

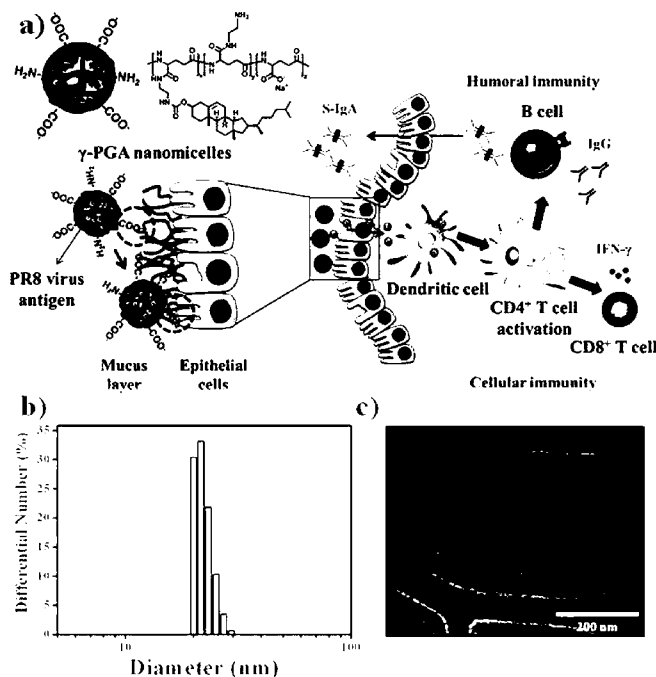


- (51) 국제특허분류:
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/004927
- (22) 국제출원일: 2013년 6월 4일 (04.06.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0062734 2013년 5월 31일 (31.05.2013) KR
- (71) 출원인: 주식회사 바이오리더스 (BIOLEADERS CORPORATION) [KR/KR]; 305-500 대전광역시 유성구 용산동 559, Daejeon (KR). 충남대학교산학협력단 (THE INDUSTRY AND ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 305-764 대전광역시 유성구 궁동 220 번지 충남대학교, Daejeon (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-333 대전광역시 유성구 어은동 52, Daejeon (KR). 국민대학교산학협력단 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 136-702 서울특별시 성북구 정릉동 861-1 국민대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최재철 (CHOI, Jae-Chul); 305-751 대전시 유성구 구죽로 25 송강그린아파트 301-501, Daejeon (KR). 임용택 (LIM, Yong Taik); 302-773 대전시 서구 둔산북로 160 한마루아파트 105-904, Daejeon (KR). 부하령 (POO, Haryoung); 305-8096 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 성문희 (SUNG, Moon-Hee); 136-753 서울시 성북구 성북로 4길 52 한신한진아파트 104-801, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo young) 등; 135-080 서울시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MUCUS LAYER-ADHESIVE POLY γ -GLUTAMIC ACID NANOMICELLES AND DRUG DELIVERY SYSTEM USING SAME

(54) 발명의 명칭: 점막 점착성 폴리감마글루탐산 나노마이셀 및 이를 이용한 약물 전달체



(57) Abstract: The present invention relates to nanomicelles comprising a complex of a poly γ -glutamic acid of which a part of the carboxylic group is substituted by an amine group and an oleophilic compound and, more specifically, to nanomicelles comprising a complex of a poly γ -glutamic acid of which a part of the carboxylic group is substituted by an amine group and an oleophilic compound, a method for producing the same, and a drug delivery system using mucus layer-adhesive properties of the nanomicelles. According to the present invention, when the nanomicelles drug delivery system on the basis of the poly γ -glutamic acid, which is a biogenous natural polymer, is utilized in the field of drug delivery to a mucus layer region, the nanomicelles drug delivery system can improve biostability and effectiveness of a drug.

(57) 요약서: 본 발명은 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀 및 이의 제조방법과 상기 나노마이셀의 점막 점착특성을 이용한 약물전달체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 생체 유래 천연고분자인 폴리감마글루탐산을 기반으로 한 나노마이셀 약물전달체를 점막 부위의 약물전달 분야에 활용함으로써, 약물의 생체 안정성 및 유효성 등을 향상

시킬 수 있다.



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, **공개:**

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 점막 점착성 폴리감마글루탐산 나노마이셀 및 이를 이용한 약물 전달체

기술분야

- [1] 본 발명은 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀 및 이의 제조방법과 상기 나노마이셀의 점막 점착특성을 이용한 약물전달체에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 본 발명은 생체친화성 천연 고분자인 폴리감마글루탐산을 이용하여 약물 또는 형광체를 전달할 수 있는 폴리감마글루탐산 나노마이셀 및 그 제조 방법에 관한 것이다. 의약의 투여경로 중 가장 많이 이용되는 것은 경구 투여이나, 점막부위에 직접 투여하여 치료효과를 증대할 수 있는약품들의 경우, 또한 점막을 통하여 흡수되는 것이 생체 이용률의 증대에 효과적인 약물들의 경우, 점막이 주요한 대체 투여 경로로서 주목받고 있다. 점막은 위장관 등 외부에 노출되지 않은 곳을 비롯하여, 구강, 비강, 생식기, 직장, 소화기, 피부궤양 부위 등에 존재하고 있다. 이들 점막 부위로 투여된 생리활성 물질들은 일반적으로 경루로 투여되어 흡수되는 약물에 비해 바로 혈류내로 흡수가 가능하여 약효 발현에 소요되는 시간이 짧은 장점이 있다. 또한 구강, 비강, 호흡기 점막, 안 점막, 생식기 점막, 피부궤양 부위의 경우, 병소부위로의 직접적인 약물 적용은 경구투여에 비하여 약물의 유효성을 보다 증강시켜 줄 수 있는 장점이 있다.
- [4] 또한, 점막 주위에 많은 면역세포들이 집중되어 있기 때문에, 인플루엔자(influenza) 백신용 항원물질을 점막을 통하여 전달함으로써 점막 면역성 (mucosal immunity)을 증강시키는 것도 매우 중요하다. 이때에 항원 전달체로 사용되는 소재들이 단순하게 항원의 전달성을 증가시켜주는 역할 이외에도 면역세포의 활성화를 돕는 백신 아주번트(vaccine adjuvant) 물질의 기능까지 수행할 수 있다면, 그 가치는 더욱 크다고 할 수 있다.
- [5] 점막 점착성 고분자로는 폴리아크릴산 소재의 물질들이 많이 사용되어 왔다. 미국 등록특허 제 4,292,299 호에서는 폴리아크릴산과 그 유도체 및 폴리아크릴산 셀룰로스 유도체 등과의 공중합체를 이용한 점막 점착성 약물체가 제안되었으며, 유럽 등록특허 제 654,261호에서는 셀룰로오스에테르 유도체, 폴리아크릴산 유도체 및 젤라틴의 물리적 혼합 조성물을 점막 점착성을 얻기 위하여 사용하였다. 또한 미국 등록 특허 제 5,942,243호에서는 폴리스티렌을 기제로 한 공중합체를 점막 투여용 약물전달 제제 성분으로

사용하였다. 그러나, 이들 점막 점착성 소재들 대부분은 화학적 합성 방법을 통하여 제조된 유기 합성 물질이다. 따라서, 생체 친화성이 있는 생체 유래 소재 물질을 기반으로 한 점막 점착성 전달체 개발이 활발하게 이루어지고 있다.

- [6] 점막을 형성하는 주성분인 뮤신은 동물의 외분비 샘에서 분비되는 점성 물질을 통틀어 이르는 말로 당질과 결합된 복합단백질을 가리킨다. 이 뮤신엔 세포의 주성분인 단백질의 소화를 촉진하여 체내에서 유용한 작용을 하고 위벽 보호 작용 해독 작용을 한다. 이 뮤신이 존재하는 기관은 구강, 비강, 후두, 위장관, 눈, 항문, 질이며 그 두께는 수nm에서 170 μ m까지 다양함. 뮤신 네트워크의 구조는 여러 결합에 의해 유지되는데, 그 결합에는 이온 결합 수소 결합, 디설피드(disulfide) 결합, 반데르발스결합 뮤신끼리 얽힘 등이 있다. 이런 결합들과 연결되는 점막 부착성 고분자에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔으며, 뮤신층에 존재하는 결합과 상호작용이 강한 특징을 가진 고분자가 주를 이룬다. 일반적으로 점막층은 복잡한 다공성 그물 구조를 가지고 있으며, 수 마이크로미터의 크기인 박테리아의 경우 일반적으로 점막층을 통과할 수 없으나 점막층이 무너진 곳이나 얇은 곳에서는 일부 통과하는 것으로 알려져 있다. 10나노미터 정도의 크기인 항체와 그보다 큰 플라스미드 DNA인 경우 점막층을 통과할 수는 있으나 점막층에 존재하는 수많은 효소에 의해 분해되므로 점막층을 통과하기 어렵다. 200나노미터 이하의 크기인 바이러스의 경우 빠르게 점막층을 통과하는 것으로 알려져 있다.

