



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월28일
(11) 등록번호 10-1300744
(24) 등록일자 2013년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/133 (2006.01) A61K 31/37 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0049773

(22) 출원일자 2011년05월25일

심사청구일자 2011년05월25일

(65) 공개번호 10-2012-0131538

(43) 공개일자 2012년12월05일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090072170 A

KR1019910005841 A

(73) 특허권자

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

김진철

강원도 춘천시 석사길 10, 101동 507호 (석사동, 봄내 아파트)

서희진

강원도 춘천시 퇴계동 1024 퇴계주공9차 907-1401

(74) 대리인

특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 4 항

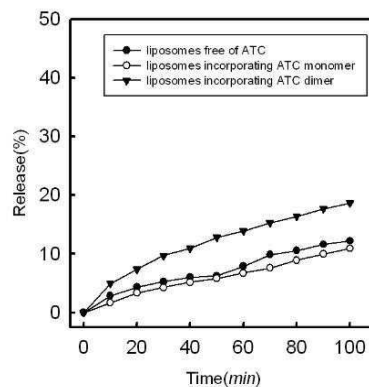
심사관 : 송건형

(54) 발명의 명칭 광 응답성 베시클 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 수용성 목적물질을 내부에 수용하는 베시클로서 상기 베시클의 막에 쿠마린이 탑재되고 광 조사에 의하여 상기 수용성 목적물질의 방출을 조절할 수 있는 광 응답성 베시클을 개시한다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0023123

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 전자기장 감응특성을 지닌 새로운 향암 전달체 개발

주관기관 강원대학교산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

수용성 목적물질을 내부에 수용하는 베시클로서,

상기 베시클을 이루는 양친매성 분자는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 또는 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine) 중 하나 이상이며,

상기 베시클의 막에 쿠마린이 탑재되어 광 조사에 의하여 상기 수용성 목적물질의 방출을 조절할 수 있고,

상기 쿠마린과 상기 양친매성 분자의 무게비는 1/1000 ~1/2인 것을 특징으로 하는 광 응답성 베시클.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 쿠마린은 쿠마린, 7-하이드록시 쿠마린, 카르복실 쿠마린 및 아세톡시 쿠마린으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 광 응답성 베시클.

청구항 3

삭제

청구항 4

(A) 쿠마린 및 양친매성 분자를 유기용매에 용해시킨 후, 상기 유기용매를 증발시켜 쿠마린/양친매성 분자의 건조 혼합 막을 형성하는 단계;

(B) 상기 건조 혼합 막에 수용성 목적물질이 용해된 수상을 첨가하여 수화시킨 후, 균질화시키는 단계; 및

(C) 탑재되지 않은 쿠마린과 수용성 목적물질을 제거하는 단계;를 포함하고,

상기 양친매성 분자는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 또는 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine) 중 하나 이상이며,

상기 쿠마린과 양친매성 분자의 무게비는 1/1000 ~1/2인 것을 특징으로 하는 광 응답성 베시클의 제조방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 쿠마린은 쿠마린, 7-하이드록시 쿠마린, 카르복실 쿠마린 및 아세톡시 쿠마린으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 광 응답성 베시클의 제조방법.

