



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년01월22일  
(11) 등록번호 10-1350497  
(24) 등록일자 2014년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)  
A61K 49/10 (2006.01) A61K 49/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0051931  
(22) 출원일자 2011년05월31일  
심사청구일자 2011년05월31일

(65) 공개번호 10-2012-0133310  
(43) 공개일자 2012년12월10일

(56) 선행기술조사문헌  
C. Hunter Rusell III. The use of ultrasound-targeted microbubble destruction in mediated delivery of a gadolinium based magnetic resonance imaging contrast agent into fibroblast cells in vitro. 2004.  
Paramagnetic liposome nanoparticles for cellular and tumor imaging. International journal of molecular sciences. 2010. 11(4), pp. 1759-1776.

(73) 특허권자  
한국화학연구원  
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자  
신병철  
대전광역시 유성구 엑스포로123번길 46-15, 501동 2204호 (도룡동, 스마트시티)

조선행  
대전광역시 유성구 가정로 43, 한울A 111동 404호 (신성동)

정석현  
부산광역시 해운대구 우2동 롯데갤러리온 센텀 S2408

(74) 대리인  
양부현

전체 청구항 수 : 총 3 항

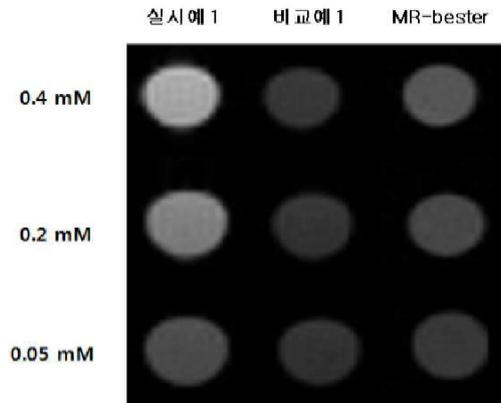
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **조영효과를 갖는 초음파 감응성 리포솜의 제조 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 초음파 감응성을 위해 이온성 지질과 지질의 말단에 Gd-컴플렉스가 공유결합된 지질을 함유하는 리포솜에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 조영작용 위하여 Gd-컴플렉스를 초음파 감응성 지질에 공유결합시켜 제조된 Gd-컴플렉스 공유결합된 지질과 초음파 감응성을 위한 양이온성 지질을 함유하는 리포솜에 관한 것으로 제조된 리포솜은 초음파에 의해 약물을 방출제어 할 수 있으며 동시에 Gd-컴플렉스에 의한 조영작용을 할 수 있다.

**대표도 - 도1**



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110000347

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초과학연구사업

연구과제명 집속 초음파 응답형 리포솜 전달체를 이용한 표적지향성 약물 전달기술개발

기여율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2011.03.01 ~ 2012.02.29

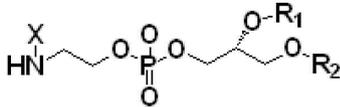
---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

(a) DOTAP, DSTAP, 디오레오일포스파티딜에탄올아민 및 디스테아로일포스파티딜에탄올아민로 구성된 군으로부터 선택되는 양이온성 지질; (b) 콜레스테롤; (c) PEG(polyethylene glycol)가 결합된 지질; 및 (d) 하기 화학식 1로 표시되는 조영 금속원소-컴플렉스가 결합된 지질을 포함하며, 상기 (a), (b), (c) 및 (d)의 물비는 5-40 : 2-6 : 5-20 : 5-30 이고, 100-200 nm의 직경을 가지는 조영용 초음파 감응성 리포솜:

**화학식 1**



상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 탄소수 8-24의 아실기(acyl), 알킬기(alkyl) 및 알케닐기(alkenyl)로 구성된 군으로부터 선택되는 탄화수소기이며, X는 (i) Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Sm 및 Nd로 구성된 군으로부터 선택되는 란타늄족 금속 원소 또는 이들의 방사성 동위원소와 (ii) 상기 조영 금속원소에 배위결합한 DOTA(tetraazacyclododecanetetraacetic acid) 또는 DTPA(diethylene triamine pentaacetic acid)이다.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

제 1 항의 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체.

**청구항 9**

제 8 항에 있어서, 상기 리포솜은 20 kHz - 5 MHz의 초음파 감응성에 의해 약물 방출이 되는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 초음파의 감응성에 의한 약물의 방출제어 효과 및 Gd-컴플렉스에 대한 조영효과를 갖는 리포솜에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 최근 리포솜에 의한 효과적인 약물전달을 위하여 특정 병소에서 특이적인 외부 자극(pH, 온도, 초음파 등)에 의해 약물이 방출 및 제어되는 리포솜의 개발이 널리 연구되고 있다. 특히 초음파 감응성 리포솜은 현재 병원에서 비침습성 항암치료를 위해 사용 중인 High Intensity Focused Ultrasound (HIFU)를 이용하여 효과적이고 편리하게 응용 가능할 수 있다는 점에서 그 이점이 있다. 또한 리포솜의 표면을 개질하거나 봉입되는 대상 및 물질을 다양화하여 단순한 약물전달 이외의 조영 작용이나 2차 치료효과를 나타내는 리포솜의 개발이 널리 연구되고 있다.