- [7] 본 발명에서 사용된 폴리감마글루탐산은 카르복실기를 가지는 폴리펩타이드로서 고분자량의 폴리감마글루탐산을 생산하는 내염성 균주 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*) 청국장 균주를 이용하여 폴리감마글루탐산을 생산하는 방법에 관한 특허(대한민국 등록특허 제 500796호) 및 폴리감마글루탐산을 함유하는 항암조성물, 면역보강제, 면역증강제, 바이러스 감염 억제에 대한 특허(대한민국 등록특허 제496606호, 제517114호, 제475406호, 제0873179호)를 출원했다. 또한, 물질의 의약품도에 대한 연구가 지속적으로 진행되면서 계속적으로 다양한 효능들이 밝혀지고 있다.

- [8] 이에, 본 발명자들은 점막 점착특성을 가지는 약물전달체를 개발하고자 예의 노력한 결과, 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀이 점막점착 특성과 면역증강효과를 가지는 것과, 상기 나노마이셀을 약물전달체로 사용할 경우, 점막으로의 약물전달효과가 높다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[9]

[10] 발명의 요약

- [11] 본 발명의 목적은 생체 유래 천연고분자인 폴리감마글루탐산을 기반으로 하여, 점막 점착성이 우수한 나노마이셀 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

- [12] 본 발명의 다른 목적은 점막 점착성이 우수한 나노마이셀을 이용한

약물전달체를 제공하는데 있다.

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀을 제공한다.
- [14] 본 발명은 또한, (a) 폴리글루탐산 용액에 친유성 화합물-아민 복합체 용액을 혼합하여 폴리글루탐산-친유성 화합물 복합체를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 폴리글루탐산-친유성 화합물 복합체에 아민계 화합물을 처리하여 폴리감마글루탐산의 카르복실기를 아민기로 치환하여, 카르복실기의 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀을 제조하는 단계를 포함하는 카르복실기의 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀의 제조방법을 제공한다.
- [15] 본 발명은 또한, 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀의 내부에 단백질, 유전자, 펩타이드, 화합물, 항원 및 천연소재로 구성된 군에서 선택되는 약물이 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 나노마이셀 약물전달체를 제공한다.

[16]

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 점막 점착성 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀 (r-PGA nanomicelles)의 화학구조식과 이 나노마이셀이 가지는 바이러스 항원 전달체의 특성에 대한 원리를 나타내는 개념도(a), 그리고 이 나노마이셀의 입경을 DLS (b)와 cryo-TEM (c)으로 나타낸 것이다.
- [18] 도 2는 마우스 모델에서 비강내로 주입된 점막 점착성 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 점막 점착성을 (a) SPECT/CT와 (b) 면역조직형광영상법 (b)을 이용한 측정 영상을 나타낸 것이다.
- [19] 도 3은 마우스 모델에서 모델항원 (OVA)이 도입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀을 비강내로 주입 후 항원 특이적인 면역효능을 측정한 결과를 나타낸 것이다. (a) OVA-특이적 IgG 항체 반응의 유도 능력 측정 (비교를 위하여 폴리감마글루탐산에 콜레스테롤과 같은 친유성기로만 치환되어 있는 폴리감마글루탐산-콜레스테롤(r-PGA-Cholesterol, 카르복실기로 표면이 되어 있음) 복합체의 경우에 나타나는 항원특이적 면역반응을 비교하여 나타내었다), (b) OVA-특이적 IgA 항체 반응의 유도 능력 측정 (c) IFN- γ ELISpot 검정을 통한 IFN- γ 를 생성하는 세포의 개수를 측정한 결과를 나타낸 것이다. (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, n. s., not significant).
- [20] 도 4는 마우스 모델에서 인플루엔자 바이러스 항원이 도입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀을 비강내로 주입 후 항원 특이적인 면역효능을 측정한 결과를 나타낸 것이다 (1. PBS, 2. PR8 only, 3. PR8 plus γ -PGA nanomicelle (10 μ g), 4. PR8 plus γ -PGA nanomicelle (100 μ g)). (a) 인플루엔자

바이러스 특이적인 IgG 항체의 생성 측정, (b) 인플루엔자 바이러스 특이적인 IgA 항체의 생성 측정, (c) IFN- γ ELISpot 검정을 통한 IFN- γ 를 생성하는 세포의 개수를 측정, (d) 바이러스 항체에 의해 헤마글루티닌의 혈액 응집 반응 억제 효능 측정, (e) 백신 투여 후 바이러스 감염에 대한 마우스 몸무게의 변화, (f) 백신 투여 후 바이러스 감염에 대한 마우스의 치사율 측정을 나타낸 것이다. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. n. s., not significant).

[21]

[22] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예

[23]

일 관점에서, 본 발명은 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[24]

본 발명의 카르복실기의 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀은 다음 단계를 거쳐 제조된다:

[25]

(a) 폴리글루탐산 용액에 친유성 화합물-아민 복합체 용액을 혼합하여 폴리글루탐산-친유성 화합물 복합체를 제조하는 단계; 및

[26]

(b) 상기 폴리글루탐산-친유성 화합물 복합체에 아민계 화합물을 처리하여 폴리감마글루탐산의 카르복실기를 아민기로 치환하여, 카르복실기의 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀을 제조하는 단계.

[27]

본 발명에 있어서, 친유성 화합물은 콜레스테롤 및 그 유도체, 탄소수 3~21개를 갖는 알리파틱(aliphatic) 화합물 (C3 - C21) 및 벤젠 그룹을 1~10개 포함하는 방향족 화합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 사용할 수 있다.

[28]

일례로, 친유성 화합물 중 콜레스테롤 계열은 Cholesterol, Cholesterol β -D-glucoside, Cholesteryl N-(trimethylammonioethyl)carbamate chloride, Cholesteryl oleyl carbonate, Cholesterol, Lanosterol, Clofibrate, Cholesteryl oleate, Mevastatin, Thiocholesterol, Stigmasterol, Cholesteryl palmitate, Diethylumbelliferyl phosphate, Cholesteryl heptadecanoate, β -Sitosterol, 5 α -Cholestane, 5-Cholesten-3-one 등의 콜레스테롤 및 그화합물 및 유도체 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[29]

친유성 화합물 중 토코페롤 계열은 ($\pm$)- α -Tocopherol, (+)- δ -Tocopherol, DL- α -Tocopherol acetate, (+)- γ -Tocopherol, Vitamin E acetate, Pinobanksin, Methyl jasmonate, Retinyl acetate, 등의 10~100여개의 탄소로 이루어진 토코페롤 및 전구체, 유도체 화합물 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[30]

친유성 화합물 중 알리파틱(aliphatic) 화합물은 Propyne, Acrolein, Allyl alcohol, 2-Propene-1-thiol, Propane, Isopropylamine, 1,3-Diaminopropane, N-Isopropylmethylamine, Propylene glycol, 2-Nitropropane, 1-Nitropropane 등을 포함하는 3탄소계 소수성 화합물 및 유도체, Butyne, Butyraldehyde, 2-Methyl-1-propanol, Diethyl ether, 2-Butanol, 1-Butanol, Butyl alcohol 등의 4

탄소계를 포함하는 소수성화합물 및 유도체, Pentyl acetate, 2-Pentyl acetate, 2-Pentyl-2-cyclopenten-1-one, Pentyl nitrite, Pentyl propionate, Pentyl valerate, N-(1-Pentyl)formamide, Pentyl laurate, 2-Pentyl butyrate의 5개 탄소를 함유하는 소수성 물질 및 그 유도체에서 선택될 수 있다.

