

키토산이 코팅된 PLGA 나노입자의 제조 및 특성

유수경 · 나재운[†] · 정경원^{*,†}

순천대학교 공과대학 고분자공학과, *조선이공대학교 생명환경화학공과
(2021년 7월 5일 접수, 2021년 7월 28일 수정, 2021년 8월 2일 채택)

Preparation and Characterization of Chitosan-coated PLGA Nanoparticle

Su-Gyeong Yu, Jae-Woon Nah[†] and Gyeong-Won Jeong^{*,†}

Department of Polymer Science and Engineering, Sunchon National University, Jeonnam 57922, Republic of Korea
*Department of Bioenvironmental & Chemical Engineering, Chosun College of Science and Technology, Gwangju 61453, Republic of Korea

(Received July 5, 2021; Revised July 28, 2021; Accepted August 2, 2021)

초 록

본 연구는 생체적합성 및 생분해성의 특성을 갖는 PLGA (poly lactic-co-glycolic acid)를 이용하여 이중(w/o/w) emulsion과 유화-용매-증발 기법을 통해 PLGA 나노입자(PNP)를 제조하였고, 이에 키토산을 전하 상호작용을 통해 키토산이 코팅된 PLGA 나노입자(CPNP)를 제조하여 입자의 안정성과 생체이용률을 극대화할 수 있는 경구 투여용 약물 전달체로 사용 가능성을 입증하고자 하였다. CPNP의 화학적 구조는 ¹H-NMR 및 FT-IR을 통해 분석하였으며, 모든 특성 피크가 나타남으로써 성공적으로 제조되었음을 확인하였다. 또한, CPNP의 입자 크기, 제타 전위 및 형태학적 이미지는 DLS와 TEM을 이용하여 각각 분석하였으며, TGA를 통해 CPNP의 열적 분해 거동을 관찰하였다. 또한, CPNP의 세포 독성은 HEK293 및 L929 세포에서 MTT assay를 수행하여 확인하였고, 모든 농도에서 70% 이상의 세포 생존율을 확인함으로써 독성이 없음을 입증하였다. 이러한 결과를 통해 본 연구에서 개발된 CPNP가 경구용 약물 전달체로써 사용 가능성이 있음을 제안한다.

Abstract

In this study, poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles (PNP) were prepared through double (w/o/w) emulsion and emulsifying solvent-evaporation technique using PLGA, which has biocompatibility and biodegradability. To maximize stability and bioavailability of the particles, chitosan-coated PLGA nanoparticles (CPNP) were prepared by charge interaction between PNP and chitosan. We demonstrated that CPNP can be utilized as a drug carrier of oral administration. The chemical structure of CPNP was analyzed by ¹H-NMR and FT-IR, and all characteristic peaks appeared, confirming that it was successfully prepared. In addition, particle size and zeta potential of CPNP were analyzed using dynamic light scattering (DLS) while morphological images were obtained using transmission electron microscope (TEM). Thermal decomposition behavior of CPNP was observed through thermogravimetric analysis (TGA). In addition, the cytotoxicity of CPNP was confirmed by MTT assay at HEK293 and L929 cell lines, and it was proved that there is no toxicity confirmed by the cell viability of above 70% at all concentrations. These results suggest that the CPNP developed in this study may be used as an oral drug delivery carrier.

Keywords: Chitosan, PLGA, Oral delivery carrier, Stability, Bioavailability

1. 서 론

생체 내에 투여된 약은 위에서 장내로 이동하여 소화 작용 및 다양한 생리학적 과정을 통해 혈액 내로 유입되고 이에 따라 약효를 보이

게 된다[1]. 일반적으로 약물을 생체 내에 투여하는 방법은 정맥투여, 안구투여, 비강투여, 경구투여 등이 있고 이 가운데 가장 간단한 방법은 경구투여 방법이다[2]. 경구투여 방법은 저분자 약물에서 거대한 생체 고분자에 이르기까지 광범위한 약물 분자를 국소 및 전신에 쉽게 사용할 수 있다[3]. 그러나 약물이 생체 내에 들어가게 되면 산 가수분해, 효소 분해 등으로 인해 물질 구조가 분해 및 변형이 일어나고 다양한 면역반응으로 인해 약물 효과가 반감되어 부작용 및 독성을 유발하게 된다[4,5].

이러한 문제점들을 극복하고자 고분자를 이용한 약물 전달 시스템(polymeric drug delivery system)은 널리 이용되어왔다[6]. 고분자 약물 전달 시스템은 나노 및 마이크로 단위의 크기를 가지는 입자를 제

[†] Corresponding Author: Jae-Woon Nah: Sunchon National University, Department of Polymer Science and Engineering, Jeonnam 57922, Republic of Korea; Gyeong-Won Jeong: Chosun College of Science and Technology, Department of Bioenvironmental & Chemical Engineering, Gwangju 61453, Republic of Korea
Tel: Jae-Woon Nah: +82-061-750-3566; Gyeong-Won Jeong: +82-62-230-8833
e-mail: Jae-Woon Nah: jwnah@sunchon.ac.kr; Gyeong-Won Jeong: gwjeong@cst.ac.kr

조하는 방법으로 약물의 부작용을 줄이고 약물의 효과를 극대화할 수 있다[7,8]. 현재 약물 전달 시스템에 널리 사용되고 있는 천연 고분자에는 collagen, albumin, chitosan 등이 있고 합성 고분자에는 poly(lactic acid), poly(glycolic acid), poly(hydroxyl butyrate), poly(lactic-co-glycolic acid) 등이 있다[9,10].

