



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월01일
(11) 등록번호 10-2789632
(24) 등록일자 2025년03월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/167 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01) A61K 47/28 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 31/155 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0038802
- (22) 출원일자 2022년03월29일
심사청구일자 2022년03월29일
- (65) 공개번호 10-2022-0136909
- (43) 공개일자 2022년10월11일
- (30) 우선권주장
1020210042768 2021년04월01일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020120091258 A*
KR101741977 B1
WO2020252375 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
에스엔제이 파마 인크
미국, 90502 캘리포니아주, 토런스 더블유 카슨스트리트 1124 엠알엘 빌딩 3층
홍성출
전라북도 전주시 완산구 여울로 161, e-편한세상 아파트 108동 206호 (서신동)
- (72) 발명자
김현진
미국, 캘리포니아주, 토런스 더블유 카슨스트리트 1124 엠알엘 빌딩 3층
홍성출
전라북도 전주시 완산구 여울로 161, 108동 206호(서신동, 서신 이편한세상)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인(유한) 해담

전체 청구항 수 : 총 7 항

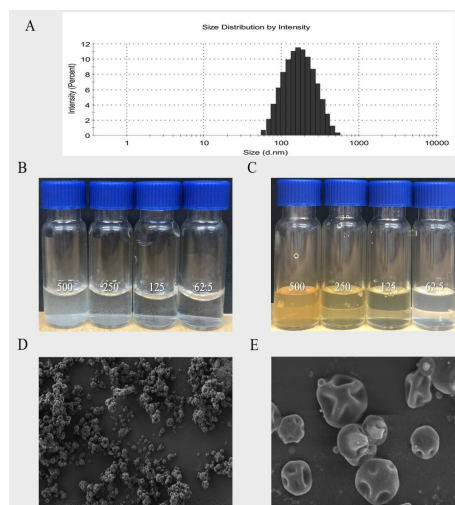
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 생활성물질의 경구용 나노입자 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 용해도, 소화관 내 분해, 장 투과성 문제들로 생체이용률이 낮아서 주로 주사제로 투여되는 생활성물질을 경구투여하기 위한 경구용 나노입자, 제형화 방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 또한 본 발명은, 장 마이크로바이옴에 대한 생활성물질의 노출을 최소화함으로써, 장내 마이크로바이옴 균형을 유지 또는 보호하는 효과를 가지는 경구용 나노입자, 제형화, 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/167 (2013.01)

A61K 31/337 (2013.01)

A61K 31/513 (2013.01)

A61K 47/28 (2013.01)

A61K 9/0053 (2013.01)

(72) 발명자

홍유진

미국, 캘리포니아주, 코로나 릿지라인 디알. 2708
, H207

책승개

전라북도 전주시 덕진구 건지3길 10-6 벤엘주택
403호

왕명달

전라북도 전주시 덕진구 건지3길 10-6 벤엘주택
401호

명세서

청구범위

청구항 1

중심부에 생활성물질이 위치하고, 상기 생활성물질을 둘러싸는 담즙산으로 구성되며, 상기 생활성물질 및 담즙산은 비공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 경구용 나노입자에 있어서,

상기 생활성물질은 니클로사마이드, 5-플로로우라실, 메트포르민, 아지스로마이신, 시프로플록사신, 램테시버 및 글루타치온으로 구성된 군에서 선택되고, 상기 담즙산은 콜산(cholic acid)인 것을 특징으로 하는 경구용 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생활성물질은 10~90 중량부, 상기 담즙산은 10~90 중량부인 것을 특징으로 하는 경구용 나노입자.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

(a) 생활성물질을 용매로 녹이는 단계;

(b) 담즙산을 용매로 녹이는 단계;

(c) 생활성물질 용액 및 담즙산 용액을 혼합하는 단계; 및

(d) 혼합된 생활성물질 및 담즙산 혼합용액을 동결건조시키는 단계를 포함하는 경구용 나노입자의 제조방법에 있어서,

상기 생활성물질은 니클로사마이드, 5-플로로우라실, 메트포르민, 아지스로마이신, 시프로플록사신, 램테시버 및 글루타치온으로 구성된 군에서 선택되고, 상기 담즙산은 콜산(cholic acid)인 것을 특징으로 하는 경구용 나노입자의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 생활성물질 용액 및 담즙산 용액은 10~90 : 10~90 부피%로 혼합되는 것을 특징으로 하는 경구용 나노입자의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 생활성물질 용액 및 담즙산 용액을 혼합한 다음, 생활성물질 및 담즙산 혼합액에 (a) 저온처리 또는 (b) Na^+ , Mg^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} 및 Fe^{2+} 로 구성된 군에서 선택되는 이온과 결합되어 생성된 염을 0.1 ~ 20 M 범위까지 첨가하는 염처리 하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 경구용 나노입자의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 저온처리는 생활성물질 및 담즙산 혼합액을 교반하면서 1 °C/분 이하 속도로 상온에서

-20 ~ +20 ℃ 범위의 온도까지 온도를 낮추면서 수행되는 것을 특징으로 하는 경구용 나노입자의 제조방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항의 경구용 나노입자를 포함하는 향균, 항기생충, 항암, 항바이러스, 항당뇨, 항산화, 항생 또는 신경보호용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 용해도, 소화관 내 분해, 장 투과성 문제들로 생체이용률이 낮은 생활성물질의 생체이용률을 개선한 경구용 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은, 장 마이크로바이옴에 대한 생활성물질의 노출을 최소화함으로써, 장내 마이크로바이옴 균형을 유지 또는 보호하는 효과를 가지는 경구용 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 건강을 위한 생활성물질(bioactive compound)을 포함하는 약물, 영양제, 식이보조제들은 알약 형태의 경구제가 가장 선호된다. 주사제의 생산비용은 통상적으로 알약의 10배 이상이므로, 주사제의 판매가 역시 매우 고가이다. 또한 복용이 간편한 경구제와 달리 주사제는 반드시 병원을 직접 내원해야 하므로, 환자에게 추가적인 시간과 비용을 요구한다. 또한 주사제는 투여 과정에서 통증을 피할 수 없다. 이처럼 경구제는 주사제에 비해 우수한 장점을 가지고 있기 때문에, 체내 흡수가 필요한 생활성물질들은 먼저 알약으로 제형화하는 것이 가장 일반적이다.

[0003] 하지만 의약품, 영양제, 식이보조제들의 생활성물질 상당수는 경구(oral) 생체이용률(bioavailability)이 매우 낮아 경구제로 제형화하는 것이 매우 어려워 주사제만 개발되어 있다. 경구 생체이용률이 낮은 약물들은 약물의 특성상 용해도가 낮거나, 소화효소에 의해 분해되거나, 장에서 혈액으로의 투과도가 낮은 특성을 가지고 있어, 혈액으로 직접 주사하는 것보다 경구투여시 혈액으로의 흡수량이 투여량보다 매우 적어지게 된다. 따라서, 생체이용률이 낮은 약물들은 주사제로만 개발되어 있거나, 생체이용률이 낮은 경구제로 개발되어 있는 상태이다.

[0004] 생체이용률이 낮은 약물들의 또 다른 문제점은 섭취량의 일부만 흡수되고 나머지 대부분은 소화관에 지속적으로 노출됨으로써 소화불량 등 장 건강에 문제를 가져온다는 점이다. 또한 소화관에 상주하고 있는 장내 미생물들이 소화관 내 약물들에 노출되면서 각 종(species)들의 생존율에 큰 영향을 미치게 되므로 장 마이크로바이옴 불균형을 가져와 각종 건강 문제를 유발하게 된다.

[0005] 장 마이크로바이옴은 당뇨, 치매, 암, 고혈압, 고지혈증 등과 같은 각종 질병을 포함하여 소화활동을 포함한 사람의 전반적 건강에 지대한 영향을 미치고 있다. 이러한 장 마이크로바이옴의 특성 때문에 장 마이크로바이옴을 건강한 상태로 유지 관리하는 것이 건강에 매우 중요하다. 사람이 섭취한 화학물들은 사람의 장 내용물과 골고루 섞이는 과정을 거쳐 체내로 흡수되기 때문에, 섭취된 화학물들이 장내미생물의 생존 및 군집 등에 매우 심각한 영향을 주게 되어, 장 마이크로바이옴의 평형을 깨트리게 된다. 특히, 미생물 사멸 효과를 가지는 항생제를 경구용 알약으로 복용시, 장내 미생물 특정 종들의 사멸을 일으키므로, 장 마이크로바이옴 불균형을 가져와, 설사, 복통 등 소화관계 질병 뿐 아니라 장 마이크로바이옴과 관련된 여러 건강 문제를 일으킨다. 따라서 생활성물질이 장 마이크로바이옴에 작용하여 장 마이크로바이옴에 영향을 주지 않도록, 생활성물질의 생체이용률을 높이는 기술을 개발할 필요성이 절실히 요구되어지고 있다.

[0006] 상기 기술한 이유들로 인해, 우수한 생체이용률을 가지는 경구용 체제를 개발하려는 노력들이 있어왔고 다음과 같은 기술들이 개발되었다.

[0007] 미국등록특허 US7060708는 체내흡수시킬 물질에 아미노산을 공유결합(conjugation)시켜, 소화관에서 아미노산이 흡수될 때 결합 물질도 같이 체내로 흡수되도록 하는 발명이다. 이 발명은 공유결합으로 인해 화학적 변화가 일어나면 물질의 고유한 특성이 변하여 활성 감소나 변형 및 부작용 문제가 있다.