- [31] 친유성 화합물 중 벤젠 그룹을 1개 이상 포함하는 방향족 화합물은 Benzen, cyclohexane, hexane등의 형태를 기본으로 하는 알리파틱 그리고 비방향성 환형화합물 및 아로마틱화합물과 그 유도체, Benzyl chloride, Benzyl chloroformate, Benzyl formate, Benzyl methyl ether, Benzyl propionate, Phenol, 2-(Methylamino)phenol, 2-tert-Butyl-6-methyl-phenol, 3-(Trifluoromethyl)phenol, Dansylcadaverine, 3-(Dansylamino)phenylboronic acid, Hexane, 3-Oxabicyclo[3.1.0]hexane-2,4-dione, 1,6-Bis(trichlorosilyl)hexane, Cyclopentene oxide, 4-Hexylphenol, Cyclo(Leu-Ala), Apicidin, Beauvericin 등 환형구조와 비환형 구조물 중에서 선택될수 있다.
- [32] 또한 친유성 화합물은 QS-21, MPLA, Tentoxin, Enniatin A, Thiamine, Ancitabine, Trapoxin A, Enniatin A1, Cycloartenol, Cypermethrin 당,아미노산, 유기산 및 유기알콜 화합물 및 그 유도체, Glycerol, Malonic acid, Malic acid, Oxalic acid, Lactic acid, Fumaric acid, Tartaric acid, Citric acid, Quinic acid, Diisopropyl azodicarboxylate, Acetic acid, Trioctylamine, Benzoic acid, 2-phenyl-pentanoic acid, Oleic acid, Palmitic acid(stearic acid), Sorbic acid, Hexanoic acid, Methyl isovalerate, Heptanoyl chloride, Dodecenoic acid, Lauric acid, Sebacic acid, Pyridoxine hydrochloride, Sodium undecylenate, 과 같은 3C이상의 유기산, 유기산 유도체 및 지방산 중에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [33] 본 발명에 있어서, 아민계 화합물은 에틸렌디아민을 포함하는 알킬디아민 계열 화합물 또는 폴리아민을 포함하는 올리고머 및 폴리머를 사용할 수 있다.
- [34] 일례로, 디아민계 화합물 중 단량체 계열로는 Hydrazine, Ethylenediamine, 1,3-Diaminopropane, 3,5-Diamino-1,2,4-triazole, Cadaverine, Hexamethylenediamine, Bis(hexamethylene)triamine, Triethylenetetramine, N,N'-Bis(2-aminoethyl)-1,3-propanediamine, 2,2-Bis(aminoethoxy)propane, Benzidine, Spermine, Minoxidil, 2,2'-(Ethylenedioxy)bis(ethylamine), Arginine, Lysine, Cystamine, Cysteamine 등에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [35] 폴리머 계열로는 Poly(ethylene glycol) bis(amine), O,O'-Bis(2-aminoethyl)octadecaethylene glycol, Chitosan, PEI, Collagen 등과 같은 생체친화성 폴리머를 매개한 다이아민 및 다가 아민형 폴리머화합물 유도체 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [36] 본 발명에서 사용되는 폴리감마글루탐산은 분자량이 1~15,000kDa인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [37] 본 발명의 일 양태에서는 카르복실기를 가진 폴리감마글루탐산에 콜레스테롤과 같은 친유성 물질 복합체에 음전하를 띠는 세포표면과 반응할 수

있는 양전하를 가진 아민기를 치환함으로서, 약물이나 항원을 봉입할 수 있는 생체 친화성 고분자 나노마이셀을 제조하였다.

- [38] 본 발명에서 폴리감마글루탐산 나노마이셀(r-PGA nanomicelles)은 폴리감마글루탐산에 콜레스테롤과 같은 친유성기와 아민기와 같은 양전하를 띠는 물질이 동시에 부착되어 있는 폴리감마글루탐산 키투게이트를 수용액에 분산하여 얻은 고분자 마이셀을 가리킨다.
- [39] 먼저, 본 발명의 일실시예를 통해 제조된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 특성을 확인하였다. DLS를 이용하여 나노마이셀의 입경을 측정 결과 지름이 22.1 ± 2.0 nm 임을 확인하였고 Cryo-TEM 을 통하여 구형의 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀을 확인하였다 (도 1). 또한, NMR을 이용하여 분석한 결과 콜레스테롤은 1.7 mol %, 원소분석을 통하여 확인한 결과 약 28.1 mol %의 아민기가 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 동적산란법을 이용하여 측정한 결과 표면전하는 약 36.43 mV 임을 확인할 수 있었다.
- [40] 다른 관점에서, 본 발명은 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀의 내부에 단백질, 유전자, 펩타이드, 화합물, 항원 및 천연소재로 구성된 군에서 선택되는 약물이 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 나노마이셀 약물전달체에 관한 것이다.
- [41] 본 발명에 있어서, 상기 항원은 폴리사카라이드, 약독된 살아있는 완전체 미생물, 불활성화된 미생물, 재조합 펩티드 및 단백질, 당단백질, 당지질, 리포펩티드, 합성 펩티드, 파열 미생물 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 본 발명의 약물전달체에 포함된 약물은 약물전달체의 점막 점착특이성을 이용하여, 점막을 통하여 전달되며, 상기 점막은 구강, 비강, 호흡기 점막, 안 점막, 생식기 점막, 피부궤양 부위 등 일 수 있다.
- [43] 본 발명의 일 양태에서는 상기 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 점막 점착성 및 항원 전달체의 특성을 증명하기 위하여 아이오딘 123 또는 FITC가 표지된 OVA 모델항원을 마우스 비강내로 주입 후 SPECT/CT 영상과 면역조직형광영상 기법을 통하여 OVA의 생체내 거동을 확인하였다. SPECT/CT 영상에서 감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA를 주입한 경우 12시간이 지나도 비강내에 OVA가 남아있는 반면, OVA만 주입한 경우는 6시간내에 OVA가 사라지는 것을 확인하였다. 면역조직형광영상에서 감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA를 주입한 경우 6시간이 지나도 비강내에 OVA가 남아있는 반면, OVA만 주입한 경우는 1시간이 지나면 OVA가 사라지는 것을 확인하였다. 또한, OVA만을 주입한 경우와 달리 감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA를 주입한 경우, OVA가 비강 점막조직내로 효과적으로 전달됨을 확인하였다 (도 2).

- [44] 상기 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀이 비강 점막 접착성 및 항원 전달체의 특성을 있음을 확인하고, 마우스 모델에서 모델항원인 OVA가 도입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀을 비강내로 주입 후 항원 특이적인 면역효능을 측정하였다. 우선, 항원특이적인 체액성 면역 반응 효능을 확인하기 위하여 마우스 혈장내 생성된 OVA 특이적인 IgG 항체를 확인하였다. 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA가 주입된 마우스에서 대조군에 비해 10.2배의 IgG 항체 생성율이 높음이 확인되었다. 또한, 점막 면역에서 특이적으로 생성되는 항체인 IgA 역시 대조군에 비해 4.5배 높은 생성율을 나타내었다 (도 3).
- [45] 참고로, 폴리감마글루탐산에 콜레스테롤과 같은 친유성기로만 치환되어 있는 폴리감마글루탐산-콜레스테롤(r-PGA-Cholesterol, 카르복실기로 표면이 되어 있음)의 경우에는 항원특이적 면역반응이 항원자체를 사용한 경우와 비교하여 보았을 때, 큰 차이가 없음을 보여주고 있어, 점막을 통한 항원 전달이 비효율적임을 알 수 있다(도 3a). 이러한 결과는 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀(r-PGA nanomicelles)에서 아민기(NH₂)로부터 유도되는 양전하의 기능이 점막점착성 및 점막을 통한 약물전달 기능과 매우 밀접하게 관계하고 있음을 알 수 있다.
- [46]
- [47] 세포성 면역 반응은 바이러스의 감염을 제어하고 질환의 징후를 개선하며 질환 회복을 촉진하는 데서 중요한 역할을 수행한다고 여겨진다. 이러한 항바이러스 세포성 면역은 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes)와 IFN- γ , IL-2와 같은 면역자극성 사이토카인을 유도하는 유형 1 CD4⁺ T-헬퍼 림프구(T-helper lymphocytes; Th1)의 도입으로 구성된다.
- [48] 따라서, 본 발명의 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀이 OVA 항원 특이적인 세포성 면역을 유도하는지를 IFN- γ ELISpot 검정을 통하여 확인하였다. 백신이 주입된 마우스의 비장내 세포 중 IFN- γ 를 생성하는 세포의 개수를 확인 한 결과 대조군에 비해 5.2배 높은 수치임을 확인함으로써, 세포성 면역 유도능력을 확인하였다 (도 3).
- [49] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀이 체액성, 세포성 면역유도에 효과적임을 확인하고, 인플루엔자 바이러스 (influenza A/PuertoRico/8/34;PR8;H1N1) 항원을 이용하여 그 효능을 검증하였다.
- [50] 우선, 항원특이적인 체액성 면역 반응 효능을 확인하기 위하여 PR8 항원 특이적인 항체를 확인하였다. 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 PR8 항원이 주입된 마우스에서 대조군에 비해 28.6배의 높은 IgG 항체 생성, 그리고 27.6 배의 높은 IgA 생성능력을 확인하였다 (도 4). PR8 항원 특이적인 세포성 면역을 유도하는지를 역시 IFN- γ ELISpot 검정을 통하여 확인하였다. 백신이 주입된 마우스의 비장내 세포 중 IFN- γ 를 생성하는 세포의 개수를 확인 한 결과

대조군에 비해 3.2배 높은 수치임을 확인함으로써, 세포성 면역 유도능력을 확인하였다. 또한, 항바이러스항체가 인플루엔자 바이러스 표면단백질인 HA와 적혈구가 결합하는 것을 방해하는 원리를 이용하여 PR8 항원 특이적인 항체 효능을 확인한 결과 대조군에 비해 4배 높음을 확인하였다 (도 4).

