



- (51) 국제특허분류:
C07F 9/6593 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/009726
- (22) 국제출원일: 2011년 12월 16일 (16.12.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0130998 2010년 12월 20일 (20.12.2010) KR
10-2011-0091796 2011년 9월 9일 (09.09.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주) 씨엔팜 (CNPHARM CO., LTD.) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 종합과학관 비동 455, 120-750 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 손연수 (SOHN, Yoon-Soo) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 압구정동 481 현대아파트 93 동 1003 호, 135-905 Seoul (KR). 전용주 (JUN, Yong-Joo) [KR/KR]; 서울특별시 강북구 번 3 동 한양아파트 101 동 1007 호, 142-742 Seoul (KR).
- (74) 대리인: 한양특허법인 (HANYANG PATENT FIRM); 서울특별시 강남구 도곡동 412-1 한양빌딩, 135-854 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 특허출원 및 특허를 받을 수 있는 출원인의 자격에 관한 선언 (규칙 4.17(ii))

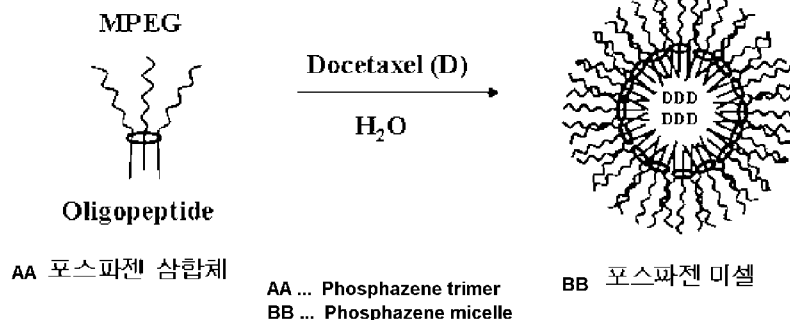
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: AMPHIPHILIC CYCLIC PHOSPHAZENE TRIMER, HYDROPHOBIC PHARMACEUTICAL FORMULATION MICELLIZED BY AMPHIPHILIC CYCLIC PHOSPHAZENE TRIMER, AND PREPARATION METHODS THEREOF

(54) 발명의 명칭: 양친성 고리형 포스파젠 삼합체, 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제 및 그 제조 방법

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to an amphiphilic cyclic phosphazene trimer having biocompatibility and a preparation method thereof. In addition, the invention relates to a hydrophobic pharmaceutical formulation micellized by the amphiphilic cyclic phosphazene trimer and a preparation method thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 생체 적합성을 갖는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 및 그 제조 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀(micelle)화한 소수성 약물제제 및 그 제조방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 양친성 고리형 포스파젠 삼합체, 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제 및 그 제조 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 생체 적합성을 갖고 정맥주사용 약물전달체로 사용되는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 및 그 제조 방법에 관한 것이다.
- [2] 또한 본 발명은 상기 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀(micelle)화한 소수성 약물제제 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 출원은 2010년 12월 20일에 한국 특허청에 제출된 한국 특허 출원 제10-2010-0130998호 및 2011년 9월 9일에 한국 특허청에 제출된 한국 특허 출원 제10-2011-0091796호의 출원일의 이익을 주장하며, 그 내용 전부는 본 명세서에 포함된다.

배경기술

- [3] 인체에 약물을 투여하는 방법은 투여 경로에 따라 여러 가지 방법이 있으나 역시 경구 및 주사 투여가 주류를 이루고 있다. 특히 주사 투여는 경구투여에 비하여 위장에서의 흡수과정을 생략할 수 있어 약물의 손실과 흡수시간을 줄일 수 있으므로 특히 효율적인 약물치료를 필요로 하는 암이나 당뇨병과 같은 난치병 치료제 투여에 널리 사용되고 있다.
- [4] 그러나 약물을 주사 투여하려면 수용성이어야 하는데 난치병 약물 중에는 물에 잘 녹지 않는 난용성 치료제가 많다. 따라서 이들을 가용화 하기 위하여 여러 종류의 계면활성제 등 첨가제를 사용하는데 이 경우 많은 부작용이 발생하고 치료효과에 큰 제약이 따르고 있다.
- [5] 예를 들면, 현재 항암제로 세계적으로 가장 널리 사용되고 있는 도스타셀(docetaxel)은 물에 대한 용해도가 6~7 µg/mL로 낮기 때문에 주사제로 사용하기 위하여 계면활성제인 폴리조베이트 80 (polysorbate 80)과 13% 에탄올 용액으로 제제하여 "탁소티어" (Taxotere®)라는 상품명으로 판매되고 있다. 그러나 탁소티어는 도스타셀의 신경독성과 같은 자체독성 외에 계면활성제인 폴리조베이트 80에 의한 급성 과민증, 부종(edema) 등의 부작용도 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한 도스타셀은 광 및 열에 대한 안정성이 낮아 계면활성제 폴리조베이트 80에 도스타셀을 녹인 용액의 바이알과 별도로 13% 에탄올 용액을 넣은 바이알 등 2용액 세트로 판매되고, 환자에게 사용 시 이 두 용액을 균일하게 혼합한 후 염수로 희석하여 8시간 이내에 환자에게 주입(infusion)해야 하는 단점이 있다.
- [6] 세계적으로 널리 사용되고 있는 최면 마취제 프로포폴(propofol) 또한 물에 불용성이기 때문에 1%의 프로포폴을 함유하는 리피드(lipid) 에멀전으로 만들어져 Diprivan®이라는 상품명으로 1986년부터 판매되고 있다. 그러나 콩기름이 주성분인 리피드 에멀전 형태의 프로포폴 마취제는 정맥주사 시

환자에게 심한 통증과 알러지를 유발하지만 아직까지 대체품이 개발되지 못하고 있다.

