



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월07일
 (11) 등록번호 10-1371698
 (24) 등록일자 2014년03월03일

- | | |
|---|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 49/18 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0064296
(22) 출원일자 2011년06월30일
심사청구일자 2011년06월30일
(65) 공개번호 10-2013-0003173
(43) 공개일자 2013년01월09일
(56) 선행기술조사문헌
US20030091621 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌 | (73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
신병철
대전광역시 유성구 엑스포로123번길 46-15, 501동
2204호 (도룡동, 스마트시티)
나경아
경기도 부천시 소사구 범안로7번길 63, 현대브러
운아파트 나동 202호 (괴안동)
(74) 대리인
양부현 |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 5 항

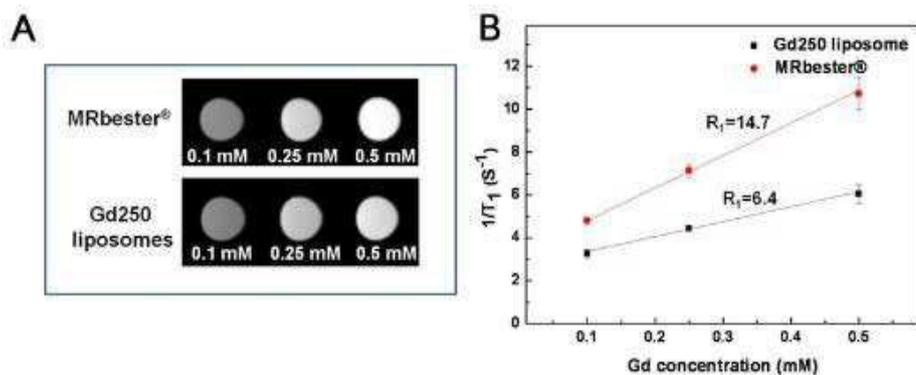
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 진단 및 치료를 위한 이중기능성 리포솜 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 전이 금속원소 및 음전하성 화학약물의 복합체를 포함하는 치료 및 진단용 이중기능 리포솜에 관한 것이다. 본 발명의 이중기능 리포솜은 MRI를 이용한 진단 및 약물 치료를 동시에 가능하도록 한다. 본 발명의 이중기능 리포솜은 상대적으로 적은 양의 조영제를 이용하여 암 진단을 위한 영상의 선명도와 정확도를 증강시킬 수 있다. 본 발명의 이중기능 리포솜은 표적화된 약물 전달체로 잘 알려진 리포솜을 조영제 전달체로 이용하고, MRI 조영제인 전이금속을 음전하성 화학약물과 함께 리포솜에 봉입함으로써 약물 치료와 더불어 암조직의 표적화된 영상화를 동시에 수행 가능하도록 한다. 본 발명은 전이금속 및 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물의 복합체 형성 원리를 기반으로, 리포솜 내 전이금속에 의한 음전하성 화학약물을 봉입하는 리포팅법을 사용하여 전이금속 조영제와 음전하성 화학약물(예컨대, 독소루비신)을 함께 리포솜에 효과적으로 봉입한다. 본 발명은 전이금속 조영제의 단점인 체내 독성, 짧은 혈관 체류시간 및 이에 의한 지속적 투여에 의한 체내 독성을 극복할 수 있도록 하며, 동시에 암조직의 약물 전달 과정과 치료 효과를 볼 수 있도록 한다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110000347

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초과학연구사업

연구과제명 집속 초음파 응답형 리포솜 전달체를 이용한 표적지향성 약물 전달기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2011.03.01 ~ 2012.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

Gd(가돌리늄) 및 독소루비신의 킬레이트 복합체가 포집(encapsulation)된 치료 및 진단용 이중기능 리포솜.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 리포솜은 나노리포솜인 것을 특징으로 하는 이중기능 리포솜.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 리포솜은 PEG(Polyethylene glycol)가 표면에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 이중기능 리포솜.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 Gd(가돌리늄) 및 독소루비신의 복합체를 포함하는 치료 및 진단용 이중기능 리포솜의 제조방법:

- (a) 리포솜을 형성시키기 위한 지질을 이용하여 지질 박막을 형성시키는 단계;
- (b) 상기 지질 박막을 Gd(가돌리늄) 수화물 용액으로 수화시켜 리포솜을 형성시키고 상기 리포솜 내에 Gd(가돌리늄)을 봉입시켜 리포솜 용액을 수득하는 단계; 및
- (c) 상기 Gd(가돌리늄)이 봉입된 리포솜 용액을 독소루비신과 접촉시켜 상기 독소루비신을 상기 리포솜 내로 봉입시켜 Gd(가돌리늄) 및 독소루비신의 킬레이트 복합체가 포집(encapsulation)된 리포솜을 수득하는 단계.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 리포솜은 50-200 nm 크기의 나노리포솜인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 진단 및 약물 치료 효과를 나타내는 이중기능 리포솜 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 리포솜은 생체막을 이루는 인지질로 이루어져 있어 생체막과의 상용성 및 생분해성이 매우 우수한 물질로 알려져 있으며, 제조가 용이하여 대량 생산이 용이하고 면역반응이 거의 없어 약물 수송체로서 개발의 여지가 무궁무진하다. 또한 리포솜은 항암제, 항세균제, 항원/항체, 단백질, 지방 및 DNA와 같은 다양한 물질을 수송할 수 있는 전달체이며, 특히 항암 약물을 봉입하였을 시 약물의 독성을 줄여 정상세포에 미치는 부작용을 최소화할 수 있으며 암 조직까지 효율적으로 운반함으로써 치료효과를 향상시킬 수 있다는 보고가 있다.
- [0003] 최근에는 이와 같은 장점을 가진 리포솜을 자기공명영상(MRI)에 이용하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다. MRI법은 자기장을 이용하여 생체 조직을 영상화하는 기술로 최근 암 진단에 많이 이용되고 있으며, 효과적인 진단을 위해서는 영상의 선명도 및 정확도가 가장 중요시되기 때문에 조영제를 사용하고 있다. 그러나 이들 조영제는 많은 양을 사용할 경우 체내 독성을 무시할 수 없는 수준이며, 또한 체내 전체에 넓게 분포함으로써 조영 효과가 크게 감소되는 경향이 있다. 따라서 조영제를 리포솜의 표면에 수식화하거나 또는 리포솜 내에 봉입하여 암 조직의 조영 효과를 극대화 할 수 있는 다양한 방법들이 보고되고 있다.
- [0004] 미국 특허 출원 제 5534241호는 조영제 킬레이터를 가진 고분자를 수식화한 인지질로 리포솜을 제조하였고 이는 MRI 조영 효과를 향상시킨다고 기술하고 있다. 또한 MRbester와 같은 조영제에 비해 리포솜 조영제는 장시간 혈관에 존재할 수 있어 촬영시 지속적인 투여가 필요 없어 부작용을 감소시킬 수 있을 것이라 보고된바 있다. 무엇보다 리포솜은 암 조직에 농축되기 때문에 리포솜 조영제는 실시간으로 암 조직을 효율적으로 관찰 할 수 있었으며, 향후 약물이나 유전자 치료제가 함께 봉입하면 약물의 전달 과정 및 치료 효과를 동시에 관찰 할 수 있는 것이라고 기술하고 있다[(N. Kamaly et al., Bioconjugate Chem. 19, 118(2008)].
- [0005] 따라서 리포솜을 이용하여 약물과 조영제를 함께 전달하여 종양세포의 조영 효과를 극대화하고 약물 치료를 병행할 수 있는 다기능성 리포솜 개발이 필요하며, 무엇보다 리포솜에 조영제와 약물을 효율적으로 봉입할 수 있는 방법에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.
- [0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 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 치료 및 진단용 이중기능 리포솜 및 보다 개선된 이중기능 리포솜의 제조방법을 제공하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 조영제로 전이 금속원소 및 화학약물의 복합체를 포함하는 이중기능 리포솜 개발을 통해, 기존 조영제의 단점인 체내 독성, 짧은 혈관 체류시간 및 이에 의한 지속적 투여에 의한 체내 독성을 극복함과 동시에 암 조직의 약물 전달 과정과 치료 효과를 추적할 수 있는 이중기능 리포솜을 개발함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 치료 및 진단용 이중기능 리포솜을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 치료 및 진단용 이중기능 리포솜의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 전이 금속 및 상기 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물의 복합체를 포함하는 치료 및 진단용 이중기능 리포솜을 제공한다.
- [0012] 본 발명자들은 치료 및 진단용 이중기능 리포솜 및 보다 개선된 이중기능 리포솜의 제조방법을 제공하고자 예의

연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 조영제로 전이 금속원소 및 화학약물의 복합체를 포함하는 이중기능 리포솜 개발을 통해, 기존 조영제의 단점인 체내 독성, 짧은 혈관 체류시간 및 이에 의한 지속적 투여에 의한 체내 독성을 극복함과 동시에 암 조직의 약물 전달 과정과 치료 효과를 추적할 수 있는 이중기능 리포솜을 개발하였다.

