



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월03일
(11) 등록번호 10-1752999
(24) 등록일자 2017년06월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/47 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/4725 (2006.01) A61K 36/47 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/47 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0036617
(22) 출원일자 2016년03월28일
심사청구일자 2016년03월28일
- (56) 선행기술조사문헌
US06171581 B1*
Špela Zupancic et al, 'Design and Development of Novel Mitochondrial Targeted Nanocarriers, DQAsomes for Curcumin Inhalation', Mol. Pharmaceutics, 2014, Vol.11, No.7, 2334-2345*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
최준식
대전광역시 유성구 엑스포로123번길 65-38, 203동 1102호(도룡동, 스마트시티 아파트)
- 박혜원
대전광역시 중구 평촌로 111, 101동 2001호
- (74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 3 항

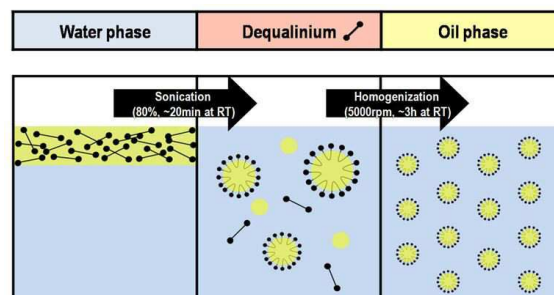
심사관 : 홍수민

(54) 발명의 명칭 디쿠알리니움 에멀션, 이의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 디쿠알리니움 에멀션, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 종래 디쿠알리니움의 리포솜 형태(DQAsome)에 비해 에멀션 형태를 간단히 제조할 수 있고, 에멀션의 안정성이 장기간 유지되며, 소수성 약물을 탑재 가능하고, 미토콘드리아 표적 효율이 종래 DQAsome에 비해 현저히 향상되는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/4725 (2013.01)

A61K 36/47 (2013.01)

A61K 47/488 (2013.01)

A61K 47/48815 (2013.01)

A61K 9/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2064737

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)

연구과제명 합성 및 생체고분자를 이용한 치료용 생체모사 고분자 나노입자 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

디쿠알리니움(Dequalinium) 0.5-1.0 중량%;

캐스터 오일(castor oil) 1-4 중량%; 및

정제수 잔량;을 포함하고, 100-200 nm 크기의 구형입자를 형성한 디쿠알리니움 에멀션을 유효성분으로 포함하는 자궁경부암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

디쿠알리니움(Dequalinium) 0.5-1.0 중량%;

캐스터 오일(castor oil) 1-4 중량%; 및

정제수 잔량;을 포함하고, 100-200 nm 크기의 구형입자를 형성한 디쿠알리니움 에멀션을 포함하는 미토콘드리아 표적성 약물전달체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 디쿠알리니움 에멀션 입자 내부에 커큐민, 파클리탁셀(Paclitaxel) 및 빈크리스틴(vincristine)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 소수성 약물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 표적성 약물전달체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디쿠알리니움 에멀션, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 용도로는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 약물전달체로서 사용될 수 있다.

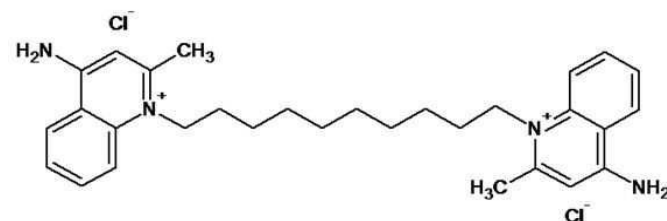
배경 기술

[0003] 환경과 사회적인 변화에 따른 바이오 의학 분야의 기술은 세대가 지날수록 더욱 발전해나가고 있다. 최근에는 치료용 유전자 전달체나 약물 전달체의 개발이 활발히 진행되고 있으며, 그 중 에멀션 시스템이 새로운 약물 전달체로서 다양하게 개발되고 있다.

[0005] 에멀션은 두 가지의 열역학적으로 불안정한 화합되지 않는 액체가 두 가지의 액체 중 한 가지의 액체에 분산된 상태로 존재하는 것을 의미한다. 에멀션은 유상, 수상, 유화제 총 3가지로 구성된다. 유화제는 친유기와 친수기를 동시에 갖는 양친매성 물질이며, 섞이지 않는 유상과 수상 각각의 계면에 흡착된다. 유상에 배치된 친유기와 수상에 배치된 친수기는 계면의 자유에너지를 낮추고, 결국 낮아진 계면 자유에너지와 계면 장력에 의해 분산 입자의 안정도가 높아져 유상과 수상이 섞이게 된다. 이렇게 다양한 상을 구성할 수 있는 에멀션은 물리 화학적 성질과 크기 조절이 용이하다. 특히, 에멀션의 유상에는 다양한 소수성 항암제뿐만 아니라 난용성 약물이나 유전자의 크기에 상관없이 다량의 치료용 유전자를 탑재시킬 수 있다는 장점이 있다.

[0007] 에멀션의 종류는 대표적으로 워터 인 오일(W/O), 오일 인 워터(O/W) 유형이 있다. 먼저, W/O 에멀션은 유상이 연속상(continuous phase), 수상이 분산상(dispersed phase)으로 존재한다. 유상이 연속상일 때는 에멀션의 안정도에 영향을 미치는 정전기적 반발력이 낮아 상의 분리가 빠르게 발생한다고 알려져 있다. 또한, 많은 양의 유상과 유화제가 필요하기 때문에 제조비용이 많이 든다는 단점이 있는 반면, O/W 에멀션은 유상이 분산상으로 존재하고 수상이 연속상으로 존재하여 정전기적 반발력이 높게 작용한다. 그러므로 에멀션의 안정도가 높아지고 상의 분리가 상당히 천천히 진행되어 보다 효율적인 약물 전달체로서의 응용이 가능하다.

