(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0063790
(43) 공개일자 2023년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 9/51* (2006.01) *A61K 31/675* (2006.01)
*A61K 47/14* (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
*A61P 31/12* (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 9/5123* (2013.01)
*A61K 31/675* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0149223
(22) 출원일자 2021년11월02일
심사청구일자 2021년11월02일

(71) 출원인
**충남대학교산학협력단**
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
**한국화학연구원**
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
**조정원**
세종특별자치시 시청대로 236, 316-1101(소담동, 새샘마을3단지)
**전우진**
전라남도 해남군 해남읍 구교3길 36-15, 205동 1401호(해남파크사이드 2차 아파트)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인 공간**

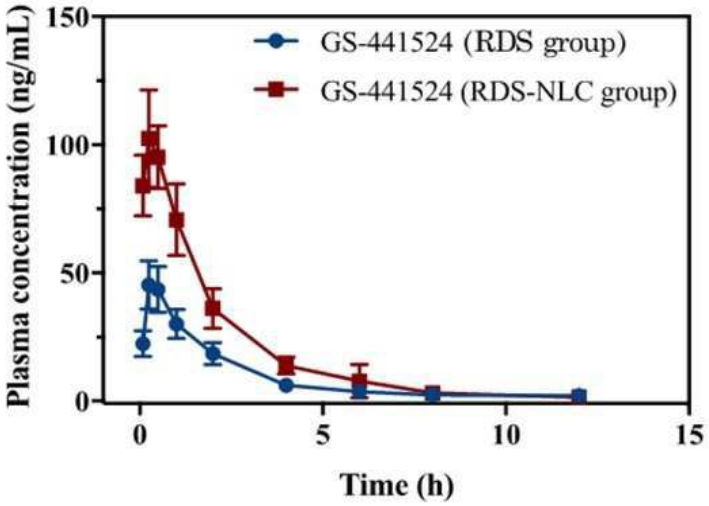
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **렘데시비르를 함유하는 나노지질담체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 렘데시비르, 고체지질, 액체지질 및 계면 활성제를 포함하고, 렘데시비르를 포함하며 고체지질과 액체지질이 혼합된 중심부에, 계면활성제가 외부를 이루는 입자 형태를 갖는 나노지질담체에 관한 것으로서, 렘데시비르의 난용성을 개선하고 생체 이용률을 증가시키는 효과가 있다.

*대 표 도* - 도10



(52) CPC특허분류
*A61K 47/14* (2013.01)
*A61K 9/0019* (2013.01)
*A61P 31/12* (2018.01)
*A61P 31/14* (2018.01)
(72) 발명자
**이홍기**
대전광역시 유성구 엑스포로123번길 34, 101동 304호(도룡동, 도룡코아루스마트리치오피스텔)
**신진수**
대전광역시 유성구 가정로 141, 한국화학연구원
**정은혜**
대전광역시 유성구 가정로 141, 한국화학연구원

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

활성성분으로서 렘데시비르, 고체지질로서 글리세롤모노스테아레이트, 액체지질로서 카프릴릭/카프릴산 글리세라이드, 및 계면활성제로서 폴리옥시에틸렌스테아레이트를 포함하는 나노지질담체.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 나노지질담체는 고체지질과 액체지질이 혼합된 중심부에 렘데시비르를 포함하고, 계면활성제가 외부를 이루는 형태인 것을 특징으로 하는 나노지질담체.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 나노지질담체에 포함된 렘데시비르가 무정형인 것을 특징으로 하는 나노지질담체.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 나노지질담체는 나노지질담체 총 중량 기준으로 활성성분 1~5 중량%, 고체지질 35~58 중량%, 액체지질 0~25 중량% 및 계면활성제 23~45 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노지질담체.

### 청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 기재된 나노지질담체의 제조 방법으로서,

(i) 렘데시비르, 고체지질, 및 액체지질을 75 내지 85℃로 가열하여 용해 및 혼합하여, 지질 혼합물을 제조하는 단계;

(ii) 계면활성제를 물에 녹인 용액을 상기 지질 혼합물과 동일한 온도로 가열하여, 계면활성제 용액을 제조하는 단계; 및

(iii) (i) 단계의 지질 혼합물을 (ii) 단계의 계면활성제 용액에 분산시켜 나노지질담체를 제조하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는, 나노지질담체의 제조방법.

### 청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 기재된 나노지질담체를 포함하는 항바이러스용 약학적 조성물.

### 청구항 7

제 6항에 있어서, 상기  바이러스는 코로나바이러스(coronavirus) 또는 필로바이러스(filovirus)인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학적 조성물.

### 청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 바이러스는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 에볼라바이러스(Ebola virus), 및 마버그바이러스(Marburg virus)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학적 조성물.

### 청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 주사제로 제형화된 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학적 조성물.

## 발명의 설명

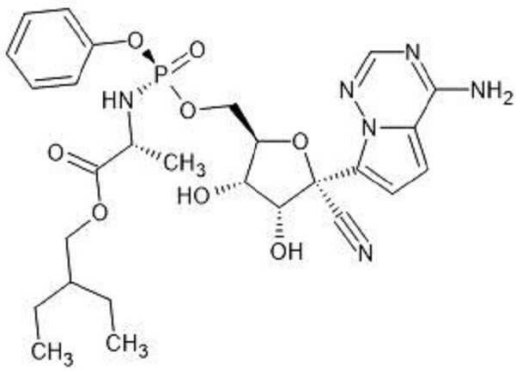
### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 렘데시비르를 함유하는 나노지질담체 및 이의 제조방법, 및 상기 나노지질담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 렘데시비르(Remdesivir)는 GS-441524에서 파생된 2-에틸부틸 (2S)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-아미노피롤로[2,1-f][1,2,4]트라이진-7-일)-5-시아노-3,4-디히드록시옥소란-2-일]메톡시-페녹시포스포릴]아미노]프로파노에이트(2-ethylbutyl (2S)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-cyano-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methoxy-phenoxyphosphoryl]amino]propanoate)로 명명되며, 하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이다.

### 화학식 1

[0003] 

[0004] 렘데시비르는 Veklury라는 상품명으로 시판되며, 다양한 RNA 바이러스에 대해 잠재적인 항바이러스 활성을 가진 아데노신삼인산 유사체의 전구 약물이다. 투여시 전구 약물인 렘데시비르는 활성 형태인 GS-441524로 대사된다. 이 GS-441524는 바이러스의 RNA-의존성 RNA 중합 효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)의 작용을 억제하여 RNA 전사의 종결을 초래하고 바이러스 RNA 생산을 감소시키는 약물이다. 주로 정맥주사 형태로 사용되고 있다.

[0005] 그러나, 렘데시비르는 logP 분배계수가 2.01로 소수성에 가까우며 물에 잘 녹지 않는 난용성 약물이다. 따라서 생체이용률이 낮아 이러한 활성 성분의 물성을 개선할 필요가 있다.

