



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0045722
(43) 공개일자 2017년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/14 (2017.01)
A61K 47/36 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A61K 47/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0133491
(22) 출원일자 2016년10월14일
심사청구일자 2016년10월14일
(30) 우선권주장
1020150144870 2015년10월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
신관우
서울특별시 강남구 선릉로 221 (도곡동, 도곡렉슬
아파트)402동 1201호
이길용
서울특별시 구로구 경인로 643 201동 204호 (신도
림동, 동아2차아파트)
안태규
서울특별시 강남구 청담동 삼익아파트 133-21
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

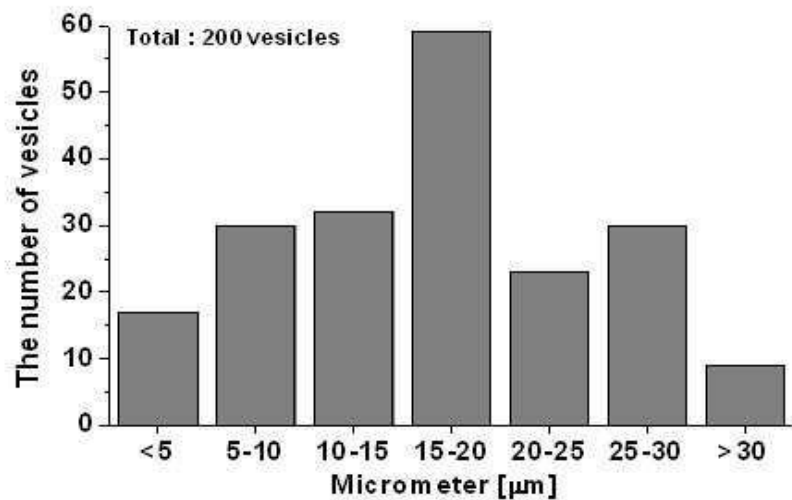
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 세포-유사 리포솜

(57) 요약

본 발명은 세포-유사 리포솜 및 이를 이용한 약물전달체를 제공한다. 본 발명에 따르면, 상기 세포-유사 리포솜은 실제 세포와 흡사한 안정성 및 친화력을 보장하고 생체 내 특정 기관까지 보다 효율적으로 전달이 가능하며 리포솜을 이용한 약물전달 시스템에 핵심적 역할을 할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/36 (2013.01)

A61K 47/42 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	201431031
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	(재)한국연구재단
연구사업명	도약연구과제
연구과제명	인공세포 구조 및 기능모사연구
기 여 율	70/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2014.05.01 ~ 2015.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	201433021
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	(재)한국연구재단
연구사업명	해외우수연구기관유치사업
연구과제명	서강-하버드 질병 바이오펜 연구 센터
기 여 율	10/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	201333037
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국과학기술원
연구사업명	원자력연구기반확충사업
연구과제명	냉중성자 표면 산란을 이용한 바이오/나노 계면 현상 연구
기 여 율	20/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2013.12.01 ~ 2014.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 음이온성 지질, 중성 지질 및 이온투과담체(ionophore)로 구성된 인지질 막; (b) 상기 음이온성 지질에 이온 결합되어 표면에 위치하는 세포외기질; 및 (c) 상기 인지질 막 내부에 세포골격을 포함하는 세포-유사 리포솜.

청구항 2

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

청구항 3

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

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 이온투과담체는 뷰베리신(Beauvericin), 칼시마이신(Calcimycine or A23187), CCCP(Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone), 그라미시딘 A(Gramicidin A), 이오노마이신(Ionomycin), 라살로시드(Lasalocid), 모넨신(Monensin), 니제리신(Nigericin), 녹액틴(Nonactin), 니스타틴(Nystatin), 살리노마이신(Salinomycin) 및 발리노마이신(Valinomycin)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 이온투과담체인 것을 특징으로 하는 세포-유사 리포솜.

청구항 5

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

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 세포골격은 액틴(actin), 비멘틴(vimentin), 신경교원섬유 산단백질(glial fibrillary acidic protein), 신경사상체(neurofilament), 케라틴(keratin), 핵 라미나(nuclear lamina) 및 튜불린(tubulin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포골격인 것을 특징으로 하는 세포-유사 리포솜.

청구항 7

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

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 세포-유사 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 세포-유사 리포솜의 제조방법:

- (a) 음이온성 지질, 중성 지질 및 이온투과담체(ionophore)로 구성된 인지질 막을 제조하는 단계;
- (b) 상기 인지질 막의 내부로 세포골격을 도입하는 단계; 및
- (c) 상기 인지질 막의 표면에 세포외기질을 도입하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포-유사 리포솜에 관한 것이다.

배경 기술

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

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

[0005] 세포골격(cytoskeleton)은 세포의 형태 및 기능을 지지하는 세포내 기질이다. 진핵생물에서, 상기 기질은 3 가지 주요 단백질로 구성된 세포의 요구에 따라 신속하게 조립 또는 분해할 수 있는 동적 구조(dynamic structure)를 나타낸다(McKinley et al. (2015). Human Anatomy (4th Ed.). New York: McGraw Hill Education. p. 29). 상기 주요 단백질은 액틴으로 구성된 마이크로필라멘트(microfilament), 튜불린으로 구성된 마이크로튜불(microtubule) 및 중간섬유(intermediate filament)이다(Wickstead B 및 Gull K (Aug 2011).

"The evolution of the cytoskeleton". The Journal of Cell Biology 194 (4): 51325 및 Gunning PW et al.(Jun 2015). "The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments". Journal of Cell Science 128 (11): 20092019).

