

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0150719
(43) 공개일자 2024년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1272 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2024-0046694

(22) 출원일자 2024년04월05일

심사청구일자 2024년04월05일

(30) 우선권주장

1020230046389 2023년04월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

박소연

대구광역시 수성구 범어로 45, 102동 403호(범어
동, 가든하이츠1차아파트)

최진술

경상북도 경주시 강동면 유금강정길 48-3

(74) 대리인

특허법인이름리온

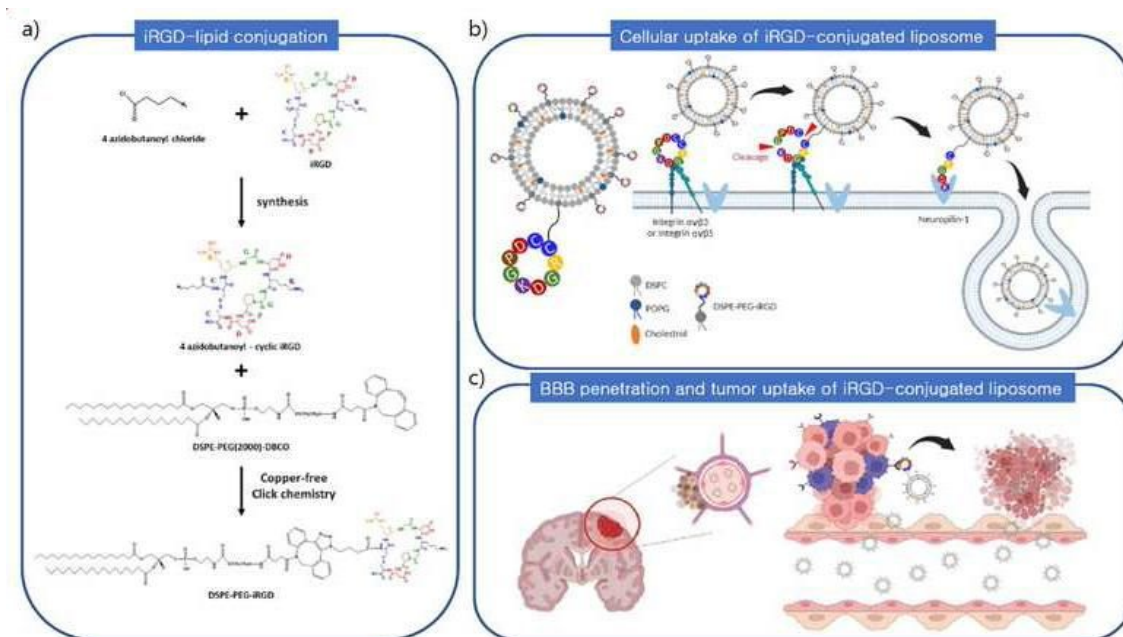
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 및 이를 포함하는 약물 전달체

(57) 요약

본 발명은 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 환형 iRGD가 결합된 지질을 포함하는 지질 나노입자를 제조하여, 뇌혈액관문의 중앙 혈관 조직에 풍부한 $\alpha v \beta 3$ 및 $\alpha v \beta 5$ 인테그린을 표적화해 뇌의 병소부위에 약물이 잘 전달되도록 하는 환형 (뒷면에 계속)

대표도



iRGD 결합 지질 나노입자 조성물을 제공한다. 또한, 시험관 내(in vitro) 뇌혈액관문 모델 실험을 통하여 교모 세포종에서 대조군과 R-iRGD 결합 지질 나노입자보다 환형 iRGD 결합 지질 나노입자가 더 많이 검출됨을 확인하였고, 세포 내 흡수가 더 잘 이루어지며, 종 지질 용량이 증가할수록 약물 담지율이 향상되고 생체와 유사한 조건에서 더 많은 양의 약물이 방출됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물 및 이를 포함하는 약물 전달체는 다양한 뇌 질환에서 우수한 예방 및 치료 효과를 얻을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711156860
과제번호	2021R1A2C1012361
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부) - (유형1-1)중견연구
연구과제명	탄성도 조절과 iRGD 매개 수동/능동 표적능 최적화를 통하여 난치성 교모세포종 치료용 리포솜 전달체 개발
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2026.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192537
과제번호	2021R1A4A1032207
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(과기정통부)
연구과제명	음파 제어 기반 단일 배아 특성 연구실
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345374533
과제번호	00275911 (RS-2023-00275911)
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축 - 박사과정생연구장려금지원사업
연구과제명	AFM힘분광법을 이용한 수동 및 능동 표적능 최적화된 교모세포종 치료용 리포솜 기반 나노약물전달체 개발
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2023.09.01 ~ 2025.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구조식 1의 구조를 포함하는, 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물:

[구조식 1]

X-Y-iRGD

상기 X는 지질 나노입자의 인지질 외부층에 삽입되는 인지질로서, DSPE, DPPC, DSPC, DOPC, DOPE, POPG, DOPE 및 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이고,

상기 Y는 지질 나노입자 외부에서 상기 X에 결합된 것으로서, PEG-DBCO-트리아졸-부티르아미드 링커(PEG-DBCO-triazole-butylamide linker), PEG-말레이미드-티오에테르 링커(PEG-maleimide-thioether linker) 및 PEG-아미드 링커(PEG-amide linker)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이며,

상기 환형 iRGD는 서열번호 1의 아미노산 서열(CRGDKGPDC)로 이루어진 환형 펩타이드이며, N말단의 시스테인(cysteine, C)에서 상기 Y를 통하여 상기 X에 결합된다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 지질 나노입자는 리포솜, 단층 리포솜(unilamellar vesicle), 다층 리포솜(multilamellar vesicle), 고형 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles) 및 미셀(micelle)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자는 뇌 종양의 인테그린(Integrin) $\alpha v \beta 3$ 또는 인테그린(Integrin) $\alpha v \beta 5$ 를 표적화하여 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물은 뇌 질환 예방 또는 치료 용도로 사용되는, 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물.

청구항 5

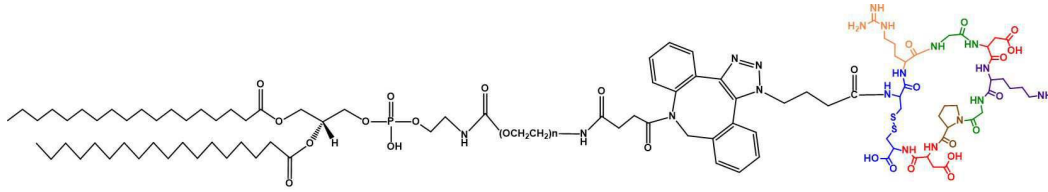
제 4항에 있어서,

상기 뇌 질환은 알츠하이머병, 경도인지장애, 뇌졸중, 치매, 뇌종양, 파킨슨병 및 루게릭병으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 구조식 1은 하기 화학식 1의 구조로 표현되는, 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물:

[화학식 1]

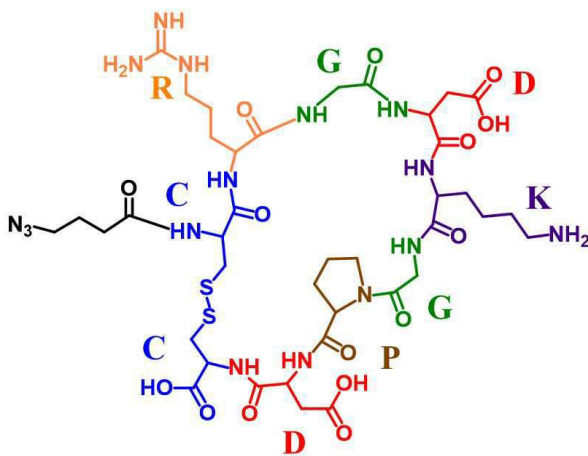


청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 화학식 1은 하기 단계로 제조되는, 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물:

i) 4 아지도부타노일 클로라이드(4 azidobutanoyl chloride)와 환형 iRGD를 결합하여 하기 화학식 2로 표현되는 화합물을 합성하는 단계; 및

[화학식 2]



ii) 상기 화학식 2로 표현되는 화합물과 DSPE-PEG(2000)-DBCO를 결합하여 상기 화학식 1로 표현되는 화합물을 합성하는 단계.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물은 박막 수화법 또는 미세유체법으로 제조되는, 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 지질 나노입자는 상기 구조식 1의 구조를 가지는 화합물을 상기 지질의 3 내지 7 몰%로 포함하는, 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 지질 나노입자는 150 내지 250 nm의 직경을 가지는, 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 환형 iRGD 결합 지질 나노입자; 및

상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 내부에 담지된 약물;

을 포함하는, 뇌혈액관문 투과능이 개선된 약물 전달체.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 약물은 항암제, 조영제, 면역조절물질 및 항염증제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 약물 전달체.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 항암제는 FAK (focal adhesion kinase) 억제제인, 약물 전달체.

청구항 14

제 11항에 있어서,

상기 약물 전달체는 뇌 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용되는, 약물 전달체.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 뇌 질환은 알츠하이머병, 경도인지장애, 뇌졸중, 치매, 뇌종양, 파킨슨병 및 루게릭병으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약물 전달체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌혈액관문(blood-brain barrier, BBB)은 혈액에 있는 외부 물질이 뇌조직으로 이동하는 것을 제한하는 역할을 하는 장벽으로서, 뇌혈관세포(brain endothelial cell), 성상교세포(astrocyte), 혈관주피세포(pericyte)로 구성되어 있다. 뇌혈액관문(blood-brain barrier, BBB)은 병원체로부터 뇌를 보호하고, 항체, 면역세포와 같은 말초면역인자들이 중추신경계로 들어가 면역 반응을 일으키는 것으로부터 보호해준다. 외부 물질은 크기와 종류에 따라 선택적으로 투과되는데, 포도당, 필수 아미노산, 전해질 등의 작은 분자는 확산 또는 능동수송을 통해 통과 가능하지만, 혈중 대사산물, 독소, 약물은 투과되지 못한다.

[0003] 오랜 기간 뇌종양, 치매, 파킨슨병 등의 뇌 질환 치료를 위한 다양한 연구가 진행되었고, 많은 치료제가 개발되었음에도 불구하고 뇌 질환 치료제 개발의 가장 큰 문제점은 뇌혈액관문(blood-brain barrier, BBB)에 의해 약물이 뇌의 병소 부위까지 전달되는 것이 억제된다는 것이며, 이는 뇌 질환 치료제 개발에서 극복해야 할 가장 중요한 요소 중 하나이다.

[0004] 비특허문헌 1에 따르면, 뇌혈액관문(blood-brain barrier, BBB)을 통한 약물 전달은 약물과 뇌혈액관문(blood-brain barrier, BBB)의 특성에 따라 제한적으로 이루어진다. 뇌혈액관문(blood-brain barrier, BBB)의 특성은 혈액 성분과 주변 뇌 세포(혈관주피세포, 성상세포, 미세아교세포, 뉴런)의 방출과 접촉에 의해 영향을 받는다.

[0005] 뇌혈액관문을 통한 약물 전달의 문제점을 극복하기 위해 뇌 질환 약물전달 기술과 관련하여 다양한 연구가 있어왔다. 뇌혈액관문 투과 방법은 크게 수동확산(passive diffusion), 운반체 매개 수송(carrier-mediated transcytosis), 흡착성 세포 투과(adsorptive-mediated transcytosis) 그리고 수용체 매개 수송(receptor-mediated transcytosis)이 있다. 또 다른 접근 방법으로는 리포솜 또는 미셀과 같은 나노 수송체(nano carrier)를 이용한 것들이 있다.

