



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월18일
(11) 등록번호 10-2313948
(24) 등록일자 2021년10월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01) A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 47/28 (2017.01) A61K 47/34 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A61K 31/4184 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0008642
- (22) 출원일자 2020년01월22일
심사청구일자 2020년01월22일
- (65) 공개번호 10-2021-0094870
- (43) 공개일자 2021년07월30일
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020170125793 A
KR1020190067172 A

- (73) 특허권자
가톨릭대학교 산학협력단
서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)
- (72) 발명자
나건
경기도 부천시 옥산로 7, A동 1302호 (중동, 리첸
시아)
이창주
경기도 부천시 부일로685번길 40-22, 명신크리스
탈 104호
- (74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 12 항

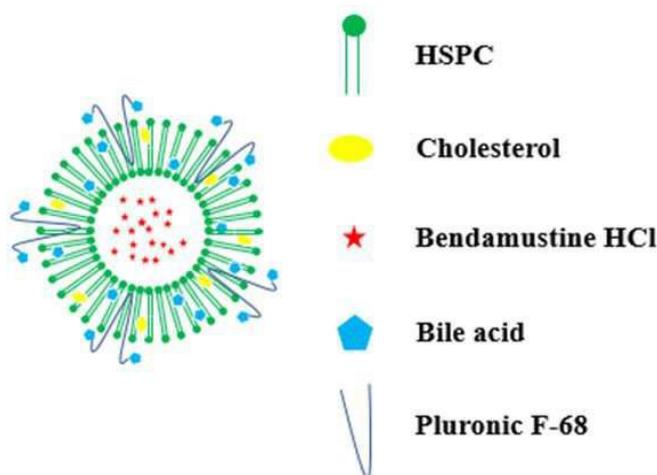
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 세포 투과도가 향상된 리포솜 및 이를 포함하는 약물 전달체

(57) 요약

본 발명은 세포 투과도가 향상된 리포솜 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것으로, 지질층 막에 의해 격리된 내부 공간을 갖는 리포솜으로서, 상기 지질층은 스테롤계 화합물, 폴록사머(poloxamer) 및 담즙산을 포함하여 위 장관 및 혈중 환경에서 방출이 제어될 수 있고, 리포솜 내부에 봉입된 벤다무스틴의 세포투과율을 향상시킬 수 있으며, p-glycoprotein에 의한 efflux 작용을 억제 시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A61K 31/704 (2013.01)
- A61K 31/7068 (2013.01)
- A61K 47/28 (2013.01)
- A61K 47/34 (2013.01)
- A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711093275
과제번호	2018M3A7B4071204
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노·소재원천기술개발사업
연구과제명	종양 표적 MRI 조영 및 치료용 나노입자의 개발
기여율	1/1
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2019.02.01 ~ 2020.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

약물을 봉입할 수 있는 내부 공간; 및

상기 내부 공간을 둘러싼 지질층 막으로 이루어지며,

상기 지질층은 스테롤계 화합물, 폴록사머(poloxamer) 및 담즙산을 포함하고, 상기 담즙산은 담즙산의 일부 또는 전부가 폴록사머에 결합되어 지질층 막 외부로 노출되는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 지질층은 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 글리세롤 및 포스파티딜 세린으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 스테롤계 화합물은 콜레스테롤, 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 시토스테롤(sitosterol), 에르고스테롤(ergosterol), 라노스테롤(lanosterol), 디노스테롤(dinosterol), 고르고스테롤(gorgosterol), 아베나스테롤(avenasterol), 사린고스테롤(saringosterol) 및 푸코스테롤(fucosterol)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 폴록사머(poloxamer)는 플루로닉(pluronic) F-68, F-87, F-127, P-105, P-123, L-61 및 L-121로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 담즙산은 우르소데옥시콜산, 타우로콜산, 타우로데옥시콜산 및 이들의 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 지질층, 스테롤계 화합물 및 담즙산은 각각 (1 내지 10) : 1 : (1 내지 10)의 질량비로 포함되는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 리포솜은 평균 입경 10 내지 200nm인 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 리포솜은 소장 상피세포를 투과하는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 리포솜은 소장의 ABST(Apical sodium-dependent Bile acid transporter)를 표적화하여 소장 상피세포를 투과하는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 따른 리포솜의 내부 공간에 함암제가 봉입되는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 함암제는 벤다무스틴, 독소루비신 및 켄시타빈으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 약물 전달체.

청구항 13

제 11항에 따른 약물 전달체를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 투과도가 향상된 리포솜 및 이를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 벤다무스틴은 1963년 독일에서 처음 합성된 함암제로서 만성 림프성 백혈병, 비호지킨 림프종 및 다발 골수종, 유방암을 치료하기 위하여 널리 사용되어 왔다. 벤다무스틴은 알킬레이팅 에이전트로서 다른 질소 머스타드에 비해 효능이 우수하고 부작용이 적은 장점을 갖는다. 또한, 다른 알킬레이팅 에이전트와의 Cross-resistance가 없어 단일요법이나 복합요법에 적합하다고 알려져 있다.

[0003] 그러나 벤다무스틴은 p-당단백질(p-glycoprotein)의 기질로서 세포 투과 시 efflux에 의해 배출될 수 있으며 혈중 반감기가 40분으로 매우 짧고, 간의 Cytochrome 효소 중 하나인 CYP1A2에 의해 대사되고, 혈중 단백질과 결합 시 항암활성을 잃는다고 알려져 있다. 또한, 혈장 안에서 화학적 안정성에 한계가 있기 때문에 치료 효과를 달성하기 위해서는 많은 투약량이나 반복적인 투여가 필요한 실정이다.

[0004] 한편, 리포솜은 지질로 이루어진 약물 전달체로, 사용하는 지질에 따라 구조나 크기 등을 조절할 수 있으며, 이중막으로 이루어져 내부의 친수성 환경에 친수성 약물을, 막을 이루고 있는 지질의 꼬리 부분의 소수성 부분에는 소수성 약물을 봉입할 수 있다. 또한, 리포솜은 약물을 봉입하여 방출을 조절할 수 있으며 혈중 순환 시간을 연장시킬 수 있다. 세포막과 유사한 성분으로 이루어져 있어 세포 투과도가 향상될 수 있으며 리포솜 내부에 봉입된 약물은 세포의 p-glycoprotein 단백질과 상호작용 할 수 없어 배출을 막을 수 있다. 또한, 양친매성이면서 독성이 거의 없고 체내에서 대사되어 배출된다는 특징을 가지고 있기 때문에 약물 전달체로서 많이 이용되고 있다.

