(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0005896
(43) 공개일자 2020년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A23L 33/00* (2016.01)
A61K 31/685 (2006.01) *A61K 47/44* (2017.01)
A61P 1/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A23L 33/00 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0079467
(22) 출원일자 2018년07월09일
심사청구일자 2018년07월09일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
임수정
서울특별시 용산구 이태원로27다길 11, 남산힐 B-1 (이태원동)
김진희
서울특별시 강북구 한천로109길 83, 104동 1007호(번동, 솔그린아파트)
(74) 대리인
특허법인리채

전체 청구항 수 : 총 12 항

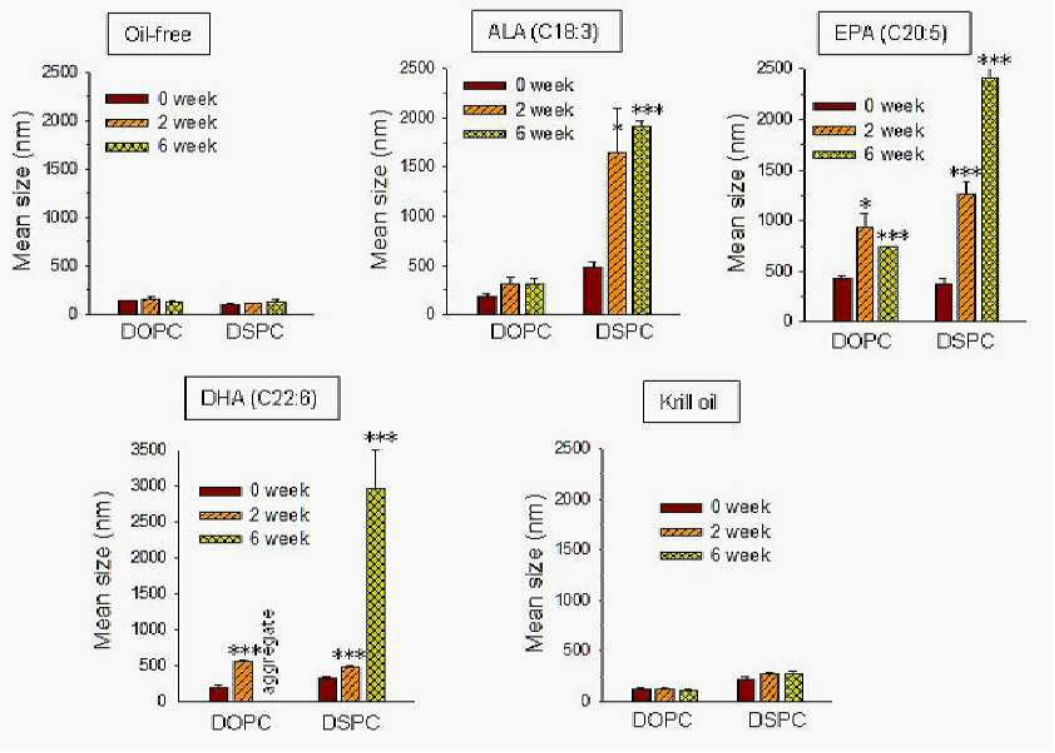
(54) 발명의 명칭 **리포좀을 포함하는 염증성 장질환 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품**

(57) 요 약

본 발명은 리포좀을 포함하는 염증성 장 질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 포스파티딜콜린 및 상기 포스파티딜콜린 사이에 개재된 크릴오일을 포함하며, 상기 포스파티딜콜린 23 내지 32 중량부에 대하여 상기 크릴오일을 6 내지 40 중량부로 포함하는 리포좀을 함유함으로써, 항염 및 항산화 효과

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



가 있고, 리포좀 내 활성 물질을 함유하더라도 저장 안정성이 뛰어나고, 리포좀 내 활성 물질의 장내 염증 부위로의 전달은 매우 우수한 효율로 할 수 있고, 리포좀의 지질 이중층 내 활성 물질이 포함되더라도 리포좀의 구조가 장시간 안정하게 유지되고, 리포좀을 동결건조시키더라도 항염, 항산화 효과가 유지되며 구조 안정성, 활성물질 저장 안정성이 낮아지지 않고, 구강 투여가 가능하여 복용이 편리하고, 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능할 수 있고, 본 발명의 리포좀을 포함한 약학 조성물, 건강기능식품은 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능할 수 있는, 본 발명은 리포좀을 포함하는 염증성 장 질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
A61K 31/685 (2013.01)
A61K 47/44 (2013.01)
A61P 1/04 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/1846 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711052129
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 효과적인 염증성 장질환 치료를 위한 대식세포 형질전환 유도능 구현 오메가좀형 약물전달 시스템 개발
기 여 율 5/10
주관기관 세종대학교
연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465026345
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구자주도질병극복연구
연구과제명 경구용 고효율 항체 치료제 전달기술 개발
기 여 율 5/10
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.30 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

포스파티딜콜린 및 상기 포스파티딜콜린 사이에 개재된 크릴오일을 포함하며, 상기 포스파티딜콜린 23 내지 32 중량부에 대하여 상기 크릴오일을 6 내지 40 중량부로 포함하는 리포좀을 함유하는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 포스파티딜콜린은 eggPC, soyPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC), hydrogenated eggPC, hydrogenated soyPC, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC), 및 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양염 또는 크론병인, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 포스파티딜콜린 사이에 스테롤계 화합물 또는 토코페롤이 더 개재되는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부,스테롤계 화합물 0.4 내지 2중량부 및 토코페롤 0.2 내지 1.5중량부를 포함하는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 리포좀 내에 면역억제제, 항-염증제, 스테로이드, 면역조절제, 사이토카인, 및 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)(TNF) 길항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나가 개재되는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

포스파티딜콜린 및 상기 포스파티딜콜린 사이에 개재된 크릴오일을 포함하며, 상기 포스파티딜콜린 23 내지 32 중량부에 대하여 상기 크릴오일을 6 내지 40 중량부로 포함하는 리포좀을 함유하는 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 포스파티딜콜린은 eggPC, soyPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC), hydrogenated eggPC, hydrogenated soyPC, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC), 및 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양염 또는 크론병인, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 포스파티딜콜린 사이에 스테롤계 화합물 또는 토코페롤이 더 개재되는, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부, 스테롤계 화합물 0.4 내지 2중량부 및 토코페롤 0.2 내지 1.5중량부를 포함하는, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 12

청구항 7에 있어서, 상기 리포좀 내에 면역억제제, 항-염증제, 스테로이드, 면역조절제, 사이토카인, 및 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)(TNF) 길항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나가 개재되는, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 염증성 장질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 리포좀을 포함하는 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 염증성 장 질환 (Inflammatory bowel disease, IBD)은 통증, 출혈 및 설사의 증상을 갖는 위장관의 전형적인 만성 염증성 질환이다. IBD의 두가지 주요 유형으로는 궤양염 (ulcerative colitis, UC)과 크론병 Crohn's disease, CD)가 있다. 아직까지 IBD 발병의 기전이 명확하지 않기 때문에, 완치보다는 증상을 완화시키고 이를 유지하기 위한 목적으로 치료가 이루어지고 있다. 현재 IBD의 내과적 치료는 메살라민(mesalamine) 등 항염증제, 부데소니드(budesonide)등 코티코스테로이드, 면역조절제, TNF-a 항체치료제 등에 의해 이루어지고 있다. 이들 치료제들은 재발을 억제하고 질병의 활성 기간(증상이 왕성하게 나타나는 기간)을 줄여 주기는 하나 반복 투여시 많은 환자에게서 전신부작용이 나타나며 고용량 투여에도 불구하고 치료효과를 보이지 않는 환자들이 나타난다.

[0004] IBD 환자가 복용한 약물의 장통과시간은 설사 증상으로 인해 흔히 매우 단축된다. 따라서 약물의 장내 체류시간을 연장시키기 위해서는 액체보다는 고체가, 마이크로 보다는 나노크기의 입자가 효과적이다. IBD환자의 염증 부위에는 다양한 면역세포들이 모여들게 되며 이들의 고체 입자 식균작용 (phagocytosis)은 염증 부위에 나노입자 축적이 증가될 수 있는 또다른 요인이 된다. 또한 나노입자 표면 하전이 음성인 경우 양성인 경우에 비해 IBD 환자 염증부위에의 부착이 훨씬 큰데 이는 장염증 부위에 강하게 침투하는 호산구(eosinophil)가 분비한 호

산구 양이온성 단백질(eosinophil cationic protein)등 양성 하전의 단백질이 많이 존재하기 때문으로 생각된다. 따라서 음성 하전의 나노크기 고체입자가 IBD의 치료에 가장 적합한 제제라 할 수 있다

[0005] 리포좀은 대표적 나노입자 제형으로, 주성분인 포스파티딜콜린 (PC)은 장점막의 주성분이기도 하기에 PC의 보충은 염증반응에 의해 손상된 장점막의 장벽능을 회복시켜 염증반응을 시켜주는 효과가 있으며 PC외 추가적인 인지질 성분 조정에 의해 표면 하전도 음성으로 조절이 가능하다. 이에, 보관 및 위장관계 내에서의 분산 안정성이 양호하면서 우수한 약효를 갖는 나노크기의 리포좀 개발의 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국특허공보 제2005-0086648호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 항염 효과가 있는 리포좀의 제공을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 리포좀 내 활성 물질을 함유하더라도 저장 안정성이 뛰어난 리포좀의 제공을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 리포좀 내 활성 물질의 장내 염증 부위로의 전달은 매우 우수한 효율로 할 수 있는 리포좀의 제공을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 리포좀의 지질 이중층 내 활성 물질이 포함되더라도 리포좀의 구조가 다양한 생리적 조건에서 장시간 안정하게 유지되는 리포좀의 제공을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 리포좀을 동결건조 시키더라도 구조 안정성이 유지되는 리포좀의 제공을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 구강 투여가 가능하여 복용이 편리한 리포좀의 제공을 목적으로 한다.

[0014] 본 발명은 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능한 리포좀의 제공을 목적으로 한다.

[0015] 본 발명은 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능한 약학 조성물, 건강기능식품의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 1. 포스파티딜콜린 및 상기 포스파티딜콜린 사이에 개재된 크릴오일을 포함하며, 상기 포스파티딜콜린 23 내지 32 중량부에 대하여 상기 크릴오일을 6 내지 40 중량부로 포함하는 리포좀을 함유하는 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0018] 2. 위 1에 있어서, 상기 포스파티딜콜린은 eggPC, soyPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC), hydrogenated eggPC, hydrogenated soyPC, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC), 및 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0019] 3. 위 1에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양염 또는 크론병인, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0020] 4. 위 1에 있어서, 상기 포스파티딜콜린 사이에 스테롤계 화합물 또는 토코페롤이 더 개재되는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0021] 5. 위 4에 있어서, 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부, 스테롤계 화합물 0.4 내지 2중량부 및 토코페롤 0.2 내지 1.5중량부를 포함하는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0022] 6. 위 1에 있어서, 상기 리포좀 내에 면역억제제, 항-염증제, 스테로이드, 면역조절제, 사이토카인, 및 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)(TNF) 길항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나가 개재되는, 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0023] 7. 포스파티딜콜린 및 상기 포스파티딜콜린 사이에 개재된 크릴오일을 포함하며, 상기 포스파티딜콜린 23 내지 32 중량부에 대하여 상기 크릴오일을 6 내지 40 중량부로 포함하는 리포좀을 함유하는 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[0024] 8. 위 7에 있어서, 상기 포스파티딜콜린은 eggPC, soyPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC), hydrogenated eggPC, hydrogenated soyPC, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC), 및 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[0025] 9. 위 7에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양염 또는 크론병인, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[0026] 10. 위 7에 있어서, 상기 포스파티딜콜린 사이에 스테롤계 화합물 또는 토코페롤이 더 개재되는, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[0027] 11. 위 10에 있어서, 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부, 스테롤계 화합물 0.4 내지 2중량부 및 토코페롤 0.2 내지 1.5중량부를 포함하는, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[0028] 12. 위 7에 있어서, 상기 리포좀 내에 면역억제제, 항-염증제, 스테로이드, 면역조절제, 사이토카인, 및 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)(TNF) 길항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나가 개재되는, 염증성 장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 리포좀은 항염 및 항산화 효과가 있다.

