

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0087009

(43) 공개일자 2022년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/50 (2006.01) A61K 47/20 (2017.01)

A61P 25/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5063 (2013.01)

A61K 47/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0177309

(22) 출원일자 2020년12월17일

심사청구일자 2020년12월17일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

심민석

인천광역시 연수구 컨벤시아대로 80, 401동 305

호(송도동, 인천송도힐스테이트)

이원중

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호(전민동, 엑스포아파트)

(74) 대리인

특허법인이름리온

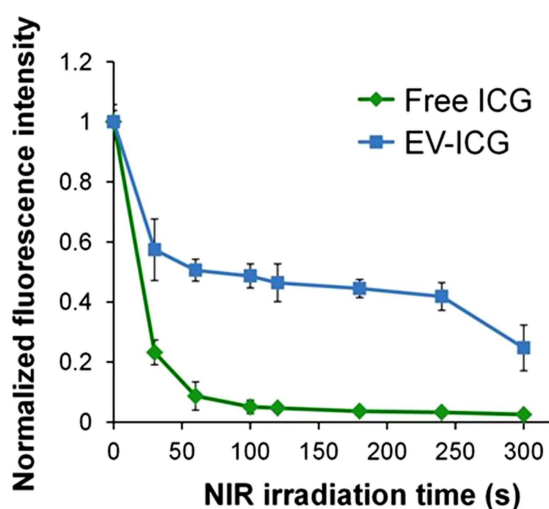
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 이중 약물이 봉입된 세포의 소포체의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 소수성 약물 및 친수성 약물이 동시에 봉입된 세포의 소포체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 친수성 약물과 소수성 약물을 동시에 봉입시키므로, 세포를 배양하거나 분리하는 등의 단계가 불필요함으로써, 상기 세포의 소포체가 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 다양한 암 및 퇴행성 질환 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/5089 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 디메틸설폭사이드(DMSO), 에탄올 및 완충액을 포함하는 혼합용매에 세포의 소포체를 혼합하는 단계; 및
- 2) 상기 1) 단계로부터 제조된 혼합물에 소수성 약물과 친수성 약물을 첨가하여 자기조립에 의해 소수성 약물;와 친수성 또는 양친성 약물;을 봉입한 세포외 소포체를 제조하는 단계;를 포함하는 이중 약물이 봉입된 세포외 소포체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 1) 내지 2) 단계는 4℃ 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 1) 단계의 혼합용매는,

상기 혼합용매 전체 부피를 기준으로 1 내지 4%(v/v)의 디메틸설폭사이드(DMSO), 5 내지 25%(v/v)의 에탄올 및 잔량의 완충액을 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 1) 단계의 혼합용매는,

상기 혼합용매 전체 부피를 기준으로 4%(v/v)의 디메틸설폭사이드(DMSO), 10 내지 20%(v/v)의 에탄올 및 잔량의 완충액을 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 1) 단계에서 상기 세포의 소포체는 1×10^7 내지 1×10^{15} 개/ml의 입자수로 혼합되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 1) 단계에서 상기 세포의 소포체는 5×10^{11} 내지 5×10^{13} 개/ml의 입자수로 혼합되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 2) 단계에서,

상기 소수성 약물은 항암제 또는 광감각제이고,

상기 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cis-platin), 도데탁셀(docetaxel), 파이프롱구민(piperlongumine), 타목시펜(tamoxifen), 캄토세신(camtothecin), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸

(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로에타민(mechlorethamine), 텍사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레코시브(celecoxib), 발데코시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이며,

상기 광감각제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 클로린계 화합물, 박테리오클로린계(bacteriochlorins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물 및 5-아미노레볼린에스테르계(5-aminoevuline esters) 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 친수성 또는 양친성 약물은 쿠마린, 플루오레세인, 로다민, 잔텐, 보디피(BODIPY)(등록상표), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)(등록상표), 인도사이아닌 그린, 마리나 블루, PyMPO, 로다민 그린(Rhodamine Green)(상표명), 테트라메틸로다민, 5-카복시-X-로다민, 보디피493, 보디피 TMR-x, 보디피630, 사이아닌3.5, 사이아닌5, 사이아닌5.5, 및 사이아닌7.5로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제1항에 따라 제조된 친수성 약물 및 소수성 약물 조합을 포함하는 세포외 소포체로서,

상기 친수성 약물 및 소수성 약물은 세포외 소포체 내에 함께 봉입된 것을 특징으로 하는 이중 약물 봉입된 세포외 소포체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 이중 약물 봉입된 세포외 소포체 내의 친수성 약물 및 소수성 약물의 봉입효율이 50%~60%인 것을 특징으로 하는 이중 약물 봉입된 세포외 소포체.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 이중 약물 봉입된 세포외 소포체는 4℃ 조건하에서 14일 동안 90% 이상의 광안전성 및 장기 안전성을 갖는 것을 특징으로 하는 이중 약물 봉입된 세포외 소포체.

