



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월26일  
(11) 등록번호 10-2122018  
(24) 등록일자 2020년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)  
A61K 31/415 (2006.01) A61K 47/42 (2017.01)  
A61K 9/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 9/1271 (2013.01)  
A61K 31/337 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0071605  
(22) 출원일자 2018년06월21일  
심사청구일자 2018년06월21일  
(65) 공개번호 10-2019-0000319  
(43) 공개일자 2019년01월02일  
(30) 우선권주장  
1020170079321 2017년06월22일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020170035782 A\*  
Biopolymers, 2004, Vol. 73, pp.258-268\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
세종대학교산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)  
(72) 발명자  
임수정  
서울특별시 용산구 이태원로27다길 11(이태원동)  
홍순석  
서울특별시 중랑구 신내역로 165, 211동 502호(신내동, 신내우디안2단지)  
(74) 대리인  
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 제인 삽입 리포솜

(57) 요약

본 발명은 제인 삽입 리포솜에 관한 것으로, 제인 코어로 구성된 내부를 인지질 이중층이 둘러싸고 있고 상기 인지질 이중층 내 인지질 사이에 끼어들어간 제인을 포함함으로써, 생체적합성이 우수하며, 통상의 리포솜에 비해 수난용성 약물의 봉입농도가 높으면서도 분산액의 안정성이 우수하여 약물의 서방성 방출이 가능하고, 따라서 투여 용량을 맞추기 위해 의약품 과량 투여로 인한 환자의 불편함을 해소할 수 있을 뿐 아니라, 동결건조 후에도 구조적으로 안정할 뿐만 아니라, 위장액 조건에서도 급격히 불안정화되지 않아 안정적으로 약물 방출이 가능한, 제인 삽입 리포솜에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/415 (2013.01)

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 9/0053 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711052129

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구

연구과제명 효과적 인 염증성 장질환 치료를 위한 대식세포 형질전환 유도능 구현 오메가3종형 약물전달 시스템 개발

기여율 1/2

주관기관 세종대학교산학협력단

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711075205

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구

연구과제명 차세대 약물전달체로서의 단백질-지질 하이브리드 나노입자의 개발 연구

기여율 1/2

주관기관 세종대학교산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인지질 이중층 및 상기 인지질 이중층 내 인지질 분자 사이에 삽입된 제인을 포함하고, 인지질 이중층 내부에 제인을 더 포함하는 제인 삽입 리포솜.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 인지질은 중성지질, 음이온성 인지질 및 양이온성 인지질로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이며, 상기 중성지질은 L- $\alpha$ -포스파티딜콜린, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나; 상기 음이온성 인지질은 L- $\alpha$ -포스파티딕산, L- $\alpha$ -포스파티딜-DL-글리세롤, 카디오리핀, L- $\alpha$ -포스파티딜이노시톨, 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[카복시(폴리에틸렌글리콜)2000], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[PDP(폴리에틸렌글리콜)2000], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-포스페이트 및 올레산 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나; 상기 양이온성 인지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판, 디올레오일 글루타마이드, 디스테아로일 글루타마이드, 디팔미토일 글루타마이드, 디올레오일 아스파르타마이드, 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판,  $\beta$ -[N-(N',N')-디메틸아미노에탄-카바모일], 메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나;인 제인 삽입 리포솜.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 인지질 이중층 사이에 수난용성 약물을 더 포함하는 제인 삽입 리포솜.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 인지질 이중층 내부에 수난용성 약물을 더 포함하는 제인 삽입 리포솜.

#### 청구항 6

청구항 4 및 5 중 어느 한 항에 있어서,

상기 수난용성 약물은 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플레틴, 카보플래틴, 에토포시드, 캄토테신, 트리암시놀론 아세트나이드, 하이드로코티손, 텍사메타손, 프레드니솔론, 베타메타손, 사이클로스포린, 셀레콕시브, 레티노산, 엠토펜리신, verteporfin, 커큐민 및 코엔자임 큐텐으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 제인 삽입 리포솜.

**청구항 7**

제인 및 인지질을 유기용매에 혼합하여, 인지질 분자 내에 제인이 삽입된 막을 형성하는 단계를 포함하고, 상기 제인의 삽입은 막의 내부에도 이루어지는 것인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.

**청구항 8**

청구항 7에 있어서, 상기 유기용매는 함수 유기용매인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

청구항 7 또는 8에 있어서, 상기 혼합은 수난용성 약물을 더 포함하여 이루어지는 것인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.

**청구항 11**

청구항 7에 있어서, 상기 인지질은 중성지질, 음이온성 인지질 및 양이온성 인지질로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이며, 상기 중성지질은 L- $\alpha$ -포스파티딜콜린, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나; 상기 음이온성 인지질은 L- $\alpha$ -포스파티딜-L-글리세롤, 카디오리핀, L- $\alpha$ -포스파티딜이노시톨, 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[카복시(폴리에틸렌글리콜)2000], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[PDP(폴리에틸렌글리콜)2000], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-포스페이트 및 올레산 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나; 상기 양이온성 인지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판, 디올레오일 글루타마이드, 디스테아로일 글루타마이드, 디팔미토일 글루타마이드, 디올레오일 아스파르타마이드, 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판,  $\beta$ -[N-(N',N'-디메틸아미노)에탄-카바모일], 메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 으로 이루어

진 군에서 선택된 적어도 하나;인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.

**청구항 12**

청구항 10에 있어서, 상기 수난용성 약물은 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플레틴, 카보플래틴, 에토포시드, 캄토테신, 트리암시놀론 아세토나이드, 하이드로코티손, 텍사메타손, 프레드니솔론, 베타메타손, 사이클로스포린, 셀레록시브, 레티노산, 엠포테리신, verteporfin, 커큐민 및 코엔자임 큐텐으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 제인 삽입 리포솜에 관한 것으로, 구체적으로는 기존의 리포솜에 비해 수난용성 약물의 가용화 효과가 우수하면서도 보다 안정한 신규 약물전달체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 약물들 중 물에 대한 용해도가 낮아 제제 개발이 어렵고 제형으로부터의 용출률이 낮아 흡수가 불량해지는 경우가 빈번하다. 이러한 수난용성 약물의 경우에는 가용화 전략이 필요한데, 가용화 방안으로 수난용성 약물을 염이나 무정형 고체로 하거나 혹은 보조용매나 계면활성제를 첨가하는 전략들이 사용된다. 그러나 계면활성제 사용에 의한 가용화는 흔히 계면활성제의 입계 미셀 형성 농도가 너무 높거나 필요량이 과다하거나 복용 후 계면활성제의 독성의 우려가 있다. 한편, 지질, 단백질, 다당류와 같은 자연 유래의 생고분자로 구성된 콜로이드성 입자는 고유의 생분해성과 생체적합성으로 인해 독성의 우려가 적으며, 따라서 이들에 약물을 탑재하여 가용화 효과를 얻으려는 방법이 각광받고 있다. 콜로이드성 입자의 제형으로의 활용은 가용화 효과 외에도 약물의 서방성 방출, 화학적 안정성 증대, 투여 후 약물동태와 조직 분포 변경 등의 추가적 효과를 내어 결국 약물의 치료 효과 증진에 기여할 수 있다. 많은 실험실에서의 연구에서 보고된 다양한 콜로이드 입자형 제제의 우수성에도 불구하고 실제 제품 개발로 이어지는 경우는 적은 데 이는 콜로이드성 입자에의 약물봉입능이 너무 낮고 또 입자의 물리적 안정성이 좋지 못하기 때문인 경우가 많다.

[0004] 리포솜(liposome)은 인지질 이중막으로 이루어진 나노-마이크로 크기의 구형 입자로서, 특히 리포솜막을 구성하는 인지질의 생체 적합성이 우수하여 인체에 적용할 수 있는 가장 적절한 콜로이드성 입자형 제형 중의 하나로 여겨지고 있다. 수난용성 약물들은 소수성 부분에 친화성을 갖는 경우가 많아 이들을 이중막을 구성하는 인지질 분자 사이에 끼워넣는 형태로 가용화할 수 있어 난용성 약물 가용화 제형으로서 리포솜 기반 제품이 연구개발되어 오고 있다. 그러나 리포솜 인지질막내에 약물을 끼워넣어 봉입시키는 경우 인지질 분자 사이의 충분한 공간 확보가 어려워 소수성 약물의 봉입농도가 높지 못한 단점이 있다. 리포솜의 응집(aggregation)과 융합(fusion)은 리포솜의 불안정화의 주요 원인이 된다. 소수성 약물을 막에 끼워넣은 경우 리포솜의 응집 또는 융합을 심화시켜 제조 후 보관과정에서 또는 투여 후 작용 부위에 이르기 전 지질 이중막을 뚫고 나와 약물이 석출될 수 있다. 제조한 리포솜의 분산액을 동결건조하여 건조 파우더 형태로 제품화한 후 사용자가 사용직전에 물을 넣어 가볍게 섞어 재분산시키는 방법으로 리포솜 제품의 안정화를 꾀할 수 있다. 그러나 동결건조 공정 자체가 리포솜 입자들의 응집 또는 융합을 촉진시키기에 이를 억제하기 위해서는 ~20%의 수크로오스 등 매우 고농도의 동결건조보호제의 첨가를 필요로 하며, 이로 인한 필요한 전체 투여 총 의약품량의 증가, 당뇨병 환자에의 투여의 어려움 등의 문제가 야기된다.

[0005] 제인은 FDA에 의해 일반적으로 안전하다고 등재된 물질로, 옥수수에서 a-, b-, g-isoform의 혼합형으로 주로 얻어지며 분자량은 21~25 kDa의 단백질이다. 소수성 부분과 친수성 부분이 번갈아 연결된 구조로 따라서 양친성이나 구성 아미노산의 50% 이상이 소수성이기에 다른 단백질들과는 달리 물에 녹지 않는다. 대신 물에서 자가 조립하여 구형 입자를 형성하는 성질이 있으며 이 구형 코어 표면을 계면활성제로 코팅하게 되면 코어-셀 형태의 안정한 제인 입자를 얻을 수 있다. 제인 내 소수성 부위들은 소수성 물질들과 소수성 인력에 의해 상호작용할 수 있어서 제인 나노입자는 토코페롤, 비타민 D3, 커큐민, 파클리탁셀 등 다양한 소수성 물질들의 가용화 및 서방성 방출 제형으로 연구개발되어 왔다.

