



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0026832
(43) 공개일자 2017년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 8/14 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A61K 8/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0122068
(22) 출원일자 2015년08월28일
심사청구일자 2015년08월28일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
신관우
서울특별시 강남구 선릉로 221 (도곡동, 도곡렉슬 아파트) 402동 1201호
이길용
서울특별시 구로구 경인로 643 201동 204호 (신도림동, 동아2차아파트)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

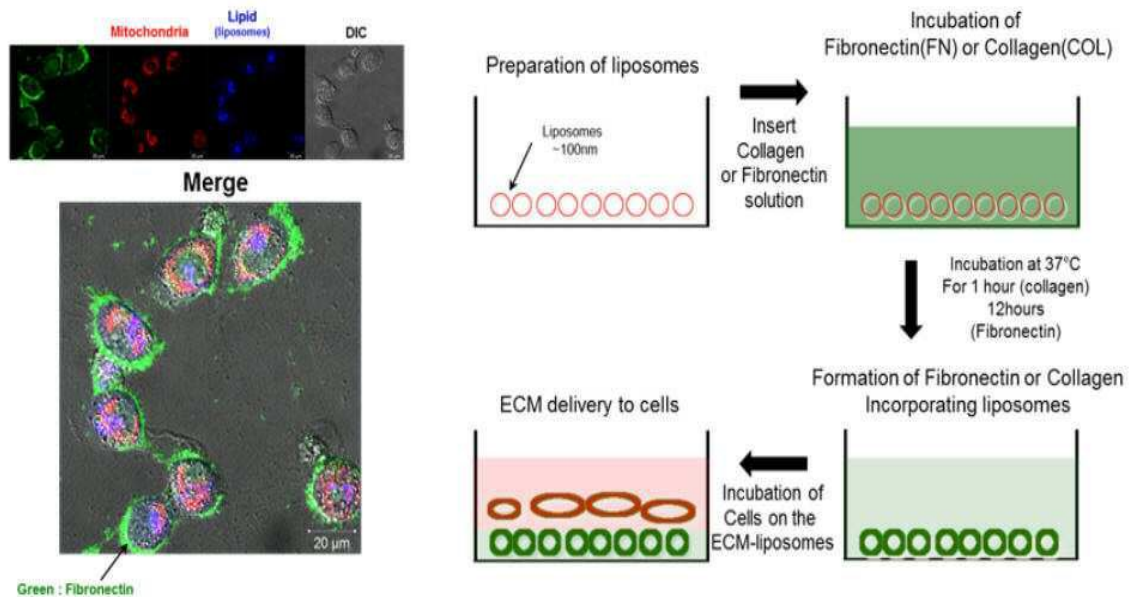
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 세포외기질 전달용 리포솜

(57) 요약

본 발명은 세포외기질 전달용 리포솜, 세포 성장 촉진 방법 및 상기 세포외기질 전달용 리포솜의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 상기 세포외기질 전달용 리포솜은 세포의 부착 및 성장을 촉진하며 이러한 이점을 이용하여 세포 또는 조직 재생에 응용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 5/0018 (2013.01)

(72) 발명자

안태규

서울특별시 강남구 청담동 삼익아파트 132-21

태기용

광주광역시 북구 첨단과기로 123 신소재공학과 (오룡동, 광주과학기술원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0017539

