



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0096330
(43) 공개일자 2011년08월30일

(51) Int. Cl.

A61K 9/51 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0015715

(22) 출원일자 2010년02월22일

심사청구일자 2010년02월22일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

윤성철

경상남도 진주시 주악동 현대성우트리펠리스 A 동305호

최문환

경상남도 진주시 신안동 426-4

사 모호신

경남진주시 가좌동 900 경상대학교 응용생명과학부 응용미생물전공

(74) 대리인

김순웅

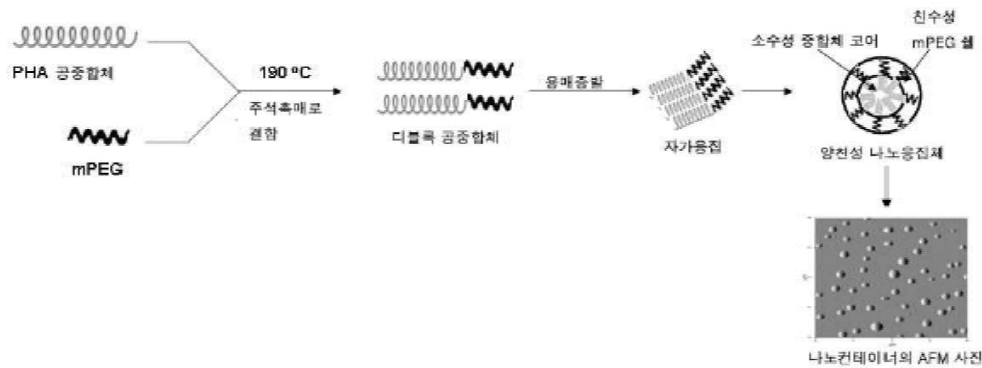
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 약물송달을 위한 양친성 PHA-mPEG 공중합 나노 컨테이너

(57) 요약

본 발명은 약물송달을 위한 나노 컨테이너에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 소수성 PHA 코어를 친수성 mPEG 부분이 감싸는 형태의 양친성 PHA-mPEG 공중합 나노 컨테이너에 관한 것이다. 본 발명의 PHA-mPEG 나노입자는 세포의 생존에 아무런 심각한 독성 없이 약물을 안전하게 송달할 수 있게 하고 수용액 내에서 안정적으로 분산되어 있으므로 약물 송달체로 유용하게 쓰일 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090091 489

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 기초연구사업 (국가핵심연구센터)

연구과제명 예방차원의 친환경 생물소재 개발

기여율

주관기관 경상대학교

연구기간 2003년 12월 1일 ~ 2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

PHA(Polyhydroxyalkanoate)-mPEG(monomethoxy polyethylene glycol) 디블록 공중합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PHA는 폴리(3-히드록시부티레이트-코-3-히드록시발레레이트)P(3HB-코-3HV) 또는 폴리(3-히드록시부티레이트-코-4-히드록시부티레이트)P(3HB-코-4HB)인 것을 특징으로 하는 디블록 공중합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 P(3HB-코-3HV)는 공중합체 내 3HV 유닛의 함량이 12~33몰%인 것을 특징으로 하는 디블록 공중합체.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 P(3HB-코-4HB)는 공중합체 내 4HB 유닛의 함량이 6~20몰%인 것을 특징으로 하는 디블록 공중합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 평균 중량 평균 분자량(Mw)이 4,900 내지 9,000 인 것을 특징으로 하는 디블록 공중합체.

청구항 6

PHA-mPEG 디블록 공중합체로 만들어지고 PHA 코어 및 mPEG 셸 구조를 가지는 약물 송달용 양친성 나노컨테이너.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 나노컨테이너는 유제화-용매 증발법(emulsification-solvent evaporation method)으로 만들어지는 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 PHA는 폴리(3-히드록시부티레이트-코-3-히드록시발레레이트)P(3HB-코-3HV) 또는 폴리(3-히드록시부티레이트-코-4-히드록시부티레이트)P(3HB-코-4HB)인 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 P(3HB-코-3HV)는 공중합체 내 3HV 유닛의 함량이 12~33몰%인 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 P(3HB-코-4HB)는 공중합체 내 4HB 유닛의 함량이 6~20몰%인 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 11

제6항에 있어서, 평균 110~170nm의 지름을 가지는 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 12

제6항에 있어서, 평균 -30 내지 -50mV의 표면 제타 포텐셜을 가지는 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 약물송달을 위한 나노 컨테이너에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 소수성 PHA 코어를 친수성 mPEG 부분이 감싸는 형태의 양친성 PHA-mPEG 공중합 나노 컨테이너에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 지난 수십 년간, 효율적인 약물 송달 수단으로 사용되는 생분해성 나노입자의 분야에서 상당한 발전이 있었다. 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.

[0003] 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 옹소화(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.

[0004] 양친성 나노입자 형태의 저분자량 생분해성 블록 공중합체가 다양한 종류의 약물의 지연 방출용으로 쓰일 수 있다고 생각되고 있다. 양친성 나노입자의 중심 소수성 도메인에 약물을 넣는 것은 블록 공중합체의 크기에 달렸다. 생분해성 양친성 나노입자를 약물 송달체로 사용하는 것은 약물이 다음과 같은 두 단계로 방출되기 때문에 바람직하다: 처음에 mPEG 부분으로부터 확산 방출되고 그 다음 생분해성 중합체 부분으로부터 분해 방출된다. 나노입자의 크기 또한 나노입자의 특성을 결정하는 중요 인자로 생각된다. 큰 입자 크기, 고분자량 중합체 및

높은 중합체 농도는 약물 확산 효율을 저해한다고 알려졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 지금까지의 대부분의 연구는 고분자량의 비변형 PHA 공중합체를 한 성분으로 사용하거나 또는 다른 폴리에스테르와 혼합한 형태로 사용하는 마이크론 크기의 입자 수준에서의 PHA 공중합체의 이용에만 초점을 맞췄다. 그러나 이러한 공중합체로 만들어진 마이크로입자는 크기가 크고 대부분의 신체의 얇은 생물학적 막을 통과하기가 어렵다. 작은 지름을 가지는 나노입자에 있어서는 큰 지름을 갖는 것들과 비교했을 때 클리어런스율이 낮아지고 혈중 체류 시간이 길어지는 것이 관찰되었다. 따라서 저분자량을 가지는 중합체로 만들어진 나노입자로 약물 전달체를 만드는 것이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기와 같은 문제를 해결하기 위해 연구를 거듭한 결과 본 발명자들은 저 분자량을 가지는 PHA-mPEG 디블록 공중합체로 만든 나노입자를 쓰는 경우 약물 전달에 유리하다는 것을 발견했다.

