



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0089179
 (43) 공개일자 2013년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 9/14* (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0001792
 (22) 출원일자 2013년01월07일
 심사청구일자 없음
 (30) 우선권주장
 1020120010505 2012년02월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인
삼성전자주식회사
 경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동)
 (72) 발명자
박선민
 대구광역시 달서구 월성동 월성보성타운2단지
 205-1007
김현령
 경기도 구리시 수택동 438-56 유흥빌리지 201호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
리앤목특허법인

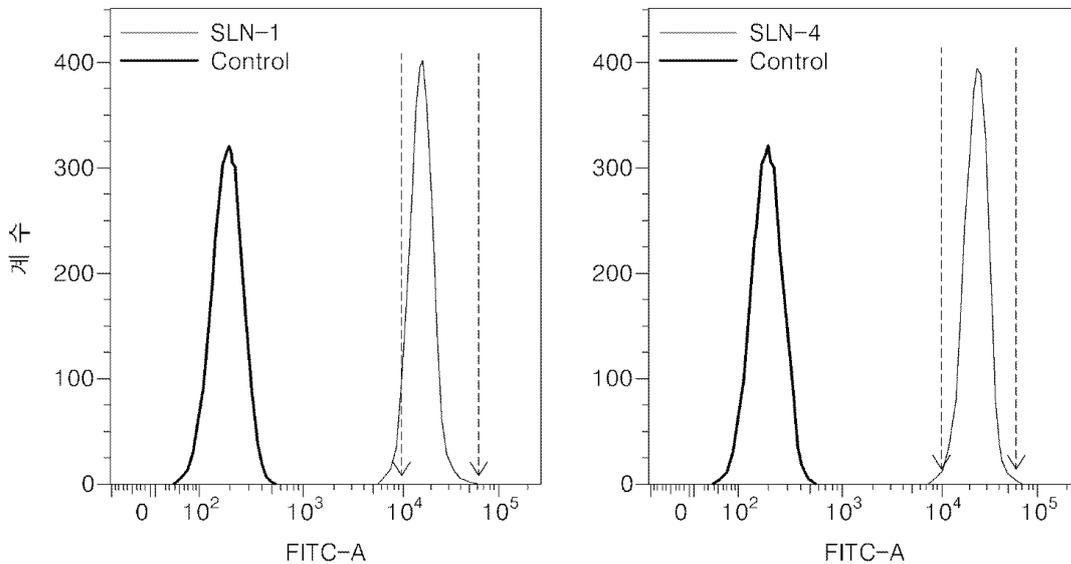
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **엘라스틴-유사 폴리펩티드를 포함하는 고형 지질 나노입자 및 그의 용도**

(57) 요약

엘라스틴-유사 폴리펩티드를 포함하는 고형 지질 나노입자 및 그의 용도를 제공한다.

대표도



(72) 발명자

박재찬

경기도 용인시 기흥구 보정동 죽현마을LG자이아파트 104-1101

채수영

경기도 수원시 장안구 천천동 천천푸르지오아파트 126-302

특허청구의 범위

청구항 1

소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드 (elastin-like polypeptide: ELP) 및 지질분자;를 포함하는 고행 지질 나노입자로서, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 포화 또는 불포화 탄화수소기, 포화 또는 불포화 아실기, 포화 또는 불포화 아미드기 또는 포화 또는 불포화 알콕시기이고, 상기 지질분자는 중성 지질 분자 또는 양친매성 지질분자인 것이고, 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, GVPGX 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 반복 단위를 1회 이상 포함하고, 여기서 V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 아미노산인 것인 고행 지질 나노입자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 하나의 엘라스틴-유사 폴리펩티드 분자에 1이상의 상기 모이어티가 접합되어 있는 것인 고행 지질 나노입자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 엘라스틴-유사 폴리펩티드 분자의 측쇄에 1이상의 상기 모이어티가 접합되어 있는 것인 고행 지질 나노입자.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 안정화제를 더 포함하는 고행 지질 나노입자.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 고행 지질 나노입자를 구성하는 지질분자는 39℃ 내지 60℃의 상전이 온도를 갖는 것을 포함하는 것인 고행 지질 나노입자.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 평균 직경 약 10nm 내지 1500nm인 고행 지질 나노입자.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 생리학적 활성 작용제, 약제학적 활성 작용제, 자기적 활성 작용제, 이미징제, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함하는 고행 지질 나노입자.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 하나이상의 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 제1 지질분자, 제2 지질분자 및 안정화제;를 포함하고, 제1 지질분자는 인지질이고, 제2 지질분자는 중성 지질분자인 고행 지질 나노입자로서, 상기 안정화제는 스테롤 또는 그 유도체, 스펅코지질 또는 그 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, 상기 인지질은 C16-C24 아실기를 갖는 것이고, 상기 중성 지질분자는 하나이상의 C4 내지 C24 카르복실산의 모노글리세리드, 디글리세리드 또는 트리글리세리드를 포함하는 것인 고행 지질 나노입자.

청구항 9

제8항에 있어서, 하나이상의 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 트리카프린과 트리라우린으로 구성된 트리글리세리드 및 콜레스테릴 올레이트를 포함하고, 상기 하나이상의 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드는, n이 1 내지 200이고 V'는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나를 나타내고, n이 2 이상인 경우 서열의 각 위치의 V'는 같거나 다른 서열이고, V'는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산이고, 각 위치의 V'의 X는 동일하거나 다른 아미노산인 스테아로일- 또는 콜레스테릴-V'n-NH₂;

n_1 , n_2 및 n_3 이 각각 1 내지 200이고 V_1 및 V_2 는 각각 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나를 나타내고, n_1 및 n_2 가 각각 2 이상인 경우 서열의 각 위치의 V'는 같거나 다른 서열이고, V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산이고, 각 위치의 V'의 X는 동일하거나 다른 아미노산인 스테아로일- 또는 콜레스테릴- $[V_1n_1V_2n_2]n_3-NH_2$; 또는

n_1 , n_2 및 n_3 이 각각 1 내지 200이고, B(SA 또는 Chol)는 각각 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나로서, V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 스테아로일- 또는 콜레스테릴-접합된 측쇄 아미노기를 가진 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘을 나타내고, V_1 은 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나로서, V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산을 나타내고, n_1 또는 n_2 가 2 이상의 수인 경우, 각 위치의 B와 V_1 은 각각 동일하거나 다른 서열인 스테아로일- 또는 콜레스테릴- $[B(SA \text{ 또는 } Chol)n_1V_1n_2]n_3-NH_2$:인 것인 고휘 지질 나노입자.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 하나 이상의 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 포스파티딜콜린, 트리카프린과 트리라우린으로 구성된 트리글리세리드 및 콜레스테릴 올레이트는 2-5: 0.1-3: 0-1의 몰비이고, 트리카프린과 트리라우린의 몰비는 1: 약 0.25 내지 약 4인 고휘 지질 나노입자..

청구항 11

약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 및 활성성분을 포함하는 고휘 지질 나노입자를 포함하는 활성성분을 개체에 전달하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 고휘 지질 나노입자는 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드 및 지질분자:를 포함하는 것인 조성물로서, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 포화 또는 불포화 탄화수소기, 포화 또는 불포화 아실기, 포화 또는 불포화 아미드 또는 포화 또는 불포화 알콕시 기이고, 상기 지질분자는 중성 지질 분자 또는 양친매성 지질분자인 것이고, 상기 활성성분은 생리학적 활성 작용제, 약제학적 활성 작용제, 자기적 활성 작용제, 이미징제, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것이고, 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, GVPGX 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 반복 단위를 1회 이상 포함하고, 여기서 V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 아미노산인 것인 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 하나의 엘라스틴-유사 폴리펩티드 분자에 1이상이 접합되어 있는 것인 조성물.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 고휘 지질 나노입자를 구성하는 지질분자는 39℃ 내지 60℃의 상전이 온도를 갖는 것을 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 평균 직경 약 10nm 내지 1500nm인 조성물.

청구항 15

청구항 11에 있어서, 상기 고휘 지질 나노입자는 하나 이상의 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 제1 지질분자, 제2 지질분자 및 안정화제:를 포함하고, 제1 지질분자는 인지질이고, 제2 지질분자는 중성 지질분자인 것인 조성물로서, 상기 안정화제는 스테롤 또는 그 유도체, 스펅코지질 또는 그 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, 상기 인지질은 C16-C24 아실기를 갖는 것이고, 상기 중성 지질분자는 하나 이상의 C4 내지 C24 카르복실산의 모노글리세리드, 디글리세리드 또는 트리글리세리드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, n이 1 내지 200인 스테아로일-(VPGVG)_n-NH₂, 포스파티딜콜린, 트리카프린과 트리라우린으로 구성된 트리글리세리드 및 콜레스테릴 올레에이트를 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

청구항 16에 있어서, n이 1 내지 200인 스테아로일-(VPGVG)_n-NH₂, 포스파티딜콜린, 트리카프린과 트리라우린으로 구성된 트리글리세리드 및 콜레스테릴 올레에이트는 2-5: 0.1-3: 0-1의 몰비이고, 트리카프린과 트리라우린의 몰비는 1: 약 0.25 내지 약 4인 조성물.

청구항 18

개체의 체내의 표적 부위에 활성성분을 전달하는 방법으로서,

활성 성분을 포함하는 고�형 지질 나노입자를 개체에게 투여하는 단계로서, 상기 고�형 지질 나노입자는 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드 및 지질분자를 포함하는 것인 단계; 및

상기 개체의 표적 부위를 가열하여 상기 표적 부위에서 상기 고�형 지질 나노입자로부터 상기 활성성분을 방출시키는 단계;를 포함하는 것인 방법으로서, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 포화 또는 불포화 탄화수소기, 포화 또는 불포화 아실기, 포화 또는 불포화 아미드 또는 포화 또는 불포화 알콕시이고, 상기 지질분자는 중성 지질 분자 또는 양친매성 지질분자인 것이고, 상기 활성성분은 생리학적 활성 작용제, 약제학적 활성 작용제, 자기적 활성 작용제, 이미징제, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것이고, 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, GVPGX 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 반복 단위를 1회 이상 포함하고, 여기서 V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 아미노산인 것인 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 고�형 지질 나노입자는 평균 직경 약 10nm 내지 1500nm인 방법.

청구항 20

청구항 18에 있어서, 상기 고�형 지질 나노입자는 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 제1 지질분자, 제2 지질분자 및 안정화제;를 포함하고, 제1 지질분자는 인지질이고, 제2 지질분자는 중성 지질분자인 것인 방법으로서, 상기 안정화제는 스테롤 또는 그 유도체, 스펅코지질 또는 그 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, 상기 인지질은 C16-C24 아실기를 갖는 것이고, 상기 중성 지질분자는 하나 이상의 C4 내지 C24 카르복실산의 모노글리세리드, 디글리세리드 또는 트리글리세리드를 포함하는 것인 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 고�형 지질 나노입자는 n이 1 내지 200인 스테아로일-(VPGVG)_n-NH₂, 포스파티딜콜린, 트리카프린과 트리라우린으로 구성된 트리글리세리드 및 콜레스테릴 올레에이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

청구항 20에 있어서, 상기 고�형 지질 나노입자는 n이 1 내지 200인 스테아로일-(VPGVG)_n-NH₂, 포스파티딜콜린, 트리카프린과 트리라우린으로 구성된 트리글리세리드 및 콜레스테릴 올레에이트는 2-5: 0.1-3: 0-1의 몰비이고, 트리카프린과 트리라우린의 몰비는 1: 약 0.25 내지 약 4인 방법.