청구항 7

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 광 응답성 베시클 및 그 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 쿠마린(coumarin)이 베시클(vesicle)에 탑재(load)된 광 응답성 베시클 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 수십 년 동안 자극 민감성 리포솜 (stimuli-sensitive liposome)에 대한 연구가 활발히 진행되어 오고 있다. 자극 민감성 리포솜이란 목적부위(target-site)에서 약물을 방출하거나, pH변화, 온도변화, 빛, 자기장 등에 민감하게 반응하여 포접(entrapment)하고 있던 내용물을 방출하는 리포솜이다.
- [0003] 목표부위 민감성 면역 리포솜 (target-sensitive immuno liposomes)은 디올레오일 포스파티딜 콜린 (dioleoylphosphatidylcholine, DOPE) 리포솜 표면을 소수화된 항체 조각 (hydrophobically modified immunoglobulin G fragment, Fab portion)으로 표면을 수식함으로써 제조되었다[Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 3, Issue 3, May-June 1989, Pages 343-389, S. Wright, L. Huang]. 면역 리포솜의 항체가 목적 세포(target cell)의 항원과 결합하면, 항체가 리포솜 표면에서 측방 확산(lateral diffusion)하기 때문에 리포솜의 인지질 이중층(bilayer)막은 교란되어 헥사고널 상(hexagonal phase)이 된다. 따라서 표적부위에서 목적물질을 방출하게 된다.
- [0004] pH 민감성 리포솜은 hemisuccinate (CHEMS), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) 등을 리포솜 막에 삽입함으로써 제조되었다[The Journal of Biological Chemistry, Volume 272, NO. 4, January 1997, V. A. Slepishkin, S. Simoes, P. Dazin, M. S. Newman, L. S. Guo, M.C. Pedrosa de Lima, N. Duzgunes]. 리포솜 표면을 메틸메타크릴산 (methylnmethacrylic acid)을 함유한 수용성 고분자로 수식하여 pH 민감성 리포솜을 제조하기도 하였다[Current Opinion in Colloid & Interface Science, doi:10.1016/j.cocis.2010.12.004, J. A. Zasadzinski, B. Wong, N. Forbes, G. Braun, G. Wu]. 특정한 pH범위에서 고분자 사슬의 형태변화가 리포솜 막에 기계적 에너지를 가하여 포접되어 있던 목적 물질을 방출시킨다.
- [0005] 한편, 포화된 포스파티딜콜린(saturated phosphatidylcholines, PC)으로 온도 민감성 리포솜을 제조하였다[Journal of Controlled Release, Volume 76, Issue 1-2, September 2001, Pages 27-37, P. Chandaroy, A. Sen, S. W. Hui]. 리포솜 막의 상전이 온도 근방에서 포접되어 있던 목적 물질이 급격하게 방출되었다. 리포솜 표면을 온도 민감성 고분자 (temperature-sensitive polymer)로 수식함으로써 온도 민감성 리포솜을 제조하였다[Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 24, Issue 1, March 2002, Pages 45-52, J. C. Kim, J. D. Kim]. 상전이온도 근처에서의 고분자의 열적인 수축(thermal contraction)이 리포솜막에 기계적 에너지를 가해 기 때문에 방출을 촉진시킨다고 밝혀져 있다.
- [0006] 비스-아조 피씨 (bis-(4-n-butylphenylazo-4'-phenylbutyryl)-L- α -phosphatidylcholine) 리포솜은 UV 선 조사 시 비스-아조 피씨의 시스-트랜스 광 이성질체에 의해 광 응답성 방출을 나타낸다. 이성질체는 리포솜 이중층의 팩킹을 방해할 것이다. 지질에 결합되어 있는 O-nitrobenzyl로 구성된 리포솜은 조사된 UV에 의해 리포솜의 내용물을 방출하게 된다. 지질의 친수성 머리는 소수성 꼬리에서 쪼개지게 되는데, 이때 막이 교란되고 재배열되면서 방출을 유도한다. 비닐 에테르 결합을 가지고 있는 지질 리포솜은 광 민감성을 방출을 나타낸다. 플라스메닐콜린은 광 민감제에 의해 지질이 분해되면서 산화된다. 이 막은 지질의 팩킹 파라미터 (packing parameter)가 변하면서 불안정하게 된다.
- [0007] 한편, 쿠마린과 그 유도체는 그들의 광 반응성 특성(photo-reactive property)으로 광 응답성 약물전달자 (photo-responsive drug carrier)개발에 응용된 경우가 있다. 310nm 이상의 빛을 조사하면 쿠마린의 이중결합들이 광 반응하여 사이클로부탄(cyclobutane)이 형성되어 쿠마린 이량체(dimer)가 형성된다. 이량체에 254 nm 이하의 빛을 조사하면 사이클로 부탄이 파괴되어 모노머(monomer)가 된다[Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, Volume 35, Issue 4, March 1997, Pages 613-623, Y. Chen, K. H. Chen].
- [0008] 상기와 같은 쿠마린의 광화학적 성질을 이용하여 광 반응성 고분자 미셀 (photo-responsive polymeric micells)을 제조하였다[Macromolecules, Volume 40, Issue 4, January 2007, Pages 790-792, J. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao]. 친수성 블록(hydrophilic block)과 쿠마린이 결합된 소수성 블록 (coumarin-conjugated hydrophobic block)으로 구성된 양친매성 고분자(amphiphilic polymer)를 극성용매(테트라하이드로퓨란과 디클로로메탄의 혼합용매)에 분산시켜서 고분자 미셀을 제조하였고, 그 다음 고분자 미셀에 365nm의 파장의 빛을 조사하여 미셀 코어 (micelle core)에 있는 쿠마린을 이량화(dimerization)시켜서 미셀 코어를 가교시켰다. 상기와 같이 제조된 고분자 미셀에 254 nm 파장의 빛을 조사한 결과에 의하면, 코아에 포접 (entrapment)되어 있던 소수성 목적물질의 방출이 촉진되었다. 이와 같은 현상은 쿠마린 이량체가 단량체 (monomer)로 광 분괴(photo-cleavage)되어서 코아의 가교밀도가 낮아지고, 그 결과 코아가 느슨해지기 때문이라고 설명되고 있다.
- [0009] 상기의 고분자 미셀은 소수성 코아의 가교밀도가 광 조사(photo-irradiation)에 의해서 조절되기 때문에, 방출에 있어서 소수성 코아에 포접되어 있는 지용성 목적물질만을 제어할 수 있는 단점이 있다. 더욱이, 지용성 목

