



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0124469
(43) 공개일자 2018년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/357 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/28 (2017.01) C07K 19/00 (2006.01)
C07K 5/107 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1271 (2013.01)
A61K 31/357 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0059023

(22) 출원일자 2017년05월12일

심사청구일자 2017년05월12일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

최준식

대전광역시 유성구 엑스포로123번길 65-38, 203동
1102호(도룡동, 스마트시티)

멀릭 수딕타

대전광역시 유성구 한밭대로313번길 40, 102호(장대동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

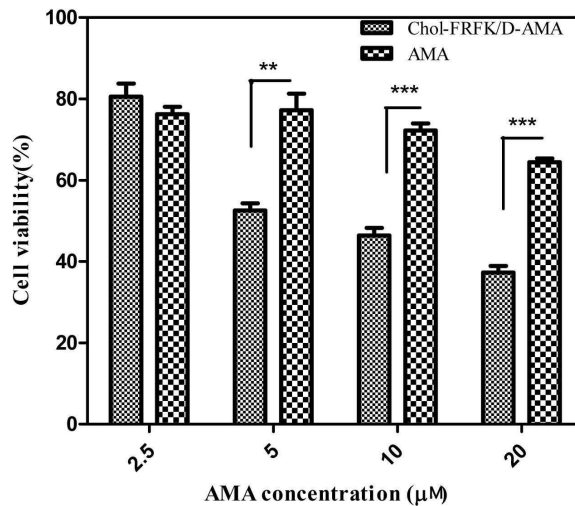
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 미토콘드리아 투과성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜

(57) 요약

본 발명은 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 미토콘드리아 투과성 펩타이드(mitochondria penetrating peptide)를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜 및 상기 나노 리포솜과 약제학적 유효량의 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 나노 리포솜은 표적한 위치에만 약물을 전달하므로, 약물의 사용량을 감소시킬 수 있으며 약물의 효과를 극대화할 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 47/183 (2013.01)

A61K 47/28 (2013.01)

C07K 19/00 (2013.01)

C07K 5/1016 (2013.01)

(72) 발명자

레티 쑤이

대전광역시 유성구 문화원로 45, 401호(궁동)

이슬기

전라북도 전주시 완산구 양지2길 10, 105동 102호
(평화동2가, 동신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1D1A1A09917141

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 합성 및 생체고분자를 이용한 치료용 생체모사 고분자 나노입자 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

N-말단에 콜레스테롤이 연결된 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 미토콘드리아 투과성 펩타이드 (mitochondria penetrating peptide)를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노 리포솜은 융합성(fusogenic)의 비양이온성 지질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 나노 리포솜은 콜레스테롤이 지질 이중막 사이에 끼여있고, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 미토콘드리아 투과성 펩타이드가 리포솜의 외부로 돌출된 구조인 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 융합성의 비양이온성 지질은 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스 파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스펅고미엘린, 세팔린, 카르디오리핀, 포스파티드산, 세레브로사이드, 디세틸포스페이트, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤(POPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE) 및 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 나노 리포솜은 미토콘드리아를 선택적으로 타겟팅하고 세포막 통과 효율을 증가시킴으로써 미토콘드리아 내 약물 흡수율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약물은 항암제인 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항암제는 안티마이신 A인 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 나노 리포솜 및 약제학적 유효량의 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 미토콘드리아 투과성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 항제간 연구는 암의 발생 및 성장, 항암제에 대한 내성 및 암 세포의 불멸에 관한 근본적인 기작에 관한 상세한 정보를 제공하였다. 최근의 연구는 암 세포 및, 비만, 당뇨 및 퇴행성 뇌질환 등과 같은 질병에 있어서 미토콘드리아의 역할을 밝혔다. 세포의 발전소인 미토콘드리아는, 본래 다양한 생리적 기능들을 수행하기 위해 요구되는 ATP 합성을 위해 진화하였다. 그러나 암 세포에서는, 미토콘드리아가 피루브산(pyruvic acid)의 산화 대신 젖산의 발효를 통한 에너지 생산에 관여하고, 이를 바르부르크 효과(Warburg effect)라고 한다. 미토콘드리아는 활성산소종의 생성, 사이토카인의 활성화 및 미토콘드리아 DNA의 손상과 같은 미토콘드리아 매개 세포자멸사(apoptosis)에 관련된 사건을 표적하는 암 연구의 새로운 주제가 되고 있다.
- [0003] 나노테크놀로지는 전신 독성 및 관련된 부작용을 최소화하면서, 표적 약물의 제조 및 약물들의 생체이용률 증진을 위한 새로운 기회를 제공한다. 약물의 나노 제제는 증진된 투과 및 유지 효과(Enhanced Permeability and Retention, EPR) 때문에 종양 미세환경에서 순순히 축적될 수 있다. 따라서, 효능이 강한 치료 약물을 나노 제제로 제조하면 분해에 영향은 덜 받으면서 요구되는 위치에 특이적으로 전달될 수 있다. 대부분의 화학 예방 치료법은 핵 DNA의 손상 및 세포 주기의 저지를 유도하여, 종양의 퇴화 및 환자의 기대 수명을 연장시킨다. 최근, 소포체(endoplasmic reticulum) 및 미토콘드리아와 같은 다른 생리학적으로 중요한 세포 내 소기관이 암 연구의 표적이 되고 있다. TPP+(triphenylphosphonium cation), 데퀼리늄(dequalinium) 및 MTS(mitochondria-targeting sequence)와 같은 미토콘드리아 표적 모이어티와 연결된 나노입자가 암 세포에 약물 또는 유전자를 전달하기 위해 사용되고 있다. pH에 민감하고 미토콘드리아를 표적하는 리포솜(liposomal)-PTX(paclitaxel) 제제는 약제 내성 폐암 세포에 있어서 만족스러운 항암 효과를 보여주었다.
- [0004] 콜레스테롤은 암 세포를 특이적으로 표적하는데, 이는 암 세포가 정상 세포와 비교하여 높은 에너지 및 영양분을 소비하기 때문이다. 콜레스테롤은 LDL(low-density lipoprotein) 수용체를 통해 암 세포 내로 이동되는데, 암 세포에는 LDL 수용체가 높은 수준으로 발현되어 있다.
- [0005] 안티마이신 A(antimycin A, 이하 AMA)는 스트렙토미세스 속(Streptomyces)의 이차 대사산물로, 항암제로 사용되는 물질이다. 미토콘드리아 내에서, AMA는 시토크롬 c 환원효소(cytochrome c reductase)의 Q-위치에 결합하여, 효소 틴-오버의 Q-사이클을 방해한다. 이로 인해, 미토콘드리아의 내부 막을 가로지르는 양성자 구배(proton gradient)가 파괴된다. AMA 및 AMA 유도체들은 다양한 암 세포주에서 독성 효과를 가지고 있다. 그러나, AMA를 이용한 나노 제제는 아직까지 연구되지 않고 있다.
- [0006] 이에 본 발명자들은 내부에 적재된 약물의 안정성을 높이고, 종양 미세환경에 선택적으로 축적될 수 있는 미토콘드리아 표적 리포솜 AMA 제제를 개발하였다.
- [0007] 한편, 한국등록특허 제1580251호에는 'TPP-PCL-TPP 고분자 및 상기 고분자를 이용한 미토콘드리아 표적 나노약물전달용 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1557101호에는 '미토콘드리아 타겟팅 시퀀스와 양이온성 올리고펩타이드를 유효성분으로 함유하는 미토콘드리아 약물전달용 담체'가 개시되어 있으나, 본 발명의 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 미토콘드리아 투과성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 미토콘드리아 투과성 펩타이드(mitochondria penetrating peptide)를 합성하고, 합성된 콜레스테롤 연결 펩타이드와 지질성분을 혼합하여 나노 리포솜을 제조하였다. 상기 나노 리포솜은 세포 내로 흡수되어 미토콘드리아를 표적화하는 것이 확인되었으며, 상온에서 장시간 동안 리포솜 제형의 안정성이 유지되는 것을 확인하였다. 또한, 항암제를 적재한 본 발명의 나노 리포솜을 암 세포에 처리한 결과, 동일 농도의 항암제 단독 처리군과 비교하여 높은 세포 사멸 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 미토콘드리아 투과성 펩타이드(mitochondria penetrating peptide)를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 표

