



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월27일
(11) 등록번호 10-1720458
(24) 등록일자 2017년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/08 (2006.01) A61K 31/12 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
C08G 65/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08B 37/003 (2013.01)
A61K 31/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0036848
(22) 출원일자 2016년03월28일
심사청구일자 2016년03월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR101484441 B1

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최준식
대전광역시 유성구 엑스포로123번길 65-38, 203동 1102호(도룡동, 스마트시티 아파트)
멀리 수딕타
대전광역시 유성구 한밭대로313번길 40, 102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 10 항

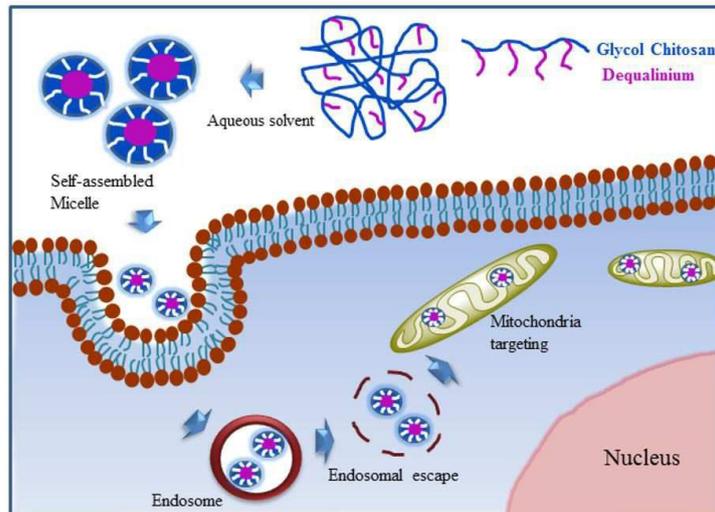
심사관 : 여경숙

(54) 발명의 명칭 글리콜키토산-디쿠알리늄 자가조립 중합체 미셀, 이의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 글리콜키토산-디쿠알리늄 자가조립 중합체성 미셀, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 글리콜키토산-디쿠알리늄(GC-DQA) 중합체로 형성되는 미셀은 대조군 DQAsome에 비하여 세포독성이 현저히 낮고, 소수성 약물을 미셀 내부에 용이하게 탑재할 수 있으며, 상온 및 냉장 보관 상태에서 장기간 안정하게 유지되고, 미토콘드리아 타겟팅 효과가 우수하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/127 (2013.01)

A61K 9/16 (2013.01)

C08G 65/48 (2013.01)

C08J 3/12 (2013.01)

(72) 발명자

송수정

경상북도 포항시 북구 학산로59번길 7, 3동 205호
(학산동, 코롱아파트)

배윤희

대전광역시 중구 목중로 69, 306동 1904호(중촌동,
하늘아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2064737

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)

연구과제명 합성 및 생체고분자를 이용한 치료용 생체모사 고분자 나노입자 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

디쿠알리니움(Dequalinium) 및 글리콜키토산이 메틸아크릴레이트 링커로 결합된 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체는 미토콘드리아 표적성인 것을 특징으로 하는 중합체.

청구항 4

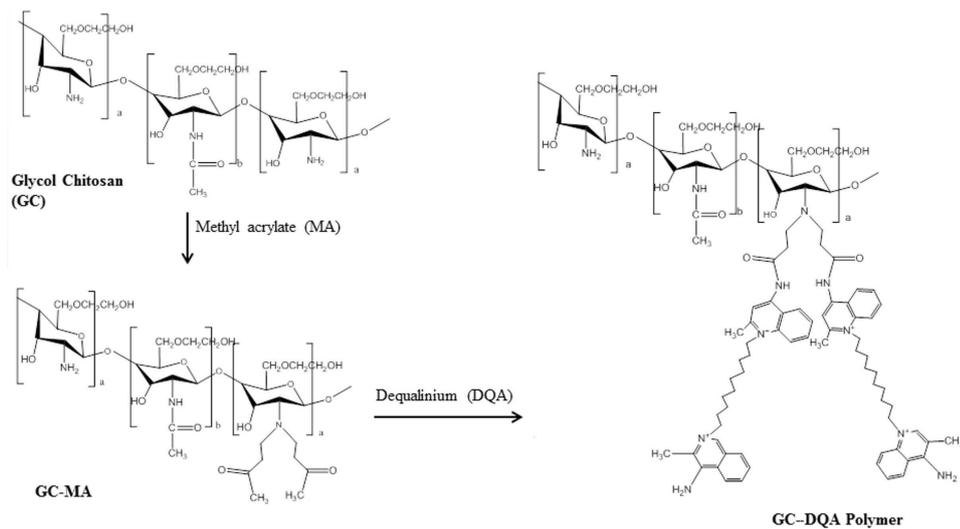
하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

용매에서 글리콜키토산(GC)의 아민기에 메틸아크릴레이트(MA)를 마이클 첨가 반응시켜 글리콜키토산-메틸아크릴레이트(GC-MA)를 준비하는 단계(단계 1); 및

단계 1에서 준비한 GC-MA를 디쿠알리니움(DQA) 클로라이드와 반응시켜 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체를 제조하는 단계(단계 2);

를 포함하는 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체의 제조방법:

[반응식 1]



상기 반응식 1에서,

a 및 b는 독립적으로 1-100000의 정수이다.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 아세톤, DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethyl sulfoxide), 아세토니트릴 및 THF(Tetrahydrofuran)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항의 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체로 형성되는 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 미셀은 내부에 소수성 약물을 탑재하는 것을 특징으로 하는 미셀.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 소수성 약물은 커큐민인 것을 특징으로 하는 미셀.

청구항 9

제6항의 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀을 포함하는 약물전달체.

청구항 10

제6항의 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀 내부에 커큐민이 탑재된 약물전달체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 암은 자궁경부암, 간암, 위암, 유방암, 폐암, 뇌암, 신경교종, 전립선암, 자궁암 또는 피부암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

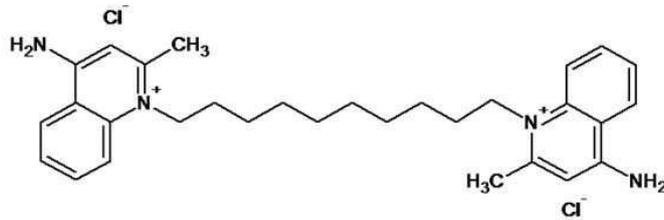
[0001] 본 발명은 글리콜키토산-디쿠알리니움 자가조립 중합체성 미셀, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 용도로는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 약물전달체로서 사용될 수 있다.

배경 기술

[0003] 환경과 사회적인 변화에 따른 바이오 의약 분야의 기술은 세대가 지날수록 더욱 발전해나가고 있다. 최근에는 치료용 유전자 전달체나 약물 전달체의 개발이 활발히 진행되고 있다.

[0005] 본 발명에서 사용한 디쿠알리니움(dequalinium)은 리포솜(liposome) 형태의 DQAsome™으로 응용되어 다양한 유전자 전달 시스템으로 주로 연구되어왔다. 디쿠알리니움은 기능적으로 항균, 항암제로 쓰이며 말라리아 치료제로 사용되고, 미토콘드리아에 효과적으로 위치하는 것으로 알려진 화합물이다. 또한, 구조적으로는 열개의 소수

성 메틸렌 체인에 의해 두 개의 친수성 퀴날디니움(quinaldinium) 유닛이 연결된 bolaform 형태를 갖고 있다. 디쿠알리니움은 퀴날디니움의 아미드기가 양이온을 띄는 cationic bola-amphiphile으로, bolaform surfactant 로도 알려져 있어, 에멀션의 유화제로 효율적인 역할을 할 수 있다.



[0006]

[0008]

커큐민(Curcumin)은 울금(curcuma longa Linn)의 뿌리에서 추출된 물질로, 구조적으로는 링 구조의 페놀과 불포화의 카보닐기를 포함하는 소수성의 폴리페놀 물질이다. 또한, 항산화와 항염증 작용을 하며 항종양, 항아밀로이드 작용을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 소수성의 커큐민은 수용액에 쉽게 용해되지 않는 반면, 오일상(oil phase)에 쉽게 용해되어 미토콘드리아 표적의 약물 전달이 가능하게 될 것이다.

[0010]

글리콜키토산은 친수성 및 무독성을 나타내는 물질로서 잘 알려져있다.

