



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월20일
(11) 등록번호 10-1513558
(24) 등록일자 2015년04월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0089753
(22) 출원일자 2013년07월29일
심사청구일자 2013년07월29일
(65) 공개번호 10-2015-0014280
(43) 공개일자 2015년02월06일
(56) 선행기술조사문헌
C. KOJIMA et al, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, Vol. 66, pp. 246-252*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
신병철
대전 유성구 엑스포로123번길 46-15, 501동 2204호 (도룡동, 스마트시티주상복합아파트)
위태인
대전 유성구 전민로 71, 108동 1003호 (전민동, 삼성푸른아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 4 항

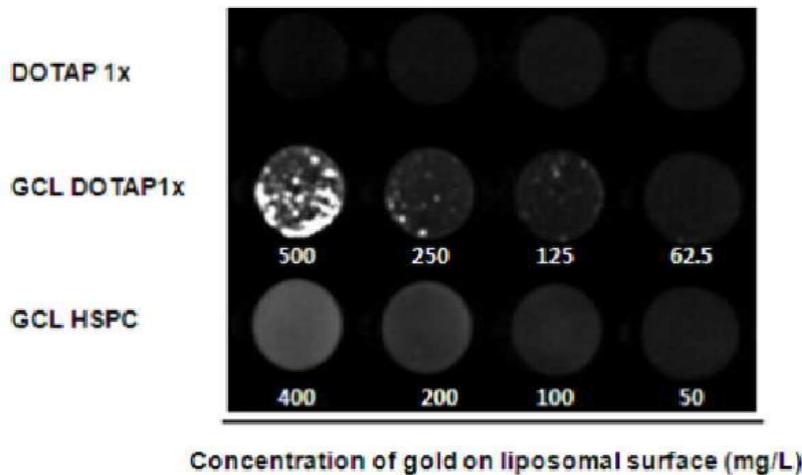
심사관 : 최영희

(54) 발명의 명칭 **금-코팅 리포솜 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 CT 조영제로서 사용 가능한 금-코팅 리포솜 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 생분해성의 리포솜으로 제조되어 몸에 축적되지 않고 분해될 수 있으며, 표면 코팅된 금은 면역반응을 일으키지 않고, 독성이 없어 안전하며, 리포솜이 림프절에서 오랫동안 잔류할 수 있어 투여 후 장시간 확인이 가능하여 영상을 비교적 쉽게 얻을 수 있고, 체내 순환시간이 짧은 기존의 CT 조영제의 한계를 극복할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

한희동

충북 청주시 상당구 영운로 137, (석교동)

조선행

대전 유성구 가정로 43, 111동 404호 (신성동, 삼성한울아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013003401

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초과학연구사업

연구과제명 집속 초음파 응답형 리포솜 전달체를 이용한 표적 지향성 약물 전달기술 개발

기여율 90/100

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1303-B0

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 산업기술연구회

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 대사증후군 치료제 개발 연구

기여율 10/100

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

양이온성 지질로서 1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)과, 중성 지질로서 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC) 및 콜레스테롤을 포함하되, 상기 양이온성 지질과 중성 지질의 질량비가 1:3-4인 양이온성 리포솜; 및 상기 양이온성 리포솜의 표면에 이온결합으로 결합된 금 이온을 포함하는 금-코팅 리포솜.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 양이온성 리포솜은 표면전하 값이 15-50 mV인 것을 특징으로 하는 금-코팅 리포솜.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 금-코팅 리포솜은 직경 50-300 nm의 나노리포솜인 것을 특징으로 금-코팅 리포솜.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 금-코팅 리포솜의 제조방법:

(a) 중성 지질인 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC) 및 콜레스테롤과 양이온성 지질인 1,2-디올레일-3-트리메틸 암모늄-프로판(DOTAP)을 사용하여 양이온성 리포솜을 형성시키는 단계, 상기 양이온성 지질과 중성 지질의 질량 비는 1:3-4이고; 및

(b) 상기 양이온성 리포솜과 환원된 금 이온을 반응시켜 양이온성 리포솜의 표면에 금 이온을 이온결합 시키는 단계.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 CT 조영제로서 사용 가능한 금-코팅 리포솜 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 암이나 혈관질환 등으로 인한 환자가 증가함에 따라 영상의학기기를 이용한 진단의 중요성이 강조되고 있다. 그 중에서 컴퓨터 단층촬영(computed tomography, CT)은 가장 널리 이용되는 영상진단 방법의 하나로서 CT 촬영을 위해서는 조영제의 투여가 선행되어야 한다. 그러나, 현재 사용되고 있는 CT 조영제로서 요오드화

벤조산 유도체는 신장독성이 있고, 체내 순환시간이 매우 짧다는 단점이 있다.

