



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월29일  
(11) 등록번호 10-2245421  
(24) 등록일자 2021년04월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 9/5115 (2013.01)  
A61K 31/704 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7036985
- (22) 출원일자(국제) 2014년05월30일  
심사청구일자 2019년05월13일
- (85) 번역문제출일자 2015년12월29일
- (65) 공개번호 10-2016-0013212
- (43) 공개일자 2016년02월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2014/061296
- (87) 국제공개번호 WO 2014/191569  
국제공개일자 2014년12월04일
- (30) 우선권주장  
13305712.5 2013년05월30일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
61/828,794 2013년05월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2005086639 A2\*  
R.L. Souhami et al. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA  
ACTA (1981) Vol.674, pp.354-371\*  
WO2009081287 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
큐라디즘  
프랑스 75012 파리 튀 드 와띠니 60
- (72) 발명자  
뽀띠에, 아그네스  
프랑스공화국, 에프-75006 빠리, 튀 생뜨-비브 6  
레비, 로랭  
프랑스공화국, 에프-75014 빠리, 불르바르 라스빠  
이 246  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 11 항

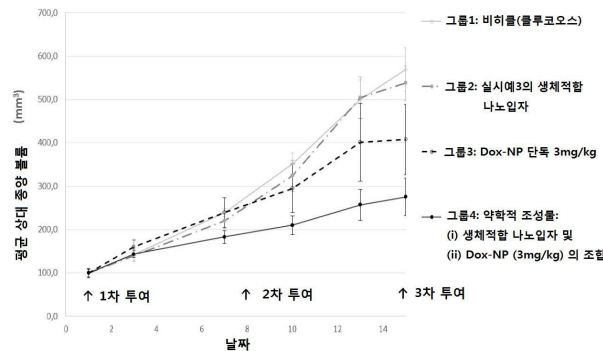
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 **약학적 조성물, 이의 제조방법 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 (i) 생체적합 나노입자 및 (ii) 목적하는 약학적 화합물의 조합을 포함하고 상기 목적하는 화합물을 필요로하는 개체 내에 투여되는, 약학적 조성물로서, 나노입자가 목적하는 화합물의 효율을 상승시키는 약학적 조성물에 관한 것이다. 생체적합 나노입자의 장축은 일반적으로 약 4 내지 약 500 nm 이고, 이의 절대적 표면 전 (뒷면에 계속)

대표도 - 도3



하 수치는 적어도 10 mV (|10 mV|)이다. 본 발명은 또한 목적하는 화합물을 필요로 하는 개체 내로, 목적하는 화합물을 투여하기 위한 이러한 조성물에 관한 것으로, 나노입자 및 목적하는 화합물은 어느 하나가 다른 하나로부터 약 5분 초과 내지 약 72시간 의 간격으로 상기 개체 내에 투여되기 위한 조성물이다.

(52) CPC특허분류

**A61K 9/1271** (2013.01)

(72) 발명자

**메이흐, 마리-에디트**

프랑스공화국, 에프-75012 파리, 불르바르 술 65

**다르몽, 오드레**

프랑스공화국, 에프-94140 알포르빌, 뤼 앙드레 술  
라디에 5

**제르맹, 마티유**

프랑스공화국, 에프-94500 샴페니 쉬르 마르느, 앙  
트레 4, 아브뉴 마르쓰 도르무와 3

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

암을, 또는 심혈관 질환, 중추신경계(CNS) 질환, 위장관 질환, 유전적 장애, 혈액 장애, 호르몬 장애, 면역 장애, 감염성 질환, 대사성 장애, 근골격 장애, 호흡기 질환, 또는 독성학적 장애를 이를 필요로하는 개체에서 치료하는 치료적 방법에 사용하기 위한, (i) 유기 생체적합 나노입자 및 (ii) 목적하는 약학적 화합물이 조합된 약학적 조성물로서,

상기 유기 생체적합 나노입자가 지질-기초 나노입자이고, 상기 생체적합 나노입자의 장축(longest dimension)이 4nm 내지 500nm이고, 상기 생체적합 나노입자의 표면 전하 수치(surface charge value)가 음(negative)이고 -10 mV 이하이며, 상기 치료적 방법이 목적하는 약학적 화합물을 개체내에 투여하는 단계와 생체적합 나노입자를 투여하는 별도의 단계를 포함하며, 상기 생체적합 나노입자는 목적하는 약학적 화합물의 투여 5분 내지 72시간 전에 투여되는 것인, 약학적 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

상기 나노입자는 생체적합 코팅으로 추가로 커버되는, 약학적 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서,

생체적합 나노입자 및 화합물의 조합된 투여는, 개체에 대하여, 상기 화합물의 표준 치료 용량에 의해서 유도되는 치료상 이점(therapeutic benefit) 및 독성과 비교할 때, 감소된 독성에 대하여 화합물의 치료상 이점을 유지하거나, 또는 동등하거나 또는 감소된 독성에 대하여 화합물의 치료상 이점을 증가시키는, 약학적 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서,

생체적합 나노입자 및 화합물의 조합된 투여는, 개체에 동등하거나 또는 감소된 독성에 대하여 동일한 치료상 이점을 유지하거나 또는 개체에 동등하거나 또는 감소된 독성에 대하여 치료상 이점을 상승시키는 반면에 상기 화합물의 표준 치료 용량과 비교할 때 투여된 화합물의 치료 용량의 적어도 10%의 감소를 허용하는, 약학적 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서,

상기 나노입자는, 제1항에서 언급된 목적하는 약학적 화합물을 필요로 하는 개체로의 투여 후 1시간 내지 6주 내로 투여받은 개체로부터 제거되는, 약학적 조성물.

**청구항 6**

제1항에 있어서,

상기 목적하는 약학적 화합물은 유기 화합물인, 약학적 조성물.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

상기 유기 화합물은, 생물학적 화합물, 저분자 표적 치료제 (small molecule targeted therapeutic), 및 세포 독성 화합물로부터 선택되는, 약학적 조성물.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 유기 화합물은 항체, 올리고뉴클레오티드, 및 합성 펩타이드로부터 선택되는, 약학적 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

상기 목적하는 약학적 화합물은 금속성 나노입자, 금속 산화물 나노입자, 금속 황화물 나노입자 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 무기화합물인, 약학적 조성물.

**청구항 10**

제1항에 있어서,

상기 목적하는 약학적 화합물은 캐리어(carrier) 내에 캡슐화되는(encapsulated), 약학적 조성물.

**청구항 11**

제1항에 있어서,

상기 목적하는 약학적 화합물은 캐리어(carrier)에 결합되는, 약학적 조성물.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 본 발명은 목적하는 화합물을 필요로 하는 개체에 투여되기 위한, (i) 생체적합 나노입자 및 (ii) 목적하는 화합물의 조합을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 나노입자가 상기 화합물의 효율(efficiency)을 향상시키는 조성물에 관한 것이다. 생체적합 나노입자의 장축(longest dimension)은 통상적으로 약 4 내지 약 500 nm이고, 이의 절대적 표면 전하 수치는 적어도 10 mV(|10 mV|)이다.
- [0002] 본 발명은 또한 목적하는 화합물을 필요로 하는 개체에 이를 투여하기 위한 조성물에 관한 것으로, 나노입자 및 목적하는 화합물이 상기 개체에 연속적으로, 일반적으로 어느 하나가 다른 하나로부터 5분 초과 내지 약 72시간 사이의 간격으로 투여되는 조성물에 관한 것이다.
- [0003] 개체에 대한, 생체적합 나노입자 및 목적하는 화합물의 조합 및 일반적으로 연속적인 투여는, 표준의 약학적 용량으로 투여될 때 상기 화합물에 의해 유도된 약학적인 이익 및 독성과 비교할 때, 상기 개체의 감소된 독성에 대하여 목적하는 화합물의 약학적인(즉, 치료적, 예방적 또는 진단적) 이익을 유지하거나, 또는 동등하거나 또는 감소된 독성에 대하여 약학적인 이익을 증가시킨다.

[0004] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화합물의 표준의 약학적 용량과 비교할 때, 일반적으로 투여된 화합물 약학적 용량의 적어도 10%의 감소를 허용하고, 반면에 개체에 동등한 독성, 바람직하게는 감소된 독성 대비 동일한 약학적 이익을 유지하거나 또는 개체에 동등하거나 또는 감소된 독성 대비 약학적 이익을 증가시킨다.

**배경 기술**

[0005] 안전성 및 효과를 확보하기 위해, 약학적 화합물은 그들의 타겟 사이트에 이를 필요로 하는 개체 내에 최상의 속도로 선택적으로 도달되기가 요구된다.