[0006] 기존에 시판되고 있는 렘데시비르의 정맥주사용 동결건조분말(Veklury inj)은 부형제로 설포부틸에테르-베타-사이클로덱스트린 나트륨(sulphobutyl ether β-cyclodextrin sodium)과 같은 사이클로덱스트린 유도체를 사용하여 렘데시비르의 난용성 문제를 해결하지만, 생체이용률의 상승을 극대화시키지 못하였고, 사이클로덱스트린은 고리형의 올리고당 분자로 주로 신장 배설되므로 신장에서의 축적으로 인해 신장애 및 간장애를 일으킬 수 있는 문제가 있어, 신장애 및 간장애를 앓고 있는 환자에게는 투여가 제한이 되거나 모니터링을 주기적으로 해야 하는 불편함이 있다.

[0007] 종래 특허기술로서 중국공개특허 112843073 A에는 소 파라인플루엔자 3형 바이러스(Bovine parainfluenza virus type 3, BPIV-3) 감염증 치료 약물의 제조에 이용되는 렘데시비르의 용도를 개시하면서, 렘데시비르 및 적어도 하나의 다른 비약물성분으로 구성된 조성물을 개시하고 있고, 한국등록특허 10-1822348 B1에는 필로비리다에(Filoviridae) 감염, 특히 에볼라바이러스 감염 및 마르부르크 바이러스 감염을 치료하는 방법 및 치료에 사용되는 화합물의 화학식과 전구 약물의 화학식이 기재되어 있다. 그러나, 이들 선행특허에는 렘데시비르 약물의 물성을 개선해 생체이용률을 높이는 방법은 개시되어 있지 않다.

[0008] 한국등록특허 10-2236174 B1에는 활성 물질인 에코나졸의 피부 투과도를 개선하고 지속적인 방출을 가능하게 하기 위해, 에코나졸, 고체지질, 액체지질 및 계면활성제를 포함하는 나노지질담체를 제조하고 이를 활용하여 피부에 국소 적용되는 필름형성 약제학적 조성물을 제조하는 점을 개시하고 있으나, 본 발명의 활성 성분인 렘데시비르의 난용성을 개선하고 생체이용률을 향상하는 데에 적합한 성분 조성, 또는 이를 포함하는 나노지질담체에 대해 제시하지 않고 있다.

[0009] 본 발명자들은 렘데시비르의 난용성을 개선하고 생체이용률을 향상할 수 있는 연구를 진행한 결과, 활성성분인

렘데시비르를 나노지질담체에 적용한 제형을 개발하였으며, 이러한 제형이 렘데시비르를 가용화하여 안정한 에멀젼 상태로 존재하게 해서 렘데시비르의 생체이용률을 향상할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-1822348 B1 (필로비리다에 바이러스 감염을 치료하는 방법, 2018. 01. 19. 공개)

(특허문헌 0002) 중국공개특허 112843073 A (Application of Remdesivir in preparation of anti-bovine parainfluenza virus type 3 medicine, 2021. 05. 28. 공개)

(특허문헌 0003) 한국등록특허 10-2236174 B1 (에코나졸을 함유하는 나노지질담체 및 이를 포함하는 필름형성 국소용 약제학적 조성물, 2021. 03. 30. 공개)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은, 렘데시비르의 난용성을 개선하여 생체이용률을 향상할 수 있는 나노지질담체(Nanostructured Lipid Carriers) 및 이를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은, 렘데시비르 함유 나노지질담체의 제조방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 활성성분으로 렘데시비르, 고체지질, 액체지질 및 계면활성제를 함유하는 나노지질담체에 관한 것이다.

[0014] 상기 나노지질담체에 있어서, 고체지질은 글리세롤모노스테아레이트인 것이 바람직하며, 상기 액체지질은 카프릴릭/카프릴산 글리세라이드인 것이 바람직하며, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌스테아레이트인 것이 바람직하다.

[0015] 상기 나노지질담체는, 렘데시비르를 포함하며 고체지질과 액체지질이 혼합된 중심부에, 계면활성제가 외부를 이루는 입자 형태를 갖는 것일 수 있다.

[0016] 상기 나노지질담체에 포함된 렘데시비르가 무정형인 것일 수 있다.

[0017] 상기 나노지질담체는 나노지질담체 총 중량 기준으로 활성성분 1~5 중량%, 고체지질 35~58 중량%, 액체지질 0~25 중량% 및 계면활성제 23~45 중량%를 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명은, 일 양태에 의하면, 나노지질담체의 제조 방법으로서,

[0019] (i) 렘데시비르, 고체지질, 및 액체지질을 75 내지 85℃로 가열하여 용해 및 혼합하여, 지질 혼합물을 제조하는 단계;

[0020] (ii) 계면활성제를 물에 녹인 용액을 상기 지질 혼합물과 동일한 온도로 가열하여, 계면활성제 용액을 제조하는 단계; 및

[0021] (iii) (i) 단계의 지질 혼합물을 (ii) 단계의 계면활성제 용액에 분산시켜 나노지질담체를 제조하는 단계;를 포함하는 제조방법에 관한 것이다.

[0022] 본 발명은, 일양태에 의하면, 상기 나노지질담체를 포함하는 항바이러스용 약학적 조성물에 관한 것이다. 상기 바이러스는 코로나바이러스(coronavirus) 또는 필로바이러스(filovirus)일 수 있고, 상기 바이러스는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 에볼라바이러스(Ebola virus), 및 마버그바이러스(Marburg virus)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0023] 상기 약학적 조성물은 주사제로 제형화된 것일 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명을 더 상세하게 설명한다.

[0025] 본 발명에서 나노지질담체란 활성성분인 렘데시비르를 포함하고 고체지질, 액체지질 및 계면활성제로 구성된 나노입자로서 활성 성분의 생체이용률을 개선하여 활성 성분의 효능을 높일 수 있도록 하는 조성물을 말한다.

[0026] 상기 나노지질담체는 총 중량 기준으로 활성성분 1~5 중량%, 고체지질 35~58 중량%, 액체지질 0~25 중량% 및 계면활성제 23~45 중량%가 혼합되는 것이 바람직하고, 활성성분 1~3 중량%, 고체지질 37~56 중량%, 액체지질 1~22 중량% 및 계면활성제 25~43 중량%가 혼합되는 것이 보다 바람직하고, 활성성분 1.5~2.5 중량%, 고체지질 38~43 중량%, 액체지질 13~20 중량% 및 계면활성제 36~42 중량%가 혼합되는 것이 가장 바람직하다.

[0027] 본 발명에서 고체지질은 녹는점 60℃ 이상인 지질류 또는 왁스류인 것을 특징으로 하며, 활성 성분인 렘데시비르에 대한 충분한 용해도를 갖는 약제학적으로 허용 가능한 고체지질을 사용할 수 있다. 상기 고체지질은 글리세롤모노스테아레이트인 것이 바람직하다.

[0028] 상기 고체지질의 함량이 나노지질담체의 총 중량을 기준으로 35 중량% 미만일 경우 렘데시비르의 봉입이 어려워 수상에 약물이 유출될 수 있으며, 58 중량%를 초과할 경우 지질이 수상에 균질하게 분산되지 않아 입자의 크기가 증가하여 침전이 발생할 수 있다. 따라서, 상기 고체지질은 나노지질담체의 총 중량 기준으로 35~58 중량%로 사용하는 것이 바람직하며, 37~56 중량%로 사용하는 것이 보다 바람직하며, 38~43 중량%로 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0029] 본 발명에서 액체지질은 용융된 고체지질과 혼합하여 약물을 고체지질 내 포함할 수 있도록 도와주며 활성 성분인 렘데시비르에 대한 높은 용해도를 갖는 약제학적으로 허용 가능한 액체지질을 사용할 수 있다. 상기 액체지질은 카프릴릭/카프릴산 글리세라이드(Capmul MCM)인 것이 바람직하다.

