



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112135604 A

(43) 申请公布日 2020. 12. 25

(21) 申请号 201980033293.4

(22) 申请日 2019.05.17

(30) 优先权数据

10-2018-0057010 2018.05.18 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2019/005923 2019.05.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/221544 K0 2019.11.21

(71) 申请人 韩国科学技术院

地址 韩国大田市

申请人 高丽大学校产学协力团

(72) 发明人 朴志镐 林智英 吴赞熙 郑大浩

金贤九 全玉花

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

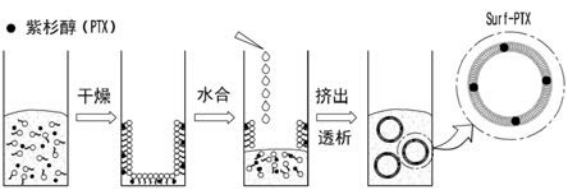
权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称

基于肺表面活性物质的抗癌药物

(57) 摘要

本发明涉及基于肺表面活性物质的抗癌药物。包封在由肺表面活性物质制成的脂质体中的抗癌药物可以有效地靶向肺癌细胞,特别是源自II型肺泡细胞的腺癌,并且具有低的毒性和优异的结构稳定性。



1. 一种抗癌用药物组合物,其包含源自活体的肺表面活性物质和抗癌药物的复合物。
2. 根据权利要求1所述的抗癌用药物组合物,其中所述肺表面活性物质是在II型肺泡细胞中产生的脂蛋白复合物。
3. 根据权利要求1所述的抗癌用药物组合物,其中所述肺表面活性物质包括膜蛋白。
4. 根据权利要求1所述的抗癌用药物组合物,其中所述复合物的特征在于靶向源自II型肺泡细胞的腺癌。
5. 根据权利要求1所述的抗癌用药物组合物,其中所述复合物是其中所述抗癌药物包封在由源自所述活体的所述肺表面活性物质制成的脂质体中的复合物,并且所述抗癌药物以基于100重量份由所述肺表面活性物质制成的所述脂质体为0.1至10重量份的量包封。
6. 根据权利要求1所述的抗癌用药物组合物,其中所述复合物的平均直径范围为200至400nm。
7. 一种根据权利要求1所述的抗癌用药物组合物的制备方法,其包括以下步骤:
制备其中溶解有抗癌药物的第一溶液;
制备其中溶解有肺表面活性物质的第二溶液;
通过将所述第一溶液和所述第二溶液混合并且使混合溶液干燥来形成膜;和
通过用蒸馏水使所述膜水合来制备包封有所述抗癌药物的复合物。
8. 根据权利要求7所述的药物组合物的制备方法,其中所述水合在40至90℃的温度下进行。
9. 根据权利要求7所述的药物组合物的制备方法,其中所述方法进一步包括在进行水合步骤之后调节所述复合物的直径的步骤。
10. 根据权利要求7所述的药物组合物的制备方法,其中所述肺表面活性物质包括膜蛋白。

基于肺表面活性物质的抗癌药物

技术领域

[0001] 本发明涉及基于肺表面活性物质的抗癌药物。

背景技术

[0002] 癌症患者每年都在显著增加,并且,在所有癌症患者之中,肺癌患者属于具有最高死亡率的一类。

[0003] 在肺癌中,腺癌(adenocarcinoma)占有所有肺癌的约40%,并且主要在肺泡区域(alveolar region)中发生。腺癌的起源通常是II型肺泡细胞(type II alveolar cell)。

[0004] II型肺泡细胞分泌并且储存肺表面活性物质(pulmonary surfactant),并且肺表面活性物质在呼吸过程期间控制肺的张力。肺表面活性物质由脂质(lipid)和膜蛋白(membrane protein)构成(非专利文献,EurRespir J.1999Jun;13(6):1455-76)。

[0005] 当使用这样的肺表面活性物质将抗癌药物递送至靶细胞时,期望可以使抗癌药物有效地靶向分泌并且储存肺表面活性物质的II型肺泡细胞。

[0006] 因此,通过制备包封在由肺表面活性物质制成的脂质体中的抗癌药物来完成本发明。

发明内容

[0007] 发明要解决的问题

[0008] 本发明的一个目的在于提供一种抗癌药物,其可以有效地递送至肺泡细胞,具有优异的生物相容性,具有低的毒性,并且具有优异的结构稳定性。

[0009] 本发明的另一个目的在于提供抗癌药物的制备方法。

[0010] 用于解决问题的方案

[0011] 为了实现以上目的,在本发明的一个方面,本发明提供抗癌用药物组合物,其包含源自活体的肺表面活性物质和抗癌药物的复合物。

[0012] 在本发明的另一个方面,本发明提供抗癌用药物组合物的制备方法,其包括以下步骤:

[0013] 制备其中溶解有抗癌药物的第一溶液;

[0014] 制备其中溶解有肺表面活性物质的第二溶液;

[0015] 通过将第一溶液和第二溶液混合并且使混合溶液干燥来形成膜(film);和

[0016] 通过用蒸馏水使膜水合(hydrating)来制备包含抗癌药物的复合物。

[0017] 发明的效果

[0018] 包封在由肺表面活性物质制成的脂质体中的抗癌药物可以有效地靶向肺癌细胞,特别是源自II型肺泡细胞的腺癌,并且具有低的毒性和优异的结构稳定性。

附图说明

[0019] 图1是示出根据实施例1的包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒的制备过程

的图。

[0020] 图2是示出在包载相对于实施例1中制备的颗粒的质量为1%、2%、5%或10% (重量%) 的紫杉醇并且除去未包载在颗粒中的紫杉醇之后, 确认包载在颗粒中的紫杉醇的量的结果的图。

[0021] 图3是示出在包载相对于比较例1中制备的颗粒的质量为1%、2%、5%或10% (重量%) 的紫杉醇并且除去未包载在颗粒中的紫杉醇之后, 确认包载在颗粒中的紫杉醇的量的结果的图。