적물질의 광제어 방출(photo-controlled release)은 유상(테트라하이드로 푸란과 디클로메탄의 혼합용매)에서 시험되었고 수상에서는 시험되지 않았다. 수상이 아니라 유상에서 시험된 이유는 비록 미셀 코아의 가교밀도가 광 제어(photo-control)될 수 있어도 소수성 코아에 포접된 지용성 목적물질이 수상에 방출되어 나올 수 없기 때문이다. 더욱이, 상기 고분자 미셀은 소수성 코아/친수성 코로나 껍질(hydrophobic core/hydrophilic corona shell)의 구조로 인하여 친수성 목적물질을 친수성 코로나 껍질에 극히 제한적인 양만을 포접할 수 있고, 포접된 친수성 목적 물질은 코로나의 느슨한 구조로 인하여 신속히 방출되어 고갈된다. 게다가 친수성 코로나 껍질 부분은 광 반응성 물질(photo-reactive material)이 결합되어 있지 않기 때문에, 친수성 목적물질이 코로나에 포접되어 있어도 광 제어 방출이 불가능하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 쿠마린을 이용하여 광 조사(photo-irradiation)에 의해 수용성 목적물질의 방출을 조절할 수 있는 광 응답성 베시클을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수용성 목적물질을 내부에 수용하는 베시클로서 상기 베시클의 막에 쿠마린이 탑재되어 광 조사에 의하여 상기 수용성 목적물질의 방출이 조절가능한 것을 특징으로 하는 광 응답성 베시클을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (A) 쿠마린 및 양친매성 분자를 유기용매에 용해시킨 후, 상기 유기용매를 증발시켜 쿠마린/양친매성 분자의 건조 혼합 막을 형성하는 단계; (B) 상기 건조 혼합 막에 수용성 목적물질이 용해된 수상을 첨가하여 수화시킨 후, 균질화시키는 단계; 및 (C) 탑재되지 않은 쿠마린과 수용성 목적물질을 제거하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 광 응답성 베시클의 제조방법을 제공한다. 예를 들면, 우선 쿠마린과 양친매성분자를 유기용매에 함께 용해 시키고, 이 용액을 둥근 플라스크와 같은 면적이 넓은 용기에 담은 후 유기용매를 증발시켜서 쿠마린/양친매성 분자의 건조 혼합 막을 제조하고, 이 건조 혼합 막에 목적물질이 용해되어 있는 수상을 첨가하여 건조 혼합 막을 팽윤(수화)/균질화 시키고, 최종적으로 베시클에 탑재되지 않은 쿠마린과 수용성 목적물질을 컬럼크로마토그래피시킴으로써, 쿠마린이 막에 탑재된 광 반응성 베시클을 제조할 수 있다.

[0013] 본 발명의 광 반응성 베시클은 365 nm 이상의 파장의 빛이 조사되면 쿠마린이 이량화(dimerization)되면서 베시클 막이 교란되고, 254nm이하의 파장의 빛이 조사되면 쿠마린 이량체(dimer)가 단량체(monomer)로 분리면서 막이 교란되기 때문에, 빛의 조사(irradiation)에 의하여 베시클로부터 수용성 목적물질의 방출을 제어할 수 있다.

[0014] 본 발명의 쿠마린으로는 쿠마린(coumarin), 7-하이드록시 쿠마린 (7-hydroxy coumarin), 카르복실 쿠마린(carboxylic coumarin), 아세톡시 쿠마린 (7-acetoxy coumarin)등이 사용될 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 베시클을 구성하는 물질로서는 패킹 파라미터(packing parameter)가 약 1인 양친매성 분자들이 사용될 수 있는데, 이러한 양친매성 분자로는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine) 등이 사용될 수 있다.

[0016] 또한, 상기 쿠마린이 탑재된 베시클을 제조할 때, 쿠마린과 양친매성 분자의 무게비는 바람직하게는 1/1000 ~ 1/2, 더욱 바람직하게는 1:500 ~ 1/3, 가장 바람직하게는 1:100 ~ 1:5이다. 이보다 낮은 비율의 범위에서는 쿠마린의 양이 너무 적어서 쿠마린의 광 반응성이 발생하더라도 리포솜 막이 충분히 유동화되지 못하고 결과적으로 광 조사에 의해서도 목적물질이 방출되지 못한다. 상기 범위보다 높은 비율의 범위에서는 쿠마린의 양이 너무 많아서 쿠마린/양친매성분자 건조 필름을 수화/균질화하는 과정에서 침전이 발생한다.

