

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 7월 25일 (25.07.2013)



(10) 국제공개번호
WO 2013/108983 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 17/14 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
C07K 14/775 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/009460
- (22) 국제출원일: 2012년 11월 9일 (09.11.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0007016 2012년 1월 20일 (20.01.2012) KR
10-2012-0125518 2012년 11월 7일 (07.11.2012) KR
- (71) 출원인: 성균관대학교 산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 440-746 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 권대혁 (KWEON, Dae Hyuk); 442-754 경기도 수원시 팔달구 우만2동 월드메르디앙 101동 1106호, Gyeonggi-do (KR). 신재윤 (SHIN, Jae Yoon); 406-736 인천시 연수구 송도동 풍림아이원 304동 604호, Incheon (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-973 서울시 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

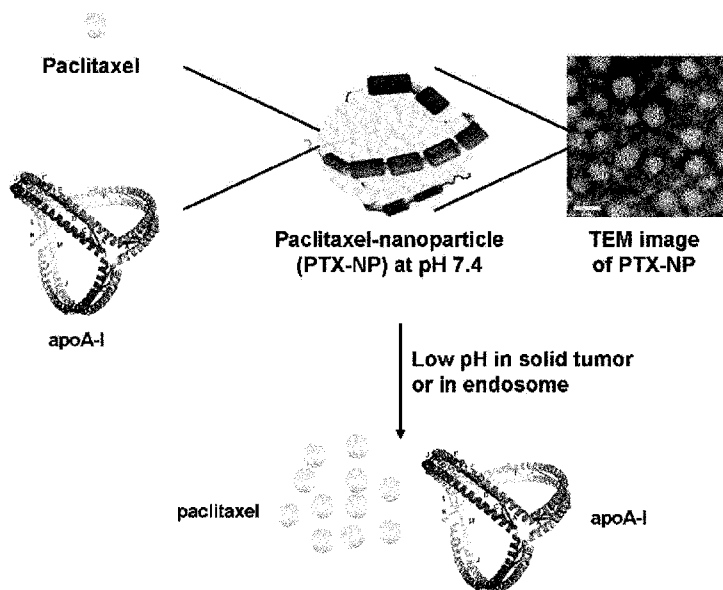
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PH-REACTIVE HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN-LIKE PARTICLE COMPLEX

(54) 발명의 명칭 : pH-반응 고밀도 리포단백질-유사 입자 결합체



(57) Abstract: The present invention relates to a pH-reactive high-density lipoprotein (HDL)-like particle complex, and more specifically, to a high-density lipoprotein-like particle complex comprising apolipoprotein A-I (apoA-I) and a drug trapped therein so as to release the drug trapped inside under an acidic pH condition, and a preparation method thereof. The high-density lipoprotein-like particle complex of the present invention can release a trapped drug under an acidic condition and shows stability even under a wide range of temperature change and a non-acidic condition, and thus could be widely used for developing a target-specific drug.

(57) 요약서: 본 발명은 pH-반응 고밀도 리포단백질-유사 입자 결합체에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 산성 pH 조건에서 내부에 포집된 약물을 방출할 수 있도록 아포리포단백질 A-I(apoA-I)과 이에 포집된 약물을 포함하는 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체는 산성조건에서 포집된 약물을 배출할 수 있으면서도, 산성조건이 아닌 경우에는 온도가 넓은 범위로

변화될 경우에도 안정성을 나타내므로, 표적 특이적인 약물의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: pH-반응 고밀도 리포단백질-유사 입자 결합체 기술분야

- [1] 본 발명은 pH-반응 고밀도 리포단백질-유사 입자 결합체에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 산성 pH 조건에서 내부에 포집된 약물을 방출할 수 있도록 아포리포단백질 A-I(apoA-I)과 이에 포집된 약물을 포함하는 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 최근, 리포솜을 이용한 약물전달시스템의 유용성이 대두되면서, 다양한 지질 성분 혼합을 통해 보다 효과적인 지질-기반 나노전달체를 제조하려는 연구들이 주목받고 있다. 주로, 리포솜 내부에 포집된 생리활성 성분이 생체세포에 높은 효율로 전달되어 활성성분의 효능을 최대한 발휘할 수 있도록 하고자, 리포솜의 구성 성분을 다양하게 하여 제조하는 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 이러한 연구의 일환으로서, 특정 세포에 대한 선택성을 향상시키기 위하여, pH, 온도 등과 같은 특정세포 특이적인 환경조건에서 약물을 전달할 수 있는 리포솜 형태의 나노입자(nano-particle, NP)를 들 수 있다. 생체내에 존재하는 모든 세포는 대체로 균일한 환경조건(특히, 온도조건 등)을 가지지만, 부분적으로는 세포특이적이거나 조직특이적인 환경조건을 갖기도 한다. 예를 들면, 정상조직에 비하여 암이 발병된 조직부위는 낮은 pH 수준을 나타낸다고 알려져 있다.
- [4] 이처럼, 특정한 환경조건이 요구되는 조직 또는 발병부위에 물질을 전달하거나 또는 치료용 약물을 전달하기 위하여는 상기 환경조건에서 포집된 약물의 방출을 조절할 수 있는 나노입자로 구성된 리포솜의 개발이 필수적으로 요구된다. 예를 들어, 폴리 에틸 아크릴산과 포스파티딜콜린이 리포솜의 외부에 결합하여 산도변화에 따라 리포솜의 구조를 변화시킬 수 있는 리포솜 복합체(Tirrell et al., *Macromolecules*, 1984, 17, 1692), 상기 폴리 에틸 아크릴산을 포함하는 지방족 고분자로 구성되어, 산도변화에 따라 리포솜을 구성하는 지방족 고분자의 구조가 변화될 수 있는 리포솜 복합체(Francis et al., *Biomacromolecules* 2001, 2, 741), 산성도 민감성 고분자로서 메타아크릴산과 n-알킬 메타아크릴레이트로 구성된 고분자를 이용한 고분자-리포솜 나노복합체(대한민국 특허등록 제716802호) 등이 개발되었으나 상기 아크릴산을 포함하는 지방족 고분자는 아크릴산의 경직성으로 인하여 안정적인 리포솜을 형성할 수 없다는 단점이 발견되었다.
- [5] 이러한 단점을 극복하기 위하여 다양한 연구를 수행한 결과, 유연성을 나타내는 인지질, 불포화 지방 및 펩타이드로 구성된 펩타이드-인지질 입자를

이용하여 제조된 리포솜-약물 복합체(WO 2009/073984), 양이온성 양 친매성 분자와,음이온성 양 친매성 분자로 구성된 pH 응답성 리포솜(WO 2010/104128) 등이 개발되었다. 이처럼 개발된 약물복합체 또는 리포솜은 여러가지 특성을 부여하기 위하여 다중성분을 포함하도록 구성되어 있는데, 이처럼 다중적인 구성요소를 포함하는 약물복합체 또는 리포솜은 장기적인 안정성이 입증되지 않는다는 단점이 있었다. 특정 질환에 사용되는 의약품 환자가 발생한 경우 즉각적으로 제조하여 환자에게 투여하는 것이 아니라, 대량으로 미리 제조하여 보관한 다음, 상기 의약품의 투여가 필요할 경우 환자에게 전달되므로, 상기 리포솜이 의약품으로 사용되기 위하여는 장기적인 안정성이 입증되어야만 하나, 상기 개발된 약물복합체 또는 리포솜은 다양한 구성요소로 인하여 각종 염에 대한 취약성을 나타내므로, 장기적인 안정성이 입증되지 않았다. 따라서, 조직특이적인 pH 변화에 따라 약물의 방출을 조절할 수 있으면서도 장기적으로 안정성이 유지될 수 있는 소재의 약물복합체 또는 리포솜의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명자들은 종래의 지질단백질로 알려진 아포리포단백질 A-I(apoA-I)을 이용하여 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체를 형성할 경우, pH 변화에 따라 약물의 방출을 조절할 수 있으면서도 단일물질로 구성되어 장기적으로 안정성이 유지될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 하나의 목적은 pH 의존적으로 포집된 물질을 방출할 수 있는 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체를 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 상기 HDL-유사 입자 결합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[11]

발명의 효과

[12] 본 발명의 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체는 산성조건에서 포집된 약물을 배출할 수 있으면서도, 산성조건이 아닌 경우에는 온도가 넓은 범위로 변화될 경우에도 안정성을 나타내므로, 표적 특이적인 약물의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[13]

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 본 발명의 pH 의존적으로 포집된 물질을 방출할 수 있는 나노파티클의 개략도이다.