본 연구에서는 이러한 고분자 중 미국식품의약국(FDA)과 유럽의약품국(EMA)에서 승인한 PLGA (poly lactic-co-glycolic acid)를 사용했다[11]. PLGA는 생체 내에 완전히 분해되어 체외로 배출이 용이하고, 높은 생체적합성, 낮은 독성의 특성을 갖는다[12]. 또한, 젖산 및 글리콜산(LA:GA)의 단량체 합성 비율에 따라 화학적 특성과 가수분해 속도 차이를 조절할 수 있다는 장점이 있어 PLGA는 약물 전달체 재료로 널리 사용되어왔다[13].

PLGA 나노입자 (PNP)를 제조하는 데 있어 사용되는 기법은 크게 가교법, 투석법 그리고 유화제를 이용한 유화법이 많이 사용되고 있으며, 본 연구에서는 W/O/W (water-in-oil-in-water) 유화법을 이용하여 PLGA 나노입자를 제조하고 약물 전달체로서 그 가능성을 입증하고자 하였다[14,15].

제조된 PLGA 나노입자(PNP)를 경구용 약물 전달체로 이용하기 위해서는 위(pH 2~3)에서 장(pH 8~10)까지 도달하는 데 있어 변화하는 pH 환경에서 입자의 안정성과 장내에서 생체 이용률이 매우 중요하다[16]. 이러한 PLGA 입자 안정성과 생체 이용률의 문제점을 해결하기 위해 강한 양전하를 갖는 천연 고분자 키토산을 PLGA 나노입자 표면에 코팅하여 약물 전달체로서 기능을 향상하고자 하였다.

키토산은 키틴을 탈 아세틸화하여 얻어지는 물질로서 β -(1, 4)-glycoside 결합으로 연결된 D-glucosamine과 N-acetyl D-glucosamine 두 단위체로 구성된 생분해성 천연 다당류이다[17]. 또한, 키토산은 항암효과, 면역 활성화 및 콜레스테롤 감소 등 우수한 생리활성을 갖는 것으로 잘 알려져 있으며, 생체 적합성이 우수하고, 독성이 낮으며 강한 양전하를 띠고 있어 약물 전달체나 유전자 전달체로 많이 응용되고 있다[18,19].

키토산을 PLGA 나노입자에 코팅했을 시에 위에서 장까지 변화하는 pH에 안정성을 향상시켜 약물을 목표 부위까지 안전하게 전달하여 오랜 시간 동안 지속적인 약물 방출(sustainable drug release)이 가능함과 동시에 장내의 세포와 단단한 접합(tight junction) 효과로 장점막과 접착 상호작용이 향상되어 생체 이용률을 증가시킬 수 있다는 이점을 갖는다[20,21].

본 연구에서는 PLGA 나노입자(PNP)를 W/O/W (water-in-oil-in-water) 유화법을 이용해 제조하였으며, 이에 천연 고분자 키토산을 전하 상호작용을 통해 키토산이 코팅된 PLGA 나노입자(CPNP)를 제조하였다. CPNP의 물리 화학적 특성은 ¹H-NMR, FT-IR, DLS (dynamic light scattering), TGA (thermogravimetric analysis), 및 TEM (transmission electron microscope)을 이용하여 분석하였고, 세포독성 여부를 MTT assay를 통해 확인함으로써 CPNP가 경구용 약물 전달체로서 사용 가능성이 있음을 규명하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

본 연구에서 사용한 키토 올리고당(Chitooligosaccharide; COS, Mw: 10 kDa)은 (주) 키토라이프(KittoLife Co., Korea)에서 구매하여 사용하였고 PLGA [Mw; 17,000, (LA:GA 75:25)]는 Corbion Purac (NLD)에서 구매하여 사용하였다. Dichloromethane (DCM), Polyvinyl alco-

hol (Mw; 13,000~23,000)은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다.

본 연구의 세포독성 실험에 사용한 HEK293과 L929 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양에 사용된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 Lonza (USA)에서 구입하였다. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (BRL, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 실험에 사용된 용매 및 시약 등은 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

2.2. PNP 및 CPNP 나노입자 제조

PLGA 나노입자(PNP)는 이중 emulsion (W/O/W) solvent-evaporation 기법으로 제조하였다[Figure 1(A)]. PLGA (50 mg)을 실온에서 DCM 6 mL에 용해시켜 PLGA 용액을 제조하였다. PLGA 용액에 1% PVA 용액 2 mL를 첨가하고 ultrasonication을 30 sec 동안 처리하여 emulsion 용액(W/O)을 만들었다. 이를 1% PVA 수용액 50 mL에 첨가하고 ultrasonication을 30 sec 동안 처리하여 W/O/W 이중 emulsion 용액을 제조하였다. Emulsion 용액(W/O/W)을 실온에서 2 h 동안 교반한 후, 회전증발기를 이용하여 잔류 DCM을 제거하였다. DCM을 제거한 용액을 5,000 rpm에서 30 min 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하고 모인 펠렛을 증류수를 이용하여 3회 세척한 후 동결 건조하여 PNP를 얻었다. 또한, 키토산이 코팅된 PLGA 나노입자(CPNP)는 전하 상호작용에 의해 제조되었다[Figure 1(B)]. 먼저 PNP (50 mg)에 증류수 25 mL를 첨가하여 PNP 용액을 제조하였고, 이에 키토산 용액 7.5×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1.5×10^{-6} , 2×10^{-6} mole을 각각 1 mL 첨가한 후 ultrasonication을 1 min 동안 처리하였다. 최종적으로 동결건조를 통해 CPNP powder를 얻어 실험에 사용하였다(Table 1).

