



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0082866
(43) 공개일자 2017년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/42 (2017.01) A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/4741 (2006.01) A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 47/08 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)

B82Y 5/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 31/444 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0002141

(22) 출원일자 2016년01월07일

심사청구일자 2016년12월16일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

황유식

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 치의학전문대학원 616호 (회기동)

이상천

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 치의학전문대학원 719호 (회기동)

이재형

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 치의학전문대학원 305호 (회기동)

(74) 대리인

안소영

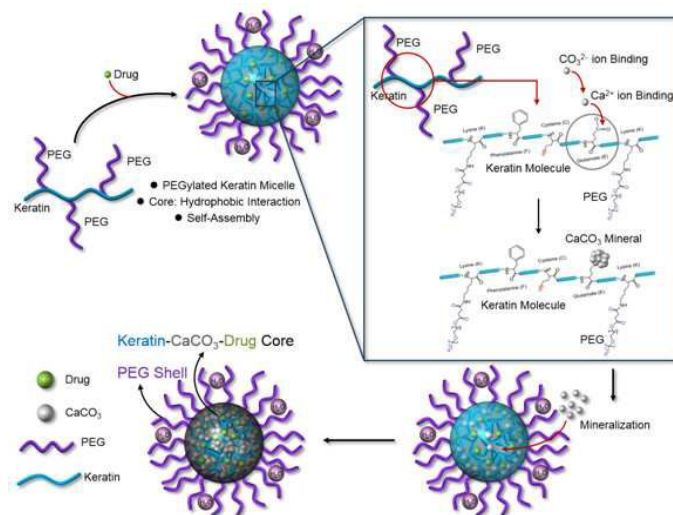
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 PEG화된 케라틴 나노입자

(57) 요약

본 발명은 약물 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자에 대한 것으로, 상기 나노입자는 소수성 약물 또는 독성이 강한 약물을 담지하는데 유용하다. 또한, 본 발명의 나노입자는 암세포를 표적으로 하여 약물을 방출시킬수 있으며, UGT1A1 관련 부작용을 완화시키는 효과가 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/4741 (2013.01)

A61K 31/4745 (2013.01)

A61K 47/08 (2013.01)

C07K 14/4741 (2013.01)

B82Y 5/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A2051387

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단(학술진흥)

연구사업명 기초의과학연구센터 (MRC) 과제

연구과제명 치아와 치주조직재생연구

기 여 율 50/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2019.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2009706

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단(학술진흥)

연구사업명 일반연구자 -기본연구

연구과제명 치아줄기세포의 크기에 따른 골형성세포 및 신경세포 분화능 연구와 이를 응용한 마이크로
골/신경조직 구현

기 여 율 50/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

약물 및 탄산칼슘을 담지하는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)화된(PEGylated) 케라틴 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PEG화된 케라틴은 케라틴의 아민기에 PEG가 결합된 것인 PEG화된 케라틴 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 약물은 항암제인 PEG화된 케라틴 나노입자.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항암제는 이리노테칸인 PEG화된 케라틴 나노입자.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 나노입자는 암세포 표적 지향성인 PEG화된 케라틴 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약물은 탄산칼슘의 pH 선택적 용해에 의해 방출되는 것인 PEG화된 케라틴 나노입자.

청구항 7

제1항의 나노입자를 포함하는 항암용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 UGT1A1을 활성화시킴으로써 약물의 부작용을 감소시키는 조성물.

청구항 9

- i) PEG화된 케라틴에 칼슘이온을 첨가하여 제1혼합물을 제조하는 단계,
- ii) 단계 i)의 제1혼합물에 약물을 첨가하여 제2혼합물을 제조하는 단계, 및
- iii) 단계 ii)의 제2혼합물에 탄산이온을 첨가하는 단계를 포함하는 제1항의 나노입자의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 PEG화된 케라틴은

- 1) 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜을 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시몰폴리뉴 클로라이드(DMTMM)와 반응시키는 단계, 및
- 2) 단계 1)에서 생성된 물질을 케라틴과 반응시키는 단계를 포함하는 방법으로 제조되는 것인 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약물 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된(PEGylated) 케라틴 나노입자에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 많은 항암제들은 탁월한 암세포 사멸효과 및 증식 억제효과를 가지고 있다. 그러나 통상적인 항암제는 암세포에

만 특이적으로 작용하는 것이 아니라 일반세포에도 동시에 작용하며, 그로 인하여 다양한 부작용이 나타난다.

[0003] 이리노테칸은 진행된 대장암 치료에 대한 혼용치료법에 널리 사용되고 있는 항암제이다. 이리노테칸은 체내에서 흡수된 후 CYP450 효소에 의해 활성 대사체인 SN-38로 변환되며, SN-38은 이리노테칸보다 100배 이상의 높은 항암활성을 나타낸다. SN-38은 세포 증식에 주요역할을 담당하는 효소인 토포이소머라제의 활성을 억제하여 암세포의 증식을 막고, 암세포를 사멸시키는 기전을 가지고 있다. 그러나 SN-38은 소수성으로, 항암작용 후에도 몸 밖으로 배출이 용이하지 않아 몸속에 잔류되며, 그에 따른 부작용이 심각하다.

