(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0067583
(43) 공개일자 2016년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 31/337* (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0173144
(22) 출원일자 2014년12월04일
심사청구일자 2014년12월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
육순홍
세종특별자치시 조치원읍 도원로 16, 112동 202호(자이아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

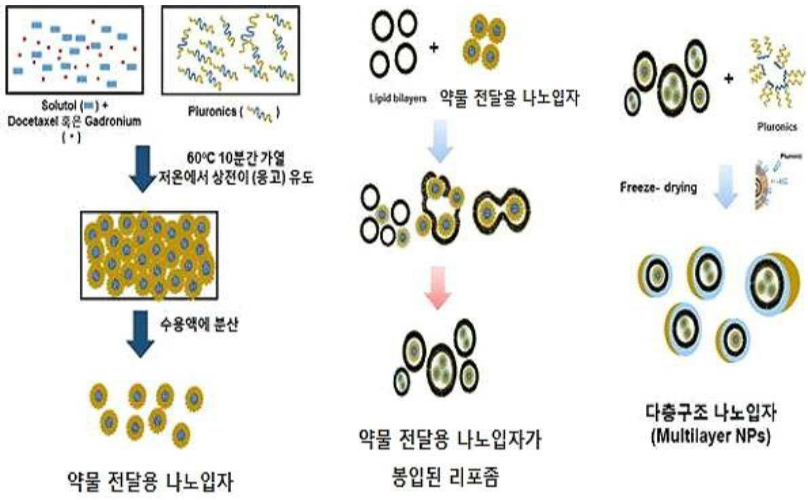
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **약물 전달용 나노입자의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 약물 전달용 나노입자의 제조방법 및 이에 따라 제조된 약물 전달용 나노입자, 상기 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조방법 및 이에 따라 제조된 리포좀, 상기 리포좀을 포함하는 다층 구조의 나노입자의 제조방법, 및 이에 따라 제조된 다층 구조의 나노입자에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 제조 공정에서 유기용매를 사용하지 않기 때문에, 잔류 물질로 인한 독성 문제가 일어나지 않고, 약물의 변성이 일어나지 않아 안정성이 높으며, 약물의 생체 조직에의 분산력이 우수한 약물 전달용 나노입자를 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A004600537
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 충청지역사업평가원
연구사업명 충청광역경제권 선도산업 R&D사업
연구과제명 나노복합체를 이용한 항암제 개량신약 개발
기 여 율 1/1
주관기관 (주)한국유나이티드제약
연구기간 2012.08.01 ~ 2015.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

PEO-PPO-PEO 공중합체(poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) copolymer), PLGA(poly(lactide-co-glycolide)), PCL(poly caprolactone), PLA(poly(lactic acid)) 및 PGA(poly(glycolic acid))로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 고분자, 및 약물을 포함하는 솔루톨 용액을 혼합하여 균질한 고분자 혼합체를 형성하는 단계; 및

상기 고분자 혼합체를 냉각하여 고형화하는 단계를 포함하는 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 고형화된 고분자 혼합체를 수용액 상에서 용해하는 단계를 추가로 포함하는 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 혼합은 40 내지 70℃의 온도에서 이루어지는 것인 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 냉각은 -100 내지 30℃에서 이루어지는 것인 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, PEO-PPO-PEO 공중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 약물 전달용 나노입자의 제조방법:

[화학식 1]

$HO-(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_c-H$

상기 화학식 1에서, b는 10이상의 정수이고, a+c는 말단 부분($(C_2H_4O)_a$ 및 $(C_2H_4O)_c$)이 공중합체의 5 내지 95 중량%, 바람직하게는 20 내지 90 중량%를 차지하도록 하는 수이다.

청구항 6

제1항에 있어서, PEO-PPO-PEO 공중합체는 폴록사머 68, 폴록사머 127, 폴록사머 188, 폴록사머 237, 폴록사머 338 및 폴록사머 407로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 솔루톨 및 고분자의 중량비가 4:1 내지 1:99인 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 약물은 난용성 약물 또는 조영제인 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 난용성 약물은 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 파목신(pamoxin), 아나스테로졸(anasterozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸 (topotecan), 벨로테칸 (belotecan), 이마티닙(imatinib), 이리노테칸 (irinotecan), 플록수리딘(floxuridine), 비노렐빈(vinorelbine), 젬시타빈(gemcitabine), 루프롤리드(leuprolide), 플루타미드(flutamide), 졸레드로네이트(zoledronate), 메토트렉세이트 (methotrexate), 캄토테신(camptothecin), 시스플라틴(cisplatin), 빈크리스틴(vincristine), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴 (fluvastatin), 아토르바스타틴(atorvastatin), 피타바스타틴 (pitavastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 나프록센 (naproxen) 및 로수바스타틴 (rosuvastatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 조영제는 망간, 가돌리늄, 에르븀, 크롬, 철, 코발트, 니켈, 란탄계열 원소, 악티늄계열 원소 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 상자성 물질을 포함하는 것인 약물 전달용 나노입자의 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 약물 전달용 나노입자 및 리포좀 용액을 혼합하는 단계를 포함하는 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 동결 건조하는 단계를 추가로 포함하는 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 리포좀 용액은 10 내지 30 중량%의 레시틴을 포함하는 수용액을 초음파 처리하여 제조되는 것인 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조방법.

청구항 14

제11항에 따른 리포좀 및 하기 화학식 1의 PEO-PPO-PEO 공중합체 수용액을 혼합하는 단계를 포함하는 다층 구조 나노입자의 제조방법.

[화학식 1]

$HO-(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_c-H$

상기 화학식 1에서, b는 10이상의 정수이고, a+c는 말단 부분($(C_2H_4O)_a$ 및 $(C_2H_4O)_c$)이 공중합체의 5 내지 95 중량%, 바람직하게는 20 내지 90 중량%를 차지하도록 하는 수이다.

청구항 15

제14항에 있어서, 동결 건조하는 단계를 추가로 포함하는 다층 구조 나노입자의 제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서, PEO-PPO-PEO 공중합체는 폴록사머 68, 폴록사머 127, 폴록사머 188, 폴록사머 237, 폴록사머 338 및 폴록사머 407로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 다층 구조 나노입자의 제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서, PEO-PPO-PEO 공중합체 수용액은 PEO-PPO-PEO 공중합체를 1 내지 30 중량 %로 포함하는 것인 다층 구조 나노입자의 제조방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 리포좀 및 PEO-PPO-PEO 공중합체의 중량비가 1:0.1 내지 1:99인 다층 구조 나노입자의 제조방법.

청구항 19

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 제조되고, 평균 입경이 5 내지 30nm인 약물 전달용 나노입자.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 약물 전달용 나노입자의 제조방법 및 이에 따라 제조된 약물 전달용 나노입자, 상기 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조방법 및 이에 따라 제조된 리포좀, 상기 리포좀을 포함하는 다층 구조의 나노입자의 제조방법, 및 이에 따라 제조된 다층 구조의 나노입자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 나노공학의 개념이 약학 분야에 도입되면서 우수한 약효를 나타내지만 낮은 용해도 및 독성으로 인하여 임상에서의 사용에 극히 제한을 받고 있는 약물들의 효과적인 체내 전달체가 개발되고 있다.

