



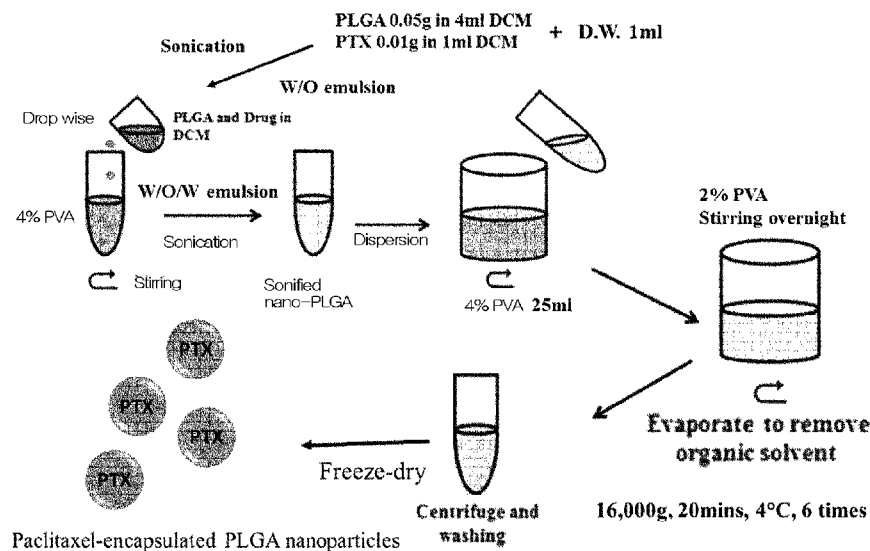
2017 년 11 월 30 일 (30.11.2017) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *A61K 9/51* (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004655
- (22) 국제출원일: 2017 년 5 월 2 일 (02.05.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0063479 2016 년 5 월 24 일 (24.05.2016) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이상경 (LEE, Sang-Kyung); 05572 서울시 송파구 올림픽로4길 15, 8동 302호 (잠실동, 아시아선수촌아파트), Seoul (KR). 이근용 (LEE, Kuen Yong); 06084 서울시 강남구 학동로88길 5, 1동 903호 (삼성동, 진흥아파트), Seoul (KR). 윤채옥 (YUN, Chae Ok); 06583 서울시 서초구 동광로27길 47, 301호 (방배동, 방배8차상지리츠빌), Seoul (KR). 이민형 (LEE, Min Hyung); 13836 경기도 과천시 별양로 111, 507동 702호 (별양동, 주공아파트), Gyeonggi-do (KR). 정건호 (CHUNG, Kun Ho); 05003 서울시 광진구 광나루로 361, 102동 701호 (군자동, 광진 동양파라곤 2단지), Seoul (KR). 올라이르판 (ULLAH, Irfan); 04763 서울시 성동구 왕십리로 222, IT/BT관 911호 (사근동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(54) Title: INTRANASAL PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING ANTICANCER DRUG-CONTAINING NANOPARTICLES FOR TREATING BRAIN DISEASES

(54) 발명의 명칭: 항암제 함유 나노입자를 포함하는 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물

Preparation of Paclitaxel-encapsulated PLGA nanoparticle



(57) Abstract: The present invention relates to an intranasal pharmaceutical composition comprising anticancer drug-containing nanoparticles for treating brain diseases. More specifically, the anticancer drug-containing nanoparticles are nasally administered to deliver the anticancer drug to only brain cells, thereby increasing therapeutic effects on brain tumor and reducing cytotoxicity to normal cells by an organic solvent used in the conventional delivery of the anticancer drug.

(57) 요약서: 본 발명은 항암제 함유 나노입자를 포함하는 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 항암제를 함유하는 나노입자를 비강 투여하여 뇌세포에만 항암제가 전달되도록 하여 뇌종양 치료적 효과를 높이고, 기존의 항암제 전달에 사용된 유기용매에 의한 정상세포의 세포독성을 줄이는 효과를 제공한다.



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

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 항암제 함유 나노입자를 포함하는 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항암제 함유 나노입자를 포함하는 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] FDA 승인을 받은 파클리탁셀(Paclitaxel 또는 탁솔(Taxol))은 난소암, 유방암, 폐암 등의 항암제로 사용되고 있다. 하지만, 탁솔이 분할하는 세포의 방추사에 결합하여 세포의 분할을 억제하므로 전신주사로 주입시 암세포 외의 장기/세포에 도달하여 탈모, 근육통, 설사 등 많은 부작용을 초래한다. 아울러, 대부분의 항암제는 소수성이어서 유기용매인 Cremophor EL에 녹여 전신주사로 투여되는데, 이에 대한 세포독성이 있어 심각한 부작용이 유발되고 있으나, 암세포의 복제를 억제하는 치료적 효과가 커 부작용에도 불구하고 임상에서 사용되고 있다.
- [3] 한편, 현재 뇌종양에 많이 쓰이는 테모졸로마이드(Temozolomide)는 경구형제제로 세포의 DNA에 결합하는 알킬화제(alkylating agent)로 활발하게 분화하는 세포의 사멸을 유도한다. 하지만, 혈액뇌장벽(BBB)에 의해 뇌종양에 가는 양이 부족하고, 일반세포에도 결합하여 많은 부작용을 초래한다.
- [4] 알려진 대부분의 항암제가 뇌종양 세포의 분열을 억제하는 작용으로 뇌종양의 성장을 억제하나, 경구형 또는 주사 제형으로 개발되어 빠르게 분열하는 정상세포에도 영향을 미쳐 부작용이 유발되는 단점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 방추사의 생성 또는 분해 억제용 항암제가 탑재된 나노입자를 비강-뇌 투여 경로를 통해 전달하여 뇌질환을 치료하는 비강 투여용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 상기 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 포함하는 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 키트를 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 이용한 뇌질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 방추사(mitotic spindle)의 생성 또는 분해 억제용 항암제를 함유하는 나노입자를 포함하는 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [9] 본 발명은 또한 상기 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물; 및

비강-뇌 약물전달장치를 더 포함하는, 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 키트를 제공한다.

- [10] 본 발명은 또한 상기 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 비강 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환의 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명은 뇌질환 치료를 위해 항암제를 함유하는 나노입자를 비강 투여함으로써 기존의 항암제 전달에서 사용하는 유기용매에 의한 정상세포의 세포독성을 줄이고, 뇌세포에만 항암제가 전달되도록 하여 뇌종양의 치료적 효과를 높인다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 본 발명의 파클리탁셀이 로딩된 나노입자(NP-PTX)의 생성 과정을 보여주는 모식도이다.
- [13] 도 2a는 NP-PTX의 동적 광산란에 의해 측정된 나노미터에서 평균 입자 직경 크기(Z_{Ave}) 및 입자 크기 분포이다. 시험한 모든 시료의 다분산지수(PDI)는 허용 범위(>0.1)에 있었다(도 2a, 내부).
- [14] 도 2b는 NPs 단독 또는 NP-PTX의 주사전자현미경(SEM) 이미지이다(스케일 바 400 μ m).
- [15] 도 2c는 37°C에서 PBS 내 나노입자로부터의 PTX 방출 동력학을 보여준다. 각 시간 간격은 3반복 실험에서 얻은 평균 $\pm$ SD를 나타낸다.
- [16] 도 3a는 다양한 농도의 PTX 단독, NP-PTX 및 RGD-NP-PTX 처리에 따른 C-6 신경교종 세포의 생존 및 사멸 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [17] 도 3b는 다양한 농도의 PTX 단독, NP-PTX 및 RGD-NP-PTX 처리에 따른 C-6 신경교종 세포의 생존 세포와 사멸 세포 수의 비율을 나타낸 것이다.
- [18] 도 4a-d는 인 비트로에서 PTX-로딩된 나노입자의 항암 효과 유도 결과를 나타낸 것으로, a)는 동량의 PTX 농도로 C6(a), 좌측) 및 U87MG(a), 우측) 신경교종 세포를 24시간 처리한 후 CCK-8 분석으로 측정된 항 증식 효과를 나타낸다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD를 나타낸다. b) PTX 또는 NP-PTX로 24시간 후 신경 교종 세포에서 세포사멸의 유세포 분석 결과를 나타낸다. % 아넥신 V 및 7AAD를 나타내는 대표적인 도트 플롯(상단 패널) 및 누적 데이터(하단 패널). 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD를 나타낸다. c)는 TUNEL 분석 결과를 나타낸다. 동량의 PTX 처리된 신경 교종 세포의 TUNEL 양성 세포(적색) 및 Hoechst 염색된 핵(파란색)을 보여주는 대표적인 형광 현미경 이미지이다(상단 패널). % TUNEL 양성 세포는 샘플당 4개 이상의 이미지로부터 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 계수하였다(하단 패널). 데이터는 3개의 독립 실험의 평균 $\pm$ SD를 나타낸다. d)는 C6 교모세포종 세포에서 PTX 단독, NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 처리 시 DNA 함량 분석

결과이다(G1, S 및 G2-M기에서 억제된 % 세포를 나타냄). 회수된 세포는 PI로 염색하고, 유세포 분석기로 분석하여, 데이터는 3반복의 평균±표준편차로 나타냄.

- [19] 도 5a-b는 비강 내 접종에 의한 나노입자의 뇌로의 전달을 나타낸 것이다. (a)는 랫트 교모세포종 모델에 접종된 I.N. 접종 NP-alexa₄₈₈(A₄₈₈) 표지된 나노입자(그룹당 n=6)의 생체 분포를 나타낸 것이다. 두뇌(밀면과 관상면)는 NP, A₄₈₈ 단독, A₄₈₈ 표지된 나노입자(NP-A₄₈₈) 및 A₄₈₈ 표지된 RGD-변형된 나노입자(RGD-NP-A₄₈₈) 접종 후 24시간에 A₄₈₈의 존재를 조사하였다. 표시된 시험 코호트±SE로부터 각 분리된 장기에 대한 임의의 픽셀 값으로 측정된 각 지시 장기(우측)의 상대 형광 강도를 묘사한 대표 이미지(뇌의 등쪽 및 관상 단면도 우측(a, 좌측) 및 누적 데이터(a, 좌측)이다. b)는 뇌의 크리오섹션의 형광 현미경 이미지이다. 대표 이미지는 a)에서 보이는 관상 절편으로부터 교모세포종에서 A488(녹색) 및 Hoechst 염색된 핵(파란색)(b) 상단 패널) 및 비-교모세포종 지역(b), 하단 패널)에 대해 염색하였다.
- [20] 도 6은 나노입자의 장기로의 전달을 확인한 결과이다.
- [21] 도 7a-e는 마우스 교모세포종 모델에서 NP-PTX의 비강 내 접종에 의한 인 비보 종양 생장의 저하 효과를 나타낸 것이다. (a)는 PBS(Mock) 플레인 나노입자 및 동량의 2mg/kg의 PTX 단독(PTX), PTX-탑재된 나노입자(NP-PTX) 및 PTX-탑재된 RGD-변형된 나노입자(RGD-NP-PTX) 처리된 정상 또는 교모세포종 모델의 대표적인 생물발광 이미징(a), 상단 패널), 절개된 뇌 이미지(a), 중간 패널) 및 엑소 비보 생물발광 이미징을 나타낸 것이다. b)는 a)에서 보여준 시험군의 인 비보(b), 좌측) 및 엑스 비보(b), 우측)에서의 생물발광 강도(BLI)를 나타낸 것이다. c)는 a)에서 보여준 시험군으로부터 연속적인 뇌 절편(상단 패널)의 대표적인 nissl 염색 및 mm³에서 암 체적(하단 패널)을 나타낸다. 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다. (d)는 a)에서 보여준 시험군으로부터 파라핀 매입 섹션에 대한 대표적인 헤마톡실린 및 에오신 염색 결과를 나타낸다. 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다. (e)는 a)에서 보여준 시험군으로부터 TUNEL 양성 세포(적색) 및 DAPI 염색된 핵(파란색) Ki67 면역염색(e), 하단 패널)을 보여주는 파라핀 매입 뇌 섹션의 대표적인 이미지를 보여준다(e), 상단 패널). 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다. 데이터는 평균±SD를 나타낸다(* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 및 n.s 유의하지 않음). 상기 데이터는 두 그룹 간의 평균값의 차이를 평가하기 위한 Mann-Whitney 테스트와 Graphpad Prism 5 소프트웨어를 사용하여 두 개 이상의 그룹 간의 평균값의 차이를 평가하는 일원 분산 분석(one-way ANOVA)에 의해 통계적으로 분석되었다. P<0.05는 통계적으로 유의하다고 간주하였다.
- [22] 도 8은 종양 이식 후 표시된 날의 동물의 체중을 나타낸다.
- [23] 도 9a-b는 마우스 교모세포종 모델에서 NP-PTX의 비강 내 접종에 의한 인 비보 종양 생장의 저하 효과를 나타낸 것으로, (a)는 PBS(Mock) 플레인 나노입자 및 동량의 1mg/kg의 PTX 단독(PTX), PTX-탑재된 나노입자(NP-PTX) 및

PTX-탑재된 RGD-변형된 나노입자(RGD-NP-PTX) 처리된 정상 또는 교모세포종 모델의 인 비모(a, 하단)에서 정상 및 살아있는 생물발광 강도(BLI)의 대표적인 살아있는 생물발광 이미징(a), 상단)이다. b)는 a)에서 보여준 시험군의 mm³에서 암 체적(하단 패널)을 나타낸다.

[24] 도 10은 본 발명의 비강-뇌 투여용 약물전달장치의 기능을 설명하기 위한 블록도이다.

[25] 도 11은 본 발명의 비강-뇌 투여용 약물전달장치의 사용 방법을 설명하기 위한 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[27] 본 발명은 방추사(mitotic spindle)의 생성 또는 분해 억제용 항암제를 함유하는 나노입자를 포함하는 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[28] 본 발명은 방추사의 생성 또는 분해 억제용 항암제를 고분자 나노입자에 봉입시키고, 비강-뇌 전달용 약물전달장치를 통해 비강-뇌 투여 경로로 항암제를 투여하므로 뇌세포에 직접적인 전달이 가능하며, 1) 효과적인 뇌종양 세포의 분할을 억제하고, 2) 대부분의 뇌세포는 G0 상태로 분할이 이루어지지 않으므로 항암제가 분열하는 뇌종양 세포에만 결합하여 세포의 복제를 표적으로 하여 억제하므로 정상 뇌세포에 대한 항암제 독성이 거의 없으며, 3) 고분자 나노입자에 항암제를 봉입시키므로 기존에 사용되는 유기용매인 Cremophor EL에 의한 독성이 없고, 4) 비강-뇌 전달을 통해 항암제가 뇌세포에만 전달되도록 하여 타 장기/세포에 전달되는 것을 최소화하여 뇌세포를 제외한 일반세포에 대한 항암제 부작용을 줄일 수 있어 뇌종양 치료적 효과를 높이는 것을 특징으로 한다.