- [0008] 미국등록특허 US7144877, US7598235, US7678782 등은 모두 약물-연결체-담즙산 계열 물질이 서로 공유결합을 통해 화학적으로 연결된 신규 화합물 구조를 제시하고 있다. 이 발명은 소화관의 소화효소에 의해 약품이 분해되는 문제가 있으며, 또한 공유결합으로 인해 화학적 변화가 일어나면 물질의 고유한 특성이 변하게 되므로 활성 감소나 변형 및 부작용 문제가 있다.
- [0009] 미국등록특허 US7736679는 커큐민에 강황 기름을 첨가하여 혼합물로 만들면, 커큐민의 흡수율을 증가시켜 생체 이용률을 높인다는 방법을 제시하고 있다. 이 발명은 커큐민과 강황 기름으로 한정되어 있고, 생체이용률 개선 정도가 미미하다.
- [0010] 미국공개특허 US20190247313는 중심부의 약물에 양전하가 띄도록 전기 자극을 가한 후, 담즙산이 공유결합된 음전하의 폴리머 물질을 섞어서 만든 나노입자를 제공한다. 이 발명은 봉입 가능한 약물이 너무 소량이라 인체에 약물을 전달하는데 한계가 있고, 음전하 폴리머-담즙산 공유결합물은 화학적으로 신규한 화합물이므로 예기치 못한 부작용이 일어날 수 있다.
- [0011] 미국공개특허 US20200009067은 지질-계면 활성제-유화용매 3가지로 구성된 혼합용액에 소수성 약물을 녹여 만든 약물 용액을 제공한다. 이 발명의 약물 용액을 경구 섭취시 체내 소화액과 섞이면서 흡수 증가로 생체이용률이 증가할 수 있으나, 소수성 약물에만 한정되고 또한 생체 이용률 향상이 미미하다는 한계가 있다.
- [0012] 상기 기술한 바와 같이, 생체이용률을 개선하기 위한 기술들은 용해도, 장 투과도, 흡수율 등을 개선하기 위한 물질을 공유결합시키는 방법을 사용하고 있다. 하지만 화학적 결합(공유결합)시 신물질(New Chemical Entity)로 바뀌게 되어 원래 물질의 구조와 화학적 특성이 변하므로, 약물의 고유한 특성을 잃거나, 예기치 못한 독성 및 면역 부작용이 발생할 수 있는 문제가 있다. 즉, 기존 기술들로는 경구제의 생체이용률을 개선하지 못하고 있고, 경구 투여로 인한 장 마이크로바이옴 문제도 해결하지 못하고 있다.
- [0013] 주사제 약물들을 경구 알약으로 대체하기 위해서는 기존 경구투여의 문제점을 근본적으로 해결하는 것이 필요하다. 즉, 경구투여한 물질의 변성이 전혀 없이 체내 흡수 후 이용되는 생체이용률을 획기적으로 증가시키는 기술이 절실하다. 또한 경구투여한 물질의 장내 미생물 노출을 최소화하여 장 마이크로바이옴 균형을 유지시키는 기술이 중요하다. 인류의 건강한 삶을 위해서는 이러한 기술의 개발이 절실히 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명자들은 생활성물질의 생체이용률이 낮은 문제와 장 마이크로바이옴 평형을 깨트리는 문제를 해결하기 위해 예의 노력하였다. 따라서 본 발명의 목적은, 생활성물질의 생체이용률을 향상시킨 경구용 나노입자 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다. 본 발명의 또 다른 목적은, 경구투여된 물질의 장내 미생물에 대한 노출을 최소화함으로써, 장 마이크로바이옴 균형을 유지하고 보호하는 효과를 가지는 경구용 나노입자 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생활성물질의 생체이용률을 획기적으로 향상시키고, 장내 마이크로바이옴 균형을 유지하고 보호하는 효과를 가지는, 경구용 나노입자 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 담즙산(bile acid)은 한쪽 부분은 소수성 다른 쪽 부분은 친수성으로 구성되는 특징을 가지는 양친매성(amphiphilic) 이라는 것에 착안하였다. 이에 본 발명자들은, 담즙산의 친수성 부분을 나노입자의 바깥쪽에 두고 안쪽 소수성 부분으로 물질을 둘러싼 구조의 나노입자를 만든다면, 경구투여로 소화기관에 도달하더라도 나노입자 안쪽에 봉입된 물질은 소화기관의 소화액에 의해 분해되지 않고, 장내 미생물에 노출되지 않기 때문에 장 마이크로바이옴의 균형을 유지한다는 가설을 세웠다.
- [0017] 또한, 본 발명자들은 소화기관으로 배출된 담즙산이 장간 순환계(enterohepatic circulation)에서 active uptake/transport 시스템을 통해 혈액으로 90% 이상 재흡수되는 특성이 있다는 것에 착안하였다. 담즙산은 지질 성분의 영양분이 소화효소와 잘 섞이도록 하는 일종의 유화제(emulsifier)이다. 이에 본 발명자들은, 생활성물질에 담즙산만을 이용하여 일체의 변성 없이 나노제형화할 수 있다면, 이는 담즙산과 함께 소화관에서 혈액으로 재흡수된다는 가설을 세웠다.
- [0018] 이에 본 발명자들은 여러 실험 끝에 담즙산으로 봉입된 경구형 나노입자의 제형화에 성공하였고, 제조된 경구용

나노입자의 실험을 통해 담즙산으로 봉입된 물질의 대부분이 체내로 흡수되는 것을 확인하였다.

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 나노입자는 ① 체내 흡수시키고자 하는 생활성물질과 ② 이를 둘러싸서 봉입한 담즙산의 비공유적 결합으로 이루어진다. 본 발명의 나노입자는 1) 봉입된 물질의 생체이용률을 획기적으로 향상시키고; 2) 봉입된 물질의 소화액에 대한 노출을 최소화함으로써, 소화기관에서의 변성 또는 분해를 막고; 3) 봉입된 물질이 담즙산과 함께 혈액으로 재흡수되어 장 투과도를 증가시키고; 4) 봉입된 물질의 생체이용률 증가에 따라 장내 미생물에 대한 노출이 최소화됨으로써, 장내 마이크로바이옴 균형을 유지하고 보호하는 특징을 가진다.

[0020] 특히 기존 기술들과는 달리 본 발명의 나노입자를 구성하는 물질과 담즙산은 일체의 공유결합 없이 비공유결합만으로 결합되어 있기 때문에, 1) 어떠한 화학적 변성이 없이 그 화학물의 효능이 그대로 유지되고; 2) 신물질(New Chemical Entity)의 생성이 없으므로 예측하지 못한 새로운 부작용이 없는 것이 특징이다.

[0021] 따라서 본 발명은 생체이용률을 혁신적으로 개선한 경구용 나노입자 및 이의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 경구용 나노입자는, 1) 봉입된 물질의 생체이용률을 획기적으로 향상시키는 효과; 2) 봉입된 물질의 소화액에 대한 노출을 최소화함으로써, 소화기관에서의 변성 또는 분해를 막는 효과; 3) 봉입된 물질이 담즙산과 함께 혈액으로 재흡수되어 장 투과도를 증가시키는 효과; 4) 봉입된 물질의 장내 미생물에 대한 노출을 최소화함으로써, 장내 마이크로바이옴 균형을 유지하고 보호하는 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 니클로사마이드 나노입자로 수용액(표기 농도 mg/ml)을 만든 후, 나노입자화하지 않은 원래 니클로사마이드 물질과 비교 확인한 결과이다(A: 제조된 니클로사마이드 나노입자 입자 크기 분석, B: 침전물이 확인되는 니클로사마이드 용액, C: 침전물이 없는 니클로사마이드 나노입자 용액, D: 니클로사마이드 나노입자 저배율 전자현미경 이미지, E: 니클로사마이드 나노입자 고배율 전자현미경 이미지).

도 2는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 니클로사마이드 나노입자에 대해 장기간 보관 또는 다양한 pH에서의 구조적 안정성을 확인한 결과이다(A: 장기간 보관된 니클로사마이드 나노입자 용액, B: 장기간 보관된 니클로사마이드 나노입자 용액의 입자크기 분석 결과, C: 다양한 pH에서 니클로사마이드 나노입자 용액, D: 다양한 pH에서 니클로사마이드 나노입자 용액 내 입자크기 분석 결과).

도 3은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 파클리탁셀 나노입자의 전자현미경 이미지와 Particle Size Analyzer 분석 결과이다(A: 파클리탁셀 나노입자 저배율 전자현미경 이미지, B: 파클리탁셀 나노입자 고배율 전자현미경 이미지 C: 평균 189 nm 입자크기로 제조된 파클리탁셀 나노입자 분석결과).

도 4는 본 발명의 실시예 2에 따라 제조된 5-플로로우라실 나노입자와 메트포르민 나노입자의 전자현미경 이미지와 Particle Size Analyzer 분석 결과이다(A: 5-플로로우라실 나노입자 전자현미경 이미지, B: 메트포르민 나노입자 전자현미경 이미지, C: 평균 119 nm 입자크기로 제조된 5-플로로우라실 나노입자 분석결과, D: 평균 108 nm 입자크기로 제조된 메트포르민 나노입자 분석결과).

도 5는 본 발명의 실시예 3에 따라 제조된 아지스로마이신 나노입자와 시프로플록사신 나노입자의 전자현미경 이미지와 Particle Size Analyzer 분석 결과이다(A: 아지스로마이신 나노입자 전자현미경 이미지, B: 시프로플록사신 나노입자 전자현미경 이미지, C: 평균 172 nm 입자크기로 제조된 아지스로마이신 나노입자 나노입자 분석결과, D: 평균 142 nm 입자크기로 제조된 시프로플록사신 나노입자 분석결과).

도 6은 본 발명의 실험예 1에서, 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 램데시버 나노입자와 본 발명의 실시예 2에 따라 제조된 글루타치온 나노입자의 전자현미경 이미지이다(A: 램데시버 나노입자, B: 글루타치온 나노입자).

도 7은 본 발명의 실험예 2에서, 아지스로마이신 나노입자를 경구투여한 마우스의 장 마이크로바이옴을 메타지놈시퀀싱 한 후 Shannon alpha-diversity analysis program으로 장 마이크로바이옴 diversity를 분석한 결과이다(Group 1 : 무항생제 대조군, Group 2: 아지스로마이신 나노입자 투여군, Group 3: 아지스로마이신 투여군).

도 8은 본 발명의 실험예 3에서, 코로나 바이러스를 감염시킨 SH101햄스터 동물모델에서 니클로사마이드 또는 니클로사마이드 나노입자를 경구투여한 후 항바이러스 치료 효능을 확인한 결과이다(A: 항바이러스 효능평가실

험 디자인 및 일정 모식도, B: 체온 측정 결과, C: 체중 측정 결과, D: 생존율 (% survival) 측정 결과).

도 9는 본 발명의 실험예 3에서, 코로나 바이러스를 감염시킨 hACE transgenic mice 동물모델에서 니클로사마이드 또는 니클로사마이드 나노입자를 경구투여한 후 항바이러스 치료 효능을 확인한 결과이다(A: 항바이러스 효능평가실험 디자인 및 일정 모식도, B: 체온 측정 결과, C: 체중 측정 결과, D: 생존율 (% survival) 측정 결과).