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 인공세포 구조 및 기능 모사 연구

기 여 율 50/100

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013K1A4A3055268

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원자력 선진기술 연구소

연구과제명 서강-하버드 질병 바이오펜 연구 센터

기 여 율 25/100

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-031932

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외우수연구기관유치사업

연구과제명 냉중성자 표면 산란을 이용한 바이오/나노 계면 현상 연구

기 여 율 25/100

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2014.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 음이온성 지질 및 중성 지질이 자기조립(self-assembly)된 인지질 막; 및 (b) 상기 음이온성 지질에 이온 결합으로 결합되어 표면에 위치하는 세포외기질을 포함하는 세포외기질 전달용 리포솜.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 음이온성 지질은 DOPS(Dioleoyl phosphatidylserine), DMPG(dimyristoyl-phosphatidyl glycerol), DPPG(dipalmitoyl-phosphatidyl glycerol), DPTA(diethylenetriamine pentaacetic acid), DPTGA(1,4-dipalmitoyl-tartarate-2,3-diglutaric acid), DSTSA(1,4-disteroyl-tartarate-2,3-disuccinic acid), CHHDA(2-carboxyheptadecanoyl heptadecylamide), DMPS(Dimyristoylphosphatidylserin), DPPS(Dipalmitoylphosphatidylserin), POPS(Palmitoyl-oleoylphosphatidylserin), DOPG(Dioleoylphosphatidylglycerol), POPG(Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol), DMPA(Dimyristoylphosphatidic acid), DPPA(Dipalmitoylphosphatidic acid), DOPA(Dioleoylphosphatidic acid), POPA(Palmitoyl-oleoylphosphatidic acid), CetylP(Cetyl phosphate) 및 CHEMS(cholesterol hemisuccinate) 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 음이온성 지질인 것을 특징으로 하는 세포외기질 전달용 리포솜.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 중성 지질은 DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DOPE(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), SM(N-palmitoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine), DLPE(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DiPPE(,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 콜레스테롤(cholesterol), 포스파티딜 콜린(phosphatidyl choline), 포스파티딜 에탄올아민(phosphatidyl ethanolamine), 테트라에테르 리피드(tetraether lipid), 세라마이드(ceramide), 스펅고리피드(sphigolipid), 디아크릴 글리세롤(diacryl glycerol) 및 글리세리드(glyceride)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 중성 지질인 것을 특징으로 하는 세포외기질 전달용 리포솜.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 리포솜은 1-30 몰% 음이온성 지질을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포외기질 전달용 리포솜.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 세포외기질은 파이브로넥틴(fibronectin), 콜라겐(collagen), 라미닌(laminin), 엘라스틴(elastin), 인테그린(integrin) 및 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질인 것을 특징으로 하는 세포외기질 전달용 리포솜.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 리포솜은 DOPC:POPE:DOPS:콜레스테롤로 구성된 리포솜인 것을 특징으로 하는 세포외기질 전달용 리포솜.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 리포솜은 10-500 nm 크기인 것을 특징으로 하는 세포외기질 전달용 리포솜.

청구항 8

상기 청구항 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 세포외기질 전달용 리포솜의 약제학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 세포 또는 조직 재생용 약제학적 조성물.

청구항 9

상기 청구항 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 세포외기질 전달용 리포솜의 화장품학적 유효량 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 피부 재생용 화장품학적 조성물.

청구항 10

상기 청구항 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 세포외기질 전달용 리포솜을 동물 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 성장 촉진 방법.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 세포외기질 전달용 리포솜의 제조방법:

- (a) 유기 용매에 음이온성 지질 및 중성 지질을 용해하여 음이온성 리포솜을 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 음이온성 리포솜의 표면에 세포외기질을 결합시키는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포외기질 전달용 리포솜에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 생물학에서 세포외기질(extracellular matrix)은 주로 동물의 구조적 지지 등을 담당하는 조직이다. 세포외기질은 동물의 결합 조직에 속한다. 세포외기질은 세포 사이의 기질과 기저막으로 구성된다(Kumar, Abbas, Fausto; Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease; Elsevier; 7th ed). 세포 사이의 기질은 여러 세포들 사이의 공간을 채우는 기질이다. 다당류로 이루어진 겔과 단백질 섬유가 세포 사이에 채워져 있어 세포외기질의 완충 작용을 돕는다(Alberts B, Bray D, Hopin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004). <Tissues and Cancer>). 기저막은 얇은 종이처럼 구성되어 있으며, 그 위에 상피조직이 위치한다.

[0004] 세포외기질의 구성 요소는 해당 세포에 의해 생성되어 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 세포외기질로 분비된다. 새로 생성된 세포외기질은 분비되어 기존의 세포외기질에 통합된다. 세포외기질은 섬유성 단백질 및 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans)의 인터라킹 메쉬로 구성된다. 세포외기질은 헤파란황산, 콘드로이틴 황산 및 케라탄황산과 같은 플테오글리칸, 히알루론산과 같은 비-프로테오글리칸 다당류, 콜라겐 및 엘라스틴과

같은 섬유, 피브로넥틴 및 라미닌으로 구성된다.