[0003] 미합중국특허 출원 1999-401836, 2002-102684, 2005-231865는 리포솜의 내부에 가스를 봉입하여 초음파 응답이 가능한 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜은 조영효과를 가지는 가스를 봉입하여 동시에 조영작용을 나타낼 수 있다. 하지만 상기 특허로 제조된 리포솜은 그 입자 크기가 수에서 수십마이크로로 주사제로 사용시 enhanced permeability and retention (EPR) effect를 가질수 없고 가스 봉입시 온도 조절과 고압이 필요해 제조가 용이하지 않으며, 불안정한 가스를 봉입하였기에 그 안정성에 한계를 가질 수 있다.

[0004] 미합중국특허 출원 2005-087142는 리포솜의 표면에 폴리에틸렌글리콜과 같은 친수성 고분자를 도입하여 초음파에 의한 방출을 유도하고자 하였다. 하지만 상기 특허로 제조된 리포솜의 경우 체온인 37 도 이상에서 봉입된 약물의 방출이 일부 일어나기 때문에 방출된 약물에 의한 부작용을 나타낼 수도 있다.

[0005] 미합중국특허 출원 2005-271641은 리포솜의 구성성분인 인지질 중 무극성 지질만을 사용하여 초음파 감응성 리포솜을 제조하였다. 하지만 상기 특허로 제조된 리포솜의 경우 지질의 Tg에만 의존하여 약물을 방출하는 단점을 가지기 때문에 초음파의 공동화효과에 의한 방출보다 열효과에 의한 방출에 기인하므로 높은 초음파 Hz에서 제한적인 방출을 보인다는 단점을 갖는다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 지질 중 초음파 감응성이 있는 양이온성 지질을 주 지질로 하고 또한, 지질 및 인지질 말단에 조영작용을 갖는 Gd-컴플렉스를 공유결합한 지질을 첨가하여 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜은 초음파에 의해 봉입약물의 방출 제어가 가능하고 공유결합된 Gd-컴플렉스에 의해 뛰어난 조영작용이 가능하다.

[0008] 본 발명은 초음파 감응성과 조영효과를 동시에 가지기 위하여 양이온성과 지질의 말단에 Gd-컴플렉스가 공유결합된 지질을 함유하는 리포솜의 제조방법에 관한 것으로 제조된 리포솜은 초음파에 의해 약물을 방출제어 할 수 있으며 동시에 Gd-컴플렉스에 의한 조영을 할 수 있는 리포솜의 제조방법에 관한 것이다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 양이온성 지질 및 조영 금속원소-컴플렉스가 결합된 지질을 포함하는 조영용 초음파 감응성 리포솜을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은, 상기 조영용 초음파 감응성 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

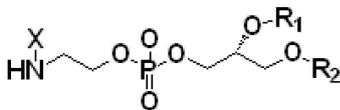
**과제의 해결 수단**

[0012] 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 지질 중 초음파 감응성이 있는 양이온성 지질을 주 지질로 하고 또한, 지질 및 인지질 말단에 조영작용을 갖는 Gd-컴플렉스를 공유결합한 지질을 첨가하여 리포솜을 제조하였다.

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 양이온성 지질; 및 (b) 조영 금속원소-컴플렉스가 결합된 지질을 포함하는 조영용 초음파 감응성 리포솜을 제공한다.

[0014] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 조영 금속원소-컴플렉스가 결합된 지질은 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 조영용 초음파 감응성 리포솜이다.

**화학식 1**



[0015] 상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 탄소수 8-24의 아실기(acyl), 알킬기(alkyl), 알케닐기(alkenyl) 및 아릴기(aryl)로 구성된 군으로부터 선택되는 탄화수소기이며, X는 (i) 1족 금속 원소, 2족 금속 원소, 전이 금속 원소, 13족-14족 원소 중 금속 및 준금속 원소, 란탄족 및 악티늄족 금속 원소; 및 (ii) 상기 금속원소로 구성된 군으로부터 선택된 금속원소와 (ii) 상기 금속원소에 배위결합, 이온결합 또는 배위결합과 이온결합 되어 있는 화합물을 포함하는 조영 금속원소-컴플렉스이다.

[0018] 본 발명의 명세서에서 용어 “아실(acyl)”은 -C(O)R로 표시되는 것으로 R은 H, 알킬, 사이클로알킬, 사이클로헥테로알킬, 아릴, 아릴알킬, 헤테로알킬, 헤테로아릴 또는 헤테로아릴알킬 그룹일 수 있다. 아실기의 예는 포밀기, 아세틸기, 사이클로헥실카보닐, 사이클로헥실메틸카보닐, 벤조일, 벤질카보닐 등이 있으나 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 명세서에서 용어 “알킬(alkyl)”은 지방족 탄화수소 그룹을 의미한다. 알킬 부위는 어떠한 알켄이나 알킨 부위를 포함하고 있지 않음을 의미하는 “포화 알킬(saturated alkyl)” 그룹일 수 있다. 알킬 부위는 적어도 하나의 알켄 또는 알킨 부위를 포함하고 있음을 의미하는 “불포화 알킬(unsaturated alkyl)” 부위일 수도 있다. 포화 또는 불포화에 있어서 알킬은 분지형, 직쇄형 또는 환형일 수 있다.

[0020] 알킬 그룹은 1-25 개의 탄소원자를 가질 수 있다. 알킬그룹은 1-6 개의 탄소원자들을 가지는 저급 알킬일 수 있으나 바람직하게는 알킬 그룹은 1-20 개의 탄소원자들을 가지는 중간 크기의 알킬이다. 예를 들어, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 알킬은 알킬쇄에 1-20 개의 탄소원자로 구성된 것 중에 선택될 수 있다.

