



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0122653
(43) 공개일자 2017년11월06일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 9/127</i> (2006.01) <i>A61K 31/201</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/337</i> (2006.01) <i>A61K 31/683</i> (2006.01)
 <i>A61K 45/06</i> (2006.01) <i>A61K 9/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 9/127</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/201</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0044223
 (22) 출원일자 2017년04월05일
 심사청구일자 2017년04월05일
 (30) 우선권주장
 1020160050882 2016년04월26일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 세종대학교산학협력단
 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)</p> <p>(72) 발명자
 임수정
 서울특별시 용산구 이태원로27다길 11(이태원동)
 장은지
 서울특별시 중랑구 동일로100길 87 101동 203호
 (면목동, 미래한건아파트)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인다나</p> |
|--|--|

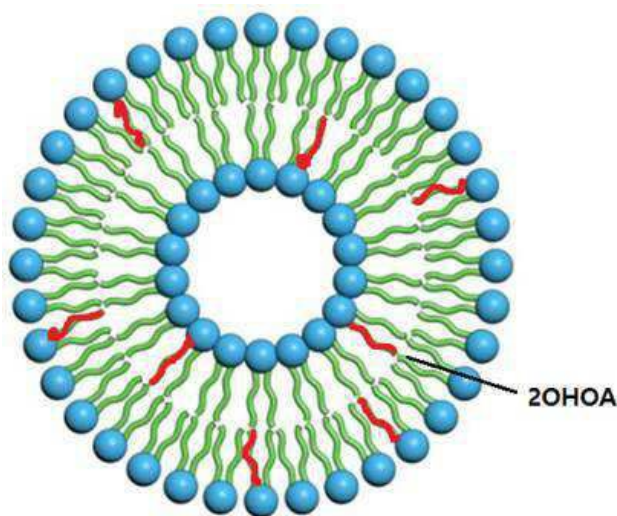
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 2-하이드록시올레산이 포함된 지질 비히클의 용도

(57) 요약

본 발명은 2-하이드록시올레산이 포함된 지질 비히클의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 2-하이드록시올레산 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 리포솜의 지질막에 삽입시킴으로써 암, 비만, 당뇨 등의 질환 치료적 효과를 높이고, 상기 리포솜의 내부 및 막 사이에 약제학적 활성성분을 포함시켜 체내에 전달하는 약물전달체로 사용하는 효과를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/337 (2013.01)

A61K 31/683 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/0021 (2013.01)

A61K 9/0043 (2013.01)

A61K 9/0053 (2013.01)

A61K 9/007 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711025307

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원

연구과제명 효과적인 염증성 장질환 치료를 위한 대식세포 형질전환 유도능 구현 오메가췌형 약물전달
시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

2-하이드록시올레산(2-hydroxyoleic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 및 포스파티딜콜린을 함유한 리포솜; 및

약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 리포솜 제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

리포솜은 상기 2-하이드록시올레산 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 리포솜의 이중막에 삽입된 구조를 갖는, 리포솜 제제.

청구항 3

제1항에 있어서,

2-하이드록시올레산의 약제학적으로 허용 가능한 염은 2-하이드록시올레산의 나트륨, 칼륨, 암모늄, 피롤리딘, 피페리딘, N-하이드록시에틸피롤리돈, N-하이드록시에틸피페리딘, 트라이에탄올아민, 다이에탄올아민, 에틸렌다이아민 및 다이에틸아민 염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 리포솜 제제.

청구항 4

제1항에 있어서,

리포솜 내 2-하이드록시올레산 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 함량은 10 내지 50 몰%인, 리포솜 제제.

청구항 5

제1항에 있어서,

2-하이드록시올레산 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 포스파티딜콜린에 대해 1 : 0.1 내지 1의 몰비로 포함되는, 리포솜 제제.

청구항 6

제1항에 있어서,

포스파티딜콜린은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디헵타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디논아노일-sn-글리세로-3-phosphocholine), 1,2-디데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diundecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디트리데카노일-sn-글리

세로-3-포스포콜린(1,2-ditridecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디펜타데카노일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipentadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디헵타데카노일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디노나데카노일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dinonadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디아라키도일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diarachidoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디헨아라키도일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihenarachidoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디베헨노일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dibehenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디트리코사노일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditricosanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디리그노세로일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilignoceroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 예그(egg) 포스파티딜콜린, 소이 포스파티딜콜린, 하이드로제네이티드포스파티딜콜린(hydrogenated_phosphatidylcholine), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Di oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine), 1,2-디미리스토올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디리놀레오일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilinoyleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디에이코세노일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dieicosenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디에루코일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dierucoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) 1,2-디도코사헥사에노일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-didocosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) 및 1,2-디에이코사헥사에노일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dieicosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 리포솜 제제.

청구항 7

제1항에 있어서,

포스파티딜콜린은 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC)인, 리포솜 제제.

청구항 8

제1항에 있어서,

리포솜 내 포스파티딜콜린의 함량은 50 내지 90 몰%로 포함되는, 리포솜 제제.

청구항 9

제1항에 있어서,

리포솜은 평균입자경이 50 nm 내지 500 nm인, 리포솜 제제.

청구항 10

제1항에 있어서,

리포솜은 평균입자경이 50 nm 내지 200 nm인, 리포솜 제제.

청구항 11

제1항에 있어서,

리포솜 제제는 비강내 투여, 정맥내 투여, 피하 주사, 뇌척수강내 주사, 흡입 투여 또는 경구 투여용 제형인, 리포솜 제제.

청구항 12

제1항에 있어서,
리포솜 제제는 투여량이 10 내지 600 mg/kg/day인, 리포솜 제제.

청구항 13

제1항에 있어서,
리포솜 제제는 항암 의약 제조를 위한 것인, 리포솜 제제.

청구항 14

2-하이드록시올레산(2-hydroxyoleic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 및 포스파티딜콜린을 함유한 리포솜; 및
약제학적 활성성분을 포함하는 약물전달체.

청구항 15

제14항에 있어서,
약제학적 활성성분은 항암 화학요법제인, 약물전달체.

청구항 16

제15항에 있어서,
항암 화학요법제는 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 발루비신(valubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine) 및 레티노산(retinoic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 약물전달체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2-하이드록시올레산이 포함된 지질 비히클의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암세포는 지방산 생합성이 끊임없이 활성화되어 있는 상태에 놓여 있어 지방산 및 인지질 등 막지질 조성이 정상세포와는 다르며 이러한 막조성의 변화는 암의 진행 정도와도 관련 있는 것으로 알려져 있다(Azordegan *et al. Mol.Cell Biol.* Vol. 374, pp. 223-232, 2013).

[0004] 세포막 지질 중 스핑고미엘린(sphingomyelin)은 하기 식 1과 같이, 포스파티딜콜린의 헤드그룹을 세라마이드에 전달함으로써 디아실글리세롤과 함께 생합성되며, 이 합성과정은 세포내 골지체 또는 세포막내 존재하는 스핑고

미엘린 합성효소(sphingomyelin synthase, SGMS)에 의해 매개되어 일어난다:

- [0005] [식 1]
- [0006] 포스파티딜콜린 + 세라마이드 → 스핑고미엘린 + 디아실글리세롤
- [0007] 암세포에서는 정상세포에 비해 세포막 중 스핑고미엘린이 적으며 SGMS를 활성화시켜 세포막 중 스핑고미엘린 수준을 정상수준으로 회복시키면 세포막에 결합하는 단백질들의 변화 등에 의해 세포주기 억류 및 세포사멸이 유도된다. 따라서 암세포막의 지질 조성 제어가 새로운 암 치료의 타겟으로 제시된바 있다(Llado *et al. Biochim Biophys Acta*, vol. 1838(6), pp. 1619-27, 2014.06).
- [0008] 올레산의 합성 유도체인 2-하이드록시올레산(2-hydroxyoleic acid, 또는, '2OHOA'라 함)는 막 지질 조성과 구조 및 중요한 막 단백질의 기능을 조절하는 강력한 항암 약물이다. 보고에 따르면, 2OHOA(또는 2OHOA의 나트륨염, NaCHOleate)를 세포에 처리하면 2OHOA는 정상세포보다는 암세포막에 더 빠르게 삽입되며 삽입된 2OHOA는 세포막 지질 조성, 막유동성 및 구조의 변화를 야기하고 이러한 세포막의 구조적 변화는 SGMS를 활성화시켜 SM 합성을 촉진하고, 세포막 중 SM의 수준을 증가시켰다(Martin *et al. Biochim Biophys Acta*, vol. 1828(5), pp.1405-13, 2013.05). 이러한 막의 변화는 막결합 단백질 분포 및 활성 등에 영향을 미쳐 결국 세포주기 및 세포사멸 관련 신호전달체계에 교란을 일으킴으로써 세포주기 억류 또는 세포사멸을 유발하게 된다. 이러한 암세포 특이적 세포사멸 유도능에 의해 2OHOA는 현재 신경교종(glioma)의 대상의 희귀의약품으로 지정되어 임상시험이 진행 중인 유망 항암제이다(Teres *et al. PNAS* vol. 109(22), pp. 8489-8494, 2012). 그러나 기존 문헌 등에서 제시하고 있는 2OHOA의 작용 농도는 배양암세포를 이용한 실험에서도 적어도 100 mM 이상, 바람직하게는 200 mM 이상으로 상당히 고농도의 2OHOA를 필요로 한다.
- [0009] 한편, 리포솜은 수용액에 포스파티딜콜린 인지질 등의 인지질을 분산시 자발적으로 형성되는 구형의 이중막 구조이다. 리포솜의 구조적 특성상 내부 수상에는 수용성 약물을 봉입하고 막을 구성하는 인지질 분자 사이에는 지용성 약물을 끼워 넣을 수 있기 때문에 다양한 약물의 수송체로서 개발되고 있다. 나노 크기의 리포솜에 항암제를 탑재하게 되면 약물의 낮은 용해도 또는 화학성 불안전성 등의 의약품화하기에 제약이 되는 단점을 극복하면서 나노 크기로 인한 EPR 효과(enhanced permeability and retention effect, Maeda)를 추가함에 의해 암조직으로의 항암제 농도를 증진시킴으로써 치료효과를 높이면서 부작용은 감소시키는 효과를 기대할 수 있다.
- [0010] 본 발명자들은 포스파티딜콜린이 SGMS의 기질이므로 리포솜형 구조체내에 기질과 2OHOA를 동시에 탑재하여 암세포에 공급할 경우 세포막에 2OHOA가 끼워져 들어가면서 주변에 미세환경(microenvironment) 내 포스파티딜콜린 농도가 증대되어 결국 SM 합성이 더욱 촉진되어 세포사멸효과가 증진될 수 있을 것으로 기대하고, 또한 2OHOA는 분자구조상 리포솜막에 쉽게 삽입될 수 있는 물질일 가능성에 착안하여 포스파티딜콜린을 주성분으로 하고 2OHOA를 보조성분으로 한 리포솜을 제조하고 이를 약물전달체로 사용하는 2OHOA 삽입형 리포솜을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) Azordegan *et al. Mol.Cell Biol.* Vol. 374, pp. 223-232, (2013)
- (비특허문헌 0002) Llado *et al. Biochim Biophys Acta*, vol. 1838(6), pp. 1619-27 (2014.06)
- (비특허문헌 0003) Martin *et al. Biochim Biophys Acta*, vol. 1828(5), pp.1405-13 (2013.05)
- (비특허문헌 0004) Teres *et al. PNAS* vol. 109(22), pp. 8489-8494 (2012)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 2OHOA가 삽입된 리포솜을 포함하는 리포솜 제제를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기의 2OHOA가 삽입된 리포솜에 약제학적 활성성분이 봉입 내지 삽입된 약물전달체를

제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0017] 2-하이드록시올레산(2-hydroxyoleic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 및 포스파티딜콜린을 함유한 리포솜; 및
- [0018] 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 리포솜 제제를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한
- [0020] 2-하이드록시올레산 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 및 포스파티딜콜린을 함유한 리포솜; 및
- [0021] 약제학적 활성성분을 포함하는 약물전달체를 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명은 리포솜에 2-하이드록시올레산을 삽입시켜 생체에 전달함으로써 저 농도의 2OHOA로부터 암에 대한 치료적 효과를 증진시킬 수 있고, 2OHOA가 삽입된 리포솜은 약제학적 활성성분을 봉입 또는 삽입시켜 생체 내로 전달할 수 있는 약물전달체로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명에 따른 2OHOA가 삽입된 리포솜을 도시한 것이다.
- 도 2는 2OHOA의 삽입에 의한 DPPC 리포솜의 DSC 서머그램 변화를 나타낸 것이다.
- 도 3은 2OHOA가 삽입된 리포솜의 상온 안정성을 나타낸 것이다.
- 도 4는 DMPC 첨가에 의한 2OHOA의 항암 활성 변화를 나타낸 것이다.
- 도 5는 2OHOA가 삽입된 리포솜의 항암 활성을 나타낸 것이다.
- 도 6은 2OHOA 농도별로 2OHOA가 삽입된 리포솜의 항암 활성을 나타낸 것이다.
- 도 7은 2OHOA가 삽입된 리포솜의 정상세포와 암세포에서의 세포 독성 결과를 비교한 것이다.
- 도 8은 비소세포성 폐암 세포주에서 2OHOA가 삽입된 리포솜에 탑재된 MTO의 항암활성을 확인한 결과이다.
- 도 9는 비소세포성 폐암 세포주에서 2OHOA가 삽입된 리포솜에 탑재된 파클리탁셀의 항암활성을 확인한 결과이다.
- 도 10은 흑색세포종 B16-F10 배양세포에서 2OHOA가 삽입된 리포솜에 탑재된 레티노산의 항암활성을 확인한 결과이다.
- 도 11은 흑색세포종 이식 동물모델에서 2OHOA가 삽입된 리포솜에 탑재된 레티노산의 항암활성을 확인한 결과로, 화살표는 투여 시점을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0027] 본 발명은 2-하이드록시올레산(2-hydroxyoleic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 및 포스파티딜콜린을 함유한 리포솜; 및
- [0028] 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 리포솜 제제에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명의 리포솜은 2-하이드록시올레산(이하, '2OHOA'라 함) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 리포솜

의 이중막에 삽입된 구조를 나타낼 수 있다. 더 구체적으로 포스파티딜콜린의 이중막에 2OHOA가 삽입된 구조일 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 포스파티딜콜린 분자 사이에 삽입되면 포스파티딜콜린 고유의 상전이온도가 달라지게 된다. 따라서, 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 삽입 전후의 포스파티딜콜린 리포솜의 상전이온도를 시차주사열량측정법(DSC)로 측정하여 온도에 따른 열량변화를 측정한 결과, 상전이온도의 피크가 이동하고, 열량피크의 크기도 현저히 감소하여 리포솜 막의 유동성을 증대시킴을 알 수 있다. 즉, 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 포스파티딜콜린 분자 사이에 끼워 들어감을 의미한다(도 2 참조). 이러한 막유동성의 증가는 리포솜 막내에 끼어 들어감으로써 탑재 가능한 지용성 또는 양친성 항암제의 탑재 효율 증가에 기여할 수 있다.

[0031] 또한, 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 포스파티딜콜린 분자 사이에 삽입되는 경우 포스파티딜콜린 리포솜의 평균입자경이 4-5배 감소하여 50 nm 내지 500 nm, 더 구체적으로 50 nm 내지 200 nm가 될 수 있다. 상기 입자경은 암 부위 축적 효과를 가져오는 EPR(Enhanced Permeability & Retention) 효과를 발휘하기에 적합할 수 있다(표 1 참조).