- [15] 도 2는 PTX-NP 및 PTX-PL-NP의 크기를 결정하는 과정을 나타내는 그래프이다. (A)는 PTX-NP 및 PTX-PL-NP의 크기 배제 크로마토그래피 분석결과를 나타내는 그래프이고, (B)는 자유 apoA-I의 크기 배제 크로마토그래피 분석결과를 나타내는 그래프이며, (C)는 PTX-NP에 대한 동적광산란 분석결과를 나타내는 그래프이고, (D)는 PTX-PL-NP에 대한 동적광산란 분석결과를 나타내는 그래프이다.
- [16] 도 3은 본 발명의 pH 의존적으로 포집된 물질을 방출할 수 있는 나노파티클의 투과 전자 현미경 분석결과를 전자현미경 사진으로서, (A 및 B)는 PTX-NP의 2가지 대표적인 이미지를 나타내고, (C 및 D)는 PTX-PL-NP의 2가지 대표적인 이미지를 나타내며, 스케일 바는 20nm를 나타낸다.
- [17] 도 4는 PTX-NP로부터 PTX의 시간 및 pH-의존 배출성을 나타내는 그래프로서, (A)는 용해된 NPs 양에 비례한 정적광산란을 다양한 pH 조건하에서 시간의 함수로서 측정한 결과를 나타내고, (B)는 PTX-NP로부터의 apoA-I 껍질 제거를 SEC를 사용하여 분석한 결과를 나타낸다.
- [18] 도 5는 PTX-NP의 열안정성을 나타내는 그래프로서, 시료는 4°C(●), 25°C(○) 및 37°C(▼)에서 120시간 동안 항온 처리되었고, 리포솜 대조군으로서, 커다란 이중 층이 하나인 소포체를 4°C(△)에서 120 시간 동안 항온 처리하였으며, 원심분리에 의해 거대 침전물을 제거한 후 광 산란강도를 측정하였다(30분 동안 15,000rpm).
- [19] 도 6은 DX(doxorubicin), MTX(methotrexate), SF(Sorafenib) 또는 EpoB(Epothilone B)와 apoA-I를 반응시켜 제조한 각각의 HDL-유사 입자 결합체와 apoA-I의 크기를 비교한 그래프이다.
- [20] 도 7은 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체(Epo NP)로부터 해리된 EpoB와 원래의 EpoB의 크기를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [21] 도 8은 서로 다른 pH 조건에서 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체(Epo NP)의 상대적인 분산강도를 나타내는 그래프이다.
- [22] 도 9는 약물 또는 상기 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체가 처리된 SK-OV3 세포의 농도변화에 따른 상기 세포의 생존율 변화를 나타내는 그래프이다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 아포리포단백질 A-I(apoA-I) 및 이에 포집된 약물을 포함하고, pH 의존적으로 포집된 약물을 배출할 수 있는 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체를 제공한다.

[25]

- [26] 본 발명의 용어 "아포리포단백질 A-I(apoA-I)"이란, 분자량 28kDa의 243개의 아미노산으로 이루어진 단일 폴리펩타이드로 구성되고, 11개의 아미노산 혹은

22개의 아미노산으로 이루어진 8개의 반복단위 도메인을 가지며, HDL을 이루는 2차 구조의 알파-헬릭스의 비율이 60 내지 75%인 단백질을 의미하며, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열로부터 발현될 수 있는 단백질이 될 수 있다. 상기 apoA-I은 주로 주변조직으로부터 콜레스테롤을 제거하여 간 또는 다른 리포단백질로 운반하는 직접적인 역할을 수행하는 고밀도 리포단백질(HDL)의 구성요소로서 사용된다. 본 발명의 목적상 상기 apoA-I은 HDL-유사 입자 결합체를 구성하는 구성요소로서 사용되는데, 상기 apoA-I은 목적하는 약물을 포집하고, pH 의존적으로 포집된 약물을 배출할 수 있는 기능을 수행할 수 있는 모든 종류의 천연형 또는 변이체 단백질이 될 수 있다. 예를 들어, 목적하는 약물을 포집하고, pH 의존적으로 포집된 약물을 배출할 수 있는 한, 천연형 apoA-I 또는 천연형 apoA-I의 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 1개 또는 수 개의 아미노산의 치환, 결실, 삽입 또는 첨가 등을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 단백질 돌연변이체 또는 인위적인 변형체일 수 있고, 상기 천연형 apoA-I의 아미노산 서열의 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 97% 이상의 상동성을 갖는 단백질이 될 수도 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[27]

[28] 본 발명의 용어 "약물"이란, 상기 apoA-I에 의하여 포집되고, 산성 pH 조건에서 배출되어 목적을 달성할 수 있는 물질을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 약물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 산성 pH를 나타내는 조직에 투여되어 특정한 질환 또는 장애를 치료, 경감 또는 예방할 수 있는 물질이 될 수 있는데, 바람직하게는 링구조를 포함하여 apoA-I에 의한 포집과 배출이 용이한 파클리탁셀, 독소루비신, MTX(methotrexate), SF(Sorafenib), EpoB(Epothilone B), 사이클로스포린, UDCA(ursodeoxycholic acid), Ilaprazole, amine 유도체(예를 들어, leeevec 등) 뿐만 아니라 steroidal backbone을 갖는 약물이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[29]

[30] 본 발명의 일 실시예에 의하면, pH 의존적으로 포집된 약물을 배출할 수 있는 HDL-유사 입자 결합체를 제조하기 위하여, 인지질과 계면활성제의 존재하에서 가열을 통하여 약물로 사용된 파클리탁셀(PTX)을 유화시키고, 희석을 통하여 상기 계면활성제의 농도를 임계 미셀농도 이하로 저하시키면서 apoA-I을 가하여 혼합하고, 원심분리 및 크기 배제 크로마토그래피를 통하여 인지질, PTX 및 apoA-I으로 구성된 HDL-유사 입자 결합체(PTX-PL-NP)를 제조하고(실시예 1-2), 계면활성제의 존재하에 약물로 사용된 파클리탁셀(PTX)을 음파분쇄하여 계면활성제로 구성된 미셀내부에 PTX를 포집시킨 다음, 희석을 통하여 상기 계면활성제의 농도를 임계 미셀농도 이하로 저하시키면서 apoA-I을 가하여 혼합하고, 원심분리 및 크기 배제 크로마토그래피를 통하여 PTX 및 apoA-I으로

구성된 HDL-유사 입자 결합체(PTX-NP)를 제조하였으며(실시예 1-3) 이들의 수율을 비교한 결과 각각 66% 및 62.2%의 수율을 나타냄을 확인하였다(실시예 2-1 표 1 및 2).

[31] 아울러, 상기 제조된 각각의 HDL-유사 입자 결합체(PTX-PL-NP 및 PTX-NP)의 크기 및 형태를 확인한 결과, PTX-PN-NP는 12.2nm의 직경을 가지는 반면, PTX-NP는 9.2nm의 직경을 갖는 구조체임을 확인하였고(도 2c 및 d), PTX-NP는 원형 형태를 나타내는 반면(도 3), PTX-PL-NP는 테두리의 후광 원을 갖는 링-유사 구조를 나타냄을 확인하였다(도 3c 및 d).

[32] 또한, 상기 제조된 각각의 HDL-유사 입자 결합체(PTX-PL-NP 및 PTX-NP)의 pH 의존성 배출여부를 확인한 결과, PTX-PL-NP는 pH 3.8 내지 10.0에서 안정한 구조를 유지하였으나, PTX-NP는 중성 및 염기성 조건(pH 7.7 내지 10.0)에서는 안정한 구조를 유지한 반면, 산성조건(pH 3.8 및 5.5)에서는 구조가 붕괴되어 포집된 PTX가 배출됨을 확인하였다(도 4a). 뿐만 아니라, 상기 PTX-NP는 중성 및 염기성 조건에서는 광범위한 온도조건에서도 안정한 구조를 유지함을 확인하였다(도 5).

[33]

[34] 한편, PTX 이외의 다른 약물을 사용할 경우에도, HDL-유사 입자 결합체를 제조할 수 있는지를 확인하기 위하여, DX(doxorubicin), MTX(methotrexate), SF(Sorafenib) 또는 EpoB(Epothilone B)를 각각 apoA-I을 가하여, 각 약물과 apoA-I으로 구성된 HDL-유사 입자 결합체를 제조하고, 이들의 크기를 비교한 결과, 약물이 처리되지 않은 apoA-I과 별다른 차이를 나타내지 않았으므로, 상기 약물들 역시 PTX와 유사하게 apoA-I에 포집됨을 알 수 있었다(도 6).

[35] 아울러, 상기 약물중의 하나인 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체(Epo NP)로부터 해리된 EpoB와 원래의 EpoB를 비교한 결과 약물의 화학적 변형이 나타나지 않았고(도 7), 상기 Epo NP는 pH 의존적으로 포집된 EpoB를 배출할 수 있음을 확인하였으며(도 8), 난소로부터 유래되어 HER2를 과발현시키고, Sr-BI 리셉터를 낮은 수준으로 발현시키는 SK-OV3 세포에 약물 또는 상기 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체를 서로 다른 농도로 각각 처리할 경우, 약물의 처리에 의해 SK-OV3 세포의 손상율이 높은 수준을 나타내는 반면, 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체의 처리에 의하여는 SK-OV3 세포의 손상율이 낮은 수준을 나타냄을 확인하였다(도 9).

[36]

[37] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 HDL-유사 입자 결합체의 제조방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 HDL-유사 입자 결합체의 제조방법은 (a) 목적하는 약물과 계면활성제를 포함하는 완충액을 음파분쇄하여, 계면활성제로 구성된 미셀내부에 목적하는 약물을 포집시키는 단계; (b) 상기 음파분쇄된 반응물에 아포리포단백질 A-I(apoA-I)을 포함하는 완충액을 가하여 반응물을 희석시키는 단계; 및 (c) 희석된 반응물로부터

리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체를 회수하는 단계를 포함한다.