청구항 23

청구항 20에 있어서, 상기 가열은 39℃ 내지 45℃로 가열되는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 엘라스틴-유사 폴리펩티드를 고�형 지질 나노입자 및 그의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

- [0002] 고형 지질 나노입자 (solid lipid nanoparticle: SLN)는 에멀전, 리포솜, 및 중합체성 나노입자에 대한 대안적 담체 시스템 (carrier system)으로서 개발되었다. 고형 지질 나노입자는 통합된 (incorporated) 화합물의 안정화, 제어된 방출, 폐쇄성 (occlusivity), 피부에 대한 인 비보 효과를 포함한 피부에 대한 필름 형성을 포함한 잇점을 제공한다. 또한 생체 내에 존재하는 지질 (biological lipid)를 사용하는 경우, 생체 적합성 및 생체 분해성이 우수하고, 저장 안정성이 높다는 장점이 있다.
- [0003] 고형 지질 나노입자는 용해/고형화 과정 (melting/solidification)에 의하여 제조될 수 있으며, 이 경우 지질분자는 용해되고, 물 중에 분산되고, 냉각시켜 상기 고형 지질 나노입자를 고형화한다. 또한, 고형 지질 나노입자는 중합체 마이크로입자의 형성과 유사한 에멀전 고정을 사용하여 생산될 수 있다. 이 경우, 지질분자는 용매에 용해되고, 유화되고, 유화제를 포함하는 수성 용액 중에 분산시켜 상기 고형 지질 나노입자를 경화시킨다. 상기 유화제의 역할은 상기 고형 지질 나노입자를 안정화시킬 수 있다.
- [0004] 그러나, 고형 지질 나노입자는 지나치게 안정하여 약물 방출에 시간이 오래 소요될 수 있다. 이를 극복하기 위하여 약물 방출을 효율적으로 할 수 있는 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 일 양상은 엘라스틴 유사 폴리펩티드를 포함하는 고형 지질 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0006] 다른 양상은 활성성분을 포함하는 엘라스틴 유사 폴리펩티드를 포함하는 고형 지질 나노입자를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 다른 양상은 상기 고형 지질 나노입자를 이용하여 개체의 체내의 표적 부위에 활성성분을 효율적으로 전달하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 일 양상은 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드 (elastin-like polypeptide: ELP) 및 지질분자를 포함하는 고형 지질 나노입자를 제공한다.
- [0009] 용어 "엘라스틴-유사 폴리펩티드 (elastin-like polypeptide)"는 온도에 따라 구조 (conformation) 변화를 하는 아미노산 중합체의 일 종류를 나타낸다. 일 구체예에서, 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 "역상전이 거동 (inverse phase transitioning behavior)"을 갖는 중합체일 수 있다. 역상전이 거동이란 "역상전이 온도 (inverse phase transition temperature: T_i)" 이하의 온도에서는 수성 용액에 용해성이고, 온도가 역상전이 온도보다 높게 상승하는 경우, 불용성으로 되는 것을 나타낸다. 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 온도가 상승함에 따라 고도로 용해성인 긴 사슬 (elongated chain)로부터 크게 감소된 용해도를 갖는 단단하게 접혀진 응집체 (tightly folded aggregate)로 전이할 수 있다. 이러한 역상전이는 온도의 상승에 따라 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 구조가 β -턴 및 찌그러진 β -구조 (distorted β -structure)를 더 많이 가지게 됨으로써 유도되는 것일 수 있다. 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 예를 들면, 약 10°C 내지 약 70°C 또는 약 39°C 내지 약 70°C의 상전이 온도를 갖는 것일 수 있다.
- [0010] 상기 고형 지질 나노입자에 있어서, 역상전이 거동 특성은 온도가 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 T_i 보다 낮은 온도에서 높은 온도로 상승함에 따라 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 수축 및 자가 조립으로 인하여, 고형 지질 나노입자를 파괴할 수 있다. 상기 고형 지질 나노입자의 파괴는 고형 지질 나노입자 중에 포함된 활성물질의 방출을 증가시킬 수 있다. 따라서, 고형 지질 나노입자에 포함된 활성성분은 온도에 대한 더 높은 민감도로 고형 지질 나노입자로부터 외부로 방출될 수 있다. 그러나, 하나이상의 구체예들이 특정한 작용 기작에 한정되는 것은 아니다.
- [0011] 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 역상전이 거동에 의한 고형 지질 나노입자의 파괴는 고형 지질 나노입자를 구성하

는 지질 분자 및 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 상전이온도에 따라 달라질 수 있다. 지질분자는 그의 상전이 온도 이하에서는 젤상, 그 이상에서는 액체 (결정성) 상으로 존재한다. 지질분자가 젤상으로 존재하는 경우, 엘라스틴-유사 폴리펩티드가 역상전이 거동에 의하여 β -턴 구조를 갖는 구조로 변경되더라도, 고히 지질 나노입자의 파괴는 일어나지 않거나 제한적일 수 있다. 반면, 지질분자가 액체 상으로 존재하는 경우, 엘라스틴-유사 폴리펩티드가 역상전이 거동에 의하여 β -턴 구조를 갖는 구조로 변경됨에 따라, 고히 지질 나노입자의 파괴는 유도될 수 있다. 즉, 지질분자가 젤상으로 존재하는 경우에 비하여 액체상으로 존재하는 경우, 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 역상전이는 고히 지질 나노입자의 파괴를 더 효율적으로 유도한다. 따라서, 고히 지질 나노입자에 포함된 활성 성분의 방출 온도는 그를 구성하는 지질분자의 상전이온도 및 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 역상전이 온도를 조절함으로써, 조절될 수 있다. 예를 들면, 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 고히 지질 나노입자를 구성하는 지질분자 및 고히 지질 나노입자의 상전이 온도는 각각 약 10°C 내지 70°C, 예를 들면, 35°C 내지 70°C, 39°C 내지 45°C 또는 39°C 내지 60°C일 수 있다.

[0012] 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 소수성기를 포함하는 모이어티가 아미노산 서열의 N 말단, C 말단, N 말단 아미노산 잔기의 측쇄, C 말단 아미노산 잔기의 측쇄 또는 양말단이 아닌 그 사이에 있는 아미노산 잔기의 측쇄에 연결된 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 N 말단 또는 C 말단에 접합되고, 하나의 엘라스틴-유사 폴리펩티드 분자당 한 분자 이상이 접합된 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 N 말단의 N 원자와의 아민 또는 아미드 결합, 또는 C 말단의 카르보닐기와 아미드 또는 에스테르 결합을 통하여 접합된 것일 수 있다. 여기서, 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 C4-C30, 예를 들면, C14-C24의 탄소수, 또는 C16-C24의 탄소수를 갖는 탄화수소 또는 카르보닐기일 수 있다.

[0013] 일 구체예에서, 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 아미노산 서열에 의하여 정의될 수 있다. 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 일부분 또는 전체가 VPGXG (서열번호 1), PGXGV (서열번호 2), GXGVP (서열번호 3), XGVPG (서열번호 4), GVPGX (서열번호 5) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 반복 단위를 1회 이상 포함하고, 여기서 V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산인 것일 수 있다. 여기서, 각 반복 단위의 X는 동일하거나 다른 아미노산일 수 있다. 상기 반복 단위는 얻어진 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 상전이 특성을 제거하지 않는 하나 이상의 아미노산 또는 다른 링커 모이어티에 의하여 서로 분리되거나, 말단 부분이 상기 하나 이상의 아미노산 또는 다른 링커 모이어티로 될 수 있다. 상기 반복 단위 대 다른 아미노산 또는 링커 모이어티의 비율은 상기 반복 단위와 다른 아미노산을 기준으로 약 0.1% 내지 약 99.9%의 상기 반복 단위로 된 것일 수 있다. 상기 선택된 반복 단위는 2 이상 반복, 예를 들면 2 내지 200회 반복되는 것일 수 있다.

[0014] 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, GVPGX 또는 이들의 조합이 1회 이상 직렬 반복된 블록 (tandemly-repeated blocks)이거나 또는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, GVPGX 또는 이들의 조합이 1회 이상 직렬 반복된 블록을 포함하는 것일 수 있다. 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 역상전이 거동 현상이 유지되는 한, VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, GVPGX 또는 이들의 조합만으로 구성된 것뿐만 아니라, 분자 내부에 그 외의 다른 부분 (portion), 예를 들면, 링커 및 차단기를 포함할 수 있다. 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 N 말단 또는 C 말단이 소수성기를 포함하는 모이어티와 결합되어 있는 것일 수 있다. 또한, 소수성기를 포함하는 모이어티는 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 측쇄 중의 반응성과 결합에 의하여 접합될 수 있다. 상기 반응성은 아미노기, 히드록실기, 티올기 또는 카르복실기일 수 있다. 소수성기를 포함하는 모이어티와 결합되어 있지 않은 반대편 말단은 차단되거나 차단되지 않을 수 있다. 예를 들면, 소수성기를 포함하는 모이어티와 엘라스틴-유사 폴리펩티드가 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 N 말단을 통하여 결합된 경우, 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 C 말단의 카르복실기는 차단되거나 차단되지 않을 수 있다. 상기 차단은 생체적합하거나, 면역원성이 없거나, 특이적 전달에 도움을 주거나, 생체 분해 시스템으로부터 회피될 수 있는 물질과 결합 또는 반응되어 이루어지는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 차단은 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 C 말단의 카르복실기와 아미노기와의 결합에 의하여 아미드 결합을 형성함으로써 이루어질 수 있다. 상기 아미노기는 암모니아 분자, 일차 아민, 2차 아민 또는 3차 아민일 수 있다. 상기 일차 아민, 2차 아민 또는 3차 아민은 각각 C1-C18, 예를 C1-C6의 탄소수를 갖는 것일 수 있다. X는 발린 또는 알라닌일 수 있다.

[0015] 상기 반복 단위는 서로 독립적으로 1 이상의 정수회 반복되어 포함될 수 있다. 상기 반복회수는 서로 독립적으로

로 2 내지 200, 2 내지 100, 2 내지 80, 2 내지 60, 2 내지 40, 2 내지 10, 2 내지 12, 2 내지 8, 2 내지 6, 4 내지 100, 8 내지 80, 10 내지 60, 12 내지 40, 20 내지 40, 4 내지 10, 4 내지 8, 또는 4 내지 6의 정수인 것일 수 있다.

[0016] 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 상기 지질분자들과 상호작용하여 엘라스틴-유사 폴리펩티드를 상기 지질 분자에 고정할 수 있는 특성을 가진 분자일 수 있다. 상기 상호작용은 공유 또는 비공유 결합일 수 있다. 상기 상호작용은 소수성 상호작용, 반데르 발스 결합, 이온 결합, 또는 수소 결합일 수 있다. 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 일부 또는 전체가 상기 지질분자와 동일하거나 다른 지질 분자인 것일 수 있다.

[0017] 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 소수성 부분으로만 구성된 분자 또는 소수성 부분과 친수성 부분을 포함하는 양친매성 분자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 양친매성 분자는 소수성 부분은 지질분자 내부 방향으로 배치되어 있고 친수성 부분은 지질분자의 외부 방향으로 배치되어 엘라스틴-유사 폴리펩티드에 결합되어 있는 것일 수 있다. 여기서, "외부 방향"이란 고휘 지질 나노입자의 중심으로부터 외부 방향을 나타낸다. 상기 모이어티는 고휘 지질 나노입자 중의 지질분자 사이에 충전(pack), 임베드(embedded) 또는 분산된 것일 수 있다. 상기 모이어티는 생체막에 천연적으로 존재하는 지질 분자이거나 생체막에 천연적으로 존재하지는 않지만 지질분자일 수 있다.

[0018] 상기 생체막에 천연적으로 존재하는 지질 분자는 인지질 또는 그의 유도체, 스테롤 또는 그 유도체, 스펅고지질 또는 그 유도체 및 이들 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 인지질 또는 그 유도체는 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 이노시톨, 포스파티딜 에탄올아민 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다. 상기 스테롤 또는 그 유도체는 콜레스테롤 또는 그의 유도체, 또는 스쿠알렌 또는 그 유도체일 수 있다. 상기 스펅고지질은 스펅고미엘린 또는 강클리오시드 또는 이들의 유도체일 수 있다. 상기 모이어티는 상기 인지질, 스테롤 또는 스펅고지질의 생체내 합성과정에서 생성되는 중간체 또는 전구체를 포함한다. 예를 들면, 포스포글리세리드, 스핀고신, 세라미드 또는 세레브로시드를 포함한다. 상기 유도체는 지방산의 에스테르일 수 있다. 상기 지방산은 C4 내지 C30의 지방산일 수 있다.

[0019] 상기 모이어티는 포화 또는 불포화 탄화수소, 포화 또는 불포화 아미드기, 포화 또는 불포화 아실 분자 또는 포화 또는 불포화 알콕시 분자일 수 있다.

[0020] 소수성기를 포함하는 모이어티와 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 접합은 생리적 또는 병적 조건에서 절단가능하지 않거나, 절단 가능한 결합에 의하여 이루어진 것일 수 있다. 절단 가능한 결합의 예는, pH 절단가능한 링커, 열 전달가능한 링커, 광 (radiation) 절단가능한 링커, 수용액에서 전달되는 링커를 매개하여 이루어진 결합일 수 있다.

