	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0128335 (43) 공개일자 2011년11월29일
<p>(51) Int. Cl. <i>A61K 9/127</i> (2006.01) <i>A61K 47/12</i> (2006.01) <i>A61K 47/18</i> (2006.01) <i>A61K 47/28</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7023505</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2010년03월10일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년10월06일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/054042</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/104128 국제공개일자 2010년09월16일</p> <p>(30) 우선권주장 JP-P-2009-058063 2009년03월11일 일본(JP)</p>		<p>(71) 출원인 가부시킴가이사 바이오나노시타 일본 도쿄도 세타가야쿠 다마가와 3-40-16</p> <p>(72) 발명자 다케오카 신지 일본 도쿄도 신주쿠구 와카마츠쵸 2-2 와세다 다 이가쿠 센탄세이메이 이카가쿠센타 오바타 요우스케 일본 지바켄 인바군 사카에마치 아지키 2-12-15 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 특허법인코리아나</p>

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) pH 응답성 리포솜

(57) 요약

산성 pH 환경하에서 목적 물질을 유지하고, 염기성 pH 환경하에서 목적 물질을 방출할 수 있는 pH 응답성 리포솜을 제공한다. 카티온성 양쪽 친매성 분자와, 아ни온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 구성 지질로서 함유하고, 수성 매체 중에 분산시켰을 때, 그 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 플러스의 제타 전위를 갖고, 또한, 그 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 마이너스의 제타 전위를 갖는 pH 응답성 리포솜을 사용한다.

(72) 발명자

나카가와 사토루

일본 도야마켄 도야마시 혼고우마치 5-101-3

오츠보 신야

일본 도쿄도 죠우후시 이리마쵸 1-27-94

가와사키 유지

일본 기후켄 모토스시 아사기 318-1

특허청구의 범위

청구항 1

카티온성 양쪽 친매성 분자와, 아ни온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 함유하는 리포솜으로서, 상기 리포솜을 수성 매체 중에 분산시켰을 때, 상기 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 플러스의 제타 전위를 갖고, 상기 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 마이너스의 제타 전위를 갖는 pH 응답성 리포솜.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 목적 물질을 유지하고, 상기 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 목적 물질을 방출하는 것인 pH 응답성 리포솜.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 카티온성 양쪽 친매성 분자를 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 5 ~ 95 몰% 함유하고, 상기 아ни온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자를 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 합계로 5 ~ 95 몰% 함유하는 것인 pH 응답성 리포솜.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분산액의 pH 가 7.0 이상 8.0 미만인 범위에서, 상기 pH 응답성 리포솜의 제타 전위가 pH 의 증가와 함께 플러스에서 마이너스로 변화하는 것인, pH 응답성 리포솜.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제타 전위가 플러스에서 마이너스로 변화하면, 유지하고 있던 목적 물질을 방출하는 것인 pH 응답성 리포솜.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 카티온성 양쪽 친매성 분자는 상기 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 이온화되기 쉽고, 상기 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 이온화되기 어려운, 카티온성 관능기를 함유하는 것인 pH 응답성 리포솜.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

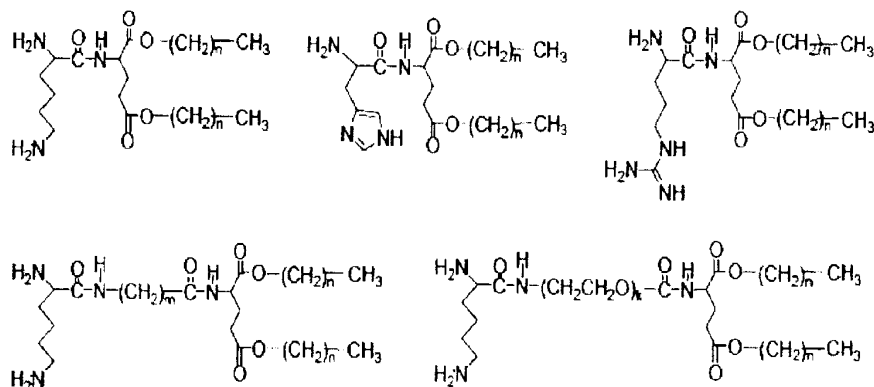
상기 카티온성 관능기는 아미노기, 구아니디노기, 이미다졸기 및 이들의 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 pH 응답성 리포솜.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

다음 식으로 나타내는 카티온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 구성 지질로서 함유하는 pH 응답성 리포솜.

[화학식 12]



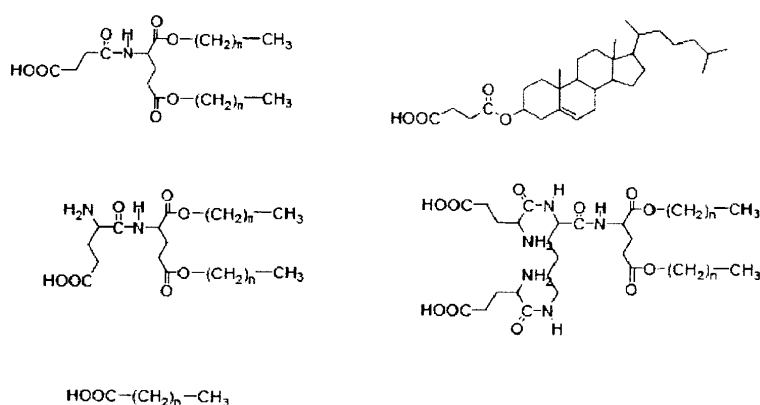
[식 중, n 은 각각 독립적으로 8 ~ 22 의 정수이고, m 또는 k 는 각각 독립적으로 1 ~ 14 의 정수이다]

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

다음 식으로 나타내는 아ни온성 양쪽 친매성 분자 또는 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 구성 지질로서 함유하는 pH 응답성 리포솜.

[화학식 13]



[식 중, n 은 각각 독립적으로 8 ~ 22 의 정수이다]

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

콜레스테롤 분자를 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 0.01 ~ 30 몰% 함유하는 것인 pH 응답성 리포솜.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리에틸렌글리콜 결합 양쪽 친매성 분자를 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 0.1 ~ 50 몰% 함유하는 것인 pH 응답성 리포솜.

명세서

기 술 분 야

본 발명은 pH 환경의 변화에 따라 목적 물질의 유지 및 방출을 제어할 수 있는 pH 응답성 리포솜에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 산성 pH 환경하에서 목적 물질을 유지하고, 염기성 pH 환경하에서 목

적 물질을 방출할 수 있는 pH 응답성 리포솜에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 리포솜 등의 분자 집합체에 목적 물질을 내포시키고, 그 방출을 제어하는 방법으로서 pH 응답성이 범용되고 있다. 예를 들어, 포스파티딜에탄올아민형 인지질을 사용한 리포솜이 알려져 있다 (예를 들어, D. Papahadjopoulos 들 Biochemistry, 24 (1985) 3091-3098 (비특허문헌 1), D. H. Thompson 들 Langmuir, 19 (2003) 6408-6415 (비특허문헌 2) 참조). 이것은, 포스파티딜에탄올아민형 인지질이 pH 에 응답하고, 그 집합 구조가 전이되어 목적 물질의 막투과성이 변화하는 성질을 이용한 것이다. 그러나, Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) 을 함유하는 리포솜은, 산성 환경 (pH 5 이하) 에서의 내포물의 방출에 한정되어 있다.
- [0003] 또, pH 응답성 리포솜으로서 아ни온성 지질과 카티온성 지질을 혼합한 리포솜이 알려져 있다 (G. Shi 들, Journal of Controlled Release 80 (2002) 309-319 (비특허문헌 3) 참조). 그러나, 이 문헌에는 염기성 pH 환경하에서 리포솜으로부터 내포물을 방출한 경우에 대해 기재되지 않았다. 또, 구성 성분으로서 4 급 아미노기를 갖는 Didecyltrimethylammonium bromide (DDAB) 가 사용되어 있고, 아미노기의 이온화를 이용한 내포물의 방출 제어는 상정되어 있지 않다. 또, 종래 알려져 있는 카티온성 지질은, 세포 독성이 높아 인체에 투여하기에는 적합하지 않다는 문제도 있다.
- [0004] 본 발명자들은, 지금까지 친수부에 양쪽 이온성 관능기를 갖는 양쪽 친매성 분자를 구성 지질로서 함유하는 리포솜이, 생리적인 pH 환경하에서 목적 물질을 내수상에 유지하고, 산성 pH 환경하에서 목적 물질을 방출시키는 것을 알아냈다 (일본 공개특허공보 2007-210953호 (특허문헌 1), 국제 공개 제2008/143339호 팜플렛 (특허문헌 2) 참조).
- [0005] 그러나, 산성 pH 환경하에서 목적 물질을 유지하고, 염기성 pH 환경하에서 목적 물질을 방출시키는 pH 응답성 분자 집합체는 지금까지 얻어지지 않았다.
- [0006] 그런데, 최근, 카티온성 지질 단독 또는 그것을 함유하는 리포솜을 사용하여, 유전자와 복합체를 형성시킴으로써 세포 내에 유전자를 도입하는 연구가 실시되고 있다. 본 발명자들도, 이와 같은 용도에 적합한 세포 독성이 낮고, 합성이 용이한 아미노산 유래의 카티온성 관능기를 갖는 복합 지질을 개발하여, 세포 내 이행성이 높은 제제가 얻어지는 것을 보고하였다 (국제 공개 제2006/118327호 팜플렛 (특허문헌 3) 참조).

