



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0016044
(43) 공개일자 2017년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/30 (2017.01) A61K 9/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/30 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0109301
(22) 출원일자 2015년08월03일
심사청구일자 2015년08월03일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 가호로44번길 7 대동아파트 102
동 303호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

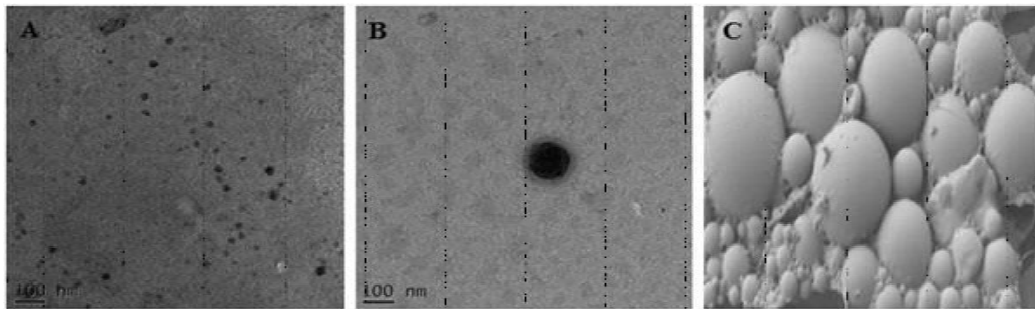
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 안토시아닌을 포함하는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 안토시아닌을 포함하는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 일 구체예에 따른 안토시아닌을 포함하는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 다양한 뇌질환의 예방 또는 치료 또는 개선에 효과적으로 작용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/1641 (2013.01)

A61K 9/1647 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009521

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업

연구과제명 치매(뇌기능향진 조절) 치료 천연신물질 소재개발 ; 나노담체 적합형 약물 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

폴리에틸렌글리콜로 표면이 개질된 생분해성 폴리머; 및 안토시아닌을 포함하는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생분해성 폴리머는 폴리(락틱-코-글리콜산)(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), 폴리(락틱산)(poly(lactic acid), PLA), 폴리(글리콜산)(poly(glycolic acid), PGA), 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone), PCL) 및 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate, PHA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 뇌질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, HIV 치매, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 피크병 및 크로이츠펔트-야콥병 및 헌팅턴병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 안토시아닌의 함량은 상기 생분해성 폴리머의 중량대비 5% 내지 20%(w/w)인 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 나노입자는 100 nm 내지 200 nm의 직경을 갖는 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 신경 세포의 보호 작용을 하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 신경세포 사멸을 억제하는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안토시아닌을 포함하는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수십년에 걸쳐 다양한 화학적 약물을 발견하고 개발하였으나, 빠른 배출 및 변성 또는 분해 같은 문제들이 여전히 해결되어야 할 과제로 남아있다. 이러한 문제들을 해결하기 위해 약물을 고용량으로 사용하거나, 복합 제제를 사용하는 등의 다양한 시도가 이루어졌다. 그러나, 적절한 약물 농도 이상의 과다 투여는 약물의 비특이적 독성을 야기할 수 있기 때문에, 효과적인 치료에 있어서는 매우 위험한 선택일 수 있다. 이러한 문제를 극복하기 위한 접근 방법 중 하나는, 예를 들어, 수중유(oil-in-water, O/W) 에멀전 및 리포솜과 같은 고체 고분자 나노입자 및 지질 시스템의 미립자 운반체 시스템(particulate carrier system)에 약물을 패키징하는 것이다. 일반적으로, 약물 전달 기술에서 높은 약물 안정성은 약물의 생체이용률을 증진시킨다. 미립자 운반체에 약물을 혼입시키면 인 비트로 및 인 비보에서 외부의 스트레스로부터 약물을 보호할 수 있고, 장기간 순환을 유지할 수 있으며, 표적 세포에 운반하도록 설계할 수 있다. 폴리(락틱-코-글리콜산)(Poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA)는 생분해성 폴리머로 사용되는 가장 우수한 물질 중 하나로서, 가수분해를 통해 젖산 및 글리콜산의 대사

물 모노머(metabolite monomer)를 생산한다. 이렇게 만들어진 젖산과 글리콜산 모노머는 내생적(endogenous)이고, 크렙스(Krebs) 회로를 통해 용이하게 체내에서 대사된다; 최소한의 전신 독성은 약물 전달 또는 생체 재료로 적용하기 위한 PLGA의 용도와 연관성이 있다. PLGA는 인체에 사용되는 다양한 약물 전달 시스템으로 미국 FDA와 EMA의 승인을 받았으며, 상기 폴리머는 다양한 분자량과 공중합체 조성물로 판매되고 있다. 상기 폴리머의 분해 시간은 수개월 내지 수년까지 다양할 수 있으며, 분자량 및 공중합체에 의해 결정된다. 일반적으로, PLGA의 형태는 사용되는 모노머의 비율에 따라 결정된다. 예를 들어, PLGA 50:50은 50%의 젖산과 50%의 글리콜산의 조성으로 이루어진 공중합체로 결정된다. 한편, 낮은 분해율로 인하여 PLA(Poly(lactic acid))는 PLGA보다 많이 사용되고 있지는 않다.

[0003] 비독성이고 혈액 친화적인 물질을 갖도록 폴리머의 표면을 개질하는 것은 캡슐화된 약물의 방출을 지속하고, 혈액순환 시간을 연장하며, 대식세포에 의한 인식을 회피하고, 혈액 순환 시간 및 캡슐화된 약물의 지속적인 방출을 연장시키기 위해 필수적이다. 폴리(에틸렌 글리콜)(poly(ethylene glycol), PEG)는 소수성의 생분해성 지방족 폴리에스테르와 결합하여 친수성의 비독성 세그먼트(segment)로서 폭넓게 사용된다. 나노입자 표면 상에 친수성의 PEG 그룹을 결합시키면, 오폐소닌 작용(opsonization) 및 식균 작용에 저항성을 가지는 것을 확인하였으며, PEG가 결합되지 않은 나노입자와 비교하였을 때, 혈액에서 오랜 시간 체류하는 것을 확인하였다.

[0004] 안토시아닌은 천연 식물 색소로서, 과일, 채소, 콩 같은 식용 식물에서 만들어진다. 특히, 안토시아닌과 같은 폴리페놀이 풍부한 식품의 섭취는 건강의 증진과 관련이 있다고 알려져 있다. 안토시아닌은 항산화와 항염증, 항신경변성의 특성을 갖는 플라보노이드(flavonoid) 서브패밀리(subfamily)를 구성한다. 베리(berry)류에서 추출한 안토시아닌은 뇌의 인지 기능을 증진시키고, 노화로 인한 산화 스트레스를 감소시킬 수 있다. 또한, 안토시아닌은 에스트로겐이 결핍된 랫트의 기억력 및 학습 저하를 예방하는 것으로도 알려져 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 폴리에틸렌글리콜로 표면이 개질된 생분해성 폴리머 및 안토시아닌을 포함하는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 양상에 따른 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 폴리에틸렌글리콜로 표면이 개질된 생분해성 폴리머 및 안토시아닌을 포함하는 나노입자를 유효성분으로 함유한다.