- [0013] 본 발명의 이중기능 리포솜은 전이 금속원소 및 상기 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물의 복합체를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 리포솜에 이용될 수 있는 전이 금속원소는 당업계에 공지된 다양한 전이 금속원소를 포함하며, 바람직하게는 MRI 조영제로 사용 가능한 전이 금속원소를 포함한다. 보다 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 전이 금속원소는 La, Pr, Nd, Gd, Tb, Mn, Zn, Fe, Sc, Ti, V, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Pd, Ag, Cd, W 및 Re를 포함하며, 보다 더 바람직하게는 La, Pr, Nd, Gd 또는 Tb이고, 가장 바람직하게는 Gd이다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 전이금속은 전이금속 이온 형태를 갖는다. 이와 같은 이온 형태의 전이금속은 음전하성 화학약물과 킬레이트 복합체를 형성하는 데 유리하다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 화학약물은 항암 화학약물이다. 바람직하게는 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물이고, 보다 바람직하게는 독소루비신(Doxorubicin), 에피루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 발루비신 및 시스플라틴이고, 가장 바람직하게는 독소루비신이다.
- [0017] 본 발명의 리포솜은 당업계에 공지된 다양한 지질, 양이온성 지질, 음이온성 지질 및 중성 지질을 이용하여 제조될 수 있으며, 바람직하게는 중성 지질이 이용된다. 상기 양이온성 지질로 사용되는 것은 디알킬디메틸암모늄, 디오레오일포스파티딜에탄올아민, 디오레오일디알킬트리메틸암모늄프로판 또는 디오레오일디알킬디메틸암모늄프로판을 포함하나, 이에 한정되지 않고 당업계에 알려진 그 밖의 다양한 양이온성 지질을 포함한다.
- [0018] 상기 음이온성 지질에는 디미리스틸글리세로포스페이트, 디팔미토일글리세로포스페이트 디미리스틸글리세로포스페이트, 디스테로일글리세로포스페이트, 디스테로일글리세로포스포글리세롤, 디팔미토일글리세로포스포글리세롤, 디미리스틸글리세로포스포세린, 디팔미토일글리세로포스포세린 또는 디스테로일글리세로포스포세린을 포함하나, 이에 한정되지 않고 당업계에 알려진 그 밖의 다양한 음이온성 지질을 사용할 수 있다.
- [0019] 상기 중성 지질은 바람직하게는 디아스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoyl phosphatidyl choline, DPPC), DOPC(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC(dimyristoylphosphatidylcholine), PLPC(1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), PE(phosphatidylethanolamine), EPC(egg phosphatidylcholine) DLPC(dilauryloylphosphatidylcholine), DMPC(dimyristoylphosphatidylcholine), MPPC(1-myristoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine), PMPC(1-palmitoyl-2-myristoyl phosphatidylcholine), SPPC(1-stearoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine), DBPC(1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DEPC(1,2-dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPC(palmitoyloeyl phosphatidylcholine), DSPE(lysophosphatidylcholine, dilinoleoylphosphatidylcholine distearoylphosphatidylethanolamine), DMPE(dimyristoyl phosphatidylethanolamine), DPPE(dipalmitoyl phosphatidylethanolamine), POPE(palmrtoyleoyl phosphatidylethanolamine), lysophosphatidylethanolamine, MPEG-750, 2000 및 5000-DSPE(carbonyl methoxypolyethylene glycol-distearoyl phosphatidyl ethanolamine), MPEG-2000 및 5000-DPPE(carbonyl methoxypolyethylene glycol-dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine), MPEG-2000 및 5000-DMPE(carbonyl methoxypolyethylene glycol-dimyristoyl phosphatidyl ethanolamine), DMPC(dimyristoylphosphatidylcholine), DOPE(dioleoyl phosphatidyl ethanolamine), PEG-PE(polyethylene glycolphosphatidyl ethanolamine), DOPC(dioleoyl phosphatidyl choline), 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-[알콕시(폴리에틸렌글리콜)](DSPE-PEG)[예컨대, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)2000](DSPE-mPEG-2000)] 및 콜레스테롤을 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에 알려진 그 밖의 다양한 중성 지질을 사용할 수 있다.
- [0020] 보다 바람직하게는 본 발명의 리포솜을 형성하는 중성 지질로는 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-[알콕시(폴리에틸렌글리콜)](DSPE-PEG)[예컨대, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)2000](DSPE-mPEG-2000)]이다.
- [0021] 본 발명에서 리포솜 입자를 형성하기 위한 지질로서 포스파티딜콜린은, 바람직하게는 소수성기의 탄소수가 16-

18인 알킬사슬을 가지는 것으로 예를 들어, 디팔미토일포스파티딜콜린 및 디스테아로일포스파티딜콜린을 포함한다. 탄소수가 16 미만인 경우에는 상전이온도가 체온 이하로 떨어져 지질 나노입자의 체내 안정성이 저하되고, 탄소수가 18을 초과하는 경우에는 리포솜 입자의 크기가 증가하기 때문에 바람직하지 못하다. 상기 포스파티딜콜린은 리포솜 입자를 형성하는 전체 지질 조성에 대하여 40-70 중량% 함유하는 것이 바람직하다.