도 10은 본 발명의 실험예 3에서, 코로나 바이러스를 감염시킨 SH101 햄스터와 hACE transgenic mice 동물모델에서 니클로사마이드 또는 니클로사마이드 나노입자를 경구투여한 후 얻어진 폐 조직의 관찰(화살표 표시: 감염에 의한 염증 부위) 및 폐 조직의 코로나 바이러스 수치를 정량분석한 결과이다(A: SH101 햄스터의 폐 조직 H&E 염색 이미지, B: hACE transgenic mice의 폐 조직의 H&E 염색 이미지, C: SH101 햄스터의 폐 조직 1 gram당 SARS-CoV-2 바이러스 RNA copies, D: hACE transgenic mice의 폐 조직 1 gram 당 SARS-CoV-2 바이러스 RNA copies).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 각종 질환에 대한 효능을 가지는 의약품에서 경구제는 주사제와 비교할 수 없을 정도로 복용이 간편하고 경제적 이므로, 의약품의 낮은 경구 생체이용률(oral bioavailability)를 개선하기 위한 여러 노력들이 있어왔다. 하지만 현재까지 발명되어진 기술은 생체이용률 향상이 미미하여 주사제를 대체할 경구제로 제형화가 어렵거나, 소화효소에 의해 약물이 분해되는 것을 피할 수 없거나, 약물에 화학적으로 결합시키는 방법을 사용하기 때문에 약물의 구조, 물성, 화학적 특성이 모두 변하게 되는 심각한 문제가 있다. 그러다보니 이러한 기술들이 성공하여 보편적으로 활용되는 경우가 없고, 많은 약물들이 여러 단점에도 불구하고 주사제로 사용되거나, 생체이용률이 매우 낮은 경구제로 이용되고 있다. 따라서 주사제를 경구제로 대체하기 위해서는 혁신적 개념의 발명이 필요하다. 본 발명은 경구제의 상기 문제점을 모두 해결할 수 있어, 모든 주사제를 먹는 알약으로 대체하는 것이 가능하므로, 이 발명이 보편화되면 인류에게 의료혁명을 가져다 줄 것으로 기대된다.
- [0025] 본 발명자들은, 생리활성을 가지는 화합물질을 공유결합과 같은 화학적 결합으로 담즙산에 연결시킨 기존 발명들과는 달리, 담즙산으로 원하는 물질을 둘러싸서 안정된 나노입자를 만드는 과정을 일체 공유결합을 사용하지 않고 비공유적으로 수행할 수만 있다면, 이 나노입자의 표면에 위치한 담즙산과 중심부에 위치한 화합물의 구조 변화가 전혀 없게 되므로 그 화학적 특성이 그대로 유지된 채로, 담즙산 흡수경로인 장간 순환계(enterohepatic circulation)을 통해 혈액으로 초고효율로 흡수될 수 있을 것이라는 점에 착안하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0026] 기존에 개발된 경구용 나노입자의 제조에는 반응물질들의 화학적 변화를 일으키는 공유결합(conjugation) 과정이 모두 필수적으로 필요하였다. 이로 인해 나노입자 제조 과정이 매우 복잡할 뿐 아니라, 공유결합으로 인한 화학적 결합물에서는 반응 물질이 구조적으로 변형되어 물질 고유의 특성을 잃게 되므로, 약물의 원래 기능이 유지되기 힘들고 동시에 신물질로 인한 예기치 못하는 부작용이 발생할 수 있다. 또한 나노제형과 약물간의 화학반응이 가능해야만 하므로, 나노입자에 봉입할 수 있는 약물의 종류가 제한적이다.
- [0027] 본 발명의 경구용 나노입자는 정확하게 두 성분, ① 체내 흡수시키고자 하는 물질과 ② 이를 둘러싸는 약물 전달체 역할을 하는 담즙산 사이의 비공유결합만으로 연결되어, 1) 봉입된 물질의 생체이용률을 획기적으로 향상시키는 효과; 2) 봉입된 물질의 소화액에 대한 노출을 최소화함으로써, 소화기관에서의 변성 또는 분해를 막는 효과; 3) 봉입된 물질이 담즙산과 함께 혈액으로 재흡수되어 장 투과도를 증가시키는 효과; 4) 봉입된 물질의 장내 미생물에 대한 노출을 최소화함으로써, 장내 마이크로바이옴 균형을 유지하고 보호하는 효과를 가진다. 이러한 탁월한 장점 때문에, 본 발명의 나노입자는 현재 주사제로 쓰고 있는 모든 약물을 경구용 제제로 바꿀 수 있는 혁신적인 발명이다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에서는, 생체이용률이 낮은 물질의 경구용 나노입자, 제형화 및 이의 이용법을 제공한다.
- [0029] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 중심부에 생활성물질이 위치하고, 상기 생활성물질을 둘러싸는 담즙산으로 구성되며, 상기 생활성물질 및 담즙산은 비공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 경구용 나노입자에 관한 것이다.
- [0030] 상기 생활성물질은 의약품, 영양제, 식이보조제의 약물, 영양성분, 기능성 용도를 가지며 체내 흡수를 목적으로 하는 모든 물질을 포함하며, 구체적인 예로는 5-플로로우라실(5-fluorouracil), 렘데시비어(remdesivir), 아지스로마이신(azithromycin), 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 페닐레프린염산염(Phenylephrine Hydrochloride), 글루타치온(glutathione), 아세트아미노이드(acetazolamide),

암포테리신(amphotericin), 아프레피탄트(aprepitant), 아자티오프린(azathioprine), 클로로티아지드(chlorothiazide), 클로르탈리돈(chlorthalidone), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 콜리스틴(colistin), 사이클로스포린 A(cyclosporin A), 디곡신(digoxin), 도세탁셀(docetaxel), 푸로세미드(furosemide), 에트라비린(etravirine), 파모티딘(famotidine), 그리세오폴빈(griseofulvin), 히드로클로로치아지드(hydrochlorothiazide), 메벤다졸(mebendazole), 메토티렉세이트(methotrexate), 네오마이신(neomycin), 니클로사마이드(niclosamide), 니스타틴(nystatin), 리토나비르(ritonavir), 알벤다졸(albendazole), 아르템테르(artemether), 클로르프로마진(chlorpromazine), 에파비렌즈(efavirenz), 글리벤클라미드(glibenclamide), 이버멕틴(ivermectin), 로피나비르(lopinavir), 메플로퀸(mefloquine), 레티놀(retinol), 스피로노락톤(spiroinolactone), 설파다이아진(sulfadiazine), 설파살라진(sulfasalazine), 트리칼벤다졸(tricalbendazole), 아사이클로비르(acyclovir), 아목시실린(amoxicillin), 비디소마이드(bidisomide), 바이페리딘(biperiden), 캡토프릴(captopril), 세파졸린(cefazolin), 클로로퀸(chloroquine), 시메티딘(cimetidine), 클록사실린(cloxacillin), 디다노신(didanosine), 에페드린(ephedrine), 에리트로마이신(erythromycin), 파모티딘(famotidine), 플루코나졸(flucanazole), 폴리난산(folinic acid), 푸로세미드(furosemide), 간시클로버(ganciclovir), 리시노프릴(lisinopril), 메토티렉세이트(methotrexate), 메트포르민(metformin), 니푸티모스(nifurtimox), 나돌롤(nadolol), 니스타틴(nystatin), 프라바스타틴(pravastatin), 페니실린(penicillin), 라니티딘(ranitidine), 레세르핀(reserpine), 테트라사이클린(tetracycline), 발사르탄(valsartan), 반코마이신(vancomycin), 독시사이클린(doxycycline), 클로르페니라민(chlorpheniramine), 클로미펜(clomiphene), 클로미프라민(clomipramine), 덱사메타손(dexamethasone), 에치닐에스트라디올(ethinylestradiol), 메토클로프라미드(metoclopramide), 모르핀(morphine), 퀴닌(quinine) 등을 예시할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0031] 상기 담즙산은 양친매성을 가지면서 장내 능동흡수가 일어나는 특징을 가지며, 바람직하게는 담즙산 또는 그 유도 성분들을 포함하며, 구체적으로 상기 담즙산은 콜산(cholic acid); 체노데옥시콜산(chenodeoxy cholic acid); 데옥시콜산(deoxycholic acid); 리소콜산(lithocholic acid); 우르소데옥시콜산(ursodesoxycholic acid); 타우로우르소데옥시콜산(tauroursodeoxycholic acid); 하이오디옥시콜산(hyodeoxycholic acid); 7-옥소 리소콜산(7-oxo lithocholic acid); 아이오도 데옥시콜산(iodo deoxycholic acid); 아이오딘 콜산(iodine cholic acid); 타우로리소콜산(tauroolithocholic acid); 글리코우르소데옥시콜산(glycoursodeoxycholic acid); 타우로콜산(taurocholic acid), 글리코콜산(glycocholic acid) 등을 예시할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0032] 또한, 본 발명의 '생활성물질의 경구용 나노입자'는 생활성물질과 담즙산이 일체의 공유결합 없이 서로 비공유 결합만으로 결합되어 있어, 어떠한 화학적 변성도 전혀 없이 그 화학물의 특성이 그대로 유지되는 것이 특징이다.

[0033] 본 발명은 다른 관점에서 상기 경구용 나노입자를 포함하는 경구용 나노입자 조성물에 관한 것이다.

[0034] 본 발명의 경구용 나노입자 조성물은 제제시 통상적으로 이용되는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 예시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 경구용 나노입자 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0036] 본 발명의 경구용 나노입자 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 경구용 나노입자 조성물의 바람직한 투여량은 1일 당 0.0001-1000 μg 이다.

[0037] 본 발명의 경구용 나노입자 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 경구용 나노입자 조성물은 나노입자에 봉입된 물질의 소화효소 노출을 최소화함으로써, 소화기관에서

흡수되기 이전에 변성 또는 분해되는 것을 막는 효과가 있다.