[0012]

본 발명의 발명자들은 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체로 형성되는 미셀이 종래의 DQAsome에 비하여 세포독성이 현저히 낮고, 소수성 약물을 미셀 내부에 용이하게 탑재할 수 있으며, 상온 및 냉장 보관 상태에서 장기간 안정하게 유지되고, 미토콘드리아 타겟팅 효과가 우수한 것을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014]

(특허문헌 0001) 미국공개특허 2001/0001067A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015]

본 발명의 목적은 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체를 제공하는 것이다.

[0017]

본 발명의 다른 목적은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0019]

본 발명의 또 다른 목적은 소수성 약물 탑재 디쿠알리니움 에멀션의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0021]

본 발명의 다른 목적은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체로 형성되는 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀을 제공하는 것이다.

[0023]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀을 포함하는 약물전달체를 제공하는 것이다.

[0025]

본 발명의 다른 목적은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀 내부에 커큐민이 탑재된 약물전달체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0027]

상기 목적을 달성하기 위하여,

[0028]

본 발명은 디쿠알리니움(Dequalinium) 및 글리콜키토산이 링커로 결합된 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체를 제공한다. 여기서, 상기 링커는 메틸아크릴레이트 동일 수 있다.

[0030]

또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

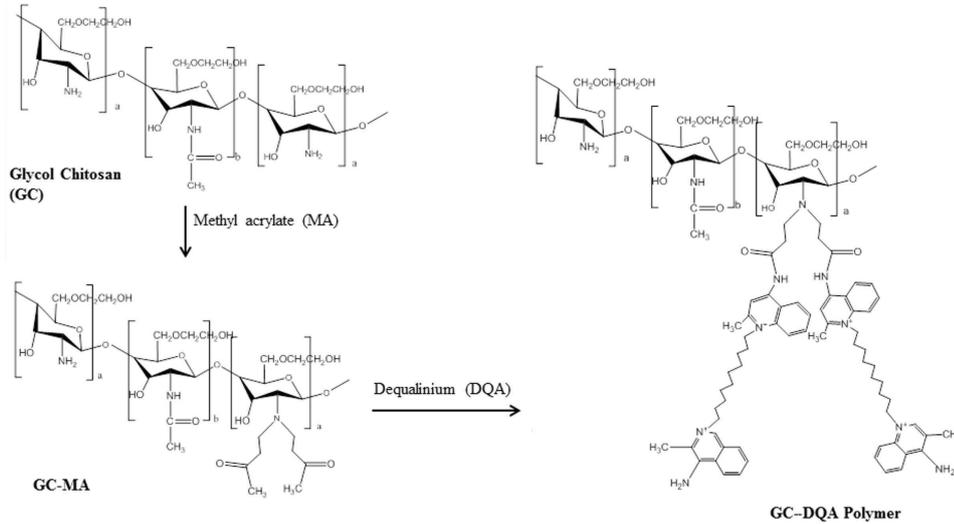
[0031]

용매에서 글리콜키토산(GC)의 아민기에 메틸아크릴레이트(MA)를 마이클 첨가 반응시켜 글리콜키토산-메틸아크릴레이트(GC-MA)를 준비하는 단계(단계 1); 및

[0032] 단계 1에서 준비한 GC-MA를 디쿠알리니움(DQA) 클로라이드와 반응시켜 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체를 제조하는 단계(단계 2);

[0033] 를 포함하는 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체의 제조방법을 제공한다.

[0034] [반응식 1]



[0035]

[0036] 상기 반응식 1에서,

[0037] a 및 b는 독립적으로 1-100000의 정수이다.

[0039] 나아가, 본 발명은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체로 형성되는 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀을 제공한다. 여기서, 상기 미셀은 내부에 소수성 약물을 탑재할 수 있고, 상기 소수성 약물의 예로는 커큐민을 들 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀을 포함하는 약물전달체를 제공한다.

[0043] 나아가, 본 발명은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀 내부에 커큐민이 탑재된 약물전달체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 여기서, 상기 암은 자궁경부암 또는 간암일 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명에 따른 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체로 형성되는 미셀은 대조군 DQAsome에 비하여 세포독성이 현저히 낮고, 소수성 약물을 미셀 내부에 용이하게 탑재할 수 있으며, 상온 및 냉장 보관 상태에서 장기간 안정하게 유지되고, 미토콘드리아 타겟팅 효과가 우수하다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은 자가조립 GC-DQA 미셀 및 이의 미토콘드리아 표적 단계를 나타낸 구성도이다.
- 도 2는 실시예 1에서 제조한 GC-DQA 중합체의 합성과정을 단계별로 나타낸 이미지이다.
- 도 3은 글리콜키토산(GC), 디쿠알리니움(DQA) 클로라이드 및 실시예 1의 GC-DQA 중합체에 대한 ¹H NMR 데이터이다.
- 도 4는 글리콜키토산(GC), 디쿠알리니움(DQA) 클로라이드 및 실시예 1의 GC-DQA 중합체에 대한 FT-IR 데이터이다.
- 도 5는 GC-DQA 미셀의 (a) AFM 이미지 및 (b) FE-SEM 이미지이다.
- 도 6은 (a) Nile Red 탑재 GC-DQA 중합체 농도에 따른 형광 강도를 측정된 그래프와, (b) GC-DQA 중합체의 임계 응집농도를 나타내는 형광 강도(좌측 Y축)와 DLS(dynamic light scattering) 크기(우측 Y축)를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 GC-DQA 중합체, 대조군 글리콜키토산(GC) 및 대조군 DQAsome(비교예 1)의 세포독성을 MTT 평가 및 LDH

평가로 확인한 결과이다(위: HDF cells, 아래: HeLa cells).

도 8은 HeLa cells에서 Nile Red 로딩 GC-DQA 미셀의 미토콘드리아 타겟팅을 보여주는 공초점 주사 레이저 현미경 이미지이다.

도 9는 HeLa cells에서 Nile Red 탑재 GC-DQA의 리소솜 탈출을 보여주는 공초점 주사 레이저 현미경 이미지이다.

도 10은 커큐민과 GC-DQA에 탑재된 커큐민 제형의 사진이다.

도 11은 HeLa cells에서 GC-DQA에 탑재된 커큐민과 일반 커큐민(Free Curcumin)의 세포독성을 나타낸 그래프이다.

도 12는 GC-DQA에 탑재된 커큐민(GC-DQA Curcumin) 및 여러 대조군을 JC-1으로 염색하여, HeLa cells에서 미토콘드리아 막의 전위변동을 보여주는 공초점 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0051]

글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체

[0052]

본 발명은 디쿠알리니움(Dequalinium) 및 글리콜키토산이 링커로 결합된 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체를 제공한다.

[0053]

상기 링커는 메틸아크릴레이트(사용가능한 링커 모두 기재) 동일 수 있다.

[0054]

본 발명에 따른 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체는 미토콘드리아 표적성인 것을 특징으로 한다.

[0056]

본 발명에 따른 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체로 형성되는 미셀은 대조군 DQAsome에 비하여 세포독성이 현저히 낮고, 소수성 약물을 미셀 내부에 용이하게 탑재할 수 있으며, 상온 및 냉장 보관 상태에서 장기간 안정하게 유지되고, 미토콘드리아 타겟팅 효과가 우수하다.

[0058]

제법

[0059]

본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0060]

용매에서 글리콜키토산(GC)의 아민기에 메틸아크릴레이트(MA)를 마이클 첨가 반응시켜 글리콜키토산-메틸아크릴레이트(GC-MA)를 준비하는 단계(단계 1); 및

[0061]

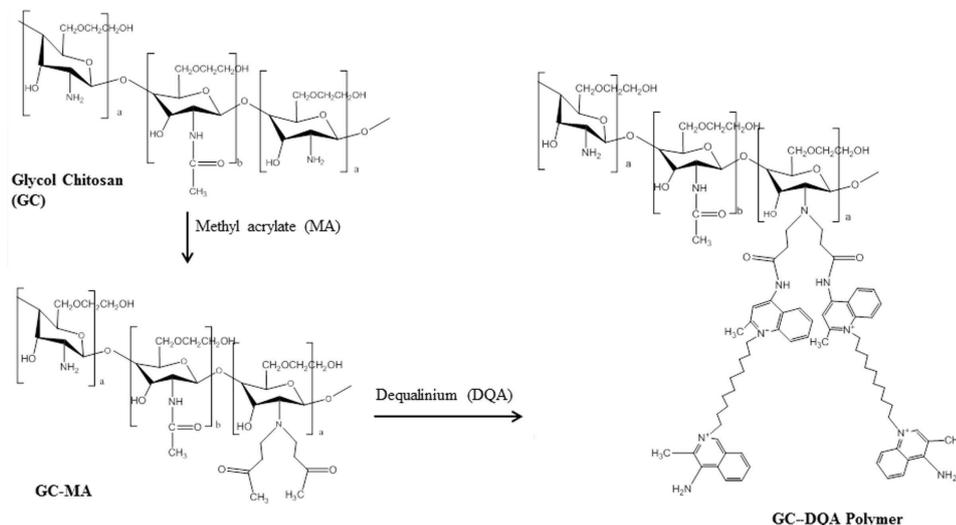
단계 1에서 준비한 GC-MA를 디쿠알리니움(DQA) 클로라이드와 반응시켜 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체를 제조하는 단계(단계 2);

[0062]

를 포함하는 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체의 제조방법을 제공한다.