[0006] 리포솜은 최소 하나의 지질2중층을 갖는 구형 소포이다. 리포솜은 영양소 및 의약품과 같은 전달하는데 사용되고 있다. 리포솜은 생체막과 유사한 구조를 가짐으로서 생체 친화적이고, 폐쇄이중층 구조로 내부에 친수성 약물을 봉입시킬 수 있는 장점이 있어 친수성 약물을 보다 효과적으로 송달하기 위한 약물수송체로서 폭넓게 활용되고 있다(Xiong, X. B. et al. Pharm. Res. 2005, 22, 933. 및 Gabizon, A. A. et al. Pharm. Res. 1993, 10, 703.). 그러나 리포솜은 체내 투여 후 간이나 비장에서 세망내피계에 의하여 쉽게 흡수될 뿐만 아니라 혈중에서 단백질의 흡착과 리포솜의 응집 등으로 인한 구조의 불안정성이 문제가 되어 결과적으로 봉입약물이 누출됨으로서 정상세포에 부작용을 나타내는 단점이 있다. 따라서 리포솜 구조의 안정화를 위해 리포솜 표면을 다양한 고분자로 수식하는 연구가 활발히 전개되고 있다(Seo, D. H. et al. Polymer(Korea) 2005, 29, 277. 및 Park, Y. J. et al. Polymer(Korea) 2004, 28, 502.)

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 실제 세포와 유사한 세포막의 강도 및 유연성을 갖는 세포-유사 리포솜을 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 음이온성 지질을 포함하는 인지질 막 및 상기 음이온성 지질에 결합된 세포외기질, 상기 인지질 막 내부에 위치하는 세포골격으로 구성된 리포솜을 제조하여 이의 구조적 안정성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 세포-유사 리포솜을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 약물전달체를 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 음이온성 지질 및 중성 지질을 포함하는 인지질 막; (b) 상기 음이온성 지질에 이온 결합되어 표면에 위치하는 세포외기질; 및 (c) 상기 인지질 막 내부에 세포골격을 포함하는 세포-유사 리포솜을 제공한다.

[0018] 본 발명자들은 실제 세포와 유사한 세포막의 강도 및 유연성을 갖는 세포-유사 리포솜을 제조하고자 노력하였다. 그 결과, 음이온성 지질을 포함하는 인지질 막 및 상기 음이온성 지질에 결합된 세포외기질, 상기 인지질 막 내부에 위치하는 세포골격으로 구성된 리포솜을 제조하여 이의 구조적 안정성을 확인하였다.

[0020] 본 발명의 주요한 특징 중 하나는 본 발명의 세포-유사 리포솜을 구성하는 인지질 막은 음이온성 지질을 포함하는 것이다.

[0021] 본 명세서에서 용어 “음이온성 지질”은 pH 4.0 내지 pH 8.0의 범위 내에서 최소 하나의 음전하를 갖는 어떠한 양친매성 지질을 의미한다. 상기 음이온성 지질은 당업계의 통상의 기술자에게 공지된 어떠한 음이온성 지질

을 모두 포함한다.

- [0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 음이온성 지질은 DOPS(Dioleoyl phosphatidylserine), DMPG(dimyristoyl-phosphatidyl glycerol), DPPG(dipalmitoyl-phosphatidyl glycerol), DPTA(diethylenetriamine pentaacetic acid), DPTGA(1,4-dipalmitoyl-tartarate-2,3-diglutaric acid), DSTSA(1,4-disteroyl-tartarate-2,3-disuccinic acid), CHHDA(2-carboxyheptadecanoyl heptadecylamide), DMPS(Dimyristoylphosphatidylserin), DPPS(Dipalmitoylphosphatidylserin), POPS(Palmitoyl-oleoylphosphatidylserin), DOPG(Dioleoylphosphatidylglycerol), POPG(Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol), DMPA(Dimyristoylphosphatidic acid), DPPA(Dipalmitoylphosphatidic acid), DOPA(Dioleoylphosphatidic acid), POPA(Palmitoyl-oleoylphosphatidic acid), CetylP(Cetyl phosphate) 및 CHEMS(cholesterol hemisuccinate) 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 음이온성 지질이다.
- [0023] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 음이온성 지질은 DOPS, DMPG, DPPG, DPTA, DPTGA, DSTSA 및 CHHDA로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 음이온성 지질이다.
- [0024] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 음이온성 지질은 DOPS이다.
- [0025] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜의 인지질 막을 구성하는 음이온성 지질은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 어떠한 음이온성 지질도 포함한다.
- [0026]
- [0027] 본 발명의 세포-유사 리포솜의 인지질 막을 이루는 지질은 음이온성 지질 외에 중성 지질도 포함한다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “중성 지질”은 pH 4.0 내지 pH 8.0의 범위 내에서 전하되지 않거나(uncharged) 중성 양성 이온성(zwitterion) 형태를 갖는 지질을 의미한다. 상기 중성 지질은 당업계의 통상의 기술자에게 공지된 어떠한 중성 지질을 모두 포함한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 중성 지질은 DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPE(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 콜레스테롤(cholesterol), DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DOPE(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), SM(N-palmitoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine), DLPE(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DiPPE(1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 포스파티딜 콜린(phosphatidyl choline), 포스파티딜 에탄올아민(phosphatidyl ethanolamine), 테트라에테르 리피드(tetraether lipid), 세라마이드(ceramide), 스펅고리피드(sphigolipid), 디아크릴 글리세롤(diacryl glycerol) 및 글리세리드(glyceride)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 중성 지질이다.
- [0030] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 중성 지질은 DOPC, POPE, 콜레스테롤, DSPC, DPPC, POPC 및 DOPE로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 중성 지질이다.
- [0031] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 중성 지질은 DOPC, POPE 및 콜레스테롤이다.
- [0032] 본 발명의 세포-유사 리포솜의 인지질 막을 구성하는 중성 지질은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 공지된 어떠한 중성 지질도 포함한다.
- [0034] 본 발명의 세포-유사 리포솜은 음이온성 지질 및 중성 지질로 구성된 인지질 막을 갖는다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 1-30 몰% 음이온성 지질을 포함한다.
- [0036] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 1-25 몰%, 1-20 몰%, 5-25 몰% 또는 5-20 몰% 음이온성 지질을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 10-20 몰% 음이온성 지질을 포함한다.
- [0039] 본 발명의 주요한 특징 중 다른 하나는 세포-유사 리포솜의 인지질막을 구성하는 음이온성 지질과 이온 결합을 통해 세포외기질이 결합되고, 상기 세포외기질의 중합반응이 자기조립을 유도하여 추가적인 세포외기질을 표면

에 유도한다. 상기 음이온성 지질로 단량체를 유도하고 유도된 단량체들이 자기조립 즉, 중합반응을 통하여 다량체로 유도된다. 예컨대, 콜라겐은 단량체로 유도되어 중합반응에 의해 다량체를 형성하고, 피브로넥틴의 경우는 단량체로 유도된 뒤 단량체의 구조변화가 생기고 폴딩 구조가 언폴딩되어 언폴딩된 피브로넥틴끼리 연결되어 다량체를 구성한다.

