



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/425 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0002014
(43) 공개일자 2007년01월04일

(21) 출원번호 10-2006-7018818
(22) 출원일자 2006년09월13일
심사청구일자 없음
번역문 제출일자 2006년09월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/004247 (87) 국제공개번호 WO 2005/084637
국제출원일자 2005년02월11일 국제공개일자 2005년09월15일

(30) 우선권주장 60/544,693 2004년02월13일 미국(US)

(71) 출원인 노드 파마수티칼스, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92121 샌 디에고 메사 럼 로드 9924

(72) 발명자 리 윌리엄 더블유.
미국 캘리포니아 92130 샌 디에고 카미니토 테스텔로 12647

(74) 대리인 박장원

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 치료용 인산칼슘 입자, 그 제조 방법 및 그 이용 방법

(57) 요약

본 발명은 생리 활성 거대 분자로 캡슐화된 인산칼슘 나노 입자를 제공한다. 상기 입자는 거대 분자의 전달을 위하여 생리 활성 거대 분자의 담체로서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 입자의 제조 방법 및 이용 방법을 제공한다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

- a) 인산칼슘 나노 입자 코어와
- b) 상기 코어 입자 내에 캡슐화된 생리 활성 거대 분자와

c) 상기 코어 입자 내에 캡슐화된 담즙산을 함유하는 표면 개질제를 포함하는 입자.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 코어 입자의 직경은 약 300 nm 미만인 것인 입자.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 담즙산은 콜레이트, 데옥시콜레이트, 타우로콜레이트, 글리코콜레이트, 타우로데옥시콜레이트, 우르소데옥시콜레이트, 타우로우르소데옥시콜레이트 및 체노데옥시콜레이트로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 입자.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 입자는 장용피(腸溶被)를 더 포함하는 것인 입자.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 생리 활성 거대 분자는 단백질, 폴리펩티드, 다당류, 핵산, 폴리뉴클레오티드, 지질 및 탄수화물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 입자.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 단백질 또는 폴리펩티드는 인슐린, 적혈구 생성 인자, 인터페론, 성장 호르몬 및 과립 세포군 촉진 인자 (G-CSF)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 입자.

청구항 7.

제4항에 있어서, 상기 생리 활성 거대 분자는 인슐린, 적혈구 생성 인자, 인터페론, 성장 호르몬 및 G-CSF로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 입자.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 생리 활성 거대 분자는 집먼지 마우스, 동물의 비듬, 곰팡이, 꽃가루, 돼지풀, 라텍스, 말벌독액 (vespid venoms) 및 곤충 유래 알레르겐류와 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 입자.

청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 입자는 분무 약제의 형태로 적용되는 것인 입자.

청구항 10.

제1항에 있어서, 상기 입자는 생리 활성 거대 분자를 점막 표면에 전달하기에 적합한 것인 입자.

청구항 11.

제1항에 있어서, 상기 입자는 안구 질환의 치료용으로 필요로 하는 객체의 안구 표면에 생리 활성 거대 분자를 전달하기에 적합한 것인 입자.

청구항 12.

제1항의 입자 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 13.

제4항의 입자 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 14.

제7항의 입자 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 15.

- a) 칼슘염 수용액을 담즙산을 함유하는 표면 개질제의 존재하에 인산염 수용액과 접촉시키는 공정과
- b) 목적하는 크기의 인산칼슘 입자를 얻을 때까지 상기 용액을 혼합하는 공정과,
- c) 입자를 회수하는 공정

을 포함하는, 1개 이상의 인산칼슘 입자를 제조하는 방법.

청구항 16.

제15항에 있어서, 상기 칼슘염의 농도는 약 5 mM 내지 약 200 mM인 것인 방법.

청구항 17.

제15항에 있어서, 상기 인산염의 농도는 약 5 mM 내지 약 200 mM인 것인 방법.

청구항 18.

제15항에 있어서, 상기 입자의 직경은 300 nm 미만인 것인 방법.

청구항 19.

제15항에 있어서, 칼슘염 수용액을 담즙산을 함유하는 표면 개질제의 존재하에 인산염 수용액과 접촉시키기 전에, 인산염 수용액 또는 칼슘염 수용액에 생리 활성 거대 분자를 첨가하는 공정을 더 포함하고, 이에 의하여 인산칼슘 입자를 거대 분자와 공결정화(共結晶化)시키는 것인 방법.

청구항 20.

제14항에 있어서, 상기 담즙산은 콜레이트, 데옥시콜레이트, 타우로콜레이트, 글리코콜레이트, 타우로데옥시콜레이트, 우르소데옥시콜레이트, 타우로우르소데옥시콜레이트 또는 체노데옥시콜레이트로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 21.

객체에게 제1항의 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하는 생리 활성 거대 분자를 필요로 하는 객체의 치료 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 신규한 인산칼슘 입자, 그의 제조 방법 및 생리 활성 거대 분자의 전달을 위한 담체로서 인산칼슘 입자를 이용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

단백질, 펩티드, 다당류, 핵산, 지질 또는 이들의 조합을 비롯한 거대 분자 약물은 다양한 의학 상태를 치료하기 위하여 현저하게 중요한 약물의 분류이다. 거대분자 약물을 투여하기 위한 주된 경로는 주사이나. 이는 유쾌하지 않고, 값이 비싸며, 때때로 가난한 환자 순응도를 일으킨다. 경구 전달용은 약을 관리하기 위한 경로로 좋다. 그러나, 거대 분자 약물은 창자를 통하여 거의 흡수되지 않고, 위산 또는 위장 내 효소에 의하여 쉽게 파괴될 수 있다. 구강 거대 분자 전달을 위한 장벽을 극복하기 위한 전도 유망한 접근법으로는 퇴화를 막고, 거대 분자 약물의 흡수를 가능하게 하는 나노 입자를 이용하는 것이 있다.

인슐린으로 부하된 나노 입자는 생활성 인슐린을 동물에게 전달할 수 있다고 보고되어 있다. 예를 들어, 무수물 푸마릭 올리고머와 산화철 첨가제를 함유하는 폴리(락티드-코-글리콜리드) 나노 입자로 부하된 인슐린에 의하여 혈장 포도당 상승을 막는다는 것을 나타낸다 (Carino et al, *Controlled Release* 65:261, (2000)). 키토산 나노 입자를 함유하는 인슐린의 경구 전달을 위한 또 다른 예가 공개된다(Pan et al., *Intl. J. Pharmaceutics*, 249:139, (2002)). 나아가, 폴리알킬시아노아크릴레이트 나노캡슐 또한 당뇨병 동물 내의 인슐린의 경구 전달을 위한 효과적인 담체라는 것이 보고되어 있다 (Dange et al. *Diabetics*, 37:246, (1988)). 위장 경로에 의하여 특정한 물질을 섭취하는 것이 기록되어 있고, 림프 파이어관(lymphatic Peyer's patches)을 포함한다(Hussain et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 50:107, (2001)).

입자를 흡수하는데 영향을 주는 인자 중에서, 입자 크기는 가장 중요한 요소로 보인다. 예를 들어, Jani et al. (*J. Pharm. Pharmacol.* 42:821, 1990)은 래트 내의 다양한 크기의 폴리스티렌 입자의 창자 흡수를 연구하였다. 폴리스티렌 입자의 흡수율은 명백하게 크기에 의존하였다. 100 nm 이하의 입자는 흡수가 현저히 잘 된 반면에, 큰 입자 (500 nm 이상)은 흡수율이 낮음을 나타냈다.

창자 흡수는 입자 크기에 따라 다르다는 것인 폴리(락티드-코-글리콜리드) 또는 PLGA 입자에서 Desai 등에 의하여 관찰되었다 (*Pharm. Res.* 13:1838, 1996). 상기 연구에서, 500 nm 이상의 PLGA 입자는 창자관에 전혀 섭취되지 않았으나, 100 nm의 PLGA 입자는 36%가 흡수되었다.

나노미터 규모의 입자는 단백질과 핵산 등의 생물학적 거대 분자를 위한 담체 입자로서 사용할 것이 제안되었다. 참조 미국 특허 제5,178,882호; 제5,219,577호; 제5,306,508호; 제5,334,394호; 제5,460,830호; 제5,460,831호; 제5,462,750호; 제5,464,634호, 제6,355,271호.

인산칼슘 입자는 생부착성/생양립성이고, 생체 외에서 세포 내 구역으로 핵산을 전달하기 위한 담체로서 보통 이용된다 (Chen et al., Mol. Cell. Biol. 7:2745-52, (1987); Welzel et al., J. Mater. Chem.14:2213-2217 (2004); Jordan et al., Nucleic Acids Research 24:596-601 (1996); Loyter et al., Exp. Cell Res. 139:223-234 (1982)). 나아가, 인산칼슘 또한 생체 내에서 큰 핵산을 전달하기 위한 유전자법을 위한 담체로서 시험되고 있다 (Roy et al., Intl. J. Pharmaceutics 250:25, (2003)).

치료용 인산칼슘 입자는 미국 특허 제6,355,271호; 제6,183,803; 미국 공개 공보 제2004/0258763호; 제2002/0054914호; 제2002/0068090호; 제2003/0185892호; 제2001/0048925호; WO 02/064112; WO 03/051394; WO 00/46147; WO 2004/050065; Cherian et al., Drug Development and Industrial Pharmacy 26:459-463 (2000)에 기재되어 있다. 인산칼슘 입자가 부하된 인슐린의 경구용 제제의 효과는 당뇨병 마우스를 시험하고, 혈당을 대조하여 나타냈다 (Morcol et al., Intl. J. Pharmaceutics 277:91, (2004)). 인산칼슘 입자는 입자 크기가 300 nm 내지 10 um이다. 동물 연구는 평균적으로 2-4 um 범위의 입자 크기를 이용하였다. 상기 입자 크기는 명백하게 최적이지는 않다. 목적하는 크기의 인산칼슘 입자를 만들기 위하여, 확장성 초음파 처리가 요구되며(Cherian et al. Drug Dev. Ind. Pharmacy, 26:459, 2000; Roy et al. Intl. J. Pharmaceutics 250:25, 2003), 이는 캡슐화된 거대 분자 약물을 상하게 할 수 있고, 공결정화 공정과 양립하지 않는다.

또한, 인산칼슘 입자 내의 거대 분자의 캡슐화 효율은 때때로 낮다. 예를 들어, 미국 특허 제6,355,271호에서, 인슐린이 미리 제조된 인산칼슘 입자에 첨가된 경우 약 40%의 흡수율을 나타내고, 인슐린이 입자 생성 중에 혼합되는 경우에는 약 89%의 흡수율을 나타낸다고 한다.