[0031] 본 발명의 리포좀은 리포좀 내 활성 물질을 함유하더라도 저장 안정성이 뛰어나다.

[0032] 본 발명의 리포좀은 위장관계 안정성이 우수하여 리포좀 내 활성 물질의 장내 염증 부위로의 전달은 매우 우수한 효율로 할 수 있다.

[0033] 본 발명의 리포좀은 리포좀의 지질 이중층 내 크릴오일이 포함되더라도 리포좀의 구조가 장시간 안정하게 유지된다.

[0034] 본 발명의 리포좀은 리포좀을 동결건조 시키더라도 항염, 항산화 효과가 유지되며 구조적 특성이 변화하지 않는다.

[0035] 본 발명의 리포좀은 구강 투여가 가능하여 복용이 편리하다.

[0036] 본 발명의 리포좀은 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능할 수 있다.

[0037] 본 발명의 리포좀을 포함한 약학 조성물, 건강기능식품은 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 DOPC 또는 DSPC를 주성분으로 하고 항산화제 알파 토코페롤 및 리포좀 막 안정성 증진을 위한 콜레스테롤을 가하여 만든 리포좀에의 각종 오메가-3-지방산 삽입이 리포좀의 분산 안정성에 미치는 영향의 지표로서 시간에 따른 리포좀의 평균 입자 크기의 변화를 나타낸 것이다. 각 리포좀의 제조 직후 (0주)와 비교하여 유의성 있는 변화는 별표 ($p<0.01$, *; $p<0.005$, **; $p<0.001$, ***)로 표시하였다.

도 2에서 (A)는 왼쪽부터 차례로 PC만으로 구성된 이중층, PC 분자 사이에 오메가-3-지방산을 끼워넣은 PC 이중층, PC 분자사이에 크릴 오일을 끼워 넣은 PC 이중층의 모식도이다. (B)는 EPA를 넣어 제조한 리포좀 및 크릴

오일을 넣어 제조한 리포좀의 제조 직후 및 상온에서 3주 보관 후 얻은 투과전자현미경 이미지이다. 노란색 화살표는 곡률 스트레스에 의해 생긴 모서리 부분을 보여준다.

도 3에서 위쪽 칼럼은 DOPC, 알파 토코페롤, 콜레스테롤의 혼합물 29. 6 mg에 크릴 오일을 0, 6, 18, 27, 54 또는 108 mg 혼합하여 단순동결건조 후 얻은 혼합물의 물리적 상태를 보여주는 이미지이며 아랫쪽 칼럼은 이중 크릴 오일을 0, 18, 27 또는 54 mg 섞은 혼합액에 수상을 가하여 제조한 리포좀의 분산 상태를 보여주는 이미지이다.

도 4에서 (A)는 DOPC, 알파 토코페롤, 콜레스테롤의 혼합물 29.6 mg에 크릴 오일을 0, 6, 18, 27, 또는 54 mg 혼합하여 제조한 리포좀의 제타 전위 값의 그래프이며 (B)는 (A)의 리포좀 중 크릴 오일을 0, 6, 18 mg 함유하는 리포좀의 상온 보관시 입자 크기 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5는 DOPC, 알파 토코페롤, 콜레스테롤로 제조한 통상적인 리포좀, 상기 조성의 지질 총량 29.6 mg에 크릴오일 18 mg을 혼합시켜 제조한 리포좀 (KO liposome), 크릴오일 자체에 알파 토코페롤만을 용해시켜 제조한 크릴오일 에멀젼 (KO emulsion) 3 종을 각각 pH 7.4의 인산염완충액, pH 1.2의 인공위액, pH 6.5의 인공장액에 넣어 37°C에서 0, 2, 4, 8 및 24 시간 방치 후 입자크기의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6에서 (A)는 DOPC, 알파 토코페롤, 콜레스테롤의 27.6 mg 혼합물에 크릴 오일 18 mg을 혼합시켜 제조한 리포좀 분산액을 동결건조하여 얻은 리포좀파우더 (좌) 및 리포좀 파우더에 물을 가해 재복원시킨 리포좀 분산액 (우)의 이미지이며 (B)는 크릴오일 삽입 리포좀의 동결건조 전후 입자경 및 다분산도를 나타내는 표이다.

도 7은 분화되어 단층의 막장벽을 형성한 CaCO-2 세포를 전염증성 사이토카인이 풍부한 대식세포 상층액 (RAW264.7 soup)과 인큐베이션하였을 때의 TEER 감소도와 통상의 리포좀 (oil-free liposome), 크릴오일 리포좀 (KO liposome) 또는 크릴오일 용액을 처리시의 TEER 변화를 나타내는 그래프이다. RAW264.7 soup 처리시와 비교하여 유의성있는 변화는 별표 ($p<0.01$, *; $p<0.005$, **; $p<0.001$, ***)로 표시하였다.

도 8은 배양한 마우스 RAW264.7 대식세포에 통상의 리포좀, 크릴오일 리포좀, 크릴오일 용액 또는 부데소니드 (BDS)를 전처리 후 LPS와 인큐베이션 후 염증성 사이토카인 (A) IL-6와 (B) TNF-a의 생성농도 측정치를 그래프로 표시한 것이다. 전처리 없이 LPS와 인큐베이션한 경우와 비교하여 유의성있는 변화는 별표 ($p<0.01$, *; $p<0.005$, **; $p<0.001$, ***)로 표시하였다.

도 9는 DSS투여에 의해 마우스에 급성대장염을 유도 후 크릴오일 리포좀 또는 부데소니드를 경구투여시 장점막 장벽능(intestinal barrier permeability)의 손상 및 회복 정도를 평가하기 위해 혈청 내독소 LPS의 농도를 측정한 결과를 그래프화한 것이다.

도 10은 DSS투여에 의해 마우스에 급성대장염을 유도 후 크릴 오일 삽입 리포좀 또는 부데소니드를 경구투여시 염증반응의 정도를 평가하기 위해 혈청중 사이토카인 (IL-6, IFN-g, TNF-a, IL12p70, IL-10) 및 chemokine (MCP-1)의 농도를 측정하여 얻은 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 발명은 리포좀을 포함하는 염증성 장 질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 포스파티딜콜린 및 상기 포스파티딜콜린 사이에 개재된 크릴오일을 포함하며, 상기 포스파티딜콜린 23 내지 32 중량부에 대하여 상기 크릴오일을 6 내지 40 중량부로 포함하는 리포좀을 함유함으로써, 항염 및 항산화 효과가 있고, 리포좀 내 활성 물질을 함유하더라도 저장 안정성이 뛰어나고, 리포좀 내 활성 물질의 장내 염증 부위로의 전달은 매우 우수한 효율로 할 수 있고, 리포좀의 지질 이중층 내 활성 물질이 포함되더라도 리포좀의 구조가 장시간 안정하게 유지되고, 리포좀을 동결건조시키더라도 항염, 항산화 효과가 유지되며 구조 안정성, 활성물질 저장 안정성이 낮아지지 않고, 구강 투여가 가능하여 복용이 편리하고, 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능할 수 있고, 본 발명의 리포좀을 포함한 약학 조성물, 건강기능식품은 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능할 수 있는, 본 발명은 리포좀을 포함하는 염증성 장 질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

[0042] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0044] 본 발명에서 "리포좀(liposome)"은 활성 약물을 봉입할 수 있는 인지질 이중막(bilayer)이다.

[0045] 본 발명에서 활성 성분은 살아있는 생물체 내 생리적인 활성을 제어 또는 활성화시킬 수 있는 물질이면 제한없이 사용될 수 있으며, 다만, 상기 물질은 살아있는 생물체의 건강을 해칠 수 있는 물질은 사용할 수 없다.

[0046] 본 발명에서 포스파티딜콜린 사이에 어떤 물질이 개재되어 있다는 것은 포스파티딜콜린, 물질, 포스파티딜콜린이 순차적으로 배열되어 있는 것을 의미하며, 여기서 포스파티딜콜린이 여러 개 연속으로 배열 후 물질이 개재된 후 다시 포스파티딜콜린이 여러 개 연속으로 배열되는 것을 반복하는 형상일 수 있으며, 임의의 개수의 포스파티딜콜린이 배열 후 임의의 개수의 물질이 배열된 다음 다시 임의의 개수의 포스파티딜콜린이 배열되는 형상일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명의 염증성 장 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 포스파티딜콜린 및 상기 포스파티딜콜린 사이에 개재된 크릴오일을 포함하며, 상기 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부에 대하여 상기 크릴오일이 6 내지 40중량부로 포함되는 리포좀을 함유한다. 구체적으로 도 1에 따르면, 리포좀을 구성하는 둘 이상의 포스파티딜콜린 사이에 크릴오일이 위치할 수 있다. 상기 비율로 크릴오일과 포스파티딜콜린이 포함되면, 크릴오일의 항염 효과, 항산화 효과가 온전히 장 내 염증부위에서 작용될 수 있으며, 리포좀의 구조 안정성 및 저장 안정성을 향상시켜 활성 물질을 리포좀 내 포함시키더라도 목적하는 위치에서 상기 활성 물질의 방출을 유도할 수 있다. 상기 범위를 벗어나면, 포스파티딜콜린이 크릴오일에 용해되어 손상된 막부위를 메우는 효과가 감소되거나 리포좀의 보관, 위장관계 및 동결건조시 구조적 안정성이 나빠지는 문제가 발생할 수 있다.

[0049] 크릴 오일은 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부에 대하여 상기 6 내지 40중량부로 포함될 수 있고, 바람직하게는 10 내지 35중량부, 보다 바람직하게는 10 내지 30중량부 포함될 수 있으나, 더욱 바람직하게는 15 내지 25중량부로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 크릴오일 함량이 상기 범위를 초과하여 과다하게 포함되는 경우, 지질이 크릴 오일에 용해되어 지질 응집체가 형성되고, 리포좀이 형성되지 않는다.