[51] 상기 결과를 바탕으로 본 발명자들은 바이러스 감염에 대한 생존율을 확인하였다. 50%의 치사율은 가지는 바이러스의 10배를 이용 생존율을 확인한 결과 PBS 주입 실험군은 100% 치사율을 나타내며, PR8 항원만 주입한 실험군은 50%의 치사율을 나타내었다. 반면에 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 PR8 항원을 주입한 실험군의 경우 100% 생존하는 결과를 나타내었다 (도 4).

[52]

[53] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀이 체액성, 세포성 면역유도에 효과적임을 확인하고 바이러스 감염에 대한 저항능력은 높여줄 수 있음을 확인하였다.

[54]

[55] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[56]

[57] 실시예 1 폴리감마글루탐산/콜레스테롤 나노마이셀 제조

[58]

[59] 1-1 콜레스테롤-아민 합성

[60] 250mmol의 에틸렌디아민(시그마알드리치, 미국)을 250ml의 톨루엔에 용해시켰다. 이때 얼음을 이용하여 온도를 낮게 유지하였다. 2.25g 콜레스테롤을 50ml 톨루엔에 용해시키고, 10분간 정치한 후, 상기 제조한 에틸렌디아민 용액에 떨어뜨려 혼합시키고, 즉시 실온에서 16시간 동안 교반하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후 탈이온수를 이용하여 여러 번 세척하였다. 위 과정을 거치며 맑아진 유기층을 마그네슘 설페이트를 이용하여 건조시키고, 건조된 용액에서 톨루엔을 회전증발시켰다. 증발된 시료를 20ml 디클로로메탄과 20ml 메탄올 혼합 용액으로 여러번 행구어내고, 1 마이크로미터 PTFE 필터를 이용하여 여과하였다. 여과된 맑은 용액을 다시 회전증발시키고 백색고체 형태의 콜레스테롤-아민시료를 얻었다. 이렇게 얻어진 콜레스테롤-아민 시료를 가지고 NMR을 이용하여 콜레스테롤과 아민의 결합정도를 확인하였다. NMR 분석결과 약 98 mol %의 아민이 결합되었음을 확인하였다.

[61]

[62] 1-2 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 합성

[63] 폴리감마글루탐산(1g, 50 KDa, 바이오피더스, 한국)을 40°C에서 10ml DMSO(10ml)에 하루정도 용해시켰다. 1-1에서 제조한 콜레스테롤-아민(1g)을 실온에서 10ml THF(Tetrahydrofuran, 시그마알드리치, 미국)에 용해시켰다. 콜레스테롤-아민 용액을 폴리감마글루탐산 용액에 천천히 떨어뜨리고 섞인 두 용액에 CDI(1g)을 넣어준 후 40°C에서 하루정도 반응시켰다. 반응된 용액을 실온에서 식힌 후 회전증발을 통해 THF를 제거하였다.

[64] 상기 THF가 제거된 용액을 아세톤을 통해 침전시키고 원심분리를 통해 용매와 용질을 충분히 분리시켜 아세톤을 제거하고 40°C에서 남아 있는 아세톤을 건조시켰다. 건조된 시료를 탈이온수에 넣고 탄산수소나트륨을 최초 반응시킨 폴리감마글루탐산과 같은 몰수로 넣어 폴리감마글루탐산을 중화시켰다. 완전히 녹인 용액에 amberlite (5 g, 시그마알드리치, 미국)로 2시간정도 교반하여 반응하지 않은 콜레스테롤 및 불순물을 제거하였다. 메쉬를 통해 amberlite를 제거하고 셀룰로오스 멤브레인 튜브(MWCO 12,000, 시그마알드리치, 미국)를 이용하여 2일간 투석하였다. 투석된 용액을 동결건조하여 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀 시료를 얻었다. 상기 나노마이셀을 NMR로 분석하여 콜레스테롤 도입량을 측정하였다. NMR 분석결과 1.7 mol % 콜레스테롤이 결합되었음을 확인 하였다.

[65]

[66] 1-3 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀 합성

[67] 100 mg의 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 복합체와 0.518 ml의 에틸렌디아민(ethylene diamine)을 60 mg의 카르보닐디이미다졸(carbonyldiimidazole)이 녹여져 있는 50 ml의 디엠에스오(DMSO)에서 녹인 후 약 24시간 동안 교반한다. 원소분석(elemental analysis)을 통하여 C, N, H의 양을 정량화함으로써, 도입된 아민기의 양을 정량화하였다. 분석결과, 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 복합체 (γ -PGA-Cholesterol)의 경우, 각각, C (35.16 ± 0.08 %), H (4.87 ± 0.19 %), N (7.40 ± 0.04 %) 값을 보였으며, 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀 (γ -PGA nanomicelles, i.e., aminated γ -PGA-Cholesterol)의 경우는, C (42.41 ± 0.38 %), H (6.95 ± 0.13 %), N (15.90 ± 0.14 %) 값을 보였다. 결과적으로, 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 경우, 약 28.1 mol %의 아민기가 치환되어 있음을 확인할 수 있었다.

[68]

[69] 실시예 2 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 특성화

[70]

[71] 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀을 증류수에 1 mg/mL로 분산시켜 DLS(Dynamic Light Scattering, 오츠가, 일본) 측정 결과, 도 1의 b)와 같이 지름이 22.1 ± 2.0 nm임을 확인하였고, Cryo-TEM을 통하여 분석한 결과, 도 1의 c)와

같이 구형의 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀임을 확인하였다. 또한, NMR을 이용하여 분석한 결과 콜레스테롤은 1.7 mol %, 원소분석을 통하여 확인한 결과 약 28.1 mol %의 아민기가 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 동적산란법을 이용하여 측정한 결과 표면전하는 약 36.43 mV 임을 확인할 수 있었다.

[72]

[73] 실시예 3 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 OVA 봉입

[74]

[75] 실시예 1에서 제작한 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀에 OVA(ovalbumin, 시그마알드리치, 미국)를 봉입하기 위해 8 mg/mL의 나노마이셀과 10 mg/mL의 OVA를 질량비 5:1의 비율로 섞고 한 시간 반응을 하면 OVA가 봉입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀이 만들어지게 된다. free OVA가 없이 100% 봉입되는 비율을 찾기 위해 8 mg/mL의 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 10 mg/mL OVA를 질량비로 2:1부터 9:1 의 비율로 반응을 하여 Polyacrylamide gel (SDS free gel)로 실험한 결과 5:1의 비율에서 100% 봉입되었음을 확인하였다.

[76]

[77] 실시예 4 아이오딘(I)이 도입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀 제조

[78]

[79] 4-1 타이로신이 도입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀 제조

[80] 아이오딘은 타이로신의 페놀고리에 높은 결합친화력을 가지므로 나노마이셀 구조에 타이로신을 결합함으로써 아이오딘을 도입할 수 있다. 실시예 1에서 제조한 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀을 물에 용해한 후, EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride, 시그마알드리치, 미국), NHS(N-hydroxysuccinimide, 시그마알드리치, 미국)와 타이로신아마이드(시그마알드리치, 미국)를 첨가하여 폴리감마글루탐산의 카르복시기와 타이로신아마이드의 아민기간 아마이드결합을 형성시켰다. 투석과 동결건조 과정을 통해 미반응물을 제거하고, 파우더 형태의 나노젤 시료를 얻었으며, 나노마이셀에 부착된 타이로신은 NMR 분석결과, 약 0.7 mole %가 도입되었다.

[81]

[82] 4-2 아이오딘이 도입된 나노마이셀 제조

[83] 타이로신이 도입된 나노마이셀을 PBS에 용해하여 준비하고, 동위원소 이온용액(Na¹²⁵I, 피어스, 미국)과 혼합한 후, 혼합용액을 iodination tube 내에서 1시간 정도 교반하며 실온에서 반응한다.

[84] 반응용액을 PD10 컬럼(시그마알드리치, 미국)에 로딩하고, PBS를 이동상으로 하여 모든 용출액을 1 ml 혹은 0.5 ml씩 분획하여 받아내었다. 각 용출분획의

123I-activity를 감마카운터로 측정하여 기록한 후, 가장 높은 activity를 나타내는 용출분획을 선택하여 사용하였다.

[85]

[86] 4-3 마우스 모델에서 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 점막 점착성 (SPECT/CT) 측정

[87] 타이로신이 도입된 나노마이셀과 아이오딘의 반응 후 가장 높은 activity의 용출분획을 선택하여 준비하고, 마우스 한 마리당 주입할 123I-activity를 고려하여 용출액을 PBS로 희석하였으며, 최종농도는 500 µg/ml 였다.