[0005] 리포솜은 최소 하나의 지질2중층을 갖는 구형 소포이다. 리포솜은 영양소 및 의약품과 같은 전달하는데 사용되고 있다. 리포솜은 생체막과 유사한 구조를 가짐으로서 생체 친화적이고, 폐쇄이중층 구조로 내부에 친수성 약물을 봉입시킬 수 있는 장점이 있어 친수성 약물을 보다 효과적으로 송달하기 위한 약물수송체로서 폭넓게 활용되고 있다(Xiong, X. B. et al. Pharm. Res. 2005, 22, 933. 및 Gabizon, A. A. et al. Pharm. Res. 1993, 10, 703.). 그러나 리포솜은 체내 투여 후 간이나 비장에서 세망내피계에 의하여 쉽게 흡수될 뿐만 아니라 혈중에서 단백질의 흡착과 리포솜의 응집 등으로 인한 구조의 불안정성이 문제가 되어 결과적으로 봉입약물이 누출됨으로서 정상세포에 부작용을 나타내는 단점이 있다. 따라서 리포솜 구조의 안정화를 위해 리포솜 표면을 다양한 고분자로 수식하는 연구가 활발히 전개되고 있다(Seo, D. H. et al. Polymer(Korea) 2005, 29, 277. 및 Park, Y. J. et al. Polymer(Korea) 2004, 28, 502.)

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 세포에 세포외기질을 전달하여 세포의 부착 및 성장을 촉진할 수 있는 리포솜을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 음이온성 지질을 포함하는 리포솜의 표면에 세포외기질을 결합시키고 이를 세포에 전달하여 세포의 부착 및 성장을 촉진시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 세포외기질 전달용 리포솜을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 세포 성장 촉진 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 음이온성 지질 및 중성 지질이 자기조립(self-assembly)된 인지질 막; 및 (b) 상기 음이온성 지질에 이온결합으로 결합되어 표면에 위치하는 세포외기질을 포함하는 세포외기질 전달용 리포솜을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 세포에 세포외기질을 전달하여 세포의 부착 및 성장을 촉진할 수 있는 리포솜을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 음이온성 지질을 포함하는 리포솜의 표면에 세포외기질을 결합시키고 이를 세포에 전달하여 세포의 부착 및 성장을 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0019] 본 발명의 주요한 특징 중 하나는 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜을 구성하는 인지질 막은 음이온성 지질을 포함하는 것이다.

[0020] 본 명세서에서 용어 “음이온성 지질”은 pH 4.0 내지 pH 8.0의 범위 내에서 최소 하나의 음전하를 갖는 어떠한 양친매성 지질을 의미한다. 상기 음이온성 지질은 당업계의 통상의 기술자에게 공지된 어떠한 음이온성 지질을 모두 포함한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 음이온성 지질은 DOPS(Dioleoyl phosphatidylserine), DMPG(dimyristoyl-phosphatidyl glycerol), DPPG(dipalmitoyl-phosphatidyl glycerol), DPTA(diethylenetriamine pentaacetic

acid), DPTGA(1,4-dipalmitoyl-tartarate-2,3-diglutaric acid), DSTSA(1,4-disteroyl-tartarate-2,3-disuccinic acid), CHHDA(2-carboxyheptadecanoyl heptadecylamide), DMPS(Dimyristoylphosphatidylserin), DPPS(Dipalmitoylphosphatidylserin), POPS(Palmitoyl-oleoylphosphatidylserin), DOPG(Dioleoylphosphatidylglycerol), POPG(Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol), DMPA(Dimyristoylphosphatidic acid), DPPA(Dipalmitoylphosphatidic acid), DOPA(Dioleoylphosphatidic acid), POPA(Palmitoyl-oleoylphosphatidic acid), CetylP(Cetyl phosphate) 및 CHEMS(cholesterol hemisuccinate) 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 음이온성 지질이다.

[0022] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 음이온성 지질은 DOPS, DMPG, DPPG, DPTA, DPTGA, DSTSA 및 CHHDA로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 음이온성 지질이다.

[0023] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 음이온성 지질은 DOPS이다.

[0024] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜의 인지질 막을 구성하는 음이온성 지질은 당업계 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 어떠한 음이온성 지질도 포함한다.

[0025]

[0026] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜의 인지질 막을 이루는 지질은 음이온성 지질 외에 중성 지질도 포함한다.

[0027] 본 명세서에서 용어 “중성 지질”은 pH 4.0 내지 pH 8.0의 범위 내에서 전하되지 않거나(uncharged) 중성 양성 이온성(zwitterion) 형태를 갖는 지질을 의미한다. 상기 중성 지질은 당업계의 통상의 기술자에게 공지된 어떠한 중성 지질을 모두 포함한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 중성 지질은 DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPE(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 콜레스테롤(cholesterol), DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DOPE(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), SM(N-palmitoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine), DLPE(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DiPPE(,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 포스파티딜 콜린(phosphatidyl choline), 포스파티딜 에탄올아민(phosphatidyl ethanolamine), 테트라에테르 리피드(tetraether lipid), 세라마이드(ceramide), 스팅고리피드(sphigolipid), 디아크릴 글리세롤(diacryl glycerol) 및 글리세리드(glyceride)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 중성 지질이다.