[0009] 본 발명에서 사용한 디쿠알리니움(dequalinium)은 리포솜(liposome) 형태의 DQAsome™으로 응용되어 다양한 유전자 전달 시스템으로 주로 연구되어왔다. 디쿠알리니움은 기능적으로 항균, 항암제로 쓰이며 말라리아 치료제로 사용되고, 미토콘드리아에 효과적으로 위치하는 것으로 알려진 화합물이다. 또한, 구조적으로는 열개의 소수성 메틸렌 체인에 의해 두 개의 친수성 퀴날디니움(quinaldinium) 유닛이 연결된 bolaform 형태를 갖고 있다. 디쿠알리니움은 퀴날디니움의 아미드기가 양이온을 띄는 cationic bola-amphiphile으로, bolaform surfactant로도 알려져 있어, 에멀션의 유화제로 효율적인 역할을 할 수 있을 것이다.



[0010]

[0012] 오일상(Oil phase)은 리시놀레산(ricinoleic acid)이 주성분인 식물성 캐스터 오일(castor oil)을 사용하였다. 캐스터 오일은 연 노란빛의 식물성 기름으로, 점도가 매우 높은 기름 중 하나이다. 미국 FDA(Food and Drug Administration)에서 안전하고 효과적인 식품 첨가 물질로 분류되어 있는 캐스터 오일은 순수한 chemical state로써 제공되는 현대약품들의 첨가제로 많이 사용되고 있어 효율적인 에멀션 시스템으로 발전 가능할 것으로 기대하였다.

[0014] 커큐민(Curcumin)은 울금(curcuma longa Linn)의 뿌리에서 추출된 물질로, 구조적으로는 링 구조의 페놀과 불포화의 카보닐기를 포함하는 소수성의 폴리페놀 물질이다. 또한, 항산화와 항염증 작용을 하며 항종양, 항아밀로이드 작용을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 소수성의 커큐민은 수용액에 쉽게 용해되지 않는 반면, 오일상(oil phase)에 쉽게 용해되어 미토콘드리아 표적의 약물 전달이 가능하게 될 것이다.

[0016] 본 발명의 발명자들은 종래 디쿠알리니움의 리포솜 형태(DQAsome)에 비해 에멀션 형태를 간단히 제조할 수 있고, 에멀션의 안정성이 장기간 유지되며, 소수성 약물을 탑재 가능하고, 종래 DQAsome에 비해 미토콘드리아 표적 효율이 현저히 향상됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0018] (특허문헌 0001) 미국공개특허 2008/0206155A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은 디쿠알리니움 에멀션을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 다른 목적은 디쿠알리니움 에멀션의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 목적은 소수성 약물 탑재 디쿠알리니움 에멀션의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0025] 본 발명의 다른 목적은 디쿠알리니움 에멀션을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0027] 본 발명의 또 다른 목적은 제1항의 디쿠알리니움 에멀션을 포함하는 약물전달체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0029] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0030] 본 발명은 디쿠알리니움(Dequalinium), 캐스터 오일(castor oil) 및 정제수를 포함하는 디쿠알리니움 에멀션을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 디쿠알리니움 클로라이드, 캐스터 오일, 증류수의 순서로 정량하여 용기에 넣는 단계(단계 1);

[0033] 15-30℃에서 10-30분 동안 초음파처리하는 단계(단계 2); 및

[0034] 15-30℃에서 2-4시간 동안 균질기(homogenizer)로 균질화하는 단계(단계 3);를 포함하는 디쿠알리니움 에멀션의 제조방법을 제공한다.

[0036] 나아가, 본 발명은 디쿠알리니움 클로라이드, 캐스터 오일, 소수성 약물의 순서로 정량하여 용기에 넣고 혼합하는 단계(단계 1);

[0037] 단계 1에 증류수를 첨가하고 15-30℃에서 10-30분 동안 초음파처리하는 단계(단계 2); 및

[0038] 15-30℃에서 2-4시간 동안 균질기(homogenizer)로 균질화하는 단계(단계 3);를 포함하는 소수성 약물 탑재 디쿠알리니움 에멀션의 제조방법을 제공한다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 디쿠알리니움 에멀션을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 여기서, 상기 암은 자궁경부암, 간암, 위암, 유방암, 폐암, 뇌암, 신경교종, 전립선암, 자궁암, 피부암 등일 수 있다.

[0042] 나아가, 본 발명은 상기 디쿠알리니움 에멀션을 포함하는 약물전달체를 제공한다. 상기 약물전달체는 미토콘드리아 표적성인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0044] 종래 디쿠알리니움의 리포솜 형태(DQAsome)에 비해 에멀션 형태를 간단히 제조할 수 있고, 에멀션의 안정성이 장기간 유지되며, 소수성 약물을 탑재 가능하고, 미토콘드리아 표적 효율이 종래 DQAsome에 비해 현저히 향상되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1에 본 발명에 따른 디쿠알리니움 에멀션(DQE)의 제조방법 개략도를 나타내었다.

도 2는 실시예 1-7에서 제조한 디쿠알리니움 에멀션(DQE)의 입자 직경을 측정한 그래프이다.

도 3은 비교예 1(Control Emulsion), 비교예 2(DQAsome) 및 실시예 6(DQE10-3%)의 제타 전위 값을 측정한 그래프이다.

도 4는 실시예 1-7에서 제조한 DQEmulsion의 입자 크기 변화를 3개월 동안 측정한 그래프이다.

도 5는 실시예 5(DQE10-1%) 및 실시예 6(DQE10-3%)에서 제조한 에멀션 입자의 모양과 크기를 원자간력 현미경으로 측정한 이미지이다((a): 실시예 5(DQE10-1%), (b): 실시예 6(DQE10-3%)).

도 6은 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션 시료를 투과 전자현미경으로 촬영한 이미지이다.

도 7은 실시예 5(DQE10-1%), 실시예 6(DQE10-3%), 비교예 1(control emulsion) 및 비교예 2(DQAsome)의 처리 농도별 세포 생존도를 측정한 그래프이다((a): HeLa 세포, (b): HepG2 세포, (c): HEK 293 세포, (d): NIH 3T3 세포).