[88] SPECT/CT 이미징을 위한 시료의 주입량은 비강투여시 40 µl 내에 대략 200 µCi 이상의 ¹²³I-activity를 갖도록 하였다. 비강투여용 tip을 이용하여 40 µl의 시료를 마우스에 주입하고, 주입후 1, 6, 12 시간 후에 SPECT/CT 이미징을 시작한다. 각 이미징 소요 시간은 대략 1시간으로, 10분간 CT 이미징후 이어 50분간 SPECT 이미징을 진행한다. 시료의 비강투여시에는 주입량이 최대 40µl로 제한되므로, 이미징을 위한 ¹²³I-activity를 확보하기 위해, 시료의 농축과정이 반드시 필요하다. ¹²³I-labeled 나노마이셀을 원심분리 필터링(ultracel, 10kDa)을 진행하여 농축하고, 40 µl 당 이미징에 필요한 activity를 확보한다. 시료의 주입은 마우스의 크기와 상태를 고려하여 양쪽 비강에 번갈아 몇 분간의 간격으로 주입하였다.

[89] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, SPECT/CT 영상에서 감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA를 주입한 경우 12시간이 지나도 비강내에 OVA가 남아있는 반면, OVA만 주입한 경우는 6시간내에 OVA가 사라지는 것을 확인하였다. 면역조직형광영상에서 감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA를 주입한 경우 6시간이 지나도 비강내에 OVA가 남아있는 반면, OVA만 주입한 경우는 1시간이 지나면 OVA가 사라지는 것을 확인하였다. 또한, OVA만을 주입한 경우와 달리 감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA를 주입한 경우, OVA가 비강 점막조직내로 효과적으로 전달됨을 확인하였다.

[90]

[91] 실시예 5 동물면역 실험

[92]

[93] 5-1 동물 및 동물면역화

[94] 상기 실시예 3에서 제조한 항원이 봉입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 생체 내(*in vivo*)에서의 면역 특성을 알아보기 위하여 동물면역실험을 수행하였다. 동물실험에는 특정 병원균이 없는 6주령의 암컷 C57BL/6 마우스(코아텍, 대한민국)를 사용하였으며, 모든 동물실험은 충남대학교 공동동물실험센터에서 승인을 받아 수행하였다. 먼저, 체중(g) 당 0.01 ml의 2.5% 아버틴(*avertin*; 2,2,2 - tribromoethanol - tert - amyl alcohol, 시그마알드리치, 미국) 용액을 마우스의 복강에 주입하여 마우스를 마취시키고, 20µl의 항원이 봉입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀을 마우스 양쪽

비강에 10 μ l씩 번갈아 주입하였다. 대조군에는 PBS에 항원만을 포함하여 비강내로 주입하였다. 면역 방법은 3회 면역화로 실시하였으며, 각 주입 사이에 7일 간격으로 면역화를 실시하였다.

[95]

[96] 5-2 항체 측정을 위한 시료 채취 및 항체 ELISA 검사

[97] 실시예 5-1에서 처리된 동물 면역 1주일 후 눈혈관에서 혈액을 채취하여 실온에서 1시간 방치하고 난 후 실온에서 약 1시간동안 방치하였다. 그리고 4°C에서 원심분리기를 이용하여 상층액만 분리하였다. 이 용액을 이용하여 항원 특이적인 IgG 생성을 확인하였다. 비강점액을 채취하기 위하여 3차 면역화 1주일 후 경추탈골 방법으로 마우스를 희생시킨 후 비강내로 200 μ l의 PBS를 주입하고 다시 회수하였다. 이 용액을 이용하여 항원 특이적인 IgA를 측정하였다.

[98] 항원 특이적인 IgG, IgA의 생성은 ELISA 검정을 통하여 확인하였다. 마우스 항체 ELISA 검정은 제조업자의 지침에 따라 실행하였다. 우선 항원단백질을 0.05M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)에 1 μ g/ml로 well당 100 μ l씩 ELISA plate에 코팅하였다. 4°C에서 하룻밤 반응시키고 그뒤 PBS-T(바이오라드, 미국)로 3회 세척한 후 2% BSA로 blocking 하였다. 이 과정은 37°C에서 1시간동안 진행하였다. 다시 세척 후에 PBS로 희석한 혈장과 비강점액을 순차적 8진 희석한 용액을 well당 100 μ l씩 넣고 2시간동안 37°C에서 반응하였다. 그리고 난 뒤 HRP가 결합된 2차 항체를 1시간동안 반응시킨 후 TMB 용액(바이오라드, 미국)을 첨가하여 발색을 유도하였다. 30분 후 2N 황산을 첨가하여 반응을 멈춘 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다. 항체의 역가는 흡광도 0.1에서 희석값으로 결정하였다.

[99] 그 결과, 도 3의 a에 나타난 바와 같이, IgG의 항체 생성율은 폴리글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA가 주입된 마우스군이 대조군에 비하여 10.2배 높은 생성율을 나타내는 것을 확인하였으며, 아민기로 표면이 치환되지 않은 폴리글루탐산-콜레스테롤 복합체의 경우, 항체 생성율 증가를 확인할 수 없었다.

[100] 도 3의 b에 나타난 바와 같이, 점막면역특이적으로 생성되는 항체인 IgA는 폴리글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 OVA가 주입된 마우스군이 대조군에 비하여 4.5배 높은 생성율을 나타내는 것을 확인하였다.

[101]

[102] 5-3 ELISpot 검정

[103] 실시예 5-1에서 처리된 동물 면역 1주일 후 마우스를 경추탈골시켜 희생시켰다. 마우스를 그룹 당 5마리씩을 선택하여 각각의 마우스에서 비장을 적출하여, 멸균된 페트리디쉬에 상기 비장 조직을 옮기고, cell strainer를 이용하여 상기 비장을 갈아 조직 피막으로부터 세포를 분리하였다. 단일 비장 세포 현탁액을 제조했다. 마우스 IFN- γ ELISpot(Nunc, 네덜란드) 검정은 제조업자의

지침에 따라 실행했다. ELISpot plate에 IFN- γ 항체 (5 μ g/ml)을 첨가하여 하룻밤 반응시킨 후 완전 배양 배지(10% 우태아혈청을 보충한 RPMI)로 2시간동안 blocking 하였다. 비장 세포(5 $\times 10^5$)를 200 μ l의 총 부피로 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO $_2$ 에서 60시간 동안 완전 배양 배지에서 펩티드 당 10 μ l/ml의 농도로 자극시켰다. 이후 세척과 HRP가 결합된 2차 항체를 2시간동안 처리한 후 AEC (3-amino-9-ethyl-carbozole, 시그마일드리치, 미국)에 15분간 반응시켜 발색을 유도한후 CTL-면역스팟 판독기 유닛(Molecular Devices, 미국)으로 스팟을 계수했다. 만 입력 비장세포 당 스팟 형성 세포(spot forming cells; SFC)의 평균 $\pm$ 표준 편차에 상응하였다.

[104] 그 결과, 도 3의 c에 나타난 바와 같이, 백신이 주입된 마우스의 비장내 세포 중 IFN- γ 를 생성하는 세포의 개수를 확인 한 결과 대조군에 비해 5.2배 높은 수치임을 확인함으로써, 세포성 면역 유도능력을 확인하였다.

[105]

[106] 5-4 Hemagglutination 검정

[107] 각 그룹별 마우스 혈청에서의 항체 역가 측정은 바이러스에 대한 HI (Haemagglutination Inhibition) 검정으로 측정하였다. 모든 혈청은 *Vibrio cholerae*에서 추출한 RDE(receptor-destroying enzyme, (Denka Seiken, 일본)을 혈청 샘플 부피 대비 1:10으로처리한 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양하였다. 혈청 내 비특이적인 수용체들의 활성을 제거한 샘플을 96 well 둥근 바닥 플레이트에서 25 μ l씩 순차적 2진 희석하였다. 두번째로 혈청 샘플에 동일 부피의 4 HAU 바이러스를 넣고, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 30분간 반응시키고, 마지막으로 0.5% 닭 적혈구(tRNA)가 포함된 PBS를 50 μ l씩 넣어준 뒤 실온에서 40분간 반응시켰다. 역가는 희석된 50 μ l 안에서 계산된 값으로 $\log_{10}N = 10N$ 에서 N값으로 표기하였다 (그림 4d).

[108]

[109] 실시예 6 바이러스 감염에대한 생존능 검정

[110] 본 실시예에서는 PR8 바이러스 항원이 봉입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 면역증강 효과를 조사하기 위하여, 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 실험동물의 치사율을 검정하였다.

[111]

[112] 6-1 바이러스의 준비

[113] 병원체로 사용된 인플루엔자 바이러스는 mouse에서 고병원성을 나타내는 H1N1 인플루엔자 바이러스주 (A/Puerto Rico/8/34(H1N1), 한국생명공학연구원, 대한민국)를 10~11일 된 백색 산란계의 유정란에 접종하여 증폭한 뒤 실험에 사용하였으며, 실험동물로는 6주령의 암컷 C57BL/6 마우스(코아텍, 대한민국)를 사용하였다. 분양된 바이러스의 순수 분리는 다음과 같이 실시하였다. 일차적으로 분리된 바이러스를 항생제가 들어있는 PBS에 희석해서 10일령 된 백색 산란계의 유정란에 접종한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 정치 배양한 뒤 유정란의

요수를 취하여 증폭된 바이러스를 사용하였다.

