 가혹한 pH 조건, 유해한 시약 사용, 및 독성 부산물의 생성 때문에 LbL 조립의 원래 장점을 잃고 있다. 공유 결합 형성에 대한 특정 조건을 고려하면, LbL 조립의 가공성과 생체적합성을 잃지 않고, 안정한 공유 결합으로 그 층들을 교차하는 것이 매우 어렵다.

[0004] 이에, 본 발명에서는 어떠한 후처리 및 첨가제 없이도 생리적 조건(pH 7.4, 수용액 및 실온) 하에서 공유 결합으로 층들을 교차연결할 수 있는 간단하고 생체적합적인 LbL 조립체 및 이의 제조방법을 개발함으로써 본 발명

을 완성하였다.

[0005] 본 발명에 따르면, LbL 조립 기술로 기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포의 표면 상에 안정하면서 생체 적합한 다층 박막을 형성할 수 있으며, 이와 같은 생체 적합성 다층 박막이 형성된 나노 입자는 약물 전달 시스템으로 이용될 수 있고, 살아 있는 세포를 캡슐화시키는 데 유용하게 사용될 수 있다.

선행기술문헌

- [0006] [비특허문헌 1] P. T. Hammond, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1271
- [0007] [비특허문헌 2] I. Drachuk, *et al.*, *ACS Nano* **2012**, *6*, 4266
- [0008] [비특허문헌 3] J. Lee S. *et al.*, *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 1351
- [0009] [비특허문헌 4] C. J. Ochs, *et al.*, *ACS Nano*, **2010**, *4*, 1653
- [0010] [비특허문헌 5] A. N. Zelikin, *et al.*, *ACS Nano* **2007**, *1*, 63

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은, 안정하면서 생체 적합한 다층 박막을 갖는 LbL 조립체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포의 표면에 형성된 것으로서, 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 및 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체가 교차 결합된 다층 조립체를 제공한다.

[0013] 상기 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포를, 1) 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 수용액에 침지시킨 후 세정하는 단계; 2) 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체 수용액에 침지시킨 후 세정하는 단계; 및 3) 상기 단계 1) 및 2)를 반복하는 단계를 포함하는, 다층 조립체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포 등의 다양한 기질의 표면에 LbL 다층 박막이 형성되는 동시에 공유결합이 이루어져서 보다 안정한, 그리고 외부 자극 응답성 다층 박막을 형성할 수 있다. 이와 같은 생체 적합성 다층 박막이 형성된 나노 입자는 약물 전달 시스템에 이용될 수 있고, 살아 있는 세포는 캡슐화되어 생체 투여에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 다층 조립체를 제조하는 과정을 모식화한 것이다.

도 2에서 (a)는 실리콘 웨이퍼 상에 형성된 LbL 막의 LbL 단계별 타원편광반사적 두께를 나타낸 것이고; (b) 내지 (e)는 각각 $CLM^{10/10}$, GSH-처리된 $CLM^{10/10}$, $NCM^{10/10}$ 및 GSH-처리된 $NCM^{10/10}$ 의 SEM 현미경사진을 나타낸 것이다.

도 3은 플루오레세인-말레이미드로 관능화된 실리콘 웨이퍼 상의 LbL 막을 형광 현미경으로 확인한 것이다((a)

CLM^{10/10}, (b) NCM^{10/10}, (c) GSH-처리된 CLM^{10/10}, 및 (d) GSH-처리된 NCM^{10/10}).

도 4에서 (a) 및 (b)는 각각 MSNP 및 MSNP@CLM^{5/5}의 투과 전자 현미경(TEM) 사진이다.

도 5에서 (a)는 MSNP, MSNP@CLM^{5/5} 및 GSH-처리된 MSNP@CLM^{5/5}의 DLS로 측정된 수력학적 직경을 나타낸 것이고; (b)는 MSNP@CLM의 다층 제조 과정 중 측정된 제타 전위값을 나타낸 것이고; (c)는 MSNP@CLM^{5/5}의 GSH 처리 농도 별 자극-개시된 약물 방출 프로파일(무처리(A), 1 mM(B), 5 mM(C) 및 10 mM(D) 처리)을 나타낸 것이고; (d)는 Dox-MSNP@CLM^{5/5}로 24시간 동안 배양한 HeLA 세포에서의 세포활성(%)을 나타낸 것이다.

도 6은 Dox에 대한 UV-가시광선 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 7에서 (a) 및 (b)는 각각 효모@CLM^{5/5} 및 GSH-처리된 효모@CLM^{5/5}를 로다민-말레이미드로 시각화한 것을 공초점 현미경으로 관찰한 사진이고; (c)는 천연 효모(Native), 효모@CLM^{5/5}, GSH-처리된 효모@CLM^{5/5}, 효모@CLM^{10/10}, 및 GSH-처리된 효모@CLM^{10/10}의 활성을 플루오레세인 디아세테이트(FDA)로 조사하여 측정된 결과이고; (d)는 라이티카제에 노출 시, 천연 효모, 효모@CLM^{5/5}, GSH-처리된 효모@CLM^{5/5}, 효모@CLM^{10/10} 및 GSH-처리된 효모@CLM^{10/10}의 광학 밀도를 측정된 결과이다.

도 8은 로다민-말레이미드로 관능화된 효모@CLM^{10/10} 및 GSH-처리된 효모@CLM^{10/10}를 공초점 현미경으로 확인한 것이다.

도 9는 효모@CLM^{5/5}, GSH-처리된 효모@CLM^{5/5}, 효모@CLM^{10/10}, 및 GSH-처리된 효모@CLM^{10/10}의 FDA로 조사된 활성을 공초점 현미경으로 확인한 것이다.

도 10은 디설파이드 함유 중합체 PDMEA-co-PDS로 다층 조립 후 부산물 피리딘티온에 대한 UV-가시광선 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 티올 함유 중합체 PMA-co-PES로 다층 조립 후 상청액 내에 있는 부산물 피리딘티온에 대한 UV-가시광선 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포의 표면에 형성된 것으로서, 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 및 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체가 교차 결합된 다층 조립체를 제공한다.
- [0017] 본 발명에서는 실리콘 웨이퍼, 실리카 나노입자, 및 살아 있는 세포와 같은 다양한 기질을 2개의 상반되게 하전된 양전하성 공중합체 및 음전하성 공중합체 용액 내에 교번적으로 침지시킴으로써, 상기 기질 상에 LbL 조립을 수행하였으며, 상기 LbL 조립을 통해 상기 기질의 표면에 다층 막을 형성시킬 수 있다. 양전하성 또는 음전하성 용액 내의 전해질이 정전기적 상호작용에 의해 하전된 표면으로 인도되는 동안, 조립된 층들은 티올-교환 반응에 의해서 형성된 디설파이드 결합으로 교차되는데, 이는 보다 안정한 다층 구조의 형성을 촉진시킨다.
- [0018] 본 발명에 따른 다층 조립체의 제조 과정에 대한 모식도를 도 1에 나타내었다.
- [0019] 본 발명에서 상기 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체는 폴리(디메틸아미노에틸메타크릴레이트-co-피리딜 디설파이드에틸메타크릴레이트)(이하, "PDMEA-co-PDS")일 수 있으며, 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체는 폴리(아크릴산-co-머캅토에틸 메타크릴레이트)(이하, "PMA-co-PES")인 것을 특징으로 한다. 상기 양전하성 및 음전하성 공중합체는 교차 결합으로 안정하게 연결됨으로써 다층 구조를 형성할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 "다층 조립체(Layer-by-layer(LbL) assembly)"는 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 및 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체가 교차 결합으로 안정하게 연결되어, 기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포의 표면에 코팅되는 형태로 다층 구조를 형성하는 것을 의미한다. 본 발명에서는 "LbL 다층", "다층", "다층 박막", "다층막" 등의 용어로도 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 기재는 실리콘 웨이퍼, 유리 및 금속(예를 들면, 금)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특

징으로 하며, 바람직하게는 실리콘 웨이퍼를 사용할 수 있다.

