(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0111079
(43) 공개일자 2008년12월22일

(51) Int. Cl.
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7025603
(22) 출원일자 2008년10월20일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2008년10월20일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/002198
국제출원일자 2007년03월13일
(87) 국제공개번호 WO 2007/110152
국제공개일자 2007년10월04일
(30) 우선권주장
10 2006 013 531.8 2006년03월24일 독일(DE)

(71) 출원인
에르테에스 로만 테라피-시스템메 아게
독일연방공화국 , 56626 안데르나흐, 로만슈트라쎄 2
(72) 발명자
크류터, 조르그
독일, 61350 바드 홈버그, 제오르그-오거스트-진-스트라쎄 13
겔페리나, 스베트라나
러시아, 117647 모스코바, 113-3, 유엘. 프로프소주즈나야, 아파트 넘버 719
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 폴리락티드 나노입자

(57) 요 약

본 발명은 포유동물의 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 가로질러 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 투여하기 위한 약물 타겟팅 시스템에 관한 것으로, 여기서 상기 약물 타겟팅 시스템이 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)의 나노입자, 및 상기 나노입자에 흡수, 흡착, 및/또는 도입된 적어도 하나의 약리적 활성 물질을 포함하고, 또한 TPGS를 포함하거나, 또는 활성 물질이 로드된 나노입자에 침착된 표면 활성 물질 Pluronic 188의 코팅을 포함하는 약물 타겟팅 시스템, 및 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법, 및 중추신경계의 질환 또는 손상의 치료를 위한 약물 타겟팅 시스템의 용도에 관한 것이다.

(72) 발명자

마크시멘코, 올가

러시아, 121609 모스코바, 아파트 # 303, 4-1, 유엘. 오센야야

카란스키, 알렉산더

러시아, 117463 모스코바, 아파트 # 670, 24, 유엘. 고루빈스캬야

특허청구의 범위

청구항 1

포유동물의 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 가로질러 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 투여하기 위한 약물 타겟팅 시스템으로서,

상기 약물 타겟팅 시스템이 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)로 된 나노입자, 및 상기 나노입자에 흡수, 흡착, 및/또는 도입된 적어도 하나의 약리적 활성 물질을 포함하고,

여기서 상기 시스템이 TPGS를 함유하거나, 또는 상기 약물-로드된 나노입자에 침착된(deposited) 플루로닉(pluronic) 188 계면활성제 코팅을 포함하는 약물 타겟팅 시스템.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 나노입자가 1,000nm 미만의 직경, 바람직하게는 100 내지 800nm의 직경, 가장 바람직하게는 150 내지 600nm의 직경을 갖는 입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 약리적 활성 물질이 치료제 또는 진단제인 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 치료제가 시냅스 및 신경효과기 접합부 부위에 작용하는 약물; 전신 및 국부 진통제 및 마취제; 최면제 및 진정제; 우울증 및 정신분열증과 같은 정신의학적 장애의 치료용 약물; 항간질제 및 항경련제; 헝틴턴 병(Huntington's disease), 노화 및 알츠하이머 병의 치료용 약물; 흥분성 아미노산 안타고니스트 및 향신경성 인자(neurotropic factor) 및 신경재생제(neuroregenerative agent); 영양 인자; CNS 외상 또는 뇌졸증의 치료를 위한 약물; 마약중독(addiction) 및 약물 남용의 치료용 약물; 오타코이드(autacoid) 및 항-염증성 약물; 기생충 감염 및 미생물성 질환용 화학요법제; 면역억제제 및 항암 약물; 호르몬 및 호르몬 안타고니스트; 중금속 및 중금속 안타고니스트; 비금속성 독극물용 안타고니스트; 암 치료용 세포증식억제제; 핵의학에서의 사용을 위한 진단 물질; 면역활성 및 면역반응제; 전달물질(transmitter) 및 그들 각각의 수용체 아고니스트 및 수용체 안타고니스트, 그들 각각의 전구체 또는 대사물질; 항생물질, 진경제, 항히스타민제, 항구토제, 이완제, 자극제, "센스(sense)" 및 "안티센스(anti-sense)" 올리고뉴클레오티드, 대뇌확장제(cerebral dilator), 정신작용제, 항-조울제(anti-manic), 혈관 확장제(vascular dilator) 및 수축제(constrictor), 항-고혈압제, 편두통 치료제, 최면제, 혈당증강제 또는 혈당강하제, 미네랄제 또는 영양제, 항-비만 약물, 동화작용제(anabolics) 및 항-천식제, 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 항암 약물이 알칼로이드, 알킬화제, 예컨대 알킬 술포네이트, 이지리딘, 에틸렌이민 및 메틸멜라민, 질소 머스터드, 니트로소우레아, 항생물질 및 유사체, 바람직하게는 안트라사이클린, 항대사물질, 예컨대 엽산 유사체, 엽산 안타고니스트, 퓨린 유사체 및 피리미딘 유사체, 효소, 면역조절제, 면역독소, 모노클로널 항체, 및 백금 착물로 구성된 군에서 선택되는 항신생물제(antineoplastic agent)인 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 진단제가 핵의학 및/또는 방사선 요법을 위한 진단에 유용한 것임을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템.

청구항 7

포유동물의 혈뇌장벽을 가로질러 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 투여하기 위한 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법으로서, 하기 단계 :

- 유기 상을 얻기 위하여 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드), 적어도 하나의 약리적 활성 물질, 및 임의로 지질 화합물을 유기 용매에 가용화(solubilizing)하는 단계;

- TPGS를 함유하는 수성 용액에 상기 유기 상을 붓는 단계;

- 1차 에멀젼을 얻기 위하여 상기 혼합물을 유화하는 단계;

- 상기 1차 에멀젼을 균질화하는 단계;

- 상기 1차 에멀젼으로부터 유기 용매를 제거하는 단계; 및

- 약물-로드된 나노입자를 포함하는, 결과물인 나노현탁액을 여과하는 단계

를 포함하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 8

포유동물의 혈뇌장벽을 가로질러 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 투여하기 위한 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법으로서, 하기 단계 :

- 유기 상을 얻기 위하여 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드), 적어도 하나의 약리적 활성 물질, 및 임의로 지질 화합물을 유기 용매에 가용화하는 단계;

- 임의로 안정화제를 포함하는 수성 용액에 상기 유기 상을 붓는 단계;

- 1차 에멀젼을 얻기 위하여 상기 혼합물을 유화하는 단계;

- 상기 1차 에멀젼을 균질화하는 단계;

- 상기 1차 에멀젼으로부터 유기 용매를 제거하는 단계;

- 약물-로드된 나노입자를 포함하는, 결과물인 나노현탁액을 여과하는 단계; 및

- 폴록사머 188로 상기 나노입자를 코팅하는 단계

를 포함하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 9

청구항 7 또는 청구항 8에 있어서, 상기 지질 화합물이 세틸 포스페이트, 포타슘 콜레스테릴 설페이트 및 토코페릴 숙시네이트로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 10

포유동물의 혈뇌장벽을 가로질러 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 투여하기 위한 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법으로서, 하기 단계 :

- 유기 상을 얻기 위하여 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)를 유기 용매에 가용화하는 단계;

- 수성 용액에 적어도 하나의 약리적 활성 물질을 용해하는 단계;

- 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓는 단계;

- 1차 에멀젼을 얻기 위하여 상기 혼합물을 유화하는 단계;

- TPGS의 수성 용액에 상기 1차 에멀젼을 붓는 단계;

- TPGS의 수성 용액 및 1차 에멀젼의 혼합물을 균질화하는 단계;

- 안정화제의 수성 용액 및 1차 에멀젼의 혼합물로부터 유기 용매를 제거하는 단계; 및

- 약물-로드된 나노입자를 포함하는, 결과물인 나노현탁액을 여과하는 단계

를 포함하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 11

포유동물의 혈뇌장벽을 가로질러 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 투여하기 위한 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법으로서, 하기 단계 :

- 유기 상을 얻기 위하여 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)를 유기 용매에 가용화하는 단계;

- 수성 용액에 적어도 하나의 약리적 활성 물질을 용해하는 단계;

- 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓는 단계;

- 1차 에멀젼을 얻기 위하여 상기 혼합물을 유화하는 단계;

- 안정화제의 수성 용액에 상기 1차 에멀젼을 붓는 단계;

- 안정화제의 수성 용액 및 1차 에멀젼의 혼합물을 균질화하는 단계;

- 안정화제의 수성 용액 및 1차 에멀젼의 혼합물로부터 유기 용매를 제거하는 단계;

- 약물-로드된 나노입자를 포함하는, 결과물인 나노현탁액을 여과하는 단계; 및

- 폴록사머 188로 상기 나노입자를 코팅하는 단계

를 포함하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 12

청구항 7 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정화제가 폴리비닐 알코올, 혈청 알부민, TPGS, 및 γ-사이클로덱스트린으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 폴리비닐 알코올이 30 -70 kDa의 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 혈청 알부민이 인간 혈청 알부민인 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 15