[0006] 그 중 지질 나노입자는 친수성 머리와 소수성 꼬리 부분을 가지는 인지질의 자가조립층으로 구성된 나노 단위 소포로, 생체막을 이루는 인지질로 구성되어 높은 생체 적합성과, 생분해성 및 낮은 독성을 가진다. 항암제, 조

영제, 면역조절물질 및 항염증제 등의 약물이 환형 iRGD 결합 리포솜 내부에 담지될 수 있다. 상기 약물은 친수성 및 소수성 물질을 포함하는 다양한 생물학적 물질로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 저분자화합물을 포함하여 항원, 항체, DNA 및 RNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 또한, 나노 단위의 지용성 분자는 지질 매개 수동확산을 통해 뇌혈액관문(blood-brain barrier, BBB)을 자유롭게 확산할 수 있다.

[0007] 또한, 지질 나노입자는 수송 물질의 체내 분해를 막아줄 뿐만 아니라 지질 나노입자의 구성 성분은 생물학적으로 활성과 면역원성이 없고, 생분해성을 띄고, 낮은 독성을 가지고 있다. 지질 나노입자는 생물학적으로 활성을 가진 성분의 운반체 역할을 할 수 있어 약물 전달 시스템(Drug delivery system, DDS)에서 약물의 효능을 향상시키고 약물 관련 독성과 부작용을 줄이기 위해 많이 사용되어 왔다.

[0008] 종래 선행기술로서, 특허문헌 1(대한민국 등록특허공보 제10-2020-0098384호)에 따르면 세균 유래 세포 외막 소포체를 포함하는 뇌혈액장벽 투과용 조성물에 대해 개시되어 있으며, 특허문헌 2(대한민국등록특허공보 제10-2018-0046310호)에 따르면, ASM(acid sphingomyelinase) 또는 혈관내피세포에서 ASM의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 유효성분으로 포함하는 뇌혈액장벽 투과용 조성물에 대한 기재가 있으나, 환형 iRGD를 직접적으로 지질 나노입자에 결합시켜 뇌혈액장벽을 투과하는 조성물에 대해서는 개시된 바 없다.

[0009] RGD(Arginine-Glycine-Aspartic acid)는 세포 외 기질(ECM)에서 세포부착과 관련된 가장 흔한 펩타이드 모티프(peptide motif)로서, 세포 부착에 필요한 피브로넥틴 내의 최소 인식 서열이다. 또한, RGD는 종양 조직을 선택적으로 인식하여 종양의 혈관조직에 존재하는 독특한 수용체에 결합할 수 있다.

[0010] iRGD(internalizing RGD)는 RGD가 개량된 것으로서, 9개의 아미노산(CRGDKGPDC)으로 이루어진 환형 펩타이드 서열이며, RGD에 CendR이라는 조직침투요소를 결합한 것이다. 환형 iRGD는 종양 혈관 조직에 풍부한 $\alpha v \beta 3$ 및 $\alpha v \beta 5$ 인테그린에 높은 결합 친화성을 가지며, 종양조직에 결합 후 절단되어 CendR 모티프가 노출되는데, 노출된 CendR은 뉴로필린(neuropilin)과의 상호작용을 통해 종양의 혈관을 통과할 수 있다. 또한, 정상세포에 독성을 거의 나타내지 않으며, 비용이 적게 들고 합성 방법이 쉬워 약물 전달 시스템에서 주목 받고 있다.

[0011] 인테그린은 세포-세포 및 세포-세포외기질(extracellular matrix, ECM) 사이의 접착에 관여하는 막 관통 수용체로서 α 및 β 소단위로 구성되어 있다. 활성화된 인테그린은 세포 주기 조절, 세포골격 구성, 세포 내 신호전달 경로 활성화 등 세포 생존에 관여한다. 상기에서 서술한 바와 같이, $\alpha v \beta 3$ 및 $\alpha v \beta 5$ 인테그린은 암 및 일부 질병에서 비정상적으로 과발현되었으며, 혈관 신생과 관련되어 있다.

[0012] 피브로넥틴은 ECM의 필수 당단백질로서 인테그린과 같은 세포 표면 수용체와 결합한다. 특히 피브로넥틴 도메인 10, 비트로넥틴(vitronectin) 도메인에 포함된 RGD 모티프는 세포 표면 수용체인 인테그린과 높은 친화력을 가진다.

[0013] 이러한 배경 하에, 본 발명은 환형 iRGD와 4 아지도부타노일 클로라이드(4 azidobutanoyl chloride)를 결합시켜 4 아지도부타노일-환형 iRGD(4 azidobutanoyl-cyclic iRGD)를 합성한 후, 이를 DSPE-PEG(2000)-DBCO에 결합시켜 만든 DSPE-PEG-iRGD를 포함하는 환형 iRGD 결합 지질 나노입자를 통하여 뇌혈액관문(blood-brain barrier, BBB) 및 뇌종양 주변의 뇌혈액관문(blood-brain tumor barrier, BBTB)의 투과능을 향상시킬 수 있음을 규명하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허공보 제10-2020-0098384호

(특허문헌 0002) 대한민국등록특허공보 제10-2018-0046310호

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) Juhairiyah, F., de Lange, E.C.M. Understanding Drug Delivery to the Brain Using Liposome-Based Strategies: Studies that Provide Mechanistic Insights Are Essential. AAPS J 23, 114 (2021)

발명의 내용

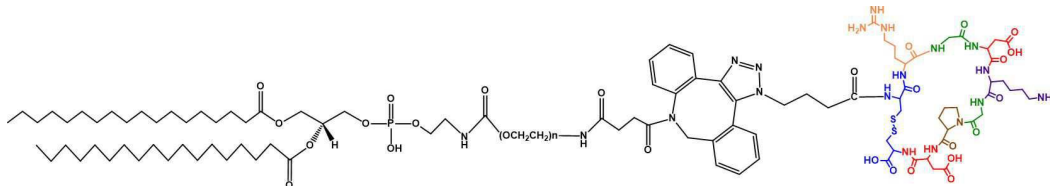
해결하려는 과제

- [0016] 본 발명의 목적은 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물 및 상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자에 담지된 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상술한 과제를 해결하기 위해, 하기 구조식 1의 구조를 포함하는 뇌혈액관문 투과성이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물을 제공한다:
- [0019] **[구조식 1]**
- [0020] X-Y-iRGD
- [0021] 상기 X는 지질 나노입자의 인지질 외부층에 삽입되는 인지질로서, DSPE, DPPC, DSPC, DOPC, POPG, DOPE 및 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고,
- [0022] 상기 Y는 상기 X에 결합되어 지질 나노입자 외부로 노출된 것으로서, PEG-DBCO-트리아졸-부티르아미드 링커(PEG-DBCO-triazole-butyramide linker), PEG-말레이미드-티오에테르 링커(PEG-maleimide-thioether linker) 및 PEG-아미드 링커(PEG-amide linker)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 상기 iRGD는 서열번호 1의 아미노산 서열(CRGDKGPDC)로 이루어진 환형펩타이드이며, N말단의 시스테인(cysteine, C)에서 상기 Y를 통하여 상기 X에 결합된다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 지질 나노입자는 리포솜, 단층 리포솜(unilamellar vesicle), 다층 리포솜(multilamellar vesicle), 고형 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles) 및 미셀(micelle)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 리포솜일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자는 뇌 종양의 인테그린(Integrin) $\alpha v \beta 3$ 또는 인테그린(Integrin) $\alpha v \beta 5$ 를 표적화할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물은 뇌 질환 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 뇌 질환은 알츠하이머병, 경도인지장애, 뇌졸중, 치매, 뇌종양, 파킨슨병 및 루게릭병으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 상기 뇌종양은 신경교종, 저급 신경교종, 다형성 신경교종, 교모세포종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 역형성 성상세포종, 희돌기 아교세포 종양 및 상의세포 종양으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 교모세포종일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 구조식 1은 하기 화학식 1의 구조로 표현될 수 있다.

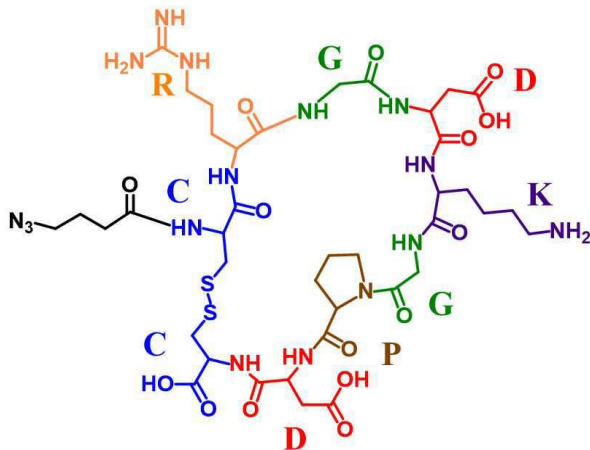
[화학식 1]



- [0031]
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1의 제조 방법은 통상의 방법이라면 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 하기 단계들을 통해 제조될 수 있다.
- [0033] i) 4 아지도부타노일 클로라이드(4 azidobutanoyl chloride)와 환형 iRGD를 결합하여 하기 화학식 2로 표

현되는 화합물을 합성하는 단계; 및

[화학식 2]



ii) 상기 화학식 2로 표현되는 화합물과 DSPE-PEG(2000)-DBCO를 결합한 화합물을 합성하는 단계.

본 발명에 있어서, 상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 제조 방법은 박막 수화법, 미세유체법, 초음파 처리법, 에탄올 주입법, 계면 활성제법, 에테르 주입법 등의 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있고, 바람직하게는 박막 수화법 또는 미세유체법으로 제조될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 지질 나노입자는 상기 구조식 1의 구조를 가지는 화합물을 상기 지질의 2 내지 8 몰%로 포함할 수 있고, 바람직하게는 3 내지 7 몰%로 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는 5 몰%로 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 지질 나노입자는 100 내지 250 nm의 직경을 가질 수 있고, 바람직하게는 170 내지 230 nm의 직경을 가질 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

또한, 본 발명은 전술한 다양한 형태의 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물 및 상기 지질 나노입자 내부에 담지되는 약물을 포함하는, 뇌혈액관문 투과능이 개선된 약물 전달체를 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기 약물은 항암제, 조영제, 면역조절물질 및 항염증제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 항암제는 FAK (focal adhesion kinase) 억제제일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

상기 약물 전달체는 뇌 질환의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명에 있어서, 상기 뇌 질환은 알츠하이머병, 경도인지장애, 뇌졸중, 치매, 뇌종양, 파킨슨병 및 루게릭병으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

발명의 효과

본 발명에 따른 환형 iRGD 결합 지질 나노입자는 뇌혈액관문 투과능이 개선되어, 약물을 뇌의 병소부위까지 효과적으로 전달하는 바, 지질 나노입자에 담지된 약물의 종류에 따라 다양한 뇌 질환의 예방 또는 치료용 약물 전달체로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 a) 환형 iRGD 결합 리포솜 제조 및 b) 세포와 c) 뇌혈액관문을 투과하는 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 질량 분석기를 사용하여 4 아지도부타노일 - 환형 iRGD의 질량 대 전하 비율(m/z)을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 질량 분석기를 사용하여 DSPE-PEG-iRGD의 질량 분석 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4 a)는 DOPC 및 DSPC의 캡슐화 효율 및 용량을 나타낸 것이다. 도 4 b)는 iRGD의 몰%를 달리하였을 때의 형광 광도를 나타낸 것이다.

도 5는 미세유체법(microfluidics)으로 지질 나노입자(lipid nanoparticles; LNPs)를 제조하는 과정의 모식도이다.

도 6 a)는 동적 광산란(Dynamic Light Scattering; DLS)으로 리포솜의 크기 및 제타 전위(zeta potential)를 측정된 결과를 나타낸 것이다. 도 6 b)는 원자 힘 현미경(atomic force microscope; AFM)으로 측정된 리포솜의 이미지 및 힘 대 거리 곡선(force vs distance curve)을 측정된 수직 프로파일(vertical profile)을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 환형 iRGD 결합 리포솜의 뇌혈액관문 투과능(permeation)을 확인하기 위해서 뇌혈관상피세포(Human Brain Microvascular Endothelial Cell; HBMEC)를 배양하여 시험관 내(in vitro) 뇌혈액관문 모델을 이용한 실험 설계를 나타낸 것이다.