[0051] 본 발명에서 리포좀은 세포막과의 형태적 유사성이 있어 세포 내로의 흡수가 용이하며, 본 발명의 리포좀의 경우 전하를 띠는 성분을 포함한 크릴오일이 포스파티딜콜린 사이에 개재되어 있음으로써 염증 부위와 정전기적 인력을 통해 항염, 항산화 효과를 가진 리포좀이 염증 부위에 축적 및 흡수되기 용이할 수 있다. 본 발명의 리포좀은 1겹, 2겹 또는 3겹 또는 그 이상으로 겹겹이 층을 이룰 수 있으며, 층이 많아질수록 리포좀 내 활성 성분을 포함시킬 경우 이의 배출을 효과적으로 제어할 수 있는 이점이 있을 뿐만 아니라, 리포좀 자체적으로 항염, 항산화효과를 갖기 때문에 적은 층으로 둘러 쌓여있을때 보다 항염, 항산화 효과가 더욱 향상되는 효과가 발생할 수 있다.

[0052] 포스파티딜콜린은 탄소수가 5 내지 30개, 바람직하게는 탄소수가 12 내지 22개이면서 상전이온도가 실온 이하여서 실온에서 유동성이 우수한 PC가 바람직하나, 이로 제한되지는 않는다.

[0053] 포스파티딜콜린의 예로는 난황 레시틴, 대두레시틴, 리소레시틴 등의 천연 레시틴; 및 디스테아로일포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린, 엘레오스테아로일포스파티딜콜린 등의 합성지질 중에서 한쪽 사슬에 이중 결합이 1개 이상 존재하는 PLPC(1-팔미토일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1-palmitoyl2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), SLPC(1-스테아로일-2-리놀레오일-sn-글리세로-포스포콜린, 1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-phosphocholine), SAPC(1-스테아로일-2-아랑키도노일-sn-글리세로-포스포콜린, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-phosphocholine) 등을 들 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 포스파티딜콜린은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC), 1,2-디펙사노일-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-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-snglycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디트리데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditridecanoyl-snglycero-3-phosphocholine), 1,2-디펜타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipentadecanoyl-sn-

glycero3-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-디노나 데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dinonadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디아라키도일-sn글리세로-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), 하이드로제네이티드포스파티딜콜린(hydrogenated phosphatidylcholine) 및 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0055] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 리포좀 내 활성 성분을 포함할 경우, 이의 저장 안정성 및 리포좀의 구조 안정성 향상을 위해, 포스파티딜콜린은 eggPC, soyPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC), hydrogenated eggPC, hydrogenated soyPC, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC) 및 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 보다 더 구체적인 일 실시예에 따르면, 포스파티딜콜린은 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC)일 수 있다. DOPC를 포스파티딜콜린으로 사용할 경우 활성 성분의 저장 안정성이 매우 우수하다.

[0056] 크릴은 새우처럼 생긴 갑각류로, 남극해에서 시식하며 식물성 플랑크톤을 먹고 생활한다. 상기 크릴로부터 오일을 얻을 수 있는데, 상기 오일에는 오메가-3-지방산 (예컨대, DHA, EPA가 포스파티딜콜린의 머리그룹에 결합되어 있는 형태), 아스타잔틴, 비타민 A 및 E가 포함되어 있다. 상기 물질들은 항염증 효과, 항산화 효과를 지니고 있어, 염증 부위에 작용 시 염증 완화 효과를 가져올 수 있다. 다만, 크릴오일을 단순 섭취할 경우, 염증 부위로의 전달이전에 화학적으로 불안정화되거나 위장관액내에서 에 의해 자가형성된 크릴오일의 에멀젼이 응집되어 염증완화효과가 크게 감소할 수 있다. 그러나, 리포좀을 이용할 경우 인지질의 종류에 따라 타겟 염증부위에서 선택적으로 흡수를 유도하여 염증 부위로의 전달률을 크게 향상시킴과 동시에 PC와 크릴오일이 동시 전달됨에 의해 PC의 장점막 장벽능 수복 효과와 크릴오일의 항염효과가 동시에 발휘되어 염증완화 효과를 크게 향상시킬 수 있다. 오메가-3-지방산을 리포좀에 삽입시키는 경우 구조적 불안정성을 초래할 수 있어 이러한 동반효과를 기대하기 어려우나, 본 발명의 리포좀의 일부를 크릴오일로 형성시키는 경우 위장관내 불안정화가 현저히 감소되어 크릴오일이 온전히 염증부위에서 항염, 항산화 작용할 수 있다.

[0057] 전술한 오메가-3-지방산은 오메가-3 지방산, ω-3 지방산 또는 N-3 지방산이라고도 불리며, 탄소 사슬의 끝에서 세 번째 탄소에서부터 이중 결합(C=C)이 시작되는 필수 불포화 지방산이다. 본원에서 지칭하는 오메가-3-지방산은 지방산 사슬 n (1 이상의 정수)가닥일 수 있고, 지방산 3개가 글리세롤에 결합되어 있는 트리글리세라이드 형태일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 오메가-3-지방산은 오메가-3 지방산 3개가 글리세롤에 결합되어 있는 트리글리세라이드 형태일 수 있다. 후술하는 EPA, DHA, ALA 또한 지방산 1가닥 또는, EPA, DHA, ALA 각각의 3가닥이 글리세롤에 결합되어 있는 트리글리세라이드 형태일 수 있다 (즉, EPA 3가닥과 글리세롤, DHA 3가닥과 글리세롤, ALA 3가닥과 글리세롤). 또는 EPA, DHA 및 ALA 중 어느 2 또는 3개가 혼용되어 글리세롤에 결합되어 있는 형태일 수 있다.

[0058] 오메가-3-지방산은 항염증 효과를 가져 염증성 질환을 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 물질이나, 이의 화학적 안정성, 염증부위 도달 및 항염효과를 증가시키기 위한 방안으로 리포좀에 삽입 시 리포좀의 곡률 스트레스(curvature stress)를 증가시켜 상기 지방산 삽입 리포좀이 응집 및 융합되는 문제가 발생한다. 그러나, 크릴오일의 경우에서처럼 대부분의 오메가-3-지방산이 포스파티딜콜린의 머리그룹에 결합되어 있는 형태로 존재하는 경우 리포좀에 삽입 시에는 리포좀의 응집·융합 현상이 발생하지 않고, 리포좀의 구조적 안정화를 도모할 수 있고, 이를 통해 리포좀에 포집된 활성 물질이 타겟 부위가 아닌 부위에서의 방출을 방지할 수 있어 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료의 효과 발생을 극대화 시킬 수 있다. 또한, 오메가-3-지방산이 포스파티딜콜린의 머리그룹에 붙어있음으로써 리포좀을 형성하는 포스파티딜콜린 사이에 곡률스트레스 유발없이 위치할 수 있으며 (도 2), 포스파티딜콜린에 결합되어 있음에 따라 염증 부위로의 흡수 용이성을 크게 증가시키는 효과도 가져올 수 있다. 즉, 염증 부위로의 흡수 용이성을 증진시킴으로써 염증 완화 효과를 극대화할 수 있다. 본 발명에서 오메가-3-지방산으로는 Eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) 또는 Alpha-linolenic acid (ALA) 등을 들 수 있다.

[0059] 전술한 아스타잔틴, 비타민 A 및 E는 강력한 항산화 기능을 가지고 있어 염증 부위에 작용 시 염증을 완화시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 오메가-3-지방산만 리포좀에 포함된 경우에 비해 아스타잔틴, 비타민 A 및 E이 더 포함되어 있는 크릴오일이 리포좀에 포함된 경우 항염증 약물인 부데소니드의 봉입효율이 높고 봉입에 의한 리포좀의 크기 변화가 적어 리포좀의 구조적 안정성이 향상된 것으로 나타나 (표 1), 아스타잔틴, 비타민 A 및 E는 리포좀의 구조적 안정성을 향상시키는 요인으로도 역할하는 것으로 보인다. 다만, 본 이론으로 한정하여 해석되지 않고, 다른 이론이 있는 경우 그로도 본 실시예가 설명될 수 있다.

[0060] 본 발명에서 염증성 장 질환 (Inflammatory bowel disease, IBD)은 통증, 출혈 및 설사의 증상을 갖는 위장관의 전형적인 만성 염증성 질환으로, 본 발명의 일 실시예에 따르면, IBD는 궤양염 (ulcerative colitis, UC) 또는 크론병 Crohn's disease, CD)일 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 포스파티딜콜린 사이에 스테롤계 화합물 또는 토코페롤이 더 개재될 수 있다. 스테롤계 화합물 또는 토코페로를 리포좀 내로 함유할 경우 리포좀의 구조를 더욱 안정화시킬 수 있어, 구조 안정성, 저장 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0063] 스테롤계 화합물은 콜레스테롤, 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀}콜레스테롤(3b-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-cabamyl]cholesterol, DC-Chol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 시토스테롤(sitosterol), 에르고스테롤(ergosterol), 라노스테롤(lanosterol), 디노스테롤(dinosterol), 고르고스테롤(gorgosterol), 아베나스테롤(avenasterol), 사린고스테롤(saringosterol), 퓨코스테롤(fucosterol), 콜레스테릴 헤미석시네이트(cholesteryl hemisuccinate), 콜레스테릴 벤조에이트(cholesteryl benzoate), 콜레스테릴 올레이트(cholesteryl oleate), 콜레스테릴 올레일 카보네이트(cholesteryl oleyl carbonate), 콜레스테릴 이소스테아레이트(cholesteryl isostearate), 콜레스테릴 리놀레이트(cholesteryl linoleate), 콜레스테릴 아세테이트(cholesteryl acetate), 콜레스테릴 팔미테이트(cholesteryl palmitate), 콜레스테릴 스테아레이트(cholesteryl stearate), 콜레스테릴 클로라이드(Cholesteryl chloride), 콜레스테릴 노나노에이트(Cholesteryl nonanoate) 및 콜레스테릴 아라키도네이트(Cholesteryl arachidonate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 스테롤계 화합물은 콜레스테롤일 수 있다.

[0064] 토코페롤은 비타민 E 활동성을 가지는 화합물의 일종으로, 토코페롤에는 알파-토코페롤, 베타-토코페롤, 감마-토코페롤, 델타-토코페롤 등이 있으며, 천연 토코페롤뿐만 아니라 합성 토코페롤도 포함할 수 있다.

[0065] 구체적인 실시예에 따르면, 스테롤계 화합물 및 토코페롤이 본 발명의 리포좀에 포함될 수 있으며, 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부, 스테롤계 화합물 0.4 내지 2중량부 및 토코페롤 0.2 내지 1.5중량부로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부, 스테롤계 화합물 0.8 내지 1.4중량부 및 토코페롤 0.6 내지 1.2중량부로 포함될 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 포스파티딜콜린 사이에 면역억제제, 항-염증제, 스테로이드, 면역조절제, 사이토카인, 및 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)(TNF) 길항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나가 더 개재될 수 있다. 또한, 면역억제제, 항-염증제, 스테로이드, 면역조절제, 사이토카인, 및 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)(TNF) 길항체 중 수용성 물질의 경우는 리포좀의 내부 수상에 포함될 수도 있다.