[0022] 图4是示出评价实施例1和比较例1中制备的颗粒的稳定性的结果的图。

[0023] 图5是通过电子显微镜拍摄的示出实施例1和比较例1中制备的颗粒的尺寸和形状的一组照片。

[0024] 图6是示出用荧光染料标记的肺表面活性物质颗粒的细胞内摄取的评价结果的一组照片。

[0025] 图7是示出在正常细胞和癌细胞之间比较和评价摄取效率的结果的一组照片。

[0026] 图8是示出确认颗粒本身的毒性的结果的图。

[0027] 图9是示出评价在各种肺癌细胞系之中对A549细胞系的选择性的结果的一组照片。

[0028] 图10是示出确认在各种肺癌细胞系之中对A549细胞系特异的细胞毒性的结果的一组图。

[0029] 图11是示出在将用DiR荧光标记的实施例1的肺表面活性物质颗粒气化并且使颗粒被吸入至小鼠模型之后评价随时间观察到的DiR荧光信号的结果的图。

[0030] 图12是示出A549小鼠肺癌模型的制备过程和实验程序的图。

[0031] 图13是示出使用包封有药物的颗粒来确认在A549肺癌模型中的治疗疗效的实验的结果的一组照片。

具体实施方式

[0032] 在下文中, 详细描述本发明。

[0033] 本发明提供一种抗癌用药物组合物, 其包含源自活体的肺表面活性物质和抗癌药物的复合物。

[0034] 此时, 复合物的形式没有特别限制, 但是, 例如可以是脂质体形式, 或者可以是其中肺表面活性物质和抗癌药物通过共价键结合的形式。

[0035] 此外, 肺表面活性物质可以是在II型肺泡细胞中产生的脂蛋白复合物(lipoprotein complex)。即, 肺表面活性物质可以包括从哺乳动物的肺采集的哺乳动物的肺表面活性物质。此时, 哺乳动物可以是人类, 并且可以是除了人类以外的动物, 特别是猪或牛。通常, 在II型肺泡细胞中分泌并且储存天然的肺表面活性物质。因此, 本发明的基于肺表面活性物质的抗癌药物可以有效地靶向肺泡细胞以递送抗癌药物。

[0036] 脂蛋白复合物中的术语脂质意指通常是两亲性的天然、合成、或半合成(即, 改性的天然)的化合物。脂质通常包含亲水性组分和疏水性组分。示例性的脂质包括磷脂(phospholipid)、脂肪酸、脂肪醇、甘油三酯、磷脂(phosphatide)、油、糖脂、脂肪族醇、蜡、萜烯和类固醇, 但是并不总限于此。短语“半合成(或改性的天然)”是指以某种方式来化学

改性的天然化合物。

[0037] 磷脂的实例包括天然和/或合成的磷脂。

[0038] 可以在本文中使用的磷脂包括磷脂酰胆碱(饱和的以及不饱和的)、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰肌醇、鞘脂、二酰基甘油酯、心磷脂、神经酰胺和脑苷脂,但是并不总限于此。示例性的磷脂包括二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二月桂酰磷脂酰胆碱(DLPC)(C12:0)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)(C14:0)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二植烷酰磷脂酰胆碱、十九酰磷脂酰胆碱、花生酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)(C18:1)、二棕榈油酰磷脂酰胆碱(C16:1)、亚油酰磷脂酰胆碱(C18:2)、肉豆蔻酰棕榈酰磷脂酰胆碱(MPPC)、硬脂酰肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(SMPC)、硬脂酰棕榈酰磷脂酰胆碱(SPPC)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰棕榈油酰磷脂酰胆碱(PPoPC)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(DMPS)、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸(DSPS)、棕榈酰油酰磷脂酰丝氨酸(POPS)、大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、鞘磷脂、磷脂酰肌醇、二磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、磷脂酸和卵磷脂酰胆碱(EPC),但是并不总限于此。

[0039] 脂肪酸和脂肪醇的实例包括固醇、棕榈酸、鲸蜡醇、月桂酸、肉豆蔻酸、硬脂酸、植烷酸和二棕榈酸,但是并不总限于此。示例性的脂肪酸包括棕榈酸。

[0040] 脂肪酸酯的实例包括棕榈酸甲酯、棕榈酸乙酯、棕榈酸异丙酯、棕榈酸胆固醇酯、棕榈酸棕榈酯、棕榈酸钠、棕榈酸钾和三棕榈精(tripalmitin),但是并不总限于此。

[0041] 同时,肺表面活性物质包含膜蛋白,并且该膜蛋白的存在使得能够选择性并且有效地靶向源自II型肺泡细胞的腺癌。膜蛋白可以包括选自SP-A、SP-B、SP-C和SP-D组成的组中的一种或多种天然表面活性物质多肽(natural surfactant polypeptide)、其一部分、或其混合物。示例性的肽可以包括天然表面活性物质多肽的至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、或50个氨基酸片段。示例性的SP-B多肽可以包括SP-B的至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸片段。SP-B肽可以是氨基末端肽或羧基末端肽。示例性的SP-B肽可以是25个氨基酸的氨基末端肽。

[0042] 在另一个实施方案中,肺表面活性物质可以包括重组产生的表面活性物质多肽。重组SP-A、SP-B、SP-C、SP-D或其一部分可以通过使用各种已知的技术在适合的原核或真核表达系统中表达编码SP-A、SP-B、SP-C、SP-D或其一部分的DNA序列来获得。容易适于包含编码表面活性物质多肽或其一部分的分离的核酸序列的重组载体、包含重组载体的宿主细胞、制备这样的载体和宿主细胞的方法、和它们在通过重组技术生产编码多肽中的用途是本领域技术人员众所周知的。可以在包含可操作地连接至至少一个调控序列的编码表面活性物质多肽的核苷酸序列的表达载体中提供编码表面活性物质多肽或其一部分的核酸序列。应当理解,表达载体的设计可以取决于例如要转化的宿主细胞的选择和/或要表达的蛋白的种类等因素。应当考虑载体拷贝数、控制拷贝数的能力、和由载体(例如,抗生素标记(antibiotic marker))编码的任意其它蛋白的表达。例如,为了产生包括融合蛋白或多肽的蛋白或多肽,可以使用核酸来诱导在培养物中生长的细胞中激酶和磷酸酶多肽的表达和过表达。