- [0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 리포솜은 나노리포솜이다.
- [0023] 본 발명의 리포솜의 평균 입경은 50-350 nm의 입자지름, 바람직하게는 50-300 nm, 보다 바람직하게는 50-200 nm, 가장 바람직하게는 100-150 nm의 입자 지름을 갖는다. 리포솜 나노입자의 평균 입경이 상기 범위를 초과할 경우 체내 순환시 세망내피계에 의해 흡수가 발생하여 목표 부위에 약물 및 리포솜을 전달하기 어렵다. 나노리포솜의 작은 입자 크기는, 본 발명의 나노리포솜이 원하는 목표조직에의 침투를 용이하게 한다.
- [0024] 본 발명의 리포솜 특히 나노리포솜은, 전이 금속 및 음전하성 화학약물에 대하여 우수한 봉입효율(encapsulation efficiency)을 나타낸다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 리포솜은 스텔스제(stealth agent)가 표면에 결합되어 있다. 상기 스텔스제는 글리콜 화합물, 바람직하게는 PEG(polyethylene glycol); 폴리옥시프로필렌 중합체(POP); 폴리비닐피롤리돈 중합체(PVP); 폴리옥시에틸렌/폴리옥시프로필렌/폴리옥시에틸렌 블록을 포함하는 블록 또는 트리블락 공중합체; 및 히드록시에틸전분을 포함하고, 가장 바람직하게는 PEG(polyethylene glycol)이다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 “스텔스제(stealth agent)”는 리포솜 입자의 표면에 결합되어 입자의 옹소닌화(opsonization) 및 이후의 세망내피계(RES)에 의한 제거를 방지하는 화합물을 의미한다. 스텔스제는 리포솜이 표적에 도달되기 전에 소화, 흡수, 옹소닌화 또는 기타의 대사 활성으로부터 보호한다. 스텔스제는 일반적으로 표적 부위에 도달하기 전 리포솜을 분해로부터 보호한다. 예를 들면, 리포솜의 표면에 결합되어 노출된 폴리에틸렌글리콜은 리포솜을 수화시키고 세망내피계(RES)에 의한 흡수 및 제거를 방지한다.
- [0027] 본 발명의 이중기능 리포솜은 스텔스제로서 글리콜 화합물, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 보다 바람직하게는 유도체화 PEG를 포함한다. 본 발명은 유도체화 PEG가 표면에 노출된 리포솜을 포함하며, 바람직하게는 PEG는 분자량이 1,000 내지 30,000 Da이다. PEG는 이중작용기성 또는 단일작용기성을 가질 수 있으며, 예컨대 알콕시-PEG(예컨대, 메톡시-PEG(mPEG))가 될 수 있다.
- [0028] 이와 같은 스텔스제의 사용에 의해, 본 발명은 혈액 내 안정성을 나타내는 체내순환 지속형 리포솜을 제공할 수 있다. 체내순환 지속형 리포솜은 투여 후 수 시간 내에 혈류에서 사라지는 통상의 제형과 달리 투여 후 혈류에 24시간 이상 잔류할 수 있다. 스텔스제, 특히 폴리에틸렌글리콜 고분자가 함유된 지질이 10-30 중량%의 범위로 사용되어 본 발명의 리포솜을 제조하는 것이 바람직하다. 상기 범위 이하의 경우 폴리에틸렌글리콜에 의한 혈액 내 안정성이 떨어지며, 상기 범위를 초과하는 경우 리포솜 입자의 크기가 지나치게 증가하게 된다.
- [0029] 본 발명의 이중기능 리포솜의 “이중기능”은 “치료” 및 “진단” 기능을 포함한다. 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환 또는 질병의 발전의 억제; (b) 질환 또는 질병의 경감; 및 (c) 질환 또는 질환의 제거를 의미한다.
- [0030] 본 발명의 리포솜에 의해 치료될 수 있는 질병, 질환 또는 상태는 다양한 질병, 질환 또는 상태를 포함하며, 바람직하게는 암이다. 본 발명의 리포솜에 의해 치료될 수 있는 암은 뇌암, 신경 내분비 암, 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 부신암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 명세서의 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 리포솜은 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 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, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일을 포함하나, 이에

한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed. 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [0033] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 관절내 주입 등으로 투여할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약제학적 조성물의 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 약제학적 조성물의 예시적인 투여량은 0.001-100 mg/kg이다.
- [0035] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 전이 금속원소 및 상기 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물의 복합체를 포함하는 치료 및 진단용 이중기능 리포솜의 제조방법을 제공한다:
- [0037] (a) 리포솜을 형성시키기 위한 지질을 이용하여 지질 박막을 형성시키는 단계;
- [0038] (b) 상기 지질 박막을 전이금속 수화물 용액으로 수화시켜 리포솜을 형성시키고 상기 리포솜 내에 전이금속을 봉입시켜 리포솜 용액을 수득하는 단계; 및
- [0039] (c) 상기 전이금속이 봉입된 리포솜 용액을 상기 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물과 접촉시켜 상기 음전하성 화학약물을 상기 리포솜 내로 봉입시켜 전이 금속원소 및 음전하성 화학약물의 복합체를 포함하는 리포솜을 수득하는 단계.
- [0040] 본 발명의 방법은 상기 이중기능 리포솜을 최종 산물로 하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0041] 본 발명의 방법을 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0042] 단계 (a): 지질 박막 형성
- [0043] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 리포솜을 형성시키기 위한 지질을 이용하여 리포솜의 박막을 형성시킨다. 상기 박막을 형성시키기 위하여 사용되는 지질은 당업계에서 공지된 다양한 지질, 양이온성 지질, 음이온성 지질 및 중성 지질을 이용하여 제조될 수 있으며, 바람직하게는 중성 지질이 이용된다.
- [0044] 지질에 대한 설명은 상술한 리포솜에 대한 설명 부분을 참조하여 설명될 수 있으며, 반복되는 부분은 그 기재를 생략한다.
- [0045] 지질 박막을 형성시키기 위하여 지질을 적합한 소수성 유기용매(예컨대, 클로로포름)에 용해시킨 후 증발기(예컨대, 회전증발기)를 사용하여 감압 증류하여 적합한 기질(substrate) 상에 박막을 형성시킨다.
- [0046] 단계 (b): 전이금속 수화물 용액을 이용한 전이금속-봉입 리포솜의 제조
- [0047] 단계 (a)에 따라 형성된 박막을 전이금속 수화물의 용액으로 수화시켜
- [0048] 리포솜을 형성시키고 상기 리포솜 내에 전이금속을 봉입시키고 리포솜 용액을 수득한다. 사용되는 전이금속의 수화물은 전이금속에 할로젠족 원소가 이온결합 되고 물분자가 결합된 형태가 바람직하다. 예를 들어, 전이금속으로서 Gd이 이용되는 경우, 50-350 mM 범위의 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ 용액이 이용된다.
- [0049] 본 발명의 방법의 특징 중 하나는, 전이금속 수화물을 이용하여 지질을 수화시켜 리포솜을 제조하는 것이고, 바람직하게는 나노리포솜을 제조하는 것이다.