2.3. CPNP의 구조적 특성 분석

Chitosan, PLGA, PNP 및 CPNP의 화학적 구조를 분석하기 위해 FT-IR (IRAffinity-1S, 350~7,800 cm^{-1} , Japan)을 수행하였다. 완전히 건조된 각각의 샘플(Chitosan, PLGA, PNP, CPNP) 2 mg을 pan 위에 얹고 400~4,600 cm^{-1} 범위에서 IR 스펙트럼을 관찰하였다.

Chitosan, PLGA, PNP 및 CPNP의 화학적 구조를 다시 한번 입증하기 위해 핵자기 공명 장치(¹H-NMR, 400 MHz, Bruker, Germany)를 통해 분석하였다. Chitosan (4 mg)은 D₂O용매 700 μL , PLGA (4 mg) 및 PNP (4 mg)는 DMSO용매 700 μL 그리고 CPNP (4 mg)는 D₂O 200 μL 와 DMSO 800 μL 에 각각 용해시켰다. 이를 핵자기 공명 장치를 통해 물질의 특성 피크와 화학적 이동 여부를 분석하여 화학적 구조를 규명하였다.

2.4. CPNP의 입자크기, 표면전하 및 형태학적 특성 분석

PNP 및 CPNP의 입자 크기 및 체타 전위는 Dynamic light scattering (DLS; zetasizer-Nano ZS90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK)을 통해 확인하였다. PNP와 CPNP 4 mg을 증류수 2 mL에 각각 분산 후 square cell (1 × 1 cm, Ratiolab, Germany)에 넣고 632.8 nm 파장에서 He-Ne 레이저 빔을 이용하여 측정하였다.

PNP 및 CPNP의 형태학적 특성은 Transmission electron microscopy (STEM, ZEISS, Sigma-500)을 통해 확인하였다. 각각의 샘플(PNP, CPNP) 10 mg을 증류수 1 mL에 분산시키고 카본 필름이 코팅된

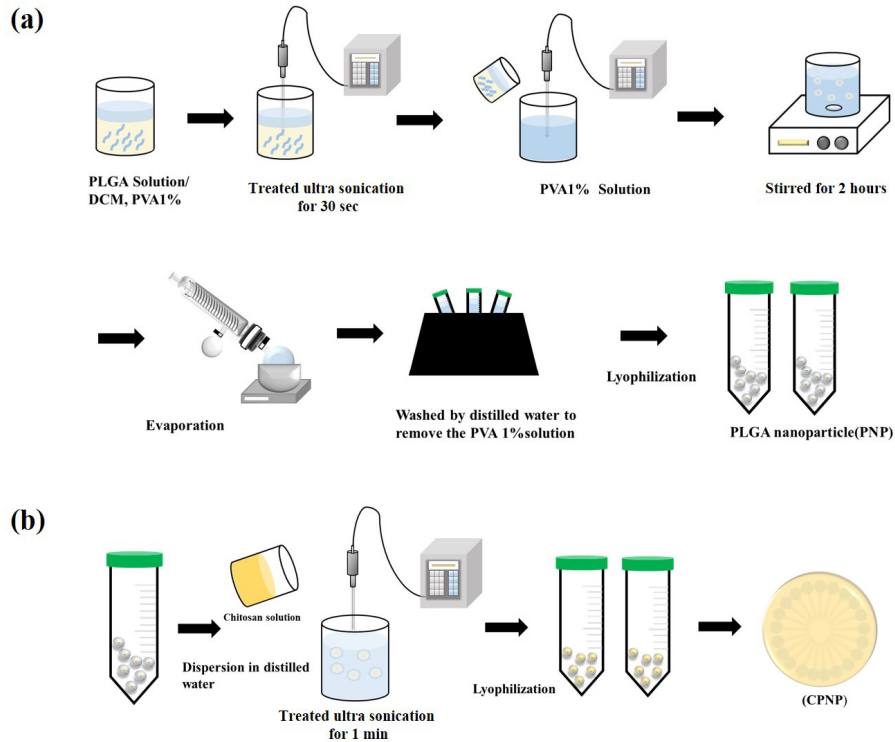


Figure 1. Preparation process of (a) PNP and (b) CPNP.

Table 1. The Weight Ratio of Chitosan Coated on PLGA Nanoparticle

Sample	PNP (mg)	Chitosan (mole)
CPNP 15%	50	7.5×10^{-7}
CPNP 20%		1.0×10^{-6}
CPNP 30%		1.5×10^{-6}
CPNP 40%		2.0×10^{-6}

copper grid 위에 올려놓는다. 이를 3% Uranyl acetate로 15분 동안 염색하고 상온 암실에서 24시간 동안 건조하여 가속 전압 20 kV 하에서 형태학적 이미지를 관찰하였다.

2.5. CPNP의 열적 특성 분석

CPNP의 열적 분해 온도를 측정하기 위해 TGA (Thermogravimetric analysis) 열분석을 수행하였다. Chitosan, PLGA, PNP와 CPNP 5 mg 각각을 알루미늄 팬 위에 올리고 N₂ 환경에서 1 min 간격으로 10 °C 씩 증가시켜 25~800 °C 까지 열분해 곡선과 온도를 각각 확인하였다.