[0007] 따라서 본 발명은 안전하고 안정적으로 약물을 전달하기 위한 양친성 PHA(Polyhydroxyalkanoate)-mPEG(monomethoxy polyethylene glycol) 디블록 공중합체 및 이것으로 만들어진 나노 컨테이너를 제공한다.

[0008] 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 혼합물을 포함한다.

[0009] 바람직하게는 상기 PHA는 폴리(3-히드록시부티레이트-코-3-히드록시발레레이트)P(3HB-코-3HV) 또는 폴리 (3-히드록시부티레이트-코-4-히드록시부티레이트)P(3HB-코-4HB)이다. 더욱 바람직하게는, 상기 P(3HB-코-3HV)는 공중합체 내 3HV 유닛의 함량이 12~33몰%이고, 또한 바람직하게는 상기 P(3HB-코-4HB)는 공중합체 내 4HB 유닛의 함량이 6~20몰%이다.

[0010] 본 발명의 PHA-mPEG 양친성 디블록 공중합체는 평균 중량 평균 분자량(Mw)이 4900 내지 9000 인 것이 바람직하다.

[0011] 또한 본 발명은 PHA-mPEG 디블록 공중합체로 만들어지는 약물 전달용 양친성 나노컨테이너를 제공한다. 상기 나노컨테이너는 본 발명의 디블록 공중합체를 가지고 당업자에게 알려진 나노입자 제조 기술을 이용하여 나노컨테이너로 만들어질 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 나노컨테이너는 유제화-용매 증발법(emulsification-solvent evaporation method)으로 만들어진다.

[0012] 바람직하게는, 상기 PHA는 폴리(3-히드록시부티레이트-코-3-히드록시발레레이트)P(3HB-코-3HV) 또는 폴리 (3-히드록시부티레이트-코-4-히드록시부티레이트)P(3HB-코-4HB)이다. 상기 P(3HB-코-3HV)는 공중합체 내 3HV 유닛의 함량이 12~33몰%이고, 상기 P(3HB-코-4HB)는 공중합체 내 4HB 유닛의 함량이 6~20몰%인 것이 더욱 바람직하다.

[0013] 또한 바람직하게는 본 발명의 나노컨테이너는 평균 110-170nm의 지름을 가진다.

[0014] 또한 바람직하게는 본 발명의 나노컨테이너는 평균 -30 내지 -50mV의 표면 제타 포텐셜을 가진다. 이렇게 높은 음의 값을 제타 포텐셜을 가지기 때문에 본 발명의 나노 컨테이너는 수용성 현탁액 상에서 안정적으로 분산될 수 있다.

[0015] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.

[0016] 본 발명자들은 다양한 조성의 PHA 공중합체를 가지고 PHA-mPEG 디블록 공중합체를 합성하고, 유제화-용매 증발법(emulsification-solvent evaporation method)을 이용하여 이 공중합체들을 코어-셸 나노입자로 응집시켰다. 만들어진 PHA-mPEG 나노입자에 대해서 특징을 분석하고 쥐 태아의 뉴런 해마 세포를 이용하여 시험관 실험으로 (*in vitro*) 생체 적합성을 평가하였다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에서는 디블록 공중합체를 합성하기 위해 우선 190℃에서 20-30분간 에스테르 교환반응을 수행했다(도 1). 이 반응을 통해서 고분자량의 PHA 공중합체가 저분자량의 마크로분자로 분해되었다. 이 저분자

량 마크로분자를 에스테르 교환반응에서의 촉매로 비스(2-에틸헥사노에이트) 주석을 넣어서 mPEG과 반응시킴으로써 블록 공중합체를 만들었다. 디블록 공중합체의 분자량 및 분자량 분포를 측정하기 위해서 GPC 분석을 했다. 정제된 디블록 공중합체 및 mPEG 전구체의 GPC 크로마토그램은 도 2에 나타내었다. 디블록 공중합체의 GPC 크로마토그램은 mPEG 전중합체의 것보다 높은 분자량 쪽으로 이동한 훨씬 넓은 단봉의 피크를 나타냄을 알 수 있다. 이러한 단봉의 피크는 정제된 산물 내에 반응하지 않고 남은 유리 전구체 전중합체가 거의 남아있지 않음을 의미한다.

[0018] 표 1에 평균 수 분자량(M_n), 중량 평균 분자량(M_w) 및 디블록 공중합체의 다분산도(M_w/M_n)를 나타내었다. 본 발명의 디블록 공중합체의 평균 중량 평균 분자량은 약 4,900 내지 9,000이었다. $^1\text{H-NMR}$ 분광법으로 디블록 공중합체 내의 PHA의 카르보닐 말단과 mPEG의 히드록실 말단 사이의 화학적 결합을 확인하였다.

[0019] DSC 분석으로 디블록 공중합체의 열 전이를 측정하였다. mPEG에 대해서는 35 내지 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서, 나머지에 대해서는 50 내지 190 $^{\circ}\text{C}$ 의 범위에서 스캔하였다. 표 1에 디블록 공중합체의 용점(T_m)을 나타냈다. mPEG 블록의 T_m 값은 43.1 내지 49.3 $^{\circ}\text{C}$ 에서, PHA 공중합체 블록은 129.7 내지 140.5 $^{\circ}\text{C}$ 에서 관찰하였다.

