



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2012년11월13일  
(11) 등록번호 10-1198715  
(24) 등록일자 2012년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)  
A61K 31/122 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2010-0045399  
(22) 출원일자 2010년05월14일  
심사청구일자 2010년05월14일  
(65) 공개번호 10-2011-0125818  
(43) 공개일자 2011년11월22일  
(56) 선행기술조사문헌  
논문1: LANGMUIR  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
(72) 발명자  
이명규  
대전광역시 서구 월평선사로 70, 204동 1002호  
(월평동, 무궁화아파트)  
아미르 아바스 목타리에  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동, 한국생명공학연구원)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이원희

전체 청구항 수 : 총 27 항

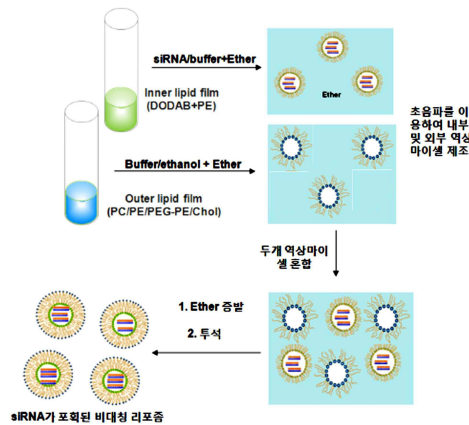
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 **핵산 및 친수성 음이온 화합물의 고효율 포획을 위한 비대칭 리포솜 및 이의 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 핵산 및 친수성 음이온 화합물의 고효율 포획을 위한 비대칭 리포솜 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로, 내부지질로서 헤드(head)가 작은 양이온 지질, 외부지질로써 헤드(head)가 큰 중성 또는 폐길화(PEGylation)된 지질로 구성되고, 상기 내부지질에 핵산 및/또는 음이온 화합물이 포획된 비대칭 리포솜에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 핵산 및 친수성 음이온 화합물이 고효율로 포획된 비대칭 리포솜을 제조할 수 있어, 유전자 치료분야뿐만 아니라 프로드러그로 제조가 어려운 친수성 음이온 약물전달 및 형광 조영제를 상기 리포솜에 포획하여 약물전달, 이미징 등의 다양한 목적에 사용할 수 있다.

**대표도 - 도3**



(72) 발명자	(56) 선행기술조사문헌
<b>정봉현</b>	US20040191306 A1
대전광역시 서구 청사로 70, 113동 607호 (월평동, 누리아파트)	논문2: RNA
<b>최종민</b>	US7341738 B2
대전광역시 대덕구 대전로1032번길 13-14 (오정동)	US20050064595 A1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NBC5700911
부처명	교육과학기술부
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	폐암 치료용 흡입/주사형 핵산 전달시스템
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2009년 07월 10일 ~ 2010년 06월 30일

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

내부지질로써 헤드(head)가 작은 양이온 지질을 포함하고, 외부지질로써 콜레스테롤, 헤드(head)가 큰 중성 인지질 및 폐길화(PEGylation)된 인지질로 구성되고, 상기 내부지질에 핵산 및 친수성 음이온 화합물로부터 선택되는 1종 이상이 포획되어 있고, 상기 외부지질은 중성 또는 음전하를 띠는 비대칭 리포솜.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 비대칭 리포솜 표면에 세포 표적 지향적 전달 및 세포투과를 위한 기능을 부착하되, 상기 기능기는 항체 또는 펩티드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 헤드가 작은 양이온 지질은 디올레일다이메틸암모늄프로판(DODAP)이고, 상기 내부지질은 디팔미토일포스페이티딜에타놀아민(DPPE) 또는 디올레일포스페이티딜에타놀아민(DOPE)를 더 포함하되, 조성 비율은 DODAP:DOPE 또는 DODAP:DPPE = 1:1 내지 9:1인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 외부지질의 중성 인지질은 디스테아로일포스페이티딜콜린(DSPC) 또는 디팔미토일포스페이티딜콜린(DPPC)의 포스페이티딜콜린(PC)계 중성 인지질을 포함하는 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 외부지질의 중성 인지질은 디스테아로일포스페이티딜콜린/디올레일포스페이티딜에타놀아민(DSPC/DOPE), 디팔미토일포스페이티딜콜린/디올레일포스페이티딜에타놀아민(DPPC/DOPE) 또는 디스테아로일포스페이티딜콜린/디팔미토일포스페이티딜에타놀아민(DSPC/DPPE)인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 중성 인지질의 함량은 몰비로 전체 외부지질의 3/7 내지 1/2인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 8**

제6항에 있어서, 상기 포스페이티딜에타놀아민(PE) 계 중성 인지질의 함량은 몰 비로 DSPC/DOPE, DPPC/DOPE 또는 DSPC/DPPE인 전체 중성 인지질의 1/2 이하인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 콜레스테롤의 함량은 몰 비로 전체 외부지질의 1/3 내지 1/2인 것을 특징으로 하는 비

대칭 리포솜.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 폐길화된 인지질은 폴리에틸렌글라이콜-포스페이티딜에타놀아민(PEG-PE) 및 기능기 도입을 위한 기능성 PEG-PE를 포함하되, 상기 폐길화된 인지질의 함량은 몰 비로 전체 외부지질의 1/6 내지 1/4 인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

제10항에 있어서, 상기 기능성 PEG-PE의 함량은 몰 비로 전체 외부지질의 1/60 이하인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 상기 핵산과 양이온 지질의 음이온/양이온(N/P) 비율은 몰 비로 1:2 내지 1:10인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 상기 외부지질이 내부지질에 비해 몰 비로 1.1-1.2배 많은 양을 사용하는 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜.

**청구항 15**

에테르/완충액 혼합용액을 사용하여 양이온 지질을 포함하는 내부지질에 핵산 및 친수성 음이온 화합물로부터 선택되는 1종 이상이 포획된 내부 역상 마이셀을 제조하는 단계(단계 1);

에테르/알코올/완충액 혼합용액을 사용하여 중성 인지질, 폐길화된 인지질 및 콜레스테롤의 혼합에 대한 외부 역상 마이셀을 제조하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 1 및 단계 2에서 제조된 내부 역상 마이셀과 외부 역상 마이셀을 혼합한 다음 유기용매를 증발시키고 투석에 의해 핵산 및 친수성 음이온 화합물로부터 선택되는 1종 이상이 포획된 비대칭 리포솜을 제조하는 단계(단계 3)를 포함하는 제1항의 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 단계 1은 pH가 4인 완충액에 양이온 지질을 포함하는 내부지질과 핵산 및 친수성 음이온 물질로부터 선택되는 1종 이상을 현탁 시킨 후, 에테르를 넣고 초음파로 교반 시켜 내부 역상 마이셀을 제조하는 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 17**

제15항에 있어서, 상기 단계 1에서 핵산이 포획된 리포솜 제조시 핵산과 양이온 지질의 음이온/양이온(N/P) 비율은 몰 비로 1:2 내지 1:10인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 상기 단계 1의 내부지질은 DODAP에 DOPE 또는 DPPE를 1:1 내지 9:1의 비율로 혼합하여 사용하는 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 19**

제15항에 있어서, 상기 단계 1에서 핵산 및 친수성 음이온 화합물로부터 선택되는 1종 이상은 단독 또는 동시에 포획되는 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 20**

제15항에 있어서, 상기 단계 2는 알코올과 완충용액에 중성 인지질, 폐길화된 인지질 및 콜레스테롤을 넣고 현탁 시킨 후, 에테르를 넣고 초음파로 교반 시켜 외부 역상 마이셀을 제조하는 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 알코올과 완충액 혼합용액은 2:1 내지 1:1 비율로 섞은 용액인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 22**

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 23**

제20항에 있어서, 상기 중성 인지질은 DSPC/DOPE, DPPC/DOPE 또는 DSPC/DPPE인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 24**

제20항에 있어서, 상기 중성 인지질의 함량은 몰 비로 전체 외부지질의 1/3 내지 1/2인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 25**

제23항에 있어서, 상기 포스페이티딜에타놀아민(PE)계 중성 인지질의 함량은 몰비로 DSPC/DOPE, DPPC/DOPE 또는 DSPC/DPPE인 전체 중성 인지질의 1/2 이하인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 26**

제20항에 있어서, 상기 콜레스테롤의 함량은 몰 비로 전체 외부지질의 1/3 내지 1/2 인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 27**

제20항에 있어서, 상기 폐길화된 인지질은 폴리에틸렌글라이콜-포스페이티딜에타놀아민(PEG-PE) 및 기능기 도입을 위한 기능성 PEG-PE를 포함하되, 상기 폐길화된 인지질의 함량은 몰 비로 전체 외부지질의 1/6 내지 1/4 인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

제27항에 있어서, 상기 기능성 PEG-PE의 함량은 몰 비로 전체 외부지질의 1/60 이하인 것을 특징으로 하는 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 30**

에테르/완충액 혼합용액을 사용하여 양이온 지질을 포함하는 내부지질에 핵산 및 친수성 음이온 화합물로부터 선택되는 1종 이상이 포획된 내부 역상 마이셀을 제조하는 단계(단계 1);

에테르/에탄올/완충액 혼합용액을 사용하여 중성 인지질, 폐길화된 인지질 및 콜레스테롤의 혼합에 대한 외부 역상 마이셀을 제조하는 단계(단계 2);

상기 단계 1 및 단계 2에서 제조된 내부 역상 마이셀과 외부 역상 마이셀을 혼합한 다음 유기용매를 증발시키고 투석에 의해 핵산 및 친수성 음이온 화합물로부터 선택되는 1종 이상이 포획된 비대칭 리포솜을 제조하는 단계(단계 3); 및

상기 단계 3에서 제조된 비대칭 리포솜 표면에 기능기를 부착하는 단계(단계 4)를 포함하는 제2항의 비대칭 리포솜의 제조방법.

**청구항 31**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 핵산 및 친수성 음이온 화합물의 고효율 포획을 위한 비대칭 리포솜 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 의약 제제 산업에 있어 약물의 부작용을 줄이고 효능 및 효과를 극대화시켜 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계한 약물전달시스템(DDS; Drug Delivery System)은 신약개발과 맞먹는 경제적 이익을 창출할 수 있으면서 성공 가능성이 큰 고부가가치 핵심기술로서 약물투여를 효율화 함으로서 환자 치료의 질을 높이는 데 그 목적이 있다.