청구항 12

제9항의 이중 약물 봉입된 세포외 소포체를 포함하는 약물전달용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소수성 약물 및 친수성 약물이 동시에 봉입된 세포외 소포체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 의약 제제 산업에 있어 약물의 부작용을 줄이고 효능 및 효과를 극대화시켜 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계한 약물전달시스템(DDS; Drug Delivery System)은 신약개발과 맞먹는 경제적 이익을 창출할 수 있으면서 성공 가능성이 큰 고부가가치 핵심기술로서 약물투여를 효율화 함으로서 환자 치료의 질을 높이는 데 그 목적이 있다.

- [0003] 약물전달시스템의 핵심기술 중 하나인 약물흡수 촉진 기술에 속하는 난용성 약물의 가용화 기술은 신약 물질의 개발비용을 줄이면서도, 의약품의 부가가치를 높일 수 있는 합리적인 방법이다.
- [0004] 오늘날 유전자의 전달 수단으로 세포의 소포체가 각광받고 있다. 이에 생체 내 세포의 소포체에 약물을 포집시키고자 노력해왔으나, 세포로부터 이를 분리하고, 분리된 세포의 소포체에 생체 외에서(ex vivo) 약물을 포집시킬 경우, 응집현상(aggregation)이 발생하여 초원심분리시 침전이 생겨 분리가 어렵고, 단백질 또는 리포솜의 구조 손상이 일어나며, 친수성 및 소수성 약물을 동시 포집시키는 것이 불가능하다는 여러 가지 한계점이 존재하였다.
- [0005] 상기 한계점을 극복하기 위하여 세포에서 분리되는 세포의 소포체에 약물을 함유시키기 위해, 친수성 또는 소수성 약물을 함유하는 리포솜을 각각 세포에 처리하여 세포에서 친수성 또는 소수성 약물을 함유하는 세포의 소포체가 분리되도록 하는 방법이 공지되었다. 이 경우 생체 기원이므로 안전성이 우수하고, 소수성 제제 및 친수성 약물을 동시에 전달할 수 있으며, 세포의 소포체의 외부 단백질에 손상을 입힐 우려가 적다는 점에서 장점이 있으나, 제조과정이 매우 복잡하고, 수일의 시간이 소요되며, 분리된 세포의 소포체에 봉입 효율이 현저히 낮고, 변수의 제어가 어려워 원하는 세포의 소포체를 얻기 힘들다는 등의 다양한 문제점들이 대두되었다.
- [0006] 따라서 상기 문제점을 해결할 수 있으면서도 소수성 약물과 친수성 약물을 동시에 전달할 수 있는 새로운 약물 전달 플랫폼을 개발하기 위해서는, 세포를 배양하지 않으면서 직접적으로 세포의 소포체에 서로 성질이 다른 약물을 동시에 포집할 수 있어야 하는데, 세포의 소포체는 약물 봉입 효율이 현저히 낮고, 약물의 포집 안정성이 떨어지는 문제가 있기 때문에 기존에 사용해오던 약물 전달체 발굴 전략으로는 한계가 있다.
- [0007] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허공보 제10-2176845호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 소수성 약물과 친수성 약물을 동시에 포집하고 있는 신규 약물전달체를 발굴하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 세포의 소포체를 활용한 전략을 고안하였고, 이를 이용하여 소수성 약물과 친수성 약물을 동시에 높은 봉입효율로 세포의 소포체에 직접적으로 포집할 수 있는 방법을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 소수성 약물과 친수성 약물을 동시에 전달할 수 있는, 이중 약물이 봉입된 세포의 소포체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조된 이중 약물이 봉입된 세포의 소포체를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 이중 약물 봉입된 세포의 소포체를 포함하는 약물전달용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 이중 약물이 봉입된 세포의 소포체의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 질병치료를 위해 약물을 개체에 투여하는 경우, 투여되는 약물이 최적의 효력을 발휘하도록 세포, 조직, 장기 및 기관으로의 전달 및 방출을 제어하는 약물전달 시스템(drug delivery system (DDS))이 중요하다. 약물전달시스템은 1960년대 초기부터 개발되기 시작하여, 최근에는 환자 및 사용 목적에 따른 제어형, 약효지속형, 표적부위용 등으로 그 유형이 더욱 다양해졌다.
- [0016] 이 중에서 리포솜(liposome)은 다양한 인지질 성분으로 만들어지는 세포막과 유사한 인공막이다. 리포솜 제제는

막 구성 등의 조절이 용이하여 응용가능성이 매우 크다고 알려져 있다. 그러나 리포솜은 특정 세포를 인식하는 능력이 없어 특정 세포나 특정 조직으로 약물을 전달하는 목적으로 사용할 수 없고, 인공적으로 제조되었기 때문에 다양한 임상 시험을 통해 생체적합성 및 안정성을 통과해야한다는 장벽이 있다.

