



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0041522
 (43) 공개일자 2014년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 47/30* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 47/12* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7032172
 (22) 출원일자(국제) 2012년05월09일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2013년12월04일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2012/052320
 (87) 국제공개번호 WO 2012/153286
 국제공개일자 2012년11월15일
 (30) 우선권주장
 1107719.5 2011년05월09일 영국(GB)
 1205979.6 2012년04월03일 영국(GB)

(71) 출원인
인스티튜트 퀴믹 데 사리아
 스페인 에-08017 바르셀로나 비아 아우구스타 390
 (72) 발명자
고메즈, 살바도르 보로스
 스페인 에-080107 바르셀로나 비아 아우구스타
 390 내
디 마우로, 프리미아노 피오
 스페인 에-08017 바르셀로나 비아 아우구스타 390
 내
 (74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **약물 전달용 중합체 나노입자**

(57) 요약

블록 공중합체 및 임의로 1종 이상의 활성제(들)를 포함하는 나노입자, 상기 나노입자를 포함하는 조성물 및 상기 나노입자의 제조 방법이 기재되어 있다. 블록 공중합체는 블록 (i) 폴리에스테르 또는 폴리아미드인 제1 중합체 및 (ii) 10 이상의 히드록실기를 갖는 에스테르 또는 에테르 결합을 함유하는 탄화수소쇄를 포함하는 제2 중합체를 포함한다. 활성제(들)는 나노입자 내에 또는 나노입자의 표면 상에 존재할 수 있다. 나노입자는 임의로 표면-개질 모이어티와 회합가능하여, 약물 전달 및 분자 영상화 기구로서 유용하다. 표면-개질 모이어티는 나노입자를 목적하는 표적, 세포, 조직 또는 바이오마커에 대하여 표적화할 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

블록 공중합체 및 임의로 1종 이상의 활성제(들)를 포함하며, 여기서

- (i) 블록 공중합체는 블록 A 및 D를 포함하고;
- (ii) 블록 A는 단량체 단위 B 및 C를 포함하는 제1 중합체로 이루어지며, 여기서 B는 탄소 원자의 총 개수가 30개 이하인 지방족 디카르복실산이고, C는 디히드록시 또는 디아미노 단량체이고;
- (iii) 블록 D는 히드록실기가 10 이상인 에스테르 또는 에테르 결합을 함유하는 탄화수소 쇄를 포함하는 제2 중합체로 이루어진 것인 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, A가 화학식 $-(B-C)_n-B-$ 을 가지며, 여기서 n은 각각의 블록 A에 대하여 독립적으로 선택된 1 이상의 수치인 나노입자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, C가 4 내지 10개의 탄소 원자를 포함하는 직쇄 지방족 디올인 나노입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, C가 1,8-옥탄디올인 나노입자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, B가 4 내지 10개의 탄소 원자를 포함하는 것인 나노입자.

청구항 6

제5항에 있어서, B가 5 내지 10개의 탄소 원자를 포함하는 것인 나노입자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 D가 폴리에틸렌 글리콜, 폴리아미도아민, 폴리아민, 폴리올 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 나노입자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 활성제가 혼입된 나노입자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 활성제가 -1.0 내지 +5.6의 logP 값을 갖는 것인 나노입자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 활성제가 도세탁셀 및 파클리탁셀을 포함하는 군으로부터 선택된 것인 나노입자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 표면-개질제(들)를 나노입자에 공유 부착시키기에 적합한 1종 이상의 커플링제(들)를 포함하는 나노입자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 표면-개질제와 회합되거나 1종 이상의 표면-개질제가

혼입된 나노입자.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 1종 이상의 표면-개질제가 진단제, 표적화제, 영상화제, 및 치료제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 나노입자.

청구항 14

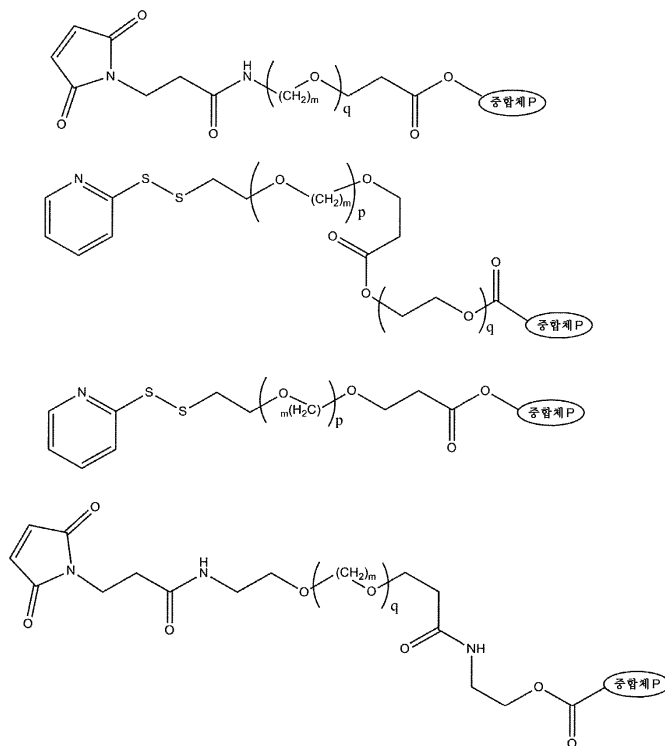
제11항 또는 제12항에 있어서, 1종 이상의 표면-개질제가 티올화된 중합체, 형광단, BBB 신호 펩티드 및 RGDS를 포함하는 군으로부터 선택된 것인 나노입자.

청구항 15

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 표면-개질제가 서열 1, 2, 3 또는 4를 포함하는 펩티드인 나노입자.

청구항 16

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 표면-개질제가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 커플링제를 통해 공유 부착된 것인 나노입자.

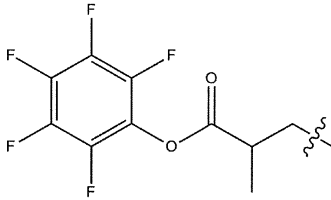


상기 식에서, m은 1 이상의 수치이고; p는 1 초과 수치이고; q는 1 초과 수치이고; "중합체 P"는 블록 공중합체이다.

청구항 17

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 커플링제가 하기 화학식 IV의 기인 나노입자.

<화학식 IV>



청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 나노입자 및 비히클을 포함하는 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 비히클이 제약상 허용되는 희석제 또는 부형제인 제약 조성물인 조성물.

청구항 20

제17항 또는 제18항에 있어서, 비히클이 극성 액체인 조성물.

청구항 21

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 비히클이 생물학적 유체인 조성물.

청구항 22

- i) 블록 공중합체 및 존재할 경우 활성제(들)를 확산 매질에 용해시켜 제1 용액을 형성하는 단계;
- ii) 상기 제1 용액을 분산 매질과 혼합하여, 상기 블록 공중합체 및 존재할 경우 상기 활성제(들)를 포함하는 침전된 나노입자, 및 확산 및 분산 매질을 포함하는 액체상을 형성하는 단계; 및
- iii) 나노입자를 액체상으로부터 분리하는 단계

를 포함하며, 여기서 확산 매질은 블록 공중합체 및 존재할 경우 활성제(들)가 용해될 수 있는 용매를 포함하고, 분산 매질은 블록 공중합체 및 존재할 경우 활성제(들)가 용해될 수 없는 용매를 포함하고, 확산 매질 및 분산 매질은 혼화성인, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 나노입자의 제조 방법.