도 8은 환형 iRGD 결합 리포솜의 뇌혈관상피세포 층을 통한 상피세포 투과능을 확인한 결과로, a)는 U87 세포와 공배양한 경우에 대한 결과이고, b)는 LN229 세포와 공배양한 경우에 대한 결과이다.

도 9는 GBM 세포에 대한 환형 iRGD 결합 리포솜 흡수능을 FACS 기기를 활용하여 확인한 결과로, a)는 리포솜이 뇌혈관상피세포 층을 투과하여 U87 세포 및 LN229 세포에 흡수되는 능력에 대한 결과이며, b)는 상기 실험 결과를 정량적으로 나타낸 것이다.

도 10은 대조군, iRGD-LP 및 R-iRGD(reverse-iRGD)의 세포 흡수 결과를 형광 현미경으로 촬영한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0048] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다.
- [0049] 본 발명은 하기 구조식 1의 구조를 포함하는, 뇌혈액관문 투과능이 개선된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 조성물에 관한 것이다:
- [0050] [구조식 1]
- [0051] X-Y-iRGD
- [0052] 상기 X는 지질 나노입자의 인지질 외부층에 삽입되는 인지질로서, DSPE, DPPC, DSPC, DOPC, POPG, DOPE 및 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고,
- [0053] 상기 Y는 지질 나노입자 외부에서 상기 X에 결합된 것으로서, PEG-DBCO-트리아졸-부티르아미드 링커(PEG-DBCO-triazole-butylamide linker), PEG-말레이미드-티오에테르 링커(PEG-maleimide-thioether linker) 및 PEG-아미드 링커(PEG-amide linker)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0054] 상기 환형 iRGD는 서열번호 1의 아미노산 서열(CRGDKGPDC)로 이루어진 환형 펩타이드이며, 환형 iRGD의 아미노산 서열 중 N말단의 시스테인(cysteine, C)에서 상기 Y를 통하여 상기 X에 결합된다. 본 발명에 있어서, 용어 "지질 나노입자"는 지질 자가조립층으로 구성된 10 내지 1000 nm 크기의 양친매성 특징을 가진 소포체를 말한다. 지질 나노입자는 저분자 약물, 펩타이드, 단백질, RNA 등을 내부에 로딩하고, 특성을 조절하여 방출시킬 수 있다. 지질 나노입자는 리포솜, 미셀 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 용어 "리포솜"은 외부 수성 환경으로부터 내부 수성 물질을 분리하는 지질 이중층 구조의 나노 단위 소포를 말한다.
- [0056] 상기 지질 나노입자는 리포솜, 단층 리포솜(unilamellar vesicle), 다층 리포솜(multilamellar vesicle), 고정 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles) 및 미셀(micelle)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 리포솜일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0057] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자는 도 1의 b)와 c)에 나타난 바와 같은 기전을 통해 뇌혈액관문을 투과한다. 구체적으로, 환형 iRGD 결합 지질 나노입자는 뇌혈액관문의 인테그린

(Integrin) $\alpha v \beta 3$ 또는 인테그린(Integrin) $\alpha v \beta 5$ 를 표적화한 후, 환형 iRGD에서 CendR 모티프가 노출된다. 이후 노출된 CendR 모티프는 뉴로필린-1(Neuropilin-1)을 표적화하여, 뉴로필린-1 의존성 메커니즘(Neuropilin-1-dependent mechanism)을 통해 지질 나노입자가 뇌혈액관문을 투과하게 해준다. 따라서, DSPE-PEG-iRGD가 포함된 환형 iRGD 결합 지질 나노입자는 뇌종양에 결합하여 뇌의 병소 부위에 전달될 수 있다.

[0058] 상기 CendR 모티프가 지질 나노입자에 부착될 수 있도록 환형 iRGD 아미노산 서열 중 시스테인(cysteine)의 NH_2 기에 4 아지도 부타노일 클로라이드(4 azidobutanoyl chloride)를 결합할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 X는 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 제조 시, 지질 나노입자의 인지질 외부층에 삽입되는 인지질로서, 인지질 이중층의 일부를 구성하는 역할을 하며, Y와의 결합을 통해 환형 iRGD를 인지질 이중층의 외부로 노출하고 있다. 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 X는 DSPE일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 지질 나노입자의 인지질 이중층의 외부층은 도 1의 b)에 나타난 바와 같이 환형 iRGD가 결합되지 않는 다른 인지질을 포함할 수 있으며, 다른 인지질의 종류로는 DSPC 및 POPG를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0061] 본 발명에 있어서, 상기 Y는 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 제조 시, 지질 나노입자 표면에 부착되어 환형 iRGD를 지질 나노입자에 연결해주는 역할을 하며, 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 Y는 PEG-DBCO-트리아졸-부티르아미드 링커(PEG-DBCO-triazole-butyramide linker)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 환형 iRGD는 다음의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어 질 수 있다: CRGDKGPDC (서열번호 1). 이때, 상기 환형 iRGD는 도 1의 b)에서 확인되는 바와 같이, 환형 구조의 펩타이드이다.

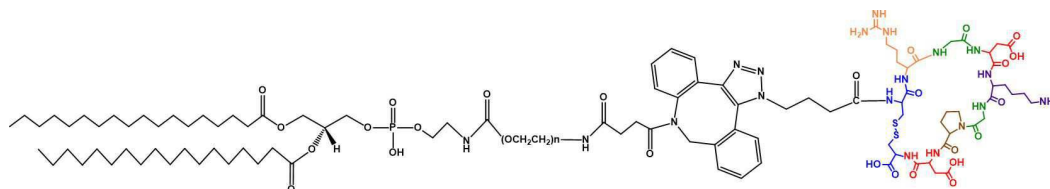
[0062] 본 발명의 뇌혈액관문 투과능이 개선된 iRGD 결합 지질 나노입자를 포함하는 조성물에 있어서, 뇌 질환 치료 물질이 결합된 펩타이드가 유효성분으로 포함될 경우, 상기 조성물은 뇌 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명에 있어 상기 뇌 질환은 그 종류가 한정되지 않으나, 바람직하게는 알츠하이머병, 경도인지장애, 뇌졸중, 치매, 뇌종양, 파킨슨병 및 루게릭병으로 이루어진 군에서 어느 하나 선택될 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 조성물은 뇌혈액관문을 투과해 뇌의 병소부위까지 전달하기 위한 용도로 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명에 있어서, 상기 구조식 1은 하기 화학식 1의 구조로 표현될 수 있다.

[화학식 1]



[0067] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1의 제조 방법은 통상의 방법이라면 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 하기 단계들을 통해 제조될 수 있다.

[0069] i) 4 아지도부타노일 클로라이드(4 azidobutanoyl chloride)와 환형 iRGD를 결합하여 하기 화학식 2로 표현되는 화합물을 합성하는 단계; 및

[화학식 2]

- [0084] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 투여 방식, 환자의 나이, 체중, 성별, 질환 정도, 투여 시간, 투여 경로 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 조절될 수 있다.
- [0085] 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 동시에 또는 차례로 투여될 수 있으며, 단일 혹은 다중으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0086] 본 발명에 있어서, "예방"이란 본 발명에 따른 조성물 및 약물 전달체 투여에 의해 뇌 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0087] 본 발명에 있어서, "치료"란 본 발명에 따른 조성물 및 약물 전달체 등에 의해 뇌질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0088] 본 발명에 있어서, "개선"이란 증상의 정도가 완화되거나 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 2는 4 아지도부타노일 클로라이드-환형 iRGD(4 azidobutanoyl chloride-cyclic iRGD)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0090] 또한, 상기 4 아지도부타노일 클로라이드-환형 iRGD(4 azidobutanoyl chloride-cyclic iRGD)는 DSPE-PEG(2000)-DBCO와 0.8:1 내지 1.2:1 몰 비율로 혼합하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 DSPE-PEG(2000)-DBCO와 1:1 몰 비율로 용해될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0091] 본 발명에 있어서, 상기 환형 iRGD 결합 지질 나노입자 제조 방법은 박막 수화법, 미세유체법, 초음파 처리법, 에탄올 주입법, 계면 활성제법, 에테르 주입법 등의 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있으며, 바람직하게는 박막 수화법 또는 미세유체법으로 제조될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0092] 상기 지질 나노입자를 구성하는 지질 구성성분 중 DSPE-PEG-iRGD는 전체 지질 대비 2 내지 8 몰%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 3 내지 7 몰%로 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 5 몰%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0093] 상기 지질 나노입자가 박막 수화법으로 제조되는 경우, 상기 지질 나노입자를 구성하는 지질 구성성분으로 DSPC, 콜레스테롤, POPG 및 DSPE-PEG-iRGD가 사용될 수 있으며, 50.9:35.5:4.5:9.1 내지 55.2:38.4:4.9:1.5의 몰비로 구성될 수 있고, 바람직하게는 53:37:5:5의 몰비로 구성될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0094] 상기 지질 나노입자가 미세유체법으로 제조되는 경우, 상기 지질 나노입자를 구성하는 지질 구성성분으로 DPPC, 콜레스테롤, DSPC 및 DSPE-PEG-iRGD가 사용될 수 있으며, 52.7:33.6:4.6:9.1 내지 57.1:36.5:4.9:1.5의 몰비로 구성될 수 있고, 바람직하게는 55:35:5:5의 몰비로 구성될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0095] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 환형 iRGD 결합 지질 나노입자의 인간뇌미세혈관내피세포 투과성을 확인한 결과, iRGD가 반대로 배열되어 분자량은 같으나 제 기능을 하지 못하는 R-iRGD 결합 지질 나노입자가 투여된 그룹에 비해 더 높은 형광세기가 나타남을 확인하였다(도 8).
- [0096] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 형광광도 측정 실험(FITC-A)을 통해 인간뇌미세혈관내피세포를 투과한 환형 iRGD 결합 지질 나노입자가 신경교종 세포 내로 흡수되는지 확인한 결과, 대조군에 비해 더 높은 세포흡수율을 나타냄을 확인하였다(도 9).
- [0097] 이하 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위는 이에 한정되지 않는다.

실시예 1

[0098] 환형 iRGD 결합 리포솜의 제조

[0099] 1-1. DSPE-PEG-iRGD의 합성과정

[0100] 환형 iRGD 결합 리포솜이 세포막의 인테그린(Integrin) $\alpha\beta3$ 또는 인테그린(Integrin) $\alpha\beta5$ 를 표적 후 절단되어 뉴로필린(neuropilin)과 결합할 수 있도록 CendR 모티프가 노출된다. 노출된 CendR 모티프에 리포솜이 부착되어있을 수 있도록 환형 iRGD 아미노산 서열 중 시스테인(cysteine)의 NH_2 기에 4 아지도부타노일 클로라이드(4 azidobutanoyl chloride)를 결합하였다.

[0101] 합성된 4 아지도부타노일 클로라이드-환형 iRGD(4 azidobutanoyl chloride-cyclic iRGD)는 리포솜과 결합을 위

해 DSPE-PEG(2000)-DBCO와 결합된다. DSPE-PEG(2000)-DBCO와 4 아지도부타노일 클로라이드-환형 iRGD(4 azidobutanoyl chloride-cyclic iRGD)를 1:1 몰 비율 (3.09 μmol)로 둥근 플라스크에 넣어 아세토니트릴 (Acetonitrile)과 정제수를 4:1비율로 섞은 용액을 넣어 용해시킨다. 이후 실온에서 회전증발기를 이용하여 아세토니트릴 용액을 증발시킨다. 결합되지 않은 펩타이드를 제거하기 위해 디에틸에테르(Diethyl ether)를 0.2 ml을 이용하여 세척한다. 이후, 미량의 디에틸에테르를 제거하기 위해 데시케이터에서 밤새 건조시킨다. 건조된 DSPE-PEG-iRGD는 4:1 비율로 섞인 아세톤(Aceton) 및 물 용액에 용해시켜 4℃에서 보관한다.