[0017] 따라서 인공적으로 합성한 지질로 이루어진 리포솜 대신 자연적인 세포막을 이용한 전달 시스템이 개발되고 있다. 세포에 유래된 전달 시스템으로는, 세포에서 자연적으로 분비되는 세포외 소포체(extracellular vesicles)가 있다. 그러나 세포외 소포체는 약물의 봉입효율이 현저히 낮고, 약물을 포집하더라도 세포외 소포체의 표면에 포집되어 응집 현상이 일어나므로 침전이 생기는 문제가 있었다. 또한 단백질 또는 세포외 소포체의 구조 손상이 일어나, 쉽게 약물이 방출되므로 장기 보관이 불가능하였다. 또한 친수성 및 소수성 약물을 직접적으로 세포외 소포체에 봉입하는 것이 불가능하여, 친수성 약물과 소수성 약물을 각각 리포솜을 통해 세포에 전달함으로써, 세포로부터 두 가지 약물이 봉입된 세포외 소포체를 직접 분비하도록 해야 했다. 이 경우 두 가지 서로 다른 성질의 약물을 봉입할 수 있으나, 배양 및 리포솜의 세포내 전달 등 여러 공정이 있어야 하며, 각 공정의 조건을 민감하게 제어해야할 뿐만 아니라 약물의 봉입효율과 크기를 제어할 수 없어 재현성이 떨어지고, 낮은 안정성을 가졌다.

[0018] 이에 본 발명자들은 소수성 약물과 친수성 약물을 동시에 포집하고 있는 신규 약물전달체를 발굴하고자 노력한 결과, 세포외 소포체의 내에 직접적으로 친수성 약물과 소수성 약물을 동시에 봉입할 때 용매의 혼합농도를 최적 수준으로 조절한 제조방법을 통하여 세포외 소포체의 약물 봉입 효율, 입자크기, 장기 보관에 따른 광안정성 및 보관안전성이 효과적으로 개선됨을 확인하였다.

[0019] 본 발명의 일 측면은 이중 약물 봉입된 세포외 소포체의 제조방법에 관한 것으로, 하기 단계를 포함한다:

[0020] 1) 디메틸설폭사이드(DMSO), 에탄올 및 완충액을 포함하는 혼합용매에 세포외 소포체를 혼합하는 단계; 및

[0021] 2) 상기 1) 단계로부터 제조된 혼합물에 소수성 약물과 친수성 약물을 첨가하여 자기조립에 의해 소수성 약물; 과 친수성 또는 양친성 약물;을 봉입한 세포외 소포체를 제조하는 단계.

[0022] 본 발명 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 세포외 소포체(extracellular vesicles)는 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭을 의미하며, 나노베지클(nanovesicle)로도 정의된다. 세포외 소포체의 직경은 대략 10 내지 1,000 nm이고, 바람직하게는 평균 직경이 30 내지 200 nm이며, 가장 바람직하게는 평균 직경이 30 내지 150 nm이며, 다량체와 원형질막의 융합이 일어나 세포 밖 환경으로 방출되는 소낭을 의미한다.

[0023] 특히, 세포외 소포체는 단일 약물 분자에 비해 크기가 크고, 생체 내 유래 물질이므로, 생체 내에서 응집이 일어나지 않고, 생체 중에서 세포내식작용(endocytosis)에 의해 특이적인 분포 거동을 나타내므로, 세포 내로의 약물전달을 용이하게 할 수 있기 때문에 약물을 병소 부위로 표적하기 위한 전달체로 이용될 수 있다. 분포 거동을 좌우하는 가장 중요한 인자는 약물전달체의 입자 크기이다. 따라서, 본 발명의 세포외 소포체는 평균 직경이 10 내지 1,000 nm일 수 있으나, 30 내지 100 nm, 병소부위로의 투과성 및 축적 효과를 고려한다면 상기 세포외 소포체의 평균 직경은 30 내지 60 nm인 것이 가장 바람직하다.

[0024] 본 발명 바람직한 구현예에 따르면, 상기 세포외 소포체는 고세균(Archaea), 원핵생물(Prokarya) 또는 진핵생물(Eukarya)의 세포로부터 유래한 생체 나노입자를 통칭하며, 엑소솜(exosome), 아그로솜(argosomes), 텍소솜(dexosomes), 엑토솜(ectosomes), 엑소베지클(exovesicle), 오키토솜(oncosome), 프로미노솜(prominosome), 프로스타솜(prostasome), 톨레로솜(tolerosome), 미세입자(microparticle), 미세소포(microvesicle), 나노소포(nanovesicle), 수포성 소포(blebbing vesicle), 출아성 소포(budding vesicle), 세포막 소포체-유사 소포(exosome-like vesicle), 매트릭스 소포(matrix vesicle), 막 소포(membrane vesicle), 탈피성 소포(shedding vesicle), 막 입자(membrane particle), 탈피성 미세소포(shedding microvesicle), 막 수포(membrane bleb), 에피디디모솜(epididimosome), 프로미니노솜(promininosome), 텍소솜(texosome) 또는 아키오솜(archeosome)을 포함할 수 있고, 바람직하게는 엑소솜(exosome), 미세소포(microvesicle) 및 미세입자(microparticle)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 가장 바람직하게는 엑소솜(exosome)일 수 있다.