청구항 23

제21항의 단계를 포함하고, iv) 나노입자를 비히클에 재현탁시키는 단계를 추가로 포함하는, 제17항 내지 제20항 중 어느 한 항의 조성물의 제조 방법.

청구항 24

용해된 활성제(들)를 포함하는 1종 이상의 액체 매질의 사용을 포함하는, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 활성제-함유 나노입자 및 조성물의 제조 방법.

청구항 25

- i) 나노입자를 제조하는 단계;
 - ii) 상기 나노입자를 활성제(들)의 농축된 용액과 함께 인큐베이션하는 단계; 및
 - iii) 상기 활성제(들)를 포함하는 나노입자를 액체상으로부터 분리하는 단계
- 를 포함하는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 활성제-함유 나노입자의 제조 방법.

청구항 26

제24항의 단계를 포함하고, iv) 나노입자를 비히클에 재현탁시키는 단계를 추가로 포함하는, 제17항 내지 제20항 중 어느 한 항의 활성제-함유 조성물의 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 블록 공중합체를 포함하는 나노입자 분야에 속한다. 본 발명은 또한 활성제가 혼입될 수 있고, 약물 전달 및 분자 영상화 기구로서 유용하도록 하는 표면-개질 모이어티와 임의로 회합가능한 나노입자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 나노입자의 제조 방법 및 그의 표면 개질 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생분해성 나노입자는 활성제, 예컨대 천연 또는 합성, 유기 또는 무기의 독립체(entity), 단백질, 펩티드 및 핵산의 투여를 위한 지속 방출 비히클로서 사용되어 왔다. 활성제는 나노입자 매트릭스에 용해되거나, 포착되거나, 캡슐화되거나, 또는 부착된다. 생분해성 나노입자, 특히 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)과 같은 친수성 중합체로 코팅된 것들은 연장된 기간 동안 순환하고 특정 전달 부위를 표적화할 수 있기 때문에 약물 전달 기구로서 유용하다 (문헌 [Mohanraj & Chen *Trop. J. Pharm. Res.* **5**, 561-573 (2006)]).

[0003] 전달 시스템으로서 나노입자를 고안하는 데에 있어서 주요 목표는 치료학적으로 최적의 속도 및 투여법으로 약물의 부위-특이적 작용을 달성하기 위해 입자 크기, 표면 특성 및 약리학적 활성제의 방출을 제어하는 것이다. 나노입자는 다양한 물질, 예컨대 단백질, 다당류 및 합성 중합체로부터 제조될 수 있다. 매트릭스 물질의 선택은 요구되는 나노입자의 크기, 캡슐화된 약물의 고유 특성 (예를 들어, 수용해도 및 안정성), 표면 특징 (예컨대, 전하 및 투과성), 생분해성, 생체적합성 및 독성의 정도, 목적하는 약물 방출 프로파일, 및 최종 생성물의 항원성을 비롯한 다수의 인자에 따라 좌우된다.

[0004] 리포솜이 약물의 분해 방지, 작용 부위에 대한 표적화 및 감소한 독성 또는 부작용을 비롯한 장점을 갖는 잠재적인 운반체로서 사용되어 왔지만, 그의 적용은 낮은 캡슐화 효율, 혈액 성분 존재하에서의 수용성 약물의 급속한 누출 및 불량한 저장 안정성과 같은 문제로 인해 제한될 수 있다. 나노입자는 리포솜에 비해 몇몇 특별한 장점을 제공한다. 예를 들어, 나노입자는 보관하는 동안에 보다 안정하고, 약물 및 단백질의 안정성을 증가시키기 용이하고, 유용한 제어 방출 특성을 갖는다.

[0005] 약물 전달 시스템으로서 나노입자를 사용하는 것의 장점으로 여러가지가 있다. 나노입자의 입자 크기 및 표면 특징을 전신성 통과 후에 수동적 및 능동적 약물 표적화를 달성하도록 용이하게 조작할 수 있다. 이들은 약물 치료 효능의 증가 및 다른 기관과의 상호작용을 최소화함으로써 부작용의 감소를 달성하도록, 운반 중에, 또한 국지화 부위에서 약물의 방출을 제어하고 지속시켜, 약물의 기관 분포 및 약물의 후속적 클리어런스(clearance)를 변경한다. 제어 방출 및 입자 분해 특징은 매트릭스 구성요소의 선택에 의해 용이하게 조정할 수 있다. 약물 로딩은 비교적 높고 약물이 화학 반응 없이 시스템에 혼입될 수 있는데; 이는 약물 활성을 보존하는 데에 있어서 중요한 인자이다. 부위-특이적 표적화는 표적화 리간드를 입자의 표면에 부착시킴으로써 또는 자기 안내의 사용에 의해 달성가능하다. 나노입자의 크기, 표면 전하 및 표면 부속물은 조정가능하다. 시스템은 경구, 비내, 비경구, 폐, 질 및 안내를 비롯한 다양한 투여 경로에 대하여 사용가능하다.

[0006] 정밀한 방출 프로파일을 위해 조정가능하고, 나노입자의 보다 높은 중량 백분율로 극성 활성제를 비롯한 광범위한 활성제를 캡슐화할 수 있는, 약물 전달을 위한 신규한 나노입자의 개발이 계속해서 요구되고 있다. 이러한 나노입자 표면의 신규한 개질 방법이 또한 요망된다. 활성제를 뇌에 전달하기 위한 벡터로서 기능할 수 있는 나노입자가 또한 요망된다.

발명의 내용

- [0007] 본 발명은 블록 공중합체 및 임의로 1종 이상의 활성제(들)를 포함하는 나노입자를 제공하며, 여기서
- [0008] (i) 블록 공중합체는 블록 A 및 D를 포함하고;
- [0009] (ii) 블록 A는 단량체 단위 B 및 C를 포함하는 제1 중합체로 이루어지며, 여기서 B는 탄소 원자의 총 개수가 30개 이하인 지방족 디카르복실산이고, C는 디히드록시 또는 디아미노 단량체이고;
- [0010] (iii) 블록 D는 히드록실가가 10 이상인 에스테르 또는 에테르 결합을 함유하는 탄화수소 쇄를 포함하는 제2 중합체로 이루어진다.
- [0011] 본 발명은 또한 블록 공중합체 및 임의로 1종 이상의 활성제(들)를 포함하는 나노입자를 포함하는 조성물, 특히

제약 조성물을 제공하며, 여기서

[0012] (i) 블록 공중합체는 블록 A 및 D를 포함하고;

[0013] (ii) 블록 A는 단량체 단위 B 및 C를 포함하는 제1 중합체로 이루어지며, 여기서 B는 탄소 원자의 총 개수가 30개 이하인 지방족 디카르복실산이고, C는 디히드록시 또는 디아미노 단량체이고;

[0014] (iii) 블록 D는 히드록실가가 10 이상인 에스테르 또는 에테르 결합을 함유하는 탄화수소쇄를 포함하는 제2 중합체로 이루어지고;

[0015] (iv) 조성물은 임의로 비히클을 추가로 포함한다.