[0017] 또한, 쿠마린/양친매성분자 건조 혼합 막을 수화시킬 때 사용하는 수상에서의 목적물질의 농도는 그 종류에 따라서 약효가 나타나는 농도가 다르기 때문에 수치로 정확히 표시할 수 없으나 약효농도가 나타나는 최저 농도와 최고농도 사이의 농도를 선택한다. 목적성분으로는 푸시딘산 나트륨, 네오마이신 설페이트, 알란토인(allantoin), 헤파린, 엑스트라툼 세페(Extratrum Cepae) 등이 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 의하면 쿠마린(coumarin)을 베시클(vesicle)에 탑재(loading)시킴으로써 광 반응성 베시클(photo-

responsive vesicle)를 제조할 수 있다. 이러한 본발명의 광 반응성 베시클은 특정 파장 범위의 빛이 조사되면 베시클로부터 수용성 목적물질의 방출을 조절할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1a는 7-하이드록시 쿠마린의 FT-IR 스펙트럼이고, 도 1b는 아세톡시 쿠마린의 FT-IR 스펙트럼이다.
- 도 2는 아세톡시 쿠마린의 ^1H NMR 스펙트럼이다.
- 도 3은 인지질에 대한 아세톡시 쿠마린의 비율이 각각 0:1(a)과 1:8 (b)인 리포솜의 투과 전자 현미경 사진이다.
- 도 4는 사이클 광조사에 따른 아세톡시 쿠마린의 이량화 정도는 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 사이클 광조사에 따른 리포솜에 탑재된 아세톡시 쿠마린의 이량화 정도를 나타내는 그래프이다.
- 도 6a는 빛을 조사하기 전에 촬영한 아세톡시 쿠마린을 함유하지 않은 리포솜의 투과전자현미경 사진이고, 도 6b는 아세톡시 쿠마린을 함유하지 않은 리포솜의 현탁액에 365 nm(400 W) 빛을 80분 동안 조사하고 연이어 254nm (6W)빛을 10분 동안 조사한 후에 촬영한 리포솜의 투과 전자 현미경 사진이다.
- 도 7a는 빛을 조사하기 전에 촬영한 아세톡시 쿠마린을 함유한 리포솜의 투과전자현미경 사진이고, 도 7b는 아세톡시 쿠마린을 함유한 리포솜의 현탁액에 365 nm(400 W) 빛을 80분 동안 조사하고 연이어 254nm (6W)빛을 10분 동안 조사한 후에 촬영한 아세톡시 쿠마린을 함유한 리포솜의 투과 전자 현미경 사진이다.
- 도 8은 아세톡시 쿠마린 이량체를 함유한 리포솜의 현탁액에 254nm의 빛을 조사하여 형광물질(카르복실 플루오레세인)의 방출(%)를 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 내용에 대해 하기 실시예에서 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지 포함한다.

[0021] 실시예 1 : 아세톡시 쿠마린(7-acetoxy coumarin)의 합성

[0022] 7-하이드록시 쿠마린(7-hydroxy coumarin) 50g, 소듐 아세테이트 (sodium acetate) 38g, 아세트 안하이드라이드 (acetic anhydride) 180 ml을 함께 250 ml 3구 플라스크 (three-neck flask)에 넣었다. 2-3방울의 피리딘을 혼합물에 첨가한 후에 144 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7 시간 동안 환류시키면서 반응을 진행하였다. 반응혼합물을 상온으로 냉각시킨 후에 에탄올과 냉각수로 세척하였다. 그 후 여과 막을 이용하여 여과한 후에, 케익을 에탄올에서 재결정화하였다.

[0023] 도 1a은 7-하이드록시 쿠마린의 FT-IR 스펙트럼이고, 도 1b는 아세톡시 쿠마린의 FT-IR 스펙트럼이다.

[0024] 도 1a의 7-하이드록시 쿠마린의 스펙트럼에서는 -OH 스트레칭 신호는 3116.1 cm^{-1} 에서 관찰되었고, C=O신호는 1703.5 cm^{-1} 와 1677.1 cm^{-1} 에서 관찰되었고, C=C 신호는 1407.8 cm^{-1} to 1564.7 cm^{-1} 범위에서 관찰되었고, C-O 신호는 832.7 cm^{-1} 에서 관찰되었다.

[0025] 도 1b의 아세톡시 쿠마린의 스펙트럼에서는 -OH 신호는 거의 사라졌고, C=O 신호, C=C 신호, C-O 신호는 7-하이드록시 쿠마린 스펙트럼에서와 동일한 위치에서 관찰되었다. 아세톡시 그룹의 C=O신호는 1735.9 cm^{-1} 에서 관찰되었고 아세톡시 그룹의 -C-O-C- 신호는 1184.2 cm^{-1} 에서 관찰되었다. 이로부터 아세톡시 쿠마린이 합성되었음을 확인할 수 있었다.

[0026] 도 2는 아세톡시 쿠마린의 ^1H NMR 스펙트럼이다. 아로마틱 프로톤의 신호는 6.4 ppm - 7.7 ppm 범위에서 관찰되었고, 아세톡시 그룹의 메틸 그룹은 2.3 ppm에서 관찰되었다. 아로마틱 프로톤 신호 면적에 대한 메틸 프로톤 신호 면적의 비는 4.9/3이었다. 이 비는 이론적인 비율인 5/3과 근사하기 때문에 아세톡시 쿠마린이 성공적으로 합성되었다는 것을 알 수 있었다.

