

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 11월 24일 (24.11.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/186429 A1

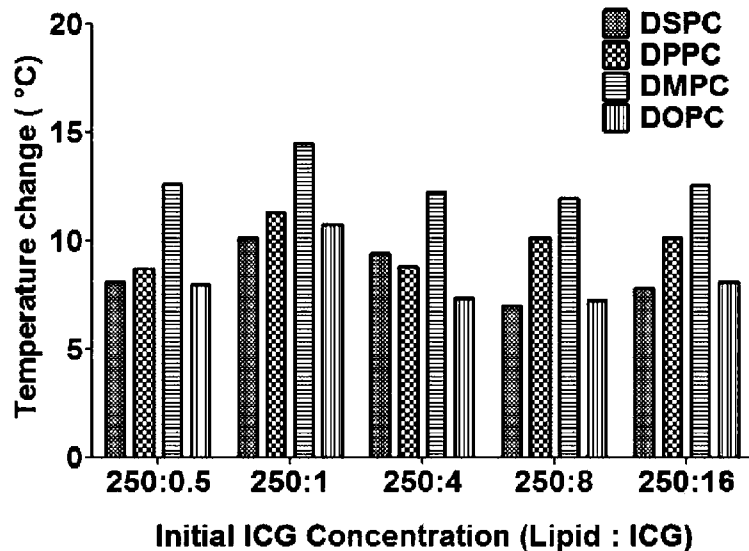
- (51) 국제특허분류:
A61K 9/127 (2006.01) A61K 9/107 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005209
- (22) 국제출원일: 2016년 5월 17일 (17.05.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0068674 2015년 5월 18일 (18.05.2015) KR
- (71) 출원인: 고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박지호 (PARK, Ji Ho); 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 외국인교수아파트 C-501, Daejeon (KR). 윤환준 (YOON, Hwan-Jun); 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, Daejeon (KR). 이혜성 (LEE, Hyesong); 34141 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, Daejeon (KR). 김현구 (KIM, Hyun Koo); 06579 서울시 서초구 반포대로 39 길 63-8, A-402, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123, 11층, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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: COMPOSITION FOR CANCER TREATMENT COMPRISING INDOCYANINE GREEN-LIPOSOME COMPOSITE

(54) 발명의 명칭: 인도시아닌 그린-리포좀 복합체를 포함하는 암 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for cancer treatment comprising an indocyanine green-capsulated liposome composite, a cancer treatment method using the same, and a method for preparing the same and, specifically, to a composition for cancer treatment, which comprises a composite containing indocyanine green and a liposome and treats cancer using the light heat generated from the irradiation of therapeutically effective light, to a cancer treatment method using the same, and a method capable of preparing the same.

(57) 요약서: 본 발명은 인도시아닌 그린 이 캡슐화된 리포좀 복합체를 포함하는 암 치료용 조성물, 이를 이용한 암 치료방법 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 리포좀 및 인도시아닌그린을 포함하는 복합체를 포함하고, 치료적으로 유효한 광 조사시 발생하는 광열을 이용하여 암을 치료하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물, 이를 이용한 암 치료방법 및 이를 제조할 수 있는 방법에 관한 것이다.



WO 2016/186429 A1



공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 인도시아닌 그린-리포좀 복합체를 포함하는 암 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 인도시아닌 그린(Indocyanine green, ICG)이 캡슐화된 리포좀 복합체를 포함하는 암 치료용 조성물, 이를 이용한 암 치료방법 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 치료적으로 유효한 광 조사에 의해 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물, 이를 이용한 암 치료방법 및 이를 제조할 수 있는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인도시아닌 그린(Indocyanine green, ICG)은 근적외선 형광 다이(NIR)로, 미국 FDA(Food and Drug Administration)에서 림프계 뿐 아니라 심장, 간 혈관 시스템의 진단에 사용 허가를 받은 물질이다. 특히, 인도시아닌 그린은 유방암의 조기 진단을 위한 전이성 림프노드의 이미징 및 감시림프절(sentinel lymph node)의 맵핑에 우수한 프로브로 알려져 있다.
- [4] 이러한 인도시아닌 그린은 친수성이 낮고, 광안정성이 낮으며, 광자 수율이 낮고, 감도가 떨어지는 단점을 가지고 있다. 또한, 인도시아닌 그린은 비특이적 응집에 취약하고, 외부 광, 용매 및 온도 변화에 의해 화학적으로 분해되는 단점이 있으며, 낮은 분자량과 소수성 특징 때문에 혈청 단백질로 잘 흡수되어 빠르게 간을 거쳐 제거된다는 문제점이 있다.
- [5] 이러한 단점을 극복하고자, 나노 물질 기반 인도시아닌 그린 프로브가 연구되어 왔으며, 나노파티클에 인도시아닌 그린을 포집하거나, 폴리머 등을 이용하여, 인도시아닌 그린의 in vivo 및 in vitro에서의 안정성을 증가시킨 연구가 있어왔다. 인도시아닌 그린을 나노파티클에 포집함으로써, 외부 광선 및 온도에 대한 물리화학적 안정이 현저히 증가되었다.
- [6] 그럼에도 불구하고, 현재 인도시아닌 그린을 체내에 적용 가능한 리포좀과 결합시켜 이를 암 치료용 조성물에 적용한 예는 없다. 암 광치료는 광에 기반한 것으로, 암 치료시 위험하고 비용이 많이 드는 수술에 의하지 않고, 종양 부위에 광을 쏘여 암을 치료하는 방법이다.
- [7] 광 치료법은 외과수술법에 비해 비파괴적이고 간단하며 부작용이 적다. 또한, 전신 마취가 불필요하고 환자의 고통도 거의 없으며, 안정과 회복을 위한 기간이 짧을 뿐만 아니라 여러 차례 반복 치료가 가능한 이점도 있다.
- [8] 한편, 종양 부위에 발열기구를 삽입하여 단순히 가열하는 방식을 갖는 열에 의한 암 치료기술은 이미 오래 전에 시도된 바 있으나, 암세포와 정상세포의 식별이 불가능하여 암세포 주변의 정상세포들도 파괴되는 문제로 인해, 실제 임상에는 널리 적용되지 못하였다. 이에 반해, 광 치료법은 약물 치료법과

방사선 치료법의 단점을 모두 극복한 새로운 암 치료법이라 할 수 있다. 초기의 광 치료법은 광원에 따라 그 종류가 다양하나, 대부분 치료기간이 길고, 치료 부위의 경계면이 부정확하다는 단점을 가지고 있다.

- [9] 예를 들어, 실리카 나노입자에 금을 코팅한 나노셸과 근적외선을 결합한 광 치료기술 또는 단일벽 탄소나노튜브 (single wall carbon nanotube: SWCNT)를 근적외선과 결합한 광 치료기술이 선택적 암 치료를 위한 방법으로 사용될 수 있음이 제시되었으나, 이들은 체내 적용에 허가를 받은 물질이 아니어서 임상적 적용에 제한이 있고, 목적하는 열을 얻기 위해 매우 고강도의 근적외선을 사용하여야 하나 광원의 강도가 이렇게 높으면 정상세포가 나노셸이나 SWCNT와 같은 발열체와 아주 가까이 있지 않더라도 손상될 수 있다는 문제점이 발생한다.
- [10] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 인도시아닌 그린의 리포솜에 캡슐화되어 있는 복합체를 포함하고, 치료적으로 유효한 광 조사에 의해 세포사멸을 유도할 수 있는 암 치료용 조성물을 통해 종래의 문제점을 해결하고, 목적하는 암 치료 효과를 달성할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[11]

[12] **발명의 요약**

- [13] 본 발명의 목적은 치료적으로 유효한 광 조사에 의해 세포사멸을 유도하여 목적하는 암 치료 효과를 나타낼 수 있는 인도시아닌 그린의 리포솜 복합체를 포함하는 암 치료용 조성물 및 그의 제조방법을 제공하는 데 있다.

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 포스파티딜콜린, 안정화제 및 인도시아닌 그린의 혼합에 의해 제조되는 인도시아닌 그린-리포솜 복합체를 함유하고, 상기 인도시아닌 그린은 리포솜에 캡슐화(encapsulation)된 것이며, 치료적으로 유효한 광 조사에 의해 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물을 제공한다.

- [15] 본 발명은 또한, 다음의 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다:

- [16] (a) 인도시아닌 그린의 리포솜에 캡슐화되어 있는 인도시아닌 그린-리포솜 복합체를 환자에 투여하는 단계; 및

- [17] (b) 종양 부위에 축적된 상기 (a) 단계에서 투여된 복합체에 치료적으로 유효한 광을 조사하는 단계.

- [18] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 암 치료용 조성물의 제조방법을 제공한다:

- [19] (a) 유기용매 중에 1종 이상의 포스파티딜콜린과 안정화제 및 인도시아닌 그린을 용해시키고, 유기용매를 제거하여 케익을 제조하는 단계;

- [20] (b) 상기 케익을 수화시켜 분산액을 제조하고, 다공성 고분자막에 압출시켜 인도시아닌 그린의 리포솜을 제조하는 단계; 및

- [21] (c) 상기 단계 (b)의 리포솜 중 인도시아닌 그린의 리포솜 내에 캡슐화된 복합체를 분리하는 단계.

[22]

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 인도시아닌 그린에 캡슐화된 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 포스파티딜콜린과 ICG 비율에 따라 광 조사시 발열 정도를 비교한 그래프이다;

[24] 도 2는 DSPC를 포함하는 리포솜 제조시, 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 DSPC와 ICG 비율에 따라 광 조사시 발열 정도를 비교한 그래프이다;

[25] 도 3은 DPPC를 포함하는 리포솜 제조시, 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 DPPC와 ICG 비율에 따라 광 조사시 발열 정도를 비교한 그래프이다;

[26] 도 4는 DMPC를 포함하는 리포솜 제조시, 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 DMPC와 ICG 비율에 따라 광 조사시 발열 정도를 비교한 그래프이다;

[27] 도 5는 DOPC를 포함하는 리포솜 제조시, 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 DOPC와 ICG 비율에 따라 광 조사시 발열 정도를 비교한 그래프이다;

[28] 도 6은 리포솜과 결합하지 않은 자유 ICG (free ICG)에 광 조사시 발열 정도를 비교한 그래프이다;

[29] 도 7은 DSPC를 포함하는 리포솜 제조시, 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 DSPC와 ICG 비율에 따라 흡광도를 비교한 그래프이다;

[30] 도 8은 DPPC를 포함하는 리포솜 제조시, 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 DPPC와 ICG 비율에 따라 흡광도를 비교한 그래프이다;

[31] 도 9는 DMPC를 포함하는 리포솜 제조시, 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 DMPC와 ICG 비율에 따라 흡광도를 비교한 그래프이다;

[32] 도 10은 DOPC를 포함하는 리포솜 제조시, 리포솜 복합체를 제조하기 위한 혼합물 중 DOPC와 ICG 비율에 따라 흡광도를 비교한 그래프이다;

[33] 도 11은 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC 각각을 포함한 리포솜에서 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC와 ICG 비율에 따라 상대적 형광 세기를 비교한 그래프이다;

[34] 도 12는 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC 각각을 포함한 리포솜에서 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC와 ICG 비율에 따라 수동력학적 평균 직경을 비교한 그래프이다;

[35] 도 13은 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC 각각을 포함한 리포솜에서 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC와 ICG 비율에 따라 제타 포텐셜을 비교한 그래프이다;

[36] 도 14는 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC 각각을 포함한 리포솜에서 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC와 ICG 비율에 따라 다분산지수(Polydispersity Index, PDI)를 비교한 그래프이다;

[37] 도 15는 DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC와 ICG 비율에 따른 광열 효과를 나타낸 그래프이다; 및

[38] 도 16은 DMPC를 포함하는 리포솜 복합체에서 광 조사에 따른 세포생존도를 나타낸 그래프이다.