[0025] 상기 세포는 구체적으로 인간 및 비인간 포유류를 포함하는 임의 유형의 동물, 식물 유래일 수 있고, 다양한 종류의 면역세포, 종양세포 등일 수 있다. 또한 본 발명의 일 실시예에서, 상기 세포는 인간 태아 신장 세포(human embryonic kidney (HEK293))를 사용하였다.

[0026] 상기 1) 단계, 2) 단계의 온도 조건은 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 4 내지 40℃ 온도 조건이라면 세포외 소포체의 변형없이 안전하게 제조될 수 있어 바람직하다. 그러나 이중 약물이 봉입된 세포외 소포체의 입자 평균 직경을 60 nm 미만으로 갖기 위해서는 4 내지 10℃, 가장 바람직하게는 4℃ 온도 조건에서 수행할 수

있다.

- [0027] 상기 혼합용매는, 혼합용매 전체 부피를 기준으로 디메틸설폭사이드(DMSO)는 1 내지 4%(v/v), 에탄올은 5 내지 25%(v/v) 및 잔량의 완충액을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 소수성 약물의 봉입효율은 60% 이상, 친수성 약물의 봉입효율은 50%를 달성하기 위해서는, 상기 혼합용매 전체 부피를 기준으로 4%(v/v)의 디메틸설폭사이드(DMSO), 10 내지 20%(v/v)의 에탄올 및 잔량의 완충액을 포함하는 것이 가장 바람직하다.
- [0028] 상기 완충액은 세포의 소포체에 사용가능한 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 pH 6 내지 10에서 충분한 완충 용량을 갖는 완충액일 수 있고, 가장 바람직하게는 인산 나트륨 완충액(sodium phosphate buffer; SPB), 인산 완충식염수(phosphate buffer saline; PBS), Tri HCl 완충액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0029] 본 발명은 이중 약물을 봉입한 세포의 소포체의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 제조방법은 실시예 1 내지 20에 나타난 바와 같이 유기용매의 혼합비율 및 온도를 조절하여 입자의 크기를 제어할 수 있을 뿐만 아니라 친수성 및 소수성의 서로 다른 극성을 갖는 약물을 동시에 포집시키는 제조방법일 수 있다. 상기 실시예에 따라 제조된 이중 약물이 봉입된 세포의 소포체의 약물 봉입효율을 측정한 결과 친수성 약물과 소수성 약물을 50% 이상으로 우수한 봉입효율을 나타내며, 각각의 약물이 50% 이상 봉입되었음에도 불구하고 이의 광안정성과 장기 보관성은 단일 약물에 비해 2~4배 이상 증가하였음을 확인하였다.
- [0030] 상기 1) 단계에서 상기 세포의 소포체는 1×10^7 내지 1×10^{15} 개/ml의 입자수로 혼합되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 5×10^{11} 내지 5×10^{13} 개/ml의 입자수로 혼합될 수 있으며, 가장 바람직하게는 1×10^{12} 개/ml의 입자수로 혼합될 수 있다.
- [0031] 상기 2) 단계에서 소수성 약물은 소수성을 띄는 약물이라면 특별히 제한되지 않으며, 수불용성 약물을 포함한다. 본 발명에서 소수성 약물이란 물과 혼화되지 않는 비극성 또는 저극성 물질로, 치료 목적의 약물학적 활성제 뿐만 아니라 진단 등의 목적으로 인체에 투여될 수 있는 모든 시약 기타 의약품 제제를 포함할 수 있다. 상기 소수성 약물은 구체적으로 항신생물제(antineoplastic), 마취제, 항염증제, 면역억제제, 호르몬 등일 수 있으나, 본 발명에서 소수성 약물은 항신생물제일 수 있다. 상기 항신생물제는 종양성 질환의 치료, 개선 또는 그 진행을 둔화하기 위해 사용되는 모든 약학적 활성제를 지칭하는 광범위한 의미를 포함한다. 즉 구체적으로 항암제 또는 광감각제(photosensitiser)를 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 이중 약물이 봉입된 세포의 소포체는 서로 다른 성질을 갖는 소수성 약물과 친수성 또는 양친성 약물을 하나의 단계만으로 동시에 세포의 소포체에 봉입할 수 있는 제조방법을 개발하였으며, 이로부터 제조된 이중 약물이 봉입된 세포의 소포체는 소수성 약물뿐만 아니라 친수성 또는 양친성 약물의 봉입효율도 50% 이상을 달성하고 있다.
- [0033] 상기 종양성 질환은 폐암, 고환암, 방광암, 전립선암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 피부암, 위암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 상기 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cis-platin), 도데탁셀(docetaxel), 파이프롱구민(piperlongumine), 타목시펜(tamoxifen), 캄토세신(camtothecin), 아나스테로졸(anastrozole), 카보플라틴(carboplatin), 토폠테칸(topotecan), 베로테칸(belotecan), 이리노테칸(irinotecan), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(vincristine), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 가장 바람직하게는 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cis-platin), 도데탁셀(docetaxel) 및 파이프롱구민(piperlongumine)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0035] 상기 광감각제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 클로린계 화합물, 박테리오클로린계(bacteriochlorins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물 및 5-아미노레블린에스테르계(5-aminoevuline esters) 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0036] 상기 친수성 또는 양친성 약물은 쿠마린, 플루오레세인, 로다민, 잔텐, 보디피(BODIPY)(등록상표), 알렉사 플루