[0067] 상기 면역억제제는, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 시클로스포린, 타크롤리무스(Tacrolimus) (FK506), 라파미신, 및 미오페놀레이트모페틸로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0068] 상기 항-염증제는, 부데소니드, 5-아미노살리실산, 설파살라진, 및 올살라진으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0069] 상기 스테로이드는, 코르티코스테로이드류, 글루코코르티코스테로이드류, 프레드니손, 프레드니솔론, 하이드로코르티손, 메틸프레드 니솔론, 덱사메타손, 및 아드레노코르티코트로픽 호르몬(Adrenocorticotropic hormone)(ACTH)으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0070] 상기 면역조절제는, 디글리코리피드된, 디글리코리피드된 마이코박테리움바캐 (deglycolipidated, deglycolipidated Mycobacterium vcacce)(PVAC), 항-종양괴사인자 수용체 상과 요소 5(항-CD40) 리간드, 항-종양괴사인자 수용체 상과 요소 5 (항-CD40), 나탈리주마브, 항-맥관유착분자-1(항-VCAM1) 및 항-세포간유착분자-1(항-ICAM1)로 구성 되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0071] 상기 사이토카인은, 인터류킨-10(IL-10)인, 조성물. 청구항 15 제 9항에 있어서, 상기 종양괴사인자(TNF) 길항체는, 인플리시마브, 에타너셉트, 아달리무마브, 및 세르톨리주마브패골(Certolizumab Pegol)(CDP870)로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0072] 상기 외에도 포스파티딜콜린 사이에 항산화 또는 항염증 작용이 있는 것으로 공지된 성분들이 더 포함될 수 있다. 예를 들면 커큐민, 코엔자임 큐텐, 레스베라트롤, 비타민A,quercetin,astaxanthin, 비타민 E, 베타카로텐, 루테인,lycopene, 플라보노이드, 카테킨, 이소플라본 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명의 일 실시예에 따른 리포좀은 그 표면에 장용성 코팅층을 더 포함할 수 있다.

[0074] 장용성 코팅층은 장용성 고분자를 포함하는 것일 수 있다. 용어 "장용성 고분자(enteric polymer)"는 위 내용물들(gastric contents)로부터 리보좀을 보호하는 고분자, 예를들면 산성 pH에서 안정한 고분자, 그러나 더 높은 pH에서는 빠르게 분해할 수 있는 고분자 또는 그것의 수화(hydration) 또는 부식(erosion)의 속도가, 상기 소화효소들과 위 내용물들(gastric contents)의 접촉이, 위장관(gastro-intestinal tract)의 잔부에 대하여 반대되는 바로서, 그것이 상기 위 내부에 있는 동안 상대적으로 미미한 것을 보장하기에 충분히 느린 고분자를 의미한다.

[0075] 장용성 고분자들의 비-제한적인 예들은, 본 기술 분야에서 알려져 있는 것들, 예를 들면 변형된 또는 비변형된 자연적 고분자들, 예를 들면 셀룰로오스 프탈산 아세테이트(cellulose acetate phthalate), 하이드록시프로필 메틸룰로오스 프탈레이트(hydroxypropyl methylcellulose phthalate), 하이드록시프로필 메틸룰로오스 숙신산 아세테이트(hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate), 및 셀락(shellac); 또는 합성 고분자들, 예를 들면 아크릴성 중합체들 또는 공중합체들(acrylic polymers or copolymers), 메타크릴산 중합체들 및 공중합체들(methacrylic acid polymers and copolymers), 메틸메타크릴레이트 공중합체들(methylmethacrylate copolymers), 및 메타크릴산/메틸메타크릴레이트 공중합체들(methacrylic acid/methylmethacrylate copolymers) (예를들면, EUDRAGIT® L 또는 S)을 포함한다.

[0076] 장용성 코팅층의 두께는 예를 들면 10 ㎛ 내지 800 ㎛, 구체적으로, 10 ㎛ 내지 500 ㎛, 10 ㎛ 내지 300 ㎛일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] 본 발명의 리포좀은 구조적 안정성이 뛰어나기 때문에 동결건조가 가능하며, 동결건조 후 사용 시 재수화시키더라도 리포좀 내 내재되어 있는 활성 물질 또는 면역억제제, 항-염증제, 스테로이드, 면역조절제, 사이토카인, 및 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor)(TNF) 길항체 등의 방출 조절능이 감소되지 않을 수 있다.

[0078] 본원 명세서 내"예방"은 동물의 병리학적 세포의 발생 또는 세포의 손상, 소실의 정도의 감소를 의미한다. 예방은 완전 할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 병리학적 세포의 발생 또는 신경세포의 사멸이 나 손실 등이 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미 할 수 있다. 또한, 본원 명세서 내 "치료"는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 전이를 예방하거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일 시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다. 즉, 상기 치료는 상기 약학 조성물에 의해 염증성 장질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 포괄하는 것으로 해석될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[0079] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 염증성 장질환은 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis) 및 장형 베체트병 (intestinal Bechet's disease)으로 구성된 군으로부터 하나 이상인 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0080] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염증성 장질환 치료용 약학 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 즉, 상기 염증성 장질환 치료용 약학 조성물은 전신 또는 국소 투여할 수 있으며, 상기 투여는 경구 투여 및 비 경구 투여를 포함할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 내 투여일 수 있다. 상기 염증성 장질환 치료용 약학 조성물은 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다. 따라서, 상기 염증성 장질환 치료용 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아

고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다. 상기 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 적소두 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다. 상기 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0082] 본 발명의 다른 측면은 다른 양태로 전술한 리포좀을 함유하는 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0083] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미할 수 있으며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있으나, 건강의 개선을 위한 목적으로 섭취하는 식품이라면 그 종류가 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0084] 일 실시예에 있어서, 상기 건강기능식품은 정제, 과립, 분말, 캅셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다. 예컨대, 상기 건강보조식품은 산제, 과립제, 정제, 캅셀제, 현탁액, 에멀젼, 시럽제, 액제, 엑스제, 차, 젤리, 엑스, 또는 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제는 당해 기술분야 에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.

[0085] 상기 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안정청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다. 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다. 상기 건강기능식품은 면역결핍질환, 세균성 및 바이러스성 감염 질환, 종양 등을 포함하는 면역 관련 질환 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있다.

[0087] 또한, 본 발명은 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료용 리포좀의 제조방법을 제공한다.

[0088] 본 발명의 제조방법은 포스파티딜콜린 23 내지 32 중량부에 대하여 상기 크릴오일을 6 내지 40 중량부를 혼합하는 단계를 포함한다. 포스파티틸 콜린과 크릴오일은 전술한 바와 같으며, 상기 비율로 크릴오일과 포스파티딜콜린이 포함되면, 크릴오일의 항염효과, 항산화효과가 온전히 장 내 염증부위에서 작용될 수 있으며, 제조된 리포좀의 구조 안정성 및 저장 안정성을 향상시켜 활성 물질을 리포좀의 리포좀에 포함하더라도 목적하는 위치에서 상기 활성 물질의 방출을 유도할 수 있다. 상기 범위를 벗어나면, 크릴오일 내 포스파티딜콜린이 녹아버리거나, 제조된 리포좀에 구조적으로 이상이 생겨 리포좀이 끈적끈적해지는 등의 문제가 발생할 수 있다.

[0089] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 포스파티딜콜린 23 내지 32중량부, 스테롤계 화합물 0.4 내지 2중량부 및 토코페롤 0.2 내지 1.5중량부를 혼합하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 범위 내로 포함 시 제조된 리포좀의 구조 안정성 및 저장 안정성이 더욱 향상될 수 있다.

[0090] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 부데소니드를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 부데소니드를 리포좀에 함유

할 경우 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과가 리포좀 자체의 것에 비해 더욱 향상될 수 있다.

[0091] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 리포좀을 동결건조시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 제조방법으로 제조된 리포좀은 구조적 안정성이 뛰어나기 때문에 동결건조가 가능하며, 동결건조 후 사용 시 재수화시키더라도 리포좀 내 내재되어 있는 활성 물질의 방출에 영향이 미미할 수 있어 동결건조 공정을 거칠 수 있다.

[0093] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0095] **실시예 1. 리포좀의 제조**

[0096] 3차 부틸 알코올에 PC, 콜레스테롤 및 알파 토코페롤을 적당한 중량비로 혼합하고 이에 a-linolenic acid (ALA, 18:3n-3), 피쉬 유래의 eicosapentaenoic acid(EPA, 20:5n-3), docosahexaenoic acid(DHA, 22:6n-3 또는 크릴 오일 등의 오메가-3-지방산을 섞어 모두 용해시켜 혼합용액을 얻었다. 이를 신속히 -80℃에서 얼리고, 동결건조기(EYELA FDU-1200, 일본)에서 동결 건조를 시행하였다. 24시간 동안 동결 건조하여 지질 파우더의 케이크를 얻었다. 얻은 케이크에 5% 덱스트로오스 1 ml을 가해 수화시켰다. 3,000 rpm에서 30초 교반하여 수화에 의해 자발적으로 형성된 리포좀 분산액을 37℃에서 1시간 동안 수조 형식의 초음파 분산기에서 130 W로 균질화, 다시 수조 형식의 세포 파쇄용 초음파 분산기 (Bioruptor)에서 7 분간 250 W 세기의 초음파 처리하여 오메가-3-지방산 또는 크릴 오일이 삽입된 리포좀을 얻었다.

[0098] **실시예 2. 제조한 리포좀의 물성 분석**

[0099] 제조한 리포좀의 평균입자경을 fiber-optics particle analyzer(FPAR-1000, Otsuka Electronics, Japan)를 이용하여 동적광산란법으로 측정하였다. 측정 전 샘플을 여과한 5% 덱스트로스 용액으로 100배 희석하였다.

[0100] 리포좀의 표면 하전값의 척도가 되는 제타 전위는 리포좀 분산액 소량을 탈이온수로 100배 희석하여 제타전위 측정기(Zen600 zetasizer, Malvern, England)를 이용해 자동측정 방식으로 측정하여 측정하였다.

[0101] 투과형 전자현미경을 이용한 리포좀의 크기 및 형상의 관찰을 위해서, 제조한 리포좀 분산액 소량을 5% 덱스트로오스 용액으로 70배 희석 후 탄소로 코팅한 200 메쉬 구리 격자판에 떨어뜨렸다. 이어서 2% uranyl acetate 용액으로 음성 염색 후 건조시켜 Tecnai G2 spirit (FEI company, Hillsboro, Oregon, USA) 로 120 kV에서 이미지를 촬영하였다. 이미지 사진은 11,000 ~ 42,000 배로 확대하였다.

[0103] **실시예 3. 리포좀의 분산 안정성 평가**

[0104] 제조한 리포좀을 원액 상태로 상온에서 6주까지 보관하며 일정한 시간 간격으로 평균입자경의 변화를 측정하여 리포좀 분산액 보관시의 분산 안정성을 평가하였다.

[0105] 위장관계에서의 리포좀의 분산 안정성을 평가하기 위해서는, 2 g의 NaCl을 1 L 3차 증류수에 녹여 HCl로 pH를 1.2로 맞춘 인공 위액 950 ㎕에 실시예 1의 방법으로 제조한 리포좀 50 μl를 넣어 잘 섞은 후 37℃ 에 보관하며 24 시간까지의 입자 크기 변화를 실시예 2의 방법으로 측정하였다. 또한 6.8 g의 KH_2PO_4를 1 L 3차 증류수에 녹여 NaOH로 pH를 6.8로 맞춘 인공 장액과 pH 7.4의 인산염완충액 용액에서도 인공 위액과 같은 실험조건으로 리포좀의 입자 크기 변화를 측정하였다.

