



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월26일

(11) 등록번호 10-2148229

(24) 등록일자 2020년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/50 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5036 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0061239

(22) 출원일자 2018년05월29일

심사청구일자 2018년05월29일

(65) 공개번호 10-2019-0135796

(43) 공개일자 2019년12월09일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080111389 A*

Ind Eng Chem Res. 50, 제13762-13770

쪽(2011.10.31.) 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

노영훈

서울특별시 용산구 이촌로 310, 102동 2203호 (이촌동, 래미안 첼리투스)

박지용

경기도 고양시 일산동구 노루목로 80 312동 201호 (장항동, 호수마을3단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 11 항

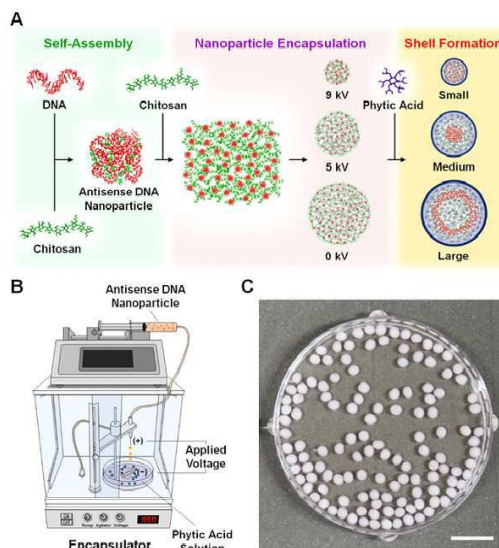
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 핵산의 경구전달용 다중막 캡슐, 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 경구전달용 캡슐 제조방법에 관한 것으로, (a) 키토산 및 핵산(Nucleic acid molecules)을 반응시켜 나노입자를 형성하는 단계; (b) 소정의 전압을 인가하는 단계; 및 (c) 피틴산과 반응시키는 단계;를 포함하는 경구전달용 캡슐 제조방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)
A61K 9/5015 (2013.01)
A61K 9/5089 (2013.01)
A61K 9/5161 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

김유진

서울특별시 동작구 동작대로11가길 14, 501호 (사당동)

(72) 발명자

김정운

서울특별시 은평구 증산로15길 35-10, 2동 902호
 (신사동, 미성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711027428

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구자지원사업

연구과제명 Ezbaro_다기능성 다층 핵산나노구조체 개발 및 이의 의학적, 생명공학적 응용(3/3)

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교

연구기간 2017.07.01 ~ 2018.06.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 키토산 및 핵산 분자(Nucleic acid molecules)을 반응시켜 핵산 나노입자를 형성하는 단계;
 (b) 상기 핵산 나노입자 및 키토산을 혼합하는 단계;
 (c) 소정의 전압을 인가하여 캡슐의 직경을 조절하는 단계;
 (d) 피틴산과 반응시킴으로써 핵산 나노입자의 캡슐내 분포도를 조절하는 단계; 및
 (e) 경화하는 단계;를 포함하는 경구전달용 캡슐 제조방법으로서,
 상기 전압은 0 내지 9 kV이며,
 상기 전압이 높을수록 핵산이 고르게 분포하고,
 상기 전압이 낮을수록 핵산이 캡슐 내부에 집중되는, 전압에 따라 핵산 나노입자의 캡슐 내 분포 조절 가능한 경구 전달용 캡슐 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,
 상기 (a) 단계에서 상기 핵산은 DNA(deoxyribonucleic acid), RNA(ribonucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), LNA(morpholino and locked nucleic acid) 및 GNA(glycol nucleic acid)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 경구전달용 캡슐 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
 상기 (c) 단계에서 상기 전압은 0 내지 9kV인 경구전달용 캡슐 제조방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,
 상기 (a) 또는 (d) 단계에서 항암제를 함께 반응시키는 경구전달용 캡슐 제조방법.

청구항 7

제1항의 제조방법으로 제조된, 경구전달용 캡슐.

청구항 8

제7항에 있어서,
 상기 핵산은 DNA(deoxyribonucleic acid), RNA(ribonucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), LNA(morpholino and locked nucleic acid), GNA(glycol nucleic acid), ODN(oligonucleotide), 플라스미드 DNA(plasmid DNA), 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide), 마이크로 RNA(microRNA), 잠금형 핵산

(locked nucleic acid), DNA 기반 효소(DNAzyme), siRNA, shRNA, RNA 기반 효소(RNAzyme) 및 핵산 애포타머 (aptamer)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 경구전달용 캡슐.

청구항 9

제7항에 있어서,
항암제를 더 포함하는 경구전달용 캡슐.