- [0003] 따라서, 이러한 저분자 요오드 화합물을 함유하지 않고도 자체로서 조영효과를 나타내는 금속 나노입자에 기반한 CT용 조영제가 개발되고 있다. 이와 관련하여, 특허문헌 1은 표면이 PEG로 치환된 금(Au) 나노입자 기반 CT용 조영제를 개시하고 있으며, 비특허문헌 1은 헤파린으로 코팅된 금 나노입자 기반 CT용 조영제를 개시하고 있다.
- [0004] 상기 금속 나노입자에 기반한 CT용 조영제는, 높은 원자번호를 갖는 금속(Au, Ta 등) 자체가 조영제의 역할(X-선을 흡수)을 하는 원리로, 나노입자의 표면을 PEG나 헤파린으로 코팅하여 생체적합성을 향상시키면서, 각각 체내 순환시간의 증대를 통한 원활한 CT 이미징 또는 간으로의 축적을 통한 특정부위의 조영효과 증대를 도모하였다.
- [0005] 그러나, 상기에서 설명한 조영제는 고비용의 문제뿐만 아니라, 원활한 배설이 이루어지지 않고 생체 내 장기간 축적됨(즉, 수년-수십년 이상의 반감기)에 따른 안전성의 한계, 또는 화합물 구조의 안정성, 즉 자기조립 구조체(self-assembled structure)가 체내 환경에서도 안정하게 원래의 구조를 유지하고, 제조 시 항상 동일한 분자량 분포를 보이는 혼합물을 얻어 동일한 성능을 갖도록 하는 재현성 확보의 어려움이 있을 것으로 예상된다. 또한, 이러한 고분자 혼합물에 기반한 인체 내 투여용 소재의 경우, 현재까지 아직 독성 시험 기준이 전세계적으로 정립되지 않아 실질적으로 임상시험을 거쳐 상업화하는 데까지 여러 가지 난관이 있을 것으로 예상된다.
- [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.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) (선행특허문헌 1) PCT 국제출원 PCT/KR2006/003452

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) (선행논문 1) IC. Sun, et al. Chem. Eur. J. 2009, 15, 13341-13347