[0006] 제인 단백질 혼합물 중 주요 형은 a-제인으로, 분자 내 a-헬릭스 구조 부위가 많이 포함되어 있으며 용매의 온도, pH, 조성 등이 달라지면 이에 따른 분자 내 인력의 변화(a-헬릭스의 풀어짐 또는 더 단단하게 꼬임 등)로

단백질의 2차, 3차 단백질 구조가 다양하게 변화된다 (도 1의 모식도). 양친성과 더불어 이러한 제인의 구조적 가변성은 자체적으로 뿐만 아니라 다른 양친성 성분과 공존시도 인력의 변화에 의해 다양한 복합 구조가 형성될 가능성을 보여준다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0008] (특허문헌 0001) 미국등록특허 제6004534호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명은 생체적합성이 우수한 리포솜 및 이의 제조방법의 제공을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명은 통상의 리포솜에 비해 약물 봉입 효율이 우수하여 가용화를 위해 부형제(인지질)량을 증가시키므로써 야기되는 의약품의 복용량 증가로 인한 환자의 불편함을 해소할 수 있는 리포솜 및 이의 제조방법의 제공을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 통상의 리포솜에 비해 분산액 상태일 때 및 위장관액을 포함한 생리적 조건에서 더 안정하며 동결건조하여 분말화한 후 물을 가해 재분산되었을 때도 원래의 구조체로 더 쉽게 복원됨으로서 구조적 안정성이 우수하여 난용성 약물의 투여 제형으로 적합한 리포솜 및 이의 제조방법의 제공을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0013] 1. 인지질 이중층 및 상기 인지질 이중층 내 인지질 분자 사이에 삽입된 제인을 포함하는 제인 삽입 리포솜.
- [0014] 2. 위 1에 있어서,
- [0015] 상기 리포솜은 인지질 이중층 내부에 제인을 더 포함하는 제인 삽입 리포솜.
- [0016] 3. 위 1에 있어서, 상기 인지질은 중성지질, 음이온성 인지질 및 양이온성 인지질로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이며, 상기 중성지질은 L- $\alpha$ -포스파티딜콜린, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나; 상기 음이온성 인지질은 L- $\alpha$ -포스파티딕산, L- $\alpha$ -포스파티딜-DL-글리세롤, 카디오리핀, L- $\alpha$ -포스파티딜이노시톨, 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[카복시(폴리에틸렌글리콜)2000], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[PDP(폴리에틸렌글리콜)2000], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-포스페이트 및 올레산 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나; 상기 양이온성 인지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판, 디올레오일 글루타마이드, 디스테아로일 글루타마이드, 디팔미토일 글루타마이드, 디올레오일 아스파르타마이드, 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판,  $\beta$ -[N-(N',N'-디메틸아미노)에탄-카바모일], 메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나;인 제인 삽입 리포솜.
- [0017] 4. 위 1에 있어서, 상기 인지질 이중층 사이에 수난용성 약물을 더 포함하는 제인 삽입 리포솜.

- [0018] 5. 위 2에 있어서,
- [0019] 상기 인지질 이중층 내부에 수난용성 약물을 더 포함하는 제인 삽입 리포솜.
- [0020] 6. 위 4 및 5 중 어느 한 항에 있어서,
- [0021] 상기 수난용성 약물은 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플레틴, 카보플래틴, 에토포시드, 캄토테신, 트리암시놀론 아세트나이드, 하이드로코티손, 텍사메타손, 프레드니솔론, 베타메타손, 사이클로스포린, 셀레룩시브, 레티노산, 엠포테리신, verteporfin, 커큐민 및 코엔자임 큐텐으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 제인 삽입 리포솜.
- [0022] 7. 제인 및 인지질을 유기용매에 혼합하여, 인지질 분자 내에 제인이 삽입된 막을 형성하는 단계를 포함하는 제인 삽입 리포솜의 제조방법.
- [0023] 8. 위 7에 있어서,
- [0024] 상기 유기용매는 함수 유기용매인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.
- [0025] 9. 위 7에 있어서,
- [0026] 상기 제인의 삽입은 막의 내부에도 이루어지는 것인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.
- [0027] 10. 위 7 내지 9 중 어느 한 항에 있어서,
- [0028] 상기 혼합은 수난용성 약물을 더 포함하여 이루어지는 것인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.
- [0029] 11. 위 7에 있어서, 상기 인지질은 중성지질, 음이온성 인지질 및 양이온성 인지질로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나이며, 상기 중성지질은 L- $\alpha$ -포스파티딜콜린, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나; 상기 음이온성 인지질은 L- $\alpha$ -포스파티딕산, L- $\alpha$ -포스파티딜-DL-글리세롤, 카디오리핀, L- $\alpha$ -포스파티딜이노시톨, 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스페이트, 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[카복시(폴리에틸렌글리콜)2000], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000], 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[PDP(폴리에틸렌글리콜)2000], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린], 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-포스페이트 및 올레산 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나; 상기 양이온성 인지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린, 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판, 디올레오일 글루타마이드, 디스테아로일 글루타마이드, 디팔미토일 글루타마이드, 디올레오일 아스파르타마이드, 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판,  $\beta$ -[N-(N',N'-디메틸아미노)에탄-카바모일], 메틸디옥타데실암모늄 브로마이드, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나;인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.
- [0030] 12. 위 7에 있어서, 상기 수난용성 약물은 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플레틴, 카보플래틴, 에토포시드, 캄토테신, 트리암시놀론 아세트나이드, 하이드로코티손, 텍사메타손, 프레드니솔론, 베타메타손, 사이클로스포린, 셀레룩시브, 레티노산, 엠포테리신, verteporfin, 커큐민 및 코엔자임 큐텐으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 제인 삽입 리포솜의 제조방법.

### 발명의 효과

- [0032] 본 발명의 리포솜은 생체적합성이 우수하다.
- [0033] 본 발명의 리포솜은 인지질 등 통상의 성분만으로 구성된 리포솜에 비해 난용성 약물의 봉입 농도가 증진되어 가용화 목적의 부형제 증가로 인한 의약품 과량 투여로 인한 환자의 불편함을 해소할 수 있고 제품의 단가 절감

에 기여할 수 있어 제품 개발에 유리하다.

- [0034] 본 발명의 리포솜은 체액에서 약물을 서서히 방출할 수 있어 수난용성약물의 급격한 방출시의 용해도 초과에 의한 석출을 방지할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 리포솜은 통상의 리포솜에 비해 분산액 상태일 때 및 위장관액을 포함한 생리적 조건에서 더 안정하며 또한 동결건조 과정에서 구조적으로 더 안정하여 더 적은량의 동결건조보호제 만으로도 물을 가하였을 때 쉽게 재분산되어 제품 개발에 유리하다.
- [0036] 본 발명의 제조방법은 상기 효과를 나타내는 리포솜을 제조할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0038] 도 1은 본 발명의 리포솜의 구조도를 간략하게 나타낸 것이다.
- 도 2는 제인 파우더, 통상적인 제인 나노입자, 통상적인 리포솜 및 제인삽입 리포솜의 FT-IR 스펙트럼을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.
- 도 3은 제인과 인지질 DMPC를 혼합하여 리포솜을 제조시 DMPC의 상전이온도에 대한 영향을 나타낸 것이다.
- 도 4는 (A) 통상적인 제인 나노입자, 통상적인 리포솜, 제인 삽입 리포솜의 TEM 이미지 및 (B) 제인 삽입 리포솜의 cryo-TEM 이미지를 나타낸 것이다.
- 도 5는 통상적인 제인 나노입자, 통상적인 리포솜, 제인 삽입 리포솜을 각각 (A)는 냉장 보관시 (B)는 혈청을 첨가한 인산염 완충액에서 37°C 보관시의 입자의 평균크기 및 다분산도 변화를 나타낸 것으로 (A)는 파클리탁셀이 봉입된 입자이며 (B)는 약물이 봉입되지 않은 입자이다.
- 도 6은 통상적인 제인 나노입자, 통상적인 리포솜, 제인 삽입 리포솜 각각을 동결건조시 각 입자의 평균크기 변화를 나타낸 것으로, (A)는 동결건조보호제를 넣지 않은 조건에서 각 입자의 동결건조를 시행한 후 얻어진 파우더를 재분산시켰을 때의 입자 크기, (B)는 첨가한 동결건조 보호제의 농도를 달리하였을 때 얻어진 입자 크기이고 여기서 (A, B)는 약물이 봉입되지 않은 입자이다. (C)는 약물로서 파클리탁셀 또는 도세탁셀을 봉입시킨 각 입자의 동결건조 후 입자내에 봉입된 채로 유지된 약물의 퍼센트를 나타낸 것이다.
- 도 7은 생리적조건 (pH 7.4, 인산염완충액)에서 제인 나노입자, 통상적인 리포솜, 제인 삽입 리포솜 각각으로부터 도세탁셀의 시간에 따른 방출양상을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 제인 삽입 리포솜의 제조 공정 과정을 간략하게 도식화한 것을 나타낸 것이다.
- 도 9는 제인 삽입 리포솜의 구조도 및 형성 기전 모식도로서, 인지질 이중층 사이 및 내부에 제인이 삽입됨을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0039] 본 발명은 제인 삽입 리포솜에 관한 것으로, 인지질 이중층 및 상기 인지질 이중층 내 인지질 사이에 끼어들어간 제인을 포함함으로써, 생체적합성이 우수하며, 리포솜에 비해 약물 탑재 효율이 우수하여 서방성 방출이 가능하고 따라서 위장관내 석출이 예방되며, 경구투여 시에도 약물 전달 효율이 우수하며, 과량 투여로 인한 환자의 불편함을 해소할 수 있을 뿐 아니라, 동결건조 후에도 구조적으로 안정할 뿐만 아니라, 경구 투여시 위산에 의해 급격히 불안정화되지 않아 안정적으로 약물 전달이 가능한, 제인 삽입 리포솜에 관한 것이다.
- [0041] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0043] 본 발명의 제인 삽입 리포솜은 인지질 이중층, 상기 인지질 이중층 내 인지질 분자 사이에 삽입된 제인을 포함한다. 상기 인지질 이중층은 내부 수상을 둘러싸고 외부의 수상과 내부의 수상을 격리하는 차단막 역할을 할 수 있다.
- [0044] 인지질 분자는 양친매성 분자로, 친수성을 나타내는 인산기에 친유기로 두 개의 지방산이 붙어있는 구조이며, 양친매성인 구조의 특성상 물 등의 용매에 분산 시 마이셀 구조를 형성할 수 있으며, 이 때, 본 발명에서는 인지질 분자는 단층막의 마이셀이 아닌 이중층막으로 둘러싸인 마이셀 구조를 가지는 리포솜을 형성한다. 본 발명에서 복수개의 인지질 분자는 본 발명의 리포솜을 구성하기에 충분한 개수의 인지질 분자를 의미한다.
- [0045] 한편, 제인(zein)은 옥수수 단백질의 일종으로, 다수의 프롤린과 글루타민으로 구성되며, 수난용성이면서도 양