- [0050] 상기 단계 (b) 및 단계 (c) 사이에 리포솜의 입자크기 분포를 균일하게 하기 위하여 기공 크기가 80-200 nm의 여과막(또는 분리막)을 사용해 상기 단계 (b)의 결과물인 리포솜 용액을 여과하는 단계를 추가적으로 포함한다. 이 경우, 여과막이 장착된 가압압출기를 사용할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 이중기능 리포솜의 평균 입경은 50-350 nm의 입자지름, 바람직하게는 50-300 nm, 보다 바람직하게는 50-200 nm, 가장 바람직하게는 100-150 nm의 입자 지름을 갖는 나노리포솜이다.
- [0052] 단계 (b)에서 사용되는 전이금속은 상술한 리포솜에 대한 설명 부분을 참조하여 설명될 수 있으며, 반복되는 부분은 그 기재를 생략한다.
- [0053] 단계 (c): 전이금속-봉입 리포솜 용액 내에 음전하성 화학약물의 봉입
- [0054] 이어, 전이금속이 봉입된 리포솜 용액을 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물과 접촉시켜 음전하성 화학약물을 리포솜 내로 봉입시켜 전이 금속원소 및 음전하성 화학약물의 복합체를 포함하는 리포솜을 수득한다.
- [0055] 단계 (b) 또는 단계 (c) 이후에 상기 리포솜 내에 봉입되지 않은 전이금속 수화물 또는 음전하성 화학약물을 제거하기 위하여 단계 (b) 또는 단계 (c)의 결과물을 분리범위 MW 1500-30000의 젤 여과(gel filtration) 컬럼에 적용하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0056] 사용되는 젤 여과 컬럼은 당업계에서 공지된 다양한 젤 여과 컬럼을 포함하며, 예를 들어 세파텍스 젤의 G--시리즈, 예컨대 세파텍스 G-50 컬럼이 이용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 방법의 특징 중 하나는, 전이금속 및 상기 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물의 복합체 형성 원리를 기반으로 리포솜 내의 전이금속 농도 구배에 의한 음전하성 화학약물의 봉입을 유도하여 봉입 효율의 향상을 도모하는 것이다.
- [0058] 단계 (c)에서 이용되는 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물에 대한 설명은 상술한 리포솜에 대한 설명 부분을 참조하여 설명될 수 있으며, 반복되는 부분은 그 기재를 생략한다.
- [0059] 상술한 바와 같이, 본 발명의 방법은 비교적 간단하면서도 개선된 봉입효율로 전이금속 및 음전하성 화학약물을 리포솜에 봉입시켜 이중기능 리포솜을 효율적으로 제조할 수 있도록 한다.

