



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0110344
(43) 공개일자 2022년08월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) **A61K 47/22** (2017.01)
A61K 47/34 (2017.01) **A61K 9/00** (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A61K 33/00 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2021-0010421**

(22) 출원일자 **2021년01월25일**
심사청구일자 **2021년01월25일**

(71) 출원인
한양대학교 에리카산학협력단
경기도 안산시 상록구 한양대학로 55
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자
김진기
서울특별시 동작구 사당로2가길 102, 105동 302호
(사당동, 사당자이아파트)

배옥남
경기도 군포시 금산로 91, 122동 202호 (산본동,
래미안 하이어스)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인 무한

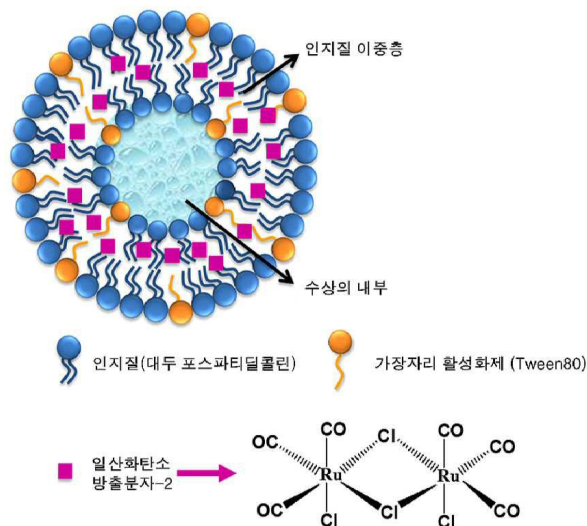
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 일산화탄소방출분자-2를 함유하는 초가변형리포좀의 개발에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 급성피부염증에 국소적으로 일산화탄소방출분자-2를 전달하여, 지속적인 CO방출을 통해 염증매개 사이토카인의 발현을 억제시켜 염증을 완화할 수 있도록 설계된 일산화탄소방출분자-2를 함유하는 초가변형리포좀에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/22 (2013.01)
A61K 47/34 (2013.01)
A61K 9/0014 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)

(72) 발명자

이관영

경기도 안산시 단원구 원고잔로 17, 832호 (고잔동)

알람젬

파키스탄, 이슬라마바드 44000, 섹터 지-7/4, 7번가, 리파 인터내셔널 대학

이은선

충청남도 공주시 공주대학로 17-15, 103동 1202호 (신관동, 현대아파트)

최호익

서울특별시 서초구 잠원로 37-48, 210동 304호 (잠원동, 신반포4차아파트)

박정숙

대전광역시 유성구 노은서로210번길 32, 405동 405호 (지족동, 열매마을아파트4단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711088569
과제번호	2017R1A2B4006458
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업 / 중견연구자지원사업 / 중견연구(총연구비1.5억초과~3억이하)
연구과제명	일산화탄소의 특이적 수송을 통한 염증성 질환 치료용 일산화탄소방출분자 함유 나노수송체의 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한양대학교(ERICA캠퍼스)
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

초가변형리포솜을 유효성분으로 포함하는 경피투과용 약물전달시스템으로서,

상기 초가변형리포솜은 인지질 및 가장자리 활성화제로 이루어진 이중층으로 구성되고, 상기 이중층 내부에 일산화탄소방출분자-2가 포함된 것을 특징으로 하는, 경피투과용 약물전달시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인지질은 탄소수가 12 ~ 24개인 지방산 사슬을 가지는 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜글리세롤(phosphatidyl glycerol) 및 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 경피투과용 약물전달시스템.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 인지질은 HPS(hydrogenated phosphatidylcholine), DLPC(Dilauroyl phosphatidylcholine), DMPC(Dimyristoyl phosphatidylcholine), DPPC(Dipalmitoyl phosphatidylcholine), DSPC(Distearoyl phosphatidylcholine), DOPC(Dioleoyl phosphatidylcholine), DEPC(Dierucoyl phosphatidylcholine), POPC(Palmitoyloleoyl phosphatidylcholine), DMPG(Dimyristoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), DPPG(Dipalmitoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), DSPG(Distearoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), DOPG(Dioleoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), POPG(Palmitoyloleoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), DMPE(Dimyristoyl phosphatidylethanolamine), DPPE(Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine), DPPE(Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine), DSPE(Distearoyl phosphatidylethanolamine), DOPE(Dioleoyl phosphatidylethanolamine), DMPA(Dimyristoyl phosphatidic acid, sodium salt), DPPA(Dipalmitoyl phosphatidic acid, sodium salt), DSPA(Distearoyl phosphatidic acid, sodium salt) 및 DOPS(Dioleoyl phosphatidylserine, sodium salt) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 경피투과용 약물전달시스템.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 가장자리 활성화제는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르(트윈, Tweens) 및소르비탄 지방산 에스테르(스판, spans) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 경피투과용 약물전달시스템.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르(트윈, Tweens)는 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 (4) 소르비탄 모노라우레이트 (Polyoxyethylene (4) sorbitan monolaurate, Tween 21), 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노팔미테이트

(Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노스테아레이트 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate, Tween 60), 폴리옥시에틸렌 (4) 소르비탄 모노스테아레이트 (Polyoxyethylene (4) sorbitan monostearate, Tween 61), 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 트리스테아레이트 (Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate, Tween 65), 및 폴리옥시에틸렌 (4) 소르비탄 모노올리에이트 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate, Tween 80) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 경피투과용 약물전달시스템.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 소르비탄 지방산 에스테르(스판, spans)는 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate, Span 20), 소르비탄 모노팔미테이트(sorbitan monopalmitate, Span 40), 소르비탄 모노스테아레이트(sorbitan monostearate, span 60), 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate, Span 80), 소르비탄 세스퀴올리에이트(sorbitan sesquileate, Span 83), 소르비탄 트리올리에이트(sorbitan trioleate, Span 85), 및 소르비탄 아이소스테아레이트(sorbitan isostearate, Span 120) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 경피투과용 약물전달시스템.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 초가변형리포솜은 일산화탄소방출분자-2 1~20 중량%, 인지질 50~80 중량%, 및 가장자리 활성화제 10~40 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는, 경피투과용 약물전달시스템.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 초가변형리포솜의 이중층은 인지질과 가장자리 활성화제가 8:2 중량비로 포함된 것을 특징으로 하는, 경피투과용 약물전달시스템.