표 1

[0020] PHA-mPEG 디블록 공중합체의 분자량 및 열 특성

디블록 공중합체	M_w^a	M_n^a	PI (M_w/M_n^a)	수율 ^b (%)	T_m^c ($^{\circ}\text{C}$) PHA 블록	T_m^c ($^{\circ}\text{C}$) mPEG 블록
P(3HB-코-12 몰% 3HV)-mPEG	8980	6200	1.44	75	140.5	49.1
P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG	4980	2650	1.87	78	133.6	49.3
P(3HB-코-6 몰% 4HB)-mPEG	5310	3580	1.46	76	133.7	43.1
P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG	7330	5230	1.40	73	129.7	47.8

[0021] ^aGPC로 측정. ^b반응 시작시에 첨가된 mPEG 및 공중합체의 중량에 대한 형성된 산물의 중량비. ^cDSC로 측정한 PHA-mPEG 디블록 공중합체의 용점: PHA 블록은 바이오달 용점을 보이는데 첫 번째는 준안정 구조의 재결정화에 따른 솔더 피크이고, 두 번째는 주 용점이다. 여기에는 주용점에 대한 T_m 을 표시하였다.

[0022] 본 발명의 다른 실시예에서는 PHA-mPEG 디블록 공중합체를 가지고 유제화 용매 증발법으로 나노입자를 합성하였다. 도 3a, b는 각각 P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG 나노입자의 비접촉 AFM 사진이다. 도 3은 본 발명의 실시예에서 만들어진 나노입자가 구형으로 생겼으며 표면이 매끈하고 200 nm 미만의 평균 지름을 가지는 것을 보여준다. P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG 나노입자 시료에서는 AFM 사진에서 몇몇 구분되게 큰 입자들이 보인다(도 3a). 그러나 P(3HB-코-12 몰% 3HV)-mPEG와 같이 3HV의 함량을 낮춘 경우 특이적으로 큰 (300~400 nm) 입자들은 보이지 않는다(도 3b). 한편 P(3HB-코-4HB)-mPEG 나노입자의 경우에는 6~20 몰% 범위의 4HB 함량일 때 유별나게 큰 입자들이 보이지 않았다. 따라서 P(3HB-코-3HV)-mPEG 나노입자에 대해서는 두 공단량체 유닛의 비율이 나노입자의 형태 및 균일한 분포에 영향을 미침을 알 수 있다. 눈에 띄게 큰 입자들은 3HV 공단량체의 높은 몰비 조성을 가지는 것으로부터 만들어진 나노입자들의 응집에 기인하는 것이라고 생각된다. 유사한 공단량체 비율 의존성 거동이 PLGA 공중합체 나노입자에서도 나타난다.

[0023] PHA-mPEG 나노입자의 입자크기, 다분산성 및 표면 전하는 표 2에 표시하였다. 본 발명의 거의 모든 나노입자는 상대적으로 낮은 다분산성 지수(PI) 값을 나타냈다. 나노입자의 PI값이 낮은 것은 입도 분포가 좁음을 나타낸다. 본 발명의 나노입자의 물속에서 측정한 제타 포텐셜은 모든 나노입자 조성에서 30 mV보다 더 낮은 음의 값이었다. 나노입자의 제타 포텐셜 값이 더 낮은 음의 값일수록 매질에서의 분산 안정성이 더 높음을 의미한다. 본 발명의 나노입자의 평균 크기는 약 110~170 nm이고 제타 포텐셜 값은 약 30 내지 50 mV이다. 따라서 본 발명의 PHA-mPEG 나노입자는 수용성 매질에서 안정한 콜로이드 현탁액을 이룰 수 있다. 더욱이, 본 발명의 나노입자의 양친성 특징은 나노입자끼리 척력을 가져서 서로 떨어져서 안정하게 하고 응집을 막는다.

표 2

[0024]

PHA-mPEG 나노입자의 입자크기, 다분산성 및 표면 전하

디블록공중합체	입자크기(nm) ±SD	다분산성 지수±SD	제타 포텐셜(mV) ±SD
P(3HB-코-12 몰% 3HV)-mPEG	162 ± 8	0.376 ± 0.003	-42 ± 5
P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG	125 ± 2	0.296 ± 0.002	-38 ± 1
P(3HB-코-6 몰% 4HB)-mPEG	119 ± 2	0.724 ± 0.003	-34 ± 2
P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG	112 ± 3	0.218 ± 0.004	-32 ± 1

[0025]

PHA-mPEG 나노입자의 코어-셸 표면형태(topography)를 이해하기 위해, 본 발명의 일 실시예에서는 *A. faecalis* T1으로부터 얻은 PHB 디폴리머라제 0.2 µg/mL를 이용하여 PHA-mPEG 및 PHA 나노입자에 대해 효소 분해를 하고, 분해 반응 후에 660 nm에서 반응 용액의 탁도를 측정하였다. 도 4는 두 개의 mPEG화 나노입자 P(3HB-코-12 몰% 3HV)-mPEG 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG와 mPEG 부분이 없는 두 개의 대응 나노입자 P(3HB-코-12 몰% 3HV) 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB)에 대한 분해 프로필을 보여주는데 mPEG화 시료는 mPEG이 없는 대응 대조 시료에 비해서 분해가 천천히 진행됨을 알 수 있다. mPEG화한 나노입자들에서 더 느린 분해를 보인 이유에 대해서는 효소에 대해 불활성인 mPEG 부분이 효소에 대해 활성인 PHA 공중합체 코어를 감싸고 있기 때문이라고 여겨진다. 단백질나 제 K로 탄화수소(C12~ C14) 말단-캡핑 폴리(L-락티드)를 분해시킬 때도 표면 장벽에 대해 유사한 효과가 나타난다. 말단-캡핑이 되지 않은 중합체 필름에 비해서 그것이 느리게 분해되는 것은 표면이 탄화수소 말단기로 덮임을 암시한다. 따라서 PHA-mPEG 나노입자의 느린 분해는, 수용액에 현탁되었을 때 소수성 공중합체가 감춰진 코어를 이루고 친수성 mPEG 부분에 의해 둘러싸인 구조의 양친성 나노입자를 이루었다는 것을 명확히 나타낸다.

