



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0170185

(43) 공개일자 2024년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 41/00 (2020.01) *A61K 9/127* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 41/0057 (2013.01)*A61K 9/1271* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0068337

(22) 출원일자 2023년05월26일

심사청구일자 2023년05월26일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

전태준

경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5409동 204호(이의동, 자연앤 힐스테이트)

김선민

서울특별시 마포구 독막로18길 5, 104동 1804호(상수동, 상수두산위브아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

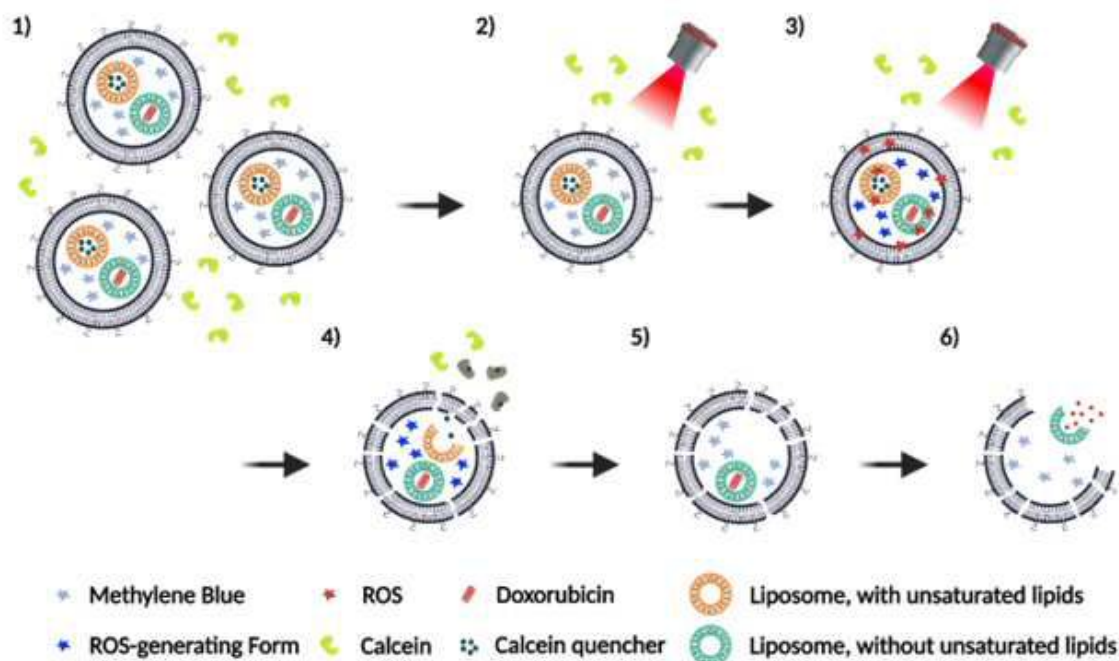
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 다중 지질 이중막 구체의 광반응성 생물학적 제제 전달 플랫폼 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 다중 지질 이중막 구체의 광반응성 생물학적 제제 전달 플랫폼 및 이의 용도 등에 관한 것이다. 리포솜의 구조의 지질 포화 정도에 따른 광 반응성 차이를 이용한 본 발명의 베소솜 약물 전달 플랫폼을 이용하여, 광 유도 ROS에 취약한 리포솜의 제어 방출(controlled release) 및 ROS에 취약하지 않은 리포솜의 지속적인 방출

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1

(sustained release)을 세포 수준에서 확인하여 각각 리포솜에서 생물학적 제제의 순차적인 방출을 확인하였고, *C. elegans*를 모델 유기체로 사용하여 생체 내에서 광 제어 가능성을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 베소솜 약물 전달 시스템은 약물 효과를 향상시키기 위해 시간에 따라 다른 내용물을 방출시킬 수 있으며, 병용 요법을 위해 여러 약물을 탑재시킬 수 있는 잠재력을 가지고 있는 것이다. 또한, 본 발명은 기존 생명공학 도구의 효율성 및 특이성 향상에 적용할 수 있으며, 고도화되고 정교한 약물 전달 시스템 발전에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

(72) 발명자

이드보라

인천광역시 미추홀구 용정공원로83번길 49, 1726호(용현동)

송서윤

서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 105동 1205호(목동, 브라운스톤태릉아파트)

장희수

인천광역시 남동구 논현로 81, 402동 1203호(논현동, 논현하늘마을엘에이치4단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711189000
과제번호	2019R1A2C1084787
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	활성산소 기전 분석 및 항산화제 스크리닝을 위한 인공생체막·세포칩 기반 통합 플랫폼 개발
기여율	1/2
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192829
과제번호	00207801
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	복합장기 및 in vivo 모델 메타플랫폼 기초연구실
기여율	1/2
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

생물학적 체제를 포함하는 복수개의 단일 지질 이중막 구체; 및
광감작제를 포함하는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 복수개의 단일 지질 이중막 구체는 각각 서로 다른 포화 지질 및 불포화 지질 비율; 및 서로 다른 광 반응성을 갖는 것인, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단일 지질 이중막 구체는 포화 지질의 비율이 높을수록 광 자극에 대하여 구조적 안정성을 유지하여, 생물학적 체제를 지연 방출하는 것인, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 광 반응성 다중 지질 이중막 구체의 외막은 1 내지 10 mol%의 불포화 지질을 포함하는 것인, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 다중 지질 이중막 구체의 직경은 100 내지 500nm인, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단일 지질 이중막 구체의 직경은 10 내지 100nm인, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 생물학적 체제는 약물, 화합물질, 나노입자, 펩타이드, 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물, 및 양성자로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 복수개의 단일 지질 이중막 구조에 포함되는 각각의 생물학적 제제가 순차적으로 방출되는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구조.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 광감작제는 페노티아진계(phenothiazine) 화합물, 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 클로린계(chlorins) 화합물, 박테리오클로린계(bacteriochlorins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물, 5-아미노레볼린 에스테르계(5-aminoevuline esters) 화합물, 및 금나노입자를 포함하는 금속나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된, 광 반응성 다중 지질 이중막 구조.

청구항 10

제2항에 있어서,

상기 불포화 지질은 DOPC(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), PLPC(1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DEPC(1,2-dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 및 POPC(palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구조.

청구항 11

제2항에 있어서,

상기 포화 지질은 DSPC(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC(dimyristoyl-phosphatidylcholine), DPPC(dipalmitoyl-phosphatidylcholine), MPPC(1-myristoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine), PMPC(1-palmitoyl-2-myristoyl-phosphatidylcholine), SPPC(1-stearoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine), 및 DBPC(1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구조.

청구항 12

제1항의 광 반응성 다중 지질 이중막 구조를 포함하는, 생물학적 제제 전달용 조성물.

청구항 13

- (a) 10 내지 100nm 크기의 기공을 갖는 막으로 압출하여 2종 이상의 단일 지질 이중막 구조를 제조하는 단계;
- (b) 상기 제조된 단일 지질 이중막 구조에 생물학적 제제를 탑재하는 단계;
- (c) 단일층 인지질에 에탄올을 첨가하여 지질 시트를 형성하는 단계;
- (d) (b) 단계에서 생물학적 제제가 탑재된 2종 이상의 단일 지질 이중막 구조에 광감작제를 첨가하고, (c) 단계의 지질 시트와 혼합하는 단계; 및
- (e) 온도를 상기 지질 시트의 녹는점 이상으로 올려 자발적인 광 반응성 다중 지질 이중막 구조 형성을 유도하는 단계;를 포함하는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구조의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 2종 이상의 단일 지질 이중막 구조는 각각 서로 다른 포화 지질 및 불포화 지질 비율; 및 서로 다른 광 반응성을 갖는 것인, 광 반응성 다중 지질 이중막 구조의 제조방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 다중 지질 이중막 구조의 직경은 100 내지 500nm인, 광 반응성 다중 지질 이중막 구조의 제조방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 다중 지질 이중막 구조의 광반응성 생물학적 제제 전달 플랫폼 및 이의 용도 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 약물 전달 시스템의 발전은 MOF(metal-organic frameworks), 미셀, 펩타이드, 하이드로겔, 리포솜을 사용하는 시스템 등 치료용 약물 분야에 큰 영향을 미쳤다. 이 중, 지질 이중층으로 둘러싸인 수성 코어(aqueous core)를 가진 리포솜은 광범위하게 연구되었으며 세포 및 조직 흡수, 생체 적합성, 자기 조립 구조 및 큰 약물 페이로드(payloads) 운반 능력과 같은 많은 이점을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 잠재력에도 불구하고, 리포솜 약물 전달 시스템은 제어 및 지속 방출을 위해 단일 담체에 여러 내용물을 적재하는 측면에서 여전히 제한 사항이 있으며, 이는 임상 적용의 장애물로 작용하고 있다.

[0004] 약물 전달 시스템의 제어 방출은 약물 방출을 정밀하게 제어할 수 있는 광-유발 시스템을 사용하여 간단히 입증되었다. 광-유발 약물 방출 또는 활성화 시스템은 비침습적이고 표적 특이적이며 조직 투과가 가능하기 때문에 이점이 있다. 더욱이 몇몇 광감작제는 이미 미국 식품 의약품국(U.S. Food and Drug Administration, FDA)에서 광역학 치료 용도로 승인되었다. 그러나 지속적인 광 노출의 필요성 및 활성 분자와의 간섭 등의 한계로 인하여 많은 시스템이 임상 치료에 적용될 수 없었다. 이러한 문제를 개선하기 위해서, 보다 정교한 디자인의 광 제어 가능한 약물 전달 시스템이 필요한 실정이다.

[0005] 베소솜은 "각지 속의 완두콩"과 유사한 더 큰 리포솜의 수성 코어에 더 작은 리포솜을 캡슐화하는 다중 구획 리포솜 구조이다. 상기 더 큰 리포솜의 크기는 일반적으로 수백 나노미터에서 수십 마이크로미터 범위이며, 종종 LUV(large unilamellar vesicles) 또는 GUV(giant unilamellar vesicles)로 불린다. 베소솜은 다음과 같은 몇 가지 이유로 리포솜보다 우수하다: i) 여러 구획을 별도의 리포솜에 로드할 수 있고, ii) 약물 보유 시간을 늘릴 수 있으며, iii) 전달 시스템을 더 섬세하게 제어하고, 공간을 독립적으로 유지된 페이로드를 탑재할 수 있다. 또한, 리포솜의 주요 결점은 비표적 부위에서 약물 내용물의 방출이다. 그러나, 베소솜은 내부 리포솜을 감싸기 위해 추가적인 최외막이 있는 바, 이를 최소화할 수 있다. 또한, 지속적인 약물 방출을 가능하게 하는 이중 장벽으로 인하여, 방출되는 약물의 양을 정밀하게 제어하여 동일한 치료 효과를 얻을 수 있어, 과다 복용으로 인한 부작용을 최소화할 수 있다. 다만, 베소솜을 이용한 약물 전달 시스템은 내부 리포솜의 크기 조절, 불안정성, 및 융합 등의 문제점이 있는 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 내부 리포솜 사이의 막간 공간에 빛에 의해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하는 광감작제를 배치하여 광 제어가 가능한 베소솜 약물 전달 플랫폼을 설계하였다. 또한, 본 발명자들은 베소솜 내부에 생물학적 제제를 탑재한 리포솜이 깨지거나 융합되지 않고, 타겟 영역까지 안정적으로 전달됨을 확인하였을 뿐만 아니라, 복수의 내부 리포솜이 각각 다른 생물학적 제제를 순차적으로 전달함을 확인하였는 바, 본 발명의 베소솜 약물 전달 시스템은 의약, 화장품, 식품 분야 등 다양한 분야에 활용될 수 있을 것으로 기대되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2510735호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 생물학적 제제를 포함하는 복수개의 단일 지질 이중막 구체; 및 광감작제를 포함하는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 다중 지질 이중막 구체를 포함하는, 생물학적 제제 전달용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 10 내지 100nm 크기의 기공을 갖는 막으로 압출하여 2중 이상의 단일 지질 이중막 구체를 제조하는 단계;
- [0012] (b) 상기 제조된 단일 지질 이중막 구체에 생물학적 제제를 탑재하는 단계;
- [0013] (c) 단일층 인지질에 에탄올을 첨가하여 지질 시트를 형성하는 단계;
- [0014] (d) (b) 단계에서 생물학적 제제가 탑재된 2중 이상의 단일 지질 이중막 구체에 광감작제를 첨가하고, (c) 단계의 지질 시트와 혼합하는 단계; 및
- [0015] (e) 온도를 상기 지질 시트의 녹는점 이상으로 올려 자발적인 광 반응성 다중 지질 이중막 구체 형성을 유도하는 단계;를 포함하는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0019] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0021] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0023] 본 발명은 생물학적 제제를 포함하는 복수개의 단일 지질 이중막 구체; 및 광감작제를 포함하는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구체를 제공한다.
- [0024] 본 발명에서, 단일 지질 이중막 구체는 인지질 이중막이 구체를 형성한 구조로, 수성코어(aqueous core)를 포함하고, 리포솜(liposome)이라고 불리며, 포화지질 또는 불포화 지질; 및 콜레스테롤로 구성될 수 있으나, 이에