[0007] 용어 "치료(treatment)"는 뇌질환에 의해 발생하는 질병, 장애 또는 상태를 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질병, 장애, 또는 상태에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질병, 장애 또는 상태가 발생하는 것의 예방, 상기 질병, 장애 또는 상태의 억제, 즉 발전의 억제 및 상기 질병, 장애 또는 상태의 경감, 즉 질병, 장애 또는 상태의 퇴행 야기를 포함하는 것으로 해석된다.

[0008] 일 구체예에 따른 상기 약학적 조성물은 경구, 직장, 코, 폐, 국소, 경피, 저장기(intracisternal), 복강내 및 비경구(피하, 근육 내, 관부내(intrathecal), 정맥내 및 피부내를 포함) 경로와 같은 임의의 적합한 경로로 투여되기 위해 구체적으로 제형화될 수 있으며, 바람직하게는 경구 경로로 투여될 수 있다. 상기 경구용 제제를 제조하는 경우에는 통상의 약학적으로 허용가능한 담체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액, 시럽제, 엘릭시르 및 용액제와 같은 경구용 액체 제제의 경우에는 물, 글리콜, 오일, 알콜 등을 담체로 사용할 수 있고, 산제, 환제, 캡셀제 및 정제와 같은 고체 제제의 경우에는 전분, 설탕, 카올린, 윤활제, 결합제, 봉해제 등을 사용할 수 있다. 바람직한 경로는 치료되는 대상의 일반적인 조건 및 연령, 치료되는 조건의 성질 및 선택되는 활성 성분에 의존할 것이며, 투여의 용이성 및 용량의 균일성 측면에서 바람직하게는 단일 투여형(unit dosage form)으로 제조될 수 있다.

[0009] 상기 약학적 조성물은 임의의 적합한 경로, 예를 들어 정제(tablet), 캡슐, 파우더, 과립, 펠렛, 구내정, 당의정, 환약 또는 정제(lozenge), 수성 또는 비-수성 액체 내에 있는 용액 또는 현탁액, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀전, 엘릭시르, 시럽 등의 형태로 경구 또는 주사액의 형태인 비경구 투여될 수 있다. 비경구 투여용 다른 약학적 조성물은 분산액, 현탁액 또는 에멀전 뿐만 아니라 사용하기 전의 멸균 주사용액 또는 분산액 내에 구성되는 멸균 파우더를 포함할 수 있다. 데포트(depot) 주사 제형물은 또한 본 발명의 영역 내에 포함될 수 있다. 비경구 투여 시 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 조사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다. 다른 적합한 투여 형태는 좌약, 스프레이, 연고, 크림, 젤,

흡입제, 피부패치 등을 포함할 수 있다. 상기 조성물을 제조하기 위해서는 당해 기술 분야에 공지된 방법이 이용될 수 있고, 당해 기술 분야에서 일반적으로 이용되는 임의의 약학적으로 허용 가능한 담체 희석제, 부형제 또는 다른 첨가제가 이용될 수 있다.

- [0010] 일 구체예에 따른 약학적 조성물을 임상적인 목적으로 투여 시, 통상 약 0.001~100 mg/kg의 양으로 함유하는 단위 투여량 또는 분리 용량의 형태로 투여된다. 총 일일 투여량은 보통 본 발명의 활성 화합물들의 체중 1kg 당 약 0.001 내지 100 mg, 바람직하게는 0.01 내지 10 mg이며 다만 환자의 상황을 종합적으로 검토하여, 또한 투여되는 약의 활성을 고려하여 상기 범위에 해당하지 않는 특정한 양을 투여할 수도 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 약학적 조성물의 1일 투여량은 1일 1 내지 3회로 투여될 수 있다.
- [0011] 또한, 일 구체예에 따른 약학적 조성물에는 활성 성분의 작용을 저해하지 않거나 활성 성분의 작용을 보조하는 기타 성분들이 더 포함될 수 있으며, 기타 당 업계에 공지된 다양한 형태로 제형화될 수 있다.
- [0012] 일 구체예에 따르면, 상기 생분해성 폴리머는 생체에서 일어나는 반응에 대하여 무독성이며, 생물학적으로 적합하다고 당업계에 알려진 폴리머라면 어떠한 것이라도 가능하며, 예를 들어, 폴리(락틱-코-글리콜산)(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), 폴리(락틱산)(poly(lactic acid), PLA), 폴리(글리콜산)(poly(glycolic acid), PGA), 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone), PCL) 또는 폴리하이드록시알카노에이트(polyhydroxyalkanoate, PHA)일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0013] 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 당업계에 알려진 다양한 뇌질환에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있으며, 상기 뇌질환은 예를 들어, 알츠하이머병, 파킨슨병, HIV 치매, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 피크병 및 크로이츠펔트-야콥병 또는 헌팅턴병일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0014] 일 구체예에 따르면, 상기 안토시아닌의 함량은 바람직하게는, 상기 생분해성 폴리머의 중량대비 5% 내지 15%(w/w)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 생분해성 폴리머의 중량대비 7% 내지 13%(w/w)일 수 있으며, 가장 바람직하게는 상기 생분해성 폴리머의 중량대비 9% 내지 11%(w/w)일 수 있다.
- [0015] 상기 안토시아닌은 식물로부터 분리 추출된 것 또는 화학적으로 합성된 것일 수 있으며, 상기 식물은 안토시아닌을 생성하는 그 어떠한 식물일 수 있다. 안토시아닌이 식물로부터 추출된 것인 경우, 상기 식물은 예를 들어, 검은콩(black bean), 블랙커런트(black currant), 초크베리(chokeberry), 블랙 초크베리(black chokeberry), 크랜베리(cranberry), 오디, 체리, 산딸기, 블루베리, 블랙베리, 가지, 아사이(acai), 머루 또는 포도일 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [0016] 일 구체예에 따르면, 상기 나노입자는 바람직하게는 100 nm 내지 200 nm의 직경을 가질 수 있으며, 가장 바람직하게는 120 nm 내지 165 nm의 직경을 가질 수 있다.
- [0017] 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 신경 세포의 보호 작용을 하는 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로는, 신경 세포의 사멸을 억제하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 일 구체예에 따른 안토시아닌을 포함하는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 다양한 뇌질환의 예방 또는 치료 또는 개선에 효과적으로 작용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 일 구체예에 따른 안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나노입자의 형태 관찰 및 인 비트로 방출 프로파일을 나타낸 것으로, (A)는 안토시아닌이 함유된 나노입자의 TEM 사진; (B)는 안토시아닌이 함유된 나노입자를 확대한 TEM 사진(scale bar =100 nm); (C)는 안토시아닌이 함유된 나노입자의 SEM 결과를 나타낸다.
- 도 2는 (a) 안토시아닌 (b) PLGA-PEG 나노입자 (c) 안토시아닌이 함유된 나노입자의 FT-IR 스펙트럼을 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 일 구체예에 따른 안토시아닌이 함유된 나노입자의 DLS 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 일 구체예에 따른 안토시아닌이 함유된 나노입자의 인 비트로 방출 프로파일을 나타낸 것이다.
- 도 5에서 (A)는 SHSY-5Y 정상 세포에 대한 PLGA-PEG 나노입자, 안토시아닌 및 안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나

노입자(An-NPs)의 인 비트로 세포 독성을 나타낸 그래프이며, (B)는 ApoTox-Glo Triplex Assay를 사용하여 수행한 SHSY-5Y 세포의 생존성, 세포 독성 및 caspase-3/7 어세이의 결과를 나타낸 그래프이다. 유의성 차이: 대조군 - * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$; A β 처리군 # $p < 0.05$ 및 ## $p < 0.01$.