[0030] 상기 액체지질의 함량이 나노지질담체의 총 중량을 기준으로 25 중량%를 초과하는 경우 나노지질담체의 입자 크기가 증가하며 수상에 균질한 분산이 어렵게 된다. 따라서, 상기 액체지질은 나노지질담체의 총 중량 기준으로 0~25 중량%로 사용하는 것이 바람직하며, 1~22 중량% 사용하는 것이 보다 바람직하며, 13~20 중량%로 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0031] 본 발명에서 계면활성제는 고체 및 액체지질 혼합물이 수상에 분산될 때 지질상 주변을 계면활성제의 소수성기가 붙어 친수성기가 수상과 접촉함에 따라 수상에 안정한 상태로 분산되도록 한다. 생성된 나노지질담체의 침전을 막고 작고 균질한 입자를 유지할 수 있도록 한다. 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌스테아레이트(Myrj52)인 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명에서 나노지질담체의 총 중량기준으로 23 중량% 미만의 계면활성제 사용은 지질과 수상의 표면장력을 낮추지 못하여 나노지질담체가 안정하게 수상에 분산되지 못하고 응집이 발생하여 침전이 생길 수 있다. 45 중량% 초과의 계면활성제 사용은 활성 성분인 렘데시비르의 친수성을 증가시켜 나노지질담체 내 렘데시비르가 봉입되지 못하고 외부 수상으로 빠져나가 봉입률을 낮출 수 있다. 따라서, 상기 계면활성제는 나노지질담체의 총 중량 기준으로 23~45 중량%를 사용하는 것이 바람직하며, 25~43 중량%를 사용하는 것이 보다 바람직하며, 36~42 중량%로 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0033] 본 발명에 따른 나노지질담체(Nanostructured lipid carriers)는 렘데시비르의 난용성 문제를 해결하면서, 다른 나노기술 약물전달시스템과 비교해 약물 방출의 조절, 약물전달 효율 및 약물 안정화 효과가 우수한 것으로 확인되었다.

[0034] 본 발명은, 일양태에 의하면, 상기 렘데시비르 함유 나노지질담체를 포함하는 항바이러스용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0035] 본 발명은 바이러스의 RNA-의존성 RNA 중합 효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)의 작용을 억제하여 RNA 전사를 종결시키는 기전을 통해 다양한 RNA 바이러스에 대해 항바이러스 활성을 갖는다. 바람직하게는, RNA 바이러스로서 코로나바이러스 과(Coronaviridae family)에 속하는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV), 중동호흡기증후군 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 등의 코로나바이러스(coronavirus); 필로바이러스 과(Filoviridae family)에 속하는 에볼라 바이러스(Ebola virus), 마버그(마르부르크) 바이러스(Marburg virus) 등의 필로바이러스(filovirus) 등을 들 수 있다. 에볼라바이러스는 자이르 에볼라바이러스(Zaire ebolavirus), 수단 에볼라바이러

스(Sudan ebolavirus), 타이 포레스트 에볼라바이러스(Tai Forest ebolavirus), 분디부교 에볼라바이러스(Bundibugyo ebolavirus), 레스톤 에볼라바이러스(Reston ebolavirus)의 5종이 알려져 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0037] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 나노지질담체에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0038] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여를 위해 정맥, 근육, 피하, 복강내, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 주사제는 액체 형태뿐만 아니라 동결건조된 형태로 제제화될 수 있으며, 주사용제로서 멸균수, 생리식염수, 또는 포도당, 만니톨, 염화나트륨 등을 포함하는 등장 용액이 사용될 수 있다. 또한, 주사제는, 필요에 따라, 약학적으로 허용가능한 성분, 예컨대, 등장화제, 현탁제, 용해보조제, pH 조절제, 완충제, 무통화제, 보존제, 산화방지제 등을 추가로 적절히 포함할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 렘데시비르의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001-100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01-50 mg/kg/일이다. 예를 들어, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 1일 용량은 1-2000 mg, 바람직하게는 5-1000 mg의 범위일 수 있고, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

## 발명의 효과

[0041] 본 발명의 렘데시비르 함유 나노지질담체는 활성성분인 렘데시비르의 물에 대한 용해도를 개선하고 생체이용률을 향상시켜 효능을 높일 수 있는 효과가 있다. 효능이 높아짐에 따라 제조 시에 활성성분의 양을 낮추는 것도 가능하게 하며, 활성성분의 용량 최소화에 따라 용량에 의한 부작용을 감소시킬 수 있는 효과가 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 렘데시비르(RDS), 글리세롤모노스테아레이트(GMS), 폴리옥시에틸렌스테아레이트(Myrj 52), 실시예 5의 조성이되 렘데시비르 미함유 나노지질담체(Blank-NLC), 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체(RDS-NLC), 사용 첨가제의 물리적 혼합물(Physical mixture)의 시차 주사 열량 그래프이다.

도 2는 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체의 입자 형성을 확인한 투과전자현미경(Transmission electron microscopy, TEM) 사진이다.

도 3은 렘데시비르(RDS), 글리세롤모노스테아레이트(GMS), 폴리옥시에틸렌스테아레이트(Myrj 52), 실시예 5의 조성이되 렘데시비르 미함유 나노지질담체(Blank-NLC), 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체(RDS-NLC), 사용 첨가제의 물리적 혼합물(Physical mixture)에 대한 X-선 회절 분석 그래프이다.

도 4는 렘데시비르(RDS), 글리세롤모노스테아레이트(GMS), 폴리옥시에틸렌스테아레이트(Myrj 52), 실시예 5의 조성이되 렘데시비르 미함유 나노지질담체(Blank-NLC), 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체(RDS-NLC), 사용 첨가제의 물리적 혼합물(Physical mixture)의 적외선분광(표면반사) 그래프이다.

도 5(A) 및 도 5(B)는 각각 실시예 5(RDS-NLC) 및 렘데시비르(RDS)의 세포 독성 평가 결과이다.

도 6(A)는 실시예 5(RDS-NLC)와 비교예 1(RDS Suspension)의 시험관 내 용출 평가 그래프이고, 도 6(B)는 도 6(A)의 일부분을 도시한 그래프이다.

도 7은 실시예 5(RDS-NLC)와 렘데시비르(RDS)의 코로나바이러스 감염 세포에서의 효능 평가 결과로서, 코로나바이러스 감염 세포의 생존율 측정 결과(도 7(A)), 플라크 어세이 결과(도 7(B)) 및 RT-qPCR 분석 결과(도 7(C))를 나타낸다.

도 8은 최고 농도에서의 렘데시비르 크로마토그램이다.

도 9는 렘데시비르를 이용하여 LC-MS/MS 분석을 진행하기 위한 표준품 직선성 검사 그래프이다.