[0004] SN-38은 간세포가 발현하는 UGT1A1 효소에 의하여 글루쿠론산화되어 체외로 배출된다. 그러나 나이가 들거나 유전적 요인에 의해 UGT1A1의 활성이 낮은 환자들의 경우 SN-38의 배출이 어려워 부작용이 심하다. 이리노테칸을 사용하는 일부 환자에서 심한 호중구 감소증과 설사를 호소하며 심한 경우 사망한 보고도 있다. 이러한 이리노테칸의 부작용은 UGT1A1 유전자의 프로모터부위에 있는 TATAA box의 다형성과의 연관되어 있다. 돌연변이가 발생하여 UGT1A1효소의 활성이 저하될 경우 혈중 SN-38의 농도가 유의하게 증가된다는 보고가 있으며, 95명의 서양인을 대상으로 한 연구에서 돌연변이가 있는 환자군에서 더 심한 설사가 발생한다는 보고가 있다.

[0005] UGT1A1 효소는 SN-38의 글루쿠론산화 이외에도, 탈록시펜, 에토포시드등의 다양한 약물의 글루쿠론산화에 관여한다. 또한, UGT1A1 효소는 빌리루빈의 체외 배출을 담당하는 유일한 효소이다. 따라서, UGT1A1 저해제로 작용하는 아타자나비르, 인디나비르, 트라닐라스트, 벨리노스타트 등의 투여는 고빌리루빈혈증을 유발할 가능성이 있다. 따라서, UGT1A1의 활성을 증가시켜 약물의 부작용을 완화시키는 방안이 필요하다.

[0006] 한편, 케라틴은 모발, 손톱, 발톱, 깃털 등을 구성하는 구조 단백질이다. 일반적으로 케라틴은 히스티딘 : 리신 : 아르기닌이 약 1 : 4 : 12의 몰비로 이루어져 있으며, 시스틴의 함량이 많아 황의 함량이 3 내지 5 %를 차지한다. 케라틴은 용해도가 낮아 보통의 용매에는 거의 녹지 않는다. 케라틴은 생체에 포함되어 있는 물질이기 때문에, 생체적합성이 매우 높으나, 낮은 용해도 때문에 그 활용이 제한적인 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) J Biol Chem 1994 Oct 14;269(41):2542
(비특허문헌 0002) Drug Metab Dispos. 2002 Jun;30(6):694-700

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 약물을 담지하는 나노입자를 제공하는 것이다.
[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노입자를 포함하는 항암용 조성물을 제공하는 것이다.
[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 i) PEG화된 케라틴에 칼슘이온을 첨가하여 제1혼합물을 제조하는 단계, ii) 단계 i)의 제1혼합물에 약물을 첨가하여 제2혼합물을 제조하는 단계, 및 iii) 단계 ii)의 제2혼합물에 탄산이온을 첨가하는 단계를 포함하는 PEG화된 케라틴 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 수행하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 약물 및 탄산칼슘을 담지하는 폴리에틸렌글리콜 (Polyethylene glycol, PEG)화된(PEGylated) 케라틴 나노입자를 제공한다.
[0012] 본 발명에서, PEG화된 케라틴이란 케라틴의 아미노산 잔기에 PEG가 결합되어 있는 물질을 의미한다. 본 발명의 PEG화된 케라틴에 있어서, PEG는 케라틴의 임의의 아미노산 잔기에 제한 없이 결합될 수 있으나, 바람직하게는 아민기에 결합한다.
[0013] 본 발명에서, 케라틴은 상업적으로 이용가능한 임의의 케라틴을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 본 발명의 케라틴은 사람 머리카락에서 추출한 케라틴을 사용할 수 있다.
[0014] 본 발명의 구체적인 일 실시양태에서 사람 머리카락을 클로로포름과 메탄올을 2:1의 비율로 섞은 혼합액에 넣어

지질을 제거하고, 2 % 과산화아세트산 용액에서 12시간 교반한 후, 5 % 2-머캅토에탄올, 5 M 우레아, 2.6 M 티오우레아 및 25 mM Tris-HCl(pH 8.5)에 넣고, 50 °C에서 72시간동안 반응시켜 케라틴을 수득하였다.