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 일본 공개특허공보 2007-210953호
(특허문헌 0002) 국제 공개 제2008/143339호 팜플렛
(특허문헌 0003) 국제 공개 제2006/118327호 팜플렛

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) D. Papahadjopoulos 들 Biochemistry, 24 (1985) 3091-3098
(비특허문헌 0002) D. H. Thompson 들 Langmuir, 19 (2003) 6408-6415
(비특허문헌 0003) G. Shi 들, Journal of Controlled Release 80 (2002) 309-319

발명의 내용

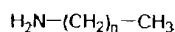
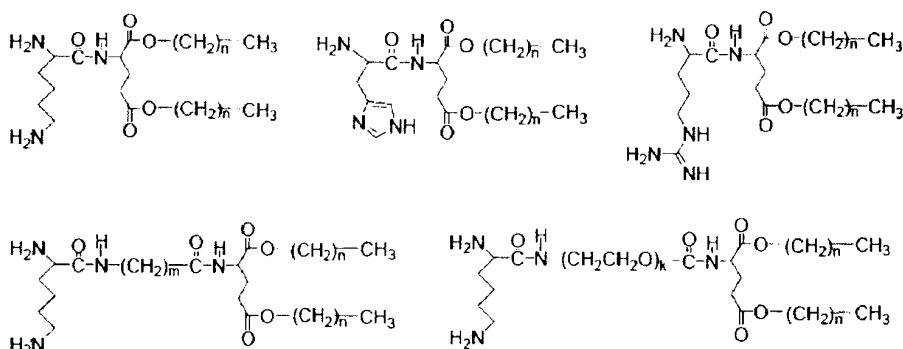
해결하려는 과제

- [0009] 상기와 같이, 산성 pH 환경하에서 목적 물질을 유지하고, 염기성 pH 환경하에서 목적 물질을 방출할 수 있는 pH 응답성 분자 집합체는 지금까지 알려지지 않았다. 이와 같은 목적 물질의 방출 거동을 갖는 pH 응답성 분자

집합체를 얻을 수 있으면, pH 응답성 리포솜 제제의 용도가 한층 넓어질 것으로 기대된다.

과제의 해결 수단

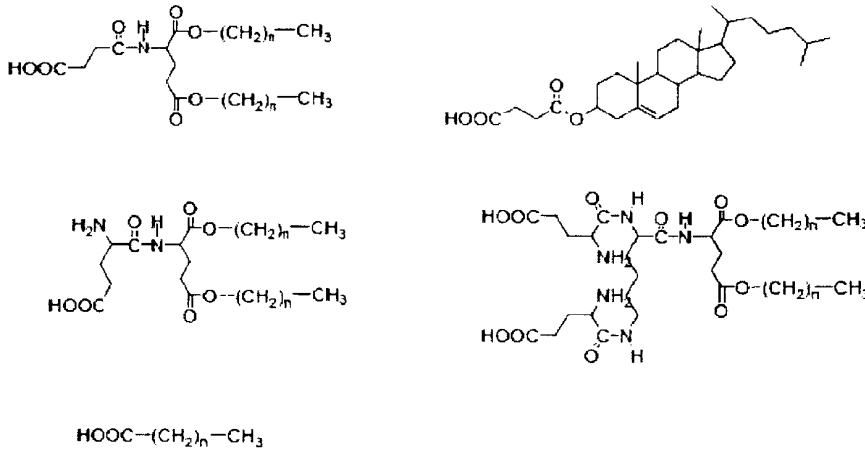
- [0010] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해서 예의 검토한 결과, 카티온성 양쪽 친매성 분자와, 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 구성 지질로서 함유하는 리포솜을 수성 매체 중에 분산시켰을 때, 산성 pH 환경하에서 그 리포솜이 플러스의 제타 전위를 갖고, 또한, 염기성 pH 환경하에서 그 리포솜이 마이너스의 제타 전위를 갖고 있으며, 그 제타 전위가 그 분산액의 pH 의 증가에 수반하여 플러스에서 마이너스로 변화하면 유지하고 있던 목적 물질이 방출되는 것을 알아내어, 본 발명을 완성시켰다.
- [0011] 즉, 본 발명은 이하에 나타낸 pH 응답성 리포솜 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] [1] 카티온성 양쪽 친매성 분자와, 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 함유하는 리포솜으로서, 상기 리포솜을 수성 매체 중에 분산시켰을 때, 상기 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 플러스의 제타 전위를 갖고, 상기 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 마이너스의 제타 전위를 갖는 pH 응답성 리포솜.
- [0013] [2] 상기 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 목적 물질을 유지하고, 상기 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 목적 물질을 방출하는 것인 [1] 에 기재된 pH 응답성 리포솜.
- [0014] [3] 상기 카티온성 양쪽 친매성 분자를 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 5 ~ 95 몰% 함유하고, 상기 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자를 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 합계로 5 ~ 95 몰% 함유하는 것인 [1] 또는 [2] 에 기재된 pH 응답성 리포솜.
- [0015] [4] 상기 분산액의 pH 가 7.0 이상 8.0 미만인 범위에서 상기 pH 응답성 리포솜의 제타 전위가 pH 의 증가와 함께 플러스에서 마이너스로 변화하는 것인 [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 pH 응답성 리포솜.
- [0016] [5] 상기 제타 전위가 플러스에서 마이너스로 변화하면, 유지하고 있던 목적 물질을 방출하는 것인 [1] ~ [4] 중 어느 한 항에 기재된 pH 응답성 리포솜.
- [0017] [6] 상기 카티온성 양쪽 친매성 분자는, 상기 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 이온화되기 쉽고, 상기 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 이온화되기 어려운, 카티온성 관능기를 함유하는 것인 [1] ~ [5] 중 어느 한 항에 기재된 pH 응답성 리포솜.
- [0018] [7] 상기 카티온성 관능기는, 아미노기, 구아니디노기, 이미다졸기 및 이들의 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 [6] 에 기재된 pH 응답성 리포솜.
- [0019] [8] 다음 식으로 나타내는 카티온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 구성 지질로서 함유하는 [1] ~ [7] 중 어느 한 항에 기재된 pH 응답성 리포솜.
- [0020] [화합식 1]



- [0021]
- [0022] [식 중, n 은 각각 독립적으로 8 ~ 22 의 정수이고, m 또는 k 는 각각 독립적으로 1 ~ 14 의 정수이다]
- [0023] [9] 다음 식으로 나타내는 아니온성 양쪽 친매성 분자 또는 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 구

성 지질로서 함유하는 [1] ~ [8] 중 어느 한 항에 기재된 pH 응답성 리포솜.

[화학식 2]



[0025]

[식 중, n 은 각각 독립적으로 8 ~ 22 의 정수이다]

[10] 콜레스테롤 분자를 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 0.01 ~ 30 몰% 함유하는 것인 [1] ~ [9] 중 어느 한 항에 기재된 pH 응답성 리포솜.

[11] 폴리에틸렌글리콜 결합 양쪽 친매성 분자를 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 0.1 ~ 50 몰% 함유하는 것인 [1] ~ [10] 중 어느 한 항에 기재된 pH 응답성 리포솜.

발명의 효과

본 발명에 의하면, 리포솜의 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 플러스의 제타 전위를 갖고, 그 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 마이너스의 제타 전위를 갖는 pH 응답성 리포솜을 제공할 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에 의하면, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은 산성 pH 환경하에서 목적 물질을 유지하고, 염기성 pH 환경하에서 목적 물질을 방출시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 실시예에서 얻어진 pH 응답성 리포솜의 제타 전위의 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2 는 실시예에서 얻어진 pH 응답성 리포솜의 입자 직경의 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3 은 실시예에서 얻어진 칼세인 내포 리포솜에 있어서의 칼세인의 방출 거동을 나타낸 그래프이다.

도 4 는 실시예에서 얻어진 칼세인 내포 리포솜에 있어서의 칼세인의 경시적 방출 거동을 나타낸 그래프이다.

도 5 는 실시예에서 얻어진 시트르산 분산 리포솜에 있어서의 pH 변화 거동을 나타낸 그래프이다.

도 6 은 실시예에서 얻어진 시트르산 분산 리포솜에 있어서의 약염기성 환경하에서 리포솜으로부터의 시트르산의 방출 거동을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 pH 응답성 리포솜 및 그 제조 방법에 대해 이하에 상세하게 설명한다.

본 발명의 pH 응답성 리포솜은 카티온성 양쪽 친매성 분자와, 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 함유하고, 수성 매체 중에 분산시켰을 때, 그 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 플러스의 제타 전위를 갖고, 그 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 마이너스의 제타 전위를 갖는 것이다. 즉, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은, 그 분산액의 pH 가 6.5 이상 8.5 미만인 범위에서, pH 의 증가와 함께 제타 전위가 플러스에서 마이너스로 변화하는 것이다. 본 발명의 바람직한 양태에서는, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은 그 분산액의 pH 가 7.0 이상 8.0 미만인 범위에서, pH 의 증가와 함께 제타 전위

가 플러스에서 마이너스로 변화한다.

[0033] 이하, 본 발명의 pH 응답성 리포솜의 구성 지질 및 pH 응답성 리포솜의 제조 방법에 대해 설명한다.

[0034] (카티온성 양쪽 친매성 분자)

[0035] 본 발명에 사용되는 카티온성 양쪽 친매성 분자는, 카티온성 관능기를 친수부에 갖는 양쪽 친매성 분자이면 특별히 제한되지 않는다. 카티온성 양쪽 친매성 분자는, 상기 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 이온화되기 쉽고, 상기 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 이온화되기 어려운, 카티온성 관능기를 함유하는 것인 것이 바람직하다. 예를 들어, 그 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 막성분에 함유되는 카티온성 관능기의 90 % 이상이 이온화되고, 그 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 막성분에 함유되는 카티온성 관능기의 50 % 이하가 이온화되는 것이 바람직하다.

