



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0100376
 (43) 공개일자 2008년11월17일

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 47/48</i> (2006.01) <i>A61K 31/451</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7023599</p> <p>(22) 출원일자 2008년09월26일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년09월26일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/001675
 국제출원일자 2007년02월27일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/104422
 국제공개일자 2007년09월20일</p> <p>(30) 우선권주장
 10 2006 011 507.4 2006년03월14일 독일(DE)</p> | <p>(71) 출원인
 에르테에스 로만 테라피-시스템에 아게
 독일연방공화국, 56626 안데르나흐, 로만슈트라
 세 2</p> <p>(72) 발명자
 크로이터, 외르그
 독일, 테-61350 바드 홈부르그 브이.디.에이치,
 게오르그-아우구스트-진-스트라제 13</p> <p>랑게르, 클라우스
 독일, 61137 쉰넵, 안 테어 투른할레 5
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 한양특허법인</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 친수성 단백질에 기초한 활성화-농축된 나노입자

(57) 요약

본 발명은 친수성 단백질 또는 친수성 단백질의 조합에 기초하는 활성화-농축된 나노입자에 관한 것으로 여기서 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편이 폴리에틸렌 글리콜- α -말레산 이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 상기 나노입자에 결합한다. 또한 상기 나노입자의 생산 방법 및 이의 용도가 개시된다.

(72) 발명자

미카엘리스, 케르스틴

독일, 60439 프랑크푸르트, 마리-루이제 카쉬니츠
스트라쎬 2

헤크마타라, 텔리

독일, 60439 프랑크푸르트, 헤세 스트라쎬 19

드라이스, 세바스티안

독일, 60488 프랑크푸르트, 인 데어 뢰메르스타트
264에이

특허청구의 범위

청구항 1

친수성 단백질 또는 친수성 단백질의 조합에 기초한 활성제-로드된(active agent-loaded) 나노입자로서, 상기 나노입자는 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 상기 친수성 단백질 또는 상기 친수성 단백질들에 결합한 하나 이상의 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편을 포함하는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 친수성 단백질 또는 하나 이상의 친수성 단백질은 혈청 알부민, 젤라틴 A, 젤라틴 B 및 카제인으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 친수성 단백질 또는 하나 이상의 친수성 단백질은 인간 기원의 것인 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편은 아포지단백(apolipoprotein), 항체, 효소, 호르몬, 세포증식억제제(cytostatic agent), 항생제, 및 이의 절편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 작용성 단백질은 아포지단백 A1, 아포지단백 B 및 아포지단백 E로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르는 3400 Da 또는 5000 Da의 평균 분자량을 가지는 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노입자는 반응성 기(reactive group)를 통한 착화 결합(complexing linkage) 또는 공유 결합(covalent linkage)에 의해, 또는 혼입(incorporation) 또는 흡착(adsorption)에 의해 활성제로 로드된 것임을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성제는 세포증식억제제, 항생제, 항바이러스 물질, 진통제(analgesic agent), 누트로픽제(nootropics), 항간질제(anti-epileptic), 진정제(sedative), 정신작용 약물(psychotropic drug), 뇌하수체 호르몬, 시상하부 호르몬, 다른 조절 펩타이드 및 이의 억제제를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성제는 달라르긴(dalargin), 로페라미드(loperamide), 튜보쿠아린(tubocuarine) 및 독소루비신을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자.