[0006] 약물 동력학(Pharmacokinetics: pK)은 살아있는 개체 내에 외부에서 투여된 물질(substance)의 운명을 확인하는 약리학(pharmacology)의 일 분지이다. 이러한 확인(determination)은 충분히 긴 시간 동안, 바람직하게는 화합물이 제거될 때까지 모든 주요 조직들의 화합물의 농도를 측정하는 단계를 포함한다. 약동학은 개체 내에서의 화학적 변화뿐 아니라 흡수 및 분포의 메커니즘을 포함하여 효율적으로 화합물의 인 비보(in vivo)적 거동을 설명하는데 필요하다. 혈중 pK 프로파일은 몸이 화합물을 어떻게 다루게 되는지를 정량적으로 설명하는 핵심 pK 파라미터들을 얻기 위해 다양한 프로그램을 사용하여 맞춰질 수 있다. 중요 파라미터들은 최대 혈중 농도( $C_{max}$ ), 반감기( $t_{1/2}$ ), 클리어런스, 곡선 하 면적(AUC), 및 평균 잔류 시간(MRT), 즉 화합물이 개체 내 머무르는 동안의 평균 시간을 포함한다. 약물 제형의 연장된 혈중 순환이 관찰되는 경우, 이는 보통 향상된 반감기( $t_{1/2}$ ), 감소된 클리어런스, 향상된 AUC 및 향상된 MRT와 관련된다. pK 데이터는 최소한의 부작용으로 치료적 효율을 증대시키기 위해 바람직한 혈중 농도를 유지하는 최상의 용량 및 처방을 결정하는데 종종 사용된다. 또한, 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 화합물의 혈중 농도는 대부분의 경우, 일반적으로 프리 드럭(free drug)의 경우, 이의 효율 및 독성 둘 다와 관련된다.

[0007] 예방 및 치료 화합물의 이화학적 특성은 생체 내에서 그들의 약동학적 특성 및 대사 속도에 큰 영향을 미친다. 따라서, 적당한 이화학적 성질의 선택은 이러한 화합물을 디자인함에 있어 핵심적이다. 하지만, 화합물이 개체 자체에 의해 항상 내부적으로 제공되지 않고 일반적으로 외부적으로 투여되기 때문에 이들의 목적하는 약물학적 작용에 맞게, 바람직하게는 이를 최적화 하도록 약물의 생체 분포 프로파일은 최적화되어야 한다.

[0008] 타겟 사이트로의 화합물의 전달을 최적화하기 위한 몇몇 접근이 진행되었다. 한 전략은 화합물이 반감기를 연장하는 은밀한 특성이 있도록, 그리고 결과적으로 이의 타겟 사이트 내 축적을 향상시키도록 약학적 화합물을 디자인하는 것이다. 하나의 유리한 접근은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 치료 화합물에 공유결합시켜 순환하는 화합물의 인 비보 반감기를 증가시키는 것으로 인 비보 반감기 증가 레벨은 화합물의 성질, 코팅의 특성에 따라 부분적으로 변화된다. 또한, 리포솜, 에멀전 또는 미셀과 같은 약물 캐리어들은 개체의 몸 내에서 그들의 생체 분포 프로파일을 변형시킴으로써 약물의 치료 효율을 향상시키도록 개발되어져 왔다.

[0009] 하지만, 치료화합물의 생체 분포의 선택성의 결여가 문제로 남아있다. 지금까지는 나쁜 동력학적 특성 및 높은 독성이 치료화합물의 개발의 실패의 중요한 원인들이었다.

[0010] 예로, 암 치료에서, 암세포를 사멸시키기 위해 몸의 필수적인 기능을 의도적으로 억제하는 것은 정상 세포 내에서 타겟에 따른 또는 메커니즘에 따른 독성을 유발시켜왔고, 가능한 치료적 윈도우(therapeutic window)를 찾기 위해 의사들은 용량-반응 및 치료적 화합물의 암과 정상 조직 사이의 분포의 차이점에 의존해야 했다. 흥미롭게도, 간독성은 간 내에서 약물-유도 세포 손상의 직접 및 간접 메커니즘에 의해 의약품 개발 및 임상적 사용에서 의약품을 철회하는 주요 이유로 남아있다.

[0011] 나노입자 화합물에 대해 제안된 하나의 접근은 유인형 캐리어를 미리-주입하여 세망내피계 시스템(reticuloendothelial system: RES)의 식세포적 능력(phagocytic capacity)을 감소, 포화 또는 심지어 비활성화시키는 것이다 [Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 11(1):31-59 1994]. 또한 손상 또는 억제(blockade)는 오폐소닌(opsonic) 분자의 감소된 플라즈마 레벨과 관련될 수 있다. 테스트 입자의 투여 전 특정 제제(agent), 예를 들어 지방산의 알킬에스테르, 텍스트란 설페이트, 히토류족 원소의 염(예를 들어 GdCl3), 약물 캐리어, 속이 빈 또는 캡슐화하는 클로드로네이트의 정맥 투여는 쿠퍼셀(kupffer cell) 흡수(uptake)의 완화된 또는 드라마틱한 감소를 유도함이 밝혀져 왔다.

[0012] 예를 들어, "Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors" [PNAS 2007]의 저자는 그들의 나노입자인 "CREKA-SPIO"의 클리어런스에 대한 RES의 역할에 관해 발표하였다. 첫 번째 연구에 따르면, 정맥 주사된 "CREKA-SPIO" 나노입자는 효율적으로 MDA-MB-435 유방암 이종이식체에 축적되지 않았다. 반면, 높은 농도의 입자들이 RES 조직에서 관찰되었다. 리포솜의 클로드로네이트를 이용하여 RES 매크로파지를 고갈시켰을 때,

입자의 반감기가 5배 연장됨이 관찰되었다. 하지만, 클로드로네이트 제제는 간과 신장의 마크로파지의 자기사멸을 유도하고, 마크로파지의 고갈이 면역 억제 및 감염과 연관된 위험을 증가시키기에 따라 이는 전 세계적으로 해로운 것으로 간주 된다. 두 번째 실험으로, 저자는 산화 철 및 Ni(II)가 유사한 플라즈마 흡수율을 끌어들이고, Ni-리포솜이 따라서 그들을 시스템적 순환에서 고갈시킬 것이라는 가정하에 잠재적인 유인용 입자로 킬레이트된 Ni(II)로 코팅된 리포솜을 테스트하였다. 실제로, 정맥 투여된 Ni-리포솜은, 그것이 CREKA-SPIO 나노입자의 투여 5분 전에 투여되거나 또는 48시간 전에 투여되던 간에, 나노입자의 혈중 반감기를 5배 증가시켰다. 하지만, 중앙 마이스의 죽음을 유발하는 높은 독성이 관찰되었다. 플레인 리포솜이 Ni-리포솜을 대신하여 테스트 되었다. 하지만, 상기 Ni-리포솜과 비교하여 독성이 낮은 반면, 플레인 리포솜은 Ni-리포솜에 비해 덜 효율적이었고, 혈중 반감기의 증가는 약 2 팩터(factor)에 불과했다.

[0013] WO 2005086639는 일반적으로 초음파 또는 X-ray의 노출 중에, 또는 자기공명 촬영(MRI) 중에, 또는 치료 중에 개체 내의 타겟 사이트에 선택적으로 원하는 제제(agent)를 투여하는 방법에 관한 것이다. 방법의 목적은

[0014] WO 2005086639는 일반적으로 초음파 또는 X-ray의 노출 중에, 또는 자기공명 촬영(MRI) 중에, 또는 치료 중에 개체 내의 타겟 사이트에 선택적으로 원하는 제제(agent)를 투여하는 방법에 관한 것이다. 서술된 방법의 목적은 유인용 비활성 캐리어의 수반되는 투여의 덕분에 구체적으로 투여된 제제의 총 용량을 감소시키는 반면 목적하는 제제의 효율을 향상시키거나 유지하는데 있다.

[0015] 설명된 발명은 가능성-기초 접근법을 활용한다. 비-타겟화된 비활성 물질(비활성 캐리어)은 목적하는 타겟화된 제제에 의한 RES 시스템의 회피를 촉진하여 따라서 원하는 사이트에서 목적하는 제제의 흡수를 개선 시키기 위하여, 유사한 물리적 특성을 보이는 목적하는 제제(활성 조성물 내에 존재하는)와 함께(즉, 동시에 연속적으로) 공동-투여된다. 이러한 접근은 목적하는 제제에 대한 환자들의 더 낮은 노출을 유발하고, 결과적으로 상기 목적하는 제제에 대한 낮은 용량 비용을 유발한다. 비활성 조성물 및 유인용 비활성 캐리어는 5분 간격, 바람직하게는 2분 또는 그 이하의 간격으로 투여된다. 이러한 접근은 비타겟화된 캐리어 또는 유인용 비활성 캐리어의 과량의 존재 및 원하는 위치에 타겟화된 비활성 캐리어의 존재하에서 제공되었을 때 이러한 과량의 유인용 캐리어가 타겟화된 목적하는 제제와 세망내피계 시스템에 의한 흡수(uptake)를 위해 경쟁한다는 가능성에 의존한다. RES에 의해 포획된 입자의 반감기는 용량 의존적이다. 즉 입자의 순환 반감기는 용량이 증가함에 따라 증가 된다. 더 높은 용량과 관련되는 더 느린 클리어런스는 투여될 목적하는 제제의 용량의 감소를 허용하는 총 제제에 대한 높은 농도를 유지하는 데 호의적인 것으로 생각된다. 다시 말해서 WO 2005086639의 저자에 따르면, 제제의 높은 용량에 따른 향상된 총 제제의 반감기는 타겟화된 제제에 유리하다. 이러한 접근과 관련된 필요사항은 개별 조성이 어떤 것이든 간에, 활성 제제 및 비활성 물질이 그들의 RES 내 클리어런스 특징과 관련하여 유사하게 행동한다는 데 있다.