[0021] 상기 알킬 그룹은 임의적으로 치환 또는 비치환될 수도 있다. 치환된 경우, 치환 그룹은, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로알리사이클릭, 히드록시, 알콕시, 아릴옥시, 메르캡토, 알킬티오, 아릴티오, 시아노, 할로젠, 카르보닐, 티오카르보닐, O-카르바밀, N-카르바밀, O-티오카르바밀, N-티오카르바밀, C-아미도, N-아미도, S-술폰아미도, N-술폰아미도, C-카르복시, O-카르복시, 이소시아네이트, 티오시아네이트, 이소티오시아네이트, 니트로, 시릴, 트리할로메탄술폰닐, 모노- 및 디-치환 아미노 그룹들을 포함한 아미노, 및 이들의 보호 유도체들로부터 개별적으로 그리고 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 그룹이다. 전형적인 알킬 그룹에는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 터셔리 부틸, 펜틸, 헥실, 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실 등이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 용어 “알케닐”은 지정된 탄소수를 가지는 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 불포화 탄화수소기를 나타내며, 예컨대, 에테닐, 비닐, 프로페닐, 이소프로페닐, 부테닐, 이소부테닐, n-펜테닐 및 n-헥세닐을 포함한다.

[0023] 본 발명의 명세서에서 용어 “아릴(aryl)”은 공유 궤도 전자계를 가지고 있는 적어도 하나의 링을 가지고 있고

카르복실릭 아릴(예를 들어, 페닐) 및 헤테로사이클릭 아릴기(예를 들어, 피리딘)를 포함하는 아릴 그룹을 의미한다. 상기 아릴은 모노사이클릭 또는 융합 링 폴리사이클릭(즉, 탄소원자들의 인접한 쌍들을 나눠 가지는 링들) 그룹들을 포함한다. 용어 “헤테로 아릴(heteroaryl)”은 적어도 하나의 헤테로사이클릭 링을 포함하고 있는 아릴 그룹을 의미한다. 용어 “헤테로사이클(heterocycle)”은 환 탄소가 산소, 질소, 황 등으로 치환되어 있는 그룹으로서, 예를 들어, 퓨란, 티오펜, 피롤, 피롤린, 피롤리딘, 옥사졸, 티아졸, 이미다졸, 이미다졸린, 이미다졸리딘, 피라졸, 피라졸린, 피라졸리딘, 이소티아졸, 트리아졸, 티아디아졸, 피란, 피리딘, 피페리딘, 몰포린, 티오몰포린, 피리다진, 피리미딘, 피라진, 피페라진, 트리아진 등을 들 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 아릴 그룹은 임의적으로 치환 또는 비치환될 수도 있다. 치환된 경우, 치환 그룹은, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로알리사이클릭, 히드록시, 알콕시, 아릴옥시, 메르캡토, 알킬티오, 아릴티오, 시아노, 할로젠, 카르보닐, 티오카르보닐, O-카르바밀, N-카르바밀, O-티오카르바밀, N-티오카르바밀, C-아미도, N-아미도, S-술폰아미도, N-술폰아미도, C-카르복시, O-카르복시, 이소시아네이토, 티오시아네이토, 이소티오시아네이토, 니트로, 시릴, 트리할로메탄술폰닐, 모노- 및 디-치환 아미노 그룹들을 포함한 아미노, 및 이들의 보호 유도체들로부터 개별적으로 그리고 독립적으로 선택된 하나 또는 그 이상의 그룹이다. 대표적인 아릴기로, 벤젠에서 유도되는 페닐기, 축합고리방향족 화합물에서 유도되는 안트라닐기, 페난트라닐기, 비페닐에서 유도되는 비페닐기 등이 있다.

[0024] 상기 조영 금속원소-컴플렉스의 조영 금속원소는 MRI에 조영제로 사용가능한 모든 금속 원소를 포함한다. 이에 상기 조영용 초음파 감응성 리포솜을 구축하는 상기 조영 금속원소-컴플렉스의 조영 금속원소는 예컨대, Ba, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Nb, Mo, Zr, Te, W, Pd, Ag, Pt, 및 Au로 구성된 군으로부터 선택되는 전이 금속 원소; Ga, In, Sn, Pb 및 Bi로 구성된 군으로부터 선택되는 13족-15족 원소; 또는 Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Sm 및 Nd로 구성된 군으로부터 선택되는 란타넘족 또는 악티늄족 금속 원소; 및 방사성 동위원소로부터 선택되는 금속원소이다.

[0025] 보다 바람직하게는, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Sm 및 Nd로 구성된 군으로부터 선택되는 란타넘족 또는 악티늄족 금속 원소 및 이의 방사성 동위원소로부터 선택되는 금속원소이며, 가장 바람직하게는 Gd이다.

[0026] 조영제로 사용될 수 있는 또 다른 예는 금속 착화합물이다. 금속-컴플렉스는 중심 금속과 그 금속에 배위 결합될 수 있는 리간드로 구성된 모든 물질을 말하며 특히, 중심금속 혹은 금속 이온과 배위 리간드로 이루어진 착화합물이다.