청구항 10

친수성 단백질 또는 친수성 단백질의 조합에 기초하고 또한 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편으로 변형된 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법으로서,

- 친수성 단백질 또는 친수성 단백질들의 조합의 수용액을 탈용매화(desolvating)시키는 단계,
 - 상기 탈용매화에 의해 생산된 나노입자를 가교결합에 의해 안정화시키는 단계,
 - 상기 안정화된 나노입자의 표면 상의 아미노기를 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 사용하여 변환시키는 단계,
 - 상기 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편을 티올화(thiolating)시키는 단계, 및
 - 상기 티올화된 단백질 또는 펩타이드 절편을 상기 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 사용하여 변환된 나노입자에 공유적으로 결합시키는 단계
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 티올화된 단백질 또는 펩타이드 절편의 결합에 이어, 상기 나노입자는 활성제로 흡착적으로 로드되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 12

청구항 10 또는 청구항 11에 있어서, 상기 친수성 단백질은 혈청 알부민, 젤라틴 A, 젤라틴 B, 카제인 및 동등(comparable) 단백질, 또는 이들 단백질의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 13

청구항 10 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친수성 단백질은 인간 기원의 것인 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 14

청구항 10 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탈용매화는 교반 및 친수성 단백질에 대한 수혼화성 비용매(non-solvent)의 첨가에 의해, 또는 염석(salting-out)에 의해 달성되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 친수성 단백질에 대한 수혼화성 비용매는 에탄올, 메탄올, 이소프로판올 및 아세톤을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 16

청구항 10 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노입자를 안정화시키기 위해 열 처리 또는 이작용성(bifunctional) 알데히드 또는 포름알데히드가 사용되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 이작용성 알데히드로서 글루타르알데히드가 사용되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 18

청구항 10 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르는 3400 Da 또는 5000 Da의 평균 분자량을 가지는 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 19

청구항 10 내지 청구항 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 티올기를 변형시키는 작용제(agent)로서 2-이미노티올레인(2-iminothiolane)이 사용되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 20

청구항 10 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성제는 세포증식억제제, 항생제, 항바이러스 물질, 진통제, 누트로픽제, 항간질제, 진정제, 정신작용 약물, 뇌하수체 호르몬, 시상하부 호르몬, 다른 조절 펩타이드 및 이의 억제제를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 21

청구항 10 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성제는 달라르긴, 로페라미드, 튜보쿠아린 및 독소루비신을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위한 방법.

청구항 22

약제학적 또는 생물학적 활성제를 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하기 위해, 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 친수성 단백질에 결합된 아포지단백을 포함하는 활성제-로드된 나노입자의 용도.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 친수성 단백질은 혈청 알부민, 젤라틴 A, 젤라틴 B, 카제인 및 동등 단백질, 또는 이들 단백질의 조합을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자의 용도.

청구항 24

청구항 22 또는 청구항 23에 있어서, 상기 친수성 단백질의 하나 이상은 인간 기원의 것인 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자의 용도.

청구항 25

청구항 22 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성제는 세포증식억제제, 항생제, 항바이러스 물질, 진통제, 누트로픽제, 항간질제, 진정제, 정신작용 약물, 뇌하수체 호르몬, 시상하부 호르몬, 다른 조절 펩타이드 및 이의 억제제를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자의 용도.

청구항 26

청구항 22 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성제는 달라르긴, 로페라미드, 튜보쿠아린 및 독소루비신을 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자의 용도.

청구항 27

청구항 22 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노입자는 뇌 질환(cerebral affection)을 치료하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는, 활성제-로드된 나노입자의 용도.

청구항 28

약제의 제조를 위한 청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 따른 나노입자의 용도.

청구항 29

뇌 질환(cerebral affection)을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한, 청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 따른 나노입자의 용도로서, 여기서 상기 작용성 단백질은 아포지단백인, 나노입자의 용도.

청구항 30

뇌 질환(cerebral affection)을 치료하기 위한, 청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 따른 나노입자의 용도로서, 여기서 상기 작용성 단백질은 아포지단백인, 나노입자의 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 친수성 단백질 또는 친수성 단백질의 조합에 기초한 활성제-로드된(active agent-loaded) 나노입자에 관한 것이고 여기서 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편이 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 상기 나노입자에 결합한다. 보다 특히, 본 발명은 하나 이상의 친수성 단백질에 기초한 활성제-로드된 나노입자에 관한 것이고 여기서 약제학적 또는 생물학적 활성제를 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier)을 가로질러 수송하기 위해, 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편, 바람직하게는 아포지단백(apolipoprotein)이 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 상기 나노입자에 결합한다.