- [0022] 본 발명에서 상기 나노 입자는 다공성 구조를 가지면서 나노 크기의 정전기적인 전하를 띠는 입자를 의미하며, 예를 들면 실리카 나노 입자일 수 있다. 상기 나노 입자는 약물 또는 기능성 물질을 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 나노 입자에 포함가능한 약물은 항암제, 항균제, 소염진통제, 항바이러스제, 항히스타민제, 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 독소루비신(Dox), 캄토테신(Camptothecin), 파클리탁셀(paclitaxel),시스-플라틴(cis-platin), 타목시펜(tamoxifen) 등을 예시할 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 나노 입자에 포함가능한 기능성 물질은 DNA, RNA, 폴리펩타이드, 비타민 및 이의 유도체, 아미노산 및 이의 유도체, 단백질, 독소(toxin) 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 메조공 실리카 나노입자를 약물에 분산시켜 나노 입자 내에 약물을 담체시킨 후, 이를 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 및 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체 용액에 교번적으로 침지시킴으로써, 상기 약물을 담체한 나노 입자의 표면에 상기 양전하성 및 음전하성 공중합체가 교차 결합으로 안정하게 연결된 다층을 형성할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 살아 있는 세포는 효모, 예를 들어 사카로마이세스 세레비지아에, 줄기 세포(stem cell), 암 세포(cancer cell) 등을 예시할 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 일 실시양태에 따르면, 살아 있는 세포의 표면에 다층 조립체를 형성시켜 캡슐화할 수 있다. 이렇게 캡슐화된 세포는 오랫동안 보관할 수 있고, 조직 세포 및 생체 장기의 개발에 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 다층 조립체는 양전하를 띠는 층과 음전하를 띠는 층의 적층수에 의하여 두께가 조절될 수 있으며, 기질의 표면에 1 nm 내지 10 μ m의 두께, 바람직하게는 10 내지 200 nm의 두께를 갖도록 형성될 수 있다.
- [0029] 한편, 본 발명은 기재, 나노 입자 또는 살아 있는 세포를, 1) 디설파이드 기를 갖는 양전하성 공중합체 수용액에 침지시킨 후 세정하는 단계; 2) 티올 기를 갖는 음전하성 공중합체 수용액에 침지시킨 후 세정하는 단계; 및 3) 상기 단계 1) 및 2)를 반복하는 단계를 포함하는, 다층 조립체의 제조방법을 제공한다.
- [0030] 상기 단계 1) 내지 3)은 완충액(예를 들어, 인산염 완충액, 나트륨 아세테이트 완충액 등의 중성, 산성 또는 염기성 완충액)을 이용하여 pH를 5 내지 10으로 조절하고, 4 내지 40℃의 온도에서 수행될 수 있다. 보다 바람직하게는 실온 내지 36℃ 및 pH 7.4인 조건에서 수행될 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 LbL 조립방식은, 양하전된 부분 및 디설파이드 연결된 것으로 이루어지거나, 또는 음하전된 부분과 티올-연결된 것으로 구성된, 합성 랜덤 공중합체인 티올- 및 디설파이드-관능화된 폴리머들 (S. Jiwanich, J.-H. Ryu, S. Bickerton, S. Thayumanavan, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10683) 사이의 인-시츄(*in-situ*) 및 상호 전환 반응을 사용한다. 이러한 기술에 의한 LbL 조립은 중합체 층 사이의 분자간 교차 결합으로 인하여 LbL 막의 안정성을 높일 수 있다.
- [0032] LbL 조립으로 형성된 다층막의 분해는, 특히 생체적합성 조건 하에서, 생물학 및 의학 분야에서 중합체 물질의 적용을 위해 중요한 문제이다. 그러나, 하나의 물질에서 물리적 안정성과 분해성을 동시에 얻는 것은, 두 가지 성질이 다소 상반적이기 때문에 어렵다. 본 발명에서는, 생체관련 자극인 세포내 작은 펩타이드인 글루타치온(GSH)에 노출시킴으로써 디설파이드 결합을 티올기로 환원시켜 생체적합성 조건 하에서 간단하게 교차막을 분해시킬 수 있다(H. H. Dam, F. Caruso, *Langmuir* **2013**, *29*, 7203).
- [0033] 본 발명에 따르면, LbL 다층구조에서 각 층의 교차는 어떠한 보조적 첨가제 없이, LbL 조립의 과정에서 동시에 형성될 수 있다. 통상적인 LbL 조립과 비교하여, 더 두껍고 더 안정한 다층구조가 조절할 수 있는 방식으로 효과적으로 얻어질 수 있다. 또한, 본 발명에서는 다층 조립체의 제조 시 생성되는 부산물의 흡수 스펙트럼을 사

용하여 인 시류 화학 반응을 쉽게 모니터 할 수 있는데, 이는 중합체 중 반응성 티올 단위체들을 감소/증가시킴으로써 교차 밀도를 조절할 수 있게 한다.

[0034] 본 발명에 따른 다층 조립체는 생체적합적 조건 하에서 티올 반응성 화합물로 관능화될 수 있다. 본 발명의 실시양태에서는 말레이미드-함유 염료만을 예시하고 있지만 이외에도, 추가의 생물의학적 기능 물질에 대한 새로운 길을 여는, 다양한 생물분자들이 그 층에 개재될 수 있다.

[0035] 공유결합으로 형성된 안정한 물질들을 분해하는 것이 일반적으로 어렵기는 하지만, 본 발명에 따른 다층 조립체는 외부 자극에 의해 분해될 수 있다. 교차된 다층구조의 안정성과 함께, 반응적 분해성은 상기 물질의 적용성을 향상시킬 수 있다. 교차된 다층구조의 형성과 분해는 생체적합성 조건(pH 7.4의 수용액) 하에서 이루어질 수 있으므로, LbL 다층구조의 유용성을 생물의학적 용도로 확대시키는 데 유리할 것이다. 상기에서 설명한 LbL 다층구조의 모든 장점들을 고려할 때, 본 발명에 따른 다층 조립체는 생물센서, 생물의학 장치 및 조직 공학을 위시한 과학과 공학의 더 넓은 분야에 적용될 수 있을 것이다.

[0036] [실시예]

[0037] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0038] **재료**

[0039] 메타크릴산, 2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜 메타크릴레이트, 및 D, L-디티오프레이톨을 시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다. 2,2'-디티오디페리딘을 TCI사(일본)로부터 얻었다. 독소루비신 염산염(Dox)을 온타리오 케미칼사(Ontario Chemical Inc.)(캐나다)로부터 얻었다. 모든 다른 화합물과 시약은 별다른 언급이 없으면 시그마-알드리치사(한국) 및 삼천 화학으로부터 얻었다. 돌베코의 개질 이글매지, 페니실린-스트렙토마이신, 0.25% 트립신-EDTA 및 우태아혈청은 기브코 라이프 테크놀로지사(Gibco Life Technology, 한국)로부터 얻었다.