[0027] 상기 금속-컴플렉스를 이루는 리간드는 -(C=O)-, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -CONH<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub>H, -OPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -OSO<sub>3</sub>H, -NO<sub>2</sub>, -CHO, -COSH, -CN, -N<sub>3</sub>, -N<sub>2</sub>, -OH, -SCOCH<sub>3</sub>, -SCN, -NCS, -NCO, -OCN, -N-, -NH-, -S-, -O-, -Se-, -Te-, -NO<sub>3</sub>, -CO<sub>3</sub>, -CONHR, -CONR-, 및 NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> (R (R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>) = C<sub>n</sub>H<sub>m</sub> 0 ≤ n ≤ 16, 0 ≤ m ≤ 34)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 작용기를 가지는 리간드를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 상기 금속 착화합물을 이루는 리간드는 중심 금속과 2개 이상의 작용기로 동시에 결합을 이루는 킬레이트 리간드를 포함한다. 바람직하게 킬레이트 리간드는 DOTA(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetic acid), EDTA(ethylenediaminetetracetic acid), DTPA(diethylenetriaminopentaacetic acid), EOB-DTPA(N-[2-bis(carboxymethyl)amino]-3-(4-ethoxyphenyl)propyl]-N-[2-bis(carboxymethyl)amino]ethyl]-L-glycine), DTPA-GLU(N,N-bis[2-bis(carboxymethyl)amino]ethyl]-L-glutamic acid), DTPA-LYS(N,N-bis[2-bis(carboxymethyl)amino]ethyl)-L-lysine), DTPA-BMA(N,N-bis[2-bis(carboxymethyl)(methylcarbamoyl)methyl]amino]ethyl]glycine), BOPTA(4-carboxy-5,8,11-tris(carboxymethyl)-1-phenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oic acid), DO3A(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triacetic acid), HPDO3A(10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triacetic acid) MCTA(2-methyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetic acid), DOTMA((α, α', α'', α''')-tetramethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetic acid), PCTA(3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid), BOPTA (4-carboxy-5,8, 11-bis(carboxymethyl)-1-phenyl-12-(phenylmethoxy)methyl-8-phosphomethyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-12-oid acid), N,N'-[(포스포노메틸이미노)다이-2,1-에타네디일]bis[N-(카르복시메틸)글라이신] (N,N'-phosphonomethylimino-di-2,1-ethanediyl-bis(N-carboxymethylglycine)), N,N'-[(포스포노메틸이미노)다이-2,1-에타네디일]bis[N-(포스포노메틸)글라이신] (N,N'-phosphonomethylimino-di-2,1-

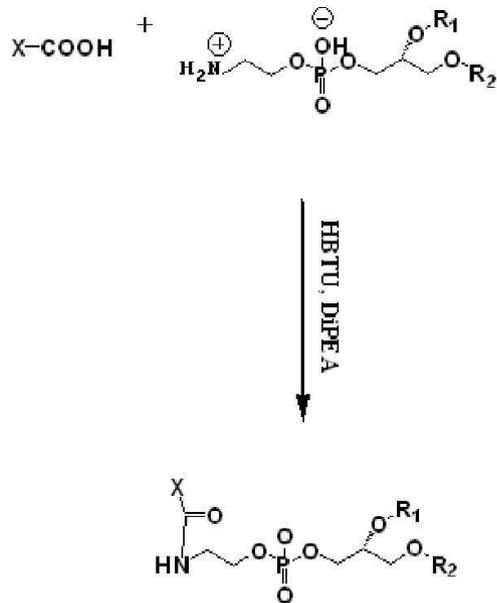
ethanediyl-bis(n-phosphonomethylglycine)), N,N'-[(포스포노메틸이미노)다이-2,1-에타네디일]bis[N-(카르복시메틸)글라이신] (N,N'-(phosphinomethylimino-di-2,1-ethanediyl-bis-(N-(carboxymethyl)glycine), DOTP(1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetrakis(methylphosphonic acid), DOTMP(1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetrakis methylene(methylphosphinic acid), 가교결합-DO2A(CB-DO2A, Cross Bridged-1,7-dicarboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane) 또는 가교결합-TE2A(CB-TE2A, Cross bridged-4,11-bis(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane) 또는 이들의 유도체를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 보다 바람직하게는 상기 금속 원소와 결합하는 리간드 화합물은 DOTA, DTPA이다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 조영용 초음파 감응성 리포솜은 지질 및 인지질 말단에 조영작용을 갖는 금속원소-컴플렉스가 지질에 공유결합 되어있는 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 양이온성 지질은 알킬디메틸암모늄, 디오레오일포스파티딜에탄올아민, 디오레오일디알킬트리메틸암모늄프로판, 디오레오일디알킬디메틸암모늄프로판 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 반응식 1



[0033] 상기 반응식 1에서; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, X는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0035] 본 발명에서 사용된 화학식 1의 지질은 주로 아마이드 결합으로 금속이온-컴플렉스와 지질을 반응식 1과 같이 공유결합하여 사용하였다.

[0036] 보다 바람직하게는 Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Sm 및 Nd로 구성된 군으로부터 선택되는 란타늄족 또는 악티늄족인 금속 원소-컴플렉스와 지질을 반응식 1과 같이 공유결합한 것이며, 가장 바람직하게는 Gd-컴플렉스와 지질을 반응식 1과 같이 공유결합한 것이다.