[0106] 제조한 리포좀을 동결건조하여 분말화 후 물을 가해 재분산시 안정성을 평가하기 위해서는, 8.2% 농도의 sucrose 용액과 리포좀 용액을 1:1로 잘 섞은 뒤 -80℃ 냉장고에서 6시간 동안 얼린 후 다시 액체 질소에서 1분간 얼린 샘플을 하루 동안 동결건조 하였다. 얻어진 동결건조 파우더는 동결건조 전 리포좀 분산액의 원부피의 증류수를 넣은 후 수초간 vortex하여 리포좀분산액을 얻은 후 그 사이즈를 실시예 2의 방법으로 측정하였다.

[0108] **실시예 4. IBD 치료용 약물 부데소니드 봉입 리포좀의 제조 및 봉입농도 평가**

[0109] 실시예 1의 3차 부틸 알코올에 지질과 각종 오메가-3-지방산을 혼합하여 용해시키는 단계에서 IBD 치료에 흔히

쓰이는 스테로이드 약물인 부데소니드를 일정량 같이 녹인 후 동결건조를 수행한 후 실시예 1의 방법에 의해 부데소니드 봉입 리포좀을 제조하였다. 제조가 끝난 후, 리포좀에 봉입되지 않은 부데소니드의 분리는 리포좀과 미봉입 부데소니드의 혼합액을 즉시 0.8 mm 셀룰로우즈 아세테이트 재질의 멤브레인 필터 (Toyo ADVANTEC, Otowa, Bunkyo-ku, Japan)로 여과하여 분리하였다. 부데소니드 봉입 리포좀의 평균 입자경을 실시예 2의 방법으로 측정하였으며 봉입된 부데소니드의 농도는 고성능 액체 크로마토그래피 방법을 이용하여 분석하였다. 분석 전 50 ㎕의 리포좀 분산액을 동결 건조하여 얻은 분말을 메탄올 0.5ml에 녹인 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액 20 ㎕를 Nanospace SI-2 HPLC system (Shiseido, japan)에 주입했다. 메탄올과 물의 혼합물 (72:28, v/v)으로 제조한 이동상을 800 μl/min의 유속으로 흘려 주었다. 역상 칼럼인 Capcell pak C18 컬럼 (Shiseido, japan)을 사용하였으며 오븐의 온도는 40℃로 설정하였다. 부데소니드의 검출은 243 nm에서 수행하였다.

[0111] **실시예 5. in vitro 막장벽능 평가 시험**

[0112] 분화된 상피세포로 구성된 단층의 막강도는 단층을 Hank's Balanced Salts Solution (HBSS, Welgene, Daegu, Korea)으로 10분간 부드럽게 씻어준 다음 epithelial volt-ohm meter (EVOM; World precision Instruments, Berlin, Germany)를 이용하여 TEER (transepithelial electrical resistance (TEER; Ω cm^2) 값을 구하여 비교 평가하였다. 먼저, 6-well plate에 장착한 24 mm 폴리카보네이트 트랜스웰 필터 (6-well plate, pore size 0.4 μm, 표면적 4.67 cm^2, corning, NY, USA)상에 표준 조건 (5% CO_2 및 37℃를 포함하는 가습 분위기) 하에서 10% 열 비활성화된 FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 DMEM에서 배양해온 인간 대장암 CaCO-2 세포주를 3.75 x 10^5 cells/well의 밀도로 접종하였다. 3 일마다 배지 (DMEM, 10% 소혈청 함유)를 교체하면서 일정시간 간격으로 EVOM을 사용해 제시된 측정법에 따라 TEER을 측정하였다. TEER 값이 점차적으로 증가하여 ₃ 1200 Ω㎠ 에 도달하면 (₃ 3주) 세포가 완전히 분화되어 막장벽이 완성되었다 판단하고 이후 실험을 진행하였다.

[0113] CaCO-2 단층이 완전히 분화되었을 때, 이와는 별도로 쥐의 대식세포 RAW 264.7 세포주를 6-well plate에 8.5 x 10^5 cells/well로 파종하였다. 24 시간 후, 리포폴리사카라이드 (LPS) 100 ng/ml를 5 시간 동안 처리하여 염증반응을 유도한 후 전염증성 사이토카인이 생성되어 함유되어 있는 배양 상등액을 수집하여 이를 완전히 분화된 Caco-2 단층에 3 시간 처리하여 막 손상을 유도하였으며 이때 막손상의 정도는 CaCO-2 단층을 HBSS로 10 분간 헹군 후 TEER을 측정하여 평가하였다.

[0115] **실시예 6. 염증성 사이토카인 전구체 (IL-6, TNF-a) 분석 (ELISA)**

[0116] IL-1 검출을 위해, 마우스 유래의 RAW 264.7 대식세포를 2.5X10^5 cells/well로 24-well 조직 배양 플레이트에 접종하고 밤새 배양하였다. 부데소니드 용액 또는 리포좀의 항염증 효과를 평가하기 위해 이들을 2시간 동안 세포에 적용하였다. 그 후 신선한 배지를 다시 공급한 후 LPS를 100 ng/ml의 농도로 가해 6시간 동안 처리하였다. 세포 상등액 중 IL-6 농도는 R&D Systems Inc.의 murine IL-6 Quantikine® enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용해 제조사의 지침에 따라 정량하였다.

[0117] TNF-α 검출을 위해, RAW 264.7 세포를 10^6 cells/well로 6-well plate에 접종하고 부데소니드, 리포좀 분산액을 각각 처리하여 2시간 방치하였다. 이어서 세포를 떼어 DMEM 배지로 세척 후 다시 10^4 cells/well 로 96-well plate에 재접종하고 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후 상등액을 취하여 R&D Systems Inc.의 TNF-α ELISA kit를 이용해 제조사의 지침에 따라 각 군의 TNF-α 생성량을 측정하였다.

[0119] **실시예 7. 급성 대장염 마우스 모델에서의 염증 완화 효과 평가**

[0120] 마우스 (웅성 C57BL/6NCrljOri mice, 7 주령) 24 마리를 4 군으로 나누고 그룹 2-4군에는 급성 대장염 (colitis)를 유도시키기 위해 멸균한 음용수에 2%로 녹인 dextran sulfate sodium (DSS, MP Biomedicals, Solon, OH)를 실험 0일부터 실험 4일째 되는 날까지 5 일간 공급하였으며 동기간 동안 그룹 1 (음성 대조군)에는 DSS를 넣지 않은 멸균 음용수를 공급하였다. 그룹 1-4 모두 day 6부터는 다시 정상 멸균 음용수를 공급하였

다. 실험 3일째되는 날부터 시작하여 7일째 되는 날까지 그룹 1, 2는 5% 덱스트로즈 용액, 그룹 3은 부데소니드, 그룹 4는 리포좀을 위관영양법으로 1일 1회, 총 5회 투여하였다. 실험 9일째 되는 날 각 마우스로부터 안와채혈법에 의해 얻은 혈청을 -20℃에 보관하였다.

[0121] 혈청 중 존재하는 내독소 (endotoxin)의 농도를 측정함에 의해 장점막 장벽능(intestinal barrier permeability)의 손상 및 회복 정도를 평가하였다. 내독소 검출시험은 Pierce LAL chromogenic endotoxin quantitation kit (Thermo scientific, USA)를 이용하여 제조사의 상세한 지침에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 냉동 보관한 혈청을 꺼내 내독소가 없는 물에 50 배 희석한 뒤 microplate well에 50 ㎕ 씩 분주하였다. 37℃ 에서 5 분간 방치 후 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 시약을 50 ㎕ 첨가하고 10 분 후 발색용 기질 100 ㎕ 을 첨가하였다. 다시 6분 후 반응 종말 시약 100 ㎕를 첨가하여 잘 섞은 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 순차 희석한 LPS 표준용액으로 얻은 표준검량선과 비교하여 샘플 중 LPS 농도를 평가하였다.

[0122] 혈청 중 전염증성 사이토카인 검출 시험에 의해 염증반응의 정도를 평가하였다. BD biosciences사의 CBA (cytometric bead array-mouse inflammation kit)를 이용하여 혈청중 사이토카인 (IL-6, IFN-g, TNF-a, IL12p70, IL-10) 및 chemokine (MCP-1)을 검출하였다. 간단히 설명하면, 혈청시료를 제조사가 제공한 희석 용액으로 2 배 희석 후 상온에서 사이토카인 anti-beads와 2시간 배양했다. 그 후 BD bioscience사의 BD FACSARIA Ⅲ를 이용해 CBA 데이터를 얻고 FCAP array 소프트웨어를 이용해 각 샘플의 사이토카인 및 chemokine을 정량하였다.

[0124] **실험예 1. 오메가-3-지방산 삽입이 리포좀의 입자경 및 보관시 크기 변화에 미치는 영향**

[0125] DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)또는 DSPC (1,2- distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 27.5 mg, 콜레스테롤 1.2 mg, 알파 토코페롤 0.9 mg의 3차 부틸 알코올 용액에 a-linolenic acid(ALA, 18:3n-3), eicosapentaenoic acid(EPA, 20:5n-3), docosahexaenoic acid(DHA, 22:6n-3) 또는 크릴 오일 (Neptune Technologies & Bioressources Inc., Quebec, Canada) 을 6 mg 씩 넣어 실시예 1의 방법으로 리포좀을 제조하였다. 제조한 리포좀의 입자경 및 입도 분포를 실시예 2의 방법으로 측정하였다. 또한 제조한 리포좀을 원액 그대로 상온에서 6주까지 보관하며 일정한 시간 간격으로 평균입자경의 변화를 측정하였다.

[0126] 그 결과, 오메가-3-지방산을 삽입하지 않은 리포좀의 경우 주요 PC 성분의 종류에 관계없이 <200 nm의 나노사이즈가 보관기간 내내 일정하게 유지되었지만 오메가-3-지방산 ALA, EPA, DHA 삽입 리포좀의 경우는 시간경과에 따라 리포좀의 입자크기 증대 양상을 보였다. DSPC 리포좀의 경우 ALA, EPA, DHA 삽입시 상온 6주 보관 후 리포좀의 입자크기는 각각 3.9, 6.3 및 9.2배 증가하였다. 상전이온도가 낮은 PC인 DOPC 리포좀 보다는 상전이온도가 높은 PC인 DSPC 리포좀의 경우, 오메가-3-지방산 중에서는 이중결합의 숫자가 증가할 수록 (ALA 3개, EPA 5개, DHA 6개) 더 현저한 입자크기 양상을 보였다 (도 1). 대조적으로, 크릴오일을 동량 삽입시킨 리포좀의 경우는 초기 입자경도 다른 오메가-3-지방산 삽입 리포좀에 비해 매우 작았으며 또한 동일한 보관 조건에서 PC의 종류에 관계없이 리포좀의 크기 증가가 관찰되지 않았다 (도 1).

