(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0105092
(43) 공개일자 2012년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 47/30* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0022663
(22) 출원일자 2011년03월15일
심사청구일자 2011년03월15일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
전태준
경기도 용인시 기흥구 한보라1로43번길 22, 한보라휴먼시아5단지 506동 704호 (보라동)
김원영
인천광역시 부평구 갈월서로 46, 7동 1202호 (갈산동, 태화아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

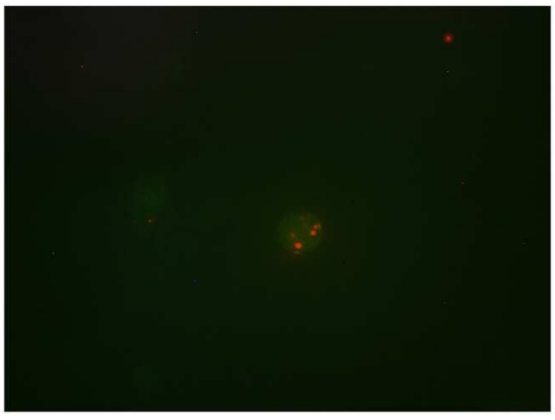
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **지질 이중막 구체 및 지질 이중막 구체를 포집하고 있는 다중 지질 이중막 구체의 제작법**

(57) 요 약

본 발명은 다음의 단계를 포함하는 단일 또는 다중 지질 이중막 구체(liposome or vesosome)의 제조방법을 제공한다: (a) 수용성 소포체 및 소수성 소포체를 제조하는 단계; (b) 상기 소포체들을 미세채널로 주입하여 역 미셀전구체(reverse micelle precursor)를 제조하는 단계; (c) 상기 역 미셀 전구체에 원심력을 가하여 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 제조하는 단계. 본 발명의 제조방법은 미세채널 내 T-교차점에서 역 미셀 전구체를 제조하고 회전 장치를 이용하여 단일 또는 다중 지질 이중막구체를 자동화하여 용이하게 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 제조장치는 (i) 주사기 펌프(syringe pump); (ii) 미세유체흐름 장치(microfluidic device); 및 (iiic) 회전 장치(spinning device)로 이루어져 있으며, 회전 장치에 의한 원심력을 이용한다. 따라서, 본 발명은 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 저비용으로 효과적이면서 용이하게 제조할 수 있는 방법을 제공하며, 이는 약물의 미세캡슐화(microencapsulation)를 통해 다양한 응용분야(예컨대, 치료제, 진단제, 등)에 적용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



(72) 발명자

정승환

인천광역시 남동구 장승남로 82, 105동 206호 (만수동, 현대아파트)

박중진

인천광역시 중구 인항로 30, 현대 아이파크 102동 202호 (신흥동3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-0088893
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기본연구
연구과제명	인공세포막을 이용한 단분자 거동 및 디텍션 시스템 연구 개발
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2010.09.01 ~ 2011.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2009-0068624
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신진교수연구지원(이공분야)
연구과제명	신약 스크리닝 및 이온통로 연구를 위한 고집적, 고효율 인공세포막 칩 연구개발
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 단일 또는 다중 지질 이중막 구체의 제조방법:

(a) 수용성 소포체 및 소수성 소포체를 제조하는 단계;

(b) 상기 소포체들을 미세채널로 주입하여 역 미셀전구체(reverse micelle precursor)를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 역 미셀 전구체에 원심력을 가하여 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 제조하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 소수성 소포체는 한 종류 이상의 소수성 소포체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 소수성 소포체는 서로 독립적인 목적 카르고(cargo of interest)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 카르고는 화학물질, 나노입자, 펩타이드, 폴리펩타이드, 핵산 또는 탄수화물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 주입은 2개 이상의 주사기 펌프(syringe pumps)를 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 주사기 펌프는 서로 독립적인 소포체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 미세채널은 상기 주사기 펌프로부터 유래한 튜브가 교차하는 지점이 1개 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 미세채널의 유속(flow rate)은 주사기 펌프의 세기 조절을 통해 조절되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 역 미셀전구체는 수용액 통로(aqueous phase)와 유기용액 통로(oil phase)의 교차점에서 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 역 미셀전구체의 크기는 상기 수용액 및 유기용액의 유속의 비율에 따라 결정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 원심력은 수용액과 유기용액의 비율에 따라 조절되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 원심력의 조절은 단일 또는 다중 지질 이중막의 크기를 결정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 단일 또는 다중 지질 이중막 구체.

청구항 14

제 13 항의 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 유효성분으로 포함하는 카르고 전달(Cargo delivery vehicle)용 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 카르고는 화학물질, 나노입자, 펩타이드, 폴리펩타이드, 핵산 또는 탄수화물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

(a) 주사기 펌프(syringe pump); (b) 미세유체흐름 장치(microfluidic device); 및 (c) 회전 장치(spinning device)로 이루어진 단일 또는 다중 지질 이중막 구체 제조용 장치.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 주사기 펌프는 2개 이상으로 이루어진 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 18

제 16 항에 있어서, 상기 주사기 펌프는 서로 독립적인 소포체를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 19

제 16 항에 있어서, 상기 회전 장치는 원심력의 조절을 통해 단일 또는 다중 지질 이중막의 크기를 조절하는 것을 특징으로 하는 장치.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단일 또는 다중 지질 이중막 구체의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 단일 또는 다중 지질 이중막 구체의 용도, 그리고 단일 또는 다중 지질 이중막 구체 제조용 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 리포좀(liposome) 혹은 베소좀(Vesosome)은 안이 비어있는 구체이고 그 내부에 실험자 혹은 이용자가 원하는 물질들을 넣어 세포내로 전달을 쉽게 해줄 수 있어 약품전달체로 서의 관심이 높아지고 있는 상황이다. 현재, 산업현장에서는 리포좀이 화장품산업에서 기능성물질의 피부세포로의 전달이나 식품산업에서는 여러가지 영양성분의 캡슐화(encapsulation) 및 수송 등에 널리 쓰이고 있는 기술이다. 또한, 미세흐름장치(microfluidic device)의 경우 나노 크기의 물질을 합성하거나 작은 크기의 세포배양 혹은 큰 단계의 배양을 하기 이전의 실험적 배양이나 대량으로 배양을 할 수 없는 세포 등의 시험배양 및 배양경향성을 실험하는 첨단의 연구 기술이다. 이러한 최신경향의 두 가지 기술로 본 발명자가 만들려는 다중 지질 이중막 구체은 단일 지질 이중막 구체(liposome) 내(內)의 리포좀으로 종래의 리포좀이 한 가지 물질만을 포집하여 원하는 곳으로 이동시키는 데 비하여 각기 다른 물질이 들어간 리포좀을 하나의 리포좀 안에 넣어 동시에 여러가지 물질을 이동시키고 반응시킬 수 있다. 하지만, 상기 베소좀의 생성은 2007년에 발표된 논문(Boyer, C., and Zasadzinski, JA., Multiple Lipid Compartments Slow Vesicle Contents Release in Lipases and Serum, *ACS Nano.*, 1(3): 176-82(2007)) 외에는 별다른 진전이 없는 상태이고, 상기 논문에 나온 방법도 매우 어려워 다년간 만들어본 숙련자만이 만들 수 있을 뿐만 아니라 만드는데 약 2일 이상의 시간이 소요된다는 큰 단점이 있다. 베소좀보다 상대적으로 만들기 쉽다는 리포좀의 경우도 종래의 기술은 만들기 어렵다. 기존의 리포좀 생성기술은 음파파쇄기(Sonicator)와 미세 다공성 막(pore membrane)같은 고가의 장비를 사용하여 제조되며 이와 같은 일련의 과정은 초보자가 하기 어려운 매우 숙련된 기술을 요하는 제조방법이다. 또한, 음파파쇄기의 세기나 미세 다공성 막의 구멍 크기의 의존하여 리포좀의 크기가 결정되는 종래의 방법은 매우 비효율적이다. 이렇게 만들어진 리포좀을 다시 다른 리포좀으로 감싸 베소좀을 만드는 방법도 매우 까다롭고 힘든 작업이다.