[0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 또한 본 발명은 화학식 1의 지질을 포함하며, 동시에 초음파 감응성을 가지는 리포솜을 그 특징으로 함으로 초음파 감응성을 위해 사용된 지질은 양이온성 지질로서 디알킬디메틸암모늄, 디오레오일포스파티딜에탄올아민, 디오레오일디알킬트리메틸암모늄프로판 또는 디오레오일디알킬디메틸암모늄프로판 등을 5 ~ 40 몰% 포함하는 것이 바람직하다. 이온성 지질이 상기 범위를 벗어나는 경우에는 리포솜의 침전이 생기는 것과 같은 안정성 문제가 발생한다.

- [0038] 또한, 상기 리포솜을 형성하는 지질로서 본 발명의 리포솜을 구성하는 지질도 특별히 한정되지 않고 공지된 지질일 수 있다. 상기 지질로는 예를 들어 인지질, 당지질, 지방산, 디알킬디메틸암모늄(dialkyl dimethylammonium)등, 폴리글리세롤알킬에테르, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, 알킬글리코시드, 알킬메틸글루카미드, 알킬수크로세스테르, 디알킬폴리옥시에틸렌에테르, 디알킬폴리글리세롤에테르 등, 폴리옥시에틸렌-폴리락트산 등의 양친매성 블록공중합체 등, 장쇄 알킬아민류 또는 장쇄 지방산 하이드라자이드류 등을 들 수 있다.
- [0039] 상기 인지질로는, 예를 들어 포스파티딜콜린(대두 포스파티딜콜린, 난황 포스파티딜콜린, 보바인 포스파티딜콜린, 디라우로일포스파티딜콜린, 디미리스토일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 디스테아로일포스파티딜콜린 등), 포스파티딜에탄올아민(디라우로일포스파티딜에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜에탄올아민, 디팔미토일포스파티딜에탄올아민 또는 디스테아로일포스파티딜에탄올아민, 디오레오일포스파티딜에탄올아민 등), 포스파티딜세린(디라우로일포스파티딜세린, 디미리스토일포스파티딜세린, 디팔미토일포스파티딜세린 또는 디스테아로일포스파티딜세린 등), 포스파티딘산, 포스파티딜글리세롤(디라우로일포스파티딜글리세롤, 디미리스토일포스파티딜글리세롤, 디팔미토일포스파티딜글리세롤 또는 디스테아로일포스파티딜글리세롤 등), 포스파티딜이노시톨(디라우로일포스파티딜이노시톨, 디미리스토일포스파티딜이노시톨, 디팔미토일포스파티딜이노시톨 또는 디스테아로일포스파티딜이노시톨 등), 리조포스파티딜콜린, 스펡고미엘린, 난황 레시틴, 대두 레시틴 또는 수소첨가 인지질 등의 천연 또는 합성 인지질 등을 들 수 있다.
- [0040] 상기 당지질로는, 예를 들어 글리세로 당지질, 스펡고 당지질 등을 들 수 있다. 상기 글리세로 당지질로는, 디갈락토실디글리세리드류(디갈락토실디라우로일글리세리드, 디갈락토실디미리스토일글리세리드, 디갈락토실디팔미토일글리세리드 또는 디갈락토실디스테아로일글리세리드 등) 또는 갈락토실디글리세리드류(갈락토실디라우로일글리세리드, 갈락토실디미리스토일글리세리드, 갈락토실디팔미토일글리세리드 또는 갈락토실디스테아로일글리세리드 등) 등을 들 수 있다. 상기 스펡고 당지질로는, 예를 들어 갈락토실셀레브로시드, 락토실셀레브로시드 또는 간글로시드 등을 들 수 있다.
- [0041] 상기 스테롤류로는, 예를 들어 콜레스테롤, 콜레스테롤헥사숙시네이트, 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카르바모일]콜레스테롤, 에르고스테롤 또는 라노스테롤 등을 들 수 있고, 리포솜 형성 지질 중에서 5 ~ 20 몰% 포함하는 것이 바람직하다. 스테롤의 비율이 상기 범위를 벗어나는 경우에는 리포솜의 안정성이 저하되며 약물의 봉입에 문제가 있다.
- [0042] 또한 상기 디알킬디메틸암모늄으로는, 예를 들어 디옥타데실디메틸암모늄(브로마이드 솔트), 디알킬디메틸암모늄프로판, 디알킬트리메틸암모늄프로판 등을 들 수 있다.
- [0043] 상기 리포솜 형성 지질은 단독 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 리포솜의 평균 입경은 50 ~ 300 nm, 바람직하게는 100 ~ 200 nm인 것이다. 지질나노입자의 평균입경이 상기 범위를 초과할 경우 체내 순환 시 세망내피계에 의해 흡수가 발생하여 목표 부위에 약물 및 리포솜을 전달하기 어렵다.
- [0045] 이하, 초음파 감응성과 조영효과를 동시에 가지기 위하여 양이온성 또는 음이온성 지질과 지질의 말단에 Gd-킴플렉스가 공유결합된 지질을 함유하는 리포솜의 제조방법을 단계별로 설명한다.
- [0046] 먼저 조영작용을 나타내는 지질을 합성하기 위하여 화학식 1과 Gd-킴플렉스를 아마이드 결합으로 공유결합하여 조영작용을 가지는 지질을 합성한다.
- [0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 조영 금속원소-킴플렉스가 결합된 지질은 상기 리포솜을 형성하는 전체 지질 성분 중 5-30 몰%비로 포함된 것을 특징으로 한다.
- [0048] 초음파 감응을 위한 이온성 지질, 스테롤류, PEG가 결합된 지질 그리고 Gd-킴플렉스가 공유결합된 지질을 5:40:2~6:5~20:5~30의 몰비율로 지질을 혼합한다.
- [0049] 이때, 사용되는 합성지질이 상기 범위 미만일 경우 조영작용이 어렵고 초과할 경우 리포솜의 형성이 용이하지 않은 단점이 있다. 스테롤류의 함량이 상기 하한일 경우 안정도가 떨어지며, 초과할 경우 초음파 감응에 제한을 받는다. PEG가 결합된 지질이 상기 미만일 경우 혈류 내 순환이 어렵고, 상기를 초과할 경우 입자크기가 커질수 있다. 이온성지질이 상기 이하일 경우 초음파 감응이 어려우며, 상기 이상일 경우 리포솜 제조가 용이하지 않다.