[0040] **제조예 1: 티올 관능화된 폴리메타크릴산 공중합체(PMA-co-PES)의 합성**

[0041] 2-시아노-2-프로필 벤조디티오에이트(29 mg, 0.13 mmol), 2-(피리딜디설파이드)에틸 메타크릴레이트(PDSEMA)(2 g, 7.84 mmol), 메타크릴산(1.575 g, 18.30 mmol) 및 아조비스이소부티로니트릴(azobisisobutyronitrile, AIBN)(6.45 mg, 0.040 mmol)의 혼합물을 디메틸포름아미드(DMF, 10 mL)에 용해하고, 반응 용기 중에서 세 번의 동결-펌프-해동 사이클을 수행하였다. 상기 사이클은 상기 혼합물을 액체 질소를 통해 동결하고, 펌프를 통해 진공을 만든 후, 서서히 해동시키면서 용액에 녹아있는 산소를 제거하는 방식으로 수행되었다. 이어, 상기 반응 용기를 밀봉한 후 미리 가열된 오일 중탕에 95°C에서 24시간 동안 두었다. 미반응성 단량체를 제거하고 폴리머를 정제하기 위해, 상기에서 얻어진 혼합물을 에틸에테르에 침전시켜 랜덤 공중합체를 생성하였다. 이렇게 제조된 랜덤 공중합체의 겔 투과 크로마토그래피(GPC), 다분산 지수(polydispersity index, PDI) 및 NMR 데이터를 측정하여 그 결과를 하기에 나타내었다.

[0042] GPC (PS 표준) 229 KDa;

[0043] PDI=3.64;

[0044] NMR (600 MHz, DMSO) δ : 8.47, 7.82-7.77, 7.25, 4.15, 3.08, 2.04-1.65, 1.24-0.87.

[0045] 두 블록 간의 물비는 폴리머 백본 내의 메틸 양성자 및 피리딘 내의 방향족 양성자를 통합시킴으로써 결정되었고, 메타크릴레이트와 2-(피리딜 디설파이드)에틸메타크릴레이트(PDSEMA)가 0.77:0.23의 물비를 나타냄을 확인할 수 있었다. 티올-관능화된 폴리머를 제조하기 위해, 상기 랜덤 공중합체를 과량(피리딜 디설파이드의 4당량)의 디티오프레이톨(DTT)을 함유하는 DMF 용액으로 처리하고, 에틸 에테르에서 침전시켰다. 티올기가 디설파이드로 산화되는 것을 방지하기 위해, LbL 제조 시에는 새로 제조한 폴리머 용액을 사용하였다. 이렇게 제조된 티올 관능화된 폴리메타크릴산 공중합체를 "PMA-co-PES(폴리(아크릴산-co-머캅토에틸 메타크릴레이트))"로 명명

하였다.

[0046] **제조예 2: 피리딘디설파이드 관능화된 폴리(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트 공중합체 (PDMEA-co-PDS)의 합성**

[0047] 2-시아노-2-프로필 벤조디티오에이트 (15 mg, 0.068 mmol), PDSEMA(1 g, 3.92 mmol), 2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트(DMAEMA)(1.44 g, 9.15 mmol) 및 AIBN (3.22 mg, 0.020 mmol)의 혼합물을 DMF (10 mL)에 용해하고, 반응 용기 중에서 상기와 동일한 방식으로 세 번의 동결-펌프-해동 사이클을 수행함으로써 탈기시켰다. 상기 반응 용기를 밀봉한 후 미리 가열된 오일 중탕에 95℃에서 20시간 동안 두었다. 미반응성 단량체를 제거하고 폴리머를 정제하기 위해, 상기에서 얻어진 혼합물을 에틸에테르에 침전시켜 랜덤 공중합체를 생성하였다. 이렇게 제조된 랜덤 공중합체의 GPC, PDI 및 NMR 데이터를 측정하여 하기에 나타내었다.

[0048] GPC (PS 표준) 26.8 KDa;

[0049] PDI=1.08;

[0050] NMR (600 MHz, DMSO) δ : 8.46, 7.84-7.75, 7.27, 4.34, 3.01-2.71, 2.04-1.65, 1.24-0.87.

[0051] 두 블록 간의 물비는 디메틸아미노에틸 메타크릴레이트 내의 메틸 양성자 및 피리딘 내의 방향족 양성자를 통합 시킴으로써 결정되었고, 2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트(DMAEA) 및 2-(피리딘디설파이드)에틸메타크릴레이트(PDSEMA)가 77:33의 물비를 나타냄을 확인할 수 있었다. 이렇게 제조된 피리딘디설파이드 관능화된 폴리(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트 공중합체를 "PDMEA-co-PDS (폴리(디메틸아미노에틸메타크릴레이트-co-피리딘디설파이드)에틸메타크릴레이트)"로 명명하였다.

[0052] **실시예 1: 교차 결합된 CLM의 제조**

[0053] 상기 제조예 1 및 2에서 얻어진 공중합체들을 이용하여 실리콘 웨이퍼의 표면에 LbL 조립을 수행하였다.

[0054] 실리콘 웨이퍼를 O₂ 플라즈마로 10분간 깨끗하게 세척하였다. 이후, 상기 웨이퍼를 PDMEA-co-PDS(1 mg/mL)의 약 36℃에서 인산염 완충액(pH 7.4)에 5분간 침지시키고 0.15 M NaCl 수용액으로 1분간 세정하였다. 이어, 세정된 웨이퍼를 PMA-co-PES(1 mg/mL)의 인산염 완충액 (50mM, pH 7.4)에 5 분간 침지시키고 수용액으로 1분간 세정하여, PDMEA-co-PDS/PMA-co-PES로 구성된 교차 결합된 LbL 다층(cross-linked multilayers, CLM) 구조체 CLM^{1/1}을 얻었다. 이렇게 얻어진 LbL 다층 구조체 CLM은 티올과 피리딘디설파이드 기 사이의 티올-교환 반응에 의해 교차 결합을 형성한다.

[0055] 상기 LbL 조립 단계를 5회 반복함으로써 CLM^{5/5}을 획득하고, 10회 반복함으로써 더 두꺼운 다층막을 갖는 CLM^{10/10}을 획득하였다.

[0056] **비교예 1: 비-교차결합된 NCM의 제조**

[0057] 먼저, PMA-co-PDS 공중합체를 제조하였다. 구체적으로, 2-시아노-2-프로필 벤조디티오에이트 (29 mg, 0.13 mmol), PDSEMA(2 g, 7.84 mmol), DMAEMA(2.88 g, 18.30 mmol) 및 AIBN(6.45 mg, 0.040 mmol)의 혼합물을 DMF(10 mL)에 용해하고, 반응 용기 중에서 상기와 동일한 방식으로 세 번의 동결-펌프-해동 사이클을 수행함으로써 탈기시켰다. 상기 반응 용기를 밀봉한 후 미리 가열된 오일 중탕에 95℃에서 24시간 동안 두었다. 미반응성 단량체를 제거하고 폴리머를 정제하기 위해, 상기에서 얻어진 혼합물을 에틸에테르에 침전시켜 랜덤 공중합체를 생성하였다. 이렇게 제조된 랜덤 공중합체의 겔 투과 크로마토그래피(GPC), 다분산지수(PDI) 및 NMR 데이터를 측정하여 하기에 나타내었다.

