



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0123928
(43) 공개일자 2017년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0053256
(22) 출원일자 2016년04월29일
심사청구일자 2016년04월29일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
신화성
인천광역시 연수구 먼우금로 126, 210동 1201호 (동춘동, 현대대림2차아파트)
권여선
서울특별시 동작구 장승배기로18길 27, 205호 (노량진동, 아파트)
(74) 대리인
김순웅

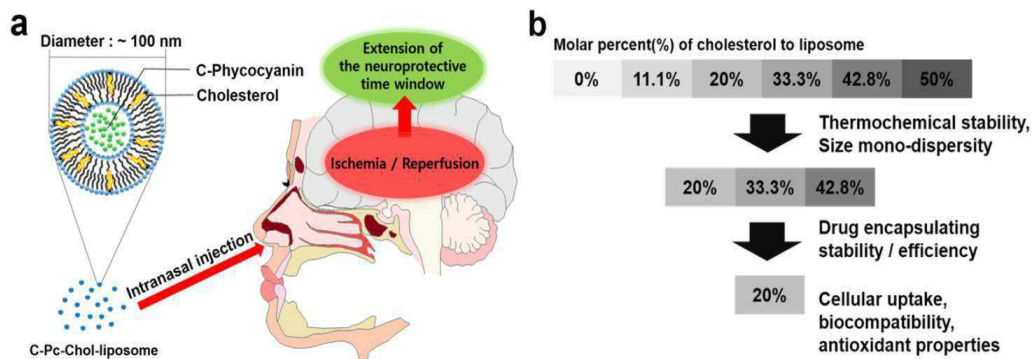
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 약물 전달용 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 산화 방지제인 피코시아닌을 담지하고 일정한 함량의 콜레스테롤을 포함하는 나노 사이즈의 리포솜은 열화학적 안정성, 사이즈 모노-분산도(size mono-dispersity), 피코시아닌 캡슐화 안정성 및 효율이 높고, 세포 흡수, 생체 적합성 및 항산화 효과가 우수하여, 종래의 약제보다 유효 성분인 피코시아닌의 신경 보호 작용 시간(neuroprotective time window)을 더 늘릴 수 있어 뇌의 허혈-재관류 손상으로 인한 뇌의 신경 세포를 보호하는 효과가 뛰어나다. 이에 따라, 상기 뇌의 신경 세포와 관련된 뇌의 질환의 예방 또는 치료에 유용하다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/0021 (2013.01)
A61K 9/0031 (2013.01)
A61K 9/0043 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)
A61K 9/006 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	52946-1
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	도약연구
연구과제명	허혈성 뇌졸중 치료용 C-Phycocyanin의 유도단량체 및 약물분비시스템 개발
기 여 율	1/1
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 해양 미생물 유래 단백질은 피코시아닌(Phycocyanin), 피코에리트린 (phycoerythrin), 카로티노이드(carotenoid), 안토시아닌(anthocyanin) 및 클로로필(chlorophyll)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 색소 단백질인 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 리포솜은 인지질 또는 스테롤을 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 인지질은 포스파티딜 콜린(phosphatidyl choline), 포스파티딜 세린 (phosphatidyl serine), 포스파티딜 에탄올아민(phosphatidyl ethanolamine), 스펅고미엘린(sphingomyelin), 포스파티딜 이노시톨(phosphatidyl inositol) 및 포스파티드산(phosphatidic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 스테롤은 콜레스테롤, 코프로스탄올, 시토스테롤 및 에르고스테롤로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 스테롤은 리포솜의 0 내지 50%(w/w)의 함량으로 포함되는 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 리포솜의 크기는 80 내지 150 나노 미터(nanometer)인 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 리포솜은 비강 투여(intranasal administration), 경구투여(oral administration), 피내주사(intracutaneous injection), 피하 주사(subcutaneous injection), 근육내 주사(intramuscular injection), 정맥내 주사(intravenous injection), 동맥내 주사(intraarterial injection), 직장내 적용(rectal administration), 구강점막 적용(application to oral mucous membrane) 및 외용(external application) 투여

로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 투여를 수행하는 투여 용도인 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 리포솜은 허혈-재관류 손상(Ischemia/reperfusion injury), 허혈성 세포 손상(Ischemic cell injury) 및 산화 스트레스(Oxidative stress)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 손상으로 인해 손상된 뇌의 신경 세포를 보호하는 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 리포솜은 뇌 손상 후 2 내지 10시간 후 투여용인 것을 특징으로 하는, 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 약물 전달용 조성물.

청구항 13

해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 약물 전달용 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌혈관 질환에 의한 사망률(인구 십만 명당 사망자수)이 암 다음으로 2위인 73.8명에 이르며, 특히 노령 연령층에 발병률이 높고, 일단 발생하면 사망률이 매우 높다. 뇌혈관 질환은 크게 2가지 형태로 분류될 수 있다. 첫번째, 뇌출혈 등에서 볼 수 있는 출혈성 뇌질환이고, 두번째, 뇌혈관의 폐쇄 등에 의해 나타나는 허혈성 뇌질환이다. 상기 출혈성 뇌질환은 교통사고 등에 의해서 주로 나타나며, 허혈성 뇌질환은 주로 노령의 사람들에서 자주 나타나는 질환이다. 상기 허혈성 뇌질환은 혈전증(thrombosis), 색전증(embolism), 일과성 허혈 발작(transient ischemic attack) 및 소경색(lacune)등으로 세분화할 수 있는데, 허혈성 뇌혈관 질환은 주로 혈전과 색전 등에 의하여 뇌에 혈류를 공급하는 혈관에 병리학적 이상이 생긴 것이다. 대뇌에 일시적인 뇌허혈이 유발되는 경우, 뇌조직에 산소와 포도당의 공급이 차단되어 신경세포에서는 ATP 감소, 부종(edema)이 발생하며, 결국 뇌의 광범위한 손상이 유발된다. 신경세포의 사멸은 뇌허혈이 있는 후 상당한 시간 경과 후에 나타나는데, 이를 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)라고 한다. 지연성 신경세포사는 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil)을 이용한 일과성 전뇌 허혈모델(transient forebrain ischemic model)을 통한 실험에서 살펴보면, 5분간 뇌허혈 유도 4일 후 해마(hippocampus)의 CA1 영역에서 신경세포사가 관찰되는 것으로 보고되고 있다(Kirino T, Sano K. Acta Neuropathol., 62, 201-208, 1984; Kirino T. Brain Res., 239, 57-69, 1982).

[0003] 뇌허혈에 의한 신경세포사 기전에는 크게 2가지가 있다. 첫번째, 뇌허혈에 의해서 세포 바깥에 과도한 글루타메이트(glutamate)가 축적되게 되며, 이러한 글루타메이트가 세포내로 유입되어 결국 과도한 세포내 칼슘의 축적

으로 신경세포사가 유발되는 흥분성 신경세포사 기전(Kang TC et al., J. Neurocytol., 30, 945-955, 2001)이고, 다른 하나는 허혈-재관류 시에 갑작스러운 산소 공급으로 인해 생체내 라디칼의 증가로 인해 DNA 및 세포질에 손상을 입어 유발되는 산화성 신경세포사 기전이다(Won MH et al., Brain Res., 836, 70-78, 1999; Sun AY, Chen YM, J. Biomed. Sci., 5, 401-414, 1998; Flowers F, Zimmerman JJ. New Horiz., 6, 169-180, 1998). 상기의 기전 연구를 바탕으로 뇌허혈 시에 나타나는 신경세포사를 효과적으로 억제하는 물질을 탐색하거나, 물질의 기전을 밝히는 연구가 많이 수행되고 있다. 그러나 아직까지 효과적으로 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제하는 물질은 거의 없는 실정이다.

[0004] 허혈성 뇌질환에서 임상적으로 사용 가능한 약물은 희소하고, 현재 유일하게 허가된 약물은 항혈전제(항응고제, 항혈소판제, 혈전용해제를 포함)이다. 티크로피딘(ticlopidine), 시로스타졸(cilostazole) 및 프로스타시크린(prostacycline)과 같은 항혈소판제나 항응고제는 종종 두통, 심계항진 및 간에 부담을 주는 부작용이 있어 사용에 제한이 따른다. 더불어, FDA 공인 시판 중인 조직 플라스미겐 활성화자(tissue plasminogen activator)는 혈전용해제로 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 빠른 산소 및 포도당의 공급을 유도하는 물질로서, 직접적으로 신경세포를 보호하는 것이 아니기 때문에 빠른 사용이 필요하다. 또한, 혈전용해제라는 특징 때문에 과량 사용 또는 자주 사용 시에는 혈관벽이 얇아져 결국 출혈성 뇌혈관 질환을 유발하게 되므로 사용에 주의가 요구된다. 이 때, 재관류 시 과도하게 발생하는 활성산소와 더불어 신경 괴사가 일어난다. 이로 인해, 현재 tPA 투여 시, 항산화제를 동시에 투여하여 신경조직을 보호하기 위한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 신경보호는 재관류 시 상당한 시간 동안 진행될 필요성이 제기되어, 신경보호 연장을 위한 항산화제 포함 전달시스템 개발에 대한 수요가 상당하다.

