



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0034289
(43) 공개일자 2018년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 49/14 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/396 (2006.01) A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 49/04 (2006.01) A61K 49/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 49/143 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0125169

(22) 출원일자 2017년09월27일

심사청구일자 2017년09월27일

(30) 우선권주장

1020160124304 2016년09월27일 대한민국(KR)

기술이전 회망 : 기술양도

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(주)아이엠지티

경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82, 의학연구
소 중양실험실 에이28벤처 (구미동, 분당서울대
학교병원)

(72) 발명자

김현철

서울특별시 영등포구 63로 7, 비동 501호(여의도
동, 은하아파트)

정진욱

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 19동 1101호
(서초동, 삼풍아파트)

정은아

서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 109동 901호
(도곡동, 삼성래미안아파트)

(74) 대리인

특허법인충정

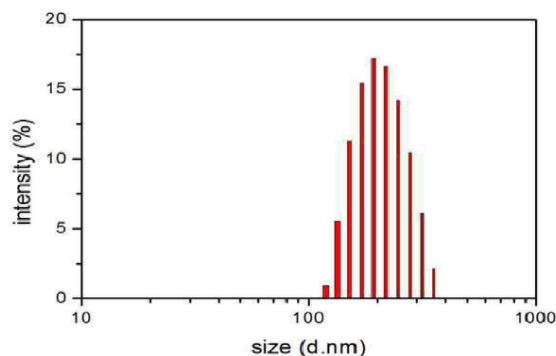
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 항암제를 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자를 이용한 간동맥 화학색전술용 조성물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 간동맥 화학색전술에 사용되는 항암제인 아드리아마이신을 대신하여 아드리아마이신을 효과적으로 담지하는 생체 단백질인 인간 혈청 알부민 기반의 나노입자를 개발하여 간동맥 화학색전술의 효과를 비약적으로 상승시키는 것을 목적으로 한다. 이러한 아드리아마이신을 담지하는 인간 혈청 알부민 나노입자는 약물을 효과적으로 세포에 집중 침투시킬 뿐만 아니라, 입자로부터 지속적인 약물 방출효과를 이용하여 장기간 치료효과를 유도할 수 있는 시너지 효과를 가진다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/396 (2013.01)

A61K 31/7068 (2013.01)

A61K 49/04 (2013.01)

A61K 49/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201653008

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 유망보건의료기술사업

연구과제명 간암의 경동맥화학색전술 치료를 위한 항암제 함유 나노입자-마이크로버블 기반 차세대 약물 전달 시스템의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

색전물질; 및

수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물.

청구항 2

색전물질;

마이크로버블; 및

상기 마이크로버블 표면에 결합되고 수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 색전물질은 리피오돌인, 간동맥색전술용 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 수용성 항암제는 마이토마이신, 시스플라틴, 아드리아마이신, 및 젬시타빈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 간동맥색전술용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 색전물질 대 나노입자의 부피비는 1:1 내지 4:1인 것을 특징으로 하는 간동맥색전술용 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 색전물질 대 나노입자와 마이크로버블의 부피비는 1:1 내지 4:1인, 간동맥색전술용 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 수용성 항암제의 농도는 1~20mg/mL인, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 나노입자의 농도는 10~50mg/mL인, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 9

수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자를 Computed Tomography 및 X-ray 조영제에 분산시키는 단계;

상기 분산된 나노입자와 색전물질을 혼합하는 단계;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 10

수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자를 Computed Tomography 및 X-ray 조영제에 분산시키는 단계;

상기 분산된 나노입자를 마이크로버블과 혼합하는 단계; 및

상기 나노입자와 마이크로버블의 혼합물과 색전물질을 혼합하는 단계;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

Computed Tomography 및 X-ray조영제는 이오파미돌(Iopamidol) 및 파미레이(Pamiray)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 12

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 색전물질은 리피오돌인, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 13

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 수용성 항암제는 마이토마이신, 시스플라틴, 아드리아마이신, 및 젬시타빈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 색전물질 대 나노입자의 부피비는 1:1 내지 4:1인 것을 특징으로 하는 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 색전물질 대 나노입자와 마이크로버블의 부피비는 1:1 내지 4:1인, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

청구항 16

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 나노입자는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법:

인간 혈청 알부민과 수용성 항암제의 혼합물을 제조하는 단계;

상기 제조한 혼합물의 산도(pH)를 조절하는 단계;

상기 산도를 조절한 혼합물을 탈용매화 물질(desolvation material)로 적정하는 단계;

상기 적정한 혼합물에 입자안정화 물질을 첨가하는 단계;

상기 입자 안정화 물질을 첨가한 후 탈용매화 물질을 기화시키는 단계; 및

상기 기화된 혼합물을 원심분리하는 단계.

청구항 17

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 나노입자는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법:

인간 혈청 알부민을 증류수에 용해시키는 단계;

상기 용해시킨 물질의 산도를 조절하는 단계;

상기 산도를 조절한 물질을 탈용매화 물질로 적정하는 단계;

상기 탈용매화 물질로 적정한 혼합물에 입자안정화 물질을 첨가하는 단계;

상기 탈용매화 물질을 기화시키는 단계;

상기 기화된 혼합물을 원심분리하는 단계; 및

상기 원심분리한 물질에 수용성 항암제를 첨가하여 반응시키는 단계.

청구항 18

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 나노입자는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법:

인간 혈청 알부민을 증류수에 용해시키는 단계;

상기 용해시킨 물질의 산도를 조절하는 단계;

상기 산도를 조절한 물질에 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolidine)을 첨가하는 단계;

상기 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolidine)을 첨가하는 단계 후 원심분리하는 단계;

상기 원심분리 후 수용성 항암제를 첨가하는 단계; 및

상기 수용성 항암제 첨가 후 탈용매화물질로 적정하는 단계.

청구항 19

청구항 16 내지 18 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자의 제조방법은,

진공 상태에서 동결건조시켜 파우더 형태의 나노입자를 형성하는 단계를 더 포함하는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간동맥 화학색전술에 대한 것으로 항암제를 효과적으로 담지하는 생체 단백질인 인간 혈청 알부민(human serum albumin) 기반의 나노입자를 개발하여 간동맥 화학색전술의 효과를 비약적으로 상승시키는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 영상기술이 발전하여 몸 안에 숨어있는 암의 정확한 위치를 찾아내어 방사선 조사, 내시경 수술 등 여러 가지 방법으로 제거할 수 있게 되었다. 하지만, 암의 위치를 정확히 발견하더라도 암이 전체 장기에 퍼져있거나, 다른 장기와 붙어 있는 경우 등 여러 가지 이유로 인해 수술적 제거가 불가능한 경우가 있다. 간암, 췌장암 등의 경우 발견하더라도 수술적 근치가 불가능한 경우가 많다.

[0003] 현재, 간 종양의 치료에 가장 많이 시행되고 있는 시술인 화학색전술은 간 종양에 영양을 공급하는 동맥을 찾아 항암제를 투여한 다음 혈관을 막아주는 치료법이다. 간 조직은 소장 및 대장 등을 돌아 나오는 문맥(portalvein)과 대동맥에서 직접 나오는 간동맥을 통하여 산소와 영양을 공급받는데, 정상 간 조직은 주로 문맥에서, 종양 조직은 주로 간동맥에서 혈액을 공급받는다. 따라서, 종양에 영양을 공급하는 간동맥에 항암제를 투여하고 혈관을 막아주면 정상 간 조직에 해를 입히지 않으면서 종양만을 선택적으로 괴사시킬 수 있다. 이러한 치료법은 암의 진행 정도에 따른 제약이 없어 적용범위가 넓고, 치료 대상의 제한이 적은 등 장점이 많기

때문에 현재 간암 치료율 향상에 가장 큰 기여를 하고 있는 방법이다. 화학색전술은 먼저 서혜부에 위치한 대퇴동맥에 카테터를 삽입하여 간동맥으로 접근한 후 혈관 조영제를 주사하여 종양의 위치, 크기 및 혈액 공급 양상 등 치료에 필요한 정보를 얻고, 치료 방침이 정해지면 약 1 mm 정도 굵기의 가는 관을 카테터에 삽입하여 표적이 되는 동맥을 찾아 시술한다.

[0004] 다만, 종래의 간동맥 화학 색전술에 따르면, 색전 물질이 일정시간 이후에 씻겨져 나간다는 한계를 나타내고, 혈관을 따라 순환하며 약물을 전신으로 퍼뜨려 정상세포의 사멸과 같은 부작용을 수반한다는 문제점이 있다.