배경기술

<2> 용어 "나노입자(nanoparticle)"는 10 nm 내지 1000 nm의 크기를 가지는 입자를 의미하는 것으로 이해되고, 또한 약물 또는 다른 생물학적 활성제(active material)가 공유 결합(covalent linkage), 이온 결합 또는 흡착 결합에 의해 결합할 수 있거나 또는 이들 물질이 혼입(incorporate)될 수 있는 인조 또는 천연 고분자 물질로 제조된다.

<3> 어떤 나노입자에 의해서는, 그 자체로는 혈액-뇌 장벽을 건널 수 없는 친수성 약물을 상기 장벽을 가로질러 수송할 수 있고, 그 때문에 이들 친수성 약물이 중추신경계(CNS)에서 치료적으로 활성화될 수 있다.

<4> 예를 들어, 폴리소르베이트 80 (트윈[®] 80) 또는 다른 텐사이드(tenside)로 코팅되는 폴리부틸시아노아크릴레이트 나노입자에 의해 상기 혈액-뇌 장벽을 가로질러 다수의 약물을 수송하는 것이 가능하였으며, 또한 이는 중추신경계에서 그들의 작용을 통해 상당한 약제학적 효과를 야기한다. 그러한 폴리부틸시아노아크릴레이트 나노입자와 함께 투여되는 약물의 예는 엔돌핀 헥사펩티드인 달라르긴(dalargin), 각각 컴퍼니 메르츠(Merz, Frankfurt)의 두 NMDA 수용체 길항제 MRZ 2/576 및 MRZ 2/596인 로페라미드(loperamide) 및 튜보쿠아린(tubocuarine) 뿐만 아니라 항신생물 활성제 독소루비신(doxorubicin)을 포함한다.

<5> 상기 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 이들 나노입자의 수송 메카니즘은 아마도 폴리소르베이트 80 코팅을 통해 나노입자에 의해 흡착되는 아포지단백 E(ApoE)를 기초로 할 것이다. 아마도, 이들 입자는 이에 의해 뇌에 대한 지질의 공급을 보증하는 뇌 내피세포의 수용체에 의해 인식되고 결합되는 모방(mimic) 지단백 입자일 것이다.

<6> 그러나 상기 혈액-뇌 장벽을 건너는 것으로 알려진 폴리부틸시아노아크릴레이트 나노입자는 폴리소르베이트 80이 생리적 기원의 것이 아니고 또한 상기 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 나노입자의 수송이 아마도 폴리소르베이트 80의 독성 효과에 기인할 것이라는 단점을 가진다. 추가로, 공지된 폴리부틸시아노아크릴레이트 나노입자는 또한 상기 ApoE의 결합이 흡착에 의해서만 일어난다는 단점을 가진다. 이에 의해, 상기 나노입자-결합된 ApoE는 자유 ApoE와 평형 상태로 존재하고, 또한, 신체 내로 주사한 후, 상기 입자로부터 ApoE의 빠른 탈착(desorption)이 일어날 수 있다. 또한, 다수의 약물은 폴리부틸시아노아크릴레이트 나노입자에 충분한 정도로 결합하지 않고, 따라서 이 담체 시스템으로는 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송될 수 없다.

<7> 이들 단점을 극복하기 위해, WO 02/089776 A1은 비오틴화된 아포지단백 E가 아비딘-비오틴 시스템 또는 아비딘 유도체를 통해 결합된 인간 혈청 알부민의 나노입자(HSA 나노입자)를 제안한다. 정맥내 주사 이후, 이들 HSA 나노입자는 흡착 결합된 또는 공유 결합된 약물뿐만 아니라 입자 매트릭스에 혼입된 약물을 혈액-뇌 장벽(BBB)을 가로질러 수송할 수 있다. 이 방식으로, 다르게는 생화학적, 화학적 또는 생리화학적 이유로 장벽을 건널 수 없는 활성제는 CNS에서 약제학적 및 치료적 적용을 위해 사용될 수 있다.