[0127] 헤드 그룹이 상대적으로 작은 오메가-3-지방산의 꼬깔형 분자 구조로 인해 오메가-3-지방산의 PC 분자 사이에의 삽입은 PC 이중층의 곡률 스트레스 (curvature stress)를 증가시켜 모서리(edge)를 가진, 융합되기 쉬운 리포좀을 형성한다고 생각된다. 한편 크릴 오일의 경우는 DHA, EPA외 DHA 결합형 PC, EPA 결합형 PC, 아스타잔틴 등 여러가지 지용성 성분이 혼합되어 존재하므로 이들의 PC 막중 오메가-3-지방산과 PC 분자 사이의 빈 공간을 적절히 채워주어 곡률 스트레스를 완화시키는 역할을 하는 것으로 생각된다 (도 2A 모식도). EPA 삽입 리포좀 및 크릴오일 삽입 리포좀의 전자현미경 이미지를 얻은 결과 EPA 삽입의 경우에만, 모서리를 가지는 리포좀의 형성과 시간 경과에 따른 이들의 융합(fusion)을 확인하여 이러한 가설이 뒷받침되었다 (도 2B).

[0129] **실험예 2. 크릴오일의 삽입량이 리포좀의 물리화학적 특성에 미치는 영향**

[0130] 실시예 1의 리포좀 제조 과정 첫 단계에서 3차 부틸 알코올에 지질로서 DOPC과 콜레스테롤 및 알파 토코페롤을 27.5:1.2:0.9의 중량비로 혼합하고 이에 크릴 오일을 지질 총량 29.6 mg 당 0, 6, 18, 27, 54, 108 mg 섞어 모두 용해시켜 혼합용액을 얻었다. 이어서 동결건조 하여 3차 부틸 알코올을 증발시킨 후 얻은 지질+크릴 오일 혼합물의 물리적 상태를 일단 관찰한 후, 이어서 실시예 1의 방법으로 수상을 가하여 분산 및 균질화 공정을 거쳐 리포좀을 제조하였다. 제조한 리포좀의 평균 입자경 및 표면 하전을 실시예 2의 방법으로 측정하였다.

[0131] 단순동결건조 후 얻은 지질+크릴 오일 혼합물을 관찰한 결과, 크릴 오일을 27 mg 첨가시까지는 크릴오일 고유의 붉은 색으로 적셔진 지질 파우더의 고체 케이크가 관찰되었으나 54 mg 이상 첨가시는 붉은 색을 띄는 뿌연 액체의 형태로 변화되어 108 mg에서는 지질이 크릴 오일에 모두 용해된 투명한 액체로 관찰되었다. 이어서 리포좀을 제조한 결과, 크릴오일을 27 mg 혼합시까지는 리포좀이 생성되었으나 54 mg 이상 혼합한 경우, 즉 크릴오일에 지질이 용해된 형태로 존재하였던 경우는 지질의 응집체가 형성되었다 (도 3). 제조된 리포좀의 제타전위를 측정한 결과, 크릴오일의 삽입량이 0 ~ 18 mg까지는 제타전위값이 음성으로 절대값이 증가하다가, 18~27 mg에서는 더 이상의 증가는 없었다. 이는 리포좀의 PC막에 끼어들어갈 수 있는 크릴오일의 양이 한정되어 있으며 18~27 mg에서 포화됨을 의미한다 (도 4A). 크릴오일을 0, 6, 또는 18 mg 삽입한 리포좀의 경우 초기 입자크기가 비슷하였고 실온 보관 중 입자 크기 증가 양상도 관찰되지 않아 (도 4B) 이 범위에서의 크릴오일 리포좀의 분산 안정성을 확인하였다.

[0133] **실험예 3. 리포좀의 위장관액 안정성 평가**

[0134] DOPC 27.5 mg, 콜레스테롤 1.2 mg, 알파 토코페롤 0.9 mg의 3차 부틸 알코올 용액에 크릴 오일을 0 또는 18 mg 넣은 혼합물로부터 실시예 1의 방법으로 리포좀을 제조하였다. 또한 크릴오일 47 mg, 알파 토코페롤 0.9 mg에 수상 1 ml를 가한 후 자발적으로 형성된 조분산액을 37℃에서 1 시간동안 수조 형식의 초음파 분산기에서 130 W로 균질화, 다시 수조 형식의 세포 파쇄용 초음파 분산기에서 7 분간 250 W 세기의 초음파 처리하여 크릴오일의 에멀젼을 얻었다. 이는 크릴오일이 오일상의 오메가-3-지방산 성분과 PC결합형 오메가-3-지방산 성분을 둘 다 함유하고 있어서 물에 분산시 자체적으로 에멀젼을 형성할 수 있다는 보고에 근거하여 크릴오일 리포좀과의 비교를 위해 대조군으로 제조하였다.

[0135] 제조한 리포좀 2종 (통상의 리포좀, 크릴 오일 18 mg을 삽입시킨 리포좀) 및 크릴오일 에멀젼 1종을 대상으로, 실시예 3의 방법으로 위장관액 안정성을 시험하였다. 그 결과, 통상의 리포좀은 37°C에 24 시간 방치시까지 인산염 완충액, 인공장액, 인공위액 모두에서 뚜렷한 입자크기의 증가를 보이지 않았다. 크릴오일 에멀젼의 경우는 인산염 완충액 및 인공장액에서는 입자크기의 증가를 보이지 않았지만 인공위액의 경우는 1시간 방치 후 4.3배 증가되어 2시간 후에는 응집체(aggregate)의 형성으로 입자크기 측정이 아예 불가능하였다. 크릴오일 리포좀의 경우는 인공위액에 24 시간 방치 후에야 3.5배의 입자 크기 증가 현상을 보여 크릴 에멀젼에 비해 위장관에서 현저히 안정함을 확인하였다 (도 5).

[0137] **실험예 4. 동결건조 후 리포좀 안정성 평가**

[0138] DOPC 27.5 mg, 콜레스테롤 1.2 mg, 알파 토코페롤 0.9 mg의 3차 부틸 알코올 용액에 크릴오일을 18 mg 넣은 혼합물로 실시예 1의 방법으로 리포좀을 제조하였다. 제조한 리포좀 분산액을 실시예 3의 방법으로 동결건조하여 동결건조된 리포좀 파우더를 얻었으며, 이에 증류수를 가해 바이얼을 손으로 잘 흔들어 복원시켰다 (도 6A). 동결건조 전 및 복원 후 리포좀의 사이즈를 실시예 2의 방법으로 측정한 결과, 동결건조 후 리포좀의 입자크기 증가가 없었고 다분산도도 0.5 이하여서 나노크기의 균일한 리포좀 형태로 쉽게 복원됨을 확인하였다 (도 6B).

[0140] **실험예 5. 부데소니드 제형으로서의 리포좀 평가**

[0141] 실시예 4의 3차 부틸 알코올에 지질 과 크릴오일을 혼합하여 용해시키는 단계에서 DOPC 27.5 mg, 콜레스테롤 1.2 mg, 알파 토코페롤 0.9 mg, 부데소니드 1.5 mg 을 크릴오일 18 mg 또는 DHA 6 mg과 같이 녹인 후 리포좀을 제조하고, 미봉입 부데소니드를 분리 후 실시예 2의 방법에 의해 부데소니드 봉입 리포좀의 입자 크기, 다분산도를 측정하고 실시예 4의 방법에 의해 부데소니드 봉입농도를 측정하였다.

[0142] 다음 표 1은 크릴오일 삽입 리포좀 및 통상적인 리포좀에 부데소니드는 약 95%의 우수한 봉입효율로 봉입되며, 봉입 리포좀의 입자 크기 및 다분산도값은 나노크기의 균일한 리포좀이 형성되었음을 보여준다. 반면 DHA 삽입 리포좀에의 부데소니드 봉입은 약 30%의 낮은 봉입효율을 보였으며 리포좀의 입자 크기도 >500 nm로 현저히 증가하였다. 이상의 결과는 크릴오일 리포좀이 부데소니드 제형으로서 적합함을 보여준다.

표 1

[0144]

리포좀의 조성 (중량비)	budesonide 봉입 농도 (mg/ml)	봉입 효율 (%)	평균 입자경 (nm)	다분산도
DOPC:CHOL:TOCO (27.5:1.2:0.9)	1.44 ± 0.11	96.0±7.3	203±64	0.205±0.079
DOPC:CHOL:TOCO:Krill (27.5:1.2:0.9:18)	1.41 ± 0.09	94.0±6.0	178±22	0.130±0.021
DOPC:CHOL:TOCO:DHA (27.5:1.2:0.9:6)	0.45 ± 0.01	30.0±1.0	630±14	0.300±0.023

[0145] **실험예 6. 리포좀의 in vitro 막장벽능 수복 효과 평가 시험**

[0146] DOPC 27.5 mg, 콜레스테롤 1.2 mg, 알파 토코페롤 0.9 mg의 3차 부틸 알코올 용액에 크릴 오일을 0 또는 18 mg 넣어 실시예 1의 방법으로 통상의 리포좀 및 크릴오일 리포좀 두 종을 제조하였다. 실시예 5의 방법에 따라 CaCO-2의 단층막을 염증성 사이토카인을 함유하는 배지에 의해 막손상을 유도한 직후 배지 1 ml 당 각 리포좀을 2.8 ㎕ 또는 5.6 ㎕ 씩 가하였다. 비교를 위해 배지로 희석한 크릴 오일 DMSO 용액을 크릴 오일 리포좀 2.8 ㎕ 중 크릴 오일 량에 해당하는 크릴 오일량 (50 mg)으로 따로 처리 후 TEER를 측정하였다.

[0147] 그 결과, 염증반응이 유도된 대식세포 상층액 처리는 단층막을 손상시켜 TEER 값을 원래 값의 40% 이하로 감소시켰고, 통상의 리포좀 및 크릴오일 리포좀은 둘다 각각 TEER 값을 리포좀 용량 의존적으로 회복시켰으며, 두 종의 리포좀 중에서는 크릴오일 리포좀의 TEER 회복 효과가 더 우수하였다. 이러한 TEER 회복 효과는 크릴 오일 용액의 경우에도 일부 관찰되어, 막장벽능 수복 효과가 리포좀의 PC 및 크릴 오일 둘다에 의해서 이루어짐을 확인하였다 (도 7).

[0149] **실험예 7. 크릴오일 리포좀의 in vitro 항염증효과 비교 평가**

[0150] 실험예 6에서와 같은 조성으로 실시예 1의 방법으로 통상의 리포좀 (oil-free)및 크릴오일 리포좀 2 종을 제조하였다. 실시예 6의 방법으로 실험을 실시하되 250 nM 부데소니드, 통상의 리포좀 분산액 5.6 ml 또는 크릴오일 리포좀 분산액 5.6 ㎕을 각각 2시간 전처리한 후, RAW 264.7 대식세포에 LPS를 100 ng/ml의 농도로 6시간 처리한 후 전염증성 사이토카인인 IL-6 및 TNF-α의 생성농도를 측정한 결과, 도 8에 나타난 것처럼 크릴오일 리포좀은 부데소니드와 유사한 정도로 IL-6 및 TNF-α의 생성량을 감소시켰다. 통상의 리포좀은 같은 농도에서 IL-6 생성농도에 영향을 미치지 않아 이러한 전염증성 사이토카인 생성 억제 효과는 리포좀에 삽입된 크릴오일에 의한 것임을 확인 할 수 있었다.