도 10은 실시예 5(RDS-NLC) 및 비교예 1(렘데시비르 현탁액, RDS)을 랫드에 정맥주사한 후 약동학적 파라미터를 비교한 그래프이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0043] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0044] **<실험예 1. 나노지질담체의 제조>**

[0045] **1-1. 실시예 1 내지 실시예 5의 나노지질담체, 및 비교예 1의 제조**

[0046] 약리활성성분으로서 렘데시비르를 사용하고 고체 지질과 액체 지질의 용량을 달리하여 하기 표 1에 기재된 조성에 따라 실시예 1 내지 실시예 5의 나노지질담체를 제조하였다. 즉, 실시예 1 내지 실시예 5의 제조를 위해, 먼저, 렘데시비르와 글리세릴모노스테아레이트, 카프릴릭/카프릴산 글리세라이드(Capmul MCM)를 정확하게 칭량하고 혼합하여 80℃로 녹였다. 그리고, 폴리옥시에틸렌스테아레이트(Myrj 52)를 정확하게 칭량하여 증류수에 녹인 용액을 첨가한 후 2분간 분산기를 이용하여 균질화하였다. 그 다음 5분간 프로브 타입 초음파 분쇄기로 균질화하여 나노지질담체를 제조하였다. 또한 비교예 1의 제조를 위해, 설포부틸에테르-베타-사이클로덱스트린 나트륨을 정확하게 칭량하여 증류수에 첨가한 후 녹였다. 그리고, 렘데시비르를 정확하게 칭량하여 첨가한 후 초음파 분쇄기를 이용하여 균질화하여 비교예 1을 제조하였다.

*표 1*

[0047]

| 성분 | 실시예 | | | | | 비교예 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 |
| | 함량 (mg) | | | | | |
| 렘데시비르 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 글리세릴모노스테아레이트 | 189 | 168 | 147 | 126 | 105 | - |
| 카프릴릭/카프릴산 글리세라이드 | 81 | 72 | 63 | 54 | 45 | - |
| 폴리옥시에틸렌스테아레이트 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | - |
| 설포부틸에테르-베타-사이클로덱스트린 나트륨 | - | - | - | - | - | 40 |
| 총 중량 | 375 | 345 | 315 | 285 | 255 | 45 |

[0048] **1-2. 실시예 1 내지 실시예 5의 입도 크기와 다분산도 분석 결과**

[0049] 상기와 같이 제조된 실시예 1 내지 5의 나노지질담체의 입도 크기와 다분산도를 평가하였다. 입도 크기와 다분산도는 electrophoretic laser scattering analyzer (ELS-Z, Otsuka Electronics, Osaka, Japan)을 사용하여 분석하였다. 실험 결과, 표 2에 나타낸 바와 같이, 실시예 1 내지 5의 경우 모두 평균 입도 200 nm이하이고, 입자 크기의 균질성을 나타내는 다분산도가 0.3 이하의 적합한 값이 나타났다.

*표 2*

[0050]

| 실시예 | 평균 입도 (nm) | 다분산도 | D50% (nm) |
|---|---|---|---|
| 실시예 1 | 184.5 | 0.222 | 197.8 |
| 실시예 2 | 152.6 | 0.201 | 161.7 |
| 실시예 3 | 139.2 | 0.213 | 146.6 |
| 실시예 4 | 133.6 | 0.213 | 144.2 |
| 실시예 5 | 117.0 | 0.198 | 124.2 |

[0051] 상기 D50%는 레이저 회절 입경 분포 측정에 의해 결정된 입자 크기 분포에서 측정된 부피의 50%에 상당하는 입도를 의미하는 것으로서, 실시예 1 내지 5는 모두 200 nm 이하의 값을 나타냈다.

[0052] 또한, 고체지질 및 액체지질의 사용량에 따라 나노지질담체의 특성이 많은 영향을 받았다. 실시예 1의 경우 가장 큰 184.5 nm의 평균 입도를 갖는 나노지질담체가 얻어진 반면, 실시예 5에서는 가장 작은 117.0 nm의 평균 입도를 갖는 나노지질담체가 형성되었다.

[0053] **<실험예 2. 최적화된 렘데시비르 나노지질담체 평가>**

[0054] 실험예 1을 통해 최적화된 조건으로서 실시예 5의 렘데시비르 나노지질담체를 제조하였다. 즉 고체지질 글리세롤모노스테아레이트 105 mg 및 액체지질 Capmul MCM 45 mg에 렘데시비르 5mg을 넣은 뒤 80℃로 가열하여 투명한 용액으로 만들었다. 100 mg의 Myrj 52를 정제수 10 mL에 녹인 후 80℃로 가열하였다. 지질과 약물의 혼합액에 가열된 계면활성제 용액 10 mL을 넣어준 뒤, 5분간 프로브 타입 초음파 분쇄기로 균질화하여 나노지질담체를 제조하였다. 제조된 나노지질담체를 동결건조하여 분말화하였다.

[0055] 다음 실험예에서 이 제제의 특성을 평가하였다.

[0056] **2-1. 시차 주사 열량 측정 (Differential scanning calorimetry, DSC)**

[0057] 렘데시비르 원료(RDS), 글리세롤모노스테아레이트(GMS), Mryj 52, 실시예 5의 조성이되 렘데시비르를 미함유한 나노지질담체(Blank-NLC), 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체(RDS-NLC) 및 capmul MCM을 제외한 사용된 모든 원료의 물리적 혼합물(Physical mixture)의 시차 주사 열량측정을 진행하였다.

[0058] 도 1의 실험 결과에서 확인되는 바와 같이, 렘데시비르 원료는 녹는점에 해당하는 약 150℃ 부근에서 흡열피크가 확인되었다. 글리세롤모노스테아레이트와 Myrj 52의 경우 각각의 흡열피크가 관찰되었으나 실시예 5의 나노지질담체에서는 무정형 또는 구조변화에 의해서 흡열피크가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 렘데시비르의 흡열피크 또한 나노지질담체 제조 후 무정형 형태 또는 다른 부형제와의 결합으로 인해 사라진 것을 확인할 수 있었다. 사용된 원료의 물리적 혼합물의 경우에도 렘데시비르의 흡열피크가 사라졌으나, 글리세롤모노스테아레이트와 Myrj 52의 피크는 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로, 렘데시비르와 부형제는 나노지질담체 제조과정 또는 혼합과정에서 렘데시비르의 나노지질담체 내 봉입 또는 각 부형제 간의 결합 및 결정형 변화로 흡열피크가 사라진 것으로 예상할 수 있다.

[0059] **2-2. 나노지질담체 형성 확인**

[0060] 본 발명에 따라 제조된 실시예 5의 나노지질담체 형성 확인은 투과전자현미경(Transmission electron microscope, Tecnai G2 F30, FEI company, Oregon, USA)으로 확인하였다. 그 결과, 도 2에 나타낸 것과 같이 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체가 입자 크기 150 nm 이하, 특히 100~130 nm의 구형 입자를 형성하는 것을 확인하였다.