[0021] 상기 모이어티는 엘라스틴-유사 폴리펩티드 N 말단의 NH 또는 C 말단의 카르보닐 (-C(O)-)기와의 결합에 의하여 접합되어 있는 것일 수 있다. 상기 모이어티는 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 측쇄의 작용기, 예를 들면, 아미노기, 카르보닐기, 히드록시기, 티올기, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 작용기와의 반응에 의하여 형성된 결합에 의하여 연결된 것일 수 있다. 상기 모이어티는 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 N 원자와의 아민 또는 아미드 결합을 통하여 접합되어 있는 것일 수 있다. 상기 소수성기를 포함하는 모이어티는 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 C 말단의 카르보닐기와 아미드 또는 에스테르 결합을 통하여 접합되어 있는 것일 수 있다.

[0022] 상기 모이어티는, 소수성기 부분이 C4-C30, 예를 들면, C14-C24의 탄소수, 또는 C16-C24의 탄소수를 갖는 것일 수 있다. 상기 모이어티는, 예를 들면, 미리스토일 (C14), 팔미토일 (C16), 스테아로일 (C18), 아라키도닐 (C20), 베헤노일 (C22) 또는 리그노세로일 (C24)일 수 있다. 상기 모이어티는 소수성 효과 (hydrophobic

effect)에 의하여 지질분자에 충전될 수 있으며, 그에 따라 상기 모이어티에 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 상기 고품 지질 나노입자에 고정되어질 수 있다.

[0023] 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP의 예는, n 이 1 내지 200이고 스테아로일- 또는 콜레스테릴- $V'n-NH_2$ 일 수 있다. 여기서, V' 는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나를 나타내고, n 이 2 이상인 경우 상기 서열에 포함되는 V' 는 같거나 다른 서열일 수 있다. n 은 2 내지 200, 2 내지 100, 2 내지 80, 2 내지 60, 2 내지 40, 2 내지 10, 2 내지 12, 2 내지 8, 2 내지 6, 4 내지 100, 8 내지 80, 10 내지 60, 12 내지 40, 20 내지 40, 4 내지 10, 4 내지 8, 또는 4 내지 6의 정수인 것일 수 있다. 여기서, 여기서 V 는 발린, P 는 프롤린, G 는 글리신, X 는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산인 것일 수 있다. 여기서, 각 반복단위의 X 는 동일하거나 다른 아미노산일 수 있다. 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP는 예를 들면, 스테아로일-(VPGVG) $n-NH_2$ 또는 콜레스테릴-(VPGVG) $n-NH_2$ 일 수 있다.

[0024] 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP의 다른 예는, n_1 , n_2 및 n_3 이 각각 1 내지 200이고 스테아로일- 또는 콜레스테릴- $[V_1n_1V_2n_2]n_3-NH_2$ 일 수 있다. 2 내지 200, 2 내지 100, 2 내지 80, 2 내지 60, 2 내지 40, 2 내지 10, 2 내지 12, 2 내지 8, 2 내지 6, 4 내지 100, 8 내지 80, 10 내지 60, 12 내지 40, 20 내지 40, 4 내지 10, 4 내지 8, 또는 4 내지 6의 정수인 것일 수 있다. 여기서, V_1 및 V_2 는 각각 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나를 나타낸다. 여기서, 여기서 V 는 발린, P 는 프롤린, G 는 글리신, X 는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산인 것일 수 있다. 여기서, 각 반복단위의 X 는 동일하거나 다른 아미노산일 수 있다. 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP는 예를 들면, 스테아로일- 또는 콜레스테릴- $[(VPGVG)n_1(VPGAG)n_2]n_3-NH_2$ 일 수 있다.

[0025] 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP의 다른 예는, n_1 , n_2 및 n_3 이 각각 1 내지 200이고 스테아로일- 또는 콜레스테릴- $[B(SA$ 또는 $Chol)n_1V_1n_2]n_3-NH_2$ 일 수 있다. n_1 , n_2 및 n_3 은 각각 2 내지 200, 2 내지 100, 2 내지 80, 2 내지 60, 2 내지 40, 2 내지 10, 2 내지 12, 2 내지 8, 2 내지 6, 4 내지 100, 8 내지 80, 10 내지 60, 12 내지 40, 20 내지 40, 4 내지 10, 4 내지 8, 또는 4 내지 6의 정수인 것일 수 있다. 여기서, $B(SA$ 또는 $Chol)$ 는 각각 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나로서, V 는 발린, P 는 프롤린, G 는 글리신, X 는 스테아로일- 또는 콜레스테릴-측쇄의 아미노 기를 가진 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘을 나타낸다. V_1 는 각각 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나로서, V 는 발린, P 는 프롤린, G 는 글리신, X 는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산을 나타낸다. 여기서, n_1 또는 n_2 가 2 이상의 수인 경우, 각 위치의 B 와 V_1 은 각각 동일하거나 다를 수 있다. 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP는 예를 들면, 스테아로일- 또는 콜레스테릴- $[(VPGK(SA$ 또는 $Chol)G)n_1(VPGXG)n_2]n_3-NH_2$ 일 수 있다.

[0026] 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 상기 고품 지질 나노입자 총 중량에 대하여 0.01 내지 50 중량%의 비율로 포함될 수 있다.

[0027] 본 명세서에 사용된 용어 "지질 분자"는 물에 상대적으로 불용성이나, 유기 용매에 용해될 수 있는 지방 (fat) 또는 지방 유래 물질을 포함한다. 지질분자는 지방산 에스테르, 지방 알콜, 스테롤, 왁스 등을 포함한다. 상기 지방의 예는 고급 지방산의 글리세릴 에스테르이다.

[0028] 상기 지질분자는 중성 지질분자 또는 양친매성 지질분자를 포함한다. 중성 지질분자는 전하를 갖지 않은 지질분자를 나타낸다. 중성 지질분자는 지방산의 글리세릴 에스테르 일 수 있다. 중성 지질분자는 하나이상의 C_4 내지 C_{24} 카르복실산의 모노글리세리드, 디글리세리드 또는 트리글리세리드를 포함한다. 카르복실산는 포화 또는 불포화 및 분지 또는 미분지된 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 지질분자는 C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , C_{24} 카르복실산의 모노글리세리드일 수 있다. 상기 카르복실산는 포화 또는 불포화 및 분지 또는 미분지된 것일 수 있다. 상기 카르복실산은 3개 글리세롤 히드록실기 중 어느 것에 공유결합에 의하여 연결될 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 지질분자는 C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} , C_{24} 카르복실산의 디글리세리드일 수 있다. 상기 카르복실산는 포화 또는 불포화 및 분지 또는 미분지된 것일 수 있다. 상기 2개 카르복

실산은 같거나 다를 수 있으며, 3개 글리세롤 히드록실기 중 어느 2개에 공유결합에 의하여 연결될 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 지질분자는 C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24 카르복실산의 트리글리세리드일 수 있다. 상기 카르복실산은 포화 또는 불포화 및 분지 또는 미분지된 것일 수 있다. 상기 3개 카르복실산은 같거나 2개 카르복실산은 같거나, 또는 3개 모두가 다를 수 있다. 3개 글리세롤 히드록실기 중 어느 2개에 공유결합에 의하여 연결될 수 있다.

[0029] 일 구체예에서, 상기 지질분자는 C8 내지 C18의 사슬 길이를 갖는 포화된 짝수, 미분지된 지방산의 트리글리세리드의 혼합물 (blend)일 수 있다. 예를 들면, 상기 지질분자는 C8, C10, C12, C14, C16, 또는 C18 카르복실산의 각 트리글리세리드의 혼합물일 수 있다. 예를 들면, 트리카프린산 글리세롤 및 트리라우린산 글리세롤의 혼합물일 수 있다. 상기 혼합물 중의 각 트리글리세리드에 대하여, 각 카르복실산은 같거나, 카르복실산 중 2개는 같거나, 3개 모두는 다를 수 있다.

[0030] 상기 지질분자는 모노글리세리드, 디글리세리드 및 트리글리세리드의 혼합물을 포함할 수 있다. 모노글리세리드, 디글리세리드 및 트리글리세리드의 각 카르복실산은 포화 또는 불포화, 분지 또는 미분지된 것일 수 있고, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24 카르복실산일 수 있다. 상기 지질분자는 C8 내지 C18의 사슬 길이를 갖는 포화된 짝수, 미분지된 지방산의 모노글리세리드, 디글리세리드 및 트리글리세리드의 혼합물일 수 있다. 예를 들면, 상기 지질분자는 C8, C10, C12, C14, C16, 또는 C18 카르복실산의 각 트리글리세리드의 혼합물일 수 있다.

[0031] 양친매성 지질분자는 친수성 부분과 소수성 부분을 포함할 수 있다. 양친매성 지질분자는 친수성 헤드와 소수성 테일을 가진 분자일 수 있다. 양친매성 지질분자는 인지질, 지방산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 지질 분자는 C14 내지 C50의 탄소 원자를 갖는 것일 수 있다. 상기 지질 분자는 인지질일 수 있다. 상기 인지질은 C12 내지 C24의 탄소 원자를 갖는 것일 수 있다. 상기 인지질은 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 이노시톨, 및 포스파티딜 에탄올아민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 하나 이상의 인지질은 1개의 아실기를 가진 것일 수 있다. 또한, 상기 인지질은 약 10°C 내지 약 70°C, 예를 들면, 약 39°C 내지 약 60°C 또는 약 38°C 내지 약 45°C의 상전이 온도를 갖는 것일 수 있다. 상기 인지질은 아실기가 포화된 것 또는 불포화된 것일 수 있다. 상기 인지질은 2개 이상의 인지질 분자의 혼합물일 수 있다. 2개 이상의 인지질 분자의 혼합에 의하여 다양한 상전이 온도를 갖는 고흥 지질 나노입자가 생성될 수 있다.

[0032] 인지질 분자는 예를 들면, 2개의 아실기를 갖는 것으로서, C12 포화된 사슬 인지질 ($T_c = \text{약 } 10^\circ\text{C}$), C14 포화된 사슬 인지질 ($T_c = \text{약 } 24^\circ\text{C}$), C16 포화된 사슬 인지질 ($T_c = \text{약 } 41^\circ\text{C}$), C18 포화된 사슬 인지질 ($T_c = \text{약 } 55^\circ\text{C}$), C20 포화된 사슬 인지질 ($T_c = \text{약 } 65^\circ\text{C}$), C22 포화된 사슬 인지질 ($T_c = \text{약 } 70^\circ\text{C}$), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 포스파티딜콜린이 그들의 아실 사슬의 길이에 따라 비슷한 방식으로 변하는 상전이 온도와 유사하게, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜 이노시톨, 포스파티딜 에탄올아민, 스핀코미엘린 및 강글리오시드도 사용될 수 있다. 포스파티딜콜린은 난 포스파티딜콜린일 수 있다.

[0033] C16 포화된 사슬 인지질의 예는 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC)일 수 있다. DPPC는 약 41.5°C의 상전이 온도를 갖는 포화 사슬 (C16) 인지질이다. C18 포화된 사슬 인지질의 예는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine: DSPC)일 수 있다. DSPC는 약 55.10°C의 상전이 온도를 갖는 포화 사슬 (C18) 인지질이다.

[0034] 상기 지질분자는 인지질 외에 다른 막-형성 물질을 포함할 수 있다. 고상 막을 형성하는 예시적 물질은 블라 지질 또는 박테리아 지질일 수 있다. 또한, 수용성 폴리머 (예, 폴리에틸렌글리콜) 및 수불용성 폴리머 (예, 폴리프로필렌옥사이드 및 폴리에틸에틸렌)을 포함하는 블록 코폴리머가 사용될 수 있다. 또한, 상기 지질분자는 중합체 성 지질분자를 포함한다. 예를 들면, 상기 지질분자는 에스테르화된 포릴(아크릴산) 또는 에스테르화된 포릴(비닐알콜)일 수 있다.

[0035] 상기 지질분자 또는 지질분자의 혼합물은 상기 고흥 지질 나노입자 총 중량에 대하여 0 내지 90중량%의 비율로 포함될 수 있다.