[0032] 또한, 제타 포텐셜로 측정된 표면하전이 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 포스파티딜콜린 분자 사이에 삽입되는 경우 중성에서 음성으로 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 함량 의존적으로 증가하여 포스파티딜콜린 리포솜이 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 삽입에 의해 구조적으로 안정화됨을 알 수 있고, 음성하전을 띠므로 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 리포솜의 막 사이에 끼워 들어갔음을 알 수 있다.

[0033] 상기 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 포스파티딜콜린 분자 사이에 삽입된 리포솜은 상온에서 한 달간 보관하여도 평균입자경에 대한 변화가 없어 안정성을 갖추고 있음을 알 수 있다(도 3 참조).

[0034] 또한, 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 약제학적 효과에 대한 포스파티딜콜린의 영향을 조사한 결과, 항암 활성의 증가를 확인할 수 있었다(도 4 참조). 이러한 상승 효과는 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 포스파티딜콜린 분자 사이에 삽입된 리포솜인 경우 더욱 현저한 시너지 효과를 나타낸다. 이는 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 포스파티딜콜린 분자 사이에 삽입됨으로써 세포막으로의 유입이 리포솜화에 의해 더 쉽게 이루어지고, 포스파티딜콜린이 스팅고미엘린 합성효소(SGMS)에 더 유용하게 사용되기 때문인 것으로 보인다(도 5 참조).

[0035] 이러한 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 포스파티딜콜린 분자 사이에 삽입된 리포솜은 정상세포에는 세포독성이 없으나, 암세포에 대해서는 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 자체의 세포사멸 활성을 유지하고 있다(도 7 참조).

[0036] 상술한 바와 같이, 본 발명의 리포솜 제제는 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 체내 유입을 증진 시킴으로써 암에 대한 치료 효과를 증진시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 리포솜 제제는 항암 의약 제조에 사용할 수 있다.

[0037] 상기 2OHOA의 약제학적으로 허용 가능한 염은 약제학적으로 허용 가능한 유기 또는 무기 염기의 임의의 가용성 염을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 무기 염기들의 전형적인 예는 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 탄산마그네슘, 탄산수소나트륨 및 탄산수소칼륨과 같은 암모니아, 칼슘, 마그네슘, 나트륨 및 칼륨의 수산화물, 탄산염 및 탄산 수소이다. 약제학적으로 허용 가능한 유기 염기들의 전형적인 예는 아르기닌, 베타인, 카페인, 콜린, N,N-다이벤질에틸렌디아민, 다이에틸아민, 2-다이에틸아미노에탄올, 2-다이메틸아미노에탄올, 에탄올아민, 에틸렌디아민, N-에틸모르폴린, N-에틸피리피리딘, N-메틸글루카민, 글루카민, 글루코사민, 히스티딘, N-(2-하이드록시에틸)피리피리딘, N-(2-하이드록시에틸)피롤리딘, 아이소프로필아민, 리신, 메틸글루카민, 모르폴린, 피페라진, 피페리딘, 테오브로민, 트라이에틸아민, 트라이메틸아민, 트라이프로필아민 및 트로메타민이다.

[0038] 더 구체적으로, 2OHOA의 약제학적으로 허용 가능한 염은 2OHOA의 나트륨, 칼륨, 암모늄, 피롤리딘, 피페리딘, N-하이드록시에틸피롤리딘, N-하이드록시에틸피페리딘, 트라이에탄올아민, 다이에탄올아민, 에틸렌디아민 또는 다이에틸아민 염 등으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다.

[0039] 리포솜 내 상기 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 함량은 10 내지 50 몰%일 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 2OHOA 함량 과소로 투여 후 2OHOA의 항암효과를 기대하기 어려울 수 있거나 리포솜의 조성분

인 포스파티딜콜린의 함량이 적어 안정한 리포솜의 형성이 어려울 수 있다.

- [0040] 상기 2-하이드록시올레산 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 포스파티딜콜린에 대해 1 : 0.1 내지 1의 몰비로 포함될 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 안정한 리포솜의 형성이 어렵거나 20HOA의 함량이 적어 20HOA의 항암효과를 기대하기 어려울 수 있다.
- [0041] 상기 포스파티딜콜린은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디헵타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diocetanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dinonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diundecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디트리테카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditridecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디펜타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디헵타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디노나데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dinodacanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디헤나라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihenarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디베헤노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dibehenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디트리코사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditricosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디리그노세로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilignoceroyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 에그(egg) 포스파티딜콜린, 소이 포스파티딜콜린, 하이드로제네이티드포스파티딜콜린(hydrogenated _phosphatidylcholine), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), 1,2-디미리스토올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilinoeoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디에루코일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 또는 1,2-디에이코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dieicosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)등을 사용할 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다. 더 구체적으로, 포스파티딜콜린은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC)일 수 있다.
- [0042] 리포솜 내 포스파티딜콜린의 함량은 50 내지 90 몰%일 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 안정한 리포솜의 형성이 어렵거나 20HOA의 함량이 적어 20HOA의 항암효과를 기대하기 어려울 수 있다.
- [0043] 상기 구조의 지질 비히클은 포스파티딜콜린 및 20HOA 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 1:0.1 내지 1의 몰비로 혼합하여 제조된 리포솜일 수 있다. 상기 몰비를 벗어날 경우, 안정한 리포솜의 형성이 어렵거나 20HOA의 함량이 적어 20HOA의 항암효과를 기대하기 어려울 수 있다.
- [0044] 상기 리포솜은 공지의 리포솜 제조 기술을 채용할 수 있어 특별히 제한하지는 않는다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 포스파티딜콜린 및 20HOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유기용매에서 일정 몰비로 혼합하고, 동결-건조 또는 진공회전증류하여 유기용매를 제거 후 수화, 초음파 처리를 통해 20HOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 지질이중막에 삽입된 리포솜을 얻을 수 있다.
- [0045] 상기 유기용매는 에탄올, 1-프로판올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 3급 부틸 알코올, 클로로포름 또는 이의 혼합을 사용할 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다.
- [0046] 본 발명의 리포솜 제제의 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. 바람직하게는, 10 내지 600 mg/kg/day의 투여량, 더 구체적으로 20 내지 100 mg/kg/day의 투여량으로 개체에 투여될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 리포솜 제제는 비강내 투여, 정맥내 투여, 피하 주사, 뇌척수강내 주사, 흡입 투여 또는 경구