- [7] 한편 최근에는 분자량이 비교적 큰 양친성 선형 공중합체를 고분자 약물전달체로 이용하여 소수성 약물을 미셀화하여 주사투여하면 이들 약물의 대사, 생체분포, 약효 및 독성 등을 개선할 수 있다는 사실이 알려져서, 이러한 고분자 약물전달체를 이용하여 소분자량 약물들의 치료 효과를 개선하려는 소위“고분자 요법(polymer therapy)”(R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45,(2006) 1198-1215)에 관한 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.
- [8] 고분자 미셀을 이용한 도스타셀 제제 연구의 대표적인 사례를 찾아보면, 친수성인 폴리(에틸렌옥사이드)와 소수성인 폴리(스티렌옥사이드)의 공중합체(PEO-b-PSO) 및 폴리(에틸렌옥사이드)와 폴리(부틸렌옥사이드)의 공중합체(PEO-b-PBO)를 사용한 경우(E. Mahmoud, et al. *Macromolecules*, 2007, 8, 2250-2257), 친수성인 메톡시폴리에틸렌글리콜(MPEG750)과 소수성인 올리고카프로락톤(oligo-caprolactone)의 공중합체(MPEG750-b-OCL₅)를 사용한 경우(M.G. Carstens, et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68(2008)596-606), 친수성인 폴리에틸렌글리콜(PEG)과 소수성인 폴리락타이드(PLA)로 구성된 양친성 고분자(PEG-b-PLA)를 사용한 경우(H.-C. Shin et al. *J. Control. Release*, 140(2009)294-300)등을 들 수 있다. 그러나 이들의 연구결과를 보면, 양친성 고분자 미셀은 종래의 계면활성제 미셀에 비하여 부분적으로는 향상된 물성을 보여주고 있으나 순수한 고분자 자체의 미셀 안정도는 높지만 도스타셀이 적재된 후의 미셀 안정도는 매우 낮아서 대부분 24시간 내에 약물이 침전되어 버리는 단점을 여전히 가지고 있다.
- [9] 즉, 종래의 유기계 양친성 고분자는 대부분 선형 공중합체로 수용액에서 자기조립에 의하여 미셀을 쉽게 형성하지만 미셀의 안정도가 낮아 특히 도스타셀 약물을 적재할 경우, 미셀이 불안정화 되어 대부분 약물이 다시 침전되어 버리므로 주사용 약물전달체로 적합하지 않다. 또한 양친성 고분자의 경우, 상술한 미셀의 안정도 외에 정맥주사용 약물전달체로서 충족시켜야 할 중요한 물성이 한 가지 더 있다. 양친성 고분자는 일반적으로 수용액에서 균일한 미셀 형태로 존재하지만 용액의 온도를 올릴 경우, 미셀의 친수성 껍질(shell)과 용매인 물과의 수소결합이 약화되어 고분자 미셀들이 서로 엉기면서 고체상으로 분리되는데 이러한 상(phase)변화 온도를 “저임계용액온도”(lower critical solution temperature, "LCST")라고 한다. 고분자 미셀을 정맥주사용 약물전달체로 안전하게 사용하려면 고분자의 저임계용액온도가 체온(37°C)보다 훨씬 높아야 혈중에서 고분자 미셀의 상변화에 의한 혈액 응고를 방지할 수 있다.
- [10] 따라서 가장 이상적인 정맥주사용 약물전달체는 종래의 계면활성제 미셀이나 양친성 고분자 미셀보다 수용액에서 더 강력하고 안정된 미셀을 형성함으로써 소수성 약물을 충분히 가용화 하여 안정화시킬 수 있고, 저임계용액온도가

체온보다 훨씬 높아서(예를 들면 50°C 이상) 안전하게 정맥주사를 할 수 있어야 하며, 체내에서는 약효와 독성 및 대사 등을 개선할 수 있어야 할 것이다.

- [11] 본 발명자들은 최근 피하주사 할 경우, 약물전달체가 체온에 의하여 겔(gel) 또는 침전물을 형성함으로써 운반약물의 방출속도를 조절 할 수 있는 소위 국부전달용 약물전달체로서, 고리형 포스파젠 골격에, 친수성기로 폴리에틸렌옥사이드($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$)의 중합도(n)가 7(평균 분자량 350) 내지 16(평균분자량 750)인 폴리에틸렌글리콜(X)과, 소수성기로 트리헵타이드 내지 펜타헵타이드(Y)를 도입한 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 $[\text{N}=\text{P}(\text{X})(\text{Y})]_3$ 를 세계 최초로 개발한 바 있다(한국등록특허 제10-0567397호). 이들 고리형 포스파젠 삼합체들은 종래의 선형 양친성 고분자와 달리, 한 분자 내에 3개의 소수성 헵타이드 그룹들이 같은 방향으로 배열되어 있어 이들의 강력한 입체적 소수성 상호작용에 의하여 강력한 핵(core)을 이루고, 주위에 친수성인 폴리에틸렌글리콜 그룹들이 껍질(shell)을 이루어 안정한 구형의 미셀을 형성한다(도 1). 그러나 종래의 양친성 포스파젠 삼합체들은, 앞에서 설명하였듯이 대부분 저임계용액온도가 체온근처(31-42°C)이므로 정맥주사 할 경우, 혈액이 응고되므로 정맥주사용 약물전달체로는 적합하지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 따라서, 본 발명의 목적은, 정맥주사용 약물전달체로 사용 가능한 양친성 고리형 포스파젠 삼합체를 제공하는 것이다.
- [13] 또한 본 발명의 목적은, 상기 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체를 제공한다.
- [15] [화학식 1]
- [16] $[\text{N}=\text{P}(\text{MPEG})(\text{올리고헵타이드 에스터})]_3$
- [17] 상기 식에서,
- [18] MPEG는 에틸렌옥사이드($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$)의 평균 중합도(n)가 17(평균 분자량 780) 내지 45(평균분자량 2000)인 메톡시폴리에틸렌글리콜이고, 올리고헵타이드 에스터는 헥사헵타이드 내지 나노헵타이드의 C_{1-6} 알킬에스터 또는 C_{7-13} 아릴알킬에스터이다.
- [19] 또한 본 발명은 소수성 약물을 상기 화학식 1의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제를 제공한다.
- [20] 또한 본 발명은 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 100 중량부와 소수성 약물 2~30 중량부를 공통 용매에 용해시키는 단계 및 상기 공통 용매를 증발시켜 제거한 다음, 잔류 용매를 진공 건조하여 양친성 고리형 포스파젠 삼합체에

미셀화한 소수성 약물을 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [21] 본 발명의 양친성을 확장한 고리형 포스파젠 삼합체는 종래의 고리형 포스파젠 삼합체가 액상인데 비하여 고체상으로 얻어지며, 소수성이 강하여 물에 잘 녹지 않는 소분자량의 도스타셀 항암제 등 소수성 약물을 미셀화하여 효율적으로 가용화할 수 있을 뿐만 아니라, 미셀화 된 고체상 분말로 제제할 수 있으므로, 약물의 물리화학적 안정성과, 약효 및 독성을 획기적으로 개선할 수 있다. 특히 본 발명의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 미셀로 제제된 도스타셀과 같은 소수성 약물을 체내에 투여할 경우, 혈중에서 도스타셀의 방출을 지연시킴으로서 생체이용률을 획기적으로 향상시키고 독성을 완화시킬 수 있다. 뿐만 아니라 본 발명의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 도스타셀은 종래의 액상제제와는 달리 고체상으로 제제되기 때문에 광분해성 안정도가 획기적으로 개선되어 장기간 보관이 가능하고 사용이 아주 편리하다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 고리형 포스파젠 삼합체 미셀과 종래의 선형 고분자 미셀의 구조적 차이를 나타낸다.
- [23] 도 2는 본 발명의, 친수성기와 소수성기를 갖는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체의 제조방법을 나타낸다. 그림에서 n 은 메톡시폴리에틸렌글리콜의 평균분자량이 780 내지 2,000이 되게 하는 정수이다.
- [24] 도 3은 소수성인 도스타셀을 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 개념도이다.
- [25] 도 4는 유방암인 MDA-MB-231에 대한 누드마우스를 이용한 in vivo xenograft 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 본 발명은 하기 화학식 1의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체를 제공한다.
- [27] [화학식 1]
- [28] $[N=P(MPEG)(\text{올리고펩타이드 에스터})]_3$
- [29] 상기 식에서,
- [30] MPEG는 폴리에틸렌옥사이드($(CH_2CH_2O)_n$)의 중합도(n)가 17(평균 분자량 780) 내지 45(평균분자량 2000)의 메톡시폴리에틸렌글리콜이고, 올리고펩타이드 에스터는 헥사펩타이드 내지 나노펩타이드의 C_{1-6} 알킬에스터 또는 C_{7-13} 아릴알킬에스터이다.
- [31]
- [32] 본 발명자들이 이미 보고한, 친수성기로 평균분자량이 350 내지 750인 폴리에틸렌글리콜과, 소수성기로 트리펩타이드 내지 펜타펩타이드를 도입한

양친성 고리형 포스파젠 삼합체는 저임계용액온도가 대부분 체온근처(31-42°C)이기 때문에 정맥 주사용 약물전달체로는 적합하지 않았으며, 특히 도스타셀을 적재한 이들 삼합체 미셀의 안정도도 충분치 못하였다.