적 약물전달용 나노 리포솜을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 나노 리포솜 및 억제학적 유효량의 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 약물전달용 나노 리포솜은 미토콘드리아를 선택적으로 표적화하고 세포막 통과 효율을 증가시킴으로써 미토콘드리아 내 약물 흡수율을 증가시킬 수 있는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜으로, 원하지 않는 부분에 약물이 전달됨으로써 일어나는 부작용을 최소화할 수 있을 뿐만 아니라, 약물의 사용량을 감소시킬 수 있고, 약물의 효과는 극대화할 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 Chol-FRFRK/D 리포솜의 구조 및 상기 리포솜의 미토콘드리아 표적화의 모식도이다.
 도 2는 본 발명의 Chol-FRFRK의 합성 모식도이다.
 도 3은 Chol-FRFRK의 ^1H NMR 분석 결과이다.
 도 4는 Chol-FRFRK는 FT-IR 분석 결과이다.
 도 5는 Chol-FRFRK의 MALDI-TOF MS 분석 결과이다.
 도 6은 Chol-FRFRK/D 리포솜의 주사전자현미경(SEM) 관찰 이미지이다.
 도 7은 D/D 리포솜, DQAsome 및 Chol-FRFRK/D 리포솜의 세포 독성을 확인한 결과로 (a)는 MTT 분석 결과이고, (b) LDH 분석 결과이다.
 도 8은 D/D 리포솜, DQAsome 및 Chol-FRFRK/D 리포솜의 세포 내로의 흡수 및 미토콘드리아 표적화를 분석하기 위한 유세포 분석 결과(a)와 공초점 레이저 현미경 분석 결과(b)이다.
 도 9는 D/D 리포솜, DQAsome 및 Chol-FRFRK/D 리포솜의 안정성을 분석하기 위해, 상온에서 30일 동안 각 리포솜의 입자 크기를 측정 한 결과이다.
 도 10은 암 세포에 Chol-FRFRK/D-AMA 리포솜과 AMA 약물을 처리하고 세포 생존율을 분석한 결과이다.
 도 11은 약물을 적재하지 않는 리포솜 및 약물 봉입 리포솜의 미토콘드리아 막 전위에 미치는 영향을 유세포 분석을 통해 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 미토콘드리아 투과성 펩타이드(mitochondria penetrating peptide)를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 용어 '미토콘드리아 투과성 펩타이드(mitochondria penetrating peptide, MPP)'는 세포막 및 미토콘드리아막을 투과할 수 있는 성질을 가진 펩타이드로, 세포막에 반응하여 엔도사이토시스(endocytosis)나 또는 직접 세포막을 투과할 수 있는 성질을 갖고 있는 펩타이드를 말한다.

[0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜에 있어서, 상기 미토콘드리아 투과성 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 상기 펩타이드는 미토콘드리아막을 투과할 수 있는 성질이 있으며, 아미노산 4개(페닐알라닌-아르기닌-페닐알라닌-리신; F-R-F-K)로 이루어진 아주 작은 펩타이드로, 미토콘드리아 내로 전달하고자 하는 약물에 대한 생물학적 간섭을 최소화할 수 있다.

[0016] 본 발명의 미토콘드리아 투과성 펩타이드는 상기 서열번호 1의 변이체를 추가로 포함할 수 있고, 변이체는 상기 펩타이드의 아미노산 단편 또는 일부가 치환 또는 결실되거나, 아미노산 서열의 일부가 생체 내에서 안정성을 증가시킬 수 있는 구조로 변형되거나, 친수성을 높이기 위해 아미노산 서열의 일부가 변형되거나, 아미노산의 일부 또는 전부가 L- 또는 D- 아미노산으로 치환되거나 또는 아미노산의 일부가 변형된 단편들일 수 있다. 상기 변이체는 미토콘드리아막 투과 기능을 보유하도록 변형될 수 있을 것이다.