[39]

- [40] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예
- [41] 본 발명은 일 관점에서, 포스파티딜콜린, 안정화제 및 인도시아닌 그린의 혼합에 의해 제조되는 인도시아닌 그린-리포솜 복합체를 함유하고, 상기 인도시아닌 그린은 리포솜에 캡슐화(encapsulation)된 것이며, 치료적으로 유효한 광 조사에 의해 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [42] 본 출원의 발명자들은 인도시아닌 그린의 캡슐화된 리포솜 복합체를 통해 인도시아닌 그린의 낮은 안정성과 관련된 단점을 극복함으로써 인도시아닌 그린의 안정성을 향상시킬 수 있을 뿐 아니라, 치료적으로 유효한 광 조사시 세포사멸에 의한 암 치료가 가능함을 확인하였다.
- [43] 본 명세서에서 광 조사에 의한 세포사멸은 광치료(phototherapy)에 의해 달성되는 것으로, 광치료는 부작용이 적고, 비침습적이며, 특정 파장의 광에 특이적이기 때문에, 암치료에 널리 사용되는 임상 방법 중 하나이다. 광치료는 광역치료 (photodynamic therapy, PDT) 및 광열치료 (photothermal therapy, PTT)를 포함하며, 이를 위해 각각 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)과 열에너지 발생을 위한 빛과 광민감제(photosensitizer)를 포함한 제제가 필요하다.
- [44] 본 출원의 발명자들은 특히, 본 발명에 따른 인도시아닌 그린의 캡슐화된 리포솜 복합체에 광 조사시 우수한 광열 치료 효과가 나타날 수 있음을 확인하였다. 이러한 효과는 암세포에 대한 세포 독성을 높여 암 치료 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [45] 하나의 실시예에서, 상기 리포솜은 포스파티딜콜린 및 안정화제를 포함하여 제조되는데, 단일 라멜라 (unilamellar) 또는 복합 라멜라 (multilamellar) 형태의 리포솜이 사용될 수 있다. 상기 포스파티딜콜린은 콜린을 도입한 인지질의 일종으로, 포화 또는 불포화 지방산의 소수성 꼬리 (hydrophobic tail) 및 콜린 친수성 머리 (hydrophilic head)를 포함하며, 예를 들어 L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken), L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Egg, Chicken), L- α -phosphatidylcholine (Soy), L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy), 1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (10:0 PC), 1,2-diundecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (11:0 PC), 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (12:0 PC (DLPC)), 1,2-ditridecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (13:0 PC), 1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (15:0 PC), 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (4ME 16:0 PC), 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (17:0 PC), 1,2-dinonadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (19:0 PC), 1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (20:0 PC), 1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (14:1 (Δ 9-Cis) PC), 1,2-dimyristelaidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (14:1 (Δ 9-Trans) PC),

1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (16:1 (Δ^9 -Cis) PC),
 1,2-dipalmitelaidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (16:1 (Δ^9 -Trans) PC),
 1,2-dipetroselenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:1 (Δ^6 -Cis) PC),
 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:1 (Δ^9 -Cis) PC (DOPC)),
 1,2-dielaaidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:1 (Δ^9 -Trans) PC),
 1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:2 (Cis) PC),
 1,2-dilinolenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:3 (Cis) PC),
 1,2-dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (20:1 (Cis) PC), DSPC
 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC
 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC
 (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 및 DOPC
 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일
 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [46] 본 출원의 발명자들은 리포솜이 결합되지 않은 자유 ICG (공지의 인도시아닌 그린 단독 사용) 및 리포솜 표면에 결합된 ICG에 비해 리포솜이 캡슐화된 ICG에서 향상된 광열 효과가 나타남을 확인하였다. 이를 바탕으로, 본 명세서에서 사용되는 캡슐화는 인도시아닌 그린을 실질적으로 리포솜 내 공간에만 존재하여 리포솜-ICG 복합체를 형성하는 것을 의미하며, 리포솜이 결합되지 않은 자유 ICG (free ICG) 또는 리포솜 표면에만 결합된 ICG는 제거되어 실질적으로 존재하지 않는 것을 의미한다.
- [47] 또한, 본 출원의 발명자들은 특히 인지질의 소수성 꼬리 길이가 짧아질수록 광열 효과가 향상되고, 소수성 꼬리에 불포화 지방산이 포함되면 광열 효과가 감소할 수 있음을 확인하였다.
- [48] 이를 바탕으로, DSPC, DPPC, DMPC 또는 DOPC를 포함하는 리포솜을 고려한 결과, 동일한 인도시아닌 그린 농도일 때 DMPC를 포함하는 리포솜 제조시, 가장 우수한 광열효과가 나타남을 확인하였다. DMPC는 소수성 꼬리의 탄소수가 14개로, 16개인 DPPC, 18개인 DSPC 또는 DOPC에 비해 소수성 꼬리 길이가 짧고, 소수성 꼬리에 불포화 지방산이 포함된 DOPC에 비해 우수한 광열 효과를 나타냄을 확인하였다 (시험예 3). 따라서, 상기 포스파티딜콜린은 바람직하게 DMPC일 수 있다.
- [49] 상기 안정화제는 지질, 지질 유도체, 단백질 또는 펩타이드 등일 수 있고, 구체적으로 폴리에틸렌글리콜이 컨쥬게이션된 포스파티딜에탄올아민일 수 있다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 안정화에 적합한 정도의 크기라면 제한없이 사용될 수 있으나, 예를 들어 분자량이 약 1,000 내지 10,000, 바람직하게 2,000 내지 8,000, 더욱 바람직하게 2,000 내지 6,000일 수 있다.
- [50] 상기 포스파티딜에탄올아민은 모노 또는 디 불포화지방산일 수 있으며, 예를 들어 DMPE (dimyristoylphosphatidylethanolamine), DPPE (dipalmitoylphosphatidylethanolamine), DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine) 및

DSPE (distearoylphosphatidyl-ethanolamine)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [51] 상기 포스파티딜콜린 및 안정화제는 인도시아닌 그린과 함께 광열 효과를 내기에 적합한 리포솜 형성에 적합한 정도로 포함될 수 있으며, 예를 들어 포스파티딜콜린 및 안정화제의 물비가 약 85:15 내지 약 98:2, 바람직하게 약 90:10 내지 95:5일 수 있다. 상기 물비 범위 내에서, 생체 내 리포솜이 가장 안정되어 수명을 최대화 시킬 수 있다.
- [52] 상기 혼합물 중 포스파티딜콜린과 인도시아닌 그린은 암 치료를 위한 광열 효과를 내기에 적합한 정도라면 제한되지 않으나, 예를 들어 250:0.1-32의 물비로 포함될 수 있다. 바람직하게, 상기 혼합물 중 포스파티딜콜린과 인도시아닌 그린은 250:0.5-16의 물비로 포함될 수 있다. 해당 범위 전체에서 목적하는 광열 효과를 나타낼 수 있으며, 본 출원의 발명자들은 특히, 해당 범위의 물비로 포스파티딜콜린과 인도시아닌 그린을 포함하는 경우, 인도시아닌 그린의 리포솜 내부에서 최적으로 분산되어 캡슐화된 복합체를 형성할 수 있으며, 암 치료에 유효한 광열 효과를 나타낼 수 있는 최적 흡광도를 가짐으로써, 유의한 광열 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [53] 기재된 범위보다 인도시아닌 그린의 포함량이 적으면 목적하는 정도의 광 반응 효과를 기대할 수 없고, 상대적으로 리포솜의 양이 많아져 리포솜 제조에 소요되는 비용 및 시간을 고려하였을 때 매우 비효율적이며, 기재된 범위보다 인도시아닌 그린의 포함량이 많으면, 오히려 리포솜 내에서 응집이 일어나거나, 더 이상 광에 반응하지 않는 정도의 임계치에 도달하게 되어 상승적 광열 효과 기대할 수 없다. 특히, 포스파티딜콜린과 인도시아닌 그린의 250:1의 물비를 가지는 경우 가장 우수한 광열 효과를 나타냄을 확인하였다. 이는 250:1의 물비로 포함된 포스파티딜콜린과 인도시아닌 그린으로부터 제조된 리포솜 복합체 중 인도시아닌 그린의 가장 높은 분산도로 분포되어 있기 때문일 것으로 판단된다.
- [54] 하나의 실시예에서, 상기 복합체에 근적외선 조사시 열이 발생할 수 있으며, 상기 근적외선은 700-900nm에서 100 mW 이상의 전력으로 3분 이상 조사될 수 있다. 이 때, 열을 발생시키는 전력은 예를 들어 100 mW 이상, 1 W 이하일 수 있으며, 바람직하게 400mW 이상 800mW 이하일 수 있다. 광 조사 시간은 3분 이상 30분 이하일 수 있다. 전술한 범위 보다 낮은 광 조사 조건에서는 인도시아닌 그린의 효과적으로 광열효과 발생에 소모되지 않으며, 높은 광 조사 조건에서는 주변 정상세포가 광 독성에 노출되어 손상이 유발될 수 있다.
- [55] 이 때 발생하는 열은 예를 들어, 90% 이상의 세포사멸, 바람직하게 95% 이상의 세포사멸이 일어날 수 있는 약 45°C 이상의 온도, 바람직하게 50°C 이상의 온도, 더욱 바람직하게 60°C 이상의 온도일 수 있다.
- [56] 상기 열을 내는 복합체 중 인도시아닌 그린은 예를 들어, 0.1-30 ug/ml, 바람직하게 1-10 ug/ml의 농도로 포함할 수 있다. 본 출원의 발명자들은 전술한

농도 범위의 인도시아닌 그린을 포함하는 리포좀 복합체에 근적외선 조사시 95% 이상의 세포사멸이 일어날 수 있는 10°C 이상의 온도 상승을 나타내는 정도로 열이 발생할 수 있음을 확인하였다.