친매성을 지니는 단백질이다. 제인은 알파 헬릭스 (alpha helix) 구조로 형성되며, 이러한 알파 헬릭스 구조가 인지질 분자 사이에 삽입됨으로써 새로운 제인 삽입 리포솜을 형성한다.

- [0046] 인지질 분자 사이에 제인이 삽입되어 리포솜을 구성하면, 본 발명의 리포솜은 제인이 삽입되지 않은 리포솜에 비해 인지질 이중층 내 공간(내부 수상이 아닌 인지질 사이의 공간)이 더 커져 약물의 탑재 효율이 보다 우수하며, 제인이 삽입되지 않은 리포솜을 분말화할 경우 구조적 불안정성이 문제되나, 본 발명의 리포솜을 분말화할 경우 제인이 인지질이 구조적으로 망가지는 것을 막아줌으로써 리포솜의 구조적 안정성이 확보될 수 있으며, 제인은 리포솜 내에서 마이크로인캡슐레이터 (microencapsulator)로서도 역할할 수 있어, 본 발명의 리포솜은 위산에 의한 급격한 불안정화가 발생하지 않으며, 이를 통해 경구용으로 제작하더라도 장내까지 목적하는 약물을 전달할 수 있다.
- [0047] 또한, 약물 탑재 효율이 우수하기 때문에 특정 질병의 치료를 위해 과다한 양의 리포솜을 투여하지 않더라도 약효를 발휘할 수 있고 약물의 효과적인 전달 또한 가능하다.
- [0048] 상기 인지질 분자 사이에 제인이 삽입된 리포솜은 인지질 이중층 내부에 제인이 더 삽입된 리포솜일 수 있다. 이러한 경우, 제인이 삽입된 리포솜은 인지질 이중층 내부가 통상적인 리포솜의 내부와는 다르게 수상이 아닌 제인으로 구성된 코어인 형태를 띌 수 있다.
- [0049] 상기 인지질 이중층 내부에 제인이 더 삽입된 리포솜의 경우, 상기 인지질 이중층 내 인지질 분자들 사이에만 삽입된 경우에 비해 인지질 이중층 내부의 공간을 더 확보할 수 있게 되어 약물의 탑재효율이 더 우수할 수 있고, 인지질 이중층 자체의 구조적 안정성을 보다 증대시키며, 생리적 조건 하 리포솜의 불안정화를 감소시켜 약물의 전달성이 보다 증대된다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 리포솜의 상전이 온도를 측정한 결과(도 3), 리포솜 제조 시 사용한 인지질의 상전이 온도가 제인 함량에 따라 점차적으로 낮아지고 피크의 크기도 감소하는 것으로 나타났다. 이는 제인이 인지질 분자 사이 또는 인지질 이중층 내에 삽입되었으며 제인이 인지질 사이 또는 인지질 이중층 내에 삽입된 정도가 균일하다는 것을 의미한다.
- [0051] 본 발명에서 상기 인지질 분자는 중성지질, 음이온성 및 양이온성 인지질 모두 사용 가능하다. 예를 들어 중성 지질로서는 L- $\alpha$ -포스파티딜콜린 (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine, PC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있고, 상기 PC는 콩, 계란, 수소화된 콩 또는 계란으로부터 유래된 PC일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0052] 상기 음이온성 지질로는 L- $\alpha$ -포스파티딕산(L- $\alpha$ -phosphatidic acid), L- $\alpha$ -포스파티딜-DL-글리세롤(L- $\alpha$ -phosphatidyl-DL-glycerol), 카디올리핀(cardiolipin), L- $\alpha$ -포스파티딜이노시톨(L- $\alpha$ -phosphatidylinositol), L- $\alpha$ -포스파티딜세린(L- $\alpha$ -phosphatidylserine), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)] (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), DLPG), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린] (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DLPS), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스페이트 (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphate, DLPA), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)] (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), DMPG), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린] (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DMPs), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스페이트 (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate, DMPA), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)] (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), DOPG), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린] (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DOPS), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스페이트 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate, DOPA), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린] (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DPPS), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스페이트 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate, DPPA), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]), DSPG), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], DSPS), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스페이트(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphate, DSPA), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[카복시(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy(polyethylene glycol)2000]), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoyl-sn-

glycero-3-phosphoethanolamine -N-[maleimide(polyethylene glycol)2000]), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[PDP(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[PDP(polyethylene glycol)2000]), 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-rac-(1-글리세롤)] (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)], POPG), 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-[포스포-L-세린](1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine], POPS), 1-팔미토일-2-올레일-sn-글리세로-3-포스페이트(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphate, POPA) 및 올레산(oleic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지는 않는다.

[0053] 상기 양이온성 지질로서는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP), 디올레오일 글루타마이드 (dioleoyl glutamide), 디스테아로일 글루타마이드 (distearoyl glutamide), 디팔미토일 글루타마이드 (dipalmitoyl glutamide), 디올레오일 아스파르타마이드 (dioleoyl aspartamide), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판 (1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane, DODAP),  $\beta$ -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄-카바모일], (3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl], DC-Chol), 및 메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine (EDOPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DOPE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지는 않는다.

[0054] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인지질 분자는 중성 지질인 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine); 양이온성 지질인 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine (EDOPC) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP) 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0055] 전술한 지질을 일정 비율로 혼합하여 본 발명의 리포솜에 포함시킬 수도 있으며, 예를 들면, 레시틴, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine (EDOPC) 및 콜레스테롤을 리포솜에 포함시킬 수도 있는데, 이 때, 이들의 중량비는 10 내지 20 : 0 내지 4 : 0 내지 2 또는 10 내지 20 : 0.1 내지 4 : 0.1 내지 2 동일 수 있으나 이로 제한되지 않고, 목적에 따라 다양한 중량비로 설정할 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 리포솜은 상기 인지질 이중층 사이 또는 인지질 이중층 내에 수난용성 약물을 더 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 리포솜은 제인이 삽입된 인지질 이중층 사이 또는 인지질 이중층 내에 약물이 탑재될 수 있는 공간을 보유하고 있으며, 상기 공간 내 다양한 물질이 위치할 수 있고, 이에, 수난용성 약물도 위치할 수 있는데, 수난용성 약물이 본 발명의 리포솜 내에 위치함으로써 약물의 전달이 보다 효율적으로 이루어질 수 있고, 표적까지 도달하기 전에 약물이 대부분 침전 및 유실되는 것을 방지할 수 있다.

[0059] 수난용성 약물이 본 발명의 리포솜 이중층막을 구성하고 있는 인지질 분자 사이 또는 인지질 이중층 내 공간으로 탑재되면, 인지질 분자 등 지질로만 구성된 리포솜 대비 약물 탑재량, 약물 전달률, 구조적 안정성 등이 매우 우수해져, 그에 따라 상기 약물에 의한 치료 효과를 극대화시킬 수 있고, 의약품 과량 투여로 인한 환자의 불편함을 감소시킬 수 있다.

[0060] 상기 수난용성 약물은 수난용성 약물을 의미하며, 예컨대, 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플레틴, 카보플레틴, 에토포시드, 캄토테신, 트리암시놀론 아세트나이드, 하이드로코티손, 텍사메타손, 프레드니솔론, 베타메타손, 사이클로스포린, 셀레코시브, 레티노산, 엠포테리신, verteporfin, 커큐민 및 코엔자임 큐텐으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나 이로 제한되지 않는다.

[0061] 상기 수난용성 약물은 본 발명의 리포솜 구성물질 내 0.5 내지 20 wt% 포함될 수 있으며, 함량이 상기 범위를 초과하면 봉입률 대비 약물량이 과하여 미봉입 상태로 제거되는 약물량이 많아질 수 있으나 이에 제한되지 아니하고, 본 발명의 사용 목적에 따라 달리할 수 있는 것이다.

[0062] 본 발명의 리포솜은 필요에 따라 스테롤계 화합물을 더 포함할 수 있고, 또는 인지질에 폴리에틸렌 글라이콜 (PEG)을 결합시켜 사용할 수 있다. 또한 본 발명의 리포솜에 오일을 포함시킬 수 있다. 이외 당업계 공지된 리포솜 변형 방법을 본 발명의 목적에 맞게 사용할 수 있다.

[0063] 상기 오일은 본 발명에서 인지질 이중층 사이 또는 인지질 이중층 내에 추가로 삽입될 수 있다. 제조중 리포솜의 막 유동성을 일시적으로 증가시켜 약물 탑재를 더욱 증진시키는 요소로 사용될 수 있고, 리포솜 보관 시 안

정성을 더욱 향상시킬 수 있으며, 탑재된 약물의 유리/석출 문제를 더욱 개선할 수 있다. 또한, PEG가 결합된 인지질을 본 발명의 리포솜에 사용 시 오일의 첨가는 1) 리포솜의 제조과정에서 거품이 형성되는 현상 2) 제조된 리포솜을 동결건조하여 보관하다가 사용 시 재분산을 위해 수상을 가한 후 흔들 때 거품이 형성되는 현상을 현저히 감소시켜 제조의 용이성을 증진시켜 주는 효과가 있다.