청구항 7 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약리적 활성 물질이 치료제 또는 진단제인 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 치료제가 시냅스 및 신경효과기 접합부 부위에 작용하는 약물; 전신 및 국부 진통제 및 마취제; 최면제 및 진정제; 우울증 및 정신분열증과 같은 정신의학적 장애의 치료용 약물; 항간질제 및 항경련제; 헝틴턴 병, 노화 및 알츠하이머 병의 치료용 약물; 흥분성 아미노산 안타고니스트 및 향신경성 인자 및 신경재생제; 영양 인자; CNS 외상 또는 뇌졸증의 치료를 위한 약물; 마약중독 및 약물 남용의 치료용 약물; 오타코이드 및 항-염증성 약물; 기생충 감염 및 미생물성 질환용 화학요법제; 면역억제제 및 항암 약물; 호르몬 및 호르몬 안타고니스트; 중금속 및 중금속 안타고니스트; 비금속성 독극물용 안타고니스트; 암 치료용 세포증식억제제; 핵의학에서의 사용을 위한 진단 물질; 면역활성 및 면역반응제; 전달물질 및 그들 각각의 수용체 아고니스트 및 수용체 안타고니스트, 그들 각각의 전구체 또는 대사물질; 항생물질, 진경제, 항히스타민제, 항구토제, 이완제, 자극제, "센스(sense)" 및 "안티센스(anti-sense)" 올리고뉴클레오티드, 대뇌확장제, 정신작용제, 항-조울제, 혈관 확장제 및 수축제, 항-고혈압제, 편두통 치료제, 최면제, 혈당증강제 또는 혈당강하제, 미네랄제 또는 영양제, 항-비만 약물, 동화작용제 및 항-천식제, 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 항암 약물이 알칼로이드, 알킬화제, 예컨대 알킬 술포네이트, 이지리딘, 에틸렌이민

및 메틸멜라민, 질소 머스터드, 니트로소우레아, 항생물질 및 유사체, 바람직하게는 안트라사이클린, 항대사물질, 예컨대 엽산 유사체, 엽산 안타고니스트, 퓨린 유사체 및 피리미딘 유사체, 효소, 면역조절제, 면역독소, 모노클로널 항체, 및 백금 착물로 구성된 군에서 선택되는 항신생물제인 것을 특징으로 하는 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 18

청구항 15에 있어서, 상기 진단제가 핵의학 및/또는 방사선 요법을 위한 진단에 유용한 것임을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 19

청구항 7 내지 청구항 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기 용매가 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 20

청구항 7 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노현탁액이 저온보호제(cryoprotecting agent)를 가한 후 냉동 건조되는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 저온보호제가 만니톨인 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 22

청구항 20 또는 청구항 21에 있어서, 상기 저온보호제가 5% (w/v)의 양으로 상기 나노현탁액에 가해지는 것을 특징으로 하는 약물 타겟팅 시스템의 제조 방법.

청구항 23

포유동물의 중추신경계의 질환 또는 장애의 치료 방법으로서, 하기 단계:

- 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)로 된 약물-로드된 나노입자를 제조하는 단계;

- 상기 약물-로드된 PLGA 나노입자를 폴록사머 188로 코팅하는 단계;

- 상기 폴록사머 188-코팅된 약물-로드된 나노입자를 포유동물의 혈류에 투여하는 단계; 및

- 상기 약물이 약리 효과를 달성하도록 하는 단계

를 포함하는 중추신경계의 질환 또는 장애의 치료 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 투여 단계가 경구 또는 정맥내 투여를 포함하는 것을 특징으로 하는 중추신경계의 질환 또는 장애의 치료 방법.

청구항 25

포유동물의 중추신경계의 질환 또는 장애의 치료를 위한, 청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 따른 약물 타겟팅 시스템의 용도.

청구항 26

포유동물의 중추신경계의 질환 또는 장애의 치료용 약제의 제조를 위한, 청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 따른 약물 타겟팅 시스템의 용도.

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본 발명은 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 타겟팅하기 위한 시스템에 관한 것이다. 특히, 본 발

명은 포유동물의 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과할 수 있는 나노미립자 약물 타겟팅 시스템에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 폴리락티드 및/또는 폴리락티드-코글리콜리드(polylactide-coglycolide)에 기반한 약물-로드된 나노입자, 폴리락티드 및/또는 폴리락티드-코글리콜리드에 기반한 약물-로드된 나노입자의 제조 방법, 및 중추신경계의 질환 및 장애의 치료, 특히 신경세포암(neuronal cancer)의 치료를 위한, 폴리락티드 및/또는 폴리락티드-코글리콜리드에 기반한 약물-로드된 나노입자의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 중추신경계 (CNS)의 질환 및 장애는 신경계 기능에 영향을 미치는 약물의 투여로 치료될 수 있다. 이들 약물은 통상적으로 종래의 경구 투여 또는 주사에 의해 이들을 필요로 하는 환자에게 제공된다. 불행하게도, 많은 약물, 예컨대 아데노신, β-엔도르핀(endorphine), 내재성 펩티드의 합성 유사체, 흥분성 및 억제성 아미노산 및 영양 인자(trophic factor)는 혈뇌장벽을 전혀 통과하지 않거나, 치료적으로 효과를 가지기에는 부족한 양만 통과한다. 그러한 약물은 직접적으로 뇌에 투여되었을 때, 예를 들어 직접 CNS 주입(direct CNS infusion)에 의해서만 치료적으로 유효하다.

<3> 직접 CNS 주입의 대안으로서, 미국특허 제6,117,454호는 포유동물의 혈뇌장벽을 가로지르는 약학적 활성 물질의 전달 방법을 제시하고, 여기서 나노입자는 혈뇌장벽을 통과함으로서 CNS에 약물 또는 진단제를 타겟팅하는데 사용될 수 있다. 미국특허 제6,117,454호에 따르면, 약물은 결과물인 폴리-부틸 시아노아크릴레이트 나노입자의 표면에 도입되거나 또는 표면상 흡수되는 부틸 시아노아크릴레이트와 같은 적절한 모노머의 중합 도중 또는 후에 가해진다. 이들 나노입자-약물 복합체는 혈뇌장벽을 통과할 수 있고, 이들이 적절한 계면활성제로 코팅된 경우 CNS에 상기 약물을 타겟팅할 수 있는 것으로 여겨진다. 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노라우레이트 (Tween® 20), 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노팔미테이트 (Tween® 40), 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노스테아레이트 (Tween® 60), 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노올레이트 (Tween® 80), 및 이들의 혼합물이, 약물-로드된 폴리-부틸 시아노아크릴레이트 나노입자가 혈뇌장벽을 통과하게 할 수 있는 적절한 계면활성제로서 청구된다.

<4> 이 문헌에서는 기본적으로 어떠한 약물이라도 약물의 구조를 변경할 필요 없이 계면활성제-코팅된 나노입자에 도입 또는 부착될 수 있고, 뇌에 전달될 수 있는 것으로 제안된다. 그러므로, 미국특허 제6,117,454호는 혈뇌장벽을 통과함으로서 CNS에 약물을 타겟팅하는 제1의 보편적인 방법을 제공하는 것으로 보여진다.

<5> 결과물인 폴리-부틸 시아노아크릴레이트 나노입자를 코팅하는데 사용된 계면활성제의 독성 부작용의 가능성에 대한 우려 및 약물-로드된 나노입자의 제조 프로세스를 단순화하기 위한 요구는, WO 98/56361에 상세히 설명된 바와 같이 단순화되고, 잠재적으로 독성이 적은 나노입자 제조 방법의 개발을 가져왔다.

<6> WO 98/56361은 나노입자가 부틸시아노아크릴레이트 모노머의 중합 도중 안정화제로서 덱스트란 12.000 또는 폴리소르베이트 85(폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 트리올레이트; Tween® 85)을 사용하여 제조된 경우 계면활성제가 더 이상 요구되지 않는다는 것을 교시한다. 안정화된 폴리부틸시아노아크릴레이트 나노입자 상으로 흡수된 달라긴(dalargin)은 혈뇌장벽을 통과할 수 있고, 또한 폴리소르베이트 85-안정화된 나노입자에 흡수된 아미트립틸린(amitriptyline)은 아미트립틸린보다 뇌에서 더 높은 농도로 축적되는 것으로 나타났다.

<7> 그러나, 제제의 효능, 특이성, 독성, 및 간단함 중 하나 이상을 향상시키기 위하여, 혈뇌장벽을 가로질러 포유동물의 CNS에 약물을 타켓팅하기 위한 약물-로드된 나노입자의 대안의 시스템에 대한 요구가 여전히 존재한다.

발명의 상세한 설명

<8> 따라서 본 발명의 목적은 포유동물의 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 가로질러 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 투여하기 위한 향상된 약물 타겟팅 시스템을 제공하는 것이다.

<9> 이 목적은 폴리(DL-락티드)(PLA) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드) (PLGA)에 기반한 나노입자를 포함하는 약물 타겟팅 시스템에 의해 달성되며, 여기서 약리적 활성 물질이 상기 나노입자에 흡수, 흡착, 및/또는 도입되고, 또한 여기서 상기 나노입자는 TPGS를 포함하거나, 또는 상기 약물-로드된 나노입자에 침착된(deposited) 폴록사머 188 계면활성제 코팅을 포함한다.