[0029] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 중성 지질은 DOPC, POPE, 콜레스테롤, DSPC, DPPC, POPC 및 DOPE로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 중성 지질이다.

[0030] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 중성 지질은 DOPC, POPE 및 콜레스테롤이다.

[0031] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜의 인지질 막을 구성하는 중성 지질은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 어떠한 중성 지질도 포함한다.

[0032] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜은 음이온성 지질 및 중성 지질로 구성된 인지질 막을 갖는다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 1-30 몰% 음이온성 지질을 포함한다.

[0034] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 1-25 몰%, 1-20 몰%, 5-25 몰% 또는 5-20 몰% 음이온성 지질을 포함한다.

[0035] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 10-20 몰% 음이온성 지질을 포함한다.

[0037] 본 발명의 주요한 특징 중 다른 하나는 세포외기질 전달용 리포솜의 표면에 상기 세포외기질을 구성하는 음이온성 지질과 이온결합으로 세포외기질이 결합되고, 세포외기질의 중합반응이 자기조립을 유도하여 추가적인 단백질을 표면에 유도한다. 상기 음이온성 지질로 단량체를 유도하고 유도된 단량체들이 자기조립 즉, 중합반응을 통하여 다량체로 유도된다. 예컨대, 콜라겐은 단량체로 유도되어 중합반응에 의해 다량체를 형성하고, 피브로넥틴의 경우는 단분자로 유도된 뒤 단분자의 구조변화가 생기고 폴딩 구조가 언폴딩되어 언폴딩된 피브로넥틴끼리 연결되어 다량체를 구성한다.

- [0039] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외기질은 파이브로넥틴(fibronectin), 콜라겐(collagen), 라미닌(laminin), 엘라스틴(elastin), 인테그린(integrin) 및 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질이다.
- [0040] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포외기질은 파이브로넥틴, 콜라겐, 라미닌 및 엘라스틴(elastin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질이다.
- [0041] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 세포외기질은 파이브로넥틴 및 콜라겐으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질이다.
- [0042] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜은 1-30 몰% 음이온성 지질, 70-99 몰% 중성 지질 및 세포외기질을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외기질 전달용 리포솜의 인지질 막은 DOPC, POPE, DOPS 및 콜레스테롤로 구성된다.
- [0044] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 DOPS를 1-30 몰% 포함한다.
- [0045] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 DOPC, POPE, DOPS 및 콜레스테롤을 30-70 몰%, 1-30 몰%, 1-30 몰% 및 10-40 몰%로 포함한다.
- [0046] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜은 나노크기의 리포솜이다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외기질 전달용 리포솜은 10-500 nm 크기이다.
- [0048] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포외기질 전달용 리포솜은 10-400nm, 10-300 nm, 10-200 nm 또는 50-150 nm 크기이다.
- [0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포외기질 전달용 리포솜의 약제학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 세포 또는 조직 재생용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜의 약제학적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 세포 또는 조직 재생용 약제학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 세포외기질 전달용 리포솜이 세포 또는 조직 재생 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 화합물 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0052] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0053] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0054] 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg(체중)이다.
- [0055] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 경피 패치, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0057] 본 발명의 일 구현예에 의하면, 본 발명의 약제학적 조성물은 피부외용 제형을 갖는다. 피부외용 제형은 특별히 한정되지 않으며 바람직하게는 파우더, 젤, 연고, 크림, 액체 또는 에어로졸 제형이다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포외기질 전달용 리포솜의 화장품학적 유효량 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 피부 재생용 화장품학적 조성물을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜의 화장품학적 유효량 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 세포 또는 조직 재생용 화장품학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "화장품학적 유효량"은 상술한 세포외기질 전달용 리포솜이 피부 재생 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0061] 본 발명의 화장품학적 조성물은 유효성분 화합물 이외에 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0062] 본 발명의 화장품학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0066] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 화장품학적 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분과 담체 성분 이외에, 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포외기질 전달용 리포솜을 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 성장 촉진 방법을 제공한다.
- [0071] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외기질 전달용 리포솜을 동물 세포와 공동 배양하여 상기 세포의 성장을 촉진한다.
- [0072] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜은 대조군과 비교하여 세포의 흡착 및 성장을 촉진킨다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포외기질 전달용 리포솜의 제조방법을

제공한다:

- [0075] (a) 유기 용매에 음이온성 지질 및 중성 지질을 용해하여 음이온성 리포솜을 제조하는 단계; 및
- [0076] (b) 상기 음이온성 리포솜의 표면에 세포외기질을 결합시키는 단계.