제한되지 않는다. 또한, 다중 지질 이중막 구조는 더 큰 리포솜의 수성 코어에 더 작은 리포솜을 캡슐화하는 다중 구획 리포솜 구조를 의미하며, 베소솜(vesosome)이라고 불린다. 본 발명에서 다중 지질 이중막 구조와 베소솜은 상호 교환하여 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명에서, 지질은 생체를 구성하는 물질 중에서 물에는 녹지 않고, 에테르, 클로로폼, 알코올, 벤젠, 석유 등의 유기용매에 잘 녹는 것으로서, 소수성 꼬리의 포화 정도(이중결합 수)에 따라서 포화 지질과 불포화 지질로 구분된다. 상기 포화 지질은 소수성 꼬리에 이중결합이 없는 지질을 의미하는 것으로, DSPC(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC(dimyristoyl phosphatidylcholine), DPPC(dipalmitoyl phosphatidylcholine), MPPC(1-myristoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine), PMPC(1-palmitoyl-2-myristoyl phosphatidylcholine), SPPC(1-stearoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine), 및 DBPC(1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 DSPC(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 또는 DPPC(dipalmitoyl phosphatidylcholine)를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 또한, 상기 불포화 지질은 소수성 꼬리에 이중결합이 하나 이상 존재하는 지질을 의미하는 것으로, DOPC(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), PLPC(1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DEPC(1,2-dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 및 POPC(palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 DOPC(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명에서, 상기 복수개의 단일 지질 이중막 구조는 포화 지질 및 불포화 지질의 비율이 각각 서로 다르고, 상기와 같은 상이한 비율에 따라 광 반응성이 각각 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 광 반응성은 빛에 의해서 광감작제가 활성 산소종(ROS)을 생성하고, 단일 지질 이중막 구조가 과산화되어 구조적으로 변형되는 정도를 의미한다. 광 반응성은 단일 지질 이중막 구조의 포화 지질 및 불포화 지질의 비율에 따라서 달라질 수 있으며, 상기 단일 지질 이중막 구조는 불포화 지질의 비율이 높을수록 활성 산소종에 의한 구조 변형에 취약할 수 있다. 따라서, 구조적 변형 정도에 따라, 단일 지질 이중막 구조에 포함된 생물학적 제제의 방출 속도가 상이할 수 있는 것이다. 본 발명에서, 상기 복수개의 단일 지질 이중막 구조에 포함되는 각각의 생물학적 제제가 순차적으로 방출될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 또한, 본 발명에서, 상기 단일 지질 이중막 구조는 포화 지질의 비율이 높을수록 광 자극에 대해서 구조적 안정성을 유지할 수 있으며, 생물학적 제제를 지연 방출할 수 있다.

[0029] 또한, 상기 복수개의 단일 지질 이중막 구조가 포함하는 각각의 생물학적 제제는 목적에 따라 동일할 수도 있고, 상이할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 지연 방출이 필요한 생물학적 제제를 포화 지질 대비 불포화 지질의 비율이 높은 단일 지질 이중막 구조에 탑재시켜서 생물학적 제제의 지연 방출 목적을 달성할 수 있다.

[0030] 본 발명에서, 상기 광 반응성 다중 지질 이중막 구조의 외막은 1 내지 10 mol%의 불포화 지질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 외막에 포함된 불포화 지질은 소분자의 빛 노출에 따른 투과성을 향상시킬 수 있다.

[0031] 본 발명에서, 상기 광감작제(photosensitizer)는 빛에 노출되지 않을 경우 비활성 상태로 있다가, 특정 파장의 빛을 조사하면 광 에너지를 발생시켜 형광 신호를 생성하거나, 주변의 기질 또는 산소와 반응하여 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하는 물질로서, 상기 광감작제는 페노티아진계(phenothiazine) 화합물, 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 클로린계(chlorins) 화합물, 박테리오클로린계(bacteriochlorins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물, 5-아미노레볼린 에스테르계(5-aminoevuline esters) 화합물, 및 금나노입자를 포함하는 금속나노입자로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 메틸렌 블루(Methylene blue)를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명에서, 생물학적 제제는 약물, 화학물질, 나노입자, 펩타이드, 폴리펩타이드, 핵산, 탄수화물, 및 양성자로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 독소루비신, 코발트(CoCl_2), 칼세인(Calcein) 또는 로다민(rhodamine)을 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명에서, 상기 다중 지질 이중막 구조의 직경은 100 내지 500nm, 100 내지 450nm, 100 내지 400nm, 100 내지 350nm, 100 내지 300nm, 100 내지 250nm, 125 내지 500nm, 125 내지 450nm, 125 내지 400nm, 125 내지 350nm, 125 내지 300nm, 125 내지 250nm, 150 내지 500nm, 150 내지 450nm, 150 내지 400nm, 150 내지 350nm,

150 내지 300nm, 150 내지 250nm, 180 내지 220nm, 또는 200nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0034] 본 발명에서, 상기 단일 지질 이중막 구조의 직경은 10 내지 100nm, 10 내지 80nm, 10 내지 60nm, 10 내지 40nm, 10 내지 30nm, 12 내지 100nm, 12 내지 80nm, 12 내지 60nm, 12 내지 40nm, 12 내지 30nm, 15 내지 100nm, 15 내지 80nm, 15 내지 60nm, 15 내지 40nm, 15 내지 30nm, 15 내지 25nm, 18 내지 22nm, 또는 20nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명은 본 발명의 다중 지질 이중막 구조를 포함하는, 생물학적 제제 전달용 조성물을 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 (a) 10 내지 100nm 크기의 기공을 갖는 막으로 압출하여 2종 이상의 단일 지질 이중막 구조를 제조하는 단계;
- [0037] (b) 상기 제조된 단일 지질 이중막 구조에 생물학적 제제를 탑재하는 단계;
- [0038] (c) 단일층 인지질에 에탄올을 첨가하여 지질 시트를 형성하는 단계;
- [0039] (d) (b) 단계에서 생물학적 제제가 탑재된 2종 이상의 단일 지질 이중막 구조에 광감작제를 첨가하고, (c) 단계의 지질 시트와 혼합하는 단계; 및
- [0040] (e) 온도를 상기 지질 시트의 녹는점 이상으로 올려 자발적인 광 반응성 다중 지질 이중막 구조 형성을 유도하는 단계;를 포함하는, 광 반응성 다중 지질 이중막 구조의 제조방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 2종 이상의 단일 지질 이중막 구조는 각각 서로 다른 포화 지질 및 불포화 지질 비율; 및 광 반응성을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 (a) 단계의 단일 지질 이중막 구조는 포화 지질 또는 불포화 지질; 및 콜레스테롤 등으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명에서, 상기 (c) 단계의 단일층 인지질은 50 내지 400nm, 50 내지 300nm, 50 내지 200nm, 50 내지 150nm, 50 내지 120nm, 70 내지 400nm, 70 내지 300nm, 70 내지 200nm, 70 내지 150nm, 70 내지 120nm, 90 내지 400nm, 90 내지 300nm, 90 내지 200nm, 90 내지 150nm, 90 내지 120nm, 90 내지 110nm, 또는 100nm 크기의 기공을 갖는 막으로 압출되어 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명에서, 상기 (c) 단계에서 지질시트는 에탄올과 인지질이 서로 맞물림(interdigitation)을 형성하여 제조될 수 있다. 또한, 상기 (c) 단계는 지질시트 제조 후 에탄올을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 (a) 내지 (e) 단계로 제조된 광 반응성 다중 지질 이중막 구조에 DPPE-PEG2000(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[azido(polyethylene glycol)-2000])를 첨가하였으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 제조방법은 추가적으로 상기 (e) 단계의 광반응성 다중 지질 이중막 구조가 100 내지 500nm의 기공을 갖는 막으로 압출되는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 종합하면, 본 발명의 광감작제 및 복수개의 단일 지질 이중막 구조를 포함하는 광 반응성 다중 지질 이중막 구조는 복수개의 단일 지질 이중막 구조에 포함된 각각 생물학적 제제를 순차적으로 방출할 수 있음을 확인하였고; 약물 보유 능력이 향상됨을 확인하였으며; 광 반응성 다중 지질 이중막 구조가 세포 독성이 없어 생체 내에서 안전하게 이용할 수 있음을 확인하였고; 유기체 *C. elegans*를 이용하여 생체 내에서 다중 지질 이중막 구조의 활용 가능성을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 베소좀 약물 전달 시스템은 의약, 화장품, 식품 분야 등 다양한 분야에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 효과

- [0049] 리포솜의 구조의 지질 포화 정도에 따른 광 반응성 차이를 이용한 본 발명의 베소좀 약물 전달 플랫폼을 이용하여, 광 유도 ROS에 취약한 리포솜의 제어 방출(controlled release) 및 ROS에 취약하지 않은 리포솜의 지속적인 방출(sustained release)을 세포 수준에서 확인하여 각각 리포솜에서 생물학적 제제의 순차적인 방출을 확인하였고, *C. elegans*를 모델 유기체로 사용하여 생체 내에서 광 제어 가능성을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 베소좀 약물 전달 시스템은 약물 효과를 향상시키기 위해 시간에 따라 다른 내용물을 방출시킬 수 있으며, 병용

요법을 위해 여러 약물을 탑재시킬 수 있는 잠재력을 가지고 있는 것이다. 또한, 본 발명은 기존 생명공학 도구의 효율성 및 특이성 향상에 적용할 수 있으며, 고도화되고 정교한 약물 전달 시스템 발전에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0051]

도 1은 광반응성 베소솜 약물 전달 시스템의 도식도를 나타낸 것이다. 구체적으로, ① 다중 로드된 베소솜은 막간 공간에 광감작제 메틸렌 블루(MB)를 포함하고, 불포화 지질이 있는 내부 리포솜은 ROS에 민감하고 칼세인 소광자를 캡슐화하였고, 불포화 지질이 없는 내부 리포솜은 ROS에 취약하지 않고 독소루비신(DOX)을 포함한다. 칼세인은 베소솜이 완전히 만들어진 후에 베소솜 용액에 첨가하였다. ② ROS를 생성하기 위해 적색광에 노출시켰다. ③ 막간 공간에서 MB로 인해 생성된 ROS는 외부 및 내부 이중층에서 불포화 지질 과산화를 유발하였다. ④ 칼세인 소광자가 방출되고 칼세인 형광의 후속 감소가 관찰되었다. ⑤ 불포화 지질이 없는 리포솜은 ROS에 의해서만 영향을 받아 장기간에 걸쳐 약물이 방출되었다.