[0026]

본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 PHA-mPEG 나노입자가 생체적합성을 가지는지 평가하기 위해 시험관 실험(*in vitro*)을 했다. 세포를 형태학적으로 분석하는 것은 나노입자의 세포 적합성을 파악하는데 있어 중요한 요소이다. 외부 물질에 높은 감수성을 가진 태아 래트의 뉴런 해마세포의 형태에 대한 여러 농도의 PHA-mPEG 나노입자의 영향을 알아보기 위해 광학현미경으로 관찰했다(도 5). 세포의 형태에 변화가 관찰된다면 나노입자에 의한 세포독성이 있음을 의미한다. 뉴런 세포는 완전히 자란 후에 보통 방추형에 수상돌기와 신경미세섬유가 나와 있는 형태이다. 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명의 나노입자를 넣고 비교적 높은 농도에서 24시간 배양한 후에도 전체적으로 형태가 대조군의 세포와 거의 유사하고 세포의 형태에 심각한 영향을 주지 않았음을 알 수 있다. 그러나 공중합체 내의 3HV 유닛의 몰 함량이 높은 P(3HB-코-3HV)-mPEG 나노입자를 고농도로 넣고 배양한 경우에는(도 5A), P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG 나노입자를 넣은 것(도 5B)에 비해 세포에서 약간의 변화가 발생했다. 낮은 몰비의 3HV 또는 4HB 유닛을 포함하는 나노입자에서는 이러한 세포 형태의 변화가 전혀 관찰되지 않았다(도면 없음). 이러한 세포 형태의 변화는 P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG 나노입자 조성물 내의 높은 함량의 3HV 유닛에 의한 염증반응 자극에 의한 것이라고 추측된다.

[0027]

또한 본 발명의 일 실시예에서는 양친성 나노입자의 세포독성을 확인하기 위해 나노입자의 용량을 증가시키면서 태아 래트 뉴런 해마 세포에서의 시험관 내 세포 환경에 대해 MTT 분석을 수행했다. 이 방법에서, 살아있는 세포는 MTT 염료를 대사시켜서 불용성의 보라색 포르마잔 산물을 만들어내는데, 그것을 분광학적으로 분석할 수 있다. 뉴런 세포는 나노입자의 농도가 400 µg/mL일 때까지 높은 생존력(viability)을 보였지만, 나노입자의 농도가 400 µg/mL가 넘자, 세포의 생존력이 약간 떨어졌다. P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG 나노입자에 비해서 P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG 나노입자가 500 µg/mL의 농도에서 세포에 약간 더 높은 독성을 보였다(도 6). MTT 분석 상 500 µg/mL 농도에서의 양 나노입자로 처리한 세포는 대조군 세포에 비해서 세포 생존율이 약간 감소하였다.

[0028]

본 발명의 일 실시예에서는 또한 세포의 생존력에 대한 나노입자의 영향을 평가하기 위한 강력한 방법으로 아포토시스를 검사하였다. 여러 농도의 나노입자로 24시간 처리한 뉴런 세포에 FJB 염색을 해서 생존 기간 후에 뉴런이 퇴화하는 것을 관찰하였다. 세포를 FJB 면역형광염색으로 라벨링하고 세포의 죽음을 아포토시스의 신호로 공초점 현미경으로 관찰하였다. 도 5에 나타난 세포의 형태학적 결과는 아포토시스 세포 사멸 결과와 잘 일치하였다. 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 나노입자의 비교적 높은 용량에도 불구하고 세포의 형태 및 세포 수의 분포에 있어서 대조군에 비해 심각한 변화가 나타나지 않았다. 공초점 현미경 상에서 나노입자로 처리한 FJB로 염색된 세포(녹색으로 표시)들은 잘 퍼져있고 뉴런 세포에서 뻗어 나온 수상돌기들은 자라서 인접한 세포들과 연결되어 완전한 수상돌기 및 신경미세섬유가 되었다(도 7). 낮은 농도의 나노입자로 처리한 세포에서는 대조군

에 비해 신경미세섬유의 발현에 심각한 변화가 보이지 않았고 적은 수의 세포가 괴사(necrosis) 또는 자연사(apoptosis)했다(죽은 세포는 화살표로 표시). 대조군에 비해서 나노입자로 처리한 세포에 큰 구조적 이상도 없었다. 그러나 높은 농도일 때 P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG 나노입자에 비해서 P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG 나노입자로 처리한 세포에서 자연사한 세포의 총 수가 약간 더 높았다(도 7A 및 7B). 이것은 조성물 중의 높은 양의 3HV 공단량체 유닛의 함량에 기인해서 세포의 죽음이 늘었다는 것을 나타낸다. 반면에 P(3HB-코-12 몰% 3HV)-mPEG 또는 P(3HB-코-6 몰% 4HB)-mPEG 나노입자로 처리한 세포에서는 더 적은 세포가 죽은 것이 관찰되었다(도면 없음). 여러 농도의 P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG 나노입자로 처리한 세포와 대조군 세포가 죽은 퍼센티지를 도 7C에 나타냈다. 3HV 및 4HB 공단량체의 함량이 낮은 나노입자로 처리한 세포에서는 세포의 죽음에 미약한 영향을 끼쳤음을 알 수 있었다(도면 없음). 이러한 결과는 PHA 공중합체의 표면에 mPEG이 무독성 코팅을 한다는 것을 증명한다. 상기 공중합체의 표면에 mPEG을 도입하는 것이 입자의 안정성과 양친성을 크게 향상시킴으로써 수용액 중에서 나노크기의 코어-셸 구조로 응집하는 것을 가능하게 한다. 이러한 코어-셸 공중합체로 만들어진 나노입자 제제는 여러 가지 약물의 안전한 송달을 가능하게 할 것이다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 PHA-mPEG 나노입자는 세포의 생존에 아무런 심각한 독성 없이 약물을 안전하게 송달할 수 있게 하고 수용액 내에서 안정적으로 분산되어 있으므로 약물 송달체로 유용하게 쓰일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 디블록 공중합체 나노입자의 형성과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명에서 사용한 디블록 공중합체 및 mPEG 전구체의 GPC 크로마토그램이다.

