

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0135508

(43) 공개일자 2023년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/22 (2017.01) A61K 47/28 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1271 (2013.01)

A61K 47/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0020822

(22) 출원일자 2023년02월16일

심사청구일자 2023년02월16일

(30) 우선권주장

1020220032877 2022년03월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

아주대학교산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

(72) 발명자

임수정

서울특별시 용산구 이태원로27다길 11, 남산힐 B-101

김은아

경기도 의정부시 용민로 373-17, 1001동 603호(낙양동, 양지마을 10단지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리채

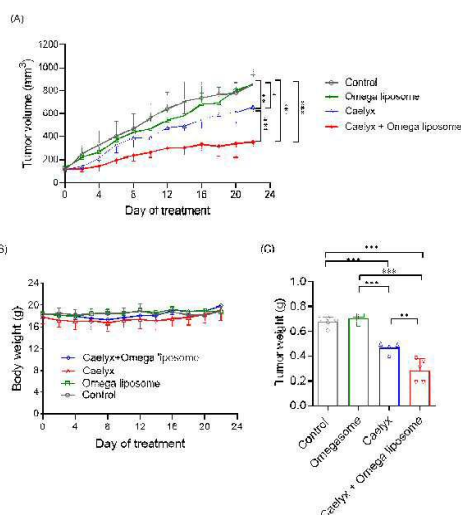
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 오메가-3 지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질을 포함하는 공 리포솜을 포함하는, 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 의하여 약물 담지 리포솜의 약물 방출을 촉진하면서도, 구조가 안정적이고, 약물 담지 리포솜의 혈중 반감기를 유지시키는 약물 방출 촉진용 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 47/28 (2013.01)

(72) 발명자

김소희

서울특별시 강남구 삼성로51길 37, 101동 1806호(
대치동, 래미안 대치 팰리스)

최현경

경기도 수원시 영통구 도청로 10, A동 1027호(이의
동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133276
과제번호	2021R1A2C1004343
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	오메가 리포좀의 막 리모델링 기능과 약물 전달에의 확장 연구
기 여 율	7/10
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711131517
과제번호	2021R1A2C1011142
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	대장암의 항암제 내성발현에 AMPK/NRF2 및 에너지 대사에 의한 PXR 조절 기전연구를
통한 항암치료 전략 구축	
기 여 율	3/10
과제수행기관명	아주대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

오메가-3 지방산(omega-3-fatty acid) 또는 그 유도체가 2개 결합된 인지질을 포함하는 공 리포솜을 포함하는, 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 오메가-3 지방산은 도코사헥사엔산 (docosahexaenoic acid, DHA) 또는 에이코사펜타엔산 (eicosapentaenoic acid, EPA)인 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 공 리포솜은 콜레스테롤(cholesterol), 올레인산, 올레인산이 결합된 인지질, 또는 알파 토코페롤(α-tocopherol)을 더 포함하는 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 오메가-3 지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질은 상기 공 리포솜 총 지질 중량 중 40% 이상 포함된 것인 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 공 리포솜의 직경은 20 nm 내지 400 nm 인 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 공 리포솜은 히스티딘, 수크로오스, 하이드록시에틸피페라진에테인설폰산, 염화나트륨, 인산염 및 텍스트로스로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나가 포함된 용액에 분산된 것인 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

청구항 7

약물 담지 리포솜에 청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 공 리포솜을 접촉시켜 형성된 막 변형 리포솜을 포함하는 약물 전달체.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 약물 담지 리포솜은 포화지방산이 결합된 인지질을 포함하는 약물 전달체.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 포화지방산이 결합된 인지질은 경화 대두 포스파티딜콜린(hydrogenated soy phosphatidylcholine, HSPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC), 경화 난황 포스파티딜콜린(hydrogenated egg phosphatidylcholine), DLPC), 1,2-디팔미토-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) 및 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC)로 이루어진 군에서 선택되는 약물 전달체.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 막 변형 리포솜의 직경은 70 nm 내지 500 nm 인 약물 전달체.

청구항 11

청구항 7에 있어서, 상기 약물 담지 리포솜과 상기 공 리포솜의 중량비는 약물 담지 리포솜의 포스파티딜콜린: 공 리포솜의 오메가-3-지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질 기준으로 1: 0.1 내지 1인 약물 전달체.

청구항 12

청구항 7에 있어서, 상기 약물은 항암제인 약물 전달체.

청구항 13

약물 담지 리포솜과 청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 조성물을 혼합하는 단계를 포함하는 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 약물 방출 촉진용 조성물 및 약물 담지 리포솜을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 약물 담지 리포솜의 약물 방출을 촉진시키는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

리포솜은 내부 수상을 인지질 이중층 막이 에워싸는 구형 베지클 구조로서 수용액에 인지질을 분산 시 자발적으로 형성되는 구조이다. 인지질의 생체적합성 뿐 아니라 내부 수상에는 수용성 약물을 봉입하고 막을 구성하는 인지질 분자 사이에는 지용성 약물을 끼워 넣을 수 있는 구조적 유연성 때문에 약물의 수송체로서 활발히 연구 개발되고 있다. 리포솜에 약물을 봉입하게 되면 약물의 낮은 용해도, 화학적 불안전성, 투여 후 너무 짧은 혈중 반감기 등의 약동학적인 한계점 등을 개선함으로써 치료 효과를 높이면서 부작용은 감소시키는 효과를 볼 수 있다. 항암제 약물의 경우 20 nm 내지 200 nm 크기 리포솜에 봉입되면 enhanced permeability and retention effect(EPR effect)에 의해 종양 부위로의 축적이 증대되는 효과도 볼 수 있다. 이러한 리포솜의 유익한 효과들은 리포솜 막구조의 조절을 통해 더욱 증대될 수 있다. 예를 들어, 포화지방산 사슬을 갖고 있는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine; 이하 PC)은 불포화된 PC로 만든 리포솜 보다 산화가 덜되고 높은 상전이 온도를 갖기 때문에 봉입된 약물을 내부에 더 잘 유지하는 특성이 있다. 폐길레이션된 인지질을 함유하는 리포솜의 경우 약물 담지 리포솜의 혈중 반감기를 현저히 연장시킬 수 있다. 따라서 상용화된 약물 담지 리포솜은 포화된 PC와

폐길레이션된 인지질로 구성되어 있는 경우가 많다.

[0004] 전신 투여된 항암제 리포솜 제형은 온 몸을 돌다가 주로 리포솜 형으로 종양 간질(tumor interstitium) 부위에 축적된 후 거기서 약물이 방출되어 일차적으로 암세포 유입 후 세포내 핵 등 약물의 작용 부위에 도달하여 약효를 낸다. 그러나, 포화된 PC로 만들고 폐길레이션된, 막이 견고한 리포솜의 경우 종양 간질에서도 리포솜으로부터의 약물 방출이 잘 이루어지지 않아 결국 약물의 작용 부위에 도달할 수 있는 약물량이 제한적인 것으로 생각되고 있다. 이로 인해 약물 담지 리포솜이 종양 부위에의 축적에도 불구하고 임상에서 기대보다는 제한적인 항암효과를 내고 있거나(독소루비신(doxorubicin)), 제한된 혈중 반감기 연장 효과에도 불구하고 상기 문제를 경감시키기 위해 폐길레이션된 인지질의 비율을 현저히 낮춘 조성으로 시판되어 있다(이리노테칸(irinotecan)). 시스플라틴(cisplatin) 담지 리포솜은 시스플라틴 용액 대비 암 조직에 축적이 증대되었음에도 불구하고 더 높은 항암효과를 발휘하지 못하여 임상시험에 실패한 바 있다.

[0005] 이를 극복하기 위한 방법으로, 리포솜 막구조의 조절을 통해 리포솜으로부터의 종양 부위에서의 약물 방출 효능을 개선시키고자 하는 연구가 진행되고 있다. 예를 들면, 포화지방산 사슬을 갖는 PC는 높은 상전이 온도를 가져서 리포솜막을 견고하게 만들지만 불포화지방산 사슬을 가진 PC는 막유동성이 보다 우수한 리포솜을 만드는 점을 이용하여, 불포화 PC를 약물 담지 리포솜의 주성분으로 사용하거나 세포막의 투과성 증진 효능이 있는 짧은 탄소사슬을 가진 스핑고리피드(short chain sphingolipid)를 포화PC 막에 같이 끼워 넣은 리포솜에 항암 약물을 봉입함으로써 약물의 방출도를 어느 정도 개선시키는 연구가 진행된 바 있다(비특허문헌 1). 또한 열에 민감하게 반응하여 약물을 방출시킬 수 있는 리소PC(lysoPC)로 구성된 리포솜에 항암 약물을 봉입하고 투여 후 종양부위에 열을 쬌어 줌으로서 약물의 국소적 방출도를 개선시키는 연구도 진행된 바 있다. 그러나 그러한 경우 리포솜 상태에서 자체적 안정성이 낮고, 투여 후 리포솜 불안정화로 인한 약물의 혈중 체류시간 등의 저해 등이 동반될 수 있다는 문제가 존재한다.

[0006] 따라서 약물 담지 리포솜의 약물 방출효과를 증진시키면서도, 기존의 리포솜 제형이 가지고 있는 안정적인 구조, 높은 혈중 체류시간 등의 장점을 유지하는 전달체의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Lummel et al.(2011),"Enriching lipid nanovesicles with short-chain glucosylceramide improves doxorubicin delivery and efficacy in solid tumors", FASEB Journal, 25,p280-289

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 약물 담지 리포솜의 약물 방출 효과를 증진시키면서도, 혈중 체류시간이나 리포솜의 안정성을 저해시키지 않는 약물 방출 촉진용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 오메가-3 지방산(omega-3-fatty acid) 또는 그 유도체가 2개 결합된 인지질을 포함하는 공 리포솜을 포함하는, 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

[0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 오메가-3 지방산은 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, DHA) 또는 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid, EPA)인 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

[0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 공 리포솜은 콜레스테롤(cholesterol), 올레인산, 올레인산이 결합된 인지질, 또는 알파 토코페롤(α -tocopherol)을 더 포함하는 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물

[0014] 4. 위 1에 있어서, 상기 오메가-3 지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질은 상기 공 리포솜의 총 지질 중량 중 40% 이상 포함된 것인 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.

- [0015] 5. 위 1에 있어서, 상기 공 리포솜의 평균 직경은 20 nm 내지 400 nm 인 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.
- [0016] 6. 위 1에 있어서, 상기 공 리포솜은 히스티딘, 수크로오스, 하이드록시에틸피페라진에테인설포산, 염화나트륨, 인산염 및 텍스트로스로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나가 포함된 용액에 분산되어 있는 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물.
- [0017] 7. 약물 담지 리포솜에 위 1 내지 6 중 어느 한 항의 공 리포솜을 접촉시켜 형성된 막 변형 리포솜을 포함하는 약물 전달체.
- [0018] 8. 위 7에 있어서, 상기 약물 담지 리포솜은 포화지방산이 결합된 인지질을 포함하는 약물 전달체.
- [0019] 9. 위 8에 있어서, 상기 포화지방산이 결합된 인지질은 경화 대두 포스파티딜콜린(hydrogenated soy phosphatidylcholine, HSPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC), 경화 난황 포스파티딜콜린(hydrogenated egg phosphatidylcholine), 1,2-디팔미토-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) 및 1,2-디스테아릴로일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC) 로 이루어진 군에서 선택되는 약물 전달체.
- [0020] 10. 위 8에 있어서, 상기 막 변형 리포솜의 직경은 70 nm 내지 500nm 인 약물 전달체.
- [0021] 11. 위 8에 있어서, 상기 약물 담지 리포솜과 상기 공 리포솜의 중량비는 약물 담지 리포솜 중 포화지방산이 결합된 포스파티딜콜린과 공 리포솜 중 오메가-3 지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질 기준으로 1: 0.1 내지 1 인 약물 전달체.
- [0022] 12. 위 8에 있어서, 상기 약물은 항암제인 약물 전달체.
- [0023] 13. 약물 담지 리포솜에 위 1 내지 6 중 어느 한 항의 공 리포솜을 혼합하는 단계를 포함하는 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진 방법.
- [0024] 14. 위 1 내지 6 중 어느 한 항의 약물 방출 촉진용 조성물 및 약물 담지 리포솜을 포함하는 키트.

발명의 효과

- [0026] 본 발명은 오메가-3 지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질을 포함하는 공 리포솜을 포함하는, 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물을 제공한다. 바람직하게는 약물을 통한 암 치료 등 질병의 치료 과정에서 약물 전달체로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 약물 담지 리포솜과 공 리포솜 혼합 시, 혼합비 의존적인 독소루비신 방출을 나타낸 것이다.
- 도 2는 약물 담지 리포솜과 공 리포솜의 혼합 방법에 따른 약물 방출 양상의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 3은 50% 혈청 존재 시 공 리포솜 혼합 유무에 의한 약물 담지 리포솜으로부터의 시간에 따른 약물 방출 양상 변화를 나타낸 것이다.
- 도 4는 공 리포솜의 보관 안정성을 나타낸 것이다.
- 도 5는 인지질 HSPC로 구성된 리포솜과 공 리포솜을 혼합시 HSPC의 상전이온도에 대한 혼합의 영향을 나타낸 것이다.
- 도 6는 공 리포솜과 약물 담지 리포솜 혼합 1일 후 초저온 투과형 전자현미경으로 관찰한 리포솜 혼합액의 형태 및 크기를 나타낸 것이다.
- 도 7은 공 리포솜과 약물 담지 리포솜 혼합 후 시간에 따른 약물 담지 리포솜의 평균입자경 및 다분산도(polydispersity index; PDI) 변화를 나타낸 것이다.