이러한 종래의 방법은 입자 크기를 최적화시키지 못하거나, 거대 분자 생성과 양립하지 않는 확장된 초음파 처리 등과 같은 가혹한 조건을 요구하게 된다. 따라서, 높은 효율과 낮은 비용으로 쉽게 제조되는 구강 거대 분자 전달계가 필요한 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명은 a) 인산칼슘 나노 입자 코어와 b) 상기 코어 입자 내에 피포(被包)된 생리 활성 거대 분자와 c) 상기 코어 입자 내에 캡슐화된 담즙산을 함유하는 표면 개질제를 포함하는 입자를 제공한다.

일부 실시 상태에 있어서, 코어 입자의 직경은 약 1000 nm 미만, 약 300 nm 미만 또는 약 200 nm 미만이다.

일부 실시 상태에 있어서, 담즙산은 콜레이트, 데옥시콜레이트, 타우로콜레이트, 글리코콜레이트, 타우로데옥시콜레이트, 우르소데옥시콜레이트, 타우로우르소데옥시콜레이트 및 체노데옥시콜레이트로 이루어진 군 중에서 선택된다.

일부 실시 상태에 있어서, 상기 입자는 장용피를 더 포함한다.

일부 실시 상태에 있어서, 상기 생리 활성 거대 분자는 단백질, 폴리펩티드, 다당류, 핵산, 폴리뉴클레오티드, 지질 및 탄수화물로 이루어진 군 중에서 선택된다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 단백질 또는 폴리펩티드는 인슐린, 적혈구 생성 인자, 인터페론, 성장 호르몬 및 과립 세포군 촉진 인자 (G-CSF)로 이루어진 군 중에서 선택된다. 일부 실시 상태에 있어서, 생리 활성 거대 분자는 집먼지 마우스, 동물의 비듬, 곰팡이, 꽃가루, 돼지풀, 라텍스, 말벌독액 (vespid venoms) 및 곤충 유래 알레르겐류와 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된다.

일부 실시 상태에 있어서, 상기 입자는 분무 약제의 형태로 적용된다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 입자는 생리 활성 거대 분자를 점막 표면에 전달하기에 적합하다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 입자는 안구 질환의 치료용으로 필요로 하는 객체의 안구 표면에 생리 활성 거대 분자를 전달하기에 적합하다.

또한, 본 발명은 본 명세서에 기재된 인산칼슘 나노 입자 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

본 발명은 a) 칼슘염 수용액을 담즙산을 함유하는 표면 개질제의 존재하에 인산염 수용액과 접촉시키는 공정과 b) 목적하는 크기의 인산칼슘 입자를 얻을 때까지 상기 용액을 혼합하는 공정과 c) 입자를 회수하는 공정을 포함하는, 1개 이상의 인산칼슘 입자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

일부 실시 상태에 있어서, 상기 칼슘염의 농도는 약 5 mM 내지 약 200 mM의 범위이다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 인산염의 농도는 약 5 mM 내지 약 200 mM의 범위이다.

일부 실시 상태에 있어서, 상기 방법은 칼슘염 수용액을 담즙산을 함유하는 표면 개질제의 존재하에 인산염 수용액과 접촉시키기 전에, 인산염 수용액 또는 칼슘염 수용액에 생리 활성 거대 분자를 첨가하는 공정을 더 포함하고, 이에 의하여 인산칼슘 입자를 거대 분자와 공결정화(共結晶化)시키는 것인 방법이다.

또한, 본 발명은 생리 활성 거대 분자를 필요로 하는 객체의 치료 방법으로서, 상기 방법은 객체에게 본 명세서에 기재된 인산칼슘 나노 입자를 함유하는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 약학 조성물은 경구로 투여된다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 약학 조성물은 점막 표면에 투여된다. 일부 실시 상태에 있어서, 상기 약학 조성물은 안구 표면에 투여된다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 신규한 생리 활성 거대 분자로 캡슐화된 인산칼슘 나노 입자, 상기 나노 입자의 제조 방법 및 생리 활성 거대 분자의 투여에 필요한 의학적 환경을 처리하기 위한 나노 입자의 이용 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 사용되는, "캡슐화된(encapsulated)", "함몰된(embedded)" 또는 "혼입된(incorporated)"이라는 것은 어떤 물질과 (예 의해) 복합되거나, 내장되거나, 결합되거나, 연관되거나, 피복되거나, 층 구조를 형성하거나, 봉입 되는 것을 의미한다. 따라서, 어떤 물질이 캡슐화되어 있다 함은 그 물질이 그 입자 구조 내로 혼입되거나, 입자의 표면에 피복 또는 부착된 것, 또는 이들 두 가지 모두를 의미하는 것이다.

다른 방식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 용어와 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의하여 통상적으로 이해되는 의미와 같다. 본 명세서에 참조되는 모든 특허, 출원, 공개 출원 및 기타 간행물은 전체적으로 본 명세서에 참조로서 혼입된다. 본 명세서에서 설명된 정의가 상기 특허, 출원, 공개 출원 및 기타 간행물 분야의 정의와 대립되거나 일치하지 않는다면, 본 명세서에서 설명된 정의가 참조로서 여기에 혼입된 정의보다 우월하다.

본 명세서에서 사용되는 "하나" 또는 "한 개"는 "적어도 하나" 또는 "1개 이상"을 의미한다.

A. 생리 활성 거대 분자로 캡슐화된 인산칼슘 나노 입자

본 발명은 a) 인산칼슘 나노 입자 코어와 b) 상기 코어 입자 내에 피포(被包)된 생리 활성 거대 분자와 c) 상기 코어 입자 내에 캡슐화된 담즙산을 함유하는 표면 개질제를 포함하는 입자를 제공한다.

본 발명의 인산칼슘 코어 입자는 평균 입자 크기 (직경)이 약 8000 nm 미만, 약 1000 nm 미만, 더욱 바람직하게는 약 300 nm 미만이다. 상기 입자는 약 50 nm 내지 약 8000 nm, 약 100 nm 내지 약 3000 nm 또는 약 100 nm 내지 약 1000 nm의 직경을 가질 수 있다. 일부 실시 상태에 있어서, 평균 입자 크기는 200 nm 미만이다. 일부 실시 상태에 있어서, 평균 입자 크기는 100 nm 미만이다.

본 발명의 코어 입자는 일반적으로 형태면에서 보통 그리고 실질적으로 구형이고, 나노 입자의 크기는 실질적으로 단분산이다. 단분산이란 상기 나노 입자 중에서 관찰되는 폭이 좁은 크기의 분산, 예를 들어, 크기가 약 20%, 약 30%, 약 40% 또는 약 50% 범위로 차이 나는 것을 의미한다.

본 명세서에서 사용되는 "실질적으로 구형"이란 용어는 실질적으로 원형 또는 타원형인 입자를 의미하고, 면이 없고 매끄러운 입자, 또는 거의 면이 없는 입자뿐만 아니라 다수의 면을 가진 다면체인 입자를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 "실질적으로 매끄러운"이란 용어는 100 nm 이상의 크기를 가지는 본질적으로 면 특징이 없고 불규칙적인 것을 의미한다. 코어 입자는 면이 전술한 유형의 수 많은 표면 불규칙성을 함유하지 않는한, 상기 정의 내에서 면이 있거나, 각이 있거나 매우 경사질 수 있다.

도 3A 및 3B는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 제조된 나노 입자의 실시예의 주사식 전자 현미경 이미지이다. 도 3A는 평균 직경 약 200 nm로 분산되거나, 피복된 거대 분자를 함유하지 않는 블랭크 나노 입자를 나타낸 것이다. 도 3B는 나노 입자 내에 평균 직경 약 70 nm으로 분산된 거대 분자 인슐린을 함유하는 나노 입자를 나타낸 것이다.

본 발명의 인산칼슘 나노 입자는 두 가지 기능을 하는 담즙산을 포함하는 표면 개질제를 함유한다. 실시예 1에 나타난 바와 같이, 담즙산의 존재하에 입자를 형성하는 경우, 인산칼슘 나노 입자 내에 생리 활성 거대 분자의 피포가 촉진된다. 또한, 담즙산은 나노 입자의 생물학적 부착성을 향상시킬 수 있고, 나노 입자의 크기에 영향을 미친다. 모든 담즙산이 사용될 수 있다. 담즙산의 예에는 콜레이트, 데옥시콜레이트, 타우로콜레이트, 글리코콜레이트, 타우로데옥시콜레이트, 우르소데옥시콜레이트, 타우로우르소데옥시콜레이트 및 체노데옥시콜레이트가 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

일부 실시 상태에 있어서, 본 발명의 인산칼슘 나노 입자는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 더 포함한다. PEG는 분자량이 약 500 달톤 내지 약 20,000 달톤이고, 예를 들어, 약 500, 약 1000, 약 5000, 약 10,000, 약 15,000, 약 20,000 달톤이다.

모든 생리 활성 거대 분자는 코어 인산칼슘 나노 입자 내에 피포될 수 있다. 그러한 생리 활성 거대 분자로는 단백질, 폴리펩티드, 다당류, 핵산, 지질, 탄수화물 및 이들의 조합이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시 상태에 있어서, 생리 활성 거대 분자는 인슐린, 적혈구 생성 인자, 인터페론, 성장 호르몬 또는 과립 세포군 촉진 인자 (G-CSF)이다. 일부 실시 상태에 있어서, 생리 활성 거대 분자는 알레르겐 또는 항원 물질이다. 알레르겐의 예에는 집먼지 마우스, 동물의 비듬, 곰팡이, 꽃가루, 돼지풀, 라텍스, 말벌독 및 곤충 유래 알레르겐류 및 이들의 조합이 있다.

생리 활성 거대 분자에는 알파-1-안티트립신, 스테로이드, 뼈다공증 치료 약물, 혈액 응고 인자, 항암 약물, 항생제, 치료용 항체, 리파아제, 베타-차단제, 항천식, 항감각 올리고뉴클레오티드, 호흡용 DNase 효소 및 기타 질병, 항염증 약물, 항바이러스, 항고혈압, 항 부정맥 약물과 같은 심장병 치료제 및 유전자 치료제, 이노제, 헤파린과 같은 항 응고 화학 및 이들의 조합 등의 모든 치료제를 포함한다. 상기 약품은 천연 분리되거나, 합성되거나, 화학적 또는 생물학적 약품일 수 있다.