- [0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외기질은 파이브로넥틴(fibronectin), 콜라겐(collagen), 라미닌(laminin), 엘라스틴(elastin), 인테그린(integrin) 및 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질이다.
- [0041] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포외기질은 파이브로넥틴, 콜라겐, 라미닌 및 엘라스틴(elastin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질이다.
- [0042] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 세포외기질은 파이브로넥틴 및 콜라겐으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포외기질이다.
- [0043] 본 발명의 세포외기질 전달용 리포솜은 1-30 몰% 음이온성 지질, 70-99 몰% 중성 지질 및 세포외기질을 포함한 다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포외기질 전달용 리포솜의 인지질 막은 DOPC, POPE, DOPS 및 콜레스테롤로 구성된다.
- [0045] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 DOPS를 1-30 몰% 포함한다.
- [0046] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 인지질 막은 DOPC, POPE, DOPS 및 콜레스테롤을 30-70 몰%, 1-30 몰%, 1-30 몰% 및 10-40 몰%로 포함한다.
- [0048] 본 발명의 또다른 특징은 음이온성 지질 및 중성 지질로 구성된 인지질 막 내부에 세포골격을 포함한다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포골격은 액틴(actin), 비멘틴(vimentin), 신경교원섬유 산단백질(glial fibrillary acidic protein), 신경사상체(neurofilament), 케라틴(keratin), 핵 라미나(nuclear lamina) 및 튜불린(tubulin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포골격이다.
- [0051] 본 발명의 세포-유사 리포솜에 상기 세포골격의 중합반응을 유도하기 위해서 이온투과담체를 이용할 수 있다.
- [0052] 본 명세서에서 용어 “이온투과담체”는 이온이 가역적으로(reversibly) 결합하는 화학종을 의미한다. 다수의 이온투과담체는 세포막을 통과하는 이온을 수송하는 지용성 독립체이다.
- [0053] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 이온투과담체는 뷰베리신(Beauvericin), 칼시마이신(Calcimycin or A23187), CCCP(Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone), 그라미시딘 A(Gramicidin A), 이오노마이신(Ionomycin), 라살로시드(Lasalocid), 모넨신(Monensin), 니제리신(Nigericin), 녹액틴(Nonactin), 니스타틴(Nystatin), 살리노마이신(Salinomycin) 및 발리노마이신(Valinomycin)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 이온투과담체이다.
- [0054] 상기 이온투과담체는 당업계의 통상의 기술자에게 공지된 어떠한 이온투과담체를 모두 포함한다.
- [0055] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 세포-유사 리포솜 내에 유도된 단량체 형태의 세포골격인 g-액틴에 이온투과담체를 통해 이온을 전달하여 f-액틴으로 중합시킨다.
- [0056] 본 발명의 세포-유사 리포솜은 나노크기의 리포솜이다.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포-유사 리포솜은 10-500 nm 크기이다.
- [0058] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포-유사 리포솜은 10-400 nm, 10-300 nm, 10-200 nm 또는 50-150 nm 크기이다.
- [0059] 상기 세포-유사 리포솜에 다른 기능성 물질을 추가적으로 도입시킨 경우에는 다양한 이미징, 또는 화학적/생물학적으로 다른 기능(예컨대, 세포 추적, 암 치료)을 수행할 수 있다. 상기 세포-유사 리포솜에 생물 활성 물질(예: 항체, 단백질, 항원, 펩타이드, 핵산, 효소, 세포 등) 또는 화학 활성 물질(예: 단분자, 고분자, 무기

지지체, 약물 등)이 공유 결합, 이온 결합, 친수성 결합, 반데르 발스 결합, 정전기적 결합, 또는 소수성 결합을 통해 결합될 수 있다. 이와 같은 결합은 세포-유사 리포솜과 표면에 직접 또는 세포-유사 리포솜에 코팅된 다작용기 리간드에 간접적으로 이루어질 수 있다.

[0060] 또한, 조영제와 활성 물질이 담체에 함께 포함되어 사용될 수 있다. 추가적인 생물 활성 물질 (biomolecules)의 예는, 항체, 단백질, 항원, 펩타이드, 핵산, 효소, 세포 등이며 바람직하게는 단백질, 펩타이드, DNA, RNA, 항원, 합텐 (hapten), 아비딘 (avidin), 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘 (neutravidin), 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴 (lectin), 셀렉틴 (selectin), 호르몬, 인터루킨, 인터페론, 성장인자, 종양괴사인자, 엔도톡신, 림포톡신, 유로키나제, 스트렙토키나제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 가수분해 효소, 산화-환원 효소, 분해 효소, 이성질화 효소와 합성효소 등의 생체활성 효소, 효소 공인자, 및 효소 억제제 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 상기 화학 활성 물질은 다양한 기능성 단분자, 고분자, 무기 물질, 또는 약물 등을 포함한다. 상기 단분자의 예는 항암제, 항생제, 비타민, 폴산을 포함하는 약물, 지방산, 스테로이드, 호르몬, 퓨린, 피리미딘, 당당류, 및 이당류 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 화학활성 화학 고분자의 예는, 텍스트란, 카르보텍스트란, 폴리사카라이드, 사이클로텍스트란, 폴루란, 셀룰로오스, 녹말, 글리코젠, 카르보하이드레이트, 당당류, 이당류, 및 올리고당류, 폴리포스파젠, 폴리락타이드, 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리안하이드라이드, 폴리말릭산, 및 폴리말릭산의 유도체, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리하이드록시부틸레이트, 폴리카르보네이트, 폴리오르소에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리-L-라이신, 폴리글리콜라이드, 폴리메틸 메타아크릴레이트, 폴리메틸에테르메타아크릴레이트, 및 폴리 비닐피롤리돈 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 상기 화학활성 무기 물질의 예는 금속 칼코겐 화합물, 무기 세라믹 물질, 탄소 물질, II/VI족 반도체, III/V족 반도체, 및 IV족 반도체, 금속, 또는 이의 복합체 등이다. 바람직하게는 실리카 (SiO₂), 티타니아 (TiO₂), 지르코니아, 다공성 물질, 인듐틴옥사이드 (ITO), 나노튜브, 흑연, 플러렌, CdS, CdSe, CdTe, ZnO, ZnS, ZnSe, ZnTe, Si, GaAs, AlAs, Au, Pt, Ag, Cu 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 세포-유사 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물전달체를 제공한다.