[0043] 为了表达表面活性物质多肽或其一部分,可以用重组基因来转染宿主细胞。宿主细胞可以是任意原核或真核细胞。例如,多肽可以在例如大肠杆菌(E.coli)等细菌细胞、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞中表达。在这些实例中,如果宿主细胞是人类细胞,则它可以在或可以不在活体中。其它适合的宿主细胞是本领域技术人员众所周知的。此外,宿主细胞可以补充有在宿主中通常不会找到的tRNA分子,从而优化多肽的表达。适合用于使多肽的表达最大化的其它方法是本领域技术人员众所周知的。

[0044] 生产多肽的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,可以在适合条件下培养转染有编码表面活性物质多肽或其一部分的表达载体的宿主细胞以允许多肽的表达。多肽可以被分泌并且从包含细胞和多肽的培养基混合物分离。可选地,多肽可以保持细胞质完整。然后,收集细胞、裂解、并且从细胞裂解物中分离蛋白。

[0045] 表面活性物质多肽与表面活性物质脂质通过静水相互作用(hydrostatic interaction)来相互作用。带电荷的氨基酸与脂质的极性头部基团相互作用,并且疏水性氨基酸与磷脂酰基侧链相互作用。例如,SP-B和SP-C是疏水性蛋白。SP-B和SP-C二者均优先结合至阴离子脂质(例如,磷脂酰甘油(PG),而不是DPPC)。SP-A和SP-D是亲水性蛋白并且与包括甘油磷脂、鞘磷脂、鞘糖脂、脂质A和脂聚糖的宽范围的两亲性脂质相互作用。SP-A与DPPC结合。例如,观察到KL4(一种SP-B模拟物)与天然表面活性物质中的脂质或表面活性物质中包含的脂质的静水相互作用。KL4肽中的赖氨酸残基与DPPC的带电荷的头部基团相互作用,并且疏水性亮氨酸残基与磷脂酰甘油的磷脂酰基侧链相互作用。

[0046] 同时,抗癌药物可以以相对于100重量份由肺表面活性物质制成的脂质体为0.1至10重量份的量包封,但是并不总限于此。抗癌药物的载量可以根据患者的病况来适当地调节。此外,复合物的直径可以是200至400nm、220至400nm、240至400nm、260至400nm、280至400nm、300至400nm、320至400nm、200至380nm、200至360nm、200至340nm、200至320nm、220至380nm、240至360nm、260至340nm、和280至320nm,但是并不总限于此。

[0047] 可以使用抗癌药物而没有限制,只要其是已知的抗癌药物即可。此时,抗癌药物的具体实例包括疏水性抗癌药物和免疫抗癌剂等。

[0048] 疏水性抗癌药物的具体实例如下:紫杉醇(paclitaxel)、阿霉素(doxorubicin)、顺铂(cis-platin)、多西他赛(docetaxel)、他莫昔芬(tamoxifen)、喜树碱(camptothecin)、阿那曲唑(anastrozole)、卡铂(carboplatin)、拓扑替康(topotecan)、贝洛替康(belotecan)、伊立替康(irinotecan)、格列卫(gleevec)和长春新碱(vincristine)。

[0049] 在一方面,可以通过吸入将抗癌药物递送至肺。可以使用吸入装置例如吸入器(包括干粉吸入器和定量吸入器)和雾化器(nebulizer)(也称为喷雾器(atomizer))以将抗癌药物递送至肺。

[0050] 示例性的干粉吸入器可以从Inhale Therapeutic Systems获得。干粉吸入器也可以从3M获得。

[0051] 在本发明的另一个方面,本发明提供抗癌用药物组合物的制备方法,其包括以下步骤:

[0052] 制备其中溶解有抗癌药物的第一溶液;

[0053] 制备其中溶解有肺表面活性物质的第二溶液;

[0054] 通过将第一溶液和第二溶液混合并且使混合溶液干燥来形成膜;和

[0055] 通过用蒸馏水使膜水合来制备包含抗癌药物的复合物。

[0056] 此时,水合可以在40至90℃的温度下进行,并且更优选在60至70℃的温度下进行。

[0057] 此外,在进行所有以上步骤之后,可以进一步进行调节抗癌药物的直径的步骤,并且可以为了调节直径的目的而使用挤出机套件(extruder kit)。

[0058] 包封在由肺表面活性物质制成的脂质体中的抗癌药物可以有效地靶向肺癌细胞,特别是源自II型肺泡细胞的腺癌,并且具有低的毒性和优异的结构稳定性。这些效果通过后述的实施例和实验例来证明。

[0059] 本发明的实施方式

[0060] 在下文中,将通过以下实施例和实验例详细描述本发明。

[0061] 然而,以下实施例和实验例仅用于说明本发明,并且本发明的内容不限于此。

[0062] <实施例1>包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒的制备

[0063] 使用具有强的抗癌疗效和非常高的疏水性的水不溶性药物紫杉醇作为药物通过以下过程来制备包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒。

[0064] 将紫杉醇粉末以10mg/ml的浓度溶解在甲醇中(第一溶液)。

[0065] 将肺表面活性物质粉末(制造商:Mitsubishi/产品名:Surfacten)以10mg/ml的浓度溶解在体积比为2:1(v:v)的氯仿和甲醇的溶液中(第二溶液)。

[0066] 将第一溶液和第二溶液混合使得肺表面活性物质和紫杉醇以20:1(w:w)的质量比混合,并且将混合溶液放入玻璃瓶中并且干燥。此时,如果需要,可以在适当的范围内调节肺表面活性物质和紫杉醇的混合质量比,以用于实现最佳药物包载。

[0067] 将干燥的肺表面活性物质用蒸馏水水合至浓度为3mg/ml。水合在热板(hot plate)上进行,并且将温度维持在60-70℃。使用挤出机套件使在水合过程期间产生的颗粒的平均直径为400nm。

[0068] 此后,使用100kDa膜通过透析来分离不能包封在颗粒中的药物12小时。结果,制成包封有药物(紫杉醇)的肺表面活性物质颗粒(图1)。

[0069] 在如实施例1中那样通过将肺表面活性物质和药物以20:1的质量比混合来制备包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒的情况下,最终制成的颗粒中的药物可以以相对于颗粒本身的质量为约1重量%来包封。即,在实施例1中,药物以基于100重量份颗粒本身为1重量份来包封。

[0070] 另一方面,为了观察后述的细胞内摄取,使用DiI(一种具有非常高的疏水性的水不溶性染料)作为染料通过以下过程来制备包封有染料的基于肺表面活性物质的颗粒。