[0061] **2-3. 나노지질담체의 X-선 회절분석 평가**

[0062] 본 발명에 따라 제조된 실시예 5의 나노지질담체의 X-선 회절분석은 X-선 회절분석기(Multipurpose X-ray Diffractometer, D8 ADVANCE, Bruker axs, Massachusetts, USA)로 분석하였다. 그 결과, 도 3에 나타낸 것과 같이 렘데시비르의 결정형 구조와 비교하였을 때, 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체에 있어서, 렘데시비르는 무정형으로 바뀐 것을 확인하였다.

[0063] **2-4. 나노지질담체의 적외선 분광(표면반사) 평가**

[0064] 본 발명에 따라 제조된 실시예 5의 IR에 대한 표면반사를 확인하기 위하여 적외선분광기(ALPHA-P, Bruker, Massachusetts, USA)를 이용하여 분석되었다. 그 결과, 도 4에서 나타난 것과 같이 구조 확인이 가능하였고, 활성 성분인 렘데시비르와 다른 첨가제 사이의 상호작용이 없고 나노지질담체에 잘 봉입되었다는 것을 확인하였다.

[0065] **2-5. 렘데시비르 함유 나노지질담체의 세포독성시험**

[0066] 본 발명에 따라 제조된 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체의 신장세포(Vero cell)에 대한 독성을 확인하기 위해 세포독성시험을 시행하였다.

[0067] <세포 배양>

[0068] Vero 세포는 Dulbecco modified Eagle medium(DMEM)에 10% 소태아혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신 (100 unit/mL 단위)을 넣은 배지에서 온도 37℃, $CO_2$ 5% 조건으로 배양한다.

[0069] <세포독성시험>

[0070] 시험 하루 전 1 X $10^4$개의 Vero 세포를 96 웰 플레이트의 각 웰에 5%의 소 태아 혈청이 포함된 DMEM에 부유시켜 배양하였다. 렘데시비르 함유 나노지질담체를 11 μM부터 5.1 nM 까지 3배수로 희석하여 하루 전 준비한 vero 세포에 처리하였으며, 대조군으로 렘데시비르를 사용하였다. 72시간 후 배양액을 제거하고, CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS, Promega) 시약을 3시간 처리한 후, SynergyTM H1 multi microplate reader (Biotek) 장비를 이용하여 O.D.(optical density)를 측정하고, 측정값을 이용하여 비처리 세포의 생존율을 100%로 환산하여 각 농도별 시료의 생존율을 계산하였다.

[0071] 렘데시비르 함유 나노지질담체의 세포독성은 7 μM수준이었고, 대조군으로 사용한 렘데시비르는 실험 농도 범위 내에서 독성이 관찰되지 않았다. 이를 통해 렘데시비르 함유 나노지질담체가 렘데시비르에 비해 1.6배 이상의 독성을 가지는 것을 확인하였다. 세포독성 시험 결과를 도 5에 나타내었다.

[0072] **2-6. 렘데시비르 함유 나노지질담체의 시험관 내 용출 평가**

[0073] 본 발명에 따라 제조된 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체의 시험관 내 용출 평가를 진행하기 위하여 비교예 1과 함께 시험을 진행하였다. 렘데시비르 2 mg에 해당하는 용량을 투석백에 넣고 pH 7.4의 PBS 용액 50ml에서 150 rpm으로 교반하면서 평가를 진행하였다. 투석백 투입 후 0.09, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48시간에 걸쳐 샘플링을 진행하였다. 그 결과, 도 6에서와 같이 pH 7.4의 Tween80 1 중량%가 혼합된 PBS 용액에서 실시예 5의 나노지질담체는 비교예 1과 비교하여 최종 용출률은 유사하면서, 속도 제어가 가능한 용출 프로파일을 나타내는 것을 확인하였다.

[0074] **2-7. 렘데시비르 함유 나노지질담체의 코로나바이러스 감염 세포에서의 효능 평가**

[0075] 코로나바이러스감염증-19(Coronavirus disease 2019, COVID-19)를 일으키는 코로나바이러스인 SARS-CoV-2를 감염시킨 세포에서, 본 발명에 따른 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체의 효능을 평가하기 위해 다음과 같이 실시하였다.

[0076] (1) 코로나바이러스 감염 세포의 생존율 평가 시험

[0077] 하루 전 신장세포(Vero cell)를 1 X $10^4$ 의 수로 96웰 플레이트 각 웰에 배양하였다. 100 μM부터 5 nM 까지 3배수로 희석한 렘데시비르 함유 나노지질담체(실시예 5, RDS-NLC)를 바이러스 감염 한 시간 전에 세포에 처리 후 0.1 MOI로 SARS-CoV-2를 감염시켰고, 대조군으로 렘데시비르를 DMSO에 녹인 용액을 희석하여 사용하였다.

[0078] 감염 후 72시간동안 배양 후 배양액을 제거하고, CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS, Promega) 시약을 3시간 처리한 후, SynergyTM H1 multi microplate reader (Biotek) 장비를 이용하여 세포의 생존율을 측정하고, 측정값을 이용하여 항바이러스 효능의 관측값을 계산하였다.

[0079] 도 7(A)에서와 같이, 렘데시비르 함유 나노지질담체의 코로나바이러스(SARS-CoV-2) 감염 세포에서의 $EC_{50}$는 0.16 μM이었으며, 대조군인 렘데시비르의 코로나바이러스(SARS-CoV-2) 감염 세포에서의 $EC_{50}$는 1.6 μM로 렘데시비르 함유 나노지질담체의 약효가 10배 더 높은 것으로 확인되었다.

[0080] (2) 플라크 어세이(plaque assay)

[0081] 배출되는 감염성 바이러스 수를 측정하기 위해 플라크 어세이(plaque assay)를 수행하였다. 하루 전 신장세포(Vero cell)를 1 X $10^6$ 의 수로 6웰 플레이트 각 웰에 배양하였다. 렘데시비르 나노지질담체를 0, 0.1, 0.3, 1 μM로 처리하고, 대조군인 렘데시비르를 0, 1, 3, 10 μM로 처리한 후, 1 MOI로 SARS-CoV-2를 감염시켰다. 24시간 후에 얻어진 상층액을 10배로 희석하여 하루 전 48웰 플레이트의 각 웰에 2 X $10^5$ 의 수로 접종하여 배양한 신장세포(Vero cell)에 한 시간 처리하고 나서, 오버레이 배지(overlay medium)로 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 배양액을 제거하고, 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 플라크(plaque)의 수를 산출하였다.

[0082] 도 7(B)에서와 같이, 렘데시비르 함유 나노지질담체를 0.1, 0.3, 1.0 μM로 처리한 코로나바이러스(SARS-CoV-2) 감염세포에서 배출되는 감염성 바이러스의 수를 플라크 어세이(plauqe assay)로 측정한 결과, 1.0 μM에서는 전혀 검출이 되지 않았으며, 0.3 μM과 0.1 μM에서 바이러스군 대비 감소한 바이러스 배출을 관찰하였다. 대조군인 렘데시비르를 1, 3, 10 μM로 처리한 코로나바이러스(SARS-CoV-2) 감염세포에서 배출되는 감염성 바이러스의 수는 10 μM에서 검출되지 않았으나, 3 μM과 1 μM에서는 감소된 바이러스 배출을 관찰하여, 렘데시비르 함유 나노지질담체가 대조군의 렘데시비르 보다 낮은 농도에서 감염성 바이러스 배출을 억제함을 관찰하였다.