2.6. CPNP의 세포 독성 평가

세포 독성은 3-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)2,5-dihhenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT assay)를 통하여 규명하였다. 정상 세포인 인간 유래 신장 세포(Human embryonic kidney cells, HEK293) 및 쥐 섬유아 세포(Murine fibroblast cells, L929)를 이용하여 확인하였다. HEK293 및 L929 세포는 습윤 배양기(5% CO₂ 그리고 95% air, 37 °C) 내에서 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배양액을 함유한 culture dish에서 부착 배양한 후, trypsin-EDTA로 세포를 탈착하여 cell수를 확인하였다. 5×10^3 cell/well로 96well-plate (SPL life

science, USA)에 seeding 한 후, 이들 동안 배양하여 세포를 안정하게 부착하였다. 이후 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM을 사용하여 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156 mg/mL 각각의 농도로 희석된 샘플(Chitosan, PLGA, PNP, CPNP (15%, 20%, 30%, 40%))을 Well에 처리하고 48 h 동안 배양하였다. 이후 MTT 시약(1 mg/mL)을 30 μL씩 96well-plate에 처리한 후 incubator에서 4 h 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 시간이 경과된 후 96 well-plate 내의 세포 배양액을 모두 제거하였다. 이후 96well-plate에 200 μL씩 DMSO를 첨가시켜 세포 내 미토콘드리아 활성에 의한 Formazan 결정을 용해시켰다. 최종적으로 micro plate reader를 사용하여 560 nm와 670 nm 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다. 세포 생존율은 다음 식 (1), (2)에 의해 계산되었다.

$$(OD \text{ value}) = (OD \text{ 560 nm} - OD \text{ 670 nm}) \tag{1}$$

$$Cell \text{ Viability}(\%) = \frac{OD_{sample} - OD_{blank}}{OD_{control} - OD_{blank}} \times 100 \tag{2}$$

3. 결과 및 토론

3.1. CPNP 나노입자 제조 및 화학적 구조 특성 분석

경구투여 방법을 이용하여 약물을 전달할 시 위(pH 2~3)에서 장 (pH 8~10)까지 도달하는 데 있어서 변화하는 pH에 대한 영향을 최소화 할 수 있어야 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 PNP는 이중 emulsion (W/O/W) solvent-evaporation 기법으로 제조하였고, 이에 전 하 상호작용을 통해 키토산을 PNP에 코팅하여 입자 안정성 및 생체 이용률을 증가할 수 있는 CPNP 약물 전달체를 제조하였다. 제조된 CPNP의 화학적 구조를 분석하기 위해 FT-IR과 ¹H-NMR를 수행하였다.

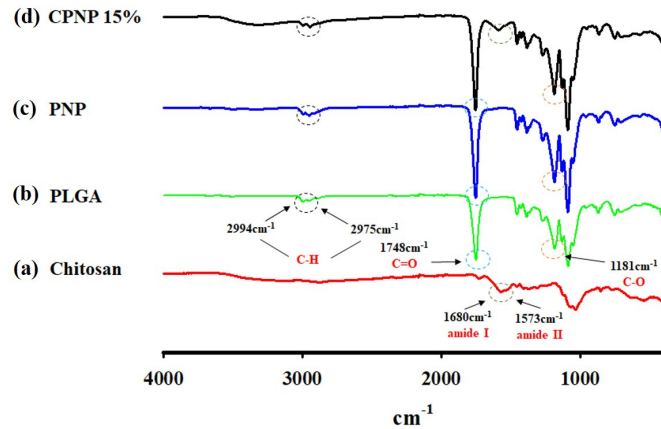


Figure 2. FT-IR spectra of (a) chitosan, (b) PLGA, (c) PNP, and (d) CPNP.

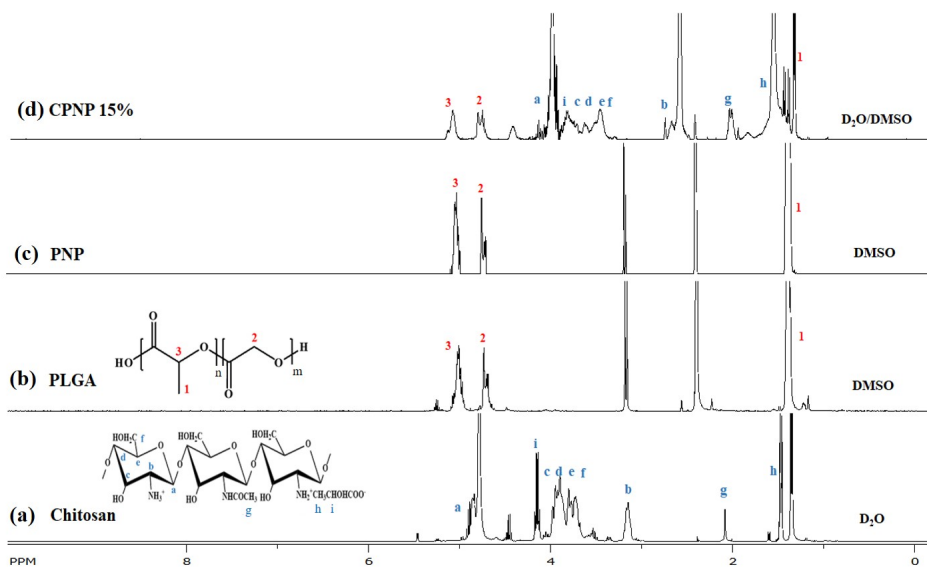


Figure 3. $^1\text{H-NMR}$ spectra of (a) chitosan, (b) PLGA, (c) PNP, and (d) CPNP.