발명의 효과

- [0060] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0061] (a) 본 발명의 이중기능 리포솜은 MRI를 이용한 진단 및 약물 치료를 동시에 가능하도록 한다.
- [0062] (b) 본 발명의 이중기능 리포솜은 상대적으로 적은 양의 조영제를 이용하여 암 진단을 위한 영상의 선명도와 정확도를 증강시킬 수 있다.
- [0063] (c) 본 발명의 이중기능 리포솜은 표적화된 약물 전달체로 잘 알려진 리포솜을 조영제 전달체로 이용하고, MRI 조영체인 전이금속을 음전하성 화학약물과 함께 리포솜에 봉입함으로써 약물 치료와 더불어 암조직의 표적화된 영상화를 동시에 수행 가능하도록 한다.
- [0064] (d) 본 발명은 전이금속 및 전이금속과 킬레이트 복합체를 형성할 수 있는 음전하성 화학약물의 복합체 형성 원리를 기반으로, 리포솜 내 전이금속에 의한 음전하성 화학약물을 봉입하는 리모팅법을 사용하여 전이금속 조영제와 음전하성 화학약물(예컨대, 독소루비신)을 함께 리포솜에 효과적으로 봉입한다.
- [0065] (e) 본 발명은 전이금속 조영제의 단점인 체내 독성, 짧은 혈관 체류시간 및 이에 의한 지속적 투여에 의한 체내 독성을 극복할 수 있도록 하며, 동시에 암조직의 약물 전달 과정과 치료 효과를 볼 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 실시예 1에서 산출되어진 리포솜 내의 Gd-독소루비신(Gd-Dox) 복합체를 색 변화를 통하여 간접적으로 관찰하였으며, 극저온 투과전자현미경(cryo-TEM) 이미지를 통해 구체적인 리포솜 내부의 형태적 변화를 관찰한 결과를 나타낸 것이다[(A) Gd가 봉입된 리포솜에 독소루비신 용액을 첨가 후 시간 변화에 따른 색 변화. (B) Gd 250 리포솜의 cryo-TEM 이미지. (C) 암모늄 황산염 농도 구배에 따른 독소루비신이 봉입된 리포솜의 cryo-TEM 이미지].

도 2는 실시예 1에서 산출되어진 리포솜의 자기공명(MR) 특성을 평가한 결과를 나타낸 것이다. [(A) 다양한 Gd 농도 (0.1 mM, 0.25 mM, 및 0.5 mM)에서의 MRbester와 Gd 250 리포솜의 T₁-가중 MR 이미지. (B) 200 MHz에서 Gd 농도에 따른 MRbester와 Gd 250 리포솜의 이완도].

도 3은 실시예 1에서 산출되어진 리포솜의 유세포 분석법에 의한 세포 내 이입 결과를 나타낸 것이다[(a) 음성 대조군, (b) Doxil, (c) Gd 250 리포솜, (d) Free 독소루비신.]

도 4는 실시예 1에서 산출되어진 리포솜의 Gd의 세포 내 이입 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 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.

[0068] 실시예

[0069] 실시예 1: Gd-Dox 복합체가 봉입된 리포솜 제조

[0070] 리포솜을 제조하기 위하여 지질 성분인 L- α -포스파티딜콜린 (HSPC), 콜레스테롤(CHOL) 및 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)2000](DSPE-mPEG-2000)(Alabaster, 미국)을 12.6:8.3:0.4의 몰 비로 사용하였다. 각 지질은 클로로포름에 용해시킨 후, 회전 증발기를 사용하여 60℃에서 감압 증류하여 둥근 플라스크 벽면에 얇은 지질막을 형성시켰다.

[0071] 형성된 지질막에 다양한 농도(50 mM, 150 mM, 250 mM 및 350 mM)의 가돌리늄 트리클로라이드(GdCl₃·6H₂O)(Sigma.Aldrich Chemical, 미국) 용액을 첨가하여 지질막이 완전히 분산 될 때까지 수화하여 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜은 200 nm, 100 nm 및 80 nm(Whatman, 미국)의 공극을 갖는 폴리카보네이트 분리막이 장착된 가압압출기(Northern Lipids Inc., 미국)를 이용하여 5번씩 가압, 압출하여 입자 크기를 조절하였다. 리포솜 내부에 봉입되지 않은 GdCl₃·6H₂O는 세파덱스 G-50 컬럼(Sephadex G-50 columns)(GE health care, 미국)을 이용하여 제거하였다.

[0072] 제조된 리포솜에 항암제인 독소루비신(보령제약, 한국)을 봉입시키기 위하여 8.6 mM의 독소루비신과 리포솜 용액을 1:1로(중량/중량) 혼합하여 60℃에서 2시간 동안 숙성시켜 최종적으로 Gd-Dox(Gd-독소루비신) 복합체가 봉입된 리포솜을 수득하였다. 상기 혼합용액에서 리포솜 내에 함유되지 않은 항암제는 세파덱스 G-50 컬럼을 이용하여 제거하였다.

[0073] 비교예 1

[0074] 폴리올법으로 상기 실시예 1과 동일한 조성의 지질성분에 수화용액의 10%(중량/중량)의 프로필렌글라이콜(Alabaster, 미국)을 첨가하여 80℃에서 1시간 동안 용해하였다. 용해된 지질용액에 다양한 농도 (50 mM, 150 mM, 250 mM, 및 350 mM)의 GdCl₃·6H₂O 용액을 첨가하여 60℃에서 1시간 교반하여 리포솜을 제조하였다. 그 후의 과정은 실시예 1과 동일하게 수행하였다.

[0075] 비교예 2

[0076] 동결/해동법으로 상기 실시예 1과 동일하게 리포솜을 제조하되, 수화 후 리포솜 용액을 60℃에 10분 액체 질소

에 10분씩 놓아두었으며 이를 5회 반복 실시하였다. 그 후의 과정을 실시예 1과 동일하게 수행하였다.