- [0050] 본 발명의 조영제는 기본적으로 MR 이미징을 가능하게 하며, 다른 기능성 물질을 추가적으로 도입시킨 경우에는 다양한 이미징, 또는 화학적/생물학적으로 다른 기능 (예컨대, 세포 추적, 암 치료)을 더 수행할 수 있다. MRI 조영제에 생물 활성 물질 (예: 항체, 단백질, 항원, 펩타이드, 핵산, 효소, 세포 등) 또는 화학 활성 물질 (예: 단분자, 고분자, 무기 지지체, 약물 등)이 MRI 조영제와 공유 결합, 이온 결합, 친수성 결합, 반데르 발스 결합, 정전기적 결합, 또는 소수성 결합을 통해 결합될 수 있다. 이와 같은 결합은 조영제와 표면에 직접 또는 조영제에 코팅된 다작용기 리간드에 간접적으로 이루어질 수 있다. 또한, 조영제와 활성 물질이 담체에 함께 포함되어 사용될 수 있다.
- [0051] 추가적인 생물 활성 물질 (biomolecules)의 예는, 항체, 단백질, 항원, 펩타이드, 핵산, 효소, 세포 등이며 바람직하게는 단백질, 펩타이드, DNA, RNA, 항원, 합텐 (hapten), 아비딘 (avidin), 스트렙타비딘 (streptavidin), 뉴트라비딘 (neutravidin), 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴 (lectin), 셀렉틴 (selectin), 호르몬, 인터루킨, 인터페론, 성장인자, 종양괴사인자, 엔도톡신, 림포톡신, 유로키나제, 스트렙토키나제, 조직 플라스미노겐 활성제, 가수분해 효소, 산화-환원 효소, 분해 효소, 이성질화 효소와 합성효소 등의 생체활성 효소, 효소 공인자, 및 효소 억제제 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 상기 화학 활성 물질은 다양한 기능성 단분자, 고분자, 무기 물질, 또는 약물 등을 포함한다.
- [0053] 상기 단분자의 예는 항암제, 항생제, 비타민, 폴산을 포함하는 약물, 지방산, 스테로이드, 호르몬, 퓨린, 피리미딘, 단당류, 및 이당류 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 화학활성 화학 고분자의 예는, 텍스트란, 카르보텍스트란, 폴리사카라이드, 사이클로텍스트란, 폴루란, 셀룰로오스, 녹말, 글리코겐, 카르보하이드레이트, 단당류, 이당류, 및 올리고당류, 폴리포스파젠, 폴리락타이드, 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리안하이드라이드, 폴리말릭산, 및 폴리말릭산의 유도체, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리하이드록시부틸레이트, 폴리카르보네이트, 폴리오르소에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리-L-라이신, 폴리글리콜라이드, 폴리메틸메타아크릴레이트, 폴리메틸테트라메타아크릴레이트, 및 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 상기 화학활성 무기 물질의 예는 금속 칼코겐 화합물, 무기 세라믹 물질, 탄소 물질, II/VI족 반도체, III/V족 반도체, 및 IV족 반도체, 금속, 또는 이의 복합체 등이다. 바람직하게는 실리카 (SiO<sub>2</sub>), 티타니아 (TiO<sub>2</sub>), 지르코니아, 다공성 물질, 인듐틴옥사이드 (ITO), 나노튜브, 흑연, 플러렌, CdS, CdSe, CdTe, ZnO, ZnS, ZnSe, ZnTe, Si, GaAs, AlAs, Au, Pt, Ag, Cu 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.
- [0057] 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체, 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0058] 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 비경구 방식으로 투여되는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 병변내 (intralesional) 주입, 또는 두개강내 (intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도, 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 치료학적 유효량의 본 발명의 입자를 포함한다. 용어 “치료학적 유효량”은 치료 목적의 질환을 치료할 수 있는 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.0001-100 mg/kg이다.
- [0059] 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나, 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수

있다. 이때 제형은 오일, 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 또는 유화액 형태이거나 엑기스제, 분말제, 과립제, 정제, 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 리포솜은 20 kHz - 5 MHz의 초음파 감응성에 의해 약물 방출이 되는 것을 특징으로 한다.