[0005] 이를 해결하기 위하여 본 발명자는 현재 간동맥 화학색전술에 사용되는 항암제인 아드리아마이신을 대신하여 아드리아마이신을 효과적으로 담지하는 생체 단백질인 인간 혈청 알부민(human serum albumin) 기반의 나노입자(크기; 약 100-300 nm)를 개발하여, 간동맥 화학색전술에 적용함으로써 간동맥 화학색전술의 효과가 비약적으로 상승되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 기존의 간동맥화학색전술에 사용된 물질이 색전시행 후 색전 물질이 일정시간 이후에 씻겨져 나간다는 한계를 나타내는바 이를 해결하며 동시에 지속적인 약물방출에 의하여 약효를 장시간 지속시켜 항암치료의 효과를 향상시키기 위한 발명이다.

[0007] 또한 본 발명은 상기의 한계로 인하여 혈관을 따라 순환하여 약물을 전신으로 퍼뜨려 정상세포의 사멸과 같은 부작용을 수반한다는 문제점이 있는 바 이를 해결하기 위한 것이다.

[0008] 구체적으로 본 발명은 현재 간동맥 화학색전술에 사용되는 항암제를 대신하여 항암제를 효과적으로 담지하는 생체 단백질인 인간 혈청 알부민(human serum albumin) 기반의 나노입자(크기; 약 100-300 nm)를 개발하여, 간동맥 화학색전술에 적용되는 새로운 조성물 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 구현 예는 색전물질; 및 수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 다른 구현 예는 색전물질; 마이크로버블; 및 상기 마이크로버블 표면에 결합되고 수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물을 제공한다.

[0011] 바람직하게는, 상기 색전물질은 리피오돌이다.

[0012] 상기 수용성 항암제는 마이토마이신, 시스플라틴, 아드리아마이신, 및 젬시타빈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0013] 상기 색전물질 대 나노입자의 부피비는 1:1 내지 4:1 일 수 있다.

[0014] 또한, 상기 색전물질 대 나노입자와 마이크로버블의 부피비는 1:1 내지 4:1이다.

[0015] 상기 수용성 항암제의 농도는 1~20mg/mL 일 수 있다.

[0016] 상기 나노입자의 농도는 10~50mg/mL 일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현 예는, 수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자를 Computed Tomography 및 X-ray 조영제에 분산시키는 단계; 및 상기 분산된 나노입자와 색전물질을 혼합하는 단계;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현 예는 수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자를 Computed Tomography 및 X-ray 조영제에 분산시키는 단계; 상기 분산된 나노입자를 마이크로버블과 혼합하는 단계; 및 상기 나노입자와 마이크로버블의 혼합물과 색전물질을 혼합하는 단계;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0019] 상기 Computed Tomography 및 X-ray 조영제는 이오파미돌(Iopamidol) 및 파미레이(Pamiray)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

- [0020] 또한, 상기 나노입자는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0021] 인간 혈청 알부민과 수용성 항암제의 혼합물을 제조하는 단계; 상기 제조한 혼합물의 산도(pH)를 조절하는 단계; 상기 산도를 조절한 혼합물을 탈용매화 물질(desolvation material)로 적정하는 단계; 상기 적정한 혼합물에 입자안정화 물질을 첨가하는 단계; 상기 입자 안정화 물질을 첨가한 후 탈용매화 물질을 기화시키는 단계; 및 상기 기화된 혼합물을 원심분리하는 단계.
- [0022] 다른 한편으로, 상기 나노입자의 제조방법은 하기 단계를 포함할 수 있다.
- [0023] 인간 혈청 알부민을 증류수에 용해시키는 단계; 상기 용해시킨 물질의 산도를 조절하는 단계; 상기 산도를 조절한 물질을 탈용매화 물질로 적정하는 단계; 상기 탈용매화 물질로 적정한 혼합물에 입자안정화 물질을 첨가하는 단계; 상기 탈용매화 물질을 기화시키는 단계; 상기 기화된 혼합물을 원심분리하는 단계; 및 상기 원심분리한 물질에 수용성 항암제를 첨가하여 반응시키는 단계.
- [0024] 또는, 상기 나노입자의 제조방법은 하기 단계를 포함할 수 있다.
- [0025] 인간 혈청 알부민을 증류수에 용해시키는 단계; 상기 용해시킨 물질의 산도를 조절하는 단계; 상기 산도를 조절한 물질에 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolidine)을 첨가하는 단계; 상기 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolidine)을 첨가하는 단계 후 원심분리하는 단계; 상기 원심분리 후 수용성 항암제를 첨가하는 단계; 및 상기 수용성 항암제 첨가 후 탈용매화물질로 적정하는 단계.
- [0026] 또는, 상기 나노입자의 제조방법은 하기 단계를 포함할 수 있다.
- [0027] 수용성 항암제를 클로로포름(chloroform)에 용해시키는 단계; 상기 용해시킨 물질에 인간혈청알부민을 첨가하는 단계; 상기 인간혈청알부민을 첨가 후 보어텍싱(vortexing)하는 단계; 상기 보어텍싱하는 단계 후 초음파처리(ultrasonification)하는 단계; 상기 초음파처리하는 단계 후 클로로포름을 증발(evaporation)시키는 단계; 및 상기 증발시킨 물질을 원심분리하는 단계.
- [0028] 또한, 상기 나노입자의 제조방법은, 진공 상태에서 동결건조시켜 파우더 제형의 나노입자를 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명은 기존 발명에 비하여 간동맥 화학색전술의 효과를 비약적으로 상승시켰다. 구체적으로 인간혈청 알부민 나노입자는 약물을 효과적으로 세포에 집중 침투시킬 뿐만 아니라, 입자로부터 지속적인 약물 방출효과를 이용하여 장기간 치료효과를 유도할 수 있다.
- [0030] 또한 간암환자는 일반적으로 알부민을 만들어낼 수 없는데 본 발명의 경우 인간혈청 알부민 기반의 나노입자를 사용함으로써 간암환자에게 알부민을 주입하는 효과까지 유도할 수 있어 복수의 유발을 억제할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자 1의 크기 분포를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자 2의 크기 분포를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자 3의 크기 분포를 나타낸 그래프이다.
- 도 4은 도세탁셀을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 크기 분포를 나타낸 그래프이다.
- 도 5은 파클리탁셀을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 크기 분포를 나타낸 그래프이다.
- 도 6는 Group 1의 시간에 따른 약물 방출 거동 분석을 나타낸 그래프이다.
- 도 7는 Group 2의 시간에 따른 약물 방출 거동 분석을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 Group 2의 형광 이미지(Red:아드리아마이신)를 나타낸 사진이다.
- 도 9은 간동맥 화학 색전술에 의한 3일, 7일 후의 항암효과를 비교 분석한 사진이다.
- 도 10은 in vitro release가 모두 마친 상태에서의 아드리아마이신 담지 인간혈청 알부민 나노입자를 이용하여

cell viability를 수행한 결과를 보여주는 사진이다.

도 11은 본 발명의 일 구현 예에 따른 제형의 DIC 이미지를 나타낸다.