[114]

[115] 6-2 동물면역 및 바이러스 감염

[116] 대조군으로는 인플루엔자 바이러스를 단독으로 비강에 주입한 마우스와 PR8 바이러스 항원(M.-S. Lee, A. Hu, *Trends Microbiol.* 20: 103, 2012) 을 비강에 주입한 마우스를 사용하였고, 실험군은 PR8 바이러스 항원이 봉입된 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀 비강투여한 후, 다음날 인플루엔자 바이러스를 투여하였다. 바이러스의 감염은 실험동물에 아버틴을 200 μ l 복강투여하여 마취한 후, 바이러스 30 μ l를 각 마우스에 비강을 통해 50%의 치사율은 가지는 바이러스의 10배 ($10 \times LD_{50}$)를 투여하였다. 바이러스 감염 2주 후까지 마우스 몸무게를 측정하고 마우스의 치사율을 검정하였다.

[117] 그 결과, 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 PR8 항원이 주입된 마우스에서 대조군에 비해 28.6배의 높은 IgG 항체 생성, 그리고 27.6 배의 높은 IgA 생성능력을 확인하였다 (도 4의 a 및 b). PR8 항원 특이적인 세포성 면역을 유도하는지를 역시 IFN- γ ELISpot 검정을 통하여 확인하였다. 백신이 주입된 마우스의 비강내 세포 중 IFN- γ 를 생성하는 세포의 개수를 확인 한 결과 대조군에 비해 3.2배 높은 수치임을 확인함으로써, 세포성 면역 유도능력을 확인하였다(도 4의 c). 또한, 항바이러스항체가 인플루엔자 바이러스 표면단백질인 HA와 적혈구가 결합하는 것을 방해하는 원리를 이용하여 PR8 항원 특이적인 항체 효능을 확인한 결과 대조군에 비해 4배 높음을 확인하였다 (도 4의 d).

[118] 상기 결과를 바탕으로 본 발명자들은 바이러스 감염에 대한 생존율을 확인하였다. 50%의 치사율은 가지는 바이러스의 10배를 이용 생존율을 확인한 결과 PBS 주입 실험군은 100% 치사율을 나타내며, PR8 항원만 주입한 실험군은 50%의 치사율을 나타내었다. 반면에 폴리감마글루탐산-콜레스테롤 나노마이셀과 PR8 항원을 주입한 실험군의 경우 100% 생존하는 결과를 나타내었다 (도 4의 f).

[119]

[120] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[121]

산업상 이용가능성

[122] 본 발명에 따른 생체 유래 천연고분자인 폴리감마글루탐산을 기반으로 한 나노마이셀 약물전달체를 점막 부위의 약물전달 분야에 활용함으로써, 약물의

생체 안정성 및 유효성 등을 향상시킬 수 있다.

청구범위

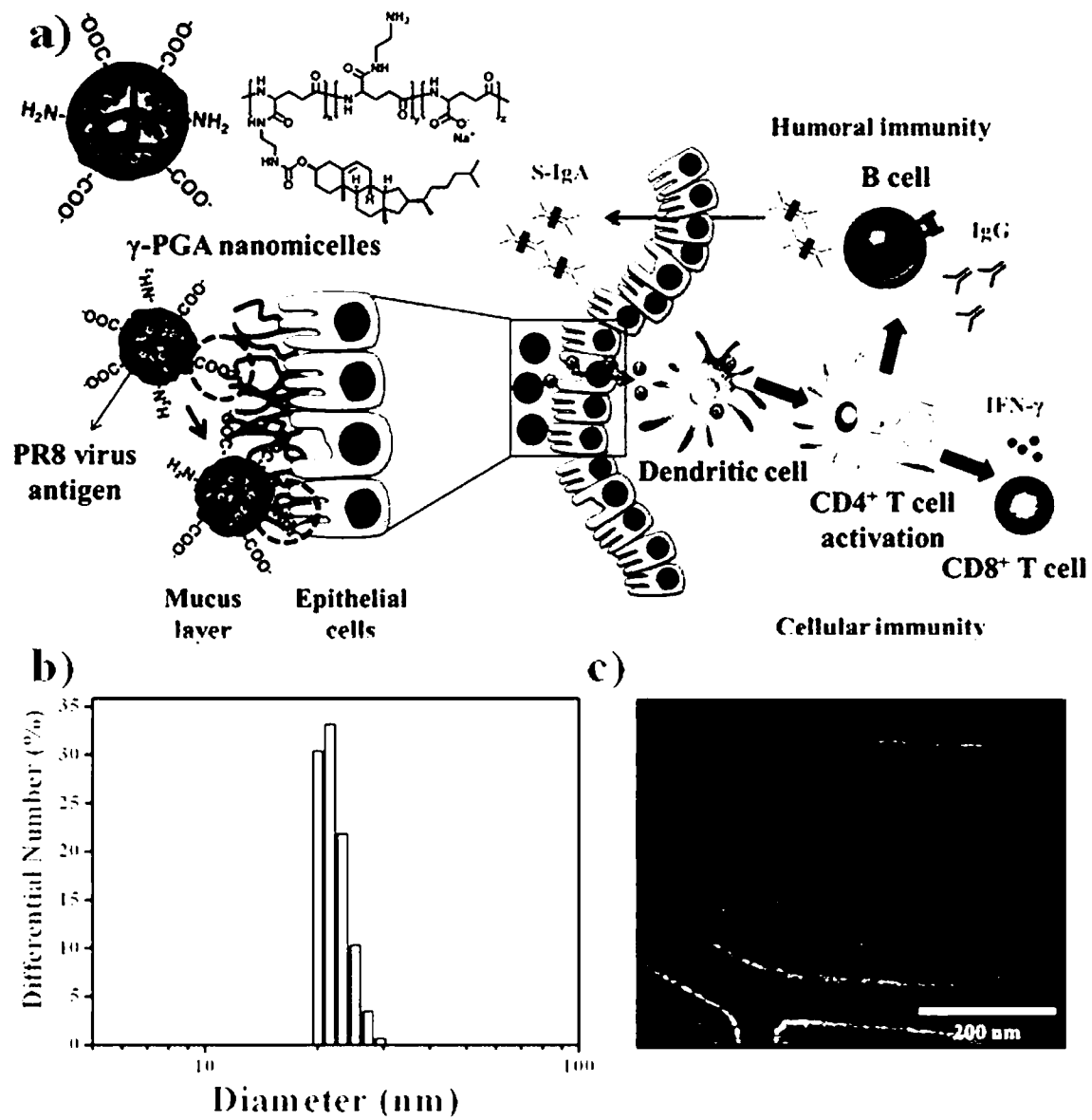
- [청구항 1] 카르복실기 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 친유성 화합물은 콜레스테롤 및 그 유도체, 탄소수 3~21개를 갖는 알리파틱(aliphatic) 화합물 (C3 - C21) 및 벤젠 그룹을 1~10개 포함하는 방향족 화합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 나노마이셀.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 폴리감마글루탐산은 분자량이 1~15,000kDa인 것을 특징으로 하는 나노마이셀.
- [청구항 4] 다음 단계를 포함하는 카르복실기의 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀의 제조방법:
 (a) 친유성 화합물-아민 복합체를 제조하는 단계;
 (b) 폴리글루탐산 용액에 친유성 화합물-아민 복합체 용액을 혼합하여 폴리글루탐산-친유성 화합물 복합체를 제조하는 단계; 및
 (c) 상기 폴리글루탐산-친유성 화합물 복합체에 아민계 화합물을 처리하여 폴리감마글루탐산의 카르복실기를 아민기로 치환하여, 카르복실기의 일부가 아민기로 치환된 폴리감마글루탐산과 친유성 화합물의 복합체로 구성된 나노마이셀을 제조하는 단계.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 친유성 화합물은 콜레스테롤 및 그 유도체, 탄소수 3~21개를 갖는 알리파틱(aliphatic) 화합물 (C3 - C21) 및 벤젠 그룹을 1~10개 포함하는 방향족 화합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 나노마이셀의 제조방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 폴리감마글루탐산은 분자량이 1~15,000kDa인 것을 특징으로 하는 나노마이셀의 제조방법.
- [청구항 7] 제4항에 있어서, 아민계 화합물은 에틸렌디아민을 포함하는 알킬디아민 계열 화합물 또는 폴리아민을 포함하는 올리고머 및 폴리머인 것을 특징으로 하는 나노마이셀의 제조방법.
- [청구항 8] 제1항의 나노마이셀의 내부에 단백질, 유전자, 펩타이드, 화합물, 항원 및 천연소재로 구성된 군에서 선택되는 약물이 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 나노마이셀 약물전달체.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 항원은 폴리사카라이드, 약독된 살아있는 완전체 미생물, 불활성화된 미생물, 재조합 펩티드 및 단백질, 당단백질, 당지질, 리포펩티드, 합성 펩티드 및 파괴 미생물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 나노마이셀 약물전달체.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 약물은 점막을 통하여 전달되는 것을 특징으로