[0102] 1-2. 박막 수화법을 이용한 환형 iRGD 결합 리포솜의 제조

[0103] 리포솜을 제작하기 위해 박막 수화법(Thin film hydration method)이 사용되었다. 리포솜을 구성하는 지질 구성 성분으로 DSPC, 콜레스테롤(Cholesterol) 및 POPG가 사용되었으며, 이는 56:39:5의 몰비로 구성되며, DSPE-PEG-iRGD를 포함하는 경우 DSPC, 콜레스테롤, POPG 및 DSPE-PEG-iRGD는 53:37:5:5 몰비로 구성된다. DSPE-PEG-iRGD를 첨가하기 전, 모든 지질을 클로로포름(Chloroform)에 용해시켜 둥근 플라스크에 넣어 회전증발기를 이용하여 55℃, 50 rpm, 650 Torr 조건하에서 약 1시간 건조하여 박막을 얻었다. 이때, 생체외실험을 위해 형광염료인 Oregon Green[®] 488 DHPE를 전체 지질의 0.4 몰%로 함께 첨가하여 제작되었다. 이후, 미량의 클로로포름을 제거하기 위해 밤새 데시케이터에서 건조되었다. 건조된 지질을 필터링이 완료된 PBS용액으로 회전증발기를 이용하여 55℃, 50 rpm 조건하에서 수화시킨다. 이후, 지질의 약 5 몰%의 DSPE-PEG-iRGD를 첨가하여 55℃에서 약 30분간 초음파 처리함으로써 페길레이션(PEGylation) 시킨다. 균일한 크기(약 100-200 nm)의 리포솜을 제작하기 위해 0.1 μm 폴리카보네이트 멤브레인(Polycarbonate Membrane Filter)을 이용하여 압출을 진행한다. 대조군인 페길레이션이 진행되지 않은 No PEG-리포솜과 역행-iRGD 결합 리포솜도 동일한 방법으로 제작되었다. 제작된 환형 iRGD 결합 리포솜은 동적 광산란(Dynamic light scattering, DLS)기기를 사용하여 크기와 제타포텐셜(Zeta potential)이 측정되었다.

[0104] 1-3. 미세유체법을 이용한 환형 iRGD 결합 지질나노입자 제조

[0105] 추가적으로, 미세유체법(microfluidics)을 이용하여 지질 나노 입자(lipid nanoparicles; LNPs)를 제작하였다. 도 5에서 확인할 수 있듯이, 배플(baffled) 구조를 갖는 미세유체 장치의 몰드는 표준 포토리소그래피 방법을 사용하여 제작하였다. 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane; PDMS) 혼합물을 몰드에 붓고 오븐에서 경화시킨 후, 주입구 및 배출구를 펀처를 사용하여 제작한다. 이후 제작된 미세유체장치는 산소 플라즈마로 처리하고 유리 슬라이드에 부착시킨 후, 주입구 및 배출구에 불소화 에틸렌 프로필렌(Fluorinated ethylene propylene, FEP) 튜빙을 고정시켜 완성하였다.

[0106] 지질 나노입자를 구성하는 지질 구성성분으로 DPPC, 콜레스테롤 및 DSPC가 사용되었으며, DSPE-PEG-iRGD를 포함하는 경우 DPPC, 콜레스테롤, DSPC 및 DSPE-PEG-iRGD는 55:35:5:5 몰비로 구성된다. 지질은 에탄올에 용해되었으며, 주사기 펌프를 이용하여 두개의 서로 다른 입구를 통해 각각 지질과 수용액이 주입된다. 각각 다른 곳에서 주입된 지질과 수용액은 하나의 배플 구조 미세유체 관에서 만나 혼합되며 지질 나노 입자가 형성된다. 미세유체의 끝에 위치한 주입구를 통해 pH 7.4 PBS용액을 주입함으로써 에탄올을 희석시킨다. 이후 중간에 위치한 배출구를 통해 지질 나노 입자를 수집하고, 투석 백을 이용하여 PBS에 밤새 투석한다. iRGD 접합 지질 나노 입자의 경우, 지질의 약 5 몰%의 DSPE-PEG-iRGD를 첨가하여 55℃에서 약 30분간 초음파 처리함으로써 페길레이션 시킨다. 제작된 지질 나노 입자는 동적 광산란 기기를 사용하여 크기와 제타포텐셜이 측정되었다.

실시예 2

[0107] 4-아지도부타노일-환형 iRGD 및 DSPE-PEG-iRGD 특성 분석

[0108] 2-1. 4-아지도부타노일-환형 iRGD 결합 확인

[0109] 환형 iRGD의 시스테인(cysteine)의 NH_2 기에 4 아지도부타노일 클로라이드를 결합시키고, 이를 Shimadzu의 LCMS-2020 기기를 사용하여 결합유무를 확인하였다. 질량 분석은 0.4 mL/min의 유속으로 주입되었으며, 용리액 A는 0.1% 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid; TFA)을 포함하는 20% 수용액, 용리액 B는 0.1% 트리플루오로아세트산을 포함하는 80% 아세토니트릴 용액이 사용되었으며, 용리액 A 20%와 용리액 B 80% 조건하에서 질량 분석이 진행되었다. 또한 전기분무 이온화(electrospray ionization; ESI) 인터페이스를 사용하여 수행되었으며, 다음과 같은 조건으로 진행되었다. 분무 가스 유량(Nebulizing Gas flow rate)은 1.5 mL/min, 건조 가스 흐름(Drying Gas Flow)은 15 mL/min, DL(Desolvation Line)과 히트 블록(Heat Block)의 온도는 각각 250℃로 설정되었다. 도 2에서 확인되는 바와 같이, 예측된 질량 값인 1058.40 g/mole과 질량 분석 결과 측

정된 질량값이 1058.53 g/mole으로 거의 유사한 것으로 보아, 환형 iRGD와 4-아지도부타노일 클로라이드가 결합되었다는 것을 증명한다.

[0110] 2-2. DSPE-PEG-iRGD의 질량 분석 스펙트럼 측정

[0111] DSPE-PEG2000-DBCO와 4-아지도부타노일-환형 iRGD를 결합시키고, 구조적 완전성을 LC-MS 분석을 통해 확인하였다. 시료는 DSPE-PEG-RGD 1.5 mg/ml(아세톤), DSPE-PEG2000-DBCO 2 mg/ml(아세트나이트릴)의 농도로 준비되었다. Synapt G2Si (Waters) 기기를 사용하여, DSPE-PEG-RGD 10 μ l를 Acquity UPLC protein BEH, 1.7 μ m (2.1 x 100 mm) 컬럼에 0.4 mL/min의 유속으로 주입되었다. 이동상 A는 0.1% 포름산을 함유하는 물이 사용되었고, 이동상 B는 0.1% 포름산을 함유하는 아세트나이트릴이 사용되었다. 그라디언트는 다음과 같이 구성하였다: 1분 동안 0% B에서 5% B로, 그 후 8분 동안 5% B에서 95% B로, 이어서 1.5분 동안 95% B에서 100% B로 증가하고, 0.5분 동안 100% B에서 0% B로 감소되었다. 질량 분석은 음성 모드에서 작동하는 전기분무 이온화(ESI) 소스가 장착된 질량 분석기를 사용하여 수행되었다. 다음과 같은 기기 매개변수 하에 측정하였다. 분무 가스(Nebulizing Gas)는 질소로, 탈용매화 기체 흐름은 800 L/hr, 탈용매화 온도는 400°C, 전극 전압은 2.0 kV, 질량 취득 범위는 150~2300 Da로 설정되었다. DSPE-PEG-RGD는 2가 이온의 형태로만 검출되었다. 예측된 질량 값은 4136 g/mol이며, 도 3에서 확인되는 바와 같이, 측정된 질량 값은 4120 g/mol으로 예측 질량 값과 유사하였다. 다만, 질량이 넓은 범위로 퍼져 있는 이유는 고분자 물질인 PEG2000을 함유하기 때문이다. 이러한 결과는 DSPE-PEG2000-DBCO와 4-아지도부타노일-환형 iRGD의 결합이 안정적으로 이루어짐을 증명한다.

실시예 3

[0112] 지질 종류에 따른 안정성 비교 및 iRGD의 최적화된 비율 측정

[0113] 3-1. 지질 종류에 따른 약물 담지율 결정

[0114] 환형 iRGD 결합 및 약물 담지 시 가장 안정적인 리포솜 제작을 위해 리포솜의 주요 구성 요소인 인지질 종류에 따른 안정성을 비교하였다. -17°C의 낮은 전이온도를 나타내는 DOPC와 55°C의 높은 전이온도를 나타내는 DSPC를 사용하여 비교했다. 이와 함께 콜레스테롤 및 POPG가 56:39:5의 몰비로 제작되었으며, 데팍티닙(defactinib)을 담지하였다. 제작된 리포솜은 4°C에서 보관되었으며 0일, 3일, 7일, 10일 후 50 μ l 리포솜 용액을 메탄올:DMSO (9:1) 혼합액 950 μ l에 희석하고 강하게 혼합함으로써 리포솜의 구조를 깨트렸다. UV-vis를 이용하여 약물의 흡광도를 측정함으로써 담지율을 확인하였다. 도 4의 a)에서 확인되는 바와 같이, DOPC가 사용된 리포솜과 비교하여 DSPC로 제작된 리포솜이 10일간 담지된 약물이 누출없이 안정적으로 담지되어 있는 것이 확인되었다.

[0115] 3-2. iRGD의 비율 별 형광광도 측정

[0116] 가장 효율적인 세포 흡수능력을 나타내는 iRGD 펩타이드 결합 비율을 확인하기 위해 전체 지질의 1.5, 5, 10 몰%의 DSPE-PEG-iRGD를 첨가한 리포솜을 제작하였다. 이때 FACS 검출을 위해 형광염료인 Oregon Green[®] 488 DHPE를 첨가하여 제작되었다. 6-웰 플레이트에 인간뇌미세혈관내피세포(HBMEC)를 5×10^4 개 배양하고, 20시간 뒤 리포솜을 세포 배양액과 1:1 비율로 처리하였다. 24시간 뒤 트립신을 사용하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포 펠렛은 1 ml PBS에 현탁하여 FACS기기를 사용함으로써 리포솜의 세포 흡수율을 확인하였다. 도 4의 b)에서 확인되는 바와 같이, 5 몰% DSPE-PEG-iRGD가 결합된 리포솜이 가장 높은 세포 흡수율을 나타내었고, 이는 혈관 투과능력 뿐만 아니라 표적 세포내로 약물이 전달될 수 있음을 증명한다. 이후에 사용된 모든 iRGD 결합 리포솜은 5 몰% iRGD 결합 조건하에 사용되었다.

실시예 4

[0117] 환형 iRGD 결합 리포솜의 물리적 특성 규명을 위한 실험

[0118] 4-1. DLS(Dynamic Light Scattering)를 이용한 크기, 균일도, 제타 포텐셜 측정

[0119] 제작된 iRGD 결합 리포솜의 크기, 균일도 및 제타포텐셜을 확인하기 위해 DLS기기를 사용하였다. 리포솜 용액 50 μ l를 정제수 1 ml에 희석시킨 후 큐벳에 넣어 직경과 PDI(Polydispersity index)를 측정하였다. 또한 희석시킨 용액 200 μ l를 사용하여 제타포텐셜을 측정하였다. 도 6의 a)에서 확인되는 바와 같이, R-iRGD 결합 리포솜(R-iRGD-LP)을 제외한 No PEG 리포솜(LP) 및 iRGD결합 리포솜(iRGD-LP)의 경우 200 nm 정도의 크기로 측정되었으며, PDI 또한 0.2 이하로 균일하게 분포되어 있는 것이 확인되었다. 또한 -50 mV 내외의 PEG 미결합 리포솜과 비교하여, iRGD 및 R-iRGD 리포솜의 경우 -30 mV 내외로 관찰되었다. 이는 iRGD 및 R-iRGD 펩타이드 결합이

제타포텐셜을 감소시키는 것으로 보여진다.