도 12는 본 발명의 일 구현 예에 따른 제형의 간암 치료 효능 데이터를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 먼저 본 발명의 실시를 위하여 필요한 개념에 대하여 간략히 설명한다.
- [0033] 증류수의 종류는 몇 번 정제한 증류수인가에 따라 1차, 2차, 3차 증류수로 나뉜다. 본원발명에 사용되는 증류수는 3차 증류수로서 유기물 및 이온을 제거한 물입니다. 유기물에 대한 영향이 큰 생물학 관련발명이므로 3차 증류수를 사용한 것이다.
- [0034] 간은 간동맥과 문맥으로부터 이중 혈류공급을 받는 기관이다. 정상적인 간조직은 70-80%의 혈류와 50%의 필요 산소량을 문맥으로부터 공급받는 반면, 간세포암은 대부분 과혈관성 종양으로 90% 이상의 혈액을 간동맥으로부터 공급받는다. 따라서, 간동맥을 통하여 치료물질을 주입하면 정상 간조직에 비하여 간세포암에 고농도로 투여되고, 색전물질을 주입하여 간동맥 혈류를 비선택적으로 차단하였을 때에도 간세포암에만 심한 허혈이 초래되므로 비교적 선택적인 종양치료가 가능하다. 이것이 간동맥을 통한 간세포암치료법에 공통적으로 적용되는 이론적 근거이다.
- [0035] 구체적으로 본 발명에 대하여 살펴보면 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 색전물질과 항암제를 담지한 인간혈청 알부민(Human Serum albumin)을 포함하는 간동맥색전술용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명에 따르면, 아드리아마이신을 담지하는 인간 혈청 알부민 나노입자가 담지한 항암제를 입자로부터 지속적으로 방출하는 효과와 함께, 나노크기 입자의 암 종양 주변 혈관벽과 암세포에 과 발현된 리셉터(예: glycoprotein60)를 이용한 트랜스사이토시스(Transcytosis) 기작에 의해 암종양 조직 및 암세포 내로 효율적으로 침투시키는 효과로, 기존의 간동맥화학색전술의 단점인 정상조직으로의 항암제 노출을 최소화하고 장기간 치료효과를 유도할 수 있는 시너지 효과를 일으킨다.
- [0037] 상기 색전물질에 사용되는 것은 Oil 조영제로서 특히 리피오돌인 것이 바람직하다.
- [0038] 상기 항암제는 난용성 항암제 또는 수용성 항암제일 수 있다.
- [0039] 상기 수용성 항암제는 마이트마이신, 시스플라틴, 아드리아마이신인 것을 특징으로 한다.
- [0040] 상기 수용성 항암제는 인간혈청알부민과 정전기적 인력을 통하여 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0041] 상기 난용성 항암제는 도세탁셀(Docetaxel), 파클리탁셀(Paclitaxel), 캄토세신(Camptothecin), 타목시펜(Tamoxifen), 5-플루오로우라실(5-FU), 류프로리드(Leuprolide), 플로타미드(Flutamide), 빈크리스틴(Vincristine), 비노렐빈(Vinorelbine), 발루비신(Valrubicin), 메클로레타민(Meclorethamine), 부술판(Busulfan), 등이며 인간혈청알부민과는 소수성-소수성 인력에 의하여 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0042] 상기 색전물질과 항암제를 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 부피비는 1:1 내지 4:1인 것을 특징으로 한다.
- [0043] 한편 상기 과제를 해결하기 위하여 수용성 항암제를 담지한 인간혈청 알부민 나노입자의 첫 번째 제조방법은, 인간 혈청 알부민과 항암제를 3차 증류수에 녹여 혼합물을 제조하는 단계; 상기 제조된 혼합물의 산도(pH)를 조절하는 단계; 상기 산도를 조절한 혼합물을 탈용매화물질(desolvation material)로 적정하는 단계; 상기 적정한 혼합물에 입자안정화 물질을 첨가하는 단계; 상기 입자안정화 물질을 첨가한 후 탈용매화 물질을 기화시키는 단계; 및 상기 기화된 혼합물을 원심분리하는 단계를 포함한다.
- [0044] 다른 한편으로는 인간 혈청 알부민을 3차 증류수에 용해시키는 단계; 상기 용해시킨 물질의 산도를 조절하는 단계; 상기 pH를 조절한 물질을 탈용매화 물질로 적정하는 단계; 상기 탈용매화 물질로 적정한 혼합물에 입자안정화 물질을 첨가하는 단계; 상기 입자안정화 물질을 첨가한 후 탈용매화 물질을 기화시키는 단계; 상기 기화된 혼합물을 원심분리하는 단계; 및 상기 원심분리한 물질에 항암제를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함한다.
- [0045] 상기 항암제의 농도는 1~20mg/mL인 것을 특징으로 한다.
- [0046] 상기 인간 혈청 알부민의 농도는 10~50mg/mL인 것을 특징으로 한다.
- [0047] 상기 산도를 조절하는 단계는 산도가 8~8.5인 것을 특징으로 한다.

- [0048] 상기 탈용매화 물질은 에탄올이며 상기 입자 안정화 물질은 알데하이드계(aldehyde), 아민계(amine), 카르복실계(carboxyl), 싸이올(thiol)인 것을 특징으로 한다.
- [0049] 상기 원심분리단계는 10000~15000rpm으로 8~12분간 원심분리하는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 2~4번 원심분리하는 것을 반복하는 것이 좋다.
- [0050] 한편 상기 과제를 해결하기 위하여 수용성항암제를 담지한 인간혈청 알부민 나노입자의 세 번째 제조방법으로 인간 혈청 알부민을 3차 증류수에 용해시키는 단계; 상기 용해시킨 물질에 산도를 조절하는 단계; 상기 산도를 조절한 물질에 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolindine)을 첨가하는 단계; 상기 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolindine)을 첨가하는 단계 후 원심분리하는 단계; 상기 원심분리하는 단계 후 항암제를 첨가하는 단계; 및 상기 항암제를 첨가하는 단계 후 탈용매화물질로 적정하는 단계를 포함하는 간동맥색전술용 조성물의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0051] 상기 항암제는 수용성 항암제이며 구체적으로 마이토마이신, 시스플라틴, 아드리아마이신인 것이 바람직하며 그 농도는 1~10mg/mL인 것을 특징으로 한다.
- [0052] 상기 인간 혈청 알부민 나노입자의 농도는 10~50mg/mL인 것을 특징으로 한다.
- [0053] 상기 산도를 조절하는 단계는 산도가 8~8.5인 것을 특징으로 한다.
- [0054] 상기 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolindine)을 첨가하는 단계에 사용되는 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolindine)의 양은 인간혈청 알부민과 2-이미노-싸아졸린딘(2-imino-thiazolindine) 몰비율이 1 : 10 - 30 인 것을 특징으로 한다.
- [0055] 상기 원심분리단계는 3000~5000rpm으로 2~4분간 원심분리하는 것을 특징으로 한다.
- [0056] 한편 상기 과제를 해결하기 위하여 난용성 항암제를 담지한 인간혈청 알부민 나노입자 제조방법은 항암제를 클로로포름(chloroform)에 용해시키는 단계; 상기 용해시킨 물질에 인간혈청알부민을 첨가하는 단계; 상기 인간혈청알부민을 첨가 후 보어텍싱(vortexing)하는 단계; 상기 보어텍싱하는 단계 후 초음파처리(ultrasonification)하는 단계; 상기 초음파처리하는 단계 후 클로로포름을 증발(evaporation)시키는 단계; 및 상기 증발시킨 물질을 원심분리하는 단계를 포함한다.
- [0057] 상기 항암제는 난용성 항암제이며 구체적으로는 도세탁셀(docetaxel) 또는 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(Docetaxel), 파클리탁셀(Paclitaxel), 캄토세신(Camptothecin), 타목시펜(Tamoxifen), 5-플루오로우라실(5-FU), 류프로리드(Leuprolide), 플로타미드(Flutamide), 빈크리스틴(Vincristine), 비노렐빈(Vinorelbine), 발루비신(Valrubicin), 메클로레타민(Meclorothamine), 부숴판(Busulfan), 등 인 것이 바람직하며 그 농도는 1~10mg/mL 인 것을 특징으로 한다.
- [0058] 상기 인간 혈청 알부민 나노입자의 농도는 10~50mg/mL인 것을 특징으로 한다.
- [0059] 상기 원심분리단계는 10000~15000rpm으로 8~12분간 원심분리하며 이 과정을 2~4번 반복하는 것을 특징으로 한다.
- [0060] 상기 4가지 방법을 통하여 수용성항암제 또는 난용성항암제를 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자를 제조하였다.
- [0061] 이러한 인간 혈청 알부민 나노입자는 그 크기가 100~300nm, 바람직하게는 200nm인 것을 특징으로 한다.
- [0062] 또한 이를 간동맥화학색전술에 적용되기 위해서는 용매를 Computed Tomography 및 X-ray 조영제로 교체하여야 한다. 따라서 입자를 동결건조시켜 powder form으로 제형을 변화시키기 위하여 1~5%의 cryo-protection materials를 첨가 후, -70 이하에서 먼저 동결 시킨 후, -70, 진공 상태에서 동결건조를시켜 powder form으로 제형을 변화시킨다. 이 때에 사용되는 cryo-protection materials는 polyethylene glycol(PEG), sucrose, dextran 등이 사용될 수 있다.
- [0063] 동결 건조된 항암제 함유 인간혈청알부민 입자를 재분산시키기 위한 Computed Tomography 및 X-ray 조영제는 이오파미돌(Iopamidol), 파미레이(Pamiray) 등이 있으며 비중에 따라 다양하게 선택될 수 있다. 비중의 선택은 리피오돌과 항암제 함유 인간혈청 알부민 나노입자가 에멀전으로 고르게 분산될 수 있는 비중의 조영제를 선택하여 파우더 제형의 항암제 함유 인간혈청 알부민 나노입자를 용해 시킨다.
- [0064] 동결건조된 항암제 함유 인간혈청알부민 입자를 위의 조영제로 재분산시킨 후, 리피오돌과 1 : 1~4 비율(Vol:Vol)로 혼합한 이후, 3 way pumping을 통하여 항암제 함유 인간혈청알부민 입자/리피오돌 에멀전을 제조한다.