[0005] 따라서, 함암제인 벤다무스틴의 적절한 약효를 발휘하기 위해 p-당단백질(p-glycoprotein)에 의한 유출(efflux)이 억제되며, 세포 투과율 및 혈장 내 안정성을 높일 수 있는 리포솜 제형화에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2017-0122653호(2017.11.06 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 항암제 약물의 세포투과율 및 혈장 내 안정성을 증진시킬 수 있는 리포솜을 제공하는 데에 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 리포솜을 이용한 약물 전달체 및 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지질층 막에 의해 격리된 내부 공간을 갖는 리포솜으로서, 상기 지질층은 스테롤계 화합물, 폴록사머(poloxamer) 및 담즙산을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 리포솜의 내부 공간에 항암제가 봉입되는 것을 특징으로 하는 약물 전달체를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 약물 전달체를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따라 제조된 벤다무스틴 봉입 리포솜, 바일로솜, PFUB는 평균 100 nm 이하의 균일한 입경을 가짐으로써 세포 투과도가 향상될 수 있다. 또한, 제타 전위가 각각 +1.94, +13.10, +6.27 mV 로 양의 값을 가져 세포 투과성이 향상될 수 있으며, 그 값이 크지 않아 리포솜, 바일로솜, PFUB 리포솜 제형 자체만으로 세포독성을 가지지 않아 안전하다.

[0013] 또한, 벤다무스틴 리포솜, 바일로솜, PFUB는 위장관 및 혈중 환경에서 방출이 제어될 수 있고, 벤다무스틴의 세포투과율을 향상시킬 수 있으며 p-당단백질(p-glycoprotein)에 의한 유출(efflux) 작용을 억제시킬 수 있다.

[0014] 특히, PFUB는 소장의 ASBT (Apical sodium-dependent Bile acid transporter)를 표적화하여 소장 상피세포 투과율을 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 리포솜 구조의 모식도를 나타낸 도면이다.

도 2는 플루로닉 F-68(PF-68) 과 우르소데옥시콜산(UDCA)의 화합물을 H^1 NMR을 이용하여 확인한 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 3은 플루로닉 F-68 과 우르소데옥시콜산의 화합물을 MALDI-TOF를 이용하여 확인한 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명에 따른 리포솜, 바일로솜, PFUB의 크기 비교를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명에 따른 리포솜, 바일로솜, PFUB의 단면을 투과전자현미경으로 촬영한 이미지를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명에 따른 리포솜, 바일로솜, PFUB의 방출 양상을 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명에 따른 리포솜, 바일로솜, PFUB의 안정성을 모사된 위액 (Simulated Gastric Fluid, SGF) 및 모사된 장액 (Simulated Intestinal Fluid, SIF) 상에서의 크기 변화 및 크기분포 변화를 동적광산란법 나노입자분석기를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명에 따른 리포솜, 바일로솜, PFUB의 세포 투과도를 Caco-2 cell line을 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명에 따른 리포솜, 바일로솜, PFUB의 Efflux Ratio를 Caco-2 cell line을 이용하여 측정한 결과를

나타낸 도면이다.

도 10은 본 발명에 따른 리포솜, 바일로솜, PFUB에 의해 세포 투과된 벤다무스틴의 양을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 본 발명에 따른 리포솜, 바일로솜, PFUB의 세포독성을 MCF-7 cell line을 이용하여 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

도 12는 본 발명에 따른 리포솜 제조 방법을 통하여 pluronic F-68 대신 PEG 2k를 사용하여 제조한 입자의 크기, PDI, 표면 전하를 나타낸 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하에서는 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0018] 본 발명자들은 항암제가 봉입된 리포솜의 지질층 막에 콜레스테롤 및 담즙산을 포함시킴으로써 위장관 및 혈중 환경에서 항암제의 방출이 제어될 수 있고, p-glycoprotein에 의한 유출(efflux) 작용을 억제 시켜 세포투과율을 향상시킬 수 있으며, 특히 담즙산의 일부를 폴록사머와 결합시키고, 지질층 막 외부로 노출시킴으로써 소장의 ABST(Apical sodium-dependent Bile acid transporter)를 표적화하여 소장 상피세포의 투과율을 향상시킬 수 있음을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다(도 1).
- [0020] 본 발명은 지질층 막에 의해 격리된 내부 공간을 갖는 리포솜으로서, 상기 지질층은 스테롤계 화합물, 폴록사머(poloxamer) 및 담즙산을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 투과도가 향상된 리포솜을 제공한다.
- [0021] 이때, 상기 담즙산의 일부 또는 전부는 폴록사머에 결합되어 지질층 막 외부로 노출된 것을 특징으로 한다.
- [0023] 상기 리포솜에 폴록사머 고분자를 삽입하면 안정성을 향상시킬 수 있고, 혈중 순환 시간을 연장하거나 약물 방출을 조절할 수 있다. Poloxamer는 폴리에틸렌 옥사이드[Poly(ethylene Oxide, PEO), 폴리프로필렌 옥사이드[Poly(propylene Oxide), PPO]로 이루어진 삼중-블록(Tri-block) 공중합체로 비이온성 고분자이다. Poloxamer는 정상세포와 비교할 때 암세포와의 막의 차이로 인해 암 세포를 우선적으로 표적할 수 있으며, 암 세포 표면의 MDR 단백질 및 다른 Efflux transporter를 억제할 수 있고, 약물의 방출을 조절할 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 담즙산은 간에서 합성되어 음식물이 섭취되고 위에서 소장으로 넘어오는 경우 분비되어 지질의 유화 작용을 통해 체장효소 중 지질분해효소인 리파아제가 지질을 분해할 수 있게 한다. 리포솜의 경구투여 시 소장 에서 담즙산과 리파아제의 작용에 의하여 리포솜의 안정성이 저해될 수 있으나, 본 발명에 따라 담즙산이 포함된 리포솜은 소장에 존재하는 담즙산에 의한 유화작용을 억제할 수 있다. 또한, 담즙산이 포함된 리포솜은 경구 투여 시 소장 Peyer's patch 의 장 관련 림프 조직에서 발견되는 Microfold cell에서 흡수될 수 있기 때문에 경구백신의 전달체로 활용될 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에 따른 상기 리포솜에서 지질층은 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 글리세롤 및 포스파티딜 세린으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되며, 바람직하게는 포스파티딜 콜린일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 또한, 상기 스테롤계 화합물은 콜레스테롤, 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 시토스테롤(sitosterol), 에르고스테롤(ergosterol), 라노스테롤(lanosterol), 디노스테롤(dinosterol), 고르고스테롤(gorgosterol), 아베나스테롤(avenasterol), 사린고스테롤(saringosterol) 및 퓨코스테롤(fucosterol)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되며, 바람직하게는 콜레스테롤일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 상기 폴록사머(poloxamer)는 플루로닉(pluronic) F-68, F-87, F-127, P-105, P-123, L-61 및 L-121로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되며, 바람직하게는 플루로닉(pluronic) F-68일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 또한, 상기 담즙산은 우르소데옥시콜산, 타우로콜산, 타우로데옥시콜산 및 이들의 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되며, 바람직하게는 우르소데옥시콜산 또는 이의 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 또한, 상기 리포솜을 이루는 지질층, 스테롤계 화합물 및 담즙산은 각각 (1 내지 10) : 1 : (1 내지 10)의 질량 비로 포함되며, 리포솜은 평균 입경 10 내지 200nm이나, 바람직하게는 평균 입경 10 내지 100nm를 갖을 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명에 따른 상기 리포솜은 소장의 ABST(Apical sodium-dependent Bile acid transporter)를 표적화

