



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2007년12월26일  
 (11) 등록번호 10-0789008  
 (24) 등록일자 2007년12월18일

(51) Int. Cl.

*A61K 31/335* (2006.01)

(21) 출원번호 10-1999-7012361  
 (22) 출원일자 1999년12월27일  
 심사청구일자 2003년06월25일  
 번역문제출일자 1999년12월27일  
 (65) 공개번호 10-2001-0014254  
 (43) 공개일자 2001년02월26일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US1998/013272  
 국제출원일자 1998년06월26일  
 (87) 국제공개번호 WO 1999/00113  
 국제공개일자 1999년01월07일  
 (30) 우선권주장  
 60/051,021 1997년06월27일 미국(US)  
 08/926,155 1997년09월09일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US 5439686 A  
 KR 10-1997-014759 A

전체 청구항 수 : 총 48 항

(73) 특허권자

**아브락시스 바이오사이언스 인크.**

미국 90025 캘리포니아주 로스앤젤레스 20쓰 플로어 윌샤이어 블바드 11755

(72) 발명자

**디사이, 닐, 피.**

미국90066  
 캘리포니아주로스앤젤레스퍼듀에비뉴3633

**순-쉬웅, 패트릭**

미국90049캘리포니아주로스앤젤레스체놀트스트리트11755

(*뒷면에 계속*)

(74) 대리인

**김영, 주성민**

심사관 : 오현식

**(54) 신규 약물 제제**

**(57) 요약**

본 발명에 따라, (항암제인 파클리탁셀과 같은) 실질적으로 수불용성인 약물학적 활성제의 생체내 전달에 유용한 조성물 및 방법이 제공되며, 상기 약물학적 활성제는 (안정제로 기능하는) 단백질로 코팅된 현탁된 입자의 형태로 전달된다. 특히, 생체적합성 분산 매질 중 단백질 및 약물학적 활성제에는 임의의 종래의 계면활성제, 및 또한 입자에 대한 임의의 고분자 코어 재료 없이 고전단력이 가해진다. 이 방법으로 직경 약 1 μm 미만의 입자가 얻어진다. 특정 조성물 및 제조 조건을 사용하고 (예를 들어, 유기상으로 극성 용매의 첨가) 적합한 유기상 및 상 분획을 신중히 선택하면, 무균-여과될 수 있는 직경 200 nm 미만의 통상적으로 작은 나노입자를 재생산할 수 있게 된다. 본 발명에 따라 생성되는 입자계는 약물학적 활성제가 결합되는 분자인 유리 단백질로서의 단백질로 코팅된 수불용성 약물의 나노입자를 포함하는 재분산성 건조 분말로 전환될 수 있다. 이로써 (단백질에 결합된 분자 형태의) 약물학적 활성제 부분이 용이하게 생체내 이용가능하고, 약물 부분이 임의의 고분자 매트릭스가 함유되지 않은 입자 내부에 존재하는 독특한 전달계가 얻어진다.

(72) 발명자

**매그다시, 설로모**

이스라엘 예루살렘 하너드스트리트 36

**사하데반, 데이비드, 씨.**

미국 90602

캘리포니아주 휘티어 프랭클린 스트리트 #313626

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아 공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드 토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 인도네시아, 가나, 감비아, 기니 비사우, 짐바브웨, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고

**특허청구의 범위**

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

탄산을 포함하는 나노입자를 함유하는 제제를 포함하며, 상기 나노입자의 평균 직경이 약 200 nm 이하이고, 제품 중 탄산의 양이 135 mg/m<sup>3</sup> 이상의 탄산 투여량을 대상체에게 전달하기에 충분하고, 상기 제제에 계면활성제가 실질적으로 없는 것인 제품.

**청구항 80**

제79항에 있어서, 상기 제제가 단백질을 포함하는 제품.

**청구항 81**

제80항에 있어서, 상기 나노입자가 단백질로 코팅된 제품.

**청구항 82**

제80항에 있어서, 상기 단백질이 알부민인 제품.

**청구항 83**

제82항에 있어서, 상기 알부민이 인간 혈청 알부민인 제품.

**청구항 84**

제79항에 있어서, 상기 탁산의 양이  $175 \text{ mg/m}^2$  이상의 탁산 투여량을 전달하기에 충분한 것인 제품.

**청구항 85**

제84항에 있어서, 상기 탁산의 양이  $250 \text{ mg/m}^2$  이상의 탁산 투여량을 전달하기에 충분한 것인 제품.

**청구항 86**

제79항에 있어서, 상기 제제가 나노입자의 액체 분산액인 제품.

**청구항 87**

제86항에 있어서, 상기 제제의 부피가  $250 \text{ ml}$  미만인 제품.

**청구항 88**

제87항에 있어서, 상기 제제의 부피가  $150 \text{ ml}$  미만인 제품.

**청구항 89**

제88항에 있어서, 상기 제제의 부피가  $60 \text{ ml}$  미만인 제품.

**청구항 90**

제79항에 있어서, 상기 제제가 탁산을  $50 \text{ mg/m}^2/\text{시}$  이상의 속도로 대상체에게 투여하기 위해 사용되는 제품.

**청구항 91**

제79항에 있어서, 상기 제제가 탁산을 2시간 이하 내에 대상체에게 투여하기 위해 사용되는 제품.

**청구항 92**

제79항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탁산이 파클리탁셀인 제품.

**청구항 93**

제79항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탁산이 도세탁셀인 제품.

**청구항 94**

탁산을 포함하는 나노입자를 함유하며, 상기 나노입자의 평균 직경이 약  $200 \text{ nm}$  이하이고, 제제 중 탁산의 농도가  $2.0 \text{ mg/ml}$  이상이며, 계면활성제가 실질적으로 없는 탁산 제제.

**청구항 95**

제94항에 있어서, 제제 중 탁산의 농도가 2 내지  $20 \text{ mg/ml}$ 인 제제.

**청구항 96**

제95항에 있어서, 제제 중 탁산의 농도가 5 내지 15 mg/ml인 제제.

**청구항 97**

제96항에 있어서, 제제 중 탁산의 농도가 5 mg/ml인 제제.

**청구항 98**

제94항에 있어서, 탁산을 50 mg/m<sup>2</sup>/시 이상의 속도로 대상체에게 투여하기 위해 사용되는 제제.

**청구항 99**

제94항에 있어서, 탁산을 2시간 이하 내에 대상체에게 투여하기 위해 사용되는 제제.

**청구항 100**

제94항에 있어서, 실온 또는 냉장 조건 중 하나 이상에서 3일 이상 동안 안정한 제제.

**청구항 101**

제94항에 있어서, 단백질을 포함하는 제제.

**청구항 102**

제94항에 있어서, 단백질로 코팅된 나노입자를 포함하는 제제.

**청구항 103**

제102항에 있어서, 상기 단백질이 알부민인 제제.

**청구항 104**

제103항에 있어서, 상기 알부민이 인간 혈청 알부민인 제제.

**청구항 105**

제94항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탁산이 파클리탁셀인 제제.

**청구항 106**

제94항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탁산이 도세탁셀인 제제.

**청구항 107**

제79항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 재협착증의 치료에 사용되는 제품.

**청구항 108**

제94항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 재협착증의 치료에 사용되는 제제.

**청구항 109**

제79항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 류마티즘성 관절염의 치료에 사용되는 제품.

**청구항 110**

제94항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 류마티즘성 관절염의 치료에 사용되는 제제.

**청구항 111**

탁산을 약 30 내지 700 mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 치료가 필요한 대상체에게 전신 투여하기 위해 사용되는, 재협착증의 치료를 위한 크레모포어-무함유 탁산 제제.

**청구항 112**

제111항에 있어서, 탁산을 약 30 내지 250 mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 치료가 필요한 대상체에게 전신 투여하기 위해 사용되는 제제.

**청구항 113**

제111항에 있어서, 탁산을 약 30 내지 135 mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 치료가 필요한 대상체에게 전신 투여하기 위해 사용되는 제제.

**청구항 114**

제111항에 있어서, 살균 여과가능한 제제.

**청구항 115**

제111항에 있어서, 동결 건조된 제제.

**청구항 116**

제111항에 있어서, 액체 현탁액인 제제.

**청구항 117**

제111항에 있어서, 단백질을 포함하는 제제.

**청구항 118**

제111항에 있어서, 탁산을 포함하는 나노입자를 포함하는 제제.

**청구항 119**

제118항에 있어서, 상기 나노입자의 평균 직경이 약 200 nm 이하인 제제.

**청구항 120**

제118항에 있어서, 상기 나노입자가 단백질로 코팅된 제제.

**청구항 121**

제120항에 있어서, 상기 단백질이 알부민인 제제.

**청구항 122**

제121항에 있어서, 상기 알부민이 인간 혈청 알부민인 제제.

**청구항 123**

제111항에 있어서, 탁산을 50 mg/m<sup>2</sup>/시 이상의 속도로 치료가 필요한 대상체에게 투여하기 위해 사용되는 제제.

**청구항 124**

제111항에 있어서, 탁산을 2시간 이하 내에 대상체에게 투여하기 위해 사용되는 제제.

**청구항 125**

제111항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탁산이 파클리탁셀인 제제.

**청구항 126**

제111항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탁산이 도세탁셀인 제제.

**명세서**

**기술분야**

- <1> 본 발명은 약물학적 활성제의 정맥내 투여를 위한 입자상 비히클의 제조 방법 및 이에 의해 제조되는 신규 조성물에 관한 것이다. 특정 면에서, 본 발명은 실질적으로 수불용성의 약물학적 활성제 (예를 들어 항암제 약물 탁솔(Taxol; 등록상표))의 체내 전달 방법에 관한 것이다. 다른 면에서, 수불용성 약물학적 활성제를 함유하는 분산가능한 콜로이드성 시스템이 제공된다. 현탁 입자는 100% 활성제로 형성될 수 있거나, 또는 생체적합성 중합체로 제제화된 중합체 셸로 피복될 수 있고, 그 직경은 약 1  $\mu\text{m}$  미만이다. 본 발명의 콜로이드성 시스템은 통상의 계면활성제 또는 어떠한 중합체 코어 매트릭스도 사용하지 않고 제조할 수 있다. 본 발명의 바람직한 면에서, 살균 여과될 수 있는 매우 작은 입자의 제조 방법이 제공된다. 중합체 셸은 약물학적 활성제의 입자, 및 임의로, 약물학적 활성제가 용해되거나 분산될 수 있는 생체적합성 분산제를 함유한다. 따라서, 본 발명은 액체 형태 또는 재분산가능한 분말 형태의 약물 전달 시스템을 제공한다. 어느 형태도 즉시 생체 이용가능한 약물 분자 (즉, 단백질에 분자적으로 결합되는 약물 분자) 및 단백질로 코팅된 순수한 약물 입자를 모두 제공한다.
- <2> 본 발명은 또한 항암제 파클리탁셀과 같은 약물의 조성물 (제제)의 사용 방법 및 제조 방법에 관한 것이다. 한 면에서, 캡슐(Capxol)(등록상표)로서 알려진 파클리탁셀 제제는 파클리탁셀의 시판되는 제제인 탁솔(Taxol)(등록상표)보다 유의하게 독성이 적고 보다 큰 효능을 갖는다. 다른 면에서, 신규 제제 캡슐(등록상표)은 비경구 투여 후에 특정 조직에 편재하여 상기 조직과 관련된 암의 치료 효능을 증가시킨다.

**배경기술**

- <3> 정맥내 약물 전달은 혈류의 신속하고 직접적인 평형을 허용하고 신체의 나머지에 약물을 운반한다. 혈관내 주사 후 단시간 내에 달성되는 피크 혈청 수준을 방지하기 위해, 안정한 담체 내에 포함된 약물의 투여는 치료 활성의 나노입자의 식피 정맥내 주사 후에 혈관내 구획 내에서 약물의 점진적인 방출을 허용한다.
- <4> 주사가능한 방출 조절된 나노입자는 1회 주사에 의해 수일 내지 수주 내지 수개월의 미리 프로그래밍된 작용 기간을 제공한다. 또한, 이들은 투여 요법에 대한 무의식적인 확실한 환자의 순응을 포함하여 통상적으로 투여되는 약물, 및 특정 조직 또는 기관을 표적으로 하는 약물에 대해 몇가지 의미있는 잇점을 제공할 수 있다 [Tice and Gilley, Journal of Controlled Release 2:343-352 (1985)].
- <5> 혈액에 존재하는 미립자 및 외부 물질은 "혈액 여과 기관", 즉 비장, 폐 및 간에 의해 순환계로부터 일반적으로 제거된다. 정상 전체 혈액에 함유된 입자 물질은 적혈구 (일반적으로 8  $\mu\text{m}$ 의 직경), 백혈구 (일반적으로 6 내지 8  $\mu\text{m}$ 의 직경) 및 혈소판 (일반적으로 1 내지 3  $\mu\text{m}$ 의 직경)을 포함한다. 대부분의 기관 및 조직 내의 미순환에 의해 상기 혈액 세포는 자유롭게 이동한다. 크기가 10 내지 15  $\mu\text{m}$ 보다 큰 혈전(혈병)이 순환계에 존재할 경우, 모세혈관의 경색 또는 차단이 발생하여 허혈 또는 산소 결핍 및 조직 괴사 가능성을 발생시킬 수 있다. 따라서, 직경이 10 내지 15  $\mu\text{m}$ 보다 큰 입자의 순환계 내로의 주사를 피해야 한다. 그러나, 7 내지 8  $\mu\text{m}$ 보다 작은 입자의 현탁액은 비교적 안전하고, 리포솜 및 에멀전 형태의 약물학적 활성제, 영양 물질 및 영상화 용도를 위한 조영제의 전달에 사용되어 왔다.
- <6> 입자의 크기 및 이들의 전달 양식은 입자의 생물학적 행동을 결정한다. 문헌 [Strand et al., Microspheres-Biomedical Application, Ed. A. Rembaum, pp 193-227, CRC Press (1988)]에는 입자의 운명이 그의 크기에 의존적이라고 기재되어 있다. 수 nm 내지 100 nm 크기의 입자는 간질(間質) 주사 후에 임파 모세혈관으로 도입되고, 식균작용이 임파절 내에서 발생할 수 있다. 정맥내/동맥내 주사 후에, 약 2  $\mu\text{m}$  미만의 입자는 단핵성 식세포계(MPS)로도 알려진 세망내피계(RES)에 의해 혈류로부터 신속하게 소거될 수 있다. 약 7  $\mu\text{m}$ 보다 큰 입자는 정맥내 주사 후에 폐 모세혈관에 포획될 것이다. 동맥내 주사 후에, 입자는 도착한 제1 모세혈관층에 포획된다. 흡입된 입자는 폐포의 매크로파지에 의해 포획된다.
- <7> 위내 산 환경에 감수성인 수불용성 또는 수난용성 제약물질은 통상적인 방법(예를 들어 정맥내 주사 또는 경구 투여)으로 투여할 수 없다. 상기 제약물질의 비경구 투여는 계면활성제 또는 에멀전 안정화제의 존재 하에 수성 액체 (예를 들어 생리 식염수)를 사용하여 지용성 약물을 유화시켜 안정한 미소에멀전을 생성시킴으로써 달성된다. 이러한 에멀전은 에멀전 성분이 약물학적으로 불활성인 경우 정맥내 주사될 수 있다. 미국 특허 제 4,073,943호에는 오일에 용해되고 계면활성제, 예를 들어 에그 포스파티드, 플루로닉스 (폴리프로필렌 글리콜과 폴리에틸렌 글리콜의 공중합체), 폴리글리세롤 올레이트 등의 존재 하에 물로 유화 처리된 수불용성 약물학적 활성제의 투여가 기재되어 있다. 국제 특허 출원 공개 제W085/00011호에는 피내 또는 정맥내 주사에 적합한 치수를 갖는 디미리스토일 포스파티딜콜린과 같은 포스포리피드로 코팅된 마취제의 제약 미소적(microdroplet)이

기재되어 있다.

- <8> 수불용성 약물의 예는 와니(Wani) 등에 의해 태평양 주목나무인 탁수스 브레비폴리아(Taxus brevifolia)로부터 처음으로 분리된 천연 생성물인 탁솔(등록상표)이다 [J. Am. Chem. Soc. 93:2325 (1971)]. 항유사분열제 중에서, 디테르펜 탄소 골격을 함유하는 탁솔은 유사분열 스피нду를 형성하는 기능을 하는 미소튜블 단백질에 대한 특유한 작용 방식을 보인다. 튜블린의 회합을 억제하는 빈블라스틴 또는 콜히친과 같은 다른 항유사분열제와는 달리, 탁솔은 튜블린의 탈중합 공정을 억제하여 세포 복제 과정을 억제하는 것으로 알려진 유일한 식물 생성물이다.
- <9> 천연 디테르페노이드인 탁솔은 약물 내성의 난소암에서 상당한 항신생물 및 항암 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다. 탁솔은 B16 흑색종, L1210 백혈병, MX-1 유방 종양 및 CS-1 결장 종양 이종 이식편과 같은 다양한 종양 모델에서 우수한 항종양 활성을 보였다. 최근의 몇몇 문헌은 신규 항암 특효약으로서 탁솔을 칭했다. 실제로, 탁솔은 최근에 난소암 치료용 물질로서 FDA에 의해 승인되었다. 그러나, 탁솔의 수난용성은 인체 투여를 위해서는 문제를 갖는다. 실제로, 수성 매질에 본래 불용성 또는 난용성인 약물의 전달은 효과적이지 못하다. 따라서, 현재 사용되는 탁솔 제제는 약물을 가용화하기 위해 크레모포어를 필요로 한다. 인체 임상 투여 범위는 200 내지 500 mg이다. 이 투여량은 에탄올:크레모포어의 1:1 용액 중에 용해되고, 정맥내 투여되는 유체 약 300 내지 1000 ml의 염수로 희석된다. 현재 사용되는 크레모포어는 폴리옥실화 피마자유이다. 상기 제제 중의 크레모포어의 존재는 동물 [Lorenz et al., Agents Actions 7, 63-67 (1987)] 및 인간 [Weiss et al., J. Clin. Oncol. 8, 1263-68 (1990)]에서 심한 과민반응과 연결되고, 그 결과 코르티코스테로이드 (텍사메타손) 및 항히스타민으로 환자에게 준비투약할 필요가 있다. 많은 희석액은 대용량의 주입 (일반적 투여량 175 mg/m<sup>2</sup> 또는 1 리터 이하) 및 3 내지 24시간의 주입 시간을 요한다. 따라서, 보다 독성이 낮은, 대체가능한 파클리탁셀 제제에 대한 필요가 존재한다.
- <10> I상 임상 시험에서, 탁솔(등록상표) 자체는 과도한 독성 효과를 보이지 않았지만, 약물을 가용화시키기 위해서 사용된 유화제에 의해 심한 알러지 반응이 발생하였다. 현재의 투여법은 크레모포어의 알러지 부작용을 저하시키기 위해 약물 주사 전에 항히스타민 및 스테로이드를 사용하여 환자를 처치할 필요가 존재한다.
- <11> 탁솔의 수용해도를 개선시키기 위해서, 몇몇 연구자들은 수용해도를 증가시키는 관능기를 사용하여 그의 화학적 구조를 변경시켰다. 이 중에는, 유의한 생물학적 활성을 보이는 술폰화 유도체 [Kingston et al., 미국 특허 제5,059,699호 (1991)] 및 아미노산 에스테르 [Mathew et al., J. Med. Chem. 35:145-151 (1992)]가 존재한다. 수용성 유도체를 생성시키기 위한 변형은 통상의 염수와 같은 무독성 담체 중에 용해된 탁솔의 정맥내 전달을 촉진시킨다. 그러나, 상기 변형은 약물 제조 비용을 상승시키고, 원치 않는 부반응 및(또는) 알러지 반응의 유도 및(또는) 약물 효능의 감소를 야기할 수 있다.
- <12> 단백질 미소구는 약물학적 물질 또는 진단제의 담체로서 문헌에 보고되었다. 알부민의 미소구는 열 변성 또는 화학적 가교결합에 의해 제조하였다. 열 변성 미소구는 100 내지 150℃에서 유화 혼합물 (예를 들어 알부민, 혼입되는 물질 및 적합한 오일)로부터 제조된다. 이어서, 미소구는 적합한 용매로 세척하여 저장한다. 문헌 [Leucuta et al., International Journal of Pharmaceutics 41:213-217 (1988)]에는 열 변성 미소구의 제조 방법이 기재되어 있다.
- <13> 화학적으로 가교결합된 미소구의 제조 방법은 에멀전을 글루타르알데히드로 처리하여 단백질을 가교결합시키고 세척하여 저장하는 단계를 수반한다. 문헌 [Lee et al., Science 213:233-235 (1981)] 및 미국 특허 제 4,671,954호에는 상기 제조 방법이 교시되어 있다.
- <14> 상기 약물학적 활성제의 담체로서의 단백질 미소구의 제조 방법은 수용성 물질의 전달에 적합하지만 수불용성 물질은 포획할 수 없다. 이러한 제한은 유중수 에멀전의 수성상 중에서의 단백질 성분의 가교결합 또는 열 변성에 의존적인 상기 제조 기술의 피할 수 없는 문제이다. 단백질 함유 수성상에 용해된 어떠한 수용성 물질도 생성되는 가교결합되거나 열 변성된 단백질 매트릭스 내에 포획될 수 있지만, 수난용성 또는 지용성 물질은 상기 기술에 의해 형성된 단백질 매트릭스에 도입될 수 없다.
- <15> 약물 함유 나노입자의 통상의 제조 방법 중의 하나는 수불혼화성 용매 (예를 들어 메틸렌 클로라이드 또는 다른 염화, 지방족 또는 방향족 용매) 중에 폴리락트산 (또는 다른 생체적합성 수불용성 중합체)를 용해시키고, 중합체 용액 중에 약물학적 활성제를 용해시키고, 오일상 또는 수성상에 계면활성제를 첨가하고, 적합한 수단에 의해 수중유 에멀전을 형성하고, 진공 하에 에멀전을 서서히 증발시키는 것을 포함한다. 오일 소적이 충분히 작고 증발 동안 안정하다면, 물 중의 중합체 현탁액이 수득된다. 약물이 중합체 용액에 처음부터 존재하기 때문

에, 상기 방법에 의하면 중합체 매트릭스를 구성하는 입자 내에 약물 분자가 포획된 조성물을 수득할 수 있다. 용매 증발법을 사용한 미소구 및 나노입자의 형성은 다양한 약물을 사용한 몇몇 연구자들에 의해 보고되었다 (예를 들어 문헌 [Tice and Gilley, Journal of Controlled Release 2:343-352 (1985); Bodmeier and McGinity, Int. J. Pharmaceutics 43:179 (1988); Cavalier et al., J. Pharm. Pharmacol. 38:249 (1985); D'Souza et al., WO 94/10980] 참조).

- <16> 문헌 [Bazile et al., Biomaterials, 13:1093 (1992) 및 Spenlehauer et al., 프랑스 특허 제2 660 556]에는 한 중합체(예를 들어 폴리락티드)는 약물과 같은 활성 성분과 함께 유기상에 용해시키고, 알부민과 같은 다른 중합체는 표면 활성제로서 사용되는 2개의 생체적합성 중합체를 사용한 나노입자의 형성이 보고되었다. 유화 및 용매의 제거 후에, 나노입자가 형성되고, 약물은 폴리락티드 입자의 중합체 매트릭스 내에 존재한다.
- <17> 중합체 매트릭스가 형성되는 중합체 용액의 특성은 제1 단계에서 적절한 에멀전을 수득하는데 매우 중요하다. 예를 들어, 폴리락티드 (주사가능 나노입자의 제조에 통상 사용되는 중합체)는 디클로로메탄-물 계면에서 그의 신속한 흡착을 야기하여 계면 장력을 저하시켜 유화 공정을 개선시키는 표면 활성을 갖는다 (예를 들어 문헌 [Boury et al., Langmuir 11:1636 (1995)] 참조). 또한, 동일 연구자들은 소 혈청 알부민 (BSA)이 폴리락티드와 상호작용하여 오일-물 계면에 존재하는 폴리락티드 단일층을 통과할 수 있다는 것을 발견하였다. 따라서, 상기 문헌을 기초로 하여, 통상의 용매 증발법 동안의 유화는 비수성 유기상 중의 표면 활성 중합체 (폴리락티드)의 존재에 의해 크게 개선된다. 실제로, 폴리락티드의 존재는 충분 조건일 뿐만 아니라, 적합한 크기의 나노입자의 형성을 위해 실제로 필요한 것이다.
- <18> 용매 증발법을 기초로 한 다른 방법은 어떠한 중합체도 유기 용매에 용해시키지 않으면서 소수성 용매 (예를 들어 톨루엔 또는 시클로헥산) 중에 약물을 용해시키고, 통상의 계면활성제를 유화제로서 혼합물에 첨가하고, 초음파 처리 또는 고전단 장치를 사용하여 수중유 에멀전을 형성한 후, 용매를 증발시켜 무수 약물 입자를 수득하는 것을 포함한다 (예를 들어 문헌 [Sjostrom et al., J. Dispersion Science and Technology 15:89-117 (1994)]. 비극성 용매의 제거시에, 용매 소적 내의 약물의 침전이 발생하고,  $\mu\text{m}$  미만의 입자가 수득된다.
- <19> 입자의 크기는 에멀전 소적의 초기 크기에 의해 주로 조절된다는 것이 밝혀졌다. 또한, 최종 입자 크기는 유기상 중의 약물 농도의 감소에 따라 감소하는 것으로 보고된다는 것은 흥미로운 사실이다. 이러한 발견은 (본 발명의 일부 실시태양에서) 나노입자의 제조에 어떠한 통상의 계면활성제도 사용하지 않는, 본원에서 보고된 결과와 대조적이다. 또한, 사용된 약물인 콜레스테릴 아세테이트는 톨루엔 중에서 표면 활성을 갖고, 오일-물 계면을 향하여 계면에서의 약물 농도가 보다 높아서 침전 가능성을 증가시킨다는 사실을 Sjostrom 문헌의 저자들은 알아야 한다.
- <20> 또한,  $\mu\text{m}$  미만의 입자의 형성은 문헌 [Calvo et al., J. Pharm. Sci. 85:530 (1996)]에 기재된 바와 같은 침전법에 의해 달성되었다. 이 방법은 약물 (예를 들어 인도메타신) 및 중합체 (폴리카프로락톤)을 메틸렌 클로라이드 및 아세톤 중에 용해시킨 후, 용액을 계면활성제 (Poloxamer 188)을 함유하는 수성상 중에 부여  $\mu\text{m}$  미만 크기의 입자 (216 nm)를 생성시키는 것을 기초로 한다. 그러나, 이 방법은 에멀전이 형성되지 않는 용매 농도에서 수행된다.
- <21> 탁솔은 항암 약물로서 매우 유망한 천연 화합물이다. 예를 들어, 탁솔은 문헌 [McGuire et al., "Taxol: A Unique Anti-Neoplastic Agent With Significant Activity Against Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms" Ann. Int. Med., 111: 273-279 (1989)]에서 약물 내성 난소암에 대한 활성제로 밝혀졌다. 본원에서 언급되는 모든 특허, 과학 문헌 및 기타 문헌은 이하에서 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- <22> 불행하게도, 탁솔은 수 용해도가 매우 낮아 적합한 투여 형태를 제공하기 어렵다. 실제로, I상 임상 시험에서, 심한 알러지 반응이 탁솔의 낮은 수 용해도를 보상하기 위해 탁솔과 함께 투여되는 유화제에 의해 발생하고, 유화제에 의해 유발된 알러지 반응에 의해 1명 이상의 환자가 사망하였다. 투여량을 제한하는 독성은 호중구 감소증, 말초 신경장애 및 과민반응을 포함한다.
- <23> 문헌 [Brown et al., "A Phase I Trial of Taxol Given by A 6-Hour Intravenous Infusion" J of Clin Oncol, 9(7): 1261-1267 (July 1991)]에는 준비투약을 하지 않고 탁솔을 21일마다 6시간 동안 정맥내 주입하였다고 보고되었다. 31명의 환자에게 64개의 평가가능한 경로로 탁솔을 투여하였다. 한 환자는 심한 (또는 급성) 과민 반응을 일으켜 주입을 중단하고 환자의 생명을 구하기 위해 즉각 치료할 필요가 있었다. 다른 환자는 과민 반응을 나타내었지만, 주입을 중단할 정도로 심하지는 않았다. 골수억제는 패혈증으로 인한 2명의 사망자가 발생하는 투여량 제한성이었다. 비혈액 독성은 한명의 환자가 등급 3의 점막염증을 보이고 2명의 환자가 등급 3의 신

경장애를 보인 것을 제외하고는 등급 1 및 2에 해당하였다. 신경장애는 개선가능한 고통스러운 감각이상으로 이루어지고, 2명의 환자에서 탁솔 주입을 중단할 필요가 있었다. 4명(비소세포 폐암 환자 3명 및 선암 환자 1명)에서 부분적인 반응이 관찰되었다. 허용되는 최대 투여량은  $275 \text{ mg/m}^2$ 으로 보고되었고, 권장된 II상 출발 투여량은  $225 \text{ mg/m}^2$ 이었다. 과민반응 발생율은 투여 계획에 의존적인 것으로서, 6 내지 24시간 동안 약물 주입 시에 과민반응 발생율은 0 내지 8%인 것으로 보고되었다. 또한, 과민반응은 주입 시간의 연장에도 불구하고 준비투약 유무에 상관없이 지속되었다. 이들 I상 연구는 다양한 말기 암환자에 대해 수행되었기 때문에, 탁솔 치료의 효능은 결정할 수 없었다.

- <24> 크리스(Kris) 등의 연구에서, 탈수 알콜 중의 크레모포어 EL로 제제화한 탁솔은 9단계에 걸쳐 단계적으로 증가시키는 15 내지  $230 \text{ mg/m}^2$ 의 투여 용량으로 21일마다 3시간 동안 정맥내 주입으로서 투여되었다. 크리스 등은 "과민반응의 심도 및 비예측가능성 때문에 상기 약물 제제의 상기 투여 계획이 탁솔을 더 많은 투여량으로 사용한다는 것을 의미하지는 않는다"고 결론지었다 (문헌 [Cancer Treat. Rep., Vol. 70, No. 5, May 1986] 참조).
- <25> 식과 주사 또는 단시간 (1 내지 3시간) 주입을 사용한 초기 시험은 아나필락시스 또는 다른 과민반응을 유발하기 때문에, 스테로이드 (예를 들어 텍사메타손), 항히스타민 (예를 들어 디펜히드라민) 및  $\text{H}_2$ -길항제 (예를 들어 시메티딘 또는 라니티딘)을 사용하여 준비투약한 후에야 탁솔을 투여하고, 가장 심각한 알러지 반응을 제거하기 위해서 주입 시간을 24시간까지 연장하여 다른 연구를 수행하였다. 최대 총 투여량  $250 \text{ mg/m}^2$ 을 사용한 탁솔의 24시간 주입을 일반적으로 3주마다 반복하여 실시한 상이한 I상 및 II상 연구가 발표되었다. 환자에게 텍사메타손, 디펜히드라민 및 시메티딘을 사용하여 예비처리하여 알러지 반응을 제거하였다 [Einzig, et al., "Phase II Trial of Taxol in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma," Cancer Investigation, 9(2) 133-136 (1991), 및 A. B. Miller et al., "Reporting Results of Cancer Treatment," Cancer, Vol 47, 207-214 (1981)].
- <26> 문헌[Koeller et al., "A Phase I Pharmacokinetic Study of Taxol Given By a Prolonged Infusion Without Premedication," Proceedings of ASCO, Vol. 8 (March, 1989)]은 탁솔 주입을 위해 사용되는 크레모포어 (폴리에톡실화 피마자유) 비히클에 의해 발생하는 것으로 생각되는 많은 알러지 반응을 방지하기 위해 일상적인 준비투약을 권고하였다. 환자에게는  $175 \text{ mg/m}^2$  내지  $275 \text{ mg/m}^2$ 의 투여량을 투여하였다.
- <27> 또한, 문헌 [Wiernik et al., "Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Taxol," Cancer Research, 47: 2486-93 (May 1, 1987)]은 I상 연구에서 6시간에 걸쳐 정맥내 주입에 의한 크레모포어 비히클 중의 탁솔의 투여를 보고하였다. 등급 3 - 4의 과민반응이 13 경로 중 4개에서 발생하였다. 상기 연구에서 출발 투여량은  $15 \text{ mg/m}^2$  (개(dog)의 가장 낮은 독성 투여량의 1/3)이었다. 투여량을 단계적으로 증가시켜 최소 3명의 환자를 독성이 확인될 때까지 각각의 투여 수준으로 처리한 후, 4 내지 6명의 환자에게 각각 후속 수준으로 처리하였다. 상기 연구는 신경 독성 및 백혈구 감소증이 투여량을 제한하고 II상 권장 시험 투여량은 준비투약과 함께  $250 \text{ mg/m}^2$ 이라고 결론내렸다.
- <28> 탁솔에 대한 다른 연구의 예는 문헌 [Legha et al., "Phase II Trial of Taxol in Metastatic Melanoma," 65:2478-81 (June 1990); Rowinsky et al., "Phase I and Pharmacodynamic Study of Taxol in Refractory Acute Leukemias," Cancer Research, 49, 4640-47 (Aug. 15, 1989); Grem et al., "Phase I Study of Taxol Administered as a Short IV Infusion Daily For 5 Days," Cancer Treatment Reports, Vol. 71, No. 12, (December, 1987); Donehower et al., "Phase I Trial of Taxol in Patients With Advanced Cancer," Cancer Treatment Reports, Vol. 71, No. 12, (December, 1987); Holmes et al., "Phase II Study of Taxol in Patients (PT) with Metastatic Breast Cancer (MBC)," Proceedings of the American Society of Clinical Oncology, 10:60 (March, 1991) 및 Suffness. "Development of Antitumor Natural Products at the National Cancer Institute," Gann Monograph or Cancer Research, 31: 21-44 (1989) (탁솔을 단지 24시간 주입 투여를 권장함)]을 포함한다.
- <29> 베이스(Weiss) 등의 문헌 ["Hypersensitivity Reactions from Taxol," Journal of Clinical Oncology, 8(7) 1263-1268 (July 1990)]은 사용되는 탁솔 투여량 및 투여 계획의 가변성이 크고 주입 계획의 변경 및 준비투약의 사용이 과민반응 발생율에 대해 미치는 영향의 정도를 알 수 없기 때문에 과민반응의 신뢰할 수 있는 전체적인 발생율을 결정하기 어렵다고 보고하였다. 예를 들어, 준비투약을 실시하지 않고  $190 \text{ mg/m}^2$  초과 투여량을

3시간 주입하여 탁솔을 투여한 5명의 환자 중에서, 3명은 과민반응을 보였고, 준비투약없이 훨씬 높은 투여량을 6시간 주입 투여한 30명의 환자 중에서 1명만이 과민반응을 보였다. 따라서, 이것은 6시간 초과의 연장 주입이 과민반응 발생을 저하에 충분함을 시사한다. 그럼에도 불구하고, 베이스 등은 24시간에 걸쳐 탁솔 250 mg/m<sup>2</sup>을 투여한 환자가 계속 분명한 과민반응을 보인다는 것을 발견하였다. 따라서, 6 내지 24시간으로 약물 주입을 연장시키면 급성 반응의 위험을 감소시킬 수 있지만, 이러한 결론은 78%의 과민반응이 탁솔 주입 개시후 10분 내에 발생하고, 이것은 전체 주입 계획 시간의 길이는 아무런 관계가 없음을 나타내기 때문에 확신할 수 없다. 추가로, 탁솔의 주입 농도는 많은 환자가 상이한 소량의 탁솔 투여량에 반응을 보이기 때문에 큰 의미가 없을 수도 있다. 결국, 탁솔 과민반응의 메카니즘은 알려지지 않았을 뿐만 아니라, 탁솔 자체가 과민반응을 유발하는지 또는 과민반응이 부형제 (크레모포어 EL; 독일 루트빅샤펜 소재의 BASF사)에 의한 것인지 불분명하다. 준비투약이 과민반응의 심도 및 횟수 저하에 어떠한 영향을 미치는지 불분명하지만, 그 사용에 따른 위험이 알려지지 않았기 때문에 예방 요법이 권고되었다.

