



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0053843
 (43) 공개일자 2014년05월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 9/127 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)
 A61K 49/18 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7023246
- (22) 출원일자(국제) 2012년01월31일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년09월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/051507
- (87) 국제공개번호 WO 2012/104275
 국제공개일자 2012년08월09일
- (30) 우선권주장
 11305096.7 2011년01월31일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 61/437,817 2011년01월31일 미국(US)

- (71) 출원인
 나노비오텍스
 프랑스공화국, 75012 파리, 튀 드 바띠뉴, 60
- (72) 발명자
 뽀띠에, 아그네스
 프랑스공화국, 에프-75006 파리, 튀 노트르 담 데 샹, 77
- 레비, 로랭
 프랑스공화국, 에프-75014 파리, 불르바르 라스빠 일 246
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인오리진

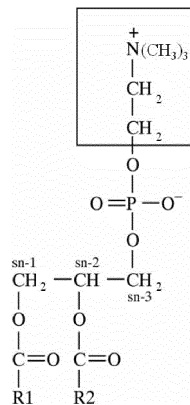
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **나노입자 전달 시스템, 이의 제조 및 용도**

(57) 요약

본 발명은 건강 분야, 특히 인간 건강 분야에서 사용될 수 있는 나노입자를 캡슐화하는 감열성 리포솜에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 전술된 감열성 리포솜을 포함하는 약학 및 진단 조성물, 및 이들의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

데이르, 마리-에디뜨

프랑스공화국, 에프-75012 파리, 볼르바르 쉘, 65

제르맹, 마띠유

프랑스공화국, 에프-94500 샹삐뉴 쉬르 마른느, 바
띠망 4, 아브뉴 막스 도르무와 3

특허청구의 범위

청구항 1

겔-액정 상 전이온도(Tm) 이상에서 파열되는 감열성 리포솜으로서,

상기 리포솜은 나노입자를 캡슐화하는 감열성 지질막을 포함하고, 상기 나노입자는 치료제 또는 진단제로서 사용될 수 있고,

각 나노입자는 i) 최대 치수가 약 100 nm 미만인 무기 코어를 포함하고, ii) 나노입자의 표면에 -20 mV 미만 또는 +20 mV 초과와 정전하(electrostatic charge)를 유발하는 제제에 의해 완전히 코팅되며,

상기 정전하는 현탁액 중 나노입자의 농도가 0.2 내지 8 g/L인 경우, pH 6 내지 8의 수성 매질에서 제타 전위 측정법에 의해 측정되는 것인, 감열성 리포솜.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 감열성 지질막은 적어도 포스파티딜콜린을 포함하는 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 감열성 지질막은 콜레스테롤을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 감열성 지질막은 디팔미토일포스파티딜콜린, 수소화 대두 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 디스테아릴포스파티딜에탄올아민-메톡시폴리에틸렌글리콜을 포함하는 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 감열성 지질막은 디팔미토일포스파티딜콜린, 디스테아릴포스파티딜에탄올아민-메톡시폴리에틸렌글리콜 및 모노팔미토일포스파티딜콜린 또는 모노스테아릴포스파티딜콜린을 포함하는 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자의 표면에 정전하를 유발하는 제제는 두 개의 기 R 및 X를 갖는 유기분자이고,

상기 R은 아민, 포스페이트 및 카르복실레이트 중에서 선택되며, 상기 X는 카르복실레이트, 실란, 포스포닉, 포스포릭, 포스페이트 및 티올 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 나노입자는 숙신이미딜 에스테르기 및 말레이미드기 중에서 선택되는 커플링기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자는 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 호르몬, 비타민, 효소, 및 중양 항원, 호르

몬 수용체, 사이토카인 수용체 및 성장인자 수용체의 리간드 중에서 선택되는 표적화기를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 리포솜의 최대 크기는 50 내지 500 nm, 바람직하게는 50 내지 250 nm인 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 리포솜의 파열은 하진된 나노입자가 방출될 수 있게 하는 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

Tm은 39℃ 내지 45℃인 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

나노입자가 치료제로서 사용되는 경우, 각 나노입자의 코어의 최대 치수가 5 nm 내지 100 nm, 바람직하게는 10 nm 내지 50 nm인 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

나노입자가 진단제로 사용될 때, 각 나노입자 코어의 최대 치수가 2 nm 내지 10 nm인 것을 특징으로 하는 감열성 리포솜.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 감열성 리포솜 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 치료 또는 진단 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 건강 분야, 특히 인간 건강 분야에 사용될 수 있는, 제어 방출을 가능하게 하는 나노입자 전달 시스템, 특히 Tm(겔-액정 상 전이온도) 이상에서 파열되는 감열성 리포솜에 관한 것이다.

[0002] 본 발명의 감열성(thermosensitive) 리포솜(liposome)은 생리적 pH의 수성 매질에서 측정시 표면 정전하가 유리하게는 -20 mV 미만 또는 +20 mV 초과인, 나노입자를 캡슐화(encapsulating)하는 감열성 지질막(lipidic membrane)을 포함한다. 캡슐화된 나노입자는 치료제 또는 진단제로 사용될 수 있다.

[0003] 또한, 본 발명은 진술한 나노입자 전달 시스템을 포함하는 약학 또는 진단 조성물, 및 이들의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0004] 종래 치료제 또는 진단제를 사용한 의학적 치료의 한계는 특이성이 부족하다는 점이다. 실제로, 대부분의 경우, 치료제 또는 진단제의 투여량 중에 일부만이 관심 부위에 도달하고, 제제의 나머지는 신체 전체에 걸쳐 분배된다. 건강한 기관 및 조직으로의 피할 수 없는 분배는 환자에 투여될 수 있는 제제의 양을 제한하고, 결과적으로 이들 제제가 본래 달성 가능한 치료효과 또는 진단효과를 달성하는 것을 방해한다.

- [0005] 의도된 부위에 도달하는 제제의 양을 증가시킬 뿐만 아니라, 신체의 다른 건강한 부분에 전달되는 양을 감소시키는 부위 특이적 제제 전달체(delivery vehicle)에 대한 필요성이 특히 독성 화학요법 약물(toxic chemotherapeutic drug)에 대해 오랜 기간 동안 인식되었다. 이와 같이 부작용을 감소시키거나 없앨 수 있는 전달체는 치료가 상당히 덜 독성을 띠고 더 효과적이게 한다. 리포솜은 치료제 및 진단제를 위한 나노 크기 전달체로서 십여 년간 임상적으로 사용되어 왔다.
- [0006] 전달체에 있어서 가장 큰 과제는 캡슐화된 제제를 조절가능한 속도로 환부에서 특이적으로 전달체로부터 완전히 방출시키는 것이다.
- [0007] 또한, 나노입자를 위한 전달체로서의 리포솜의 사용은 특히 외부 활성화(externally activable) 나노입자에 있어서 아직 전임상 개발 단계에 있다(Al-Jamal W.T. et al. Nanomedicine, 2007; 2:85-98).
- [0008] 엔도솜막(endosomal membrane)의 불안정화를 촉진하고 양자점(quantum dot: QD) 세포질 방출에 유리한 융합성(fusogenic) 또는 pH 민감성 지질을 포함하는 PEG-지질로 제형화된 리포솜의 제조가 시험관 내에서 개시되었다(Sigot et al. Bioconjugate Chem. 2010; 21:14651472). 몇 분 내에 리포솜으로부터 이중막으로의 이동을 촉진하는 짧은 아실 사슬을 융합성 PEG-지질에 결합함으로써, 리포솜으로부터의 PEG-지질 해리를 촉진시킬 수 있다. 선택적으로는, 특정 엔도솜 구획의 산성 환경에 노출되면 폴리머 부분이 리포솜 표면으로부터 절단되는, 절단 가능한 pH-민감성 PEG 유사체를 첨가함으로써, PEG-지질이 세포 내에서 방출될 수 있다. 이와 같은 '자발' 방출이 유리할 수는 있지만(특히 원격 전이(distant metastasis)의 치료를 위해), 이는 국소환경에만 좌우되기 때문에, 리포솜 함유물 방출은 환경이 최적이지 아니라면 여전히 느릴 수 있고 전혀 일어나지 않을 수도 있다. 따라서, 이와 같은 리포솜을 가지고는 리포솜의 함유물 방출의 정밀한 제어가 가능하지 않다.
- [0009] 감광제(photosensitizer)를 포함하는 리포솜의 제조 또한 개시되었다(US 2010/0233224). 감광제는 빛 및 산소에 노출시 지질 사슬의 과산화를 통해 리포솜막의 불포화 인지질을 산화시킬 수 있다. 리포솜의 적재물(load)을 방출하기 위해, 리포솜의 광산화(photo-oxidation)가 필요에 따라 빠르게 외부 광자극을 통해 촉발될 수 있다. 산화는 리포솜막의 손상 및 그에 따른 리포솜의 함유물의 방출을 유발한다. 그러나, 표적 조직이 표면적으로 접근 가능한 곳에서만 이와 같은 광원(light source)이 사용될 수 있다. 더 깊은 조직에 통합된 리포솜은 빛에 의해 자극할 수 없다. 따라서, 감광제를 포함하는 리포솜은 인체의 깊은 기관 또는 구조에 나노입자를 전달하기 위해서는 사용될 수 없다.
- [0010] 또한, 레이저 활성화 중공 금속 나노구조(laser activable hollow metal nanostructure)가 약제를 선택적으로 방출하기 위하여 이들이 캡슐화된 리포솜막의 투과화를 촉발하는 수단으로 종래에 사용되었다(WO 2009/097480).
- [0011] US 2009004258은 상자성 산화철 나노입자 및 약제를 캡슐화하는 감열성 리포솜을 개시하는데, 상기 상자성 산화철 나노입자는 대체 자기장에 의한 활성화를 통해 표적 환경에서 약물의 특이적 또는 선택적 방출을 가능하게 한다. 그러나, 이와 같은 리포솜은 캡슐화된 나노입자가 통과할 수 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본원에서, 본 발명자는 대상체에서 나노입자의 안전한 체내(in vivo) 전달 및 제어되고 효율적인 방출을 가능하게 하는 유리한 시스템을 제공한다.
- [0013] 특히, 이와 같은 시스템은 인체의 깊은 구조에서 외부 활성화 나노입자의 전달 및 방출을 가능하게 한다. 진단 도구 및/또는 치료도구로 사용가능한 효과적인 활성화 나노입자의 예는 본 발명자에 의해 WO2007/118884, WO 2009/147214 및 WO2011/003999에 개시되었다.

과제의 해결 수단

본 발명의 요약

- [0014] 본 발명자는 Tm에서 또는 Tm 초과에서 파열되는 감열성 리포솜을 제공하며, 상기 리포솜은 나노입자를 캡슐화하는 감열성 지질막을 포함하고, 상기 나노입자의 "표면 정전하(electrostatic surface charge)"(본원에서 "전하" 또는 "표면 전하"로도 정의됨)는 생리적 pH(6 내지 8)의 수성 매질에서 측정시 -20 mV 미만 또는 +20 mV 초과이며, 상기 나노입자는 치료제 또는 진단제로 사용될 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명자는 본 발명에 따른 감열성 리포솜 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 치료 또는 진단

조성물을 제공한다.

[0017] 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 생성물, 즉 감열성 리포솜 및 조성물 중 하나 이상을 본 제품의 사용 방법을 제공하는 안내표와 함께 포함하는 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명에 따른 감열성 리포솜은 유리하게는 생물학적 환경, 특히 본원에서는 세망내피계(Reticulo Endothelial System: RES)로도 불리는 단핵식세포계(mononuclear phagocyte system)에 의한 조기 포획(premature capture) 또는 흡소닌화(opsonization)로부터 나노입자를 보호할 수 있다.

[0019] 따라서, 본 발명에 따른 리포솜은 열활성화에 따라 온전한(intact) 나노입자를 전달 및 방출할 수 있게 한다(열활성화는 온도의 생리적 증가를 통해 달성되거나, 또는 예를 들어 이온화 방사선(ionizing radiation) 또는 고강도 집속 초음파(High Intensity Focused Ultrasound)와 같은 외부활성화를 통해 달성될 수 있음). 후술되는 바와 같이, 나노입자는 원하는 부위에 방출되면 선택적으로 외부 활성화를 통해 치료제 또는 진단제로 기능할 수 있다.

[0020] 또한, 본원에 기재된 감열성 리포솜은 유리하게는 원하는 부위, 특히 대상의 신체의 깊은 부위 또는 구조에 혈관 경로를 통해 나노입자를 전달할 수 있다.

[0021] 이제 (전달에 추가하여) 나노입자 방출의 정밀하고 효율적인 제어가 또한 가능하다. 본원에 기재된 감열성 리포솜으로부터 나노입자의 방출은 T_m 을 초과하거나 T_m 과 동일한 온도 T_r 에 대해 본 발명자에 의해 입증되었다. 리포솜막 과열(막의 물리적 분해, 분열 또는 손상)을 유발하는 나노입자와 지질성 이중막 간의 상호작용은 이와 같은 놀라운 결과를 설명할 수 있다(도 4e의 검은색 화살표 참조).