[0005] 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier, BBB)은 물질의 통로에 대한 물리적 장벽으로 작용하여, 중추 신경계 장애의 치료를 위한 제제 투여의 경로로 중요하다(Xie, Y. 등, J. Control Release 105, 106-119 (2005)). 비강 투여는 뇌의 손상에 효과적인 것으로 알려져 있다(William, M. P. Pharm. Res. 24, 1733-1744 (2007)). 상기 전달 타입은 후각 신경상피(neuroepithelium)를 통하여 코에서 뇌로 약물의 전달되고, 혈액-뇌 장벽(BBB)을 우회하고, 간의 첫번째-통과 대사를 피한다(Candace, L. G. 등, J. Pharm. Sci. 94, 1187-1195 (2005)). 비강 경로를 통한 약물 전달은 코 점액층, 점막 상피, 후각 신경상피를 통한 경로를 포함하고, 친유성 약물 담체는 비강 투여에 적합한 후보이며, 리포솜은 친유성 약물 담체의 전형적인 것이다(Illum, L, Eur. J. Pharm. Sci. 11, 1-18 (2000)). 리포솜은 친유성 및 점막-부착 특성 때문에, 캡슐화된 약물의 산화 및 저하를 방지하기 위하여 사용되어 왔다(Corace, G. 등, J. Liposome. Res. 24, 323-335 (2014)). 리포솜의 약물 반감기는 적어도 내부-비강으로 투여되는 비 약물보다 4배 이상 높음을 확인하였다(Jaafari, M. R. Iran. J. Pharm. Res. 4, 3-11 (2005)). 리포솜은 타겟-특이적 지질을 합성하거나, 보조제를 이용하고, 적절한 항체 및 폴리머를 코팅하는 것에 의해, 타겟-전달을 증진하거나 방출하는 특이적 기능을 갖도록 설계될 수 있다(Gregoriadis, G. Trends Biotechnol. 13, 527-537 (1995)). 콜레스테롤 보충은 리포솜의 안전성을 향상시키는 종래의 방법이며, 인지질 소포체로 콜레스테롤의 혼입은 지질 이중층 구조를 더욱 단단하고 안정적으로 만들기 때문이다(Johnson, S. M. BBA-Biomembranes 307, 27-41 (1973)). 콜레스테롤의 수산기는 인지질의 친수성 헤드와 상호 작용하고, 강도의 조절 및 지질 이중층의 강도를 조절하는 이의 스테로이드 골격은 소수성 인지질 체인과 상호 작용한다(Maria-Lucia, B. Drug. Deliv. Transl. Res. 5, 231-242 (2015)). For these reasons, cholesterol increases the retention of solutes entrapped inside liposome vesicles and serum-induced stability¹⁷. 게다가, 콜레스테롤은 뇌 세포 멤브레인의 20~25%를 차지한다. 콜레스테롤을 포함하는 리포솜은 SH-SY5Y (인간 신경 아세포종 세포주) 및 Schwann 세포에 의한 내재화를 강화됨이 보고되었다(Lee, S. Y. 등, Plos One 8 (2013)). 그러나, 비강 전달 경로와 관련된 물리적 및 생물학적 환경은 리포솜의 물리적 안정성 및 생물학적 효능에 영향을 미친다.

[0006] C-피코시아닌(C-Phycocyanin, C-Pc)은 스피룰리나와 같은 남조류에서 얻은 단백질이며, 이는 산화 방지제 및 ROS 스캐빈저, 항-염증효과 및 항균 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Romay, C. 등, Curr. Protein Pept. Sci. 4, 207-216 (2003)).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 효과적으로 뇌 신경 세포를 보호하고, 이와 관련된 뇌질환 예방 또는 치료를 위한 방안을 연구한 결과, 산화방지제인 피코시아닌을 리포솜에 담지하고, 상기 리포솜은 일정한 함량의 콜레스테롤로 구성되었을 때, 허혈성 뇌졸중 재관류 시, 본 발명의 리포솜이 뇌조직 보호 시간을 연장하는 데 효과적임을 확인하

여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은, 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은, 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은, 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은, 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은, 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 산화 방지제인 피코시아닌을 담지하고 일정한 함량의 콜레스테롤을 포함하는 나노 사이즈의 리포솜은 열화학적 안정성, 사이즈 모노-분산도(size mono-dispersity), 피코시아닌 캡슐화 안정성 및 효율이 높고, 세포 흡수, 생체 적합성 및 항산화 효과가 우수하여, 종래의 약제보다 유효 성분인 피코시아닌의 신경 보호 작용 시간(neuroprotective time window)을 더 늘릴 수 있어 뇌의 허혈-재관류 손상으로 인한 뇌의 신경 세포를 보호하는 효과가 뛰어나다. 이에 따라, 상기 뇌의 신경 세포와 관련된 뇌의 질환의 예방 또는 치료에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 0%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-0 mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(a), 20%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-0 mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(b), 20%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-1mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(c)의 TEM 이미지를 확인한 도이다.

도 2는 C-피코시아닌(C-Pc)를 담지하지 않고, 0%(w/w) 콜레스테롤(a), 20%(w/w) 콜레스테롤(b), 50%(w/w) 콜레스테롤(c)을 포함하는 리포솜의 크기 분포 나타낸다. 또한, C-피코시아닌(C-Pc)를 담지하고, 0%(w/w) 콜레스테롤(d), 20%(w/w) 콜레스테롤(e), 50%(w/w) 콜레스테롤(f)을 포함하는 리포솜의 크기 분포 나타낸 도이다.

도 3은 각 0%, 11.1%, 20% 및 33.3%(w/w) 콜레스테롤을 포함하는 리포솜의 시차주사 열량측정법(DSC)을 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 각 0%, 11.1%, 20%, 33.3% 및 42.8%(w/w), 콜레스테롤을 포함하는 리포솜의 C-피코시아닌(C-Pc)의 분출 정도를 시간(0, 1, 3, 5, 24, 48 및 72 시간)에 따라 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 Neuro2a 세포에 PBS, 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc), C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 0%(w/w) 콜레스테롤 리포솜 및 C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜을 처리하여 1시간(a) 또는 10시간(b) 후의 각 Neuro2a 세포 흡수 수준을 형광 강도를 통하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 PBS, 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc), C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 0%(w/w) 콜레스테롤 리포솜 및 C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜을 처리한 세포의 생존율을 확인하고(a), 과산화수소(H_2O_2)를 처리한 조건 하에서 상기 각 조건으로 처리한 세포의 생존율을 확인한 결과(b)를 나타낸 도이다.

도 7은 PBS, 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc), 0% 콜레스테롤 리포솜, C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 0%(w/w) 콜레스테롤 리포솜 및 C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜을 처리한 세포에서 MnSOD(a) 또는 카탈라아제(b)의 mRNA 발현수준을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 중대뇌동맥 폐색(Middle cerebral artery occlusion, MCAO) 동물 모델 유도 시점 2시간 후에 본 발명의 리포솜을 처리하는 개략적인 실험 모식도(a), 각 조건에 따른 동물 모델의 경색 부피(infarct volumes)를 확인한 결과(b) 및 각 조건에 따른 동물 모델의 경색 부피(infarct volumes)의 평균을 나타낸 결과

(c)를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 중대뇌동맥 폐색(Middle cerebral artery occlusion, MCAO) 동물 모델 유도 시점 6시간 후에 본 발명의 리포솜을 처리하는 개략적인 실험 모식도(a), 각 조건에 따른 동물 모델의 경색 부피(infarct volumes)를 확인한 결과(b), 각 조건에 따른 동물 모델의 경색 부피(infarct volumes)의 평균을 나타낸 결과(c) 및 각 처리군 마우스의 신경학적 후유증(neurological deficits) 특성을 분석한 결과(mNSS 값)(d)을 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 리포솜 및 투여 방법을 개략적으로 나타낸 모식도이고(a), 콜레스테롤 함량에 따른 특징(b)을 나타낸 도이다.