도 2a는 각 리포솜을 적색광에 노출시킨 후 MDA를 측정하여 지질 과산화를 평가한 결과를 나타낸 것이다.

도 2b 및 2c는 ROS가 유도(도 2b) 또는 유도되지 않은(도 2c) 상황에서 NBD 형광 강도를 측정하여 5가지 유형의 리포솜(DSPC, DOPC, DSPC:DOPC=2:1, DSPC:DOPC=1:1, DSPC:DOPC=1:2)의 구조적 변형 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다(**p < 0.005, n.s.:not significant).

도 2d는 9 μ M의 메틸렌 블루가 처리된 형광 표지 리포솜의 적색광 여부에 따른 NBD 형광 강도를 측정하여, 5가지 유형의 리포솜(DSPC, DOPC, DSPC:DOPC=2:1, DSPC:DOPC=1:1, DSPC:DOPC=1:2)의 구조적 변형 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2e는 도 2b의 각 그래프 기울기에 의해 계산된 리포솜 변형률을 나타낸 그래프이다(오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타냄).

도 3은 베소솜의 특성을 나타낸 것이다. 구체적으로, 도 3a는 베소솜을 합성하는 과정을 나타낸 것이다(①두 종류의 서로 다른 50nm의 내부 리포솜을 준비, ②내부 리포솜에 DOX 탑재, ③두 종류의 내부 리포솜에 MB를 첨가하고, 지질 시트와 혼합, ④온도를 높여 자발적인 소포 형성 유도, ⑤DOX-베소솜(두 종류의 내부 리포솜 모두에 DOX를 탑재하는 베소솜) 완성). 도 3b는 100nm 소포의 융합에 의해 형성되는 에탄올-유도 맞물린 지질 시트의 주사 전자 현미경(SEM, Scanning electron microscopy) 이미지를 나타낸 것이다(축척 막대: 25 μ m(삽입 이미지의 경우 5 μ m)). 도 3c는 DOX-DOPC(DOX를 탑재하는, DOPC로 구성된 리포솜) 및 DOX-DSPC(DOX를 탑재하는, DSPC로 구성된 리포솜)를 첨가한 후 지질의 상전이 온도(T_m) 이상으로 온도를 증가시킴으로써 에탄올유도 맞물린 지질 시트로부터의 자발적인 베소솜 형성의 주사전자현미경(SEM) 이미지를 나타낸 것이다(축척 막대: 25 μ m). 도 3d는 DOX가 로드된 50 nm 리포솜을 캡슐화하는 DOX-베소솜의 극저온 투과 전자 현미경(Cryo-TEM) 이미지를 나타낸 것이다(축척 막대: 100nm). 도 3e는 DOX-베소솜의 동적 광산란(DLS, Dynamic light scattering) 및 제타 포텐셜 측정 결과를 나타낸 것이다(사진은 측정에 사용된 DOX-베소솜 용액임).

도 4는 칼세인 용액에서 Co-DOPC(코발트를 탑재하는, DOPC로 구성된 리포솜), DOX-DSPC 및 MB를 캡슐화하는 베소솜을 적색광에 노출시키고 0, 3, 6, 12, 및 24시간 후에 형광 강도를 측정한 결과를 나타낸 것이다(오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타냄(n=3)).

도 5a는 A549 세포에서 MB-베소솜의 세포 독성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 DOPC로 구성된 리포솜에 캡슐화된 칼세인(Calcein, 녹색 형광) (cal-DOPC), DSPC로 구성된 리포솜에 캡슐화된 로다민(rhodamine, 적색 형광) (Rhod-DSPC)이 빛 노출 시 세포 수준에서 제어 및 지속적인 방출이 됨을 확인한 결과를 나타낸 것이다(축척 막대: 100 μ m).

도 5c는 세포 배양 후 3시간 지점에서 LIVE/DEAD 형광 염색 이미지를 나타낸 것이다(축척 막대: 100 μ m).

도 5d는 세포 배양후 3, 6, 12 및 24시간 시점에서 적색광 노출 유무에 따른 세포 생존률을 확인한 결과를 나타낸 것이다(오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타냄(n=3). *p < 0.05, n.s.:not significant).

도 6a는 MB-베소솜으로 처리된 C. elegans를 ROS에 민감한 염료 CM-H2DCFDA로 염색한 후 적색광 유무에 따른 형광을 확인한 결과를 나타낸 것이다(축척 막대: 200 μ m)

도 6b는 DOX-베소솜 처리 후 LIVE/DEAD로 염색된 *C. elegans*의 형광 이미지를 나타낸 것이다(축척 막대: 200 μ m).

도 6c는 무처리군; DOX-베소솜 처리 후 적색광 노출한 군; 및 DOX-베소솜 처리 후 광노출 없는 군;의 빛 노출 후 0 및 6시간 후의 몸의 길이를 측정한 결과를 나타낸 것이다(L과 L0은 각각 측정 당시의 몸 길이와 무처리군의 각 측정 시간에서의 몸 길이를 나타냄; 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타냄; ** $p < 0.01$, n.s.:not significant)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실험방법]

1. 재료 및 시약

모든 지질, DSPC, DOPC, DPPC, DPPE-PEG2000, 18:0 NBD PE, 18:1 NBD PE 및 압출기 세트는 Avanti Polar Lipid, Inc.(Alabaster, AL)에서 구입하였다. DOX(Doxorubicin hydrochloride)는 프랑스 Strasbourg의 EDQM에서 구입하였다. 폴리카보네이트(Polycarbonate, PC) 막(기공 크기가 0.4, 0.2, 0.1 및 0.05 μ m인 Nuclepore Track-Etch 멤브레인)은 영국 Amersham Place의 Global Life Sciences Solutions Operations UK Ltd.에서 구입하였다. 콜레스테롤, 트리스, 칼세인, 황산암모늄(ammonium sulfate), 무수 에탄올(absolute ethanol), 디메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO), 트리톤 X-100은 Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO에서 구입하였다.

2. 형광 표지된 리포솜의 ROS 반응성

NBD-표지된 지질은 리포솜을 형광 표지하기 위해 1 mol% 비율로 클로로포름에 용해된 지질과 통합되었다. 총 1 mg의 지질을 유리 바이알에 증착시키고 아르곤 가스로 퍼지(purge)하여 박막을 형성하였다. 지질 필름은 각 지질의 T_m 이상으로 예열된 1mL의 PBS로 수화되었다. 바이알을 2분 동안 격렬하게 볼텍싱(vortexing)시키고, 지질 용액을 대상 지질의 T_m 이상의 온도에서 0.4 μ m 기공 크기의 PC 막을 통해 21회 압출하였다. 리포솜을 큐벳(cuvette)에서 MB(methylene blue)와 최종 부피 3mL로 혼합하였다. 큐벳은 MB를 감광시켜 ROS 생성시키기 위해, LED 장치(635 nm, ACULEDVHL, PerkinElmer, Waltham, MA)를 사용하여 적색광에 노출시켰다. NBD 형광의 변화는 480/533 nm의 ex/em(여기/방출) 파장에서 분광형광광도계(spectrofluorophotometer, RF-5301PC, Shimadzu Europe, Arlington, TX)를 사용하여 측정하였다.

3. 지질 과산화 분석

리포솜의 제조 및 광 노출은 지질 농도가 2mg/mL인 것을 제외하고 실험방법 2와 동일한 과정에 따라 수행하였다. 과산화 정도는 지질 과산화(MDA) 분석 키트(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 결정하였다. 생성된 샘플은 마이크로플레이트 판독기(VARIOSKAN LUX, Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA)를 사용하여 ex/em = 532/553 nm에서 형광을 측정하였다.

4. 리포솜에 독소루비신 로딩

총 5mg의 DSPC(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine):콜레스테롤 = 2:1 및 DOPC(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine):콜레스테롤 = 2:1을 클로로포름에 용해시키고, 증발 및 감압 과정을 수행하여 유리 바이알에 지질막을 증착시키고 아르곤 가스로 퍼지하였다. 지질막을 1mL의 300mM 황산암모늄으로 수화한 다음, 2분간 격렬하게 볼텍싱하였다. 용액은 0.05 μ m 기공 크기의 폴리카보네이트(PC) 막을 통해 압출하여 리포솜을 제조하였다. 과량의 황산 암모늄을 원심 필터(100 kDa, Amicon Ultra - 0.5 mL, Merk Millipore Ltd. Cork, Ireland)를 사용하여 제거하였다. 그런 다음, 리포솜을 수집하고, 2.5 mg/mL의 지질 농도로 물에 현탁시키고, DOX(5 mg/mL)를 지질:DOX = 1:1(w/w)로 첨가하였다. DOX 로딩을 위해 혼합물을 60°C에서 1시간 동안

유지하였다. 로드된 리포솜을 수집하고 PBS에 재현탁하여 최종 지질 농도를 5mg/mL로 만들었다. 그 후, 리포솜을 하기 실험방법 5에 설명된 대로 베소솜으로 캡슐화하였다.

5. 베소솜 합성

베소솜(Vesosomes)은 약간의 수정을 가한 미리 설정된 프로토콜에 따라 합성하였다. 구체적으로, 95 mol% DPPC 및 5mol% DOPC의 지질을 아르곤 가스 퍼징에 의해 유리 바이알에 증착시켰다. 그 후, 바이알을 1mL의 PBS(25mg/mL 지질 농도)로 채웠다. 단일층 리포솜(unilamellar liposomes)을 형성하기 위하여, 상기 용액은 지질의 T_m 이상의 온도에서 0.1 μ m 기공 크기의 PC 막을 통해 21회 압출하였다. 실온으로 냉각한 후, 무수 EtOH를 첨가하여 최종 EtOH 농도가 3M을 초과하도록 하였다. 용액을 실온에서 6시간 이상 방치하여, 무수 EtOH에 의해 에탄올과 인지질이 서로 완전히 맞물림(interdigitiation)을 형성하도록 하였다. 형성된 지질 시트에 1mL의 PBS를 첨가하고 15°C에서 5분간 10,000 X g으로 원심분리하여, EtOH 함유 상등액을 제거 및 세척하였다. 이를 통하여, 마이크로사이트의 지질시트 펠렛을 제조하였다.

펠릿화된 지질 시트에 10X MB 40 μ L(PBS에 용해됨), 미리 만들어진 실험방법 4의 방법으로 제조된 DOX-DSPC 및 DOX-DOPC 용액 180 μ L(5 mg/mL 지질 농도)를 추가하였다. 혼합 용액을 유리 바이알에 옮기고 DOX-DSPC, DOX-DOPC 및 MB를 포집하는 리포솜을 지질 시트로부터 생성하기 위하여, 45°C에서 30분 동안 200 rpm으로 교반하여 자발적인 리포솜 형성을 유도하였다. 합성된 베소솜에 DPPE-PEG2000(프로브 팁 초음파 처리기(VCX500, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT)로 PBS에 용해됨)이 5%의 물분율로 첨가되었다. 그런 다음, 용액을 0.2 μ m 기공 크기의 PC 막을 통해 11회 압출하였다. 압출된 용액을 원심분리에 의해 캡슐화되지 않은 물질로부터 제거하였다. 그 후, 베소솜 펠렛을 PBS에 재현탁시켰다. 베소솜 용액을 후속 실험을 위해 PBS 또는 세포 배양 배지로 추가 희석하였다.