청구항 10

제7항에 있어서,
소화기관의 점막에 점착하는 경구전달용 캡슐.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 캡슐; 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 소화기관으로의 핵산 전달용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,
상기 소화기관으로의 핵산 전달용 조성물을 포함하는, 소화기암 치료를 위한 소화기관으로의 핵산 전달용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,
상기 소화기암은 식도암, 위암 또는 대장암인 핵산 전달용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 안정성이 우수한 핵산의 경구전달용 캡슐 및 이의 다양한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 안티센스(antisense) 치료법은 암 발생과 관련된 특정 단백질의 발현을 효과적으로 저해하므로 최근 다양한 종류의 암 치료에 응용되고 있다.
- [0003] 경구 투여를 통한 안티센스 치료는 항암 치료의 편의성을 높이고 치료제를 질병 부위에 효과적으로 전달할 수 있다.
- [0004] 그러나 위액, 소화 효소 및 점액층과 같은 생리적 장벽은 핵산의 안정성을 저하시켜 경구 전달을 제한시킨다.
- [0005] 상기 한계를 극복하고자 핵산을 화학적으로 변형시키거나, 나노입자화, 또는 다중 지지체 형성 등의 다양한 약물전달시스템이 개발되었으나, 소화기암, 특히 대장-특이적 전달을 위해 설계된 시스템은 전무한 실정이다.
- [0006] 유전 질환자의 세포 내로 정상적인 유전자 서열을 삽입하는 기술이 제안된 이후 다양한 유전적 장애를 치료하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 최근 핵산의 의약적 용도가 규명됨에 따라 핵산을 세포 내로 효율적으로 전달하는 시스템에 대한 관심이 집중되고 있다.
- [0007] 한편, 키토산은 키토산으로부터 탈아세틸화 공정을 거쳐 얻어지는 천연의 고분자 소재로서 독성이 매우 적어 생체 적합성이 우수하고, 겔화 및 필름 형성이 용이하며, 다가의 양이온성을 가져 음이온성의 물질과 결합이 용이하며, 장 흡착성이 우수하여, 키토산을 이용한 캡슐화를 통해 약물이나 기능성 물질을 전달하는 기술에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.
- [0008] 그러나, 아직까지 핵산의 경구 전달을 위한 약물전달시스템 개발은 미흡한 실정이며, 본 발명자들은 키토산의

특성을 활용함으로써 핵산을 효과적으로 전달할 수 있는 경구전달 플랫폼을 제공하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 핵산을 안정적으로 질병 부위까지 전달할 수 있는 경구전달용 약물전달시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 키토산 및 핵산(Nucleic acid molecules)을 반응시켜 나노입자를 형성하는 단계; (b) 소정의 전압을 인가하는 단계; 및 (c) 피틴산과 반응시키는 단계;를 포함하는 경구전달용 캡슐 제조방법이 제공된다.

[0011] 일 실시예에 있어서, 상기 캡슐 제조방법은 (d) 경화하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 (a) 단계에서 상기 핵산은 DNA(deoxyribonucleic acid), RNA(ribonucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), LNA(morpholino and locked nucleic acid) 및 GNA(glycol nucleic acid)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 단계에서 상기 전압은 0 내지 9kV일 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 단계에서 상기 전압을 제어하여 캡슐의 직경을 조절할 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 (a) 또는 (c) 단계에서 항암제를 함께 반응시킬 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 키토산 및 핵산(Nucleic acid molecules)을 포함하는 자가조립 나노입자; 및 피틴산을 포함하는 셸;로 이루어진 경구전달용 캡슐이 제공된다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 핵산은 DNA(deoxyribonucleic acid), RNA(ribonucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), LNA(morpholino and locked nucleic acid) 및 GNA(glycol nucleic acid)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 캡슐은 항암제를 더 포함할 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 캡슐은 소화기관의 점막에 점착할 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 캡슐 및 약제학적으로 허용되는 담체를 유효성분으로 포함하는 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0021] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 캡슐을 포함하는 소화기암 치료용 조성물이 제공된다.

[0022] 일 실시예에 있어서, 상기 소화기암은 식도암, 위암 또는 대장암일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따르면, 키토산 및 피틴산의 정전기적 상호작용에 의해 형성된 하이드로겔 캡슐은 화학적 가교결합에서 보이는 독성 및 기타 부작용이 거의 없다.

[0024] 상기 경구전달용 캡슐은 핵산을 효과적으로 포집할 뿐만 아니라, 외측에 형성된 셸은 강산 및 DNA분해효소로부터 핵산을 안정적으로 보호할 수 있다.

[0025] 상기 경구전달용 캡슐은 제조에 있어서 정전기 전위를 제어함으로써 캡슐의 크기 및 핵산의 분포를 유연하게 조정할 수 있으며, 질병 특성과 부위를 고려하여 다양하게 활용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정된 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 경구전달용 캡슐의 제조방법을 도식화한 것이다. (A) 캡슐의 합성방법을 개략적으로 도시한 것이다. (B) 캡슐화 기기를 도시한 것이다. (C) 제조된 캡슐의 광학이미지이다.

도 2는 발명의 일 실시예에 따른 경구전달용 캡슐의 형태를 관찰한 것이다. (A) 전압을 달리하여 제조한 크기가 상이한 캡슐의 광학 및 전자현미경 이미지이다 (B) 경화 시간에 따른 캡슐의 쉼의 형성을 관찰한 것이다. (C) 캡슐화 단계 전 올리고 핵산(안티센스 DNA) 나노입자의 유체 역학적 크기를 측정된 것이다. (D) 크기가 상이한 캡슐의 직경 분포를 분석한 것이다.