[0071] 将红色染料DiI以1mg/ml的浓度溶解在甲醇中(第一溶液)。

[0072] 将肺表面活性物质粉末以10mg/ml的浓度溶解在体积比为2:1的氯仿和甲醇的溶液中(第二溶液)。

[0073] 将第一溶液和第二溶液混合使得肺表面活性物质和染料以1000:1的质量比混合,并且将混合溶液放入玻璃瓶中并且干燥。

[0074] 将干燥的肺表面活性物质用蒸馏水水合至浓度为3mg/ml。水合在热板上进行,并且将温度维持在60-70℃。使用挤出机套件使在水合过程期间产生的颗粒的平均直径为400nm。

[0075] <实施例2>未包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒的制备

[0076] 除了不使用紫杉醇以外,通过进行与实施例1中所述相同的过程来制备未包封有药物的肺表面活性物质颗粒。

[0077] <比较例1>包封有药物的基于肺表面活性物质的模拟(mimetic)颗粒的制备

[0078] 为了比较实施例1中制备的“包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒”的功能,通过以下过程来人工制备模拟颗粒。

[0079] 特别地,仅使用作为肺表面活性物质的主要组分的DPPC(脂质)、DOPC(脂质)、DPPG(脂质)和胆固醇来制备模拟颗粒。根据实施例1的基于肺表面活性物质的颗粒和根据比较例1的模拟颗粒之间的主要差异是膜蛋白的有无。

[0080] 将DPPC、DOPC、DPPG和胆固醇以52.2:22.1:11.2:14.4的摩尔比混合,并且将混合物溶解在氯仿中(第三溶液)。

[0081] 将实施例1的第一溶液与以上制备的第三溶液混合使得模拟颗粒组分(DPPC、DOPC、DPPG和胆固醇)与药物以20:1的质量比混合,并且将混合溶液放入玻璃瓶中并且干燥。

[0082] 将模拟颗粒组分用蒸馏水水合至浓度为3mg/ml。水合在热板上进行,并且将温度维持在60-70℃。使用挤出机套件使在水合过程期间产生的颗粒的平均直径为400nm。

[0083] 此后,使用100kDa膜通过透析来分离不能包封在颗粒中的药物12小时。结果,制成包封有药物(紫杉醇)的肺表面活性物质模拟颗粒。

[0084] 另一方面,为了观察后述的细胞内摄取,以与实施例1中所述相同的方式制备包封有DiI的模拟颗粒。

[0085] <比较例2>未包封有药物的基于肺表面活性物质的模拟颗粒的制备

[0086] 除了不使用紫杉醇以外,通过进行与比较例1中所述相同的过程来制备未包封有药物的肺表面活性物质模拟颗粒。

[0087] <实验例1>粒径和表面电荷的评价

[0088] 利用DLS(动态光散射(Dynamic Light Scattering))来测量实施例1和2以及比较例1和2中制备的颗粒的尺寸和表面电荷。结果在表1中示出。

[0089] [表1]

[0090]		实施例 1(包载 5wt%的 PTX)	实施例 2(未包 载 PTX)	比较例 1(包载 5wt%的 PTX)	比较例 2(未包载 PTX)
	平均直径(nm)	424.9	321.8	322.6	301.3
	表面电荷, ZP(mV)	-53.5	-45.6	-36.8	-40

[0091] <实验例2>包封在颗粒中的药物的浓度的评价

[0092] 包封在实施例1中制备的肺表面活性物质颗粒中的药物的浓度通过HPLC来定量和评价。结果在图2中示出。

[0093] 图2是示出在包载相对于实施例1中制备的颗粒的质量为1%、2%、5%或10%(重量%)的紫杉醇并且除去未包载在颗粒中的紫杉醇之后,确认包载在颗粒中的紫杉醇的量的结果的图。

[0094] 如图2中所示,当使用大于5重量%时,尽管存在微小变化,但是载量是饱和的。

[0095] 每1mg肺表面活性物质包载有约12μg药物。

[0096] 因此,判断最有效的是以5重量%的浓度包载药物,并且将来以该方式进行实验。

[0097] 同时,还将包封在比较例1中制备的颗粒中的药物的浓度进行定量和评价,并且结果在图3中示出。

[0098] 图3是示出在包载相对于比较例1中制备的颗粒的质量为1%、2%、5%或10%(重量%)的紫杉醇并且除去未包载在颗粒中的紫杉醇之后,确认包载在颗粒中的紫杉醇的量的结果的图。

[0099] 如图3中所示,与肺表面活性物质不同,即使在5%以上的浓度下也包载大量药物。这是因为模拟颗粒不具有常规的肺表面活性物质所具有的膜蛋白,因此存在大量空间用于包载药物。

[0100] 在模拟颗粒的情况下,每1mg肺表面活性物质包载约25 μ g药物。

[0101] <实验例3>颗粒稳定性的评价和通过电子显微镜检查(electron microscopy)的确认

[0102] 将实施例1和比较例1中制备的颗粒各自与FBS(胎牛血清(Fetal Bovine Serum))(总体积的10%)混合。此后,将它们各自放在37℃培养箱中,并且使用DLS设备测量各时间段的颗粒的尺寸。

[0103] 图4是示出评价实施例1和比较例1中制备的颗粒的稳定性的结果的图。

[0104] 如图4中所示,实施例1和比较例1中制备的颗粒随时间发生的粒径的变化非常小。因此,确认颗粒稳定性是优异的。

[0105] 此后,对于电子显微镜检查,将颗粒和戊二醛以2.5%的体积比混合并且在室温下固定2小时。然后,将颗粒放在碳网(carbon grid)上并且用2%PTA溶液染色。结果在图5中示出。