[0064] 상기 오일은 중쇄(medium-chain) 이상(중쇄 또는 장쇄)의 지방산 트리글리세라이드, 즉 탄소수 6 내지 22의 지방산 트리글리세라이드일 수 있다. 구체적으로, 상기 오일은 탄소수 6인 카프로인산 트리글리세라이드(caproic acid triglyceride), 탄소수 8인 카프릴산 트리글리세라이드(caprylic acid triglyceride), 탄소수 10인 카프린산 트리글리세라이드(capric acid triglyceride), 탄소수 12인 라우린산 트리글리세라이드(lauric acid triglyceride) 및 이들의 혼합 오일(예: Glyceryl Tricaprylate/Tricaprate인 Captex300, Labrafac Lipophile WL 1349 등 시판 제품 많음), 중쇄(medium-chain) 이상(중쇄 또는 장쇄)의 지방산 트리글리세라이드들을 다량 포함하는 천연 오일인 콩기름, 코코넛유, 해바라기씨유, 깨기름, 피마자유, 면실유, 야자유, 홍화유, 땅콩기름, 옥수수기름, 올리브유, 카놀라유 및 크릴유로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0065] 스테롤계 화합물은 콜레스테롤, 3 $\beta$ -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바미]콜레스테롤(3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-cabamyl]cholesterol, DCChol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 시토스테롤(sitosterol), 에르고스테롤(ergosterol), 라노스테롤(lanosterol), 디노스테롤(dinosterol), 고르고스테롤(gorgosterol), 아베나스테롤(avenasterol), 사린고스테롤(saringosterol), 푸코스테롤(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)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0067] 본 발명은 다른 양태로서, 제인 삽입 리포솜의 제조방법을 제공한다.

[0068] 이하, 본 발명의 제조방법을 구체적으로 설명한다.

[0069] 본 발명의 제조방법은 제인 및 인지질을 유기용매 또는 유기용매와 물의 혼합용매(예컨대, tertiary butyl alcohol과 물의 혼합용매)에 혼합하여, 인지질 이중층 사이에 제인이 삽입된 막을 형성하는 단계를 포함한다. 예컨대, 제인 및 인지질 분자를 tertiary butyl alcohol과 물의 혼합용매에 혼합한 후 동결건조 후 수용매를 가해 분산시킨 후 소니케이션에 의해 균질화 과정을 거치면, 인지질이 이중층 구조를 형성함과 동시에 인지질 이중층 사이에 제인이 삽입된다. 즉, 상기 이중층에는 복수의 인지질이 포함되며, 상기 인지질 이중층 사이에 제인이 삽입되어 있다.

[0070] 본 발명의 제조 방법으로 제조한 리포솜은 구조적 안정성, 약물 탑재량, 약물 전달률 등이 지질로만 구성된 리포솜에 비해 매우 우수하며, 약물의 효과 또한 우수하고, 종래 리포솜 기술로 제조된 의약품 대비 복용 용량의 감소로 환자의 복약 순응도를 개선시킬 수 있다.

[0071] 상기 제인의 삽입은 막의 내부에도 이루어지는 것일 수 있다. 이러한 경우, 막의 내부에 제인이 삽입된 리포솜은 인지질 이중층 내부가 통상적인 리포솜의 내부와는 다르게 수상이 아닌 제인으로 구성된 코어인 형태를 띠 수 있다.

[0072] 상기 막의 내부에 제인이 더 삽입되도록 제조된 리포솜의 경우, 상기 인지질 이중층 내 인지질 분자들 사이에만 삽입되도록 제조된 리포솜에 비해 구조적 안정성, 약물 탑재량, 약물 전달률 등이 보다 우수하고, 약물의 효과 또한 개선된다.

[0073] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인지질 100 중량부 대비 제인 1 내지 110 중량부로 유기용매 또는 유기용매와 물의 혼합용매에 혼합될 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 상기 범위 내로 인지질 및 제인을 유기용매에 혼합하면 완성된 본 발명의 리포솜에는 인지질 100 중량부 대비 제인 1 내지 15 중량부가 포함될 수 있다.

[0074] 인지질과 제인의 중량비가 상기 범위를 벗어나는 경우로서, 인지질이 너무 많아지면 제인이 상대적으로 줄어 통상의 리포솜 대비 약물탑재능이 개선되지 못하거나 동결건조 후 리포솜의 구조가 불안정해질 수 있어 경구 투여를 통한 약물 전달률이 낮아지는 문제가 발생할 수 있고, 제인이 너무 많아지면 인지질이 상대적으로 줄어 리포

좀의 구조 자체의 형성이 어려워질 수 있으며, 약물 탑재 시 리포좀의 구조 형성에 문제가 있어 약물이 새어나가는 등 약물 탑재 효율에 문제가 발생할 수 있다.

- [0075] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 유기용매는 예를 들면, 알코올, 클로로포름, 에테르, 핵산 및 이들의 혼합용매 등일 수 있으며, 구체적으로는 알코올 (예컨대, *ter*-부틸 알코올, 에틸 알코올 등)일 수 있으나, 이에 제한되지 아니하고, 바람직하게는 함수 유기용매 일 수 있다.
- [0076] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 제조방법은 제인 및 인지질을 유기용매 내 혼합 후 교반하는 단계를 더 포함할 수 있고, 교반 이후 알코올 기타 유기용매를 제거하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 이들 단계를 거쳐 제인 삽입 리포좀을 제조할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 유기용매와 물 혼합용매의 제거는 동결건조 방법 또는 감압하에서 회전증발건조 방법을 사용할 수 있으며, 유기용매의 완전한 제거를 위해 질소 가스를 주입하는 단계를 추가로 더 수행할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에서 사용한 용매를 제거하기 위한 방법으로 동결건조 방법을 사용할 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 동결건조 방법 사용 시 완성된 리포좀의 보관 및 사용이 용이해지는 장점이 있다.
- [0078] 본 발명의 제조방법에 있어, 제인과 인지질 분자에 관한 구체적인 추가적인 설명은 전술한 바와 같다.
- [0080] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 제조방법은 수난용성 약물을 상기 리포좀 구성물질과 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0081] 수난용성 약물은 수용액 상에서는 용해도가 매우 낮으나, 알코올계 용매에서는 가용화가 가능한 약물로, 수난용성 약물을 알코올계 용매 (예컨대, 알코올 수용액)상에 넣고 혼합하여 가용화시킬 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0082] 수난용성 약물은 도세탁셀, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플레틴, 카보플래틴, 에토포시드, 캄토테신, 트리암시놀론 아세트나이드, 하이드로코티손, 텍사메타손, 프레드니솔론, 베타메타손, 사이클로스포린, 셀레콕시브, 레티노산, 엠포테리신, verteporfin, 커큐민 및 코엔자임 큐텐으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0083] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 제인, 인지질, 수난용성 약물을 용해시킨 알코올 용매(예컨대, 75 내지 90% 3차-부틸 알코올 용매)를 동결건조 방법으로 제거하고, 수성 용매를 가한 후 얻은 조분산액을 인지질의 전이온도 이상의 온도에서 소니케이션하여 균질화함으로써 리포좀을 제조할 수 있다. 상기 전이온도는 예컨대, 0 내지 60 ℃일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0084] 본 단계를 거치면, 제인이 삽입된 인지질 이중층 사이 또는 인지질 이중층 내부에 수난용성 약물이 봉입되어 (도 1, 도 9 참조), 이중층 사이 또는 인지질 이중층 내 제인, 인지질 및 약물이 혼성된 구조를 갖는 제인 삽입 리포좀을 제조할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 제조방법은 예컨대, 앞서 제조된 혼성 리포좀을 초음파 분쇄기로 수욕상에서 균일하게 분산시키는 단계 (균질화 단계), 상기 단계 이후 원심분리하는 단계, 0.45 내지 0.8 mm 필터로 여과하는 단계 또는 투석하는 단계를 더 포함할 수 있다. 균질화 단계는 전술한 전이온도 이상의 온도에서 소니케이션하여 균질화함으로써 수행할 수 있다. 투석하는 단계에서는 분자배제크기한도가 5,000 내지 200,000인 투석막을 사용할 수 있으며, 이때 투석에 의해 리포좀에 탑재되지 않고 외부 수용매에 다소 녹은 약물을 제거할 수 있다.
- [0086] 원심분리 단계에서는 1,500 X g 내지 5,000 X g로 3 내지 15분 동안 원심분리할 수 있으며, 원심분리 또는 필터로 여과하는 단계에서는 리포좀에 삽입되지 못하고 침전한 제인과 약물을 동시에 제거할 수 있다.
- [0087] 본 발명의 제인 삽입 리포좀은 약물의 봉입농도가 인지질 100 대비 5 내지 30% (5, 10, 15, 20, 25 및 30 (%) 중 어느 두 숫자 사이의 범위일 수 있다)이며, 리포좀의 크기는 10 내지 1,000nm 범위 (10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 및 1000 (nm) 중 어느 두 숫자 사이의 범위)가 될 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0088] 본 발명은 리포좀에 가용화하여 봉입된 약물의 생체 내, 특히 위장관 내 전달효율 증진을 위해 적용 가능하다.
- [0090] 이하, 본 발명을 실시예로 보다 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아님은 당연하다.