도 3은 전압을 달리하여 제조한 크기가 상이한 캡슐의 단면 형광 현미경 이미지 및 3D 모델을 나타낸다. 키토산은 녹색(FITC), 핵산은 적색(Cy5)으로 표시하였다. 캡슐의 쉼은 3D 모델에서 파란색으로 표시하였다(기준자 500 μm).

도 4는 SGF 처리에 따른 핵산의 분해 속도를 관찰한 것이다.

도 5는 소화효소 처리에 따른 핵산의 분해 속도를 관찰한 것이다. (A) 캡슐을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 동안 DNase I(0.03 U/ μL)로 처리하고, DNA 안정성을 관찰하였다. (B) 핵산(안티센스 DNA)과 캡슐을 SGF(pH 1.2)에서 2 시간 동안(37 $^{\circ}\text{C}$) 배양하고, DNA 안정성을 관찰하였다. (C) 캡슐을 SGF(pH 1.2)에서 2시간 동안(37 $^{\circ}\text{C}$) 배양한 후 SIF(pH 6.8)로 옮겨 70시간 동안 추가로 배양하면서 DNA 안정성을 관찰하였다.

도 6은 캡슐에서 방출된 올리고 핵산의 세포 흡수를 관찰한 것이다. (A) 대장암 HT-29 세포를 36시간 동안 각 유형의 캡슐에 노출시켰다. 올리고 핵산을 Cy5로 표지(적색)하고 세포핵을 Hoechst 33342로 염색(청색)하였다(기준자 10 μm). (B) 캡슐에서 방출된 올리고 핵산에 의한 대장암 HT-29 세포 GFP 발현 억제 정도를 확인하였다. 세포를 250 및 500nM 농도의 안티센스 DNA로 처리하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0030] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고서에 기술되어 있다.
- [0031] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0032] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사건이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 적혀지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카복실 방향으로 적혀진다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0034] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 키토산 및 핵산(Nucleic acid molecules)을 반응시켜 나노입자를 형성하는 단계; (b) 소정의 전압을 인가하는 단계; 및 (c) 피틴산과 반응시키는 단계;를 포함하는 경구전달용 캡슐 제조방법이 제공된다.
- [0035] 상기 “경구전달용 캡슐”은 키토산 및 핵산(Nucleic acid molecules)을 포함하는 자가조립 나노입자; 및 피틴산을 포함하는 쉼;로 이루어질 수 있다.
- [0036] 상기 경구전달용 캡슐은 코어-쉼(core-shell) 구조를 가지며 코어 내부에 핵산 나노입자가 포집될 수 있다. 상기 키토산 및 핵산(Nucleic acid molecules)을 포함하는 나노입자는 자가조립을 통해 코어를 형성할 수 있으며, 상기 피틴산을 포함하는 쉼은 외부 환경으로부터 상기 코어를 보호할 수 있다.
- [0037] 상기 코어-쉼 구조의 캡슐을 형성하는 자가조립 나노입자는 내부에 위치하여 하나 이상의 코어 구조를 형성할 수 있으며, 상기 피틴산을 포함하는 쉼은 상기 코어 구조를 둘러싸며 상기 캡슐의 외부 영역을 형성할 수 있다.
- [0038] 상기 캡슐 내부가 다중 코어를 이루는 경우 상기 쉼은 피틴산으로 구성될 수 있으나, 상기 코어는 상기 피틴산

의 일부를 포함할 수도 있으며, 통상적인 코어-셸 구조로서 지칭될 수 있는 캡슐 구조가 모두 포괄될 수 있다.