[0003] 약물전달시스템의 핵심기술 중의 하나인 약물흡수 촉진 기술에 속하는 난용성 약물의 가용화 기술은 신약 물질의 개발비용을 줄일 수 있는 동시에 현재 출시되어 있는 의약품의 부가가치를 높일 수 있는 가장 합리적인 방법으로 여겨지고 있다. 특히, 우리나라와 같이 신약개발 여건이 열악한 상황에서 약물의 가용화 기술의 개발을 통한 개량 신약의 개발은 적은 비용으로 막대한 부가가치를 창출할 수 있는 분야이다(KAIST 기술동향보고서, 2004).

- [0004] 오늘날 유전자의 전달이나 약물전달의 수단으로 가장 각광받고 있는 물질 가운데 하나가 리포솜이라 할 수 있다.
- [0005] 리포솜은 양친매성 지질의 생체세포막의 구성성분인 인지질(phospholipid)을 주성분으로 사용하여 형성된 지질-이중막(lipid-bilayer)구조의 소포체(vesicle)로서 내부 수상(aqueous compartment)에 수용성 약물을 봉입시키거나 지질-이중막에 소수성 약물을 담지시킬 수 있는 약물전달체이다. 이러한 리포솜의 막 구조는 세포막의 구조와 비슷하여 독성이 적고 세포와의 융합이나 세포 내 이입을 통해 약물전달이 가능하며 또한, 조합에 따라 크기, 표면 전하 및 화학적 개질 등 특성의 조절이 가능하고 특히, 우수한 생체적합성 때문에 약물전달체로서 연구가 활발히 진행되어 왔다(Bangham, Torchilin, V. P. 2005, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4; 145).
- [0006] 상용화된 리포솜 제제로서 미국 Gilead사와 일본 Fujisawa사가 진균 감염증을 적응증으로 개발한 Ambisome을 들 수 있다(도 1 참조). Ambisome은 약 100 nm의 크기를 갖는 리포솜의 단일 이중층(unilamellar bilayer)에 진균 감염증 치료제인 Amphotericin이 인지질의 장쇄 알킬기와 소수성 인력에 의해 삽입시킨 제형이며, hydrogenated soy phosphatidylcholine(HSPC), cholesterol, distearoylphosphatidyl glycerol(DSPG), 산화방지제, 응집방지제 등의 성분으로 이루어진 동결건조 제품이다(미국FDA product information Amphotericin).
- [0007] 전신순환을 목적으로 하는 다른 입자형 약물전달체의 경우와 마찬가지로 리포솜은 혈중 단백질의 흡착으로 인해 간이나 비장에 많이 존재하는 대식세포의 식작용(phagocytosis)에 의해 순환계에서 소실되거나, 혈중 순환과정 중 리포솜으로부터 약물이 유출되는 문제점이 있었다. 특히, 대식세포의 식작용은 리포솜 표면에 옹소닌 단백질(opsonic protein)의 흡착을 통해 발생하기 때문에 이러한 문제점을 해결하는 기술로서 인지질의 말단에 PEG(poly[ethylene glycol])을 결합시킨 인지질-PEG유도체를 리포솜의 구성성분으로 사용하거나, 제조된 리포솜의 표면을 PEG 또는 다당류 등으로 코팅함으로써 옹소닌 단백질의 흡착을 억제할 수 있는 리포솜이 개발되었다. 이러한 리포솜은 대식세포의 식작용에 의한 약물의 소실을 감소시킴으로써 약물의 혈중순환시간을 연장하고, 나아가 표적 장기로의 약물 도달률을 높이는 효과를 발휘한다. 특히, 미국 Alza사에 의해 개발된 100 nm크기의 PEG-리포솜 기술은 흔히 스텔스-리포솜(Stealth liposome)으로 불리며, 혈중순환시간이 증가된 리포솜화 항암제로 상용화되었다. 미국 Ortho Biotech사는 스텔스-리포솜 기술을 세포독성 안트라사이클린(anthracycline)계 항암제인 독소루비신(doxorubicin)에 적용한 Doxil을 상용화하였다(미국FDA product information Doxil).
- [0008] Antisense RNA, siRNA등의 핵산은 생체 내에서 특정 단백질의 발현을 억제할 수 있는 물질로, 암, 유전병, 감염 질병, 자가면역 질환 등의 치료에 중요한 도구로 각광받고 있다(Novina and Sharp, *Nature*, 430, 161-164, 2004). 그러나 siRNA와 같은 핵산은 세포 내로 직접 전달이 어렵고, 혈액 내에서 효소에 의해 쉽게 분해되므로 이를 극복하기 위한 연구들이 많이 진행되고 있다.
- [0009] 현재까지 핵산을 세포 내로 운반하는 방법으로 양전하 지질 또는 중합체와 섞어 운반하는 방법(각각 지질-DNA 접합체(lipoflex) 및 폴리머-DNA 접합체(polyflex)라 명명함)이 주로 사용되고 있다(Hirko등, *Curr. Med. Chem.*, 10, 1185-1193, 2003; Merdan등, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 54, 715-758, 2002; Spagnou등, *Biochemistry*, 43, 13348-13356, 2004). 지질-DNA 접합체는 핵산과 결합하여 세포 내로 핵산을 잘 전달시켜 세포수준에서 많이 사용되고 있으나, 생체 내에서는 국부적으로 주사 시 많은 경우 체내에서 염증을 유발시키며(Filonand 및 Phillips, *Biochim. Biophys. Acta*, 1329, 345-356, 1997), 혈관 내 주사 시 주로 1차 통과기 관들인 폐, 간, 비장 등과 같은 조직에 축적되는 단점이 있다(Ren 등, *Gene Therapy*, 7, 764-768, 2000). 반면에 체내에서 존재하는 인지질은 중성 또는 음전하를 띠므로, 핵산 결합력이 매우 낮은 단점이 있다.
- [0010] 이를 극복하는 방법으로 siRNA의 비주형가닥(sense strand)에 콜레스테롤등 다른 지질에 결합시켜 siRNA를 운반하는 방법이 시도되고 있으나, 이들 결합체들은 혈액 내의 LDL 및 HDL등 리포프로테인과 결합되어 운반되어 주로 간 조직 특이성을 보인다(Soutschek 등, *Nature*, 432, 173-178, 2004; Wolfrum등, *Nat. Biotechnol.*, 25, 1149-1157, 2007).
- [0011] 또한, 양이온성 폴리머에 핵산을 결합시킨 결합체(polyplex)도 보체(complement)에 의하여 제거되는 등 원하는 조직으로의 운반 효율이 낮은 단점이 있다(Plank등, *Human Gene Ther.*, 7, 1437-1446, 1996; Chui등, *Chem. Biol.*, 11, 1165-1175, 2004; Elmen등, *Nucleic Acids Res.*, 33, 439-447, 2005).
- [0012] 이외에도 siRNA의 노출은 톨-유사 수용체(Toll-like receptor)에 효능제(agonist)로 작용하여 비특이적으로

인터페론 알파 발현을 증가시키거나(Hornung등, Nat. Med., 11, 263-270, 2005) 비특이 선천성 면역 반응을 일으키기도 한다(Judge등, Nat. Biotech., 23, 457-462, 2005).

[0013] siRNA의 안정성을 높이고 비 특이 면역반응을 없애고자 하는 연구로는 siRNA의 2'-OH를 2'-F, 2'-OMe 및 2'-H 치환하는 방법이 사용되지만(Morrissey등, Hepatology, 41, 1349-1356, 2005), 합성 비용이 많이 드는 단점이 있고, delivery를 위해서는 지질-DNA 접합체(lipoflex) 및 폴리머-DNA 접합체(poliflex)를 만들어야 한다.

[0014] 친수성 음이온 약물은 세포투과가 매우 어렵기 때문에 이들에 대해서는 대부분 세포투과가 가능한 프로드러그 형태로 만들어 치료제로 개발하고 있다. 또한, 칼세인(calcein), 인도시아닌-그린(indocyanine green), 클로로톡신(Cy5.5)등 친수성 음이온 형광물질들은 생체 내에서 리포솜의 이동을 측정할 수 있는 중요한 이미징 도구로 사용할 수 있다.

[0015] 리포솜에 핵산을 포획하는 방법으로는 핵산의 강력한 음이온 성질을 이용하여 양이온 지질이 포함된 지질 복합체에 포획시키는 방법들이 사용되고 있다. 현재까지 개발된 방법 중 고분자 핵산의 포획률이 높은 방법들로는 난황 포스파티딜콜린/콜레스테롤/라이신-디파미토일 포스파티딜에타놀아민 (EPC/CH/lysine-DPPE)을 사용하는 초음파를 이용한 교반 방법(다양한 핵산에 대한 포획률, 60-100%)(Puyal등, Eur. J. Biochem. 15, 697-703, 1995), 디올레오일포스파티딜에탄올아민/폴리에틸렌글라이콜-세린/디올레오일디메틸암모늄-클로라이드(DOPE/PEG-Cer/DODAC)를 사용하는 계면활성제 투석(detergent dialysis) 방법(4-10 Kbp, 포획률 60-70%)(Wheeler등, Gene Ther., 6, 271-281,1999), 디올레일디메틸아모늄-프로판/콜레스테롤/디스테아로일-sn-글리세롤-포스포콜린/폴리에틸렌글라이콜-세린(DODAP/Chol/DSPC/PEG-cer) 또는 디스테아로일-sn-글리세롤-포스포콜린/콜레스테롤/N-[메톡시 폴리(에틸렌글라이콜)2000]카바모일]-1,2-디마이스틸록실프로필-3-아민/1,2-디리놀레이록시-3-디메틸아미노프로판(DSPC/Chol/PEG-C-DMA/DLinDMA)을 사용하는 에탄올 투석법(각각 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN) 포획률 50% 또는 siRNA 포획률 93%)(Semple, 2001 *Biochim. Biophys. Acta*, 1510; 152-166, ; Morrissey, 2005, *Nat Biotech.*, 23; 1002-1007, ), 디올레이록시프로필-트라이메틸암모늄-클로라이드/콜레스테롤/디올레오일포스파티딜에탄올아민/폴리에틸렌글라이콜-세린(DOTAP/Chol/DOPE/PEG-cer)를 사용하는 동결건조된 매트릭스의 수화작용 방법(siRNA 포획률, 95%)(Wu등, Pharm. Res., 26, 512-522, 2009) 등이 많은 방법이 개발되었으나, 모든 경우 제조시 지질 혼합액을 한가지 동일한 조성을 사용하여 핵산을 포획하는 방법을 사용하였으며, 이는 저 분자량 친수성 음이온 물질을 효과적으로 포획하기 어려운 단점이 있다.