- [0036] 용어 "고체 (solid)"는 고형 지질 나노입자의 적어도 일부분이 실온 및 상압에서 고체라는 것을 나타낸다. 그러나, 고형 지질 나노입자는 액체 지질 및/또는 포집된 용매를 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 고형 지질 나노입자는 그의 안정화제를 더 포함할 수 있다. 상기 안정화제는 스테롤 또는 그 유도체, 스펅코지질 또는 그 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 안정화제는 콜레스테롤, β -콜레스테롤, 콜레스테롤의 지방산 에스테르, 예를 들면, C10 내지 C24의 지방산 에스테르, 시스토스테롤, 에르고스테롤, 스티그마스테롤, 4,22-스티그마스타디엔-3-온, 스티그마스테롤 아세테이트, 라노스테롤 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0038] 상기 고형 지질 나노입자 안정화제는 스테로이드, 스펅코지질 또는 그 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 안정화제는 지질분자들 사이에 삽입 (incorporation)될 수 있는 특성을 가진 스테로이드인 것일 수 있다. 본 명세서에 있어서, 용어 "스테로이드 (steroid)"란 융합된 4개의 시클로알칸 고리의 형태 즉, 왼쪽으로부터 오른쪽으로 A,B 및 C 고리로 명명된 3개의 시클로헥산 고리와 하나의 시클로펜탄 고리 (D 고리)를 포함하는 고난 (gonane) 또는 그로부터 유래된 골격을 포함하는 유기 화합물을 나타낸다. 여기서 "그로부터 유래된 골격"이란 상기 고난 골격에 불포화 결합이 도입된 것을 포함한다. 상기 스테로이드는 4개의 고리에 부착된 관능기 및 고리의 산화 상태에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 상기 스테로이드는 상기 고리에 친수성 관능기를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 스테로이드는 상기 고리에 히드록실기를 갖는 것일 수 있다. 상기 스테로이드는 스테롤일 수 있다. 용어 "스테롤(sterol)"이란 스테로이드의 한 형태로서, 3번 위치에 히드록실기를 갖고 콜레스탄 (cholestane)으로부터 유래된 골격을 갖는 것을 나타낸다. 여기서 "유래된 골격"이란 콜레스탄 골격에 불포화 결합이 도입된 것을 포함한다. 상기 스테로이드는 식물, 동물 및 곰팡이에서 발견되고 있는 스테로이드를 포함한다. 예를 들면, 동물 또는 곰팡이에서와 같이 라노스테롤 또는 식물에서와 같이 시클로아르테놀 (cycloartenol)으로부터 만들어진 것일 수 있다. 상기 스테롤은 콜레스테롤 또는 그의 유도체를 포함한다. 여기서 "유도체 (derivative)"란 콜레스테롤의 유도체로서 지질 이중층에 삽입되는 성질을 유지하고 있는 것을 의미한다. 상기 유도체는 지방산 에스테르를 포함한다. 상기 안정화제는 콜레스테롤, 시스토스테롤, 에르고스테롤, 스티그마스테롤, 4,22-스티그마스타디엔-3-온, 스티그마스테롤 아세테이트, 라노스테롤, 시클로아르테놀, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0039] 상기 안정화제는 상기 고형 지질 나노입자 총 중량에 대하여 0 내지 50 중량%, 예를 들면 1 내지 50 중량%, 5 내지 50 중량%, 10 내지 50 중량%, 20 내지 50 중량%, 30 내지 50 중량%, 1 내지 40 중량%, 5 내지 20 중량%, 10 내지 40 중량%, 20 내지 30 중량%, 또는 1 내지 10 중량%의 비율로 포함될 수 있다.
- [0040] 상기 고형 지질 나노입자는 친수성 중합체로 유도체화된 인지질 유도체를 더 포함할 수 있다. 상기 친수성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산 및 폴리글리콜산의 공중합체, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 올리고사카라이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 유도체는 C4-C30, 예를 들면 C16-C24의 인지질에 PEG가 접합된 것일 수 있다. 상기 유도체는 DPPC-PEG, 또는 DSPE-PEG인 것일 수 있다. 상기 PEG는 분자량 180 내지 50,000 Da일 수 있다. 상기 유도체는 상기 고형 지질 나노입자 총 중량에 대하여 0 내지 10중량%, 예를 들면, 1 내지 10중량%, 2 내지 10중량%, 3 내지 10중량%, 5 내지 10중량%, 1 내지 8중량%, 2 내지 5중량%, 3 내지 5중량%, 또는 1 내지 5중량%의 비율로 포함될 수 있다.
- [0041] 상기 고형 지질 나노입자를 구성하는 지질분자는 39°C 내지 60°C의 상전이 온도를 갖는 것일 수 있다. 상기 엘라стин-유사 폴리펩티드는 35°C 내지 70°C 또는 39°C 내지 70°C의 상전이 온도를 갖는 것일 수 있다.
- [0042] 상기 고형 지질 나노입자는 평균 직경 약 10nm 내지 1500nm, 예를 들면, 약 10nm 내지 1000nm, 약 10nm 내지 500nm, 약 10nm 내지 300nm, 약 100nm 내지 300nm 또는 약 100nm 내지 200nm인 것일 수 있다.
- [0043] 상기 고형 지질 나노입자는 활성 물질을 더 포함할 수 있다. 상기 활성 물질은 생리학적 활성 작용제, 약제학적 활성 작용제, 자기적 활성 작용제, 이미징제, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 약제학적 활성 성분은 마취제, 항히스타민제, 항암제, 항궤양제, 항발작제, 근육이

완제, 면역억제제, 항감염제, 비스테로이드성 항염증제, 이미징제, 영양제, 및 그들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 활성성분은 메토티렉세이트, 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드, 엘립티신, 캅토테신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시스플라틴, 프레드니손, 메틸-프레드니손, 이부프로펜 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 활성 물질은 고�형 지질 나노입자 내에 분산, 임베드 또는 삽입 (incorporation)된 것일 수 있다. 상기 활성 물질은 고�형 지질 나노입자 총 중량에 대하여 0.01 내지 10중량%, 예를 들면, 0.1 내지 10중량%, 1 내지 10중량%, 3 내지 10중량%, 5 내지 10중량%, 0.01 내지 8중량%, 0.01 내지 5중량%, 또는 0.1 내지 5중량%의 비율로 포함될 수 있다.

[0044] 상기 고�형 지질 나노입자는 계면활성제를 더 포함할 수 있다. 계면활성제는 액체에 용해되어 표면장력을 현저히 저하시키는 작용을 하는 물질로서 분자 내에 친수성 부분과 소수성 부분으로 나뉘어 존재하며, 이 때문에 계면에 흡착하기 쉽고, 일정한 농도 (임계미셀 농도) 이상에서는 미셀이라는 분자집합체를 형성한다. 본 시스템에서 계면활성제는 지질입자의 영감방지 및 균일한 분산을 위해 사용될 수 있다. 계면활성제는 폴리에테르, 예를 들면, 소르비탄 모노라우레이트의 폴리옥시에틸렌 유도체 (Tween)일 수 있다. 계면활성제는 Tween 20 또는 Tween 80일 수 있다. 계면활성제는 고�형 지질 나노입자의 총 부피에 대하여 0 내지 10부피%, 예를 들면, 0 내지 10부피%, 1 내지 10부피%, 3 내지 10부피%, 5 내지 10부피%, 1 내지 8부피%, 1 내지 5부피%, 또는 3 내지 5부피%로 포함될 수 있다. 하나이상의 계면활성제는 고�형 지질 나노입자의 제조 중에 유기상 또는 수성상에 용해되거나 현탁될 수 있다. 다른 구체예에서, 하나이상의 계면활성제는 제조 후 고�형 지질 나노입자의 현탁물에 첨가될 수 있다.

[0045] 계면활성제가 유기상 및/또는 수성상에 존재하는 경우, 상기 계면활성제는 고�형 지질 나노입자의 내부 (interior) (즉, 포집된 (encapsulated) 또는 고�형 지질 나노입자의 외부 (즉, 외부에 존재하는 관능기에 공유 또는 비공유 결합됨)에 위치할 수 있다. 하나이상의 계면활성제가 고�형 지질 나노입자의 형성 후에 혼합되는 경우, 계면활성제는 고�형 지질 나노입자의 외부 즉, 외부에 존재하는 관능기에 공유 또는 비공유 결합되어 위치할 수 있다.

[0046] 상기 고�형 지질 나노입자의 일 구체예는, 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 제1 지질분자, 제2 지질분자 및 안정화제;를 포함하고, 제1 지질분자는 인지질이고, 제2 지질분자는 중성 지질분자인 고�형 지질 나노입자일 수 있다. 상기 모이어티, 안정화제, 인지질분자 및 중성 지질분자에 대하여는 상기한 바와 같다. 상기 구체예에서, 상기 인지질은 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 이노시톨, 포스파티딜 에탄올아민 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다. 상기 인지질은 C16-C24 아실기를 갖는 것일 수 있다. 상기 중성 지질분자는 하나이상의 C4 내지 C24 카르복실산의 모노글리세리드, 디글리세리드, 트리글리세리드 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 안정화제는 스테롤 또는 그 유도체, 스펅코지질 또는 그 유도체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 안정화제는 콜레스테롤, β-콜레스테롤, 콜레스테롤의 C10 내지 C24의 지방산 에스테르, 시스토스테롤, 에르고스테롤, 스티그마스테롤, 4,22-스티그마스타디엔-3-온, 스티그마스테롤 아세테이트, 라노스테롤 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0047] //

[0048] 일 구체예에서, 상기 고�형 지질 나노입자는 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP,포스파티딜콜린, 트리카프린과 트리라우린으로 구성된 트리글리세리드 및 콜레스테릴 올레이트를 포함할 수 있다. 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP, 포스파티딜콜린, 트리카프린과 트리라우린으로 구성된 트리글리세리드 및 콜레스테릴 올레이트는 2-5: 0.1-3: 0-1의 몰비이고, 트리카프린과 트리라우린의 몰비는 1: 약 0.25 내지 약 4인 것일 수 있다. 여기서, 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP의 예는, n이 1 내지 200이고 스테아로일- 또는 콜레스테릴-V'n-NH₂일 수 있다. 여기서, V'는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나를 나타내고, n이 2 이상인 경우 상기 서열의 각 위치의 V'는 같거나 다른 서열일 수 있다. n은 2 내지 200, 2 내지 100, 2 내지 80, 2 내지 60, 2 내지 40, 2 내지 10, 2 내지 12, 2 내지 8, 2 내지 6, 4 내지 100, 8 내지 80, 10 내지 60, 12 내지 40, 20 내지 40, 4 내지 10, 4 내지 8, 또는 4 내지 6의 정수인 것일 수 있다. 여기서, V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산인 것일 수 있다. 여기서, 각 위치의 V'의 X는 동일하거나 다른 아미노산일 수 있다. 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP는 예를

들면, 스테아로일-(VPGVG)_n-NH₂ 또는 콜레스테릴-(VPGVG)_n-NH₂일 수 있다.

[0049] 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP의 다른 예는, n₁, n₂ 및 n₃이 각각 1 내지 200이고 스테아로일- 또는 콜레스테릴-[V₁n₁V₂n₂]_{n₃}-NH₂일 수 있다. n₁, n₂ 및 n₃은 2 내지 200, 2 내지 100, 2 내지 80, 2 내지 60, 2 내지 40, 2 내지 10, 2 내지 12, 2 내지 8, 2 내지 6, 4 내지 100, 8 내지 80, 10 내지 60, 12 내지 40, 20 내지 40, 4 내지 10, 4 내지 8, 또는 4 내지 6의 정수인 것일 수 있다. n₁ 및 n₂가 각각 2 이상인 경우 서열의 각 위치의 V'는 같거나 다른 서열일 수 있다. 여기서, V₁ 및 V₂는 각각 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나를 나타낸다. 여기서, V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산인 것일 수 있다. 여기서, 각 위치의 V'의 X는 동일하거나 다른 아미노산일 수 있다. 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP는 예를 들면, 스테아로일- 또는 콜레스테릴-[(VPGVG)_{n₁}(VPGAG)_{n₂}]_{n₃}-NH₂일 수 있다.

[0050] 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP의 다른 예는, n₁, n₂ 및 n₃이 각각 1 내지 200이고 스테아로일- 또는 콜레스테릴-[B(SA 또는 Chol)_{n₁}V₁n₂]_{n₃}-NH₂일 수 있다. n₁, n₂ 및 n₃은 각각 2 내지 200, 2 내지 100, 2 내지 80, 2 내지 60, 2 내지 40, 2 내지 10, 2 내지 12, 2 내지 8, 2 내지 6, 4 내지 100, 8 내지 80, 10 내지 60, 12 내지 40, 20 내지 40, 4 내지 10, 4 내지 8, 또는 4 내지 6의 정수인 것일 수 있다. 여기서, B(SA 또는 Chol)는 각각 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나로서, V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 스테아로일- 또는 콜레스테릴-접합된 측쇄 아미노기를 가진 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘을 나타낸다. V₁는 각각 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나로서, V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산을 나타낸다. 여기서, n₁ 또는 n₂가 2 이상의 수인 경우, 각 위치의 B와 V₁는 각각 동일하거나 다를 수 있다. 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 ELP는 예를 들면, 스테아로일- 또는 콜레스테릴-[(VPGK(SA 또는 Chol)G)_{n₁}(VPGXG)_{n₂}]_{n₃}-NH₂일 수 다.

