



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년10월30일

(11) 등록번호 10-1791585

(24) 등록일자 2017년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 38/14 (2006.01) A61K 47/24 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/127 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0084699

(22) 출원일자 2016년07월05일

심사청구일자 2016년07월05일

(56) 선행기술조사문헌

비특허문헌 1 (제67회 대한생리학회
추계학술대회, 2015)*

비특허문헌 3 (J. DRUG DEL. SCI. TECH., 2005)*

SCIENCE, 1999, Vol. 283, pp.1482-1488*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

인제대학교 산학협력단

경남 김해시 인제로 197, 내 (어방동,
인제대학교)

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

한진

부산광역시 연제구 고분로 200, 121동 1804호 (연
산동, 연산엘지아파트)

고경수

서울특별시 강남구 삼성로 150, 미도아파트 212동
601호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 12 항

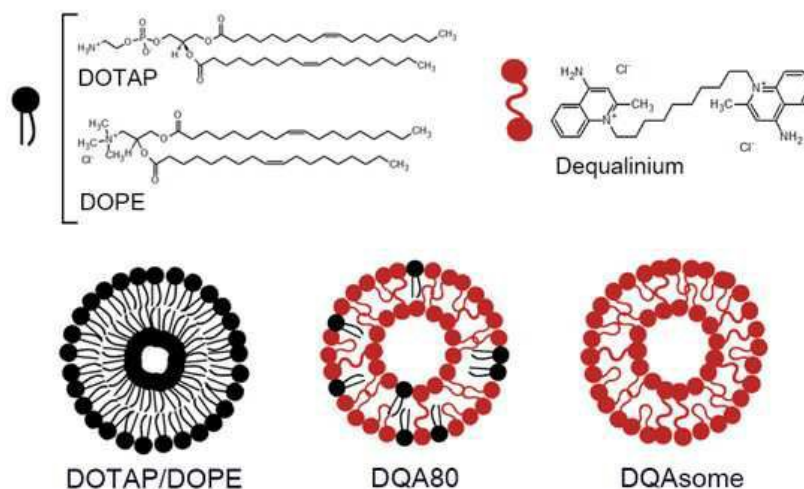
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜, 이를 이용한 약물전달용 조성물 및 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 본 발명에 따른 나노 리포솜은 미토콘드리아 표적 능력과 함께 안정성까지 갖춘 이상적인 미토콘드리아 표적화 전달체로서 상기 나노 리포솜에 약물이나 생리활성 물질을 담지하여 미토콘드리아 질환 치료제로서 유용하게 사용할 수 있을 뿐 아니라, 나노 리포솜 자체로도 미토콘드리아 형상을 변화시켜 세포자멸사를 유도할 수 있어 항암제로서 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/513 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
A61K 38/14 (2013.01)
A61K 47/24 (2013.01)
A61K 48/0033 (2013.01)

(72) 발명자

정승훈

부산광역시 동래구 금정마을로 100 (온천동)

최준식

대전광역시 유성구 엑스포로123번길 65-38, 203동
 1102호 (도룡동, 스마트시티주상복합아파트)

배윤희

부산광역시 진구 복지로 75 인제대학교 의과대학
 심혈관대사질환 연구센터

송수정

경상북도 포항시 북구 학산로59번길 7, 3동 205호
 (학산동, 코오롱아파트)

이슬기

전라북도 전주시 완산구 양지2길 10, 105동 102호
 (평화동2가, 동신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0020224
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 2015년 이공분야 중점연구소지원사업
 연구과제명 심혈관 및 대사질환센터
 기 여 율 55/100
 주관기관 인제대학교 산학협력단
 연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013064737
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)
 연구과제명 합성 및 생체고분자를 이용한 치료용 생체모사 고분자 나노입자 개발 연구
 기 여 율 45/100
 주관기관 충남대학교 산학협력단
 연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

디켈리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 것을 특징으로 하는 나노 리포솜.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 나노 리포솜은 미토콘드리아를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 나노 리포솜.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 나노 리포솜은 총 100 중량부에 대하여 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 5 내지 20 중량부, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP) 5 내지 20 중량부 및 디켈리늄의 60 내지 90 중량부인 것을 특징으로 하는 나노 리포솜.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 나노 리포솜은 평균 직경이 50 내지 300 nm인 것을 특징으로 하는 나노 리포솜.

청구항 5

디켈리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 나노 리포솜을 유효성분으로 포함하는, 약물 또는 생리활성물질 전달용 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 조성물은 미토콘드리아를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는, 약물 또는 생리활성물질 전달용 조성물.