도 8은 공초점현미경으로 관찰한 이미지이다. 도 8에서 비교예 2(DQAsome) 및 실시예 6(DQE10-3%)의 에멀전은 초록형광(CF, Carboxyfluorescein)을 나타내고, 세포핵은 파란형광(bisbenzimidazole H 33342 trihydrochloride), 미토콘드리아는 빨간형광(MitoTracker)으로 나타난다.

도 9(a)는 각각 커큐민을 1, 3 및 5mg 포함한 실시예 9-11에서 제조한 에멀션의 입자 크기를 측정한 그래프이다.

도 9(b)는 각각 커큐민을 1, 3 및 5mg 포함한 실시예 9-11에서 제조한 에멀션의 커큐민 탑재 효율을 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0049] **디쿠알리니움 에멀션**

[0050] 본 발명은 디쿠알리니움(Dequalinium), 캐스터 오일(castor oil) 및 정제수를 포함하는 디쿠알리니움 에멀션을 제공한다. 상기 디쿠알리니움은 에멀션 입자를 형성하는 역할을 하고, 캐스터 오일은 이의 안정성을 향상시키는 역할을 한다.

[0051] 구체적으로, 디쿠알리니움(Dequalinium) 0.5-1.0 중량%; 캐스터 오일(castor oil) 1-4 중량%; 및 정제수 잔량을 포함할 수 있다. 만약, 디쿠알리니움(Dequalinium)이 0.5 중량% 미만일 경우 균질하지 못한 에멀션이 형성되는 문제가 있고, 1.0 중량% 초과일 경우 안정성이 감소하는 문제가 있을 수 있다. 만약, 캐스터 오일이 1 중량% 미만일 경우 에멀전 형성이 저하되는 문제가 있을 수 있고, 4 중량% 초과일 경우 에멀전 형성이 저하되는 문제가 있을 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 디쿠알리니움 에멀션은, 에멀션 입자 내부에 소수성 약물을 더 포함할 수 있다. 상기 소수성 약물의 예로는 커큐민, 파클리탁셀(Paclitaxel), 빈크리스틴(vincristine) 등을 들 수 있다.

[0054] 상기 소수성 약물은 디쿠알리니움 에멀션 총 중량에 대해 0.01-0.05 중량% 포함될 수 있다. 만약, 소수성 약물의 함량이 0.05% 초과일 경우 탑재 효율이 저하되는 문제가 있을 수 있다.

[0056] 본 발명에 따른 디쿠알리니움 에멀션은 미토콘드리아 표적성인 것을 특징으로 한다. 종래 디쿠알리니움의 리포솜 형태(DQAsome)에 비해, 본 발명에 따른 디쿠알리니움 에멀션은 미토콘드리아 표적 효율이 현저히 향상되는 결과를 나타낸다(실험예 6 및 도 8 참조).

[0058] **디쿠알리니움 에멀션의 제조방법**

- [0059] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 디쿠알리니움 에멀션의 제조방법을 제공한다.
- [0060] 디쿠알리니움 클로라이드, 캐스터 오일, 증류수의 순서로 정량하여 용기에 넣는 단계(단계 1);
- [0061] 15-30℃에서 10-30분 동안 초음파처리하는 단계(단계 2); 및
- [0062] 15-30℃에서 2-4시간 동안 균질기(homogenizer)로 균질화하는 단계(단계 3).
- [0064] 상기 제조방법은 단계 3 이후에 여과 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 디쿠알리니움 클로라이드, 캐스터 오일, 증류수의 순서로 정량하여 용기에 넣는 단계이다.
- [0068] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 15-30℃에서 10-30분 동안 초음파처리하는 단계이다. 여기서, 상기 초음파 처리의 세기는 10-30 kHz, 바람직하게는 15-25 kHz, 특히 바람직하게는 18-22 kHz 일 수 있다.
- [0070] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 3은 15-30℃에서 2-4시간 동안 균질기(homogenizer)로 균질화하는 단계이다. 여기서, 균질기는 3000-7000rpm 작동조건을 사용할 수 있다.
- [0072] **소수성 약물 탑재 디쿠알리니움 에멀션의 제조방법**
- [0073] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 소수성 약물 탑재 디쿠알리니움 에멀션의 제조방법을 제공한다.
- [0074] 디쿠알리니움 클로라이드, 캐스터 오일, 소수성 약물의 순서로 정량하여 용기에 넣고 혼합하는 단계(단계 1);
- [0075] 단계 1에 증류수를 첨가하고 15-30℃에서 10-30분 동안 초음파처리하는 단계(단계 2); 및
- [0076] 15-30℃에서 2-4시간 동안 균질기(homogenizer)로 균질화하는 단계(단계 3).
- [0078] 상기 제조방법은 단계 3 이후에 여과 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 약물 탑재 에멀션의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 디쿠알리니움 클로라이드, 캐스터 오일, 소수성 약물의 순서로 정량하여 용기에 넣고 혼합하는 단계이다.
- [0082] 본 발명에 따른 약물 탑재 에멀션의 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 단계 1에 증류수를 첨가하고 15-30℃에서 10-30분 동안 초음파처리하는 단계이다. 여기서, 상기 초음파 처리의 세기는 10-30 kHz, 바람직하게는 15-25 kHz, 특히 바람직하게는 18-22 kHz 일 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 약물 탑재 에멀션의 제조방법에 있어서, 상기 단계 3은 15-30℃에서 2-4시간 동안 균질기(homogenizer)로 균질화하는 단계이다. 여기서, 균질기는 3000-7000rpm 작동조건을 사용할 수 있다.
- [0086] **암 예방 또는 치료용 약학적 조성물**
- [0087] 본 발명은 상기 디쿠알리니움 에멀션을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 디쿠알리니움은 항암제 등으로 쓰이는 화합물이다.
- [0088] 여기서, 상기 암은 자궁경부암, 간암, 위암, 유방암, 폐암, 뇌암, 신경교종, 전립선암, 자궁암, 피부암 등일 수 있다.
- [0090] **약물전달체**
- [0091] 본 발명은 상기 디쿠알리니움 에멀션을 포함하는 약물전달체를 제공한다. 디쿠알리니움은 미토콘드리아에 효과적으로 위치하는 것으로 알려진 화합물이다.
- [0092] 여기서, 본 발명에 따른 디쿠알리니움 에멀션은 종래 DQAsome에 비해 미토콘드리아 표적성이 현저히 향상되는 효과가 있다.
- [0094] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0096] **<실시예 1-8> 디쿠알리니움 에멀션(DQE)의 제조**
- [0097] 디쿠알리니움 클로라이드(Dequalinium chloride)의 농도와 캐스터 오일(castor oil) 함량에 따른 에멀션 형성의 차이를 확인하기 위해 디쿠알리니움 클로라이드와 캐스터 오일을 이용해 제조하였다(조성은 하기 표 1 참조).