[0003] 따라서, 보다 간편하고 용이하게 실시할 수 있는 베소좀의 제조방법이 당업계에서 시급히 요구되고 있는 실정이다.

[0004] 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

[0005] 본 발명자들은 리포좀 또는 베소좀을 간편하게 제조할 수 있는 신규한 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 수용액 통로(aqueous phase) 및 유기용액 통로(oil phase)를 미세유체흐름 장치(microfluidic device) 내에서 교차시켜 역 미셀전구체(reverse micelle precursors)를 형성시키고, 이를 회전 장치(spinning device)의 원심력을 이용하여 리포좀 또는 베소좀으로 용이하게 제조할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 단일 또는 다중 지질 이중막(liposome or vesosome)의 제조방법을 제공한다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 단일 또는 다중 지질 이중막을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 카르고 전달(Cargo delivery vehicle)용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 단일 또는 다중 지질 이중막 제조용 장치를 제공하는 데 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 다음의 단계를 포함하는 단일 또는 다중 지질 이중막 구체(liposome or vesosome)의 제조방법을 제공한다:

[0012] (a) 수용성 소포체 및 소수성 소포체를 제조하는 단계;

[0013] (b) 상기 소포체들을 미세채널로 주입하여 역 미셀전구체(reverse micelle precursor)를 제조하는 단계;

[0014] (c) 상기 역 미셀 전구체에 원심력을 가하여 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 제조하는 단계.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 방법에 의해 제조된 단일 또는 다중 지질 이중막 구체(liposome or vesosome)를 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 유효성분으로 포함하는 카르고 전달(Cargo delivery vehicle)용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 주사기 펌프(syringe pump); (b) 미세유체흐름 장치(microfluidic device); 및 (c) 회전 장치(spinning device)로 이루어진 단일 또는 다중 지질 이중막 구체 제조용 장치를 제공한다.

[0018] 본 발명자들은 리포좀 또는 베소좀을 간편하게 제조할 수 있는 신규한 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 수용액 통로(aqueous phase) 및 유기용액 통로(oil phase)를 미세유체흐름 장치(microfluidic device) 내에서 교차시켜 역 미셀전구체(reverse micelle precursors)를 형성시키고, 이를 회전 장치(spinning device)의 원심력을 이용하여 리포좀 또는 베소좀으로 용이하게 제조할 수 있음을 발견하였다.

[0019] 본 발명은 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 효과적이면서 용이하게 제조할 수 있는 방법을 제공하며, 이는 약물의 미세캡슐화(microencapsulation)를 통해 다양한 응용분야(예컨대, 치료제, 진단제, 등)에 적용될 수 있다.

[0020] 생분해성 폴리머 또는 리포좀 안에 약물의 미세캡슐화는 항생제 및 화학치료제 같은 많은 약물들의 약물동력학을 개선하는데 이용되어 왔다[J. A. Zasadzinski, Current Opinion in Solid State and Materials Science 2, 345 (1997); D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos, Current Opinion in Solid State and Materials Science 1, 392 (1996); D. D. Lasic, Liposomes: From Physics to Applications (Elsevier, Amsterdam (1993); T. M. Allen, Current Opinion in Colloid and Interface Science 1, 645 (1996)]. 상기 약물 전달 구조체는 폴리머 또는 지질 쉘 안에 약물을 효과적으로 캡슐화하도록 디자인되어 환자에게 투여된다. 약물 전달 운반체(drug delivery vehicles)는 신체의 특정 타겟 위치에 함유하고 있는 약물을 배출하기 위해 능동적으로 또는 수동적으로 타겟된다. 이러한 타겟된 약물 배출은 캡슐화된 약물의 효율성을 증가시키고 약물 만을 투여하였을 때 전형적으로 발생하는 심각한 부작용을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 현재 신체의 특정 위치로의 지속적인 배출 또는 타겟된 배출하기 위해 단막성 소포체(unilamellar vesicles)가 많은 화합물에 대한 약물 전달 운반체로서 이용되고 있다. 배출된 약물은 소포체의 수용성 내부에 함유되고 배출은 소포체 이중막을 통한 느린 침투로 이루어진다. 안정성의 증대, 침투율의 감소, 이중막 내로의 폴리머의 삽입 또는 혈류 내의 대식세포에 의한 제거의 감소 등을 위해 단막성 소포체 막의 다양한 변형들이 실시되고 있다. 예컨대, 상기 변형은 이중막 내에 분자들을 폴리머화시키거나 또는 교차결합시키는 변형을 포함한다.

[0021] 리포좀은 항상 폐쇄성 구형(sealed, usually spherical)으로, 다양한 약물을 캡슐화할 수 있는 단막성 또는 다막성(multilamellar) 소포체이다. 리포좀은 현재까지 가장 많이 연구되고 있는 소포체이고 안정성, 약물동력학 및 생분포(biodistribution)를 변형시킬 수 있는 많은 지질 및 조성물을 가지도록 제조될 수 있다[T. M. Allen et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 16, 267-284 (1995)]. 상기 지질 이중막은 약물을 캡슐화하여 이

의 배출율을 조절하는 기능을 한다. 전형적으로, 리포좀은 신체로부터 외래 물질을 제거하고자 하는 대식세포로부터 리포좀을 보호하기 위해 소포체 막 내로 삽입된 폴리머를 포함한다. 상기 폴리머들은 리포좀의 순환시간(circulation time)을 크게 증가시킨다. 또한, 특이적인 타겟 기관 또는 세포에 소포체를 타겟하기 위해 리포좀은 표면에 특이적인 결합 제제를 삽입할 수 있다.

[0022] 운반 시스템으로서의 다막성 및 단막성 리포좀의 단점은 크기이다. 즉, 리포좀의 크기는 대부분의 정상 막 배리어와 교차하는 것을 억제하고 정맥 내 경로(intravenous route)에 의해 투여를 제한한다. 또한, 리포좀의 조직 선택성은 리포좀을 외래 미세입자(microparticulates)로 인지하여 간 및 비장 같은 조직에 리포좀을 집중시키는 세망 내피조직 세포(reticuloendothelial cells)에 제한된다. 리포좀 시스템의 추가적인 단점은 약물 캡슐화, 약물 침투성 및 리포좀 생체적합성(biocompatibility)를 조절하기 위한 단일 지질막에 의존한다는 것이다. 상술한 기능을 효과적으로 수행할 수 있는 지질막을 발견하는 것이 매우 어려운 것으로 알려져 있다.