- [0017] 본 발명의 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜은 융합성(fusogenic)의 비양이온성 지질을 추가로 포함하는 것일 수 있고, 상기 융합성 비양이온성 지질은 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE), 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스 파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스펅고미엘린, 세팔린, 카르디오리핀, 포스파티드산, 세레브로사이드, 디세틸포스페이트, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG), 팔미토일올레오일포스파티딜글리세롤(POPG), 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 팔미토일올레오일-포스파티딜에탄올아민(POPE) 및 디올레오일-포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도페틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트(DOPE-mal)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에서 용어 '리포솜(liposome)'은 지질이 만든 구형이나 타원형 구조체를 의미한다. 인지질 같은 분자는 한 분자 안에 물을 싫어하는 성질인 소수성(hydrophobic)을 띠는 부분과 물을 좋아하는 성질인 친수성(hydrophilic)을 보이는 부분을 동시에 가지고 있어, 물에 넣으면 친수성을 보이는 부분은 물에 접근하려고 하고, 반대로 소수성 부분은 물을 피해 소수성 부분끼리 응집하게 된다. 그 결과 지질로 된 이중층의 구조가 생기는데 이를 리포솜이라고 한다. 리포솜 안쪽에는 공간이 있기 때문에 여기에 항암제 등의 약물을 넣어 몸속으로 전달하기도 한다.
- [0019] 본 발명의 상기 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜은 콜레스테롤이 N-말단에 연결된 미토콘드리아 투과성 펩타이드와 지질 성분을 혼합하여 제조한 것으로, 제조된 리포솜은 콜레스테롤이 지질 이중막 사이에 끼여있고, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 미토콘드리아 투과성 펩타이드가 리포솜의 외부로 돌출된 구조를 가진다. 본 발명의 리포솜은 미토콘드리아를 선택적으로 표적화하고 세포막 통과 효율을 증가시킴으로써 미토콘드리아 내 약물 흡수율을 증가시킬 수 있는 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜이다.
- [0020] 본 발명의 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜에 있어서, 상기 약물은 항암제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특히, 본 발명의 나노 리포솜 내에 봉입될 수 있는 약물의 범위에는, 소수성의 특징으로 인체 내로 전달(delivery)이 어려운 약물을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 미토콘드리아 표적 약물전달용 나노 리포솜에서, 상기 항암제는 치료 목적으로 표적 세포에 축적되기를 희망하는 약물 또는 세포 내 소기관인 미토콘드리아에 작용하는 약물일 수 있고, 바람직하게는 안티마이신 A일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명은 또한, 상기 나노 리포솜 및 약제학적 유효량의 항암제를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 암 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 나노 리포솜은 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 미토콘드리아 투과성 펩타이드(mitochondria penetrating peptide)와 융합성의 비양이온성 지질로 이루어진, 미토콘드리아를 표적하는 약물전달용 나노 리포솜이다. 본 발명의 상기 나노 리포솜은 약제학적 유효량의 항암제가 리포솜 내부에 봉입한 형태의 나노 리포솜일 수 있다. 암 세포의 미토콘드리아를 표적으로 약물을 전달하면 세포의 에너지 생성을 막고 자살을 촉진해 암세포 사멸을 유도할 수 있는 효과가 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 항암제는 치료 목적으로 표적 세포에 축적되기를 희망하는 약물 또는 세포 내 소기관인 미토콘드리아에 작용하는 약물일 수 있고, 바람직하게는 안티마이신 A일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "약제학적 유효량"은 항암제의 효능 또는 활성(즉, 암세포 성장 억제 또는 암세포 사멸능)을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0026] 본 발명의 암 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 암은 폐암, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암, 흑색종, 방광암, 유방암, 췌장암, 결장암, 전립선암, 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병, 갑상선암, 갑상선 여포암, 신장암, 비장암, 방광암, 두경부암, 위암, 간암, 골암, 뇌암, 담관암, 소장암, 자궁암 및 고환암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 암일 수 있고, 바람직하게는 폐암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명에 따른 암 치료용 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0028] 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 내부에 항암제를 봉입한 나노 리포좀의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있다. 또한, 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 재료 및 방법

[0032] 1. 재료

[0033] 콜레스테롤 클로로포름산염(cholesterol chloroformate), 안티마이신 A(antimycin A), DMF(N,N-dimethylformamide), DIPEA(N,N-diisopropylethylamine), 피페리딘(piperidine), TFA(trifluoroacetic acid), TIS(triisopropylsilane), 메탄올(무수, 99.8%), MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 및 DCM(dichloromethane, 99.6%)은 Sigma-Aldrich(미국)에서 구매하여 사용하였다. HOBt(N-hydroxybenzotriazole) 및 HBTU(2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetra-methyluronium)는 Anaspec(미국)에서 구매하였다. 링크 아미드(link amide) 레진, Fmoc-L-Arg(pbf)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, 및 Fmoc-Phe-OH는 Novabiochem(미국)에서 구입하였으며, 디올레오일-포스파티딜에탄올아민(DOPE)은 Avanti polar lipids(미국)에서 구매하였다. LDH 세포독성 분석 키트는 (주)대일랩서비스(한국)에서 구매하였으며, 세포 배양에 필요한 배지 및 관련 시약은 Gibco(미국)에서 구매하였다.

[0034] 2. 세포 배양

[0035] 폐암 세포주인 A549 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구매하였으며, 37℃ 세포배양기(5% 이산화탄소 및 95% 습도 조건)에서 배양·유지하였다. 배양액은 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% 항생제가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 사용하였고, *in vitro* 실험은 세포가 배양용기에 70-90% 정도 찼을 때 수행하였다.

[0036] 3. SPPS(solid phase peptide synthesis)법을 이용한 Chol-FRFFK의 합성

[0037] 본 발명의 N-말단에 콜레스테롤이 연결된 미토콘드리아 투과성 펩타이드(이하, Chol-FRFFK)는 Fmoc(flourenylmethyloxycarbonyl chloride)의 화학적 성질을 이용하여 합성하였다. 간단하게, 첫 번째 아미노산은 HBTU, HOBt, Fmoc-Lys(Boc)-OH의 4 등가물과 DIPEA의 8 등가물을 혼합하고 무수의 DMF에서 37℃, 16시간 동안 반응시켜 링크(link) 아미드 레진에 연결하였다. Fmoc의 디프로텍션(deprotection)은 피페리딘(30% in DMF, v/v)에서 37℃, 2시간 동안 수행하였으며, 닐하이드린(ninhydrin) 반응을 통해 유리 일차 아민기를 확인하였다. 연속되는 모든 아미노산은 전술한 과정을 반복함으로써 순차적으로 연결시켰다. 그 후, DCM에 들어있는 콜레스테롤 클로로포름산염 4 등가물을 아미노산이 결합된 레진에 첨가하고 16시간 동안 반응시켰다. 최종 산물인 Chol-FRFFK는 TFA:DCM이 1:1의 비율로 혼합된 용액을 사용하여 레진으로부터 떼어냈으며, 차가운 에테르에서 침전시켰다. 최종적으로, 모든 보호기들은 TFA:TIS:중류수가 95:2.5:2.5의 비율로 혼합된 혼합용액에서 28℃, 6시간 동안 저어가며 반응시켜 제거하였으며, 보호기들이 제거된 최종 산물은 투석하고(MWCO=1kD), 동결건조하여 추후 실험에 사용하였다.

[0038] 4. Chol-FRFFK 특성 분석

[0039] 단계적인 아미노산 및 콜레스테롤의 연결은 ¹H NMR(nuclear magnetic resonance), FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy) 및 MALDI-TOF MS(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass

spectrometry) 분석으로 확인하였다. 시료 3mg을 DMSO-d₆(Deuterated DMSO)에 녹여 ¹H NMR로 분석하였고(400 MHz), FT-IR 측정을 위해서는 건조시킨 상태의 시료를 사용하였다.

[0040] **5. 리포솜(liposome) 준비**

[0041] Chol-FRFF/D 리포솜은 박막 탈수 및 재수화 방법을 통해 준비하였다. 먼저, DOPE를 Chol-FRFF가 포함된 메탄올:클로로포름 혼합용액(1:1)에 용해시키고, 용액 내에 잘 분산되도록 흔들어주었다. 그 후, 상기 용액을 질소 가스를 이용하여 상온에서 건조시켰다. 얻어진 지질막을 증류수에 재용해하여 최종 농도 2mg/ml가 되도록 준비하였고, 30분간 초음파 처리하였다. Chol-FRFF 대 DOPE의 몰비를 1:1로 하여 리포솜을 준비하였다. D/D 리포솜(DOTAP/DOPE liposome) 및 DQAsome을 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하기 위해 준비하였고, 입자 크기 분석기 ELS-Z(Otuka Electronics, 일본)를 이용한 DLS(dynamic light scattering) 분석 및 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments, 영국)을 이용한 제타-전위 측정을 통해 리포솜의 특성을 분석하였다. 측정은 증류수에 녹아있는 시료 1mg/ml를 사용하여 25℃에서 이루어졌으며, 모든 측정은 3반복으로 수행하고, 이들의 평균값으로 입자 크기 및 제타 전위(표면 전하)를 평가하였다. 원자력 현미경(Nanoscope MultiMode Atomic Force Microscope) 및 전계방출형 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, JSM-7500F, JEOL, 일본)을 나노입자(리포솜)의 형태를 확인하기 위해 사용하였다.