디쿠알리니움 클로라이드, 캐스터 오일, 증류수의 순서로 20ml 유리시약병에 정량하여 넣었다. 15-20분간 초음파처리(Bath type)한 후, 균질기(homogenizer) (Polytron-PT3100, KINEMATICA Inc. Bohemia, USA)를 사용하여 3시간 이상 상온에서 균질화하였다. 제조한 DQEmulsion (Dequalinium Emulsion, DQE)은 0.8 μ m 여과장치로 여과하여 상온에서 보관하였다.

도 1에 본 발명에 따른 디쿠알리니움 에멀션(DQE)의 제조방법 개략도를 나타내었다.

각 농도의 디쿠알리니움과 캐스터 오일의 함량에 따라 제조한 에멀션의 입자 크기를 Zetasizer Nano ZS(MALVERN)를 이용해 측정하였다. 그 결과, 디쿠알리니움 8mM 이하는 균질한 에멀션이 형성되지 않았지만, 10mM 이상일 경우, 200nm 내외의 균질한 입자를 갖는 에멀션이 형성되었다. 이러한 결과를 토대로, 디쿠알리니움 10mM에서 캐스터 오일의 함량에 따른 에멀션 입자의 크기를 측정하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

도 2는 실시예 1-7에서 제조한 디쿠알리니움 에멀션(DQE)의 입자 직경을 측정한 그래프이다.

도 2에 나타나 바와 같이, 캐스터 오일의 함량이 증가할수록 에멀션 입자의 크기도 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 3% 이하의 함량에서 200nm 내외의 입자를 형성하였다. 이러한 결과를 통해 실시예 6(DQE10-3%)의 에멀션이 가장 이상적으로 균질한 입자를 형성함을 알 수 있었다.

<실시예 9-11> 커큐민 탑재 디쿠알리니움 에멀션(DQE)의 제조

커큐민(Curcumin)의 농도에 따른 DQEmulsion 형성의 차이를 확인하기 위해 디쿠알리니움 클로라이드(Dequalinium chloride), 캐스터 오일(castor oil), 커큐민의 순서로 20ml 유리시약병에 정량하여 넣은 후 잘 녹을 때까지 와류(vortex)하였다(조성은 하기 표 1 참조). 그 다음, 증류수를 넣어 15-20분간 초음파처리한 후, 균질기(homogenizer)를 사용하여 3시간 이상 상온에서 균질화 하였다. 제조한 DQEmulsion은 0.8 μ m 여과장치로 여과하여 상온에서 보관하였다.

<비교예 1> 대조군 에멀전의 제조

DQEmulsion의 대조군으로 이용한 control emulsion은 IPM(isopropyl myristate), LAS(PEG-8 caprylic/capric glyceride), 레시틴(lecithin)과 증류수의 순서로 20ml 유리시약병에 정량하여 15-20분간 초음파처리한 후, 균질기로 3시간 이상 상온에서 균질화하였다(조성은 하기 표 1 참조). 제조한 control emulsion은 0.8 μ m 여과장치로 여과하여 상온에서 보관하였다.

<비교예 2> 디쿠알리니움 리포솜 (DQAsome™)의 제조

DQEmulsion의 대조군으로 이용한 DQAsome은 알려진 제조 방법을 참고하였다. 메탄올 5ml과 디쿠알리니움 0.0528g을 둥근바닥 플라스크 정량해 넣어 디쿠알리니움을 완전히 녹인 다음 진공 펌프를 이용하여 메탄올 용매를 모두 날려주었다. 그 다음, HEPES buffer (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) (pH7.4, 5mM) 5ml을 넣고 25℃ 이하에서 1시간 동안 초음파처리하였다. 초음파처리가 끝난 후 10,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 용해되지 않은 디쿠알리니움을 제거하였다. 제조한 DQAsome은 0.8 μ m 여과장치로 여과하여 유리시약병에 상온에서 보관하였다.

하기 표 1에 실시예 1-11 및 비교예 1에서 제조한 에멀전의 조성을 나타내었다.

표 1

	함량 (g)				
	디쿠알리니움	캐스터오일	정제수	커큐민	Total

실시예1	DQE6	0.0317 (6mM)	0.1 (1%, w/w)	9.868	X	10
실시예2	DQE8	0.0422 (8mM)		9.857		
실시예3	DQE10	0.0528 (10mM)		9.847		
실시예4	DQE12	0.0633 (12mM)		9.837		
실시예5	DQE10-1%	0.0528 (10mM)	0.1 (1%, w/w)	9.847		
실시예6	DQE10-3%		0.3 (3%, w/w)	9.647		
실시예7	DQE10-5%		0.5 (5%, w/w)	9.447		
실시예8	DQE10-7%		0.7 (7%, w/w)	9.247		
실시예9	DQE-1mg	0.0528 (10mM)	0.3 (3%, w/w)	9.646	0.001 (1mg)	
실시예10	DQE-3mg			9.644	0.003 (3mg)	
실시예11	DQE-5mg			9.642	0.005 (5mg)	
비교예1	Control Emulsion	LAS	IPM	정제수	레시틴	
		0.5	0.1	9.3	0.1	

[0119] <실험예 1> DQEmulsion의 제타 전위 측정

[0120] 가장 이상적으로 균질한 입자를 형성했던 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션 입자의 표면 전하량을 Zetasizer Nano ZS(MALVERN)를 사용해 측정하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0122] 도 3은 비교예 1(Control Emulsion), 비교예 2(DQAsome) 및 실시예 6(DQE10-3%)의 제타 전위 값을 측정한 그래프이다.