[0092] **실시예 1: 제인이 삽입된 리포솜의 제조**

[0093] 85:15 부피비로 혼합한 3차 부틸 알코올+ 증류수에 다양한 중량비의 DOPC와 EDOPC 및 제인을 섞어 용해시켰다. 이에 적당량의 파클리탁셀, 도세탁셀, 커큐민 또는 셀레콕시브 등 난용성 약물 중 하나를 추가로 혼합한 후 3,000 rpm 의 속도로 1분간 혼합하고 37℃에서 10분간 수조 형식의 초음파 분산기를 사용해 모두 용해시켰다. 얻어진 혼합용액을 신속하게 -80℃에서 얼리고 동결건조기를 사용하여 -45℃에서 24시간 동안 동결건조를 시행하여 제인, 지질 및 약물 파우더를 얻었다. 얻어진 파우더에 5% D-glucose 용액 1 ml를 가해 수화시킨 후 3,000 rpm 에서 1분간 교반하여 얻어진 약물 탑재/제인 삽입 리포솜 분산액을 37℃에서 1시간 동안 수조 형식의 초음파 분산기에서 130 와트로 분쇄 및 균질화, 다시 수조 형식의 세포 파쇄용 초음파 분산기에서 7분간 250 와트의 초음파를 처리하여 균질화함으로써 약물이 봉입된 제인이 삽입된 리포솜 제형을 얻었다.

[0094] 미봉입된 약물과 삽입 되지 않은 제인의 침전물을 제거하기 위해서 0.8 μm 의 필터로 여과하여 여과액을 취하여 사용시까지 4℃에 보관하였다.

[0096] **비교예 1: 리포솜의 제조**

[0097] 제인을 첨가하지 않으며 100% 3차 부틸 알코올을 사용하는 것을 제외하고는 실시예1의 제인 삽입 리포솜의 제조법과 동일한 방법으로 제조하였다.

[0099] **비교예 2: 통상적인 제인 나노입자로서 제인 코어-카제인 셀 입자의 제조**

[0100] 기존에 보고된 anti-solvent precipitation법으로 제조하였으며 제인 코어의 응집을 방지하기 위한 셀을 이를 안정화제로는 안정화 효과가 우수하다고 보고된 카제인을 사용하였다.

[0101] 10 mg의 카제인에 2 ml의 5% D-glucose 용액을 넣어 3,000 rpm에서 1분간 혼합한 후 30분간 수조 형식의 초음파 분산기를 사용하여 완전히 녹인 카제인 용액을 얻었다. 제인 10 mg에 80% 에탄올 용액 1 ml를 넣어 3,000 rpm에서 1분간 혼합한 후 10분간 수조 형식의 초음파 분산기를 사용하여 완전히 녹은 제인 용액을 얻었다. 약물을 탑재하고자 하는 경우는 약물도 제인 용액에 함께 넣어 녹였다. 카제인 용액이 들어있는 용기에 제인 용액을 한 방울씩 떨어뜨리며 3,000 rpm에서 교반하며 혼합한 후 10분간 더 교반하였다. 교반 후 흡후드에서 질소가스를 사용하여 에탄올을 증발시켰다. 미탑재 된 약물 및 제인의 제거는 실시예 1과 같은 방법으로 시행하였다.

[0103] **실시예 2: 제인 삽입 리포솜의 특성 분석 실험법**

[0104] 리포솜에 탑재된 파클리탁셀, 도세탁셀, 셀레콕시브의 농도는 제조한 리포솜 소량을 80% 메탄올 용액에 20배 희석 후 227, 227 또는 254 nm 파장에서 HPLC 방법으로 정량 하였으며, 커큐민의 농도는 리포솜 소량을 메탄올로 겐 다음 424 nm 흡광도 파장에서 흡광도를 측정하여 표준검량선을 활용하여 정량하였다.

[0105] 리포솜의 평균입자경 및 다분산도는 제조한 리포솜을 5% D-glucose 용액으로 적절히 희석 후 FPAR-1000 기기를 사용해 광산란법으로 측정하였다.

[0107] **실시예 3: 리포솜의 동결건조 방법**

[0108] 제조된 리포솜을 동결건조보호제로서 동부피의 2.57% 수크로오스 용액을 혼합하거나 없거나 하여 6 시간동안 -80℃에서 얼린 다음 액체 질소에서 1분간 더 얼린 후 -45℃ 에서 하룻밤 동결건조 하였다. 동결건조한 샘플을 동결건조 전 리포솜 용액과 같은 부피의 증류수로 3,000 rpm에서 1분간 교반하면서 수화하였다. 동결건조과정에 의해 석출된 약물을 제거하고자 하는 경우, 1,600 rpm에서 5 분간 원심분리하여 석출된 약물을 제거하였다.

[0109]

[0110] **실시예 4: 리포솜에의 제인 삽입의 확인**

[0111] DMPC 또는 DOPC, EDOPC 등 PC 18 mg과 제인 0, 2.5, 5 또는 10mg을 각각 혼합하여 실시예 1의 방법으로 리포솜을 제조하고 미삽입 제인을 원심분리에 의해 제거한 후 최종적으로 얻어진 리포솜 중 인지질의 농도와 제인의 농도를 각각 Stewart assay법과 278nm에서의 흡광도법으로 표준검량선을 활용하여 정량 하였다. 그 결과 초기 제인 함량의 증가에 따라 리포솜 제조 후 삽입된 제인의 양이 증가되는 경향을 보였으며, 이때 PC의 종류에 따라 제인삽입량에 차이가 있어 포화레시틴인 DMPC보다는 유동성이 우수한 불포화레시틴인 DOPC의 경우 삽입량이 높았고 DOPC에 양이온성 인지질인 EDOPC를 혼합하는 경우 더 저농도의 제인 농도에서도 제인의 삽입량이 증가되어 나타났으며 인지질 100 대비 약 18.3% 정도에서 제인의 삽입량은 포화되었다 (표 1 : 리포솜 제조시 초기 제인 혼합 비율에 따른 제조 후 리포솜에의 제인 삽입비율).

표 1

| [0112] | 제조시PC:제인 혼합비율(mg) |      | 제조후PC:제인 삽입비율(mg) | 봉입효율 (%) |
|--------|-------------------|------|-------------------|----------|
|        | PC                | 제인   |                   |          |
|        | DMPC 18           | 2.5  | 18:1.0            | 40.3±1.5 |
|        | DMPC 18           | 5.0  | 18:1.8            | 36.4±1.9 |
|        | DMPC 18           | 10.0 | 18:3.3            | 32.7±0.5 |
|        | DOPC 18           | 5    | 18:2.0            | 39.3±1.3 |
|        | DOPC 16+EDOPC 2   | 5    | 18:2.5            | 49.3±0.7 |

[0114] 실시예1 또는 비교예1의 방법으로 DMPC 18 mg/ml만으로 된 리포솜을 제조하고, 상기 리포솜에 표 1에 기재된 합량의 제인을 추가하여 삽입시킨 제인 삽입 리포솜을 제조 후, 시차주사열량계(DSC)에 의하여 리포솜의 상전이 온도에 제인의 삽입이 미치는 영향을 고찰하였다(도 3). NanoDSC 기기를 사용하여 분당 1℃씩 올리면서 0℃에서 50℃까지 엔탈피 변화를 측정하였다. 제인의 삽입비율 증가에 따라 DMPC의 상전이온도는 24.2, 23.8, 23.5, 22.9도로 점차적으로 감소되었고 상전이온도에서 나타나는 피크도 점점 넓어졌으며 엔탈피도 감소되었다. 이는 DMPC 분자 사이에 제인 분자가 상당히 규칙적으로 끼어 들어가 DMPC 분자 사이의 인력을 감소시켰음을 의미한다. 또한 15도 부근에서 관찰되는 DMPC의 pretransition peak도 감소되다 소멸되었는데 이는 제인 분자의 친수성 부분이 DMPC의 phosphate head group사이에 삽입됐음을 의미한다.

[0115] 통상의 리포솜(16:2 DOPC:EDOPC으로 제조), 제인 삽입 리포솜(16:2:5 의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조), 제인 코어-카제인 셸 입자(10:10 제인:카제인으로 제조)을 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 방법으로 각각 제조 후, 투과전자현미경(TEM)법에 의해 리포솜의 크기 및 형태를 고찰하기 위하여, 제조한 리포솜을 200 mesh copper grid 위에서 2% uranyl acetate 용액으로 염색 후 Tecnai G2 spirit 기기를 사용하여 120 keV에서 42,000배 확대하여 관찰하였다. 그 결과, 제인 삽입 리포솜은 인지질만으로 구성된 리포솜과 유사한 크기의 구형 형태를 보였다(도 4A).

[0116] 제인 삽입 리포솜 내부의 제인 코어를 관찰하기 위해 제인삽입 리포솜(16:2:5의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조)을 제조 후 리포솜을 300 mesh copper grid 위에 떨어뜨린 후 Tecnai G2 spirit 기기를 사용하여 120 keV에서 4X4 CCD 카메라를 이용하여 42,000배 확대하여 cryo-TEM을 통해 관찰하였다. 그 결과, 제인삽입 리포솜의 내부가 통상적인 리포솜의 내부와는 다르게 수상이 아닌 코어이며 이를 다양한 두께의 셸이 둘러싸고 있음이 관찰되었다(도 4B).