[0063]

[반응식 1]



[0064]

- [0065] 상기 반응식 1에서,
- [0066] a 및 b는 독립적으로 1-100000의 정수이다.
- [0068] 본 발명에 따른 제법에 있어서, 상기 단계 1은 용매에서 글리콜키토산(GC)의 아민기에 메틸아크릴레이트(MA)를 마이클 첨가 반응시켜 글리콜키토산-메틸아크릴레이트(GC-MA)를 준비하는 단계이다.
- [0069] 상기 용매로는 물, 메탄올, 에탄올, 아세톤, DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethyl sulfoxide), 아세토니트릴, THF(Tetrahydrofuran) 등을 사용할 수 있고, 바람직하게는 물 및 에탄올을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0070] 반응온도는 20-60℃, 바람직하게는 30-40℃일 수 있고, 반응시간은 1-5일, 바람직하게는 2-4일이다.
- [0072] 본 발명에 따른 제법에 있어서, 상기 단계 2는 단계 1에서 준비한 GC-MA를 디쿠알리니움(DQA) 클로라이드와 반응시켜 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체를 제조하는 단계이다.
- [0073] 반응온도는 20-60℃, 바람직하게는 30-40℃일 수 있고, 반응시간은 1-5일, 바람직하게는 2-4일이다.
- [0075] **글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀**
- [0076] 본 발명은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 중합체로 형성되는 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀을 제공한다.
- [0077] 상기 미셀은 내부에 소수성 약물을 탑재할 수 있고, 상기 소수성 약물로는 커큐민 등을 탑재할 수 있다.
- [0079] **약물전달체**
- [0080] 본 발명은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀을 포함하는 약물전달체를 제공한다.
- [0082] **약학적 조성물**
- [0083] 본 발명은 상기 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 미셀 내부에 커큐민이 탑재된 약물전달체를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0084] 상기 암은 자궁경부암, 간암, 위암, 유방암, 폐암, 뇌암, 신경교종, 전립선암, 자궁암, 피부암 등일 수 있다.
- [0086] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0088] **재료**
- [0089] 글리콜키토산(≥ 60%, titration, crystalline), 메틸아크릴레이트(99%), 메탄올(anhydrous 99.8%), 디쿠알리니움 클로라이드 수화물(≥ 95%), 및 3-(4,5-디메틸티아졸-2일)-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드 (MTT)는 Sigma Aldrich(서울, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 커큐민(95%)는 Alfa Aesar(서울, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. LDH 세포독성 평가 키트는 Daeillab service(서울, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum), 100× 항생제-항진균제(antibiotic-antimycotic reagent)는 Gibco (Gaithersburgs, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 초고순도 증류수(DW; Innovation Pure Water System)를 모든 용액 제조 및 실험에 사용하였다.
- [0091] **<실시예 1> 글리콜키토산-디쿠알리니움 (GC-DQA) 중합체의 제조**
- [0092] 글리콜키토산을 메틸아크릴레이트와 마이클첨가반응(Michael addition reaction)시켜 글리콜키토산-디쿠알리니움 중합체를 제조하였다.
- [0093] 구체적으로, 글리콜키토산 (10 mg)을 증류수 (DW, 5 mL)에 용해시킨 용액을 준비하였다. 다음으로, 둥근바닥 플라스크에 100배 과량의 메틸아크릴레이트를 무수 메탄올 (45 mL)과 혼합한 다음, 상기에서 준비한 글리콜키토산 용액을 점적 첨가하였다. 반응은 37℃의 불활성 분위기하에서 3일간 반응하였다. 다음으로, 메탄올과 과량의 메틸아크릴레이트는 감압하에 증발시키고, 24시간 투석하여 정제하였다. 상기 결과의 글리콜키토산-메틸아크릴레이트(5 mL in DW)를 20배 과량의 디쿠알리니움 클로라이드 (45 mL in MeOH)에 첨가하여 3일간 불활성 분위기하에서 반응시켰다. 다음으로, 셀룰로오즈 막 (MWCO = 1kD)을 이용하여 3일간 투석하여(against MeOH/DW (1:0, 1:1, 0:1 v/v)) 목적의 글리콜키토산-디쿠알리니움(GC-DQA) 양친매성 중합체 용액을 얻었다. 상기 GC-DQA 중합체 용액을 동결건조하여 백색의 시료를 얻었다.
- [0095] **<실시예 2> Nile Red (dye) 및 커큐민 로딩 GC-DQA 미셀의 제조**

- [0096] 커큐민/염료 로딩 GD-DQA 미셀은 간단한 투석 방법을 이용하여 제조하였다. 구체적으로, 커큐민/Nile Red (500 μ M)이 용해된 무수 메탄올을 실시예 1에서 제조한 5 mg의 GC-DQA가 용해된 증류수와 혼합하였다. MeOH/DW (9:1) 용액을 최종 용량이 2.5 mL이 되도록 모든 제형에 사용하였다. 상기 제조된 용액을 2분간 초음파처리한 다음, 투석막(MWCO = 1kD)을 이용하여 12시간 동안 투석(against 물)하였다. 잔류 커큐민을 제거하기 위해서, 상기에서 얻은 용액을 시린지필터(0.8 μ m pore size)로 여과하여 얻은 커큐민/염료 로딩 미셀을 동결건조하고 커큐민 표준곡선을 이용하여 커큐민 농도를 결정하였다.
- [0098] <비교예 1> 디쿠알리니움 리포솜 (DQAsome™)의 제조
- [0099] 대조군으로 이용한 DQAsome은 알려진 제조 방법을 참고하였다. 메탄올 5mL과 디쿠알리니움 0.0528g을 등근바닥 플라스크 정량해 넣어 디쿠알리니움을 완전히 녹인 다음 진공 펌프를 이용하여 메탄올 용매를 모두 날려주었다. 그 다음, HEPES buffer (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) (pH7.4, 5mM) 5mL을 넣고 25℃ 이하에서 1시간 동안 초음파처리하였다. 초음파처리가 끝난 후 10,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 용해되지 않은 디쿠알리니움을 제거하였다. 제조한 DQAsome은 0.8 μ m 여과장치로 여과하여 유리시약병에 상온에서 보관하였다.
- [0101] <실험예 1> 글리콜키토산-디쿠알리니움 (GC-DQA) 중합체의 동정
- [0102] 실시예 1에서 제조한 GC-DQA 중합체를 ^1H NMR으로 확인하였다.
- [0103] 구체적으로, 글리콜키토산(GC), 디쿠알리니움(DQA) 및 GC-DQA 중합체를 D_2O , 메탄올-d4 및 D_2O /메탄올-d4 (1:1 v/v) 각각에 용해하여, ^1H NMR (400 MHz) 시료를 준비하였다. 컨주게이션 수율은 각각의 재료 피크에 기초하여 계산하였다. 자가조립 나노입자의 크기는 입자크기분석기 ELS-Z (Photal, Otuka Electronics, Japan)를 통한 동적 광산란 테크닉(dynamic light scattering technique) 및 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK)를 이용한 제타 전위로 결정하였다. GC(글리콜키토산) 및 DQAsome(비교예 1)을 대조군으로 사용하였다. 측정은 25℃에서 증류수에 총 시료 1 mg/mL 농도로 수행하였다. 모든 측정은 최소 3회 수행하여 평균을 구하였다. 나노입자의 형태학(morphology)은 원자력현미경 (Nanoscope MultiMode Atomic Force Microscope) 및 FE-SEM (JSM-7500F; JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하여 확인하였다.
- [0105] 종래의 연구에서 양친매성 글리콜키토산은 다양한 항암제 전달체로 응용되었다. 자가조립 나노입자를 얻기 위해서 최근에는 글리콜 키토산에 소수성 부분으로서 FITC, 5 β -콜란산 및 콜레스테롤을 화학적으로 결합시켜 사용하였다.
- [0107] 도 2는 실시예 1에서 제조한 GC-DQA 중합체의 합성과정을 단계별로 나타낸 이미지이다.
- [0109] 처음에 메틸아크릴레이트(MA)는 메탄올에 용해된 글리콜키토산의 1차아민 작용기와 공유결합으로 반응하였다. 다음으로, 생성물은 디쿠알리니움(DQA)과 반응하여 양친매성 GC-DQA 중합체를 형성하였다.
- [0111] 도 3은 글리콜키토산(GC), 디쿠알리니움(DQA) 클로라이드 및 실시예 1의 GC-DQA 중합체에 대한 ^1H NMR 데이터이다.
- [0113] 도 3에 나타난 바와 같이, 글리콜키토산과 비교하여, 벤젠 고리의 CH 프로톤 및 디쿠알리니움의 메틸렌 프로톤에 각각 대응하는 7.5-8.5 ppm 및 1.3 ppm에서 특징적인 피크가 나타났다.
- [0115] 도 4는 글리콜키토산(GC), 디쿠알리니움(DQA) 클로라이드 및 실시예 1의 GC-DQA 중합체에 대한 FT-IR 데이터이다.
- [0117] 도 4에 나타난 바와 같이, 글리콜키토산의 피크는 다음과 같다: 1057(C-O stretch), 1420-1376 (C-H bend), 1619 (amide I band, C=O stretch of acetyl group, 2879 (C-H stretch), 3341 (O-H stretch overlapped with N-H stretch).
- [0118] 그러나, GC-DQA에서는 메틸아크릴레이트의 메틸아실 작용기와 디쿠알리니움의 아민 작용기 사이에 형성되는 아민 결합의 카보닐 스트레칭을 나타내는 1726 cm^{-1} 에서 새로운 피크가 확인되었다.
- [0120] <실험예 2> GC-DQA 미셀의 물리화학적 특성 평가 및 임계응집농도(Critical Aggregate Concentration, CAC) 계산