청구항 7

디켈리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 나노 리포솜; 및 약물 또는 생리활성 물질 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 미토콘드리아 질환은 허혈성 뇌질환, 허혈성 심질환, 파킨스 질환, 알츠하이머 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성측색경화증(ALS), 미토콘드리아 뇌근증, 자폐증, 우울증, 당뇨, 비만, 뇌졸중, 심장병, 동맥경화, 고혈압, 고콜레스테롤증, 비정형 페닐케톤뇨증 및 암질환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 약물은 파클리탁셀, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 독소루비신 및 5-플로로우라실로 이루어진 군에서 선택된 항암제; 또는 레스베라트롤, 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드, 아스코르빈산, 알파 리포익산 및 토코페롤로 이루어진 군에서 선택된 항산화제 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 생리활성 물질은 펩타이드, 단백질, 호르몬제 또는 유전자인 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 유전자는 플라스미드 DNA(plasmid DNA; pDNA) 또는 siRNA인 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 12

디켈리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 나노 리포솜; 및 약물 또는 생리활성 물질 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜, 상기 나노 리포솜을 이용한 미토콘드리아 표적화 약물전달용 조성물 및 상기 나노 리포솜을 이용한 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미토콘드리아는 에너지 합성 및 세포 수명에 있어서, 중요한 세포 내 소기관으로, 최근 미토콘드리아의 역기능에 의해 발병되는 것으로 알려진 알츠하이머와 같은 신경 퇴행성 질환, 헌팅턴병, 파킨슨병, 당뇨병, 암 및 노화관련 질환과 같이 다양한 질병들이 보고되어짐에 따라, 미토콘드리아에 대한 연구가 증가하고 있다.

[0003] 이러한 질병들을 치료하기 위한 방법으로, 약 또는 유전자와 같은 치료 생리활성 물질을 미토콘드리아로 전달함으로써 상기 질병의 치료 효과를 증진시킬 수 있다. 이에 따라, 선택적이며 효율적으로 미토콘드리아를 타겟팅할 수 있는 담체 시스템에 대한 연구의 필요성이 높아졌다.

[0004] 그러나, 미토콘드리아로 생리 활성물질을 운반하기 위해서는 세포막과 미토콘드리아 막을 통과해야 하는데 기존의 미토콘드리아 약물전달용 담체는 이러한 세포 장벽 통과에 어려움을 겪고 있다. 또한 코돈 시스템을 포함한 미토콘드리아 유전자 발현 시스템은 다른 핵 유전자 시스템과 다르며 이들의 유전적 차이들은 미토콘드리아 특이적 코어 시스템의 발달에 방해가 된다.

[0005] 이러한 문제점을 해결하기 위한 미토콘드리아 약물전달용 담체 연구는 담체 자체가 미토콘드리아에 영향을 주지 않는 물질이면서, 미토콘드리아를 정확하게 목표로 하여 세포막을 안전하게 통과함으로써, 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 담체에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1580251호 (2015.12.18)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명의 목적은 미토콘드리아 표적화 신규 나노 리포솜을 제공하는 데에 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 미토콘드리아 표적화 신규 나노 리포솜을 유효성분으로 포함하는 약물 또는 생리활성 물질 전달용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 또다른 목적은 상기 미토콘드리아 표적화 신규 나노 리포솜과 약물 또는 생리활성 물질을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 또다른 목적은 상기 미토콘드리아 표적화 신규 나노 리포솜을 유효성분으로 포함하는 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 디퀼리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 것을 특징으로 하는 나노 리포솜을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 디퀼리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 나노 리포솜을 유효성분으로 포함하는, 약물 또는 생리활성물질 전달용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 디퀼리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 나노 리포솜; 및 약물 또는 생리활성 물질 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 디퀼리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 나노 리포솜을 유효성분으로 포함하는, 암질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 나노 리포솜은 미토콘드리아 표적 능력과 함께 안정성까지 갖춘 이상적인 미토콘드리아 표적화 전달체로서 상기 나노 리포솜에 약물이거나 생리활성 물질을 담지하여 미토콘드리아 질환 치료제로서 유용하게 사용할 수 있을 뿐 아니라, 나노 리포솜 자체로도 미토콘드리아 형상을 변화시켜 세포자멸사를 유도할 수 있어 항암제로서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에 따른 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜의 형태를 나타낸 것이다.
 도 2는 본 발명에 따른 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜의 전자현미경 분석 결과이다.
 도 3은 본 발명에 따른 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜의 DNA packing 효율 결과이다.
 도 4 및 도 5는 본 발명에 따른 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜의 세포내 유입효율 결과이다.
 도 6은 본 발명에 따른 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜과 플라스미드의 패키징 후 세포 내 미토콘드리아 전달 및 분포를 확인한 결과이다.
 도 7은 본 발명에 따른 미토콘드리아 표적화 나노 리포솜과 플라스미드의 패키징 후 세포 내 미토콘드리아 형상 변화를 나타낸 결과이다(a: 미처리, b: DOTAP/DOPE/pDNA 처리, c: DQAsome/pDNA 처리, d: DQA80/pDNA 처리).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 디퀼리늄(Dequalinium)의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 것을 특징으로 하는 나노 리포솜을 제공한다.

