

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0027069 (43) 공개일자 2011년03월16일
(51) Int. Cl.	C08F 293/00 (2006.01) C08H 1/00 (2006.01) C08F 226/10 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0084994 (22) 출원일자 2009년09월09일 심사청구일자 2009년09월09일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내 (72) 발명자 정병문 서울특별시 도봉구 창동 북한산아이파크 522동 2101호 한진옥 서울특별시 서초구 반포1동 716-20번지 104호 (74) 대리인 특허법인다나

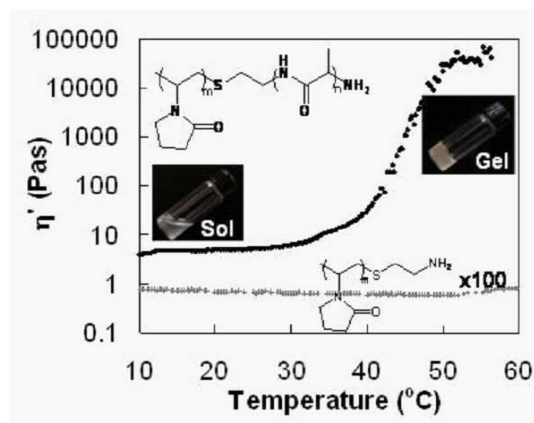
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 온도 민감성 졸-젤 전이 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 온도 민감성 졸-젤 전이 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수용액 하에서 온도에 따라 졸-젤의 상전이 반응을 나타내는 저분자량의 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체로 기존의 졸-젤 전이 온도 민감성 고분자 수용액과 비교하여 제조시간이 현저히 단축되고 제조가 용이한 온도 민감성 졸-젤 전이 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0080447/2009-0083751

부처명 한국연구재단/한국연구재단

연구관리전문기관

연구사업명 도약연구지원사업/핵심연구자지원사업

연구과제명 생분해성 줄-젤 전이 고분자와 이의 의학적 응용/펩타이드 의약전달시스템을이용한 파골 세포 작용억제기전 연구

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단/이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2009년 05월 01일 ~ 2014년 02월 28일/2007년 09월 01일 ~ 2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

수평균 분자량이 500 내지 3,000인 폴리비닐피롤리돈 블록; 및

수평균 분자량이 200 내지 3,000인 폴리펩티드 블록을 포함하되, 총 분자량이 700 내지 20,000인 생분해성 블록 공중합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

생분해성 블록 공중합체는 폴리비닐피롤리돈-폴리펩티드, 폴리비닐피롤리돈-폴리펩티드-폴리비닐피롤리돈, 폴리펩티드-폴리비닐피롤리돈-폴리펩티드, 또는 (폴리비닐피롤리돈-폴리펩티드) $_n$ 의 구조를 가지되, 여기서 상기 n 은 2 내지 20의 정수인 생분해성 블록 공중합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

폴리비닐피롤리돈은 아민기, 또는 하이드록시기 말단을 하나 이상 포함하는 생분해성 블록 공중합체

청구항 4

제3항에 있어서,

폴리비닐피롤리돈은 모노메톡시 아미노-폴리비닐피롤리돈, 디아미노-폴리비닐피롤리돈, 또는 비닐피롤리돈 및 아크릴 산, 메타크릴 산, 아크릴아미드, 메타크릴아미드, 비닐아세테이트, 비닐알콜, 2-하이드록시에틸메타크릴레이트 및 2-하이드록시에틸아크릴레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상이 결합된 공중합체인 생분해성 블록 공중합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

폴리비닐피롤리돈은 생분해성 블록 공중합체 100 중량부에 대하여 40 내지 80 중량부로 포함되는 생분해성 블록 공중합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

폴리펩티드는 글라이신, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파산, 아스파라긴, 시스틴, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상인 생분해성 블록 공중합체.

청구항 7

제6항에 있어서,

폴리펩티드는 DL-형 아미노산, D-형 아미노산 및 L-형 아미노산에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 생분해성 블

록 공중합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

폴리펩티드는 생분해성 블록 공중합체 100 중량부에 대하여 20 내지 60 중량부로 포함되는 생분해성 블록 공중합체.

청구항 9

말단에 아민기, 또는 하이드록시기를 하나 이상 포함하는 폴리비닐피롤리돈; 및

N-카르복시 또는 하이드록시 아미노산 무수물과 반응시키는 단계를 포함하는 생분해성 블록 공중합체의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

반응은 0 내지 120℃에서 5 내지 72시간 동안 실시하는 생분해성 블록 공중합체의 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 생분해성 블록 공중합체를 포함하는 약물전달체.

청구항 12

제11항에 있어서,

항암제, 호르몬, 항생제, 진통제, 항감염제, 단백질 또는 펩티드 및 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 활성화합물을 더 포함하는 약물전달체.

청구항 13

제12항에 있어서,

항암제는 탁솔, 아드리아마이신, 블레오마이신, 시스플라틴, 카보플라틴, 독소루비신, 5-플로로우라실, 메토크렉세이트 또는 안티노마이신 D인 약물전달체.

청구항 14

제12항에 있어서,

단백질 또는 펩티드는 옥시토신, 바소프레신, 루테나이징 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬, 인슐린, 글루카곤, 인터루킨, 인터페론, 가스트린, 칼시토닌, 에리쓰로포이틴, 칼씨토닌, 엔돌핀, 엔지오텐신, 암 고사 인자 (TNF), 신경 성장 인자 (NGF), 그래nul로사이트 콜로니 자극 인자 (GCSF), 레닌 또는 항체인 약물전달체.

청구항 15

제12항에 있어서,

핵산은 DNA, 플라스미드 DNA, RNA, RNAi, 또는 siRNA인 약물전달체.

청구항 16

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 생분해성 블록 공중합체를 포함하는 조직공학용 지지체.

청구항 17

제16항에 있어서,

콘드로사이트, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 간세포, 심장 줄기 세포, 심근 세포, 내피 세포, 및 섬유아 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 살아있는 세포를 더 포함하는 조직공학용 지지체.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 온도 민감성 졸-젤 전이 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수용액 하에서 온도에 따라 졸-젤의 상전이 반응을 나타내는 저분자량의 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체로 기존의 졸-젤 전이 온도 민감성 고분자 수용액과 비교하여 제조시간이 현저히 단축되고 제조가 용이한 온도 민감성 졸-젤 전이 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수용액 중에서 졸-젤 전이 반응을 나타내는 것으로 현재까지 보고된 고분자는 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(프로필렌 글리콜)-폴리(에틸렌 글리콜) (폴록사머), 폴리(N-이소프로필아크릴 아미드) 및 이의 공중합체, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(락타이드/글리콜라이드), 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리프로필렌프말레이트, 키토산/글리세롤 인산염, 폴리포스파젠, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리카프로락톤, 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리알라닌, 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(알라닌/페닐 알라닌) 등이 있다.

[0003] 이들 고분자의 수용액은 상온 또는 그 이하의 온도에서는 용액 또는 졸 상태로 존재하지만, 체온 (37℃) 근처의 온도에서는 수화젤로 전이가 일어나므로, 이러한 고분자는 의약 전달 및 조직공학 재료로 이용될 수 있을 것으로 유력시되고 있다. 즉, 졸 상태에서 의약 또는 세포와 혼합한 후에 피하 또는 근육 주사를 통하여 체내에 투입하여 원하는 부위에서 수화젤 (depot)이 순간적으로 만들어지도록 함으로써, 약물을 서서히 방출하거나 세포가 자라서 조직이 재생되도록 할 수 있다. 이런 생분해성 재료는 외과적 수술이 필요 없이 임플란트 (implant)를 만들고, 졸 상태에서 단순한 마이크로 필터를 통하여 살균이 가능하다.

[0004] 그러나, 폴록사머, 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드) 및 이의 공중합체는 생체 내에서 분해되지 않으며, 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(프로필렌 글리콜)-폴리(에틸렌 글리콜)의 경우 25 중량%의 수용액으로부터 만든 수화젤이라도 하루 이내에 용해되어 젤의 형태를 유지하지 못한다.

[0005] 미국특허 제6,117,949호, 제6,201,072호 및 제6,841,617호는 온도를 상승시킬 때 수용액에서 수화젤로 전이가 일어나는 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(락타이드/글리콜라이드) 및 이들의 의학적 응용을 개시하고 있다. 미국 공개특허 제2006-0018949호는 온도를 상승시킬 때 수용액에서 수화젤로 전이가 일어나는 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리프로필렌프말레이트 및 이들의 의학적 응용을 개시하고 있다. 그러나, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(락타이드/글리콜라이드)와 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(프로필렌 프말레이트)는 분해 시에 산이 발생하고, 녹이는 데에 오랜 시간이 소요되며, 또한 수용액 상태로 상온에서 보관하는 경우에는 불안정하여 쉽게 가수 분해된다. 또한, 졸-젤 전이가 일어나는 최소 농도가 10 중량% 이상으로 비교적 높다는 단점이 있다.