- [0039] 또한, 본 발명의 경구용 나노입자 조성물은 나노입자에 봉입된 물질의 장내 미생물 노출을 최소화함으로써, 장내 마이크로바이옴 균형을 유지하고 보호하는 효과가 있다.
- [0040] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 생활성물질을 용매로 녹이는 단계; (b) 담즙산을 용매로 녹이는 단계; (c) 생활성물질 용액 및 담즙산 용액을 혼합하는 단계; 및 (d) 혼합된 생활성물질 및 담즙산 혼합용액을 동결건조시키는 단계를 포함하는 경구용 나노입자의 제조방법에 관한 것이다.
- [0041] 상기 생활성물질을 녹이는 용매는 물, DMSO, 에탄올, 메탄올, 아세톤 등을 예시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 담즙산을 녹이는 용매는 에탄올, 물, 메탄올 등을 예시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 중심부에 생활성물질이 위치하고, 상기 생활성물질을 둘러싸는 담즙산으로 구성되며, 상기 생활성물질 및 담즙산은 비공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 경구용 나노입자를 제조하기 위해서는 생활성물질 용액 및 담즙산 용액을 혼합시켜야 하는데, 상기 혼합은 생활성물질 용액 및 담즙산 용액을 한곳에 섞고, 교반하거나 초음파 처리함으로써 혼합시킬 수 있다.
- [0044] 본 발명의 경구용 나노입자의 제조방법은 경구용 나노입자의 형성을 더욱 촉진시키기 위하여, 생활성물질 용액 및 담즙산 용액을 혼합한 다음, 생활성물질 및 담즙산 혼합액에 저온처리 또는 염처리하거나 염처리 후 저온처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 저온처리는 생활성물질 및 담즙산 혼합액을 교반하면서 1 °C/분 이하 속도로 상온에서 -20 ~ +20 °C 범위의 온도까지 온도를 낮추면서 수행될 수 있으며, 상기 염처리는 생활성물질 및 담즙산 혼합액을 교반하면서 Na^+ , Mg^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} 등으로 구성된 군에서 선택되는 염을 0.1 ~ 20 M 범위까지 첨가시킬 수 있다.
- [0046] 상기 저온처리시 속도 또는 온도가 상기 범위를 벗어날 경우에는 경구용 나노입자의 형성 촉진 효과가 미미할 수 있다.
- [0047] 또한, 상기 염처리시 처리되는 염의 농도가 상기 범위를 벗어날 경우에는 경구용 나노입자의 형성 촉진 효과가 미미할 수 있다.
- [0048] [실시예]
- [0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0050] **실시예 1. 혼합반응을 이용한 경구용 나노입자의 제조**
- [0051] 니클로사마이드(niclosamide)는 항균, 항기생충, 항암, 항바이러스, 신경보호 등 다양한 약리적 효과가 매우 우수한 것으로 알려져 있지만, 흡수 문제와 불수용성 문제로 인해, 체내흡수가 필요없는 장내 기생충 알약으로만 FDA에 승인되어 있다. 니클로사마이드가 우수한 항균 및 항바이러스 효과에도 불구하고 코로나(COVID-19) 치료제, 결핵 치료제, 항바이러스제 또는 항암제로 개발되지 못한 이유는 소수성 화합물인 니클로사마이드(niclosamide)는 제한적인 소수성 유기용매에만 녹아서 주사제로 개발하기 힘들고, 경구로 투여시 체내흡수가 되지 않아 알약의 생체이용률이 10% 미만이기 때문이다. 또한, 대표적인 세포독성 항암제인 파클리탁셀(paclitaxel) 역시 생체이용률이 10% 정도로 인해 주사제로만 처방되고 있다. 파클리탁셀을 경구용 나노입자로 제작하면 주사제 대신 복용약으로 처방할 수 있어 약물 부작용 감소 및 이용의 편의성을 기대할 수 있다.
- [0052] 이에, 본 발명자들은, 생체이용률을 개선한 경구용 제제로 개발시 용량 증가 효과, 부작용 감소 및 이용의 편의성이 기대되는 니클로사마이드(niclosamide)와 파클리탁셀(paclitaxel)에 대해, 아래와 같은 방법으로 나노입자화 하였다.
- [0053] 니클로사마이드(niclosamide) 분말은 DMSO 용매에 6 mg/mL 농도로 녹이고, 콜산(cholic acid) 분말은 물에 6 mg/mL 농도로 녹였다. 니클로사마이드 용액 1 mL과 콜산 용액 3 mL을 서로 섞은 후, 물이 담긴 초음파발생기에 5분간 두 용액을 철저히 혼합한 다음, 이 용액을 동결건조하여 분말화하였다. 제조된 니클로사마이드 나노입자는 완전한 수용성 나노입자로, 순수한 니클로사마이드(pure niclosamide)와는 달리, 침전물 없이 물에 잘 녹

았으며, 평균 입자 크기는 120 ~ 150 nm 이었고, 전자현미경으로 확인되었다(도 1).

[0054] 또한 제조된 니클로사마이드 나노입자를 6주 이상 장기간 보관하거나, pH 6.8과 pH 7.4에서 12시간 이상 방치하여도 입자 크기가 안정적으로 유지됨을 확인하였다(도 2)

[0055] 파클리탁셀 분말은 DMSO 용매에 10 mg/mL 농도로 녹이고, 콜산(cholic acid) 분말은 에탄올에 6 mg/mL 농도로 녹였다. 이 paclitaxel 용액 1 mL과 콜산 용액 3 mL을 서로 섞은 후, 이 파클리탁셀 및 콜산 혼합액을 넣은 물이 담긴 초음파발생기에 이 혼합액이 담긴 용기를 넣어 5분간 초음파로 철저히 혼합하였다. 혼합과정이 끝난 이 용액은 동결건조하여 분말화하였다.

[0056] 제조된 파클리탁셀 나노입자는 완전한 수용성 나노입자로, 순수한 파클리탁셀(pure paclitaxel)과는 달리, 물에 잘 녹았으며, 평균 입자 크기는 150 ~ 250 nm 이었고, 전자현미경과 Particle Size Analyzer로 확인되었다(도 3).

[0057] 제조된 나노입자 각각을 랫드에 20 mg/Kg(시험물질 기준) 용량으로 경구투여 한 후, 시간 별로 랫드에서 혈액을 채취하였다. 이 때 대조군으로는 나노입자 제조시 사용된 순수한 생활성물질을 랫드에 동량 경구투여하여 같은 실험을 하였다. 랫드에서 시간별로 채취한 혈액 0.1 mL에 아세톤(acetone) 0.9 mL을 넣은 후, 이 혼합용액을 vortex를 이용하여 철저히 섞었다. 혼합된 용액은 15,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 제거하고 얻어진 용액만을 LC-MS/MS로 분석한 결과, 생체이용률은 표 1과 같았다.

표 1

생활성물질종류	나노입자화하지 않은 화학물의 생체이용률	나노입자화한 화학물의 생체이용률 (콜산으로 봉입한 나노입자)
niclosamide	9.5 %	75.3 %
paclitaxel	10.4 %	89.7 %

[0059] 이 실험은 나이클로사마이드의 나노입자 제조과정을 나타내고 있지만, BCS 분류 class IV group의 체내흡수율이 낮은 소수성 물질들(아세트아미노이드(acetazolamide), 암포테리신(amphotericin), 아프레피탄트(aprepitant), 아자티오프린(azathioprine), 클로로티아지드(chlorothiazide), 클로르탈리돈(chlorthalidone), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 콜리스틴(colistin), 사이클로스포린 A(cyclosporin A), 디곡신(digoxin), 도세탁셀(docetaxel), 푸로세미드(furosemide), 에트라비린(etravirine), 파모티딘(famotidine), 푸로세미드(furosemide), 그리세오폴빈(griseofulvin), 히드로클로로치아짓(hydrochlorothiazide), 메벤다졸(mebendazole), 메토틱세이트(methotrexate), 네오마이신(neomycin), 니스타틴(nystatin), 파클리탁셀(paclitaxel), 리토나비르(ritonavir) 등) 또는 class IV group 이외의 체내 흡수율을 개선할 필요가 있는 소수성 물질들(알벤다졸(albendazole), 아르템더(artemether), 클로르프로마진(chlorpromazine), 에파비렌즈(efavirenz), 글리베클라미드(glibenclamide), 이버멕틴(ivermectin), 로피나비르(lopinavir), 메플로퀸(mefloquine), 레티놀(retinol), 스피로노락톤(spironolactone), 설파디아진(sulfadiazine), 설파살라진(sulfasalazine), 트리칼벤다졸(tricalbendazole) 등)도 거의 유사한 방법으로 본 발명의 나노입자로 제조될 수 있다. 이들의 경우 용매를 DMSO 대신 에탄올, 메탄올, 아세톤 등을 사용하거나, 콜산 대신 담즙산을 구성하는 다른 담즙산을 사용하여도 경구용 나노입자가 제조됨을 확인하였다.

[0060] 실시예 2. 염처리를 이용한 경구용 나노입자의 제조

[0061] 5-플로로우라실(5-fluorouracil)은 대표적인 세포독성 항암제로 암치료에 가장 많이 사용하고 있는 항암제 중 하나이지만 경구 생체이용률(oral bioavailability)이 낮아 현재 주사제로만 사용되고 있다. 메트포르민(metformin)은 대표적인 제2형 당뇨병치료제로써 복용의 편의성으로 인해 주로 알약으로 처방되고 있으나 bioavailability는 30% 수준이다.

[0062] 이에, 본 발명자들은, 생체이용률을 개선한 경구용 제제로 개발시 용량 증가 효과, 부작용 감소 및 이용의 편의성이 기대되는 5-플로로우라실과 메트포르민에 대해, 본 발명의 기술을 이용하여 여러 조건으로 실험한 결과 아래와 같은 방법으로 나노입자화 하였다.

[0063] 5-플로로우라실 분말을 물에 6 mg/mL 농도로 녹이고, 콜산 분말은 에탄올에 6 mg/mL 농도로 녹였다. 이 5-플로로우라실 용액 1 mL과 콜산 용액 3 mL을 서로 섞은 후, 이 용액에 NaCl 10 mg을 섞은 후 에탄올이 담긴 초음파 발생기에서 5분간 두 용액을 철저히 섞었다. 다음, 초음파 발생을 유지하면서 초음파발생기에 드라이아이스를

첨가하여 5-플로로우라실 용액을 냉동시킨 후 동결건조하여 분말화하였다. 제조된 5-플로로우라실 나노입자는 90 ~ 120 nm 크기임을 확인하였다(도 4).

[0064] 메트포르민 분말을 물에 5 mg/mL 농도로 녹이고, 콜산 분말은 에탄올에 5 mg/mL 농도로 녹였다. 이 메트포르민 용액 1 mL과 콜산 용액 3 mL을 서로 섞은 후, 이 용액에 NaCl을 60 mg을 추가한 한 후 에탄올이 담긴 초음파발생기에서 5분간 두 용액을 철저히 섞었다. 다음, 초음파 발생을 유지하면서 초음파발생기에 드라이아이스를 첨가하여 메트포르민 용액을 냉동시킨 후 동결건조하여 분말화하였다. 제조된 메트포르민 나노입자는 90 ~ 120 nm 크기임을 확인하였다(도 4).

