



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0096333
(43) 공개일자 2011년08월30일

(51) Int. Cl.

C08F 299/00 (2006.01) *C08F 301/00* (2006.01)

A61K 9/22 (2006.01) *B82B 3/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0015719

(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 응용생명과학 부 응용미생물전공

(74) 대리인

김순웅

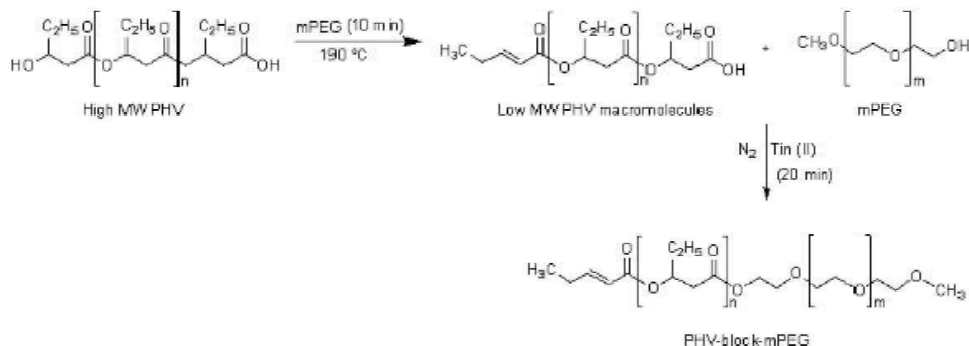
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) PHV-mPEG 디블록 공중합체 및 이를 이용한 소수성 약물전달을 위한 양친성 나노컨테이너

(57) 요약

본 발명은 약물전달을 위한 신규한 양친성 나노입자에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 소수성 약물을 전달하기 위한 양친성 PHV-mPEG 디블록 공중합체 나노입자에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 양친성 디블록 공중합체 나노입자는 수용액 상에 안정적으로 분산될 뿐만 아니라 독성에 민감한 신경 배아 세포에 독성이 거의 없어 소수성 약물에 대한 효과적인 약물 송달 시스템으로 사용될 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

PHV-mPEG(poly(3-hydroxyvalerate)-monomethoxy polyethylene glycol) 디블록 공중합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 10,000 내지 15,000의 중량 평균 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 디블록 공중합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 12,000 내지 13,500의 중량 평균 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 디블록 공중합체.

청구항 4

PHV-mPEG 디블록 공중합체로 만들어지고 PHV 코어 및 이를 둘러싼 mPEG 셸의 구조를 가지는 약물 송달을 위한 양친성 PHV-mPEG 나노컨테이너.

청구항 5

제4항에 있어서, 평균 190 내지 220nm의 지름을 가지는 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 6

제5항에 있어서, 평균 200 내지 215 nm의 지름을 가지는 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 7

제5항에 있어서, -10 내지 -20 mV의 평균 제타 포텐셜을 가지는 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 8

제7항에 있어서, -12 내지 -16 mV의 평균 제타 포텐셜을 가지는 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

청구항 9

제4항에 있어서, 유제화 용매 증발법으로 만들어지는 것을 특징으로 하는 나노컨테이너.

명세서

기술 분야

본 발명은 약물전달을 위한 신규한 양친성 나노입자에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 소수성 약물을 전달하기 위한 양친성 PHV-mPEG 디블록 공중합체 나노입자에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [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-히드록시발레레이트)(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 어려울 뿐만 아니라 약물 확산 효율을 저해하기 때문에 블록 공중합체 형태의 저분자량 폴리에스테르만이 약물 송달의 첨가물 또는 아유반트로 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 흡수분해에 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 흡수분해 및 탐식작용으로부터 보호한다. 또한, 폴리에스테르-mPEG 블록 중합체의 분해로 방출되는 mPEG은 신장을 통해 쉽게 몸 밖으로 배설된다.
- [0006] 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 주요 인자로 생각된다. 큰 입자 크기, 고분자량 중합체 및 높은 중합체 농도는 약물 확산 효율을 저해한다고 알려졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 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 송달체를 만드는 것이 필요하다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기와 같은 문제를 해결하기 위해 연구를 거듭한 결과 본 발명자들은 저 분자량을 가지는 PHV-mPEG(poly(3-hydroxyvalerate)-monomethoxy polyethylene glycol) 디블록 공중합체로 만든 나노입자를 쓰는 경우 약물 송달에 유리하다는 것을 발견했다.