<10> 여기에서 사용된 용어 "약물-로드된 나노입자(drug-loaded nanoparticles)"는 약리적 활성 물질을 포함하는 나노입자를 의미하는 것으로 이해해야 한다. 약리적 활성 물질은 치료제 또는 진단제일 수 있다. 그러므로, 본 발명의 "약물-로드된 나노입자"는 상기 나노입자에 흡수, 흡착, 또는 도입되는 적어도 하나의 치료제 및/또는

적어도 하나의 진단제를 포함한다.

<11> 여기에서 사용된 용어 "혈뇌장벽(blood-brain barrier)"은 즉, 기저막, 신경아교 세포 및 뇌 혈관(brain vessel)의 내피와 같은 혈뇌장벽을 의미한다. 상기 혈뇌장벽은 뇌로 물질이 이동하는 것을 조절하는 기능을 한다. 여기에서 사용된 용어 "혈뇌장벽"은 또한 혈-척수 장벽(blood-spinal barrier) 및 혈-망막 장벽(blood-retina barrier) 의미한다.

<12> 폴리락트산으로도 불리는 폴리락티드(PLA)는 락트산에 기반한 폴리에스테르이다. 폴리락티드는 폴리히드록시산(polyhydroxyacid)이다. 이들은 생물친화성(biocompatible) 및 생분해성이다.

<13> 폴리락티드의 특성은 이들의 분자량, 결정화도 및 적용 가능한 경우, 코폴리머의 비율에 주로 의존한다. 폴리락티드의 분자량이 증가함에 따라 폴리락티드의 유리전이온도, 용융점, 인장 강도 및 E-모듈은 증가하지만, 파단 연신율은 감소한다.

<14> 폴리락티드는 락티드의 개환중합(ring-opening polymerization)에 의해 얻을 수 있다. 개환중합은 주석 옥토에이트(stannous octoate) 촉매의 존재 중 140 내지 180℃의 온도에서 수행된다. 고분자량을 갖는 폴리락티드는 이러한 방법으로 손쉽게 제조될 수 있다.

<15> 또한, 고분자량 및 순수한 폴리락티드는 소위 중축합에 의해 락트산으로부터 직접적으로 생성될 수 있다.

<16> 폴리락티드 코글리콜리드(PLGA)는 글리콜산과 연결된 락트산으로 구성된 생분해성 폴리머이고, 그들 각각의 백분율은 약물 방출 속도에서 중요한 역할을 한다. 락티드 대 글리콜리드의 비율은 90:10 내지 10:90일 수 있고, 20:80 내지 80:20의 비율이 바람직하고, 40:60 내지 60:40의 비율이 더 바람직하며, 50:50의 비율이 가장 바람직하다. 락티드는 광학적으로 활성이고, 순수한 D-락티드에서 순수한 L-락티드까지 D 및 L 이성질체의 어떠한 비율로도 존재할 수 있고, 라세미체는 50% D-락티드 및 50% L-락티드를 포함한다.

<17> 폴록사머는 일반식 $HO(C_2H_4O)_a(-C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$을 가진 비이온성 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체이다. 이들은 액체에서 고체까지의 다양한 상이한 등급으로 입수가능하다. 폴록사머는 항생물질에 대한 유화제, 가용화제, 계면활성제, 및 습윤제로서 사용된다.

<18> 폴록사머 188(Pluronic® F68 (BASF Corp.))은 1차 히드록시기에서 종결하는 이관능성 블록 공중합체 계면활성제이다. 이는 상대적으로 비-독성인 비-이온성 계면활성제이다. 폴록사머 188은 8,400의 평균 분자량, 77℃에서 1,000cps의 점도, >100℃의 담점(cloud point)(10% 수성), 및 >24의 HLB 값을 가진다.

<19> 폴록사머 185 (Pluronic® P65 (BASF Corp.))는 1차 히드록시기에서 종결하는 이관능성 블록 공중합체 계면활성제이다. 이는 상대적으로 비-독성인 비-이온성 계면활성제이다. Pluronic® P65는 3,400의 평균 분자량, 60℃에서 180cps의 점도, 80-84℃의 담점(10% 수성), 및 12-18의 HLB 값을 가진다.

<20> 폴록사머 235로도 지정되는 Pluronic® P85 (BASF Corp.)는 1차 히드록시기에서 종결하는 이관능성 블록 공중합체 계면활성제이다. 이는 상대적으로 비-독성인 비-이온성 계면활성제이다. Pluronic® P85는 4,600의 평균 분자량, 60℃에서 310cps의 점도, 83-89℃의 담점(10% 수성), 및 12-18의 HLB 값을 가진다.

<21> 폴리소르베이트 80 (폴리옥시에틸렌-소르비탄-모노올레이트, Tween® 80)은 비-이온성 계면활성제이다. 폴리소르베이트 80은 1,300의 평균 분자량, 25℃에서 375-480 mPa·s의 점도, 및 14-16의 HLB 값을 가진다.

<22> TPGS (D-α-토코페릴 폴리에틸렌 글리콜 1000 숙시네이트)는 D-α-토코페릴숙시네이트의 수용성 유도체이다. TPGS는 지방 흡수장애 증후군, 예컨대 만성 소아 담즙정체(chronic childhood cholestasis)를 가진 사람을 위한 비타민 E의 수용성 전달 형태로서 사용된다. 이는 비타민 D와 같은 지용성 비타민 및 수-불용성 HIV 프로테아제 억제제 앰프레나비어(amprenavir)를 위한 흡수 및 생체이용율(bioavailability) 증강제로서 또한 사용된다. TPGS는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 1000과 함께 D-α-토코페릴 숙시네이트의 에스테르화에 의해 합성된다(PEG 1000의 분자량은 대략 1,000 달톤이다). 그 분자량은 대략 1,513 달톤이다. 이는 미색(pale yellow)이며, 양친매성 및 친수성인 왁스성 고체 물질이다. TPGS의 약동학은 여전히 연구중이다. TPGS는 비타민 E의 다른 형태보다 음식물 섭취 후 소장의 루멘으로부터 더 효과적으로 흡수된다. 장세포 내로의 그것의 흡수 메카니즘은 불명료하게 남아있다. (친수성 및 친지질성 말단 양자를 가지는) 양친매성 본성 때문에, TPGS는 그 자체의 미셀(micelle)을 형성하고, 따라서 그를 위한 담즙산염을 필요로 하지 않는다. TPGS는 이들 약물과 함께 제형화된 경우 친지질성 약물의 흡수를 증강시킬 수 있다. 또한, TPGS와 동시투여되었을 때 일부 약물의 경구 생체이용율의 증대는, 부분적으로 장에서 P-당단백질의 억제에 기인한 것일 수 있다.

<23> 본 발명의, 약물-로드된 PLA 나노입자 및 PLGA 나노입자는 혈뇌장벽을 가로질러 중추신경계에 약물을 타겟팅하는데 사용될 수 있고, 또한 중추신경계의 질환 또는 장애의 치료용으로, 또는 중추신경계의 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조용으로 사용될 수 있다.

실 시 예

<26> 본 발명의, 약물-로드된 PLA 나노입자 및 PLGA 나노입자는 a) 고압 균질화-용매 증발법 또는 b) 2중 에멀젼법(수중유중수(water-in-oil-in-water) 에멀젼)에 의해 제조될 수 있다.

<27> a) 고압 균질화-용매 증발법

<28> 통상적으로, 폴리머 및 약물은 유기 용매에 용해된다. 이러한 유기 상을 안정화제의 수성 용액 내로 교반 하에서 천천히 붓는다. 이어서 상기 혼합물을 고속 전단 균질화기(shear homogenizer)를 사용하여 유화한다. 이어서 얻어진 1차 에멀젼을 높은 압력에서 고압 균질화기를 통과시킨다. 주위 온도 및 통상의 압력에서 교반 하 천천히 증발시키거나, 또는 감압 하 급속 증발에 의해 유기 용매를 제거한다. 프로세스 도중, 나노방울(nanodroplet)은 수성계에서 응결한다.

<29> 결과물인 나노현탁액을 유리-소결 필터(glass-sintered filter)를 통해 여과한다. 보관을 위해 바람직하게는 만니톨의 5% w/v로 저온보호제(cryoprotecting agent)를 가하였다. 이어서 상기 현탁액을 바이알에 채우고, -35℃에서 냉동하고, 후속하여 냉동건조하였다.

<30> 만일 추가의 화합물, 예컨대 세틸 포스페이트, 포타슘 콜레스테릴 설페이트 또는 토코페릴 숙시네이트가 약물 타겟팅 시스템의 제제에서 유화제 및/또는 반대 이온으로서 사용되는 경우, 폴리머 및 지질 화합물은 유기 용매에서 용해되고, 약물은 물에 용해된다. 유기 및 수성 용액은 주위 온도에서 혼합 및 인큐베이션된다. 이어서 상기 혼합물을 안정화제를 포함하는 교반된 수성 용액에 붓고, 이어서 전술한 바와 같이, 추가로 처리하였다.

<31> b) 2중 에멀젼법

<32> 통상적으로, 폴리머는 유기 용매에 용해되고, 약물은 물에 용해된다. 수성 용액을 유기 상에 가한다. 상기 혼합물을 유화한다. 얻어진 물/오일(w/o) 에멀젼을 안정화제의 수성 용액에 가하고, 이어서 추가로 유화한다. 결과물인 조 에멀젼(coarse emulsion)을 고압 균질화기를 통과시킨다. 균질화 단계를 몇 번 반복하여 안정한 w/o/w 에멀젼을 제조한다. 이어서 유기 용매를 주위 온도 및 통상의 압력에서 천천히 증발시켜서 제거한다.