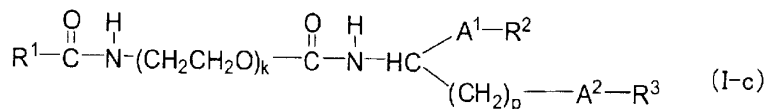
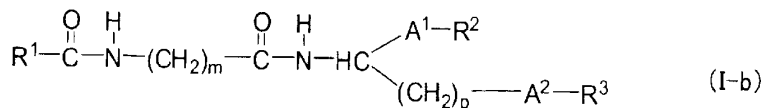
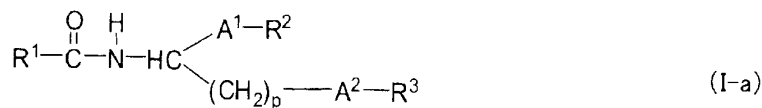
[0036] 본 명세서에 있어서, 「카티온성 관능기」는 수용액 중에서 카티온성을 나타내는 기이면 특별히 제한되지 않지만, 생체 적합성의 관점에서는 아미노산 유래의 것이 바람직하고, 특히 아미노기, 구아니디노기, 이미다졸기 및 이들의 유도체가 바람직하다.

[0037] 여기서 「유도체」로는, 아미노기, 구아니디노기, 이미다졸기에 함유되는 수소 원자가 저급 알킬기 (메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸 등), 아미노알킬기 (아미노메틸, 아미노에틸, 아미노프로필, 아미노부틸 등) 또는 대응하는 올리고아미노알킬기, 수산기, 하이드록시알킬기 (하이드록시메틸, 하이드록시에틸, 하이드록시프로필 등), 올리고 옥시알킬기 (올리고옥시메틸기, 올리고옥시에틸기, 올리고옥시프로필 등) 등의 치환기로 치환된 화합물을 들 수 있다. 치환기의 수는 특별히 제한되지 않는다.

[0038] 카티온성 양쪽 친매성 분자에 함유되는 카티온성 관능기의 수는 특별히 제한되지 않으며, 1 개 또는 복수 갖고 있어도 되는데, 원료 입수가 용이한 점에서 1 개 또는 2 개가 바람직하다. 카티온성 양쪽 친매성 분자에 카티온성 관능기가 복수 함유되는 경우, 그들은 동일해도 되고 상이해도 된다.

[0039] 카티온성 양쪽 친매성 분자로는, 일반식 (I-a) ~ (I-c)

[0040] [화학식 3]



[0041]

[0042] [식 중, R¹은 각각 독립적으로 아미노산 유래의 카티온성 관능기를 갖는 탄화수소기이고, R² 및 R³은 각각 독립적으로 사슬형 탄화수소기이며, A¹ 및 A²는 각각 독립적으로 -COO-, -OCO-, -CONH-, 및 NHCO-로 이루어지는 군에서 선택되는 결합기이고, p는 각각 독립적으로 2 ~ 4의 정수이며, m은 1 ~ 14의 정수이고, k는 1 ~ 250의 정수이다]

[0043] 로 나타내는 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

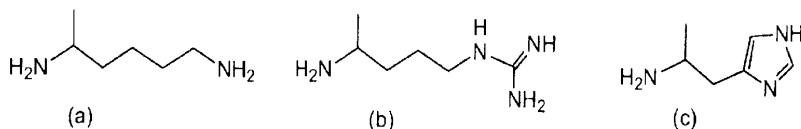
[0044] 상기 식 (I-a) ~ (I-c)로 나타내는 화합물은, 원료의 조달 및 합성이 용이하고, 리포솜 형성능이 높기 때문에 목적 물질을 안정적으로 그 내수상에 유지할 수 있다. 또, 그 화합물은 생분해성이 높고, 분해물도 아미노산 또는 그 유도체, 혹은 장사슬 알코올 등이기 때문에 저독성이라는 등의 이점도 있다.

[0045] 상기 식 중, R^1 은 각각 독립적으로 아미노산 유래의 카티온성 관능기를 갖는 탄화수소기이다.

[0046] R^1 은 카티온성 관능기를 적어도 1 개 갖고 있으면 되지만, 카티온성 관능기를 2 개 이상 갖고 있는 것이 바람직하다. 특히 카티온성 관능기를 2 개 이상 갖고 있는 화합물은, 생리적 환경하에서 생체 조직 또는 세포에 대한 정전적인 상호 작용이 강한 점에서 바람직하다. 카티온성 치환기를 2 개 이상 갖고 있는 경우에는, 카티온성 치환기의 조합은 특별히 제한되지 않는다.

[0047] 예를 들어, R^1 로는, 다음 식 (a), (b) 또는 (c) 중 어느 것으로 나타내는 기인 것이 바람직하다.

[0048] [화학식 4]



[0049]

[0050] 상기 식 중, R^2 및 R^3 은 각각 독립적으로 사슬형 탄화수소기이다. 「사슬형 탄화수소기」는, 결합기 A^1 또는 A^2 에 공유 결합으로 도입할 수 있는 소수성의 기이면 특별히 제한되지 않는다. 사슬형 탄화수소기는 직사슬 또는 분기 사슬의 어느 것이어도 되지만, 직사슬이 바람직하다. 사슬형 탄화수소기의 주사슬의 탄소수는 12 ~ 30 이 바람직하고, 12 ~ 22 가 보다 바람직하다. 이와 같은 사슬형 탄화수소기에 이중 결합 또는 삼중 결합 등의 불포화 결합이 있는 경우, 그 수는 1 ~ 4 인 것이 바람직하다. 사슬형 탄화수소기의 주사슬로는 알킬 사슬, 알케닐 사슬 또는 알키닐 사슬이 바람직하고, 알킬 사슬이 보다 바람직하다.

[0051] 사슬형 탄화수소기는 알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 이소프레노이드기, 카르복실기, 수산기, 아미노기, 및 메르캅토기로 이루어지는 군에서 선택되는 치환기를 갖고 있어도 된다. 여기서, 알킬기로는 탄소수 1 ~ 6 의 알킬기가 바람직하고, 예를 들어 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, sec-부틸기, tert-부틸기, 펜틸기, 헥실기 등을 들 수 있다. 알케닐기로는, 탄소수 1 ~ 6 의 알케닐기가 바람직하고, 예를 들어 비닐기, 알릴기, 프로페닐기, 이소프로페닐기, 2-부테닐 등을 들 수 있다. 알키닐기로는, 탄소수 1 ~ 6 의 알키닐기가 바람직하고, 에틸닐기, 프로피닐기, 부티닐기 등을 들 수 있다.

[0052] 이들 사슬형 탄화수소기 중에서도, R^2 및 R^3 으로는, 치환기를 갖고 있어도 되는 탄소수 12 ~ 22 의 알킬 사슬이 바람직하다.

[0053] 또, 상기 식 중, A^1 및 A^2 는 각각 독립적으로 $-COO-$, $-OCO-$, $CONH-$, 및 $NHCO-$ 로 이루어지는 군에서 선택되는 결합기이다. A^1 및 A^2 의 조합은 특별히 제한되지 않지만, 원료 입수가 용이한 점에서 A^1 및 A^2 가 모두 $-COO-$ 인 것이 바람직하다.

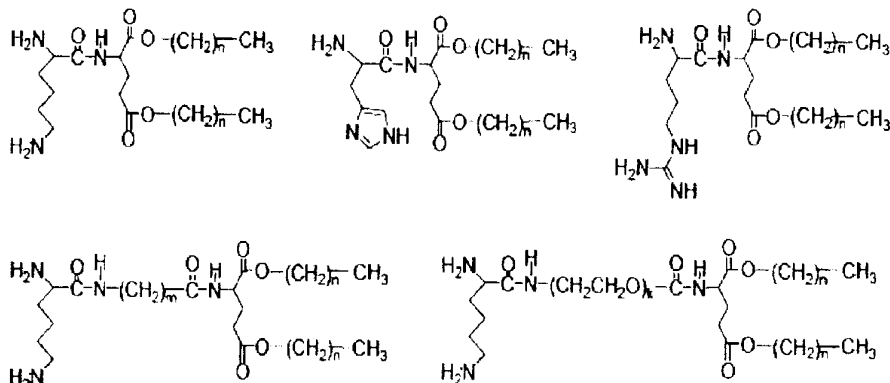
[0054] 상기 식 중, p 는 각각 독립적으로 2 ~ 4 의 정수이다. p 가 2 ~ 4 이면, 2 분자막 중에서 식 (I) 의 화합물의 사슬형 탄화수소기를 막평면에 대해 대략 수직으로 배향시킬 수 있는 점에서 바람직하다. 또, p 가 2 ~ 4 이면, 수용액 중에서 카티온성 양쪽 친매성 분자가 집합하여 형성하는 2 분자막의 친-소수 계면이 안정적이고 소포체 구조를 형성하기 쉽기 때문에, 소포체 구조 및 분산 상태를 안정화시키는 효과를 기대할 수 있다. 특히, p 가 2 이면, 글루타민산이나 그 유도체를 원료로 할 수 있기 때문에, 저가격이나 저독성의 면에서 보다 바람직하다.