[0027] 실시예 2 : 아세톡시 쿠마린을 함유한 리포솜의 제조

[0028] 본 실시예에서는 필름 수화법(film hydration)을 이용하여 아세톡시 쿠마린을 탑재한 리포솜을 제조하였다

[International Journal of Biological Macromolecules, Volume 47, Issue 5, December 2010, Pages 635-639, Y. J. Hong, J. C. Kim].

[0029] 클로로 포름에 용해되어 있는 에그 포스파티딜콜린 (egg phosphatidylcholine, EPC) 용액(100mg/ml) 0.14ml과 클로로 포름에 용해되어 있는 아세톡시 쿠마린 모노머 용액 (6 mg/ml)을 25ml의 밀이 둥근 플라스크에 넣어 혼합하였다. 이때 EPC에 대한 아세톡시 쿠마린의 비는 0:1, 1:20, 1:10, 1:8, 1:4, 1:1이 되게 하였다. EPC와 아세톡시 쿠마린으로 구성된 건조 혼합필름을 얻기 위하여 감압 하에서 회전 증발기에서 용매를 증발시켰다. 그 다음 HEPES 완충용액(pH 8.0)에 용해되어 있는 형광염료(carboxy fluorescein, CF)용액 2ml로 건조필름을 수화시켜서 필름이 플라스크 벽으로부터 용액으로 분산되게 하였다. 그 다음 분산액을 균질화하기 위하여 bath sonicator(Sonics & Materials, USA)에서 20분 동안 상온에서 초음파 분쇄하여 주었다. 그 다음 리포솜 막을 어닐링(annealing)해 주기 위하여 5 ℃에서 약 12시간 동안 방치하였다. 리포솜에 봉입되지 않은 형광성 물질을 제거하기 위하여 리포솜 현탁액을 Sephadex G-100 column (1.8 cm > 40 cm)을 통과시켜 주어 최종적으로 아세톡시 쿠마린과 형광염료가 탑재된 리포솜을 제조하였다.

[0030] 리포솜에 포접된 형광염료의 형광성 퀀칭(fluorescence quenching)정도는 인지질(EPC)농도를 0.07%로 맞춘 후에 하기 식을 이용하여 결정하였다.

수학식 1

[0031]
$$\text{퀀칭 정도}(\%) = (1 - F_i / F_f) \times 100$$

[0032] 여기서 F_i 는 리포솜에 포접되지 않은 형광염료를 제거한 후에 측정한 리포솜 현탁액의 형광성이고, F_f 는 형광염료를 포함한 리포솜을 triton X-100으로 용해시킨 후에 측정한 용액의 형광성이다. 형광성 세기는 상온에서 측정하였고, 492 nm에서 여기(excitation)시키고 517 nm 에서 형광성을 측정하였다.

[0033] 또한, 리포솜의 평균 직경은 입도 분석기 (ZetaPlus 90, Brookhaven Instrument Co., USA)로 측정하였다. 리포솜 현탁액을 완충용액으로 희석하여 리포솜 현탁액의 광산란 세기가 40 Kcps -100 Kcps 가 되게 하였다.

[0034] 하기의 표 1에는 리포솜에 포접된 형광염료의 퀀칭(quenching)과 리포솜의 평균크기를 나타내었다.

표 1

EPC에 대한 ATC의 비	0:1	1:20	1:10	1:8	1:4	1:2	1:1
퀀칭 (%)	71	69	83	55	59	56	72
평균 직경 (nm)	181	192	116	137	214	155	159

[0036] 상기 표 1에 의하면, 인지질(EPC)에 대한 아세톡시 쿠마린의 비율이 0:1, 1:20, 1:8, 1:4일 때, 퀀칭(%)는 약 71%, 69%, 55%, 59 %이었다. 퀀칭(%)는 리포솜이 형성되는 정도의 척도인데, 퀀칭(%)가 높을수록 리포솜이 높은 수율로 형성된다는 것을 의미한다. 따라서, 인지질(EPC)에 대한 아세톡시 쿠마린의 비율이 증가할수록 아세톡시 쿠마린은 리포솜의 형성 정도를 감소시킴을 알 수 있었다. 아세톡시 쿠마린은 수 불용성이기 때문에 인지질의 소수성 꼬리와 소수성 상호작용을 할 수 있고, 이에 아세톡시 쿠마린은 리포솜 막에 탑재(loading)되는 것 외에도 인지질(EPC)과 혼합 미셀 (mixed micelle)을 형성할 수도 있다. 이에 아세톡시 쿠마린의 비율이 증가하면 형광염료의 형광성 퀀칭(quenching)이 낮아지는 것이라 판단되었다. 또한, 인지질(EPC)에 대한 아세톡시 쿠마린의 비율이 1:2 와 1:1일 때는, 균일한 현탁액은 좀처럼 얻기 어려웠고 대신 클러스터(cluster)들이 포함된 불균한 현탁액이 얻어졌다. 따라서, 아세톡시 쿠마린을 함유한 리포솜을 높은 수율로 제조하기 위해서는 인지질(EPC)에 대한 아세톡시 쿠마린에 대한 비율이 1:4를 초과하지 않는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