- <30> 연장된 주입 기간을 사용할 경우 과민반응을 방지하기 위해 준비투약이 사용되어야 하는지에 대한 선행 기술의 상충되는 권고 및 6시간에 걸쳐 수행된 주입의 효능 데이터 결여 때문에 승인된 암 치료 프로토콜로서 크레모포어 EL 에멀전 중의 탁솔의 높은 투여량 (170 mg/m<sup>2</sup> 초과)의 24시간 주입을 사용하였다.
- <31> 장시간 주입 기간의 사용에 의해 에멀전 중의 탁솔 투여 부작용을 최소화할 수 있을 것으로 보이지만, 긴 주입 기간은 환자에게 불편하고, 총 6 내지 24시간의 주입 기간을 위해 환자를 모니터할 필요때문에 높은 비용이 소요된다. 추가로, 긴 주입 기간은 환자가 병원 또는 치료 진료소에서 하룻밤 이상 입원하여야 한다.
- <32> 또한, 파클리탁셀의 보다 높은 투여량이 문헌에 기재되어 있다. 높은 투여량의 시클로포스파미드 및 시스플라틴, 이어서 자가 조혈 전구세포 지지물(AHPCS)와 조합하여 파클리탁셀의 최대 허용 투여량(MTD)을 정하기 위해 스테머 등 [Stemmer et al, (Stemmer SM, Cagnoni PJ, Shpall EJ, et al): "High-dose paclitaxel, cyclophosphamide, and cisplatin with autologous hematopoietic progenitor-cell support: A phase I trial," J. Clin. Oncol. 14:1463-1472 (1996)]은 파클리탁셀의 단계적 증가 투여량을 24시간에 걸쳐 주입한 후, 시클로포스파미드 (5,625 mg/m<sup>2</sup>) 및 시스플라틴 (165 mg/m<sup>2</sup>) 및 AHPCS를 주입하여 예후가 빈약한 유방암, 비호지킨(Non-Hodgkin) 임파종 (NHL) 또는 난소암 환자 49명에 대해 I상 시험을 수행하였다. 투여량을 제한하는 독성은 파클리탁셀 825 mg/m<sup>2</sup>에서 2명의 환자에서 나타났고, 이중 한명의 환자는 다기관 기능부전으로 사망하고 다른 한명은 등급 3의 호흡, CNS 및 신 독성이 발생하였지만 해결되었다. 등급 3의 다발성 신경장애 및 등급 4의 CNS 독성도 관찰되었다. 이 조합의 최대 허용 용량(MTD)은 파클리탁셀 (775 mg/m<sup>2</sup>), 시클로포스파미드 (5,625 mg/m<sup>2</sup>) 및 시스플라틴 (165 mg/m<sup>2</sup>), 이어서 AHPCS인 것으로 결정되었다. 각각 다발성 신경장애 및 점막염증은 현저한 독성을 보였지만, 둘 모두 개선시킬 수 있고 견딜 수 있었다. 유방암 환자 33명 중 18명 (54%)은 부분적인 반응을 보였다. 또한, 반응은 NHL (5명의 환자 중 4명) 및 난소암 (2명의 환자 중 2명) 환자에서 관찰되었다.
- <33> 미국 특허 제5,641,803호는 3시간 주입으로 투여된 투여량 175 및 135 mg/m<sup>2</sup>에서 탁솔의 사용을 보고하였다. 주입 프로토콜은 준비투약의 사용을 필요로 하고, 환자의 35%에서 과민반응의 발생이 보고되었다. 신경독성은 환자의 51%가, 즉 높은 투여량 그룹에서는 66%가, 낮은 투여량 그룹에서는 37%가 신경독성을 경험한 것으로 보고되었다. 또한, 환자의 48%가 24시간의 보다 긴 주입 시간 동안 신경독성을 경험하였고, 3시간의 짧은 시간 동안 주입한 환자 54%가 신경독성을 경험하였다.
- <34> 파클리탁셀 투여량이 클수록 반응율이 더 높다는 것은 문헌에서 입증되었다. 파클리탁셀의 최적 투여량 및 투여 계획은 계속 연구중이다. 파클리탁셀 투여량 강도가 질병 반응의 유발에 중요할 가능성을 평가하기 위해 NCI의 리드 (Reed) 등은 난소암 및 유방암의 치료시에 II상 시험 데이터를 분석하였다 [Reed E, Bitton R, Sarosy G, Kohn E: Paclitaxel dose intensity, "Journal of Infusional Chemotherapy, 6:59-63 (1996)]. 그 결과는 재발성 난소암에서 객관적인 질병 반응과 파클리탁셀 투여량 강도 사이의 관계가 0.022의 2측 p값으로서 통계학적으로 크게 유의하다는 것을 시사한다. 유방암에서의 관계는 0.004의 2측 p값으로서 훨씬 더 강하다. 135 mg/m<sup>2</sup>/21일에서 객관적인 반응율은 13.2%이고, 250 mg/m<sup>2</sup>/21일에서 객관적인 반응율은 35.9%이었다. 175 mg/m<sup>2</sup>의 중간 투여량에서 관찰된 반응율은 135 mg/m<sup>2</sup> 및 250 mg/m<sup>2</sup> 결과와 직선관계를 보였고, 선형 회귀 분석은 상기 데이터에 대한 0.946의 상관 계수를 보였다 (Reed et al. 1996).

- <35> 홈스의 연구 [Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, et al, "Phase II trial of Taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer," J. Natl. Cancer Inst., 83:1797-1805, (1991)] 및 MSKCC [Reichman BS, Seidman AD, Crown JPA, et al, "Paclitaxel and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor as initial chemotherapy for metastatic breast cancer," J. Clin. Oncol., 11:1943-1951 (1993)]에서, 탁솔의 투여량을 250 mg/m<sup>2</sup>까지 증가시키면 현재 탁솔에 대해 승인된 투여량 175 mg/m<sup>2</sup> (26%)보다 큰 반응율(60%)을 생성시킨다는 것이 밝혀졌다. 그러나, 이러한 결과는 상기 높은 투여량에서의 높은 독성때문에 재현되지 않았다. 그러나, 상기 연구는 파클리탁셀 투여량 증가시에 반응율의 증가 가능성에 대한 증거를 제공한다.
- <36> 탁솔에 대해서는 환자를 종종 하룻밤 입원시켜야 하는 준비투약이 필요하기 때문에, 준비투약의 필요를 제거하는 파클리탁셀 제제를 개발하는 것이 매우 바람직하다.
- <37> 탁솔 투여에 관련된 과민반응에 의해 탁솔에 대해서는 준비투약이 필요하기 때문에, 과민반응을 야기하지 않는 파클리탁셀 제제를 개발하는 것이 매우 바람직하다. 또한, 신경독성을 일으키지 않는 파클리탁셀 제제를 개발하는 것도 바람직하다.
- <38> 탁솔 주입은 그 전에 일반적으로 준비투약을 실시하고, 주입후 모니터링 및 기록 때문에 환자를 하룻밤 입원시켜야 할 필요가 종종 있기 때문에, 치료되는 피투여자가 입원할 필요가 없는 파클리탁셀 제제를 개발하는 것이 매우 바람직하다.
- <39> 탁솔의 보다 높은 투여량은 임상 반응의 개선을 달성하지만 독성이 높은 것으로 입증되었기 때문에, 이러한 독성이 없이 상기 투여량을 달성할 수 있는 파클리탁셀 제제를 개발하는 것이 바람직하다.
- <40> 탁솔의 투여량을 제한하는 독성이 뇌 및 신경독성임이 입증되었기 때문에, 상기 독성을 저하시키는 파클리탁셀 제제를 개발하는 것이 바람직하다.
- <41> 또한, 준비투약은 환자의 불편을 증가시키고 치료 비용 및 기간을 증가시키기 때문에 준비투약을 제거하는 것이 바람직하다.
- <42> 또한, 환자의 입원 기간을 최소화하기 위해 현재 3 내지 24시간 투여되는 탁솔의 주입 기간을 단축시키는 것이 바람직하다.
- <43> 탁솔은 현재 0.6 내지 1.2 mg/ml의 농도에서 투여되는 것이 승인되었고 인간에 대한 일반적인 투여량은 약 250 내지 350 mg이기 때문에, 이것은 300 ml 초과와 주입 부피를 필요로 한다. 투여 기간을 감소시키기 위해서 보다 높은 농도에서 안전한 탁솔 제제를 개발함으로써 상기 주입 부피를 저하시키는 것이 바람직하다.
- <44> 탁솔 주입은 탁솔 제제 내의 크레모포어에 의한 가스화제의 침출 때문에 특수한 정맥내 튜브 및 백 또는 병을 사용하여야 하는 제한이 있기 때문에, 크레모포어를 함유하지 않아서 통상 사용되는 플라스틱 튜브 또는 백으로부터 독성 물질을 침출시키지 않는 탁솔(등록상표) 제제를 개발하는 것이 바람직하다.
- <45> <발명의 개요>
- <46> 따라서, 본 발명의 목적은 약물 전달에 통상적으로 사용되는 것과 같은 추가의 유화제 및 가용화제의 존재로 인한 알러지 반응을 일으키지 않는 조성물 중의 비게질된 형태의 약물학적 활성제 (예를 들어, 탁솔, 탁산, 탁소테레, 등)을 전달하기 위한 것이다.
- <47> 또한, 본 발명의 목적은 적합한 생체적합성액 중에 현탁될 수 있는 미소입자 또는 나노입자의 조성물 중의 약물학적 활성제를 전달하기 위한 것이다.
- <48> 본 발명의 또 다른 목적은 수중유 에멀전으로부터 용매 증발 기술에 의해 약물학적 활성제의 초미소입자 (나노입자)의 형성 방법을 제공하는 것이다. 몇몇 방법에서는 단백질을 안정화제로 사용한다. 몇몇 방법은 임의의 종래의 계면활성제 없이, 및 임의의 고분자 코어 재료 없이 수행된다.
- <49> 본 발명의 이러한 목적 이외의 목적은 명세서 및 청구항으로부터 분명해질 것이다.
- <50> 본 발명에 따라, 본 발명자들은 실질적으로 수불용성인 약물학적 활성제가 수성 분산액 중에서 비경구 투여에 적합한 미소입자 또는 나노입자의 형태로 전달될 수 있다는 것을 발견하기에 이르렀다. 이러한 전달 방식에서는 예를 들어 염수로 희석된 에탄올 및 폴리에톡실화 피마자유를 함유하는 에멀전 중 실질적으로 수불용성인 약물학적 활성제 (예를 들어, 탁솔)를 투여할 필요가 있다 (예를 들어, 문헌 [Norton et al., Abstracts of the

2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus, September 23-24, 1992] 참조). 이러한 공지된 조성물의 단점은 알려지 부작용을 일으키는 그의 특성에 있다.

- <51> 따라서, 본 발명에 따라, 다양한 조건하에서 제조된 수중유 에멀전으로부터 용매 증발 기술에 의해 약물학적 활성제의 나노입자의 형성 방법을 제공한다. 예를 들어, 고전단력 (예를 들어, 초음파처리, 고압 균질화 등)을 임의의 종래의 계면활성제, 및 임의의 고분자 코어 재료 없이 사용하여, 나노입자의 매트릭스를 형성할 수 있다. 그 대신, 단백질 (예를 들어 인간 혈청 알부민)을 안정화제로 사용한다. 별도의 방법에서, 나노입자는 임의의 고전단력 없이, 미소에멀전을 자발적으로 형성하는 물질을 간단하게 선택함으로써 형성될 수 있다.
- <52> 또한, 본 발명은 0.22  $\mu\text{m}$  여과기를 통해 살균 여과시킬 수 있는 통상적으로 작은 나노입자 (직경 200 nm 미만)의 재현가능한 형성 방법을 제공한다. 이는 수불용성 용매 (예를 들어 에탄올)을 유기상에 첨가하고, 유기상 형태, 상 분획, 및 유기상 중 약물의 농도를 신중히 선택하여 달성할 수 있다. 대량의 단백질 (예를 들어 알부민)을 함유하는 제제는 단백질의 열 응고 때문에 오토클레이빙과 같은 종래의 방법으로 살균할 수 없으므로, 0.22  $\mu\text{m}$  여과기에 여과가능한 크기의 나노입자의 형성능은 중요하고 의미있다.
- <53> 본 발명의 또다른 실시형태에 따라, 본 발명자들은 실질적으로 수불용성인 약물학적 활성제의 체내 전달에 유용한 조성물을 개발하였다. 본 발명의 조성물은 고분자 쉘 내에 함유된 실질적으로 수불용성인 (고체 또는 액체로서의) 약물학적 활성제를 포함한다. 고분자 쉘은 생체적합성 가교 중합체이다. 실질적으로 수불용성인 약물학적 활성제를 함유하는 고분자 쉘은 투여용 생체적합성 액체 중에 현탁될 수 있다.
- <54> 본 발명은 약물학적 활성제 분자의 일부가 단백질 (예를 들어, 인간 혈청 알부민)에 결합되어 있어, 포유류에게 투여시 즉시 생체내 이용할 수 있는 약물 전달계를 제공한다. 약물학적 활성제의 또 다른 부분은 단백질로 코팅된 나노입자 내부에 함유되어 있다. 약물학적 활성제를 함유하는 나노입자는 임의의 고분자 매트릭스에 의해 회석됨이 없이 순수한 활성 성분으로서 존재한다.
- <55> 종래의 약물학적 활성제의 대부분은 (소수성 또는 이온성 상호작용을 통해) 예를 들어 혈청 알부민과 같은 담체 단백질에 결합되어 혈액 흐름을 따라 순환된다. 본 발명의 방법 및 이렇게 생성되는 조성물은 투여 전에 (소수성 또는 이온성 상호작용을 통해) 단백질에 "예비-결합"되는 약물학적 활성제를 제공한다.
- <56> 본 명세서에서는 인간 혈청 알부민에 결합될 수 있는 항암제인 탁솔 (파클리탁셀)에 대한 상기 언급된 생체내 이용 방법을 모두 증명한다 (예를 들어 문헌 [Kumar et al., Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 80:337 (1993)] 참조). 탁솔에 비해 본 발명의 입자 중 알부민의 농도가 높으므로, 혈액 흐름 중 약물의 천연 담체인 알부민에 결합된 분자 형태의 다량의 약물이 제공된다.
- <57> 또 다른 장점은 탁솔이 입자의 표면에 흡착되는 성능을 향상시키는 다른 약물 뿐만이 아니라 탁솔에 결합되는 인간 혈청 알부민의 결합능이다. 알부민은 (유기 용매의 제거에 의해 형성되는) 콜로이드성 약물 입자 상에 존재하므로, 전기적 반발 및 입체 안정화의 조합 때문에 장기간 안정한 콜로이드성 분산액의 형성을 촉진시킨다.
- <58> 본 발명에 따라, 물 또는 염수 중에서 용이하게 재구성될 수 있는 분말 형태의 초미세입자가 제공된다. 이 분말은 동결건조시켜 물이 제거된 후 얻을 수 있다. 인간 혈청 알부민은 본 발명의 몇몇 나노입자의 구조 성분으로, 또한 냉동보호제 및 재구성 보조제로도 기능한다. 상기 기재된 본 발명의 방법에 따른 제조 방법으로 0.22  $\mu\text{m}$  여과기를 통해 여과가능한 입자는 건조 또는 동결건조된 후, 정맥내 주입에 유용한 무균 고체 제제로 생성된다.
- <59> 본 발명은 또 다른 면에서 액체 분산액 중 나노입자 형태 또는 투여를 위해 쉽게 재구성될 수 있는 고체로서의 항암 약물의 조성물, 예를 들어 탁솔을 제공한다. 특정 약물, 예를 들어 탁솔의 특수한 성질 때문에, 계면활성제의 사용에 의존하는 종래의 용매 증발 방법으로는 이러한 조성물을 얻을 수 없다. 각종 계면활성제의 존재하에서, 거대한 약물 결정 (예를 들어 약 5  $\mu\text{m}$  내지 수백  $\mu\text{m}$ 의 크기)는 제조 공정 후 몇분 저장하는 동안 형성된다. 이러한 결정의 크기는 통상적으로 정맥내 투여 가능한 크기보다 훨씬 더 크다.
- <60> 본 발명에 따른 입자가 결정형, 무정형, 또는 그의 혼합물일 수 있다는 것이 이해되지만, 약제가 무정형으로 제제 중에 존재하는 것이 통상적으로 바람직하다. 이는 용해 및 흡착을 쉽게하여 생체이용률이 더 양호하게 된다.
- <61> 항암제인 파클리탁셀 (탁솔, 브리스톨 마이어스 스кви브, BMS)은 난소, 유방, 폐, 식도, 두경부, 방광 및 림프종을 포함한 다수의 인간 암 중에서 두드러진 임상 활성을 갖는다. 이는 시스플라틴과 병용하는 난소암 치료 및

이전의 특정한 병용 화학요법 섭생으로의 치료에 실패한 전이성 유방암에 대해 최근에 승인되었다. 탁솔 (등록상표)의 주요 제한점은 그의 불량한 용해성이므로, BMS 제제는 가용화 비히클로서 크레모포어 EL 50% 및 에탄올 50%를 함유한다. 이 제제의 각 바이알에는 6 mg/ml의 농도로 용해된 파클리탁셀 30 mg이 함유되어 있다. 정맥내 투여 전에, 이 제제를 파클리탁셀 0.6 mg/ml을 함유하는 최종 투여 용액용으로 염수 중 1:10으로 희석하여야 한다. 이 제제는 동물 [Lorenz et al., Agents Actions, 7:63-67 (1987)] 및 인간 [Weiss et al., J. Clin. Oncol., 8:1263-68 (1990)]에서의 심한 과민반응과 연관이 있으므로, 환자에게 코르티코스테로이드 (예를 들어, 텍사메타손) 및 안티히스타민을 준비투약할 필요가 있다. 희석을 많이 하면 주입 부피가 많아지고 (통상적인 투여량은 175 mg/m<sup>2</sup> 또는 1 ℓ 이하), 주입 시간은 3시간 내지 24시간이 된다. 따라서, 파클리탁셀에 대한 별도의 독성이 덜한 제제가 필요하다.

<62> 캡슐 (등록상표)는 신규한 항암 약물 파클리탁셀의 크레모포어-무함유 제제이다. 본 발명자들은 동물 연구를 기준으로, 크레모포어-무함유 제제가 현저하게 독성을 줄이고 환자로의 준비투약을 요구하지 않을 것으로 생각한다. 준비투약은 파클리탁셀의 최근에 승인되어 시판되고 있는 BMS (브리스톨 마이어스 스쿼브) 제제 중 크레모포어에 의해 나타나는 과민반응 및 아나필락시를 줄이는데 필요하다. 캡슐 (등록상표)는 재구성 및 정맥내 투여용 동결건조 분말이다. 0.9% 염화 나트륨 주사액 또는 5% 텍스트로스 주사액과 같은 적합한 수성 매질로 재구성되면, 캡슐 (등록상표)는 파클리탁셀의 안정한 콜로이드성 용액을 형성한다. 콜로이드성 현탁액의 크기는 20 nm 내지 8 μm, 바람직하게는 약 20 내지 400 nm 범위일 수 있다. 캡슐 (등록상표)의 2 가지 주요 성분은 비개질된 파클리탁셀 및 인간 혈청 알부민 (HSA)이다. HSA는 물에 쉽게 용해되므로, 캡슐 (등록상표)는 HSA의 용해성 한계에 의해서만 국한되어 임의의 원하는 농도의 파클리탁셀로 재구성될 수 있다. 따라서, 캡슐 (등록상표)는 희석액 (0.1 mg/ml 파클리탁셀) 내지 농축액 (20 mg/ml 파클리탁셀)에 걸친 광범위한 농도로 재구성될 수 있다. 이로써 투여 부피가 상당히 줄어든다.

<63> 본 발명에 따라, 수현탁액 중의 비경구 투여에 적합한 나노입자 형태의 생물학적 제제의 생체내 전달에 유용한 조성물 및 방법이 제공된다. 본 발명의 조성물은 고분자에 의해 안정화된다. 고분자는 알부민 단백질과 같은 생체적합성 물질이다. 생물학적 제제의 전달에 본 발명의 조성물을 사용하면, 염수 중에 희석된, 예를 들어 에탄올 및 폴리에틸올화 피마자유와 같은 독성 희석액 또는 비히클 중의 생물학적 제제를 투여할 필요가 없어진다 (예를 들어 문헌 [Norton et al., Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus, September 23-24, 1992] 참조). 이러한 공지된 조성물의 단점은 심각한 알러지 및 다른 부작용을 나타내는 그의 특성에 있다.

<64> 입자 현탁액 형태의 생물학적 제제의 전달은 세포의 세망내피 (RES) 계에 의해 입자가 간, 폐, 비장, 림프 순환 등과 같은 장기 중으로 흡수됨으로서 이루어지므로 이러한 장기를 표적으로 하게 된다. RES 함유 장기를 표적으로 하는 것은 다양한 크기의 입자를 사용하여 상이한 경로로 투여함으로써 조절할 수 있다. 그러나, 래트에 투여할 경우, 캡슐 (등록상표)는 유사량의 탁솔 (등록상표)보다 현저하게 더 높은 수준으로 전립선, 췌장, 고환, 세정관, 뼈 등과 같은 RES를 함유하는 조직 이외의 조직 중에 축적되는 것을 예상 외로 놀랍게도 발견하게 되었다.

<65> 따라서, 나노입자 제제인 파클리탁셀의 본 발명의 제제인 캡슐 (등록상표)는 전립선, 췌장, 고환, 세정관, 뼈 등과 같은 조직, 즉 RES를 함유하지 않는 장기 내에, 탁솔 (등록상표)와 같은 파클리탁셀의 비-입자 제제보다 현저하게 높은 수준으로 농축된다. 따라서, 캡슐 (등록상표)는 탁솔 (등록상표)보다 더 높은 효능으로 이러한 조직의 암 치료에 사용될 수 있다. 그러나, 많은 다른 조직으로의 분포는 캡슐 (등록상표) 및 탁솔 (등록상표)와 유사하므로, 캡슐 (등록상표)는 다른 조직 중의 탁솔 (등록상표)와 최소한 유사한 수준으로 항암 활성을 유지하는 것으로 기대된다.

<66> 전립선 내의 기본 정위는 제제의 입도 (20 내지 400 nm), 또는 제제 중 단백질 알부민의 존재에 따르며, 이로써 특정 막 수용체 (gp60, gp18, gp13 등)를 통해 전립선 조직 중 정위가 정해진다. 또한 마찬가지로, 알부민 이외의 다른 생체적합성, 생체내 분해성 고분자는 상기 언급된 특성에 의해 이러한 조직 중에서 파클리탁셀의 고도의 국소 농축이 야기되는 전립선과 같은 특정 조직에 대해 특이성을 나타낸다. 이러한 생체적합성 물질은 본 발명의 범위 내에 있다. 전립선 중 파클리탁셀의 높은 국소 농도를 달성하기 위한 조성물의 바람직한 실시형태는 크레모포어 무함유 및 입도 20 내지 400 nm 범위의, 파클리탁셀 및 알부민 제제이다. 또한, 이러한 실시형태는 동등량의 탁솔 (등록상표)을 투여할 때에 비해 췌장, 신장, 폐, 심장, 뼈 및 비장 중에서 파클리탁셀의 더 높은 수준의 농축이 야기되는 것으로 증명되었다. 이러한 특성은 테스토스테론 수준의 저하, 의학적 고환절제술의 달성, 및 재발협착증의 치료를 위한 맥관계로의 고도의 국소 농축 제공 방법을 포함하는 상기 제제의 신규

용도를 제공한다.

- <67> 또한, 파클리탁셀은 캡슐 (등록상표)로서 투여되었을 경우, 탁솔보다 더 낮은 속도로 대사에 의해 그의 대사산물로 변환된다. 이는 파클로탁셀의 유사 투여량으로 장기간 동안 항암 활성이 증가되었다는 것을 나타낸다.
- <68> 또한, 놀랍게도 파클리탁셀과 동등량으로 캡슐 (등록상표) 및 탁솔 (등록상표)를 래트에게 투여하였을 경우, 탁솔 (등록상표) 군이 캡슐 (등록상표) 군에 비해 골수억제 정도가 훨씬 더 높았다. 이로써 감염 및 열 에피소드 (예를 들어, 발열 호중구감소증)의 발생율을 낮출 수 있다. 이는 또한 통상적으로 21 일인 치료간 주기 시간을 줄일 수 있다. 따라서, 캡슐 (등록상표)를 사용하면 탁솔 (등록상표)를 능가하는 실질적인 장점이 제공될 수 있다.
- <69> 놀랍게도, 탁솔 (등록상표) 비히클 (염수로 희석된 크레모포어/에탄올)은 단독으로 강한 골수 억제를 유발하고 심한 과민반응을 나타내어 마우스의 몇몇 투여군에서 치사가 발생한다는 것을 발견하게 되었다. 이러한 반응은 동등량 이상의 캡슐 (등록상표)군에서 관찰되지 않았다. 따라서, 탁솔 (등록상표) 비히클을 함유하지 않는 파클리탁셀의 제제인 캡슐 (등록상표)는 실질적으로 유리하다.
- <70> 또한 놀랍게도, 캡슐 (등록상표) 및 탁솔 (등록상표)를 동등량의 파클리탁셀로 래트에게 투여할 경우, 현저하게 높은 LD<sub>50</sub>값으로 나타난 바와 같이, 탁솔 (등록상표)에 비해 캡슐 (등록상표)에 있어서 훨씬 더 낮은 독성이 나타났다. 이는 더 많은, 치료학적 유효량의 파클리탁셀이 환자에게 투여될 수 있게 한다. 문헌에는 파클리탁셀의 투여량이 높아질수록 응답률이 증가하는 것이 기재되어 있다. 더 낮은 독성으로 인해 캡슐 (등록상표) 제제를 더 많은 투여량으로 투여할 수 있어 이 약물의 총 포텐셜을 취할 수 있게 된다.
- <71> 또한 놀랍게도, 실질적으로 수불용성 약물 파클리탁셀의 제제인 캡슐 (등록상표)는 수성 매질 중에서 이에 한정되지는 않으나 0.1 내지 20 mg/ml 범위의 몇가지 다른 농도로 재구성될 때 안정하다. 이는 약물이 투여되는 동안 주입 부피가 작아지는 것과 같은 탁솔 (등록상표)에 비해 실질적인 장점을 제공하여, 탁솔 (등록상표)의 공지된 불안정성 (예를 들어, 침전)을 극복하게 되어, 주입 라인 중 인-라인 여과기를 사용하지 않아도 된다. 따라서, 캡슐 (등록상표)는 환자로의 파클리탁셀의 투여를 현저하게 간단하게 하고 및 개선시킨다.
- <72> 또한, 탁솔 (등록상표)는 저 투여량에도 신경독성 효과는 나타내는 반면, 캡슐 (등록상표)는 탁솔 (등록상표)와 같은 파클리탁셀과 동등량으로 투여될 래트에게 경우, 신경독성을 전혀 나타내지 않는다.
- <73> 본 발명의 제제는 또한, 종개 기술의 전달계에 의해 요구되는 투여 부피 및 시간에 비해 더 작은 부피의 액체를 사용하고 현저하게 줄어든 투여 기간을 요구하는, 파클리탁셀, 및 다른 실질적인 수불용성 약물학적 활성제를 투여할 수 있게 한다.
- <74> 생체적합성 고분자 매트릭스와 조합되어, 본 발명의 제제 (캡슐 (등록상표))는 더 낮은 독성 및 연장된 활성을 갖는 파클리탁셀의 국소 서방 전달을 허용한다.
- <75> 상기 캡슐 (등록상표)에 대한 놀라운 발견은 파클리탁셀을 투여받는 환자의 삶의 질을 실질적으로 개선할 수 있다는 가능성을 제공한다.  
파클리탁셀의 캡슐(등록상표) 제제의 잠재적 이점:
- <76> · 캡슐 (등록상표)는 파클리탁셀 및 인간 혈청 알부민 만을 함유하는 동결건조 분말이다. 동결건조 분말의 재구성으로 형성된 콜로이드성 용액의 특성 때문에, 약물을 용해하는 (파클리탁셀의 BMS 제제 중) 크레모포어 또는 (도세탁셀의 롱벨랑 제제 중의) 폴리소르베이트 80, 및 에탄올과 같은 용매와 같은 독성 유화제 용매가 필요하지는 않다. 독성 유화제를 제거하면 탁솔 제품으로 발생하는 것으로 공지된 심한 과민반응 및 아나필락시 반응의 발생이 줄어들 것이다.
- <77> · 또한, 약물 투약 전에 스테로이드 및 안티히스타민을 준비투약하지 않는 것으로 기대된다.
- <78> · 독성이 줄어들므로, LD<sub>0</sub>/LD<sub>50</sub> 연구로 나타나는 바와 같이, 더 높은 효능을 위해 투여량을 높일 수 있다.
- <79> · (BMS 제제에 비해) 골수 억제의 감소는 치료 주기 기간 (통상적으로 3 주)를 줄이고, 치료학적 결과를 개선하는 것으로 기대된다.
- <80> · 캡슐 (등록상표)는 BMS 제제 (0.6 mg/ml)에 비해, 더 낮은 주입 부피 및 정맥내 식피를 허용하면서, 더 높은 농도 (20 mg/ml 이하)로 투여될 수 있다.
- <81> · 탁솔 (등록상표)는 제제 내로 표준 주입 튜빙되는 가소화제의 침출 때문에 니트로글리세린 폴리올레핀 주입

세트로만 주입가능하다. 캡슐 (등록상표)는 침출을 보이지 않고, 임의의 표준 주입에 사용할 수 있다. 또한, 용액을 함유하는 모든 크레모포어 저장시 유리 또는 폴리올레핀 용기만을 사용할 수 있다. 캡슐 (등록상표) 제제는 이러한 제한점이 없다.

<82> · 탁솔 제제에서의 문제는 내재하는 카테터 중 파클리탁셀의 침전이다. 이는 부동의 불량한 조절된 투여량의 원인이 된다. 신규 제제인 캡슐 (등록상표)의 콜로이드성 용액의 고유 안정성으로 인해, 침전 문제가 완화된다.

· 탁솔 (등록상표)의 투여시에는 인라인 여과기를 사용하여 침전 및 다른 입자물을 제거할 필요가 있다. 캡슐 (등록상표)에는 그의 고유 안정성 때문에 이러한 문제점이 없다.

<83> 문헌에는 수백 nm 크기의 입자가 암 부위의 새는 혈관을 통해 암 증으로 우선적으로 분배된다는 것이 기재되어 있다. 따라서, 캡슐 (등록상표) 중의 파클리탁셀의 콜로이드성 입자는 BMS 제제 중에 투여되는 파클리탁셀의 부작용을 현저하게 줄이는 우선적인 목적 효과를 나타낼 수 있다.

<84> 따라서, 상기 원하는 특징을 제공하는 파클리탁셀의 신규 제제를 제공하는 것이 본 발명의 첫번째 목적이다.

<85> 본 발명의 또 다른 목적은 특정 조직 중에 파클리탁셀을 배치시킴으로써, 이러한 조직에 더 높은 항암 활성을 제공하는 것이다.

<86> 본 발명의 또다른 목적은 주입 부피를 줄이기 위해 약 2 mg/ml 이상의 농도로 파클리탁셀을 투여하는 것이다.

<87> 또한, 본 발명의 목적은 탁솔 (등록상표) 비히클을 포함하지 않는 파클리탁셀 제제를 제공하는 것이다.

<88> 본 발명의 또다른 목적은 암 치료용 탁솔을 투여받는 환자의 삶의 질을 개선시키는 파클리탁셀 제제를 제공하는 것이다.

### 발명의 상세한 설명

<93> 본 발명에 따라, 파클리탁셀 치료를 받는 환자에게 제약상 허용되는 제제 중 상기 파클리탁셀을 175 mg/m<sup>2</sup> 이상의 투여량으로 2시간 이하의 투여 기간에 걸쳐 진신 투여하는 것을 포함하는, 파클리탁셀 치료를 받는 환자의 파클리탁셀의 혈액 독성 감소 방법이 제공된다.

본 발명에 따라, 체내 전달을 위한 실질적으로 수불용성인 약물학적 활성제의 제조 방법도 제공되며, 이 방법은

a) 자발적으로 미소에밀전을 형성하는

i) 용해되어 있는 상기 활성제를 갖는 유기 용매,

ii) 물 또는 수성 용액,

iii) 계면활성제, 및

iv) 공동계면활성제를 조합하고,

b) 상기 유기 용매를 제거하여 수중 상기 활성제의 나노입자 현탁액을 얻는 것을 포함한다.