도 8은 공 리포솜의 혼합이 약물 담지 리포솜에 담지된 약물의 항암활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 9는 약물 담지 리포솜과 공 리포솜의 혼합에 의한, 담지된 약물의 암세포 유입도 및 세포내 핵 유입도 변화를 나타낸 것이다.

도 10은 SD rats에 독소루비신, 독소루부신 담지 리포솜(케릭스, Caelyx[®]) 및 케릭스+공 리포솜 혼합액을 독소루비신 용량 5mg/kg로 각각 정맥투여 후 시간에 따른 독소루비신의 평균 혈중농도-시간 곡선을 나타낸 것이다.

도 11은 인간 대장암세포를 이식한 마우스에 케릭스 및 케릭스+공 리포솜 혼합액을 독소루비신 용량 4 mg/kg으로 각각 정맥투여 24, 48 시간 후 주요 장기 및 암조직에의 독소루비신 분포 정도를 형광이미지로 얻은 것이다.

도 12는 대장암을 이식한 마우스를 4 그룹으로 나눠 대조군(리포솜 제제의 용매, 그룹 1), 공 리포솜(그룹 2), 케릭스(그룹 3) 및 케릭스+공 리포솜 혼합액(그룹 4)을 독소루비신 용량으로 4 mg/kg에 해당하는 양으로 각각 2회 정맥투여 후, 시간에 따른 종양의 크기 변화(도 12A), 체중의 변화(도 12B) 및 투여 22일 후 각 마우스로부터 적출한 암조직의 무게(도 12C)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하 본 발명을 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적인 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 의미를 따른다.

[0031] <약물 방출 촉진용 조성물>

[0032] 본 발명은 오메가-3 지방산(omega-3-fatty acid) 또는 그 유도체가 결합된 인지질을 포함하는 공 리포솜을 포함하는, 약물 담지 리포솜의 약물 방출 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에서 상기 약물 방출 촉진용 조성물은 상기 "공 리포솜"이 상기 "약물 담지 리포솜"과 물리적으로 접촉되고, 이때 막간 상호작용이 일어나 약물 담지 리포솜의 막구조를 변화시킴에 의해 담지된 약물을 리포솜 외부로 방출시킬 수 있다. 본 발명에서 "약물 방출"은 상기 "공 리포솜"과 상기 "약물 담지 리포솜"을 혼합시킨 시점부터 시간 의존적으로 약물이 리포솜으로부터 방출되는 것을 의미하는 것으로, 혼합 후 즉시 모든 약물이 한꺼번에 방출되는 것과 대비되는 용어이다. 본 발명의 일 실시예에서 공 리포솜과 약물 담지 리포솜 혼합으로부터, 담지된 독소루비신의 80%가 8시간 동안 시간의존적으로 방출되는 것을 확인하였다(도 3 참조).

[0034] <공 리포솜>

[0035] 본 발명에서 "공 리포솜"이란, 리포솜 내부 및 막내 공간에 약물을 담지하지 않는 리포솜을 의미한다. 리포솜은 내부 수상을 인지질 이중층으로 구성된 막이 에워싸는 베지클 구조로, 상기 인지질은 양친매성 분자로, 글리세롤 한 분자에 친수성을 나타내는 인산기 및 소수성을 나타내는 두 개의 지방산이 붙어있는 구조이다. 더 구체적으로, 본 발명의 공 리포솜은 인지질의 2개의 소수성 지방산이 모두 오메가-3 지방산 또는 그 유도체로 되어 있는 인지질을 막에 포함하고, 리포솜 내부 및 막간 공간에 약물을 담지하지 않는 리포솜을 말한다. 이에 따라 본 발명의 공 리포솜은 "오메가 리포솜(omega liposome)"이라는 용어와 혼용된다. 또한 "공 리포솜" 혹은 "오메가 리포솜"이라고 언급할 때에는 리포솜 뿐만 아니라, 리포솜이 분산된 리포솜 분산액을 의미할 수도 있다.

[0036] 본 발명에서 상기 공 리포솜은 오메가-3 지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질을 포함한다. 상기 오메가-3 지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질은 인지질의 2개의 지방산 모두가 오메가-3 지방산 또는 그 유도체로 되어 있는 인지질을 의미한다.

[0037] 예를 들면, 지방산 분자 중 2개가 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, DHA) 또는 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid, EPA) 또는 그 유도체일 수도 있고, DHA와 EPA 또는 그 유도체를 한 분자씩 가지는 인지질일 수 있다. 예를 들어, DHA와 그 유도체의 조합, EPA와 그 유도체의 조합, DHA와 EPA의 조합, DHA와 EPA 유도체의 조합, DHA 유도체와 EPA의 조합, DHA 유도체와 EPA 유도체의 조합 등이 모두 가능하다.

[0038] 오메가-3 지방산의 유도체는 예를 들면 에스터 유도체일 수 있다. 에스터의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, t-부틸, 벤질, 니트로벤질, 메톡시벤질, 벤즈하이드릴 및 트리클로로에틸을 포함한다.

- [0039] 본 발명의 상기 약물 방출 촉진용 조성물의 효과는 인지질을 구성하는 2개의 지방산 모두 오메가-3 지방산 또는 그 유도체인 경우에만 발휘된다. 만약, 오메가-6 지방산으로 인지질을 구성할 경우, 오메가-3 지방산과 달리 약물 방출을 촉진시키는 효과가 보이지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서 DA-PC(1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 20:4(Cis) PC)의 경우, 오메가-3 지방산 또는 그 유도체를 포함하는 인지질을 포함하는 리포솜과 달리 약물 방출 촉진 효과가 전혀 없는 것을 확인하였다. 또한, 오메가-3 지방산 또는 그 유도체를 1분자만 인지질에 포함하는 경우에도 전혀 본 발명의 약물 방출 촉진 효과가 발휘되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서, mono-DHA-PC(1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 18:0-22:6 PC)로 제조한 공 리포솜의 경우, 약물 담지 리포솜과 혼합하더라도 약물 방출 효과가 전혀 증진되지 않았다(실험예 1 참조).
- [0040] 반면, 상기 인지질을 구성하는 인산기의 종류는 제한되지 않고 사용될 수 있다. 예를 들면, 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딕산(phosphatidic acid), 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol), 포스파티딜세린(phosphatidylserine), 에틸포스포콜린(ethylphosphocholine), 포스포에탄올아민(phosphoethanolamine, 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol) 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서, 오메가-3-지방산이 결합된 포스파티딜콜린(di-DHA-PC) 외 오메가-3-지방산이 결합된 포스포에탄올아민(di-DHA-PE)을 포함하는 공 리포솜에 의해서도 약물 담지 리포솜의 약물 방출이 촉진되는 것을 확인하였다(실험예 1 참조).
- [0041] 본 발명에서 상기 오메가-3 지방산이 결합된 인지질은 상기 공 리포솜의 총 지질 중량에 대해 40 중량% 이상으로 포함될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 공 리포솜 총 지질 중량에 대해 44.5 중량%를 가지는 경우에도 약물 담지 리포솜의 약물방출이 촉진되는 것을 확인하였다(실험예 1 참조). 오메가-3 지방산이 결합된 인지질의 함량 하한은 40 중량%, 50 중량%, 60 중량% 등일 수 있다. 오메가-3 지방산이 결합된 인지질을 공 리포솜 총 중량의 100%로 포함하는 경우에도 약물 담지 리포솜의 약물방출이 촉진되는 것을 확인된 바, 그 함량 상한은 한정되지 않는다. 예를 들면 100 중량%, 90 중량%, 80 중량% 등일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 공 리포솜의 직경은 당업자가 사용할 수 있는 리포솜 제조방식 또는 약물의 종류 등의 조건에 따라서 선택될 수 있다. 예를 들면, 20 내지 400nm, 20 내지 350nm, 20 내지 300nm, 20 내지 250nm, 20 내지 200nm의 직경의 공 리포솜을 사용할 수 있다(실험예 1과 실험예 3 참조). 본 발명의 일 실시예에서는 119 nm의 직경을 가진 공 리포솜이 356 nm의 직경을 가진 조분산 리포솜에 비해 약물 방출 촉진 효과가 더 큰 것을 확인하였다(실험예 1 참조). 다만, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] <공 리포솜의 추가 구성 성분>
- [0044] 본 발명에서 상기 공 리포솜은 콜레스테롤(cholesterol), 올레인 산(oleic acid) 또는 올레인 산이 결합된 인지질, 또는 알파 토크페롤(α -tocopherol)과 같은 추가 구성성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다. 상기 콜레스테롤 또는 알파 토크페롤은 공 리포솜의 입자 크기를 감소시키고 보관 시 안정성을 증가시킬 수 있다. 상기 올레인 산 또는 올레인 산이 결합된 인지질은 공 리포솜의 입자 크기를 감소시키고 약물 담지 리포솜과의 작용을 더욱 증진시킬 수 있다(실험예 1 참조).
- [0045] 본 발명에서 콜레스테롤(cholesterol), 올레인 산(oleic acid) 또는 올레인 산이 결합된 인지질 또는 알파 토크페롤(α -tocopherol)과 같은 추가 성분의 함량은 공지된 리포솜의 조성비 범위 내에서 제한 없이 선택될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 콜레스테롤, 올레인산 또는 올레인산이 결합된 인지질 및 토크페롤이 각각 공 리포솜 총 지질 중량 대비 0 중량% 내지 15 중량%, 0 중량% 내지 25 중량% 및 0 중량% 내지 15 중량%로 포함되는 경우 모두에서 약물 담지 리포솜의 약물방출이 촉진되는 것을 확인하였다(실험예 1 참조).
- [0046] 상기 성분 이외에도, 상기 공 리포솜은 혈중 체류 시간을 증진시키기 위해 폐길레이션된 인지질을 더 포함할 수도 있고, 본 발명의 일 실시예에서 DSPE-PEG-2000(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carbonyl-methoxy(polyethylene glycol)-2000] 포함 여부와 무관하게 방출 효능이 유지되는 것을 확인하였다(실험예 1 참조).
- [0048] <공 리포솜 분산액>
- [0049] 공 리포솜은 투여시 환자 체액과 pH 및 삼투압을 맞추기 위해 공 리포솜의 제조방법에 따라 히스티딘, 인산염, 또는 헵에스(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, HEPES) 등의 완충제와 수크로오스, 텍스트로스 또는 염화나트륨을 수용매에 포함하는 분산액 형태로 존재할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 분산액

에 히스티딘/수크로오스를 포함하거나 인산염을 포함하거나 무관하게 약물 방출 촉진 효과가 발휘됨을 확인하였다(실험예 1 참조).

- [0051] <공 리포솜의 제조방법>
- [0052] 본 발명의 공 리포솜은 당 분야에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0053] 예를 들면, 실시예 1에 기재된 것과 같이,
- [0054] i) 3차 부틸 알코올, 클로로포름, 에탄올 등의 용매에 인지질류를 용해시킨 혼합 용액을 얻는 단계
- [0055] ii) 상기 i)의 용액에서 용매를 제거하는 단계
- [0056] iii) 상기 ii)의 단계를 통해 얻어진 잔여물(지질류)에 수용매를 가하여 리포솜 조분산액을 수득하는 단계
- [0057] iv) 상기 iii)의 단계를 통해 얻은 조분산액을 추가로 초음파 처리하는 등 리포솜의 크기를 줄이고 균일화하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0058] 위 방법에서, i) 단계의 인지질류는 종기로는 di-DHA-PC (1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 22:6 (Cis) PC)이며, 이에 한정되지 않고, 오메가-3-지방산 결합 인지질(오메가-3 지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질)류라면 모두 사용가능하다.
- [0059] i) 단계에서 오메가-3-지방산 결합 인지질만을 용해시켜도 충분하지만, 여기에 추가 성분을 첨가할 수 있다. 상기 추가 성분의 예로는 콜레스테롤(cholesterol), 올레인산(oleic acid) 또는 올레인산 결합 인지질 및 알파 토코페롤(α -tocopherol)이 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 콜레스테롤, 올레인산 또는 올레인산 결합 인지질 및 알파 토코페롤과 같은 추가 성분의 함량은 공지된 리포솜의 조성비 범위 내에서 제한 없이 선택될 수 있다. 예컨대, 콜레스테롤, 올레인산 또는 올레인산 결합 인지질 및 토코페롤이 공 리포솜 총 지질 중량 대비 0 중량% 내지 15 중량%, 0 중량% 내지 25 중량 및 0 중량% 내지 15 중량%로 포함될 수 있다.
- [0060] ii) 단계에서 용매의 제거는 증발 또는 동결 건조 등에 의할 수 있다.
- [0061] 용매 제거는 예를 들면 동결 건조에 의할 수 있다. 동결 건조 조건은 예컨대 영하 45℃로서 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 증발은 방치 또는 회전 증발일 수 있으며, 이는 공지된 조건에 따라 수행될 수 있다.
- [0063] iii) 단계에서 수용매에 첨가되는 성분으로는 히스티딘, 인산염 또는 헤페스(HEPES)등의 완충제와 수크로오스, 텍스트로스 또는 염화나트륨 등이 있다. 상기 용매에는 상기 성분 1종 이상이 단독으로 또는 조합하여 존재할 수 있다. 성분의 선택은 주로 공 리포솜의 제조 방법에 따르게 되며, 공 리포솜 투여시 환자 체액과 pH 및 삼투압을 맞추고 공 리포솜의 안정성을 유지하기 위한 것이다.
- [0064] iii) 단계에서, 리포솜 조분산액의 수득을 돕기 위해 수용매를 가한 후 교반할 수 있다. 교반 조건은 예컨대, 3,000 rpm에서 30 초 교반하는 방법 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] iv) 단계를 통해서, iii) 단계에서 생성된 조분산액을 추가로 초음파처리함으로써 크기가 작아지고 균일해진 리포솜을 얻을 수 있다. 초음파 처리 조건은 예컨대, 자발적으로 형성된 리포솜 조분산액을 37℃에서 1시간 동안 수조 형식의 초음파 분산기에서 130 W로 균질화, 다시 수조 형식의 세포 파쇄용 초음파 분산기(UCD-200T, 일본)에서 7 분간 250 W 세기의 초음파 처리하는 방법 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 균질화 방법은 수조 초음파 처리 외 프로브 초음파 처리(probe sonicator), 익스트루더(extruder), 고압 호모지나이저(high pressure homogenizer), 마이크로플루이다이저(microfluidizer) 사용으로 대체될 수도 있다.
- [0067] <약물 방출 촉진에 공 리포솜을 사용하는 방법>
- [0068] 상기 방법에 의해 얻어진 오메가-3-지방산 또는 그 유도체가 결합된 인지질 함유 리포솜(오메가 리포솜)을 약물 담지 리포솜과 다양한 중량비(약물 담지 리포솜의 포스파티딜콜린: 오메가 리포솜의 오메가-3-지방산 결합 인지질 기준)로 혼합하고(본 발명에서 1:0.1 내지 1:1로 예시), 이 혼합액을 추가로 혼합하여 (예컨대: 300 rpm으로 교반, 혹은 초음파 분산기 130 W에서 소니케이션, 혹은 직접 혼합) 환자에게 투여함으로써, 약물 담지 리포솜 내에 포함된 약물의 방출 촉진에 사용할 수 있다.