[0016] 이에 본 발명자들은 내부에는 독성이 강하나 핵산 및 친수성 음이온 화합물 포획에 유리하고, 헤드(head) 그룹이 작아 리포솜 내부에 잘 위치할 수 있는 양이온 지질을, 외부에는 헤드(head) 그룹이 크고, 세포표면과 유사하여 독성이 적은 중성 및 음이온 지질 조성을 갖는 비대칭 리포솜을 제조하고 상기 리포솜이 siRNA 및 친수성 음이온 화합물을 포획할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0017] 본 발명의 목적은 핵산 및 친수성 음이온 화합물의 고효율 포획을 위한 비대칭 리포솜 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

**과제의 해결 수단**

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 내부지질로서 헤드(head)가 작은 양이온 지질, 외부지질로써 헤드(head)가 큰 중성 또는 폐길화(PEGylation)된 지질로 구성되고, 상기 내부지질에 핵산 및/또는 음이온 화합물이 포획된 비대칭 리포솜을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 에테르/완충액 혼합용액을 사용하여 양이온 지질에 핵산 또는 친수성 음이온 화합물이 포획된 내부 역상 마이셀을 제조하는 단계(단계 1);



- [0020] 에테르/에탄올/완충액 혼합용액을 사용하여 중성 지질, 콜레스테롤, 폐길화된 지질에 대한 외부 역상 마이셀을 제조하는 단계(단계 2); 및
- [0021] 상기 단계 1 및 단계 2에서 제조된 내부 역상 마이셀과 외부 역상 마이셀을 혼합한 다음 유기용매를 증발시키고 투석에 의해 핵산 또는 친수성 음이온 화합물이 포획된 비대칭 리포솜을 제조하는 단계(단계 3)를 포함하는 비대칭 리포솜의 제조방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따르면, 핵산 및 친수성 음이온 화합물이 고효율로 포획된 비대칭 리포솜을 제조할 수 있어, 유전자 치료분야뿐만 아니라 프로드러그로 제조가 어려운 친수성 음이온 약물전달 및 형광 조영제를 상기 리포솜에 포획하여 약물전달, 이미징 등의 다양한 목적에 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 종래기술의 항진균제 Amphotericin B의 화학구조 및 Ambisome®의 단면도이다.
- 도 2는 종래기술의 항암제 Doxorubicin의 화학구조 및 Doxil®의 단면도이다.
- 도 3은 본 발명의 핵산 및 친수성 음이온 화합물을 고효율로 포획하기 위한 비대칭 리포솜의 제조방법의 모식도이다.
- 도 4는 내부 양전하 지질 및 pH가 siRNA 포획에 미치는 영향 나타내는 아가로우즈 젤 전기영동 사진이며, NP-40 비처리군(-)은 포획되지 않은 siRNA를, 처리군(+)은 전체 siRNA를 나타낸다.
- 도 5는 외부지질의 포스페이티딜클로린/포스페이티딜에타놀아민 조합이 핵산 포획에 미치는 영향을 나타내는 사진이다.
- 도 6은 외부지질의 콜레스테롤 몰 비가 핵산 포획에 미치는 영향을 나타내는 사진이다.
- 도 7은 외부지질의 디스테마릴포스페이티딜콜린(DSPC):디올레오일포스파티딜에탄올아민(DOPE) 비율이 핵산 포획에 미치는 영향을 나타내는 사진이다.
- 도 8은 기능기를 갖는 외부지질의 폴리에틸렌글라이콜-포스페이티딜에타놀아민(PEG-PE), 말레이마이드PEG-PE(miPEG-PE) 및 카복실산PEG-PE(caPEG-PE)가 siRNA 포획에 미치는 영향을 나타내는 사진이다.
- 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 형광물질 및 siRNA가 포획된 리포솜의 색분포를 나타내는 사진이다.
- 도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 인도사이아닌-그린(ICG)이 포획된 리포솜의 ICG 농도에 따른 근적외선 형광 분포를 나타내는 사진이다.
- 도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 인도사이아닌-그린(ICG)이 포획된 리포솜을 NP40으로 파괴전과 후의 근적외선 형광 사진이다.
- 도 12는 siRNA에 칼세인(calcein)의 포함 유무에 따른 siRNA의 리포솜 포획에 미치는 영향을 나타내는 사진이다.
- 도 13은 외부에 폴리에틸렌글라이콜-포스페이티딜에타놀아민(PEG-PE), 말레이마이드PEG-PE(miPEG-PE) 및 카복실산PEG-PE(caPEG-PE)을 갖는 리포솜들에 대해 ICG 농도에 따른 siRNA의 리포솜 포획에 미치는 영향을 나타내는 사진이다.
- 도 14는 도 13보다 낮은 농도의 ICG를 처리시 siRNA의 리포솜 포획에 미치는 영향을 나타내는 사진이다.
- 도 15는 표면에 R12 펩타이드가 부착되지 않은 칼세인 포획 리포솜 (a 및 b) 및 부착된 칼세인이 포획 리포솜 (c 및 d)의 폐암 세포(A5409) 세포투과성을 분석한 사진이다. e는 d를 확대한 사진이다.
- 도 16은 표면에 R12 펩타이드가 부착되지 않은 칼세인 포획 리포솜 (a 및 b) 및 부착된 칼세인이 포획 리포솜 (c 및 d)의 폐암 세포(NCI-H322) 세포투과성을 분석한 사진이다. e는 d를 확대한 사진이다.

도 17은 ICG가 포획된 리포솜들 표면에 R8(c), R12(d) 및 PC5-2(e) 펩티드가 부착 유무에 따른 A549 세포투과성을 나타낸 사진이다.

도 18은 ICG가 포획된 리포솜들이 표면에 R8(c), R12(d) 및 PC5-2(e) 펩티드가 부착 유무에 따른 NCI-H322 세포투과성을 나타낸 사진이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 내부지질로써 헤드(head)가 작은 양이온 지질, 외부지질로써 헤드(head)가 큰 중성 또는 폐길화(PEGylation)된 지질로 구성되고, 상기 내부지질에 핵산 및/또는 음이온 화합물이 포획된 비대칭 리포솜을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 따른 비대칭 리포솜에 있어서, 내부지질은 양이온 지질을 사용하여 독성이 강하나 헤드 그룹이 작으므로 핵산 및 친수성 음이온 화합물 포획에 유리하고, 헤드(head) 그룹이 작아 리포솜 내부에 잘 위치할 수 있으며, 외부지질은 중성 또는 음이온 지질을 사용하여 헤드(head) 그룹이 커 리포솜 외부에 위치하는 것이 유리하고, 세포표면과 유사하므로 비특이적으로 혈액 내 단백질과 세포들에 결합 되지 않는 장점이 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 비대칭 리포솜에 있어서, 상기 친수성 음이온 화합물은, 약물, 진단용 형광 물질 등을 포함한다.
- [0028] 본 발명에 따른 비대칭 리포솜에 있어서, 상기 내부지질의 성분은 디올레일다이메틸암모늄-프로판(DODAP)과 디올레일포스페이트일에타놀아민(DOPE) 또는 디팔미틸포스페이트일에타놀아민(DPPE)를 사용하는 것이 바람직하고, 이들의 몰 비율은 DODAP와 DOPE 또는 DPPE가 1:1 내지 9:1인 것이 바람직하다.
- [0029] 본 발명에 따른 비대칭 리포솜에 있어서, 상기 외부지질은 중성 인지질, 폐길화된 인지질(PEG-PE) 및 콜레스테롤을 포함하며, 이때 상기 중성 인지질은 DPPE/DOPE, DSPC/DPPE 또는 DSPC/DOPE로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, DSPC/DOPE인 것이 더욱 바람직하다. 이때, 상기 중성 인지질의 함의 몰비는 전체 외부지질 중 1/2 이하이고, DPPE/DOPE, DSPC/DPPE 또는 DSPC/DOPE의 비율은 몰비로 1:1~3:0인 것이 바람직하다. 또한, 상기 외부지질 중 상기 콜레스테롤은 전체 외부지질의 1/3 이상으로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0030] 본 발명에 따른 비대칭 리포솜에 있어서, 상기 외부지질 중 폐길화된 인지질(PEG-PE)은 전체 외부지질의 1/6 내지 1/4로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명에 따른 비대칭 리포솜은 표면에 세포 표적 지향적 전달 및 세포투과를 위한 기능을 부착할 수 있다. 이때, 상기 기능기로서 항체, 펩티드, 저분자 리간드 등이 사용될 수 있다. 상기 기능을 부착시키기 위해 폐길화된 인지질은 기능성 폐길화된 인지질을 더 첨가할 수 있다. 상기 기능성 폐길화된 인지질로는 말레이마이드-PEG-PE(miPEG-PE), 카복실릭-PEG-PE(caPEG-PE) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 기능성 폐길화된 인지질은 전체 외부지질의 1/60 이하로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0032] 본 발명에 따른 비대칭 리포솜에 있어서, 핵산과 양이온 지질의 음이온/양이온(N/P) 비율은 1:2 이하가 바람직하나, 그 이상이 되면 핵산 포획률이 감소한다.
- [0033] 나아가 본 발명에 따른 비대칭 리포솜을 구성하는 전체 내부지질과 외부지질의 몰 비율은 1:1.2인 것이 바람직하다.
- [0034] 또한, 본 발명은
- [0035] 에테르/완충액 혼합용액을 사용하여 양이온 지질에 핵산 및/또는 친수성 음이온 화합물이 포획된 내부 역상 마이셀을 제조하는 단계(단계 1);
- [0036] 에테르/알코올/완충액 혼합용액을 사용하여 중성 지질 및 폐길화된 지질에 대한 외부 역상 마이셀을 제조하는