[0016] 본 발명은 또한 (i) 본원에 기재된 블록 공중합체를 포함하는 나노입자 및 (ii) 본원에 기재된 상이한 블록 공중합체를 포함하는 나노입자의 혼합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 나노입자에는 극성이 매우 다양한 활성제가 로딩될 수 있다. 활성제는, 존재한다면, 예를 들어 흡착, 흡수 또는 포착에 의해 나노입자에 혼입될 수 있고, 예를 들어 탈착, 확산, 중합체 침식, 효소-매개 방출, 가속 방출을 위한 나노입자 붕해, 또는 이들 메카니즘의 일부 조합에 의해 나노입자로부터 방출될 수 있다.

[0018] 활성제(들)는 나노입자 내에 또는 나노입자의 표면 상에 존재할 수 있다. 활성제(들)와 나노입자 사이의 상호작용은 전형적으로 수소 결합, 정전기 상호작용 또는 물리적 캡슐화와 같이 비공유적이다. 그러나, 대안의 실시양태에서, 활성제(들)와 나노입자는 공유 결합 또는 링커(linker)에 의해 연결된다.

[0019] 본 발명의 나노입자의 추가 장점은 혼입된 활성제의 버스트(burst) 방출을 방지한다는 점이다. 투여 이후에 제어 전달 시스템으로부터의 활성제의 조기 버스트 방출은 독성 수준의 활성제를 유도하거나 활성제가 그의 관심 표적 부위에 도달하는 것을 방해할 수 있다. 중합체의 생분해성, 및 그에 따른 나노입자의 방출 프로파일은 블록 A 및 D의 단량체의 개수; 블록의 분자량 비율; 중합체의 총 분자량; 또는 중합체의 친수성을 변화시킴으로써 조정할 수 있다. 예를 들어, 블록 A의 길이는 보다 장기 또는 단기의 방출 프로파일을 달성하도록 변화할 수 있다. 부형제, 예컨대 폴리소르베이트, 소르비탄의 지방산과의 에스테르, 당류 및 리포제 또한 나노입자 내에 캡슐화될 수 있다.

[0020] 나노입자는 활성제의 방출을 용이하게 하기 위해 붕해제, 초붕해제 또는 습윤화제를 추가로 포함할 수 있다. 별법으로, 나노입자는 용해되어 나노입자에 세공 또는 채널을 형성하는 수용성 분자를 포함할 수 있고, 이러한 세공 또는 채널을 통해 활성제가 방출될 수 있다.

[0021] 본 발명의 나노입자의 추가 장점은, 활성제의 방출이 체내에서, 예를 들어 위장관에서 상이한 pH 환경에 의해 영향을 받지 않도록 pH-비의존성 방출을 허용한다는 점이다. 본원에서, pH-비의존성 방출이란 pH 1 내지 9의 환경에서 나노입자로부터의 활성제의 확산 속도가 10% 미만으로 변화하는 것으로서 정의된다.

[0022] 나노입자는 생체적합성이며 그의 사용 환경에 대하여 충분히 내성을 가져, 목적하는 표적에 도달하여 목적하는 생리학적 효과를 달성할 수 있도록 충분한 양의 나노입자가 포유동물 체내에 들어간 이후에도 실질적으로 운전하게 유지된다. 본원에 기재된 블록 공중합체 및 그의 구성요소 블록은 생체적합성이고, 바람직하게는 생분해성이다.

[0023] 본원에서 사용된 용어 '생체적합성'이란 불리한 반응을 초래하지 않으면서 살아있는 대상체에 삽입되거나 주입될 수 있는 물질을 기술한다. 예를 들어, 적절하게 제어될 수 없는 면역계에 의한 염증 또는 급성 거부 반응을 초래하지 않는 것이다. "생체적합성"이란 상대적인 용어이며, 생 조직에 고도로 적합한 물질이라 하더라도 어느 정도의 면역 반응을 예상해야 하는 것으로 이해될 것이다. 물질의 생체적합성을 평가하는 시험관내 시험은 그 물질을 세포에 노출시키는 것이고; 생체적합성 물질은 전형적으로 중간 농도 (예를 들어, 50 $\mu\text{g}/10^6$ 개 세포)에서 유의한 세포 사멸 (예를 들어, > 20%)을 초래하지 않을 것이다.

[0024] 본원에서 사용된 용어 '생분해성'이란 생리학적 환경에서 분해되어 유의한 독성 효과 없이 세포에 의해 재사용되거나 제거될 수 있는 단량체 및/또는 다른 비중합체 모이머를 형성하는 중합체를 기술한다. 분해는 효소 작용 또는 세포 기구에 의한 것과 같이 생물학적인 수 있거나, 또는 화학적인 수 있다. 중합체의 분해는 사용된 중합체 또는 공중합체에 따라 다양한 속도로 발생하여, 반감기가 대략 수일, 수주, 수개월, 또는 수년일 수 있다.

[0025] 나노입자는 또한 혈액적합성을 갖는다. 혈액적합성은 ISO 10993-4에 따라 측정할 수 있다. 본 발명의 나노입

자를 포함하는 조성물은 내독소가 존재하지 않도록 용이하게 제조될 수 있다 (바람직하게는, 리무루스 아메바세포 용해물 (Limulus Amebocyte Lysate; LAL) 시험에 의해 < 2 EU/ml). 또한, 빈(empty) 나노입자는 낮은 세포 독성을 나타낸다 (암 및 비암 세포에 대하여 바람직하게는 $IC_{50} > 1 \mu M$, 보다 바람직하게는 $> 10 \mu M$, 보다 바람직하게는 $> 100 \mu M$, 보다 바람직하게는 $> 1 mM$).

