(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 1 월 9 일 (09.01.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/007517 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 47/30* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/005860

(22) 국제출원일: 2013 년 7 월 2 일 (02.07.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0072942 2012 년 7 월 4 일 (04.07.2012) KR

(71) 출원인: **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암동 5 가 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: **심상준 (SIM, Sang Jun)**; 135-506 서울시 강남구 도곡 2 동 도곡렉슬아파트 301-803, Seoul (KR). **원상호 (WON, Sang Ho)**; 220-785 강원도 원주시 일산동 국제아파트 103 동 1501 호, Gangwon-do (KR). **이종욱 (LEE, Jong Uk)**; 152-773 서울시 구로구 신도림동 동아 1 차아파트 105 동 201 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM)**; 137-130 서울시 서초구 바우뫼로 225 한마음빌딩 4 층, Seoul (KR).

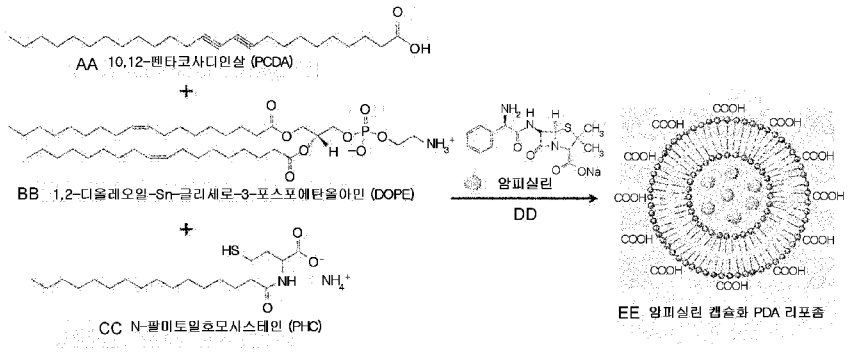
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PH SENSITIVE FLUORESCENT POLYDIACETYLENE LIPOSOME AND DRUG DELIVERY VEHICLE COMPRISING SAME

(54) **발명의 명칭** : pH 민감성 형광 발광의 폴리디아세틸렌 리포좀 및 이를 포함하는 약물 전달체



AA ... 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA)
BB ... 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)
CC ... N-palmitoyl homocysteine (PHC)
DD ... Ampicillin
EE ... Ampicillin-encapsulated PDA liposome

(57) **Abstract**: The present invention relates to a drug delivery vehicle comprising a polydiacetylene liposome, wherein a lipid bilayer is formed by a mixture of 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), and N-palmitoyl homocysteine (PHC), and a drug to be delivered is encapsulated in an isolated inner space of a polydiacetylene liposome. The PDA liposome drug delivery vehicle of the present invention comprises a lipid layer formed by mixing different phospholipids, excluding polydiacetylene, so as to be stable, and thus any leakage problems of an encapsulated drug are eliminated. In addition, since the liposome is sensitive to a pH, the shape and size thereof can be readily changed through the formation of a liposome-liposome conjugate by the improved sensitivity of the drug delivery vehicle under a specific acidic requirement, thereby enabling selective drug release, and thus can be applied as a drug delivery vehicle for various target materials. Additionally, the release of a drug can be controlled by controlling a pH requirement of the surroundings, and a drug release process can be monitored in real time through the fluorescence expressed by the stimulation to the surroundings.

(57) **요약서**:

[다음 쪽 계속]

WO 2014/007517 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 폴리디아세틸렌 리포좀을 포함하는 약물 전달체에 관한 것으로서, 10, 12-펜타코사디인산(PCDA), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 N-팔미토일호모시스테인(PHC)의 혼합물에 의해서 지질 이중층을 형성하고, 폴리아세틸렌 리포좀의 격리된 내부 공간에 전달하고자 하는 약물이 캡슐화되어 있는 것을 특징으로 하며, 본 발명에 따른 PDA 리포좀 약물 전달체는 폴리디아세틸렌 이외에 서로 다른 인지질을 혼합하여 형성된 지질층을 포함하여 안정정적으로 캡슐화된 약물 누출의 문제가 없다. 또한, pH 에 민감하기 때문에 특정의 산성 조건 하에서는 개선된 약물 전달체의 감도에 의해서 리포좀-리포좀 융합을 형성하여 그 형태와 크기가 쉽게 변화될 수 있어서 선택적 약물방출이 가능하고, 이에 따라 다양한 표적 물질에 대한 약물 전달체로 활용될 수 있다. 또한, 주변 환경의 pH 조건을 조절하여 약물의 방출시기를 조절할 수 있고, 주변 환경 자극에 의해 발현되는 형광을 통해서 약물 방출과정을 실시간으로 모니터링할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: pH 민감성 형광 발광의 폴리디아세틸렌 리포좀 및 이를 포함하는 약물 전달체

기술분야

[1] 본 발명은 폴리디아세틸렌 리포좀을 기반으로 하는 약물 전달체에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 폴리디아세틸렌과 더불어 여러 가지 인지질을 이용하여 신규의 pH 민감성 폴리디아세틸렌 리포좀을 만들고, 주변 환경 자극에 의해 별도의 형광물질 첨가 없이 폴리디아세틸렌 리포좀이 자체적으로 형광을 발현하는 특징을 이용하여 형광강도 측정 및 모니터링을 통하여 약물이 방출되는 현상을 형광을 통해서 모니터링이 가능한 약물 전달체에 관한 것이다.

배경기술

[2] 리포좀은 약물 전달 및 생물 의학적 진단과 같은 다양한 치료 용도에 있어서 유용한 화학적 및 물리적 특성을 갖고 있기 때문에 약물 전달체로서 광범위하게 연구되고 있다. 약물 전달체에서 가장 중요한 요소는 약물이 정확하게 약물이 필요로 하는 곳에 방출이 되어야 하는 점과 더불어 이 일련의 과정들을 실시간으로 모니터링으로 할 수 있어야 한다.

[3] 그러나, 약물 방출을 실시간으로 모니터링하고 약물 방출을 제어하기는 매우 곤란하다. 일반적으로 통상의 리포좀은 약물 전달에 있어서 몇 가지 문제점을 가지고 있는데, 그 예로는 생리학상의 조건하에서 형태학상의 불안정성, 가수분해, 산화 및 약물 누수 등을 들 수 있다. 이와 같이, 리포좀 약물 전달 시스템은 해결해야 할 많은 문제점을 갖고 있다.

[4] 이러한 불안정성 및 방출 문제점을 극복하기 위해서, 다양한 유형의 고분자 리포좀이 개발되고 있으며, 종래 리포좀을 약물 전달체로 이용한 관련 기술이 한국등록특허 10-0963831, PCT/US2005/015349 등에 개시되어 있으나, 약물방출을 과정을 실시간으로 모니터링하고 약물 방출을 조절할 수 있는 신규의 리포좀 개발이 절실히 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 따라서, 본 발명은 상기 리포좀 약물 전달 시스템에서 약물 전달체의 불안정성, 방출문제, 약물 방출의 실시간 모니터링의 어려움 등을 해결하고자 하는 것으로서, 디아세틸렌의 중합에 의해서 리포좀을 제조하여 기존의 리포좀들에 비해 안정성을 증가시켜 약물의 누출을 방지하면서, 특정 환경 조건에서만 약물을 선택적으로 방출하고, 형광을 통해서 약물이 방출되는 과정을 실시간으로 모니터링 할 수 있는 신규의 폴리디아세틸렌 리포좀 및 이를 포함하는 약물 전달체를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[6] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[7] 지질층 막에 의해서 매질로부터 격리된 내부 공간을 갖는 폴리디아세틸렌 리포좀으로서,

[8] 상기 지질층은 10, 12-펜타코사디인산(PCDA), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 N-팔미토일호모시스테인(PHC)를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리디아세틸렌 리포좀을 제공한다.

[9] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 PCDA, DOPE 및 PHC의 혼합 몰비는 6 : 3 : 1일 수 있다.

[10] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 폴리디아세틸렌 리포좀은 매질의 pH값이 낮아질수록 민감하게 반응하여 직경이 증가할 수 있다.

[11] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 폴리디아세틸렌 리포좀은 외부 환경 자극에 의해서 고유한 형광을 자체적으로 발하고, 상기 형광을 실시간 모니터링할 수 있으며, 상기 외부 환경 자극은 pH값의 변화일 수 있다.

[12]

[13] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[14] 지질층 막에 의해서 매질로부터 격리된 내부 공간을 갖는 폴리디아세틸렌 리포좀을 포함하는 약물전달체로서,

[15] 상기 지질층은 10, 12-펜타코사디인산(PCDA), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 N-팔미토일호모시스테인(PHC)를 포함하고,

[16] 상기 폴리아세틸렌 리포좀의 격리된 내부공간에 전달하고자 하는 약물이 캡슐화되어 있는 것을 특징으로 하는 폴리아세틸렌 리포좀을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

[17] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 PCDA, DOPE 및 PHC의 혼합 몰비는 6 : 3 : 1일 수 있다.

[18] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 폴리아세틸렌 리포좀은 매질의 pH값 조건이 낮아질수록 직경이 증가하고, 지질층의 측면 상이 분리되면서 인접한 폴리아세틸렌 리포좀과 융합(fusion)될 수 있다.

[19] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 폴리아세틸렌 리포좀이 인접한 폴리아세틸렌 리포좀과 융합시 리포좀 내부의 약물이 방출되고, 상기 약물 방출시 폴리아세틸렌 리포좀은 고유의 형광을 발할 수 있다.

[20] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 약물은 항생 약물 또는 항암 약물일 수 있다.

[21] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 약물 전달체는 약물 방출시기 및 방출량을 조절할 수 있는 것, 상기 약물 방출시기 및 방출량은 하기 단계에 의해서 조절되는 것을 특징으로 한다.

[22] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 약물 전달체는 약물 방출시기 및 방출량을

조절할 수 있는 것으로서, 상기 약물 방출시기 및 방출량은 하기 단계에 의해서 조절됨과 동시에 자체적으로 발하는 고유의 형광을 통하여 약물방출을 실시간으로 모니터링할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[23] (a) 약물 전달체에 대해서 매질의 pH 조건을 3-7 범위에서 제어하여 약물의 방출시기를 조절하는 단계;

[24] (b) 상기 방출시기를 조절하여 약물을 방출함과 동시에 외부 자극인 pH 조건의 변화에 의해서 리포좀이 자체적으로 고유한 형광을 발현하는 단계; 및

[25] (c) 상기 리포좀의 형광을 통해서 약물 방출 및 방출량을 확인하고 모니터링하는 단계.

