(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0099539
(43) 공개일자 2015년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 47/48* (2006.01) *A61K 31/785* (2006.01)
(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
*A61K 47/48192* (2013.01)
*A61K 31/785* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7018092
(22) 출원일자(국제) 2013년12월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년07월06일
(86) 국제출원번호 PCT/PL2013/000154
(87) 국제공개번호 WO 2014/088434
국제공개일자 2014년06월12일
(30) 우선권주장
P.401934 2012년12월06일 폴란드(PL)

(71) 출원인
**우니베르스테트 우쯔**
폴란드 우쯔, 유엘.나루토위즈카 65 (피엘-90-131)
(72) 발명자
**프라니아크-피에트리가, 아이다**
폴란드 피엘-90-326 로지 유엘. 포모르스카 141/143 우니베르스테트 우쯔 비지알 바이오로지 아이 오크로니 스로도위스카
**브리스제브스카, 마리아**
폴란드 피엘-90-326 로지 유엘. 포모르스카 141/143 우니베르스테트 우쯔 비지알 바이오로지 아이 오크로니 스로도위스카
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인 남앤드남**

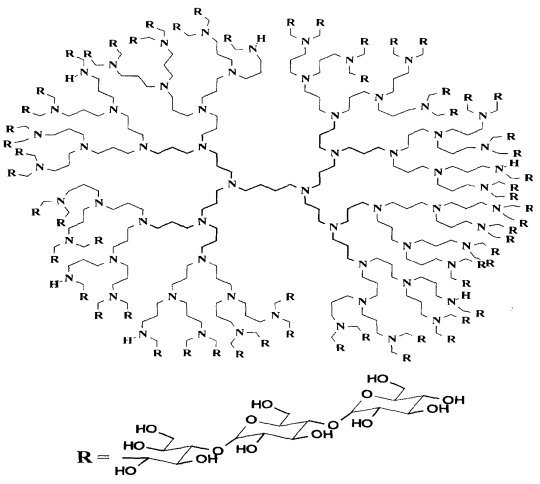
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **말토트리오즈-코팅된 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴트리머 ＰＰＩ-Ｇ４-ＤＳ-Ｍａｌ-ＩＩＩ의 적용**

## (57) 요 약

본원에서는 신생물 증식 질환, 특히, 만성 림프구성 백혈병을 치료하기 위한 약물을 제조하기 위한, 말토트리오즈 입자로 코팅된 80-95%의 주변 아민기를 함유한 말토트리오즈-코팅된 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴드리머 PPI-G4-DS-Mal-III의 용도가 기재되어 있다.

*대 표 도* - 도1




PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머 입자의 패턴

(72) 발명자

**아페란스, 디트마르**

독일 01069 드레스덴 호회 슈트라쎄 6 레이브니츠 인스티튜트 오브 올리머 리서치 드레스덴

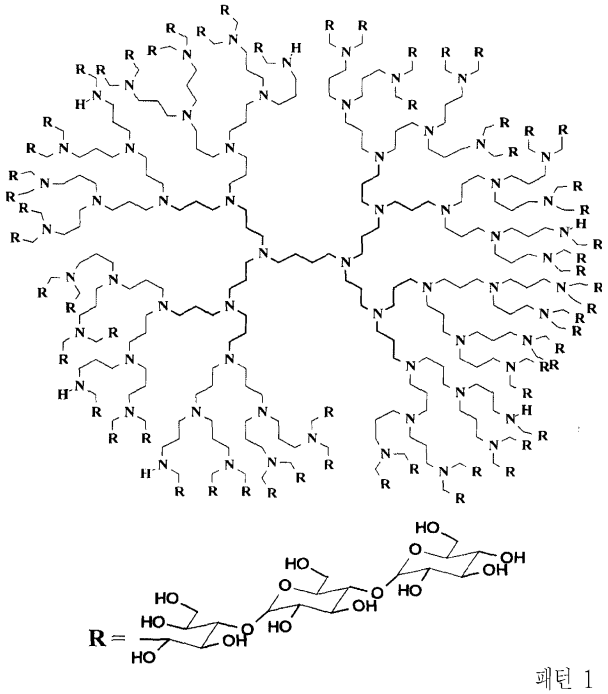
**크라즈네트, 바르바라**

폴란드 피엘-90-326 로지 유엘. 포모르스카 141/143 우니베르스테트 우쯔 비지알 바이오로지 아이 오크로니 스로도위스카

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

신생물 증식 질환, 특히, 만성 림프구성 백혈병을 치료하기 위한 약물을 제조하기 위한, R 성분이 말토트리오즈 입자를 나타내는 패턴 1에 의해서 정의된 말토트리오즈-코팅된 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴드리머 PPI-G4-DS-Mal-III의 용도:




패턴 1

### 청구항 2

제 1항에 있어서, PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머가 PPI-G4 덴드리머의 조밀한 코팅 DS(조밀한 쉘((Dense Shell)을 형성하는 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴드리머 입자 PPI-G4의 아미노기와 관련된 80-95%, 더욱 유리하게는 90%의 말토트리오즈 입자(Mal-III)를 함유하는 용도.

## 명 세 서

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 패턴 1로 정의되며 짧게는 PPI-G4-DS-Mal-III로 표시되는 말토트리오즈-코팅된 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴르리머 PPI-G4-DS-Mal-III의 용도에 관한 것이며, 패턴 1에서, R 성분은 말토트리오즈 입자(3 α-글루코오즈 잔기로 제조된 트리사카라이드)를 나타내고, 상기 기호에서, PPI-G4는 제 4 세대의 폴리프로필렌이민 덴드리머를 나타내고, DS(조밀한 쉘: Dense Shell)은 조밀한 코팅을 나타내고, Mal-III은 말토트리오즈를 나타낸다.

### 배 경 기 술

[0002] 장기간 동안, 광범위한 연구가 혈액암(hematomalignancies)을 치료하기 위한 새로운 효과적인 약물을 조사하기 위해서 수행되었다. 여러 해 동안, 만성 림프성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia: CLL)의 표준 치료는 약물의 선택으로 알킬화 약물, 예컨대, 니트로겐 머스터드(nitrogen mustard), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide) 또는 클로람부실(chlorambucyl)의 적용을 기초로 하였다. 1980년대에는, 우선, 소위 퓨린 유사체(purine analogues: ANP) 군에 속하는 화합물이 합성되었다. 이들 중 둘, 즉, 클라드리빈 (2-클로르데옥

시아데노신, 2-CdA) 및 플루다라빈(fludarabine: FA)이 CLL 치료 뿐만 아니라, 다른 골수- 및 림프세포증식 질환의 치료에 통상적으로 사용된다. 최근에, 몇 가지 모노클로날 항체 및 면역독소가 CLL 치료에 도입되었다. ANP와 함께 투여된 모노클로날 항체, 예를 들어, 리툭시맙(rituximab)은 CLL 치료의 효과를 증가시킨다.