6. 베소솜 내용물의 제어 및 지속 방출

베소솜은 DOPC 리포솜이 100mM CoCl₂을 포함한다는 점을 제외하고, 실험방법 5와 동일한 방법에 따라 만들어졌다. 합성된 베소솜(CoCl₂-DOPC 및 DOX-DSPC 포함)을 12-14kD MWC0 투석 백(dialysis bag)에 넣고, PBS에 용해된 칼세인(calcein)에 대해 투석하였다. 그런 다음, 베소솜을 10분 동안 적색광에 노출시켰다. ex/em = 495/516 nm에서 칼세인의 형광 강도를 측정하여, 코발트의 방출을 정량화하였다. DOX의 방출은 ex/em = 480/533 nm에서 DOX 형광을 측정하여 정량화하였다. 측정이 끝나면, 투석 백에 Triton X-100(1%, v/v)을 첨가하여 소포(vesicles)를 파괴하였다. 백의 내용물을 벌크 용액과 혼합하고, 칼세인과 DOX의 형광 강도를 측정하였다. 이 값은 상대 형광 강도(%) 계산을 위해 최대 방출로 설정하였다.

7. 세포 내 베소솜 내용물의 순차적 방출

베소솜은 DOPC 리포솜이 Tris-NaOH(pH 10)에 용해된 100mM 칼세인을 포함하고, DSPC 리포솜이 Tris-NaOH(pH 10)에 용해된 100mM 로다민 B를 포함한다는 것을 제외하고, 실험방법 5과 동일한 방법에 따라 만들어졌다. 24-웰 플레이트에 시딩된 총 5X10⁴ 개의 A549 세포에 칼세인-베소솜을 처리하였다. 2시간 배양한 후, 세포를 형광 현미경(Evos™ M7000, Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA)으로 광 조사 전, 광 노출 10분, 24시간 후의 시점에 이미지화하였다.

8. LIVE/DEAD 염색

세포와 C. elegans를 염색하기 위해 LIVE/DEAD 키트를 사용하였다. 염색된 세포는 형광 현미경(Evos™ M7000, Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA)을 사용하여 이미지화하였다. 살아있는 물체(녹색 형광)와 손상된 물체(적색 형광)의 이미지를 따로 촬영하여 병합하였다.

9. C. elegans 성장 억제 분석

[0081] 브리스톨 N2 균주 *C. elegans*(야생형)는 CGC 스톡 센터(Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN)에서 획득하였다. L1 단계-동기화된 *C. elegans*를 배소즙 용액에 현탁하고 20° C의 암흑 속에서 4시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 20분 동안 적색광에 노출시키고, 특정 시점에 몸 길이를 측정하였다. 이 동물 실험과 관련하여 국내에는 규정된 규정이나 허가가 없었다.

[0083] 10. 주사 전자 현미경

[0084] SEM 이미징을 위해, 맞물린 지질 시트(interdigitated lipid sheet)와 배소즙을 PC 막 위에서 동결 건조시켰다. 샘플을 Pt 코팅(Q150T-S, Quorum Technologies, Lewes, 영국)하고 15kV의 가속 전압에서 SEM(S-4300SE, Hitachi, 도쿄, 일본)으로 관찰하였다.

[0086] 11. 극저온 투과 전자 현미경

[0087] 극저온 투과전자현미경(cryo-TEM)의 경우, 배소즙 용액을 Vitrobot Mark IV(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 glow-discharged Quantifoil R 1.2/1.3 300 mesh holey carbon EM 그리드(Quantifoil) 위에 놓았다. 동결 수화 표본은 100kV의 가속 전압에서 Tecnai 10 TEM(FEI)으로 관찰하였으며, Elsa Cryo-Transfer Holder 698 시스템(Gatan)으로 온도를 모니터링하였다. 이 기기는 대한민국 춘천에 위치한 강원 연계형 융합 이미징 특화센터에 설치되어 있었다.

[0089] 12. 동적 광 산란(DLS, Dynamic Light Scattering) 및 제타(Zeta) 포텐셜 측정

[0090] 표준 배소즙 용액을 희석하여 최적의 강도 범위의 입자 농도를 얻었다. 그런 다음, 제타 포텐셜 및 입자 크기 분석기(ELS-Z, Otsuka Electronics Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 DLS 및 제타 포텐셜 측정을 개별적으로 수행하였다.

[0092] [실시예]

[0093] 실시예 1. 리포솜의 ROS(reactive oxygen species) 반응성 확인

[0094] 지질은 소수성 꼬리의 포화 정도(이중 결합 수)가 다를 수 있다. 지질 과산화(oxidation)는 자유 라디칼이 지질 꼬리에서 파이 결합을 제거하여 추가 연쇄 반응을 겪을 수 있는 반응성 라디칼 중간체를 생성하는 과정이다. 불포화 지질의 과산화가 리포솜 이중층의 구조적 변형을 일으키는지 여부를 결정하기 위해, 상이한 조성의 불포화 지질을 갖는 리포솜을 제형화하였다. DOPC(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)는 각각의 꼬리에 하나의 C=C 결합을 가지고 있으며, 불포화 지질을 나타내는 데 사용하였다. 이는 FDA의 승인을 받은 지질 기반 약물 전달 시스템에서 가장 일반적으로 사용되는 지질 중 하나이다. 포화 지질은 DOPC와 탄소 사슬 길이는 같지만 C=C 결합이 없는 DSPC(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)를 사용하였다. 두 종류의 리포솜은 각각의 지질을 단독으로 사용하여 제형화하였고, 나머지 세 종류의 리포솜은 DSPC와 DOPC를 2:1, 1:1 및 1:2 몰비로 혼합하여 제형화하였다. 이러한 비율은 C=C 결합이 있거나 없는 지질이 ROS에 노출되었을 때, 리포솜의 구조적 안정성을 어떻게 방해하는지 조사하기 위해 선택하였다. 메틸렌 블루(Methylene blue, MB)는 ROS를 효율적으로 생성하고 저렴하며, 수십 년 동안 다른 임상 응용 분야에서 안전하게 사용되어 왔고, 광역학 요법에 대해 임상적으로 승인되었는바, PS(photosensitizer)로 선택되었다.

[0095] MB로 둘러싸인 리포솜에 적색광을 가하여, ROS 노출 시 각 리포솜 유형에 대한 지질 과산화를 평가하였다. 리포솜을 MB와 최종 농도 6 μ M로 혼합하고, 20분 동안 적색광에 노출시켰다. 지질 과산화는 적색광에 노출된 후, 과산화된 불포화 지방산의 최종 생성물 중 하나인 MDA(malondialdehyde)의 양을 측정하여 조사하였다. 그 결과는 도 2a에 나타내었다.

[0096] 도 2a에 나타난 바와 같이, DOPC로만 구성된 리포솜은 빛 노출 후 가장 높은 형광 강도를 나타내어, 가장 큰 MDA 생산 또는 대부분의 지질이 과산화된 것을 암시하였다. 또한, 리포솜의 DOPC 몰 비율이 감소함에 따라 형광 강도가 감소하였다. 불포화 지질의 비율이 증가할 수록 지질 과산화가 증가한다는 결과는 리포솜 구조에서 불포화 지질이 빛 노출 후 구조적 변형을 겪는다는 것을 명확하게 나타내었다. 또한, 빛에 노출되지 않은 그룹에서

는 지질 과산화의 징후가 관찰되지 않았으며, 이는 리포솜 구조의 변형이 빛 노출에 기인함을 암시한다.

[0097] 1% NBD(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol)-표지 지질을 리포솜에 통합하여 불포화 지질의 존재 하에 리포솜의 구조적 변형을 추가로 조사하였다. 리포솜 구조 파괴의 정도는 리포솜을 구성하는 지질의 팩킹(packaging)이 느슨해짐에 따른 NBD 형광 강도의 감소를 측정함으로써 정량화되었다. 이는 더 많은 물-NBD 형광체 상호 작용을 허용하여 본질적으로 방출 강도를 감소시켰다. 형광 강도는 0, 5, 10, 15, 20분에 측정하였다. 그 결과는 도 2b 및 2c에 나타내었다.

[0098] 도 2b에 나타낸 바와 같이, 지질 과산화가 가장 적은 DSPC로만 구성된 리포솜은 가장 적은 형광 감소를 보인 반면, 과산화 부위가 가장 많은 DOPC 리포솜은 뚜렷한 감소를 보였다. 대조적으로, 도 2c에 나타낸 바와 같이, ROS를 유도하기 위해 빛에 노출되지 않은 5가지 유형의 리포솜 모두에서 형광의 유의한 감소가 관찰되지 않았다.

[0099] 또한, 도 2d에 나타낸 바와 같이, 높은 농도(9 μ M)의 MB가 포함되었을 때 유사한 경향이 나타났는데, 구조적 변형이 적색광에 노출된 MB에서 과생된 ROS에 기인함을 확인하였다.

[0100] 또한, 도 2e는 도 2b 및 2c의 각 그래프의 기울기에 의해 계산된 리포솜 변형률에 대한 불포화 지질 조성의 효과를 입증한다. 도 2e에 나타낸 바와 같이, 도 2e의 선형 관계는 과산화 부위의 수와 리포솜 파괴 사이에 강한 상관관계가 있음을 나타낸다. 따라서 지질 과산화 부위가 가장 많은 DOPC 리포솜이 ROS에 가장 취약한 반면, 가장 적은 DSPC 리포솜은 ROS에 가장 강한 내성을 보였다. 즉, 지질 과산화 부위의 수는 ROS에 노출된 리포솜의 변형 정도와 관련이 있다는 것을 의미한다.

[0101] 총체적으로, 이러한 결과는 리포솜의 구조적 변형에 따라 내용물 방출 속도를 제어하는 약물 전달 시스템을 설계하는 데 사용할 수 있는 지질의 다양한 구성에 대한 통찰력을 제공한다. 또한, 서로 다른 리포솜을 함께 사용하면 동일한 양의 ROS에 노출된 후 구조적으로 다른 정도로 붕괴되어 시간에 따라 약물을 방출하게 된다는 점을 알 수 있다.

[0103] 실시예 2. 광감작제 및 다양한 리포솜을 캡슐화하는 베소솜

[0104] 다르게 제조된 리포솜(불포화 또는 포화 지질 포함)과 그 주위에 광감작제를 탑재하기 위해서, 상기 구성들을 베소솜 구조로 캡슐화하였다. 베소솜 생산을 위해, 지질 조성이 다른 두 종류의 리포솜을 준비하였다. 콜레스테롤을 포함하는 DOPC 또는 DSPC로 구성된 리포솜(DOPC 또는 DSPC: 콜레스테롤=2:1 몰비)을 50nm 기공 크기의 폴리카보네이트 막을 통해 압출하고 DOX를 탑재하였다. 베소솜은 에탄올-유도 맞물린 상(interdigitated phase)을 이용하여 준비하였다. 효율적인 세포 흡수를 위해서 나노입자 크기가 중요하다. 그러나, 역유화(inverted emulsion) 또는 초음파 처리와 같은 기존 방법을 사용하여 적절한 크기를 달성하는 동시에 각 구획 내부의 개별 약물을 보호하는 것은 어렵다. 이때, 에탄올 유도 맞물린 상을 이용하면 다른 소포의 효율적인 포획과 직경의 조정이 가능하다. 베소솜을 합성하는 과정은 도 3a에 나타내었다. 95% DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)와 5% DOPC로 구성된 단일층 인지질 또는 단일층 리포솜(unilamellar liposomes)를 형성하였다. 그런 다음, SUV에 에탄올을 첨가하여 서로 맞물린 지질 이중층 시트를 만들기 위해 빠르게 융합하였다. 도 3b에 나타낸 바와 같이, 한번 생성된 이 지질 시트는 에탄올을 제거한 후에도 지질의 상전이 온도(T_m , 지질이 액체로 변하고 그 이하에서는 고체로 변하는 온도) 이하에서 안정적이다. 두 종류의 리포솜과 광감작제 MB를 지질 시트에 첨가하였다. 도 3c에 나타낸 바와 같이, 지질의 T_m 이상으로 온도를 증가시켜 지질 시트에서 자발적인 소포 형성을 통해 베소솜이 형성되었다.