[0058] GPC (PS 표준) 229 KDa;

[0059] PDI=3.64;

- [0060] NMR (600 MHz, DMSO) δ : 8.47, 7.82-7.77, 7.25, 4.15, 3.08, 2.04-1.65, 1.24-0.87.
- [0061] 이어, 상기 실시예 1에서 PMA-co-PES 대신 PMA-co-PDS를 이용한 것을 제외하고는 동일한 방식으로 수행하여 PDMEA-co-PDS/PMA-co-PDS로 구성된, 비-교차결합된 LbL 다층(non cross-linked multilayers, NCM) 구조체 $NCM^{1/1}$, $NCM^{5/5}$, $NCM^{10/10}$ 등을 제조하였다. 이렇게 얻어진 구조체 NCM은 각 공중합체들이 모두 피리딘디설파이드기를 가지기 때문에 교차 결합될 수 없다.
- [0062] **실시예 2: MSNP@CLM의 제조 및 약물 전달 시스템**
- [0063] 2-1) MSNP의 합성과 특성화
- [0064] 메조공 실리카 나노입자(mesoporous silica nanoparticles, MSNP)를 소프트-템플레이팅 기법으로 합성하였다(K. Zhang, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 2427).
- [0065] 먼저, 세틸-트리메틸암모늄 브로마이드(CTAB) 1.54 g, 트리에탄올아민 0.347 g 및 100 mL 증류수의 혼합물을 1 시간 동안 80°C에서 교반하였다. 상기 혼합물에, 테트라에틸-오소실리케이트(TEOS) 14.58 g을 빠르게 첨가하고 계면활성제 용액에 첨가하였다. 주의할 것은, 작은 유기 아민(small organic amine, SOA)을 함유하는 계면활성제가 증류수에 완전히 녹을 때에만, TEOS를 상기 혼합물에 첨가하였다.
- [0066] 상기 과정을 거쳐 MSNP를 수득하였으며 상기 MSNP는 1.0 SiO₂: 0.06 CTAB: 0.026 SOA: 80.0 H₂O의 몰 조성으로 구성되며 최종 pH는 7.2 내지 7.3 범위임을 확인하였다.
- [0067] 2-2) MSNP 내의 약물 적재
- [0068] 상기 2-1에서 수득한 약 5 mg의 MSNP를 5 mg 독소루비신(Dox, 온타리오 케미칼사)을 포함하는 수용액 1 mL에 분산시키고, 실온에서 3시간 동안 방치하여 MSNP 내에 약물이 적재되도록 두었다. 이 후, 상기 시료를 원심분리하고, 상층액을 버리고, 침전된 나노파티클을 재분산하는 사이클을 반복하여 세척하여 미적재 Dox를 제거하고, 추후 사용을 위해 약물이 적재된 MSNP 현탁액을 수집하였다.
- [0069] UV-Vis 스펙트럼을 사용하여 하기 계산식에 따라 독소루비신 적재율을 결정하였다(B. Chang, *et al.*, *J. Mater. Chem.* 2010, 20, 9941).
- [0070] [계산식 1]
- [0071] 포획 효율 (%) = (MSNPs 내의 약물 질량) / (약물의 처음 질량)
- [0072] [계산식 2]
- [0073] 약물 적재율(%) = (MSNPs내의 약물 질량) / (약물 적재된 MSNPs의 질량)
- [0074] 2-3) 약물이 적재된 MSNP의 CLM 캡슐화
- [0075] 상기 2-2에서 수득한 Dox 약물이 적재된 MSNP의 현탁액(10 wt%)을 pH 7.4 인산염 완충액을 이용하여 수번의 원심분리/재현탁을 반복함으로써 세척하였다. 얻어진 현탁액을 1 mL 인산염 완충액에 재분산시키고, 인산염 완충액(pH 7.4)에 함유된 양성 중합체 PDMEA-co-PDS (2 mg/mL)의 1 mL와 혼합하고, 자석 교반기로 연속 교반하면서, 상기 중합체의 흡착을 15분간 진행하였다. 이어, 10,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리한 후, 얻어진 입자들을 새로운 pH 7.4 인산염 완충액으로 2번, 그리고 증류수로 세척하고, 1 mL pH 7.4 인산염 완충액에 재분산시켰다. 이렇게 얻어진 입자를 $MSNPs@CLM^{1/0}$ 으로 지칭하였다.
- [0076] 이어, 상기 $MSNPs@CLM^{1/0}$ 입자를 인산염 완충액에 함유된 PMA-co-PES (2 mg/mL) 1 mL과 혼합하고, 양전하성 및 음전하성 중합체 간에 디설파이드 교차 결합이 형성되도록 15분간 연속 교반하였다. 10,000rpm에서 5분 동안 원심 분리 후, 입자들을 pH 7.4 인산염 완충액 및 증류수로 세척하였다. 상기 과정을 거쳐 두 개 층이 조립된

MSNP@CLM^{1/1}을 수득하였다.

[0077] PMA-co-PES 및 PDMEA-co-PDS를 사용하여 동일한 과정을 반복함으로써 추가 8 개 층을 조립하였고, 각 조립에 대하여 층 2/2, 3/3, 4/4, 5/5 등과 같이, 용어 'MSNP@CLM' 으로 나타냈다.

[0078] 실시예 3: 효모@CLM의 제조

[0079] 살아 있는 효모 세포를 CLM으로 캡슐화

[0080] 살아 있는 효모 세포를 CLM으로 캡슐화하기 위하여, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하였다.

[0081] 먼저, 사카로마이세스 세레비지에(시그마사) 세포의 단일 콜로니를 효모-추출-펩톤-텍스트로즈(YPD) 브로스 아가 플레이트로부터 취해서, YPD 배양액에 현탁하고, 30℃에서 30시간 동안 진탕 배양기에서 배양하였다. 이렇게 배양된 세포를 0.15 M NaCl 수용액으로 세척하였다. 이어, 상기 세포를 PDMEA-co-PDS(1 mg/mL)의 인산염 완충액(pH 7.4) 및 PMA-co-PES(1 mg/mL)의 인산염 완충액에 각각 5 분간 교번적으로 침지하고 0.15 M NaCl 수용액으로 세척하였다. 상기 과정을 거쳐 살아 있는 효모 세포의 표면에 CLM 다층막이 5/5 및 10/10으로 형성된 효모@CLM^{5/5} 및 효모@CLM^{10/10}을 제조하였다.

[0082] 시험예 1: CLM 및 NCM 분석

[0083] 1-1) CLM 및 NCM의 두께 및 형상 조사

[0084] 상기 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 다층 구조체 CLM 및 NCM들을 타원편광반사법(ellipsometry)과 주사 전자 현미경(SEM)을 사용하여 특성화하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0085] 도 2의 (a)에서 보는 바와 같이, 실리콘 웨이퍼 상에 형성된 LbL 층의 적층수에 따른 타원편광반사적 두께는, LbL 적층의 전체적인 단계에서 CLM이 NCM보다 두꺼웠다. 예를 들어, CLM^{10/10}의 두께는 ~160 nm이었으나, NCM^{10/10}의 두께는 단지 ~40 nm이었다. 이를 통해 교차 결합이 다층 구조의 두께를 약 4 배 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, SEM으로 확인한 CLM^{10/10} 및 NCM^{10/10}의 다층화된 막의 표면 형상과 두께는, CLM^{10/10}의 경우 나노미터 규모의 직포 구조를 나타내었으며(도 2의 (b)), NCM^{10/10}는 매우 매끈하였다(도 2의 (c)). SEM 단면도에 따르면, CLM^{10/10}은 NCM^{10/10}보다 훨씬 두꺼운 것으로 나타났다.

[0086] 1-2) 분해성 조사

[0087] 디설파이드 결합을 두 개 티올기로 해리할 수 있는 글루타치온(GSH) 10mM 에 CLM^{10/10} 및 NCM^{10/10}을 3시간 동안 실온에서 담지시켜 노출시킴으로써 다층막의 반응적 분해성을 조사하였다.

[0088] 도 2에 나타난 바와 같이, CLM^{10/10}을 GSH에 노출시킬 때, CLM의 타원편광반사법적 두께는 ~160 nm로부터 ~10 nm 미만으로 극적으로 감소되었고, 이는 상기 다층구조 막이 외부 자극에 대하여 거의 완전하게 분해되었다는 것을 암시한다. SEM 사진에 따르면, 상기 다층구조 막의 표면 형상은 매끈하게 변하였고, 그 두께가 감소하였다는 것이 나타났다(도 2의 (d)). 반면, NCM^{10/10}의 경우 GSH-처리 후에 큰 차이가 없었다(도 2의 (e)).