[38]

[39] 상기 방법에 있어서, 상기 약물은 링구조를 포함하여 apoA-I에 의한 포집과 배출이 용이한 약물이 될 수 있고, 바람직하게는 파클리탁셀이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 계면활성제는 음파분쇄에 의하여 미셀을 형성할 수 있는 것을 사용할 수 있고, 바람직하게는 소듐 콜레이트가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 아울러, 상기 완충액은 중성 pH를 유지할 수 있는 모든 종류의 완충액을 사용할 수 있고, 바람직하게는 10mM Tris HCl과 100mM NaCl을 포함하여 pH 7.4를 유지할 수 있는 디스크 형성 완충액이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 다음으로, 상기 음파분쇄는 저온상의 온도조건에서 발열이 되지 않도록 음파의 최소출력의 조건으로 짧은 시간간격을 두고 조사하는 조건으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 5 내지 15°C의 온도조건에서 전체출력의 5 내지 20%의 출력으로 1 내지 3초 간격으로 5 내지 20초 동안 1 내지 10회로 음파를 조사하는 조건으로 수행할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[40]

[41] 또 다음으로, 상기 희석은 반응액에 포함된 계면활성제의 농도를 저하시켜서 계면활성제로 인하여 형성된 미셀을 제거하려는 목적과, 상기 약물에 적정 몰비의 apoA-I을 가하기 위한 목적으로 수행되는데, 대체로 apoA-I이 적정농도로 용해된 동일한 완충액을 부가하는 방식으로 수행된다. 이때, 상기 약물과 부가된 apoA-I의 혼합비는 바람직하게는 1:10 내지 1:200(몰비)일 수 있고, 보다 바람직하게는 1:20 내지 1:150(몰비)일 수 있으며, 가장 바람직하게는 1:50 내지 1:100(몰비)일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 끝으로, 상기 HDL-유사 입자 결합체를 회수하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 크기 배제 크로마토그래피 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[42]

한편, 상기 방법에 있어서, HDL-유사 입자 결합체의 제조수율을 향상시키고, 불순물을 용이하게 제거하기 위하여, 상기 (b) 단계 이후에, 계면활성제를 완전히 제거하거나 또는 희석된 반응물로부터 HDL-유사 입자 결합체를 회수하기 전에 반응물을 원심분리하여 침전물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수도 있다. 이때, 상기 계면활성제의 제거는 계면활성제 흡착제를 처리하는 방법, 투석방법, 크로마토그래피 방법 등을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 계면활성제 흡착제로는 폴리스티렌 혼성중합체(polystyrene copolymer). 바람직하게는 Bio-bead SM2, XAD 1, XAD 2, XAD 3, XAD 4, IRC 등을 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 크로마토그래피 방법은 겔여과 크로마토그래피 방법을 이용하여 수행할 수 있으나, 이 또한 특별히 제한되지 않는다.

[43]

발명의 실시를 위한 형태

[44]

[45] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] 실시예 1: 재료 및 방법

[48]

[49] 실시예 1-1: 재조합 apoA-I의 발현 및 정제

[50]

[51] 코돈-최적화된 인간 apoA-I의 발현은 이전에 기술된 발현 벡터인 pNFXex-apoA-I를 이용한 pET 단백질 발현 시스템(Novagen, 메디슨, 위스콘신)을 사용하여 실시하였다(R.O. Ryan, et al., Protein Expr. Purif., 27:98-103, 2003). His-태그된 apoA-I의 정제는 공지된 바에 따라 수행하였다(J.Y. Shin, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 388:217-221, 2009).

[52]

[53] 실시예 1-2: 인지질을 이용한 HDL-유사 파클리탁셀 나노파티클의 제조

[54]

[55] 인지질의 일종인 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)을 클로로포름에 25mM의 스톡 용액으로 제조하였고 테스트 튜브의 내벽에 지질 필름을 생성하고자 질소가스로 건조하였다. 인지질 필름을 포함하는 글래스 튜브를 진공상태에서 하룻밤 위치시켜 남은 용매를 제거하였다. 건조된 POPC의 필름을 계면활성제의 일종인 100mM 소듐 콜레이트가 첨가된 디스크 형성 완충액(10mM Tris HCl, 100mM NaCl, pH 7.4)에 혼합하고 60°C에서 가열하는 방식으로 용해시켜서 지질 대 콜레이트의 최종 비율을 1:4로 맞추고, 완전한 용해를 위해 37°C에서 2시간 동안 추가로 용해시켰다. 그런 다음, 1.64mM POPC 용액 0.1mL를 100mM 소듐 콜레이트를 포함하는 디스크 형성 완충액에 용해된 4mg/mL 농도의 파클리탁셀(PTX, 1.64mM)과 혼합하였다. PTX-PL-NP의 형성을 유도하기 위해, 혼합 용액을 정제된 apoA-I를 포함하는 2mL 디스크 형성 완충액으로 희석하여 상기 소듐 콜레이트 농도를 임계 미셀 농도(critical micelle concentration) 아래로 저하시켜 제거하였으며, 이때, apoA-I 대 (PTX+POPC)의 혼합비율은 1:75(몰비)로 유지하였다.

[56]

상기 희석된 혼합용액을 15,000rpm에서 30분간 원심분리하여, 단백질과 지질이 응집되어 침전된 침전물을 제거하고, 상층액을 수득하였다. 상기 수득한 상층액을 25°C로 유지하면서, ACTA FPLC 장치(GE Healthcare, Buckinghamshire, 영국)에서 Superdex-200 10/300 GL 컬럼을 사용하여 크기 배제

그로마토그래피(SEC)에 적용하였다. 이때, 상기 컬럼을 적절한 완충용액(10mM Tris HCl, pH 8.0)을 사용하여 평형화하고, 시료의 주입량은 100 μ l이며, 시료의 주입속도는 0.5ml/분의 조건으로 수행하였다.

[57] 상기 SEC를 수행한 결과, HDL-유사 파클리탁셀 나노파티클(PTX-PL-NP)을 제조하였고, 50 내지 60%의 최종 PTX 회수율을 나타내었다.

[58]

[59] 실시예 1-3: 인지질을 이용하지 않은 HDL-유사 파클리탁셀 나노파티클의 제조

[60]

[61] 상기 실시예 1-2에 개시된 바와 같이, HDL-유사 입자 결합체를 위해 널리 사용된 절차를 따라 PTX-PL-NP를 수득할 수 있었으나, 인지질을 포함하지 않는 HDL-유사 파클리탁셀 나노파티클(PTX-NP)은 상기와 같은 방법으로 형성될 수 없었다.

[62] 이에, 인지질을 사용하지 않고서도 PTX-NP를 높은 수율로 제조할 수 있는 방법을 개발하기 위하여, 100mM 소듐 콜레이트와 4mg/ml로 용해된 PTX(1.64mM)를 포함하는 디스크 형성 완충액을 음파분쇄방법에 적용하여, 소듐 콜레이트에 의하여 형성되는 미셀내부에 PTX를 포집시켰다. 이때, 사용된 음파분쇄조건은 음파가 출력되는 탐침은 마이크로팁(micro-tip)형태로 시료 내부로 탐침이 가능한 크기를 이용하여 최소출력 20%내로 구성하고 발열이 일어나지 않도록 저온 상에서 1초간격으로 하여 전체 10초 3회 반복을 하였다. 이어, 상기 음파분쇄된 디스크 형성 완충액을 apoA-I를 포함하는 2ml 디스크 형성 완충액으로 희석하여 소듐 콜레이트 농도를 임계 미셀 농도 아래로 저하시켰으며, 이때, apoA-I 대 PTX의 혼합비율은 1:100(몰비)이었다.

[63] 그런 다음, 상기 희석된 혼합용액에 계면활성제 흡착제인 Bio-beads SM-2(bio-Rad Laboratories)를 첨가하여 임계 미셀농도 이하로 존재하는 소듐 콜레이트를 완전히 제거한 다음, 실시예 1-2와 동일하게 원심분리 및 크기 배제 그로마토그래피(SEC)에 순차적으로 적용하여 HDL-유사 입자 결합체(PTX-NP)를 제조하고 그에 포함된 apoA-I의 농도, PTX의 농도 및 제조수율을 측정하였다.

[64]

[65] 실시예 1-4: 동적광산란법 및 투과전자현미경

[66]

[67] 상기 실시예 1-2 및 1-3에서 각각 제조한 HDL-유사 입자 결합체(PTX-PL-NP 및 PTX-NP)의 크기 분배는 Dynapro apparatus(Wyatt Technology, 산타 바바라, 캘리포니아)를 사용한 동적 레이저광 산란법으로 결정하였다. 산란 각도 및 온도는 각각 90도 및 25°C로 고정하였다. LIBRA 120 전자 현미경(Carl Zeiss, Jena, 독일)에서 에너지 필터-투과전자현미경을 사용하였다. HDL-유사 입자 결합체를 탄소로 코팅된 100 메쉬 구리 그리드(mesh copper grid)에 침전시킨 후, 그리드를 필터 페이퍼로 두들겨 표면의 물을 제거하였고 2% 우라닐 아세테이트를

사용하여 음성적으로 염색하였다. 상기 샘플은 측정 전에 공기로 건조하였다.

[68]

[69] 실시예 1-5: 파클리탁셀의 정량 검사

[70]

[71] a Capcell Pak C18 MG 역상 컬럼(Shiseido, 도쿄, 일본) 및 자외선 감지기가 장착된 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 PTX를 정량하였다. 순수 에탄올을 1.0ml/분의 유속으로 등용매 이동상으로 사용하였다. 파클리탁셀의 농도를 표준 곡선으로부터 정량하였다.

[72]

[73] 실시예 1-6: HDL-유사 입자 결합체로부터 apoA-I의 시간 의존적 제거

[74]

[75] HDL-유사 입자 결합체로부터의 PTX 배출을 정적 광 산란법을 사용하여 관찰하였다. 500nm에서 여기 및 방출을 가지고 Molecular Device SpectraMax M2 Fluorimeter를 사용하여 정적인 광 산란을 측정하였다. 같은 pH(7.4)에서 2시간 동안 값을 측정한 후에, 시료의 pH를 증가시키거나 또는 저하시켰다.

[76]

[77] 실시예 2: 결과

[78]

[79] 실시예 2-1: 파클리탁셀을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체의 제조

[80]

[81] 지금까지 보고된 다양한 HDL-유사 입자 결합체는 pH 의존성을 나타내지 않았다. 거의 모든 HDL-유사 입자 결합체는 인지질, 콜레스테롤 및 콜레스테릴 에스테르 뿐만 아니라 지방 친화성 약물을 포함하였다. 포스페티딜콜린과 같은 인지질이 원반 나노구조의 가장자리를 둘러싸는 apoA-I 결합에 중요하기 때문에, NP로부터 인지질을 제외하면 pH와 같은 환경적 변화에 민감도를 나타낼 것이라고 추론하였다.