- [0026] 본원에서 사용된 용어 '나노입자'는 약 1 내지 약 1000 nm의 직경을 갖는 고체 입자를 말한다. 본 발명의 나노입자의 평균 직경은 당업계에 공지된 방법으로, 바람직하게는 동적 광산란법으로 측정할 수 있다. 특히, 본 발명은 동적 광산란법에 의해 90°의 산란 각도 및 25°C의 온도에서, 여과수로 적절하게 희석된 샘플 및 적합한 장치, 예컨대 말베른 인스트루먼트 (Malvern Instruments; 영국) 제조의 제타사이저(Zetasizer)TM 장치를 사용하여, 표준 시험법 ISO 22412:2008 (누적법 A.1.3.2)에 따라 분석하였을 때, 약 1 내지 약 1000 nm의 직경을 갖는 고체 입자인 나노입자에 관한 것이다. 입자가 x nm의 직경을 갖는다고 하면, 일반적으로 상기 평균 주변에 입자가 분포될 것이지만, 입자수의 50% 이상 (예를 들어, $> 60%$, $> 70%$, $> 80%$, $> 90%$, 또는 그 초과)이 $x \pm 20%$ 범위 내의 직경을 가질 것이다.
- [0027] 바람직하게는, 나노입자의 직경은 약 10 내지 약 1000 nm, 보다 바람직하게는 약 5 내지 약 500 nm, 보다 바람직하게는 약 50 내지 약 400 nm, 보다 바람직하게는 약 50 내지 약 150 nm이다. 별법으로, 나노입자의 직경은 약 1 내지 약 100 nm이다. 한 실시양태에서, 나노입자는 투과 전자 현미경으로 측정하였을 때, 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만, 바람직하게는 1% 미만의 응집도를 나타내고, 또한 바람직하게는 나노입자는 실질적으로 응집되어 있지 않다.
- [0028] 본 발명의 나노입자는 포유동물, 특히 인간 용도로 허용되는 제약 조성물로 제공될 수 있다. 이들은 전형적으로 비히클 중에 제공된다. 비히클은 전형적으로 액체이고 조성물에서 연속상을 형성한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 조성물은 조성물의 연속상을 차지하는 액체 비히클 중의 나노입자의 분산액이다. 특히, 비히클은 투여 후에 포유동물 체내의 표적으로 상기 나노입자의 운반을 허용하는 것이다. 비히클은 당업계에 공지된, 임의의 제약상 허용되는 희석제 또는 부형제일 수 있다. 비히클은 전형적으로 약리학적으로 불활성이다. 바람직하게는, 비히클은 극성 액체이다. 특히 바람직한 비히클은 물 및 염 및/또는 완충제를 함유하는 생리학적으로 허용되는 수용액, 예를 들어 식염수 또는 인산염-완충 식염수를 포함한다. 임의적으로, 비히클은 생물학적 유체이다. 액체 비히클은 보관을 위해 또는 폐 또는 비내 투여용 분말, 주사용 현탁물을 위한 분말, 또는 경구 투여용 정제 또는 캡슐제를 제공하기 위해, 예를 들어 동결건조, 증발 또는 원심분리에 의해 제거될 수 있다.
- [0029] 비히클의 선택은 조성물의 의도하는 투여 모드와 같은 인자에 의해 영향을 받을 것이다. 예를 들어, 폐 또는 비내 투여용 분말, 주사용 현탁물을 위한 분말, 또는 경구 투여를 위한 정제 또는 캡슐제를 제공하기 위해서는 고체 비히클이 사용될 수 있고; 정맥 주사용 현탁물 또는 비내 투여용 용액을 제공하기 위해서는 액체 비히클이 사용될 수 있다.
- [0030] 바람직하게는, 나노입자는 조성물의 약 1 중량% 내지 약 90 중량%를 구성한다. 보다 바람직하게는, 나노입자는 조성물의 약 5 중량% 내지 약 50 중량%, 보다 바람직하게는 약 10% 내지 약 30%를 구성한다.
- [0031] 본 발명의 나노입자는 또한 의학 및 약물 전달 이외의 다른 분야에서, 예를 들어 농업, 전자공학, 페인트 및 접착제에서도 그 용도가 발견될 수 있다.
- [0032] 블록 공중합체는 하나 이상의 블록 A 및 하나 이상의 블록 D를 포함한다. 복수 개의 블록 A 및/또는 블록 D 반복 단위가 존재할 경우에, 각각의 블록 A 및/또는 각각의 블록 D는 블록 공중합체 전체에서 동일할 수 있거나, 또는 블록 공중합체는 본원에서 정의된 범위 내에서, 상이한 유형의 블록 A 및/또는 상이한 유형의 블록 D를 포함할 수 있다. 블록 A 및 D의 동일성의 변화는 각각의 블록의 단량체 (즉, 화학 조성) 및 분자량의 동일성을 포함한다. 마찬가지로, 임의의 블록 A에서, 각각의 단량체 B 및 C는 블록 전체에서 동일할 수 있거나, 또는 블록은 본원에서 정의된 범위 내에 포함되는 독립적으로 선택된 단량체를 포함할 수 있다. 블록 공중합체는 랜덤 블록 공중합체일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 공중합체에서 각각의 블록 A는 동일한 화학 조성을 갖고/거나 각각의 블록 D는 동일한 화학 조성을 갖는다. 바람직하게는, 각각의 블록 A는 동일한 분자량 또는 분자량 분포를 갖고/거나, 각각의 블록 D는 동일한 분자량 또는 분자량 분포를 갖는다.
- [0033] 바람직하게는, 블록 공중합체는 강성-가요성 블록 공중합체이며, 여기서 A는 강성 블록이고 D는 가요성 블록이다. 블록 공중합체는 블록 A에 의해서만, 또는 블록 D에 의해서만, 또는 블록 A와 D의 혼합물에 의해서 종결될 수 있다. 바람직하게는, 블록 공중합체는 각각의 말단에서 블록 D에 의해 종결된다. 바람직하게는, A는 소수성 블록이고 D는 친수성 블록이다.

- [0034] 바람직하게는, A는 화학식 $-(B-C)_n-B-$ 또는 $-(C-B)_n-C-$ 을 가지며, 여기서 n은 각각의 블록 A에 대하여 독립적으로 선택된 1 이상의 수치이다. A가 화학식 $-(C-B)_n-C-$ 을 가질 경우에, 연결기를 이용하여 블록 A를 블록 D에 연결할 수 있다. 연결기는 디카르복실산일 수 있다. 바람직하게는, A는 화학식 $-(B-C)_n-B-$ 을 갖는다. 바람직하게는, n은 5 이상이고, 보다 바람직하게는 5 내지 20이고, 보다 바람직하게는 5 내지 15이다.
- [0035] 바람직하게는, B는 2 내지 20개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 2 내지 15개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 4 내지 10개의 탄소 원자를 함유한다. 별법으로, B는 5 내지 20개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 5 내지 10개의 탄소 원자를 함유한다. 바람직하게는, B는 직쇄 포화 디카르복실산이다. B는 2개 이상의 관능기를 함유할 수 있다. 바람직하게는, B는 숙신산, 글루타르산, 아디프산, 피멜산, 수베르산, 아젤라산 및 세바스산, 바람직하게는 글루타르산, 아디프산, 피멜산, 수베르산, 아젤라산 및 세바스산, 보다 바람직하게는 글루타르산 및 아디프산을 포함하는 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, B는 1개 이상의 탄소-탄소 이중 결합(들)을 함유하는 직쇄 디카르복실산, 예컨대 말레산, 푸마르산 또는 글루타콘산이다.
- [0036] 바람직하게는, C는 30개 이하의 탄소 원자, 바람직하게는 4 내지 10개의 탄소 원자를 함유하는 지방족 디아민 또는 디올이다. 바람직하게는, C는, 바람직하게는 2 내지 15개, 보다 바람직하게는 4 내지 10개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 지방족 디올이고, 보다 바람직하게는 1,8-옥탄디올이다. 별법으로, C는, 바람직하게는 2 내지 15개, 보다 바람직하게는 4 내지 10개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 지방족 디아민이다.
- [0037] 바람직하게는, 블록 D는 폴리알킬렌 글리콜 (특히, 폴리에틸렌 글리콜), 폴리아미도아민, 폴리아민, 폴리올 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 블록 D는 폴리알킬렌 글리콜, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)로부터 선택된다.
- [0038] 중합체 D의 분자량은 바람직하게는 150 내지 20,000 kDa, 보다 바람직하게는 1500 내지 10,000 kDa, 보다 바람직하게는 2000 내지 3000 kDa이다. 중합체 D의 분자량은 바람직하게는 150 내지 20,000 Da, 보다 바람직하게는 1500 내지 10,000 Da, 보다 바람직하게는 2000 내지 3500 Da이다. 중합체 D의 분자량은 150 Da, 200 Da, 300 Da, 400 Da, 600 Da, 1000 Da, 1450 Da, 1500 Da, 3350 Da, 4000 Da, 6000 Da 또는 8000 Da일 수 있다.
- [0039] 블록의 분자량은 활성제 친화성 및 그에 따른 캡슐화 효율, 활성제 방출 속도론, 물 흡수율 및 나노입자 분해와 같은 나노입자 특징을 조정하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 블록 A 및 D의 상대적인 평균 길이는 블록 공중합체의 친수성/친유성 비율 및 그에 따른 활성제의 방출 프로파일을 조정하기 위해 변경될 수 있다. 한 실시양태에서, n은 5 내지 20 또는 5 내지 15이고, 블록 D는 2500 내지 5000 Da의 분자량을 갖는다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 블록 공중합체는 당업계에 공지된 통상의 기술로 합성할 수 있다. 바람직한 방법은 하기 단계를 포함한다: (i) 단량체 단위 B를 단량체 단위 C와, 바람직하게는 생성되는 블록 A의 말단에 B가 위치하는 비율로 반응시키는 단계; (ii) 블록 A를 블록 D와, 바람직하게는 생성되는 블록 공중합체의 말단에 D가 위치하는 비율로 반응시켜 블록 공중합체를 생성하는 단계. 반응은 예를 들어, 에너지원으로서 마이크로파 조사 (즉, 1 mm 내지 1 m의 파장으로)를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 사용되는 블록 공중합체를 사용하여 나노입자를 제조할 수 있다. 블록 공중합체는 나노입자의 다양한 제조 방법에 사용하기에 적합하다는 장점을 갖는다. 본 발명의 나노입자는 2가지의 주요 카테고리로 분류될 수 있는, 당업계에 공지된 방법으로 제조할 수 있다: (i) 중합 반응을 포함하는 형성; 및 (ii) 예비형성된 공중합체의 분산에 의한 형성.
- [0042] 중합 반응을 포함하는 나노입자의 형성은 추가로 에멀전 및 계면 중합으로 분류될 수 있다. 에멀전 중합은 연속상에 따라, 유기적 또는 수성일 수 있다.
- [0043] 예비형성된 공중합체의 분산에 의한 나노입자의 형성은 하기 기술을 포함할 수 있다: 유화/용매 증발, 용매 교환 및 계면 침착, 유화/용매 확산, 및 염 농도의 증가에 의한 침전. 이들 기술에서, 블록 공중합체를 먼저 제조한 후에, 추가로 가공하여 나노입자를 형성한다.
- [0044] 나노입자를 제조하기 위한 방법은 계면 축합, 초임계 유체 가공 기술, 이온성 겔화 또는 코아세르베이션 (coacervation)을 이용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 나노입자가 활성제를 포함할 경우에, 활성제는 나노입자의 제조 중에 존재할 수 있고, 전형적으로는 활성제(들)가 나노입자의 제조에 사용되는 액체 매질 중에 존재한다. 별법으로, 또는 부가적으로, 활성제(들)는 나노입자에 그의 제조 후에 흡수에 의해 혼입될 수 있다.