발명의 효과

[26] 본 발명에 따른 PDA 리포좀 약물 전달체는 폴리디아세틸렌 외에 서로 다른 인지질을 혼합하여 형성된 지질층을 포함하여 안정정적으로 캡슐화된 약물 누출의 문제가 없다. 또한, 산성 조건 하에서는 pH에 민감한 약물 전달체들은 pH값이 낮아질수록 리포좀-리포좀 융합을 형성하여 그 형태와 크기가 쉽게 변화될 수 있어서 선택적 약물방출이 가능하고, 폴리디아세틸렌 표면에 있는 COOH기에 의해서 표면에 따라 다양한 표적 물질을 이용할 수있으므로 효과적인 약물 전달체로 활용될 수 있다. 또한, 이로 인해 주변의 환경에 따라 약물의 방출시기를 조절할 수 있고, 나아가서 주변 환경의 자극에 의해 발현되는 폴리디아세틸렌 리포좀의 형광 발현을 통해서 약물 방출을 확인하고 모니터링 및 약물 방출량 및 방출 효율도 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[27] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따라 항생 약물 암피실린이 캡슐화되어 로딩된 pH 민감성 PDA 리포좀의 합성 및 그 형태를 보여주는 개념도이다.

[28] 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따라 산성 pH 조건에서의 암피실린의 방출 조절과 형광 발광에 의한 약물 방출 모니터링을 보여주는 개념도이다.

[29] 도 2는 본 발명에 따른 PDA 리포좀에 대한 다양한 pH 조건에서의 TEM 사진 및 크기 분포도로서, 리포좀의 평균 직경은 각각 (a) pH 7.4에서 110 nm, (b) pH 6.5에서 355 nm, 및 (c) pH 3.3에서 2047 nm이다.

[30] 도 3은 본 발명에 따른 PDA 리포좀에 다양한 부피의 산을 첨가한 다양한 pH 조건에서 PDA 리포좀의 평균 직경을 보여주는 그래프이다.

[31] 도 4. 합성예 2 및 비교예 2의 암피실린 로딩 PDA 리포좀으로부터 시험관내 암피실린의 방출량을 보여주는 그래프이다.

[32] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 약물 방출 확인을 위한 항균 분석법을 나타낸 개념도이다.

[33] 도 6은 본 발명에 따라 암피실린이 캡슐화되어 로딩된 pH 민감성 PDA 리포좀 약물 전달체를 이용한 항균 분석의 전형적인 결과를 보여주는 이미지로서, 각각 (a) 처리하지 않음, (b) PBD 완충 용액(pH 4), (c) 암피실린 표준 용액 (PBS중의

용액), (d) 암피실린 캡슐화 리포좀, (e) 산 처리된 암피실린 캡슐화 리포좀(pH 4), 및 (f) 초음파 처리된 암피실린 캡슐화 리포좀이다.

[34] 도 7은 각각의 접시에서 박테리아 배지상의 성장 억제 영역의 형광 이미지를 나타낸 것으로서, 각각 (a) 처리하지 않음, (b) PBD 완충 용액(pH 4), (c) 암피실린 표준 용액 (PBS중의 용액), (d) 암피실린 캡슐화 리포좀, (e) 산 처리된 암피실린 캡슐화 리포좀(pH 4), 및 (f) 초음파 처리된 암피실린 캡슐화 리포좀이다.

[35] 도 8은 산성 pH 조건(pH 4)에서 (a) 비교예 2 (b) 합성예 2의 형광 이미지이다.

[36] 도 9는 산성 pH 조건(pH 4)에서 (a) 비교예 2 (b) 합성예 2의 형광 강도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[37] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[38] 본 발명은 약물 전달체로 이용할 수 있는 신규의 폴리디아세틸렌 리포좀에 관한 것으로서, 하기 도 1a에 나타나 있는 바와 같이,2 10, 12-펜타코사디인산(PCDA), 1, 2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 팔미토일호모시스테인(PHC) 지질 단량체를 혼합하여 지질층을 형성하고, 내부에 약물을 안정적으로 캡슐화할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[39] 또한, 본 발명은 상기 폴리디아세틸렌 리포좀을 포함하는 약물 전달체로서, 이중 지질층 막에 의해서 매질로부터 격리된 내부 공간을 가지고, 상기 격리된 내부 공간에 전달하고자 하는 약물을 캡슐화할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[40] 상기 지질층을 이루는 지질 단량체는 PCDA, DOPE 및 PHC를 혼합하여 형성하고, 그 혼합 몰비는 6 : 3 : 1이다.

[41] 하기 도 1b에 나타나 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 PDA 리포좀은 UV 조사시에 인접한 디아세틸렌 단량체의 삼중결합이 중합하여 고분자를 형성하므로 기존에 사용되었던 리포좀들보다 안정성이 더욱 향상되고, 낮은 pH 조건에서 민감하게 반응하며, 외부 자극에 의해서 자체적으로 고유의 형광이 발현되고, 리포좀과 인접한 리포좀이 융합되어 리포좀의 크기가 증대대면서 내부의 약물이 방출된다.

[42] 또한, 본 발명에 따른 폴리디아세틸렌 리포좀을 포함하는 약물 전달체는 약물의 방출시기, 방출량 및 방출 효율을 조절할 수 있는 것과 더불어 외부 자극에 의해 발현되는 폴리디아세틸렌 리포좀의 고유한 형광을 통해서 약물방출을 실시간으로 모니터링이 가능하다는 것을 특징으로 한다.

[43] 구체적으로 먼저, 본 발명에 따른 폴리디아세틸렌 리포좀은 pH에 민감하게 반응하므로 주변 환경의 pH 조건에 따라서 약물이 방출되도록 조절할 수 있다. 또한, 약물을 방출함과 동시에 약물 방출로 인하여 발생하는 고유의 형광 발광 강도를 측정, 모니터링할 수 있고, 이렇게 측정된 형광 발광 강도에 의해서 약물 방출량을 확인한 후 다시 약물 전달체의 pH 조건을 3-7 범위에서 제어하여 약물 방출량과 방출 효율도 조절할 수 있다.

[44] 이와 같이, 본 발명은 폴리디아세틸렌(PDA) 리포좀을 약물 전달체로 사용함으로서 여러 가지 잇점을 가진다. 먼저, 폴리디아세틸렌은 일반적으로 비독성 물질이고, UV 조사시 리포좀과 리포좀이 1,4-부가 반응을 통해서 중합하여 엔-인(ene-yne) 교대 공액 주쇄 중합체 사슬을 형성하여 가교된 고분자 폴리디아세틸렌 리포좀을 형성하는 데, 이는 중합되지 않은 리포좀에 비해서 안정성이 더욱 우수하다. 또한, 헤드부에 카르복실기를 가지므로, 선택적인 표적화를 위해서 다양한 리간드와 수용체를 리포좀 표면에 결합시킬 수가 있다. 그리고, 리포좀의 지질 조성을 변화시킴으로써 중합도 및 약물 방출 속도를 조절할 수 있다. 마지막으로, 폴리아세틸렌 리포좀이 다양한 pH 조건과 외부 자극에 의해서 인접한 리포좀과 융합되면서 내부에 캡슐화된 약물이 방출되고, 이때 폴리디아세틸렌 리포좀이 비형광에서 형광으로의 전이되므로 약물 방출을 효율적으로 모니터할 수도 있다.

[45] 본 발명에 따라서 표적물질에 유효하게 전달할 수 있는 약물로는 다양한 항생 약물 또는 항암 약물 등이 가능할 수 있다. 이하, 상술하는 실시예에서는 암피실린을 사용하여 구체적으로 실험하였다.

[46] 암피실린은 수용액에서 단기 안정성을 갖는 강력한 항생물질로서, 임상적으로는 광범위한 세균 감염의 치료에 사용된다. 암피실린을 본 발명에 따른 pH 민감성 PDA 리포좀을 사용해서 캡슐화하고, 그 치료 효과를 플라크 분석법에 의해 시험하였다. 플라크 분석의 목적은 박테리아 생육지내에서 항생물질의 분리된 플라크를 성장시키는 것이다. 한천 배지상에서 박테리아 성장이 제거됨을 확인할 수 있으며, 이에 의해서 박테리아에 대한 항생물질의 효능을 확인한다. 암피실린이 캡슐화되어 로딩된 pH 민감성 PDA 리포좀의 경우 이하 실시예에서 상술하는 바와 같이, 낮은 pH 조건만으로도 박테리아가 현저하게 사멸됨을 확인하였다. 더욱이, PDA 리포좀의 형광 특성의 고유한 변화에 기인하여, 형광 현미경분석법에 의해 PDA 리포좀의 형광 사진을 촬영함으로써 약물 방출을 쉽게 모니터할 수 있다.

[47] 구체적으로, 매질의 pH가 7에서 4로 낮아지는 경우 본 발명에 따른 PDA 리포좀들은 서로 신속하게 융합하고, pH가 저하됨에 따라서 그 크기가 110.0 ± 19.3 nm에서 2046.7 ± 487.4 nm로 대략 20 배 증가한다.

[48] 이에 따라서 중성 조건에서는 디아세틸렌 지질의 가교에 의해서 안정적으로 약물의 누출이 방지되며, 이후 캡슐화된 약물은 산성 pH 조건하에서 순간적으로 방출된다. 암피실린은 산성 pH 조건하에서 4 시간 이내에 리포좀으로부터 거의 완전히 방출되었으며(74.4 ± 3.9%), 암피실린의 방출량은 HPLC에 의해 분석하였다. 마지막으로, *E.coli*의 생육지상에서 플라크(plaque)의 출현에 의해 치료 효과를 관찰하였으며, 약물 방출 모니터링을 위해서 PDA 리포좀의 형광 사진을 플라크로부터 촬영하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 신규의 pH 민감성 고분자 리포좀이 약물 담체로서 매우 유망함을 확인할 수 있었다.

[49] 이에 따라서 중성 조건에서는 디아세틸렌 단량체의 삼중결합 가교에 의해서

생성된 폴리디아세틸렌 리포좀은 안정적으로 약물의 누출이 방지되며, 이후 캡슐화된 약물은 산성 pH 조건하에서 순간적으로 방출된다. 암피실린은 산성 pH 조건하에서 4 시간 이내에 리포좀으로부터 거의 완전히 방출되었으며(74.4 ± 3.9%), 암피실린의 방출량은 HPLC에 의해 분석하였다. 마지막으로, 배지 위에 박테리아를 키우고, 이 후에 약물이 들어있는 약물 전달체를 pH 4환경에서 떨어뜨려 배지 안에 플라크(plaque)의 출현을 통해 치료 효과를 관찰하였으며, 약물 방출 모니터링을 위해서 PDA 리포좀의 형광 사진을 플라크로부터 촬영하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 신규의 pH 민감성 고분자 리포좀이 약물 전달체로서 매우 유망함을 확인할 수 있었다.

발명의 실시를 위한 형태

[50] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않고, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[51]

[52] <실시예>

[53] 이하, 본 발명의 실시예에서 사용된 물질은 다음과 같다.

[54] 10, 12-펜타코사디인산(PCDA), 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DMPC), 암피실린나트륨염, 염산 용액 및 0.1 M 인산염 완충 염수 pH 7.4(PBS 완충액)은 Sigma-Aldrich (Korea)로부터 구입하여 사용하였다.