[82] 이러한 추론을 확인하기 위해, apoA-I를 사용하여 2가지 형태의 HDL-유사 입자 결합체(PTX-PL-NP 및 PTX-NP)를 제조하고, 역상크로마토그래피 방법을 이용하여, 각 결합체의 제조시 사용된 초기 파클리탁셀의 농도, 각 결합체에 포집된 파클리탁셀의 최종농도 및 제조수율을 각각 산출하였다.

[83]

[84] 먼저, 실시예 1-2의 방법으로 제조된 HDL-유사 입자 결합체(PTX-PL-NP)의 경우, 초기 파클리탁셀 및 각 결합체에 포집된 파클리탁셀을 각각 역상크로마토그래피로 정량분석하여 각각의 크로마토그래프의 면적을 산출하고, 초기 파클리탁셀의 면적에 대한 각 결합체에 포집된 파클리탁셀의 면적의 비율을 산출하여, 각 결합체에 포집된 파클리탁셀의 최종농도 및 제조수율을 각각 산출하였다(표 1).

[85]

[86] 표 1

[Table 1]

PTX-PL-NP에 포함된 파클리탁셀의 농도 및 제조수율

제조 방법	초기 파클리탁셀($\mu\text{g}/\text{ml}$)	최종 파클리탁셀($\mu\text{g}/\text{ml}$)	수율(%)
희석투석가열 + 희석음파분쇄 + 희석	1400140014001400	NDND302924	NDND22 66

[87] a 세제 제거전 혼합 용액에 용해된 파클리탁셀의 농도

[88] b SEC 정제 후 HDL-유사 입자 결합체에 존재하는 파클리탁셀의 농도

[89] ND: 검출되지 않음

[90]

[91] 상기 표 1에서 보듯이, 상기 apoA-I가 수용성 배지에서 상당히 가용성을 나타내에도 불구하고, 희석방법 및 투석방법을 각각 단독적으로 사용할 경우에는 PTX가 포집된 정상적인 HDL-유사 입자 결합체가 형성되지 않았으나, 가열방법 및 희석방법을 순차적으로 적용하거나 또는 음파분쇄방법 및 희석방법을 순차적으로 적용할 경우에는, PTX가 포집된 정상적인 HDL-유사 입자 결합체가 형성됨을 확인할 수 있었다.

[92] 특히, 가열방법 대신에 음파분쇄방법을 사용할 경우, 제조수율이 약 3배로 증가함을 확인하였으므로, 가열방법 보다는 음파분쇄방법을 이용할 경우, PTX의 유화효율을 향상시켜서 HDL-유사 입자 결합체의 제조수율을 향상시킬 수 있는 것으로 분석되었다.

[93]

[94] 다음으로, 실시예 1-3의 방법으로 제조된 HDL-유사 입자 결합체(PTX-NP)의 경우, PTX-PL-NP의 결과와는 달리, 단순 희석방법 및 투석방법 뿐만 아니라, 가열 및 희석방법을 순차적으로 적용한 경우에도, PTX가 포집된 정상적인 HDL-유사 입자 결합체가 형성되지 않았으므로, 음파분쇄방법 및 희석방법을 순차적으로 적용하여 HDL-유사 입자 결합체를 제조할 수 있음을 확인하였다(표 2).

[95]

[96] 표 2

[Table 2]

PTX-NP에 포함된 apoA-I과 파클리탁셀의 농도 및 제조수율

제조 방법	apoA-I($\mu\text{g}/\text{ml}$)	최종 파클리탁셀($\mu\text{g}/\text{ml}$)	수율(%)
음파분쇄 + 희석	560	924	62.2

[97]

- [98] 상기 표 2에서 보듯이, 음파분쇄방법 및 회석방법을 순차적으로 적용하여 제조된 HDL-유사 입자 결합체의 제조수율은 62.2%로서 실시예 1-2의 방법으로 제조된 결합체의 제조수율과 유사한 수준을 나타내었다.
- [99] 아울러, 상기 제조된 PTX-NP에 포함된 단백질과 파클리탁셀의 비율을 몰비로 환산하여 비교하면 약 1:55로 산출되었는데, 이러한 몰비는 apoA-I 한 분자가 약 110개의 PTX 분자를 포집한다는 것을 의미하는 것으로 분석되었다.
- [100]
- [101] **실시예 2-2: 파클리탁셀 나노파티클의 크기 및 형태**
- [102]
- [103] 상기 제조된 각각의 HDL-유사 입자 결합체인 PTX-NP 및 PTX-PL-NP를 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 분석한 결과, PTX-NP의 피크는 PTX-PL-NP의 피크보다 더 높은 용출 부피로 약간 이동하였으므로, PTX-NP가 PTX-PL-NP보다 상대적으로 작은 크기를 갖는 것으로 분석되었다(도 2a).
- [104] 아울러, 상기 각각의 HDL-유사 입자 결합체를 동적광산란 분석에 적용한 결과, PTX-PL-NP는 12.2nm의 직경을 가지는 반면, PTX-NP는 9.2nm의 직경을 갖는 구조체임을 확인하였다(도 2c 및 d).
- [105] 한편, 투과 전자 현미경 분석결과, PTX-NP는 원형 형태를 나타내는 반면(도 3), PTX-PL-NP는 테두리의 후광 원을 갖는 링-유사 구조를 나타냄을 확인하였다(도 3c 및 d).
- [106]
- [107] 상술한 바와 같이, 상기 제조된 각각의 HDL-유사 입자 결합체인 PTX-NP 및 PTX-PL-NP는 서로 상이한 구조적 특성을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 구조적 특성은 인지질의 유무에 의하여 기인한 것으로 파악되었으므로, 상기 인지질은 HDL-유사 입자 결합체의 원반구조를 유지하는 구성요소로서 사용된 것으로 분석되었다.
- [108]
- [109] **실시예 2-3: PTX-NP의 pH 의존성 반응**
- [110]
- [111] 암 화학요법을 위해 pH 의존성 HDL-유사 입자 결합체의 중요한 특징은 낮은 pH에서 약물의 선택적 방출이고 상기 약물은 생리학적 pH에서 NP내에 안정적으로 유지되어야 한다는 점이다. HDL-유사 입자 결합체의 pH-의존 행동을 측정하고자, 정적 광 산란법이 사용되었다. 순수한 apoA-I의 크기는 HDL-유사 입자 결합체보다 현저하게 작기 때문에(도 2b), 상기 HDL-유사 입자 결합체로부터 PTX를 제거하면, 정적 광 산란법에 의해 측정된 수치가 감소하게 된다. 광 산란 강도는 HDL-유사 입자 결합체의 양에 비례하는데, 상기 각 실시예에서 제조된 HDL-유사 입자 결합체(PTX-PL-NP 및 PTX-NP)의 정적 광 산란값을 pH 3.8, 5.5 및 7.4에서 6시간 동안 측정하였다(도 4a).
- [112] 생리학적 pH인 pH 7.7에서는, 두 NPs에 대한 광 산란 강도에서 어떠한 변화도

없었다. PTX-NP가 인지질이 없음에도 불구하고, 그것은 생리학적 pH에서 PTX-PL-NP 만큼 안정하였다. 대조적으로, PTX-NP의 광 산란 강도는 pH 5.5에서 현저하게 감소하였고, 강도 감소 속도는 pH 3.8에서 더욱 빨랐다. PTX-PL-NP는 심지어 pH 3.8에서도 안정적으로 유지되었다. 흥미롭게도, 두 NPs는 염기성 pH 범위(pH 8.2 내지 10.0)에서 광 산란 강도에서 어떠한 차이도 보여주지 않았다. 낮은 pH에서 PTX-NP의 낮추어진 광 산란 강도가 PTX의 방출에 의한 것인지의 여부를 확인하기 위하여, pH 7.4 또는 5.5에서 PTX-NP를 5시간동안 항온처리하고, SEC을 사용하여 분석하였다. 그 결과, 생리학적 pH인 pH 7.4에서는 PTX-NP의 함량이 안정적으로 유지되었으나, pH 5.5에서는 PTX-NP의 농도가 감소하고, 용액중에 순수한 apoA-I이 방출함을 확인하였다.

[113] 상기 결과로부터 PTX-NP가 낮은 pH에서 PTX를 선택적으로 배출할 수 있지만(pH 의존성 배출능력), PTX-PL-NP는 pH 의존성 배출능력을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

[114] 상기 pH 의존성 배출능력을 나타내는 PTX-NP의 안정성을 분석한 결과, pH 7 내지 10의 조건에서 25°C로 5일간 유지할 경우에도, 광 산란 강도가 변화되지 않았고, 광범위한 온도 범위(4, 25 및 37°C)에서도 안정성이 유지됨을 확인하였으나, 대조군으로 사용된 결합체는 이러한 안정성을 나타내지 않음을 알 수 있었다(도 5).

[115]

[116] 상술한 결과를 종합하면, 인지질이 결핍된 PTX-NP는 오직 산성 pH 범위에서 pH 의존적으로 포집된 물질을 방출함을 알 수 있으므로, 상기 PTX-NP는 산성 pH 조건을 조성하는 생체내 암세포의 치료를 위한 적합한 치료제로서 사용될 수 있을 것이다.

[117]

[118] 실시예 3: 파클리탁셀 이외의 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체의 제조 및 특성 평가

[119]

[120] 상기 실시예 2에서 확인된 파클리탁셀 이외의 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체를 제조하고, 상기 제조된 각각의 HDL-유사 입자 결합체가 상기 실시예 2의 것과 동일한 특성을 나타내는지 확인하고자 하였다.