[0023] 전형적으로, 베소좀은 크기 면에서 매우 작고 외층 이중막(outer bilayer membrane)의 지질 조성물을 조작하거나 또는 기계적인 과정(예컨대, 제한된 크기의 필터를 통한 베소좀의 배출)에 의해 그 직경이 약 0.05 마이크론으로부터 5 마이크론으로 조절된다. 베소좀은 많은 수용성 또는 지질-용해성 약물 또는 다른 용질을 내부 소포체 또는 외부 캡슐(즉, 소포체와 외층 이중막 사이의 공간) 안에 또는 양 쪽 모두에 함유할 수 있다. 이후, 상술한 약물 또는 다른 수용성 물질은 내부 소포체 막 및 외층 이중막을 통해 점진적으로 침투할 수 있다.

[0024] 상술한 베소좀의 제조는 일반적으로 다단계(multi-step) 과정에 의해 제조될 수 있다. 첫 번째 단계로, 내부 포함 유니트(interior containment units)를 제조하여 운반될 특이 약물 또는 다른 제제를 로딩한다. 두 번째 단계는 응집된(aggregated) 소포체를 이용하는 경우에 소포체 이중막 또는 함유물(contents)의 파괴 없이 크기-조절된 소포체 응집체를 제조하는 단계이다. 세 번째 단계는 외막(outer membrane) 내에 자유 또는 응집된 소포체를 캡슐화시키는 단계이다. 상술한 베소좀의 제조방법은 그 과정이 복잡할 뿐 아니라, 매우 어렵고 효율성이 떨어지는 단점을 가진다.

[0025] 본 발명의 방법에 따르면, 본 발명의 단일 또는 다중 지질 이중막 구체(liposome or vesosome)는 다음과 같이 용이하게 제조될 수 있다.

[0026] (a) 수용성 소포체 및 소수성 소포체를 제조하는 단계.

[0027] 수용성 및 소수성 소포체의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있는데, 예를 들어, 계면활성제-투석법(Detergent-dialysis), 초음파 방법(sonication), 자발적인 소포체 제조법(spontaneous vesicle preparations), 역상 증발법(reverse phase evaporation) 등을 포함하며, 모든 가능한 방법이 소포체 제조에 이용될 수 있다. 즉, 다양한 형태의 소포체 제조방법은 다음과 같다: (a) 역상 증발법, 계면활성제-투석법, pH 점프 같은 소포체의 화학적 제조방법; (b) 초음파 처리방법(ultrasonication) 같은 기계적 처리방법; 및 (c) 특별한 처리 없이 소포체를 직접적으로 평형화시키는 자발적인 소포체 제조방법[Jung, H. T. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98, 1353]. 비캡슐화된 생물학적 제제는 상술한 소포체 제조 과정의 단계에서 다양한 투석 기법, 이온 교환, 크로마토그래피, 여과 또는 원심분리를 통해 제거될 수 있다. 또한, 내부 소포체를 제조하는 단계 및 약물을 로딩하는 단계도 당업계에 잘 알려져 있다(T. M. Allen et al., Advanced Drug Delivery Reviews, 16, 267-284 (1995); T. M. Allen, Current Opinion in Colloid and Interface Science, 1, 645-651 (1996); D. D. Lasic, Liposomes: From Physics to Applications, (Elsevier, Amsterdam (1993)); D. D. Lasic et al., Current Opinion in Solid State and Materials Science, 1, 392-400 (1996)).

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 유기용액은 헥세인(Hexane), 데칸(decane), n-데칸(n-decane), 도데칸(dodecane), 스쿠알렌, 콜레스테롤, 테트라데칸(tetradecane), 헥사데칸(hexadecane),노난(nonane), 사이클로헥산, 폴리비닐알코올, 라우르산, 아세트산, 포름산, 벤젠, 나프탈렌, 니트로벤젠, 페놀 및 에틸렌 브로마이드로 구성된 군으로부터 선택된 최소 하나 이상의 유기용매를 포함하고, 보다 바람직하게는, 본 발명에 적합한 유기용액은 헥세인(Hexane), 데칸(decane), n-데칸(n-decane), 스쿠알렌 및 콜레스테롤로 구성된 군으로부터 선택된 최소 하나 이상의 유기용매를 포함한다. 또한, 더욱 견고한 지질 이중막을 제조하기 위해, 상기 유기용매의 혼합 비율을 조절할 수 있다.

[0029] 예를 들어, 데칸과 헥사데칸의 혼합물을 지질 유기용액의 제조에 이용하는 경우, 1:9-2:8의 데칸:헥사데칸의 중량비를 가지는 혼합물을 이용하는 것이 바람직하며, 스쿠알렌과 헥사데칸의 경우에도 1:9-2:8의 중량비를

가지는 혼합물을 이용하는 것이 바람직하다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 지질 이중막 전구체로서의 지질 유기용액의 제조에 사용되는 지질은 당업계에서 지질 이중막을 제조할 때 사용하는 어떠한 지질과 친수성과 소수성을 포함하는 블록공중합체(AB diblock copolymer, ABA triblock copolymer)도 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 적합한 지질은 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 카르디오리핀(cardiolipin), 콜레스테롤 및 스핑고마이엘린이다. 보다 구체적으로, 본 발명에 적합한 지질은 아솔렉틴(Asolectin), 다이파이타노일포스파티딜콜린(Diphytanoylphosphatidylcholine, DPhPC), DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DHPC(1,2-diheptanoyl -sn-glycero-3-phosphocholine), DHPE(1,2-dihexanoyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine), DMPC(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DIODPC(1,2-DiODodecyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), DMPS(dimyristoyl phophatidylserine), DLPC(dimyristoyl phosphatidylglycerol, dilauryl phosphatidycholine), DMPE(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DMPG(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), Lyso PC(1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine), Lyso PE(1-oleoyl-2 -hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DDPC(1,2-didecanoyl-sn- glycero-3-phosphocholine), DEPA-NA(1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DEPC(1,2-erucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DEPE(1,2- dierucoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DLOPC(1,2-linoleoyl- sn-glycero-3-phosphocholine), DLPA-NA(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DLPE(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DLPS-NA(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoserine (sodium salt)), DMPA-NA(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DMPS-NA(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (sodium salt)), DOPA-NA(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DOPC(1,2-oleoyl -sn-glycero-3-phosphocholine), DOPE(1,2-dioleoyl-sn- glycero-3-phosphoethanolamine), DOPS-NA(1,2-dioleoyl-sn- glycero-3-phosphoserine (sodium salt)), DPPA-NA(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DPPE(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine), DPPS-NA(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (sodium salt)), DSPA-NA(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)), DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DSPE(1,2-diostearpyl- sn-glycero-3-phosphoethanolamine), MSPC(1-myristoyl, 2-stearoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), PMPC(1-palmitoyl, 2-myristoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), POPC(1-palmitoyl, 2-oleoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), POPE(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), PSPC(1-palmitoyl, 2-stearoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), SMPC(1-stearoyl, 2-myristoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), SOPC(1-stearoyl, 2-palmitoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), SPPC(1-stearoyl, 2-palmitoyl-sn-glycero 3-phosphocholine), PCDA (10,12- pentacosadiynoic acid), 및 PMOXA-PDMS-PMOXA(poly(methyloxazoline)-poly(dimethylsiloxane)- poly(methyloxazoline)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 지질 유기용액에서 지질의 농도는 특별하게 제한되지 않지만, 바람직하게는 0.1-19 wt%이고, 보다 바람직하게는 1-3 wt%이다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 소수성 소포체는 한 종류 이상의 소수성 소포체를 포함하며, 서로 독립적인 목적 카르고(cargo of interest)를 포함한다.