FT-IR 수행 결과 chitosan의 경우에는 1680 cm^{-1} 에서 amide(C=O), 1573 cm^{-1} 에서 amide II(N-H) 피크가 확인하였다. PLGA와 PNP는 2994 cm^{-1} , 2975 cm^{-1} 에서(C-H) 피크가 나타나는 것을 확인하였고 또한, 카르보닐기(C=O) 피크는 1748 cm^{-1} 에서 확인되었으며, 에스터(C-O) 그룹의 특성 피크는 1180 cm^{-1} 에서 관찰되었다(Figure 2). 또한, CPNP의 화학적 구조를 한 번 더 확인하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ 를 수행한 결과 chitosan 구조에서 C₁위치의 수소 피크는 $\delta=4.8\text{ ppm}$, C₂위치의 수소 피크는 $\delta=3.1\text{ ppm}$, 그리고 C_{3,4,5,6}위치의 수소 피크는 $\delta=3.5\sim 4.0\text{ ppm}$ 에서 나타났다. 또한, 키토산 구조 내에 존재하는 아세틸 그룹의 수소의 특성 피크를 $\delta = 2.1\text{ ppm}$ 에서 확인하였으며, 키토산에 도입되어있는 lactic acid의 수소 특성 피크를 $\delta = 1.2\text{ ppm} \sim 1.5\text{ ppm}$ 과 $\delta = 4.2\text{ ppm}$ 에서 각각 확인하였다. PLGA와 PNP 결과에서 Lactic acid의 $-\text{CH}_3$ 피크는 $\delta = 1.4\text{ ppm}$, Glycolic acid의 $-\text{CH}_2$ 와 $-\text{CH}_3\text{CH}$ 피크는 $\delta = 4.8\text{ ppm}$ 과 $\delta = 5.1\text{ ppm}$ 에서 각각 관찰되었다. 그러므로 이러한 FT-IR과 $^1\text{H-NMR}$ 구조분석을 통해 최종 물질인 CPNP에서 키토산 및 PLGA의 특성 피크가 모두 관찰됨에 따라 성공적으로 CPNP가 제조되었음을 입증하였다(Figure 3).

3.2. CPNP 나노입자의 입자크기, 표면전하 및 형태학적 특성 분석

CPNP 나노입자의 입자 크기, 제타 전위 그리고 형태학적 특성을 분석하고자 DLS와 TEM을 수행하였다. PNP와 CPNP의 형태학적 이미지를 관찰한 결과 모두 구형의 나노입자 형태를 나타냄을 확인하였고(Figure 5), PNP와 CPNP는 단 분산의 입자분포를 나타냈으며, PNP의 입자 크기는 $439.15 \pm 46.74\text{ nm}$ 이고 CPNP 15% 입자크기는 $1011.15 \pm 62.01\text{ nm}$ 나타났다. 또한, chitosan이 PNP에 코팅이 되는 비율이 증가함에 따라 입자 크기가 감소하는 것을 확인하였다(Table 2, Figure 4). CPNP가 PNP보다 입자 크기가 증가한 이유는 키토산을 PNP 표면에 전하 상호작용에 따른 코팅에 의한 layer가 형성되었기 때문인 것으로 사료되고, 키토산의 코팅 비율이 증가함에 따라 입자 크기가 감소되는 이유는 키토산의 양이 증가할수록 $-\text{NH}_3^+$ 전하가 세기가 커져 PNP와 전하 상호작용이 강해짐으로써 더욱 소형의 입자를 형성한 것으로 사료된다. 또한, DLS를 통해 제타 전위를 측정된 결과 PNP 표면 전하가 음전하 $-2.01 \pm 0.55\text{ mV}$ 를 나타냈으며, 이에 키토산이 코팅된 CPNP의 표면 전하는 전체적으로 양전하를 띄었다. 또한, 키토산 비율이 증가할수록 더 강한 양전하를 나타냄을 확인하였다 [Table 2, Figure 4(B)]. 이러한 이유는 키토산의 비율 증가로 인한

Table 2. Characteristic Analysis of PNP and CPNP

Sample	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Thermal degradation temperature (°C)
Chitosan	-	-	176.6
PLGA	-	-	245.9
PNP	439.15±46.74	-2.010±0.55	245.7
CPNP 15%	1011.15±62.01	0.259±0.11	249.3
CPNP 20%	762.50±0.71	0.274±0.02	257.0
CPNP 30%	672.55±1.06	0.530±0.05	256.9
CPNP 40%	557.45±13.93	5.765±0.16	258.2