[0083] (3) RT-qPCR(Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction) 분석

[0084] 코로나바이러스(SARS-CoV-2) 감염세포에서 생성되는 바이러스 유래의 Spike 유전자의 발현 정도를 측정하기 위해 RT-qPCR를 다음과 같이 실시하였다. 하루 전 신장세포(Vero cell)를 1 X $10^6$ 의 수로 6웰 플레이트 각 웰에 배양하였다. 렘데시비르 나노지질담체를 0, 0.1, 0.3, 1 μM로 처리하고, 대조군인 렘데시비르를 0, 1, 3, 10 μM로 처리한 후, 1 MOI로 SARS-CoV-2를 감염시켰다. 24시간 후에 얻어진 각 세포에서 RNA를 추출하여, SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step RT-PCR kit(Invitrogen, USA)를 이용하여 바이러스 spike 유전자(S gene)와 대조군으로 β-actin을 사용하여 RT-qPCR를 수행하였다.

[0085] RT-qPCR 분석 결과는 도 7(C)에 나타내었다. 렘데시비르 나노지질담체를 0.1, 0.3, 1.0 μM로 처리한 코로나바이러스(SARS-CoV-2) 감염세포에 있어서, spike 유전자가 1 μM에서는 전혀 발현되지 않았고 0.3 μM에서는 매우 미미한 수준으로 발현되었으며, 0.1 μM에서는 바이러스만 처리한 경우 대비 약간 감소한 수준으로 spike 유전자가 발현되었다. 대조군으로서 렘데시비르를 1, 3, 10 μM로 처리한 코로나바이러스(SARS-CoV-2) 감염세포에 있어서, 10 μM과 3μM 에서는 spike 유전자가 전혀 발현되지 않았고, 1 μM에서는 약간 감소한 수준의 spike 유전자가 발현되어, 렘데시비르 나노지질담체가 대조군의 렘데시비르 보다 낮은 농도에서 바이러스 유전자의 생성을 억제하는 것으로 확인되었다.

[0086] 이처럼 본 발명에 따른 렘데시비르 함유 나노지질담체는 렘데시비르의 난용성을 개선하여 낮은 농도로도 우수한 항바이러스 활성을 나타내는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0087] **2-8. 렘데시비르 함유 나노지질담체의 약물동태학적 평가**

[0088] 본 발명에 따른 렘데시비르 함유 나노지질담체의 약물동태학적 평가를 위해 시험을 다음과 같이 실시하였다. 실험동물로 랫드를 실험군 및 대조군 당 각 6마리씩 사용하였으며, 이들을 우리 속에서 동일한 조건으로 4일 이상 일정량의 통상적인 고체사료 및 물을 공급하면서 사육하였다. 랫드를 12시간 이상 절식시킨 후 실험에 사용하였으며, 절식 시에는 물을 자유롭게 마실 수 있게 하였다.

[0089] 실험군에는 본 발명의 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체를 동결건조하여 2 mg/mL의 농도가 되도록 농축하고 생리식염수에 현탁하여 주사하였고, 대조군에는 비교예 1의 렘데시비르 현탁액을 렘데시비르를 설포부틸에테르-베타-사이클로덱스트린 나트륨 수용액에 2 mg/mL의 농도로 제조하여 주사하였다. 모든 그룹에 렘데시비르 10 mg/kg에 해당하는 용량을 정맥 주사하였다.

[0090] <약동학적 파라미터 측정 결과>

[0091] 랫드에 정맥 투여 후 0.09, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12시간마다 약 0.5 mL의 혈액을 안와정맥을 통해 얻었다. 얻은 시료를 15,000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 취한 뒤, HPLC-MS/MS 분석 전까지 -20℃에서 보관했다. 다음 표 3과 표 4는 활성성분인 렘데시비르의 활성 대사체인 GS-441524를 분석하기 위한 조건이다. 또한, 다음 분석조건의 부분적인 밸리데이션을 위해 표준물질의 3회 반복 분석 결과를 도 8과 도 9에 나타내었다.

*표 3*

[0092]

| GS-441524의 HPLC-MS/MS 분석법 | |
|---|---|
| 컬럼 | Kinetex® 2.6 μm XB-C18 100Å column (50 × 2.1 mm, 2.6 μm; Phenomenex, California, USA) |
| 이동상 | 5 mM 암모늄 아세테이트 수용액 : 메탄올 |
| 주입량 | 2 μL |
| 유속 | 0.4 mL/min |
| m/z | 291.2 → 200.2 |
| 컬럼 온도 (℃) | 40 |
| collision energy (eV) | 19 |

| | |
|---|---|
| Gas temperature (℃) | 290 |
| Gas flow rate (L/min) | 11 |
| Nebulizer pressure(psi) | 40 |

표 4

[0093]

| 시간 (min) | 이동상 A (%) | 이동상 B (%) | 유속 (mL/min) |
|---|---|---|---|
| 0.00 | 100 | 0 | 0.400 |
| 0.30 | 100 | 0 | |
| 2.30 | 40 | 60 | |
| 2.40 | 30 | 70 | |
| 3.30 | 30 | 70 | |
| 3.32 | 100 | 0 | |
| 4.30 | 100 | 0 | |

[0094] 실시예 5의 렘데시비르 함유 나노지질담체의 혈장 렘데시비르 농도 대 시간 프로파일의 주요 약동학 파라미터를 하기 표 5와 도 10에 나타내었다.

표 5

[0095]

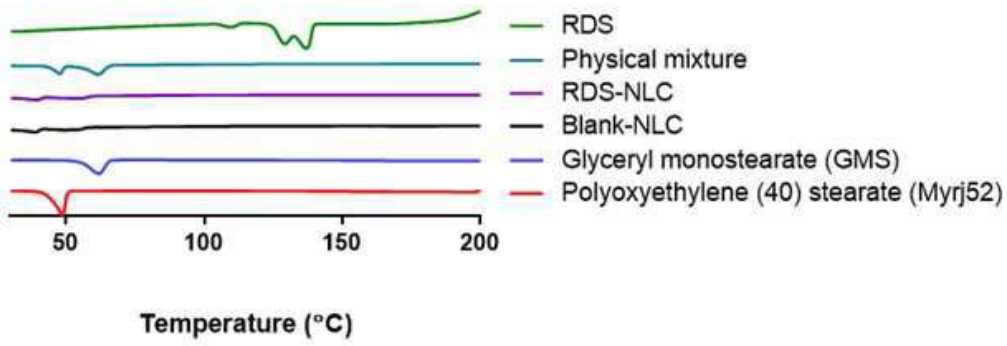
| 렛드에 정맥주사 후 약동학적 파라미터 | | |
|---|---|---|
| 약동학적 파라미터 | 대조군<br>(비교예 1) | 실험군<br>(본 발명의 실시예 5) |
| $T_{1/2}$lz (hr) | 4.04 ± 2.92 | 3.07 ± 1.31 |
| $T_{max}$ (hr) | 0.33 ± 0.13 | 0.22 ± 0.07 |
| $C_{max}$ (ng/mL) | 46.32 ± 8.68 | 104.53 ± 17.68*** |
| $AUC_{0-24}$ (hr*ng/mL) | 111.91 ± 16.89 | 234.77 ± 33.79*** |
| V/F (L/kg) | 452.78 ± 277.88 | 192.12 ± 102.10 |
| Cl/F (L/hr/kg) | 81.83 ± 54.56 | 41.99 ± 5.62*** |
| ***P<0.001 | | |

[0096] 표 5 및 도 10에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 실시예 5의 $AUC_{0-24}$는 비교예 1과 비교하여 약 210% 증가하고 Cmax 또한 226% 증가하여 생체이용률이 향상되는 것으로 확인되었다.