<94> 삭제

<95> 삭제

<96> 삭제

<97> 삭제

- <98> 삭제
- <99> 삭제
- <100> 삭제
- <101> 삭제
- <102> 삭제
- <103> 삭제
- <104> 삭제
- <105> 삭제
- <106> 삭제
- <107> 삭제
- <108> 본 발명의 추가 실시형태에 따라, 실질적으로 수불용성인 제약상 허용되는 활성제인 고체 또는 액체 입자를 포함하는 약물전달계가 제공된다.
- <109> 상기 단백질 코팅은 그와 연관된 유리 단백질을 갖고, 상기 약물학적 활성제는 상기 단백질 코팅 내에 함유되어 있고, 상기 약물학적 활성제는 상기 유기 단백질과 연관되어 있고, 상기 입자의 평균 직경은 약 1  $\mu\text{m}$  이하이다.
- <110> 삭제
- <111> 삭제
- <112> 삭제
- <113> 삭제
- <114> 삭제

- <115> 삭제
- <116> 삭제
- <117> 삭제
- <118> 삭제
- <119> 삭제
- <120> 상기 언급된 방법으로 생성된 조성물은 독성이 매우 낮은 각종 형태의 약물학적 활성제를 제공한다는 것이 관찰되어 특히 유리하다. 또한, 본 발명에는 독성이 낮은 형태의 약물학적 활성제, 예를 들어 파클리탁셀의 제조 방법이 기재되어 있다.
- <121> 바람직한 실시형태에서, 상기 언급된 입자의 평균 직경은 약 200 nm 이하이다. 이러한 입자는 살균 여과기에 주입할 수 있으므로, 원하는 약물학적 활성제를 함유하는 용액의 무균을 달성하기 위해 더 강력한 치료를 할 필요가 없어 특히 유리하다.
- <122> 본 명세서에 사용된 바와 같은 "파클리탁셀"은 달리 언급하지 않는 한 파클리탁셀의 모든 형태, 변형체 및 유도체, 예를 들어 탁소테레 등을 포괄한다.
- <123> 캡슐 (등록상표)는 출원인의 양수인이 시판하는 파클리탁셀 제제의 등록상표이다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 캡슐 (등록상표)는 실시예 1의 방법으로 제조되는 단백질-코팅된 파클리탁셀 나노입자에 대한 준말이다. 캡슐 (등록상표)는 항암 약물 파클리탁셀의 신규 크레모포어-무함유 제제이다. 본 발명자들은 동물 연구를 기준으로, 크레모포어-무함유 제제는 현저하게 독성이 낮고, 환자에게로의 준비투약이 필요하지 않을 것이라고 생각한다. 준비투약은 최근에 증명되고 파클리탁셀의 BMS (브리스톨 마이어스 스쿼브) 제제로 표기되는 크레모포어에 의해 발생하는 과민반응 및 아나필락시를 감소시키는데 필요하다. 캡슐 (등록상표)는 재구성 및 정맥내 투여를 위한 동결건조 분말이다. 캡슐 (등록상표)의 각 용기는 파클리탁셀 30 mg 및 인간 혈청 알부민 약 400 mg을 함유한다. 0.9% 염화 나트륨 주입액 또는 5% 텍스트로스 주입액과 같은 적합한 수성 매질과 함께 재구성될 경우, 캡슐 (등록상표)는 파클리탁셀의 안정한 콜로이드성 용액을 형성한다. 콜로이드성 나노입자의 크기는 통상적으로 400 nm 미만이다. 나노입자는 유기 용매 중 USP 인간 혈청 알부민 용액 및 파클리탁셀 용액의 고압 균질화에 의해 제조된다. 그 다음, 이 용매는 제거되어 인간 혈청 알부민 중 파클리탁셀의 콜로이드성 현탁액 또는 용액이 생성된다. 이 현탁액은 살균 여과되고 동결건조되어 캡슐 (등록상표)이 얻어진다. 이 제제는 다른 추가의 부형제 또는 안정화제를 함유하지 않는다. 생성물의 무균성은 무균 제조 방법 및(또는) 살균 여과에 의해 확인된다. 캡슐 (등록상표)의 2 가지 주요 성분은 비게질된 파클리탁셀 및 인간 혈청 알부민 (HSA)이다. HSA는 물에 쉽게 용해되므로, 캡슐 (등록상표)는 HSA의 용해도 한계로 제한될 뿐 파클리탁셀의 임의의 원하는 농도로 재구성될 수 있다. 따라서, 캡슐 (등록상표)는 희석액 (0.1 mg/ml 파클리탁셀) 내지 농축액 (20 mg/ml 파클리탁셀)로 광범위하게 재구성될 수 있다. 이는 투여 부피가 상당히 작게 한다.
- <124> 본 명세서에 사용된 용어 "생체내 전달"은 경구, 정맥내, 피하, 복강내, 초내, 근육내, 흡입, 국소, 경피성, 좌약 (직장내), 질좌제 (질내), 요도내, 문맥내, 간내, 동맥내, 체액내 등의 투여 경로에 의한 약물학적 활성제의 전달을 의미한다.
- <125> 본 명세서에 사용된 용어 " $\mu\text{m}$ "는 밀리미터의 1/1000의 측정 단위이다.
- <126> 본 명세서에 사용된 용어 "생체적합성물질"은 어떠한 가역적인 방법으로도 생체계를 도입되는 방향으로 감지될 수 있을 만큼 바꾸거나 영향을 미치지 않는 물질을 말한다.
- <127> 본 발명의 실시예에 사용되는 실질적으로 수불용성인 약물학적 활성제에는 약물학적 활성제, 진단제, 영양제 등을 포함한다. 약물학적 활성제에는 다음과 같은 것이 포함된다:

- <128> 진통제/해열제 (예를 들면, 아스피린, 아세트아미노펜, 이부프로펜, 나프록센 나트륨, 염산부프레노르핀, 염산 프로폭시펜, 나프실산프로폭시펜, 염산메페리딘, 염산히드로모르폰, 황산모르핀, 염산옥시코돈, 인산코데인, 중 타르타르산디히드로코데인, 염산펜타조신, 중타르타르산히드로코돈, 타르타르산레보르파놀, 디플루니살, 살리실 산트롤라민, 염산날부핀, 메페남산, 타르타르산부토르파놀, 살리실산콜린, 부탈비탈, 시트르산페닐톨록사민, 시 트르산디펜히드라민, 메토티리메프라진, 염산신나메드린 및 메프로바메이트 등);
- <129> 마취제 (예, 시클로프로판, 엔플루란, 할로탄, 이소플루란, 메톡시플루란, 아산화질소, 프로포폴 등);
- <130> 향천식약물 (예, 아젤라스틴, 케토티펜, 트라사녹스, 암렉사녹스, 크로몰린, 이부틸라스트, 몬텔루카스트, 네도 크로밀, 옥사토마이드, 프란루카스트, 세라트로다스트, 수플라타스트 토실레이트, 티아라미드, 카피르루카스트, 질레루톤, 베클로메타손, 부데소나이드, 텍사메타손, 플루니솔라이드, 트리암시놀론 아세토나이드 등);
- <131> 항생제 (예, 네오마이신, 스트렙토마이신, 클로람페니콜, 세팔로스포린, 암피실린, 페니실린, 테트라시클론 등);
- <132> 항우울약물 (예, 네포팜, 옥시페르틴, 독세핀 히드로클로라이드, 아목사핀, 트라조돈 히드로클로라이드, 아미트 리프틸린 히드로클로라이드, 마프로틸린 히드로클로라이드, 페넬진 술페이트, 데시프라민 히드로클로라이드, 노 르트리프틸린 히드로클로라이드, 트라닐시프로민 술페이트, 플루옥세틴 히드로클로라이드, 독세핀 히드로클로라 이드, 이미프라민 히드로클로라이드, 이미프라민 과모에이트, 노르트리프틸린, 아미트리프틸린 히드로클로라이 드, 이소카르복사지드, 데시프라민 히드로클로라이드, 트리미프라민 말레에이트, 프로트리프틸린 히드로클로라 이드 등);
- <133> 항당뇨병약 (예, 비구아나이드, 호르몬, 술폰닐우레아 유도체 등 )
- <134> 항진균제 (예, 그리세오펴빈, 켈로코나졸, 암포테리신 B, 니스타틴, 칸디시딘 등);
- <135> 항고혈압제 (예, 프로파놀롤, 프로파페논, 옥시프레놀롤, 니페디핀, 레세르핀, 트리메타판 캄실레이트, 페녹시 벤즈아민 히드로클로라이드, 파르길린 히드로클로라이드, 데세르피딘, 디아조옥시드, 구아네티딘 모노술페이트, 미녹시딜, 레스신나민, 나트륨 니트로프루시드, 라우올피아 세르펜티나, 알세록실론, 펜톨아민 메실레이트, 레 세르핀 등);
- <136> 항염증약 (예, (비스테로이드성) 인도메타신, 나프록센, 이부프로펜, 라미페나존, 피록시캠, (스테로이드성) 코 르티손, 텍사메타손, 플루아자코르트, 히드로코르티손, 프레드니솔론, 프레드니손 등);
- <137> 항종양제 (예, 아드리아마이신, 시클로포스파미드, 악티노마이신, 블레오마이신, 두아노루비신, 독소루비신, 예 피루비신, 미토마이신, 메토티렉세이트, 플루오로우라실, 카르보플라틴, 카르무스틴 (BCNU), 메틸-CCNU, 시스플 라틴, 에토포사이드, 인터페론, 캄포테신 및 그의 유도체, 페네스테린, 파클리탁셀 및 그의 유도체, 탁소테레 및 그의 유도체, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 타목시펜, 에토포사이드, 피포술판 등);
- <138> 항불안제 (예, 로라제팜, 부스피론 히드로클로라이드, 프라제팜, 클로르디아제폭시드 히드로클로라이드, 옥사제 팜, 클로라제페이트 이칼륨, 디아제팜, 히드록시진 과모에이트, 히드록시진 히드로클로라이드, 알프라졸람, 드 로페리돌, 할라제팜, 클로르메자논, 단트롤렌 등);
- <139> 면역억제제 (예, 시클로스포린, 아자티오프린, 미조리빈, FK506 (타크롤리무스) 등);
- <140> 항편두통약물 (예, 에르고타민 타르트레이트, 프로파놀롤 히드로클로라이드, 이소메탐텐 류케이트, 디클로랄페 나존 등);
- <141> 진정제/최면약물 (예, 바르비투레이트 (예, 펜토바르비탈, 펜토바르비탈 나트륨, 세코바르비탈 나트륨), 벤조디 아제핀 (예, 플루아제팜 히드로클로라이드, 트리아졸람, 토마제팜, 미다졸람 히드로클로라이드), 등);
- <142> 항협심증약 (예, 베타-아드레날린성 차단제, 칼슘 채널 차단제 (예, 니페디핀, 딜티아젬 히드로클로라이드 등), 니트레이트 (예, 니트로글리세린, 이소소르비드 디니트레이트, 펜타에리트리톨 테트라니트레이트, 에리트리톨 테트라니트레이트), 등);
- <143> 항정신병약 (예, 할로페리돌, 록사핀 숙시네이트, 염산록사핀, 티오리다진, 염산티오리다진, 티오티센, 염산플 루페나진, 플루페나진 데카노에이트, 플루페나진 에난테이트, 염산트리플루오페라진, 염산클로르프로마진, 페르 페나진, 시트르산리튬 및 프로클로르페라진 등);
- <144> 항조증약 (예, 탄산리튬);

- <145> 항부정맥약 (예, 브레틸륨 토실레이트, 염산에스몰롤, 염산베라파밀, 아미오다론, 염산엔카이니드, 디곡신, 디기톡신, 염산메실레틴, 인산디소피라미드, 염산프로카인아미드, 황산퀴니딘, 글루콘산퀴니딘, 폴리갈락투론산퀴니딘, 아세트산플레카이니드, 염산토카이니드 및 염산리도카인 등);
- <146> 항관절염약 (예, 페닐부타존, 숄린다, 페니실라민, 살살레이트, 피록시캄, 아자티오프린, 인도메타신, 메클로페나메이트 나트륨, 골드 나트륨 티오말레이트, 케토프로펜, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 툴메틴 나트륨 등);
- <147> 항통풍제 (예, 콜히친, 알로푸리놀 등);
- <148> 항응집제 (예, 헤파린, 헤파린 나트륨, 와파린 나트륨 등);
- <149> 혈전용해제 (예, 유로키나제, 스트렙토키나제, 알토플라제 등);
- <150> 항섬유소용해제 (예, 아미노카프로산);
- <151> 혈류제 (예, 펜톡시필린);
- <152> 항혈소판제 (예, 아스피린, 엠포린, 아스크립틴 등);
- <153> 항경련제 (예, 발프로산, 디발프로에이트 나트륨, 페니토인, 페니토인 나트륨, 클로나제팜, 피리미돈, 페노바르비톨, 페노바르비톨 나트륨, 카르바마제핀, 아모바르비탈 나트륨, 메트숙시미드, 메타르비탈, 메포바르비탈, 메페니토인, 펜숙시미드, 파라메타디온, 에토도인, 페나세미드, 세코바르비톨 나트륨, 클로라제페이트 이칼륨, 트리메타디온 등);
- <154> 항파킨슨제 (예, 에토숙시미드 등);
- <155> 항히스타민제/항소양증약, (예, 히드록시진 히드로클로라이드, 디펜히드라민 히드로클로라이드, 클로르페니라민 말레에이트, 브롬페니라민 말레에이트, 시프로헵타딘 히드로클로라이드, 테르페나딘, 클레마스틴 푸마레이트, 트리프롤리딘 히드로클로라이드, 카르비녹사민 말레에이트, 디페닐피랄린 히드로클로라이드, 페닌다민 타르트레이트, 아자타딘 말레에이트, 트리켈렌나민 히드로클로라이드, 텍클로르페니라민 말레에이트, 메트딜라진 히드로클로라이드, 트림프라진 타르트레이트 등);
- <156> 갈습 조절에 유용한 약물 (예, 칼시토닌 및 부갑상선 호르몬 등);
- <157> 항균제 (예, 황산아미카신, 아즈트레오남, 클로람페니콜, 팔미트산클로람페니콜, 클로람페니콜 나트륨 숙시네이트, 염산시프로플록사신, 염산클린다마이신, 팔미트산클린다마이신, 인산클린다마이신, 메트로니다졸, 염산메트로니다졸, 황산켄타미신, 염산린코마이신, 황산토브라마이신, 염산반코마이신, 황산폴리믹신 B, 콜리스티메테이트 나트륨 및 황산폴리스틴 등);
- <158> 항바이러스제 (예, 인터페론 감마, 지도부딘, 염산아만타딘, 리바비린 및 아시클로비르 등);
- <159> 항미생물제 (예, 세팔로스포린 (예, 세파졸린 나트륨, 세프라딘, 세파클러, 세파피린 나트륨, 세프티죽심 나트륨, 세포페라존 나트륨, 세포테탄 이나트륨, 세푸록심 아조틸, 세포탁심 나트륨, 세파드록실 일수화물, 세프타지딤, 세팔렉신, 세팔로틴 나트륨, 염산세팔렉신 일수화물, 세파만돌 나페이트, 세폭시틴 나트륨, 세포니시드 나트륨, 세포라니드, 세프트리악손 나트륨, 세프타지딤, 세파드록실, 세프라딘 및 세푸록심 나트륨 등), 페니실린 (예, 암피실린, 아목시실린, 페니실린 G 벤자틴, 시클라실린, 암피실린 나트륨, 페니실린 G 칼륨, 페니실린 V 칼륨, 피페라실린 나트륨, 옥사실린 나트륨, 염산바캄피실린, 클록사실린 나트륨, 티카르실린 이나트륨, 아즐로실린 나트륨, 카르베니실린 인다닐 나트륨, 페니실린 G 칼륨, 페니실린 G 프로카인, 메티실린 나트륨 및 나프실린 나트륨 등), 에리트로마이신 (예, 에리트로마이신 에틸숙시네이트, 에리트로마이신, 에리트로마이신 에스톨레이트, 에리트로마이신 락토비오네이트, 에리트로마이신 시에아레이트 및 에리트로마이신 에틸숙시네이트 등) 및 테트라사이클린 (예, 염산테트라사이클린, 독시사이클린 하이클레이트 및 염산미노사이클린 등) 등);
- <160> 항감염제 (예, GM-CSF);
- <161> 기관지확장제 (예를 들면, 교감신경 흥분제 (예, 염산에피네프린, 황산메타프로테레놀, 황산테르부탈린, 이소에타린, 이소에타린 메실레이트, 염산이소에타린, 황산알부테롤, 알부테롤, 비톨데롤 메실레이트, 염산이소프로테레놀, 황산테르부탈린, 중타르타르산에피네프린, 황산메타프로테레놀, 에피네프린, 중타르타르산에피네프린), 항콜린제 (예, 이프라트로퓴 브로마이드), 잔틴 (예, 아미노필린, 디필린, 황산메타프로테레놀, 아미노필린), 비만 세포 안정화제 (예, 크로몰린 나트륨), 흡입 코르티코스테로이드 (예, 플루리솔리드, 베클로메타손 디프로

피오네이트, 베클로메타손 디프로피오네이트 일수화물, 살부타몰, 베클로메타손 디프로피오네이트 (BDP), 이프라트로폴 브로마이드, 부데소니드, 케토티펜, 살메테롤, 크시나포에이트, 황산테르부탈린, 트리암시놀론, 테오필린, 네도크로밀 나트륨, 황산메타프로테레놀, 알부테롤 및 플루니솔리드 등);

- <162> 호르몬 (예를 들면, 안드로겐 (예, 다나졸, 테스토스테론 사이피오네이트, 플루옥시메스테론, 에틸테스토스테론, 테스토스테론 에나니헤이트, 메틸테스토스테론, 플루옥시메스테론, 테스토스테론 사이피오네이트), 에스트로겐 (예, 에스트라디올, 에스트로피페이트, 복합 에스트로겐), 프로게스틴 (예, 메톡시프로게스테론 아세테이트, 노르에틴드론 아세테이트), 코르티코스테로이드 (예, 트리암시놀론, 베타메타손, 인산베타메타손 나트륨, 텍사메타손, 인산텍사메타손 나트륨, 텍사메타손 아세테이트, 프레드니손, 메틸프레드니솔론 아세테이트 현탁액, 트리암시놀론 아세토니드, 메틸프레드니솔론, 인산프레드니솔론 나트륨, 숙신산메틸프레드니솔론 나트륨, 숙신산히드로코르티손 나트륨, 숙신산메틸프레드니솔론 나트륨, 트리암시놀론 헥사카토니드, 히드로코르티손, 히드로코르티손 사이피오네이트, 프레드니솔론, 플루오로코르티손 아세테이트, 과라메타손 아세테이트, 프레드니솔론 테블레트, 아세트산프레드니솔론, 인산프레드니솔론 나트륨 및 숙신산히드로코르티손 나트륨 등) 및 갑상선 호르몬 (예, 레보티록신 나트륨) 등) 등;
- <163> 저혈당제 (예, 사람 인슐린, 정제 소 인슐린, 정제 돼지 인슐린, 글리부리드, 클로르프로파미드, 글리피지드, 톨부타미드 및 톨라자미드 등);
- <164> 저지질혈제 (예, 클로피브레이트, 텍스트로티록신 나트륨, 프로부콜, 로바스타틴 및 니아신 등);
- <165> 단백질 (예, DNase, 알기나제, 수폐록시드 디스뮤타제 및 리파제 등);
- <166> 핵산 (예, 본원에 기술한 단백질을 포함하는, 임의의 치료 활성 단백질을 암호화하는 센스 또는 안티센스 핵산 등);
- <167> 적혈구생성 자극제 (예, 에리트로포이에틴);
- <168> 항궤양제/항역류제 (예, 파모티딘, 시메티딘 및 염산라니티딘 등);
- <169> 항오심약/진토약 (예, 염산메클리진, 나빌론, 프로클로르페라진, 디벤히드리네이트, 염산프로메타진, 티에틸페라진 및 스코폴라민 등);
- <170> 지용성 비타민 (예, 비타민 A, D, E, K 등);
- <171> 미토탄, 비사딘, 할로니트로소우레아스, 안트로시클린, 엘립티신 등과 같은 다른 약물.
- <172> 본 발명의 실시예에 사용하기 위한 진단제의 예에는 초음파 조영제, 방사선조영제 (예, 요오도-옥탄, 할로카본, 레노그라핀 등), 자기 조영제 (예, 플루오로카본, 지용성 상자성 화합물 등) 뿐만 아니라, 몇몇 물리적 및(또는) 화학적 개질없이 쉽게 전달되지 않아 실질적으로 수불용성인 그의 특성을 수용할 수 없는 다른 진단제도 포함된다.
- <173> 본 발명의 실시예에 사용하기 위한 영양제의 예에는 아미노산, 당류, 단백질, 탄수화물, 지용성 비타민 (예, 비타민 A, D, E, K 등), 지방 또는 그의 임의의 2 개 이상의 조합물이 포함된다.
- <174> <A. 고전단 균질화법을 사용한 나노 입자의 형성
- <175> 본 발명에 다른 중합 셀 중에 함유된 약물학적 활성제와 선행 기술의 단백질 미소구 사이의 중요한 차이점은 형성의 성질 및 입자 형성 후의 단백질의 최종 상태 및 수용성 또는 실질적으로 수불용성 제제를 운반하는 능력에 있다. 본 발명에 따르면, 중합체 (예를 들어, 단백질)는 고압력 균질화기에서 고전단 조건에 노출되므로써 가교될 수 있다. 고전단은 용해 또는 현탁된 약물학적 활성제를 함유하는 분산체를, 가교된 중합체의 셀이 비수성 매질의 미세 방울 주위에 형성되게 하는 숄프히드릴 또는 디숄파이드기를 임의로 함유하는 생체적합성 중합체 (예를 들어, 알부민)의 수용액에 분산시키는데 사용된다. 고전단 조건은 엄청난 국소 발열을 일으키고, 예를 들어 숄프히드릴 잔기를 산화시키고(시키거나) 존재하는 디숄파이드 결합을 방해함으로써 중합체를 가교하여 새로운 가교 디숄파이드 결합을 형성할 수 있는 초과산화물 이온을 형성하는 액체 중의 공동현상을 생성한다.
- <176> 본 발명의 방법과는 달리, 선행 기술의 글루타르알데히드 가교 방법은 비특이적이고 단백질 구조에 존재하는 모든 친핵성기 (예를 들어, 아민 및 히드록실기)와 본질적으로 반응적이다. 선행 기술에 교시되어 있는 바와 같이 열 변성은 단백질 구조를 상당히 그리고 비가역적으로 변경시킨다. 한편, 본 발명에 의해 고려되는 디숄파

이드 형성은 실질적으로 단백질을 변성시키지 않는다. 또한, 셀내에 함유된 실질적으로 수불용성 약물학적 활성제의 입자는 선행 기술의 가교되거나 열 변성된 단백질 미소구와는 상이한데, 그 이유는 본 발명에 의해 제조된 중합체 셀은 코팅된 입자의 직경에 비해 비교적 얇기 때문이다. 중합체 코팅물의 "셀 두께"는 직경이 1 μm (1000 nm)인 코팅 입자의 경우 약 25 nm인 것으로 측정되었다 (투과 전자 현미경에 의해). 한편, 선행 기술의 미소구는 단백질 셀을 갖기 보다는, 오히려 미소구의 부피 전체에 걸쳐 단백질이 분산되어 있다.

- <177> 따라서, 본 발명에 따른 약물학적 활성제는 적절한 용매, 예를 들어 클로로포름, 염화메틸렌, 에틸 아세테이트, 에탄올, 테트라히드로푸란, 디옥산, 부탄올, 부틸 아세테이트, 아세토니트릴, 아세톤, 디메틸술폰, 디메틸 포름아미드, 메틸 피롤리디논 등 및 이들의 2종 이상의 혼합물 중에 용해된다. 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 고려되는 추가의 용매로는 대두유, 코코넛유, 올리브유, 홍화유, 면실화씨유, 참깨씨유, 오렌지유, 리모넨유, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 알콜, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> 에스테르, C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> 케톤, 폴리에틸렌 글리콜, 지방족 탄화수소물, 방향족 탄화수소물, 할로겐화 탄화수소물 및 이들의 배합물이 포함된다.
- <178> 나노입자 형성의 종래 방법과는 달리, 중합체 (예를 들어, 폴리락트산)는 용매 중에 용해되지 않는다. 본 발명 조성물의 제조에 사용되는 유상은 전형적으로 용매 중에 용해된 약물학적 활성제만을 함유한다.
- <179> 다음으로, 단백질 (예를 들어, 사람 혈청 알부민)은 안정한 나노입자의 형성을 위한 안정화제로 작용하도록 (수성상에) 첨가된다. 단백질은 약 0.05 내지 25 % (w/v)의 범위, 보다 구체적으로 약 0.5 내지 5 % (w/v)의 범위내의 농도로 첨가된다. 나노입자 형성의 종래 방법과는 달리, 계면활성제 (예를 들어, 나트륨 라우릴 술페이트, 레시틴, 트윈(Tween) 80, 플루로닉(Pluronic) F-68 등)은 혼합물에 첨가되지 않는다.
- <180> 다음으로, 에멀전은 고압 및 고전단력에 균질화법으로 형성된다. 이러한 균질화법은 편리하게는 전형적으로 약 3,000 내지 60,000 psi 범위의 압력에서 작동되는 고압 균질화기에서 수행된다. 바람직하게는, 이러한 방법은 약 6,000 내지 40,000 psi 범위의 압력에서 수행된다. 얻어진 에멀전은 매우 작은 나노 크기 방울의 비수성 용매 (용해된 약물학적 활성제 함유) 및 매우 작은 나노 크기 방울의 단백질 안정화제를 포함한다. 허용가능한 균질화법으로 고압 균질화법, 고전단 혼합기, 초음파 분해법, 고전단 추진기 등과 같은 고전단 및 공동현상을 제공하는 방법이 포함된다.
- <181> 마지막으로, 용매는 감압하에 증발하여 약물학적 활성제 및 단백질의 단백질 코팅된 나노입자 및 단백질을 포함하는 콜로이드계를 생성한다. 허용가능한 증발 방법으로는 회전증발기, 낙하 막 증발기, 분무 건조기, 동결 건조기 등의 사용이 포함된다. 한외여과도 용매 제거용으로 사용된다.
- <182> 용매의 증발에 이어서, 액상 현탁액을 건조시켜 약물학적 활성제 및 단백질을 함유하는 분말을 얻을 수 있다. 얻어진 분말은 임의 편리한 시간으로 적절한 수성 매질, 예를 들어 식염수, 완충 식염수, 물, 완충 수성 매질, 아미노산 용액, 비타민 용액, 탄수화물 용액 등 및 이들의 2종 이상의 혼합물에 재분산시켜 포유동물에 투여될 수 있는 현탁액을 얻을 수 있다. 이 분말을 얻기 위해 고려되는 방법으로는 동결 건조법, 분무 건조법 등이 포함된다.
- <183> 본 발명의 다른 실시태양은 매우 작은 μm 이하의 입자 (나노입자), 즉 직경이 200 nm 미만인 입자의 형성을 위한 별법을 제공한다. 이러한 입자는 액상 현탁액의 형태로 사용하기 전에 멸균 여과될 수 있다. 본 발명의 제조 방법의 최종 생성물 (즉, 약물 입자)을 멸균 여과하는 능력은, 오토클레이브와 같은 종래의 수단에 의해 고농도의 단백질 (예를 들어 혈청 알부민)을 함유하는 분산액을 멸균할 수 없기 때문에 매우 중요하다.
- <184> 멸균 여과가능한 입자 (200 nm 미만의 입자)을 얻기 위해, 약물학적 활성제는 먼저 고농도에서 실질적으로 수불용성 유기 용매 (예를 들어, 물 중의 약 5 % 미만의 용해도를 갖는 용매, 예를 들어 클로로포름) 중에 용해시켜 약물학적 활성제를 함유하는 유상을 형성한다. 적절한 용매는 상기에 개시되어 있다. 나노입자 형성을 위한 종래 방법과는 달리, 중합체 (예를 들어, 폴리락트산)는 용매 중에 용해되지 않는다. 본 발명의 방법에 사용되는 유상은 용매 중에 용해된 약물학적 활성제만을 함유한다.
- <185> 다음으로, 수혼화성 유기 용매 (예를 들어, 용해도가 물 중에 약 10 %를 초과하는 용매, 예를 들어 에탄올)를 첨가하여 전체 유기상의 약 1 내지 99 % (v/v) 범위, 보다 바람직하게는 약 5 내지 25 % (v/v) 범위의 최종 농도로 유상에 첨가한다. 수혼화성 유기 용매는 에틸 아세테이트, 에탄올, 테트라히드로푸란, 디옥산, 아세토니트릴, 부탄올, 아세톤, 프로필렌 글리콜, 글리세롤, 디메틸 술폰, 디메틸 포름아미드, 메틸 피롤리디논 등과 같은 용매에서 선택할 수 있다. 별법으로, 수불용성 용매와 수혼화성 용매의 혼합물을 먼저 제조하고, 이어서 이 혼합물 중에 약물학적 활성제를 용해시킨다.

- <186> 다음으로, 사람 혈청 알부민 또는 상기한 바와 같은 임의 다른 적절한 안정화제를 수성 매질에 용해시킨다. 이 성분은 안정한 나노 크기 방울의 형성을 위한 안정화제로서 작용한다. 임의로, 충분한 양의 제1 유기 용매 (예를 들어, 클로로포름)를 수성상 중에 용해시켜 포화 농도에 가깝게 만든다. 별도의 계량된 양의 유기상 (지금은 약물학적 활성제, 제1 유기 용매 및 제2 유기 용매를 함유함)을 포화된 수성상에 첨가하여, 유기상의 상 분획이 약 0.5 내지 15 %(v/v), 보다 바람직하게는 1 내지 8 %(v/v) 사이가 되게 한다.
- <187> 다음으로, 마이크로 및 나노 크기 방울을 포함하는 혼합물을 저전단력에서 균질화로 형성한다. 이것은, 예를 들어 약 2,000 내지 약 15,000 rpm 범위에서 작동하는 통상의 실험실용 균질화기를 사용하는 당업자에 의해 쉽게 확인될 수 있는 각종 방법으로 달성할 수 있다. 이어서, 고압 (예를 들어, 약 3,000 내지 60,000 psi 범위)에서 균질화를 행한다. 얻어진 혼합물은 수성 단백질 용액 (예를 들어, 사람 혈청 알부민), 수불용성 약물학적 활성제, 제1 용매 및 제2 용매를 포함한다. 마지막으로, 용매는 진공하에서 쉽게 증발시켜 멸균 여과될 수 있는 극히 작은 나노입자 (즉, 직경이 약 10 nm 내지 200 nm 범위인 입자) 형태의 콜로이드 분산액 (약물학적 활성제 및 단백질)을 생성한다. 입자의 바람직한 크기 범위는 제제 및 작동 변수에 따라서 약 50 내지 170 nm 사이이다.
- <188> 본 발명에 따라 제조되는 콜로이드계는 또한, 예를 들어 적절한 온도-시간 프로파일에서 동결건조법 또는 분무 건조법으로 물을 제거하여 분말 형태로 전환시킬 수 있다. 단백질 (예를 들어, 사람 혈청 알부민) 그 자체는 냉동보호제 또는 동결보호제로서 작용하고, 분말은 만니톨, 수크로스, 글리신 등과 같은 통상의 냉동보호제를 사용할 필요없이 물, 식염수 또는 완충액을 첨가하여 용이하게 재조성된다. 필수적이지는 않지만, 물론 통상의 냉동보호제를 필요한 경우 본 발명의 제제에 첨가할 수 있다는 것은 이해된다.
- <189> 약물학적 활성제의 콜로이드계는 비교적 작은 부피로 고투여량의 약물학적 활성제를 전달할 수 있다. 이것은 큰 부피의 유체를 수용할 때 환자의 불편함을 최소화하고 병원 입원 기간을 최소화한다. 또한, 중합체 셀 또는 코팅물의 벽은 일반적으로 단백질 가수분해 효소에 의해 생체내에서 완전히 분해가능하기 때문에 (예를 들어 중합체가 단백질인 경우), 전달계에서 부작용이 실질적으로 생성되지 않고, 이것은 선형 제제에 의해 일어나는 심각한 부작용과는 매우 대조를 이루는 것이다.
- <190> 수많은 생체적합성 중합체를, 실질적으로 수불용성 약물학적 활성제를 둘러싸고 있는 중합체 셀을 형성하기 위한 본 발명의 실시예에 사용할 수 있다. 술포히드릴기 또는 디술폰아이드 결합을 구조내에 임의로 함유하는 기본적으로 모든 천연 또는 합성 중합체를 실질적으로 수불용성 약물학적 활성제의 입자에 대해 디술폰아이드 가교된 셀을 제조하기 위해 이용할 수 있다. 술포히드릴기 또는 디술폰아이드 결합은 중합체 구조내에 미리 존재시킬 수 있거나, 또는 이들을 적절한 화학적 개질에 의해 도입할 수 있다. 예를 들어, 단백질, 펩티드, 폴리핵산, 폴리사카라이드 (예를 들어, 전분, 셀룰로스, 텍스트란, 알기네이트, 키토산, 펙틴, 히알루론산 등), 프로테오글리칸, 지단백질 등과 같은 천연 중합체는 상기 개질을 위한 후보자이다.
- <191> 본 발명에 따른 안정화제로 사용하기 위해 고려되는 단백질로는 알부민 (35개 시스테인 잔기 함유), 면역글로불린, 카세인, 인슐린 (6개 시스테인 함유), 헤모글로빈 ( $\alpha_2\beta_2$  단위 당 6개 시스테인 잔기 함유), 리소짐 (8개 시스테인 잔기 함유), 면역글로불린, 알파-2-마크로글로불린, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 피브리노젠, 리파제 등이 포함된다. 단백질, 펩티드, 효소, 항체 및 이들의 배합물은 본 발명에 사용하기 위해 고려되는 일반적인 안정화제의 균이다.
- <192> 현재, 안정화제로 사용하기 위한 바람직한 단백질은 알부민이다. 임의로, 알파-2-마크로글로불린인 공지된 옵션과 같은 단백질을 사용하여 대식세포형 세포에 의해 실질적으로 수불용성 약물학적 활성제의 셀 봉입된 입자의 흡수를 증가시키거나, 또는 간 및 비장으로의 셀 봉입된 입자의 흡수를 증가시킬 수 있다. 특이적 항체를 또한 이용하여 나노입자를 특정 부위에 표적화시킬 수 있다. 또한, 생물질을 목적하는 부위에 표적화하는데 용이하게 할 수 있는 항체 또는 효소와 같은 다른 기능적 단백질을 사용하여 안정화 단백질의 성분으로 사용할 수 있다.
- <193> 유사하게는, 합성 중합체도 중합체 셀을 함유하는 입자의 형성을 위한 양호한 후보자이다. 또한, 폴리알킬렌 글리콜 (예를 들어, 직쇄 또는 분지쇄), 폴리비닐 알콜, 폴리아크릴레이트, 폴리히드록시에틸 메타크릴레이트, 폴리아크릴산, 폴리에틸옥사졸린, 폴리아크릴아미드, 폴리이소프로필 아크릴아미드, 폴리비닐 피롤리디논, 폴리락티드/글리콜리드 등 및 이들의 배합물은 본 발명의 제제의 생체적합성 중합체를 위한 양호한 후보자이다.
- <194> 유사하게는, 합성 폴리펩티드도 실질적으로 수불용성 약물학적 활성제용 안정화제를 위한 양호한 후보자이다. 또한, 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 고려되는 것으로는 시스테인 잔기 및(또는) 디술폰아이드기를 함유하는 합

성 폴리아미노산, 유리 술프히드릴기 및(또는) 디술파이드기를 함유하도록 개질된 폴리비닐 알콜, 유리 술프히드릴기 및(또는) 디술파이드기를 함유하도록 개질된 폴리히드록시에틸 메타크릴레이트, 유리 술프히드릴기 및(또는) 디술파이드기를 함유하도록 개질된 폴리아크릴산, 유리 술프히드릴기 및(또는) 디술파이드기를 함유하도록 개질된 폴리에틸옥사졸린, 유리 술프히드릴기 및(또는) 디술파이드기를 함유하도록 개질된 폴리아크릴아미드, 유리 술프히드릴기 및(또는) 디술파이드기를 함유하도록 개질된 폴리비닐 피롤리디논, 유리 술프히드릴기 및(또는) 디술파이드기를 함유하도록 개질된 폴리알킬렌 글리콜, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리카프로락톤, 또는 유리 술프히드릴기 및(또는) 디술파이드기를 함유하도록 개질된 이들의 공중합체 및 이들의 2중 이상의 혼합물을 들 수 있다.

<195> 본 발명 조성물의 제조에서, 광범위한 유기 매질을 사용하여 실질적으로 수불용성 약물학적 활성제를 현탁 또는 용해시킬 수 있다. 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 고려되는 유기 매질로는 셀을 제조하는데 사용되는 중합체 또는 약물학적 활성제 그자체와 화학적으로 반응하지 않은 약물학적 활성제를 현탁시키거나 용해시킬 수 있는 모든 비수성 액체가 포함된다. 예로는 식물성유 (예를 들어, 대두유, 올리브유 등), 코코넛유, 홍화유, 면화씨유, 참깨씨유, 오렌지유, 리모넨유, 탄소 원자수 4 내지 30의 지방족, 지환족 또는 방향족 탄화수소물 (예를 들어, n-도데칸, n-데칸, n-헥산, 시클로헥산, 톨루엔, 벤젠 등), 탄소 원자수 2 내지 30의 지방족 또는 방향족 알콜 (예를 들어, 옥탄올 등), 탄소 원자수 2 내지 30의 지방족 또는 방향족 에스테르 (예를 들어, 에틸 카프릴레이트 (옥타노에이트) 등), 탄소 원자수 2 내지 30의 알킬, 아릴 또는 시클릭 에테르 (예를 들어, 디에틸 에테르, 테트라히드로푸란 등), 탄소 원자수 1 내지 30의 (및 임의로 하나 이상의 할로겐 치환체를 갖는) 알킬 또는 아릴 할로겐화물 (예를 들어, CH<sub>3</sub>Cl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl-CH<sub>2</sub>Cl 등), 탄소 원자수 3 내지 30의 케톤 (예를 들어, 아세톤, 메틸 에틸 케톤 등), 폴리알킬렌 글리콜 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 등) 또는 이들의 2중 이상의 배합물을 들 수 있다.

<196> 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 고려되는 특히 바람직한 유기 매질의 배합물은 전형적으로 비점이 약 200 °C 이하이고, 고분자량 (덜 휘발성) 유기 매질과 함께 휘발성 액체, 예를 들어 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 벤젠, 에탄올, 부탄올, 부틸 아세테이트 등 (즉, 약물학적 활성제를 위한 고도의 용해도를 가지고 사용되는 기타 유기 매질 중에 가용성인 용매)를 포함한다. 기타 유기 매질에 첨가하는 경우, 이들 휘발성 첨가제는 약물학적 활성제를 유기 매질에 용해시키는데 보조한다. 이것은, 이 단계가 통상 시간을 소비하기 때문에 바람직하다. 용해에 이어서, 휘발성 성분을 증발로(임의로 진공하에) 제거할 수 있다.

<197> 상기한 바와 같이 제조한 중합체 셀을 포함한 약물학적 활성제의 입자는 생체적합성 수성 액체 중에 현탁액으로서 전달한다. 이 액체는 물, 식염수, 적절한 완충액을 함유하는 용액, 아미노산, 당, 단백질, 탄수화물, 비타민 또는 지방 등과 같은 영양제를 함유하는 용액에서 선택할 수 있다.