[0055] 상기 식 중, m 은 1 ~ 14 의 정수이다. m 은 1 ~ 11 이 바람직하고, 1 ~ 8 이 보다 바람직하며, 1 ~ 5 가 더욱 바람직하다.

[0056] 또, 상기 식 중, k 는 1 ~ 250 의 정수이다. k 는 1 ~ 120 이 보다 바람직하고, 1 ~ 10 이 더욱 바람직하다.

[0057] 상기 식 (I-a) ~ (I-c) 로 나타내는 화합물의 구체예로는, 다음 식으로 나타내는 화합물을 바람직하게 들 수 있다.

[0058] [화학식 5]

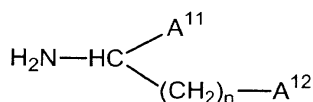


[0059]

[0060] [식 중, n 은 각각 독립적으로 7 ~ 21 의 정수이고, m 은 1 ~ 14 의 정수이며, k 는 1 ~ 250 의 정수이다]

[0061] 상기 식 (I-a) ~ (I-c) 로 나타내는 화합물은, 공지된 반응을 조합함으로써 간편한 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 다음 식

[0062] [화학식 6]



[0063]

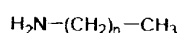
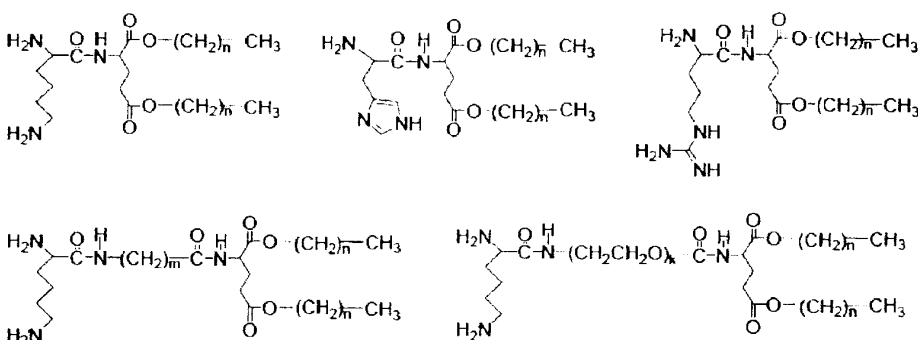
[0064] [식 중, A¹¹ 및 A¹² 는 각각 독립적으로 카르복실기, 수산기, 또는 아미노기이고, n 은 2 ~ 4 의 정수이다]

[0065] 을 갖는 3 관능성 코어 화합물에, 사슬형 탄화수소기의 공급원 및 카티온성 관능기를 갖는 탄화수소기의 공급원을 순차 반응시킴으로써 제조할 수 있다. 또한, 제조 방법의 상세에 대해서는, 국제 공개 제2006/118327호 팜플렛을 참조하면 된다.

[0066] 카티온성 양쪽 친매성 분자는 1 종 단독으로 사용해도 되고, 2 종 이상을 조합하여 사용할 수도 있다.

[0067] 본 발명에 사용되는 카티온성 양쪽 친매성 분자로는, 다음 식으로 나타내는 화합물 군에서 선택되는 적어도 1 종을 함유하는 것이 바람직하다.

[0068] [화학식 7]



[0069]

[0070] [식 중, n 은 각각 독립적으로 8 ~ 22 의 정수이고, m 은 1 ~ 14 의 정수이며, k 는 1 ~ 250 의 정수이다]

[0071] 상기 식 중, n 은 11 ~ 21 이 바람직하고, 11 ~ 17 이 보다 바람직하며, 3 ~ 17 이 더욱 바람직하다. m 은 1 ~ 11 이 바람직하고, 1 ~ 8 이 보다 바람직하며, 1 ~ 5 가 더욱 바람직하다. k 는 1 ~ 250 이 바람직하고, 1 ~ 120 이 보다 바람직하며, 1 ~ 10 이 더욱 바람직하다.

[0072] 본 발명의 pH 응답성 리포솜에 있어서, 카티온성 양쪽 친매성 분자의 함유량은, 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 5 몰% 이상이 바람직하고, 10 몰% 이상이 보다 바람직하며, 30 몰% 이상이 더욱 바람직하다. 또, 95 몰% 이하가 바람직하고, 80 몰% 이하가 보다 바람직하며, 50 몰% 이하가 더욱 바람직하고, 30 몰% 이하가 특히 바람직하다.

[0073] (아니온성 양쪽 친매성 분자)

[0074] 본 발명에 사용되는 아니온성 양쪽 친매성 분자는, 친수부에 아니온성 관능기를 갖는 양쪽 친매성 분자이면 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 「아니온성 관능기」는, 수용액 중 염기성 pH 환경하에서 아니온성을 나타내는 것이면 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 이와 같은 아니온성 관능기로는, 카르복실기 및 인산기를 바람직하게 들 수 있다.

[0075] 아니온성 양쪽 친매성 분자의 구체예로는, 디아실포스파티딜글리세롤, 디아실포스파티딘산, 디아실포스파티딜이노시톨, 디아실포스파티딜세린, 지방산, 카르복실산형 양쪽 친매성 분자, 아니온성 아미노산형 양쪽 친매성 분자 등을 들 수 있다.

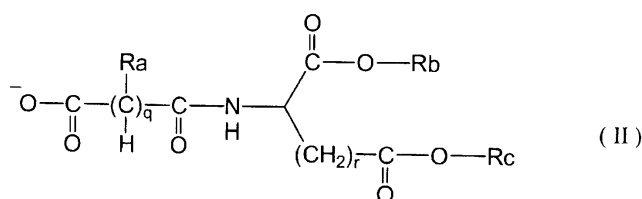
[0076] 아니온성 양쪽 친매성 분자는 1 종 단독으로 사용해도 되고, 2 종 이상을 조합하여 사용해도 된다.

[0077] (양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자)

[0078] 본 발명에 사용되는 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자는, 친수부에 카티온성 관능기 및 아니온성 관능기를 병유하는 양쪽 친매성 분자이면 특별히 제한되지 않는다.

[0079] 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자로는, 일반식 (II)

[0080] [화학적식 8]



[0081]

[0082] [식 중, q, r 은 각각 독립적으로 1 ~ 4 의 정수이고, Ra 는 1 개가 NH₃⁺ 이고, 그 외의 Ra 는 모두 수소 원자이며, Rb 및 Rc 는 각각 독립적으로 탄소수 8 ~ 22 의 사슬형 탄화수소기이다]

[0083] 로 나타내는 화합물이 바람직하게 사용된다.

[0084] 식 (II) 중, q, r 은 각각 독립적으로 2 또는 3 인 것이 바람직하다. 또, Ra 는 하나가 NH₃⁺ 이고, 그 외의 Ra 는 모두 수소 원자이지만, 말단 카르복실기로부터 세어서 3 번째 또는 4 번째 탄소의 Ra 가 NH₃⁺ 이고, 그 외의 Ra 가 수소 원자인 것이 바람직하다. 보다 구체적으로는, 식 (II) 중, q 가 3 이고, r 이 3 이며, 말단 카르복실탄소로부터 세어서 4 번째 탄소의 Ra 가 NH₃⁺ 이고, 그 외의 Ra 가 H 인 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 ; q 가 2 이고, r 이 3 이며, 말단 카르복실탄소로부터 세어서 3 번째 탄소의 Ra 가 NH₃⁺ 이고, 그 밖의 R 이 H 인 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 ; q 가 3 이고, r 이 2 이며, 말단 카르복실탄소로부터 세어서 4 번째 탄소의 Ra 가 NH₃⁺ 이고, 그 외의 Ra 가 H 인 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 ; q 가 2 이고, r 이 2 이며, 말단 카르복실탄소로부터 세어서 3 번째 탄소의 Ra 가 NH₃⁺ 이고, 그 외의 Ra 가 H 인 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자를 바람직하게 들 수 있다.

[0085] Rb 및 Rc 는 각각 독립적으로 탄소수 8 ~ 22 의 사슬형 탄화수소기이다. 「사슬형 탄화수소기」는 공유 결합으로 도입할 수 있는 소수성의 기이면 특별히 제한되지 않는다. 사슬형 탄화수소기는, 직사슬 또는 분기 사슬중 어느 것이어도 되고, 직사슬인 것이 바람직하다. 또, 사슬형 탄화수소기는, 알킬 사슬, 알케닐 사슬, 알키닐 사슬, 이소프레노이드 사슬, 비닐기, 카르복실기, 수산기, 아미노기, 및 메르캅토기로 이루어지는 군에서 선택되는 치환기를 갖고 있어도 된다. 사슬형 탄화수소기의 탄소수는, 바람직하게는 12 ~ 20 이고,

보다 바람직하게는 14 ~ 18 이다. 또, 사슬형 탄화수소기는 이중 결합이나 삼중 결합 등의 불포화 결합을 갖고 있어도 되고, 그 경우에 그 수는 1 ~ 4 인 것이 바람직하다. 이들 중에서도, Rb 및 Rc 로는, 직사슬 또는 분기 사슬의 탄소수 12 ~ 20 의 알킬기인 것이 바람직하고, 직사슬의 탄소수 14 ~ 18 의 알킬기인 것이 특히 바람직하다.