- [0006] 미국 공개특허 제2005-0020808호는 온도를 상승시킬 때 수용액에서 수화젤로 전이가 일어나는 폴리포스파젠을, 미국특허 제6,344,488호는 키토산/글리세롤 인산염 및 이들의 의학적 응용을 개시하고 있으나, 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(락타이드/글리콜라이드), 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리(프로필렌 프말레이트), 폴리포스파젠 등은 옛 형상으로서, 용해시키는 데에 오랜 시간이 소요되는 단점이 있다.
- [0007] 미국 특허 제7,087,244호 (2006), *J. Controlled Release* 2009, 137, 25-30, *Soft Matter* 2008, 4, 2383-2387, *Macromolecules* 2008, 41, 8204-8209는 온도를 상승시킬 때 수용액에서 수화젤로 전이가 일어나는 폴리(에틸렌 글리콜)/폴리펩티드 및 이들의 의학적 응용을 광범위하게 개시하고 있다.
- [0008] *J. Agri. Food Chem.*, 1996, 44, 804는 우유에서 추출한 베타락토글로불린 수용액을 온도를 증가시킬 때, 티올 작용기의 가교반응에 의해 10 wt. % 수용액의 경우 85 °C에서 졸에서 젤로 전이가 일어남을 보여준다. 그러나, 이 현상이 의학적 용도로 이용하기에는 너무 높은 온도이다. *J. Mol. Biol.*, 1998, 283, 255, *Biomacromolecules*, 2007, 8, 3736, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 2002, 54, 1075 는 발린-프롤린-글리신-발린-글리신의 펜타펩티드와 프롤린-히드록시프롤린-글리신의 트리펩티드, 폴리히스티딘, 또는 글리신-알라닌-글리신-알라닌-글리신-세린의 헥사펩티드의 블록공중합체를 이용하여 온도를 증가시킬 때, 졸-젤 전이 현상을 보고하였다. 또한, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 2002, 54, 1057는 알라닌-프롤린-글리신-글리신의 테트라펩타이드와 폴리에틸렌글리콜의 블록공중합체로부터 졸-젤 전이 물질을 보고하였다. 또한, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 11802 는 발린-라이신-발린-라이신- 발린-라이신- 발린-라이신- 타이로신- 라이신-발린-프롤린-프롤린-타이로신-라이신타이로신-발린-타이로신-발린(VKVKVKVKTKVPPTKTKVKV)을 이용하여 온도가 증가할 때 이들 수용액이 졸에서 젤로 전이가 일어남을 보고하였다.
- [0009] 그러나, 이들 폴리펩타이드 물질은 미생물을 이용하거나 고체상 합성의 방법으로 제조되어 매우 단가가 높고, 소량으로 제조되는 한계가 있어, 본 발명에서 제시하는 1 단계 개환반응을 통하여 졸-젤 전이 물질을 제조하는 방법에 비하여 실용적인 면에서 문제가 있다.
- [0010] 또한, 대한민국 공개특허 제2002-0023441호는 졸-젤 상전이를 일으키는 이소프로필아크릴아미드 공중합체 및 이를 이용한 혈관 폐색을 개시하고 있으나, 이들은 생체 내에서 분해되지 않으므로 의약 전달 또는 조직공학용 재료로 응용하는 경우에 체내에서 제거하여야 한다는 한계가 있다. 또한, 아크릴아미드는 발암 물질로서, 잔류 다량체의 독성이 문제가 될 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 온도가 증가함에 따라 졸에서 수화젤로 변하는 약물전달체, 조직공학용 지지체 등으로 사용할 수 있는 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0013] 수평균 분자량이 500 내지 3,000인 폴리비닐피롤리돈 블록; 및
- [0014] 수평균 분자량이 200 내지 3,000인 폴리펩티드 블록을 포함하되, 총 분자량이 700 내지 20,000인 생분해성 블록 공중합체를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한
- [0016] 말단에 아민기, 또는 하이드록시기를 하나 이상 포함하는 폴리비닐피롤리돈; 및
- [0017] N-카복시 또는 하이드록시 아미노산 무수물과 반응시키는 단계를 포함하는 생분해성 블록 공중합체의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한 본 발명의 생분해성 블록 공중합체를 포함하는 약물전달체 또는 조직공학용 지지체를 제공한다.

효 과

[0019] 본 발명에 따른 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 블록 공중합체의 수용액은 일정한 농도 이상인 경우에 특정 온도 이하에서는 수용액으로 존재하지만, 그 이상의 온도에서는 수화젤로 전이가 일어나므로, 의약 전달매체로 응용될 수 있다. 기존의 폴리에틸렌글리콜을 바탕으로 하는 졸-젤 전이 온도민감성 고분자 수용액의 제조시간을 3 ~ 10 배 이상 단축시켜 수용액 제조가 매우 편리한 장점이 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0021] 본 발명은

[0022] 수평균 분자량이 500 내지 3,000인 폴리비닐피롤리돈 블록; 및

[0023] 수평균 분자량이 200 내지 3,000인 폴리펩티드 블록을 포함하되, 총 분자량이 700 내지 20,000인 생분해성 블록 공중합체에 관한 것이다.

[0024] 본 발명의 생분해성 블록 공중합체는 약물전달체, 소수성 약물의 가용화제, 세포배양, 조직공학용 지지체 등의 학적으로 응용될 수 있는 고분자로서, 일정 농도 이상에서, 체온 (37℃) 이하의 온도에서는 수용액으로 존재하나, 37℃ 이상에서는 수화젤로 존재하게 되는, 졸-젤 전이가 일어날 수 있는 고분자임을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명의 생분해성 블록 공중합체는 친수성 고분자로 폴리비닐피롤리돈을, 소수성 고분자로 폴리펩티드를 포함하여 수용액 하에서 마이셀을 형성하며, 온도가 높아짐에 따라 마이셀이 응집하는 특징이 있다.

[0026] 본 발명의 생분해성 블록 공중합체는 친수성 및 소수성의 균형을 유지하고, 생체 내 주입 후 체외 배출을 용이하게 하기 위해 총 분자량이 700 내지 20,000이 바람직하다. 보다 바람직하게는 1,000 내지 3,000이 좋다.

[0027] 상기 생분해성 블록 공중합체는 폴리비닐피롤리돈 블록(A) 및 폴리펩티드(B)를 이용하여 이원 블록, 삼원 블록, 또는 다중 블록 공중합체로 제조될 수 있다.

[0028] 바람직하게는, A-B, A-B-A, B-A-B, 또는 (AB)_n의 구조를 가질 수 있다. 여기서 상기 n은 2 내지 20의 양의정수이다.

[0029] 또한, 상기 폴리피롤리돈은 폴리펩티드가 결합할 수 있도록 말단에 친핵성 작용기, 예를 들어, 아민기 또는 하이드록시기 등을 단독 또는 2종 이상 포함할 수 있다.

[0030] 상기 폴리피롤리돈으로 모노메톡시 아미노-폴리비닐피롤리돈, 디아미노-폴리비닐피롤리돈, 또는 비닐피롤리돈과 아크릴 산, 메타크릴 산, 아크릴아미드, 메타크릴아미드, 비닐아세테이트, 비닐알콜, 2-하이드록시에틸메타크릴레이트, 또는 2-하이드록시에틸아크릴레이트 등의 공중합체를 사용할 수 있다. 상기 공중합체 또는 비닐피롤리돈 단독중합체에 있어서, 비닐피롤리돈의 몰 함량은 공중합체에 대해 70% 내지 100%인 것이 바람직하다.

[0031] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 생분해성 이원블록 공중합체의 경우, 모노메톡시 아미노-폴리비닐피롤리돈을 사용할 수 있다. 또한, 생분해성 삼원블록 공중합체의 경우에는 디아미노-폴리비닐피롤리돈을 사용할 수 있다.

[0032] 상기 폴리비닐피롤리돈은 수평균 분자량이 500 내지 3,000인 것이 바람직한데, 상기 분자량 범위가 500 미만인 경우, 졸-젤 전이를 일으키기 위한 폴리피롤리돈/폴리펩티드 고분자의 물에서의 용해도가 문제가 되고, 고분자량의 경우, 특히 20,000 이상의 경우 사구체 여과를 통한 체외배출의 문제가 있다. 졸-젤 전이 현상은 친수성 고분자 블록의 길이에 매우 민감하여 특히, 3,000을 초과하는 경우, 체온 이하에서 졸-젤 현상을 보이는 블록공중합체를 만들기 어려운 특성 있다.