- [0009] 따라서 본 발명은 PHV-mPEG 디블록 공중합체 및 이를 이용한 양친성 나노컨테이너를 제공한다.
- [0010] 바람직하게는 본 발명의 PHV-mPEG 디블록 공중합체는 10,000 내지 15,000의 중량 평균 분자량을 가진다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 PHV-mPEG 디블록 공중합체는 12,000 내지 13,500의 중량 평균 분자량을 가진다.
- [0011] 또한 바람직하게는 본 발명의 양친성 PHV-mPEG 나노컨테이너는 평균 190 내지 220nm의 지름을 가지며, 더욱 바람직하게는 평균 200 내지 215 nm의 지름을 가진다.
- [0012] 또한 바람직하게는 본 발명의 양친성 PHV-mPEG 나노컨테이너는 -10 내지 -20 mV의 평균 제타 포텐셜을 가진다. 더욱 바람직하게는 -12 내지 -16 mV이다.
- [0013] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명의 PHV-mPEG 디블록 공중합체를 합성하는 과정을 도 1에 모식적으로 도시하였다. 190℃에서 20-30분간 에스테르 교환반응을 해서 110℃의 융점(T_m)을 가지는 고분자량 PHV를 저분자량 마크로분자로 분해했다. 고온에 민감한 PHV의 말단 히드록실기가 사라지고 올레핀기가 생성된다. 저분자량 마크로분자는 에스테르 교환 반응의 촉매로 작용하는 비스(2-에틸헥사노에이트) 주석의 존재 하에 mPEG의 OH기와 반응한다. 이렇게 에스테르 교환반응에 의해 PHV-mPEG 디블록 공중합체가 만들어진다.
- [0015] 표 1에 본 발명의 일 실시예에서 만들어진 디블록 공중합체의 중합체 수율, 수 평균 분자량(M_n), 중량 평균 분자량(M_w) 및 다분산도(M_w/M_n)를 나타내었다. 디블록 공중합체의 분자량 및 분자량 분포를 측정하기 위해서 GPC 분석을 했다. PHV-mPEG 디블록 공중합체는 GPC 크로마토그래프에서 mPEG 전중합체에 비해 상대적으로 이른 용리 시간에 더 넓은 단봉의 피크를 나타낸다(도 2). 이러한 단봉의 피크 및 상대적으로 좁은 분자량 분포(PI = 1.24)는 반응하지 않은 유리 전구체 전중합체가 순수한 산물 내에 거의 없음을 나타낸다.

표 1

[0016] PHV-mPEG 디블록 공중합체의 분자량 및 열 특성

시료	M _w ^a	M _n ^a	PI(M _w /M _n ^a)	수율 ^b (%)	T _m ^c (℃)	T _m ^c (℃)
					PHV 블록	mPEG 블록
PHV-mPEG	12,900	10,400	1.24	78	96.7	42.2

[0017] ^aGPC로 측정. ^b반응 시작시에 넣은 mPEG 및 PHV에 대한 형성된 산물의 중량비. ^cDSC로 측정한 디블록 공중합체의 융점; PHV 블록은 용융 재결정 때문에 양봉 피크를 나타낸다. T_m은 주된 두 번째 피크를 나타냈다.