[0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용될 수 있는 목적 카르고는 생물학적 제제를 포함한다.

[0033] 본 명세서의 용어 “생물학적 제제(biological agent)”는 약물(예컨대, 화학물질, 나노입자, 펩타이드, 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물, 양성자(quantum dots)), 용질, 치료제, 화장제(cosmetic agents) 및 조영제를 포함한다. 본 명세서의 용어 “내부 포함 유니트(interior containment units)”는 치료제, 진단제, 화장제 또는 조영제 같은 제제를 포함할 수 있는 내부 공간을 가지는 구조체를 의미한다. 전형적으로, 상기 구조체는 구형이지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 포함 유니트는 지질 소포체이다.

[0034] 본 발명에서 이용할 수 있는 적합한 치료제는 포함 유니트 내에 포함될 수 있는 제제로, 항생제, 항진균제, 화학치료제, 신생혈관제제, 항결핵약제 및 항체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 항생제는 아미카신, 카나마이신 B, 암포마이신, 바시트라신, 바이사이클로마이신, 카프레오마이신, 폴리믹신 E, 사이클로세린, 클로람페니콜, 닥티노마이신, 에리스로마이신, 젠타마이신, 그람미시딘 A, 페니실린, 리파미신, 스트렙토마이신 및 테트라마이신을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명에서 이용할 수 있는 적합한 치료제는 신경접합 위치에 기능하는 약물일 수 있으며, 예컨대, 신경액전달물질(neurohumoral transmitters), 콜린성 아고니스트(cholinergic agonists), 항콜린에스터라제 제

제(anticholinesterase agents), 항무스카린성 제제(antimuscarinic drugs), 카테콜라민, 교감신경유사작용제제(sympathomimetic drugs) 및 아드레날린 수용체 길항제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 또한, 상기 치료제는 염증을 감소시키는 약물일 수 있으며, 예를 들어 히스타민 길항제, 브라디키닌(bradykinin), 5-하이드록시트립타민(5-hydroxytryptamine), 지질-유래된 오타코이드(autacoids), 메틸크산틴, 크로몰린 소듐(cromolyn sodium), 진통제 및 해열제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 치료제는 신장 기능 및 전해질 대사에 영향을 미치는 약물일 수 있으며, 예를 들어, 이뇨제 및 유기 화합물의 관 수송 억제제들을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 더 나아가, 상기 치료제는 심혈관 기능에 영향을 미치는 약물일 수 있다. 예를 들어, 레닌, 안지오텐신(angiotensin), 유기 질산염, 칼슘-채널 차단제, 베타-아드레날린성 길항제, 항고혈압제, 강심제(digitalis) 및 항부정맥제를 포함하지만, 이에 한정된 것은 아니다.

[0039] 본 발명에서 이용할 수 있는 적합한 진단제는 방사선 표지, 효소, 크로모포어 및 형광제(fluorescers)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명에서 이용할 수 있는 적합한 조영제는 방사선 약물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 방사선 약물은 ^{201}Tl, ^{99m}Tc, ^{133}Xe 및 이의 유사물 같은 뉴클라이드(nuclides), 뉴클라이드 킬레이트, ^{11}C-데옥시-D-글루코오스, ^{18}F-2-플루오로데옥시-D-글루코오스, [1-^{11}C]- 및 [^{123}I]-베타-메틸 지방산 유사물, ^{13}N-암모니아 및 이의 유사물 같은 방사선 표지된 대사제(metabolic agents), ^{99m}Tc-테트라사이클린, ^{99m}Tc-파이로포스페이트, ^{203}Hg-수은제, ^{67}Ga-시트레이트및 이의 유사물 같은 경색부 축적 제제(infarct avid agents), 방사선 표지된 리간드, 단백질, 펩타이드 및 단일클론항체를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 이용될 수 있는 카르고는 표지될 수 있으며, 이때 이용될 수 있는 표지는 녹색 형광 단백질(green fluorescence protein), 방사능동위원소(예컨대, C^{14}, I^{125}, P^{32} 및 S^{35}), 화학물질(예컨대, 바이오틴), 형광물질[예컨대, 플루오레신, FITC(fluoresein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) 및 Coumarin], 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] <u>(b) 상기 소포체들을 미세채널로 주입하여 역 미셀전구체(reverse micelle precursor)를 제조하는 단계.</u>

[0043] 본 발명에서, 단막성 소포체인 리포좀을 제조하는 경우 하나의 주사기 펌프를 이용하여 유기용액 통로(oil phase) 및 수용액 통로(aqueous phase)에 주입하여 제조한다. 즉, 유기용액 통로에 방울로 투여됨에 따라 유화된 후, 수용액 통로를 지나면서 패키징이 되어 리포좀이 제조된다(참고: 도 4).

[0044] 또한, 다막성 소포체(베소좀)의 제조에 있어서, 상술한 바와 같이 제조된 수용성 및 소수성 소포체를 서로 다른 주사기 펌프를 이용하여 미세채널로 주입하여 이의 교차점(junctions)에서 역 미셀전구체를 제조한다(참고: 도 1 및 도 2).

[0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 주입은 2개 이상의 주사기 펌프(syringe pumps)를 이용하여 실시한다. 상기 미세채널 내로의 주입은 주사기 펌프의 조절을 통해 유속의 흐름속도를 조절할 수 있으며, 이를 통해 다양한 크기의 역 미셀전구체를 제조할 수 있다.

[0046] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 미세채널의 유속(flow rate)은 주사기 펌프의 세기 조절을 통해 조절된다.

[0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 주사기 펌프는 서로 독립적인 소포체를 포함한다.

[0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 미세채널은 상기 주사기 펌프로부터 유래한 튜브가 교차하는 지점이 1개 이상이고, 상기 교차점은 여러 가지 형태(예컨대, T-교차점 또는 이의 변형된 형태)를 가질 수 있다.

[0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 역 미셀전구체는 미세채널 내 수용액 통로(aqueous phase)와 유기용액 통로(oil phase)의 교차점에서 형성되며, 이의 크기는 상기 수용액 및 유기용액의 유속의 비율에 따라

결정된다.