[0152] **실험예 8. 염증성 장질환 마우스 모델에서의 크릴 오일 리포좀의 염증반응 완화 효과 평가**

[0153] DOPC 27.5 mg, 콜레스테롤 1.2 mg, 알파 토코페롤 0.9 mg, 크릴 오일 18 mg 의 혼합물로부터 실시예 1의 방법으로 크릴오일 리포좀을 총지질 29.6 mg/ml, 크릴 오일 18 mg/ml의 농도로 제조하였다. 또한 부데소니드 용액의 단독투여를 위해 수상으로 5% 덱스트로스를, 계면활성제로 1% CMC(carboxymethylcellulose), 유상으로 0.05 %의 대두유를 사용하여 부데소니드 수중유형 유탁액 (0.53 ㎍/ml)을 제조하였다.

[0154] 실시예 7의 방법으로 2% DSS에 의해 급성대장염을 유도한 마우스(female C57BL/6NCrljOri mice, 7 주령)에 day 3부터 day 7까지 그룹 1, 그룹 2은 5% 덱스트로즈 용액, 그룹 3은 부데소니드로 0.4 mg /kg의 부데소니드 유탁액, 그룹 4는 크릴 리포좀을 7.6 ml/kg을 위관영양법으로 1일 1회 투여하였다.

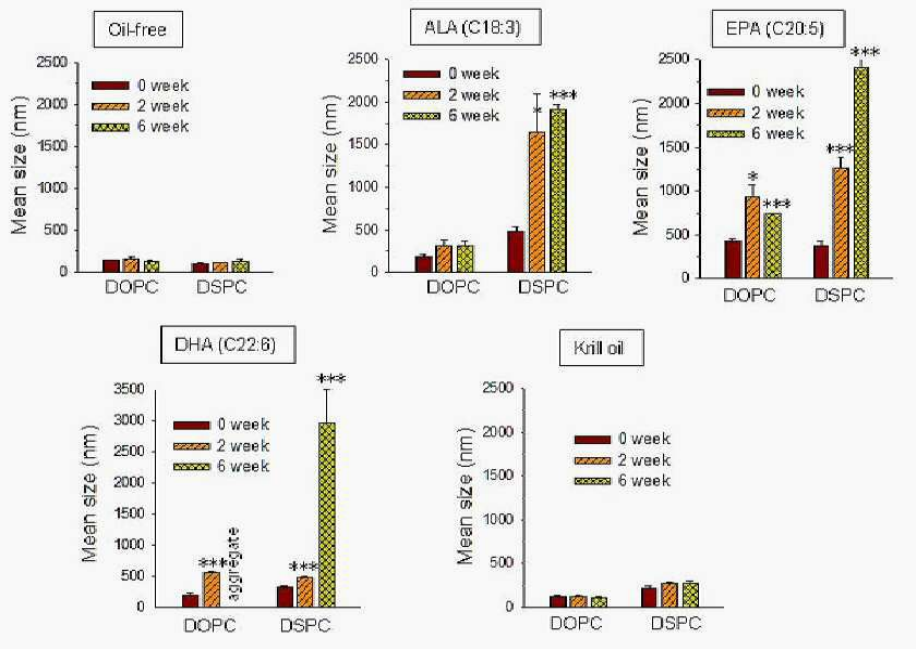
[0155] Day 9에 마우스들로부터 얻은 혈청시료를 대상으로, 내독소혈증 테스트를 수행한 결과, DSS에 의해 급성 대장염이 유도되지 않은 정상군 (음성대조군)에서는 혈청 중 LPS가 검출되지 않았으나 DSS에 의해 급성 대장염이 유도된 2군 (양성 대조군)에서는 검출되어 장점막 손상에 의한 내독소 유입을 확인할 수 있었다. 크릴 오일 리포좀을 경구투여한 군에서는 혈청 중 LPS 농도가 현저히 감소되어 나타났고 ($p<0.001$) 그 감소된 정도는 부데소니드 투여군보다도 더 컸다(도 9). 이는 크릴오일 리포좀의 경구투여가 염증에 의해 손상된 장점막능을 수복시키는 효과가 있음을 시사한다.

[0156] 각 혈청샘플 중 사이토카인(IL-6, IFN-g, TNF-a, IL12p70, IL-10) 및 chemokine (MCP-1)을 정량한 결과, 크릴

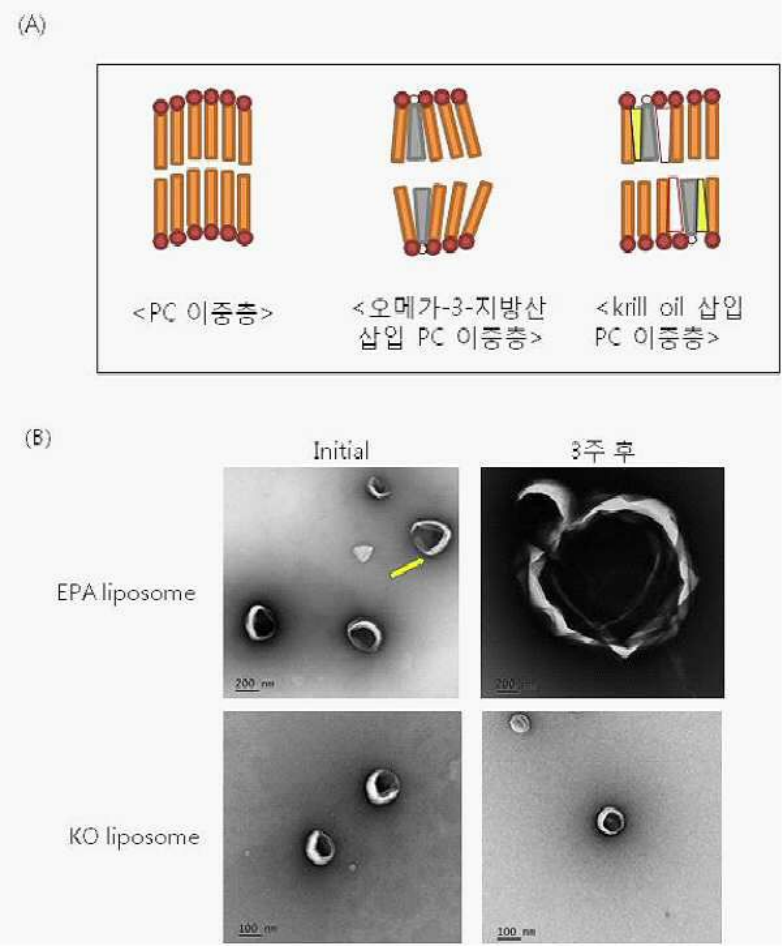
오일 리포좀 투여군에서의 IL-6 와 TNF-a의 혈청 중 농도는 양성 대조군에서의 그것과 비교시 유의성있게 감소하였으며 부데소니드 투여군과 비교시 감소 정도는 유사하거나 더 컸다. MCP-1, IFN-g 의 경우도 유의성은 없었으나 크릴오일 리포좀 투여군에서 감소되었다 (도 10). 이상의 결과는 크릴오일 삽입 리포좀을 경구투여시 염증성장질환에 의해 나타나는 각종 염증 반응을 효과적으로 완화시킬 수 있음을 시사한다.

도면

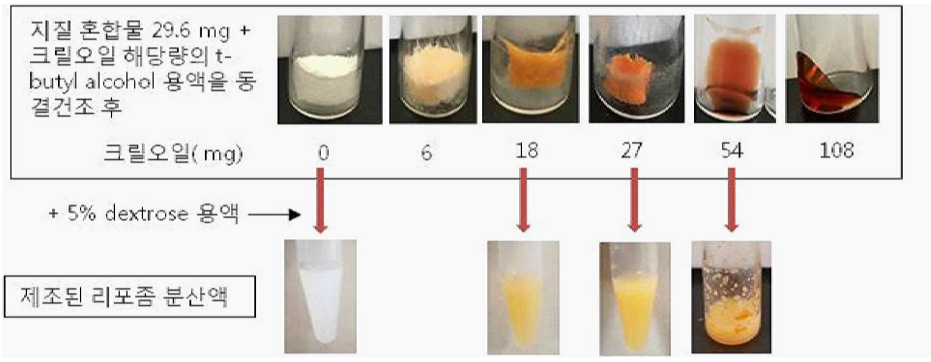
도면1



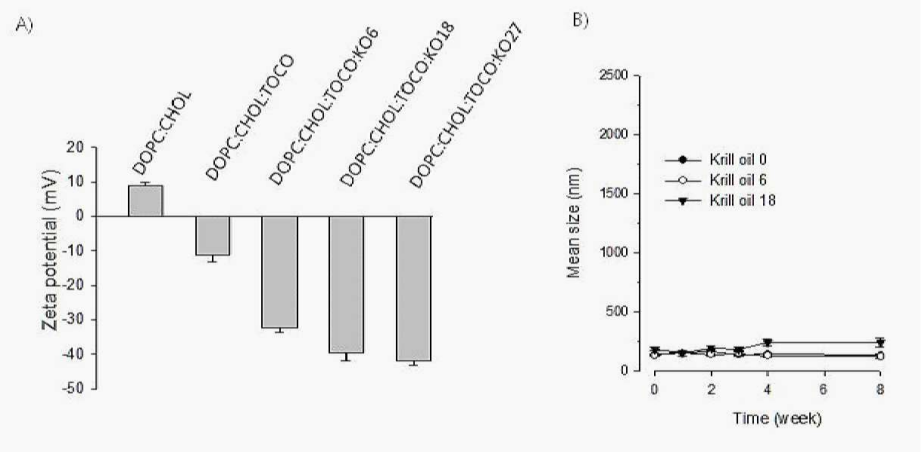
도면2


(A)
<PC 이중층>
<오메가-3-지방산 삽입 PC 이중층>
<krill oil 삽입 PC 이중층>
(B)
Initial
3주 후
EPA liposome
KO liposome
200 nm
100 nm

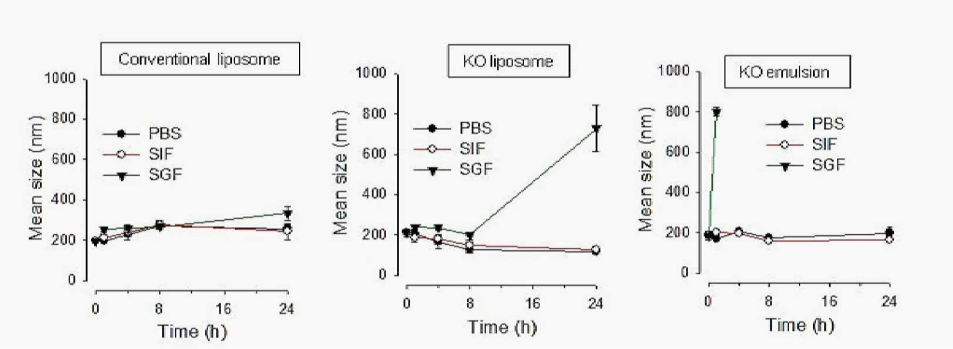
도면3


지질 혼합물 29.6 mg + 크릴오일 해당량의 t-butyl alcohol 용액을 동결건조 후
크릴오일(mg)
0
6
18
27
54
108
+ 5% dextrose 용액
제조된 리포좀 분산액