[0106] 图5是通过电子显微镜拍摄的示出实施例1和比较例1中制备的颗粒的尺寸和形状的一组照片。

[0107] 如图5中所示,确认到实施例1和比较例1中制备的颗粒是尺寸为200至300nm的圆形的颗粒。

[0108] <实验例4>肺表面活性物质颗粒的细胞内摄取的评价

[0109] 由于肺表面活性物质源自2型肺泡细胞,因此本发明人试图证明表面活性物质被良好地摄取与2型肺泡细胞相同类型的A549细胞中。

[0110] -A549:来自2型肺泡细胞的人类肺腺癌细胞系

[0111] 将A549细胞以20,000个细胞/孔的密度在6孔板中传代培养(subculture),并且一天后,用包含DiI(红色荧光)的实施例1或比较例1的颗粒(3mg/ml)以60 μ g/ml的浓度对其进行处理。将板放置在37℃的培养箱中4小时,然后更换培养基。在更换培养基之后,将细胞核用Hoechst染料染色24小时。使用共聚焦显微镜(60 $\times$ 镜头)来确认细胞内摄取的程度。结果在图6中示出。

[0112] 图6是示出包载有药物的肺表面活性物质颗粒的细胞内摄取的评价结果的一组照片。

[0113] 如图6中所示,在比较例1的模拟颗粒的情况下,由于与A549细胞的亲和力低,因此使得细胞内摄取不多。

[0114] 另一方面,在用相同浓度处理的、实施例1的基于肺表面活性物质的颗粒的情况

下,确认到与比较例1相比,使得细胞内摄取相对更多。

[0115] 这是因为作为肺表面活性物质的特定特性的肺表面活性物质中的膜蛋白在细胞内摄取中起到重要作用。

[0116] <实验例5>正常细胞和癌细胞之间摄取效率的比较评价

[0117] 为了评价实施例1中制备的包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒和比较例1中制备的包封有药物的基于肺表面活性物质的模拟颗粒在正常细胞和癌细胞之间在摄取效率方面是否具有差异,进行以下实验。

[0118] 将以上实验例中使用的HPAEPic (人类肺泡上皮细胞 (Human Pulmonary Alveolar Epithelial Cells), 正常细胞) 或A549细胞以20,000个细胞/孔的密度接种在6孔板中,并且将实施例1和比较例1的DiI标记的脂质体颗粒 (3mg/ml) 以60 μ g/ml的浓度添加至其中。在4小时后,洗去培养基,并且在24小时后,在共聚焦显微镜下观察结果。结果在图7中示出。

[0119] 图7是示出在正常细胞和癌细胞之间比较和评价摄取效率的结果的一组照片。

[0120] 如图7中所示,确认到实施例1和比较例1的大多数颗粒不残留在正常细胞HPAEPic (人类肺泡上皮细胞) 中,并且也确认到实施例1和比较例1的颗粒以相对大的量积聚在肺癌细胞A549中。应当理解,以上结果是由于正常细胞具有吸收和排出颗粒的活性功能、而癌细胞具有在吸收颗粒之后继续保留它们的特性的事实所导致的。

[0121] 当比较实施例1和比较例1的颗粒时,确认到与比较例1的模拟颗粒相比,相对较大量的实施例1的颗粒积累在癌细胞中。

[0122] <实验例6>颗粒毒性试验

[0123] 为了评价颗粒和颗粒中的药物的毒性,进行以下实验。

[0124] 将A549细胞以3,000个细胞/孔的密度在96孔板中传代培养,并且一天后,用基于肺表面活性物质的颗粒和模拟颗粒以各种浓度对其进行处理。

[0125] 首先,为了确认颗粒本身的毒性,用没有药物的实施例2的基于肺表面活性物质的颗粒和比较例2的模拟颗粒以如下浓度 (浓度:1 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、75 μ g/ml、150 μ g/ml、300 μ g/ml、600 μ g/ml、和1200 μ g/ml) 对细胞进行处理。

[0126] 将板放在37 $^{\circ}$ C培养箱中4小时,然后更换培养基。更换培养基二十四小时后,细胞死亡的程度通过MTT试验来确认。结果在图6中示出。

[0127] 如图8中所示,确认到,直至1200 μ g/ml的两种颗粒,大于70%的细胞仍存活。

[0128] <实验例7>在各种肺癌细胞系之中对A549细胞系的选择性的评价

[0129] 进行以下实验以确认实施例1中制备的包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒和比较例1中制备的药物在各种肺癌细胞系之中是否显示对A549细胞系的特异性的选择性。

[0130] 将以下细胞系以5,000个细胞/孔的密度接种在6孔板中,用浓度为100 μ g/ml的实施例1和比较例1的DiI标记的脂质体颗粒对其进行处理。2小时后,洗去培养基,并且将细胞核用Hoechst染料染色,随后在共聚焦显微镜下观察。结果在图9中示出。

[0131] -A549细胞系 (腺癌/人类肺癌)

[0132] -H460细胞系 (大细胞癌/人类肺胸腔积液)

[0133] -PC9细胞系 (腺癌/人类肺癌)

[0134] 图9是示出评价在各种肺癌细胞系之中对A549细胞系的选择性的结果的一组照

片。

[0135] 如图9中所示,确认到与H460和PC9肺癌细胞系相比,根据实施例1的颗粒在A549细胞系中显著地被吸收。

[0136] 此外,进行以下实验以确认实施例1中制备的包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒和比较例1中制备的药物在各种肺癌细胞系之中是否显示对A549细胞系的特异性的选择性。

[0137] 将肺癌细胞系以3,000个细胞/孔的密度接种在96孔板中,用浓度为15 μ g/ml的实施例1和比较例1的脂质体颗粒对其进行处理。2小时后,洗去培养基并且评价细胞存活率(%)。结果在图10中示出。

[0138] 图10是示出确认在各种肺癌细胞系之中对A549细胞系特异的细胞毒性的结果的一组图。(Mime和Sur分别是比较例2和实施例2的颗粒;并且Mi-PTX和Sur-PTX分别是比较例1和实施例1的颗粒。)

[0139] 如图10中所示,确认到实施例1中制备的包封有药物的基于肺表面活性物质的颗粒对A549细胞系比对H460或PC9肺癌细胞系显示显著的细胞毒性。以上结果是由于肺表面活性物质颗粒比模拟颗粒在A549细胞中摄入更多的事实导致的。

[0140] <实验例8>使用包封有药物的肺表面活性物质的体内实验

[0141] 8-1. 气化前/后的颗粒稳定性试验

[0142] 在体内实验的情况下,使用吸入技术以将颗粒递送至小鼠模型的肺部。此时,使用SCIREQ公司的inExpose (雾化器)。

[0143] 该装置通过超声处理 (sonication) 使液体颗粒气化。此时,在气化前/后检查粒径以确保颗粒保持纳米尺寸形状。将气化的颗粒收集在50ml管中并且液化 (devolatize),并且用DLS装置测量尺寸。结果在表2中示出。