[0050] 미세유체역학(microfluidics)은 마이크론 범위에서 유체량을 이동, 혼합, 조절 및 반응시키는 소형 장치의 개발을 기술로 다음과 같은 장점을 가진다: (a) 적은 양의 반응물(reagents); (b) 확산 및 다량 운반 같은 과정의 증대된 효과로 인한 더욱 신속하고 민감한 반응; (c) 여러 과정의 동시 실행 가능; 및 (d) 비용 절감. 가장 중요하게는, 미세유체흐름 장치(microfluidic devices)의 제조는 경제적이고 분석 과정을 자동화하기 위해 여러 가지 모듈의 통합을 허용한다(Duffy et al., Analytical Chemistry 70:4974-4984 (1998); Jingdong et al., Analytical Chemistry 72:1930-1933 (2000); and Martynova et al., Analytical Chemistry 69(23):4783-4789 (1997)). 미세유체흐름 장치는 미소 규모의 총 분석시스템의 통합적 구성성분으로 다양한 모듈 유니트를 포함한다(Manz et al., "Miniaturized total chemical analysis systems. A novel concept for chemical sensing," Transducers '89: Proceedings of the 5th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators and Eurosensors III. Part 1, Montreux, Switzerland (Jun. 25-30, 1989); van den Berg et al., Proceedings of the International Symposium on Micromechantronics and Human Science, pages 181-184 (1994); and Dhawan et al., Analytical and Bioanlytical Chemistry, 373:421-426 (2002)). 미세유체흐름 장치/시스템에서 혼합을 위한 여러 가지 전략들이 실시될 수 있다. 대규모 혼합을 위한 난류(Turbulence)는 대부분의 미세유체흐름 장치/시스템에서는 효과적이지 않다. 이에, 혼합을 위한 다른 전략들이 개발되었으며, 그 중 대표적인 것이 수동 혼합기(passive mixers)이다. 수동 혼합기는 채널의 기하학만을 이용한다. 예를 들어, 수동 혼합기는 다음을 포함한다: (a) 혼합된 유체들 간의 계면 부위를 증가시키기 위해 생선뼈 형태 구조(herring-bone structures)의 견고한 배열을 이용하여 횡단 흐름을 발생시키는 수동 혼합기(Stroock et al., Science 295:647-651 (2002)); (b) 크로마토그래피 컬럼의 부분적으로 패킹된 베드를 자극하는 사형채널(serpentine channel)을 이용하는 수동 혼합기(He et al., "A Picoliter Volume Mixer for Microfluidic Analytical Systems," Analytical Chemistry 73:1942 (2001)); 및 (c) 깊은 웰 구조를 가지는 T-교차점 혼합기(T-junction mixer)를 이용하는 수동 혼합기(Johnson et al., "Rapid Microfluidic Mixing," Analytical Chemistry 74:45 (2002)). 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 T-교차점 혼합기(T-junction mixer)를 이용하는 수동 혼합기를 이용한다.

[0051] (c) 상기 역 미셀전구체에 원심력을 가하여 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 제조하는 단계.

[0052] 제조된 역 미셀전구체는 회전 장치(spinning device)에 의해 가해지는 원심력 하에서 단일 지질 이중막 구체(리포좀) 또는 다중 지질 이중막 구체(베소좀)로 제조된다(참고: 도 1 내지 도 3).

[0053] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단일 또는 다중 지질 이중막 제조에 중요한 원심력은 수용액과 유기용액의 비율에 따라 조절되고, 상기 조절을 통해 제조되는 단일 또는 다중 지질 이중막 구체의 크기가 결정된다.

[0054] 본 명세서의 용어 "베소좀(vesosome)"은 독특한 외층 이중막 구조 안에 캡슐화된 다양한 단막성 또는 다막성 포함 유니트(예를 들어, 소포체)에 의해 형성된 구조체이다.

[0055] 본 발명에서 이용될 수 있는 회전 장치(spinning devices)는 단일 또는 다중 이중막 구체의 형성에 필요한 원심력을 가할 수 있는 장치는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어 컴퓨터 쿨링팬을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 방법에서 이용되는 원심력의 크기는 사용되는 수용액 및 유기용액의 종류 및 성질, 그리고 제조하고자 하는 단일 또는 다중 지질 이중막 구체의 크기에 따라서 다양하게 결정될 수 있다.

[0057] 본 발명의 카르고 전달(Cargo delivery vehicle)용 조성물은 내부에 다양한 포함 유니트(예컨대, 지질 소포체)를 캡슐화하기 위한 외층 지질 이중막을 가지는 베소좀을 포함한다. 상기 외층 지질 이중막은 다양한 지질 조성물로부터 생산될 수 있으며, 상기 이중막은 다막성 또는 단막성일 수 있다.

[0058] 상기 이중막 구조 내에 포함된 내부 포함 유니트는 균일한 크기(uniform size)이거나 유사한 막 또는 내부 조성물일 수 있으며, 또한 다양한 크기 및/또는 다른 막 또는 내부 조성물일 수 있다. 내부 포함 유니트의 막은 다막성 또는 단막성일 수 있다. 또한, 포함 유니트는 응집되거나 또는 자유로운 형태일 수 있다. 본 명세서의 용어 "균일한 크기(uniform size)"는 매우 유사한 크기를 의미하며, 반드시 동일한 크기의 소포체를 의미하는 것은 아니다.

[0059] 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 다양한 방법에 의해 투여할

수 있는데, 예를 들어, 근육 내 주사, 정맥 내 주사, 경구 투여, 폐흡수(pulmonary adsorption), 직장 투여, 피하 주사, 설하 투여 또는 국부(topical) 투여를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 다양한 포함 유니트에서 생물학적 제제를 위한 투여 및 투여량 처방의 가장 효과적인 모드는 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.

[0061] 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 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0062] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0063] (a) 본 발명은 단일 또는 다중 지질 이중막 구체의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 단일 또는 다중 지질 이중막 구체의 용도, 그리고 단일 또는 다중 지질 이중막 구체 제조용 장치에 관한 것이다.

[0064] (b) 본 발명의 제조방법은 미세채널 내 T-교차점에서 역 미셀전구체를 제조하고 회전 장치를 이용하여 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 자동화하여 용이하게 제조할 수 있다.

[0065] (c) 본 발명의 제조장치는 (i) 주사기 펌프(syringe pump); (ii) 미세유체흐름 장치(microfluidic device); 및 (iiic) 회전 장치(spinning device)로 이루어져 있으며, 회전 장치에 의한 원심력을 이용한다.

[0066] (d) 따라서, 본 발명은 단일 또는 다중 지질 이중막 구체를 저비용으로 효과적이면서 용이하게 제조할 수 있는 방법을 제공하며, 이는 약물의 미세캡슐화(microencapsulation)를 통해 다양한 응용분야(예컨대, 치료제, 진단제, 등)에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도1a는 본 발명의 자동 단일 또는 다중 지질 이중막 제조 장치의 모식도이다.

도1b는 자동 단일 또는 다중 지질 이중막 제조 장치 중 미세유체흐름장치(microfluidic device)의 실제사진이다.

도2는 미세유체흐름장치(microfluidic device)의 변형 방법에 대한 모식도이다.