[0042] **6. 세포 독성 실험**

[0043] Chol-FRFF/D 리포솜의 세포 생존률에 대한 영향은 MTT 어세이를 통해 평가하였다. 간단하게, 인간 폐암 세포주인 A549 세포를 96-웰 플레이트에 1.2×10^4 세포/웰로 준비하고, 37℃ 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 다양한 농도의 Chol-FRFF/D 리포솜, D/D 리포솜 및 DQAsome을 각각 10μl 씩 세포에 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. 그 후, 배양배지를 제거하고, 세포를 PBS(phosphate buffer saline)로 두 번 세척한 다음, 최종 농도 0.5mg/ml의 MTT가 들어있는 신선한 배지 100μl를 세포에 처리하고, 2시간 배양시켰다. 2시간 후 배지를 제거하고 DMSO를 처리하여 포르마잔(formazan) 결정을 용해시키고, 마이크로플레이트 리더기(VERSAMA XTM, Molecular Devices Corp., 미국)를 사용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 무처리 대조구와 비교하여 살아있는 세포의 비율로 해석하였다. 리포솜의 세포 독성은 A549 세포에서 분비되는 LDH(lactate dehydrogenase)를 이용하여 분석하였다. 상술한 바와 같이 세포를 준비하고, 다양한 농도의 Chol-FRFF/D 리포솜, DQAsome 및 D/D 리포솜을 처리한 후, 24시간 후에 세포 배양액의 상층액 10μl를 0.2mM NADH(Nicotinamide adenine dinucleotide)와 2.5mM sodium pyruvate가 포함된 용액에 첨가하여 반응시키고 흡광도를 측정하였다. LDH 활성은 20% 트윈-20을 처리하지 않은 세포 및 처리한 세포의 흡광도를 각각 100% 및 0%의 생존력으로 하여, 이들과의 상대적인 값으로 계산하였다.

[0044] **7. 리포솜의 세포 내 흡수 및 미토콘드리아 표적화**

[0045] Chol-FRFF/D 리포솜의 세포 내로의 흡수 및 미토콘드리아 표적화는 공초점 레이저 주사현미경 및 유세포 분석기를 사용하여 분석하였다. 나노입자(리포솜)의 세포 내 분포를 분석하기 위해서, A549 세포를 공초점 현미경용 디쉬(μ-Slide 8 well, ibiTreat, 한국)에 7×10^3 세포/ml로 준비하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후, CF(carboxyfluorescein)-표지된 리포솜 20μl를 첨가하고 6시간 동안 추가 배양하였다. 미토콘드리아 염색 후에 핵을 염색하였으며, 각각 미토타랙커 레드와 bisbenzimidazole(Hoechst 33342)를 사용하였다. 그런 다음 배지를 제거하고, 세포를 DPBS로 세척한 다음, Zeiss LSM 5 실시간 공초점 레이저 주사현미경(Carl Zeiss, 독일)으로 관찰하였다. CF-표지된 Chol-FRFF/D 리포솜의 세포 흡수의 정량적 분석은 유세포 분석기를 통해 수행되었다. 6-웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰로 세포를 깔고(seeding) 웰 면적의 70-80% 수준으로 세포가 차도록 배양한 다음, 최종 농도 0.1mg/ml의 CF-표지된 Chol-FRFF/D 리포솜을 처리한 다음 12시간 동안 배양시켰다. 12시간 후에 세포를 수확하고, DPBS로 세척한 다음, 7,000rpm의 속도로 5분간 원심분리하여 세포를 모은 다음 유세포 분석기를 통해 형광의 정도를 측정하였다.

[0046] **8. 리포솜 제형의 안정성(stability) 평가**

[0047] 리포솜은 시간이 지날수록 응축되거나 다양한 크기를 보이는 경향이 있다. 따라서 리포솜의 안정성은 리포솜 기반의 약물 제제에 있어서 중요한 인자이다. Chol-FRFF/D 리포솜의 안정성은 DQAsome 및 D/D 리포솜의 안정성과 비교하였다. 리포솜 준비일로부터 30일 동안 매 주 DLS를 사용하여 리포솜의 크기를 측정하였다. 결과 그래프는 측정된 입자 직경 크기의 평균값으로 나타내었다.

9. 약물 적재 및 캡슐화 효율

안티마이신 A(이하 AMA)를 박막 분산 방법을 이용하여 Chol-FRFF/D 리포솜에 적재하였다. 간단하게, Chol-FRFF 및 DOPE를 무게 비 1:1의 비율로 메탄올:클로로포름(1:1) 혼합용액에 용해시켰다. 그런 다음, 에탄올에 녹아있는 AMA(200 μ M)를 상기 지질 혼합물에 첨가하고, 용액 내 잘 분산되도록 섞어주었다. 지질 및 약물 혼합물은 질소를 사용하여 건조시킨 후, 지질막을 수화시켜 최종 농도 2mg 지질/ mL 로 준비하였다. 현탁액을 30분 동안 초음파 처리하여 미토콘드리아 표적 AMA 나노-조성물(Chol-FRFF/D-AMA 리포솜)을 획득하였다. AMA 나노-조성물의 크기는 DLS를 사용하여 측정하였고, AMA-DQAsome 및 AMA-D/D 리포솜은 각각 약물을 적재하지 않은 리포솜 자체가 불안정성 또는 높은 독성의 문제가 있어, 제조하지 않았다.

10. Chol-FRFF/D-AMA 리포솜의 세포 독성

약물을 적재한 Chol-FRFF/D-AMA 리포솜의 세포독성을 측정하기 위해서, A549 세포에 다양한 농도의 Chol-FRFF/D-AMA 리포솜을 처리하고, MTT 어세이를 통해 분석하였다.

11. 미토콘드리아 막 전위 평가

A549 세포의 미토콘드리아 막 전위는 형광의 JC-1 프로브(5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide)를 사용하여 측정하였다. JC-1은 양이온성 염료로, 미토콘드리아 막 전위가 정상일 때에는 응집체(j-aggregates)의 형태로 존재하며 590 $\pm$ 10 nm 파장의 붉은 형광을 발하며, 미토콘드리아 막 전위가 감소되면 JC-1 프로브 단일체가 효율적으로 미토콘드리아 내로 포획될 수 없어 세포질에 축적이 되며, 525 $\pm$ 10 nm 파장의 녹색 형광을 발하는 특성이 있다. 약물을 적재한 Chol-FRFF/D-AMA 리포솜의 미토콘드리아 막 전위에 미치는 영향을 분석하기 위해서, A549 세포를 6-웰 플레이트에 1 $\times$ 10⁵ 세포/웰로 준비하고 24시간 동안 배양시킨 후, Chol-FRFF/D 리포솜, DQAsome, D/D 리포솜, Chol-FRFF/D-AMA 리포솜 및 AMA(최종농도 0.1mg/ mL)를 12시간 동안 처리하였다. 그 후, 세포 배양액을 제거하고 세포를 세척한 후, 10mM의 JC-1을 처리하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 반응시켰다. 그런 다음, 세포를 DPBS로 2번 세척하고, Zeiss LSM 5 실시간 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 분석하였다.