하여 소장 상피세포를 투과할 수 있다.

- [0034] 또한, 본 발명에 따른 상기 리포솜의 내부 공간에 함압제가 봉입되는 것을 특징으로 하는 약물 전달체를 제공한다.
- [0035] 이때, 상기 함압제는 벤다무스틴, 독소루비신 및 젠시타빈으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택되며, 바람직하게는 벤다무스틴일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 약물 전달체를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0038] 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양의 고분자 접합체 또는 그의 염을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 "약학적으로 허용되는"이란, 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 의미한다.
- [0040] 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 갈슘 포스페이트, 갈슘 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.
- [0041] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 치료 효과적인 질환 상태 또는 증상이 있는 사람 또는 기타 포유동물에 적합하게는 주사 또는 기타 다른 방법으로 전달(예: 이식, 체강 또는 가능한 공간에 넣는 것, 신체의 조직 표면을 코팅 또는 이식 가능한 장치의 표면을 코팅함으로써)될 수 있지만, 특히, 상기 약학 조성물은 비경구로 전달되는 것이 바람직하다. 이때, "비경구"란 근육내, 복막내, 복부내, 피하, 정맥 및 동맥내를 의미한다. 그러므로 본 발명의 리포솜 약물 전달체를 포함하는 약학 조성물은 대표적으로 주사 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 주사 가능한 약학 조성물은 임의의 적합한 방법, 바람직하게는 피하 바늘을 통한 주사에 의해 사람 또는 기타 포유동물의 체내에 주사 또는 삽입할 수 있다. 예를 들면, 주사 또는 기타 다른 방식으로 동맥내, 정맥내, 비노생식기, 피하, 근육내, 피하, 두개내, 심장막내, 흉막내, 또는 기타 신체강 또는 가능한 공간내로 투여할 수 있다. 또는, 카테터 또는 시린지를 통해 예를 들어 관절경 시술 동안에 관절내로, 또는 비노생식관내로, 맥관내로, 구개내로 또는 흉막내, 또는 신체 내임의의 체강 또는 가능한 공간내로, 수술, 외과, 진단 또는 중재 시술 도중에 도입할 수 있다.
- [0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0048] <실시예 1> 폴록사머(Poloxamer) 와 담즙산의 결합(conjugation)
- [0049] Pluronic F-68 0.50 g, 우르소데옥시콜산(Ursoodeoxycholic acid; UDCA) 0.47 g, N,N'-디사이클로헥실카보디이미드(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide) 0.39 g, 4-디메틸아미노 피리딘(4-(Dimethylamino)pyridine) 0.23 g을 10 mL 의 디메틸 설폭사이드(Dimethyl sulfoxide)에 녹인 후 상온에서 24시간 동안 교반하여 반응시켰다. 반응 후, 생성된 부산물인 디사이클로헥실 우레아(dicyclohexyl urea)를 제거하기 위해 1 mL의 탈이온수(deionized water)를 첨가하여 침전시킨 후 0.45 μm 크기의 실린지 필터를 이용하여 제거하였다. 또한, 미반응물을 제거하기 위해 탈이온수(deionized water) 상에서 3일간 투석하였다. 투석 후 동결건조하여 최종 반응물을 ^1H NMR과 MALDI-TOF를 이용하여 분석하였다.