- [0039] 상기 경구전달용 캡슐은 경구 투여시 위/장관의 혹독한 환경에서 내부 핵산을 안정적으로 보호할 수 있고, 소화기관의 점막에 점착하여 상기 핵산을 효과적으로 서방출할 수 있다.
- [0040] 상기 경구전달용 캡슐은 소화기관의 점막에 점착하여 소화기관의 질병 부위에서 국소적으로 핵산을 서방출하므로, 식도암, 위암 및 대장암 등 소화기암 치료를 위한 약물 전달체로서 사용될 수 있다.
- [0041] 상기 (a) 단계에서 키토산 및 핵산(Nucleic acid molecules) 반응시켜 나노입자를 형성할 수 있다.
- [0042] 상기 핵산은 음전하를 띄고, 상기 키토산은 양전하를 띄므로, 정전기적 인력에 의해 자가조립 나노입자를 형성할 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 상기 핵산은 DNA(deoxyribonucleic acid), RNA(ribonucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), LNA(morpholino and locked nucleic acid), 및 GNA(glycol nucleic acid)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 음전하에 의해 키토산과 자가조립할 수 있으면 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 핵산은 ODN(oligonucleotide), 플라스미드 DNA(plasmid DNA), 안티센스 올리고핵산(antisense oligonucleotide), 마이크로 RNA(microRNA), 잠금형 핵산(locked nucleic acid), DNA 기반 효소(DNAzyme), siRNA, shRNA, RNA 기반 효소(RNAzyme), 또는 핵산 앵타머(aptamer)로서 활용 가능하며, 핵산 약물로서 인체에 적용 가능한 다양한 형태로 도입될 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 핵산은 하나 이상의 단백질을 암호화하는 서열 또는 비-암호화 서열(non-coding sequence)을 포함할 수도 있다.
- [0046] 구체적으로, 상기 핵산은 BDNF(brain derived neurotrophic factor), GDNF(glial derived neurotrophic factor), NT3(neurotrophic factor 3), FGF(fibroblast growth factor), TGF(transforming growth factor), PDGF(platelet-derived transforming growth factor), MGF(milk growth factor), EGF(endothelial growth factor), ECDGF(endothelial cell-derived growth factors), NGF(nerve growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), 4-1BBR(4-1 BB receptor), TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand), artemin(GFRalpha3-RET ligand), CXCL13(B cell-attracting chemokine 1), BLC(B lymphocyte chemoattractant), BCMA(B cell maturation protein), BDNF(bone-derived growth factor), MGDF(megakaryocyte derived growth factor), KGF(keratinocyte growth factor, thrombopoietin), PGDF(platelet-derived growth factor), MGDF(megakaryocyte derived growth factor), KGF(keratinocyte growth factor), BMP2(bone morphogenetic protein 2), BRAK, C-10, 및 CT1(Cardiotrophin 1)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 암호화하는 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 다른 케모카인(chemokine), 인터루킨(interleukin) 등을 암호화할 수도 있다.
- [0047] 상기 키토산은 탈아세틸화 단위인 D-글루코사민, 및 아세틸화 단위인 N-아세틸-D-글루코사민을 포함하는 선형 폴리사카라이드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 구체적으로, 상기 키토산은 폴리[β 아미노-2-디옥시-D-글로코피라노즈] (poly[β 및 그 유도체일 수 있다.
- [0049] 상기 키토산 유도체는 티올화 키토산(thiolated chitosan), 트리메틸화 키토산(trimethylated chitosan), 카르복시메틸 키토산(carboxymethyl chitosan) 또는 N-(2-히드록실 프로필-3-트리메틸 암모늄) 키토산 클로라이드(N-(2-hydroxyl propyl-3-trimethyl ammonium) chitosan chloride)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 상기 키토산의 평균 분자량은 30,000 내지 1,000,000 달톤일 수 있고, 바람직하게는 80,000 내지 300,000 달톤일 수 있다. 상기 키토산의 평균 분자량이 30,000 달톤 미만이면 키토산 용액의 점도가 낮아져서 수율이 저하될 수 있고, 1,000,000 달톤 초과이면 키토산 용액의 점도가 지나치게 높아져 캡슐화 공정의 효율이 저하될 수 있다.
- [0051] 상기 (b) 단계에서 소정의 전압을 인가하고, 상기 (c) 단계에서 피틴산과 반응시킬 수 있다.
- [0052] 상기 (b) 단계에서 키토산 용액을 포함하는 핵산을 피틴산 용액으로 정전기적 압출하여 이온 상호 작용에 의한 핵산/키토산/피틴산 하이드로겔 캡슐을 형성할 수 있고, 상기 캡슐의 직경은 정전기 전위에 의해 조절될 수 있다.
- [0053] 상기 캡슐 제조방법은 (d) 경화하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