도 3은 P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG(a) 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG(b) 나노입자의 비접촉 AFM 사진이다.

도 4는 본 발명에 따른 두 개의 mPEG화 나노입자와 mPEG 부분이 없는 두 개의 대응 나노입자에 대한 분해 프로필을 보여주는 도면이다.

도 5는 본 발명의 디블록 공중합체 나노입자로 처리한 래트 태아의 해마 뉴런 세포의 광학현미경 사진이다. A: P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG 나노입자 첨가, B: P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG 나노입자 첨가.

도 6은 본 발명의 디블록 공중합체 나노입자로 처리한 래트 태아의 해마 뉴런 세포의 생존력을 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명의 디블록 공중합체 나노입자로 처리한 래트 태아의 해마 뉴런 세포의 아포토시스를 나타내는 도면이다. A: P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG 나노입자로 처리한 세포의 공초점 현미경 사진, B: P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG 나노입자로 처리한 세포의 공초점 현미경 사진, C: 아포토시스 세포 수를 나타내는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0032] <실시예 1>

[0033] 디블록 공중합체의 제조

[0034] 1.1 재료의 준비

[0035] P(3HB-코-12 몰% 3HV) 및 P(3HB-코-33 몰% 3HV) 공중합체는 10 g/L 포도당 및, 0.4 및 1.5 mL/L γ -발레로락톤을 각각 함유하는 PHA 합성 무기질 배지에서 *Hydrogenophaga pseudoflava* 33668을 35℃에서 96시간 동안 배양하여 생산하였다.

[0036] P(3HB-코-6 몰% 4HB) 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB) 공중합체는 10 g/L의 과당 및, 1 및 4 mL/L의 ϵ -카프롤락톤을 각각 함유하는 PHA 합성 무기질 배지에서 *Ralstonia eutropha* H16를 30℃에서 96시간 동안 배양하여 생산하였다.

[0037] 모노메톡시 폴리(에틸렌글리콜)(mPEG[수-평균 분자량(Mn)=2000]), 비스(2-에틸헥사노에이트) 주석 촉매, 소듐

데옥시콜레이트, 디클로로메탄(DCM)은 Sigma-Aldrich Korea Ltd로부터 구입하였다. 모든 다른 화학물질들은 분석 등급을 사용하였다. 세포에서 적정량 추출해낸 폴리에스테르는 진공 상태에서 50℃에서 밤새 건조시켰다. 추출공정은 Pyrex Soxhlet 장치에서 6시간 동안 뜨거운 클로로포름을 이용하였으며, 농축된 용매 추출물은 빠르게 휘저은 냉 메탄올에서 침전시켰다.

1.2 디블록 공중합체의 제조

종래 알려진 에스테르 교환법(transesterification method)으로 PHA-mPEG 디블록 공중합체를 제조하였다.

25 mL 둥근 바닥 플라스크에 자석 교반기를 설치하고 1:1 중량비로 PHA 공중합체 및 mPEG 공중합체를 넣었다. 190℃로 예열한 유조에서 반응을 시켰다. 질소를 흘려보내면서 약 70 mg의 비스(2-에틸헥사노에이트) 주석 촉매를 시린지를 사용하여 고무 중격을 통해 플라스크로 넣었다. 계속 저어주면서 20-30분간 반응을 시켰다. 반응이 완료된 후에 플라스크를 빼내어 얼음 위 또는 상온에서 왁스 같은 물질이 나오도록 식혔다. 얻어진 PHA-mPEG 디블록 공중합체를 5 mL의 클로로포름에 녹인 후에 100 mL의 증류수에 방울방울 넣어서 유제를 만들었다. 상기 유제를 자석 교반기로 힘차게 저어서 유기용매를 증발시켰다. 만들어진 콜로이드 현탁액을 12,000Da 분자량 분리막을 이용하여 1주일간 증류수에 대해 투석하여 정제하였다. 만들어진 정제된 디블록 공중합체를 감압 동결건조해서 밝은 하얀색의 분말을 얻어냈다(수율 70-80%).

1.3 디블록 공중합체의 특성 확인

앞서 만들어진 디블록 공중합체의 분자량 및 다분산성(polydispersity)을 30℃에서 세 개의 PL겔 칼럼(10^5 , 10^3 및 10^2), 하나의 Agilent G1310A 이소크래틱 펌프(Isocratic pump), 하나의 Agilent 1047A RI 검출기, 하나의 Agilent G1316A 칼럼 부분 및 하나의 Agilent G1311A 진공 가스제거기(degasser)로 구성된 Agilent 1100 시리즈 GPC(gel permeation chromatography) 시스템(Agilent, Santa Clara, CA)을 이용하여 측정하였다. 분 당 1.0 mL의 유속으로 클로로포름을 용리액으로 사용하였다. 시스템 조정(calibration)을 위해서 낮은 다분산도를 가지는 표준 폴리스티렌(Polymer Laboratories, Amherst, MA)을 사용하였다.

디블록 공중합체의 분자 구조는 Bruker-DRX-500 MHz 분광계로 $^1\text{H-NMR}$ 을 이용해서 얻어냈다. 시료의 스펙트럼은 상온에서 CDCl_3 에서 기록하였다. 표준 소프트웨어로 나뉜 스펙트럼 신호를 통합하였다.

데이터 단말(data station)이 구비된 DSC(differential scanning calorimeter) Q200 (TA Instruments, New Castle, DE)를 이용해서 질소 퍼징을 하면서 상기 디블록 공중합체의 열전이(thermal transition)를 측정하였다. 분당 10 °C의 비율로 가열하면서 50에서 190 °C의 범위에서 스캔하였다.