[0003] 모든 이러한 광범위한 항백혈병 약물에도 불구하고, CLL은 여전히 치료 불가능한 질환이다. 따라서, 그러한 질환을 치료해 낼 수 있는 새로운 치료제에 대한 연구가 깊이 의식되고 있으며, 이의 치료 효과에 대한 돌파구가 상당히 기대되고 있다.

[0004] 신생물 질환(neoplastic diseases)에서, 증식 기전, 즉, 세포를 증식하는 유기체의 능력은 신생물 세포의 경우에 손상된 세포의 무한하고 조절되지 않은 증식이며, 이러한 증식은 유기체에서의 신생물 과정의 발생을 초래한다. 특히, 백혈병 림프구(leukemic lymphocyte)는 비교적 짧은 시간 내에 유기체에서 증가된 수의 림프구의 발생을 유도하는 강화된 증식 기전을 보이는 것으로 여겨지는데, 증가된 수의 림프구의 발생은 혈액 순환에서의 유해한 B-림프구의 축적(림프구 증가증) 및 신생물 질환의 신속한 전개를 유도한다. 만성 림프성 백혈병(CLL)의 경우에서의 일반적으로 공지된 사실(패러다임)은 프로그램된 세포 사망의 자연적인 과정, 즉, 인간 유기체에 존재하는 백혈병 림프구의 아폽토시스(apoptosis)의 결함(손상)의 발생이다.

[0005] 신생물 질환의 확대된 세계적인 발생은 인간에게 매우 위험한 질환인 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함한 신생물 질환을 근절하는 새로운 효과적인 약물 또는 약물 성분에 대한 조사를 하게 했다. 따라서, 백혈병 림프구에서의 아폽토시스를 유도하는 능력을 나타내며, 이들의 증식(무한 증식)을 억제하고, 동시에 다른 건강한 혈액 세포에 대해서는 독성을 나타내지 않는 CLL에 대항하는 약물 성분/약물에 대한 연구 및 조사를 수행하는 것에 대한 긴급한 필요가 있다.

[0006] 21 세기에, 나노기술은 급속하게 발전하고 있는 연구 분야이다. 따라서, 신생물에 대항한 싸움에서 효과적일 수 있는 물질에 대한 조사가 이러한 특정의 분야에서 수행되었다. 최근 공지된 생물학적으로 적용된 나노입자는 덴드리머라는 명칭으로 분지된 구조를 지닌 화학적 폴리머 화합물이다. 이들은 컨주게이션(conjugation) 또는 캡슐화(encapsulation)를 통한 항암 약물의 캐리어로서 사용된다.

[0007] 문헌[Omidi Y, Hollins A.I, Drayton RM, Akhtar S. J Drug Target (2005), 13 : 43 1-443]에서는, 종양발생주(oncogenic line)(폐 및 피부 신생물을 유발시킴)에서의 유전자(공지된 서열의 DNA 단편) 핵내 주입(transfection)에 사용되는 제 2 세대 및 제 3 세대의 폴리프로필렌이민 덴드리머(PPI)가 밝혀졌다. 신생물 세포에 도입된 유전자가 변화된 내인성 유전자 발현(세포에 선재(pre-existent)됨)을 조사하는 것에 주어지며, 또한 아폽토시스-관련된 유전자에서의 조사에 주어진다. 이는 종양발생 세포의 사망을 유발시키는 치료적 결과(유전자 치료)에 매우 유리한 영향을 나타냈다. 또한, 신생물 세포에 도입된 PPI 벡터가 아폽토시스의 기전을 유도하는 유전자를 활성화시킴이 관찰되었다.

[0008] 문헌[D. Appelhans, U. Oertel, R. Mazzeo, H. omber, J. Hoffmann, S. Weidner, B. Brutschy, B. Voit and M. F. Ottaviani, Dense shell glycodendrimers: UV/Vis and electronic paramagnetic resonance study of metal ion complexation. Proc R Soc A 2010; 466: 1489-1513]에서, 거의 완전히 말토트리오즈-개질되어 있는 표면을 지니는 PPI-G4 덴드리머(PPI-G4-DS-Mal-III)의 사용이 다양한 세대(3-5)의 PPI 개질된 덴드리머와 함께 구리 이온 착물화 조사(Cu II)에서 처음으로 기재되었다.

[0009] 특정의 질환 단계에서 약물 적용에 대한 연구에서, 그들이 투여되는지 투여되지 않는지를 결정하는 중요한 기준은 인간 세포에 대한 이들의 독성 수준이다. PPI-G4 폴리프로필렌이민 덴드리머는 매우 높은 독성을 나타낸다. 따라서, 생의학적 연구 및 의학적 치료 둘 모두에서 유용한 낮은 독성의 덴드리머를 합성하려는 시도가 이루어졌다.

[0010] 나노입자, 예컨대, 덴드리머의 장래 발전 및 이용성을 고려하여, 본 발명의 발명자들은 백혈병 세포에서 아폽토시스의 기전을 유도하고, 동시에, 혈액의 다른 이상 변이 요소에 낮은 독성을 나타냄으로써 작용할 수 있는 작은 분자 질량의 화합물을 발명할 의도로 광범위한 조사를 수행하였다.

## *발명의 내용*

[0011] 본 발명의 주제는, 증식성 신생물 질환, 특히, 만성 림프구성 백혈병을 치료하기 위한 약물을 제조하기 위한, 패턴 1로 정의되며 짧게는 PPI-G4-DS-Mal-III로 표시되는 말토트리오즈로 코팅된 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴르리머의 적용이며, 상기 패턴 1에서, R 성분은 말토트리오즈 입자를 나타내고, 상기 기호에서, PPI-G4는 제 4 세대의 폴리프로필렌이민 덴드리머, 즉, DS(조밀한 쉘)는 조밀한 코팅을 나타내고, Mal-III은 말토트리오즈(3

α-글루코오즈 잔기로 제조된 트리사카라이드)를 타나낸다.

[0012] PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머가, 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴드리머 입자 PPI-G4의 아미노기와 관련하여, 80-95%, 더욱 유리하게는 90%의 말토트리오즈 입자 - Mal-III를 함유하여, PP1-G4 덴드리머의 조밀한 코팅(조밀한 쉘)을 형성시키는 것이 유리하다.

[0013] 만성 림프구성 백혈병을 포함한 아폽토시스의 손상된 기전을 지닌 증식성 신생물 질환을 치료하기 위한 약물을 제조하기 위해서 본 발명에서 사용되는, 말토트리오즈 PPI-G4-DS-Mal-III로 코팅된 그러한 제 4 세대의 폴리프로필렌이민 덴드리머는 아폽토시스, 즉, 백혈병 B-림프구의 사망을 유발시키는 활성 물질로서 놀라운 효과를 나타낸다. 아폽토시스 기전을 촉발시킴으로써, B 백혈병 림프구는 사망하고, 이어서 손상된 백혈병 세포로서 유기체에서 제거되고, 그에 따라서, PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머을 사용한 치료가 긍정적인 효과를 준다.