- [0054] 상기 경화 단계를 통해 셸(shell)을 형성시켜 다양한 크기의 경구전달용 캡슐을 합성할 수 있고, 상기 캡슐의 크기를 조절함으로써 상기 핵산의 분포를 달리할 수 있다.
- [0055] 상기 (b) 단계에서 상기 전압은 0 내지 9kV일 수 있고, 상기 전압을 제어하여 캡슐의 직경을 조절할 수 있다.
- [0056] 상기 (b) 단계에서 높은 전압을 인가하면 상기 캡슐의 직경이 작아지고 상기 핵산이 고르게 분포하는 반면, 낮은 전압을 인가하면 상기 캡슐의 직경이 커지고 상기 핵산이 캡슐 내부에 집중 분포될 수 있다.
- [0057] 상기 캡슐은 강산의 위액 및 소화 효소(DNase I)로부터 핵산을 안정적으로 보호할 수 있다.
- [0058] 예컨대, 상기 캡슐은 크기가 클수록 핵산의 안정성은 증가하고 방출 속도는 감소하며, 소화기 세포의 흡수 및 단백질 발현 억제 효능은 크기 의존적으로 구현될 수 있다.
- [0059] 상기 캡슐의 셸은 피틴산을 더 포함할 수 있고, 상기 키토산 고분자를 가교시킬 수 있다.
- [0060] 상기 피틴산은 거의 모든 식물, 특히 종자와 곡류 등에 다량 함유되어 있으며, 알칼리와 결합하여 중성염을 형성할 수 있다.
- [0061] 상기 피틴산은 미오-이노시톨-6-인산(myo-inositol hexaphosphate)으로도 호칭되며, 미오-이노시톨 고리에 에스테르 결합된 여섯 분자의 인산기로 구성되어 있고, 상기 인산기들은 좌우 대칭적으로 결합될 수 있다.
- [0062] 상기 피틴산은 최근 생체 적합성 고분자로 각광받고 있는 트리폴리포스페이트와 비교하여 키토산의 양이온과 반응할 수 있는 음이온의 수가 2배 이상이므로 키토산과 효과적으로 가교될 수 있다.
- [0063] 상기 경구전달용 캡슐은 생체 내 성분으로 안전하고, 음이온수가 많은 피틴산을 사용함으로써 안정성을 확보할 수 있다.
- [0064] 상기 경구전달용 캡슐은 공극이 적고 단단한 구조를 가지며, 소화관 점막 또는 점막 상부에 분포하는 점액층에서 소화액에 의한 활성 성분의 손상을 방지할 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 경구전달용 캡슐은 pH 의존성 서방출(pH-dependent controlled release) 특성을 가질 수 있다. 상기 경구전달용 캡슐은 산성 조건에서 매우 안정하므로 낮은 pH 조건에서 핵산을 방출하지 않고, 중성 조건 하에서 핵산을 서서히 방출할 수 있다.
- [0066] 한편, 상기 (a) 또는 (c) 단계에서 항암제를 함께 반응시킬 수 있다.
- [0067] 구체적으로, 상기 (a) 단계에서 키토산 및 핵산(Nucleic acid molecules)을 반응시킬 때 항암제를 투입함으로써 핵산 및 항암제를 동시에 탑재시킬 수 있고, 상기 (c) 단계에서 피틴산과 함께 항암제를 반응시킴으로써 항암제를 탑재시킬 수도 있다.
- [0068] 상기 항암제는 암세포의 각종 대사경로에 작용하여 암세포에 대하여 세포독성(cytotoxicity) 또는 성장억제효과(cytostatic effect)를 나타내는 약제를 총칭하며, 작용기전과 화학구조에 따라 대사길항제, 식물성 알칼로이드, topoisomerase inhibitor, 알킬화제, 항암성 항생물질, 호르몬제, 기타 약제로 분류될 수 있다.
- [0069] 상기 항암제는 옥살리플라틴, 이마티니브, 도세탁셀, 페메트렉시드, 게피티니브, 테가푸르, 카페시타빈, 엘로티디브, 독시플루리딘, 파클리탁셀, 인터페론 알파, 겐시타빈, 플루다라빈, 이리노테칸, 카르보플라틴, 시스플라틴, 텍소터어, 독소루비신, 에피루비신, 5-플루오로우라실, UFT, 타목시펜, 고세렐린, 헤르셉틴, 항-CD20 항체, 루프로리드(루프론) 및 플루타미드로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 필요에 따라 도입되는 항암제의 종류를 달리할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 캡슐 및 약제학적으로 허용되는 담체를 유효성분으로 포함하는 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0071] 상기 약제학적 조성물은 통상의 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0072] 상기 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0073] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합

하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0074] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0075] 상기 약제학적 조성물은 상기 경구전달용 캡슐 및 담체 등을 사용하여, 의학 분야의 통상의 방법을 통하여 제조될 수 있으며, 그 방법은 특별히 한정되지 않는다.

[0076] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0077] **제조예 1 : 키토산 하이드로겔 제조**

[0078] 피틴산을 이용한 이온화 겔화 과정을 통해 키토산 하이드로겔을 제조하였다.

[0079] 1%(v/v) 농도의 아세트산 수용액에 용해시켜 1.5%(w/v) 농도의 키토산을 제조하였다.

[0080] 피틴산 수용액(0.75%, v/v)을 정제수에 용해시키고, 5N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH를 6으로 조정하였다.

[0081] 피틴산 수용액을 서서히 교반하면서 키토산 수용액을 적가하였고, 전압값을 달리하여 캡슐의 크기를 제어하였다.

[0082] 캡슐을 1시간 동안 경화시킨 후 정제수로 세척하고 입자 크기에 따라 두 분획으로 분리하였다(1000-1180 μm , 2000-2360 μm).

[0083] **제조예 2 : 올리고핵산이 도입된 키토산 하이드로겔 제조**

[0084] 올리고 핵산이 로딩된 키토산 하이드로겔을 제조하였다.

[0085] 0.2%의 키토산 및 올리고 핵산을 강하게 볼텍싱하여 키토산-올리고 핵산 자가조립 나노입자를 형성하였다. 3% 키토산을 1.5% 농도까지 첨가하여 나노입자를 캡슐화하였다.

[0086] 제조예 1과 동일한 방법으로 피틴산 수용액을 서서히 교반하면서 키토산 수용액을 적가하였다.

[0087] 초음파 처리를 통해 올리고 핵산이 로딩된 키토산 하이드로겔을 완성하였다.

[0088] **실험예 1 : 하이드로겔 캡슐 형태 관찰**

[0089] 광학 현미경, 공초점 현미경, 형광 현미경, SEM을 이용하여 하이드로겔 캡슐의 형태를 관찰하였다.

[0090] 도 2를 참조하면, 상기 캡슐은 얇은 외층을 포함하는 매끄러운 표면 및 다공질의 내층 구조가 확인되었다.