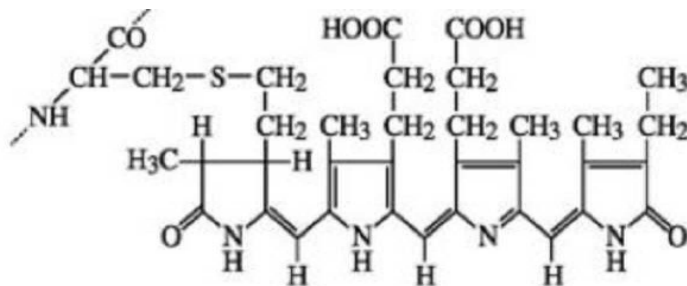
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은, 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 있어서, "리포솜"은 외부 수성 환경으로부터 내부 수성 상을 분리하는 적어도 하나의 이중층을 포함하는 소포를 말한다.

[0017] 상기 해양 미생물 유래 단백질은 피코시아닌(Phycocyanin), 피코에리트린 (phycoerythrin), 카로티노이드(carotenoid), 안토시아닌(anthocyanin) 및 클로로필(chlorophyll)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 색소 단백질이고, 바람직하게는 피코시아닌(Phycocyanin)이며 하기 화학식 1의 구조로 나타낸다.

[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 "피코시아닌"은 피코에리트린과 함께 홍조, 남조, 크립토향 등의 조류에 함유되어 있는 물질로 공유결합한 피코시아노빌린(곧은사슬상의 테트라피롤유도체)을 크로모젠이라고 하는 청색소 단백질을 의미한다. 피코시아닌과 함께 빌린단백질이라고 하며, 빛에너지를 클로로필 a에 전달하여 광합성을 진행시킨다.

[0021] 상기 리포솜은 인지질 또는 스테롤을 포함하고, 상기 인지질은 포스파티딜 콜린(phosphatidyl choline), 포스파티딜 세린 (phosphatidyl serine), 포스파티딜 에탄올아민(phosphatidyl ethanolamine), 스핑고미엘린(sphingomyelin), 포스파티딜 이노시톨(phosphatidyl inositol) 및 포스파티드산(phosphatidic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1종이며, 바람직하게는 포스파티딜 콜린이나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 "포스파티딜 콜린"은 가장 대표적인 인지질로, 디글리세리드에 인산콜린이 결합한 것을 의미한다. 동식물계에 널리 분포하며, 동물조직에서는 지질의 약 1/2을 차지한다. 생체막 지질의 주요한 구성 성분이며, 콜린의 효율적인 공급원으로 중요할 뿐만 아니라, 각종 효소의 활성화에 필요하다.

[0023] 상기 스테롤은 콜레스테롤, 코프로스탄올, 시토스테롤 및 에르고스테롤로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 바람직하게는 콜레스테롤이나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 "콜레스테롤"은 척추동물에서 발견되는 대표적 스테롤이다. 사람의 경우 거의 모든 세포의 구성성분으로서 유리형 또는 지방산과의 에스테르형으로 존재하고, 특히 뇌, 척수, 신경조직 등에 많이 들어 있다. 세포의 원형질 및 형질막의 구성성분인 반면, 성호르몬, 부신피질호르몬, 담즙산, 비타민D 등 다른 스테로이드의 대부분은 콜레스테롤로부터 생합성된다.

[0025] 상기 스테롤은 리포솜의 0 내지 50%(w/w)의 함량으로 포함되나, 바람직하게는 10 내지 40%(w/w)의 함량이고, 보다 바람직하게는 15 내지 35%(w/w)의 함량이나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 상기 리포솜의 크기는 80 내지 150 나노 미터(nanometer)이고, 바람직하게는 80 내지 130 나노 미터이며, 더욱

바람직하게는 90 내지 110 나노 미터이나, 이에 제한되지 않는다.

- [0027] 상기 리포솜은 비강 투여(intranasal administration), 경구투여(oral administration), 피내주사(intracutaneous injection), 피하 주사(subcutaneous injection), 근육내 주사(intramuscular injection), 정맥내 주사(intravenous injection), 동맥내 주사(intraarterial injection), 직장내 적용(rectal administration), 구강점막 적용(application to oral mucous membrane) 및 외용(external application) 투여로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 투여를 수행하는 투여 용도이며, 바람직하게는 비강 투여이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 "비강 투여"는 비공에 직접 투여하도록 된 제제이며, 종래의 근육 내 주사의 경우 발작 또는 의식소실을 일으킬 위험이 있는 반면, 비강 투여는 상기 방법에 비해 훨씬 안전하고, 의식이 없는 환자에게 적용하기에도 용이한 이점이 있다.
- [0029] 상기 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펠트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이고, 바람직하게는 뇌졸중이며, 더욱 바람직하게는 허혈성 뇌졸중이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 상기 리포솜은 허혈-재관류 손상(Ischemia/reperfusion injury), 허혈성 세포 손상(Ischemic cell injury) 및 산화 스트레스(Oxidative stress)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 손상, 바람직하게는 허혈-재관류 손상으로 인해 손상된 뇌의 신경 세포를 보호하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 상기 리포솜은 뇌 손상 후 2 내지 10시간 후 투여용이고, 바람직하게는 2 내지 7시간이나, 이에 제한되지 않는다. 허혈성 뇌졸중이 발생하고, 재관류가 일어난 4시간 이후(허혈성 뇌졸중 발병 후 6시간), 비강 투여 시, 리포솜에 담지된 피코시아닌의 신경 보호 작용 시간을 늘리는 효과가 있어, 뇌의 신경 세포 보호에 탁월한 효과를 나타낸다.
- [0032] 상기 리포솜은 리포솜을 단독으로 포함하거나, 뇌의 신경 세포 보호 및 이에 따른 뇌 질환에 효과가 있는 물질을 유효성분으로 더 포함할 수 있고, 상기 유효성분 외에도 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 추가성분, 즉, 약제학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 보다 상세하게는 상기 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산염류에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다.
- [0034] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 통상의 것을 모두 사용 가능하고, 일 예로 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 칼슘카보네이트, 텍스트린, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 성분들은 리포솜에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 리포솜은 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서 단독으로 사용될 수 있고, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 리포솜은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 리포솜의 일일 투여량은 0.01 내지 10000 mg/kg이며, 바람직하게는 1 내지 20mg/kg이고, 하루 1회 내지 3회에 나눠 투여하는 것이 바람직하다.
- [0038] 또한 본 발명은, 상기 조성물을 포함하는 뇌질환 치료 또는 예방용 약제를 제공한다.
- [0039] 상기 약제는 과립제, 산제, 시럽제, 액제, 현탁제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 환제, 주사제, 경피흡수제, 로션제, 연고제, 첩부제, 카타플라즈마제, 페이스트제 또는 좌제로 제형화된 약제이나, 이에 제한되지 않는다.

- [0041] 또한 본 발명은, 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 "약물 전달"은 인체의 질병이나 손상된 부위를 치료하기 위하여 특정한 의약품을 사용하게 되는데, 이때 의약품에 의한 치료 효과를 극대화시키고 인체의 부작용을 최소화하기 위한 목적으로 약물전달 시스템 (Drug delivery system; DDS)을 포함한다. 다양한 경로를 통해 체내에 투여된 약물은 혈액과 림프계의 운반 경로를 통하여 생체막과 장기 등으로 이동함으로써 특정 부위에 도달하게 된다.
- [0044] 또한 본 발명은, 해양 미생물 유래 단백질을 유효성분으로 담지한 리포솜을 포함하는 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명에 따른 조성물은 뇌 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 하는 건강식품에 포함될 수 있으며, 본 발명의 리포솜을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 합성 또는 추출물로부터 분리된 것을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 또한 상기 리포솜의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 조절하여 사용될 수 있다.
- [0046] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0047] 본 발명의 식품 보조 첨가제는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에르트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0048] 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명에 따른 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0050] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052] 실험예 1. 리포솜 제조

[0053] 1-1. C-피코시아닌(C-Phycocyanin, C-Pc)을 담지한 리포솜의 제조

[0054] 리포솜 내 콜레스테롤 함량 및 C-피코시아닌(C-Pc)담지 여부에 따라 각 리포솜을 제조하였다.

[0055] 구체적으로, 리포솜은 필름 수화 방법(film hydration method)(Romay, C. 등, Inflamm. Res. 47, 36-41 (1998))을 이용하여 준비하였다. 달걀 노른자(PC, Sigma Aldrich, U.S.)에서 얻은 L- α -포스파티딜콜린 및 콜레스테롤(Chol; Sigma Aldrich, U.S.)을 상이한 함량(0, 11.1, 20, 33.3, 42.8 및 50%(w/w))으로 혼합하였다. 지질 용액을 진공 챔버에서 3시간 동안 지질 필름을 형성하도록 건조하였다. 10 mM 리포솜 용액을 제조하기 위해 20 μ g/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)을 포함하거나 포함하지 않는 1 ml의 PBS로 상기 필름을 수화(hydrated)시킨 후, 바이알의 바닥에서부터 벗겨지도록 볼텍싱하였다. 생체 내 실험을 위한 리포솜은 1 mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)을 포함하도록 제조하였다. 다중층의 리포솜을 파괴하기 위해, -80도 냉동고 및 20도의 수조를 사용하여 10회 냉동/해동을 수행하였다. 리포솜 용액은 압출기(Avanti Polar Lipids, U.S.)를 이용하여 100 nm 기공 폴리카보네이트 멤브레인을 통하여 압출하였다. 세포에 리포솜을 처리하기 전에, 리포솜은 0.22 μ m 필터를 통과시킨 것을 멸균시키고 이용하였다.