[55] 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 팔미토일호모시스테인(암모늄염)(PHC)은 Avanti Polar Lipids. Inc. (Alabaster, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

[56] LB 브로스(broth)는 Becton, Dickinson and Company (Korea)로부터 구입하였으며, 식물 한천은 Duchefa Biochemie (Haarlem, Netherlands)으로부터 구입하였으며, *E.coli* O-157(ATCC43894)을 사용하였고, 정수 시스템(Human corporation, Korea)으로부터 입수한 탈이온수(DI, 물의 저항은 18.2 $m\Omega cm^{-1}$임)를 배지 및 완충 용액을 제조하는데 사용하였다.

[57]

[58] 합성예 1. 본 발명에 따른 pH 민감성 PDA 리포좀 약물 전달체의 합성

[59] PCDA, DMPC, DOPE 및 PHC의 클로로포름 용액을 각각 황갈색 유리 바이알에서 -4 ℃하에 제조하였다. PCDA, DOPE 및 PHC 지질 단량체의 용액을 6:3:1의 몰비율(PCDA:DOPE:PHC)하에 총 지질 농도 1.0 mM로 혼합하였다. 이후 N_2 기체를 사용해서 클로로포름을 제거하고, 남아있는 혼합된 디아세틸렌의 건조층을 완만한 교반하에 80 ℃로 설정된 순환하는 수조에서 15 분 동안 가열함으로써 10 mM PBS 완충액(pH 7.4) 1.0 mL에 재현탁시켜서 제조된 용액을

프리필터-100 nm 멤브레인-프리필터 복합체를 통해 10회 반복해서 압출하였다. 압출기 시스템은 건조 배스상의 PCDA, DOPE 및 PHC 지질 형성을 위해 85 ℃로 유지시켰다. 압출된 용액은 약 100 nm의 리포좀을 함유하였다. 이어서, 리포좀 용액을 20 분 동안 실온(25)으로 건조시키고 4℃에 보관하였다.

[60]

[61] 비교예 1. 종래의 PDA 리포좀 약물 전달체의 합성

[62] PCDA, DMPC의 클로로포름 용액을 각각 황갈색 유리 바이알에서 -4 ℃하에 제조하였다. PCDA 및 DMPC 지질 단량체의 용액을 8:2의 몰비율(PCDA:DMPC)하에 최종 농도 1.0 mM로 혼합한 것을 제외하고는 상기 합성예 1과 동일한 방법으로 합성하였다.

[63]

[64] 실험예 1. PDA 리포좀의 크기 및 제타포텐셜 측정

[65] (1) 전기영동 광산란 분광 분석기(ELS-Z, Otsuka Electronics, Tokyo, Japan)를 이용하여 상기 합성예 1 및 비교예 1에 따라 합성된 PDA 리포좀의 크기 및 제타포텐셜(zeta potential)을 측정하였다. 고분자 리포좀이 650 nm의 최대 흡수 파장을 가지며, 이에 의해서 입자 크기 측정이 방해될 수 있기 때문에 리포좀 용액은 입자 크기 측정을 위해 제조한 후에는 UV 광으로 조사하지 않았다.

[66]

[67] (2) PDA 리포좀의 크기 및 안정성

[68] 상기 합성예 1(PCDA/DOPE/PHC) 및 비교예 1(PCDA/의 PDA 리포좀의 제타포텐셜(리포좀들간의 반발 정도) 및 크기를 전기영동 광산란법에 의해서 측정하였고, 그 결과를 하기 [표 1]에 나타내었다.

[69] 표 1

[Table 1]

구분	조성	평균 직경 (nm)	pH 4평균 직경 (nm)	증가 비율(%)	제타포텐셜 (mV)	다분산도
비교예 1	PCDA:DMPC(8:2)	135.0±54.8	258.6±72.2	91.5	-12.54±1.29	0.27±0.03
합성예 1	PCDA:DOPE:PHC (6:3:1)	111.6±23.5	995.5±240.3	792	-7.15±0.43	0.23±0.03

[70]

[71] 콜로이드 표면상의 전하의 중요한 지표인 제타포텐셜에 의해서 콜로이드 시스템의 안정성을 예측하고 조절할 수 있다. 상기 [표 1]에서, 두 가지 유형의 리포좀의 제타포텐셜 값이 음의 값(-7.15 내지 -12.54 mV)을 보여주는데, 이는 PCDA(음성) 및 PHC(음성)과 같은 하전된 지질이 리포좀에 위치하기 때문이다.

PCDA는 헤드기에 카르복실기를 갖는다. 이 카르복실기는 수용액에서 약하게 이온화되어 리포좀 표면상의 음전하를 증가시킨다. 하전된 지질이 삽입된 리포좀은 제타포텐셜 값이 더 높은 것으로 판단할 때 우수한 어셈블리를 나타낸다. 합성예 1의 PCDA, DOPE 및 PHC(몰비율 6:3:1)로 이루어진 리포좀은, 제타포텐셜이 -12.54 mV인 비교예 1의 PCDA 및 DMPC 리포좀(몰비율 8:2)에 비해서 더 낮은 제타포텐셜(-7.15 mV)를 갖는데, 그 이유는 중성 전하를 갖는 DOPE 또는 DMPC, 즉, 쯔비터 이온(zwitter ion)의 몰비율이 증가하였기 때문이다. 또한, PCDA의 분율도 감소하였다. 이러한 값들은 정전 반발력에 의해 PDA 리포좀의 응집을 감소시키고 안정성을 유지시킬 수 있다.

[72] 중성 pH 하에서, 상기 합성예 1 및 비교예 1의 리포좀은 모두 100-150 nm 범위에서 유사한 크기를 갖는다. 각각의 리포좀의 크기를 산성 pH 조건(pH 4)에서 다시 측정하고 산 처리 이전과 크기를 비교하여 pH가 PDA 리포좀에 미치는 영향을 확인하였다. 산 처리 이후에, 비교예 1의 PCDA 및 DMPC 리포좀은 전에 비해 약간의 크기 증가를 나타낸 반면에, 합성예 1의 PCDA, DOPE 및 PHC 리포좀의 크기는 대략 10 배 증가하였다. 그러므로, 본 발명에 따른 합성예 1의 PCDA, DOPE 및 PHC로 이루어진 리포좀이 산성 pH에 매우 민감하므로, 약물 전달체로 매우 우수함을 알 수 있다.

[73]

[74] 실험예 2. pH 값 변화에 의한 pH 민감성 PDA 리포좀의 특성 분석

[75] (1) 다양한 농도의 HCl 0.5-2 L를 리포좀 용액에 첨가하고 강력하게 혼합하여 소정의 pH를 유지하였으며, 리포좀 형태 및 크기를 고분해능 투과 전자 현미경(HR-TEM, Tecnai 20, 200 kV의 가속 전압 하에 작동) 및 전기영동 광산란 분광분석기(ELS-Z)를 사용하여 특성 분석하였다.

[76] 리포좀 용액을 탄소 코팅된 구리 그리드 상에 부착하였다. 건조시킨 후에, 샘플을 HR-TEM으로 분석하였다. 다양한 pH 조건에서 PDA 리포좀의 평균 입자 크기 분포를 ELS-Z에 의해 측정하였고, 각각의 실험을 3회 반복하였으며, 각각의 결과는 3회 측정치의 평균으로 하였다. 여기에서는 모두 약물을 트랩하지 않은 블랭크 리포좀을 사용하였다.

[77]

[78] (2) pH 값이 pH 민감성 PDA 리포좀에 미치는 영향

[79] 상이한 pH 값에서 약물을 로딩하지 않은 pH 민감성 리포좀의 형태와 크기를 HR-TEM 및 전기영동 광산란법에 의해 특성 분석을 하였고, 그 결과를 하기 도 2 및 도 3에 나타내었다. 또한, HR-TEM을 산에 의해 유발되는 PDA 리포좀의 형태 변화를 분석하는 데에도 사용하였다.

[80] 하기 도 2(a)는 합성예 1의 PCDA, DOPE 및 PHC(6:3:1 몰비율)로 이루어진 PDA 리포좀의 전형적인 사진이다. 6:3:1 몰비율의 PCDA, DOPE 및 PHC의 고분자 PDA 리포좀은 구형의 구조를 갖고, 평균 직경은 pH 7.4에서 110.0 ± 19.3 nm이다. HCl 0.8 ㎕를 리포좀 용액 2 mL에 첨가한 후에(pH 6.5), 리포좀은 더 커져서

직경이 354.5 ± 73.9 nm가 되었다. 도 2(b)는 리포좀 일부가 서로 응집하고 융합한 것을 보여준다. 그러나, 대부분의 리포좀은 그것의 소낭형 구조를 유지하였는데, 그 이유는 고분자 리포좀이 산에 의해 유발되는 형태 변화에 대하여 내성을 갖기 때문이다. 마지막으로 HCl 1.7 ㎕를 리포좀 소낭 2 mL에 첨가한 경우(pH 3.3), 리포좀은 훨씬 더 커졌다. 결과적으로, 도 2(c)에 나타낸 바와 같이, 대부분의 리포좀이 융합하고 평균 직경은 2046.7 ± 487.4 nm가 되었다.

[81] 다양한 pH 조건에서 PDA 리포좀의 입자 크기 분포 곡선이 하기 도 3에 도시되어 있다. 리포좀의 평균 직경은 산 처리 이후에 110.0 ± 19.3 nm에서 2046.7 ± 487.4 nm로 대략 20 배 증가하였으며, 이는 pH가 낮을수록 리포좀이 더 크다는 것을 시사한다. 이러한 결과에 대한 두 가지 주요한 이유는 다음과 같다. 첫째, 양성자화된 PHC의 이중층 용해도가 낮아서 산성 pH 조건하에서 PHC의 도메인들이 형성되기 때문이다. 이와 같은 이중층 지질의 측면 상 분리는 융합의 주요 원인이 될 수 있다. 둘째로, DOPE의 존재가 산에 의해 유발되는 리포좀 융합을 촉진한다. DOPE는 육각형 상 또는 반전된 미셀을 형성하는 경향이 있다.

[82]

[83] 합성예 2. 약물이 로딩된 pH 민감성 리포좀(합성예 1)의 합성

[84] PCDA, DMPC, DOPE 및 PHC의 클로로포름 용액을 각각 황갈색 유리 바이알에서 -4 ℃하에 제조하였다. PCDA, DOPE 및 PHC 지질 단량체의 용액을 6:3:1의 몰비율(PCDA:DOPE:PHC)하에 총 지질 농도 1.0 mM로 혼합하였다. 이후 N_2 기체를 사용해서 클로로포름을 제거하고, 남아있는 혼합된 디아세틸렌의 건조층을 완만한 교반하에 80 ℃로 설정된 순환하는 수조에서 15 분 동안 가열함으로써 암피실린(0.02 mg/mL)의 PBS 완충액(pH 7.4) 1.0 mL에 재현탁시켰다. 제조된 용액을 프리필터-100 nm 멤브레인-프리필터 복합체를 통해 10회 반복해서 압출하였다. 압출기 시스템은 건조 배스상의 PCDA, DOPE 및 PHC 지질 형성을 위해 85 로 유지시켰다. 압출된 용액은 약 100 nm의 암피실린이 로딩된 리포좀을 함유하였다.