실시예 1. 미토콘드리아를 표적하는 Chol-FRFF의 합성

본 발명에서는 SPSP(solid phase peptide synthesis) 기술을 이용하여 미토콘드리아를 표적하는 펩타이드를 합성하였다. 링크 아미드 레진은 순차적으로 결합되는 아미노산을 위한 기질로 사용되었고, 콜레스테롤은 세포 내에서 분해될 수 있는 카바메이트 에스터(carbamate ester) 결합 형성을 통해 아미노산과 연결되었다(도 2). 펩타이드의 성공적인 연결 및 합성은 ¹H NMR을 통해 확인하였다. 도 3에서 확인되는 것처럼, 0.6~1.8ppm 사이의 특징적인 피크는 콜레스테롤의 C-H3, C-H2, C-H의 양성자와 대응되며, 8~9ppm 사이의 피크는 연결된 아미노산의 일차 및 이차 아민기의 양성자에 대응된다. 7ppm의 넓은 피크는 페닐알라닌의 벤젠 고리에 대응된다. 추가적으로, FT-IR을 사용하여 연결여부를 재확인하였다. 그 결과, Chol-FRFF의 피크 배치는 다음과 같았다(도 4): 1644, amide I band, C=O stretch of the acetyl group; 2937, C-H stretch; 3182, N-H stretch.

Chol-FRFF의 분자량은 MALDI-TOF MS를 통해 확인하였으며, 약 994.36Da의 분자량을 가지는 것으로 관찰되었다(도 5).

실시예 2. Chol-FRFF/D 및 Chol-FRFF/D-AMA 리포솜의 준비

용해성 지질인 DOPE와 Chol-FRFF를 유기용매 혼합물에 녹여서 제조한 Chol-FRFF/D 리포솜은, 콜레스테롤이 지질 이중층 사이에 박혀있고 FRFF의 올리고펩타이드가 리포솜 표면에 위치한 형태이다(도 1). 대조군으로 사용한 DQAsome과 D/D 리포솜, 및 약물을 적재한 Chol-FRFF/D-AMA 리포솜의 크기 및 표면 전하 분석 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

리포솜의 입자 크기 및 표면 전하

리포솜 조성	크기(nm)	제타 전위(mV)
DOTAP/DOPE (D/D 리포솜)	101	51.1
DQAsome	110	62.2
Chol-FRFF/DOPE (1:1)	165	32.6
Chol-FRFF/DOPE-AMA	250	31.7

[0060] D/D 리포솜, DQAsome 및 Chol-FRFFK/D 리포솜의 입자 크기가 200nm 보다 작은 것으로 확인되었다. Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜은 250nm의 크기로 다른 조성의 리포솜에 비해 크기가 다소 큰 것으로 확인되었는데, 이는 리포솜 코어에 AMA의 봉입으로 인한 것으로 유추되었다. 표면 전하를 측정한 결과, DQAsome과 D/D 리포솜은 각각 62.2 및 51.1mV의 높은 양 전하를 보이는 것으로 확인된 반면, Chol-FRFFK/D 리포솜 및 Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜은 각각 32.7 및 31.7mV의 제타 전위를 보여 중간 정도의 양이온성을 보여주었다. 주사전자현미경(SEM) 분석을 통해 얻어진 Chol-FRFFK/D 리포솜의 형태는 DLS를 사용하여 분석한 결과보다 작은 직경을 가지는 구 모양으로 확인되었으며, 이러한 크기의 차이는 SEM 이미지 분석에는 건조 시료가 사용된 까닭인 것으로 판단되었다.

[0061] **실시예 3. Chol-FRFFK/D 리포솜의 세포 독성 분석**

[0062] 콜레스테롤은 세포막의 주요 구성요소 및 스테로이드계 호르몬의 전구체이기 때문에, 콜레스테롤 유도체가 비독성의 특성인 것은 입증되어 왔다. 본 발명자들은 다양한 농도의 D/D 리포솜, DQAsome 또는 Chol-FRFFK/D 리포솜을 각각 세포에 처리하고 독성을 분석하였다. 그 결과, DQAsome 또는 Chol-FRFFK/D 리포솜을 처리한 폐암 세포에서는 무시할 수 있는 수준의 독성이 관찰되었다. 반면, D/D 리포솜을 100 μ g/ml 이상 처리한 폐암 세포에서는 세포 독성이 확인되었다(도 7). D/D 리포솜의 세포 독성은 그들의 높은 양이온성 특성으로 인해, 세포막의 파괴로 인한 것으로 유추되었다.

[0063] **실시예 4. 세포 내 흡수 및 미토콘드리아 표적화 분석**

[0064] 이전의 연구에서 FRFFK 4개의 아미노산을 프로브에 연결하여 미토콘드리아를 표적하였을 때, 효율적인 표적화가 되지 않음을 확인하였다(Horton KL et al., Chem. Biol. 2008, 15:375-382). K(lysine)와 R(arginine) 아미노산은 양이온성으로, 음이온성의 막 단백질과 정전기적인 상호작용에 의해 엔도시토시스(endocytosis)를 촉진하며, F(phenylalanine)의 친유성(lipophilicity) 또한, 세포 내로의 흡수에 기여한다. 그러나, 콜레스테롤을 포함하는 나노입자는 LDL 콜레스테롤 수용체에 의해 세포 내로 흡수되게 된다. 따라서, 본 발명의 Chol-FRFFK는 대조군 대비 증가된 세포 내로의 흡수 및 미토콘드리아 표적화를 보여줄 것으로 예상되었다.

[0065] CF(carboxyfluorescein)-표지된 리포솜을 이용하여 세포 내로의 흡수 정도 및 미토콘드리아 표적화 정도를 분석한 결과, Chol-FRFFK/D 리포솜을 처리한 군에서 무처리 군 대비 형광을 나타내는 세포가 많이 증가하였음을 확인할 수 있었다(도 8a). 형광의 세기 또한, D/D 리포솜 또는 DQAsome을 처리한 군의 형광보다 높게 확인되었다. 공초점 레이저 현미경을 통한 세포 내에서의 리포솜 분포를 확인한 결과, 양성 대조군으로 사용한 DQAsome과 Chol-FRFFK/D 리포솜을 처리한 세포에서 CF의 녹색 형광과 미토콘드리아 염색 염료의 붉은색 형광이 공존하는 것이 확인되었다(도 8b). 상기의 결과를 통해, Chol-FRFFK/D 리포솜이 세포 내로 흡수가 잘 되며, 미토콘드리아 표적화 효율 역시 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0066] **실시예 5. 나노입자(Chol-FRFFK/D 리포솜)의 안정성 분석**

[0067] DLS를 이용한 나노입자의 입자크기 측정 결과를 분석하여 D/D 리포솜, DQAsome 및 Chol-FRFFK/D 리포솜의 안정성을 평가한 결과, D/D 리포솜과 Chol-FRFFK/D 리포솜은 상온에서 한달 동안 방치하여도 일정한 크기를 유지하여, 그 제형이 안정한 것을 확인하였으며, DQAsome의 경우 리포솜 제조 5일 후부터 입자가 봉해되어 크기가 증가되는 것이 확인되었다(도 9). 이는 DQAsome이 습도에 취약하기 때문인 것으로 판단되었다.