[0014] 추가로, PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 혈액의 다른 이상 변이 요소와 관련하여 독성이 없고 혈액 내 더욱 효과적인 생물학적 분배를 나타낸다.

[0015] 단독으로 사용한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머에 대한 $IC_{50}$은 10 mg/ml이며, 이는 이의 더 약한 항아폽토시스 작용을 나타낸다. 덴드리머 표면상에 더 많은 말토트리오즈 기가 존재하면 할수록 나노입자의 독성은 더 낮다. 90%로 Mal-III로 코팅된 덴드리머는 백혈병 세포에서의 아폽토시스 경로를 개시시키기에 더 많은 시간을 필요로 하며; 이의 명백한 효과(apparent effect)는 48 시간 인큐베이션 후에 관찰된다. 또한, 미토콘드리아 전위의 강하는 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향 하에 백혈병 림프구에서 더 낮다. 모든 환자가 더 강하고 더 신속하게 작용하는 약물에 적용될 수 있게 충분히 강한 유기체를 지니는 것은 아니다. 어떤 유기체는 더 긴 적응 시간, 예를 들어, 24 시간을 필요로 하며, 단지 그러한 시간 후에 약물 작용이 시작된다. 그리고, 그러한 경우에, 만성 림프구성 백혈병을 포함한 증식성 신생물 질환에서의 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머-관련된 치료가 매우 권장된다.

[0016] 본 발명에서 사용되며, 덴드리머 외부 구조에 말토트리오즈 입자(Mal-III)를 함유하는 말토트리오즈로 코팅된 제 4 세대의 PPI-G4-DS-Mal-III 폴리프로필렌이민 덴드리머는 이의 합성법과 성질에 대한 설명을 포함하고 있는 문헌[Appelhans D, Oertel U, Mazzeo R et al, Proc R Soc A 2010; 466: 1489- 1513]에서 공개되어 있으며, 문헌[Chem Eur J (2008), 14: 7030-7041 Klajnert B, Appelhans D, Komber H et al]에는 수소원자($^1$H)에 대한 관독이 500,13 MHz 주파수에서 이루어지는 $^1$HNMR 분광분석 방법의 이용에 의한 자기 공명에 의해서 측정된 PPI-G4-DS- Mal-III 덴드리머 몰 질량(MM)이 기재되어 있다. 도 1 및 표 1에 도시된 바와 같이, PPI-G4 덴드리머의 표면 아미노기는 DS(DS-조밀한 쉘)로 지정된 조밀한 덴드리머 코팅을 형성시키기 위해서 (58) - 90% 범위로 말토트리오즈-포화(Mal-III)된다. 말토트리오즈에 의한 덴드리머의 코팅은 독일의 드레스덴(Dresden)에 소재하는 Leibnitz Institute of Polymer Research에서 수행되었다. 생성물은 상업적으로 구입 가능하지 않다. 그러나, 제 4 세대의 PPI 덴드리머(PPI-G4)는 네덜란드의 아인트호벤(Eindhoven) 소재의 Symo-Chem으로부터 상업적으로 구입 가능하다.

[0017] 표 1

[0018] 상업적으로 구입 가능한 PPI-G4 및 합성된 PPI-G4-DS-Mal-III의 몰 질량(MM[a]; 표면 말토트리오즈 기의 수 및 백분율.

| 덴드리머 | MM 이론치 (g/mol) | MM 측정치 (g/mol) | 표면 Mal-III 기의 수(백분율) 이론치 | 표면 Mal-III 기의 수(백분율)측정치 |
|---|---|---|---|---|
| PPI-G4 | 3514 | 3514 | - | - |
| PPI-G4-DS-Mal-III | 34774 | 31000 | 64 (100%) | 58 (90%) |

[0019]

[0020] 본 발명에서 사용되는 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 MNC의 50% 세포독성을 유발시키는 덴드리머의 농도로서 정의되는 독성 지표인 $IC_{50}$의 시험에 주어졌다. 단독으로 사용된 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머에 대한 $IC_{50}$은 48 시간 배양물에서 10 mg/ml였다. $IC_{50}$의의 계산은 만성 림프구성 백혈병의 경우인 장애가 있는 아폽토시스 기전을 지닌 증식성 신생물 질환을 치료하는데 있어서의 항신생물 치료에 요구되는 약물 중의 PPI- G4-DS-Mal-III

덴드리머의 투여량을 조절하게 하고, 약물을 일반적으로 공지된 방법에 따른 다양한 약제 형태로 제조하게 한다.

[0021] 본 발명이 이하 실시예에서 설명될 것이다. 본 발명의 주제는 도면에서 예시되고 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 말토트리오즈의 조밀한 코팅을 지니는 짧게 PPI-G4-DS-Mal-III로 기재되는 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴드리머의 입자를 도시하고 있다.

도 2는 덴드리머로 처리되지 않은 대조 백혈병 B 림프구와 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머로 처리되고 시험된 백혈병 B 림프구의 두 가지 변수의 '도트-플롯' 유형 히스토그램('dot-plot' type histogram)을 도시하고 있다. CLL에서의 백혈병 림프구에 적용된 이중 염색 방법(프로피듐 아이오다이드(propidium iodide) 및 아넥신-V(annexin-V))에서, 세포예정사(programmed cell death)의 다양한 단계(초기 아폽토시스, 후기 아폽토시스, 괴사)에 있는 세포를 관찰할 수 있다.

도 3은 덴드리머로 처리되지 않은 건강한 대조 B 림프구와 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머로 처리되고 시험된 건강한 B 림프구의 두 가지 변수의 '도트-플롯' 유형 히스토그램을 도시하고 있다. CLL에서의 백혈병 림프구에 적용된 이중 염색 방법(프로피듐 아이오다이드 및 아넥신-V)에서, 세포예정사의 다양한 단계(초기 아폽토시스, 후기 아폽토시스, 괴사)에 있는 세포를 관찰할 수 있다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 나타낸 실시예로부터의 시험 결과가 표에 주어져 있다.

[0024] 표 2는 시험된 제 4 세대의 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향 하에 아폽토시스 또는 괴사되는 시험관내 배양물 중의 백혈병 림프구의 평균 백분율의 결과를 나타내고 있으며; 추가로, 그러한 결과는 각각의 평균 값과 관련한 표준 편차의 값 및 통계적 분석을 제공한다.

[0025] 표 3은 시험된 제 4 세대의 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향 하에 아폽토시스 또는 괴사되는 시험관내 배양물 중의 건강한 림프구의 평균 백분율의 결과를 나타내고 있으며; 추가로, 그러한 결과는 각각의 평균 값과 관련한 표준 편차의 값 및 통계적 분석을 제공한다.