[0018] PHV-mPEG 디블록 공중합체의 화학적 구조는 ¹H NMR 분광법으로 측정하였다. 도 3의 상단의 스펙트럼이 PHV-mPEG의 것이고, 하단은 순수한 mPEG의 것인데, a부터 h까지의 피크는 PHV와 관련된 것이고, i, j 및 k 피크는 mPEG과 관련된 것이다. 도 3의 스펙트럼 하단에 화살표로 표시한 3.71 ppm에서의 흡수는 유리 mPEG의 히드록실 말단에 결합한 메틸렌 양자에 기인한 것이라고 생각된다. PHV-mPEG의 스펙트럼에서는 흡수 신호가 보이지 않고 대신에 4.16 ppm에서의 피크(피크 i)가 나타나서 메틸렌 양자가 에틸렌 글리콜의 말단기에서 에스테르 결합을 형성하여 PHV와 mPEG 사이에 결합 부위가 생겼음을 나타낸다. PHB-mPEG과 비슷하게, PHV-mPEG에서도 역시 히드록실 말단기의 열 가수분해에 의한 올레핀 말단기와 연관된 6.95 및 5.74 ppm(각각 피크 c 및 d)에서 두 개의 작은 피크가 나타났다. PHV 블록의 말단 펜데노일기와 연관된 메틸과 메틸렌의 양자는 1.00 및 2.15 ppm에서의 공명(각각 피크 a 및 b)을 보인다. 3.60 ppm에서의 공명(j) 및 3.31 ppm에서의 공명(k)은 각각 mPEG 블록의 메틸렌과 메틸 양자와 관련이 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서는 디블록 공중합체의 DSC 분석으로 열 전이를 측정했다. PHV-mPEG 디블록 공중합체에 대한 스캔 범위는 50 에서 200℃였고, mPEG에 대해서는 35 내지 100℃에서 측정했다. T_m 값은 mPEG 블록에 대해서는 42.2℃, PHV 블록에 대해서는 96.7℃이 때문에(표 1참조), 두 개의 구분된 용융 흡열(endotherm)이 PHV-mPEG 디블록 공중합체 내의 PHV 및 mPEG 블록에 대해 관찰된다. 두 개의 용융 흡열은 디블록 공중합체 내에 두

블록에 대한 별개의 결정상이 형성되었음을 나타낸다. 양봉 형태의 용융 흡열은 또한 PHV-mPEG 내의 PHV 부분에서도 나타나는데, 용융 재결정이 PHA 중합체에 대한 이러한 이중 용융 피크에 대한 원인으로 생각된다. 전구체 전중합체와 비교했을 때, 양 블록의 열적 특성은 더 낮은 온도로 이동했다(표 1). 이러한 융점 하강은 부분적으로는 에스테르 교환반응에 의한 히드록실기와 카르복실기의 결합 반응을 나타내고, 시료의 결정도(crystallinity)가 줄었음을 의미한다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 디블록 공중합체를 가지고 o/w 용매 증발법에 의해 생분해성 나노입자를 만들었다. 도 4a 및 b는 각각 PHV(대조군) 및 PHV-mPEG 나노입자의 FE-SEM 현미경 사진을 보여준다. 이렇게 만들어진 나노입자는 잘 분산된 구형으로 매끄러운 표면 형태를 보인다. 그러나 몇몇 입자는 현미경 스테이드에서 말리는 동안 쭈그러들고 납작해져서 표면이 약간 변형되었다. ELS로 측정된 PHV 나노입자의 평균 크기는 370 ± 3 nm 이고, PHV-mPEG 나노입자는 208 ± 1 nm이다. 표 2에 나노입자의 평균 크기, 다분산도 및 제타 포텐셜을 기재하였다. ELS로 측정된 나노입자의 평균 크기는 FE-SEM으로 측정된 것과 일치했다. mPEG-그래프트 나노입자에 비해서 PHV 나노입자의 크기가 상대적으로 큰 것은 입자 크기 분석을 위해서 여과 없이 현탁액을 제조했기 때문이다. 그 때문에 PHV 입자에서 약간의 응집이 발생했다. 한편, PEG화 나노입자는 동결 건조 후에도 응집되지 않고 수용액상에서 안정한 현탁액을 형성했다. 이것은 나노입자의 mPEG 부분이 정전기적으로 나노입자의 응집을 막기 때문이다. PEG는 동결 건조를 할 때 응집을 막기 위해 단백질에 안정제로 널리 쓰여 왔다. PHV 입자의 제타 포텐셜은 25 ± 2 mV이고, mPEG-그래프트 입자의 값은 14 ± 1 mV이다(표 2). 이것은 PEG화를 통해서 나노입자의 표면 전하가 감소하였음을 명확히 나타낸다.