[0022] **본 발명의 상세한 설명**

[0023] 본 발명자는 본원에서 T_m (겔-액정 상 전이온도) 이상에서 과열되는 감열성 리포솜을 제공한다. 이와 같은 리포솜은 대상체에서 치료제 또는 진단제로 사용가능한 나노입자를 캡슐화하는 감열성 지질막을 포함한다.

[0024] 본 발명자는 놀랍게도 생리적 pH(통상적으로 pH 6 내지 8)의 수성 매질에서 측정시 나노입자의 표면 정전하가 -20 mV 미만 또는 +20 mV 초과일 때, T_m 이상에서 감열성 리포솜이 과열되는 것을 발견하였다. 이와 같은 리포솜막의 과열은 캡슐화된 하전된 나노입자를 방출할 수 있게 한다.

[0025] 본원에서 사용되는 "대상체(subject)"라는 용어는 임의의 유기체를 의미한다. 상기 용어는 인간만을 지칭하는 것이 아니며, 인간은 대상의 한 예이고, 동물, 특히 온혈 척추동물, 통상적으로 포유류뿐만 아니라 조식 배양체도 지칭한다.

[0026] **리포솜**

[0027] "리포솜"이라는 용어는 소포내 매질을 외부 매질로부터 분리하는 막을 형성하는 양친매성 분자의 하나 이상의 이중막으로 구성되는 구체 소포를 지칭한다. 소포내 매질은 리포솜의 내부 수성 코어를 구성한다. 친수성 분자 또는 성분은 당업자에 알려지고 본원에 기재된 캡슐화의 활성화 방법을 통해 리포솜의 내부 수성 코어 내에 캡슐화될 수 있다. 소수성 분자 또는 성분은 막의 내부에 포획될 수 있다.

[0028] 이중막을 구성하는 양친매성 분자는 지질, 특히 인지질이다. 인지질 분자의 양친매성 성질은 포스페이티기 및 글리세롤기로 구성되는 친수성 머리, 및 하나 또는 둘의 지방산으로 구성되는 소수성 꼬리의 존재에 기인한다(도 1 참조).

[0029] 수성 매질에서 인지질은 지방 아실 사슬과 물의 접촉을 최소화하기 위하여 자기-어셈블리되는 경향이 있고, 이들의 화학구조에 따라 다른 종류의 어셈블리(미셀, 라멜라상(lamellar phase) 등)를 도입하는 경향이 있다. 특히, 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)은 "자발" 곡률(curvature)을 거치고 결국 소포를 형성하는 스테킹된 이중막을 구성하는 라멜라상을 형성하는 것으로 알려졌다(Lasic D.D. et al. Adv. Colloid. Interf. Sci. 2001;89-90:337-349). 인지질 라멜라상은 열방성(thermotropic) 액정을 구성한다. 이는 양친매성 분자의 배열(ordering) 정도가 온도에 좌우됨을 의미한다. 실제로, 인지질 이중막은 "겔-유사" 라멜라상 L_{β} 에서 "유체-유사" 라멜라상 L_{α} 로의 전이에 대응되는 주 상 전이온도 T_m ("용융"의 온도)를 나타낸다. "겔" 상에서, 지방산의 탄산 사슬간의 강한 소수성 상호작용은 인지질 분자의 결정 배열(crystalline ordering)을 촉진한다: 이중막은 소형 이온에 대해서만 투과성이다. "유체" 상에서, 소수성 꼬리는 인지질 분자의 배열의 손실을 유발하고 "액정" 상을 유도하는 열운동에 기인하여 움직인다: 이중막은 약제와 같은 분자에 투과성이 된다.

- [0030] "겔-액정(gel-to-liquid crystalline)" 상 전이온도 T_m 은 인지질 분자의 화학적 구조에 좌우된다: 탄화수소 사슬 길이, 불포화도, 지방산의 비대칭성 및 분지화, 사슬-글리세롤 결합의 종류(에스테르, 에테르, 아마이드), 글리세롤 백본에 사슬 부착의 위치(1,2- 대 1,3-) 및 머리기의 변형.
- [0031] 포스파티딜콜린의 경우, 지방 아실 사슬의 구조 및 형태에 특히 관련성이 있다(Koynova et al., Biochim. Biophys. Acta 1998;1376:91-145).
- [0032] 지방산의 사슬 길이를 연장시키면, 주(main) 상 전이온도가 상승한다. 예를 들어, 9 내지 24개 탄소 원자의 사슬 길이를 갖는 포화 디아실 포스파티딜콜린에 대해, T_m 은 $1/n$ (n 은 지방 아실 사슬의 탄소 수임)에 선형적으로 좌우되고, T_m 은 즉 $n=16$ 일 때 41°C 부터, $n=24$ 일 때 80°C 까지 증가한다는 점이 나타난다.
- [0033] 주 겔-액정 상 전이온도에 대한 불포화의 효과는 형태(시스 또는 트랜스 타입), 지방 아실 사슬에서의 위치 및 이중결합의 수에 좌우된다. 예를 들어, 시스 타입의 불포화된 단일 부위를 18개의 탄소를 포함하는 포스파티딜콜린의 $sn-2$ 사슬에만 도입하는 것 및 양 사슬에 모두 도입하는 것은 사슬 용융 전이 온도를 각각 50°C (54.5°C 에서 3.8°C) 및 75°C (54.5°C 에서 -21°C) 낮추는 효과가 있을 수 있다. 반면, 이중결합이 트랜스 타입인 경우, 그 효과는 상당히 약화된다. 더욱이, T_m 은 시스-이중결합의 위치에 크게 좌우된다. 특히, T_m 은 이중결합이 탄화수소 사슬의 기하학적 중심에 위치할 때 최소화되고, 이중결합이 사슬의 한 말단으로 이동함에 따라 점진적으로 증가한다. 이와 같은 의존성은 이중결합이 포스파티딜콜린의 $sn-2$ 사슬에만 존재하거나 양 사슬에 모두 존재할 때 적용된다. 이중결합의 수의 영향에 대하여, 시스-불포화의 수가 증가할수록 T_m 이 감소함이 나타났다. 예를 들어, 18개의 탄소원자를 포함하는 포스파티딜콜린의 양 아실 사슬에 2개 또는 3개의 시스-불포화 부위가 도입되면, 사슬 용융 전이 온도는 인상값에도 각각 109°C (54.5°C 에서 -55.1°C) 및 116°C (54.5°C 에서 -61.5°C) 낮아진다(Koynova et al., Biochim. Biophys. Acta 1998;1376:91-145).
- [0034] 혼합 사슬 포스파티딜콜린은 $sn-1$ 및 $sn-2$ 위치에서 다른 탄화수소 사슬 길이를 나타낸다. 한정된 구조의 관련 포스파티딜콜린의 전이온도를 정확하게 예측할 수 있는 실험식이 유도되었다. 정규화된 사슬-길이 비등가성 파라미터(chain-length inequivalence parameter) $\Delta C/CL$ 가 개시되었으며, 여기서 $\Delta C(=|n_1-n_2+1.5|)$ 는 유효 사슬-길이 차이이고, n_1 및 n_2 은 각각 글리세롤 백본의 $sn-1$ 및 $sn-2$ 위치에서 사슬의 탄소 수이다. CL 은 두 사슬 중 더 긴 사슬의 유효길이이다. 두 개의 사슬을 구성하는 총 탄소수가 동일한 포스파티딜콜린에 있어서(n_1+n_2 =상수), 사슬 길이 비등가성 파라미터 $\Delta C/CL$ 이 약 0.4로 증가할 때 사슬 용융 온도는 단조 감소한다. $\Delta C/CL$ 이 약 0.4 이상으로 증가할 때, 아실 사슬의 메틸 말단에 의해 유발되는 패킹 섭동(packing perturbation)은 매우 강해져 비대칭 포스파티딜콜린 분자는 혼합 상호교차(mixed interdigitation)로 지칭되는 새로운 패킹 배열을 도입한다. 이와 같은 재배열에 따라, T_m 은 사슬 길이 비대칭성과 함께 증가한다.
- [0035] 약제 전달 목적을 위해, 스테롤 성분이 리포솜에 적합한 물리화학적 및 생물학적 거동을 부여하기 위해 포함될 수 있다. 이와 같은 스테롤 성분은 콜레스테롤 또는 이의 유사체, 예를 들어 에르고스테롤 또는 콜레스테롤헤미숙시네이트 중에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 콜레스테롤이다.
- [0036] 콜레스테롤의 존재는 일반적으로 리포솜의 투과성을 감소시키고 혈장 또는 혈청 단백질의 불안정 효과로부터 리포솜을 보호하는 것으로 인식되기 때문에, 콜레스테롤은 종종 리포솜의 지질 제형에 사용된다.
- [0037] 콜레스테롤 분자는 3개의 잘 구분된 영역을 포함한다: 소형 극성 히드록실기, 강성 판형 스테로이드 고리(rigid plate-like steroid ring) 및 알킬 사슬 꼬리. 콜레스테롤이 막으로 삽입될 때, 이의 극성 히드록실기는 포스파티딜콜린 분자의 글리세롤 백본 영역의 중간 주변에 위치했다(Kepczynski M. et al., Chemistry and Physics of Lipids, 2008;155:7-15). 콜레스테롤로서 개질제를 지질 이중막에 통합시키는 것은 구조, 자유부피, 두께, 유동성(점성) 및 극성(소수성)과 같은 리포솜막의 구조적 또는 물리적 성질을 크게 변화시킨다.
- [0038] 이중막의 점성은 막의 자유 부피에 영향을 주는 이중막 내에서 콜레스테롤의 위치 및 온도에 좌우된다. 이중막의 미세점성(microviscosity)에 대한 콜레스테롤의 효과는 다소 복잡하다. 콜레스테롤이 액상의 막의 분명한 미세점성을 증가시키는 것(유동성 감소)이 잘 알려졌다(Cournia et al., J.Phys.Chem.B, 2007;111:1786-1801).
- [0039] Papahadjopoulos et al.은 리포솜에 대한 콜레스테롤의 보호효과는 혈청 또는 혈장과 접촉할 때 지질막의 물리적 상태, 즉 "겔" 또는 "유체"에 좌우된다는 것을 보여준다. 겔 상태에서, 콜레스테롤의 존재는 이중막 내 인지질 아실 사슬의 배열 파라미터에 영향을 주고, 포획된 분자의 방출을 향상시킨다. 유체 상태에서, 콜레스테롤은 리포솜을 안정화하고, 캡슐화된 물질의 누출을 방지한다(Papahadjopoulos et al., Pharm. Research, 1995;12(10):1407-1416).