[85] 이어서, 리포좀 용액을 20분 동안 실온(25 ℃)으로 냉각시켰다. 상기 용액을 얼음 위에 놓인 페트리 접시상으로 옮기고, 고분자 리포좀을 가교시키기 위해 254 nm UV 하에 15 분 동안 조사하였다. 약물이 로딩된 리포좀 및 용액에 잔류하는 유리된 상태의 암피실린을 크기 배제 컬럼(세파덱스 G25)을 사용해서 제거하였다.

[86]

[87] 비교예 2. 약물이 로딩된 종래 리포좀(비교예 1)의 합성

[88] PCDA, DMPC의 클로로포름 용액을 각각 황갈색 유리 바이알에서 -4 ℃ 하에 제조하였다. PCDA 및 DMPC 지질 단량체의 용액을 8:2의 몰비율(PCDA:DMPC)하에 최종 농도 1.0 mM로 혼합한 것을 제외하고는 상기 합성예 2와 동일한 방법으로 합성하였다.

[89]

[90] 실험예 3. 박테리아 성장용 배지의 제조

[91] LB 브로스와 한천 배지를 제조하기 위해, LB 브로스 12.5 g과 식물 한천 7.5 g을 1 L 멸균 플라스크로 옮겼다. 성분들을 증류수 또는 탈이온수 500 mL에 용해시키고, 플라스크 입구를 알루미늄 호일, 유사한 마개 또는 캡으로 기밀하게 덮어주었다. 혼합물을 비등할 때까지 가열하여 한천을 용해시키고 15 분 동안 121-124 ℃에서 오토클레이브로 처리하여 멸균한 후에, 오토클레이브가 냉각되고 압력이 0이 되기를 기다렸다. 오토클레이브로부터 배지를 제거하고 실온으로 냉각시켰다. LB 한천이 일단 손으로 만져 뜨거울 정도의 온도(약 45 ℃)로 냉각되면, 0.5 cm 또는 1/4 층의 한천을 페트리 접시에 부어주었다. 이것은 대략 한천 부피 20-25 mL에 해당한다. 페트리 접시를 30-40분 동안 완전히 응고될 때까지 편평한 표면상에 놓아두었다. 고체 한천을 함유하는 페트리 접시를 4 ℃에 보관하였다.

[92]

[93] 실험예 4. 박테리아 배양 및 성장

[94] 박테리아(*E.coli*) 300 ㎕를 LB 브로스 3.0 mL에 첨가하고, 배양액을 강력하게 진탕시켰다. 박테리아를 진탕하는 배양기에서 37 ℃하에 밤새 배양하였다. 37 ℃ 배양기에서 고체 한천 평판을 미리 가온시켜 응축을 감소시킨 후에, 박테리아 배양액 200 ㎕를 온난한 기판의 한천 표면상에 신속하게 부어 주었다. *E.coli* 배양액을 배지를 함유하는 한천 평판상에 도말하고, 15 분 동안 *E. coli*를 한천 배지에 흡수시켰다.

[95]

[96] 실험예 5. 시험관내 약물 방출에 대한 항균 분석

[97] 고체 한천과 융합성 박테리아를 함유하는 6 개의 페트리 접시를 준비하였다. 먼저, PBS 완충액(pH 4.0), 약물이 캡슐화된 리포좀 용액, 산 처리된 pH 4의 약물 캡슐화 리포좀 용액, 초음파 처리된 약물 캡슐화 리포좀 용액, 및 암피실린 표준 용액을 0.02 M 농도로 희석하였다. 이어서, 각 용액 20 ㎕를 각각의 페트리 접시의 중앙에 적하하였다. 뚜껑을 다시 덮고 페트리 접시를 뒤집어서 LB 한천상으로 수분이 이동하는 것을 방지한 후에, 반전된 평판을 밤새 37 ℃ 배양기에 놓아두었다.

[98] 대조군(아무것도 처리하지 않은 경우, PBS 완충액(pH 4)을 사용해서 평판 배양 및 PBS 완충액에 현탁된 약물 캡슐화 리포좀을 사용해서 평판 배양)을 동일한 조건하에 시험하였으며, 8-12 시간 후에, 제거 영역인 플라크를 평판상의 박테리아 생육지내에서 관찰할 수 있었다.

[99]

[100] 실험예 6. HPLC에 의한 암피실린의 정량 분석

[101] PCDA/DMPC의 몰비율이 8:2인 비교예 2, PCDA/DOPE/PHC의 몰비율이 6:3:1인 합성예 2로부터 암피실린의 방출 특성 분석을 실온에서 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 방법을 사용해서 수행하였다. 역상 C-18 컬럼(Xbridge,

RP-18, 250 × 4.6 mm, 5 ㎛, Waters Co.), 펌프(Agilent Technologies 1200 시리즈), 자동 주입기(애글리언트테크놀로지스 1200 시리즈), 및 UV/가시광선 검출기(Agilent Technologies 1100 시리즈)를 구비한, 애글리언트(Aglient) HPLC 시스템(미국, Agilent Technologies)을 사용해서 암피실린을 정량 분석하였다. 이동상은 pH 7.2로 조정된 메탄올:물(450:550, v/v)중의 0.575% 아세트산암모늄으로 이루어졌다. 암피실린 표준 용액의 범위는 5-100 ㎍/mL이었으며, 검정 곡선은 직선형이었고, r^2값은 0.93-1.0의 범위 내에 존재하였다. 암피실린 표준 용액과 샘플 주입 부피는 1 mL이었으며, 컬럼은 100 bar의 압력하에 작동시켰고, 이동상의 유속은 0.6 mL/분으로 하였으며, 230 nm의 흡광도에서 검출하였다. 각각의 주입된 물질로부터 3 벌의 샘플을 취하여 피이크 아래의 면적을 매회 측정하였다. 표준물질 및 대조군을 비롯한, 각각의 실험 시스템에 대한 분석을 모두 동일자에 수행하였다.

[102] 리포좀에 로딩된 암피실린의 총량을 측정하기 위해서, 고분자 리포좀을 에탄올 부피 10 배를 사용해서 용해시켰다. 암피실린이 캡슐화된 리포좀 용액 0.2 mL를 에탄올 2 mL에 용해시켰다. 이어서, 리포좀 팽윤 용액을 5분 동안 혼합하고, 0.22 ㎛ 1회용 필터를 통해서 여과하였다. HCl 0.8 ㎕를 암피실린 캡슐화 리포좀 용액 1 mL에 첨가하고, 산성 pH 조건에서 리포좀으로부터 암피실린의 방출량을 측정하기 위해 소정의 pH 4로 만들었다. 방출 과정은 12 시간 동안 지속하였다. 두 가지 값, 즉, 리포좀에 로딩된 암피실린의 총량 및 리포좀으로부터 암피실린의 방출량을 추가의 처리없이 HPLC에 의해 분석하였다.

[103]

[104] 실험예 7. 약물 방출 모니터링을 위한 형광 분석

[105] 약물 방출 모니터링 가능성 및 비교예 2와 신규의 본 발명에 따른 합성예 2의 pH 민감성 리포좀 사이의 차이를 확인하기 위해서, 각각의 PDA 리포좀의 형광 사진 및 형광 강도를 형광 현미경 분석법에 의해 분석하였다.

[106] 형광 현미경은 다음과 같은 4 개의 주요 부분으로 이루어졌다. 현미경, 형광 유닛(광원인 수은 아크 램프, 형광 장치 및 적색상 PDA 형광의 분석에 적합한 니콘 G2A 필터로 이루어짐), 디지털 카메라 유닛(Infinity, 미국), 및 사진 분석 소프트웨어(i-solution, 한국).

[107] PDA 리포좀 반점들로부터 유래한 형광 신호를 상기 시스템으로 가시화하고 디지털 현미경사진을 촬영하였다. 반점 강도를 사진 분석 소프트웨어로 계산하였다. 강도는 각 화소의 평균 강도값을 가리키고, 디지털 사진 분석법에 의해 분석하였을 때 0 내지 255 사이의 값이었으며, 여기서 0은 최소값이고 255는 최대값이었다.

[108]

[109] (1) 암피실린 캡슐화의 정량분석

[110] 본 발명에 따른 CDA, DOPE 및 PHC로 이루어진 신규의 pH 민감성 PDA 리포좀은 산성 pH 조건하에서 약물 방출을 조절할 수 있는 특성을 가지는데,

이를 PCDA 및 DMPC로 이루어진 종래의 PDA 리포좀과 비교하여 확인하였다.

[111] 하기 [표 2]는 PCDA 및 DMPC로 이루어진 종래의 PDA 리포좀과 본 발명에 따른 CDA, DOPE 및 PHC로 이루어진 신규의 pH 민감성 PDA 리포좀의 캡슐화 효율 및 약물 함량을 나타낸 것이다.

[112] 표 2

[Table 2]

구분	조성	캡슐화 효율 (%)	약물 함량 (%)
비교예 2	PCDA:DMPC(8:2)	62.89 ± 0.87	11.67 ± 0.01
합성예 2	PCDA:DOPE:PHC (6:3:1)	60.41 ± 1.82	10.83 ± 0.03

[113] 캡슐화 효율(%) 및 약물 함량(%)은 하기 식에 의해서 각각 구하였다.

[114] 캡슐화 효율(%)=(리포좀에 캡슐화된 암피실린의 실제량/리포좀 분산액중의 암피실린의 주입량) × 100

[115] 약물 함량(%)=(리포좀에 캡슐화된 암피실린의 실제량/동결 건조된 리포좀의 총량) × 100

[116] 상기 [표 2]에서 보는 바와 같이, PCDA/DMPC로 이루어진 리포좀 및 PCDA/DOPE/PHC로 이루어진 리포좀에 대하여 각각 캡슐화 효율 및 약물 함량을 측정한 결과 62.89±0.87%, 11.67±0.01% 및 60.41±1.82%, 10.83±0.03%이었다. 즉, 리포좀의 캡슐화 효율 및 약물 함량이 크게 다르지 않았다. 따라서, 리포좀의 지질 유형과 지질 조성은 약물 하중 용량에 현저한 영향을 미치지 않는다.

[117] 시험관내 암피실린 방출 프로파일은 하기 도 4에 도시되어 있다. 약물 방출시 pH 조건이 PDA 리포좀에 미치는 영향을 본 연구에서 조사하였다. 하기 도 4에 도시된 바와 같이, 2 시간 이내에 PCDA/DMPC 및 PCDA/DOPE/PHC 리포좀으로부터 방출되는 암피실린의 양(%)은 각각 9.21±3.14% 및 57.42±7.35%이었다. 방출 프로파일에서, 산성 pH 조건하에(pH 4) 본 발명에 따른 pH 민감성 PCDA/DOPE/PHC 리포좀 내의 암피실린은 신속하게 방출되고 약 4 시간 이내에 거의 완전히 방출되었다. 이와는 달리, 종래의 PCDA/DMPC 리포좀은 시간 경과에 따른 리포좀 응집 및 약물 확산에 기인하여 소량의 암피실린을 방출하였다. 방출된 암피실린의 양은 12 시간 경과 후에 두 그룹에 대하여 각각 9.75±3.31% 및 78.84±2.83%이었다. 본 발명에 따른 신규의 리포좀은 캡슐화된 암피실린의 75% 이상을 방출하는 반면에, 12 시간 후에 종래의 리포좀으로부터는 단 10%의 캡슐화된 암피실린이 방출되었을 뿐이다. 그러므로, 종래의 리포좀은 낮은 pH 조건에 의해서 영향을 받지 않았다. 약물 방출 속도는 항온배양 시간이 증가함에 따라 다소 감소하였지만, 두 경우에 모두

약물이 서서히 릴리즈되는 서방형 약물 방출 패턴이 관찰되었다.