[0033] 또한, 상기 폴리비닐피롤리돈은 생분해성 블록 공중합체의 소수성 및 친수성의 균형을 통한 졸-젤 전이가 가능

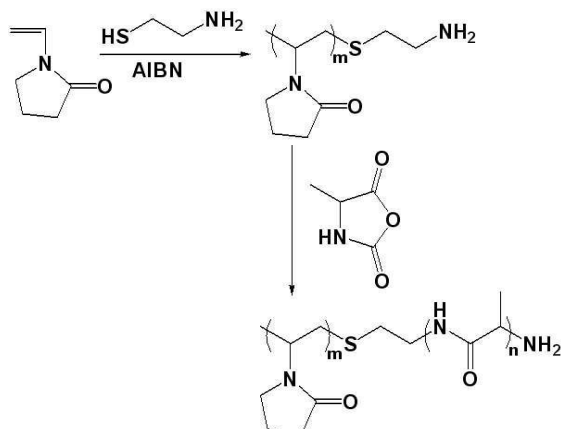
하도록 생분해성 블록 공중합체 100 중량부에 대하여 40 내지 80 중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 함량 범위를 벗어날 경우 물에 잘 용해되거나 졸-겔 전이가 관찰되지 않는다.

- [0034] 또한, 상기 폴리펩티드로, 글라이신, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스팔산, 아스파라긴, 시스틴, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 또는 발린 등을 단독 또는 2종 이상의 아미노산을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0035] 상기 아미노산은 DL-형태, D-형태, L-형태, 또는 이들의 공중합체를 포함할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 수평균 분자량은 200 내지 3,000인 것이 바람직하다. 졸-겔 전이 현상을 보이기 위하여 적당한 분자량의 친수성과 소수성 블록의 분자량이 요구되는 바, 상기 분자량 범위가 200 미만인 경우, 소수성 블록이 작아 분자응집력이 약하여 겔 형성이 어려우며, 3,000을 초과하는 경우, 소수성 부분이 너무 커서 물에 대한 용해도가 급격히 줄어 졸-겔 현상을 관찰할 수 없다.
- [0036] 상기 폴리펩티드는 생분해성 블록 공중합체의 소수성 및 친수성의 균형을 통한 졸-겔 전이가 가능하도록 생분해성 블록 공중합체 100 중량부에 대하여 20 내지 60 중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 함량 범위를 벗어날 경우, 물에 용해되지 않기 때문이다.
- [0037] 본 발명은 또한
- [0038] 말단에 아민기, 또는 하이드록시기를 하나 이상 포함하는 폴리비닐피롤리돈; 및
- [0039] N-카르복시 또는 하이드록시 아미노산 무수물과 반응시키는 단계를 포함하는 생분해성 블록 공중합체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명의 생분해성 블록 공중합체의 제조방법을 단계별로 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0041] 제1단계로, 폴리비닐피롤리돈의 말단에 폴리펩티드가 결합할 수 있는 친핵성 작용기, 예를 들어, 아민기, 또는 하이드록시기를 하나 이상 도입하는 것이다.
- [0042] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 폴리비닐피롤리돈이 친핵성 작용기로 아민기를 포함할 경우, 티오라디칼을 형성할 수 있는 화합물 하에서 자유 라디칼 중합법에 따라 제조될 수 있다.
- [0043] 상기 티오라디칼을 형성할 수 있는 화합물로 2-아미노 에탄티올 및 아조비스(이소부티로나이트릴)(AIBN)을 사용할 수 있다.
- [0044] 상기 티오라디칼은 폴리비닐피롤리돈, 2-아미노 에탄티올 및 AIBN이 반응 시 생성된 AIBN의 라디칼이 2-아미노 에탄티올로 전이되어 생성될 수 있으며, 이로 인해 폴리비닐피롤리돈은 아민기 말단을 갖게 된다.
- [0045] 상기 아민기 말단을 함유하는 폴리피롤리돈으로 모노메톡시 아미노-폴리비닐피롤리돈, 또는 디아미노-폴리비닐피롤리돈을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 생분해성 이원블록 공중합체를 제조할 경우, 모노메톡시 아미노-폴리비닐피롤리돈을 사용할 수 있다. 또한, 생분해성 삼원블록 공중합체를 제조할 경우에는 디아미노-폴리비닐피롤리돈을 사용할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 단계에서 제조된 아민기 말단 함유 폴리비닐피롤리돈은 진공, 또는 톨루엔 하에서 증류시켜 수분을 제거하는 단계를 더 실시할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 생분해성 블록 공중합체의 제조방법에 따르면, 제2단계로, 상기 친핵성 작용기 말단을 함유하는 폴리비닐피롤리돈과 N-카르복시 또는 하이드록시 아미노산 무수물을 반응시켜 블록 공중합체를 제조하는 단계이다.
- [0048] 상기 반응은 0 내지 120℃에서 5 내지 72시간 동안 실시될 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명은 또한 본 발명의 생분해성 블록 공중합체를 포함하는 약물전달체 또는 조직공학용 지지체에 관한 것이다

다.

- [0050] 본 발명의 생분해성 블록 공중합체는 일정한 농도 이상인 경우에 특정 온도 이하에서는 수용액으로 존재하지만, 그 이상의 온도에서는 수화젤로 전이가 일어나므로, 생체 세포 및 조직을 효과적으로 지지, 유도, 재생, 배양 또는 선택 차단하거나 생리활성 및 약리 물질을 공급과 삼출할 수 있는 약물전달체, 또는 조직공학용 지지체로 사용될 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 약물전달체는 활성화합물을 더 포함할 수 있다. 상기 활성화합물은 신체의 질병, 징후 및 그 외 증상을 진단, 예방 또는 치료하거나 신체 기능에 작용하는데 유용한 임의의 화학물질, 생물학적 물질 또는 이들 물질의 혼합물일 수 있다.
- [0052] 바람직한 활성화합물로, 만성 치료요법 또는 장기적인 치료요법에 사용되는 약물, 예를 들어 탁솔, 아드리아마이신, 블레오마이신, 시스플라틴, 카보플라틴, 독소루비신, 5-플로로우라실, 메톡트렉세이트 또는 안티노마이신 D 등의 항암제; 호르몬; 항생제; 진통제; 항감염제; 옥시토신, 바소프레신, 루테나이즈 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬, 인슐린, 글루카곤, 인터루킨, 인터페론, 가스트린, 칼시토닌, 에리쓰로포이틴, 칼세토닌, 엔돌핀, 엔지오텐신, 암 고사 인자 (TNF), 신경 성장 인자 (NGF), 그라놀로사이트 콜로니 자극 인자 (GCSF), 레닌 또는 항체 등의 단백질 또는 펩티드; 또는 DNA, 플라즈미드 DNA, RNA, RNAi, 또는 siRNA 등의 핵산 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0053] 또한, 본 발명의 조직공학용 지지체는 하나 또는 다수 개의 살아있는 세포를 포함할 수 있다.
- [0054] 상기 살아있는 세포로 콘드로사이트, 배아 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 간세포, 심장 줄기 세포, 심근 세포, 내피 세포, 또는 섬유아세포 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0055] 또한, 상기 활성화합물, 또는 살아있는 세포는 본 발명의 생분해성 블록 공중합체 내에 혼입되어 포함되거나, 또는 약물이 적재된 콜로이달 담체, 예를 들어 나노입자, 나노캡슐, 리포솜, 리포플렉스, 지질컴플렉스, 고형지질 나노입자 또는 약물접합체의 형태로 혼입될 수 있다.
- [0056] 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.
- [0057] <실시예 1> 이원블록 공중합체의 합성
- [0058] N-비닐피롤리돈, 2-아미노 에탄티올, 아조비스(이소부티로나이트릴, AIBN), 2-아닐리노나프탈렌, 및 벤젠은 Aldrich로부터 구입하여 사용하였다. L-알라닌의 N-카르복시 무수물 및 DL-알라닌의 N-카르복시 무수물은 M&H Laboratory(Korea)로부터 얻었다. 톨루엔은 사용 전에 소듐으로 건조하였다. 클로로포름 및 N,N-디메틸 포름아마이드(무수물)은 사용 전에 마그네슘 설페이트 무수물을 처리하여 사용하였다.
- [0059] 2-아미노 에탄티올 하에서 N-비닐피롤리돈의 자유-라디칼 중합법에 따라 아민 처리된 PVP를 합성하였으며, 합성 과정은 하기 반응식 1에 도시하였다.

[0060] [반응식 1]



[0061]

[0062] 구체적으로 설명하면, 표 1에 도시된 PVP-II를 제조하기 위해, N-비닐피롤리돈(106.6 mL; 1.0 mol), 벤젠(250 mL) 및 2-아미노에탄티올(5.01mL; 0.049 mol)을 둥근바닥 플라스크에 첨가하였다. 상기 반응 시스템에서 산소를 제거하기 위해 1시간 동안 질소를 제거하였다. 질소 가스 하에서 AIBN (6.08 g; 0.037 mol)를 첨가하고, 70 °C에서 24시간 동안 중합을 실시하였다. 디에틸 에테르를 사용하여 반응 혼합물을 침전시켰다. 침전물 내 잔류용매는 진공 하에서 제거하였다.