[0144] [表2]

[0145]		超声处理前的尺寸 (nm)	超声处理后的尺寸 (nm)
	实施例 1(表面活性物质-PTX)	223.4	185.8
	实施例 2(表面活性物质)	214.1	218.5
	比较例 1(模拟物-PTX)	216.1	188.3
	比较例 2(模拟物)	223.3	223

[0146] 如表2中所示,即使将颗粒气化,气化前/后的粒径也几乎不变。从以上结果,确认到使根据本发明的纳米颗粒气化并且稳定地递送至小鼠模型中。

[0147] 8-2. 气化的颗粒在小鼠模型的肺中的残留程度的确认

[0148] 为了确认气化的表面活性物质颗粒长期残留在小鼠模型的肺中并且几乎不转运至其它器官,用DiR荧光来标记表面活性物质,并且通过气化将颗粒递送至小鼠模型。

[0149] 在气化后(0h)、在1小时后、在3小时后、在6小时后、和在24小时后立即从小鼠模型取出器官,然后使用Li-CoR装置测量DiR荧光信号(800nm)。结果在图11中示出。

[0150] 图11是示出在将用DiR荧光标记的实施例1的肺表面活性物质颗粒气化并且使颗粒被吸入小鼠模型之后评价随时间观察到的DiR荧光信号的结果的图。

[0151] 如图11中所示,确认到气化的颗粒在肺中残留至少24小时,并且难以转运至其它

器官。

[0152] 8-3. 使用包封有药物的颗粒确认在A549肺癌模型中的治疗疗效

[0153] 为了构建A549肺癌模型,通过静脉注射将一百万个A549细胞注入裸鼠的尾部。约5周后,使用吸入技术每周两次以1mg/kg的浓度递送抗癌药物。此时,将其分为用水注射的对照组(DW)、用包封有药物的模拟颗粒(比较例1,Mi-PTX)注射的组、和用包封有药物的肺表面活性物质颗粒(实施例1, Sur-PTX)注射的组。吸入约5次后,将小鼠模型处死以取出肺,并且将肺用H&E染色。然后,由病理学家通过分析来确认治疗效果。

[0154] A549小鼠肺癌模型的制备过程和实验程序在图12中示出,并且确认治疗结果在图13中示出。

[0155] 当通过H&E染色来分析肺部时,肺中的致密圆形区域是A549肺癌部位。如图13中所示,在对照组(DW)和吸入包封有药物的模拟颗粒(比较例1)的组的情况下,在肺中观察到许多肺癌遍及肺部,并且治疗效果不足。根据分析照片的病理学家的意见,确认到当吸入包封有药物的肺表面活性物质颗粒(实施例1)时,与对照组相比,肺癌减少了30%。由此,确认到包封有药物的肺表面活性物质颗粒在A549肺癌模型的治疗中是有效的。

[0156] 产业上的可利用性

[0157] 抗癌药物包封在由肺表面活性物质制成的脂质体中的复合物可以有效地靶向肺癌细胞,特别是源自II型肺泡细胞的腺癌,并且具有低的毒性和优异的结构稳定性,使得可以将复合物有效地用作抗癌组合物。