<198> 또한, 이들 생체적합성 물질을 (가교되거나 비가교된) 겔과 같은 몇몇 물리적 형태로 사용하여 약물학적 활성 성분, 예를 들어 파클리탁셀을 매트릭스의 확산 및(또는) 분해로 방출될 수 있는 매트릭스를 제공할 수 있다. 또한, 온도 민감성 물질을 본 발명의 제제를 위한 분산 매트릭스로 이용할 수 있다. 따라서, 예를 들어 캡슐 (등록상표)를, 중앙 부위에서 겔화하고 서방출형 캡슐을 제공하는 온도 민감성 물질 (예를 들어, 폴리아크릴아미드의 공중합체 또는 폴리알킬렌 글리콜과 폴리락티드/글리콜리드의 공중합체)의 액체 제제에 주입할 수 있다. 캡슐 제제는 상기 생체적합성 중합체의 매트릭스에 분산시켜 파클리탁셀의 조절 방출형 제제를 제공하고, 이것은 캡슐 제제 (파클리탁셀과 결합된 알부민)의 특성을 통하여 하기와 같이 전신 독성을 낮게 할 뿐만 아니라, 뇌 조직에 대해 독성을 낮게 한다. 생체적합성 중합체 매트릭스와 함께 캡슐과 유사하게 제제화된 다른 화학치료제 또는 캡슐의 배합물은 뇌 및 복막내의 고형 종양을 치료하기 위한 화학치료제의 국소 전달을 조절하는데 그리고 다른 고형 종양에 대한 국소 적용에 유용할 수 있다. 이들 배합 제제는 파클리탁셀의 사용에 제한되지 않으며, 항감염제, 면역억제제, 기타 화학치료제 등을 포함한 각종 약물학적 활성 성분과 함께 이용할 수 있다.

<199> 본 명세서에 기재한 바와 같이 제조된, 중합체 안정화 층내에 실질적으로 완전히 함유되거나 또는 결합된 콜로이드 입자는 순수한 형태로 전달되거나, 또는 임의로 생체적합성 매질 중의 현탁액으로 전달될 수 있다. 이 매질은 물, 완충된 수성 매질, 식염수, 완충된 식염수, 아미노산의 임의로 완충된 용액, 단백질의 임의로 완충된 용액, 당의 임의로 완충된 용액, 탄수화물의 임의로 완충된 용액, 비타민의 임의로 완충된 용액, 합성 중합체의 임의로 완충된 용액, 지질 함유 에멀전 등에서 선택할 수 있다.

<200> 또한, 콜로이드 입자는 임의로 적절한 제제로 개질할 수 있고, 여기서 제제는 임의의 공유결합을 통한 중합체 층에 결합된다. 이러한 결합을 위해 고려되는 공유결합으로는 에스테르, 에테르, 우레탄, 디에스테르, 아미드, 2차 또는 3차 아민, 포스페이트 에스테르, 술페이트 에스테르 등이 포함된다. 중합체 셀의 임의 개질을 위해

고려되는 적절한 제제는 합성 중합체 (폴리알킬렌 글리콜, 예를 들어 직쇄 또는 분지쇄 폴리에틸렌 글리콜), 폴리비닐 알콜, 폴리히드록시에틸 메타크릴레이트, 폴리아크릴산, 폴리에틸옥사졸린, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐 피롤리딘은 등), 인지질 (예를 들어, 포스파티딜 콜린 (PC), 포스파티딜 에탄올아민 (PE), 포스파티딜 이노시톨 (PI), 스핀고미엘린 등), 단백질 (예를 들어, 효소, 항체 등), 폴리사카라이드 (예를 들어, 전분, 셀룰로스, 텍스트란, 알기네이트, 키토산, 펙틴, 히알루론산 등), 화학적 개질제 (예를 들어, 피리독살 5'-포스페이트, 피리독살의 유도체, 디알데히드류, 디아스피린 에스테르 등) 또는 이들의 2종 이상의 배합물이 포함된다.

<201> 안정화된 콜로이드 입자의 일반적인 테마에 대한 변형이 가능하다. 생체적합성 분산제 중 약물의 미세 입자의 현탁액을 사용하여 (용해된 생물질을 함유하는 생체적합성 분산제 대신) 생물질의 분산제에 현탁된 입자를 함유하는 중합체 셸을 제조할 수 있다. 즉, 중합체 셸은 분산제 중의 생물질의 포화 용액을 함유할 수 있다. 다른 변형은 먼저 휘발성 유기 용매 (예를 들어, 벤젠) 중에 생물질을 용해시켜 중합체 셸을 형성하고, 진공하에 예를 들어 증발기, 분무 건조기에 의해 휘발성 용매를 증발시키거나 또는 전체 현탁액을 동결 건조시킴으로써 제조된 생물질의 고품 코어를 함유하는 중합체 셸이다. 이것은 중합체 코팅물에 의해 둘러싸인 생물질의 고품 코어를 함유하는 구조를 생성한다. 이 방법은 비교적 작은 부피로 고투여량의 생물질을 전달하는데 특히 유리하다. 일부 경우, 코어에 대해 셸을 형성하는 생체적합성 물질은 예를 들어, 인슐린의 경우 그 자체로 치료제 또는 진단제일 수 있고, 이것은 상기한 방법으로 형성되는 중합체 셸의 일부로서 전달될 수 있다. 다른 경우, 셸을 형성하는 중합체는 예를 들어 표적화하는데 사용되는 항체의 경우 또는 헤모글로빈의 경우에서 생물질의 전달에 참여할 수 있고, 이것은 상기한 초음파 조사법으로 형성되는 중합체 셸의 일부로서 전달되어 산소와의 높은 결합력을 갖는 혈액 치환을 제공할 수 있다.

<202> 당업자들은, 몇몇 변형이 본 발명의 일면의 범주 및 정신내에서 가능하다는 것을 알 수 있을 것이다. 중합체 셸내의 유기 매질은 변형될 수 있고, 각종 약물학적 활성제가 이용될 수 있으며, 광범위한 단백질 및 다른 천연 및 합성 중합체가 중합체 셸의 벽 형성에 사용될 수 있다. 또한 동등하게 광범위하게 응용된다. 다른 생의약적 응용, 예를 들어 약물, 진단제 (영상 적용에서), 인공 혈액 및 비경구용 영양제의 전달 이외에도, 본 발명의 중합체 셸 구조는 피부용 크림 또는 헤어 보호제와 같은 화장품, 향료 제품 및 압력 민감성 잉크 등에서 혼입될 수 있다.

<203> 본 발명의 일면은 하기 비제한적인 실시예를 참고로 보다 상세히 기재될 것이다.

<204> <실시예 1>

<205> <고압 균질화에 의한 나노입자의 제조>

<206> 파클리탁셀 30 mg을 염화메틸렌 3.0 ml 중에 용해시켰다. 용액을 사람 혈청 알부민 용액 (1 %(w/v)) 27.0 ml에 첨가하였다. 혼합물을 낮은 RPM (Vitris 균질화기, 모델: Tempest I.Q.)에서 5분 동안 균질화시켜 조 에멀전을 형성시키고, 이어서 고압 균질화기 (Avestin)에 옮겼다. 5회 이상 동안 에멀전을 재순환시키면서 9,000 내지 40,000 psi에서 유화시켰다. 얻어진 계를 회전 증발기로 옮기고, 염화메틸렌을 감압 (30 mmHg)하에 40 °C에서 20 내지 30분 동안 재빨리 제거하였다.

<207> 얻어진 분산액은 반투명이었고, 얻어진 파클리탁셀 입자의 통상 직경은 160 내지 220 nm (Z-평균, Malvern Zetasizer)이었다.

<208> 또한, 분산액을 임의의 냉동보호제를 첨가하지 않고 48시간 동안 동결건조시켰다. 얻어진 케이크는 멸균수 또는 식염수를 첨가하여 원래 분산액으로 쉽게 제조성할 수 있었다. 제조성 후 입자 크기는 동결건조 전과 동일하였다.

<209> <실시예 2>

<210> <통상의 계면활성제 및 단백질을 사용하면 큰 결정이 형성되었다>

<211> 하기 실시예는 종래의 용매 증발법에서 사용되는 계면활성제를 첨가한 영향을 입증한다. 일련의 실험을 실시예 1에 기재한 것과 유사한 과정을 사용하여 수행하였고, 단 트윈 80 (1 내지 10 %)과 같은 계면활성제를 유기 용매에 첨가하였다. 염화메틸렌을 제거한 후, 광현미경 및 편광에 의해 관찰할 때 평균 크기가 1 내지 2 μm인 다수의 파클리탁셀 결정이 얻어진다는 것을 발견하였다. 결정은 수시간내에 성장하여 크기가 약 5 내지 15 μm인 매우 큰 바늘형 결정을 형성하였다. 유사한 현상이 다른 통상적으로 사용되는 계면활성제, 예를 들어 플루로닉 (Pluronic) F-68, 플루로닉 F-127, 크레모포어 EL 및 브리지 (Brij) 58을 사용한 경우에도 관찰되었다.

<212> 이들 결과로부터, 알부민과 같은 단백질과 배합한 통상적인 계면활성제를 이용하는 종래의 용매 증발법은 극성

용매 (예를 들어, 염화메틸렌)를 사용하면서 중합체 코어없이  $\mu\text{m}$  이하의 약물 입자 (예를 들어, 파클리탁셀)의 형성에 적절하지 않다는 것을 알 수 있다.

<213> <실시예 3>

<214> <통상적인 계면활성제를 단독으로 사용하면 큰 결정이 형성되었다

<215> 이 실시예는, 극성 수불혼화성 용매 (예를 들어 클로로포름) 중에 가용성인 약물학적 활성제와 함께, 중합체 코어 물질없이 통상적인 계면활성제를 사용하는 경우 나노입자를 형성할 수 없다는 것을 입증하였다.

<216> 탁솔 30 mg을 클로로포름 0.55 ml 및 에탄올 0.05 ml 중에 용해시켰다. 용액을 1 % 클로로포름으로 미리 포화시킨 트윈 80 용액 (1 % (w/v)) 29.4 ml에 첨가하였다. 혼합물을 낮은 RPM (Vitris 균질화기, 모델: Tempest I.Q.)에서 6분 동안 균질화시켜 조 에멀전을 형성시키고, 이어서 고압 균질화기 (Avestin)에 옮겼다. 6회 이상 동안 에멀전을 재순환시키면서 9,000 내지 40,000 psi에서 유화시켰다.

<217> 얻어진 계를 회전 증발기로 옮기고, 클로로포름을 감압 (30 mmHg)하에 40 °C에서 15 내지 30분 동안 재빨리 제거하였다. 얻어진 분산액은 불투명하였고, 큰 바늘형 결정의 약물을 함유하였다. 결정의 초기 크기 (또한 편광에 의해 관찰)는 0.7 내지 5  $\mu\text{m}$ 이었다. 실온에서 수시간 동안 분산액을 저장하면 결정 크기가 더 증가하였고, 결국 침전을 형성하였다.

<218> <실시예 4>

<219> 200 nm 미만의 평균 여과가능한 나노입자의 제조

<220> 이 실시예는 평균 여과가능한 약물 입자를 얻을 수 있는 방법을 기재한다. 탁솔 30 mg을 클로로포름 0.55 ml 및 에탄올 0.05 ml 중에 용해시켰다. 용액을 1 % 클로로포름으로 미리 포화시킨 사람 혈청 알부민 용액 (1 % (w/v)) 29.4 ml에 첨가하였다. 혼합물을 낮은 RPM (Vitris 균질화기, 모델: Tempest I.Q.)에서 5분 동안 균질화시켜 조 에멀전을 형성시키고, 이어서 고압 균질화기 (Avestin)에 옮겼다. 6회 이상 동안 에멀전을 재순환시키면서 9,000 내지 40,000 psi에서 유화시켰다. 얻어진 계를 회전 증발기로 옮기고, 클로로포름을 감압 (30 mmHg)하에 40 °C에서 15 내지 30분 동안 재빨리 제거하였다. 얻어진 분산액은 반투명이었고, 얻어진 탁솔 입자의 통상 직경은 140 내지 160 nm (Z-평균, Malvern Zetasizer)이었다. 분산액을 혼탁도 또는 입자 크기에서 임의의 중요한 변화를 일으키지 않고 0.22  $\mu\text{m}$  여과기 (Millipore)를 통해 여과하였다.

<221> 탁솔 함량의 HPLC 분석으로, 탁솔의 97 % 이상이 여과후 회수되었고 따라서 평균 탁솔 분산액이 얻어진다는 것을 알 수 있었다.

<222> 또한, 평균 분산액을 임의 동결보호제를 첨가하지 않고 48시간 동안 동결건조시켰다. 얻어진 케이크는 평균수 또는 식염수를 첨가하여 원래 분산액으로 쉽게 재조성할 수 있었다. 재조성 후 입자 크기는 동결건조 전과 동일하였다.

<223> <실시예 5>

<224> 200 nm 미만의 평균 여과가능한 나노입자의 제조

<225> 이 실시예는 평균 여과가능한 약물 입자를 얻을 수 있는 방법을 기재한다. 탁솔 225 mg을 클로로포름 2.7 ml 및 에탄올 0.3 ml 중에 용해시켰다. 용액을 사람 혈청 알부민 용액 (3 % (w/v)) 97 ml에 첨가하였다. 혼합물을 낮은 RPM (Vitris 균질화기, 모델: Tempest I.Q.)에서 5분 동안 균질화시켜 조 에멀전을 형성시키고, 이어서 고압 균질화기 (Avestin)에 옮겼다. 6회 이상 동안 에멀전을 재순환시키면서 9,000 내지 40,000 psi에서 유화시켰다. 얻어진 계를 회전 증발기로 옮기고, 클로로포름을 감압 (30 mmHg)하에 40 °C에서 15 내지 30분 동안 재빨리 제거하였다. 얻어진 분산액은 반투명이었고, 얻어진 탁솔 입자의 통상 직경은 140 내지 160 nm (Z-평균, Malvern Zetasizer)이었다. 분산액을 혼탁도 또는 입자 크기에서 임의의 중요한 변화를 일으키지 않고 0.22  $\mu\text{m}$  여과기 (Sartorius, sartobran 300)를 통해 여과하였다. 탁솔 함량의 HPLC 분석으로, 여과 후 탁솔의 70 내지 100 %가 사용된 조건에 따라 회수된다는 것을 알 수 있었다. 따라서 평균 탁솔 분산액이 얻어졌다.

<226> 평균 분산액을 평균 유리 바이알로 무균 충전시키고, 임의 동결보호제를 첨가하지 않고 동결건조시켰다. 얻어진 케이크는 평균수 또는 식염수를 첨가하여 원래 분산액으로 쉽게 재조성할 수 있었다. 재조성 후 입자 크기는 동결건조 전과 동일하였다.

- <227> 삭제
- <228> 삭제
- <229> 삭제
- <230> 삭제
- <231> 삭제
- <232> 삭제
- <233> 삭제
- <234> 삭제
- <235> 삭제
- <236> <실시예 8>
- <237> <모델 약물의 나노입자의 형상>
- <238> 이소프레세르핀 (모델 약물) 30 mg을 염화메틸렌 3.0 ml 중에 용해시켰다. 용액을 사람 혈청 알부민 용액 (1 % (w/v)) 27.0 ml에 첨가하였다. 혼합물을 낮은 RPM (Vitris 균질화기, 모델: Tempest I.Q.)에서 5분 동안 균질화시켜 조 에멀전을 형성시키고, 이어서 고압 균질화기 (Avestin)에 옮겼다. 5회 이상 동안 에멀전을 재순환시키면서 9,000 내지 18,000 psi에서 유화시켰다. 얻어진 계를 회전 증발기로 옮기고, 염화메틸렌을 감압 (30 mmHg)하에 40 °C에서 20 내지 30분 동안 재빨리 제거하였다. 얻어진 분산액은 반투명이었고, 얻어진 파클리탁셀 입자의 통상 직경은 120 내지 140 nm (Z-평균, Malvern Zetasizer)이었다. 분산액을 0.22 μm 세공을 통해 여과하였다.
- <239> 또한, 멸균 분산액을 임의 동결보호제를 첨가하지 않고 48시간 동안 동결건조시켰다. 얻어진 케이크는 멸균수 또는 식염수를 첨가하여 원래 분산액으로 쉽게 재조성할 수 있었다. 재조성 후 입자 크기는 동결건조 전과 동일하였다.
- <240> <실시예 9>
- <241> <모델 약물의 매우 작은 입자 형상>
- <242> 입자 크기를 감소시키는데 에탄올 첨가의 영향은 이소프레세르핀의 경우 입증된다. 이소프레세르핀 30 mg을 염화메틸렌 2.7 ml 및 에탄올 0.3 ml 중에 용해시켰다. 용액을 사람 혈청 알부민 용액 (1 % (w/v)) 27.0 ml에 첨가하였다. 혼합물을 낮은 RPM (Vitris 균질화기, 모델: Tempest I.Q.)에서 5분 동안 균질화시켜 조 에멀전을 형성시키고, 이어서 고압 균질화기 (Avestin)에 옮겼다. 5회 이상 동안 에멀전을 재순환시키면서 9,000 내지 40,000 psi에서 유화시켰다. 얻어진 계를 회전 증발기로 옮기고, 염화메틸렌을 감압 (30 mmHg)하에 40 °C에서 20 내지 30분 동안 재빨리 제거하였다. 얻어진 분산액은 반투명이었고, 얻어진 파클리탁셀 입자의 통상 직경은 90 내지 110 nm (Z-평균, Malvern Zetasizer)이었다. 분산액을 0.22 μm 여과기 (Millipore)를 통해 여과하였다.

- <243> 또한, 멸균 분산액을 임의 동결보호제를 첨가하지 않고 48시간 동안 동결건조시켰다. 얻어진 케이크는 멸균수 또는 식염수를 첨가하여 원래 분산액으로 쉽게 재조성할 수 있었다. 재조성 후 입자 크기는 동결건조 전과 동일하였다.
- <244> <실시예 10>
- <245> <본 발명의 방법에 적합하지 않은, 약물로 과포화된 수혼화성 용매 단독 사용>
- <246> 탁솔 30 mg을 에탄올 0.6 ml 중에 분산시켰다. 상기 농도 (50 mg/ml)에서, 탁솔은 완전히 용해되지 않고, 과포화된 분산액을 형성하였다. 이 분산액을 사람 혈청 알부민 용액 (1 % (w/v)) 29.4 ml에 첨가하였다. 혼합물을 낮은 RPM (Vitris 균질화기, 모델: Tempest I.Q.)에서 5분 동안 균질화시켜 조 분산액을 형성하고, 이어서 고압 균질화기 (Avestin)에 옮겼다. 에멀전을 6회 이상 동안 재순환시키면서 9,000 내지 40,000 psi에서 유회시켰다. 얻어진 계를 회전증발기에 옮기고, 에탄올을 감압 (30 mm Hg)하에 40°C에서 15 내지 30분 동안 재빨리 제거하였다. 얻어진 분산액 입자 크기는 약 250 nm 내지 수  $\mu\text{m}$ 의 범위로 매우 광범위하였다.
- <247> 현미경 관찰 결과, 탁솔의 큰 입자 및 전형적인 바늘형 결정이 존재하였다. 이들 입자는 너무 커서 정맥내 주사가 불가능하였다. 상기 실험은 본 발명의 방법에서 자유롭게 물과 혼합할 수 있는 에탄올과 같은 용매를 사용하면 입자 크기 분포가 매우 넓은 큰 입자가 형성되어 그 자체로는 단독으로 본 발명의 방법에 사용될 수 없음을 입증한다. 따라서, 본 발명의 방법은 약물 성분의 용해 또는 분산을 위해 용매를 단독으로 사용할 경우 수혼화성 용매는 사용 대상에서 제외한다. 본 발명의 방법은 사용시에 상기 용매를 본 발명의 나노입자를 생성시키는 필수적으로 수불혼화성 용매와 혼합할 것을 필요로 한다.
- <248> 삭제
- <249> 삭제
- <250> 삭제
- <251> 삭제
- <252> <실시예 12>
- <253> X-선 분말 회절에 의한 나노입자 형태의 파클리탁셀의 물질적 상태 측정
- <254> 일반적으로, 파클리탁셀 원료는 여러가지 크기, 통상적으로는 5 내지 500  $\mu\text{m}$ 의 침상 결정으로 존재한다. 결정의 크기가 몇  $\mu\text{m}$ 을 넘는다면, 모세혈관을 막을 가능성이 있기 때문에 정맥 주사용 약물 제제에서 결정이 존재한다는 것은 분명히 해롭다. 또한, 약물 결정의 용해도는 일반적으로 비결정질 약물보다 낮기 때문에 정맥 투여 후 약물의 생체이용률을 저하시킨다. 또한, 제제 중의 약물의 로딩이 증가함에 따라 결정화 경향 또한 증가한다는 것이 공지되어 있다. 따라서, 제제는 약물을 본질적으로 비결정질 형태로 함유하는 것이 이롭다.
- <255> 동결건조된 분말 제제에서 파클리탁셀의 결정질 또는 비결정질 성질을 결정하기 위해 X-선 분말 회절법을 사용하였다. 샘플 1-파클리탁셀 분말; 샘플 2-동결건조된 혈청 알부민; 샘플 3-파클리탁셀과 알부민의 물리적 혼합물; 및 샘플 4-제제화된 파클리탁셀의 샘플을 분석하였다. 각 샘플은 CuK $\alpha$  방사선, 40 KeV/30 mA의 가속화 전압, 0.05° 2-세타의 스텝 크기 및 스텝 당 2.0초의 데이터 취득 시간을 사용하여 2° 내지 70° 2-세타 각에서 x-선 사진을 찍었다. 샘플 1은 결정질 샘플의 전형적인 강한 피크를 나타냈다. 5.1° 2-세타에 가장 강한 파클리탁셀 피크가 있었다. 샘플 2는 비결정질 물질의 전형적인 넓은 험프를 나타냈다. 샘플 3은 주로 샘플 2의 넓은 험프를 나타냈지만, 이외에도 파클리탁셀의 5.1° 2-세타에서의 피크를 볼 수 있었다. 제제화된 파클리탁셀인 샘플 4는 파클리탁셀의 결정성에 관한 근거를 전혀 나타내지 않았고 샘플 2와 동일하게 보였으므로, 제제화된 샘플에서는 실질적으로 비결정질의 약물학적 활성제가 존재함을 나타내었다.
- <256> 본 발명에 따라 제조된 나노입자의 비결정성은 나노입자 제조를 위해 종래에 사용되는 다른 방법에 의해 제조된 생성물과는 직접적으로 다르다. 예를 들어, 미국 특허 제5,145,684호 (Liversidge 외) 및 문헌 [Liversidge-

Merisko 외, Pharmaceutical Research 13(2): 272-278 (1996)]에 기재된 분쇄 기술의 사용은 실질적으로 결정질 생성물을 제조한다.

- <257> <실시예 13>
- <258> 고압 균일화에 의한 시클로스포린 나노입자 (정맥내 주사용 캡소린)의 제조
- <259> 시클로스포린 30 mg을 염화 메틸렌 3.0 ml 중에 용해시켰다. 이어서, 이 용액을 사람의 혈청 알부민 용액 (1% w/v) 27.0 ml에 첨가하였다. 이 혼합물을 낮은 RPM (비트리스 균일화기 모델: 템페스트 I.Q.)에서 5분 동안 균일화하여 조에멀전을 형성하고, 이어서 고압 균일화기 (아베스틴)로 옮겼다. 에멀전을 5회 이상 재순환시키면서 9000 내지 40,000 psi에서 유화 작용을 수행하였다. 얻어진 계를 회전식 증발기로 옮기서 감압 (30 mmHg)하에 40 °C에서 20 내지 30분 동안 염화 메틸렌을 빠르게 제거하였다. 생성된 분산액은 반투명이었고, 생성된 시클로스포린 입자의 전형적인 직경은 160 내지 220 nm (Z-평균, 말번 제타사이저(Malvern Zetasizer))였다.
- <260> 이 분산액을 냉동보호제를 전혀 첨가하지 않고, 48 시간 동안 추가 동결건조하였다. 그 결과 생성된 케이크는 무균수 또는 염수를 첨가하여 원래의 분산액으로 쉽게 재구성할 수 있었다. 재구성 후의 입도는 동결건조 전과 동일하였다.
- <261> <실시예 14>
- <262> 고압 균일화에 의한 시클로스포린 나노액적 (경구용 캡소린)의 제조
- <263> 시클로스포린 30 mg을 적합한 오일 (10%의 오렌지유를 함유하는 참기름) 3.0 ml 중에 용해하였다. 이어서, 용액을 사람의 혈청 알부민 용액 (1% w/v) 27.0 ml에 첨가하였다. 이 혼합물을 낮은 RPM (비트리스 균일화기 모델: 템페스트 I.Q.)에서 5분 동안 균일화하여 조에멀전을 형성하고, 이어서 고압 균일화기 (아베스틴)으로 옮겼다. 에멀전을 5회 이상 재순환시키면서 9000 내지 40,000 psi에서 유화 작용을 수행하였다. 생성된 분산액은 160 내지 220 nm의 전형적인 직경 (Z-평균, 말번 제타사이저)을 가졌다.
- <264> 이 분산액을 직접 사용하거나 또는 임의로 적당한 냉동보호제를 첨가함으로써 48 시간 동안 동결건조하였다. 그 결과 생성된 케이크는 무균수 또는 염수를 첨가하여 원래의 분산액으로 쉽게 재구성할 수 있었다.
- <B. 음파 분쇄법을 이용하여 나노입자의 형성>
- 고전단 균질화법을 이용하는 것과 유사하게 음파 파쇄법을 이용하여 수불용성의 제약학상 활성제의 단백질-도포 나노입자를 형성하는 것은 분자간 디설피드 결합의 형성을 통해 단백질을 가교시킴으로써 이루어진다고 생각된다. 상기에서 설명된 고전단 균일화 기술에 의한 종래 기술의 여러가지 잇점이 하기에서 설명되는 음파 분쇄법에도 동일하게 해당된다.
- 음파 분쇄법에 사용될 수 있는 유기 용매, 단백질 및 나노-단백질 중합체에 관해서는, 고전단 균질화법에 관해 상기에서 설명되는 성분들을 참고한다. 동일한 성분은 모두 두 방법에서 동일하게 충분히 작용할 것으로 기대된다.
- 본 발명의 이러한 특성은 이제 하기의 비제한적인 실시예를 참고로 보다 상세히 설명될 것이다.
- <265> <실시예 15>
- <266> 향천식제의 흡입용 제제
- <267> 미소입자 기술을 사용하여 향천식 약물을 제조하여 건조 분말 흡입제용 (DPI)으로 효과적인 제제를 제조하였다. 스테로이드계 약물 (예, 베클로메타손, 베클로메타손 디프로피오네이트, 부테소니드, 텍사메타손, 플루니솔리드, 트리암시놀론 아세토니드 등)에서 출발하여 호흡계에 효과적으로 전달되도록 적합한 입도 및 방출 특성을 갖는 건조 제제를 제조하였다.
- <268> 이 제제는 음파 분쇄 기술, 또는 용매 중에 용해된 활성 약물을 단백질 수용액에 분산시켜 나노입자의 에멀전을 형성하는 균질화법을 이용하여 제조하였다. 이어서, 이 에멀전을 증발시켜 용매를 제거하고, 단백질로 도포된 활성 약물은 용액 중에 남았다. 콜로이드계 약물 입자를 함유하는 액상 샘플을 말번 제타사이저에 의해 측정하였으며 260 nm의 Z-평균 크기를 가졌다. 바람직한 실시태양에서, 이런 콜로이드계 입자의 크기 범위는 약 50 내지 1,000 nm, 보다 바람직하게는 약 70 내지 400 nm이다.
- <269> 이 액형 중에 다른 부형제를 용해시킬 수도 있다. 이러한 부형제로는 (제한되는 것 없이) 만니콜 0.5 내지 15%, 락토오스 0.1 내지 5% 및 말토덱스트린이 포함된다. 이런 단계에서, 활성 약물, 단백질 및 부형제의 결과

의 용액을 분무 건조하거나 동결건조하고, 분쇄하여 건조 분말을 수득할 수 있다. 분무 건조 후, 건조 입자의 크기는 말번 마스터사이저에 의해 약 1 내지 10  $\mu\text{m}$ 의 D(v.0.5)로 측정된다. 입자의 바람직한 크기 범위는 0.5 내지 15  $\mu\text{m}$ , 보다 바람직하게는 0.7 내지 8  $\mu\text{m}$ 이다.

- <270> 그 후, 이 분무 건조된 분말을 부형제 담체 분말과 혼합하였다. 또한, 락토오스, 트레할로스, 파마토스 325 M, 수크로스, 만니톨 등을 비롯한 몇몇 담체를 이용할 수 있다. 담체 분말의 크기는 제제화된 약물 입자 보다 상당히 크다 (락토오스는 약 63 내지 90  $\mu\text{m}$ , 파마토스는 40 내지 100  $\mu\text{m}$ 임).
- <271> 건조 분말 제제의 효능은 안데르센(Andersen) 8단계 연속 충격기로 시험함으로써 증명된다. 충격기 시험 결과는 미세 입자 분율 (FPF)이 약 60%라는 것을 알았다. 이는 호흡용 물질로 적당히 조정된 입자가 매우 효과적으로 방출됨을 시사한다. 이 FPF는 상당히 크며, 보다 큰 제제 입자 내에 약물의 콜로이드계 나노입자를 함유하는 제제 조성물 때문이다.
- <272> 이런 제제는 DPI를 통해 에어로졸 전달용 건조 분말 제제를 가공하고 조정하는데 있어서 미소입자 및 분무-건조 기술이 적합함을 나타낸다.
- <273> <실시예 16>
- <274> 현재의 바람직한 제조 공정의 개요: 파클리탁셀 1 그램으로 출발
- <275> 3%의 HSA 용액을 제조하였다. 25%의 알부테인 51.7 ml에 주입용 물 379.3 ml를 첨가하였다. 완전히 혼합하고, 무균의 0.22  $\mu\text{m}$  날겐(Nalgen) 1회용 여과기 제품을 통해 용액을 여과하였다. 사용할 때까지 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.
- <276> 유리병에 있는 파클리탁셀 1.0 g을 칭량하였다. 바이알에  $\text{CHCl}_3$  및 에틸 알콜을 적당한 분율로 섞어서 잘 혼합하였다. 파클리탁셀에 클로로포름/에틸 알콜 혼합물 13.33 ml를 첨가하였다. 파클리탁셀이 전부 용액으로 용해되도록 교반하였다. 이 용액을 0.22  $\mu\text{m}$  무균 테플론 여과기로 여과하고, 무균 유리병에 모았다.
- <277> 유리병에 있는 용해된 파클리탁셀 용액에 HSA 용액을 첨가하였다. 센트리 마이크로프로세서 (Centry Microprocessor) 혼합기를 사용하여 파클리탁셀/HSA 용액을 혼합하였다. 이 용액을 혼합할 때, 성분들을 균일 화기의 챔버에 부었다. 원하는 입도가 얻어질 때까지 이 혼합물을 압력하에 균일화기로 순환시켰다. 콘테스 (Kontes) 등근 바닥 플라스크에 있는 균일화된 샘플을 모았다.
- <278> 최종 샘플이 있는 플라스크를 회전식 증발기에 고정시켰다. 진공을 걸고 회전식 증발기를 최대로 회전시켜 유기 용매를 증발시켰다. 그 결과 사람 알부민 중의 파클리탁셀의 콜로이드계 용액이 얻어졌다. 입도 분석을 위해 회전 증발된 샘플 약 3 ml를 두었다.
- <279> 무균 후드하에, 무균 0.45/0.2  $\mu\text{m}$  여과기를 사용하여 콜로이드계 용액을 여과하고, 무균 회수 용기에 모았다. 파클리탁셀 농도에 대해 HPLC로 분석하기 위해 여과된 샘플 약 3 ml를 두었다.
- <280> 바이알 당 파클리탁셀 30 mg (또는 다른 양)을 얻기 위해 충전 부피를 측정하였다. 살균 여과된 샘플을 (분석을 기초로) 압열 멸균된 히톤(Wheaton) 30 ml 바이알에 각각 약 17 ml로 채웠다. 바이알을 압열 멸균된 히톤 세럼 바이알 마개로 막았다. 각 바이알은 파클리탁셀 약 30 mg이 들어 있어야 한다.
- <281> FTS 시스템 스톱퍼링 트레이 동결건조기에서 소정의 동결건조 사이클을 이용하여 샘플을 동결건조시켰다. 샘플을 동결건조시킨 후, 바이알을 막고 20 mm의 히톤 알루미늄 절취 마개로 주름을 잡아서 바이알을 밀봉하였다. 샘플에 적당하게 표시를 하였다. 모든 과정은 무균 조건하에서 깨끗한 실내 환경에서 수행하였다.
- <282> 동결건조 샘플은 1000 ppm 미만, 보다 바람직하게는 500 ppm 미만, 또는 심지어 100 ppm 미만의 수준으로 잔류 용매를 함유한다.
- <283> 최종 생성물 살균 여과: 증발에 의한 용매 제거에 이어, 플라스크에 있는 파클리탁셀의 콜로이드계 용액을 0.45/0.2  $\mu\text{m}$  조합 살균 여과기를 통해 여과하였다. 여과 용액을 무균 비이커에 모아서 30 ml 바이알에 채웠다. 그 후, 바이알을 동결건조기에 넣었다. 동결건조 사이클의 완료에 이어 바이알을 건조의 무균 질소 기체로 채우고, 질소하에 뚜껑을 덮는다.
- <284> 세균 및 다른 세포를 포획하여 사멸시키기 위해 고압 균질화 과정을 이용하는 것이 주목할만 하다.
- <285> <실시예 17>

- <286> 삭제
- <287> 오일 함유 단백질 쉼의 제조
- <288> 삭제
- <289> 삭제
- <290> 삭제
- <291> USP (United States Pharmacopia) 5%의 사람 혈청 알부민 용액 (알파 세라퓨틱 코퍼레이션(Alpha Therapeutic Corporation)사 제품) 3 ml를 음과 분쇄 프로브 (가열 시스템, 모델 XL2020)에 고정시킬 수 있는 원통형 용기에 넣었다. 알부민 용액을 USP 등급 대두유 (두유) 6.5 ml로 덮었다. 소니케이터 프로브의 끝을 두 용액 사이의 계면에 놓고, 어셈블리는 20 °C의 냉욕에서 유지하였다. 이 계를 평형하게 하고, 소니케이터를 30초 동안 작동시켰다. 격렬한 혼합이 일어났고, 백색의 우유 같은 현탁액이 얻어졌다. 현탁액을 보통의 염수로 1:5로 희석하였다. 입자 카운터 (입자 데이터 시스템, 엘존(Elzone), 모델 280 PC)를 이용하여 입도 분포 및 오일 함유 단백질 쉼의 농도를 측정하였다. 생성된 단백질 쉼은 최대 단면적이 약  $1.35 \pm 0.73 \mu\text{m}$ 을 갖는 것으로 측정되었고, 총 농도는 원래의 현탁액 1 ml 당 약  $10^9$  쉼로 측정되었다.
- <292> 대조물로서, 단백질이 없는 상기 성분들은 초음파 조사시 안정한 미소에멀전을 형성하지 않았다. 이 결과는 단백질이 중심체 형성에 필수적이라는 것을 시사한다. 이는 하기에서 설명되는 주사 전자 현미경 및 투과 전자 현미경 연구에 의해 확인되었다.
- <293> <실시예 18>
- <294> 용해된 파클리탁셀을 함유하는 중합성 쉼의 제조
- <295> 탁술을 USP 등급 대두유 중에 2 mg/ml의 농도로 용해시켰다. USP 5% 사람 혈청 알부민 용액 3 ml를 음과 분쇄에 고정시킬 수 있는 원통형 용기에 취했다. 알부민 용액을 대두유/탁술 용액 6.5 ml로 덮었다. 소니케이터 프로브 끝을 두 용액의 계면에 놓고, 어셈블리를 평형 상태로 유지하고 소니케이터를 30초 동안 작동시켰다. 격렬한 혼합이 일어났고, 오일/탁술 용액으로 싸인 단백질-도포 중합성 쉼을 함유하는, 안정한 백색의 우유 같은 현탁액이 얻어졌다.
- <296> 가교된 단백질 쉼에 약물을 더 많이 로딩하기 위해, 오일 및 약물 (약물의 용해도가 상당히 높음)에 대한 양쪽성 용매를 오일과 혼합할 수 있다. 이 용매가 비교적 비독성 (예, 아세트산 에틸)이라면, 원래의 담체와 함께 주입할 수 있다. 다른 경우, 중합성 쉼의 제조에 이어 진공하에서 액체를 증발시켜 제거할 수 있다.
- <297> 본 발명의 제제의 물리적 특성을 얻기 위해 몇몇 상이한 방법을 사용할 수 있다고 알려져 있다. 고효능과 관련 있는, 특정 기관 부위 (전립선, 폐, 췌장, 골, 신장, 심장)에서 국소 농도가 높고 독성이 낮은 (LD50의 증가, 척수 억압의 감소, 뇌 독성 감소) 제제와 관련된 생물학적 특성은 제조 방법과 무관하다.
- <298> <실시예 19>
- <299> 음과 분쇄법에 의한 나노입자의 제조
- <300> 파클리탁셀 20 mg을 염화 메틸렌 1.0 ml 중에 용해시켰다. 이 용액을 사람 혈청 알부민 용액 (5% w/v) 4.0 ml에 첨가하였다. 이 혼합물을 낮은 RPM (비트리스 균질화기, 모델: 템페스트 I.Q.)에서 5분 동안 균질화하여 조에멀전을 형성하고, 그 후 40 kHz 소니케이터 셀로 옮겼다. 소니케이터를 1분 동안 0 등급에서 60 내지 90%의 출력에서 수행하였다 (550 소닉 디스멤브레이터(Sonic Dismembrator)). 이 혼합물을 회전식 증발기로 옮기고, 감압하에 (30 mmHg) 20 내지 30분 동안 염화 메틸렌을 40 °C에서 빠르게 제거하였다. 생성된 파클리탁셀 입자의 통상적인 직경은 350 내지 420 nm (Z-평균, 발먼 제타사이저)였다.
- <301> 이 분산액을 냉동보호제를 전혀 첨가하지 않고 48 시간 동안 추가 동결건조하였다. 그 결과 생성된 케이크는

무균수 또는 염수를 첨가하여 원래의 분산액으로 쉽게 재구성할 수 있었다. 재구성 후의 입도는 동결건조 전과 동일하였다.