- [33] 본 발명자들은 정맥주사용 약물전달체로 이용하기 위해서는 포스파젠 삼합체 미셀의 안정성이 높아야 한다는 것을 인식하고, 역동광산란법(dynamic light scattering method)을 이용하여 다양한 올리고펩타이드를 포함하는 고리형 포스파젠 삼합체에 대해 예비 실험을 하였다. 그 결과 적어도 소수성이 헥사펩타이드 내지 나노펩타이드 정도 즉, 소수성 지수인 $\log P(P = [\text{solute}]_{\text{n-octanol}} / [\text{solute}]_{\text{water}})$ 가 2 이상인 올리고펩타이드를 고리형 포스파젠 삼합체에 도입하는 경우, 안정한 미셀의 임계 농도(<10 mg/L)를 유지할 수 있음을 밝혀내었다.
- [34] 또한 정맥주사용 약물전달체로 이용되기 위해서는 고리형 포스파젠 삼합체의 저임계용액온도가 높아야 한다는 것을 인식하고 고온, 바람직하게는 50°C 이상의 저임계용액온도를 갖는 포스파젠 삼합체를 제조하고자 노력한 결과, 소수성인 올리고펩타이드로 헥사펩타이드 내지 나노펩타이드를 고리형 포스파젠 삼합체에 도입하는 경우 적어도 폴리에틸렌옥사이드의 평균 중합도가 17(평균분자량 780) 내지 45(평균분자량 2000)가 되는 폴리에틸렌글리콜 ($\log P < -2.8$)을 도입하여야 포스파젠 미셀의 저임계용액온도를 50°C 이상으로 유지할 수 있음을 밝혀내었다.
- [35] 본 발명의 화학식 1의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체에 있어서, 올리고펩타이드는 바람직하게는 글라이신(Gly), 페닐알라닌(Phe), 루이신(Leu), 이소루이신(Ile), 알라닌 (Ala) 및 발린(Val)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 소수성 아미노산들을 포함하는 헥사펩타이드 내지 나노펩타이드이다.
- [36] 상기 알킬에스터 또는 아릴알킬에스터의 바람직한 예로 메틸에스터, 에틸에스터 또는 벤질에스터 등을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 상기 올리고펩타이드 에스터의 구체적인 예로는, 글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실에틸에스터(GlyPheLeuGlyPheLeuEt), 글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실벤질에스터(GlyPheLeuGlyPheLeuBz) 또는 글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실에틸에스터(GlyPheLeuGlyPheLeuGlyPheLeuEt)등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [38] 상기 올리고펩타이드를 포함하는 상기 화학식 1의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체의 예로는 트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜780)트리스(글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실에틸에스터)사이클로트리포스파젠 ([NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃),

트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜780)트리스(글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실벤질에스터)사이클로트리포스파젠

([NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]₃),

트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜1000)트리스(글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실벤질에스터)사이클로트리포스파젠

([NP(MPEG1000)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]₃), 또는

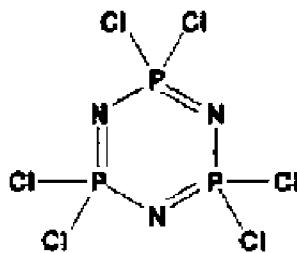
트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜2000)트리스(글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실에틸에스터)사이클로트리포스파젠([NP(MPEG2000)(GlyPheLeuGlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃) 등을 들 수 있다.

그러나 역시 이에 제한되는 것은 아니다.

- [39] 상기 화학식 1로 표시되는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체는, 하기 화학식 2의 6염화 포스파젠 삼합체[(N=PCl₂)₃]로부터 제조될 수 있다. 예를 들면 하기 화학식 2의 6염화 포스파젠 삼합체 1몰에 대하여 친수성기로서 폴리에틸렌글리콜의 평균 중합도(n)가 17(평균분자량 780) 내지 45(평균분자량 2,000)의 메톡시폴리에틸렌글리콜의 나트륨염 또는 칼륨염 3몰과 소수성기로서 헥사펩타이드 내지 나노펩타이드의 C₁₋₆ 알킬에스터 또는 벤질에스터 3몰을 순차적으로 치환시킴으로써 얻을 수 있다.

[40] [화학식 2]

[41]



- [42] 그 제조과정을 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

- [43] 먼저 폴리에틸렌글리콜의 평균 중합도(n)가 17 내지 45의 모노메톡시폴리에틸렌글리콜을 과량의 나트륨 또는 칼륨 금속 조각과 함께 반응시켜 하기 화학식 3의 메톡시폴리에틸렌글리콜의 나트륨염 또는 칼륨염을 제조한다. 이 때 상기 반응을 수행하는 용매는 임의의 유기용매가 사용될 수 있으며, 예를 들면 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠 또는 톨루엔 중에서 수행할 수 있다. 상기 반응은 불활성 기체(예: 아르곤 기체)의 존재 하에서 약 5시간 이상 환류시킴으로써 수행할 수 있다.

[44] [화학식 3]

[45]



- [46] 이렇게 만든 상기의 메톡시폴리에틸렌글리콜염 3당량을 상기 화학식 2의 고리형 6염화 포스파젠 삼합체 1몰(6당량)과 0°C 이하의 저온에서 반응시켜

메톡시폴리에틸렌글리콜과 염소를 각각 3당량씩 포함하는 포스파젠 삼합체 중간체를 제조한다. 반응용매는 상기 반응을 저해하지 않는 임의의 용매가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 테트라하이드로퓨란, 톨루엔, 클로로포름 등에서 선택된 용매를 1종 이상 사용할 수 있다.