청구항 9

초가변형리포솜을 유효성분으로 포함하는 피부염증 치료용 약학적 조성물로서,

상기 초가변형리포솜은 인지질 및 가장자리 활성화제로 이루어진 이중층으로 구성되고, 상기 이중층 내부에 일산화탄소방출분자-2가 포함된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 초가변형리포솜의 이중층은 인지질과 가장자리 활성화제가 8:2 중량비로 포함된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일산화탄소방출분자-2를 함유하는 초가변형리포솜의 개발에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 급성

피부염증에 국소적으로 일산화탄소방출분자-2를 전달하여, 지속적인 CO방출을 통해 염증매개 사이토카인의 발현을 억제시켜 염증을 완화할 수 있도록 설계된 일산화탄소방출분자-2를 함유하는 초가변형리포솜에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

지난 수십 년 동안 산화질소(NO), 일산화탄소(CO) 및 황화수소(H₂S)를 포함한 기체분자는 신체내에서 생성되는 가스 전달 물질로 잘 알려져 왔으며, 새로운 치료가능성으로 인해 주목받아 왔다.(Ryter SW, Choi AM. Carbon monoxide: present and future indications for a medical gas. Korean J Intern Med 2013;28:123-40) 일산화탄소의 경우 산소보다 250배 높은 헤모글로빈에 대한 결합력으로 저산소증을 일으키는 독성으로 인해 이로운 생체 기능에 대해서는 연구가 이루어지지 않았다.(Piantadosi CA. Biological chemistry of carbon monoxide. Antioxid Redox Signal 2002;4:259-70.) 그러나, 신체내에서 자연발생적으로 생성되는 일산화탄소는 항염증, 항세포사멸, 항증식, 항산화, 혈관형성 그리고 세포보호작용과 같은 다양한 생물학적 작용을 나타낸다.(Motterlini R, Otterbein LE. The therapeutic potential of carbon monoxide. Nat Rev Drug Discov 2010;9:728-43, Bauer I, Pannen BH. Bench-to-bedside review: Carbon monoxide-from mitochondrial poisoning to therapeutic use. Crit Care 2009;13:220.) 신체 내에서의 일산화탄소 발생은 헴 옥시제나아제(heme oxygenase, HO)에 의한 헴(heme)의 이화작용에 의해 헴이 일산화탄소, 빌리베르딘(biliverdin) 및 철이온으로 대사되며 발생한다. 헴 옥시제나아제는 기본구성효소인 헴 옥시제나아제-2와 반응에 의해 활성화되는 유도효소인 헴 옥시제나아제-1으로 구분된다.(Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. Pharmacol Rev 2008;60:79-127.) 헴 옥시제나아제-1은 허혈, 저산소증, 염증, 세포사멸 신호, 산화/환원 불균형과 같은 자극에 의해 활성화되어 세포내, 신경 및 혈관기능을 조절하기 위한 신호전달물질로 작용하는 일산화탄소를 생성한다.(Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. Expert Opin Investig Drugs 2005;14:1305-18.) 일산화탄소는 종양괴사인자-알파, 대식세포 염증단백질-1베타, 인터루킨-1베타와 같은 염증 사이토카인을 억제하기 위한 미토겐활성화단백질 키나아제(MAPKs) 경로를 조절하여 항염증 효과를 나타낸다

[0004]

이러한 내인성 일산화탄소의 생리학적 기능들이 밝혀지며 일산화탄소 적용을 통한 치료효과에 대해 연구들이 이루어져왔다. 흡입을 통한 일산화탄소의 적용으로 염증, 허혈, 폐 및 혈관손상, 패혈증 그리고 이식편거부반응과 같은 동물모델에서 강력한 항염증 효과가 입증되었다.(Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. Am J Physiol 1999;276:L688-94, Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, et al. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. Nat Med 2001;7:598-604, Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. Intensive Care Med 2008;34:649-58.) 그러나 직접적인 일산화탄소 흡입은 과다 투여가 치명적일 수 있기 때문에 엄격한 용량조절과 특수한 장비가 필요한 단점이 있다.(Romão CC, Blättler WA, Seixas JD, Bernardes GJL. Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide. Chem Soc Rev 2012;41:3571-83.) 이러한 문제를 해결하기 위해 일산화탄소를 방출하여 안전하게 전달할 수 있는 일산화탄소방출분자가 합성되었다. 일산화탄소방출분자는 적절한 생물학적 환경에 노출될 때 제어된 양의 일산화탄소를 방출할 수 있는 전이금속 카르보닐 복합체이다. 개발된 일산화탄소방출분자로는 일산화탄소방출분자-1 (CORM-1, [Mn₂(CO)₁₀andFe(CO)₅]), 일산화탄소방출분자-2 (CORM-2, [Ru(CO)₃Cl₂]₂), 일산화탄소방출분자-3 (CORM-3, [Ru(CO)₃Cl-glycinate]) 및 일산화탄소방출분자-A1 (CORM-A1[Na₂(H₃BCO₂)]¹⁴)이 있다.(García-Gallego S, Bernardes GJ. Carbon-monoxide-releasing molecules for the delivery of therapeutic CO in vivo. Angew Chem 2014;53:9712-21.) 일산화탄소방출분자는 빛(CORM-1) 또는 리간드치환반응(CORM-2, CORM-3)에 의해 일산화탄소를 방출하며, 다양한 동물모델에서 일산화탄소의 치료효과들을 입증하였다.(Ismailova A, Kuter D, Bohle DS, Butler IS. An overview of the potential therapeutic applications of CO-releasing molecules. Bioinorg Chem Appl 2018;2018:8547364.) 일산화탄소방출분자-2는 상업적으로 이용가능하며 다양한 연구에서 항염증효과가 입증되었다.(Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Suzuki T, Hirata I, Mizushima K, et al. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule exerts an anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Dig Dis Sci 2011;56:1663-71) 그러나 일산화탄소방출분자-2의 일산화탄소 방출 반감기는 1분 내외이며, 지용성이기 때문에 임상적으로 이용하기에는 어려운 단점이 있다.(Motterlini R, Mann BE, Foresti R.

Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. Expert Opin Investig Drugs 2005;14:1305-18.) 일산화탄소방출분자-2의 나노기술 기반 전달은 짧은 일산화탄소 방출의 단점을 해결하기 위한 좋은 전달체라고 할 수 있다. 여러 연구에서는 일산화탄소방출분자-2를 함유한 나노입자를 통해 일산화탄소의 방출을 제어방출 하여 치료효과를 개선하였다. 일산화탄소방출분자-2를 함유한 스티렌-말레산 공중합체 미셀은 쥐 대장염 모델에서 일산화탄소방출분자-2 보다 개선된 조직보호효과를 보였다.(Yin H, Fang J, Liao L, Nakamura H, Maeda H. Styrene-maleic acid copolymer-encapsulated CORM2, a water-soluble carbon monoxide (CO) donor with a constant CO-releasing property, exhibits therapeutic potential for inflammatory bowel disease. J Control Release 2014;187:14-21.) 일산화탄소방출분자-2를 함유한 고형지질나노입자는 지속적인 일산화탄소 방출을 통해 카라기난으로 유발된 쥐의 발 염증 모델에서 향상된 항염증 효과를 보였다.(Qureshi OS, Zeb A, Akram M, Kim M-S, Kang J-H, Kim H-S, et al. Enhanced acute anti-inflammatory effects of CORM-2-loaded nanoparticles via sustained carbon monoxide delivery. Eur J Pharm Biopharm 2016;108:187-95.) 본 발명에서는 피부 염증 모델에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 나노운반체의 효과에 대해 입증하고자 한다.

[0005] 트랜스퍼솜 (transfersomes), 초가변형리포솜 (ultradeformable liposomes, UDLs), 가변형 리포솜 (elastic or deformable liposomes) 으로 알려진 차세대 리포솜은 약물의 피부투과를 개선할 수 있는 전달체로 큰 가능성을 가지고 있다.(Zeb A, Arif ST, Malik M, Shah FA, Din FU, Qureshi OS, et al. Potential of nanoparticulate carriers for improved drug delivery via skin. J Pharm Investig 2019;49:485-517.) 초가변형리포솜은 인지질이중층 과 가장자리 활성화제로 구성된 구형의 나노크기의 약물전달시스템이다.(Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggat VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. Int J Pharm 2007;332:1-16.) 인지질 이중층에 가장자리활성화제가 도입된 초가변형리포솜은 가변성을 가지며, 표피를 지나 피부 깊숙이 통과될 수 있다.(Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochim Biophys Acta 1992;1104:226-32.)

[0006] 따라서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜은 일산화탄소방출분자-2의 피부투과를 개선하고, 일산화탄소의 방출 반감기를 향상시켜 피부염증을 완화시키는 전달체로 이용될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 초가변형리포솜을 유효성분으로 포함하는 경피투과용 약물전달시스템과 피부염증 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 초가변형리포솜을 유효성분으로 포함하는 경피투과용 약물전달시스템을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 초가변형리포솜을 유효성분으로 포함하는 피부염증 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 초가변형리포솜을 개체의 피부 염증 부위에 도포하는 단계를 포함하는 피부염증 치료 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 피부염증 치료용 약제의 제조를 위한 초가변형리포솜을 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 초가변형리포솜은 인지질 및 가장자리 활성화제로 이루어진 이중층으로 구성되고, 상기 이중층 내부에 일산화탄소방출분자-2가 포함된 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 인지질은 탄소수가 12 ~ 24개인 지방산 사슬을 가지는 포스파티딜콜린