[29] 상기 방추사의 생성 또는 분해 억제용 항암제는, 방추사 조립(생성)을 억제하는 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈플루닌(vinflunine), 빈데신(vindesine) 및 비노렐빈(vinorelbine)를 포함하는 빈카 알칼로이드계(vinca alkaloids) 항암제를 들 수 있다. 또한, 방추사 분해를 억제하는 항암제로, 카바지탁셀(cabazitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 라로탁셀(larotaxel), 오르타탁셀(ortataxel), 파클리탁셀(paclitaxel) 및 테세탁셀(tesetaxel)을 포함하는 탁센계(taxanes) 항암제; 또는 이사베필론(ixabepilone)을 포함하는 에포틸론계(epothilones) 항암제를 들 수 있다.

[30] 상기 나노입자는 생분해성 고분자로 제조될 수 있다. 생분해성 고분자는 예를 들어, 폴리-D-락트산, 폴리-L-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-D-락트산-코-글리콜산, 폴리-L-락트산-코-글리콜산, 폴리-D,L-락트산-코-글리콜산(PLGA), 폴리락타이드(PLA), 폴리락타이드-글리콜라이드(PLA/GA), 또는 폴리알킬시아노아크릴레이트,

폴리아크릴로일 하이드록시에틸 전분(poly(acryloyl hydroxyethyl) starch), 폴리부틸렌 테레프탈레이트-폴리에틸렌글리콜의 공중합체, 키토산(chitosan) 및 그의 유도체, 폴리오르쏘에스터-폴리에틸렌글리콜의 공중합체, 폴리에틸렌글리콜 테레프탈레이트-폴리부틸렌 테레프탈레이트의 공중합체, 폴리세바식언하이드라이드(poly sebacic anhydride), 풀루란(pullulan) 및 그의 유도체, 전분 및 그의 유도체, 셀룰로오스 초산염(cellulose acetate) 및 그의 유도체, 폴리언하이드라이드(polyanhydride), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리카보네이트(polycarbonate), 폴리부타디엔(polybutadiene), 폴리에스터(polyesters), 폴리하이드록시부티르산(polyhydroxybutyric acid), 폴리메틸 메타크릴레이트(polymethyl methacrylate), 폴리메타크릴산 에스터(polymethacrylic acid ester), 폴리오르쏘에스터(polyorthoester), 폴리비닐초산(polyvinylacetate), 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol), 폴리비닐부티랄(polyvinyl butyral), 폴리비닐포말(polyvinylformal), 알부민, 카제인, 콜라겐, 피브린, 피브리노젠, 젤라틴, 헤모글로빈, 트랜스페린, 제인, 및 이들의 혼합물로 구성되는 그룹으로부터 선택될 수 있다.

- [31] 상기 나노입자는 종양 마커를 표적화하는 성분이 추가로 결합되어 있을 수 있다.
- [32] 상기 종양 마커를 표적화하는 성분은 인테그린을 표적화하는 RGD 펩타이드, 또는 실렌지타이드(cilengitide); EGFR에 결합하는 리간드인 EGF 또는 EGFR 결합 펩타이드 등을 사용할 수 있다.
- [33] 상기 항암제를 함유하는 나노입자는 공지의 제조방법을 이용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 수중유중수형(water-in-oil-in-water, w/o/w) 이중 에멀전 방법에 따라 제조될 수 있다. 구체적으로, PLGA 및 항암제인 파클리탁셀을 유기용매에 녹이고, 초음파처리를 통해 유화시킨 후 단일 에멀전을 수용성 PVA 용액에 다시 유화시키고 초음파처리하여 얻은 이중 에멀전을 PVA 용액에 첨가하여 유기용매를 증발시켜 제조할 수 있다.
- [34] 상기 유기용매는, 예를 들어, 디클로로메탄, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 헥산, 및/또는 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 항암제를 함유하는 나노입자는 구형의 약 150 내지 200nm의 평균 직경을 가질 수 있다.
- [36] 본 발명은 또한 상기 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물; 및 비강-뇌 약물전달장치를 더 포함하는, 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 키트에 관한 것이다.
- [37] 본 발명의 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물은 비강-뇌 전달용 약물전달장치를 통해 비강-뇌 투여 경로로 분사될 수 있다.
- [38] 상기 비강-뇌 전달용 약물전달장치는 공지의 네블라이저 형태를 사용할 수 있다. 본 발명에 따르면, 상기 비강-뇌 전달용 약물전달장치는, 도 10에 도시된 바와 같이, 동결건조된 약품을 보관하는 동결건조 약품 컨테이너(110), 상기

동결건조된 약품을 해동하는 솔벤트를 보관하는 복원 솔벤트 컨테이너(120), 상기 동결건조된 약품과 상기 솔벤트의 혼입을 방지하는 멤브레인 및 추진력을 제공하는 압축기(130)를 포함하되, 상기 압축기의 추진력은, 상기 멤브레인을 오픈(open)함으로써, 상기 동결건조된 약품과 상기 솔벤트를 믹싱하여 상기 동결건조된 약품을 해동함은 물론 상기 해동된 약품을 분무시키도록 구성될 수 있다.

[39] 또한, 상기 비강-뇌 전달용 약물전달장치는, 약품의 분사를 위해 분무부(140)를 포함하며, 약품은 상기 분무부를 통하여 외부로 분무될 수 있다.

[40] 상기 비강-뇌 전달용 약물전달장치는, 상기 압축기를 기준으로 상기 복원 솔벤트 컨테이너, 상기 멤브레인, 상기 동결건조 약품 컨테이너 및 분무부 순서로 위치할 수 있다.

[41] 상기 복원 솔벤트 컨테이너는 가요성으로 이루어지며, 상기 추진력에 의하여 상기 복원 솔벤트 컨테이너가 변형됨에 따라 증가한 내압에 의하여 상기 멤브레인이 오픈될 수 있다. 즉, 상기 추진력에 의하여 상기 복원 솔벤트 컨테이너가 상기 동결건조 약품 컨테이너 방향으로 이동함에 따라 상기 복원 솔벤트 컨테이너의 내압이 증가하여 상기 멤브레인이 오픈될 수 있다.

[42] 상기 압축기는 상기 복원 솔벤트 컨테이너의 일단으로 추진력을 제공하며, 상기 복원 솔벤트 컨테이너의 타단은 상기 멤브레인에 의하여 상기 동결건조 약품 컨테이너와 차단될 수 있다.

[43] 따라서, 상기 복원 솔벤트 컨테이너의 일단은 상기 추진력을 제공받는 수용홈을 포함할 수 있다.

[44] 상기 동결건조 약품 컨테이너(110)는, 약품을 동결건조된 상태로 보관할 수 있다. 약품을 동결건조한다는 의미는 약물을 얼린 다음에 주위의 기압을 낮춰서 고체 상태의 물을 기체로 승화한다는 의미로 이해될 수 있다. 즉, 상기 동결건조 약품 컨테이너(110)는 동결건조된 파우더(powder) 형태로 약품을 보관할 수 있다. 본 발명에서는 항암제를 함유하는 나노입자를 동결건조하여 보관할 수 있다.

[45] 상기 동결건조 약품 컨테이너는 상기 해동된 약품을 분무하기 위한 미세공을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 미세공으로부터 분출된 약품은 상기 분무부를 통하여 외부로 분무될 수 있다.

[46] 상기 멤브레인은 약품 보관 시에는 상기 동결건조된 약품과 상기 솔벤트의 혼입을 차단하며, 약품 분무 시에는 오픈됨으로써, 상기 동결건조된 약품이 상기 솔벤트와 혼입되어 해동되도록 구성될 수 있다.

[47] 상기 복원 솔벤트 컨테이너(120)는 상기 동결건조된 약품을 해동하는 복원 솔벤트를 보관할 수 있다. 이하에서 복원 솔벤트는 편의를 위하여 솔벤트로 약칭될 수 있다.

[48] 상기 복원 솔벤트 컨테이너(120)는 상기 복원 솔벤트로서, 예를 들어, 글리세롤(glycerol), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌

글리콜(polyethylene glycol), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), 에틸 알코올(ethyl alcohol), 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 피넛 오일(peanut oil), 멸균정제수(sterile water), 멸균식염수(sterile normal saline solution), 멸균인산염 버퍼 용액(sterile phosphate buffer solution) 중 적어도 하나의 물질을 포함할 수 있다.

[49] 약품을 보관하는 모드에서는 상기 동결건조 약품 컨테이너(110)의 동결건조 약품과 상기 복원 솔벤트 컨테이너(120)의 복원 솔벤트는 멤브레인에 의하여 서로 혼입이 방지되도록 구성될 수 있다. 이와 달리, 약품을 분무하는 모드에서는 상기 멤브레인이 오픈됨으로써, 상기 동결건조 약품 컨테이너(110)의 동결건조 약품과 상기 복원 솔벤트 컨테이너(120)의 복원 솔벤트가 혼입되어 동결건조 약품이 해동 복원될 수 있다.

[50] 상기 압축기(130)는 상기 약물전달장치(100)에 추진력을 제공할 수 있다. 보다 구체적으로 상기 압축기(130)는 약품을 분무하는 추진력을 제공하는 동시에, 상기 동결건조 약품 컨테이너(110)와 상기 복원 솔벤트 컨테이너(120) 사이의 멤브레인을 오픈 즉 파손함으로써, 동결건조 약품과 복원 솔벤트를 믹싱시킬 수 있다.

[51] 상기 압축기(130)는 다양한 방식으로 구동될 수 있다. 상기 압축기(130)는 주사기 타입으로 조작자가 직접 추진력을 제공하는 형태로 마련될 수 있다. 이와 달리, 상기 압축기(130)는 압축가스를 포함하며, 조작자의 조작에 따라 압축가스를 분사함으로써, 추진력을 제공하는 형태로 마련될 수 있다. 이하에서는 설명의 편의를 위하여 상기 압축기(130)가 압축가스를 포함하는 경우를 상정하기로 한다.

[52] 상기 압축가스는 인체에 흡입되어도 무방한 물질로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 상기 압축가스는 하이드로플루오알케인(Hydrofluoroalkane: HFA), 질소, 클로로플루오로카본(chloroflourocarbon: CFC), 공기 중 적어도 하나의 물질로 이루어질 수 있다.

[53] 상기 압축가스는 반드시 압축가스일 필요는 없으며 압축 액체 형태로 제공될 수 있음은 물론이다.

[54] 상기 분무부(140)는 동결건조된 약품을 복원 솔벤트와 믹싱하여 해동된 약품을 상기 압축기(130)로부터 제공되는 추진력을 통하여 분무하는 통로를 제공할 수 있다.

[55] 도 11은 비강-뇌 전달을 위한 약물전달장치의 사용 방법을 보여주는 도면이다. 도 11에 개시된 비강-뇌 전달을 위한 약물전달장치(100)는 압축기(230)를 수용하는 제1 하우징(202); 상기 동결건조 약품 컨테이너, 복원 솔벤트 컨테이너, 멤브레인 및 분무부를 수용하는 제2 하우징(204)을 포함할 수 있다.

[56] 도 11을 참조하면, 본 발명의 약물전달장치(100)의 일 단은 비강의 입구에 인입될 수 있다. 약물전달장치(100)의 일 단이 비강의 입구에 인입된 상태에서 상기 압축기(230)를 푸쉬함으로써, 동결건조된 형태로 보관 중인 약품이

해동되어 비강으로 나선형 형태로 분무(흰색 화살표 참조)될 수 있다. 비강으로 분무된 약품은 비강-뇌 약물 전달 스팟이 정확하게 도달함으로써, 비강-뇌 약물 전달율을 향상시킬 수 있다.

- [57] 또한, 본 발명의 약물전달장치의 사용 시에는 대상체 예를 들어, 대상자의 머리를 메카포지션(mecca position)의 형태로 유지한 상태에서, 사용하여야 비강-뇌 약물전달 효과를 극대화할 수 있다. 메카포지션에서의 약물 주입은, 비강을 통하여 뇌에 집중적으로 약물이 전달되도록 하므로 다른 장기로의 유입을 없애는 효과를 제공할 수 있다. 이때 메카포지션이라 함은, 대상체의 머리가 가슴을 향하는 자세를 말할 수 있다.
- [58] 또한, 본 발명의 비강-뇌 약물전달장치의 사용 시에는 대상체 예를 들어, 대상체가 수면, 마취 상태일 때 또는 의식을 잃었을 때 상술한 메카포지션을 유도하여 약물을 제공하는 것이 효과적일 수 있다.
- [59] 본 발명은 또한 상기 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 비강 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환의 치료 방법을 제공한다.
- [60] 상기 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물은 조성물을 담지할 수 있는 담지부가 구비된 주입 장치에 담지하여 비강 투여될 수 있다.
- [61] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상술한 비강-뇌 약물전달장치의 동결건조 약품 컨테이너에 담지하여 비강 투여될 수 있다.
- [62] 상기 비강 투여는 대상체의 수면, 마취 또는 무의식 상태에서 수행될 수 있다.
- [63] 상기 뇌질환은 뇌종양일 수 있다.
- [64] 상기 대상체는 개, 고양이, 랫트, 마우스, 인간 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다.
- [65] 이상, 본 발명을 바람직한 실시예를 사용하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [66] <실시예 1> 파클리탁셀이 로딩된 PLGA 나노입자의 제조
- [67] 파클리탁셀을 전달하기 위해 PLGA 나노입자를 이용하였다. 또한, 암 환경 내에서 효과적인 약물 방출 및 타겟 특이성을 개선하기 위해, 나노입자의 표면을 RGD 펩타이드로 개질하였다. RGD 펩타이드는 악성 암 세포에 의해 발현되는 인테그린 수용체를 타겟으로 한다.
- [68] 이를 위해, 이미 기술된 수중유중수형(water-in-oil-in-water, w/o/w) 이중 에멀전 방법(F, Danhier *et al. Journal of Controlled release*, vol.133(1), pp.11-17, 2009)에 따라 파클리탁셀이 로딩된 PLGA 나노입자(NP-PTX)를 제조하였다. PTX(1%,

w/v) 및 PLGA(4%, w/v)를 디클로로메탄에 녹이고, 탈이온수를 1:5 부피비로 용액에 첨가하여 프로브-타입 소니케이터(Branson Digital Sonifier®, Danbury, CT)를 사용하여 25W 출력으로 60초 동안 실온에서 유화시켰다. 단일 에멀전(w/o)을 수용성 PVA 용액(4%, w/v)에 다시 유화시키고, 30W로 120초 동안 소니케이션하였다(w/o/w). 이중 에멀전을 PVA(1%, w/v) 용액에 붓고, 밤새 교반하여 용매를 증발시켰다. NP-PTX는 16000 rpm에서 원심분리하여 수득하여, 세척하고, 동결건조하였다(도 1).