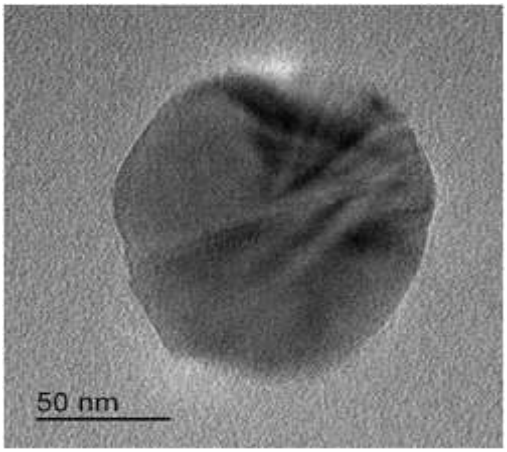
[0097] 이처럼 본 발명의 렘데시비르 함유 나노지질담체는 렘데시비르의 난용성 문제를 해결하면서도 생체이용률의 상승을 극대화해서 활성성분의 용량을 줄일 수 있고, 신장 축적으로 인해 신장애 및 간장애를 유발할 수 있는 사이클로덱스트린을 사용하지 않으므로, 부작용을 감소시킬 수 있다.

## 도면

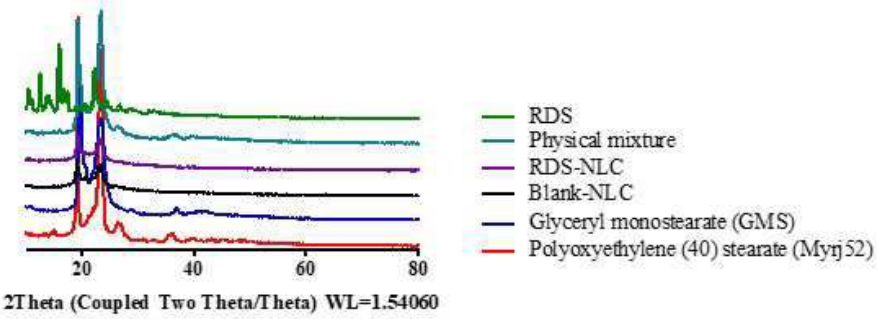
### 도면1



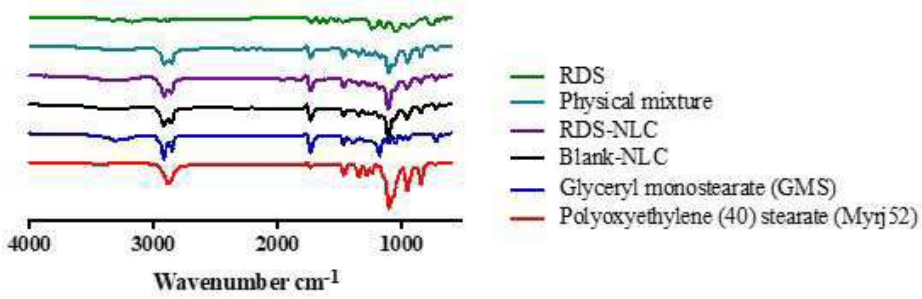
도면2



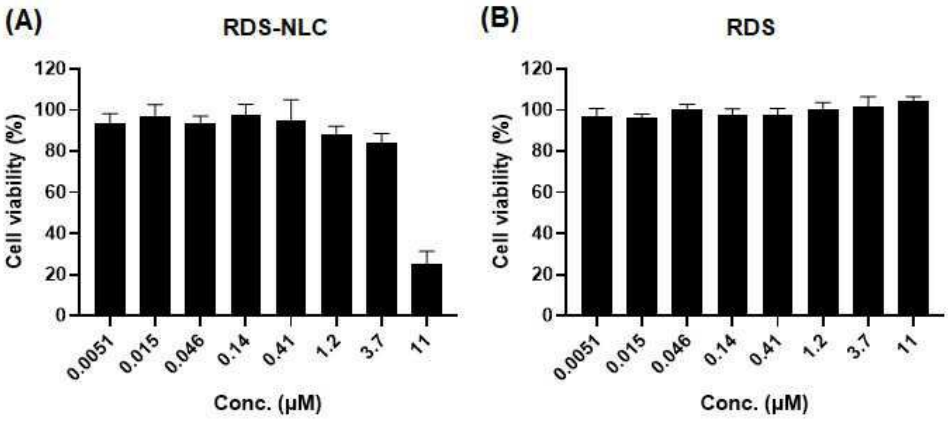

도면3



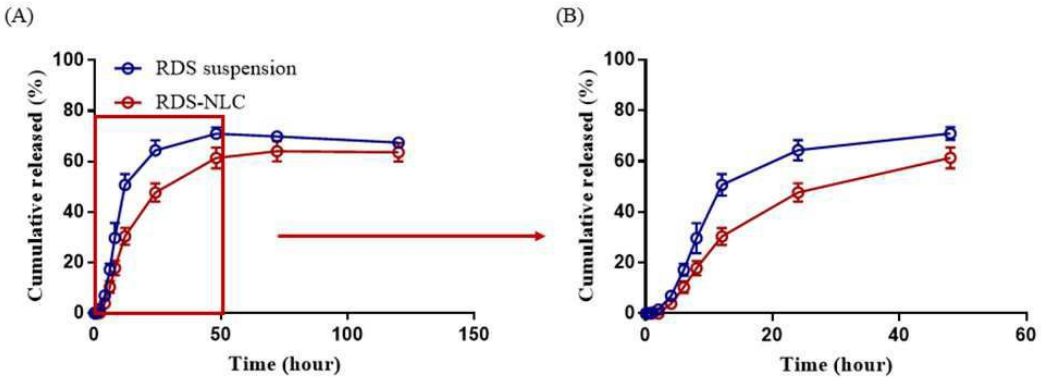

도면4



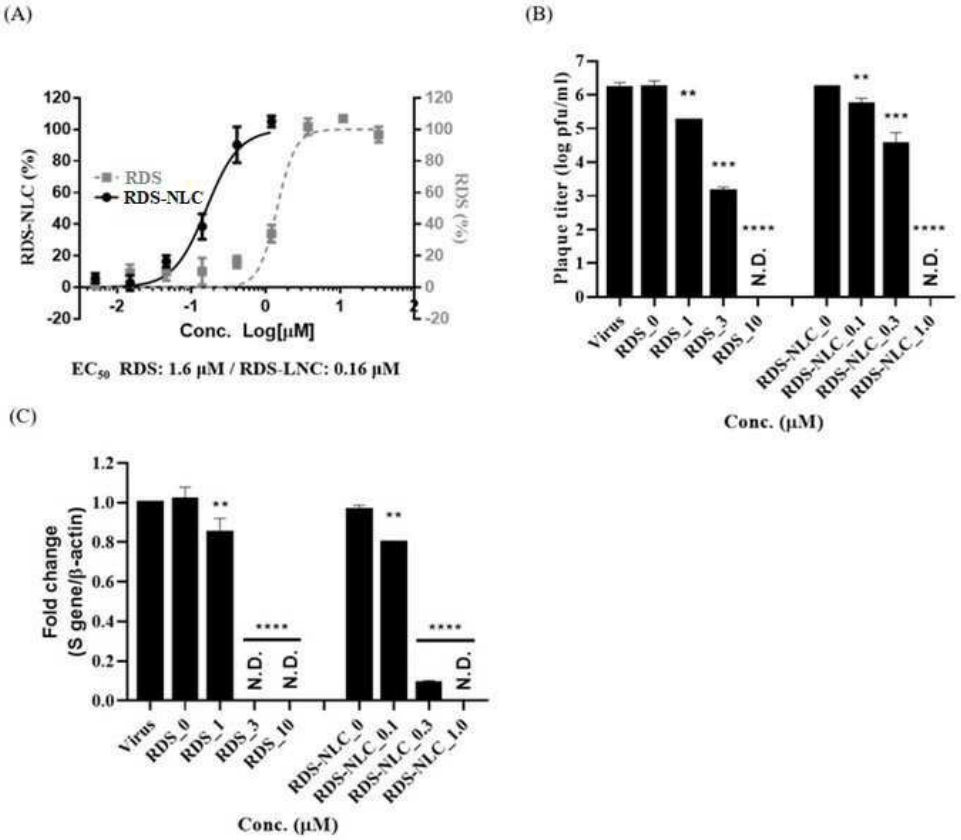

도면5



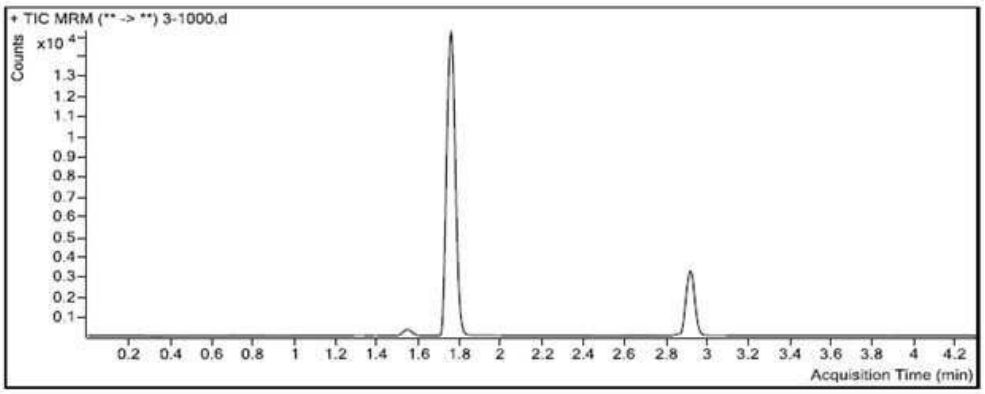
도면6


(A)
(B)
RDS suspension
RDS-NLC
Cumulative released (%)
Time (hour)

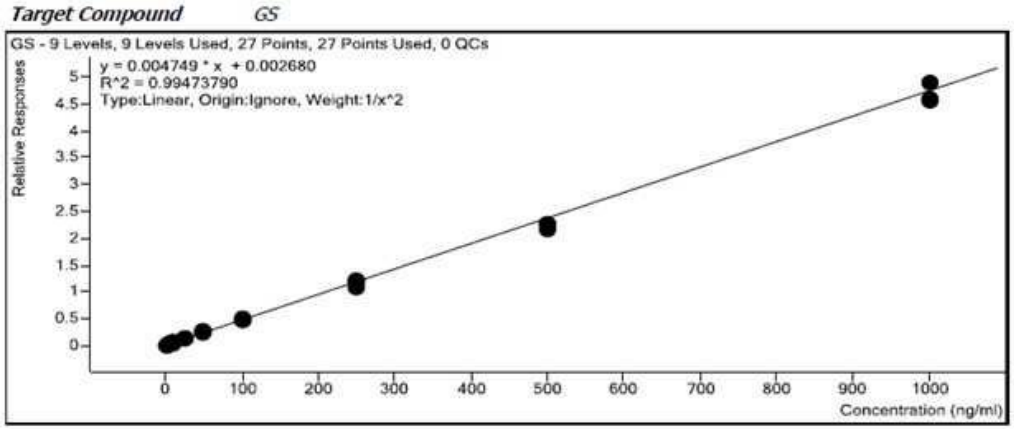
도면7


(A)
RDS
RDS-NLC
RDS-NLC (%)
RDS (%)