- [57] 특히, 종양이 발생한 림프절 중 인도시아닌 그린을 포함하는 리포좀 복합체의 축적량이 높을수록 열 발생량 역시 높아져, 주요 세포 파괴에 충분한 정도 이상의 열이 발생하여 세포사멸이 일어날 수 있음을 확인하였다. 이를 통해, FDA 허가받은 물질에 기반하여 개발된 인도시아닌 그린을 포함하는 리포좀 복합체는 큰 임상적 잠재성을 가질 수 있음을 확인하였다.
- [58] 하나의 실시예에서, 상기 복합체는 인도시아닌 그린의 캡슐화된 리포좀의 종류 및 크기에 따라 크기 (직경)이 결정될 수 있으며, 복합체의 평균 수동력학적 직경(hydrodynamic diameter, HD)은 예를 들어, 50-200nm, 바람직하게 100-150 nm 일 수 있다.
- [59] 또 다른 실시예에서, 상기 복합체는 낮은 정도의 다분산지수를 나타내어 분자량 및 구조가 균일함을 확인하였는데, 이 때 상기 다분산지수는 0.2 이하일 수 있다.
- [60] 경우에 따라서, 본 발명에 따른 암 치료용 조성물은 암 치료에 유효한 항체 또는 이의 면역치료적으로 유효한 단편, 세포독성제 또는 화학치료제를 추가로 포함할 수 있다.
- [61] 항체는 단클론 항체, 다클론 항체, 2 개 이상의 온전한 항체로 형성되는 다중특이성 항체 및 목적하는 생물학적 암 치료 활성을 나타내는 항체 단편을 포함하며, 면역치료적으로 유효한 항체 단편은 항원 결합 또는 이들의 가변 구역을 포함하는 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 및 Fc 단편, 디아바디(diabodies), 선형 항체, 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체로, 온전한 항체의 일부를 포함한다.
- [62] 세포독성제는 세포의 기능을 저해하거나 또는 방지하고/하거나 세포의 붕괴를 야기하는 물질로, 방사성 동위원소, 화학치료제 및 독소, 예컨대 박테리아, 균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 단편을 포함할 수 있다.
- [63] 화학치료제는 종양 세포 상에 직접적으로, 예컨대 세포정지 또는 세포 독성 효과에 의해서 및 생물학적 응답 변화와 같은 메커니즘을 통해 간접적이지 않게, 신규 세포의 발생, 성숙 또는 확산을 방지하는 화학적 약제가 포함된다. 본 발명에 적합한 화학치료제는 바람직하게는 천연 또는 합성 화학적 화합물이 포함된다.
- [64] '암' 및 '종양'은 비제어적인 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는, 포유류에서의 생리학적 상태를 의미하거나 또는 설명하는 것으로, 본 발명의 조성물에 의해 유방, 심장, 폐, 소장, 대장, 비장, 신장, 방광, 두경부, 난소, 전립선, 뇌, 췌장, 피부, 뼈, 골수, 혈액, 흉선, 자궁, 정소, 자궁경부 및 간의 종양과 같은 종양 또는 전이성 종양이 치료될 수 있다.

- [65] 이를 바탕으로, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다:
- [66] (a) 인도시아닌 그린 이 리포솜에 캡슐화되어 있는 인도시아닌 그린-리포솜 복합체를 환자에 투여하는 단계; 및
- [67] (b) 종양 부위에 축적된 상기 (a) 단계에서 투여된 복합체에 치료적으로 유효한 광을 조사하는 단계.
- [68] 다른 관점에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 암 치료용 조성물의 제조방법에 관한 것이다:
- [69] (a) 유기용매 중에 1종 이상의 포스파티딜콜린과 안정화제 및 인도시아닌 그린을 용해시켜 이의 혼합물을 제조하고, 유기용매를 제거하여 케익을 제조하는 단계;
- [70] (b) 상기 케익을 수화시켜 분산액을 제조하고, 다공성 고분자막에 압출시켜 인도시아닌 그린 이 포함된 리포솜을 제조하는 단계; 및
- [71] (c) 상기 단계 (b)의 리포솜 중 인도시아닌 그린 이 리포솜 내에 캡슐화된 복합체를 분리하는 단계.
- [72] 본 발명에 따른 제조방법에서 단계 (a)는 유기용매 중에 1종 이상의 포스파티딜콜린과 안정화제 및 인도시아닌 그린을 용해시키고 유기용매를 제거하여 케익을 제조하는 단계이다. 인도시아닌 그린 이 리포솜에 캡슐화되어 있는 복합체를 포함한 조성물은 필름 수화/압출법을 통해 제조될 수 있다.
- [73] 상기 리포솜의 재료가 되는 포스파티딜콜린 및 안정화제는 앞서 언급한 내용이 제조방법과 관련된 발명에도 동일하게 적용된다. 상기 유기용매에 포스파티딜콜린 및 안정화제를 용해시킬 수 있다.
- [74] 상기 단계 (a)에서 유기용매는 예를 들어, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게 클로로포름을 사용할 수 있다.
- [75] 이후 (b) 유기용매를 제거하고 건조시켜 제조된 케익을 수화시켜 분산액을 제조하고, 다공성 고분자막에 압출시켜 인도시아닌 그린 이 포함된 리포솜을 제조하는 단계를 거친다. 상기 분산액은 등장액으로 수화시켜 제조될 수 있는데, 상기 등장액은 등장화제로 예를 들어, 글루코스, 트레할로스 등을 포함할 수 있으며, 등장화제는 예를 들어, 1-10% (w/v), 바람직하게 3-7 % (w/v)의 농도로 포함될 수 있다.
- [76] 상기 분산액은 다공성 고분자막에 압출시켜 단일 또 멀티 라멜라 소포(vesicle) 형태의 리포솜으로 제조될 수 있으며, 이 때 사용되는 다공성 고분자막은 예를 들어 폴리카보네이트 고분자막일 수 있고, 다공성 고분자막의 공극 직경은 예를 들어 10~1000 nm, 바람직하게 50~200 nm일 수 있다.
- [77] 다음 단계 (c)에서 인도시아닌 그린 이 리포솜 내에 캡슐화된 복합체를

분리한다. 제거에 사용되는 방법은 인도시아닌 그린을 리포솜 내에 캡슐화된 복합체와 자유 인도시아닌 그린 및 리포솜 표면에 단순히 결합하거나 노출된 인도시아닌 그린을 분리할 수 있는 방법이라면 제한없이 사용될 수 있으며, 예를 들어 투석 막에 통과시키거나, 크로마토그래피 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피 등)를 사용하여, 목적하는 인도시아닌 그린을 리포솜 내에 캡슐화된 복합체만을 분리할 수 있다.

[78]

[79] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[80]

[81] 실시예 1: Liposomal ICG의 제조

[82] ICG (IR-25, laser grade pure)는 Acros Organics에서 입수하였다. 주성분 지질로 DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 또는 DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)와 DSPE-PEG2000 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000])을 95:5의 몰비율로 혼합하여 클로로포름에 녹인 용액에 1mg/ml로 메탄올에 녹인 인도시아닌 그린 (지질 몰농도 총합: ICG = 250:X (M)) 을 필요한 농도만큼 혼합하고 유기용매를 완전히 증발시킨 후 플라스크 바닥에 생성된 지질 케익을 5% 글루코스 수용액 2ml로 수화(hydration)하였다.

[83] 이 때, 수화 용액 중 조성은 DSPC, DPPC, DMPC 또는 DOPC과 ICG의 비율이 각각 250:0.5, 250:1, 250:4, 250:8, 250:16 및 250:32이었다.

[84] 0.1 μ m 폴리카보네이트 막을 이용해 수화 완료한 리포솜 용액을 평균 100nm의 단일 또는 멀티 라멜라 리포솜이 되도록 압출하였다. 압출을 완료한 100nm 단일 또는 멀티 라멜라 리포솜 용액을 Sephadex G-50이 채워진 컬럼을 통과시켜, 크기 배제 크로마토그래피 (Size-exclusion chromatography) 기법을 이용해 리포솜에 포함되지 않은 ICG와 ICG가 함유된 리포솜을 분리한다. 100kDa MWCO (molecular weight cut-off)를 갖는 투석막 (dialysis membrane)을 이용해 투석하여 미량 존재하는 자유 ICG (Free ICG)와 리포솜 표면에 붙어 있는 ICG를 제거하고, ICG가 캡슐화된 리포솜 복합체를 제조하였다.

[85] ICG가 리포솜에 캡슐화되어 생기는 분산효과로 인한 형광세기 증가 및 흡광도 변화를 이용해, 리포솜 ICG 용액에 존재 하는 자유 ICG 및 리포솜 표면에 노출된 ICG의 유무를 확인하였다.

[86] 리포솜을 구성하는 포스파티딜콜린과 DSPE-PEG200 중 포스파티딜콜린의 농도를 알 수 있는 Stewart assay를 통해 자유 ICG를 제거한 리포솜-ICG

복합체에서 포스파티딜콜린의 농도를 구하였다. 또한, 메탄올 80%와 리포솜 용액 20%를 혼합하면 리포솜 구조가 모두 붕괴되고 ICG가 본래의 흡광도를 나타내고, 785nm에서 흡광도가 최대치를 갖는다. 메탄올 80%에서 ICG는 농도에 비례하여 흡광도가 증가하기 때문에, 이를 통해 리포솜 복합체내에 포함되어 있는 ICG의 농도를 785nm의 흡광도를 통해 구하였다. $\{(\text{총 포스파티딜콜린 농도}) / (\text{ICG 농도})\}$ 을 통해 리포솜-ICG 복합체 중 포스파티딜콜린과 ICG 간의 비율을 구할 수 있다. 이를 통해 각각의 리포솜-ICG 복합체를 합성하기 위해 포스파티딜콜린 포함 케익을 제작할 때에 첨가된 ICG의 양에 비해, 최종적으로 합성된 리포솜-ICG 복합체에 포함된 ICG의 양을 비교할 수 있다.

- [87] 그 결과, 케익 제작시 첨가된 ICG의 양이 포스파티딜콜린:ICG의 몰비가 250:0.5~16 (M)의 범위일 때는 첨가된 ICG의 양이 증가할 수록 리포솜 내부에 포함되는 ICG의 양이 증가한다. 그러나, 케익 제작시 첨가된 ICG의 양이 포스파티딜콜린:ICG의 몰비가 250: 16을 초과하면, 리포솜 내부에 포함되는 ICG의 양이 증가하지 않게 된다.

[88]

- [89] 시험예 1: Liposomal ICG의 광열효과

- [90] 실시예 1에서 제조된 Liposomal ICG 복합체 중 모든 Liposomal ICG와 Free ICG의 ICG 농도를 5ug/ml에 맞추었고, 실시예 1에서 제조된 Liposomal ICG 복합체에 808nm의 레이저를 650mW로 3분간 조사하고(81J, Joule), 열화상카메라(FLIR)를 통해 리포솜 용액 총 부피 100ul에 의해 발생하는 광열효과를 측정하였다.

- [91] 측정된 광열 효과를 도 1 내지 도 6에 나타내었다. 도 1 및 도 6을 비교하면, 리포솜에 결합되지 않은 자유 ICG의 경우 150초 이상의 광 조사에도 불구하고 온도 상승 정도가 5°C에 불과하여, 리포솜에 캡슐화되어 포함된 ICG에 비해 보다 상대적으로 미약한 광열효과를 나타냄을 확인하였다.