[0091] 상기 캡슐 내 올리고 핵산의 분포를 관찰하기 위해 공초점 현미경을 이용하여 FITC-표지 키토산, Cy5-표지 핵산을 포함하는 하이드로겔 캡슐을 분석하였다.

[0092] 도 3을 참조하면, 9kV의 전압이 인가된 캡슐의 직경은 가장 작고 핵산이 고르게 분포한 반면, 5kV, 0kV 전압이 인가된 캡슐은 크기는 커진 반면 핵산은 고르게 분포되지 않고 코어에 집중되었다.

[0093] 즉, 전압을 제어함으로써 캡슐의 크기와 핵산의 분포를 조정할 수 있으며, 상기 캡슐의 용도나 적용 부위를 고려하여 다양한 형태로 캡슐을 제조할 수 있다.

[0094] **실험예 2 : 위액에 대한 보호 효과 분석**

[0095] 상기 캡슐이 핵산을 경구 전달 가능한지 확인하고자, 위액에 의해 분해되는지 확인하였다.

[0096] 위액의 강산 조건 및 소화액의 핵산가수분해 효소는 핵산의 생물학적 활성을 감소시키는 중요한 요인이다.

[0097] 상기 캡슐이 강산으로부터 핵산을 보호할 수 있는지 확인하고자, 상기 캡슐 또는 핵산을 SGF(simulated gastric fluid)에서 일정 시간 반응시켰다(90 rpm, 37° C).

[0098] 도 4를 참조하면, 단독으로 반응시킨 핵산은 3시간 후 완전히 분해된 반면, 상기 캡슐은 강산에서 올리고 핵산의 분해를 효과적으로 저지하였다.

[0099] 특히, 직경이 큰 캡슐은 직경이 작은 캡슐보다 보호 능력이 현저히 증가하였다.

[0100] 즉, 직경이 큰 캡슐은 작은 캡슐보다 표면적이 상대적으로 크므로, 수소 이온이 캡슐을 용이하게 관통하지 못하며 위액에 대한 보호 효과가 우수하다.

[0101] **실험예 3 : 효소적 분해에 대한 보호 효과 분석**

[0102] 상기 캡슐이 핵산을 경구 전달 가능한지 확인하고자, 핵산가수분해 효소에 의해 분해되는지 확인하였다.

[0103] 도 5A를 참조하면, 상기 캡슐 또는 핵산에 DNase I를 처리한 결과, 핵산은 10분 후 완전히 분해된 반면, 캡슐 내 핵산은 4시간 후에도 핵산이 분해되지 보존되었다.

[0104] 직경이 작은 캡슐의 보호 능력은 상대적으로 낮은 수준이었으나, 직경에 따른 보호 효과에 있어서 큰 차이는 관찰되지 않았다.

[0105] **실험예 4 : 핵산 방출 프로파일 분석**

[0106] 하이드로겔 캡슐은 정전기적 상호 작용에 의해 형성될 수 있고, 다른 이온이나 전하를 띄는 단백질에 의해 분해될 수 있다.

[0107] 인공위핵소화효소(SGF) 및 인공장핵소화효소(SIF) 처리에 따른 상기 캡슐의 방출 프로파일을 분석하였다.

[0108] 도 5B 및 5C를 참조하면, 직경이 큰 캡슐은 시간 경과에 따라 핵산을 서서히 방출한 반면, 직경이 작은 캡슐의 핵산 방출 속도는 상대적으로 높은 수준으로 분석되었다.

[0109] **실험예 5 : 생물학적 활성 분석**

[0110] 크기가 상이한 캡슐에서 방출된 올리고 핵산에 의한 대장암 HT29 세포의 GFP 발현 억제 정도를 확인하였다.

[0111] 올리고 핵산을 Cy5로 표지(적색)하고 세포핵을 Hoechst 33342로 염색(청색)하였으며, 대장암 HT-29 세포를 36시간 동안 캡슐에 노출시켰다.

[0112] 도 6을 참조하면, 직경이 작은 캡슐은 시간 경과에 따라 직경이 큰 캡슐 보다 GFP 발현을 더 높은 수준으로 억제하였다.