[0026] 표 4는 시험된 세 가지 농도에서의 PPI-G4-DS- Mal-III 덴드리머의 영향 하에 및 CLL 치료에 가장 빈번하게 사용되는 두 가지 약물, 즉, 플루다라빈(퓨린 유사체) 및 리툭시맙(모노클로날 항체)의 영향 하에 시험관내 배양물 중의 감소된 미토콘드리아 전위를 보인 세포 - 백혈병 림프구의 평균 백분율의 결과를 나타낸다.

[0027] **실시예 1**

[0028] 90%의 말토트리오즈를 함유한 말토트리오즈 PPI-G4-DS-Mal-III으로 코팅된 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴드리머를 사용하여 백혈병 림프구에서 아폽토시스 과정을 유도하는 능력 및 앞선 세포에서의 이러한 덴드리머의 세포독성이 시험관내 연구로 연구되었다.

[0029] **a) 시험관내 MNC 단핵 세포(백혈병 림프구)의 분리 및 배양**

[0030] 조사 물질은 15명의 환자로부터 채혈된 말초 혈액이었으며, 그러한 환자들은 만성 림프구성 백혈병(CLL)(연령 39 내지 85세(평균 연령은 63.8세)의 8명의 여성(K) 및 7명의 남성(M))에 대해서 이전에 치료되지 않았으며 폴란드 로츠(Lodz) 소재의 Hematology Outpatient Clinic and Hematology Department, Medical University의 환자로서 등록된 환자였다. 폴란드의 로츠 소재의 Ethics Committee of the Medical University는 연구를 증인했다(RNN/75/10/KE). 고지에 입각한 동의(informed consent)를 연구에 포함된 모든 환자로부터 얻었다.

[0031] 대부분(약 90%)이 B 백혈병 림프구인 단핵 세포(MNC)를 항응고제로서 디소듐 베르세네이트(disodium versenate)-EDTA 상에 수집된 말초혈액으로부터 분리하였다. 다음으로, 혈액을 시험 튜브내의 Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, USA)상에 층화시키고 200g 가속도(여기서, g는 중력가속도를 의미한다)로 20 분 동안 밀도 구배에 대해서 원심분리하였다. 상 경계에서 얻은 MNC의 고리를 분리하고 RPMI-1640 매질(PAA, Germany)로 2회 세척하였다. 얻은 MNC를 1 x $10^6$ 세포/ml의 농도로 RPMI-1640 매질에 현탁시키고; 다음 물질을 순차적으로 첨가하였다: 20%의 불활성화된 소태아혈청(FBS) 및 항생제, 예컨대, 스트렙토마이신, 젠타마이신(500 ml 배양 매질당 5ml 항생제 혼합물)(PPA, Germany) 및 90%의 말토트리오즈를 함유하는 시험되는 주어진 농도의 PPI-G4-DS-

Mal-III 덴드리머(농도는 이하 기재되어 있다). 배양물을 RPMI-1640 매질 중에 1ml 최종 용적으로 만들었다. MNC의 배양물을 37℃ 및 98% 습도의 5% $CO_2$의 유입과 함께 24 시간 동안 생물학적 인큐베이터에서 인큐베이션(incubation)하였다. 인큐베이션 과정 후에, MNC 아폽토시스 및 세포독성에 대한 정성 및 정량 검정을 수행하였다.

[0032] 앞선 검정을 이용하여, 다음 용적으로 35%를 함유하는 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머로 시험을 수행하기 위해서 림프구 MNC의 배양물을 제조하였다:

[0033] - 4 mg/ml의 배양 매질,

[0034] - 6 mg/ml의 배양 매질,

[0035] - 8 mg/ml의 배양 매질,

[0036] - 10 mg/ml의 배양 매질.

[0037] 또한, 림프구 MNC의 배양물에 대한 시험을 48-시간-인큐베이션 시간 동안 수행하였다.

[0038] 90%의 말토트리오즈를 함유한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머 없이 동일한 조건에서 제조된 배양물을 대조군으로서 여겼다.

[0039] **b) 아폽토시스 및 세포독성의 검정 - 아넥신-V 및 프로피듐 아이오다이드 시험**

[0040] 인큐베이션 후에, MNC 백혈병 림프구를 차가운 완충 염수 용액(PBS-염화나트륨과 인산나트륨을 함유하는 염수 용액)으로 2회 세척하고, 다음으로, 세포를 아넥신-V(Ann-V)와 컨주게이션된 5㎕의 FITC(형광 이소티오시아네이트 염료(fluorescein isothiocyanate dye)) 및 10 ㎍/ml의 프로피듐 아이오다이드(IP)를 함유하는 결합 완충액에 현탁시켰다. 다음으로, 샘플을 15 분 동안 암실의 실온에서 인큐베이션하고, 이들의 형광을 파장이 FL1 490" ± 20 nm 및 FL3 530" ± 20 nm인 유세포 분석기(flow cytometer)(FACSCalibur Becton Dickinson)를 사용하여 즉각적으로 검정하였다.

[0041] 프로피듐 아이오다이드(IP)는 세포막 보전성(cell membrane integrity)을 유지(IP 세포-음성, IP-)시키면서 건강한 세포에 의해서 능동적으로 제거되는 자가형광을 나타내는 양이온성 용액이다. 아넥신-V는 세포막 보전성을 변화시켜서 세포막 외부 단층으로의 포스파티딜세린의 변위를 유발시킨다. 화합물의 세포독성은 환경으로의 IP 방출의 장애를 통해서 입증된다(IP - 양성 세포, IP+)

[0042] 아폽토시스 지수(apoptic index: AI)를 계산하기 위해서, 아넥신-V(AnnV+IP- 및 AnnV+/IP+)로 염색된 세포를 검정하였다. 35%의 말토트리오즈 덴드리머를 함유하는 PPI-G4-DS-Mal-III의 세포독성을 IP로 염색된 백혈병 림프구 MNC의 생존능력을 측정함으로써 추정하였다.

[0043] **c) 미토콘드리아 막 전위의 검정(아폽토시스의 초기 마커)**

[0044] 미토콘드리아 막 전위는 아폽토시스의 초기 지표이다. CMXRos, 즉, 클로로메틸-X-로사민(Chloromethyl-X-rosamine)(미국의 Mito Tracker Red CMXRos, Molecular Probes에 의한 시약 명칭) 및 FITC와 컨주게이션된 글리코포린 A(glycophorin A)에 대한 모노클로날 항체(덴마아크의 Dako에 의한 항-글리코포린 A FITC의 시약 명칭)을 이의 검정을 위해서 사용하였다. CMXRos는 미토콘드리아 막의 내부 표면상에 음전기 부하가 존재하는 때에 생 세포의 미토콘드리아 매트릭스에서 축적되는 친지성의 양이온성 염료이다. 내부 미토콘드리아 막을 따른 이러한 프로톤의 비대칭적 정위는 생 세포 내의 높은 미토콘드리아 막 전위($\Delta\Psi m$)를 유도한다. 감소된 미토콘드리아 전위 $\Delta\Psi m$는 유도 과정 동안에 아폽토시스의 첫 번째 증상 중 하나이며, 이는 CMXRos의 미토콘드리아 흡수의 저하를 유발시킨다.