- [47] 그런 다음 상기반응에서 얻어진 고리형 포스파젠 중간체를 헥사펩타이드 내지 나노펩타이드의 C₁₋₆알킬에스터 또는 벤질에스터 3몰과 반응시켜 목적하는 최종 생성물인 상기 화학식 1의 양친성 포스파젠 삼합체를 제조할 수 있다. 이 때, 그 반응비율은 특별히 한정되는 것은 아니나 헥사펩타이드 내지 나노펩타이드의 C₁₋₆알킬에스터 또는 벤질에스터를 상기 고리형 포스파젠 중간체 1몰에 대해 3 내지 5당량 반응시킬 수 있다. 또한 상기 반응은 친핵성 치환반응을 촉진하는 염기의 존재 하에서 반응시키는 것이 바람직하며, 예를 들어 트리에틸아민 등이 사용될 수 있다. 반응용매는 상기 반응을 저해하지 않는 임의의 용매일 수 있으며, 바람직하게는 테트라하이드로퓨란, 벤젠, 톨루엔, 클로로포름 및 이들의 조합에서 선택될 수 있다. 상기 반응은 실온 내지 70°C의 온도에서 약 24~72시간 동안 반응시킨 후, 계속해서 40~60°C의 온도에서 약 1~4일간 환류반응 시킬 수 있다.
- [48] 상기 반응이 완료된 후에는, 상기 화학식 1의 생성물을 분리 및 정제하는 과정을 수행할 수 있다. 즉, 반응용액을 원심분리 또는 여과 등에 의해, 부산물로 생성된 과량의 침전물들을 제거한다. 그런 다음 여액을 감압농축한 후 물로 3회 이상 세척하고, 유기층을 건조제(예: MgSO₄)로 건조한 후 다시 감압 여과하여 여액을 수득할 수 있다. 그 여액을 다시 감압 농축한 다음 마지막으로 크로마토그래피를 이용하여 분리 정제하여 상기 화학식 1의 순수한 포스파젠 삼합체를 고체상태로 얻을 수 있다.
- [49] 본 발명은 상기 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제를 제공한다.
- [50] 상기 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제에서 소수성 약물이란 물에 난용성인 약물이면 제한 없이 사용 가능하나 바람직하게는 정맥주사제로 제조할 필요가 있는 약물이다. 상기 소수성 약물로 바람직하게는 도스타셀(docetaxel), 파클리탁셀(paclitaxel) 등의 항암제와 프로포폴(propofol)과 같은 마취제, 펩타이드 또는 단백질 약물 등을 들 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [51] 본 발명의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제는 물리화학적으로 안정한 고체상의 분말 제제가 가능하여 보관성도 크게 개선되고 사용이 간편하다는 장점이 있다.
- [52] 상기 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제는 상기 화학식 1의 양친성 포스파젠 삼합체 100 중량부와, 소수성 약물 2~30 중량부를 공통 용매에 용해시키는 단계 및 상기 공통 용매를 증발시켜 제거한 다음, 잔류 용매를 건조하여 양친성 고리형 포스파젠 삼합체에 미셀화한 소수성 약물을

수득하는 단계를 통해 제조될 수 있다.

- [53] 일반적으로 물에 불용성인 약물을 종래의 양친성 고분자로 미셀화하여 물에 용해시키는 방법으로는 투석법(dialysis)이 가장 많이 사용되고 있다. 즉, 수불용성인 약물과 양친성 고분자 약물전달체를 공통 유기용매에 완전히 녹인 후 약물의 분자량에 따라 적절한 투석막에 넣어 봉인한 다음 물로 투석하면 수용성 미셀형 약물이 얻어진다. 그러나 이 방법은 정확한 투석시간을 맞추는 것과 약물농도의 제어가 쉽지 않고, 미셀화된 약물을 용액으로부터 회수하는 번거로운 절차를 거쳐야 하는데 이에 반해 본 발명의 제조방법은 공정이 단순하다는 장점이 있다.

- [54] 본 발명의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제의 제조방법에 사용되는 공통 용매로는 특별히 제한은 없으나, 예를 들면 에탄올, 메탄올 등의 알코올, 아세톤, 클로로포름, 에틸아세테이트, 클로로벤젠, 아세트니트릴 등을 1종 이상 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [55] 이하 본 발명의 구성 및 작용을 실시예 및 실험예를 들어 설명하나, 본 발명의 권리범위가 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 실시예에서는 Perkin-Elmer C, H, N 분석기로 탄소, 수소 및 질소의 원소 분석을 수행하였다. 수소의 핵자기 공명 스펙트럼은 Bruker DPX-250 NMR Spectrometer를, 인 핵자기 공명 스펙트럼은 Varian Gemini-500 NMR Spectrometer를 사용하여 얻었다. 수용액 중에서의 나노 입자의 입도 분포는 Malvern Zetasizer (Nano-ZS)를 사용하여 측정하였다.
- [57]
- [58] 실시예 1:
트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜780)트리스(글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실에틸에스터)사이클로트리포스파젠
([NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃)의 제조
- [59] 평균분자량 780의 메톡시폴리에틸렌글리콜(8.11 g, 10.4 mmol)을 톨루엔 용매 하에서 딘스탁(Dean Stark)을 이용해 건조한 후 나트륨조각 (0.26 g, 11.4 mmol)을 넣고 아르곤 기류 하에서 12시간 환류하여 메톡시폴리에틸렌글리콜의 나트륨염 용액을 얻었다. 헥사클로로사이클로트라이포스파젠(1.00 g, 2.88 mmol)을 건조된 테트라하이드로퓨란 용매에 녹인 다음 얼음 중탕(0°C)에 넣고 앞서 제조된 메톡시폴리에틸렌글리콜 나트륨염 용액을 천천히 적가하였다. 얼음 중탕을 제거하고 이 용액에 트라이에틸아민(2.61 g, 25.8 mmol)과 헥사펩타이드 에틸에스터 HClGlyPheLeuGlyPheLeuEt (8.05 g, 11.2 mmol)를 녹인 클로로포름 용액(100 ml)을 가한 후 70°C로 온도를 올려 48시간 동안 반응시켰다. 반응용액을 원심분리 또는 여과하여 생성된 과량의 침전물들(Et₃NHCl 또는 NaCl)을 제거하고 여액을 감압 농축하였다. 이 농축액에 메탄올을 가하여 다시 녹인 후

다시 감압 농축하였다. 이 과정을 2~3회 반복한 후 다시 메탄올 100 ml에 녹인 후 투석막(통과분자량:1000)을 이용하여 24시간 동안 투석한 후 다시 증류수로 24시간 투석하여 동결 건조하였다. 소량의 다른 이성질체를 제거하기 위하여, 위에서 얻어진 화합물을 컬럼크로마토그래피를 (alumina, 50-200 mesh, neutral, MC/MeOH=97:3) 이용하여 분리 정제하였다. 이렇게 얻은 화합물을 감압 증류하여 최종 포스파젠 생성물 [NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃ (수율, 64.0%)을 얻었다.

[60] 조성식: $C_{213}H_{366}N_{21}O_{75}P_3$.

[61] 분자량 = 4483.9

[62] 원소분석 결과:

[63] 이론치: C, 57.06; H, 7.55; N, 6.56. 실험치: C, 56.6; H, 8.21; N, 6.33.

[64] ¹H NMR (CDCl₃, δ in ppm): 0.69-0.87 (m, 36H, 2(Leu-(CH₃)₂)), 1.14 (t, 9H, Leu-OCH₂CH₃), 1.31-1.62 (m, 18H, 2(Leu-CHCH₂)), 2.60-3.09 (b, 12H, 2(Phe-CH₂)), 3.68-3.96 (b, 12H, 2(Gly-CH₂)), 4.0-4.1 (m, 6H, Leu-OCH₂CH₃), 4.17-4.44 (m, 6H, 2(Leu-CH)), 4.5-4.8 (b, 6H, 2(Phe-CH)), 7.14-7.23 (m, 30H, Phe-C₆H₅), 7.9-8.54 (m, 18H, NHCO)

[65] ³¹P NMR(CDCl₃, δ in ppm): 22.4.