[청구항 11]

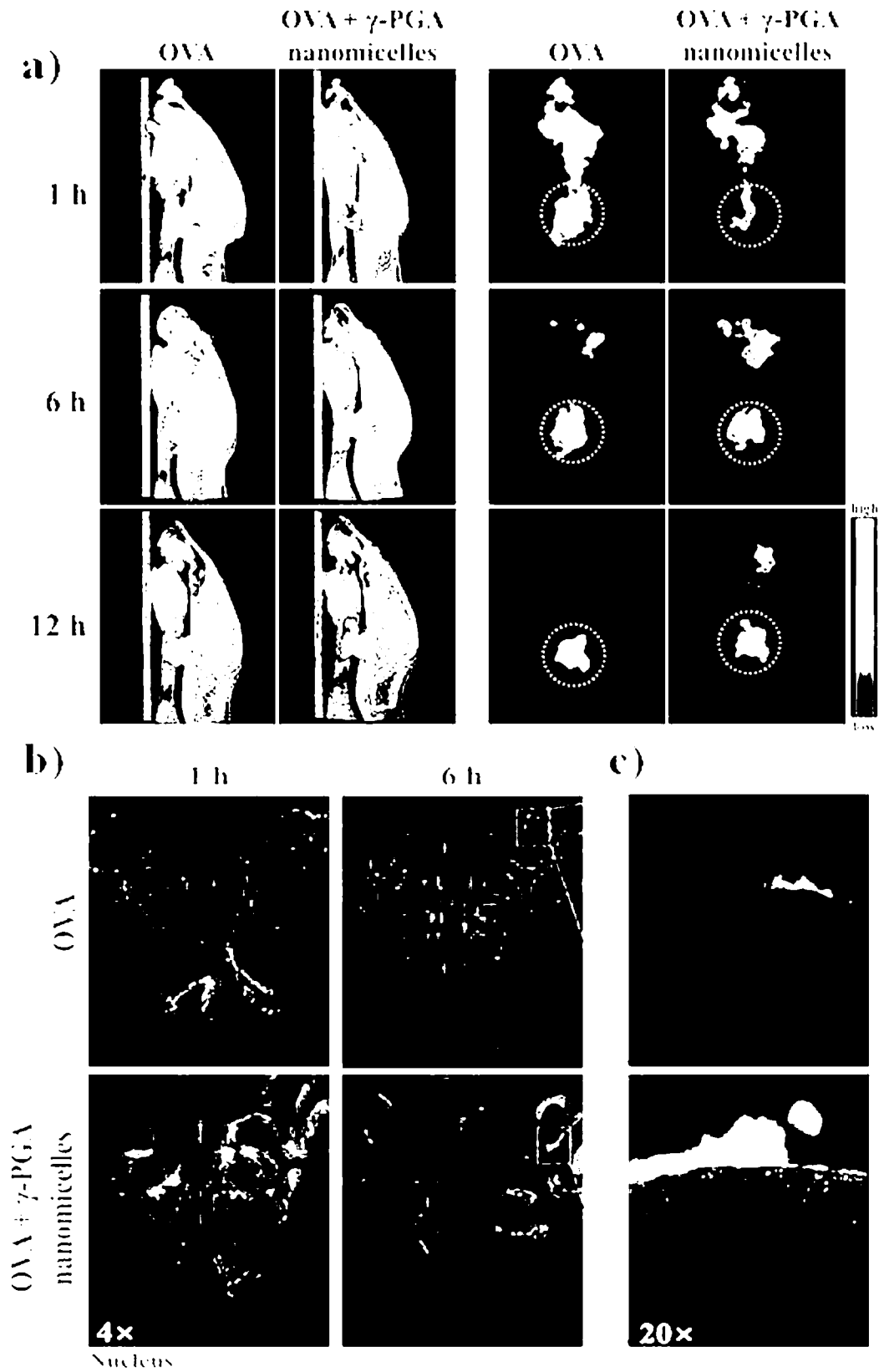
하는 나노마이셀 약물전달체.

제8항에 있어서, 점막은 구강, 비강, 호흡기 점막, 안 점막, 생식기 점막 및 피부궤양 부위로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 나노마이셀 약물전달체.

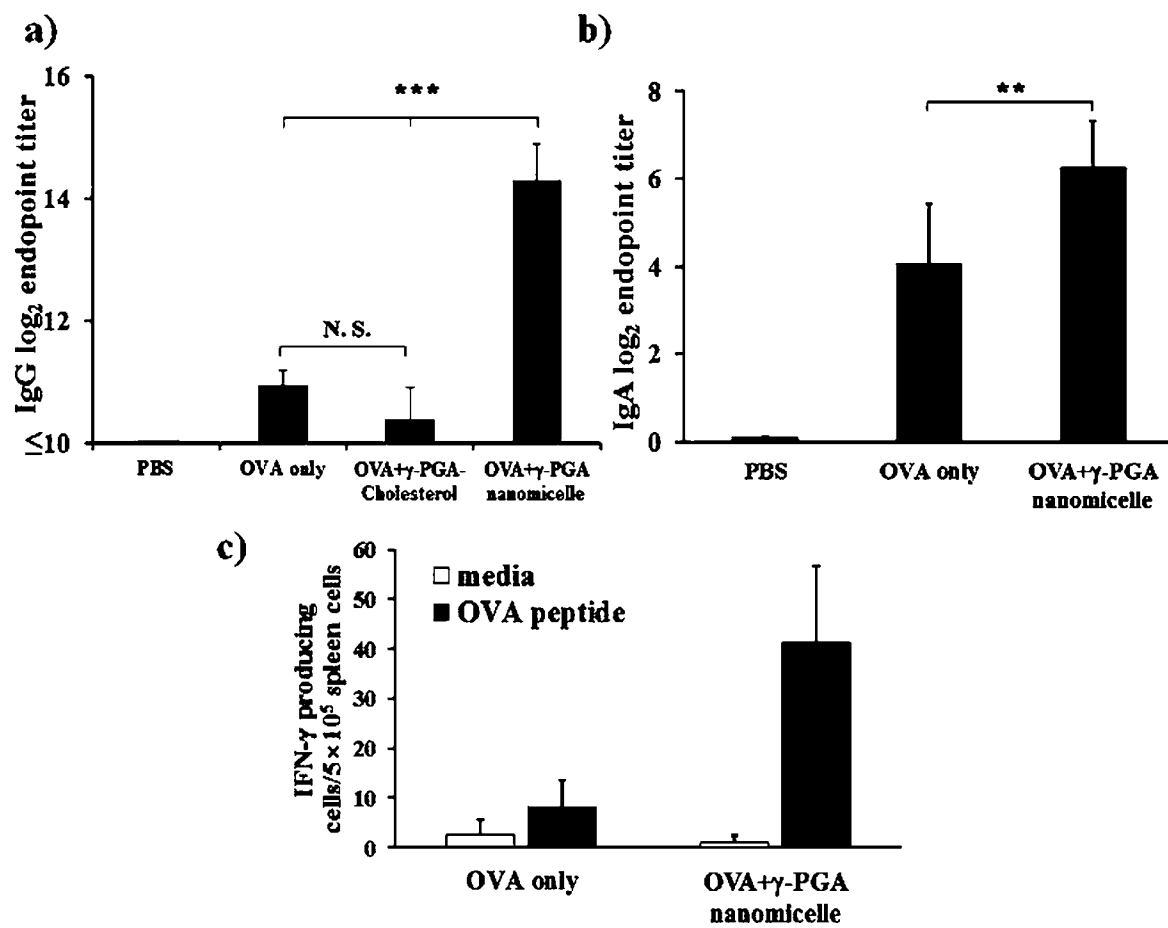
[Fig. 1]