[0089] 1-3) CLM과 NCM의 관능화

[0090] N-(5-플루오레세이닐)말레이미드 수용액(1 mg/mL)을 여과하고, 이를 수성 소듐 인산염 완충액(100 mM, pH 7.4)에 1:1 (v/v) 비율로 첨가함으로써 제조된 N-(5-플루오레세이닐)말레이미드 용액 내에, 실시예 1 및 비교예 1에서 제조된 실리콘 웨이퍼 상에 형성된 CLM^{10/10} 또는 NCM^{10/10}을 3시간 동안 둬으로써 플루오레세이닐기를 도입하였다.

[0091] 플루오레세인-관능화된 $CLM^{10/10}$ 및 $NCM^{10/10}$ 을 형광 현미경으로 확인한 결과를 도 3의 (a) 및 (b)에 나타내었다. 한편, 시험예 1-2에서 GSH 처리된 $CLM^{10/10}$ 및 $NCM^{10/10}$ 을 상기와 동일한 방식으로 플루오레세인닐기를 도입한 후 형광 현미경으로 확인한 결과를 도 3의 (c) 및 (d)에 나타내었다. 도 3에서 보는 바와 같이 녹색 형광은 상기 막들이 플루오레세인으로 기능화된 것을 명확하게 나타내고 있다.

[0092] 시험예 2: MSNP@CLM 분석

[0093] 상기 실시예 2에서 제조한 MSNP 및 MSNP@CLM^{5/5}의 투과 주사 전자현미경(TEM) 사진을 각각 도 4의 (a) 및 (b)에 나타내었다. TEM 현미경 사진은 MSNP의 형상을 현저히 변화시켰다는 것을 나타낸다. 라스베리 형상의 메조공 나노입자의 날카로운 가장자리들은 CLM 코팅 후에 무디어 졌음을 알 수 있다.

[0094] 또한, MSNP의 표면에서 다층이 조립됨에 따른 다층 구조체의 성장을 동적 광산란(DLS)법으로 수력학적 직경을 측정하였다. 구체적으로, MSNP, MSNP@CLM^{5/5} 및 GSH-처리된 MSNP@CLM^{5/5}의 DLS 측정된 수력학적 직경 결과를 도 5의 (a), 및 하기 표 1에 나타내었다. 분석은 각 층에 대해 3회 실시하였으며, 결과를 평균 $\pm$ SD으로 표시하였다.

표 1

	입자 직경 (nm)
MSNP@CLM ^{1/1}	112.3 $\pm$ 1.72
MSNP@CLM ^{2/2}	151.0 $\pm$ 3.00
MSNP@CLM ^{3/3}	159.6 $\pm$ 2.54
MSNP@CLM ^{4/4}	168.8 $\pm$ 4.40

[0096] 도 5의 (a), 및 상기 표 1에서 보는 바와 같이, 수용액에서 천연 MSNP의 수력학적 직경은 90 nm 였지만, MSNP@CLM^{5/5}은 185 nm로 증가하였다. 이는 CLM의 수력학적 두께가 ~45 nm이라는 것을 의미한다.

[0097] 또한, MSNP의 표면에서 다층이 조립됨에 따른 다층 구조체의 성장을 제타 전위 측정기로 확인한 결과를 도 5의 (b) 및 하기 표 2에 나타내었다. 분석은 각 층에 대해 3회 실시하였으며, 결과를 평균 $\pm$ SD으로 표시하였다

표 2

시료	제타 전위 (mV)
MSNP@CLM ^{1/0} (PMA-co-PES)	3.93 $\pm$ 0.40
MSNP@CLM ^{1/1} (PDMEA-co-PDS)	-40.03 $\pm$ 0.35
MSNP@CLM ^{2/1} (PMA-co-PES)	3.54 $\pm$ 0.28
MSNP@CLM ^{2/2} (PDMEA-co-PDS)	-32.78 $\pm$ 0.64
MSNP@CLM ^{3/2} (PMA-co-PES)	3.85 $\pm$ 0.34
MSNP@CLM ^{3/3} (PDMEA-co-PDS)	-29.62 $\pm$ 0.74
MSNP@CLM ^{4/3} (PDMEA-co-PDS)	5.85 $\pm$ 0.24
MSNP@CLM ^{4/4} (PMA-co-PES)	-35.77 $\pm$ 0.24
MSNP@CLM ^{5/4} (PDMEA-co-PDS)	6.11 $\pm$ 0.11
MSNP@CLM ^{5/5} (PMA-co-PES)	-32.41 $\pm$ 0.52

- [0099] 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 반대로 하전된 고분자전해질들의 적층에 따라, MSNP@CLM의 제타-전위값 (1/0 내지 5/5)은 양과 음의 값 사이를 주기적으로 왕래하고 있었다. 예를 들어, MSNP@CLM는 양이온성 PDMEA-co-PDS의 첫 번 흡착시 +3.9 mV를 나타낸 반면, 천연 MSNPs는 -30.5 mV의 제타 전위를 보였다. 교번하는 표면 하전의 이러한 결과들은 콜로이드성 입자-기반 LbL 조립에 특징적이며, MSNPs가 정전기 상호작용에 기반하여, 반대로 하전된 고분자전해질들로 순차적으로 코팅된다는 것을 나타낸다.
- [0100] **시험예 3: 약물 방출 프로파일**
- [0101] Dox에 대한 UV-가시광선 스펙트럼
- [0102] 상기 실시예 2-2에서 얻어진 Dox 약물이 적재된 MSNP를 원심 분리하여 상청액을 수집하고 이의 UV-Vis 흡광도를 측정하여 도 6에 나타내었다. 도 6에서 보는 바와 같이, MSNP의 다공성 구조는 약물 적재된 MSNP를 제거한 후 UV-Vis 스펙트럼에 의해 측정 시, 독소루비신(Dox)의 적재를 6.7 %까지 높일 수 있음을 알 수 있었다.
- [0103] Dox의 시험관내 방출 프로파일
- [0104] 실시예 2에서 제조한 MSNP@CLM^{5/5}로부터 Dox의 시험관내 방출 프로필을 확인하기 위하여, MSNP@CLM^{5/5}에 다양한 농도(1 mM, 5 mM 및 10 mM)의 GSH를 첨가한 후 24시간 동안 실온에서 방치하였다 이어, MSNP로부터의 Dox 방출을 480 nm 여기 및 580 nm 방출 파장을 가지는 형광을 사용하여 UV-Vis 스펙트럼으로 측정하였으며, 약물 방출률(%) 결과를 도 5의 (c)에 나타내었다.
- [0105] 도 5의 (a) 및 (c)에서 확인되는 바와 같이, GSH를 처리하지 않으면(그래프 A), Dox의 방출이 없었으나, GSH의 가변적 몰수, 즉 GSH의 처리 농도가 증가함에 따라 약물 방출률이 증가함을 알 수 있었다(그래프 B: 1 mM 처리, 그래프 C: 5 mM 처리, 및 그래프 D: 10 mM 처리). 이는 CLM은 외부 자극에 반응하여 분해되었고 MSNP로부터 약물 분자들을 방출하였음을 의미한다.
- [0106] **시험예 4: MSNP@CLM의 세포 활성 분석**
- [0107] MSNP, MSNP@CLM^{5/5} 및 Dox-MSNP@CLM^{5/5}의 세포 활성을 알다마르 블루 (Alamar blue) 분석으로 연구하였다.
- [0108] HeLa 세포주(ATCC)를 10 % 우태아 혈청(FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유한 DMEM에서, 37℃에서 5% CO₂ 습윤 조건하에서 배양하였다. 배양된 세포를 96-웰 플레이트에, 10% FBS를 함유한 DMEM 100 μ l를 가진 웰 당 5 x 10³ 세포 밀도로 분주하고, MSNP, MSNP@CLM^{5/5} 및 Dox-MSNP@CLM^{5/5} 첨가한 후 24시간 동안 배양(37℃, 5% CO₂)하고, 알다마르 블루 염색으로 24시간 세포 활성을 분석하였다.
- [0109] 세포 활성 분석 결과에 따르면, MSNP, 및 MSNP@CLM^{5/5}은 생체 적합성인 반면, Dox-MSNPs@CLM^{5/5}와 24시간 동안 배양한 후 HeLa 세포에서의 세포 활성 분석 결과에서는 Dox-MSNP@CLM^{5/5}는 유의한 세포 성장 저해가 일어났다(도 5의 (d)). 이러한 결과들은 교차성 및 분해성 다층구조들이 약물 전달계에 대한 약속된 물질이라는 것을 나타낸다.
- [0110] **시험예 5: 효모@CLM의 관능화**
- [0111] 로다민-말레이미드 (1 mg/mL)의 수용액을 여과하고 이를 수성 소듐 인산염 완충액(100 mM, pH 7.4)에 1:1 (v/v) 비율로 첨가함으로써 제조한 로다민-말레이미드 용액 내에, 실시예 3에서 제조한 효모@CLM^{5/5} 및 효모@CLM^{10/10}를 1시간 동안 덩으로써 CLM을 로다민 기로 관능화시켰다.
- [0112] 로다민-관능화된 효모@CLM^{5/5} 및 효모@CLM^{10/10}를 공초점 현미경으로 확인한 결과를 도 7의 (a) 및 도 8의 (a)에 나타내었다. 도 7의 (a) 및 도 8의 (a)에 나타난 바와 같이, 캡슐화는 LbL 다층구조를 로다민-연결된 말레이미드로, 티올과 말레이미드 기 사이의 결합 반응을 통해 관능화시킴으로써 확인하였다. 고리 모양의 붉은