<33> 상기 유기 상에 용액을 가하기 전에 물에 약물 및 γ-사이클로덱스트린과 같은 추가의 유화제를 용해하는 것이 가능하다.

<34> 얻어진 나노현탁액을 유리-소결 필터를 통해 여과한다. 보관을 위해 저온보호제를 가하고, 이어서 상기 나노현탁액을 바이알에 채우고, 냉동하고, 이어서 냉동건조하였다.

<35> 얻어진 나노입자 제형은 재현탁성(resuspendability), 입자 크기, 약물 로딩(이론상), 및 약물 함량에 대해 테스트될 것이다.

<36> 본 발명의 의도 및 범주 내에서 다양한 변화 및 변경이 본 발명의 상세한 설명과 첨부한 도면 및 특허청구범위로부터 기술분야의 당업자에게 명백해질 것이기 때문에, 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내는 구체적인 실시예 및 발명의 상세한 설명은 단지 예시를 위한 것이다.

<37> 본 발명의 약물 타겟팅 시스템은 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)에 기반한 나노입자, 적어도 하나의 약리적 활성 물질을 포함하며, 또한 TPGS를 함유하거나 또는 상기 약물-로드된 나노입자상에 침착된(deposited) 계면활성제 코팅을 포함하며, 여기서 상기 계면활성제는 폴록사머 188이다.

<38> 바람직한 구현예에서, 상기 약물 타겟팅 시스템의 나노입자는 1,000nm 미만의 직경, 바람직하게는 100 내지 800nm의 직경, 가장 바람직하게는 130 내지 160nm의 직경을 갖는다.

<39> 약리적 활성 물질, 즉 치료제 또는 진단제를 포유동물의 혈뇌장벽을 가로질러 포유동물의 CNS에 투여하기 위하여, 본 발명의 PLA- 및/또는 및/또는 PLGA-기반 나노입자는 실질적으로 어떠한 약리적 활성 물질과도 함께 로드될 수 있다.

<40> 치료제는 시냅스 및 신경효과기 접합부 부위에 작용하는 약물; 전신 및 국부 진통제 및 마취제; 최면제 및 진정제; 우울증 및 정신분열증과 같은 정신의학적 장애의 치료용 약물; 항간질제 및 항경련제; 헌팅턴 병(Huntington's disease), 노화 및 알츠하이머 병의 치료용 약물; 흥분성 아미노산 안타고니스트 및 향신경성 인

자(neurotropic factor) 및 신경재생제(neuroregenerative agent); 영양 인자; CNS 외상외상의 치료를 위한 약물; 마약중독(addiction) 및 약물 남용의 치료용 약물; 오타코이드(autacoid) 및 항-염증성 약물; 기생충 감염 및 미생물성 질환용 화학요법제; 면역억제제 및 항암 약물; 호르몬 및 호르몬 안타고니스트; 중금속 및 중금속 안타고니스트; 비금속성 독극물용 안타고니스트; 암 치료용 세포증식억제제; 핵의학에서의 사용을 위한 진단 물질; 면역활성 및 면역반응제; 전달물질(transmitter) 및 그들 각각의 수용체 아고니스트 및 수용체 안타고니스트, 그들 각각의 전구체 또는 대사물질; 항생물질, 진경제, 항히스타민제, 항구토제, 이완제, 자극제, "센스(sense)" 및 "안티센스(anti-sense)" 올리고뉴클레오티드, 대뇌확장제(cerebral dilator), 정신작용제, 항-조울제(anti-manic), 혈관 확장제(vascular dilator) 및 수축제(constrictor), 항-고혈압제, 편두통 치료제, 최면제, 혈당증강제 또는 혈당강하제, 미네랄제 또는 영양제, 항-비만 약물, 동화작용제(anabolics) 및 항-천식제, 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

<41> 바람직한 치료제는 항암 약물이며, 바람직하게는 항신생물제(antineoplastic)이다. 상기 항신생물제는 알칼로이드, 알킬화제, 예컨대 알킬 술포네이트, 이지리딘, 에틸렌이민 및 메틸멜라민, 질소 머스터드, 니트로소우레아, 항생물질 및 유사체, 바람직하게는 안트라사이클린, 항대사물질, 예컨대 엽산 유사체, 엽산 안타고니스트, 퓨린 유사체 및 피리미딘 유사체, 효소, 면역조절제, 면역독소, 모노클로널 항체, 및 백금 착물로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

<42> 특히 바람직한 항신생물제는 9-아미노캠프토데신(aminocamptothecin), 도세탁셀(docetaxel), 엑테이나시딘(ecteinascidin), 에토포시드(etoposide), 이리노테칸(irinotecan), 파클리탁셀(paclitaxel), 루비테칸(rubitecan), 테니포시드(teniposide), 토포테칸(topotecan), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 부술판(busulfan), 임프로술판(improsulfan), 피포술판(piposulfan), 카르보퀴온(carboquone), 우레데파(uredepa), 알트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포아미드, 트리에틸렌티오포스포아미드, 클로람부실(chlorambucil), 클로나파진(chlornaphazine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 에스트라부스틴(estramustine), 이포스파미드(ifosfamide), 메클로르에타민(mechlorethamine), 메클로로에타민 옥사이드 하이드로클로라이드(mechlorethamine oxide hydrochloride), 멜파란(melphalan), 노벰비친(novembichin), 퍼포스파미드(perfosfamide), 페네스테린(phenesterine), 프레드니무스틴(prednimustine), 트리클로르메틴(trichlormethine), 트로포스파미드(trofosfamide), 우라실 머스터드(uracil mustard), 카르무스틴(carmustine), 클로로조토신(chlorozotocin), 포테무스틴(fotemustine), 로무스틴(lomustine), 니무스틴(nimustine), 라니무스틴(ranimustine), 다카르바진(dacarbazine), 만노무스틴(mannomustine), 미토브로니톨(mitobronitol), 미토락톨(mitolactol), 피포브로만(pipobroman), 테모졸로미드(temozolomide), 아클라시노마이신(aclacinomycins), 안트라마이신(anthramycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycins), 카크티노마이신(cactinomycin), 카루비신(carubicin), 클로모마이신(chromomycins), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르류신(norleucine), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 메노가릴(menogaril), 미토마이신(mitomycins), 미코페놀산(mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin), 올리보마이신(olivomycins), 페플로마이신(peplomycin), 피라루비신(pirarubicin), 플리카마이신(plicamycin), 포르피로마이신(porfiromycin), 퓨로마이신(puromycin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), TNP-470, 튜베르시딘(tubercidin), 발루비신(valrubicin), 지노스타틴(zinostatin), 조루비신(zorubicin), 데노프테린(denopterin), 에다트렉세이트(edatrexate), 메소트렉세이트(methotrexate), 노라트렉시드(nolatrexed), 페메트렉시드(pemetrexed), 피리트렉심(piritrexim), 프테로프테린(pteropterin), 랄리트렉시드(ralitrexed), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 클라드리빈(cladribine), 플루다라빈(fludarabine), 6-머캅토퓨린(mercaptopurine), 티아미프린(thiamiprine), 티오구아닌(thioguanine), 티아조퓨린(tiazofurin), 안시타빈(ancitabine), 아자시티딘(azacitidine), 6-아자우리딘(azauridine), 카페시타빈(capecitabine), 카르모푸르(carmofur), 사이타라빈(cytarabine), 데시타빈(decitabine), 독시플루리딘(doxifluridine), 에미테푸르(emitefur), 에노시타빈(enocitabine), 플록스우리딘(floxuridine), 플루오로우라실(fluorouracil), 겜시타빈(gemcitabine), 테가푸르(tegafur), L-아스파라기나아제(asparaginase), 란피르나세(ranpirnase), 브로피리딘(bropirimine), 인터페론(interferon)-α, 인터페론-ɣ, 인터루킨(interleukin)-2, 렌티난(lentinan), 프로파게르마늄(propagermanium), PSK®, 로퀴니멕스(roquinimex), 시조피란(sizofiran), 우베니멕스(ubenimex), 데니루킨 디프티톡스(denileukin diftitox), 알렘투주맙(alemtuzumab), 에드레콜로맙(edrecolomab), 겜투주맙 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin), 이브리투모맙 티욱세탄(ibritumomab tiuxetan), 리툭시맙(rituximab), 토시투모맙(tositumomab) ^{131}I, 트라스투주맙(trastuzumab), 카르보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 로바플라틴(lobaplatin), 미보플라틴

(miboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 암사크린(amsacrine), 3산화비소(arsenic trioxide), 비산트렌(bisantrene), 데포스파민(defosfamine), 데메콜신(demecolcine), 디아지퀴온(diaziquone), 에플로르니틴(eflornithine), 엘리프니늄 아세테이트(elliptinium acetate), 에토글루시드(etoglucid), 펜레티니드(fenretinide), 플라보피리돌(flavopiridol), 질산갈륨(gallium nitrate), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이마티니브(imatinib), 리아로졸(liarozole), 로니다민(lonidamine), 밀테포신(miltefosine), 미토구아존(mitoguazone), 미톡산트론(mitoxantrone), 모피다몰(mopidamol), 니트라크린(nitracrine), 펜토스타틴(pentostatin), 페나메트(phenamet), 포도필리닉산 2-에틸하이드라지드(podophyllinic acid 2-ethylhydrazide), 프로카르바진(procarbazine), 라족세인(razoxane), 소부족세인(sobuzoxane), 스피로게르마늄(spirogermanium), 테누아조닉산(tenuazonic acid), 티라파자민(tirapazamine), 트리아지퀴온(triaziquone), 및 우레탄(urethane)으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

<43> 본 발명의 약물 타겟팅 시스템은 고압 균질화-용매 증발법 또는 2중 에멀젼법에 의해 제조될 수 있다.