[0065] 제조된 나노입자 각각을 랫드에 20 mg/Kg(생활성물질기준) 용량으로 경구투여 한 후, 시간 별로 랫드에서 혈액을 채취하였다. 대조군으로는 나노입자 제조시 사용된 순수한 생활성물질을 랫드에 동량 경구투여하여 같은 실험을 하였다. 랫드에서 시간별로 채취한 혈액 0.1 mL에 아세톤 0.9 mL을 넣은 후, 이 혼합용액을 vortex를 이용하여 철저히 섞었다. 혼합된 용액은 15,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 제거하고 얻어진 용액만을 LC-MS/MS로 분석한 결과, 생체이용률은 표 2와 같았다.

표 2

생활성물질종류	나노입자화하지 않은 화학물의 생체이용률	나노입자화한 화학물의 생체이용률 (콜산으로 봉입한 나노입자)
5-fluorouracil	57.8 %	95.3 %
metformin	38.3 %	81.7 %

[0067] 이 실험은 5-fluorouracil과 metformin의 나노입자 제조과정을 나타내고 있지만, BCS 분류 class III group의 low permeability를 가지는 친수성물질(아사이클로비르(acyclovir), 아목시실린(amoxicillin), 비디소마이드(bidisomide), 바이페리딘(biperiden), 캅토프릴(captopril), 세파졸린(cefazolin), 클로로퀸(chloroquine), 시메티딘(cimetidine), 클록사실린(cloxacillin), 디다노신(didanosine), 에페드린(ephedrine), 에리트로마이신(erythromycin), 파모티딘(famotidine), 플루코나졸(fluconazole), 폴리닌산(folinic acid), 푸로세미드(furosemide), 간시클로버(ganciclovir), 리시노프릴(lisinopril), 메토크세이트(methotrexate), 메트포르민(metformin), 니폴티모스(nifurtimox), 나돌롤(nadolol), 니스타틴(nystatin), 프라바스타틴(pravastatin), 페니실린(penicillin), 라니티딘(ranitidine), 레세르핀(reserpine), 테트라사이클린(tetracycline), 발사르탄(valsartan), 반코마이신(vancomycin) 등) 또는 class III 이외의 체내 흡수율을 개선할 필요가 있는 친수성 물질들(클로르페니라민(chlorpheniramine), 클로미펜(clomiphene), 클로미프라민(clomipramine), 덱사메타손(dexamethasone), 에치닐에스트라디올(ethinylestradiol), 메토클로프라미드(metoclopramide), 모르핀(morphine), 퀴닌(quinine) 등)도 거의 유사한 방법으로 본 발명의 경구용 나노입자로 제조된다. 이들의 경우 용매를 물 대신 필요에 따라 용매를 에탄올, 메탄올, 아세톤 등을 사용하거나, 콜산 대신 담즙산을 구성하는 다른 담즙산을 사용하여도 경구용 나노입자가 제조됨을 확인하였다.

[0068] 실시예 3. 저온처리를 이용한 경구용 나노입자의 제조

[0069] 아지스로마이신(azithromycin)은 대표적인 broad-spectrum 항생제로 세균 감염 치료를 위해 가장 많이 사용하고 있는 항생제 중 하나이나 경구 생체이용률이 낮아, 인체로 흡수되지 않고 장내에 다량으로 잔류하고 있다. 장내에 잔류한 아지스로마이신은 장내미생물들을 죽여, 장내 세균총을 파괴함으로써 사람들에게 여러 가지 심각한 부작용을 야기하고 있다.

[0070] 시프로플록사신(ciprofloxacin) 또한 대표적인 broad-spectrum 항생제이지만 생체이용률이 높지 않아 아지스로마이신과 동일한 문제를 야기한다. 따라서 생체이용률을 개선하여 장내 잔류량을 감소시킴으로써 약물 부작용을 감소시킬 필요가 있다.

[0071] 이에, 본 발명자들은, 생체이용률을 개선한 경구용 제제로 개발시 용량 증가 효과, 부작용 감소 및 이용의 편의성이 기대되는 아지스로마이신과 시프로플록사신에 대해, 본 발명의 기술을 이용하여 여러 조건으로 실험한 결과 아래와 같은 방법으로 나노입자화 하였다.

[0072] 아지스로마이신 분말을 에탄올에 6 mg/mL 농도로 녹이고, 콜산 분말은 에탄올에 6 mg/mL 농도로 녹였다. 다음, 아지스로마이신 용액 1 mL과 콜산 용액 3 mL을 서로 섞은 후, 이 용액에 NaCl 1 mg을 섞은 후 에탄올이 담긴 초음파발생기에서 5분간 두 용액을 철저히 섞었다. 다음, 온도조절장치를 이용하여 아지스로마이신 및 콜산 혼합액을 교반하면서 0.001 °C/분 속도로 상온에서 -4 °C까지 온도를 낮추었다. 마지막으로 이 혼합 용액을 동결

시킨 후 동결건조하여 분말화하였다. 제조된 아지스로마이신 나노입자는 130 ~ 220 nm 크기임을 확인하였다(도 5).

[0073] 시프로플록사신 분말을 물에 5 mg/mL 농도로 녹이고, 콜산 분말은 에탄올에 5 mg/mL 농도로 녹였다. 이 시프로플록사신 용액 1 mL과 콜산 용액 3 mL을 서로 섞은 후, 이 용액에 FeCl₂ 1 mg을 넣은 후 에탄올이 담긴 초음파 발생기에서 5분간 두 용액을 철저히 섞었다. 다음, 온도조절장치를 이용하여 시프로플록사신 및 콜산 혼합액을 교반하면서 0.001 °C/분 속도로 상온에서 -2 °C까지 온도를 낮추었다. 마지막으로 이 혼합 용액을 동결시킨 후 동결건조하여 분말화하였다. 제조된 시프로플록사신 나노입자는 100 ~ 200 nm 크기임을 확인하였다(도 5).

[0074] 제조된 나노입자 각각을 랫드에 20 mg/Kg(생활성물질기준) 용량으로 경구투여 한 후, 시간 별로 랫드에서 혈액을 채취하였다. 대조군으로는 나노입자 제조시 사용된 순수한 생활성물질을 랫드에 동량 경구투여하여 같은 실험을 하였다. 랫드에서 시간별로 채취한 혈액 0.1 mL에 아세톤 0.9 mL을 넣은 후, 이 혼합용액을 vortex를 이용하여 철저히 섞었다. 혼합된 용액은 15,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 제거하고 얻어진 용액만을 LC-MS/MS로 분석한 결과, 생체이용률은 표 3과 같았다.

표 3

생활성물질종류	나노입자화하지 않은 화학물의 생체이용률	나노입자화한 화학물의 생체이용률 (콜산으로 봉입한 나노입자)
azithromycin	32.1 %	83.2 %
ciprofloxacin	19.3 %	89.5 %

[0076] 이 실험은 azithromycin과 ciprofloxacin의 나노입자 제조과정을 나타내고 있지만, BCS 분류 class III group의 low permeability를 가지는 물질(클로로퀸(chloroquine), 시메티딘(cimetidine), 클록사실린(cloxacillin), 디다노신(didanosine), 에페드린(ephedrine), 에리트로마이신(erythromycin), 파모티딘(famotidine), 플루코나졸(fluconazole), 폴리닌산(folinic acid), 푸로세미드(furosemide), 간시클로버(ganciclovir), 리시노프릴(lisinopril), 메토티렉세이트(methotrexate), 메트포르민(metformin), 니폴티목스(nifurtimox), 나돌롤(nadolol), 니스타틴(nystatin), 프라바스타틴(pravastatin), 페니실린(penicillin), 라니티딘(ranitidine), 레세르핀(reserpine), 테트라사이클린(tetracycline), 발사르탄(valsartan), 반코마이신(vancomycin), 독시사이클린(doxycycline) 등) 또는 class III 이외의 체내 흡수율을 개선할 필요가 있는 친수성 물질들(클로르페니라민(chlorpheniramine), 클로미펜(clomiphene), 클로미프라민(clomipramine), 텍사메타손(dexamethasone), 에치닐에스트라디올(ethinylestradiol), 메토클로프라미드(metoclopramide), 모르핀(morphine), 퀴닌(quinine) 등)도 거의 유사한 방법으로 본 발명의 경구용 나노입자로 제조된다. 이들의 경우 용매를 물 대신 필요에 따라 용매를 에탄올, 메탄올, 아세톤 등을 사용하거나, 콜산 대신 담즙산을 구성하는 다른 담즙산을 사용하여도 경구용 나노입자가 제조됨을 확인하였다.

[0077] 실험예 1. 본 발명의 나노입자화가 봉입된 물질의 분해에 미치는 영향 평가

[0078] 렘데시버(remdesivir)는 일종의 nucleoside analog로 뛰어난 항바이러스 효과로 인해 최초로 승인된 코로나 치료제이다. 렘데시버는 covid-19 치료에 가장 효과적인 치료제이지만 주사제로만 개발된 상태인데, 이는 렘데시버 섭취시 소화액의 핵산분해효소에 의해 대부분 바로 분해되므로 혈액으로 흡수되는 주사제에 비해 경구제의 생체이용률이 너무 낮기 때문이다.

[0080] 3개의 아미노산이 펩티드 결합에 의해 형성된 펩티드로부터 유도된 글루타치온(glutathione)은 강력한 항산화효능과 더불어 미백 효과가 있다. 글루타치온을 먹게 되면 소화액 속의 단백질분해효소에 의해 바로 분해되고 극소량만이 흡수되므로, 글루타치온의 생체이용률은 매우 낮다. 따라서 글루타치온을 경구로 복용하면 실질적으로 원하는 피부 미백효과를 기대하기 힘들어 경구용보다는 주사제로 더 많이 사용되고 있다. 주사제의 여러 단점들로 인해 글루타치온의 생체이용률을 개선시키려는 연구가 활발하게 진행되어 왔으나 아직까지 소화효소에 의한 분해 문제를 해결하지 못했고 이에 경구용 글루타치온 제제 개발의 성공 사례가 없다.

[0081] 이에, 본 발명자들은, 생체이용률을 개선한 경구용 제제로 개발하기 위해, 본 발명의 기술을 이용하여 여러 조건으로 실험한 결과 상기 실시예 1의 기술을 이용하여 경구투여용 렘데시버 나노입자를 제조하였고(도 6), 상기 실시예 2의 기술을 이용하여 경구투여용 글루타치온 나노입자를 제조하였다(도 6).