[0068] **실시예 6. Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜의 암 세포 사멸 효과 분석**

[0069] 상기에서 D/D 리포솜의 높은 세포 독성 및 DQAsome의 제형 불안정성으로 인해, AMA 약물 봉입은 Chol-FRFFK/D 리포솜에서만 수행하였다. AMA는 미토콘드리아의 내부(inner) 막 전위를 저해하여 세포의 사멸을 유도하는 약물이다.

[0070] AMA 약물과 동일 농도의 AMA 약물을 적재한 Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜을 각각 폐암 세포주인 A549 세포에 2.5, 5, 10 및 20 μ M의 농도로 처리하고, 폐암 세포주의 생존율을 비교한 결과, Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜 처리 농도가 높아질수록, 세포 생존율이 감소되는 것이 확인되었다(도 10). 특히, Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜은 IC₅₀이 10 μ M의 농도로 확인된 반면, AMA를 단독으로 처리한 경우, 20 μ M의 농도에서도 대부분의 암 세포가 생존해있음을 확인할 수 있었다. 상기의 결과를 통해, Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜이 약물의 생체이용률을 증가시킬 수 있었다.

[0071] **실시예 7. 리포솜의 미토콘드리아 막 전위에 미치는 영향 분석**

[0072] D/D 리포솜, DQAsome, Chol-FRFFK/D 리포솜, Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜 및 AMA가 암 세포의 미토콘드리아 막 전위

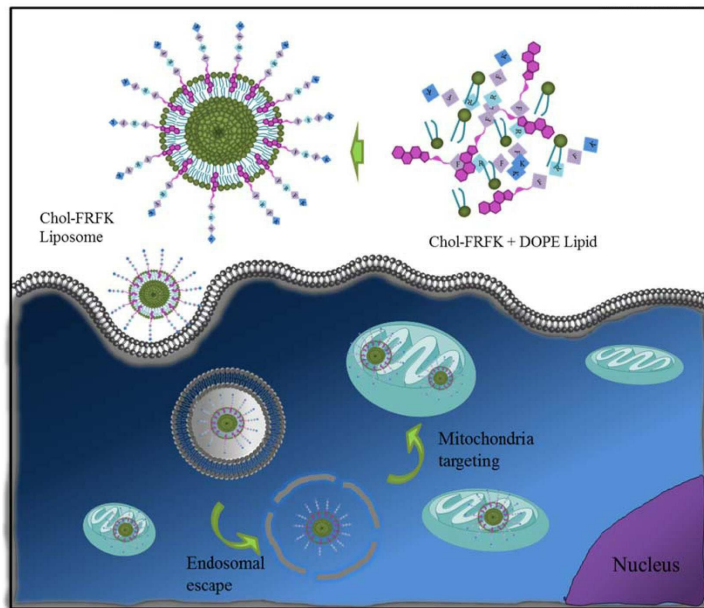
에 미치는 영향을 분석하였다. CCCP(Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine)는 심각한 세포 사멸을 유발하지 않으면서, 미토콘드리아 투과성 전이(mitochondrial permeability transition)를 일으키는 프로토노포어(protonophore)로, 미토콘드리아 막 전위의 완전한 소멸을 보여주는 양성 대조군으로 사용하였다.

[0073] 다양한 리포솜 또는 AMA 약물을 처리한 암 세포의 미토콘드리아 막 전위를 분석한 결과, D/D 리포솜을 처리한 세포에서는, D/D 리포솜의 높은 독성으로 인해 세포가 파괴되어 전체 세포수가 감소되어 측정된 집단의 비율이 감소된 것을 알 수 있었으며, DQAsome을 처리한 세포에서는 무처리 세포군에 비해 미토콘드리아 막 전위가 많이 붕괴된 것을 확인할 수 있었다. 반면, Chol-FRFFK/D 리포솜을 처리한 세포에서는 무처리 세포군에 비해서는 미토콘드리아 막 전위 붕괴 비율이 증가된 것을 확인할 수 있었지만, D/D 리포솜 및 DQAsome 처리에 비해서는 온전한 미토콘드리아 막 전위를 가진 세포의 비율이 높은 것을 알 수 있었다. 또한, 상기의 약물 독성 실험 결과와 일치하게, Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜 처리군은 생존한 세포의 수가 감소되어 전체 집단의 비율이 감소되었으며, 측정된 집단에서도 미토콘드리아 막 전위가 붕괴된 비율이 보다 많이 관찰되었다(도 11). 즉, Chol-FRFFK/D-AMA 리포솜 처리군은 리포솜이 세포 내 미토콘드리아로 효율적으로 전달되어 AMA 약물이 기능하고 이로 인해 세포 사멸이 유도된 것을 예측할 수 있었다.

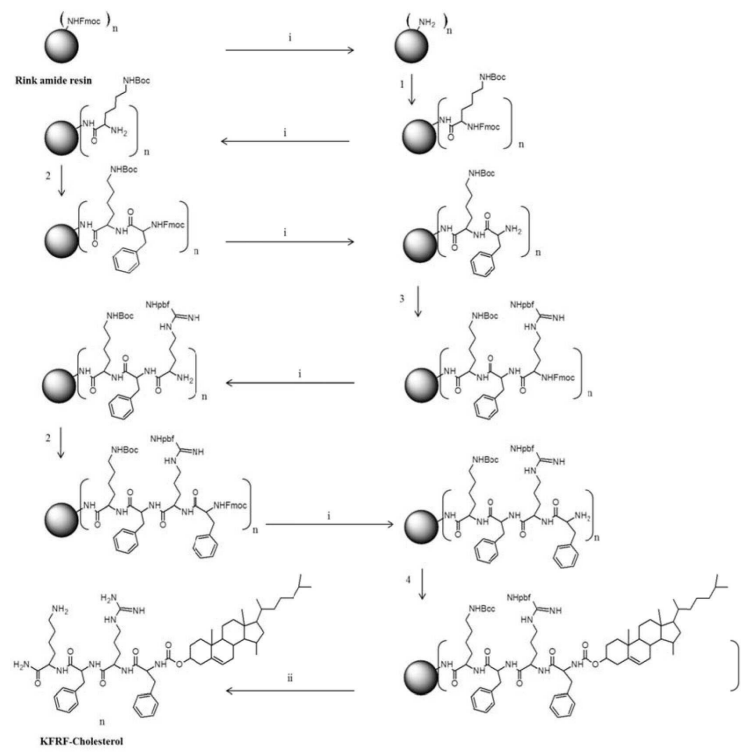
[0074] 상기의 결과들을 토대로, 본 발명의 Chol-FRFFK/D 리포솜이 내부에 봉입한 약물을 미토콘드리아 내로 효율적으로 전달하여 약물의 효과를 증대시킬 수 있음을 알 수 있었다. 특히, 본 발명의 리포솜은 AMA와 같은 소수성의 약물을 효과적으로 봉입하며, 세포 내부로의 흡수를 용이하게 하므로, 미토콘드리아를 표적으로 하는 다른 종류의 약물에도 응용가능할 것으로 예상되었다.