다.

[0065] 본 발명의 다른 구현 예는 색전물질; 마이크로버블; 및 상기 마이크로버블 표면에 결합되고 수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물을 제공한다. 이처럼 마이크로버블에 나노입자를 결합시킴으로써 마이크로버블을 이용한 조영 효과까지 얻을 수 있어 바람직하다.

[0066] 본 발명의 다른 구현 예는 수용성 항암제를 담지하는 인간 혈청 알부민(Human Serum albumin) 나노입자를 Computed Tomography 및 X-ray 조영제에 분산시키는 단계; 상기 분산된 나노입자를 마이크로버블과 혼합하는 단계; 및 상기 나노입자와 마이크로버블의 혼합물과 색전물질을 혼합하는 단계;를 포함하는, 간동맥색전술용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0067] 상기 간동맥색전술용 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 구체적인 구성에 대하여 앞서 검토한 바와 동일한 내용이 적용될 수 있다.

[0068] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서의 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0069] 제조예 1

[0070] 친수성 항암제 중 하나인 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 제조방법 1

[0071] 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자는 단백질이 극성차이에 의하여 응집되는 효과를 이용하여 제조될 수 있다. 더욱이 양전하를 띄고 있는 아드리아마이신과 음전하를 띄고 있는 인간 혈청 알부민의 특성을 이용하여 정전기적 결합을 유도함으로써 더욱 효과적으로 아드리아마이신을 담지 할 수 있다. 실험방법에 따라 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자는 3가지 형태로 제작될 수 있다.

[0072] 1.1 제조방법.

[0073] 150mg의 인간혈청 알부민과 5mg의 아드리아마이신을 3mL의 3차 증류수에 녹인 후, 아드리아마이신이 효과적으로 인간 혈청 알부민과 결합될 수 있도록 약 2시간 동안 stirring을 수행한다. 이 후, 인간혈청 알부민, 아드리아마이신 혼합액에 pH를 약 8.0-8.5로 조절하기 위하여 pH meter를 이용하여 NaOH를 첨가하면서 조절한다. 이 후, 아드리아마이신이 결합된 인간 혈청 알부민이 나노미터 크기로 응집될 수 있도록 에탄올을 적정한다. 응집이 되는 것은 용액의 혼탁도의 변화로 관찰 할 수 있음. 5mL을 적정한 결과 용액의 혼탁도가 변하는 관찰한 이후 응집된 아드리아마이신이 결합된 인간혈청 알부민을 cross-linking시켜 안정화를 유도하기 위하여 glutaraldehyde를 첨가한다. 첨가된 glutaraldehyde는 8%의 용액으로 10 μ L가 첨가된다. 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 안정성은 glutaraldehyde의 첨가량에 따라 조절될 수 있다. 이 후, overnight동안 stirring을 수행하여 충분히 반응 시켜 줌과 동시에 적정된 에탄올을 기화시키는 과정을 수행한다. 충분히 반응하여 안정화된 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자만을 획득하기 위하여 12000rpm으로 10분 동안 원심분리를 수행하여 입자화되지 않은 아드리아마이신이 결합된 인간혈청 알부민을 제거하며, 세 차례 반복하여 순도를 높인다.

[0074] 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 크기는 dynamic light scattering 방법을 이용하여 측정할 수 있으며 전자 현미경 이미지를 통해 나노입자형태의 morphology를 관찰할 수 있다. 또한, 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자에 담지된 아드리아마이신의 정량분석은 최초 투여한 아드리아마이신의 양과 담지되지 않은 아드리아마이신의 차에 의해 산출 될 수 있으며 담지되지 않은 아드리아마이신은 HPLC를 이용하여 정량 분석 할 수 있다.

[0075] 1.2 특징분석

[0076] Dynamic light scattering 방법으로 입자의 크기를 분석한 결과 200.4 $\pm$ 50.7 nm의 크기를 나타내고 있으며, 크기분포도 역시 균일한 입자 분포를 나타내고 있다. 또한, 입자 내 담지된 아드리아마이신의 효과는 약 89.64%의 담지 효과를 나타내고 있다.

[0077] 제조예 2

[0078] 친수성 항암제 중 하나인 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 제조방법 2

[0079]

2.1 제조방법

[0080]

본 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자 2는 위에서 개발된 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자 1에서 약간 변화된 제형으로 안정화시켜 주기 위해 투여된 glutaraldehyde 대신 disulfide bond를 유도하여 제작된 제형이다. Disulfide bond는 인간 혈청 알부민에 thiol기를 2-imino thiazolindine을 반응시켜 유도하여 수행된다. Thiol 기를 유도하기 위하여 먼저 150mg의 인간혈청 알부민을 3mL의 3차 증류수에 녹인 후 pH를 8.0-8.5로 조절한다. 이 후, 2-imino thiazolindine을 6mg를 넣고 1시간 동안 반응 시켜 인간 혈청 알부민에 thiol기를 도입한다. 충분히 반응시켜 준 후, 도입되지 않은 2-imino thiazolindine을 제거하기 위하여 3000 Da membrane을 이용하여 원심분리를 4000rpm에서 3분 동안 수행함으로써 제거한다. 분리되지 않은 thiol기가 유도된 인간 혈청 알부민에 5mg의 아드리아마이신을 첨가하여 1시간 동안 stirring 하여 효과적으로 thiol기가 유도된 인간 혈청 알부민에 결합한다. 이 후, 에탄올을 약 5mL을 적정하여 overnight 교반한다.

[0081]

이 후 아드리아마이신이 담지된 인간혈청 알부민 나노입자의 순도를 높혀 채취하는 과정 및 분석 방법은 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자 1의 공정과 동일하다.

[0082]

2.2 특징분석

[0083]

Dynamic light scattering 방법으로 입자의 크기를 분석한 결과 193.8 ± 69.7 nm의 크기를 나타내고 있으며, 크기분포도 역시 균일한 입자 분포를 나타내고 있다. 또한, 입자 내 담지된 아드리아마이신의 효과는 약 70.35%의 담지효과를 나타내고 있다.

[0084]

제조예 3

[0085]

친수성 항암제 중 하나인 아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 제조방법 3

[0086]

3.1 제조방법.

[0087]

아드리아마이신을 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자 3의 경우 아드리아마이신이 인간혈청 알부민에 효과적으로 정전기적 힘에 의하여 결합되는 성질을 이용하여 담지시키는 방법으로 제조된다. 먼저 아드리아마이신이 담지되지 않은 인간 혈청 알부민 나노입자를 제조하기 위하여 150mg의 인간 혈청 알부민을 3mL의 3차 증류수에 용해시켜 지속적으로 stirring을 수행한다. 충분히 녹인 후 NaOH를 이용하여 pH를 8.0-8.5로 조절한다. 이 후 인간 혈청 알부민을 응집시키기 위하여 에탄올을 약 5mL 적정한 이 후 cross-linking 시켜주기 위하여 8%-glutaraldehyde를 10 μ L 첨가하여 overnight동안 stirring을 수행한다. 충분히 overnight동안 cross-linking 반응을 시켜 준 이 후, 제작된 인간 혈청 알부민 입자만 취득하기 위하여 12000 rpm으로 10분간 원심 분리를 시켜 입자화 되지 않은 인간 혈청 알부민을 제거한다. 취득된 인간 혈청 알부민 나노입자에 아드리아마이신을 담지시키기 위하여 아드리아마이신 5mg을 인간 혈청 알부민 나노입자에 첨가하여 1시간 동안 반응시킨다.

[0088]

3.2 특징분석

[0089]

Dynamic light scattering 방법으로 입자의 크기를 분석한 결과 246.9 ± 79.3 nm의 크기를 나타내고 있으며, 크기분포도 역시 균일한 입자 분포를 나타내고 있다. 또한, 입자 내 담지된 아드리아마이신의 효과는 약 45.95%의 담지 효과를 나타내고 있다.