오르(Alexa Fluor)(등록상표), 인도사이아닌 그린, 마리나 블루, PyMPO, 로다민 그린(Rhodamine Green)(상표명), 테트라메틸로다민, 5-카복시-X-로다민, 보디피493, 보디피 TMR-x, 보디피630, 사이아닌3.5, 사이아닌5, 사이아닌5.5, 및 사이아닌7.5로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0037] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 제조방법에 따라 제조된 친수성 약물 및 소수성 약물 조합을 포함하는 세포외 소포체로서, 상기 친수성 약물 및 소수성 약물은 세포외 소포체 내에 함께 봉입된 것을 특징으로 하는 이중 약물 봉입된 세포외 소포체를 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명의 또 다른 측면은 상기 이중 약물 봉입된 세포외 소포체를 포함하는 약물전달용 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 제조방법으로 제조된 이중 약물 봉입된 세포외 소포체는 수용액 상태에서 용해도가 향상되고 점도가 낮아 주사용 제제로서의 사용 및 대량생산이 가능하다. 또한 이중 약물 봉입된 세포외 소포체의 제조조건을 제어함으로써, 이의 평균 직경, 약물 봉입효율 및 봉입량의 조절이 가능하고, 소수성 약물과 친수성 약물을 동시에 용이하게 봉입할 수 있으므로, 새로운 약물전달시스템 혹은 약물전달플랫폼으로 이용할 수 있다.
- [0040] 상기 이중 약물 봉입된 세포외 소포체 내의 친수성 약물 및 소수성 약물의 봉입효율이 50%~60%인 것일 수 있다.
- [0041] 상기 이중 약물 봉입된 세포외 소포체는 4℃ 조건하에서 60일 동안 60% 이상의 광안정성 및 장기 안전성을 가질 수 있다.
- [0042] 상기 이중 약물 봉입된 세포외 소포체는 봉입된 약물 중 어느 하나에, 광감각제 또는 형광 염료를 포함함으로써, 약물 투여 경로를 영상화할 수 있고, 레이저를 조사하여 활성산소나 라디칼 상태의 산소를 발생시켜, 항암제와 동시에 암세포를 파괴하는 이중 효과를 갖도록 할 수 있다.
- [0043] 상기 이중 약물 봉입된 세포외 소포체를 생체 내에 투여하면, 상기 이중 약물 봉입된 세포외 소포체는 그 자체로 우수한 약물전달체로 활용될 수 있다.
- [0044] 또한 본 발명에서는 생체 외에서 세포에 이중 약물이 봉입된 세포외 소포체를 투여하여 원하는 부위에 약물을 전달할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 구체적인 실시에서 본 발명의 이중 약물 봉입된 세포외 소포체를 단일 공정을 통해 유의적으로 제조할 수 있음을 확인하였다. 또한 제조과정시 혼합용매의 DMSO, 에탄올의 비율을 달리하였을 때 소수성 약물과 친수성 또는 양친성 약물의 봉입효율 및 직경의 크기가 달라짐을 확인하였고, 4℃에서 60일 이상 보관하였음에도 그 형광이 남아있음을 확인하였다.
- [0046] 따라서, 본 발명의 이중 약물 봉입된 세포외 소포체는 우수한 세포막에 대한 결합능을 가지며, 세포에 처리될 경우 함유하고 있는 소수성 약물 및 친수성 또는 양친성 약물을 동시에 주변의 원형질막 및 세포질에 운반함으로써 효율적이고 선택적인 약물 전달을 가능하도록 할 뿐만 아니라, 생체에서 기원한 나노재료로 안전하고 응집 현상이 일어나지 아니하여 순환이 잘 되므로 세포외 소포체가 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 다양한 암 및 퇴행성 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약물전달용 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.
- [0048] 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업자에게 잘 알려진 여러 가지 인자에 따라 제조될 수 있는데, 예를 들면 이용된 특정 생리활성물질, 이의 농도, 안정성 및 의도된 생체이용성; 본 발명의 이중 약물 봉입된 세포외 소포체로 치료하고자 하는 질환 및 질병 또는 상태; 치료받을 개체, 나이, 크기 및 일반적인 상태; 조성물을 투여하는데 이용되는 경로, 예를 들어 비강, 구강, 안구, 국소, 경피 및 근육 등의 요인을 고려해야 하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일반적으로 경구 투여 경로 이외의 생리활성물질 투여에 이용되는 약제학적으로 이용가능한 담체에는 D5W, 텍스트로즈 및 생리학적 염을 용적의 5% 이내로 포함하는 수용액을 포함한다. 또한 약제학적으로 이용가능한 담체에는 보존제 및 항산화제와 같은 활성 성분들의 안정성을 보장시킬 수 있는 추가 성분들을 포함할 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명의 약물 전달용 조성물의 투여량은 의도하는 치료에 유효한 용량으로 투여된다. 특정의 의학적 질환을 치료하거나 또는 이의 진행을 억제시키는데 요구되는 치료상 유효량은 의학 분야에 공지된 예비임상 연구 및 임상연구를 이용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명에서 상기 치료상 유효량은 임상의 또