도 6은 PLGA-PEG 나노입자의 세포 내 흡수를 보여주는 CLSM 이미지 결과이다(scale bar = 50 μm).

도 7은 A β_{1-42} 처리된 SHSY-5Y 세포주에서 유리 안토시아닌 및 An-NPs 처리에 대한 세포 사멸 관련 단백질의 발현 수준을 확인하기 위한 웨스턴 블롯 분석 결과이다(약물 처리 농도는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 레인 1, 전세포 용해물; 레인 2, A β -처리 세포; 레인 3, A β 및 안토시아닌 처리 세포; 레인 4, A β 및 An-NP 처리 세포. 유의성 차이: 대조군 - * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$; A β 처리군 # $p < 0.05$ 및 ## $p < 0.01$.

도 8은 안토시아닌 및 An-NPs의 항세포사멸 효과를 확인한 TUNEL 및 DAPI 염색된 세포의 이미지이다(10배 확대 시야, scale bar=1 μm). 유의성 차이: 대조군 - * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$; A β 처리군 # $p < 0.05$ 및 ## $p < 0.01$.

도 9는 A β_{1-42} 가 처리된 SHSY-5Y 세포에서 알츠하이머 마커의 단백질 발현 수준을 확인하기 위한 웨스턴 블롯 분석 결과이다(약물 처리 농도는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 레인 1, 전세포 용해물; 레인 2, A β -처리 세포; 레인 3, A β 및 안토시아닌 처리 세포; 레인 4, A β 및 An-NP 처리 세포. 유의성 차이: 대조군 - * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$; A β 처리군 # $p < 0.05$ 및 ## $p < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 1. 실험 재료 및 방법

[0023] 1.1. 실험 재료

[0024] Poly(lactide-co-glycolide)(PLGA)-PEG, 소듐 디옥시콜레이트(sodium deoxycholate) 및 디클로로메탄(dichloromethane)은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 모든 화학 시약은 분석용 등급을 사용하였다. Anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-A β , anti-APP, anti-BACE-1 항체는 Santa Cruz Biotechnology에서, anti-caspase-3, anti-actin 항체는 Cell Signaling에서 구입하였다. 2차 항체인 염소 항-마우스(goat anti-mouse) IgG, 염소 항-토끼(goat anti-rabbit) IgG, 토끼 항-염소(rabbit anti-goat) IgG는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다.

[0026] 1.2. 안토시아닌(Anthocyanin)이 함유된 PLGA-PEG 나노입자의 제조

[0027] 안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나노입자는 기존의 유화-용매 증발 기법(emulsification-solvent evaporation technique)을 변형하여 제조하였다. 먼저, 100 mg의 PLGA-PEG 및 약물 10 mg을 지속적으로 저어주면서 3 mL의 DCM에 용해하였다. 상기 혼합물에 12 mM 소듐 디옥시콜레이트 용액 20 mL를 첨가한 다음, Microtip Probe Sonicator D-12207를 사용하여 10분 동안 20%의 출력으로 프로브 초음파 분산(probe sonicated)하였다. 이후, 형성된 유탁액(emulsion)은 유기층(organic phase)이 완전히 증발될 때까지 실온의 후드(fume hood) 내에서 부드럽게 교반하였다. 나노입자는 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 분리하였으며, 이후 여분의 유화제 및 남은 약물을 제거하기 위해 증류수로 2회 세척하였다. 나노입자 현탁액은 동결 건조시켜 상기 약물이 함유된 나노입자의 미세 분말을 수득하였다. 원심 분리 후, 상층액에 존재하는 안토시아닌의 양을 520 nm의 파장에서 분광 광도계(Hewlett Packard UV 8452A)로 분석하였다. PLGA-PEG 나노입자의 약물 캡슐화의 효율은 기존의 방법에 따라 수행하였다. 약물이 함유되지 않은 나노입자는 단일 에멀전 기술을 사용하여 상기와 동일한 방법으로 제조하였다. 형광이 표지된 나노입자 제형(formulation)을 제조하기 위해, 내부 수성층(inner aqueous phase)에 rhodamine-123 (0.5 mg/mL)을 첨가하였으며, 상기 형광이 표지된 나노입자 또한 상기와 동일하게 단일 에멀전-용매 증발 방법(single emulsion-solvent evaporation method)을 사용하여 제조하였다.

[0029] 1.3. 나노입자의 물리적 특성

[0030] 나노입자 표면 형태는 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM), 투과전자현미경(transmission electron microscopy, Tecnai-12, 120 kV)과 10% 우라닐 아세트산(uranyl acetate) 수용액에서 매질 염색(negative staining)을 통해 확인하였다. 입자의 크기 및 크기 분포는 광 산란법(light scattering method, DLS-8000; Otsuka Electronics Co., Osaka, Japan)을 통해 결정하였다. 나노입자의 평균 입자 크기는 3회 실험의 평균값을 계산하여 결정하였다. 나노입자의 표면 전하는 제타 전위 값으로 환산하여 특정하였으며, 이는 20°의 산란 각에서 전기영동 광산란법(ELS-Z; Otsuka Electronics Co., Osaka, Japan)을 사용하여 결정하였다. 나노입자와 안토시아닌의 상호 작용을 연구하기 위해 DTGS(KBr 창을 포함한) 검출기가 장착된 VERTEX 80v (Bruker Optics) FT-IR 분광계로 진공 하에서 푸리에 변환-적외선(Fourier transform-infra red, FT-IR) 스펙트럼을 관찰하였다. 동결 건조 샘플은 KBr 파우더와 혼합하여 실온에서 분쇄하였으며, 얇은 펠렛으로 압축하였다.

[0032] 1.4. 인 비트로 약물 방출

[0033] 인 비트로 상에서 약물이 함유된 나노입자로부터 안토시아닌의 방출 측정은 기존의 방법에 따라 37°C에서 50 ml의 PBS (pH 7.4)를 포함하는 유리 장치에서 수행하였다. 먼저, 약물이 함유된 나노입자 50 mg을 5 ml의 PBS에 분산시킨 다음, 셀룰로오스 멤브레인 투석 튜브(분자량 컷오프 = 3000~3500 Da)에 넣었다. 이후, 상기 투석 튜브를 방출 배지(release medium)(50 ml)에 침지시키고, 37°C 진탕 항온수조(shaker bath)(100 rpm)에 인큐베이션 하였다. 상기 용액으로부터 1 ml의 표본(aliquot)을 주기적으로 회수하였다. 상기 용액의 부피는 가라앉은 상태를 보존시키기 위해 샘플링할 때마다 1 ml의 새로운 완충액을 추가하여 일정하게 유지시켰다. 상기 배지에서 방출된 안토시아닌의 양을 520 nm에서 분광학적 분석을 통해 측정하였다. 이후, 안토시아닌의 방출 퍼센트를 투석 시간에 대한 함수로 하여 좌표에 나타내었다. 대조 실험을 위해, 안토시아닌 5 mg을 DCM에서 용해시키고, 5 ml의 PBS를 첨가하여 초음파 분산하였다. 유기 용매는 교반하여 증발시켰으며, 남은 대부분의 안토시아닌은 적은 양의 부유 안토시아닌 입자와 함께 배지에 용해시켰다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