상기 인산칼슘 나노 입자는 피막을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 생리 활성 거대 분자로 피포되거나, 피포되고, 포화된 나노 입자는 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 유드라짓(Eudragit) 및 아구아테릭(Aquateric) 등의 장용 고분자로 피복된다. 장용피의 공정은 당해 기술 분야에 잘 기술되어 있고, 본 명세서에서 참조로서 혼입되어 있다 (Beyger et al., J. Pharm. Sci. 75:573-578 (1986); Maharaj et al., J. Pharm. Sci. 73:39-42 (1984)).

또한, 본 발명은 인산칼슘 나노 입자의 코어 및 코어 입자 내에 캡슐화된 생리 활성 거대 분자를 포함하며, 이중 생리 활성 거대 분자가 핵산, 폴리뉴클레오티드, 단백질 또는 폴리펩티드라는 전제하에 코어 입자의 평균 입자 크기 (직경)는 약 300 nm 미만인 인산칼슘 나노 입자를 제공한다. 또한, 본 발명은 인산칼슘 나노 입자의 코어 및 코어 입자 내에 캡슐화된 생리 활성 거대 분자를 포함하며, 이중 생리 활성 거대 분자는 항체인 경우 코어 입자의 평균 입자 크기 (직경)는 약 300 nm 이하인 인산칼슘 나노 입자를 제공한다.

또한, 본 발명은 본 명세서에 기재된 인산칼슘 나노 입자 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 적절한 담체 및 이들의 제형은 당해 기술 분야에 알려져 있고, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000에 기재되어 있다. 약학 조성물은 용액, 캡슐, 알약, 분말 및 분무 약제의 형태로 제작될 수 있고, 경구 전달용, 점막 전달용, 또는 안구 표면에 전달용으로 적합한 형태로 제작될 수 있다. 상기 조성물은 완충액, 보존제, 비이온성 계면 활성제, 용해 보조제, 안정화제, 완화제, 윤활제 및 감식제 등의 기타 성분을 함유할 수 있다. 상기 조성물은 거대 분자의 방출을 조절하기 위하여 제작될 수 있다.

B. 인산칼슘 나노 입자의 제조 방법

본 발명은 또한 a) 칼슘염 수용액을 담즙산을 함유하는 표면 개질제의 존재하에 인산염 수용액과 접촉시키는 공정과 b) 목적하는 크기의 인산칼슘 입자를 얻을 때까지 상기 용액을 혼합하는 공정과 c) 입자를 회수하는 공정을 포함하는, 1개 이상의 인산칼슘 입자를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명의 인산칼슘 나노 입자는 통상적으로 수용액 배지 중에서 가용성 칼슘염을 종기로는 담즙산을 함유하는 표면 개질제의 존재하에 가용성 인산염과 현탁함으로써 제조된다.

일부 실시 상태에 있어서, 농도가 약 1 mM 내지 약 100 mM인 2 염기성 인산나트륨의 증류수 용액과 농도가 0.01-1% (w/v)인 데옥시콜레이트와 같은 표면 개질제를 제조하고, 관(vessel) 중에서 혼합하였다. 일부 실시 상태에 있어서, 1-30% (w/v) 농도를 가지는 폴리에틸렌 글리콜 등의 기타 부형제 또한 포함한다.

용액의 pH는 인산염 완충계에 의하여 조절된다. pH가는 나노 입자의 크기에 영향을 미치고, 피포되는 거대 분자의 요구되는 안정성과 양립해야 한다. pH 가는 약 4.0 내지 약 9.0 또는 더욱 바람직하게는 약 5.0 내지 약 8.0일 수 있다.

입자 크기는 칼슘, 인산염 및 거대 분자를 비롯한 다양한 성분의 농도에 의하여 영향을 받는다. 일반적으로, 칼슘 또는 인산염의 농도는 더 높고, 나노 입자는 더 크다. 나노 입자를 생성하기 위하여, 농도가 1 mM 내지 약 100 mM인 염화칼슘 등의 칼슘염의 수용액을 전술한 인산염의 수용액과 혼합하였다. 인산칼슘 나노 입자의 생성을 가리키는 혼탁도가 바로 형성되었다. 혼합은 일반적으로 1분 내지 1시간 동안, 또는 더 길게 (예를 들어, 2-48시간) 걸린다. 입자의 크기는 혼합 속도가 증가하거나 초음파 처리함으로써 감소될 수 있다.

생성된 인산칼슘 나노 입자는 추가로 회수되고, 회수되거나 정제될 수 있다. 일부 실시 상태에 있어서, 캡슐화된 거대 분자를 함유하는 생성된 인산칼슘 나노 입자는 원심 분리에 의하여 회수된다. 용액을 3000-1000 x g에서 5-15분 동안 원심 분리하고, 수집된 나노 입자를 진공 상태에서 건조시킨다. 일부 실시 상태에 있어서, 캡슐화된 거대 분자를 함유하는 형성된 인산칼슘 나노 입자를 여과에 의하여 회수하였다. 용액을 진공 상태의 뷔셀 깔대기 (buechel funnel) 등의 여과기에 첨가한다. 20 nm의 아노디스크(Anodisc)막 등의 여과막은 나노 입자를 회수하는데 이용될 수 있고, 추가로 진공 상태에서 건조시킨다.

본 발명의 입자는 생리 활성 거대 분자의 포집율을 증가시키기 위하여 담즙산을 함유하는 표면 개질제의 존재하에 생성된다. 본 발명에서 사용되는 담즙산의 예에는 콜레이트, 데옥시콜레이트, 타우로콜레이트, 글리코콜레이트, 타우로데옥시콜레이트, 우르소데옥시콜레이트, 타우로우르소데옥시콜레이트 또는 체노데옥시콜레이트가 있다. 담즙산의 농도는 일반적으로 0.01% 내지 5%이다. 일반적으로, 상기 공정은 입자의 피복율이나 포화율을 실질적으로 높게 될 것이다. 예를 들어, 표면 개질제가 없는 경우 인슐린 부하율이 50-60%인 반면에, 동일한 조건에서 표면 개질제의 존재하에 인슐린 부하율은 100%에 이를 수 있다.

생리 활성 거대 분자를 함유하는 나노 입자의 부하는 담즙산과 부형제의 존재하에 인산염 용액과 결합시키거나 혼합하기 전에 혼입되는 생리 활성 거대 분자와 칼슘염 수용액을 혼합하거나, 또는 담즙산과 부형제의 존재하에 인산염 용액과 결합시키거나 혼합하기 전에 혼입되는 생리 활성 거대 분자와 인산염 수용액을 혼합함으로써 수행하는 것이 좋다. 피포되는 생리 활성 거대 분자의 농도는 약 0.1-20 mg/ml일 수 있다. 나노 입자는 적당한 시간 동안, 일반적으로 1분 내지 1시간 동안 유지된다. 나노 입자는 원심 분리나 여과에 의하여 현탁액으로부터 분리될 수 있고, 그 다음 진공 상태에서 건조시킨다.

본 발명의 나노 입자는 예를 들어, 장용피로 피복될 수 있다. 장용피 공정 및 물질은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있고, 실행되고 있는 것이다. 서로 다른 장용 고분자의 선택이 거대 분자의 약물 동태학적 거동과 위장관의 표적 지역의 변화를 일으킬 수 있다는 것은 잘 알려져 있다.

일부 실시 상태에 있어서, 생리 활성 거대 분자로 캡슐화된 인산칼슘 나노 입자는 장용 고분자 용액에 현탁된다. 주로 흔히 사용되는 용매는 아세톤, 에탄올 또는 이들의 조합이다. 예를 들어, 나노 입자는 10-100 mg/ml의 농도로 현탁될 수 있다. 고분자와 코어 나노 입자의 피복율은 3:1 내지 0.5:1, 또는 바람직하게는 2:1 내지 1:1일 수 있다. 나노 입자는 가벼운 초음파 처리에 의하여 분산될 수 있고, 1-5 x 부피의 파라핀 오일을 혼합물에 첨가할 수 있다. 보텍스 또는 초음파처리에 의하여 혼합을 완료한 후에, 2-10 x 부피의 클로로포름을 피복 고분자를 경화시키기 위하여 첨가할 수 있다. 피복된 입자는 와트만 Chr 3MM 등의 여과지에 의하여 회수될 수 있고, 클로로포름으로 세척할 수 있다. 회수된 산물은 진공 상태에서 추가로 건조시킬 수 있고, 균일한 크기로 분쇄할 수 있다.

일부 실시 상태에 있어서, 인산칼슘 나노 입자를 농도가 20-100 mg/ml인 장용 고분자 용액에 현탁시키고, 나노 입자에 대한 고분자의 피복율은 2:1 내지 1:1이다. 현탁액을 가볍게 초음파 처리하고, 장용 고분자를 용해시키지 않는 용매와 장용 고분자를 용해시키는 용매를 함유하는 미셀에 바로 첨가한다. 혼합물과 분산 용매 사이의 부피비는 1:10 내지 500:1이다. 입자를 와트만 Chr 3MM과 같은 여과지 상에서 여과하여 회수한다. 입자를 진공 상태에서 건조시키고, 균일한 크기로 분쇄한다.

본 발명의 입자는 기타의 표면 개질제와 함께 더 피복되거나 포화되거나, 이들 둘 다를 행할 수 있다. 본 발명의 용도에 적합한 상기 표면 개질제에는 거대 분자를 변형시키지 않고 입자에 생리 활성 거대 분자를 포집 또는 결합시키는 것을 촉진

하는 물질을 포함한다. 표면 개질제로서 적합한 예는 미국 특허 제5,460,830호, 제5,462,751호, 제5,460,831호 및 제 5,219,577호에 기재되어 있다. 적합한 표면 개질제의 다른 예로는 미국 특허 제5,219,577호에 기재된 셀로비오스 또는 올리고뉴클레오티드 등의 염기성 당 또는 개질된 당이 있다. 또한, 적합한 표면 개질제에는 탄수화물, 탄수화물 유도체가 있고, 예를 들어, 미국 특허 제5,460,830호에 기재된 바와 같이 --OH 사이드기가 풍부한 탄수화물류를 함유하는 기타의 거대 분자가 적절한 표면 개질제로서 좋다.

인산칼슘 입자의 피복은 인산칼슘 코어 입자의 현탁액에 셀로비오스 또는 PEG (예를 들어, 약 292 mM) 등의 표면 개질제의 원액을 약 1 ml의 원액 대 약 20 ml의 입자 현탁액의 비율로 첨가함으로써 제조될 수 있다. 혼합물을 섞을 수 있고, 적어도 부분적으로 피복된 코어 입자를 형성하기 위하여 밤새 방치한다. 일반적으로, 상기 공정은 일부 부분적으로 피복되거나 피복되지 않은 입자가 존재하더라도, 입자의 피복을 실질적으로 완료시킬 것이다.