[0105] 극저온 투과 전자 현미경(cryo-TEM)을 사용하여 내부 구조를 추가로 조사하였다. 그 결과는 도 3d에 나타내었다

[0106] 도 3d에 나타낸 바와 같이, 단일 구형 층으로 둘러싸인 온전한 장형 타원체 모양의 단층 소포를 보였다. 단층 소포는 DOX 분자가 쌓여 있는 바늘-모양의 구조를 캡슐화하였다.

[0107] 또한, 베소솜에 대한 추가 특성 정보는 도 3e에 나타내었다.

[0108] 도 3e에 나타낸 바와 같이, 베소솜의 평균 직경은 약 200nm로 측정되었으며, 베소솜이 200nm 기공 크기의 PC 멤브레인으로 압출되었기 때문에 다분산 지수가 0.042인 매우 좁은 크기 분포를 가지게 되었다. 제타 포텐셜 값은 -6.58mV로 측정되었으며, 유사한 지질 조성을 가진 DOX-로드 리포솜과 유사하다.

[0110] **실시예 3. 베소솜 내에 캡슐화된 리포솜의 내용물의 순차적 방출 확인**

[0111] 성공적인 베소솜 특성화에 따라, 동일한 ROS 조건에서 제어되거나 지속적인 약물 방출의 타당성을 검증하기 위해 다양한 내용물을 탑재하였다. DOPC로 구성된 리포솜에는 코발트가 담겼고(Co-DOPC), DSPC로 구성된 리포솜에는 DOX를 담았다(DOX-DSPC). 두 리포솜은 이후에 MB와 함께 더 큰 리포솜으로 캡슐화되어 Co/DOX-베소솜이 되었다. 베소솜 용액을 칼세인을 포함하는 벌크 용액과 혼합하여, Co-DOPC에서 방출되는 코발트(칼세인 형광 소광제)와의 상호작용에 의한 칼세인 형광을 감소시켰다. 베소솜 외막에 적은 양으로 존재하는 5%의 DOPC는 빛 노출 시 작은 분자의 투과성을 허용한다. 반면에, 대부분의 DOX-DSPC는 ROS에 덜 취약하기 때문에, 더 오랜 기간 동안 그대로 유지되어 DOX 방출이 오래 지속된다. 결과적으로, 칼세인 형광은 방출되는 코발트의 양에 반비례하는 반면, DOX 형광은 지연 방출로 인해 점차 증가한다. Co/DOX-베소솜을 10분 동안 적색광에 노출시키고, 광 노출 직후와 광 노출 후 3, 6, 12, 및 24시간에 형광 강도를 측정하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0112] 도 4에 나타난 바와 같이, Co-DOPC는 크게 교란되어 빛이 가해지자마자 형광 강도가 초기 강도의 절반 미만으로 감소하였다. 반면, DOX는 단기적으로 눈에 띄게 방출되지 않았다. 또한, DOX는 24시간 시점에서 여전히 방출되고 있는 반면, 코발트는 3시간 시점에서 거의 완전히(초기 양의 거의 90%) 방출되었다. 총체적으로, 도 2에서 확인된 서로 다른 지질 조성을 가진 각 리포솜의 ROS에 대한 서로 다른 반응은 다른 이중층에 캡슐화한 후 성공적으로 재현되었다. 여러 내용물의 광 제어 약물 방출 외에도, DSPC 리포솜에서 DOX의 보유(retention) 및 약물의 방출을 베소솜에서의 약물 방출과 비교하면, 베소솜을 형성하지 않은 리포솜에서 베소솜에서의 방출 대비 약 1.5배 빠른 방출을 나타내므로, 본 발명의 베소솜이 리포솜을 감싸는 추가 이중층으로 인해 향상된 약물 보유 및 지연된 방출 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0114] **실시예 4. 베소솜 시스템의 세포 내 적용 가능성 확인**

[0115] 세포 적용 가능성을 조사하기 전에, MB만을 포함하는 소포(MB-베소솜)를 사용하여 세포 독성을 확인하였다. 구체적으로, A549 세포를 MB-베소솜과 함께 2시간 동안 배양하고 ROS 생성을 위하여 적색광에 10분 노출시켰다. 24시간 후, 세포 독성을 확인하였다. 그 결과는 도 5a에 나타내었다.

[0116] 도 5a에 나타난 바와 같이, MB의 농도가 증가함에 따른 세포 생존율은 모두 약 90%인 바, 베소솜은 세포흡수에 용이하며 안전하다는 것을 확인하였다.

[0117] 다음으로 광 노출 시 세포 수준에서 내용물의 제어 및 지속적인 방출을 조사하였다. 칼세인(Calcein, 녹색 형광)은 DOPC로 구성된 리포솜에 캡슐화(Cal-DOPC)되었고, 로다민(rhodamine, 적색 형광)은 DSPC로 구성된 리포솜(Rhod-DSPC)에 자가 소광 농도(self-quenching concentrations)로 캡슐화되었다. 내용물이 방출되면, 염료의 형광이 최적으로 희석된 농도로 확산되면서 관찰 가능하다. 그 결과는 도 5b에 나타내었다.

[0118] 도 5b에 나타난 바와 같이, 광유도 전에는 어느 채널에서도 유의미한 형광이 관찰되지 않았다. 빛에 노출된 직후에, 빨간색 채널은 여전히 형광을 나타내지 않았지만, 녹색 채널은 형광을 나타내어 ROS에 취약한 리포솜(Cal-DOPC)에서만 내용물이 방출되었음을 나타내었다. 광 노출 24시간 후, 녹색 형광은 관찰되지 않았지만, 적색 형광이 분명한바, ROS에 취약하지 않은 리포솜(Rhod-DSPC)에서 내용물이 방출되었음을 나타내었다.

[0119] 베소솜을 약물 운반체로 사용할 가능성은 빛에 노출된 그룹과 그렇지 않은 그룹 간의 단기 및 장기 세포 생존율을 비교하여 추가로 검증하였다. DOX는 DNA에 인터칼레이션(intercalation)하며 자유 라디칼을 발생시켜 강한 세포 독성을 나타내기 때문에 모델 약물로 활용하였다. DOPC와 DSPC로 구성된 DOX-로드 리포솜(DOX-DOPC, DOX-DSPC)은 베소솜 구조(DOX-베소솜)로 만들어져 세포 치료에 사용되었다. 적색광 유도 ROS 생성 시, DOX-DOPC는 구조적으로 불안정하고 캡슐화된 내용물을 쉽게 방출하였는 바, 단기 세포의 생존율이 감소하였다. 반면에, 적색광에 노출되지 않은 세포는 단기적으로 DOX 세포 독성의 영향을 덜 받을 것이다. 그러나, 장기적으로, 적색광에 노출된 DOX-베소솜과 노출되지 않은 DOX-베소솜 모두 최종적으로 동일한 양의 DOX를 방출하였다. 따라서, 두 그룹의 세포 생존율은 점차 같은 수준에 도달하였다. 검증을 위해 3시간 시점에서 단기 염색 이미지를 촬영하였다. 살아있는 세포와 죽은 세포는 각각 칼세인-AM(녹색)과 에티디움 호모다이어머(ethidium homodimer)-1(적색)로 염색하였다. 그 결과는 도 5c에 나타내었다.

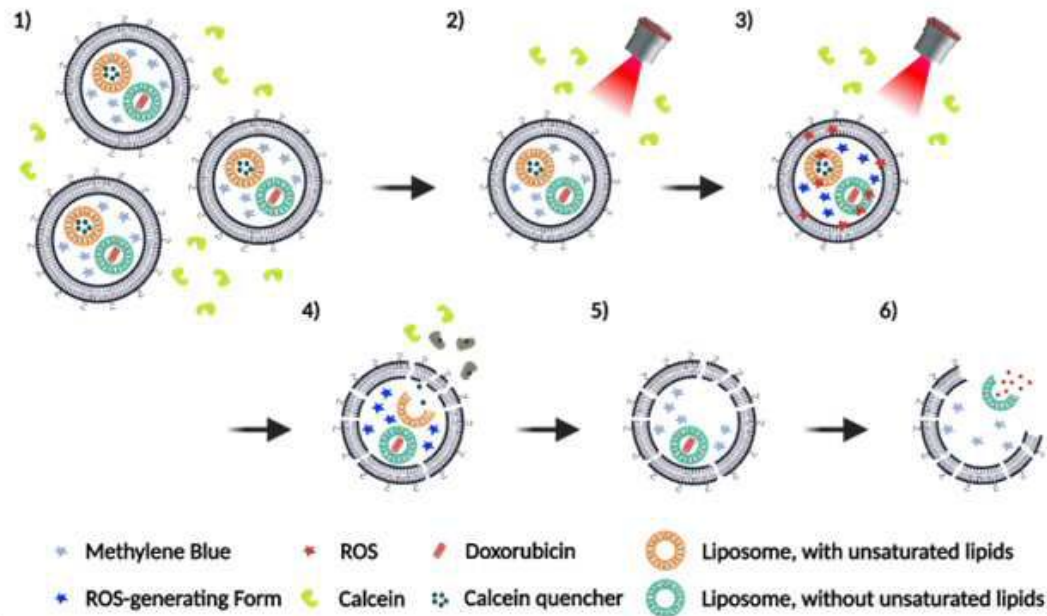
[0120] 도 5c에 나타난 바와 같이, 빛에 노출되지 않은 그룹에서 강한 녹색 형광으로 세포가 완전히 생존할 수 있음을 분명히 보여주었다. 그러나, 적색광에 노출된 그룹에서는 세포의 많은 부분이 손상되었다. 이러한 결과는 단기적으로 적색광에 노출된 세포만이 DOX-DOPC에서 방출된 DOX의 영향을 받았다는 것을 나타낸다.