투여용 제형을 가질 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [0049] 본 발명은 또한
- [0050] 2-하이드록시올레산(2-hydroxyoleic acid) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염; 및 포스파티딜콜린을 함유한 리포솜; 및
- [0051] 약제학적 활성성분을 포함하는 약물전달체에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 리포솜은 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 리포솜의 이중막에 삽입되어 있는 구조를 가지며, 상기 리포솜은 내부의 수상부와 지질 이중막으로 되어 있어 내부 수상에는 수용성 약물을 봉입하고, 막을 구성하는 인지질 분자 사이에는 지용성 약물을 끼워 넣을 수 있으므로 약물전달체로 사용할 수 있다.
- [0053] 따라서, 본 발명의 리포솜은 약제학적 활성성분을 내부 수상에 봉입하거나 막에 삽입시켜 체내로 전달할 수 있다.
- [0054] 상기 약제학적 활성성분은 리포솜의 제조 시 봉입 내지 삽입될 수 있다. 일 구체예에 따르면, 포스파티딜콜린 및 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 혼합 시 약물을 첨가하여 혼합하거나, 포스파티딜콜린 및 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염의 혼합물을 동결건조 및 수화하는 과정에서 수화 용액에 약물을 첨가하여 리포솜을 형성함으로써 약물이 봉입 내지 삽입될 수 있다.
- [0055] 상기 약제학적 활성성분은 항암 화학요법제일 수 있다. 상기 항암 화학요법제의 예시로, 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 발루비신(valubicin), 미톡산트론(mitoxantrone), 제피티닙(gefitinib), 에를로티닙(erlotinib), 이리노테칸(irinotecan), 토폠테칸(topotecan), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 또는 레티노산(retinoic acid) 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 항암제 미톡산트론(mitoxantrone, MTO)를 포스파티딜콜린 및 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염과 함께 유기용매에 용해시키고, 동결 건조 및 수화 후 초음파 처리를 통해 MTO가 탑재된 리포솜을 제조할 수 있다. MTO의 탑재 효율을 측정한 결과, 포스파티딜콜린 리포솜은 약 3.8% 정도의 MTO의 탑재가 확인되나, 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 삽입된 포스파티딜콜린 리포솜은 100%의 MTO 탑재를 확인할 수 있어 약제학적 활성성분의 탑재 효율이 개선됨을 확인할 수 있었다. 이는 2OHOA 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이 삽입된 포스파티딜콜린 리포솜의 표면하전의 음성하전의 절대값이 MTO 탑재에 의해 크게 감소한 것으로 보아 MTO와 2OHOA의 정전기적 인력에 의한 효과로 보인다(표 2 참조).
- [0057] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 항암제인 파클리탁셀이 탑재된 DOPC/2OHOA 리포솜은 비소세포성 폐암 세포주에 대해 강력한 항암 활성을 보이며, 암세포의 성장을 50% 억제하는 농도의 경우, 파클리탁셀은 12nM의 MTO에 비해 8nM의 낮은 농도에서 유사한 항암활성을 나타낸다(도 9 참조).
- [0058] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 항암제인 레티노산이 탑재된 DMPC/콜레스테롤/2OHOA 리포솜은 레티노산이 90-95% 리포솜에 탑재되었고, 악성흑색종 세포주에 대해 강력한 항암 활성을 보이며, 2OHOA가 없는 리포솜에 탑재된 레티노산에 비해 2OHOA가 삽입된 리포솜에 탑재된 레티노산은 약 10배 낮은 농도에서 유사한 항암 활성을 나타낸다(도 10 참조). 또한, 상기 레티노산이 탑재된 DMPC/콜레스테롤/2OHOA 리포솜은 흑색 세포종 마우스 모델에서 2OHOA이 삽입되지 않은 리포솜에 탑재된 레티노산 처리군과 2OHOA 용액이 처리된 처리군의 항암 효과는 유사하였으나, 이들에 비해 2OHOA이 삽입된 리포솜에 탑재된 레티노산 처리군은 현저히 우수한 항암 효과를 나타냈다(도 11 참조). 이는, 2OHOA가 삽입된 리포솜의 우수한 항암제 전달 능력을 통해 저농도의 항암제에서도 우수한 항암 효과를 나타내고, 동량의 항암제의 항암 효과 역시 개선함을 시사하는 것이다.
- [0059] 본 발명의 리포솜 제제 또는 약물전달체는 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0060] 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이온아트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메

틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0061] 또한, 본 발명의 리포솜 제제 또는 약물전달체는 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 한 양태로서, 본 발명에 따른 리포솜 제제 또는 약물전달체는 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[0063] 본 발명의 리포솜 제제 또는 약물전달체의 다른 바람직한 양태는 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다.

[0064] 또한, 상기 멸균 주사용 제제는 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비휘발 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.

[0065] 본 발명의 약물전달체의 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.

[0066] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0068] <실시예 1> 20HOA 삽입된 리포솜의 제조

[0069] 3차 부틸 알코올에 포스파티딜콜린 16 μmole 과 20HOA(2-hydroxyoleate형, 20HOA의 나트륨염) 0~16 μmole 를 넣어 용해시킨 후 용액을 신속하게 영하 80℃에서 얼린 후 동결건조기에서 동결 건조를 시행했다. 24시간 동안 동결건조한 후에 얻은 지질 파우더에 5% 텍스트로스 용액 1mL을 가해 수화시켰다. 수화시 분산액의 온도는 사용한 포스파티딜콜린의 상전이온도(DMPC 23℃, DPPC 43℃, DSPC 56℃) 이상으로 유지하였다. 3,000rpm에서 30초 교반하여 수화에 의해 자발적으로 형성된 리포솜 분산액을 37℃에서 30분간 수조 형식의 초음파 분산기에서 130W로 분쇄 및 균질화, 다시 수조 형식의 세포 파쇄용 초음파 분산기에서 7분간 250W 세기의 초음파를 처리하여 20HOA 삽입 리포솜을 얻었다.

[0071] <실험예 1> 리포솜에서 20HOA 삽입 확인

[0072] 20HOA가 리포솜 막의 포스파티딜콜린 분자 사이에 삽입되면 포스파티딜콜린 고유의 상전이온도가 달라진다. 따라서, 실시예 1의 방법으로 16 μmole 의 DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 단독 또는 1.8 μmole 의 20HOA를 9:1 몰비로 혼합한 용액으로부터 2종의 리포솜을 각각 제조한 후 20HOA 삽입 전후의 포스파티딜콜린 리포솜의 상전이온도를 시차주사열량측정법(Differential Scanning Calorimetry)에 의하여 측정하였다. 제조한 리포솜 약 5mg을 시차주사열량측정기(Q2000 differential scanning calorimeter, TA Instruments, USA)의 표준 알루미늄 팬 위에 놓은 후 질소 대기 하에서 10℃부터 70℃까지 일정속도로 가열해가며 온도에 따른 열량변화를 측정하여 그래프를 얻었다.

[0073] 도 2에 나타난 바와 같이, DPPC만으로 구성된 리포솜은 약 41℃에서 DPPC가 겔 상태에서 액상 크리스탈 상태(liquid crystalline)로 전환되는 열량 피크가 뚜렷하게 관찰되었으나 DPPC와 20HOA 혼합액으로 제조한 리포솜의 경우 상전이온도의 피크가 약 39℃로 이동하였으며 열량 피크의 크기도 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 20HOA 분자가 DPPC 분자 사이에 끼워 들어감으로서 DPPC 분자간의 인력을 감소시켜 리포솜막의 유동성을 증대시켰음을 의미한다.

[0075] <실험예 2> 리포솜에서 20HOA 봉입효율 및 물리화학적 특성 분석

[0076] 포스파티딜콜린으로 DMPC를 사용하고 다양한 초기 DMPC:2OHOA 비율로 2OHOA 삽입 리포솜을 제조한 후 Amicon Ultra-4 Centrifugal filters(10,000NMWL, Millipore)를 이용하여 미삽입 2OHOA를 분리하였다. 즉, 제조한 리포솜 2mL를 취해 필터 장착 디바이스의 윗부분에 넣은 후 25℃에서 3,000g로 10분 원심분리하는 과정을 2회 반복, 필터 아래로 내려간 미삽입 2OHOA 용액을 모아 분광광도계로 205nm에서 흡광도를 측정하고, 미리 작성해놓은 2OHOA의 표준검량선을 이용하여 미삽입 2OHOA의 농도를 측정하여 리포솜 제조 시 처음에 가한 2OHOA 양으로부터 미삽입 2OHOA의 양을 빼 이로부터 삽입 2OHOA의 농도를 얻었다.

[0077] 2OHOA 삽입 리포솜의 평균입자경 및 입도분포는 fiber-optics particle analyzer(FPAR-1000, Otsuka Electronics, Japan)를 이용하여 동적광산란법으로 측정하였다. 측정 전 샘플을 여과한 5% 텍스트로스 용액으로 100배 희석하였다. 리포솜의 표면하전은 각 샘플을 탈이온수로 희석하여 제타전위 측정기(Zen 600 zetasizer, Malvern, England)를 이용해 자동측정 방식으로 측정하여 평가하였다.