[0121] 크기 평가

[0122] GC-DQA 미셀, 대조군으로서 글리콜키토산(GC) 및 대조군으로서 DQAsome(비교예 1)의 크기를 DLS(Dynamic light scattering), SEM(scanning electron microscope) 및 AFM(Atomic Force Microscope)으로 확인하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0123] DLS(Dynamic light scattering)을 통해서는 1mg/ml (in DW) 용액에서 315 nm 크기의 응집체를 확인하였고, SEM 및 AFM을 통해서는 이보다 작은 약 260 nm 크기의 응집체를 확인하였다. 이는 시료의 건조 상태 분석에 따른 흔한 결과이다.

[0125] 도 5는 GC-DQA 미셀의 (a) AFM 이미지 및 (b) FE-SEM 이미지이다.

[0127] 도 5에 나타난 바와 같이, (a) AFM 이미지 및 (b) FE-SEM 이미지 모두에서 GC-DQA 미셀의 표면 형태학(morphology)은 구 모양으로 확인되었다.

[0129] 제타 전위 평가

[0130] 제타 전위를 측정하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

	크기 (nm)	제타전위 (mV)
대조군 (글리콜키토산, GC)	N/A	23.7±2
비교예 1 (DQAsome)	169.9±2	62.2±3
실시에 1 (GC-DQA 미셀)	315.1±1	29.1±1

[0133] 표 1에 나타난 바와 같이, 제타 전위에서 GC 및 GC-DQA 미셀 사이에는 확연한 차이가 없지만, 비교예 1(DQAsome)의 경우 62 mV의 높은 양전하를 나타냈다. 따라서, 글리콜키토산과 디쿠알리니움 이 결합하면, 디쿠알리니움(DQA)은 GC-DQA 중합체의 표면 전하에 어떠한 기여도 하지 않는 것으로 보인다. 이는, 디쿠알리니움(DQA)의 소수성에 기인하여, DQA는 미셀의 코어 내부에 위치하여 전체 중합체의 표면 전하에 기여하는 바가 없기 때문인 것으로 사료된다.

[0135] GC-DQA 미셀의 임계응집농도

[0136] GC-DQA 미셀의 임계응집농도는 형광 테크닉을 통해 소수성 형광프로브 Nile Red를 이용하여 계산하였다.

[0137] 구체적으로, 5 µl의 Nile Red (25 µl in MeOH)를 1 mL의 GC-DQA 용액에 0.05 - 0.5 mg/mL 농도로 첨가하였다. 다음으로, 용액을 와류(vortexd)하고 Cary Eclipse fluorescence Spectroscopy(Santa Clara, Unites states)을 이용하여 분석하였다(여기 파장 550 nm, 발광파장 560-760 nm). 650 nm에서의 형광 강도를 GC-DQA 미셀의 임계응집농도 값으로 계산하였다. 또한, GC-DQA 현탁액의 임계응집농도를 DLS(Dynamic light scattering) 테크닉으로 측정하였다. 특정 농도에서 응집 형성을 확인하기 위해서 동일한 GC-DQA 현탁액 농도가 측정되었다. 모든 DLS 측정값은 최소 3번 측정하여 평균을 구하였다.

[0139] 도 6은 (a) Nile Red 탑재 GC-DQA 중합체 농도에 따른 형광 강도를 측정한 그래프와, (b) GC-DQA 중합체의 임계응집농도를 나타내는 형광 강도(좌측 Y축)와 DLS(dynamic light scattering) 크기(우측 Y축)를 나타내는 그래프이다.

[0141] 도 6(a)에 나타난 바와 같이, 0.15-0.2 mg/ml 사이의 중합체 농도에서 Nile Red의 샤프한 형광 강도가 관찰되었다.

[0142] 도 6(b)에 나타난 바와 같이, DLS(dynamic light scattering) 결과 0.01 mg/ml 농도에서 GC-DQA 중합체가 응집을 시작하는 것으로 나타났다. 따라서, GC-DQA 중합체의 임계응집농도는 대략 0.097 mg/mL인 것으로 계산되었고, 이 결과는 종래의 콜레스테롤로 개질된 글리콜키토산과 유사한 값이다.