단계(단계 2); 및

- [0037] 상기 단계 1 및 단계 2에서 제조된 내부 역상 마이셀과 외부 역상 마이셀을 혼합한 다음 유기용매를 증발시키고 투석에 의해 핵산 또는 친수성 음이온 화합물이 포획된 비대칭 리포솜을 제조하는 단계(단계 3)를 포함하는 핵산 및/또는 친수성 음이온 화합물이 포획된 비대칭 리포솜의 제조방법을 제공한다.
- [0038] 상기 단계 1은 에테르/완충액 혼합용액을 사용하여 양이온 지질에 핵산 및/또는 친수성 음이온 화합물이 포획된 내부 역상 마이셀을 제조하는 단계로서, 구체적으로 pH가 4인 완충액에 양이온 지질과 핵산 및/또는 친수성 음이온 물질을 현탁 시킨 후, 에테르를 넣고 초음파로 교반시켜 내부 역상 마이셀을 제조한다.
- [0039] 이때, 상기 내부지질로서 디올레일다이메틸암모늄-프로판(DODAP)과 디올레일포스페이티일에타놀아민(DOPE) 또는 디팔미틸포스페이티일에타놀아민(DPPE)를 사용하는 것이 바람직하고, 이들의 몰 비율은 DODAP와 DOPE 또는 DPPE가 1:1 내지 9:1인 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 핵산과 양이온 지질의 N/P 비율은 1:2 이하인 것이 바람직하다.
- [0041] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 친수성 음이온 화합물 및 핵산은 단독 또는 동시에 포획될 수 있다.
- [0042] 다음으로, 상기 단계 2는 에테르/알코올/완충액 혼합용액을 사용하여 중성 지질 및 폐길화된 지질에 대한 외부 역상 마이셀을 제조하는 단계로서, 구체적으로 알코올과 완충용액에 중성지질 및 폐길화된 지질을 넣고 현탁 시킨 후, 에테르를 넣고 초음파로 교반시켜 외부 역상 마이셀을 제조한다.
- [0043] 이때, 상기 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 사용할 수 있으며, 상기 알코올과 완충액 혼합용액은 2:1 내지 1:1 비율로 혼합되는 것이 바람직하다.
- [0044] 본 발명에 따른 제조방법 있어서, 상기 외부지질은 중성 인지질, 폐길화된 인지질(PEG-PE) 및 콜레스테롤을 포함하며, 이때 상기 중성 인지질은 DPPE/DOPE, DSPC/DPPE 또는 DSPC/DOPE로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, DSPC/DOPE인 것이 더욱 바람직하다. 이때, 상기 중성 인지질의 함의 몰비는 전체 외부지질 중 1/2 이하이고, DPPE/DOPE, DSPC/DPPE 또는 DSPC/DOPE의 비율은 몰비로 1:1~3:0인 것이 바람직하다. 또한, 상기 외부지질 중 상기 콜레스테롤은 전체 외부지질의 1/3 이상으로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0045] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 외부지질 중 폐길화된 인지질(PEG-PE)은 혈중에서의 리포솜의 안정성을 증진시키는 역할을 하며, 전체 외부지질의 몰비로 1/6 내지 1/4로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0046] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 폐길화된 인지질은 기능성 폐길화된 인지질을 더 첨가할 수 있다. 상기 기능성 폐길화된 인지질로는 miPEG-PE, caPEG-PE 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 기능성 폐길화된 인지질은 전체 외부지질의 1/60 이하로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0047] 다음으로, 상기 단계 3은 비대칭 리포솜을 제조하는 단계로서, 상기 단계 1 및 단계 2에서 제조된 내부 역상 마이셀과 외부 역상 마이셀을 혼합한 다음 유기용매를 증발시키고 투석함으로써 핵산 및/또는 친수성 음이온 화합물이 포획된 비대칭 리포솜을 제조할 수 있다.
- [0048] 또한, 제조된 리포솜은 세포 표적 지향적 전달 및 세포투과를 위하여 표면에 기능기를 부착하는 제조하는 단계(단계 4)를 추가로 수행할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 제조된 핵산포획 비대칭 리포솜은 외부가 중성 또는 음이온 지질로 만들어져 독성이 적고, 내부에는 핵산 포획에는 유리하나, 독성이 있는 양이온성 지질을 함유하게 제조하여 이로 인한 독성을 최소화할 수 있으며, 외부지질로서 PEG-PE이 포함됨으로써 혈액 내에서 리포솜의 안정성을 증가시킬 수 있으며, 기능기를 지닌 PEG-PE에 표적지향성 물질(항체, 펩티드, 저분자 리간드등)을 부착하여 특정조직에 운반 및 세포투과를 가능하게 할 수 있다.

[0050] 따라서 본 발명에 따르면, 핵산 및 친수성 음이온 화합물이 고효율로 포획된 비대칭 리포솜을 제조할 수 있어, 유전자 치료분야뿐만 아니라 프로드러그로 제조가 어려운 친수성 음이온 약물전달 및 형광 조영제를 상기 리포솜에 포획하여 약물전달, 이미징 등의 다양한 목적에 사용할 수 있다.

[0051] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0052] <실시예 1> 핵산이 포획된 리포솜의 제조 1

[0053] 도 3에 나타난 바와 같은 방법으로 본 발명에 따른 핵산이 포획된 리포솜을 제조하였다.

[0054] 구체적으로, 내부 양이온 지질은 디올레일다이메틸암모늄-프로판(DODAP)에 디올레일포스페이티일에타놀아민(DOPE)을 1:1로 섞은 지질혼합액(지질로 1 mg)을 얇은 막으로 만들어 완전히 건조한 다음, 100  $\mu$ g의 서열번호 1 및 2의 이중(duplex) siRNA(N/P ratio= 2)를 150  $\mu$ g의 100 mM 시트르산 완충액(pH 4)에 가하여 현탁액을 제조하였다. 상기 현탁액에 400  $\mu$ l의 에테르를 가한 다음, 수조 타입의 초음파로 교반하여 siRNA이 포획된 내부역상 마이셀을 제조하였다.

[0055] 외부지질은 디스테릴포스페이티딜클로린:디올레일포스페이티일에타놀아민:메톡시PEG2000-디스테릴포스페이티딜에탄올아민:콜레스테롤(DSPC:DOPE:PEG-PE:CH)=1.5:1.5:1:2 몰 비로 섞은 지질혼합액(지질; 1.7 mg)을 얇은 막으로 만들어 완전히 건조한 다음, HBS(20 mM HEPES, 150 mM 염화나트륨, pH 7.3~7.5) 200  $\mu$ l와 에탄올 120  $\mu$ l를 가하여 현탁액을 만든 다음, 600  $\mu$ l의 에테르를 가하고 수조 형태의 초음파기로 교반함으로써 외부역상 마이셀을 제조하였다. 이후, 핵산이 포획된 내부역상 마이셀 용액과 외부역상 마이셀 용액을 내부지질:외부지질=1:1.21이 되도록 혼합한 다음 유기용매를 증발시키고, HBS로 투석에 의해 잔류 유기용매를 제거하여 siRNA이 포획된 비대칭 리포솜을 제조하였다.

[0056] <실험예 1> 내부지질 및 완충액 조성에 따른 siRNA의 포획률 분석

[0057] 내부 양이온 지질은 디올레일다이메틸암모늄-프로판(DODAP) 또는 디올레일트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)에 디올레일포스페이티일에타놀아민(DOPE)을 1:1 내지 9:1로 섞은 지질혼합액(지질로 1 mg)을 얇은 막으로 만들어 완전히 건조한 다음, 1100  $\mu$ g의 서열번호 1 및 2의 이중(duplex) siRNA(N/P ratio= 2 ~ 4)를 150의 50-150mM 시트르산 완충액(pH 4 또는 5)에 가하여 현탁액을 제조하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 siRNA이 포획된 리포솜을 제조하였다.

[0058] 상기 리포솜의 내부지질 및 외부지질의 조성 및 비율, 완충액의 조성 및 pH를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	내부지질		외부지질		완충액	
	조성	비율	조성	비율	조성	pH
a	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2	0.15M 시트르산	4.0
b	DOTAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2	0.15M 시트르산	4.0
c	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2	0.15M 시트르산	4.0
d	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2	0.15M 시트르산	5.0

[0060] 제조된 리포솜은 0.5 × TBE 완충액[5.4 g의 트리스 염기(Tris base), 2.75 g의 붕산(boric acid), 2 ml의 0.5M 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediamine tetraacetic acid(pH 8.0))을 1L 물에 용해시켜 제조함]을 이용하여 4% 아가로스(agarose) 전기영동으로 리포솜의 siRNA 포획율을 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0061] 도 4에서 nonidet-P40(NP40)은 전체 siRNA의 양을 분석하기 위하여 첨가해 준 물질로 NP40이 없을 때 나타나는 밴드는 포획되지 않은 siRNA이다.

[0062] 측정 결과 외부 역상 마이셀 제조시 첨가하는 에탄올은 PEG-PE가 들어있는 외부 역상 마이셀의 형성을 도와주며, 제거시 역상 마이셀이 형성되지 않았다(결과는 보이지 않음). 도 4의 (a) 및 (c)에 나타난 바와 같이, 완충액의 pH가 4이고 내부 양이온 지질로서 DODAP을 사용한 경우 포획률이 높았으며, 완충액 농도에 따른 효과는 나타나지 않았다. 반면에 도 4의 (b)에 나타난 바와 같이, 내부 양이온 지질로서 DOTAP을 사용한 경우에는 siRNA가 포획되지 않았으며, 도 4의 (d)에 나타난 바와 같이, 내부 역상 마이셀 제조시 pH 5의 완충액을 사용한 경우에도 siRNA가 포획되지 않았다.

[0063] 이로부터 본 발명에 따른 리포솜의 제조에 있어서, 핵산의 포획시 내부 양이온 지질은 DODAP를 사용하는 것이 바람직하며, 완충액의 pH는 4인 것이 바람직한 것을 알 수 있다.

[0064] <실험예 2> 외부지질 조성에 따른 siRNA 포획률 분석

[0065] 내부지질은 DODAP 및 DOPE로 고정하고, 150 mM 시트르산 완충액, pH 4로 고정하고, 외부지질 중 포스파디일콜린/포스파티딜에타놀아민(PC/PE)의 조성을 하기 표 2에 나타난 바와 같이 다양하게 변화시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 핵산이 포획된 리포솜을 제조하고, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 리포솜의 siRNA 포획율을 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0066] 표 2에 있어서, DPPC는 디올릴포스페이티닐클로린이고, DOPC는 디올릴포스페이티닐클로린이고, DSPC는 디스테릴포스페이티딜클로린이고, DPPE는 디팔미틸포스페이티틸에타놀아민이고, DOPE는 디팔미틸포스페이티틸에타놀아민이다.

표 2

구분	내부지질		외부지질	
	조성	비율	조성	비율
a	DODAP/DOPE	1/1	DPPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2
b	DODAP/DOPE	1/1	DPPC/DPPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2
c	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DPPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2
d	DODAP/DOPE	1/1	DOPC/DPPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2
e	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2

[0068] 도 5에 나타난 바와 같이, 측정 결과 포스파디일콜린/포스파티딜에타놀아민(PC/PE) 조성에서 디올릴포스페이티닐클로린/디팔미틸포스페이티틸에타놀아민(DPPC/DPPE) 및 디올릴포스페이티닐클로린/디팔미틸포스페이티틸에타놀아민(DOPC/DPPE) 조합을 사용한 경우 포획률이 낮았으며(도 5의 b 및 d 참조), 다른 조합 (디팔미틸포스페이티틸에타놀아민/디올레일포스페이티틸에타놀아민(DPPE/DOPE), 디스테릴포스페이티딜클로린/디팔미틸포스페이티틸에타놀아민(DSPC/DPPE) 및 디스테릴포스페이티딜클로린/디올레일포스페이티틸에타놀아민(DSPC/DOPE))은 모두 90% 이상의 높은 포획률을 나타냈다(도 5의 a, c 및 e 참조).