표 2

[0021] 나노입자의 크기 및 표면 전하

시료	입자크기 ^a (nm) $\pm$ SD	크기 다분산도 ^a $\pm$ SD	제타 포텐셜 ^a (mV) $\pm$ SD
PHV-mPEG	208 ± 1	0.26 ± 0.01	-14 ± 1
PHV(대조군)	370 ± 3	0.23 ± 0.20	-25 ± 2

[0022] ^a나노입자의 입자크기, 다분산도 및 표면 전하는 ELS 로 측정하였다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 나노입자의 시험관 내(in vitro) 세포 독성을 실험하였다. DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)를 이용하여 시료를 희석해서 5 종류의 희석 시료(20, 50, 100, 200, 400 /mL)를 MTT 분석에 사용하였다. 나노입자의 세포 독성은 용량 및 작용 기간에 대해서 평가했다. 원하는 농도의 나노입자 현탁액을 제조한 후에 외부 물질에 높은 감수성을 가진 신경 배아 세포로 독성 실험을 했다. 도 5a는 PEG화 나노입자 및 비 PEG화 나노입자 대조군으로 처리하고 24시간 동안 37℃에서 배양한 후의 세포 생존율을 보여준다. 본 발명의 나노입자 및 비 PEG화 나노입자 시료에서 모두 낮은 농도에서 비슷한 세포 생존력을 나타내서 세포 생존력에 영향이 적음을 알 수 있다. 세포가 좀 더 높은 농도(200 μ g/mL 이상)의 나노입자에 48시간 동안 노출되었을 때, 비-PEG화 나노입자 시료에서 약간 세포 독성이 증가된 것을 볼 수 있다(도 5b). PHV 나노입자에서 세포 독성이 증가한 것은 HV 단위에 의해 유도된 염증반응 때문이라고 여겨진다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 신규한 양친성 디블록 공중합체 나노입자는 수용액 상에 안정적으로 분산될 뿐만 아니라 독성에 민감한 신경 배아 세포에 독성이 거의 없어 소수성 약물에 대한 효과적인 약물 전달 시스템으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 PHV-mPEG 디블록 공중합체를 합성하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 2는 PHV-mPEG 디블록 공중합체와 mPEG 전중합체의 GPC 크로마토그래프이다.

도 3은 PHV-mPEG 디블록 공중합체와 mPEG의 ¹H-NMR 그래프이다.

도 4는 PHV(대조군)(a) 및 PHV-mPEG 나노입자(b)의 FE-SEM 현미경 사진 및 PHV(대조군)(c) 및 PHV-mPEG 나노입

자(d)의 크기 분포를 나타낸 그래프이다.

도 5는 PHV 및 본 발명의 PHV-mPEG 나노입자로 처리한 배아 해마 뉴런 세포의 생존율을 나타낸 그래프이다. DMEM 배지에서 24시간(도 5a) 및 48시간(도 5b) 동안 원하는 농도(25400 $\mu\text{g/mL}$)의 나노입자를 넣고 세포 초기 농도 1×10^6 /웰로 하여 배양하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

<실시예 1>

디블록 공중합체의 제조

1.1 재료의 준비

Paracoccus denitrificans KCTC 2530(Korean Culture Type Collection)을 90 mM n-발레릭산을 단일한 탄소 공급원으로 사용하여 배양함으로써 PHV 단일중합체를 제조했다.