[0035] 1.5. 세포 배양과 약물 처리

[0036] Amyloid- β_{1-42} (A β_{1-42} , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)는 저장 용액(stock solution)을 제조하기 위해 1 mg/ml 농도로 멸균 식염수에 용해시켰다. SHSY-5Y 세포는 DMEM 용액, 10% FBS, 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신)에 유지시켜, 5일 동안 성장시킨 후, 하기와 같이 처리하였다: (1) 대조군: DMEM 용액에 24시간 동안 배양함, (2) A β -처리군: A β_{1-42} (5 μ M)를 포함하는 DMEM 용액에 24시간 동안 배양함, (3) A β 및 안토시아닌 처리군: A β_{1-42} (5 μ M)를 포함하는 DMEM 용액에서 12시간 동안 배양하고, 이후 12시간 동안 안토시아닌(0.2 mg/ml)에 배양함. (4) A β 및 안토시아닌이 함유된 나노입자(An-NPs)의 처리군: 12시간 동안 A β_{1-42} (5 μ M)를 포함하는 DMEM 용액에 배양하고, 이후 12시간 동안 An-NPs(0.2 mg/ml)와 함께 배양함; 모든 세포는 6일째 되는 날에 수확하였으며, 이후 분석 실험에 사용하였다.

[0038] 1.6. MTT 어세이

[0039] PLGA-PEG 나노입자(안토시아닌 부재), 유리(free) 안토시아닌 및 안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나노입자(An-NPs)의 인 비트로 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 어세이에 의해 결정하였다. 각 샘플은 4개의 다른 농도로 일반 SHSY-5Y 세포주를 사용하여 실험하였다. 상기 세포를 1×10^4 cells/well로 96 웰 플레이트(well plate)에 넣고, 50~200 μ g/ml 범위에서 동일하게 안토시아닌을 농도를 증가시키며 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 상기 세포는 대조군에서 사용된 성장배지와 동일한 배지로 처리하였으며, 세포독성은 기존의 방법에 따라 측정하였다.

[0041] 1.7. ApoTox-Glo triplex 분석

[0042] 생존성, 세포독성 및 caspase-3/7 활성(caspase-3/7 activation)을 평가하기 위해 단일 어세이 웰에서 ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega)를 수행하였다. 상기 분석은 두 파트로 이루어진다: 첫번째 파트에서, 세포 활성

및 세포독성의 마커인, 2종의 프로테아제 활성을 동시에 측정하였다. SHSY-5Y 세포(2×10^4 cells)는 96-웰 어세이 플레이트에서 배양하였으며, 각 웰은, 10% FBS 및 1%의 페니실린/스트렙토마이신을 포함한 최종 부피 200 μ l의 DMEM을 포함하였다. 37°C의 습윤 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양한 후에, 상기 세포는 1.5.에서 설명한 바와 같이, A β ₁₋₄₂, 유리 안토시아닌 및 안토시아닌이 함유된 PLGA-mPEG 나노입자를 처리하였다. 어세이를 위해, GF-AFC 기질 및 bis-AAF-R110 기질을 모두 포함한 20 μ l의 생존성/세포독성 시약을 모든 웰에 첨가한 후, 500 r.p.m에서 30초 정도 오비탈 웨이킹(orbital shaking)을 하여 혼합하고, 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 형광은 2종의 파장에서 측정하였다: 400 nm/505 nm(생존성) 및 485 nm/520 nm(세포독성). GF-AFC 기질은 생존 세포 내부로 들어가 생존-세포 프로테아제에 의해 절단되어 AFC를 방출한다. Bis-AAF-R110 기질은 생존 세포 내부로 들어가지 않지만, 사멸-세포 프로테아제에 의해 절단되어 R110을 방출한다. 생존-세포 프로테아제 활성은 온전하게 생존 가능한 세포를 제한하지 않으며, 형광발생(fluorogenic) 세포투과 펩티드 기질인 글리실-페닐알라닐-아미노플루오로쿠마린(glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin, GFAFC)을 사용하여 측정하였다. 형광 발생, 세포 불투과 펩티드 기질인 비스-알라닐, 알라닐, 페닐알라닐-로다민110(bis-alanylalanylphenylalanyl-rhodamine 110, bis-AAF-R110)은 세포막이 완전히 소실된 세포로부터 방출된 사멸-세포의 프로테아제 활성을 측정하기 위해 사용하였다. 상기 어세이의 두번째 파트는, 4개의 아미노산 서열 DEVD를 포함하며, 빛을 생성하는(luminogenic) caspase-3(caspase-3) 기질을 사용하여 caspase 활성, 루시페라제(luciferase) 활성 및 세포 용해(cell lysis)를 측정하였다. Caspase-Glo3/7 시약을 모든 웰에 첨가한 후(100 μ l), 500 r.p.m에서 30초 정도 오비탈 웨이킹(orbital shaking)을 하여 혼합하였다. 실온에서 30분 동안 배양한 후, 발광 정도를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다.

1.8. 세포 내 흡수

로다민(rhodamine)을 함유한 나노입자의 세포 내 흡수는 공초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscopy, CLSM)을 사용하여 SHSY-5Y 세포주에서 관찰하였다. CLSM(Fluoview FV 1000, Olympus, Japan) 관찰을 위하여, 0.1 mg/ml의 농도의 새로 제조된 rhodamine-123이 함유된 나노입자 현탁액을 세포 배양 배지와 혼합한 다음, 4-웰 커버글라스 챔버에서 전-배양된 세포를 추가하고 6시간 및 12시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 세포를 PBS로 3회 세척하고, 4%의 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시킨 다음, 다시 PBS로 세척한 후, 5분 동안 DAPI에서 배양하였다. 상기 슬라이드를 PBS로 세척하고, 글라스 커버 슬립을 마운팅 배지(mounting medium)과 함께 글라스 슬라이드에 올려 놓은 다음, CLSM으로 형광 이미지를 획득하였다.

1.9. 웨스턴 블롯 분석

웨스턴 블롯 분석은 기존 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 먼저, 세포를 수확하여 프로테아제 억제 캐테일을 포함한 0.2M PBS에 균질화를 하였다. 원심분리 후, 각각의 단백질 샘플을 각 그룹으로부터 수집하였으며, 환원 조건 하에서 7 내지 18%의 겔 상에 SDS-PAGE를 수행하였다. 단백질의 분자량 확인을 위해 7-200 kDa의 GangNam-STAIN (iNtRON Biotechnology) 단백질 마커를 사용하였다. 이후, 상기 단백질을 폴리비닐리덴 디플루오라이드(polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인 상에 이전시킨 다음 5%의 스킴 밀크(skim milk)로 블로킹하였다. 면역블로팅(immunoblotting)은 각각의 1차 항체로 수행하였으며, 항-액틴(anti-actin) 항체를 대조군(loading control)으로 사용하였다. 이후, 상기 멤브레인은 염소 유래의 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)가 결합된 항-토끼 IgG 또는 항-염소 IgG 또는 항-마우스 IgG 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 프로브로 사용하여 결합시켰다. PVDF 멤브레인에 대한 면역 반응은 Ez West Lumi 웨스턴 블로팅 검출 시약(ATTO Corporation, Japan)을 사용하여 가시화하였다. X-ray 필름은 컴퓨터 기반의 Sigma Gel 소프트웨어(Jandel Scientific, San Rafael, and Chicago, USA)로 스캔 및 분석하여 결과물의 밴드 밀도를 획득하였다.