(phosphatidyl choline), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 포스파티딜글리세롤(phosphatidyl glycerol) 및 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 인지질은 HPS(hydrogenated phosphatidylcholine), DLPC(Dilauroyl phosphatidylcholine), DMPC(Dimyristoyl phosphatidylcholine), DPPC(Dipalmitoyl phosphatidylcholine), DSPC(Distearoyl phosphatidylcholine), DOPC(Dioleoyl phosphatidylcholine), DEPC(Dierucoyl phosphatidylcholine), POPC(Palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine), DMPG(Dimyristoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), DPPG(Dipalmitoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), DSPG(Distearoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), DOPG(Dioleoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), POPG(Palmitoyl oleoyl phosphatidylglycerol, sodium salt), DMPE(Dimyristoyl phosphatidylethanolamine), DPPE(Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine), DSPE(Distearoyl phosphatidylethanolamine), DOPE(Dioleoyl phosphatidylethanolamine), DMPA(Dimyristoyl phosphatidic acid, sodium salt), DPPA(Dipalmitoyl phosphatidic acid, sodium salt), DSPA(Distearoyl phosphatidic acid, sodium salt) 및 DOPS(Dioleoyl phosphatidylserine, sodium salt) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 가장자리 활성화제는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르(트윈, Tweens) 및 소르비탄 지방산 에스테르(스판, spans) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르(트윈, Tweens)는 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트(Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, Tween 20), 폴리옥시에틸렌 (4) 소르비탄 모노라우레이트(Polyoxyethylene (4) sorbitan monolaurate, Tween 21), 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노팔미테이트(Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate, Tween 40), 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노스테아레이트(Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate, Tween 60), 폴리옥시에틸렌 (4) 소르비탄 모노스테아레이트(Polyoxyethylene (4) sorbitan monostearate, Tween 61), 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 트리스테아레이트(Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate, Tween 65), 및 폴리옥시에틸렌 (4) 소르비탄 모노올리테이트(Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate, Tween 80) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 소르비탄 지방산 에스테르(스판, spans)는 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate, Span 20), 소르비탄 모노팔미테이트(sorbitan monopalmitate, Span 40), 소르비탄 모노스테아레이트(sorbitan monostearate, span 60), 소르비탄 모노올리테이트(sorbitan monooleate, Span 80), 소르비탄 세스퀴올리테이트(sorbitan sesquioleate, Span 83), 소르비탄 트리올리테이트(sorbitan trioleate, Span 85), 및 소르비탄 아이소스테아레이트(sorbitan isostearate, Span 120) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명은 다양한 조성과 농도의 제형을 이용하여 추가변형리포솜을 제조하였고, 100nm 내외의 사이즈를 가지며 우수한 다분산지수, 봉입률, 가변도를 모두 만족하는 조성을 탐색한 결과 대두포스파티딜콜린 : Tween80 : 일산화탄소방출분자-2 = 8:2:1 의 비율로 제조된 추가변형리포솜에서 급성피부염증 개선 및 치료를 위한 사이즈, 다분산지수, 봉입률, 가변도 조건이 충족됨을 확인하고, 이를 급성피부염증 개선 또는 치료를 위한 용도에 제공하고자 한다.

[0022] 따라서, 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 추가변형리포솜은 일산화탄소방출분자-2 1~20 중량%, 인지질 50~80 중량%, 및 가장자리 활성화제 10~40 중량%를 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 추가변형리포솜의 이중층은 인지질과 가장자리 활성화제가 8:2 중량비로 포함된 것일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 대두포스파티딜콜린, Tween80, 및 일산화탄소방출분자-2를 8:2:1 (w/w) 비율로 혼합하는 단계를 포함하는 급성피부염 개선 또는 치료용 추가변형리포솜 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따르는 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜은 제어된 일산화탄소의 방출과 효율적인 일산화탄소 방출을 통해 생체내, 외에서 개선된 항염증효과를 보인다. 또한, 본 발명을 통한 일산화탄소방출분자-2의 제어된 일산화탄소 방출을 통하여 항염증 효과의 증가뿐만 아니라 세포보호효과, 혈관이완효과, 항증식효과, 항산화효과, 세포자멸사 억제효과 등을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜의 도식을 나타낸 것이다.

도 2은 일산화탄소방출분자-2를 함유된 초가변형리포솜의 투과전자현미경 (TEM) 사진을 나타낸 것이다.

도 3는 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜의 가변도를 비교한 그래프이다.

도 4는 180분 동안 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜과 일산화탄소방출분자-2 용액으로부터 방출되는 일산화탄소를 비교한 그래프이다.

도 5은 일산화탄소방출분자-2를 함유된 초가변형리포솜 또는 일산화탄소방출분자-2 용액을 처리한 RAW 264.7 대식세포의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 염증반응의 지표로 일산화질소의 발생량을 비교하기 위하여 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, LPS)로 염증이 유도된 대식세포에 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜 또는 일산화탄소방출분자-2 용액을 처리한 후, RAW 264.7 대식세포의 아질산염 생성량을 비교한 그래프이다.

도 7은 테트라데카노일포르볼 아세테이트 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA)로 급성피부염증이 유발된 쥐의 피부염증모델에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 처리하였을 때, 귀의 두께변화를 통하여 염증반응의 지표인 부종의 정도를 비교한 그래프이다.

도 8는 테트라데카노일포르볼 아세테이트 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA)로 급성피부염증이 유발된 쥐의 피부염증모델에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 처리하였을 때, 귀의 무게변화를 통하여 염증반응의 지표인 부종의 정도를 비교한 그래프이다.

도 9은 테트라데카노일포르볼 아세테이트 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA)로 급성피부염증이 유발된 쥐의 피부염증모델에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 처리하였을 때, 호중구량을 비교하여 염증반응의 정도를 비교한 그래프이다.

도 10은 테트라데카노일포르볼 아세테이트 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA)로 급성피부염증이 유발된 쥐의 피부염증모델에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 처리하였을 때, IL-6 mRNA의 양을 비교하여 염증반응의 정도를 비교한 그래프이다.

도 11은 테트라데카노일포르볼 아세테이트 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA)로 급성피부염증이 유발된 쥐의 피부염증모델에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 처리하였을 때, IL-1 β mRNA의 양을 비교하여 염증반응의 정도를 비교한 그래프이다.

도 12은 테트라데카노일포르볼 아세테이트 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA)로 급성피부염증이 유발된 쥐의 피부염증모델에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 처리하였을 때, TNF- α mRNA의 양을 비교하여 염증반응의 정도를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 고농도의 일산화탄소는 산소결핍을 유도하여 정상조직의 독성 및 중독효과를 유도하여 조직손상을 일으킬 수 있다. 그러나 저농도의 일산화탄소는 항염증효과, 세포보호효과, 혈관이완효과, 항증식효과, 항산화효과, 세포자멸사 억제효과 등이 있다.

[0030] 본 발명은 위 서술한 바와 같이 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 제조하여 일산화탄소의 국소적인 피부전달 및 제어된 방출을 통해서 독성을 경감시키고 항염증 효과를 나타내고자 한다.