- [0050] H^1 NMR의 경우 DMSO-d6 에 반응물을 10 mg/mL 농도로 녹인 후 측정하여 수소원자 비를 구하여 측정하였다(도 2). 측정 결과, Pluronic PEO(Polyethylene Oxide) 지역의 수소원자(a), PPO(Polypropylene Oxide) 지역의 수소원자(b, c), UDCA 의 19번 탄소와 결합된 수소원자(d)의 화학이동(chemical shift) 값은 각각 3.51, 3.33, 1.03, 0.61(ppm)이었으며, a:d 부피비는 38.91:1.00 로 합성을 확인하였다.
- [0051] MALDI-TOF의 경우 클로로포름(Chloroform)에 1 mg/mL 농도로 녹인 후 Linear mode 상의 intensity를 측정하였다(도 3). 측정 결과 합성물의 분자량은 9149.4로 측정되었다.
- [0053] <실시예 2> **벤다무스틴 리포솜, 담즙산이 첨가된 리포솜 및 폴록사머-담즙산 결합체(conjugate)가 첨가된 리포솜의 제조**
- [0054] 2-1. 벤다무스틴 리포솜의 제조
- [0055] 20 mg의 하이드로제네이티드 포스파티딜콜린과 10 mg의 콜레스테롤, 5 mg의 벤다무스틴 하이드로클로라이드를 반응기에 넣고, 클로로포름 5 mL을 넣어 균일하게 녹여준 후 회전 증발기를 이용하여 클로로포름을 증발시켰다. 남아있는 클로로포름이 없도록 진공 펌프를 이용하여 제거한 후, 반응기 벽면에 얇은 막이 형성되는지 확인하였다. 반응기 벽면에 얇은 막이 형성되면 탈이온수(deionized water) 5 mL로 수화시켜 초음파처리 하였다. 이후, 압출기를 이용하여 200 nm, 100 nm 필터 페이퍼 순서로 각 3회씩 압출하여 크기를 조절하였다. 회수한 리포솜 용액을 MWCO 3500 투석막에 넣은 후 탈이온수(deionized water) 상에서 4시간 투석하여 봉입되지 않은 벤다무스틴을 제거하여 벤다무스틴이 봉입된 리포솜을 제조하였다(이하 "리포솜(Liposome)" 이라 칭함).
- [0056] 2-2. 담즙산이 첨가된 리포솜의 제조
- [0057] 상기 <실시예 2-1>에서 제조된 리포솜과 동일한 방법으로, 콜레스테롤 10 mg 대신 2.5 mg, 추가로 7.5 mg의 우르소데옥시콜산 나트륨염을 사용하여 벤다무스틴이 봉입되고, 담즙산이 첨가된 리포솜을 제조하였다(이하 "바이로솜(Bilosome)" 이라 칭함).
- [0058] 2-3. 폴록사머-담즙산 결합체(conjugate)가 첨가된 리포솜의 제조
- [0059] 상기 <실시예 2-2>에서 제조된 바이로솜과 동일한 방법으로, 추가로 상기 <실시예 1>에서 제조한 폴록사머-담즙산 결합체(conjugate)를 7.5 mg 첨가하여 벤다무스틴이 봉입되고, 폴록사머-담즙산 결합체(conjugate)가 첨가된 리포솜을 제조하였다(이하 "PFUB"로 칭함).
- [0060] 2-4. 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 첨가된 리포솜의 제조
- [0061] 상기 <실시예 2-3>과 동일한 방법으로, Pluronic F68-담즙산 결합체 대신 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol; PEG) 2k 를 2.5mg, 5mg, 7.5mg 첨가하여 리포솜을 제조하였다. 제조한 리포솜의 평균 크기, 다분산지수(Polydispersity index; PDI)값, 표면전하를 도 12에 나타냈다.
- [0062] 그 결과, PEG 고분자를 이용하여 리포솜을 제조한 경우, PDI 값이 0.5 이상으로 높은 수치를 보였는데, 이는 입자 분포도가 단일하지 않다는 것을 나타낸다.
- [0063] 따라서 PEG 고분자를 사용할 경우, PEG의 높은 친수성에 의해 리포솜 내부 소수성 영역에 삽입되기 어려워 리포솜과 따로 존재하여 PEG 끼리 존재할 수 있는 가능성을 시사한다.
- [0065] <실시예 3> **동적광산란법 나노입자분석기를 통한 벤다무스틴 봉입 리포솜의 형성 여부 확인**
- [0066] 상기 <실시예 2>에서 제조한 리포솜, 바이로솜, PFUB를 회수하여 동적광산란법 나노입자분석기에 1 mL 시료를 취해 측정하고, 이를 도 4에 나타내었다.
- [0067] 그 결과, 리포솜 41.37 ± 5.31 nm, 바이로솜 89.09 ± 3.82 nm, PFUB 89.33 ± 8.11 nm 크기로 평균 100nm 이하의 크기를 갖는 벤다무스틴 봉입 리포솜이 형성됨을 확인하였다. 또한, 제타전위 값은 리포솜 $+1.94 \pm 0.28$ mV, 바이로솜 13.10 ± 0.36 mV, PFUB 6.27 ± 0.63 mV로 양의 값을 가져 세포 투과성이 향상되고, 그 값이 크지 않아 리포솜, 바이로솜, PFUB 제형 자체만으로 세포독성을 갖지 않아 안전하다.
- [0069] <실시예 4> **투과전자현미경을 통한 벤다무스틴 봉입 리포솜의 형성 확인**
- [0070] 상기 <실시예 2>에서 제조한 리포솜, 바이로솜, PFUB를 회수하여 각 10 μ l씩 250-mesh 카본 그리드에 처리한 후, 탈이온수(Deionized water)를 이용하여 삽입되지 않은 리포솜을 제거한 다음 2% 우라닐 아세테이트 용액으로 음성염색 하였다. 상기 시료를 12시간 건조시킨 후, 투과전자현미경 이미지를 측정하였다.