[66] **Lower critical solution temperature (LCST):** 72.0°C.

[67] 실시예 2:

트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜780)트리스(글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실벤질에스터)사이클로트리포스파젠 ([NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]₃)의 제조

[68] 헥사펩타이드 에틸에스터 HClGlyPheLeuGlyPheLeuEt 대신 같은 몰수의 헥사펩타이드 벤질에스터 HClGlyPheLeuGlyPheLeuBz를 사용하여 실시예 1과 동일한 방법으로 다음과 같은 물성의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 [NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]₃를 합성하였다(수율: 45.7%).

[69] 조성식: $C_{243}H_{402}N_{21}O_{81}P_3$.

[70] 분자량: 5006.8

[71] 원소분석 결과: 이론치: C, 58.29; H, 8.09; N, 5.87. 실험치: C, 58.73; H, 8.09; N, 6.23.

[72] ¹H NMR (250MHz, DMSO, 25°C): δ= 0.73-0.87 (m, 36H, 2(Leu-(CH₃)₂)), 1.2-1.56 (m, 18H, 2(Leu-CH₂CH)), 2.71-2.3 (m, 12H, 2(Phe-CH₂)), 3.24 (s, 9H MPEG-OCH₃), 3.79 (d, 12H, 2(Gly-CH₂)), 4.3 (b, 6H, 2(Leu-CH)), 4.61 (b, 6H, 2(Phe-CH)), 5.11(d, 6H, C₆H₅-CH₂), 7.22 (s, 30H, 2(Phe-C₆H₅)), 7.5 (s, 15H, O-CH₂-C₆H₅), 7.9-8.54 (m, 18H; NHCO)

[73] ³¹P NMR(CDCl₃, ppm): δ= 22.7

[74] **LCST** = 66°C.

[75] 실시예 3:

트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜1000)트리스(글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실벤질에스터)사이클로트리포스파젠
([NP(MPEG1000)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]₃)의 제조

- [76] 분자량 780의 메톡시폴리에틸렌글리콜 대신 같은 몰수의 분자량 1000의 메톡시폴리에틸렌글리콜을, 그리고 헥사펩타이드 에틸에스터 HClGlyPheLeuGlyPheLeuEt 대신 같은 몰수의 헥사펩타이드 벤질에스터 HClGlyPheLeuGlyPheLeuBz를 사용하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 다음과 같은 물성의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 [NP(MPEG1000)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]₃ (수율: 50.7%)를 제조하였다.
- [77] 조성식: C₂₅₈H₄₃₂N₂₁O₉₀P₃.
- [78] 분자량: 5322.2
- [79] 원소분석결과: 이론치: C, 57.80; H, 8.12; N, 5.49. 실험치: C, 57.63; H, 8.10; N, 5.43.
- [80] ¹H NMR (250MHz, DMSO, 25°C): δ= 0.73-0.87 (m, 36H, 2(Leu-(CH₃)₂)), 1.2-1.56 (m, 18H, 2(Leu-CH₂CH)), 2.71-2.3 (m, 12H, 2(Phe-CH₂)), 3.24 (s, 9H, MPEG-OCH₃), 3.37-3.5 (m, 264H, MPEG1000-OCH₂CH₂), 3.79 (d, 12H, 2(Gly-CH₂)), 4.3 (b, 6H; 2(Leu-CH)), 4.61 (b, 6H; 2(Phe-CH)), 5.11(d, 6H; C₆H₅-CH₂), 7.22 (s, 30H, 2(Phe-C₆H₅)), 7.5 (s, 15H, O-CH₂-C₆H₅), 7.9-8.54 (m, 18H; NHCO)
- [81] ³¹P NMR(CDCl₃, ppm): δ= 22.9
- [82] LCST = 70°C.
- [83] 실시예 4:
트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜2000)트리스(글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실에틸에스터)사이클로트리포스파젠([NP(MPEG2000)(GlyPheLeuGlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃)의 제조
- [84] 분자량 780의 메톡시폴리에틸렌글리콜 대신 같은 몰 수의 분자량 2,000의 메톡시폴리에틸렌글리콜을, 그리고 헥사펩타이드 에틸에스터 HClGlyPheLeuGlyPheLeuEt 대신 같은 몰수의 나노펩타이드 에틸에스터 HClGlyPheLeuGlyPheLeuGlyPheLeuEt를 사용하여, 제조예 1과 동일한 방법으로 다음과 같은 물성의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 [NP(MPEG2000)(GlyPheLeuGlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃를 합성하였다(수율: 39.7%).
- [85] 조성식: C₄₃₂H₇₇₁N₃₀O₁₆₈P₃.
- [86] 분자량: 9166.77
- [87] 원소분석결과: 이론치: C, 56.60; H, 8.48; N, 4.58. 실험치: C, 56.33; H, 8.79; N, 4.37.
- [88] ¹H NMR (250MHz, DMSO, 25°C): δ= 0.73-0.87 (m, 54H 3(Leu-(CH₃)₂)), 1.10 (t, 9H, Leu-OCH₂CH₃) 1.2-1.56 (m, 27H, 3(Leu-CH₂CH)), 2.71-2.3 (m, 18H, 3(Phe-CH₂)), 3.24 (s, 9H, MPEG2,000-OCH₃), 3.37-3.5 (m, 540H, MPEG2,000-OCH₂CH₂), 3.79

(d, 18H, 3(Gly-CH₂)), 4.0-4.1 (m, 6H, Leu-OCH₂CH₃), 4.3 (b, 9H, 3(Leu-CH)), 4.61 (b, 9H, 3(Phe-CH)), 7.22 (s, 45H, 3(Phe-C₆H₅)), 7.9-8.54 (m, 18H; NHCO)

[89] ³¹P NMR(CDCl₃, ppm): δ= 22.6

[90] LCST = 96°C.

[91] 실시예 5: [NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃로 미셀화된 도스타셀 항암제의 제조

[92] 실시예 1에서 만든 포스파젠 삼합체 100 mg과 도스타셀 25 mg을 무수 에탄올 10 ml에 완전히 용해시킨 후 회전증발기로 아스피레이터 감압 하에서 에탄올 용매를 서서히 증발시킨 다음 30분 내지 1시간 동안 진공 건조시켜 잔류 용매를 완전히 제거하면 포스파젠 삼합체로 미셀화된 고체상의 도스타셀 항암제를 얻는다.

[93]

[94] 실시예 6 및 실시예 7: [NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃로 미셀화된 도스타셀 항암제의 제조

[95] 하기 표 1의 함량으로 실시예 5와 같이 제조하여 포스파젠 삼합체로 미셀화된 고체상의 도스타셀 항암제를 얻는다.

[96] 표 1

[Table 1]

	실시예 1의 포스파젠 삼합체(mg)	도스타셀(mg)	무수 에탄올(ml)
실시예 5	100	25	10
실시예 6	100	12	10
실시예 7	100	5	5

[97] 실시예 8 내지 실시예 10: [NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃로 미셀화된 파클리탁셀 항암제의 제조

[98] 하기 표 2의 함량으로 실시예 5와 같이 제조하여 포스파젠 삼합체로 미셀화된 고체상의 파클리탁셀 항암제를 얻는다.