[0019] 디퀼리늄은 도 1에 도시된 바와 같이, 양쪽 말단에 미토콘드리아 타겟팅 효과를 내는 말단기가 있으며 중심부터 탄소 체인이 있는 구조를 가지고 있다. 이러한 구조적인 특성 때문에 자기조립(self-assembly)이 가능하며, 이 가운데 체인이 접히거나 혹은 일렬로 배열되는 하나의 레이저를 가지는 구조를 가지게 된다. 따라서, 50-300 nm의 나노수준의 평균 직경을 갖는 입자 형성이 가능하다.

[0020] 하지만 디큐에이솜(DQAsome)은 비교적 짧은 탄소사슬 때문에 안정성이 떨어지며, 이는 디큐에이솜(DQAsome)을 전달체로 이용할 경우 효과를 감소시키게 된다.

- [0021] 이에, 본 발명자들은 안정성 개선 및 전달체로서의 성능 향상을 위하여, 인지질인 DOTAP과 DOPE를 도입하였으며, DOTAP은 양이온성의 인지질로서 세포막 투과성을 높이며, DOPE는 융합 인지질로서 리포솜을 안정화 시키며, 2중막의 구형 리포솜을 구성하며, 전달효율이 우수하며 안정성 또한 뛰어나므로, 상기 인지질을 디큐에이솜(DQAsome)에 혼합하면 디큐에이솜(DQAsome)의 성질은 보존하면서 인지질처럼 2중막을 구성할 수 있게 되어 미토콘드리아 표적 능력과 함께 안정성까지 갖춘 이상적인 전달체를 제작할 수 있다는 것을 밝혀내어 본 발명을 완성한 것이다.
- [0022] 상기 나노 리포솜은 총 100 중량부에 대하여 DOPE 5 내지 20 중량부, DOTAP 5 내지 20 중량부 및 디퀼리늄의 60 내지 90 중량부일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 디퀼리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 나노 리포솜을 유효성분으로 포함하는, 약물 또는 생리활성물질 전달용 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 조성물은 미토콘드리아를 표적으로 할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 디퀼리늄의 자기조립에 의해 형성된 디큐에이솜(DQAsome)에 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 및 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 도입시킨 나노 리포솜; 및 약물 또는 생리활성 물질 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 미토콘드리아 질환은 허혈성 뇌질환, 허혈성 심질환, 파킨스 질환, 알츠하이머 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성측색경화증(ALS), 미토콘드리아 뇌근증, 자폐증, 우울증, 당뇨, 비만, 뇌졸중, 심장병, 동맥경화, 고혈압, 고콜레스테롤증, 비정형 폐닐케톤뇨증 및 암질환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 약물은 파클리탁셀, 미토마이신, 블레오마이신, 시스플레틴, 독소루비신 및 5-플로로우라실로 이루어진 군에서 선택된 항암제; 또는 레스베라트롤, 폴리페놀, 플라보노이드, 카로티노이드, 아스코르빈산, 알파 리포익산 및 토코페롤로 이루어진 군에서 선택된 항산화제 중 하나 이상일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 "생리활성 물질"은 동물 또는 사람의 체내에서 생리적인 기능을 촉진 또는 억제하여 목적하는 생물학적 또는 약리학적 효과를 유도할 수 있는 물질로서, 동물 또는 사람에게 투여하기 적합한 화학적 또는 생물학적 물질 또는 화합물을 의미하며, (1) 감염 예방과 같은 원하지 않은 생물학적 효과를 예방하여 유기물에 대한 예방 효과를 가지고, (2) 질병으로 생기는 컨디션을 경감시키며, 예를 들어 질병의 결과로 생기는 고통 또는 감염을 완화시키며, (3) 유기물로부터 질병을 완화, 감소 또는 완전히 제거할 수 있는 역할을 수행할 수 있다. 또한, 상기 "생리활성물질"은 "약물" 또는 "치료제"의 용어와도 상호 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0029] 상기 생리활성 물질로는 펩타이드, 단백질, 호르몬제 또는 유전자로서 인간성장호르몬, 백혈구성장인자, 적혈구성장인자, 대식세포 성장인자, 신경성장인자, 엔지오스테틴, 코르티솔, 인슐린, 갑상선 자극 호르몬, 글루카곤, 테트라하이드로바이오프테린, 단일 항체, 백신류, 플라스미드 DNA(plasmid DNA; pDNA) 및 siRNA로 이루어진 군에서 하나 또는 둘 이상 선택될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양의 생리활성 물질을 추가로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 상기 생리활성 물질이 동물 또는 사람에게 투여되어 목적하는 생리학적 또는 약리학적 활성을 나타내기에 충분한 양을 말한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 투여 대상의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 또한 본 발명에 따른 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라