[0070] <약물 담지 리포좀>

[0071] 본 발명에서 "약물 담지 리포좀"이란, 상기 리포좀의 인지질 분자 사이 공간 또는 리포좀 내부 수상에 약물을 포함하는 리포좀을 말하고, 앞서 언급한 공 리포좀과는 약물 담지 여부 및 구성하는 인지질의 종류에서 구별되는 용어이다. 상기 인지질의 종류나 약물의 종류와 관계없이 약물이 담지되어 있다면, 제한 없이 본 발명의 약물 담지 리포좀으로서 선택될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 약물 담지 리포좀에 사용된 인지질의 종류나 담지된 약물에 따라 약물 방출 촉진 여부가 변화되는지 확인하기 위하여, DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)을 주성분으로 하고, 독소루비신을 담지한 DOPC-dox 리포좀, 이리노테칸 담지 리포좀(시판품 오니바이드 및 DSPC로 제조한 리포좀) 모두에서 본 발명의 공 리포좀을 혼합하였을 때, 약물 방출이 촉진되는 것을 확인하였다(실험예 1 참조).

[0072] 본 발명에서 상기 약물 담지 리포좀의 인지질 분자는 중성지질, 음이온성 및 양이온성 인지질 모두 사용이 가능하고, 예를 들면 중성지질로서는 L- α -포스파티딜콜린(L- α -phosphatidylcholine, PC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있고, 콩, 계란, 경화된 콩 또는 계란으로부터 유래된 PC일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0073] 상기 음이온성 지질로는 L- α -포스파티딕산(L- α -phosphatidic acid), L- α -포스파티딜-DL-글리세롤(L- α -phosphatidyl-DL-glycerol), 카디올리핀(cardiolipin), L- α -포스파티딜이노시톨(L- α -phosphatidylinositol), L- α -포스파티딜세린(L- α -phosphatidylserine), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), DMPG, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DMPS), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate, DMPA), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), DOPG, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DOPS), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate, DOPA), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DPPS), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate, DPPA), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), DSPG, 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DSPS), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate, DSPA), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[카복시-메톡시(폴리에틸렌글리콜)](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy-methoxy(polyethylene glycol)])-1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), POPG, 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], POPS), 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-포스페이트(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate, POPA) 및 올레산(oleic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지는 않는다.

[0074] 폐길레이션된 인지질은 PEG의 분자량이 예를 들면 1000 내지 50000, 1000 내지 30000, 1000 내지 20000, 1000 내지 10000, 1000 내지 8000, 1000 내지 6000, 2000 내지 6000, 3000 내지 6000 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0075] 상기 양이온성 지질로서는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane, DOTAP), 디올레오일 글루타마이드(dioleoyl glutamide), 디스테아로일 글루타마이드(distearoylglutamide), 디팔미토일 글루타마이드(dipalmitoyl glutamide), 디올레오일 아스파르타마이드(dioleoylaspartamide), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane, DODAP), β -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄-카바모일], (β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoil], DC-Chol), 메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디스테아로일-

sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE) 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지는 않는다.

[0076] 본 발명의 공 리포솜은 약물 담지 리포솜의 막구조를 유연하게 하여 약물 방출 촉진 효과를 나타내는 것이기 때문에, 약물 담지 리포솜이 본래 단단한 구조를 가질수록 그 효과가 극대화될 수 있다. 단단한 구조를 갖는 약물 담지 리포솜은 예를 들면 포화지방산이 결합된 인지질을 포함하는 리포솜일 수 있다. 상기 포화지방산이 결합된 인지질의 예를 들면, 경화 대두 포스파티딜콜린(hydrogenated soy phosphatidylcholine, HSPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC), 경화 난황 포스파티딜콜린(hydrogenated egg phosphatidylcholine), 1,2-디팔미토-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) 및 1,2-디스테아릴로일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC) 등을 들 수 있다. 포화지방산이 결합된 인지질의 비율은 예를 들면 약물 담지 리포솜의 총 지질 중량 중 0% 초과 내지 100%일 수 있고, 구체적으로, 하한이 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 등일 수 있고, 상한은 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70% 등일 수 있다.

[0077] 약물 담지 리포솜에 담지되는 약물은 리포솜에 담지될 수 있는 약물이라면 당 분야에 공지된 약물이 제한 없이 사용될 수 있다. 다양한 질환에 대한 다양한 약물이 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 항암제일 수 있다. 암은 예를 들면 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종 등일 수 있다. 항암제는 예를 들면 독소루비신, 이리노테칸 등일 수 있으며, 그 외에도 공지된 항암제가 제한 없이 사용될 수 있다.

[0079] <약물 전달체>

[0080] 본 발명에서는 약물 담지 리포솜에 상기 공 리포솜을 접촉시켜 형성된 막 변형 리포솜을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

[0081] 본 발명의 약물 전달체에서, 상기 공 리포솜과 상기 약물 담지 리포솜이 물리적으로 접촉하면, 양 리포솜내 인지질 막간 상호작용이 일어남으로써 그 과정에서 약물 담지 리포솜 막을 구성하는 인지질의 배열이 변화하여 막 구조가 유연해진다. 이에, 약물 담지 리포솜에 담지된 약물이 서서히 방출될 수 있다(실험예 2 참조). 막 변형 리포솜은 이러한 인지질의 배열이 변화된 리포솜을 의미한다.

[0082] 본 발명에서 상기 약물 전달체는 약물 담지 리포솜의 약물 방출을 촉진하면서도, 종래 약물 방출을 촉진하는 약물 담지 리포솜이 가지고 있던 문제점, 즉 전달체의 막구조가 불안정하여 장기간 리포솜의 형태를 유지하지 못하거나, 혈중 농도가 급격하게 떨어지는 문제점이 개선된 전달체에 해당한다.

[0083] 본 발명의 약물 전달체는 보관 시에는 상기 공 리포솜과 상기 약물 담지 리포솜으로 분리하여 보관 가능하다. 공 리포솜은 4℃에서 보관시 5 개월까지도 평균입자경과 다분산도가 변화하지 않으므로, 보관 시 안정성이 유지되는 것을 확인하였기에(실험예 2 참조), 종래 약물 전달체가 가지고 있는 불안정성을 해결하였다.

[0084] 또한, 본 발명의 약물 전달체는 리포솜에 담지 되지 않은 상태로 동일 약물을 전달할 때의 혈중 반감기가 118분 인데 반해, 759분의 반감기를 가져 약물 반감기를 유의성 있게 증가시키는 것을 확인하였다(실험예 5 참조). 그리고, 상기 약물 전달체는 약물을 세포 내로 유의미하게 전달할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 독소루비신을 약물 담지 리포솜인 케릭스 형태로 투여하였을 때와 대비하여 본 발명의 약물 전달체로 전달하였을 때, 약 30배 가량 세포 내 유입도가 증가하며 독소루비신의 작용 부위인 세포내 핵으로의 유입도는 약 192배 증가하는 것을 확인하였다(실험예 4 참조).

[0085] 본 발명의 상기 약물 전달체는 약물 담지 리포솜과 공 리포솜을 적절한 비율로 조합하여 제조할 수 있다. 조합시의 중량비는 약물의 종류, 사용의 목적 등에 따라 선택할 수 있다. 공 리포솜의 인지질 이중막을 형성하는 오메가-3-지방산 결합 인지질과 약물 담지 리포솜의 인지질 이중막을 형성하는 포스파티딜콜린과의 상호 작용에 의해 막 구조가 변화하고, 약물 방출이 조절되는 것이므로, 그 약물 방출 조절을 위한 혼합비는 약물 담지 리포

좀의 포스파티딜콜린과 공 리포좀의 오메가-3 지방산 결합 인지질의 중량비를 기준으로 할 수 있다. 예를 들면, 약물 담지 리포좀의 PC 대 공 리포좀의 오메가-3-지방산 결합 인지질 중량비는 1: 0.1 내지 1, 1: 0.2 내지 0.8, 1: 0.3 내지 0.8, 1: 0.4 내지 0.7, 1: 0.4 내지 0.6 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 막 변형 리포좀은 예를 들면 그 직경이 70 내지 500nm, 70 내지 400nm, 70 내지 300nm, 100 내지 300nm 등일 수 있다.

[0087] 본 발명의 약물 방출 촉진용 조성물은 약물 담지 리포좀 및 지침서와 함께 동봉하여 키트 형태로 판매될 수 있으며, 또는 약물 방출 촉진용 조성물 단독으로 판매될 수도 있다. 키트로 판매되는 경우 키트내 지침서에 따라, 하나의 박스내에 포장된 상기 약물 담지 리포좀에 상기 약물 방출 촉진용 조성물을 혼합하여 사용한다. 또는, 별도로 판매되는 경우 상기 약물 방출 촉진용 조성물을 포장지로부터 분리하고 아래 기재와 같이 약물 담지 리포좀과 서로 혼합하여 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 약물 방출 촉진용 조성물을 약물 담지 리포좀과 혼합하는 단계를 포함하는 약물 담지 리포좀의 약물 방출 촉진 방법을 제공한다.

[0088] 상기 양 리포좀을 혼합하여 물리적으로 접촉시키는 단계는 당업자가 사용하는 방법에 의하여 제한 없이 선택할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 앞서 언급한 공 리포좀 및 약물 담지 리포좀이 포함된 용액을 섞은 후 vortex mixer를 사용하여 3,000 rpm에서 수 초 교반하거나(right after mixing), 섞고 vortex mixing 후 200 rpm에서 30분 교반한 경우(gentle mixing) 또는 섞고 vortex mixing 후 37℃에서 30분 동안 수조 형식의 초음파 분산기에서 130 W로 소니케이션한 경우(bath sonication) 각각의 약물 방출 촉진 효과 차이를 확인하였을 때, 모든 경우에서 약물 방출 촉진이 일어나는 것을 확인하였다(실험예 1 참조). 다만, 이에 제한되지 않는다.

[0089] 본 발명의 상기 약물 방출 촉진용 조성물은 담지되는 약물의 종류에 따라서 암을 포함하는 다양한 질병의 치료 목적으로 사용될 수도 있다. 예를 들면, 난소암, 대장암, 췌장암, 위암, 간암, 유방암, 자궁경부암, 갑상선암, 부갑상선암, 폐암, 비소세포성폐암, 전립선암, 담낭암, 담도암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 혈액암, 방광암, 신장암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 직장암, 뇌암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS central nervous system) 종양, 1차 CNS림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0090] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0092] 실시예 1. 공 리포좀(오메가 리포좀)의 제조 및 약물 담지 리포좀과의 혼합

[0093] 3차 부틸 알코올에 di-DHA-PC(1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 22:6 (Cis) PC) 또는 di-DHA-PE(1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 22:6 (Cis) PE) 등 오메가-3-지방산 결합 인지질류 및 추가 성분 지질을 총 9.6 내지 24.5 mg 넣어 녹인 혼합 용액을 얻었다. 이를 신속히 영하 80℃에서 얼리고, 동결건조기(EYELA FDU-1200, 일본)에서 동결 건조를 시행하였다. 24 시간 동안 건조하여 얻은 지질 파우더의 케이크에 10mM 히스티딘/10% 수크로오스 함유 용액 1 ml를 가해 수화시켰다. 3,000 rpm에서 30 초 교반하여 자발적으로 형성된 리포좀 조분산액을 37℃에서 1 시간동안 수조 형식의 초음파 분산기에서 130 W로 균질화, 다시 수조 형식의 세포 파쇄용 초음파 분산기(UCD-200T, 일본)에서 7 분간 250 W 세기의 초음파 처리하여 평균크기가 감소되고 보다 균일해진 공 리포좀을 얻었다. 상기 방법에 의해 얻어진 오메가-3-지방산 결합 인지질 함유 리포좀(오메가 리포좀)을 약물 담지 리포좀과 다양한 비율로 섞은 후, 3,000 rpm에서 수 초 교반 하여 잘 혼합하고, 때로는 추가로 이 혼합액을 37℃에서 200 rpm으로 30분 교반하거나(gentle mixing) 37℃에서 30분 동안 수조 형식의 초음파 분산기에서 130 W로 소니케이션(bath sonication) 하는 방법으로 혼합을 촉진시켰다.