[0117] 제인 파우더, 통상의 리포솜 (16:2 DOPC:EDOPC으로 제조), 제인 삽입 리포솜(16:2:5 의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조), 제인 나노입자(카제인 없이 10mg 제인만으로 제조)을 실시예 1, 비교예1 및 비교예2의 방법으로 각각 제조 및 동결건조 한 후 그 구조를 확인 하기 위해서 Nicolet Nexus 670 FTIR spectrometer를 사용하여 500-4000  $cm^{-1}$  범위를 측정하였다. 그 결과, 제인 파우더의 스펙트럼은 1539  $cm^{-1}$ 의 amide I의 C=O 스트레칭, 1652  $cm^{-1}$ 의 amide II의 C-N 스트레칭, 그리고 3300  $cm^{-1}$  근방의 amide A의 O-H 및 N-H 스트레칭과 연관된 3개의 적외선 밴드를 보였으며 제인 나노입자 또한 제인 파우더와 유사한 스펙트럼을 나타냈다. 리포솜은 인지질 특유의 몇몇 스펙트럼을 나타내었다. 즉 965, 1092/1261, 1727 그리고 2851/2920  $cm^{-1}$  에서 각각 인지질 콜린 그룹의  $N^+(CH_3)_3$  비대칭성 스트레칭 바이브레이션,  $PO_4^{2-}$ 의 대칭/비대칭의 스트레칭, 에스테르기의 C=O 스트레칭 그리고 알킬 체인의  $CH_2$ 의 대칭/비대칭성의 스트레칭을 보였으며 또한 PC 껍질에 수소결합한 물분자의 O-H 스트레칭에 해당하는 넓은 밴드가 3385  $cm^{-1}$  근방에서 관찰되었다. 통상적인 리포솜에서 나타난 대부분의 밴드는 제인 삽입 리포솜에서도 동일하게 나타났다. 통상적인 리포솜과 제인 삽입 리포솜 FTIR 스펙트럼에서의 가장 큰 차이점은 제인 삽입 리포솜의 1653  $cm^{-1}$ 에서 제인의 amide II에서 기인한 C-N stretching 밴드가 작지만 선명하게 관찰되었으며  $PO_2^-$ 의 비대칭성 스트레칭 밴드와 에스테르기의 C=O stretching 밴드가 각각 1261로부터 1254  $cm^{-1}$ 로, 1727에서 1734 $cm^{-1}$ 으로 살짝 이동되어 나타났다는 것이다. 또한 물분자의 수소결합에 해당하는 밴드가 제인 삽입 리포솜의 경우 더 크고 넓게 나타났는데 이는 PC 분자 사이에 제인 분자가 끼어들어가 서로 다른 분자간의 수소결합 숫자가 증가되었음을 의미한다. 제인 삽입 리포솜에서 제인 나노입자의 amide II C-N 스트레칭 밴드가 매우 작아져 있고 1539 $cm^{-1}$ 에서 관찰되는 amide I의 C=O 밴드는 관찰되지 않는 것으로 보아 제인은 리포솜 셸 부분

에 일부 끼어들어가 있고 나머지는 리포솜 내부에 존재한다는 것을 유추할 수 있다 (도 2).

[0119] **실시예 5: 난용성 약물 봉입능의 증진 효과**

[0120] 수난용성 약물인 파클리탁셀, 도세탁셀, 커큐민 또는 셀레록시브를 각각 인지질 18 mg 당 2.6, 2.6, 3 또는 4 mg씩 섞어 제인 나노입자(10:10 제인:카제인으로 제조), 리포솜 (16:2의 DOPC:EDOPC으로 제조) 또는 제인 삽입 리포솜(16:2:5의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조)에 봉입시킨 후, 완성된 리포솜에 미봉입되어 석출된 약물을 필터여과로 제거하였다. 실시예 2의 방법으로 각 약물의 봉입 농도를 측정된 결과, 다음 표 2(파클리탁셀, 도세탁셀, 커큐민 또는 셀레록시브의 통상적인 리포솜 또는 제인삽입 리포솜으로의 탑재농도 및 효율비교)와 같이 네 약물의 경우 모두 제인 삽입 리포솜에의 봉입 농도 및 봉입 효율이 현저히 개선되었다. 이러한 수난용성(지용성) 약물의 봉입 농도 개선은 약물 분자가 PC, 제인 분자 둘 다와 소수성 인력에 의해 결합할 수 있어 셀에도 더 많이 끼어들어가고 제인 코어에도 봉입될 수 있기 때문으로 생각된다.

**표 2**

[0121]

| 약물    | 구조체      | 탑재 농도(mg/ml) | 편차 (mg/ml) | 봉입 효율 (%) |
|-------|----------|--------------|------------|-----------|
| 파클리탁셀 | 리포솜      | 1.38         | 0.08       | 53.1      |
|       | 제인삽입 리포솜 | 1.94         | 0.14       | 74.6      |
| 도세탁셀  | 리포솜      | 1.27         | 0.09       | 48.8      |
|       | 제인삽입 리포솜 | 2.47         | 0.10       | 95.0      |
| 커큐민   | 리포솜      | 0.81         | 0.02       | 27.0      |
|       | 제인삽입 리포솜 | 2.24         | 0.11       | 74.7      |
| 셀레록시브 | 리포솜      | 1.69         | 0.09       | 42.3      |
|       | 제인삽입 리포솜 | 3.96         | 0.38       | 99.0      |

[0123] **실시예 6: 제인 삽입에 의한 리포솜의 안정화**

[0124] 통상적인 리포솜 (16:2의 DOPC:EDOPC으로 제조), 제인 삽입 리포솜 (16:2:5의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조)에 표 2와 같이 각각 파클리탁셀을 탑재하여 제조 후, 실시예 2의 방법으로 평균입자경을 측정된 결과, 제인 삽입 리포솜에 더 고용량의 파클리탁셀이 탑재되었음에도 불구하고 제조직후 평균입자경이 더 작았으며, 냉장온도에서 12주 동안 보관시 리포솜의 경우 입자경의 현저한 증가가 관찰되었지만 제인 삽입 리포솜의 경우는 그렇지 않았다 (도 5A).

[0125] 약물 봉입 없이 제인 나노입자(10:10 제인:카제인으로 제조), 통상의 리포솜(16:2의 DOPC:EDOPC으로 제조), 제인 삽입 리포솜(16:2:5의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조) 50ml를 10% 소혈청 알부민이 포함된 10mM 인산염 완충용액 5 ml에 섞어 37°C에서 보관하며 실시예 2의 방법으로 각 시간에 따라 변화되는 입자의 크기를 관찰 하였다. 혈청은 양이온성 나노입자의 불안정화를 촉진시키므로 양이온성 EDOPC를 리포솜을 구성하는 PC로 사용하였음을 감안하여 이 조건에서 실험을 수행하였다. 그 결과, EDOPC가 없는 제인 나노입자는 변화가 없었다. EDOPC를 포함하는 인지질만으로 구성된 리포솜과 제인삽입 리포솜 중 리포솜은 5분만에 초기 크기보다 약 2배, 2시간 뒤에 2.4배 증가하였다. 이에 반해서 제인 삽입 리포솜은 5분 뒤에 1.1배 크기가 증가하였으며 2시간 뒤에 1.7배 증가하여 통상의 리포솜 보다 혈청 존재 조건에서 높은 안정성을 보였다(도 5B).

[0126] 통상의 리포솜(16:2 DOPC:EDOPC으로 제조), 제인 삽입 리포솜(16:2:5의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조)을 각각 약물 탑재 없이 제조 후, 동결건조보호제로서 수크로우즈를 첨가하거나 첨가하지 않은 상태에서 실시예 3의 방법으로 동결건조하여 분말화한 후 물을 다시 넣어 살짝 vortex하여 재분산한 다음에 평균입자경을 측정된 결과, 수크로우즈를 가하지 않은 경우는 리포솜의 입자경이 약 3배 증가하였으나 제인 삽입 리포솜의 경우는 1.6배 만 이 증가하였다 (도 6A).

[0127] 통상의 리포솜(16:2의 DOPC:EDOPC으로 제조), 제인 삽입 리포솜(16:2:5의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조)에 각각 도세탁셀을 봉입시켜 제조 후 수크로우즈 용액을 0, 1.3 또는 5%로 가한 상태에서 실시예 3의 방법으로 동결건조하여 평균입자경을 측정된 결과 제인 삽입 리포솜의 경우는 더 높은 도세탁셀 봉입농도에도 불구하고 수크로우즈를 1.3%만 넣어도 입자경의 변화가 거의 없었지만 인지질만으로 구성된 리포솜의 경우는 5%는 넣어야 입자경의 증가를 방지할 수 있었다 (도 6B).

[0128] 제인 삽입 리포솜(16:2:5의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조)에 각각 도세탁셀 또는 파클리탁셀을 탑재하여 제조 후 수크로우즈 용액을 가한 상태에서 실시예 3의 방법으로 동결건조 및 석출된 약물을 분리 후 실시예 2의 방법으

로 입자 내부에 남아있는 약물의 농도를 측정하였다. 그 결과, 제인 삽입 리포솜은 가장 높은 약물 봉입농도를 갖고 있음에도 불구하고 초기 농도 대비 도세탁셀 95.2%, 파클리탁셀 93.7%의 가장 높은 약물이 입자 내부에 남아있어 봉입 농도에 있어서 동결건조에 의한 유의성있는 감소는 없음을 알 수 있었다 (도 6C).

[0129] 인지질만으로 구성된 리포솜(16:2의 DOPC:EDOPC으로 제조), 제인 삽입 리포솜(16.2:1.8:2:4의 DOPC:EDOPC:cholesterol: Zein으로 제조)을 실시예 1 및 비교예 1의 방법으로 약물 봉입 없이 제조하였다. 제조한 리포솜 3종을 각각 100 ml 씩 취해 인공장액(1% pancreatin, 0.68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 포함하고 NaOH로 pH 6.8 로 맞춘 용액) 또는 인공위액(0.32% pepsin, 0.2 g NaCl을 포함하고 HCl으로 pH를 1.2로 맞춘 용액) 900ml에 넣어 37°C에서 교반하며 방치하였다. 방치 0, 2, 6 시간 후 샘플을 취해 사이즈를 측정된 결과, 다음 표 3에 나타난 것처럼, 제인 삽입 리포솜의 경우 인공위액, 장액 모두에서 시간에 따른 입자 크기의 증가가 거의 없음을 관찰하였다. 이는 경구투여 후 위장관계 조건에서의 제인 삽입 리포솜의 안정성을 시사한다.

표 3

[0130]

| 리포솜의 종류  | 인공 위액에서의 입자 크기 변화 (nm) |         |         | 인공 장액에서의 입자 크기 변화 (nm) |          |         |
|----------|------------------------|---------|---------|------------------------|----------|---------|
|          | 0 h                    | 2 h     | 6 h     | 0 h                    | 2 h      | 6 h     |
| 리포솜      | 131±18                 | 1551±27 | 1185±30 | 131±18                 | 1154±349 | 1044±94 |
| 제인삽입 리포솜 | 128±14                 | 479±291 | 168±10  | 128±14                 | 253±5    | 193±33  |

[0131] 이상의 결과는, 리포솜의 인지질 이중층 내 제인삽입에 의해 분산액으로 보관 시, 인공위장관액에 혼합시 및 분산액을 동결건조 후에도 리포솜의 구조가 안정화되어 있음을 보여준다.