[0090]

제조예 4

[0091]

난용성항암제(도세탁셀; Docetaxel)를 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 제조방법

[0092]

소수성 항암제를 효과적으로 담지하는 인간혈청 알부민 나노입자 제조방법은 다음 아래와 같다. 소수성 항암제인 Docetaxel을 10 mg/mL의 농도로 chloroform에 용해 시켜 stock solution을 제조한다. 또한, 인간 혈청 알부민 용액을 50 mg/mL의 농도로 3mL 제조한 후 이전에 준비한 paclitaxel 또는 docetaxel stock solution을 100-200 μ L를 추가하여 high speed로 vortexing을 해준다. Vortexing하여 작은 크기의 chloroform에 녹아있는 docetaxel emulsion을 제조한 후 이어서 ultrasonication을 100% amplitude에 1 cycle 조건으로 2분간 수행함으로써 내부에 항암제 용액을 담지하며 인간 혈청 알부민 shell로 구성된 에멀전을 제조한다. 제조된 emulsion이 HSA로 코팅이 된 것을 확인한 이 후, 진공상태에서 overnight동안 chloroform을 evaporation시킨다. 이 때 중요한 것은 chloroform이 빠르게 기화하여 폭발하는 것을 방지하여야 한다. Chloroform이 완전히 제거된 이 후 12000rpm에서 10분간 centrifugation하여 입자화 되지 않은 인간 혈청 알부민과 docetaxel을 제거한다. 이 과정을 3번 반복하여 확실하게 제조된 docetaxel이 함유된 인간 혈청 알부민 나노입자만을 취득한다.

[0093] **제조예 5**

[0094] **난용성항암제(파클리 탁셀; Paclitaxel)를 담지한 인간 혈청 알부민 나노입자의 제조방법**

[0095] 소수성 항암제를 효과적으로 담지하는 인간혈청 알부민 나노입자 제조방법은 다음 아래와 같다. 소수성 항암제인 Paclitaxel을 10 mg/mL의 농도로 chloroform에 용해 시켜 stock solution을 제조한다. 또한, 인간 혈청 알부민 용액을 50 mg/mL의 농도로 3mL 제조한 후 이전에 준비한 paclitaxel stock solution을 100-200 μ L을 추가하여 high speed로 vortexing을 해준다. Vortexing하여 작은 크기의 chloroform에 녹아있는 Paclitaxel emulsion을 제조한 후 이어서 ultrasonication을 100% amplitude에 1 cycle 조건으로 2분간 수행함으로써 내부에 항암제 용액을 담지하며 인간 혈청 알부민 shell로 구성된 에멀전을 제조한다. 제조된 emulsion이 HSA로 코팅이 된 것을 확인한 이 후, 진공상태에서 overnight동안 chloroform을 evaporation시킨다. 이 때 중요한 것은 chloroform이 빠르게 기화하여 폭발하는 것을 방지하여야 한다. Chloroform이 완전히 제거된 이 후 12000rpm에서 10분간 centrifugation하여 입자화 되지 않은 인간 혈청 알부민과 docetaxel을 제거한다. 이 과정을 3번 반복하여 확실하게 제조된 Paclitaxel이 함유된 인간 혈청 알부민 나노입자만을 취득한다.

[0096] **실험예 1 - 약물 방출 거동 실험 분석**

[0097] 간동맥 화학색전술에 적용이 되어 아드리아마이신이 결합된 인간 혈청 알부민 나노입자가 충분히 장시간동안 약물을 방출하여 약효를 지속시키는 효과를 검증하기 위하여 먼저 in vitro 에서 아드리아마이신이 결합된 인간 혈청 알부민 나노입자 1,2,3의 약물 방출 거동을 분석한다. 또한, 간동맥 화학 색전술에서 시행되는 방법과 동일한 방법으로 색전 물질인 리피오돌과 비울별로 혼합하여 에멀전형태로 변화시켜 방출되는 아드리아마이신을 정량 분석함으로써 약물 방출 거동을 측정한다.

[0098] **1.1 실험방법**

[0099] 아드리아마이신이 결합된 인간 혈청 알부민 나노입자로부터 방출되는 아드리아마이신을 분석하기 위하여 2000 Da 크기의 dialysis membrane에 제조된 시료를 1mL (아드리아마이신 함유량: 5mg) 주입하여 완벽히 밀봉한다. 이것을 10mL의 phosphate buffer saline이 들어있는 tube에 넣고 37에서 shaking시켜 주어 지정된 time point에 dialysis membrane을 10mL의 phosphate buffer saline이 들어있는 tube로 옮겨주어 time point마다 sample을 획득한다. 준비된 시료의 group은 아래와 같다.

[0100] group 1. - free Adriamycin in phosphate buffer saline (free DOX (PBS)) or contrast media (free DOX(Pamiray))

[0101] - free Adriamycin & lipiodol with volume ratio of 1:4 (free DOX (1:4))

[0102] - 인산완충식염수 (DOX-HSA-NPs (PBS)) 또는 조영제 (DOX-HSA-NPs (Pamiray)) 내에, 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자

[0103] - 1:4 (DOX-HSA-NPs (1:4))의 부피비로서, 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자 & 리피오돌

[0104] group 2. - 1:1, 1:2, 1:3 및 1:4의 부피비로서, 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자 & 리피오돌

[0105] **1.2 실험결과**

[0106] <도 6>는 group 1에 대한 약물 방출 거동을 분석한 결과를 보여줌. free 아드리아마이신 군 (free DOX)의 경우 3시간 이내에 대부분 약물이 방출되는 결과를 나타내었으며, 비중이 높은 조영제(pamiray)에 분산된 free 아드리아마이신 군 (free DOX (Pamiray))의 경우 약간 약물 방출 시간을 지연시키는 결과를 도출한다. 또한, 리피오돌과 혼합되어 에멀전이 된 형태의 free 아드리아마이신 군 (free DOX (1:4))의 경우 리피오돌에 감싸져 있는 에멀전 형태로 free DOX (PBS) 군과 free DOX (Pamiray) 군보다 약물 방출의 속도를 감소시켜 지속 방출 효과를 나타낸다.

[0107] free 아드리아마이신 군들과 비교하여 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자 군은 기본적으로 인간 혈청 알부민 나노입자의 특성에 의하여 모두 장시간 지속 방출 효과를 유도할 수 있는 물질로, 모두 지속적 약물 방출 효과를 나타내었다. 대부분 단시간 내에 방출하는 free 아드리아마이신 군들과는 반대로 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자군은 초기에 방출 되는 약물의 양은 모두 1mg이내의 매우 미비한 상태로, 지속적으로 약물을 방출 시켜 장기간치료효과를 기대할 수 있는 제형으로 판단된다. 특히, 리피오돌과 1:4 비율로 혼합되어 에멀전이 된 아드리아마이신 담지 인간 혈청 알부민 나노입자는 초기 시점에 거의 방출되는 효

과를 나타내지 않았으며 서서히 지속 방출 되는 효과가 가장 뛰어나 장기간 약효를 기대할 수 있다.

[0108] 간동맥 화학색전술에 적용을 위하여 리피오돌과의 최적의 혼합 비율을 도출하기 위하여 리피오돌과의 혼합 비율을 1:1, 1:2, 1:3, 1:4로 조절한 결과, <도 7>에서 나타내듯 1:3과 1:4의 비율이 최적의 비율로 도출되었다. 1:1, 1:2 비율의 에멀전은 1:3, 1:4의 비율과 비교하여 단시간 내에 약물이 더욱 방출되는 결과를 도출하였다. 더욱이 <도 8>에서 볼 수 있듯 1:1, 1:2 비율의 에멀전은 리피오돌이 외부에서 아드리아마이신 담지 인간 혈청 알부민 나노입자를 감싸는 형태의 에멀전이 아닌 아드리아마이신 담지 인간 혈청 알부민 나노입자가 외부에서 리피오돌을 감싸는 형태로 색전효과를 크게 기대할 수 없는 제형이다. 따라서 색전효과 및 약물의 지속 방출 효과를 극대화시킬 수 있는 제형은 1:4 비율의 에멀전으로 결론을 도출한다.

[0109] **실험예 2 - 질병 동물 모델을 이용한 간동맥화학색전술에 의한 항암효과 분석**

[0110] 개발된 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자와 리피오돌을 1:4 비율로 혼합시킨 에멀전과 현재 간동맥 화학색전술에서 시행되는 방법으로 아드리아마이신을 리피오돌과 1:4 비율로 혼합시킨 에멀전의 항암효과를 동물 실험을 통하여 검증한다. 동물 모델은 VX2 carcinoma rabbit model로 간에 직접 암세포를 이식하여 성장시키면서 간암 질병 동물 모델을 제작 평가한다.

[0111] **2.1 실험방법**

[0112] VX2 carcinoma rabbit model을 이용하여 rabbit의 artery까지 X-ray 영상을 보면서 catheter를 위치시킨 후, 각각 free 아드리아마이신 & 리피오돌 에멀전(1:4 비율)과 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자 & 리피오돌 에멀전(1:4) 비율을 200 μ l를 주입하여 간동맥 화학 색전술을 시행한다. 이때 각각 전달되는 아드리아마이신의 함량은 1mg으로 동일하며 리피오돌 역시 동일한 용량으로 주입됨으로써 색전술에 의한 항암효과 영향을 동일하게 조절한다. 각각의 시료를 주입한 이후 3일 후, 7일 후 종양을 채취하여 항암 효과를 분석한다. 실험 군은 아래와 같다.