[0144] <실험예 3> MTT 평가 및 세포독성 평가

- [0145] MTT 평가
- [0146] 암세포 및 정상세포에 대한 GC-DQA 미셀의 세포 생존도는 MTT 비색 절차를 이용하여 산출하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0147] 구체적으로, 인간 자궁경부암세포(HeLa cell) 및 인간 피부섬유아세포(HDF cells) (출처: ATCC, Rockville, MD, USA)를 10% (v/v) FBS(Gibco, Grand Island, NY) 및 1% (w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM medium에서 5 % CO₂의 습한 분위기, 37℃에서 24시간 배양하였다. 세포독성 평가를 위해서 세포들을 96 편평바닥 웰 플레이트(SPL Life Sciences, Seoul, Korea)에 1.5×10^4 cells/well 농도로 분주하고 24시간 동안 같은 조건을 유지하였다. 다음으로, GC-DQA 중합체, 대조군 글리콜키토산(GC) 및 대조군 DQAsome(비교예 1)을 다양한 농도로 첨가하고 24시간 배양 후에, 배지를 제거하고 세포를 DPBS로 2회 세척하였다. MTT 용액(5 mg/ml)을 새로운 배지에 0.5 mg/ml 농도가 되도록 희석한 다음, MTT 시약을 포함하는 DMEM 배지 100 μ l를 세포에 첨가하고, 37℃에서 2시간 배양하였다. 다음으로, 배지를 폐기하여 과란 포르마잔 결정을 DMSO에 용해하였다. 마이크로플레이트 리더(VERSAMA XTM, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA)를 이용하여 UV 흡광을 측정하였고, 데이터는 대조군과 비교하여 생존세포의 백분율로 해석하였다.
- [0148] 또한, HeLa 세포에서 커큐민 로딩 미셀과 대조군으로서 커큐민 단독의 세포독성을 측정하였다. 약물 로딩 GC-DQA 미셀의 세포독성 평가를 수행하면서, DQAsome(비교예 1)은 낮은 커큐민 로딩율(encapsulation efficiency, EE)로 인해서 대조군에서 제외하였다. 또한, 약물을 로딩하지 않은 DQAsome(비교예 1) 자체가 높은 독성을 나타내어, 약물 유효성 측정에 적합하지 않았다.
- [0150] 디쿠알리니움은 양전하를 띄고, 높은 독성을 나타내며, 미토콘드리아 표적 유전자 전달체로 잘 알려져 있다. 디쿠알리니움의 표적 능력을 독성 없이 이용하려는 것은 실용적인 도전이다. 그래서, 글리콜키토산(GC)와 같은 생체적합성 고분자가 디쿠알리니움의 독성을 억제할 것으로 보였다.
- [0152] 종래의 연구에서, 암세포에서 디쿠알리니움 클로라이드의 세포독성 효과는 미토콘드리아 전위의 변화 및 K⁺ 채널 폐쇄와 관련 있는 것으로 보고되었다. 그렇기는 하지만, 디쿠알리니움 클로라이드의 존재하에 암세포의 세포자살을 매개하는 미토콘드리아 내의 활성산소의 과잉생산 역시 중요한 역할을 한다. 게다가, 미토콘드리아 및 세포자살 저항과 관련이 있는 Warburg 효과 가설은 DQAsome과 암세포에서 높은 독성을 나타내는 것에 의해 영향을 받을 수 있다. 본 발명자의 연구에서, 미토콘드리아 연관(mitochondria mediated) 및 막 교란 경로(membrane disruptive pathway) 모두에서 GC-DQA 중합체는 무독성이다. 미셀 형태에서 글리콜키토산의 생체적합성 및 디쿠알리니움 코어는 GC-DQA 중합체의 독성을 억제 가능하다.
- [0154] LDH(Lactate dehydrogenase) 평가
- [0155] HeLa 세포 및 HDF 세포에서 나노입자(미셀)의 독성을 알아보기 위하여 대조군과 함께 LDH 방출 평가를 통해 측정하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. LDH 평가는 막 교란을 측정한다. LDH의 방출은 막의 용리를 의미하고 LDH 방출량 증가는 높은 독성을 의미한다.
- [0156] 구체적으로, 인간 자궁경부암세포(HeLa cell) 및 인간 피부섬유아세포(HDF cells) (출처: ATCC, Rockville, MD, USA)를 1.0×10^4 cells/well 농도로 10% (v/v) FBS 및 1% (w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM medium에서 5 % CO₂의 습한 분위기, 37℃에서 24시간 배양하였다. GC-DQA 미셀, 대조군 글리콜키토산(GC) 및 대조군 DQAsome(비교예 1)을 다양한 농도로 10 μ l 처리하였다. 24시간 배양 후, 96 웰플레이트의 웰에서 0.2 mM NADH 및 2.5 mM sodium pyruvate를 함유하는 작동시약의 100 μ l 부분표본에 10 μ l의 상청액(supernatant)을 첨가하였다. 미처리 세포 및 20% Tween-20 처리한 세포를 각각 생존도 100% 및 0%로 여기고 함께 LDH 활성을 측정하였다. 평가는 시료 각각에 대하여 3회씩 수행하여 평균을 구하였다. 나노입자(미셀) 처리한 세포의 생존도는 미처리 세포 대비 백분율로 표현하였다.
- [0158] 도 7은 GC-DQA 중합체, 대조군 글리콜키토산(GC) 및 대조군 DQAsome(비교예 1)의 세포독성을 MTT 평가 및 LDH 평가로 확인한 결과이다(위: HDF cells, 아래: HeLa cells).
- [0160] 도 7에 나타난 바와 같이, GC-DQA 미셀은 암세포(HeLa) 및 정상세포(HDF)에서 모두 무독성이었다. 하지만, HDF 세포주에 비하여 HeLa 세포주에서 DQAsome(비교예 1)의 경우 더 낮은 세포 생존도를 나타냈다.
- [0162] 커큐민 로딩 GC-DQA (GC-DQA-Cur) 미셀의 세포독성

- [0163] 커큐민 단독 및 커큐민 로딩 GC-DQA의 세포독성 효과를 HeLa 세포에서 평가하였다. 상술한 바와 같이, 약물을 로딩하지 않은 GC-DQA 미셀은 암세포 및 정상세포 모두에서 무독성을 나타내는 반면에, DQAsome(비교예 1)은 높은 독성을 나타냈다(도 7 참조). 종래의 연구에서 커큐민은 에너지 생산 기작을 방해하여 세포자살에 이르게 하는 암세포의 미토콘드리아 전위에 손상을 줄 수 있는 것으로 보고되었다. 그러나, 낮은 농도의 커큐민은 확연한 효과를 나타내지 않는다.
- [0165] 도 10은 커큐민과 GC-DQA에 탑재된 커큐민 제형의 사진이다.
- [0166] 도 11은 HeLa cells에서 GC-DQA에 탑재된 커큐민과 일반 커큐민(Free Curcumin)의 세포독성을 나타낸 그래프이다.
- [0168] 도 11에 나타난 바와 같이, 커큐민이 GC-DQA 미셀에 탑재되고(encapsulated) 5 μ M 농도로 처리될 경우 50% 생존도가 관찰되었다. 그러나, 동일 농도의 커큐민 단독은 HeLa 세포에서 미미한 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 GC-DQA-Cur 미셀이 소수성의 커큐민을 효과적으로 전달하는 것이 분명하고, 커큐민의 생체이용가능성을 향상시킨다. 게다가, 디쿠알리니움으로부터 가해지는 독성이 커큐민과 함께 상승효과를 나타내어 암세포의 세포자살 기작을 용이하게 하는 것으로 사료된다.
- [0170] <실험예 4> 세포 흡수(Cell uptake) 및 미토콘드리아 타겟팅 평가
- [0171] Nile Red 로딩 나노입자(미셀)의 세포 흡수는 공초점 레이저 주사 현미경으로 평가하였다. 나노입자의 분산을 확인하기 위하여, HeLa 세포를 5×10^3 cells/mL 농도로 공초점 접시(μ slide 8 well, ibiTreat, South Korea)에 분주하고, 10% (v/v) FBS 및 1% (w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM medium에서 5% CO₂의 습한 분위기, 37°C에서 24시간 배양하였다. 다음으로, Nile Red 로딩 나노입자(미셀)을 20 μ l 첨가하고 4시간 배양하였다. 미토콘드리아를 MitoTracker Green으로 염색한 다음, 핵을 bisbenzimidazole (Hoechst 33342)으로 염색하였다. 배지를 제거하고, 세포를 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세척한 다음, 세포를 Zeiss LSM 5 Live confocal laser microscope를 이용하여 관찰하였다.
- [0172] 글리콜키토산(GC)에 대해 종래에 보고된 연구에서, GC 기반의 나노전달체가 세포막과 높은 결합 친화력을 갖고 몇몇 식균작용 경로(예를 들어, clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, and micropinocytosis)를 통해 흡수될 수 있음이 설명되었다. 그럼에도 불구하고, GC 기반의 나노전달체의 세포내 교환(intracellular trafficking) 연구는 1시간 배양 후에 곧 세포질에서 입자가 발견되고, 리소솜에 포획되는 경우는 거의 없었다. 그래서, GC-DQA 미셀의 세포흡수 및 미토콘드리아 타겟팅을 공초점 레이저 주사 현미경으로 확인하였다.
- [0174] 도 8은 HeLa cells에서 Nile Red 로딩 GC-DQA 미셀의 미토콘드리아 타겟팅을 보여주는 공초점 주사 레이저 현미경 이미지이다.
- [0176] 도 8에 나타난 바와 같이, Nile Red 로딩 GC-DQA 미셀은 HeLa 세포에서 4시간 배양 후에 흡수되고 미토콘드리아 내에 선택적으로 축적되는 것으로 나타났다. Mito-tracker green으로부터의 형광 신호는 Nile Red로부터 나오는 적색 형광과 완전히 통합되어 노란점으로 표시되었다. 게다가, GC-DQA 미셀의 무독성을 나타내는 타원형 핵과 함께 세포가 관찰되었다.
- [0178] <실험예 5> 동일위치(colocalization) 연구 및 나노입자 추적
- [0179] 식균작용 과정으로 내재화된 후의 나노재료는 산성의 리소솜 구획에서 분해되는 경향이 있다. 효과적인 치료 효능이 갖기 위해서, 나노재료는 엔도솜(endosome)으로부터 쉽게 탈출할 수 있어야 한다. 세포 흡수 후에 GC-DQA 미셀의 세포 간 죽음(intracellular fate)을 평가하기 위해, HeLa 세포를 5×10^3 cells/mL 농도로 공초점 접시(μ slide 8 well, ibiTreat, South Korea)에 분주하고, 10% (v/v) FBS 및 1% (w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM medium에서 5% CO₂의 습한 분위기, 37°C에서 24시간 배양하였다. 다음으로, 20 μ l의 GC-DQA 나노입자, 대조군 글리콜키토산(GC) 및 DQAsome(비교예 1)을 각각 첨가하였다. 4시간 배양 후에, 세포를 세척하고 LysoTracker Green으로 30분간 염색하고 acridine orange (AO, 5 μ M)으로 15분 염색하였다. 세포를 DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 세척한 다음, 세포를 Zeiss LSM 5 Live confocal laser microscope를 이용하여 관찰하였다.
- [0181] 치료제 응용을 위한 나노전달체 설계에 있어서, 나노입자의 운명은 중요한 인자이다. 리소솜 구획에서 세포외 재료의 분해는 세포의 혼한 청소 기작이다. 엔도솜 탈출을 확인하기 위해, Nile Red 로딩 GC-DQA 미셀을 이용하

여 동일위치(colocalization) 연구를 수행하였다. 리소솜 및 핵을 각각 LysoTracker green 및 Hoechst로 염색하였다. 4시간 배양 후에, 리소솜 내부에 포획되지 않고 세포질에서 Nile Red 로딩 GC-DQA 미셀이 관찰되었다. 리소솜 내부에 나노입자가 동일위치에 있을때, 녹색 및 적색 형광이 합쳐져 노란점으로 보였다.