형광은, 세포가 로다민으로 관능화되어 있고 CLM으로 캡슐화되어 있다는 것을 명확하게 보여준다.

[0113] 한편, 효모@CLM^{5/5} 및 효모@CLM^{10/10}를 각각 GSH에 pH 7.4에서 3시간 노출시킨 후의 공초점 현미경사진을 확인함으로써 다층막의 반응적 분해성을 조사하였다. 도 7의 (b) 및 8의 (b)에서 보는 바와 같이, 고리 모양의 붉은 형광이 사라지는 것이 나타났다. 이러한 결과는 CLM이 생체적합성 조건 하 외부 자극에 반응하여 분해될 수 있다는 것을 의미한다.

[0114] 시험예 6: 효모@CLM의 세포 활성 시험

[0115] 세포내 에스테라제(esterase)류의 활성 및 막 온전성을 조사하는 데 사용되어온 플루오레세인 디아세테이트 (FDA)를 효모@CLM^{5/5}에 조사함으로써 캡슐화된 세포의 활성(생존율(%))을 시험하였다.

[0116] 우선, FDA가 물에 난용성이기 때문에 FDA를 아세톤에 용해하여 스톱 용액 (10 mg/mL)을 제조하였다. 상기 스톱 용액 2 μ L를 효소 세포 현탁액(10 mM 인산염 완충액 용액, pH 6.5) 1 mL와 혼합하였다. 상기 혼합액을 진탕하면서 실온에서 30 분 배양한 다음, 세포를 원심 분리하여 수집하였다. 이어, 0.15 NaCl 수용액으로 세척한 후, 생존율을 측정하고 공초점 현미경으로 특성화하였다.

[0117] 한편, 효모@CLM^{5/5} 이외에도, GSH에 pH 7.4에서 3시간 노출시킨 GSH-처리된 효모@CLM^{5/5}, 효모@CLM^{10/10}, 및 상기와 동일한 방식으로 GSH-처리된 효모@CLM^{10/10}에 대해서도 상기와 동일한 방식으로 FDA 조사된 활성을 평가하였다.

[0118] 그 결과, 도 7의 (c) 및 도 9에서 보는 바와 같이, 천연 효모에 대해서는 94%, 효모@CLM^{5/5}에 대해서는 93%, 및 효모@CLM^{10/10}에 대해서는 88%였다. 세포 캡슐화에 대한 이전의 보고와 비교하여, 활성은 현저히 높았다. CLM 코팅의 분해 후에도, 활성은 효모@CLM^{5/5}에 대하여 여전히 80% 내지 92%, 효모@CLM^{10/10}에 대하여 85%였다. 종합적으로, 이 결과들은 CLM 코팅의 캡슐화뿐 아니라 분해도 생 효모 세포에 적합하다는 것을 명확히 나타낸다.

[0119] 시험예 7: 용혈 시험

[0120] 용혈 시험 전, 천연 효모, 효모@CLM^{5/5} 및 효모@CLM^{10/10}의 광학 밀도를 0.85% NaCl 수용액에 희석함으로써, 600 nm에서 ~1.0으로 조절하였다.

[0121] 우선, 라이티카제(lyticase, ~3.8 mg, $\geq 2,000$ 유닛/mg 단백질, *Arthrobacter luteus*로부터 출처)를 글리세롤 (500 μ L) 및 TRIS-EDTA (TE) 완충액 (500 μ L, pH 7.5)의 혼합물에 용해함으로써 스톱 용액을 제조하였다. 상기 스톱 용액의 10 μ L를 효소 현탁액 (TE 완충액, pH 7.5)에 첨가하고, 및 상기 현탁액을 진탕하면서 37°C에서 배양하였다. 상기 혼합물의 소량을 정해진 시간에 추출하여 UV-가시광선 분광분석법에 의해 600 nm에서 광학 밀도를 측정하였다.

[0122] 한편, GSH-처리된 효모@CLM^{5/5}, 및 GSH-처리된 효모@CLM^{10/10}에 대해서도 상기와 동일한 방식으로 라이티카제에 노출 시 광학 밀도를 측정하였다. 그 결과를 도 7의 (d)에 나타내었다.

[0123] 인공 캡슐화의 가장 중요한 역할 중 하나는 외부 침입으로부터 생 세포를 보호하는 것이다. 도 7의 (d)에서 보는 바와 같이, 비록 천연 효모 및 효모@CLM 모두 라이티카제의 소화의 결과로 용혈되었지만, 효모@CLM은 천연 효모보다 용혈에 훨씬 더 내성이 있었다. 구체적으로, 효모@CLM^{5/5}의 ~22% 및 효모@CLM^{10/10}의 ~43%가 6시간 후에도 여전히 생존한 반면, 천연 효모는 ~12%가 생존하였다. 이러한 결과들은 CLM이 라이티카제의 침투를 지연시킨다는 것을 의미한다.

[0124] 라이티카제에 대한 저항성은 CLM의 두께를 조절함으로써 조절되었다. 효모@CLM^{10/10}의 광학 밀도는 6시간까지 효모@CLM^{5/5}보다 더 높게 남았다.

[0125] 또한, 보호 코팅막의 분해 후 효모@CLM^{5/5} 및 효모@CLM^{10/10} 둘 다 천연 효모와 유사한 용혈 저항성을 나타낸 것

으로 보아, 코팅막의 분해는 상기 보호 효과를 제거함을 알 수 있었다. 캡슐화된 세포의 보호는 주로 교차된 LbL 다층구조에 의해 성취되었지만, 그러한 보호는 정전기적으로 형성된 LbL 다층구조에 의해 나타나지 않았다. 즉, 교차 결합이, 다층구조에 안정성을 더함으로써 생세포를 보호하는 효과적인 도구가 될 수 있다는 것을 알 수 있었다.