- [0015] 본 발명에서, PEG는 예를 들어, 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜, 2염기산 폴리에틸렌글리콜, α, ω -비스(2-카르복시에틸-폴리에틸렌글리콜, 0,0'-비스(2-브로모에틸)폴리에틸렌글리콜, 0,0'-비스(2-클로로에틸)폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 디메실산, 메톡시폴리에틸렌글리콜 아세트산, 0-[2-(3-숙시닐아미노)에틸]-0'-메틸-폴리에틸렌글리콜, 0-(2-브로모에틸)-0'-메틸폴리에틸렌글리콜, 0-(2-클로로에틸)-0'-메틸폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 모노메틸 에테르 메실산(Mesylate), 알데히드 기능화 폴리에틸렌글리콜, 글리시딜이서 기능화 폴리에틸렌글리콜, 나이트로페틸 카보네이트 기능화 폴리에틸렌글리콜, 메실(Mesyl) 기능화 폴리에틸렌글리콜 또는 토실(Tosyl) 기능화 폴리에틸렌글리콜일 수 있으며, 바람직하게는 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌 글리콜일 수 있다. 상기 PEG의 분자량은 1000 내지 20000일 수 있으며, 바람직하게는 2000 내지 10000 일 수 있다.
- [0016] 종래에 케라틴은 높은 생체 적합성을 가지고 있으나, 매우 낮은 용해도에 의해 생체재료로의 사용에 제약이 많았다. 본 발명에서는 놀랍게도 케라틴을 PEG화하는 경우, 용해도를 크게 증가시킬 수 있음을 발견하였다.
- [0017] 본 발명의 PEG화된 케라틴은, 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜 5000 용액에 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시몰폴리늄 클로라이드(DMTMM)를 첨가하여 교반한 후, 케라틴을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 PEG화된 케라틴은 마이셀 나노입자를 형성하여 약물 및 탄산칼슘을 담지할 수 있다. 상기 나노입자는 본 발명의 PEG화된 케라틴을 pH 7 내지 pH 9, 바람직하게는 pH 7 내지 pH 8, 가장 바람직하게는 pH 7 내지 pH 7.5의 용매에 첨가하고, 볼텍스(vortex), 교반 또는 음파처리(sonication)하여 제조할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 나노입자 형성에 사용하는 용매로는, 증류수, 이차수, 삼차수, 인산완충식염수, 정제수, 멸균수, C₁ 내지 C₄ 알코올 또는 에틸렌 글라이콜 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 삼차수 또는 인산완충식염수일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 나노입자 형성 시, PEG화된 케라틴은 0.2 (w/v)% 이상 5.0 (w/v)% 이하의 농도로 용매에 첨가될 수 있으며, 바람직하게는 0.2 (w/v)% 이상 0.5 (w/v)% 이하의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자의 크기는 PEG화된 케라틴이 첨가된 용액의 볼텍스, 교반 또는 음파처리 속도에 따라 조절될 수 있으며, 바람직하게는 50 nm 내지 500 nm, 더 바람직하게는 100 nm 내지 400 nm 일 수 있고, 가장 바람직하게는 150 내지 350 nm 일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 항암제, 항바이러스제, 항생제를 비롯한 다양한 약물을 제한 없이 담지할 수 있으며, 바람직하게는 항암제를 담지할 수 있다.
- [0023] 상기 약물은 예를 들어, 랄록시펜(Raloxifene), 에토포시드(Etoposide), 아타자나비르(Atazanavir), 인디나비르(Indinavir), 트라닐라스트(tranilast), 벨리노스타트(Belinostat) 또는 이리노테칸(Irinotecan)등을 들 수 있다.
- [0024] 상기 약물의 나노입자 내 담지량은 5 중량% 내지 30 중량% 일 수 있으며, 바람직하게는 10 중량% 내지 20 중량% 일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 일 실시양태에서, PEG화된 케라틴을 pH 9.0의 삼차수에 용해시키고, 낮아진 pH를 pH 9.0로 다시 조절한 후, 염화칼슘 용액(pH 9.0)을 첨가한 후 교반하고, 이리노테칸 염산염 용액(pH 9.0)을 첨가한 후 교반하고, 탄산나트륨 용액(pH 9.0)을 첨가한 후 교반하여, 이리노테칸 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 수득하였다.
- [0026] 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 마이셀 형태이므로, 약물을 내부에 담지할 수 있으며, 용해도가 낮은 소수성 약물도 효과적으로 담지할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 세포독성이 적다.
- [0028] 또한, 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자에 담지된 탄산칼슘은 암세포 및 암조직에 의해 형성되는 약산성의 환경에서 선택적으로 미네랄화되어, 담지된 약물을 방출시킨다. 따라서 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 탄산칼슘을 담지함으로 인하여, 암세포 표적 지향성을 나타내며, 나아가 암세포에서 선택적으로 약물을 방출시킬 수 있다는 장점을 가진다.