폴리에스테르의 공단량체의 양은 HP-1 모세관 칼럼 및 불꽃 이온화 검출기를 구비한 휴렛-팩커드 HP5890 시리즈 II 가스 크로마토그래피를 이용하여 폴리에스테르를 황산/메탄올 처리하여 환원된 메틸 에스테르를 분석하여 측정하였다.

<실시예 2>

나노입자의 제조

2.1 나노입자의 제조

약간 변형시킨 유제화 용매 증발법을 이용해서 디블록 공중합체로부터 양친성 나노입자를 만들었다.

50 mg의 디블록 공중합체를 포함하는 2 mL DCM을 12 mM 소듐 데옥시콜레이트 용액(50 mL)에 넣고, 마이크로팁 프로브 소니케이터 D-12207(Bandelin Electronics, Germany)을 사용하여 혼합액을 20%의 출력으로 6분간 프로브 초음파 처리하였다. 유제가 만들어진 상온에서 흡 후드 안에 넣고 유기 상이 완전히 증발될 때까지 부드럽게 저어주었다. 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 나노입자를 정제하고 물로 세 번 씻어서 남아있던 유화제를 제거하였다. 4가지 종류의 양친성 나노입자(P(3HB-코-12 몰% 3HV)-mPEG, P(3HB-코-33 몰% 3HV)-mPEG, P(3HB-코-6 몰% 4HB)-mPEG 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG)가 만들어졌고 이후의 실시예에서 사용되었다.

[0051] **2.2 나노입자의 특성 확인**

[0052] 나노입자의 형태적 특성은 원자 간력 현미경(AFM)(PSIA XE-100, Santa Clara, CA)으로 분석하였다. 막 조겐 운모(mica) 표면에 나노입자 현탁액을 피펫으로 떨어뜨려서 배양기 내에서 30℃에서 건조시켰다. 비접촉 모드로 사진을 찍었다. 42 N/m의 공칭 출력 상수(nominal force constant)를 가지는 125 × 30 μm의 캔틸레버를 스캐닝에 사용했다. XEI 1.7.1 소프트웨어로 사진들을 분석했다.

[0053] 입자 크기 및 입도 분포는 광산란법(DLS-8000; Otsuka Electronics Co., Osaka, Japan)으로 측정하였다. 입자 크기 분석을 위해서 약 10 mL의 나노입자 수 현탁액을 만들고 90°의 산란각에서 광학적으로 분석했다. 각 시료의 평균 입자 크기는 세 번 측정해서 평균값을 계산하였다. 나노입자의 표면 전하는 제타 포텐셜로 나타냈는데, 20°의 산란각에서 전기영동 광산란 분광광도계(ELS-8000; Otsuka Electronics Co., Osaka, Japan)로 측정하였다.

[0054] 수용액 중에서의 나노입자의 코어-셸 응집은 P(3HB-코-12 몰% 3HV)-mPEG 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB)-mPEG 디블록 공중합체 나노입자를 효소로 분해한 후에 분광광도계로 확인하였고 P(3HB-코-12 몰% 3HV) 및 P(3HB-코-20 몰% 4HB) 공중합체로 만들어진 입자와 비교하였다. 일본 카나가와 대학의 사이토 교수로부터 받은 *Alcaligenes faecalis* T1에서 얻어진 PHB 디폴리머라제를 사용했다. 울트라-초음파처리(ultra-sonication)하고 1 mM의 MgCl₂를 함유하는 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 현탁시켜서 공중합체 입자 및 mPEG을 씌운 나노입자의 안정한 현탁액(660 nm에서의 초기 흡광도 3.0 ± 0.03)을 제조했다. 0.2 /mL의 정제된 효소를 넣어서 37℃의 진탕조에서 분해 반응을 시작했다. 탁도가 감소하는 것을 휴렛 팩커드 UV 8452A 분광광도계로 660 nm에서 측정했다.

[0055] **<실시예 3>**

[0056] **생체적합성 평가**

[0057] **3.1 해마 뉴런 세포 배양**

[0058] 경상대학교 신경생물학 실험실에서 250g 정도의 암컷 Sprague-Dawley 래트 20마리를 온도 조절된 환경에서 임의 취식할 수 있게 하고 06:0020:00까지 조명을 비추어 키웠다. 수정시킨 지 17일에 임신한 래트에 단두술을 수행하고, 태아를 꺼냈다.

[0059] 상기 임신한 래트로부터 꺼낸 태아 래트의 해마 뉴런을 배양했다.

[0060] 채취한 해마 조직을 0.25% 트립신-EDTA로 20분간 처리하고 얼음처럼 차가운 무칼슘 무마그네슘 헝크스 평형염액(Hank's balanced salt solution)(pH 7.4) 속에서 기계적으로 분쇄했다. 원심분리를 통해 펠렛화한 다음 폴리리신(0.02 g/L)으로 코팅된 챔버 슬라이드 배양판에 세포(1 × 10⁶ 세포/mL)를 심었다. 10% 열-불활화 우태혈청, 1 mM 피루베이트, 4.2 mM 중탄산나트륨, 20 mM HEPES, 0.3 g/L 우혈청 알부민, 50 U/mL 페니실린 및 50 mg/L의 스트렙토마이신이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 온도는 37℃로 하고 5% CO₂와 95%의 공기로 구성된 습한 환경조건으로 세포를 배양했다.