Conc. Log[μM]
EC50 RDS: 1.6 μM / RDS-LNC: 0.16 μM
(B)
Plaque titer (log pfu/ml)
Virus
RDS_0
RDS_1
RDS_3
RDS_10
RDS-NLC_0
RDS-NLC_0.1
RDS-NLC_0.3
RDS-NLC_1.0
N.D.
Conc. (μM)
(C)
Fold change (S gene/β-actin)
Conc. (μM)

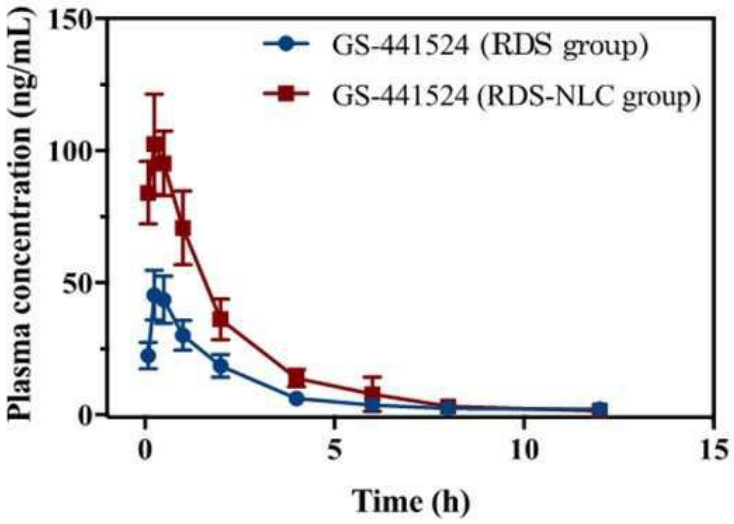
도면8


+ TIC MRM (** -> **) 3-1000.d
Counts
x10 4
Acquisition Time (min)

도면9


Target Compound GS
GS - 9 Levels, 9 Levels Used, 27 Points, 27 Points Used, 0 QCs
y = 0.004749 * x + 0.002680
R^2 = 0.99473790
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x^2
Relative Responses
Concentration (ng/ml)

도면10


GS-441524 (RDS group)
GS-441524 (RDS-NLC group)
Plasma concentration (ng/mL)
Time (h)