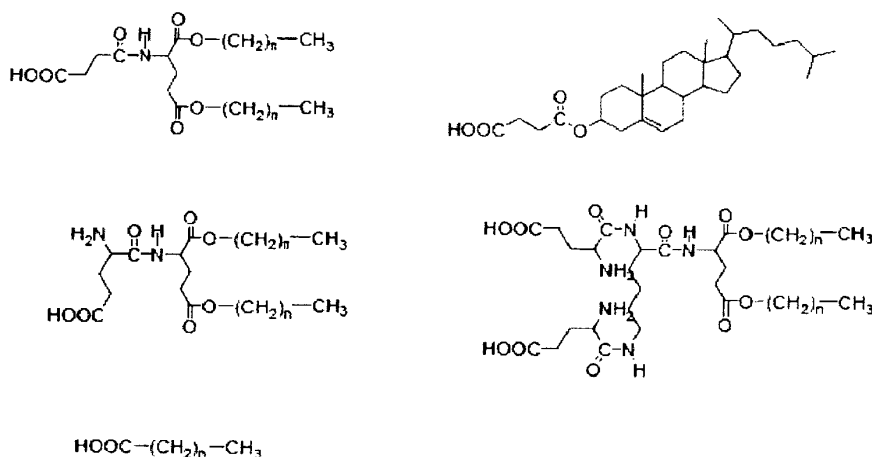
[0086] 상기 식 (II) 로 나타내는 화합물은, 일본 공개특허공보 2007-210953호에 기재된 방법 또는 그에 준한 방법에 따라 제조할 수 있다. 제조 방법의 상세는, 일본 공개특허공보 2007-210953호를 참조하면 된다.

[0087] 이들 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자는 1 종 단독으로 사용해도 되고, 2 종 이상을 조합하여 사용할 수도 있다.

[0088] 본 발명에 있어서는, 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자를 조합하여 사용해도 되고, 이들 중 어느 1 종만을 사용해도 된다. 본 발명에 있어서는, 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 구성 지질로서 함유함으로써, 약염기성 환경하에서 리포솜을 구성하는 분자 집합 상태가 변화하여 리포솜의 막투과성을 변화시키고, 내포하는 목적 물질을 방출시킬 수 있다.

[0089] 그 중에서도, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은 다음 식으로 나타내는 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종을 구성 지질로서 함유하는 것이 바람직하다.

[0090] [화학식 9]



[0091]

[0092] [식 중, n 은 각각 독립적으로 8 ~ 22 의 정수이다]

[0093] 이들 화합물은 공지된 것으로, Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) 그리고 Hexacosanoic acid (식 중 n : 24) 는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 로부터 용이하게 입수할 수 있다.

[0094] 본 발명의 pH 응답성 리포솜에 있어서, 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자의 함유량은, 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해 합계로 5 몰% 이상이 바람직하고, 10 몰% 이상이 보다 바람직하며, 30 몰% 이상이 더욱 바람직하다. 또, 95 몰% 이하가 바람직하고, 80 몰% 이하가 보다 바람직하며, 50 몰% 이하가 더욱 바람직하고, 30 몰% 이하가 특히 바람직하다.

[0095] 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자를 조합하여 사용하는 경우, 아니온성 양쪽 친매성 분자와 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자의 혼합 몰비 (아니온성 양쪽 친매성 분자/양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자) 는, 10/1 ~ 1/10 이 바람직하고, 5/1 ~ 1/5 가 보다 바람직하며, 2/1 ~ 1/2 가 더욱 바람직하다.

[0096] 본 발명의 pH 응답성 리포솜은 스테로이드류를 추가로 함유할 수 있다. 스테로이드류로는, 스테롤, 담즙산, 프로비타민 D, 스테로이드 호르몬 등, 퍼하이드로시클로펜타노페난트렌을 갖는 모든 스테로이드를 들 수 있다. 그 중에서도 스테롤류를 사용하는 것이 바람직하다. 스테롤류로는, 예를 들어 에르고스테롤, 콜레스테롤 등을 들 수 있다. 그 중에서도 콜레스테롤 분자가 바람직하다.

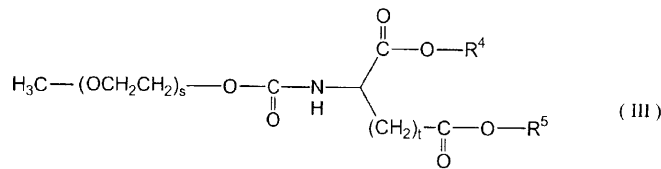
[0097] 스테로이드류의 함유량은 특별히 제한되는 것은 아니지만, 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해, 0.01 몰% 이상이 바람직하고, 0.05 몰% 이상이 보다 바람직하며, 0.1 몰% 이상이 더욱 바람직하다. 또, 30 몰% 이하가 바람직하고, 10 몰% 이하가 보다 바람직하며, 5 몰% 이하가 더욱 바람직하다. 스테로이드류는, 분자 집합체의 안정화제로서 작용할 수 있고, 원하는 방출 속도 및 방출률 등에 따라 적절히 조정할 수 있다. 스

테로이드류는 1 종 단독으로 사용해도 되고, 2 종 이상을 조합하여 사용해도 된다.

[0098] 또, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은 폴리에틸렌글리콜 결합 양쪽 친매성 분자를 추가로 함유할 수 있다. 본 발명에 사용되는 폴리에틸렌글리콜 결합 양쪽 친매성 분자는, 양쪽 친매성 분자의 친수부에 폴리에틸렌글리콜이 결합된 것이면 특별히 제한되지 않는다. 폴리에틸렌글리콜부의 분자량은, 200 ~ 5 만 정도인 것이 바람직하고, 1000 ~ 1 만 정도인 것이 보다 바람직하다.

[0099] 폴리에틸렌글리콜 결합 양쪽 친매성 분자로는, 예를 들어 다음 식 (III) 으로 나타내는 화합물이 바람직하게 사용된다.

[0100] [화학식 10]



[0101]

[0102] [식 중, s 는 3 ~ 250 의 정수이고, t 는 1 ~ 4 의 정수이며, R⁴ 및 R⁵ 는 각각 독립적으로 탄소수 8 ~ 22 의 사슬형 탄화수소기이다]

[0103] 상기 식 (III) 중, s 는 폴리에틸렌글리콜부의 분자량이 상기 범위가 되도록 선택하면 된다. 또, t 는 2 또는 3 인 것이 바람직하다. R⁴ 및 R⁵ 의 사슬형 탄화수소기의 구체예는, 식 (II) 의 Ra 및 Rb 에서 예시한 것과 동일한 것을 들 수 있다.

[0104] 폴리에틸렌글리콜 결합 양쪽 친매성 분자를 함유함으로써, 리포솜의 응집이 억제되어, 생체 내에 투여한 후의 혈중 체류 시간을 증대시킬 수 있다. 폴리에틸렌글리콜 결합 양쪽 친매성 분자는 1 종 단독으로 사용해도 되고, 2 종 이상을 조합하여 사용할 수도 있다.

[0105] 본 발명에 있어서, 폴리에틸렌글리콜 결합 양쪽 친매성 분자의 함유량은, 특별히 제한되는 것은 아니지만, 리포솜의 구성 지질의 합계 몰수에 대해, 0.1 몰% 이상이 바람직하고, 0.2 몰% 이상이 보다 바람직하며, 0.3 몰% 이상이 더욱 바람직하다. 또, 50 몰% 이하가 바람직하고, 10 몰% 이하가 보다 바람직하며, 5 몰% 이하가 더욱 바람직하다.

[0106] 본 발명의 pH 응답성 리포솜은, 상기 성분 외에 본 발명의 목적을 손상시키지 않는 범위에서, 난황 레시틴, 대두 레시틴, 수소 첨가 난황 레시틴, 수소 첨가 대두 레시틴, 디아실포스파티딜콜린, 디아실포스파티딜에탄올아민, 스펅고미엘린, 다종의 당지질 등의 리포솜의 구성 지질로서 알려져 있는 인지질을 1 종 또는 2 종 이상 함유해도 된다.

[0107] 본 발명의 pH 응답성 리포솜의 제조 방법은 특별히 제한되는 것이 아니라, 공지된 방법에 준하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 카티온성 양쪽 친매성 분자와, 아니온성 양쪽 친매성 분자 및 양쪽 이온성 양쪽 친매성 분자 중 적어도 1 종과, 그 밖의 임의 성분을 함유하는 혼합 지질의 분말 혹은 박막을 수화시키고 분산시킨 후, 고압 압출(익스트루전) 법, 초음파 조사법, 교반(볼텍스 믹싱, 호모게나이저) 법, 고속 교반법, 프렌치 프레스법, 동결 용해법, 마이크로 플루이다이저법 등을 사용하여 pH 응답성 리포솜을 제조할 수 있다. 혹은, 상기 혼합 지질을 유기 용매에 용해시킨 용액을 수상에 주입한 후, 에탄올 또는 에테르 등의 유기 용매를 감압 또는 투석으로 제거하여 pH 응답성 리포솜을 제조할 수도 있다. 또, 상기 혼합 지질을 콜산나트륨, 도데실황산나트륨, Triton X, 옥틸글리코사이드 또는 라우릴에테르 등의 비이온성 계면 활성제과 함께 수상에 분산시켜 에멀션을 형성시키고, 투석에 의해 제거하여 pH 응답성 리포솜을 제조할 수도 있다. 그 외, 역상 증발법, 인큐베이션법 등을 채용하여 pH 응답성 리포솜을 제조해도 된다.