[118] 따라서, 본 발명에 따른 PCDA/DOPE/PHC로부터의 암피실린 방출은 동일한 pH하에서 PCDA/DMPC 리포좀으로부터의 방출에 비해서 신속하고, 이러한 결과는 신규의 pH 민감성 리포좀이 산성 pH 조건하에서 약물을 신속하게 성공적으로 방출할 수 있음을 의미한다.

[119]

[120] (2) 항균 분석에 의한 시험관내 약물 방출 확인

[121] 본 발명에 따른 신규 리포좀에 의한 적절한 시험관내 약물 방출을 확인하기 위해서, 하기 도 5에 도시된 바와 같이 간단하고 신빙성있는 항균 분석법을 사용하였다.

[122] 먼저, 리포좀으로부터 원활하게 방출되는 약물인 경우에 융합성 박테리아의 생육지상에서 성장 억제 영역(플라크)이 나타날 것이다. 또한, 암피실린이 캡슐화된 리포좀에 대한 분석에 있어서 특이적인 요건을 충족해야 한다. 첫째, 캡슐화된 약물은 그 생물학적 활성을 유지해야 한다. 둘째, 리포좀내의 모든 약물을 분석에 이용할 수 있어야 하며, 이는 완전한 방출을 필요로 한다. 셋째, 분석법이 정량적이어야 한다.

[123] 암피실린 캡슐화 pH 민감성 PDA 리포좀에 대한 항균 분석의 전형적인 결과가 하기 도 6에 도시되어 있다.

[124] 접시 (a), (b) 및 (d)는 대조군으로서, 각각 (a) 아무것도 처리하지 않은 접시, (b) PBS 완충액(pH 4)을 사용해서 평판 배양한 접시 및 (d) PBS 완충액에 현탁된 약물 캡슐화 리포좀을 사용해서 평판 배양한 접시이다.

[125] 하기 도 6에서 보는 바와 같이, 이러한 대조군에 대해서는 성장 억제 영역이 존재하지 않는다. 특히, 접시 (d)에서 성장 억제 영역이 없다는 것은 본 발명에 따른 신규 리포좀 시스템이 매우 안정하고 부작용을 유발하는 원치 않는 암피실린 방출을 방지할 수 있음을 입증한다.

[126] 이와는 달리, 암피실린 제제를 사용할 경우 성장 억제 영역이 일반적으로 관찰되었다. 접시 (c)는 암피실린 표준 용액에 대한 전형적인 반응이다. 접시 (e) 및 (f)는 각각 pH 4 조건에 대한 산 처리 및 초음파 처리를 사용한 약물 캡슐화 리포좀에 대한 반응이다. 탐침 초음파처리기를 최대 동력으로 사용하여 완전한 약물 방출을 위해 약물 캡슐화 리포좀의 소낭 구조를 파괴하였다. 본 발명에 따른 pH 민감성 PDA 리포좀으로부터 방출된 암피실린은 박테리아를 사멸함으로써 생물학적으로 작용하였고, 이러한 전략은 박테리아의 생육지상의 성장 억제 영역의 존재에 의해 확인되었다. 또한, 성장 억제 영역의 직경을 측정함으로써 방출된 약물의 양을 분석할 수 있었다.

[127]

[128] (3) 약물 방출 모니터링을 위한 형광 분석

[129] pH 조건 등의 다양한 외부 자극에 따른 구조 변화에 기인하여 형광 방출을 나타내므로, 본 발명에 따른 pH 민감성 PDA 리포좀을 다양한 pH 조건에서 약물

전달에 대하여 형광 발생법으로 모니터할 수 있다. 따라서, pH 민감성 PDA 리포좀의 형광 사진을 촬영하고 강도를 측정하였다.

[130] 하기 도 7은 각각의 접시에서 박테리아 배지상의 성장 억제 영역의 형광 사진을 나타낸 것으로서, 접시 (e)만이 산에 의해 유발된 PDA 리포좀-리포좀 융합 및 형태 변화에 기인하여 성장 억제 영역의 명확한 형광 사진을 갖는다. 그러나, 초음파 처리된 PDA 리포좀 용액을 적하한 접시 (f)에서는 형광 사진이 존재하지 않는다. 이는 PDA 리포좀이 완전히 충돌하는 리포좀 구조에 기인하여 형광성을 상실하였다.

[131] 또한, PCDA 및 DMPC로 이루어진 종래의 고분자 리포좀(비교예 1, 2)을 산성 조건에서 본 발명에 따른 PCDA, DOPE 및 PHC로 이루어진 신규의 pH 민감성 리포좀(합성예 1, 2)과 비교하였다.

[132] 하기 도 8 및 도 9에 나타낸 바와 같이, 종래의 PDA 리포좀은 단일의 적색 반점 형광 사진을 가지며 형광 강도는 산성 조건(pH 4)에서 다소 증가하였다. 그 반면에, 신규의 pH 민감성 PDA 리포좀은 주로 응집되고 리포좀-리포좀 융합에 기인하여 강한 적색 형광 사진을 갖는다. 또한, 산 처리한 후에 형광 강도가 현저하게 증가하였고, 이는 PDA 리포좀의 구조내의 상당한 변화에 의해 유발된 것이다. 산성 pH 조건에서 pH 민감성 PDA 리포좀을 다른 PDA 리포좀으로부터 쉽게 구별할 수 있었다.

[133] 따라서, 본 발명에 따른 신규의 pH 민감성 PDA 리포좀을 약물 전달체로 활용할 경우에 특정의 pH 조건에서 약물이 자동적으로 방출되도록 조절할 수 있으며, 또한 특정의 pH 조건하에서 선택적인 양물 방출을 가능하게 할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 신규의 pH 민감성 PDA 리포좀의 형광 사진 및 강도를 측정함으로써, 종양 세포의 경우와 유사하게 산성 pH 조건에서 시험관 내 및 생체 내에서 실시간 약물 방출을 모니터링할 수 있다.

산업상 이용가능성

[134] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 신규의 PDA 리포좀은 약물 전달용 나노담체로 유효하게 활용될 수 있다. 특히, 본 발명에 PDA 리포좀 약물 전달체는 각기 다른 유형의 지질을 혼합함으로써 산성 조건 하에서 감도를 개선한 점을 특징으로 한다. 다양한 pH에서 리포좀의 형태 및 입자 크기 분포를 측정한 결과 PCDA, DOPE 및 PHC로 이루어진 리포좀이 리포좀-리포좀 융합을 통해서 그 형태와 크기가 쉽게 변화됨을 확인할 수 있었다. 또한, 산성 pH에서 약물을 방출을 보다 쉽게 조절할 수 있으며, 형광 사진을 촬영하고 형광 강도를 측정함으로써 약물 방출 효율을 확인할 수 있었다.

청구범위

[청구항 1] 지질층 막에 의해서 매질로부터 격리된 내부 공간을 갖는 폴리디아세틸렌 리포좀으로서,
상기 지질층은 10, 12-펜타코사디인산(PCDA), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 N-팔미토일호모시스테인(PHC)를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리디아세틸렌 리포좀.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 PCDA, DOPE 및 PHC의 혼합 몰비는 6 : 3 : 1인 것을 특징으로 하는 폴리디아세틸렌 리포좀.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 폴리디아세틸렌 리포좀은 매질의 pH값이 낮아질수록 직경이 증가하는 것을 특징으로 하는 폴리디아세틸렌 리포좀.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 폴리디아세틸렌 리포좀은 외부 환경 자극에 의해서 고유한 형광을 자체적으로 발하고, 상기 형광을 실시간 모니터링할 수 있으며,
상기 외부 환경 자극은 pH값의 변화인 것을 특징으로 하는 폴리디아세틸렌 리포좀.

[청구항 5] 지질층 막에 의해서 매질로부터 격리된 내부 공간을 갖는 폴리디아세틸렌 리포좀을 포함하는 약물전달체로서,
상기 지질층은 10, 12-펜타코사디인산(PCDA), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 N-팔미토일호모시스테인(PHC)를 포함하고,
상기 폴리아세틸렌 리포좀의 격리된 내부공간에 전달하고자 하는 약물이 캡슐화되어 있는 것을 특징으로 하는 폴리아세틸렌 리포좀을 포함하는 약물 전달체.

[청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 PCDA, DOPE 및 PHC의 혼합 몰비는 6 : 3 : 1인 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

[청구항 7] 제 5 항에 있어서,
상기 폴리아세틸렌 리포좀은 매질의 pH값 조건이 낮아질수록 직경이 증가하고, 지질층의 측면 상이 분리되면서 인접한 폴리아세틸렌 리포좀과 융합(fusion)되는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

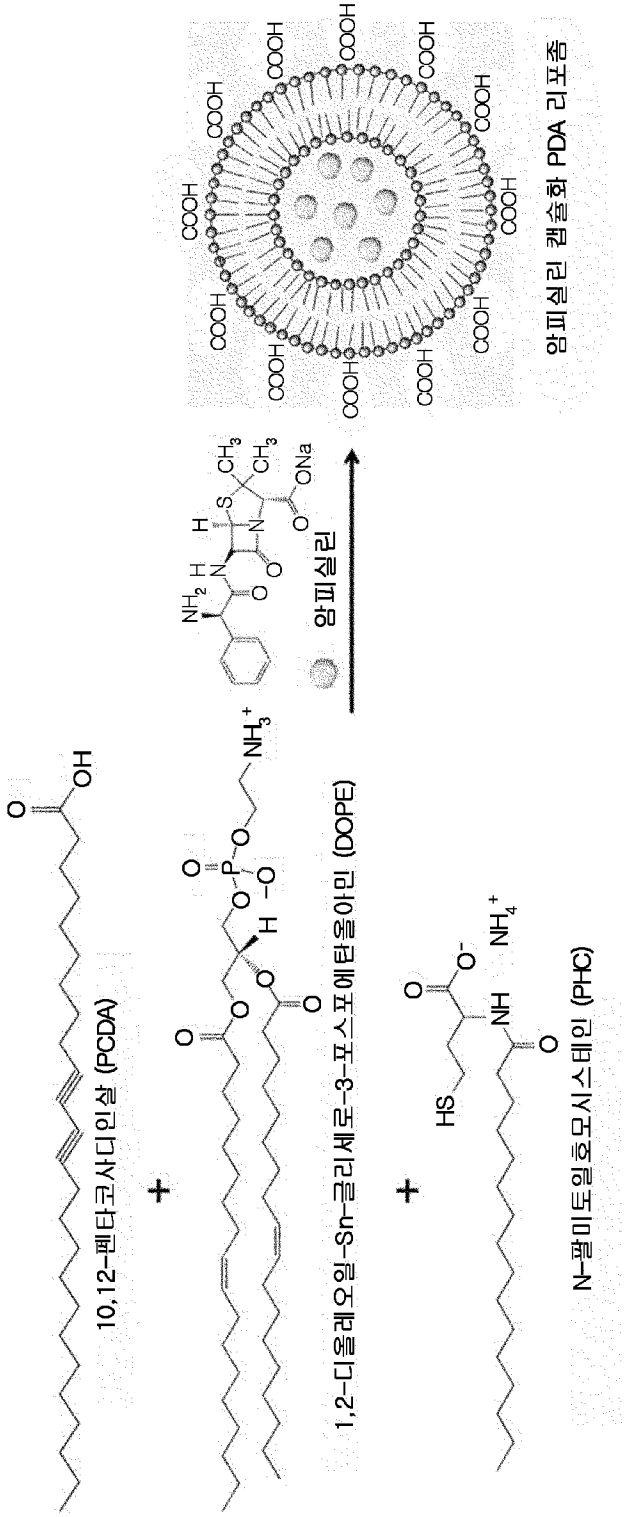
[청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 폴리아세틸렌 리포좀이 인접한 폴리아세틸렌 리포좀과