- [0071] 상기 <실시예 3>에서의 결과와 동일하게, 평균 100nm 이하의 크기를 갖는 벤다무스틴 봉입 리포솜이 형성됨을 확인하였다(도 5).
- [0073] <실시예 5> 벤다무스틴 봉입 리포솜의 벤다무스틴 방출 양상 확인
- [0074] 상기 <실시예 2>에서 제조한 리포솜, 바일로솜, PFUB의 방출 양상을 확인하기 위해 벤다무스틴 봉입 리포솜을 MWCO 3500 투석막에 1 mL을 넣은 후 pH 7.4 0.01M, 0.9% 염화나트륨을 함유한 인산 완충용액 10 mL이 들어있는 코니컬 튜브에 넣고, 각 시간별로 새로운 완충용액으로 갈아주어 회수한 용액을 고성능 액체크로마토그래피 피크면적 분석을 통해 정량하였다.
- [0075] 그 결과, 벤다무스틴은 리포솜에서 24시간 동안 35%, 바일로솜 28%, PFUB 43%로 방출됨을 확인하였다(도 6).
- [0077] <실시예 6> 모사 위액 및 모사 장액에서의 리포솜, 바일로솜, PFUB 안정성 확인
- [0078] 상기 <실시예 2>에서 제조한 리포솜, 바일로솜, PFUB를 위장관 환경에서 안정성 확인을 위해 모사 위액, 모사 장액에서 크기와 PDI(Polydispersity Index) 값을 측정하였다.
- [0079] 모사 위액은 pH 1.2 로 제작되었으며 deionized water에 염화나트륨, 염화수소를 녹여 pH meter기를 이용해 확인하였다. 모사 장액은 deionized water에 제1 포타슘포스체이트(monobasic potassium phosphate), 수산화나트륨을 녹여 pH meter기를 이용해 pH 6.8 로 제작됨을 확인하였다. 또한, 모사 장액의 경우 1% (w/v) 판크레아틴(pancreatin) 효소를 첨가하여 제조하였다. 제조된 모사 위액과 모사 장액에 20% (v/v) 리포솜, 바일로솜, PFUB 용액을 처리하고 37℃, 50 rpm 교반 환경에서 4시간 동안 교반하였다. 이후 크기 변화와 PDI값 변화를 동적광산란법 나노입자분석기를 이용해 확인하였다.
- [0080] 그 결과, 위 모사 용액과 장 모사 용액 하에서 리포솜, 바일로솜, PFUB 의 유의미한 크기 변화는 보이지 않았다. 그러나 PDI 의 경우, 리포솜에서 그 값이 증가하였고 편차도 증가함을 확인할 수 있었다. PFUB의 경우, PDI값은 0.11에서 0.14로 위 모사 용액 보다 장 모사 용액에서 소폭 증가하였지만 편차는 유의미한 변화를 보이지 않음을 통해 입자 분포가 유지되고 약물이 안정하게 봉입됨을 확인할 수 있었다. 또한, 바일로솜의 경우, 0.13에서 0.2로 증가하여 제형 안정성이 감소됨을 확인할 수 있었다. 리포솜의 경우, 위 모사 용액 0.19 보다 장 모사 용액에서 0.26으로 증가하여 제형 안정성이 감소됨을 확인할 수 있었다(도 7).
- [0081] 따라서 PFUB의 경우 플루로닉의 계면활성작용으로 인해 위 모사 환경에서 장 모사 환경으로 변화해도 약물을 안정하게 봉입하고 제형 안정성을 유지할 수 있음을 확인하였다.
- [0083] <실시예 7> Caco-2 세포 monolayer를 이용한 리포솜, 바일로솜, PFUB의 세포 투과성 확인
- [0084] 상기 <실시예 2>에서 제조한 리포솜, 바일로솜, PFUB 의 세포 투과성을 확인하기 위해 Caco-2 세포를 이용하였다. Caco-2 세포 passage 는 42~45를 사용하였고 이 passage의 caco-2 세포는 p-당단백질(p-glycoprotein) 활성 및 여타 다른 리셉터(receptor), 트랜스포터(transporter)의 작용이 활발하여 실험에 적합하다.
- [0085] 6-well transwell 상층부 반투과성 표면에 caco-2 세포를 배양하고 28일 후 monolayer가 형성되었음을 확인하였다. 이후, 제형화하지 않은 벤다무스틴, 리포솜, 바일로솜, PFUB를 100 µg/mL의 농도로 상층부에 처리하여 4시간 동안 orbital shaker 상에서 37℃, 100 rpm 환경에서 배양하였다. 이후, 투과된 벤다무스틴 양을 측정하기 위해 상층부, 하층부 용액을 취해 고성능 액체크로마토그래피로 분석하여 겔보기 투과계수, 투과비율(Efflux ratio), 투과 벤다무스틴을 정량하였다. 겔보기 투과계수는 하기 식(1)에 의해 산출하였고, Efflux ratio는 하기 식 (2)에 의해 산출하였다.
- [0087] 식 (1) : 겔보기 투과계수 = $(dQ/dT)/C \cdot A$
- [0088] (dQ/dT 는 단위시간당 투과된 벤다무스틴 양이며 C는 초기 투여농도, A는 세포 monolayer 단면적이다.)
- [0089] 식 (2) : Efflux ratio = (B to A 겔보기 투과계수/A to B 겔보기 투과계수)
- [0090] (A는 Apical side 이며 B 는 Basolateral side 로, 각각 위, 아래 방향성을 의미한다. 아래에서 위로 투과한 벤다무스틴 겔보기 투과계수를 위에서 아래로 투과한 벤다무스틴 겔보기 투과계수로 나누어 계산하였다.)
- [0092] 그 결과, 제형화하지 않은 벤다무스틴(Free BM)의 경우 위쪽(Apical side)에서 아래쪽(basolateral side)으로의 겔보기 투과계수는 1.32였으며, 리포솜, 바일로솜, PFUB 경우 각각 2.51, 2.93, 4.18로 증가하였다. PFUB의 경우 free BM 대비 3.67배 높은 겔보기 투과계수를 나타내었으며, 이는 플루로닉(pluronic)의 계면활성 작용에 의한 제형 안정성 증가 및 세포막 투과도가 향상됨을 의미한다. 또한, 리포솜, 바일로솜, PFUB 모든 실험군에서

겉보기 투과계수가 증가하였고, 이는 리포솜 제형화를 통한 벤다무스틴 안정성 향상, 세포막과의 친화성이 높은 리포솜 제형의 특성에서 기인한다(도 8a).

[0093] 또한, TCA는 타우로콜산(taurocholic acid)으로 세포막에 존재하는 담즙산 수송 단백질인 ASBT로 흡수될 수 있다. UDCA와 경쟁적으로 작용하여 PFUB가 ASBT를 통한 트랜스사이토시스(transcytosis)에 의해 세포를 투과할 수 있는지 여부를 판단하기 위해 실험을 수행하였다. 그 결과, TCA의 존재 하에서 각 실험군의 세포 투과도는 free BM, 리포솜, 바일로솜, PFUB 각각 1.22, 2.82, 3.08, 3.74 였으며, 도 8(a)의 값과 비교하여 PFUB 실험군을 제외하고 리포솜, 바일로솜은 TCA 존재 유무에 관계없이 세포를 투과함을 확인할 수 있었다. 그러나, PFUB 실험군의 경우 TCA가 존재함에 따라 약 10.53%의 벤다무스틴 세포 투과도가 차이남을 확인하였다(도 8b).

[0094] 또한, 투과비율(Efflux ratio)의 경우 free BM은 1 이상의 수치를 보여주었다. 이는 free BM 이 세포막 표면에 존재하는 유출펌프(efflux pump) 인 p-glycoprotein 기질임을 보여준다. 그러나, 리포솜 제형화를 통해 p-glycoprotein에 의한 세포 efflux가 줄어들음을 확인할 수 있었다. 또한, efflux는 TCA 존재 유무에 따라 유의미한 결과 차이를 보이지 않았으며 이는 efflux 의 경우 p-glycoprotein 단백질의 영향을 주로 받기 때문이다(도 9).

[0095] 또한, 투과된 BM의 양을 정량하여 free BM 대비 제형화를 통한 실험군에서 얼마나 투과량이 향상되었는지 파악할 수 있다. free BM 의 경우, 약 6 μ g이 투과되었으며, 리포솜, 바일로솜, PFUB의 경우, 각각 1.91배, 2.18배, 3.13배 투과량이 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, PFUB를 제외한 실험군은 TCA 존재 유무에 따라 투과량의 유의미한 차이를 보이지 않았으며, PFUB의 경우 TCA가 존재함에 따라 free BM 대비 2.5배 향상되었음을 확인하였다. 이는, PFUB의 세포 투과에는 pluronic에 결합된 UDCA에 의한 ABST 매개 트랜스사이토시스(ASBT-mediated transcytosis)에 의해 단순 리포솜 제형화보다 세포 투과도가 향상될 수 있었음을 의미한다(도 10).