[0065] 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체, 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0066] 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 비경구 방식으로 투여되는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 병변내(intralesional) 주입, 또는 두개강내 (intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도, 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 치료학적 유효량의 본 발명의 입자를 포함한다. 용어 “치료학적 유효량”은 치료 목적의 질환을 치료할 수 있는 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.0001-100 mg/kg이다.

[0067] 본 발명의 상기 리포솜 및 상기 리포솜에 봉입된 약물을 포함하는 약물 전달체는 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나, 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일, 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 또는 유화액 형태이거나 엑기스제, 분말제, 과립제, 정제, 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0069] 본 발명의 또다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 세포-유사 리포솜의 제조방법을 제공한다:
- [0070] (a) 음이온성 지질, 중성 지질 및 이온투과담체(ionophore)로 구성된 인지질 막을 제조하는 단계;
- [0071] (b) 상기 인지질 막의 내부로 세포골격을 도입하는 단계; 및
- [0072] (c) 상기 인지질 막의 표면에 세포외기질을 도입하는 단계.

- [0074] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 세포골격의 도입은 전기 인가에 의해 실시된다.
- [0075] 하기 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)에서 도입되는 세포골격은 단분자이다. 실제 세포와 유사한 세포골격을 갖도록, 인지질 막의 이온투과담체를 통해 양이온을 도입하여 세포골격 다발의 형성을 유도한다.
- [0076] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (c)의 세포외기질은 인지질 막을 구성하는 음이온성 지질과 결합하여 도입된다.

- [0078] 본 발명의 세포-유사 리포솜의 제조방법은 상기 세포-유사 리포솜과 동일한 인지질 막의 구성을 가지므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

발명의 효과

- [0080] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0081] (a) 본 발명은 세포-유사 리포솜 및 이를 이용한 약물전달체를 제공한다.
- [0082] (b) 본 발명의 세포-유사 리포솜은 개선된 강도 및 유연성을 나타낸다.
- [0083] (c) 본 발명의 세포-유사 리포솜은 실제 세포와 흡사한 안정성 및 친화력을 보장하고 생체 내 특정 기관까지 보다 효율적으로 전달이 가능하며 리포솜을 이용한 약물전달 시스템에 핵심적 역할을 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0085] 도 1은 거대 리포솜의 크기를 나타낸다.
- 도 2는 거대 리포솜에 세포외기질을 유도하는 과정을 나타낸 모식도 및 형광이미지를 보여준다.
- 도 3은 거대 리포솜에 유도된 세포골격 및 세포골격이 유도된 거대 리포솜의 형광이미지를 나타낸다.
- 도 4는 Hela 세포의 수크로즈 농도 증가에 대한 세포 수축 현상을 형광 이미지로 나타낸다.
- 도 5는 콜라겐이 유도된 리포솜 및 피브로넥틴이 유도된 리포솜의 강도(stiffness) 및 유연성(elasticity) 증대 결과를 나타낸다.
- 도 6a 및 6b는 세포골격이 포함된 리포솜의 강도 증대 결과를 나타낸다.
- 도 7a 및 7b는 리포솜의 막 및 내부에 세포외기질(ECM) 및 세포골격이 도입된 형광이미지를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0086] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0088] 실시예 1: 세포외기질을 포함하는 리포솜의 제작