[0003] 하나의 예로, 고분자 공중합체를 이용한 친수성 고분자 미셀(Polymeric Micelle)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Proceedings of National Academy of Science U.S.A., 2007 volume 104, pages 932-936, by Dmitri Simberg et. al., Journal of Controlled Release, 2010, volume 148, pages 344-350, by Keun Sang Oh et. al). 또한, 안정한 고분자 미셀 조성물을 이용하여 난용성 항암제인 파클리탁셀(Paclitaxel)의 가용화에 관한 발명이 보고된 바 있다(대한민국 등록 특허 제421,451호).

[0004] 그러나 상기의 방법들에서 사용하는 대부분의 블록 고분자들은 인체 내에서의 안전성을 인정받은 상태가 아니기 때문에 실제 임상적용에 많은 문제점이 있다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여, 본 발명자는 인체에 적용이 가능한 플루로닉을 고분자를 담체로 사용하고 온도 상전이현상을 이용하여 나노입자를 제조하는 방법을 개발한 바 있다(대한민국 특허 등록 제932,613호). 그러나, 상기 방법은 나노입자 제조 중에 담지된 약물의 산화가 일어나 응용 가능한 약물의 범위가 극히 제한된다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록 특허 제 10-0421451호

(특허문헌 0002) 대한민국 등록 특허 제10-0932613호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기 문제점을 해결하고자 하는 것으로, 제조 공정 중에 약물의 변성이 일어나지 않아 안정성이 높고, 크기가 작은 초소형 약물 전달용 나노입자의 제조방법 및 이에 따라 제조된 약물 전달용 나노입자에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 상기 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조방법 및 이에 따라 제조된 리포좀, 상기 리포좀을 포함하는 다층 구조의 나노입자의 제조방법 및 이에 따라 제조된 다층 구조의 나노입자에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은, PEO-PPO-PEO 공중합체(poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) copolymer), PLGA(poly(lactide-co-glycolide)), PCL(poly caprolactone), PLA(poly(lactic acid)) 및 PGA(poly(glycolic acid))로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 고분자, 및 약물을 포함하는 솔루톨 용액을 혼합하여 균질한 고분자 혼합체를 형성하는 단계; 및 상기 고분자 혼합체를 냉각하여 고형화하는 단계를 포함하는 약물 전달용 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 약물 전달용 나노입자 및 리포좀 용액을 혼합하는 단계를 포함하는 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 상기 리포좀 및 하기 화학식 1의 PEO-PPO-PEO 공중합체 수용액을 혼합하는 단계를 포함하는 다층 구조 나노입자의 제조방법을 제공한다:

[0010] [화학식 1]

[0011] $HO-(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_c-H$

[0012] 상기 화학식 1에서, b는 10이상의 정수이고, a+c는 말단 부분($(C_2H_4O)_a$ 및 $(C_2H_4O)_c$)이 공중합체의 5 내지 95 중량%, 바람직하게는 20 내지 90 중량%를 차지하도록 하는 수이다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 방법에 따라 제조된 약물 전달용 나노입자, 상기 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀 및 상기 리포좀을 포함하는 다층 구조의 나노입자를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 제조 공정에서 유기용매를 사용하지 않기 때문에, 잔류 물질로 인한 독성 문제가 일어나지 않고, 약물의 변성이 일어나지 않아 안정성이 높으며, 약물의 생체 조직에서의 분산력이 우수한 약물 전달용 나노입자를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 약물 전달용 나노입자, 상기 나노입자가 봉입된 리포좀 및 다층구조 나노입자의 생성 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따라 제조된 약물 전달용 나노입자의 Bio-TEM (Transmittance electron microscopy, 투과 전

자 현미경) 사진이다.

도 3은 본 발명에 따라 제조된 약물 전달용 나노입자의 입자분포도를 보여준다.

도 4는 본 발명에 따라 제조된 다층구조 나노입자의 Bio-TEM (Transmittance electron microscopy, 투과 전자 현미경) 사진이다.

도 5는 본 발명에 따라 제조된 다층구조 나노입자의 입자분포도를 보여준다.

도 6은 기존 도세탁셀 제형 (free docetaxel), 도세탁셀이 충진된 약물 전달용 나노입자, 및 다층구조 나노입자 (Multilayer NPs)의 항암효과를 보여준다.

도 7은 솔루톨 대신 PEG를 사용하여 제조한 약물 전달용 나노입자의 SEM 이미지(Biomaterials, 32 7924-7931(2011))를 보여준다.

도 8은 본 발명에 따른 약물 전달용 나노입자 및 솔루톨 대신에 PEG를 사용하여 제조되는 종래의 나노입자의 X-ray 결정 구조 결과를 보여준다.

도 9는 본 발명에 따른 약물 전달용 나노입자 및 솔루톨 대신에 PEG를 사용하여 제조되는 종래의 나노입자에서 방출되는 도세탁셀의 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 의 히스토그램(Biomaterials, 32 7924-7931(2011))을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은, PEO-PPO-PEO 공중합체(poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) copolymer), PLGA(poly(lactide-co-glycolide)), PCL(poly caprolactone), PLA(poly(lactic acid)) 및 PGA(poly(glycolic acid))로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 고분자, 및 약물을 포함하는 솔루톨 용액을 혼합하여 균질한 고분자 혼합체를 형성하는 단계; 및 상기 고분자 혼합체를 냉각하여 고형화하는 단계를 포함하는 약물 전달용 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0017] 이하에서, 본 발명의 약물 전달용 나노입자의 제조방법 및 이에 따라 제조된 약물 전달용 나노입자에 대하여 상세히 설명한다.

[0018] 다만, 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 이하에서 기술하는 특정 실시예 및 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0019] 도 1의 왼쪽 모식도는, 본 발명의 약물 전달용 나노입자의 제조 과정을 보여준다.

[0020] 본 발명의 약물 전달용 나노입자의 제조방법에 있어서, 먼저 약물을 포함하는 솔루톨 용액과 생체적합성 고분자를 혼합하여 균질한 고분자 혼합체를 형성한다. 생체적합성 고분자의 예는, PEO-PPO-PEO 공중합체 (poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) copolymer), PLGA(poly(lactide-co-glycolide)), PCL(poly caprolactone), PLA(poly(lactic acid)) 및 PGA(poly(glycolic acid))로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상이 포함되나, 이에 제한 되는 것은 아니다.

[0021] 한 구체예에서, PEO-PPO-PEO 공중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 트리블록(triblock) 공중합체일 수 있다.