적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 조성물은 상기 생리활성 물질의 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 화합물과도 병행하여 투여할 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0034]

[0035] <실시예 1> DQA80 나노 리포솜 제작

[0036] DQAsome은 종래 알려진 문헌(Drug Deliv 2000, 7, 1-5)을 참고하여 제작하였다. 염화 디퀼리늄(Dequalinium chloride)은 둥근 바닥 플라스크에서 최종농도 10 mM이 되도록 메탄올로 녹였다. 메탄올을 rotary evaporator로 20분간 날려 제거한 뒤, 만들어진 디퀼리늄 필름을 5 mM HEPES 완충액에 넣어 분산시켰다. 분산시킨 용액을 1시간 동안 소니케이션을 실시한 뒤, 10000 rpm 에서 10분간 원심분리 하여 금속 입자를 제거하였다. 마지막으로 DQAsome은 0.8 mm 직경을 갖는 실린지 필터로 여과하여 보관하였다.

[0037] DOTAP/DOPE와 DQA80은 세포침투성 리피드 DOTAP과 융합성 리피드인 DOPE를 이용하여 각각 제작하였다. 간략하게, 10 mg의 DOTAP/DOPE (molar ratio, DOTAP/DOPE=50:50)과 DQA80 (molar ratio, DOTAP/DOPE, dequalinium chloride =10:10:80)은 유리 플라스크를 이용하여 클로로포름에 각각 녹였다. 각각의 샘플은 질소가스로 유기용매를 날려준 뒤, 남은 유기용매를 제거하기 위하여 진공에 1시간 동안 보관하였다. 그 뒤 5 mM HEPES 완충액 (pH 7.4)에 분산시켜 1시간 동안 소니케이션을 실시하며, DQA80의 경우에는 10000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 상등액만 취하였다. 마지막으로 각각의 샘플은 0.8 mm 직경을 갖는 실린지 필터로 여과하여 보관하였다. 형광표지된 DQAsome, DOTAP/DOPE, DQA80의 경우에는 CF-PE(carboxyfluorescein)를 이용하여 제작하였다. CF-PE는 리피드 양에 비교하여 1/50,000의 비율로 제작하였다.

[0038] <실시예 2> 나노 리포솜의 크기 분석

[0039] 앞서 제작된 DQAsome을 변형시켜서 염화 디퀼리늄의 함량에 따라 DQA10, DQA40, DQA60, 그리고 DQA80 나노 리포솜을 각각 제작하였으며, 그 크기와 형태를 분석하였다. 이러한 분석을 위해서 900 ml 의 멸균된 물에 각 시료를 희석해서 나노 리포솜의 크기와 표면력을 ELS-Z의 기기를 이용해서 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 1 및 도 2와 같다.

표 1

[0040]

제형	크기 (nm)	제타전위 (mV)
DQAsome	208.0±3.08	55.6±2.12
DOTAP/DOPE	243.30±5.16	73.7±1.17
DQA10	66.0±6.33	63.6±1.06
DQA40	118.4±5.40	62.1±1.33
DQA60	195.4±10.13	57.0±1.22
DQA80	203.5±4.78	62.9±1.33

[0041] <실시예 3> DNA 패키징 분석

[0042] DQA80 나노 리포솜은 양이온성의 성질을 나타내며, 플라스미드 DNA는 음이온성 성질을 나타내므로 상호 정전기적인 인력을 이용해서 복합체를 형성할 수 있다. 이에, HEPES 완충액 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.0)에 각 시료를 다양한 중량 비율로 변화시켜 복합체를 형성시켰다. 그 후에 각 시료에 PicoGreen의 형광물질을 이용해서 각 시료가 어떠한 중량 비율에서 복합체를 형성하는지를 형광측정기를 이용해서 형광강도로 측정하였다.