1.10. TUNEL 분석

세포 사멸(apoptotic cell death)를 확인하기 위하여 제조업체의 권장사항에 따라 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling) 염색을 수행하였다. 인 시투(in situ) 세포 사멸 검출 키트는 Roche (Cat. No.11684809910)에서 구입하였다. 융합성 SHSY-5Y 세포주는 상기 1.5.의 약물 처리에서 설명한 바와 같이, DMEM 용액(대조군), A β , A β 및 안토시아닌, A β 및 안토시아닌이 함유된 나

노입자를 각각 처리하였다. 세포 사멸에 의한 형태적 특징을 관찰하기 위해, 핵 DNA를 TUNEL(GenScript Corporation, USA)을 이용하여 45분 동안 염색하였다. 이후, 상기 세포를 PBS로 2회 세척한 다음, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로 10분 동안 대조 염색(counterstain)하였다. 글라스 커버 슬립을 봉입 배지(mounting medium)와 함께 글라스 슬라이드에 탑재하였다. TUNEL-양성(녹색)과 DAPI(파란색) 염색 패턴은 공초점 레이저 주사 현미경(Fluoview FV 1000, Olympus, Japan)을 사용하여 획득하였다.

1.11. 데이터 분석

데이터는 3중으로 수행된 실험(n=3)의 평균±표준편차로 표현하였다. 통계상 차이는 ANOVA(one-way analysis of variance) 수행 후, student t-test를 사용하여 평가하였다. 통계상의 차이는 $P < 0.05$ 의 레벨에서 통계적으로 유의하다고 간주하였다. * 또는 ** 표시는 대조군과 비교하여 각각 $P > 0.05$ 또는 $P > 0.01$ 의 유의성 있는 차이를 나타낸다. # 또는 ## 표시는 Aβ 처리군과 비교하여 각각 $P > 0.05$ 또는 $P > 0.01$ 의 유의성 있는 차이를 나타낸다.

2. 실험 결과

2.1. 안토시아닌이 함유된 나노입자의 제조 및 특성

안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나노입자(An-NPs)는 유화-용매 증발 방법(emulsification-solvent evaporation technique)을 통해 제조하였으며, TEM 및 SEM을 이용하여 형태학적인 조사를 한 결과, 도 1의 (A) 내지 (C)에서 보는 바와 같이, 평균 지름 120-165 nm의 매끄러운 구형 모양의 형상을 나타내었다.

2.2. 안토시아닌 및 나노입자 사이의 상호 작용 확인

안토시아닌과 나노입자 사이의 물리적인 상호 작용은 FT-IR 분석을 통해 확인하였다. 최종 생성물의 구조적 조성을 확인하기 위해 안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나노입자(An-NPs) 및 그의 전구체인 PLGA-PEG, 및 안토시아닌의 FT-IR 스펙트럼을 기록하였다. 도 2의 (A) 내지 (C)는 각각 안토시아닌, PLGA-PEG 나노입자 및 안토시아닌이 함유된 나노입자(An-NPs)의 전형적인 FT-IR 스펙트럼을 나타낸다.

상기 스펙트럼에서, 특성 흡수 피크가 NPs로 마스크 한 An-NPs의 어떠한 특징적인 피크도 구별되지 않았다.

2.3. 입자 크기 및 제타 전위

평균 입자 크기 및 제타 전위는 각각 DLS 와 ELS 분석에 의해 측정하였다. DLS 측정으로부터 결정된 나노입자의 평균 지름은 165 nm로서, 낮은 다분산 지수(polydispersity index)를 나타내었으며, 이는 거의 단분산성(monodispersed) 나노입자의 형성을 의미한다(도 3). 이러한 결과는 도 1의 TEM 및 SEM에 의한 형태학적 분석을 통한 결과를 지지하는 것이다. DLS 분석 및 현미경 관찰을 통해 나노입자의 한정된 크기 분포를 확인할 수 있었다. 한편, ELS에 의해 측정한 상기 제조된 나노입자의 제타전위는 -12 mV이었다.

2.4. 약물 함유 및 인 비트로 약물 방출

안토시아닌은 친수성 약물을 캡슐화하는 고분자 나노입자의 가능성을 평가하기 위한 모델 약물로서 이용하였다. 페길화(PEGylated)된 나노입자로부터 안토시아닌의 생체 이용 가능성 및 제어된 방출의 연구를 위해, 상기 약물을 PLGA-PEG 나노입자 내에 캡슐화하였으며, 이에 대한 방출 동역학을 인 비트로에서 확인하였다. 도 4는 37℃의 PBS에서 안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나노입자의 인 비트로 방출 프로파일을 나타낸다. 안토시아닌은 PLGA 및 안정제인 PEG-2000에 기반한 생분해성 나노입자 체형에서 60%의 효율로 캡슐화되었으며, 인 비트로에서 2상성(biphase)의 방출 프로파일을 나타내었다. 페길화된 모든 나노입자는 초기에 나노입자로부터 폭발적인 약물의 방출을 보인 후 지속적인 방출을 하는 유사한 방출 프로파일을 나타낸다. 약물의 일정한 양이 나노입자의 표면에 흡수되거나, 내부 폴리머 코어에 느슨하게 결합될 수 있으며, 이러한 현상은 배양의 초기 단계 동안에 사라지게 되는데, 이는 약물의 초기 폭발적인 방출을 의미한다. 코어 영역에서 강하게 캡슐화된 약물은 느리고 지속적인 방출 동역학을 따르게 된다. 반면, 거의 모든 유리(free) 안토시아닌은 3시간 이내에 배지로 방출됨을 확

인할 수 있었다. 이러한 결과는 PLGA-PEG 나노입자가 안토시아닌의 방출을 효과적으로 확장시키며, 친수성 약물의 전달 제어에 사용될 수 있다는 것을 의미한다.