- <302> <실시예 20>
- <303> 형광단을 함유하는 가교된 단백질 쉘의 생체내 생분포
- <304> 정맥 주사 후 단백질 중합성 쉘 내에 트랩핑된 액체의 흡수율 및 생분포를 측정하기 위해, 형광 염료 (루브렌, 알드리치(ALdrich)사로부터 구입)를 사람 혈청 알부민 (HSA) 단백질 중합성 쉘 내에 트랩핑하고, 표지 물질로 사용하였다. 따라서, 루브렌을 톨루엔 중에 용해시키고, 톨루엔/루브렌을 함유하는 알부민 쉘을 상기에서 설명된 바대로 초음파 조사에 의해 제조하였다. 결과의 우유색 현탁액을 보통의 염수로 5배 희석하였다. 이어서, 희석된 현탁액 2 ml를 10분에 걸쳐 래트의 꼬리 정맥에 주입하였다. 주입 1 시간 후와 주입 후 24 시간 후에 동물 한마리를 희생시켰다.
- <305> 폐, 간, 신장, 비장, 및 골수의 냉동된 부분 100  $\mu$ m을 중합성 쉘에 트랩핑된 형광 염료 또는 방출된 염료의 존재 여부를 위해 형광 현미경으로 시험하였다. 1 시간 후에는, 대부분의 중합성 쉘이 그대로인 것처럼 보였고 (즉, 약 1  $\mu$ m 직경의 형광 입자가 밝게 보임), 폐와 간에 위치하였다. 24 시간 후에는, 간, 폐, 비장 및 골수에서 염료가 관찰되었다. 조직의 일반적인 착색도 관찰되었으며, 이는 중합성 쉘의 쉘벽이 소화되어서 그 안에서 염료가 유리되었음을 나타낸다. 이 결과는 예상과 일치하며, 과클리탁셀과 같은 트랩핑된 약물의 지연 방출 또는 조절 방출을 위해 본 발명의 조성물의 사용 가능성을 증명한다.
- <306> <실시예 21>
- <307> 대두유 (SBO)를 함유하는 중합성 쉘의 독성
- <308> 대두유를 함유하는 중합성 쉘을 실시예 15에서 설명된 대로 제조하였다. 결과의 현탁액을 보통의 염수로 희석해서 하나의 용액은 20% SBO를 함유하고 다른 용액은 30%의 SBO를 함유하는 2개의 다른 용액을 제조하였다.
- <309> 시판되는 TPN제인 인트라리피드는 20%의 SBO를 함유한다. 1 cc/분으로 주사할 때 마우스에 있는 인트라리피드에 대한 LD<sub>50</sub>은 30 g의 마우스에 대해 약 4 ml, 즉 120 ml/kg이다.
- <310> 두 그룹의 마우스 (각 그룹은 마우스가 3마리임; 각 마우스는 약 30 g임)를 하기와 같이 SBO를 함유하는 본 발명의 조성물로 처치하였다. 각 마우스에게 SBO-함유 중합성 쉘의 제조 현탁액 4 ml를 주사하였다. 한 그룹의 마우스 각각에게는 20%의 SBO를 함유하는 현탁액을, 다른 그룹의 마우스 각각에게는 30%의 SBO를 함유하는 현탁액을 투여하였다.
- <311> 20% SBO를 함유하는 현탁액을 주사한 그룹에 있는 3마리의 마우스는 모두 이 처치를 견뎌냈고, SBO 처치 1 주일 후 관찰했을 때 어떤 조직이나 기관에서도 심한 독성은 관찰되지 않았다. 30%의 SBO를 함유하는 현탁액을 주사한 그룹에 있는 3마리의 마우스 중 한 마리만이 주입 후 죽었다. 이 결과는 본 발명에 따른 중합성 쉘 내에 함유되어 있는 오일은 시판되는 SBO 제제 (인트라리피드)에 비해 LD<sub>50</sub> 투여량에서 독성이 없음을 분명히 증명한다. 이런 효과는 중합성 쉘 내로부터 오일이 지연 방출 (즉, 조절된 속도로 생체내 이용됨)되기 때문일 수 있다. 이러한 지연 방출은 시판되는 에멀전에 의해 높은 오일 투여량에 도달되는 것과는 달리, 오일 치사량에 도달되는 것을 막을 수 있다.
- <312> <실시예 22>
- <313> 중합성 쉘로부터 방출되는 대두유의 생체내 생체이용률
- <314> 래트의 혈류로 중합성 쉘의 현탁액을 주입한 후 중합성 쉘을 싸고 있는 물질의 느린 방출 또는 지연 방출을 측정하기 위해 시험을 수행하였다. 대두유 (SBO)를 함유하고 있는 가교 단백질 (알부민)을 싸고 있는 중합성 쉘은 상기에서 설명된 음파 분쇄법에 의해 제조하였다. 오일을 함유하는 중합성 쉘의 결과의 현탁액을 염수 중에 희석하여 20%의 오일을 함유하는 최종 현탁액을 얻었다. 이 현탁액 5 ml를 래트의 캐놀라를 삽입한 외부 경정맥에 10분에 걸쳐 주사하였다. 주사 후 이 래트로부터 수혈에 걸쳐 채혈하고, 혈중 트리글리세리드의 양 (대두유는 트리글리세리드가 주성분임)을 통상의 분석법에 의해 측정하였다.
- <315> 시판되는 지방 에멀전 (인트라리피드, 20%의 대두유, 1.2%의 계란 노른자의 인지질, 및 2.25%의 글리세린을 함유하는 수성 비경구 영양제) 5 ml를 대조물로 사용하였다. 대조물은 유화제로 계란의 인지질을 이용하여 에멀전을 안정화시켰다. 두 경우에서의 트리글리세리드의 혈청량의 비교는 시간 함수로 오일의 생체이용률을 직접

비교할 것이다. 20%의 오일을 함유하는 중합성 셀의 현탁액 이외에, 최종 오일 농도 30%로 염수 중에 오일을 함유하는 중합성 셀의 샘플 5 ml 또한 주사하였다. 3 그룹에서 각각 2마리를 사용하였다. 각 경우 혈중 트리글리세리드의 양을 mg/dl 단위로 표 1에 정리하였다.

표 1

<316>

그룹	혈청 트리글리세리드 (mg/dl)					
	Pre	1시간	4시간	24시간	48시간	72시간
인트라리피드 대조물 (20% SBO)	11.4	941.9	382.9	15.0	8.8	23.8
중합성 셀 (20% SBO)	24.8	46.7	43.8	29.3	24.2	43.4
중합성 셀 (30% SBO)	33.4	56.1	134.5	83.2	34.3	33.9

<317>

주사 전에 혈중 양은 'Pre'라고 표시된 칼럼에 나타난다. 분명히, 인트라리피드 대조물에 대해서는 주사 이후 매우 많은 양의 트리글리세리드가 관찰되었다. 그 후, 트리글리세리드 양이 주사 이전 수준까지 떨어지는데 24시간이 걸리는 것으로 나타났다. 따라서, 오일은 주사 이후 대사에 바로 이용 가능하다는 것을 알 수 있다.

<318>

인트라리피드 (20%)와 총 오일량이 동일한 오일을 함유하는 중합성 셀의 현탁액은 혈청에서 검출가능한 트리글리세리드의 상당히 다른 생체이용률을 나타내었다. 그 양은 그의 정상 수치의 약 2배까지 상승하며 트리글리세리드가 오랜 시간 동안 이 수준이 유지되며, 이는 정상과 상당히 근접한 수준에서 혈류로 느리게 지연 방출된다는 것을 나타낸다. 30%의 오일을 갖는 오일 함유 중합성 셀을 섭취한 그룹은 매우 높은 트리글리세리드 양 (투여량이 많아질수록 많아짐)을 나타내며, 48시간 안에 정상 수치로 떨어졌다. 또한, 이 그룹에서는 혈중 트리글리세리드 양이 인트라리피드를 섭취한 대조군에 비해 상당히 크게 증가하지는 않는다. 이는 또한, 본 발명의 조성물로부터는 오일이 느리고 지속적으로 이용됨을 나타내며, 이는 중합성 셀 내에 함유되어 있는 물질의 혈중 양이 위험스럽게 높아지는 것을 피할 수 있으며 허용가능한 양을 오랜 시간에 걸쳐 이용할 수 있는 잇점을 갖는다. 분명히, 본 발명의 중합성 셀 내에 전달되는 약물은 이와 동일한 잇점을 가질 것이다.

<319>

대두유를 함유하는 중합성 셀은 아미노산, 필수 전해질, 비타민, 및 당의 수용액 중에 현탁되어 고영양 수액 (TPN)을 형성할 수 있다. 이러한 TPN은 전해질의 존재하에서는 에멀전의 불안정성으로 인해 현재 이용되는 지방 에멀전 (예, 인트라리피드)으로 제제화될 수 없다.

<320>

<실시예 2>

<321>

제약학상 활성제의 고형 코어를 함유하는 단백질로 싸인 중합성 셀의 제조

<322>

중합성 셀 내에 있는 탁솔과 같이 수용성이 불량한 약물을 전달하는 또다른 방법은 고형 약물 코어 주변에 중합성 물질의 셀을 제조하는 것이다. '단백질 도포 약물 입자가 하기와 같이 얻어질 수 있다. 실시예 16에서 설명되는 방법을 유기 용매를 사용하여 반복하여 비교적 고농도의 탁솔을 용해시킨다. 일반적으로 사용되는 용매는 벤젠, 톨루엔, 헥산, 에틸 에테르, 클로로포름, 알콜 등과 같은 유기 용매이다. 중합성 셀은 실시예 15에서 설명되는 것과 같이 제조된다. 용해된 탁솔을 함유하는 중합성 셀의 우유빛 현탁액 5 ml를 보통의 염수 중에 10 ml로 희석하였다. 이 현탁액을 회전식 증발기에 넣고, 진공에 의해 휘발성 유기물질을 제거하였다. 결과의 현탁액을 현미경으로 시험한 결과 불투명한 코어가 나타났으며, 이는 모든 유기 용매가 실질적으로 제거되었으며 고형 탁솔이 존재한다는 것을 시사한다. 현탁액을 동결하여 오랫동안 저장할 수 있으며, 직접 사용하거나 이후에 동결건조할 수 있다.

<323>

별법으로, 약물이 용해되어 있는 유기 용매를 함유하는 코어를 갖는 중합성 셀을 동결건조하여 사용시에 염수 (또는 다른 적합한 액체) 중에 재현탁될 수 있는 건조된 부서지기 쉬운 분말을 얻었다. 중합성 셀을 형성하는데 사용하기 위한 바람직한 단백질은 현재로서는 알부민이지만, α-2-마크로글로불린, 공지된 옵소닌과 같은 다른 단백질을 사용하여 대식세포와 같은 세포에 의해 중합성 셀의 흡수량을 증가시킬 수 있다. 별법으로, PEG와 같은 분자를 입자에 도입하여 생체내 순환 시간이 증가된 중합성 셀을 제조할 수 있다.

- <324> 삭제
- <325> <C. 자발적인 미소에멀전에 의한 나노입자의 형성
- <326> 음과 분쇄, 고전단 균질화, 또는 임의의 다른 고에너지 기술을 사용하지 않고 나노입자를 형성하는 것이 또한 가능하다. 따라서, 필요하다면 본질적으로 순수한 약물의 현탁액 (또는 건조 분말)을 형성하는 것이 가능하다.
- <327> 미소에멀전은 고전단 장치나 다른 실질적인 교반기를 사용하지 않고 모든 성분을 접촉시킬 때 자발적으로 형성되는 열동력학적으로 안정한 에멀전계이다. 미소에멀전은 실질적으로 불투명하지 않은데, 즉, 투명하거나 반투명하다. 미소에멀전은 통상적인 액적 크기가 1000 Å 미만인 분산층을 포함하므로, 광학 투명도를 갖는다. 미소에멀전에서의 액적은 통상적으로 구형이지만, 긴 원통형과 같은 다른 구조가 실현가능하다 (추가의 설명을 위해서는 예를 들어, 문헌 [Rosof, Progress in Surface and Membrane Science, 12:405, Academic Press (1975), Friberg, Dispersion Science and Technology, 6:317 (1985)] 참조).
- <328> 하기에서 나타낸 바와 같이 본 발명은 오일층을 제거한 후, 매우 작은 나노입자를 얻기 위한 제1 단계로 미소에멀전의 독특한 특성을 이용한다.
- <329> 초기에 설명한 바와 같이, 미소입자 및 나노입자는 여러 방법, 그 중 용매 증발법에 의해 형성할 수 있다. 이 방법은 원리상 계면활성제의 존재하에서 단순한 수중유 에멀전의 형성을 기초로하지만, 회전자-고정자 혼합기, 소니케이터, 고압 균질화기, 콜로이드 혼합기 등과 같은 여러가지 장치에 의해 고전단력을 사용할 수 있다. 중합체와 분산유 액적 중에 용해된 약물을 함유하는 에멀전을 형성한 후, 오일층을 통상적으로 감압 및 승온에서 증발에 의해 제거하면, 용해된 약물 및 중합체의 미소입자 또는 나노입자가 형성된다. 명백하게, 입자의 크기는 에멀전 액적 크기에 좌우되며, 액적이 작아질수록 생성되는 입자가 작아진다. 작은 에멀전 액적은 매우 높은 에너지를 사용함으로써만, 심지어는 이후에 미소플루이디저 (Microfluidizer)와 같은 가장 진보된 고압 균질화기를 사용함으로써 달성될 수 있고, 75 nm 미만의 에멀전 액적을 달성하는 것은 실행 가능하지 않다. 에멀전이 원래 불안정한 계이고 응집 및 액적 융합과 같은 과정을 겪기 때문에, 이러한 에멀전에 대한 용매 증발 과정 결과 보다 큰 입자가 형성된다.
- <330> 통상적인 에멀전에서 용매 증발법을 사용하는 것과 관련된 문제점을 극복하는 새로운 방법은 하기의 단계로 이루어진다:
- <331> a. 물에서의 낮은 용해도를 갖고, 물보다 높은 수증기압을 갖는 용매 중에서 수불용성 약물을 용해시킨다. 결합체가 원칙상 존재할 수는 있지만 이 약물은 추가의 중합성 결합체 없이 용해된다.
- <332> b. 용매를 적당한 계면활성제 및 수용성 공계면활성제와 혼합시킨다.
- <333> c. 적당한 양의 물 또는 수용액을 그 혼합물에 첨가하여 어떠한 고전단 장치도 사용하지 않고 수중유 에멀전이 자발적으로 형성된다. 수용액은 제1 제조 단계 중에 미소에멀전 형성에 영향을 줄 수 있는 전해질, 아미노산, 또는 임의의 다른 첨가제를 함유할 수 있다.
- <334> d. 임의로 단백질 용액을 미소에멀전에 첨가한다.
- <335> e. 감압하에서 증발에 의해 용매를 제거하여 약물을 1000 Å 미만의 통상적인 크기를 갖는 매우 작은 비결정질 나노입자 형태로 침전시킨다. 이 단계에서 입자를 계면활성제, 공계면활성제, 및 임의로 단백질, 당 등과 같은 보호제를 함유하는 수성 매질 중에 분산 및 안정화시킨다. 허용되는 증발법으로는 회전식 증발기, 폴링 필름 증발기, 분무 건조기, 동결 건조기, 및 공업상 통상적으로 사용되는 표준 증발 장치를 사용하는 방법이 포함된다.
- <336> f. 임의로 투석, 한외여과, 흡착 등에 의해 계면활성제 및 공계면활성제를 제거하여 단백질에 의해 안정화되는 나노입자를 얻을 수 있다.
- <337> g. 용매 증발에 이어, 나노입자의 액상 분산액을 건조하여 약물 및 임의로 단백질을 함유하는 분말을 얻을 수 있고, 이를 염수, 완충액, 물 등과 같은 적합한 수성 매질에 재분산시켜 1000 Å 미만의 입도를 갖는 생활형으로 투여할 수 있는 현탁액을 얻을 수 있다. 이런 분말을 얻기 위해 허용되는 방법은 동결 건조법, 분무 건조법 등이다. 동결 건조에 의해 고형으로의 전환을 수행한다면, 동결건조, 각종 냉동보호제, 예를 들면 만니톨, 락토오스, 알부민, 카르복시메틸 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 말토덱스트린 및(또는) 폴리에틸렌 글리콜을 첨

가할 수 있다.

- <338> 이런 나노입자를 추가의 부형제 또는 매트릭스-형성 물질과 추가 혼합하여 높은 생체이용율, 조절된 방출 특성 및 위증에서의 보호능을 갖는 약물 전달계를 얻을 수 있다. 최종 생성물은 정제, 캡슐제, 재구성 액체 등으로 포유류에게 투여할 수 있다.
- <339> 본 발명의 제제는 나노입자 및 미소입자를 제조하고 미소에멸전 또는 "프리-미소에멸전 농축물"을 사용하기 위해 종전에 사용되는 방법에 비해 상당한 잇점을 갖는다.
- <340> 본 발명의 방법을 사용하여 실행되는 여러가지 잇점이 존재한다. 적당한 성분을 선택한다면, 고비용 장치 및 에너지 투자할 필요 없이 미소에멸전이 자발적으로 형성된다. 액적 크기는 고전단 장치에 의해 얻어진 최소 에멸전 액적보다 거의 크기 자리수 정도 작고, 따라서 매우 작은 나노입자가 얻어질 수 있다. 미소에멸전은 열동력학적으로 안정하므로, 에멸전 불안정성과 관련된 일반적인 문제점 (예를 들어, 생성된 입자 크기의 시간 의존성)을 피할 것이다. 전체의 공정이 통상의 에멸전 용매 증발법에 비해 훨씬 더 간단하며, 여러 파라미터에 덜 민감하다. 이 공정에서는 단순한 혼합만이 포함되므로, 큰 제조 부피에 대한 규모 확대는 고전단 균질화와 같은 장치로 유화시키는 것에 비해 매우 간단하다. 신규한 방법에 의해 얻어진 입도가 살균 여과에 사용되는 막의 세공 크기 미만의 크기 자리수로 매우 작기 때문에 증가된 여과압 및 여과 과정 중의 많은 약물 손실과 같은 막 막힘과 관련된 문제점 없이 매우 효과적이다. 유화 공정에서 고전단력을 사용하지 않기 때문에, 유화 공정 중에 온도가 전혀 증가하지 않으며, 따라서 심지어 본 발명의 신규한 방법에 의해 온도 민감성 약물을 가공할 수도 있다. 본 발명의 액상 제제 중의 약물은 분산된 나노액적을 함유하는 통상의 미소에멸전에 비해 분산된 나노입자를 함유하므로, 즉 액체 상태 (미소액적) 대 고체 상태 (나노입자)에서 보다 많은 화학 반응이 일어나므로 화학적 안정성이 증가되었다. 본 발명은 연속 미소에멸전 층으로서 액상인 통상의 미소에멸전에 비해 건조 제제로서 화학적 안정성을 증가시켰다. 고형 제제는 액체 형태로 존재하는 통상의 미소에멸전 또는 "프리-미소에멸전 농축물"에 비해 정제, 과립제 및 캡슐제와 같은 각종 고상 투여 형태 중에 약물을 포함시킬 수 있다. 매우 작은 평균 입도와 함께 매우 좁은 입도 분포로 인해 통상의 방법으로 제조된 미소입자 및 나노입자보다 더 균일한 방법으로 약물의 흡착성을 증가시키며, 따라서 생체이용률이 증가될 것으로 예상된다.
- <341> 하기에 제시되는 실시예가 수불용성 분자를 언급하지만, 나노입자 제조에 유용하다고 고려되는 약물은 이제 제한되는 것 없이 수용성이거나 수불용성인 약물, 진단제, 치료제, 영양제 등이 있다. 약물 카테고리 및 화합물의 비제한적 열거가 본 발명의 고전단 균질화 측면에서 사용하기 위한 상기 열거된 모든 화합물에 제한되지 않는다.
- <342> 하기의 실시예에 언급된 용매로는 톨루엔 및 부틸 아세테이트가 있지만, 필요한 약물을 용해시킬 수 있는 임의의 용매 또는 용매 혼합물이 본 발명의 공정에서 사용하기 적당할 것이고, 단, 적당한 미소에멸전은 용매를 제거하기 전에 형성할 수 있다. 이러한 용매로는 클로로포름, 염화 메틸렌, 에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 이소부틸아세테이트, 프로필 아세테이트, tert-부틸메틸 에테르, 부탄올, 프로필렌 글리콜, 헵탄, 아니솔, 큐멘, 에틸 포르메이트 에탄올, 프로판올, 테트라히드로푸란, 디옥산, 아세토니트릴, 아세톤, 디메틸 술폰, 디메틸 포름아미드, 메틸 피롤리디논, 대두유, 코코넛유, 피마자유, 올리브유, 잇꽃유, 면실유, C1-C20알콜, C2-C20 에스테르, C3-C20케톤, 폴리에틸렌 글리콜, 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소, 할로겐화 탄화수소, d-리모넨, 그의 조합 등이 있다.
- <343> 이 방법에서 사용되는 단백질 (또는 몇몇 단백질의 혼합물)은 초기 혼합 중에 또는 증발 단계 중에 침전되서는 안된다. 알부민 (예, BSA, HSA, 계란), 젤라틴, 콜라겐, IgG, 각종 효소, 락토글로불린, 카제인, 콩 단백질 등을 비롯한 여러 단백질이 있다.
- <344> 본 발명에 이용되는 계면활성제는 적당한 공계면활성제 및 용매의 존재하에 약물 또는 (존재한다면) 단백질의 침전을 일으키지 않고 수중유 미소에멸전을 자발적으로 형성할 수 있어야 한다. 계면활성제는 비이온성 (트윈, 스팬, 트리톤, 플루로닉, 폴리글리세롤 에스테르 등), 음이온성 (SDS, 콜레이트 및 데옥시콜레이트, 지방산 비누 등), 양이온성 (세틸트리메틸 염화암모늄 등) 또는 양쪽이온성 (레시틴, 아미노산 등)일 수 있다.
- <345> 공계면활성제는 용해된 약물 분자 (또는 존재하는 경우 단백질)의 침전을 유발하지 않고 큰 결정질 물질의 형성을 유도하지 않으며 선택된 계면활성제로 미소에멸전을 자발적으로 형성시키는 성능을 가져야 한다. 공계면활성제는 부탄올, 프로필렌 글리콜, 벤질 알콜, 프로판올 등과 같이 수용성 또는 유용성일 수 있다.
- <346> 동결건조에 의한 나노입자의 액상 분산액의 전환은 만니톨, 락토오스, 아미노산, 단백질, 다당류 등과 같은 냉동보호제의 첨가를 필요로 할 수 있다.

- <347> 본 발명에 기재된 원리는 하기 방법의 여러 변형으로 적용될 수 있음이 명백하다.
- <348> 1. 약물 입자의 형성은 용매가 혼합될 수 있는 적절한 용매 중에 미소에멀전의 희석에 의해 유도될 수 있다. 예를 들면, 용매의 수용도가 낮은 경우 미소에멀전을 용매가 이의 수용도 미만이 되는 정도로 희석할 수 있다.
- <349> 2. 용매 및 임의로는 계면활성제 및 공계면활성제는 약물을 용해시키지 않는 선택적 추출제를 사용하여 제거될 수 있다.
- <350> 3. 계면활성제 및 공계면활성제는 단백질 분자량의 크기 미만의 컷-오프를 갖는 여과기를 사용하며 한외여과에 의해 제거될 수 있다. 또한 단순 투석이 선택될 수 있다.
- <351> 4. 제제는 최종 제제의 의도된 용도 (경구, 정맥내, 국소 등)에 허용되는 성분만을 함유할 수 있으므로 이의 제거는 필요하지 않다.
- <352> 5. 유사하게는 글리세롤, 벤질 알콜 등과 같이 최종 생성물에 남을 수 있는 공계면활성제가 사용될 수 있다.
- <353> 6. 미소에멀전 (전해질, 에탄올 등)의 상태도에 영향을 줄 수 있는 다양한 수용성 분자의 첨가가 가능하므로 다양한 성분들 사이의 비를 조절하여 최적 약물 하중을 얻는다.
- <354> 7. 상태도 (및 미소에멀전의 형성을 유발하는 성분비)에 영향을 주기 위하여 자발적 유화 단계가 실온 이외의 온도에서 수행될 수 있다. 특히 물중 오일로부터 오일 중 물 미소에멀전으로 계를 변화시키는데 온도 효과 (에톡실화 계면활성제 중)를 사용할 수 있다.
- <355> 8. 약물의 생체이용률에 영향을 주기 위하여 용매 상에 기타 성분들을 첨가할 수 있다. 특히, 경구 흡수를 개선하고 약물이 화학적 및 효소적 분해되는 것으로부터 방지하기 위하여 대두유와 같은 오일을 첨가하는 것이 바람직하다.
- <356> 9. 유사하게는 약물과 함께 용매에 매트릭스 형성 중합체 (예, PVP)의 첨가가 수행될 수 있다.
- <357> 10. 안정화 및 고상 형성 특성은 단백질 이외의 수용성 중합체 (카르복시메틸 셀룰로스, 고무 등)을 미소에멀전의 외부 수성상에 첨가함으로써 변할 수 있다.
- <358> 11. 얻어진 고상 형태 분말의 유동성은 여과기로서 콜로이드성 입자 (예, 실리카)의 첨가, 또는 재구성/항응집 보조제의 첨가에 의해 변할 수 있다.
- <359> 12. 본 발명에 기재된 동일한 원리가 수용성 입자를 형성하는데 적용될 수 있으며, 오일 중 물 미소에멀전이 형성되는 조성 범위에서 유화 단계를 수행한다. 예를 들면 상기 방법은 극소의 단백질 나노입자를 형성하는데 사용될 수 있다.
- <360> <실시예 24>
- <361> 시클로스포린 A의 나노입자의 제조
- <362> 시클로스포린 A 115 mg을 부틸 아세테이트 1 ml 중에 용해시키고 트리톤 (Triton) X-100:n-부탄올 4:1 용액 2그램과 혼합하였다. 투명계를 얻었다. 물 10 g을 약간 진탕시키며 적가하였다. 투명한 물 중 오일 미소에멀전을 얻었다. 1% 카제인 용액 10 g을 약간 진탕시키며 첨가하였다. 계는 다소 혼탁해졌다. 부틸 아세테이트를 로토랩 (Rotovap)에서 40 °C에서 80 mmHg하에 제거하였다. 계는 완전히 투명해졌다.
- <363> 입도를 광자 상관 분광계에 의해 측정하였다. Z 평균이 25 내지 33 nm이며, 수 또는 부피 분포 기준의 크기는 9 nm임을 알게 되었다. 광학 현미경 또는 편광하에 관찰되는 입자는 존재하지 않았다. 상기 결과는 결정질 입자가 존재하지 않음을 나타낸다.
- <364> 상기 나노입자의 액상 분산액을 락토오스 (2%w/w)를 첨가한 후 동결건조시켰다.
- <365> 백색 고상 물질을 얻었으며, 물 중에서 재구성시에 동결건조하기 전에 것과 유사한 투명계를 얻었다. 상기 재구성된 시료의 입도는 본래 제제의 것과 매우 유사하며, Z-평균은 약 40 nm이고 부피 및 수 분포 기준의 직경은 10 내지 12 nm이었다.
- <366> <실시예 25>
- <367> 시클로스포린 A의 나노입자의 제조

- <368> 시클로스포린 A 119 mg을 부틸 아세테이트 중에 용해시키고 트리톤 X-100:프로필렌 글리콜 4:1 용액 2그램과 혼합하였다. 투명계를 얻었다. 물 7 g을 약간 진탕시키며 적가하였다. 투명한 물 중 오일 미소에멀전을 얻었다. 1% 카제인 용액 7 g을 약간 진탕시키며 첨가하였다. 계는 다소 혼탁해졌다. 시료를 물로 1:1 희석한 후 용매를 증발시켰다. 부틸 아세테이트를 40 °C에서 80 mmHg하에 로토랩에서 제거하였다. 계는 완전히 투명해졌다. 또한 상기 방법에 의해 극소의 나노입자를 얻었고, Z-평균은 45 nm이고 부피 및 수 분포 기준의 직경은 11 nm이었다.
- <369> 상기 나노입자의 액상 분산액을 락토오스 (2% w/w)를 첨가한 후 동결건조시켰다.
- <370> 백색 고상 물질을 얻었으며, 물 중에서 재구성시에 동결건조 전에 것과 유사한 투명계를 얻었다. 상기 재구성된 시료의 입도는 본래 제제의 것과 매우 유사하며, Z-평균은 약 25 nm이고 부피 및 수 분포 기준의 직경은 9 내지 11 nm이었다.
- <371> <실시예 26>
- <372> 시클로스포린 나노입자
- <373> 미소에멀전을 조성, 시클로스포린 50 mg, 부틸 아세테이트 0.5 g, 트윈 80:프로필렌 글리콜 (1:1) 3.04 g 및 물 6.8 g으로 제조하였다. 미소에멀전을 증발하여 5 mg/ml 시클로스포린을 함유하는 투명 액체를 얻었다. 비교 실험에서 부틸 아세테이트를 제외하고 상기 성분들을 단순 혼합하여 수행하였는데 17시간이 지난 후에도 시클로스포린은 용해되지 않았다.
- <374> 폴리소르베이트 (트윈), 소르비탄 에스테르 (스판), 수크로스 에스테르, 레시틴, 모노디글리세리드, 폴리에틸렌-폴리프로필렌 블록 공중합체 (플루로믹스), 비누 (스테아르산나트륨 등), 글리콜산나트륨 담즙염, 에톡실화 피마자유, 나트륨 스테아로일-락틸레이트, 에톡실화 지방산 (myrj), 에톡실화 지방 알콜 (Brij), 나트륨 도데실 술페이트 (SDS) 등을 포함하는 계면활성제에 대한 여러 가능성이 존재한다. 또한, 일반적으로 전분, 젤라틴, 셀룰로스 유도체 등과 같은 생체중합체가 사용될 수 있다. 또한 경구 투여용으로 [McCutcheon Handbook of Surfactants] 또는 [CTFA Index]에 존재하는 계면활성제 뿐만 아니라 모든 허용되는 식품 등급 계면활성제가 사용될 수 있다. 미소에멀전에 가능한 공용매 또는 공계면활성제로는 프로필렌 글리콜, 에탄올, 글리세롤, 부탄올, 올레산 등이 있다.
- <375> <실시예 27>
- <376> BHT의 나노입자의 제조
- <377> 부틸화 히드록시 톨루엔 (BHT) 110 mg을 톨루엔 1 ml 중에 용해시키고 트리톤 X-100:n-부탄올 4:1 용액 2 ml와 혼합하였다. 1% 카제인 용액 32 g을 첨가하고 미소에멀전은 자발적으로 형성되었다. 미소에멀전을 감압 80 mmHg하에 40 °C에서 투명해질 때까지 증발시켰다. 얻어진 입도는 Z-평균이 30 nm이고, 부피 및 수 분포 기준의 직경은 각각 16 및 15 nm이었다.
- <378> <실시예 28>
- <379> BHT 나노입자의 제조
- <380> 실시예 27에 기재된 바와 유사한 방법을 카제인 용액 대신에 물을 사용하며 수행하였다. 40 °C에서 80 mmHg하에 증발한 후 계는 투명해졌고 Z-평균 크기는 약 10 nm이었다.
- <381> <실시예 29>
- <382> 파클리탁셀 나노입자의 제조
- <383> 파클리탁셀 30 mg을 부틸 아세테이트 2 ml 중에 용해시키고 4:1 트리톤 x-100:프로필렌 글리콜 4 g에 첨가하였다. 물 40 ml를 첨가하고 계는 약간 혼탁해졌다. 증발시킨 후 계는 완전히 투명해졌다. Z-평균 크기는 6 nm 이었고, 부피 및 수 분포 기준의 크기는 7-9 nm이었다. 동일 크기를 1일 후에 4 °C에서 얻었다.
- <D. 나노입자 제제의 모든 방법에 대한 다양한 실시예>
- <384> <실시예 30>
- <385> 미소에멀전 상태도의 확인
- <386> 조성물은 미소에멀전을 제공하고 용매 증발법에 의해 나노입자를 얻는데 사용될 수 있는 것으로 확인되었다.

상기 조성물은 소수성 분자, 연속 매질로서의 수용액, 계면활성제 및 가능하게는 공계면활성제를 용해시킬 수 있는 수산화성 용매를 함유하여야 한다.