[69] <실시예 2> 나노입자의 물리화학적 특성규명

[70] 상기에서 제조된 NP-PTX의 Z-평균 크기는 Malvern's Zetasizer Nano ZS(Malvern instruments, Worcestershire, UK)로 측정하였다. 1mg의 나노입자를 1mL의 여과된 탈이온수에 녹였다. Z-평균 크기(nm), 다 분산도(25°C, 측정 각 170°)의 5 가지 판독 값이 사용되었다. 데이터 분석을 위해 물의 점도(0.8872 mPa.s)와 굴절률(1.33)을 사용하여 Z-평균 크기를 결정하였다. 나노입자의 표면 형태는 주사 전자 현미경(Tokyo, Japan)으로 조사하였다. 탈이온수에 나노입자를 현탁하고(0.5% w/v), 실온에서 알루미늄 홀더에 올려놓았다. 장착된 샘플을 밤새 건조시킨 다음 진공 하에 백금으로 코팅하였다.

[71] 다음으로, HPLC(Waters HPLC 모델)로 NP-PTX의 약물 로딩 효율 및 방출 프로파일을 측정하였다. 컬럼은 대칭 C18 컬럼, 100Å, 5 μ m, 4.6mm×250mm이었다. 이동상은 아세토니트릴/물(75/25 v/v)이었고 유속은 1mL/min으로 유지되었고 파장 227nm에서 검출되었다. 로딩 효율을 결정하기 위해 50 μ L의 NP를 1N NaOH 용액으로 용해시킨 다음 1N HCl 용액으로 NaOH 용액을 중화시켰다. 아세토니트릴을 PTX가 용해된 PTX 용액에 첨가하여 PTX를 용해시켰다. PTX-로딩된 PLGA 나노입자의 로딩 효율 측정 후, 0.5mg의 PTX-로딩된 PLGA 나노입자를 5mL의 인산 완충액(PBS, pH 7.4)에 분산시키고, 결정 시점에서 교반하면서 37°C에서 배양하고, 그 용액을 4°C에서 30분 동안 22000g에서 초원심분리하였다. 상등액을 회수하여 5mL의 아세토니트릴과 혼합하고 펠렛을 5mL의 PBS로 재현탁하고 37°C에서 교반하면서 다시 인큐베이션 하였다. 각 샘플을 50 μ L의 부피로 주입하고 전술한 HPLC 조건으로 분석하였다.

[72] 상기 실시예 1에서 제조된 나노입자의 크기는 수용 가능한 좁은 크기 분포 내에서 150-200nm 근처였다. 다분산도 지수 $PDI \geq 0.1$ 이며, PTX의 로딩 전후 또는 RGD 펩타이드를 이용한 표면 개질 전 후 크게 달라지지는 않았다(도 2a, 2c). 이 결과는 나노입자에서 PTX의 로딩이 약물이 없는 나노입자와 비교하여 크기에 영향을 주지 않는다는 기존의 연구와 일치한다. 같은 패턴이 주사전자현미경 분석에서도 관찰되었다. 주사전자현미경 사진도에는 균일한 구형 입자의 형성이 나타났다(도 2a).

[73] 이전 연구들에서, 230nm 미만의 나노입자들은 인 비트로 및 인 비보 둘 다에서 세포 전달이 개선되었음을 보여주었다.

- [74] 나노입자 내부에 로딩된 PTX 함량비율은 약 5.3% 미만이었으며, 캡슐화 효율은 약 40%였다. 그러나, RGD-NP-PTX 그룹에서 약물 함량 비율은 최종 2.8% 미만, 그리고, 30%의 캡슐화 효율로 줄어들어, 느슨하게 캡슐화된 약물이 배출됨을 시사한다(도 2c).
- [75] 초기 30분 내에 나노입자로부터 대략 30%의 약물 함량이 방출되고, 이후 4일 이상 서서히 지속적으로 방출되었다(도 2b). PTX의 지속적인 방출은 세포 내 환경에서 상당한 약물 함량이 필요한 곳에서 항-종양 효과를 위해서는 장점이 될 것이다. 전반적으로, 이 결과는 나노입자로의 소수성 PTX 약물 로딩이 균일한 구형 나노 크기의 입자를 형성하여 캡슐화된 PTX의 지속적인 방출을 허용함을 입증하는 것이다.
- [76] <실시예 3> PTX-로딩된 나노입자의 세포 증식 억제에 의한 항-종양 효과
- [77] 파클리탁셀은 몇몇 타입의 고형암에 대한 항종양 약물로 널리 사용되는 것 중 하나이다. 배양된 C-6 신경교종 세포에서 PTX의 항-암 효과를 밝히기 위해, PTX 단독, NP-PTX 및 RGD-NP-PTX를 다양한 마이크로몰(μM) 농도로 처리하였다.
- [78] 실험에 사용한 랫트(C6) 및 인간(U87MG) 교모세포종 세포는 ATCC(Rockville, MD)로부터 얻었으며, 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서 10% 소태아혈청, 페니실린(100IU/mL) 및 스트렙토마이신(100 μg /mL)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's Medium(DMEM)에서 배양하였다. 모든 인 비트로 실험을 위해 세포를 1×10^5 세포/웰의 밀도로 12-웰 플레이트에 씨딩하였다. 이어서, 다양한 농도의 PTX 단독 또는 동량의 NP-PTX를 24시간 동안 세포에 처리하였다.
- [79] 세포 주기 분석을 위해, C6 또는 U87MG 교모세포종 세포를 다양한 농도의 PTX 단독 또는 동량의 NP-PTX에 24시간 동안 노출하였다. 그리고 나서, 세포를 회수하고 4°C에서 2시간 동안 70% 에탄올에서 고정하였다. 인큐베이션 후 세포를 세척하고, 추가로 DNase free RNase(1mg/mL)과 더불어 0.02mg/mL의 프로피디움 아이오다이드(PI)와 함께 인큐베이션 하였다. 세포 주기 프로파일은 유세포 분석기(BD FACS Calibur™)를 사용하여 연구하고, FlowJo software로 분석하였다.
- [80] C6 신경교종 세포의 생존 및 사멸 분석을 위해, 세포를 상기와 같이 배양하고, PTX 또는 NP-PTX로 24시간 동안 처리한 후, 제조자의 지시에 따라 생존/사멸 가능성/세포 독성 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 칼신-AM(calcein-AM) 및 에티디움 호모 다이머(EthD-1)와 함께 배양하였다. 이미지는 형광 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 캡처하였다. 살아 있거나 죽은 세포의 퍼센트는 NIH(National Institute of Health)가 개발한 소프트웨어 imageJ에 의해 계산되었다.
- [81] 인 비트로 항종양 효과를 시험하기 위해, PTX 또는 NP-PTX의 항 종양 효능은 CCK-8 분석(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 사용하여 지시된 농도로 24시간 배양기에서 제조자의 지시에 따라 측정하였다. PTX 또는 NP-PTX로 처리한 후 세포사멸 세포의 백분율을 확인하기 위해, 제조사의 지시에 따라

- 세포를 PE 아넥신 V 세포사멸 검출 키트(BD Pharmingen™)로 염색하였다.
- [82] 루시퍼라제를 발현하는 안정한 C6 세포주(C6-Luc)의 생성을 위해 루시퍼라제 발현 렌티바이러스 벡터(RediFect Red-FLuc-GFP, PerkinElmer, Waltham, MA)를 사용하였다. Red-FLuc-GFP로 37°C에서 8시간 처리하였다. 플레이트를 37°C에서 48시간 더 배양하였다. 안정한 루시퍼라제-발현 세포주가 확립될 때까지 세포를 FACS 분석기로 GFP 발현에 의해 분류하였다.
- [83] 생존 및 사멸 분석에서 나타난 바와 같이, 암세포 사멸은 농도 의존적으로 증가하였다(도 3a). 또한, PTX 단독 처리 시, 0.01, 0.1, 1, 10 및 50 μ M의 농도에서 각각 8.3%, 23.1%, 31.8%, 49.2%, 63.8%의 죽은 세포가 발견되었다. NP-PTX의 암세포 사멸 거동은 24시간 후 PTX 단독 처리와 비교적 유사하였다. 그러나, RGD-NP-PT 처리 시, 약간 증가하였다(도 3b).
- [84] 생존 및 사멸 분석과 동일하게, CCK-8 분석 역시 C6 또는 U87MG 세포에서 각 처리 농도에서 항-증식 효과의 유사한 패턴이 보였다(도 4a). C6-신경교종 세포 증식은 미-처리된 매우 증식하는 세포와 비교하여 동량의 50 μ M의 PTX 처리 시, C6에서 35% 미만, U87MG 교모세포종 세포에서 20% 미만으로 극적으로 감소하였다.
- [85] 다음으로, 각각 초기 및 후기 세포사멸에 대한 마커로서 아넥신 V 및 7-AAD로 세포를 염색하여 PTX가 랫트 신경교종 세포에서 세포사멸을 유도하는지 조사하였다. 아넥신 V 및 7-AAD 양성 세포 둘 다의 수는 PTX, NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 중 어느 것을 처리한 후 농도-의존적으로 증가하였다(도 4b). 또한, 0.01, 0.1, 1, 10 및 50 μ M PTX 처리 시 아넥신 V 양성 세포는 각각 22.5%, 24.1%, 30.1%, 33.1%, 34.2% 증가하였다(도 4b의 하단 좌측 패널). 동량의 PTX를 처리한 세포에서 약물 농도가 증가함에 따라 7-AAD 양성 세포의 수도 상승하였다(도 4b의 하단 우측 패널).
- [86] 추가로, PTX, NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 처리된 C6-신경교종 세포에서 세포사멸 세포의 총 수를 TUNEL 분석을 통해 시험하였다. TUNEL 염색된 세포사멸 세포의 수는 모든 동량의 PTX 처리된 군에서 농도 의존적으로 증가하였다(도 4c). TUNEL 양성 세포의 수는 각 시험된 마이크로몰 농도의 PTX에서 약 77, 97.5, 136.6, 198.6 및 236.1로 평가되었다.
- [87] Hoechst 염색 결과, 정상 미-처리된 신경교종 세포에서 분절화 또는 단편화 없이 동종의 핵 구조를 나타냈다. 대조적으로, PTX, NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX의 처리는 처리 후 DNA 단편화 또는 분절화가 심각하게 형성되거나 응축된 핵을 나타냈다(도 4c).
- [88] 이들 결과는 PTX-로딩된 나노입자가 배양된 신경교종 세포에 대해 효과적인 항-암 효과를 나타냄을 시사한다. 사실, PTX의 작용 메커니즘과 일관되게, 효과적인 항-암 효과는 세포의 대다수가 G2 및 M 세포주기에 들어가는 곳에서 더 긴 인큐베이션 시기 동안 관찰될 수 있다.
- [89] 다음으로, 랫트 및 인간 교모세포종 세포 주기 정지에 대한 TPX 처리의 효과를

확인하였다. 배양 세포에의 PTX 노출이 G2-M 주기 정지를 유도한다는 것은 잘 알려져 있다. PTX 처리된 세포의 DNA 함량 분석은 G1 기에 정지된 세포의 유의적인 감소와 더불어 G2-M기에서 정지된 세포 집단의 축적을 나타낸다(도 4d). 대표 막대 그래프 데이터에 따르면, 미-처리된 세포에서 제한된 집단 29%가 G2-M기에 있으며, 대다수의 세포 집단은 G1기에 있다. C6 교모세포종 세포에서 PTX 단독, NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX에서 동량의 TPX(10 μ M)를 처리한 경우, G2-M기의 83%, 86%, 88% 전진과 9%, 8%, 7%의 G1기를 나타냈다(도 4d). 유사한 패턴이 G2-M기에서 약간 더 정지된 집단을 갖는 인간 U87MG 교모세포종 세포에서 관찰되어, U87MG 세포에서 더 큰 PTX 반응을 시사한다(도 4d). 흥미롭게도, PTX 단독 처리와 비교하여, 신경교종 세포의 정지된 G2-M 체크포인트 집단은 약하게 증가되어 PTX 농도의 세포 내 침투가 향상됨을 시사한다. 이 결과는 배양된 교모세포종의 PTX 노출은 G2-M기에서 세포주기 정지를 최종적으로 촉진함을 입증한다.

- [90] <실시예 4> 비강 접종에 의한 나노입자의 뇌로의 전달
- [91] 신경교종을 갖고 있는 뇌에서 입자의 인 비보 분포를 평가하기 위해, alexa488(A₄₈₈)를 NH₂-개질된 PLGA 나노입자에 결합시켰다. 추가로, 나노입자의 암 특이 표적화를 위해, A₄₈₈이 결합된 나노입자를 RGD로 표면 개질하였다. A₄₈₈이 결합된 나노입자의 생체 내 분포를 확인하기 위해, 총 100 μ g의 alexa488이 결합된 NP를 POD 장치를 이용하여 각 콧구멍에 최종 부피 25 μ l로 I.N 접종하였다(도 11 참조). 접종 후 24시간에, 동물을 희생시키고, 장기를 절제하였다. 차가운 PBS로 장기를 세척하고, 표면 수막을 제거하여 자가-형광을 제거하였다. Image station(Carestream, Rochester, NY) 하에서 형광 신호를 탐지하기 위해 뇌를 관찰하였다. 상대 형광 강도는 image J 소프트웨어(NIH)를 사용하여 측정하였다. 신경교종 지역에서 세포밀도(%)를 측정하기 위해, 70 μ m 세포 스트레이너(BD, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 단일세포 현탁액을 제조하였다. 유세포 분석기(BD, Franklin Lakes, NJ)를 통해 세포를 획득하고, FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.
- [92] RGD-개질된 나노입자의 단일 비강 내 접종은 24시간 접종 후 뇌의 신경교종 지역에서 특이적으로 형광 신호의 눈에 띄는 국소화를 나타냈다(도 5a). 관상 뇌 절편 이미지는 암 지역에서 특이적으로 A₄₈₈ 표지된 RGD-NP 입자의 강한 분포를 보여주어, 인테그린이 풍부한 암 지역에서 입자가 국소화됨을 시사한다. 대조적으로, NP-A488 그룹은 암-특이 지역에서 국소화 없이 빈약한 분포를 보여주어 제한된 종양 세포 침투를 시사한다.
- [93] 추가로 신경교종이 있는 동물 뇌에서 나노입자의 분포를 평가하기 위해, 냉동 절편을 준비하였다. 형광 현미경 데이터는 NP-A488 및 RGD-NP-A₄₈₈이 암 부위에서 뚜렷한 분포 패턴을 나타냈다(도 5b). 엑스 비보 뇌 이미징 데이터와 일관하게, A₄₈₈ 또는 NP-A₄₈₈는 암 지역에서 빈약한 분포를 보였다. 대조적으로, RGD-NP-A₄₈₈는 비-암 지역과 비교하여 암 지역 내에서 강하게 국소화되어, RGD