[0063] PVP-PA (PIII)는 아민 처리된 PVP (PVP-II) 하에서 L-알라닌의 N-카르복시 무수물 및 DL-알라닌의 N-카르복시 무수물의 링 오픈 중합(ring opening polymerization)을 통해 제조하였다. PVP (PVP-II) (15.0 g; 0.012 mole; MW 1240 달톤)를 톨루엔(100 mL)에 녹이고, 남아있는 물은 공비 증류(azeotropic distillation)로 제거하여 최종 부피가 약 20 mL이 되도록 하였다. 클로로포름/디메틸 포마이드 무수물(65 mL; 12/1 v/v), L-알라닌의 N-카르복시 무수물(2.61 g; 0.0227 mole), 및 DL-알라닌의 N-카르복시 무수물(6.09 g; 0.0530 mole)을 상기 반응 플라스크에 첨가하고, 40 °C에서 24시간 동안 교반하였다. 디에틸 에테르를 사용하여 반응 혼합물을 침전시키고, 침전물 내 잔류 용매는 진공 하에서 제거하였다. 상기 고분자는 24시간 투석(막의 한계 분자량이 1,000 달톤 임)하여 추가로 정제하였다. 투석 백에 남아있는 고분자 수용액을 동결건조하여 백색 분말 형태의 중합체를 생성하였다. 수율은 약 60%였다.

[0064] 조성과 블록 길이가 다른 중합체 역시 상기와 유사한 방법으로 제조하였고, 본 발명에 사용된 고분자 목록은 표 1에 도시하였다.

[0065] <실험예 1> PVP 및 PVP-PA의 질량 측정

[0066] PVP 및 PVP-PA의 MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption and ionization-time of flight) 질량 스펙트럼은 337 nm에서 질소 레이저 방출 펄스 UV가 장착되어 있고, 반사기 모드에서 20 Kv의 가속전압에서 작동하는 질량분석기(mass spectrometer, Voyager-DE STR; Applied Biosystems, Foster, CA)에서 측정하였다. 0.1% 트리플루오로아세트산을 포함하는 60/40 (v/v) (아세트나이트릴/물) 혼합물의 α-시아노-4-하이드록시신남산 용액(4 mg/mL)으로 구성된 고분자 매트릭스 용액 5μl를 MALDI-TOF 판에 침착하고, 실온에서 공기건조하였다. 모든 측정 은 포지티브 이온 모드에서 실시하였다.

[0067] 또한, PVP-PA (CF₃COOD에 녹임) (500 MHz NMR spectrometer; Varian)의 ¹H-NMR 스펙트럼은 고분자의 조성을 측정하는데 사용하였다. 물에서 중합체의 코어-셸 구조를 입증하기 위해 20 °C에서 PVP-PA (PIII) (D₂O에 녹임)의 ¹H-NMR 스펙트럼과 CF₃COOD에서의 스펙트럼을 비교하였다. 온도 별로 PVP-PA (PIII; 12.0 wt. % D₂O에 녹임)의 ¹³C-NMR 스펙트럼 변화를 조사하였다. 용액 온도는 각 온도에서 20분간 평형을 유지하였다.

[0068] 도 2a에 나타난 바와 같이, PVP 및 PVP-PA의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼 측정 결과 상기 고분자의 단봉분포(unimodal distribution)를 얻었다. MALDI-TOF 질량 스펙트럼에서 측정된 고분자의 분자량은 절대 분자량이다. PVP의 분자량은 생체 시스템에 적용 시 신장에 의해 빠르게 제거될 수 있는 3,000 달톤 미만이었다. 또한, PVP-

PA의 분자량은 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(CF_3COOD)을 이용하여 계산하였다(도 2b).

[0069] PVP-PA 블록 공중합체 조성을 계산하기 위해 4.7 - 4.9 ppm ($-\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)-$)에서 PA의 메틴 피크 및 2.6 - 3.0 ppm (피롤리돈 링의 $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$)에서 PVP의 메틸렌 피크를 사용하였다. L-알라닌의 N-카르복시 무수물과 DL-알라닌의 N-카르복시 무수물의 반응성이 같다는 가정 하에서, L-알라닌 및 DL-알라닌의 조성은 중합 동안 공급비에 따라 제공하였다.

[0070] 표 1에 도시된 바와 같이, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 및 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 통해 측정된 분자량의 차이는 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 전체 영역에서 상(phase)의 오차로부터 생긴 것 같다. 그러나, 경향 면에서는 서로 상당히 상관관계가 있었다. PVP-PA의 분자량 및 분자량 분포는 각각 1,400 - 2,200 달톤 및 1.1 - 1.2 이었다.

표 1

polymer	PVP-PA ^a	PVP-PA ^b	L/DL ^c	M_n^a	M_w/M_n^a
PVP-I	970	-	-	970	1.2
PVP-II	1240	-	-	1240	1.1
PI	970-510	970-650	30/70	1480	1.1
PII	1240-350	1240-510	30/70	1590	1.1
PIII	1240-580	1240-720	30/70	1820	1.1
PIV	1240-880	1240-950	30/70	2120	1.2
PV	1240-540	1240-700	20/80	1780	1.1
PVI	1240-520	1240-660	40/60	1760	1.1

[0071]

^a MALDI-TOF 질량 스펙트럼에서 측정된 결과임.

[0072]

^b $^1\text{H-NMR}$ (CF_3COOD) 스펙트럼 결과임. 알라닌(n)에 대한 N-비닐피롤리돈(m)의 반복단위의 수의 비율은 하기 식에 따라 측정함.

[0073]

$$A_{4.7-4.9}/A_{2.6-3.0} = n/(2m+4)$$

[0074]

$A_{4.7-4.9}$ 및 $A_{2.6-3.0}$ 는 각각 4.7 - 4.9 ppm 및 2.6 - 3.0 ppm에서 $^1\text{H-NMR}$ 의 전체 영역을 뜻함.

[0075]

PVP-PA의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 도 2b에 도시함.

[0076]

PVP의 분자량의 M_n 은 MALDI-TOF 질량 스펙트럼에서 얻음.

[0077]

^c PVP-PA의 L-알라닌/DL-알라닌 비율은 L-알라닌의 N-카르복시 무수물의 반응성이 DL-알라닌의 N-카르복시 무수물과 동일한 것으로 가정하고 단량체 공급량을 이용하여 측정함.

[0078]

<실험예 2> 블록 공중합체의 상태도(phase diagram) 조사

[0079]

상기 PVP-PA 수용액은 온도가 상승함에 따라 졸-젤 전이를 겪으므로 PVP-PA (PIII) 수용액의 상태도를 측정하였다. 상기 중합체 수용액의 졸-젤 전이는 시험관을 뒤집는 방식으로 조사하였다. 상기 중합체 수용액(1.0 mL)을 내경이 11 mm인 바이알에 첨가하였다. 전이온도는 각 단계별로 1 °C씩 올리면서 흐름(졸)-흐르지 않음(젤) 기준으로 측정하였다. 각 데이터의 수치는 평균 3회 측정치이다.

[0080]

도 3a에 도시된 바와 같이, 중합체 농도가 4 wt. %에서 13 wt. %로 증가함에 따라, 졸-젤 전이온도는 64 °C에서 30 °C로 감소하였다. 4.0 wt. % 이하에서는 점도 증가가 관찰되었다. 그러나, 상기 수용액은 고온에서 질량 흐름(mass flow)을 멈출 만큼 충분히 견고하지는 않았다. 14.0 wt. %를 초과할 경우, 중합체 수용액은 젤 상태로 존재하고, 10 - 80 °C에서 졸-젤 전이는 관찰되지 않았다.