[121]

[122] 실시예 3-1: 파클리탁셀 이외의 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체의 제조

[123]

[124] 크기배제 크로마토 그래피로서 Superdex-200 10/300 GL 컬럼 대신에 Superose-12 10/300 GL 컬럼을 사용하고, 약물로서 파클리탁셀 대신에 DX(doxorubicin), MTX(methotrexate), SF(Sorafenib) 또는 EpoB(Epothilone B)을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-3과 동일한 방법으로 DX, MTX, SF

또는 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체를 제조하였다.

[125]

[126] 실시예 3-2: 파클리탁셀 이외의 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체의 크기분석

[127]

[128] 상기 실시예 3-1에서 제조한 각각의 HDL-유사 입자 결합체가 정상적으로 형성되었는지를 확인하기 위하여, 제조된 각 HDL-유사 입자 결합체의 크기를 약물을 포집하지 않은 apoA-I의 크기와 비교하였다(도 6). 도 6은

DX(doxorubicin), MTX(methotrexate), SF(Sorafenib) 또는 EpoB(Epothilone B)와 apoA-I를 반응시켜 제조한 각각의 HDL-유사 입자 결합체와 apoA-I의 크기를 비교한 그래프이다. 도 6에서 보듯이, 각각의 서로 다른 약물이 포집된 4종의 HDL-유사 입자 결합체는 약물을 포집하지 않은 apoA-I와 동일한 용출곡선을 나타내므로, 상기 HDL-유사 입자 결합체는 apoA-I의 내부에 약물이 포집된 형태로 제조된 것임을 알 수 있었다.

[129] 이는 HDL-유사 입자 결합체가 DX, MTX, SF 또는 EpoB를 포함할 경우에도, 파클리탁셀과 유사하게, apoA-I의 내부에 포집된 형태로 구성됨을 의미하는 것으로 분석되었다.

[130]

[131] 실시예 3-3: HDL-유사 입자 결합체에 포집된 약물의 변형여부 분석

[132]

[133] 상기 실시예 3-1에서 제조된 각각의 HDL-유사 입자 결합체 중에서 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체인 Epo NP를 대상으로 하여, 포집에 의해 약물이 화학적으로 변형되는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[134] 구체적으로, 상기 제조된 Epo NP에 포집된 약물을 추출하기 위해서 hexane : 2-propanol을 5:3(v/v)의 비율로 첨가하여 4°C에서 약 12시간 동안 반응시키고, 반응이 종료된 후 반응물을 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 상기 수득한 상층액에 질소가스처리 및 진공처리를 순차적으로 적용하여 용매를 완전히 제거하였다. 상기 용매가 제거된 반응산물에 메탄올을 가하여 용해시키고, Capcell Pak C18 MG 역상 컬럼(Shiseido, 도쿄, 일본) 및 자외선 감지기가 장착된 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에 적용하여 Epo NP로부터 추출된 Epo B를 분석한 다음, 분석 패턴을 확인하여 화학적 변화 여부를 확인하였다(도 7). 이때, HPLC 분석조건은 이동상으로서 순수 메탄올을 사용하고, 상기 이동상의 속도를 1.0ml/분으로 설정하였으며, 249nm파장에서 분석하였다. 도 7은 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체(Epo NP)로부터 해리된 EpoB와 원래의 EpoB의 크기를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[135] 도 7에서 보듯이, EpoB가 apoA-I의 내부에 포집되어 HDL-유사 입자 결합체를 형성하여도, EpoB가 화학적으로 변형되지는 않음을 알 수 있었다.

[136]

[137] **실시예 3-4: EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체의 pH 의존성 반응**

[138]

[139] 상기 실시예 2-3의 결과로부터 PTX-NP가 낮은 pH에서 PTX를 선택적으로 배출할 수 있지만(pH 의존성 배출능력), PTX-PL-NP는 pH 의존성 배출능력을 나타내지 않음을 확인하였으므로, 상기 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체인 Epo NP도 동일한 능력을 갖는지의 여부를 확인하고자 하였다. 상기 능력을 확인하기 위하여 정적 광 산란법을 사용하였는데, Epo NP로부터 EpoB가 방출되면 정적 광 산란도(분산강도)가 방출된 EpoB 농도에 비례하는 특성을 이용하였다.

[140]

[141] 구체적으로, 상기 Epo NP를 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 10의 조건에 노출시키고, 상기 Epo NP로부터 방출된 Epo B의 상대적인 분산강도를 정적 광 산란법을 사용하여 측정하고 상호비교하였다(도 8). 이때, 정적 광 산란법은 여기 및 방출파장을 500nm로 설정한 Molecular Device SpectraMax M2 Fluorimeter를 사용하여 수행하였는데, pH 7.4에서 약 2시간 동안 분산강도를 측정하고 이를 기준값으로 설정한 후, 상기 시료의 pH를 증가 또는 감소시킨 후에 다시 분산강도를 측정하고, 이들 분산강도의 변화수준에 근거하여 pH 의존성 배출능력을 평가하였다.

[142] 도 8은 서로 다른 pH 조건에서 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체(Epo NP)의 상대적인 분산강도를 나타내는 그래프이다. 도 8에서 보듯이, pH 7 내지 10의 조건에서는 Epo NP의 분산강도가 감소되지 않았으나, pH 3 내지 6의 조건에서는 Epo NP의 분산강도가 감소되어 상대적으로 저하되었으므로, pH 3 내지 6의 조건에서는 Epo NP로부터 EpoB가 방출되며, 이러한 특성을 가지는 Epo-NP는 산성 pH 조건을 조성하는 생체내 암세포의 치료를 위한 적합한 치료제로서 사용될 수 있음을 시사하였다.

[143]

[144] **실시예 3-5: HDL-유사 입자 결합체의 안전성 평가**

[145]

[146] 약물보다는 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체가 세포에 대한 안전성을 향상시킬 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여, 파클리탁셀을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체인 PTX-NP와 EpoB를 포함하는 HDL-유사 입자 결합체인 EpoB-NP를 각각 제작하고, 이들 각 결합체 또는 상기 각 약물을 난소로부터 유래되어 HER2를 과발현시키고, Sr-BI 리셉터를 낮은 수준으로 발현시키는 SK-OV3 세포에 서로 다른 농도(0 내지 100nM)로 처리하고, 처리농도 변화에 따른 SK-OV3 세포의 생존율 변화를 측정하고자 하였다.

[147] 먼저, SK-OV3 세포는 RPMI 1640 with 2.05mM L-glutamine, with 10% FBS, with Antibiotic Antimycotic solution (Hyclone)로 구성된 배지를 이용하여 초도 배양하고, 배양된 세포의 수를 계수한 다음, 4×10^4 개의 세포를 96 well cell

culture plate (SPL)의 각 웰에 각각 분주하고 CO₂ incubator MCO-18AIC (Sanyo Electric Co.)으로 37°C, 5% CO₂에서 24시간동안 배양하였다.

[148] 다음으로, 대조군 시료로서 HDL-유사-입자 결합체의 음성대조군으로는 PBS(8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ 및 0.24 g KH₂PO₄, pH 7.4)를 세포에 처리한 시료를 사용하고; 약물의 음성대조군으로는 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 세포에 처리한 시료를 사용하였으며; 세포가 완전히 죽었을 때의 결과 값을 나타내는 양성대조군으로는 상기 배양된 세포에 2% Triton X-100을 2시간 처리한 시료를 사용하고; 무처리 시료(Blank)로서, 세포 없이 배지만 plate well에 분주한 시료를 사용하였다.

[149] 상술한 바와 같이, 약물 또는 HDL-유사-입자 결합체의 부작용을 확인하기 위하여, 상기 약물 또는 HDL-유사-입자 결합체를 상기 배양된 세포에 0nM, 1nM, 2.5nM, 5nM, 10nM, 50nM 또는 100nM가 되도록 처리하고, 상기 약물 또는 HDL-유사-입자 결합체가 처리된 세포의 생존율을 MTT 분석법으로 측정하였으며, 측정된 값을 상기 각 대조군의 시료를 대상으로 MTT 분석법을 수행하여 얻어진 세포 생존율과 비교하였다(도 9).

[150] 끝으로, MTT 분석법은 다음과 같이 수행하였다: 먼저, 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide (MTT, Calbiochem)을 5mg/ml 농도로 PBS에 용해시킨 MTT 농축액을 여과 및 희석(10%)하여 MTT 용액을 준비하였다. 한편, 상기 약물 또는 HDL-유사-입자 결합체가 처리된 세포에서 배지와 약물을 제거한 후에 상기 준비된 MTT 용액을 각 웰당 100 μ l씩 분주한 다음, 37°C, 5% CO₂에서 3시간 동안 1차 반응시키고, 반응이 종료된 후, 배지와 MTT 용액을 제거 하고 100% DMSO를 각 웰당 100 μ l씩 분주하고, 차광조건에서 20분간 상온에서 2차 반응시켰다. 2차 반응이 종료된 후, 분광광도계 (Spectra M2, Molecular device)를 이용하여 시료를 대상으로 570nm에서 흡광도를 측정하고, 측정된 수치를 하기 식에 대입하여 세포 생존율을 산출하였다.

[151]

[152] 세포 생존율(%) = (S-P-B)/(N-P-B) X 100

[153] 상기 식에서,

[154] S: 약물 또는 HDL-유사-입자 결합체를 처리한 시료의 흡광도

[155] B: 무처리 시료의 흡광도

[156] P: 양성대조군의 흡광도

[157] N: 음성 대조군의 흡광도

[158]

[159] 도 9는 약물 또는 상기 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체가 처리된 SK-OV3 세포의 농도변화에 따른 상기 세포의 생존율 변화를 나타내는 그래프이다.

[160] 도 9에서 보듯이, 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체를 처리할 경우에는

100nM의 농도로 처리하여도 50% 이상의 세포 생존율을 나타내는 반면, 약물을 처리할 경우에는 10nM의 농도로 처리하여도 50% 이하의 세포 생존율을 나타냄을 확인하였으므로, 약물을 포함하는 HDL-유사 입자 결합체는 세포에 대하여 높은 안전성을 나타냄을 확인하였다.