2.5. 인 비트로 세포독성(MTT 어세이)

나노입자의 세포독성 프로파일은 MTT 어세이를 사용하여 정상적인 SHSY-5Y 세포에서 확인하였다. PLGA-PEG 나노입자, 안토시아닌 및 안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나노입자(An-NPs) 테스트 샘플 각각에 대하여 4종의 서로 다른 농도를 사용하였다. 각각의 어세이 시약은 24시간 동안 상기 세포 및 나노입자를 배양한 후 첨가하였다. 실험 결과, 안토시아닌이 함유된 PLGA-PEG 나노입자는 정상 SHSY-5Y 세포에 어떠한 세포독성 효과를 나타내지 않았으며, 도 5의 (A)에서 보는 바와 같이, 실험한 농도에서 85-95%의 생존율을 나타내었다. 이는, PLGA 및 PEG 폴리머가 FDA에서 승인한 안정적인 물질이기 때문인 것으로 해석되며, 이에, PLGA-PEG 나노입자는 세포독성이 거의 없는 유망한 약물 운반체로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

2.6. 인 비트로에서 $A\beta$ -유도된 신경독성에 대한 안토시아닌이 함유된 나노입자의 효과

인 비트로에서 $A\beta_{1-42}$ 에 대한 An-NPs의 신경보호 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 SHSY-5Y 세포 생존성/세포독성 및 세포 사멸(세포 사멸 마커 caspase-3/7 사용함)을 Apo-Tox Glo 어세이를 통해 측정하였다. $A\beta_{1-42}$ 처리는 살아있는 SHSY-5Y 세포 숫자의 현저한 감소를 초래하였으나, caspase-3/7의 세포독성과 활성화는 대조군에 비해 현저히 증가하였다. 반면, 안토시아닌 또는 An-NPs를 처리한 결과, $A\beta_{1-42}$ 의 신경독성 효과를 현저히 감소시켰으며, 세포 생존성이 향상되고, 세포독성 및 caspase-3/7 활성이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 결과로부터 단독으로 안토시아닌이 처리된 군과 비교할 때, An-NPs를 처리한 경우 더욱 현저한 신경보호 효과를 나타낸다는 사실을 확인할 수 있었다(도 5의 (B)).

2.7. SHSY-5Y 세포에 의한 나노입자의 세포 내 흡수

SHSY-5Y 세포에 의한 나노입자의 세포 내 흡수를 평가하기 위해 CLSM 분석을 수행하였다. 세포 내 보존 정도를 확인하기 위해, 로다민(rhodamine)이 함유된 나노입자를 배양된 SHSY-5Y 세포에 4시간 및 12시간 동안 처리하였다. 그 결과, 로다민이 함유된 나노입자는 시간 의존적으로 SHSY-5Y 세포에 효과적으로 흡수되는 것을 확인할 수 있었다. 도 6에서 나타낸 바와 같이, 나노입자의 흡수는 단시간(4시간) 동안 배양된 세포에 비해 장시간(12시간) 동안 배양된 세포에서 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 일정한 시간 간격 동안 세포가 배양될 때 나노입자의 흡수가 이루어짐을 나타낸다.

2.8. SHSY-5Y 세포에서 $A\beta$ -유도된 단백질 수준의 세포 사멸 마커(Bax, Bcl-2, caspase-3)에 대한 안토시아닌의 효과

Bcl-2 단백질 패밀리는 세포 내 세포 사멸 신호 전달에 있어서 결정적인 역할을 수행한다. 미토콘드리아를 통한 세포 사멸(mitochondrial apoptosis)은 세포 사멸을 막는(antiapoptotic) 단백질인 Bcl-2 및 세포 사멸을 유도하는(proapoptotic) 단백질인 Bax를 포함하는 단백질 패밀리에 의해 조절된다. 실험 결과, $A\beta_{1-42}$ 의 처리는 대조군과 비교할 때, Bcl-2의 발현이 현저히 감소하고, Bax의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도, 안토시아닌과 An-NPs는 $A\beta_{1-42}$ -유도된 Bcl-2 및 Bax 단백질의 발현 수준을 현저하게 반전시켰다. caspase(caspase)의 활성화는 신경세포를 사멸시키기 때문에, 세포 사멸의 주요한 실행 단백질로 간주되는 시스템 프로테아제이다. $A\beta_{1-42}$, 유리 안토시아닌 및 An-NPs 처리 이후 caspase-3 단백질의 발현 수준을 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 그 결과, $A\beta_{1-42}$ 의 투여는 SHSY-5Y 세포에서 caspase-3의 단백질 수준을 현저하게 증가시켰다. 다른 실험 결과와 일치하게, 안토시아닌 및 $A\beta_{1-42}$ 과 함께 처리한 An-NPs는 caspase-3의 수준을 상당히 감소시킴을 확인할 수 있었다(도 7). 또한, An-NPs는 $A\beta_{1-42}$ 를 처리한 SHSY-5Y 세포주에서 안토시아닌과 비교할 때, Bax 및 caspase-3의 발현을 더욱 활발하게 억제함을 확인할 수 있었다.

[0082] **2.9. SHSY-5Y 세포에서 A β -유도된 신경퇴행에 대한 안토시아닌이 함유된 나노입자의 효과**

[0083] A β ₁₋₄₂-유도된 신경 세포의 사멸의 형태학적 평가를 위해, SHSY-5Y 세포에서 각각의 약물 처리 후 TUNEL 및 DAPI 염색법을 이용하여 안토시아닌 및 An-NPs의 항세포사멸 효과를 조사하였다. 그 결과, A β ₁₋₄₂의 처리는 대조군과 비교하여 TUNEL 양성 세포의 수가 증가하는 것으로 확인되었다. A β ₁₋₄₂의 처리 후, 안토시아닌 또는 An-NPs에 노출한 결과, A β ₁₋₄₂의 처리군과 비교하여 SHSY-5Y 세포주에서 TUNEL 양성 세포의 수가 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(도 8). 또한, SHSY-5Y 세포에서 An-NPs는 A β ₁₋₄₂-유도된 신경퇴행에 대하여 안토시아닌에 비해 훨씬 높은 보호 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

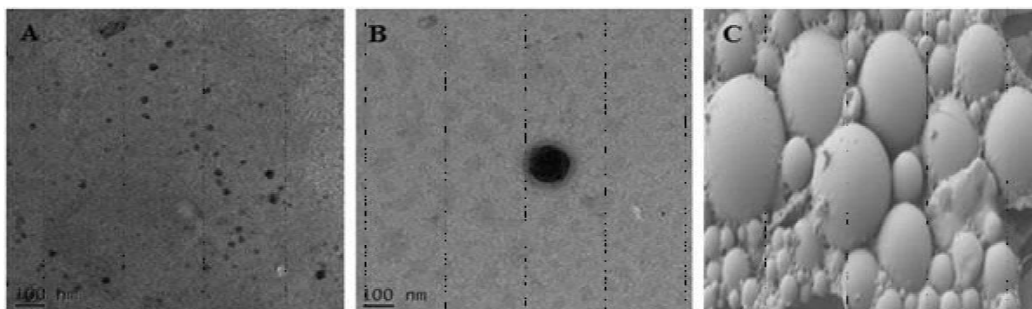
[0085] **2.10. SHSY-5Y 세포에서 A β -유도된 알츠하이머 마커(A β , APP, BACE-1)의 단백질 수준에서 안토시아닌의 효과**

[0086] 아밀로이드 베타의 증착은 알츠하이머 질환의 발병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명자들은 A β ₁₋₄₂ 처리 후 An-NPs의 항-알츠하이머 효과를 확인하였다. A β ₁₋₄₂가 처리된 SHSY-5Y 세포에 A β , APP 및 BACE-1과 같은 알츠하이머 마커의 단백질 발현 수준을 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, A β ₁₋₄₂를 처리하였을 때, 대조군과 비교하여 A β , APP 및 BACE-1의 발현 수준이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 반면, 안토시아닌 및 An-NPs를 처리하였을 때, A β ₁₋₄₂ 처리군과 비교하여 A β , APP 및 BACE-1의 발현 수준이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(도 9). 이러한 결과들로 볼 때, 안토시아닌 및 An-NPs는 잠재적으로 항-세포사멸 및 항-알츠하이머의 특성을 가질 수 있다는 것을 확인할 수 있었으며, An-NPs는 상기 효과에 있어서 안토시아닌 자체에 비해 더욱 그 가능성이 크다는 점을 나타낸다. 이러한 결과는 안토시아닌이 함유된 나노입자(An-NPs)가 안토시아닌 자체에 비해 더욱 효과적으로 현저한 신경보호 활성을 갖는다는 것을 의미한다.