- [0040] 콜레스테롤을 25 mol % 초과 농도로 첨가시, 겔-액정 지질-상 전이에 극적인 효과가 있다. 액체-불규칙상(유체) 및 고체-규칙상(겔) 사이의 열역학적으로 안정한 새로운 공존 영역이 개시되었다: 액체-규칙상(Cournia et al., J. Phys. Chem. B, 2007;111:1786-1801; Polozov et al., Biophysical Journal, 2006;90:2051-2061). 이와 같이 새로운 상은 순수 지질에 의해 형성된 겔상의 유동성 및 유체상의 유동성의 중간인 유동성을 특징으로 한다. 최근, 콜레스테롤이 포화 고융점 지질, 예를 들어 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine: DPPC) 및 스팅고미엘린(sphingomyelin)와 결합하여 모델 막, 소위 "지질 래프트(lipid-raft)"에 동적 복합체(dynamic complex)를 생성할 때, 액체-규칙상이 형성된다는 것이 개시되었다. 콜레스테롤은 콜레스테롤-풍부 및 콜레스테롤-궁핍 마이크로도메인이 형성되는 모델 막에서의 상분리를 촉진한다(Radhakrishnan et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 2000;97:12422-12427; Mc Connell et al. Biochim. Biophys. Acta, 2003;1610:159-173). 실제로, Gaber et al.(Pharm. Research, 1995;12(10):1407-1416)은 33 mol%의 콜레스테롤 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 수소화 대두(hydrogenated soybean) 포스파티딜콜린(HSPC) 및 콜레스테롤을 각각 100:50:75 및 50:50:50의 몰비로 함유하는 두 개의 지질 제형이, 시차주사열량측정법(differential scanning calorimetry measurement)에 의해 입증된 바와 같이, 30°C 내지 65°C의 상 전이온도를 나타내지 않음을 보여주었다. 이와 같은 제형을 갖는 리포솜은 "비감열성" 리포솜으로 불린다.
- [0041] 본 발명에서 사용될 수 있는 통상적인 "감열성" 리포솜(즉, 주 상 전이온도 T_m 이 통상적으로 39°C 내지 55°C, 바람직하게는 39°C 내지 50°C, 더욱 바람직하게는 39°C 내지 45°C인 리포솜)은 하나 이상의 포스파티딜콜린을 포함한다.
- [0042] 포스파티딜콜린은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디스테아릴포스파티딜콜린(DSPC), 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 모노팔미토일포스파티딜콜린(MPPC), 모노스테아릴포스파티딜콜린(MSPC) 및 이들의 혼합물 중에서 선택된다.
- [0043] 바람직한 구현예에서, 감열성 리포솜은 디스테아릴포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디스테아릴포스파티딜에탄올아민(DSPE)-메톡시폴리에틸렌 글리콜(PEG)(DSPE-PEG)을 더 포함한다.
- [0044] 바람직한 구현예에서, 콜레스테롤은 25 mol% 미만의 몰비로 첨가된다.
- [0045] 바람직한 감열성 지질막은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 콜레스테롤 및 디스테아릴포스파티딜에탄올아민(DSPE)-메톡시폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예를 들어 PEG2000 (DSPE-PEG2000)을 포함한다.
- [0046] 특정 구현예에서, 앞서 정의된 화합물의 몰비는 바람직하게는 100:50:30:6 또는 100:33:27:7이다.
- [0047] 다른 바람직한 감열성 지질막은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 모노팔미토일포스파티딜콜린(MPPC) 및 디스테아릴포스파티딜에탄올아민(DSPE)-메톡시폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예를 들어 메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(DSPE-PEG2000)을 포함한다.
- [0048] 특정 구현예에서, 앞서 정의된 화합물의 몰비는 바람직하게는 100:12:5이다.
- [0049] 다른 바람직한 감열성 지질막은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 모노스테아릴포스파티딜콜린(MSPC) 및 디스테아릴포스파티딜에탄올아민(DSPE)-메톡시폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예를 들어 메톡시폴리에틸렌 글리콜-2000(DSPE-PEG2000)을 포함한다.
- [0050] 특정 구현예에서, 앞서 정의된 화합물의 몰비는 바람직하게는 100:12:5이다.
- [0051] 제조 모드에 따라, 소포의 크기 및 라멜라의 수(degree of lamellarity)가 조정된다. 단일라멜라 지질 소포를 제조하는 다양한 방법이 문헌에 개시되었다: 역상 증발법(Szoka et al., PNAS, 1978;75(9):4191-4198), 에탄올 주입법(Pons et al., International Journal of Pharmaceutics, 1993;95(1-3):51-56), 가열법(Mozafari et al., Journal of Biotechnology, 2007; 129: 604-613), 그러나 가장 간단한 방법은 지질 필름 수화법(Bangham et al., J. Mol. Bio., 1965;13:238-252)이다.
- [0052] 요약하면, 지질 필름 수화법에서, 지질은 클로로포름과 같은 유기용매에 용해된다. 용액의 균질화 후, 유기용매는 질소 흐름에서 증발된다. 이와 같이 획득된 건조 지질 필름은 그 후 주 상 전이온도 T_m 을 초과하는 온도에서 수성 매질에 의해 수화되고, 100 내지 800 nm의 크기를 갖는 다중라멜라 소포가 형성된다(Mills J.K. et al. Methods in Enzymology 2004;387:82-113). 각각 용액의 동결(액체 질소에서) 및 용해(T_m 초과 온도에서)에 의한, 탈수 및 재수화의 순환은 단일라멜라 소포를 형성하여 수성 내부 부피를 증가시킨다. 그 후, 소포의 크기를 조정(calibration)할 수 있게하는 공정이 적용되어 균일한 크기 분포를 획득한다. 초음파처리는 20 내지 50

nm 크기의 소형 단일라멜라 소포(SUV)를 생성하는 반면, 압출공정은 여과막을 통해 여과기공의 크기에 따라 50 내지 500 nm 크기를 갖는 대형 단일라멜라 소포(LUV)를 생성한다. 초음파처리 및 압출 공정 모두 Tm을 초과하는 온도에서 수행되어야 한다.

- [0053] 본 발명에 따른 감열성 리포솜의 최대크기는 통상적으로 50 내지 500 nm, 바람직하게는 50 내지 250 nm, 예를 들어 50 nm 내지 약 150 nm이다.
- [0054] 본 발명에서 사용되는 감열성 리포솜은 바람직하게는 이들의 생체적합성 및 특이적 생체분포성 (biodistribution)을 보장 또는 향상시키기 위하여 생체적합성 코팅을 포함한다.
- [0055] 생체적합성 코팅은 생리적 유체(혈액, 혈장, 혈청 등), 임의의 등장성(등장성) 매질 또는 생리적 매질, 예를 들어 글루코스(5%) 및/또는 NaCl(0.9 %)을 포함하는 매질과 같은 생체적합성 현탁액에서 리포솜이 안정할 수 있게 하거나 안정할 수 있게 돕고, 이는 약학적 투여를 위해 필요하다.
- [0056] 이와 같은 생체적합성 코팅은 리포솜을 표면처리제로 처리함으로써 획득될 수 있다.
- [0057] 안정성은 생체적합성 현탁액에서 리포솜의 동적 광산란 측정(dynamic light scattering measurement)에 의해 확인될 수 있다.
- [0058] 상기 코팅은 유리하게는 체내(*in vivo*) 리포솜의 완전성(integrity)을 보존하고, 생체적합성을 보장 또는 향상시키고, 이의 최적의 기능화(예를 들어, 스페이서(spacer) 분자, 생체적합성 폴리머, 표적화제(targeting agent), 단백질 등)를 가능하게 한다.
- [0059] 코팅은 비생분해성 또는 생분해성일 수 있다. 본 발명에서 두 가지 옵션이 모두 사용될 수 있다.
- [0060] 비생분해성 코팅의 예로는 당류(예를 들어, 아가로스) 및 포화 탄소 폴리머(예를 들어, 산화 폴리에틸렌)로 구성되는 군에서, 망상화(reticulate)되거나 그렇지 않은 채로, 개질되거나 그렇지 않은 채로(예를 들어, 폴리메타크릴레이트 또는 폴리스티렌), 단독 또는 조합으로 선택되는 하나 이상의 물질 또는 표면처리제가 있다.
- [0061] 생분해성 코팅의 예로는, 예를 들어 개질되거나 개질되지 않은, 천연이거나 천연이 아닌 생물학적 분자; 및 개질되거나 개질되지 않은, 천연 형태이거나 천연 형태가 아닌 생물학적 폴리머로 구성되는 군에서 선택되는 하나 이상의 물질 또는 표면처리제가 있다. 생물학적 폴리머는 다황산화(polysulfate)되거나 그렇지 않은 사카라이드, 올리고사카라이드 또는 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트란일 수 있다.
- [0062] 전술된 물질, 화합물 또는 표면처리제는 단독으로 또는 조합, 혼합물 또는 어셈블리로, 복합되거나 복합되지 않고, 공유결합하거나 공유결합하지 않고, 선택적으로 다른 화합물과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 감열성 리포솜은 생물학적 조직 또는 세포의 특이적 타겟화를 가능하게 하는 표면 성분을 더 포함할 수 있다. 이와 같은 표면 성분은 바람직하게는 표적 생물학적 구조에 존재하는 인식요소(recognition element)와 리포솜의 상호작용을 가능하게 하는 표적화제이다.
- [0064] 이와 같은 표적화제는 리포솜이 종양에 축적된 때에만 작용할 수 있다.
- [0065] 표적화제의 형태는 표적과의 상호작용에 원인이 있기 때문에, 상기 표적화제의 밀도는 당업자에 알려진 방법에 따라 조심스럽게 조절된다. 높은 밀도는 사실 표적화제의 형태를 교란, 및 그에 따라 표적 세포에 의한 인식을 교란할 수 있다(예를 들어, J A Reddy et al. Gene therapy 2002;9:1542; Ketan B. Ghaghada et al. Journal of Controlled Release 2005;104:113 참조). 또한, 높은 표적화제 밀도는 맥관에서의 순환 동안 세망내피계(RES)에 의한 리포솜의 제거를 도울 수 있다.
- [0066] 코팅은 또한 생물학적 조직 또는 세포의 특이적인 표적화를 가능하게 하는 표면 성분과 같이, 관심 분자를 리포솜의 표면에 결합시킬 수 있는 다른 기능기(또는 링커부분(linker segment))를 포함할 수 있다.
- [0067] **나노입자**
- [0068] 본 발명의 생성물 및 조성물은 다양한 분야, 특히 의학 및 수의학 분야에서 사용될 수 있다.
- [0069] 캡슐화된 나노입자가 감열성 리포솜으로부터 방출되면 치료제 또는 진단제로 사용될 수 있고, 이의 구조는 이의 의도된 기능에 직접적으로 좌우된다.
- [0070] "나노입자"라는 용어는 입자 또는 입자의 응집체를 지칭하고, 상기 나노입자는 코어(또는 중심 코어) 및 코팅을 포함하며, 상기 코어의 최대 치수(dimension)는 약 100 nm 미만이다. 통상적으로, 나노입자 코어의 최대 치수는

원형 또는 구형 나노입자의 직경, 또는 계란형 또는 타원형 나노입자의 최대 길이이다.

- [0071] 본원에서 "나노입자의 크기" 및 "나노입자의 최대 크기"라는 용어는 "나노입자의 코어의 최대 치수"를 지칭한다.
- [0072] "코어"는 단일 입자(결정 또는 미소결정(crystallite)) 또는 입자의 응집체(결정 또는 미소결정의 응집체)를 지칭한다.
- [0073] 투과전자현미경(Transmission Electron Microscopy: TEM) 또는 cryoTEM이 유리하게는 특히 코어가 단일 입자로 구성될 때 나노입자 코어의 크기를 측정하기 위하여 사용될 수 있다(도 2 참조). 또한, 동적 광산란법(Dynamic Light Scattering: DLS)이 상기 코어가 입자 또는 입자의 응집체로 구성될 때 용액 중 나노입자 코어의 유체역학적 직경을 측정하는데 사용될 수 있다. 이와 같은 두 가지 방법이 크기 측정치를 비교하고 상기 크기를 확인하기 위하여 연달아 사용될 수도 있다.
- [0074] 나노입자의 중심 코어는 통상적으로 치료 물질 또는 진단 물질로부터 제조되고, 이는 활성화가능(activable) 또는 여기가능(excitable) 물질이다. 상기 물질은 무기 물질, 유기 물질 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 물질은 바람직하게는 무기 물질이다.
- [0075] 나노입자가 pH 6 내지 8의 수성 매질에 현탁되는 0.2 내지 8 g/L 농도의 나노입자 현탁액에서 수행되는 제타전위 측정법에 의해 측정시, 표면 전하가 -15 mV 미만 또는 +15 mV 초과, 예를 들어 -15 mV 내지 -20 mV 또는 +15 mV 내지 +20 mV, 통상적으로 -20 mV 미만 또는 +20 mV 초과라면, 어떤 종류의 나노입자도 본 발명의 감열성 리포솜에 캡슐화될 수 있다.
- [0076] 나노입자의 형태는 예를 들어 원형, 평평한 형태, 길쭉한 형태, 구형, 계란형 또는 타원형 및 이와 유사한 형태일 수 있다. 형태는 제조방법에 의해 결정 및 조절되고, 당업자에 의해 원하는 적용예에 따라 조정될 수 있다.
- [0077] 입자의 형태가 이들의 "생체적합성"에 영향을 줄 수 있기 때문에, 표적 부위에 전달되면 입자는 다소 균일한 형태를 갖는 것이 바람직하다. 따라서, 약동학적(pharmacokinetic) 이유에 따라, 나노입자는 본질적으로 구형, 원형 또는 계란형인 것이 바람직하다. 구형 또는 원형이 특히 바람직하다.
- [0078] 본 발명에서 사용되는 나노입자의 최대 크기, 즉 나노입자 코어의 최대 치수는 통상적으로 1 내지 100 nm이다.
- [0079] 나노입자가 치료제로 사용될 때, 이는 유리하게는 약 5 nm 내지 약 100 nm, 예를 들어 약 5 nm 내지 80 nm, 예를 들어 약 10 nm 내지 약 80 nm, 유리하게는 약 10 또는 20 nm 내지 약 70 nm, 바람직하게는 약 15 nm 내지 약 60 nm 또는 약 10 nm 또는 15 nm 내지 약 50 nm이다.
- [0080] 나노입자가 진단제로 사용될 때, 이는 유리하게는 약 2 nm 내지 약 10 nm, 예를 들어 약 4 nm 내지 약 8 nm이다.
- [0081] 본 발명에서 사용되는 나노입자는 코어 및 코팅을 포함하고, 상기 코팅은 생리적 pH의 수성 매질에서 측정시 -20 mV 미만 또는 +20 mV 초과인 표면 정전하를 유발한다.
- [0082] 정전 코팅은 유리하게는 "전코팅(full coating)"(완전한 단일막)이다. 이는 나노입자의 모든 표면에 적절한 전하를 발생시키는 매우 높은 밀도의 생체적합성 분자의 존재를 의미한다. 이와 같은 전코팅은 T_m 이상에서 감열성 리포솜막의 파열을 도울 것이다.
- [0083] 코어를 구성하는 무기 물질은 자성 물질일 수 있다.
- [0084] 자성 물질은 예를 들어 철, 니켈, 코발트, 가돌리늄, 사마륨, 네오디뮴 및 이들의 혼합물을 바람직하게는 산화물, 수산화물 또는 금속의 형태로 포함한다.
- [0085] 특정 실시예에서, 코어를 형성하는 물질은 산화 제1철 및 산화 제2철로 구성되는 군에서 선택된다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 산화 나노입자는 마그네타이트 또는 마그헤마이트로부터 제조된다.
- [0086] 혼합 물질이 또한 자기장과 나노입자 간의 상호작용을 최적화하기 위하여 사용될 수 있다. (여러 물질의 임의 혼합물로서 당업자에게 잘 알려진) 고체 용액 형태, 예를 들어 CoFe₂O₄가 혼합 물질로 사용될 수 있다. 분리상에서의 고체 용액 형태, 예를 들어 Fe₂O₃/Co가 또한 사용될 수 있다.
- [0087] 자성 물질이 치료 물질로 사용될 때, 이는 바람직하게는 강자성 물질이다.