[0069] 이로부터 본 발명에 따른 리포솜의 제조에 있어서, 핵산의 포획시 외부지질은 DPPE/DOPE, DSPC/DPPE 또는 DSPC/DOPE의 조합을 사용하는 것이 바람직한 것을 알 수 있다.

[0070] 이에, 외부지질 중성 지질의 조합을 DSPC/DOPE의 조합으로 고정하고 콜레스테롤(CHOL)의 조성을 하기 표 3에 나타난 바와 같이 다양하게 변화시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 핵산이 포획된 리포솜을 제조하고, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 리포솜의 siRNA 포획율을 측정하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

표 3

구분	내부지질		외부지질	
	조성	비율	조성	비율
a	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.75/1.75/1/1

b	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2
c	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/3

[0072] 도 6에 나타난 바와 같이, 콜레스테롤은 물 비를 기준으로 전체 외부지질의 1/6 물 비를 사용한 경우 포획률이 감소하였으나, 1/3 내지 1/2의 물 비를 사용한 경우 포획률이 95% 이상으로 나타났다.

[0073] 이로부터 본 발명에 따른 리포솜의 제조에 있어서, 핵산의 포획시 콜레스테롤의 비율은 전체 외부지질의 1/3 내지 1/2의 물 비를 사용하는 것이 바람직한 것을 알 수 있다.

[0074] 또한, 외부지질 중성 지질의 조합을 DSPC/DOPE의 조합으로 고정시키고 DSPC/DOPE의 비율을 하기 표 4에 나타난 바와 같이 다양하게 변화시킨 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 핵산이 포획된 리포솜을 제조하고, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 리포솜의 siRNA 포획율을 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

표 4

구분	내부지질		외부지질	
	조성	비율	조성	비율
a	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	3/0/1/2
b	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	2.5/0.5/1/2
c	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	2/1/1/2
d	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	1.5/1.5/1/2

[0076] 도 7에 나타난 바와 같이, DSPC:DOPE의 물 비를 전체 외부지질에서 1/4:1/4 내지 1/2:0으로 조절하여 포획 비율을 측정한 결과, 모두 90% siRNA의 포획률을 나타냈다.

[0077] 상기 실험을 바탕으로 외부지질은 DSPC/DOPE/PEG-PE/CH을 선택하였고, 조성은 DSPC는 외부지질 중 물 비로 1/4 내지 1/2, DOPE는 0 내지 1/4, PEG-PE는 1/6 및 콜레스테롤은 1/3 내지 1/2에서 대부분의 siRNA를 포획할 수 있음을 알 수 있다.

[0078] <실험예 3> 외부지질에 기능기 도입에 따른 siRNA 포획률 분석

[0079] 리포솜 표면에 세포투과를 위한 펩티드 결합을 위한 기능기 도입을 위하여 하기 표 5에 나타난 바와 같이 PEG-PE 대신 PEG-PE/miPEG-PE 또는 PEG-PE/caPEG-PE를 9:1 비율로 섞고, 다양한 siRNA(서열번호 1 및 2의 이중(duplex) siRNA, 서열번호 3 및 4의 이중 siRNA, 및 서열번호 5 및 6의 이중 siRNA)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 핵산이 포획된 리포솜을 제조하고, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 리포솜의 siRNA 포획율을 측정하여 그 결과를 도 8에 나타내었다.

표 5

구분	내부지질		외부지질	
	조성	비율	조성	비율
a	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/miPEG-PE/CHOL	2/1/0.9/0.1/2
b	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/caPEG-PE/CHOL	2/1/0.9/0.1/2
c	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	2/1/1/2

[0081] 도 8에 나타난 바와 같이, 리포솜 표면에 기능기 도입에 관계없이 siRNA의 포획률은 모두 95% 이상으로 나타났다. 따라서, 본 발명에 따른 리포솜은 세포투과를 위하여 추가적으로 표면에 기능기를 도입할 수 있음을 알 수 있다.

[0082] <실시예 2> 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜의 제조 1

[0083] 내부지질은 DODAP:DOPE=1:1, 외부지질은 DSPC:DOPE:PEG-PE:CHOL=2:1:1:2 몰 비로, 그리고 전체 내부와 외부지질의 몰 비는 1:1.2로 하고, 핵산 대신 친수성 음이온 화합물로서 음이온 형광물질인 칼세인(calcein)을 100  $\mu\text{g}$  또는 30  $\mu\text{g}$  사용하는 것을 제외하고는 실시예 1의 방법과 동일한 방법으로 수행하여 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜을 제조하였다.

[0084] <실시예 3> 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜의 제조 2

[0085] 친수성 음이온 화합물로서 음이온 형광물질인 인도시아닌-그린(indocyanine green (ICG))을 100  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$  또는 10  $\mu\text{g}$  사용하는 것을 제외하고는 실시예 1의 방법과 동일한 방법으로 수행하여 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜을 제조하였다.

[0086] <실시예 4> 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜의 제조 3-4

[0087] 외부에 세포투과를 위한 펩티드 결합시키기 위하여 PEG-PE 대신 PEG-PE/miPEG-PE를 9:1 비율로 사용하는 것을 제외하고는 실시예 2 또는 3의 방법과 동일한 방법으로 수행하여 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜을 제조하였다.

[0088] <실시예 5> 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜의 제조 5-6

[0089] 외부에 세포투과를 위한 펩티드 결합시키기 위하여 PEG-PE 대신 PEG-PE/caPEG-PE를 9:1 비율로 사용하는 것을 제외하고는 실시예 2 또는 3의 방법과 동일한 방법으로 수행하여 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜을 제조하였다.

[0090] <실험예 4> 친수성 음이온 화합물의 리포솜 포획 분석

[0091] 형광 물질들이 포획된 리포솜들은 리포솜의 표적 지향적 전달 및 세포 투과를 분석할 수 있는 유용한 도구 이 될 수 있다. 이에 본 발명에 따른 리포솜의 형광 물질 포획률을 다음과 같이 측정하였다.

[0092] 실시예 2~5에서 제조된 친수성 음이온 화합물이 포획된 리포솜을 투석함으로써 포획되지 않은 형광물질을 측정하여 리포솜의 형광 물질 포획률을 측정하였다.

[0093] 그 결과를 도 9 내지 11에 나타내었다.

[0094] 측정 결과, 모든 경우 기능기 존재 유무에 관계없이 95% 이상의 형광물질이 포획된 것을 알 수 있다(결과는 보이지 않음).

[0095] 도 9는 친수성 음이온 형광물질이 포획된 리포솜을 보여주는 도면이며, 구체적으로, (a)는 100  $\mu\text{g}$ 의 칼세인이 포획된 리포솜, (b)는 30  $\mu\text{g}$ 의 칼세인이 포획된 리포솜, (c)는 100  $\mu\text{g}$ 의 ICG가 포획된 리포솜, (d)는 30  $\mu\text{g}$ 의 ICG가 포획된 리포솜, (e)는 10  $\mu\text{g}$ 의 ICG가 포획된 리포솜, (f)는 siRNA가 포획된 리포솜 및 (g)는 완충액을 나타낸다.

[0096] 도 10은 리포솜 내 포획된 ICG((a) 0  $\mu\text{g}$ , (b) 2  $\mu\text{g}$ , (c) 5  $\mu\text{g}$ , (d) 10  $\mu\text{g}$ , (e) 30  $\mu\text{g}$ , 및 (f) 100  $\mu\text{g}$ )를 775 $\pm$ 25 nm에서 여기 시키고, 845 $\pm$ 27.5 nm에서 방출 파장에서 형광을 측정한 결과를 나타내는 도면으로, 리포솜 내부의 ICG 농도가 5  $\mu\text{g}$ 일 경우 형광이 가장 높았으며, 다음으로 2  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 30  $\mu\text{g}$  순서로 높은 형광을 나타내었다. 그리고 100  $\mu\text{g}$ 에서는 전혀 형광이 나타나지 않았다. 이는 ICG가 고농도에서는 오히려 형광성을 억제하는 특성이 있음을 보여준다.

[0097] 도 11은 30  $\mu\text{g}$  및 100  $\mu\text{g}$ 의 ICG가 들어 있는 리포솜을 각각 PBS로 1/3 및 1/10로 희석한 후 형광성을 분석한 도면으로, (a) 및 (b)는 각각 30  $\mu\text{g}$ 의 ICG가 들어 있는 리포솜을 희석한 후 NP40으로 처리하기 전과 후의 형광 현미경 사진이고, (c) 및 (d)는 각각 100  $\mu\text{g}$ 의 ICG가 들어 있는 리포솜을 희석한 후, NP40으로 처리하기 전과 후의 형광 현미경 사진이다.

[0098] 도 11에 나타낸 바와 같이, 희석에 의한 효과는 나타나지 않았으나(도 11의 a 및 c 참조), 이들 리포솜을 NP40를 사용하여 파괴한 경우에는 강한 형광을 나타내는 것으로 나타났다(도 11의 b 및 d 참조).

[0099] 이 결과는 오히려 질병 진단에는 유리한 것으로, 암과 같은 질환 부위에서 특이적으로 고농도 ICG가 포획된 리포솜이 파괴되도록 제조하면, 암 등 질환 부위에서 ICG가 방출되어 생체 내 질환 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

[0100] <실시예 6> siRNA 및 형광물질이 동시 포획된 리포솜 제조

[0101] 내부지질 및 외부지질의 조성을 하기 표 6 내지 표 8에 나타낸 바와 같이 다양하게 변화시키고, 전체 내부와 외부지질의 몰 비는 1:1.2로 하고, siRNA 100  $\mu\text{g}$ 은 형광물질 0 ~ 100  $\mu\text{g}$  섞어 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1의 방법과 동일한 방법으로 수행하여 siRNA 및 형광물질이 포획된 리포솜을 제조하였다.