[0078] 표 1에 나타난 바와 같이, 리포솜 제조 시 초기 2OHOA 함량 증가에 따라 리포솜으로의 2OHOA 삽입율은 증가하는 경향을 보였으며 2OHOA가 총 지질의 33% 이상인 경우 리포솜 막에 95% 이상 삽입되었다.

[0079] 또한, 2OHOA 삽입시 리포솜의 평균입자경이 4-5배 감소하여 항암제의 나노입자 탑재에 의한 암 부위 축적 효과를 가져오는 EPR 효과를 발휘하기에 적합한 입자경(10nm - 100nm) 범위에 들어갔으며 제타 포텐셜로 측정된 표면하전이 중성에서 음성으로 2OHOA 함량 의존적으로 증가하여 포스파티딜콜린 구조의 리포솜이 2OHOA 삽입에 의해 안정화됨을 알 수 있었다. 또한, 음성하전을 띠는 2OHOA이 리포솜 내부가 아니라 막 사이에 끼어들어갔음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0080] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 제조한 2OHOA 삽입 리포솜은 상온에서 한달 간 보관 시 평균입자경 등의 변화가 없어 안정하였다.

표 1

[0081] 리포솜 제조시 초기 2OHOA 함유율에 따른 리포솜에서 2OHOA 삽입 효율, 평균 입자경 및 다분산도 및 표면전하에 미치는 영향

리포솜 조성 (μmole/mL)	2OHOA 삽입율 (%)	평균입자경 (nm)	다분산도	제타전위 (mV)
DMPC16	-	390±93	0.231±0.033	+5.9±2.1
DMPC:2OHOA (9:1)	-	-	-	-26.7±1.7
DMPC:2OHOA (16:4)	79.00	81±12	0.293±0.034	-57.3±2.1
DMPC:2OHOA (16:5.3)	91.10	90±8	0.327±0.073	-55.9±3.5
DMPC:2OHOA (16:8)	95.90	75±0	0.343±0.026	-58.1±1.6
DMPC:2OHOA (16:16)	98.42	83±14	0.247±0.041	-61.0±4.3

[0083] <실험예 3> 포스파티딜콜린 용액의 병용투여가 2OHOA 용액의 항암활성에 미치는 영향

[0084] 세포막에는 SGMS의 기질로 작용할 수 있는 포스파티딜콜린이 존재하지만 추가적으로 외부에서 포스파티딜콜린을 공급 시 기질농도 증가에 의해 SGMS가 매개하는 SM 합성반응이 촉진되어 SM의 합성증진에 의한 세포사멸 증대가 가능할 것이라는 가설을 검증하기 위해, 0~240 μM의 DMPC 에탄올 용액을 120 μM의 2OHOA DMSO 용액과 함께 SCC-1 세포에 가하여 37℃의 5% CO₂ 세포배양기에서 72시간 방치 후 MTT 분석을 수행하였다.

[0085] MTT 분석을 위해, 플레이트에서 배지를 제거하고 PBS로 세포를 세척한 후, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)(0.25g/50mL in PBS) 용액이 10%가 되게 DMEM 배지로 희석하여 0.1mL씩 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 이후, MTT가 포함된 배지를 걷고 PBS로 세포를 세척한 후 DMSO 1mL을 첨가하고 피펫으로 DMSO 용액을 흡입과 분출을 반복하여 세포에 생긴 포마잔 결정(formazan crystal)이 잘 용해되도록 한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 2OHOA를 포함하지 않는, 빈 텍스트로스 용액을 처리한 경우와 비교하여 세포 성장율을 %로 나타내었다.

[0086] 도 4에 나타난 바와 같이, 2OHOA 단독으로는 세포성장을 약 10.8% 억제하는 데 그쳤지만 DMPC를 추가한 경우 DMPC 용량의존적으로 항암활성이 증대되어 240 μM DMPC 보충 시 37.2% 억제하였다.

- [0087] 이러한 결과는 DMPC의 보충이 SGMS에 의한 SM 생성을 촉진시켜 결국 20HOA가 더 증진된 항암활성을 나타내었을 가능성을 시사한다.
- [0089] <실험예 4> 20HOA가 삽입된 리포솜의 항암 활성 평가
- [0090] 실시예 1의 방법으로 제조한 20HOA 삽입 리포솜(DMPC:20HOA= 16:8) 또는 유리 DMPC와 혼합한/혼합하지 않은 유리 20HOA의 DMSO(dimethylsulfoxide) 용액 각각을 5% 텍스트로스 용액으로 희석하여 두경부암 SCC-1 세포주와 72시간 방치 후 MTT 분석법에 의해 항암 활성을 측정하였다.
- [0091] 도 5에 나타난 바와 같이, 120 μ M의 20HOA 용액 단독은 세포성장도를 10.8% 감소시키고 120 μ M의 유리 20HOA + 240 μ M의 유리 DMPC 혼합용액은 세포성장도를 37.2% 감소시킨 반면 동일 농도의 20HOA와 DMPC를 함유하는 리포솜은 세포 성장을 약 80% 감소시켰다. 이는 20HOA를 리포솜에 삽입하면 상승적 항암활성을 나타냄을 의미한다. 이는 20HOA의 세포막으로의 유입이 리포솜화 함에 의해 더 쉽게 이루어지며 같은 이유로 리포솜으로 투여 시 SGMS 주변에 미세환경에서 이용할 수 있는 DMPC의 농도가 증가하여 더 유용하게 사용되기 때문인 것으로 추측된다.
- [0092] 도 6은 다양한 20HOA 농도의 20HOA 용액과 리포솜 삽입 20HOA의 용량-세포사멸 곡선을 나타낸 것으로, 리포솜에 올레산을 동일한 비율로 삽입한 경우, 동일 농도에서 세포의 성장에 영향을 주지 않아 관찰된 항암 활성은 20HOA에 의한 것임을 확인하였다. 또한, 20HOA를 단독용액 형태로 투여시보다 리포솜 삽입형으로 투여시 암세포 성장 억제 효과가 보다 낮은 농도에서 관찰됨을 확인하였다. 즉 20HOA는 120 μ M의 농도에서 단독용액인 경우에 비해 리포솜삽입형인 경우 4.6배 더 효과적으로 세포성장을 억제시켰다. 암세포의 성장을 50% 억제하는 20HOA의 농도는 유리 형으로서는 약 155 μ M이었지만 리포솜 삽입형으로서는 100 μ M으로 감소되었다.
- [0094] <실험예 5> 배양 세포주에서의 20HOA가 삽입된 리포솜의 세포독성 평가
- [0095] 인간 두경부암 UM-SCC-1 세포주를 웰(well)당 2,000개씩 접종하였다. 배지로는 10%의 소혈청을 함유한 DMEM 배지를 사용하였다. 접종한 세포를 하룻밤 방치하여 세포가 부착되도록 한 후 20HOA 용액(40 mM DMSO 용액) 또는 20HOA 삽입 리포솜 분산액을 5% 텍스트로스를 사용하여 다양한 20HOA 농도로 희석하고, 각 웰에 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C의 5% CO₂ 세포배양기에서 72시간 배양한 후 MTT 분석을 통해 20HOA를 포함하지 않는, 빈 텍스트로스 용액을 처리한 경우와 비교하여 세포 성장율을 %로 나타내었다.
- [0096] 정상세포에서의 세포독성을 평가하기 위해서는, 인간 폐 섬유모세포주 MRC-5를 웰당 7,000 개씩 접종하고 배지로는 10%의 소혈청 함유 DMEM 배지를 사용하여 암세포주와 같은 방법으로 실험하였다.
- [0097] 도 7에 나타난 바와 같이, 정상세포인 MRC-5 세포주의 경우 동일조건에서 DMPC:20HOA 리포솜과 방치시 암세포에 비해 세포사멸은 현저히 작게 나타났다. 이러한 결과는 리포솜에 삽입하여도 유리 20HOA의 암세포 선택적 세포사멸 활성은 그대로 유지됨을 보여준다.
- [0099] <실시예 2> 20HOA가 삽입된 리포솜의 항암제 미토산트론(mitoxantrone, MTO) 전달체로서의 용도 평가
- [0100] DMPC 16 μ mole 또는 DMPC와 20HOA의 16:8 μ mole 혼합물 용액 각각에 MTO 2.5mg을 같이 용해한 것을 제외하고는 실시예 1과 같은 방법으로 2종의 리포솜을 제조하였다. 리포솜에 탑재되지 않은 MTO는 제조한 리포솜 1mL를 분자량 10,000의 투석막 안쪽에 넣은 후 1,000mL의 5% 텍스트로스 용액에 대해 4시간 투석하여 제거하였다. 얻은 MTO 탑재 리포솜을 에탄올로 100배 희석하여 갠 후 분광광도계로 660nm에서의 흡광도를 측정하여 미리 작성해놓은 MTO의 검량선과 비교하여 리포솜에의 MTO 탑재 효율을 결정하였다.
- [0101] 표 2에 나타난 바와 같이, DMPC 만으로 제조된 리포솜에는 MTO가 3.8%만이 탑재되었으나 20HOA가 삽입된 리포솜에는 100% 탑재됨을 확인하였다. 20HOA가 삽입된 리포솜에의 MTO 탑재 효율이 증진된 것은 DMPC:20HOA 리포솜의 표면하전의 음성하전의 절대값이 MTO 탑재에 의해 크게 감소한 것으로 볼 때 MTO-20HOA 간의 정전기적 인력에 의한 효과로 생각된다.