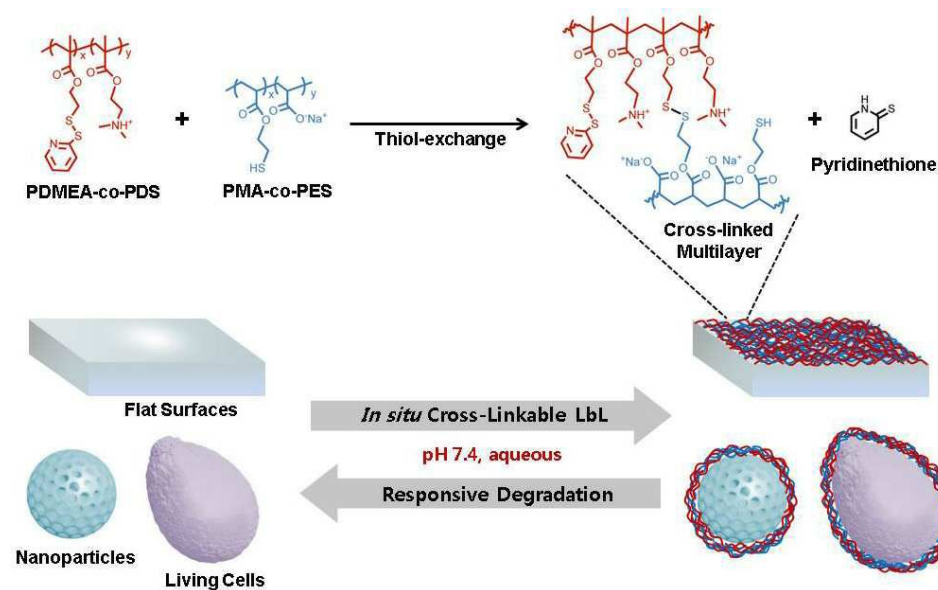
[0126] 시험예 8: 피리딘티온 함량 분석

[0127] 상기 실시예 2-3에서 수득한 MSNP@CLM을 이용하여 각 층 사이에 일어나는, 티올과 피리딜디설파이드 간의 교환 반응을 상청액에 남겨진 중합체 용액으로부터 UV-Vis 흡광도를 사용하여 분석하였다(D.C. Gonzalez-Toro, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 6964). 방법은 상반적으로 하전된 고분자 전해질들 간의 교차로 인한 부산물의 양을 확인하였다.

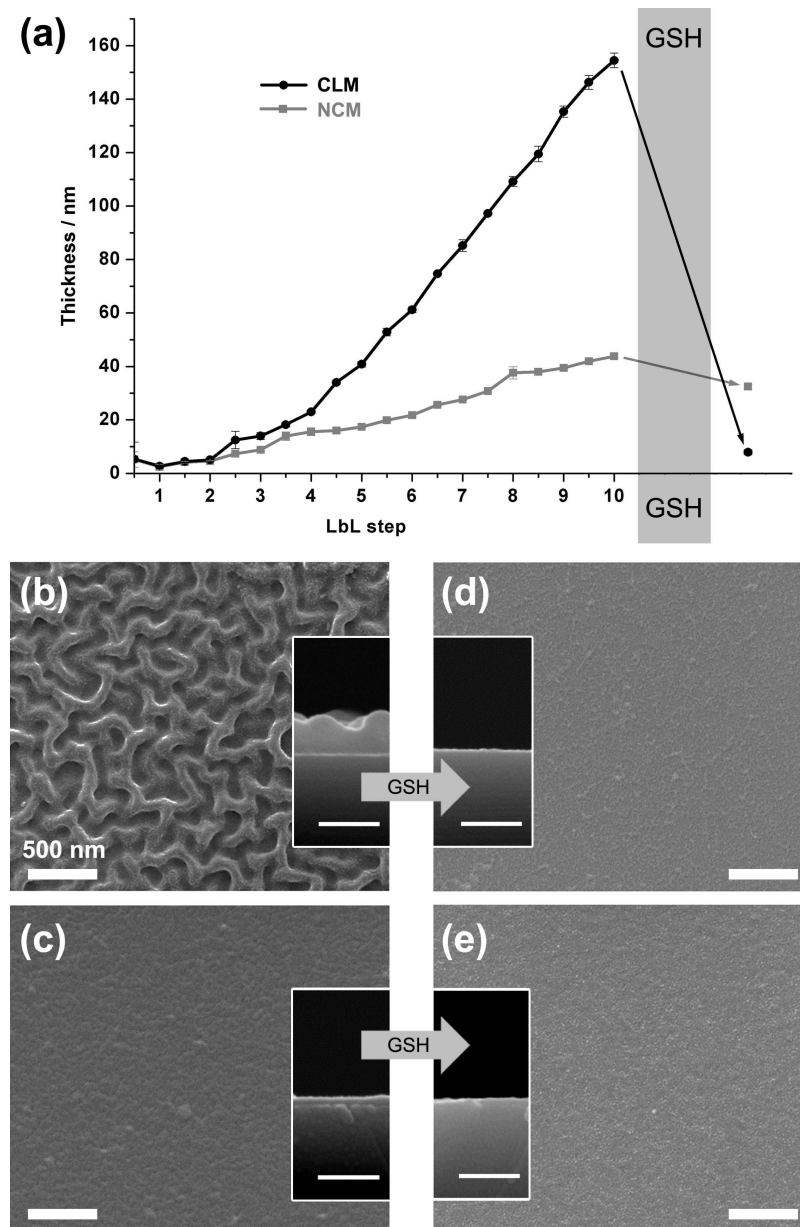
[0128] 구체적으로, 디설파이드 함유 중합체 PDMEA-co-PDS로 다층 조립한 후 상청액 내에 존재하는 부산물 피리딘티온의 양을 UV-가시광선 스펙트럼으로 343 nm에서 측정하여 도 10에 나타내었다. 또한, 티올 함유 중합체 PMA-co-PES로 다층 조립한 후 상청액 내에 존재하는 부산물 피리딘티온의 양을 UV-가시광선 스펙트럼으로 343 nm에서 측정하여 도 11에 나타내었다. 도 10 및 11에서 확인되는 바와 같이, LbL 적층의 수가 증가함에 따라 더 많은 양으로 피리딘티온이 방출되는 것이 관찰되었는데, 이는 MSNP의 표면적이 커지고, 상기 티올-교환 반응에 대한 상호작용이 더 커지기 때문인 것으로 추측된다.