[0037] 한편, 인지질에 대한 아세톡시 쿠마린의 비율이 0:1, 1:20, 1:8, 1:4일 때 리포솜의 평균 크기는 181 nm, 192 nm, 137 nm, 214 nm 이었다. 리포솜의 크기는 수화온도, 초음파 분쇄 강도, 초음파 분쇄기의 배스(bath)에서 플라스크의 위치 등 제조조건 등에 민감하기 때문에, 재현성 있게 제조하기가 어렵다[Phrmaceutical Manufcaturing Handbook: Production and Processes edited S.C. Gad, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2008, Page 456, S. G. Antimisariis, P. Kallinteri, D. G. Fatouros]. 따라서 크기의 변화는 낮은 재현성(reproducibility) 때문이고, 아세톡시 쿠마린의 비율의 변화와는 밀접한 관계가 없다고 판단되었다. 또

한, 평균 크기 측면에서 분류하면, 리포솜은 다층구조 베시클 (multi-lamellar vesicle)로 분류될 수 있음을 알 수 있었다.

[0038] 도 3은 인지질(EPC)에 대한 아세톡시 쿠마린의 비율이 0:1과 1:8인 리포솜의 투과 전자 현미경(TEM) 사진이다. 사진상에서 리포솜의 크기는 약 100 nm에서 200 nm 정도였고 다층구조 (multi-lamellar structures)가 관찰되었다.

[0039] 실시예 3 : 아세톡시 쿠마린과 리포솜에 포접된 아세톡시 쿠마린의 이량화 관찰

[0040] 본 실시예에서는 아세톡시 쿠마린을 에탄올에 용해시키고 그 용액을 증류수로 희석하여 농도가 0.02 mg/ml이 되게 하였다. 이 용액을 365 nm(400W)의 빛으로 80분 조사하고 그리고 254 nm (6W)의 빛으로 10분 조사하는 식으로 빛을 주기적으로 조사하여 아세톡시 쿠마린의 주기적 이량화/탈이량화(Cyclic dimerization and de-dimerization)를 관찰하였다.

[0041] 한편, 리포솜에 탑재된 아세톡시 쿠마린의 주기적 이량화/탈이량화를 상기 광조사 조건과 동일하게 조사하면서 관찰하였다. 이때 리포솜에 탑재된 아세톡시 쿠마린의 농도는 리포솜에 봉입되지 않은 아세톡시 쿠마린의 농도와 동일하게 하였다.

[0042] 이량화 정도는 하기 식으로 결정하였다.

수학식 2

$$\text{이량화 정도 (\%)} = (1 - \frac{\text{광조사 후 310nm에서 흡광도}}{\text{광조사 전 310 nm에서 흡광도}}) \times 100$$

[0044] 310 nm의 흡광도는 아세톡시 쿠마린 단량체의 흡광도이다. 365 nm의 빛을 조사하면 310 nm에서의 용액의 흡광도가 감소하는 데 그 이유는 아세톡시 쿠마린 단량체가 이량체로 되어서 단량체의 양이 감소하기 때문이다.

[0045] 도 4은 사이클 광조사에 따른 아세톡시 쿠마린의 이량화 정도를 보여주는데, 365nm파장의 빛(400W)을 80분간 조사하였을 때 이량화 정도는 66%까지 증가하였다가 연이어 254nm 파장의 빛(6W)을 10분 동안 조사하였을 때 이량화 정도는 27.5%까지 감소하였다. 계속하여 365 nm 파장의 빛과 254nm 파장의 빛을 번갈아 가면서 조사하였을 때 이량화 정도의 증가와 감소는 반복되었다.

[0046] 도 5는 사이클 광조사에 따른 리포솜에 탑재된 아세톡시 쿠마린의 이량화 정도를 보여주는데, 365nm파장의 빛(400W)을 80분간 조사하였을 때 이량화 정도는 57%까지 증가하였다가 연이어, 254nm 파장의 빛(6W)을 10분 동안 조사하였을 때 이량화 정도는 38%까지 감소하였다. 계속하여 365 nm 파장의 빛과 254nm 파장의 빛을 번갈아 가면서 조사하였을 때 이량화 정도의 증가와 감소는 반복되었다.

[0047] 이로부터 리포솜에 탑재되지 않은 아세톡시 쿠마린뿐만 아니라 리포솜에 탑재된 아세톡시 쿠마린도 주기적 광조사에 의해서 이량화/탈이량화를 반복한다는 것을 알 수 있었다.

[0048] 실시예 4 : 리포솜의 광 안정성 관찰

[0049] 본 실시예에서는 주기적인 광조사에 대한 리포솜의 안전성을 리포솜 크기 및 모양 변화를 관찰함으로써 평가하였다.