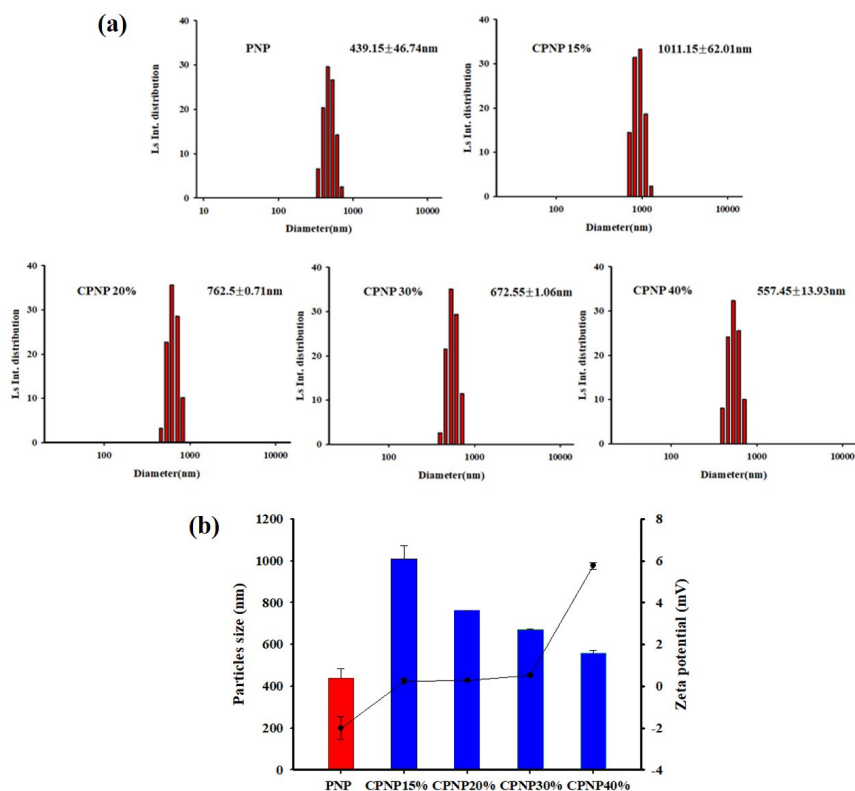


Figure 4. (a) Particle size distribution and (b) zeta potential of PNP and CPNP nanoparticle.

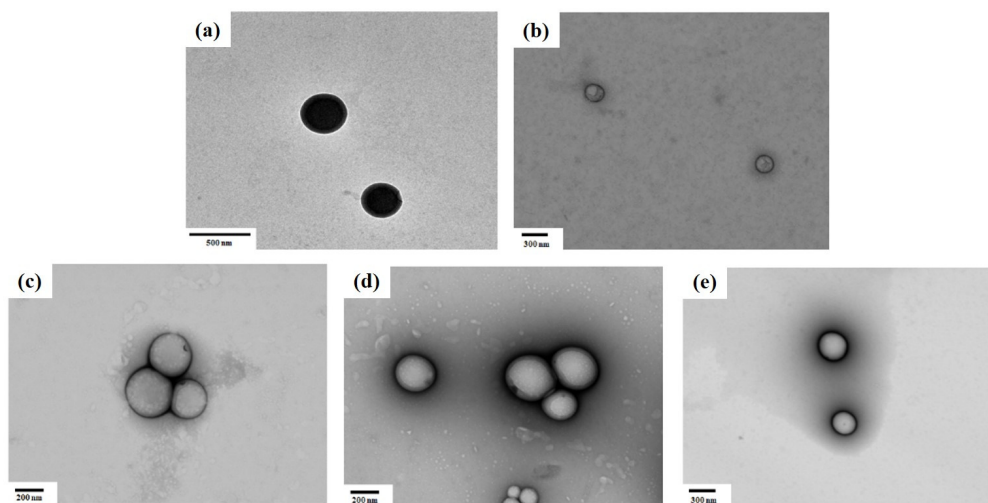


Figure 5. Morphological analysis of (a) PNP, (b) CPNP 15%, (c) CPNP 20%, (d) CPNP 30% and (e) CPNP 40%. [Dark-field: (a), Bright-field: (b), (c), (d), (e)].

-NH₃⁺ 전하 세기의 영향 때문인 것으로 사료된다. 이러한 결과를 통해서 제조된 CPNP는 입자의 안정성 및 생체이용률을 극대화할 수 있는 경구용 약물 전달체로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

3.3. CPNP 나노입자의 열분해 거동 분석

CPNP의 열적 분해 거동을 확인하기 위해서 TGA 분석을 수행하였다. 그 결과 Chitosan은 176.6 °C, PLGA는 245.9 °C, PNP는 245.7 °C, CPNP 15%는 249.3 °C, CPNP 20%는 257 °C, CPNP 30%는 256.9 °C 및 CPNP 40%는 258.2 °C에서 각각 열분해 온도를 확인하였다(Table 2, Figure 6). 최종물질인 CPNP가 PNP보다 높은 열분해 온도를 나타냄을 확인할 수 있었고, 또한, PNP 나노입자 표면에 전하 상호작용에 의해 코팅된 키토산의 양이 증가할수록 열분해 온도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 키토산이 PNP 나노입자 표면에 코팅됨에 따라 열분해 온도가 증가한 것으로 사료된다. 이러한 결과를 통해서 PNP에 키토산이 성공적으로 코팅되었음을 간접적으로 입증함으로써 CPNP가 경구용 약물 전달체로 응용 가능할 것으로 판단된다.