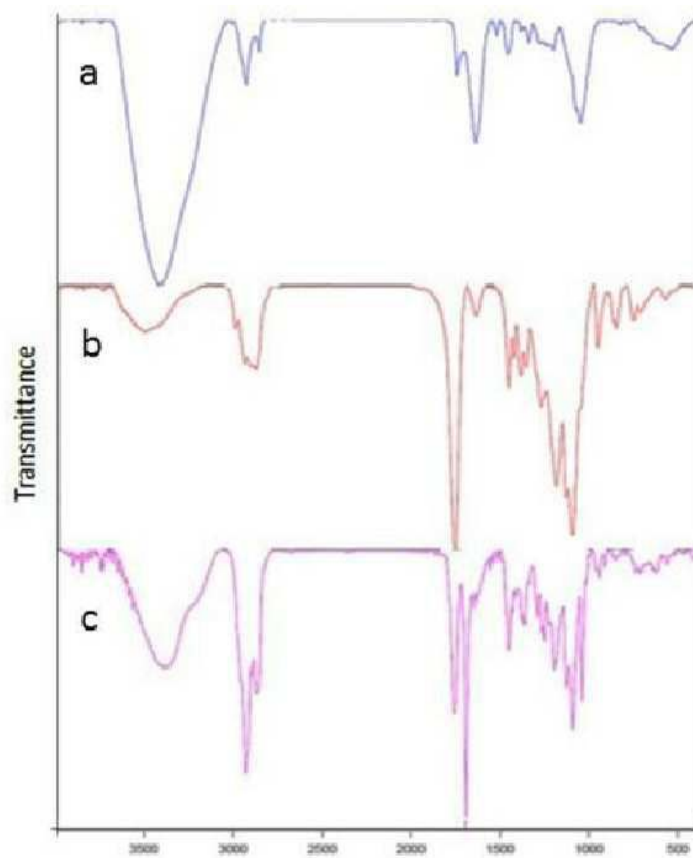
[0088] 이상에서 본 발명에 따른 바람직한 실시예가 설명되었으나, 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다는 점을 이해할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 첨부된 특허청구범위에 의해서 정해져야 할 것이다.