[0081]

- [0082] 또한, PVP-PA 수용액의 줄-젤 전이는 저장율(G') 및 손실율(G'')이 유의하게 증가하는 것과 관련되어 있다. 따라서, 온도별 PVP-PA(PIII) 수용액의 저장률과 손실율의 변화를 측정하였다. PVP의 G'' 를 기준물질로 표시하였다. 상기 중합체 수용액의 모듈 변화는 dynamic rheometry (Thermo Haake, Rheometer RS 1)로 조사하였다. 이를 위해, 상기 중합체 수용액을 직경이 25 mm인 평행판과 0.5 mm의 틈 사이에 위치시켰다. 실험 동안 수분 증발을 최소화 하기 위해, 상기 판은 물로 포화된 챔버 내에 놓아두었다. 데이터는 제어된 스트레스(4.0 dyne/cm^2) 및 진동수(1.0 rad/s) 하에서 수집하였다. 가열속도는 1분당 $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 로 하였다.
- [0083] 도 3b에 나타난 바와 같이, G' 가 G'' 를 초과하는 것은 줄-젤 전이온도 또는 이상에서 탄성요소가 점성요소에 지배적임을 뜻하는 것이다. 반면, PVP 수용액의 G' 및 G'' 에서의 유의적인 변화는 없었고, 시험 온도 범위에서 G'' 이 G' 보다 더 컸다.
- [0084] 또한, PVP-PA는 친수성 PVP와 소수성 PA로 구성되어 있어 물에서 자기조립될 수 있다. CF_3COOD 및 D_2O 에서 PVP-PA (PIII)의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 비교하였다. 각각 D_2O 및 CF_3COOD 에서 0 ppm의 표준피크로 3-(트리메틸실릴)프로판산 및 테트라메틸실란을 이용하였다.
- [0085] 도 4에 나타난 바와 같이, CF_3COOD 에서 PVP-PA (PIII)의 $^1\text{H-NMR}$ 피크는 D_2O 에서 관찰된 것으로부터 아래쪽으로 이동한 $0.2 - 0.3 \text{ ppm}$ 였다. 이는 표준피크의 차이, 및 PVP 및 PA의 CF_3COOD 과 아마이드 간의 수소결합으로 인한 결과일 것이다. 특히, CF_3COOD 에서 $1.5 - 1.8 \text{ ppm}$ 에서 PA ($-\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)-$)의 일직선의 메틸 피크는 D_2O 에서 유의하게 붕괴되는 반면, $3.3 - 3.8 \text{ ppm}$ 에서 PVP ($-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$)의 메틸렌 피크가 일직선을 유지하였다. 이러한 양상은 PVP-PA가 물에서 친수성 PVP가 셀을, 소수성 PA가 코어를 형성하는 코어-셀 구조를 형성함을 뜻하는 것이다.
- [0086] <실험예 3> 형광 분광계를 이용한 PVP-PA 마이셀의 임계 농도 측정
- [0087] $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 형광 분광계(RF5301, Shimadzu)를 이용하여 PVP-PA (PIII)의 마이셀의 임계 농도를 측정하였다. $1.0 \times 10^{-4} - 5.0 \times 10^{-1} \text{ wt. \%}$ 의 중합체 농도 범위에서 상기 중합체 수용액에 2-아닐리노나프탈렌을 메탄올에 녹인 용액($10 \text{ } \mu\text{l}$, 0.01 mM)을 주입하였다. 여기 파장은 309 nm 였다. 상기 용액의 형광 스펙트럼은 350 내지 600 nm 로 기록되었다. 밴드 위치는 중합체 농도에 따라 표시하였고, 2개의 외삽된 선의 교차 지점을 마이셀의 임계 농도로 정의하였다.
- [0088] 도 5a에 나타난 바와 같이, 2-아닐리노나프탈렌은 $350 - 600 \text{ nm}$ 에서 형광 방출 스펙트럼을 나타냈다. 상기 염료가 소수성 환경에 놓이게 되면, 형광 스펙트럼의 푸른색으로의 이동과 함께 형광 강도가 증가하였다.
- [0089] 또한, 염료 농도를 $10 \text{ } \mu\text{M}$ 로 고정하고, PVP-PA (PIII) 농도를 1.0×10^{-4} , 5.0×10^{-4} , 1.0×10^{-3} , 5.0×10^{-3} , 1.0×10^{-2} , 5.0×10^{-2} , 1.0×10^{-1} , 및 $5.0 \times 10^{-1} \text{ wt. \%}$ 로 처리하였다. 상기 염료의 형광 스펙트럼의 밴드 위치는 마이셀의 임계 농도를 찾기 위해 로그함수로 표시하였다.
- [0090] 도 5a의 내부에 표시된 그래프를 보면, 2개의 외삽된 선의 교차 지점이 마이셀의 임계 농도이며, 약 $0.01 \text{ wt. \%}$ 이었다.
- [0091] 또한, 마이셀 형성은 투과전자현미경으로 확인할 수 있다. 이를 위해, PVP-PA (PIII) 수용액($0.05 \text{ wt. \%}$, $10 \text{ } \mu\text{l}$)을 카본 그리드 상에 위치시키고, 초과 용액은 여과지를 사용하여 빨아들였다. 상기 그리드는 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 24 시간 동안 공기건조시켰다. 현미경 사진은 200 kV 의 가속전압을 사용하여 JEM-2100F (JEOL)에서 얻었다. 도 5b에서 스케일 바는 200nm 이다.
- [0092] 도 5b에 나타난 바와 같이, $30 - 90 \text{ nm}$ 의 구형의 마이셀이 관찰되었다. $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 수분 증발 동안 약간 뒤틀림이 있긴 하나, 구형 마이셀이 명확하게 관찰되었다.

- [0093] <실험예 4> PVP-PA의 겔보기 크기 측정
- [0094] 동적광산란 연구를 통해 물에서 응집하는 상기 중합체의 겔보기 크기 및 크기 분포를 입증하였다. 동적광산란장치(ALV 5000-60x0)를 이용하여 온도 별로 물(0.05 wt. %)에서 응집된 PVP-PA (PIII)의 겔보기 크기를 조사하였다. 상기 수용액은 각 온도에서 20분간 평형을 유지시켰다. 광원으로, 532 nm에서 작동하는 YAG DPSS-200 laser (Langen, Germany)를 사용하였다. 산란된 빛은 입사빔에 대해 90° 각도에서 측정하였다. 동적광산란 결과는 제어된 CONTIN 방법에 따라 분석하였다. 감쇠율(decay rate) 분포는 현성 확산 계수(apparent diffusion coefficient)로 바꾸었다. 확산 계수로부터, 중합체 응집체의 겔보기 유체역학적 크기는 Stokes-Einstein 식을 이용하여 얻을 수 있다.
- [0095] 도 6에 나타난 바와 같이, 상기 중합체는 20 °C에서 직경 20 - 70 nm로 응집하며, 투과전자현미경 사진도에서 관찰된 마이셀의 크기와 비견될만 하였다. 반면, 상기 마이셀은 45 °C로 승온함에 따라 갑자기 100 nm 크기로 증가하거나, 폭넓게 분포하였다. 50 °C 이상에서, 상기 중합체는 1000 nm 보다 더 크게 응집함이 관찰되었는데, 이는 중합체의 유의한 응집이 고온에서 일어남을 뜻하는 것이다.
- [0096] <실험예 5> PVP-PA의 분자적 수준에서의 구조 변화 측정
- [0097] PVP-PA의 구조적 변화를 분자적 수준에서 조사하기 위해, 온도 별로 중합체 수용액의 FTIR, CD, 및 ^{13}C -NMR을 조사하였다.
- [0098] FTIR 스펙트럼 분석을 위해, PVP-PA (PIII) 수용액(12.0 wt. %, D_2O 에 녹임)의 FTIR 스펙트럼(FTIR spectrophotometer FTS-800; Varian)은 각 단계마다 5 °C씩 승온하면서 10 °C 내지 50 °C의 온도 범위 별로 조사하였다. 레졸루션(Resolution)은 2.0 cm^{-1} 로 하였다. 상기 수용액은 각 온도에서 20분간 평형을 유지시켰다. 아마이드 피크의 디콘볼루션(Deconvolution)은 $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ 의 스펙트럼 범위에서 실시하였다. 역필터링된(Deconvoluted) 스펙트럼은 XPSPEAK41 프로그램을 사용하여 맞추었다.
- [0099] 또한, PVP-PA (PIII) 수용액의 타원율은 원편광 이색성 분광측정기(Circular Dichroism (CD) Spectroscopy, J-810, JASCO)를 사용하여 1.0×10^{-4} - 5.0×10^{-1} wt. %의 중합체 농도 범위에서 20 °C의 고정된 온도에서 농도별로 얻었다. 또한, 각 단계마다 5 °C씩 승온하면서 10 °C ~ 50 °C의 범위에서 0.05 wt. %의 고정된 농도에서 온도별 PVP-PA (PIII) 수용액의 타원율을 얻었다. 상기 수용액은 각 온도에서 20분간 평형을 유지시켰다.
- [0100] 도 7a에 나타난 바와 같이, 비록 PVP 공중합체(PVP-II)의 카보닐 피크와 PVP-PA 수용액(D_2O 에 녹임)의 FTIR 스펙트럼에서 아마이드 I 밴드가 겹치기는 하나, 온도가 증가함에 따라 1624 cm^{-1} 에서 집중된 솔더 피크의 증가가 명백하게 관찰되었다. $1620\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ 에서 FTIR 피크는 폴리펩티드의 β -sheet 구조 때문이다.
- [0101] 반 정량적 방식으로, 1624 cm^{-1} 에 집중된 피크에서의 증가를 분석하기 위해, XPSPEAK41 프로그램에서 카보닐 피크를 2개의 피크로 감쇠시켰다(도 7b).
- [0102] 또한, 도 7a의 FTIR 스펙트럼을 $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ 의 전체 카보닐 피크에 대해 1624 cm^{-1} 에 집중된 커브 하에 있는 영역의 비율로 다시 표시하였다.
- [0103] 도 7c에 나타난 바와 같이, 상기 비율(f_β), β -sheet 구조의 측정은 온도가 10 에서 50 °C로 증가함에 따라 3 %에서 12 %로 증가하였다. 상기 사실은 온도가 증가함에 따른 PA의 β -sheet 구조가 강화됨을 뜻하는 것이다.
- [0104] 또한, 농도 및 온도에 대한 PVP-PA (PIII) 수용액의 CD 스펙트럼 조사 결과, 도 8a에 나타난 바와 같이, 중합체 농도가 0.01 wt. % 이상인 경우, 218 nm에서 236 nm로의 네거티브 코튼 밴드의 적색 이동이 관찰되었다. 이러한 네거티브 코튼 밴드의 적색 이동은 또한 중합체 농도가 증가함에 따라 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(L-벤질 글루타메이트) (PEG-L-PBG) 및 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(L-알라닌) (PEG-L-PA) 이원블록 공중합체 수용액에서도 보고된 바 있다. PEG는 카이로-광학적 특징(chiro-optical property)을 나타내지 않기 때문에 α -helices 또는 β -sheets 구조를 갖는 폴리펩티드의 자기조립으로 인한 것으로 사료되었다.