[0022] [화학식 1]

[0023] $HO-(C_2H_4O)a(C_3H_6O)b(C_2H_4O)c-H$

[0024] 상기 화학식 1에서, b는 10이상의 정수이고, a+c는 말단 부분($(C_2H_4O)a$ 및 $(C_2H_4O)c$)이 공중합체의 5 내지 95 중량%, 바람직하게는 20 내지 90 중량%를 차지하도록 하는 수이다.

[0025] 상기 PEO-PPO-PEO 공중합체의 성질은 폴리옥시프로필렌 블록 및 폴리옥시에틸렌 블록의 비율, 즉 상기 화학식 1

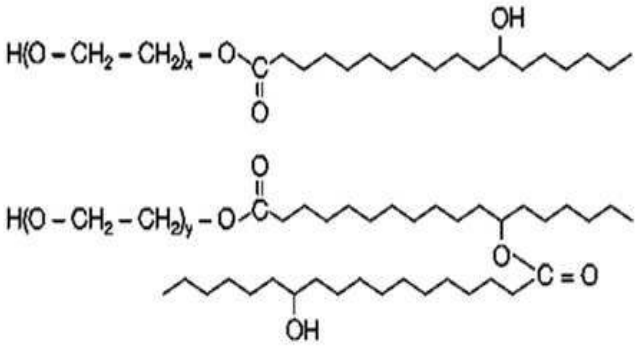
에서 b 및 a+c의 비율에 좌우된다. 상기 PEO-PPO-PEO 공중합체는 공지된 문헌에 기재된 방법으로 제조하거나 미리 제조되어 상업적으로 시판되는 제품을 사용할 수 있다. 본 발명의 제조방법에서 사용하는 PEO-PPO-PEO 공중합체는 특별히 제한되지는 않으나 예를 들면 약 1,000 내지 약 16,000의 분자량을 가질 수 있다.

[0026] 한편, 상기 PEO-PPO-PEO 공중합체는 폴록사머(poloxamer) 또는 플루로닉(pluronic)으로도 알려져 있다. 폴록사머는 실온에서 고체이고, 물과 에탄올에 용해되는 성질을 갖는다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 PEO-PPO-PEO 공중합체로 폴록사머 68(F-68), 폴록사머 127(F-127), 폴록사머 188(F-188), 폴록사머 237(F-237), 폴록사머 338(F-338) 또는 폴록사머 407(F-407) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 폴록사머 188이란 상기 화학식 2에서 b가 30이고 a+c가 75인 화합물로서 분자량이 약 8,350인 폴록사머를 의미한다.

[0027] 한편, 약물을 포함하는 솔루톨(solutol) 용액은 솔루톨과 약물을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0028] 솔루톨(Solutol, HS-15)은 친수성과 소수성을 가지는 양쪽성 고분자로, 비이온성 용해제 혹은 유화제로 사용되는 물질이다. 15 몰(mole)의 에틸렌 옥사이드 (Poly ethylene oxide (PEG)의 주성분) 과 1 몰의 12-하이드록시스테아린 산으로 이루어져 있으며, 주사슬에 친유성 (lipophilic) 의 stearic 구조가 포함되어 있어서 소수성의 약물과 우수한 혼합성을 나타낸다. 솔루톨은 하기 화학식 2로 표시될 수 있다.

[0029] [화학식 2]

[0030] 

[0031] 본 발명의 나노입자에 충진되는 약물의 종류는 제한되지 않으나, 난용성 약물 또는 조영제를 포함한다.

[0032] 한 구체예에서, 난용성 약물은 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 파목신(pamoxin), 아나스테로졸(anasterozole), 카보플라틴(carboplatin), 토포테칸 (topotecan), 벨로테칸 (belotecan), 이마티닙(imatinib), 이리노테칸 (irinotecan), 플록수리딘(floxuridine), 비노렐빈(vinorelbine), 젬시타빈(gemcitabine), 루프롤리드(leuprolide), 플루타미드(flutamide), 졸레드로네이트(zoledronate), 메토트렉세이트 (methotrexate), 캄토테신(camptothecin), 시스플라틴 (cisplatin), 빈크리스틴(vincristine), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴 (fluvastatin), 아토르바스타틴(atorvastatin), 피타바스타틴 (pitavastatin), 프라바스타틴 (pravastatin), 나프록센 (naproxen) 및 로수바스타틴 (rosuvastatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0033] 한 구체예에서, 조영제는 망간, 가돌리늄, 에르븀, 크롬, 철, 코발트, 니켈, 란탄 계열 원소, 악티늄 계열 원소 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 상자성 물질을 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 조영제는 Gd-DOTA 복합체 ((1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) gadolinium(III))일 수 있다. Gd-DOTA 복합체는 MRI (Magnetic Resonance Imaging)에 사용되는 조영제로서 본 발명의 약물 전달용 나노입자에 충진시 분자영상 효과를 증진시키고 특히 암이 발생한 부분을 효과적으로 조영하는 효과가 있다.

[0034] 약물을 포함하는 솔루톨 용액과, 상기 생체적합성 고분자를 혼합하기 위하여, 온도를 각 물질의 용융점 이상으로 유지하여 용융 상태로 만든다.

[0035] 본 발명의 약물 전달용 나노입자의 제조에 있어서, 상기 솔루톨 용액과 상기 생체적합성 고분자를 혼합하기 위

한 온도는 40 내지 70℃, 50 내지 60℃일 수 있다. 상기 온도 범위에서 혼합할 때, 용융된 균질 액상 점성체인 고분자 혼합체를 얻을 수 있다.

[0036] 본 발명의 약물 전달용 나노입자는 솔루톨 및 생체적합성 고분자의 양에 따라 특성이 달라질 수 있다. 예를 들어, 솔루톨 및 생체적합성 고분자의 중량비가 4:1 내지 1:99, 1:1 내지 9:1일 수 있다. 상기 범위에서, 나노입자의 수득율이 향상되며, 충진된 약물의 방출율이 적절하게 유지될 수 있다.

[0037] 다음으로, 균질한 고분자 혼합체를 냉각하여 고형화하는 단계를 포함한다. 냉각하여 고형화 (온도 상전이)하는 단계는 실온에서 공기 중에 방치하거나 외부 냉각기 또는 온도 조절 가능한 반응 용기를 사용하여 냉각속도를 조절하는 단계를 포함할 수 있다. 여기에서, 실온은 15℃를 초과하는 상온을 말하나, 그에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 액상 점성체 형태의 고분자 혼합체를 냉각하는 속도 및 온도는 특별히 한정되지 아니하며, 일반적으로는 실온에서 공기 중에 방치할 때의 온도 저하 속도로도 충분하나, 필요에 따라 외부 냉각기 또는 온도 조절 가능한 반응 용기를 사용하여 냉각 속도를 조절할 수 있다.

[0039] 예를 들어, 냉각은 -100 내지 30℃, -50 내지 25℃, -30 내지 20℃, -10 내지 15℃에서 이루어질 수 있다.