영양 배지에서 미리 배양한 세포를 10 mL/L의 n-발레릭산을 함유하는 PHA 합성 무기질 배지로 옮기고 60시간 동안 배양하였다. 한일-Supra 22K (로터 A250S-6, 6,000 rpm으로 10분간)으로 원심분리하여 세포를 거두었다. Pyrex Soxhlet 장치에서 뜨거운 클로로포름으로 폴리에스테르를 추출했다. mPEG[수 평균 분자량(Mn)= 2000], 비스(2-에틸헥사노에이트) 주석 촉매, 폴리비닐알코올(PVA)(Mw, 9,00010,000 Da, 80% 수화됨) 및 디클로로메탄(DCM)은 Sigma-Aldrich Korea Ltd로부터 구입하였다. 다른 화학물질들은 분석등급을 사용하였다.

1.2 디블록 공중합체의 제조

약간 변형된 마르슈울트 법(Marchessault's method)으로 PHV-mPEG 공중합체를 합성하였다.

우선 자기 교반기가 구비된 25 mL의 둥근 바닥 플라스크에 실시예 1.1에서 준비된 중합체 및 mPEG을 1:1의 중량 비로 넣었다. 190℃로 예열된 유조에서 진공 상태로 반응을 진행시켰다. 약 70 mg의 비스-에틸헥사노에이트 주석 촉매를 질소가 흐르는 가운데 시린지를 이용하여 고무 중격을 통과해 넣었다. 20-30분간 계속 저으면서 반응을 시켰다. 반응이 완료된 후에, 플라스크를 꺼내어 얼음 또는 상온에서 식혀서 왁스 같은 산물을 얻어냈다. 얻어진 변형 디블록 공중합체를 5 mL 클로로포름에 녹인 후에 100 mL의 증류수에 방울방울 넣어서 유제가 만들어 지도록 했다. 만들어진 유제를 자석 교반기로 힘차게 저어서 유기용매가 날아가도록 했다. 만들어진 콜로이드 현탁액은 30,00035,000 Da 분자량 제거막을 이용하여 증류수에 대해 1주간 투석하였다. 그 다음 중합체를 동결 건조해서 밝은 하얀색의 분말을 얻었다(수율 70-80%).

1.3 공중합체의 특성

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 사용하여 디블록 공중합체의 분자량을 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 ^1H -NMR을 이용해서 얻어냈다. 시료의 스펙트럼은 상온에서 CDCl_3 에서 기록하였다. 표준 소프트웨어로 나뉜 스펙트럼 신호를 통합하였다.

데이터 단말(data station)이 구비된 TA DSC(differential scanning calorimeter) Q10 V6.21(TA Instruments, New Castle, DE)를 이용해서 질소 퍼징을 하면서 상기 디블록 공중합체의 열전이(thermal transition)를 측정하

였다. 분당 10℃의 비율로 가열하면서 50에서 200 ℃의 범위에서 스캔하였다.

[0039] <실시예 2>

[0040] 나노입자의 합성

[0041] 2.1 나노입자의 합성

[0042] 약간 변형된 o/w 용매증발법으로 디블록 공중합체로부터 양친성 나노입자를 합성했다.

[0043] 50 mg의 디블록 공중합체를 함유하는 2 mL DCM을 1% PVA 용액(60 mL)에 넣고 혼합액을 15% 출력으로 마이크로팁 프로브 소니케이터 D-12207(Bandelin Electronics, Germany)을 이용하여 1-2분간 프로브 초음파 처리하였다. 만들어진 o/w 유제를 상온의 흡 후드에서 부드럽게 저어서 유기용매가 완전히 증발되도록 했다. 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 나노입자를 정제했고, 물로 세 번 씻어서 여분의 유제를 제거했다. 나노입자 현탁액을 동결 건조시켜서 나노입자의 미세 분말을 얻었다. PHV 단일 중합체 나노입자도 같은 방법으로 만들었다.