[0097] <실시예 8> MCF-7 세포를 이용한 독성 확인

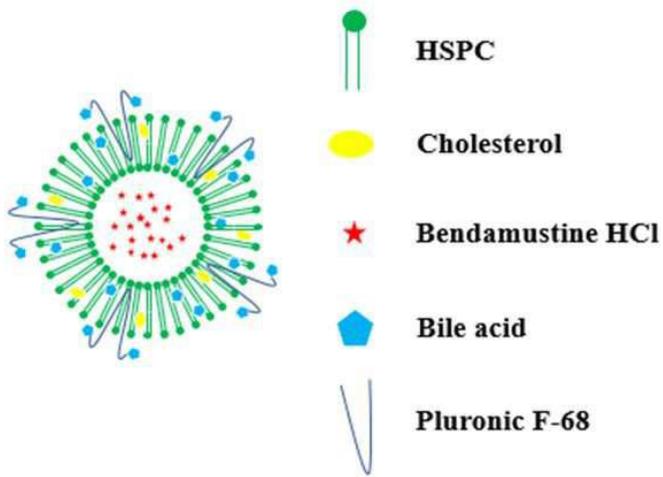
[0098] 상기 <실시예 2>에서 제조한 리포솜, 바일로솜, PFUB 의 세포 독성을 알아보기 위해 MCF-7 세포를 이용하였다. MCF-7 세포는 인간 유방암 세포주이다.

[0099] 96-well plate에 MCF-7 세포를 배양하고 제형화하지 않은 벤다무스틴, 리포솜, 바일로솜, PFUB를 농도별로 처리하여 4시간 동안 uptake 시켰다. 이후 uptake 되지 않은 샘플을 세척하고 약물의 작용을 위해 24시간 동안 배양하였다. 이후 MCF-7 세포 생존률을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하여 흡광도 값을 결과처리 하였다.

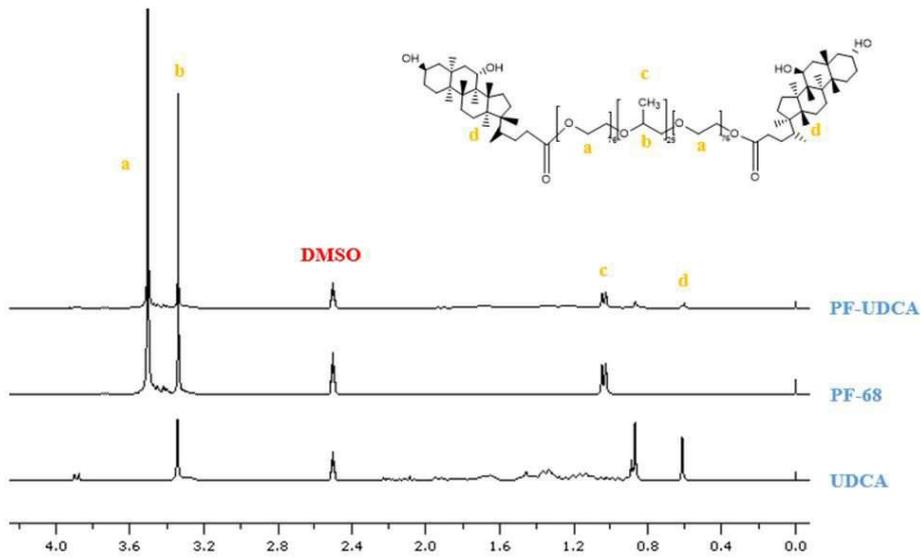
[0100] 그 결과, 0.5 mg/mL의 농도에서는 free BM의 세포 독성이 높게 나타났다. 이는 리포솜 제형화를 통한 경우 약물의 방출이 조절되는 것에 더 영향을 받아 방출이 필요 없는 free BM 실험군에서 더 높게 나타남을 확인할 수 있다. 이후 농도가 낮아짐에 따라 free BM 실험군보다 리포솜, PFUB 실험군에서 더 높은 독성을 확인할 수 있었다. 이는 세포 투과도 요인에 의한 영향을 받아 세포 투과도가 더 높은 리포솜, PFUB 군에서 독성이 높게 나오는 것을 확인할 수 있다. 또한, 바일로솜 실험군의 경우 약물 방출이 가장 느리게 되므로 전체적으로 독성이 낮게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한, 리포솜 자체 독성은 없는 수준이었으며, 모든 실험군에서 0.003 mg/mL 이하의 농도에서 무시할만한 독성 수준을 나타내었다(도 11).