[0124] 도 3에 나타난 바와 같이, 비교예 1(control emulsion)의 전하량은 7.6mV, 비교예 2(DQAsome)의 전하량은 55.0mV로 측정되었으며, 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션은 다소 낮은 42.7mV로 측정되었다. 제조한 실시예 6(DQE10-3%)은 양이온성을 갖는 에멀션이라는 것을 확인할 수 있었고, 에멀션이 DQAsome보다 양전하를 더욱 응축한다는 것을 알 수 있었다.

[0126] <실험예 2> DQEmulsion의 흡광도 측정을 통한 디쿠알리니움의 정량

[0127] 제조된 DQEmulsion의 디쿠알리니움 함량을 정량하기 위하여 UV/VIS spectrophotometer(Optizen POP, Mecasys, Korea)를 사용하였다. 디쿠알리니움은 메탄올에 용해시켜 농도별로 준비한 후 325nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 standard curve와 비교하였다. 그 결과, 실상에 1-11의 모든 에멀션이 99%이상 디쿠알리니움을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0129] <실험예 3> DQEmulsion의 물리적 안정성 평가

[0130] 실시예 1-7에서 제조한 DQEmulsion의 물리적 안정성을 확인하기 위해 ELS-Z(Otusuka Electronics, Otsuka, Japan)를 사용해 25℃ 상온에서 3개월 동안 입자의 크기 변화를 측정하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0132] 도 4는 실시예 1-7에서 제조한 DQEmulsion의 입자 크기 변화를 3개월 동안 측정한 그래프이다.

[0134] 도 4에 나타난 바와 같이, 디쿠알리니움 8mM 이하일 때는 시간이 지날수록 큰 형태적 변화를 동반하였다. 반면, 디쿠알리니움 10mM 이상일 때는 입자 크기가 200nm 이하로 큰 크기 변화를 보이지 않았으며, 육안으로 관찰되는 침전물도 확인할 수 없었다. 또한, 캐스터 오일의 함량이 증가할수록 훨씬 더 높은 안정성을 보였으며 3%에서 가장 이상적으로 유지되었다. 따라서 디쿠알리니움 10mM에 캐스터 오일이 3% 함량일 때 가장 균질하고 안정적인 에멀션을 형성함을 확인할 수 있었다.

[0136] <실험예 4> DQEmulsion 입자의 이미지 확인

[0137] 원자간력 현미경 측정

[0138] 제조한 실시예 5(DQE10-1%)와 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션 시료를 유리판에 점적하여 2시간동안 천천히 상온에서 말린 후, 에멀션 입자의 모양과 크기를 원자간력 현미경을 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0140] 도 5는 실시예 5(DQE10-1%) 및 실시예 6(DQE10-3%)에서 제조한 에멀션 입자의 모양과 크기를 원자간력 현미경으로 측정한 이미지이다((a): 실시예 5(DQE10-1%), (b): 실시예 6(DQE10-3%)).

- [0142] 도 5에 나타난 바와 같이, DQE10-1%와 DQE10-3% 모두 균일한 입자를 형성하고 있으나 DQE10-3% 에멀션이 더 균일하며, 크기는 100~200nm로 존재함을 확인할 수 있었다.
- [0144] **투과 전자현미경 측정**
- [0145] 제조한 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션 시료의 입자 내부 구조와 모양을 확인하기 위해 투과 전자현미경을 이용해 확인하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0147] 도 6은 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션 시료를 투과 전자현미경으로 촬영한 이미지이다.
- [0149] 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션은 100~200 nm 크기의 구형 입자를 형성함을 확인할 수 있었다.
- [0151] **<실험예 5> DQEmulsion의 세포 내 독성 확인**
- [0152] DQEmulsion의 농도에 따른 세포 독성을 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 세포는 Human epithelial carcinoma HeLa cell, human embryonic kidney 293 cell, human hepatocellular liver carcinoma HepG2 cell, mouse embryonic fibroblast NIH 3T3 cell을 이용하였다. 96well plate에 well당 10,000마리의 세포를 37℃, 5% CO₂ 에서 배양하였다. 실시예 5(DQE10-1%), 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션은 배양한 세포에 농도별로 처리한 후, 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 각 well에 MTT solution을 처리하여 ELIZA (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용해 570nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0154] 도 7은 실시예 5(DQE10-1%), 실시예 6(DQE10-3%), 비교예 1(control emulsion) 및 비교예 2(DQAsome)의 처리 농도별 세포 생존도를 측정한 그래프이다((a): HeLa 세포, (b): HepG2 세포, (c): HEK 293 세포, (d): NIH 3T3 세포).
- [0156] 도 7에 나타난 바와 같이, HeLa, HepG2 세포에서는 실시예 5(DQE10-1%)와 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션 모두 DQAsome 대비 더 높은 세포 독성을 보인 반면, HEK293, NIH3T3 세포에서는 더 낮은 세포 독성을 보였다. 따라서, 제조한 실시예 5(DQE10-1%), 실시예 6(DQE10-3%) 에멀션이 암세포 주에서 높은 세포 독성을 갖으며 특히 HeLa cell에서 더 높은 세포 독성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.
- [0158] **<실험예 6> DQEmulsion의 공초점 현미경 관찰**
- [0159] 형광표지 DQEmulsion (CF-DQE10-3% 에멀션)의 준비
- [0160] 형광표지 DQEmulsion은 디쿠알리니움 0.0528g, 캐스터 오일 0.3g, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein)(ammonium salt) (이하, 'CF'라 함) 1.12 μ g, 증류수 9.848g의 순서로 20ml 유리시약병에 정량하였다. 15-20분간 초음파처리하고 균질기로 3시간 이상 상온에서 균질화한 후, 제조된 CF-DQEmulsion은 0.8 μ m 여과장치로 여과하여 상온에서 보관하였다.
- [0162] 형광표지 DQAsome (CF-DQAsome)의 준비
- [0163] 메탄올 5ml과 디쿠알리니움 0.0528g를 둥근바닥 플라스크 정량해 넣어 디쿠알리니움을 완전히 녹인 다음, CF 1.12 μ g를 첨가하여 진공 펌프를 이용하여 메탄올 용매를 모두 날려주었다. 그 다음, HEPES buffer (pH7.4, 5mM) 5ml을 넣고 25℃ 이하에서 1시간 동안 초음파 처리하였다. 초음파 처리가 끝난 후 10,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 용해되지 않은 디쿠알리니움을 제거하였다. 제조한 CF-DQAsome은 0.8 μ m 여과장치로 여과하여 유리시약병에 상온에서 보관하였다.
- [0165] 실시예 6(DQE10-3%)에서 제조한 에멀션의 미토콘드리아 표적 약물 전달 효율을 확인하기 위해 HeLa 세포를 이용해 공초점 현미경(LSM5 live configuration vario two VRGB)으로 관찰하였다. 구체적으로, Confocal well(μ -slide 8 well, ibidi, Germany)에 5,000마리/well의 세포를 37℃, 5% CO₂ 에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, CF-DQAsome과 CF-DQE10-3% 에멀션은 0.25 μ g/ μ l로 준비하여 세포에 처리한 후 37℃, 5% CO₂ 에서 4시간 동안 배양하였다. 세포의 핵 염색은 bisbenzimidide H 33342 trihydrochloride를 처리하여 5분 동안 상온 반응하였고, 미토콘드리아 염색은 MitoTracker를 처리하여 5분 동안 상온 반응하였다.
- [0167] 도 8은 공초점현미경으로 관찰한 이미지이다. 도 8에서 비교예 2(DQAsome) 및 실시예 6(DQE10-3%)의 에멀션은 초록형광(CF, Carboxyfluorescein)을 나타내고, 세포핵은 파란형광(bisbenzimidide H 33342 trihydrochloride), 미토콘드리아는 빨간형광(MitoTracker)으로 나타난다.
- [0169] 도 8에 나타난 바와 같이, 대조군인 DQAsome과 비교했을 때 DQE10-3%에멀션이 더욱 효과적으로 미토콘드리아에