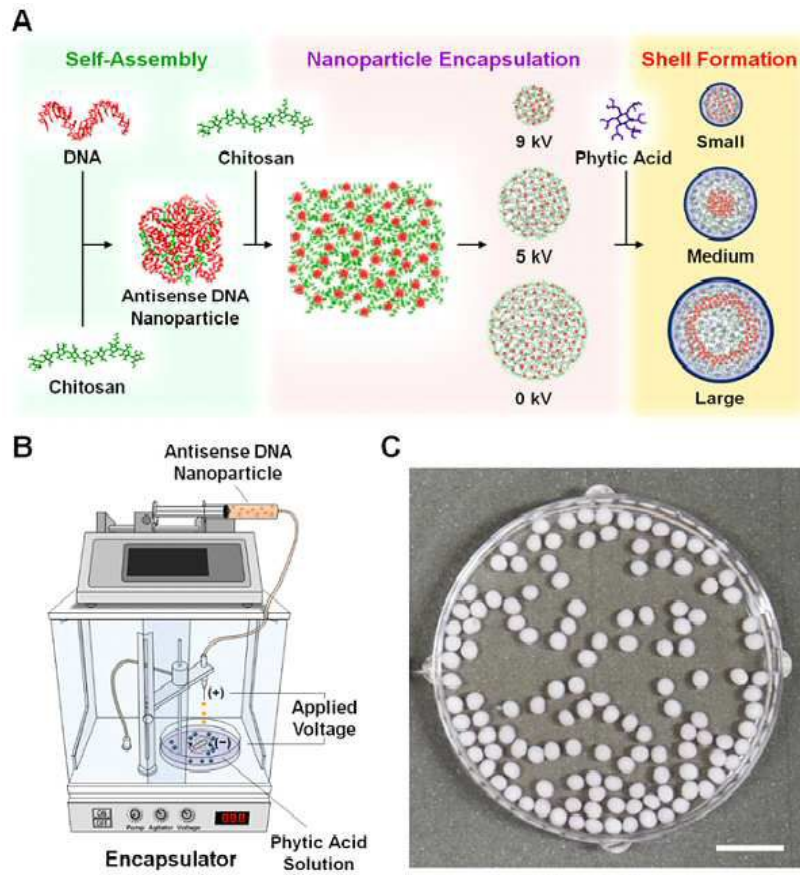
[0113] 상기 캡슐은 직경에 따라 올리고 핵산을 방출하는 속도가 상이하며, 직경이 작은 캡슐은 상대적으로 더 빠른 속도로 대장암 HT-29 세포에 올리고 핵산을 방출시킬 수 있다.

[0114] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

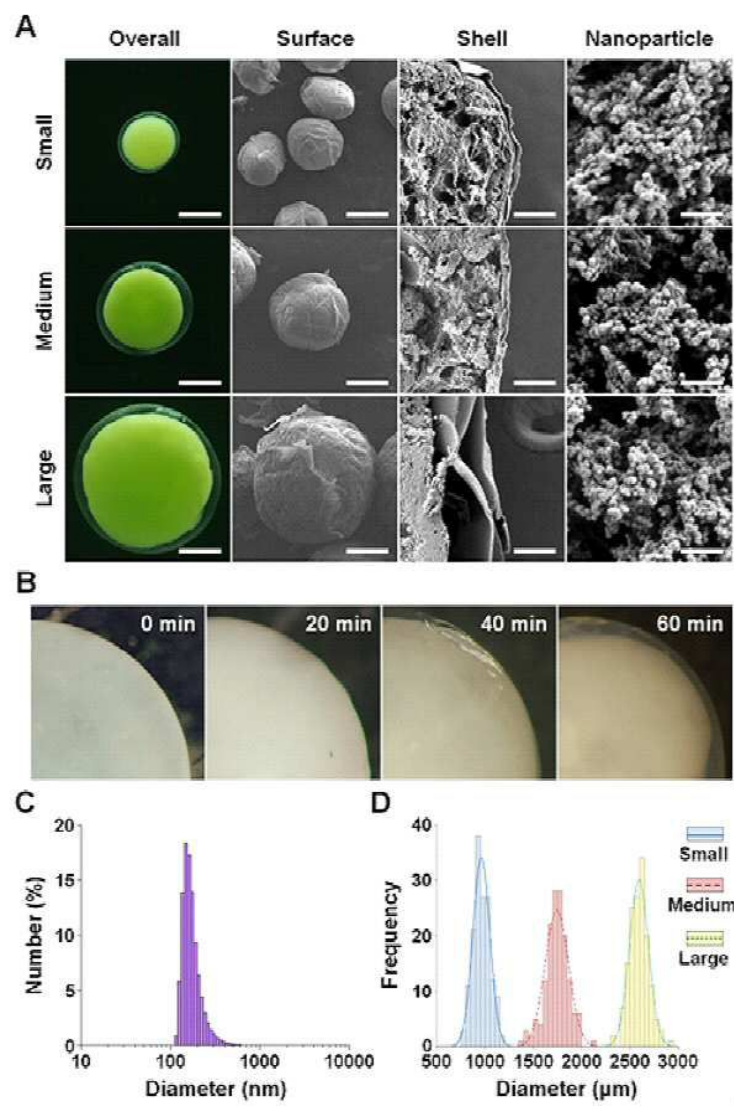
[0115] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