도면4



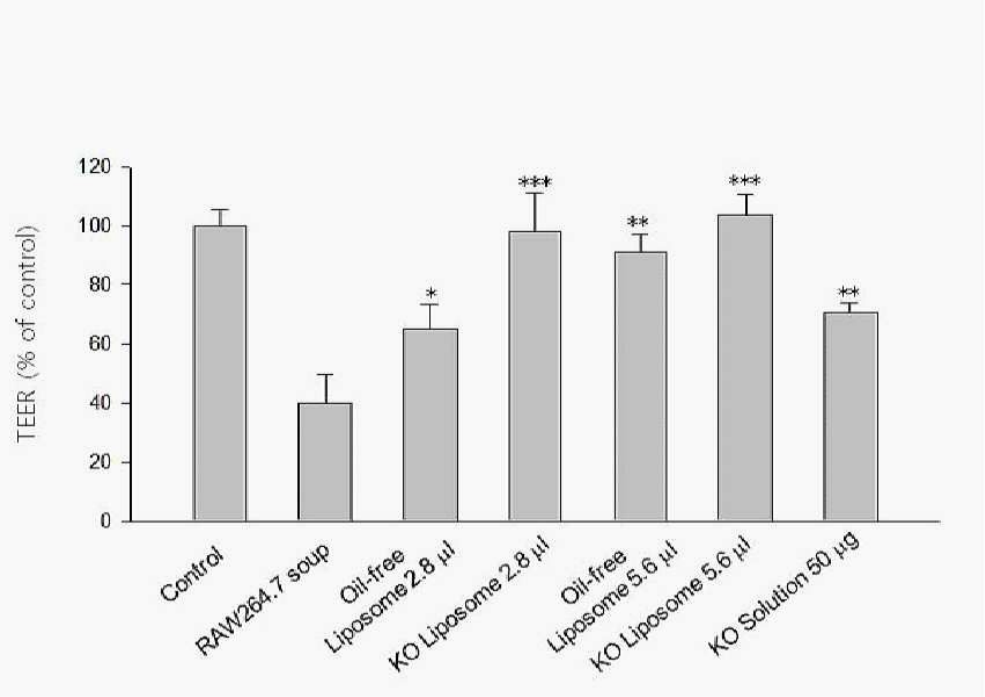
도면5



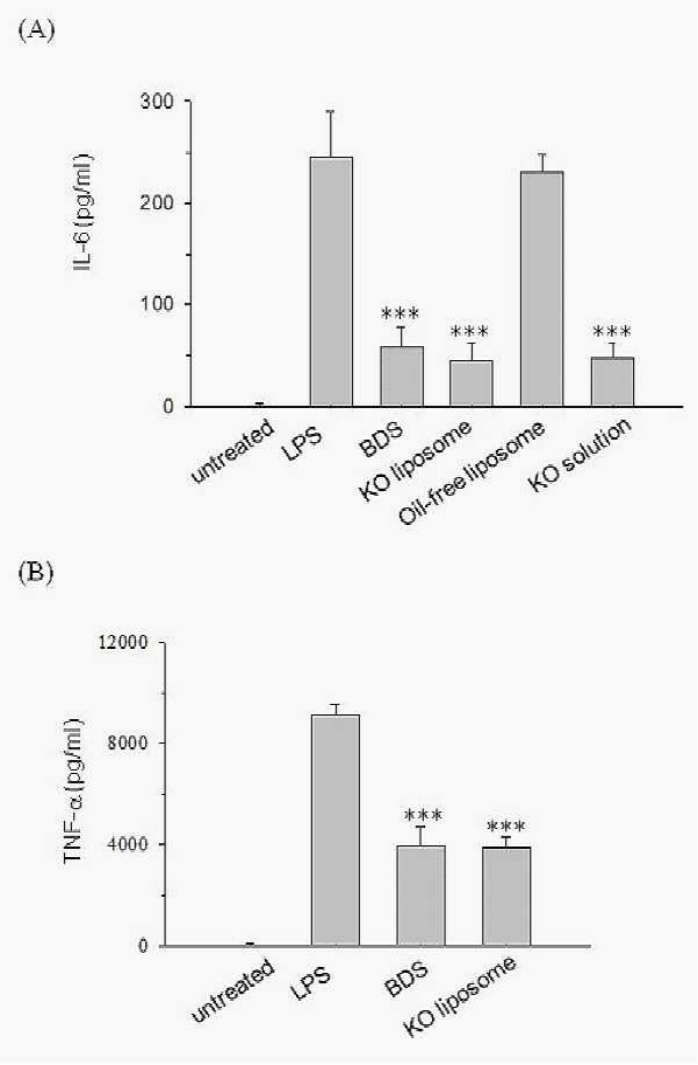
도면6

제조 조건	평균입자경	다분산도(PI)
실시예 2의 균질화 공정을 거쳐 제조한 리포좀 분산액	217 ± 23	0.234 ± 0.030
리포좀 분산액을 동결건조하여 얻은 파우더에 물을 첨가하여 흔든 후	190 ± 22	0.301 ± 0.023

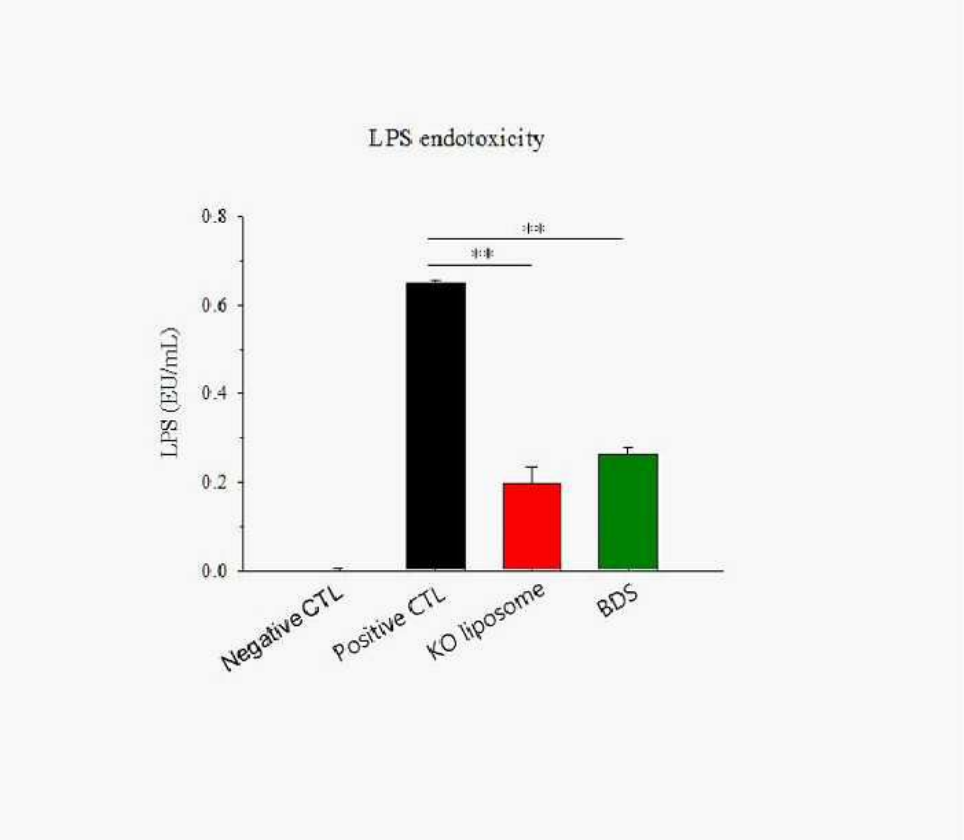
도면7


TEER (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
*
***
**
***
**
Control
RAW264.7 soup
Oil-free Liposome 2.8 μl
KO Liposome 2.8 μl
Oil-free Liposome 5.6 μl
KO Liposome 5.6 μl
KO Solution 50 μg

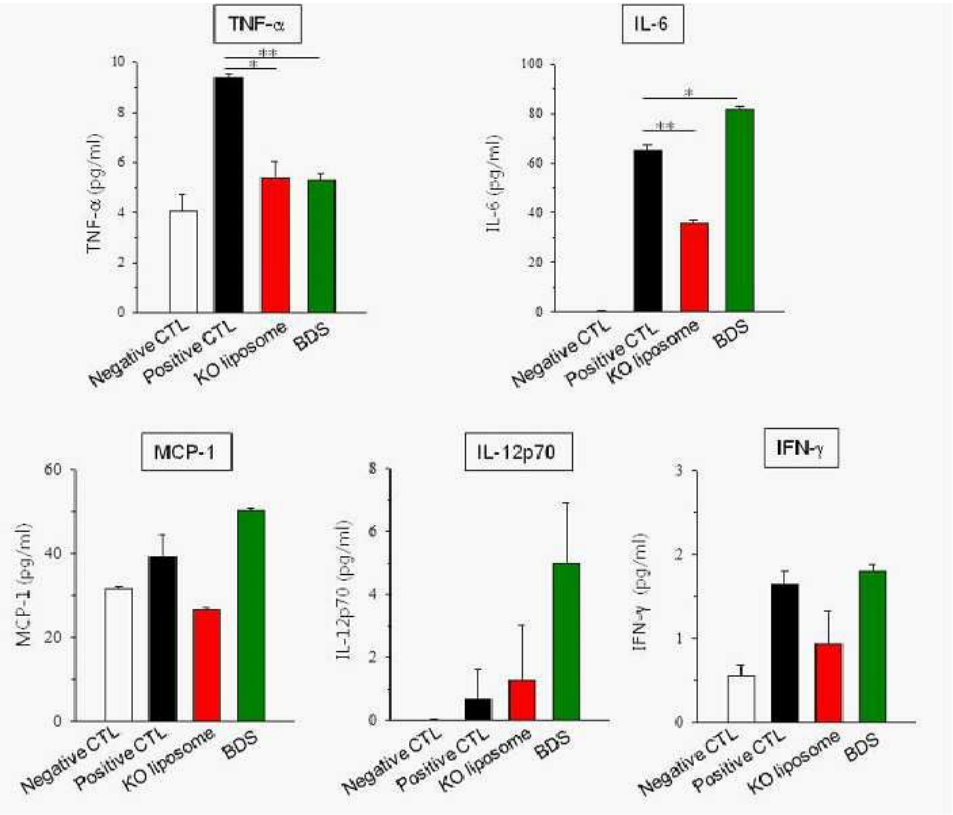
도면8


(A)
IL-6 (pg/ml)
300
200
100
0
***
***
***
untreated
LPS
BDS
KO liposome
Oil-free liposome
KO solution
(B)
TNF-α (pg/ml)
12000
8000
4000
0
***
***
untreated
LPS
BDS
KO liposome

도면9


LPS endotoxicity
LPS (EU/mL)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
Negative CTL
Positive CTL
KO liposome
BDS

도면10


TNF-α
TNF-α (pg/ml)
IL-6
IL-6 (pg/ml)
MCP-1
MCP-1 (pg/ml)
IL-12p70
IL-12p70 (pg/ml)
IFN-γ
IFN-γ (pg/ml)
Negative CTL
Positive CTL
KO liposome
BDS