[0044] 2.2 나노입자의 특성

[0045] FE-SEM(field emission scanning electron microscopy) 모델 XL30S(Philips, The Netherlands)를 이용해서 나노입자의 형태를 관찰했다. 나노입자 현탁액을 증류수로 희석시켜서 시료를 만들고 탄소 스테드에 떨어뜨렸다. 나노입자를 공기 중에서 말리고 10 mA의 전류 강도로 300초간 진공 상태로 스퍼터 코터(JFC-1100E, 이온 스퍼터링 장치, JEOL, Japan)를 이용해서 금으로 코팅했다.

[0046] 나노입자의 크기 및 제타 포텐셜은 25℃에서 전기영동 광산란 분광광도계(ELS-8000; Otsuka Electronics, Osaka, Japan)로 산란각을 90° 및 20°로 하여 측정했다. 약 100 mg의 동결 건조된 나노입자를 1분간 울트라 초음파 처리하여 pH 7.4인 10 mL의 PBS(phosphate buffered saline)에 재분산시켰다. PBS로 희석한 나노입자 현탁액을 여과하지 않고 입자 크기 및 제타 포텐셜을 측정하기 위해 사용하였다.

[0047] <실시예 3>

[0048] 세포 독성 실험(*in vitro*)

[0049] 3.1 해마 뉴런 세포 배양

[0050] 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.

[0051] 상기 임신한 래트로부터 꺼낸 태아 래트의 해마 뉴런을 배양했다.

[0052] 채취한 해마 조직을 0.25% 트립신-EDTA로 20분간 처리하고 얼음처럼 차가운 무칼슘 무마그네슘 Hank's 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(1×10^6 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.

[0053] 3.2 MTT 분석

[0054] 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. MTT 분석은 살아있는 세포 미토콘드리아의 리덕타제 효소(숙시네이트 디하이드로게나제)의 환원 능력에 기초한 것으로, 그것은 노란색의 수용성 MTT 염료를 보라색의 불용성 포르마잔 산물로 환원시킨다. 570 nm 흡광도로 측정된 포르마잔 생성량은 배지 내 살아있는 세포의

수에 정비례한다.

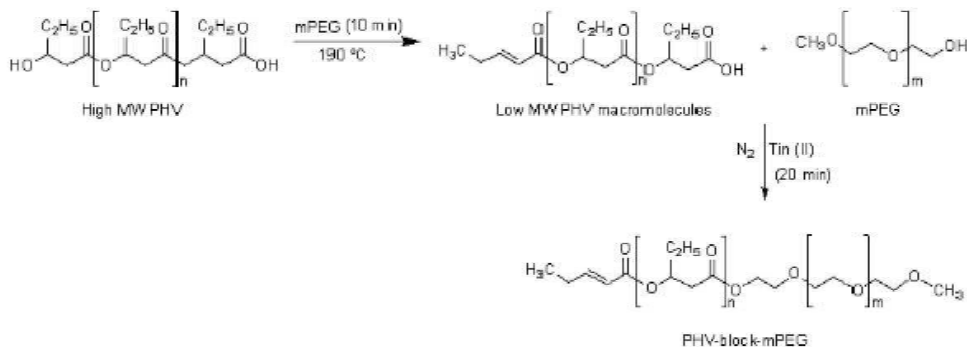
[0055] 세포를 우선 1×10^6 세포/웰의 비율로 96-웰 플레이트에 심은 다음 습한 5% CO₂ 대기 속에서 37℃에서 24시간 배양하여 세포가 부착되고 완전히 자라도록 했다. 24시간 후에, 웰 내의 배지를 원하는 농도의 나노입자 분산액을 포함하는 배지로 바꾼 다음 24시간 및 48시간 동안 더 배양했다. 24시간 후에, 세포를 PBS(pH 7.4)로 두 번 씻고 20 μ L의 MTT 용액(5 mg/mL PBS)을 각 웰에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배지를 모두 빨아낸 다음, 웰 당 100 μ L의 디메틸설폭시드를 첨가하고 플레이트를 상온에서 궤도 진탕기(orbital shaker) 상에서 1시간 동안 배양하여 형성된 포르마잔 결정이 녹도록 했다. 세포 생존력의 흡광도는 570 nm에서 마이크로플레이트 리더(Anthos 2020, Anthos Labtech Instruments, Wals., Austria)를 이용하여 측정하였다.