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 현재 CT 조영제로서 이용되는 요오드화 벤조산 유도체가 갖는 신장독성과 체내 순환시간이 매우 짧다는 문제점에 착안하여, 이러한 문제점이 없는 새로운 CT 조영제를 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 생분해성이며 체내 체류 시간이 긴 양이온성 리포솜의 표면에 면역반응을 일으키지 않으며 안전한 금 이온을 코팅함으로써, CT 조영제로 사용할 수 있는 금-코팅 리포솜을 제조하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 금-코팅 리포솜을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 금-코팅 리포솜을 포함하는 조영제를 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 금-코팅 리포솜의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 양이온성 리포솜; 및 상기 양이온성 리포솜의 표면에 이온결합으로 결합된 금 이온을 포함하는 금-코팅 리포솜을 제공한다.
- [0015] 본 발명자들은 현재 CT 조영제로서 이용되는 요오드화 벤조산 유도체가 갖는 신장독성과 체내 순환시간이 매우 짧다는 문제점에 착안하여, 이러한 문제점이 없는 새로운 CT 조영제를 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 생분해성이며 체내 체류 시간이 긴 양이온성 리포솜의 표면에 면역반응을 일으키지 않으며 안전한 금 이온을 코팅함으로써, CT 조영제로 사용할 수 있는 금-코팅 리포솜을 제조하였다.
- [0016] 본 발명의 금-코팅 리포솜은 인체 내의 세포에 흡수되고, 리포솜 표면에 이온결합된 금의 조영 효과로 CT 조영제로서 기능할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 양이온성 리포솜은 당업계에서 공지된 다양한 지질, 즉 양이온성 지질, 중성 지질 및/또는 음이온성 지질을 사용하여 표면 전하 값이 양의 값을 나타내도록 제조될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 양이온성 리포솜은 중성 지질 및 양이온성 지질을 포함한다. 즉, 본 발명의 양이온성 리포솜은 중성 지질과 양이온성 지질을 적절한 비율로 혼합하여 제조될 수 있으며, 이때 이용 가능한 양이온성 지질의 예에는, 1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), 1,2-디스테로일-3-트리메틸암모늄-프로판(DSTAP), 디메틸디옥타데실 암모늄 브로미드(DDAB), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(DXTAP), 디데실 디메틸암모늄-프로판(DDAC), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판(DXDAP), N-1-(2,3-디올레일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA) 및 1,2-디올레일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP) 등이 있다.
- [0019] 하나의 특정예에서 상기 양이온성 지질은 DOTAP이다.
- [0020] 상기 양이온성 리포솜 제조에 이용 가능한 중성 지질의 예에는, 수소화 대두 포스파티딜콜린 (HSPC), 콜레스테롤, 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 달걀 포스파티딜콜린(EPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 모노팔미토일 포스파티딜콜린(MPPC), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DBPC), 디팔미토일 포스파티딜 에탄올아민(DPPE), 카르보닐 메톡시폴리에틸렌 글리콜-디스테아로일 포스파티딜 에탄올아민(MPEG-750-DSPE, -MPEG-2000-DSPE 및 MPEG-5000-DSPE) 및 디올레오일 포스파티딜콜린(DOPC) 등이 있다.
- [0021] 하나의 특정예에서 상기 중성 지질은 HSPC 및/또는 콜레스테롤이다.
- [0022] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 양이온성 지질과 중성 지질은 질량비가 1:1-5이다. 하나의 특정예에서 상기 양이온성 지질과 중성 지질의 질량비는 1:1-4이다.
- [0023] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 양이온성 리포솜은 음이온성 리포솜을 이용하여 제조될 수도 있다. 즉, 제조된 리포솜의 표면전하 값이 양의 값을 갖도록 하는 범위 내에서 음이온성 지질을 포함할 수 있다. 이때 이용 가능한 음이온성 지질의 예에는, 디미리스틸글리세로포스페이트, 디팔미토일글리세로포스페이트 디미리스틸글리세로포스페이트, 디스테로일글리세로포스페이트, 디스테로일글리세로포스포글리세롤, 디팔미토일글리세로포스포라글리세롤, 디미리스틸글리세로포스포세린, 디팔미토일글리세로포스포세린 및 디스테로일글리세로포스포세린 등이 있다.
- [0024] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 양이온성 리포솜은 표면전하 값이 15-50 mV이다. 하나의 특정예에서 상기 양이온성 리포솜의 표면전하 값은 20-50 mV이다.
- [0025] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 금-코팅 리포솜은 나노 크기 리포솜이다. 하나의 특정예에서 본 발명의 금-코팅 리포솜의 평균 입경은 10-400 nm이고, 다른 특정예에서는 50-300 nm이며, 또 다른 특정예에서는 100-300 nm이고, 또 다른 특정예에서는 100-250 nm이다. 금-코팅 리포솜 나노입자의 평균 입경이 상기 범위를 초과할 경우 체내 순환 시 세망내피계에 의해 흡수가 발생하여 목표 부위에 리포솜을 전달하기 어려울 수 있다. 나노크기 리포솜의 작은 입자크기는, 본 발명의 금-코팅 리포솜이 원하는 목표 조직에의 침투를 용이하게 한다.
- [0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 금-코팅 리포솜의 제조방법을 제공한다:

- [0027] (a) 중성 지질과 양이온성 지질을 사용하여 양이온성 리포솜을 형성시키는 단계; 및
- [0028] (b) 상기 양이온성 리포솜과 환원된 금 이온을 반응시켜 양이온성 리포솜의 표면에 금 이온을 이온결합 시키는 단계.
- [0029] 본 발명의 방법은 상기 금-코팅 리포솜을 최종 산물로 하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0030] 본 발명의 방법을 각 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0031] 단계 (a): 양이온성 리포솜 형성
- [0032] 본 발명에 따르면, 먼저 양이온성 리포솜을 제조한다. 상기 양이온성 리포솜은 당업계에 공지된 다양한 양이온성 지질과 중성 지질을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 양이온성 리포솜의 제조는, (a-1) 지질을 적합한 소수성 유기용매(예컨대, 클로로포름)에 용해시킨 후 증발기(예컨대, 회전증발기)를 사용하여 감압 증류하여 적합한 기질 상에 지질 박막을 형성시키는 단계; 및 (a-2) 형성된 지질 박막을 수화시켜 리포솜을 형성시키는 단계를 포함한다. 이때, 지질 박막의 수화를 위하여 암모늄설페이트 용액을 사용할 수 있다.
- [0034] 단계 (b): 금-코팅 리포솜 제조
- [0035] 이후, 제조된 양이온성 리포솜과 환원된 금 이온을 반응시켜 양이온성 리포솜의 표면에 금 이온을 이온결합시켜 금-코팅 리포솜을 제조한다.
- [0036] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 단계 (a)에서 얻은 양이온성 리포솜을 함유하는 용액에 염화금(HAuCl₄) 및 환원제를 첨가한 후 교반하여 반응시킴으로써 실시할 수 있다. 이때, 금의 환원을 위한 환원제로서 아스코르브산을 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0038] (i) 본 발명의 금-코팅 리포솜은 표면에 코팅된 금 입자에 의하여 CT 조영제로서 기능을 나타내며, 리포솜 내부에 약물을 봉입하는 경우에는 치료 효과를 함께 얻을 수 있다.
- [0039] (ii) 본 발명은 생분해성의 리포솜으로 제조되어 몸에 축적되지 않고 분해될 수 있으며, 표면 코팅된 금은 면역 반응을 일으키지 않고, 독성이 없어 안전하다.
- [0040] (iii) 본 발명은 리포솜이 림프절에서 오랫동안 잔류할 수 있어 투여 후 장시간 확인이 가능하여 영상을 비교적 쉽게 얻을 수 있고, 체내 순환시간이 짧은 기존의 CT 조영제의 한계를 극복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 실시예에서 제조한 리포솜 및 금-코팅 리포솜을 함유하는 현탁액의 색을 보여주는 사진이다.
- 도 2는 금-코팅 리포솜의 표면 금 함량을 보여준다.
- 도 3은 금-코팅 리포솜의 CT 조영제로서의 효과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 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.