도면

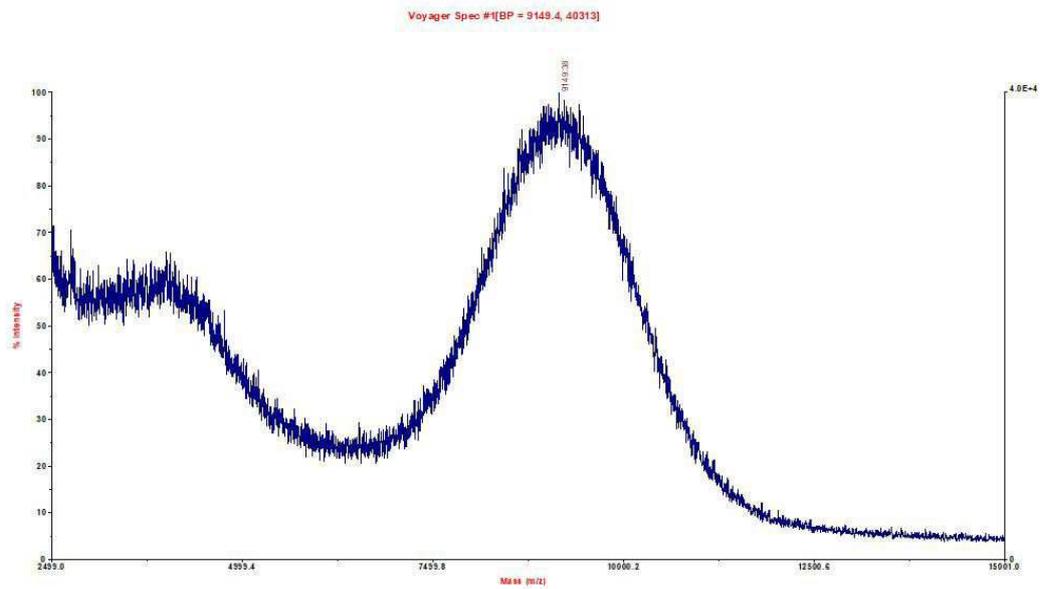
도면1



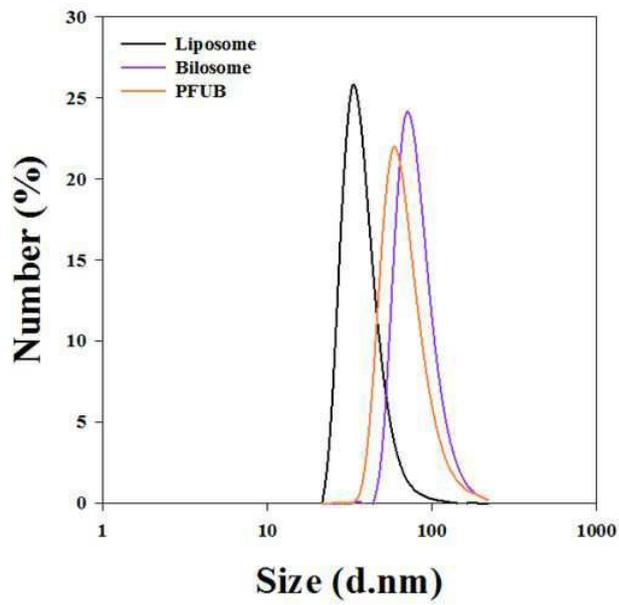
도면2



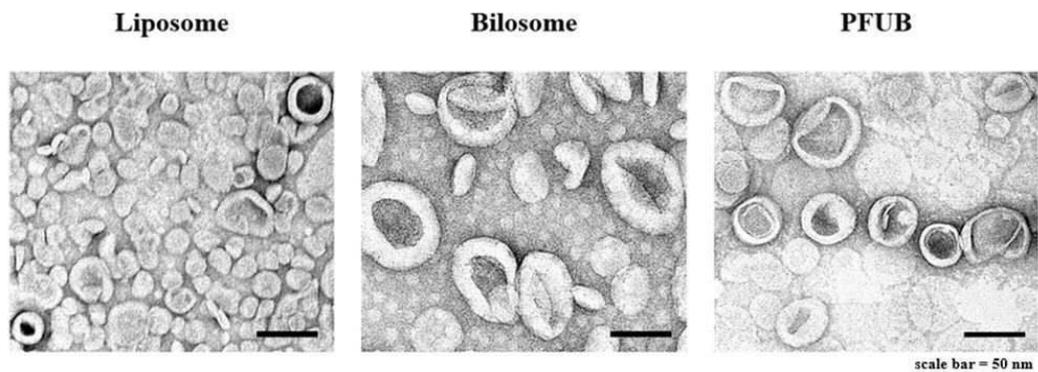
도면3



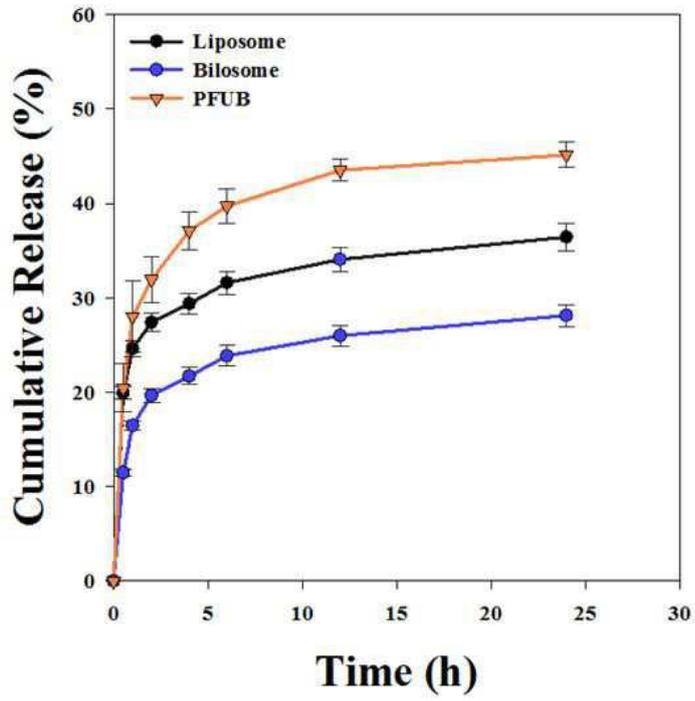
도면4



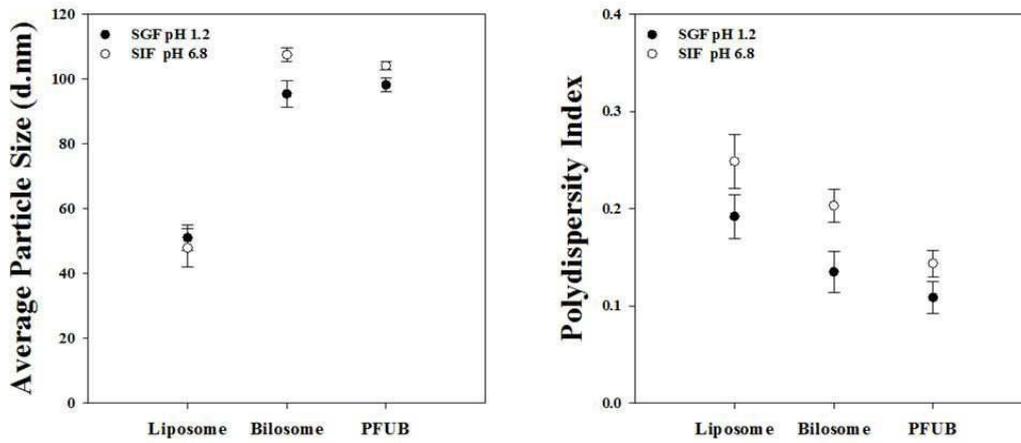
도면5



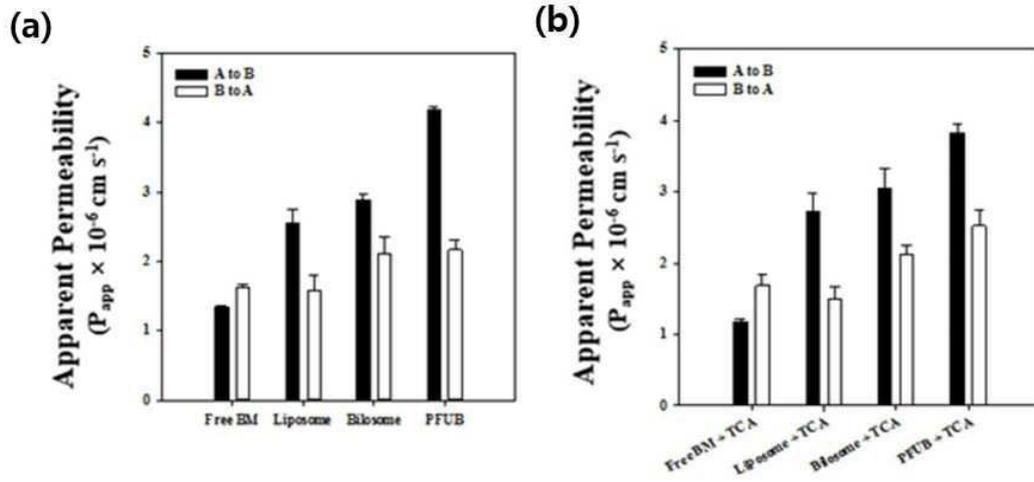
도면6



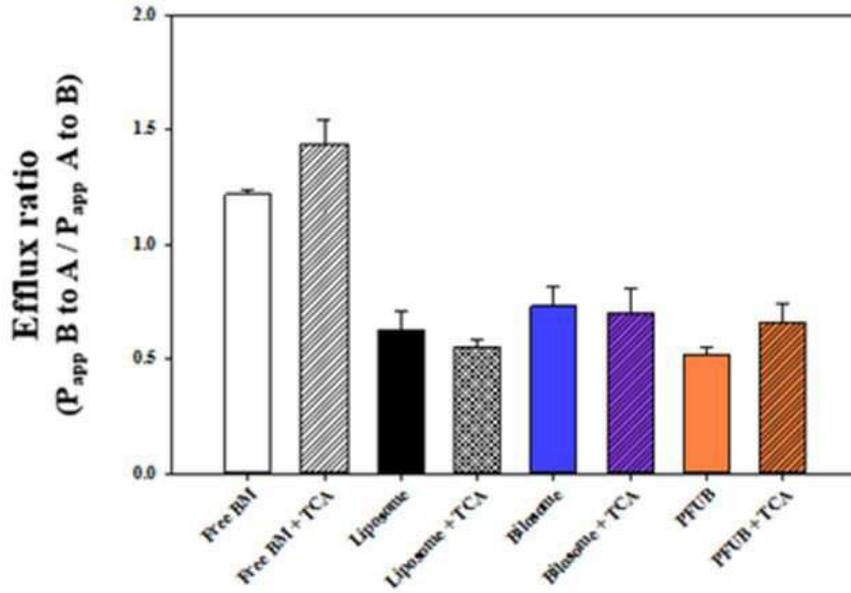
도면7



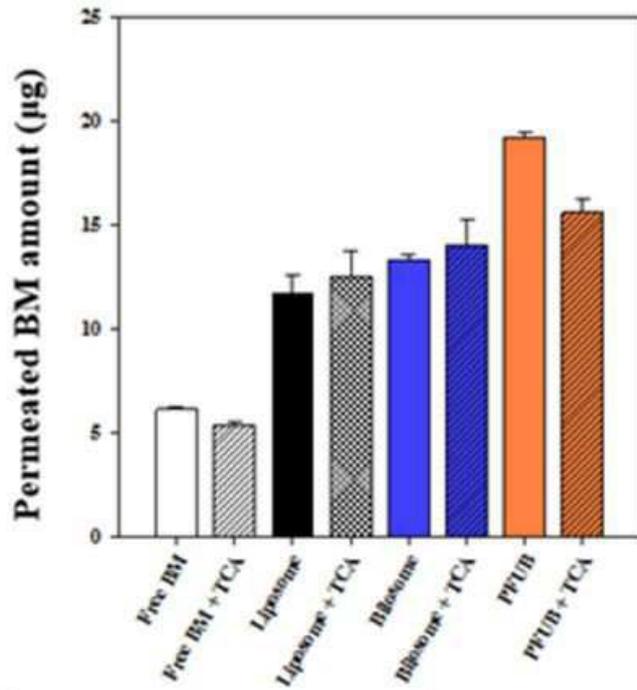
도면8



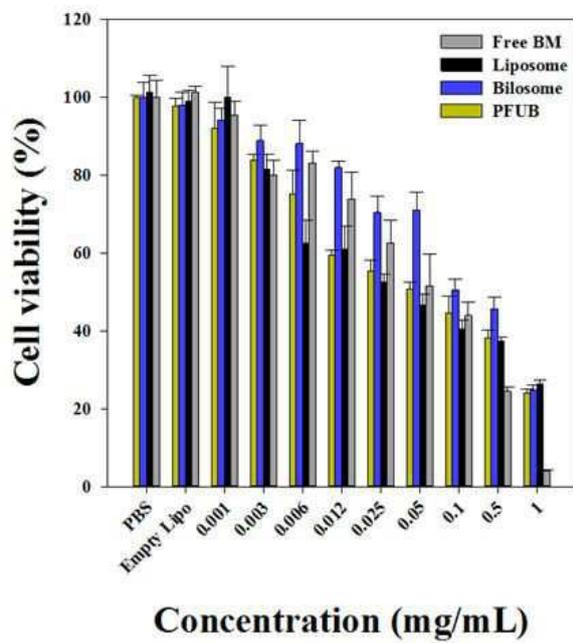
도면9



도면10



도면11



도면12

	Bendamustine	HSPC	Cholesterol	UDCA	PEG _{2k}
PEG-liposome 1	5	20	2.5	7.5	2.5
PEG-liposome 2	5	20	2.5	7.5	5
PEG-liposome 3	5	20	2.5	7.5	7.5

Unit : mg

	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
PEG-liposome 1	49.36 ± 12.28	0.56 ± 0.04	19.20 ± 0.19
PEG-liposome 2	50.63 ± 9.37	0.56 ± 0.03	19.00 ± 0.94
PEG-liposome 3	55.50 ± 2.03	0.51 ± 0.06	20.20 ± 0.93