[0016] 이러한 접근에 있어서, 비활성 제제 및 활성 제제의 준-수반적(quasi-concomitant) 투입은 혈중 존재하는 대량의 제제 및 그 결과 그들의 혈중 반감기의 증가에서 요구된다. 가능성-기초 접근에 분명히 의존하는 이러한 전략은 비활성 제제보다는 상기 활성 제제에 이점을 부여하여 타겟 사이트에 축적을 성공적으로 달성하기 위해 활성 제제와 타겟팅 제제의 연합을 필연적으로 필요로 한다. 또한, 준-수반적인 투여 때문에, 활성 물질의 사용 용도에 따라 비활성 캐리어의 특이적인 디자인이 요구된다.

[0017] 종래기술로부터 명백한 의학적 오랜 필요성에도, 그들의 받아들일 수 없는 독성 또는 그들의 원치 않는 약물 동력학적 파라미터들 때문에 환자들에게 효율적으로 활용될 수 없었던 화합물(치료적, 예방적 및 진단적 화합물을 포함함)의 개선(improvement)은 여전히 관심사로 남아있다.

**발명의 내용**

[0018] 본 발명은 치료, 예방 또는 진단에서, 이의 의도된 사용이 무엇이든 간에 목적하는 화합물(이하 "화합물"로 칭함)의 효율(efficiency)을 최적화하는 것을 허용한다. 여기서 언급하는 (i) 생체적합 나노입자 및 (ii) 적어도 하나의 목적하는 화합물의 조합인, 조성물은 적어도 하나의 목적하는 화합물의 약물 동력학적 파라미터를 최적화하고, 그 결과로서 예를 들어 그들의 받아들일 수 없는 독성 때문에 개발될 수 없었던 치료적 화합물의 개발을 가능하게 한다.

[0019] 본 발명의 일반적인 조성물(여기서는 일반적으로 "약학적 조성물"이라 칭함)은 (i) 생체적합 나노입자 및 (ii) 적어도 하나의 화합물 ("목적하는 화합물")의 조합을 포함하는 조성물로, 생체적합 나노입자의 장축이 일반적으로 약 4 nm 내지 약 500 nm이고, 생체적합 나노입자의 절대적 표면 전하 수치가 적어도 10 mV인 조성물이다.

[0020] 본 발명의 바람직한 목적은, (i) 생체적합 나노입자 및 (ii) 목적하는 약학적 화합물의 조합을 포함하고, 생체

적합 나노입자의 장축이 약 4 nm 내지 약 500 nm이고, 생체적합 나노입자의 절대적 표면 전하 수치가 적어도 10 mV (|10 mV|)인, 목적하는 약학적 화합물을 이를 필요로 하는 개체 내에 투여하기 위한 약학적 조성물로서 나노입자 및 목적하는 화합물이, 상기 목적하는 화합물을 필요로 하는 개체 내에, 어느 하나가 다른 하나로부터 5분 초과 내지 약 72시간 이내의 간격으로 투여되는 약학적 조성물을 제공하는데있다.

- [0021] 본 발명의 조성물을 통한 생체적합 나노입자 및 목적하는 화합물의 개체 내로의 조합된 투여는, 상기 화합물의 표준 약학적 용량에 의해 유도되는 약학적 이익과 독성을 비교하였을 때, 일반적으로 이들의 개체에 대해 감소된 독성에 대하여 화합물의 동일한 약학적(즉, 치료적, 예방적 또는 진단적) 이익을 허용(유지) 하거나, 또는 개체에 대해 동등하거나 또는 감소된 독성(바람직하게는 감소된 독성)에 대하여 화합물의 약학적 이익을 증가시킨다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 (i) 개체에 대해 동등한 독성, 바람직하게는 감소된 독성 대비 동등한 약학적 이익을 유지하는 반면, 또는 (ii) 개체에 대하여 동등하거나 또는 감소된 독성 대비 약학적 이익을 증가시키는 반면에, 상기 화합물의 표준 약학적 용량과 비교했을 때, 투여된 화합물의 약학적 용량의 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 15%의 감소를 일반적으로 허용한다.
- [0023] 입자의 형태가 이의 "생체적합성"에 영향을 줄 수 있기 때문에, 상당히(quite) 동종(homogeneous)의 형태를 가지는 입자가 여기에서는 선호된다. 약동학적인 이유에 의해, 형태가 필수적으로 구형, 등골거나 또는 타원인 나노입자가 선호된다. 이러한 형태는 또한 나노입자의 세포와의 상호작용 또는 세포에 의한 흡수(uptake)에 유리하다. 구형 또는 원형이 특히 바람직하다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 용어 "나노입자" 는 사이즈(size)가 나노미터 범위인, 일반적으로 약 1 nm 내지 약 500 nm, 바람직하게는 약 4 nm 내지 약 500 nm, 약 4 내지 약 400 nm, 약 30 nm 내지 약 300 nm, 약 20 nm 내지 약 300 nm, 약 10 nm 내지 약 300 nm, 예를 들어 약 4 nm 내지 약 100 nm, 예를 들어 약 10 nm, 15 nm 또는 20 nm 내지 약 100 nm의 사이, 또는 약 100 nm 내지 약 500 nm, 일반적으로 약 100 nm 내지 약 300 nm인 제품(product)을, 특히 합성 제품을 의미한다.
- [0025] 여기에서, 용어 "나노입자의 사이즈", "나노입자의 가장 큰 사이즈" 및 "나노입자의 가장 긴 사이즈" 는 구형이거나 또는 타원형일 경우 "나노입자의 가장 긴 또는 가장 큰 축" 또는 "나노입자의 지름"을 일반적으로 의미한다.
- [0026] 투과전자현미경법(TEM) 또는 극저온-TEM은 나노입자의 사이즈를 측정하는데 사용될 수 있다. 그뿐만 아니라, 동적 광산란법(DLS)이 용액 내 나노입자의 유체역학적 지름을 측정하는데 사용될 수 있다. 이들 두 방법은 사이즈 측정을 비교하고 상기 사이즈를 확정(confirm)하기 위하여 다른 방법을 사용한 후에 추가로 더 이용될 수 있다. 바람직한 방법은 DLS이다(참조. International Standard ISO22412 Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008).
- [0027] 본 발명에서 사용될 수 있도록, 생체적합 나노입자의 절대 전자적 표면 전하 ("전하" 또는 "표면 전하" 라 칭함)는 |10 mV| (절대 값) 보다 높다. 나노입자의 표면 전하는 일반적으로 수용성 매질 내에서 0.2 내지 10 g/L의 나노입자 농도, pH 6 및 내지 8, 및 일반적으로 0.001 내지 0.2 M, 예를 들어 0.01 M 또는 0.15 M의 수용성 매질 내 전해질 농도에서 제타 포텐셜(zeta potential) 측정법으로 측정된다.
- [0028] 본 발명의 생체적합 나노입자는 일반적으로 적어도 |10 mV|, 즉 -10 mV 미만 또는 + 10 mV 초과, 예를 들어 - 12 mV 또는 - 15 mV 내지 - 20 mV 미만 또는 +12 mV 또는 + 15 mV 내지 + 20 mV 초과, 일반적으로 - 15 mV 미만 또는 + 15 mV 초과,의 전자적 표면 전하를 가진다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 생체적합 나노입자는 10mV 보다 큰 절대 전자적 표면 전하 수치("절대적 표면 전하 수치")를 가지고, 상기 전하는 더욱 바람직하게는 음전하이다.
- [0029] 하전 되어 있는 한, 본 발명에서 사용되는 나노입자는 유기물이거나 또는 무기물 일 수 있다. 유기 및 무기 나노입자의 혼합물도 또한 사용될 수 있다.
- [0030] 유기 나노입자인 경우, 나노입자는 지질-기초 나노입자(글리세롤지질, 포스포지질, 스테롤 지질 등), 여기서 "단백질-나노입자" 라고 지칭되기도 하는 단백질-기초 나노입자(예를 들어 알부민), 폴리머-기초 나노입자("폴리머성 나노입자"), 코폴리머-기초 나노입자("코폴리머성 나노입자"), 탄소-기초 나노입자, 바이러스-기초 나노입자(예를 들어 바이러스성 벡터) 일 수 있다.
- [0031] 유기 나노입자는 또한 리포솜, 젤, 하이드로젤, 미셀, 덴드리머 등과 같은 나노캡슐(할로우 나노입자) 또는 나

노스피어(플레인 나노입자) 일 수 있다. 상기 기술된 유기 나노입자의 혼합물도 사용될 수 있다.