는 연구자가 목적하는, 특정 조직, 시스템, 및 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 유발시키는 활성 성분의 양을 말한다. 본 발명의 약물 전달용 조성물의 투여 경로는 적합한 모든 투여 경로가 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 세포외 소포체는 세포막 또는 조직막에 융합되어 세포내식작용에 의해 세포 내부로 유입될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0050] 본 발명의 이중 약물이 봉입된 세포외 소포체는, 친수성 약물과 소수성 약물을 동시에 포집할 수 있으므로, 하나의 질환에 대해 복합 치료가 가능한 복합약물로써 활용될 수 있다.
- [0051] 또한, 세포에서 분리된 세포외 소포체를 기반으로 하므로, 효율적이고 선택적인 약물 전달이 한 번의 투여로 가능하므로, 치료 효율을 극대화 할 수 있다.
- [0052] 또한, 상기 이중 약물이 봉입된 세포외 소포체는 생체에서 기원한 나노재료로 안전성이 우수하며, 생체적합성이 뛰어나, 기본 항암제의 안전성과 면역원성 문제를 극복할 수 있다.
- [0053] 또한 상기 이중 약물이 봉입된 세포외 소포체는 직접 친수성 약물과 소수성 약물을 봉입시키므로, 세포를 배양하거나 분리하는 등의 단계가 불필요함으로써, 상기 세포외 소포체가 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 다양한 암 및 퇴행성 질환 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1은 NIR 조사 시간에 따른 free ICG와 EV-ICG의 ICG 형광세기 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 보관 기간에 따른 free ICG와 EV-ICG의 ICG 형광세기 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0056] 실시예
- [0057] <제조예 1> 엑소좀 분리
- [0058] 인간 태아 신장 세포(human embryonic kidney (HEK293) 유래 엑소좀을 분리하기 위하여 상기 각각의 세포를 5% FBS 및 1% 항생제/항진균제가 포함된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂, 37℃의 조건으로 각각 배양하였다. 이때, 세포는 2 내지 3일에 한번씩 지름이 10 cm인 플레이트에 계대배양하였다. 세포로부터 엑소좀을 분리하기 위하여 배지의 세포 잔해(debris)를 제거한 후, ExoQuick-TC 키트를 이용하여 엑소좀을 분리하였다. 엑소좀 분리 실험은 32,000 rpm에서 1시간 30분 동안 원심분리한 엑소좀이 제거된 FBS를 사용하여 수행되었다. 분리된 엑소좀을 나노입자추적분석(Nanoparticle tracking Analysis, NTA)으로 확인한 후에 사용하였다.
- [0059] <실험예 1> 용매조건에 따른 이중 약물 봉입된 세포외 소포체(Extracellular vesicles, EVs)의 제조 및 봉입효율 비교
- [0060] 하기 표 1에서와 같이 다양한 농도의 DMSO와 에탄올을 포함하는 500 μ l PBS 완충용액을 제조하고, 여기에 5.0×10^{11} 입자수의 중간엽줄기세포 유래 엑소좀(exosome)을 혼합하였다. 상기 혼합물에 0.4 mg ICG(Indocyanine Green)와 0.2 mg PTX(Paclitaxel)을 첨가하였다. 이를 빛이 차단된 상태에서 4℃에서 2 시간동안 배양하여 이중 약물이 봉입된 세포외 소포체를 제조하였다. PD MiniTrap G-25 desalting column을 이용하여 봉입되지 않은 약물을 제거하고, 이중 약물이 봉입된 세포외 소포체는 4℃에 보관하였다.
- [0061] 상기 세포외 소포체에 봉입된 ICG와 PTX의 봉입효율은 LC-Mass/Mass(Agilent LC 1100)를 이용하여 측정하였다. 봉입 효율은 다음 식을 통해 계산하였다.
- [0062] [식 1]
- [0063] 봉입 효율 = weight of loaded ICG or PTX/(weight of initially added ICG or PTX)
- [0064] 이중 약물 봉입된 세포외 소포체의 입자 크기를 DLS장비를 이용하여 측정하였다(Nano-ZS, Malvern)

표 1

[0065]