[0078] 본 발명의 방법은 상기 세포외기질 전달용 리포솜의 제조방법으로, 이 둘 사이에 공통된 인지질 막 및 세포외기질의 구성 및 상기 인지질 막의 조성과 같은 내용은본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

발명의 효과

[0080] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- [0081] (a) 본 발명은 세포외기질 전달용 리포솜, 세포 성장 촉진 방법 및 상기 세포외기질 전달용 리포솜의 제조방법을 제공한다.
- [0082] (b) 본 발명은 리포솜을 통해 세포외기질을 세포로 전달하여 세포의 부착 및 성장을 촉진시키는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0084] 도 1은 세포외기질이 유도된 리포솜의 크기를 나타낸다.
- 도 2는 리포솜에 세포외기질을 유도하여 HeLa 세포에 전달되는 결과를 나타낸다.
- 도 3는 세포외기질이 유도된 리포솜을 처리한 HeLa 세포 및 HEK 293 세포의 세포성장의 형광 이미지를 대조군과 비교하여 나타낸다.
- 도 4은 세포외기질이 유도된 리포솜을 처리한 HeLa 세포 및 HEK 293 세포의 흡착률을 나타낸다.
- 도 5는 세포외기질이 유도된 리포솜을 처리한 HEK 293 세포의 성장과정을 36시간 관찰한 결과를 나타낸다.
- 도 6는 세포외기질이 유도된 리포솜을 처리한 HeLa 세포의 성장과정을 36시간 관찰한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

리포솜에 세포외기질(콜라겐 또는 피브로넥틴)을 포함하는 리포솜의 제작 및 세포외기질 전달 확인

음전하를 이용한 세포외기질 유도

[0090] 세포막을 구성하는 지질은 아반티 리피드(Avanti lipid)에서 구입하였고, 세포외기질인 콜라겐은 시그마-알드리치(sigma-aldrich)에서 구입하였으며, 피브로넥틴은 사이토스켈레톤(cytoskeleton, inc)에서 구입하였다.

[0091] 첫 번째로 세포막을 자기조립(self-assembly)을 통해 조립하기 위해, 음전하를 외부에 형성시키기위해 음전하를 띠는 DOPS(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine)를 포함하는 다음과 같은 지질 구성을 선택하였다. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine(DOPC) : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(POPE) : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine(DOPS) : 콜레스테롤(cholesterol; chol) = 4:1:1:2 (mol). 위와 같은 비율로 클로로포름(CHCl_3)에 1 mg lipid/ml로 반응시킨 뒤 유리에 코팅 뒤 질소로 유기용매를 제거 후 잔여 유기용매를 완전히 제거 하기 진공상태에서 1시간 정도

두었다. 이 후 0.28 M 수크로즈, 2 mM MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid), pH 4.2(콜라겐 유도시) 또는 0.28 M 수크로즈, 2 mM Tris-HCl, pH 7.4(피브로넥틴 유도시) 용액과 반응 시킨다. 합성된 리포솜에는 DOPS가 포함되어 있어 음전하를 포함하고 있으며, 이를 이용해 콜라겐 또는 피브로넥틴과의 이온결합을 유도하였다. 구체적으로는 1 mg/ml 콜라겐 용액을 80℃에서 변성(denaturation)시키거나 산성 용액인 0.05 M HCl에 녹여 콜라겐을 단분자 혹은, 크기가 작은 소섬유(fibril) 형태로 제조하여 전처리 한다. 콜라겐 유도시 pH가 높으면 콜라겐이 리포솜에 유도되기전에 자기조립을 하게되어, 상대적으로 낮은 pH에서 반응을 진행하였다. 전처리 방법에 따라 콜라겐의 리포솜 표면에서의 두께가 달라진다. 전처리 한 콜라겐을 베지클(vesicle; bare 리포솜) 용액에 떨어뜨려 30분 동안 37℃에 반응 시킨 뒤 0.28 M 글루코즈 0.01 mM KOH를 이용하여 pH를 7.4로 맞춰주었다. 피브로넥틴은 PBS 완충액을 통해 1 mg/ml로 녹인 후 24시간 동안 37℃에 반응시켰다. 반응시 99% 습도를 유지하여 리포솜 외부와 내부의 삼투압이 발생하지 않도록 주의하였다. 리포솜의 형광태깅으로는 N-Rh-DOPE[1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)]를 이용하였고, 콜라겐은 FITC(Fluorescein Isothiocyanate) 형광 태깅, 피브로넥틴은 HiLyte Fluor 488(AnaSpec)를 이용하였다.