[0043] 실시예

[0044] 실시예 1: 양이온성 리포솜 제조

[0045] 리포솜을 제조하기 위하여, 지질 성분인 L-a 포스타디딜콜린(HSPC), 콜레스테롤(CHOL) 및 1,2-디오레일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)(Avanti polar)을 다양한 질량비로 사용하였다(표 1에 표기). 각 지질을 클로로포름에 용해시킨 후, 회전 증발기를 사용하여 40℃에서 감압하여 둥근 플라스크 벽면에 얇은 지질막을 형성시켰다. 형성된 지질막에 암모늄설페이트 250 mM 용액을 첨가하여 지질막이 완전히 분산될 때까지 수화하여 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜은 크기를 조절하기 위하여 가압압출기로 각각 200 nm, 100 nm 및 80 nm의 폴리카보네이트 분리막(Whatman, USA)을 이용하여 4-5회 이상씩 가압 압출하였다. 투석막(MWCO 12,000-14,000)을 이용하여 리포솜 수용액을 4℃에서 24시간 이상 투석하여 리포솜 안에 들어가지 않은 암모늄설페이트를 제거하였다.

[0046] 실시예 2: 양이온성 리포솜 표면에 금 코팅

[0047] 금 코팅은 리포솜 수용액에 금을 넣어준 후 금을 환원시켜서 리포솜 표면에 코팅시키는 방법으로서, 실시예 1에서 제조된 1 ml 리포솜 용액에 각각 100 mM 염화금(HAuCl₄) 수용액 30 μl와 500 mM 아스코르브산 수용액 40 μl를 교반하면서 천천히 넣어주고, 10분 이상 리포솜 색깔이 변할 때까지 반응시켜 금 코팅 리포솜(GCL)을 제조하였다. 이후 반응이 되지 않은 염화금과 아스코르브산을 제거하기 위하여, 투석막(MWCO 12,000-14,000)을 이용하여 4℃에서 24시간 이상 투석하였다.

[0048] 시험예 1: 제조된 리포솜의 입자크기와 표면 전하 측정

[0049] 각각 실시예 1 과 2에서 제조한 양이온성 리포솜과 GCL의 입자크기 및 표면 전하를 전기영동 광산란 분광광도기(ELS-Z, Otuska, 일본)를 이용하여 측정하였다. 측정결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	구성 (질량 비 w/w)	입자크기 (nm)	표면전하 (mV)	입자크기(nm) [금 코팅 후]			
				10분	24시간		
실시예1-1	HSPC	HSPC:CHOL (3:1)	109.0±7.2	0.31±3.5	실시예2-1	185.8±7.6	253.8±4.4
실시예1-2	DOTAP 1X	HSPC:CHOL:DOTAP (3:1:1)	107.2±8.3	27.47±2.3	실시예2-2	154.8±9.2	163.3±6.5
실시예1-3	DOTAP 2X	HSPC:CHOL:DOTAP (3:1:2)	111.3±5.2	33.17±5.6	실시예2-3	155.6±8.2	230.9±8.4
실시예1-4	DOTAP 4X	HSPC:CHOL:DOTAP (3:1:4)	109.1±9.3	42.74±4.4	실시예2-4	170.3±6.3	189.3±12

[0050]

[0051] 실시예 1에서 제조한 양이온성 리포솜의 물리적 특성을 확인한 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이 입자크기는 큰 차이를 보이지 않았으나, DOTAP의 질량비가 커질수록 표면전하가 점점 증가하였다(표 1). 또한, 도 1에 나타낸 바와 같이, 각 리포솜은의 색이 다르게 나타났고, 그에 따라 흡광도도 다르게 나타난다(도 1).