<44> TPGS를 함유하는, 약물 로드된 PLA- 및/또는 PLGA 나노입자 약물 타겟팅 시스템의 바람직한 제조 방법은 하기 단계 :

<45> - 유기 상을 얻기 위하여 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드), 적어도 하나의 약리적 활성 물질, 및 임의로 지질 화합물을 유기 용매에 가용화(solubilizing)하는 단계;

<46> - TPGS를 함유하는 수성 용액에 상기 유기 상을 붓는 단계;

<47> - 1차 에멀젼을 얻기 위하여 상기 혼합물을 유화하는 단계;

<48> - 상기 1차 에멀젼을 균질화하는 단계;

<49> - 상기 1차 에멀젼으로부터 유기 용매를 제거하는 단계; 및

<50> - 약물-로드된 나노입자를 포함하는, 결과물인 나노현탁액을 여과하는 단계

<51> 를 포함한다.

<52> TPGS를 함유하는, 약물 로드된 PLA- 및/또는 PLGA 나노입자 약물 타겟팅 시스템의 또다른 바람직한 제조 방법은 하기 단계 :

<53> - 유기 상을 얻기 위하여 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)를 유기 용매에 가용화하는 단계;

<54> - 수성 용액에 적어도 하나의 약리적 활성 물질을 용해하는 단계;

<55> - 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓는 단계;

<56> - 1차 에멀젼을 얻기 위하여 상기 혼합물을 유화하는 단계;

<57> - TPGS의 수성 용액에 상기 1차 에멀젼을 붓는 단계;

<58> - TPGS의 수성 용액 및 1차 에멀젼의 혼합물을 균질화하는 단계;

<59> - 안정화제의 수성 용액 및 1차 에멀젼의 혼합물로부터 유기 용매를 제거하는 단계; 및

<60> - 약물-로드된 나노입자를 포함하는, 결과물인 나노현탁액을 여과하는 단계

<61> 를 포함한다.

<62> 폴록사머 188로 코팅된, 약물 로드된 PLA- 및/또는 PLGA-나노입자 약물 타겟팅 시스템의 바람직한 제조 방법은 하기 단계 :

<63> - 유기 상을 얻기 위하여 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드), 적어도 하나의 약리적 활성 물질, 및 임의로 지질 화합물을 유기 용매에 가용화하는 단계;

<64> - 임의로 안정화제를 포함하는 수성 용액에 상기 유기 상을 붓는 단계;

<65> - 1차 에멀젼을 얻기 위하여 상기 혼합물을 유화하는 단계;

<66> - 상기 1차 에멀젼을 균질화하는 단계;

<67> - 상기 1차 에멀젼으로부터 유기 용매를 제거하는 단계;

<68> - 약물-로드된 나노입자를 포함하는, 결과물인 나노현탁액을 여과하는 단계; 및

<69> - 폴록사머 188로 상기 나노입자를 코팅하는 단계

<70> 를 포함한다.

<71> 폴록사머 188로 코팅된, 약물 로드된 PLA- 및/또는 PLGA-나노입자 약물 타겟팅 시스템의 또다른 바람직한 제조 방법은 하기 단계 :

<72> - 유기 상을 얻기 위하여 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)를 유기 용매에 가용화하는 단계;

<73> - 수성 용액에 적어도 하나의 약리적 활성 물질을 용해하는 단계;

<74> - 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓는 단계;

<75> - 1차 에멀젼을 얻기 위하여 상기 혼합물을 유화하는 단계;

<76> - 안정화제의 수성 용액에 상기 1차 에멀젼을 붓는 단계;

<77> - 안정화제의 수성 용액 및 1차 에멀젼의 혼합물을 균질화하는 단계;

<78> - 안정화제의 수성 용액 및 1차 에멀젼의 혼합물로부터 유기 용매를 제거하는 단계;

<79> - 약물-로드된 나노입자를 포함하는, 결과물인 나노현탁액을 여과하는 단계; 및

<80> - 폴록사머 188로 상기 나노입자를 코팅하는 단계

<81> 를 포함한다.

<82> 본 발명의 약물 타겟팅 시스템의 제조를 위한 바람직한 진단제 및 치료제, 특히 항신생물제는 본 명세서에서 앞서 구체적으로 설명하였다.

<83> 본 발명의 약물 타겟팅 시스템의 제조를 위한 바람직한 유기 용매는 디클로로메탄 및 클로로포름으로 구성된 군에서 선택된다. PLA- 및/또는 PLGA-나노입자의 제조를 위한 용매로서 에틸 아세테이트를 사용하는 것도 가능하며, 단 상기 임의의 안정화제는 에틸 아세테이트에 용해된다.

<84> 디클로로메탄 및 에틸 아세테이트의 혼합물을 사용하는 것도 가능하다.

<85> 바람직한 지질 화합물은 세틸 포스페이트, 포타슘 콜레스테릴 설페이트 및 토코페릴 숙시네이트로 구성된 군에서 선택된다.

<86> 바람직한 안정화제는 유화제, 계면활성제 또는 반대이온이다. 바람직한 안정화제는 폴리비닐 알코올, 혈청 알부민, γ-사이클로덱스트린, 및 토코페릴 폴리에틸렌 글리콜 1000 숙시네이트(TPGS)로 구성된 군에서 선택되며, 여기서 상기 폴리비닐 알코올은 바람직하게는 30 -70 kDa의 분자량을 가지며, 특히 바람직한 혈청 알부민은 인간 혈청 알부민이다.

<87> 보관을 위해, 결과물인 약물-로드된 나노입자의 나노현탁액은 폴록사머 188로 코팅되기 전에 냉동건조될 수 있다. 바람직하게는 저온보호제는 냉동 건조되기 전에 나노현탁액에 가해진다. 적절한 저온보호제는 만니톨이며, 이는 바람직하게는 5% (w/v)의 양으로 상기 나노현탁액에 가해진다.

<88> 약물-로드된 나노입자의 코팅은 바람직하게는 용액 중 폴록사머 188 용액으로, 상기 계면활성제가 상기 약물-로드된 나노입자를 코팅하는 것을 가능하게 하는 충분한 시간을 부여함으로서 수행된다.

<89> 약물 타겟팅 시스템이 폴리(DL-락티드) 및/또는 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)로 구성된 나노입자, 치료제, 및 TPGS 또는 상기 약물-로드된 나노입자에 침착된 폴록사머 188 계면활성제 코팅을 포함하는, 혈뇌장벽을 가로질러 포유동물의 중추신경계에 약리적 활성 물질을 투여하기 위한 약물 타겟팅 시스템은, 포유동물의 중추신경계의 질환 또는 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 상기 약물 타겟팅 시스템은 중추신경계 활성을 가지지만, 변형되지 않거나 또는 담체와 결합되지 않은 채로 포유동물의 혈뇌장벽을 통과할 수 없는 약리적 활성 물질의 투여용으로 특히 적합하다.

<90> 본 발명의 약물 타겟팅 시스템은 신경세포암의 치료용으로 특히 유용한데, 그 이유는 이것이 혈뇌장벽을 가로질

러 항신생물제를 전달하여, CNS에 이들 항암 약물을 타겟팅할 수 있기 때문이다.

<91> 본 발명의 약물 타겟팅 시스템은 혈류에 진입할 수 있도록 투여될 것이며, 그에 의해 상기 약물이 상기 혈뇌장벽에 도달하고 통과한다. 바람직하게는, 본 발명의 약물 타겟팅 시스템은 경구로 또는 주사에 의해 투여되며, 더 바람직하게는 정맥 주사에 의해 투여된다.

<92> [실시예]

<93> 1. 나노미립자 제형의 제조

<94> 다양한 등급의 Lactel® 폴리머 - 폴리(DL-락티드) (PLA) 및 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드) (PLGA) - 를 Absorbable Polymers, USA로부터 구매하였고; 독소루비신 하이드로클로라이드는 Sicor, Rho, Italy로부터 기증받았고; 세틸 포스페이트, 포타슘 콜레스테릴 설페이트, 폴리비닐 알코올(PVA) (MW 30-70 kDa), 및 인간 혈청 알부민(HSA)은 Sigma로부터 구매하였으며; D-α-토코페릴 폴리에틸렌글리콜 1000 숙시네이트(TPGS)는 Eastman Chemical Company, USA로부터 구매하였다.

<95> 약물-로드된 PLA 및 PLGA 나노입자를 고압 균질화-용매 증발법 또는 2중 에멀젼법을 사용하여 제조하였다.