- [0089] 음전하를 이용한 세포외기질 유도

- [0090] 리포솜의 인지질막을 구성하는 지질은 Avanti lipid에서 구입하였고, 세포외기질인 콜라겐은 sigma-aldrich에서 피브로넥틴은 cytoskeleton, inc에서 구입하였다.
- [0091] 첫 번째로, 음전하를 외부에 형성하는 인지질막을 자기조립을 통해 조립하기 위해, 음전하를 띠는 DOPS를 포함하는 다음과 같은 지질 구성을 선택하였다. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine(DOPC) : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(POPE) : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine(DOPS) : 콜레스테롤(chol) = 4:1:1:2 (mol). 위와 같은 비율로 클로로포름(CHCl_3)에 1 mg lipid/㎖로 반응시킨 뒤 ITO 글래스에 코팅 뒤 질소로 유기용매를 제거 후 잔여 유기용매를 완전히 제거 하기 위해 진공상태에서 1시간 정도 두었다. 이 후 0.2 M 수크로즈, 2 mM MES, pH 4.2(콜라겐 유도시) 또는 0.2 M 수크로즈, 2 mM Tris-HCl, pH 7.4(피브로넥틴 유도시) 용액과 37℃에서 10분(콜라겐 유도시) 또는 24시간(피브로넥틴 유도시) 동안 반응 시킨 뒤 양 전극에 1.5 V, 10 Hz의 교류전기를 4시간 정도 인가하여, 10-100 μm 의 거대 리포솜을 제조하였다(도 1).
- [0092] 도 2의 좌측이 상기와 같은 방법으로 합성한 리포솜이다. 합성된 리포솜에는 DOPS가 포함되어 있어 음전하를 포함하고 있으며, 이를 이용해 콜라겐 또는 피브로넥틴을 유도하였다. 구체적으로는 1 mg/㎖ 콜라겐 용액을 80℃에서 변성(denaturation)시켜, 단분자로 만든 뒤, 이를 리포솜 용액에 떨어 뜨려 30분 동안 37℃에 반응 시킨 뒤 0.2 M 글루코스 0.01 mM KOH를 이용하여 pH를 7.4로 맞추어 주었다. 피브로넥틴은 PBS 완충액을 통해 1 mg/㎖으로 용해한 후 24시간 동안 37℃에 반응시켰다. 반응시 99% 습도를 유지하여 리포솜 외부와 내부의 삼투압이 발생하지 않도록 주의하였다. 도 2의 오른쪽 부분이 위와 같은 방법으로 콜라겐 또는 피브로넥틴이 유도된 리포솜이다. 리포솜의 형광태깅으로는 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)을 이용하였고, 콜라겐은 FITC 형광태깅, 피브로넥틴은 HiLyte 488를 이용하였다.
- [0094] **실시예 2: 리포솜에 세포골격(F-Actin)을 포함하는 리포솜의 제작**
- [0095] *이온투과담체(ionophore)를 통한 리포솜 내부의 세포골격 형성*
- [0096] 리포솜의 인지질막을 구성하는 지질은 Avanti lipid에서 구입하였고, 세포골격인 액틴(actin)은 cytoskeleton, inc에서 구입하였다. 세포골격인 액틴은 G-액틴은 단분자 상태와 F-액틴인 필라멘트 형태로 존재하는데, F-액틴 구조가 세포 안에 존재하는 세포골격이다. 우선 리포솜 안에 G-액틴을 포함하는 리포솜을 합성하고, 2가 양이온을 인지질막 안으로 이온투과담체를 통해 침투시켜 F-액틴으로 자기조립을 유도하는 방식으로 제조하였다.
- [0097] 인지질막에 2가 양이온을 투과시키는 리포솜을 제작하기 위해 다음과 같은 지질 구성을 선택하였다. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine(DOPC) : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(POPE) : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine(DOPS) : 콜레스테롤(chol) = 4:1:1:2 (mol)에 2%의 칼슘 이온투과담체(calcium ionophore)를 포함하였다. 실시예 1과 같이 클로로포름(CHCl_3)에 1 mg lipid/㎖로 반응시킨 뒤 ITO 글래스에 코팅 뒤 질소로 유기용매를 제거 후 잔여 유기용매를 완전히 제거 하기 진공상태에서 1시간 정도 두었다. 이 후 0.2 M 수크로즈, 2 mM Tris-HCl, 0.2 mM NaATP, 10 μM G-액틴, 2 μM 로다민 팔로이딘(rhodamine phalloidin) pH 7.4 용액과 반응 시킨 뒤 양 전극에 1.5 V, 10 Hz의 교류전기를 4시간 정도 인가하여, 10-100 μm 의 거대 리포솜을 완성시켰다. 이 후 0.2 M 글루코스, 2 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 pH 7.4에 반응시켜 2가 양이온(Ca^{2+})이 리포솜 안으로 수송되게 하여 G-액틴을 F-액틴으로 전환시켰다. 도 3의 오른쪽 부분이 위와 같은 방법으로 세포골격이 유도된 리포솜이다. 리포솜의 형광태깅으로는 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)을 이용하였고, 액틴은 로다민 팔로이딘(cytoskeleton, inc)을 이용하였다.
- [0099] **실시예 3: 삼투압을 통한 리포솜 구조 변형 관찰**
- [0100] *수크로즈 농도구배를 통한 리포솜 구조 변화 관찰*
- [0101] 기존 지질로만 구성된 리포솜은 외부 삼투압 및 미세환경 변화에 민감하게 반응하여, 리포솜 형태가 바로 파괴된다. 본 발명에서 제작된 세포외기질 또는 세포골격이 포함된 리포솜의 구조적지지를 확인하기 위하여, 외부에 수크로즈의 농도를 증가 시켜 삼투압을 발생시킨 후 구조변화를 관찰하였다. 도 4의 실험은 Hela 세포에

형광 태깅을 한 후 외부에 1M 수크로즈 용액을 첨가하여 외부 농도를 증가 시켰다. 농도를 증가시켜 세포가 수축되는 현상을 확인하였고, 이와 동일한 방법으로 외부에 세포외기질 즉, 콜라겐 또는 피브로넥틴이 유도된 리포솜의 변화를 관찰하였다. 그 결과 콜라겐이 유도된 리포솜은 강도(stiffness)를 증대시키는 것을 확인하였고, 피브로넥틴이 유도된 리포솜 유연성(elasticity)이 증대되었다(도 5). 세포골격이 포함된 리포솜은 외부 환경에 따라 리포솜의 손상이 와도 그 구조를 유지하는 현상을 관찰하였다(도 6a 및 6b). 세포외기질이 유도된 리포솜과 기존에 발명된 인지질로만 구성된 리포솜의 유연성 실험을 하기 위해, 리포솜 외부삼투압의 변화를 통해 강도를 특정하였다. 대조군 리포솜(bare liposome)의 인지질 구성은 세포외기질이 유도된 리포솜과 동일한 (DOPC) : (POPE) : (DOPS) : (chol) = 4:1:1:2 (mol)로 구성하였으며, 나머지 조건 또한 동일 음전하가 포함된 리포솜과 동일하다. 합성된 베어 리포솜에 1M 수크로즈 용액을 첨가하여 리포솜외부와 내부의 삼투압의 차이가 0.050 Osm/kg되도록 맞추준 뒤 변화를 관찰하였다. 용이한 관찰을 위해 1M 수크로즈 용액에는 alexa-488 dye를 첨가하여 형광이미지를 얻을 수 있도록 하였다. 도 6a 및 6b와 같이 외부에 삼투압을 걸어두게 되면 대조군 리포솜은 형태가 바로 없어지지만 세포외기질이 유도된 리포솜은 형태가 유지되는 것을 확인하였다.