[0108] 이렇게 하여 얻어지는 본 발명의 pH 응답성 리포솜은, 리포솜 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 플러스의 제타 전위를 갖고, 그 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 마이너스의 제타 전위를 가질 수 있다. 즉, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은, 리포솜 분산액의 pH 가 6.5 이상 8.5 미만인 범위에서, pH 응답성 리포솜의 제타 전위가 pH 의 증가와 함께 플러스에서 마이너스로 변화한다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은 리포솜 분산액의 pH 가 7.0 이상 8.0 미만인 범위에서, pH 응답성 리포솜의 제타 전위가 pH 의 증가와 함께 플러스에서 마이너스로 변화한다.

[0109] 본 발명의 바람직한 양태에 의하면, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은, 표면 전하가 pH 변화에 응답하여 이와 같은 거동을 갖기 때문에, 리포솜 분산액의 pH 가 6.5 미만인 산성 환경하에서 목적 물질을 유지하고, 그 분산액의 pH 가 8.5 이상인 염기성 환경하에서 목적 물질을 방출할 수 있다. 본 발명의 다른 바람직한 양태에 의하면, 본 발명의 pH 응답성 리포솜은, 상기 분산액의 pH 가 7.0 미만에서 목적 물질을 유지하고, 상기 분산액의 pH 가 8.0 이상에서 목적 물질을 방출할 수 있다.

[0110] 또한, 본 명세서에 있어서 「목적 물질을 유지한다」라고 할 때는, 수분산 상태에서 리포솜 내수상에 목적 물질이 유지되어 있는 것을 의미하지만, 다소 (바람직하게는 10 % 미만) 의 목적 물질의 방출이 관찰되어도 된다. 예를 들어, 형광 물질인 칼세인을 사용한 경우, 1 시간 후의 방출률은 10% 미만인 것이 바람직하고, 5 % 미만인 것이 보다 바람직하다. 또한, 칼세인의 방출률은 다음 식에 의해 구해진다.

수학식 1

$$\text{칼세인의 방출률(\%)} = (I_x - I_0)/(I_T \times 1.1 - I_0)$$

I_0 : pH6.5에 있어서의 형광 강도

I_x : 각pH 의 완충액에 첨가한 후의 형광 강도

I_T : 1%Triton-X 200 μ L첨가했을때의 형광 강도

[0111]

[0112] 또, 「목적 물질을 방출한다」라고 할 때는, 외수상의 pH 를 바꾸어 1 시간 이내에 목적 물질을 바람직하게 10 % 이상 방출하는 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 식에 의해 구해지는 칼세인의 방출률은 10 % 이상인 것이 바람직하고, 20 % 이상인 것이 보다 바람직하다.

[0113] 리포솜에 목적 물질을 유지시키는 방법은, 목적 물질의 종류 등에 따라 적절히 선택하면 된다. 예를 들어 목적 물질이 수용성 약물인 경우에는, 리포솜 제조시에 약물을 수상에 용해시켜 조제할 수 있다. 유지되지 않은 수용성 약물은 겔 여과, 초원심분리 또는 한외 여과막 처리 등에 의해 목적 물질을 유지한 리포솜과 분리할 수 있다. 한편, 지용성 약물인 경우에는, 혼합 지질이 유기 용매에 용해되어 있는 상태에서 약물을 혼합하여 상기 서술한 방법으로 리포솜을 형성함으로써, 예를 들어 2 분자막 소포체의 소수부에 목적 물질을 유지시킬 수 있다. 프로브, 핵산, 단백질 등의 경우에는 동일한 방법으로 리포솜에 목적 물질을 유지시키거나, 혹은 2 분자막 소포체의 외측 표면 상에 목적 물질을 국재시킬 수 있다.

[0114] 본 발명의 pH 응답성 리포솜은 수성 매체에 분산시켰을 때, 산성 pH 환경하에서 플러스의 제타 전위를 갖고, 또한, 염기성 pH 환경하에서 마이너스의 제타 전위를 갖는다는, 종래에 없는 pH 응답 거동을 나타낼 수 있다. 본 발명의 pH 응답성 리포솜에 목적 물질을 유지시킴으로써, pH 응답성 제제의 용도가 넓어질 것으로 기대된다.

[0115] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0116] 실시예 1

[0117] [1] 혼합 지질의 조제

[0118] 표 1 에 나타낸 각 혼합 지질을 t-부틸알코올에 용해시킨 후, 동결 건조시켜 혼합 지질 분말을 조제하였다. 카티온성 양쪽 친매성 분자로서 1,5-Dihexadecyl-L-lysyl-L-glutamate (Lys-Glu2C₁₆), 아니온성 양쪽 친매성 분자로서 Cholesteryl Hemisuccinate (CHEMS) 또는 팔미트산 (PA) 을 사용하였다. PEG5000-GLu2C18 의 수식량은 총 지질의 0.3 mol% 로 하였다. 사용한 지질의 화학 구조를 이하에 나타낸다.

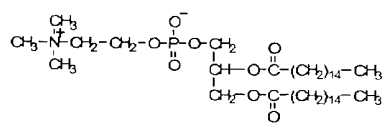
표 1

혼합 지질	혼합비 (mol)
DPPC/chol/PEG ₅₀₀₀ -Glu2C ₁₈	5/5/0.03
DPPC/Lys-Glu2C ₁₆ /PA/chol/PEG ₅₀₀₀ -Glu2C ₁₈	2.5/2.5/2.5/2.5/0.03
DPPC/Lys-Glu2C ₁₆ /CHEMS/PEG ₅₀₀₀ -Glu2C ₁₈	5/2.5/2.5/0.03
Phytopresome	-

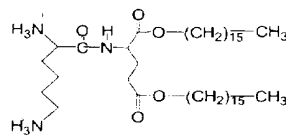
[0119]

[0120]

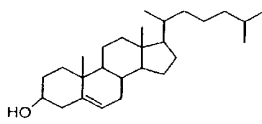
[화학식 11]



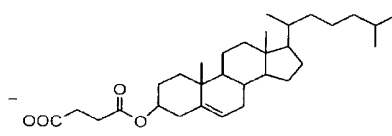
DPPC



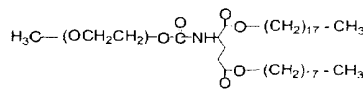
1,5-Dihexadecyl *N*-lysyl-L-glutamate
(Lys-Glu2C₁₆)



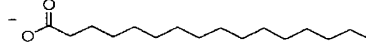
Cholesterol(chol)



Cholesteryl hemisuccinate
(CHEMS)



PEG-lipid (PEG: Mw 5000)



Palmitic acid (PA)

[0121]

[0122]

[2] 리포솜의 조제

[0123]

각 혼합 지질 20 mg 을 20 mM 인산 완충액 (1 ml, pH 6.5) 에 분산시키고, 6 시간 교반 후, 고압 압출법 (최종 공경 0.22 μ m) 으로 입자 직경 200 - 300 nm 의 리포솜을 조제하였다. 조제한 리포솜의 지질 농도는, 리포솜 분산액 중의 DPPC 농도로부터 산출하였다.

[0124]

[3] 제타 전위의 측정

[0125]

조제한 리포솜 (10 μ l, [lipid] = 10 mg/ml) 을 20 mM Tris-buffer 990 μ l (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) 에 첨가하고, 총농도 [lipid] = 1 mg/ml 로 하여 37 $^{\circ}$ C 에 있어서의 제타 전위 측정을 실시하였다 (Marvern Zetasizer). 그 결과를 도 1 에 나타낸다.

[0126]

도 1 에 나타내는 바와 같이, DPPC/chol/PEG-Glu2C₁₈ 로 이루어지는 리포솜은, 모든 pH 에서 마이너스의 제타 전위를 나타냈다. 또, 컨트롤로서 사용한 Phytopresome 조성의 리포솜도 마찬가지로, 모든 pH 에서 마이너스의 제타 전위를 나타냈다. 양 리포솜 모두, pH 7.4 이상에서 제타 전위가 작아졌다. 이것은, pH 의 상승과 함께 인지질의 친수부의 극성 헤드부의 아니온성 이온화 경향이 강해졌기 때문인 것으로 생각된다.

[0127]

한편, DPPC/Lys-Glu2C₁₆/PA/chol/PEG-Glu2C₁₈ 또는 DPPC/Lys-Glu2C₁₆/CHEMS/PEG-Glu2C₁₈ 로 이루어지는 본 발명의 pH 응답성 리포솜은, pH 값이 7.4 또는 7.5 이하에서 플러스의 제타 전위를 나타내고, 그러한 값들보다 pH 가 높아지자 제타 전위가 마이너스의 값으로 변화하였다. 이 pH 상승에 수반하는 제타 전위의 플러스에서 마이

너스로의 변화는, 막성분에 함유하는 Lys-Glu2C₁₆의 탈프로톤화에 수반되는 현상인 것으로 고찰된다. 또 아 니온성 지질의 종류에 따라 제타 전위의 변화 거동이 상이한 것을 나타냈다.

[0128] [4] 입자 직경의 측정

[0129] 조제한 리포솜 ([lipid] = 10 mg/ml)을 20 mM Tris-buffer 990 μ l (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)에 각각 첨가하고, 농도를 [lipid] = 1 mg/ml로 하여 입자 직경 측정을 동적 광 산란법을 사용하여 측정하였다 (BECKMAN COULTER N4 PLUS). 그 결과를 도 2에 나타낸다.

[0130] 도 2에 나타내는 바와 같이, 조제한 4종의 리포솜의 입자 직경은 200 - 300 nm 정도로, 측정한 모든 pH에 있어서의 입자 직경의 변화는 보이지 않았고, pH 변화에 대해 안정적이었다. 따라서, 각 pH에 있어서의 리포솜의 입자 직경은 pH 6.5에서 조제했을 때의 입자 직경에 거의 일치하고 있어 변화하지 않았다.