[0082] 제조된 램데시버 나노입자와 글루타치온 나노입자를 각각 랫드에 20 mg/Kg (약물 기준) 용량으로 경구투여한 후, 시간 별로 랫드에서 혈액을 채취하였다. 대조군으로는 나노입자 제조시 사용된 순수한 생활성물질(램데시버 또는 글루타치온)을 랫드에 동량 경구투여하여 같은 실험을 하였다. 랫드에서 시간별로 채취한 혈액 0.1 mL에 아세톤 0.9 mL을 넣은 후, 이 혼합용액을 vortex를 이용하여 철저히 섞었다. 혼합된 용액은 15,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 제거하고 얻어진 용액만을 LC-MS/MS로 분석한 결과, 생체이용률은 표 4와 같았다.

표 4

생활성물질종류	나노입자화하지 않은 화학물의 생체이용률	나노입자화한 화학물의 생체이용률 (콜산으로 봉입한 나노입자)
remdesivir	1.5 %	89.1%
glutathione	9.1 %	83.3 %

[0084] 표 4에서 알 수 있듯이 본 발명은, 경구투여시 소화되는 문제로 인해 주사제로만 사용가능했던 생리활성물질들을 경구용 약물로 제형화할 수 있는 혁신적 기술로, 생리활성물질을 체내 소화효소로부터 보호하여 생체이용률을 크게 개선시켰다.

[0085] 이 실험은 remdesivir와 glutathione의 나노입자 제조과정을 예시로 나타내고 있지만, 이외에도 경구투여시 소화기관의 소화효소들에 의해 분해되는 특성을 가지는 다른 생화학물질 역시 거의 유사한 방법으로 본 발명의 경구용 나노입자로 제조된다. 필요에 따라 용매를 DMSO 대신 에탄올, 메탄올, 아세톤 등을 사용하거나, 콜산 대신 담즙산을 구성하는 다른 담즙산을 사용하여도 경구용 나노입자가 제조됨을 확인하였다.

[0086] **실험예 2. 본 발명의 나노입자화가 장 마이크로바이옴 평형에 미치는 영향 평가**

[0087] 아목시실린(amoxicillin), 아지스로마이신(azithromycin), 클린다마이신(clindamycin), 세프트리악손(ceftriaxone), 에리트로마이신(erythromycin), 플루코나졸(fluconazole), 페니실린(penicillin), 테트라사이클린(tetracycline) 등은 병원에서 흔히 사용되는 항생제들이다. 이들은 대부분 우수한 용해성(solubility)과 투과성(permeability)으로 생체이용률도 우수하여, 주사제 대신 경구제로 사용하는 것이 일반적이다. 그러나 경구 섭취된 이후 장에 머무르면서 혈액으로 흡수되기 이전까지 장 내강에 잔류하는 항생제는 주변의 장내 미생물들을 죽이게 되므로 장 마이크로바이옴 평형을 깨트려 설사, 복통, 등과 같은 다양한 소화계 질병을 유발시킨다.

[0088] 이에, 본 발명자들은, 항생제의 나노입자화시 장 마이크로바이옴 평형에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 상기 실시예 3의 기술을 이용하여 경구용 아지스로마이신(azithromycin) 나노입자를 제조하였다. 제조된 나노입자를 랫드에 20 mg/Kg 용량으로 경구투여한 후, 시간 별로 랫드에서 혈액을 채취하였다. 이 때 동일한 양의 아지스로마이신을 대조군 랫드에 경구투여하여 비교 실험을 하였다. 랫드에서 시간별로 채취한 혈액 0.1 mL에 아세톤 0.9 mL을 넣은 후, 이 혼합용액을 vortex를 이용하여 철저히 섞었다. 혼합된 용액은 15,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 제거하고 얻어진 용액만을 LC-MS/MS로 분석한 결과, 생체이용률은 표 5와 같았다.

표 5

생활성물질종류	나노입자화하지 않은 화학물의 생체이용률	나노입자화한 화학물의 생체이용률 (콜산으로 봉입한 나노입자)
azithromycin	39.8 %	92.6.%

[0090] 상기 실시예 3의 방법에 의해 제조된 아지스로마이신 나노입자를 각 랫드에 5 mg/Kg (약물 기준) 용량으로 5일간 매일 경구투여 한 후, 메타지놈시퀀싱 방법으로 장 마이크로바이옴을 분석하였다. 이 때 대조군으로, 나노입자와 동량의 원래 생활성물질(아지스로마이신)을 동물에 경구투여하여 동일한 실험을 같이 수행하였다. 실험 결과 아지스로마이신 투여군과 비교시 아지스로마이신 나노입자 투여군에서는 항생제인 아지스로마이신이 장 마이크로바이옴에 노출되지 않아 장 마이크로바이옴 평형을 전혀 깨트리지 않는다는 것을 알 수 있었다(도 7).

[0091] **실험예 3: 본 발명의 나노입자화가 약물의 효능에 미치는 영향 평가**

[0092] 본 발명자들은 실시예 1의 방법으로 제조된 니클로사마이드(niclosamide) 나노입자의 구조적 안정성과 향상된 bioavailability를 확인한 후, in vivo 동물실험으로 경구용 니클로사마이드 나노입자의 바이러스 감염에 대한

치료효과를 확인하였다. 모든 실험은 BSL 3단계에서 진행되었다. 이를 위해 먼저 코로나 동물모델인 SH101 햄스터를 준비한 후 치사량(TCID₅₀)의 SARS-CoV-2 바이러스에 감염시켰다. 바이러스 감염 후 1시간이 지난 시점에 니클로사마이드 나노입자를 5 또는 10 mg/Kg(약물 기준) 용량으로 매일 경구투여하였다. 이 때 대조군으로, 원래 생활성물질 니클로사마이드 10 mg/Kg 또는 Phosphate-buffered saline(PBS)을 경구투여하여 비교 실험을 수행하였다. 이후 7일 dpi(day-post-infection)동안 감염 증상(체중 감소, 발열 후 체온 저하, 개체 사망 등)을 확인하였다(도 8).

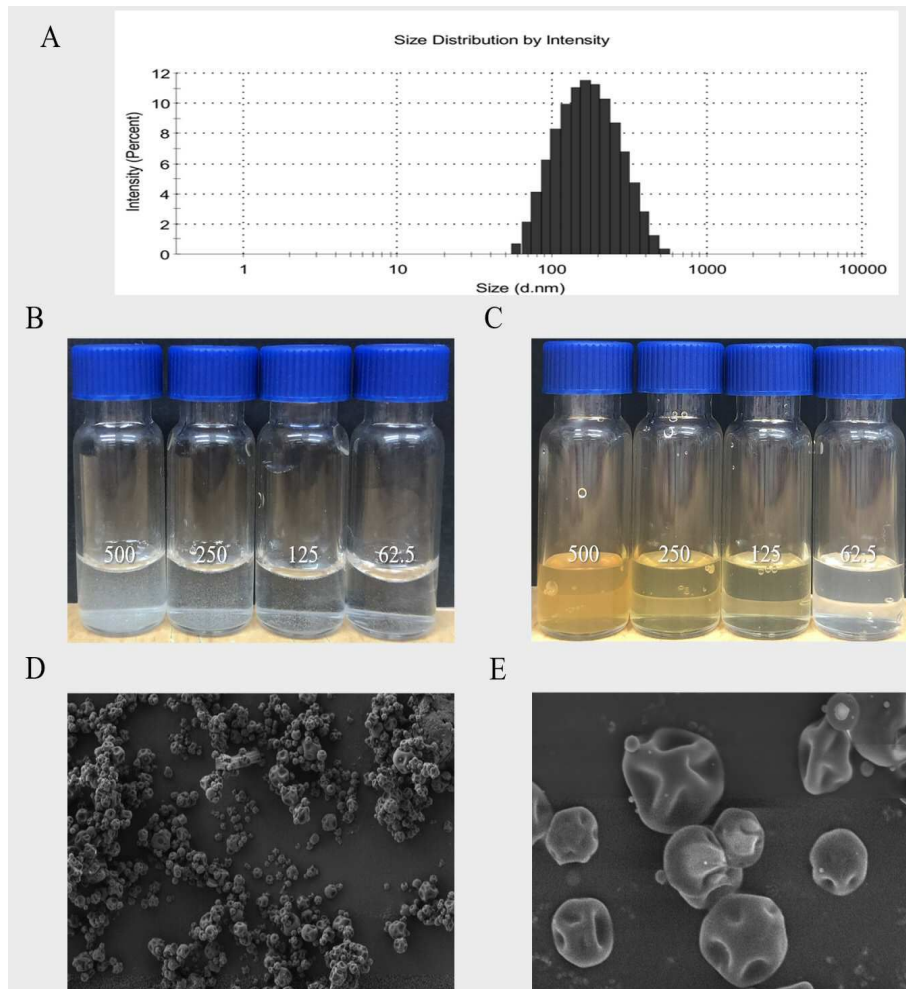
[0093] 또 다른 코로나 동물모델인 hACE2 transgenic mice를 이용하여 동일한 실험을 수행하면서, 7일 dpi(day-post-infection)동안 감염 증상(체중 감소, 발열 후 체온 저하, 개체 사망 등)을 확인하였다(도 9).

[0094] 3dpi와 7dpi 시점에 각각 sampling된 폐조직은 절편을 Hematoxyline and Eosin (H&E) 염색한 후 현미경으로 관찰하였다(도 10). 또한 폐 조직으로부터 추출한 RNA에 대해서는 SARS-CoV-2 바이러스의 envelope (E) 유전자에 대한 pcr (forward primers: 5' -GCCTCTTCTCGTTCCTCATCAC-3' , reverse primer: 5' -AGCAGCATCACGCCATTG-3')를 50 ℃에서 2분, 95 ℃에서 2분 이후 [95℃에서 15초, 60 ℃에서 30초]를 40 cycles 수행한 후 95 ℃에서 15초, 60 ℃에서 1분, 95 ℃에서 45초 조건으로 RT-qPCR을 수행함으로써 폐 조직내 SARS-CoV-2 바이러스의 양을 정량분석 하였다(도 10).