[0120] 4-2. AFM (Atomic Force Microscopy)을 이용한 나노 입자 형상 측정

[0121] 제작된 리포솜 형태를 확인하기 위해 원자힘현미경(Atomic Force Microscopy; AFM)을 활용하였다. AFM 실험을 위해 마이카(mica) 표면에 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane; APTES)을 처리함으로써 리포솜을 표면 기능화된 마이카에 고정했다. 실란화(Silanization)를 위해 마이카 표면을 데시게이터에서 밤새 APTES 증기상에 노출시키고 100℃에서 1시간 동안 구워냈다. 탈이온수에서 고정된 리포솜을 0.5 Hz의 스캔 속도로 256 x 256 픽셀의 해상도에서 700 x 700 nm 크기의 지형 이미지를 획득하였다. 도 6의 b)와 같이, 제작된 리포솜은 구형의 형태로 DLS결과와 일치하게 약 200 nm 내외의 크기임을 증명하였다.

실시예 5

[0122] **환형 iRGD 결합 리포솜의 HBMEC에 투과성을 확인하기 위한 실험**

[0123] 5-1. 뇌혈액관문의 in vitro 구현 모델

[0124] 제작된 환형 iRGD 결합 리포솜의 뇌혈액관문 투과성을 평가하기 위해 12-웰 플레이트에 0.4 μm 트랜스웰을 설치하여 상부 챔버에 인간뇌미세혈관내피세포(HBMEC) 5×10^4 개를 배양한다. 이는 세포 배양 후 TEER 값을 측정하여 가장 높은 저항성을 가진 세포 개수를 사용한 것이다. 세포 배양 전, 트랜스멤브레인에 세포가 잘 부착될 수 있도록, 파이브로넥틴을 0.2 mg/ml의 농도로 약 30분간 처리하였다. 트랜스웰의 하부 챔버에는 신경교종 세포주인 U87과 LN229 세포주를 2.5×10^5 개씩 배양하였다. 배양 후 가장 높은 TEER 값을 나타내는 8시간 후, 리포솜을 세포배양액과 1:1의 비율로 첨가하였다. 이후 5분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 36시간 그리고 48시간마다 하부층의 배양액을 10 μl 추출 후 96웰 플레이트에 정제수 90 μl 에 희석하여, 마이크로 플레이트 리더기에 485/535 파장대로 형광세기를 측정하였다.

[0125] 5-2. HBMEC 투과성 실험

[0126] 결과적으로, 폐길레이션이 진행되지 않은 No PEG 리포솜 및 iRGD가 반대로 배열되어 제기능을 못하는 R-iRGD 결합 리포솜이 투여된 그룹과 비교하여 환형 iRGD 결합 리포솜이 투여된 그룹에서 높은 형광세기를 나타내었다. 도 8에서 확인되는 바와 같이, 본 발명에 따른 환형 iRGD 결합 리포솜 및 이를 포함하는 약물 전달체가 뇌혈액관문의 주요 구성성분인 인간뇌미세혈관내피세포(HBMEC)를 투과하여 표적부위에 도달할 수 있음을 증명한다.

실시예 6

[0127] **환형 iRGD 결합 리포솜 검출을 위한 형광광도 측정 실험(FACS)**

[0128] 6-1. 형광광도 측정 실험

[0129] 뇌혈액관문을 투과한 환형 iRGD 결합 리포솜이 신경교종 세포 내로 흡수되는지 확인하기 위해 트랜스웰실험과 유사하게 진행되었다. 12-트랜스웰의 상부 챔버에 인간뇌미세혈관내피세포(HBMEC)가 5×10^4 개, 하부챔버에는 U87과 LN229 세포주가 2.5×10^5 개 배양되었다(도 7). 배양 후 8시간 뒤, 리포솜을 처리하고 48시간 후 상부 챔버를 제거하고 하부 챔버의 신경 교종 세포를 트립신을 이용하여 수집하였다. 수집된 세포는 1,700 rpm 속도의 원심분리기를 이용하여 흡수되지 않은 리포솜을 제거하고 세포만 수거되었다. 수집된 세포 펠렛은 1 ml PBS에 현탁하여 FACS기기를 이용하여 세포 흡수율을 확인하였다. 도 8 및 도 9의 a)에서 확인되는 바와 같이, 본 발명에 따른 환형 iRGD 결합 리포솜 및 이를 포함하는 약물 전달체가 뇌혈액관문의 주요 구성성분인 인간뇌미세혈관내피세포(HBMEC)를 투과하여 표적부위에 도달할 수 있음을 증명한다.

[0130] 6-2. 형광광도 측정 실험 결과의 막대 그래프

[0131] 세번의 독립적인 FACS실험 후 평균값을 막대그래프로 나타내었다. 결과적으로, 환형 iRGD 결합 리포솜이 신경교종세포인 U87 및 LN229 세포주 모두에서 대조군과 비교하여 높은 세포흡수율을 나타냄을 증명한다. 도 9의 b)에서 확인되는 바와 같이, 환형 iRGD 결합 리포솜 및 이를 포함하는 약물 전달체가 상부 챔버의 미세혈관 내피세포를 투과하여 높은 세포 흡수를 나타내는 것은, 환형 iRGD 결합 리포솜이 다양한 뇌질환을 대상으로 효과적인 약물전달치료제로서의 가능성을 나타냄을 증명한다.

실시예 7

[0132] **환형 iRGD 결합 리포솜의 세포 내 이행 능력 확인**

[0133] 리포솜의 세포내 이행 능력을 확인하기 위해 형광염료가 첨가된 리포솜을 이용하여 형광염색실험을 수행하였다. 12-웰 플레이트에 에탄올과 DPBS로 세척된 12 mm Ø 둥근 커버슬립을 놓고, 그 위에 인간뇌미세혈관내피세포, U87, LN229 세포주가 2.5×10^4 개 배양되었다. 배양 후 20시간 뒤 리포솜과 세포배양액을 1:4 비율로 첨가하였다. 24시간 후, 배양액 내 리포솜을 제거하기 위해 DPBS로 세척하고 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 10분 간 세포를 고정시켰다. 이후 슬라이드 글라스에 커버슬립을 고정시키기 위해 DNA Stain DAPI가 포함된 ProLong™ Gold를 사용하였다. 도 10에서 확인되는 바와 같이, iRGD 결합 리포솜(iRGD-LP)이 No PEG(LP) 및 R-iRGD 결합 리포솜(R-iRGD-LP)과 비교하여 세포 내부로 흡수되었음을 알 수 있다. 이는 iRGD 펩타이드의 결합이 표적 부위로 리포솜의 축적을 용이하게 한다는 것을 증명한다.

실시예 8

[0134] **환형 iRGD 결합 리포솜의 약물 전달 실험**

[0135] 8-1. 데팍티닙 담지 후 물리적 특성 확인 실험

[0136] iRGD 결합 리포솜의 효능 평가를 위해, FAK 저해제(inhibitor)인 데팍티닙을 담지하여 실험을 수행하였다. 우선 iRGD에 대한 신경교종 세포주 및 인간뇌미세혈관내피세포의 선택적 결합 가능성을 확인하기 위해 웨스턴블롯 실험을 수행하였다. iRGD와 상호작용하는 인테그린 $\alpha V \beta 3$ 및 $\alpha V \beta 5$ 와 뉴로필린-1의 단백질 발현을 확인하였다. 도 11의 a)에서 확인되는 바와 같이, 인간뇌미세혈관내피세포, U87, LN229 세포주에서 iRGD 관련 단백질의 높은 발현이 확인되었고, 이는 이전의 iRGD 결합 리포솜의 높은 세포 흡수율과 일치한다.

[0137] 제작된 리포솜의 크기 및 제타포텐셜과 같은 물리적 특성은 DLS 기기로부터, 데팍티닙의 담지율은 UV-vis를 통해 확인되었으며 실험 방법은 이전 실험과 동일하게 수행되었다(실시예 3 및 4). 도 11의 b)에 따르면, 제작된 리포솜은 데팍티닙 담지 후에도 약 200 nm내외의 균일한 분포를 나타내지만 R-iRGD 결합 리포솜의 경우, 크기가 300 nm 내외로 커지는 것이 확인되었다. 도 11의 d)에서 나타난 것과 같이, 제타포텐셜 또한 펩타이드 결합에 의해 -40 mV에서 -20 내지 30 mV 정도로 감소되는 것을 확인하였다. 또한 도 11의 c)에서 확인되는 바와 같이, 총 지질의 용량에 따라 용량 의존적으로 약물의 담지가 증가되는 것이 확인되었다.

[0138] 8-2. 데팍티닙 로딩 및 방출 실험

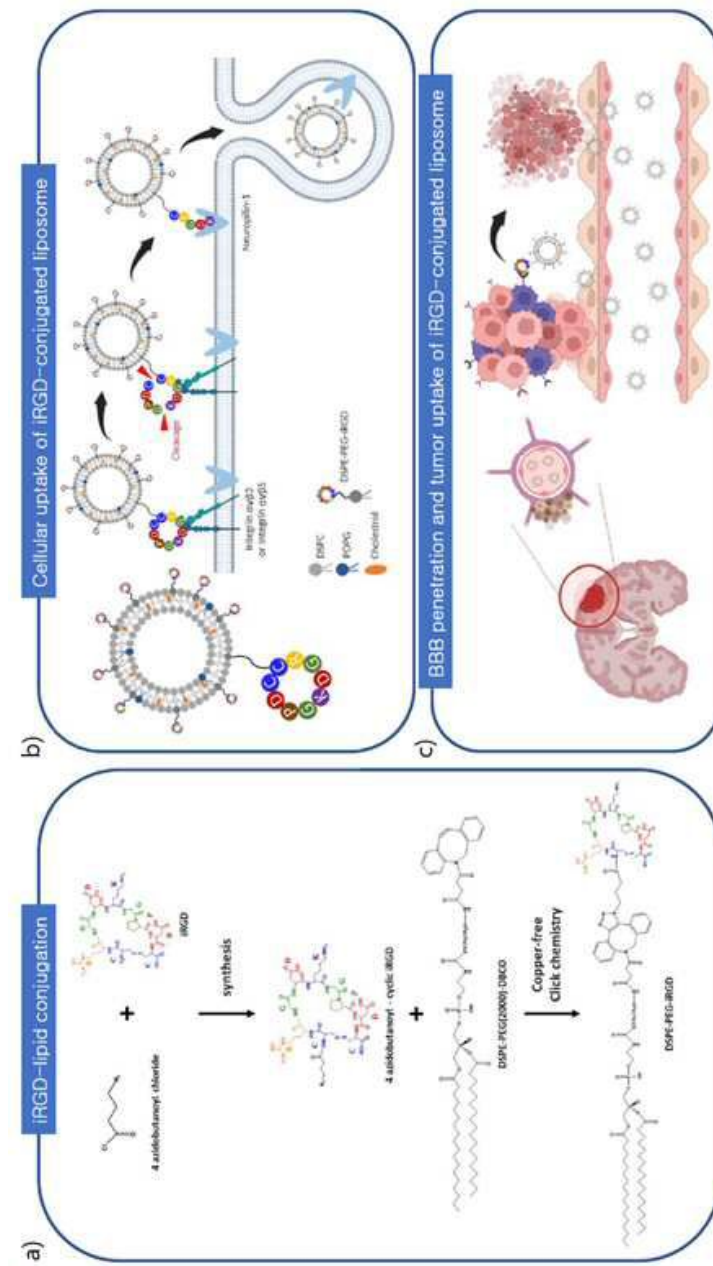
[0139] 리포솜 내 데팍티닙 약물 담지를 위해, 박막 수화법을 이용한 제조과정에서 약물을 첨가했다. 수화과정에서 데팍티닙 약 510 ug을 첨가하였으며, 이때 데팍티닙의 용해를 위해 2:1:1:6 비율의 PEG300:DMSO:PVA:시트레이트(Citrate) 용액에 녹여져 사용되었다. 수화과정은 회전증발기를 이용하여 55℃, 50 rpm 조건하에서 1 - 2시간 진행되었다. 약물의 담지율은 UV-vis를 이용하여 측정되었다. 도 12의 a)에서 확인되는 바와 같이, 약 20 - 30% 정도의 약물이 담지되는 것이 확인되었다. 또한 약물의 방출 효능을 확인하기 위해 10K MWCO 투석 멤브레인에 리포솜 용액 1 ml을 넣고 밀봉시켰다. 밀봉시킨 투석백을 30 ml PBS용액(pH 7.4)에 담구어 방치하였다. 이때, 생체내와 유사한 조건하에 측정하기 위해 용액의 온도를 37℃로 유지하고 마그네틱 바를 이용하여 100 rpm으로 교반하였다. 이후 2시간, 4시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일마다 투석백 외부의 PBS 용액 1 ml를 추출하여 UV-vis로 흡광도를 측정하였다. 도 12의 b)에서 확인되는 바와 같이, 7일 후 제작된 모든 리포솜이 60% 이상의 방출량이 확인되었다. 특히 iRGD 결합 리포솜의 경우, 펩타이드가 결합되지 않은 리포솜과 비교해 약 15 - 20% 이상의 방출량을 나타내어 더 효과적인 세포사멸을 유도할 수 있음을 증명한다.