3.4. CPNP 나노입자의 세포 독성 평가

CPNP를 생체에 적용하기 위해서는 세포 독성을 나타내지 않는 농도의 확립이 필요하다. 이러한 세포 독성 유무를 입증하기 위해 정상 세포 HEK293과 L929 세포에 chitosan, PLGA, PNP 및 CPNP를 다양한 농도(1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156 mg/mL)로 처리하

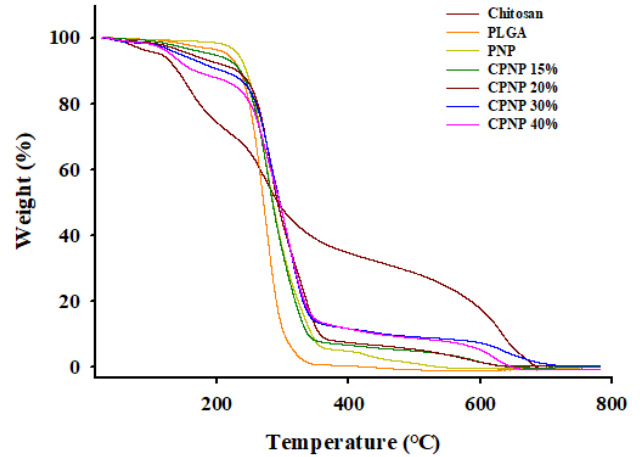


Figure 6. Thermal diagram of chitosan, PLGA, PNP, and CPNP.

여 MTT assay를 통해 분석하였다. 그 결과 처리한 sample의 모든 농도에서 HEK293 및 L929 세포 생존율이 70% 이상으로 세포 독성이 거의 없는 것을 확인하였다(Figure 7). 이러한 독성 결과를 통해 CPNP는 다양한 약물을 담지하여 생체에 적용하였을 시 부작용을 최소화하고 약물 효능을 극대화할 수 있는 우수한 경구 약물 전달체로 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

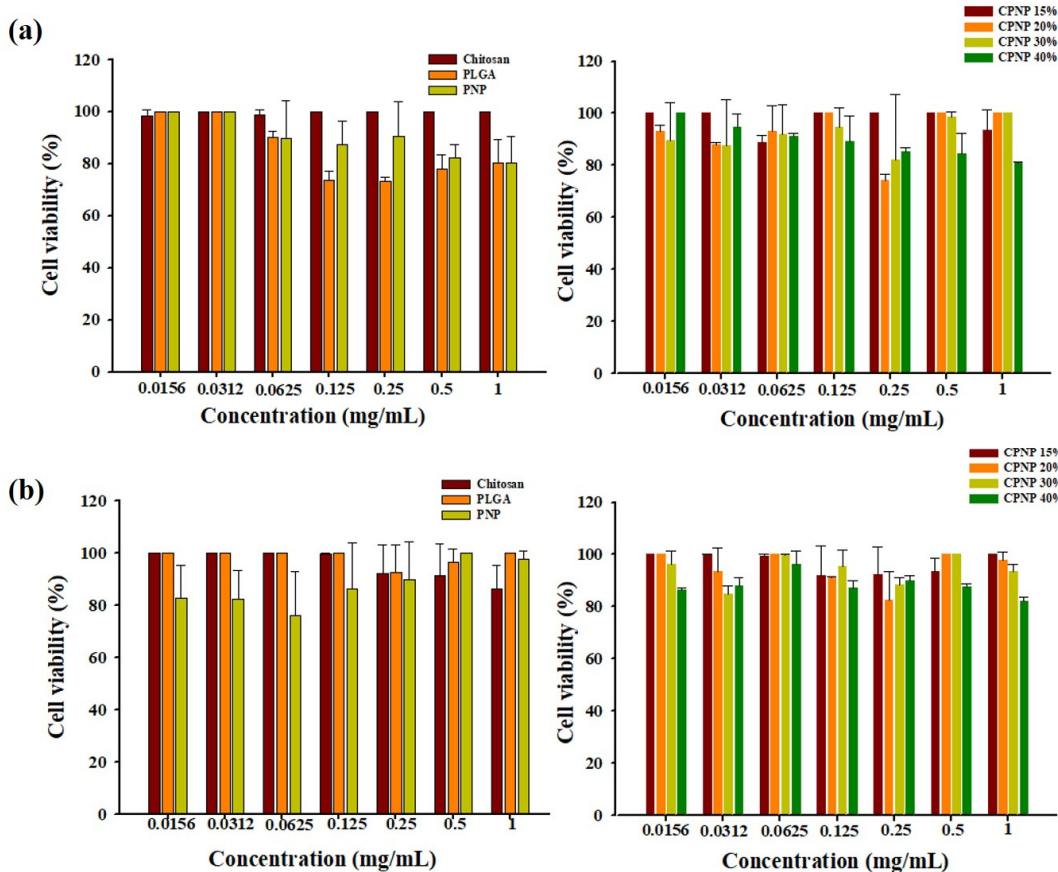


Figure 7. Cytotoxicity evaluation of chitosan, PLGA, PNP, and CPNP by MTT assay after the incubated for 48 h at the various cell lines. (a) HEK293 cell line and (b) L929 cell line.