[0095] 실시예 2. 약물 담지 리포좀으로부터의 *in vitro* 약물 방출 평가 시험

[0096] 실시예 1의 방법에 의해 여러 가지 조성의 오메가 리포좀을 제조 후 약물 담지 리포좀과 혼합하였다. 분자량 컷 오프가 12-14 kDa인 투석 백을 탈이온수로 10 분간 씻어준 다음 클로저로 한쪽 입구를 막은 후, 독소루비신 담지 리포좀(Caelyx, 케릭스(株), 한국얀센) 혼합액의 경우 약물 농도로서 1 mg/ml, 이리노테칸 담지 리포좀(오니바이드주, 세르비에 및 in-house 제조한 이리노테칸 담지 리포좀) 혼합액의 경우 약물 농도로서 2.2 mg/ml으로 pH 7.4의 인산염 완충액 용액으로 맞춰서 각 투석백 내부에 100 μ l (독소루비신) 또는 200 μ l (이리노테칸) 넣었다. 클로저로 밀봉한 투석 백을 pH 7.4의 인산완충생리식염수 액 100 ml (케릭스) 또는 pH 7.2의 인산완충염용

액 14 ml (오니바이드) 또는 pH 5.0의 인산완충염용액 14 ml (in house 제조한 이리노테칸 리포솜)에 담근 후 37℃의 진탕 항온 수조에서 100 rpm의 속도로 교반하였다. 방출된 약물 농도 정량을 위해 투석액 중 샘플 1 ml를 수집하고 동일한 부피의 투석액을 보충하였다. 약물 담지 리포솜으로부터 방출된 독소루비신 양은 형광광도계를 사용하여 정량 하였으며(excitation 파장 = 466 nm, 방출 파장 = 588 nm) 방출된 이리노테칸 양은 분광광도계(흡광 파장 = 365 nm) 또는 고속액체크로마토그래피(흡광 파장 = 254 nm)를 사용하여 정량하였다.

[0098] **실시예 3. 오메가 리포솜 혼합에 의한 약물 담지 리포솜의 물리적 변화 분석**

[0099] 두 가지 조성의 오메가 리포솜(오메가 리포솜1: Di-DHA-PC 9.6 mg, 콜레스테롤 0.8 mg, 알파 토크페롤 0.3 mg; 오메가 리포솜2: Di-DHA-PC 9.6 mg, 올레인산 0.6 mg, 알파 토크페롤 0.3 mg)을 실시예 1의 방법으로 제조 및 독소루비신 담지 리포솜(케릭스)과 케릭스 중 HSPC: 오메가 리포솜 중 Di-DHA-PC 중량 기준 1:0.5의 비율로 혼합하였다. 혼합액을 37℃의 항온 수조에서 0, 24, 48, 72 시간 방치 후 평균입자경을 fiber-optics particle analyzer (FPAR-1000, Otsuka Electronics, Japan)를 이용하여 동적 광산란법으로 측정하였다. 이때 각 샘플은 측정 바로 전 10 mM 히스티딘/10% 수크로오스 용액으로 100 배 희석하였다.

[0100] 약물 담지 리포솜-오메가 리포솜 혼합시 막구조의 변화가 일어나는지 고찰하기 위하여, 오메가 리포솜을 HSPC 9.58 mg/ml로 별도로 제조한 리포솜과 실시예 1의 방법으로 HSPC: 오메가 리포솜 Di-DHA-PC 중량 기준 1:0.5의 비율로 혼합하였다. 혼합액을 10 mM 히스티딘/10% 수크로오스 용액으로 약 5 배 희석하여 시차주사열량계(NanoDSC, TA instrument, DE, USA)를 사용하여 분당 1℃씩 올리면서 40℃에서 70℃까지 엔탈피 변화를 측정하였다(도 5). 또한 초저온 투과형 전자현미경을 이용한 리포솜의 형태 및 크기 변화 관찰을 위해서, 상기 케릭스+오메가 리포솜 혼합액을 37℃에서 하룻밤 방치하였다. 이를 10 mM 히스티딘/10% 수크로오스 용액으로 3 배 희석 후 탄소로 코팅한 300 메쉬 격자판에 떨어뜨렸다. 이어서 -170℃ 이하의 온도에서 cryo-holder를 사용하여 유리체 얼음 격자를 전자 현미경으로 옮기고 Tecnai G2 F20 spirit (FEI company, Hillsboro, Oregon, USA)로 120 kV에서 이미지를 촬영하였다. 이미지 사진은 14,500 배로 확대하였다(도 6).

[0102] **실시예 4: 리포솜 담지 약물의 약리활성에 오메가 리포솜 혼합이 미치는 영향 평가**

[0103] 인간 유래의 HCT-116 대장암세포 또는 마우스 유래의 B16-F10 흑색종세포를 $2.5 \sim 3 \times 10^3$ cells/well로 96-well 조직 배양 플레이트에 접종하고 밤새 배양하였다. 리포솜 담지 항암제 약물의 항암 효과를 평가하기 위해, 오메가 리포솜을 실시예 1의 방법으로 제조 후 실시예 1의 gentle mixing 방법으로 케릭스와 혼합하였다. 이 리포솜 혼합액을 약물로서 10~10,000 nM (독소루비신)이 되도록 희석하여 48시간 동안 암세포와 배양하였다. 그 후 배지를 걷어낸 뒤 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 0.5 mg/ml의 농도로 가해 2 시간 동안 처리하였다. 플레이트에 있는 용액을 제거한 뒤 다이메틸 설펝사이드(DMSO) 100 μ l를 처리해 결정을 녹였다. 마이크로 플레이트 분광 광도계를 이용해 540 nm 파장에서의 흡광도를 측정 후 항암제 약물 미처리 세포의 성장율을 기준으로 하여 성장율%로 환산하였다.

[0104] **실시예 5: 세포 내 및 핵 내로의 약물 유입도 평가 시험**

[0105] 오메가 리포솜 혼합이 리포솜 담지 약물의 세포로의 유입도에 미치는 영향을 평가하기 위해, 인간 유래 HCT-116 대장암세포를 1×10^6 cells/well로 6-well 조직 배양 플레이트에 접종하였다. 다음날 독소루비신으로서 20 또는 60 μ g/ml에 해당하는 케릭스 또는 케릭스-오메가 리포솜 혼합액을 2 시간 동안 세포와 배양하였다. 차가운 pH 7.4의 인산염완충액 용액으로 두 번 씻어준 뒤 세포를 떼어내 튜브에 담았다. 이 튜브를 원심분리기에서 5 분 13,200 rpm의 속도로 세포를 가라 앉혔다. 상등액 제거 후 pellet에 증류수에 녹인 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)을 100 μ l 가하고 수조 형식의 세포 파쇄용 초음파 분산기를 사용하여 6분 동안 분쇄 처리하였다. 여기에 아세트니트릴 200 μ l를 가해 원심분리기에서 5 분동안 13,200 rpm의 속도로 원심분리하여 단백질 pellet과 분리하였다. 상등액을 모아 상등액 중 독소루비신 농도, 즉 세포로 유입된 독소루비신 양을 형광광도계로 정량 하였다.

[0106] 오메가 리포솜 혼합이 약물의 세포내 작용 부위인 핵까지 도달하는 정도에 미치는 영향을 평가하기 위해, 인간 유래 HCT-116 대장암세포를 1×10^6 cells/well로 6-well 조직 배양 플레이트에 접종하였다. 다음날 독소루비신으로서 20 또는 100 μ g/ml에 해당하는 케릭스 또는 케릭스-오메가 리포솜 혼합액을 3 시간 동안 세포와 배양하였다. 차가운 pH 7.4의 인산염완충액 용액으로 두 번 씻어준 뒤 세포를 떼어내 튜브에 담았다. 이 튜브를 원심

분리기에서 5 분 13,200 rpm의 속도로 원심분리하여 세포를 가라 앉혔다. 상등액 제거 후 pellet에 10% NP-40을 넣은 hypotonic buffer (20 mM Tris (pH 7.4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂)를 넣어 재분산시켰다. 이어서 10 분 동안 3,000 rpm의 속도로 원심분리하여 핵 분획을 함유하는 pellet으로부터 세포질 분획을 함유하는 상등액을 분리하였다. 얻은 Pellet은 Invitrogen사의 cell extraction buffer로 재분산시켜 3,000 rpm에서 1분 교반 후 4℃에서 30 분동안 13,250 rpm의 속도로 원심분리하여 핵 분획에 해당하는 상등액을 얻었다. 세포질 분획, 핵 분획 중의 독소루비신 농도는 형광광도계로, 각 분획의 단백질 농도는 BCA assay kit로 각각 정량하였다.

[0108] 실시예 6: 랫트 모델에서의 약물동태학 평가 시험

[0109] 8주령 SD rat를 무작위로 세 그룹(독소루비신, 케릭스 및 케릭스+오메가 리포좀 혼합액)으로 나누고 케타민 100 mg/kg으로 마취 후 경정맥 및 경동맥에 각각 약물 주입과 혈액 채취를 위하여 폴리에틸렌 튜브(polyethylene tube)를 삽입하였다. 세 그룹에 독소루비신 용액, 케릭스 및 케릭스+오메가 리포좀 혼합액을 독소루비신 용량 기준으로 5 mg/kg을 경정맥으로 각각 투여 후 1, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720, 960, 1,440, 2,160 및 2,880분에 혈액 120 μ L를 취하여 원심분리 후 50 μ L의 혈장을 취하여 고속액체크로마토그래피로 독소루비신 농도를 분석하였다. 혈액 채취 후 혈액응고를 막기 위하여 20IU 헤파린이 든 주사용 생리식염수 0.3 mL를 flush하였다. 또한 약물 투여 후 24시간까지 뇨를 채집하여 부피를 측정하였다.

[0110] 혈장 및 뇨 중 독소루비신 농도의 정량을 위하여, 혈장 또는 뇨 50 μ L에 아세트니트릴 100 μ L와 15 μ g/mL 다우노루비신(내부표준물질) 15 μ L를 가하여 잘 섞은 후 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 혈장 내 단백질을 제거 후 상등액 100 μ L를 HPLC 칼럼(reversed phase column, particle size 5 μ m, 내경 4.6mm, 길이 250mm)에 주입하였다. 이동상 조건은 water(pH 2.6)와 acetonitrile을 68:32(v/v)의 비율로 유속 1mL/min으로 사용하였다. 약물의 검출을 위해 형광분석기를 사용하였으며 이때 excitation(Ex) 파장은 475nm, emission(Em) 파장은 555nm이었으며 독소루비신과 다우노루비신의 retention time은 각각 4.1 분과 6.8분이었다.