[0045] CMXRos 원액은 94㎕의 DMSO(디메틸설폭사이드) 중에 제조자가 공급한 물질을 희석시킴으로써 제조되었으며, 20℃에서 저장되었다. 이어서, 작업 용액을 또한 DMSO(1 : 10)를 사용하여 제조하였고 4℃에서 저장하였다. 1 x $10^6$ MNC/ml 농도의 단핵 세포, 즉, 백혈병 림프구를 37℃에서 30 분 동안 CMXRos(500㎕ RPMI 1640 매질 중의 2.5㎕ 작업 용액)와 함께 인큐베이션하였다. 정확하게 15 분 후에, FITC와 컨주게이션된 글리코포린 A에 대한 5㎕의 모노클로날 항체를 첨가하여, 낮은 미토콘드리아 전위로 인해서 잘못된 양성 결과를 줄 수 있는 샘플 중의 어떠한 부수적인 적혈구를 제거하였다. 다음으로, 샘플을 유세포 분석기를 사용하여 측정하였다. 낮은 미토콘드리아 전위에 의해서 항-글리코포린 A-FITC($\Delta\Psi m^{low}$/Gly-$A^-$ 세포)에 결합되지 않은 백분율을 계산하였다.

[0046] 모든 형광 측정은 아르곤 레이저 488nm 및 컴퓨터 프로그램 CellQuestPro (Becton Dickinson, USA)을 구비한 유세포 분석기 FACSCalibur(Becton Dickinson, USA)에 의해서 수행되었다. 매번 10 000 세포가 평가되었다. 형광은 표준 방사 필터: 그린 - FL1(파장 λ=530±20nm) 및 레드 - FL3 (λ>600nm)를 사용하여 측정되었다.

[0047] **d) 통계적 분석**

[0048] 90%의 말토트리오즈를 함유하는 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머가 첨가되는 본 발명의 백혈병 림프구(NMC)의 배양물과 그러한 PPI-G4-DS- Mal-III 덴드리머가 첨가되지 않는 대조 배양물에서 얻은 결과 사이의 유의한 통계적 차이를 윌콕슨 순위 시험(Wilcoxon rank test)을 이용하여 비교하고 유의한 통계적 차이는 유의 수준이 $p < 0,05$인 것들인 것으로 추정하였다.

[0049] PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 $IC_{50}$ 독성 지표를 백혈병 림프구(MNC)의 50% 세포독성을 유발시키는 덴드리머의 농도로서 정의하였다. $IC_{50}$의 계산은 항신생물 치료에 필요한 약물 함유 PPI-G4- DS-Mal-III 덴드리머의 도즈(dose)를 조절하는 것을 가능하게 한다. 약물의 단일 도즈가 약물 유도되는 세포에 대해서 100% 세포를 파괴하기 위한 독성이게 하는 것이 필요하다면, 그러한 약물 도즈에서 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머 농도는 백혈병 세포의 50%의 세포사를 유발시키는 농도보다 2 배만큼 더 높다. 이는 신속한 치료 효과가 권장되는 진행성 질환을 앓고 있는 환자를 위한 약물 도즈(짧은 시간에 더 적은 정제가 주어짐)에 적용된다. 약한 환자, 예를 들어, 노인 환자의 경우에, 약물 함유 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 도즈는 백혈병 림프구를 파괴시키기 위해서 절반까지 감소된 농도로 설정되어야 한다. 치료는 더 긴 시간이 소요될 것이며, 세포 붕괴 과정으로 인한 부작용은 더 적을 것이지만; 최종 치료 효과는 달성될 것이다(환자에게 더 긴 시간 동안 더 많은 정제가 투여되어, 치료 효과가 달성된다)

[0050] **e) 수집된 결과**

[0051] 24 시간 및 48 시간 인큐베이션 후의 각각의 농도에서의 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머에 의해서 유도된 아폽토시스 MNC의 백분율은 자발적 아폽토시스 백혈병 세포의 백분율보다 유의하게 더 높았다($p < 0,01$ )(표 2). 아폽토시스가 진행중인 CLL 세포의 세포 분석기 분석이 도 2에 도시되어 있다. 아폽토시스가 진행중인 세포의 더 높은 백분율은 24 시간 인큐베이션에 비해서 48 시간 인큐베이션의 경우에 관찰되었다. 후기 아폽토시스 세포($Ann\text{-}V^{+}IP^{+}$)에 대한 가장 큰 차이는 48 시간 인큐베이션 후에 8 mg/ml의 덴드리머 농도에서 나타났지만($p = 0,02$), 24 시간 인큐베이션 후에, 대조군과의 차이가 또한 유의 수준이었다($p = 0,007$)(표 2)

[0052] PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 세 가지 농도, 즉, 4 mg/ml, 6 mg/ml 및 8 mg/ml에서 24 시간 인큐베이션(각각, $p = 0,04$; $p = 0,005$; $p = 0,005$) 후에 뿐만 아니라, 상기 언급된 농도에서 48 시간 인큐베이션(각각, $p = 0,04$; $p = 0,02$; $p = 0,007$) 후에 CLL 세포의 초기 아폽토시스($Ann\text{-}V^{+}IP^{-}$)를 유도하였다. 24 시간-배양물 또는 48 시간-배양물에서의 대조 배양물에 비한 CLL 괴사 세포의 백분율에 대한 통계적 유의 수준 차이는 관찰되지 않았다. 이는 시험된 덴드리머가 아폽토시스 기전을 유도함으로써 CLL 세포사를 유발시키며 세포의 보전성을 방해함으로써 세포 막에 직접적으로 작용하지는 않음을 나타낸다. 단독으로 사용된 PPI-G4- DS-Mal-III 덴드리머에 대한 $IC_{50}$은 10 mg/ml였다.