- [0088] 자성 물질이 진단 물질로 사용될 때, 이는 바람직하게는 초자성(supermagnetic) 물질이다.
- [0089] 코어를 구성하는 무기 물질은 50 이상, 바람직하게는 60 또는 61 이상, 더욱 바람직하게는 65, 66, 67 또는 68 이상의 원자수(Z)를 갖는 금속성 원소에 의해 구성되는 고전자밀도 물질일 수 있다.
- [0090] 원자수(양성자수로도 알려짐)는 원자의 핵에서 발견되는 양성자의 수이다. 이는 전통적으로 기호 Z로 나타낸다. 원자수는 고유한 화학원소를 나타낸다. 중성 전하의 원자에서, 원자수는 전자의 수와 동일하다.
- [0091] Z는 나노입자의 입사 방사선 흡수능력(incoming radiations absorption capacity)에 관여한다.
- [0092] 코어를 구성하는 무기 물질은 산화 세륨(IV)(CeO₂), 산화 네오디뮴(III)(Nd₂O₃), 산화 사마륨(III)(Sm₂O₃), 산화 유로퓸(III)(Eu₂O₃), 산화 가돌리늄(III)(Gd₂O₃), 산화 테르븀(III)(Tb₂O₃), 산화 디스프로슘(III)(Dy₂O₃), 산화 홀뮴(Ho₂O₃), 산화 에르븀(Er₂O₃), 산화 툴륨(III)(Tm₂O₃), 산화 이테르븀(Yb₂O₃), 산화 루테튬(Lu₂O₃), 산화 하프늄(IV)(HfO₂), 산화 탄탈륨(V)(Ta₂O₅) 및 산화 레늄(IV)(ReO₂) 중에서 선택되는 산화물이다.
- [0093] 본 발명에서, 무기 산화물의 혼합물도 가능하다.
- [0094] 코어를 구성하는 무기 물질은 금속일 수 있고, 상기 금속은 바람직하게는 40 또는 50 이상, 더욱 바람직하게는 60 또는 70 이상의 원자수(Z)를 갖는다.
- [0095] 상기 금속은 금(Au - Z = 79), 은(Ag - Z = 47), 백금(Pt - Z = 78), 팔라듐(Pd - Z = 46), 주석(Sn - Z = 50), 탄탈륨(Ta - Z = 73), 이테르븀(Yb - Z = 70), 지르코늄(Zr - Z = 40), 하프늄(Hf - Z = 72), 테르븀(Tb - Z = 65), 툴륨(Tm - Z = 69), 세륨(Ce - Z = 58), 디스프로슘(Dy - Z = 66), 에르븀(Er - Z = 68), 유로퓸(Eu - Z = 63), 홀뮴(Ho - Z = 67), 란타늄(La - Z = 57), 네오디뮴(Nd - Z = 60), 프라세오디뮴(Pr - Z = 59) 및 이들의 혼합물 중에서 선택될 수 있다.
- [0096] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 나노입자 코어는 금으로 구성된다.
- [0097] 본 발명에서, 나노입자 코어는 무기 산화물 및 금속의 혼합물로 구성될 수 있다.
- [0098] 생리적 pH의 수성 매질에서 측정시 -20 mV 미만 또는 +20 mV 초과를 표면 정전하를 유발하는 코팅은 무기 또는 유기 표면 코팅일 수 있다.
- [0099] 무기인 경우, 코팅은 산화물, 수산화물 및 옥시수산화물로 구성되는 군에서 선택될 수 있다. 무기 코팅은 예를 들어 실리슘, 알루미늄, 칼슘 및/또는 마그네슘을 포함할 수 있다.
- [0100] 예를 들어 마그네슘 및 칼슘으로 구성되는 군에서 선택되는 무기체는 pH 7에서 나노입자 표면에 양전하(+20 mV 초과)를 가져올 것이다.
- [0101] 다른 구현예에서, 실리슘기가 pH 7에서 나노입자 표면에 음전하(-20 mV 미만)를 가져오기 위해 사용될 수 있다.
- [0102] 유기인 경우, 코팅은 나노입자 표면과 공유결합 또는 정전기결합을 통해 상호작용할 수 있고, 상기 나노 입자에 표면 성질을 제공할 수 있는 분자에 의해 제조된다.
- [0103] 표면 코팅 유기 분자는 두 개의 기 R 및 X를 갖는다. X의 기능은 나노입자 표면과 상호작용하는 것이고, R의 기능은 나노입자 표면에 특이적 성질을 제공하는 것이다.
- [0104] X는 예를 들어 카르복실레이트기(R-COO⁻), 실란기(R-Si(OR)₃), 포스포닉기(R-PO(OH)₂), 포스포릭기(R-O-PO(OH)₂), 포스페이트기(R-PO₄³⁻) 및 티올기(R-SH) 중에서 선택될 수 있다.
- [0105] R는 적어도 생리적 pH의 수성현탁액의 나노입자에 표면전하를 가져온다.
- [0106] R이 양전하를 나노입자 표면에 가져올 때, R은 아민(NH₂-X)일 수 있다.
- [0107] R이 음전하를 나노입자 표면에 가져올 때, R은 포스페이트(PO₄³⁻-X) 또는 카르복실레이트(COO⁻-X)일 수 있다.
- [0108] 나노입자 표면에 양전하(+20 mV 초과)를 제공하는 유기 코팅은 예를 들어 아미노프로필트리에톡시실란, 폴리리신 또는 2-아미노에탄티올이다.
- [0109] 나노입자 표면에 음전하(-20 mV 미만)를 제공하는 유기 코팅은 예를 들어 폴리포스페이트, 메타포스페이트, 피

로포스페이트 등 또는 예를 들어 시트레이트 또는 디카르복실산, 특히 숙신산 중에서 선택된다.

- [0110] 다시, 정전 코팅은 유리하게는 "전코팅"이다.
- [0111] 이와 같은 정전 코팅 및 특히 아미노 또는 카르복실 성분은 또한 나노입자 표면에 임의의 기를 결합시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 이는 본원에 기재된 바와 같이 예를 들어 카르보다이미드와 같은 링커(linker)를 사용하여 나노입자 표면에 표적화기(targeting group) 또는 커플링기(coupling group)를 결합시키는 데 사용될 수 있다.
- [0112] 선택적으로는, 나노입자 표면은 나노입자가 감열성 리포솜에서 방출될 때 단백질과 직접 상호작용하여 이들과 공유결합을 형성할 수 있는 기(커플링기)를 사용하여 기능화될 수 있다.
- [0113] R은 숙신이미딜 에스테르기(아민기와 반응함) 및/또는 말레이미드기(카르복실기와 반응함)와 같이 단백질에 존재하는 아민기, 카르복실기 또는 티올기와 공유결합으로 상호작용할 수 있는 반응기로 만들어질 수 있다.
- [0114] 선택적으로는, 특이적 생물학적 조직 또는 세포를 표적화할 수 있는 기(표적화기)를 사용하여 기능화할 수 있다. 표적화기는 인간 또는 동물 신체에 존재하는 분자에 친화성을 보이는 임의의 생물학적 또는 화학적 구조일 수 있다.
- [0115] 이와 같은 표적화기는 통상적으로 나노입자가 표적부위에 축적되고, Tm 이상에서 열활성화에 의해 리포솜으로부터 방출되면 작용한다.
- [0116] 표적화기는 항원, 스페이서 분자 및 생체적합성 폴리머 중에서 선택될 수 있다. 표적화기는 인간 또는 동물 신체에 존재하는 분자에 친화성을 보이는 임의의 생물학적 또는 화학적 구조일 수 있다. 예를 들어, 이는 펩티드, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드, 단백질, 핵산(DNA, RNA, siRNA, tRNA, miRNA 등), 호르몬, 비타민, 효소 등 및 일반적으로 분자(예를 들어 수용체, 마커, 항원 등)의 임의의 리간드일 수 있다. 병리학적 세포에 의해 발현되는 분자의 리간드, 특히 종양 항원, 호르몬 수용체, 사이토카인 수용체 또는 성장인자 수용체의 리간드. 상기 표적화기는 예를 들어 LHRH, EGF, 폴레이트(folate), 항-B-FN 항체, E-셀렉틴/P-셀렉틴, 항-IL-2R α 항체, GHRH 등으로 구성되는 군에서 선택된다.
- [0117] 본원에 기재된 정전 코팅 및/또는 커플링기는 임의의 기를 나노입자 표면에 결합시키기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 이들은 나노입자 표면에 표적화기를 그래프트하기 위한 링커로 사용될 수 있다.
- [0118] 따라서, 본원의 특별한 목적은 공유결합에 의해 또는 정전기에 의해 -20 mV 미만 또는 +20 mV 초과 표면 정전하를 유발하는 제제로 코팅된 나노입자를 캡슐화하는 감열성 리포솜이다.
- [0119] 이와 같은 제제는 바람직하게는 두 개의 기 R 및 X를 갖는 유기 분자이고, 상기 R은 아민, 포스페이트 및 카르복실레이트 중에서 선택되며, 상기 X는 카르복실레이트, 실란, 포스포닉, 포스포릭 및 티올 중에서 선택된다.
- [0120] 나노입자는 숙신이미딜 에스테르 및 말레이미드에서 선택되는 커플링기, 및/또는 펩티드, 올리고펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 호르몬, 비타민, 효소, 및 종양 항원, 호르몬 수용체, 사이토카인 수용체 및 성장인자 수용체의 리간드 중에서 선택되는 표적화기를 더 포함할 수 있다.
- [0121] 선택적으로는, 나노입자 표면은 입체기(steric group)를 사용하여 기능화될 수 있다. 이와 같은 기는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 산화폴리에틸렌, 폴리비닐알코올, 폴리아크릴레이트, 폴리아크릴아미드(폴리(N-이소프로필아크릴아미드)), 바이오폴리머 또는 폴리카바미드, 텍스트란, 크실란, 셀룰로스, 콜라겐과 같은 폴리사카라이드 및 폴리술포베타인 등과 같은 쯔비터이온성 화합물 중에서 선택될 수 있다.
- [0122] 이와 같은 입체기는 생리적 유체(혈액, 혈장, 혈청 등), 임의의 등장성(등장성) 매질 또는 생리적 매질, 예를 들어 글루코스(5%) 및/또는 NaCl(0.9%)을 포함하는 매질과 같은 생체적합성 현탁액에서 나노입자의 안정성을 증가시킨다.
- [0123] 본 발명에 기재된 내용으로부터, 당업자는 본 발명의 본질을 벗어나지 않는 범위 내에서 나노입자는 변형될 수 있음을 인식할 것이다.
- [0124] 본 발명에서 사용될 수 있는 나노입자 또는 나노입자 응집체를 제조하기 위한 통상적인 방법은 예를 들어 WO2007/118884, WO 2009/147214, US 6,514,481 B1, WO2011/003999, 및 문헌[Liu et al., Journal of Magnetism and Magnetic Materials 270 (2004) 1-6 "Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres"]에 개시되어 있다.