[0051] 고�형 지질 나노입자를 제조하는 방법은 알려져 있다. 고�형 지질 나노입자는 용해/고형화 과정 (melting/solidification)에 의하여 제조될 수 있으며, 이 경우 지질분자는 용해되고, 물 중에 분산되고, 냉각시켜 상기 고�형 지질 나노입자를 고형화한다. 또한, 고�형 지질 나노입자는 중합체 마이크로입자의 형성과 유사한 에멀전 고정을 사용하여 생산될 수 있다. 이 경우, 지질분자는 용매에 용해되고, 유화되고, 유화체를 포함하는 수성 용액 중에 분산시켜 상기 고�형 지질 나노입자를 경화시킨다. 상기 유화체의 역할은 상기 고�형 지질 나노입자를 안정화시킬 수 있다. 다른 방법으로는, 필름 형성/수화 과정 (film formation/hydration)에 의하여 제조될 수 있다. 이 경우 지질분자 및 소수성 약물이 유기 용매에 동시에 용해/제거 후에는 초음파 처리 (sonication)와 보르텍싱을 통해서 약물이 도입된 고�형 지질 나노입자를 제조할 수 있다. 고�형 지질 나노입자의 조성에 따라 두 가지 제조 방법이 차별적으로 사용될 수 있다.

[0052] 고�형 지질 나노입자는 예를 들면, 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 지질분자 및 2상 용매 시스템 (binary solvent system)을 포함하는 유기상을 제공하는 단계; 유기상을 제거하여 얇은 막 (film)을 생성하는 단계; 물을 포함하는 수성상을 제공하는 단계; 및 상기 얇은 막과 수성상을 조합 및 분산하는 단계에 의하여 제조될 수 있다. 상기 유기상, 또는 상기 유기상의 일부분은, 선택적으로 제거될 수 있으며, 그에 따라 수성 현탁물로서 상기 고�형 지질 나노입자가 제조될 수 있다. 용어 "2상 용매 시스템"이란 2가지 이상의 혼화가능한 또는 부분적으로 혼화가능한 용매를 포함하는 용매 시스템을 나타낸다. 이 용어는 특히, 3 용매, 4 용매, 및 5 용매 시스템을 포함할 수 있다. 상기 용매 시스템은 실온 및 상압에서 액체인 용매를 일반적으로 포함한다. 그러나, 전체 시스템은 실온 및 상압에서 액체이지만, 상기 시스템 중 하나 이상의 용매는 실온 및 상압에서 고체 또는 기체일 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 상기 2상 용매 시스템은 클로로포름 (CHCl₃)-에탄올, 클로로포름 (CHCl₃)-메탄올, 디클로로메탄 (CH₂Cl₂)-에탄올, 디클로로메탄 (CH₂Cl₂)-메탄올, N-메틸피롤리돈(NMP)-아세톤, 테트라히드로푸란 (THF)-아세톤, 또는 디메틸포름아미드(DMF)-아세톤일 수 있다.

- [0053] 고형 지질 나노입자는 또한, 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 중성 지질분자 및 2상 용매 시스템 (binary solvent system)을 포함하는 유기상을 제공하는 단계; 유기상을 제거하여 얇은 막 (film)을 생성하는 단계; 물을 포함하는 수성상을 제공하는 단계; 및 상기 얇은 막과 수성상을 조합 및 분산하는 단계에 의하여 제조될 수 있다. 그러나, 고형 지질 나노입자의 제조는 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있으며, 특정한 방법에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 일 구체예에서, 상기 고형 지질 나노입자는 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 제1 지질분자, 제2 지질분자 및 안정화제;를 포함하고, 제1 지질분자는 인지질이고, 제2 지질분자는 중성 지질분자인 고형 지질 나노입자로서, 제2 지질분자 및 안정화제는 내부 코어를 형성하고, 제1 지질분자는 상기 내부 코어를 둘러싸는 구조를 갖는 것일 수 있다. 상기 제1 지질분자는 상기 내부 코어를 단일층 (monolayer)의 형태로 둘러싸는 것일 수 있다. 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드는 상기 모이어티를 통하여 제1 지질분자 및 선택적으로 제2 지질분자와 상호작용에 의하여 상기 고형 지질 나노입자에 고정된 것일 수 있다. 상기 엘라스틴-유사 폴리펩티드, 제1 지질분자, 제2 지질분자 및 안정화제에 대하여는 상기한 바와 같다. 또한, 고형 지질 나노입자는 계면활성제를 포함할 수 있다.
- [0055] 다른 양상은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 및 활성성분을 포함하는 고형 지질 나노입자를 포함하는 활성성분을 개체에 전달하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 고형 지질 나노입자는 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드 및 지질분자;를 포함하는 것인 조성물을 제공한다.
- [0056] 상기 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제는 당업계에 알려진 것일 수 있다. 상기 담체 또는 희석제는 물 예를 들면, 식염수 및 멸균수, 링거액, 완충제, 텍스트로스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0057] 상기 고형 지질 나노입자에 대하여는 상기한 바와 같다.
- [0058] 상기 고형 지질 나노입자는 수성 매질 중에 분산되어 있는 것일 수 있다. 상기 수성 매질은 생리식염수 또는 PBS를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 고형 지질 나노입자는 리포솜에 포집되거나, 분산물, 또는 에멀전의 형태로 제형화될 수 있다. 상기 활성성분은 상기 고형 지질 나노입자의 내부 공간에 포집되어 있는 것일 수 있다. 상기 활성성분은 상기 고형 지질 나노입자의 지질분자에 포집되어 있는 것일 수 있다. 상기 고형 지질 나노입자는 39°C 내지 45°C의 상전이 온도를 갖는 것일 수 있다.
- [0059] 상기 활성성분은 생리학적 활성 작용제, 약제학적 활성 작용제, 자기적 활성 작용제, 이미징제, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 활성성분은 수불용성 성분, 수용성 성분 및 이들의 조합 중 하나 이상일 수 있다. 상기 약제학적 활성 성분은 마취제, 항히스타민제, 항암제, 항케양제, 항발작제, 근육이완제, 면역억제제, 항감염제, 비스테로이드성 항염증제, 이미징제, 영양제, 및 그들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 활성성분은 메토타렉세이트, 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드, 엘립티신, 캄토테신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시스플라틴, 프레드니손, 메틸-프레드니손, 이부프로펜 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0060] 다른 양상은 개체의 체내의 표적 부위에 활성성분을 전달하는 방법으로서, 활성 성분을 포함하는 고형 지질 나노입자를 개체에게 투여하는 단계로서, 상기 고형 지질 나노입자는 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드 및 지질분자를 포함하는 것인 단계; 및 상기 개체의 표적 부위를 가열하여 상기 표적 부위에서 상기 고형 지질 나노입자로부터 상기 활성성분을 방출시키는 단계;를 포함하는 것인 방법을 제공한다.

- [0061] 상기 방법은 활성 성분을 포함하는 고행 지질 나노입자를 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 활성성분을 포함하는 고행 지질 나노입자에 대하여는 상기한 바와 같다. 상기 고행 지질 나노입자는 상전이 온도 39℃ 내지 45℃인 것일 수 있다.
- [0062] 상기 투여는 비경구 투여일 수 있다. 상기 비경구 투여는 예를 들면, 정맥내 투여, 피하, 근육내, 체강내 (복강, 관절, 또는 안강), 또는 직접 주사에 의하여 투여될 수 있다. 직접 주사는 병증의 부위 예를 들면, 종양 부위에 직접 주사하는 것일 수 있다. 상기 고행 지질 나노입자는 정맥과 같은 혈액 내에 투여하고, 혈류에 의하여 종양 부위와 같은 표적 부위에 전달될 수 있다. 상기 표적 부위는 리키한(leaky) 특성을 갖는 것일 수 있다. 어구 "리키한 특성 (leaky property)"란 정상 조직 또는 세포에 비하여 물질의 증가된 투과도를 갖는 특성을 나타낸다. 표적 부위는 종양의 혈관의 물질 투과도가 종양 혈관의 리키함 (leakiness)으로 인하여 증가된, 종양 부위일 수 있다.
- [0063] 상기 개체는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물일 수 있다. 상기 포유동물은 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 염소, 원숭이, 생쥐 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0064] 상기 방법은 상기 개체의 표적 부위를 가열하여 상기 표적 부위에서 상기 고행 지질 나노입자로부터 상기 활성 성분을 방출시키는 단계를 포함한다. 상기 가열은 임상적 과정으로 가열되거나, 염증과 같은 체내의 다른 부위에 비하여 내재적으로 더 높은 표적 부위와 연관될 것일 수 있다. 상기 임상적 과정에 의한 가열은, 직접적 열 전달, 예를 들면, 수조의 더운 액체 매질, 예를 들면 물에 신체를 접촉시키는 것, 표적 부위에 초음파, 예를 들면, 고강도 집중된 초음파 (high intensity focused ultrasound)를 가하는 것, 또는 자기장, 예를 들면, 증폭된 자기장 (amplified magnetic field: AMF), 마이크로파 (microwave) 및/또는 고주파 (high frequency)를 가하는 것에 의하여 이루어질 수 있다. 상기 표적 부위는 병적인 증상이 존재하는 위치, 예를 들면, 종양 부위 (예, 고행 종양), 또는 염증이 존재하는 부위일 수 있다. 상기 가열은 39℃ 내지 45℃로 가열하는 것일 수 있다.
- [0065] 상기 활성성분은 생리학적 활성 작용제, 약제학적 활성 작용제, 자기적 활성 작용제, 이미징제, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있다. 상기 약제적 활성 성분은 마취제, 항히스타민제, 항암제, 항궤양제, 항발작제, 근육이완제, 면역억제제, 항감염제, 비스테로이드성 항염증제, 이미징제, 영양제, 및 그들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 활성성분은 메토티렉세이트, 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드, 엘립티신, 캄토테신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시스플라틴, 프레드니손, 메틸-프레드니손, 이부프로펜 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0066] 일 양상에 따른 고행 지질 나노입자에 의하면, 온도에 따른 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 수축 또는 자가조립에 의하여, 입자의 분산성이 조절될 수 있다. 따라서, 상기 고행 지질 나노입자는 활성성분을 개체의 표적 부위에 효율적으로 전달하기 위한 비히클로서 사용될 수 있다.
- [0067] 활성성분을 포함하는 상기 고행 지질 나노입자는, 고행 지질 나노입자 자체의 상전이 온도뿐만 아니라, 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 상전이 온도에 의하여 입자의 분산성 및 활성성분 방출성이 조절될 수 있다. 따라서, 상기 고행 지질 나노입자가 생체 온도에서 더 안정한 조성을 갖는 경우, 예를 들면, 생체 온도에서 더 안정하게 고행 지질 나노입자를 유지될 수 있도록 하기에 유효한 양의 콜레스테롤과 같은 지질분자를 안정화시키는 분자가 포함되어 있는 상태에서도, 소수성기를 포함하는 모이어티가 접합된 엘라스틴-유사 폴리펩티드의 상전이 온도에 의하여 입자의 분산성 및 활성성분의 방출성이 효율적으로 조절될 수 있다.
- [0068] 다른 양상에 따른 고행 지질 나노입자를 포함하는 활성성분을 개체에 전달하기 위한 약학적 조성물에 의하면,

활성성분을 개체에 효율적으로 전달하는데 사용될 수 있다.

[0069] 다른 양상에 따른 개체의 체내의 표적 부위에 활성성분을 투여하는 방법에 의하면, 활성성분을 개체의 체내의 표적 부위에 효율적으로 전달할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 실시예 1에 따라 제조된 수난용성 물질인 메틸레드 (methyl red: MR)를 포함하는 고행 지질 나노입자의 수분용성 물질 방출 프로필을 나타낸다.

도 2는 실시예 2에 따라 제조된 계면활성제 양에 따른 고행 지질 나노입자의 크기를 나타낸다.

도 3은 실시예 3에 따라 제조된 쿠마린-6을 포함하지 않은 고행 지질 나노입자 (A)와 쿠마린-6을 포함한 고행 지질 나노입자 (B)의 투과전자현미경 사진을 나타낸다.

도 4는 실시예 4에 따라 제조된 지질분자의 종류 및 계면활성제의 양에 따른 고행 지질 나노입자의 크기를 나타낸다.

도 5는 실시예 7에 따라 제조된 고행 지질 나노입자에 안정제로 사용되는 유사 콜레스테롤의 존재 여부 및 온도에 따른 입자의 크기 변화를 나타낸다.

도 6은 실시예 8에 따른 파클리카셀이 봉입된 엘라스틴 유사 폴리펩티드가 도입된 고행 지질 나노입자의 약물 분출의 온도민감성을 나타낸 도면이다.