- [92] 도 1 중 DSPC, DPPC, DMPC 또는 DOPC를 포함하는 복합체 각각에서 발생하는 광열효과를 각각 도 2 내지 도 5에 나타내었다. 복합체를 구성하는 인지질의 소수성 꼬리 길이가 짧아질수록 광열 효과가 향상됨을 확인하였고, 소수성 꼬리에 불포화 지질쇄가 포함되면 광열 효과가 감소함을 확인할 수 있다. DSPC, DPPC, DMPC 및 DOPC 중 DMPC (도 4)에서 가장 우수한 광열 효과가 발생함을 확인할 수 있다. DSPC, DPPC, DMPC 또는 DOPC: ICG의 몰비가 250:0.5 내지 250:16인 경우 목적하는 광열 효과가 나타남을 확인할 수 있었는데, 특히, 포스파티딜콜린: ICG의 몰비가 250:1인 경우 포스파티딜콜린의 종류와 관계없이 우수한 광열 효과를 나타내었다.

- [93] 포스파티딜콜린: ICG의 몰비가 250:0.5 미만, 예를 들어 250:0.1인 경우는 유사한 정도의 광열 효과를 얻고자 하는 경우 상대적으로 투입되는 리포솜의 양이 지나치게 많아져 리포솜 제조에 소요되는 비용 및 시간을 고려하였을 때 매우 비효율적이며, 산업적 적용을 고려하면 적합하지 않다. 따라서, 광열

효과를 통해 암을 치료하기 위한 조성물에서 포스파티딜콜린: ICG의 몰비는 250:0.5의 범위에서부터 최적화될 수 있다. 또한, 포스파티딜콜린: ICG의 몰비가 250:16 초과, 예를 들어 250:32인 경우에는 ICG를 추가로 넣은 경우에도 리포솜-ICG 복합체에서 ICG의 비율이 증가하지 않고, 오히려 뭉침 (aggregation)이 발생하여 적합하지 않다 (도 15).

[94]

[95] 시험예 2: Liposomal ICG의 특성

[96] Dynamic light scattering 방법을 이용하여 각 복합체의 평균 수동력학적 직경(hydrodynamic diameter, HD), 다분산 지수 (polydispersity index) 및 제타포텐셜 (zeta potential)을 측정하였다. 또한, 400nm ~ 1000nm의 파장에서 5nm 간격으로 흡광도를 측정하였으며, Excitation 785nm 및 Emission 820nm로 형광 세기를 측정하였다. 이 때 사용된 농도는 ICG 기준으로 5 ug/ml 이다.

[97] 그 결과를 도 7 내지 도 14에 나타내었다. 도 7 내지 도 10을 참조하면, DSPC, DPPC, DMPC 또는 DOPC를 포함하는 복합체는 800nm에서 최대 흡광도를 가지고, 700nm 초반대에서 낮은 peak를 나타냄을 확인할 수 있다. 동일한 ICG 농도에서 DSPC, DPPC, DMPC 또는 DOPC (M): ICG (M) 중 ICG의 몰비가 높아질수록 800nm에서 가지는 최대 흡광도가 낮아지고, 700nm 초반대에서 나타나는 낮은 peak가 상대적으로 높아짐을 알 수 있는데, 이는 DSPC, DPPC, DMPC 또는 DOPC:ICG가 250:16을 초과하는 경우, 리포솜 복합체 내부에서 ICG가 응집될 가능성이 높음을 의미한다.

[98] 도 11을 참조하면, 동일한 ICG 농도에서 총 지질 (M): ICG (M) 중 ICG의 비율이 높아질수록 형광 세기가 감소함을 확인할 수 있으며, 도 12 내지 도 14에서와 같이 평균 수동력학적 직경(hydrodynamic diameter, HD), 제타포텐셜 및 다분산 지수는 총 지질 (M): ICG (M)의 비율 또는 지질 종류에 따라 큰 차이가 없었다.

[99]

[100] 시험예 3: Liposomal ICG의 세포 사멸 효과

[101] HeLa 세포 (ATCC® CCL-2™)를 5000 Cells/100ul 1 Well의 양으로 준비하였다. Hela 세포에 제조예 1 중 지질(포스파티딜콜린) (M): ICG (M)을 250:1 비율로 각각 합성한 리포솜-ICG 복합체를 5 ug/ml (ICG의 농도 기준)로 각각 처리한 뒤, 808nm, 650mW의 레이저를 3분 동안 조사하였다. 레이저를 조사하고 30분 이후에 세포 배양액 내에 잔존하는 인도시아닌 그린을 포함한 리포솜을 제거하고 24시간 동안 세포를 배양한 후 MTT Assay를 통해 세포사멸 효과를 측정하였다.

[102] 그 결과를 도 16에 나타내었다. 도 16을 참조하면, DMPC를 포함하는 리포솜-ICG 복합체에서 가장 향상된 세포사멸 효과를 나타냄을 확인하였다.

[103]

산업상 이용가능성

- [104] 본 발명에 따른 암 치료용 조성물은 인도시아닌 그린의 캡슐화된 리포솜을 포함하는 복합체에 치료적으로 유효한 광을 조사하여 유의한 세포사멸 효과를 나타냄으로써, 우수한 암 치료 효과를 나타낼 수 있을 뿐 아니라, 외과 수술법에 의하지 않고도 종양을 제거할 수 있다. 또한, 정상세포에의 영향을 최소화하면서도 암 세포에 대하여 선별적으로 세포사멸 효과를 나타낼 수 있다.
- [105]
- [106] 본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

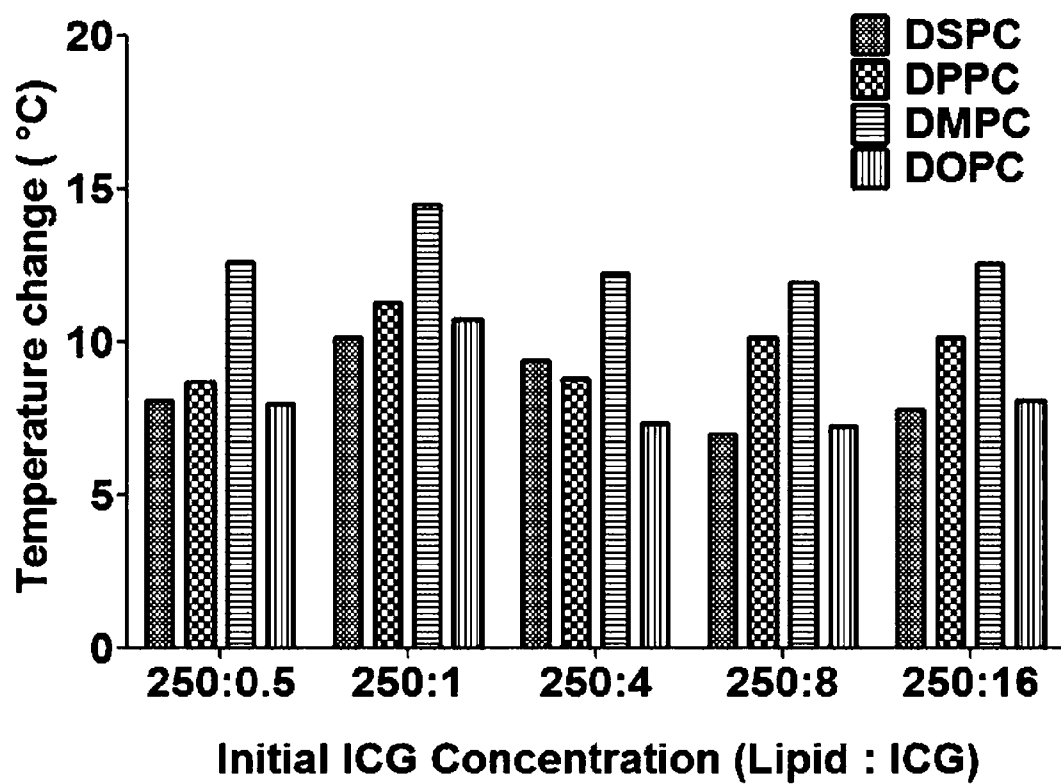
청구범위

- [청구항 1] 포스파티딜콜린, 안정화제 및 인도시아닌 그린의 혼합에 의해 제조되는 인도시아닌 그린-리포솜 복합체를 함유하고, 상기 인도시아닌 그린은 리포솜에 캡슐화(encapsulation)된 것이며, 치료적으로 유효한 광 조사에 의해 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린은 L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken), L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Egg, Chicken), L- α -phosphatidylcholine (Soy), L- α -phosphatidylcholine, hydrogenated (Soy) 1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (10:0 PC), 1,2-diundecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (11:0 PC), 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (12:0 PC (DLPC)), 1,2-ditridecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (13:0 PC), 1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (15:0 PC), 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (4ME 16:0 PC), 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (17:0 PC), 1,2-dinonadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (19:0 PC), 1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (20:0 PC), 1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (14:1 (Δ 9-Cis) PC), 1,2-dimyristelaidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (14:1 (Δ 9-Trans) PC), 1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (16:1 (Δ 9-Cis) PC), 1,2-dipalmitelaidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (16:1 (Δ 9-Trans) PC), 1,2-dipetroselenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:1 (Δ 6-Cis) PC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:1 (Δ 9-Cis) PC (DOPC)), 1,2-dielaidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:1 (Δ 9-Trans) PC), 1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:2 (Cis) PC), 1,2-dilinolenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (18:3 (Cis) PC), 1,2-dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (20:1 (Cis) PC), DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 및 DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 안정화제는 폴리에틸렌글리콜에 컨쥬게이션된 포스파티딜에탄올아민 (phosphatidylethanolamine)인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 폴리에틸렌글리콜은 1,000 내지 10,000의