- [0125] **치료적 사용**
- [0126] 나노입자가 표적 세포에 의해 내재화(internalize)되거나, 표적 세포와 접촉하면, 치료용 나노입자의 효율은 상승된다. 이와 같은 목적을 달성하기 위해, 나노입자 표면 성질은 통상적으로 표적 세포와의 상호작용을 돕기 위해 개질된다. 예를 들어, 나노입자 표면의 전하가 개질되거나, 표면이 본원에 기재된 것과 같은 표적화기 또는 표적화제에 결합될 수 있다.
- [0127] 특이적 결합 상호 작용은, 나노입자가 세포막 상의 상보적(complementary) 분자 또는 수용체와 특이적으로 상호 작용할 수 있도록 하는 표면 리간드(본원에 기재된 표적화기)의 상호작용이다. 이와 같은 상호작용은 수용체-매개 엔도사이토시스(endocytosis)를 유도한다. 나노입자 표면에 결합(conjugate)된 표적화 리간드는 표적 세포에 발현된 표면 항원, 막 단백질, 수용체를 인식하고 결합할 수 있으며, 이에 따라 엔도사이토시스 및 세포내 전달을 촉발한다.
- [0128] 세포접촉 및 입자흡수(particle uptake)를 촉진하는 비특이적 인력은 표면 전하와 같은 나노입자의 고유의 본성으로부터 유래된다.
- [0129] 그러나, 대부분의 경우, 이와 같은 개질은 나노입자의 생체분포에 유해하다.
- [0130] 본원에 기재된 감열성 리포솜은 이와 같은 문제를 극복하고, 전술된 바와 같이, 대상체의 체내에서의 효율적인 생체분포(전달) 및 치료용 나노입자의 제어방출을 가능하게 한다. 이와 같은 리포솜은 표적 부위에서 나노입자, 특히 개질된 표면 성질을 나타내는 나노입자의 농도를 향상시킨다.
- [0131] 나노입자의 제어방출(공간적 및 시간적)이 이제 가능하다. 즉, 나노입자는 이의 치료 활성이 이의 세포와의 상호작용(세포와 접촉하는 나노입자, 및/또는 세포에 내재화된 나노입자)에 의존할 때, 필요한 장소 및 순간에 전달된다.
- [0132] 나노입자가 치료 도구로 사용될 때, 이의 코어는 외부 활성화될 수 있는 물질, 즉 외부 에너지원에 의해 활성화될 수 있는 물질일 수 있는 치료물질에 의해 제조된다. 특정 구현예에서, 치료물질은 표적 세포, 조직 또는 기관을 기능적으로 방해, 변형 또는 과열할 수 있다.
- [0133] 치료 물질은 전술된 바와 같은 고전자밀도 물질 및 자성 물질 중에서 선택될 수 있다.
- [0134] 활성화원(activation source)은 코어가 HfO₂ 또는 Au와 같은 고전자밀도 물질에 의해 제조된 나노입자에 대한 이온화 방사원(ionizing radiation source)일 수 있다.
- [0135] 이온화 방사는 통상적으로 약 5 KeV 내지 약 25 000 KeV, 특히 약 5 KeV 내지 약 6000 KeV(LINAC 원), 또는 약 5 KeV 내지 약 1500 KeV(예컨대, 코발트 60 원)이다. X-선 원을 사용하여, 특히 바람직한 이온화 방사는 통상적으로 약 50 KeV 내지 약 12 000 KeV, 예를 들어 약 50 KeV 내지 약 6000 KeV이다.
- [0136] 시험관내(*in vitro*) 수행시, 이온화 방사선의 필요 투여량은 바람직하게는 약 0.05 Gray 내지 약 16 Gray, 바람직하게는 약 0.05 Gray 내지 약 6 Gray이다.
- [0137] 특히 국소적으로 체외(*ex vivo*) 또는 체내(*in vivo*) 수행시, 투여량은 약 0.05 Gray 내지 약 16 또는 30 Gray이다.
- [0138] 현재 관행에 따르면, 총 이온화 방사량은 인체에서 약 1.5 Gray 내지 약 85 Gray이다. 현재 관행에 따라, 약 40 Gray의 추가적인 방사량 증가가 또한 인체에 제공될 수 있다.
- [0139] 총 방사 투여량은 단일투여, 분할투여, 다분할투여 등과 같이 상이한 스케줄에 따라 전달될 수 있다.
- [0140] 일반적이고 비제한적인 방법에 따라, 하기의 X-선이 나노입자를 활성화하기 위한 다양한 경우에 사용될 수 있다:
- [0141] - 특히 표피상 표적 조직에 효율적인 50 내지 150 keV의 X-선;
- [0142] - 6 cm 두께의 조직을 통과할 수 있는 200 내지 500 keV의 X-선(오르소 전압);
- [0143] - 1000 keV 내지 25,000 keV의 X-선(메가 전압). 예를 들어, 전립선암의 치료를 위한 나노입자의 이온화는 15,000 keV의 에너지를 갖는 5집속(five focused) X-선을 통해 수행될 수 있다.
- [0144] 방사성 동위원소는 선택적으로 이온화 방사원으로 사용될 수 있다(퀴리요법(curiotherapy) 또는 브래키요법

(brachytherapy)으로 지칭됨). 특히, 유리하게는 요오드 I^{125} ($t_{1/2}=60.1$ 일), 팔라듐 Pd^{103} ($t_{1/2}= 17$ 일), 세슘 Cs^{137} 및 이리듐 Ir^{192} 이 사용될 수 있다.

- [0145] 방사성면역치료에 있어서, 면역방사성핵종(immunoradionuclide)(또는 면역방사성표지된 리간드)이 이온화 방사원으로 사용될 수 있다. 적합한 방사성면역치료용 방사성핵종은 예를 들어 ^{131}I , ^{186}Re , ^{177}Lu 또는 ^{90}Y 중에서 선택될 수 있다.
- [0146] 양성자 빔과 같은 하전입자, 탄소와 같은 이온 빔, 특히 고에너지 이온 빔이 또한 이온화 방사원으로 사용될 수 있다.
- [0147] 전자 빔이 또한 4 MeV 내지 25 MeV의 에너지를 갖는 이온화 방사원으로 사용될 수 있다.
- [0148] 나노입자 원자의 원하는 X-선 흡수 한계에 가깝거나 대응되는 에너지를 갖는 X-선을 선택적으로 생성하기 위해, 특정 단색 방사원(monochromatic irradiation source)이 사용될 수 있다.
- [0149] 우선적으로, 이온화 방사원은 선형 가속기(Linear Accelerator: LINAC), 코발트-60 및 브래키요법 원 중에서 선택될 수 있다.
- [0150] 양(방사선 총 투여량의 범위) 및 스케줄(단일투여, 또는 분할 또는 다분할 프로토콜 등에 따른 방사선의 계획 및 전달)은 질환/해부학적 부위/질환 단계 환자 세팅/환자 연령(소아, 성인, 노인 환자)에 따라 지정되고, 특이적 상황에 있어서 치료의 기준을 구성한다.
- [0151] 방사선은 나노입자의 방출 후 어느 때에도, 한번 이상, 방사성요법에 대해 현재 사용가능한 임의의 시스템을 사용하여 적용될 수 있다.
- [0152] 특정 구현예에서, 치료 물질은 자성 산화물(마그네타이트 또는 마그헤마이트), 특히 강자성 물질이고, 활성화원은 자기장원(magnetic field source)이다.
- [0153] 바람직하게는 비진동(non-oscillating) 또는 안정적인 자기장이 나노입자의 방출 후에, 한번 이상, 임의의 자기장원을 사용하여 지속적으로 적용될 수 있다.
- [0154] 자기장원은 바람직하게는 균일한 단방향성(unidirectional) 자기장원이고, 이는 임의의 영구자석, 전자석 및 자기공명영상(Magnetic Resonance Imaging: MRI) 장비 중에서 선택될 수 있다.
- [0155] 적절한 비진동 또는 안정적인 자기장이 통상적으로 0.5 내지 5 Tesla의 자기장을 갖는 표준 MRI 장비에 의해 사용가능하다.
- [0156] 자기장에 노출되면, 노출의 기간에 따라, 자성 나노입자는 세포 또는 조직의 파괴를 가능하게 할 수 있다(수분, 예를 들어 2 또는 5분 내지 120분).
- [0157] 본 발명의 나노입자 또는 나노입자 응집체 및 조성물은 자기장이 가해지면 유리하게는 암세포 또는 이와 같은 것으로 의심되는 세포의 용균을 위해 사용될 수 있다.
- [0158] 본원에서, 본 발명자는 대상체를 치료하기 위한 약학 조성물을 제조하기 위해 본원에 기재된 나노입자, 또는 본원에 기재된 것과 동일하거나 상이한 나노입자의 집단을 사용하는 것에 대해 개시한다.
- [0159] "치료"라는 용어는 기능 이상을 교정하거나, 질환을 예방하거나, 병리학적 증상을 개선하기 위해 수행되는 모든 행동을 지칭하고, 그 예로 특히 이상조직, 특히 종양의 크기 또는 성장의 감소, 상기 크기 또는 성장의 제어, 이상세포 또는 조직의 억제 또는 파괴, 질환 진행의 감속, 암 진행의 지연을 수반한 질환 안정화, 전이발생의 감소, 질환의 완화 또는 완전관해(complete remission)(예를 들어, 암에 있어서) 등을 들 수 있다.
- [0160] 약학 조성물은 상기 세포가 활성화원에 노출될 때, 대상체에서 표적 세포를 교란, 방해, 변형 또는 파괴하기 위한 조성물일 수 있다.
- [0161] 본 발명의 목적은 표적 세포가 활성화원에 노출될 때, 대상체에서 표적 세포를 교란, 방해, 변형 또는 파괴하기 위한 본원에 기재된 감열성 리포솜, 및/또는 본원에 기재된 방법에 따라 획득될 수 있는 감열성 리포솜이다.
- [0162] 본 발명에 따른 특정 감열성 리포솜은 암을 예방 또는 치료하거나 대상체의 암 증상을 완화하기 위한 리포솜이다.

- [0163] 본원에 기재된 특정 방법은, 대상체에서 세포의 교란, 용균, 세포자멸 또는 괴사를 유도 또는 초래하는 방법으로서, a) 나노입자를 함유하는 감열성 리포솜(전술된 바와 같음)을 대상체에 투여하는 단계; b) 나노입자가 국소 방출되어 세포, 특히 표적 세포와 상호작용할 수 있도록, 감열성 리포솜을 T_m 이상으로 가열하는 단계; 및 선택적으로 c) 세포를 활성화원, 통상적으로 전술된 바와 같은 활성화원에 노출시켜, 나노입자를 활성화하여 결과적으로 상기 세포의 교란, 용균, 세포자멸 또는 괴사를 유도 또는 초래하는 단계를 포함하는 방법이다.
- [0164] 본 발명에 따른 감열성 리포솜은 다른 경로, 예컨대 국소(예를 들어, 종양내(intra-tumoral: IT)), 피하(subcutaneous), 정맥내(intra-venous: IV), 피내(intra-dermic), 동맥내(intra-arterial), 기도(흡입), 복막내(intra-peritoneal), 근육내(intra-muscular) 및 경구(per os) 경로에 의해 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 감열성 리포솜은 종양절제(tumorectomy) 후 종양이 있던 자리의 가상 구멍에 투여될 수 있다. 바람직한 투여 경로는 정맥내 경로이다.
- [0165] 감열성 리포솜의 정맥내 경로에 따른 주사 후 일정 시간 경과 후, 투과 및 보유 강화(Enhanced Permeation and Retention: EPR) 효과에 의해 종양 덩어리로 감열성 리포솜의 수동적 축적이 유발된다. 실제로, 종양 혈관은 정상적인 모세혈관으로부터 매우 구분되고, 이들 혈관의 "누수성(leakiness)"은 정상적인 조직에서는 흔치않은 리포솜의 선택적 혈관외유출(extravasation)을 촉진한다는 점이 발견되었다. 효과적인 종양 림프 배출(tumour lymphatic drainage)의 부족은 림프 리포솜의 제거를 방해하고, 이들의 축적을 촉진한다.
- [0166] 따라서, 본 발명의 나노입자는 정맥내 투여된 감열성 리포솜으로부터 방출되면 원발성 종양뿐만 아니라 전이성 종양을 성공적으로 표적화할 수 있다.
- [0167] 표적 세포는 임의의 병리학적 세포, 즉 병리학적 메카니즘에 관련된 세포, 예를 들어 종양 세포와 같은 증식성(proliferative) 세포, 협착성(stenosing) 세포(섬유아세포/평활근(smooth muscle) 세포), 또는 면역계 세포(병리학적 세포 클론)일 수 있다. 바람직한 적용은 악성 세포 또는 조직의 치료(예를 들어, 괴열 또는 기능변형)에 기반한다.
- [0168] 본 발명의 다른 목적은 대상체 또는 환자의 장애, 특히 암을 예방 또는 치료하거나, 장애의 증상을 완화하는 방법으로서, a) 감열성 리포솜 또는 이와 같은 감열성 리포솜을 포함하는 본원에 기재된 조성물을 장애를 겪는 환자에게 투여하는 단계; b) 나노입자가 국소 방출되어 세포, 특히 표적 세포와 상호작용할 수 있도록, 감열성 리포솜을 T_m 이상으로 가열하는 단계; 및 c) 그 후 상기 대상체를 본원에 기재된 활성화원에 노출시켜, 환자의 이상세포의 변형, 교란 또는 기능 괴사를 유발함으로써 상기 대상체를 치료하여, 상기 장애를 예방 또는 치료하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0169] 종래의 암 관리는 조직적으로 동시의 복합성 치료를 의미한다(예를 들어, 방사성요법 및 화학요법의 조합).
- [0170] 본원에 기재된 활성화원에 노출되는 나노입자는, 예를 들어 방사성요법에서, 다른 암 치료요법 프로토콜과 함께 사용될 수 있다. 이와 같은 프로토콜은 수술, 방사선수술, 화학요법 및 세포분열억제제(cytostatic), 세포독성제(cytotoxic), 표적화 치료제(targeted therapy), 백신 및 암을 치료하기 위한 다른 생물학적 또는 무기물의 투여를 포함하는 치료를 포함하는 군에서 선택될 수 있다.
- [0171] 본 발명에 따른 감열성 리포솜은 본원에 기재된 나노입자를 임의의 관심 치료분자, 특히 암을 치료하기 위한 임의의 공지된 생물학적 또는 무기 물질과 함께 캡슐화할 수 있다.
- [0172] 본원에 기재된 나노입자는 또한 방사성요법의 측면에서 단독으로 사용될 수도 있다.
- [0173] 증가된 치료 효능이 관찰되는 것은 부분적으로 본 발명의 감열성 리포솜을 통한 이동 및 그에 따른 이들의 제어 방출에 의해 표적 부위에 유효 나노입자의 농도가 증가하였기 때문이다.
- [0174] 본 발명은 임의 종류의 악성 종양, 예를 들어 혈액(hematological) 종양 또는 악성 종양, 및 고체 종양, 특히 상피(epithelial), 신경외배엽(neuroectodermal) 또는 간엽(mesenchymal) 기원의 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 리포솜은 전악성(premalignant) 병변(lesion) 또는 전통적으로 방사성요법이 사용 및/또는 권고되는 특정 양성(benign) 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0175] 종양 또는 암은 방사성요법이 전통적인 치료법인 암일 수 있다. 이와 같은 암은 특히 피부암(AIDS에 수반되는 악성 신생물(neoplasm), 흑색종(melanoma) 포함); 중추신경계 종양(뇌, 뇌간, 소뇌, 뇌하수체, 척추관, 눈 및 안와(orbit) 포함); 두경부(head and neck) 종양; 폐암; 유방암; 위장 종양(예를 들어, 간 및 간담도관(hepatobiliary tract) 암, 대장, 직장 및 항문 암, 위, 췌장, 식도 암; 남성 비교생식기 종양(예를 들어, 전립선, 고환, 음경 및 요도 암); 부인과 종양(예를 들어, 자궁경, 자궁내막, 난소, 난관, 질 및 외음부 암); 부신