- 웹타이드로 나노입자를 개질한 것은 비-신경교종 지역보다는 신경교종 지역에서 특이적으로 종양세포 내재화를 개선함을 시사한다(도 5b).
- [94] RGD-NP-A₄₈₈ 처리군에서 소수 국소화는 뇌에서 주변 청소치에 이르기까지 비-표적화된 나노입자의 연속적인 배출을 시사함에도 불구하고, 주변 장기 데이터에서는 NP-A₄₈₈ 처리군에서 간과 신장에서 국소화가 관찰되었다(도 6).
- [95] <실시예 5> 랫트 교모세포종 모델에서 비강 내 접종된 PTX-로딩된 나노입자에 의한 종양 성장 저하 효과
- [96] 두개 내 C6-Luc 오쏘트로픽(orthotropic) 모델에서 비강 내로 전달된 PTX-로딩된 나노입자의 치료적 효능을 평가하였다. 발색단이 용해된 PTX(탁솔)의 I.N 접종은 아마도 그것의 끈적한 특성으로 인해 접종 후 몇 분 내에 비정상적인 동물 거동을 유발한다. 따라서, PTX 용매로 DMSO를 사용하였다. 추가로, DMSO-연관된 세포 독성을 최소화하기 위해, PTX-로딩된 나노입자를 PBS에 녹였다. I.N 접종은 종양 투여 후 4일째 모델에서 시작하고 총 3회 동안 매일 수행하였다.
- [97] 구체적으로, 6주령의 수컷 Sprague-Dawley 랫트에서 두개 내 종양 모델을 확립하였다. 마취된 랫트를 정위 프레임에 정치하고, 두개골을 천천히 스왓 브레그마에 노출하였다. 브레그마에 대한 모니터링 지점은 전후방, 0mm; 측면, 2.0mm; 복부면, 4.0mm로 하였다. 미세수술용 드릴을 사용하여 경막을 훼손하지 않으면서 두개골에 미세한 배액관(burr hole)(0.7mm)을 만들었다. 총 2×10^5 / $10 \mu\text{l}$ 의 C6-Fluc 세포를 26 게이지 해밀턴 마이크로 주사기(80330; 미국, 네바다주 리노)를 사용하여 $0.9 \mu\text{l}$ /분의 속도로 주사하였다. 면역결핍 누드마우스에서 인간 교모세포종 모델을 만들기 위해, 1×10^5 /4mL의 U87MG-Fluc 세포를 같은 방법으로 접종하였다. 수술 후 피부를 봉합하였다. 그리고 나서, 동물을 무작위로 각 그룹으로 할당하고, 랫트에서는 2mg/kg의 PTX 또는 마우스 모델에서는 1mg/kg의 PTX를 I.N 접종하였다.
- [98] 인 비보 및 엑스 비보 생물발광 이미징을 수행하였다. 인 비보 생물발광 이미징을 위해, 150mg/kg의 D-루시페린(Caliper, Hopkinton, MA)를 마취된 동물에 복강내 주사하였다. 라이브 이미지는 IVIS Lumina caliper series(Life Technologies, Carlsbad, CA)로 D-루시페린 주사 후 15분에 얻었다. 엑스 비보 생물발광을 평가하기 위해, 절제된 뇌 조직을 D-루시페린 기질과 15분 동안 인큐베이션하고 상기에서 언급된 이미징을 수행하였다.
- [99] Nissl 염색을 위해, 파라핀이 삽입된 뇌 절편에서 파라핀을 제거하고, 재수화시킨 후 표준 프로토콜에 따라 0.1% 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 용액을 처리하였다. 염색된 절편을 커버슬립으로 덮고, 광학 현미경을 사용하여 무작위로 사진을 찍었다. 이전에 설명한 대로 imageJ 소프트웨어를 사용하여 압 체적을 계산하였다.
- [100] 조직학 및 TUNEL 분석을 위해, 파라핀이 삽입된 뇌 절편에서 파라핀을 제거하고, 재수화시킨 후 H & E 염색을 시행하였다. 그 후 H & E 염색 절편을

- 커버슬립으로 덮고, 광학 현미경 하에서 관찰하였다.
- [101] 파라핀이 제거되고 수화된 뇌 절편에서 세포사멸을 조사하기 위해 제조자의 지시에 따라 인 시츄 세포 사멸 검출 키트(Millipore)를 사용하여 TUNEL 분석으로 분석하였다. 핵을 Hoechst 33342로 대조 염색하고 수성 마운트 용액(Abcam, Cambridge, UK)으로 고정시켰다. 세포의 형광 신호는 형광 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)으로 촬영하였다.
- [102] 면역 조직 화학 염색을 위해, pre-warmed 항원 회복 완충액(10mM Sodium citrate, 0.05% Tween-20(w/v), pH6.0)으로 95°C에서 25분간 색인을 열처리를 통해 불활성화시키고, 실온에서 냉각하였다. 다음으로, 1% BSA 및 10% 염소 혈청을 함유한 TBST로 37°C에서 1시간 동안 색인을 블로킹하고, Ki67 1차 항체(Abcam, Cambridge, UK)와 4°C에서 밤새도록 인큐베이션 하였다. 이후, TBST로 색인을 세척하고, HRP가 커플링된 2차 다클론 항체를 2시간 동안 가하였다. TBST에서 5회 세척한 후 DAB 기질(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)을 사용하여 색인을 현상하였다.
- [103] 식염수 또는 PTX가 없는 나노입자 처리군에서 종양 진행은 빠르게 자랐고, 신경교종 세포 주사 후 14일에 심각하게 되었다. PTX 단독 처리군은 상대적으로 식염수 처리군과 동일하여 PTX의 소수성 특성은 충분한 약물 침투와 종양 지역 내 축적을 제한함을 시사한다. NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX의 처리는 그러나, 암 진행을 방해한다(도 7a 상단 패널).
- [104] 14일에, 평균 인 비보 생물발광 측정 결과, 식염수, PTX 단독 또는 나노입자 단독 처리된 동물에서 생물발광 신호에서 1.0×10^8 배 증가를 나타냈다. NP-PTX 처리된 동물은 47%까지 종양 생장이 가파스로 느려졌지만, 이 진행은 RGD-NP-PTX 처리군에서 70%으로 유의하게 감소되었다(도 7b 좌측 패널). 인 비보 생물발광 데이터와 일관되게, 절제된 뇌 이미지는 NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 처리군과는 대조적으로 종양 이식 후 14일에 PBS, PTX가 없는 나노입자, 또는 PTX 단독 군에서 거대한 종양 덩어리를 나타냈다(도 7a 중간 및 하단 패널). 추가로, 엑스 비보 뇌 샘플의 생물발광 신호는 PBS 처리 동물과 비교하여 NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 처리 동물에서 각각 52%, 74% 감소를 보였다(도 7b 우측 패널).
- [105] NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX이 I.N 접종된 동물에서 종양 체적은 식염수 처리된 그룹보다 암 체적이 유의하게 작았다(도 7c). 대표적인 Nissl 염색된 뇌 관상 슬라이스(각 뇌의 3개의 슬라이스)는 PBS, NP 및 PTX 단독 접종된 동물에서 종양 크기에서의 감소는 보이지 않았고, 3개의 뇌 관상 슬라이스 모두 동일하게 종양세포가 분포되어 있었다. NP-PTX 접종된 그룹은 앞쪽 뇌 슬라이스(2.70mm에서 브레그마까지)에서 비교적 억제된 종양 성장을, 뒤쪽 관상 절편(브레그마로부터 -6.04mm)에서 완전히 억제된 종양 성장을 시사한다(도 7c). 종양 체적(mm³)은 PBS, NP, PTX 단독 접종된 동물에서 각각 98.4, 99.1 및 90.1에 도달하였다. NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 처리는 각각 52.2 및

27.6까지 이 로드를 감소하였다(도 7c 하단 패널). 식염수 처리군과 비교하여 NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 접종된 군에서 종양 체적은 각각 44% 및 72% 감소를 보였다. 전반적으로, 종양 로드에서 일관된 감소는 인 비보 또는 엑스 비보에서 관찰 분석되었다.

- [106] 대표 H & E 사진도는 정상 뇌 조직으로부터 잘 분화된 세포 형태를 보이나, 모든 그룹에서 종양 코어에 있는 세포는 구형에서 핵의 호산성의 치밀한 배열을 갖는 타원형으로 되었다. 그러나, NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 접종된 동물은 식염수 접종된 동물과 비교하여 세포 죽음이 있는 큰 지역을 보였고, 신경교종 세포 성장을 억제하였다(도 7d).
- [107] 추가로, TUNEL 염색은 RGD-NP-PTX 접종된 동물에서 나타나는 많은 세포사멸 세포 수를 지시하면, 이는 종양세포 세포사멸을 유도하여 향상된 항-종양 활성을 시사한다(도 7e 상단).
- [108] 세포 증식 분석을 위한 면역 조직 화학은 식염수 접종된 동물의 종양 코어에서 Ki67+ 세포의 큰 수가 보이나, 이들 세포는 NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 접종된 군에서 현저하게 감소된다. 추가로, 종양 세포 유입집단의 억제를 도시한다(도 7e 하단).
- [109] 추가로, 접종된 동물의 체중을 측정하여 나노입자의 인 비보 독성을 평가하였다. 체중 변화는 전달된 약물의 인 비보 독성을 평가하는 신뢰할만한 지표이다. RGD-NP-PTX가 접종된 동물은 어떤 유의적인 체중 변화를 보이지 않으며, 식염수 또는 나노입자가 접종된 동물과 유사하였다. 그러나, 종양 이식 후 시간이 흐르면서 암 덩어리로 인해 모든 동물에서 체중의 미미한 변화가 관찰되었다(도 8). PTX 단독 접종된 동물은 체중 소실에 유의적인 효과를 보여, PTX의 독성 효과를 시사한다. 전반적으로, 상기 인 비보 치료 데이터는 NP-PTX의 I.N 접종이 세포사멸을 유도하여 종양 덩어리를 줄임을 시사한다.
- [110] <실시예 6> 인간 교모세포종 모델에서 비강 내 접종된 PTX-로딩된 나노입자에 의한 종양 성장 저하
- [111] PTX-로딩된 나노입자의 임상 관련 치료 효능을 평가하기 위해, 고도의 침습성 인간 교모세포종 전-임상 모델을 선별하였다.
- [112] 대표적인 생물발광 강도(BLI) 데이터 분석 결과, 종양이 모든 시험군에서 세포 이식 후 4일 이내에 똑같이 시작되었다. 총 3회 I.N 접종 후, 종양 생장은 식염수 처리군과 비교하였을 때, NP-PTX에서 약간의 변화에도 불구하고, RGD-NP-PTX에서 효과적으로 억제되었다(도 9a 상단). 상기 랫트 교모세포종 데이터와 일관되게, PTX 단독 처리는 어떤 치료적 효과를 보이지 않아, 제한된 뇌 전달을 시사한다. 식염수 처리와 비교하여, NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 처리는 최종 처리 후 2일째에 생물발광 강도에서 각각 41% 및 77%, 8일째에 60% 및 80% 감소를 유발한다(도 9a 하단).
- [113] 최종 접종 후 2일째에 NP-PTX에서 생물발광 강도의 감소는 PTX 초기 효과에서 기인할 수 있으나, 접종을 멈추면 암 생장이 다시 시작한다.

대조적으로, RGD-NP-PTX를 접종한 마우스는 시간이 지나도 계속적으로 암 진행을 지연시킨다. 추가로, 종양 체적(mm³) 분석 결과, 종양 이식 후 16일 이내에 75.6이나, NP-PTX 또는 RGD-NP-PTX 처리는 각각 54% 및 75% 종양 감소를 유발하였다(도 9b). 마우스에서 랫트 모델에 이르기까지 PTX-로딩된 나노입자의 치료 지수에서의 차이는 성별 또는 접종 차이에서 기인할 수 있다. 게다가, 마우스는 코의 표면적이 상대적으로 작고, 비강 내 후각 상피는 실질적으로 더 많아 뇌 흡수가 더 잘되게 한다. 상기 결과는 다른 치료군과 비교하여 RGD-NP-PTX는 효과적인 종양 성장 억제를 나타냄을 입증한다.

[114] [부호의 설명]

[115] 100: 약물전달장치 110: 동결건조 약품 컨테이너

[116] 120: 복원 솔벤트 컨테이너 130, 230: 압축기

[117] 140: 분무기 202: 제1 하우징

[118] 204: 제2 하우징

산업상 이용가능성

[119] 본 발명은 뇌종양 치료 분야에 적용할 수 있다.

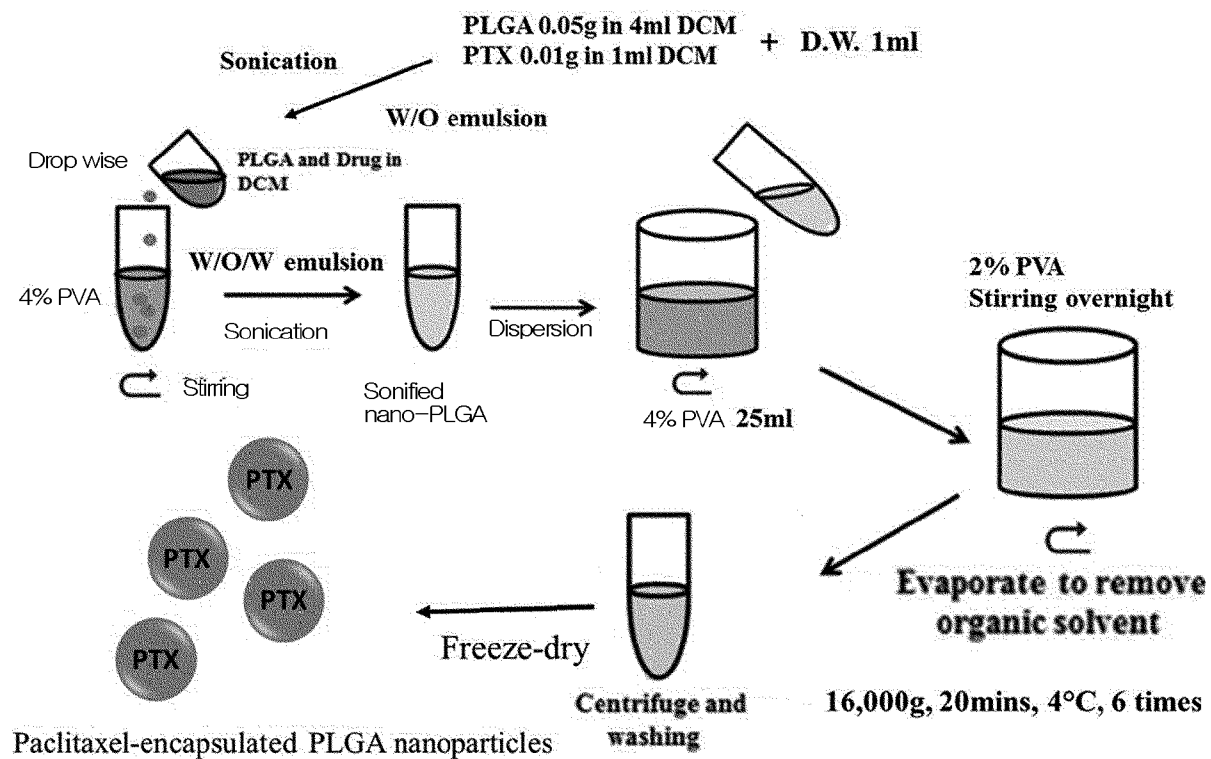
[120]