[0183] 도 9는 HeLa cells에서 Nile Red 탑재 GC-DQA의 리소솜 탈출을 보여주는 공초점 주사 레이저 현미경 이미지이다.

[0185] 도 9에 나타난 바와 같이, 리소솜의 형광은 Nile Red 형광과 합쳐지지 않아, 4시간 배양 후 엔도솜 탈출을 확인하였다. 소수성으로 개질된 글리콜키토산 나노입자에 관한 종래의 보고에서는 단지 1시간 배양 후에 세포질에서 약 80%의 나노입자가 관찰되는 결과를 나타냈다.

[0187] <실험예 6> JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 전위($\Delta\Psi_m$)의 평가

[0188] HeLa 세포에서 형광 프로브 JC-1 (5,59,6,69-tetrachloro-1,19,3,39-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide)을 이용하여 미토콘드리아 막 전위를 측정하였다. JC-1은 미토콘드리아 전위가 온전할 때 응집체 형태(j-aggregates)로 존재하는 양이온성 염료로서, 적색 형광(590±10 nm)을 낸다. 미토콘드리아 막 전위가 낮을 경우, 프로브 모너머는 미토콘드리아에 효율적으로 포함될 수 없어, 세포질에서 녹색 형광(525±10 nm)을 내는 것이 일반적 결과이다. 커큐민 로딩 GC-DQA 미셀의 미토콘드리아 막 전위를 평가하기 위해, HeLa 세포를 5×10^3 cells/mL 농도로 공초점 접시(μ slide 8 well, ibiTreat, South Korea)에 분주하고, 10% (v/v) FBS 및 1% (w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM medium에서 5% CO₂의 습한 분위기, 37°C에서 24시간 배양하였다. 시료를 처리하고 4시간 후의 세포를 세척하고 10 mM의 JC-1과 함께 37°C에서 10분간 배양하였다. 다음으로, 세포를 PBS로 2회 세척하고, Zeiss LSM 5 Live confocal laser microscope을 이용하여 분석하였다.

[0190] 미토콘드리아 막 전위(Mitochondria membrane potential, MMP, $\Delta\Psi_m$)는 세포 생존 및 사망 사이에서 '마스터 신호'로 여겨진다. 종래의 보고에서, 몇몇 동시에 발생하는 기작에 의한 손상된 미토콘드리아 막 전위로부터 발생하는 암세포로부터의 항세포자살 신호가 확인되었다. 그러므로, MMP 및 다음의 세포자살을 유도할 수 있는 다양한 외인성 인자/시약이 이용된다. 친유성 양이온은 미토콘드리아의 내부 막에서 축적되어 MMP 감소를 야기하는 것으로 보고되었다.

[0192] GC-DQA 중합체 및 GC-DQA-Cur 처리된 HeLa 세포에서 MMP를 검출하기 위해 형광 프로브 JC-1을 사용하였다.

[0194] 도 12는 GC-DQA에 탑재된 커큐민(GC-DQA Curcumin) 및 여러 대조군을 JC-1으로 염색하여, HeLa 세포에서 미토콘드리아 막의 전위변동을 보여주는 공초점 이미지이다.

[0196] 도 12에 나타난 바와 같이, GC-DQA-Cur 및 DQAsome(비교예 1) 처리한 세포는 4시간 배양 후에, 다른 대조군에 비해 더 강한 녹색 형광 강도가 관찰되었다. GC-DQA-Cur 및 DQAsome의 독성은 세포자살의 주요한 지시인 MMP에 영향을 줄 수 있다. 세포독성 평가에서 확인된 바와 같이, GC, GC-DQA 미셀 및 커큐민(10 μ M) 단독은 MMP에 어떤 확연한 효과를 나타내지 않았다. 상기 결과는 암세포에서 미토콘드리아 매개 세포자살을 야기하는 커큐민을 GC-DQA 미셀이 미토콘드리아로 효율적으로 전달하는 것을 설명한다.

[0197] 따라서, 본 발명에 따른 미토콘드리아 타겟팅 부위와 약물의 조합은 암 치료분야에서 응용될 가능성이 높다.

[0199] <실험예 7> GC-DQA 미셀의 약물 포획 효율(Encapsulation Efficiency, EE) 평가

[0200] 상술한 실험결과에서 보듯이, GC-DQA 미셀은 상온 및 냉장 보관 상태에서 6개월 이상 안정할 수 있는 응집체를 수성 용매에서 약 315 nm 크기로 형성할 수 있다. 약물전달체 또는 제형의 안정성은 필수조건이기 때문에, 커큐민을 더 포획할 수 있는 GC-DQA-Cur 미셀을 준비하였다. 커큐민은 항산화, 항염증 및 항암과 같은 다양한 치료 효과를 나타내는 폴리페놀성 화합물이다. 하지만, 커큐민은 물에 용해되지 않아 치료제로의 응용에 장애물이 된다.

[0201] 실시예 2에서와 같이 GC-DQA-Cur를 제조하였고, 이의 약물 로딩효율을 평가한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

실시예 1의 GC-DQA 중합체 함량 (mg)	커큐민 (μ M)	포획효율 (Encapsulation Efficiency, EE, %)	로딩효율	크기 (nm)
1	100	1.23±6	0.0006	352
2	100	3.3±3	0.0016	349

3	100	2.1±5	0.001	280
4	100	1.7±3	0.0005	299
5	100	10±5	0.005	308
3	200	2.18±6	0.017	N/A
5	200	5.34±3	0.008	N/A
5	500	25.7±4	0.18	N/A

[0204] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 포획효율이 가장 높은 경우 25% 효율을 나타냈다. 본 실험결과에 따라서, 상술한 in vitro 실험들에서 포획효율이 가장 높은 제형을 이용하였다.

[0206] <제제예 1> 약학적 제제의 제조

[0207] <1-1> 산제의 제조

[0208] GC-DQA-Cur 미셀 2 g
 [0209] 유당 1 g

[0210] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0212] <1-2> 정제의 제조

[0213] GC-DQA-Cur 미셀 100 mg
 [0214] 옥수수전분 100 mg
 [0215] 유당 100 mg
 [0216] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0217] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0219] <1-3> 캡슐제의 제조

[0220] GC-DQA-Cur 미셀 100 mg
 [0221] 옥수수전분 100 mg
 [0222] 유당 100 mg
 [0223] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0224] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

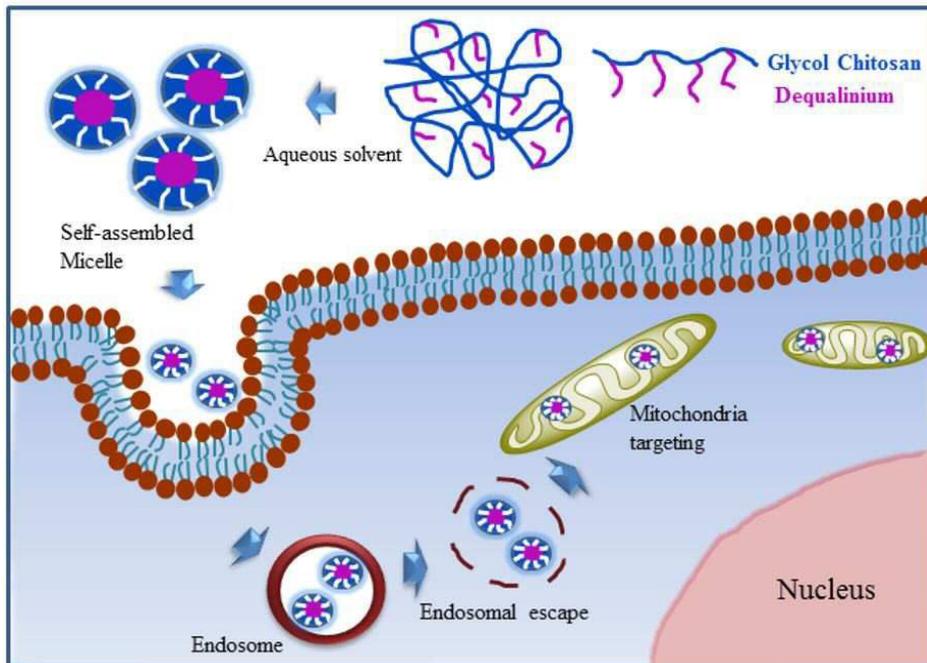
[0226] <1-4> 주사액제의 제조

[0227] GC-DQA-Cur 미셀 10 µg/ml
 [0228] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지
 [0229] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ml