- [0105] 본 실험예에서, PVP 자체는 카이로-광학적 특성을 갖지 않으며, 네거티브 코튼 밴드는 폴리펩티드로부터 유래한 것이다. PVP-PA의 FTIR 스펙트럼이 부분적으로 물에서 β -sheet 구조를 나타내는 점을 고려하면, PVP-PA의 네거티브 코튼 밴드는 폴리펩티드의 2차 구조에서 유래한 것이다. 0.05 wt. %의 고정된 고분자 농도에서 온도를 증가시키면, 222 nm에서 집중된 네거티브 코튼 밴드가 약간 감소함이 관찰되었는데, 이는 폴리펩티드의 2차 구조에서 약간의 변화가 있음을 뜻하는 것이다 (도 8b).
- [0106] 결론적으로, FTIR 및 CD 스펙트럼에 따르면, 10 - 50 °C 온도 범위에서 PVP-PA의 PA는 랜덤 코일 구조와 β -sheets 구조가 혼합된 구조를 형성함을 알 수 있다.
- [0107] 한편, PVP-PA 수용액(D₂O에 녹임)의 ¹³C-NMR 스펙트럼은 졸-젤 전이온도 이상으로 온도가 증가함에 따라 17-18.3 ppm에서 PVP (-NCH₂CH₂CH₂CO-)의 메틸렌 피크와 16-17 ppm에서 PA (-NHCOCH(CH₃)-)의 메틸 피크가 넓어지고, 아래쪽으로 이동하였다(도 9). 177-179 ppm에서 PVP 및 174-176 ppm에서 PA의 카보닐 피크가 유사한 경향을 나타냈다(도 9의 내부 그래프 참조). PVP-PA 수용액의 졸-젤 전이는 PVP 및 PA 단편의 분자 이동을 감소시키며, ¹³C-NMR 스펙트럼에서 PVP 및 PA 피크가 넓어지고 붕괴되는 결과를 낳는다.
- [0108] <실험예 6> PVP-PA 수용액의 졸-젤 전이의 구조-특성의 상관관계 조사
- [0109] PA의 길이, PVP 길이, 및 PA의 L-알라닌/DL-알라닌의 조성을 변화시키면서 PVP-PA 수용액의 졸-젤 전이의 구조-특성의 상관관계를 연구하였다.
- [0110] 도 10a에 나타난 바와 같이, 소수성 PA 블록 길이가 증가함에 따라, 졸-젤 전이온도는 감소되었는데, 이는 졸-젤 전이가 소수성 결합에 의해 추진됨을 뜻하는 것이다. 8.0 wt. %의 PVP-PA 농도에서, PA 블록 길이가 350에서 880 달톤으로 증가할 때 PVP-PA의 졸-젤 전이온도는 61 °C에서 25 °C로 감소하였다. 또한, 도 10b에 나타난 바와 같이, 소수성 PA 블록 길이가 350에서 880 달톤으로 증가하면, f_{β} 는 2.4에서 7.1로 증가하였다.
- [0111] 또한, PVP-PA의 친수성 PVP 블록 길이가 1240에서 970 달톤으로 감소함에 따라, 졸-젤 전이온도는 유의하게 감소하였다(도 11a). 이러한 경향은 또한 폴리에스테르 기반의 온도민감성 상전이(reverse thermogelling) 중합체에서 보고된 바 있다. 흥미롭게도, 친수성 PVP 블록 길이가 970에서 1240 달톤으로 증가함에 따라, f_{β} 는 6.7에서 2.6으로 감소하였다(도 11b). 입체장애(steric hindrance)에 의한 폴리펩티드의 β -sheet 팩킹(packing) 시보다 긴 친수성 블록이 보다 짧은 친수성 블록보다 훨씬 더 많이 방해할 것이다.
- [0112] 또한, PVP-PA의 블록 길이는 같고, PA의 L-알라닌/DL-알라닌 비율은 20/80, 30/70, 및 40/60으로 달리하였다. 상기 비율은 중합 시 DL-알라닌의 N-카르복시 무수물에 대한 L-알라닌의 N-카르복시 무수물의 비율이 같다고 가정된 것이다. L-알라닌의 조성이 증가함에 따라, 졸-젤 전이온도는 감소하였다(도 12a). 또한, L-알라닌의 조성이 증가함에 따라, f_{β} 는 2.2에서 4.9로 증가하였다(도 12b). 입체규칙성 L-이성질체의 조성이 증가함에 따라, 상기 중합체는 β -sheet 구조로 효과적으로 채워지게 되며, 소수성 결합에 의한 상기 중합체의 응집 경향은 증가하였다. 따라서, PA의 L-알라닌의 조성이 증가함에 따라 졸-젤 전이온도는 감소하였다.
- [0113] 상기 구조-특성의 상관관계는 소수성 PA 블록 길이가 증가하고, 친수성 PVP 길이가 감소하며, 및 L-알라닌/DL-알라닌 비율이 증가함에 따라 졸-젤 전이온도가 감소함을 입증하였다. 이러한 경향은 f_{β} 에서의 변화에서 나타난 바와 같이 PA의 β -sheet 형성 경향과 일치하였다.
- [0114] <비교예 1> PVP-PA 및 PEG-PA 수용액의 졸-젤 전이 비교
- [0115] 분자량과 조성이 같은 PVP-PA 및 PEG-PA 수용액 졸-젤 전이를 비교하였다(도 13). 상업적으로 이용 가능한 α -amino- ω -methoxy PEG 분자량은 한계가 있으므로, 1000 달톤의 분자량을 사용하여 PEG-PA를 제조하였다. L-Ala 대 DL-Ala의 비율은 본 발명의 PVP-PA 과 일치하도록 유지하기 위해 30/70으로 유지하였다. PEG-PA의 MALDI-

TOF 질량 스펙트럼 및 ^1H -NMR 스펙트럼은 도 14에 도시하였다.

[0116] 도 13에 나타난 바와 같이, 친수성 블록의 분자량이 증가함에 따라 양친매성 중합체 수용액의 졸-젤 전이온도가 증가하였고, 졸-젤 전이를 나타내는 농도 범위를 증가시킨다. 비록 PVP-PA (1240-880) 이원블록 공중합체가 PEG-PA (1000-880) 이원블록 공중합체 보다 분자량이 더 큰 친수성 블록을 가지나, PVP-PA 수용액의 졸-젤 전이는 PEG-PA 보다 더 낮은 농도에서 일어났다 소수성 블록 대 친수성 블록의 비율이 같을 때, PVP-PA (1240-880) 및 PEG-PA (1000-720)를 비교할 수 있다. 상기 비율은 각각 0.71 및 0.72였다. PVP-PA 수용액의 졸-젤 전이온도는 PEG-PA 보다 낮았다. 그러므로, PEG는 본 발명의 양친매성 블록 공중합체의 졸-젤 전이를 추진함에 있어서 PVP 보다 유의하게 더 친수성으로 작용하는 것 같다.