청구범위

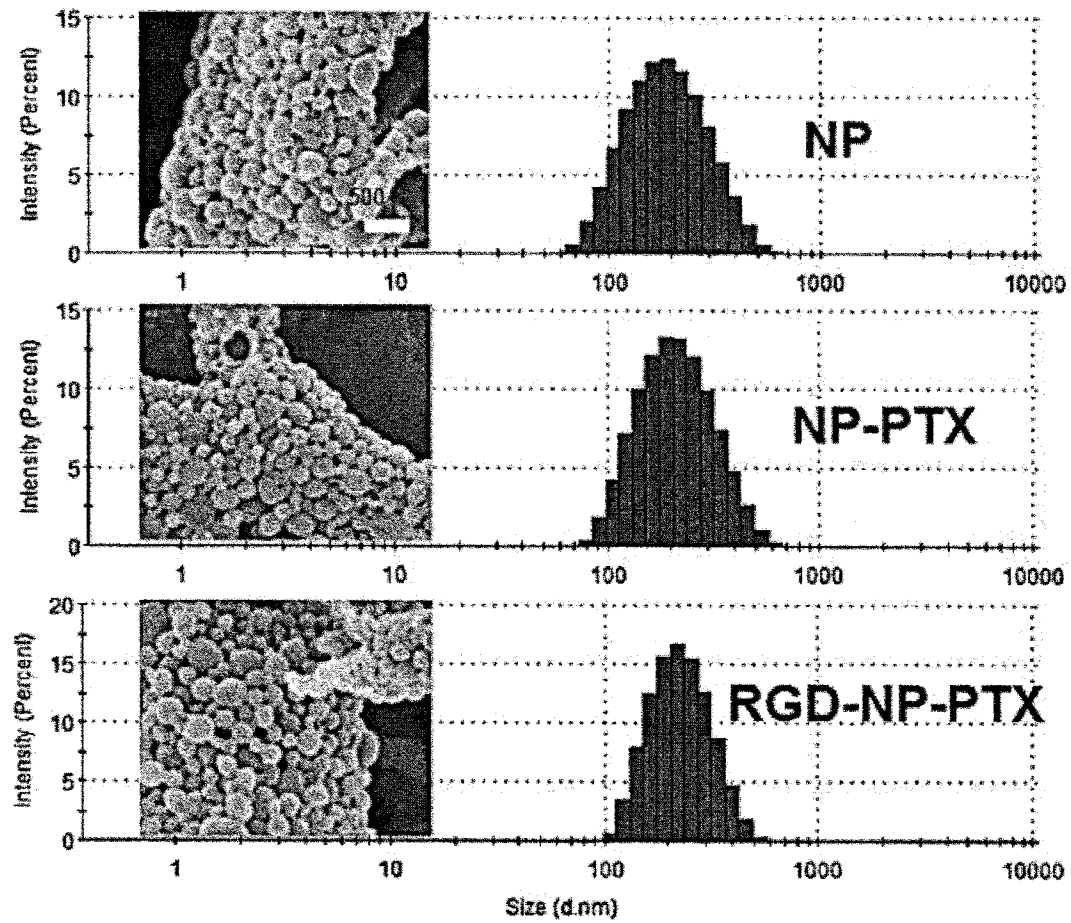
- [청구항 1] 방추사(mitotic spindle)의 생성 또는 분해 억제용 항암제를 함유하는 나노입자를 포함하는 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
방추사의 생성 또는 분해 억제용 항암제는 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈플루닌(vinflunine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 카바지탁셀(cabazitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 라로탁셀(larotaxel), 오르타탁셀(ortataxel), 파클리탁셀(paclitaxel), 테세탁셀(tesetaxel) 및 이사베필론(ixabepilone)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
나노입자는 폴리-D-락트산, 폴리-L-락트산, 폴리-D,L-락트산, 폴리-D-락트산-코-글리콜산, 폴리-L-락트산-코-글리콜산, 폴리-D,L-락트산-코-글리콜산(PLGA), 폴리락타이드(PLA), 폴리락타이드-글리콜라이드(PLA/GA), 또는 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리아크릴로일 하이드록시에틸 전분(poly(acryloylhydroxyethyl) starch), 폴리부틸렌 테레프탈레이트-폴리에틸렌글리콜의 공중합체, 키토산(chitosan) 및 이의 유도체, 폴리오르쏘에스터-폴리에틸렌글리콜의 공중합체, 폴리에틸렌글리콜 테레프탈레이트-폴리부틸렌 테레프탈레이트의 공중합체, 폴리세바식언하이드라이드(poly sebacic anhydride), 풀루란(pullulan) 및 그의 유도체, 전분 및 이의 유도체, 셀룰로오스 초산염(cellulose acetate) 및 이의 유도체, 폴리언하이드라이드(polyanhydride), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리카보네이트(polycarbonate), 폴리부타디엔(polybutadiene), 폴리에스터(polyesters), 폴리하이드록시부티르산(polyhydroxybutyric acid), 폴리메틸 메타크릴레이트(polymethyl methacrylate), 폴리메타크릴산 에스터(polymethacrylic acid ester), 폴리오르쏘에스터(polyorthoester), 폴리비닐초산(polyvinyl acetate), 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol), 폴리비닐부티랄(polyvinyl butyral), 폴리비닐포말(polyvinyl formal), 알부민, 카제인, 콜라겐, 피브린, 피브리노겐, 젤라틴, 헤모글로빈, 트랜스페린, 제인 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 고분자로부터 형성되는, 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
나노입자는 종양 마커 표적화 성분이 추가로 결합된 것인, 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물.

- [청구항 5] 제4항에 있어서,
종양 마커 표적화 성분은 RGD 펩타이드, 실렌지타이드(cilengitide), EGF
및 EGFR 결합 펩타이드로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 뇌질환
치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항의 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물; 및
비강-뇌 약물전달장치를 더 포함하는, 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용
키트.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
비강 투여는 수면, 마취 또는 무의식 상태의 대상체(subject)에서 수행하는
것인, 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 키트.
- [청구항 8] 제1항의 뇌질환 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 그것을
필요로 하는 대상체에 비강 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환의 치료
방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
비강 투여는 대상체의 수면, 마취 또는 무의식 상태에서 수행하는 것인,
뇌질환의 치료 방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서,
뇌질환은 뇌종양을 포함하는, 뇌질환의 치료 방법.

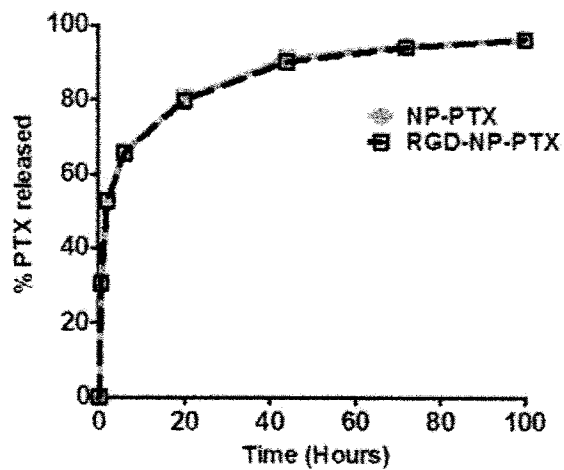
[도 1]

Preparation of Paclitaxel-encapsulated PLGA nanoparticle

[도2a]



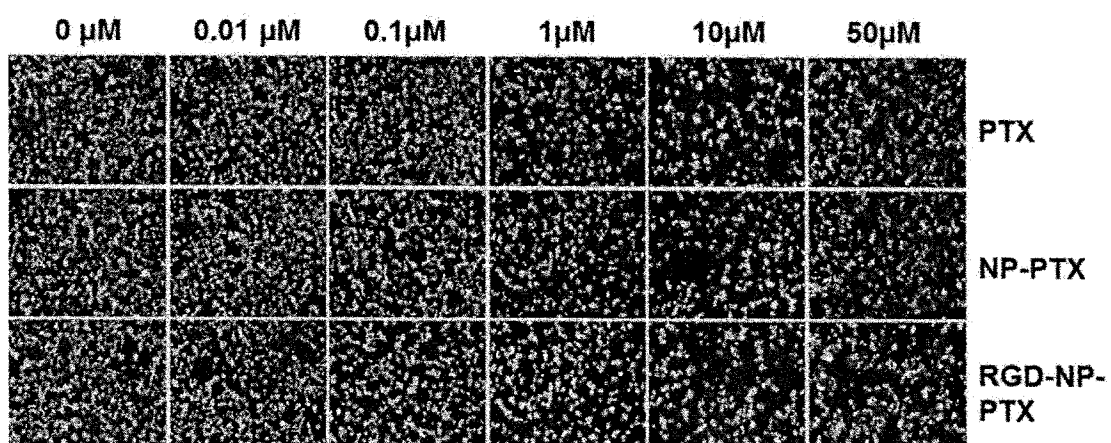
[도2b]



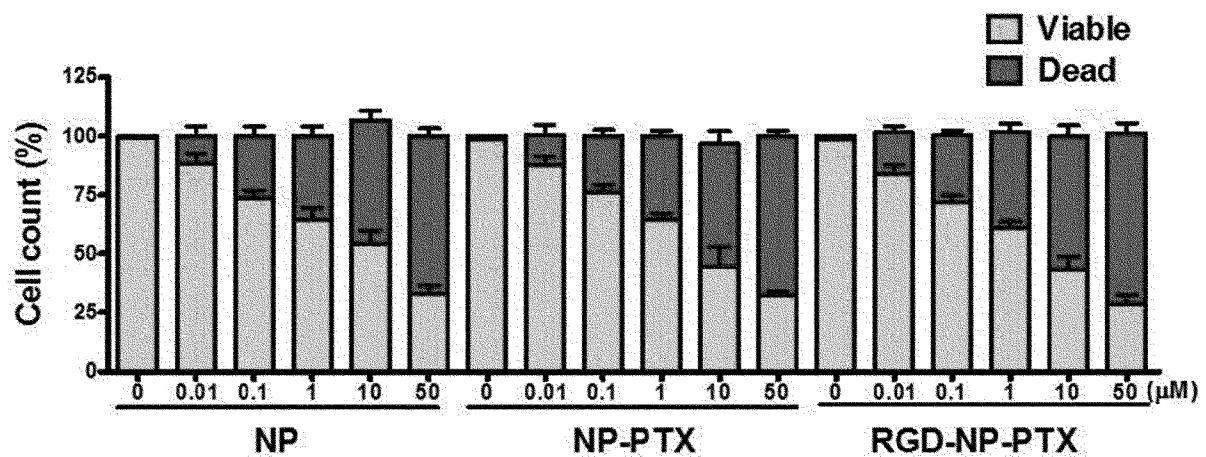
[도2c]

Particle	Z-Ave $\pm$ SD (d nm)	PDI	PTX loading (wt%)
PLGA	157.6 $\pm$ 7.15	0.163 $\pm$ 0.01	NA
PLGA-PTX	174.2 $\pm$ 8.57	0.143 $\pm$ 0.03	5.2%
RGD-NP-PTX	197.2 $\pm$ 12.5	0.192 $\pm$ 0.05	2.8%

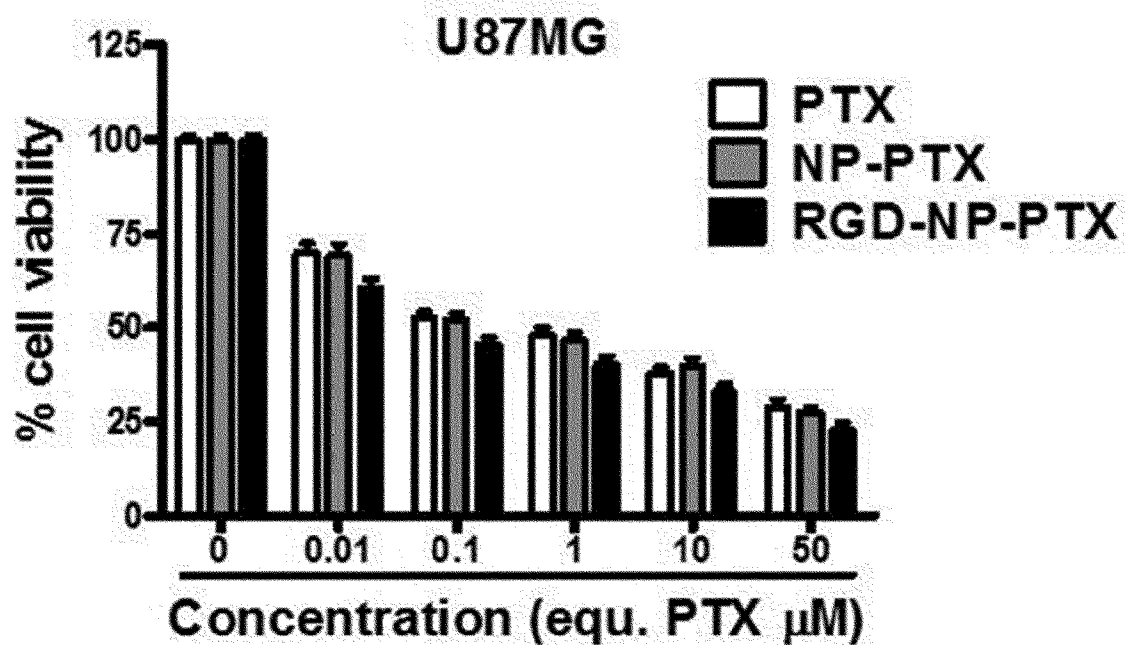
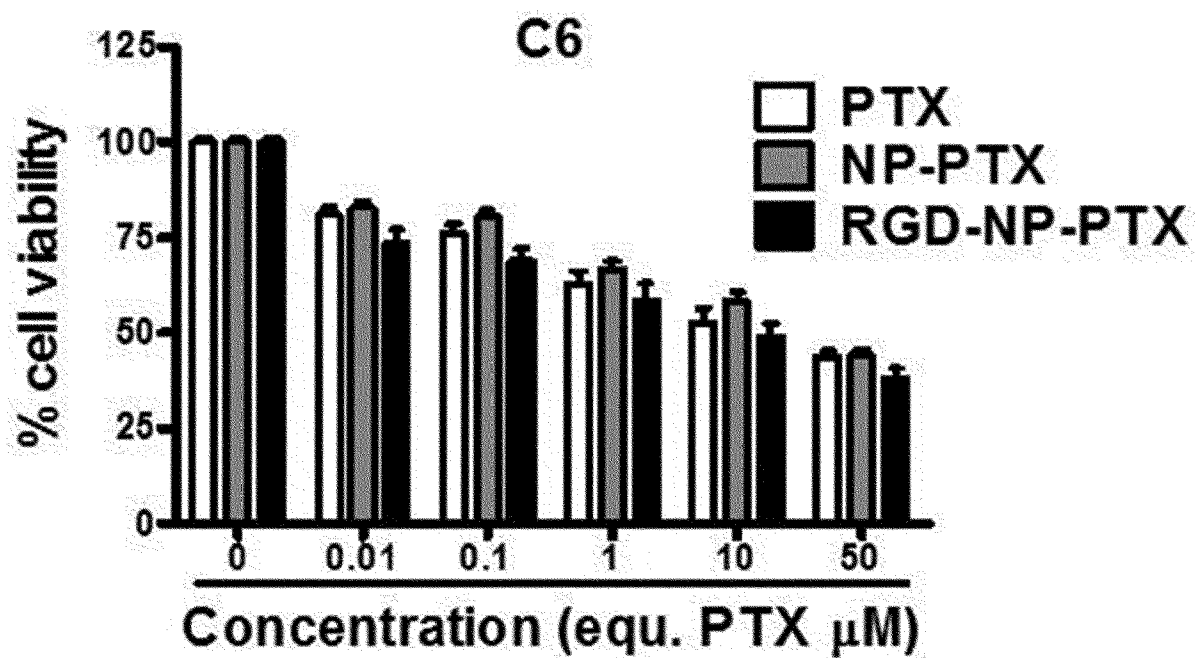
[도3a]