위치하였다. 따라서 DQEmulsion이 미토콘드리아를 표적으로 효과적인 효율을 갖는 물질임을 확인할 수 있었다.

[0171] <실험예 7> 커큐민(Curcumin) 탑재 DQEmulsion 입자의 크기 측정

[0172] 가장 높은 안정성을 보였던 형성 조건인 실시예 6(DQE10-3%)을 바탕으로 커큐민(curcumin)의 농도에 따른 DQEmulsion을 형성한 후, 에멀션 입자의 크기를 확인하기 위해 ELS-Z(Otusuka Electronics, Otsuka, Japan)를 이용해 측정하였고, 그 결과를 도 9(a)에 나타내었다.

[0174] 도 9(a)는 각각 커큐민을 1, 3 및 5mg 포함한 실시예 9-11에서 제조한 에멀션의 입자 크기를 측정한 그래프이다.

[0176] 도 9(a)에 나타난 바와 같이, 각 농도의 커큐민 탑재 DQEmulsion의 크기는 모두 100~200nm의 크기를 갖는 것을 알 수 있었으며, 커큐민의 함량이 증가할수록 입자의 크기는 조금씩 작아지는 것을 확인할 수 있었다.

[0178] <실험예 8> 커큐민 탑재 DQEmulsion의 흡광도 측정을 통한 커큐민의 정량

[0179] 커큐민의 농도에 따른 DQEmulsion의 형성 후 에멀션에 탑재된 커큐민의 함량을 정량하고 탑재 효율(encapsulation efficiency)을 확인하기 위해 UV/VIS spectrophotometer(Optizen POP, Mecasys, Korea)를 사용하였다.

[0180] 구체적으로, 커큐민은 캐스터 오일에 용해시켜 농도별로 준비한 후, 420nm의 파장에서 흡광도를 측정하고 standard curve와 비교하여 커큐민의 탑재 효율을 계산하였고, 그 결과를 도 9(b)에 나타내었다.

[0182] 도 9(b)는 각각 커큐민을 1, 3 및 5mg 포함한 실시예 9-11에서 제조한 에멀션의 커큐민 탑재 효율을 측정한 그래프이다.

[0184] 도 9(b)에 나타난 바와 같이, 커큐민의 함량이 증가할수록 탑재 효율이 조금씩 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 커큐민이 1mg일 때 100% 가장 가까운 탑재 효율을 보였다.

[0186] <제제예 1> 약학적 제제의 제조

[0187] <1-1> 산제의 제조

[0188] 디쿠알리니움 에멀션 2 g

[0189] 유당 1 g

[0190] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0192] <1-2> 정제의 제조

[0193] 디쿠알리니움 에멀션 100 mg

[0194] 옥수수전분 100 mg

[0195] 유당 100 mg

[0196] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0197] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0199] <1-3> 캡슐제의 제조

[0200] 디쿠알리니움 에멀션 100 mg

[0201] 옥수수전분 100 mg

[0202] 유당 100 mg

[0203] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0204] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0206] <1-4> 주사액제의 제조