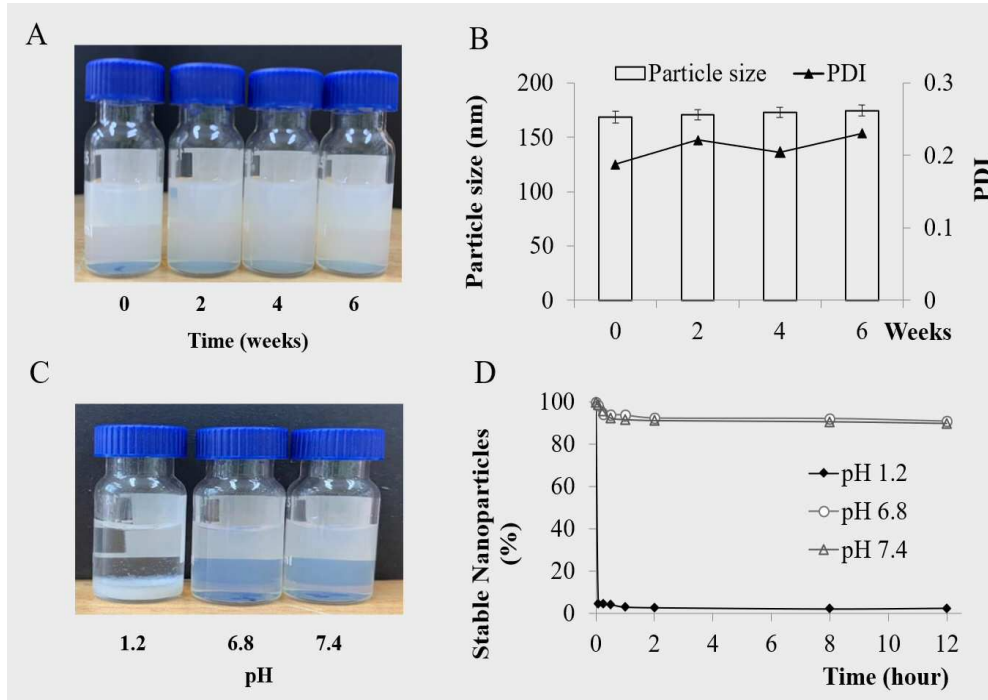
[0095] 상기와 같이, 코로나 동물모델인 SH101 햄스터와 hACE2 transgenic mice에서 실험한 결과에 의하면, 니클로사마이드 나노입자 투여군에서는 항바이러스제인 니클로사마이드를 감염된 조직으로 전달시킴으로써 생체이용률이 개선되어 SARS-CoV-2 바이러스를 사멸시킴으로써(도10의 C, D), PBS 투여군 및 니클로사마이드 투여군과는 달리, SARS-CoV-2 감염에 대해 뚜렷한 치료효과를 가짐을 확인하였다.

도면

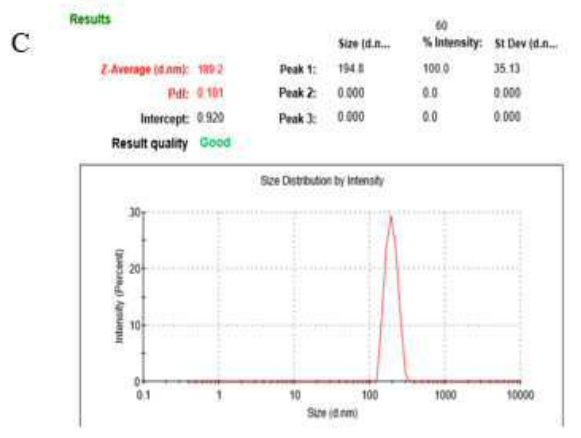
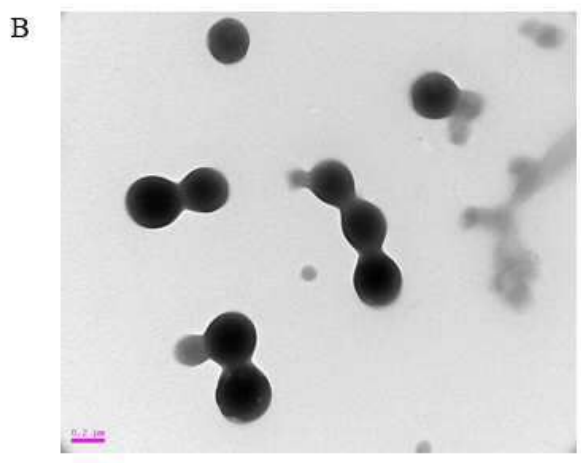
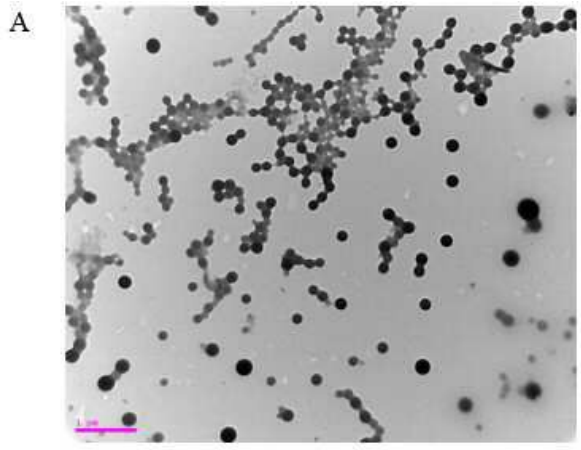
도면1