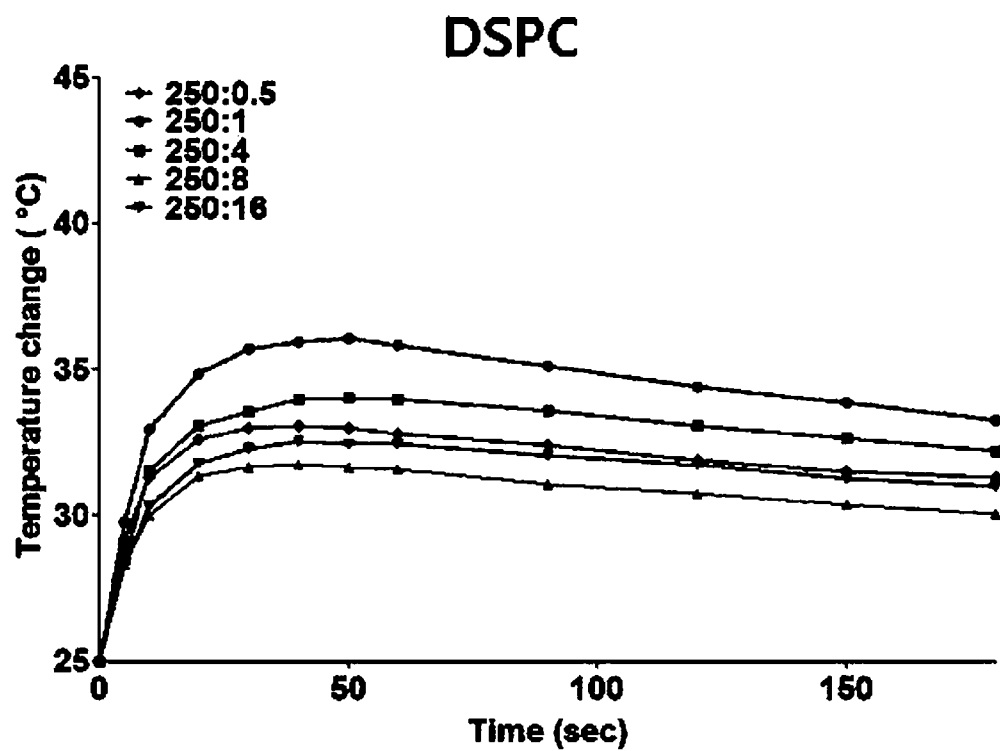
- 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 포스파티딜에탄올아민은 DMPE (dimyristoylphosphatidylethanolamine), DPPE (dipalmitoylphosphatidylethanolamine), DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine) 및 DSPE (distearoylphosphatidyl-ethanolamine)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 인도시아닌 그린은 0.1-30 ug/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린과 인도시아닌 그린은 250:0.1-32의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린과 인도시아닌 그린은 250:0.5-16의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 치료적으로 유효한 광은 700-900nm에서 100 mW 이상 1 W 이하의 전력으로 3분 이상 30분 이하로 조사되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 복합체의 평균 수동력학적 직경(hydrodynamic diameter, HD)은 50-200nm인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 복합체의 다분산지수(polydispersity index)는 0.2 이하인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 암 치료에 유효한 항체 또는 이의 면역치료적으로 유효한 단편, 세포독성제 또는 화학치료제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.
- [청구항 13] 하기 단계를 포함하는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 암 치료용 조성물의 제조방법:
 (a) 유기용매 중에 1종 이상의 포스파티딜콜린과 안정화제 및 인도시아닌 그린을 용해시키고, 유기용매를 제거하여 케익을 제조하는 단계;
 (b) 상기 케익을 수화시켜 분산액을 제조하고, 다공성 고분자막에 압출시켜 인도시아닌 그린 포함 리포솜을 제조하는 단계; 및
 (c) 상기 단계 (b)의 리포솜 중 인도시아닌 그린 리포솜 내에 캡슐화된 복합체를 분리하는 단계.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물의 제조방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 다공성 고분자막은 공극의 직경이 50-200nm인

폴리카보네이트로 이루어진 것임을 특징으로 하는 압 치료용 조성물의
제조방법.

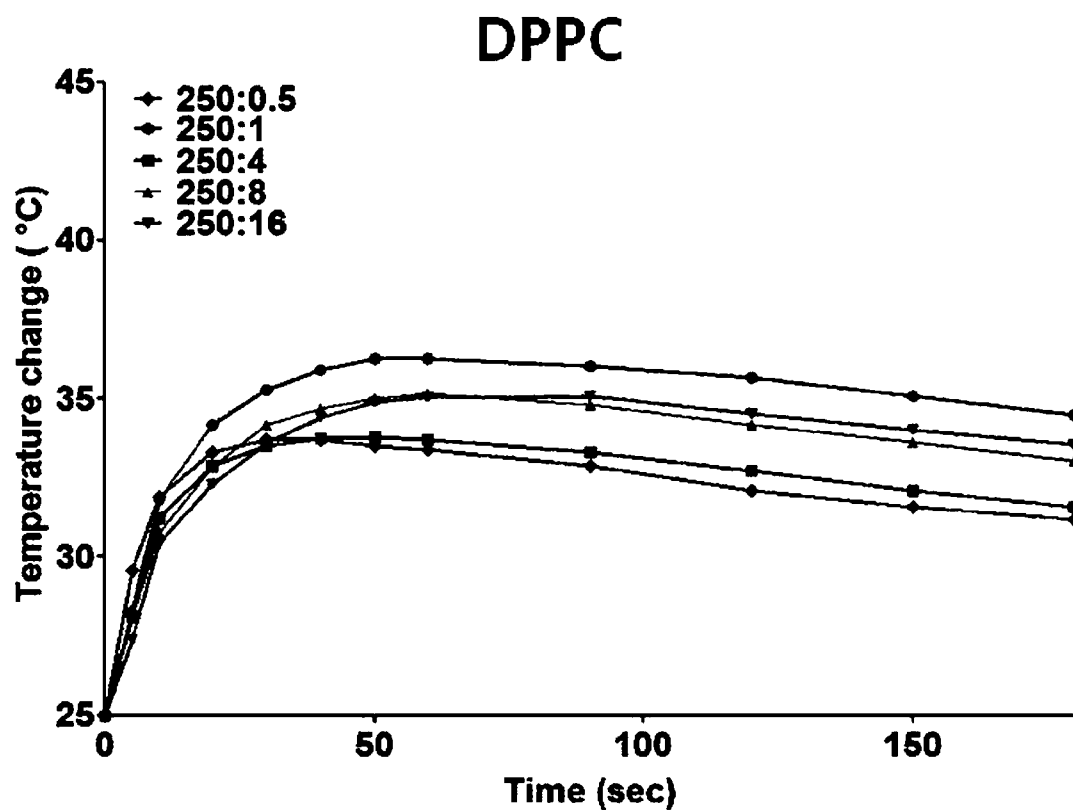
[도1]



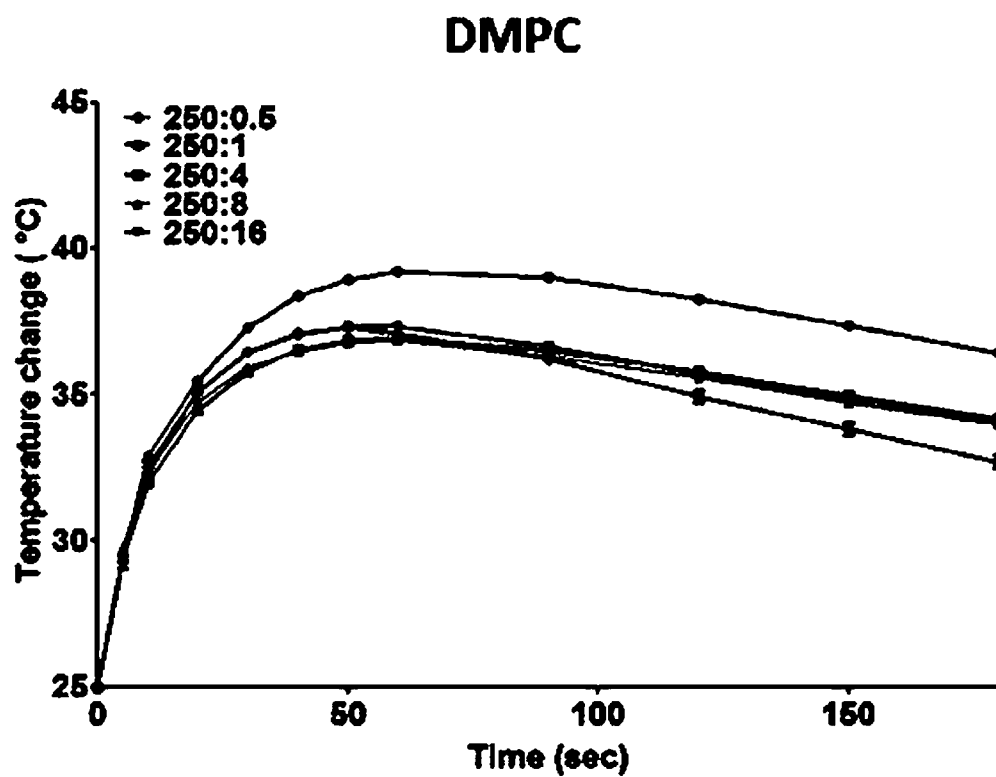
[도2]



[도3]

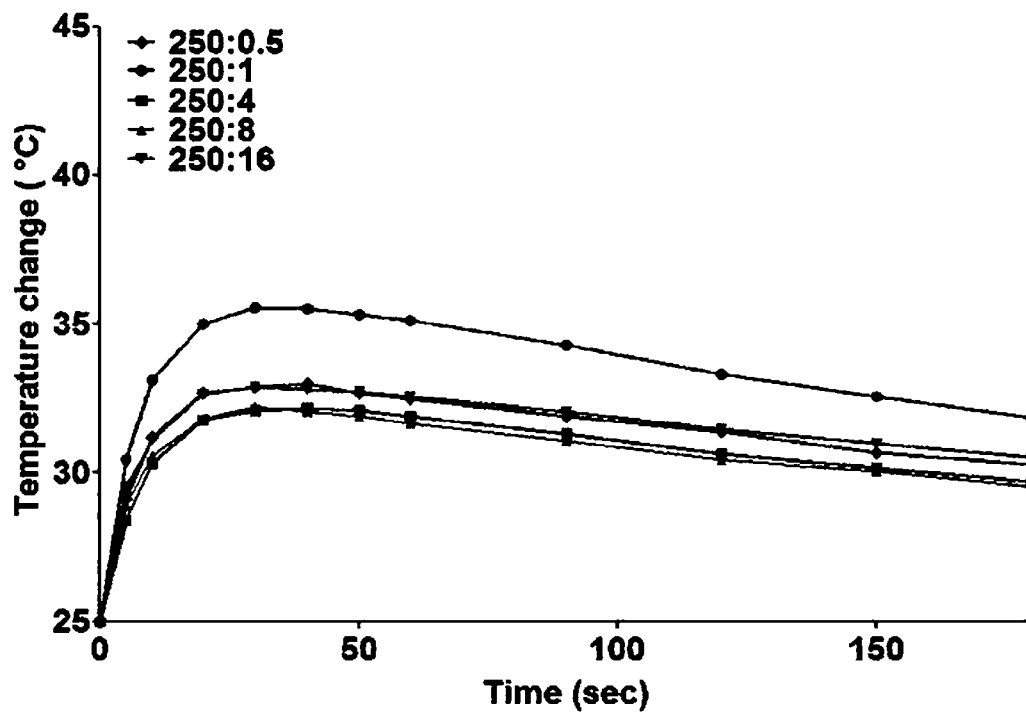


[도4]