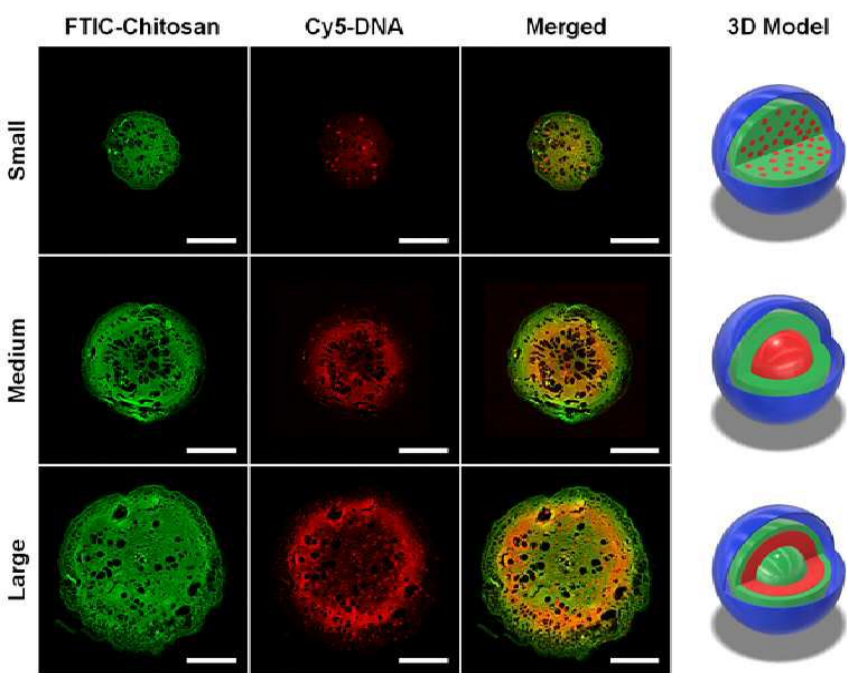
도면1



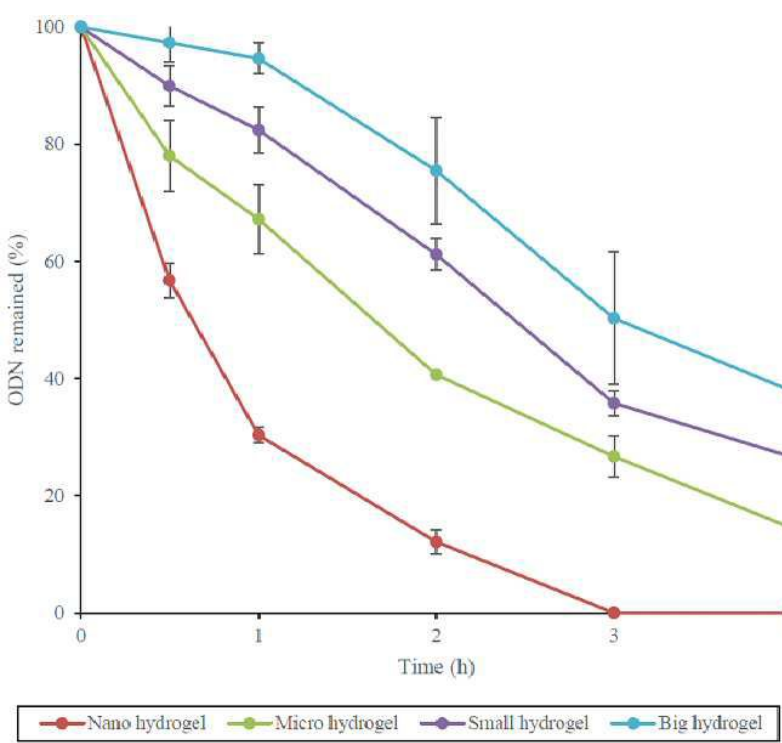
도면2



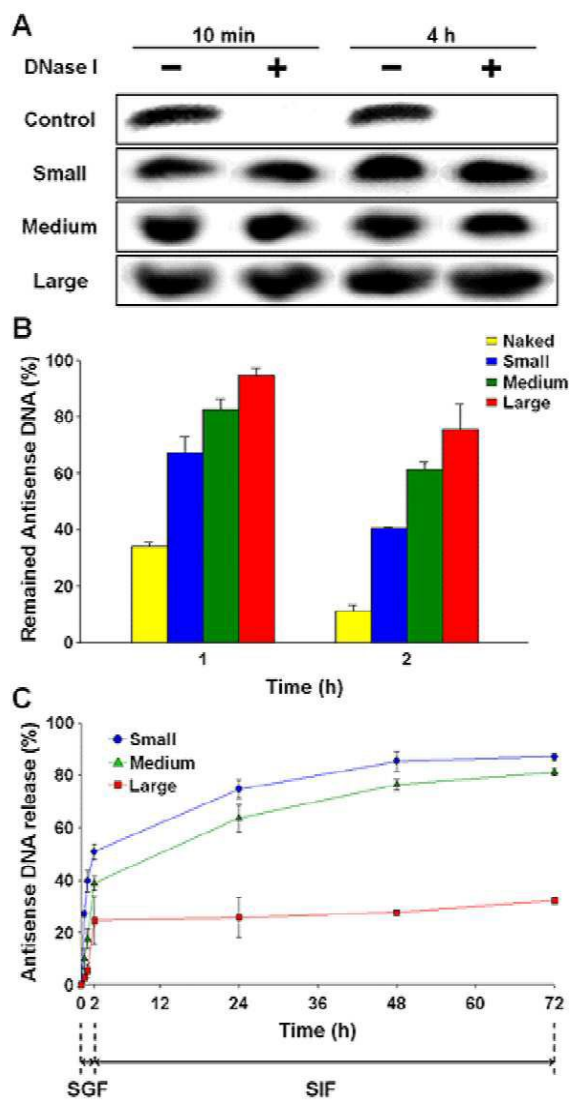
도면3



도면4



도면5



도면6