- [0030] 또한, 본 발명은 약물 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 PEG화된 케라틴 나노입자, 약물 및 탄산칼슘은 앞서 기술한 바와 같다.
- [0032] 상기 항암용 조성물은 UGT1A1을 활성화시키는 것을 특징으로 한다. UGT1A1은 다양한 약물을 글루쿠론산화 하여 체외로 배출시키는 역할을 하며, 빌리루빈을 대사시켜 체외로 배출시키는 유일한 효소로 알려져 있다. 본 발명의 PEG화된 케라틴은 UGT1A1 효소 및 UGT1A1과 관련된 수용체인 CAR (Constitutive Androstane Receptor), GR (Glucocorticoid Receptor), AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) 발현을 향상시킨다.
- [0033] 따라서 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 UGT1A1과 관련된 약물, 특히 항암제의 부작용 완화에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0034] 상기 UGT1A1과 관련된 약물의 부작용의 완화로는 예를 들어, 독성 물질의 글루쿠론산화에 의한 배출 촉진일 수 있으며, 또는 UGT1A1 저해 약물에 의한 빌리루빈 축적 및 간 독성의 해소일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 본 발명의 효과를 해치지 않는 범위 안에서 약학적으로 허용 가능한 희석제, 결합제, 붕해제, 윤활제, pH 조절제, 산화방지제, 용해보조제 등의 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0036] 희석제는 수가, 전분, 미결정셀룰로오스, 유당(유당수화물), 포도당, 디-만니톨, 알기네이트, 알칼리토금속류염, 클레이, 폴리에틸렌글리콜, 무수인산수소칼슘, 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.
- [0037] 결합제는 전분, 미결정셀룰로오스, 고분산성 실리카, 만니톨, 디-만니톨, 자당, 유당수화물, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈(포비돈), 폴리비닐피롤리돈 공중합체(코포비돈), 히프로멜로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 천연검, 합성검, 젤라틴, 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.
- [0038] 붕해제는 전분글리콘산나트륨, 옥수수전분, 감자전분 또는 전호화전분 등의 전분 또는 변성전분; 벤토나이트, 몬모릴로나이트, 또는 비검 (veegum) 등의 클레이; 미결정셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 카르복시 메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류; 알긴산나트륨 또는 알긴산 등의 알긴류; 크로스카멜로스(croscarmellose) 나트륨 등의 가교 셀룰로오스류; 구아검, 잔탄검 등의 검류; 가교 폴리비닐피롤리돈(crospovidone) 등의 가교 중합체; 중탄산나트륨, 시트르산 등의 비등성 제제, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0039] 윤활제는 탈크, 스테아린산, 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 라우릴 설페이트나트륨, 수소화식물성오일, 나트륨벤조에이트, 나트륨스테아릴푸마레이트, 글리세릴 베헤네이트, 글리세릴 모노레이트, 글리세릴모노스테아레이트, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 콜로이드성 이산화규소 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.
- [0040] pH 조절제는 초산, 아디프산, 아스코르빈산, 아스코르빈산 나트륨, 에테르산 나트륨, 사과산, 숙신산, 주석산, 푸마르산, 구연산(시트르산)과 같은 산성화제와 침강 탄산 칼슘, 암모니아수, 메글루민, 탄산 나트륨, 산화 마그네슘, 탄산 마그네슘, 구연산 나트륨, 삼염기칼슘인산염과 같은 염기성화제 등을 사용할 수 있다.
- [0041] 산화방지제는 디부틸 히드록시 톨루엔, 부틸레이티드 히드록시아니솔, 초산토코페롤, 토코페롤, 프로필 갈레이트, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨 등을 사용할 수 있다.
- [0042] 용해보조제는 라우릴황산나트륨, 폴리소르베이트 등의 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테류, 도큐세이트 나트륨, 폴록사머(poloxamer) 등을 사용할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 조성물은 경구투여를 위하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 고형제제로 제제화될 수 있으며, 이러한 고형제제는 상기 갖은 추출물과 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 제조될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 함께 사용될 수 있다. 또한 상기 약학적 조성물이 경구를 위한 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 액상제제로 제제화될 수 있으며, 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용하여 액상제제로 제제화될 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명의 조성물은 비경구 투여를 위한 제제화를 위하여 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템슐, 마크로콜, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0045] 상기 조성물의 투여량은, 담지된 약물의 종류, 환자의 중증, 나이, 성별, 체중 등의 환자의 상태와 투여경로 및 투여 기간에 따라 적절하게 조절될 수 있다.
- [0046] 상기 용어 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구투여, 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 조성물은 추가적인 활성성분을 더 포함할 수 있으며, 단독 또는 호르몬 치료, 약물 치료 등의 다양한 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은
- [0049] i) PEG화된 케라틴에 칼슘이온을 첨가하여 제1혼합물을 제조하는 단계,
- [0050] ii) 단계 i)의 제1혼합물에 약물을 첨가하여 제2혼합물을 제조하는 단계, 및
- [0051] iii) 단계 ii)의 제2혼합물에 탄산이온을 첨가하는 단계를 포함하는 제1항의 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0052] 상기 PEG화된 케라틴 및 약물은 앞서 기술한 바와 같다.
- [0053] 본 발명의 제조방법은 도 3에 간단히 도식화하였다.
- [0054] 본 발명의 제조방법의 제 i) 단계는 칼슘이온이 케라틴의 아미노산 잔기에 부착되는 단계이다. 상기 칼슘이온을 첨가하는 방법은 제한되지 않으나, 칼슘염을 용매에 용해시켜 이온화된 상태로 첨가하는 것이 바람직하다. 상기 칼슘염의 형태는 특별히 제한되지 않으며, 바람직하게는 염화칼슘 일 수 있다.
- [0055] 상기 용매는 증류수, 이차수, 삼차수, 인산완충식염수, 정제수, 멸균수, C₁ 내지 C₄ 알코올 또는 에틸렌 글라이콜 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 삼차수 또는 인산완충식염수일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 제조방법의 제 i) 단계에서, 상기 PEG화된 케라틴은 바람직하게는
- [0057] 1) 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜을 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시물폴리뉴 클로라이드(DMTMM)와 반응시키는 단계, 및
- [0058] 2) 단계 1)에서 생성된 물질을 케라틴과 반응시키는 단계를 포함하는 방법으로 제조될 수 있다.
- [0059] 상기 제1) 단계는 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜의 숙신산 작용기를 활성화시키는 단계이며, 상기 제2) 단계는 케라틴의 아미노산의 아민 잔기가 숙시닐기와 반응하여 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계이다.
- [0060] 한편, 본 발명의 제조방법의 제 ii) 단계는 나노입자에 담지될 약물을 첨가하는 단계이다. 약물의 첨가 방법은 특별히 제한되지 않으나, 용매에 용해시켜 첨가하는 것이 바람직하다. 상기 용매는 첨가되는 약물의 용해도 및 극성 등을 고려하여, 약물을 변형시키지 않고 충분히 용해시킬 수 있는 용매 중에서 적절히 선택할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 제조방법의 제 iii) 단계는 탄산이온이 케라틴의 아미노산 잔기에 부착하는 단계이다. 상기 탄산이온을 첨가하는 방법은 제한되지 않으나, 탄산염을 용매에 용해시켜 이온화된 상태로 첨가하는 것이 바람직하다. 상기 탄산염의 형태는 특별히 제한되지 않으며, 바람직하게는 탄산나트륨 일 수 있다. 상기 용매는 앞서 제 i) 단계에서 기술한 바와 같다.
- [0062] 본 발명의 제조방법에 의하면, 약물 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 효과적으로 제조할 수 있다.