도 7은 실시예 9에 따른 고행 지질 나노입자를 사용한 쿠마린-6의 세포내 전달 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 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.

[0072] 실시예 1: 수난용성 물질인 메틸레드를 포함하는 고행 지질 나노입자의 제조

[0073] 지질분자를 이용하여 고행 지질 나노입자를 제조하였다. 인지질로서 난 포스파티딜콜린 (egg PC), 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (6:4의 몰비), 및 안정화제로서 콜레스테릴 올리에이트 5:2:1의 몰비로 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 용해물 1 내지 2ml를 1ml PBS가 포함된 용기 중에 첨가하고 보르텍싱 및 초음파 처리에 의하여 분산시키고, 용기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증발시켜 상기 고행 지질 나노입자를 형성하였다 (이하 "대조군 SLN"이라 함). 또한, 난 PC의 10중량%에 해당하는 메틸레드 (MR)를 난 PC, 콜레스테릴 올리에이트, 및 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (6:4의 몰비)과 함께 용매 중에 용해시키는 것을 제외하고는 상기 과정과 동일하게, 수행하여 MR 함유 SLN을 제조하였다 (이하 "실험군 SLN"이라 함).

[0074] 도 1은 실시예 1에 따라 제조된 고행 지질 나노입자의 MR 방출 프로필을 나타낸다. 도 1은 수난용성 물질을 포함하는 고행 지질 나노입자 (실험군 SLN)와 수난용성 물질이 포함되지 않은 고행 지질 나노입자 (대조군 SLN)를 50mL의 PBS 중에서 400uL를 첨가하고, 상온 및 상압에서 보관하면서 MR의 최대 흡수 파장인 410nm에서 시간에 따른 얻어진 흡광도 값을 측정하여 결과를 나타낸다. 가로축은 흡광도 측정 시간이며, 세로축은 흡광도 값을 나타낸다. 도 1에 나타난 바와 같이, 상온에서는 시간에 따른 MR의 방출이 미미하였다 (봉입량의 1%이하). 즉, 엘라스틴 유사 폴리펩티드를 가지지 않는 고행 지질 나노입자는 봉입된 물질의 방출 정도가 매우 낮았다.

[0075] 또한, 얻어진 고행 지질 나노입자는 동적 광 산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고행 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 μL를 90 μL의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다. 그 결과, 메틸레드를 포함하는 고행 지질 나노입자의 입자 크기는 168nm±0.5nm이었다.

[0076] 실시예 2: 계면활성제를 포함하는 고�형 지질 나노입자의 제조

[0077] 본 실시예에서는 인지질로서 난 포스파티딜콜린, 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (6:4 몰비), 및 콜레스테릴 올리에이트를 5:2:1의 몰비로 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 용해물 1 내지 2ml를 서로 다른 비율 (PBS 부피 기준으로 0, 2.5, 5, 및 10 부피%)의 계면활성제 Tween 20를 가지는 1ml PBS가 포함된 용기 중에 첨가하고 보르텍싱 및 초음파 처리에 의하여 분산시키고, 유기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증발시켜 상기 고�형 지질 나노입자를 형성하였다.

[0078] 얻어진 고�형 지질 나노입자는 동적 광 산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고�형 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 µL를 90 µL의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다. 그 결과, 생성된 고�형 지질 나노입자는 평균 직경이 약 50nm 내지 650nm이었다.

[0079] 도 2는 실시예 2에 따라 제조된 계면활성제 양에 따른 고�형 지질 나노입자의 크기를 나타낸다. 도 2에 나타낸 바와 같이, Tween 20의 양이 증가할수록 입자 크기는 작아졌다.

[0080] 실시예 3: 수난용성 물질을 포함하는 고�형 지질 나노입자의 제조 및 투과전자현미경 확인

[0081] 본 실시예에서는, 인지질로서 난 포스파티딜콜린, 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (6:4 몰비), 및 콜레스테릴 올리에이트를 5:2:1의 몰비로, 수난용성 물질인 쿠마린-6 (난 포스파티딜콜린의 10중량%)과 동시에 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 용해물 1 내지 2ml를 1ml PBS (PBS 부피 기준으로 2 부피%의 Tween 20 포함)가 포함된 용기 중에 첨가하고 보르텍싱 및 초음파 처리에 의하여 분산시키고, 유기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증발시켜 상기 고�형 지질 나노입자를 형성하였다.

[0082] 얻어진 고�형 지질 나노입자는 동적 광 산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고�형 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 µL를 90 µL의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다. 그 결과, 생성된 고�형 지질 나노입자는 평균 직경이 약 200nm 내지 220nm이었다. 더불어 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였을 때, 고�형 지질 분자에 쿠마린-6 입자가 도입되어 있는 것을 확인하였다.

[0083] 도 3은 쿠마린-6을 포함하지 않은 고�형 지질 나노입자 (A)와 쿠마린-6을 포함한 고�형 지질 나노입자 (B)의 투과전자현미경 사진을 나타낸다. 도 3의 B에 나타낸 바와 같이, 고�형 지질 나노입자 중에 쿠마린-6에 해당하는 검은 점이 존재하였다.

[0084] 또한, 생산된 고�형 지질 나노입자의 안정성을 조사하였다. 실시예 1에 따라 제조된 고�형 지질 나노입자, 1mg of Egg PC/ml of PBS (MR 미포함) 농도의 용액을 상온 및 상압에서 1 주일 동안 보관하면서, 제조 당일, 24시간 및 72 시간 후에 상기와 동일하게 Zetasizer에 의하여, 입자 크기를 측정하였다. 평균 입자 크기는 168nm±0.5nm로서 약 72 시간 동안 보관하더라도 입자 크기 변화는 없었다.

[0085] 실시예 4: 지질분자의 종류 및 계면활성제의 양에 따른 고�형 지질 나노입자의 제조

[0086] 본 실시예에서는 실시예 3에서와 동일한 방법으로 고�형 지질 나노입자를 제조하였으나, 구성성분 중, 인지질의 종류를 난 포스파티딜콜린 또는 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC)으로 하고 트리글리세리드인 트리카프린과 트리라우린 비율을 8:2로 변화시켜 지질 나노입자를 제조하였다 (쿠마린-6 미함유). 또한, Tween 20의 양을 PBS의 0,1, 또는 2 부피%로 사용하였다. 제조된 지질 나노입자 농도는 1mg/Tween 20 함유 PBS 1ml이었다.

[0087] 얻어진 고휘 지질 나노입자는 동적 광 산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고휘 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 μ L를 90 μ L의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다.

[0088] 도 4는 지질분자의 종류 및 계면활성제의 양에 따른 고휘 지질 나노입자의 크기를 나타낸다. 도 4는 실시예 4에 서와 동일한 방법으로 제조된 고휘 지질나노입자 용액 10 μ L와 PBS 90 μ L를 혼합한 용액을 제조하고, 이를 25 $^{\circ}$ C 및 45 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 유지하면서, 상기한 바와 같이 Zetasizer를 사용하여 평균 직경을 측정한 결과이다. 도 4 에 나타낸 바와 같이, 생성된 고휘 지질 나노입자는 인지질이 난 PC인 경우, 25 $^{\circ}$ C에서 평균 직경이 약 200nm 내 지 약 950nm이었고, 45 $^{\circ}$ C에서 약 50nm 내지 약 400nm이었다 (도 4(a)). 또한, 인지질이 DPPC인 경우, 25 $^{\circ}$ C에서 평균 직경이 약 500nm 내지 약 2580nm이었고, 45 $^{\circ}$ C에서 약 250nm 내지 약 700nm이었다.

[0089] **실시예 5: 엘라스틴-유사 폴리펩티드를 포함하는 고휘 지질 나노입자의 제조 및 입자 크기 측정**

[0090] 엘라스틴-유사 폴리펩티드로서 n이 1 내지 200인 스테아로일-(VPGVG)n-NH₂ (이하 SA-Vn)이를 사용하여 고휘 지 질 나노입자를 제조하였다. 여기서, 스테아로일 기는 N 말단의 질소와 아미드 결합에 의하여 연결되어 있다.

[0091] 본 실시예에서는 n인 5와 6인 SA-V5와 SA-V6 (펩트론, 한국), 인지질로서 난 포스파티딜콜린, 트리글리세리드로 서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (6:4 몰비) 및 콜레스테릴 올리에이트를 5:2:1의 몰비로 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 유기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증 발시켜 상기 지질 용액을 필름화하였다. PBS를 가하고 보르텍싱 및 초음파 처리에 의해 입자가 분산된 고휘 지 질 나노입자 용액을 얻는다.

[0092] 얻어진 고휘 지질 나노입자는 동적 광 산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고휘 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 μ L를 90 μ L의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다. 그 결 과, 생성된 고휘 지질 나노입자의 크기는 사용된 엘라스틴 유사 폴리펩티드의 길이에 따라 220nm (SA-V5)와 120nm (SA-V6)이었다.

[0093] **실시예 6: 엘라스틴-유사 폴리펩티드를 포함하는 고휘 지질 나노입자의 제조 및 온도에 따른 입자 크기 변화**

[0094] 엘라스틴-유사 폴리펩티드로서 n1 및 n2는 각각 1 내지 200인 콜레스테릴-(VPGVG)n1-(VPGAG)n2-NH₂ (이하 Chol-Vn1An2라 함)이를 사용하여 고휘 지질 나노입자를 제조하였다.

[0095] 본 실시예에서는 n1이 3이고 n2가 1인 Chol-Vn1An2 (난 포스파티딜콜린의 0, 1, 2.5, 및 5 wt%), 인지질로서 난 포스파티딜콜린, 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (8:2 몰비), 및 콜레스테릴 올리에 이트를 5:2:1의 몰비로 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 유 기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증발시켜 상기 고휘 지질 나노입자를 필름화하였다. PBS를 가하고 보르텍싱 및 초음파 처리에 의해 입자가 분산된 고휘 지질 나노입자 용액을 얻는다.

[0096] 얻어진 고휘 지질 나노입자는 동적 광산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고휘 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 μ L를 90 μ L의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다.

[0097] 표 1과 2는 위와 같이 측정된 고�형 지질 나노입자의 크기를 나타낸다.

표 1

시료명	메인 피크(d.nm)	2번째 피크(d.nm)	3번째 피크(d.nm)	PdI
w/o Chol-V3A-25°C	1046 (100%)	-	-	0.498
1% Chol-V3A-25°C	326.9 (61%)	82.92 (37%)	5204 (2%)	0.412
2.5% Chol-V3A-25°C	181 (90%)	34.22 (6%)	5194 (4%)	0.379
5% Chol-V3A-25°C	212.3 (98%)	5207 (2%)	-	0.4

표 2

시료명	메인 피크 (d.nm)	2번째 피크(d.nm)	3번째 피크(d.nm)	PdI
w/o Chol-V3A-42°C	134.2 (67%)	1746 (33%)	-	0.677
1%Chol-V3A-42°C	178.4 (100%)	-	-	0.296
2.5%Chol-V3A-42°C	148.1 (100%)	-	-	0.138
5%Chol-V3A-42°C	164.7 (100%)	-	-	0.304

[0100] * %: 전체 입자 분포에서 해당 크기 입자의 퍼센트임

[0101] ** Pdi: polydispersity index

[0102] *** d: diameter

[0103] 표 1 및 2에 나타낸 바와 같이, 생성된 고�형 지질 나노입자는 엘라스틴 유사 폴리펩티드를 포함할 경우, 25°C에서 평균 직경이 약 210nm 내지 330nm이었고 42°C에서 약 150nm 내지 180nm이었다. 엘라스틴 유사 폴리펩티드를 포함하지 않은 경우, 25°C에서 평균 직경이 약 1050nm이었고 45°C에서 약 140nm 내지 1750nm이었다. 엘라스틴 유사 폴리펩티드인 Chol-V3A를 고�형 지질 나노입자에 도입함으로써 입자의 온도 민감성이 증대됨을 확인하였다. 엘라스틴 유사 펩티드를 포함하고 있을 때, 온도에 따른 입자의 크기 감소뿐만 아니라, 입자의 분산도도 개선되었다. 예를 들면, 분산도는 25°C에서 보다 45°C에서 Pdi 값이 감소하였다.

[0104] 실시예 7: 엘라스틴-유사 폴리펩티드를 포함하는 고�형 지질 나노입자의 제조 및 중심 부분 (core lipid)을 이루는 성분 및 온도에 따른 입자 크기 변화 관찰

[0105] 엘라스틴-유사 폴리펩티드로서 n1이 1 내지 200인 콜레스테릴-(VPGVG)n1(VPGAG)n2-NH₂ (이하 Chol-Vn1An2라 함: VPGVG(서열번호 6) 및 VPGAG(서열번호7))를 사용하여 고�형 지질 나노입자를 제조하였다.