- [0032] 폴리머 또는 코폴리머는 천연 기원이거나 또는 합성 기원일 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 유기나노입자를 제조하기 위한 합성(인공의) 및 천연의 폴리머 또는 코폴리머의 예는 폴리아크릴산(PLA), 폴리(락타이드-코-글리콜릭)산 (PLGA), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리갈락틴, 폴리락타이드, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리소르베이트, 폴리비닐알코올, 폴리아크릴아미드, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리락테이트-코-글리콜레이트, 폴리(아미도 아민), 폴리(에틸렌이민), 알지네이트, 셀룰로오스 및 셀룰로오스 파생 폴리머, 콜라겐, 히알uron산, 폴리글루탐산(PGA), 액틴, 폴리사카라이드, 및 젤라틴으로부터 선택될 수 있다.
- [0034] 나노입자가 무기이고, 이의 장축이 일반적으로 약 10 nm, 예를 들어 약 8 nm 미만, 약 7 nm 미만, 일반적으로 약 7 nm 내지 약 4 nm, 예를 들어 약 6 nm 미만, 약 5 nm 미만 또는 약 4 nm 미만인 경우, 나노입자는 어떠한 무기물질로부터 생성될 수 있다. 무기물질은 예를 들어 란타게열을 포함하여 원소 주기율표상 3, 4, 5, 6 주기 금속원소를 포함할 수 있다. 나노입자의 장축이 일반적으로 약 10nm 미만인 경우, 나노입자는 더 큰 구조로 모일(assemble) 수 있다. 더 큰 구조로 모이는(assembling) 나노입자는 일반적으로 나노입자 및 생체적합 폴리머, 단백질 등과의 상호작용에 의해서 트리거(trigger) 될 수 있다. 더 큰 구조는 또한 나노입자의 캐리어, 일반적으로 젤라틴 구조 (여기서는 "젤라틴 나노입자"라 칭함) 또는 리포솜과 같은 할로우 캐리어와 같은 플레인 캐리어 내로의 포획에 의해 획득될 수 있다. 인 비보 투여 후에 이러한 더 큰 구조는 추가로 나노입자를 방출할 수 있다.
- [0035] 나노입자가 무기입자이고 상기 나노입자의 장축이 일반적으로 적어도 10 nm, 일반적으로 10 내지 500 nm인 경우, 나노입자는 (i) 예를 들어, Mg, Ca, Ba 및 Sr로부터 선택되는, 하나 또는 그 이상의 2가 금속 원소 (ii) 예를 들어 Fe 및 Al로부터 선택되는, 하나 또는 그 이상의 3가 금속 원소 및 (iii) Si를 포함하는 하나 또는 그 이상의 4가 금속 원소 중 적어도 하나를 포함하거나 또는 이들로 구성될 수 있다.
- [0036] 하나의 특정 실시예에서, 나노입자의 무기물질은 (i) 예를 들어 Mg, Ca, Ba 및 Sr로부터 선택되는, 하나 또는 그 이상의 2가 금속 원소 (ii) 예를 들어 Fe 및 Al로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 3가 금속 원소 및 (iii) Si를 포함하는 하나 또는 그 이상의 4가 금속 원소로부터 선택된다.
- [0037] 추가의 특정 실시예에서, 나노입자의 무기물질은 탄산 칼슘(CaCO<sub>3</sub>), 탄산 마그네슘(MgCO<sub>3</sub>), 수산화 마그네슘(Mg(OH)<sub>2</sub>), 수산화 철(Fe(OH)<sub>2</sub>), 철 옥시수산화물(FeOOH), 산화 철(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 또는 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 산화 알루미늄(Al<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), 수산화 알루미늄(Al(OH)<sub>3</sub>), 알루미늄 옥시수산화물(AlOOH) 및 실리시움 옥사이드(SiO<sub>2</sub>)로부터 선택된다.
- [0038] 여기서 설명되는 조성물 내 사용되는 나노입자는 생체적합성, 즉 생체 조직에 양립될 수 있다. 조성물에 의해 요구되는 경우, 나노입자는 따라서 생체적합 물질로 코팅되어 사용될 수 있다. 본 발명의 특성의 실시예에서, 여기 언급된 나노입자는 따라서 생체적합 코팅으로 커버 된다.
- [0039] 생체적합 물질은 생물학적 타겟과 상호작용을 허용하는 제제(agent)일 수 있다. 나노입자의 절대 전하가 적어도 10mV인 경우 이러한 제제는 일반적으로 양전하 또는 음전하를 나노입자의 표면에 가져올 수 있다. 나노입자의 표면에 양 전하를 생성시키는 제제는 예를 들어 아미노프로필트리에톡시실란(aminopropyltriethoxysilane) 또는 폴리리신(polylysine)으로부터 선택될 수 있다. 나노입자의 표면에 음전하를 생성하는 제제는 예를 들어 포스페이트(예를 들어 폴리포스페이트, 메타포스페이트, 파이로포스페이트 등), 카르복실레이트(예를 들어 시트레이트 또는 디카르복실릭 산, 특히 숙신산) 또는 설페이트로부터 선택될 수 있다.
- [0040] 특성의 실시예에서, 나노입자의 절대 전하가 적어도 10mV (|10 mV|)인 한, 나노입자는 스테릭 그룹 (steric group)을 보이는 제제로부터 선택되는 생체적합물질로 코팅될 수 있다. 이러한 그룹은 예를 들어 폴리에틸렌글리콜(PEG); 폴리에틸렌옥사이드; 폴리비닐알콜; 폴리아크릴레이트; 폴리아크릴아미드(폴리(N-이소프로필아크릴아미드)); 폴리카바미드(polycarbamide); 바이오폴리머; 텍스트란, 자일렌 및 셀룰로오스와 같은 폴리사카라이드; 콜라겐; 폴리설포베타인(polysulfobetain)과 같은 쌍극이온화합물(switterionic compound) 등으로부터 선택될 수 있다.
- [0041] 생체적합 코팅은 유리하게도 "전체코팅"(완전한 단층(monolayer))일 수 있다. 이는 나노입자의 모든 표면에 적당한 하전을 만드는 매우 높은 밀도의 생체적합 분자의 존재를 의미한다. 생체적합 코팅은 라벨 링 제제, 일반적으로 표준 이미지 장치를 이용하여 색의 시각화를 가능하게 하는 제제 더 포함할 수 있다.