도3은 자동 단일 또는 다중 지질 이중막 제조 장치 중 한 부분인 회전 장치의 작용 모식도이다.

도4는 자동 단일 또는 다중 지질 이중막 제조 장치 중 한 부분인 회전 장치의 작용 중 역 미셀전구체(reverse micelle precursor)가 완전한 단일 또는 다중 지질 이중막 구체가 형성되는 과정을 설명한 모식도이다.

도5는 회전 장치(spinning device)의 실제 사진과 모식도이다.

도6은 실험예 1로 확인 할 수 있는 리포좀의 현미경 사진이다.

도7은 실험예 2로 확인 할 수 있는 베소좀의 현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 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.

[0069] **실시예**

[0070] **발명의 구성 및 작용**

[0071] 상기의 본 발명의 목적을 이루기 위해 사용되는 시스템에서는 미세흐름 장치에 흘려주는 유속(Flow rate)를 제어해 주는 주사기 펌프(syringe pump; Harvard apparatus)와 미세유체흐름 장치(microfluidic device), 그리고 가장 핵심이라 할 수 있는 회전 장치(spinning device)의 3가지 부분으로 구성이 되어있다(도 1a). 주사기 펌프(syringe pump)의 경우는 미세유체흐름 장치(microfluidic device)에 들어가는 지질이 용해된 유기용매와 수용성 기질이 녹은 용액을 일정한 속도로 흘려주는 작용을 하게 된다. 이때, 유기용액과 수용액의 흐름속도의 비율을 변화시켜 줄 경우에는 여러 크기의 단일다중 지질 이중층 구체를 만들 수 있게 된다. 미세유체흐름 장치의 경우 'T' 모양의 채널(도 1b)이 존재 하게 되고 이러한 모양의 채널에 한쪽은 지질이 용해된 유기용액을 다른 한쪽에는 수용성 기질이 용해된 수용액을 흘려주게 된다. 이때, 주사기 펌프(syringe pump)로 일정한 속도의 흐름으로 밀어주게 된다. 이때, 유기용액 쪽의 유속을 빠르게 해주어 수용액채널에서 나오는 용액을 절단하는 방식의 작업으로 지질 이중막 구체의 전구체인 역 미셀을 만들게 된다. 또한, '2가지 물질 혹은 2가지 이상의 다른 성질을 가지는 지질 이중막 구체를 포집하여 하나의 지질 이중막 구체로 만들기 위하여 T' 형태의 채널이 아닌 도 2와 같은 변형된 장치를 사용할 수 있다. 이렇게 만들어진 역 미셀은 다음 단계인 회전 장치로 넘어가게 된다. 회전 장치의 경우 내부에 위에 설명한 수용액과 동일한 용액과 동일한 유기용액으로 미리 채워놓게 된다. 이렇게 채워진 회전 장치를 모터를 이용하여 돌려주게 되면 원심력에 의하여 두 가지의 수용액과 유기용액이 분리되어 돌아가게 되며, 수용액과 유기용액의 경계에는 단일 지질층(lipid mono layer)이 형성 된다. 이 회전 장치의 중앙부에 미세유체흐름 장치에서 나오는 채널을 연결하여 통과시켜 주게 된다. 미세유체흐름 장치에서 형성되는 역 미셀 전구체가 원심력에 의해 회전 장치 내부의 유기용액에서 수용액으로 이동을 하게 된다. 이때 회전 장치 내부의 지질 단일막 경계를 통과하면서 역 미셀은 완전한 단일 또는 다중 지질 이중막 구체(liposome 또는 vesosome)로 형성된다(도 3 및 도 4).

[0072] **실시예 1: 본발명의 기본 물질인 지질용액의 제조**

[0073] 본발명에서 쓰이는 지질용액에는 여러가지가 있다. 특히 안정적인 지질 이중막 구체를 만들기 위해서는 이러한 지질용액에 들어가는 재료의 종류와 농도가 중요한 요인이 된다. 기본적으로, 헥세인(Hexane; Samchun), 데칸(Decane; Junsei), n-데칸(n-decane; MP) 등의 용매에 아솔렉틴(Asolectin; Sigma), DPhPC(Avanti), DPPC(Avanti) 등의 용질을 사용하게 된다. 이때 이러한 용질과 용매만이 아닌 더욱 견고한 지질 이중막 구체를 만들어주기 위하여 squalen이나 콜레스테롤을 일정한 비율로 섞어준다. 스쿠알렌(squalene; Sigma)이나 콜레스테롤(Sigma)은 지질 이중막 사이에 존재하게 되어 지질 이중막 구체를 더욱 안정적인 상태가 되게 한다. 본 실험에서는 여러번의 실험을 통해 최적의 비율을 찾게 되었다. 지질의 비율은 아솔렉틴과 콜레스테롤은 4:1의 비율로 섞고, n-데칸과 스쿠알렌의 비율은 9:1로 혼합한 실험에서 최적의 결과를 나타내었다. 또한, 전체적인 비율은 20 mg/ml의 비율로 섞인 시료가 가장 안정된 지질 이중막 구체를 형성시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[0074] **실시예 2: 회전 장치의 제조**

[0075] 본 발명의 핵심적인 장치라고 할 수 있는 회전 장치의 제조를 수행해 보았다. 우선, 우리가 원하는 회전 장치는 RCF(relative centrifugal force)라는 상대원심력의 세기를 나타내거나 혹은 이러한 상대원심력을 유추할 수 있는 회전수(RPM)이 표시가 되는 장치가 있어야 한다. 또한, 회전을 원활하게 해 줄 수 있는 장치가 필요하다. 상용화되어 있는 제품으로는 스핀쿼터라는 장치가 있지만 고가에 부피도 커 본 실험자는 일반 주변에서 흔히 구할 수 있는 개인용 컴퓨터의 쿨링팬을 이용하였다. 회전을 위한 장치는 앞서 설명한 것과 같은 컴퓨터용 쿨링팬(Zalman)과 그 쿨링팬의 회전수를 보여주는 쿨링팬 회전수 조절 장치를 이용하고 실제적으로 역 미셀전구체를 받아 단일 지질 이중막 혹은 다중 지질 이중막으로 완성시켜주는 장치는 페트리 디쉬(SPC) 덮개의 가운데에 구멍을 뚫고 또 다른 덮개를 서로 붙여 제작을 하게 된다. 이때, 구멍에는 시료가 밖으로 튀어나가는 것을 방지하기 위하여 원뿔 모양의 보조체를 달게 된다. 이렇게 만들어진 장치를 팬과 붙여 회전 장치를 완성하였다(도 5). 상기 회전장치에 수용액과 지질용액을 넣고 회전시켜주게 되면 지질용액과 수용액의 비중 차이로 수용액은 바깥쪽으로 몰리게 되고 지질용액은 안쪽으로 몰리게 된다. 그 결과, 수용액과 지질용액 사이에 지질로 이루어진 단일층이 형성되고 이는 역미셀 리포좀(혹은 베소좀) 전구체를 완전하게 리포좀(혹은 베소좀)으로 완성시켜 주게 하는 역할을 한다.