[0061] 3일 후 세포들이 접착성을 갖게 되고 완전히 자랐을 때 실시예 2에서 만든 나노입자 분산액(100500 μg/mL)을 세포에 첨가하였다. 일반 매질로 처리한 세포를 대조군으로 사용하였다. 세포의 형태는 24시간 배양한 후에 올림푸스 IX70 광학 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

[0062] **3.2 세포 독성 MTT 분석**

[0063] 본 발명의 나노입자의 시험관 내(*in vitro*) 세포에 대한 독성을 알아보기 위해 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT) 분석을 수행하였다. 실시예 3.1의 태아 래트의 뉴런 해마 세포를 96-웰 플레이트에 심었다. DMEM 내 나노입자 현탁액을 세포 배양액에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 나노입자는 넣지 않은 매질을 넣은 웰을 대조군으로 사용하였다. 습한 5% CO₂ 배양기에서 37℃로 24시간 동안 세포를 배양하였다. 배양 후에 MTT(5 mg/mL PBS(phosphate buffered saline), pH = 7.4)를 각 웰에 넣고 37℃에서 4시간 동안 배양하여 세포 생존율을 구하였다. 살아있는 세포 내에서 생성되는 포르마잔의 가용화를 위해서 디메틸설폭시드

를 각 웰에 넣고, 595 nm의 시험 파장에서 기준 파장을 690 nm로 하여 마이크로타이터 플레이트 리더에 흡광도를 기록하였다. 광학적 밀도는 기준 파장과 시험 파장에서의 흡광도 차이로 계산하였다. 세포 성장에 대한 나노입자의 영향은 세포 생존율(%)로 평가했다.

3.3 아포토시스 관찰

종래 알려진 방법으로 FJB(Fluoro-Jade-B) 염색을 수행했다.

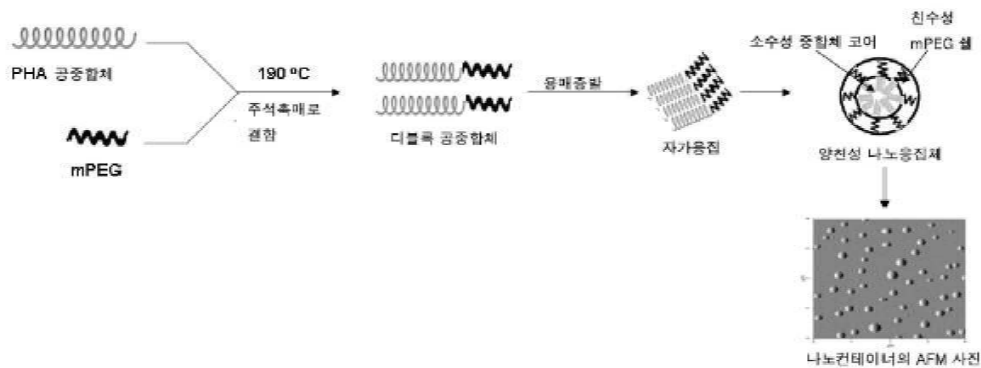
폴리리신이 코팅된 챔버 슬라이드 상에서 시험관 내 배양된 원시 해마 신경세포에 대해서 면역형광염색을 했다. 일반 매질로 처리한 세포를 대조군으로 하고, 나노입자 분산액(100500 $\mu\text{g/mL}$)으로 세포를 처리하여 37°C에서 24시간 동안 세포를 배양했다. 챔버 슬라이드를 각각 5분간 PBS로 세 번 씻고 4% 파라포름알데히드 PBS 용액으로 5분간 고정시킨 후에 70 °C에 보관하였다. 다음날 슬라이드를 공기로 3시간 동안 말린 후에 0.06% 과망간산 칼륨 용액으로 옮겨서 10분간 두었다. 물로 씻은 후에, 슬라이드를 0.1% 아세트산 및 0.0004% FJB(Calbiochem, San Diego, California, USA)의 용액에 20분간 침지시켰다. 증류수로 슬라이드를 3번 씻고 55°C에서 10분간 말렸다. 배지가 올려진 유리 슬라이드를 커버 슬립으로 덮고 FITC 필터를 이용하여 공초점 현미경(Fluoview Olympus, Japan)을 사용하였다.

모든 결과는 세 번의 실험으로부터 얻은 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타냈다. 통계적 오차는 student's t-테스트로 ANOVA를 이용하여 평가하였다. 오차는 $P < 0.05$ 의 수준의 통계적 유의성을 가진다.

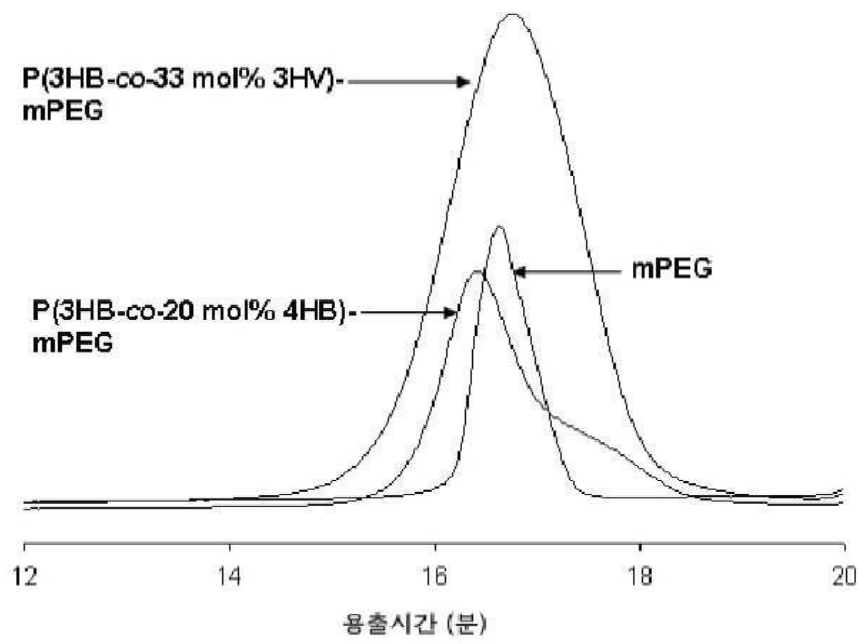
이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