- [0057] 1-2. 시차주사 열량측정법(Differential scanning calorimetry, DSC)
- [0058] 콜레스테롤을 추가한 후 C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 리포솜의 전이 온도 변화를 시차주사 열량계(calorimeter (Netzsch, Germany))를 이용하여 측정하였다. 각 조건의 리포솜 샘플(2 mg)을 알루미늄 팬에 놓고 알루미늄 뚜껑으로 밀봉하였다. 시차주사 열량 측정은 기준으로서 공팬(empty pan)을 이용하여 5도/분의 가열 속도로 20~50도의 범위에 걸쳐 실시하였다.
- [0060] 1-3. 리포솜의 크기 및 제타 전위
- [0061] 리포솜의 크기 및 제타 전위를 측정하기 위하여, 리포솜 용액을 증류수로 5배 희석하여 준비하였다. 입자 크기, 다분산 지수(polydispersity indices), 및 제타 전위는 레이저 회절 사이즈 분석기(Mastersizer 2000, Malvern, UK)을 이용한 동적 광 산란을 통해 분석하였다. 각 기준의 리포솜 샘플은 상기 과정을 3번 수행하였다.
- [0063] 1-4. 투과 전자 현미경(Transmission electron microscopy, TEM) 이용
- [0064] 리포솜 형태는 TEM(JEM 2100F, JEOL, Japan)을 이용하여 측정하였다. 각 조건의 리포솜 샘플을 10배 희석하고, TEM 그리드에 떨어뜨리고 1%의 우라닐 아세테이트를 10분간 염색한 후, 증류수로 3회 세척하였다. 그리드를 인공 챔버에 밤새두둑 두고, TEM을 이용하여 리포솜을 관찰하였다.
- [0066] 1-5. C-피코시아닌(C-Pc) 리포솜의 캡슐화 효율 및 생체 외 C-피코시아닌(C-Pc) 리포솜의 방출 프로파일 확인
- [0067] 기준으로서 C-피코시아닌(C-Pc)을 이용하고, 리포솜에 C-피코시아닌(C-Pc)을 캡슐화한 양을 측정하였다. 용액에서 리포솜을 분리하기 위하여 20,000 g에서 30분간 원심분리하여 리포솜 소포를 수득하였다. 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc) 및 불안정 리포솜을 포함한 상등액을 모으고, BCA assay kit(Thermo Scientific, US)를 이용하여 BCA 단백질 분석을 실시하였다. C-피코시아닌(C-Pc)이 없는 리포솜의 상등액을 대조군으로 이용하였다. 캡슐화 효율(encapsulation efficiency, EE%)의 비율은 하기 수식 1을 이용하여 계산하였으며, 각 조건의 샘플은 3번 측정하였다. 상기 각 조건의 샘플은 암 조건하에 제조하였다.

수학식 1

$$EE\% = \frac{(\text{총 C-Pc}) - (\text{상등액 용액 내 C-Pc})}{\text{총 C-Pc}} \times 100$$

- [0068]
- [0069] 생체 외 C-피코시아닌(C-Pc)의 프로파일 방출은, 9 ml의 PBS(pH 7.4)를 1 ml의 리포솜 용액을 37도의 조건에서 각 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 또는 72 시간의 조건으로 처리하였다. 상기 각 시간마다, 1 ml의 용액을 취하여 20,000 g 및 30분 조건으로 원심분리하였다. 분출된 C-피코시아닌(C-Pc)을 포함하는 상등액에 대하여 BCA 단백질 분석을 수행하였다.
- [0071] 1-6. 세포 배양
- [0072] Neuro2A 세포(마우스 신경 아세포종 세포주)는 ATCC(American Type Culture Collection)(USA)에서 얻고, 10% 우태아 혈청(FBS, Gibco, UK) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco, UK)을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)(Gibco, UK)에서 37도, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 세포의 분화를 위하여, 2% FBS 및 20 μM 레티노산(retinoic acid)으로 4-5일 동안 처리하였다. 리포솜은 세포에 처리되기 전에, 0.22 μm 필터로 걸러 멸균하였다.
- [0074] 1-7. C-피코시아닌(C-Pc) 담지 리포솜의 흡수 수준 및 세포 독성

- [0075] 구체적으로, Neuro2a 세포에 대한 C-피코시아닌(C-Pc) 담지 리포솜의 흡수는 공초점 현미경(LSM 510 META, Carl Zeiss, 및 Germany)을 이용하여 관찰하였다. Neuro2a 세포에 3시간 동안 5 μ g/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)을 포함하는 C-피코시아닌(C-Pc) 담지 리포솜을 처리하였다. 또한, 양성 대조군 또는 음성 대조군으로, 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc) 또는 PBS를 Neuro2a 세포에 처리하였다. C-피코시아닌(C-Pc) 유무에 따라 세포를 배양한 후, 배지를 제거하고 세포를 PBS로 제거한 후, 차가운 4% 파라포름알데히드로 15분간 고정시킨 후, Hoechst 33342 dye(Thermo Fisher, MA USA)로 염색하였다. 핵은 405 nm 레이저 및 BP 420-480 nm 방출 필터를 이용하여 이미지화하였으며, C-피코시아닌(C-Pc) 검출은 LP 615 nm 방출 필터를 이용하였다.
- [0076] Neuro2a 세포에 대한 리포솜의 세포 독성 효과는 MTT 분석을 이용하여 분석하였다. 상기 실험에 1-6의 세포 배양 방법으로 배양한 Neuro2a 세포에, 500 μ M 리포솜을 37도의 조건으로 1, 3, 또는 5일 동안 배양하였다. MTT 분석은 100 μ l MTT 용액을 이용하여 37도로 1시간 동안 수행하였다. 상기 MTT 용액을 제거하고 포르마잔 결정을 200 μ l의 디메틸 설펝시다제로 용해하였다. 광학 밀도(OD)는 ELISA 판독기(Tecan, Austria)를 이용하여 540 nm로 분석하였다.
- [0078] 1-8. C-피코시아닌(C-Pc) 담지 리포솜의 산화 방지 효과 확인 방법
- [0079] C-피코시아닌(C-Pc) 담지 리포솜의 산화 방지 효과를 평가하기 위하여, Neuro2a 세포 생존율은 과산화수소(H_2O_2)로 유도된 산화 조건 하에서 수행되었다. 상기 실험에 1-6의 세포 배양 방법으로 Neuro2a 세포를 배양하였으며, C-피코시아닌(C-Pc) 담지 또는 비 담지한 리포솜을 1일 동안 전처리하고, 24시간 동안 200 μ M H_2O_2 로 처리하였다. 세포 생존율은 상기 실험에 1-7의 MTT 분석을 이용하여 측정하였다. qRT-PCR은 C-피코시아닌(C-Pc) 담지 리포솜을 처리한 Neuro2a 세포의 산화 방지 효소의 mRNA 수준을 측정하기 위해 사용하였다. 총 RNA는 RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 분리하였다. cDNA는 RNA QuantiFast Reverse Transcription Kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 합성하였으며, qRT-PCR은 QuantiFast SYBR Green PCR Kit(Qiagen, Germany) 및 Rotor-Gene Q PCR unit(Qiagen, Germany)을 이용하였다. PCR 조건은 40회로, 95도에서 5분, 95도에서 10초, 및 60도에서 30분으로 수행하였다. 베타-액틴은 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로서 이용하였다. 프라이머의 서열은 다음과 같다: 베타-액틴은 5'-GTACTCTGTGTGGATCGGTGG-3'(서열번호 1, 정방향) 및 5'-AACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'(서열번호 2, 역방향), MnSOD는 5'-ACCGAGGAGAAGTACCACGA-3' (서열번호 3, 정방향) 및 5'-TGGGTTCTCCACCCTTA-3' (서열번호 4, 역방향), Catalase는 5'-GCGGATTCCTGAGAGAGTGG-3'(서열번호 5, 정방향) 및 5'-TGTGGAGAATCGAACGGCAA-3'(서열번호 6, 역방향)을 사용.
- [0081] 1-9. 동물 모델 및 비강 투여
- [0082] 중대뇌동맥 폐색(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)은 실험 동물의 사용에 대한 국가 지침에 따라 수행하였다. 수컷 Sprague dawley(SD) 래트(DBL, 한국)를 12시간 명-암 사이클하에 22 ± 2 도의 조건으로 두었으며, 먹이 및 식수를 제공하였다. INHA-IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee of Inha University (Republic of Korea))에서 제공한 프로토콜로 이용하였으며, 모든 동물의 절차는 블라인드로 처리하였다.
- [0083] MCAO 래트 모델은 Johnson, S. M 등(BBA-Biomembranes 307, 27-41 (1973))에 기재된 방법으로 준비하였다. 8주령 SD 래트를 3% 이소플루란(BKpharm, South Korea)을 이용하여 마취시키고, 안면 마스크를 이용하여 1.5% 이소플루란을 유지시켰다. 수술 동안, 직장 온도는 열 패드를 이용하여 37도를 유지시켰다. 열 패드에 배와위(supine position)로 동물의 자세를 취한 후, 작은 정중선 목 절개(small midline neck incision)를 하고, 미주 신경(vagal nerve)을 유지하면서, 경부 절개 경동맥(common carotid artery, CCA), 내 경동맥(internal carotid artery, ICA) 및 외부 경동맥(external carotid artery, ECA)를 노출시켰다. ECA는 실크 봉합사로 묶고 MCA는 실리콘-코팅된 4-0 나일론 필라멘트(AILEE, South Korea)를 오른쪽 ICA에 삽입하여 막았다. 상기 삽입된 필라멘트는 실크 봉합사를 이용하여 해당 위치에 고정시키고 CCA는 클램프(JEUNG DO BIO, South Korea)와 연결하였다. 목의 피부를 닫고 1시간 동안 봉합한 후, 삽입된 필라멘트를 잡아 당겨 MCA를 통하여 혈액을 재관류시켰다. 콜레스테롤 0% 또는 20%의 리포솜을 각각 포함하는 8.34 μ m의 샘플, C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 콜레스테롤 0% 또는 20%의 리포솜; 및 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc)을 재관류 후에 6시간 동안 총 용량 33.36 μ l로 각 쿿구멍에 2회 비강 투여하였다. 2일 후 MCAO 래트의 뇌를 해부하고 2 mm 두께의 섹션을 제공하기 위해 래트 brain slicer (Zivic, USA)를 이용하여 관상면(coronal plane)을 분리하였다. 상기 섹션을 TTC (2, 3, 5