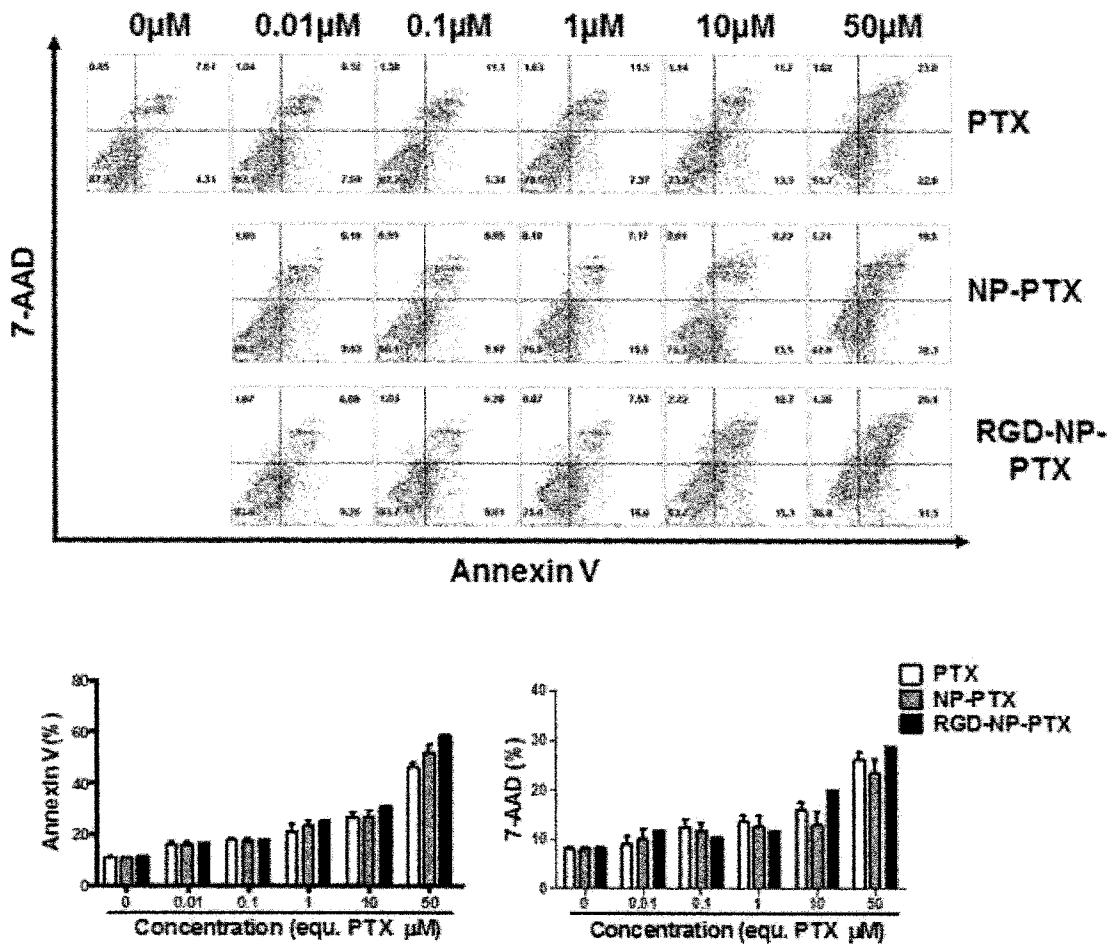
[도3b]



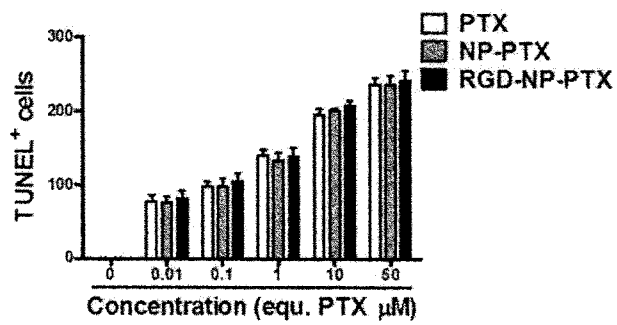
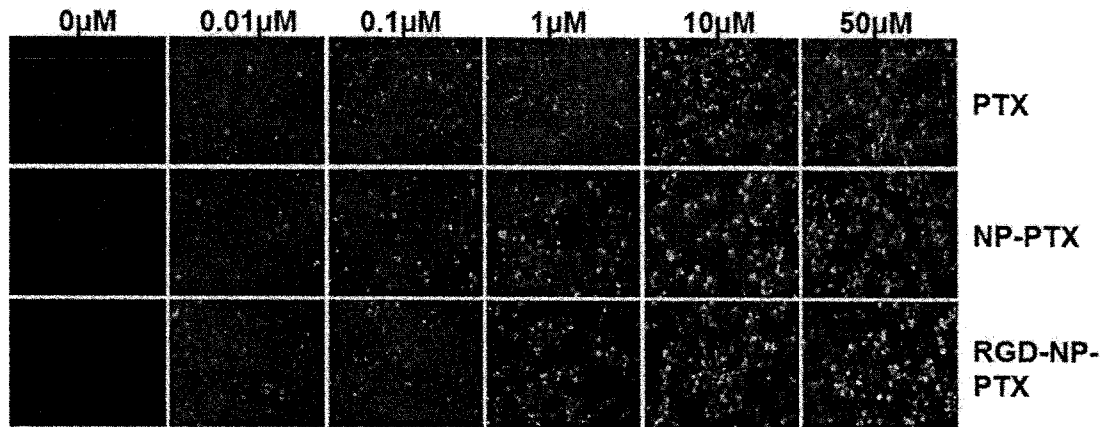
[도4a]



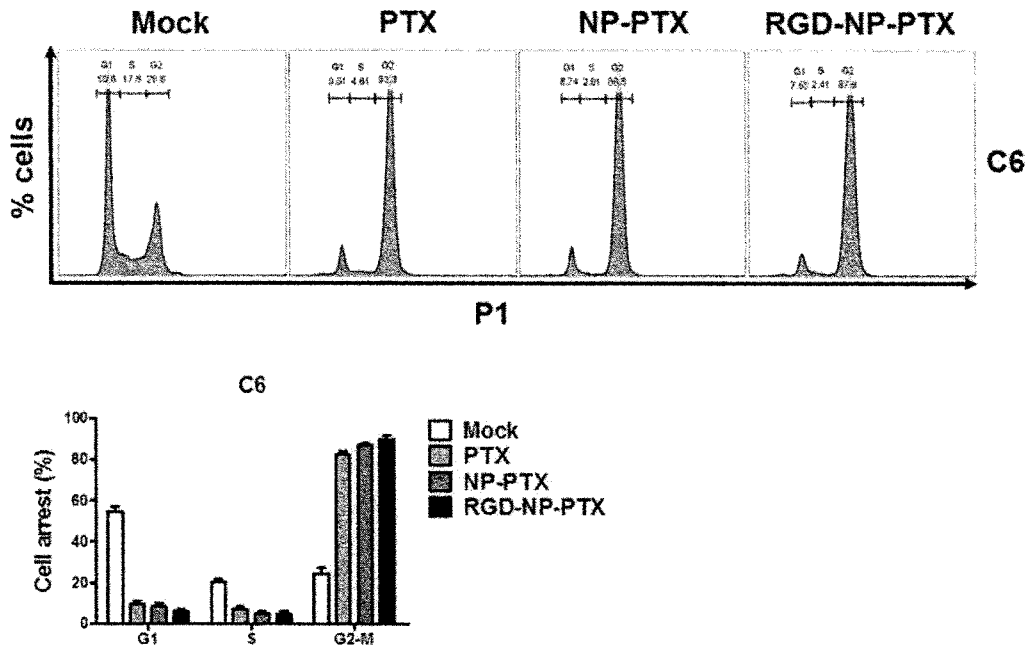
[도4b]



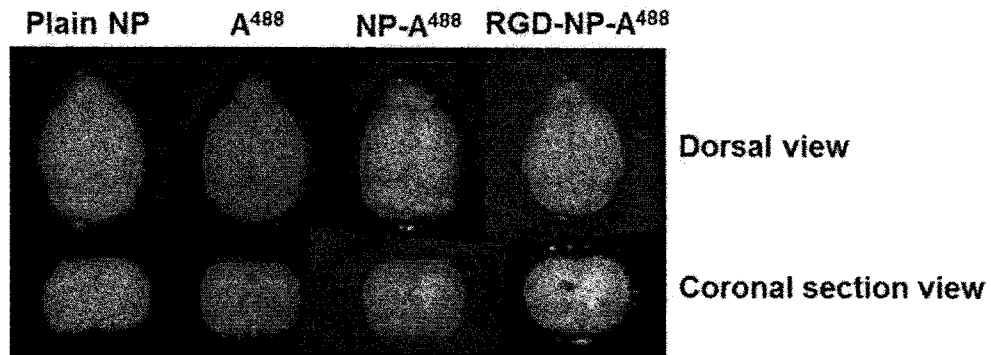
[Figure 4c]



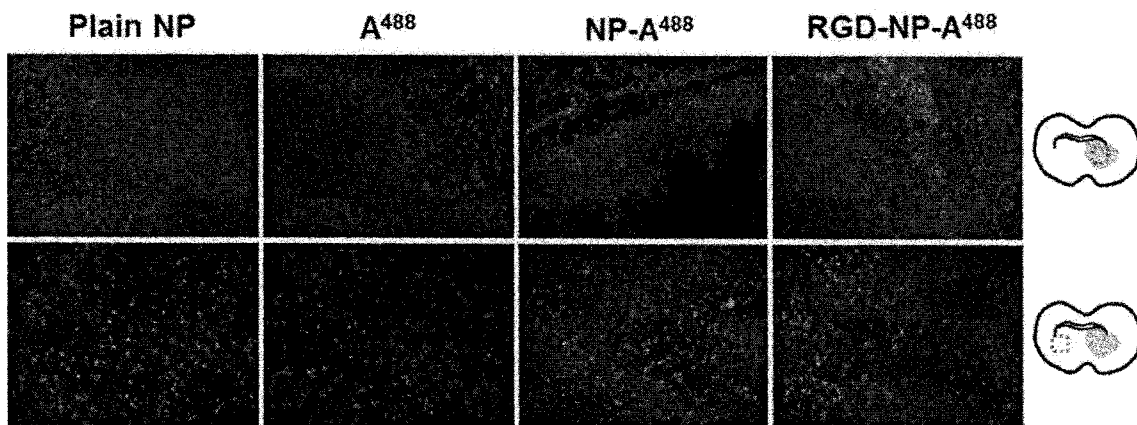
[도4d]



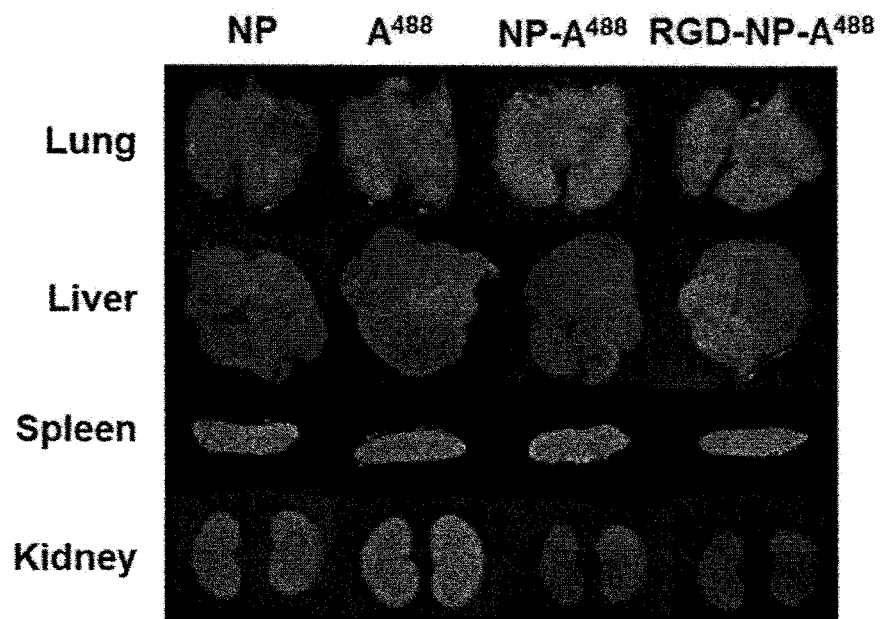
[도5a]



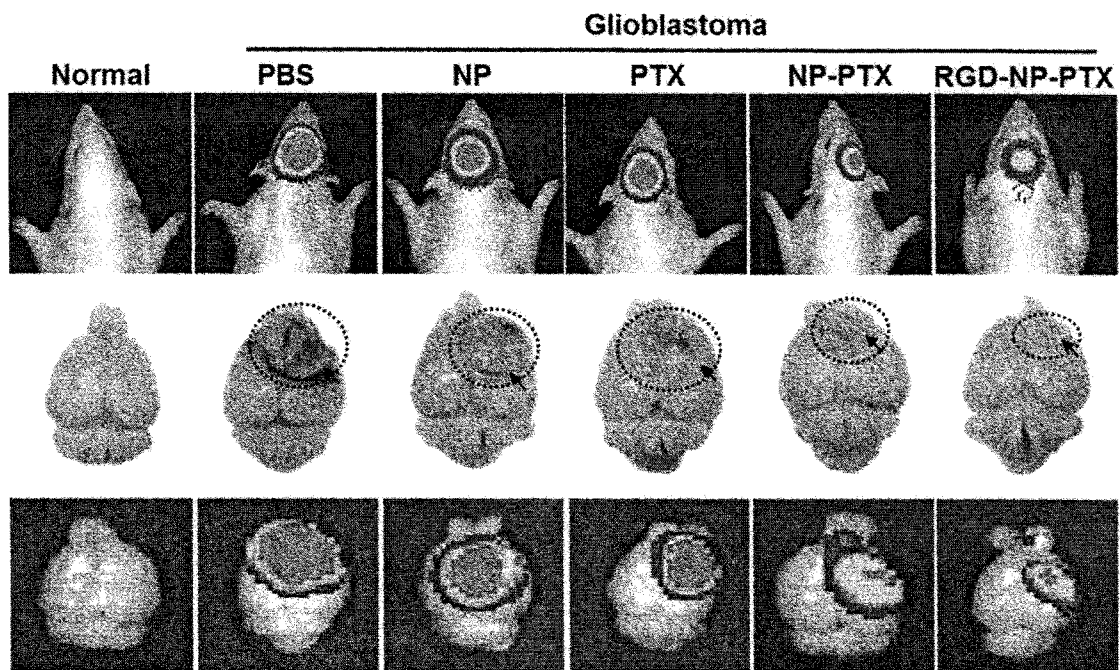
[도5b]