[0053] CLL 세포에 대한 아폽토시스의 기전을 통한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 활성을 확인하는 또 다른 방법은 미토콘드리아 전위의 평가이다. 세 가지 농도, 즉, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml로 덴드리머를 함유하는 24-시간 배양물에서, 아폽토시스 세포의 수는 대조 배양물에서 세포의 수보다 유의하게 더 높았다. 아폽토시스 세포의 백분율은 덴드리머의 농도를 증가시킴에 따라서 비례하여 증가하였다. 1,6 μM 농도의 퓨린 유사체(FA, 플루다라빈)과의 인큐베이션 후의 아폽토시스 세포 비율을 8 mg/ml의 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머 농도에 대한 아폽토시스 세포의 백분율과 비교하였다. 10 μg/ml의 농도의 모노클로날 항체 항-CD20(Rit, 리툭시맙)은 자발적 아폽토시스(대조 샘플에서) 정도의 아폽토시스-유도 작용을 나타냈다. 덴드리머와의 세포 배양물에서 48 시간 후에, 세포 백분율 $\Delta\Psi m^{low}/Gly\text{-}A^{-}$는 대조 배양물(28.3%)에서의 세포 백분율보다 유의하게 더 높았다(67,1 내지 91,9%). 결과가 표 4에 제시되어 있다.

[0054] **실시예 2**

[0055] 90%의 말토트리오즈를 함유한 말토트리오즈 PPI-G4-DS-Mal-III으로 코팅된 제 4 세대 폴리프로필렌이민 덴드리머를 사용하여 건강한 혈액 세포에서 아폽토시스 과정을 유도하는 능력 및 앞선 세포에서의 이러한 덴드리머의 세포독성이 시험관내 연구로 연구되었다.

[0056] **a) 건강한 지원자로부터 얻은 MNC에서의 아폽토시스 유도 및 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머 세포독성의 검정**

[0057] 조사 물질은 25 내지 65세(평균 연령은 38,00 ± 10,80이다)의 5명의 건강한 지원자(3명의 여성 및 2 명의 남성)에서 수집된 말초 혈액이었다. 단핵 세포(MNC)의 분리, 세포 배양물, 또한 아폽토시스 및 세포독성의 검정은 실시예 1에서와 동일한 방법을 시용하여 이루어졌다.

[0058] 건강한 단핵 세포에 대한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 효과는 무시할만했지만, 대조 배양물과 덴드리머를 함유한 배양물 사이의 차이는 통계적 유의 수준을 나타냈다. 단지 48 시간 후에 아폽토시스 세포의 더 높은 백분율이 6 mg/ml 및 8 mg/ml의 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머 농도의 경우에 관찰되었다((p = 0,03). 24 시간 인큐베이션 후의 IP 염색된 사망 세포의 백분율은 8 mg/ml의 PPI-G4- DS-Mal-III 덴드리머 농도의 경우에 12.9%인 반면에, 덴드리머 미처리된 세포의 경우에는 12,38%였다. 제시된 결과에 의해서 입증되는 바와 같이, PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 건강한 림프구에 대해서 독성을 나타내지 않는다(표 3, 도 3).

[0059] **b) MNC 림프구 증식의 억제 또는 유도에 대한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향**

[0060] MNC는 건강한 지원자의 혈액으로부터 밀도 구배 방법(실시예 1에서 기재된 바와 같음)을 이용하여 분리되었다. PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머에 의한 림프구 증식의 억제 또는 유도를 검정하기 위해서, 덴드리머와 함께 또는 덴드리머 없이, 그리고, 시험 샘플인지 대조 샘플인지에 따라서 파이토헤마글루티닌(phytohemaglutinin: PHA-M)의 존재 또는 부재하에 세포를 각각 인큐베이션하였다. 72 시간 인큐베이션 후에, 샘플을 MTT(3-(4,5-디메틸-2-티아졸릴)-2,5-디페닐-2H-트리아졸륨 브로마이드)에 의해서 분광광도법으로 분석하였다. PHA-M의 최종 농도는 10㎕/ml였고, PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 0,2, 0,04 및 0,008 mg/ml의 농도로 사용되었다. 배양물 매질 중의 10㎕/ml 농도의 PHA-M에 의한 MNC 현탁액을 양성 - 증식 대조군으로 여겼고, PBS 완충액 중의 MNC 현탁액을 음성 - 비증식 대조군으로 여겼다.

[0061] PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 건강한 림프구의 세포 증식을 약간 제한했다. 이러한 효과는 생물학적 관점에서 상당한 유의 수준이 아니다.

[0062] **c) 적혈구 용혈에 대한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향**

[0063] 시험에 주어진 샘플에서, 용혈의 수준이 37℃에서 2, 4, 16 및 24 시간 동안의 사전 인큐베이션 후에 그리고 5 분 동안의 1000g의 원심분리 동안에 상등액내로 방출된 헤모글로빈(HGB)을 기초로 하여 측정되었다. 참조(100% 용혈)의 경우에, 적혈구는 증류수로 처리되었다. PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 비개질된 덴드리머(PPI-G4)와는 대조적으로 적혈구 용혈을 유발시키지 않았다. 상기 관찰로부터 90%의 말토트리오즈를 함유하는 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 적혈구에 대해서 안전하며; 이는 이들의 세포 막을 파괴하지 않음이 분명하다.

[0064] **d) 혈소판(PLT) 응고에 대한 PPI-G4-DS-MaI-III 덴드리머의 영향**

[0065] 건강한 공여자로부터의 혈액을 CPDA-1 항응고제(100mM 글루코오즈; 55mM 만니톨; 25,8 mM $K_2HPO_4$; 14,7 mM $KH_2PO_4$; 17,9 mM 포타슘 시트레이트); (mM - 몰 질량) 상에 수집하였다. 혈장을 360g(g-중력가속도)에서 5 분 동안 원심분리하였다. PLT 펠릿(상등액이 없는 원심분리 후의 세포의 클러스터)을 Tris(TRIS - EDTA를 함유하는 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 완충액)(0,12 M NaCl, 0,0154 M KC1, 0,006 글루코오즈, 0,0015 M $Na_2EDTA$, 0,0133 M Tris; pH 6,5) (M - Mol)에 현탁시켰다. 현탁액을 360g에서 5 분 동안 원심분리하였다. 펠릿을 2,0 x $10^9$ 세포/ml의 농도로 완충액(TRIS 완충액)에 재현탁시켰다. PLT의 응집을 자동 혈소판응집 분석기 AP2110를 사용하여 측정하였다. 1 ㎍/ml의 농도의 트립신을 양성 대조군으로서 PLT에 첨가하였다.

[0066] PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 시험된 농도 어디에서도 PLT 응집을 유발시키지 않았다.

[0067] 상기 기재된 바와 같이, CLL 림프구에 대한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머 보충은 이들 세포에서의 아폽토시스의 기전을 유의수준으로 유도하여, 이들의 증식 및 생존을 상당히 감소시킨다. 약물로서 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머를 사용하여 증식성 신생물 질환, 특히 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 치료하는데 있어서 효과적인 치료 효과를 예상할 수 있음이 입증되었다. 동시에, 본 발명에서 제시한 어떠한 방식으로 적용된 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머는 인간에게의 이의 안정한 사용을 보장하는 혈액의 다른 이상 변이 요소에 대해 비독성임이 입증되었다.