[161]

청구범위

- [청구항 1] 아포리포단백질 A-I(apoA-I) 및 이에 포집된 약물을 포함하고, pH 의존적으로 포집된 약물을 배출할 수 있는 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 아포리포단백질 A-I(apoA-I)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 약물은 링구조를 포함하는 것인 결합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 약물은 파클리탁셀, DX(doxorubicin), MTX(methotrexate), SF(Sorafenib) 및 EpoB(Epothilone B)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 결합체.
- [청구항 5] 목적하는 약물을 아포리포단백질 A-I(apoA-I)에 포집시키는 단계를 포함하여, pH 의존적으로 포집된 약물을 배출할 수 있는 고밀도 리포단백질(HDL)-유사 입자 결합체의 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 아포리포단백질 A-I(apoA-I)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,
인지질 또는 콜레스테롤 없이 아포리포단백질 A-I(apoA-I)만을 사용하여 약물을 포집하는 것인 방법
- [청구항 8] (a) 목적하는 약물과 계면활성제를 포함하는 완충액을 음과분쇄하여, 계면활성제로 구성된 미셀내부에 목적하는 약물을 포집시키는 단계
(b) 상기 음과분쇄된 반응물에 아포리포단백질 A-I(apoA-I)을 포함하는 완충액을 가하여 반응물을 회석시키는 단계; 및
(c) 회석된 반응물로부터 리포단백질(HDL)-유사 나노입자(NP) 결합체를 회수하는 단계를 포함하는, 리포단백질(HDL)-유사 나노입자(NP) 결합체의 제조방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 아포리포단백질 A-I(apoA-I)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법
- [청구항 10] 제8항에 있어서,
상기 약물은 링구조를 포함하는 것인 방법.
- [청구항 11] 제8항에 있어서,
상기 약물은 상기 약물은 파클리탁셀, DX(doxorubicin),

MTX(methotrexate), SF(Sorafenib) 및 EpoB(Epothilone B)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

[청구항 12]

제8항에 있어서,
상기 계면활성제는 음과분쇄에 의하여 미셀을 형성하는 것인 방법.

[청구항 13]

제8항에 있어서,
상기 계면활성제는 소듐 콜레이트인 것인 방법.

[청구항 14]

제8항에 있어서,
완충액은 디스크 형성 완충액(Tris HCl, NaCl, pH 7.4)인 것인 방법.

[청구항 15]

제8항에 있어서,
상기 음과분쇄는 5 내지 15°C의 온도조건에서 수행되는 것인 방법.

[청구항 16]

제8항에 있어서,
상기 희석은 apoA-I와 목적하는 약물의 혼합비를 1:50 내지 1:100(몰비)로 유지하고, 계면활성제의 농도를 임계 미셀농도 이하로 저하시키도록 수행되는 것인 방법.

[청구항 17]

제8항에 있어서,
상기 (b) 단계 이후에, 계면활성제를 완전히 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

[청구항 18]

제17항에 있어서,
계면활성제 흡착제를 처리하여 수행하는 것인 방법.

[청구항 19]

제18항에 있어서,
상기 계면활성제 흡착제는 폴리스티렌 혼성중합체(polystyrene copolymer)인 것인 방법.

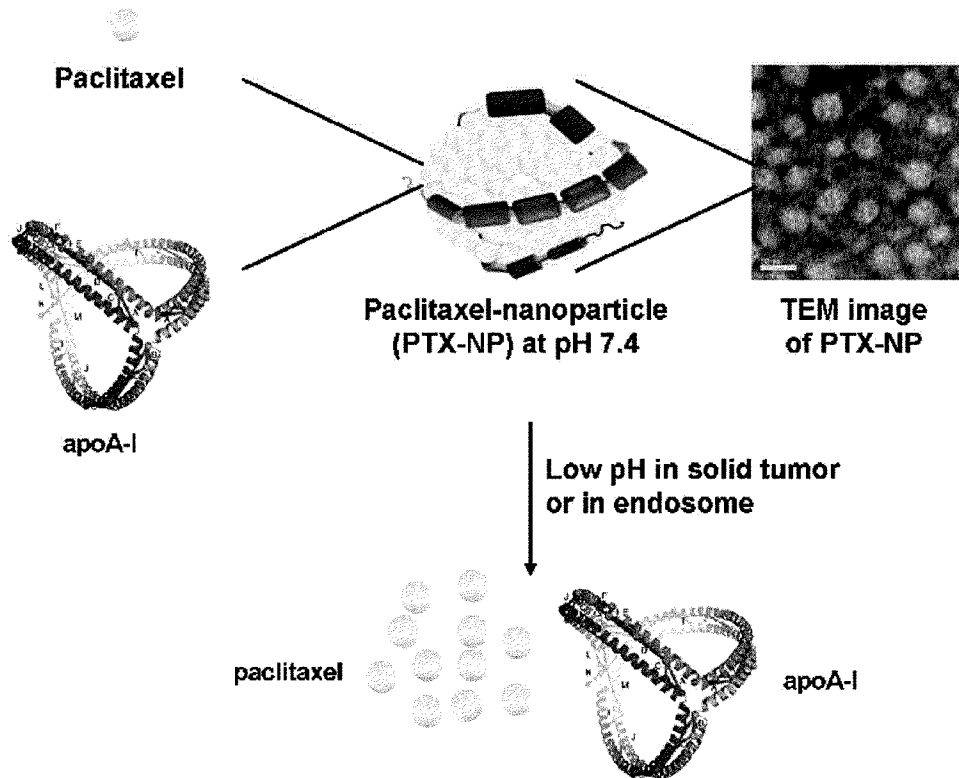
[청구항 20]

제8항에 있어서,
상기 희석된 반응물로부터 HDL-유사 NP 결합체를 회수하기 전에 반응물을 원심분리하여 침전물을 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

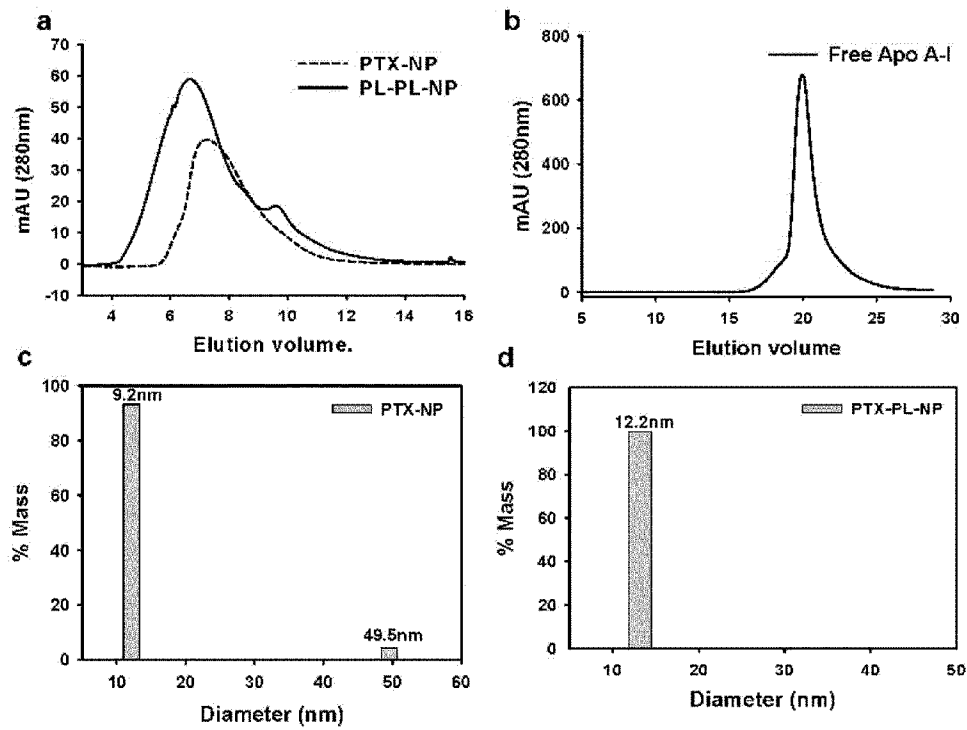
[청구항 21]

제8항에 있어서,
상기 HDL-유사 NP 결합체의 회수는 크기 배제 크로마토그래피 방법을 통하여 수행되는 것인 방법.