<8> 그러나, 상기 아비딘-비오틴 시스템은 다양한 단점을 가진다. 예를 들어, 이의 사용은 나노입자의 생산에 있어 복잡하고 또한 추가로, 면역학적 효과 또는 다른 부작용을 야기할 수 있다. 또한, 아비딘-비오틴 시스템을 포함하는 입자 시스템은 연장된 기간 동안 보관될 때 응집(agglomerate)하려는 경향이 있고, 이는 평균 입자 크기를 증가시키고 또한 상기 입자의 효율에 역효과를 가진다.

발명의 상세한 설명

<9> 따라서 본 발명의 기초를 이루는 과제는 아비딘-비오틴 시스템을 포함하는 HSA 나노입자의 단점 및 종래 기술로부터 공지된 폴리부틸시아노아크릴레이트 나노입자의 단점을 가지는 이들 나노입자없이, CNS에 공급될 수 있는, 생화학적, 화학적 또는 생리화학적 이유로 혈관-뇌 장벽을 건널 수 없는 약물에 의한 나노입자를 제공하는 것이

었다.

- <10> 이 과정은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 및/또는 생물학적 활성제를 포함하고, 또한 작용성 단백질로서 작용하는 아포지단백이 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 결합되는, 친수성 단백질 또는 친수성 단백질의 조합에 기초하는 나노입자에 의해 해결된다.
- <11> 본 발명의 나노입자의 기초가 되는 친수성 단백질, 또는 하나 이상의 상기 친수성 단백질은, 바람직하게는 혈청 알부민, 젤라틴 A, 젤라틴 B 및 카제인을 포함하는 단백질 군에 속한다. 인간 기원의 친수성 단백질이 보다 바람직하다. 가장 바람직하게는, 상기 나노입자는 인간 혈청 알부민을 기초로 한다.
- <12> 상기 이작용성(bifunctional) 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르는 말레이미드기 및 N-하이드록시숙시미드 에스테르를 포함하고, 이들 사이에는 한정된 길이의 폴리에틸렌 글리콜 사슬이 존재한다. 바람직하게는, 상기 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편은 3400 Da 또는 5000 Da의 평균 분자량을 가지는 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 상기 친수성 단백질에 커플된다.
- <13> 상기 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 친수성 단백질에 결합한 아포지단백은 아포지단백 E, 아포지단백 B(ApoB) 및 아포지단백 A1 (ApoA1)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- <14> 본 발명에 따른 나노입자의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 작용성 단백질은 아포지단백이 아니라 항체, 효소 및 펩타이드 호르몬으로 구성되는 단백질 군으로부터 선택되는 것이다. 그러나, 이는 또한 거의 모든 원하는 펩타이드 절편, 바람직하게는 상기에 언급된 작용성 단백질의 작용적 활성 절편 군으로부터의 펩타이드 절편을 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 상기 나노입자에 커플시킬 수 있다.