- [0046] 바람직하게는, 나노입자는 용매 치환 및 계면 침착의 기술을 사용하여 예비형성된 공중합체의 분산에 의해 형성된다. 용매 치환법 (문헌 [Fessi et al., *Int. J. Pharmaceutics* **55**, R1-R4(1989)])이 나노입자의 형성을 위해 사용되어 왔다. 문헌 [Bilati et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* **24**, 67-75 (2004)]에 상기 방법으로 친수성 약물의 캡슐화를 달성하기 위한 접근법이 개시되어 있다.
- [0047] 용매 치환법은 고속의 교반 속도, 초음파 처리 또는 매우 높은 온도를 요구하지 않는다. 예를 들어, 25°C에서 50 내지 150 rpm, 보다 바람직하게는 약 100 rpm의 교반 속도로 수행할 수 있다. 이는 활성제(들)의 손상 가능성을 감소시키는 유성-수성 계면의 부재를 특징으로 한다. 절차는, 독성이어서 허용가능한 한계를 넘어선 잔류물이 나노입자에 잔류한다면 제약 용도 및 수의과 용도로 적합하지 않을 수 있는 유기 용매 및 계면활성제를 사용하지 않고 수행할 수 있다.
- [0048] 용매 치환법은 혼화성이며 확산 매질 및 분산 매질을 구성하는 2종의 용매를 사용한다. 바람직하게는, 공중합체 및 존재할 경우 활성제(들)는 확산 매질 (전형적으로, "용매"라 함)에서는 가용성이지만, 분산 매질 (전형적으로, "비-용매"라 함)에서는 비가용성이다. 공중합체 및 임의로 활성제(들)를 확산 매질에 용해시키고, 생성된 용액을 분산 매질에 첨가한다. 임의적으로, 분산 매질은 계면활성제를 포함한다. 확산 매질이 분산 매질로 확산되면, 나노침전이 공중합체의 급속 탈용매화에 의해 발생하여, 활성제가 공중합체 내에 위치하는 나노입자를 형성한다. 확산 매질은 공기-액체 계면의 공정에의 도입을 피하기 위해, 예를 들어 시린지를 통해 분산 매질에 직접 첨가하는 것이 바람직하다. 나노입자를 분산 및 확산 매질로부터 분리하기 위해 다양한 방법, 예를 들어 동결건조, 접선류 여과, 원심분리 및 초원심분리, 또는 이들 방법의 조합이 이용가능하다. 일부 경우에는, 예를 들어 나노입자가 클 경우에는, 원심분리가 바람직하다. 일부 경우에는, 예를 들어 대용량 배치의 제조에서는, 나노입자 조성물을 접선류 여과에 의해 농축시킨 후에 동결건조시킬 수 있다. 바람직하게는, 분산 및 확산 매질은 원심분리 또는 회전식 증발에 의해 제거한다. 입자를 임의로 용매에 재현탁시켜, 부착된 활성제를 나노입자의 표면으로부터 제거한다. 이러한 용매는 추가의 원심분리 단계에 의해 제거할 수 있다. 나노입자를 최종적으로 적합한 극성 액체에 재현탁시킬 수 있다.
- [0049] 따라서, 본 발명의 나노입자를 제조하는 바람직한 방법 (용매 치환법)은
- [0050] i) 블록 공중합체 및 존재할 경우 활성제(들)를 확산 매질에 용해시켜 제1 용액을 형성하는 단계;
- [0051] ii) 상기 제1 용액을 분산 매질과 혼합하여, 상기 블록 공중합체 및 존재할 경우 상기 활성제(들)를 포함하는 침전된 나노입자, 및 확산 및 분산 매질을 포함하는 액체상을 형성하는 단계; 및
- [0052] iii) 나노입자를 액체상으로부터 분리하는 단계
- [0053] 를 포함하며, 여기서 확산 매질은 블록 공중합체 및 존재할 경우 활성제(들)가 용해될 수 있는 용매를 포함하고, 분산 매질은 블록 공중합체 및 존재할 경우 활성제(들)가 용해될 수 없는 용매를 포함하고, 확산 매질 및 분산 매질은 혼화성이다.
- [0054] 본 발명의 나노입자는 캡슐화를 위한 활성제의 존재하에 또는 부재하에 합성할 수 있다. 블록 공중합체는 수불용성일 정도로 충분히 소수성이고, 활성제와, 또한 그 자체와 나노입자를 형성하기 위해 적절한 수소 결합을 할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물을 제조하는 바람직한 방법은 나노입자를 제조하는 상기 방법을 포함하고, 또한 하기 단계를 추가로 포함한다:
- [0056] iv) 나노입자를 비히클에 재현탁시키는 단계.
- [0057] 본 발명은 또한 본원에서 정의된 나노입자 및 조성물의 제조 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 활성제(들)를 포함하는 1종 이상의 액체 매질을 사용하는 것을 포함하고, 바람직하게는 활성제(들)가 그 액체 매질에 용해되어 있다.
- [0058] 본원에 기재된 용매 치환법은 공정 파라미터 및 그에 사용되는 성분 특성의 선택에 의해 나노입자 특성의 조절을 가능하게 한다. 특히, 나노입자 크기, 다분산도, 제타-전위, 활성제 캡슐화 효율, 활성제 포착율, 활성제(들)의 방출 프로파일 및 나노입자의 분해 프로파일을 제어할 수 있다. 제타-전위는 바람직하게는 -45 mV 내지 +20 mV, 보다 바람직하게는 약 -40 mV 내지 약 -20 mV이다. 별법으로, 제타-전위는 -20 mV 내지 +20 mV일 수 있다.
- [0059] 본원에서, 활성제 캡슐화 효율은 활성제-함유 나노입자의 제조 방법에서 사용된 전체 활성제의 중량 백분율로서