[0111] HPLC 분석으로 정량한 독소루비신 혈중농도를 WinNonlin 프로그램을 이용하여 약동학적 파라미터를 산출하였다. 약동학적 파라미터에 있어서 세 그룹 간 각 통계처리를 위해 analysis of variance(ANOVA) 분석 후 Tukey's test하였으며 P < 0.05를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[0113] 실시예 7: 종양 이식 마우스 모델에서의 항암 약물 분포 평가 시험

[0114] 오메가 리포좀 혼합이 종양 동물 모델에서의 약물 담지 리포좀의 조직 분포에 미치는 영향을 고찰하기 위하여, 인간 유래의 HCT-116 대장암 세포주 5X10⁶개를 BALB/c nude mice의 오른쪽 다리 상부에 각각 피하 주사하였다. 이식된 종양 부피가 250~300 mm³에 도달하였을 때 무작위로 두 그룹으로 나누어 각 그룹에 케릭스 및 케릭스+오메가 리포좀 혼합액을 독소루비신 용량 기준 4 mg/kg로 꼬리 정맥으로 각각 투여하였다. 투여 24 시간 및 48 시간 후에 각 마우스로부터 종양 조직 및 주요 장기를 적출하였다. 각 조직에 존재하는 독소루비신의 형광 이미지를 IVIS Lumina III In Vivo Imaging System (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 ex vivo 분석하였다. 형광의 세기는 Livingimage® software version 4.7.3으로 측정하였다. 두 그룹 간 각 통계처리를 위해 student T-test 하였으며 P < 0.05를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[0116] 실시예 8: 종양 이식 마우스 모델에서의 항암 활성 평가 시험

[0117] 오메가 리포좀 혼합이 종양 동물 모델에서의 약물 담지 리포좀의 항암 활성에 미치는 영향을 고찰하기 위하여, 인간유래의 HCT-116 대장암 세포주 5X10⁶개를 BALB/c nude mice의 오른쪽 다리 상부에 각각 피하 주사하였다. 이식된 종양 부피가 약 ~100 mm³에 도달하였을 때 마우스를 무작위로 4 그룹으로 나누었다 (n=4~5) (그룹 1: 히스티딘/수크로오스 용액(대조군), 그룹 2: 케릭스, 그룹 3: 케릭스+오메가 리포좀 혼합액 및 그룹 4: 오메가 리포좀). 각 그룹에 각 투여액을 독소루비신 용량 기준 4 mg/kg에 해당하는 양으로 꼬리 정맥으로 2회 투여하였다 (제0일 및 제5일). 이를 간격으로 각 마우스의 종양의 장축 및 단축의 길이를 디지털 캘리퍼로 측정하고 체중을 체중계로 측정하였다. 종양의 부피는 다음 식을 이용하여 계산하였다: 종양 부피 (mm³) = 1/2 X 장축 길이 X (단축 길이)². 투여 후 22일째 되는 날, 각 마우스들로부터 종양 조직을 채취하여 무게를 측정하였다. 각 그

룹 간 각 통계처리를 위해 analysis of variance(ANOVA) 분석 후 Tukey's test하였으며 $P < 0.05$ 를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[0119] 실험예 1. 약물 방출 실험 결과

[0120] Di-DHA-PC 9.6 mg, 콜레스테롤 0.8 mg, 알과 토크페롤 0.3 mg, 총 10.7 mg으로 실시예 1의 방법으로 오메가 리포솜을 제조 후, 독소루비신 담지 리포솜(케릭스)과 실시예 1의 bath sonication 방법으로 혼합하였다. 케릭스와 오메가 리포솜의 혼합 비율을 케릭스의 PC: 오메가 리포솜의 di-DHA-PC 중량 기준 1:0 내지 1:1까지 다르게 한 여러 혼합액으로부터 실시예 2의 방법으로 6시간까지 방출된 독소루비신 농도를 측정한 결과, 케릭스로부터의 약물 방출은 혼합 비율 의존적으로 증가하다가 PC 중량비가 1 대 0.5 일 때 포화되었으며 이때 약물 방출정도는 오메가 리포솜 부재시에 비교하여 6.8 배였다(도 1).

[0121] 약물 담지 리포솜과 오메가 리포솜의 혼합 방법 차이에 따른 약물 방출 양상의 변화를 확인하기 위하여, 약물 담지 리포솜(케릭스)과 도 1의 실험에서의 오메가 리포솜을 케릭스 PC: 오메가 리포솜 PC 중량비 1:0.5의 고정 비율로 혼합하였는데 실시예 1의 right after mixing 및 gentle mixing 방법의 경우 bath sonication 방법으로 혼합한 경우와 비슷하거나 다소 약화된 약물 방출 유도 효과를 나타내었다(도 2). 이는 초음파 분쇄기 등의 기기 사용 없이도 약물 방출 유도 효과가 발휘될 수 있음을 의미한다.

[0122] 오메가 리포솜 혼합 유무 및 조성에 따른 약물 담지 리포솜으로부터의 약물 방출 양상 변화를 확인하기 위하여, 약물 담지 리포솜(케릭스)과 실시예 1의 방법으로 제조한 여러 조성의 오메가 리포솜을 케릭스의 PC: 오메가 리포솜의 오메가 지방산 결합 인지질 중량 기준으로 1:0.5 내지 1:1의 비율로 혼합하였다 (표 1).

표 1

방출 실험 성분	중 리포솜의 막 조성 (중량비, mg)	중 리포솜 막 성분의 중량%				혼합비	수상 성분	평균 입자 경 (nm)	Release (%)				
		오메가-3-지방 산 2가 결합 인지질	콜레스 테롤	알파 토 코페롤	올리인 산 오메 가 결합 인지질				2 시간	4 시간	6시간	8시간	24 시간
doxorubicin 용액									47.4 ± 1.3	72.8 ± 3.2	81.6 ± 2.1		
케릭스 단독									3.9 ± 1.4	4.4 ± 1.9	7.9 ± 4.9	10.6 ± 0.4	10.1 ± 1.5
오메가 리포 솜 (di- omega-3- fatty acid- conjugated phospholipid 이 혼합)	di-DHA-PC alone (9:6)	100	-	-	-	1:0.5	히스타민/우크로우	119	31.3 ± 2.7	55.1 ± 4.0	60.5 ± 2.3	66.6 ± 1.6	N/A
	di-DHA-PC alone 포본산 (9:6)	100	-	-	-	1:0.5	히스타민/우크로우	356	19.3 ± 0.5	32.6 ± 0.8	37.6 ± 3.5	N/A	51.6 ± 1.7
	diDHA-PC:CHOL 96:0.8	92.3	7.7	-	-	1:0.5	히스타민/우크로우	N/A	40.3 ± 1.6	45.1 ± 4.5	53.7 ± 5.6	52.9 ± 2.4	N/A
	diDHA-PC:CHOL 96:1.6	86.7	14.3	-	-	1:0.5	히스타민/우크로우	219	11.5 ± 0.5	32.4 ± 2.4	37.6 ± 2.0	36.0 ± 2.1	N/A
	diDHA-PC:CHOL 96:3.2	75	25	-	-	N/A	인산염	1017	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	diDHA-PC:α-tocopherol (9:6:16)	86.7	-	14.3	-	1:0.5	인산염	219	22.9 ± 4.0	52.9 ± 3.3	54.3 ± 1	55.5 ± 5.4	N/A
	di-DHA-PC:CHOL:α-tocopherol (9:6:0.8:0.3)	89.7	7.5	2.8	-	1:0.5	히스타민/우크로우	129	24.7 ± 7.4	53.4 ± 2.1	53.6 ± 5.8	N/A	63.4 ± 3.1
	diDHA-PC:CHOL:α-tocopherol:DSPE-PEG2000 (9:6:0.8:0.3:3.2)	69.1	5.8	2.2	-	1:0.5	히스타민/우크로우	272	30.6 ± 2.7	47.9 ± 4.2	59.3 ± 2.8	54.2 ± 3.7	56.3 ± 2.2
	diDHA-PC:EDOPC:CHOL:α-tocopherol (10:9:0.5:2:1:0.5)	77.3	14.6	4.3	-	1:0.5	히스타민/우크로우	83	13.5 ± 1.6	27.6 ± 5.4	34.1 ± 3.3	35.5 ± 3.3	40.4 ± 3.2
	diDHA-PC:soy-PC:CHOL:α-tocopherol (10:9:10.9:2:1:0.5)	44.5	8.6	2.4	-	1:0.5	히스타민/우크로우	303	7.8 ± 0.2	10.5 ± 1.0	9.1 ± 0.6	15.5 ± 0.1	45.7 ± 1.9
	di-DHA-PC:oleic acid (9:6:31)	75.6	-	-	24.4	1:1	히스타민/우크로우	N/A	40.6 ± 2.7	53.3 ± 6.4	71.6 ± 2.3	72.4 ± 5.6	71.8 ± 1.2
	di-DHA-PC:oleic acid:α-tocopherol (9:6:0.6:0.3)	91.4	-	2.9	5.7	1:0.5	인산염	85	39.7 ± 1.4	60.6 ± 1.9	56.3 ± 5.8	62.5 ± 6.1	76.8 ± 5.7
	di-DHA-PC:oleic acid:α-tocopherol (9:6:1.2:0.3)	86.5	-	2.7	10.8	1:1	인산염	115	23.9 ± 0.3	59.0 ± 5.0	69.1 ± 0.8	77.5 ± 3.1	82.5 ± 3.3
	di-DHA-PC:DOPE:α-tocopherol (9:6:0.6:0.3)	91.4	-	2.9	5.7	1:0.5	인산염	N/A	32.7 ± 5.8	51.6 ± 6.2	53.9 ± 10.4	98.3 ± 6.7	95.2 ± 6.2
	di-DHA-PC:oleic acid:α-tocopherol (9:6:1:0.3)	88.5	-	2.6	15	1:1	인산염	174	12.3 ± 0.5	32.1 ± 2.0	42.1 ± 1.0	62.5 ± 3.3	N/A
타 리포솜 중 합	di-EPA-PC:CHOL:α-tocopherol (9:6:0.8:0.3)	89.7	7.5	2.8	-	1:0.5	히스타민/우크로우	N/A	41.0 ± 1.4	45.2 ± 2.5	57.2 ± 5.8	61.7 ± 1.4	N/A
	mono DHA-PC:CHOL:α-tocopherol	-					히스타민/우크로우	164	2.1 ± 0.7	4.1 ± 0.4	3.6 ± 0.4	3.5 ± 0.3	N/A
	di-DA-PC:CHOL:α-tocopherol (9:6:0.8:0.3)	-				1:0.5	히스타민/우크로우	168	5.3 ± 1.4	6.7 ± 1.1	N/A	6.2 ± 2.8	8.5 ± 1.6
	DOPC:CHOL (9:6:3:2)	-					히스타민/우크로우	620	1.5 ± 0.2	2.9 ± 0.9	3.4 ± 0.2	N/A	3.0 ± 0.1
	DOPC:oleic acid:CHOL (α-tocopherol) (9:6:0.6:0.3)	-				1:0.5	인산염	112	5.8 ± 0.8	6.6 ± 0.6	8.5 ± 2.7	7.8 ± 1.3	13.0 ± 2

* 약물을 담지 리포솜의 PC:오메가 리포솜의 오메가-3-지방산 결합 인지질 중량비

[0125] 실시예 2의 방법으로 측정한 결과, 케릭스 단독으로는 24 시간까지도 약 10%의 약물만이 방출되었다. 반면, Di-DHA-PC를 함유하는 오메가 리포솜을 혼합한 경우 시간 의존적으로 약물의 방출이 이루어져 방치 6시간 후까지 9.1 내지 60.5%, 24시간 후 40.4% 내지 96.2%가 방출되었다. 이때 오메가 리포솜 중 Di-DHA-PC를 총 지질의 44

중량% 함유하는 경우, 50 중량%을 초과하여 함유하는 경우보다 다소 낮기는 하지만 방출 촉진 효과는 여전히 관찰되었다. 오메가 리포솜에 Di-DHA-PC를 44% 이상 함유하는 경우 총 지질 중 콜레스테롤, 알파 토크페롤, DSPE-PEG-2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000], 올레인 산, 올레인 산이 결합된 인지질 등 다른 성분들이 추가되어도 약물 방출 촉진 효과는 관찰되었으며, 올레인 산 또는 올레인 산 결합 인지질인 DOPE(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)가 추가된 경우 약물 방출 촉진 효과는 더욱 우수하였다. di-DHA-PC 100%로 제조한 리포솜의 경우 356 nm의 조분산 리포솜보다는 균질화 과정을 거쳐 더 작게 119 nm로 만든 리포솜이 약물 방출 촉진 효과가 더 컸다. Di-DHA-PC가 아닌 di-DHA-PE 함유 리포솜의 경우도 우수한 약물 방출 효과를 나타내었다. 한편, 탄소 사슬 두 가닥 중 한 개의 가닥만 오메가-3-지방산으로 이루어진, mono-DHA-PC (1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholinemono-DHA-PC, 18:0-22:6 PC)를 함유하는 리포솜, 두 가닥 모두 오메가-6-지방산인 DA-PC (1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 20:4(Cis) PC)을 함유하는 리포솜 및 DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 18:1 PC) 리포솜의 경우는 이러한 약물 방출 유도 효과가 전혀 없어서, 약물 방출 유도 효과가 두 가닥의 오메가-3-지방산을 갖는 인지질 함유 리포솜 특이적임을 알 수 있었다(표 1). 또한 리포솜을 체내 투여시 혈청 단백질들의 리포솜 표면의 흡착에 의해서 오메가 리포솜의 약물 방출 촉진 효과가 발휘되지 못할 가능성을 점검하기 위하여 50% 혈청 존재시 상기 di-DHA-PC 함유 오메가 리포솜(di-DHA-PC: CHOL: α -tocopherol = (9.6: 0.8: 0.3 mg))을 케릭스 PC: 오메가 리포솜 PC 기준 1:0.5 중량비 혼합 후 케릭스로부터의 약물 방출 양상을 표 1 과 같은 조건에서 실험한 결과, 여전히 시간 의존적으로 약물 방출이 유도되어서(도 3), *in vivo*에서도 오메가 리포솜의 약물방출 촉진 효과를 기대할 수 있었다.

[0126] 오메가 리포솜의 방출 촉진 효과가 약물 담지 리포솜의 PC 종류에 영향 받는지 고찰하기 위하여, 케릭스에 사용된 HSPC 대신 DOPC(1,2,-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)를 주성분으로 하고 나머지 지질 조성은 동일하게 하여 *in house* 제조한 독소루비신 담지 리포솜(DOPC-DOX-liposome)과 도 3의 실험에서의 오메가 리포솜을 약물 담지 리포솜 PC:오메가 리포솜 PC 중량 기준 1:0.5 비율로 혼합시도 약물 방출 촉진 효과가 관찰되었다. 또한 담지한 약물이 독소루비신의 경우에 한정되어 오메가 리포솜의 효과가 나타나는지 고찰하기 위하여, 이리노테칸 담지 리포솜(오니바이드)과 상기 오메가 리포솜을 오니바이드 PC: 오메가 리포솜 PC 중량비 1:0.5로 혼합하여 실시예 2의 방법으로 pH 7.4에서 약물방출을 고찰한 결과 시간 의존적 약물 방출 촉진 효과가 관찰되었다. 오니바이드와 동일 지질 조성의 DSPC 리포솜을 제조하여 상기 오메가 리포솜을 약물 담지 리포솜 PC: 오메가 리포솜 PC 기준 1:0.4 및 1:0.6 중량비로 혼합하여 pH 5.0에서 방출 속도를 고찰한 경우에는 혼합비 의존적 약물 방출 촉진 효과가 관찰되었다(표 2).