[0102] 리포솜에서 20HOA의 삽입 여부에 따른 항암제 MTO 탑재 효율, 평균입자경, 다분산도 및 표면하전 평가

리포솜 조성	MTO 탑재효율(%)	평균입자경 (nm)	다분산도	제타 전위 (mV)
DMPC (16 μ mole)	3.8	83 $\pm$ 24	0.255 $\pm$ 0.008	+5.4
DMPC:20HOA (16:8 μ mole)	105	56 $\pm$ 10	0.322 $\pm$ 0.037	-30.7

[0104] <실시에 3> MTO가 탑재된 20HOA 삽입 리포솜의 항암 활성 평가

[0105] MTO가 탑재된 20HOA 삽입 리포솜의 항암 활성을 평가하기 위해, DMPC와 20HOA의 16:8 μ mole 혼합물 용액에 MTO 2.1 μ g을 같이 용해한 것을 제외하고는 실시예 2와 같은 방법으로 MTO 탑재/20HOA 삽입 리포솜을 제조하였다. MTO가 탑재된 20HOA 삽입 리포솜과 유리 MTO의 DMSO 용액을 5% 텍스트로스 용액으로 다양한 MTO 농도로 각각 희석하여 비소세포성폐암 H460 세포주와 72시간 방치 후 MTT 분석법에 의해 항암 활성을 측정하였다.

[0106] 도 8에 나타난 바와 같이, MTO 단독 용액에 비해 리포솜 탑재 MTO는 동일 MTO 농도에서 훨씬 강력한 항암활성을 보였다. 즉, MTO 농도가 75 nM일 때, MTO 단독 용액의 경우는 57%의 세포독성을 보인 반면, 리포솜 탑재 MTO의 경우는 95%의 세포독성을 보였다.

[0108] <실시에 4> 20HOA가 삽입된 리포솜의 항암제 파클리탁셀 전달체로서의 용도 평가

[0109] DOPC와 20HOA의 16:8 μ mole 혼합물 용액에 파클리탁셀 1.8mg을 같이 용해한 것을 제외하고는 실시예 1과 같은 방법으로 리포솜을 제조하였다. 리포솜에 탑재되지 않은 파클리탁셀은 주사기에 장착한 0.8 μ m 필터를 통과시켜 제거하였다. HPLC 분석법으로 리포솜에의 파클리탁셀 탑재 농도를 측정하였다.

[0110] 그 결과, 파클리탁셀은 1.5mg/mL의 농도로 20HOA 삽입 리포솜에 탑재되었다.

[0111] 파클리탁셀이 탑재된 20HOA 삽입 리포솜과 유리 파클리탁셀의 DMSO 용액을 5% 텍스트로스 용액으로 다양한 MTO 농도로 각각 희석하여 비소세포성 폐암 H460 세포주와 72시간 방치 후 MTT 분석법에 의해 항암 활성을 측정하였다.

[0112] 도 9에 나타난 바와 같이, 파클리탁셀 단독 용액에 비해 리포솜 탑재 파클리탁셀은 동일 파클리탁셀 농도에서 훨씬 강력한 항암활성을 보였다. 즉, 암세포의 성장을 50% 억제하는 농도가 파클리탁셀 단독 용액의 경우는 12nM 리포솜 탑재 MTO의 경우는 8nM로 33% 낮은 농도에서 유사한 항암활성을 나타내었다.

[0114] <실시에 5> 20HOA가 삽입된 리포솜의 항암제 레티노산(all-trans retinoic acid) 전달체로서의 용도 평가

[0115] DMPC 60 μ mole과 콜레스테롤 5 μ mole의 혼합물 용액, 또는 DMPC 30 μ mole, 콜레스테롤 5 μ mole 및 20HOA 30 μ mole의 혼합물 용액에 레티노산 0.4mg을 각각 용해시킨 것을 제외하고는 실시예 1과 같은 방법으로 20HOA 미삽입 또는 삽입 리포솜 2종을 제조하였다. 리포솜에 탑재되지 않은 레티노산은 주사기에 장착한 0.8 μ m 필터를 통과시켜 제거하였다.

[0116] 흡광도 분석법으로 340nm에서 리포솜에서의 레티노산 탑재 농도를 측정한 결과 레티노산은 90-95% 리포솜에 탑재되었다.

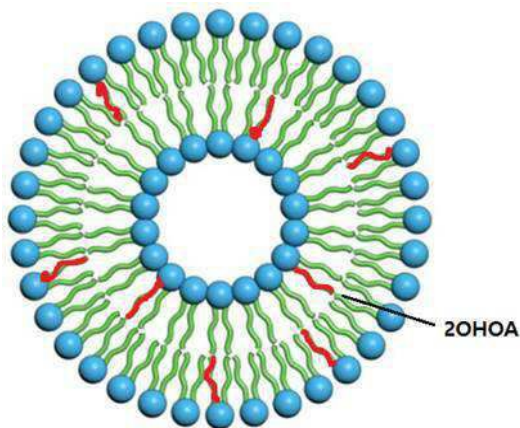
[0117] 레티노산이 탑재된 20HOA 삽입 리포솜과 20HOA 미삽입 리포솜을 5% 텍스트로스 용액으로 다양한 레티노산 농도로 각각 희석하여 배양한 악성흑색종 B16-F10 세포주와 72시간 방치 후 MTT 분석법에 의해 항암 활성을 측정하였다.

[0118] 도 10에 나타난 바와 같이, 20HOA 미삽입 리포솜에 비해 20HOA 삽입 리포솜에 탑재된 레티노산은 동일 레티노산 농도에서 훨씬 강력한 항암활성을 보였다. 즉, 20HOA 미삽입 리포솜에 탑재된 레티노산의 경우는 10 μ M에서 암세포의 성장을 약 43% 억제하였지만 20HOA 삽입 리포솜에 탑재된 레티노산의 경우는 1 μ M에서 암세포의 성장을 약 45% 억제하였다.