나타낸, 나노입자에 혼입된 활성제를 말한다. 이는 전형적으로 95% 이하, 보다 전형적으로는 70% 내지 95%이다.

- [0060] 본원에서, 활성제 포착율은 활성제-로딩 나노입자에서의 활성제의 중량 백분율을 말한다. 활성제 포착율은 바람직하게는 2 중량% 이상, 보다 바람직하게는 5 중량% 이상, 보다 바람직하게는 10 중량% 이상이고, 전형적으로는 2 중량% 내지 20 중량%, 보다 바람직하게는 5 중량% 내지 20 중량%, 보다 바람직하게는 10 중량% 내지 20 중량%의 범위이다.
- [0061] 본 발명의 나노입자의 제조에서 사용되는 블록 공중합체의 장점은 높은 활성제 포착율을 허용한다는 점이다. 활성제 포착율은 다른 나노입자가 이전에 나타냈던 것보다 높다. 예를 들어, 본 발명의 나노입자가 용매 치환법에 의해 제조될 경우, 활성제 포착율은 1 내지 10 중량% 또는 2 내지 5 중량%인 반면에, 용매 치환에 의한 당업계에 공지된 나노입자의 제조는 약 1 중량%의 포착율을 허용한다. 바람직하게는, 활성제 포착율은 4 중량% 보다 높다. 본 발명의 나노입자가 이중 에멀전법으로 제조될 경우, 활성제 포착율은 전형적으로 5 중량% 이상, 바람직하게는 10 중량% 이상이다. 이와 달리, 이중 에멀전법에 의한 다른 물질로부터의 나노입자의 제조는 단지 약 3 내지 4 중량%의 활성제 포착율을 제공한다.
- [0062] 본 발명의 나노입자는 활성제 고함량 (예를 들어, > 5%) 및 높은 캡슐화 효율 (예를 들어, 70-95%)로 형성될 수 있다.
- [0063] 다양한 비-용매, 용매:비-용매의 비율, 중합체 농도, 용해된 약물의 백분율 및 나노입자의 매질로부터의 분리 방법을 사용하여 이들 특성을 조정할 수 있다.
- [0064] 용매는 중합체 및 존재할 경우 활성제가 용해될 수 있는 액체로부터 적합하게 선택된다. 용매는 바람직하게는 극성, 비양성자성 용매이다. 바람직한 용매는 아세톤, 메틸에틸 케톤, 메틸 프로필 케톤, 아세토니트릴, 디메틸포름아미드, 디메틸술폰, 2-피롤리돈 및 *N,N*-디메틸아세트아미드 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 비-용매는 중합체 및 존재할 경우 활성제(들)가 용해될 수 없는 액체로부터 적합하게 선택된다. 바람직한 비-용매는 물, 메탄올 및 에탄올, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 유럽 의약청 가이드라인 참고번호 EMA/CHMP/ICH/82260/2006에서 허용가능하다고 간주된 임의의 물질을 용매 또는 비-용매로서 사용할 수 있다. 완충제를 사용하여 활성제가 용해될 수 없는 pH를 달성할 수 있다. 비-용매의 동일성이 수득되는 나노입자의 크기에 영향을 미친다. 용매 및 비-용매는 바람직하게는 1:1 내지 1:50의 용매:비-용매, 보다 바람직하게는 1:2 내지 1:20, 보다 바람직하게는 1:10의 부피비로 존재한다.
- [0065] 확산 매질 중의 블록 공중합체의 농도는 제한되지 않는다. 그러나, 바람직하게는 1 내지 1000 mg/ml, 보다 바람직하게는 5 내지 100 mg/ml, 보다 바람직하게는 10 내지 50 mg/ml, 보다 바람직하게는 20 mg/ml이다. 중합체 농도가 너무 높다면, 나노입자의 형성을 방해할 수 있다.
- [0066] 활성제, 또는 1종 초과 활성제가 존재할 경우에는 각각의 활성제의 확산 또는 분산 매질 중의 농도는 바람직하게는 1 내지 500 mg/ml, 보다 바람직하게는 5 내지 100 mg/ml, 보다 바람직하게는 10 내지 50 mg/ml, 보다 바람직하게는 20 mg/ml이다. 활성제의 농도가 높을수록 보다 높은 활성제 캡슐화 효율 및 보다 높은 활성제 포착율이 초래된다.
- [0067] 나노입자를 제조하는 추가 방법은
- [0068] i) 블록 공중합체를 수-비혼화성 용매에 용해시키는 단계;
- [0069] ii) 활성제를, 존재할 경우에는, 수-혼화성 용매에 용해시키는 단계;
- [0070] iii) 유중수 에멀전을 형성하는 단계; 및
- [0071] iv) 제1 용매를 증발시켜 나노입자를 형성하는 단계
- [0072] 를 포함하며, 여기서 수-비혼화성 용매 및 수-혼화성 용매는 비혼화성이다.
- [0073] 나노입자를 제조하는 추가 방법 (이중 에멀전법)은
- [0074] i) 블록 공중합체를 수-비혼화성 용매에 용해시키는 단계;
- [0075] ii) 활성제를, 존재할 경우에는, 수-혼화성 용매에 용해시키는 단계;
- [0076] iii) 유중수 에멀전을 형성하는 단계;