표 6

[0102]

구분	내부지질		외부지질		포획물질
	조성	비율	조성	비율	
a	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/miPEG-PE/CHOL	1.5/1.5/0.9/0.1/2	칼세인 30 $\mu\text{g}$ + siRNA 100 $\mu\text{g}$
b	DODAP/DOPE	1/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/miPEG-PE/CHOL	1.5/1.5/0.9/0.1/2	siRNA 100 $\mu\text{g}$

표 7

[0103]

구분	내부지질		외부지질	
	조성	비율	조성	비율
a	DODAP/DOPE	9/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/miPEG-PE/CHOL	2/1/0.9/0.1/2
b	DOTAP/DOPE	9/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/caPEG-PE/CHOL	2/1/0.9/0.1/2
c	DODAP/DOPE	9/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	2/1/1/2

표 8

[0104]

구분	내부지질		외부지질		포획물질
	조성	비율	조성	비율	
a	DODAP/DOPE	9/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	2/1/1/2	ICG 10 $\mu\text{g}$ + siRNA 100 $\mu\text{g}$
b	DOTAP/DOPE	9/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	2/1/1/2	ICG 5 $\mu\text{g}$ + siRNA 100 $\mu\text{g}$
c	DODAP/DOPE	9/1	DSPC/DOPE/PEG-PE/CHOL	2/1/1/2	ICG 2 $\mu\text{g}$ + siRNA 100 $\mu\text{g}$

[0105] 제조된 리포솜은 투석함으로써 포획되지 않은 형광물질을 측정하여 리포솜의 형광 물질 포획률을 측정하였다. 측정 결과를 도 12 내지 도 14에 나타내었다.

[0106] 구체적으로, 도 12는 표 6의 조성을 가진 리포솜의 siRNA 포획률을 나타내는 아가로즈 젤 전기영동 사진, 도 13은 ICG가 각각 100, 30 및 0을 siRNA 100과 섞고 표 7의 조성을 가진 리포솜들의 제조시 siRNA 포획률을 나타내는 아가로즈 젤 전기영동 사진이며, 도 14는 표 8의 조성을 가진 리포솜의 siRNA 포획률을 나타내는 아가로즈 젤 전기영동 사진이다.

[0107] 측정 결과, 형광물질의 포획률은 siRNA 존재 유무에 관계없이 고효율로 포획되었지만(결과는 보이지 않음), siRNA의 포획률은 형광물질 농도에 의존적으로 억제되었다(도 12 및 13 참조). 그러나 ICG 농도를 10  $\mu\text{g}$  이하로 사용한 경우, siRNA 포획에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(도 14 참조).

[0108] <실험예 5> 형광물질이 포획되고 세포 투과를 위한 펩티드로 표지된 리포솜의 세포투과성 분석

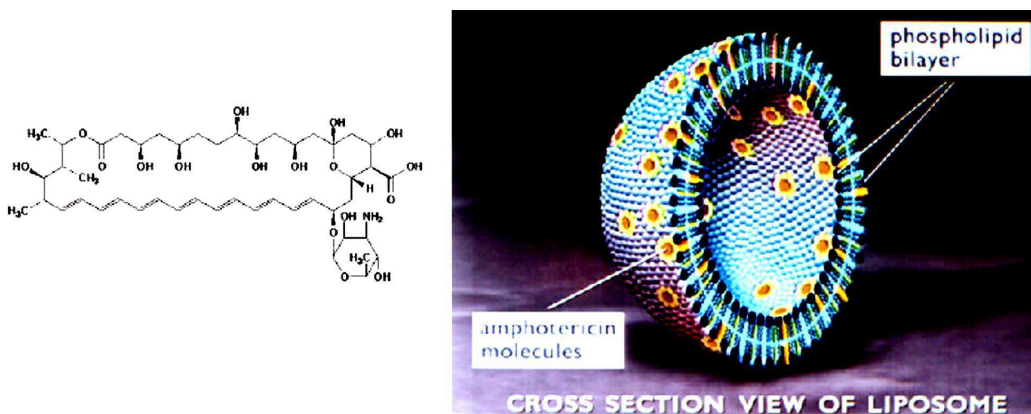
[0109] 리포솜 내부에 포획된 물질이 세포를 투과하여 세포질 내로 운반되는가를 알아보기 위하여, 상기 실시예 2 또는 3에서 제조한 형광물질이 포획된 리포솜에, 세포 투과를 할 수 있는 펩티드의 설프히드린(sulfhydryl)기를 리포솜 표면의 말레이미드(maleimide)에 표지한 다음, 세포투과성 및 세포 내 분포 양상을 분석했다.



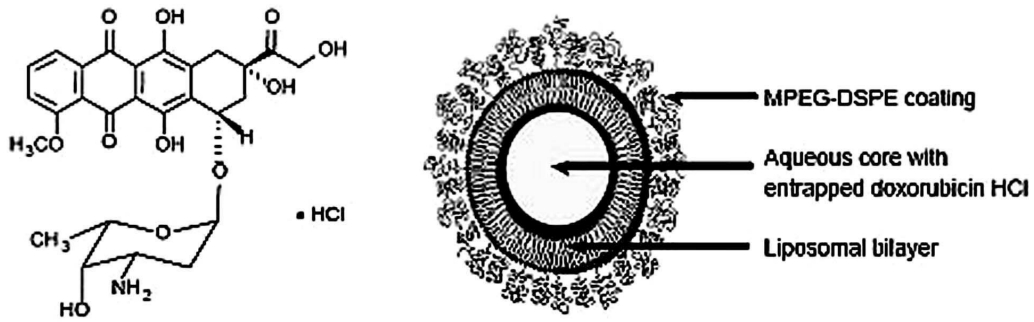
- [0110] 분석 결과를 도 15 내지 도 18에 나타내었다.
- [0111] 구체적으로 도 15 및 도 16은 각각 칼세인(calcein)이 포획된 리포솜의 세포투과 펩티드의 존재 유무에 따른 A549 및 H322 폐암세포(non-small cell lung cancer, NSCLC)의 세포투과성을 분석한 사진으로, 상기 사진 중 (a)는 세포투과 펩티드(R12 펩티드(서열번호 7))가 결합이 안된 리포솜의 핵염색 사진(DAPI), (b)는 세포투과 펩티드가 결합 되지않은 리포솜의 칼세인 형광 사진, (c)는 세포투과 펩티드가 결합 된 리포솜의 핵염색 사진, (d)는 세포투과 펩티드가 결합 된 리포솜의 칼세인 형광 사진, 및 (e)는 상기 (d)의 확대 사진이다.
- [0112] 도 15 내지 16에 나타낸 바와 같이, 칼세인을 포획한 리포솜의 경우, 펩티드를 표지하지 않은 리포솜은 세포 투과성을 나타내지 않았으나(도 15 및 16, b 참조), R12 펩티드로 표지한 리포솜은 A549 및 H322 폐암세포(non-small cell lung cancer, NSCLC)를 투과하여 세포 내에서 칼세인(calcein) 특이 형광을 나타냈다(도 15 및 16, d 참조). 또한, 펩티드가 결합 된 리포솜을 처리한 경우의 칼세인(calcein) 형광을 분석한 결과, 표면에 강한 형광입자가 나타났다. 이는 칼세인(calcein)이 포획된 리포솜이 펩티드에 의존적으로 세포 표면에 붙어 나타나는 결과이다.
- [0113] 도 17 및 18은 ICG가 포획된 리포솜을 R8(서열번호 8), R12(서열번호 7) 및 PC5-2(서열번호 9); Chang등, *PLos One*, 4, 1-11, 2009)으로 표지한 다음, 세포투과성을 형광현미경으로 분석(ex 775±50/ em 845±55)한 결과로, 상기 사진 중 (a)는 리포솜을 처리하지 않은 사진, (b)는 세포투과 펩티드가 결합이 안된 리포솜의 핵염색 또는 ICG 형광 사진, (c)는 세포투과 펩티드(R8(서열번호 8))가 결합된 리포솜의 핵염색 또는 ICG 형광 사진, (d)는 세포투과 펩티드(R12(서열번호 7))가 결합된 리포솜의 핵염색 또는 ICG 형광 사진, 및 (e)는 세포투과 펩티드(PC5-2(서열번호 9))가 결합된 리포솜의 핵염색 또는 ICG 형광 사진이다.
- [0114] 도 17 및 도 18에 나타낸 바와 같이, 측정 결과 정도의 차이는 있지만 A549 및 H322 세포에 대해 모든 조성의 펩티드 의존적인 투과성을 나타냈다.
- [0115] 따라서, 본 발명에 따른 비대칭 리포솜은 용이하게 세포를 투과할 수 있어 내부에 포획된 물질을 세포질 내로 운반하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