[0068] 표 2

[0069] 시험관내 배양물에서의 CLL 세포의 아폽토시스 및 생존성에 대한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향

| 24h | | 대조군 | | | PPI-g4-DS-Mal-III 4 mg/ml | | | PPI-g4-DS-Mal-III 6 mg/ml | | | PPI-g4-DS-Mal-III 8 mg/ml | | | PPI-g4-DS-Mal-III 10 mg/ml | | | 통계적 분석 (P 값) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 13 |
| | | Ann+IP - | Ann+IP + | Ann- IP+ | Ann+ IP- | Ann+IP + | Ann -IP+ | Ann+IP - | Ann+IP + | Ann -IP+ | Ann+IP - | Ann+IP + | Ann -IP+ | Ann+IP - | Ann+IP + | Ann- IP+ | 1 v 4= 0.04<br>1 v 7= 0.005<br>1 v 10= 0.005<br>4 v 7= 0.009<br>4 v 10= 0.009<br>2 v 5= 0.02<br>2 v 8= 0.01<br>2 v 11= 0.007 |
| n | | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | |
| X | | 9.46 | 7.57 | 4.25 | 15.95 | 14.62 | 3.75 | 20.88 | 15.92 | 2.64 | 24.77 | 17.25 | 3.94 | 27.97 | 18.90 | 6.73 | |
| SD | | 9.83 | 6.72 | 2.63 | 15.36 | 15.07 | 3.47 | 16.79 | 14.67 | 3.37 | 15.17 | 14.30 | 5.82 | 19.04 | 15.45 | 7.16 | |
| 48h | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| n | | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 1 v 4= 0.04<br>1 v 7= 0.02<br>1 v 10= 0.007<br>2 v 5= 0.04<br>2 v 8= 0.02<br>2 v 11= 0.01 |
| X | | 11.70 | 15.30 | 11.95 | 18.10 | 24.66 | 5.42 | 21.55 | 27.66 | 7.22 | 22.96 | 32.96 | 8.15 | 22.91 | 40.71 | 9.77 | |
| SD | | 8.75 | 11.77 | 13.61 | 14.17 | 17.34 | 4.81 | 18.47 | 19.32 | 7.40 | 15.34 | 18.67 | 8.77 | 15.37 | 18.58 | 5.60 | |

[0070]

[0071] n - 샘플의 수; X - 아폽토시스 또는 괴사 세포의 평균 백분율; SD - 표준편차; 초기 압폽토시스 - $Ann^{+}IP^{-}$; 후기 아폽토시스 - $Ann^{+}IP^{+}$; 괴사 - $Ann^{-}IP^{+}$; Ann - 마넥신-V; IP - 프로피듐 아이오다이드

[0072] 표 3

[0073] 시험관내 배양물에서의 건강한 세포의 아폽토시스 및 생존성에 대한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향

| 24h | | 대조군 | | PPI-g4-DS-Mal-III 4 mg/ml | | PPI-g4-DS-Mal-III 6 mg/ml | | PPI-g4-DS-Mal-III 8 mg/ml | | PPI-g4-DS-Mal-III 10 mg/ml | | 통계적 분석 (P 값) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 13 |
| | Ann+IP- | Ann+IP+ | Ann-IP+ | Ann+IP- | Ann+IP+ | Ann-IP+ | Ann+IP- | Ann+IP+ | Ann-IP+ | Ann+IP- | Ann+IP+ | Ann-IP+ | Ann+IP- | Ann+IP+ | Ann-IP+ | 1 v 7 = 0.04<br>1 v 10= 0.04<br>1 v 13 = 0.05<br>2 v 5 = 0.04<br>2 v 8 = 0.04<br>2 v 11 = 0.04<br>2 v 14 = 0.05 |
| n | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| X | 11.0 | 4.11 | 8.27 | 15.42 | 5.99 | 6.80 | 16.66 | 6.28 | 5.41 | 17.43 | 6.56 | 6.34 | 21.13 | 8.62 | 6.12 | |
| SD | 1.97 | 0.76 | 1.22 | 1.61 | 0.65 | 1.09 | 1.05 | 0.88 | 1.72 | 1.72 | 1.38 | 3.32 | 2.79 | 1.18 | 3.08 | |
| 48h | | | | | | | | | | | | | | | | |
| n | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 v 7 = 0.03<br>1 v 10 = 0.03<br>1 v 13 = 0.03 |
| X | 18.05 | 13.02 | 10.56 | 18.56 | 14.09 | 10.20 | 22.88 | 13.59 | 10.18 | 26.40 | 17.26 | 7.93 | 33.93 | 22.84 | 7.37 | |
| SD | 4.71 | 1.22 | 3.41 | 4.74 | 1.66 | 2.15 | 6.14 | 2.56 | 3.59 | 5.94 | 4.29 | 2.17 | 8.50 | 4.25 | 1.33 | |

[0074]

[0075] n - 샘플의 수; X - 아폽토시스 또는 괴사 세포의 평균 백분율; SD - 표준편차; 초기 압폽토시스 - $Ann^{+}IP^{-}$; 후기 아폽토시스 - $Ann^{+}IP^{+}$; 괴사 - $Ann^{-}IP^{+}$; Ann - 마넥신-V; IP - 프로피듐 아이오다이드

[0076] 표 4

[0077] 시험관내 배양물에서의 CLL 세포 미토콘드리아 전위에 대한 PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향. 퓨릴 유사체(플루다라빈; FA) 및 모노클로날 항체(리툭시맙; Rit)과의 비교

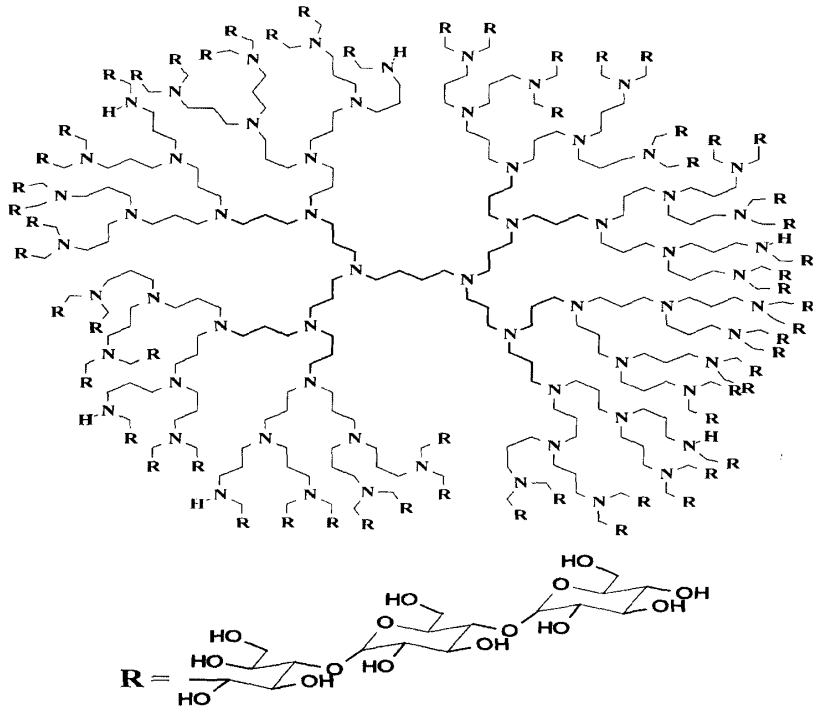
| 24h | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 대조군 | PPI-G4-DS-Mal-III 4 mg/ml | PPI-G4-DS-Mal-III 6 mg/ml | PPI-G4-DS-Mal-III 8 mg/ml | FA 1.6 μM | Rit 10 μg/ml |
| n | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| X | 37.91 | 46.52 | 49.75 | 58.53 | 52.05 | 44.92 |
| SD | 16.23 | 14.56 | 13.09 | 13.33 | 17.81 | 16.70 |
| 48h | | | | | | |
| n | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| X | 42.04 | 60.75 | 67.60 | 76.54 | 74.49 | 60.58 |
| SD | 14.26 | 12.24 | 17.14 | 15.26 | 17.47 | 19.99 |