- [0042] 생체적합 나노입자와 목적하는 화합물의 조합된 투여는 5분 초과 내지 약 72시간의 간격으로, 각각 개체에 대해, 일반적으로 목적하는 화합물을 필요로 하는 개체 내에 투여되었을 때, 상기 화합물의 표준 약학적, 일반적으로 치료적 용량에 의해 유발된 약학적 이익 및 독성과 비교하여 감소된 독성 대비 목적하는 화합물의 약학적인 (즉 치료적, 예방적 또는 진단적인), 일반적으로 치료적인 이점을 유지하거나 또는 동등하거나 또는 감소된 독성 대비 화합물의 약학적 이점을 증가시킨다.
- [0043] 특정의 일 실시예에서, 생체적합 나노입자 및 목적하는 화합물의 조합된 투여는 개체에 대한 화합물의 동등한 독성 또는 감소된 독성(바람직하게는 감소된 독성) 대비 동등한 치료상 이점을 유지하거나 또는 개체에 대한 화합물의 동등하거나 또는 감소된 독성 대비 치료상 이점을 증가시키는 반면에, 일반적으로 어느 하나가 다른 하나로부터 5분 초과 내지 약 72시간의 간격으로 목적하는 화합물을 필요로 하는 개체 내에 투여될 때 상기 화합물의 표준 치료 용량과 비교해서 투여된 화합물 치료적 용량의 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 15%의 감소를 허용한다.
- [0044] 특정 실시예에서, 나노입자는 몇몇 목적하는 화합물들, 일반적으로 두 목적하는 화합물들과 함께 투여된다.
- [0045] 나노입자는 목적하는 화합물을 필요로 하는 개체에 대한 투여 후, 바람직하게는 이를 투여받은 개체로부터 일반적으로 1시간 내지 6주 이내로, 예를 들어 1달 (4주), 1시간 내지 1달 이내로, 예를 들어 1시간 내지 3주, 또는 1시간 내지 2주, 또는 1시간 내지 1주 내로 제거된다.
- [0046] 나노입자를 구성하는 물질(이의 생체적합 코팅이 존재하는 경우 이를 포함)은 나노입자의 생체지속성(biopersistence)을 결정하는데 중요하다. 나노입자는 로 생분해성(biodegradable)(예를 들어 생분해성 폴리머, PLGA 또는 PLA와 같은 폴리머로 구성되는 경우), 용해성(예를 들어 산화 철), 또는 비 분해성 및 비 용해성으로 여겨질 수 있다. 생분해성, 용해성의 나노입자는 개체로부터 빠른 나노입자 클리어런스를 촉진한다.
- [0047] 상이한 분자들 또는 제제들이 앞서 언급된 생체적합 나노입자와 조합해서 투여되는, 본 발명에 따른 적어도 하나의 목적하는 화합물, 적어도 하나의 목적하는 약학적 화합물로 사용될 수 있다. 이러한 화합물은 앞서 설명한 바와 같이 치료적, 예방적 또는 진단적 화합물일 수 있다. 이는 유기 화합물이거나 또는 무기 화합물 일 수 있다.
- [0048] 목적하는 화합물로서 사용 가능한 유기화합물의 예는 생물학적 화합물, 항체, 올리고뉴클레오티드, 합성 펩타이드, 저분자 표적 치료제(저분자 타겟된 치료제), 세포독성 화합물, 및 다른 상응하는 프로 드럭 또는 이들의 유도체 등으로부터 선택될 수 있다.
- [0049] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 문맥에서 사용될 수 있는 목적하는 화합물은 유기화합물, 바람직하게는 생물학적 화합물, 저분자 표적 치료제(저분자 타겟된 치료제) 및 세포독성 화합물로부터 선택되는 유기화합물이다. 또 다른 특정 실시예에서 목적하는 화합물은 항체, 올리고 뉴클레오티드 및 합성 펩타이드로부터 선택된다.
- [0050] 예를 들어 생물학적 화합물은 항체, 바람직하게는 인플릭시맵, 아달리뮤맵(adalimumab), 베비시주맵(bevacizumab), 리투시맵(rituximab), 트라스투주맵(trastuzumab), 라니비주맵(ranibizumab), 세투시맵(scetuximab), 파나티맵(panatimumab)과 같은 모노클로날 항체 ("mAb"); 엔브렐(etanercept) 또는 인터페론 베타-1a와 같은 단백질 또는 제조합 단백질; 인슐린 글라르진(insulin glargine) 또는 베타세론(betaseron)과 같은 펩타이드 또는 제조합 펩타이드; 프리베나(prevnar) 13 또는 가디실(gardasil)과 같은 백신; 에포진(epogin)과 같은 바이오시밀러; 리플라갈(replagal) 또는 크레온(creon)과 같은 효소 또는 제조합 효소; 등이다.
- [0051] 예를 들어 올리고뉴클레오티드는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 미포머센 나트륨(mipomersen sodium) 또는 푸세니드(pursennid)와 같은 앵타머 등이다.
- [0052] 합성된 또는 인조의 펩타이드 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate) 또는 루프롤라이드 아세테이트(leuprolide acetate) 같은 것이다.
- [0053] 저분자 표적 치료제(저분자 타겟된 치료제)는 일반적으로 악성 세포 내의 변이 된, 과발현된 또는 그렇지 않으면 위험한 단백질(암 치료의 잠재적 타겟) 위의 효소적 도메인을 억제한다. 몇몇 치료 제제는 세포 부분을 타겟하거나 (예를 들어 오로라 키나아제(aurora-kinase) 억제제 또는 사이클린-의존 키나아제 억제제), 다른 생물학적 매카니즘들, 예를 들어 단백질 턴오버 및 크로마틴 변형(예를 들어 히드톤-디아세틸라제 억제제)을 타겟하는 것들을 포함한다. 저분자 화합물 타겟된 치료제는 예를 들어 이매티닙(imatinib), 라파마이신(rapamycin), 게프티닙(gefitinib), 얼로티닙(erlotinib), 소라페닙(sorafenib), 수니티닙(sunitinib), 닐로티닙(nilotinib), 다사티닙(dasatinib), 라파티닙(lapatinib), 보르테조밍(bortezomib), 아토르바스타틴(atorvastatin) 등이다.

- [0054] 세포독성 화합물은, 예를 들어 안트라사이클린(anthracycline)(예를 들어 독소루비신, 다우노루비신(daunorubicine) 등)과 같은 DNA-변형 제제, 알킬화제(예를 들어 멜팔란(melphalan) 또는 테모졸로마이드(temozolomide)), 정의된 생리적 메카니즘을 매우 정확하게 간섭하는 약물, 예를 들어 마이크로튜블 폴리머화(예를 들어 탁솔), 또는 메타블라이트 합성(예를 들어 메토티렉세이트) 등이다. 활성화 가능한 세포독성화합물은 일반적으로 광역학적 치료(예를 들어 포토프린)에 사용되고, 레이저원과 같은 외부적 자원에 의해 활성화되어 이의 치료적 효과를 발생한다. 다른 통상적인 세포독성 화합물은 일반적으로 여기서 설명하거나 또는 숙련된 종양학자들에게 알려진 화학요법제로부터 선택된다.
- [0055] 프로드럭(예를 들어 카페시타빈 또는 이리노테칸)은 대사되어 인 비보 상에서 이의 활성형으로 되고 이의 예측되는 치료적 효과를 발생시킨다.
- [0056] 목적하는 화합물로 사용 가능한 무기화합물의 예는 전이원소 착염(transition metal coordination complex), 방사선의약품, 나노입자 등으로부터 선택된다.
- [0057] 전이원소 착염은 더 일반적인 유기 기초 의약품들보다 넓은 범위의 배위 수, 기하학적 구조들, 접근 가능한 산화환원 상태들, 리간드 치환의 열역학 및 동역학의 "조화-가능성", 넓은 구조적 다양성을 포함하는 잠재적인 이점을 제공한다. 금속-기초 물질들은 세포 분자적 타겟들과 상호작용하여 생화학적 기능들에 영향을 미쳐 악성 세포의 파괴를 야기한다. 전이 원소 착염은 일반적으로 DNA에 작용하는 세포사멸 제제(예를 들어, 백금 착염: 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살로플라틴 또는 루테니움(ruthenium) 또는 금 착염)이다.
- [0058] 방사선의약품은 진단 목적으로 또는 선택적으로 악성 세포를 파괴하기 위하여 방사선을 방출한다. 일반적인 방사선 의약품은 예를 들어 스트론튬-89, 탈륨-201, 테크네튬(technetium)-99, 사마륨-83 등을 포함한다.
- [0059] 나노입자는 일반적으로 금속 산화물 나노입자(예를 들어 WO 2009/147214 및 WO 2007/118884 참조), 금속성 나노입자(예를 들어 금, 백금 또는 은 나노입자), 금속 황화물 나노입자(예를 들어 Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>), 및 이들의 혼합물(예를 들어 하프늄 산화물 물질로 커버된 금 나노입자)로부터 선택될 수 있다. 나노입자는 예를 들어 전자기적 방사능원, 초음파원 또는 자기적원과 같은 외부적 소스(source)을 통해 활성화될 수 있다.
- [0060] 앞서 언급된 생체적 나노입자와 조합하여 투여되는(일반적으로 순차적으로 앞서 설명한 바와 같이 투여되는) 목적하는 화합물은 당업자에게 알려진 방법으로 캐리어내에 캡슐화되거나 캐리어에 접목(또는 결합)될 수 있다. 일반적인 캐리어는 예를 들어 리포솜(예를 들어 DOXIL 또는 열민감성 지질을 사용하는 ThermoDox), 미셀, 폴리머성(또는 "폴리머") 캐리어, 하이드로겔, 겔, 코폴리머 캐리어, 단백질 캐리어, 무기 캐리어이다.
- [0061] 본 발명에 따른 약학적 조성물(나노입자 및 목적하는 화합물과의 조합에 의해 정의되는)은 다양한 분야, 특히 인간 또는 수의학분야에서 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로, 동물, 바람직하게는 포유류(예를 들어 수의학에서), 심지어 더 바람직하게는 그 연령 또는 성별에 관계없이 인간에게 사용되기 위함이다.
- [0062] 본 발명의 약학적 조성물은 심혈관 질환, 중추신경계(CNS) 질환, 위장관 질환, 유전적 장애, 혈액 장애(hematological disorders), 호르몬 장애, 면역학(immunology), 감염성 질환, 대사성 장애, 근골격 장애, 종양학, 호흡기 질환, 독성학, 등에서 사용될 수 있다. 바람직한 실시예로, 약학적 조성물은 심혈관 질환, CNS 질환, 종양학, 감염성 질환, 대사성 장애에 사용될 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 문맥에서, 나노입자 및 화합물(목적하는 화합물)은 화합물 약학적 효율을 최적화하기 위하여 유리하게도 상기 화합물을 필요로 하는 개체 내에, 어느 하나가 다른 하나로부터 5분 초과 내지 72시간 사이의 간격으로, 일반적으로는 5분 초과 내지 약 24시간의 간격으로, 바람직하게는 5분 또는 30분 초과 내지 약 12시간 사이의 간격으로 투여될 수 있다.
- [0064] 본 발명 내에서, 나노입자 및 화합물(목적하는 화합물(들))이 유리하게도 상기 화합물을 필요로 하는 개체 내에 어느 하나가 다른 하나로부터 5분 초과 내지 약 72시간 사이의 간격으로 투여될 때, 생체적합 나노입자의 절대적 표면 전하 수치는 적어도 10mV(110mV1)이다.
- [0065] 본 발명에 따른 일 실시예에서, 나노입자 및 화합물(들)("목적하는 화합물(들)")이 유리하게도 상기 화합물들을 필요로 하는 개체 내에 5분 초과 내지 약 24시간의 간격으로 각각 투여될 때, 생체적합 나노입자의 절대적 표면 전하 수치는 유리하게는 적어도 15 mV (115 mV1)이다.
- [0066] 또 다른 특정의 본 발명에 따른 실시예에서 나노입자 및 화합물(들)(목적하는 화합물(들))이 상기 화합물들을 필요로 하는 개체 내에 어느 하나가 다른 하나로부터 5분 초과 내지 약 12시간의 간격으로 투여되는 경우, 생체

적 나노입자의 절대적 표면전하 수치는 적어도 20 mV (|20 mV|)이다.