[0093] 리포솜의 사이즈 측정

[0094] 제작된 리포솜을 크기를 측정하기 위해 Dynamic light scattering(DLS) 장치를 이용하여 크기를 측정하였다. 리포솜 합성시에 폴리카보네이트(polycarbonate) 필터를 이용하여, 크기를 100 nm로 조절하였고, 조절된 리포솜에 세포외기질을 유도한 후 DLS를 통해 크기를 측정하였다. 세포외기질이 유도된 뒤에는 크기가 약 10 nm정도 증가 된 것을 확인하였다(도 1).

[0096] 제작된 리포솜을 통해 실제 세포에 전달

[0097] 제작된 리포솜 및 세포외기질에 형광 태깅하여, 실제세포와 같이 배양하여, 세포외기질 전달 과정을 확인하였다(도 2). 배양조건은 37℃, 이산화탄소 5%, 습도 99%, 배지조성은 DMEM, 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin 조건에서 72시간동안 배양하였다. 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 리피드는 세포안쪽으로 이동하고, 세포외기질은 세포외부에 형성된다. 파이브로넥틴을 흡착한 리포솜과 HeLa 세포를 동시에 배양하게 되면, 세포가 파이브로넥틴이 흡착된 리포솜과 반응하여, 외부의 세포외기질인 파이브로넥틴을 세포자신의 세포외기질로 활용하고, 남은 lipid는 세포내부로 이동되는 것을 확인하였다.

[0099] 세포성장 과정 확인

[0100] 세포외기질이 유도된 리포솜의 HeLa 세포 및 HEK 293 세포의 성장에 미치는 영향

[0101] 제작된 세포외기질이 세포 흡착과 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, 본 발명에서 제작된 리포솜과 대조군을 형성하여 비교 분석 하였다. 대조군으로는 음성대조군(a), 0.28 M 수크로즈 0.2 mM Tris-HCl pH 7.4(b), 순수 리포솜(c), 피브로넥틴 코팅(d), 콜라겐 코팅(e), FN-리포솜(f), COL-리포솜(g)에 HeLa 세포 또는 HEK-293 세포를 3시간 동안 배양한 후 세포흡착여부를 확인하였으며, 6, 20 및 36시간째에 세포 성장상태를 확인하였다. 도 3 내지 도 6의 결과를 통해 세포외기질을 세포막 위에 유도한 경우가 다른 경우에 비해 세포 흡착과 성장에 도움을 주는 것으로 확인되었다. 세포의 흡착여부는 10^5 개의 세포 씨드(seed)를 각각의 세포 배양 플라스크 4시간 동안 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), 37℃에서 배양한 뒤 흡착되지 않은 세포를 PBS로 제거하여 흡착된 세포를 카운팅하여, 기존 10^5 개의 세포가 얼마나 남아 있는지 확인하여, 흡착되는 세포의 확률을 계산하였다. 각각 5번의 실험을 통해 표준편차를 계산하였다.

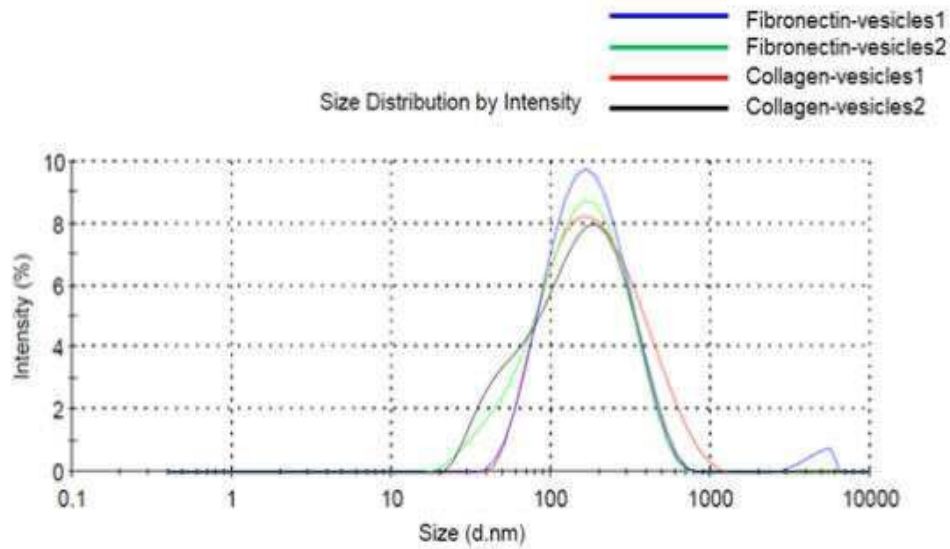
[0102] 리포솜 외부에 존재하는 세포외 단백질은 베지클과 세포와의 융합으로 기존 베지클을 형성하고 있던 지질은 세포 내부로 들어가며,(도 2의 blue) 세포외기질은 세포 외부에 전달되는 것을 도 2을 통해 확인하였다.