- [0077] iv) 상기 유중수 에멀전을 중합체 계면활성제를 함유하는 수-혼화성 용매에 분산시키는 단계;
- [0078] v) 수중 유중수 에멀전을 형성하는 단계; 및
- [0079] vi) 수중 유중수 에멀전을 여과하여 나노입자를 수득하는 단계
- [0080] 를 포함하며, 여기서 수-비혼화성 용매 및 수-혼화성 용매(들)는 비혼화성이다.
- [0081] 나노입자를 제조하는 추가 방법 (변형된 이중 에멀전법)은
- [0082] i) 블록 공중합체를 수-비혼화성 용매에 용해시키는 단계;
- [0083] ii) 활성제를, 존재할 경우에는, 수-혼화성 용매에 용해시키는 단계;
- [0084] iii) 수중유 에멀전을 형성하는 단계;
- [0085] iv) 상기 수중유 에멀전을 중합체 계면활성제를 함유하는 수-비혼화성 용매에 분산시키는 단계;
- [0086] v) 유중 수중유 에멀전을 형성하는 단계; 및
- [0087] vi) 유중 수중유 에멀전을 여과하여 나노입자를 수득하는 단계
- [0088] 를 포함하며, 여기서 수-비혼화성 용매 및 수-혼화성 용매(들)는 비혼화성이다.
- [0089] 본원에서, "활성제"는 동물에 투여되었을 때 생물학적 효과를 초래하는 생체활성 또는 치료용 모이티어를 의미한다. 포유동물 체내에의 전달이 소망되는 임의의 활성제가 본 발명의 나노입자와의 회합을 위해 또는 본 발명의 나노입자에의 혼입을 위해 고려된다. 본 발명의 나노입자는 1종 이상의 활성제를 포함할 수 있고, 한 실시양태에서는 1종의 활성제만을 포함한다. 활성제는 친유성 또는 친수성일 수 있으며, 또한 천연 또는 합성, 유기 또는 무기의 독립체, 단백질 (항체, 항체 단편 및 인터페론 포함), 펩티드, 핵산, 지질 또는 다당류일 수 있다. 바람직하게는, 1종 이상의 활성제가 파클리탁셀 및 도세탁셀을 포함하는 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 1종 이상의 활성제가 파클리탁셀을 포함한다.
- [0090] 본 발명의 나노입자에 활성제가 혼입되었을 경우에, 상기 나노입자는 바람직한 특징, 예를 들어 단독의 활성제와 비교하여 유사하거나 그보다 높은 효능을 나타낸다. 활성제가 세포독성 제제, 예를 들어 파클리탁셀일 경우에, 나노입자는 유사하거나 보다 높은 항종양 활성을 나타내지만, 건강한 세포에 대하여 유사하거나 감소한 독성을 나타낸다.
- [0091] 나노입자가 용매 치환법에 의해 제조될 경우에, 활성제의 동일성은 그의 확산 매질에서의 용해도에 의해서만 제한된다. 용해도가 너무 높다면, 나노입자에 혼입되지 않을 것이다. 그러나, 본 발명의 나노입자의 제조에서 사용되는 블록 공중합체의 장점은 캡슐화될 수 있는 약물의 범위가 증가한다는 점이다. 따라서, 활성제는 바람직하게는 -1.0 내지 +5.6의 logP 값을 갖는다. 예를 들어, +3.0 내지 +5.6의 logP 값을 갖는 소수성 활성제를 본 발명에서 사용할 수 있다. -1.0 내지 +3.0의 logP 값을 갖는 친수성 활성제 또한 사용할 수 있다.
- [0092] 나노입자는 2종 이상의 활성제의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 1종 초과 활성제가 나노입자 내에 혼입될 수 있고/거나 1종 초과 활성제가 나노입자의 표면에 부착될 수 있다. 제1 활성제 (또는 활성제의 제1 혼합물)를 포함하는 나노입자 및 제2 활성제 (또는 활성제의 제2 혼합물)를 포함하는 나노입자의 혼합물도 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0093] 나노입자는 제1 활성제 분획 및 제2 활성제 분획을 포함할 수 있다. 제1 활성제 분획은 나노입자 내에 혼입될 수 있고, 제2 활성제 분획은 나노입자의 표면 상에 흡착될 수 있다. 활성제 또는 활성제 분획은 특정 방출 프로파일을 가질 수 있는데, 예를 들어 즉시 방출, 비-즉시 방출 또는 지연 방출일 수 있다. 바람직하게는, 방출 속도는 방출 시간의 80% 이상 동안에, 보다 바람직하게는 방출 시간의 90% 이상 동안에 대략 0차 (즉, 시간 비의존적)이다.
- [0094] 나노입자로부터의 활성제의 방출 프로파일은 투석법으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 1 M 나트륨 살리실레이트를 함유하는 수성 매질 중의, 활성제-로딩 나노입자 용액 (활성제 0.1 mg 함유) 1 ml를 투석용 백 (MWCO 1400 Da, 투석법에 의해 1 M 나트륨 살리실레이트 함유)에 도입하고, 선단-밀봉된 투석용 백을 37°C의 1 M 나트륨 살리실레이트 용액 50 ml에, 100 rpm으로 교반하면서 96시간 동안 완전히 침수시킨다. 적절한 시간 간격으로, 0.2 ml의 분취량을 회수하고 동일한 부피의 새로운 매질로 대체한다. 샘플에서의 활성제의 농도를 HPLC로 측정하고, 부피 대체에 대하여 보정한다.