및 후복막 종양; 위치와 관계없는 뼈 및 연조직의 육종; 림프종; 골수종; 백혈병; 및 소아 종양(예를 들어, 윌름스 종양(Wilm's tumor), 신경아세포종, 중추신경계 종양, 유잉 육종(ewing's sarcoma) 등)으로 구성되는 군에서 선택될 수 있다.

[0176] 본 발명은 치료에 있어서는, 원발성 종양, 또는 2차 침습, 국소 또는 원격 전이에 사용될 수 있고, 예방에 있어서는 흑색종, 폐암, 신장암, 유방암 등에서 관찰되는 침습(전이)와 같은 2차적 악성 중추신경계 관여를 방지하기 위해 사용될 수 있다.

[0177] 감열성 리포솜은 항암치료 기간에 걸쳐 아무때나 사용될 수 있다. 이들은 예를 들어 네오아주반트(neoadjuvant)(암 절제를 위한 수술적 개입 전) 또는 아주반트(수술 후)로 투여될 수 있다.

[0178] 또한, 감열성 리포솜은 수술로 제거할 수 없는 진행된 종양에 대해서도 사용될 수 있다.

[0179] 필요한 경우, 감열성 리포솜의 반복적인 주사 또는 투여가 수행될 수 있다.

[0180] **진단적 사용**

[0181] 나노입자의 제어 전달은 체내(*in vivo*) 이미지화 및/또는 진단 목적을 위해 필요하고, 상기 나노입자가 본 발명에 따른 감열성 리포솜에 캡슐화되면 이제 가능하다.

[0182] 본원에서, 본 발명자는 이상 조직 또는 세포, 특히 대상체의 종양 세포의 존재를, 바람직하게는 상기 대상체가 외부에너지원에 노출될 때, 검출하기 위한 진단 조성물을 제조하기 위해, 본 발명에 따른 감열성 리포솜, 특히 본원에 기재된 나노입자를 포함하는 감열성 리포솜 또는 본원에 기재된 것과 동일하거나 상이한 나노입자 군을 사용하는 방법을 개시한다.

[0183] 본 발명의 목적은 대상체가 외부에너지원에 노출될 때 상기 대상체의 이상 세포를 검출 또는 시각화하기 위한, 본원에서 정의되거나, 및/또는 본원에 기재된 방법에 따라 획득할 수 있는 감열성 리포솜이다.

[0184] 진단 물질은 전술된 바와 같은 고전자밀도 물질 및 자성 물질 중에서 선택될 수 있다.

[0185] 나노입자가 이상 조직 또는 세포를 검출 또는 시각화하기 위한 진단제로 사용될 때, 이의 코어는 유리하게는 이미지화 물질로 구성될 수 있다.

[0186] 이와 같은 이미지화 물질은 유리하게는 전술된 산화 제1철 및 산화 제2철과 같은 임의의 자성물질 중에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 나노입자는 MRI에서 가시적인 γ - Fe_2O_3 (마그헤마이트) 또는 Fe_3O_4 (마그네타이트)로 제조되는 코어를 갖는다.

[0187] 또한, 이미지화 물질은 HfO_2 또는 Au와 같이 컴퓨터 단층촬영 스캐너(CT 스캐너)에서 가시적인 임의의 높은 전기밀도 물질 중에서 선택될 수 있다.

[0188] 이미지화 목적을 위해, 전술된 바와 같이 표적화기를 나노입자에 부가하는 것이 바람직하다.

[0189] 본 발명의 다른 목적은 장애를 갖는 것으로 의심되는 대상체 또는 환자의 표적 세포를 검출 또는 시각화하는 방법(특히 장애, 특히 암을 진단할 수 있게 함)으로서, a) 감열성 리포솜 또는 본원에 기재된 바와 같은 감열성 리포솜을 포함하는 조성물을 장애를 가진 환자에게 투여하는 단계; b) 나노입자가 국소 방출되어 세포, 특히 표적 세포와 상호작용할 수 있도록, 관심 부위를 T_m 이상으로 가열하는 단계; 및 c) 그 후 상기 대상체를 본원에 기재된 바와 같은 활성화원에 노출시켜, 환자의 표적세포를 검출 또는 시각화할 수 있게 하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0190] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 감열성 리포솜은 혈액순환에서 세망내피계(RES)에 의한 인식을 피하면서 표적 나노입자(특히 종양 세포를 특이적으로 인식할 수 있는 나노입자)를 전달할 수 있다.

[0191] 종양 덩어리가 존재한다면, T_m 이상에서 감열성 리포솜으로부터 방출된 나노입자는 종양에 들어가 표적 암 세포와 상호작용한다. 고밀도 나노입자가 사용되면, 나노입자의 축적은 자성 나노입자에 대한 MRI에서 가시적인 신호 교란 또는 CT 스캐너 신호 증가를 촉진한다.

[0192] 종양 덩어리가 없다면, 나노입자는 신장을 통해 혈액순환에서 제거될 것이고, 신호 증가 또는 교란이 검출 또는 시각화되지 않을 것이다.

[0193] 본 발명자는 본원에서, 대상체의 표적부위, 특히 종양 및 이의 미세환경(microenvironment)으로부터 상기 표적

부위를 표현형화(phenotype)하는데 사용할 수 있는 단백질을 수집하기 위한 진단 조성물을 제조하기 위해, 본 발명에 따른 감열성 리포솜, 특히 본원에 기재된 나노입자를 포함하는 감열성 리포솜 또는 본원에 기재된 것과 동일하거나 상이한 나노입자 군을 사용하는 것을 개시한다.

- [0194] 본 발명의 다른 목적은 대상체 또는 환자의 표적 부위로부터 단백질을 수집하는 방법(특히 상기 표적 부위를 표현형화시킬 수 있음)으로서, a) 감열성 리포솜 또는 본원에 기재된 바와 감열성 리포솜을 포함하는 조성물을 장애편을 겪는 환자에게 투여하는 단계; b) 나노입자가 표적 부위에 방출되어 상기 표적 부위와 상호작용할 수 있도록, 상기 감열성 리포솜을 T_m 이상으로 가열하는 단계; 및 c) 그 후 상기 표적 부위의 단백질로 덮인 나노입자를 수집하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0195] 상기 방법은 혈액에 나노입자를 방출시키기 위해 감열성 리포솜을 T_m 이상으로 가열하는 단계 및 혈액 단백질을 표적 부위의 단백질과 비교하기 위해 혈액 단백질로 덮인 나노입자를 수집하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0196] 이와 같은 접근은 종래 조직검사와 비교하여 유리한 비침습성 기법을 구성한다.
- [0197] 본원에 기재된 감열성 리포솜은 특정 환자의 암 단계에 관한 정보를 제공할 수 있기 때문에 개인화 치료요법에 사용될 수 있는 진단 도구이고, 종양학자(ncologist)가 상기 환자에 대해 가장 적합한 치료방법을 선택하고 특정 치료방법의 효율성을 따를 수 있도록 도울 수 있다.
- [0198] 본원에 기재된 감열성 리포솜은 특정 치료요법에 대한 종양 반응을 분석하고 환자의 임상 결과(무진행생존(Progression Free Survival))를 예측하기 위한 정보를 더 제공할 수 있다.
- [0199] 이와 같은 특이적 사용을 위해 전술된 바와 같이 임의의 나노입자가 사용될 수 있다. 나노입자는 우선적으로 전술된 바와 같이 자성 코어로 제조된다(예를 들어, Fe₂O₃ 또는 Fe₃O₄).
- [0200] 종양을 표현형화하기 위해, 커플링기와 함께 코팅을 포함하는 나노입자를 사용하는 것이 바람직하다. 이와 같은 커플링기는 유리하게는 숙신이미딜 에스테르, 말레이미드 및 이들의 혼합물 중에서 선택될 수 있다. 이와 같은 기는 주로 단백질에 존재하는 아미노기 및 카르복실기와 공유결합을 형성할 것이다.
- [0201] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 감열성 리포솜은 혈액순환에서 세망내피계(REs)에 의한 인식을 피하면서 커플링기와 함께 코팅을 포함하는 나노입자를 전달할 수 있다.
- [0202] T_m 이상에서 감열성 리포솜으로부터 방출된 나노입자는 표적 부위의 단백질과 상호작용할 수 있다. 상기 단백질 군에 의해 덮인 나노입자는 소변에서 수집될 수 있다. 이어서, 소변 샘플은 단백질의 효소 소화 및 펩티드 단편의 분석 후 예를 들어 질량 분석기를 사용하여 단백질 군을 분석하기 전에 나노입자를 농축시키기 위해 처리될 수 있다.
- [0203] 자성 나노입자는 예를 들어 자성 콜렉터(magnetic collector)를 사용하여 표적 부위로부터 다른 방법으로 수집될 수 있다.
- [0204] 본 발명의 다른 목적은 본원에 기재되거나 본원에 기재된 방법에 의해 획득할 수 있는 감열성 리포솜을 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 부형제, 전달체 또는 담체와 함께 포함하는 치료 또는 진단 조성물이다.
- [0205] 진단 조성물은 특히 진단 및 치료가 동시에 수행될 때 약학 조성물과 결합되거나 약학 조성물에 동화될 수 있다. 후자의 경우, 동일한 나노입자가 일반적으로 치료제 및 진단제로 사용된다.
- [0206] 조성물은 액체(현탁액 중 입자), 겔, 페이스트 등의 형태일 수 있다. 바람직한 조성물은 바람직하게는 액체 형태의 주사가 가능한 제형의 형태이다.
- [0207] 사용되는 부형제, 전달체 또는 담체는 예를 들어 살린, 등장성, 멸균, 버퍼 용액 등과 같이 이와 같은 경우에 사용되는 임의의 전통적인 지지체일 수 있다. 또한, 조성물은 안정화제, 감미료, 계면활성제 등을 포함할 수 있다. 조성물은 예를 들어 앰플, 병, 플라스크와 같이 약학 제형의 알려진 기법을 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0208] 본 발명의 조성물에서 나노입자의 농도는 원하는 용도, 대상 환자, 표적 세포의 특성 및 선택된 투여 경로에 따라 당업자에 의해 쉽게 조절될 수 있다.
- [0209] 약학 조성물은 (본원에 기재된 나노입자 또는 나노입자 군과 구별되는) 질환, 예를 들어 암을 치료하기 위한 치료 화합물을 더 포함할 수 있다. 이와 같은 추가적인 치료 화합물은 나노입자와 함께 리포솜에 캡슐화될 수 있다.