표 2

약물 담지 리포솜 종류	혼합 PC 중량비	Drug released (%)					
		2 h	4 h	6 h	24 h	48 h	72 h
DOPC-DOX-Liposome		0.1 ± 0.6	3.2 ± 2.3	3.8 ± 0.7			
	1:0.5	6.2 ± 1.6	28.5 ± 0.9	34.8 ± 0.9			
Onivyde		NA*	NA*	NA*	37.9 ± 4.2	56.3 ± 7.0	68.9 ± 7.1
	1:0.5	NA*	NA*	NA*	56.5 ± 6.5	91.8 ± 0.9	
Irinotecan-DSPC-liposome		3.5 ± 0.9	3.4 ± 0.5		16.1 ± 6.5	23.8 ± 9.8	32.1 ± 2.3
	1:0.4	16.4 ± 1.4	30.1 ± 3.7		49.5 ± 3.6	55.1 ± 1.8	59.9 ± 7.6
	1:0.6	31.7 ± 3.9	52.1 ± 3.1	5	85.9 ± 4.1	83.4 ± 2.0	87.4 ± 5.5

[0128]

[0129] * 검출 한계치 이하

[0131] 한편 상기 오메가 리포솜을 4℃에서 보관하면서 실시예 3의 광산란법으로 평균입자경과 다분산도를 측정한 결과 5 개월까지도 변화를 보이지 않아 보관시 자체적으로 안정함을 확인하였다(도 4).

[0132]

[0133] **실험예 2. 오메가 리포솜 혼합에 의한 약물 담지 리포솜의 물리적 변화 평가 결과**

[0134] 실시예 1의 방법으로 실시예 3의 오메가 리포솜 1 및 2를 제조 후, 케릭스 또는 케릭스의 PC인 HSPC 9.58 mg/ml 으로 in house 제조한 리포솜과 혼합(케릭스 PC:오메가 리포솜 PC 중량 기준 1:0.5 비율)하고 실시예 3의 방법으로 약물 담지 리포솜(케릭스)의 크기 및 형태학적 변화를 관찰하였다.

[0135] 오메가 리포솜 1과 in house 제조 HSPC 리포솜을 혼합 후 NanoDSC 기기를 사용하여 엔탈피 변화를 측정한 결과, 오메가 리포솜 혼합에 의해 HSPC 리포솜의 상전이온도는 53.1도에서 51.6도로 감소되었고 상전이온도에서 나타나는 피크도 넓어졌으며 엔탈피도 감소되었다(도 5). 이는 인지질 이중층을 이루는 HSPC 분자 사이에 오메가 리포솜의 지질 성분이 끼어 들어가 HSPC 분자 사이의 인력이 감소된 결과이다. 즉, 두 리포솜의 혼합에 의해 막간 상호작용이 일어나 HSPC 리포솜의 막구조의 유연성이 증가되었음을 시사한다.

[0136] 실시예 3의 방법으로 초저온 투과형 전자현미경으로 케릭스, 오메가 리포솜, 케릭스+오메가 리포솜의 형태 및 크기를 관찰하였다. 스케일 바는 50 nm를 의미한다 (도 6). 케릭스 리포솜의 경우 대체로 구형 베지클로서 내부에는 양끝이 베지클 막에 부착된 막대형 약물결정이 관찰되었다. 오메가 리포솜1, 2는 약 20-60 nm의 크기로 광산란법으로 측정한 경우보다 작게 관찰되었는데 이는 광산란법으로 측정하는 경우 물분자의 리포솜 표면의 흡착이 사이즈를 크게 만드는 경향이 오메가 리포솜의 경우 크기 때문으로 추측된다. 오메가 리포솜 혼합 후 관찰한 케릭스 리포솜의 모양은 원반형으로 변환되면서 길쭉해지거나 독소루비신이 외부로 방출되어 내부가 비워진 베지클 형태로 되었다. 이는 오메가 리포솜이 약물 담지 리포솜과 막간 상호작용하여 약물 담지 리포솜의 막구조를 변화시키고 약물을 방출시키기 때문으로 추측된다. 한편 광산란법으로 시간에 따른 리포솜의 평균입자경 및 다분산도(polydispersity index; PDI) 변화를 측정한 결과, 방지 시간에 따라 케릭스의 평균 입자경(막대)과 다분산도(점, PDI)가 증가하였다(도 7). 이는 혼합 후 리포솜-리포솜 막간 상호작용에 의해 약물 담지 리포솜이 다소 커지고 크기의 불균일도가 증가하였음을 시사한다. 종합하면, 이들 데이터는 약물 담지 리포솜에 대한 오메가 리포솜의 약물 방출 유도 효과가 리포솜-리포솜 막 간 상호작용에 의해 일어남을 시사한다.

[0138] **실험예 3. 오메가 리포솜 혼합에 의한 리포솜 담지 약물의 약리활성 변화 평가**

[0139] 오메가 리포솜 혼합이 리포솜 담지 항암제 약물의 약리 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실시예 3의 오메가 리포솜1, 2와 케릭스를 케릭스 PC: 오메가 리포솜 PC 기준 1:0 내지 1:0.7 중량비로 각각 혼합하였다. 리포솜 혼합액을 실시예 1의 gentle mixing 또는 bath sonication 방법으로 혼합한 후 실시예 4의 방법으로 항암활성을 평가하였다.

[0140] 그 결과, 오메가 리포솜과 혼합한 케릭스는 혼합 방법에 관계없이 혼합하지 않은 케릭스보다 동일한 독소루비신 농도에서 현저히 높은 암세포 성장 억제 효과를 보였으며 그 효과는 혼합비 의존적이어서 오메가 리포솜 1의 1:0.2, 1:0.5 및 1:0.7 혼합에 의해 대장암에서 케릭스의 IC₅₀를 각각 5, 15 및 16배 이상 감소시켰다. 독소루비신 용액의 경우는 오메가 리포솜의 혼합이 암세포 성장 억제도에 영향을 미치지 않아 오메가 리포솜의 혼합 효과는 리포솜형 약물의 경우에만 특이적으로 나타났다. 대장암뿐 아니라 흑색종 세포에서도 오메가 리포솜2 혼합에 의한 항암 활성 7배 증진이 관찰되었다(도 8, 표3)

표 3

[0142]

Treatment	혼합 중량비 (케릭스 PC:오메가 리포솜 PC)	혼합 방법	대상 암세포	IC ₅₀ (nM)
독소루비신 수용액			HCT116	265
독소루비신 수용액+오메가 리포솜1			HCT116	770
케릭스			HCT116	>10,000
케릭스+오메가 리포솜1	1:0.2	초음파 분산	HCT116	2058

케릭스+오메가 리포솜1	1:0.5	초음파 분산	HCT116	670
	1:0.5	Gentle mixing		650
	1:0.7	Gentle mixing	HCT116	626
독소루비신 수용액			B16F10	191
케릭스			B16F10	1945
케릭스+오메가 리포솜2	1:0.5	Gentle mixing	B16F10	269

[0144] **실험예 4. 오메가 리포솜 혼합에 의한 리포솜 담지 약물의 세포내 유입도 및 핵내 도달도 평가**

[0145] 오메가 리포솜 혼합에 의한 리포솜 담지 독소루비신의 암세포 유입도를 확인하기 위하여 실시예 3의 오메가 리포솜 1과 케릭스를 케릭스 PC:오메가 리포솜PC 중량비 기준 1:0.5로 gentle mixing에 의해 혼합 후, 혼합액을 실시예 5의 방법으로 세포에 처리 후 세포내 유입 독소루비신 농도를 정량한 결과, 오메가 리포솜 혼합에 의해서 케릭스 담지 독소루비신의 세포내 유입도는 현저히 증가되었다(도 9A). 즉, 케릭스를 독소루비신으로서 20 $\mu\text{g/ml}$ 또는 60 $\mu\text{g/ml}$ 으로 투여 2 시간 후 세포내로 유입된 독소루비신량은 오메가 리포솜 혼합에 의해 약 30 및 35 배 증가되었다. 막이 견고한 리포솜을 암세포에 투여할 때 세포로의 약물 유입은 리포솜으로부터 약물이 방출된 후 약물 분자의 세포막을 지나는 투과에 의해 주로 일어나므로, 오메가 리포솜혼합에 의한 암세포로의 약물 유입도 증가는 세포 유입 전후에 독소루비신의 방출이 촉진되기 때문인 것으로 생각된다.

[0146] 독소루비신이 항암활성을 발휘하기 위해서는 세포내 핵까지 유입되어야 한다. 오메가 리포솜 혼합에 의한 리포솜 담지 독소루비신의 암세포 내 핵으로의 도달도를 평가하기 위하여 혼합액을 실시예 5의 방법으로 세포에 처리 후 세포질 분획 및 핵 분획에 유입된 독소루비신 농도를 정량한 결과, 오메가 리포솜 혼합에 의해서 케릭스 담지 독소루비신의 핵 유입도는 현저히 증가되었다(도 9B). 즉, 케릭스를 독소루비신으로서 20 $\mu\text{g/ml}$ 으로 투여 3 시간 후 세포핵까지 유입된 독소루비신량은 오메가 리포솜 혼합에 의해 약 192 배 증가되었다.

[0148] **실험예 5. 오메가 리포솜 혼합에 의한 약물 담지 리포솜의 약물동태학적 변화 평가**

[0149] 실시예 1의 방법으로 Di DHA-PC 9.58 mg, 콜레스테롤 0.8 mg, 알파 토크페롤 0.3 mg으로 오메가 리포솜을 제조 및 케릭스와 혼합(PC 중량비 기준 케릭스:오메가리포솜 = 1:0.5) 후 실시예 6의 방법으로 약물동태학적 평가를 시행하였다.

[0150] 세 그룹의 SD랫트에 독소루비신, 케릭스 및 케릭스+오메가 리포솜을 각각 정맥투여 후 얻은 평균 혈중농도-시간 곡선(도 10)과 그에 따른 약동학 파라미터를 표 4에 나타냈다. 도 10에 의하면, 독소루비신 용액 투여군은 혈중 농도가 매우 빠르게 감소하는 반면 케릭스 및 케릭스+오메가 리포솜을 투여한 군은 높은 혈중농도를 48 시간 이상 유지하였다. 그 결과 독소루비신의 혈중반감기는 독소루비신 투여군은 118 분인데 비해 케릭스 및 케릭스+오메가 리포솜 투여군은 각각 1038 분 및 759 분으로 유의성있게 증가하였으며 AUC 또한 독소루비신 투여군이 589 $\mu\text{gmin/mL}$ 로 낮은 값을 보이는 것에 비해 케릭스 및 케릭스+오메가 리포솜 투여군은 각각 333 배 및 150 배 증가하였다. 케릭스 및 케릭스+오메가 리포솜 투여군을 비교하면 오메가 리포솜 혼합액 투여군에서 AUC, 반감기 및 MRT가 감소하고 클리어런스가 증가하였으나 통계적으로 유의한 차이는 AUC에서만 얻어졌다. 24시간까지의 뇨 중 배설량 비교 결과 오메가 리포솜 혼합에 의해 케릭스 제제로부터 독소루비신 유리 증가로 인하여 뇨 중 독소루비신 배설량의 증가가 관찰되었다(표 4).

[0151] 결론적으로, 케릭스에 오메가 리포솜을 혼합하여 투여한 경우 오메가 리포솜에 의해 유도되는 케릭스 제제로부터의 독소루비신 방출에 의해 케릭스 단독 투여에 비해 AUC가 감소하나 독소루비신 용액 대비 여전히 유의성 있게 높은 AUC 와 긴 반감기를 보여 리포솜 제제로서의 약동학적 특징을 유지한다.

표 4

[0153]

Parameters	독소루비신 (n = 6)	Caelyx (n = 6)	Caelyx+omega liposome (n = 6)
Body weight (g) ^a	271 $\pm$ 3.76	260 $\pm$ 9.02	262 $\pm$ 4.83

Terminal half-life (min) ^b	118 ± 41.4	1038 ± 454	759 ± 124
AUC (μgmin/mL) ^c	589 ± 143	196616 ± 36618	88302 ± 12540
MRT (min) ^b	71.0 ± 43.1	1453 ± 680	1093 ± 159
CL (mL/min/kg) ^b	8.91 ± 2.06	0.0261 ± 0.00451	0.0575 ± 0.0074
Ae _{0-24 h} (% of dose) ^d	4.53 ± 2.36	0.0488 ± 0.0159	2.95 ± 1.87

[0154] a: 독소루비신 그룹이 케릭스 그룹과 유의성 있게 다르다(P<0.05). 케릭스 그룹과 케릭스+오메가 리포솜 그룹은 유의미한 차이를 보이지 않았다. b: 독소루비신 그룹이 케릭스 그룹 및 케릭스+오메가 리포솜 그룹과 유의성 있게 다르다(P<0.001, P<0.01). 케릭스 그룹과 케릭스+오메가 리포솜 그룹은 유의미한 차이를 보이지 않았다.