[99] 표 2

[Table 2]

	실시예 1의 포스파젠 삼합체(mg)	파클리탁셀(mg)	무수 에탄올(ml)
실시예 8	100	25	10
실시예 9	100	12	10
실시예 10	100	5	5

[100] 실시예 11: [NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃로 미셀화된 프로포폴

주사액의 제조

- [101] 실시예 1에서 만든 포스파젠 삼합체 45 mg과 프로포폴 원액 5 mg을 무수 에탄올 10 ml에 완전히 용해시킨 후 회전증발기로 아스피레이터 감압 하에서 에탄올 용매를 서서히 증발시킨 다음 10 내지 20분간 진공 건조시켜 잔류 용매를 완전히 제거하고 증류수 1 ml에 녹여 투명한 0.5% 프로포폴 주사액을 얻는다.
- [102] 실시예 12 내지 실시예 14: [NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]₃로 미셀화된 도스타셀 항암제의 제조
- [103] 하기 표 3의 함량으로 실시예 5와 같이 제조하여 포스파젠 삼합체로 미셀화된 고체상의 도스타셀 항암제를 얻는다.

- [104] 표 3

[Table 3]

	실시예 2의 포스파젠 삼합체(mg)	도스타셀(mg)	무수 에탄올(ml)
실시예 12	100	25	10
실시예 13	100	12	10
실시예 14	100	5	5

- [105] 실시예 15 내지 17: [NP(MPEG1000)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]₃로 미셀화된 도스타셀 항암제의 제조
- [106] 하기 표 4의 함량으로 실시예 5와 같이 제조하여 포스파젠 삼합체로 미셀화된 고체상의 도스타셀 항암제를 얻는다.

- [107] 표 4

[Table 4]

	실시예 3의 포스파젠 삼합체(mg)	도스타셀(mg)	무수 에탄올(ml)
실시예 15	100	25	10
실시예 16	100	12	10
실시예 17	100	5	5

- [108] 실시예 18 내지 20: [NP(MPEG2000)(GlyPheLeuGlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃로 미셀화된 도스타셀 항암제의 제조
- [109] 하기 표 5의 함량으로 실시예 5와 같이 제조하여 포스파젠 삼합체로 미셀화된 고체상의 도스타셀 항암제를 얻는다.
- [110] 표 5

[Table 5]

	실시에 4의 포스파젠 삼합체(mg)	도스타셀(mg)	무수 에탄올(ml)
실시에 18	100	25	10
실시에 19	100	12	10
실시에 20	100	5	5

- [111] 실시예 21: 본 발명의 [NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]₃와 종래의 [NP(MPEG350)(GlyPheLeuGlyEt)]₃의 도스타셀 제제 비교 실험
- [112] 본 발명의 실시예 1의 포스파젠 삼합체와 한국등록특허 제0567397호(손연수 등)의 실시예 1의 포스파젠 삼합체를 이용하여 본 발명의 실시예 5와 같은 방법으로 도스타셀 항암제를 제제한 후 수용액에서의 미셀의 안정성, 마우스에 대한 정맥 주사 실험 등을 실시하였다. 우선 본 발명의 실시예 1로 제제된 도스타셀 항암제는 분말형 미셀로 얻어졌으나 한국등록특허 제0567397호의 실시예 1로 제제된 도스타셀 항암제는 오일 형태의 액상으로 얻어졌다. 이렇게 제제된 약물을 각각 도스타셀 기준 0.2% 수용액으로 제조한 후 상기 수용액 10 ml씩을 20 ml 투명한 바이알에 넣고 실내 조명하에 상온에서 관찰한 결과 한국등록특허 제0567397호의 실시예 1의 용액은 약 3일 후 도스타셀 약물이 대부분 포스파젠 미셀에서 분리되어 침전 되었으나 본 발명의 실시예 1의 용액은 3개월이 지나도 도스타셀의 분리 침전이 전혀 관찰되지 않았다. 또한 상기 수용액을 각각 ICR mouse 3마리에 10 mg/kg dose로 정맥주사를 시도 한 결과, 본 발명의 실시예 1의 용액(저임계용액온도 = 72°C)은 용이하게 꼬리부분에 정맥주사가 가능하였으나 한국등록특허 제0567397호의 실시예 1의 용액(저임계용액온도 = 36°C)은 주사 시작과 함께 용액의 점도가 높아져 주사액의 주입을 완료 할 수 없었다.
- [113]
- [114] 실험예 1: 포스파젠 미셀형 도스타셀 항암제와 탁소티어의 혈 대사 비교 실험
- [115] 수컷 스프라그-돌리(SD) 래트 (230~250g) 5마리를 1군으로 하여, 각 개체에 대하여 도스타셀 투여량을 5mg/kg로 하여 실시예 6의 포스파젠 고분자 미셀형 도스타셀과 비교약물인 탁소티어를 정맥 주입(i.v. infusion)으로 3분 동안 투여하였다. 약물 투여 후 48시간 동안 시간별(0, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48시간)로 혈액(100μl)을 채취하여 각 시료를 원심분리기로 플라스마를 분리한 후 -20°C에서 보관한 다음 HPLC로 분석하였다. 이렇게 얻은 시간 대 플라스마 도스타셀 농도 곡선으로부터 윈논린(WinNonlin) 프로그램을 이용하여 약물동력학적 파라미터들을 계산하여 다음 표 6에 표시하였다.
- [116] 표 6

[Table 6]

대사 파라미터	탁소티어	실시예 6
	Mean±S.D.	Mean±S.D.
C ₀ (ug/ml)	5.32±1.58	4.07±0.92
AUClast(ug*hr/ml)	0.360 ±0.116	0.664±0.050
t _{1/2} (hr)	0.396±1.11	0.711±0.796
Ke(1/hr)	8.05±3.65	1.78±0.992
Vz(L)	1.24±2.21	1.67±1.55
Cl(L/hr)	3.38±1.00	1.86±0.281

[117] * C₀: 초기농도, AUC: 플라스마-시간 곡선내 면적, t_{1/2}: 반감기, Ke: 제거율 상수, Vz: 분포 부피, Cl: 소진율

[118]

[119] 표 6에서 보면, 실시예 6의 고분자 미셀형 도스탁셀 항암제의 체내 반감기(t_{1/2}=0.711시간)는 현재 임상에서 사용되고 있는 탁소티어(t_{1/2}=0.396시간)에 비하여 약 2배 정도 길고, 약물의 생체이용률을 나타내는 AUC (Area under the curve) 값은 본 발명의 미셀형 도스탁셀 항암제(0.664)가 탁소티어(0.360)의 약 2배 정도로 높음을 알 수 있다. 탁세인 계열 항암제는 백금착물과 같은 다른 항암제와 달리 소수성이 매우 강하고 혈중 내의 수송 단백질에 의하여 매우 빨리 제거된다는 사실을 고려하면 약물의 혈중 반감기와 생체이용률이 2배로 증가한 것은 대단한 결과이다.