- <15> 따라서 본 발명의 주제는 친수성 단백질 또는 친수성 단백질의 조합에 기초하는 활성제-로드된 나노입자이고 또한 상기 나노입자는 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 통해 상기 친수성 단백질 또는 상기 친수성 단백질들에 결합되는 하나 이상의 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <16> 수송될 활성제를 상기 나노입자에 로드하는 것은 반응성 기(reactive group)를 통한 착화 결합(complexing linkage) 또는 공유 결합에 의해, 상기 나노입자 내로의 상기 활성제의 혼입, 또는 상기 나노입자에 대한 상기 활성제의 흡착에 의해 달성될 수 있다.
- <17> 기본적으로, 본 발명의 나노입자는 거의 모든 원하는 활성제/약물로 로드될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 상기 나노입자는, 그 자체는 혈액-뇌 장벽을 건널 수 없는 활성제로 로드된다. 보다 바람직하게는, 상기 활성제는 세포증식억제제(cytostatic agent), 항생제, 항바이러스 물질, 및 신경 질환에 대해 활성인 약물의 군, 예를 들어 진통제(analgesic agent), 누트로픽제(nootropics), 항간질제(anti-epileptic), 진정제(sedative), 정신작용 약물(psychotropic drug), 뇌하수체 호르몬, 시상하부 호르몬, 다른 조절 펩타이드 및 이의 억제제를 포함하는 군으로부터의 약물의 군에 속하고, 이 목록은 결코 한정하고자 함이 아니다. 가장 바람직하게는, 상기 활성제는 달라르긴, 로페라미드, 튜보쿠아린 및 독소루비신을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- <18> 본 발명의 나노입자는, 상기 작용성 단백질 또는 이의 펩타이드 절편을 상기 입자의 친수성 단백질에 커플시키는데에, 부작용을 유발할 수 있는 아비딘-비오틴 시스템을 사용하는 것이 불필요하다는 이점을 가진다.
- <19> 바람직하게는, 본 발명의 나노입자는 처음에 상기 친수성 단백질 또는 상기 친수성 단백질들의 수용액을 탈용매화(desolvating) 공정에 의해 나노입자로 변환시키고, 이어서 상기 나노입자를 가교결합에 의해 안정화시킴으로써 생산된다.
- <20> 상기 수성 용매로부터의 탈용매화는 에탄올의 첨가에 의해 달성되는 것이 바람직하다. 원칙적으로, 아세톤, 이소프로판올 또는 메탄올과 같은, 다른 수산화성의, 친수성 단백질에 대한 비용매(non-solvent)의 첨가에 의해 탈용매화를 달성할 수도 있다. 따라서, 개시 단백질로서 젤라틴은 아세톤의 첨가에 의해 성공적으로 탈용매화된다. 수상(aqueous phase)에 용해된 단백질의 탈용매화는 또한 황산 마그네슘 또는 황산 암모늄과 같은 구조-형성(structure-forming) 염의 첨가에 의해 가능하다. 이는 염석(salting out)이라 불린다.
- <21> 상기 나노입자를 안정화시키기 위해 적합한 가교결합체는 이작용성 알데히드, 바람직하게는 글루타르알데히드뿐만 아니라 포름알데히드이다. 또한, 열 처리에 의해 상기 나노입자 매트릭스를 가교결합시킬 수 있다. 안정된 나노입자 시스템은 60°C에서 25시간을 초과하는 시간으로, 또는 70°C에서 2시간을 초과하는 시간으로 수득되었다.