[0210] 본 발명은 또한 본원에 기재된 감열성 리포솜 또는 조성물 중 하나 이상을 포함하는 키트를 제공한다. 통상적으로, 상기 키트는 본 발명에 따른 하나 이상의 감열성 리포솜 또는 감열성 리포솜 군을 포함한다. 일반적으로, 상기 키트는 또한 본 발명의 약학 또는 진단 조성물의 유효성분 중 하나 이상에 의해 촉진된 하나 이상의 용기를 포함한다. 이와 같은 용기와 함께, 본 방법에 따른 감열성 리포솜, 감열성 리포솜의 군 또는 조성물을 사용하기 위해 제공될 수 있는 제품의 사용방법을 제공하는 안내표가 제공될 수 있다.

[0211] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 하기의 실시예에서 명확해질 것이고, 이는 본 발명을 설명하기 위한 것으로 본 발명을 제한하지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0212] 도 1: 포스파티딜콜린 분자의 도식구조.

도 1은 글리세롤 백본의 주위에 구조화된 인지질 분자를 나타낸다: *sn-1* 및 *sn-2* 사슬은 아실기에서 탄화수소 장쇄(R1 및 R2는 9개 이상의 탄소 원자를 포함함)에 의해 치환된 것이고, *sn-3* 사슬은 쓰비터이온 성질을 분자에 제공하는 콜린기(N(CH₃)₃⁺) 및 포스페이트기(PO₄⁻)를 갖는 극성 머리를 포함하는 것임.

도 2a 및 2b: 산화철 나노입자의 투과전자현미경(TEM) 이미지.

도 2a는 5 nm 크기의 산화철 나노입자의 TEM 관찰결과를 나타낸다(실시예 1 참조)(스케일 바 = 200 nm).

도 2b는 30 nm 크기의 산화철 나노입자의 TEM 관찰결과를 나타낸다(실시예 2 참조)(스케일 바 = 200 nm).

도 3: 산화철-함유 리포솜에 대해 획득된 전형적인 용출 프로파일.

도 3은 제1철 이온과 페난트롤린 사이의 비색형 반응을 통한 UV-가시 분광법(Cary 100 Varian 분광계)에 의해 자성 나노입자를 정량화함으로써 측정된 산화철-함유 리포솜에 대한 용출 프로파일을 나타낸다. 리포솜-함유 분획이 수집된다. 리포솜에서 산화철의 농도는 1 내지 2.5 g/L이다.

도 4: 나노입자-함유 리포솜의 Cryo-TEM 관찰

화살표 1은 cryo-TEM 그리드(grid) 가공의 경계를 나타낸다.

화살표 2 및 3은 각각 리포솜막 및 산화철 나노입자를 나타낸다.

도 4a는 실온에서 숙성된(aged) 산화철 나노입자가 적재된 비감열성 리포솜을 나타낸다(실시예 4.2).

도 4b는 60°C에서 숙성된 산화철 나노입자가 적재된 비감열성 리포솜을 나타낸다(실시예 4.2).

도 4c는 실온에서 숙성된 산화철 나노입자가 적재된 감열성 리포솜을 나타낸다(실시예 4.1).

도 4d는 43°C(T_m)에서 숙성된 후에 감열성 리포솜으로부터 방출된 산화철 나노입자를 나타낸다(실시예 4.1).

도 4e는 48°C(T_m 초과)에서 숙성된 후에 감열성 리포솜으로부터 방출된 산화철 나노입자를 나타낸다(실시예 4.1).

도 4f는 실온에서 숙성된 산화철 나노입자가 적재된 감열성 리포솜을 나타낸다(실시예 4.3).

도 4g는 또한 43°C(T_m)에서 숙성된 산화철 나노입자가 적재된 감열성 리포솜을 나타낸다(실시예 4.3).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0213] **실시예 1: 5 nm 크기의 나노입자 제조**

[0214] 5 nm를 중심으로 하는 크기분포를 갖는 산화철 나노입자가 US4329241; Bacri et al., J. Magn. Magn. Mat., 1986;62:36-46으로부터 도입된 제1철 및 제2철 이온의 공침(coprecipitation)에 의해 합성된다.

[0215] 요약하면, 이온강도가 제어된 반응 매질은 pH 12로 유지되는 3M 질산나트륨 용액으로 구성된다. Fe(III)/Fe(II) 몰비가 2인 제1철 및 제2철 이온의 3M 질산나트륨 용액이 제조되고, 혼합하면서 반응 매질에 천천히 첨가된다. 이는 빠르게 검게 변한다. 그 후, 용액 전체는 하룻밤 동안 주위온도에서 혼합하면서 숙성된다.

[0216] 그 후, 페라이트 나노입자가 자석에 침전되고, 반응 매질을 제거하기 위하여 상층액을 제거한다. 그 후, 실온에서 강하게 혼합하면서 펠릿을 2M 질산(HNO₃) 용액에 희석시킴으로써 나노입자 표면의

해교(peptization)(산성화) 및 산화가 수행된다.

[0217] 나노입자 코어의 산화는 상승된 온도(>90℃)에서 강하게 혼합하면서 질산 제2철 용액에 펠릿을 인큐베이션함으로써 수행된다.

[0218] 나노입자는 그 후 원심분리에 의해 세척된다.

[0219] 펠릿은 마지막으로 산성수로 희석하여 산화철의 농도가 150 g/L에 도달되게 한다. 상기 용액은 초음파처리에 의해 균질화되고, 그 후 pH는 pH 2로 조절된다.

[0220] 나노입자의 모폴로지(크기 및 형태)는 투과전자현미경에 의해 관찰된다(도 2a). 산화철 나노입자의 결정구조는 X-선 회절분석에 의해 확인되었다.

[0221] **실시예 2: 30 nm 크기의 산화철 나노입자 제조**

[0222] 30 nm를 중심으로 하는 크기분포를 갖는 산화철 나노입자는 제1철 이온의 침전 및 그 후 침전물의 산화에 의해 합성된다.

[0223] 수성 반응 매질은 질소 흐름의 지속적인 버블링 하에서 pH 8로 유지되었다. 염화 제1철 용액 및 수산화나트륨 용액이 제조되고, 반응 매질에 동시에 첨가되었다. 용액은 녹색으로 변했고, 매우 탁하게("밀키하게") 변했다.

[0224] 산화 단계는 H₂O₂ 용액을 첨가함으로써 수행되었다. 용액은 검게 변했고, 이는 페라이트 물질의 형성을 나타낸다. H₂O₂를 완전히 첨가한 후에, 질소 흐름이 제거되었다. 페라이트 나노입자는 그 후 교반하면서 2시간 동안 숙성되었다.

[0225] 상층액을 제거하기 위하여 페라이트 나노입자는 자석에 침전시켰다. 과염소산(HClO₄)에 의한 나노입자 표면의 해교는 펠릿을 1M HClO₄ 용액에서 희석함으로써 수행되었다.

[0226] 마지막으로, 해교된 나노입자는 증류수에 현탁시켜 180g/L 및 pH 2의 자성 유체를 획득하였다.

[0227] 상기와 같이 획득된 산화철 나노입자의 크기 및 형태가 투과전자현미경에 의해 관찰되었다(도 2b). 산화철 나노입자의 결정구조는 X-선 회절분석에 의해 확인되었다.

[0228] **실시예 3: 나노입자의 표면처리**

[0229] **3.1 헥사메타인산나트륨(HMP)에 의한 나노입자의 기능화**

[0230] 실시예 1의 산화철 나노입자 현탁액에 헥사메타인산나트륨 현탁액이 첨가되었고(첨가되는 헥사메타인산나트륨의 양은 LD50/5 미만임), 현탁액의 pH가 pH 6 내지 8로 조절되었다.

[0231] 표면 전하(< -20 mV)는 나노입자가 pH 6 내지 8의 수성 매질에 현탁된 0.2 내지 2 g/L 농도의 나노입자 현탁액에 가해지는 633nm HeNe 레이저를 사용하여 Zetasizer NanoZS(Malvern Instruments)에서 제타 전위 측정법에 의해 측정된다.

[0232] **3.2 실리카에 의한 나노입자의 기능화**

[0233] 첫번째 실리카 함침은 입자 용액(240 mL 증류수 중 실시예 2의 입자 1g에 대한 780μl)에 규산 나트륨을 첨가함으로써 수행된다. 남은 규산 나트륨은 물에 대한 원심분리에 의해 제거된다. 125 mg 입자가 0.6 mmol의 테트라 오르소규산을 함유하는 물/에탄올(1/4) 용액에 분산된다. 실리카 전구체 가수분해 및 축합은 대량의 암모늄 용액을 첨가함으로써 증대된다. 용액은 증류수에서 원심분리에 의해 입자를 세척하기 전에 밤새 배양된다. 코팅된 입자는 물에 남겨진다(pH는 약 7.4로 조절됨).

[0234] 표면 전하(< -20 mV)는 나노입자가 pH 6 내지 8의 수성 매질에 현탁된 0.2 내지 2 g/L 농도의 나노입자 현탁액에 가해지는 633nm HeNe 레이저를 사용하여 Zetasizer NanoZS(Malvern Instruments)에서 제타 전위 측정법에 의해 측정된다.

[0235] **3.3 2-[메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필] 트리메톡시실란; 90% 6-9 PE-유닛(PEO-실란)에 의한 나노입자의 기능화**

[0236] PEO-실란은 산성매질에서 축매되는 가수분해-축합 공정을 통해 산화철 나노입자 표면(실시예 1의 나노입자)에 공유적으로 그래프트된다.

[0237] 실시예 1의 산화철 나노입자 현탁액에 PEO-실란 현탁액이 첨가된다. 통상적으로, 246μl 부피의 PEO-실란(92

wt%) 용액이 산화철 중 75 g/L인 나노입자 용액 2mL에 첨가된다. 용액의 pH는 그 후 pH 6 내지 8로 조절된다.

[0238] 표면 전하(+8 mV)는 나노입자가 pH 6 내지 8의 수성 매질에 현탁된 0.2 내지 2 g/L 농도의 나노입자 현탁액에 가해지는 633nm HeNe 레이저를 사용하여 Zetasizer NanoZS(Malvern Instruments)에서 제타 전위 측정법에 의해 측정된다.

[0239] **실시예 4: 나노입자를 함유하는 리포솜의 제조**

[0240] 4.1 전하가 -20 mV 미만인 나노입자를 함유하는 "감열성 리포솜"(TSL):

[0241] 나노입자-함유 리포솜이 지질성 필름 재수화법을 사용하여 제조된다(Bangham et al., J. Mol. Bio., 1965;13:238-252; Martina et al., J. Am. Chem. Soc., 2005;127:10676-10685):

[0242] a) 지질은 클로로포름에 용해된다. 클로로포름은 결국 질소 흐름에서 증발된다. 지질성 필름의 재수화는 실시예 3.1에 기재된 산화철 용액 2mL에 의해 55°C에서 수행되고, 그에 따라 지질 농도는 50mM이다.

[0243] 하기의 지질 조성물이 사용되었다: 몰비 100:33:27:7(DPPC:HSPC:Chol:DSPE-PEG2000)의 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 콜레스테롤(Chol) 및 폐길화된 디스테아릴포스파티딜에탄올아민(DSPE-PEG2000).

[0244] b) 샘플을 55°C에서 조절된 액체 질소 및 물 베스에 연속적으로 침지시킴으로써 동결-용해 주기가 그 후 20번 수행된다.

[0245] c) 써모배럴(thermobarrel) 압출기(LIPEX™ Extruder, Northern Lipids)가 제어된 온도 및 압력에서 나노입자-함유 리포솜의 크기를 조정하기 위해 사용되었다. 모든 경우에, 압출은 2 내지 20 bar의 압력에서 55°C에서 수행되었다.

[0246] d) 비캡슐화된 입자의 분리는 세파크릴 S1000 여과 겔에서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 수행된다.

[0247] e) 용출 프로파일은 [Che et al., Journal of Chromatography B, 1995;669:45-51], 및 [Nigo et al., Talanta, 1981;28:669-674]에서 도입된 제1철 이온/페난트롤린 비색반응을 통한 UV-가시 분광법(Cary 100 Varian 분광계)을 이용하여 자성 나노입자의 정량화에 의해 측정된다. 리포솜-함유 분획이 수집된다(도 3, 첫번째 피크). 리포솜에서 산화철의 농도는 1 내지 2.5 g/L이다.

[0248] 이와 같은 조성물은 43°C의 Tm을 갖는다.