- <387> 물 중 부틸 아세테이트의 미소에멸전은 상태도에 의해 기재되는 다양한 조성으로 형성될 수 있다 (부틸 아세테이트는 최종 생성물 중 허용되는 잔류 고농도를 갖는 용매로서 분류됨). 또한, 계면활성제 및 공계면활성제는 식품 및 제약 적용: 트윈 80 (에톡실화 소르비탄 모노올레에이트) 및 프로필렌 글리콜에 사용된다. 예비 실험을 모델 소수성 분자로서 BHT를 사용함으로써 수행하여 크기가 20 내지 50 nm인 입자의 분산액을 얻었다. 0.2 μm 여과기에 의해 여과한 후 약 100%의 BHT가 막을 통과하였다.
- <388> 계면활성제/공계면활성제의 다양한 조성의 상태도를 계면활성제/공계면활성제의 혼합물 (다양한 비율로 용매와 혼합하기 전에 제조함)과 용매를 볼텍싱한 후 물을 적가함으로써 얻었다. "수선(water line)"을 따라 다양한 조성의 혼탁도가 관찰되었고 반투명계를 제공하는 조성을 광산란에 의해 추가로 분석하였다. 용매/계면활성제/공계면활성제의 다양한 비를 사용함으로써 미소에멸전을 제공하는 상태도의 영역을 확인하였다 (소수의 선택된 성분만이 미소에멸전을 제공함). 동일 방법을 BHT를 부틸 아세테이트 중에 용해시킨 후 상태도 실험을 수행하는 계에 대해 사용하였다.
- <389> BHT를 함유하는 미소에멸전 및 나노입자의 "여과성"은 0.2 μm 여과 전후에 UV 흡수 스펙트럼을 비교함으로써 평가하였다. 나노입자를 부틸 아세테이트의 진공 증발 (60 mmHg, 40 °C)에 의해 얻었다. 전체 방법에 걸쳐 고전단 장치가 사용되지 않는 것이 강조되어야 한다.
- <390> 미소에멸전계는 구강 전달에 사용될 수 있는 것으로 확인되었다. n-부틸 아세테이트를 용매로서 선택하였다. 하기 계면활성제 및 공계면활성제를 다양한 비에서 평가하였다.
- <391> 트윈 80:글리세롤 5:1
- <392> 트윈 80:글리세롤 4:1
- <393> 트윈 80:글리세롤 3:1
- <394> 트윈 80:글리세롤 2:1
- <395> 트윈 80:글리세롤 1:1
- <396> 스팩 80:글리세롤 4:1
- <397> 스팩 80:글리세롤 3:1
- <398> 트윈 80:프로필렌 글리콜 4:1
- <399> 트윈 80:프로필렌 글리콜 3:1
- <400> 트윈 80:프로필렌 글리콜 2.5:1
- <401> 트윈 80:프로필렌 글리콜 1.5:1
- <402> 트윈 80:프로필렌 글리콜 1:1
- <403> 트윈 80:프로필렌 글리콜 1:2
- <404> ((트윈 80 + 스팩 80) 7:1):프로필렌 글리콜 3.5:1
- <405> ((트윈 80 + 스팩 80) 7:1):프로필렌 글리콜 1:1
- <406> ((트윈 80 + 스팩 80) 8:1):프로필렌 글리콜 4:1
- <407> ((트윈 80 + 스팩 80) 5:1):프로필렌 글리콜 1:1
- <408> 트윈 80:((프로필렌 글리콜 + 글리세롤) 1:1.2) 2:1
- <409> 적합한 조성은 계면활성제로서 트윈 80 및 공계면활성제로서 프로필렌 글리콜 1:1이다. 전체 상태도를 n-부틸 아세테이트계, 트윈 80:프로필렌 글리콜 1:1, 물에 대해 평가하였다. 2개의 또다른 용매, s-부틸 아세테이트 및 t-부틸 아세테이트를 시험하였다. 상기 계에 대한 상태도는 n-부틸 아세테이트의 것과 동일하였다. n-부틸 아세테이트계, 트윈 80:프로필렌 글리콜 1:1, 물을 추가로 평가하였다.
- <410> 시료 7% 부틸 아세테이트, 30% 계면활성제/PG, 63% 물에 대한 입도의 측정을 수행하였다. Z 평균은 약 20 nm이

었다. 나노입자 형성 방법을 수불용성 염료인 수단 III에 대해 부틸 아세테이트 1 g 중 약 10 mg 농도 (5% 부틸 아세테이트, 23% 계면활성제/PG, 72% 물)에서 수행하였다. 입도는 약 17 nm이었다. 또한 나노입자 형성 방법을 1 g 부틸 아세테이트 중 100 mg 농도에서 BHT에 대해 수행하였다. 상기 계에 대한 상태를 결정하였다. 조성에 따라 좌우되며 입도는 약 20 내지 50 nm이었다.

<411> 수단 III 및 BHT에 의한 비교 실험을 수행하였다. 물 14.4 g을 수단 III 10 mg에 첨가하고 계면활성제/PG 4.6 g을 혼합물에 첨가하였다. 시료를 자기 교반기에서 24시간 동안 교반시켰다. 수단 III의 분해를 관찰하였다. 그러나, 동일 실험을 BHT (물 9 g 및 계면활성제/PG 4.3 g 중 BHT 100 mg)로 수행하는 경우 BHT의 분해는 관찰되지 않았다. 상기 단계에서 증발을 수행하였다 (온도 40 °C, 압력 약 60 mmHg). 시료에 대한 입도 측정을 증발 전후에 수행하였다. 증발 전 및 후의 시료에 대한 Z-평균 약 20-50 nm, 및 30 nm를 각각 얻었다.

<412> 증발 후의 시료를 0.2 μm 여과기를 통해 여과시키고 여과 전후의 BHT 농도를 UV 흡광에 의해 측정하였다. 2개의 시료 사이에 차이점이 존재하지 않았다. 상기 결과는 명백하게 극소의 BHT 나노입자를 제시한다.

<413> 2개의 시료를 제조하였다 (상기 시료에 대한 조성: 시료 번호 1: 4% 부틸 아세테이트; 14% 계면활성제/PG; 80% 물; 시료 번호 2: BHT 123 mg/부틸 아세테이트 g; 5% 부틸 아세테이트; 18% 계면활성제/PG; 77% 물).

<414> <실시예 3I>

<415> 방법 장치 선택에서의 대응품

<416> 현재의 배치를 제조하는데 사용된 방법 장치는 임상 제조를 위해 정를 증가하는 것이다. 캡슐 (등록상표) 제조를 위한 보다 큰 규모의 장치의 선택에 있어서 여러개의 대응품이 존재한다. 몇몇의 대응품은 하기와 같다.

장치 카테고리	장치 선택
예비혼합기	블레이드 혼합기, 로토스테이터 혼합기
고압 장치	고압 균질화기 (Avestin, Microfluidics, Stansted), 음파파쇄기 (가열계)
용매 제거 장치	회전 증발기, 연속 유동 증발기, 와이핑된 막 증발기, 플래쉬 증발기, 재순환 농축기, 한외여과기
탈수 장치	동결건조기, 분무 건조기

<418> <실시예 3J>

<419> 다양한 물질로부터의 제제화된 정맥내 전달계

<420> 정맥내 전달계의 제조를 위해 사용된 물질은 중합체 (예, 폴리에틸렌, 폴리비닐, 폴리프로필렌 관류 등) 또는 유리일 수 있다. 표준 의학 등급 관류는 이의 내면 상에 소수성 잔기를 함유하는 것으로 공지되어 있다. 상기 잔기는 따라서 주입 용액과 접촉하게 된다. 사실상 이러한 관류는 카테터와 같이 소수성 잔기를 처리 용액과 접촉하게 하여 관류에 수성 물질의 흡착을 감소시키도록 특징적으로 고안된다. 그러나, 처리 용액 중 임의의 소수성 잔기는 카테터 관류 및 전달계의 기타 성분에 결합하려고 할 것이다. 이에 따라 소수성 약물학적 활성제의 상당한 부분은 관류 카테터 및 전달관의 내부벽에 격리된다. 따라서, 소수성 약물학적 활성제의 투여량은 활성제의 상당한 부분이 관류 벽에 흡수될 수 있기 때문에 변할 수 있다. 중태 치료에 있어서 소수성 약물학적 활성제가 질병을 치료하는데 사용되는 경우 활성제의 유효 투여량에 상당한 감소는 치료의 실패를 유발할 수 있다. 실패는 특히 활성제가 일정 수준 초과로 존재하는 것을 필요로 하지만 치료량은 좁은 것인, 치료 잔기를 사용하는 경우 발생한다.

<421> 소수성 약물학적 활성제의 정맥내 도입의 신규 방법이 개발되었다. 활성제의 소수성 잔기를 보호함으로써 생체 적합성 코팅물의 소수성 잔기 (예, 알부민)와 연합을 통해 관류에 부착하려는 활성제의 경향은 급격하게 감소된다. 따라서, 본 발명은 매우 소수성인 약물을 표준 의학 등급 중합체 및 소수성 유리와 함께 사용하는 것을 가능하게 하며, 약물은 보호되므로 표면에 흡수되지 않는다. 본 발명의 방법은 소수성 약물 주위에 생체상화성 중합체 (예, 알부민)의 보호 코팅물을 위치시키고 얻어진 조성물을 소수성 중합체 전달계에 위치시키는 것을 포함한다. 본 발명의 방법은 따라서 다양한 소수성 치료의 전달을 개선할 수 있다.

<422> <실시예 3K>

<423> <과클리탁셀의 HPLC 분석>

- <424> 크로마토그래피계
- <425> HPLC: 시마쯔 (Shimadzu) LC-10AS 용매 전달계
- <426> 시마쯔 SIL-10A 자동 주입기
- <427> 시마쯔 SCL-10A 계조절기
- <428> 시마쯔 SPD-M10AV 다이오드어레이 검출기
- <429> 시마쯔 CTO-10A 칼럼 오븐
- <430> 칼럼: 쿠로실 (Curosil)-PPP, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm x 25 cm, 페노메섹스 (Phenomenex) 또는 C-18
- <431> 이동상: 물/아세트니트릴 65:45
- <432> 유동 속도: 등용매, 1.0 ml/분
- <433> 검출: 228 nm
- <434> <파클리탁셀 벌크 약물 물질 (BDS)의 확인>
- <435> 파클리탁셀 BDS 및 파클리탁셀 표준물 (99.9%, Hauser Chemical Research, Inc., Lot 1782-105-5)을 아세트니트릴 중 정량적으로 용해시키고 HPLC로 개별적으로 주입시켰다. 1.00 mg/ml 파클리탁셀 BDS 10  $\mu\text{l}$  및 2.07 mg/ml 표준 파클리탁셀 10  $\mu\text{l}$ 를 주입하였다. 파클리탁셀 BDS의 주요 피크의 체류 시간은 파클리탁셀 표준물 (Hauser 제품)의 체류 시간과 일치하였다.
- <436> <파클리탁셀 BDS의 효능>
- <437> 파클리탁셀 BDS 및 표준 파클리탁셀을 상기 기재한 바와 같이 HPLC에 주입하였다. 파클리탁셀의 효능을 표준 파클리탁셀에 걸친 파클리탁셀 BDS의 피크 면적비 및 표준 파클리탁셀의 공지된 효능을 기준으로 하여 유도하였다.
- <438> <파클리탁셀 BDS의 불순도 프로파일>
- <439> 상기 기재된 바와 같은 크로마토그래피계는 탁산의 고분해능을 제공할 수 있었다. 상기 HPLC계의 선형 반응 범위에 해당하는 아세트니트릴 중 1.0 mg/ml 파클리탁셀 BDS 10-20  $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 주입하였다. 불순도 프로파일을 상대 피크 면적에 의해 측정하였다.
- <440> <캡슐 (등록상표) 중 파클리탁셀의 효능 분석>
- <441> 표준 용액 (60, 100, 120, 140 및 160  $\mu\text{g/ml}$ )을 3% HSA 중 파클리탁셀 BDS 를 정량적으로 용해시킴으로써 제조하였다. 캡슐 (등록상표) 시료를 파클리탁셀 농도 약 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 염수 중에서 희석하였다. 표준 용액 및 캡슐 (등록상표) 시료를 내부 표준물로서 세팔로만닌으로 고정된 후 고체상 추출 및 액체상 추출하였다 (하기 참고). 개별적으로 표준 제제 및 캡슐 (등록상표) 시료 제제의 동일 부피 20-30  $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 주입하여 파클리탁셀 및 내부 표준 세팔로만닌 사이의 피크 반응비를 측정하였다. 표준 주사액으로부터의 결과에 대하여 보통 최소 자승 회귀법에 의해 캘리브레이션 곡선을 얻었다. 캡슐 (등록상표) 중 파클리탁셀의 효능을 시료 주사액과 표준 주사액의 피크 반응비를 비교함으로써 결정하였다.
- <442> <캡슐 (등록상표) 중 파클리탁셀의 불순도 프로파일>
- <443> 캡슐 (등록상표)을 고체상 추출 또는 액체상 추출 (하기 참고)에 처리한 후 HPLC에 주입하였다. 캡슐 (등록상표)로부터 추출된 약 1 mg/ml 파클리탁셀 30  $\mu\text{l}$ 를 주입하여 상기와 같이 불순도 프로파일을 조사하였다.
- <444> <고체상 추출>
- <445> 캡슐 (등록상표) 시료를 염수 중 약 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 재구성하였다. 고체상 추출 칼럼, 본드-엘루트 (Bond-Elut) (C-18)를 물로 콘디셔닝하였다. 칼럼을 시료로 부하시키고 진공을 사용하여 칼럼을 통해 통과시켰다. 이어서 칼럼을 물로 세척한 후 파클리탁셀을 아세트니트릴로 용출하였다. 아세트니트릴 중 추출된 파클리탁셀 함유 용

출물을 HPLC에 주입하였다.

- <446> <액체상 추출>
- <447> 캡슐 (등록상표) 시료를 염수 중 약 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 재구성하였다. 상기 시료 약 200  $\mu\text{l}$ 에 아세토니트릴 800  $\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 혼합물을 30초 동안 볼텍싱시킨 후 5분 동안 3000 g에서 원심분리시켰다. 상등액을 제거하고 수거하였다. 펠릿을 염수 200  $\mu\text{l}$  중에 재현탁시키고 추출 단계를 반복하였다. 제2의 상등액을 제1의 상등액과 혼합하였다. 혼합 추출물을 증발에 의해 농축한 후 HPLC에 주입하였다.
- <448> <실시예 34>
- <449> 광자 상관 분광계 (PCS)에 의한 입도 분포
- <450> 재구성된 캡슐 (등록상표)의 입도 분포를 말번 제타사이저 (Malvern Zetasizer, Malvern Instruments Ltd.) 상에 광자 상관 분광계 (PCS)에 의해 분석하였다. 제타사이저를 NIST 기록 나노스피어 사이즈 스탠다드 (Nanosphere (등록상표) Size Standards) (Duke Scientific Corporation)에 의해 캘리브레이션하였다. 말번 제타사이저 상에서의 캡슐 (등록상표) 입도 측정용 방법은 하기 인자의 조절을 포함한다.
- <451> 온도: 20.70  $^{\circ}\text{C}$ ,
- <452> 산란각: 90.
- <453> 굴절율 분산: 1.33
- <454> 파장: 633 nm
- <455> 점도 (오토): 0.99
- <456> 실제 굴절율: 1.59
- <457> 가상 굴절율: 0
- <458> 제타사이저를 제조한 후 kcts/초 기록기로부터 양호한 크기 측정값에 필요한 시료의 희석액을 결정하였다 (시료 200  $\mu\text{l}$ 를 큐벳에 분취한 후 0.22  $\mu\text{m}$  여과기 여과된 증류수 약 2 ml로 희석함). 큐벳을 제타사이저에 있는 큐벳 홀더에 위치시키고 측정을 시작하였다. 측정이 시작된 후 상관기 조절 디스플레이가 나타났다. 메뉴로부터 디스플레이 속도계를 선택하였다. 속도는 중간 범위 100-250 kcts/초이어야 한다. 속도가 너무 크거나 또는 너무 작은 경우 또다른 시료를 진하거나 또는 묽은 희석액으로 제조하였다. 재구성된 캡슐 (등록상표)의 크기를 다중모드 분석에 의해 3회 자동 수행한 후 분석하고 평균내고 기록하였다. 평균 입도는 캡슐 (등록상표)의 25 배치에 대해 155 nm  $\pm$  23 nm이었다.
- <459> <실시예 35>
- <460> 폴리뉴클레오티드 구조물, 효소 및 백신용 담체로서의 중합체 셀
- <461> 유전자 치료가 이용가능한 치료 선택으로서 보다 광범위하게 허용됨에 따라 (현재에는 40개 초과인 인간 유전자 전달 제안이 NIH 및(또는) FDA 리뷰 보드에 의해 승인됨) 상기 치료 방법을 이행하는데 있어서 극복하여야 할 하나의 장벽은 유전자 물질을 인간 세포의 계놈에 혼입하는데 비루스 벡터를 사용하는 것에 대한 내성이다. 비루스는 본질적으로 독성이다. 따라서 유전자 치료, 특히 비치명적이고 비유전자적인 질병에 비루스 벡터의 사용에 내재하는 위험성은 허용되지 않는다. 불리하게도 비루스 벡터를 사용하지 않고 전달된 플라스미드는 일반적으로 표적 세포의 계놈에 혼입되지 않는다. 또한 통상의 약물의 경우와 같이 상기 플라스미드는 인체에 한정된 반감기를 가진다. 따라서, 유전자 치료 (및 유전자 치료의 역 형태이고 핵산 또는 올리고뉴클레오티드가 유전자 발현을 억제하는데 도입되는 안티센스 치료)의 이행에 있어서 일반적인 제한은 크기가 커서 세포막을 투과할 수 있는 핵산 또는 올리고뉴클레오티드를 효율적으로 전달할 수 없는 것이다.
- <462> 상기 기재한 바와 같이 DNA, RNA, 플라스미드, 올리고뉴클레오티드, 효소 등을 단백질 미소캡슐 셀에 캡슐화하는 것은 간, 폐, 비장, 림프 및 골수에 이의 표적화된 전달을 용이하게 할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 상기 생물체는 비루스 벡터의 사용에 관련된 부수적인 위험 없이 세포간 위치에 전달될 수 있다. 상기 유형의 제제는 직접적으로 혈류로부터 RES의 세포로, 근육내 주사에 의해 근육 세포로, 또는 직접 주사에 의해 종양으

로 중합체 쉘의 비특정 흡수 또는 세포 이물 흡수를 용이하게 한다. 또한, 핵 수용체에 대한 단클론 항체가 특정 세포 유형의 핵에 캡슐화된 생성물을 표적화하는데 사용될 수 있다.

- <463> 상기 구조물에 의해 표적화될 수 있는 질병으로는 당뇨병, 간염, 혈우병, 낭포성 섬유증, 다발성 경화증, 일반적인 암, 감기, AIDS 등이 있다. 예를 들면, 인슐린형 성장 인자 (IGF-1)에 대한 유전자는 당뇨병 말초 신경 장애 및 약액질의 치료를 위한 전달용 단백질 세포로 캡슐화될 수 있다. 인자 IX 및 인자 VIII를 암호화하는 유전자 (혈우병 치료에 유용함)는 본 발명의 단백질 미소캡슐 쉘로 캡슐화됨에 의해 간에 표적화될 수 있다. 유사하게 저밀도 지단백질 (LDL) 수용체에 대한 유전자는 본 발명의 단백질 미소캡슐 쉘로 캡슐화됨에 의해 아테롬성동맥경화증 치료를 위해 간에 표적화될 수 있다.
- <464> 본 발명의 수행에 유용한 기타 유전자는 종양 세포에 대한 인체의 면역 반응을 재자극하는 유전자이다. 예를 들면 플라스미드에 함유되는 DNA에 의해 암호화된 HLA-B7과 같은 항원은 종양 (예, 피부암)으로 직접 주입하기 위해 본 발명의 단백질 쉘로 혼입될 수 있다. 종양내에서는 항원은 종양 특정 세포에 모집되어 종양을 면역계 공격에 대한 표적이 되게 하는 시토킨 (예, IL-2)의 수준을 증가시킨다.
- <465> 또다른 예로서 아데노 관련 비루스 계통의 일부를 함유하는 플라스미드는 본 발명의 단백질 미소캡슐 쉘로 캡슐화하기 위한 것으로 여겨진다. 또한, 본 발명의 단백질 미소캡슐 쉘은 치료 유전자를 다양한 종양 및 감염성 질병에 대해 채택된 면역치료를 위해 CD8 + T 세포에 전달될 수 있다.
- <466> 본 발명의 단백질 쉘은 또한 예를 들면 간염 B 비루스에 대한 안티센스 뉴클레오티드의 표적화된 전달을 통해 감염성 질병과 싸우는 전달체로서 사용될 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드의 예는 간염 B 비루스의 폴리아데닐화 신호에 대한 21-mer 포스포로티오에이트이다.
- <467> 본 발명의 단백질 쉘은 또한 낭포성 섬유증 트랜스막 조절제 (CFTR) 유전자의 전달을 위해 사용될 수 있다. 상기 유전자가 결핍된 인간은 CFTR 유전자를 함유하는 본 발명의 단백질 미소캡슐 쉘을 분무하고 폐에 직접적으로 흡입시킴으로써 치료될 수 있는 낭포성 섬유증을 발병시킨다.
- <468> 또한 효소가 본 발명의 단백질 쉘을 사용하여 전달될 수 있다. 예를 들면 효소, DNase는 캡슐화되어 폐에 전달될 수 있다. 유사하게는, 리보자임은 캡슐화되고 중합체 쉘의 외부에 적합한 항체를 부착시킴으로써 비루스 엔벨로프 단백질 또는 비루스 감염된 세포에 표적화될 수 있다. 백신은 또한 본 발명의 중합성 미소캡슐에 캡슐화되고, 피하, 근육내 또는 정맥내 전달에 사용될 수 있다.
- <469> <실시예 36>
- <470> 뇌종양 및 복막내 종양의 국부 치료
- <471> 화학요법제를 종양에 국부적으로 전달하는 것은 약물에 장기간 노출되면서 투여량을 최소화하여 부작용을 제한하는데 효과적인 방법이다. 상기 논의된 생체적합성 물질도 또한 겔체 (가교 또는 비가교됨)와 같은 여러 물리적 형태로 사용되어 기질을 제공하며, 이 기질의 확산 및(또는) 분해에 의해 약물학적 활성 성분, 예를 들어 파클리탁셀이 방출될 수 있다. 캡슐 (등록상표)은 생체적합성 물질의 기질내에 분산되어, 뇌종양 및 복막 공동내의 종양 (난소암 및 전이성 질병)의 치료 동안 파클리탁셀의 체제를 지속적으로 방출할 수 있다. 본 발명의 제제를 위한 분산 기질로서 온도 민감성 물질도 사용될 수 있다. 즉, 예를 들어 캡슐 (등록상표)은 온도 민감성 물질 (예를 들어, 폴리아크릴아미드의 공중합체 또는 폴리알킬렌 글리콜의 공중합체, 및 폴리락티드/글리콜리드 등)의 액상 제제로 주사될 수 있으며, 이것은 종양 부위에서 겔화되어 캡슐 (등록상표)을 서서히 방출시킨다. 캡슐 (등록상표) 제제는 상술한 생체적합성 중합체의 기질내로 분산되어 파클리탁셀 제제의 방출을 조절할 수 있으며, 이를 통해 캡슐 (등록상표) 제제 (파클리탁셀과 결합된 알부민)의 특성면에서 상술한 전신 독성이 저하될 뿐만 아니라 뇌 조직에 대한 독성도 저하된다. 생체적합성 중합체 기질과 함께 캡슐 또는 그와 유사하게 조제된 화학요법제를 이와 같이 병용하는 것은 뇌 및 복막내의 고상 종양 (난소암)의 치료용 화학요법제를 다른 고상 종양으로 국소적으로 전달하고 다른 고상 종양에 대해 국부적으로 사용하는 것을 조절하는데 유용할 수 있다. 이 복합 제제는 파클리탁셀의 용도로 제한되지 않으며, 항감염제, 면역억제제 및 기타 화학요법제 등이 포함되는 광범위한 약물학적 활성 성분과 함께 사용될 수 있다.
- <472> <실시예 37>
- <473> 재구성후의 캡슐 (등록상표)의 안정성
- <474> 유리 바이알중의 동결건조된 캡슐 (등록상표)을 멸균 생리 식염수를 사용하여 1, 5, 10 및 15 mg/ml의 농도로 재구성하고, 실온 및 냉장 조건에서 저장하였다. 이 현탁액은 이 조건하에서 적어도 3 일 동안 균질한 것으로

발견되었다. 여러 시점에서 입도를 측정하였으나 크기 분포에는 변화가 없었다. 상기 조건하에서 침전은 전혀 발견되지 않았다. 이러한 안정성은 예기치 않은 것이었고, 0.6 내지 1.2 mg/ml의 추천 농도로 재구성한 후 약 24 시간 내에 침전하는 탁술 (등록상표)과 관련된 문제점을 극복하였다.

- <475> 또한, 재구성된 캡슐 (등록상표)은 테플론, 실라스틱, 폴리에틸렌, 타이곤 및 기타 표준 주입관 재료와 같은 상이한 중합체 관 재료의 존재하에 안정하였다. 이것은 폴리에틸렌 주입 세트 및 유리 주입 병으로 제한되는 탁술 (등록상표)을 능가하는 주요 잇점이다.
- <476> <실시예 38>
- <477> 캡슐 (등록상표)용 단위 투약형
- <478> 캡슐 (등록상표)을 적합한 크기의 바이알에서 동결건조 분말로서 제조하였다. 이어서, 원하는 투여량을 적합한 용기에 채우고 동결건조하여 원하는 양의 알부민 및 파클리탁셀을 주성분으로 하는 분말을 얻을 수 있었다. 이어서, 이러한 용기를 멸균 생리 식염수 또는 기타 수성 희석액을 사용하여 사용 관점에서 적절한 부피로 재구성하여 희석액중의 파클리탁셀의 균질 현탁액을 얻었다. 재구성된 용액을 표준 정맥내 주입 세트를 사용한 주사 또는 주입에 의해 환자에게 직접 투여할 수 있었다.
- <479> 또한, 캡슐 (등록상표)은 사용시 해동하여 환자에게 간단하게 투여할 수 있는 병 또는 백에 즉시 사용하기 용이한 냉동 용액으로서 제조하였다. 이로써, 제조 공정에서 동결건조 단계를 생략하였다.
- <480> 본 발명의 제제 및 탁술 (등록상표)를 파클리탁셀의 균등한 투여량으로 랫트에 투여하였을 때, 탁술 (등록상표)군의 경우 본 발명의 제제 군에 비해 보다 높은 골수억제 효과가 나타난 것은 매우 놀라운 것이었다. 이로 인해, 감염 발생률 및 발열 에피소드 (예를 들어, 열에 의한 호중구감소증)가 저하될 수 있었다. 이것은 또한 현재 21 일인 치료간 주기를 감소시킬 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 제약 조성물을 사용하는 경우, 상기 주기는 2 주 이하로 감소되어 암 치료에 보다 효과적일 수 있다. 따라서, 본 발명에 따라 제조되는 제약 조성물의 용도는 탁술 (등록상표)을 능가하는 실질적인 잇점을 제공할 수 있다.
- <481> <실시예 39>
- <482> 약물의 구강 전달
- <483> 탁술 (등록상표)은 구강 경로로 매우 열등하게 흡수된다. 캡슐 (등록상표)과 같은 미립 제제는 파클리탁셀과 같은 약물의 흡수를 크게 개선시킬 수 있다. 또한, 미소에멸전/중착 방법을 통해 제조된 본 발명의 파클리탁셀 제제는 구강을 통해 약물을 흡수하는데 유용하다. 이러한 제제를 계면활성제와 병용하면 상기 약물의 구강 생체적합성을 크게 개선시킨다. 지질, 계면활성제, 효소 억제제, 삼투 개선제, 이온 페어링제, 대사 억제제 등을 사용하는 경우, 놀랍게도 본 발명의 파클리탁셀 제제의 구강을 통한 흡수를 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 이온 페어링제의 예에는 트리클로로아세테이트, 트리클로로아세테이트 살리실레이트, 나프탈렌 술폰산, 글리신, 비스-N,N-디부틸아미노에틸렌 카보네이트, n-알킬 술포네이트 및 n-알킬 설페이트가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 막 삼투 개선제의 예에는 나트륨 카프레이트, 아실 글리세라이드, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르사실 카르니틴, 나트륨 콜레이트, 나트륨 타우로콜레이트, 나트륨 타우로디히드로푸시데이트, EDTA, 나트륨 살리실레이트 및 나트륨 메톡시살리실레이트가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 제제에 사용될 수 있는 지질 및 계면활성제의 비제한적인 목록은 다음에 설명되어 있다.
- <484> <실시예 40>
- <485> 다른 약물의 본 발명의 제제 및 캡슐 (등록상표)의 투여 방식
- <486> 본 발명의 제제는 정맥내 주입, 정맥내 대량주입, 복강내 주사, 동맥내 주사, 문맥내 주사, 간 전색, 종양내 주사 또는 피하 주입, 요도내 주사 또는 이온삼투요법, 근육내 주사, 피하 주사, 포막내 주사, 건조 분말 또는 분무액의 흡입 등으로 투여될 수 있다.
- <487> <실시예 41>
- <488> 혈관형성 혈관계의 표적화를 위한 캡슐 (등록상표)의 용도
- <489> 혈관형성술은 암, 류마티즘성 관절염 및 망막증과 같은 질병의 진행에 원인이 되고(되거나) 심화시키는 인자로서 연루되어 왔다. 본 발명자들은 놀랍게도 캡슐 (등록상표)이 동물 모델내의 종양을 치료할 뿐만 아니라 류마티즘성 관절염의 통증을 경감시키거나 또는 반전시킬 수 있다는 것을 밝혀내었다. 따라서, 캡슐 (등록상표)이

항혈관형성 활성을 갖는 것이 가능하다. 캡슐 (등록상표)을 보다 효과적으로 만들기 위해, 적합한 펩티드를 캡슐 (등록상표)에 결합시켜 혈관형성 혈관계를 표적화하는 것이 가능하다. 이러한 펩티드의 예로는 RGD (아르기닌-글리신-아스파르트산)가 있다. 표적화 요법을 위해, 유사한 활성을 갖는 많은 다른 펩티드를 캡슐 (등록상표) 또는 본 발명의 방법에 의해 제조된 다른 약물에 결합시킬 수 있다. 펩티드/캡슐 (등록상표)은 필요에 따라 통상의 수단으로 환자에게 투여할 수 있다.

<실시예 42>

<491> 간장 질환 치료를 위한 캡슐 (등록상표)의 용도

<492> 말기의 간세포 암종 및 간장의 다른 암은 캡슐 (등록상표)을 문맥내 투여하여 치료될 수 있다. 간에 직접 전색 시킴으로써 간에 도달하는 투여량을 크게 개선시킬 수 있다. 또한, 질병을 보다 효율적으로 치료하기 위해 통상의 탁솔 (등록상표)보다 더 많은 투여량을 사용할 수 있다. 또한, 보다 큰 치료 효능을 위해, 간장 조직에 위치하는 펩티드 또는 단백질과 같은 적합한 표적화제를 캡슐 (등록상표)과 병용할 수 있다.

<E. 임상전 연구에 포함되거나 직접 관련된 실시예>

<실시예 43>

<494> 파클리탁셀의 독성/골수억제 연구 - 랫트에 단일 투여량으로 투여하기 위한 BMS 제제 및 캡슐 (등록상표)의 비교 연구

<495> 연구의 개요를 다음에 나타낸다:

<496> 스케줄: 1X, 단일 투여 정맥내 주입 (1일)

<497> 동물: 스프라그 돌레이 (Sprague Dawley) 랫트, 40 마리의 숫컷, 40 마리의 암컷, 군 당 5 마리의 랫트/성별

<498> 중량: 300 ± 50 g

<499> 연구 기간: 15 일

<500> 처리 군: BMS (비히클 1 + 처리군 3)

<501> 캡슐 (등록상표) (비히클\* 1 + 처리군 3)

<502> 투여량: BMS (0, 3, 6 및 9 mg/kg)

<503> 캡슐 (등록상표) (0, 6, 9 및 12 mg/kg)

<504> 투여 농도: 0.6 mg/ml (모든 랫트)

<505> 투여 부피: BMS (15, 5, 10, 15 ml/kg)

<506> 캡슐 (등록상표) (20, 10, 15 및 20 ml/kg)

<507> 주입 속도: 대략 0.75 ml/시간 (모든 랫트)

<508> 투여 경로: 정맥내 주입, 꼬리 정맥

<509> Clin obs: 1X/일

<510> Clin Path: 0 (처리전), 1, 3, 7, 11, 15 일, NCI Tox Branch용 Do 표준 목록

<511> 체중: -1, 1, 3, 8 및 15일

<512> (\*비히클은 파클리탁셀의 첨가를 생략한 것을 제외하고는 제조 섹션에 기재된 바와 동일한 방법으로 제조하였음.)

<실시예 44>

<514> 파일롯 골수억제 (혈액학적 독성) 연구

<515> 형식상의 연구를 시작하기에 앞서, 캡슐 (등록상표) 군의 3 마리 랫트 및 BMS 군의 3 마리 랫트를 사용한 파일롯 연구를 수행하여 결과를 측정하였다. 사용된 투여량은 5 mg/kg이고, 이 때의 투여 부피는 7 ml/kg이었다.

투여량은 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 대량 투여하였다. 이 연구 결과를 각각의 제제에 대한 WBC 갯수 (골수억제의 지시자)의 변화(%)를 시간 함수로서 나타내는 도 3의 그래프에 요약하였다.

- <516> <파일럿 골수억제 연구의 결론>
- <517> 데이터는 WBC 갯수 (평균값 + SD)가 캡슐 (등록상표) 군에 비해 BMS 군에서 크게 저하되었고, 이는 BMS 제제에 대한 골수억제 정도가 더 큰 것을 나타내었다 (BMS 제제에 대한 최대 WBC 억제가 >70%인 반면, 캡슐 (등록상표)에 대한 최대 WBC 억제는 <30%이었음). 이 데이터를 분석한 결과, 0, 13, 14 일을 제외한 모든 데이터 시점에 대해 두 군들간에 통계학상 상당한 차이 ( $p < 0.05$ )가 있음을 나타내었다. 또한, WBC의 정상 수준은 캡슐 (등록상표)을 주입한 군에서 6일 이내에 회복된 반면, BMS 군은 14 일 쯤에 WBC 정상 수준을 회복하였다. 이는 캡슐 (등록상표)의 경우 혈액학적 독성이 상당히 경감되었음을 나타낸다. 인간의 임상 실험에서 유사한 결과가 나타난다면, 이 데이터는 치료 주기들간의 간격 (현재 탁솔 (등록상표)의 경우 3 주임)이 상당히 감소될 수 있음 (아마도 캡슐 (등록상표)을 사용하는 경우 2 주 또는 1 주 이하)을 뒷받침할 수 있다.
- <518> <실시예 45>
- <519> 항종양 효능의 파일럿 연구
- <520> 상기 연구를 시작하기 앞서, 캡슐 (등록상표)을 사용한 파일럿 연구를 수행하여 표적 투여량 범위 및 효능을 측정하였다. 마우스 (n=10)의 피하에 MX-1 유방 종양을 이식하고, 종양 크기가 약 150 내지 300 mg에 도달할 때 치료하기 시작하였다. 이러한 종양 크기는 12 일 쯤에 도달하였고, 이식한지 13일 후에 치료하기 시작하였다. 캡슐 (등록상표)을 식염수로 재구성하여 파클리탁셀의 나노입자 콜로이드 용액을 수득하였다. 종양 함유 마우스 (n=5)를 재구성된 캡슐 (등록상표)을 사용하여 5 일 동안 매일 꼬리 정맥 대량주사를 통해 20 mg/kg (VIV-1로 표시됨)의 투여량으로 치료하였다. 대조용 종양 함유 군 (n=5)에 동일한 스케줄로 식염수만을 투여하였다. 종양 크기를 시간의 함수로서 모니터링하였다. 종양 중량은 평균 4500 mg 이상으로 크게 증가한 것으로 나타났고, 이 군에 속한 모든 동물들을 28 일과 39일 사이에 모두 희생시켰다. 다른 한편, 치료군은 상당한 치료효능을 나타내었으며, 모든 동물은 25 일이 되자 측정가능한 종양이 전혀 없었다. 이 군에 속한 동물을 제발의 징후 및 종양의 증거가 전혀 나타나지 않았던 39 일 쯤에 모두 희생시켰다. 그 결과를 도 4에 나타낸다.
- <521> <결론>
- <522> 이 연구는 캡슐 (등록상표)에 대한 상당한 항종양 활성을 나타내었다. 즉, 파클리탁셀의 항종양 활성은 캡슐 (등록상표) 제제에서 보존되었다. 이 연구는 파클리탁셀 나노입자의 정맥내 투여가 가용성 형태의 약물을 투여한 경우만큼 효능이 있을 수 있음을 나타내었다. 즉, 캡슐 (등록상표)은 승인되어 시판중인 크레모포어 함유 BMS 제제에서 나타나는 독성 효과 없이 효능있고 강력한 항종양 활성을 나타내었다.
- <523> 주: SRI (Southern Research Institute) 학자들의 문헌 데이터 및 경험을 근거로, 희석액 12 (크레모포어/에탄올, BMS 제제에 사용된 것과 동일한 희석액)에 용해된 파클리탁셀의 최대 허용 투여량 (MTD)은 무흉선종 마우스의 이러한 특정 스트레인의 경우 22.5 mg/kg인 것으로 수립되었다. 이러한 결과는 파클리탁셀을 희석액 12내에 시판되는 BMS 제제 (BMS 파클리탁셀, 크레모포어/에탄올중의 6 mg/ml)에 비해 훨씬 더 높은 농도로 용해시킴으로써 얻었다. 이는 마우스에 투여되는 크레모포어/에탄올의 양을 최소화하여 비히클 독성을 피하도록 하였다. 22.5 mg/kg의 투여량에서, 희석액 12중의 파클리탁셀의 효능은 상기 캡슐 (등록상표)의 효능과 유사하였다.
- <524> <실시예 46>
- <525> 동물 모델내 류마티즘성 관절염의 파클리탁셀 나노입자를 사용한 치료
- <526> 라우바인 (Louvain) 랫트중의 콜라겐으로 유발된 관절염 모델을 관절염에 대한 파클리탁셀 나노입자의 치료 효과를 시험하는데 사용하였다. 실험 동물의 앞발 크기를 모니터링하여 관절염의 심각 정도를 평가하였다.
- <527> 관절염이 충분히 전개된 후 (일반적으로 콜라겐 주사 후 9 내지 10 일 경과), 실험 동물을, 각각 파클리탁셀 나노입자 1 mg/kg 충분량 또는 파클리탁셀 나노입자 0.5 mg/kg + 프레드니손 0.2 mg/kg 충분량 (복합 치료)을 3 주 동안 1 주 당 1회 투여로 6 회 복막내 투여한 상이한 군으로 분류하였다. 앞발 크기를 치료 시작무렵 (0 일)에 측정하고, 약물을 주입할 때마다 측정하였다. 통상의 식염수만을 투여한 1군을 대조군으로 하였다. 실험의 마지막 무렵에, 파클리탁셀 나노입자를 투여한 군의 앞발 크기는 42% 감소하고, 복합 치료한 군의 앞발 크기는 33% 감소한 반면, 대조군의 앞발 크기는 약 20% 증가하였다. 관절염이 유발되기 전의 원래 앞발 크기는 50%이었다. 그 결과를 도 2에 나타내었다. 결론적으로, 파클리탁셀 함유 나노입자의 관절염에 대한 치료 효과가 입증되었다. 파클리탁셀 및 스테로이드 모두의 장기간 사용에 따른 부작용을 피하기 위해, 유사한 효과를

언지만 각각의 약물을 1/2 투여량으로 투여하는 복합 치료법을 선택하는 편이 아마도 보다 양호할 것이다.