C. 인산칼슘 나노 입자를 이용하는 방법

본 발명은 또한 생리 활성 거대 분자를 필요로 하는 객체의 치료 방법으로서, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 인산칼슘 나노 입자를 함유하는 약학 조성물을 객체에게 투여하는 것을 포함한다.

본 발명의 조성물의 투여는 경구 투여, 정맥 투여, 흡입하여 투여, 동맥 투여, 근육 내 투여, 심장 내 투여, 뇌실 내 투여, 비경구 투여, 경막 내 투여, 그리고 복막 내 투여를 비롯한 당해 기술 분야에서 알려진 모든 방법일 수 있다.

정맥 등으로 전신에 투여되거나, 국소적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 나노 입자 및 약학 조성물은 필요로 하는 객체에게 투여될 수 있다. "객체"는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간이다. 포유류에는 농경용 가축 (소 등), 운동용 동물, 애완 동물 (고양이, 개, 말 등), 영장류, 마우스 및 래트가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

일부 실시 상태에 있어서, 약학 조성물은 인슐린으로 캡슐화된 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자를 포함한다. 약학 조성물은 당뇨병 또는 고혈당증을 치료하기 위하여 객체에게 용액, 캡슐, 알약 및 분말의 형태로 경구 투여될 수 있다.

일부 실시 상태에 있어서, 약학 조성물은 인터페론으로 캡슐화된 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자를 포함한다. 약학 조성물은 바이러스 감염, 암 및 자가 면역 질환을 치료하기 위하여 객체에게 용액, 캡슐, 알약 및 분말의 형태로 경구 투여될 수 있다.

일부 실시 상태에 있어서, 약학 조성물은 적혈구 생성 인자로 캡슐화된 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자를 포함한다. 약학 조성물은 빈혈 또는 적혈구치 상승을 치료하기 위하여 객체에게 용액, 캡슐, 알약 및 분말의 형태로 경구 투여될 수 있다.

일부 실시 상태에 있어서, 약학 조성물은 G-CSF로 캡슐화된 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자를 포함한다. 약학 조성물은 화학요법 또는 기타의 이유로 발생하는 호중성백혈구감소증을 치료하기 위하여 객체에게 용액, 캡슐, 알약 및 분말의 형태로 경구 투여될 수 있다.

일부 실시 상태에 있어서, 약학 조성물은 인간 성장 호르몬으로 캡슐화된 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자를 포함한다. 약학 조성물은 왜소증, 성인 성장 호르몬 결핍, 소모병 및 심각한 상처 등의 성장 호르몬의 보충을 필요로 하는 환경에 처하기 위하여 객체에게 용액, 캡슐, 알약 및 분말의 형태로 경구 투여될 수 있다.

일부 실시 상태에 있어서, 약학 조성물은 부갑상샘 호르몬 (PTH)으로 캡슐화된 장용 피복된 인산칼슘 입자를 포함한다. 약학 조성물은 객체에게 용액, 캡슐, 알약 및 분말의 형태로 경구 투여될 수 있다. 경구 PTH 조성물은 뼈다공증 또는 PTH 투여를 필요로 하는 다른 질환을 치료하기 위하여 사용될 수 있다.

본 발명의 입자는 알레르겐류 또는 기타의 항원 물질을 전달하는데 사용될 수 있다. 일부 실시 상태에 있어서, 약학 조성물은 알레르겐 또는 항원을 함유하는 캡슐화된 인산칼슘 나노 입자를 포함한다. 약학 조성물은 객체에게 객체 내의 면역 반응을 유발시키고, 객체에게 알레르겐의 방출을 조절하며, 객체 내의 알레르기 민감 소실을 유도하기 위하여 투여될 수 있다. 상기 입자는 피하 투여, 흡입을 통한 투여 또는 점막 표면을 관통하여 투여될 수 있다. 상기 입자는 스프레이, 분무 약제, 연고, 점안약, 젤, 현탁액, 캡슐, 좌약, 삽입용 탐폰 또는 이들의 조합으로 전달될 수 있다.

본 발명의 입자는 점막 면역 보호, 점막 백신 전달 또는 점막 약물 전달용으로 점막 표면에 생리 활성 거대 분자를 전달하는데 이용될 수 있다. 생리 활성 거대 분자의 비제한적인 예는 항원 물질, 천연 면역촉진 인자, 면역원성 폴리펩티드를 코

당하는 폴리뉴클레오티드 물질, 인슐린 등의 치료 약물 또는 점막 표면에 투여하는 경우 치료 효과를 나타낼 수 있는 기타의 모든 조성물 중 1개 이상을 포함한다. 입자는 모든 생리학적으로 허용 가능한 부형제와 복합시킬 수 있고, 경구, 폐내, 비강, 직장 또는 안구 등의 점막 표면을 통하여 투여될 수 있다.

본 발명의 입자는 안구 질환을 치료하기 위하여 안구 표면에 생리 활성 거대 분자를 전달하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료용 단백질 또는 펩티드 또는 치료 효과를 낼 수 있는 기타의 성분은 입자 내에 피포될 수 있고, 안구 표면에 투여될 수 있다. 안구 질환 또는 치료될 수 있는 조건으로 녹내장, 포도막염, 색소성 망막염, 황반 변성, 망막병증, 망막 혈관 질환 및 기타의 혈관 기형, 안구내염, 감염성 질환, 비감염 질환이 아닌 염증, 안구 허혈 증상, 주변 맥락 망막 변성, 망막 변성, 맥락막 장애 및 중양, 유리체 장애, 및 염증성 시각 신경병증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

다음의 실시예는 예시적인 목적으로만 기재되어 있고, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 인산칼슘 나노 입자는 본원에서 상세하게 서로 다른 실시예에서 제조될 수 있다. 다음의 비제한적인 실시예는 서로 다른 실시예의 전형적인 결과를 나타내고 있다.

실시예

실시예 1

인산칼슘 나노 입자가 부하된 소혈청 알부민 (BSA)의 제조

초음파 처리에 의한 인산칼슘 입자의 제조

200 밀리그램의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, MW 10000, 플루카), 23.2 mg의 BSA, 1 ml의 125 mM Na₂HPO₄, 3 ml의 BBS 용액 (1.4 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 12 mM 포도당, 275 mM NaCl 및 40 mM BES를 함유, pH 6.964)을 20 ml의 수용액에 용해시켰다. 상기 용액의 OD280은 0.615이었다. 진탕하면서, 0.3 ml의 2.5 M CaCl₂를 첨가하였다.

곧바로 침전이 일어났고, 밤새 실온에서 진탕하였다. 혼합물을 15분 동안 초음파 처리하고, 15분 동안 8000 rpm에서 스피ن 다운하였다. 수집된 입자를 진공 상태에서 건조시키고, 회수율을 측정하였다. 상청액의 OD280은 0.084이었다. 포집율은 다음의 식에 의하여 측정하였다.

$$\text{효율 (\%)} = [1 - \text{상청액의 OD280/개시 용액의 OD280}] \times 100$$

이 경우, 포집율은 86%이었다.

인산칼슘 입자로부터 BSA 방출 지수를 구하였다. 20.6 mg의 BSA로 부하된 인산칼슘 입자에 20 ml의 인산염완충식염수 (PBS)를 첨가하였다. 혼합 후에, 22 마이크로-원심관을 각각 0.8 ml의 알리코트로 세팅하였다. 모든 알리코트는 37°C에서 진동시켰다. 아래의 표 1에서 나타내는 각 시점에서, 알리코트 3개 튜브를 취하여 10분 동안 14000 rpm에서 스피ن 다운하였다. 상청액을 제거하고, OD280을 측정하였으며, 데이터는 표 1에 나타내었다. 인산칼슘 입자로부터 BSA 방출은 본질적으로 PBS 중에서 4-8시간 후에 완료되었다.

표 1

인산칼슘 입자로부터 BSA 방출 지수

시간 (시)	0.5	1	2	3	4	8	24
평균 OD280	0.059	0.089	0.154	0.159	0.183	0.193	0.174

초음파 처리 없이 BSA-부하된 인산칼슘 나노 입자의 제조

200 밀리그램의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, MW 10000, 플루카), 10 mg의 BSA, 1 ml의 125 mM Na₂HPO₄, 3 ml의 BBS 용액을 20 ml의 수용액에 용해시켰다. 상기 용액의 OD280은 0.350이었다. 진탕하면서, 0.3 ml의 2.5 M CaCl₂를 첨가하였다.

곧바로 침전이 일어났고, 입자를 15분 동안 8000 rpm에서 스핀 다운하여 회수하였다. 수집된 입자를 진공 상태에서 건조시켰다. 상청액의 OD280은 0.224이었고, 포집율은 36%이었다.

데옥시콜레이트의 존재하에 BSA-부하된 인산칼슘 나노 입자의 제조

200 밀리그램의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, MW 10000, 플루카), 10 mg의 BSA, 1 ml의 125 mM Na₂HPO₄, 3 ml의 BBS 용액 및 40 mg의 데옥시콜레이트를 20 ml의 수용액에 용해시켰다. 상기 용액의 OD280은 0.296이었다. 진탕하면서, 0.3 ml의 2.5 M CaCl₂를 첨가하였다.

곧바로 침전이 일어났고, 입자를 15분 동안 8000 rpm에서 스핀 다운하여 회수하였다. 수집된 입자를 진공 상태에서 건조시켰다. 상청액의 OD280은 0.084이었고, 포집율은 72%이었다.

상기 두 가지 실시예는 데옥시콜레이트가 동일한 조건 하에서 실질적으로 피복율을 촉진한다는 것을 나타낸다.

여과에 의한 BSA-부하된 인산칼슘 나노 입자의 제조

1그램의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG, MW 10000, 플루카), 40 mg의 BSA, 12 mM의 인산나트륨, pH 6.6, 및 160 mg의 소듐 데옥시콜레이트를 20 ml의 수용액에 용해시켰다. 데옥시콜레이트를 첨가 전에 1 ml의 에탄올에 용해시켰다. OD280은 1.349이었다. 진탕시키면서, 20 ml의 72 mM CaCl₂를 첨가하였다. 2분 후에, 혼합물을 20 nm의 아노디스크(Anodisc)막 상에서 여과하였다. 막을 진공 상태에서 건조시키고, 칼슘 나노 입자를 회수하였다. 여과액의 OD280은 0.142이고, 피포(披包)율은 82%이었다.