[0106] 본 실시예에서는 n1이 3이고 n2가 1인 Chol-Vn1An2 (난 포스파티딜콜린의 1wt%), 인지질로서 난 포스파티딜콜린, 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리아우린의 혼합물 (7:3 몰비), 및 콜레스테릴 올리에이트를 5:2:1 혹은 5:2:0의 몰비로 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 유기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증발시켜 상기 고�형 지질 나노입자를 필름화하였다. 얻어진 고�형 지질 나노입자 필름에 PBS (PBS 부피 기준으로 5 부피비 triton X-100 함유 또는 비함유: PBS 1mL 첨가시, triton X-100은 50 µL)를 가하고 보르텍싱 및 초음파 처리에 의해 입자가 분산된 고�형 지질 나노입자 용액을 얻는다. Triton X-100은 계면활성제로서 Tween과 같은 비이온성 성질을 갖는다..

[0107] 얻어진 고�형 지질 나노입자는 동적 광산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고�형 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 µL를 90 µL의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다.

[0108] 도 5는 실시예 7에 따라, 고�형 지질 나노입자의 안정제로 작용하는 콜레스테릴 올리에이트가 입자의 코어에 도입 여부에 따른 입자 분산의 온도 민감성을 나타낸다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 고�형 지질 나노입자는 콜레스테릴 올리에이트를 포함할 경우, 25°C에서 평균 직경이 약 730nm, 37°C에서 약 240nm 내지 310nm, 및 42°C에서

는 약 210nm 내지 270nm 이었다. 또한, 고행 지질 나노입자는 콜레스테릴 올리에이트를 포함하지 않은 경우, 25℃에서 평균 직경이 약 630nm, 37℃에서 210nm, 및 45℃에서 약 190nm이었다. 콜레스테릴 올리에이트가 입자의 코어에 도입되지 않았을 때, 엘라스틴 유사 폴리펩티드를 가지는 고행 지질 나노입자의 온도 민감성 및 분산성이 증대됨을 확인하였다.

[0109] **실시예 8: 엘라스틴-유사 폴리펩티드를 포함하는 고행 지질 나노입자의 파클리탁셀 봉입 및 온도에 따른 분출 확인**

[0110] ELP로서 n이 1 내지 200인 콜레스테릴-(VPGVG)n1(VPGAG)n2-NH₂ (이하 Chol-Vn1An2라 함)를 사용하여 고행 지질 나노입자를 제조하였다.

[0111] 본 실시예에서는 n1이 3이고 n2가 1인 Chol-Vn1An2 (난 포스파티딜콜린의 1wt%), 파클리탁셀 (난 PC 양의 10중량%)과 5:2의 몰비의 인지질로서 난 포스파티딜콜린과 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (7:3 몰비)을 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 유기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증발시켜 상기 고행 지질 나노입자를 필름화하였다. PBS를 가하고 보르텍싱 및 초음파 처리에 의해 입자가 분산된 고행 지질 나노입자 용액을 얻는다.

[0112] 얻어진 고행 지질 나노입자는 동적 광산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고행 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 μL를 90 μL의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다. Zetasizer에서 측정시, 25℃ 및 42℃에서 5 분 동안 유지하면서, 평균 직경을 측정하였다.

[0113] 그 결과, 파클리탁셀을 포함하는 고행 지질 나노입자가 Chol-V3A를 포함할 경우, 25℃에서 평균 직경이 약 720nm, 및 42℃에서는 약 240nm이었다. Chol-V3A를 포함하지 않은 경우, 25℃에서 평균 직경이 약 1350nm, 및 42℃에서 약 310nm이었다. 이로써 고행 지질 나노입자에 Chol-V3A가 도입될 경우, 온도에 따른 입자의 분산성이 증대됨을 확인했다. Zetasizer에서 측정시, 얻어지는 PDI 값은 감소하였고, 주어진 시료에서 측정된 입자의 평균 크기가 작아졌으며, 이는 입자간의 크기 차이가 감소한다는 것을 나타내는 것으로 여겨진다.

[0114] 도 6은 실시예 8에 따른 파클리탁셀이 봉입된 엘라스틴 유사 폴리펩티드가 도입된 고행 지질 나노입자의 약물 분출의 온도 민감성을 나타낸 도면이다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 42℃의 경우 약 20 분 정도에서 약물이 급격하게 방출되었으나, 25℃ 및 37℃의 경우 비슷한 방출 경향을 보였으며, 약 60분 경과에서도 급격한 방출은 없었다.

[0115] 도 6은 반투막과 UV를 이용하여 고행 지질 나노입자로부터 온도에 따른 파클리탁셀의 분출 정도를 확인한 결과이다. 구체적으로, 고행 지질 나노입자 2.5mg (5mg of 난 PC/ml)을 25mL의 PBS (1부피% Tween 20) 매질 중의 반투막 (Spectra/Por™ Dialysis membrane, MWCO 1,000)에 첨가하고, 25℃, 37℃ 및 42℃에서 인큐베이션하고, 지정된 시간에 반투막 외부의 용액의 흡광도를 파클리탁셀 최대흡수 파장(λ_{max}) 240nm에서 측정하였다. 그 결과, 25℃와 37℃에 비하여 42℃에서, 10 분 이상 경과시에서 2배 이상의 약물이 방출되었다.

[0116] **실시예 9: 엘라스틴-유사 폴리펩티드를 포함하는 고행 지질 나노입자의 쿠마린-6 봉입 및 온도에 따른 세포내 전달 (cellular uptake) 확인**

[0117] 엘라스틴-유사 폴리펩티드로서 n이 1 내지 200인 콜레스테릴-(VPGVG)n1(VPGAG)n2-NH₂ (이하 Chol-Vn1An2라 함) 이를 사용하여 고행 지질 나노입자를 제조하였다.

- [0118] 본 실시예에서는 n1이 3이고 n2가 1인 Chol-Vn1An2 (난 포스파티딜콜린의 1wt%), 쿠마린-6 (난 PC 양의 10중량%), 및 5:2의 몰비의 인지질로서 난 포스파티딜콜린과 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (7:3 몰비)을 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 유기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증발시켜 상기 고�형 지질 나노입자를 필름화하였다. PBS를 가하고 보르텍싱 및 초음파 처리에 의해 입자가 분산된 고�형 지질 나노입자 용액을 얻는다.
- [0119] 얻어진 고�형 지질 나노입자의 세포내 전달 정도를 확인하기 위하여 유세포 분석 (flow cytometry)을 이용하여 분석했다. 쿠마린-6가 봉입된 고�형 지질 나노입자를 암세포인 KB 세포에 처리하여 2시간 이후, 세포내 전달 정도를 형광도 (FITC 필터 사용)를 이용해 측정했다. 구체적으로, KB 세포 (ATCC Number: CCL-17™)를 성장 배지 (10% (v/v) FBS 함유 ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium) 500ul를 포함하는 12웰 플레이트에 2.5×10^5 cells/웰의 농도로 각 웰에 접종하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 세포 농도가 80% 컨플루언스가 될 때까지 배양하였다. 각 웰의 배지를 신선한 상기 성장 배지 500 μl를 첨가하고 여기에 웰당 쿠마린-6가 9 μg/ml를 첨가하고, 37°C 또는 42°C에서 10분 동안 방치한 후에, 2시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, 형광-활성화된 세포 소팅 (fluorescence-activated cell sorting: FACS)(Canto II, BD bioscience) 기기를 사용하여 유세포 분석을 수행하여 세포로부터 방출되는 형광을 측정하였다.
- [0120] 도 7은 실시예 9에 따른 고�형 지질 나노입자를 사용한 쿠마린-6의 세포내 전달 결과를 나타낸다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 수난용성 물질인 쿠마린-6을 고�형 지질 나노입자에 봉입하였을 때, 세포 내 전달도가 100배 이상 증가하였다. 도 7에서, SLN-1은 Chol-V3A가 없는 조성의 고�형 지질 나노입자이고 SLN-4는 Chol-V3A가 존재하는 조성의 고�형지질 나노입자를 나타낸다. Control은 쿠마린-6을 직접 세포에 처리한 것을 나타낸다 (9 μg/ml의 농도로 12웰 플레이트에 처리, 웰당 4.5 μg의 쿠마린-6가 처리됨). 도 7에서 세포의 수는 SLN1에 비하여 SLN4에서 더 많은 세포에 고�형 지질나노입자가 내재화 (internalization)되었다는 것을 알 수 있다. 도 7에서, 세포 수는 그래프 하의 면적 값으로 평가되며, SLN-1의 경우 X 값의 범위는 약 5,000 내지 30,000으로 약 9,000 내지 60,000인 SLN-4의 범위에 비하여 더 넓다.
- [0121] **실시예 10: 복수 개의 아실기를 갖는 엘라스틴-유사 폴리펩티드를 포함하는 고�형 지질 나노입자**
- [0122] 엘라스틴-유사 폴리펩티드로서 SA-[K'(SA)V'3]₂-NH₂를 사용하여 고�형 지질 나노입자를 제조하였다. 여기서, SA는 스테아로일이고, K'는 VPGKG (서열번호 8)를 나타내고, K'(SA)는 VPGKG의 라이신 측쇄의 NH₂에 스테아로일기가 접합되어 있는 것을 나타내고, V'는 VPGXG, PGXGV, GXGVP, XGVPG, 및 GVPGX 중 어느 하나를 나타내고, 1, 2, 3 번째 V'는 같거나 다른 서열일 수 있다. 여기서, 여기서 V는 발린, P는 프롤린, G는 글리신, X는 프롤린이 아닌 천연 아미노산 또는 비천연 아미노산인 것일 수 있다. 여기서, 각 반복 단위의 X는 동일하거나 다른 아미노산일 수 있다.
- [0123] 본 실시예에서는 SA-[(VPGK(SA)G)(VPGVG)₃]₂-NH₂ (서열번호 9, 난 PC의 3wt%), 파클리탁셀 (난 PC의 10중량%)와, 5:2:1 몰비의 인지질로서 난 포스파티딜콜린, 트리글리세리드로서 트리카프린과 트리라우린의 혼합물 (7:3 몰비), 및 콜레스테롤 올리에이트를 클로로포름 및 에탄올의 혼합 용매 (2:1 부피비) 중에 상온 및 상압에서 용해시키고, 유기 용매를 로타리 증발기에 의하여 증발시켜 상기 고�형 지질 나노입자를 필름화하였다. 1 부피% Tween 20 함유 PBS를 가하고 보르텍싱 및 초음파 처리를 반복하여 입자가 분산된 고�형 지질 나노입자 용액을 얻는다 (SLN 5mg/ml). 대조군으로서, 콜레스테롤 올리에이트를 포함하지 않은 SLN을 동일한 과정에 의하여 제조하였다.
- [0124] 얻어진 고�형 지질 나노입자는 동적 광산란 (dynamic light scattering: DLS) 기기인 Zetasizer Nano ZS (Malvern instrument, UK)를 사용하여 평균 직경을 측정하였다. 구체적으로, 상기 고�형 지질 나노입자 (1mg of Egg PC/mL of PBS, Egg PC의 10wt%) 10 μL를 90 μL의 PBS를 포함한 큐벳 (Disposable solvent resistant MicroCuvette (ZEN0040), Malvern, UK)에 첨가하고, Zetasizer에서 광산란에 의하여 직경을 측정하였다.

[0125] 그 결과, SLN 입자 크기는 콜레스테롤 올리에이트를 포함하는 경우(이하 "실험군"이라 함), 37℃ 및 42℃에서 각각 약 360nm 및 310nm이었고, 올리에이트를 포함하지 않은 경우(이하 "대조군"이라 함), 37℃ 및 42℃에서 각각 약 270nm 및 270nm이었다. 즉, 올리에이트를 포함하는 경우, SLN은 37℃ 이상으로 온도가 상승할 때 그 크기가 작아졌다. Zetaziser에서 측정시, 37℃ 및 42℃에서 5 분 동안 유지하면서, 평균 직경을 측정하였다.

[0126] 표 3은 온도에 따른 측정된 SLN의 분산도를 나타낸다.