[0052] 시험예 2: 금-코팅 리포솜 표면의 Au 정량 분석

[0053] 리포솜의 금 코팅 여부를 확인하기 위하여, 유도결합 플라즈마 분석(ICP)과 에너지 분산형 엑스레이 측정기(EDS)를 이용하여 리포솜 표면의 Au를 정량 및 분석하였다.

[0054] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 유도 결합 플라즈마 분석 결과 금-코팅리포솜의 표면 Au의 양은 250±2.4 mg/L이었으며, 에너지 분산형 엑스레이 측정 결과 Au 이온이 검출되었다. 이러한 결과를 통하여 리포솜 표면의 금 코팅을 확인할 수 있었다(도 2).

[0055] **시험예 3: 금-코팅 리포솜의 CT 조영 효과**

[0056] 실시예 2에서 제조한 GCL DOTAP 1x의 조영 효과를 CT로 스캔하여 확인하였다. CT 촬영 결과는 도 3에 나타내었다

[0057] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 금-코팅 리포솜(GCL DOTAP 1x)은 그렇지 않은 리포솜과 비교했을 때 조영 효과를 나타내었다(도 3).

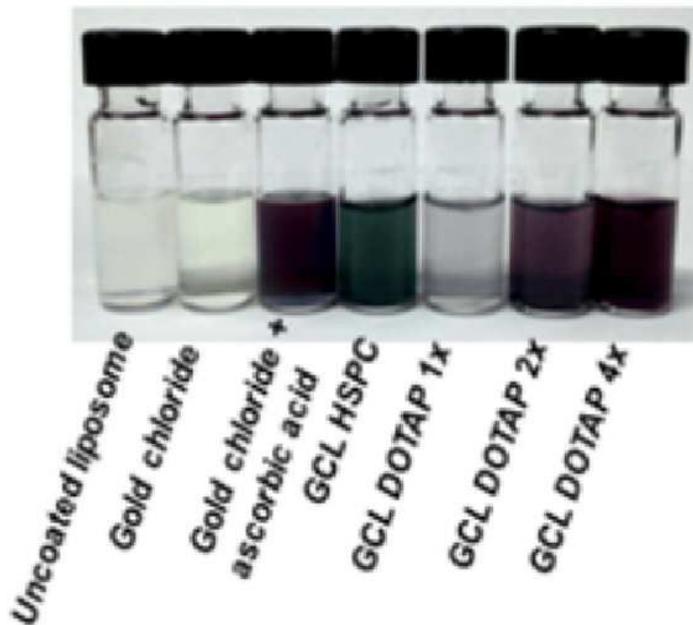
[0058] **사사(Acknowledgement)**

[0059] 본 연구는 교육과학기술부 도약과제(NRF-2009-0078434)의 연구비 지원으로 연구되었음.

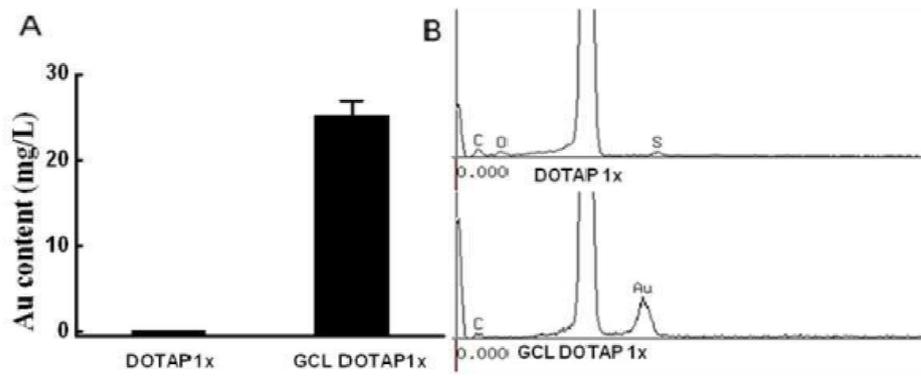
[0060] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