[0102] 위와 같은 결과로, 리포솜의 다양한 특성 변화는 리포솜을 통한 약물전달시 생체내 환경 및 영향에 맞추어 구조적지지를 증대시킬 수 있어, 생체친화적이고 안정적인 약물전달 시스템, 의학치료 및 세포외기질과 세포골격과 세포막과의 상관관계에 대한 연구에 중추적인 기능을 할 것이다.

[0104] 실시예 4: 세포외기질과 세포내 골격을 포함하는 리포솜의 제작

[0105] 리포솜의 인지질막을 구성하는 지질은 Avanti lipid에서 구입하였고, 세포골격인 액틴(actin)은 cytoskeleton, inc에서 구입하였다. 세포골격인 액틴은 G-액틴인 단분자 상태와 F-액틴인 필라멘트 형태로 존재하는데, F-액틴 구조가 세포 안에 존재하는 세포골격이다. 우선 리포솜 안에 G-액틴을 포함하는 리포솜을 합성하고, 2가 양이온을 인지질막 안으로 이온투과담체를 통해 침투시켜 F-액틴으로 자기조립을 유도하는 방식으로 제조하였다.

[0106] 인지질막에 2가 양이온을 투과시키는 리포솜을 제작하기 위해 다음과 같은 지질 구성을 선택하였다. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine(DOPC) : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(POPE) : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine(DOPS) : 콜레스테롤(chol) = 2:1:1:1(mol)에 칼슘 이온투과담체(calcium ionophore) 및 마그네슘 이온투과담체magnesium ionophore)를 각각 1% 첨가하여 혼합하였다. 실시예 1과 같이 클로로포름(CHCl_3)에 1 mg lipid/ml로 반응시킨 뒤 ITO 글래스에 코팅 뒤 질소로 유기용매를 제거 후 잔여 유기용매를 완전히 제거하기 진공상태에서 1시간 정도 두었다. 이 후 0.2 M 수크로즈, 2 mM Tris-HCl, 0.2 mM NaATP, 10 μM G-액틴, 2 μM Acti-stain 670 phalloidin pH 7.4 용액과 반응 시킨 뒤 양 전극에 1.5 V, 10 Hz의 교류전기를 4시간 정도 인가하여, G-액틴(41 kDa)을 포함하는 10-100 μm 의 거대 리포솜을 완성시켰다. 인지질 막이 전기인가에 의해 스웰링(swelling) 되면서 G-액틴이 리포솜 내에 도입된다. 이 후 0.2 M 글루코즈, 2 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 10 mM MgCl_2 pH 7.4에 반응시켜 2가 양이온(Mg^{2+} , Ca^{2+})이 리포솜 안으로 수송되게 하여 G-액틴을 F-액틴으로 전환시켰다. 도 7의 오른쪽 부분이 위와 같은 방법으로 세포골격이 유도된 리포솜이다. 리포솜의 형광태깅으로는 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) 을 이용하였고, 액틴은 Acti-stain 670 phalloidin (cytoskeleton, inc)을 이용하였다.

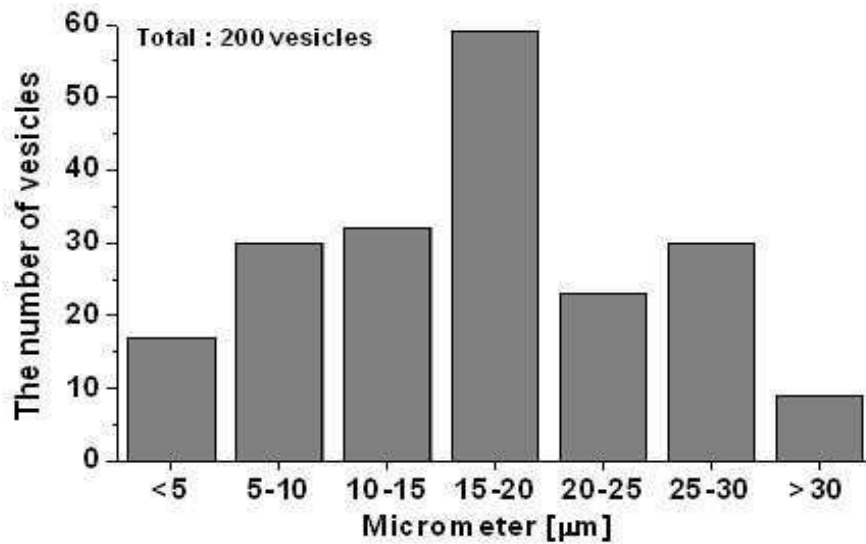
[0107] 이온투과담체(ionophore)를 통한 리포솜 내부의 세포골격 형성 후 음전하를 통해 세포외기질인 라미닌(Laminin, cytoskeleton, inc)을 유도하였다. 합성된 세포골격 리포솜에는 DOPS가 포함되어 있어 음전하를 포함하고 있으며, 이를 이용해 라미닌을 유도하였다. 라미닌은 PBS 완충액을 통해 1 mg/ml로 용해한 후 24시간 동안 37°C에 반응시켰다. 반응시 99% 습도를 유지하여 리포솜 외부와 내부의 삼투압이 발생하지 않도록 주의하였다. 라미닌은 HiLyte 488을 이용해 형광태깅 하였다.

[0108] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 리포솜의 인지질 막은 빨간색으로, 인지질 막 표면에 결합된 라미닌은 녹색으로 표시된 것을 확인하였다. 세포골격은 2가 양이온을 이용하여 액틴 단분자를 액틴 다발로 형성시켰으며 흰색으로 표시되어있다 (도 7a). 공초점 현미경을 사용하여, 구형으로 존재하는 리포솜을 Z-stack 이미지를 얻어, 3D-렌더링 기법을 사용하여 전체적인 구조를 확인하였다(도 7b). 세포외기질은 리포솜 외부에 코팅되어 있으며, 일부는 확산을 통해 내부에 일부 존재하는 것을 확인하였으며, 세포골격은 리포솜 내부에 전체적으로 존재하는 것을 확인하였다.