[0113] group - 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자 & 리피오돌 에멀전 (1:4 비율) 3일 후 채취 (001)

[0114] - 아드리아마이신이 담지된 인간 혈청 알부민 나노입자 & 리피오돌 에멀전 (1:4 비율) 7일 후 채취 (002)

[0115] - free 아드리아마이신 & 리피오돌 에멀전 (1:4 비율) 3일 후 채취 (003)

[0116] - free 아드리아마이신 & 리피오돌 에멀전 (1:4 비율) 7일 후 채취 (004)

[0117] **2.2 실험결과**

[0118] <도 9>은 각각 3일 후, 7일 후의 항암 효과를 나타내고 있음. Free 아드리아마이신과 아드리아마이신이 담지된 인간혈청 알부민을 색전술에 적용한 경우, 두 군 모두 효과적으로 간암을 사멸 시키는 결과를 나타내었다. 하지만 free 아드리아마이신을 처리한 경우 7일 후의 결과 (004)에 근거하여 Peripheral 부위에 생존한 암세포를 볼 수 있는 반면, 아드리아마이신이 담지된 인간혈청 알부민을 처리한 군 (002)의 경우 모두 효과적으로 간암세포를 사멸 시킨 결과를 도출하여 간동맥 화학색전술에 의한 효과가 극대화 되었음을 나타내었다. 더욱이 약물의 지속 방출에 의한 효과로 기대되어 장기간 항암효과가 기대된다.

[0119] **실험예 3**

[0120] **In vitro release 마친 상태에서의 cell ciability 수행 결과 데이터분석**

[0121] 위의 실험은 in vitro release가 모두 마친 상태에서의 아드리아마이신 담지 인간혈청 알부민 나노입자를 이용하여 cell viability를 수행한 결과이다. 도 10의 왼쪽사진에서 볼 수 있듯, release가 더 이상 진행되지 않는 시점에서의 아드리아마이신 담지 인간 혈청 알부민 나노입자는 붉은 색을 나타내며 여전히 아드리아마이신을 담지하고 있음을 알 수 있다.

[0122] 이 때의 입자를 이용하여 항암효과를 정량 분석한 결과가 도 10 중간의 그래프로써 여전히 아드리아마이신을 담지한 상태로 존재하는 입자는 세포 내로 들어 갔을 때에 분해되어 여전히 항암효과를 지니고 있어 암세포의 사멸을 유도하였음을 알 수 있다.

[0123] 도 10 우측 사진의 형광 이미지를 근거로 세포핵에서 아드리아마이신이 검출됨을 입증하였다. 즉, 세포내에서 아드리아마이신 인간혈청 알부민 입자가 분해되어 담지하고 있는 아드리아마이신을 유출시키고 유출된 아드리아마이신이 세포핵으로 침투, 항암효과를 유발하였음을 알 수 있다.

[0124] 따라서, 아드리아마이신 담지 인간혈청 알부민 나노입자는 입자에서 유출되는 아드리아마이신이 항암효과를 나

타넬 뿐만 아니라, 입자가 세포내 침투한 이후 알부민 입자가 분해되면서 아드리아마이신이 2차적으로 유출되어 항암효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[0125] **제조예 6 - 마이크로버블의 제조**

[0126] 지질로는 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC), DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-n [poly(ethyleneglycol)]₂₀₀₀-N-hydroxysuccinimide)을 몰 비율 (mole ratio)로 9:1이 되도록 비율을 맞춘 뒤 chloroform 에 녹인 후, rotary evaporator를 이용하여 chloroform 을 완전하게 증발시켜 지질박막을 형성한다.

[0127] 이어서, 0.01M의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)을 지질박막에 첨가하고 온도를 55-60℃로 유지하면서 지질을 녹여 준다. 이후에 C₃F₈ gas를 혼합액이 든 용기에 넣어 충전한 후, 45초 동안 mechanical agitation 을 가하여 마이크로버블을 제작한다.

[0128] **제조예 7 - alb-MB-TACE 형성**

[0129] **7.1. 제조방법**

[0130] 1. Doxorubicin·HCl이 로딩된 인간 혈청 알부민 나노입자 (DOX-HSA NPs) pellet을 일정 농도가 되도록 (예:6.25mg/ml) contrast medium인 pamiray에 분산시킨다. 나노입자가 충분히 분산될 수 있도록 vortexing을 이용한다.

[0131] 2. 마이크로버블 (0.5mg/ml 혹은 1mg/ml)을 제작하여 5ml syringe에 담고 마이크로버블이 담겨있던 유리 vial에 PBS 1ml을 추가로 넣어 남은 마이크로버블을 회수한 뒤 5ml syringe에 담는다.

[0132] 3. 마이크로버블이 담긴 5ml syringe를 원심 분리기에 넣고 (225g, 10분)의 조건으로 상층부에 마이크로버블이 모이도록 한다. 이후에 최상층부의 마이크로버블을 남기고 syringe안의 용액을 버린다.

[0133] 4. 사용할 양 만큼의 DOX-HSA NPs와 마이크로버블을 섞어 충분한 반응이 일어나도록 파이펫팅한다. 이후에 상온에서 1시간 동안 반응시킨다.

[0134] 5. alb-MB-TACE 제형 형성을 위해 pamiray에 녹아 있는 DOX-HSA NPs-MB를 일정량 e-tube 혹은 유리 vial에 넣고 Lipiodol도 비율에 맞춰같은 1.5ml 플라스틱 튜브 혹은 유리 vial에 넣어 vortexing한다. 육안으로 층 분리 없이 충분히 섞인 것을 확인하면서 15~20초간 vortexing 한다.(예: DOX-HSA NPs-MBs in pamiray : lipiodol = 1:2, v/v)

[0135] **7.2. 특징 분석**

[0136] 상기 alb-MB-TACE 제형에 대한 DIC 이미지 및 모식도를 하기 도 11에 나타낸다. 또한, 총 5회 이상 DIC 이미지를 얻은 뒤 현미경 프로그램상에서 각 배율에 대한 scale bar를 이용하여 제형의 평균 크기를 얻은 결과, 17.69 ±6.83 μm 의 평균직경을 가졌다.

[0137] **실험예 4 - 질병 동물 모델을 이용한 간동맥화학색전술에 의한 항암효과 분석**

[0138] 상기 개발된 alb-MB-TACE 제형 에멀전의 항암효과를 동물 실험을 통하여 검증하였다. 동물 모델은 VX2 carcinoma rabbit model로 간에 직접 암세포를 이식하여 성장시키면서 간암 질병 동물 모델을 제작 평가한다.

[0139] **4.1 실험방법**

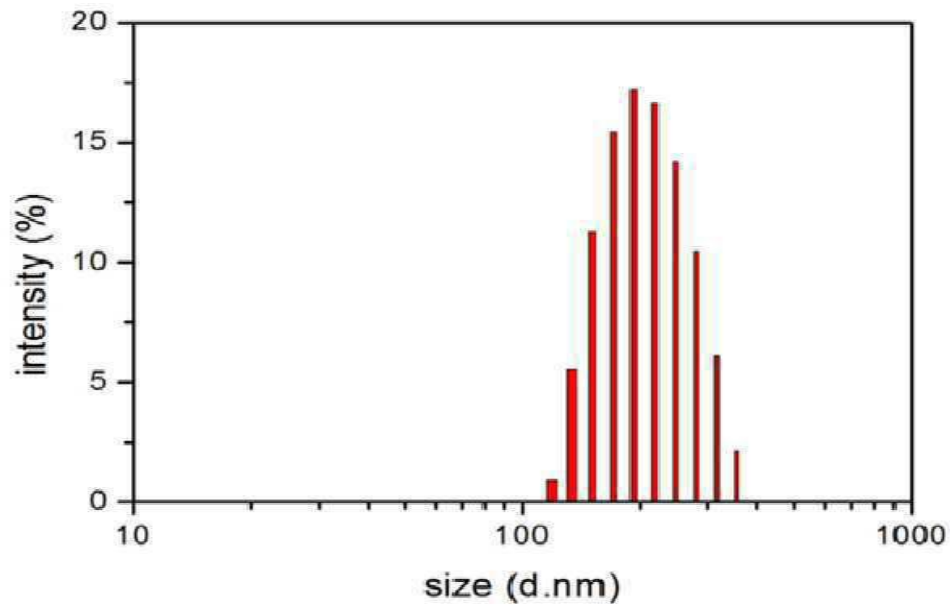
[0140] alb-MB-TACE 제형의 에멀전은 토끼 1마리당 DOX 0.5mg 투여를 목표로 제작되었다. 상기 제형을 토끼에게 주입 후 바로 성인용 convex probe (center frequency 1.8MHz)를 이용하여 초음파를 15분간 가해주었다.