[0031] 이에 본 발명은 효율적인 일산화탄소 전달을 통해 급성피부염증을 완화하기 위한 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜의 개발하여 이를 경피투과용 약물전달시스템 및 피부염증 치료 용도에 제공하고자 한다.

[0032] 본 발명에서는 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜의 발명을 통해 일산화탄소의 방출반감기를 개선하였고, 테트라데카노일포르볼 아세테이트 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA)로 유발된 피부염증모델에서 항염증 효과를 입증하였다.

[0033] 대두 유래 포스파티딜콜린을 인지질 이중층 구성성분으로 사용하고 Tween 80을 가장자리 활성화제(edge activator)로 첨가하여 지질 막 수화법 및 압출 방법을 통해 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 제조하였다. 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형 리포솜을 제조한 후 입자 크기, 다분산지수, 제타 전위, 봉입률, 형상 및 가변도를 포함한 물리화학적 특성을 평가하였다. 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜에서의 일산화탄소 방출을 미오글로빈 분석을 통해 평가하였다. 생체외(in vitro) 와 생체내(in vivo)에서의 항염증 효과는 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, LPS)로 유도된 대식세포와 TPA로 유도된 피부염증 모델에서 각각 평가하였다.

[0034] 보다 구체적으로, 본 발명자들은 구체적인 실험을 통해 대두 포스파티딜콜린(soy phosphatidyl choline)을 인지질 이중층 구성성분으로 하고, Tween80을 가장자리 활성화제(edge activator)로 첨가하여 지질 막 수화법(lipid film hydration) 및 압출방법(extrusion technique)을 통해 일산화탄소방출분자-2를 함유하도록 초가변형리포솜을 제작하였다. 또한, 포스파티딜콜린과 Tween80의 비율을 달리 하여 초가변형리포솜을 제조하여 그 물리화학적 특성과 가변도를 평가한 결과, 8:2(실시에 2)로 혼합하여 제조된 초가변형리포솜에서 가장 높은 가변도를 확인하였다.

[0035] 또한, 본 발명자들은 구체적인 실험을 통해 실시예 2의 초가변형리포솜과 일산화탄소방출분자-2 용액(비교예 2)의 일산화탄소 방출 패턴과 일산화탄소의 반감기를 확인한 결과, 실시예 2의 초가변형리포솜이 더 오랜시간 일산화탄소를 방출하고 약 40배 증가한 반감기를 가짐을 확인하였고, 초가변형리포솜의 저장 안정성과 비세포독성 및 항염증 효과와 우수함을 확인하였는바, 대두 포스파티딜콜린과 Tween80을 8:2 혼합하여 제조된 초가변형리포솜을 피부염증 치료를 위하여 제공할 수 있다.

[0037] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0039] [실시예]

[0040] 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 제조하기 위해 표 1과 같이 적절한 비율로 대두 포스파티딜콜린(soy phosphatidyl choline)을 인지질 이중층 구성성분으로 사용하고 Tween80을 가장자리 활성화제(edge activator)로 첨가하여 지질 막 수화법(lipid film hydration) 및 압출방법(extrusion technique)을 통해 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포솜을 제조하였다. 더 자세히 설명하면, 둥근바닥 플라스크에 적절한 비율의 일산화탄소방출분자-2, 대두 포스파티딜콜린, Tween80을 클로르포름에 녹인 후, 감압증류장치를 이용하여 용매를 휘발시켜 얇은 지질막을 형성한다. 적절히 가온한 5% 포도당용액을 첨가하여 수화시켜 준 후, 초음파기를 통해 1차적으로 입자크기를 감소시키고 100 nm 멤브레인을 통과시켜 입자크기를 균질하게 줄여준다. 최종적으로 초미세여과 원심분리법을 이용하여 봉입되지 않은 일산화탄소방출분자-2를 제거하였다.

표 1

	조성 (w/w)			
	대두 포스파티딜콜린	Tween 80	콜레스테롤	일산화탄소방출분자-2
실시예 1	9	1	-	1
실시예 2	8	2	-	1
실시예 3	7	3	-	1
실시예 4	6	4	-	1
비교예 1	8	-	2	1
비교예 2	-	-	-	1

[0042] 실험예 1 : 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀의 물리화학적 특성

[0043] 상기 실시예로 제조한 조성물에서 미량을 취하여 물로 희석한 후, 입자측정기(Zeta sizer Nano ZS)을 이용하여 입자크기, 다분산지수, 제타전위를 평가하였다. 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀에서 일산화탄소 방출분자-2의 포집효율은 유도결합 플라즈마 분광 분석법(ICP-AES)을 이용하여 루테튬을 정량함으로써 측정하였다. 평가한 물리화학적 특성들은 표 2에 정리된 바와 같으며 모든 실시예에서 100 nm내외의 균일한 입자가 제조된 것을 확인할 수 있다. 제타전위는 40 mV내외이며, 포집효율은 Tween80의 비율이 증가할수록 감소된 것을 확인할 수 있다.

표 2

[0044]

	물리화학적 특성			
	입자 크기 (nm)	다분산지수	제타 전위 (mV)	포집 효율 (%)
실시예 1	106.3 ± 1.6	0.070 ± 0.025	43.7 ± 4.9	35.5 ± 0.9
실시예 2	100.9 ± 1.5	0.087 ± 0.025	42.7 ± 4.5	31.5 ± 2.0
실시예 3	98.6 ± 3.1	0.116 ± 0.005	40.9 ± 4.8	27.1 ± 2.3
실시예 4	95.3 ± 1.2	0.141 ± 0.031	38.0 ± 6.8	23.9 ± 2.0

[0045] 실험예 2 : 투과 전자 현미경 (TEM)

[0046] 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀의 형태는 실시예 2를 이용하여 투과 전자 현미경으로 확인하였다. 도 2과 같이 균일한 크기의 둥근 입자가 형성된 것을 확인할 수 있다.