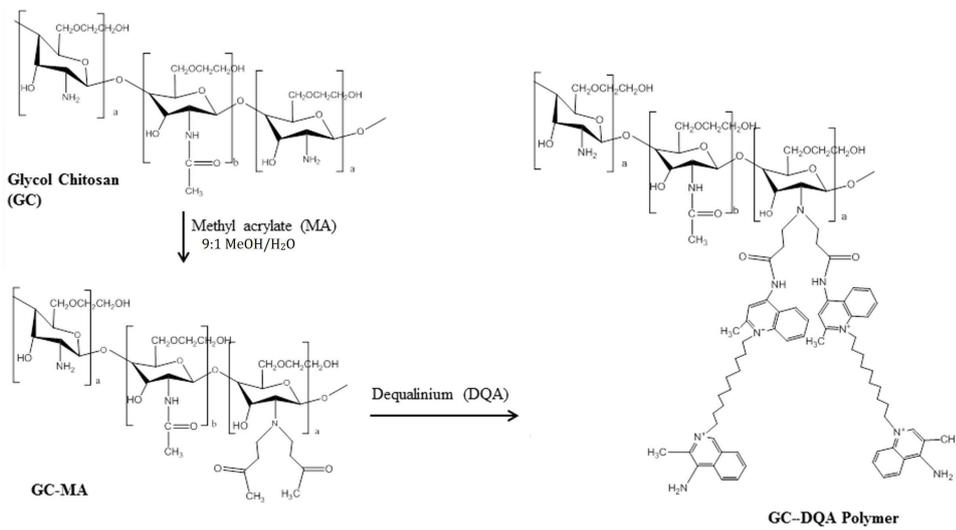
[0230] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명에 따른 화합물을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15분 이상 오토클레이브로 살균하여 주사액제를 제조하였다.