도면

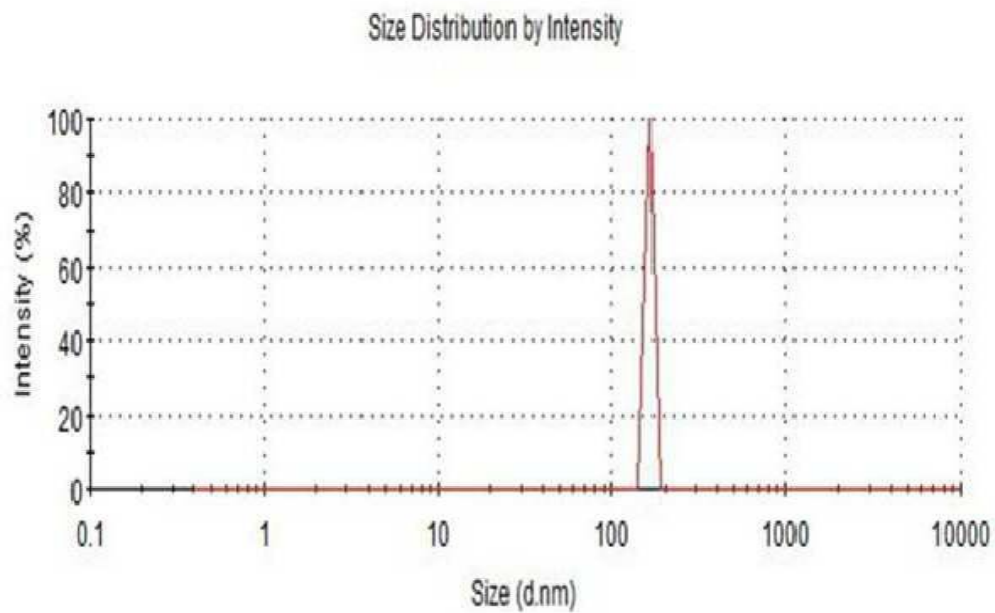
도면1



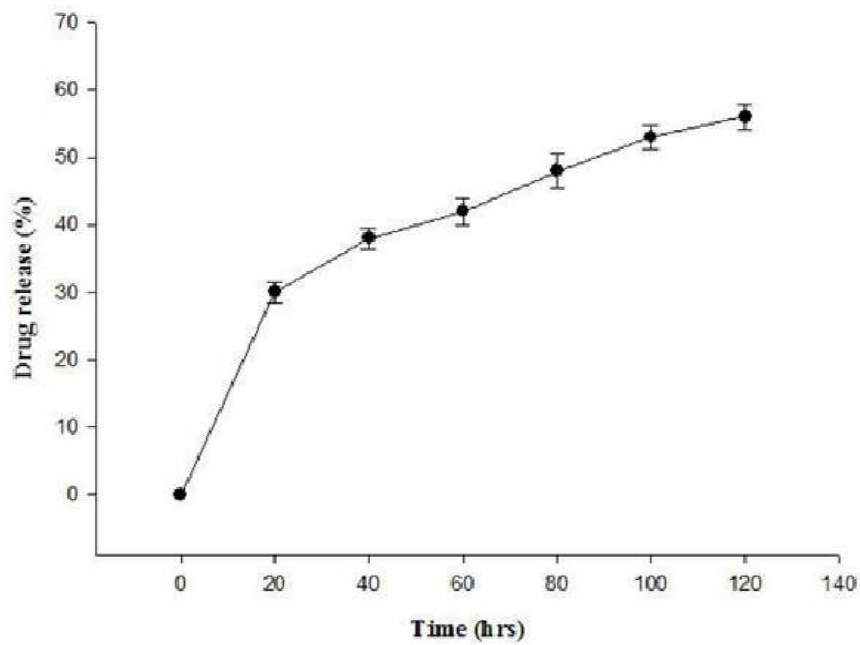
도면2



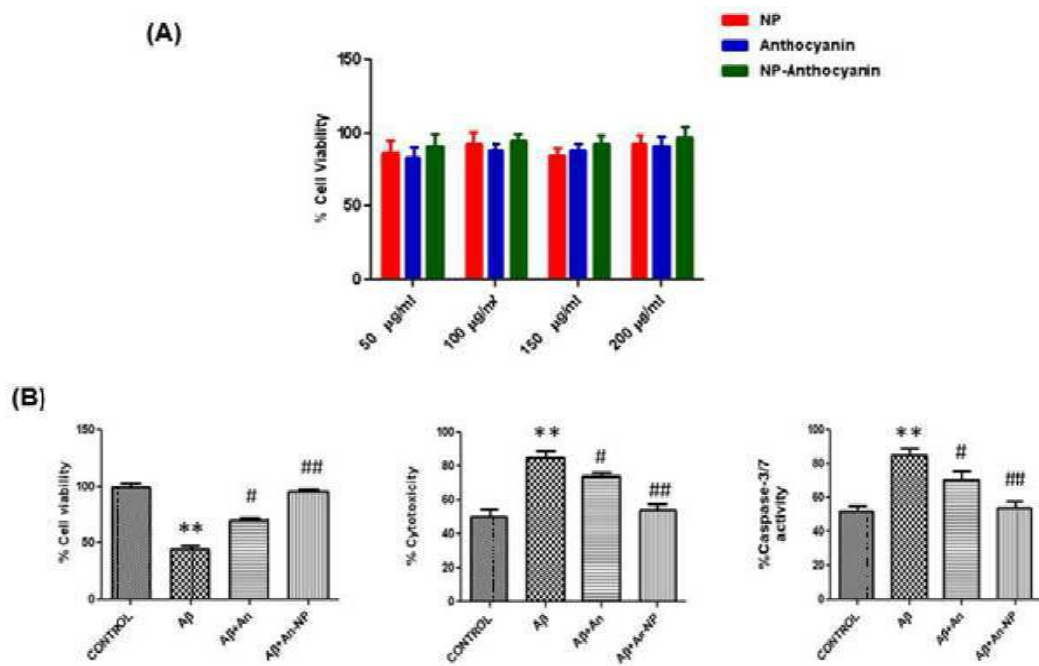
도면3



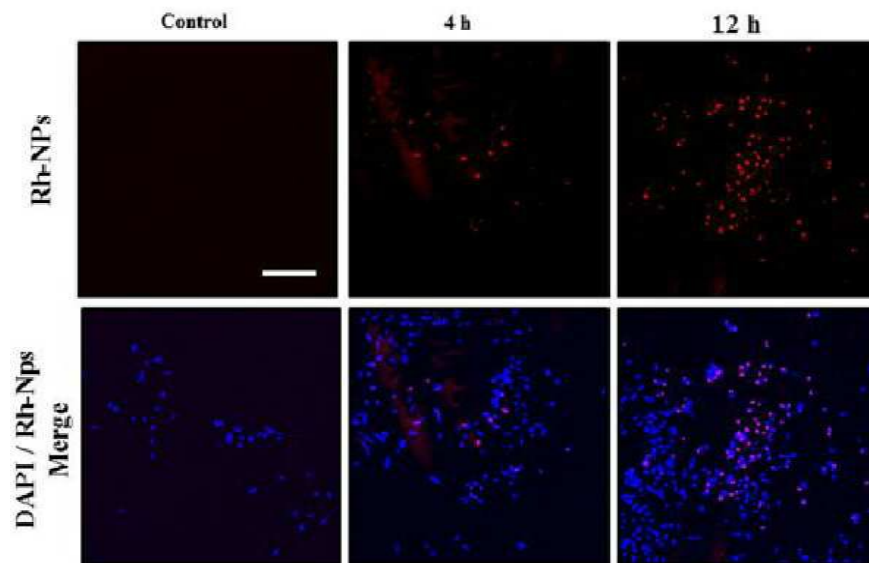
도면4



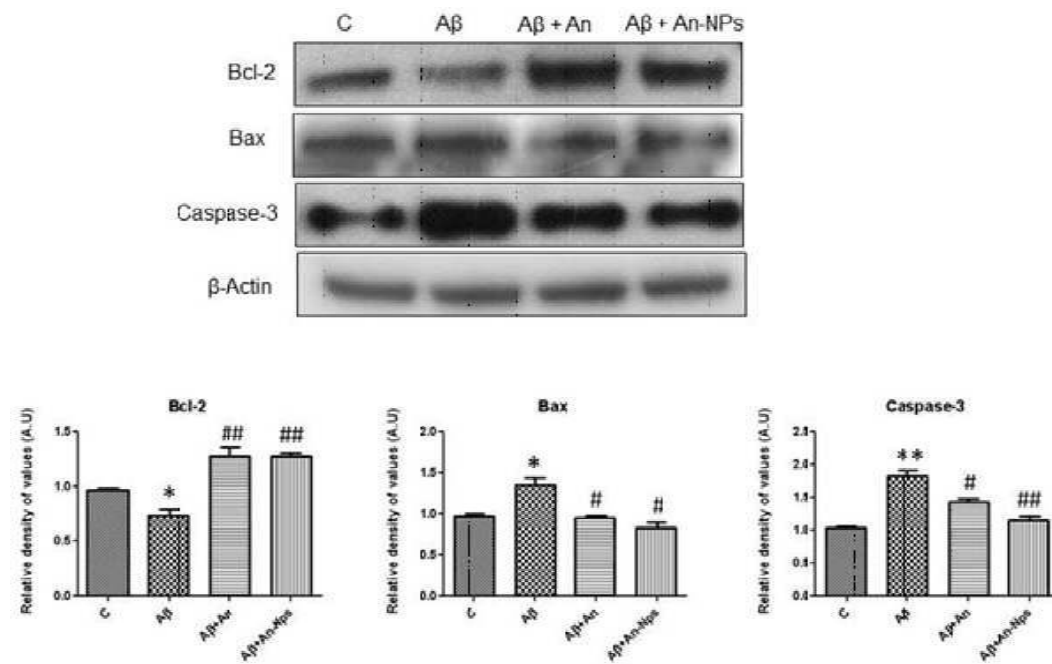
도면5



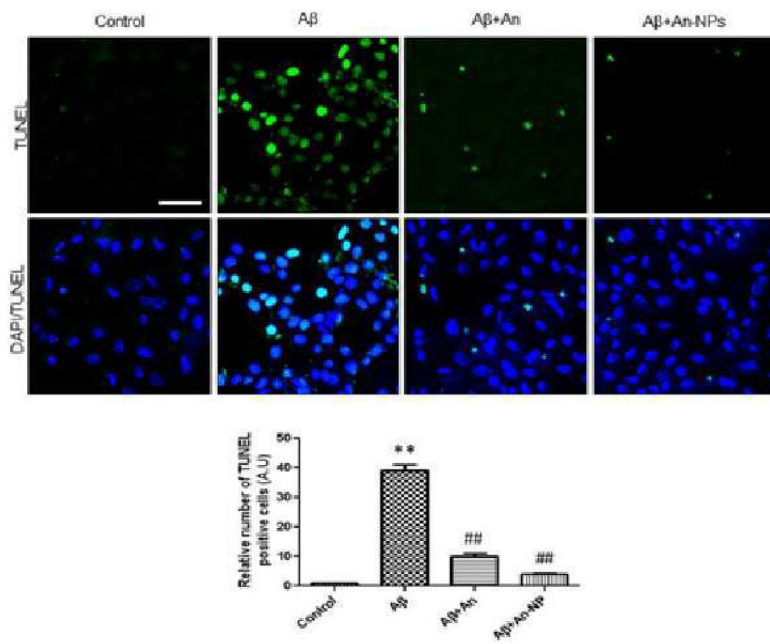
도면6



도면7



도면8



도면9