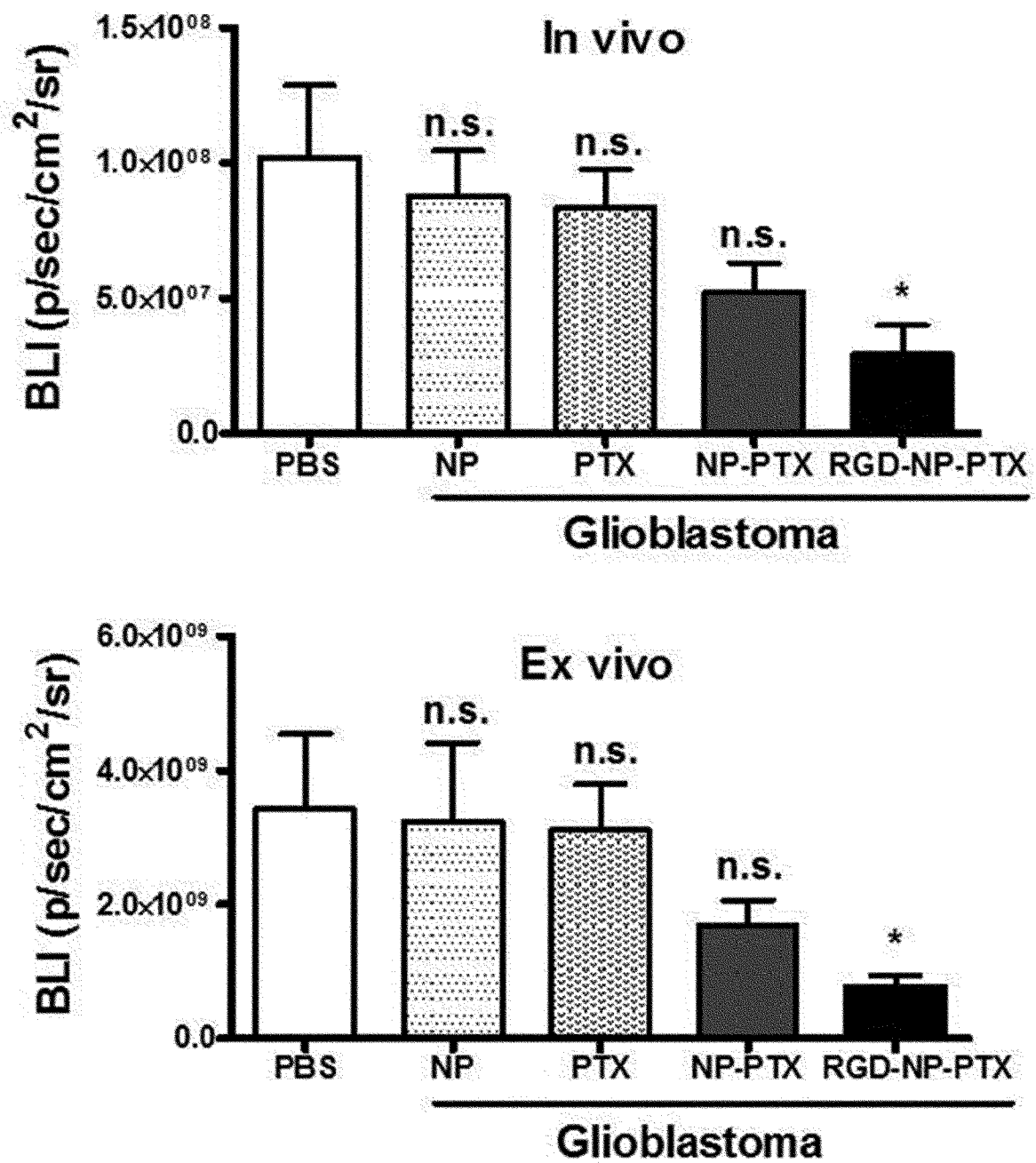
[도6]



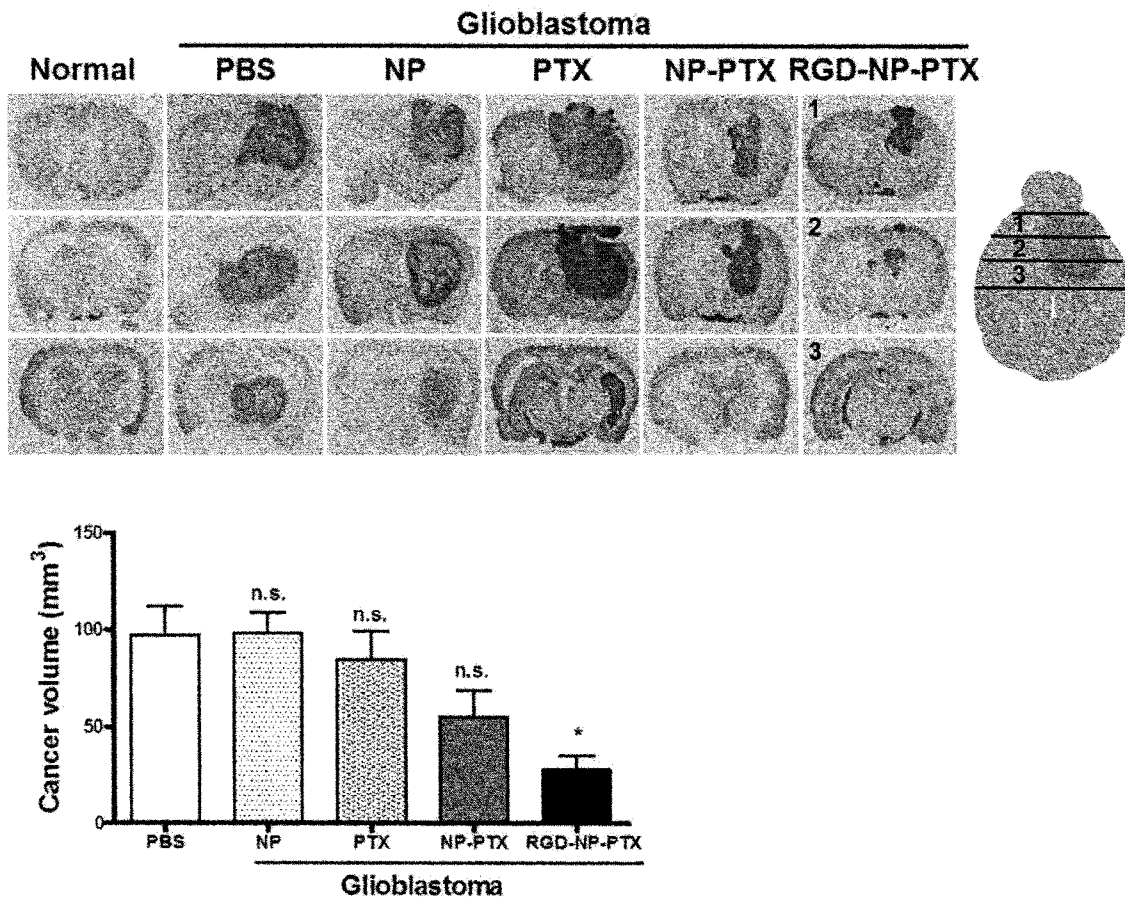
[도7a]



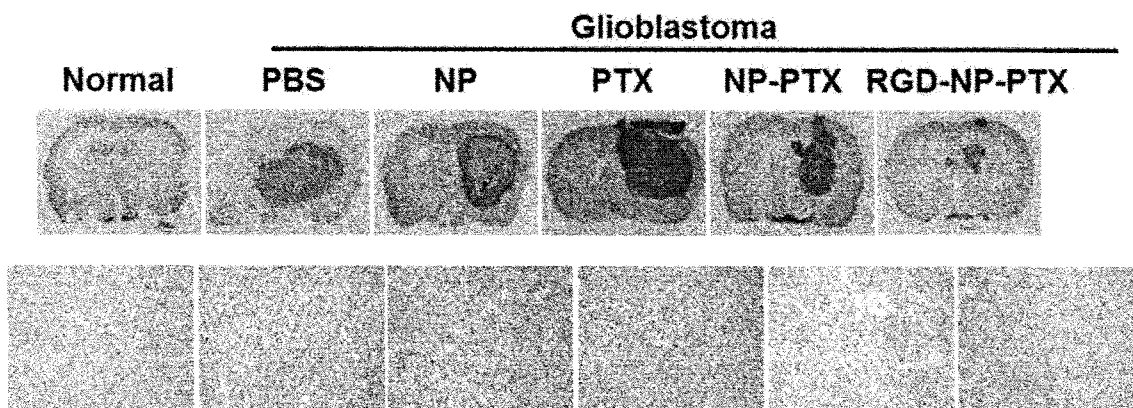
[도7b]



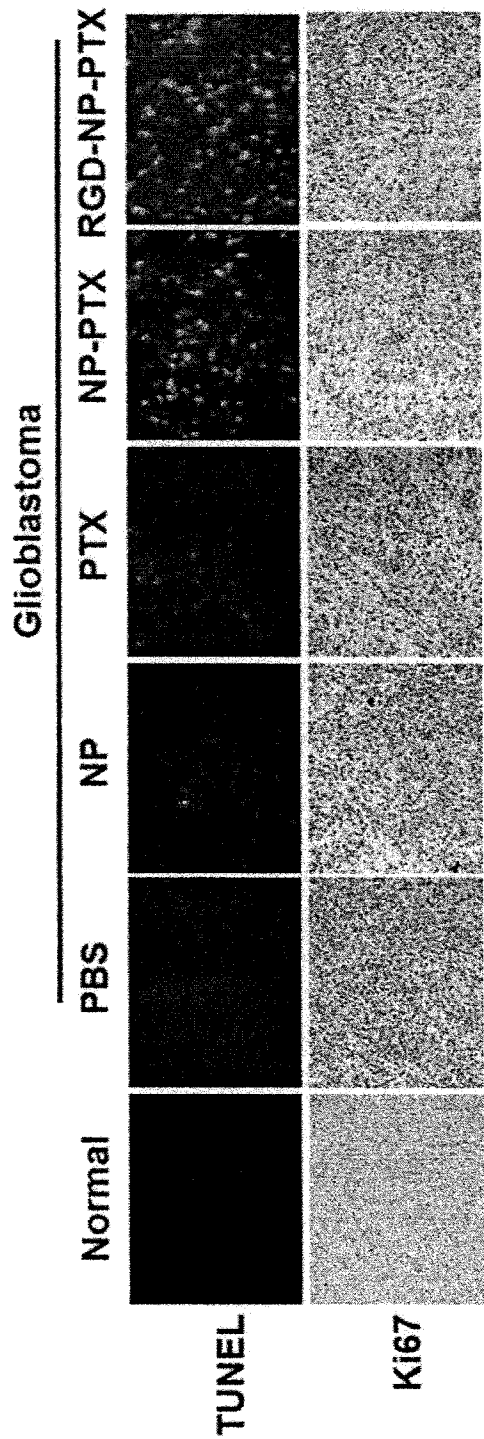
[도7c]



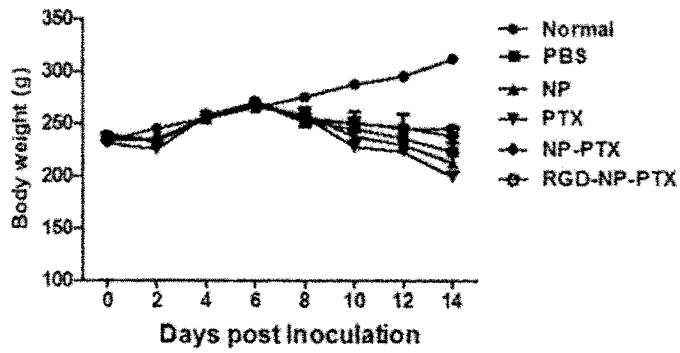
[도7d]



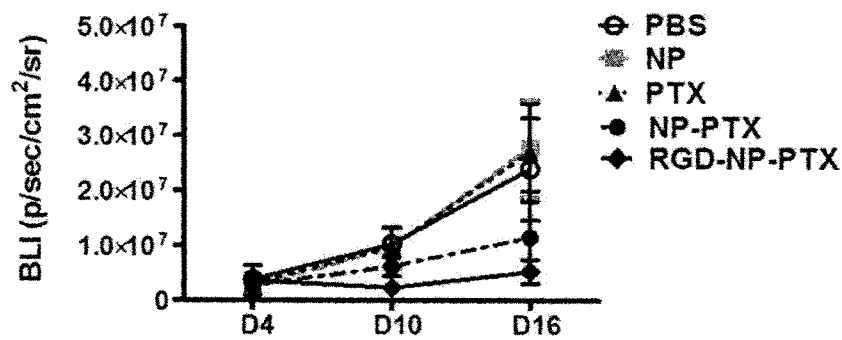
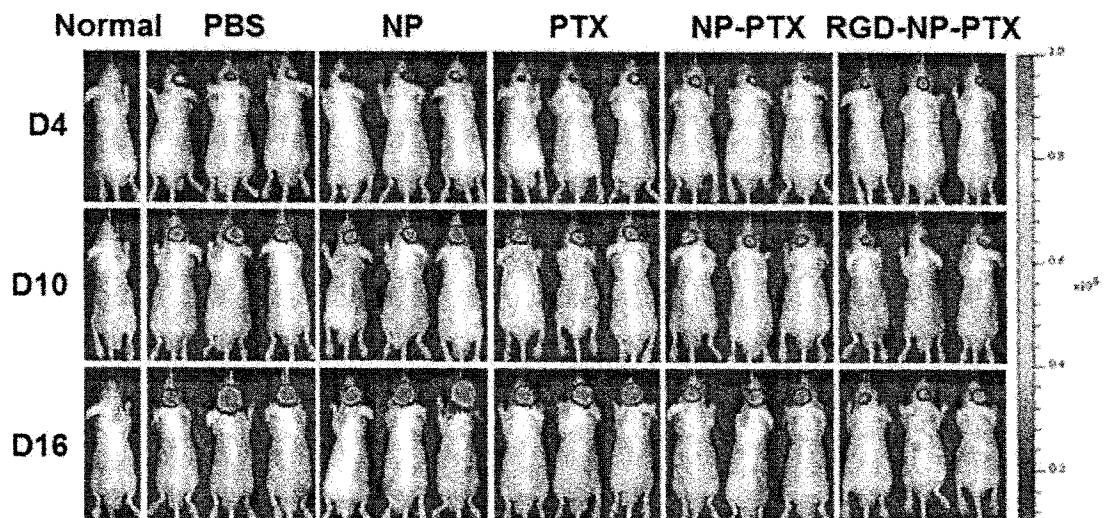
[도7e]