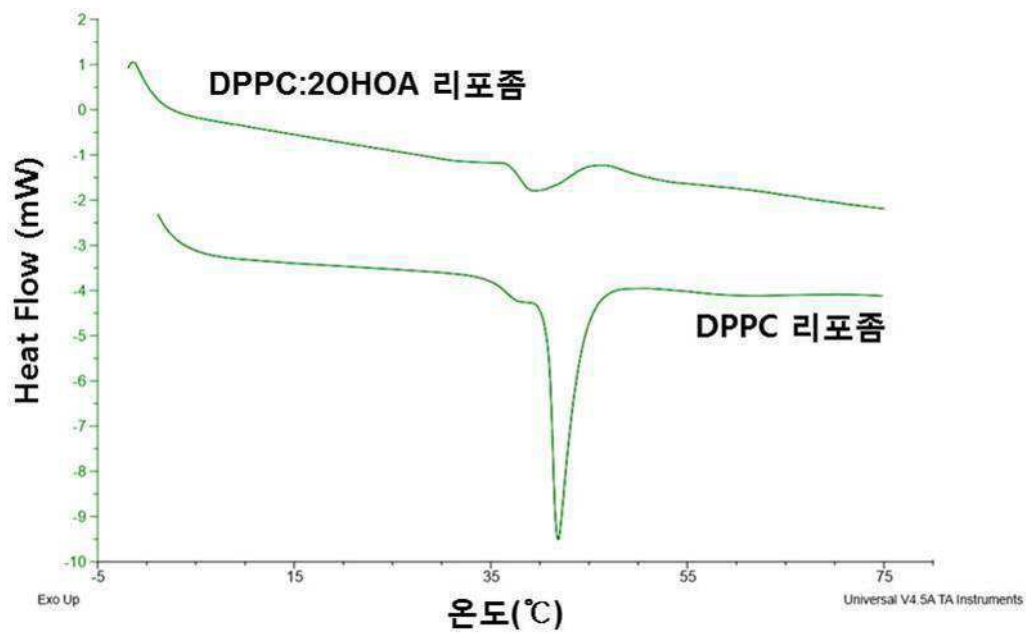
- [0120] <실시예 6> 20HOA가 삽입된 리포솜에 탑재된 레티노산(all-trans retinoic acid)의 동물모델에서의 항암활성 개선효과 평가
- [0121] 20HOA가 삽입된 리포솜에 탑재된 레티노산의 암이식 동물모델에서의 항암활성의 개선 정도를 평가하기 위하여 실시예 5의 방법으로 60:5 몰비의 DMPC와 콜레스테롤로 제조된 리포솜에 레티노산을 탑재시킨 20HOA 미삽입 리포솜, 30:30:5 몰비의 DMPC, 20HOA와 콜레스테롤로 제조된 리포솜에 레티노산을 탑재시킨 20HOA 삽입 리포솜 2종을 제조하였다.
- [0122] 쥐 유래의 흑색 세포종 B16-F10 세포주 2×10^6 개를 Balb/c 마우스의 등 중양에 이식하였다. 이식한 암세포주의 부피가 약 30mm^3 에 도달한 후 마우스들을 20HOA 용액 투여군(그룹 1), 20HOA 미삽입 리포솜에 탑재된 레티노산 투여군(그룹 2), 20HOA 삽입 리포솜에 탑재된 레티노산 투여군(그룹 3), 20HOA를 삽입하고 레티노산을 탑재하지 않은 빈 리포솜 투여군의 4종류의 그룹으로 한 그룹당 6-7 마리씩 무작위로 나누었다. 이때 20HOA 용액은 용해를 돕기 위해 증류수에 0.25% 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(hydroxypropylmethylcellulose)와 0.2% Tween80을 가하여 제조하였다. 각 그룹에 해당하는 투여용 시료를 $200\mu\text{g}/\text{마우스 kg}$ 의 레티노산 농도로 0, 2, 5일 되는 날 3회에 걸쳐 복강내 주사하였다. 암덩어리의 가장 짧은 직경(L)과 가장 긴 직경(W)을 미리 정한 시간간격으로 측정 후 암 부피를 $(L \times W^2)/2$ 의 공식에 의해 계산하였다.
- [0123] 그 결과, 20HOA 삽입 리포솜 투여군은 다른 투여군에 비해 유의적으로 더 큰 암성장 억제 효과를 나타내었다(도 11).