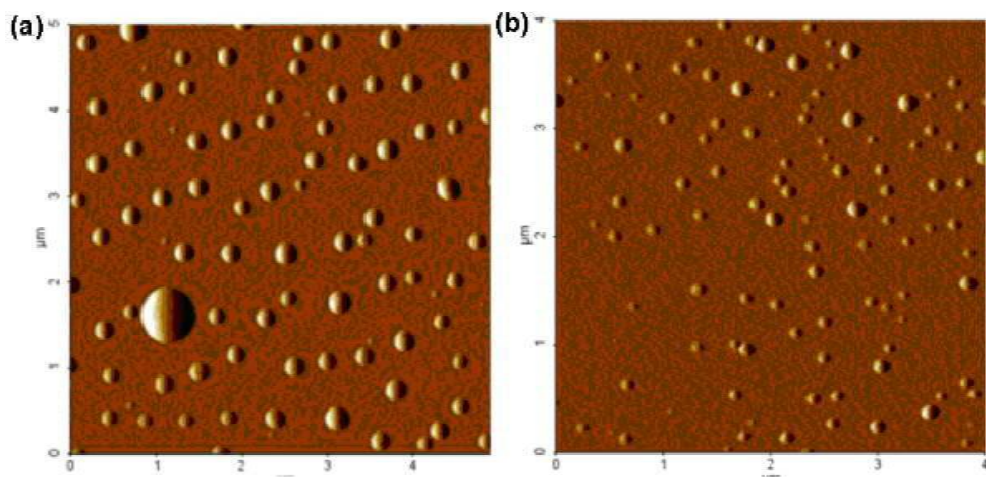
도면1



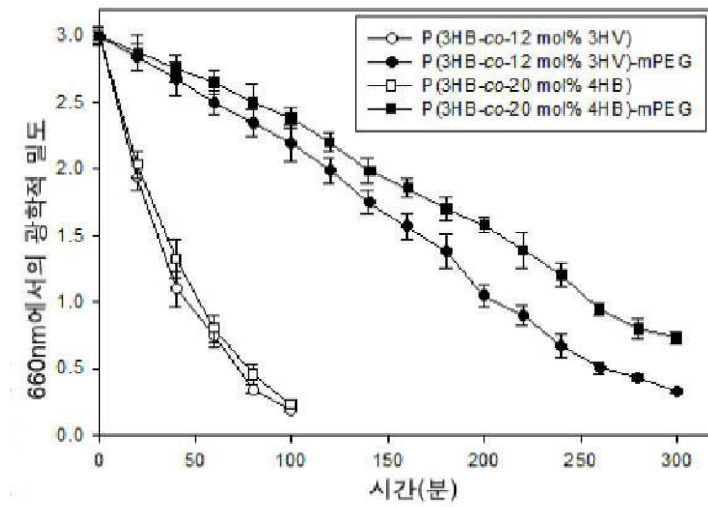
도면2



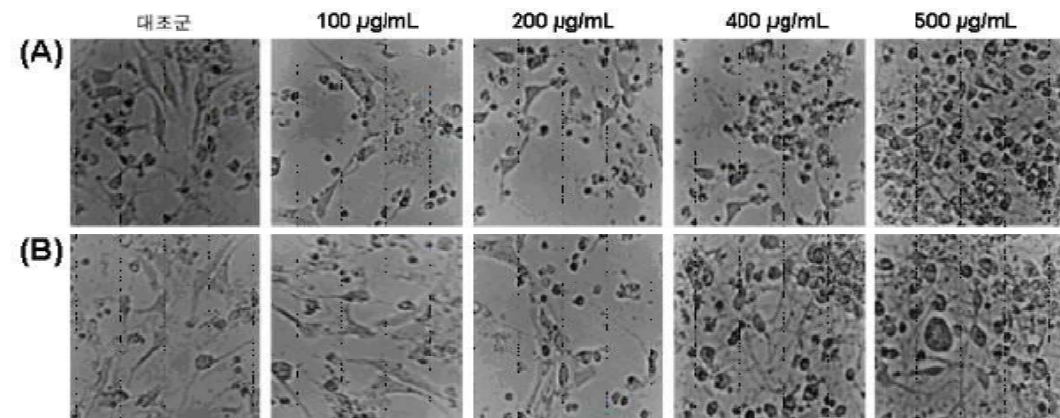
도면3



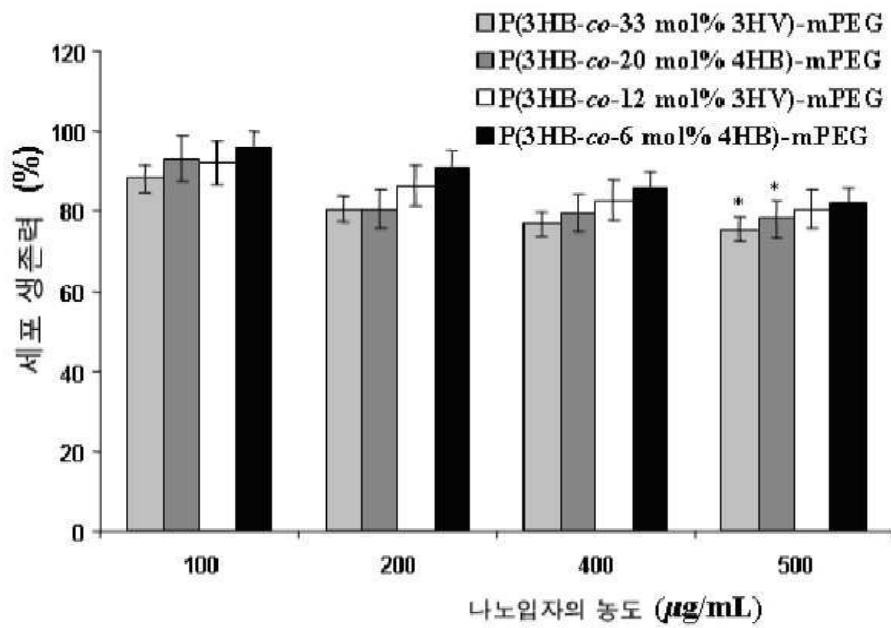
도면4



도면5



도면6



도면7