구분	PBS 완충액		봉입효율	
	DMSO, %(v/v)	Ethanol, %(v/v)	ICG	PTX
실시예 1	1	5	36.5±0.9	39.5±0.9
실시예 2	1	10	42.8±2.5	48.1±2.5
실시예 3	1	15	42.2±1.1	43.2±8.2
실시예 4	1	20	37.8±1.5	39.6±6.6
실시예 5	1	25	24.8±3.3	31.9±4.1
실시예 6	2	5	41.3±2.8	44.3±7.3
실시예 7	2	10	45.2±1.3	48.6±4.3
실시예 8	2	15	45.4±8.5	44.3±2.5
실시예 9	2	20	40.4±4.2	40.0±6.5
실시예 10	2	25	38.7±9.5	32.4±2.6
실시예 11	3	5	49.8±3.9	45.4±2.8
실시예 12	3	10	51.1±4.4	42.8±3.0
실시예 13	3	15	53.5±8.5	44.2±5.9
실시예 14	3	20	50.2±15.9	43.8±2.8
실시예 15	3	25	45.0±12.9	42.7±4.1
실시예 16	4	5	51.1±12.3	41.7±3.2
실시예 17	4	10	56.9±10.9	48.1±3.4
실시예 18	4	15	59.6±16.4	49.8±2.4
실시예 19	4	20	60.7±12.3	51.9±4.3
실시예 20	4	25	39.3±9.4	45.4±2.8

[0066]

표 1에 나타난 바와 같이, 본원발명의 제조방법으로 제조된 세포의 소포체는 이중약물이 세포의 소포체 내에 효과적으로 봉입되어 있음을 확인할 수 있었다. 다만, 4%(v/v) 농도의 DMSO와 10 내지 20%(v/v) 농도의 에탄올을 함유하는 완충액으로 제조된 경우에만 소수성 약물과 친수성 약물이 모두 50% 이상 우수한 효율로 봉입되는 것을 확인할 수 있다.

[0067]

그 중에서도 특히 4%(v/v) 농도의 DMSO와 10 내지 20%(v/v) 농도의 에탄올을 함유하는 완충액으로 제조될 경우에는, 소수성 약물이 60% 이상, 친수성 약물은 50% 이상 봉입되는 최대 약물 봉입 효율을 얻을 수 있다는 장점을 갖는다.

[0068]

나아가, 상기 최적화된 비율로 제조해야, 파괴되는 세포의 소포체를 줄이고 고수율(투입한 세포의 소포체 대비 제조된 이중 약물 봉입된 세포의 소포체의 비율)(94% 이상)(실시예 19)로 이중 약물 봉입된 세포의 소포체를 얻을 수 있는데(미도시), 구체적으로 상기 범위를 크게 벗어난 실시예 1 내지 16과 실시예 20의 이중 약물 봉입된 세포의 소포체는 수율(공정효율)이 70% 미만인 것으로 확인되었다. 실시예 17, 18의 이중 약물 봉입된 세포의 소포체는 봉입효율은 실시예 19와 유사한 수준을 유지하였으나, 이의 수율은 80% 미만인 것으로 확인되었다. 즉, 실시예 17-18은 공정효율이 80% 미만으로 저하됨을 알 수 있다.

[0069]

따라서, 4%(v/v) 농도의 DMSO와 10 내지 20%(v/v) 농도의 에탄올을 함유하는 완충액의 조건에서 제조되는 것(실시예 19)이 94% 이상의 수율을 달성할 수 있음과 동시에, 고효율의 약물 봉입효율을 얻을 수 있으므로, 상기 조건으로 제조되는 것이 가장 바람직하다.

[0070]

상술한 바와 같이 친수성 약물과 소수성 약물이 높은 효율로 탑재되는 경우, dose를 줄이면서도 같은 항암 효과를 얻을 수 있다는 큰 효과를 얻을 수 있다.

[0071]

<실험예 2> 온도에 따른 이중 약물 봉입된 세포의 소포체(Extracellular vesicles, EVs)의 제조

[0072]

4%(v/v) 농도의 DMSO와 20%(v/v) 농도의 에탄올을 포함하는 500 μ l PBS 완충용액을 제조하고, 여기에 5.0×10^{11} 세포의 소포체(Extracellular vesicles, EVs)와 0.4 mg ICG(Indocyanine Green)와 0.2 mg PTX(Paclitaxel)을 혼합하였다. 상기 혼합액을 빛이 차단된 상태에서 다양한 온도조건(4℃ 또는 37℃)에서 2 시간동안 배양하여 각각의 이중 약물이 봉입된 세포의 소포체(실시예 21, 22)를 제조하였다(표 2).

[0073]

PD MiniTrap G-25 desalting column을 이용하여 봉입되지 않은 약물을 제거하고, 이중 약물이 봉입된 세포의 소

포체는 4℃에 보관하였다.

[0074] 상기 각각의 온도에서 제조된 이중 약물 봉입된 세포와 소포체의 입자 크기를 DLS(dynamic light scattering) 장비를 이용하여 측정하였(Nano-ZS, Malvern)고, 그 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

구분	PBS 완충액		봉입효율		입자크기 nm
	DMSO, %(v/v)	Ethanol, %(v/v)	ICG	PTX	
실시예 21 4℃	4	20	60.4±1.1	51.3±2.1	56.3±9.9
실시예 22 37℃	4	20	60.2±1.5	50.9±1.2	66.4±10.3

[0076] 표 2에 나타난 바와 같이, 4℃에서 제조된 이중 약물 봉입된 세포와 소포체의 크기(hydrodynamic diameter)는 56.3 ± 9.9 nm인 것으로 확인되었다. 또한, 37℃에서 제조된 이중 약물 봉입된 세포와 소포체의 크기(hydrodynamic diameter)는 66.4 ± 10.3 nm인 것으로 확인되었다.