[0040] 본 발명의 제조방법에 있어서, 고형화된 고분자 혼합체를 수용액 상에 용해하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 고형화된 고분자 혼합체를 수용액 상에 용해함으로써 에멀젼 형태의 약물 전달용 나노입자를 수득할 수 있다. 나노입자를 형성하기 위하여 고형화된 혼합물의 용해에 필요한 시간은 일반적으로 실온에서 10분 내지 1시간 정도이지만, 혼합물의 양에 따라 가변적이다.

[0041] 또한, 상기에서 제조된 에멀젼 형태의 약물 전달용 나노입자를 동결 건조하거나, 용매를 제거함으로써 분말 형태의 나노입자를 제조할 수 있다. 용매의 제거는 용매를 증발시킴으로써 이루어질 수 있다. 상기와 같이 증발 또는 동결 건조에 의해 분말 형태의 약물 전달용 나노입자를 제조하는 경우, 약물의 열 변형을 막을 수 있는 이점이 있다.

[0042] 본 발명은 상기에 따라 제조된 약물 전달용 나노입자를 제공한다. 본 발명에 따른 약물 전달용 나노입자의 평균 입경은 5 내지 30㎚, 10 내지 25㎚, 또는 10 내지 20㎚이다. 본 발명의 약물 전달용 나노입자는 상기 범위의 평균 입경을 갖는 초소형 나노입자로, 난용성 약물의 용해도를 크게 개선할 수 있고, 산화 등 약물의 변성이 일어나지 않아 안정성이 높으며, 약물의 생체 조직에의 분산력이 우수한 이점이 있다. 또한, 인체에 유해한 영향을 줄 수 있는 유기 용매나 기타 부형제를 사용하지 않고 체내 잔류 시에도 문제가 없는 생체적합성 고분자를 사용하여 간단한 방법으로 제조할 수 있어 안전성 및 공정 용이성을 모두 달성할 수 있다. 하기 실험예에서 보여주는 바와 같이, 본 발명의 약물 전달용 나노입자는 기존의 제제와 비교하여 암 치료 효과가 우수하다.

[0043] 본 발명은 또한, 상기에서 제조된 약물 전달용 나노입자 및 리포좀 용액을 혼합하는 단계를 포함하는 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 약물 전달용 나노입자를 리포좀 내에 봉입함으로써, 리포좀에 의하여 나노입자를 안정화할 수 있다.

[0044] 본 발명의 리포좀의 제조에 있어서, 사용되는 약물 전달용 나노입자에 관하여는 약물 전달용 나노입자에 대하여 위에서 기술한 모든 내용이 그대로 혹은 적절하게 변경되어 적용될 수 있다.

[0045] 도 1의 가운데 모식도는, 본 발명의 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조 과정을 보여준다.

[0046] 구체적으로, 상기에서 제조된 약물 전달용 나노입자 및 리포좀 용액을 혼합한다. 약물 전달용 나노입자 및 리포좀 용액의 혼합은 나노입자 융합(vesicle fusion)을 이용하여 나노입자와 리포좀을 융합하는 단계이다.

[0047] 리포좀 용액을 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 리포좀 용액은 공지된 어떠한 방법으로 제조하여 사용할 수도 있고, 제조된 용액을 구입하여 사용할 수도 있다. 예를 들어, 리포좀 용액은 인지질을 포함하는 수용액을 초음파 처리 등을 하여 수득할 수 있다.

[0048] 한 구체예에서, 인지질로써 레시틴을 사용하여 약 10 내지 약 30 중량%의 수용액으로 제조한 후, 초음파 처리함으로써 리포좀 수용액을 제조할 수 있다. 상기와 같은 방법으로 수득된 리포좀 수용액 내에 포함된 리포좀의 입경은 약 50 내지 약 150㎚, 바람직하게는 약 100㎚ 정도이다. 상기 범위에서, 약물의 포집율 및 체내 전달율이 향상된다.

[0049] 레시틴은 세포막의 주요 성분인 인지질의 일종으로, 글리세롤에 인산/콜린과 두 분자의 지방산이 결합된 구조를 가진다. 레시틴은 세포막의 구성 성분으로, 콩이나 계란에서 추출되는 자연성분이고, 영양분의 흡수 및 노폐물의 배설 등 생명의 기초대사에 관여하며, 신경 전달 물질인 아세틸콜린을 공급함으로써 뇌의 활동을 도와 치매 등 각종 뇌질환을 치료 및 예방하고, 유화제로 작용하여 혈관벽에 과잉으로 존재하는 콜레스테롤을 용해시킴으로써 심근경색 등 심혈관 질환의 예방에 효과가 있다. 또한, 비타민 A나 E 등 지용성 비타민의 흡수를 촉진시켜 노화를 예방한다. 따라서 수술 후 환자들에게 공급되는 영양분으로 가장 널리 사용되고 있다. 또한, 대부분 주사제(링거액) 형태로 체내에 투여되기 때문에 인체 이용에 아무런 문제점이 없다.

[0050] 약물 전달용 나노입자 및 리포좀 용액을 혼합할 때, 상기 약물 전달용 나노입자 및 리포좀의 중량비는 1: 1 내지 1: 99, 바람직하게는 1: 1 내지 1: 20, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 1:5일 수 있다. 상기 범위에서, 리포좀에 의한 안정화 효과가 우수하면서도, 약물 방출 조절이 원활하게 이루어지는 이점이 있다.

[0051] 본 발명의 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀 제조에 있어서, 약물 전달용 나노입자와 리포좀 용액을 혼합한 후, 동결 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 동결 건조에 대하여는 상기에서 이와 관련하여 기술한 내용이 그대로 적용될 수 있다.

[0052] 본 발명은 또한, 상기 방법에 따라 제조된 리포좀을 제공한다. 상기 방법에 의하여 제조된 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀은 균일한 입도 분포를 나타낸다. 예를 들어, 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 평균 입자 크기는 약 150 내지 약 200㎚일 수 있다. 또한, 본 발명의 리포좀은 나노입자의 융합현상을 이용하여 제조됨으로써, 난용성 약물의 수용액에서의 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0053] 본 발명은 또한, 상기에서 제조된 리포좀 및 하기 화학식 1의 PEO-PPO-PEO 공중합체 수용액을 혼합하는 단계를 포함하는 다층 구조 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0054] [화학식 1]

[0055] $HO-(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_c-H$

[0056] 본 발명의 다층 구조 나노입자의 제조에 있어서, 사용되는 약물 전달용 나노입자 및 리포좀에 관하여는 위에서 기술한 관련된 모든 내용이 그대로 혹은 적절하게 변경되어 적용될 수 있다. 또한, 상기 화학식 1의 PEO-PPO-PEO 공중합체에 관하여는 이와 관련하여 위에서 기술한 모든 내용이 그대로 적용될 수 있다.