[0117] 또한, PVP-PA (PIII)는 실온에서 분말 형태를 가지므로, 다루기 편하고 정량하기 편한 반면, 상기 PEG-PA는 실온에서 오히려 점착성 형태를 가진다. 특히, PVP-PA (PIII)의 분해시간은 약 20분인 반면, 이전의 폴리에틸렌글리콜-폴리알라닌(PEG-PA) 또는 폴리에틸렌글리콜-폴리(알라닌-코-페닐알라닌)(PEG-PAF)의 분해 시간은 졸-젤 전이 수용액(1.0 mL)을 제조하기 위해 몇 시간이 소요되었다. 물에서 PVP-PA의 분말 형태 및 짧은 분해시간은 약물 제형의 재구성을 용이하게 할 수 있음을 지적하는 것이다.

[0118] 또한, 중합체(PIII) 수용액(0.5 mL; 12.0 wt. %)로부터 제조되는 *in situ* 에서 형성된 PVP-PA 젤의 안정성을 실험하였다. 37 °C에서 인산염 완충액(3.0 mL)을 젤의 상단끝에 첨가하고 전체 배지(3.0 mL)는 매일 바꿔주었다. *In vitro* 연구 결과, 중합체 수용액(12.0 wt. %) 으로부터 제조된 PVP-PA (PIII) 젤은 2주 후에 10% 미만까지 감소하였는데, 이는 물에서 실제로 변하지 않음을 뜻하는 것이다. 30.0 wt.% 의 초기 고분자 농도로부터 제조된 Pluronic F127 ((에틸렌 글리콜)₉₉-(프로필렌 글리콜)₆₅-(에틸렌 글리콜)₉₉) 삼원블록 공중합체 수화젤은 같은 공정을 통해 5일 이내에 완전히 사라졌다.

도면의 간단한 설명

[0119] 도 1은 본 발명의 폴리비닐피롤리돈/폴리펩티드 이원 블록(diblock) 공중합체 수용액의 온도 및 농도에 따른 졸-젤 전이 거동을 보여주는 상전이 그래프이다.

[0120] 도 2는 PVP 및 PVP-PA의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼 분석 결과(a) 및 ^1H -NMR 스펙트럼(CF_3COOD) 결과(b)를 나타낸 것이다.

[0121] 도 3은 PVP-PV(PIII) 수용액의 상태도(a)와, PVP-PA(PIII) 수용액(12 wt.%)의 저장율(G') 및 손실율(G'')에서의 온도별 변화를 나타낸 것이다.

[0122] 도 4는 D_2O 및 CF_3COOD 에서 PVP-PA(PIII)의 ^1H -NMR 스펙트럼의 비교 결과를 나타낸 것이다.

[0123] 도 5는 20°C 물에서 2-아닐리로나프탈렌 처리 시 PVP-PA(PIII)의 마이셀의 임계 농도(CMC)를 측정한 결과(a)와, 중합체 수용액(0.05 wt.%)에서 생성된 PVP-PA(PIII)의 투과전자현미경 사진도(b)를 나타낸 것이다.

[0124] 도 6은 물에서 PVP-PA(PIII)의 온도별 겔보기 크기 분포를 나타낸 것이다.

[0125] 도 7은 10°C에서 50°C까지 5°C씩 승온하면서 온도별로 PVP-PA(PIII) 수용액(12.0 wt.%, D_2O 에 녹임)의 FTIR 스펙트럼 분석 결과(a), XPSPEAK41 프로그램에 의한 카보닐 피크의 디콘볼루션(b), 및 전체 카보닐 피크에 대해 1624cm^{-1} 에 집중된 피크 영역의 비율(f_β)로 상기 (a)를 다시 표시한 것이다(c).

[0126] 도 8은 20°C에서 농도별 PVP-PA(PIII)의 CD 스펙트럼(a)과, 10°C에서 50°C까지 5°C씩 승온하면서 온도별로 PVP-PA(PIII)(0.05 WT.%)의 CD 스펙트럼(b)을 나타낸 것이다.

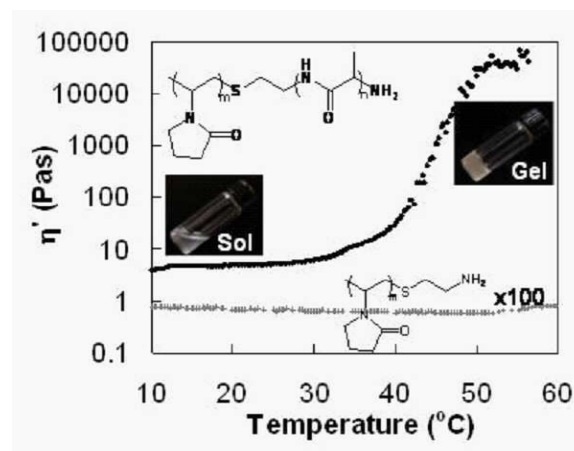
[0127] 도 9는 온도별로 물(12.0 wt.%)에서 PVP-PA(PIII)의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[0128] 도 10은 PVP-PA 수용액의 상태도에 대한 PA 분자량의 효과(a)와, PVP-PA 수용액(12.0 wt.%, D_2O 에 녹임)의 FTIR 스펙트럼(b)을 나타낸 것이다.

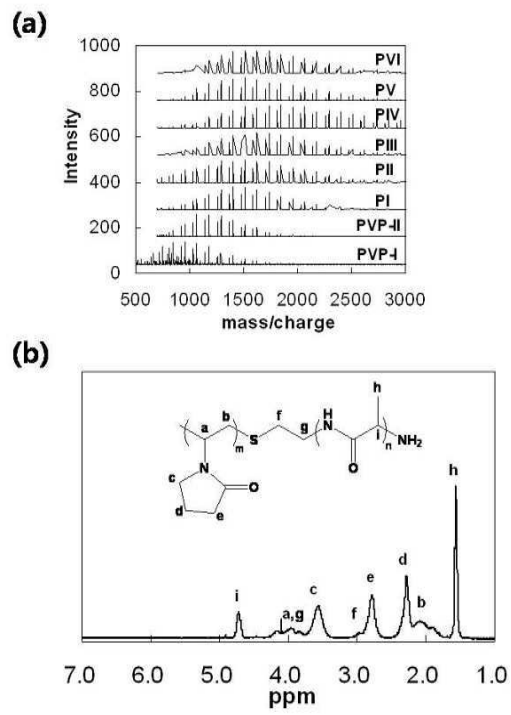
- [0129] 도 11은 PVP-PA 수용액의 상태도에 대한 PVP 분자량의 효과(a)와, PVP-PA 수용액(12.0 wt.%, D₂O에 녹임)의 FTIR 스펙트럼(b)을 나타낸 것이다.
- [0130] 도 12는 PVP-PA 수용액의 상태도에 대한 PA의 L-알라닌/DL-알라닌의 비율의 효과(a)와, PVP-PA 수용액(12.0 wt.%, D₂O에 녹임)의 FTIR 스펙트럼(b)을 나타낸 것이다.
- [0131] 도 13은 PVP-PA 및 PEG-PA 수용액의 상태도를 비교한 것이다.
- [0132] 도 14는 α -amino- ω -methoxy PEG 및 PEG-PA의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼(a) 및 ¹H-NMR 스펙트럼(CF₃COOD)(b)을 나타낸 것이다.