- 트리페닐테트라졸륨 클로라이드(triphenyltetrazolium chloride))로 염색하여 경색 부피(infarct volumes)를 측정하였다.

실시예 1. 콜레스테롤 함량 및 C-피코시아닌(C-Pc) 담지 여부에 따른 리포솜의 크기, 제타 전위 및 다분산 지수(polydispersity indices) 확인

콜레스테롤 함량 및 C-피코시아닌(C-Pc) 담지 여부에 따른 리포솜의 크기, 제타 전위 및 다분산 지수(polydispersity indices)를 확인하였다.

구체적으로, 각 조건의 리포솜의 형태 및 크기를 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-1과 같이 L- α -포스파티딜 콜린을 포함하고, C-피코시아닌(C-Pc)을 0 또는 1mg/ml로 담지하며, 상이한 콜레스테롤 함량(%) (0, 11.1, 20, 33.3, 42.8 및 50(w/w))으로 구성된 각 리포솜의 형태 및 크기를 상기 실험에 1-4에 나타낸 TEM의 방법을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 중 0%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-0 mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(a), 20%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-0 mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(b), 20%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-1mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(c)를 도 1에 나타내었다.

또한, 각 조건의 리포솜의 크기, 다분산 지수 및 제타 전위를 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-1과 같이 L- α -포스파티딜 콜린을 포함하고, C-피코시아닌(C-Pc)을 0 또는 1mg/ml로 담지하며, 상이한 콜레스테롤 함량(%) (w/w) (0, 11.1, 20, 33.3, 42.8 및 50)으로 구성된 각 리포솜의 크기, 다분산 지수 및 제타 전위를 실험에 1-3의 방법을 이용하여 측정하여 그 결과를 하기 표 1에 나타내었고, 각 조건 중 일부의 리포솜의 크기 분포를 확인한 결과를 도 2에 나타내었다.

표 1

	Chol (molar %) to liposome	Size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
liposome	0	95.35±0.07	0.0975±0.004	-7.97±3.70
	11.1	98.8±4.95	0.1095±0.013	-9.88±0.23
	20	100.15±3.61	0.098±0.007	-9.53±1.02
	33.3	106±0.14	0.0985±0.005	-12.68±0.31
	42.8	106±1.98	0.103±0.007	-16.7±0.82
	50	119.16±0.19	0.2623±0.007	-17±0.81
C-pc-liposome	0	90.25±2.47	0.101±0.019	-2.9±0.55
	11.1	95.45±0.35	0.1025±0.012	-5.54±1.74
	20	104.05±1.48	0.1105±0.013	-9.30±1.92
	33.3	106.95±0.07	0.104±0.006	-8.47±0.39
	42.8	111.1±0.57	0.119±0.006	-11.25±1.52
	50	125.43±4.46	0.261±0.004	-15.18±1.52

또한, 상기 실험에 1-1과 같이 L- α -포스파티딜 콜린을 포함하고, 상이한 콜레스테롤 함량(%) (w/w) (0, 11.1, 20 및 33.3)으로 구성된 각 리포솜의 전이 온도 변화를 실험에 1-2의 시차주사 열량측정법(DSC)으로 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

도 1에 나타낸 바와 같이, 0%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-0 mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(a), 20%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-0 mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(b), 20%(w/w)의 콜레스테롤-리포솜-1mg/ml의 C-피코시아닌(C-Pc)(c)의 TEM 이미지를 확인한 결과, 리포솜의 크기는 C-피코시아닌(C-Pc)에 영향을 받지 않고, 콜레스테롤의 함량에 따라 크기가 증가함을 확인하였다.

또한, 표 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 모든 조건 하의 리포솜은 126nm크기 보다 더 작음을 확인하였다. 50%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜은 콜레스테롤을 포함하지 않는 리포솜보다 크기가 약 24.97% 증가됨을 확인한 바, 콜레스테롤 함량이 증가할수록, 리포솜 크기도 증가되며 그 크기는 약 90 내지 130 nm사이 크기 범위를 형성함을 확인하였다. 또한, C-피코시아닌(C-Pc)의 담지 여부는 리포솜의 크기에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 또한, 리포솜의 다분산 지수(PIs)는 42.8% 함량 이하의 콜레스테롤 조건의 리포솜에서 0.2 이하임

을 확인하여, 균질하게 분포함을 확인하였다. 또한, 제타 전위는 50%(w/w) 콜레스테롤 리포솜은 -17 mV이고, 0%(w/w) 콜레스테롤 리포솜은 7.97 mV임을 확인하여, 제타 전위는 콜레스테롤의 함량이 높아짐에 따라 낮아짐을 확인하였다. 반면에, C-피코시아닌(C-Pc)의 담지 시, 리포솜의 제타 전위는 증가함을 확인하였다.

또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 0%(w/w) 및 11.1%(w/w) 콜레스테롤을 포함하는 리포솜에서는 전이 온도가 각 7.1도 및 -6.9도로 측정되고, 트랜지션 피크(transition peaks)가 나타남을 확인하였다. 반면에, 20%(w/w) 및 33.3%(w/w) 콜레스테롤을 포함하는 리포솜에서는 트랜지션 피크가 나타나지 않음을 확인하였다.

실시예 2. 콜레스테롤 함량 및 C-피코시아닌(C-Pc) 담지 여부에 따른 리포솜의 캡슐화 효율 및 방출 효율 확인

콜레스테롤 함량 및 C-피코시아닌(C-Pc) 담지 여부에 따른 리포솜의 캡슐화 효율 및 방출 효율을 확인하였다.

구체적으로, 각 조건의 리포솜의 캡슐화 효율을 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-5의 방법으로 C-피코시아닌(C-Pc)을 0 또는 1mg/ml로 담지하며, 상이한 콜레스테롤 함량(%) (w/w) (0, 11.1, 20, 33.3, 42.8 및 50)으로 구성된 각 리포솜의 캡슐화 효율(E.E(%)) 및 방출 효율을 확인하였다. 그 결과를 표 2 및 도 4에 나타내었다.

표 2

	Chol (molar %) to liposome	E.E (%)
liposome	0	-
	11.1	-
	20	-
	33.3	-
	42.8	-
	50	-
C-pc-liposome	0	63.95±0.53
	11.1	73.14±1.60
	20	75.47±0.81
	33.3	72.44±0.35
	42.8	68.72±2.04
	50	-

표 2에 나타난 바와 같이, C-피코시아닌(C-Pc)을 담지하고 각 0, 11.1, 20, 33.3 및 42.8%(w/w)의 콜레스테롤 함량인 리포솜의 캡슐화 효율은 각 63.95±0.53, 73.14±1.60, 75.47±0.81, 72.44±0.35 및 68.72±2.04 임을 확인하였고, 콜레스테롤 함량이 높아질수록 캡슐화 효율이 점점 낮아짐을 확인하였다. 따라서, 캡슐화 효율은 콜레스테롤 함량이 20%(w/w)일 때, 가장 효율적임을 확인하였다.