[0057] 도 1의 오른쪽 모식도는, 본 발명의 다층 구조 나노입자의 제조 과정을 보여준다. 상기 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀 및 PEO-PPO-PEO 공중합체 수용액을 혼합함으로써 다층 구조의 나노입자를 제조할 수 있다.

[0058] 한 구체예에서, PEO-PPO-PEO 공중합체 수용액은 PEO-PPO-PEO 공중합체를 1 내지 30 중량 %로 포함할 수 있다. 상기 범위에서 제조된 다층 구조 나노입자의 분산력 및 안정성이 우수하고, 표적지로의 약물 전달 효율이 우수한 이점이 있다.

[0059] 한 구체예에서, 상기 리포좀 및 상기 PEO-PPO-PEO 공중합체의 중량비는 1: 0.1 내지 1: 99, 1: 1 내지 1: 20, 또는 1:1 내지 1:5일 수 있다. 상기 범위에서, 리포좀의 표면 안정화 효과가 우수하고 약물의 방출이 원활하게 이루어진다. 리포좀에 대하여 PEO-PPO-PEO 공중합체가 너무 적게 포함되면 PEO-PPO-PEO 공중합체에 의한 리포좀 표면의 안정화 효과가 미미할 수 있다. 반면에, 리포좀에 대하여 PEO-PPO-PEO 공중합체가 너무 많이 포함될 경우 충진된 약물의 방출이 억제되어 바라는 치료효과를 구현할 수 없는 문제가 생길 수 있다.

[0060] PEO-PPO-PEO 공중합체는 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 표면 및 리포좀의 인지질 이중층의 적어도 일부에 PEO-PPO-PEO 공중합체가 교차 결합하는 형태로 회합함으로써 리포좀의 구조를 유지시키는 역할을 한다.

[0061] 본 발명에서 회합(association)이란, 리포좀의 표면 상에 PEO-PPO-PEO 공중합체가 정전기적 인력 등에 의해 리포좀과 결합되어 있거나, 리포좀의 인지질 이중층의 적어도 일부와 PEO-PPO-PEO 공중합체가 교차결합(cross link)한 상태를 모두 포함한다.

[0062] 본 발명의 다층 구조 나노입자의 제조에 있어서, 리포좀 용액과 고분자를 혼합한 후, 동결 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 동결 건조에 대하여는 상기에서 이와 관련하여 기술한 내용이 그대로 적용될 수 있다. 동결건조하여, 분말화함으로써, 장기간 보관할 수 있고, 이동 및 투여시 편리성을 제공할 수 있다.

[0063] 본 발명은 또한, 상기에 따라 제조된 다층 구조 나노입자를 제공한다.

[0064] 본 발명의 다층 구조 나노입자는 상기 리포좀을 다시 생체적합성 고분자인 PEO-PPO-PEO 공중합체에 회합(association)함으로써, 우수한 분산성을 나타내고, 응집 현상이 발생하지 않아 체내 투여를 위하여 수용액 등의 용액에 분산하였을 때 용해되는 과정에서 쉽게 재분산될 수 있다. 또한, 인체에 유해한 영향을 줄 수 있는 유기 용매나 기타 부형제를 사용하지 않고 체내 잔류 시에도 문제가 없는 생체적합성 고분자를 사용하여 간단한 방법으로 제조할 수 있어 안전성 및 공정 용이성을 모두 달성할 수 있다. 더하여, 미세한 분말 형태로 제조하는 경우, 보관 안정성이 향상되어 약제학적 제제로 다양하게 이용 가능하다.

[0065] 이하, 본 발명을 제조예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0066] **[제조예 1] 초소형 약물 전달용 나노입자의 제조**

[0067] 0.2g의 솔루톨 (Solutol)에 도세탁셀 0.05g을 혼합하여 균질한 용액을 제조한 후 0.8g의 플루로닉 (폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 트리블록 공중합체, 폴록사머, F-68)을 첨가한 후 반응용기에 도입하고, 60℃까지 가열하였다. 상기 온도에서 10분 동안 유지한 후에, 반응 혼합물이 완전히 용융되어 액상의 점성체가 되면, 가열을 중단하고 방치하여 실온(15℃)까지 냉각시켰다. 굳어진 혼합체를 증류수에 녹이고, 0.45 ㎛ 필터로 여과하여, 초소형 약물 전달용 나노입자를 수득하였다.

[0068] 수득한 나노입자를 Bio-TEM (Transmittance electron microscopy, 투과 전자 현미경)으로 관찰하였다. 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 구형의 초소형 나노입자가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

[0069] 또한, 제조된 나노입자의 입자 분포도를 입자분석기(Particle size analyzer)를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 제조된 나노입자의 평균 입자직경이 10 내지 20 nm임을 확인할 수 있었다.

[0070] **[제조예 2] 초소형 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀의 제조**

[0071] 0.2g의 솔루톨 (Solutol)에 도세탁셀 0.05g을 혼합하여 균질한 용액을 제조한 후 0.8g의 플루로닉 (폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 트리블록 공중합체, F-68)을 첨가한 후 반응용기에 도입하고, 60℃까지 가열하였다. 상기 온도에서 10분 동안 유지한 후에, 반응 혼합물이 완전히 용융되어 액상의 점성체가 되었을 때, 가열을 중단하고 방치하였다. 실온(15℃)까지 냉각시켜, 초소형 약물 전달용 나노입자를 제조하였다.

[0072] 별도로, 레시틴을 20 중량%의 수용액으로 제조한 후, 10분 동안 초음파 처리하여 리포좀 수용액을 제조하였다. 이때, 리포좀의 입경은 70 nm이었다. 실온에서 응고된 초소형 나노입자 0.1g을 20 중량%의 레시틴 수용액 0.8g과 혼합하고 나노입자 융합을 유도하여 나노입자가 봉입된 리포좀 (다핵구조 나노입자)을 제조하였다. 이때 리포좀의 입경은 70 내지 80 nm이었다.

[0073] **[제조예 3] 초소형 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀을 포함하는 다층 구조 나노입자의 제조**

[0074] 제조예 2에서의 초소형 약물 전달용 나노입자가 봉입된 리포좀 수용액 0.1g에 20 중량%의 플루로닉 (F-68) 수용액 0.8g을 첨가하여 10분간 교반한 후 동결건조하여 분말화된 다층구조 나노입자를 제조하였다.

[0075] 수득한 나노입자를 Bio-TEM (Transmittance electron microscopy, 투과 전자 현미경)으로 관찰하였다. 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 구형의 다층구조 나노입자가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

[0076] 또한, 제조된 나노입자의 입자 분포도를 입자분석기(Particle size analyzer)를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 제조된 나노입자의 평균 입자직경이 50~70 nm임을 확인할 수 있었다.