**도면**

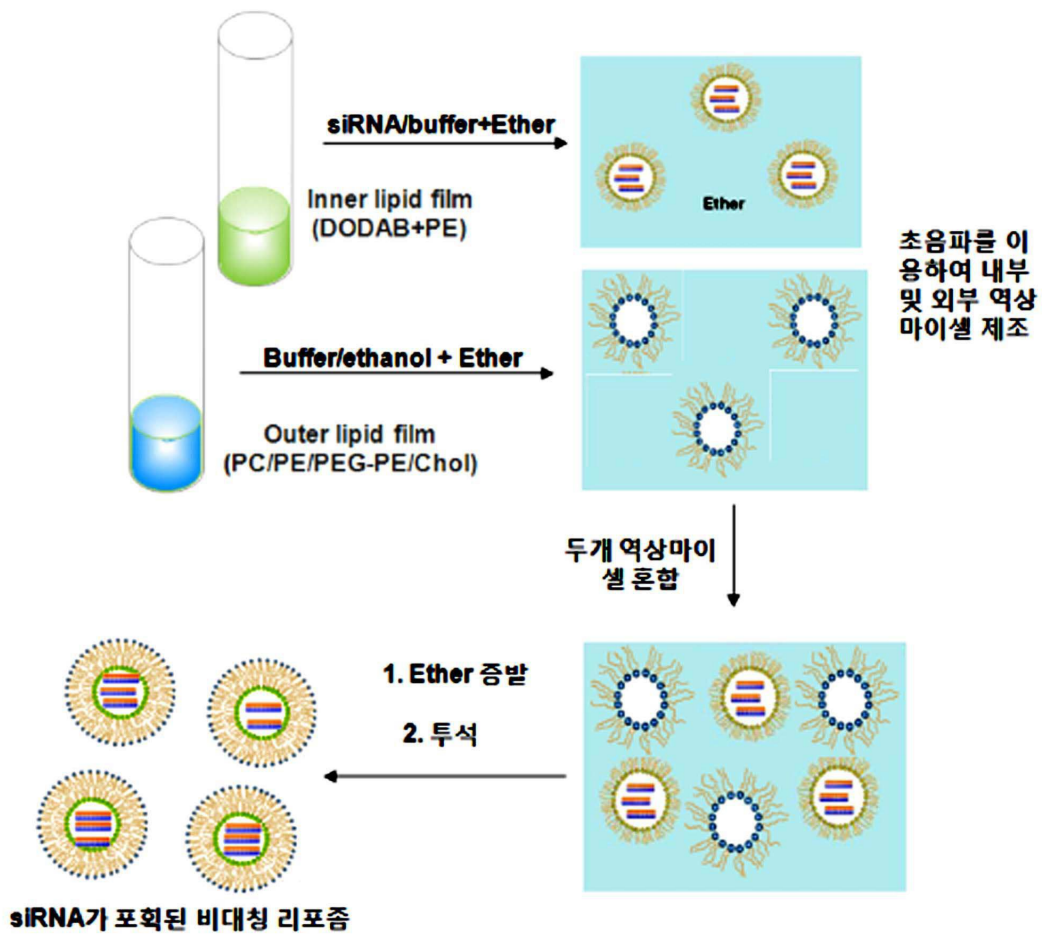
**도면1**



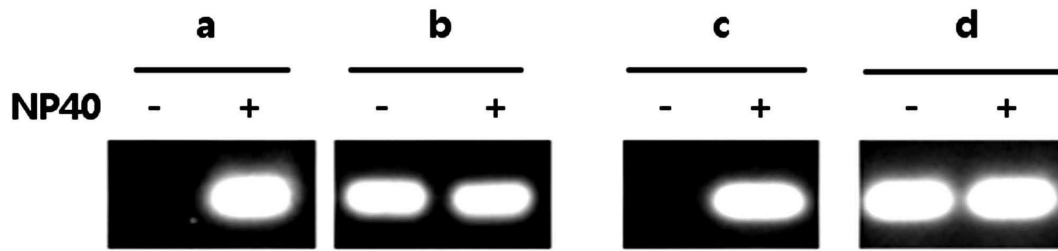
도면2



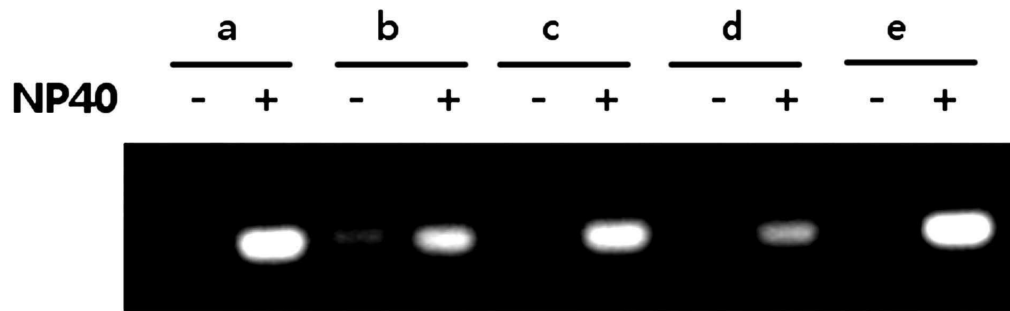
도면3



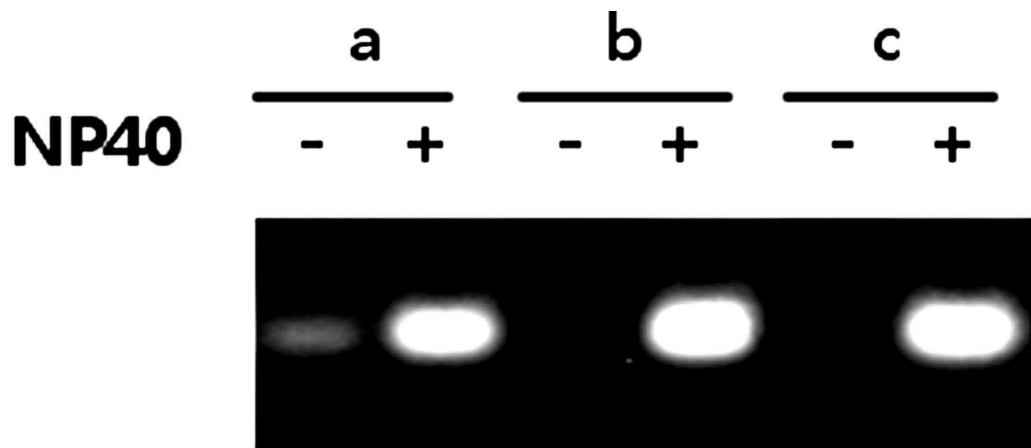
도면4



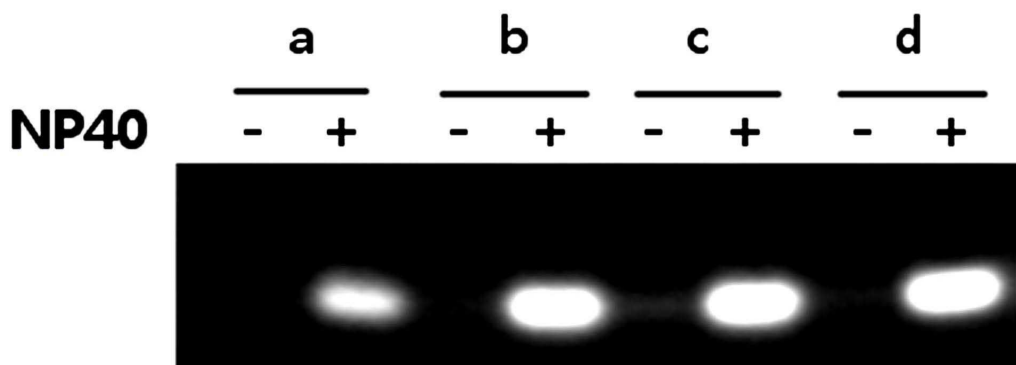
도면5



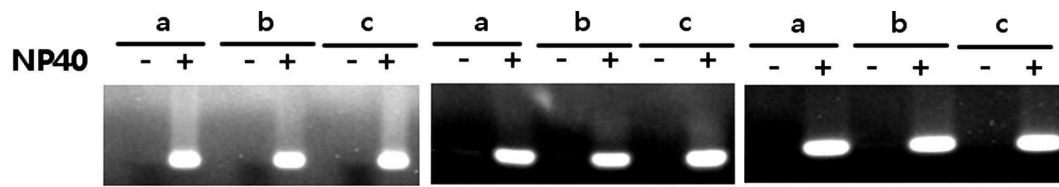
도면6



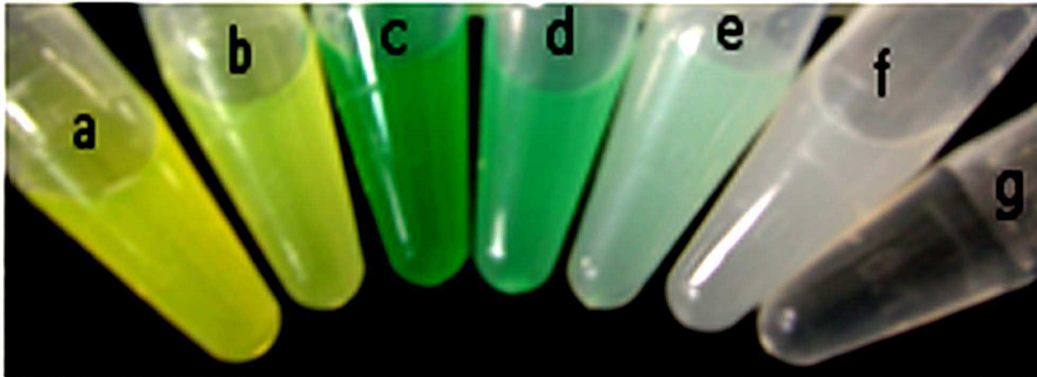
도면7



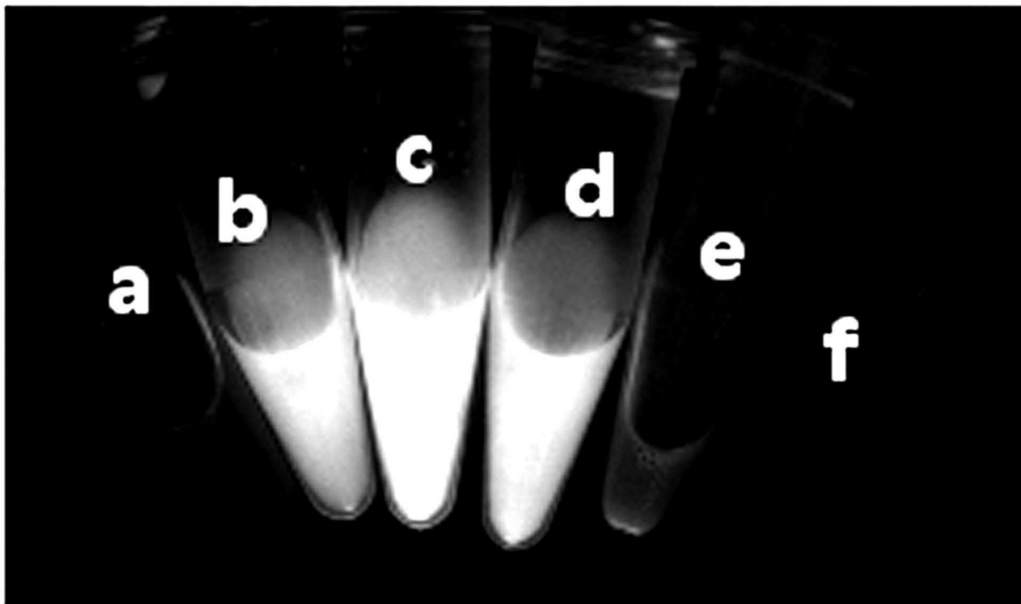
도면8



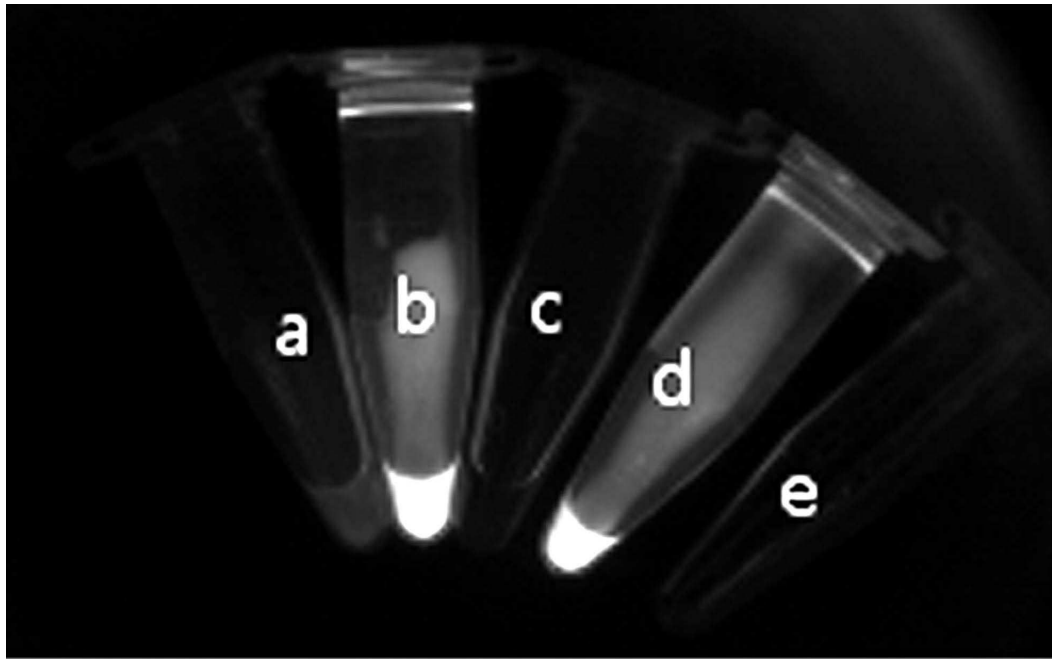
도면9