[0141] **4.2 실험결과**

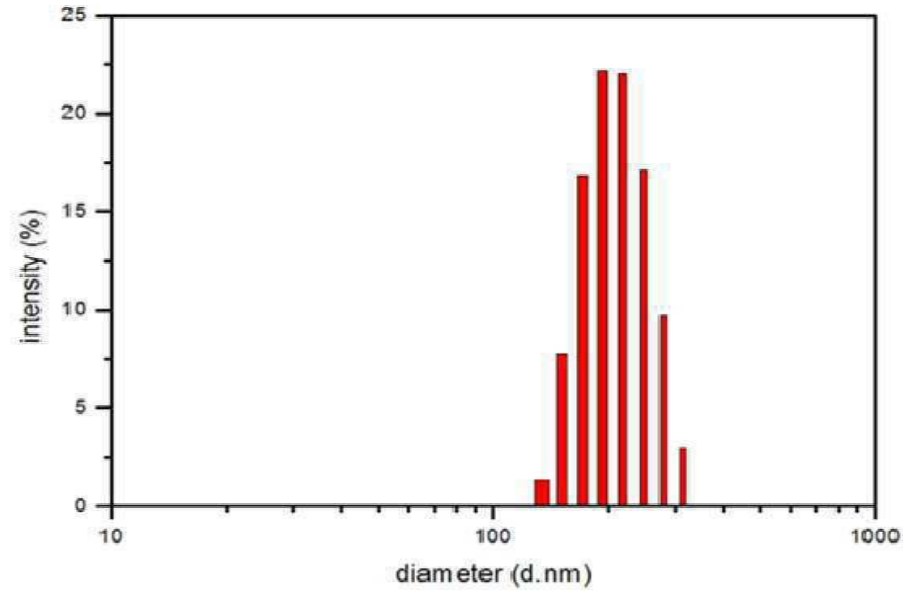
[0142] 동물 모델에 대한 alb-MB-TACE의 치료 효능 평가로서, tumor volume change (volume inhibition ratio) 결과로도 12에 도시한다. 도 12에서, 아무것도 처리해주지 않은 Control 군은 초기에 비해 종양 부피가 약 380% 증가된 것을 알 수 있다. 이와 비교해 alb-MB-TACE의 초기 대비 종양 부피의 증가는 약 20%미만으로 거의 일어나지 않은 것을 알 수 있다.