- [0121] 또한, 세포 배양 후, 3, 6, 12 및 24시간 시점에서 세포 생존률 측정 결과를 도 5d에 나타내었다.
- [0122] 도 5d에 나타난 바와 같이, 세포 생존률 결과는 형광 이미지와 일치하였다. 단기(제어 방출)의 간격은 시간이 지남에 따라, DOX가 두 유형의 리포좀(지속 방출)에서 방출됨에 따라 좁아졌다.
- [0124] **실시예 5. *C. elegans*를 모델 유기체로 사용한 생체 내 적용**
- [0125] 플레이트에서 성장한 세포와 달리, 고등 유기체에서 약물 방출을 유발하는 것은 진피층과 같은 복잡한 구조와 동일한 자극에 다른 정도로 반응하는 다양한 세포 유형으로 인해 더 어렵다. 본 발명자들은 광-유발 베히스톡스 약물 전달 시스템의 생체 내 평가를 위한 모델 유기체로 *C. elegans*를 사용하였다. *C. elegans*는 60-80%의 인간 유전자 상동성 비율, 짧은 수명, 이용 가능한 고처리량 시스템, 및 외부 유체의 나노 입자의 지속적인 엔도사이토시스(endocytosis)로 인해 생체 내 나노입자 분석에 적합한 바, 모델 유기체로 활용되었다. *C. elegans*는 또한 인간의 피부와 같은 기능을 하는 표피층을 가지고 있어, 연구자들이 빛의 침투 효과를 조사할 수 있다. 구체적으로, 리포좀은 광유도 방식으로 단백질과 화학 물질을 *C. elegans*에 전달하는 데 사용하였고, *C. elegans*의 성장은 DOX에 의해 억제된다.
- [0126] 또한, MB-베히스톡스로 처리된 *C. elegans*를 ROS에 민감한 염료 CM-H2DCFDA로 염색한 후 적색광 유무에 따른 형광을 확인하였다. 그 결과는 도 6a에 나타내었다.
- [0127] 도 6a에 나타난 바와 같이, MB-베히스톡스에서 세포 내 ROS 생성 결과와 유사하게, ROS 형광은 빛에 노출된 *C. elegans*에서만 관찰되었다.
- [0128] 다음으로, *C. elegans*를 DOX-베히스톡스로 처리하고 LIVE/DEAD 형광 염료로 염색하고, 적색광 유무에 따라서, 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과는 도 6b에 나타내었다.
- [0129] 도 6b에 나타난 바와 같이, 노출되지 않은 그룹의 *C. elegans*는 영향을 받지 않은 반면(손상되지 않음, 녹색), 노출 그룹의 *C. elegans*는 부분적으로 손상되었다(빨간색).
- [0130] 손상을 정량적으로 측정하기 위해 성장 억제 분석을 수행하였다. L1 단계- 동기화된 *C. elegans*는 이 단계의 *C. elegans*가 일반적으로 20° C에서 단 48시간 만에 약 700 μ m 성장하여 간단한 크기 측정이 가능하기 때문에 사용되었다. 무처리군, DOX-베히스톡스 처리 후 적색광 노출한 군, 및 DOX-베히스톡스 처리 후 광노출 없는 군의 세 가지 다른 그룹의 *C. elegans*를 광학 현미경을 사용하여 촬영하고, 이미지를 분석하여 성장 억제 효과를 정량화하였다. 그 결과는 도 6c에 나타내었다.
- [0131] 도 6c에 나타난 바와 같이, 상대적인 몸 길이는 각 0시간 및 6시간 지점에서 측정된 몸 길이를 처리되지 않은 *C. elegans*의 몸 길이로 나누어 계산하였다. 흥미롭게도, 적색광이 없이 DOX-베히스톡스가 처리된 *C. elegans*의 몸 길이는 처리되지 않은 *C. elegans*의 몸 길이와 크게 다르지 않았다. 대조적으로, 적색광에 노출된 *C. elegans*의 몸 길이는 6시간 지점에서 더 짧았는데, 이는 DOX가 빛에 노출된 그룹에서만 성공적으로 방출되어, *C. elegans*의 성장을 방해하는 것을 의미한다. 즉, 유기체 수준에서 다양한 불포화/포화 지질로 구성된 서로 다른 리포좀을 포함하는 베히스톡스 시스템으로부터 빛에 의해 순차적으로 약물이 방출될 가능성을 확인할 수 있었다.
- [0133] 따라서, 본 발명자들은 제어 및 지속 방출뿐만 아니라 다양한 분자의 로딩을 허용하는 베히스톡스 약물 전달 플랫폼을 고안하였으며, 리포좀 구조의 지질 포화 정도에 따라 ROS에 대한 반응성이 다르기 때문에, 세포 수준에서 빛에 노출되면 ROS에 취약한 리포좀에서 제어 방출(controlled release)이 달성되는 반면, ROS에 취약하지 않은 리포좀에서는 지속적인 방출(sustained release)이 관찰됨을 확인하였다. 즉, ROS에 취약한 리포좀의 내용물은 광 노출 직후에 방출되는 반면, ROS에 취약하지 않은 리포좀의 내용물은 장기간에 걸쳐 지속적으로 방출되는 것이다. 또한 *C. elegans*를 모델 유기체로 사용하여 생체 내에서 광 제어 가능성을 추가로 조사하여, 더 높은 유기체 수준에서 적용이 가능함을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 베히스톡스 약물 전달 시스템은 약물 효과를 향상시키기 위해 시간에 따라 다른 내용물을 방출시킬 수 있으며, 병용 요법을 위해 여러 약물을 탑재시킬 수 있는 잠재력을 가지고 있는 것이다. 또한, 이 시스템은 효율성과 특이성을 향상시키기 위해 기존 생명공학 도구를 활용하여 적용될 수 있으며, 고도화되고 정교한 약물 전달 시스템에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.
- [0135] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명

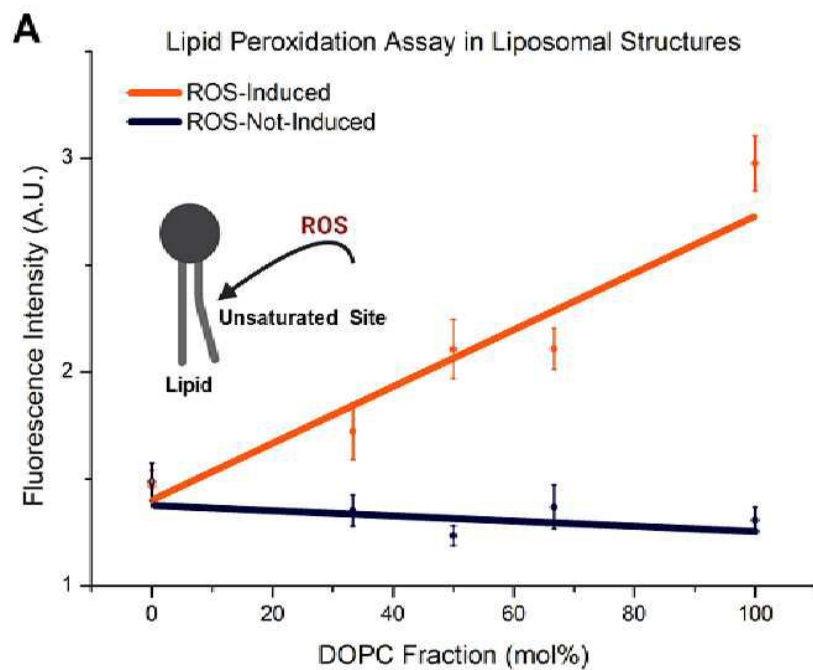
의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