[0077] **[실험예 1] 나노입자의 항암 효과 확인**

[0078] 제조예 1의 초소형 약물 전달용 나노입자 (Ultrafine Nanoparticles (NPs)) 와 제조예 2의 다층구조 나노입자 (Multilayer Nanoparticles (NPs))의 우수한 항암효과를 확인하기 위하여, 상기 입자 각각에 도세탁셀을 충진하

여 기존의 도세탁셀 제형 ((Taxotere®) 과 항암효과를 비교하였다. 사용한 동물은 C_3H/HeN 마우스이고 종양의 크기가 50-100 mm^3에 달하였을 때 10mg/kg 용량으로 꼬리를 통하여 약물을 정맥 주사하였다. 3일 간격으로 3 회 투여하여 15일이 경과한 후, 암 조직의 크기를 비교하였다.

[0079] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 초소형 약물 전달용 나노입자 및 다층구조 나노입자는 기존의 Taxotere®제형에 비하여 암 조직의 성장속도가 현저히 저하됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 나노입자가 기존 제형에 비하여 우수한 항암효과를 나타냄을 제시한다.

[0080] **[실험예 2] 솔루톨 사용 유무에 따라, 제조된 나노입자 물성 비교**

[0081] [실험예 2-1] 나노입자의 크기 비교

[0082] 솔루톨 대신 폴리에틸렌글리콜 400(PEG 400)을 사용하고, 온도 조건을 90°C(PEG 사용시 나노입자가 형성되는 온도)로 변경한 것만을 제외하고, 제조예 1과 동일한 방법으로 도세탁셀이 함유된 약물 전달용 나노입자를 제조하였다.

[0083] 제조된 나노입자를 SEM(scanning electron microscope)으로 관찰하였다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 마이크로 단위에 가까운 나노입자가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

[0084] 제조된 나노입자의 입자 분포도를 입자분석기(Particle size analyzer)를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 제조된 나노입자의 평균 입자직경이 500nm ~ 1um임을 확인할 수 있었다.

[0085] 이 결과와 제조예 1에 따른 본 발명의 약물 전달용 나노입자의 평균 입자직경을 비교해 본 결과, 본 발명의 약물 전달용 나노입자의 평균 입자직경이 10 ~ 20 nm인데 비하여, PEG를 사용한 경우에는 25 내지 100배 이상 크기가 큰 나노입자가 얻어짐을 확인할 수 있었다.

[0086] 이러한 결과는, 솔루톨을 사용한 경우에만 솔루톨과 약물의 우수한 혼합성으로 인하여 입자 크기가 작은 초소형 나노입자를 제조할 수 있음을 제시한다.

[0087] [실험예 2-2] 나노입자의 결정 구조 비교

[0088] 제조예 1에 따른 본 발명의 약물 전달용 나노입자 및 실험예 2-1에서 제조한 PEG를 사용한 나노입자의 X-ray 결정 구조를 분석하였다.

[0089] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 솔루톨 대신 PEG를 이용하여 제조되는 나노입자의 경우 도세탁셀 및 플루로닉의 결정피크가 그대로 존재하였다. 이는 나노입자를 이루는 요소들간의 혼합도가 좋지 않음을 나타낸다.

[0090] 그러나, 본 발명에 따른 약물 전달용 나노입자는 도세탁셀의 결정피크는 사라지고 플루로닉의 결정피크도 감소함이 관찰되었다. 이는 본 발명의 나노입자는 구성성분 간의 혼합도가 우수함을 의미한다.

[0091] 또한, 구성성분 간의 우수한 혼합도는 나노입자의 크기 감소에 기여할 것임이 예측된다.

[0092] [실험예 2-3] 약물 변성 유무 비교

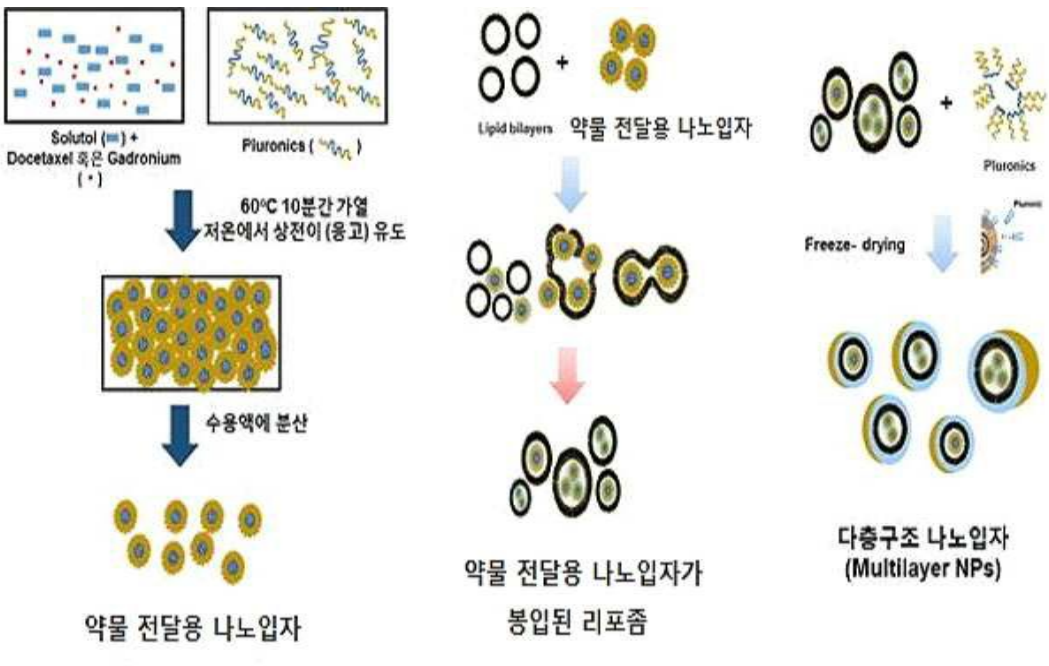
[0093] 실험예 1에서 PEG를 사용하여 제조한 나노입자 및 제조예 1에서 제조한 본 발명의 약물 전달용 나노입자에서 약물 방출 시, 약물이 변성되는 유무를 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 로 확인하였다.

[0094] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, PEG를 사용한 경우, 도세탁셀의 분해 산물인 epi-docetaxel 피크가 관찰되나, 솔루톨을 사용한 경우에는 이와 같은 산화물의 형성이 관찰되지 않음을 알 수 있었다.