도면

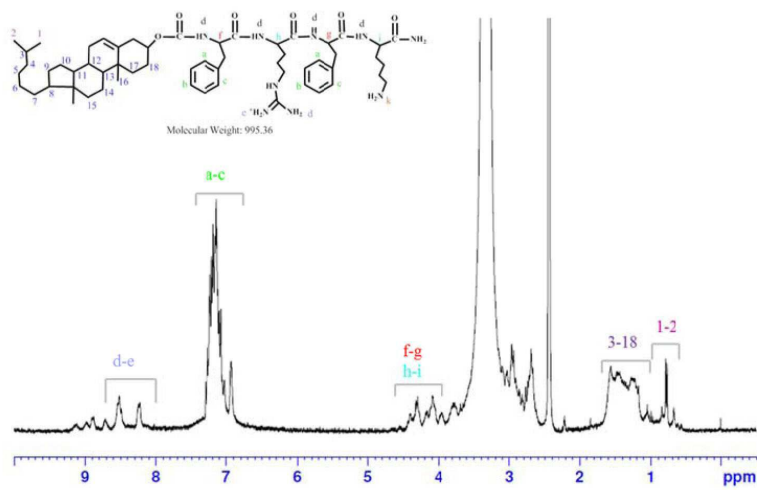
도면1



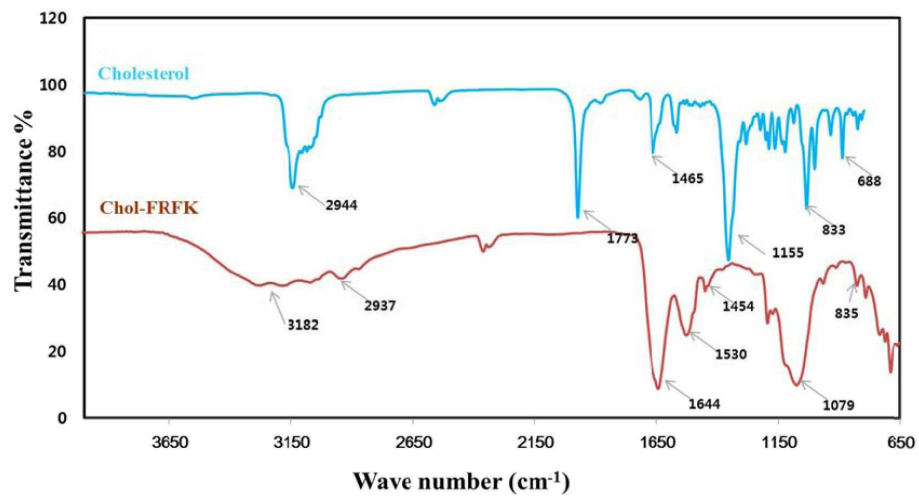
도면2



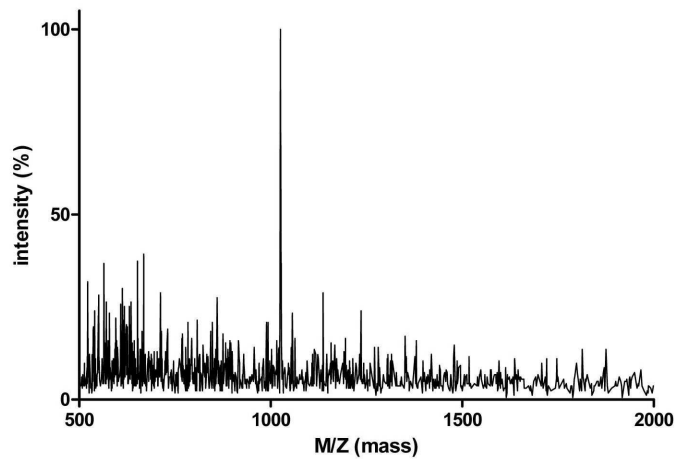
도면3



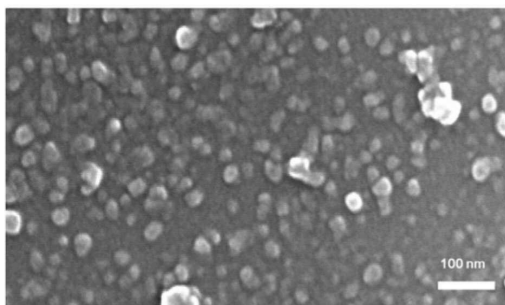
도면4



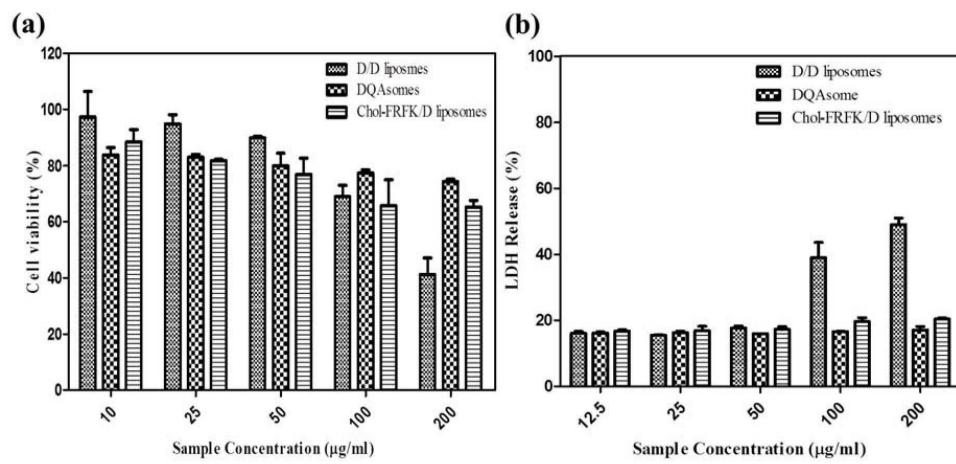
도면5



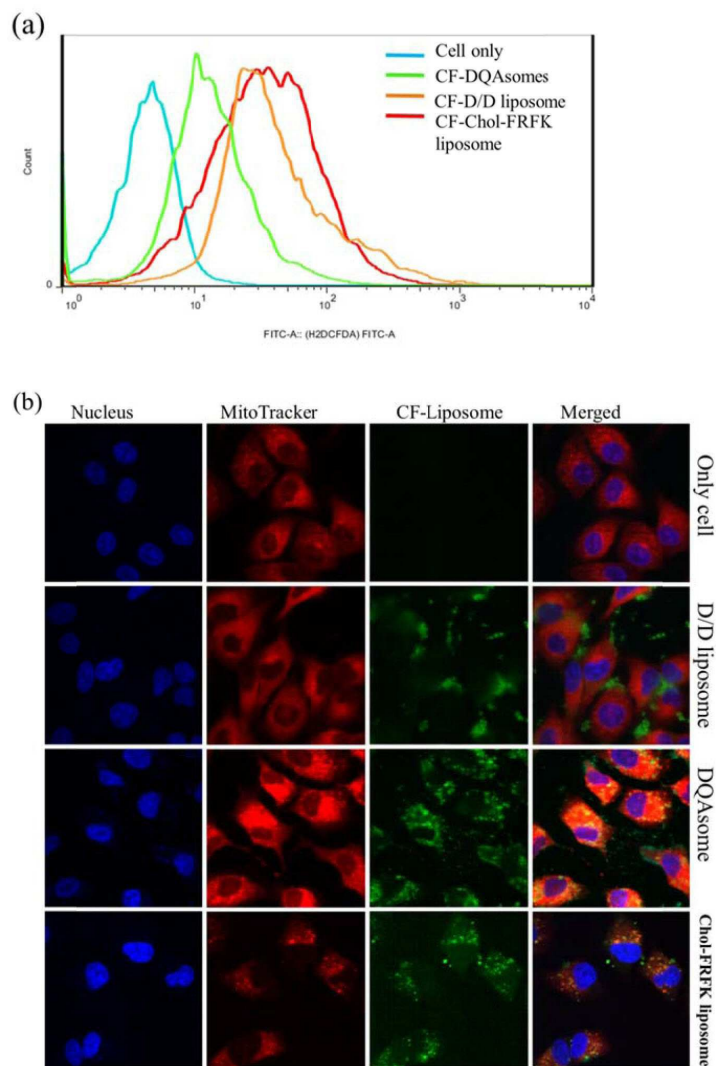
도면6



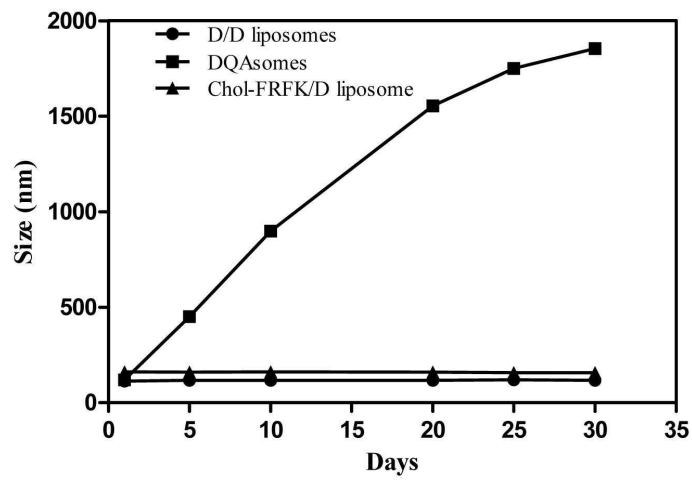
도면7



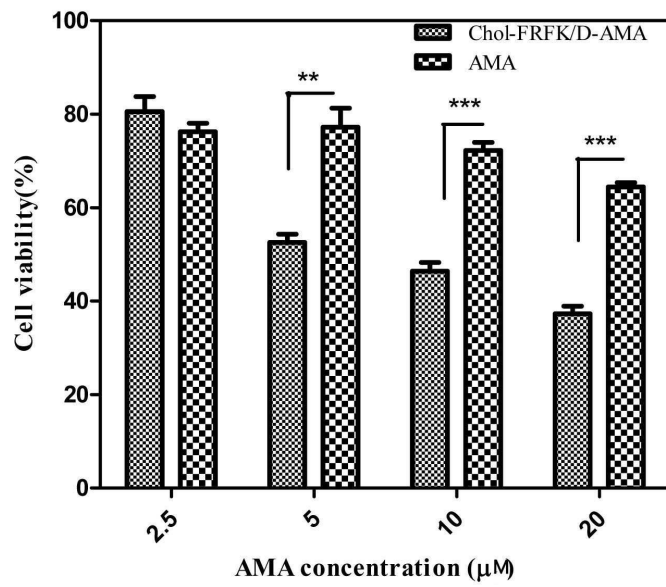