실시예 2

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자가 부하된 적혈구 생성 인자 (EPO)의 제작

EPO 시료 (1.2 mg/ml에서 1 ml)를 4 °C에서 밤새 1 L의 물에 투석하였고, 최종 부피는 1.3ml이었다. 400 mg의 PEG (MW 10000, 플루카), 1.3 ml의 EPO, 6 ml의 BBS, pH 6.964 및 2 ml의 125 mM Na₂HPO₄를 총 40 ml의 용액으로 혼합하였다. OD280은 0.070이었다. 진탕하면서, 600 ul의 2.5 M CaCl₂를 첨가하였다. 곧바로 침전하였고, 실온에서 1시간 동안 계속하여 진탕하였다.

상기 용액을 8000 g에서 10분 동안 스핀 다운하여, 입자를 수집하였다. 용액의 OD280은 0.033으로 측정되었고, 모든 입자를 진공 상태에서 건조시켰다. 포집율은 53%로 평가되었다.

EPO 부하된 인산칼슘 나노 입자를 0.5 ml의 10% 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트 상에서 아세톤:에탄올 (95:5)로 현탁하였다. 1.5 ml의 파라핀 오일을 첨가하고, 보텍스로 혼합한 후, 6 ml의 클로로포름을 첨가하였다. 입자를 왓만 여과지 (Chr 3mm)로 회수하고, 클로로포름으로 세척하였다. 입자를 진공 상태에서 건조시키고, 균일한 크기로 분쇄하였다.

EPO 부하는 인산칼슘 나노 입자로 피복된 1 mg의 입자를 취함으로써 측정하였고, 실온에서 4시간 동안 0.5 ml의 PBS 상에서 재현탁시켰다. 14000 rpm에서 스핀 다운한 후에, 상청액 중의 EPO 농도를 공업용 ELISA 키트 (R&D 시스템)로 측정하였다. EPO 부하는 3600 IU/mg이었다.

실시예 3

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 적혈구 생성 인자의 생체 내 활성화

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 EPO 활성을 보통 Balb/c 마우스 중에서 적혈구 용적률을 측정함으로써 평가하였다.

동물. 9마리의 6-8주령 암컷 Balb/C 마우스를 환기되는 우리에 넣었다. 음식과 물을 리브리움으로 공급하였다. 광주기를 매 12시간으로 세팅하였다.

처리. 임의로 3마리의 마우스를 한 개의 그룹으로 하여 세 그룹으로 나누었다. 매개군(vehicle group)을 0.5 ml의 매개 (vehicle) 용액(10 mM 아세트산 나트륨, pH 4.0)로 5일 동안 매일 한 번씩 가비지(gavage)하였다. 피하 (SC) 주사군을 5일 동안 날마다 한 번씩 매개제 중에서 50 IU EPO로 주사하였다. 구강 그룹은 5일 동안 매일 한 번씩 0.5 ml의 매개제 중에서 1000 IU EPO로 가비지(gavage)하였다. 2일째에 모든 마우스에 10 mg의 철분 텍스트란을 주사하였다. 10일째에, 혈액 시료를 눈 뒤를 뚫어 추출하고, 모세 시험관을 혈액 시료를 수집하는데 사용하였다. 모세 시험관을 3000 rpm에서 20 분 동안 스피ن 다운하였고, 적혈구 용적률 (HCT)은 총 혈액 중 적혈구의 비율로 계산하였다. 그 결과를 아래의 표 2에 나타 내었다. 양방적이고 비평등한 (Two-tailed and unequal) 분산 t-테스트는 엑셀 스프레드시트 프로그램 중에서 빌트-인 기능으로 수행되었다.

표 2

동물에서의 HCT 값

그룹	동물 수	HCT	매개제와의 비교치
매개제	3	0.51±0.01	
SC	3	0.52±0.02	0.41
구강	3	0.55±0.01	<0.05

상기 데이터는 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내에 구강 전달된 EPO가 활성이고, HCT 값이 현저하게 증가 된 것을 나타내는 것이다.

실시에 4

인산칼슘 나노 입자가 부하되고 장용 피복된 과립 세포군 촉진 인자 (G-CSF)의 제작

데옥시콜레이트의 피막화와 생리 활성의 이중 효과는 다음의 두 가지 실시예에 나타나 있다.

데옥시콜레이트 부존재하에 인산칼슘 나노 입자가 부하된 G-CSF의 제작

1.9 mg/ml의 시료에서 20 ml G-CSF를 4 °C에서 밤새 3L의 물에 투석하였고, 최종 G-CSF 농도는 1.5 mg/ml이었다. 200 mg의 PEG (MW 10000, 플루카), 2.5 ml의 G-CSF, 3 ml의 BBS, pH 6.964 및 1 ml의 125 mM Na₂HPO₄를 혼합하고, 20 ml의 증류수에 적용하였다. OD280은 0.145이었다. 진탕하면서, 300 ul의 2.5 M CaCl₂를 첨가하였고, 곧바로 침전 하였다. 실온에서 10분 동안 계속하여 진탕하고, 입자를 10분 동안 폴리트론 균질기로 균질화하였으며, 8000 g에서 10분 동안 스피ن 다운하여 입자를 수집하였다. 상청액의 OD280은 0.033이고, 캡슐화 효율은 77%이다. 입자는 진공 상태에서 건조시켰다.

G-CSF 부하된 인산칼슘 나노 입자를 장용 고분자 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트로 피복하였다. 17 mg의 입자를 아세테이트 프탈레이트 상에서 95:5 아세톤:에탄올로 현탁하였다. 보텍스로 혼합한 후, 20 ml의 파라핀 오일을 진탕하면서 첨가하고, 7.5 ml의 클로로포름을 1분 후에 첨가하였다. 피복된 입자를 와트만 여과지 (Chr 3mm)로 여과하여 회수하고, 클로로포름으로 세척하였다. 입자를 진공 상태에서 건조시키고, 균일한 크기로 분쇄하였다.

데옥시콜레이트의 존재하에 G-CSF 부하된 인산칼슘 입자의 제작

200 mg PEG (MW 10000, 플루카), 2.5 ml GCSF, 65.9 mg 데옥시콜레이트, 3 ml BBS 용액, pH 6.964 및 1 ml의 125 mM Na₂HPO₄를 용해시켜 20 ml로 하였다. 데옥시콜레이트를 첨가 전에 1 ml의 에탄올에 용해시켰다. OD280은 0.106이었다. 진탕시키면서, 300 ul의 2.5M CaCl₂를 첨가하였고, 곧바로 침전이 일어났다. 10분 동안 계속 진탕하면서, 입자를 5 분 동안 폴리트론 균질기로 균질화하였으며, 8000 g에서 10분 동안 스피ن 다운하여 입자를 회수하였다. 상청액의 OD280은 0.008이고, 캡슐화 효율은 92%이다. 입자는 진공 상태에서 건조시켰다.

G-CSF 부하된 인산칼슘 나노 입자를 장용 고분자 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트로 피복하였다. 58 mg의 입자를 1.2 ml의 5% 아세테이트 프탈레이트 상에서 95:5 아세톤:에탄올로 현탁하였다. 보텍스로 혼합한 후, 20 ml의 파라핀 오일을 진탕하면서 첨가하고, 7.5 ml의 클로로포름을 1분 후에 첨가하였다. 피복된 입자를 와트만 여과지 (Chr 3mm)로 여과하여 회수하고, 클로로포름으로 세척하였다. 피복된 입자를 진공 상태에서 건조시키고, 분쇄하였다.

실시예들은 입자가 테옥시콜레이트의 존재하에 제조되는 경우 포집율이 현저하게 개선될 수 있다는 것을 증명하였다.

실시예 5

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 G-CSF의 생체 내 활성

구강 G-CSF의 활성을 보통 Balb/C 마우스에 처리한 후의 백혈구 수를 세어 측정하였다.

동물. 18마리의 6-8주령 암컷 Balb/C 마우스를 환기되는 우리에 넣었다. 음식과 물을 리브리움으로 공급하였다. 광주기를 매 12시간으로 세팅하였다.

처리. 마우스를 임의로 4개의 그룹으로 나누었다. 매개군과 SCG군은 각각 4마리의 마우스를, CAP군과 CAPD군은 각각 5마리의 마우스로 하였다. 매개군은 0.5 ml의 10 mM NaAc, pH 4.0으로 처리하였다. SCG는 매개제로 100 ug/kg G-CSF을 0.1 ml 피하 주사하였다. CAP군은 2 mg/kg G-CSF에서 1 ml의 매개제로 장용 피복된 인산칼슘 입자 내에 구강 G-CSF로 처리하였다. CAPD는 테옥시콜레이트의 존재하에 제조된 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 G-CSF이다. 복용량은 CAP군과 같다.

마우스를 4일 동안 매일 처리하고, 혈액 시료를 5일 째에 추출하여 백혈구의 총 수를 측정하였다. 적혈구를 용해시키고, 총 백혈구 수를 현미경을 이용하여 측정하였다. 데이터는 t-테스트의 빌트-인 기능을 가지는 엑셀 스프레드시트 프로그램을 이용하여 분석하였다.

표 3

총 백혈구 수의 측정

군	동물 수	WBCx 10^6	P vs V	p vs SCG
매개	4	3.36±0.82		
SCG	4	5.40±0.76	<0.05	
CAP	5	5.74±0.24	<0.05	0.64
CAPD	5	7.42±0.75	<0.01	<0.05

상기 데이터는 주사된 G-CSF와 구강 운반된 G-CSF의 백혈구 수가 현저하게 높다는 것을 나타낸다. 또한, 테옥시콜레이트의 존재하에 제조된 인산칼슘 나노 입자는 G-CSF 활성을 더 나타내고, 테옥시콜레이트가 없는 경우보다 백혈구 수가 더 높다.

실시예 6

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 G-CSF의 생물학적 동등성(Bio-Equivalency)

동물. 10마리의 8-10주령 난소 적출 래트(Sprague-Dawley rat)를 환기되는 우리에 넣었다. 음식과 물을 리브리움으로 공급하였다. 광주기를 매 12시간으로 세팅하였다.

처리. 임의로 래트를 2 마리의 매개군 (V), 4마리의 주사군 (G) 및 구강 G-CSF 처리군 (D)의 세 그룹으로 나누었다. 처리 일람표 하기의 표 4에 기재하였다. V는 10 mM NaAc, pH 4.0의 매개군이고, G는 피하 주사군이다. D는 테옥시콜레이트의 존재하에 제조된 장용 피복된 인산칼슘 입자 내의 구강 G-CSF이다.