[0078]

[0079] n - 샘플의 수; X - 낮은 미토콘드리아 전위를 나타내는 세포의 평균 백분율($\Delta\Psi m^{low}$/Gly-A$^-$(%); SD - 표준편차; FA - 플루다라빈; Rit - 리툭시맙

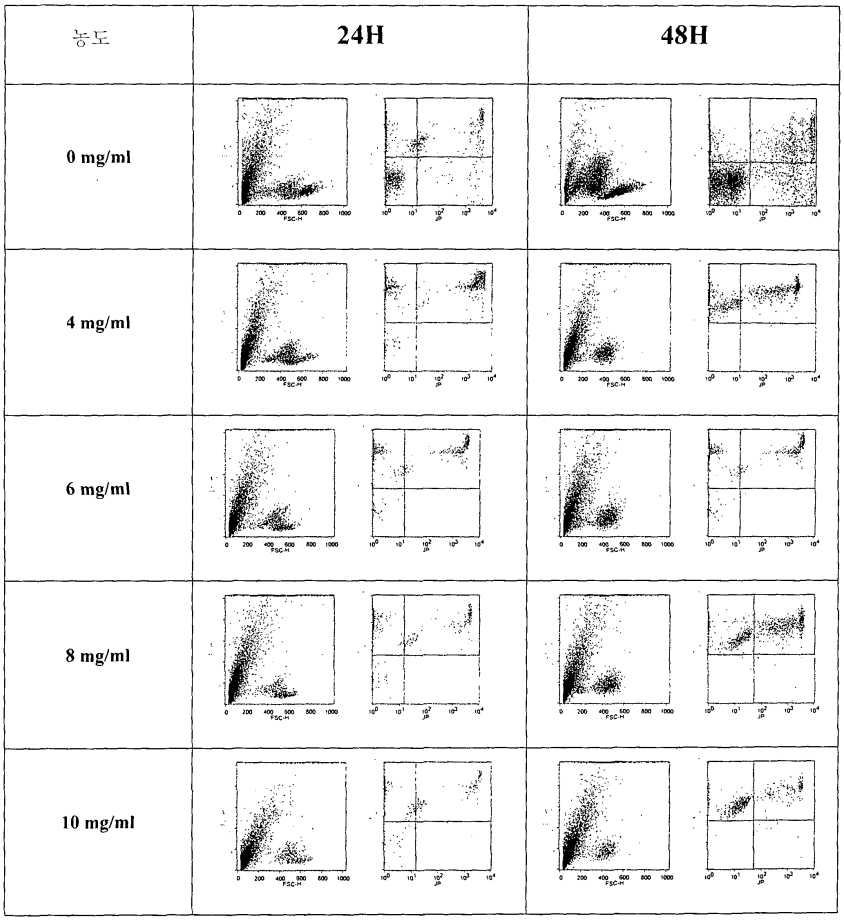
## 도면

### 도면1



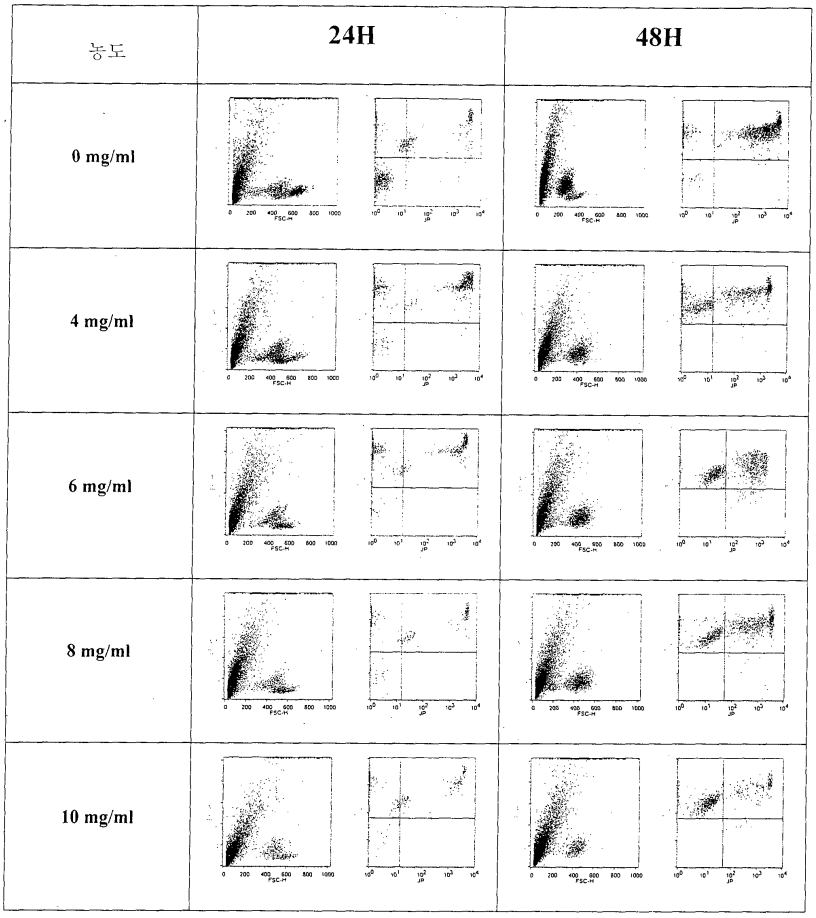

PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머 입자의 패턴

도면2




PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향하의
아폽토시스 CLL 세포의 세포분석기 분석

도면3




PPI-G4-DS-Mal-III 덴드리머의 영향하의
건강한 림프구에서의 아폽토시스의 세포분석기 분석