[0104] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.

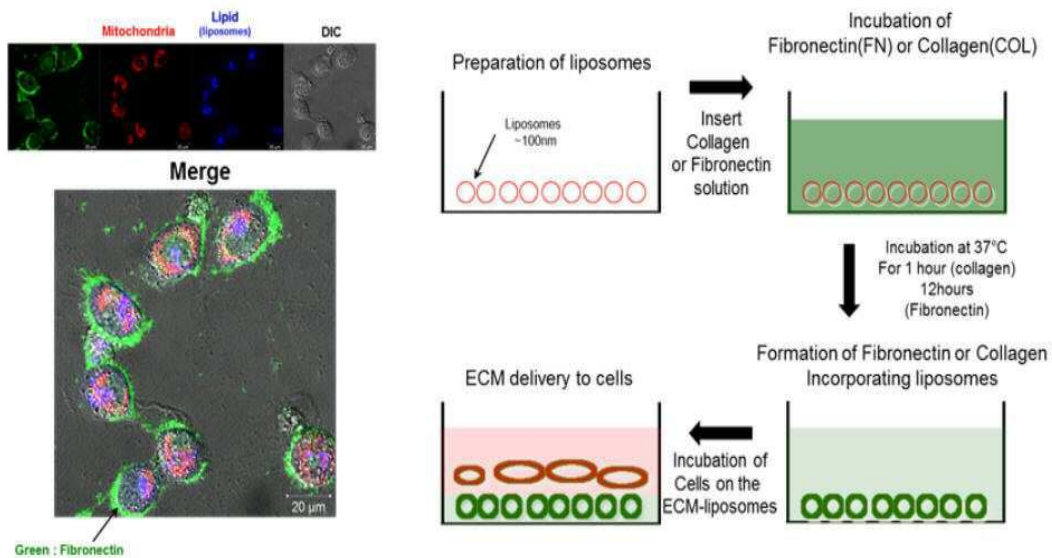
따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