- <22> 상기 안정화된 나노입자의 표면 상에 위치한 작용성 기 (아미노기, 카르복실기, 하이드록실기)는 아포지단백의 직접 공유 컨주게이션(direct covalent conjugation)에 사용될 수 있다. 이들 작용성 기는 아미노기 및 자유 티올기 모두에 반응성인 헤테로이작용성 "스페이서(spacer)"를 통해, 자유 티올기가 미리 도입된 아포지단백에 결합될 수 있다.
- <23> 본 발명의 나노입자를 생산하기 위해, 입자 표면의 아미노기를 헤테로이작용성 폴리에틸렌 글리콜(PEG)계 가교제 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 사용하여 변환시킨다. 이 공정에서, 상기 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르의 숙신이미드기는 입자 표면의 아미노기와 반응하여 N-하이드록시-숙신이미드를 방출시킨다. 이 반응에 의해, 상기 입자 표면에 PEG기를 도입시킬 수 있고 이는, 차례로, 티올화된 물질과 반응하여 티오에테르를 형성할 수 있는 말레이미드기를 사슬의 타단에 포함한다.
- <24> 본 발명의 나노입자를 생산하기 위해 바람직한 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르의 폴리에틸렌 글리콜 사슬은 3400 Da의 평균 분자량을 가진다 (NHS-PEG3400-Mal). 그러나, 원칙적으로, 보다 짧거나 보다 긴 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 예를 들어 5000 달톤의 평균 분자량을 가지는 폴리에틸렌 글리콜 사슬을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 사용하는 것도 가능하다.
- <25> 본 발명의 나노입자를 생산하기 위해, 커플되는 아포지단백, 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편은 2-이미노티올레인(2-iminothiolane)을 사용하는 변환에 의해 티올화된다. 상기 단백질 또는 펩타이드 절편의 자유 아미노기는 이 변환에 사용된다.
- <26> 각 반응 단계 후, 상기 입자 시스템은 여러차례의 원심분리 및 수용액에서의 재분산에 의해 정제된다. 이 변환에 이어, 각각의 용해된 단백질은 원칙적으로 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에 의해 저분자 반응 산물로부터 분리된다.
- <27> 친수성 단백질 또는 친수성 단백질의 조합에 기초하고 또한 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편으로 변형된 활성제-로드된 나노입자를 생산하기 위해 바람직한 방법은
- <28> - 친수성 단백질 또는 친수성 단백질들의 조합의 수용액을 탈용매화시키는 단계,
- <29> - 상기 탈용매화에 의해 생산된 나노입자를 가교결합에 의해 안정화시키는 단계,
- <30> - 상기 안정화된 나노입자의 표면 상의 아미노기를 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 사용하여 변환시키는 단계,
- <31> - 상기 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편을 티올화(thiolating)시키는 단계; 및
- <32> - 상기 티올화된 단백질 또는 펩타이드 절편을 상기 폴리에틸렌 글리콜- α -말레이미드- ω -NHS 에스테르를 사용하여 변환된 나노입자에 공유적으로 결합시키는 단계
- <33> 를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <34> 약제학적 효과를 매개하기 위해, 약제학적 또는 생물학적 활성 물질 (활성제)는 상기 입자 내에 혼입될 수 있다. 이 경우에서, 상기 활성제의 결합은 공유 결합, 착화 결합에 의해서뿐만 아니라 흡착 결합에 의해 달성될 수 있다.
- <35> 티올화된 아포지단백의 공유 결합 또는 다른 티올화된 작용성 단백질 또는 펩타이드 절편의 공유 결합에 이어, PEG-변형된 나노입자는 상기 활성제로 흡착적으로 로드되는 것이 바람직하다.
- <36> 특히 바람직한 방법에서 상기 친수성 단백질, 또는 상기 친수성 단백질들 중 하나 이상은 혈청 알부민, 젤라틴 A, 젤라틴 B 및 카제인 및 동등(comparable) 단백질, 또는 이들 단백질의 조합을 포함하는 단백질 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 인간 기원의 친수성 단백질이 상기 생산에 사용된다.
- <37> 아포지단백 E가 결합된 친수성 단백질 또는 친수성 단백질들의 조합인 본 발명의 나노입자는, 그렇지 않고는 혈액-뇌 장벽을 건너지 않는 약제학적 또는 생물학적 활성제, 특히 친수성 활성제를 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하여 약제학적 효과를 유도하기에 적합하다. 바람직한 활성제는 세포증식억제제, 항생제, 및 신경 질환에 대해 활성인 약물의 군, 예를 들어 진통제, 누트로픽제, 항간질제, 진정제, 정신작용 약물, 뇌하수체 호르몬, 시상하부 호르몬, 다른 조절 펩타이드 및 이의 억제제를 포함하는 군에 속한다. 그러한 활성제의 예는 달라르긴, 로페라미드, 튜보쿠아린, 독소루비신 등이다.
- <38> 따라서, 활성제로 로딩되고 아포지단백으로 변형될 수 있는, 본원에서 기술된 나노입자는 다수의 뇌질환을 치료