[0140] 8-3. 독성 실험

[0141] 지질 나노 입자는 비교적 안전한 약물전달체로 알려져 있지만, 제조과정에서 사용되는 지질의 조성, 내부 용액의 종류, 표면 전하 등의 요소에 의해 독성을 나타낼 수 있다. 따라서 약물이 담지되지 않은 나노 입자의 독성 평가는 필수적이다. 96-웰플레이트에 인간뇌미세혈관내피세포, U87, LN229 세포주가 2×10^3 개 배양되었다. 20시간 후, 제작된 리포솜을 5, 10, 25, 50, 75 ul/ml 으로 세포에 처리하고 24시간 후 MTT 분석을 통해 세포 생존율을 확인하였다. 도 13에서 확인되는 바와 같이, 세포에 처리된 리포솜은 iRGD 또는 R-iRGD 펩타이드 결합에 관계없이 세포독성을 유발하지 않는 것으로 확인되었으며, 이는 리포솜의 안전성을 증명한다.

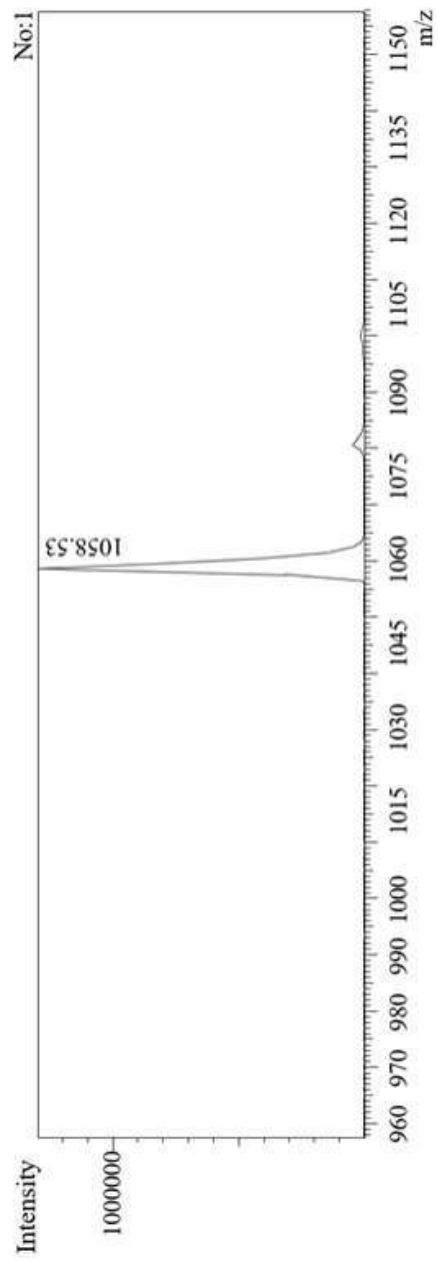
도면

도면1

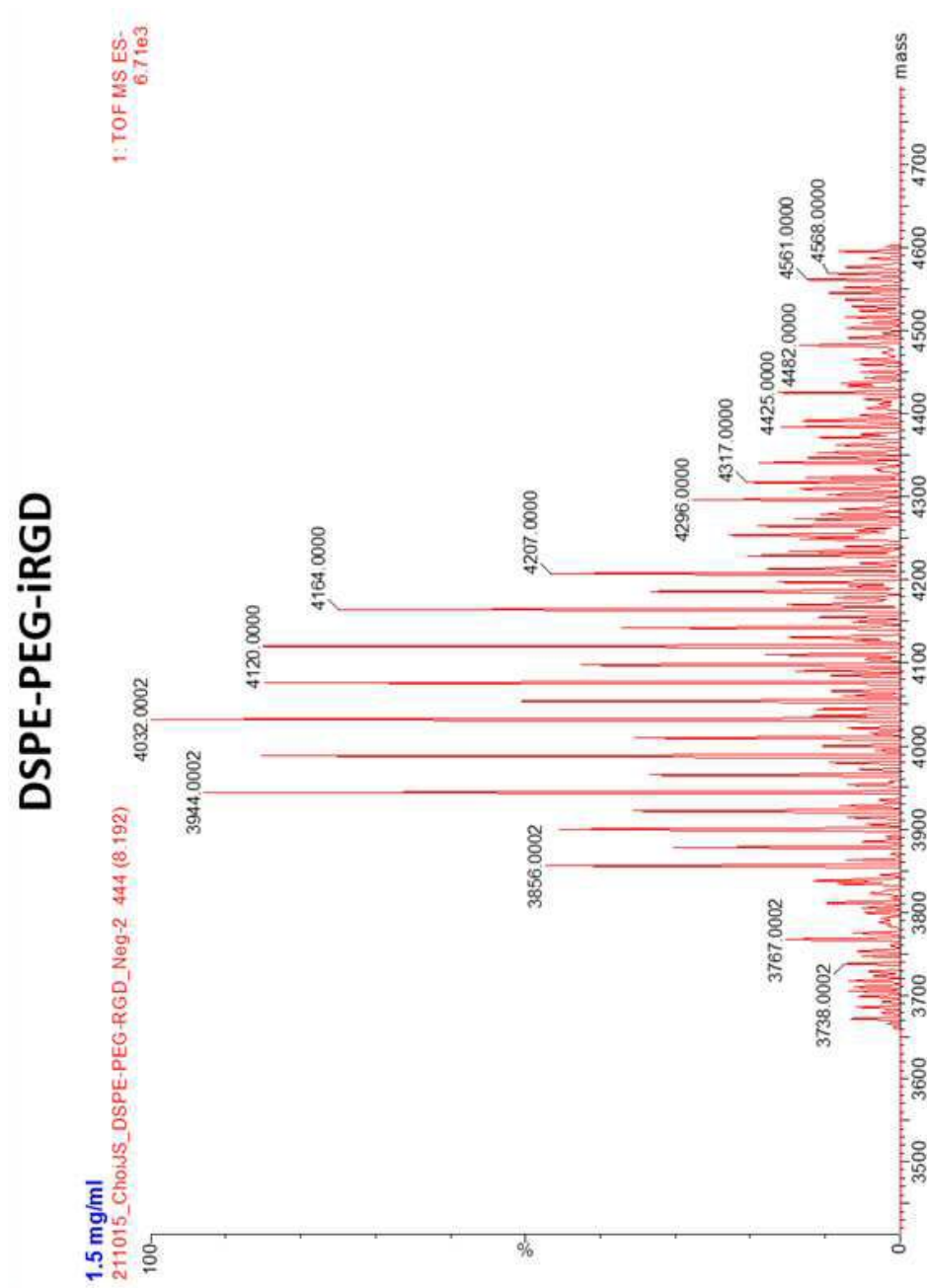


도면2

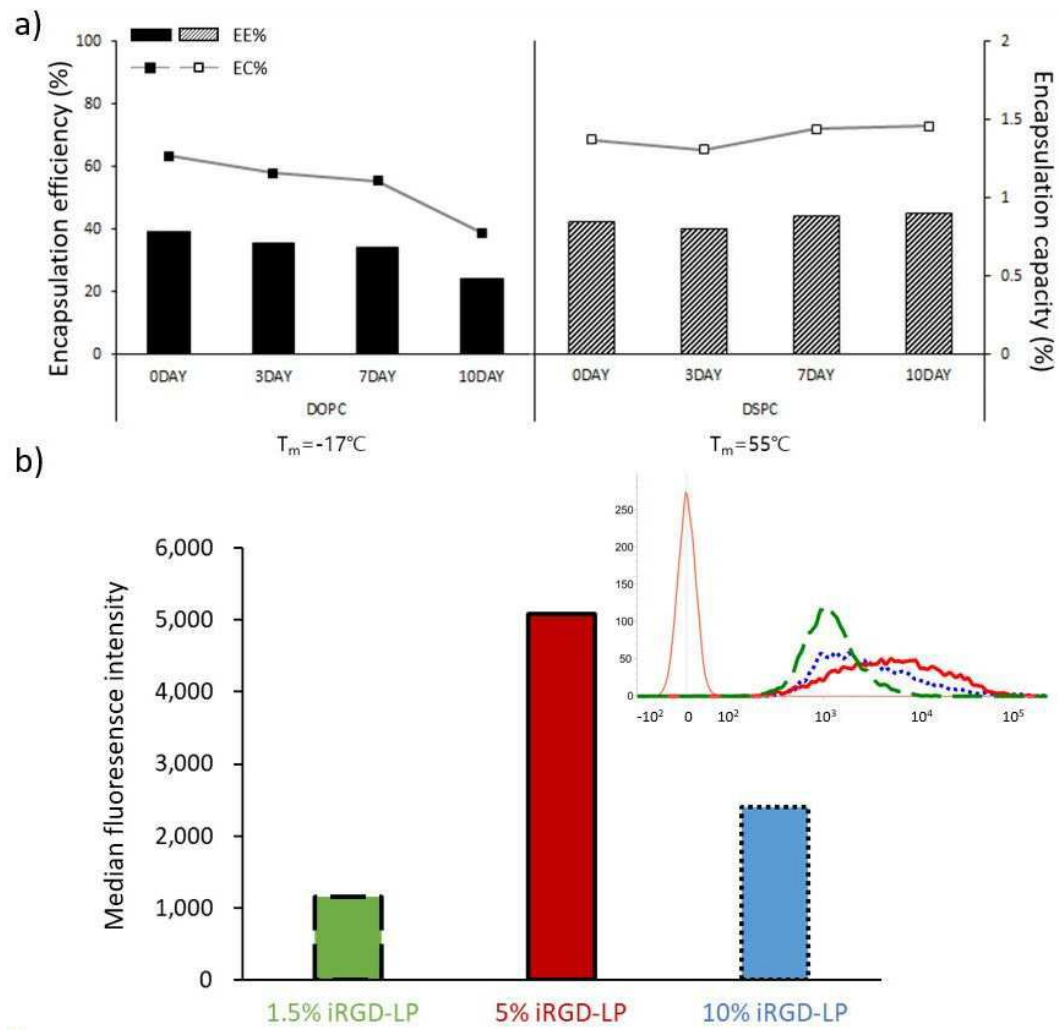
4 azidobutanoyl - cyclic iRGD



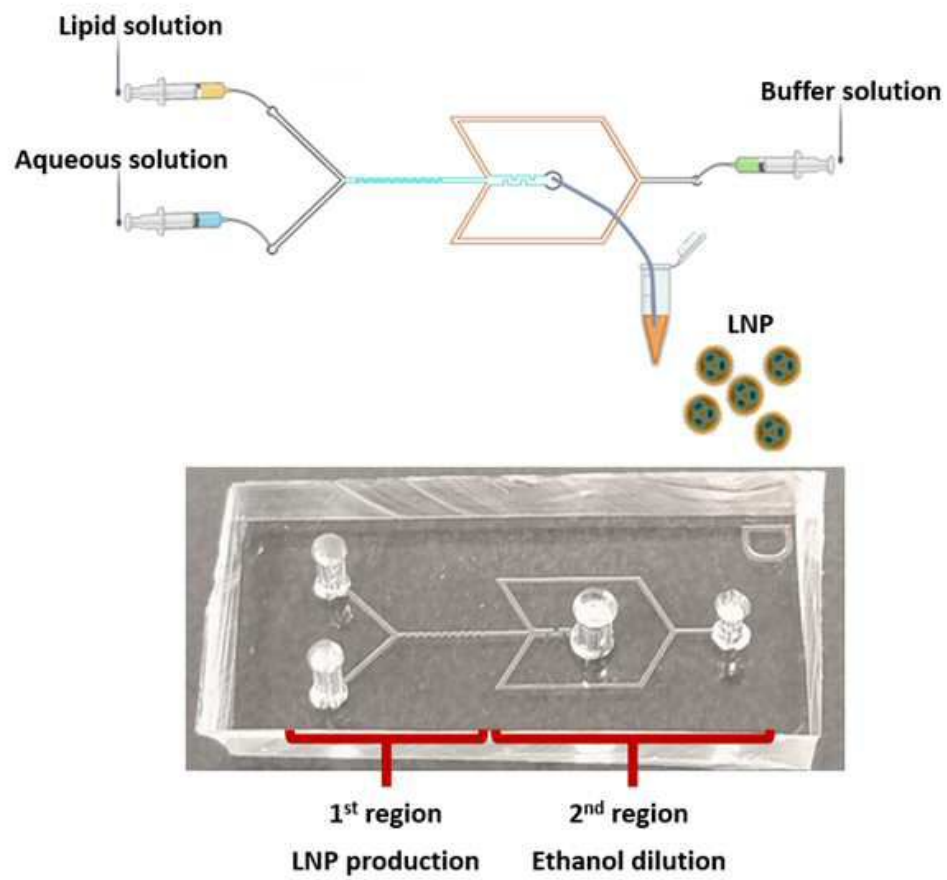
도면3



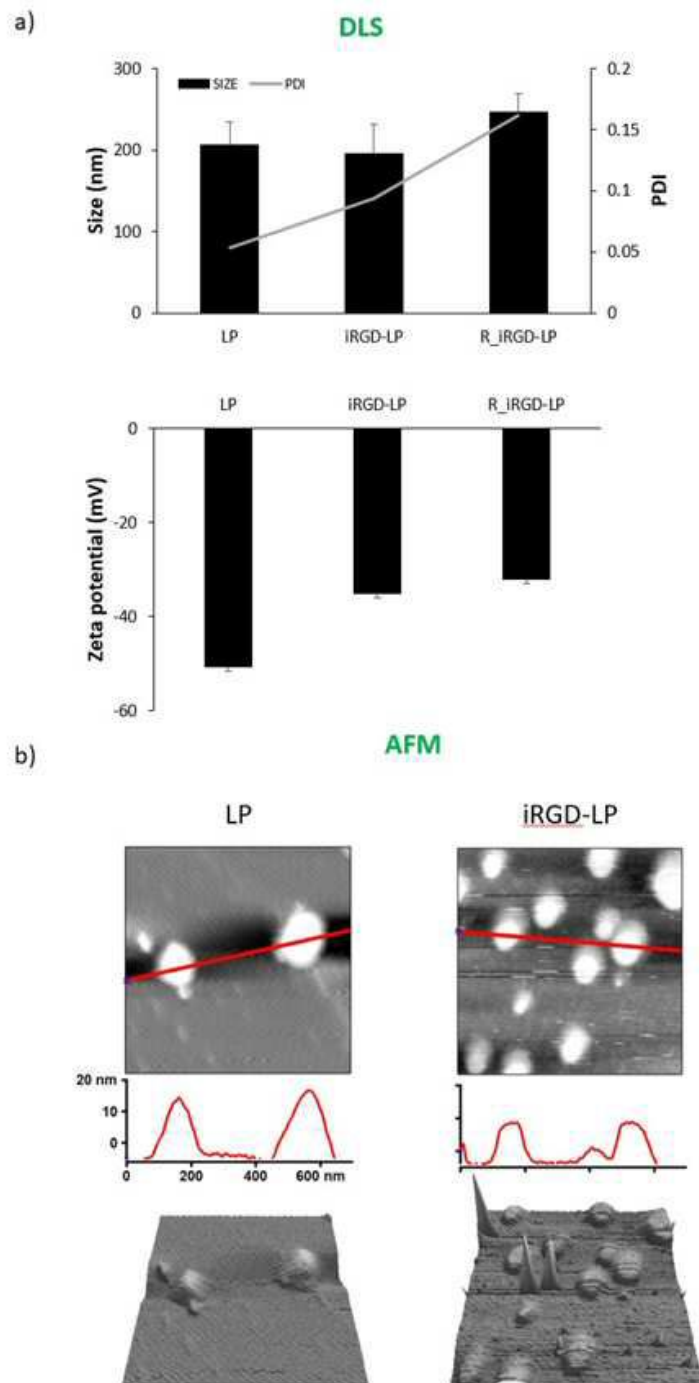
도면4



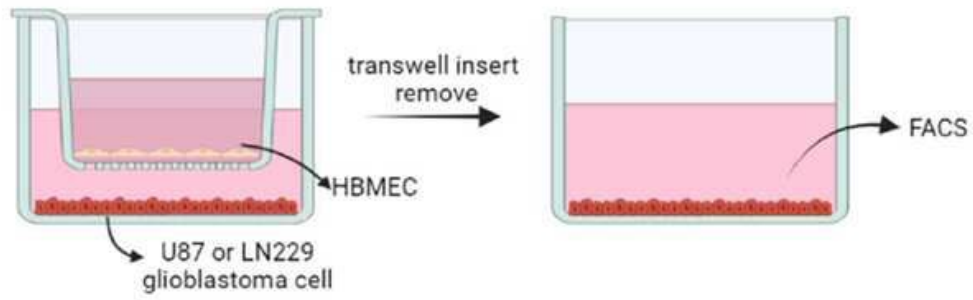