[0043] 그 결과, 도 3과 같이 DQA80이 DQAsome과 비교해서 DNA와 결합효율이 높음을 확인할 수 있었다.

[0044] <실시예 4> 세포 내 미토콘드리아 전달 확인 및 분석

[0045] DQA80 나노 리포솜이 세포내 소기관 중에서 어느 기관에 분포하는지를 알아보기 위해서, 먼저 나노 리포솜인 DQAsome, DOTAP/DOPE, 그리고 DQA80을 10 µg/ml의 카르복시플루오레세인(carboxyfluorescein; CF)으로 표지한 후 상기 CF 표지된 나노 리포솜을 HeLa 세포에 처리하고 24시간 동안 배양하였다.

[0046] 상기 배양물을 4, 8 시간, 그리고 12 시간 후에 Lysotracker 염색시약을 이용해서 15분 동안에 37℃ 배양기에서

염색시키고 연속적으로 NucBlue Live Ready probes 시료를 이용해서 5분 동안에 37℃ 배양기에서 세포의 핵을 염색시켰다. 그 후에 각 시료를 레이저공초점 현미경을 이용해서 각 나노 리포솜의 세포내 분포도를 관찰하였다.

[0047] 그 결과, 도 4와 같이 DQA80/pDNA는 DQAsome/pDNA와 비교해서 세포내 유입이 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0048] 또한, 세포 내 유입의 양적인 변화를 분석하기 위해서 나노 리포솜인 DQAsome, DOTAP/DOPE, 그리고 DQA80를 CF로 표지한 후에 플라스미드 DNA와 중량비율 1:16로 복합체를 형성하였다. 상기 형성된 복합체를 HeLa 세포와 24 시간 동안 배양한 후에 각 시료를 PBS를 이용해서 씻어내었다. 각 시료를 7,000 rpm에서 원심분리 후 수거해서 유세포분석기를 이용해서 각 시료의 세포 내 유입 여부를 측정하였다.

[0049] 그 결과, 도 5와 같이 DQA80/pDNA는 DQAsome/pDNA와 비교해서 세포내 유입이 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0050] <실시예 5> 세포 내 미토콘드리아 분포 확인 및 분석

[0051] DQA80 나노 리포솜이 세포소기관 중에 미토콘드리아에 분포하는지를 알아보기 위해서 나노 리포솜인 DQAsome, DOTAP/DOPE, 그리고 DQA80를 CF로 표지한 후에 hmtGFP 플라스미드와 중량비율 1:16에서 복합체를 형성하였다. 상기 형성된 복합체를 HeLa 세포주와 12 시간 반응시킨 후에 Mitotracker 염색시약을 이용해서 15 분 동안에 37℃ 배양기에서 염색시키고 연속적으로 NucBlue Live Ready probes 시료를 이용해서 5분 동안 37℃ 배양기에서 세포의 핵을 염색시켰다. 그 후에 각 시료를 레이저공초점 현미경을 이용해서 각 나노 리포솜의 미토콘드리아에 분포하는지를 관찰하였다.

[0052] 그 결과, 도 6과 같이 DQA80/pDNA는 DQAsome/pDNA와 비교해서 살아있는 세포의 미토콘드리아로 보다 더 잘 전달됨을 확인할 수 있었다.