[0061] 약물이 포함된 상기 리포솜이 인체 내의 타겟 세포에 흡수되고 리포솜에서 약물이 방출되어 약물을 전달하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 상기 양이온성 지질로 이루어진 리포솜으로 이루어져 있어, 지질막을 구성하는 양이온성 지질의 큰 친수성 부분들의 배열모양과 지질간의 반발력에 의해 구성지질 간의 간격이 비교적 넓은 형태이다. 이에 20 kHz - 5 MHz와 같은 상대적으로 낮은 파장대 영역의 초음파에 의해 지질의 구조가 핵사고날 구조로 순간 변형되면서 지질 막의 비교적 넓은 간격으로, 약물을 순간 방출하여 세포 내 이입을 증진시킨다.

**발명의 효과**

[0062] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0063] (a) 양이온성 지질과 함께 결합하고 있는 조영 금속원소-킴플렉스가 결합된 지질을 포함하는 리포솜은 초음파에 감응하여 약물방출을 유도할 수 있어 표적지향성 투여제로 사용할 수 있다.

[0064] (b) 본원 발명의 리포솜은 조영제의 역할인 동시에 약물 전달체로서의 기능도 동시에 갖는 듀얼 펑션(dual function)을 가진다.

**도면의 간단한 설명**

[0065] 도 1은 시험예 3에서 사용된 리포솜 및 시판제제의 농도를 달리하여 촬영한 MR 영상 사진이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0067] **실시예**

[0068] **실시예 1 : Gd-킴플렉스가 결합된 지질의 제조**

[0069] 0.9 mmol 의 protected DOTA를 DMF에 녹인 뒤 HSTU와 디이소프로필에탄올아민(DiPEA)을 첨가하여 1시간 이상 교반한다. 그 혼합물은 10 ml의 클로로포름에 0.8 mmol의 디스테아로일글리세로포스포에탄올아민(DSPE)과 같이 첨가하여 65도에서 3시간 교반 후 상온에서 12시간 이상 교반한다. 그 반응물은 톨루엔과 클로로포름으로 공동 감압증발시켜 protected DOTA를 물/메탄올(1:1)의 용액에서 원심분리하여 펠렛을 얻었다. 얻어진 펠렛은 에틸이서와 물로 상분리 및 추출하여 유기상만을 얻어 건조하였다. 건조된 유기상은 트리플루오로아세테이트:클로로포름(1:2)용액에서 17시간 반응하였다. 반응이 끝난 용액은 톨루엔과 클로로포름으로 공동 감압증발시켜 DOTA-DSPE 지질을 얻었다. 얻어진 DOTA-DSPE는 9 ml의 클로로포름 용액에 용해시킨 후 0.42 mmol의 Gd(III)OAc<sub>3</sub>가 녹아있는 pH 6.5의 메탄올/물(10:1)용액에서 20시간 교반하였다. 교반이 끝난 용액은 메탄올/톨루엔(1:1)과 클로로포름 용액으로 공동 감압증발시켜 Gd-킴플렉스가 공유결합된 지질인 Gd(III)-DOTA-DSPE를 얻었다. <sup>1</sup>H-NMR (CDC<sub>13</sub>): δ = 7.73 (s, 1H, NH), 4.24 (m, 1H, CH), 2.34 (m, 4H, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.27 (m, 60H), 0.91 (t, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>3</sub>). MALDI-TOF (negative mode): m/z [M-H]<sup>-</sup> Calculated 1287.1 Da.; Observed 1287.232 Da.

[0070]  
 [0071] 실시예 2-1 : 조영효과 및 초음파 감응성을 가지는 양이온성 리포솜의 제조

[0072] 조영효과 및 초음파 감응성을 가지는 리포솜의 제조를 위하여 지질성분인 Gd(III)-DOTA-DSPE, 콜레스테롤, DSPE-mPEG2000 그리고 DSPE를 각각 10:4:15:21의 몰비율로 혼합하여 클로로포름 용매에 용해시킨 후, 둥근 바닥 플라스크에서 회전 응축증발기를 이용하여 용매를 제거하면서 필름형태의 지질막을 얻었다.

[0073] 다음으로 250 mM 암모늄 설페이트 용액을 필름에 첨가하여 75℃에서 수화시켜 리포솜을 제조하였고 수화과정이 끝난 후 가압 압출기를 사용하여 리포솜의 크기를 100~150 nm 내외로 형성하였다. 봉입되지 않은 암모늄 설페이트는 막 투과법을 이용하여 제거하였고, 독소루비신은 이온 구배 로딩법을 사용하여 리포솜 내부에 봉입시켰다. 이후 봉입되지 않은 독소루비신은 막 투과법을 이용하여 제거하였다.

[0074] **비교예 1. 대조 리포솜의 제조**

[0075] 대조리포솜은 상기 실시예 2-1과 동일하게 제조되 리포솜을 형성하는 지질 성분으로 L-α-포스파티딜콜린 (HSPC), 콜레스테롤 그리고 DSPE-mPEG2000을 3:1:1의 질량비율로 리포솜을 제조하였다.

[0076] **시험예 1**

[0077] 상기 실시예 2-1과 비교예 1에 의해 제조한 리포솜의 입자 크기와 표면 전하를 전기영동 광산란 분광광도기(ELS-Z, Otuska, Japan)를 이용하여 측정하였고, 모델 약물인 독소루비신의 함유율은 자외선 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 리포솜의 Gd 함유량은 ICP를 이용하여 분석하였다. 상기 결과를 다음 표 1에 나타내었다.