[0077] **시험예 1: Gd-Dox 복합체가 봉입된 리포솜의 입자크기, 표면 전하 및 독소루비신과 Gd 함유율 측정**

[0078] 실시예 1과 비교예 2-3에 의해 제조한 리포솜의 입자 크기와 표면 전하를 전기영동 광산란 분광 광도기(ELS-Z, Otuska, 일본)를 이용하여 측정하였고, 독소루비신의 함유율은 클로르포름과 메탄올을 1:1로(중량/중량) 혼합한 용액에 리포솜을 녹인 후 UV-vis 분광광도계(UV-mini, Shimadzu, 일본)를 이용하여 497 nm에서 측정하였으며, Gd 함유율은 유도결합플라즈마 원자방출분광 분석기(Ultima-C, Jobin Yvon, 프랑스)를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 다음 표 1에 나타내었다:

표 1

구분	샘플 ID	수화용액 (mM)	입자크기 (nm)	표면전하 (mV)	독소루비신 함유율 (mM)	Gd 함유율 (mM)
실시예	Gd 50 리포솜	50	95.5±8.6	10.01±2.1	1.69±0.2	0.28±0.1
	Gd 150 리포솜	150	103.0±5.2	7.33±1.9	2.85±0.1	0.92±0.6
	Gd 250 리포솜	250	118.8±10.7	4.81±0.8	3.57±0.8	1.90±0.4
	Gd 350 리포솜	350	96.5±4.5	9.76±1.2	4.27±1.4	2.00±0.1
비교예 1	Gd 50 리포솜	50	112.4±9.7	8.21±3.5	0.75±0.5	0.11±0.07
	Gd 150 리포솜	150	115.1±7.6	5.7±2.7	1.86±0.2	0.21±0.8
	Gd 250 리포솜	250	109.7±12.7	9.87±5.5	2.55±1.1	0.80±0.1
	Gd 350 리포솜	350	118.5±9.4	9.55±2.7	3.57±1.0	1.70±0.5
비교예 2	Gd 50 리포솜	50	100.4±5.7	7.12±2.5	2.01±2.1	0.31±0.3
	Gd 150 리포솜	150	98.7±7.9	10.75±2.1	2.54±1.1	0.76±0.4
	Gd 250 리포솜	250	101.8±5.1	5.79±9.1	3.47±1.2	1.91±0.2
	Gd 350 리포솜	350	103.7±11.2	8.99±5.7	4.25±2.5	2.01±0.7

[0080] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 실시예 1 리포솜의 물리적 특성을 확인하였고, 이를 비교예 1-2의 리포솜과 대비한 결과 입자 크기 그리고 표면전하는 큰 차이를 보이지 않았으나, 비교예 1은 실시예 1에 비해 독소루비신과 Gd의 함유율이 낮은 것을 확인하였으며, 비교예 2는 실시예 1의 독소루비신과 Gd의 함유율이 비슷한 수준인 것을 확인하였다.

[0081] 또한, 표 1의 실시예 1에서 나타난 바와 같이 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ 용액의 농도가 증가 할수록 리포솜에 봉입되는 Gd의 양이 증가하였으며, 봉입된 Gd 양의 증가는 독소루비신의 봉입되는 양을 증가시켰다. 그러나 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ 용액의 농도가 250 mM 이상에서는 Gd의 봉입 양이 더 이상 크게 증가하지 않았다.

[0082] 도 1에 나타난 바와 같이, Gd-Dox 복합체는 리포솜의 색 변화를 통하여 간접적으로 관찰하였으며, 극저온 투과 전자현미경(cryo-TEM)(Tecnai G2 Spirit, FEI Company, 미국) 이미지를 통해 구체적인 리포솜 내부의 형태적 변화를 확인하였다. Doxil(Mountain View, 미국)과 같이 암모늄 설페이트 농도 구배에 의해 독소루비신을 봉입한 리포솜은 내부의 섬유성 버들(fibrous buddle) 형태가 관찰되었으나, Gd-Dox 복합체가 봉입된 본 발명의 리포솜에서 독소루비신은 리포솜 내부에서 특이적인 형태로 존재하지 않음을 확인하였다.

[0083] **시험예 2: Gd-Dox 복합체가 봉입된 리포솜의 자기공명영상**

[0084] 리포솜의 봉입된 Gd의 자기공명(MR) 특성을 4.7T MR 기계(Bruker-biospin, 독일)를 사용하여 평가하였으며, 농도에 따른 T_1 -강조 MR 이미지를 얻어 이완도를 측정하여 의약품으로 사용되고 있는 MRbester(태준제약, 한국)와 비교하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다. Gd 250 리포솜은 MRbester처럼 농도에 따른 T_1 -강조 MR 이미지를 얻을 수 있었으나 MRbester 에 비해 이완도가 약 2배 낮게 나타남을 확인하였다.