또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 시간이 흐름에 따라, 20%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜에서 시간 당 C-피코시아닌(C-Pc)의 분출이 다른 함량의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜보다 가장 늦게까지 지속됨을 확인하였다.

실시예 3. 콜레스테롤 함량에 따른 리포솜의 흡수 수준, 세포 독성 확인 및 산화 방지 효과 확인

콜레스테롤 함량에 따른 리포솜의 흡수 수준, 세포 독성 및 산화 방지 효과를 확인하였다.

3-1. 콜레스테롤 함량에 따른 리포솜의 흡수 수준 확인

구체적으로, 세포에 대한 각 조건의 리포솜 흡수 수준을 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-7의 방법을 이용하여 양성 대조군 또는 음성 대조군으로, 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc) 또는 PBS를 Neuro2a 세포에 처리하였다. 또한, C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 0%(w/w) 또는 20%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜을 Neuro2a 세포에 처리한 후, 각 1시간 또는 10시간 이후에 각 세포의 리포솜 흡수 수준을 관찰하였고, 상기 1시간 또는 10시간 이후의 시간 경과에 따른 흡수율을 비교하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5의 a에 나타난 바와 같이, 세포 처리 1시간 이후, C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 0%(w/w) 콜레스테롤 리포솜보다 C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜에서 형광 강도가 높음을 확인하여, Neuro2a 세

포에 대한 흡수 수준이 높음을 확인하였다.

[0107] 또한, 도 5의 b에 나타낸 바와 같이, 세포 처리 10시간 이후, C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜에서 형광 강도는 여전히 높음을 확인하였고, 다른 대조군은 상기 세포 처리 1시간 이후보다 형광 강도가 약간 높아짐을 확인하였다.

[0108] 따라서, 1시간 또는 10시간의 시간 경과에 따른 흡수율은 리포솜보다 C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜에서의 형광 강도는 세포 처리 1시간 이후에도 다른 군 보다 형광 강도가 높음을 확인하여, 흡수율이 다른 군보다 빠름을 확인하였다. 또한, 세포 처리 10시간 이후에도 1시간 이후와 동일한 형광 강도를 보여, 흡수 지속력 또한 다른 군보다 뛰어남을 확인하였다.

[0110] 3-2. 콜레스테롤 함량에 따른 리포솜의 세포 독성 확인

[0111] 구체적으로, 세포에 대한 각 조건의 리포솜 세포 독성 여부를 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-7의 MTT 분석 방법을 이용하여 양성 대조군 또는 음성 대조군으로, 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc) 또는 PBS를 Neuro2a 세포에 처리하였다. 또한, C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 0%(w/w) 또는 20%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜을 Neuro2a 세포에 처리한 후 1, 3, 또는 5일 동안 배양하여 세포 생존력을 확인하고, 또한, 과산화수소(H_2O_2)을 24시간 동안 처리하여 유도된 산화 조건하에서 상기 각 조건의 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0112] 도 6에 나타낸 바와 같이, C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜을 Neuro2a 세포에 처리 시, 시간이 지날수록 세포 생존력이 대조군 및 0%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜을 처리한 군보다 더 높아짐을 확인하였다(a). 또한, 피코시아닌을 담지 않은 리포솜은 과산화수소(H_2O_2)를 처리한 산화 조건 하에서 유의적으로 세포 생존률이 낮음을 확인하였고, 반면에 피코시아닌을 담지하고 0%(w/w) 및 20%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜을 처리한 세포에서는 세포 생존률이 피코시아닌을 처리하지 않은 군보다 높음을 확인하였다(b).

[0114] 3-3. 콜레스테롤 함량에 따른 리포솜의 산화 방지 효과 확인

[0115] 구체적으로, 세포에 대한 각 조건의 리포솜의 산화 방지 효과를 확인하기 위하여, 상기 실험에 1-8의 방법을 이용하여 양성 대조군 또는 음성 대조군으로, 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc) 또는 PBS를 Neuro2a 세포에 처리하였다. 또한, C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 0%(w/w) 또는 20%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜을 Neuro2a 세포에 처리한 후 과산화수소(H_2O_2)로 유도된 산화 조건에서 각 조건에 따른 세포의 산화 방지 효소인 MnSOD 또는 카탈라아제의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0116] 도 7에 나타낸 바와 같이, C-피코시아닌(C-Pc) 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜을 처리한 군의 MnSOD 또는 카탈라아제의 mRNA 발현수준은 MnSOD는 1.7379이고 카탈라아제는 1.6485의 발현 수준을 나타냄을 확인하였다. 또한, 양성 대조군인 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc) 처리 군만큼, MnSOD 또는 카탈라아제의 mRNA 발현수준이 유의적으로 발현됨을 확인하였다.

[0118] 실시예 4. 중대뇌동맥 폐색(Middle cerebral artery occlusion, MCAO) 동물 모델에 대한 리포솜의 신경보호 효과 확인

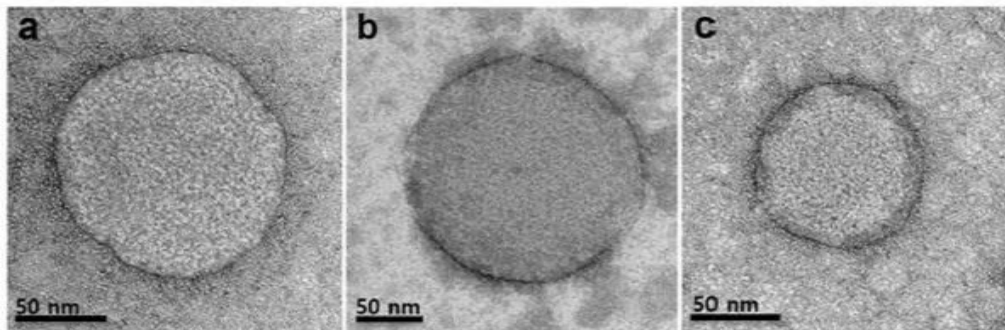
[0119] 허혈성 뇌졸중의 원인이 되는 중대뇌동맥 폐색(Middle cerebral artery occlusion, MCAO) 동물 모델에서, 콜레스테롤 함량 및 C-피코시아닌(C-Pc) 담지 여부에 따른 신경 보호 효과를 확인하였다.

[0120] 구체적으로, 상기 실험에 1-9의 방법을 수행하였으며, 도 8의 a 또는 도 9의 b에 나타낸 바와 같이, 동물 모델에 중대뇌동맥 폐색(MCAO)을 유도한 시점으로부터 1시간 후에 혈액을 채관류하고, MCAO 유도 시점 2시간 후 또는 6시간 후에 대조군으로 PBS를 이용하고, 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜, C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 0%(w/w) 또는 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜; 및 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc) 각각을 마우스에 각각 비강 투여한 후, MCAO 유도 시점 48시간 후 경색 부피(infarct volumes)를 측정하였다. 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다.