도면5



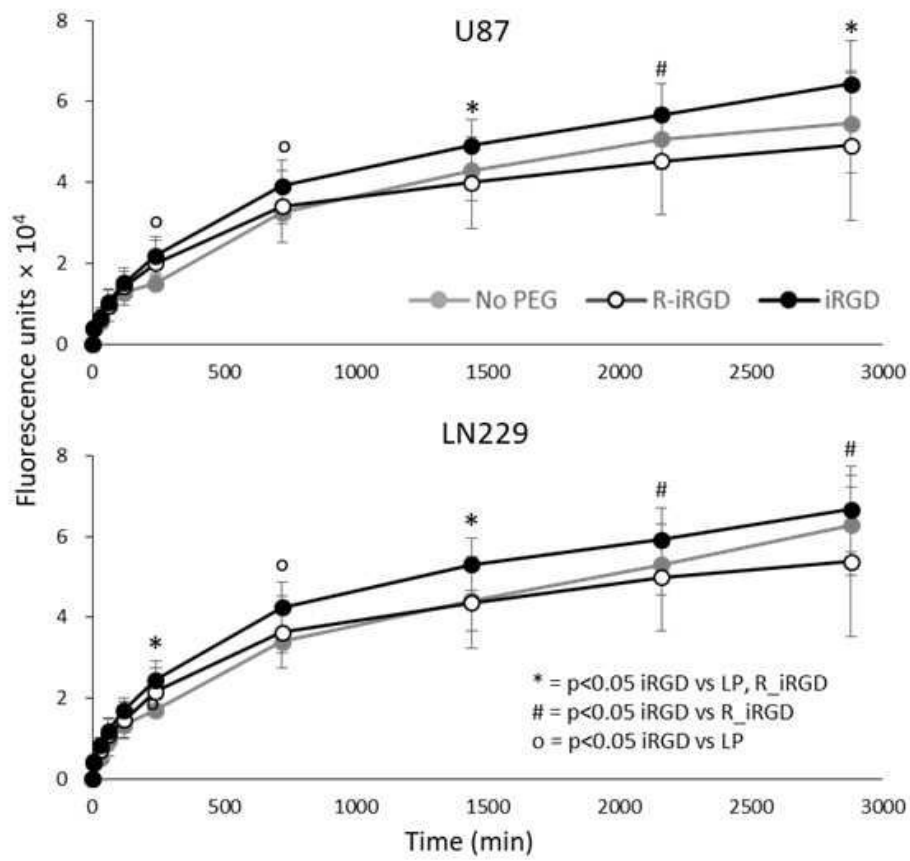
도면6



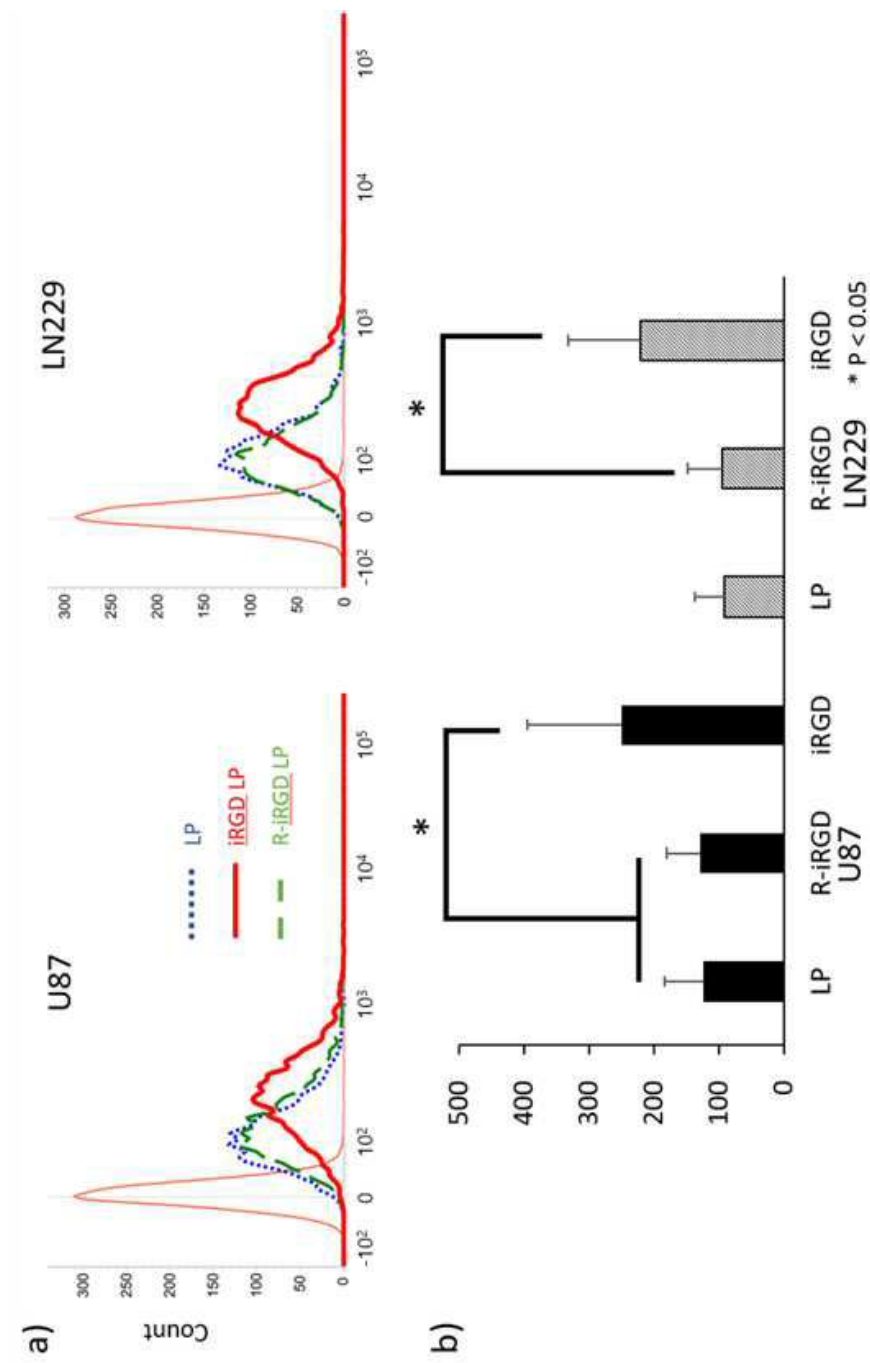
도면7



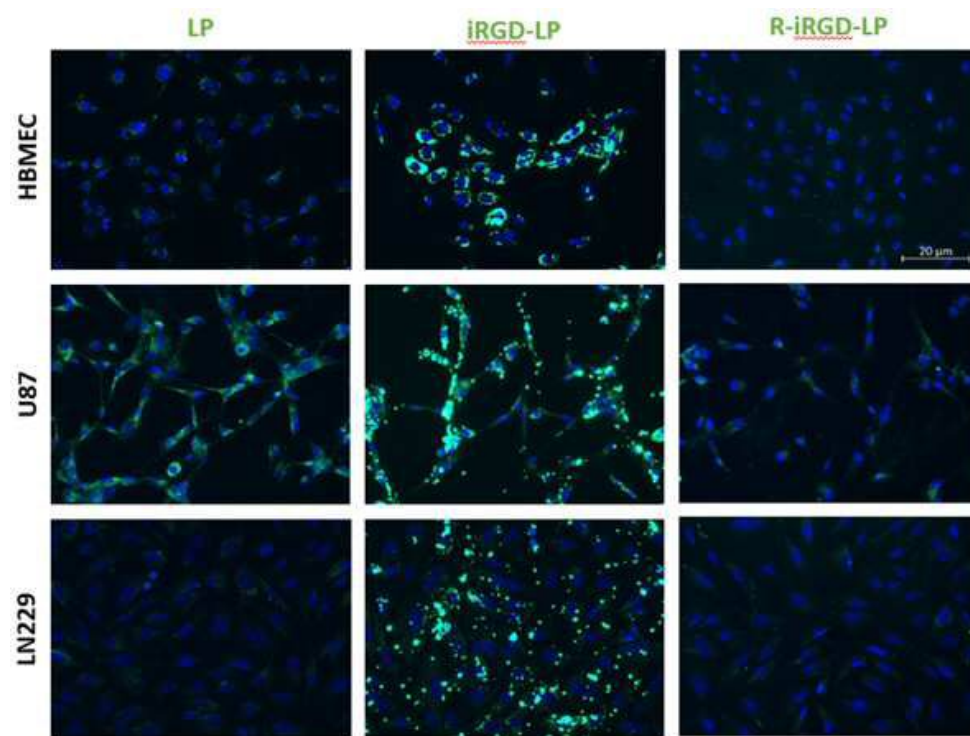
도면8



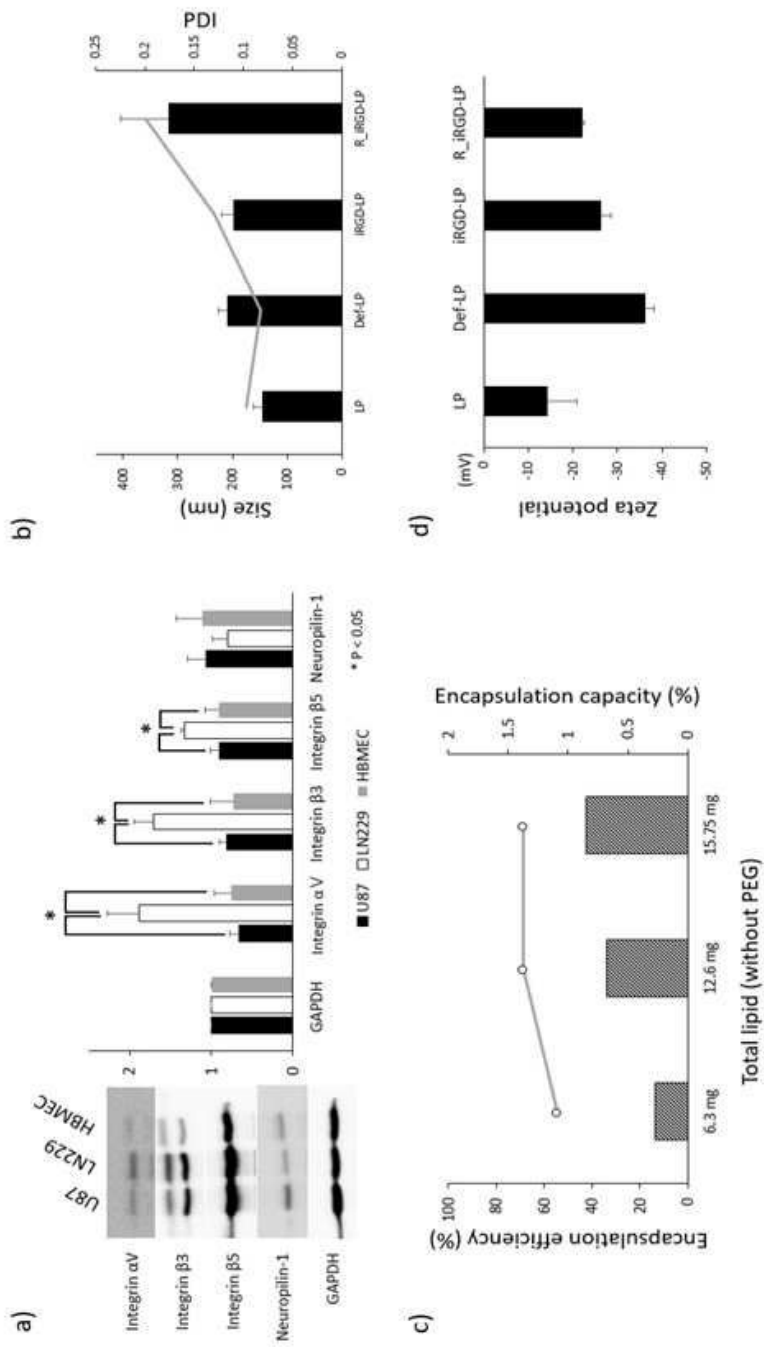
도면9



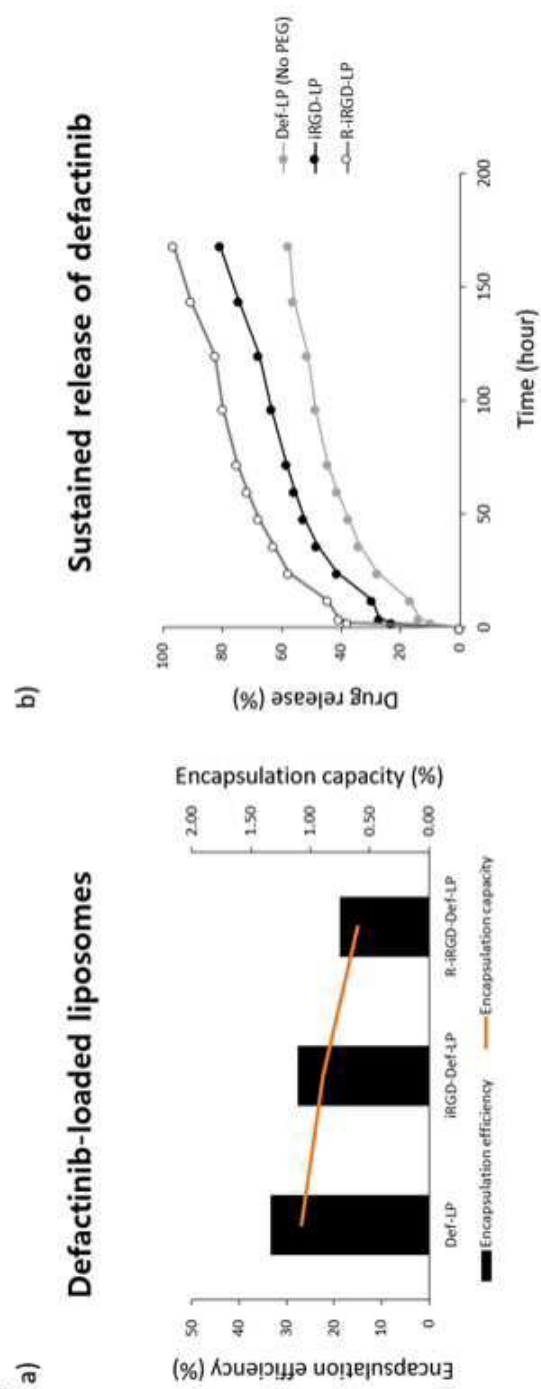
도면10



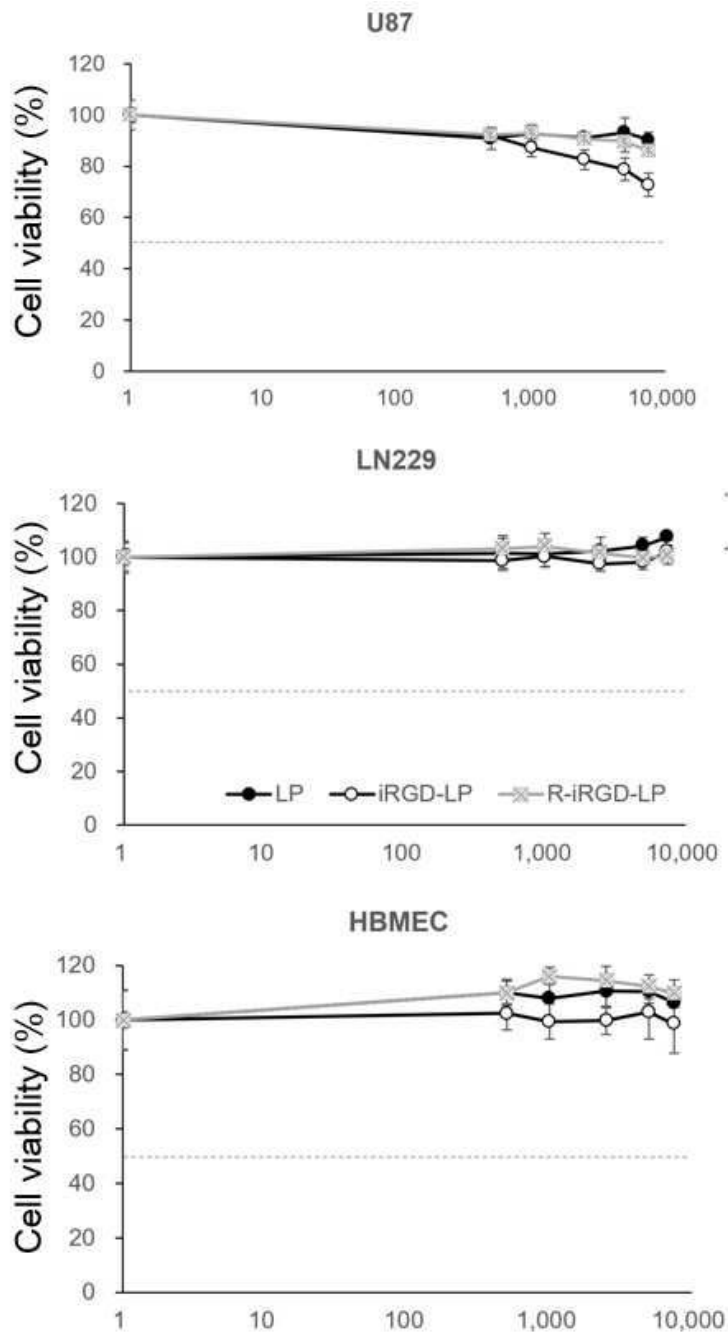
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.