[0155] c: 독소루비신 그룹이 케릭스 그룹 및 케릭스+오메가 리포솜 그룹과 유의성 있게 다르다(P<0.001), 케릭스 그룹은 케릭스+오메가 리포솜 그룹과 유의성 있게 다르다(P<0.001).

[0156] d: 독소루비신 그룹이 케릭스 및 케릭스+오메가 리포솜 그룹과 유의성 있게 다르다(P<0.01). 케릭스 그룹은 케릭스+오메가 리포솜 그룹과 유의성 있게 다르다(P<0.05).

[0158] 실험예 6. 오메가 리포솜 혼합에 의한 항암 약물 담지 리포솜의 종양 동물 모델에서의 조직 분포 변화 평가

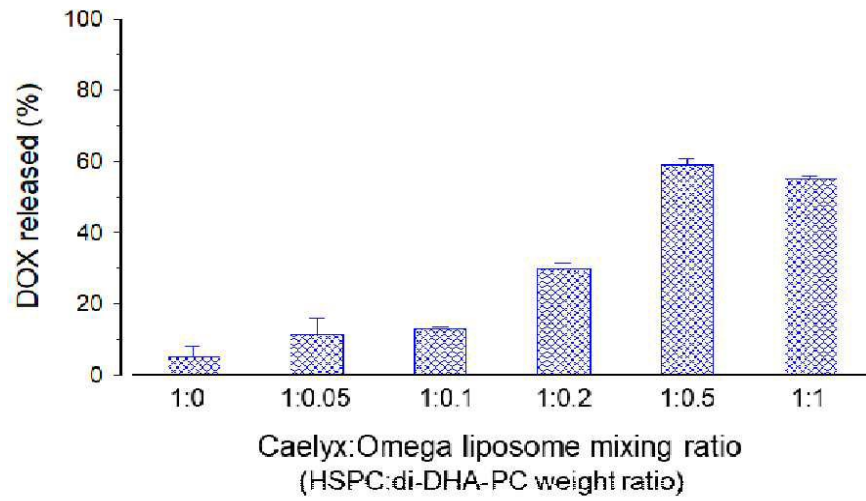
[0159] 실험예 5에서의 오메가 리포솜과 케릭스를 혼합 후 실시예 7의 방법으로 종양 동물 모델에서 약물 분포 평가를 시행하였다. 케릭스 및 케릭스+오메가 리포솜 혼합액을 각각 정맥투여 24, 48 시간 후에 각 마우스로부터 종양 조직 및 간, 폐, 심장, 비장, 신장을 적출한 결과, 간, 폐, 심장, 비장, 신장 중 독소루비신의 분포는 오메가 리포솜 혼합 여부와 관계없이 변화를 보이지 않았으며 종양조직에서의 약물 분포만이 오메가 리포솜의 혼합에 의해 유의성 있게 증가되었다(p<0.01, 24 시간 및 p<0.05, 48시간)(도 11). 즉, 오메가 리포솜의 혼합에 의해서 독소루비신의 주요 독성 부위인 심장에서의 약물 분포는 변화없이 타겟 부위인 종양 조직에서의 약물 축적을 증가시킬 수 있었다.

[0161] 실험예 7: 오메가 리포솜 혼합에 의한 항암 약물 담지 리포솜의 종양 동물 모델에서의 약리 활성 변화 평가

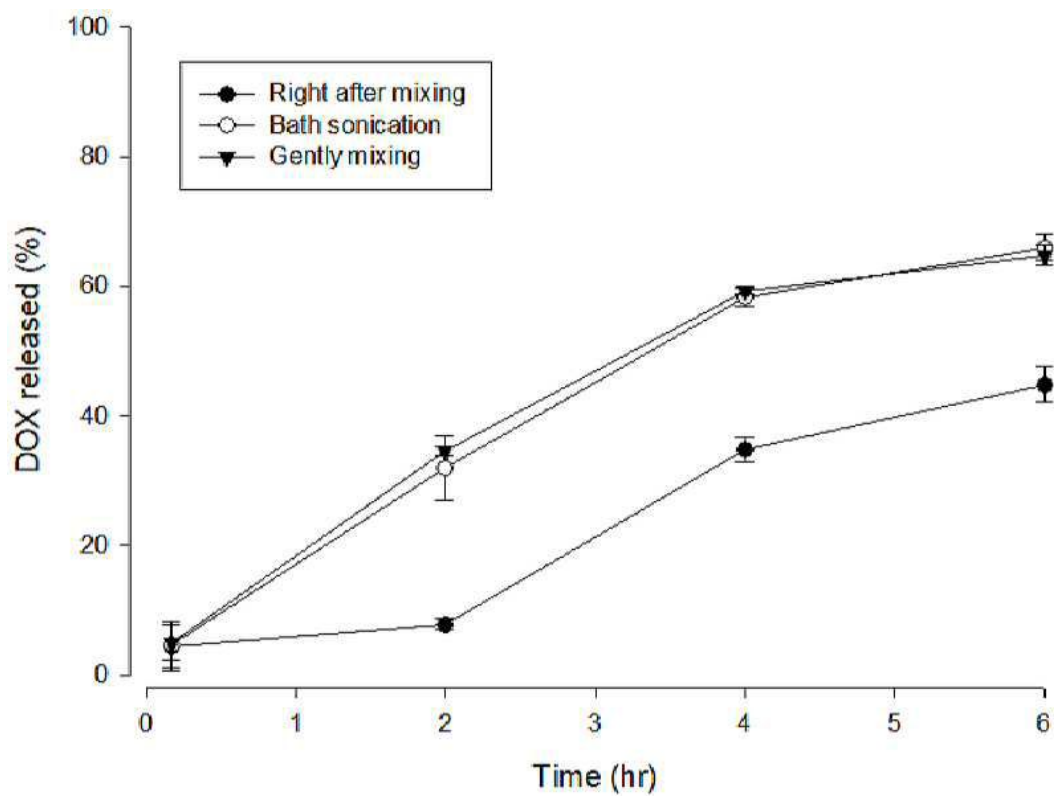
[0162] 실험예 5에서의 오메가 리포솜과 케릭스를 혼합 후 실시예 8의 방법으로 종양 동물 모델에서 약리 활성 평가를 시행하였다. 투여 시작 후 22일 간 종양의 부피 변화를 측정한 결과, 대조군(히스티딘/수크로오스 용액 투여 그룹)에 비해 케릭스 투여 그룹, 케릭스+오메가 리포솜 혼합액 투여 그룹의 종양 성장 속도가 현저히 감소되었으며(제22일 기준 p<0.01 및 p<0.0001), 케릭스 그룹과 케릭스+오메가 리포솜 혼합액 투여 그룹을 비교시도 종양의 성장 속도는 현저히 감소되었다(제22일 기준 p<0.0001). 오메가 리포솜 투여군과 대조군간의 종양의 성장 속도 차이는 없었다(p>0.05)(도 12A). 항암 치료시 독성의 지표로 흔히 평가되는 체중의 경우, 어떤 그룹에서도 체중의 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(도 12B). 제22일에 각 마우스로부터 적출한 종양의 무게를 비교한 결과, 대조군에 비해 케릭스 투여 그룹, 케릭스+오메가 리포솜 혼합액 투여 그룹의 종양 조직의 무게는 현저히 감소되었으며(각 p<0.001 및 p<0.0001), 케릭스 그룹과 케릭스/오메가 리포솜 투여 그룹을 비교시도 종양 무게는 현저히 감소되었다(p<0.01). 오메가 리포솜 투여군과 대조군간의 종양 무게의 차이는 없었다(p>0.05)(도 12C). 이상의 결과는 케릭스 투여 전 오메가 리포솜의 혼합이 항암 약물의 부작용은 증가시키지 않으면서 항암 활성을 현저히 개선시킴을 의미한다.