융합시 리포좀 내부의 약물이 방출되고,
상기 약물 방출시 폴리아세틸렌 리포좀은 자체적으로 고유한 형광을 발하고, 상기 형광을 실시간으로 모니터링할 수 있는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

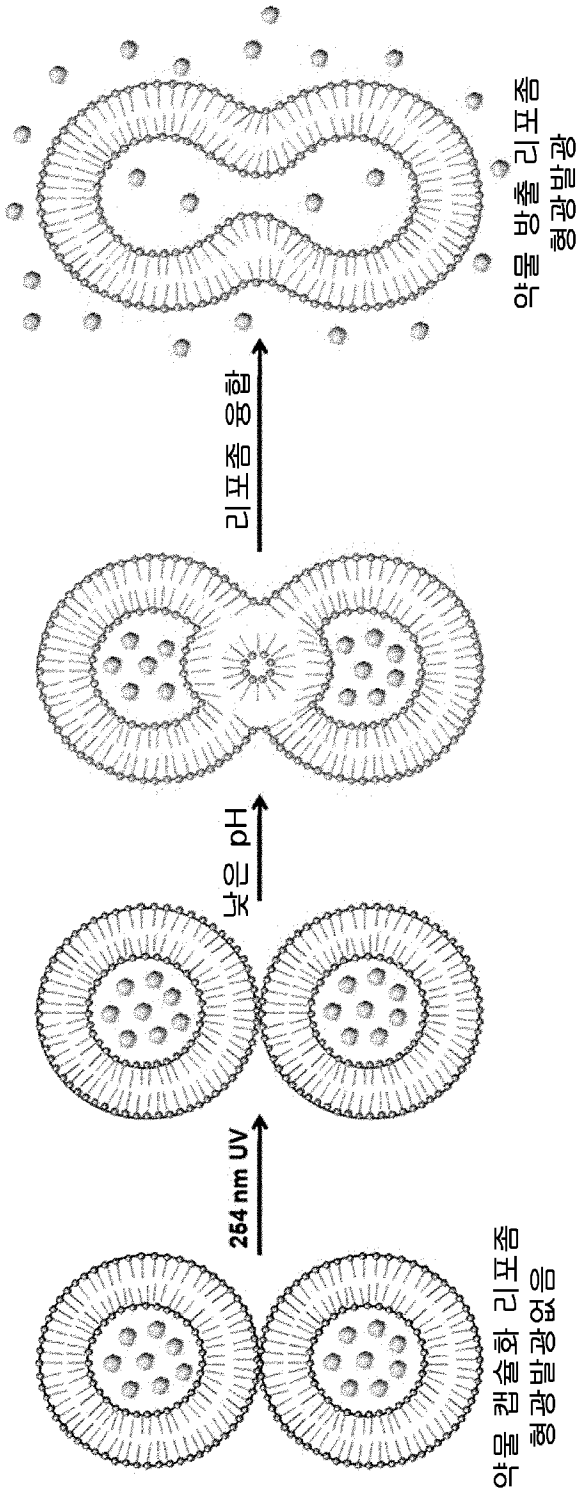
[청구항 9] 제 5 항에 있어서,
상기 약물은 항생 약물 또는 항암 약물인 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

[청구항 10] 제 5 항에 있어서,
상기 약물 전달체는 약물 방출시기 및 방출량을 조절할 수 있는 것으로서, 상기 약물 방출시기 및 방출량은 하기 단계에 의해서 조절됨과 동시에 자체적으로 발하는 고유의 형광을 통하여 약물방출을 실시간으로 모니터링할 수 있는 것을 특징으로 하는 약물 전달체:
(a) 약물 전달체에 대해서 매질의 pH 조건을 3-7 범위에서 제어하여 약물의 방출시기를 조절하는 단계;
(b) 상기 방출시기를 조절하여 약물을 방출함과 동시에 외부 자극인 pH 조건의 변화에 의해서 리포좀이 자체적으로 고유한 형광을 발현하는 단계; 및
(c) 상기 리포좀의 형광을 통해서 약물 방출 및 방출량을 확인하고 모니터링하는 단계.

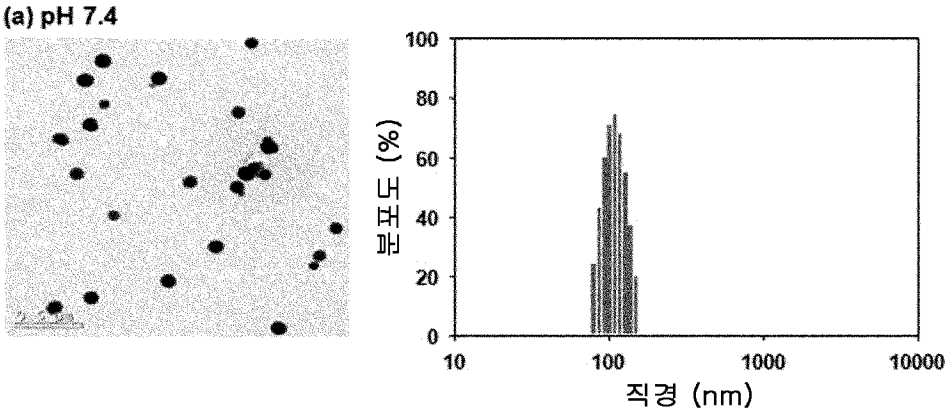
[Fig. 1a]


10,12-펜타코사디인살 (PCDA)
1,2-디올레오일-Sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE)
N-팔미도일호모시스테인 (PHC)
암피실린
암피실린 캡슐화 PDA 리포좀

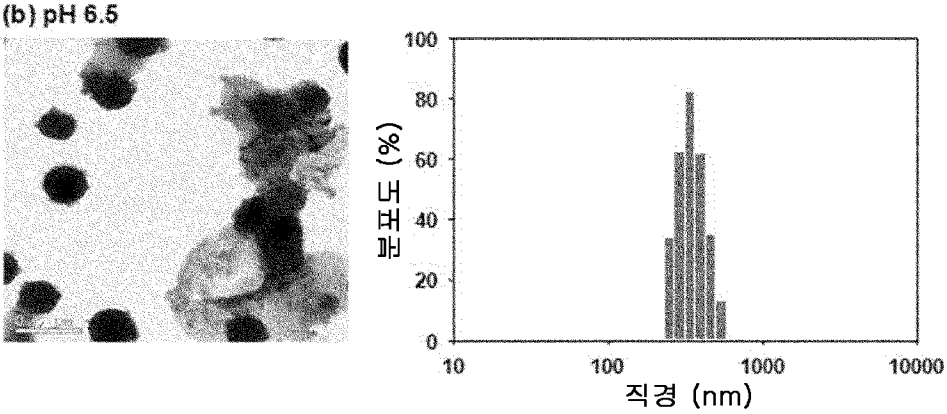
[Fig. 1b]



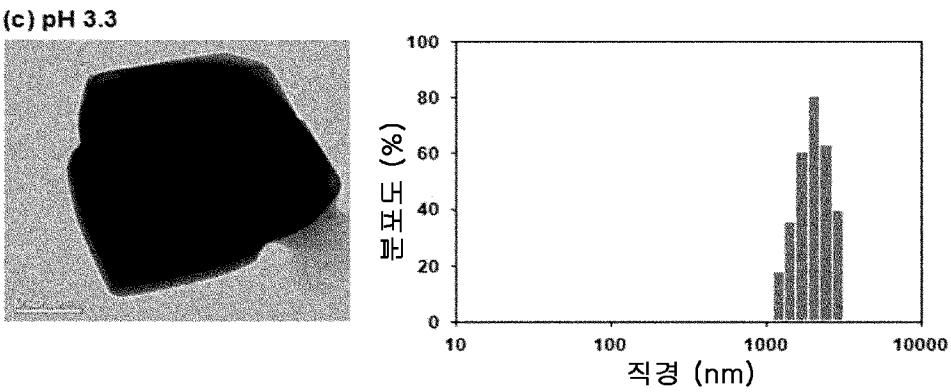
[Fig. 2a]



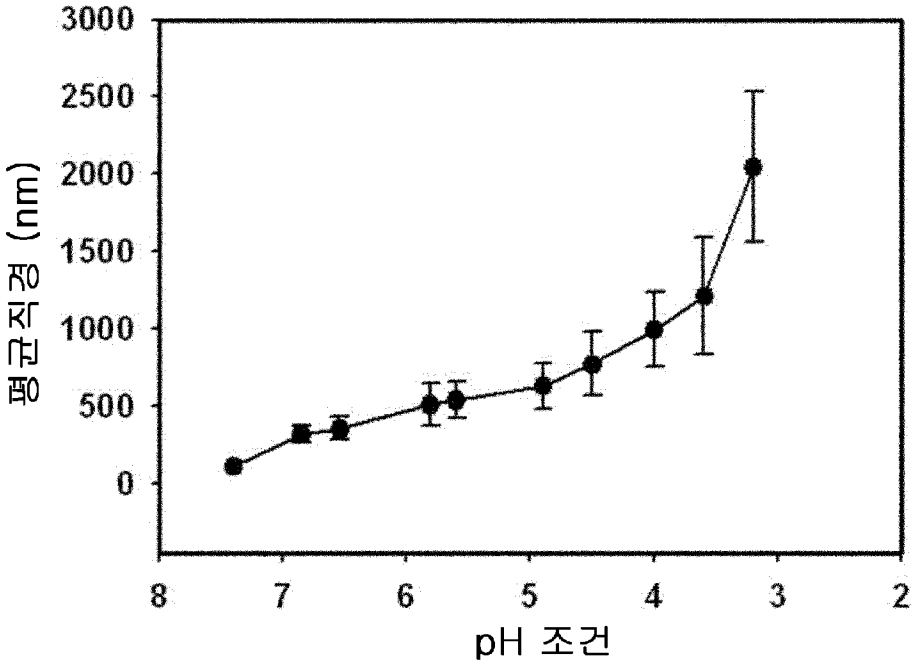
[Fig. 2b]