[0207] 디쿠알리니움 에멀션 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

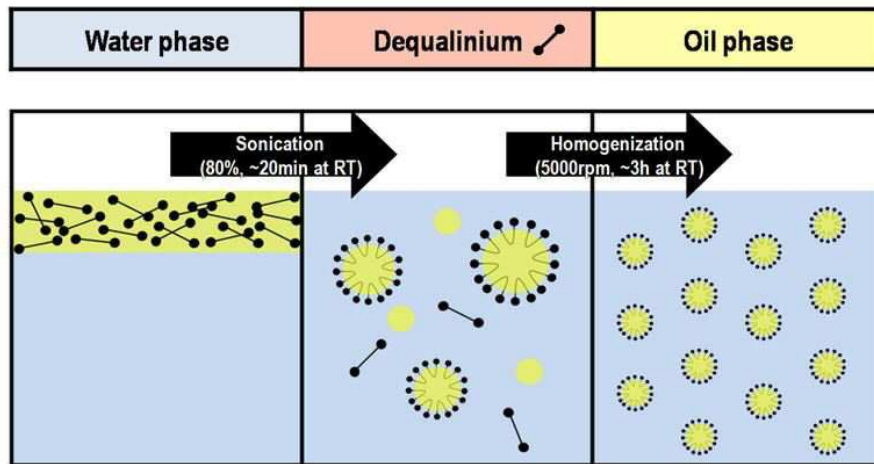
[0208] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지

[0209] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ml

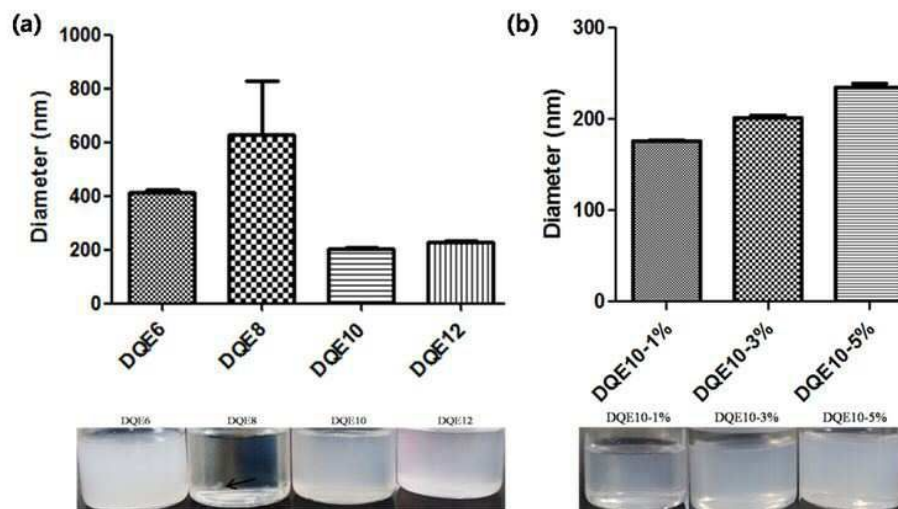
[0210] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명에 따른 화합물을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15분 이상 오토클레이브로 살균하여 주사액을 제조하였다.