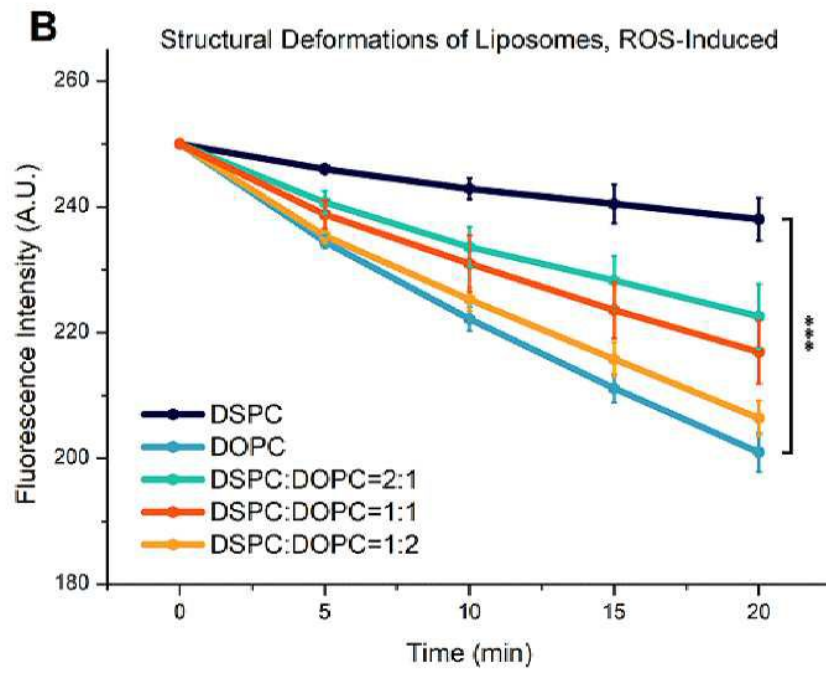
도면1



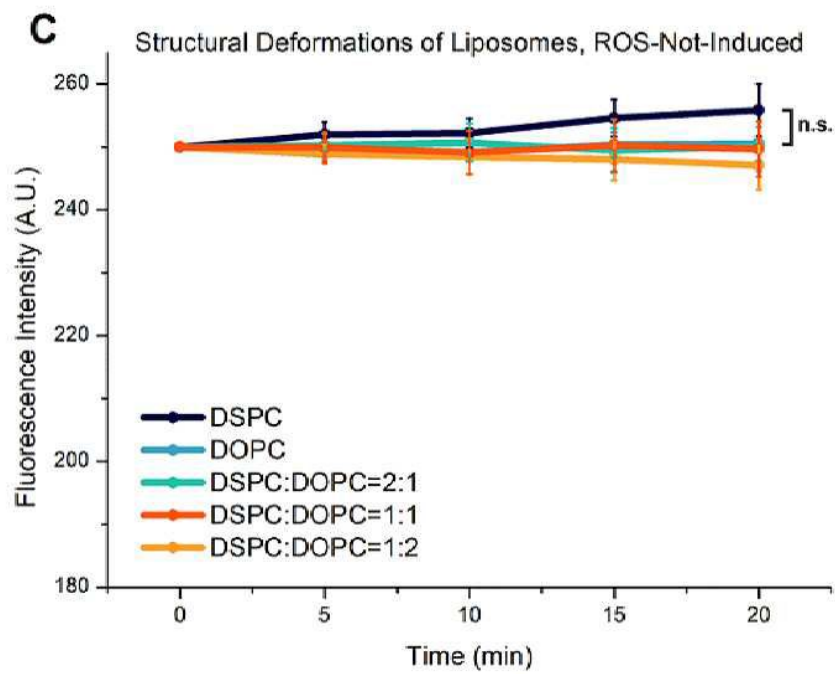
도면2a



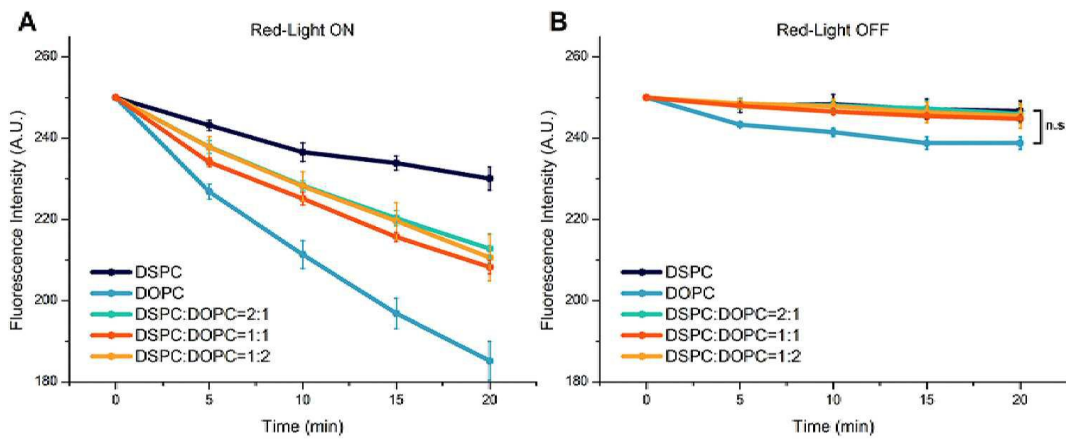
도면2b



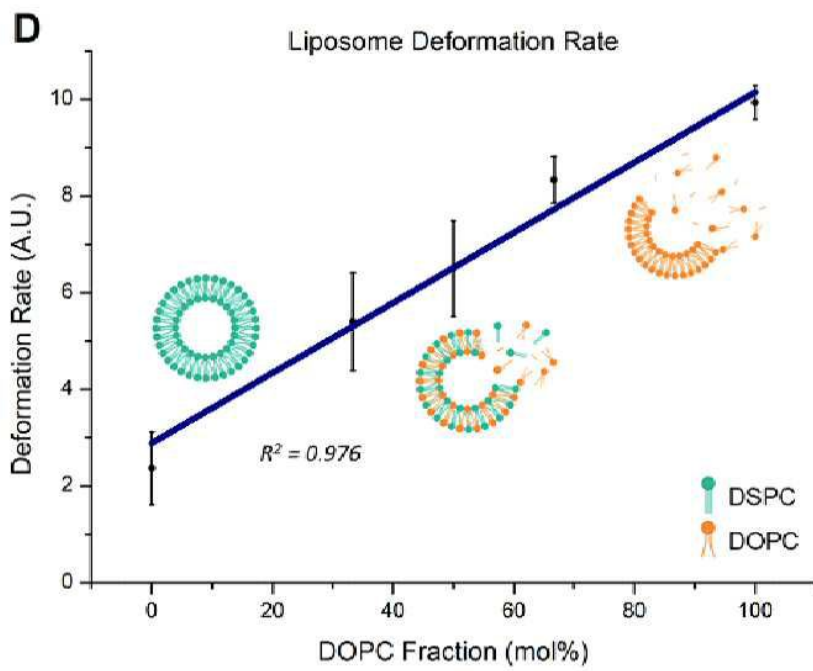
도면2c



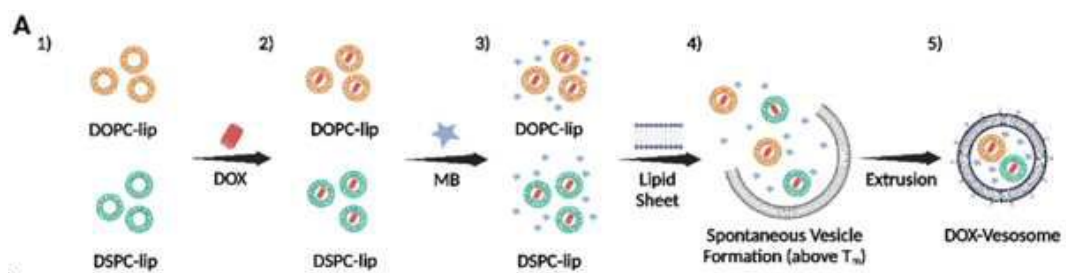
도면2d



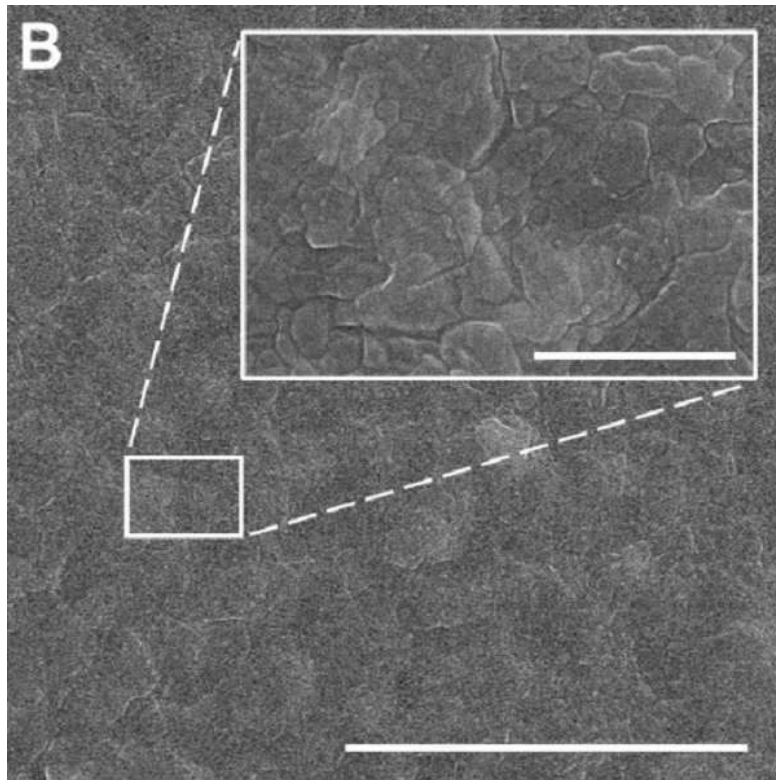
도면2e



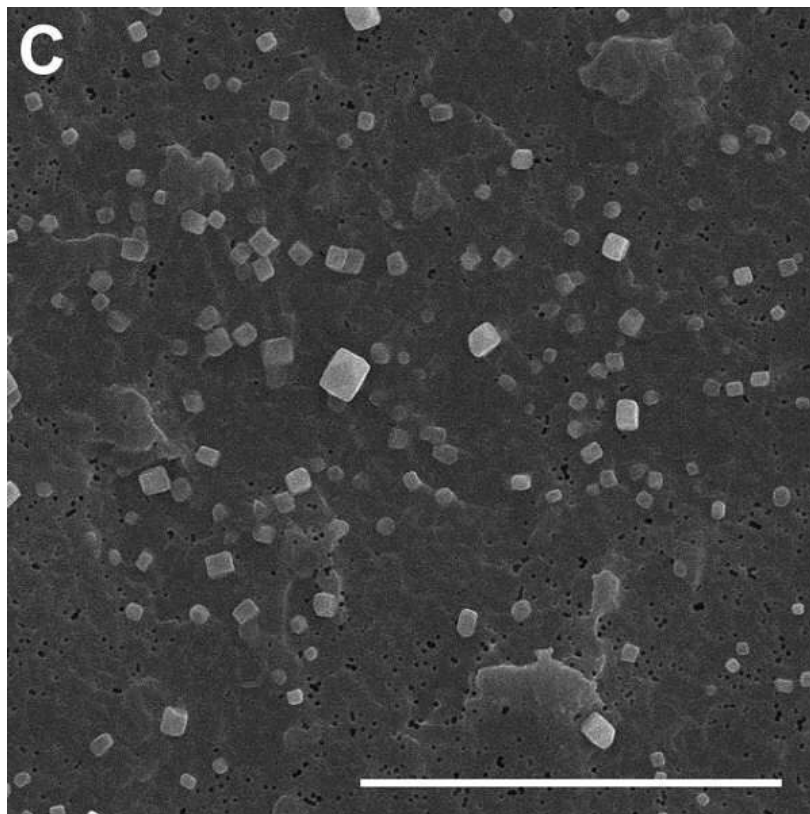
도면3a



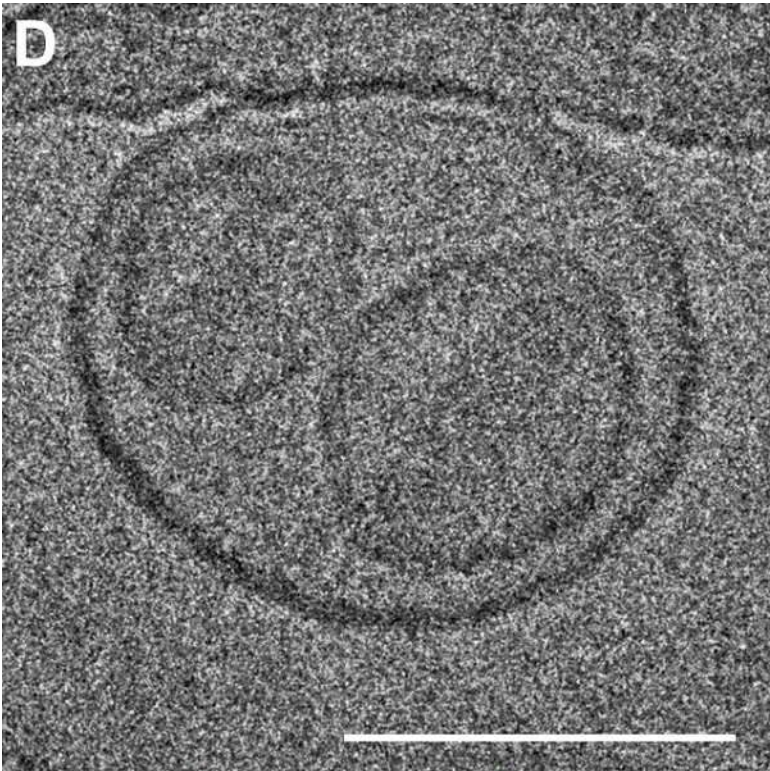
도면3b