표 4

처리 일람표

군	경로	부피	복용량
V	구강	1 ml	
G	피하	100 ul	200 ug/kg
D	구강	1 ml	2 mg/kg

래트를 처리하고, 혈액 시료를 미리 계획된 시점인 0, 4, 8, 12 및 26 시간째에 추출하였다. 적혈구를 용해시키고, 총 백혈구 수를 현미경을 이용하여 측정하였다.

도 1은 각 시점에서의 백혈구 수를 나타낸다. 주사된 G-CSF와 구강 전달된 G-CSF에 대한 커브 아래의 면적을 측정하였고, 구강 전달된 G-CSF의 생물학적 동등성은 피하 경로의 8.5%로 평가되었다.

실시예 7

인산칼슘 나노 입자가 부하된 장용 피복된 인터페론 알파(IFN)의 제작

400 mg PEG (MW 10000, 플루카), 1.3 ml IFN, 6 ml BBS 용액, pH 6.964 및 2 ml 125 mM Na₂HPO₄를 총 40 ml의 수용액으로 혼합하였다. OD280은 0.082이었다. 진탕하면서, 600 ul의 2.5 M CaCl₂를 첨가하더니, 곧바로 침전이 일어났다. 실온에서 10분 동안 계속하여 진탕하고, 입자를 10분 동안 초음파 처리하고, 8000 g에서 10분 동안 스피ن 다운하였다. 상청액의 OD280은 0.033이었다. 캡슐화 효율은 60%이다. 입자는 진공 상태에서 건조시키고, 35.2 mg의 입자를 회수하였다.

인산칼슘 나노 입자가 부하된 IFN을 장용 고분자 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트로 피복하였다. 32mg의 입자를 640 ul 5% 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트 상에서 95:5 아세톤:에탄올로 현탁하였다. 보텍스로 혼합한 후, 20 ml의 파라핀 오일을 진탕하면서 첨가하고, 7.5 ml의 클로로포름을 1분 후에 첨가하였다. 피복된 입자를 왓만 여과지 (Chr 3mm)로 여과하여 회수하고, 클로로포름으로 세척하였다. 입자를 진공 상태에서 건조시키고, 분쇄하였다.

실시예 8

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 IFN의 생체 이용률 (Bio-Availability)

동물. 2마리의 8-10주령 난소 적출 래트(Sprague-Dawley rat)를 환기되는 우리에 넣었다. 음식과 물을 리브리움으로 공급하였다. 광주기를 매 12시간으로 세팅하였다.

처리. 한 마리의 래트를 100 ul 10 mM NaAc, pH 4.0의 피하 주사를 통하여 1.6백만 IU IFN를 처리하였다. 다른 래트는 1 ml의 매개 용액 중의 인산칼슘 입자 내에 16백만 IU IFN로 가비지하였다.

혈액 시료를 미리 계획된 시점인 -0.5, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24시간째에 추출하였다. 혈청을 ELISA 분석을 위하여 저장하였다.

도 2는 각 시점에서의 혈청 IFN 수준을 나타낸다. 주사된 IFN와 구강 전달된 IFN에 대한 커브 아래의 면적을 측정하였고, 구강 전달된 IFN의 생체 이용률은 피하 경로의 10.2%로 평가되었다.

실시예 9

인산칼슘 나노 입자가 부하된 장용 피복된 인슐린의 제작

후물린(Humulin; 엘리 릴리)을 약국에서 구입하였다. 180 ml의 인슐린 시료 (642 mg)를 세파텍스 G-25 컬럼 (4.6 cm x 100 cm, 1.7 L 베드 부피)와 함께 증류수로 교체하였다. OD280을 관찰하고, 제1 최고점 (first peak)을 수집하였다. 총 300 ml 시료를 회수하였고, OD280은 2.022이었다.

5 g PEG (MW 10000, 플루카), 600 mg 인슐린, 1.6 g 데옥시콜레이트, 40 ml BBS 용액, pH 6.964, 19.2 ml의 125 mM Na₂HPO₄를 총 40 ml의 수용액으로 혼합하고, 증류수로 400 ml로 조절하였다. 데옥시콜레이트를 첨가 전에 10 ml 에탄올로 용해시켰다. OD280은 1.868이었다. 진탕하면서, 600 ul의 2.5 M CaCl₂를 첨가하더니, 곧바로 침전이 일어났다. 데옥시콜레이트를 첨가 전에 10 ml의 에탄올에 용해시켰다. OD280은 1.868이었다. 진탕시키면서, 400 ml의 36 mM CaCl₂를 혼합하고, 생성된 입자를 20 nm의 아노디스크(Anodisc)막 상에서 곧바로 여과하였다. 여과액의 OD280은 0.022이고, 피포(披包)율은 98.2%이었다. 입자를 진공 상태에서 건조시켰고, 회수된 총 입자량은 1.8 g이었다.

블랭크(blank) 나노 입자를 단백질 성분의 결핍을 제외하고는 동일한 공정에 의하여 제조하였다. 인산칼슘 나노 입자로 부하된 인슐린과 블랭크 인산칼슘 나노 입자로 부하된 인슐린 모두를 재료 실험 연구실 (Material Testing Labs)에서 주사식(走査式) 전자 현미경 (SEM)에 놓았다. SEM의 이미지를 도 3A 및 도 3B에 나타냈다. 블랭크 인산칼슘 나노 입자는 평균 직경 200 nm의 구형, 단분산(單分散)형 및 오목형이었다 (도 3A). 대조적으로, 인산칼슘 나노 입자가 부하된 인슐린은 평균 직경 약 70 nm의 구형과 단분산형태였다 (도 3B).

장용피(enteric coating)의 경우 0.5 g의 인산칼슘 나노 입자가 부하된 인슐린을 0.5 g의 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트를 함유하는 5 ml 아세톤:에탄올 (95:5)로 현탁하였다. 혼합 후, 15 ml의 파라핀 오일을 첨가하고 혼합한 후, 50 ml의 클로로포름을 첨가하였다. 입자를 와트만 여과지 (Chr 3mm)로 수집하고, 클로로포름으로 세척하였다. 입자는 진공 상태에서 건조시키고, 균일한 크기로 분쇄하였다. 인슐린 농도는 실온에서 3시간 동안 1 ml의 PBS 내에 입자 1 mg으로부터 방출 인슐린을 취하여 측정하였다. 14000 rpm에서 스핀 다운한 후에, 상청액 중의 EPO 농도를 공업용 ELISA 키트 (R&D 시스템)로 측정하였다. EPO 부하는 3600 IU/mg이었다. 표준적으로 인슐린을 포함하는 로우리 단백질 분석법 (Lowry protein assay)을 방출 매질 내의 인슐린 농도를 측정하는데 이용하였다.

실시에 10

장용피 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 인슐린의 생물학적 동등성

동물 모델. 35마리의 8-10주령 난소 적출 래트를 환기되는 우리에 넣었다. 음식과 물을 리브리움으로 공급하였다. 광주기를 매 12시간으로 세팅하였다.

래트에 20 mM 구연산 완충액 중의 스트렙토조신 60 mg/kg을 복강내 주사하고, pH 4.5. 1 ml의 5% 포도당을 스트렙토조신 이후 8시간째에 복강 내 주사하였다. 2주 후, 공복 혈당 수준을 측정하였다. 공복 혈당은 24 마리의 래트 중에서 >300 mg/D이었고, 이들은 후속 실험에 이용하였다.

처리. 임의로 16마리의 래트를 세 그룹으로 나누었다. 인슐린 용액군 (OI-50, "대조")과 인슐린 주사군 (SCI-5, "주사") 양쪽은 각각 4마리의 당뇨병 래트로 이루어졌다. 처리군 (PO-50, "구강")은 8 마리의 래트로 이루어졌다. 대조군은 0.5 ml의 매개 용액 중에서 50IU 인슐린/kg을 구강으로 주입하였다. 주사군은 0.5 ml의 매개체 중 5 IU 인슐린/kg을 피하 주사하였다. 구강군은 0.5 ml의 매개 용액 중 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내에 형성된 50 IU 인슐린/kg을 구강으로 주입하였다. 매개 용액은 10 mM 아세트산, pH 4.0 중 2% 카르복시메틸-셀룰로오스이었다.

표 5

인슐린 처리 일람표

군	경로	동물 수	부피	복용량
OI-50 (대조)	구강	4	0.5 ml	50 IU/kg
SCI-5 (주사)	피하	4	0.5 ml	5 IU/kg
PO-50 (구강)	구강	8	0.5 ml	50 IU/kg

밤새 공복 후에, 래트를 처리하고, 0, 1, 3, 6, 12 및 24시간이 되는 시점에서 꼬리 정맥을 통하여 혈액 시료를 추출하였다. 혈당을 글루코미터 (슈어스텝)로 측정하였다.

도 4는 당뇨병 래트에 구강 또는 피하 인슐린으로 처리한 후에 각 시점에서 혈당 변화의 백분율을 나타낸다. 피하 인슐린은 혈당 수준을 빠르게 경감시키고, 12시간 이내에 정상 수치로 회복된다. 인산칼슘 입자로 전달되는 구강 인슐린은 좀 더 완만하고, 혈당 감소율이 긴 것을 나타낸다. 구강 인슐린의 생물학적 동등성은 피하 인슐린에 비하여 12%이었다.

실시에 11

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 인슐린에 의한

건강 지원자의 혈당 감소

장용 피복된 인산칼슘 입자 내의 구강 인슐린의 활성을 측정하기 위하여, 두 명의 건강한 인간 지원자를 실험하였다. 표준 포도당 견딤 검사를 수행하였다. 각 지원자는 12시간 이상 금식하였고, 68 g의 포도당을 주입하였다. 포도당 주입과 관련하여 -30, 0, 30, 60, 90, 120, 150 및 180분 되는 시점에 슈어스텝 글리코미터로 혈당을 측정하였다. 측정의 두 가지 주기를 각 지원자에게 수행하였다. 제1 주기는 바세린을 도포하여 표준 포도당 견딤 검사를 하는 것이다. 각 지원자는 제2 측정 주기 동안 -30분째에 장용 피복된 인산칼슘 입자 내의 200U 구강 인슐린을 취하였다.

첫 번째 지원자의 혈당 변화를 도 5A에 나타냈다. 장용 피복된 인산칼슘 입자를 통하여 전달된 구강 인슐린은 혈당 최고치 및 최저치 모두 감소하였다.

두 번째 지원자의 혈당 변화 백분율을 도 5B에 나타냈다. 장용 피복된 인산칼슘 입자를 통하여 전달된 구강 인슐린은 혈당 최고치가 감소하고, 측정 기간 전체를 통하여 혈당 커브가 저하되었다.