- [0067] 또한, 여기서는 여기서 언급하고 있는 질환들이 있는 개체를 치료하는 방법으로, 상기 방법은 상기 개체에 본 발명에 따른 약학적 조성물을 투여하는 단계, 일반적으로 여기서 언급된 생체적합 나노입자 및 적어도 하나의 목적하는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 개시된다. 생체적합 나노입자 및 화합물이 어느 하나가 다른 하나로부터 5분 초과 내지 약 72시간의 간격으로 투여되는 동안 나노입자 또는 적어도 하나의 목적하는 화합물 중 어느 하나는 개체 내 먼저 투여된다. 나노입자 또는 적어도 하나의 목적하는 화합물 중 어느 하나의 투여는 각각 단회 투여, 각각 반복투여, 예를 들어 각각의 몇 번의 연속적인 투여일 수 있다. 생체적합 나노입자는 한번 투여될 수 있고, 적어도 하나의 목적하는 화합물은 한번보다 많이 투여될 수 있고, 또는 그 반대일 수 있다.
- [0068] 특정의 실시예에서, 생체적합 나노입자는 목적하는 화합물의 수회(several) 투여, 즉, 적어도 첫 번째의 상기 목적하는 화합물 투여를 포함하는 프로토콜의 시작점에, 이들의 투여 전 또는 후에, 적어도 투여된다.
- [0069] 또 다른 특정 실시예에서, 생체적합 나노입자는 목적하는 화합물의 수차례 투여를 포함하는 프로토콜의 시작점에 투여되지 않고, 상기 목적하는 화합물의 이차 또는 삼차 투여 전에 투여되지 않으며, 이들의 투여 전 또는 후에 투여된다.
- [0070] 앞선 마지막 두 실시예의 문맥에서, 생체적합 나노입자는 또한, 상기 목적하는 화합물의 연속하는 투여 내내 또는 부분 동안 목적하는 화합물과 함께 투여(앞서 설명한 바와 같이 전에 또는 후에 투여) 될 수 있다.
- [0071] 특정의 실시예에서, 본 발명의 나노입자는 상기 개체로의 적어도 하나의 목적하는 화합물의 투여 전에, 일반적으로 적어도 하나의 목적하는 화합물의 투여 5분 초과 내지 약 72시간 전에 개체 내에 투여된다.
- [0072] 여기에서, 용어 "나노입자"는 특히 약 4 nm 내지 약 100 nm, 예를 들어 약 10 nm, 15 nm 또는 20 nm 내지 약 100 nm의 사이즈를 가지는 제품, 특히 합성의 제품을 지칭한다. 이러한 나노입자와 함께 사용되는 목적하는 화합물의 예는 유기 화합물, 일반적으로 생물학적 화합물이다. 이는 유리하게는 항체, 올리고뉴클레오티드, 합성 펩타이드, 저분자 표적 치료제 (저분자 타겟 된 치료제), 및 세포독성 화합물로부터 선택되고, 바람직하게는 항체, 저분자 표적 치료제 (저분자 타겟된 치료제) 및/또는 세포독성 화합물이다.
- [0073] 또한, 용어 "나노입자"는 약 100 nm 내지 약 500 nm, 일반적으로 약 100 nm 내지 약 300 nm의 입자 크기를 가지는 제품, 특히 합성 제품을 의미할 수도 있다. 이러한 나노입자와 함께 사용될 수 있는 목적하는 화합물의 예는 무기화합물, 일반적으로 금속성 나노입자, 금속 산화물 나노입자, 금속 황화물 나노입자 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 무기화합물 또는 캐리어 내 캡슐화되거나 또는 이러한 캐리어에 접목된 어느 목적 화합물 일 수 있다.
- [0074] 본 발명의 약학적 조성물의 생체적합 나노입자는 정맥 내, 동맥 내 및/또는 복강 내와 같은 루트에 의해 투여될 수 있다. 투여의 바람직한 루트는 정맥 루트이다.
- [0075] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 목적하는 화합물은 피하투여, 정맥 투여, 피부 내 투여, 동맥 내 투여, 기도 (흡입), 복강 내, 근육 내 및/또는 경구 투여 등과 같은 다른 루트들에 의해 투여될 수 있다.
- [0076] 다음의 예는 이에 범위의 한정 없이 본 발명을 예시한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0077] 도 1: 화합물의 사이즈(장축)에 따른 혈중 순환으로부터의 치료적 화합물의 제거에 관한 가능한 루트들의 개략적인 도면,
- 도 2: MDA-MB-231-lucD3H2LN 이종이식체 내 (i) 실시예 3의 생체적합 나노입자 및 (ii) Dox-NP® 를 포함하는 약학적 조성물의 치료 스케줄에 대한 개략적인 대표도,
- 도 3: MDA-MB-231-lucD3H2LN 이종이식체 내 (i) 실시예 3의 생체적합 나노입자 및 (ii) Dox-NP® 를 포함하는 약학적 조성물의 종양 재-성장 지연(re-growth delay)에 관한 것 도면(평균 RTV ± SD).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0078] **실시예 1: 생체적합 나노입자로의 리포솜(liposome)의 합성 n° 1**

[0079] 리포솜이 지질 필름 재-수화법(lipidic film re-hydration method)을 사용하여 제조되었다:

- [0080] a) 지질이 클로르 포름에 용해된다. 클로르포름은 질소 플로우 하에서 증발된다. pH 7.4에서 HEPES 20 mM 및 NaCl 140 mM를 이용하여 지질 필름의 재수화가 50℃에서 수행되어, 지질성 농도가 5 mM이 되었다.
- [0081] 하전 된 리포솜을 제조하는데 다음의 지질 화합물이 사용되었다:
- [0082] DPPC(디팔미토일포스파티딜콜린): 86% mol; MPPC(모노팔미토일포스파티딜콜린): 10% mol; DSPE-PEG(디스테아릴포스파티딜에탄올아민-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000]): 4% mol.
- [0083] b) 연속적으로 샘플을 액체 질소 내 및 50℃에서 조절되는 워터배스(bath) 내로 플런지 함으로서 동결 용해 주기(Freeze-thaws cycles)가 6회 수행되었다.
- [0084] c) 조절된 온도 및 압력에서 리포솜의 사이즈를 측정하는데 써모배럴 압출기(thermobarrel extruder)(LIPEXTM Extruder, Northern Lipids)가 사용되었다. 모든 경우에서, 압출은 10bars의 압력 하에서 50℃에서 수행되었다.
- [0085] 준비된 리포솜의 사이즈 분포는 Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)을 사용하여 633 nm HeNe 레이저로 90℃의 앵글에서 동적 광 산란법(DLS)에 의해서 측정되었다. 리포솜 서스펜션은 HEPES 20 mM 및 NaCl 140 mM내 pH 7.4하에서 100배 희석되었다. 리포솜 사이즈 (즉 유체역학적 직경)는 다분산지수(polydispersity index) 약 0.1를 가지고 약 170 nm와 동등했다.
- [0086] 당업자가 이해하는 바와 같이, 바람직한 표면 전하는 선별된 지질성 화합물 덕분에 획득되었고, 이의 수치는 Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)를 사용한 제타 포텐셜 측정에 의하여 확인되었다.
- [0087] 리포솜은 물에서 100배 희석되었고, 획득된 서스펜션의 pH는 pH7.4로 조절되었다. 리포솜의 표면 전하는 pH 7.4에서 약 -14 mV 와 동등하였다.
- [0088] **실시예 2: 개체 내 투여되는 치료적 화합물의 동등한 치료적 효능(efficacy) 대비 개체 내 투여되는 치료적 화합물의 용량의 적어도 10%의 감소를 허용하는 방법.**
- [0089] X-레이와 같은 이온화 방사능에 노출되었을 때, 전기 및/또는 높은 에너지 광자(photon)를 발생시킬 수 있는, 생체적합 나노입자 및 활성가능한 산화물 나노입자를 포함하는 항암 치료용 청구항 1의 약학적 조성물 (이하 "화합물" 또는 "약학적 화합물"로 사용됨)은 이종이식된(xenografted) 종양이 있는 누드 mice에 다음의 방법으로 투여된다:
- [0090] a) 각 누드 mice에 생체적합 나노입자를 투여(정맥투여)하는 단계;
- [0091] b) 단계 a) 후 5분 초과 내지 72시간 사이에 단계 a)의 mice 각각에 현재 사용되는 용량과 비교하여 낮은(10%) 용량으로 치료적 화합물을 투여(정맥투여)하는 단계;
- [0092] c) 약물동력학적 파라미터를 획득하기 위하여 각 mice의 혈액 또는 혈장 샘플들 내 치료적 화합물의 농도를 측정하는 단계로, 치료적 화합물의 상기 농도는 치료적 화합물의 투여 후 1분 내지 24시간 사이에 1회 또는 바람직하게는 수차례 측정되는 단계;
- [0093] d) 약학적 조성물의 투여 후 독성에 대한 임상적 징후(sign)를 평가하는 단계; 및
- [0094] e) 치료적 화합물의 정맥 투여 24시간 후 이의 종양 누적(tumor accumulation)을 측정하는 단계.
- [0095] **실시예 3: 생체적합 나노입자로서 리포솜의 합성 n° 2**
- [0096] 지질 필름 재 수화법(lipid film re-hydration method)을 사용하여 리포솜이 제조되었다:
- [0097] a) 지질이 클로르포름에 용해된다. 클로르포름은 증발되도록 질소 플로우 하에서 증발된다. HEPES 20 mM 및 NaCl 140 mM를 이용한 pH 7.4에서의 지질 필름의 재-수화는 60℃에서 수행되어 지질 농도가 25 mM에 도달된다.
- [0098] 다음의 지질 조성물이 하전된 리포솜을 제조하는데 사용되었다:
- [0099] DPPC(디팔미토일포스파티딜콜린) 62% mol; HSPC(수화된 소이빈 포스파티딜콜린) 20% mol; CHOL(콜레스테롤) 16% mol; POPS(1-팔리토일-2-올레오일 포스파티딜세린) 1% mol; DSPE-PEG(디스테아릴포스파티딜에탄올아민-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000]) 1% mol.
- [0100] b) 연속적으로 샘플을 액체 질소 및 60℃로 조절되는 워터 배스(bath) 내로 플런지 함에 의해 동결용해주기가 6회 수행되었다.