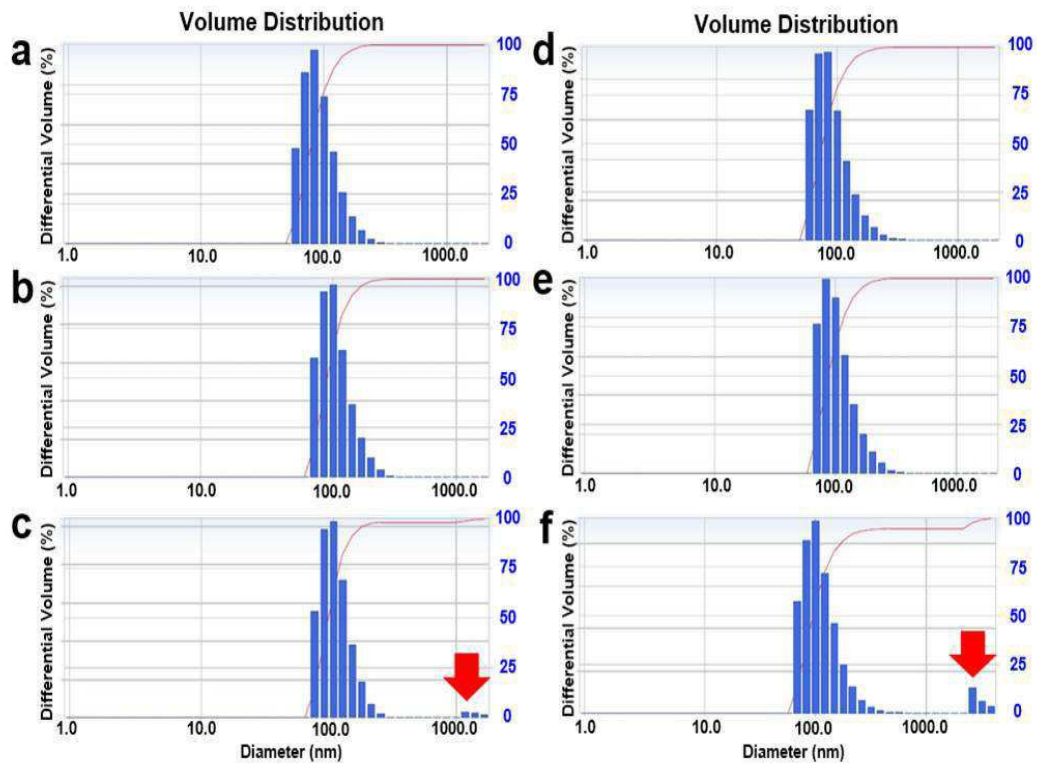
- [0121] 도 8에 나타난 바와 같이, MCAO 유도 시점 2시간 후 본 발명의 C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜을 처리한 마우스에서 양성 대조군인 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc)을 처리한 군 만큼, 유의적으로 경색 부피(infarct volumes)가 줄어들음을 확인하였다.
- [0122] 또한, 도 9에 나타난 바와 같이, MCAO 유도 시점 6시간 후 본 발명의 C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 20%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜을 처리한 마우스는 양성 대조군인 자유(free) C-피코시아닌(C-Pc) 마우스와 비교하여 3분의 1의 수준으로, C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 0%(w/w)의 콜레스테롤 리포솜 마우스와 비교하여 2분의 1의 수준으로 경색 부피(infarct volumes)가 현저히 줄어들음을 확인하였다.
- [0124] 상기와 같은 결과를 통하여, 도 10의 a에 나타난 바와 같이, 허혈-재관류 손상 발생 4시간 후 또는 중대뇌동맥 폐색(허혈성 뇌졸중의 원인) 발생 6시간 후 C-피코시아닌(C-Pc)을 담지한 콜레스테롤을 포함하고 크기가 100nm 내의 리포솜을 비강 투여 시, 신경 보호 물질인 C-피코시아닌(C-Pc)의 신경 보호 작용 시간(neuroprotective time window)을 늘려 뇌 신경 세포를 보호할 수 있음을 확인하였다. 특히, 도 10의 b에 정리된 바와 같이, 콜레스테롤 함량 0%, 11.1%, 20%, 33.3%, 42.8% 및 50%(w/w) 중에서, 20%, 33.3% 및 42.8%(w/w) 함량의 콜레스테롤 조건이 열화학적 안정성 및 사이즈 모노-분산도(size mono-dispersity)가 더 안정적인 것을 확인하였다. 이 중, 20%(w/w) 함량의 콜레스테롤 조건이 약제 캡슐화 안정성 및 효율이 높음을 확인하였다. 이처럼, 상기 20%(w/w) 함량의 콜레스테롤 조건은 세포 흡수, 생체 적합성 및 항산화 효과가 다른 함량에 비해 우수함을 확인하였다.
- [0125] 특히, 허혈성 뇌졸중이 발생하고, 재관류가 일어난 4시간 이후(허혈성 뇌졸중 발병 후 6시간), 상기 20%(w/w) 함량의 콜레스테롤 조건의 리포솜을 비강 투여 시, 리포솜에 담지된 피코시아닌의 신경 보호 작용 시간(neuroprotective time window)을 늘리는 효과가 있어, 뇌의 허혈-재관류 손상으로 인한 뇌의 신경 세포를 보호하는 효과가 뛰어남을 확인하였다.