<96> 고압 균질화-용매 증발을 위하여, 폴리머 및 약물을 디클로로메탄에 통상적으로 용해하였다. 이 유기 상을 교반 하 안정화제(PVA 또는 HSA)의 수성 용액 중으로 천천히 부었다. 상기 혼합물을 고속 전단 균질화기(Ultra-Turrax T-25 (IKA))를 사용하여 유화하였다. 이어서 얻어진 1차 에멀젼을 400 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40; Gaulin GmbH, Germany)를 통과시켰다. 유기 용매를 주위 온도 및 통상의 압력에서 교반 하(3시간) 천천히 증발시키거나, 또는 감압 하 급속 증발에 의해 제거하였다(로터리 증발기 BUCHI R-200). 프로세스 도중, 나노방울은 수성계에서 응결한다. 얻어진 나노현탁액을 유리-소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제(cryoprotecting agent)로서 5% w/v 만니톨을 가하였다. 이어서 상기 현탁액을 바이알에 채우고, -35℃에서 냉동하고, 냉동건조하였다.

<97> 지질 화합물, 예컨대 세틸 포스페이트, 포타슘 콜레스테릴 설페이트, 또는 토코페릴 숙시네이트를 일부 제제에서 유화제 및/또는 반대이온으로서 사용하였다. 이 경우에, 폴리머 및 지질 화합물은 유기 용매(디클로로메탄 또는 클로로포름)에 가용화되고, 상기 약물은 물에 용해되었다. 상기 유기 및 수성 용액을 혼합하고 주위 온도에서 12시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 상기 혼합물을 안정화제를 함유하는 교반된 수성 용액(25 ml)에 붓고, 이어서 전술한 바와 같이 추가로 처리하였다.

<98> 2중 에멀젼법을 위하여, 폴리머(500 mg)를 디클로로메탄(5 ml)에 통상적으로 용해하였다(자석 교반 하 1시간). 약물(50 mg)을 물(2 ml)에 용해하였다. 수성 용액을 상기 유기 상에 적가하였다. 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25(19,500 rpm에서 2분)를 사용하여 유화하였다. 얻어진 물/오일(w/o) 에멀젼을 안정화제(PVA, HSA, 또는 TGPS)의 1% 수성 용액 25 ml에 가하고, 이어서 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 유화하였다. 이어서 얻어진 조에멀젼(coarse emulsion)을 600bar의 압력에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통과시켰다. 균질화 단계를 수회 반복하여 안정한 w/o/w 에멀젼을 생성하였다. 주위 온도 및 통상의 압력에서(자석 교반기, 3시간) 천천히 증발시켜서 w/o/w 에멀젼으로부터 유기 용매를 제거하였다. 얻어진 나노현탁액을 유리-소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨을 가하였다. 이어서 상기 현탁액을 바이알에 채우고(1 ml/바이알), 냉동하고(-35℃), 냉동건조하였다.

<99> 디클로로메탄은 PLA/PLGA 나노입자의 제조에 사용되는 통상의 용매이다. 그러나, 에틸 아세테이트 또는 디클로로메탄 및 에틸 아세테이트의 혼합물을 사용하는 것 또한 가능하다. 그러나, 일부 반대이온들은 에틸 아세테이트에 용해되지 않는다. 이러한 경우 에틸 아세테이트는 PLA/PLGA 나노입자의 제조용으로 부적절한 용매이다.

<100> 얻어진 제형을 재현탁성, 입자 크기, 약물 로딩(이론상), 및 약물 함량에 대해 테스트하였다.

<101> 물로 냉동건조 나노입자의 재구성 후 균일하고 안정적인 콜로이드계가 관찰되는 경우, 얻어진 나노미립자 제형은 적절한 것으로 간주되었다. 나노입자의 재현탁성을 시각적으로 측정하였다. 따라서, 냉동건조된 제형을 함유하는 바이알의 함량은 물로 최초 부피(2 ml)로 재구성하였고, 상기 바이알을 2-4 분간 온화하게 흔들었다. 적절한 재구성된 제형은 관찰가능한 응집체 또는 침전물 없이 유백광을 내는 액체가 되었다. 관찰가능한 응집체 또는 침전물을 함유하는 샘플은 버렸다.

<102> 나노입자의 크기는 재구성된 제형(50㎕)의 일정부분(aliquot)이 3ml의 이중 증류수를 함유하는 나노사이저(Nanosizer) 테스트 튜브 내로 옮겨진 광자 상관 분광법(PCS)에 의해 측정하였다. 상기 튜브를 흔들고, 이어서

Coulter N4MD 나노사이저(Coulter Electronics, U.K)에 삽입하였다. 작업 파라미터는 하기와 같다 :

<103> 산란각: 90°

<104> 온도: 25°

<105> 점도: 0.01 포이즈

<106> 굴절률 1.333

<107> 여과 단계 후 반응 혼합물에서 또는 재구성 후 냉동 건조 제형에서 약물 로딩을 측정하였다. 약물 로드의 측정 방법은 초여과(ultrafiltration)에 의한 나노입자의 분리 및 후속하여 분광광도법에 의해 여과물에서 유리 약물(free drug)의 정량 분석을 포함한다.

<108> 나노미립자 제형의 약물 로드의 측정을 위하여, 냉동 건조된 제형을 가진 바이알의 내용물을 1 ml의 물에서 재구성하여, 400㎕를 마이크로원심분리기 필터(Microcon 30 kDa, Millipore)로 옮기고, 50분간 16,000rpm에서 원심분리하여 나노입자를 분리하였다. 100㎕의 깨끗한 여과물을 3 ml의 이중 증류수를 함유하는 큐벳에 옮기고, 분광광도계(Spectronics Heλios, Thermospectronic, GB)를 사용하여 480 nm에서 물에 대한 흡수를 측정하였다. 샘플에서 약물의 농도는 적절한 보정 그래프(calibration graph)를 사용하여 측정하였다.

<109> 상대적인 약물 로딩(전체 약물 양의 %)을 하기와 같이 계산하였다:

<110> $$\% \text{ 약물 로딩} = \frac{Ci - Cf}{Ci} \times 100\%$$,

<111> 여기서

<112> Ci = 중합 매체에서 초기 약물 농도(mg/ml);

<113> Cf = 여과물에서 약물 농도(mg/ml).

<114> 약물 함량(mg/바이알)을 측정하기 위한 방법은 냉동 건조된 제형의 완전한 용해 후 정량 분석이다. 용액 중 약물의 농도는 보정 커브를 사용하여 분광광도법에 의해 구하였다.

<115> 약물 함량을 측정하기 위하여, 냉동 건조된 제형을 가진 바이알의 내용물을 2 ml의 디메틸술폭시드에 용해하고(3시간, 주위 온도); 이 용액의 100㎕를 3 ml의 이중 증류수를 함유하는 분광광도계 큐벳에 옮기고, 분광광도계(Spectronics Heλios, Thermospectronic, GB)를 사용하여 480 nm에서 물에 대해서 흡수를 측정하였다. 샘플에서 약물의 농도는 적절한 보정 그래프를 사용하여 측정하였다.

<116> 제제 1

<117> 고압 균질화-용매 증발법에 의해 나노입자를 제조하였다. 250 mg의 폴리머(PLGA 75:25, MW 90,000 ~ 126,000 Da) 및 25 mg의 독소루비신을 5 ml의 디클로로메탄에 용해하였다. 안정화제로서 0.5%의 PVA를 함유하는 교반된 수성 용액(25 ml)에 상기 유기 상을 붓고, 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25 (2분; 15,100 rpm)를 사용하여 유화하였다. 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 사용하여 400 bar에서 결과물인 1차 에멀젼을 추가로 균질화하였다. 감압 하 디클로로메탄을 증발시켰다(회전자 증발기 BUCHI R-200). 결과물인 나노현탁액을 유리-소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 140-220 nm이었고, 독소루비신 로딩은 40%였다.

<118> 제제 2

<119> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(산 말단기를 가진 PLGA, 고유 점도 : η=0.20 dL/g)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 25 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 0.001N HCl에 용해하였다. 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 19,500 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 1% PVA 수성 용액에 붓고, 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 3회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통과시키고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 110-160 nm이었고, 독소루비신 로딩은 75%였다.

<120> 제제 3

<121> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(PLGA 75:25, MW 90,000 ~ 126,000 Da)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 25 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 0.001N HCl에 용해하였다. 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 19,500 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 1% PVA 수성 용액에 붓고, 이 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 160-330 nm이었고, 독소루비신 로딩은 47%였다.

<122> 제제 4

<123> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(PLA, η=0.36 dL/g)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 25 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 0.001N HCl에 용해하였다. 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 19,500 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 1% PVA 수성 용액에 붓고, 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 126-210 nm이었고, 독소루비신 로딩은 42%였다.

<124> 제제 5

<125> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(산 말단기를 가진 PLGA, η=0.20 dL/g)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 25 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 0.001N HCl에 용해하였다. 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 19,500 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 1% PVA 수성 용액에 붓고, 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 3회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 140-200 nm이었고, 독소루비신 로딩은 73%였다.