발명의 효과

- [0063] 본 발명의 약물 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자는 약물을 효과적으로 담지할 수 있다. 또한, 탄산칼슘이 암세포의 약산성 조건에서 미세알화되므로, 암세포를 표적으로 하여 약물을 방출시킬 수 있다.
- [0064] 나아가, 본 발명의 나노입자를 구성하는 PEG화된 케라틴은 UGT1A1의 발현을 향상시키는 효과가 있어, 약물의 대사를 촉진하고, 특히 독성이 있는 약물을 빠르게 배출시킬 수 있으며, UGT1A1 저해 작용을 하는 약물에 의한 빌리루빈의 축적 및 간독성을 해소시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 나노입자를 포함하는 조성물은 UGT1A1 관련 부

작용 완화에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 PEG화된 케라틴을 제조하는 방법을 도식화한 것이다.

도 2는 PEG화된 케라틴을 NMR 분석한 데이터이다.

도 3은 약물 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 제조하는 방법을 도식화한 것이다.

도 4의 a는 PEG화된 케라틴 나노입자의 평균 입자 크기를 동적 광산란으로 측정한 그래프이며, b는 PEG화된 케라틴 나노입자를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 것이며, c는 EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) 분석으로 PEG화된 케라틴 나노입자에 담지된 탄산칼슘을 확인한 것이고, d는 FT-IR(Fourier Transform Infrared) 분석으로 탄산칼슘의 바테라이트 결정형을 확인한 것이다.

도 5는 PEG화된 케라틴을 HepG2 세포에 처리했을 때의 UGT1A1 발현 정도를 경과시간 및 PEG화된 케라틴의 농도 별로 나타낸 그래프이다.

도 6은 PEG화된 케라틴의 세포독성을 현미경으로 관찰한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 내용에 의해 한정되는 것은 아니다.

<제조예> PEG화된 케라틴의 제조

제조예 1: 케라틴의 수득

사람 머리카락을 약한 세제를 이용해서 깨끗하게 세척한 후 증류수로 여러 번 씻어주었다. 지질제거를 위해 머리카락을 비이커에 담고, 클로로포름과 메탄올을 2:1의 비율로 섞은 혼합액에 머리카락이 잠길 때까지 넣어주었다. 24시간 후 지질 제거에 사용한 용액이 머리카락에 남아있지 않을 때까지 증류수로 여러 번 세척한 후 머리카락을 기건(air-dry)시켰다. 2 % 과산화아세트산(Sigma aldrich) 800 mL에 기건시킨 머리카락 20 g을 넣고 37 °C에서 12시간동안 300 rpm의 속도로 교반하였다. 12시간 후, 머리카락을 체에 거르고 증류수로 세척하여 남아 있는 산화물을 제거하였다. 머리카락을 400 mL 신다이(Shindai) 용액 (5 % 2-머캅토에탄올, 5 M 우레아, 2.6 M 티오우레아(이상 Sigma aldrich) 및 25 mM Tris-HCl(pH 8.5))에 넣고, 50 °C, 400 rpm의 조건에서 72시간동안 반응시켰다. 그 후, 머리카락 용액을 50 mL 튜브에 넣고 3500 rpm으로 20분 동안 원심분리하였다. 상등액을 모아 12-14 kDa 컷오프 Spectra/Por[®] 4 투석막(Spectrum)을 이용해서 투석하였다. 투석이 끝난 케라틴 액체샘플을 동결 건조하여 케라틴 파우더를 제조하였다.

제조예 2: PEG화된 케라틴의 합성

도 1에 제시된 반응과정으로 PEG화된 케라틴을 합성하였다.

케라틴 파우더 0.5 g을 미세부품 단위계수 측정 전자저울(0.001 g ~ 620 g, AJ-620E)로 달아 500 mL 파이렉스 비이커(ISOLAB, YLS, 독일)에 넣었다. 비이커에 삼차수 100 mL를 넣고, 40×8 mm 마그네틱 교반봉([B00C3ME4ZA], 1572500 IKAFLON 40, IKA)과 MS-H-S10 10-Channel 마그네틱 교반기를 이용하여 300 rpm의 속도로 24시간 동안 교반하였다.