[0050] 작은 유리병에 담겨 있는 5ml의 리포솜 현탁액에 주기적인 조사(cyclic irradiation)를 하였다. 즉, $\lambda = 365$ nm (400W) 파장의 빛을 80분 동안 조사하고 $\lambda = 254$ nm (6W) 파장의 빛을 10분 동안 조사하는 방식의 주기적인 조사를 하였다. 주기적인 조사가 리포솜의 크기 및 모양 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 아세톡시 쿠마린이 탑재되지 않은 리포솜과 아세톡시 쿠마린이 탑재된 리포솜 (아세톡시 쿠마린:인지질 =1:8)의 투과 전자 현미경 사진을 광 조사하기 전과 후에 촬영하였다.

[0051] 도 6a는 빛을 조사하기 전에 촬영한 아세톡시 쿠마린을 함유하지 않은 리포솜의 투과전자현미경 사진인데, 100nm-200nm의 다층구조 베시클이 관찰되었다. 도 6b는 아세톡시 쿠마린을 함유하지 않은 리포솜의 현탁액에 365 nm(400 W) 빛을 80분 동안 조사하고 연이어 254nm (6W)빛을 10분 동안 조사한 후에 촬영한 리포솜의 투과 전자 현미경 사진인데, 다층구조의 베시클이 관찰되었고 크기는 빛을 조사하기 전보다 다소 증가하였으나 큰 변화는 없었다.

[0052] 도 7a는 빛을 조사하기 전에 촬영한 아세톡시 쿠마린을 함유한 리포솜의 투과전자현미경 사진인데, 100nm-200nm

의 다층구조 베시클이 관찰되었다. 도 7b는 아세톡시 쿠마린을 함유한 리포솜의 현탁액에 365 nm(400 W) 빛을 80분 동안 조사하고 연이어 254nm (6W)빛을 10분 동안 조사한 후에 촬영한 아세톡시 쿠마린을 함유한 리포솜의 투과 전자 현미경 사진인데, 다층구조의 베시클이 관찰되었고 크기는 빛을 조사하기 전보다 현저하게 증가하였다.

[0053] 상기 실시예 3에 의하면 아세톡시 쿠마린은 리포솜에 탑재된 상태에서도 365 nm파장의 빛에 의해서 이량화가 되고 254 nm의 빛에 의해서 탈이량화가 되었다. 이와 같은 이량화와 탈이량화가 리포솜 막을 유동화(fluidization)시키고 리포솜을 융합(fusion)시켰기 때문에 리포솜의 크기가 현저하게 증가한 것이라 판단되었다.

[0054] 실시예 5 : 광 조사에 따른 리포솜으로부터의 방출

[0055] 본 실시예에서는 아세톡시 쿠마린 이량체를 탑재한 리포솜의 광 조사에 따른 목적물질의 방출을 관찰하였다.

[0056] 우선, 상기 실시예 2와 같이 필름수화법을 이용하여 아세톡시 쿠마린 이량체를 탑재한 리포솜을 제조하였다. 클로로포름에 용해되어 있는 에그 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine, EPC) 용액(100mg/ml) 0.14ml과 클로로포름에 용해되어 있는 아세톡시 쿠마린 이량체 용액 (2 mg/ml) 0.875 ml을 25ml의 밀이 둥근 플라스크에 넣어 혼합하여 인지질(EPC)에 대한 아세톡시 쿠마린 이량체의 무게비가 1:8이 되게 하였다. 그 후 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 혼합건조필름을 제조하고, 혼합건조필름을 수화시키고, 현탁액을 균질화하고, 포접되지 않은 형광염료를 분리하여 아세톡시 쿠마린 이량체가 탑재된 리포솜을 제조하였다.

[0057] 광 조사에 따른 리포솜으로부터의 형광염료 방출을 관찰하기 위해서 쿠마린 이량체를 함유한 리포솜 현탁액에 254nm의 빛을 조사하여 하기 식을 이용하여 방출(%)를 결정하였다.

수학식 3

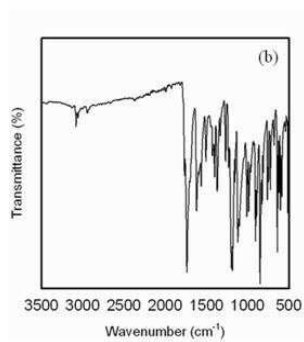
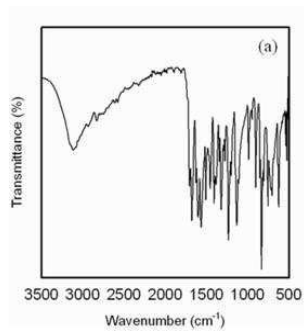
$$\text{방출}(\%) = (F_t - F_i) / (F_f - F_i) \times 100$$

[0059] 여기서 F_t 는 광 조사 t시간 경과 후 리포솜 현탁액의 형광성, F_i 는 리포솜 현탁액에 광 조사하기 전 리포솜 현탁액의 형광성, F_f 는 리포솜을 triton X-100으로 용해시킨 후의 용액의 형광성이다. 형광성 세기는 상온에서 측정하였고, 492 nm에서 여기(excitation)시키고 517nm 에서 형광성을 측정하였다.