<126> 제제 6

<127> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(산 말단기를 가진 PLGA 50:50, η=0.20 dL/g)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 25 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 0.001N HCl에 용해하였다. 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 19,500 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 1% PVA 수성 용액에 붓고, 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 3회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 130-190 nm이었고, 독소루비신 로딩은 67%였다.

<128> 제제 7

<129> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(산 말단기를 가진 PLGA 50:50, η=0.20 dL/g)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 50 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 0.001N HCl에 용해하였다. 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 20,100 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 1% PVA 수성 용액에 붓고, 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 125-185 nm이었고, 독소루비신 로딩은 69%였다.

<130> 제제 8

<131> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(산 말단기를 가진 PLGA 50:50, η=0.20 dL/g)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 25 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 0.001N HCl에 용해하였다. 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 22,600 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 1% HSA 수성 용액에 붓고, 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 100-200 nm이었고, 독소루비신 로딩은 40%였다.

<132> 제제 9

<133> 고압 균질화-용매 증발법에 의해 나노입자를 제조하였다. 250 mg의 폴리머(PLA, MW 90,000 ~ 126,000 Da) 및 15.1 mg의 세틸 포스페이트를 4 ml의 디클로로메탄에 가용화하였다. 21.8 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 물에 용해하였다. 유기 및 수성 용액을 혼합하고, 주위 온도에서 12시간동안 인큐베이션하였다. 이어서 안정화제로서 1%의 HSA를 함유하는 교반된 수성 용액(25 ml)에 상기 혼합물을 붓고, Ultra-Turrax T-25 (2분; 19,100 rpm)를 사용하여 유화하였다. 결과물인 1차 에멀젼을 600bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 감압 하 디클로로메탄을 증발시켰다(회전자 증발기 BUCHI R-200). 결과물인 나노현탁액을 유리-소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 160-240 nm이었고, 독소루비신 로딩은 60%였다.

<134> 제제 10

<135> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(산 말단기를 가진 PLGA 50:50, η=0.20 dL/g)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 25 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 0.001N HCl에 용해하였다. 상기 유기 상에 상기 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 19,900 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 1% TGPS 수성 용액에 붓고, 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 300-380 nm이었고, 독소루비신 로딩은 45%였다.

<136> 제제 11

<137> 고압 균질화-용매 증발법에 의해 나노입자를 제조하였다. 250 mg의 폴리머(PLA, 0.34 dL/g) 및 21.2 mg의 포타슘 콜레스테릴 설페이트를 5 ml의 클로로포름에 가용화하였다. 21.8 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 물에 용해하였다. 유기 및 수성 용액을 혼합하고, 주위 온도에서 12시간동안 인큐베이션하였다. 이어서 안정화제로서 1%의 PVA를 함유하는 교반된 수성 용액(23 ml)에 상기 혼합물을 붓고, Ultra-Turrax T-25 (2분; 19,100 rpm)를 사용하여 유화하였다. 결과물인 1차 에멀젼을 600bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 감압 하 디클로로메탄을 증발시켰다(회전자 증발기 BUCHI R-200). 결과물인 나노현탁액을 유리-소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 500-600 nm이었고, 독소루비신 로딩은 89%였다.

<138> 제제 12

<139> 고압 균질화-용매 증발법에 의해 나노입자를 제조하였다. 250 mg의 폴리머(PLA, 0.34 dL/g) 및 22.9 mg의 D-α-토코페릴 숙시네이트를 5 ml의 클로로포름에 가용화하였다. 25.4 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 물에 용해하였다. 유기 및 수성 용액을 혼합하고, 주위 온도에서 12시간동안 인큐베이션하였다. 이어서 안정화제로서 0.5%의 PVA를 함유하는 교반된 수성 용액(23 ml)에 상기 혼합물을 붓고, Ultra-Turrax T-25 (2분; 23,600 rpm)를 사용하여 유화하였다. 결과물인 1차 에멀젼을 600bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 감압 하 클로로포름을 증발시켰다(회전자 증발기 BUCHI R-200). 결과물인 나노현탁액을 유리-소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 224-368 nm이었고, 독소루비신 로딩은 50%였다.

<140> 제제 13

<141> 고압 균질화-용매 증발법에 의해 나노입자를 제조하였다. 250 mg의 폴리머(PLA, 0.34 dL/g) 및 14.9 mg의 세틸 포스페이트를 5 ml의 클로로포름에 가용화하였다. 24.5 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드를 2 ml 물에 용해하였다. 유기 및 수성 상을 혼합하고, 주위 온도에서 12시간동안 인큐베이션하였다. 이어서 안정화제로서 0.5%의 PVA를 함유하는 교반된 수성 용액(23 ml)에 상기 혼합물을 붓고, Ultra-Turrax T-25 (2분; 23,600 rpm)를 사용하여 유화하였다. 결과물인 1차 에멀젼을 600bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 감압 하 클로로포름을 증발시켰다(회전자 증발기 BUCHI R-200). 결과물인 나노현탁액을 유리-소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 200-250 nm이었고, 독소루비신 로딩은 53%였다.

<142> 제제 14

<143> 2중 에멀젼법에 의해 나노입자를 제조하였다. 500 mg의 폴리머(산 말단기를 가진 PLGA 50:50, η=0.67 dL/g)를 3 ml 디클로로메탄에 가용화하였다. 20 mg의 독소루비신 하이드로클로라이드 및 45 mg의 γ-사이클로덱스트린을 3 ml 물에 용해하였다. 유기 상에 수성 용액을 붓고, Ultra-Turrax T-25를 사용하여 혼합물을 유화하였다(2분; 23,600 rpm). 결과물인 1차 에멀젼을 25 ml의, 0.5% PVA 수성 용액에 붓고, 상기 혼합물을 Ultra-Turrax T-25를 사용하여 다시 균질화하고, 이어서 600 bar에서 고압 균질화기(APV Micron Lab 40)를 통해 4회 통과시켰다. 3시간 동안 주위 온도에서 상기 에멀젼을 교반함으로서 디클로로메탄을 증발시켰다. 결과물인 나노현탁액을 유리 소결 필터를 통해 여과하고, 저온보호제로서 5% w/v 만니톨의 추가 후 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 제형은 완전히 재현탁 가능했다. PCS에 의해 측정된 입자 크기는 200-250 nm이었고, 독소루비신 로딩은 44%였다.

<144> 2. 동물 연구

<145> 동소이식 종양 모델 시스템(Orthotopic Tumour Model System). 실험 시스템은 랫트에서 두개골로(intracranially) 이식된 101/8 교모세포종에 기반하였다. 이 종양은 Wistar 랫트 소뇌로 α-디메틸벤즈안트라센(DMBA) 펠렛의 국부 주사에 의해 최초로 만들어졌고, 뇌내 이식(intracerebral implantation)에 의한 지속적인 통과(continuous passages)에 의해 유지된다. 장기간 보관을 위해 상기 종양 조직을 -196℃로 유지하고, 랫트의 뇌 내로의 주사에 의해 증식하였다.

<146> 101/8 교모세포종은 표면-변형된 폴리(부틸 시아노아크릴레이트 나노입자)에 로드된 독소루비신을 사용하여 실험적인 화학요법을 위해 이전에 채택하였다. 상기 종양은 안정한 단형의(monomorphous) 구조를 갖고, 뇌 실질(brain parenchyma)에서의 신속한 확산 성장과, 괴사에 대한 더 적은 경향을 가지는 공격적인 교모세포종의 특징적인 조직학적 양상(histological picture)을 나타낸다. 종양의 이식가능성은 약 100%였고, 접종 후 예측가능한 무증상(symptom-free) 수명을 가져왔다. 본 연구에서 101/8 교모세포종의 이식은 신선한 종양 조직을 사용하여 수행되었다. 이 기법이 선택되어, 모 종양(parent tumor), 특히 그 항원성 구조 및 분화의 주요한 통상적인 특징을 보존하도록 한다.

<147> 200 - 250 g 중량의 성체 숫컷 Wistar 랫트를 1주일간 순응시키고, 5개의 그룹으로 사육했다. 이들에게 표준 실험실용 음식 및 물을 원하는대로 공급했다. 종양 이식을 위하여, 동물들을 펜토바르비탈(50 mg/kg)의 복강내 주사에 의해 깊이 마취시켰다. 중심선 시상 절개를 통해, 치과용 드릴로 우측 관상 봉합(right coronal suture)의 2mm 후부 및 시상 중심선의 2mm 측면의 지점에 직경 1.5 mm의 천두공(burr hole)을 만들었다. 냉동 저장물로부터의 종양 물질(대략, 10^6 세포)을 21-게이지 바늘에 연결된 투베르쿨린 주사기 내로 도입하였다. 상기 선단을 뼈 표면 4mm 아래에 두고, 종양 조직을 우측 뇌실(right lateral ventricle)의 바닥으로 주사하였다. 두피 절개를 봉합하거나, 아교로 막았다. 질병의 현저한 임상 징후의 발생 후(통상적으로 14일 째), 상기 동물을 이산화탄소 질식으로 죽이고, 이어서 목을 잘랐다. 뇌를 즉시 제거하였다. 종양을 절제하고, 외과용 매스로 자르고; 전술한 바와 같이, 종양 이식(5 mg)을 새로운 실험 동물의 뇌에 접종하였다. 적절한 좌표를 확인하고, 상기 기법을 반복된 예비 실험에 의해 개량하였다.