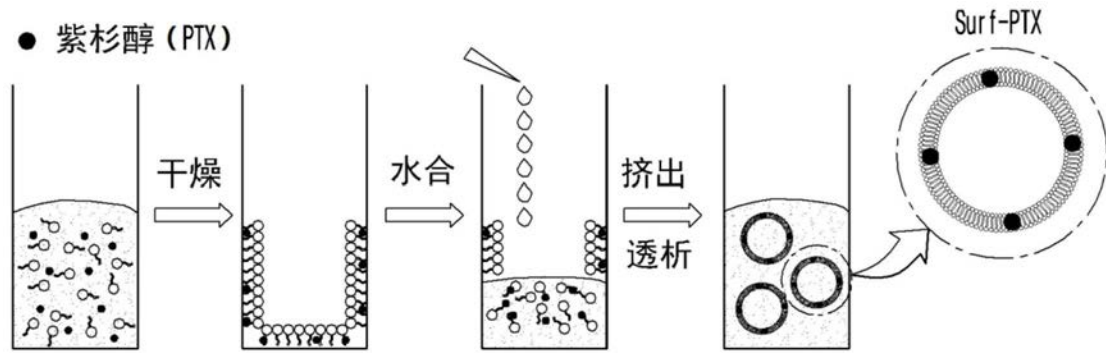


图1

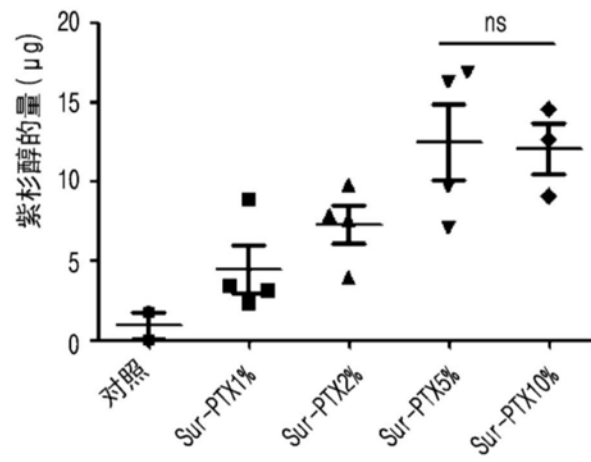


图2

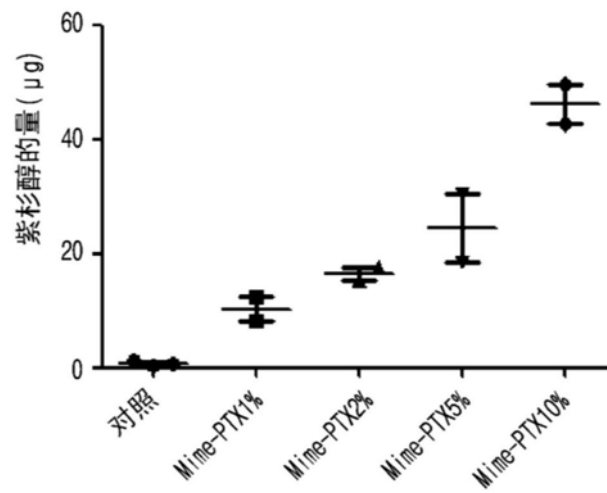


图3

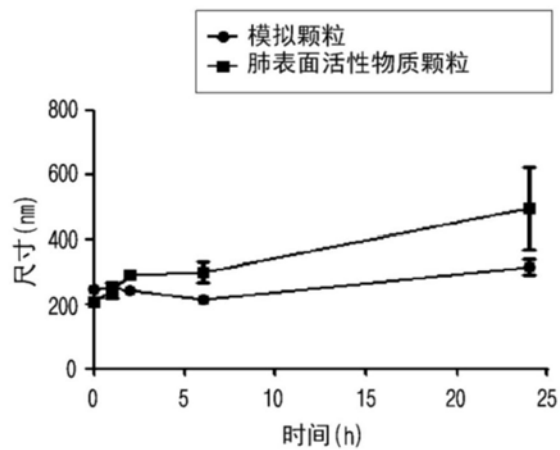


图4

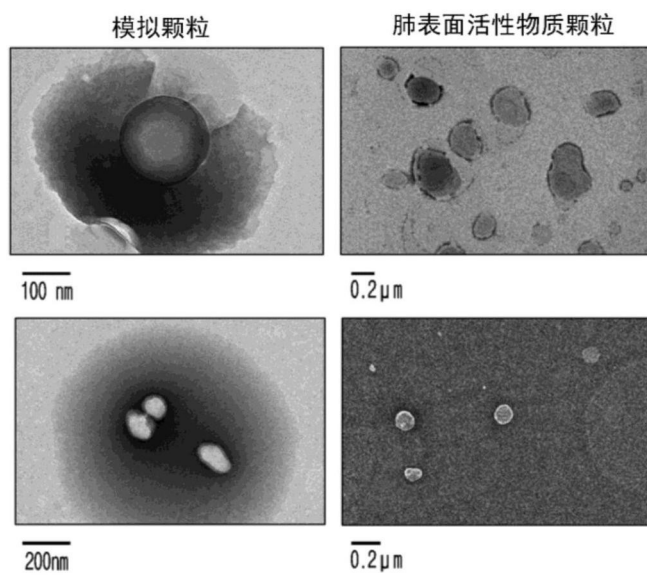


图5

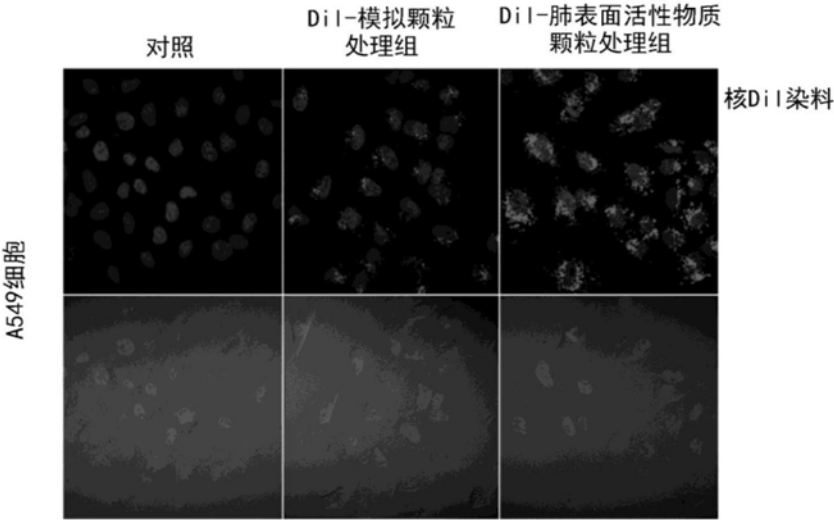


图6

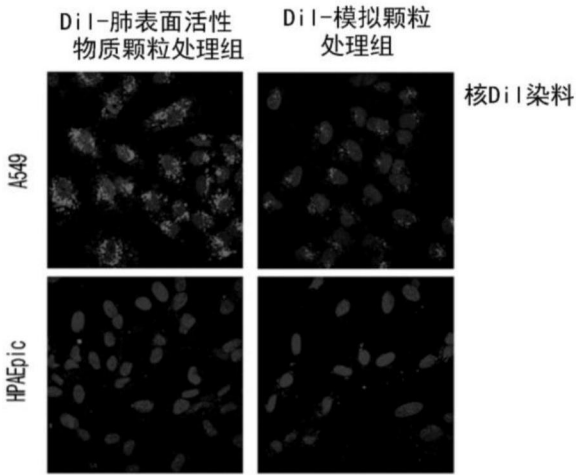