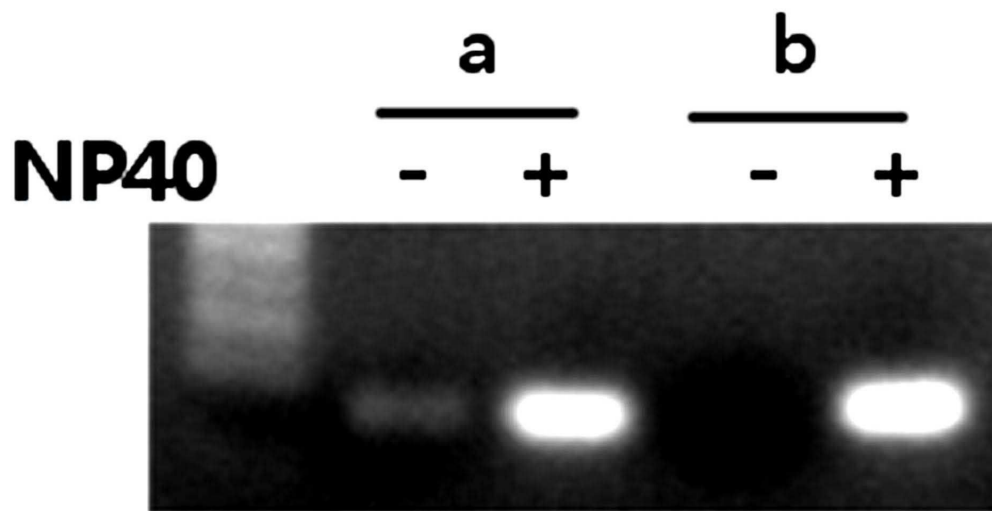
도면10



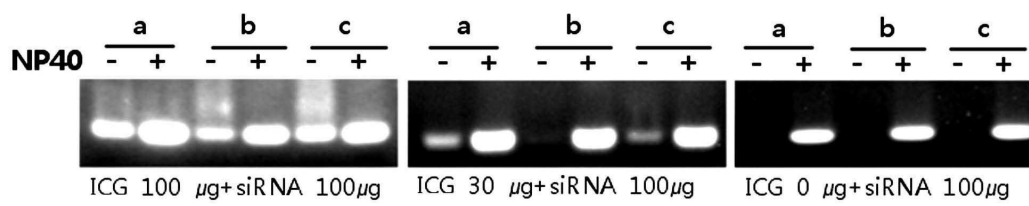
도면11



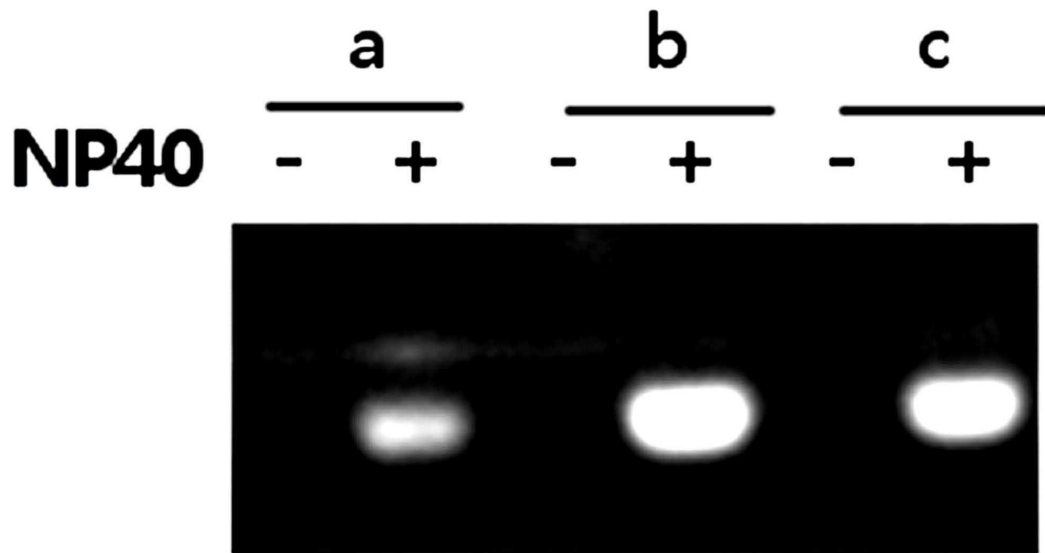
도면12



도면13

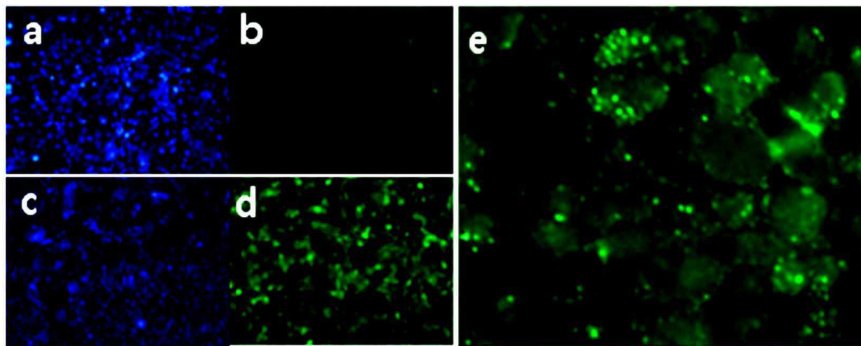


도면14



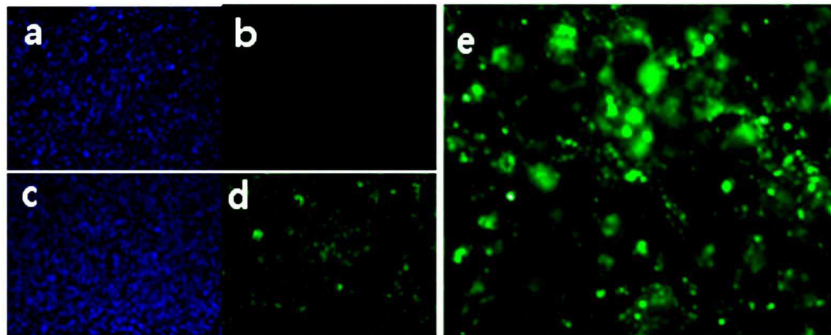
도면15

A549



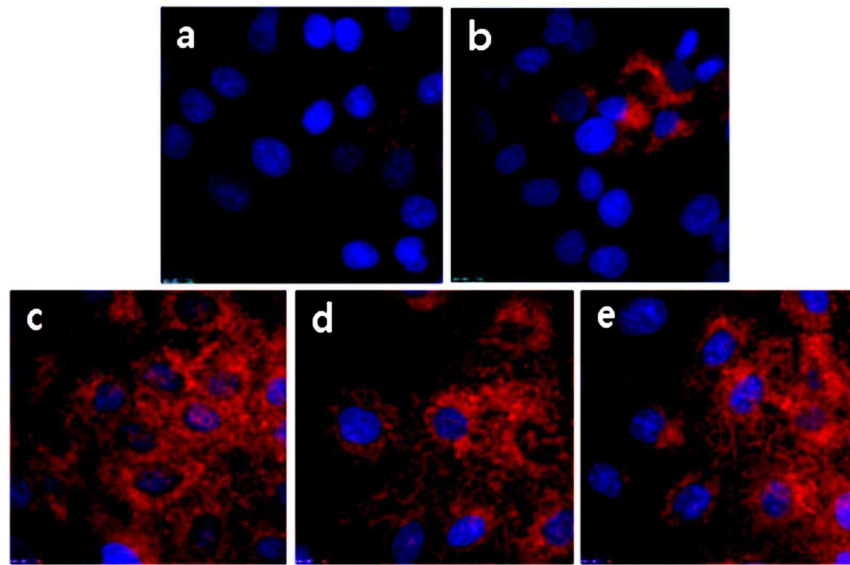
도면16

NCI-H322



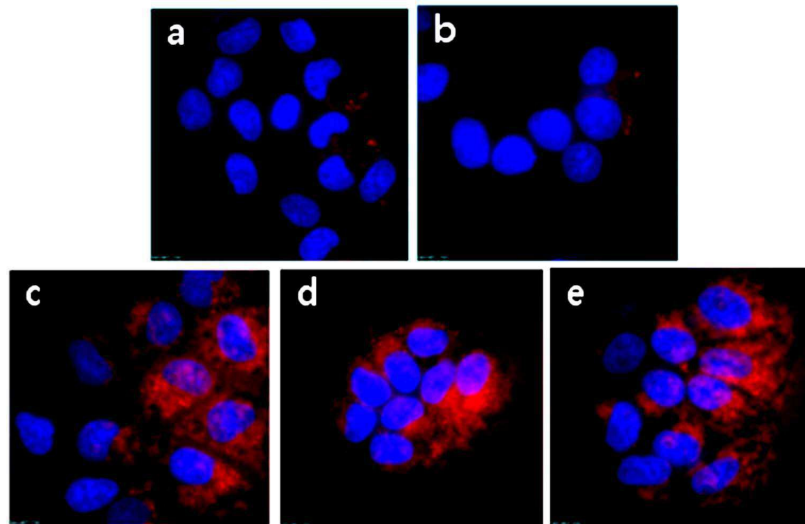
도면17

A549



도면18

NCI-H322



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)