도면

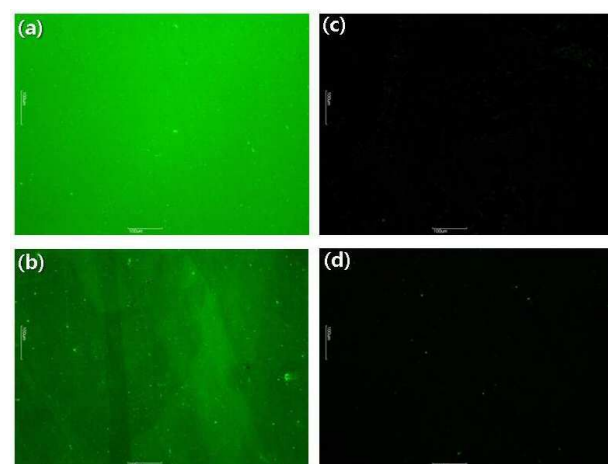
도면1



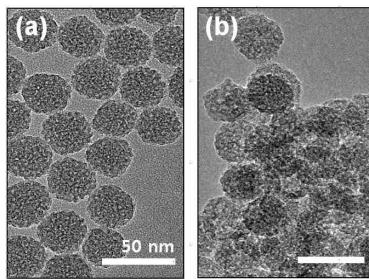
도면2



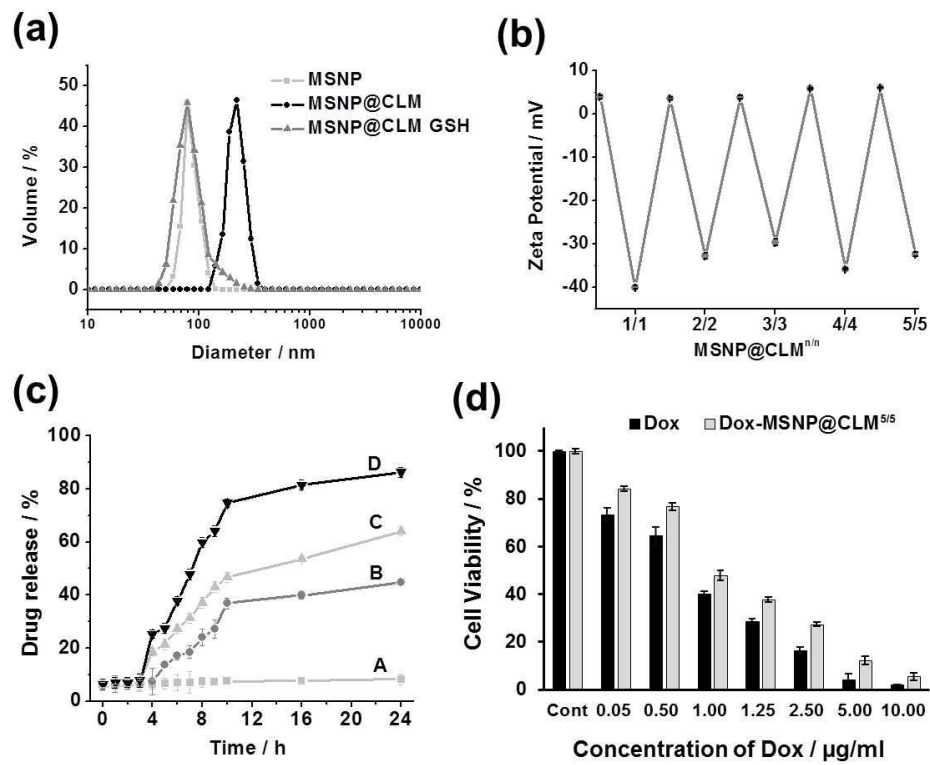
도면3



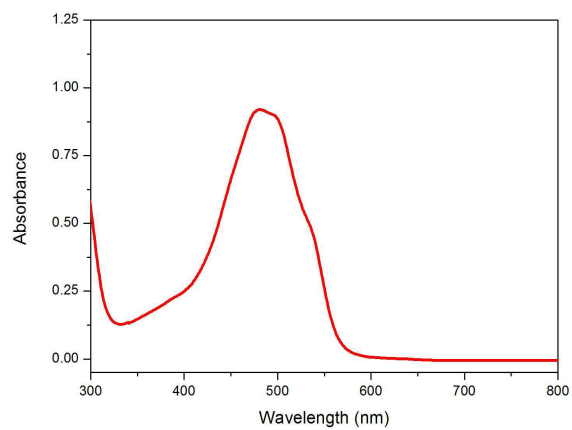
도면4



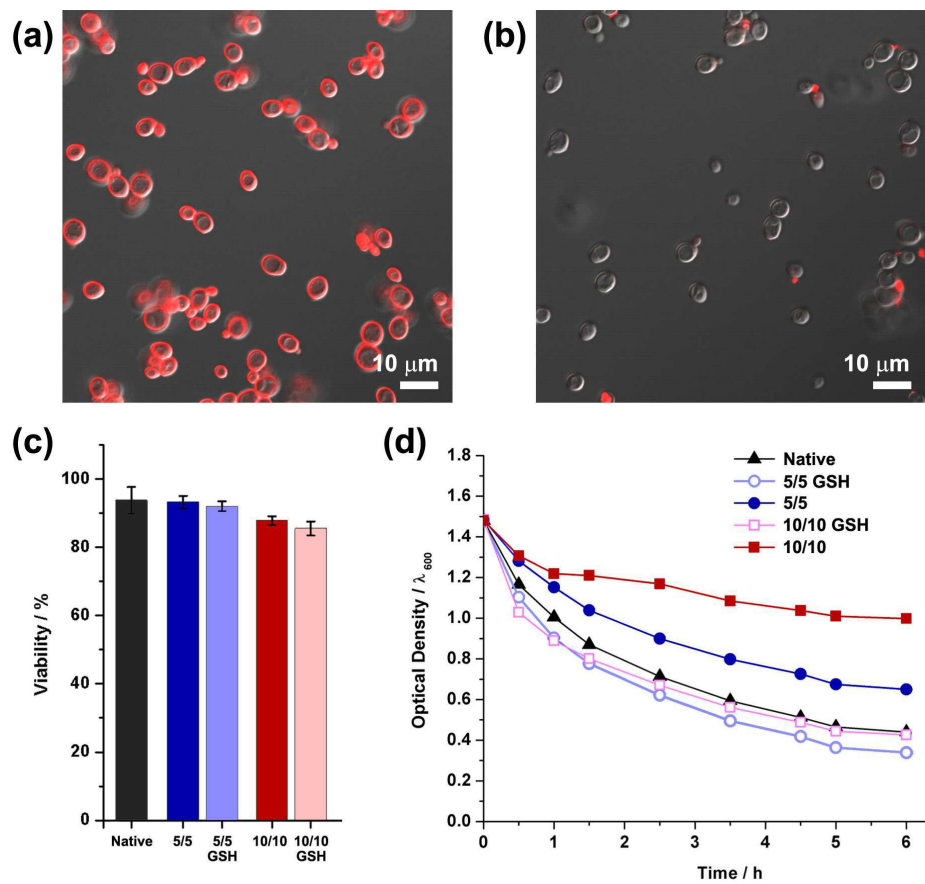
도면5



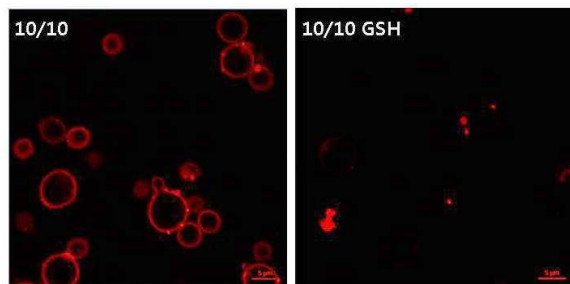
도면6



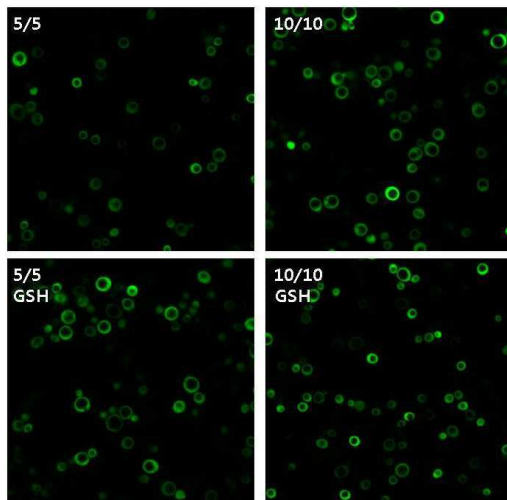
도면7



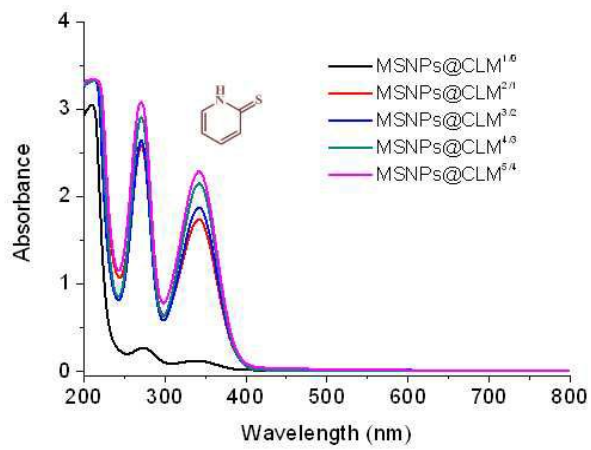
도면8



도면9



도면10



도면11