图7

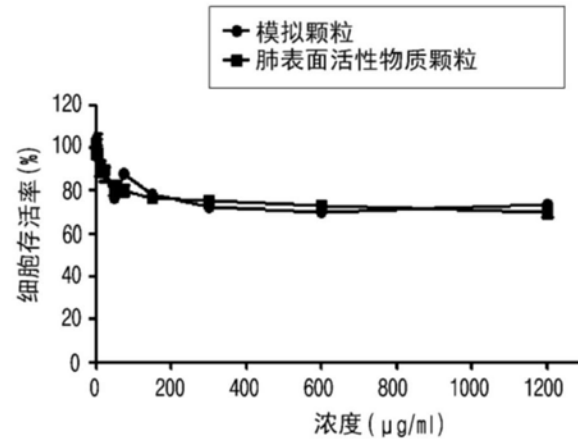


图8

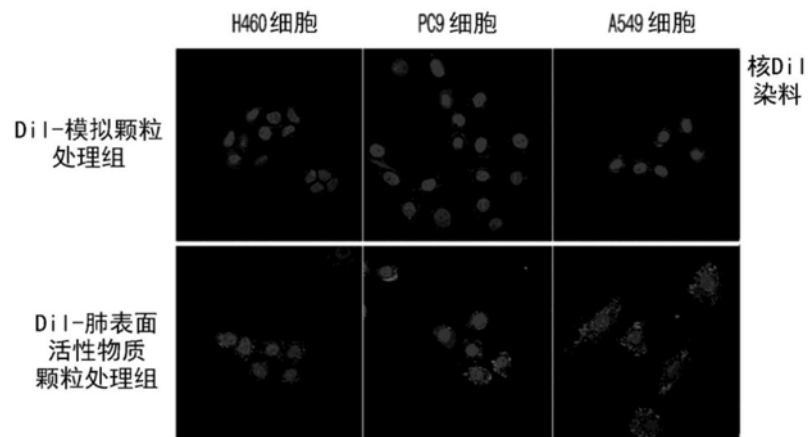


图9

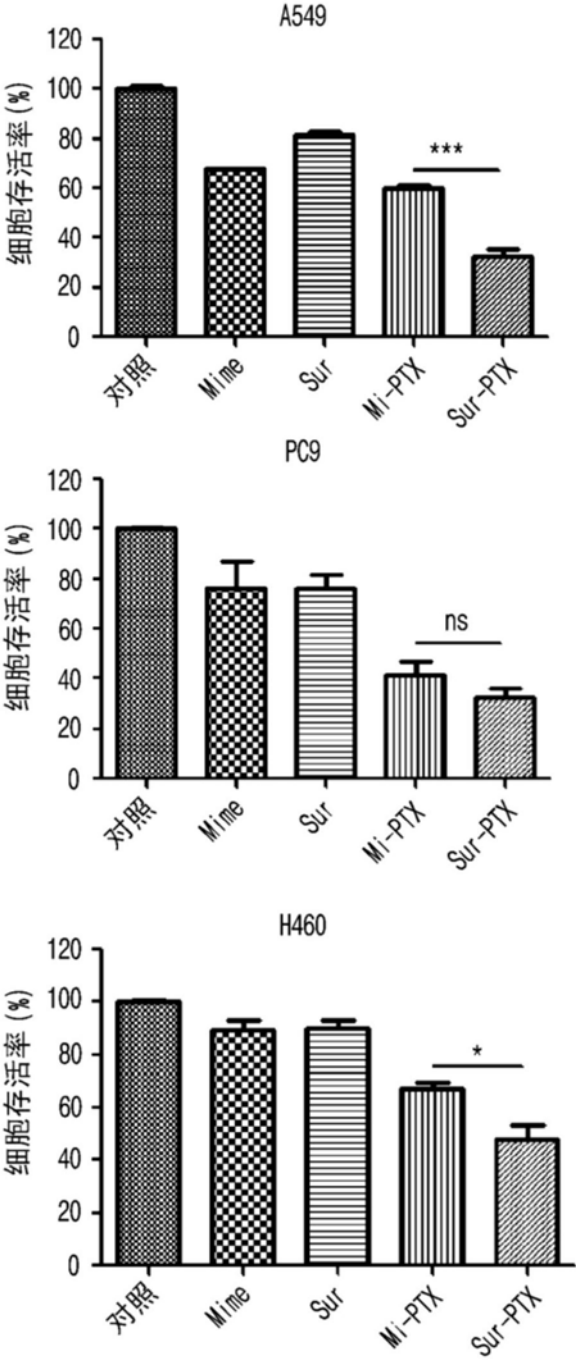


图10

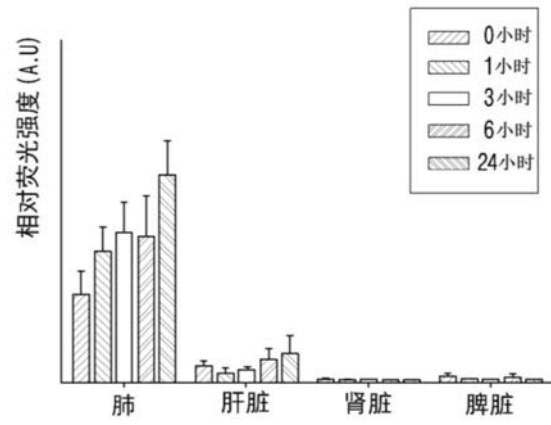


图11

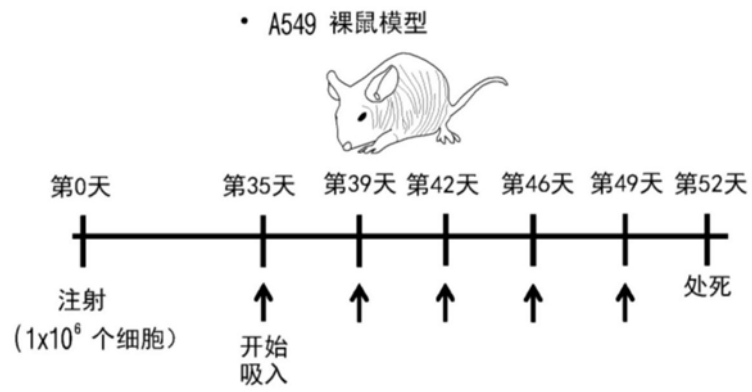


图12

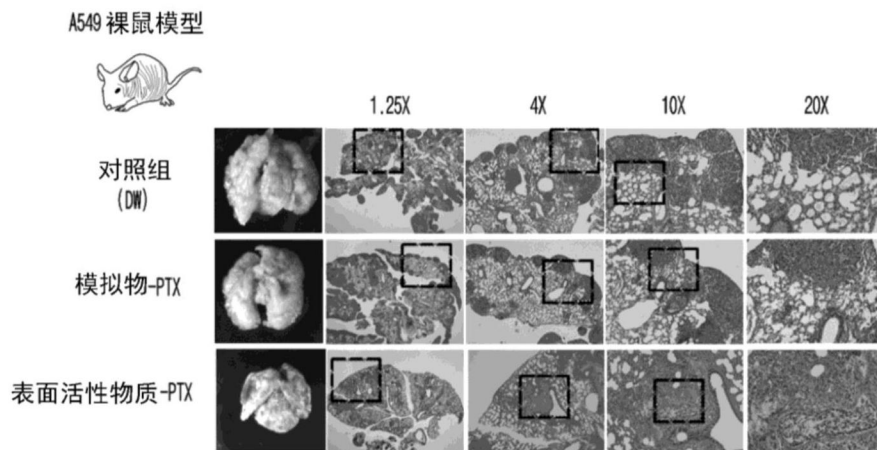


图13