[120] 실험예 2: 포스파젠 미셀형 파클리탁셀 항암제와 탁솔의 혈 대사 비교 실험

[121] 상기 실험에 1과 똑같은 방법으로 본 실시예 8의 미셀형 파클리탁셀과 Cremophor EL로 제제된 탁솔(Bristolmyer사 제품)의 혈대사 실험을 수행한 결과 아래 표 7과 같은 결과를 얻었다. 표에서 보면 본 발명의 미셀형 파클리탁셀의 반감기가 계면활성제로 가용화한 탁솔보다 약 2배증가했고 생체이용률을 나타내는 AUC 값도 배가 증가함을 알 수 있다.

[122] 표 7

[Table 7]

대사 파라미터	탁솔	실시예 8
	Mean±S.D.	Mean±S.D.
C ₀ (ug/ml)	2.70±0.65	1.53±0.15
AUClast(ug*hr/ml)	1.97 ±0.31	2.97±0.59
t _{1/2} (hr)	3.54±2.46	6.29±2.51
Ke(1/hr)	0.275±0.165	0.133±0.077
Vz(L)	2.78±1.74	4.47±2.01
Cl(L/hr)	0.56±0.063	0.51±0.015

[123] * C₀: 초기농도, AUC: 플라스마-시간 곡선내 면적, t_{1/2}: 반감기, Ke: 제거율 상수, Vz: 분포 부피, Cl: 소진율

[124]

[125] 실험예 3: 포스파젠 미셀형 도스타셀 항암제와 탁소티어의 누드마우스를 이용한 in vivo 항암효능 비교실험

[126] 시험동물은국내산 누드마우스 CAnN.Cg-Foxn1nu/CrljOri를 1군 당 5마리씩 사용하였고, 사용한 암세포주는 유방암인 MDA-MB-231, 표준물질은 부형제 플라시보(Placebo)를, 양성 대조약으로는 현재 임상에서 사용하는 탁소티어를 최적 투여량인 15 mg/kg에서, 그리고 시험물질로는 본 실시예 6의 포스파젠 미셀형 도스타셀 5mg/kg 및 15 mg/kg의 2가지 다른 투여량에서 in vivo 항암효과를 비교하였다. 약물 투여방법은 상기 유방암 세포주를 누드마우스에 이식하여 암조직의 부피가 80-100 mm³에 도달하면 약물을 상기 투여량에 따라 1, 5, 9일째 3회 투여하였고 5주간 암조직의 성장 속도를 측정하여 다음 도 4에 도시하였다.

[127] 도 4에서 보면, 탁소티어는 문헌에 보고된 최적의 투여용량인 15mg/kg에서 예상대로 암조직의 완전한 치유효과(regression)을 보여주고 있는데, 본 포스파젠 미셀형 도스타셀(DTX로 표기)의 경우를 보면, 같은 15 mg/kg 용량에서는 물론 최소 용량인 5mg/kg에서도 완전한 암조직의 치유효과를 보여주고 있다. 이러한 동물실험 결과는 본 포스파젠 미셀형 도스타셀의 경우 현재 임상에서 사용되는 탁소티어의 치료 용량을 1/3로 줄일 수 있는 가능성을 보여주고 있으므로 아주 획기적인 실험결과라 할 수 있다. 사실 이러한 실험결과는 앞의 실험예 1의 혈 대사실험에서 포스파젠 미셀형 도스타셀의 생체이용률 파라미터(AUC)가 탁소티어에 거의 2배로 나타난 결과와 일치하고 있다. 만약 임상에서도 도스타셀의 투여 용량을 1/3로 줄일 수 있다면 도스타셀 약물에 의한 부작용을 획기적으로 줄일 수 있을 뿐만 아니라 치료비용도 크게 줄일 수 있어 엄청난 파급효과가 기대된다. 이러한 항암 효능실험결과는 다음 실험예 4의 급성독성

시험결과도 일치하고 있다.

[128] 실험예 4: 미셀형 도스타셀 항암제와 탁소티어의 세포독성 비교실험

[129] 본 발명의 고분자 미셀형 도스타셀 항암제와 현재 임상에서 사용되는 탁소티어에 대하여 항암 치료의 범위와 효능을 비교하기 위하여 문헌에 보고된 방법(Rita Song 외 *J. Control. Release* 105 (2005)142-150)에 따라 8종의 주요 인간 암 세포주에 대하여 생체외 항암 활성 시험을 실시하여 그 결과를 아래의 표 8에 나타내었다. 표 8에서 보면 in vitro 세포독성 (IC₅₀)은 탁소티어에 비하여 포스파젠 미셀형 도스타셀이 PEG의 분자량에 관계없이 전반적으로 다소 낮게 나오는데 그 이유는 도스타셀 항암제 성분이 강력한 포스파젠 미셀 내부에 갇혀 있어 암세포와의 접촉이 지연되기 때문이라 생각된다. 그러나 전반적으로 포스파젠 미셀형 도스타셀과 탁소티어의 암 치료 범위는 거의 유사함을 알 수 있다.

[130] 표 8

[Table 8]

Tumor cells	In vitro cytotoxicity(IC ₅₀ , nM)		
	탁소티어	실시에 6	실시에 16
HCT-15(colon)	34.1 ±0.08	54.7 ±17.2	58.4 ±13.9
A549(lung)	5.85 ±1.85	8.81 ±1.41	10.4 ±1.46
PC3(prostate)	9.80 ±2.09	12.6 ±1.22	13.7 ±1.15
SNU638(stomach)	0.748 ±0.09	3.65 ±0.83	5.27 ±0.08
SK-OV-3(ovary)	9.21 ±0.59	14.4 ±1.42	14.6 ±2.73
A431(epidermoid)	4.90 ±2.33	10.8 ±2.73	14.5 ±5.17
MCF-7(breast)	4.24 ±0.52	8.74 ±0.40	9.85 ±0.225
MES-SA(cervical)	31.1 ±10.2	26.8 ±8.97	36.8 ±9.41

[131]

[132] 실험예 5: 포스파젠 미셀형 도스타셀 항암제와 탁소티어의 급성독성 비교실험

[133] 6 주령의 몸무게 20-22g인 수컷 ICR 쥐들(male ICR mice)을 20°C, 60% 습도에서 5일간 순화시킨 후 OECD 가이드 라인 423(OECD guide line 423)에 따라 시험하였다. 즉 시험물질을 생리염수에 녹인 다음, 탁소티어의 경우에는 5, 30, 50, 100 mg/Kg 용량으로, 그리고 실시에 6의 도스타셀을 10% 포함하는 포스파젠 미셀형 도스타셀은 5, 50, 300, 500, 1000, 2,000 mg/Kg 용량으로 각각 3마리씩 정맥 투여한 후 2주간 개체별 체중변화, 생존율을 관찰하였고 2주후에는 조직검사를 실시하고 OECD guide line 425에 따라 LD₅₀ 값을 계산하였다.