[0048] 실험예 3 : 가변도 평가

[0049] 상기 실시예로 제조한 조성물의 가변도를 평가하였다. 각 실시예의 조성물을 50 nm 폴리카보네이트 막이 설치된 압출장치에 주입한 후 0.1 Mpa의 압력으로 질소를 넣어 5분동안 막을 통과하는 양을 평가하였다. 비교예(비교예 1)로는 일반적으로 리포좀 제조에 이용되는 콜레스테롤이 8:2의 비율로 첨가된 리포좀을 이용하였다. 콜레스테롤은 리포좀의 견고함을 유지시켜 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 5분 동안 막을 통과한 양과 막을 통과한 후의 입자크기를 평가하여 가변도를 비교한 결과, 도 3와 같이 모든 실시예에서 비교예보다 높은 가변도를 나타내었고, 인지질과 가장자리활성화제가 8:2의 비율로 조성된 실시예 2에서 가장 높은 가변도를 보였다.

[0051] 실험예 4 : 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀에서 일산화탄소의 방출

[0052] 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀에서의 일산화탄소 방출은 미오글로빈 분석법을 이용하여 평가하였다. 미오글로빈을 강제로 환원시킨 뒤 일산화탄소방출분자-2 용액 또는 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀을 주입하게 되면, 일산화탄소가 발생하게 되고 미오글로빈과 결합하여 일산화탄소-미오글로빈 중합체를 이루게 된다. 일산화탄소-미오글로빈 중합체의 농도를 흡광도를 통해 측정함으로써 시간에 따른 일산화탄소의 방출량을 평가하였다. 비교예(비교예 2)로는 일산화탄소방출분자-2 용액을 이용하여 평가하였다. 도 4와 같이 비교예 2에서는 초반에 급격한 방출을 보인 반면, 실시예 2에서는 지속적인 일산화탄소 방출을 보였다. 일산화탄소 방출 반감기는 비교예2와 비교하여 40배까지 증가하였다.

[0054] 실험예 5 : 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀의 저장 안정성 평가

[0055] 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀의 저장 안정성은 실시예2를 28일 동안 4℃ (표3) 와 25℃ (표4)에서 보관하며 평가하였다. 실시예 2의 안정성 평가를 위해 입자크기, 다분산지수, 제타전위, 포집효율을 측정하였다.

표 3

[0056]

요일	입자 크기(nm)	다분산지수	제타 전위 (mV)	포집 효율 (%)
0	100.9 ± 1.5	0.087 ± 0.025	42.7 ± 4.5	31.5 ± 2.0
1	99.8 ± 2.6	0.059 ± 0.016	45.2 ± 6.8	31.4 ± 2.0

3	98.1 ± 2.3	0.087 ± 0.003	42.2 ± 1.0	30.5 ± 1.8
7	100.3 ± 0.8	0.085 ± 0.019	46.3 ± 3.7	30.1 ± 2.8
14	99.0 ± 5.9	0.077 ± 0.013	45.2 ± 4.4	29.0 ± 2.0
21	97.9 ± 3.2	0.077 ± 0.029	45.1 ± 3.2	28.0 ± 1.1
28	99.2 ± 1.7	0.067 ± 0.020	40.2 ± 6.0	27.2 ± 2.5

표 4

요일	입자 크기(nm)	다분산지수	제타 전위 (mV)	포집 효율 (%)
0	100.9 ± 1.5	0.087 ± 0.025	42.7 ± 4.5	31.5 ± 2.0
1	99.2 ± 2.9	0.085 ± 0.016	41.7 ± 2.6	30.9 ± 2.6
3	96.8 ± 3.6	0.083 ± 0.028	41.8 ± 1.6	29.9 ± 1.9
7	97.6 ± 3.5	0.071 ± 0.007	37.4 ± 4.6	27.4 ± 2.0
14	95.9 ± 2.4	0.067 ± 0.010	22.6 ± 1.7	24.6 ± 3.3
21	89.5 ± 3.2	0.067 ± 0.002	7.7 ± 1.3	23.2 ± 3.9
28	89.5 ± 4.3	0.079 ± 0.021	3.5 ± 1.0	15.5 ± 4.1

실험예 6 : 생체 외에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀의 비세포독성 및 항염증 효과

일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀의 비세포독성은 MTT 분석법을 통하여, RAW 264.7 대식 세포의 생존율을 평가하여 확인하였다. 도 5과 같이 실시예2와 비교예2의 10, 20 μM 에서 세포독성이 없는 것을 확인할 수 있었고 두 농도에 대해 항염증효과 실험을 진행하였다. 항염증 효과는 RAW 264.7 대식세포를 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, LPS)를 이용하여 염증반응을 유도한 후 각각 실험예 2와 비교예 2를 처리하여 일산화질소의 생성량을 평가하였다. 일산화질소는 염증반응의 지표로서 염증반응의 정도를 나타낼 수 있다. 도 6과 같이 비교예2 보다 실시예 2에서 일산화질소 생성량이 감소된 것을 확인할 수 있었고, 이를 통해 실시예 2의 항염증효과를 입증할 수 있었다.