[0133] **실시예 7. 제인 삽입 리포솜으로부터의 약물 방출**

[0134] 인지질만으로 구성된 리포솜(16:2의 DOPC:EDOPC으로 제조), 제인 삽입 리포솜(16:2:5의 DOPC:EDOPC:Zein으로 제조), 제인 코어-카제인 셀 입자(10:10 제인:카제인으로 제조)을 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 방법으로 각각 제조하되 약물로서 도세탁셀을 탑재하였다. 미탑재 약물을 제거 후, 탑재된 도세탁셀 농도를 실시예 3의 방법으로 정량, 각 제제를 약물농도로 250g/ml로 희석 후 각 800 ml씩 분자량 12,000 내지 14,000cut off의 투석용 용기에 넣었다. 비교를 위하여 약물을 같은 농도로 에탄올과 0.2% Tween 80 인산염완충용액의 50:50 혼합액에 녹인 용액도 시험용 샘플로 사용하였다. 투석액으로는 30 ml의 0.2% Tween 80 pH 7.4의 인산염완충용액을 사용하여 70 rpm, 37°C에서 교반하면서 미리 정한 시각에 약물이 유리되어 나왔을 투석액 1ml를 취하고 새로운 용액을 1ml 보충하여 싱크 상태를 유지하였다. 방출된 약물의 농도는 실시예 3의 방법으로 정량하였다.

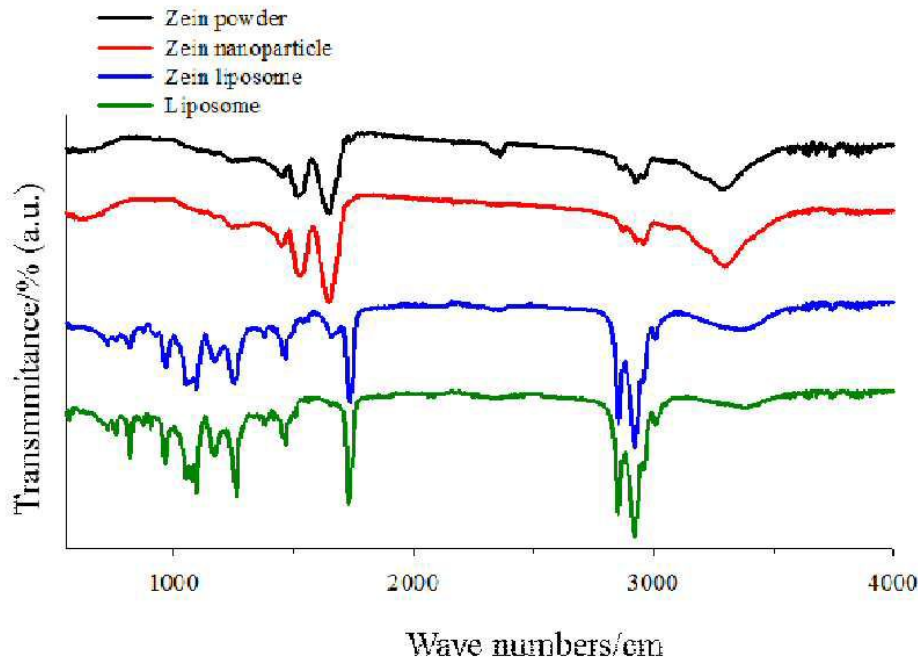
[0135] 그 결과, 약물 단독 용액의 경우 매우 빠른 방출을 보여 12시간 내에 거의 100% 방출되었으며, 제인 코어-카제인 셀 입자 봉입 도세탁셀의 경우 약 80%가 방출된 것으로 나타났다. 그러나, 제인 삽입 리포솜 봉입 도세탁셀, 리포솜 탑재 도세탁셀의 경우 같은 시각에 약 35, 14% 방출된 것으로 나타나, 제인 삽입 리포솜의 경우 제인 코어-카제인 셀 입자 봉입 도세탁셀보다는 현저히 지연된 방출 양상을 보였으며, 리포솜보다는 빠른 약물 방출 양상을 보였다. 그러나 제인 삽입 리포솜의 경우 72시간 까지도 <60% 이내의 약물 방출을 나타내었으며, 이러한 농도는 리포솜 대비 도세탁셀의 봉입 농도가 약 2배라는 점을 고려할 때, 나노크기의 콜로이드 입자 봉입에 의해 서방성 방출능이 유지되었음을 알 수 있다(도 7).



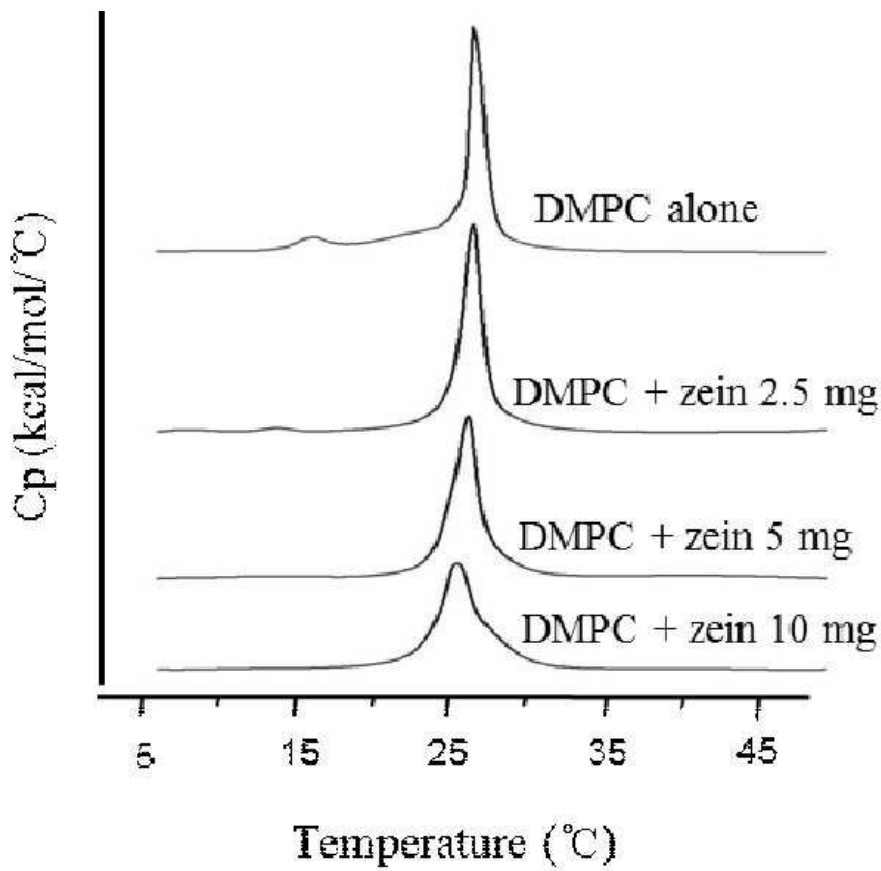
도면  
도면1



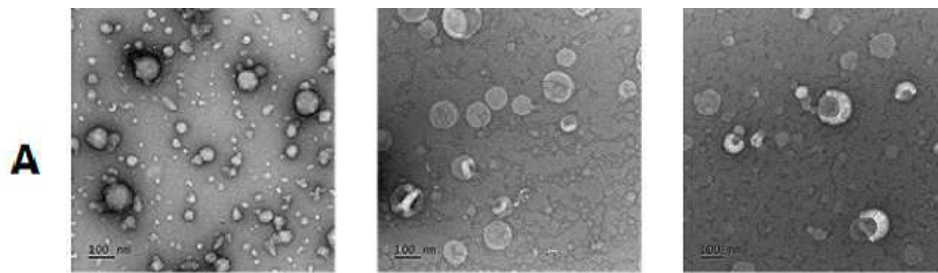
도면2



도면3



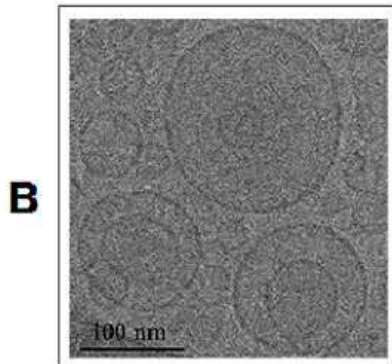
도면4



제인 코어-  
카제인 셸 입자  
(Zein core-shell  
nanoparticle)

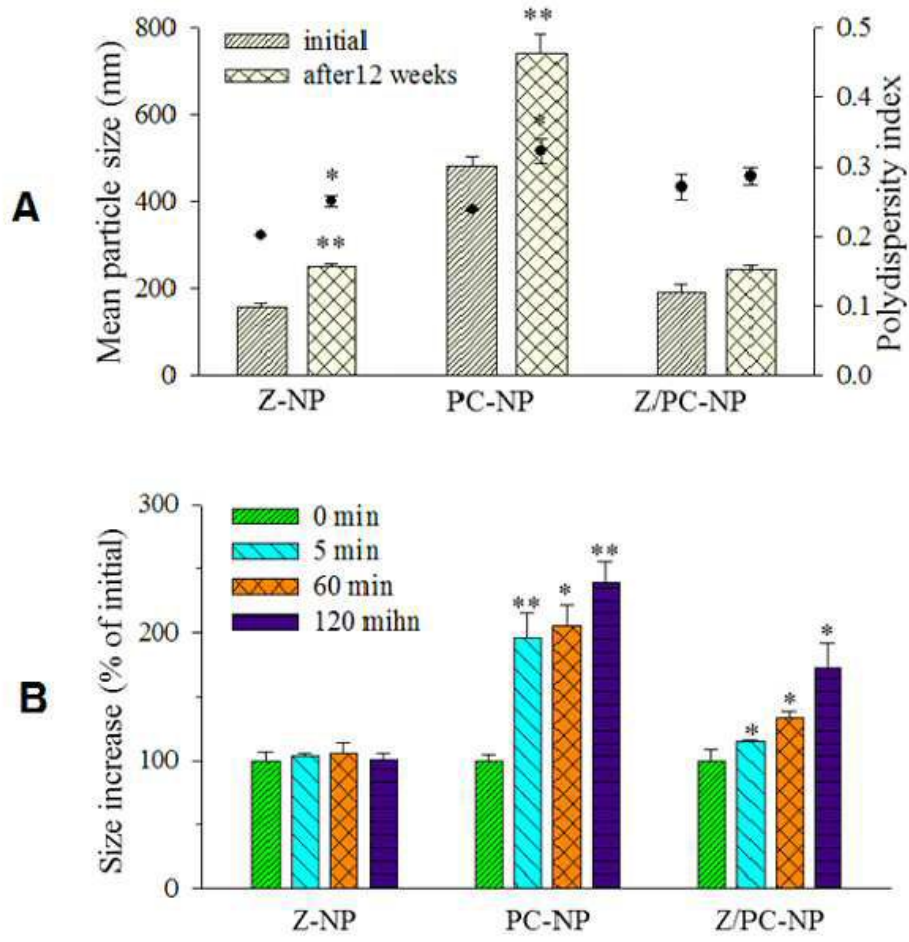
리포좀  
(Liposome)