표 3

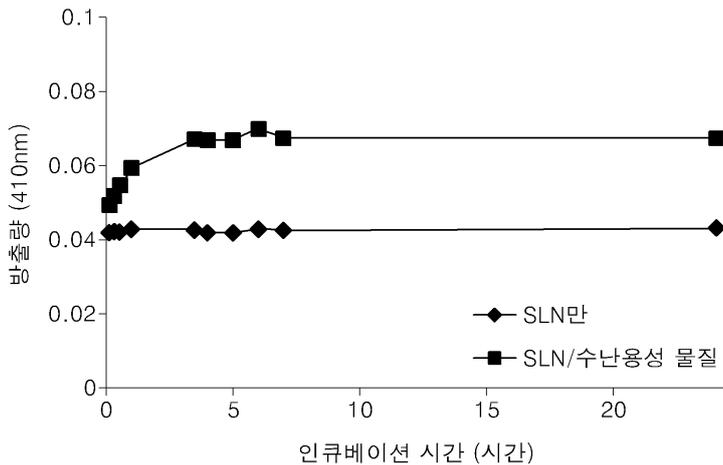
시료명	다분산 지수 (polydispersity index)		
	25℃	37℃	42℃
실험군	0.63	0.14	0.24
대조군	0.44	0.24	0.23

[0128] 표 3에 나타낸 바와 같이, 실험군 및 대조군 모두에서 온도 증가에 따라 SLN의 다분산 계수가 감소하였다. 즉, 온도가 증가함에 따라 1 중량% tween 20 함유 PBS 중의 SLN은 더 균일하게 분산된 용액으로 되었다. 그에 따라, SLN에 포함된 파클리탁셀은 방출이 더 용이하게 될 것으로 예상된다. 분산도가 증가하면서 큰 입자가 작은 입자로 나누어지고, 이로써 고흡 지질 나노입자의 표면적이 증가하고 내부에 도입되어 있는 약물이 지질 입자 외부 즉, 용매에 더 많이 노출되게 된다. 따라서 입자가 작아지고 분산도가 상승함에 따라 약물의 방출이 용이하게 될 것으로 예상된다.

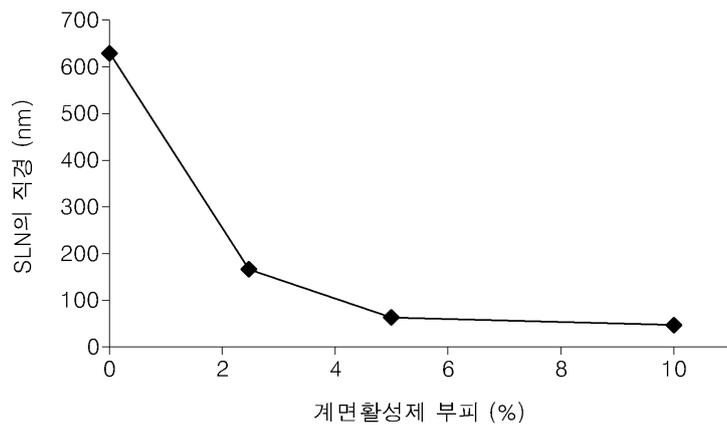
[0129] .

도면

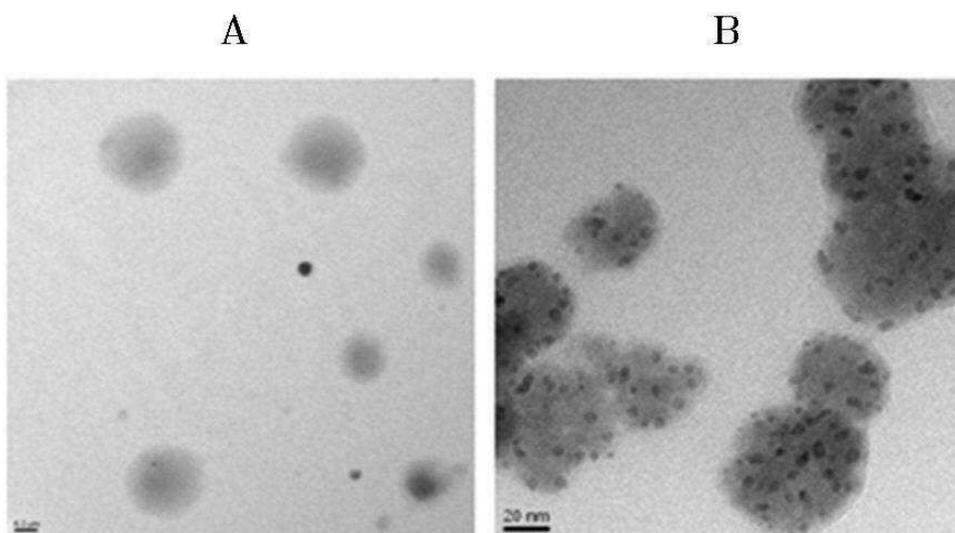
도면1



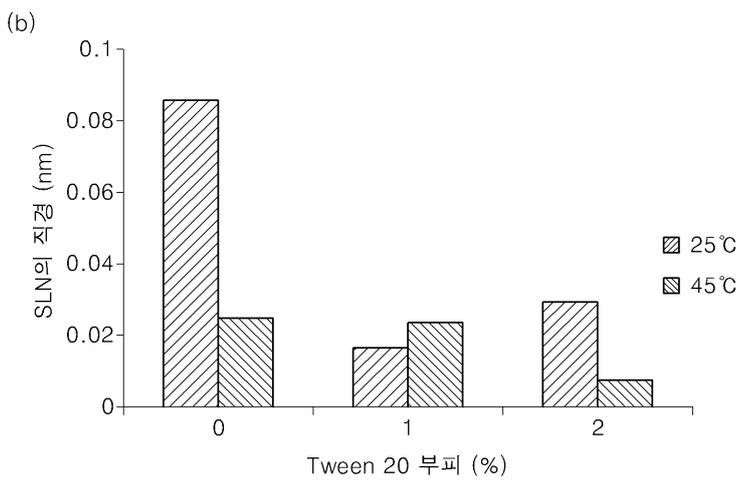
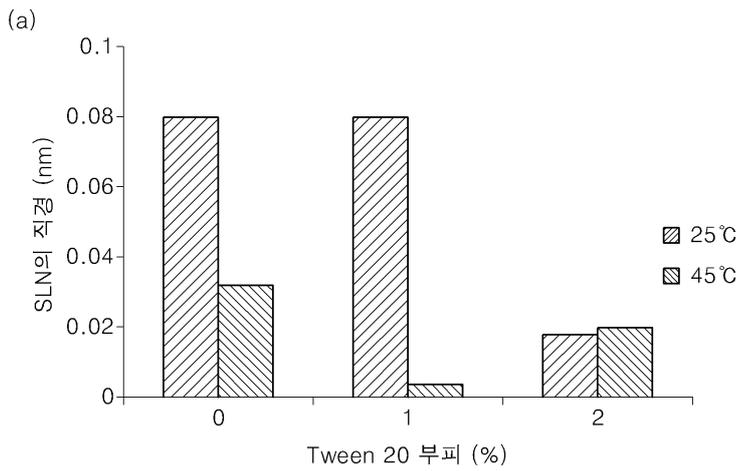
도면2



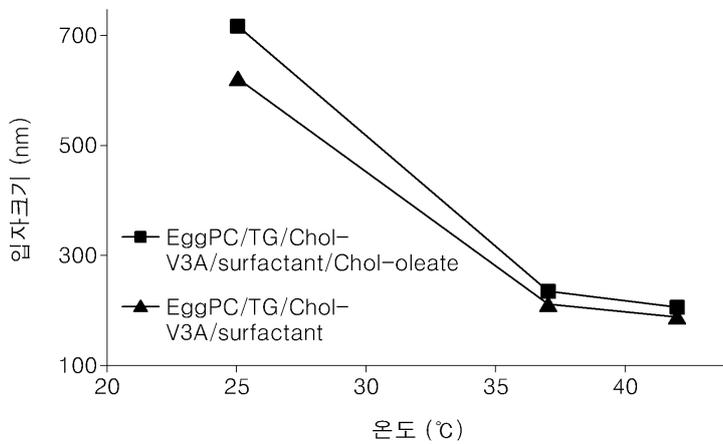
도면3



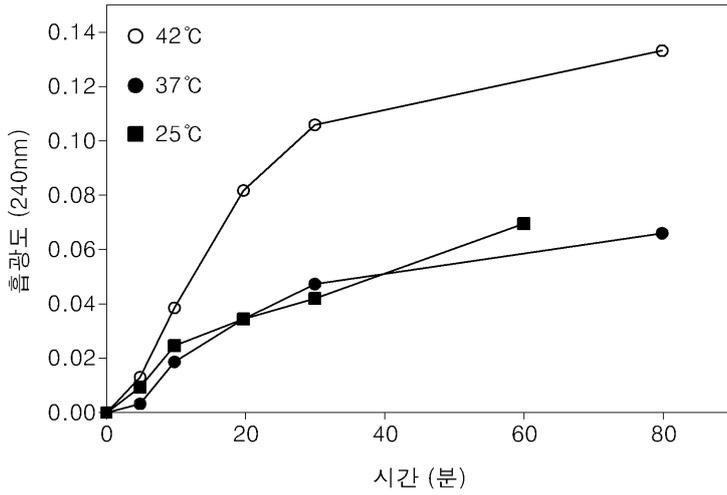
도면4



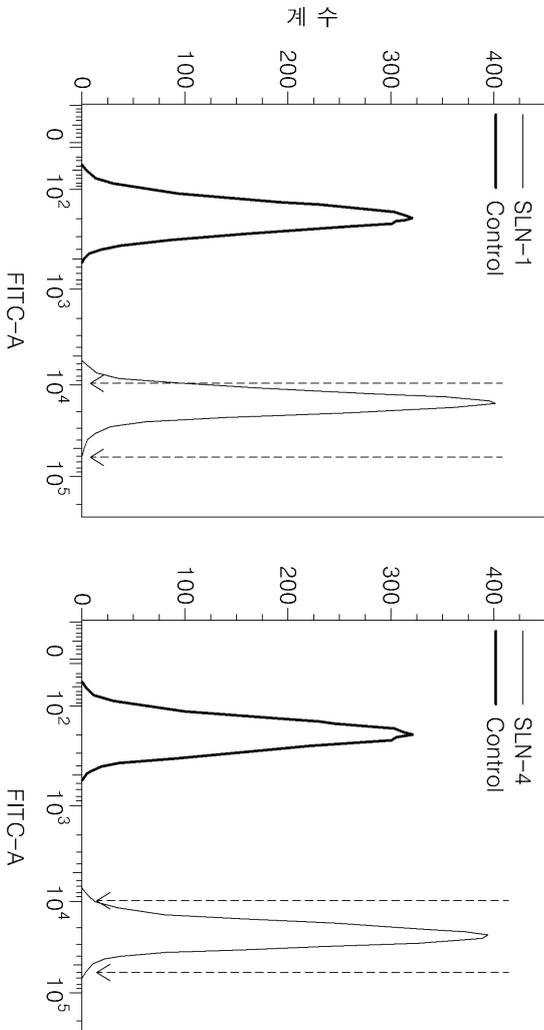
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> Samsung Electronics Co., Ltd.

<120> Solid lipid nanoparticle including elastin-like polypeptide and use thereof

<130> PN094923

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> elastin-like polypeptide unit sequence

<220><221> VARIANT

<222> (4)

<223> Xaa denotes amino acid other than proline

<400> 1

Val Pro Gly Xaa Gly

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> elastin-like polypeptide unit sequence

<220><221> VARIANT

<222> (3)

<223> Xaa denotes amino acid other than proline

<400> 2

Pro Gly Xaa Gly Val

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> elastin-like polypeptide unit sequence

<220><221> VARIANT

<222> (2)

<223> Xaa denotes amino acid other than proline

<400> 3

Gly Xaa Gly Val Pro

1 5

<210

> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> elastin-like polypeptide unit sequence

<220><221> VARIANT

<222> (1)

<223> Xaa denotes amino acid other than proline

<400> 4

Xaa Gly Val Pro Gly

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> elastin-like polypeptide unit sequence

<220><221> VARIANT

<222> (5)

<223> Xaa denotes amino acid other than proline

<400> 5

Gly Val Pro Gly Xaa

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Elastin-like polypeptide

<400> 6

Val Pro Gly Val Gly

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Elastin-like polypeptide

<400> 7

Val Pro Gly Ala Gly

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Elastin-like polypeptide unit sequence

<400> 8

Val Pro Gly Lys Gly

1 5

<210> 9

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Elastin-like polypeptide unit sequence; the nitrogens at the N-terminal end and lysine side chains are conjugated to stearyl groups and C-terminal end is modified to -NH₂

<400> 9

Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val

1 5 10 15

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Lys Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

20 25 30

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

35 40