도면

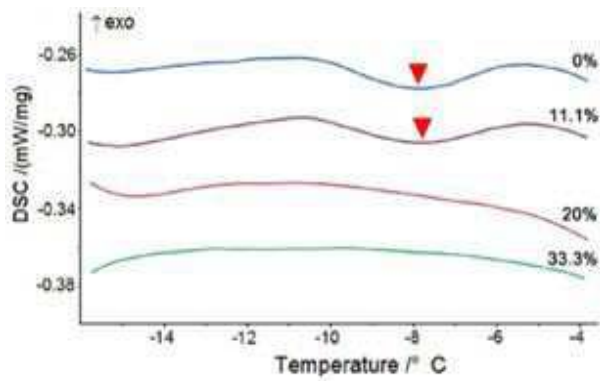
도면1



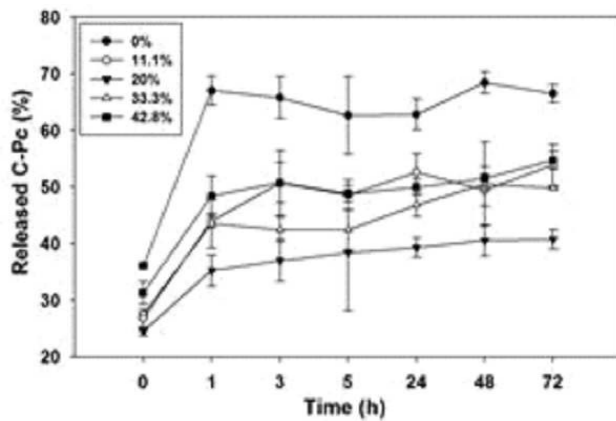
도면2



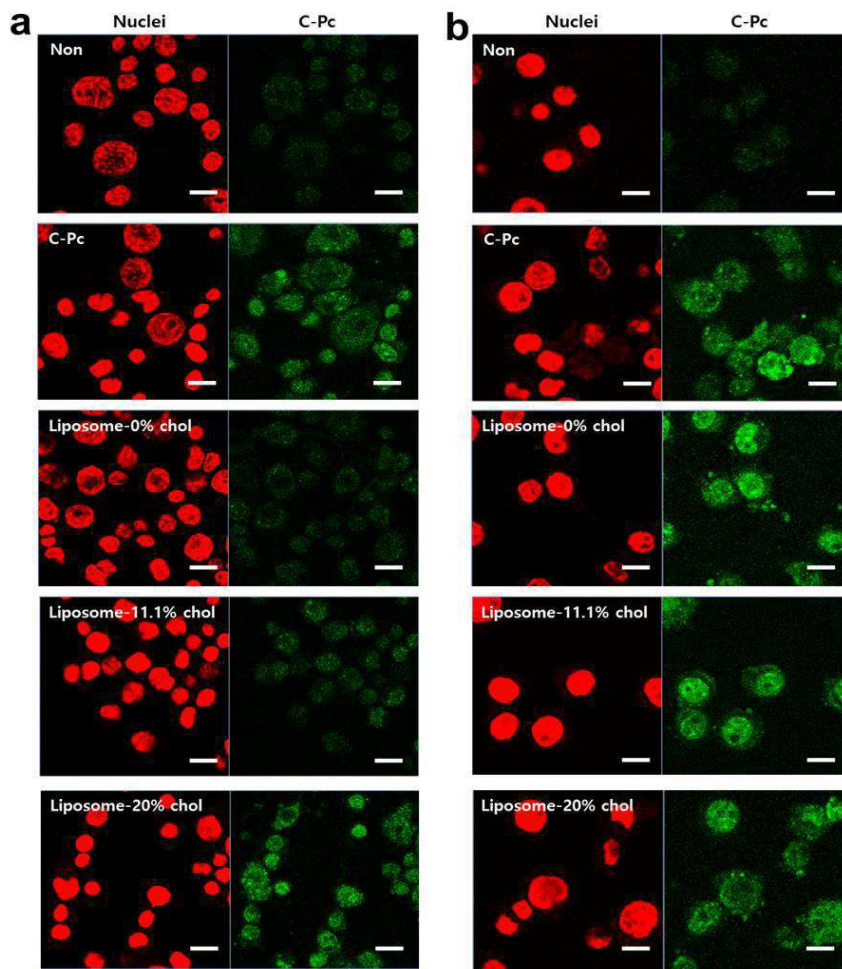
도면3



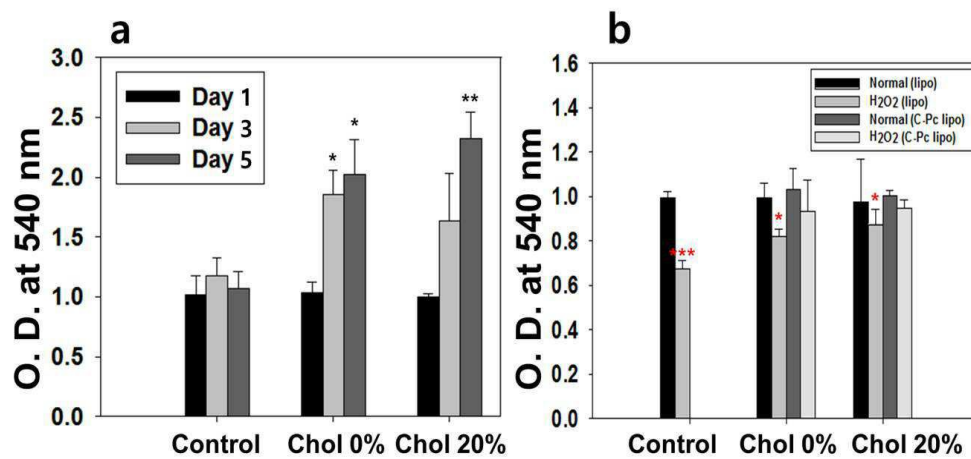
도면4



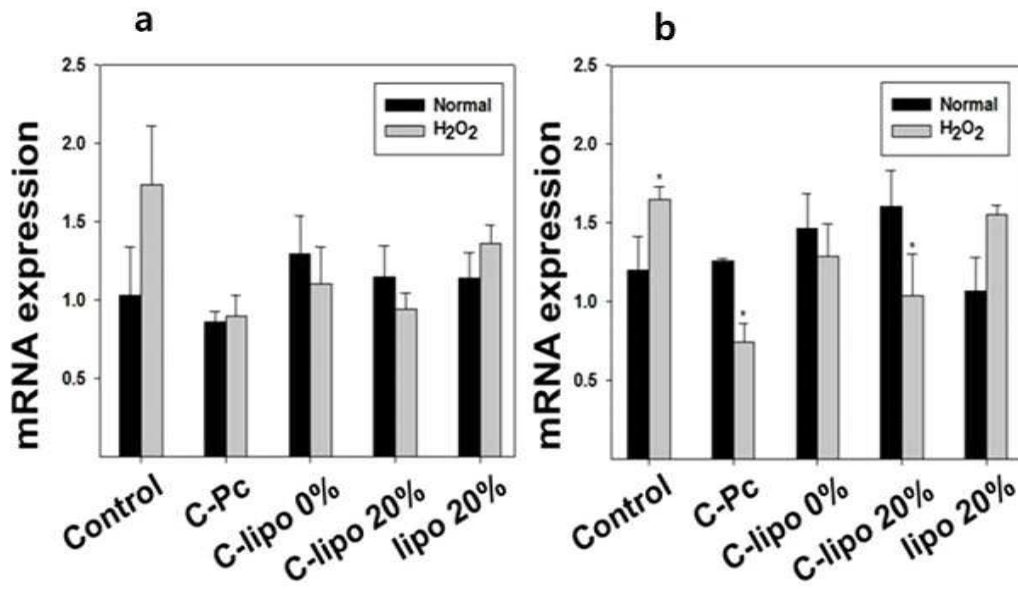
도면5



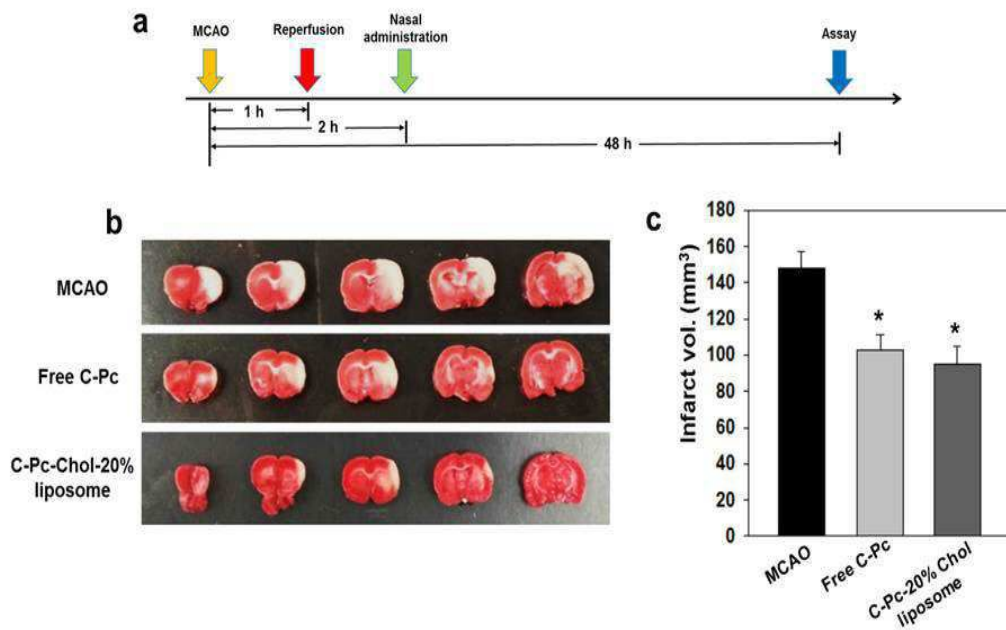
도면6



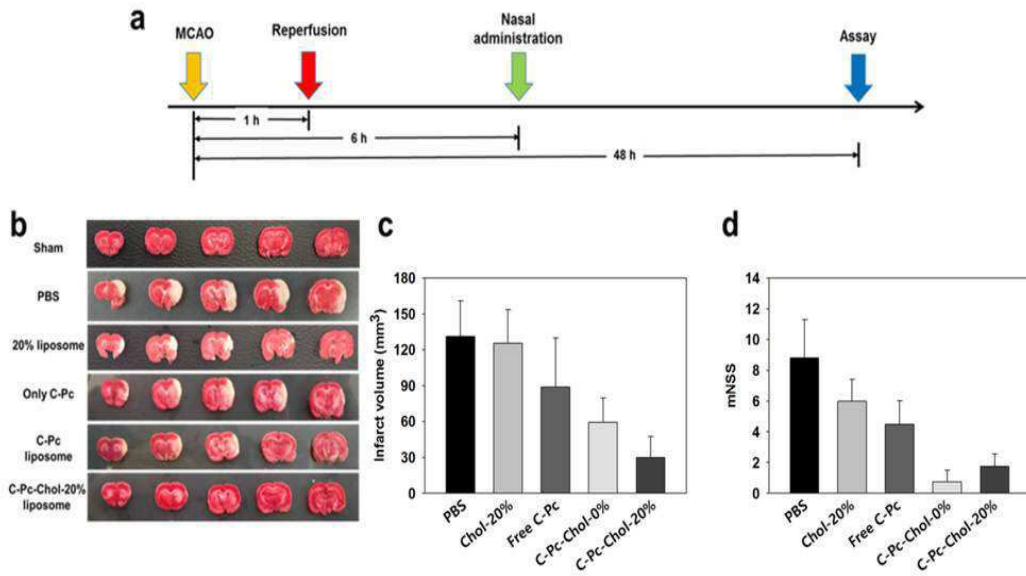
도면7



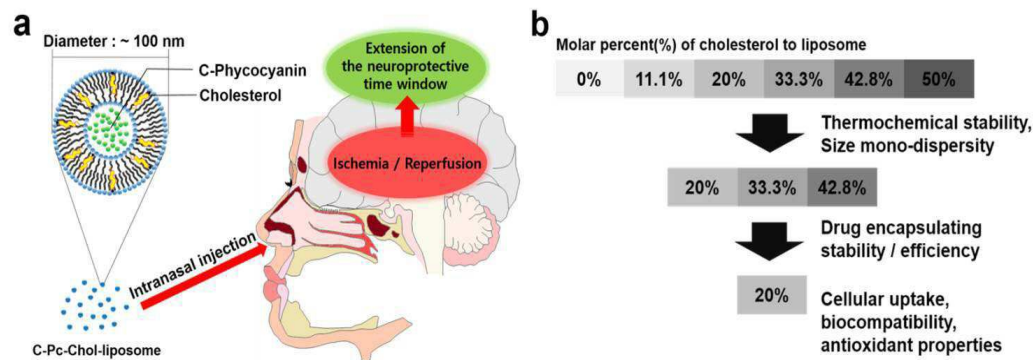
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> A pharmaceutical composition comprising liposome containing protein from marine microorganism as an active ingredient for brain disease
- <130> 1-191
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for beta-actin

<400> 1

gtactctgtg tggatcgggtg g 21

<210> 2

<211> 21

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for beta-actin

<400> 2

aacgcagctc agtaacagtc c 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for MnSOD

<400> 3

accgaggaga agtaccacga 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for MnSOD

<400> 4

tgggttctcc accaccctta 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Catalase

<400> 5

gcggattcct gagagagtgg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Catalase

<400> 6

tgtggagaat cgaacggcaa

20