메톡시폴리에틸렌글리콜을 변형시킨 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜 5000(mPEG, 17929-5G-F, Lot#R063737/2V Sigma aldrich) 300 mg을 삼차수 20mL에 1시간 동안 녹였다. mPEG용액에 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시물폴리뉴 클로라이드(DMTMM) n-수화물(327-53752, wako chemical) 16mg을 넣고 1시간동안 교반하였다. 케라틴 용액과 mPEG 및 DMTMM의 결합 용액을 500 mL 비커에 넣어, 40×8 mm 마그네틱 교반봉(1572500 IKAFLON 40, IKA)과 MS-H-S10 10-Channel 마그네틱 교반기를 이용하여 500rpm의 속도로 실온에서 3일 동안 교반하여 PEG와 케라틴을 반응시켰다.

제조예 3: PEG화된 케라틴의 정제

제조예 2의 반응이 끝난 후, Spectra/Por 투과막 튜브(직경 16 mm, 평폭 25 mm, MW10000, Spectrum)에 PEG화된

케라틴 용액을 한 튜브당 100 mL씩 넣고, Spectra/Por RC 투석 튜빙 클로저(최대 폭 55 mm, Orange, Spectrum)를 양쪽 튜브에 패킹하였다. 5L 플라스틱 비이커(지름 197 mm, 높이 265 mm)에 삼차수 4 L를 채워 PEG화된 케라틴 용액이 담긴 튜브를 넣고 마그네틱 바를 넣고 교반하면서 투석하였다. 이때, 12시간마다 새로운 삼차수로 갈아주었으며, 실온에서 3일 동안 삼차수로 총 6번을 갈아주면서 투석하였다. 최종 PEG화된 케라틴 용액을 50 mL 원심관(17x120 mm, BD Falcon)에 40 mL 씩 나눠 담은 후, 초저온냉장고(Nihon freezer, Upright type, Single cooling type, 542 ℓ)에서 -70 ℃로 24시간 동안 완전히 동결시켰다. 원심관 뚜껑을 열고, 동결건조기(Alpha 2-4 LSC PLUS, Laboratory freeze dryers, Christ)에 넣고 -85 ℃의 진공상태에서 후 완전히 파우더 형태가 되도록 3일 동안 건조시켰다.

제조예 4: PEG화된 케라틴의 확인

제조예 3에서 얻은 PEG화된 케라틴을 NMR을 통해 분석하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 PEG화된 케라틴에서 각기 케라틴 및 PEG에서 특이적으로 나타나는 피크가 동시에 존재하고 있음을 확인하였다.

<실시예> 약물(이리노테칸) 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자의 제조

실시예 1: 나노입자의 제조

도 3에 제시된 과정으로 이리노테칸 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 제조하였다.

제조예에서 제조한 PEG화된 케라틴(50 mg)을 pH 9.0의 삼차수 3 mL에 용해시켰다. PEG화된 케라틴이 용해되면서 pH가 6.0으로 낮아져 0.1 N NaOH를 넣어 다시 pH 9.0으로 높였다. 그리고 별도로 염화칼슘(CaCl_2)(20 mg, 0.18 mmol)을 삼차수(pH 9.0) 1 mL에 완전히 용해시켰다. 두 수용액을 혼합시켜 2시간 동안 1200 rpm의 속도로 교반한 후 이리노테칸 염산염(20 mg, 0.032 mmol, Sigma Aldrich Co.)의 3차수(pH 9.0, 2 mL) 수용액을 첨가하고 2시간 더 1200 rpm의 속도로 교반하였다. 탄산나트륨(20 mg, 0.19 mmol)을 삼차수(pH 9.0) 1 mL에 용해시킨 후 상기 PEG화된 케라틴, 염화칼슘, 이리노테칸 염산염(Sigma Co.)이 혼합된 수용액에 첨가하여 12 시간 동안 1200 rpm의 속도로 실온에서 교반하였다. 반응 후 삼차수(pH 9.0) 33 mL 첨가하여 용액 양을 40 mL로 맞추고 1000 rpm으로 10분 동안 원심분리기를 작동시킨 후 하층에 가라앉은 침전물을 제거하고 상층액을 삼투막 멤브레인(분자량 제한: 25,000 g/mol)을 이용하여 4시간 동안 삼투교환을 하였다. 최종적으로 72시간 동안 동결건조하여 갈색의 파우더 형태로 이리노테칸 및 탄산칼슘을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 얻었다(수율: 52%).

상기 나노입자 내 이리노테칸 담지량은 0.1 N HCl 수용액을 이용해 이리노테칸 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 완전히 용해시킨 후 UV-Vis 스펙트로포토미터를 이용하여 정량하였다. 이리노테칸 염산염의 농도-흡광도의 표준 검량선(calibration standard curve)을 이용해 계산하였으며 15 중량%인 것을 확인하였다.

실시예 2: 나노입자의 물리적 특성 확인

상기 실시예 1에서 얻은 PEG화된 케라틴 나노입자의 평균 입자 크기(hydrodynamic diameter)를 동적 광산란을 통해 계산하였다. 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 상기 약물담지 PEG화된 케라틴 나노입자의 평균 입자 크기는 260.0 nm인 것으로 확인되었다.

또한, 상기 실시예 1에서 얻은 PEG화된 케라틴 나노입자를 투과 전자 현미경(TEM)으로 조사한 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이, 구형의 균일한 나노입자가 형성되었음을 확인할 수 있었다.