- [0101] c) 조절된 온도 및 압력하에서 써모배럴 압출기(thermobarrel extruder) (LIPEXTM Extruder, Northern Lipid s)가 리포솜의 사이즈를 산출하는데 사용되었다. 모든 경우에서, 압출은 60°C, 5 bars에서, 0.1µm 포어 사이즈 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 멤브레인을 이용하여 수행되었다.
- [0102] 준비된 리포솜의 사이즈 분포는 Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)을 사용하여 633 nm HeNe 레이저로 90 °C의 앵글에서 동적 광 산란법(DLS)에 의해서 측정되었다. 리포솜 서스펜션은 HEPES 20 mM 및 NaCl 140 mM 내 pH 7.4 하에서 100배 희석되었다. 리포솜 사이즈 (즉 유체역학적 직경)는 0.1과 동등한 다분산지수 (polydispersity index)를 가지고 약 145 nm와 동등했다.
- [0103] 당업자가 이해하는 바와 같이, 바람직한 표면 전하는 선별된 지질성 화합물 덕분에 획득되었고, 이의 수치는 Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)를 사용한 제타 포텐셜 측정에 의하여 확인되었다.
- [0104] 리포솜은 1mM의 소듐 클로라이드 용액에서 100배 희석되었고, 획득된 서스펜션의 pH는 pH 7.4로 조절되었다. 리포솜의 표면 전하는 pH 7.4, NaCl 1mM 에서 약 -25 mV 와 동등하였다.
- [0105] **실시예 4: MDA-MB-231-lucD3H2LN 이종이식(xenografts) 내 Dox-NP® 및 실시예 3의 생체적합 나노입자를 포함하는 약학적 조성물의 종양 재-성장의 지연 (도 2 및 도 3)**
- [0106] 본 연구는 (i) 실시예 3으로부터의 생체적합 나노입자 및 치료적 목적 화합물로서 Dox-NP® (리포소말 캡슐화된 독소루비신)을 포함하는 약학적 조성물의 NMRI 누드 mice에 이종이식된 MDA-MB-231-luc-D3H2LN 종양 모델에 대한 효능을 관찰하기 위해 수행되었다.
- [0107] 인간 유방 선암(adenocarcinoma) MDA-MB-231-luc-D3H2LN 세포 라인이 Caliper Life Science (Villepinte, France)에서 구매되었다. 세포들은 10% 페탈 보바인 세럼, 1% 비필수 아미노산, 1% L-글루타민, 및 1% 소듐 옥피루베이트 (Gibco)가 보강된 MEM/EBSS 배지 (Minimum Essential Medium with Earl's Balanced Salts Solution)에서 배양되었다.
- [0108] 6-7주 (20-25g)의 NMRI 누드 mice가 Janvier Labs (France)로부터 주문되었다. mice는 이종이식을 위한 암세포의 접목 전 어느 날 세슘-137 방사능 조사 장치를 이용하여 3Gy의 전신 방사능 조사를 받았다.
- [0109] 마우스의 우측 하단 옆구리 내 50 µL 내 4x10<sup>6</sup> 셀을 피하 접종함으로써 MDA-MB-231-luc-D3H2LN 종양이 획득되었다. 종양은 볼륨이 약 100 mm<sup>3</sup> 근처가 될 때 까지 성장되었다. 종양 직경은 디지털 캘리퍼를 사용함으로써 측정되었고, 종양 볼륨은 다음 식을 사용하여 mm<sup>3</sup>으로 산출되었다:
- $$\text{종양 볼륨 (mm}^3\text{)} = \frac{\text{길이 (mm)} \times (\text{너비})^2 (\text{mm}^2)}{2}$$
- [0110]
- [0111] mice는 분리 케이지로 랜덤화 되었고, 숫자로 식별되었다(pawn tatto). 4 그룹들이 도면에서 보이는 바와 같이 처치되었다.
- [0112] - 그룹 1: 멸균 글루코오스 5% (컨트롤 (비히클) 그룹)
- [0113] 네 마리(4)의 mice에게는 1일, 7일 및 14일 차에 멸균 글루코오스 5% 용액이 투여되었다. 각 시간 (일자)당, 5% 글루코오스가 두 번씩 투여되었다. 첫 번째의 5% 글루코오스 용액의 투여는 두 번째 투여 4시간 전에 수행되었다.
- [0114] - 그룹 2: 실시예 3으로부터의 생체적합 나노입자들 (컨트롤 그룹)
- [0115] 네 마리의 mice에게 멸균된 5% 글루코오스 용액 및 실시예 3의 생체적합 나노입자(10 ml/kg)가 1일, 7일 및 14일에 정맥주사 되었다. 각각의 시간(일)에, 실시예 3으로부터의 생체적합 나노입자 주사는 글루코오스 5% 용액의 투여 4시간 전에 수행되었다.
- [0116] - 그룹 3: Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신) (치료 그룹)
- [0117] 5마리의 mice에게 멸균 글루코오스 5% 용액 및 Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신)이 1일, 7일 및 14일에 정맥 주사 되었다. 각 시간(일)에, 멸균 글루코오스 5% 용액의 주사는 Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신) 주사 4시간 전에 수행되었다.
- [0118] - 그룹 4: 약학적 조성물, 즉 (i) 실시예 3으로부터의 생체적합 나노입자 및 (ii) Dox-NP® (3mg/kg

독소루비신)의 조합 (치료 그룹)