도면

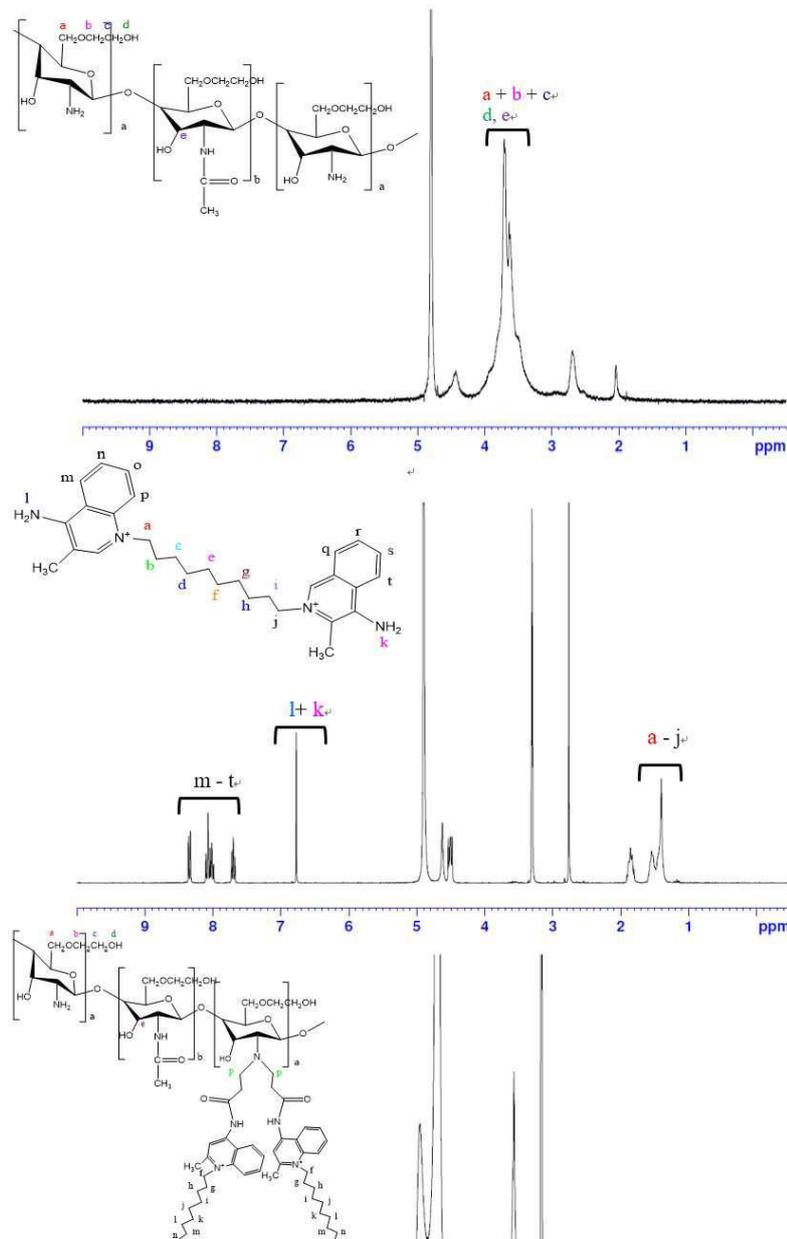
도면1



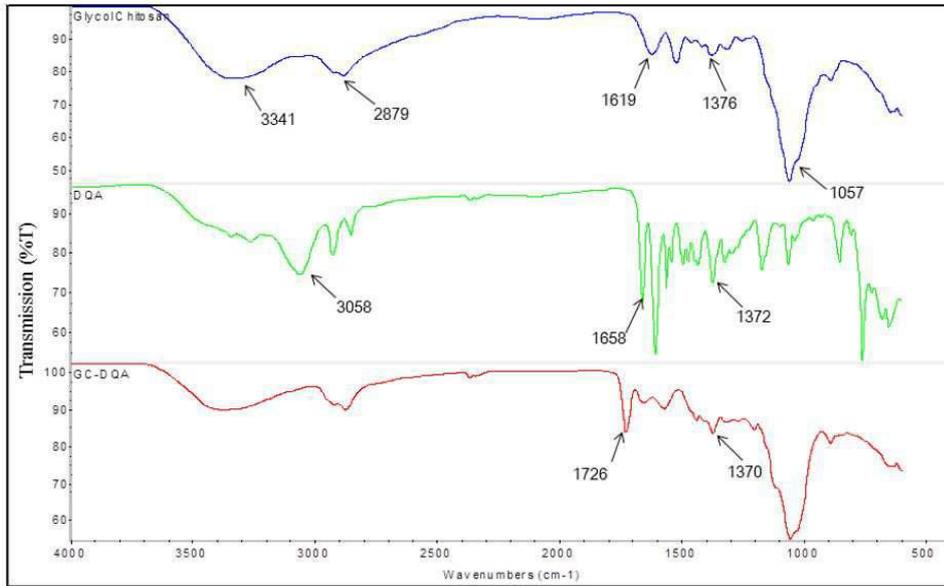
도면2



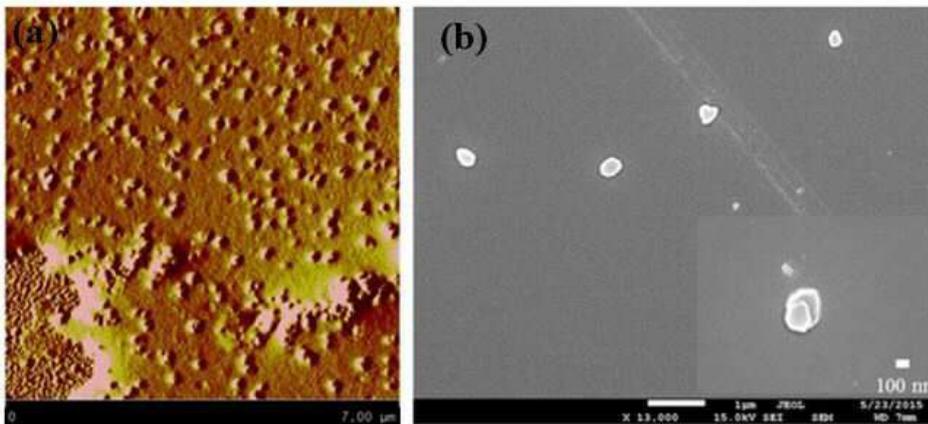
도면3



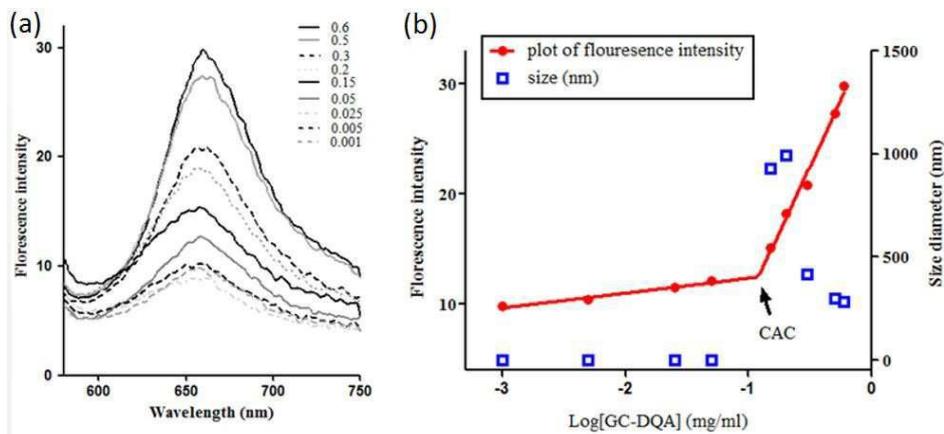
도면4



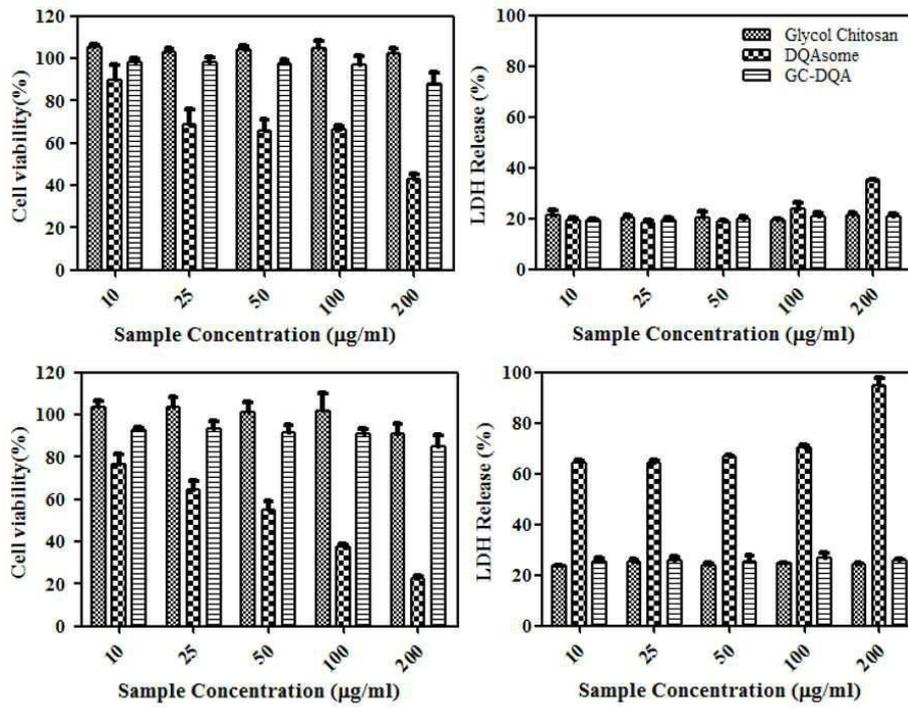
도면5



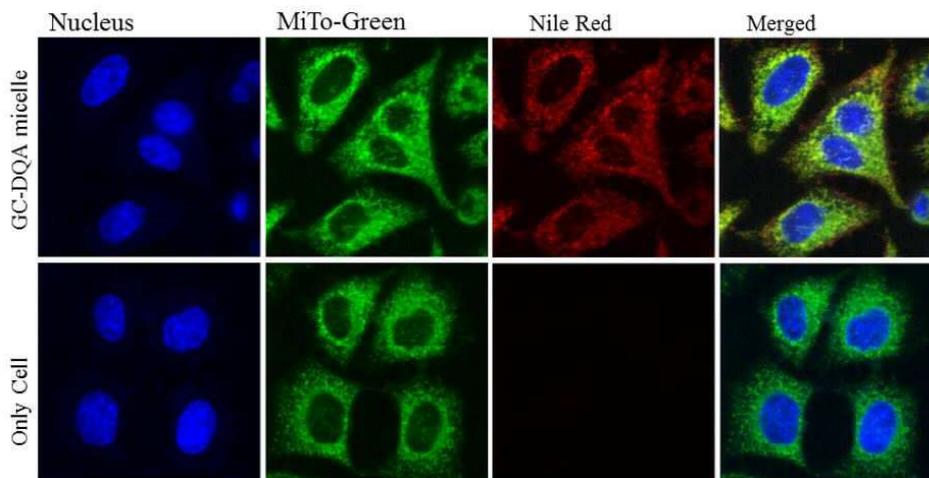
도면6



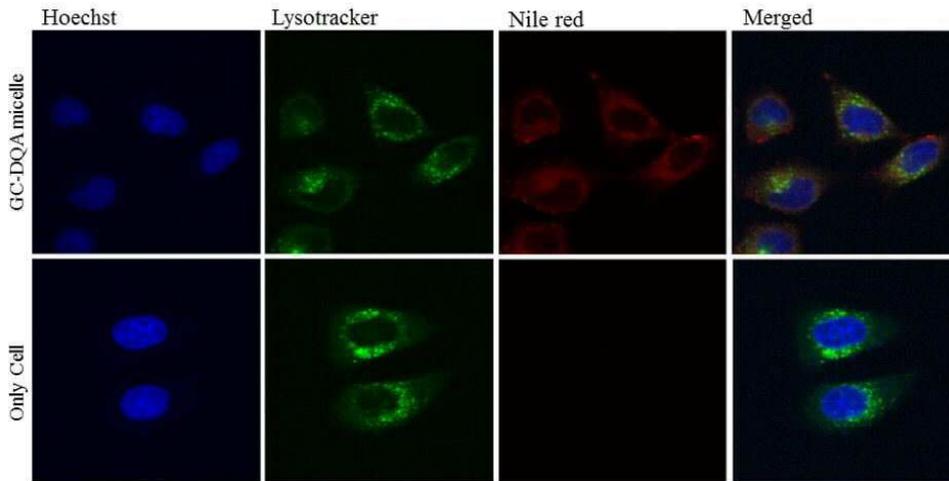
도면7



도면8



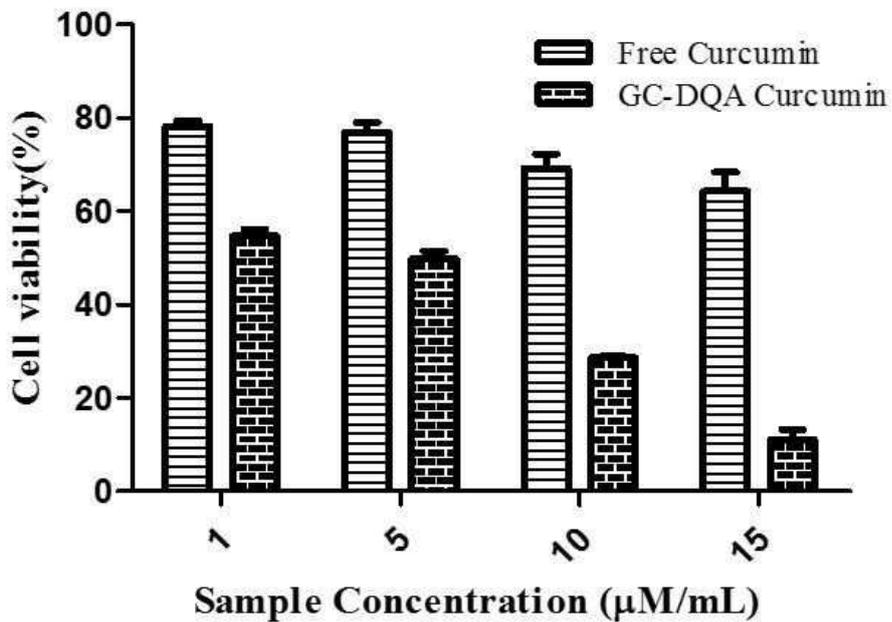
도면9



도면10



도면11



도면12