실험예 7 : 생체 내에서 일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀의 항염증 효과

일산화탄소방출분자-2를 함유한 초가변형리포좀의 생체 내에서 항염증효과를 평가하기 위하여 쥐의 급성피부 염증모델을 이용하였다. 쥐의 한쪽 귀에 각각 실시예와 비교예를 처리한 후, 테트라데카노일포르볼 아세테이트 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA)을 같은 귀에 처리하여 급성피부염증을 유도하였다. 이때 각 실시예와 비교예에 의한 항염증 효과를 귀의 무게 및 두께변화를 통해 부종의 정도를 평가하였다. 그리고 호중구수와 염증매개 사이토카인인 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA의 발현정도를 평가하여 염증반응의 정도를 평가하였다. 실험을 종료한 후 쥐의 귀 조직을 취하여 조직병리학적 평가를 실시하였다. 본 실험에서 양성 대조군으로는 인도메타신(비교예3)을 이용하여 항염증효과를 비교하였다. 그 결과, 도 7, 도면8와 같이 실험예 2에서 귀의 두께 및 무게 변화가 적었으며, 이를 통해 항염증효과를 통해 부종의 발생이 억제된 것을 확인할 수 있다. 도 9, 도 10, 도 11, 도 12을 통해 실험예 2를 처리했을 때 호중구수가 가장 낮으며, 염증매개 사이토카인인 IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA의 발현정도가 가장 낮은 것을 확인할 수 있다. 또한 표 5와 같이 조직병리학적 특성에서도 실시예 2를 처리했을 때, 각질층의 과다증식(Epidermal hyperliferation)이 가장 억제되었고, 백혈병성 침윤(leucocyte infiltration)의 정도도 가장 낮은 수치를 보였다.

표 5

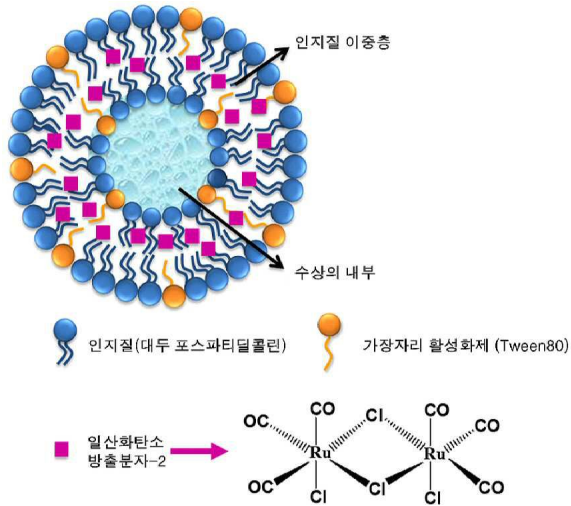
	귀 부종	표피 과다 각질화	백혈병성 침윤
대조군	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TPA	3.53 ± 0.38	2.47 ± 0.69	3.27 ± 0.43
TPA + 비교예 3	2.93 ± 0.43	1.47 ± 0.30	2.60 ± 0.15
TPA + 비교예 2	2.87 ± 0.56	1.93 ± 0.72	2.53 ± 0.65
TPA + 실시예 2	1.13 ± 0.77 [#]	0.93 ± 0.72 [*]	0.73 ± 0.55 [#]

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이

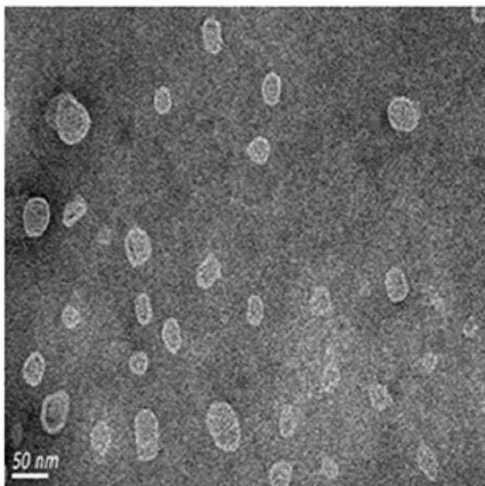
러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