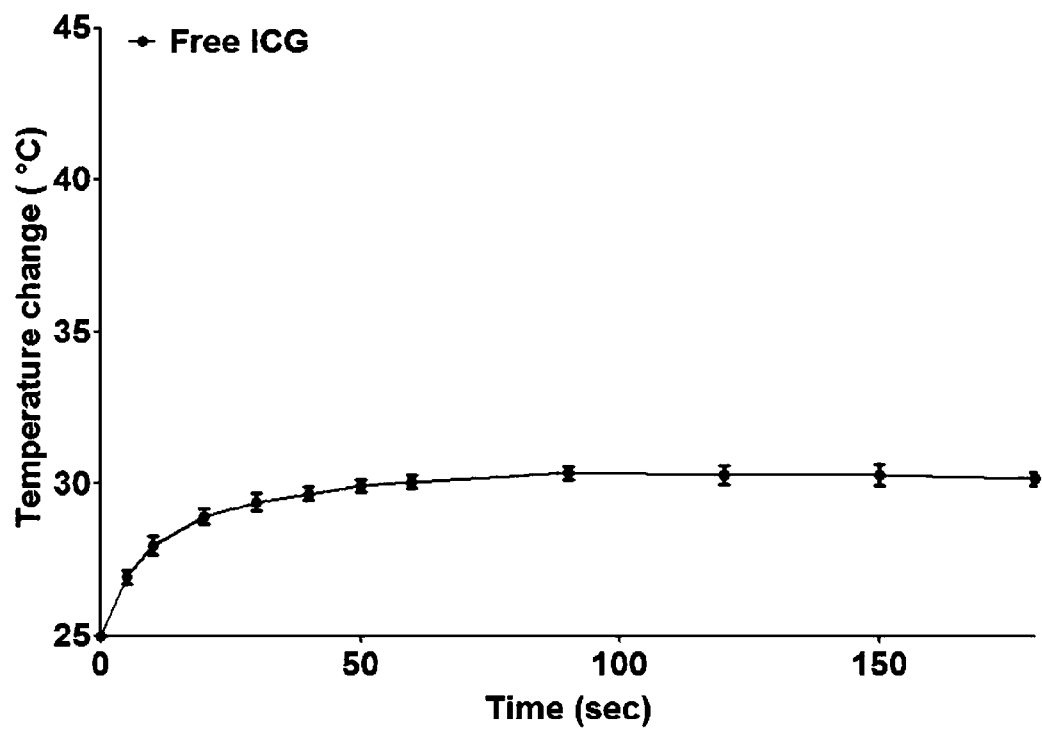


[도5]

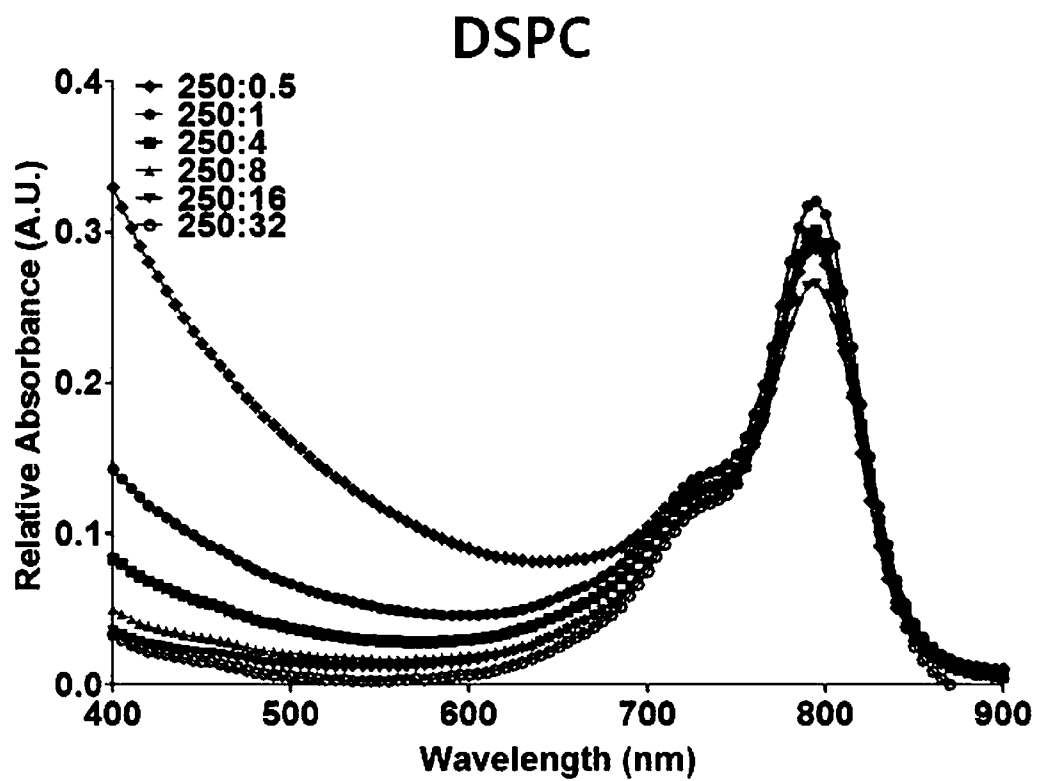
DOPC



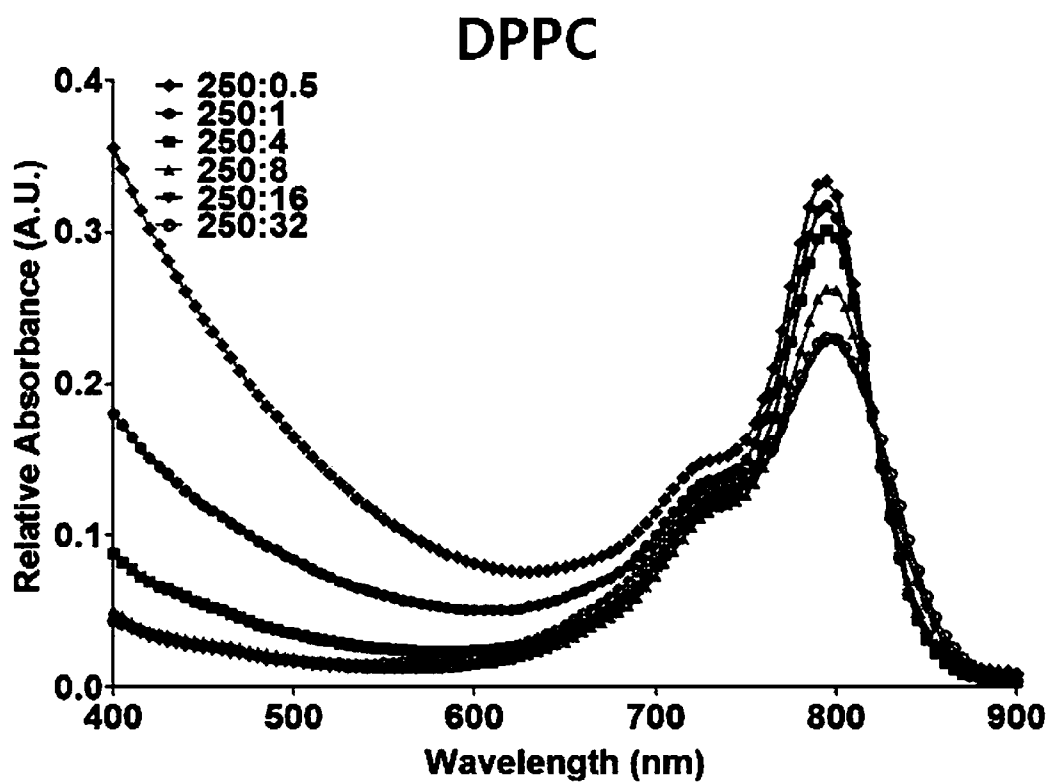
[도6]



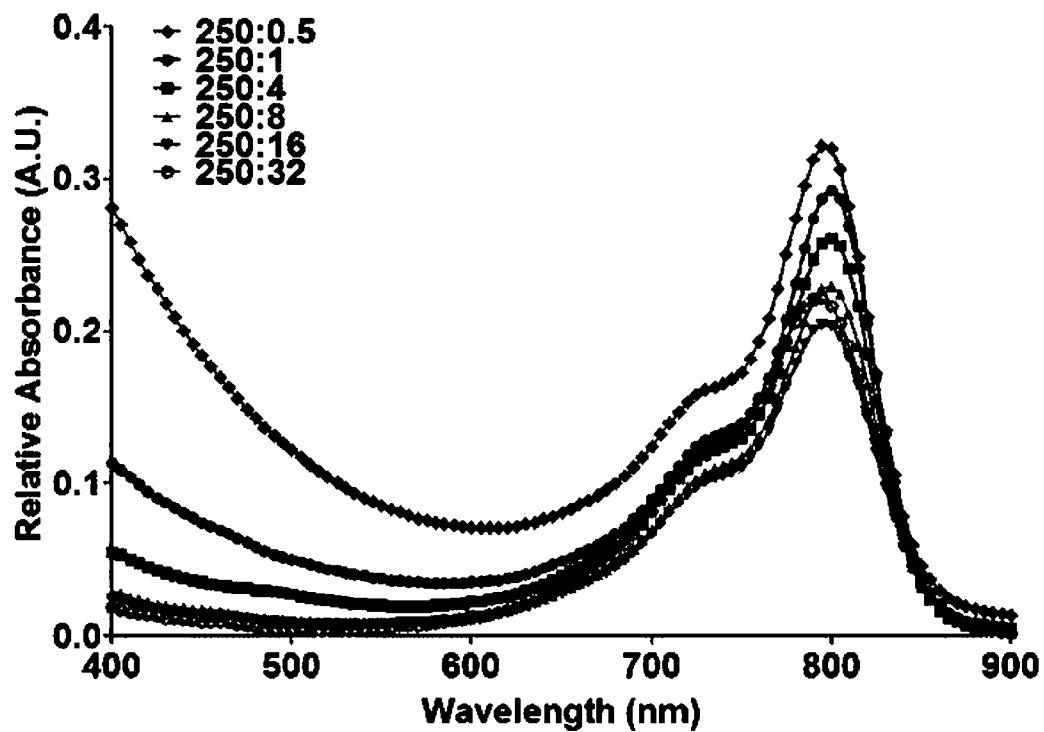
[도7]