도면2

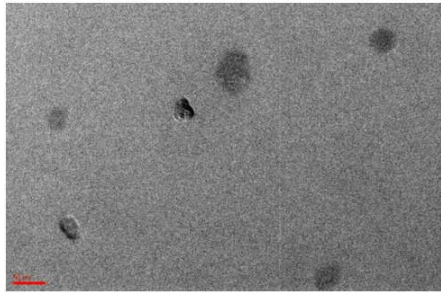


도면3

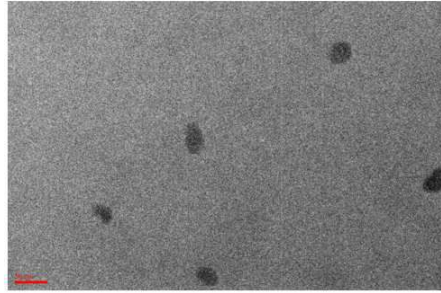


도면4

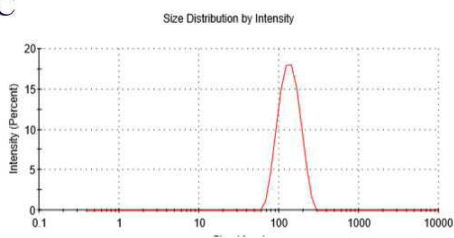
A



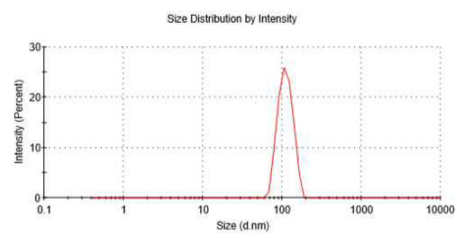
B



C

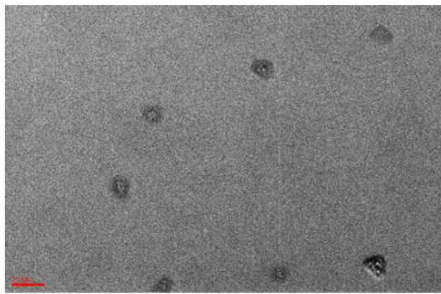


D

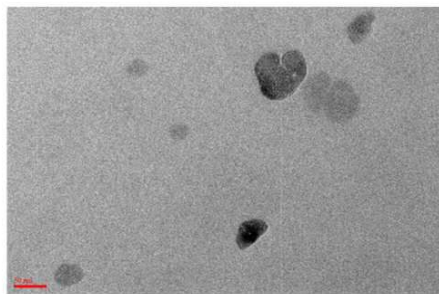


도면5

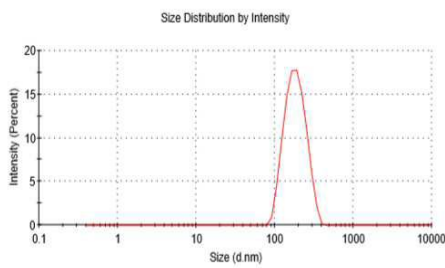
A



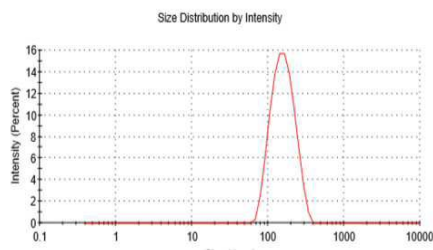
B



C

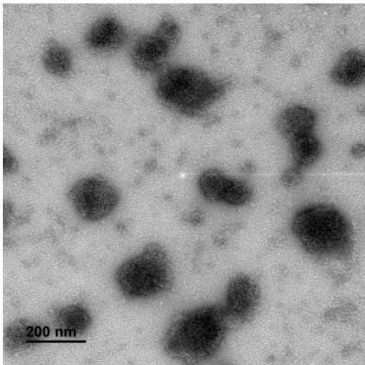


D

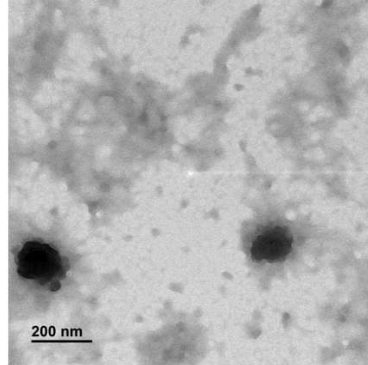


도면6

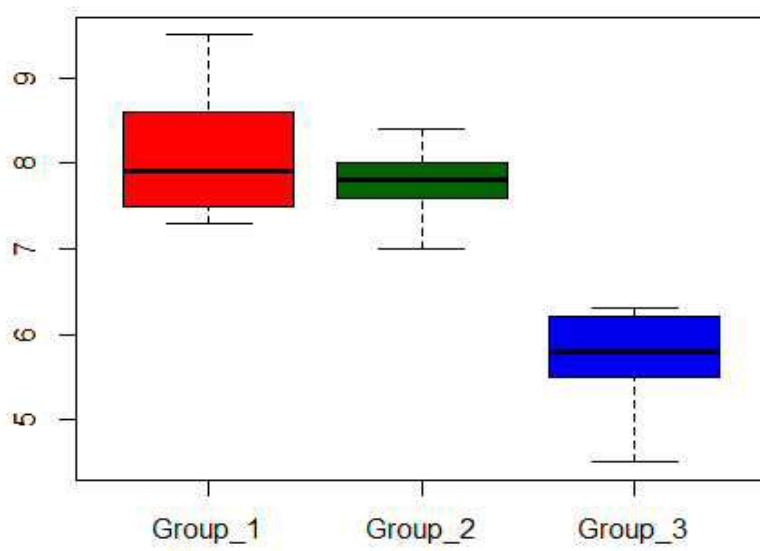
A



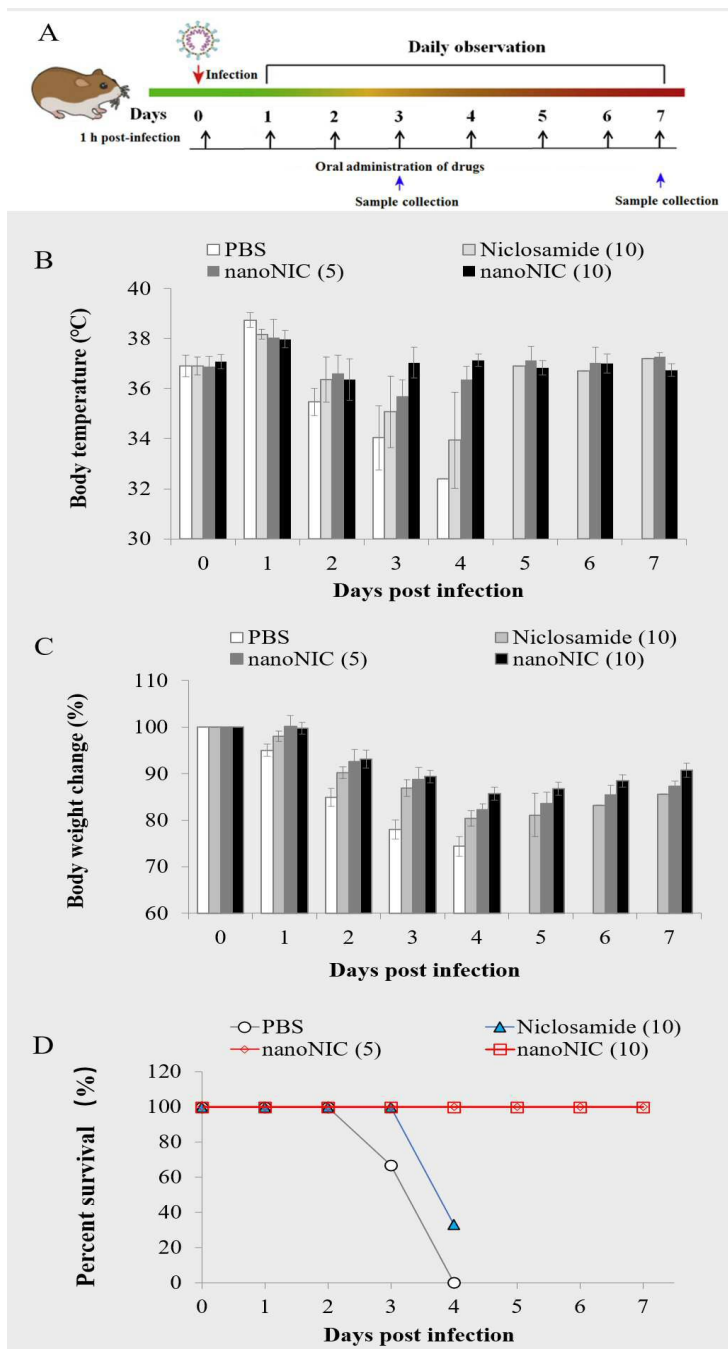
B



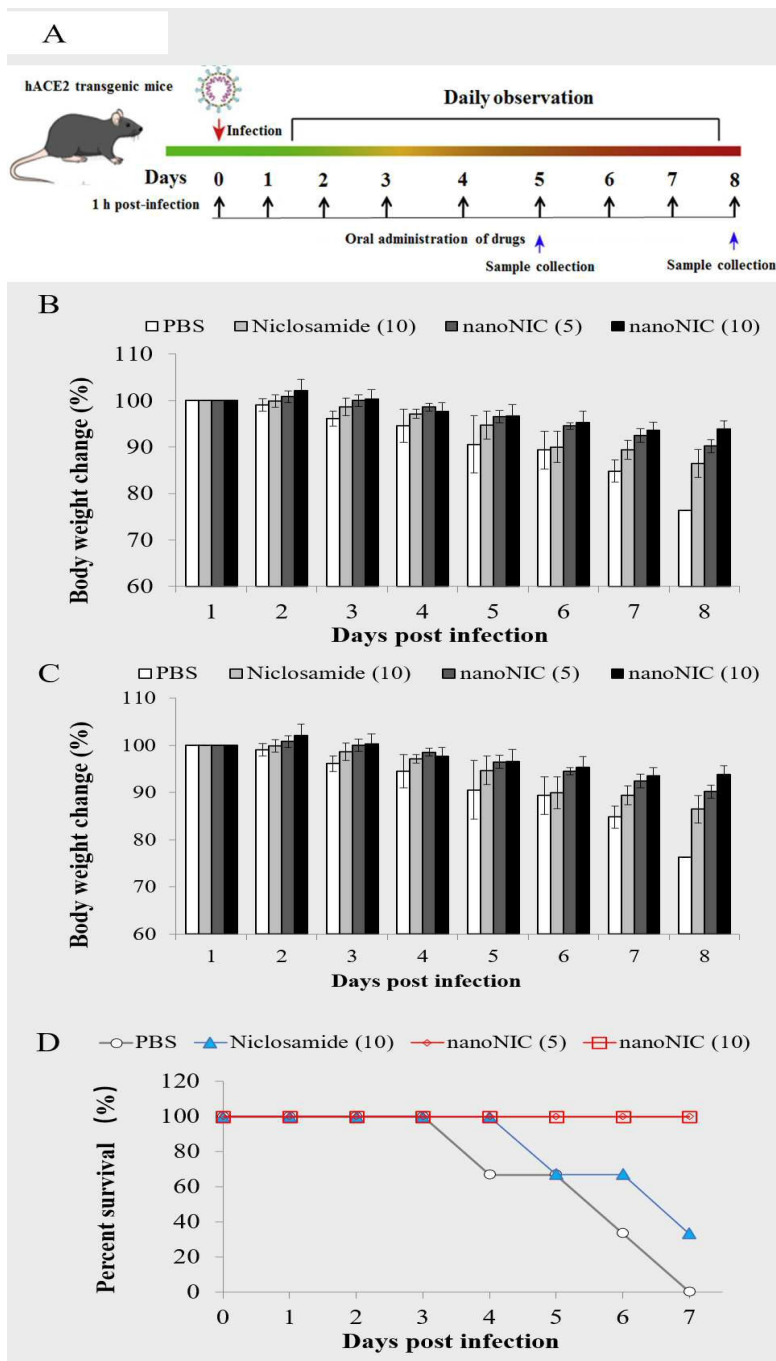
도면7



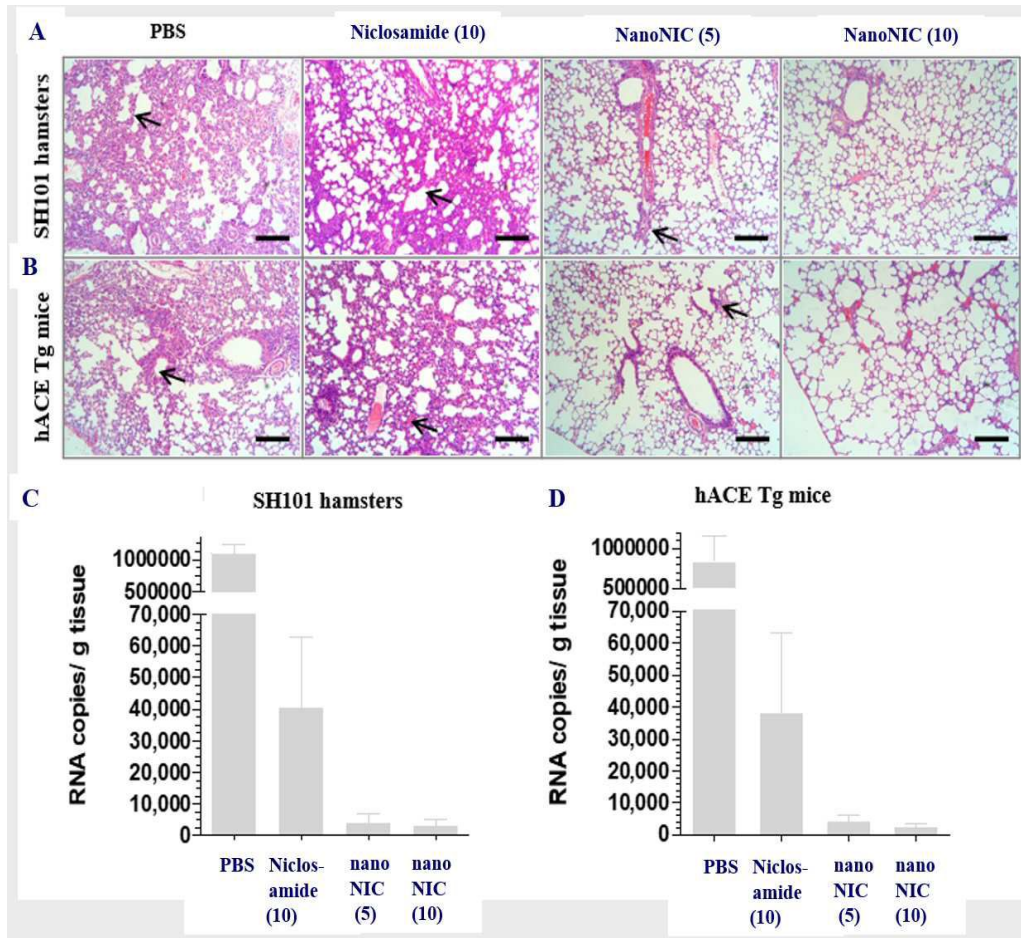
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> SNJ PHARMA INC.
 - <120> Oral nanoparticle of bioactive substances and preparing method thereof
 - <130> P22047
 - <150> KR 21/0042768
 - <151> 2021-04-01
 - <160> 2
 - <170> KoPatent In 3.0
 - <210> 1
 - <211> 22
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> SARS-CoV-2 envelope forward primer
 - <400> 1
- gcctcttctc gttctctcatc ac

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SARS-CoV-2 envelope reverse primer

<400> 2

agcagcatca ccgccattg

19