또한, 도 4c 및 4d에 각각 나타난 바와 같이, PEG화된 케라틴 나노입자의 EDX(Energy-dispersive X-ray spectroscopy) 분석으로 탄산칼슘 원소 성분을 확인할 수 있었고, FT-IR(Fourier Transform Infrared) 분석결과 탄산칼슘의 한 상인 바테라이트(vaterite) 결정형의 탄산칼슘 입자가 형성되었음을 확인할 수 있었다.

<실험예>

실험예 1: PEG화된 케라틴의 간세포에서의 UGT1A1 발현 향상 효과 확인

1×10^4 cells/cm² HepG2 세포를 6웰 플레이트에 접종하고 24시간동안 인큐베이션한 후, 일반 배지, 0.5 및 0.75% (w/v) PEG화된 케라틴 배지로 바꿔주었다. 12시간, 24시간, 36시간 또는 48시간동안 인큐베이션한 후, 배지를 제거하고 DPBS로 세척해 주었다. RNA를 추출하기 위해 하이브리드-R 키트(Gene All)를 사용하였고, 나노드롭

(MICROP UV-Vis Spectrophotometer M600)을 사용하여 정량하였다.

1 µg의 RNA를 AccuPowerr[®] Cycle Script RT Premix (Bioneer, 대전, 한국)에 첨가해서 열순환기(T106, Bio-Rad)를 이용해 cDNA를 만들었다. 사용한 프라이머의 서열은 하기 [표 1]과 같다

[표 1]

	sense	antisense
UGT1A1	5'-GAG AGA GGT GAC TGT CCA GGA C-3'	5'-CAA ATT CCT GGG ATA GTG GAT TTT-3'
β-Actin	5'-GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT-3'	5'-TCG TGC GTG ACA TTA AGG AG-3'

각각의 반응에 SYBR Green PCR Mix 10 µL, 0.5pmole의 프라이머(sense와 antisense)와 50nmole의 주형(template)을 넣어주었다. RT-PCR은 RG6000 5plex HRM (Corbett Research)기기를 사용하였으며, 95℃에서 15초, 어닐링(annealing) 온도 57℃에서 45초로, 40 사이클을 설정하였다.

역치주기(Threshold cycle, Ct) 값을 측정하기 위해, 상대정량(comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$))법을 사용하였다.

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, PEG화된 케라틴을 처리한 세포에서 UGT1A1 mRNA의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

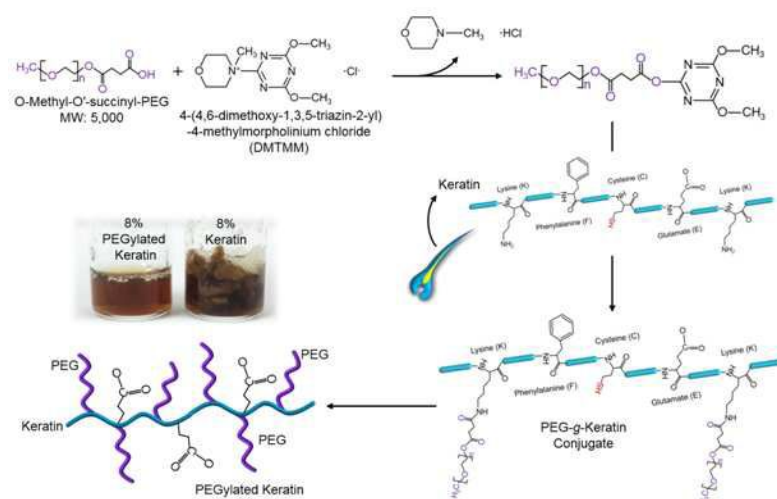
실험예 2: PEG화된 케라틴의 세포독성 확인

12 웰 플레이트에 HepG2 2.7×10^3 cells/cm²를 접종하고, 24시간 후 일반 배지, 0.5, 1.0 및 2.0% (w/v) PEG화된 케라틴 배지로 바꾸어 주었다. 24시간 인큐베이션한 후 Live/Dead viability/cytotoxicity 키트 (invitrogen)를 사용하여, Live&Dead assay를 시행하였다. DPBS 1ml에 0.5 µl의 칼세인(Calcein)과 2.0 µl의 에티듐 호모다이머(Ethidium Homodimer)를 넣고 섞어주었다. 배지를 제거한 후 DPBS로 세척한 각각의 웰에 200 µl씩 넣어주었다. 알루미늄 호일로 빛을 차단하고 37℃에서 10분 동안 인큐베이션한 후 DPBS로 세척하고, 형광현미경(Olympus BX51)으로 관찰하였다.

그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 2.0% 농도까지 대조군과 유사한 세포형태가 관찰되는 것이 확인되었고, 따라서 PEG화된 케라틴은 세포독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