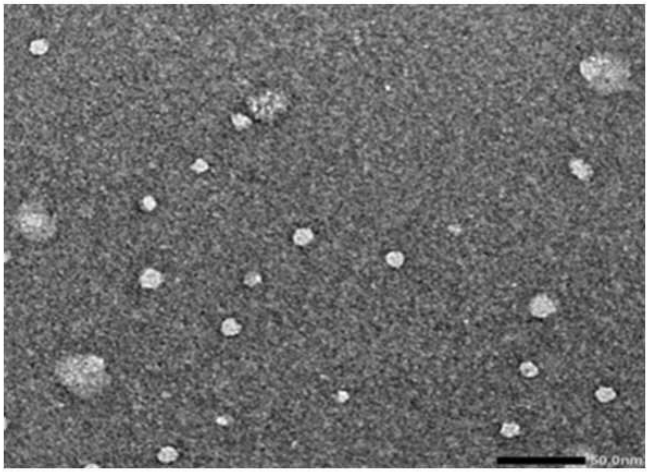
[0095] 이러한 결과는, PEG를 사용할 경우, 높은 용융 온도로 인하여 약물이 산화되는 변성이 일어나지만, 솔루톨을 사용하는 경우에는 약물 변성이 일어나지 않음을 나타낸다.

도면

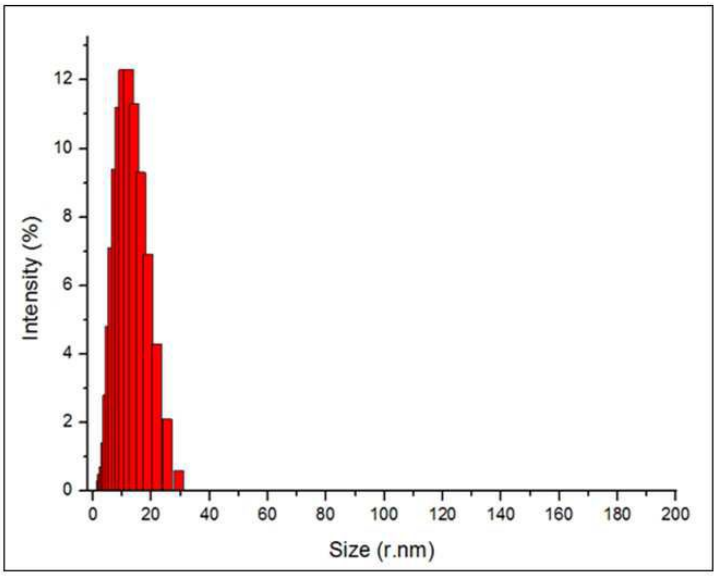
도면1


Solutol (═) +
Docetaxel 혹은 Gadronium
(•)
Pluronics ( )
60°C 10분간 가열
저온에서 상전이 (응고) 유도
수용액에 분산
약물 전달용 나노입자
Lipid bilayers
약물 전달용 나노입자
약물 전달용 나노입자가
봉입된 리포좀
Pluronics
Freeze- drying
다층구조 나노입자
(Multilayer NPs)

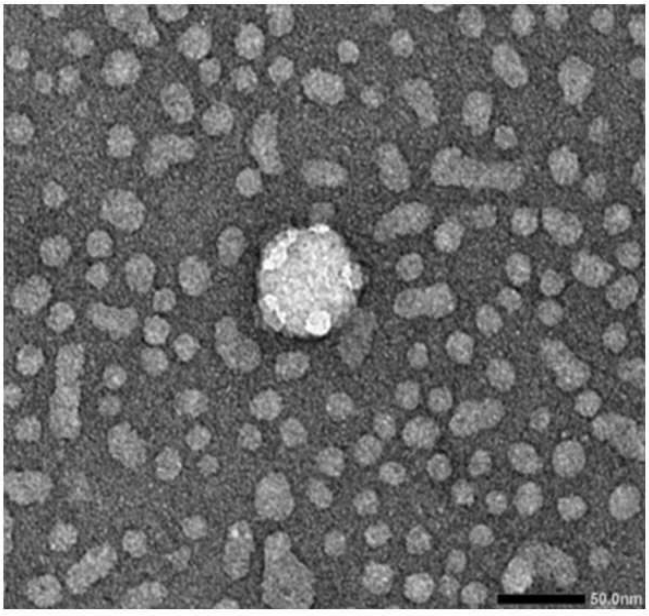
도면2



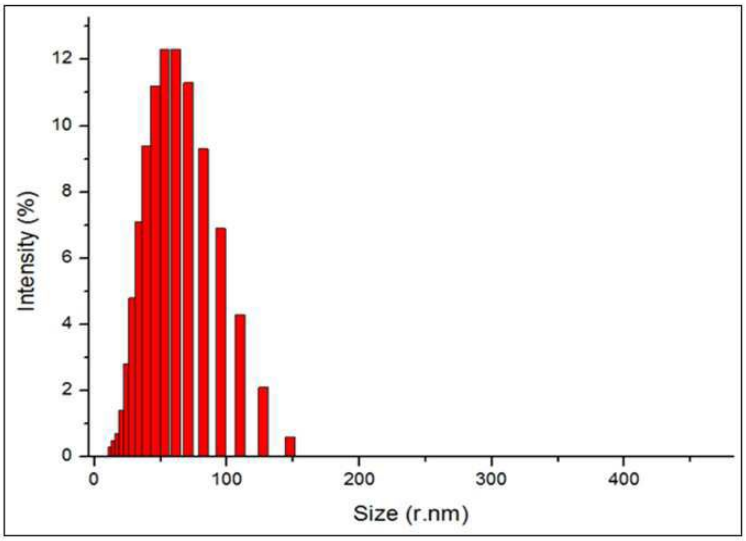
도면3


Intensity (%)
Size (r.nm)
0
2
4
6
8
10
12
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200