[0249] 4.2 전하가 -20 mV 미만인 나노입자를 함유하는 "비감열성 리포솜"(NTSL):

[0250] a) 단계에서 하기의 지질 조성물이 사용되는 것을 제외하고는, 전술된 절차에 따랐다: 몰비 100:65:7(HSPC:Chol:DSPE-PEG2000)의 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 콜레스테롤(Chol) 및 폐길화된 디스테아릴포스파티딜에탄올아민(DSPE-PEG2000).

[0251] a), b) 및 c) 단계에서, 지질 필름의 재수화, 용해 주기 및 압출 공정은 62°C에서 수행되었다.

[0252] 4.3 전하가 15 mV 미만인 나노입자를 함유하는 "감열성 리포솜"(TSL):

[0253] 실시예 3.3의 나노입자가 사용된 것 외에는, 전술된 실시예 4.1의 절차를 따랐다.

[0254] 실시예 5: 나노입자의 방출

[0255] 리포솜에 포획된 나노입자의 방출을 시각화하기 위해, 실시예 4.1 및 4.2에서 제조된 것과 같은 나노입자-함유 리포솜 용액 30μl이 물 베스에서 가열되었다.

[0256] 그 후, cryoTEM 관찰을 위해 다공성 탄소 코팅된 구리 그리드(grid)에 각 용액을 5μl씩 증착시켰다; 초과량은 여과지로 닦아냈고, 액체 질소로 냉각되는 액체 에탄 베스에 그리드를 침지시켰다. 샘플은 약 -170°C의 온도에서 유지되고 관찰되었다.

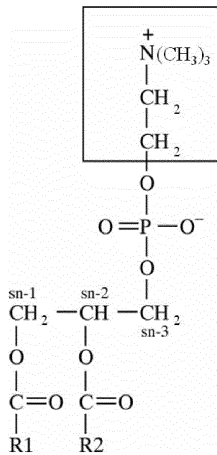
[0257] 도 4a 및 4b는 물 베스에서 60°C에서 가열 전후에, 산화철 나노입자를 함유하는 구형 230nm-크기의 "비감열성" 리포솜(NTSL)을 나타낸다.

[0258] 도 4c 및 4d는 물 베스에서 43°C(Tm)에서 가열 전후에, 산화철 나노입자를 함유하는 구형 200 nm-크기의 "감열성" 리포솜(TSL)을 나타낸다.

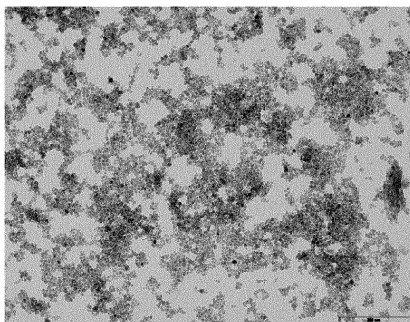
- [0259] 도 4e는 물 배스에서 48°C(T_m 초과)에서 가열 후에, 산화철 나노입자를 함유하는 구형 200 nm-크기의 "감열성" 리포솜(TSL)을 나타낸다.
- [0260] 도 4f는 실온에서 숙성된 산화철 나노입자가 적재된 감열성 리포솜을 나타낸다(실시예 4.3).
- [0261] 도 4g는 43°C(T_m)에서 숙성된 산화철 나노입자가 적재된 감열성 리포솜을 또한 나타낸다(실시예 4.3).
- [0262] "비감열성" 리포솜(NTSL)에 있어서, 온전한 230 nm-크기의 리포솜을 가열 전 후에 볼 수 있다(도 4a 및 4b).
- [0263] "감열성" 리포솜(TSL)에 있어서, 온전한 200 nm-크기의 리포솜을 가열 전에 도 4c에서 볼 수 있다.
- [0264] 반면, 도 4d에서 Tr=43°C에서, 그리고 도 4e에서 Tr=48°C에서 가열 후에, 200 nm-크기의 리포솜은 변형된 형태(도 4e, 흰색 화살표) 및 이중막의 파열을 나타낸다; 지질 이중막의 몇몇 조각도 또한 볼 수 있다. 몇몇의 사진은, 가열 후에 온전한 지질막이 더 이상 관찰되지 않고 산화철 나노입자가 지질 소포의 주변에 위치하는 소포를 나타낸다(도 4d). 자유 산화철 나노입자가 그리드에서 흔히 관찰된다. 나노입자의 방출이 Tr=T_m=43°C 온도에서 또는 T_m 이상의 온도(48°C)에서 나타난다. 하전된 나노입자와 지질 이중막(도 4e, 검은색 화살표) 간의 상호작용이 이와 같이 놀라운 결과를 설명할 수 있을 것이다.

도면

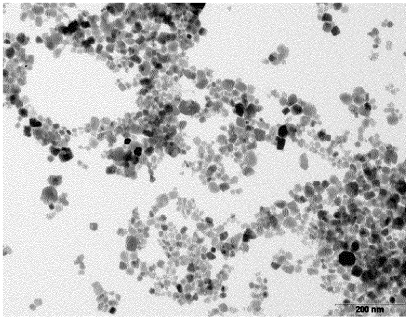
도면1



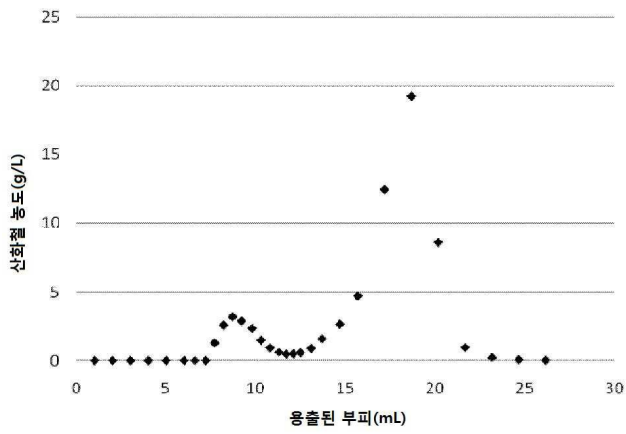
도면2a



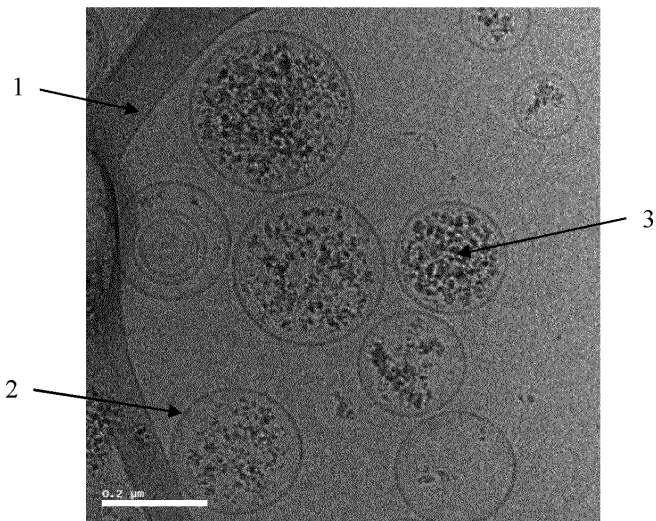
도면2b



도면3

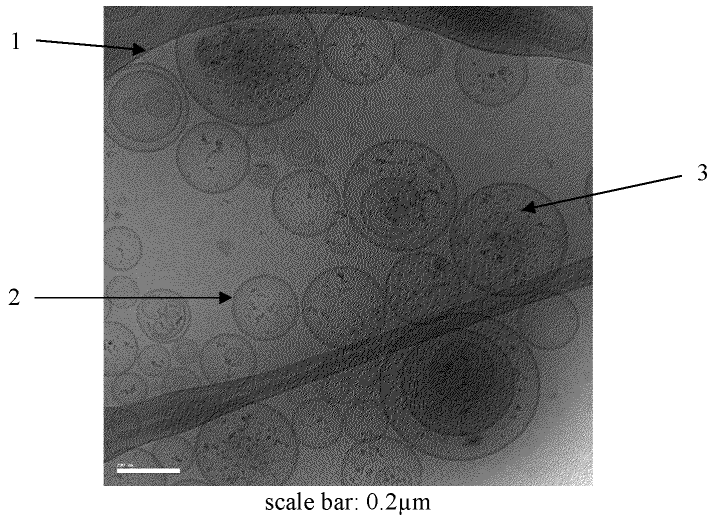


도면4a

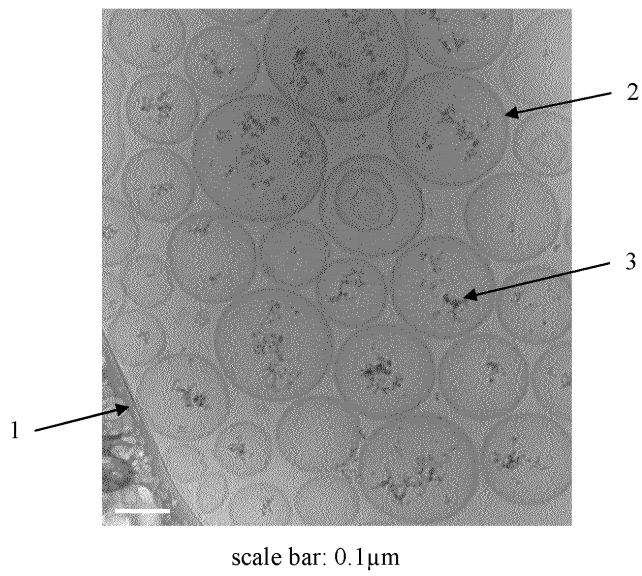


scale bar: 0.2μm

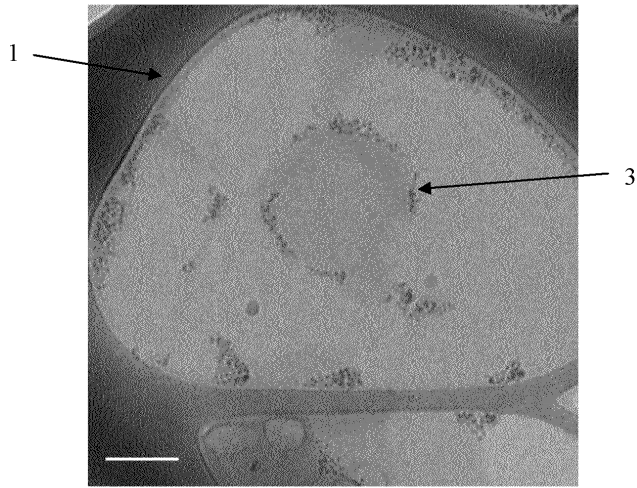
도면4b



도면4c

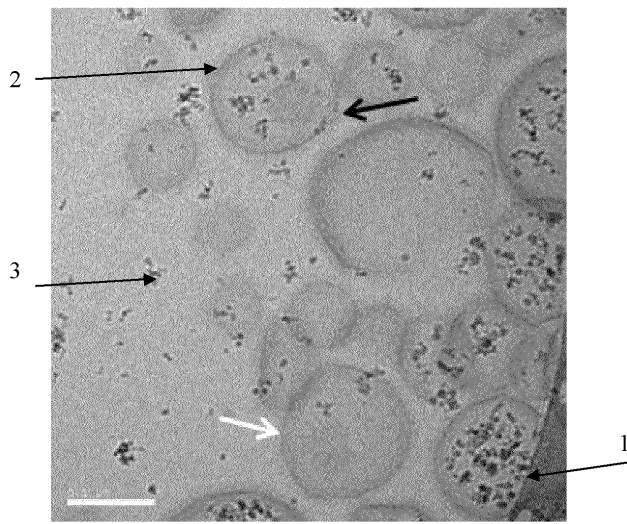


도면4d



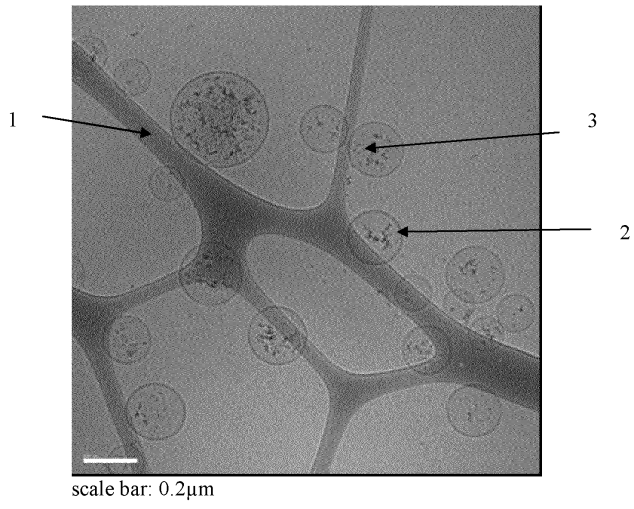
scale bar: 0.1 μ m

도면4e



scale bar: 0.1 μ m

도면4f



도면4g