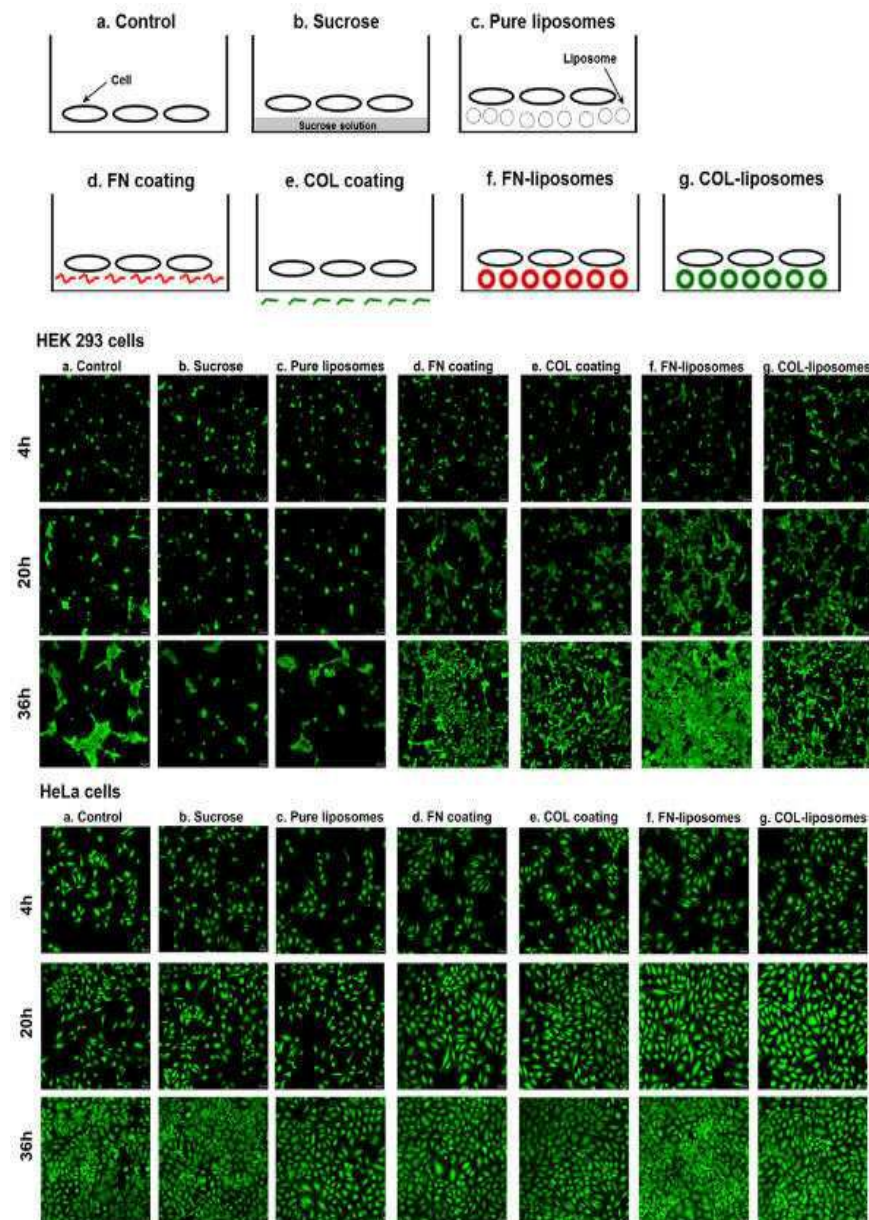
도면1



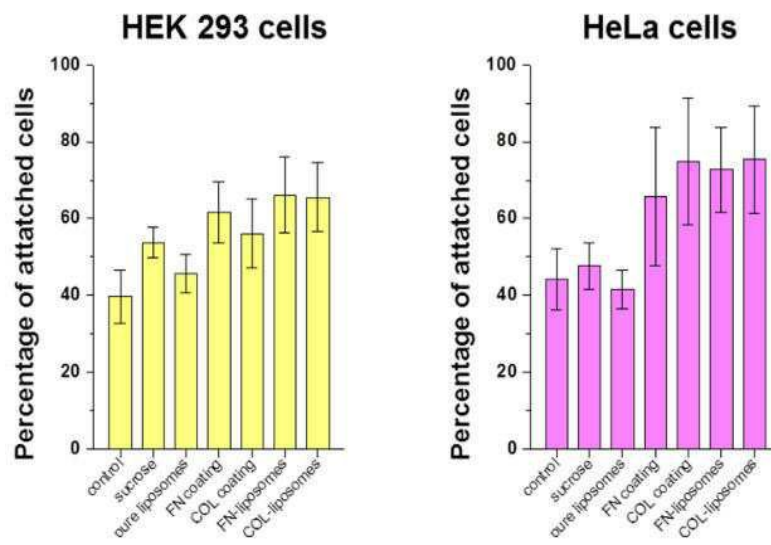
도면2



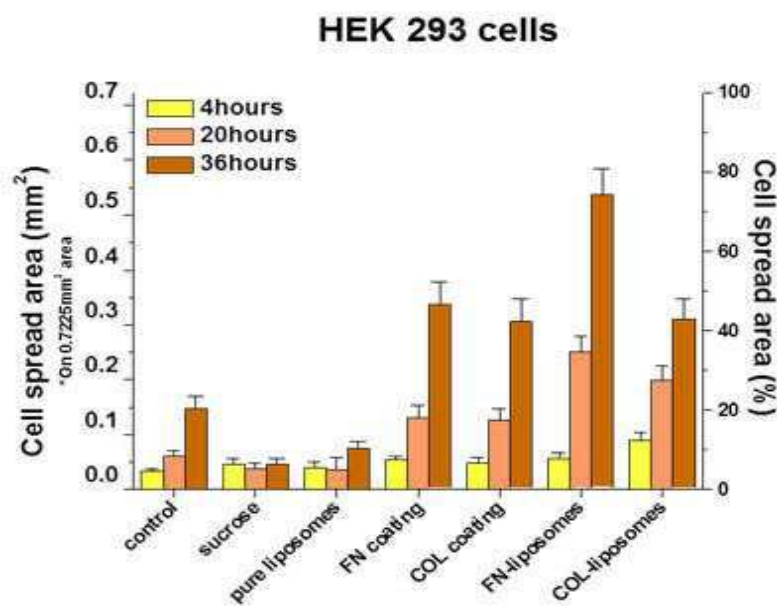
도면3



도면4



도면5



도면6