- <528> <실시예 47>
- <529> 동맥 재협착증에 대한 캡슐 (등록상표)의 효과
- <530> 비정상적인 혈관 평활근 분열 (VSMP)은 아테롬성 동맥경화증, 고혈압 및 대부분의 혈관내 진행과 같은 심혈관 질환과 관련된 것이다. 비정상적인 VSMP는 경피 경강직 관상 혈관형성술 (PTCA)의 일반적인 합병증이다. PTCA 후의 VSMP로 야기된 만성 재협착증의 발병률은 3 내지 6 개월 내에 40 내지 50% 높은 것으로 보고되었다.
- <531> PTCA와 관련된 혈관 재폐색의 높은 발병률에 의해 재협착증의 동물 생체내 모델이 전개되므로, 이를 막기 위한 체제를 찾아야 한다. 하기 연구는 동맥의 내막 외상후의 재협착증을 방지함에 있어서 캡슐 (등록상표)의 용도를 설명한다.
- <532> 중량이 350 내지 400 gm인 슛컷 스프라그-돌레이 랫트를 케타민 및 럼폰으로 마취시키고, 통상의 우측 경동맥을 3.0 cm 간격으로 노출시켰다. 부착된 조직을 제거하여 2개의 DIETRICH 마이크로 불독 클램프가 미주 신경 또는 관련된 상위의 경부 신경절 및 교감 코드에 분쇄 상처를 주지 않으면서 경동맥 주변 약 2 cm 떨어진 곳에 위치하도록 하였다. 혈관의 이 분절을 따라 어떠한 지관도 존재하지 않았다. 쓰리웨이 스텝콕에 부착된 30-게이지 니들을 먼저 삽입하고, 이어서 고립된 분절의 하부 말단을 빼내어 혈관의 벽에 구멍을 만든 후, 주사를 위해 상부 말단에 삽입하였다. 인산염으로 완충된 식염수 2 내지 3 ml를 주사하여 고립된 분절 내부의 모든 혈액을 세정하고, 이어서 쓰리웨이 스텝콕을 압축 공기의 조절된 공급원과 연결된 또다른 연결부로 전환하였다. 공기의 완만한 스트림 (25 ml/분)을 3 분 동안 혈관의 루멘을 따라 통과시켜 내피의 상처를 건조시켰다. 이어서, 분절을 식염수로 다시 채운 후, 니들을 혈관에서 제거하였다. 클램프를 제거하기 전에, 혈관 벽상의 니들 구멍을 조심스럽게 조각하여 출혈을 방지하였다. 또한, 니들 구멍을 막아 출혈을 멈추는데는 식염수로 흠뻑 적신 면봉을 사용할 수 있다. 피부를 7.5 mm 금속 클립으로 폐쇄하여 베타딘으로 세척하였다.
- <533> 수술한 시술을 받은 모든 동물들을 시술 후 제14일 췌에 희생시켰다. 각 측의 경동맥은 병리학적 검사 동안 회복되었다. 수술하지 않은 측은 자기 대조군으로서 이바지할 것이다. 상이하게 처리된 실험 군은 다음과 같다:
- <534> 1군: 높은 투여량의 캡슐 (등록상표) 치료군:  
 <535> 파클리탁셀 5 mg (인간의 알부민 w/100 mg)/kg/주, 정맥내.
- <536> 2군: 낮은 투여량의 캡슐 (등록상표) 치료군:  
 <537> 파클리탁셀 1 mg (인간의 알부민 w/20 mg)/kg/주, 정맥내.
- <538> 3군: 약물 비히클 대조군:  
 <539> 인간의 알부민 100 mg/kg/주, 정맥내.
- <540> 경동맥 생체검사 샘플을 포르말린으로 보존한 후, 횡단면 (8 μm)을 파라핀 블록으로부터 절개하고, 헤마톡실린 및 에오신으로 착색시켰다. 혈관층 (내막, 중막 및 외막)의 횡단면 면적을 정량하였다.
- <541> 대조군의 상처입은 경동맥은 내막 평활근 세포가 상당히 축적되고 최하부 막에 VSMC의 침입이 있는 것으로 나타났다. 경동맥 벽의 전체 두께는 두배가 되었다. 치료군은 대조군에 비해 내막 벽 두께가 만족스러운 만큼 상당히 감소한 것으로 나타났다.
- <542> <실시예 48>
- <543> 나노입자의 생체내 표적화
- <544> 단백질, 항체, 효소, 펩티드, 올리고뉴클레오티드, 당류, 다당류 등과 같은 특정 표적화 잔기를 나노입자의 단백질 코팅제에 혼입함으로써, 체내의 특이 부위를 표적화하는 것이 가능하다. 이러한 표적화능은 치료 또는 진단 목적으로 이용될 수 있다.
- <545> <실시예 49>
- <546> 중합체 셀의 항체 표적화
- <547> 본 발명의 특정 면의 중합체 셀의 특성에 의해 단클론성 항체 또는 다클론성 항체를 중합체 셀에 결합시키거나 또는 항체를 중합체 셀에 혼입하는 것이 가능하였다. 항체를 형성되는 중합체 마이크로캡슐 셀로서의 중합체

셀에 혼입하거나 또는 항체를 중합체 셀의 제조 후에 중합체 셀에 결합시킬 수 있었다. 표준 단백질 고정화 기술을 이러한 목적으로 사용할 수 있었다. 예를 들어, 알부민과 같은 단백질로 제조된 단백질 마이크로캡슐의 경우, 알부민 라이신 잔기상의 다수의 아미노기는 적합하게 변성된 항체의 결합에 이용가능하였다. 일례로서, 항종양제는 종양에 대한 항체를 형성되는 중합체 셀에 혼입함으로써 종양에 전달될 수 있거나 또는 종양에 대한 항체는 중합체 셀이 제조된 후에 중합체 셀에 결합될 수 있다. 또다른 예로서, 유전자 생성물은 표적 세포상의 수용체에 대한 항체를 형성되는 중합체 셀에 혼입함으로써 특이 세포에 전달될 수 있거나 또는 표적 세포상의 수용체에 대한 항체는 중합체 셀의 제조후에 중합체 셀에 결합될 수 있다. 또한, 코어 수용체에 대한 단클론 항체는 캡슐화된 생성물을 특정 세포 형태의 코어에 대해 표적화하는데 사용될 수 있다.

<548> <실시예 5D>

<549> 이러한 중합체 셀 함유 제제의 정맥내 전달을 이용한 이식된 조직에 대한 면역억제제의 표적화

<550> 면역억제제는 거절 에피소드의 방지를 위한 조직 이식 후에 광범위하게 사용된다. 특히, 효능있는 면역억제제인 시클로스포린은 동물의 피부, 심장, 신장, 췌장, 골수, 소장 및 간장을 포함하는 동종유전 이식조직의 생존률을 연장시킨다. 시클로스포린은 몇몇 체액 면역을 억제하고, 여러 동물 중에 있어서 많은 기관에 대한 세포 증개 반응, 예컨대 동종이식 거절반응, 연기된 과감작, 경험적 알리지 뇌척수염, 프로인트 아주번트성 관절염 및 이식장기 대 개체반응 질환을 보다 큰 정도로 억제하는 것으로 입증되었다. 시클로스포린을 사용한 인간내의 신장, 간장 및 심장 동종유전 이식이 성공적으로 수행되었다.

<551> 시클로스포린은 현재 알콜중의 시클로스포린 용액을 함유한 캡슐제, 및 옥수수 오일, 폴리옥시에틸화 글리세리드 등과 같은 유제, 또는 올리브유, 폴리옥시에틸화 글리세리드 등의 용액제 형태로 구강을 통해 전달된다. 이것은 또한 정맥내 주사로 투여되며, 이 경우 이것은 에탄올 (약 30%) 및 크레모포어 (폴리옥시에틸화 피마자유)의 용액에 용해된다 (주사에 앞서 통상의 식염수 또는 5% 텍스트로스중에 1:20 내지 1:100으로 희석되어야 함). 구강용 용액의 절대 생체적합성은 정맥내 주입과 비교하여 약 30%이다 (Sandoz Pharmaceutical Corporation, Publication SDI-Z10 (A4), 1990). 일반적으로, 시클로스포린의 정맥내 전달로 인해, 탁솔 (등록상표)의 현재 실시되는 정맥 전달과 관련된 문제점, 즉 정맥내 제제에 사용되는 운반 비히클인 크레모포어에 기인한 것으로 여겨지는 아나필락시 반응 및 알리지 반응을 겪는다. 또한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 캡슐화된 약물 (예를 들어, 시클로스포린)의 정맥내 전달은 약물의 투여 직후에 위험한 피크의 혈액 수준을 피하게 된다. 예를 들어, 시클로스포린에 대해 현재 이용가능한 제제과 상술한 캡슐화된 형태의 시클로스포린을 비교하면, 주사 직후의 시클로스포린의 피크 혈액 수준이 5 배 감소된 것으로 나타났다.

<552> 크레모포어와 관련된 문제점을 피하기 위해, 상술한 중합체 셀내에 함유된 시클로스포린은 정맥내 주사로 전달될 수 있다. 이것은 생체적합성 유제 또는 다수의 기타 용매에 용해될 수 있으며, 그 후에 이것은 상술한 초음파분해를 통해 중합체 셀에 분산될 수 있다. 또한, 중합체 셀내의 시클로스포린 (또는 기타 면역억제제)을 전달하는데 있어서 중요한 잇점은 주사된 물질의 간장내의 RES계에 의한 흡수에 기인한 국부 표적화이다. 이로 인해, 어느 정도는 전신 독성을 피하고 국부 표적화에 기인한 유효 투여량을 감소시킬 수 있다.

<553> <실시예 5I>

<554> 항체 표적화에 대한 캡슐 (등록상표)의 용도

<555> 다양한 종양 또는 조직에 대한 단클론성 항체를 캡슐 (등록상표)에 결합하여 캡슐 (등록상표) 또는 본 발명의 방법으로 제조된 다른 약물을 질병의 환부에 표적화시킬 수 있다. 예를 들어, 난소암에 대한 항체를 캡슐 (등록상표)에 결합하고, 복막내 투여하는 것은 난소암 환자에게 큰 잇점을 제공할 것이다.

<556> <실시예 5Z>

<557> 치료제의 정맥내 투여

<558> 치료제, 예를 들어, 약물, 이미징제 등의 정맥내 투여는 치료제를 간장을 통과하는 적어도 하나의 경로에 미리 배치시킨다. 치료제가 간장을 통해 여과되는 경우, 치료제의 상당 부분이 간장에 의해 흡수되어 단리되며, 따라서 전신 분배에 이용할 수 없다. 또한, 일단 간장에 의해 흡수되면 대사되기 쉬우며, 생성되는 대사 부산물은 종종 일반적인 전신 독성을 갖는다. 본 발명에 따른 코팅제로 약물 또는 기타 치료제를 캡슐화함으로써 (예를 들어, 알부민과 같은 단백질을 사용함) 정맥내 투여시 일어나는 간장에 의한 단리는 완화된다. 알부민은 예를 들어, 간장을 통과하여 일반적으로 환자의 전신에 분배되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 간장에 의한 알부민의 단리는 간장 수용체 (또는 다른 메카니즘)를 갖는 약물 또는 독성 화합물과 동일한 정도로 일어나지 않음

며, 이는 혈류로부터 이들을 제거해야 하는 진행을 개시한다. 생체적합성 중합체의 코팅제 (예를 들어, 인간의 알부민 코팅제)를 사용하여 치료제를 보호함으로써, 약물은 간장을 우회하게 되며, 일반적으로 모든 기관계를 통해 분배된다. 본 발명의 한가지 면에 따르면, 간장을 우회하기 위한 신규한 방법이 제공되며, 이는 약물을 인간의 간장 알부민 (사실상 생리적 성분임)으로 캡슐화시키는 것을 포함한다. 이러한 방식으로, 약물은 전신 치료에 보다 이용가능하게 된다. 약물의 이용가능성이 증가되는 것 외에도, 간세포성 약물 분해의 대사 부산물의 생성이 감소된다. 간장 우회 통과와 증가 및 약물 대사의 부산물 감소 모두는 전체적인 약물 효능을 상승적으로 개선시킨다. 개선된 효능은 인간의 알부민으로 캡슐화된 모든 약물 및 물질에 대해 확장된다.

- <559> <실시예 53>
- <560> 약물의 골수억제 (혈액학적 독성) 효과 및 일반적인 독성의 경감
- <561> 몇몇 화학치료요법 약물은 이들의 골수억제 효과로 인해 투여량 제한 독성을 갖는다. 탁솔 (등록상표) (파클리탁셀)은 이러한 약물의 고전적인 예이다. 크레모포어/에탄올의 현재 승인된 제제로 투여하는 경우, 탁솔 (등록상표)은 환자의 혈액 수치를 정상으로 회복시키기 위해 약물의 반복 투여를 제한하고 적어도 3 주 동안 환자의 재치료를 배제시키는 골수억제 효과를 나타낸다. 본발명의 특정 면의 약물 담체, 즉 인간의 알부민의 비독성 생체적합성으로 인해 골수억제의 독성 부작용이 크게 경감될 수 있다는 것은 명백하였다.
- <562> 스프라그 돌레이 랫트에 시판되는 제제 (크레모포어/에탄올 중의 BMS로부터 시판, 탁솔 (등록상표)로서 지칭됨) 또는 본 발명의 방법에 의해 제조된 제제를 알부민을 지닌 나노입자로서 투여하였다. 두가지 제제 모두를 꼬리 정맥 주사로 투여하였다. 탁솔 (등록상표) 제제의 경우에 5 mg/kg의 단일 투여 수준을 투여한 반면, 본 발명의 제제의 경우 5 mg/kg 및 12 mg/kg의 두가지 수준의 투여량으로 투여하였다. 투여 후에 골수억제의 지표로서 랫트의 백혈구 세포 갯수를 매일 모니터하였다.
- <563> 탁솔 (등록상표) 제제 (5 mg/kg)의 경우에 WBC 갯수는 투여된지 1 일 및 2 일 후에 각각 47.6% 및 63.5% 저하된 반면, 본 발명의 제제 5 mg/kg의 경우에 WBC 갯수는 투여된지 1 일 및 2 일 후에 각각 14.7% 및 2.4% 증가하였다. 본 발명의 제제의 투여량을 12 mg/kg으로 높인 경우, WBC 갯수는 투여된지 1 일 및 2 일 후에 각각 6.5% 및 3.6% 증가하였다.
- <564> 이 결과는 단기간의 골수억제가 본 발명의 제제 중의 약물을 투여함으로써 크게 경감된다는 것을 나타낸다.
- <565> 일반적인 독성의 또다른 지시자는 동물의 체중이다. 파클리탁셀을 투여한 후, 랫트의 체중을 또한 모니터하였다. 탁솔 (등록상표) 제제를 5 mg/kg 투여한 경우에 투여한지 3 일내에 체중이 10.4% 감소한 반면, 본 발명의 제제로 파클리탁셀을 동일량 투여한 경우 체중이 단지 3.9% 감소하였으며, 이는 본 발명의 제제의 독성이 크게 경감되었음을 나타낸다.
- <566> 본 발명의 제제 및 탁솔 (등록상표)을 파클리탁셀의 투여량과 균등하게 랫트에 투여했을 때, 본 발명의 제제 군에 비해 탁솔 (등록상표) 군에 대해 훨씬 더 높은 정도의 골수억제효과가 나타난 것은 놀라운 것이었다. 이로 인해, 감염 발생률 및 발열 에피소드 (예를 들어, 열에 의한 호중구감소증)가 저하될 수 있다. 이것은 또한 현재 탁솔 (등록상표)의 경우 21 일인 치료간 주기를 감소시킬 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 제약 조성물을 사용하면, 이 주기는 2주, 1주 또는 그 미만으로 감소되어 암에 대한 보다 효과적인 치료를 가능하게 할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따라 제조된 제약 조성물을 사용하여 탁솔 (등록상표)에 실질적인 잇점을 제공할 수 있다.
- <567> <실시예 54>
- <568> 나노입자 제제의 대량투여량 투여
- <569> 크레모포어/에탄올로 이루어진 시판되는 BMS 제제내의 항암 약물인 파클리탁셀은 대량으로 정맥내 투여될 수 없다. 이는 비히클의 광범위한 독성으로 인해 심각한 과민성 반응이 초래되고, 환자는 스테로이드, 항히스타민제 등으로 미리 배합된 약물을 투여해야 하기 때문이다. 탁솔 (등록상표) 제제는 정맥내 주입으로 투여되어 1 시간 내지 24 시간 지속된다. 반대로, 본 발명에 다른 제제는 비독성 담체를 사용하기 때문에 오늘날 임상적으로 사용되는 탁솔 (등록상표) 제제에서 보여지는 독성 문제점 없이 정맥내로 대량주입 (즉, 1 시간 미만의 주입 시간)되기에 용이하게 환자에게 투여될 수 있다.
- <570> 환자에 효과적인 파클리탁셀의 투여량은 전형적으로 환자의 체중 또는 환자 외양에 따라 200 내지 500 mg이다. 탁솔 (등록상표)은 0.6 mg/ml의 최종 투여 농도로 투여되어야 하며, 이는 큰 부피 (전형적으로 약 300 내지 1000 ml의 범위)의 주입을 요한다. 대조적으로, 본 발명의 제제는 이러한 제한이 없으며, 원하는 농도로 투여

될 수 있다. 이는 임상자들이 수 분 만큼 적은 시간에 투여될 수 있는 신속한 정맥내 대량 투여로 환자를 치료할 수 있게 한다. 예를 들어, 본 발명의 제제는 투여 농도 20 mg/ml로 재구성되는 경우, 200 내지 500 mg의 총 투여량에 대한 주입 부피는 단지 각각 10 내지 25 ml이다. 이는 임상 실습에 있어서 큰 잇점이다.

- <571> <실시예 55>
- <572> 탁솔 (등록상표)와 비교한 나노입자 제제 중 파클리탁셀 독성의 감소
- <573> 항암제인 파클리탁셀이 크레모포어/에탄올 중의 그의 상용 제제 (즉, 탁솔 (등록상표))에 있어서 광범위한 독성을 가지며 과민반응을 일으키고, 스테로이드, 항히스타민 등의 예비 약물을 혼합한 약물을 환자가 수용해야 하는 것이 요구된다는 것이 공지되어 있다. BMS 제제의 독성은 본 발명의 나노입자 제제와 비교된다.
- <574> 따라서, C57BL 마우스의 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 상이한 투여량의 제제가 주사되고, 주사후 마우스를 일반적으로 관찰하여 독성 효과를 검사하였다.
- <575> 탁솔 (등록상표)의 경우, 30 mg/kg의 투여량은 정맥내 투여 5분 내에 한결같이 치사에 이르게 하였다. 동일한 투여량에서, 본 발명의 나노입자 제제는 명백한 독성 효과를 나타내지 않았다. 103 mg/kg의 투여량에서 나노입자 제제는 마우스의 체중에 있어서 일부 감소를 나타냈지만, 이러한 높은 투여량에서도 치사에 이르지 않았다.
- <576> 대략 1000 mg/kg, 800 mg/kg 및 550 mg/kg의 투여량은 모두 치사에 이르게 했지만, 치사에 이르는 시간에 있어서 수시간 내지 24시간의 범위에서 상이하였다. 따라서, 본 발명의 제제의 치사 투여량은 103 mg/kg을 초과하지만 550 mg/kg 미만이었다.
- <577> 따라서, 본 발명의 파클리탁셀 제제의 치사 투여량은 실질적으로 탁솔<sup>®</sup> 제제의 것보다 높다는 것이 명백하다. 이는 보다 높은 투여량의 화학치료 약물이 보다 현저하게 감소된 독성을 가지며 보다 유효한 종양세포포괴 활성을 위해 투여될 수 있는 임상학적 수행에 있어서 큰 의미를 갖는다.
- <578> <실시예 56>
- <579> 본 발명의 방법에 의해 제조된 탁솔 (등록상표) 및 정맥내 1회 투여후 탁솔에 대한 마우스의 LD 측정
- <580> 캡슐 (등록상표), 탁솔 (등록상표) 및 그들의 담체 비히클의 LD<sub>50</sub>을 1회 정맥내 투여후 비교하였다. 총 48마리의 CD1 마우스가 사용되었다. 30, 103, 367, 548 및 822 mg/kg의 파클리탁셀 투여량이 캡슐 (등록상표)에 대하여 시험되고, 4, 6, 9, 13.4 및 20.1 mg/kg의 파클리탁셀 투여량이 탁솔 (등록상표)에 대하여 시험되었다. 사람의 알부민에 대한 투여량, 캡슐 (등록상표)에 대한 비히클은 단지 4.94 g/kg(548 mg/ml의 캡슐 (등록상표) 투여량에 상응함)에서만 시험되었는데, 이는 사람의 알부민은 사람에게 독성이 있다고 생각되지 않기 때문이다. 탁솔 (등록상표) 비히클(크레모포어(Cremophor) EL (등록상표))에 대하여 시험된 투여량은 개별적으로 9, 11.3, 16.6 및 20.1 mg/kg의 파클리탁셀 투여량에 상응하는 1.5, 1.9, 2.8 및 3.4 ml/kg이었다. 3 내지 4마리의 마우스에게 각 농도를 투약하였다. 결과는 캡슐 (등록상표)로 투여된 파클리탁셀이 탁솔 (등록상표) 또는 탁솔 (등록상표) 비히클 단독 투여된 것보다 독성이 낮은 것으로 나타났다. 캡슐 (등록상표)에 대한 LD<sub>50</sub> 및 LD<sub>10</sub>은 447.4 및 371.5 mg/kg의 파클리탁셀, 7.53 및 5.13 mg/kg의 탁솔 (등록상표) 중 파클리탁셀, 및 1325 및 794 mg/kg의 탁솔 (등록상표) 비히클(15.06 및 9.06 mg/kg 탁솔 투여량에 상응함)이었다. 이러한 연구에서, 캡슐 (등록상표)에 대한 LD<sub>50</sub>은 탁솔 (등록상표)보다 59배, 탁솔 (등록상표) 비히클 단독보다는 29배를 초과하였다. 캡슐 (등록상표) 중 파클리탁셀에 대한 LD<sub>10</sub>은 탁솔 (등록상표) 중 파클리탁셀보다 72배를 초과하였다. 이러한 연구에 대한 모든 데이터의 검토는 탁솔 (등록상표) 비히클이 탁솔 (등록상표)의 독성을 초래함을 제시한다. 탁솔 (등록상표) 및 탁솔 (등록상표) 비히클을 수용한 마우스들은 투여후 일시적으로 밝은 핑크색 피부 착색으로 나타나는 심각한 과민감성의 전형적인 징후를 나타냈다. 캡슐 (등록상표) 및 캡슐 (등록상표) 비히클군에 대해서는 어떠한 그런 반응도 나타나지 않았다.
- <581> 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

<582>

군	1회 정맥내 투여					
	투여량 (mg/kg)	동물의 수 (n)	치사 수	생존%	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	MTD 또는 LD <sub>10</sub> (mg/kg)
캡슐 (등록상표)	822	3	3	0	447.4	371.5
	548	4	4	0		
	367	3	0	100		
	103	3	0	100		
	30	3	0	100		
탁솔 (등록상표)	20.1	4	4	0	7.53	5.13
	13.4	4	4	0		
	9	3	2	33		
	6	4	1	75		
	4	3	0	100		

<583>

이러한 높은 투여량의 캡슐 (등록상표)은 농축과 주사액로서 투여되었고, 사람에게 있어서 대략 80 내지 2000 mg/m<sup>2</sup>의 투여량과 동일하다. 본 연구에서 LD<sub>50</sub> 또는 캡슐 (등록상표)의 최대 허용 투여량은 사람에게 있어서 대략 1000 mg/m<sup>2</sup>에 해당한다. 이는 탁솔 (등록상표)에 대하여 허용된 사람의 투여량인 175 mg/m<sup>2</sup>보다 현저하게 높다.

<584>

놀랍게도, 비히클인 크레모포어/에탄올 단독은 심각한 과민감성 반응 및 여러 투여량의 마우스군에서는 치사를 야기하는 것으로 밝혀내었다. 탁솔 (등록상표) 비히클 단독에 대한 LD<sub>50</sub> 데이터는 그것이 캡슐 (등록상표)보다 상당히 독성이 크고, 탁솔 (등록상표)의 독성에 현저하게 기여하는 것을 나타낸다. 문헌에서 과민감성의 원인은 불명확하지만, 이러한 데이터에 기초하여 본 발명자들은 HSR이 탁솔 (등록상표) 비히클에 기여할 수 있다고 생각한다.

<585>

<실시예 5>

<586>

마우스의 정맥내 다중 투여후 캡슐 (등록상표) 및 탁솔 (등록상표)의 LD<sub>0</sub>의 측정

<587>

캡슐 (등록상표) 및 BMS-탁솔 (등록상표)의 LD<sub>50</sub> 및 그들의 담체를 하기 정맥내 단일 투여로 비교하였다. 총 32 마리의 CD1 마우스가 사용되었다. 30, 69 및 103 mg/kg의 파클리탁솔 투여량을 포함하는 캡슐 (등록상표)이 연속 5일 동안 매일 투여되었다. 4, 6, 9, 13.4 및 20.1 mg/kg의 파클리탁솔 투여량을 포함하는 탁솔 (등록상표)을 연속 5일 동안 매일 투여하였다. 4마리의 마우스에게 각 농도를 투약하였다. 결과를 표 3에 나타낸다.

표 3

<588>

정맥내 다중 투여

군	투여량 (mg/kg)	동물의 수	치사 수	생존 수	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	MTD 또는 LD <sub>10</sub>
캡슐 (등록상표)	103	4	4	0	76	64
	69	4	1	75		
	30	4	0	100		
탁솔 (등록상표)	20.1	4	4	0	8.0	4.3
	13.4	4	4	0		
	9	4	2	50		
	6	4	1	75		
	4	4	0	100		

<589> 본 결과는 캡슐 (등록상표)이 탁솔 (등록상표)보다 독성이 작음을 나타낸다. 캡슐 (등록상표)의 LD<sub>50</sub> 및 LD<sub>10</sub>은 개별적으로 76.2 및 64.5 mg/kg의 파클리탁셀이고, 이에 비하여 탁솔 (등록상표)에서는 개별적으로 8.07 mg/kg 및 4.3 mg/kg의 파클리탁셀이다. 본 연구에서 캡슐 (등록상표)에 대한 LD<sub>50</sub>은 탁솔 (등록상표)보다 9.4배 높았다. 캡슐 (등록상표)에 대한 LD<sub>10</sub>은 탁솔 (등록상표)보다 캡슐 (등록상표)의 경우가 15배 높았다. 본 연구의 결과는 매일 간격에서 다중 투여량으로 투여될 때 캡슐 (등록상표)이 탁솔 (등록상표)보다 독성이 작음을 제시한다.

<590> <실시예 5>

<591> 캡슐 (등록상표) 및 탁솔 (등록상표)의 두 제제의 독성 및 효능

<592> 본 연구는 MX-1 사람 유방 종양 분획을 이식한 암컷 무흉선 NCR-nu 마우스에서 캡슐 (등록상표), 탁솔 (등록상표) 및 탁솔 (등록상표) 비히클의 효능을 측정하기 위해 수행되었다.

<593> 각 5마리의 마우스군에게 5일 동안 13.4, 20, 30, 45 mg/kg/day의 투여량으로 캡슐 (등록상표) 제제 VR-3 또는 VR-4를 정맥내 주사하였다. 또한 5마리의 마우스군에게 5일 동안 13.4, 20 및 30 mg/kg/day의 투여량으로 탁솔 (등록상표)을 정맥내 주사하였다. 10마리의 마우스 표준군에게 5일 동안 캡슐 (등록상표) 비히클 표준(사람의 알부민, 600 mg/kg/day)을 정맥내 주사하여 치료하였다. 평가 매개변수는 완전한 종양 퇴행의 수, 완전한 퇴행의 평균 기간, 종양이 없는 생존자 및 종양 재발이었다.

<594> 캡슐 (등록상표) 제제 VR-3의 치료는 모든 투여량 농도에서 완전한 종양 퇴행을 일으켰다. 가장 높은 2종의 투여량에서도 103일후 100% 생존율을 얻었다. 캡슐 (등록상표) 제제 VR-4는 가장 높은 3종의 투여량군에서 완전한 종양 퇴행을 일으켰고, 13.4 mg/kg/day에서는 60% 퇴행을 나타냈다. 103일후 생존율은 제제 VR-4의 경우 다소 낮았다. 30, 20 및 13.4 mg/kg/day에서의 탁솔 (등록상표) 치료는 103일후 각 40%, 20% 및 20%의 생존율을 나타냈다. 표준 비히클의 치료는 종양 성장에 어떠한 효과도 나타내지 않았으며, 33 내지 47일 후에 동물을 희생시켰다. 결과를 표4에 나타낸다.

**표 4**

<595>

투약량 (mg/kg /일)	CR/총			TSF/TR			DCR(일)			비특정 치사/총		
	VR-	VR-	TAX	VR-3	VR-4	TAX	VR-3	VR-4	TAX	VR-	VR-4	TAX
45	5/5	5/5	NA	5/0	3/2	NA	>88	>73	NA	0/5	0/5	NA
30	5/5	5/5	4/4	5/0	5/0	2/2	>88	>88	>56	0/5	0/5	1/5
20	5/5	5/5	4/4	1/4	2/3	1/3	>51	>47	>57	0/5	0/5	1/5
13	4/5	3/5	4/5	0/5	0/5	1/4	10	8	>29	0/5	0/5	0/5

<596> CR = 완전한 종양 퇴행

<597> TFS = 종양이 없는 생존자

<598> TR = 종양 재발

<599> DCR = 완전한 퇴행 일수

<600> 이러한 예기치 않고 놀라운 결과는 탁솔과 비교하여 2종의 캡슐 (등록상표) 제제에 대한 증가된 효능을 나타낸다. 또한, 파클리탁셀의 보다 높은 투여량이 제제의 보다 낮은 독성으로 인해 캡슐 (등록상표) 군에서 달성된다. 이러한 높은 투여량은 농축액 주사액으로서 투여되었다.

<601> <실시예 5>

<602> 쥐의 정맥내 1회 투약후 <sup>3</sup>H-탁솔 (등록상표) 및 캡슐 (등록상표)에 대한 혈액 역학 및 조직 분포

<603> 캡슐 (등록상표) 내 제제화된 <sup>3</sup>H-파클리탁셀과 탁솔 주사액 농도의 약물동력학 및 조직 분포를 비교하기 위한 2종의 연구가 수행되었다. 14마리의 수컷 쥐에게 10 mg/kg의 <sup>3</sup>H-탁솔 (등록상표) 및 10마리의 쥐에게 4.9 mg/kg

을 정맥내 주사하였다. 10마리의 수컷 쥐에게 5.1 mg/kg의 상기<sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)을 정맥내 주사하였다.

<604> 총 방사능 및 파클리탁셀 모두의 농도는 <sup>3</sup>H-탁셀 (등록상표) 또는 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)의 5 mg/kg I.V. 농축과 투약 후 이상성으로 감소한다. 그러나, 총 방사능 및 파클리탁셀 모두의 농도는 유사한 <sup>3</sup>H-탁셀 (등록상표)을 투약하고 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)을 투여한 후 현저하게 보다 낮아진다. 이러한 보다 낮은 농도는 혈액 외부로 보다 신속하게 분포된다.

<605> 혈액 HPLC의 프로파일은 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표) 및 <sup>3</sup>H-탁셀 모두를 위한 고도로 극성인 대사물질에 대한 대사의 유사 패턴을 나타낸다. 그러나, 대사 속도는 <sup>3</sup>H-탁셀의 27.7%에 비해 파클리탁셀 투약 24시간 후 44.2%의 혈액 방사능이 존재하는 바와 같이 <sup>3</sup>H-캡슐에 대해 현저하게 보다 낮게 나타난다. 방사능의 방출은 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)에 대해 뇨에서 단지 최소로 및 분변에서 주로 발생하며, 이는 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)에 대해 보고된 방출 패턴과 유사하다. 5 mg/kg으로 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표) 또는 <sup>3</sup>H-탁셀의 I.V. 투여 후 총 방사능 및 파클리탁셀에 대한 혈액동력학을 표5에 나타낸다.

표 5

치료	AUC <sub>0-24</sub> (mg eq.hr/ml)	외삽된 C <sub>0</sub> (mg eq/ml)	관찰된 C <sub>max</sub> (mg eq/ml)	관찰된 T <sub>max</sub> (hr)	t <sub>1/2β</sub> (hr)
총 방사능					
<sup>3</sup> H-캡슐 (등록상표)	6.1	7.6	4.2	0.03	19.0
<sup>3</sup> H-탁셀 (등록상표)	10.2	19.7	13.5	0.03	19.7
파클리탁셀	3.7	7.0	4.0	0.03	11.4
<sup>3</sup> H-캡슐 (등록상표)	5.4	17.1	11.8	0.03	7.2
<sup>3</sup> H-탁셀					

<607> 조직 방사능 농도는 14개 조직 중 12개에 대한 <sup>3</sup>H-탁셀 투여 후보다 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표) 투여 후 보다 높아진다. 조직/혈액 ppm 비율은 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)이 투약된 동물에 대한 모든 조직에서 보다 높지만, 혈액 농도는 보다 낮다. 이는 혈액으로부터 혈액동력학 데이터에 의해 제시된 조직으로의 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)의 신속한 분포를 보조한다.