상기 연구는 장용 피복된 인산칼슘 입자 내의 구강 인슐린이 인간 피검자 내의 활성이 있고, 혈당을 감소시킬 수 있음을 나타낸다. 측정 기간 동안 어떠한 부작용도 기록되지 않았다.

실시에 12

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 인슐린에 의한

당뇨병 환자의 공복 혈당 대조

장용 피복된 인산칼슘 입자 내의 구강 인슐린의 유용성은 당뇨병 환자에게 더 평가하여 보았다. 혈당 수준을 조절하기 위하여 정기적으로 인슐린으로 치료받는 19명의 유형 II 당뇨병 환자가 본 연구에 지원하였다. 평가의 세 가지 주기를 각 환자에게 수행하였다.

제1 주기에서, 각 환자는 12시간 이상 금식하였다. 혈당 수준을 다음날 아침에 매 30분마다 측정하였다. 이번 주기에서 바삭함을 마련하기 위한 치료는 수행하지 않았다.

제2 주기에서, 각 환자는 12시간 이상 금식하였다. 혈당 수준을 다음날 아침에 매 30분마다 측정하였다. 슈어스텝 글리코미터로 혈당 수준을 측정하였다. 각 환자는 이번 주기에서 0인 시점에 10 IU 후물린 피하 주사하였다.

제3 주기에서, 각 환자는 12시간 이상 금식하였다. 혈당 수준을 다음날 아침에 매 30분마다 측정하였다. 슈어스텝 글리코미터로 혈당 수준을 측정하였다. 장용 피복된 인산칼슘 입자 내에 100IU 또는 200IU 구강 인슐린을 각 환자에게 이번 주기에서 0인 시점에 주입하였다.

각 환자의 순서를 무작위로 하고, 구강 인슐린 측정 후에서 다음 주기 전의 세척 기간은 48시간이었다. 연구 후에, 기초 자료로서 17명의 환자가 유용하였고, 19명의 환자를 인슐린 주사에 대한 자료로서, 6명의 환자가 100 IU 구강 인슐린 치료에 대한 자료로서, 그리고 11명의 환자를 200 IU 구강 인슐린 치료에 대한 자료로서 활용하였다.

측정된 각 주기의 혈당 변화의 백분율을 도 6에 나타냈다. 치료하지 않은 경우, 혈당 수준은 올라갔고, 관찰 기간 도안 비교적 안정한 상태를 유지하였다. 인슐린을 주입한 경우에는 혈당이 현저하게 감소하였다. 사실, 7명의 환자는 저혈당증으로

발견하였고, 그들의 혈당 수준은 50 mg/dL 아래로 떨어졌으며, 구강 포도당으로 치료받아야 했다. 대조적으로, 100 IU 또는 200 IU 구강 인슐린을 취한 환자는 기초 자료와 비교하여 혈당 수준이 만족할만큼 현저하게 완만한 감소를 보였고, 저혈당증은 관찰되지 않았다. 또한, 200 IU 구강 인슐린으로 치료한 환자는 혈당이 더욱더 감소하였다.

이번 연구는 장용 피복된 인산칼슘 입자 내의 구강 인슐린이 당뇨병 환자의 혈당 수준을 복용량에 따라 효과적으로 조절할 수 있음을 보여주는 것이다.

실시예 13

인산칼슘 나노 입자 내에 부하된 장용 피복된 인간 성장 호르몬 (hGH)의 제작

hGH 시료를 세파텍스 G-25 제염(除鹽) 컬럼과 함께 증류수로 교체하였다. hGH의 양은 OD280 측정하여 계산하고, 광학 계수는 0.68이었다. 200 mg PEG (MW 10000, 플루카), 84 mg hGH, 12 mM 인산염 및 320 mg 테옥시콜레이트를 40 ml의 용액으로 용해하였다. 측정된 OD280은 1.307이었다. 진탕하면서, 40 ml의 72 M CaCl₂를 혼합하고, 20 nm의 아노디스크(Anodisc)막 상에서 여과하여 바로 침전시켰다. 여과액의 OD280은 0.039이었다. 입자를 진공 상태에서 건조시켰고, 포집율은 입자 생성 전후의 OD280 측정치에 의거할때 95%이었다.

장용피(enteric coating)의 경우 인산칼슘 나노 입자가 부하된 300 mg의 hGH을 95:5 아세톤:에탄올인 4 ml 10% 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트로 현탁하였다. 혼합 후, 6 ml의 파라핀 오일을 첨가하고 혼합한 후, 18 ml의 클로로포름을 첨가하였다. 입자를 와트만 여과지 (Chr 3mm)로 수집하고, 클로로포름으로 세척하였다. 입자는 진공 상태에서 건조시키고, 균일한 크기로 분쇄하였다. hGH 농도는 1 ml의 PBS에 1 mg의 입자를 첨가하고, 실온에서 3시간 동안 인큐베이션시켜 측정하였다. 표준적으로 hGH을 포함하는 로우리 단백질 분석법을 방출 매질 내의 hGH 농도를 측정하는데 이용하였다.

실시예 14

장용피 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 인간 성장 호르몬에 의한 체중 증가 촉진

장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 hGH의 활성을 뇌하수체를 제거한 래트에 대하여 성장 호르몬 활성의 표준 분석법으로 실험하였다.

동물 모델 뇌하수체 절제 수술 (타코닉 팜스)을 행한 20마리의 6주령 난소 적출 래트를 환기되는 우리에 넣었다. 음식과 물을 리브리움으로 공급하였다. 광주기를 매 12시간으로 세팅하였다. 각 래트의 체중을 매일 관찰하였다.

처리. 임의로 20마리의 래트를 세 그룹으로 나누었다. 매개군과 주사군은 각각 4마리의 래트로 이루어졌다. 처리군은 12마리의 래트로 이루어졌다. 매개군은 파라핀 오일로 처리하였다. 래트는 매일 아침 처리하고, 그날 저녁 체중을 측정하였다.

표 5

hGH 처리 일람표

군	경로	동물 수	부피	복용량
V	구강	4	0.5 ml	
SC20	피하	4	0.5 ml	20 ug/래트/일
P050	구강	12	0.5 ml	50 ug/래트/일

도 7은 뇌하수체를 제거한 래트 내의 구강 또는 피하 hGH로 처리한 후의 순체중 증가를 나타낸 것이다. 피하 hGH는 실질적인 순체중 증가를 나타낸 반면, 매개 처리군은 체중이 다소 감소하였다. 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자로 전달된 구강 hGH는 체중이 현저하게 증가하여, 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 구강 hGH가 생물학적으로 활성을 가짐을 나타냈다.

실시예 15

인산칼슘 나노 입자가 부하된 부갑상샘 호르몬 (PTH)의 제작

부갑상샘 호르몬 1-34 (PTH)을 세파텍스 G-25 제염(除鹽) 컬럼과 함께 증류수로 교체하였다. 400 mg PEG (MW 10000, 플루카), 6 ml BBS 용액, pH 6.964 및 2 ml 125 mM의 Na_2HPO_4 를 총 40 ml의 용액으로 혼합하였다. OD280은 0.082이었다. 진탕하면서, 600 ul의 2.5 M CaCl_2 를 첨가하였다. 곧바로 침전이 일어났고, 입자를 10분 동안 8000 rpm에서 스핀 다운하였다. 상청액의 OD280은 0.033이었다. 입자를 진공 상태에서 건조시켰다. 포집율은 36%이었다. 포집율은 입자 생성 전후의 OD280 측정치에 의거할때 59%이었다.

실시예 16인산칼슘 나노 입자가 부하된 다당류 & BCG의 핵산 추출액의 제작

칼메트-구에린 간균 (BCG-PSN)의 다당류 및 핵산 추출액은 면역 조절 작용을 한다. BCG-PSN은 다당류와 핵산 추출액을 둘 다 함유하며, 화합물의 상기 분류 내의 인산칼슘 나노 입자의 유용성을 증명하기 위하여 사용된다.

BCG-PSN은 쉹두 룡생 파마스티칼 엘티디. (쉹두, 중국)으로부터 분말 형태로 얻었다. 1 mg BCG-PSN, 50 mg PEG (플루카, MW 10000), 0.25 ml BBS, pH 6.964 및 0.75 ml 125 mM Na_2HPO_4 를 총 20 ml의 용액으로 혼합하였다. OD260은 0.22이고, 다당류 함량은 안트론 방법 (Anthrone method)에 의하여 측정하였다.

진탕하면서, 75 ul의 5 M CaCl_2 를 첨가하였고, 실온에서 1시간 동안 계속하여 진탕하였다. 입자를 8000 g에서 10분 동안 스핀 다운하였다. 상청액의 OD280은 0.0이고, 다당류 함량은 22.1 ug/ml이었다. 캡슐화 효율은 핵산 성분에 대하여 100%이고, 다당류 성분에 대하여 약 63%이었다. 입자를 진공 상태에서 건조시켰다.

상기 실시예는 예시적인 목적이고, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다. 전술한 실시예의 수 많은 변화가 가능하다. 전술한 실시예에 대한 변형 및 변화가 당업계에서 숙련된 자에게 명백하기 때문에, 본 발명은 청구범위에 의하여만 제한되는 것으로 한다.

[참조 문헌]

U.S. 특허 No. 3,925,545; 4016252; 4350686; 4500512; 4552756; 5178882; 5219577; 5306508; 5334394; 5364838; 5460830; 5460831; 5462750; 5462751; 5464634; 5506203; 5549973; 5580859; 5593875; 5595762; 5620896; 5629021; 5641515; 5648097; 5695617; 5747001; 5785975; 5827822; 5866553; 5891420; 5898028; 5902789. FR 특허 Nos.7212036; 7924948. GB 특허 No.1422973. PCT WO 90/11092; WO 93/17706; WO 93/24640; WO98/35562; WO00/15194; WO 00/46147.

Academic Press Dictionary of Science and Technology. <http://www.harcourt.com/dictionary/def/2/2/3/1/2231200.html>, Nov. 2000.*

Abstracts of Papers Presented at the 1992 meeting on Modern Approaches to New Vaccines, Including Prevention of AIDS, Cold Spring Harbor, Vaccine 11: 92 (1993).

Aldovini and R. A. Young, "Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines," Nature 351: 479-482 (1991).

Ascadi et al., "Human dystrophin expression in mdx mice after 근육내 injection of DNA constructs," Nature 352: 815-818 (1991).

Bartus et al., "Sustained Delivery of Proteins for Novel Therapeutic Products," Science, 281(5380): 1161-1162 (1998).