[134] 실험결과를 보면, 탁소티어의 경우, 5 mg/Kg 에서는 3마리 모두 살아남았으나 30 mg/Kg에서는 3마리 중 2마리가 죽고, 50 및 100 mg/Kg에서는 3마리 모두 죽어

LD₅₀ 값을 계산하면 약 28 mg/Kg으로 산출되었다. 다음, 도스타셀을 10% 포함하는 포스파젠 미셀형 도스타셀의 경우에는 500 mg/Kg 까지는 모두 살아남았고 1,000 및 2,000 mg/Kg에서는 3마리 모두 죽어 LD₅₀ 값을 계산하면 약 750 mg/Kg으로 산출되며 도스타셀로 환산하면 75 mg/Kg으로 나온다. 즉, 폴리소베이트 80(polysorbate 80)으로 조제한 탁소티어의 도스타셀 LD₅₀ 값이 28 mg/Kg인데 비하여 실시예 6의 포스파젠 미셀로 조제된 도스타셀은 LD₅₀ 값이 75 mg/Kg으로 약 3배 증가한 것으로 산출되었다. 이렇게 급성독성이 3배로 완화된 이유는 계면활성제로 미셀화된 탁소티어의 경우는 주사 직후 체내에서 미셀이 바로 깨져 도스타셀이 혈중에 바로 방출되지만 본 포스파젠으로 미셀화된 도스타셀은 혈중에서 미셀의 안정도로 인하여 미셀로부터 서서히 방출되므로 급성독성은 많이 완화되고 생체이용률이 증가하여 약효가 증가하는 것으로 추정된다.

[135] 실험예 6: 포스파젠 미셀형 프로포폴 마취제와 Diprivan®의 비교실험

[136] 스프라그-돌리(SD) 래트 16주령(female, 300~340g) 3마리를 1군으로 하여, 경정맥에 약물투여를 위한 IV cannula를 설치하고 시험물질을 10 mg/Kg/min의 속도로 microprocessor-controlled syringe pump를 이용하여 미리 확보된 정맥로를 통하여 투여하였다. 마취유도 능력(Anesthetic induction)을 다음 순서로 평가하고, 마취유도의 end point까지 들어간 propofol의 양을 총 투여용량(Dose)으로 결정하였다.

[137] - 관찰행동의 소실(Stunned)

[138] - 기립반사 소실(Loss of righting reflex)

[139] - 안검자극 반응소실(Loss of lash reflex)

[140] - 10초 간격의 발가락 자극 반응에 따른 반사작용 소실(Loss of leg withdrawal)

[141]

[142] 실험결과를 다음 표 9에 요약하였다. 표 9에서 보면, 실시예 11의 포스파젠 미셀형 프로포폴이 현재 상품으로 사용되는 리피드 에멀전 형태의 프로포폴 주사제인 Diprivan® 보다 마취 시간이 약간 지연되고 있는데 이러한 사실은 종래의 리피드 에멀전 형태의 프로포폴이 주사 직후 에멀전의 분산과 함께 혈중에 유리되어 통증 리셉터와 반응하는데 비하여 포스파젠 미셀에 포집되어 있는 프로포폴은 주사직후 혈중에 바로 유출되지 않고 상당부분 미셀 형태로 조직에 흡수되어 마취가 지연됨을 알 수 있으며, 이러한 사실로부터 현재 문제가 되어 있는 리피드 에멀전 상태의 프로포폴보다 본 발명의 포스파젠 미셀에 포집되어 있는 프로포폴은 혈중의 통증 리셉터와의 반응시간을 줄임으로서 통증 해소에 크게 기여할 수 있을 것으로 추정된다.

[143] 표 9

[Table 9]

미셀형 시험약물(PPF, n = 3)							Diprivan®(n = 30)	
Demography								
ID	Unit	1	2	3	Mean	SD	Mea n	SD
Test date		2011-03-16	2011-03-16	2011-03-16				
Age	weeks	16	16	16	16.00	0.00		
Sex		Female	Female	Female				
BW	kg	0.34	0.305	0.311	0.32	0.02		
Rate	mg/min	3.4	3.05	3.11	3.19	0.19		
Anesthetic induction								
Dose	mg/kg	22.5	38.3	40.8	33.8	9.94	20.5	4.4
Stunned	sec	50	65	25	46.6	20.2	40	9
Loss of righting reflex	sec	60	100	100	86.6	23.0	55	12
Loss of lash reflex	sec	70	140	180	130	55.6	89	17
Loss of leg withdrawal	sec	135	230	245	203	59.6	123	26

청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체.
 [화학식 1]
 $[N=P(MPEG)(\text{올리고펩타이드 에스터})]_3$
 상기 식에서,
 MPEG는 폴리에틸렌옥사이드($(CH_2CH_2O)_n$)의 중합도(n)가 17(평균 분자량 780) 내지 45(평균분자량 2000)의
 메톡시폴리에틸렌글리콜이고, 올리고펩타이드는 헥사펩타이드
 내지 나노펩타이드의 C_{1-6} 알킬에스터 또는 C_{7-13}
 아릴알킬에스터이다.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 올리고펩타이드는 글라이신(Gly),
 페닐알라닌(Phe), 루이신(Leu), 이소루이신(Ile), 알라닌(Ala) 및
 발린(Val) 중에서 선택되는 1종 이상의 소수성 아미노산을
 포함하는 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 올리고펩타이드 에스터는
 글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실에틸에스
 터(GlyPheLeuGlyPheLeuEt),
 글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실벤질에스
 터(GlyPheLeuGlyPheLeuBz) 또는
 글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실글라이실
 페닐알라닐루이실에틸에스터(GlyPheLeuGlyPheLeuGlyPheLeuEt)
 인 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 화학식 1의 양친성 고리형 포스파젠
 삼합체는
 트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜780)트리스(글라이실페닐알라닐
 루이실글라이실페닐알라닐루이실에틸에스터)사이클로트리포스
 파젠 ($[NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuEt)]_3$),
 트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜780)트리스(글라이실페닐알라닐
 루이실글라이실페닐알라닐루이실벤질에스터)사이클로트리포스
 파젠 ($[NP(MPEG780)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]_3$),
 트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜1000)트리스(글라이실페닐알라
 nil루이실글라이실페닐알라닐루이실벤질에스터)사이클로트리포스
 파젠 ($[NP(MPEG1000)(GlyPheLeuGlyPheLeuBz)]_3$) 또는
 트리스(메톡시폴리에틸렌글리콜2000)트리스(글라이실페닐알라
 nil루이실글라이실페닐알라닐루이실글라이실페닐알라닐루이실
 에틸에스터)사이클로트리포스파젠($[NP(MPEG2000)(GlyPheLeuGl$
 $yPheLeuGlyPheLeuEt)]_3$)인 것을 특징으로 하는 양친성 고리형

- 포스파젠 삼합체.
- [청구항 5] 청구항 1의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 소수성 약물제제가 항암제용인 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 소수성 약물이 도스타셀 또는 파클리탁셀인 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제.
- [청구항 8] 청구항 5에 있어서, 상기 소수성 약물제제가 마취제용인 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 소수성 약물이 프로포폴인 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제.
- [청구항 10] 청구항 1의 양친성 고리형 포스파젠 삼합체 100 중량부와 소수성 약물 2~30 중량부를 공통 용매에 용해시키는 단계 및 상기 공통 용매를 증발시켜 제거한 다음, 잔류 용매를 건조하여 양친성 고리형 포스파젠 삼합체에 미셀화한 소수성 약물을 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제의 제조방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 공통 용매는 알코올, 아세톤, 클로로포름, 에틸아세테이트, 클로로벤젠 및 아세트니트릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 양친성 고리형 포스파젠 삼합체로 미셀화한 소수성 약물제제의 제조방법.

[Fig. 4]

Tumor size growth