[0056] 세포의 생존율은 본 발명의 나노입자로 처리한 세포의 대조군 나노입자로 처리한 세포의 OD 570에 대한 OD 570의 비율로부터 계산하였다. 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.

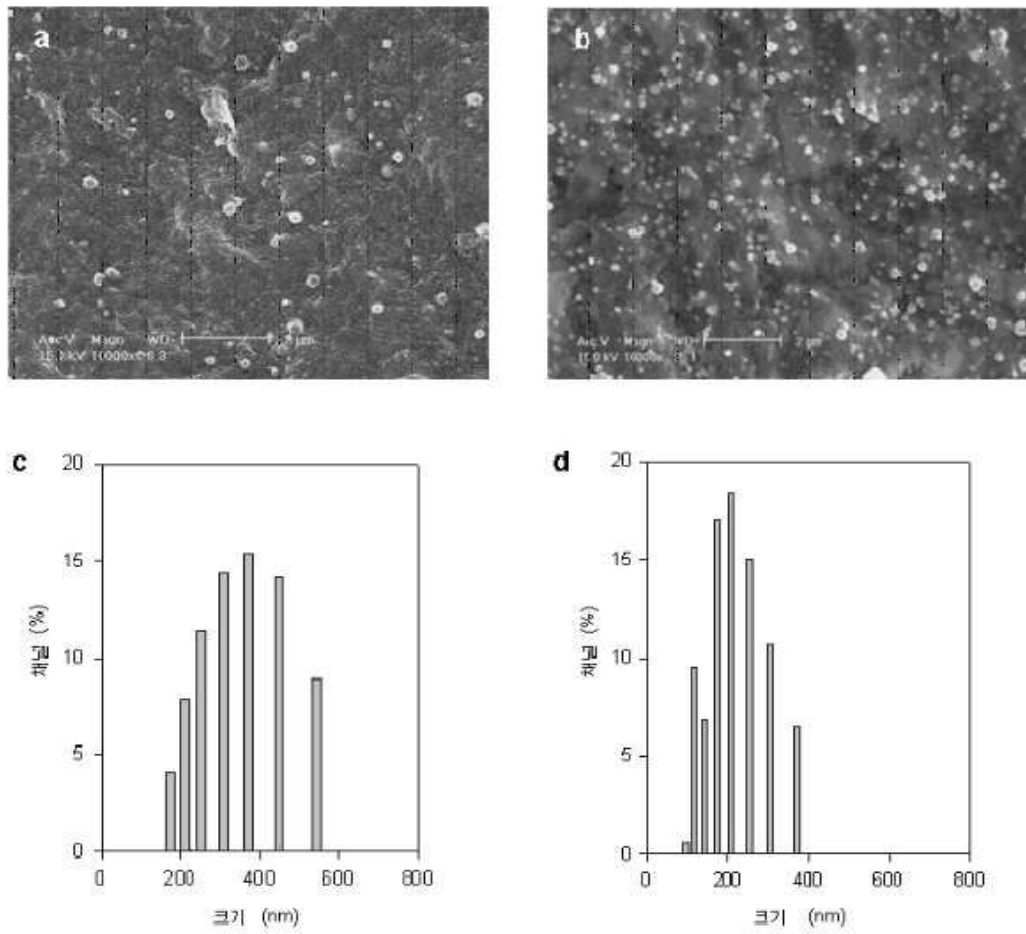
[0057] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1



도면4



도면5