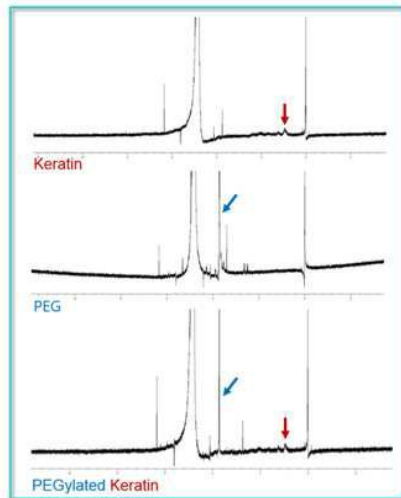
도면

도면1

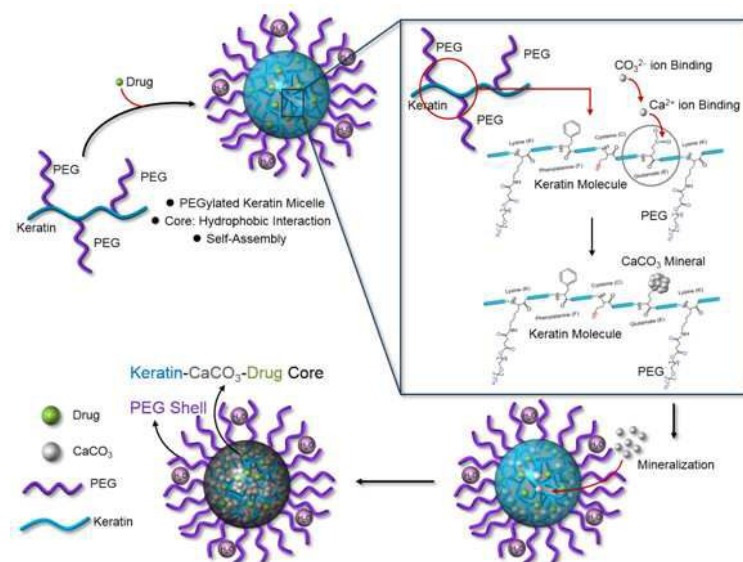


도면2

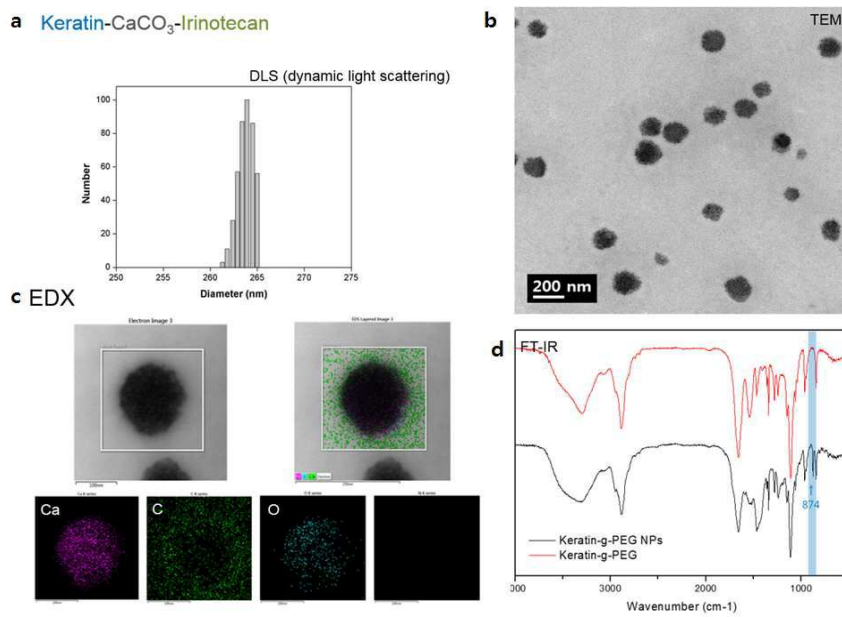
NMR Analysis of poly(ethylene glycol)-graft keratin (PEG-g-keratin) conjugates



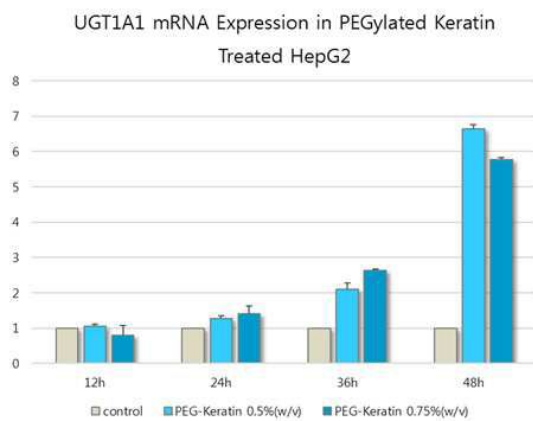
도면3



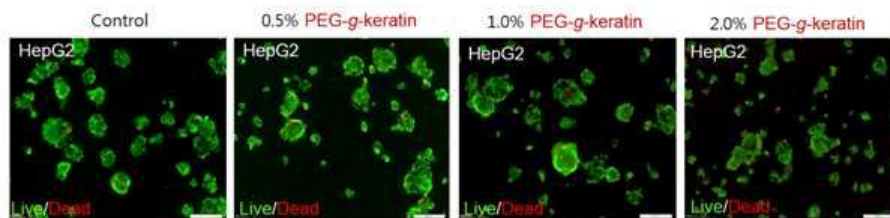
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY
- <120> Pegylated keratin nanoparticle
- <130> P15-160-KHU
- <160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of UGT1A1

<400> 1

gagagaggtg actgtccagg ac 22

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of UGT1A1

<400> 2

caaattcctg ggatagtgga tttt 24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of beta-actin

<400> 3

gtcaggcagc tcgtagctct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of beta-actin

<400> 4

tcgtgcgtga cattaaggag 20