도면

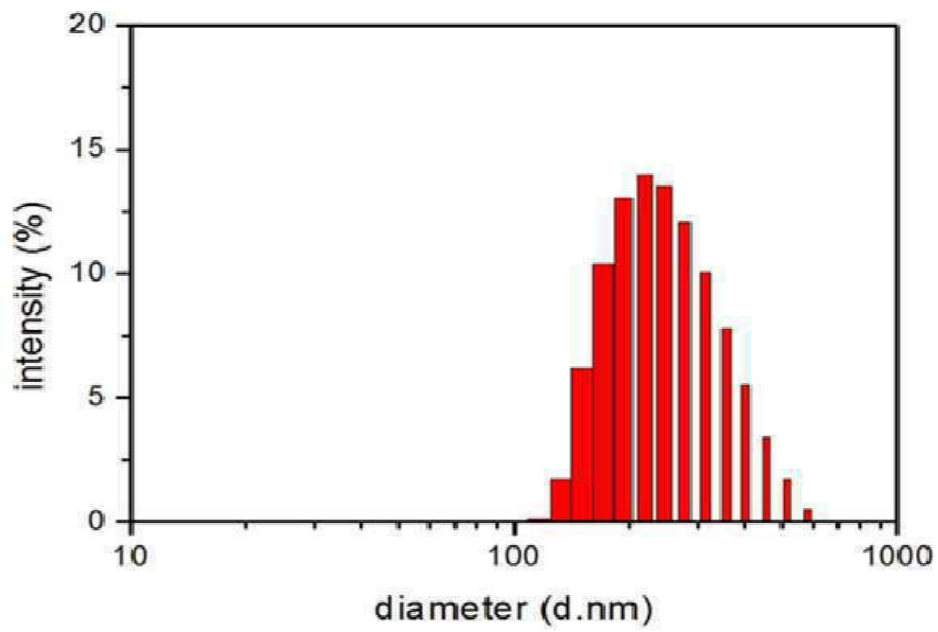
도면1



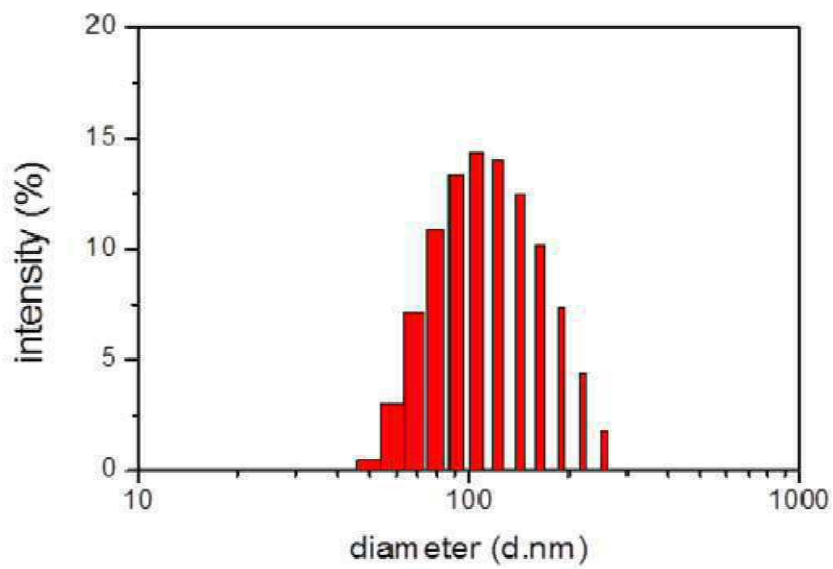
도면2



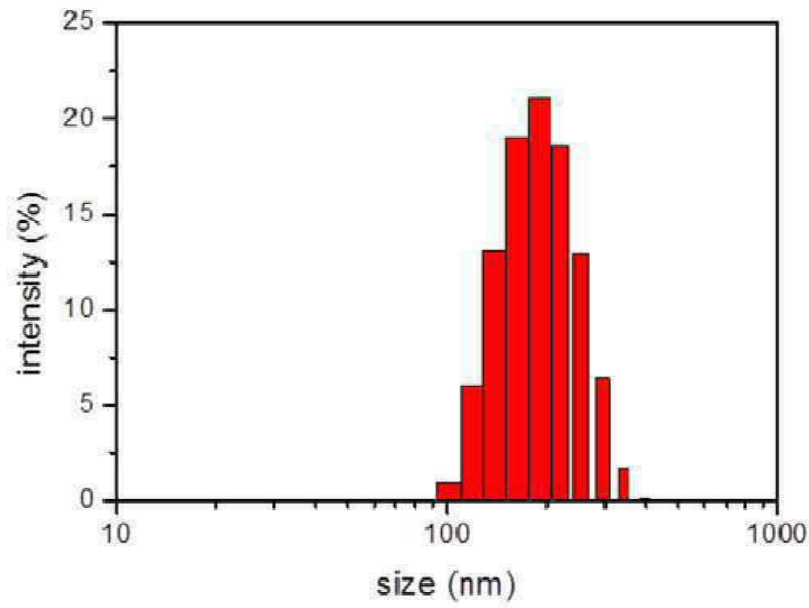
도면3



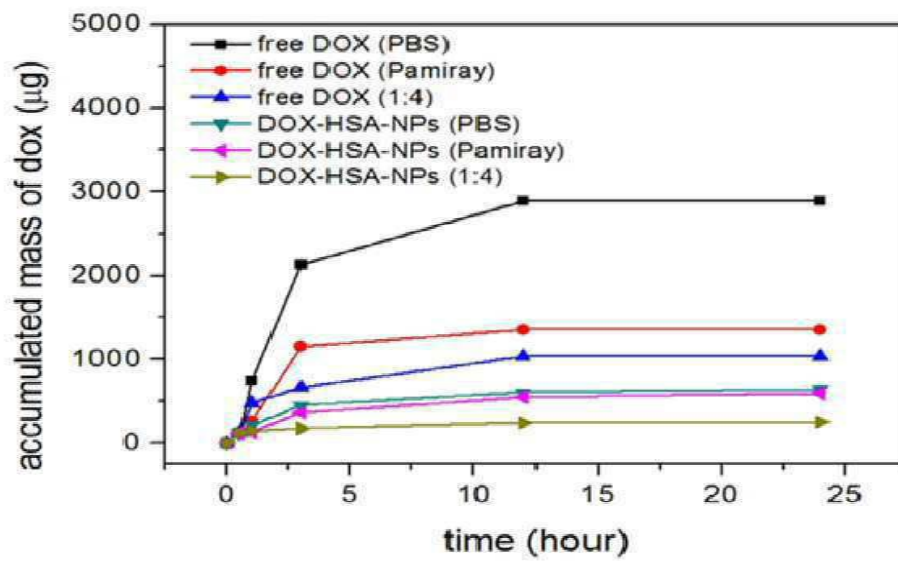
도면4



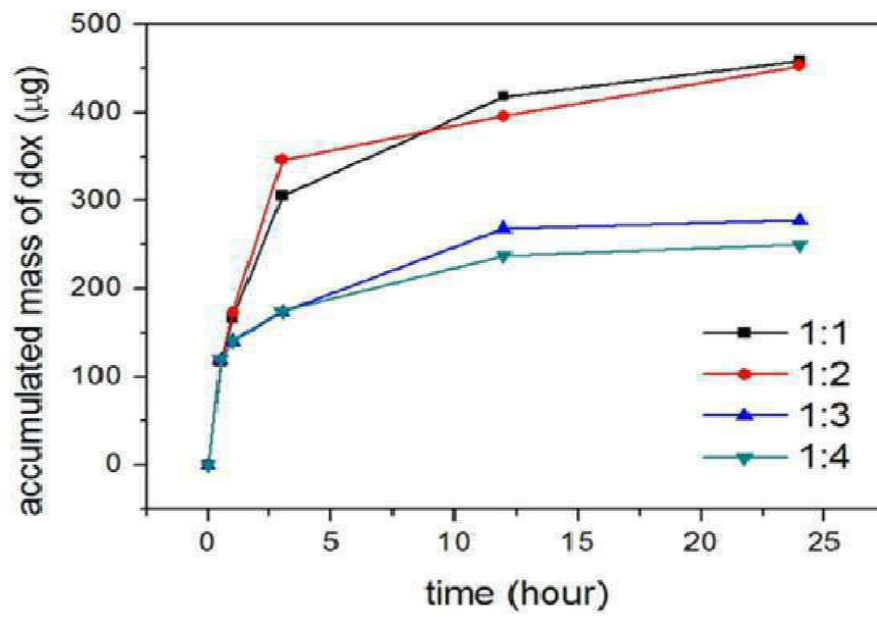
도면5



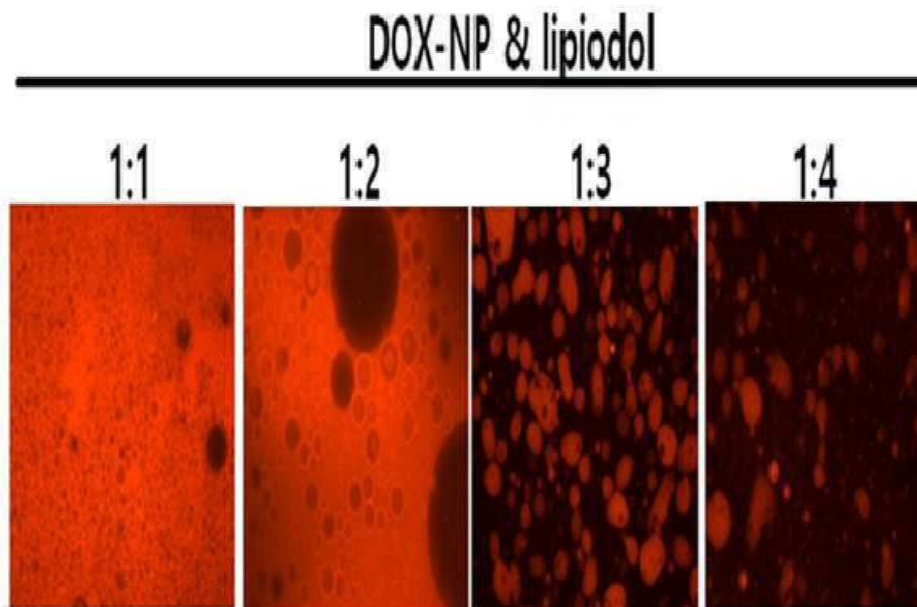
도면6



도면7



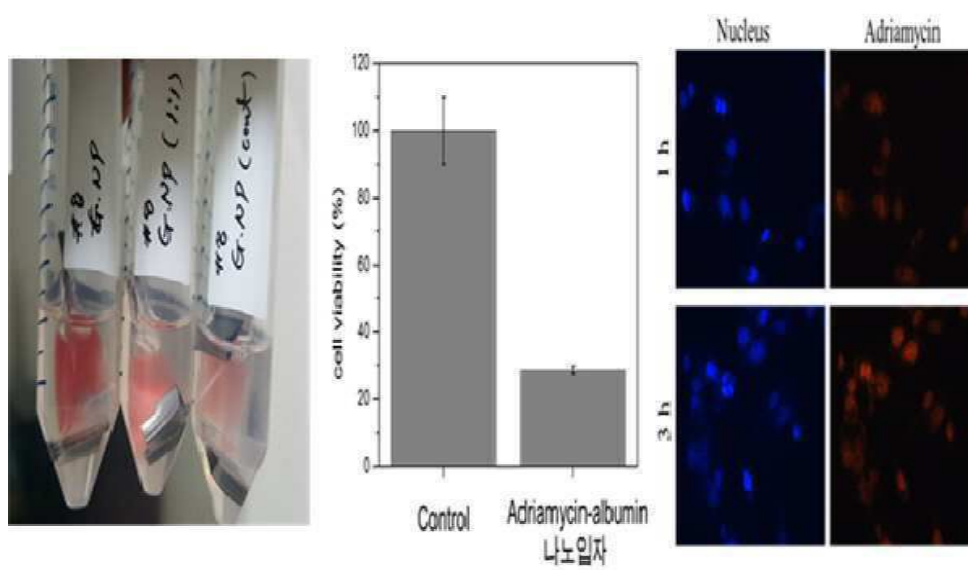
도면8



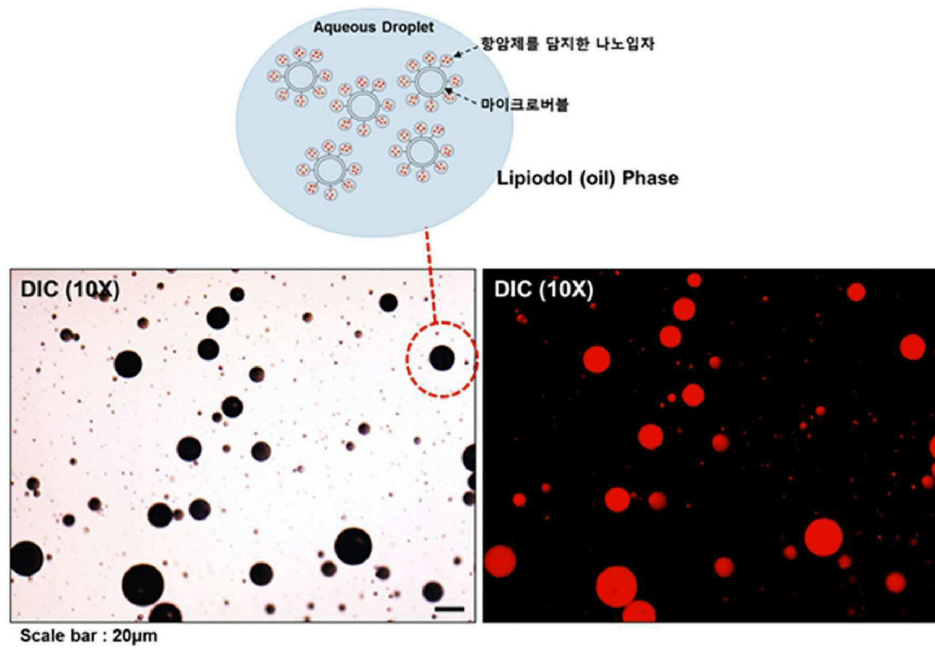
도면9



도면10



도면11



도면12