도면

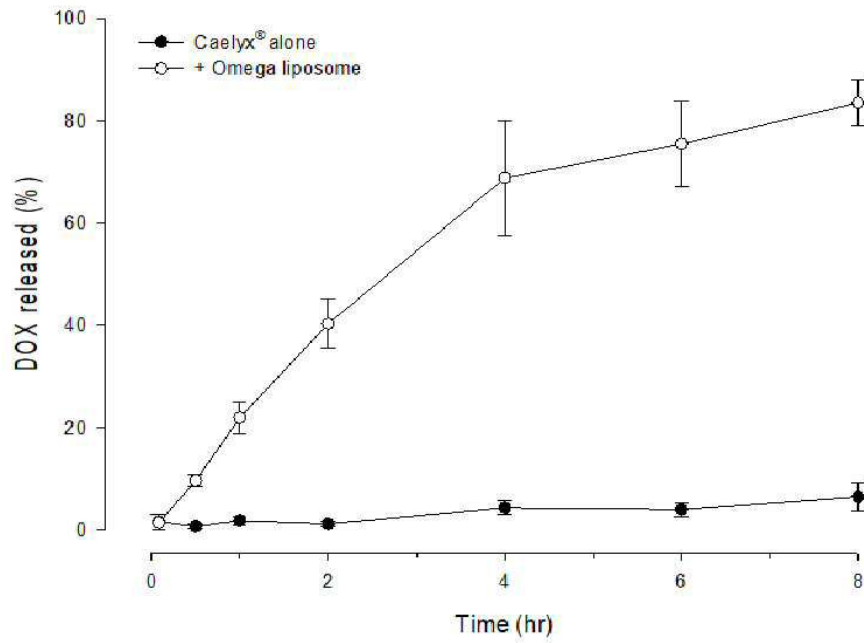
도면1



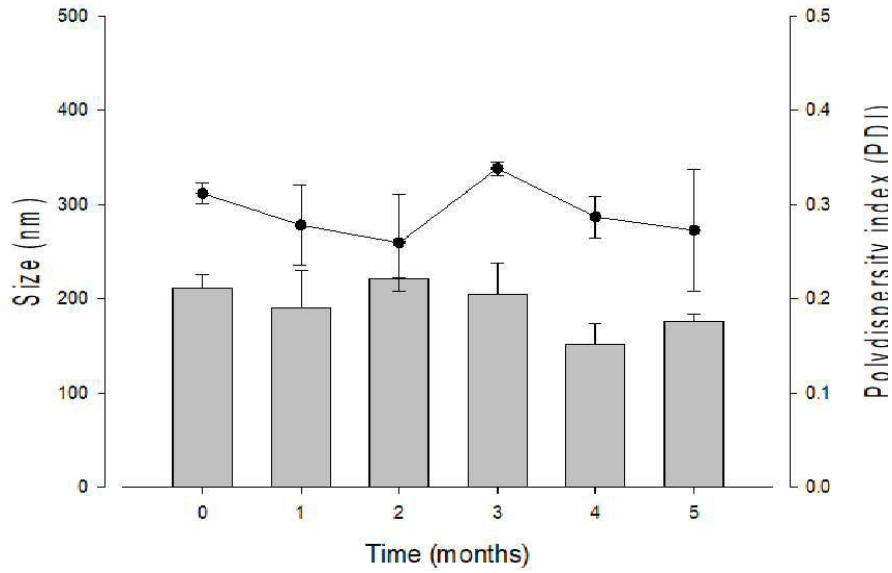
도면2



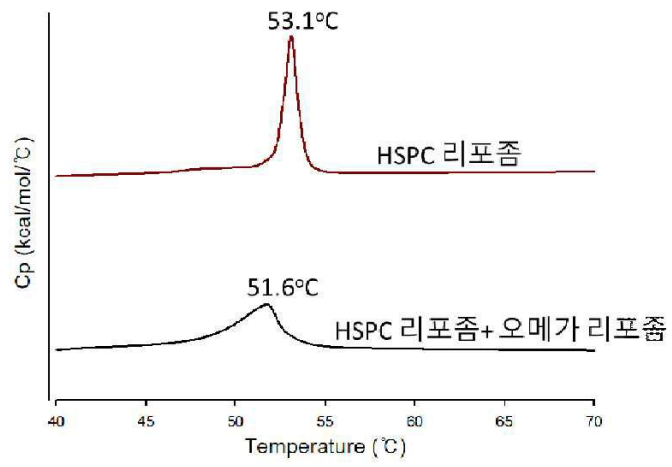
도면3



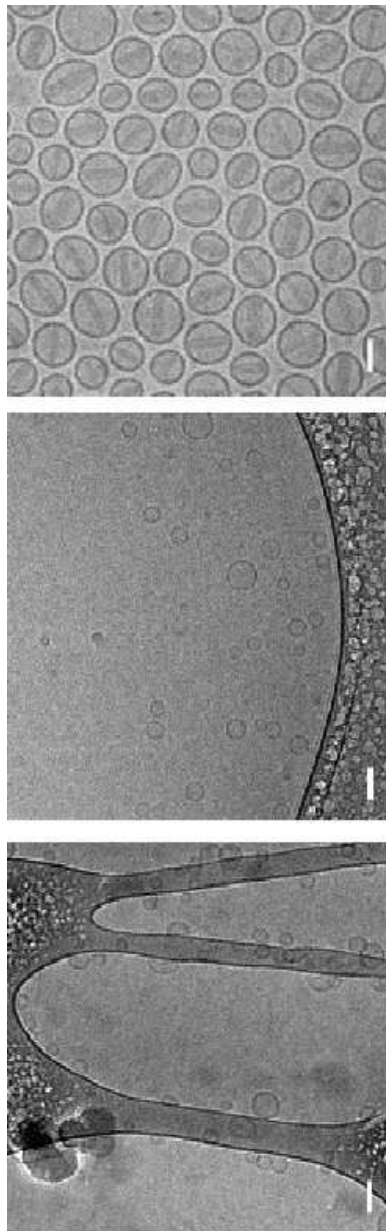
도면4



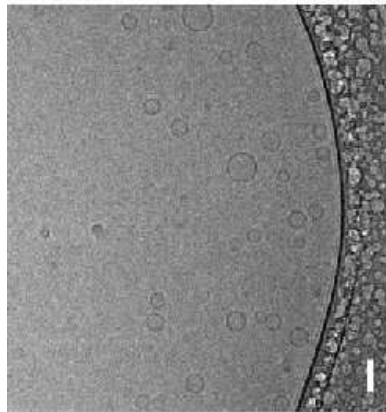
도면5



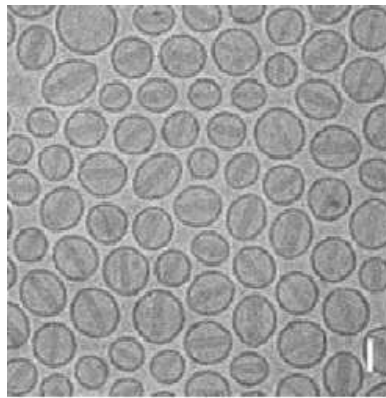
도면6



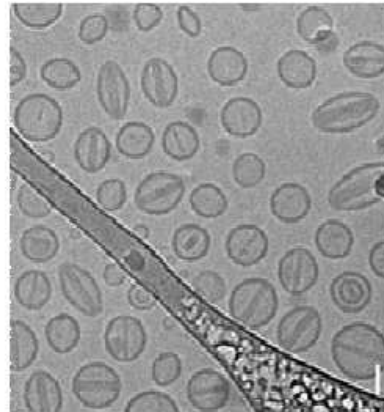
오메가 리포좀 1



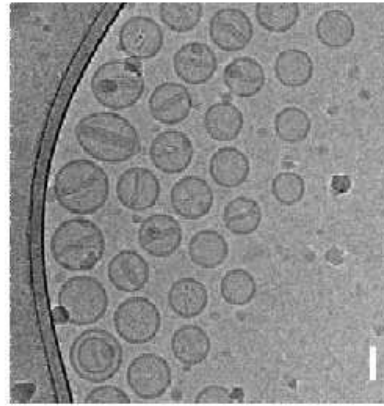
오메가 리포좀 2



케릭스

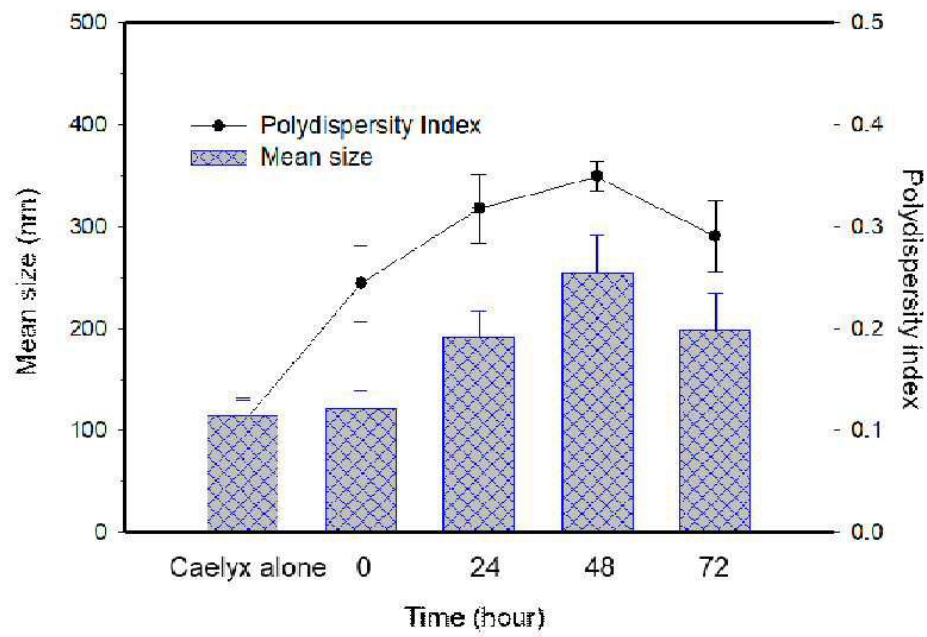


케릭스+오메가 리포좀 1

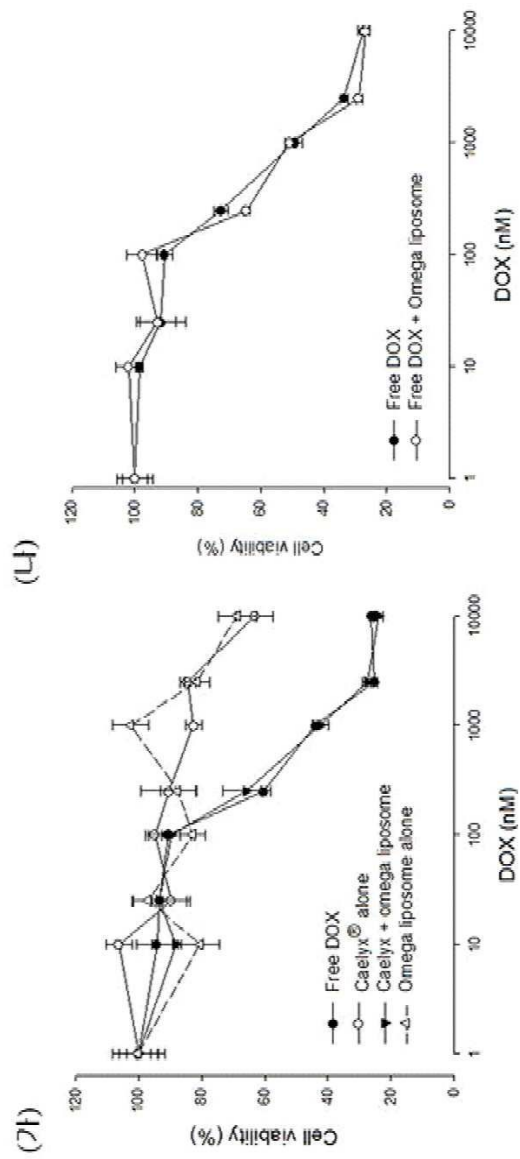


케릭스+오메가 리포좀 2

도면7

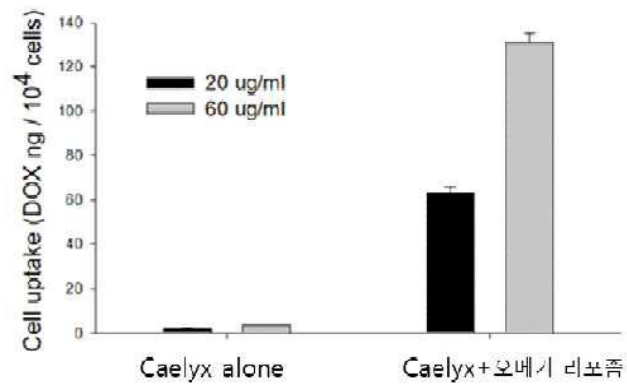


도면8

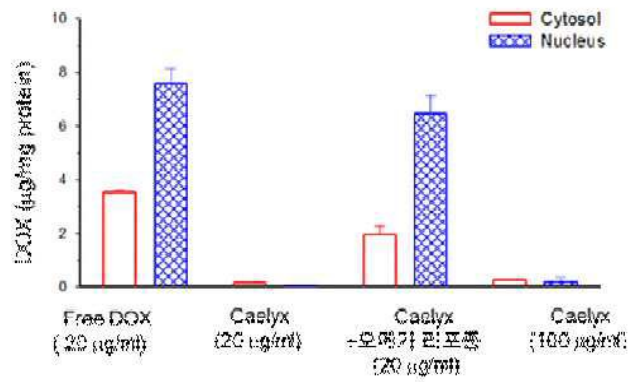


도면9

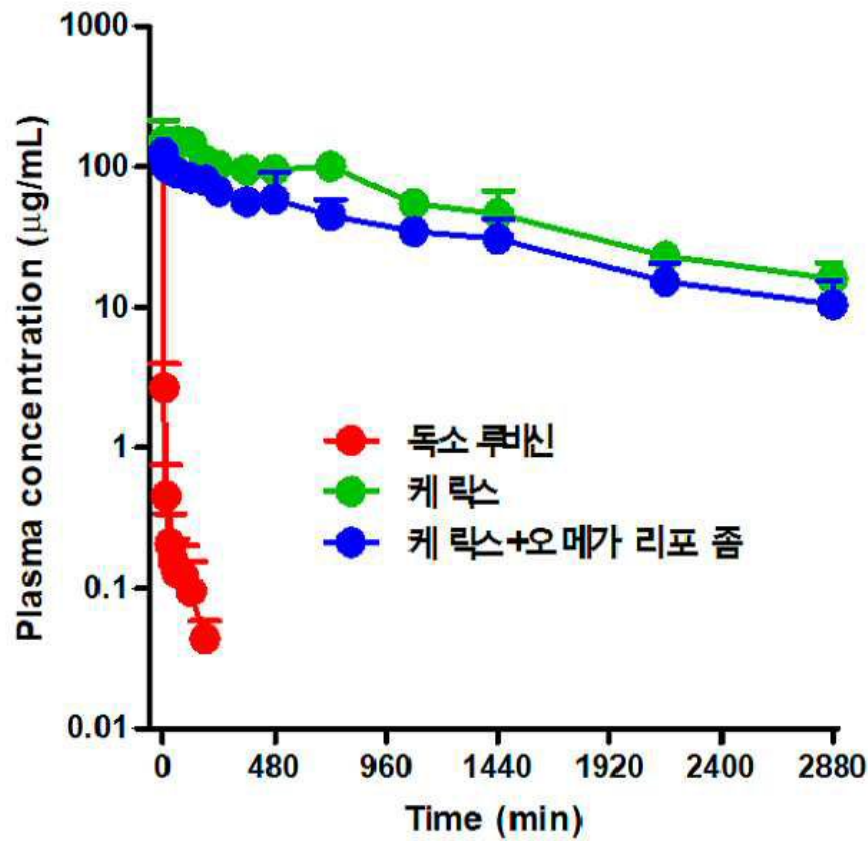
(A)



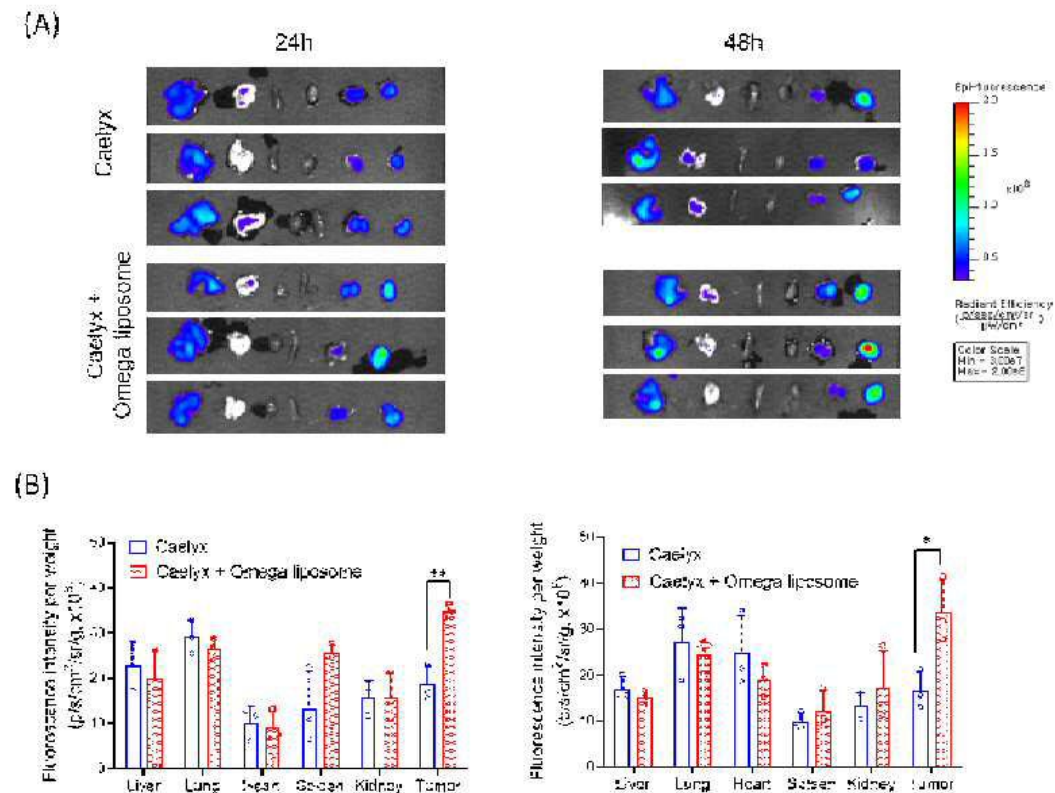
(B)



도면10



도면11



도면12