**표 1**

	Gd의 농도 (mM)	입자크기 (nm)	표면전하 (mV)	독소루비신의 봉입률(%)
실시예 2-1	2.01±0.31	131.4±9.1	-31.6±7.2	62.9±1.5
비교예 1	-	107.8± 2.4	-19.5± 0.3	84.5± 18.5

[0079] 지질 성분으로 Gd(III)-DOTA-DSPE가 함유된 실시예 2-1의 경우 Gd의 농도가 2 mM이상 측정되었으나 Gd(III)-DOTA-DSPE가 함유되지 않은 비교예 1의 경우 Gd가 측정되지 않았다. 제조된 리포솜들의 입자크기는 실시예의 경우 130 nm 정도 였으며 봉입효율은 60% 이상이었다. 실시예 2-1의 경우 양이온성 지질을 사용하였으나 표면의 폴리에틸렌글리콜과 Gd-컴플렉스의 영향으로 음이온성을 나타내었다.

[0080] **시험예 2**

[0081] 상기 시험예 2의 리포솜들의 초음파 감응성을 측정하기 위하여 20 kHz와 1 MHz의 초음파를 각각 1분간 진폭 60%로 조사한 후 모델 약물인 독소루비신의 방출량을 형광 분광광도계를 이용하여 흡수파장 497 nm, 방출 파장 585 nm에서 측정한 값을 다음 표 2에 나타내었다.

**표 2**

	초음파에 의한 독소루비신의 방출량 (%)	
초음파 (Hz)	20 kHz	1 MHz
실시예 2-1	33.06±0.15	30.6±2.12
비교예 1	3.1±0.64	1.02±0.31

[0083] 제조된 초음파 감응성 리포솜인 실시예 2-1의 경우 1분의 초음파 조사만으로 약 30%이상의 높은 방출을 보였으나 비교예 1과 같은 대조 리포솜의 경우 3%이하의 낮은 방출효율을 나타내었다. 그러므로 실시예 2-1의 경우 초음파에 의한 약물의 방출 제어가 가능하다는 것을 알 수 있다.

[0084] **시험예 3**

[0085] 실시예 2-1의 조영효과를 관찰 및 평가하기 위하여 시판 조영제 제제인 MR-bester와 같이 농도별로 T<sub>1</sub> 조영을 4.7 T MR 시스템을 사용하여 측정하였다. 측정된 T<sub>1</sub>-weighted MR 영상과 R<sub>1</sub> 값을 도면 1과 표 3에 나타내었다.

**표 3**

[0086]

	실시예 2-1	비교예 1	MR-bester
Gd의 농도 (uM)	r <sub>1</sub> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
50	0.89	0.51	0.54
100	1.22	0.48	0.60
200	2.08	0.51	0.71
300	2.49	0.49	0.81
400	3.23	0.51	1.02

[0087] 측정된 표 3의 r<sub>1</sub>값에서 알 수 있듯이 본 발명에서 제조된 실시예의 경우 비교예 1과 비교해 400 uM에서 7배의 높은 조영효과를 가지며 특히 시판 제제인 MR-bester와 비교시 400 uM에서 3배 이상 높은 조영효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 이는 Gd-킬렉스 제제인 MR-bester보다 리포솜의 표면에 Gd-킬렉스를 개질한 제제인 실시예의 경우 용액속 Gd의 부분 밀도를 높여 조영효과를 증가시킨 것으로 사료된다. 도면 1의 MR 영상에서도 본 발명의 실시예가 비교예나 MR-bester보다 우수한 영상을 나타내었다.

[0088] **시험예 4**

[0089] 세포 내 이입효율을 비교하기 위하여 실시예 2-1, 비교예 1 그리고 독소루비신 용액을 사용하여 유세포 분석을 실시하였다. B16F10 세포를 24 웰플레이트에서 웰 당 1x10<sup>5</sup> 세포를 배양하였다. 15 ug 독소루비신/ml의 리포솜 용액을 45분간 배양하였다. 이때 실시예 2-1의 경우 초음파 처리 전과 20 kHz, 1 MHz의 초음파로 2분간 60%의 진폭으로 조사하여 약물 방출을 유발 후 세포에 처리하였다. 처리 및 배양이 끝난 세포는 파라포름알데하이드로 고정한 후 유세포 분석기를 이용하여 형광 560 nm에서 유세포 분석을 실시하였다.

**표 4**

[0090]

	Control	독소루비신 용액	비교예 1	실시예 2-1 초음파 처리 전	실시예 2-1 20 kHz 초음파 처리 후	실시예 2-1 1 MHz 초음파 처리 후
형광 강도	72.0±2.0	4189.5±3363.6	650.0±415.7	455.7±116.6	2351.0±1408.6	854.5±707.8

[0091] 초음파를 처리하지 않은 군인 비교예 1과 초음파 처리 전인 실시예 2-1의 경우 650이하의 낮은 형광 강도를 나타내었으나 초음파 처리 후 세포 처리한 실시예 2-1의 경우 850이상의 높은 형광 강도를 나타내었다. 특히 20 kHz로 초음파 처리한 군의 경우 2351.0의 매우 높은 형광 강도를 관측할 수 있다. 이는 본 발명의 초음파 감응성 리포솜이 초음파에 의해 약물을 순간 방출하여 세포 내 이입을 증진시킬 수 있다는 것을 가르킨다.

도면

도면1