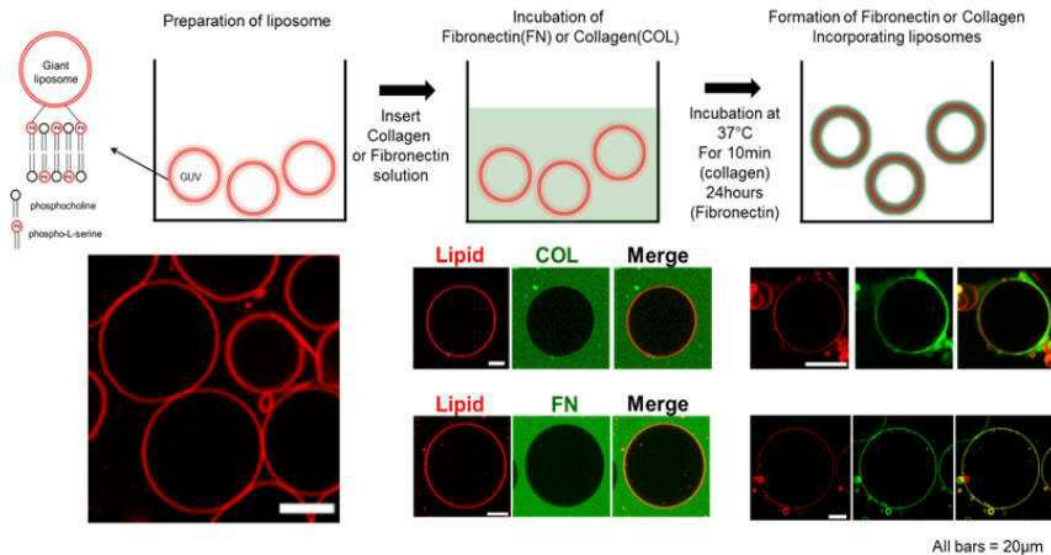
[0110] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