4. 결 론

본 연구에서는 PLGA를 이중 에멀전(W/O/W) 용매-중발 기법을 이용하여 PNP를 제조하고, 이에 전하 상호작용을 통해 키토산이 코팅된 CPNP를 개발하여 경구 약물 전달체로서 가능성을 다양한 물리화학적 특성 및 MTT assay를 통해 입증하였다. CPNP의 화학적 구조는 ¹H-NMR과 FT-IR을 이용하여 각각의 특성 피크를 확인함으로써 성공적으로 제조되었음을 입증하였다. 또한, PNP 및 CPNP의 형태학은 TEM을 통하여 구형의 나노입자를 관찰하였으며, CPNP의 입자 크기와 표면 전하를 DLS로 확인한 결과 CPNP의 입자 크기 및 전하는 PNP보다 더 증가하는 것을 확인하였다. 또한, TGA를 이용하여 CPNP의 열분해 거동을 확인한 결과 CPNP가 PNP 보다 열분해 온도가 증가하였고, MTT assay를 통해 CPNP가 세포 독성이 없는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 CPNP는 체내 안정성 및 생체 이용률을 증가시킬 수 있는 경구 및 다양한 의학 분야의 약물 전달체로 활용 가능함을 제안한다.

References

1. P. Colucci, C. S. Yue, M. Ducharme, S. Benvenga, A review of the pharmacokinetics of levothyroxine for the treatment of hypothyroidism, *Eur. Endocrinol.*, **9**, 40 (2013).
2. M. Goldberg, I. Gomez-Orellana, Challenges for the oral delivery of macromolecules, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 289-295 (2003).
3. R. Duncan, H. Ringsdorf, R. Satchi-Fainaro, Polymer therapeutics —polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: past, present and future opportunities, *J. Drug Target.*, **14**, 337-341 (2006).
4. E. W. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E.T. Cunningham, D.R. Guyer, A.P. Adamis, Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 123-132 (2006).
5. Y. Yun, Y. W. Cho, K. Park, Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 822-832 (2013).
6. N. Krinick, Y. Sun, D. Joyner, J. Spikes, R. Straight, J. Kopeček, A polymeric drug delivery system for the simultaneous delivery of drugs activatable by enzymes and/or light, *J. Biomater. Sci.*, **5**, 303-324 (1994).
7. M. A. Moses, H. Brem, R. Langer, Advancing the field of drug delivery: taking aim at cancer, *Cancer Cell*, **4**, 337-341 (2003).
8. S. A. Viores, Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration, *Int. J. Nanomedicine*, **1**, 263 (2006).
9. E. Chiellini, R. Solaro, Biodegradable polymeric materials, *Adv. Mater.*, **8**, 305-313 (1996).
10. C. S. Brazel, S. L. Rosen, *Fundamental principles of polymeric materials*, John Wiley & Sons (2012).
11. S. A. Wickline, A. M. Neubauer, P. M. Winter, S. D. Caruthers, G. M. Lanza, Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with

- targeted nanoparticles, *J. Magn. Reson. Imaging*, **25**, 667-680 (2007).
12. X. Zhang, M. Sun, A. Zheng, D. Cao, Y. Bi, J. Sun, Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **45**, 632-638 (2012).
13. E. Locatelli, M. C. Franchini, Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system, *J. Nanoparticle Res.*, **14**, 1316 (2012).
14. M. M. Badran, A. H. Alomrani, G. I. Harisa, A. E. Ashour, A. Kumar, A. E. Yassin, Novel docetaxel chitosan-coated PLGA/PCL nanoparticles with magnified cytotoxicity and bioavailability, *Biomed. Pharmacother.*, **106**, 1461-1468 (2018).
15. D. Ding, Q. Zhu, Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics, *Mater. Sci. Eng., C*, **92**, 1041-1060 (2018).
16. N. K. Al-Nemrawi, A. R. Okour, R. H. Dave, Surface modification of PLGA nanoparticles using chitosan: Effect of molecular weight, concentration, and degree of deacetylation, *Adv. Polym. Technol.*, **37**, 3066-3075 (2018).
17. L. Hu, X. Meng, R. Xing, S. Liu, X. Chen, Y. Qin, H. Yu, P. Li, Design, synthesis and antimicrobial activity of 6-N-substituted chitosan derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 4548-4551 (2016).
18. A. Zimoch-Korzycka, Ł. Bobak, A. Jarmoluk, Antimicrobial and antioxidant activity of chitosan/hydroxypropyl methylcellulose film-forming hydrosols hydrolyzed by cellulase, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1436 (2016).
19. G.-W. Jeong, S.-C. Park, C. Choi, J.-P. Nam, T.-H. Kim, S.-K. Choi, J.-K. Park, J.-W. Nah, Anticancer effect of gene/peptide co-delivery system using transferrin-grafted LMWSC, *Int. J. Pharm.*, **488**, 165-173 (2015).
20. M. P. Patel, R. R. Patel, J. K. Patel, Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review, *J. Pharm. Pharm.*, **13**, 536-557 (2010).
21. B. Semete, L. Booyens, L. Kalombo, J. D. Venter, L. Katata, B. Ramalapa, J. A. Verschoor, H. Swai, In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **249**, 158-165 (2010).

Authors

Su-Gyeong Yu; M.Sc., Researcher, Department of Polymer Science and Engineering, Sunchon National University, Jeonnam 57922, Republic of Korea; sgyu@nate.com
 Jae-Woon Nah; Ph.D., Professor, Department of Polymer Science and Engineering, Sunchon National University, Jeonnam 57922, Republic of Korea; jwnah@sunchon.ac.kr
 Gyeong-Won Jeong; Ph.D., Professor, Chosun College of Science and Technology, Department of Bioenvironmental & Chemical Engineering, Gwangju 61453, Republic of Korea; gwjeong@ cst.ac.kr