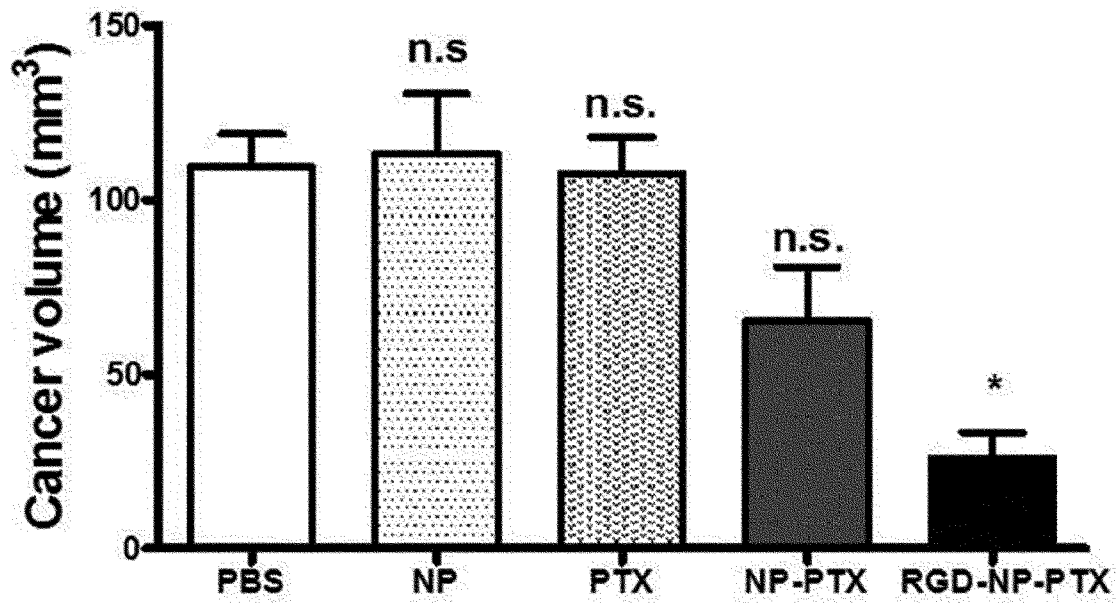
[도8]



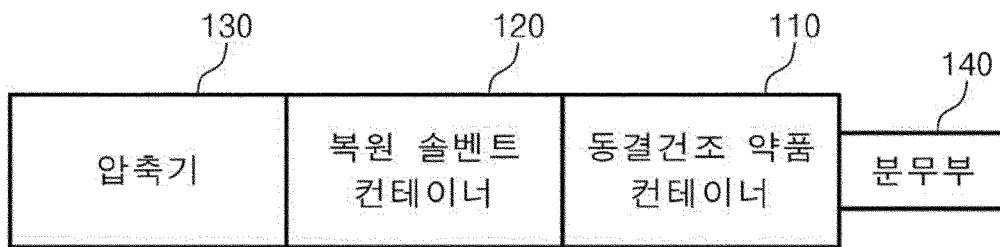
[도9a]



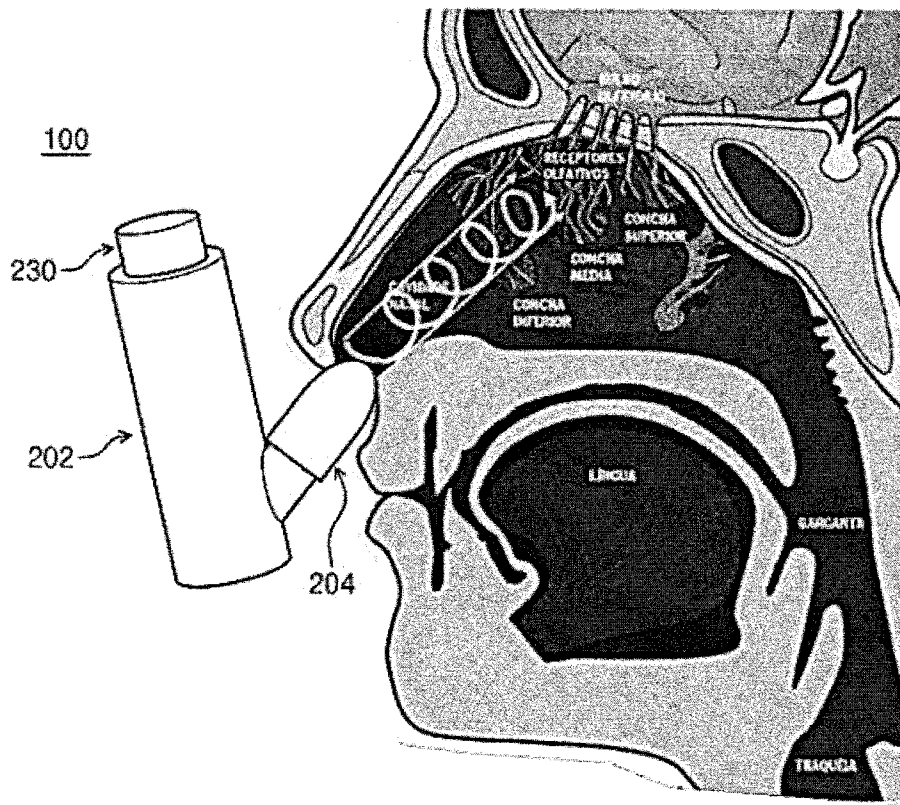
[도9b]



[도10]

100

[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/51(2006.01)i, A61K 31/337(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/51; A61K 31/70; A61K 47/34; A61K 31/765; A61K 45/00; A61K 9/16; A61K 47/30; A61K 47/26; A61K 47/48;
A61K 31/40; A61K 31/337; A61K 9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: spindle fiber, anticancer drug, nano particle, brain disease, intranasal delivery, drug, delivery device, kit, brain tumor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0023042 A (GU, Frank et al.) 04 March 2015 See claims 1, 50-54, 66, 67; paragraphs [0020], [0029]-[0030], [0040]-[0041], [0051]-[0053], [0075]-[0077], [0126]-[0127], [0136], [0139], [0157], [0162].	1-4,6-7
Y		5
Y	KR 10-2014-0041522 A (INSTITUT QUIMIC DE SARRIA CETS FUNDACIO PRIVADA) 04 April 2014 See claims 1, 10-14, 18; paragraphs [0001], [0112]-[0113].	5
A	KR 10-2014-0033370 A (NORTHSHORE UNIVERSITY HEALTHSYSTEM) 18 March 2014 See the entire document.	1-7
A	JP 2013-209373 A (MASSACHUSETTS INST. OF TECHNOLOGY et al.) 10 October 2013 See the entire document.	1-7
A	KR 10-2014-0036338 A (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) 25 March 2014 See the entire document.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 AUGUST 2017 (08.08.2017)

Date of mailing of the international search report

08 AUGUST 2017 (08.08.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004655

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **8-10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 8-10 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and to a diagnostic method, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004655

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0023042 A	04/03/2015	CA 2877051 A1	27/12/2013
		CN 104507458 A	08/04/2015
		EP 2863892 A1	29/04/2015
		JP 2015-520197 A	16/07/2015
		US 2014-0005379 A1	02/01/2014
		US 2015-0320694 A1	12/11/2015
		US 2016-0243189 A1	25/08/2016
		WO 2013-188979 A1	27/12/2013
		WO 2016-176768 A1	10/11/2016
KR 10-2014-0041522 A	04/04/2014	AU 2012-251971 A1	02/05/2013
		AU 2012-251971 B2	30/04/2015
		CA 2835637 A1	15/11/2012
		CN 103635182 A	12/03/2014
		EP 2706989 A1	19/03/2014
		JP 2014-518862 A	07/08/2014
		MX 2013012934 A	05/03/2014
		RU 2013154422 A	20/06/2015
		US 2014-0213641 A1	31/07/2014
		WO 2012-153286 A1	15/11/2012
KR 10-2014-0033370 A	18/03/2014	AR 086207 A1	27/11/2013
		AU 2012-249494 A1	02/05/2013
		BR 112013027369 A2	17/01/2017
		CA 2834395 A1	01/11/2012
		CN 103619792 A	05/03/2014
		EA 201301205 A1	30/04/2014
		EP 2702030 A1	05/03/2014
		JP 2014-513103 A	29/05/2014
		MX 2013012337 A	16/04/2014
		TW 201311255 A	16/03/2013
JP 2013-209373 A	10/10/2013	US 2014-0050724 A1	20/02/2014
		WO 2012-149302 A1	01/11/2012
		CA 2648099 A1	04/09/2008
		CA 2648099 C	29/05/2012
		CA 2702305 A1	09/10/2008
		CA 2702305 C	21/07/2015
		CA 2891005 A1	09/10/2008
		EP 2007435 A2	31/12/2008
		EP 2136788 A1	30/12/2009
		EP 2136788 B1	26/10/2011
		EP 2436376 A1	04/04/2012
		EP 2436376 B1	09/07/2014
		EP 2644192 A1	02/10/2013
		EP 2644192 B1	10/05/2017
		EP 2644594 A1	02/10/2013
		JP 2009-534309 A	24/09/2009
		JP 2010-540535 A	24/12/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004655

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0036338 A	25/03/2014	JP 2014-051520 A	20/03/2014
		JP 2016-084354 A	19/05/2016
		JP 5410434 B2	05/02/2014
		JP 5873855 B2	01/03/2016
		US 2010-0266491 A1	21/10/2010
		US 2014-0017327 A1	16/01/2014
		US 2014-0314864 A1	23/10/2014
		US 2015-0023875 A1	22/01/2015
		US 8709483 B2	29/04/2014
		US 8802153 B2	12/08/2014
		WO 2008-105773 A2	04/09/2008
		WO 2008-105773 A3	06/11/2008
		WO 2008-121949 A1	09/10/2008
		EP 2896401 A1	22/07/2015
		EP 2896401 A4	23/03/2016
		KR 10-1493930 B1	16/02/2015
		US 2015-0231087 A1	20/08/2015
		WO 2014-042450 A1	20/03/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/51(2006.01)i, A61K 31/337(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/51; A61K 31/70; A61K 47/34; A61K 31/765; A61K 45/00; A61K 9/16; A61K 47/30; A61K 47/26; A61K 47/48; A61K 31/40; A61K 31/337; A61K 9/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 방추사, 항암제, 나노입자, 뇌질환, 비강 투여, 약물전달장치, 키트, 뇌종양

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2015-0023042 A (구 프랭크 등) 2015.03.04 청구항 1, 50-54, 66, 67; 단락 [0020], [0029]-[0030], [0040]-[0041], [0051]-[0053], [0075]-[0077], [0126]-[0127], [0136], [0139], [0157], [0162] 참조.	1-4, 6-7
Y		5
Y	KR 10-2014-0041522 A (인스티튜트 퀴믹 데 사리아) 2014.04.04 청구항 1, 10-14, 18; 단락 [0001], [0112]-[0113] 참조.	5
A	KR 10-2014-0033370 A (노스쇼어 유니버시티 헬스시스템) 2014.03.18 전체 문헌 참조.	1-7
A	JP 2013-209373 A (MASSACHUSETTS INST OF TECHNOLOGY 등) 2013.10.10 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-2014-0036338 A (사회복지법인 삼성생명공익재단) 2014.03.25 전체 문헌 참조.	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 08월 08일 (08.08.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 08월 08일 (08.08.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 8-10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제8항 내지 제10항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0023042 A	2015/03/04	CA 2877051 A1 CN 104507458 A EP 2863892 A1 JP 2015-520197 A US 2014-0005379 A1 US 2015-0320694 A1 US 2016-0243189 A1 WO 2013-188979 A1 WO 2016-176768 A1	2013/12/27 2015/04/08 2015/04/29 2015/07/16 2014/01/02 2015/11/12 2016/08/25 2013/12/27 2016/11/10
KR 10-2014-0041522 A	2014/04/04	AU 2012-251971 A1 AU 2012-251971 B2 CA 2835637 A1 CN 103635182 A EP 2706989 A1 JP 2014-518862 A MX 2013012934 A RU 2013154422 A US 2014-0213641 A1 WO 2012-153286 A1	2013/05/02 2015/04/30 2012/11/15 2014/03/12 2014/03/19 2014/08/07 2014/03/05 2015/06/20 2014/07/31 2012/11/15
KR 10-2014-0033370 A	2014/03/18	AR 086207 A1 AU 2012-249494 A1 BR 112013027369 A2 CA 2834395 A1 CN 103619792 A EA 201301205 A1 EP 2702030 A1 JP 2014-513103 A MX 2013012337 A TW 201311255 A US 2014-0050724 A1 WO 2012-149302 A1	2013/11/27 2013/05/02 2017/01/17 2012/11/01 2014/03/05 2014/04/30 2014/03/05 2014/05/29 2014/04/16 2013/03/16 2014/02/20 2012/11/01
JP 2013-209373 A	2013/10/10	CA 2648099 A1 CA 2648099 C CA 2702305 A1 CA 2702305 C CA 2891005 A1 EP 2007435 A2 EP 2136788 A1 EP 2136788 B1 EP 2436376 A1 EP 2436376 B1 EP 2644192 A1 EP 2644192 B1 EP 2644594 A1 JP 2009-534309 A JP 2010-540535 A	2008/09/04 2012/05/29 2008/10/09 2015/07/21 2008/10/09 2008/12/31 2009/12/30 2011/10/26 2012/04/04 2014/07/09 2013/10/02 2017/05/10 2013/10/02 2009/09/24 2010/12/24

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2014-0036338 A

2014/03/25

JP 2014-051520 A 2014/03/20
JP 2016-084354 A 2016/05/19
JP 5410434 B2 2014/02/05
JP 5873855 B2 2016/03/01
US 2010-0266491 A1 2010/10/21
US 2014-0017327 A1 2014/01/16
US 2014-0314864 A1 2014/10/23
US 2015-0023875 A1 2015/01/22
US 8709483 B2 2014/04/29
US 8802153 B2 2014/08/12
WO 2008-105773 A2 2008/09/04
WO 2008-105773 A3 2008/11/06
WO 2008-121949 A1 2008/10/09

EP 2896401 A1 2015/07/22
EP 2896401 A4 2016/03/23
KR 10-1493930 B1 2015/02/16
US 2015-0231087 A1 2015/08/20
WO 2014-042450 A1 2014/03/20