- [0119] 5마리의 mice에게 실시예 3으로부터의 생체적합 나노입자 (10 ml/kg) 및 Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신)이 1일, 7일 및 14일에 정맥투여 되었다. 각 시간(일)에, 실시예 3으로부터의 생체적합 나노입자(10 ml/kg)의 투여는 Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신)의 투여 4시간 전에 수행되었다.
- [0120] The Dox-NP® (Avanti Polar lipids 사제- 10% w/v 수크로오스가 포함된 10mM 히스티딘 버퍼 내 pH 6.5-6.8에서 2 mg/ml 독소루비신 HCl의 리포솜 제제(liposomal formulation))이 추가적인 희석 없이 3mg/kg의 독소루비신이 주입되는데 필요한 용량으로 투여되었다.
- [0121] 실시예 3으로부터의 생체적합 나노입자의 서스펜션이 추가적인 희석 없이 투여되었다.
- [0122] Dox-NP® 및 실시예 3으로부터의 생체적합 나노입자는 말단 꼬리 정맥을 통해 100U (0.3ml) 인슐린 시린지를 이용하여 (TERUMO, France) 정맥투여되었다.
- [0123] mice는 임상적 징후(sign), 체중 및 종양 사이즈가 팔로우업 되었다.
- [0124] 종양 볼륨은 디지털 캘리퍼를 이용한 이차원 종양 볼륨 측정에 의하여 다기의 식을 이용하여 측정되었다:  
 종양 볼륨 (mm<sup>3</sup>) = 
$$\frac{\text{길이 (mm)} \times (\text{너비})^2 (\text{mm}^2)}{2}$$
- [0125]
- [0126] 각 그룹 내에서 상대적인 종양 볼륨(RTV)은 Vt/V0 비율 (Vt: 치료 기간 중 주어진 날의 종양 볼륨, 및 V0: 치료를 시작한 때의 종양 볼륨)로 표현되었다.
- [0127] 치료 효율은 두(two) 배가(doubling) 시간 동안 (하나의 배가 시간은 종양 볼륨이 두 배가 되는데 소요되는 시간임)의 특이적 성장 지연(specific growth delay: SGD) 및 최상의 퍼센트 T/C 수치 (% T/C) 를 이용하여 측정되었다.
- [0128] 두 배가 시간동안의 SGD는 다음과 같이 계산되었다:  

$$\text{SGD} = \frac{\text{T4d 치료군} - \text{T4d 컨트롤}}{\text{T4d 컨트롤}}$$
- [0129]
- [0130] 상기 식에서 T4d는 종양 볼륨이 두 배가 되는 데 소요되는 시간임 (100 mm<sup>3</sup> 부터 400 mm<sup>3</sup>까지의 평균 RTV).
- [0131] 퍼센트 T/C 수치 (“% T/C”) 는 1, 3, 7, 10, 13, 15, 18, 21 및 24일 때의 컨트롤 그룹 (그룹 1)에 대한 치료 그룹들 (그룹 2, 3, 4)의 상대적인 종양 볼륨의 중간 값(median)을 나누고 상기 나눔의 결과 수치에 100을 곱하여 산출되었다 (도 2 참조). (본 발명의 문맥에서 사용되는 생체적합 나노입자를 포함하거나 또는 포함하지 않는) 치료 주입 후 2주 내로 획득된 가장 낮은 % T/C 값들이 최적의(optimal) %T/C 값에 상응한다.
- [0132]
- [0133] 도 3은 하기의 것을 정맥투여 한 후 (앞서 언급된 조건하에서) 획득된 모든 그룹들에 대한 평균 상대 종양 볼륨 (평균 RTV)를 보여준다:
- [0134] - 비히클 (멸균 글루코오스 5%), 1, 7 및 14일 (그룹 1);
- [0135] - 실시예 3의 생체적합 나노입자, 1, 7 및 14일의 각 비히클 (멸균 글루코오스 5%) 투여 4시간 전 (그룹 2);
- [0136] - Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신), 1, 7 및 14일 (그룹 3); 또는
- [0137] - 실시예 3의 생체적합 나노입자, 1, 7 및 14일의 Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신) 투여 4시간 전(그룹 4).
- [0138] 도 3에서 보이는 바와 같이, Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신) 단독과 비교해서, (i) 실시예 3의 생체적합 나노입자 및 (ii) Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신)의 조합을 포함하는 약학적 조성물의 첫 번째 주입 후에 마크된 종양 성장 억제가 관찰되었다.
- [0139] 종양 각각의 볼륨이 두 배가 되는데 요구되는 시간 (일수로 표현됨) (T4d)는 산출되었다 (치료 효과의 기간을 측정함에서). Dox-NP® 단독 투여에 대한 T4d가 14일이지만, 약학적 조성물에 대한 T4d는 약 31일로 측정되었다

(표 1). 또한, (100mm<sup>3</sup>에서 400mm<sup>3</sup>까지의 평균 TRV로부터 시작되는) 두(two) 배가 시간(double time)동안의 종양 성장으로부터 측정되는 특이적 성장 지연 (specific growth delay: SGD)은 약학적 조성물에 대하여 약 2와 동등한 반면, Dox-NP® 단독인 경우 약 0을 나타내었다 (표 1).

표 1

[0140]

그룹	100 내지 400 mm <sup>3</sup> 의 T4d (일) (평균 RTV)	SGD
그룹 1: 비히클 (컨트롤 그룹)	11	-
그룹 2: 실시예 3의 생체 적합 나노입자	11	0
그룹 3 : Dox-NP® 단독 (3mg/Kg)	14	0
그룹 4: (i) 실시예 3의 생체적합 나노입자 및 (ii) Dox-NP® (3mg/Kg)를 포함하는 약학적 조성물	31	2

[0141]

표 1: 종양 볼륨이 두 배가 되는데 걸리는 시간 (T4d) 및 두, 배가 시간(doubling time) 동안 종양 성장으로부터 측정되는 특이적 성장 지연 (Specific Growth Delay) (SGD). Td4 는 두 배가시간(doubling time) (100 mm<sup>3</sup> 내지 400 mm<sup>3</sup>의 평균 RTV) 에 도달하는 데 걸리는 일 수를 의미한다. 컨트롤 그룹은 비히클 (글루코오스 5%) 단독 (-)이다.

[0142]

더욱이, 퍼센트 T/C(%T/C) (그룹 1이 희생되는 날까지 산출됨)는 Dox-NP® 단독에 비해 약학적 조성물에서 더 빨리 감소된다. 이는 약학적 조성물의 뚜렷한 영향을 의미한다. 24일에 관찰된 최상의 %T/C 인 25는 실제로 (i) 실시예 3의 생체적합 나노입자 및 (ii) Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신)의 조합인 약학적 조성물로부터 획득되었다. 반면 21일차에 관찰 된 최상의 %T/C 인 38은 그룹 Dox-NP® 단독으로부터 획득 되었다 (도 2).

표 2

[0143]

날짜	그룹 2: 생체적합 나노입자 단독	그룹 3: Dox-NP® 단독 (3mg/kg)	그룹 4: (i) 생체적합 나노입자 및 (ii) Dox-NP® (3mg/Kg) 를 포함하는 약학적 조성물
1	100	100	100
3	104	126	121
7	90	106	80
10	87	76	60
13	103	80	55
15	98	74	45
18	98	56	43
21	87	38	33
24	98	40	25

[0144]

표 2: 퍼센트 T/C (%T/C)는 1, 3, 7, 10, 13, 15, 18, 21 및 24일에서의 컨트롤 그룹 (그룹 1) 대비 치료 그룹 (그룹 2, 3, 4)에서의 상대적 종양 볼륨의 중간 값을 나누고 상기 나눈 결과 값에 100을 곱하여 산출된다. 컨트롤 그룹은 그룹 1 (비히클, 멸균 글루코오스 5% 단독)이다. %T/C는 그룹 1 (컨트롤 그룹)이 희생되는 날인 24일 까지 산출된다. 최상의 %T/C는 각 그룹에 대해서 회색 박스로 표시된다.

[0145]

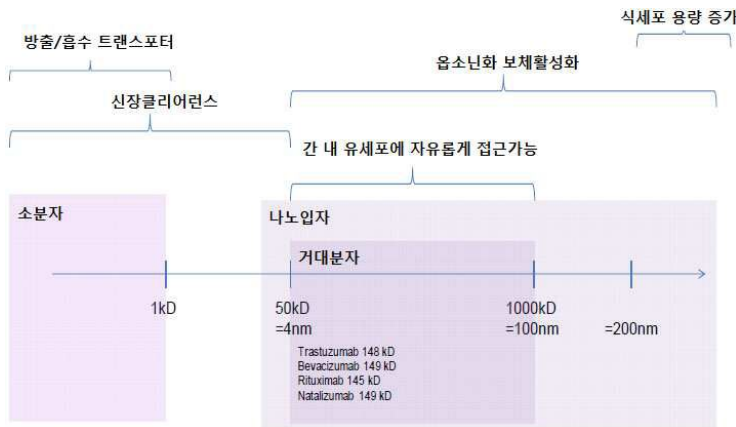
전반적으로, 이러한 결과는 본 발명에 따른 약학적 조성물 [즉 (i) 실시예 3의 생체적합 나노입자 및 (ii) the

Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신)의 조합과 상응하는 조성물]의 유리한 종양 성장 지연을 보여주는데, 이는 Dox-NP® (3mg/kg 독소루비신)이 단독으로 사용될 때(즉 본 발명의 문맥에서 사용되는 생체 적합 나노입자가 존재하는 않는 경우에는) 관찰되지 않는 결과이다. 이러한 종양 성장 지연은 실시예 3의 생체적합 나노입자 및 목적하는 화합물 (Dox-NP®)이 연속적으로 투여되고, 생체적합 나노입자는 Dox-NP®의 투여 4시간 전에 투여될 때 관찰되었다.

[0146] 본 발명자들은 목적하는 화합물과 생체적합 나노입자가 개체 내에 어느 하나가 다른 하나로부터 5분 초과 내지 72시간 간격으로 투여되는 한 동일한 결과가 관찰됨을 확인하기 위해 이러한 실험을 재생산한다.

도면

도면1



도면2



도면3