[0053] <실시예 6> DQA80 나노 리포솜의 구조 확인

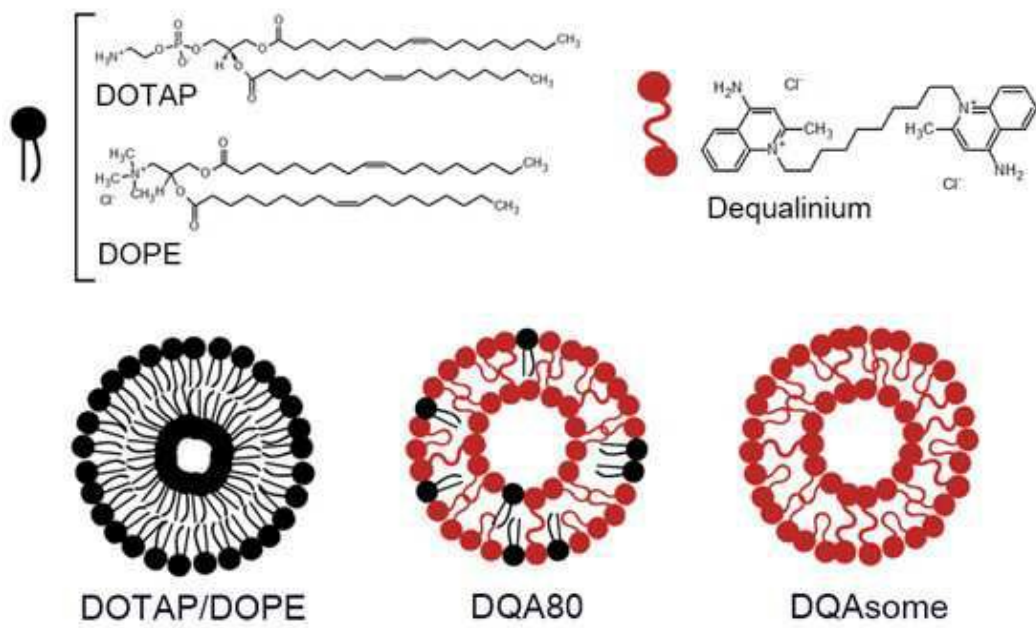
[0054] DQA80 나노 리포솜의 구조를 투과전자현미경을 이용해 알아보기 위해서 HeLa 세포에 DQAsome, DOPE/DOPE, 그리고 DQA80를 1: 16 중량 비율로 플라스미드 DNA와 복합체를 형성한 후, 암세포인 HeLa 세포에 8 시간 동안 과발현 시켰다. 과발현 시킨 각 시료를 2.5% 글루타르알데히드에 0.1 mol/L 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.4)의 고정액을 이용해서 4℃에서 4 시간 동안 고정시켰다. 그 후에 1% OsO₄가 포함되어 있는 1 mol/L 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.4)에서 2 시간 동안 한 번 더 고정시켰다. 각 시료를 알코올 농도에 따라서 연속적으로 탈수시켰다. 그 후에 ultra-microtome를 이용해서 절편을 냈고, 상기 절편 된 세포를 copper grids로 탑재시키고 우라닐 아세테이트를 이용해서 염색하고 구연산을 이용해서 한번 더 염색하였다. 최종 각 시료를 H-7600 투과전자현미경을 이용해서 관찰하였다.

[0055] 그 결과, 도 7과 같이 DQA80/pDNA는 유의성있게 미토콘드리아 구조를 변화시켰다. 즉, 미토콘드리아가 팽창하고 둥근 형상으로 되어 미토콘드리아 막을 손상시켜 활성산소종을 방출하고 세포자멸사(apoptosis)를 초래할 것으로 기대된다.

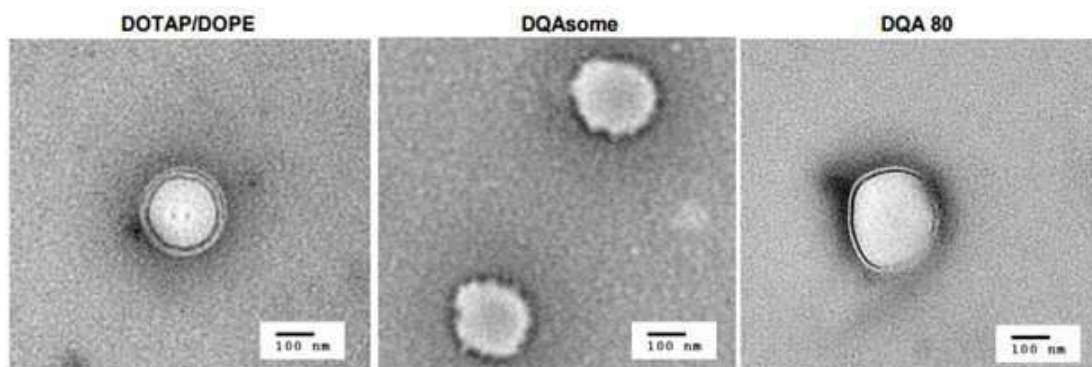
[0056] 또한 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 특허 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