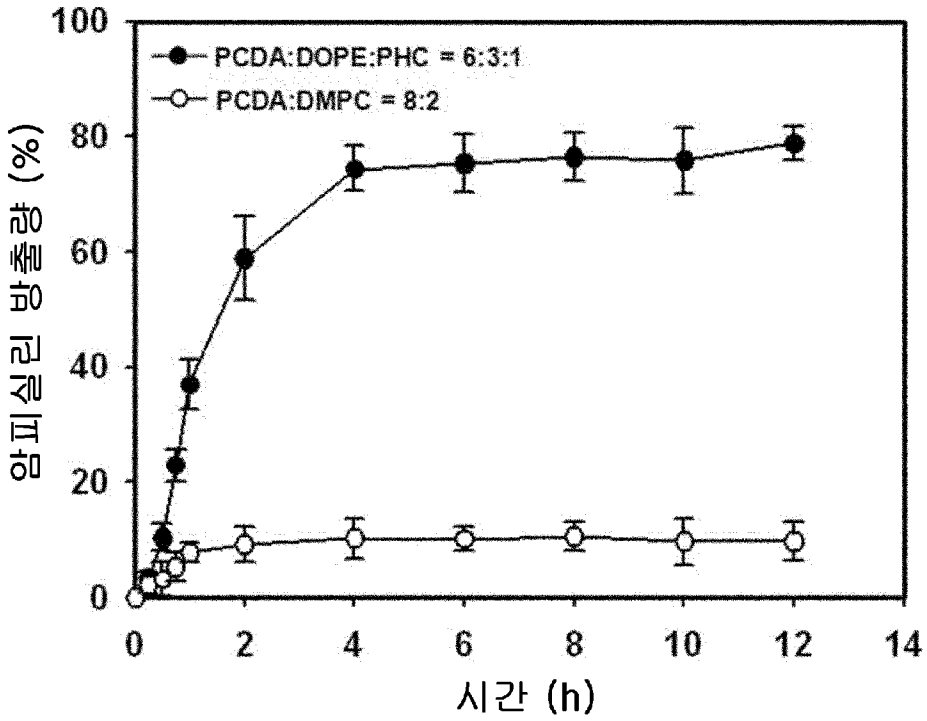
[Fig. 2c]



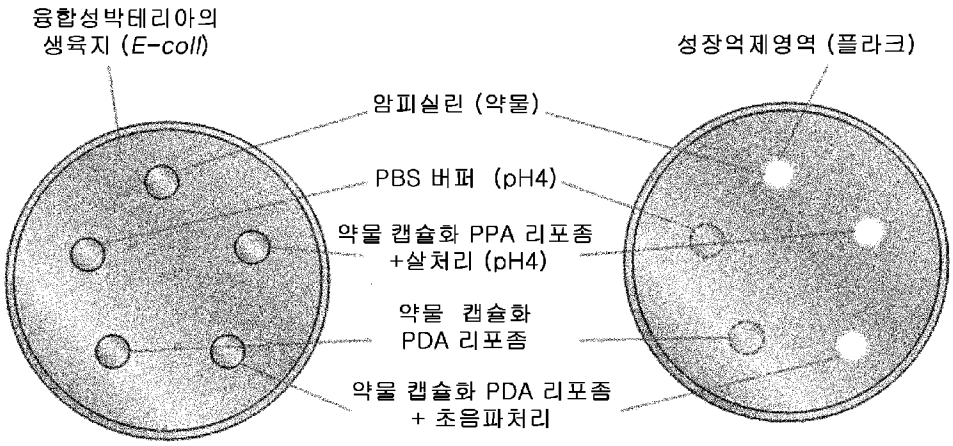
[Fig. 3]


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
평균직경 (nm)
8
7
6
5
4
3
2
pH 조건

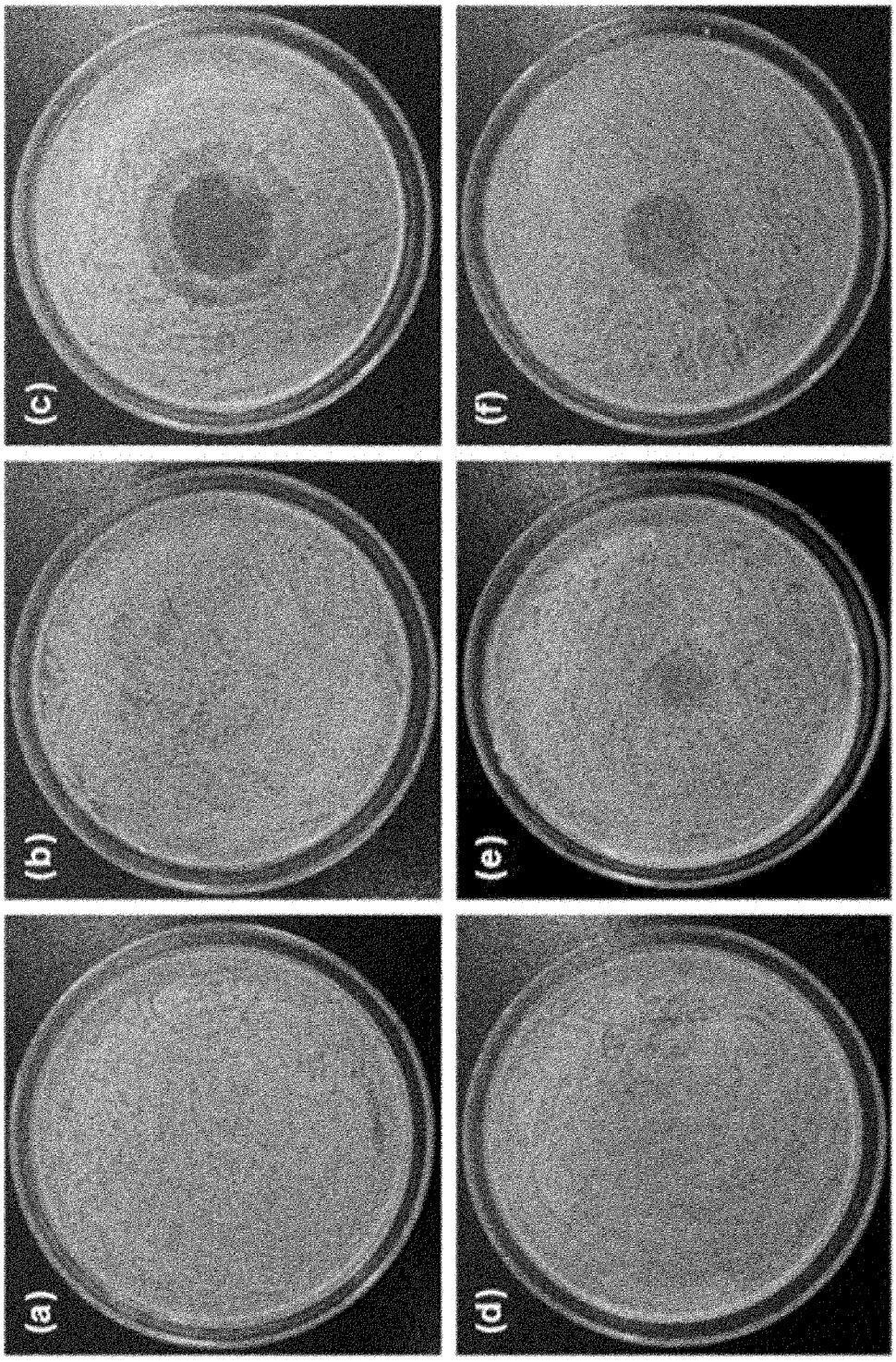
[Fig. 4]


100
80
60
40
20
0
암피실린 방출량 (%)
PCDA:DOPE:PHC = 6:3:1
PCDA:DMPC = 8:2
0
2
4
6
8
10
12
14
시간 (h)

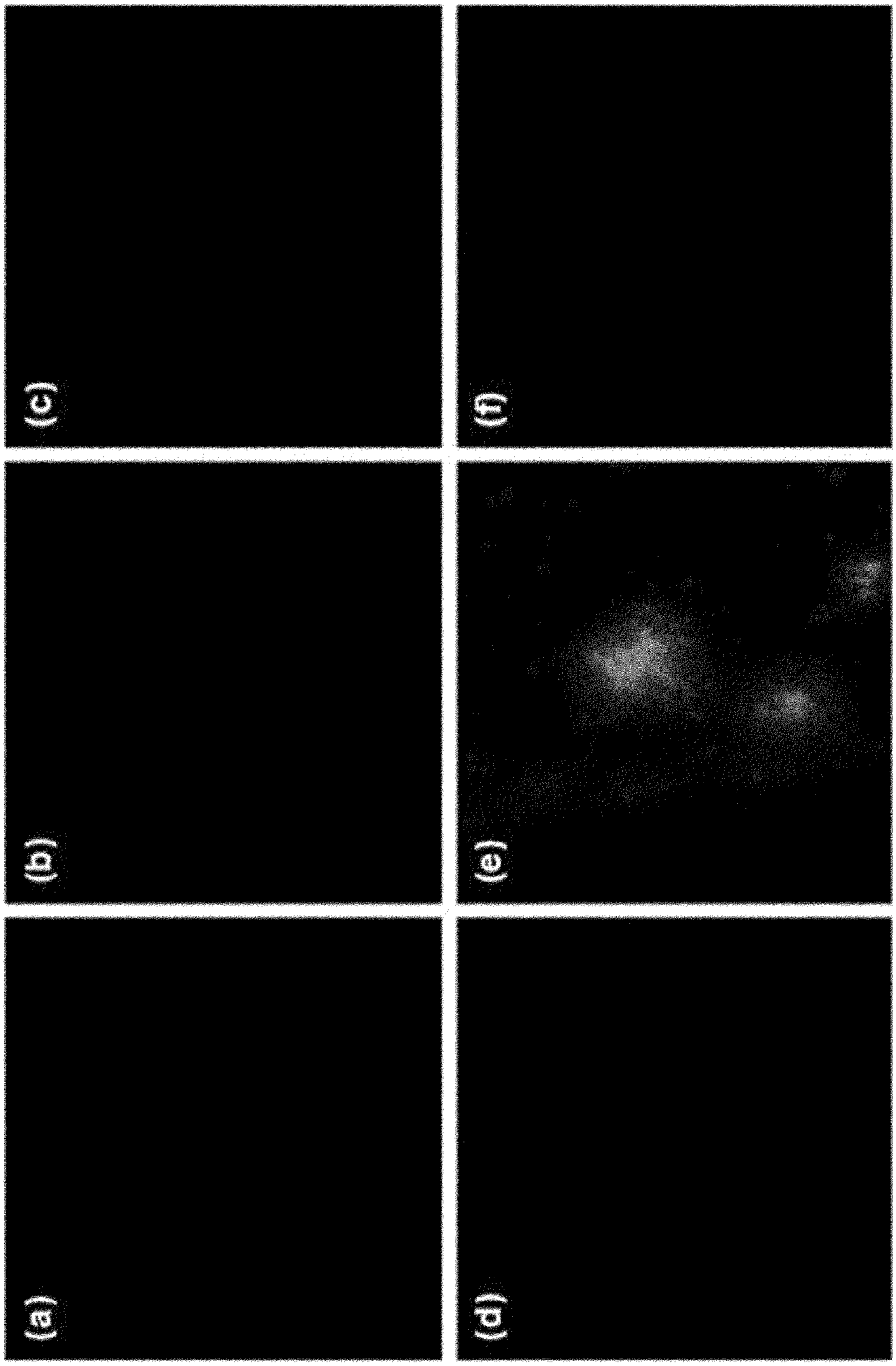
[Fig. 5]