[0131] [5] 칼세인 내포 리포솜의 조제

[0132] 4 종류의 혼합 지질 20 mg에 1 mM의 칼세인 수용액 (2 ml, pH 6.5)을 첨가하고, 6시간 수화 교반을 실시하였다. 그 후 엑스트루전법 (최종 공경 : 0.22 μ m)에 의해 입자 직경 약 200 nm의 칼세인 내포 리포솜을 조제하였다. 미내포 칼세인은 겔 여과 (Sephadex G-75)에 의해 제거하였다.

[0133] [6] 칼세인의 방출 거동

[0134] 조제한 4 종류의 칼세인 내포 리포솜 ([lipid] = 1 mg/ml, 30 μ l)을 570 μ l의 20 mM Tris-buffer (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 가만히 정지시켰다. 그 혼합액 100 μ l를 1.9 ml의 20 mM Tris-buffer (pH 6.5)로 희석하여 형광 측정 (λ_{ex} : 490 nm, λ_{em} : 520 nm)을 실시하였다. 칼세인의 방출률은 이하의 식에 의해 산출하였다. 그 결과를 도 3에 나타낸다.

수학적 2

$$\text{칼세인 방출률 \%} = (I_x - I_0) / (I_T \times 1.1 - I_0)$$

I_0 : pH 6.5에 있어서의 형광 강도

I_x : 각 pH의 완충액에 첨가한 후의 형광 강도

[0135] I_T : 1% Triton-X 200 μ l 첨가했을 때의 형광 강도

[0136] 도 3에 나타내는 바와 같이, DPPC/cho1/PEG-Glu2C₁₈로 이루어지는 리포솜은, 모든 pH에서 칼세인의 방출은 관찰되지 않았다. 또, 컨트롤로서 사용한 Phytopresome 조성의 리포솜에 대해서도 pH에 의한 방출 거동의 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 모든 pH에서 40% 정도의 칼세인 방출이 관찰된 점에서, 내포 안정성이 낮은 막이었다.

[0137] 한편, DPPC/Lys-Glu2C₁₆/PA/cho1/PEG-Glu2C₁₈ 또는 DPPC/Lys-Glu2C₁₆/CHEMS/PEG-Glu2C₁₈로 이루어지는 리포솜에서는, pH 6.5에서의 칼세인 방출률은 10% 미만인데 반해, pH 상승에 수반하여 칼세인의 방출이 촉진되었다. 칼세인의 방출률은, DPPC/Lys-Glu2C₁₆/PA/cho1/PEG-Glu2C₁₈에서는, pH 7.0에서 약 10%, pH 8.0에서 약 35%, pH 9.0에서 60%였다. 또 DPPC/Lys-Glu2C₁₆/CHEMS/PEG-Glu2C₁₈의 리포솜에서는, pH 7.0에서 20%, pH 8.0에서 약 40%, pH 9.0에서 60%였다. pH 변화에 의한 입자 직경의 변화가 없었기 때문에, 칼세인의 방출은 리포솜의 제타 전위 변화에 수반하여 막투과성이 늘어나 칼세인이 방출되기 쉬워진 것으로 고찰된다. 또 DPPC/cholesterol/PEG-Glu2C₁₈로 이루어지는 리포솜에서는 칼세인 방출이 일어나지 않는 점에서, 내포 칼세인의 방출에는 제타 전위가 플러스에서 마이너스로 변화하여 2분자막을 구성하는 지질 분자의 충전 상태가 변화하는 거동이 필요하다는 것을 알 수 있었다.

[0138] [7] 칼세인의 경시적 방출 거동

[0139] 다음으로, pH 6.5, pH 7.5, pH 8.0에 있어서의 칼세인의 방출 속도에 관한 평가를 실시하였다. 조제한 각각의 칼세인 내포 리포솜 ([lipid] = 1 mg/ml, 30 μ l)을 570 μ l의 20 mM Tris-buffer (pH 6.5, 7.5, 8.5)에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 혼합하였다. 각 pH에 있어서의 소정 시간 경과 후의 방출률은, 다음 식에 의해 산출하였다. 그 결과를 도 4에 나타낸다.

수학식 3

$$\text{칼세인의 방출률(\%)} = (I_x - I_0) / (I_T \times 1.1 - I_0)$$

I_0 : t=0(hr)에 있어서의 형광 강도
 I_x : t=x(hr)에 있어서의 형광 강도
 I_T : 1%Triton-X 200 μ L 첨가했을 때의 형광 강도

[0140]

[0141]

도 4 에 나타내는 바와 같이, DPPC/Lys-Glu2C₁₆/CHEMS/PEG-Glu2C₁₈ 로 이루어지는 리포솜은, 48 시간 후에 pH 6.5 에서 약 30 %, pH 7.5 에서 약 55 %, 나아가서는 pH 8.5 에서 65 % 의 방출률이었다.

[0142]

한편, DPPC/Lys-Glu2C₁₆/PA/cho1/PEG-Glu2C₁₈ 에서는, 48 시간 후에 pH 6.5 에서 약 40 %, pH 7.5 에서 약 65 %, 나아가서는 pH 8.5 에서 80 % 의 방출률인 점에서, DPPC/Lys-Glu2C₁₆/CHEMS/PEG-Glu2C₁₈ 의 리포솜과 비교 하여, 각 pH 에 있어서 방출 속도가 높은 것을 나타냈다. 이것은 팔미트산 (PA) 이 1 본체의 지질인 점에서, 2 분자막의 분자 충전 상태가 나빠 막투과성이 높기 때문인 것으로 생각된다.

[0143]

[8] 시트르산 분산 리포솜의 조제

[0144]

각 혼합 지질 20 mg 을 20 mM 시트르산 (pH 2.2) 에 수화시키고, 그 후 분산액을 엑스트루전법 (최종 공경 : 0.22 μ m) 에 의해 입자 직경 200 - 300 nm 의 리포솜을 조제하였다. 또 필요에 따라 이 리포솜 분산액 ([lipid] = 55 mg/ml, 10 μ l) 또는 시트르산 (20 mM, 10 μ l) 을 4 ml 의 300 μ M 수산화나트륨 수용액 (pH 10.5) 에 첨가한 직후부터의 pH 변화 거동을 pH 미터로 측정하였다. 그 결과를 도 5 에 나타낸다.

[0145]

도 5 에 나타내는 바와 같이, 수산화나트륨 수용액에 시트르산을 첨가하자, 순식간에 pH 가 7.0 으로 저하되었다. 이 pH 변화는 시트르산과 수산화나트륨의 중화 반응인 것으로 생각된다. 다음으로, DPPC/cho1/PEG-Glu2C₁₈ 리포솜 분산액을 첨가하자, 서서히 pH 가 저하되어 6 시간 후에는 pH 7.7 로 변화하였다. Phytosomes 도 동일한 pH 변화를 나타냈지만, 적하 직후의 pH 저하는 DPPC/cholesterol/PEG-Glu2C₁₈ 보다 빨랐다. 시트르산만을 첨가하면, pH 가 순식간에 저하된 것에 반해, 리포솜 분산계에서는 pH 가 서서히 저하되었다. 이것은 리포솜 내에 있는 시트르산이 외수상과의 pH 변화에 의한 프로톤의 농도 구배에 의해 누출되어, pH 를 저하시키고 있기 때문에 pH 변화는 지연되고 있는 것으로 고찰할 수 있다.

[0146]

다음으로, DPPC/Lys-Glu2C₁₆/PA/cho1/PEG-Glu2C₁₈ 로 이루어지는 리포솜을 첨가하자, 6 시간 후에 pH 7.5 까지 저하되었다. 이것은 이 리포솜이 외수상의 약염기성 환경에 응답하여 시트르산을 방출하기 때문에 DPPC/cholesterol/PEG-Glu2C₁₈ 이나 Phytosome 보다 재빠르게 pH 가 저하된 것으로 생각된다. 이들 결과로부터, pH 변화에 수반하는 내포 시트르산의 리포솜으로부터의 방출 거동이 나타났다. 또 DPPC/Lys-Glu2C₁₆/PA/cho1/PEG-Glu2C₁₈ 리포솜이 약염기성 환경하에서 내포하는 시트르산을 방출하기 쉬운 것이 시사되었다.

[0147]

[9] 약염기성 환경하에서의 리포솜으로부터의 시트르산의 방출 거동

[0148]

약염기성 환경하에서의 리포솜으로부터의 시트르산의 방출 거동을 검토하였다. 먼저, 리포솜 분산 시트르산 수산액 ([lipid] = 250 μ M, 4 ml) 또는 시트르산 수용액 (30 mM, pH 2.2, 4 ml) 에 2 M 수산화나트륨 수용액 170 μ l 를 첨가하여 혼합액의 pH 를 6.5 로 조제하였다. 그 후, 300 mM 의 수산화나트륨 수용액 60 μ l 를 첨가하여 혼합액의 pH 를 7.5 - 8.5 로 변화시켰다. 그 후의 pH 변화 거동을 pH 미터로 경시적으로 측정하였다. 그 결과를 도 6 에 나타낸다.

[0149]

도 6 에 나타내는 바와 같이, 시트르산만에서는 순식간에 pH 가 저하되고, pH 7 에서 거의 일정한 값을 나타냈다. 다음으로 컨트롤 리포솜 DPPC/cholesterol/PEG-Glu2C₁₈ 나 Phytosome 에서는, 혼합액 pH 를 6.5 에서 8 로 조제해도 pH 의 변화가 거의 일어나지 않았다. 이것은 내포하고 있는 시트르산 (30 mM, pH 2.2) 이 30 분으로는 거의 하지 않는 것을 나타냈다.