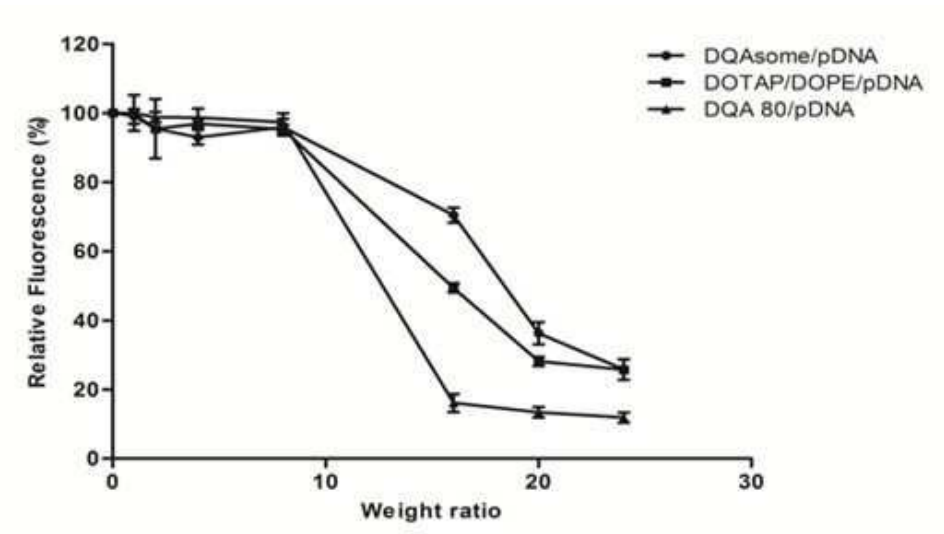
도면1



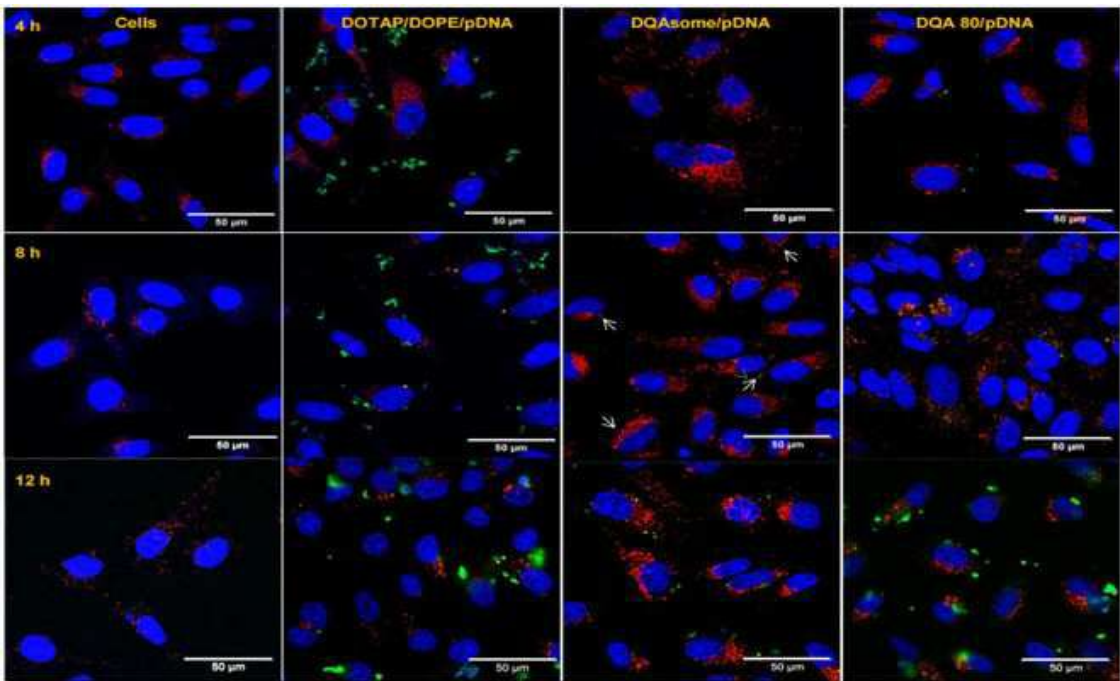
도면2