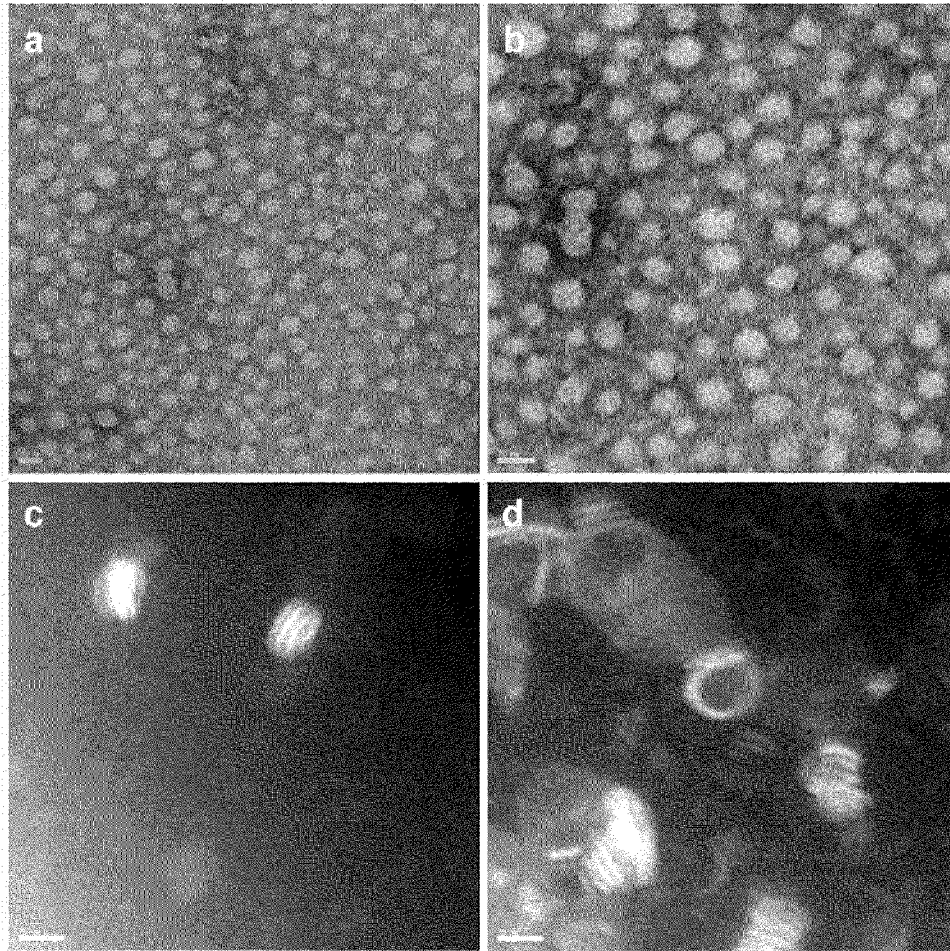
[Fig. 1]



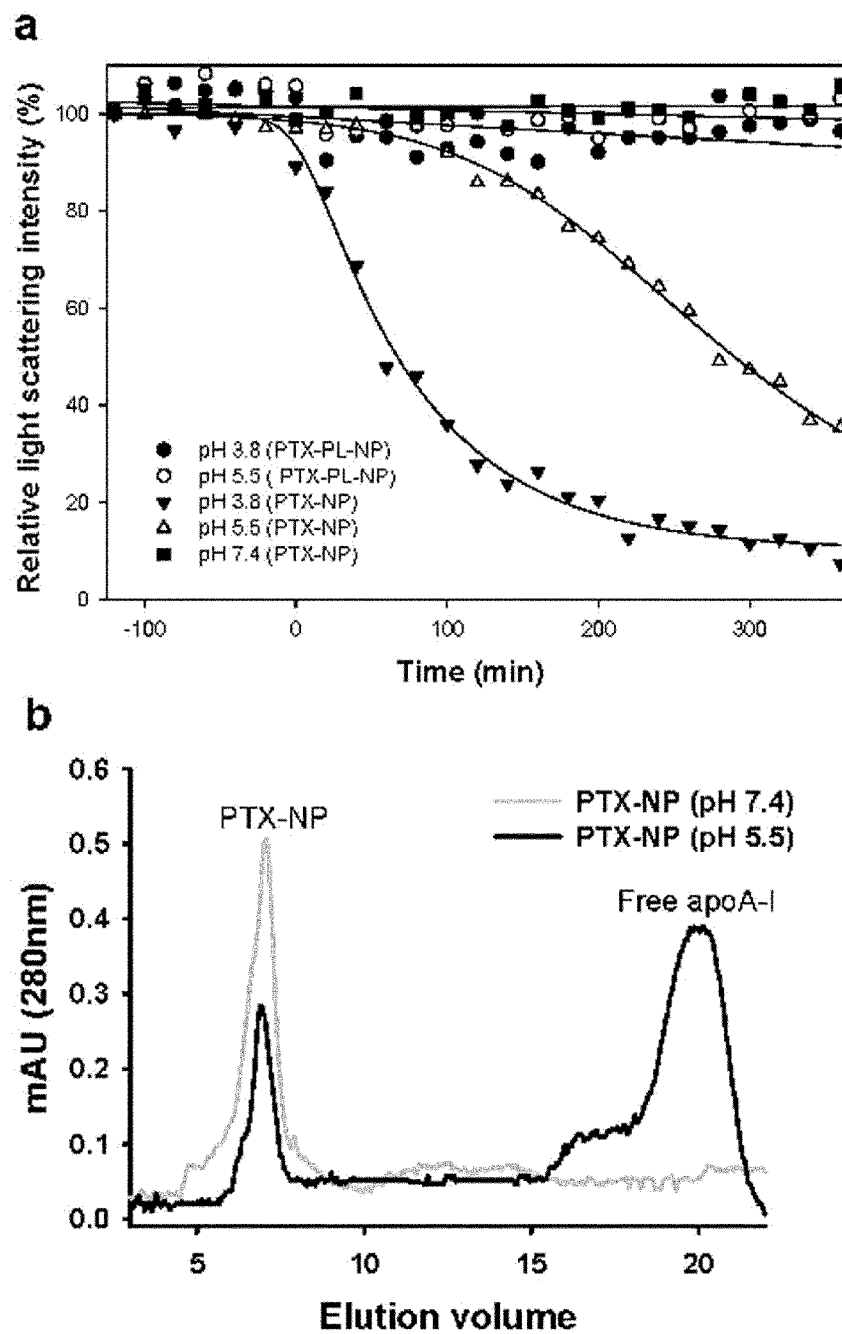
[Fig. 2]



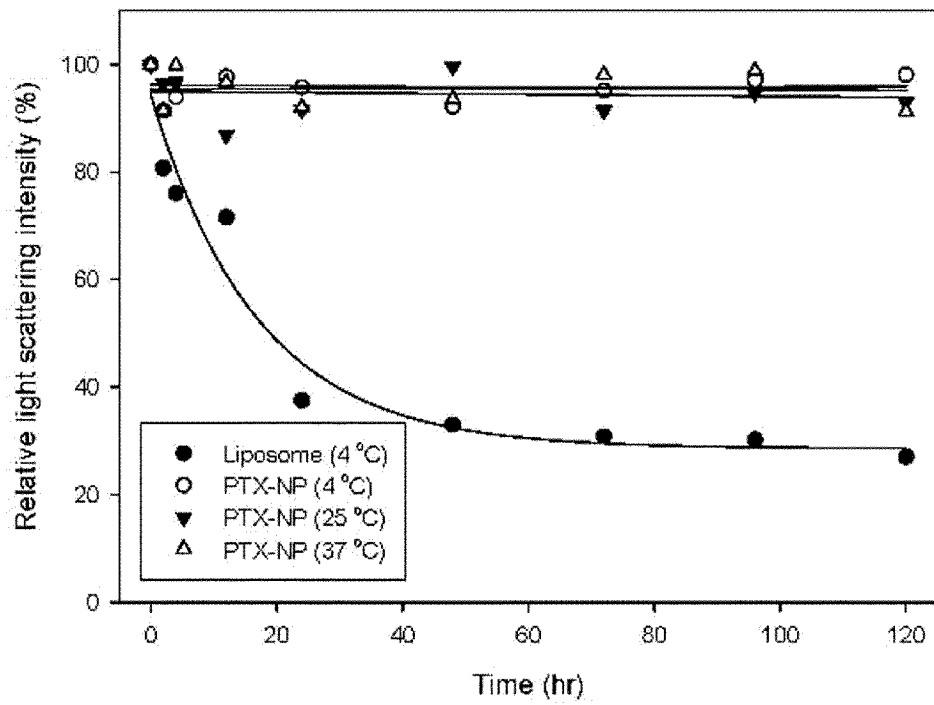
[Fig. 3]



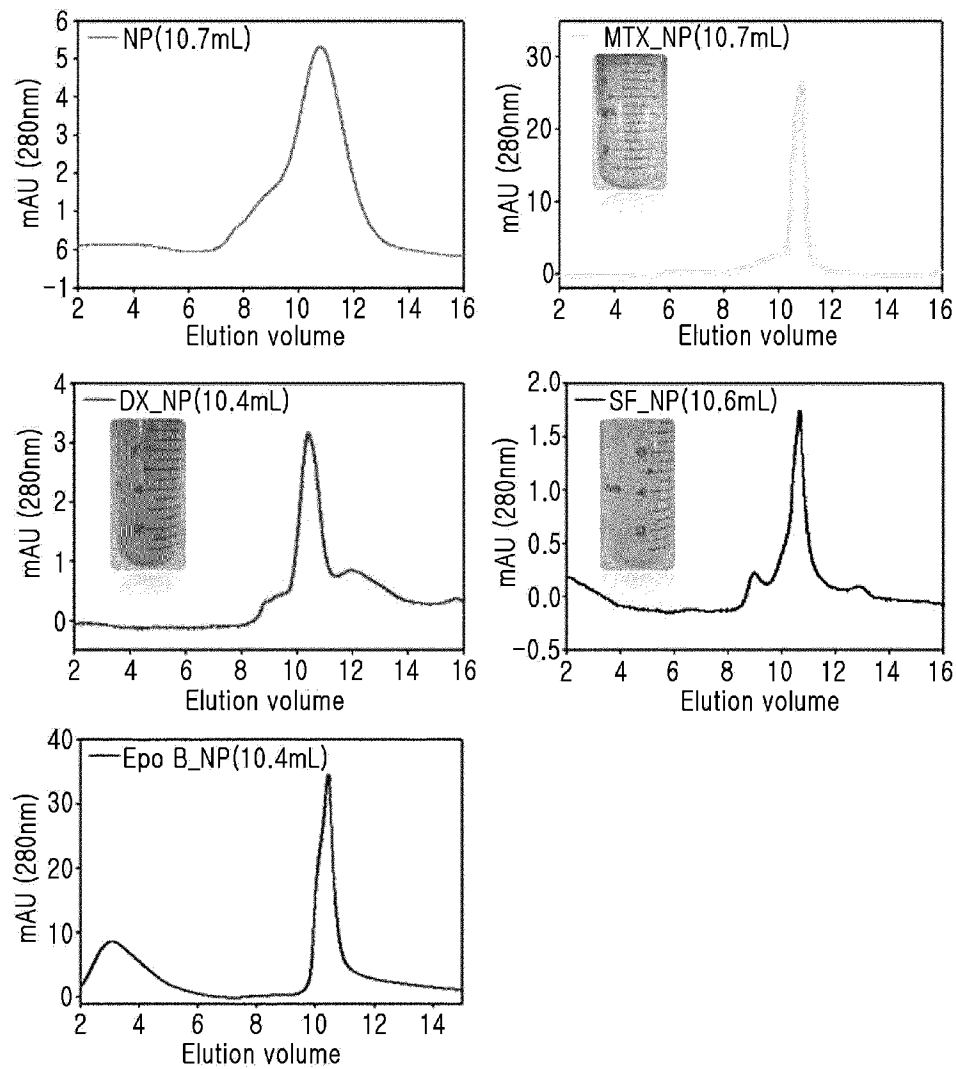
[Fig. 4]