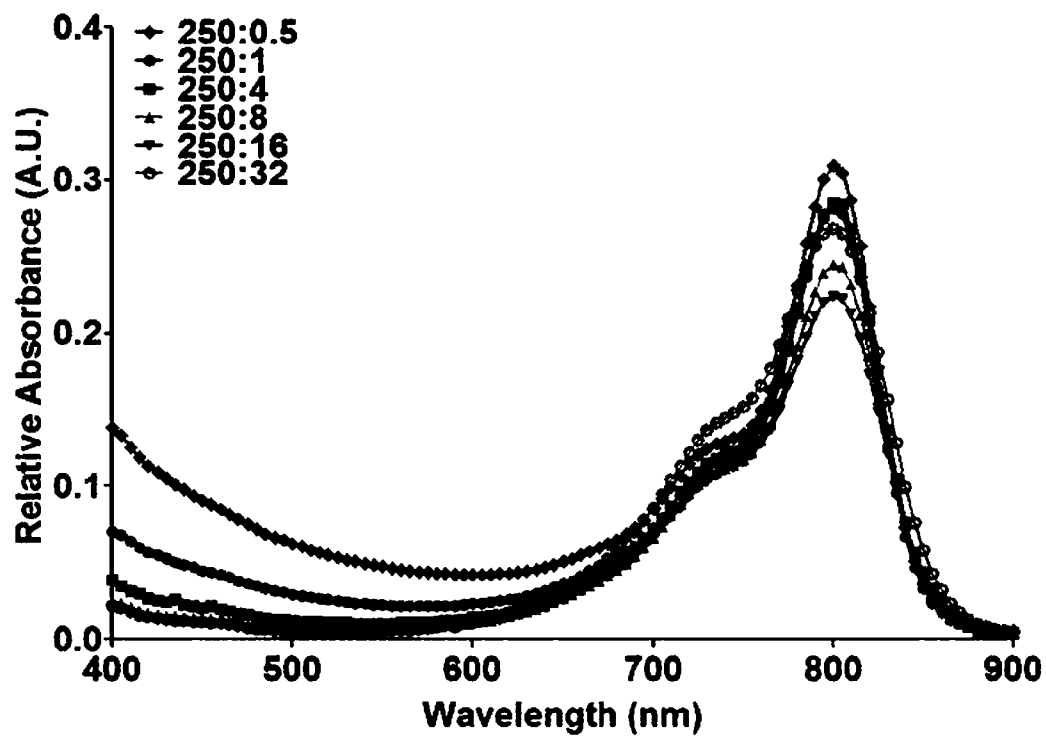
[도8]



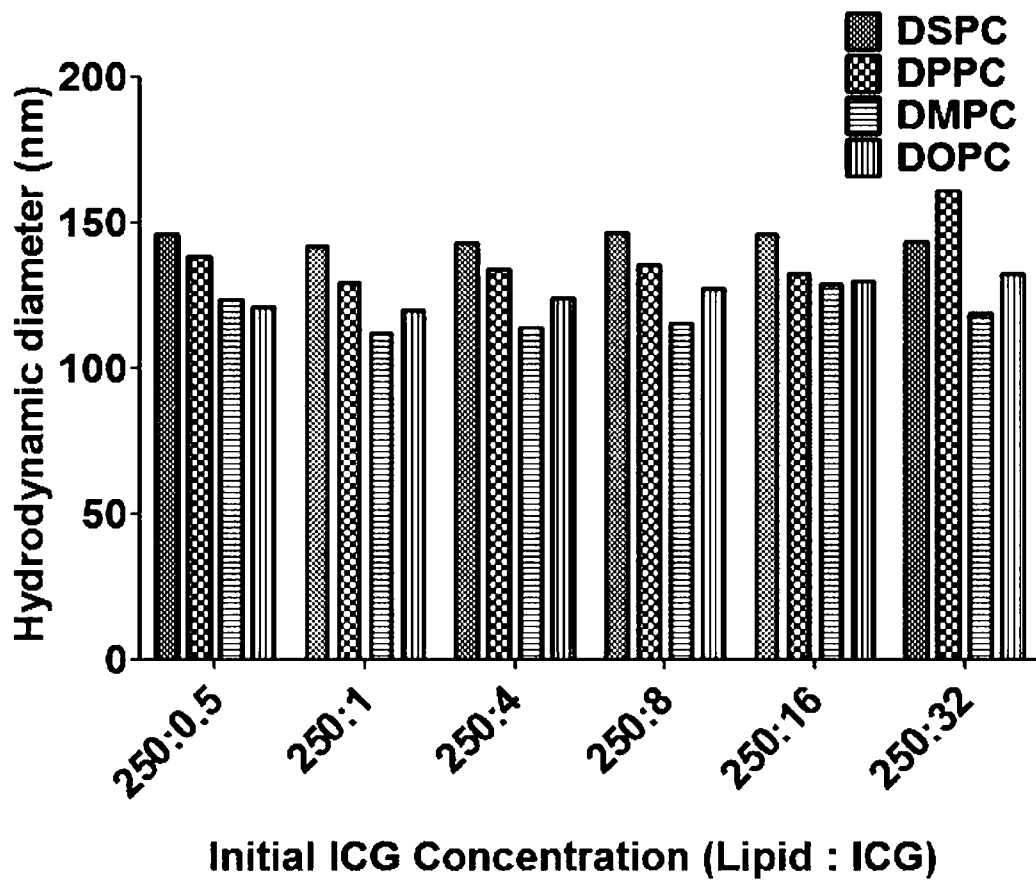
[도9]

DMPC

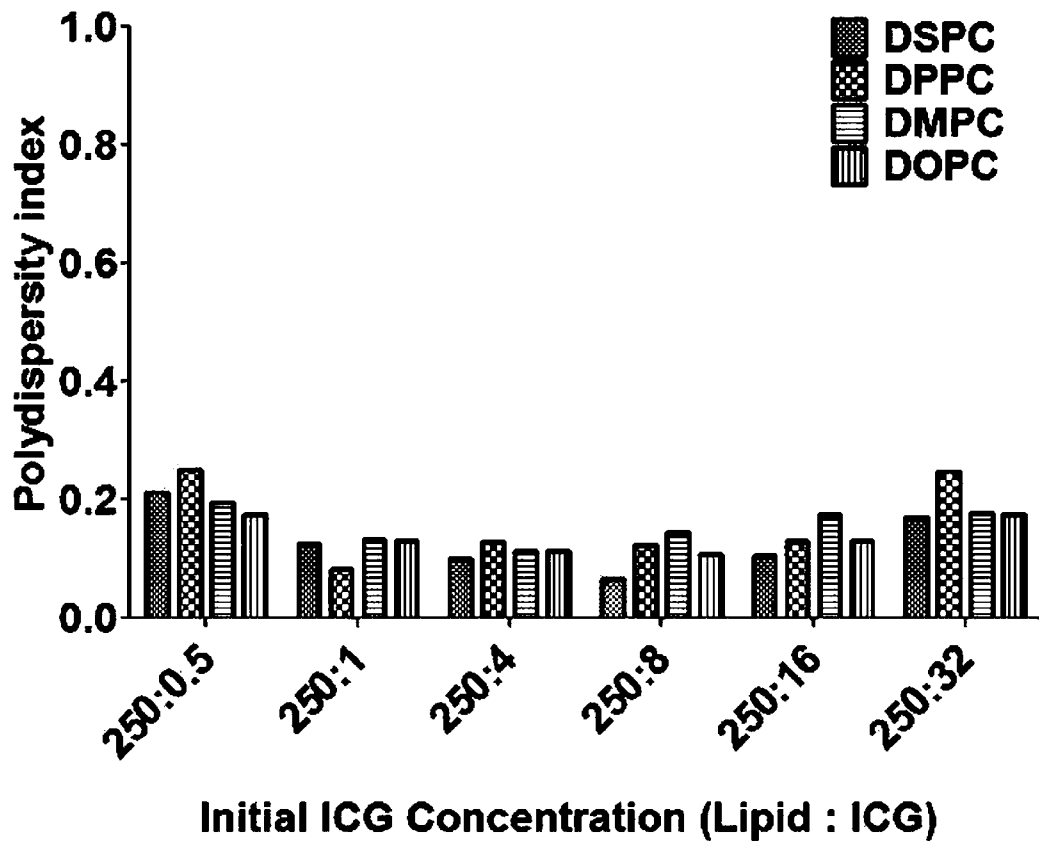
[도10]

DOPC

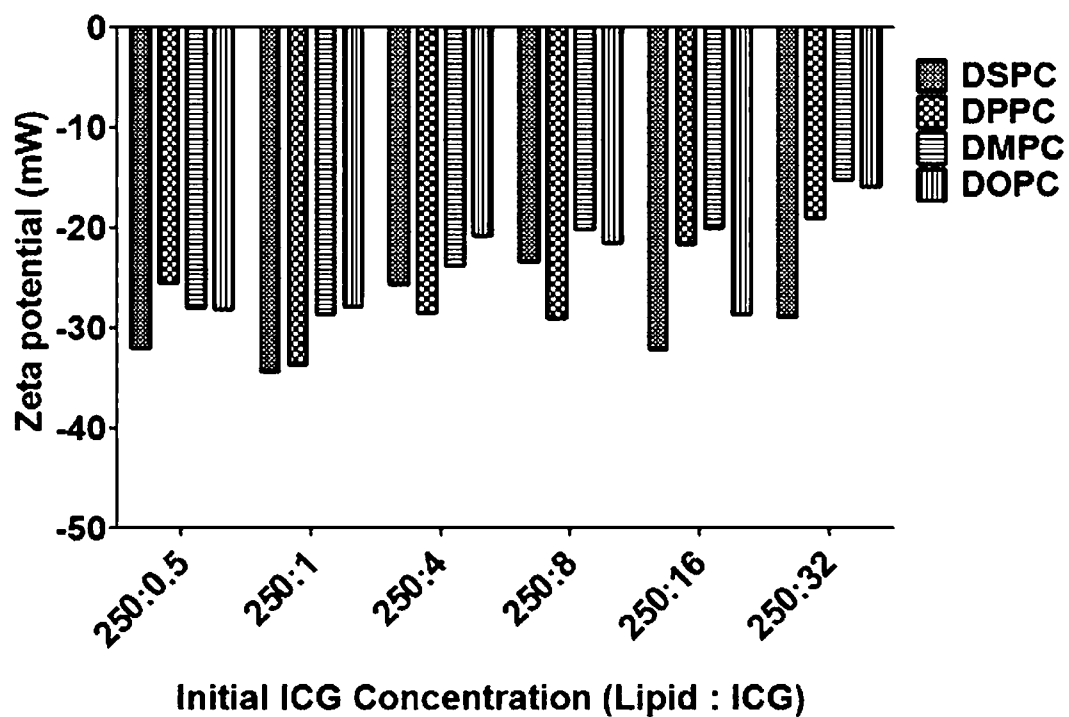
[도11]