도면8



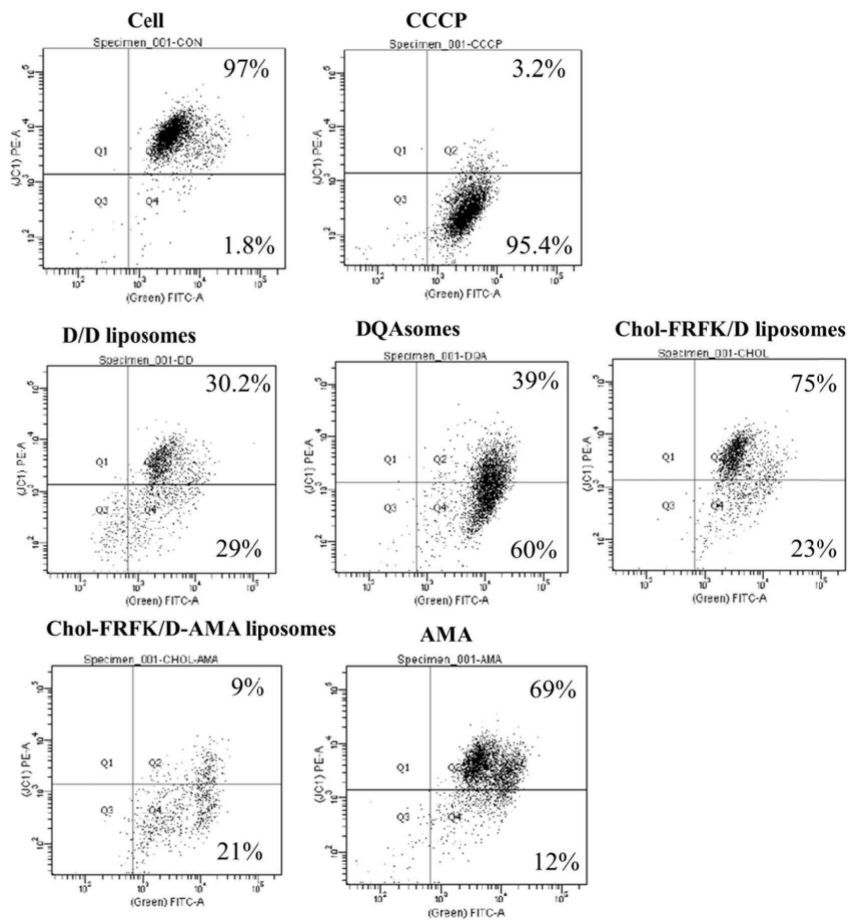
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Nanoliposome for drug delivery to mitochondria containing
mitochondria penetrating peptide with conjugated cholesterol in
N-terminus as effective component

<130> PN17154

<160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mitochondria penetrating peptide

<400> 1

Phe Arg Phe Lys