[0085] **시험예 4: Gd-Dox 복합체가 봉입된 리포솜의 세포 이입률과 Doxil과의 비교**

[0086] 리포솜의 세포 이입률을 측정하기 위하여 B16F10 암세포주를 사용하였으며, 24 웰 플레이트에 세포를 2×10^4

cells/well 수준으로 1일간 배양 후 독소루비신 약물과 상기 실시예 1의 Gd 250 리포솜과 Doxil을 각각 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 독소루비신이 함유된 배지를 2시간 동안 처리하였다. 2시간 후 배지를 제거하였고, PBS 완충용액으로 2번씩 세척한 후 세포를 5 ml 튜브에 모았다. 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, 미국)를 통하여 리포솜의 세포의 이입률을 판단하였으며, 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0087] 도 3에서 보는 바와 같이 유세포 분석 결과 Gd 250 리포솜의 독소루비신은 Doxil 보다 높은 세포내 이입 효율을 보였다.

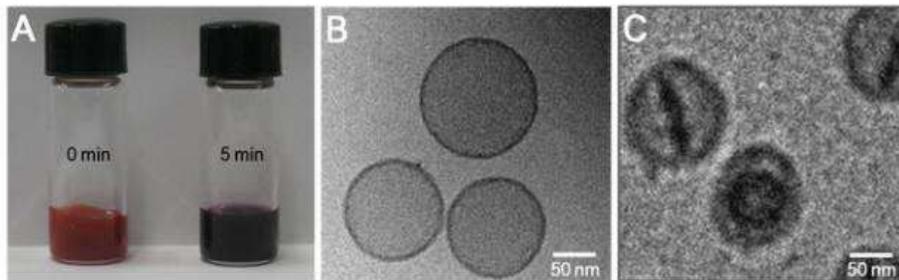
[0088] 실시예 1-5: Gd-Dox 복합체가 봉입된 리포솜의 세포 이입률과 MRbester과의 비교

[0089] 리포솜 내의 Gd의 세포내 이입 효율을 측정하기 위하여 B16F10 암세포주를 사용하였으며, 24 웰 플레이트에 세포를 2×10^4 cells/well 수준으로 1일간 배양 후 상기 실시예 1의 Gd 250 리포솜과 MRbester를 각각 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Gd가 함유된 배지를 2시간 동안 처리하였다. 2시간 후 배지를 제거하였고, PBS 완충용액으로 2번씩 세척한 후 질산(60%, 중량/중량)용액에 세포를 부유시킨 다음 60°C에서 12시간 동안 세포를 녹였다. 녹인 세포액은 유도결합플라즈마 원자방출분광 분석기(Ultima-C, Jobin Yvon, 프랑스)를 통하여 세포에 이입된 Gd의 농도를 확인하였으며, 그 결과는 도 4에 나타내었다.

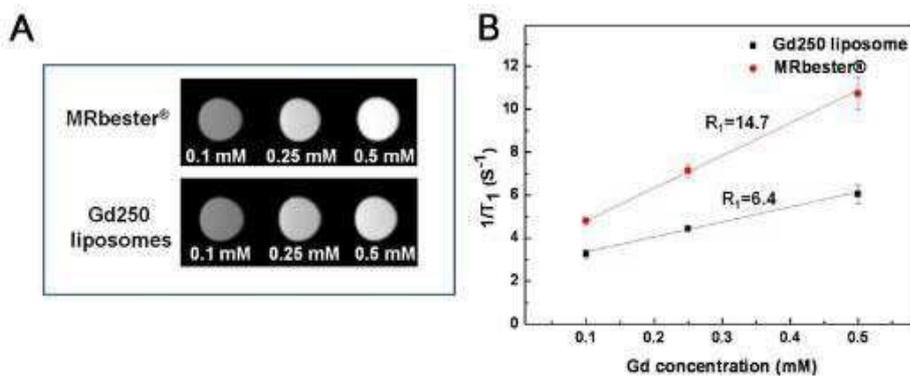
[0090] 도 4에서 보는 바와 같이 Gd 250 리포솜의 Gd는 MRbester 보다 높은 세포내 이입 효율을 보였다.

도면

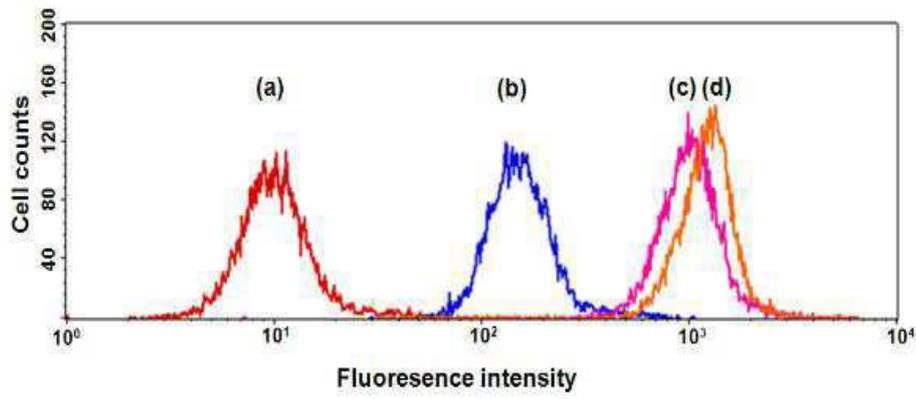
도면1



도면2



도면3



도면4