하는데에 적합하다. 이때문에, 담체 시스템에 결합된 활성제는 각각의 치료 목적에 따라 선택된다. 상기 담체 시스템은 특히, 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 불충분한 이동을 나타내거나 또는 어떠한 이동도 나타내지 않는 이들 활성 물질에 대해 사용될 수 있다. 활성제로서 고려되는 적합한 물질은, 약간의 적용 영역을 언급한다면, 뇌 종양의 치료를 위한 세포증식억제제, 뇌 영역 내 바이러스 감염, 예를 들어 HIV 감염증의 치료를 위한 활성제뿐만 아니라 치매 질환(dementia affection)의 치료를 위한 활성제이다.

<39> 따라서, 본 발명의 다른 주제는 약제의 생산을 위한 본 발명의 나노입자의 용도이고; 보다 특히 이들 나노입자가 약제학적 또는 생물학적 활성제를 혈액-뇌 장벽을 가로질러 수송하기 위해 사용될 수 있음에 따른, 뇌 질환의 치료를 위한 약제를 생산하기 위한, 작용성 단백질이 아포지단백인 본 발명의 나노입자의 용도 및, 뇌질환을 치료하기 위한 상기 단백질의 용도, 각각이다.

실시예

<41> 탈용매화에 의해 HSA 나노입자를 생산하기 위해, 200 mg의 인간 혈청 알부민을 10 mM NaCl 용액 2.0 ml에 용해시키고, 이 용액의 pH를 8.0 값으로 조정하였다. 교반하에, 이 용액에 8.0 ml의 에탄올을 1.0 ml/분의 속도로 점적(drop-wise) 첨가에 의해 첨가하였다. 이 탈용매화 단계는 200 nm의 평균 입자 크기를 가지는 HSA 나노입자를 형성시킨다.

<42> 상기 나노입자는 235 μ l의 8% 글루타르알데하이드 용액의 첨가에 의해 안정화시켰다. 12시간의 인큐베이션 시간에 이어, 상기 나노입자를 3회의 원심분리 및 처음에는 정제수로의 재분산 그리고 이어서는 PBS 완충액 (pH 8.0)으로의 재분산에 의해 정제하였다.

<43> 상기 나노입자를 활성화시키기 위해, 500 μ l의 가교제 NHS-PEG3400-Mal 용액 (PBS 완충액 8.0 내 60 mg/ml)을 2.0 ml의 나노입자 현탁액 (PBS 완충액 내 20 mg/ml)에 첨가하고 교반(agitation)하에 실온에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. 이 인큐베이션 시간 후, PEG-변형된 나노입자는 상기에 기재한 바와 같이 정제수로 정제하였다. 이들 단계는 상기 표면에 적용된 PEG 유도체의 말레이미드기를 통해, 자유 티올기에 대해 반응성을 가지는 PEG화된 HSA 나노입자를 산출하였다.

<44> 아포지단백의 공유 결합을 위해, 처음에, 자유 티올기를 이의 구조 내에 도입시켰다. 이때문에, 500 μ g의 아포지단백을 1.0 ml TEA 완충액 (pH 8.0)에 용해시키고, 2-이미노티올레인 (트라우트 시약(Traut's reagent))을 50배 물 초과되도록 첨가하였다. 실온에서의 12시간 반응 시간 후, 티올화된 아포지단백은 텍스트란 탈염 컬럼 (D-salt[®] 컬럼)을 통한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였으며, 저분자 반응 산물을 이 공정에서 분리하였다.

<45> HSA 나노입자에 대한 상기 티올화된 아포지단백의 공유 컨쥬게이션을 위해, 500 μ g의 티올화된 아포지단백을 25 mg의 PEG-변형된 HSA 나노입자에 첨가하고, 이 혼합물을 실온에서 12시간 동안 인큐베이트하였다. 이 반응 시간 후, 비반응한 아포지단백은 상기 나노입자를 원심분리 및 재분산함으로써 제거하였다. 이 최종 정제 단계에서, 아포지단백-변형된 HSA 나노입자를 에탄올 2.6 부피%에 취하였다.