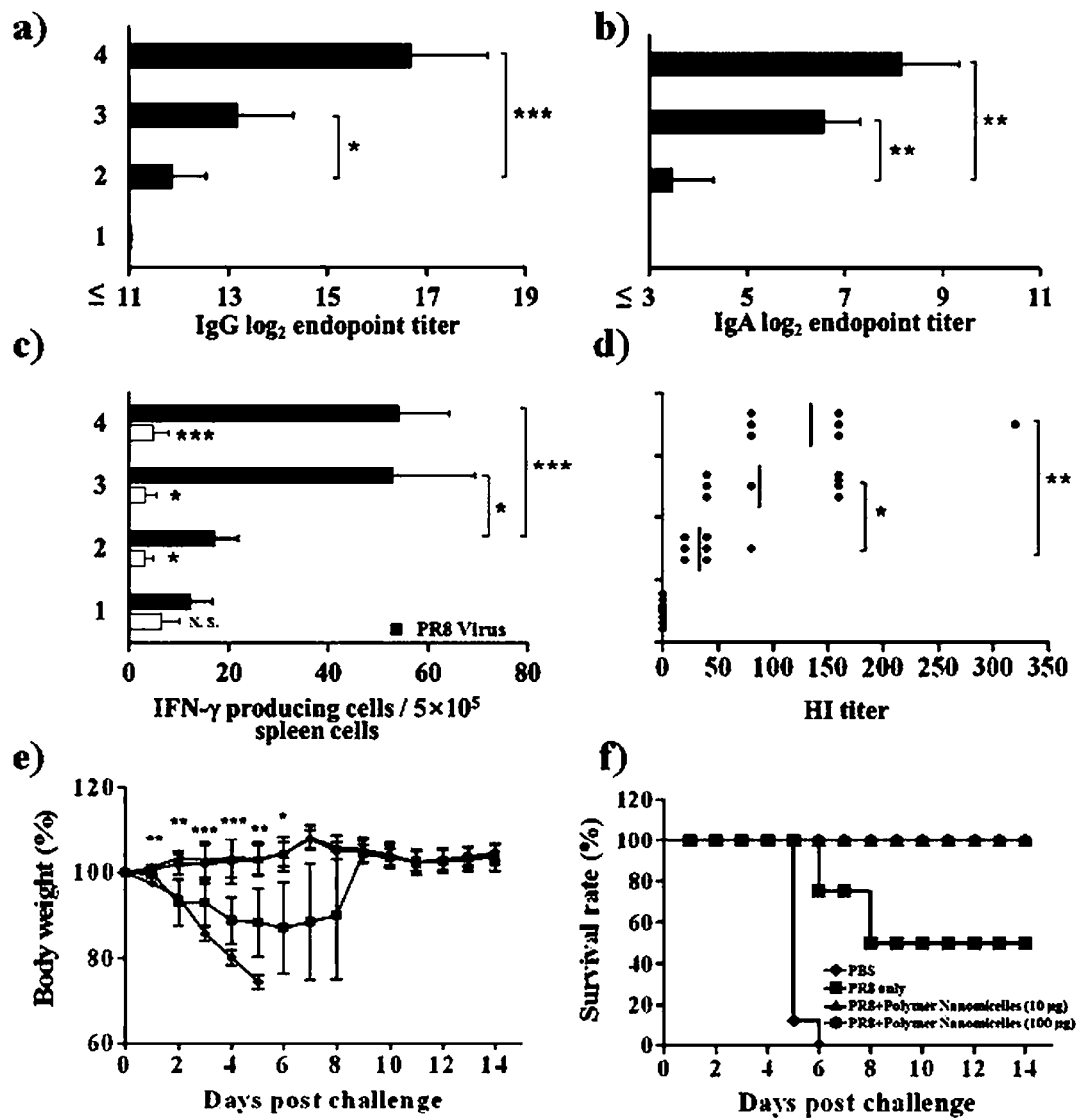
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/004927**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 9/127(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/127; C08G 69/48; C08G 69/08; C08G 69/10; C07C 55/24; C07D 471/00; A61K 9/107; C08L 77/10; A61K 47/30; A61K 47/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: glutamic acid, nanomicell, carboxyl group, amine, hydrophobic property

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2008-0106482 A (OSAKA UNIVERSITY et al.) 05 December 2008 See abstract and claims 1-9.	1-11
A	KR 10-1250543 B1 (SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS CORPORATION) 28 March 2013 See abstract and claims 1-20.	1-11
A	KR 10-2012-0129901 A (NANOCARRIER CO., LTD.) 28 November 2012 See abstract and claims 1-7.	1-11
A	US 2008-0161605 A1 (HO, G. et al.) 03 July 2008 See abstract and claims 1-16.	1-11
A	US 7399860 B2 (KUMAR, A. M. et al.) 15 July 2008 See abstract and claims 1-25.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 JANUARY 2014 (29.01.2014)

Date of mailing of the international search report

03 FEBRUARY 2014 (03.02.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/004927

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0106482 A	05/12/2008	CA 2651618 A1	15/11/2007
		US 2010-0036093 A1	11/02/2010
		WO 2007-129746 A1	15/11/2007
KR 10-1250543 B1	03/04/2013	KR 10-2011-0076826 A	06/07/2011
KR 10-2012-0129901 A	28/11/2012	CN 102781427 A	14/11/2012
		EP 2433618 A1	28/03/2012
		JP 2011-162452 A	25/08/2011
		JP 4829351 B2	07/12/2011
		US 2012-0093881 A1	19/04/2012
		US 8574601 B2	05/11/2013
		WO 2011-096558 A1	11/08/2011
US 2008-0161605 A1	03/07/2008	CN 100547034 C	07/10/2009
		CN 1629220 A	22/06/2005
		US 2005-0136516 A1	23/06/2005
		US 2008-0160569 A1	03/07/2008
		US 7364879 B2	29/04/2008
		US 7759088 B2	20/07/2010
		US 7790417 B2	07/09/2010
US 7399860 B2	15/07/2008	AU 2001-079301 A	23/04/2001
		AU 781735 B2	09/06/2005
		BR 0014652 A	10/06/2003
		CA 2387611 A1	19/04/2001
		CA 2387611 C	29/03/2011
		CN 101507820 A	19/08/2009
		CN 1607962 A	20/04/2005
		EP 1225917 A2	31/07/2002
		EP 1466627 A1	13/10/2004
		HU 0203123 A2	28/01/2003
		HU 0203123 A3	28/12/2004
		JP 2003-511423 A	25/03/2003
		MX PA02003719 A	30/08/2002
		NO 20021701 A	23/05/2002
		NZ 529789 A	29/04/2005
		PL 354623 A1	09/02/2004
		SG 147286 A1	28/11/2008
		US 2002-0077279 A1	20/06/2002
		US 2003-0224971 A1	04/12/2003
		WO 01-26693 A2	19/04/2001
		WO 01-26693 A3	27/12/2001
		ZA 200202695 A	25/02/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/127(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/127; C08G 69/48; C08G 69/08; C08G 69/10; C07C 55/24; C07D 471/00; A61K 9/107; C08L 77/10; A61K 47/30; A61K 47/48

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 글루탐산, 나노마이셀, 카르복실기, 아민, 친유성

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2008-0106482 A (오사카 유니버시티 외) 2008.12.05 요약 및 청구항 1-9 참조.	1-11
A	KR 10-1250543 B1 (주식회사 삼양바이오팜) 2013.03.28 요약 및 청구항 1-20 참조.	1-11
A	KR 10-2012-0129901 A (나노카리아 가부시기가이샤) 2012.11.28 요약 및 청구항 1-7 참조.	1-11
A	US 2008-0161605 A1 (HO, G. 외) 2008.07.03 요약 및 청구항 1-16 참조.	1-11
A	US 7399860 B2 (KUMAR, A. M. 외) 2008.07.15 요약 및 청구항 1-25 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 01월 29일 (29.01.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 02월 03일 (03.02.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

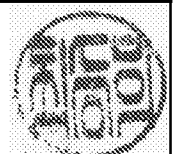
 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 +82-42-481-8740



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0106482 A	2008/12/05	CA 2651618 A1 US 2010-0036093 A1 WO 2007-129746 A1	2007/11/15 2010/02/11 2007/11/15
KR 10-1250543 B1	2013/04/03	KR 10-2011-0076826 A	2011/07/06
KR 10-2012-0129901 A	2012/11/28	CN 102781427 A EP 2433618 A1 JP 2011-162452 A JP 4829351 B2 US 2012-0093881 A1 US 8574601 B2 WO 2011-096558 A1	2012/11/14 2012/03/28 2011/08/25 2011/12/07 2012/04/19 2013/11/05 2011/08/11
US 2008-0161605 A1	2008/07/03	CN 100547034 C CN 1629220 A US 2005-0136516 A1 US 2008-0160569 A1 US 7364879 B2 US 7759088 B2 US 7790417 B2	2009/10/07 2005/06/22 2005/06/23 2008/07/03 2008/04/29 2010/07/20 2010/09/07
US 7399860 B2	2008/07/15	AU 2001-079301 A AU 781735 B2 BR 0014652 A CA 2387611 A1 CA 2387611 C CN 101507820 A CN 1607962 A EP 1225917 A2 EP 1466627 A1 HU 0203123 A2 HU 0203123 A3 JP 2003-511423 A MX PA02003719 A NO 20021701 A NZ 529789 A PL 354623 A1 SG 147286 A1 US 2002-0077279 A1 US 2003-0224971 A1 WO 01-26693 A2 WO 01-26693 A3 ZA 200202695 A	2001/04/23 2005/06/09 2003/06/10 2001/04/19 2011/03/29 2009/08/19 2005/04/20 2002/07/31 2004/10/13 2003/01/28 2004/12/28 2003/03/25 2002/08/30 2002/05/23 2005/04/29 2004/02/09 2008/11/28 2002/06/20 2003/12/04 2001/04/19 2001/12/27 2004/02/25