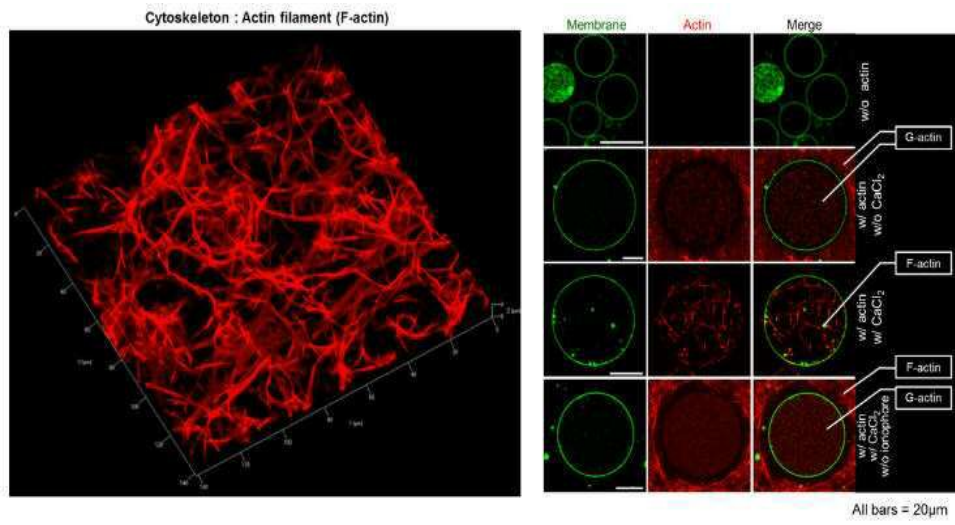
도면1



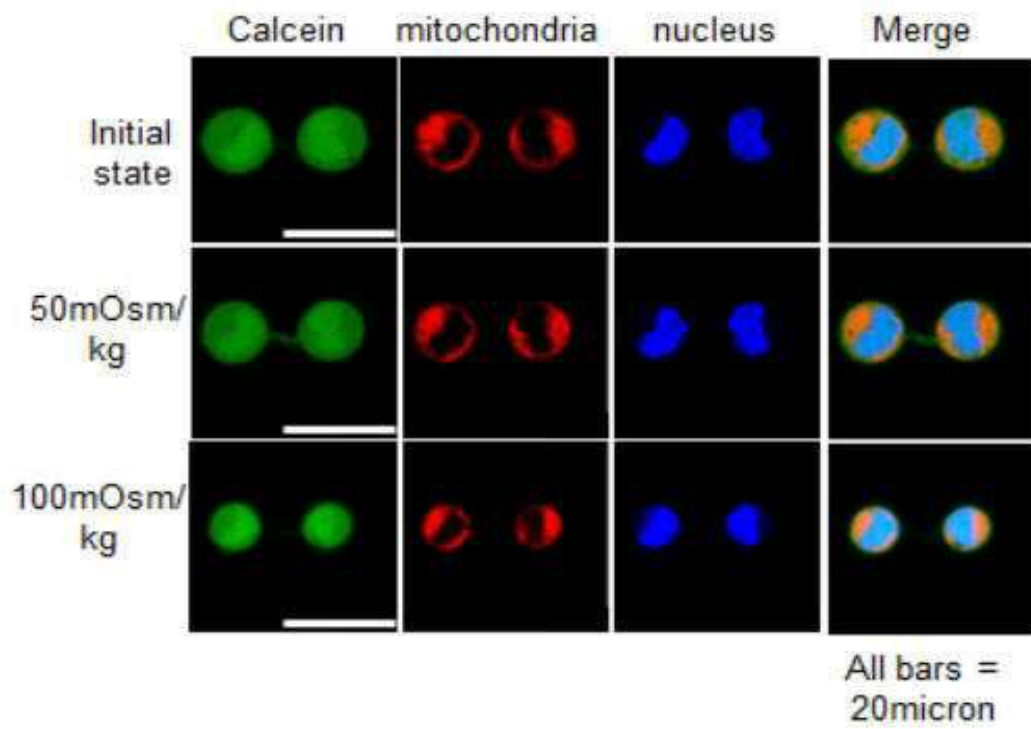
도면2



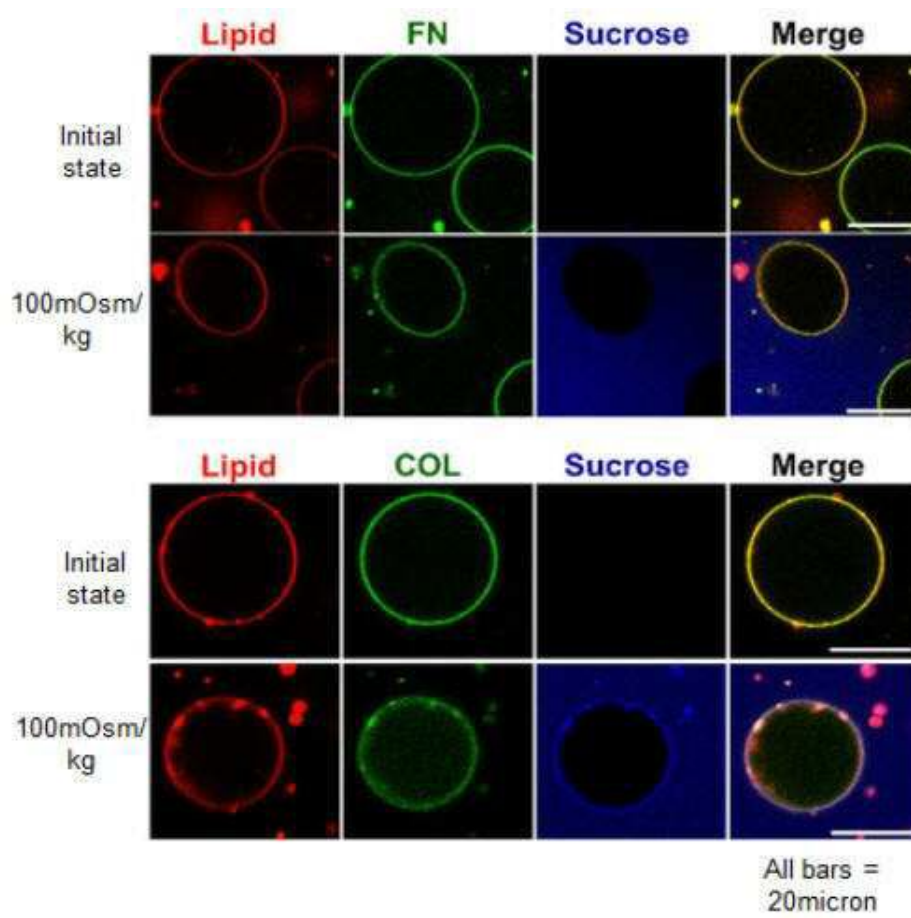
도면3



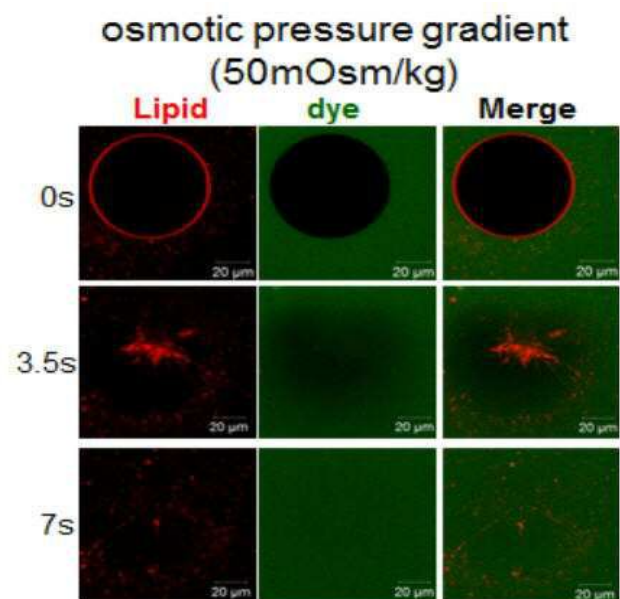
도면4



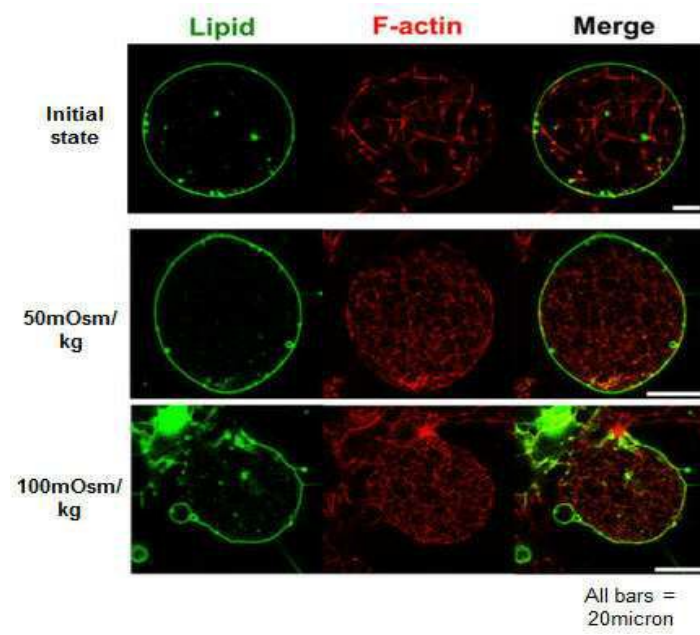
도면5



도면6a



도면6b



도면7