- Bastin, et al., "Use of Synthetic Peptides of Influenza Nucleoprotein to Define Epitopes Recognized by Class I-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes," *J. Exp. Med.*, 165(4): 1508-1523 (1987).
- Benvenisty, N., and Reshef, L. *PNAS* 83, 9551-9555, (1986).
- Bennink and J. W. Yewdell, "Recombinant Vaccinia Viruses as Vectors for Studying T Lymphocyte Specificity and Function," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 163:153-184 (1990). Carbone and Bevan, "Induction of 타원형 bumin-specific cytotoxic T cells by in vivo peptide immunization," *J. Exp. Med.*, 169(1): 603-612 (1989).
- Collins et al., "Processing of exogenous liposome-encapsulated antigens in vivo generates class I MCH-restricted T cell responses," *J. Immunol.*, 148(11): 3336-3341 (1992). Cooney et al., "Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein," *Lancet*, 337: 567-572 (1991).
- Cox et al., "Bovine Herpesvirus 1: Immune Responses in Mice and Cattle Injected with Plasmid DNA," 1993, *J. Virol.*, 67(9): 5664-5667.
- Deres, et al., "In vivo priming of virus-specific cytotoxic T-lymphocytes with synthetic lipoprotein vaccine," *Nature*, 342: 561-564 (1989).
- Donnelly et al., "DNA Vaccines," *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 617-648 (1997).
- Edgington, "Turning On Tumor-Fighting T-Cells," *Biotechnology*, 11:1117-1119 (1993).
- Edwards et al., *Science*, 276:1868 (1997).
- Friedman, T., "Progress toward human gene therapy," *Science*, 244, 1275-1281 (1989).
- Furth et al., "Gene Transfer into Somatic Tissues by Jet Injection," *Analytical Biochemistry*, 205(2): 365-368, (1992).
- Gardner et al., "Cell-mediated cytotoxicity against ectromelia virus-infected target cells," *Eur. J. Immunol.*, 4: 68-72 (1974).
- Goto et al., "Local tissue irritating effects and adjuvant activities of 칼슘 phosphate and aluminum hydroxide with different physical properties," *Vaccine*, 15(12/13):1364-1371 (1997).
- Hahn et al., "Infectious Sindbis virus transient expression vectors for studying antigen processing and presentation," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 2679-2683 (1992).
- Hansen et al., *FEBS Lett.* 290, 73 (1991).
- Jiao et al., *Hum. Gene Therapy* 3, 21 (1992) *.
- Kato et al., "Relationship between Hemolytic Activity and Adsorption Capacity of Aluminum Hydroxide and 칼슘 Phosphate as Immunological Adjuvants for Biologicals," *Microbiol. Immunol.*, 38(7): 543-548 (1994).
- Kitsis et al., "Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88: 4138-4142 (1991).
- Lin et al., "Expression of Recombinant Genes in Myocardium In Vivo after Direct Injection of DNA," *Circulation* 82 (6): 2217-2221 (1990).

- Lin and Askonas, "Biological properties of an influenza A virus-specific killer T cell clone," *J. Exp. Med.* 154(1): 225-234 (1981).
- Maniatis, et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1.0-19.0 (1989).
- Mascola et al., "Surveillance of Listeriosis in Los Angeles County, 1985-1986," *Arch. Intern. Med.*, 149(7): 1569-1572 (1989).
- McMichael et al., "Cytotoxic T-Cell Immunity to Influenza," *New Engl. J. Med.*, 309(1): 13-17 (1983).
- McMichael et al., "Recognition of Influenza A virus Nucleoprotein by human cytotoxic T lymphocytes," *J. Gen. Virol.*, 67: 719-726 (1986).
- Miller, "Retroviral Vectors," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 3-24 (1992).
- Montgomery, D. L. et al., 1993, *Cell Biol.*, 12, pp. 777-783. *.
- Redfield et al., "Disseminated Vaccinia in a Military Recruit with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Disease," *New Engl. J. Med.*, 316(11): 673-676 (1987).
- Robinson et al., "Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA," *Vaccine* 11(9): 957-960 (1993).
- Sato et al., "Immunostimulatory DNA Sequences Necessary for Effective Intradermal Gene Immunization," *Science* 273: 352-354 (1996).
- Schafer et al., "Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine," *J. Immunol.*, 149(1):53-59 (1992).
- Service, *Science* 277:5330 (1997).
- Stover et al., "New use of BCG for recombinant vaccines," *Nature* 351: 456-460 (1991).
- Takahashi et al., "Induction of CD8 cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs," *Nature*, 344: 873-875 (1990).
- Tang et al., "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response," *Nature*, 356: 152-154 (1992).
- Taylor and Askonas, "Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo," *Immunol.*, 58(1): 417-420 (1986).
- Townsend, "Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes," *Annu. Rev. Immunol.*, 7: 601-624 (1989).
- Townsend et al., "The Epitopes of Influenza Nucleoprotein Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes Can Be Defined with Short Synthetic Peptides," *Cell* 44: 959-968 (1986).
- Ulmer, J. B. et al., "Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein," *Science*, 259: 1745-1749 (1993).
- Wang et al., "Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type I," *P.N.A.S. USA* 90: 4156-4160 (May, 1993).

Wang, et al., "Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with 칼슘- or aluminum phosphate," Vaccine, 18: 1227-1235 (2000).

Weiner et al., "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization," PNAS (USA) 94(19): 10833-10837 (1997).

Wolff et al., "Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle," Human Mol. Genet. 1(6): 363-369 (1992).

Wolff et al., "Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo," Science 247: 1465-1468 (1990).

Yap and Ada, "Transfer of specific cytotoxic T lymphocytes protects mice inoculated with influenza virus," Nature, 273: 238-239 (1978).

Yewdell et al., "Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 1785-1789 (1985).

Zhu et al., "Systemic Gene Expression After 정맥 DNA Delivery into Adult Mice," Science 261: 209-211 (1993).

도면의 간단한 설명

도 1은 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 ("D") 내에 매개제 ("V"), G-CSF 피하 주사 ("G") 또는 구강 G-CSF를 처리한 래트 내의 백혈구 수를 나타낸 그래프이다.

도 2는 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 ("O16M") 내의 인터페론 피하 주사 ("SC1.6M") 또는 구강 인터페론으로 처리한 후에 래트 내의 혈청 인터페론 농도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 주사식 전자 현미경 하에서 인산칼슘 나노 입자의 이미지를 나타낸 것이다. 도 3A는 블랭크 인산칼슘 나노 입자의 이미지를 5000배 확대하여 나타낸 것이다. 도 3B는 인산칼슘 나노 입자가 부하된 인슐린의 이미지를 5000배 확대하여 나타낸 것이다.

도 4는 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 ("구강") 내의 구강 인슐린 용액 ("대조"), 피하 인슐린 주사 ("주사") 및 구강 인슐린으로 처리한 당뇨병 래트 내의 혈당 변화 백분율을 나타낸 그래프이다.

도 5A는 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내에 200 IU 구강 인슐린을 함유하는 구강 포도당을 68g 주사한 후에("구강 인슐린; Oral Insulin"), 또는 주사하지 않은 상태("No Rx")에서의, 한 명의 건강한 지원자의 혈당 변화를 나타낸 그래프이다.

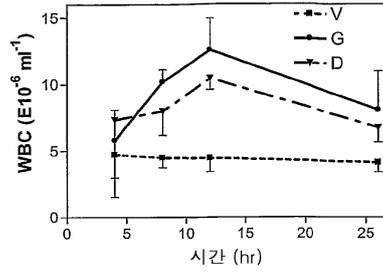
도 5B는 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내에 200 IU 구강 인슐린을 함유하는 구강 포도당을 68g 주사한 후에("구강 인슐린"), 또는 주사하지 않은 상태("No Rx")에서의, 두 명의 건강한 지원자의 혈당 변화 백분율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 당뇨병이 있는 지원자들 중에서 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 내의 무처리 ("블랭크; Blank"), 10 IU 인슐린 주사 ("SC10") 또는 100 IU ("PO100") 또는 200 IU ("PO200") 구강 인슐린을 처리한 경우의 혈당 변화 백분율을 나타낸 그래프이다.

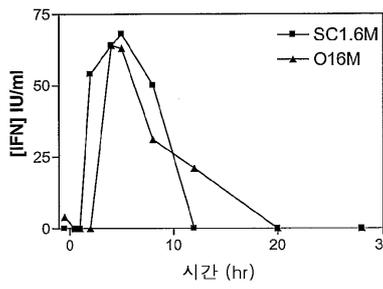
도 7은 장용 피복된 인산칼슘 나노 입자 ("PO50") 내의 매개제 ("V"), 성장 호르몬 주사 ("SC20") 또는 구강 성장 호르몬으로 처리한 뇌하수체를 제거한 래트 중에서 순체중 증가를 나타낸 그래프이다.

도면

도면1



도면2



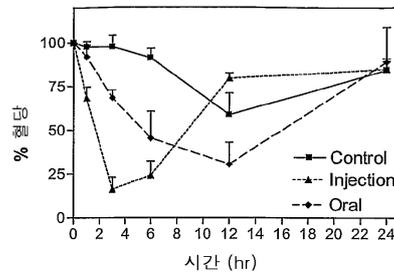
도면3A



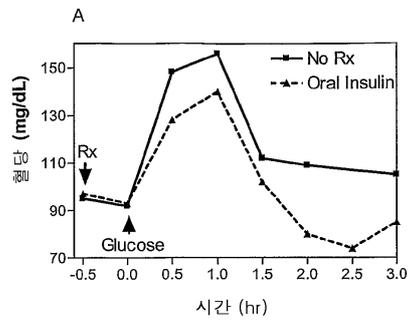
도면3B



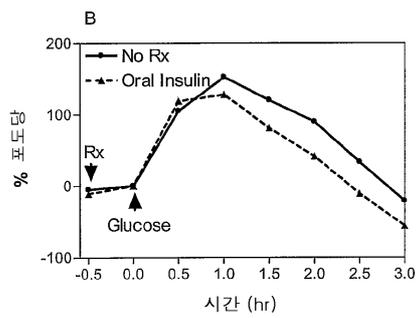
도면4



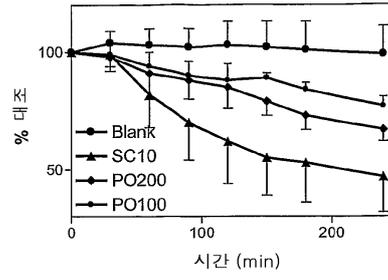
도면5A



도면5B



도면6



도면7