도면

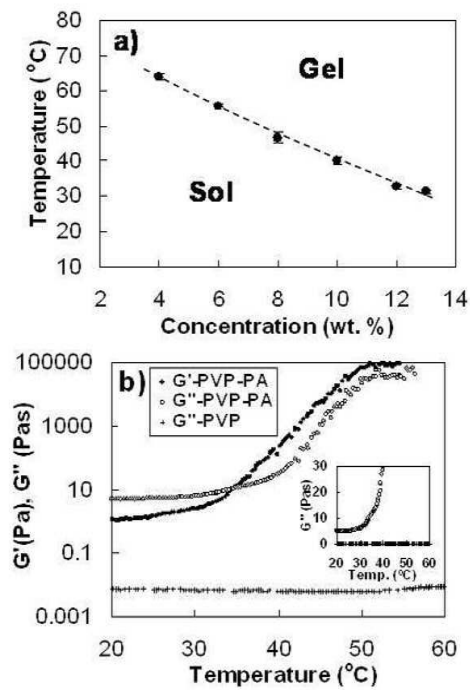
도면1



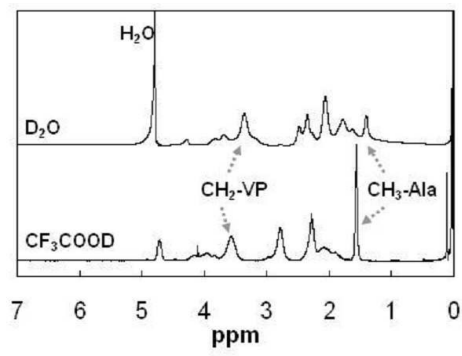
도면2



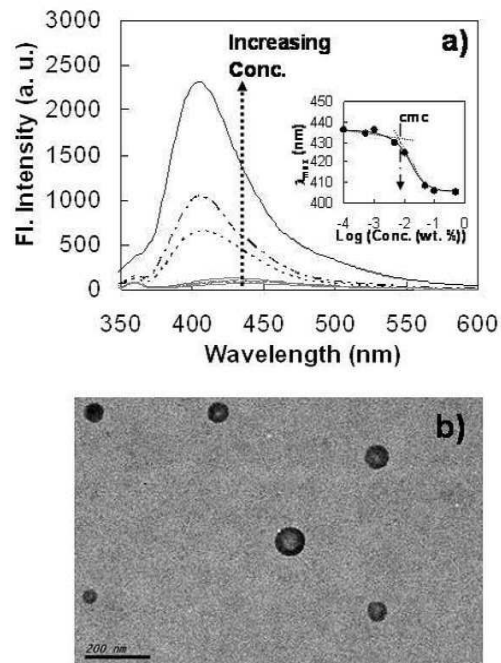
도면3



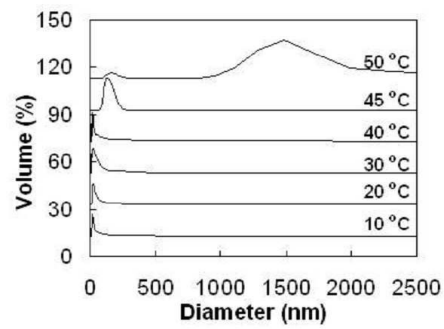
도면4



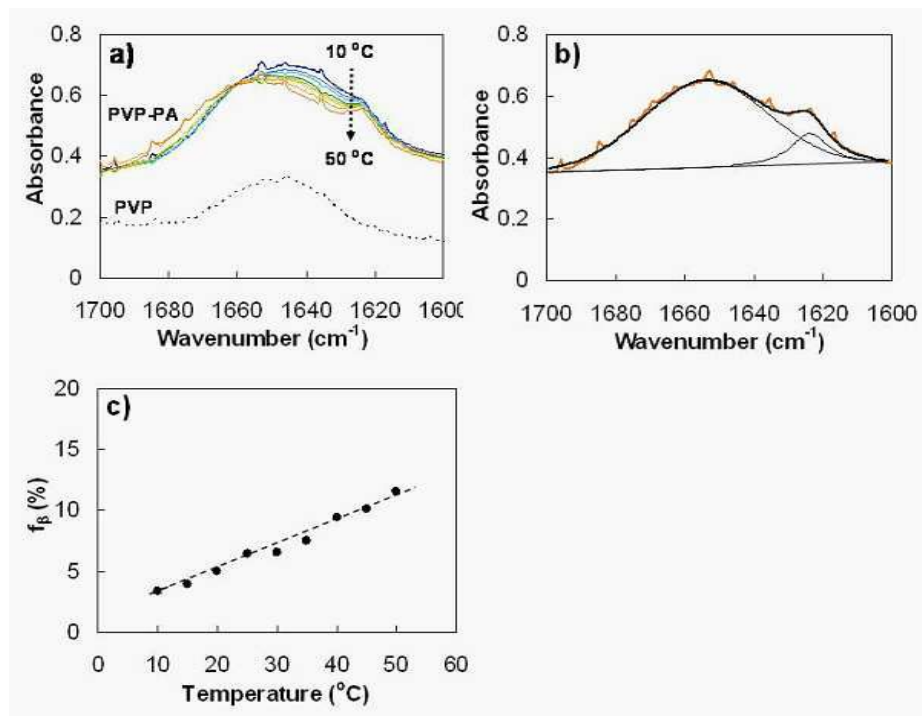
도면5



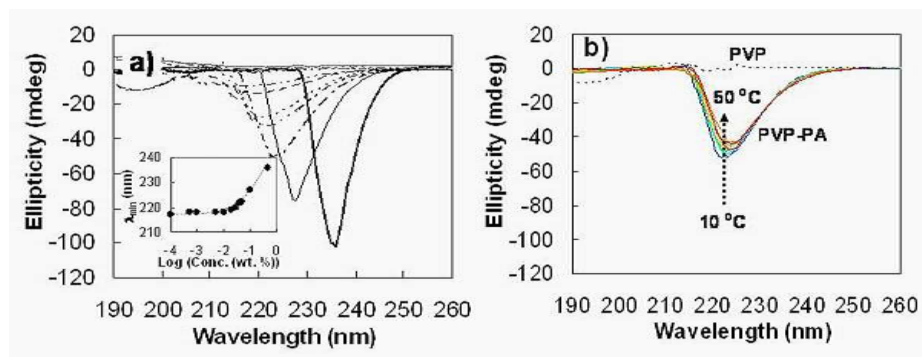
도면6



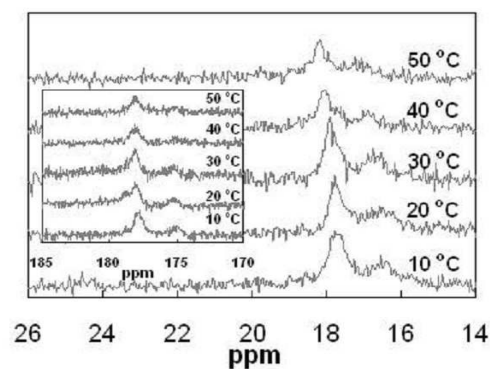
도면7



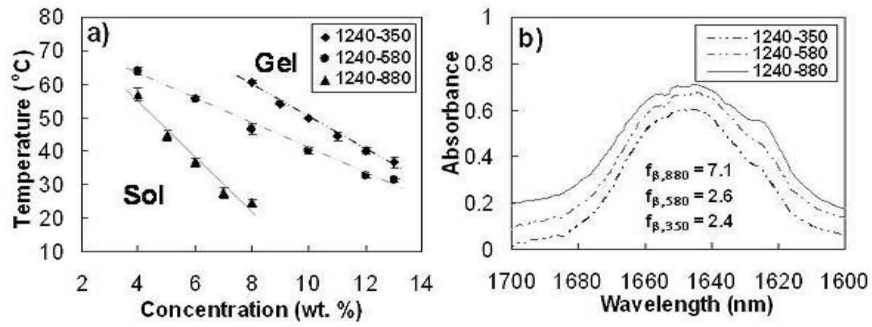
도면8



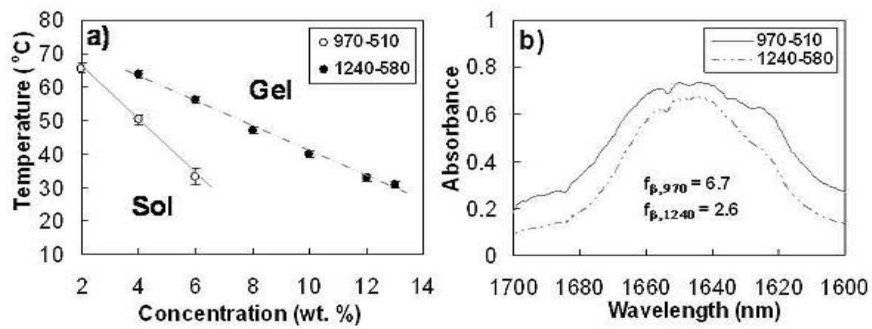
도면9



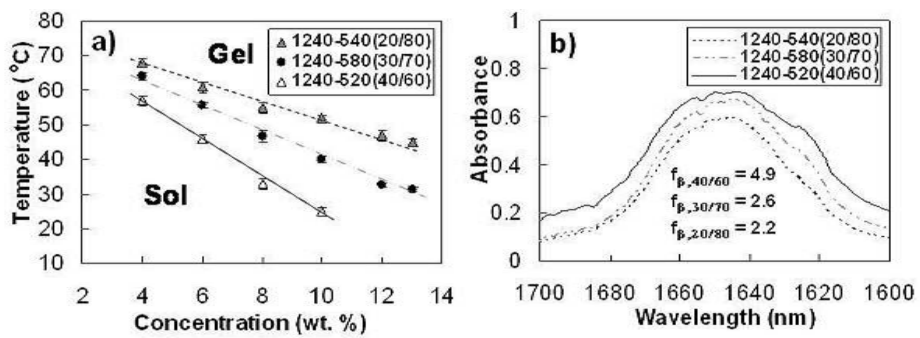
도면10



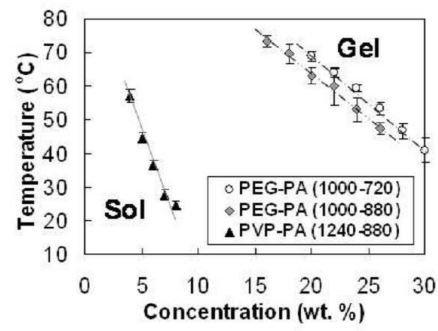
도면11



도면12



도면13



도면14