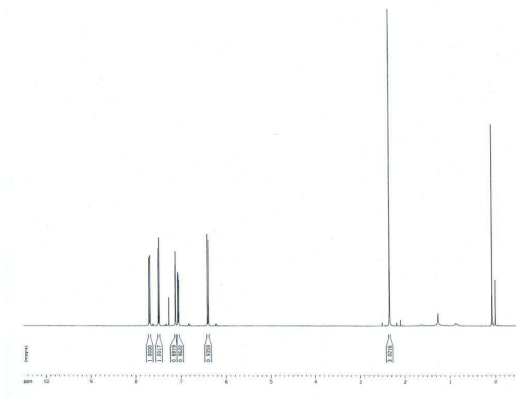
[0060] 도 8은 아세톡시 쿠마린 이량체를 함유한 리포솜 현탁액에 254nm의 빛을 조사하여 방출(%)를 관찰한 결과이다. 광 조사에 의해서 100분 동안 형광물질이 19%까지 증가하였는데, 이는 리포솜에 탑재되어 있는 쿠마린 이량체가 광 분해되어 단량체가 되는 과정에서 리포솜 막이 물리적인 스트레스를 받아서 유동화되어 리포솜 막에 팩킹 결함(packing defect)이 생성되어 형광물질이 방출된 것이라 판단되었다. 이는 상기 도 5에 의하여 확인한 리포솜에 탑재되어 있는 쿠마린 이량체가 254nm의 빛의 조사에 의해서 단량체가 되는 결과와 일치하는 결과이다.

도면

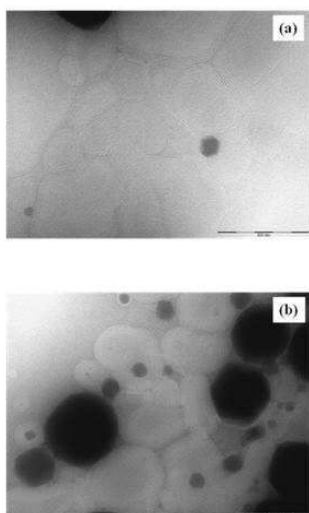
도면1



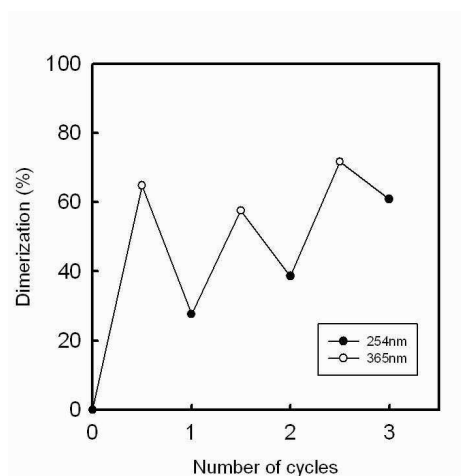
도면2



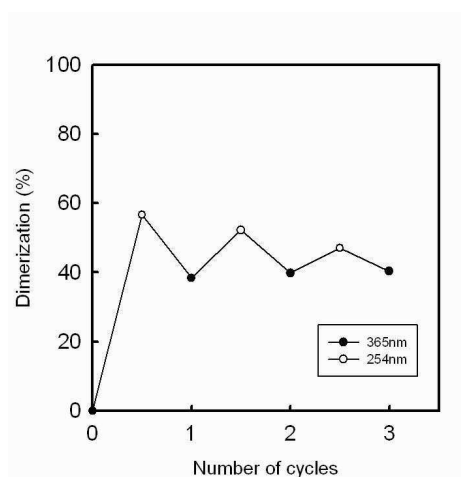
도면3



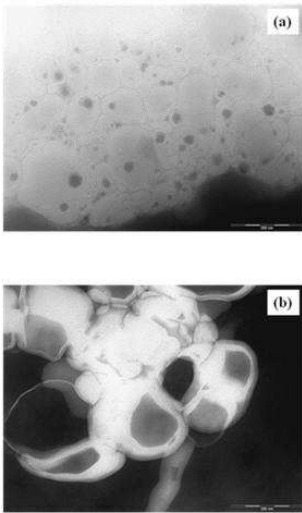
도면4



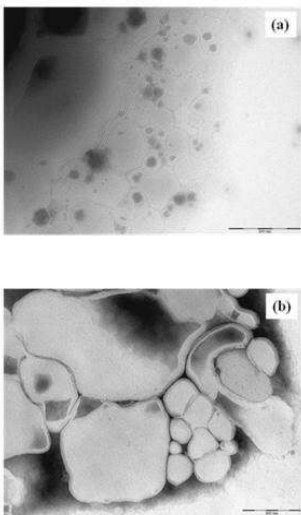
도면5



도면6



도면7



도면8