<46> 분리 샘플 내에서, 아포지단백 E, 아포지단백 B 및 아포지단백 A1은 티올화되었으며 HSA 나노입자에 커플되었다.

<47> 나노입자에 모델 약물 로페라미드를 로딩하기 위해, 에탄올 2.6 부피%에 녹인 6.6 mg 로페라미드를 20 mg의 ApoE-변형된 나노입자에 첨가하였으며 2시간 동안 인큐베이트하였다. 이 시간 후, 결합되지 않은 약물은 원심분리 및 재분산에 의해 분리하였다; 결과물인 로페라미드-로드된 아포지단백-변형된 HSA 나노입자를 주사 목적을 위해 물에 취하였으며, 물로 희석하여 입자 함량을 10 mg/ml로 조정하였다. 상기 나노입자는 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 활성제의 수송에 대한 그들의 적합성을 실험하기 위한 동물 실험에 사용하였다.

<48> 용해된 형태로는 혈액-뇌 장벽(BBB)을 건널 수 없는 아편유사제(opioid)로서의 로페라미드는 BBB를 건너기 위한 상응하는 담체 시스템에 대해 특히 적합한 모델 약물이다. 로페라미드-함유 제제의 적용 후에 발생하는 진통 효과는 상기 물질이 중추 신경계에 축적되고, 따라서 BBB를 넘어선다는 직접적인 증거를 제공한다.

<49> 동물 실험에 사용되는 일반적인 나노미립자 제제는 10.0 mg/ml 나노입자, 0.7 mg/ml 로페라미드 및 190 μ g/ml ApoE를 함유하였다.

<50> 동물 실험을 위해 적용준비된(ready-to-apply) 나노미립자 제제의 조성물 (총 부피 2.0 ml)은 이하와 같다:

- <51> 1. 10.0 mg/ml 아포지단백-변형된 HSA 나노입자
- <52> 2. 190.0 μg/ml 공유 결합된 아포지단백
- <53> 3. 0.7 mg/ml (상기 나노입자에 흡착적으로 결합된) 로페라미드
- <54> 4. 주사 목적을 위한 물

<55> 상기 제제를 7.0 mg/kg 로페라미드의 용량으로 마우스에게 정맥내로 적용하였다. 20g인 마우스의 평균 체중에 기초하여, 상기 동물은 상기 언급된 제제를 200 μl의 적용량으로 수용하였다.

<56> 이 시스템의 도움으로, 도 1에 나타난 진통 효과는 상기 언급된 활성제 로페라미드를 사용하는 정맥 내 주사 후에 달성되었다. 진통 (통각 반응(nociceptive response))은, 뜨거운 광선을 마우스의 꼬리 상에 쬐어주고 마우스가 그의 꼬리를 쳐서 피할 때까지 지난 시간을 측정하는 꼬리치기(tail-flick) 테스트에 의해 검출하였다. 10초 후 (= 100 % MPE) 상기 실험은 마우스에게 상해를 입히지 않도록 하기 위해 중지하였다. 음성 MPE 값은 제제의 투여 후 마우스가 치료 전보다 그의 꼬리를 더 빨리 쳐서 피하는 경우에서 발생한다.

<57> 비교로서, 2.6 부피%의 에탄올에 녹인 로페라미드 용액 0.7 mg/ml를 사용하였다. 자유 물질 로페라미드 자체는 혈액 뇌 장벽을 가로지르는 수송의 결핍에 의해 어떠한 진통 효과도 나타내지 않는다.

도면의 간단한 설명

<40> 도 1: 폴리에틸렌 글리콜-α-말레이미드-ω-NHS 에스테르를 통해 아포지단백으로 변형된 로페라미드-로드된 HSA 나노입자의 정맥내 적용에 따른 진통 효과 (최대 가능 효과, MPE)의 도시

도면

도면1