[0076] **실시예 3: 자동으로 형성된 지질 이중막 구체(liposome 혹은 vesosome)의 확인**

[0077] 만들어진 리포좀 또는 베소좀을 확인하는 방법은 광학적인 방법과 리포좀 내부와 외부에 포함된 물질의 농도를 다르게 하여 크기 변화를 관찰하는 방법이 있다.

[0078] 광학적인 방법의 경우, 리포좀을 이루는 지용성 용액에 형광 지질(NBD-PE; Avanti)을 섞어 주어 이러한 형광을 형광 현미경(Olympus, Japan) 혹은 공초점 현미경(Zeiss, Germany) 등을 통하여 관찰함으로서 지질 이중막 구체를 확인하는 방법이다. 이때, 베소좀의 경우는 안에 들어가는 리포좀과 밖에 감싸는 지질 이중막 구체의 형광 지질의 색을 다르게 하여 관찰을 하였다. 이와 같이 관찰된 리포좀 혹은 베소좀은 초록색의 환(環)형의 물체로 관찰되었다.

[0079] 물질의 농도를 다르게 하여 크기 변화를 관찰하는 방법의 경우 안과 밖의 농도 차에 의해 삼투압이 생기고 이로 인하여 리포좀 내부의 용매가 밖으로 빠져나가 리포좀의 크기가 줄어들게 된다. 이를 확인함으로써 지질 이중막이 단일인지 다중인지 확인을 할 수 있고 다른 물질의 조각이나 공기방울이 아닌 용매가 지질이중막으로 둘러 싸여진 리포좀이란 것을 확인 할 수 있다.

[0080] **실험예 1: 형광을 띄는 지질을 이용하여 리포좀의 생성을 확인**

[0081] 수용성 통로(Aqueous phase)에 흘려줄 시료로 3차 증류수, 지용성 통로(Oil phase)에 흘려줄 시료로 0.05% NBD-PE(초록색 형광을 띄는 지질), 20% 아솔렉틴 w/n-데칸 용액을 준비하였다. 각각의 용액을 유리 주사기에 넣고 'T' 자형 미세흐름장치(microfluidic device)에 연결해 주었다. 회전 장치의 경우, 미세흐름장치에서 흘려주는 수용성 용액, 지용성 용액과 같은 성분의 시료들을 알맞은 비율로 넣어 주었다. 그런 후, 미세흐름장치의 출구 부분에 리포좀이 포집되어 나갈 수 있는 관을 연결하고 이 관을 회전 장치의 입구에 연결시켰다. 현미경으로 미세흐름장치의 'T' 모양의 연결 부분에서 수용성 층(aqueous phase)이 방울로 절삭이 잘 되는지 확인할 수 있게 초점을 맞춘다. 그런 후, 지용성 층(Oil phase)과 수용성 층의 유체 흐름을 일정한 비율의 유속으로 조절하였다. 이와 동시에, 회전 장치 내 회전모터를 작동시켜 원하는 RCF 값의 속도로 맞춘 후 작동시켰다. 현미경으로 보며 유속을 조절하여 절삭되는 크기를 조절하고 리포좀을 포집하였다. 포집을 한 후 회전 장치 내의 지용성 용액을 제거(지용성용액이 위에 위치함으로 쉽게 제거할 수 있음)해 주고, 남은 수용성용액에서 시료를 채취해 형광현미경 혹은 공초점 현미경 등으로 관찰하였다. 그 결과, 리포좀은 공기방울 등과 달리 형광을 나타냄으로 동그란 형광을 띈 시료를 관찰하여 리포좀이 제조되었음을 확인할 수 있었다(도 6).

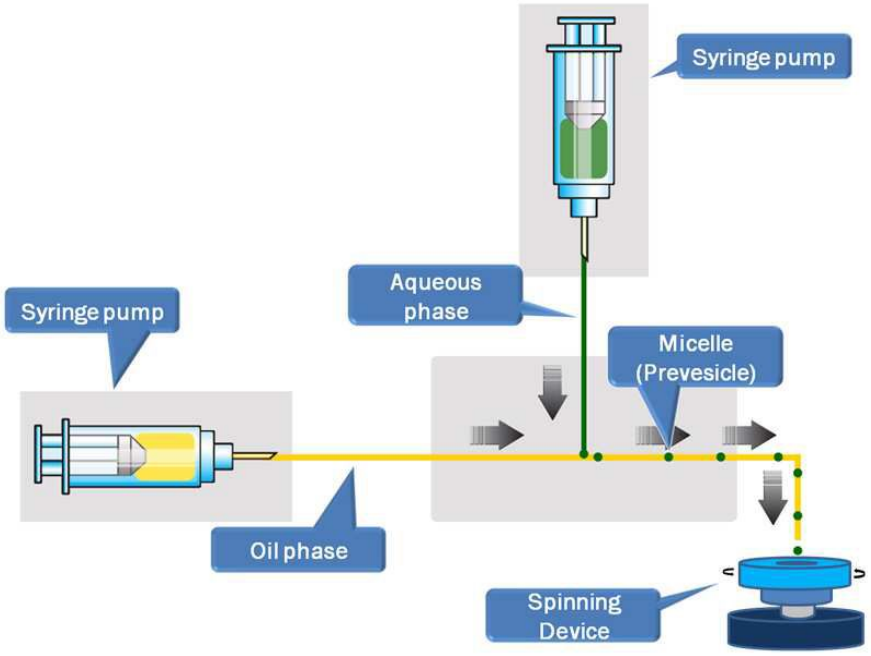
[0082] **실험예 2: 붉은 형광을 띄는 PCDA 소포체 용액과 녹색 형광을 띄는 형광 지질을 이용하여 안과 밖의 형광색이 다른 베소좀의 제조 및 확인**

[0083] 수용성 통로에 흘려줄 시료로 PCDA(Sigma) 소포체 용액을 제조하였다. 이때, PCDA 소포체 용액은 붉은색의 지질 이중막 구체(liposome)과 비슷한 형태를 띈 물체로 보통은 푸른색을 띄고 있다가 충격, pH 변화, 온도 변화 등이 가해지면 붉은색 형광을 띄게 되는 물질이다. 실험에서는 붉은색으로 변한 PCDA 소포체 용액을 사용하였다. 지용성 통로에 흘려줄 시료로는 0.05% NBD-PE, 20% 아솔렉틴 w/n-데칸 용액을 준비하였다. 나머지 실험의 과정과 방법은 실험예 1에 기재된 방법과 동이하며, 포집된 시료를 형광현미경 혹은 공초점 현미경을 사용하여 관찰하였을 경우, 초록색 원 안에 붉은색 형광의 점들이 퍼져있는 혹은 내부는 붉은 색이고 겉은 초록색의 구형 물체를 관찰할 수 있는데, 이것이 붉은색 형광 리포좀이 안에 들어 있는 초록색형광 리포좀인 베소좀이다(도 7).