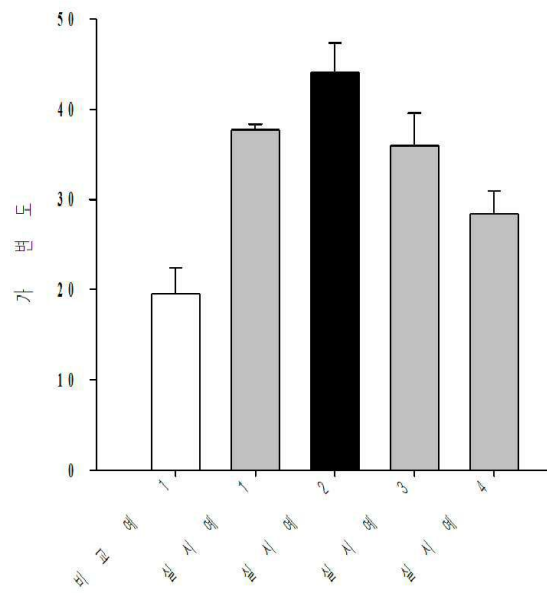
도면1



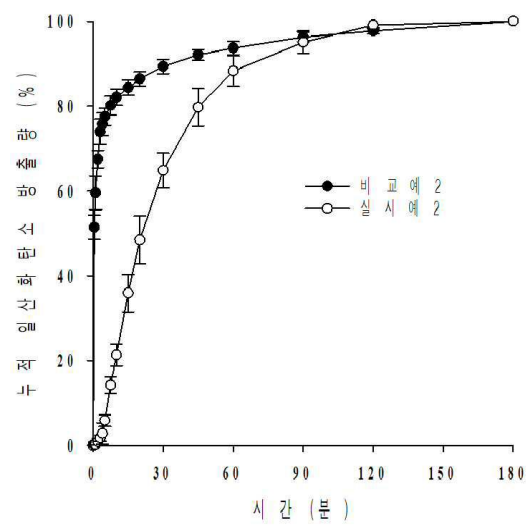
도면2



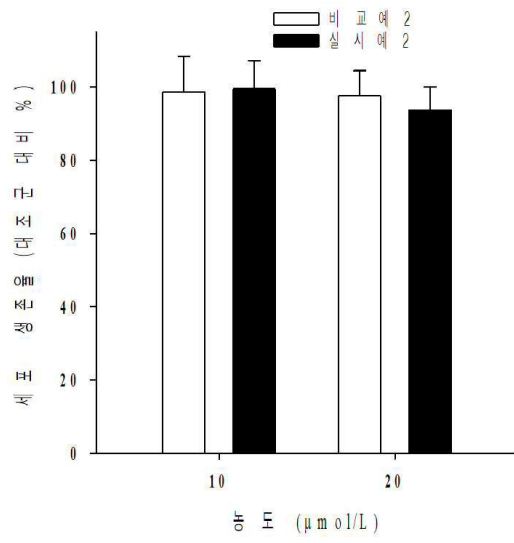
도면3



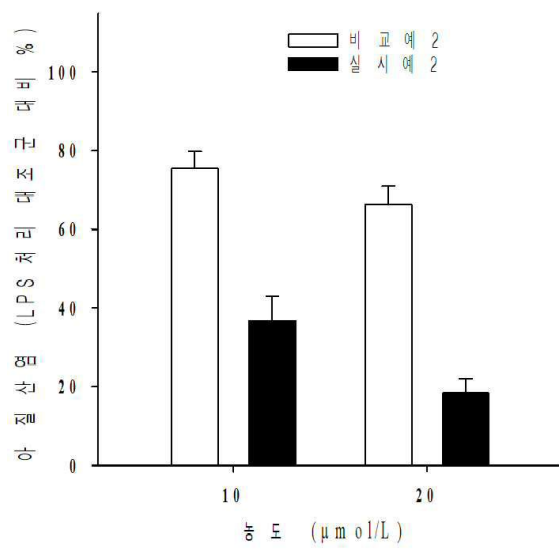
도면4



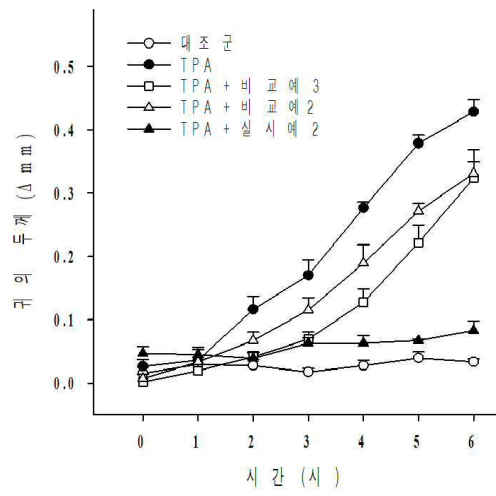
도면5



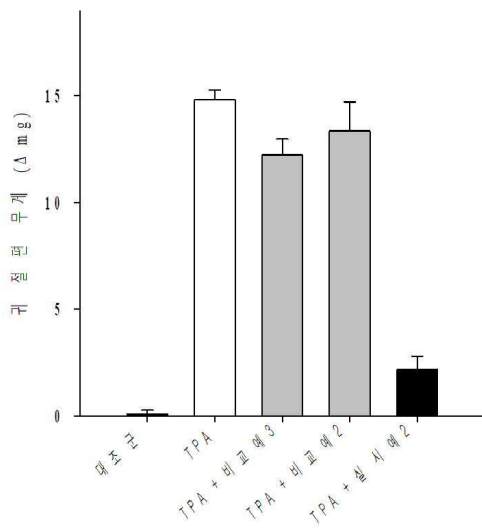
도면6



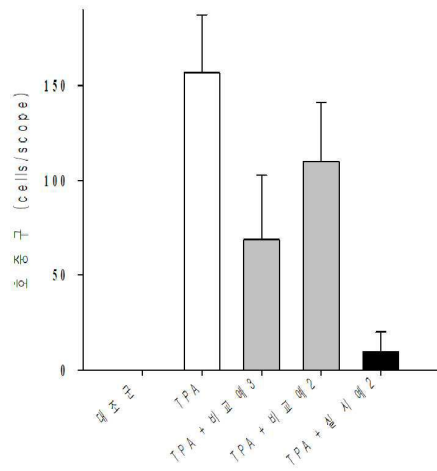
도면7



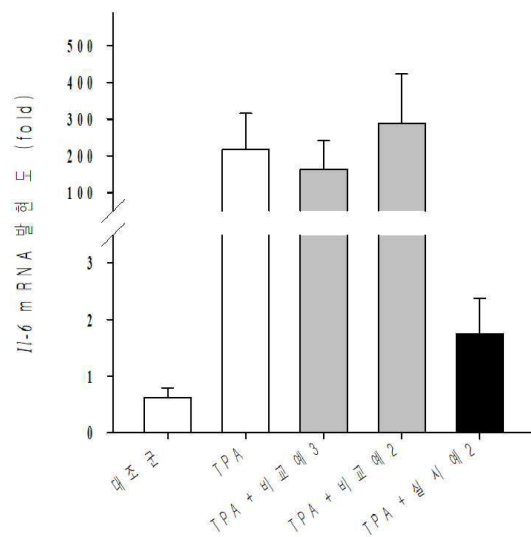
도면8



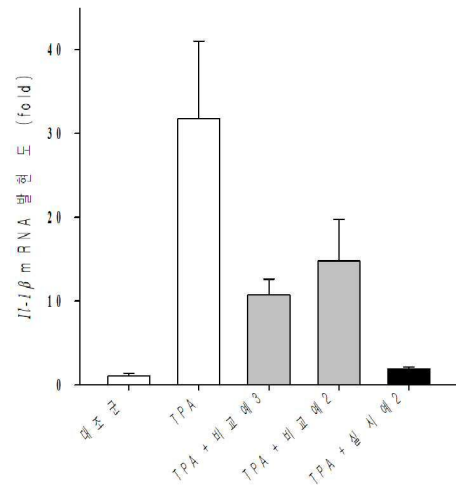
도면9



도면10



도면11



도면12