융합성박테리아의
생육지 (E-coli)
성장억제영역 (플라크)
암피실린 (약물)
PBS 버퍼 (pH4)
약물 캡슐화 PPA 리포좀
+살처리 (pH4)
약물 캡슐화
PDA 리포좀
약물 캡슐화 PDA 리포좀
+ 초음파처리

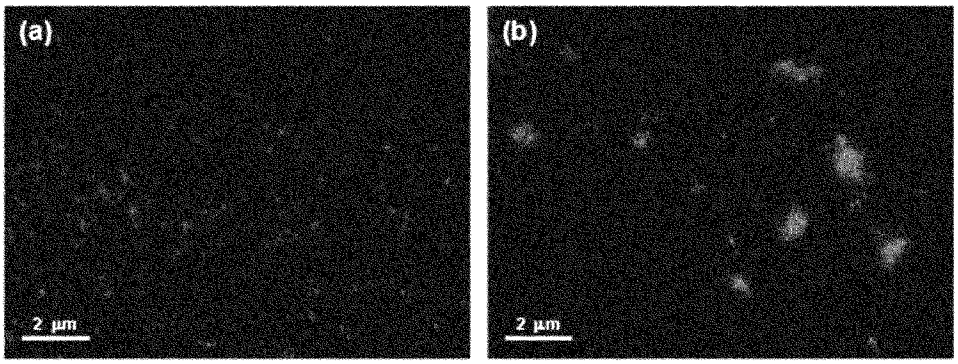
[Fig. 6]



[Fig. 7]

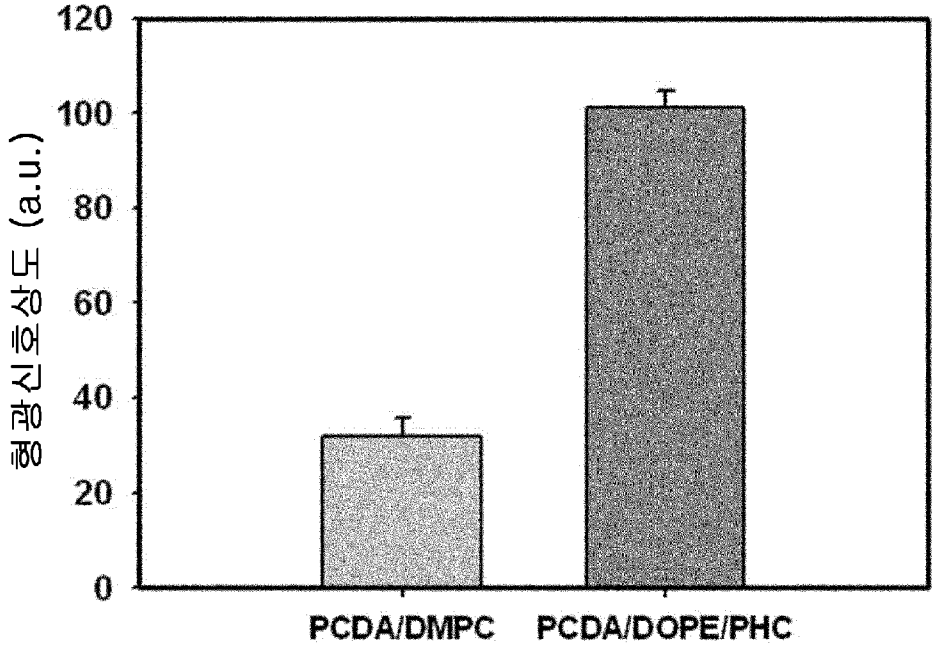


[Fig. 8]



PCDA/DMPC 리포좀 (pH4) PCDA/DOPE/PHC 리포좀 (pH4)

[Fig. 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/005860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/127; A61K 31/195; A61K 9/10; A61K 9/16; A61K 47/48; A61K 47/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: polydiacetylene(polydiacetylene), liposome(liposome), 10,12-pentacosadiynoic acid (10,12-pentacosadiynoic acid), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), N-palmitoyl homocysteine(N-palmitoyl homocysteine)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CONNOR, J. et al., "pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion", Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984, vol. 81, pages 1715-1718. See pages 1715-1717.	1-10
A	WO 2010-091078 A2 (DANFOSS AQUAZ A/S) 12 August 2010 See claims 1-20; pages 4 and 9.	1-10
A	US 6730322 B1 (BERNSTEIN, H. et al.) 04 May 2004 See claims 1-20; column 5, line 5 - column 6, line 28.	1-10
A	US 2008-0131498 A1 (HASSAN, M. et al.) 05 June 2008 See claims 1-7; paragraphs [0046], [0047] and [0062].	1-10
A	GUO, X. et al., "Mechanism of pH-triggered collapse of phosphatidylethanolamine liposomes stabilized by an ortho ester polyethyleneglycol lipid", Biophysical Journal, 2003, vol. 84, pages 1784-1795. See pages 1784 and 1785.	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 SEPTEMBER 2013 (30.09.2013)	**01 OCTOBER 2013 (01.10.2013)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

International application No.
PCT/KR2013/005860

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2010-091078 A2	12/08/2010	AU 2010-210664 A1	25/08/2011
		CA 2751331 A1	12/08/2010
		CN 102395357 A	28/03/2012
		EP 2393481 A2	14/12/2011
		IL 214395 D	27/09/2011
		JP 2012-516776 A	26/07/2012
		KR 10-2011-0117696 A	27/10/2011
		MA 33094 B1	01/03/2012
		MX 2011008050 A	09/09/2011
		SG 173165 A1	29/08/2011
		US 2012-0043275 A1	23/02/2012
US 6730322 B1	04/05/2004	AU 1999-29954 A1	23/11/1999
		AU 1999-29954 B2	02/05/2002
		CA 2329875 A1	11/11/1999
		CN 1301150 A	27/06/2001
		EP 1073422 A1	07/02/2001
		EP 1073422 B1	08/03/2006
		JP 2002-513752 A	14/05/2002
		JP 5153032 B2	27/02/2013
		KR 10-0703051 B1	05/04/2007
		US 2001-0000230 A1	12/04/2001
		US 2001-0000470 A1	26/04/2001
		US 2001-0043948 A1	22/11/2001
		US 2003-0147962 A1	07/08/2003
		US 2007-0104656 A1	10/05/2007
		US 6423345 B2	23/07/2002
		US 6689390 B2	10/02/2004
		US 7052719 B2	30/05/2006
		US 7160557 B2	09/01/2007
		WO 99-56731 A1	11/11/1999
US 2008-0131498 A1	05/06/2008	AU 1999-48156 A1	05/01/2000
		EP 1089727 A1	11/04/2001
		EP 1089727 B1	07/12/2005
		JP 2002-518322 A	25/06/2002
		US 2004-0022841 A1	05/02/2004
		US 2013-0039977 A1	14/02/2013
		US 7351427 B2	01/04/2008
		WO 99-65481 A1	23/12/1999

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/005860

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/127(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/127; A61K 31/195; A61K 9/10; A61K 9/16; A61K 47/48; A61K 47/30

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 폴리디아세틸렌(polydiacetylene), 리포좀(liposome), 10,12-펜타코사디인산(10,12-pentacosadiynoic acid), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), N-팔미토일 호모시스테인(N-palmitoyl homocysteine)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CONNOR, J. 외 2명, 'pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion', Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984년, 81권, 페이지 1715-1718. 페이지 1715-1717 참조.	1-10
A	WO 2010-091078 A2 (DANFOSS AQUAZ A/S) 2010.08.12. 청구항 1-20; 페이지 4 및 9 참조.	1-10
A	US 6730322 B1 (BERNSTEIN, H. 외 3명) 2004.05.04. 청구항 1-20; 컬럼 5, 라인 5 - 컬럼 6, 라인 28 참조.	1-10
A	US 2008-0131498 A1 (HASSAN, M. 외 1명) 2008.06.05. 청구항 1-7; 단락 [0046], [0047] 및 [0062] 참조.	1-10
A	GUO, X. 외 2명, 'Mechanism of pH-triggered collapse of phosphatidylethanolamine liposomes stabilized by an ortho ester polyethyleneglycol lipid', Biophysical Journal, 2003년, 84권, 페이지 1784-1795. 페이지 1784 및 1785 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 09월 30일 (30.09.2013)	2013년 10월 01일 (01.10.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
최승희
전화번호 +82-42-481-8740

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/005860

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2010-091078 A2	2010/08/12	AU 2010-210664 A1	2011/08/25
		CA 2751331 A1	2010/08/12
		CN 102395357 A	2012/03/28
		EP 2393481 A2	2011/12/14
		IL 214395 D	2011/09/27
		JP 2012-516776 A	2012/07/26
		KR 10-2011-0117696 A	2011/10/27
		MA 33094 B1	2012/03/01
		MX 2011008050 A	2011/09/09
		SG 173165 A1	2011/08/29
		US 2012-0043275 A1	2012/02/23
US 6730322 B1	2004/05/04	AU 1999-29954 A1	1999/11/23
		AU 1999-29954 B2	2002/05/02
		CA 2329875 A1	1999/11/11
		CN 1301150 A	2001/06/27
		EP 1073422 A1	2001/02/07
		EP 1073422 B1	2006/03/08
		JP 2002-513752 A	2002/05/14
		JP 5153032 B2	2013/02/27
		KR 10-0703051 B1	2007/04/05
		US 2001-0000230 A1	2001/04/12
		US 2001-0000470 A1	2001/04/26
		US 2001-0043948 A1	2001/11/22
		US 2003-0147962 A1	2003/08/07
		US 2007-0104656 A1	2007/05/10
		US 6423345 B2	2002/07/23
		US 6689390 B2	2004/02/10
		US 7052719 B2	2006/05/30
		US 7160557 B2	2007/01/09
		WO 99-56731 A1	1999/11/11
US 2008-0131498 A1	2008/06/05	AU 1999-48156 A1	2000/01/05
		EP 1089727 A1	2001/04/11
		EP 1089727 B1	2005/12/07
		JP 2002-518322 A	2002/06/25
		US 2004-0022841 A1	2004/02/05
		US 2013-0039977 A1	2013/02/14
		US 7351427 B2	2008/04/01
		WO 99-65481 A1	1999/12/23