<148> 동물 시험에 사용될 나노입자는 산 말단기(η = 0.20 dl/g)를 가진 저분자량 PLGA 50:50에 기반하며, 또한 독소루비신 하이드로클로라이드를 사용하여 독소루비신으로 로드되었다. 독소루비신-로드된 PLGA 나노입자의 제조를 위해서 1:10의 약물 대 폴리머 비율을 사용했다. 입자 크기는 144 ± 12 nm로 측정되었고, 독소루비신 로딩은 75.5%였다.

<149> 계면활성제-코팅된 입자를 얻기 위하여, 냉동 건조된 제형을 계면활성제(Pluronic® F68, Pluronic® P85 및 폴리소르베이트 80) 중 하나의 1% 수성 용액에 재현탁하였다. 이어서 결과물인 제제를 교반 하 30분 동안 인큐

베이션하여 2시간 내에 사용하였다.

<150> 종양 보유 랫트를 6개의 그룹(n = 10)으로 임의로 분리하고, 하기 제형 중 하나를 제공했다 : 1) 비처리 대조군; 2) 염수 중 독소루비신(DOX); 3) 1% Pluronic® F68 중 독소루비신(Dox/F68); 4) 독소루비신 로드된 PLGA 나노입자(DOX-PLGA); 5) Pluronic® F68로 코팅된, 독소루비신 로드된 PLGA 나노입자(DOX-PLGA/F68); 6) 폴리소르베이트 80으로 코팅된, 독소루비신 로드된 PLGA 나노입자(도시되지 않음); 7) Pluronic® P85로 코팅된, 독소루비신 로드된 PLGA 나노입자(결과는 도 1에 도시되지 않음).

<151> 종양 이식 후 2일째, 5일째, 및 8일째 3 x 1.5 mg/kg의 투여량 요법을 사용하여 꼬리 정맥 내로 이들 제제를 정맥으로 주사했다

<152> 이 동물들을 처리 후 100일 동안 추적하였고; 이어서 생존한 동물들을 죽여서 부검하였다. 결과를 도 1에 도시한다.

<153> 대조군에서, 동물들은 종양 이식 후 19일 내에 모두 죽었다. 폴록사머 188로 코팅된, 독소루비신 로드된 PLGA 나노입자는 종양-보유 랫트의 생존을 크게 향상시켰고 : 동물들의 40%(4/10)가 100일동안 생존하였다. 폴록사머 188의 1% 용액 중 독소루비신으로 처리된 그룹에서는 한마리 동물만 생존하였다. 이들 동물에서 종양의 부재는 형태학상 검사에 의해 확인하였다.

<154> 폴록사머 188로 코팅된, 독소루비신-로드된 PLGA 나노입자로 얻어진 결과와는 반대로, 폴리소르베이트 80 또는 Pluronic® P85와 함께 독소루비신-로드된 나노입자의 코팅은 나노입자-부착 독소루비신의 효능을 향상시키는데 실패했다(데이터는 도시되지 않음).

<155> 제2 세트의 실험에서, 산 말단기를 가진 PLGA(PLGA-COOH)에 기반한 독소루비신 로드된 PLGA 나노입자를 포함하고, 안정화제로서 TPGS를 함유하거나(Dox/PLGA-COOH/TPGS; 제제 10), 또는 TPGS로 코팅된(Dox/PLGA-COOH+TPGS) 제형은 101/8 교모세포종-보유 랫트에서 그 생체 내 효과에 대해 연구되었다. 후자의 제형은 나노입자를 동물에게 주사하기 전에, 제제 5에 따른 나노입자를 0.5% TPGS에 재현탁함으로서 얻었다.

<156> 이러한 세트의 실험의 결과는 도 2에 도시된다. 제제 10에 따른 나노입자, 즉, 안정화제로서 TPGS를 함유하는 나노입자가, 종양 보유 랫트의 생존 시간을 상당히 증가시키고, 이 실험용으로 사용된 종양-보유 랫트의 20%의 장기 생존을 가능하게 한 것을 볼 수 있다. 사용에 앞서 TPGS로 코팅된 제제 5에 따른 나노입자는 유효하지 않았다.

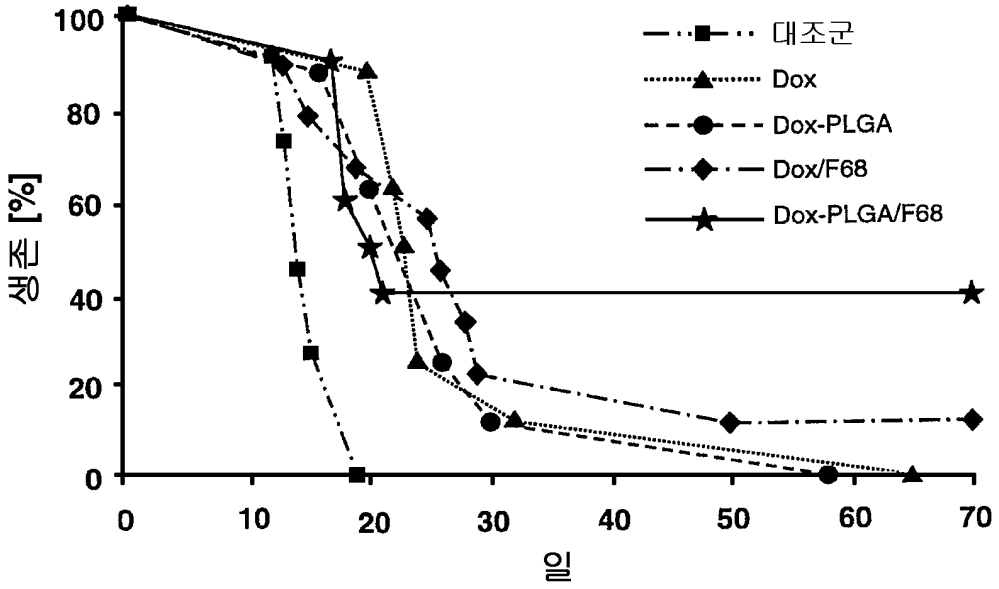
도면의 간단한 설명

<24> 도 1은 독소루비신을 포함하는 다양한 나노입자 제제로의 화학요법 후 두개의(intracranial) 101/8 교모세포종(glioblastoma)을 보유하는 랫트의 생존을 나타내는 그래프를 도시한다.

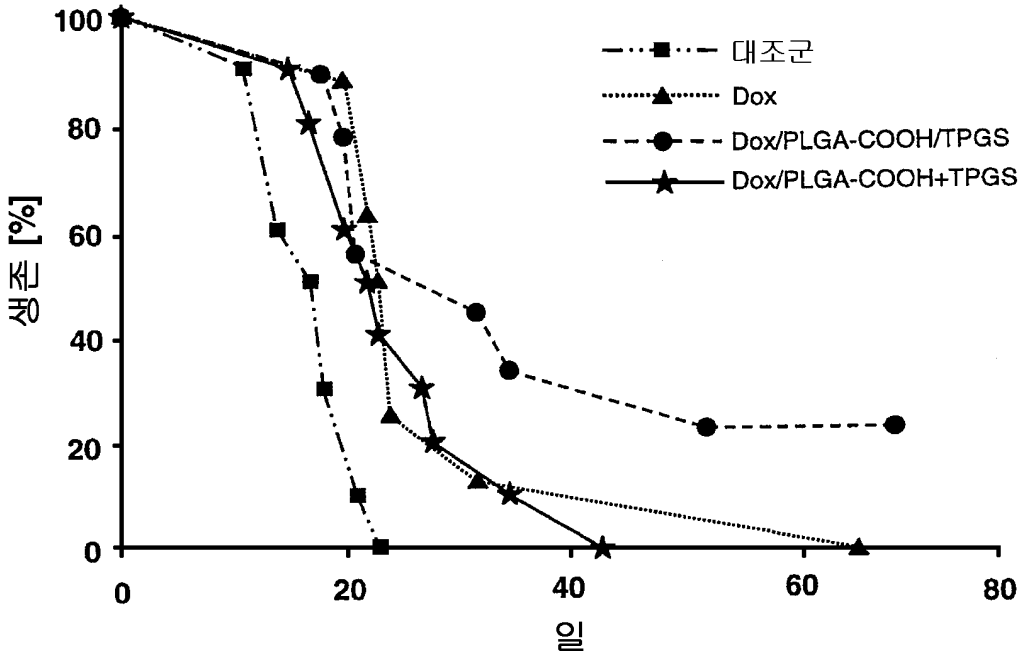
<25> 도 2는 독소루비신 및 TPGS를 포함하는 다양한 나노입자 제제로의 화학요법 후 두개의 101/8 교모세포종을 보유하는 랫트의 생존을 나타내는 그래프를 도시한다.

도면

도면1


100
80
60
40
20
0
생존 [%]
0
10
20
30
40
50
60
70
일
대조군
Dox
Dox-PLGA
Dox/F68
Dox-PLGA/F68

도면2


100
80
60
40
20
0
생존 [%]
0
20
40
60
80
일
대조군
Dox
Dox/PLGA-COOH/TPGS
Dox/PLGA-COOH+TPGS