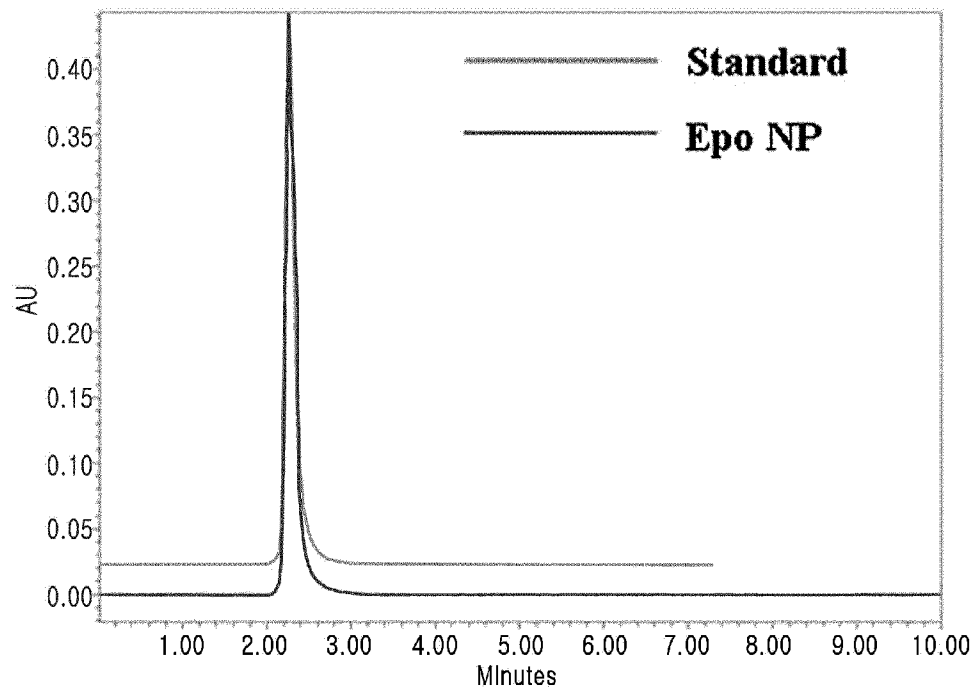
[Fig. 5]



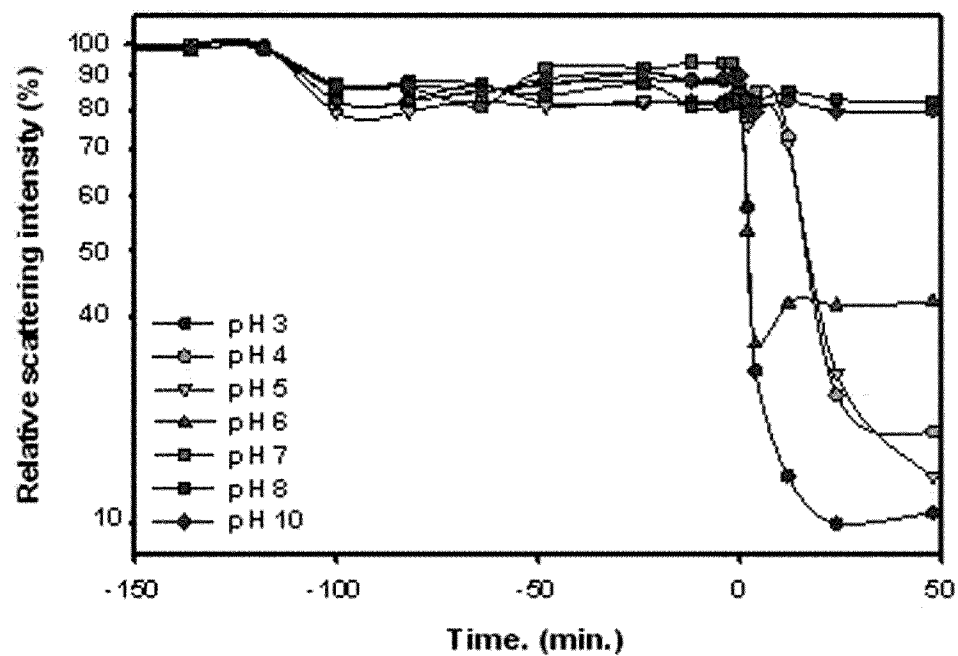
[Fig. 6]



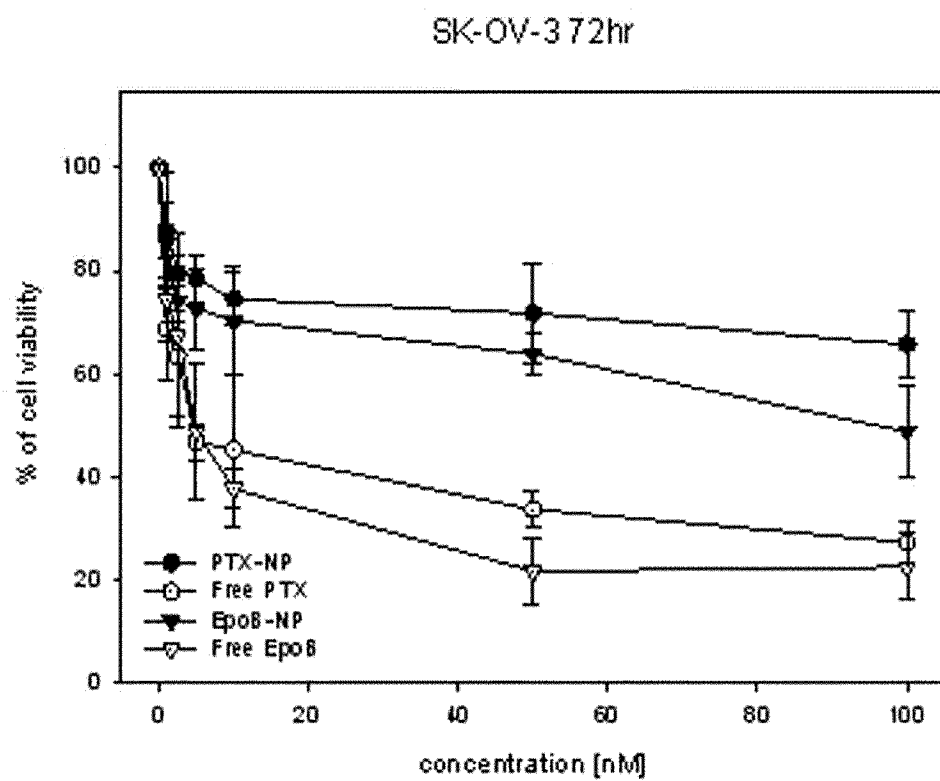
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/009460**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 17/14(2006.01)i, C07K 14/775(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 17/14; A61K 8/00; A61K 9/16; A61K 47/42; C08F 8/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: apoA-I, scavenging, paclitaxel, pH, high density lipoprotein, similarity, nano, particle, aggregate, surfactant, micelle, sound wave, sodium cholate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0039798 A (GREEN CROSS CORPORATION) 20 April 2011 See the entire document.	1-21
A	SHIN, J. Y. et al., BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (2009) Vol. 388, pages 217-221 See the entire document.	1-21
A	KR 10-0716802 B1 (AMOREPACIFIC CORPORATION) 14 May 2007 See the entire document.	1-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 MARCH 2013 (21.03.2013)

Date of mailing of the international search report

25 MARCH 2013 (25.03.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/009460

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0039798 A	20.04.2011	KR 10-1132626 B1	02.04.2012
KR 10-0716802 B1	14.05.2007	KR 10-0654102 B1	05.12.2006
		KR 10-0793824 B1	11.01.2008
		KR 10-2007-0091443 A	11.09.2007
		WO 2007-078060 A1	12.07.2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 17/14(2006.01)i, C07K 14/775(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 17/14; A61K 8/00; A61K 9/16; A61K 47/42; C08F 8/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아포리포단백질 A-I, 포집, 파클리탁셀, pH, 고밀도리포단백질, 유사, 나노, 입자, 결합제, 계면활성제, 미셀, 음파, 소듐 폴레이트		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0039798 A (주식회사 녹십자) 2011.04.20 전문 참조.	1-21
A	SHIN, J. Y. 외 11명, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (2009) 388권, 페이지 217-221 전문 참조.	1-21
A	KR 10-0716802 B1 ((주)아모레퍼시픽) 2007.05.14 전문 참조.	1-21
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 03월 21일 (21.03.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 03월 25일 (25.03.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 정재철 전화번호 82-42-481-3479 

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2011-0039798 A

2011.04.20

KR 10-1132626 B1

2012.04.02

KR 10-0716802 B1

2007.05.14

KR 10-0654102 B1

2006.12.05

KR 10-0793824 B1

2008.01.11

KR 10-2007-0091443 A

2007.09.11

WO 2007-078060 A1

2007.07.12