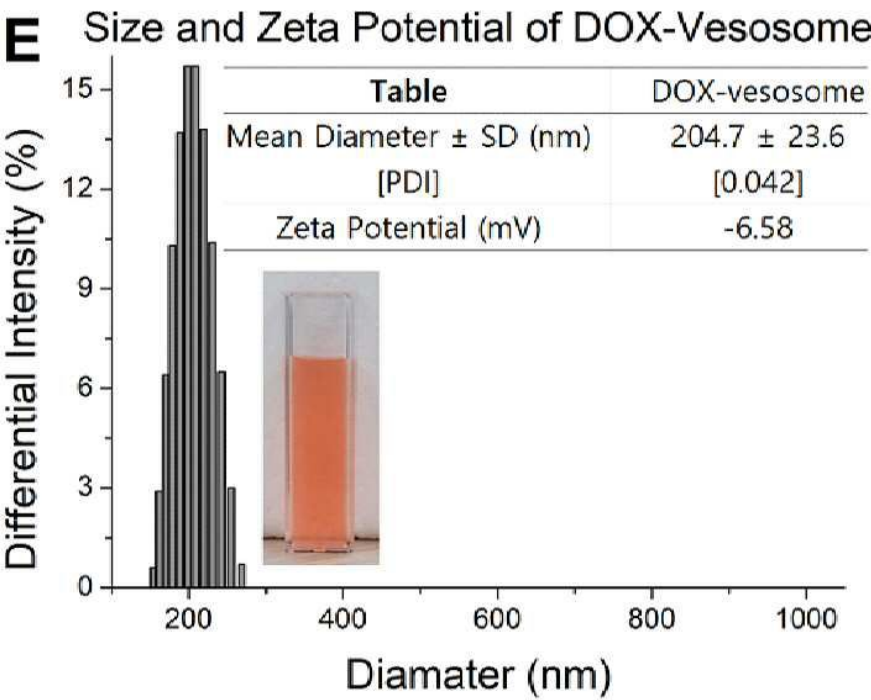
도면3c



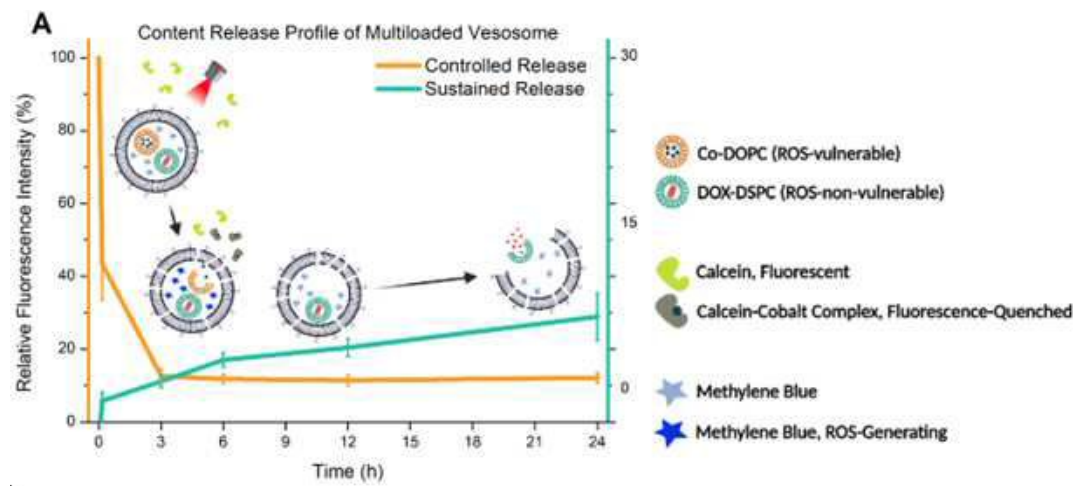
도면3d



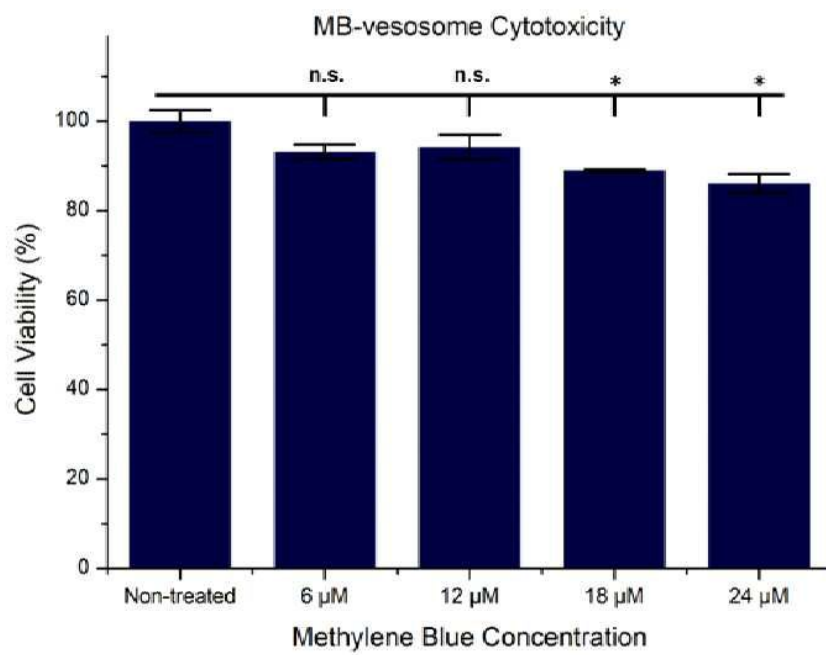
도면3e



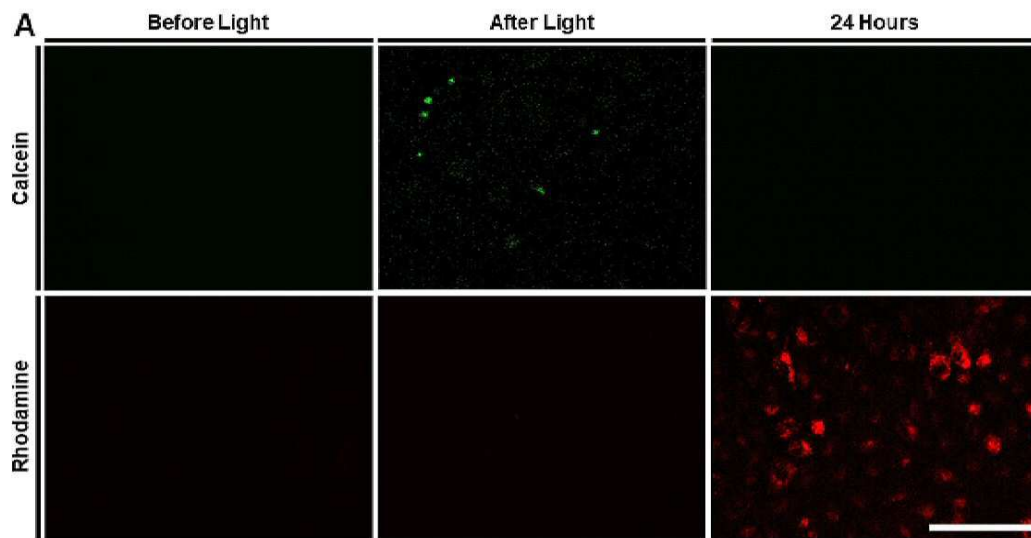
도면4



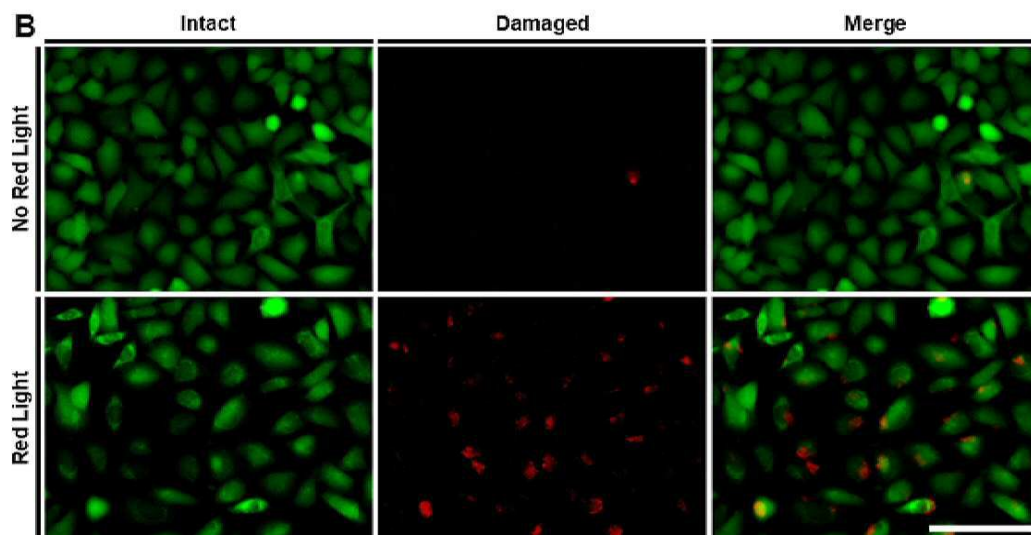
도면5a



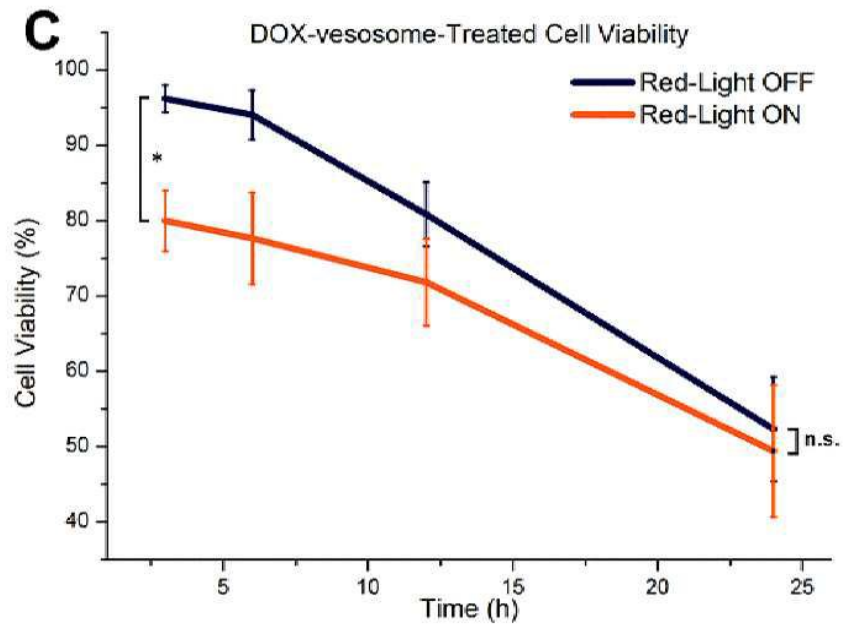
도면5b



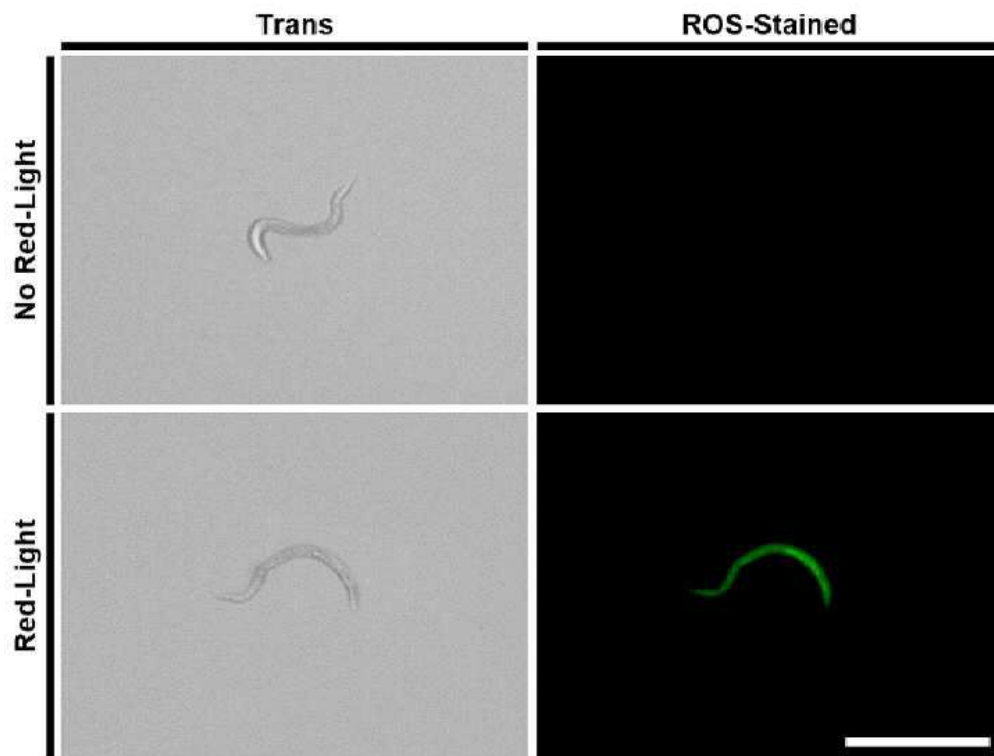
도면5c



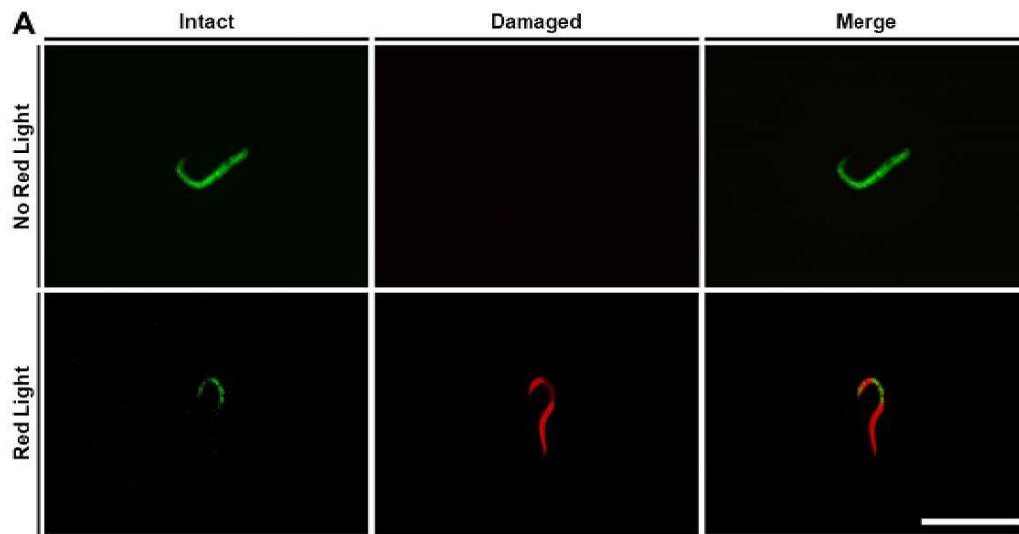
도면5d



도면6a



도면6b



도면6c