제인삽입 리포좀  
(Zein liposome)

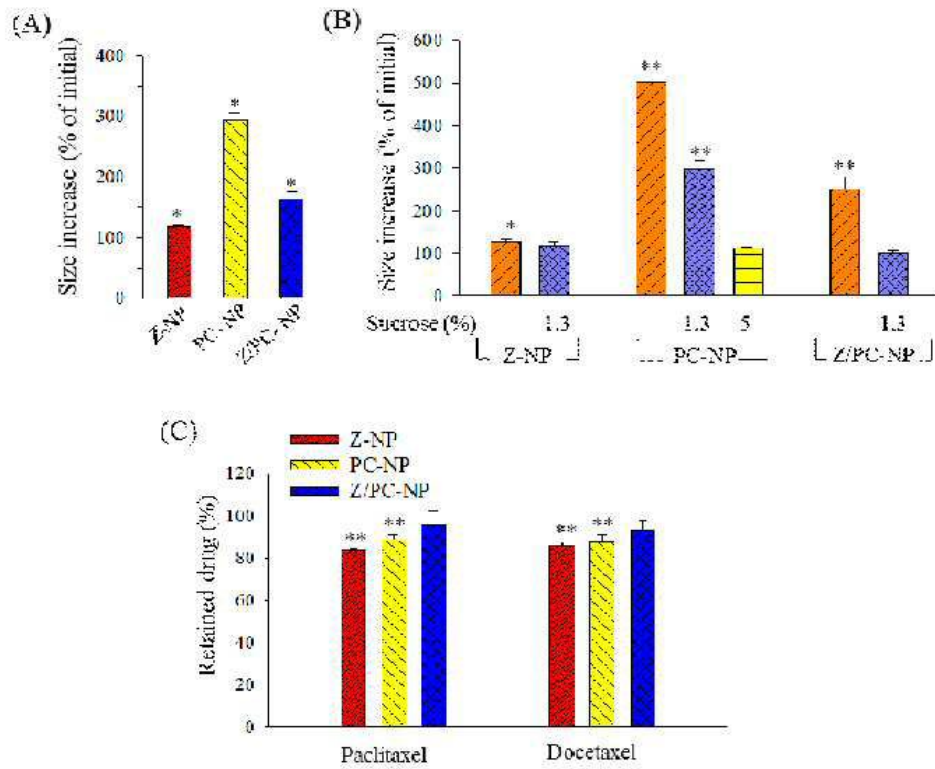


제인삽입 리포좀  
(Zein liposome)

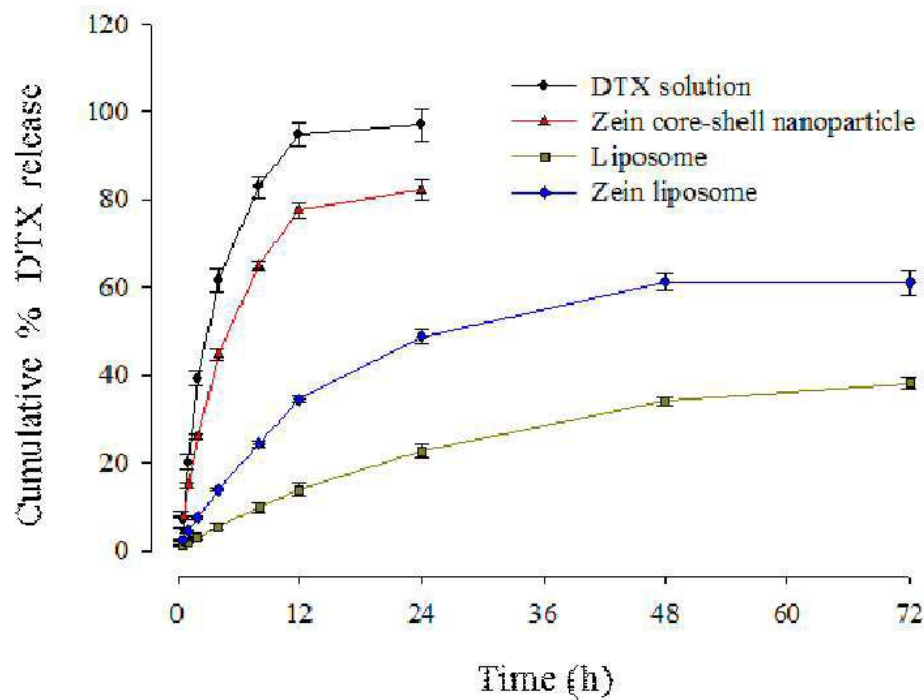
도면5



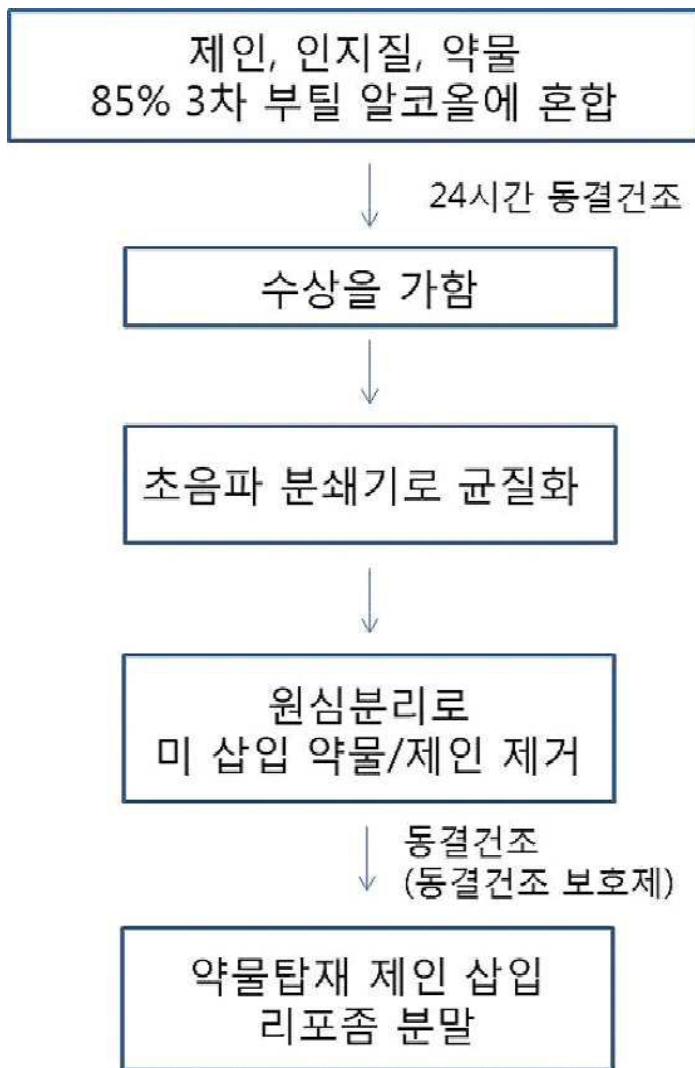
도면6



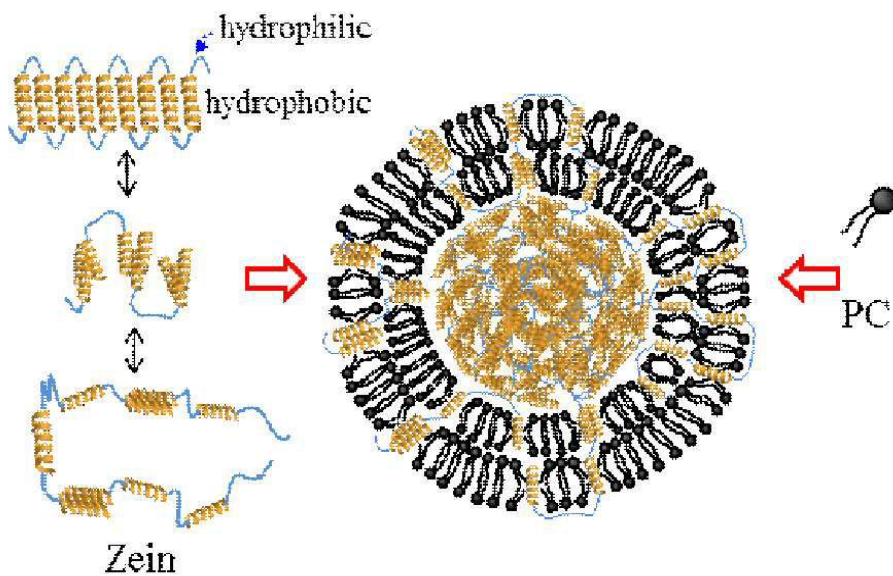
도면7



도면8



도면9



【심사관 직권보정사항】

**【직권보정 1】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 제1항

**【변경전】**

~제인을 포함하고, 상기 리포솜은 인지질 이중층 내부에 제인을 더 포함하는 제인 삽입 리포솜

**【변경후】**

~제인을 포함하고, 인지질 이중층 내부에 제인을 더 포함하는 제인 삽입 리포솜