도면

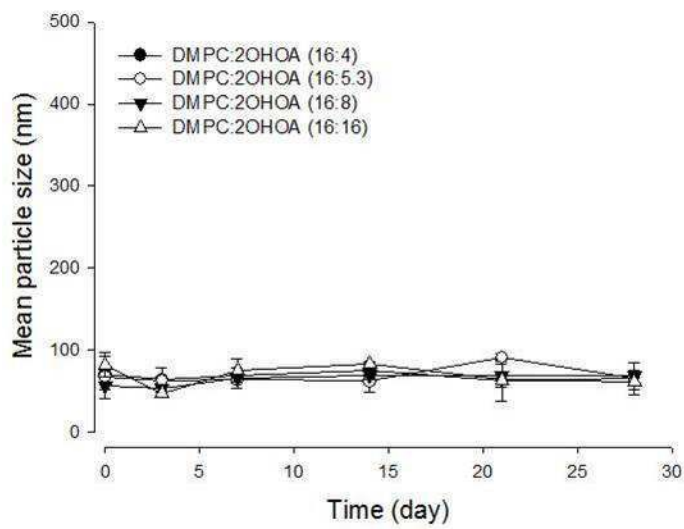
도면1



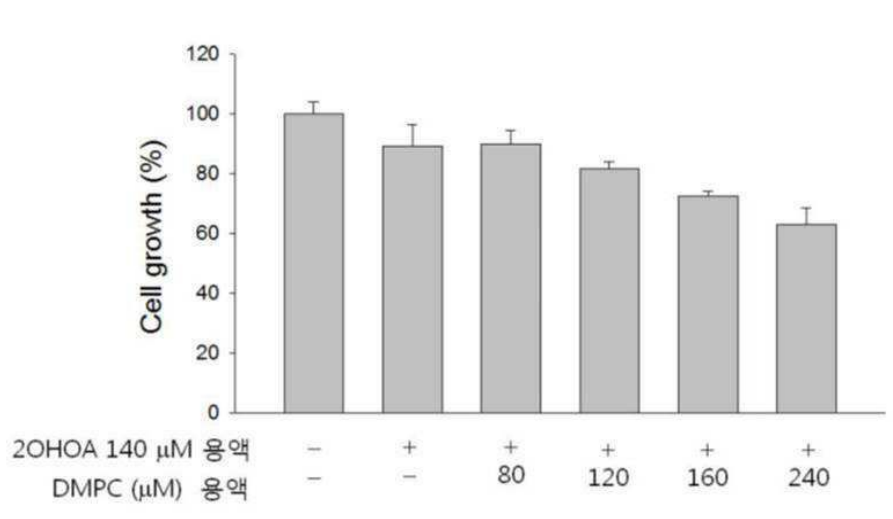
도면2



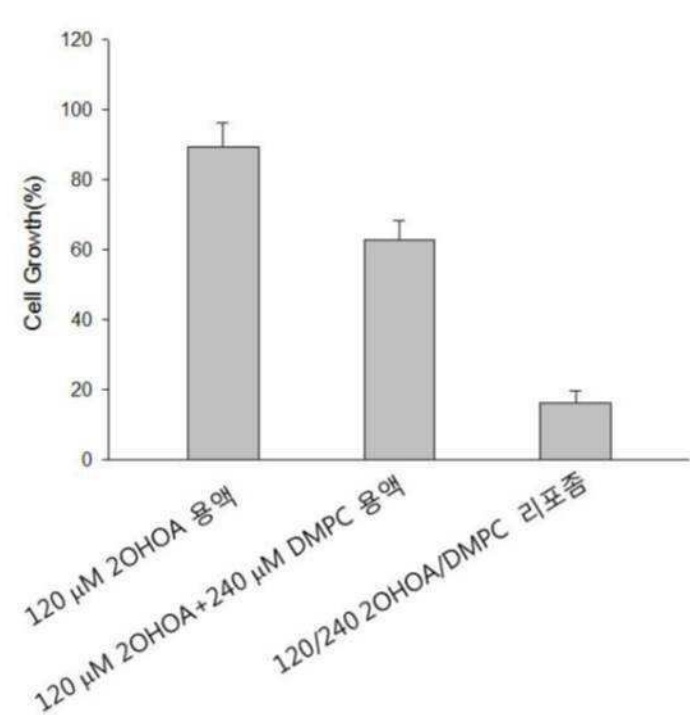
도면3



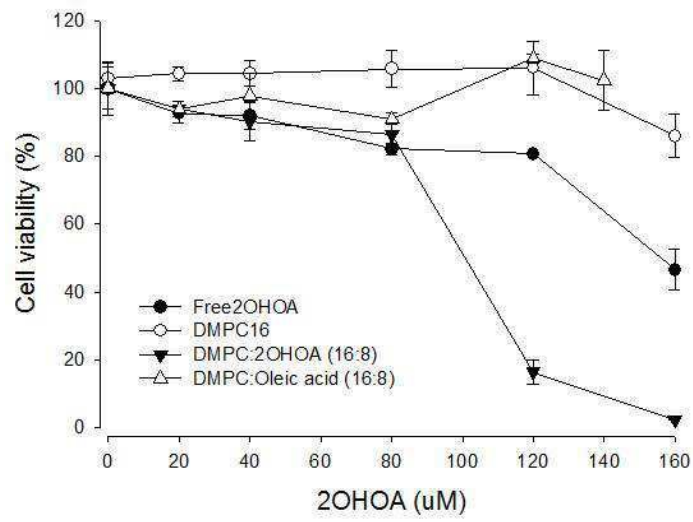
도면4



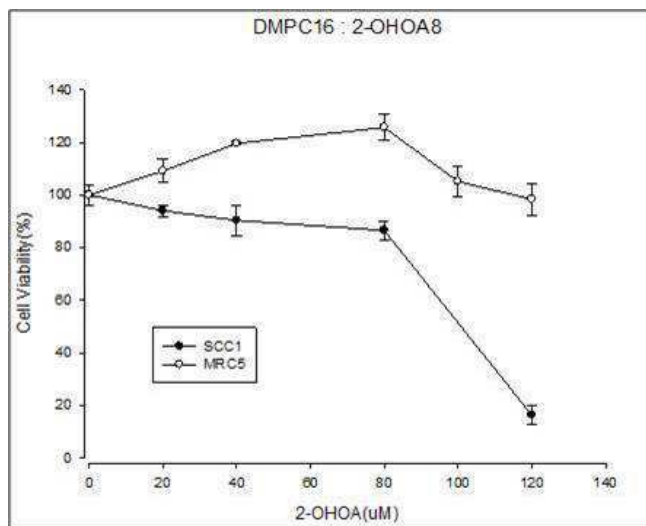
도면5



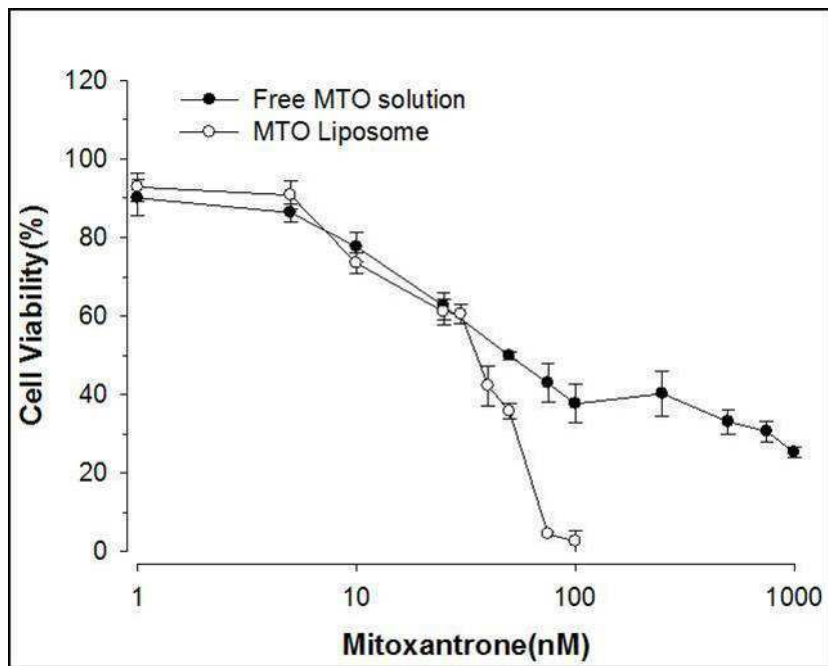
도면6



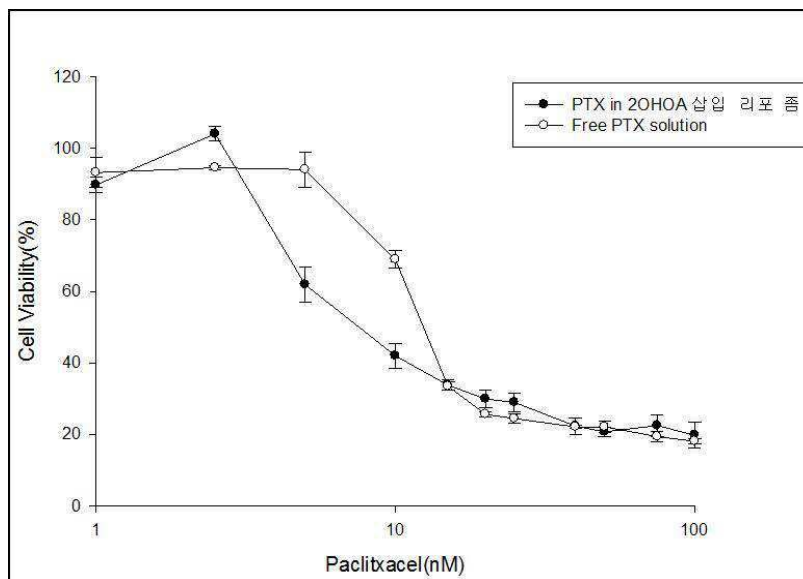
도면7



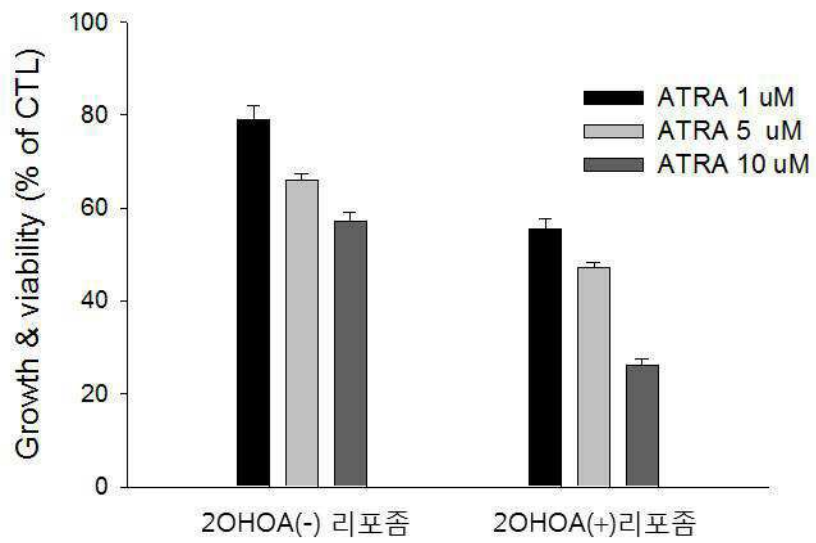
도면8



도면9



도면10



도면11