도면

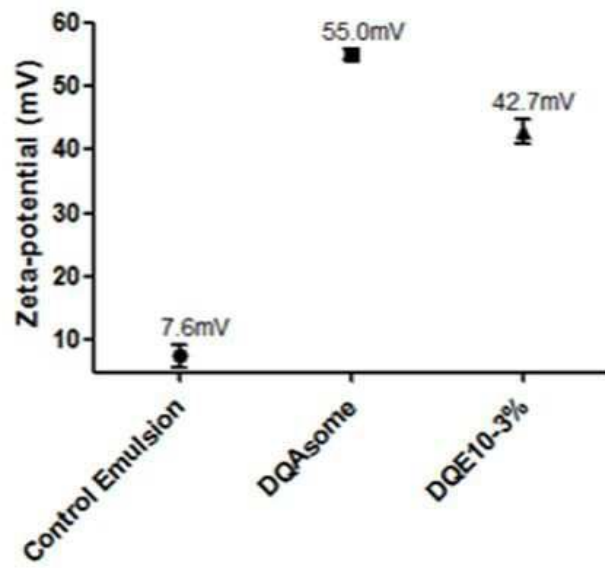
도면1



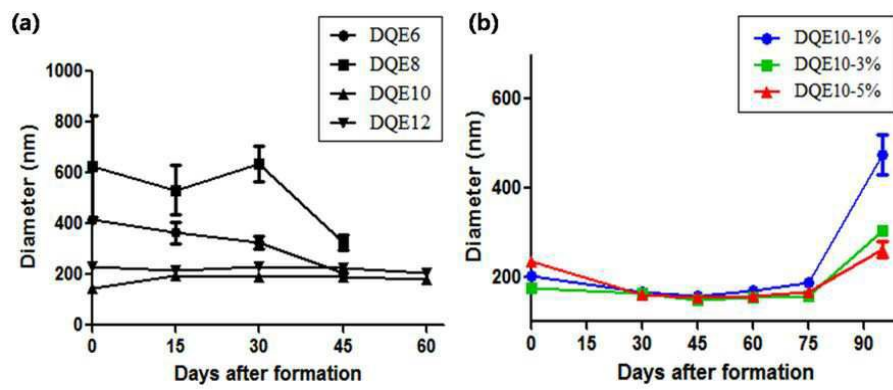
도면2



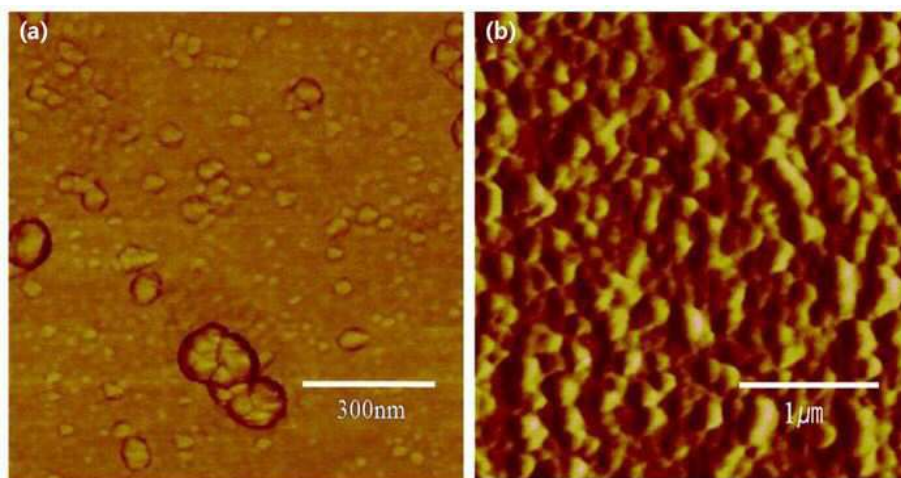
도면3



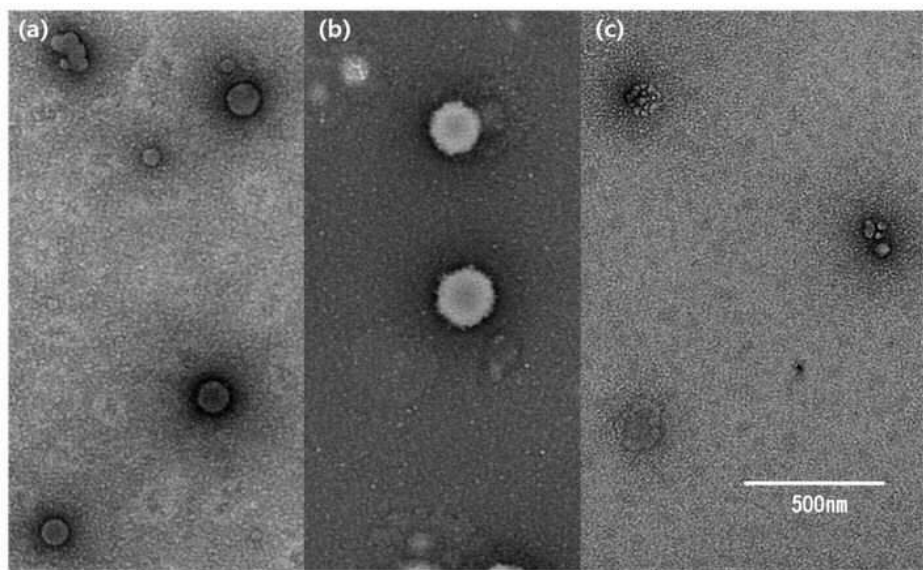
도면4



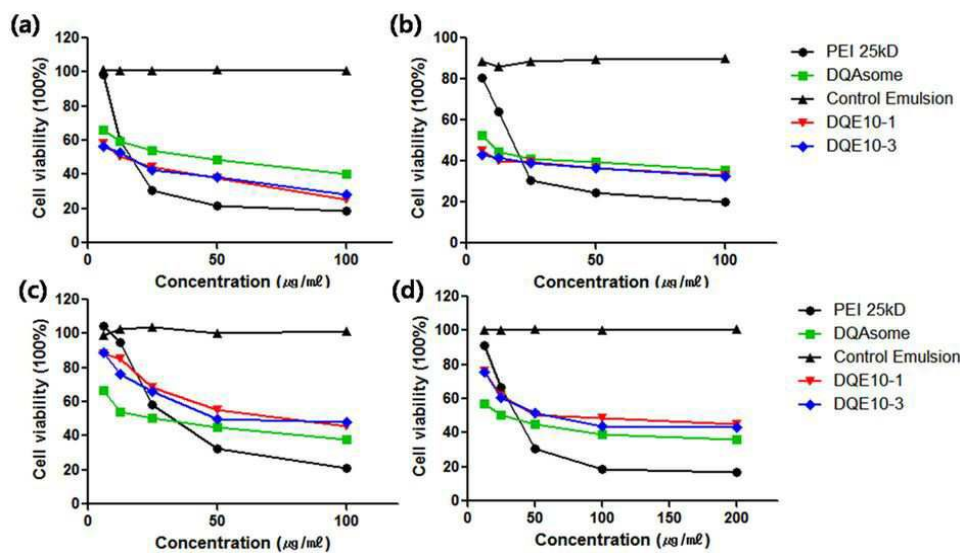
도면5



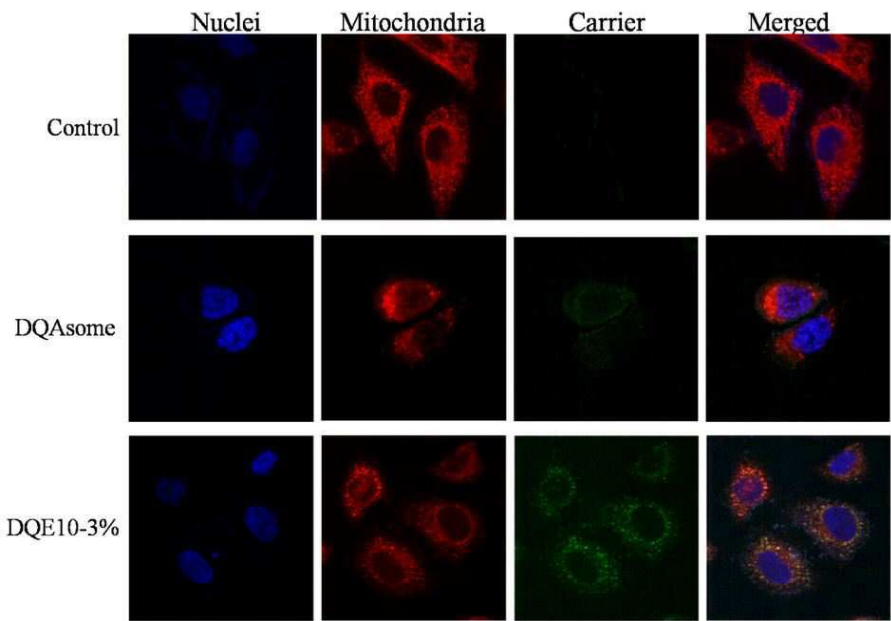
도면6



도면7



도면8



도면9