<608> 캡슐 (등록상표)에 제제화된 <sup>3</sup>H-파클리탁셀은 주사액 농도에 대하여 탁셀 (등록상표)에 제제화된 <sup>3</sup>H-파클리탁셀과 유사한 약물동력학적 프로파일을 나타내지만, 조직/혈액 ppm 비율 및 대사 속도는 현저하게 상이하다. 혈액 샘플의 투여 2분 후, 탁셀 (등록상표) 치료된 동물에 대한 것보다 현저하게 낮은 농도의 캡슐 (등록상표)로 치료된 동물에 대한 총 방사능은 <sup>3</sup>H-캡슐이 혈액 외부로 보다 신속하게 분포됨을 나타낸다. 그러나, 대사 속도는 <sup>3</sup>H-탁셀의 28%에 비해 파클리탁셀 투약 24시간 후 44%의 혈액 반응성이 존재하는 바와 같이 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)에 대해 현저하게 보다 낮게 나타난다.

<609> 캡슐 (등록상표)에 대한 이러한 발견은 놀라운 것이고, 탁셀과 비교하여 파클리탁셀의 지속 활성을 성취하기 위한 신규 제제를 제공한다. 국부적인 높은 농도와 함께, 이러한 향상된 활성은 1차 종양 또는 높은 국부적인 농도를 갖는 기관에서 전이의 치료에 증가된 효능을 나타내야만 한다. 조직 분포를 하기 표6에 나타낸다. 데이터는 각 군에 있어서 10마리의 쥐의 평균 및 표준 편차(캡슐 (등록상표) 및 탁셀 (등록상표))를 나타낸다.

표 6

<610> 5 mg/kg의 <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표) 및 <sup>3</sup>H-탁셀 (등록상표)의 정맥내 1회 투약후 ppm으로 나타낸 수컷 쥐의 조직내 방사능 잔사

샘플	캡슐 (등록상표)		탁셀 (등록상표)	
	평균값	±SD	평균값	±SD
뇌	0.106	0.008	0.145	0.020
심장	0.368	0.063	0.262	0.037
폐	1.006	0.140	0.694	0.057
간	1.192	0.128	1.37	0.204
신장	0.670	0.110	0.473	0.068
근육	0.422	0.120	0.386	0.035
위장관	0.802	0.274	0.898	0.243
고환	0.265	0.023	0.326	0.047
췌장	0.963	0.357	0.468	0.070
몸체	0.596	0.070	0.441	0.065
뼈	0.531	0.108	0.297	0.051
비장	0.912	0.131	0.493	0.070
전립선	1.728	0.356	1.10	0.161
정액낭	1.142	0.253	1.20	0.237
혈액	0.131	0.010	0.181	0.020
혈장	0.131	0.012	0.196	0.026

<611> 데이터는 탁셀 (등록상표)과 비교하여 여러 기관에 현저하게 보다 높은 농도의 캡슐 (등록상표)이 축적됨을 나타낸다. 이러한 기관에는 전립선, 췌장, 신장, 폐, 심장, 뼈 및 비장이 포함된다. 따라서, 캡슐 (등록상표)은 이러한 기관의 암의 치료에 있어서 파클리탁셀의 동일 농도에서 탁셀 (등록상표)보다 효과적일 수 있다.

<612> 전립선 조직에서의 농도는 전립선암의 치료에 있어서 특별한 관심이 있다. 이 놀랍고 예기치않은 결과는 전립선암의 치료와 밀접한 관련이 있다. 하기 표7은 탁셀 (등록상표)와 비교하여 전립선에 캡슐 (등록상표)에 대한 파클리탁셀의 증가된 축적을 나타내는 개별 쥐(각 군에 10마리)에 대한 데이터를 나타낸다. 전립선내의 국부화에 대한 근거는 제제의 입자 크기(20 내지 400 nm) 또는 특이 막 수용체(gp 60, gp 18, gp 13등)를 통한 전립선 조직내로의 국부화를 야기할 수 있는 단백질 알부민의 제제 내 존재의 결과일 수 있다. 또한, 알부민이 아닌 다른 생체적합하고, 생분해가능한 중합체가 전립선과 같은, 상기 기술한 특성의 결과로 이러한 조직내에 파클리탁셀의 높은 국부 농도를 나타내는 특정 조직에 대한 특이성을 나타낼 수 있다. 그러한 생체적합성 물질이 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 전립선내에 파클리탁셀의 높은 국부 농도를 성취하기 위한 조성물의 바람직한 실시양태는 20 내지 400 nm의 입자 크기를 갖는 파클리탁셀 및 알부민을 포함하고 크레모포어를 함유하지 않는 제제이다. 이 실시양태는 또한 동일량의 탁셀 (등록상표)과 비교할때 췌장, 신장, 폐, 심장, 뼈 및 비장에서 파클리탁셀이 보다 높은 농도를 나타내는 것으로 입증되어 왔다.

**표 7**

<613> 5 mg/kg의 파클리탁셀을 투약한 각 군의 10마리의 쥐에 대한 데이터

캡슐 (등록상표)		탁솔 (등록상표)	
	1.228		1.13
	2.463		1.04
	1.904		0.952
	1.850		1.42
	1.660		0.31
	1.246		1.08
	1.895		1.03
	1.563		0.95
	1.798		0.94
	1.576		1.18
평균	1.728	평균	1.103
SD	0.36	SD	0.16

<614> 이 데이터는 전립선에 대한 캡슐 (등록상표)의 국부화가 탁솔 (등록상표)에 비교하여 약 150%임을 나타낸다.

<615> 캡슐 (등록상표) 제제에 있어서 전립선에 대하여 이러한 예기치않은 파클리탁셀의 국부화는 그러한 기관에 영향을 주는 다른 질환 상태의 치료, 예를 들면 전립선염(전립선의 염증 및 감염)의 치료를 위한 유사한 제제로서의 항생제와 같은 전립선에 약물학적으로 활성인 다른 작용제의 전달을 촉진할 수 있고, 양성 전립선 비대체의 치료에 유효한 치료 작용제가 높은 국부 전달을 성취하기 위해 유사한 형태로 제제화될 것이다. 유사하게, 캡슐 (등록상표)이 심장에 높은 국부 농도를 제공한다는 놀라운 발견은 재협착 뿐만 아니라 관상 동맥내 아테롬성경화증의 치료를 촉진할 수 있다. 파클리탁셀은 재협착 및 아테롬성경화증의 예방에 치료 효과가 있음이 입증되어 왔고, 따라서 캡슐 (등록상표)은 이상적인 비히클이다. 또한, 중합된 알부민이 가능하게는 gp 60, gp 18 및 gp 13 수용체를 통해서 염증성 내피 관에 선택적으로 결합됨이 입증되어 왔다.

<616> <실시예 60>

<617> 쥐의 정맥내 다중 투약후 파클리탁셀의 혈액 역학 및 조직 분포

<618> <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)을 사용한 연구는 9.1, 26.4, 116.7 및 148.1 mg/kg의 캡슐 (등록상표) 중 파클리탁셀의 농도 측정 투여량으로 4개의 추가군의 쥐를 치료함으로써 보충되었다. 혈액을 꼬리 정맥으로부터 수집하고 AUC<sub>0-24</sub>를 계산하였다. 24시간에서 혈액 샘플을 수집, 추출하고 추출물을 HPLC상에 주입하여 혈액내의 모화합물의 농도를 측정하였다.

<619> <sup>3</sup>H-캡슐 (등록상표)의 I.V. 투여후 총 방사능 및 파클리탁셀에 대한 혈액동력학을 표8에 나타낸다.

**표 8**

군/투여량 (mg/kg)	AUC <sub>0-24</sub> (μg eq.hr/ml)	외삽된 C <sub>0</sub> (μg eq/ml)	관찰된 C <sub>max</sub> (μg eq/ml)	관찰된 T <sub>max</sub> (hr)	t <sub>1/2β</sub> (hr)
A/9.1	11.5	10.2	7.19	0.03	22.3
B/26.4	43.5	44.8	29.5	0.03	16.0
C/116.7	248.9	644.6	283.3	0.03	8.48
D/148.1	355.3	1009.8	414.2	0.03	9.34

<621> 파클리탁셀의 투여량이 증가함에 따라, 곡선하의 면적은 그에 비례하여 증가했다. 24시간후 모화합물의 농도는 8.5(0.04 ppm 내지 0.34 ppm)의 인자에 의해 9 mg/kg에서 148 mg/kg으로 증가했다.

<622> <실시예 61>

<623> 쥐의 정맥내 1회 투여후 캡슐 (등록상표) 및 탁솔 (등록상표)의 독성 측정

- <624> 본 연구의 목적은 수컷 및 암컷 쥐에게 1회 I.V. 투여후 캡슐 (등록상표)의 독성을 측정하는 것이었다. 캡슐 (등록상표)을 6마리의 수컷 및 6마리의 암컷 쥐에게 5, 9, 30, 90 및 120 mg/kg의 투여량으로 투여하였다. 각 투여량 군의 동물중 1/2을 8일차에 안락사시키고, 부검하였다. 나머지 동물들은 31일차에 부검하였다. 캡슐 (등록상표) 치료된 동물들의 결과를 일반 식염수 및 비히클 표준군의 결과 뿐만 아니라 5, 9 및 30 mg/kg의 탁솔 (등록상표)로 치료된 동물의 결과와 비교하였다.
- <625> 투약 직후, 투여후 1시간 및 4시간, 및 이후 매일 1회씩 동물을 검사하였다. 안락사 이전에 혈액학적 및 혈청 측정을 위하여 각 동물로부터 혈액을 수집하였다.
- <626> 30일의 관찰 기간동안 13건의 치사가 발생하였다. 30 mg/kg 파클리탁셀의 투여량에서 탁솔 (등록상표)로 치료된 모든 12마리의 동물은 4일차에 모든 동물이 치사되었다. 캡슐 (등록상표)로 치료된 동물은 오직 한 마리만이 치사하였다. 캡슐 (등록상표)로 치료된 동물은 90 mg/kg을 수용하고, 15일차에 치사하였다. 캡슐 (등록상표)로 치료된 어떠한 다른 동물도 90 kg 또는 120 mg/kg의 투여량에서 치사하지 않으며, 따라서, 치사는 치료와 관련되는 것으로 생각되지 않는다.
- <627> 최초 4시간의 관찰 기간동안, 입모 및 비틀걸음이 탁솔 (등록상표)로 치료된, 아마도 약물의 알콜 함량으로 인해 대다수의 동물에게서 관찰되었다. 입모는 캡슐 (등록상표)로 치료된 소수의 동물에서 나타났다. 30 mg/kg의 파클리탁셀 투여량에서 탁솔 (등록상표)로 치료된 동물은 입모 및 기면상태가 관찰되었고 4일차에 치사하였다. 캡슐 (등록상표) 치료된 동물에서는 90 mg/ml 및 120 mg/ml 투여량 농도에서 몇차례의 입모가 발생한 것을 제외하고 어떠한 명백한 독성 징후도 나타나지 않았다.
- <628> 캡슐 (등록상표) 치료된 동물에서는 어떠한 비정상도 보고되지 않았다. 8일 및 13일에 대한 전반적인 부검 결과는 정상적이었다. 투여량에 관련된 현저한 변화가 캡슐 (등록상표)로 치료한 동물의 남성 생식 기관에서 나타났다. 종종 다중병소의 간질성 림프구의 침입을 수반하는 부고환 관의 상피성 세포의 변성 및 공포화가 관찰되었다. 캡슐 (등록상표)의 투여량이 증가함에 따라, 고환내에서 수정 세관의 심각한 위축이 증가하는 것이 나타났다. 병리학자의 의견에 있어서, 9, 30, 90 및 120 mg/kg의 캡슐 (등록상표)로 치료된 동물의 남성 생식 기관에서 현저한 손상이 관찰되었다. 이러한 변화는 고환의 확산 변성 및 괴사와 관련된다. 이러한 변화는 보다 높은 투여량의 캡슐 (등록상표)을 수용한 동물에서 가장 널리 퍼져있었다. 치료하지 않은 표준 동물, 비히클 표준 동물 또는 탁솔 (등록상표)로 치료한 동물은 고환에서 어떠한 변화도 나타나지 않았다.
- <629> 이러한 발견은 예기치않은 것이고 전립선암과 같은 호르몬 의존성 암의 치료에 현저한 치료학적 관련성을 갖는다. 고환의 제거(고환절제술(orchietomy))은 전립선암의 치료에 대한 치료학적 접근법이다. 캡슐 (등록상표)은 그러한 위치에 파클리탁셀의 높은 국부 농도를 성취하고, 활성 원료의 활성을 유지하고, 고환의 기능을 감소시키고 독성의 크레모포어 포낭없이 이러한 질환을 치료하기 위한 신규 제제를 나타낸다. 따라서, 캡슐 (등록상표)을 이용한 치료는 테스토스테론 및 다른 남성호르몬의 농도를 감소하게 한다.
- <630> 대뇌 피질 괴사는 탁솔 (등록상표) 치료된 동물의 중간 투여량 농도에서 나타났다. 이는 보다 높은 투여량의 탁솔로 치료된 동물의 치사를 설명할 수 있다. 캡슐 (등록상표)로 치료한 동물에서는 어떠한 대뇌 손상도 나타나지 않았다.
- <631> 이러한 대뇌 또는 신경상 독성의 결여는 놀라운 것이고, 뇌중양의 치료 및 쥐에 있어서 5 내지 120 mg/kg(사람에 있어서 30 내지 700 mg/m<sup>2</sup>의 투여량과 동일함)의 높은 조직 투여량을 성취하는 능력 모두에 있어서 현저한 관련성을 갖는다.
- <632> 요약하면, 캡슐 (등록상표)은 탁솔 (등록상표)보다 상당히 독성이 낮았다. 9 mg/kg보다 높은 투여량에서 탁솔 (등록상표)로 치료된 어떠한 동물도 생존하지 못했다. 90 mg/kg의 캡슐 (등록상표)에서 우발적인 치사를 제외하고, 캡슐 (등록상표)을 수용한 모든 동물은 120 mg/kg이하의 투여량에서 생존하였다. 남성 생식기관 및 체중 억제에 관한 캡슐 (등록상표)의 높은 투약량에 관련된 효과가 존재하였다. 암컷 쥐는 120 mg/kg 이하로 캡슐 (등록상표)을 투여하는 것에 의한 임의의 독성 효과를 입증하지 못했다. 이러한 높은 투여량은 농축피 투여량으로 투여되고, 사람에게 있어서 30 내지 700 mg/m<sup>2</sup>의 투여량과 동일하였다.
- <633> <실시예 6>
- <634> 정맥내 투여후 시클로스포린 나노입자(캡소린(Capsorine) I.V.)에 대한 약물동력학적(PK) 데이터(산도즈(Sandoz)에서 시판중인 샌드임뮌(Sandimmune) I.V. 제제와 비교)

<635> 상기와 같이 제조된(실시에 13 및 14) 시클로스포린의 나노입자(캡소린 I.V.)를 식염수에서 복원하고 정맥내 농축피로써 3마리의 스프라그 돌리 쥐의 첫번째군에 투여하였다. 3마리 쥐의 두번째군에 크레모포어/에탄올을 포함하는 샌드임툼 I.V.를 식염수에 희석시킨후 투여하였다. 각군은 2.5 mg/kg의 시클로스포린의 동일 투여량을 수용하였다. 혈액 샘플을 0, 5, 15, 30(분) 및 1, 2, 4, 8, 24, 36 및 48(시간)에 취하였다. 혈액중 시클로스포린의 농도는 HPLC에 의해 분석되고 전형적인 PK 매개변수가 측정되었다. PK 곡선은 하기와 같은 시간동안 전형적인 쇠퇴를 나타냈다.

<636>

	시간 동안의 쇠퇴	
	AUC, mg-hr/ml	Cmax, ng/ml
캡소린 I.V.	12,228	2,853
샌드임툼 I.V.	7,791	2,606

<637> 또한, 샌드임툼 I.V. 제제의 독성으로 인해, 군중의 3마리의 쥐중 2마리는 투약후 4시간내에 치사하였다. 따라서, 본 발명에 따른 나노입자 제제 (캡소린 I.V.)는 시판중인 제제 (샌드임툼 I.V.)와 비교하여 보다 큰 AUC 및 독성이 없음을 나타낸다.

<638> <실시에 63>

<639> 경구 투여후 네오랄(Neoral, 산도즈에서 시판중인 제제)와 비교한 시클로스포린 나노점액(경구용 캡소린)에 대한 약물동력학적(PK) 데이터

<640> 상기와 같이 제조된 시클로스포린 나노점액을 경구 위관영양법에 의해 3마리의 스프라그 돌리 쥐의 첫번째군에 오렌지 주스로 투여하였다. 3마리의 쥐의 두번째군에 시판중인 에멀전화제가 포함된 미소에멀전 제제를 또한 위관영양법에 의해 오렌지 주스로 희석시킨후 투여했다. 각 군은 동일한 오렌지 주스의 용적중 12 mg/kg의 시클로스포린의 동일 투여량을 수용하였다. 혈액 샘플을 0, 5, 15, 30(분) 및 1, 2, 4, 8, 24, 36 및 48(시간)에 취하였다. 혈액중 시클로스포린의 농도는 HPLC에 의해 분석되고 전형적인 PK 매개변수가 측정되었다. PK 곡선은 하기와 같은 시간동안 전형적인 쇠퇴를 나타냈다.

<641>

	시간 동안의 쇠퇴	
	AUC, mg-hr/ml	Cmax, ng/ml
경구용 캡소린	3,195	887
네오랄	3,213	690

<642> 따라서, 본 발명의 나노점액 제제 (경구용 캡소린)은 시판중인 제제 (네오랄)과 유사한 PK 거동을 나타낸다.

<643> <실시에 64>

<644> 캡슐 (등록상표)을 사용한 임상학적 조사 : 목적 및 장점

<645> 단계 I/II에 대한 초기 투여량을 선택하기 위한 이론적 근거는 탁솔 (등록상표) 제제와 비교한 캡슐 (등록상표) 제제에 대한 매우 낮은 예비 임상학적 독성 데이터에 기초할 것이다. 상기 예비 임상학적 데이터는 단계 I/II 연구에 대한 캡슐 (등록상표)의 초기 투약 농도가 탁솔 (등록상표) 제제에 있어서 파클리탁셀에 대해 성립된 MTD(최대 허용 투여량)를 사용할 것임을 나타내고 있다.

<646> 현재 예비 임상학적 데이터에 기준하여, 시장에서 허용되기 위한 임상학적 목적은 파클리탁셀의 투여전에 예비 약물에 대한 필요성을 제거하고, 탁솔 (등록상표)과 동일한 캡슐 (등록상표)의 투여량, 즉 동일한 항종양 반응을 얻을 수 있는 투여량을 결정하고, 파클리탁셀 투여를 위해 연속적인 I.V. 주입(3 내지 4시간)의 필요성을 제거 및 보다 짧은 기간(1시간 미만 또는 농축피)에 걸친 투여로 대체하는 것이다.

<647> 파클리탁셀을 위한 캡슐 (등록상표) 제제에는 다수의 유효한 장점이 있다. 캡슐 (등록상표)은 단지 파클리탁셀과 사람의 혈청 알부민만을 포함하는 동결건조된 분말이다. 동결건조된 분말의 복원시 형성된 콜로이드 용액의 성질로 인하여, 크레모포어(BMS의 파클리탁셀 제제 내) 또는 폴리소르베이트 80(롱 블랑의 도세탁셀 제제 내)와 같은 독성 에멀전화제, 및 약물을 용해시키기 위한 에탄올과 같은 용매가 필요하지 않게 된다. 독성 에멀전화제를 제거하는 것은 탁솔 (등록상표)과 같은 생성물로부터 발생한다고 공지되어 있는 심한 과민반응 및 아나필락시의 발생을 감소시킬 것이다.

- <648> 또한, 약물의 투여 이전에 스테로이드 및 항히스타민을 사용하는 어떠한 예비 약물치료도 선행되지 않는다.
- <649> LD<sub>10</sub>/LD<sub>50</sub> 연구에 의해 증명된, 감소된 독성으로 인해, 보다 높은 투여량이 사용되어 보다 큰 효능을 얻게 된다.
- <650> 골수억제에 있어서의 감소(탁술 (등록상표)과의 비교)는 치료 주기 기간(현재 3주일)의 감소 및 치료학적 성과를 개선할 것으로 기대된다.
- <651> 캡슐 (등록상표)은 탁술 (등록상표) (0.6 mg/ml)과 비교하여 보다 높은 농도(20 mg/ml 이하)에서 투여될 수 있고, 보다 낮은 주입 용적을 허용하며 가능하게는 정맥내 농축피로서 투여될 수 있다.
- <652> 탁술 (등록상표)에 관해 인지된 문제점은 내재하는 카테테르관에 파클리탁셀이 침전된다는 것이다. 이는 상계에 어긋나고 불완전하게 제어된 투약으로 야기된다. 신규 제제, 캡슐 (등록상표)의 콜로이드 용액의 고유 안정성으로 인해, 침전의 문제점은 완화된다.
- <653> 문헌에서는 낮은 수백 nm 크기 범위의 입자가 종양의 위치에서 누출되기 쉬운 관을 통해서 종양으로 선택적으로 분배됨을 제시하고 있다. 따라서, 캡슐 (등록상표) 제제 내의 파클리탁셀의 콜로이드 입자는 BMS 제제 내에서 투여되는 파클리탁셀의 부작용을 현저하게 감소시키고, 선택적 약물 표적화 효과를 나타낸다.
- <654> <실시예 65>
- <655> 캡슐 (등록상표)의 임상학적 시험 설계의 개요
- <656> 징후 : 전이성 유방암
- <657> 투약 계획 : 단계 I/II 시험에 대한 초기 투약량을 선택하기 위한 이론적 근거는 BMS 제제와 비교한 캡슐 (등록상표) 제제에 대한 현저하게 낮은 예비 임상학적 독성 데이터에 기초한다. 마우스에 있어서 1회 투여량 LD<sub>10</sub>은 398.1 mg/kg으로 측정된다. 이러한 투여량의 표면적 기준(mg/kg 값의 3배)으로의 전환은 1194.3 또는 약 1200 mg/m<sup>2</sup>으로 평가된다. 사람에게 대해서는 이러한 값의 절반인 1/10 투여량인 120 mg/m<sup>2</sup>의 투여량으로 출발한다. 그러나, 파클리탁셀은 175 mg/m<sup>2</sup>의 투여량에서 안전하고, 쥐에 있어서 보다 낮은 골수억제를 나타낸 캡슐 (등록상표)을 사용한 시험 연구에 기준하여, 175 mg/m<sup>2</sup>의 투여량이 캡슐 (등록상표) 제제에 대하여 안전해야만 하는 것이 이미 잘 성립되어 있다. 캡슐 (등록상표) 용액은 아마도 대략 15 내지 30분 이하에 전달된다.
- <658> <실시예 66>
- <659> 캡슐 (등록상표)의 임상학적 개발 프로그램의 개요 :
- <660> 단계 I/II 배합물 발견 연구/제한된 효능 시험
- <661> 환자/목적 : 표준 치료법에 무반응성인 진행된 유방 전이 질환을 가진 환자들. 이 시험의 목적은 전이성 유방암 환자들에게 단일 작용제로서 캡슐 (등록상표)에 대한 반응 속도를 수립하는 것이다.
- <662> 투약 - 단계 I 성분 : 시험의 단계 I 성분에 사용되는 초기 투약량은 파클리탁셀에 대해 공지된 최대 허용 투약량(MTD, 175 mg/m<sup>2</sup>)이다. 이후 투약량은 MTD에 도달할 때까지 25% 단계로 증가된다. 초기 캡슐 (등록상표) 투여량 농도의 각각에 3명의 환자가 있으며 MTD에서는 6명으로 전개된다. 다음 투여량 농도로 이동하는 능력은 반작용 패턴에 기준한다. 즉, 특정 투여량 농도에서 6명중 2명 이상의 환자가 3등급의 비-골수억제 독성 또는 4등급의 골수억제 독성(WHO 독성 등급에 대하여)을 나타낼 때마다 연구는 중단된다. 캡슐 (등록상표)에 대한 투여량은 시험이 중단되는 투여량의 바로 전단계의 투여량으로 지정된다. 매일 5시간 또는 24시간 주입과 같은 약물 투여의 별도 계획이 초기, 1회 투여량 농축피 계획의 결과에 기준하여 필요한 경우 조사될 수 있다.
- <663> 약물동력학 : 선택된 환자에 대하여, 완전한 약물동력학적 연구가 적절하게 지정된 시점에서 수집된 혈청을 사용하여 수행된다. t<sup>1/2</sup> (α, β 단계), AUC, C<sub>max</sub>, 제거율 및 분배 용적과 같은 매개변수가 측정된다.
- <664> 환자 - 단계 II 성분 : MTD를 정한후, 원형의 파클리탁셀 시험에 사용된 것과 유사한 유방암 환자가 단계 II 성분으로 선택된다. 명수는 95% 신뢰 구간에서 허용할 수 있는 정확도로 종양 반응 속도를 수립하기 위한 요구에 기준한다. 그러한 경우, 연구는 캡슐 (등록상표)에 대하여 기대되는 반응 속도를 포함하는 신뢰 구간을 나타냄으로써 표준 파클리탁셀과의 동일성을 수립하는 단일 목적이 주어진다. 사용되는 환자 샘플의 크기는 30 명이고, 이는 단계 I/II 연구의 단계 II 성분으로 일반적이다.

<665> 측정 : 일차 결과는 등록된 환자에 대한 종양 반응 속도(CR/PR)이다. 또한, 반응에 대한 시간, 반응 지속 시간 및 생존 시간이 검사된다. 치료의 안정성이 또한 반작용 비율 및 표준 실험 매개변수에 있어서의 변화로부터 평가된다.

**도면의 간단한 설명**

<89> 도 1은 종양을 앓는 마우스 (각 군당 n=5)로의 파클리탁셀 나노입자의 정맥내 투여 결과를 나타낸 것이며, 염수를 투여받는 대조군 (●)에 비해 치료군 (■) 중 종양의 완전한 퇴행을 나타낸다. 실질적으로 비조절된 종양 증식이 대조군에서 나타난다. 치료군의 투여량은 5 일간 연속적으로 정맥내 식피로서 투여되는 파클리탁셀 20 mg/kg이다.

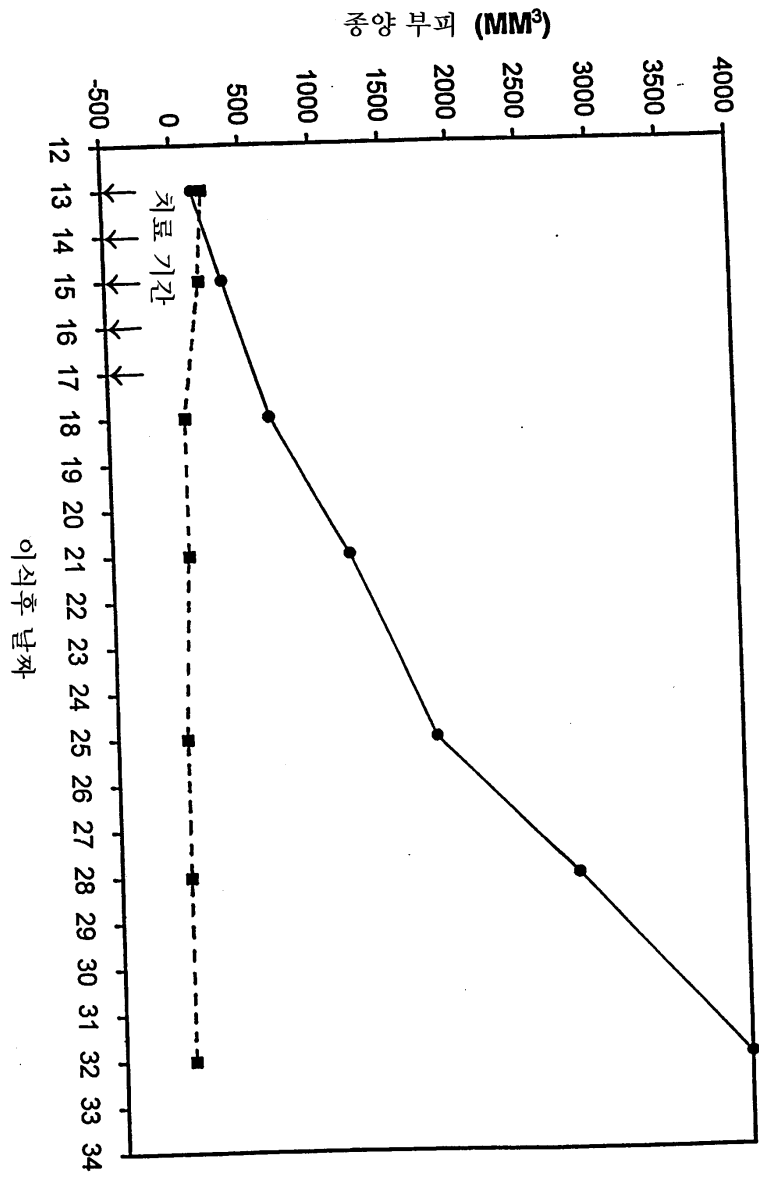
<90> 도 2는 앞발에 관절염이 진전된 래트로의 파클리탁셀 나노입자의 복강내 투여 후 피내 콜라겐 주입 결과를 나타낸 것이다. 앞발의 부피를 측정하고, 질환의 심각도를 기재하였다. 앞발의 부피는 치료 개시점에서 100%로 하였다. 0 번째 날은 치료 개시를 나타낸다. 3 개의 군-염수를 투여받는 대조군 (n=2, 실선으로 표기되고 도 안에 "비치료"로 표시됨); 파클리탁셀 나노입자를 1 mg/kg의 투여량으로 투여받는 제1 치료군 (n=4, 굵은 선으로 표기되고 도 안에 "파클리탁셀 나노입자 1.0 mg/kg으로 표시됨); 및 파클리탁셀 나노입자 0.5 mg/kg의 투여량 및 프레드니손 0.2 mg/kg의 투여량의 조합물을 투여받는 제2 치료군 (n=4, 굵은 선으로 표기되고 도 안에 "프레드니손 0.2 mg/kg + 파클리탁셀 나노입자 0.5 mg/kg으로 표시됨)이 있다. 대조군이 같은 기간 동안 앞발 부피가 증가하는데 비해, 2 개의 치료군은 관절염이 퇴행하면서 같은 기간 동안 앞발 부피의 극적인 감소를 나타내었다.

<91> 삭제

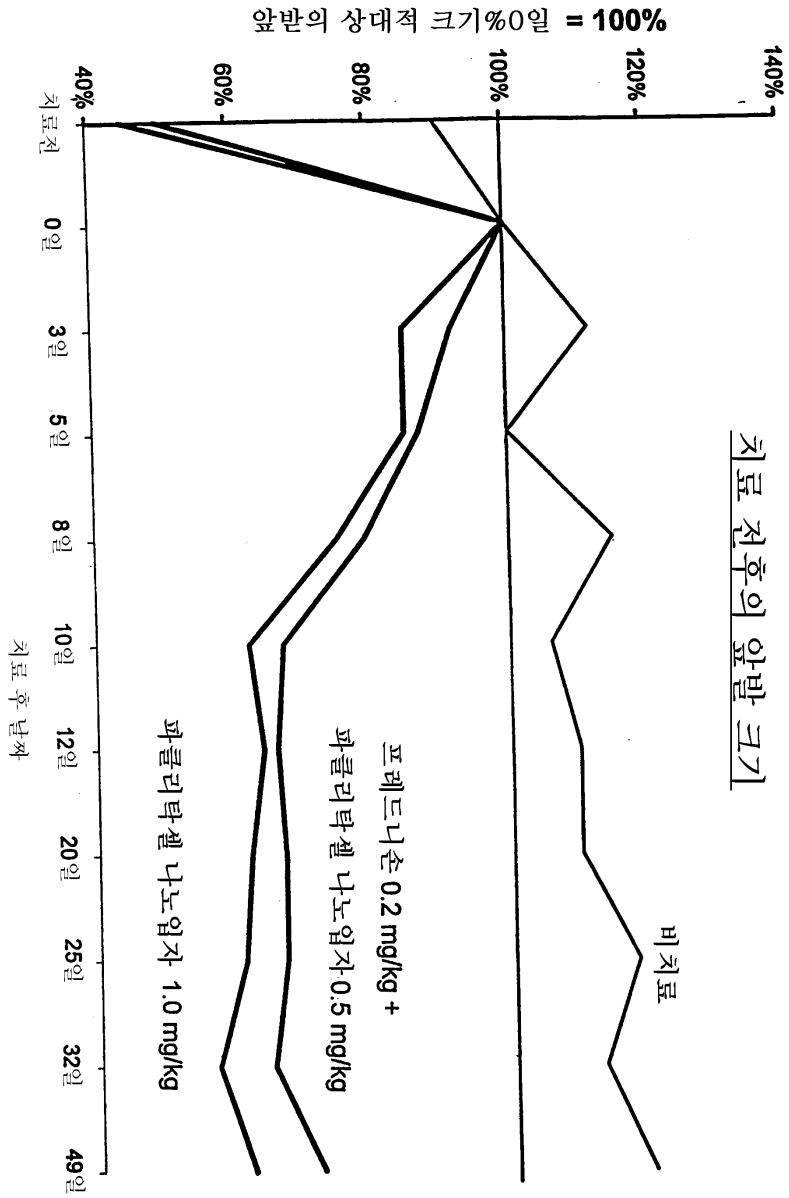
<92> 삭제

도면

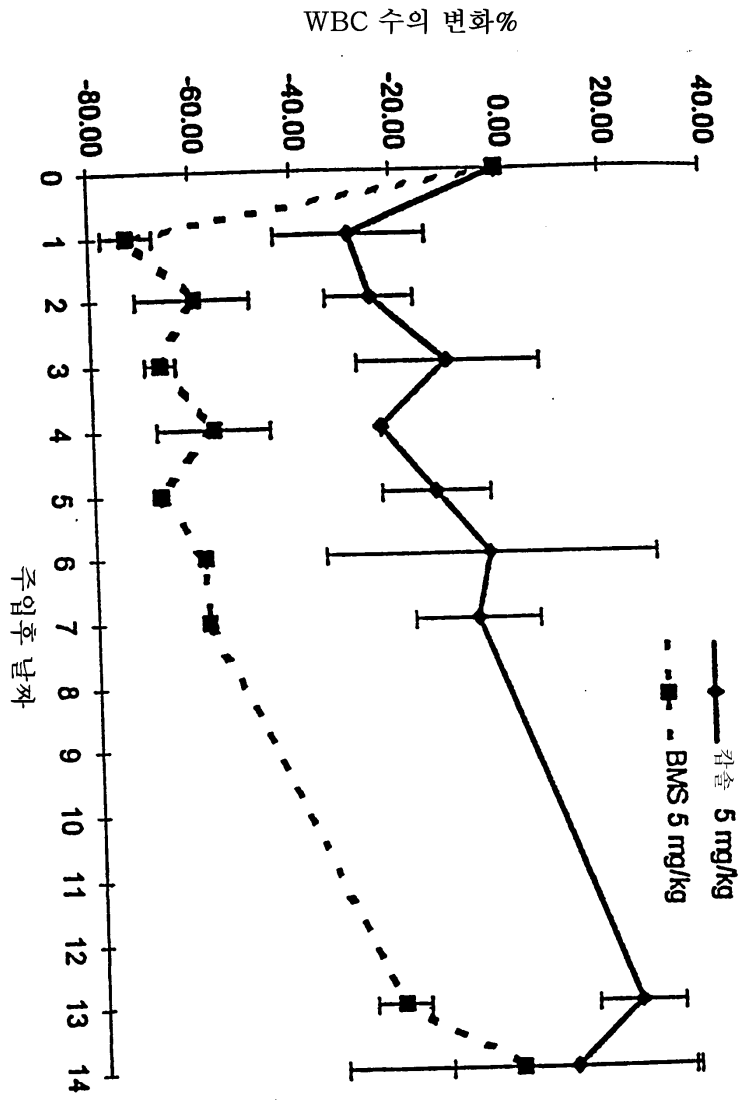
도면1



도면2



도면3



도면4