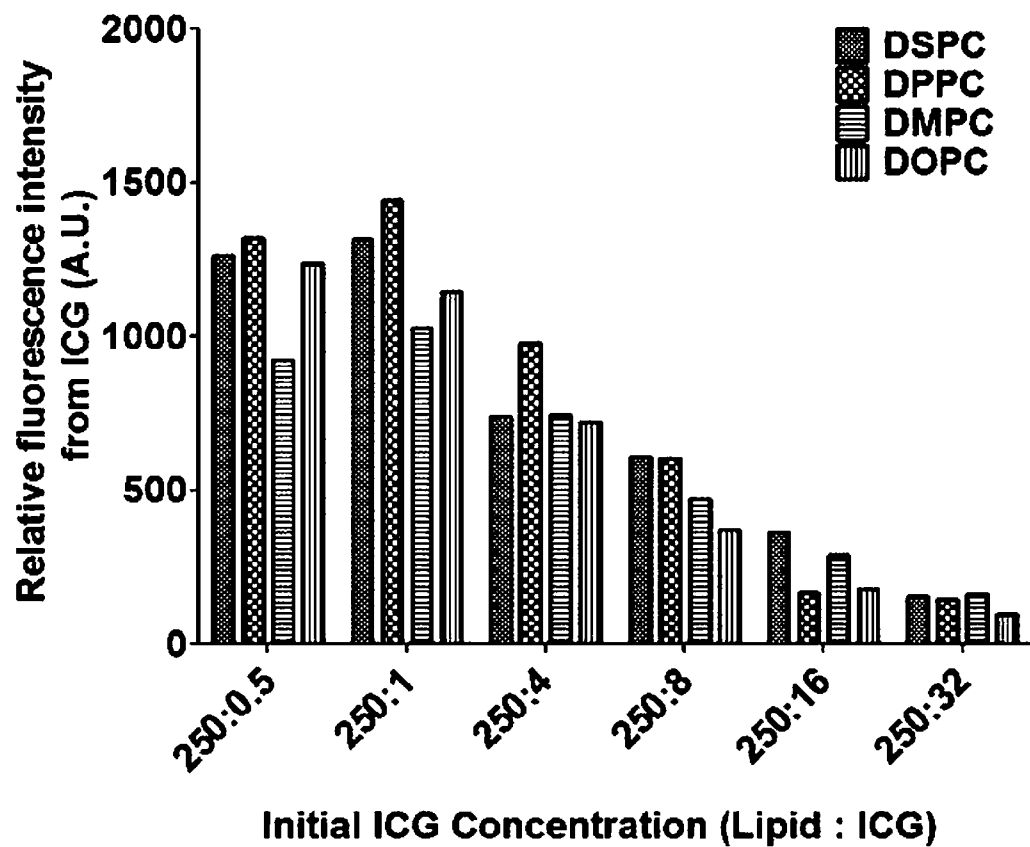
[도12]



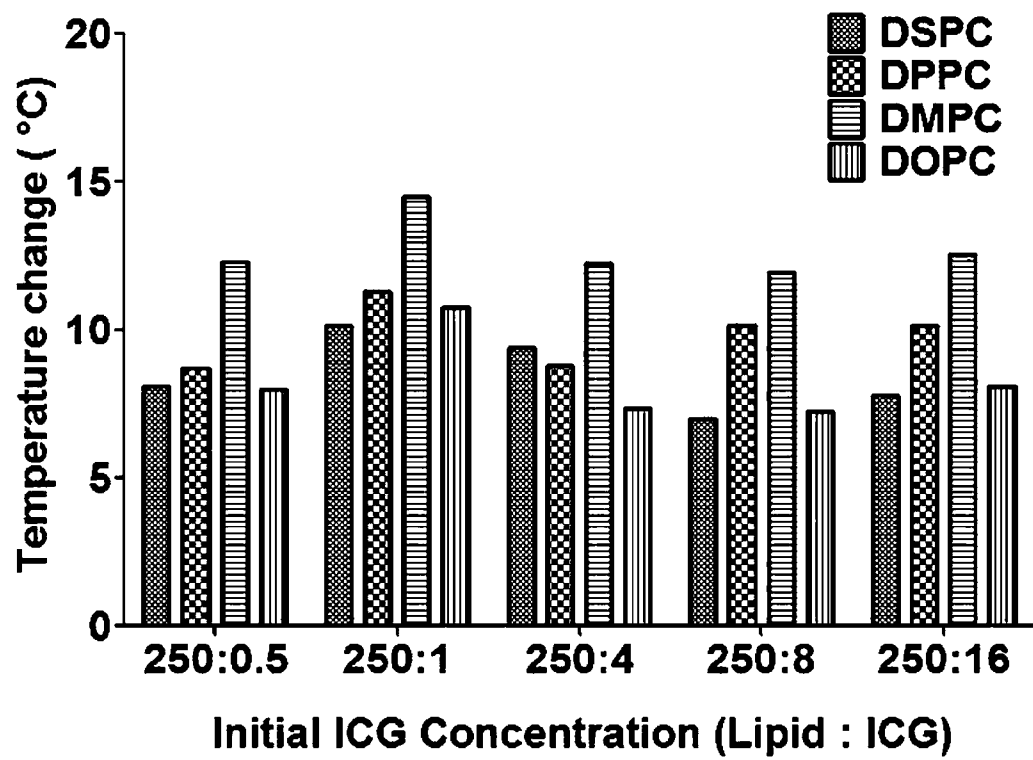
[도13]



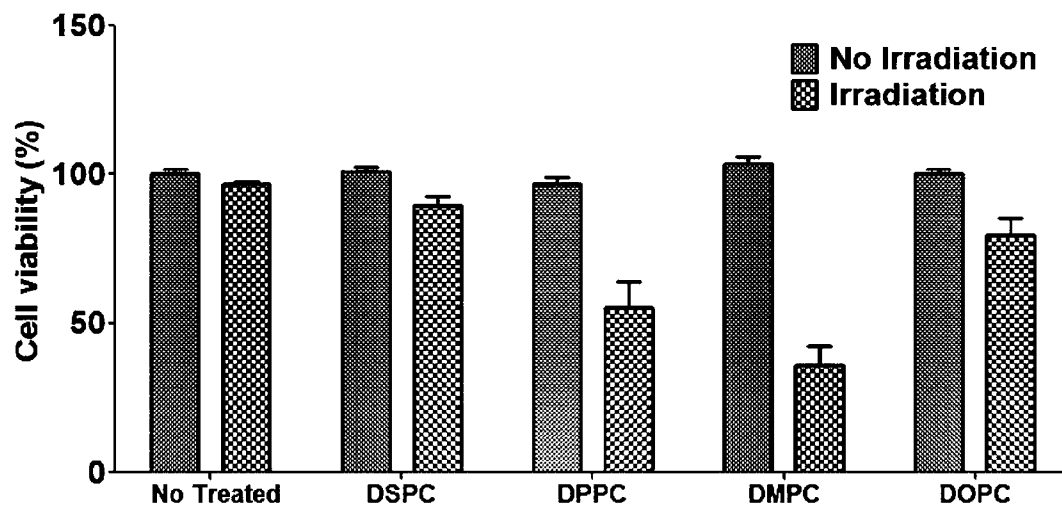
[도14]



[도15]



[도16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127(2006.01)i, A61K 9/107(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; A61N 1/30; A61N 5/06; A61P 35/00; A61N 5/067; A61B 18/18; A61K 41/00; A61K 9/107

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: liposome, phosphatidylcholine, stabilizer, indocyanine green (ICG), encapsulation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHEMESH, Colby S. et al., "Indocyanine Green Loaded Liposome Nanocarriers for Photodynamic Therapy Using Human Triple Negative Breast Cancer Cells", Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 19 March 2014, vol. 11, pages 193-203 See pages 193 and 195-196; abstract.	1-15
A	KR 10-2012-0018234 A (LIM, Kyuon - Won et al.) 02 March 2012 See claim 1.	1-15
A	KR 10-2011-0138003 A (KIM, Jin - Wang) 26 December 2011 See claims 1-2.	1-15
A	CN 103893761 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 02 July 2014 See claims 1-3.	1-15
A	US 6602274 B1 (CHEN, James) 05 August 2003 See abstract.	1-15



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

30 SEPTEMBER 2016 (30.09.2016)

Date of mailing of the international search report

30 SEPTEMBER 2016 (30.09.2016)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/005209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0018234 A	02/03/2012	NONE	
KR 10-2011-0138003 A	26/12/2011	KR 10-1244434 B1	18/03/2013
CN 103893761 A	02/07/2014	NONE	
US 6602274 B1	05/08/2003	AU 2413700 A	01/08/2000
		CA 2356776 A1	20/07/2000
		EP 1140176 A1	10/10/2001
		JP 2002-534219 A	15/10/2002
		US 2002-0087205 A1	04/07/2002
		US 2003-0109813 A1	12/06/2003
		US 2003-0208249 A1	06/11/2003
		US 2004-0215292 A1	28/10/2004
		US 2005-0196401 A1	08/09/2005
		US 2008-0114285 A1	15/05/2008
		US 6899723 B2	31/05/2005
		US 7018395 B2	28/03/2006
		WO 00-41727 A1	20/07/2000

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 9/127(2006.01)I, A61K 9/107(2006.01)I																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/127; A61N 1/30; A61N 5/06; A61P 35/00; A61N 5/067; A61B 18/18; A61K 41/00; A61K 9/107 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: 리포좀, 포스파티딜콜린, 안정화제, 인도시아닌 그린, 캡슐화																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SHEMESH, COLBY S. 등, 'Indocyanine green loaded liposome nanocarriers for photodynamic therapy using human triple negative breast cancer cells', Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2014.03.19, 11권, 페이지 193-203 페이지 193 및 195-196; 초록 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2012-0018234 A (임경원 등) 2012.03.02 청구항 1 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2011-0138003 A (김진왕) 2011.12.26 청구항 1-2 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103893761 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 2014.07.02 청구항 1-3 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6602274 B1 (CHEN, JAMES) 2003.08.05 요약 참조.</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	SHEMESH, COLBY S. 등, 'Indocyanine green loaded liposome nanocarriers for photodynamic therapy using human triple negative breast cancer cells', Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2014.03.19, 11권, 페이지 193-203 페이지 193 및 195-196; 초록 참조.	1-15	A	KR 10-2012-0018234 A (임경원 등) 2012.03.02 청구항 1 참조.	1-15	A	KR 10-2011-0138003 A (김진왕) 2011.12.26 청구항 1-2 참조.	1-15	A	CN 103893761 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 2014.07.02 청구항 1-3 참조.	1-15	A	US 6602274 B1 (CHEN, JAMES) 2003.08.05 요약 참조.	1-15
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	SHEMESH, COLBY S. 등, 'Indocyanine green loaded liposome nanocarriers for photodynamic therapy using human triple negative breast cancer cells', Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2014.03.19, 11권, 페이지 193-203 페이지 193 및 195-196; 초록 참조.	1-15																		
A	KR 10-2012-0018234 A (임경원 등) 2012.03.02 청구항 1 참조.	1-15																		
A	KR 10-2011-0138003 A (김진왕) 2011.12.26 청구항 1-2 참조.	1-15																		
A	CN 103893761 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 2014.07.02 청구항 1-3 참조.	1-15																		
A	US 6602274 B1 (CHEN, JAMES) 2003.08.05 요약 참조.	1-15																		
☐ 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 신구성 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 2016년 09월 30일 (30.09.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 09월 30일 (30.09.2016)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 박정민 전화번호 +82-42-481-3516 																		

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/005209

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0018234 A	2012/03/02	없음	
KR 10-2011-0138003 A	2011/12/26	KR 10-1244434 B1	2013/03/18
CN 103893761 A	2014/07/02	없음	
US 6602274 B1	2003/08/05	AU 2413700 A	2000/08/01
		CA 2356776 A1	2000/07/20
		EP 1140176 A1	2001/10/10
		JP 2002-534219 A	2002/10/15
		US 2002-0087205 A1	2002/07/04
		US 2003-0109813 A1	2003/06/12
		US 2003-0208249 A1	2003/11/06
		US 2004-0215292 A1	2004/10/28
		US 2005-0196401 A1	2005/09/08
		US 2008-0114285 A1	2008/05/15
		US 6899723 B2	2005/05/31
		US 7018395 B2	2006/03/28
		WO 00-41727 A1	2000/07/20