[0077] 약물의 봉입효율 면에서는, 제조온도에 따라 유의미한 차이가 발생하지 않았으나, 입자크기면에서는 4℃ 온도조건으로 제조하였을 때, 10 nm 더 작은 크기의 이중 약물이 봉입된 세포와 소포체를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

[0078] <실험예 3> 실시예 19로부터 제조된 이중 약물이 봉입된 세포와 소포체의 광안정성(photostability) 및 저장 안정성(storage stability) 확인

[0079] 상기 실험예 1의 실시예 19로부터 제조된 이중 약물이 봉입된 세포와 소포체를 준비하였다. 보관기간에 따른 이중 약물이 봉입된 세포와 소포체의 광안정성과 저장안정성을 다음과 같이 확인하였다.

[0080] 먼저, 광안정성 평가를 위해 실시예 19로부터 제조된 이중 약물이 봉입된 세포와 소포체(EV-ICG)를 10 µg/ml ICG 농도로 PBS에 녹이고, 808 nm NIR light(근적외선)을 5 분간 조사하였다. 그리고 ICG형광 세기를 NIR 조사 시간별로 측정하였다. 비교예로 10 µg/ml 농도로 ICG를 PBS에 용해한 free ICG를 사용하였다.

[0081] 다음, 저장 안정성은 free ICG와 EV-ICG(10 ×g/mL ICG)를 준비하고, 이들을 각각 빛이 차단된 조건하에서, 4℃, 60일 동안 보관하며 형광세기를 시간별로 관찰하여 확인하였다.

[0082] 도 1은 NIR 조사 시간에 따른 free ICG와 EV-ICG의 ICG 형광세기 변화를 나타낸 그래프로, 이에 따르면, 실시예 19로부터 제조된 이중 약물이 봉입된 세포와 소포체(EV-ICG)는 빛 조사에 의한 ICG의 광퇴색(photobleaching)이 free ICG에 비해 유의미하게 억제됨을 알 수 있다.

[0083] 도 2는 보관 기간에 따른 free ICG와 EV-ICG의 ICG 형광세기 변화를 나타낸 그래프로, 실시예 19로부터 제조된 이중 약물이 봉입된 세포와 소포체(EV-ICG)는 14일이 지난후에도 형광이 90% 정도 남아있음을 확인하였다.

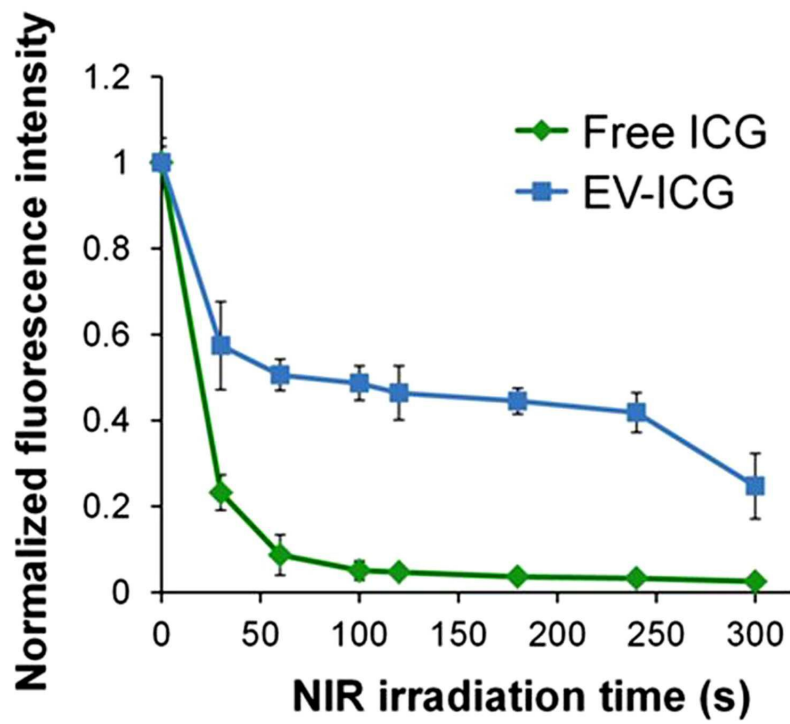
[0084] 이에 반해 free ICG는 7일부터 급격하게 형광이 감소하여 14일째에는 60%의 형광만이 남아있음을 확인하였다.

[0085] 이를 통해 실시예 19로부터 제조된 이중 약물이 봉입된 세포와 소포체(EV-ICG)는 장기 보관성이 우수하므로, ICG의 형광을 이용한 광역학치료, 광열치료, 이미징 분야에 적용시 훨씬 더 유리함을 알 수 있다.

[0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2