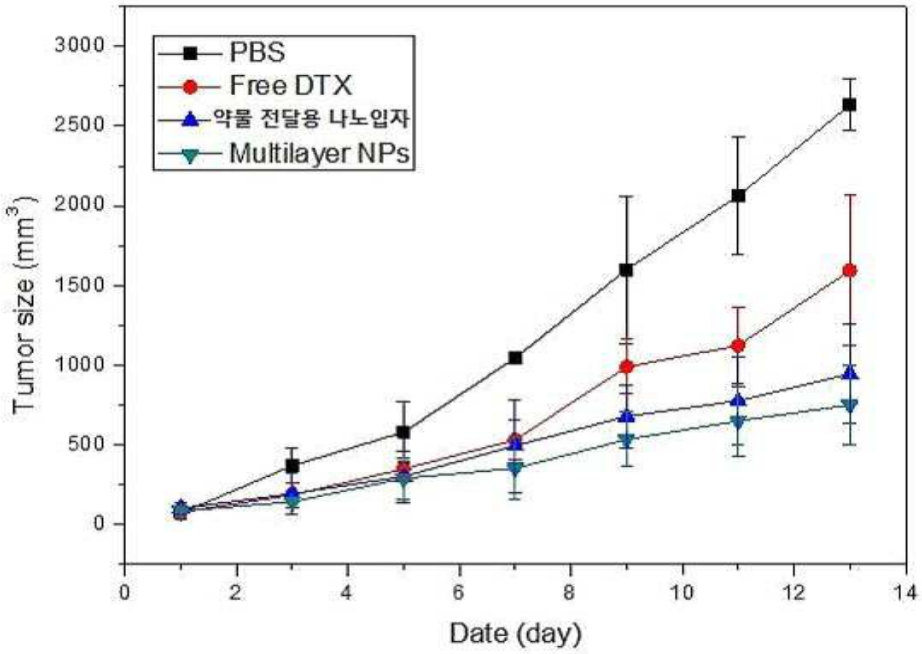
도면4


50.0nm

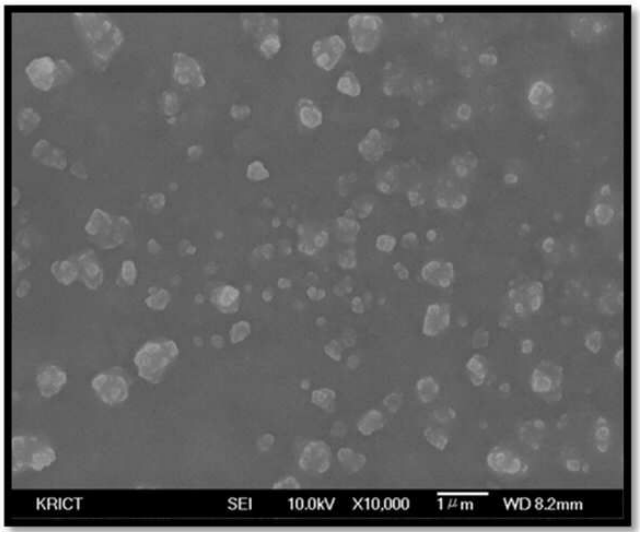
도면5


Intensity (%)
Size (r.nm)
0
2
4
6
8
10
12
0
100
200
300
400

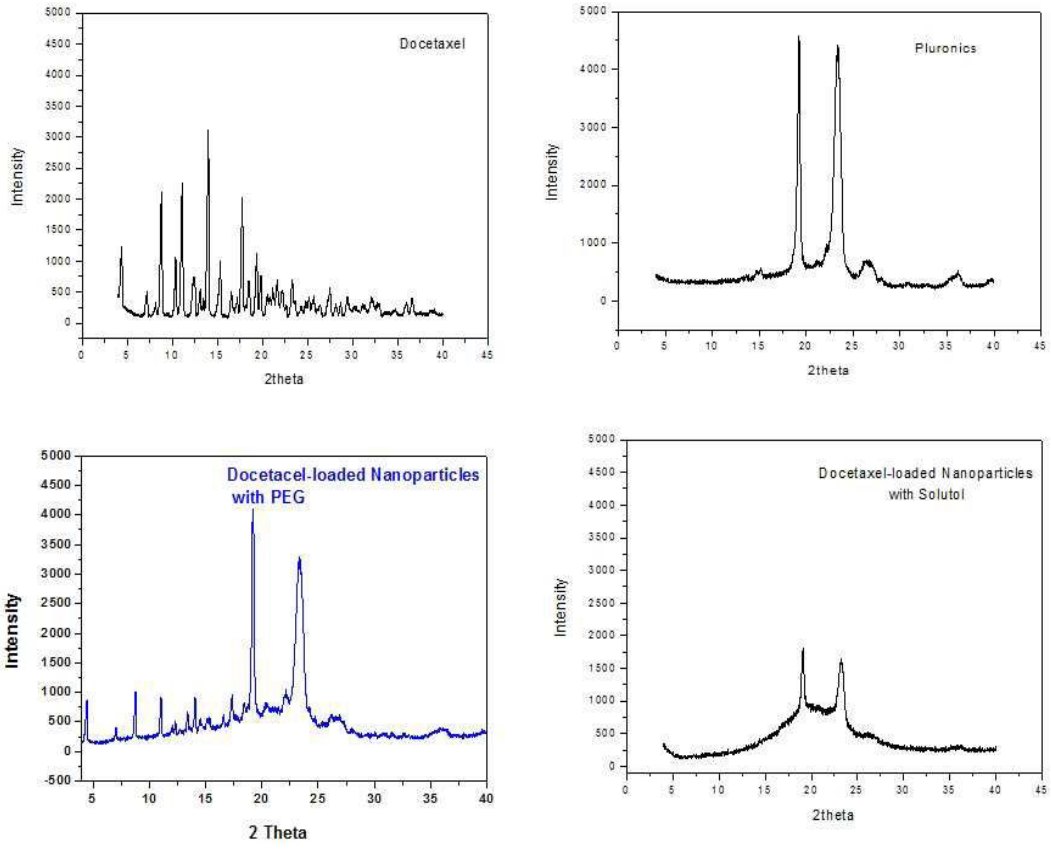
도면6


PBS
Free DTX
약물 전달용 나노입자
Multilayer NPs
Tumor size (mm3)
Date (day)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0
2
4
6
8
10
12
14

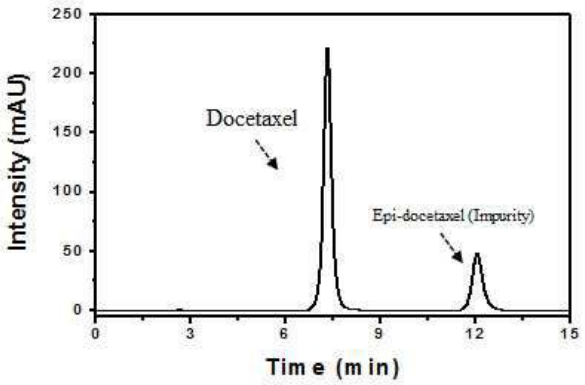
도면7


KRICT
SEI
10.0kV X10,000
1μm
WD 8.2mm

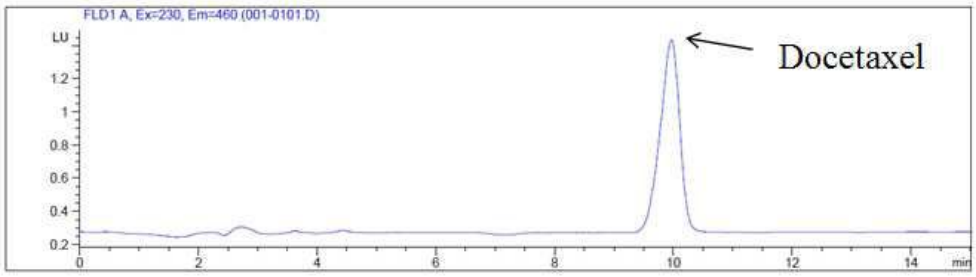
도면8


Docetaxel
Intensity
2theta
Pluronics
Intensity
2theta
Docetacel-loaded Nanoparticles
with PEG
Intensity
2 Theta
Docetaxel-loaded Nanoparticles
with Solutol
Intensity
2theta

도면9



PEG-제조된 나노입자에서 도세탁셀(docetaxel)의 HPLC의 히스토그램



본 발명의 약물 전달용 나노입자에서 방출되는 도세탁셀의 HPLC의 히스토그램