[0084] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 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 발명 의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

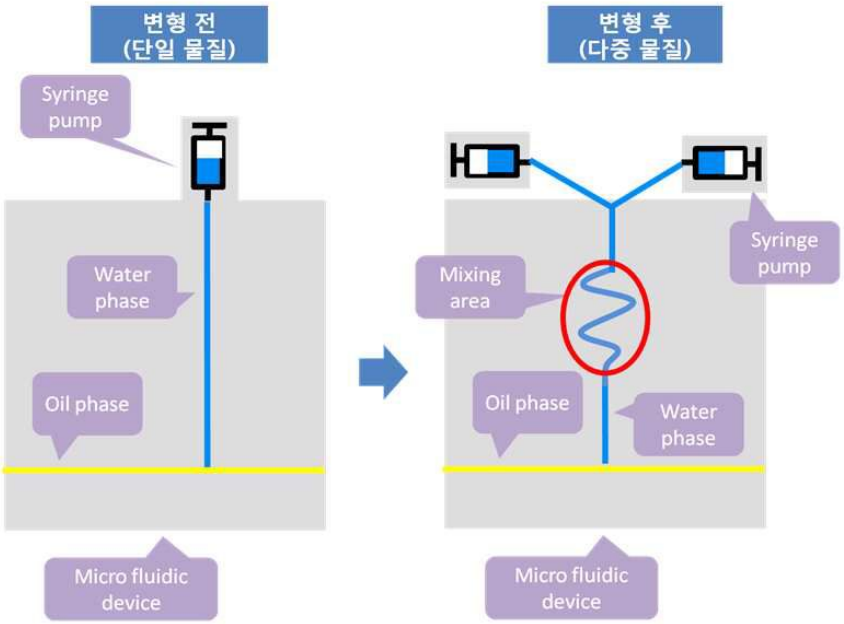
도면1a



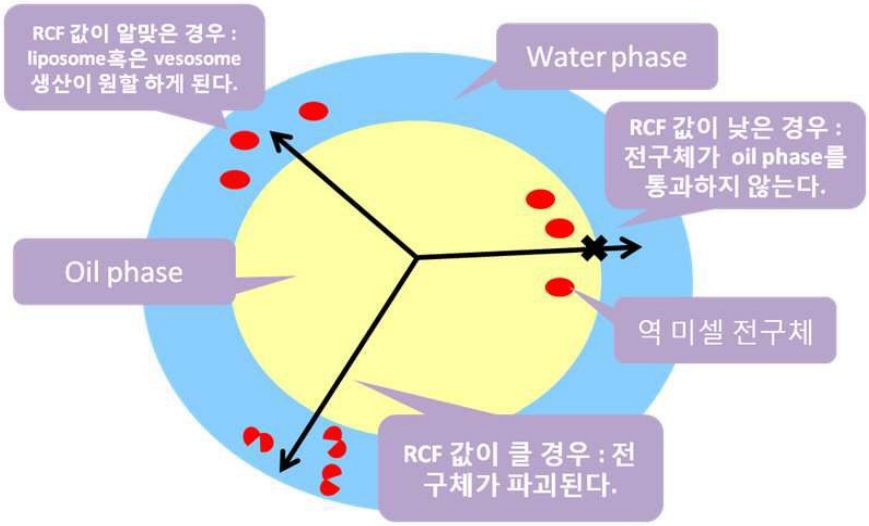
도면1b



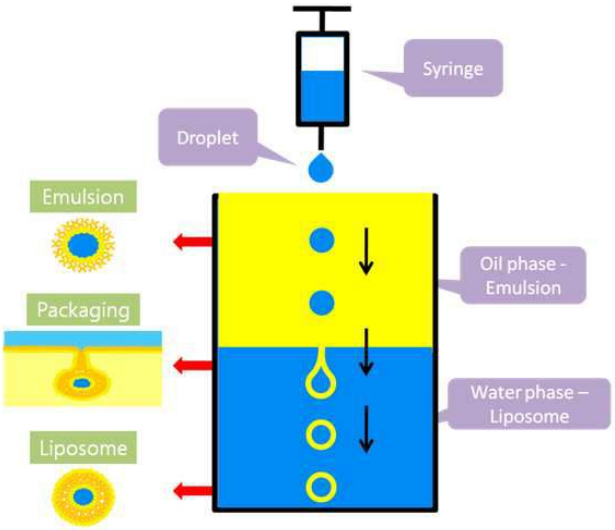
도면2



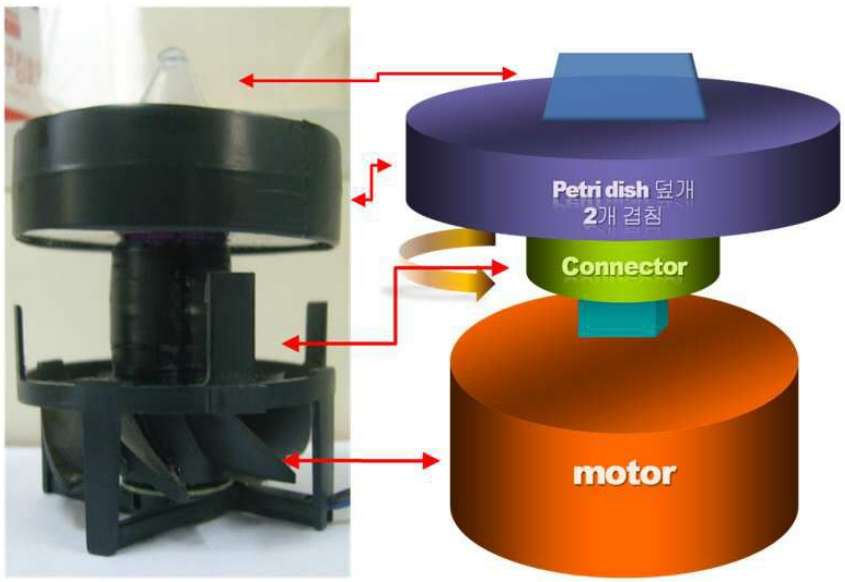
도면3


RCF 값이 알맞은 경우 : liposome혹은 vesosome 생산이 원할 하게 된다.
Water phase
RCF 값이 낮은 경우 : 전구체가 oil phase를 통과하지 않는다.
Oil phase
역 미셀 전구체
RCF 값이 클 경우 : 전구체가 파괴된다.

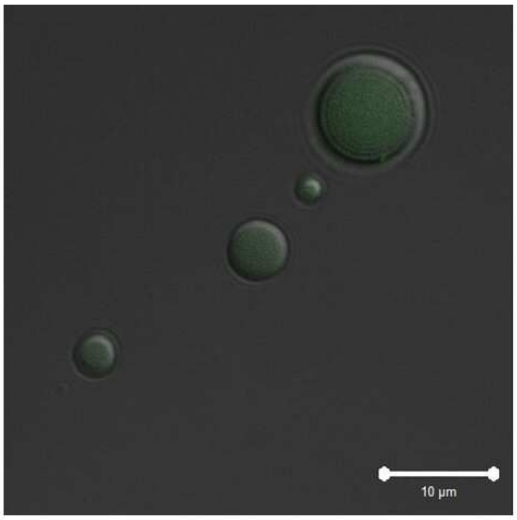
도면4


Syringe
Droplet
Emulsion
Oil phase - Emulsion
Packaging
Water phase – Liposome
Liposome

도면5



도면6



도면7