[0150]

한편, pH 응답성 리포솜 DPPC/Lys-Glu2C₁₆/PA/cho1/PEG-Glu2C₁₈ 에서는, pH 가 8.0 이 되자 혼합액의 pH 가 저하되었다. pH 변화에 수반하여 내포되어 있던 시트르산이 리포솜 내수상으로부터 방출되고, 분산액의 pH 가

제어된 것으로 생각된다.

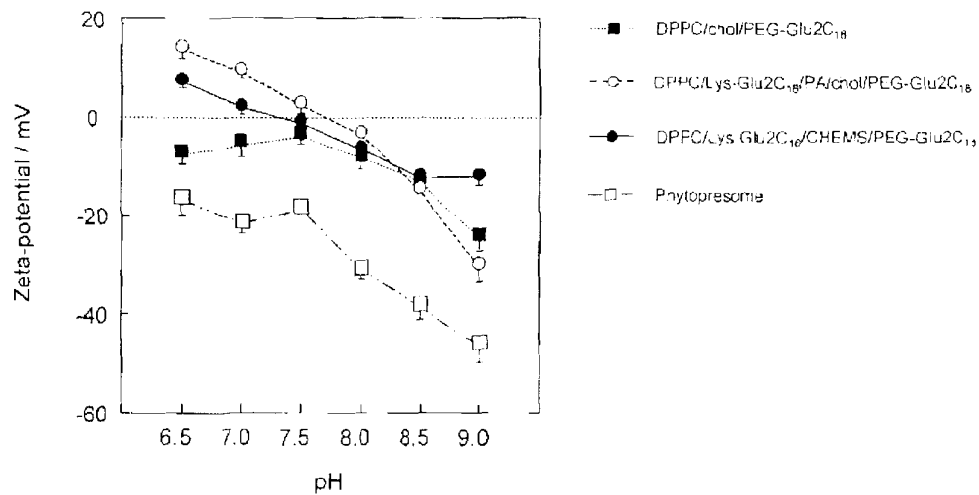
[0151] 이상의 결과로부터, 리포솜 막성분에 카티온성 지질 ; Lys-Glu2C₁₆ 과 아니온성 지질 ; PA 또는 CHEMS 를 사용하면, 리포솜 분산매의 pH 가 상승했을 때에 리포솜의 제타 전위가 플러스로부터 마이너스로 변화하고, 리포솜 분산 상태를 유지한 채로 리포솜의 막투과성이 상승하는 것을 알 수 있었다. 본 발명에 의하면, 내수상에 형광 물질이나 시트르산 등을 내포시켜 두면, 약염기성 환경하에서 내포물을 방출할 수 있는 것을 나타낼 수 있다.

산업상 이용가능성

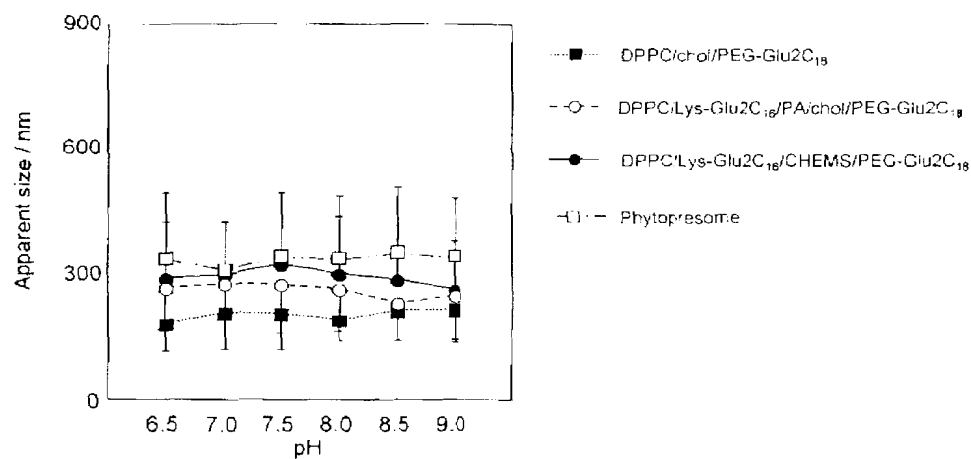
[0152] 본 발명의 pH 응답성 리포솜은 약물, 프로브, 핵산 및 단백질 등의 운반체로서 유용하고, 지금까지 없는 pH 응답성 거동을 갖는 점에서, pH 응답성 제제의 가능성이 넓어질 것으로 기대된다.

도면

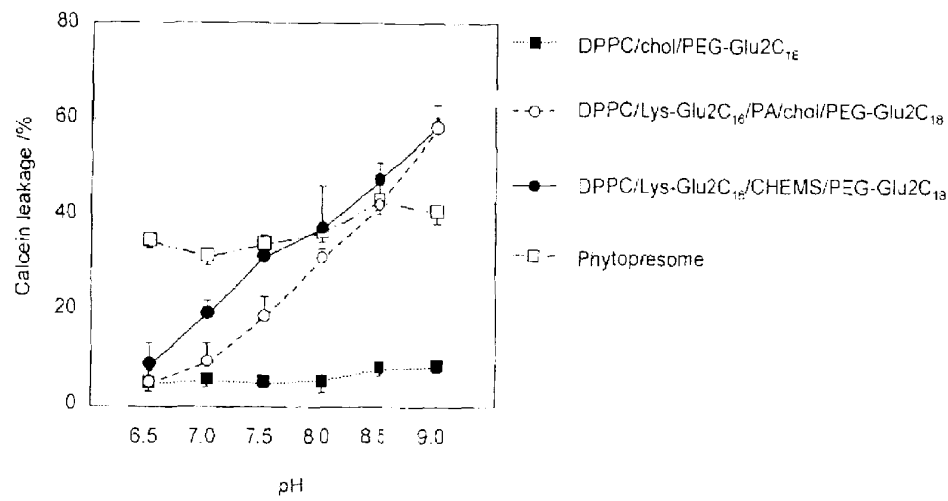
도면1



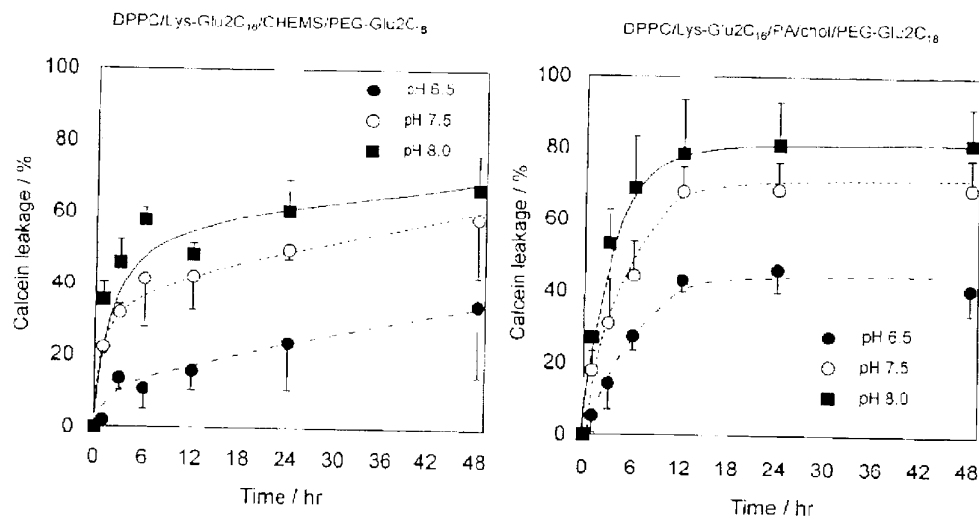
도면2



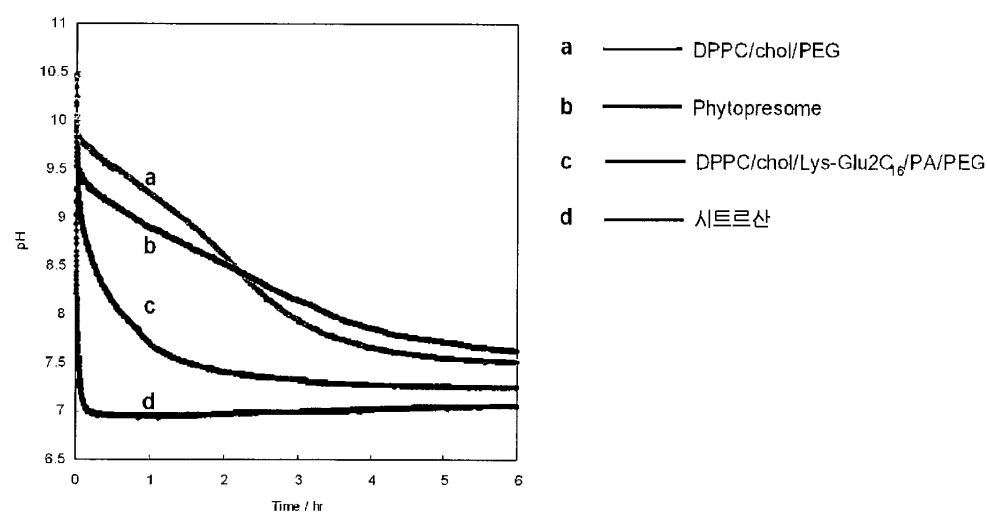
도면3



도면4



도면5



도면6