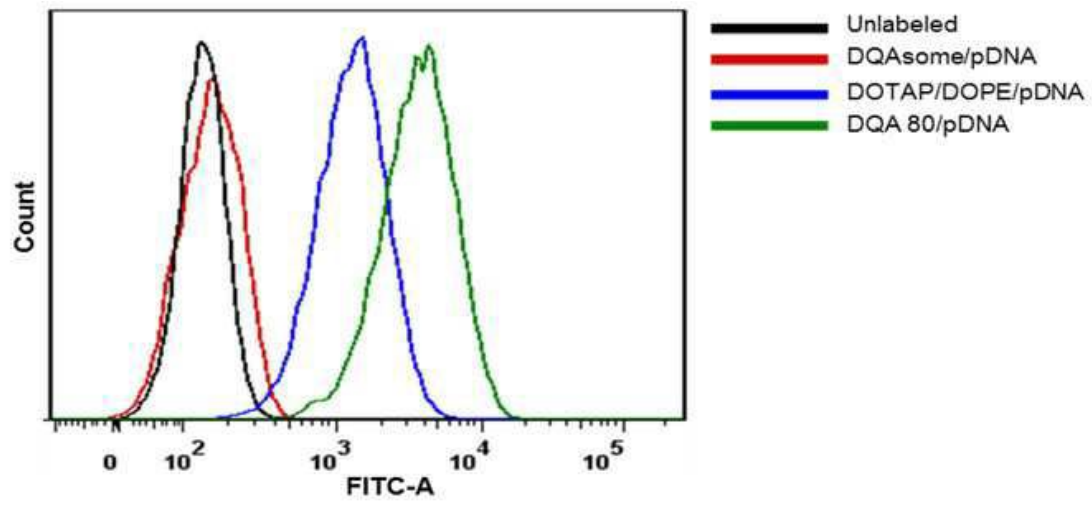
도면3



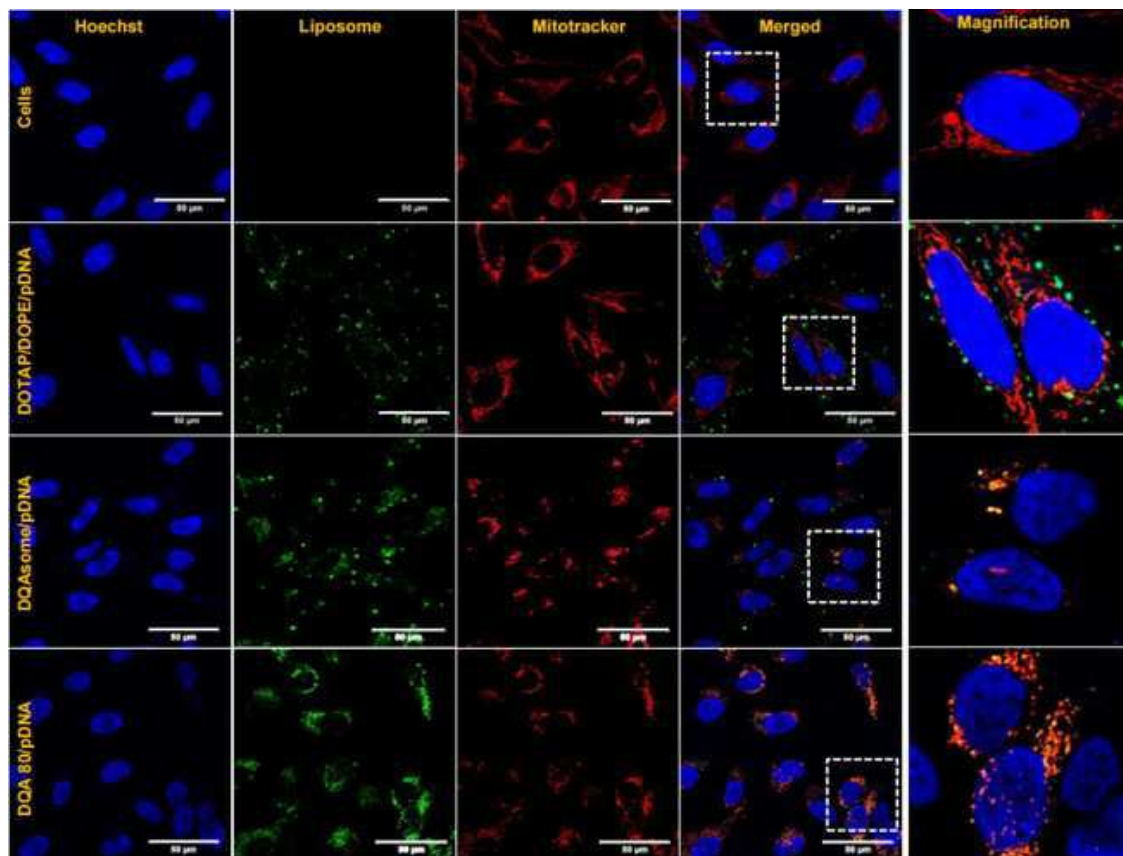
도면4



도면5



도면6



도면7