- [0095] 용어 "즉시 방출"은, 예를 들어 12시간 후에, 활성제 또는 활성제 분획의 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상이 방출되는 것을 나타낸다. 별법으로, 24시간 후에, 활성제 또는 활성제 분획의 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상이 방출되는 것을 나타낼 수 있다.
- [0096] 용어 "비-즉시 방출"은, 예를 들어 12시간 후에, 활성제 또는 활성제 분획의 50% 미만, 바람직하게는 70% 미만, 보다 바람직하게는 90% 미만이 방출되는 것을 나타낸다. 별법으로, 24시간 후에, 활성제 또는 활성제 분획의 50% 미만, 바람직하게는 70% 미만, 보다 바람직하게는 90% 미만이 방출되는 것을 나타낼 수 있다.
- [0097] 용어 "지연 방출"은, 예를 들어 24시간 후에, 활성제 또는 활성제 분획의 50% 미만, 바람직하게는 40% 미만, 보다 바람직하게는 30% 미만이 방출되는 것을 나타낸다. 별법으로, 48시간 후에, 활성제 또는 활성제 분획의 50% 미만, 바람직하게는 40% 미만, 보다 바람직하게는 30% 미만, 보다 더욱 바람직하게는 20% 미만이 방출되는 것을 나타낼 수 있다.
- [0098] 제1 활성제 분획은 제2 활성제 분획과 상이한 방출 프로파일을 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 활성제 분획은 지연 방출 분획일 수 있고, 제2 활성제 분획은 즉시 방출 분획일 수 있거나, 또는 그 반대일 수 있다. 제1 활성제 분획에 포함된 활성제(들)는 제2 활성제 분획에 포함된 활성제(들)와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0099] 예를 들어, 나노입자는 나노입자 내에 혼입된 제1 활성제 분획 및 나노입자의 표면 상에 흡착된 제2 활성제 분획을 포함할 수 있고, 여기서 제1 활성제 분획 및 제2 활성제 분획은 동일한 활성제를 포함한다. 이 경우에, 제1 활성제 분획은 지연 방출 분획일 수 있고, 제2 활성제 분획은 즉시 방출 분획일 수 있다. 이 경우에, 바람직하게는 지연 방출 분획의 30% 미만이 48시간 후에 방출된다.
- [0100] 제1 활성제 분획 및 제2 활성제 분획이 동일한 활성제(들)를 포함할 경우에, 제1 활성제 분획 대 제2 활성제 분획의 비율 (wt:wt)은 20:1 내지 1:1, 10:1 내지 1:1, 2:1 내지 1:1, 1:1 내지 2:1, 1:1 내지 10:1 또는 1:1 내지 20:1일 수 있다.
- [0101] 별법으로, (i) 특정 활성제 방출 프로파일을 갖는 나노입자 및 (ii) 상이한 활성제 방출 프로파일을 갖는 나노입자의 혼합물도 본 발명의 범주 내에 포함된다. 상이한 방출 프로파일을 갖는 나노입자는 상이하거나 동일한 활성제(들)를 포함할 수 있다.
- [0102] 본 발명은 또한 본원에서 정의된 1종 이상의 활성제(들)를 포함하는 나노입자의 제조 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0103] i) 나노입자를 제조하는 단계;
- [0104] ii) 상기 나노입자를 활성제(들)의 농축된 용액과 함께 인큐베이션하는 단계; 및
- [0105] iii) 상기 활성제(들)를 포함하는 나노입자를 액체상으로부터 분리하는 단계를 포함한다.
- [0106] 본 발명은 또한 본 발명의 조성물의 제조 방법을 제공하고, 여기서 나노입자는 1종 이상의 활성제(들)를 포함하고, 상기 방법은
- [0107] i) 나노입자를 제조하는 단계;
- [0108] ii) 상기 나노입자를 활성제(들)의 농축된 용액과 함께 인큐베이션하는 단계;
- [0109] iii) 상기 활성제(들)를 포함하는 나노입자를 액체상으로부터 분리하는 단계; 및
- [0110] iv) 나노입자를 비히클에 재현탁시키는 단계를 포함한다.
- [0111] 본 발명의 나노입자는 그의 약리학적 특성을 조정하기 위해 1종 이상의 표면-개질제(들)를 유리하게 포함할 수 있다. 본 발명에서의 사용이 고려되는 표면-개질제는 진단제, 표적화제, 영상화제 및 치료제를 포함한다. 양으로 하전된 표면-개질제를 사용할 수 있다. 표면-개질제는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 다당류, 지방산, 지질, 및 천연 및 합성 소분자일 수 있다. 상이한 표면-개질제(들)를 포함하는 나노입자의 혼합물도 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0112] (i) 표면-개질제, 예를 들어 혈액-뇌 장벽에 대한 표적화제인 표면-개질제를 포함하는 나노입자, 및 (ii) 표면-개질제를 포함하지 않는 나노입자의 혼합물도 본 발명의 범주 내에 포함된다. 이러한 혼합물을 사용하여 뇌의 이차 종양 및 신체 또 다른 부위, 예컨대 폐 또는 유방의 일차 종양을 치료할 수 있다.
- [0113] 표적화제는 나노입자를 목적하는 표적, 세포, 조직 또는 바이오마커(biomarker)로 인도하고, 세포 표면 상의 질

환-관련 바이오마커를 인식할 수 있다. 이들은 신호 펩티드, 항체 및 앵타머(aptamer)를 포함할 수 있다. 표적화제는 표적에 따라 달라질 것이고, 당업자라면 적합한 표적화제를 용이하게 이용할 수 있을 것이다. 바람직한 표적화제는 티올화된 중합체 (예를 들어, 점막 부착을 개선하기 위한 것), 혈액-뇌 장벽 (BBB) 신호 펩티드 및 세포 부착 펩티드, 예를 들어 비제한적으로 RGD, RGDC, RGDV 및 RGDS 펩티드 (예를 들어, 인테그린 수용체에 대한 표적화를 위한 것)를 포함한다. 표면-개질체는 펩티드, 바람직하게는 서열 1일 수 있다.

[0114] 본 발명의 나노입자는 BBB를 횡단할 수 있다. 본 발명의 나노입자가 BBB 신호 펩티드인 표면-개질체 (즉, 표적화제)를 포함할 경우에, 신호 나노입자가 나노셔틀(nanoshuttle)로서 작용하여, 다수의 활성제 모이어티를 BBB를 횡단하여 전달할 수 있다. 바람직한 BBB 신호 펩티드는 표 1에서 1문자 코드로 나타낸 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8을 포함하는 펩티드를 포함한다 (5-TAMRA는 5-카르복시테트라메틸로다민을 나타내고; BIO는 비오틴을 나타내고, CARB는 당류를 나타냄).

표 1

서열 번호 #	펩티드 서열
1	(5-TAMRA-)HKKWQFNSPFVPRADPARKGKVHIPPFLDNI-TCRVPMAREPTVIHGKREVTLHLHPDH
2	$\begin{array}{c} \text{SH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CGGKTFYGGSRGKRNNFKTEEY}-\text{CONH}_2 \end{array}$
3	$\begin{array}{c} \text{SH} \\ \\ \text{BIO}-\text{CGGKTFYGGSRGKRNNFKTEEY}-\text{CONH}_2 \\ \\ \text{CARB} \end{array}$
4	TFFYGGCRGKRNNFKTEEY
5	TFFYGGSRGKRNNFKTEEY
6	CGGKTFYGGCRGKRNNFKTEEY
7	CGGKTFYGGSRGKRNNFKTEEY
8	HKKWQFNSPFVPRADPARKGKVHIPPFLDNI-TCRVPMAREPTVIHGKREVTLHLHPDH

[0115]

[0116] 진단제 및 영상화제는 조영제, 자기 물질, 감광제, 방사성 표지, 및 형광성 화합물, 예컨대 카르복시플루오레세인을 포함한다. 이러한 제제는 시험관내 및 생체내에서의 생체내분포 연구를 위해 사용할 수 있다. 본 발명의 나노입자의 뇌에의 전달이 이러한 연구에 의해 입증되었다. 예를 들어, 표면-개질체를 포함하는, 파클리탁셀-로딩 나노입자가 생체내에서의 생체내분포 연구를 통해 뇌에서 검출되었다. 또한, 형광성 표지된 나노입자는 혈액-뇌 장벽을 모의한 세포 연구에서 사용할 수 있다.

[0117] 표면-개질체의 추가 예는 비오틴이다.

[0118] 표면-개질체는 예비형성된 나노입자, 또는 블록 공중합체 또는 나노입자 형성 전의 그의 구성요소 중합체 또는 단량체 중 어느 하나와의 접촉을 통해 나노입자 내로 또는 나노입자 상으로 도입될 수 있다. 표면-개질체의 나노입자 또는 블록 공중합체와의 회합은 공유 부착, 정전기 상호작용 또는 특이적 또는 비특이적 흡착에 의한 것일 수 있다.

[0119] 따라서, 본 발명의 나노입자는 나노입자에 커플링될 수 있는 표면-개질체의 범위 내에서 특히 유용하다.

[0120] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 표면-개질체는 커플링제를 통해 나노입자 또는 블록 공중합체 내로 또는 나노입자 또는 블록 공중합체 상으로 도입된다. 그러므로, 본 발명의 추가 측면에 따라서, 본원에서 정의된 나노입자는 나노입자 내에 또는 나노입자 상에 도입된 커플링제를 갖는다. 커플링제에 의해 관심 표면-개질체의 나노입자와의 회합이 가능해진다. 전형적으로, 커플링제 전체 또는 그 일부가, 표면-개질체가 나노입자와 회합할 때 유지된다.

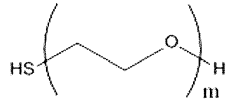
[0121] 표면-개질체는 나노입자 형성 전에 또는 그 후에 블록 공중합체에 커플링될 수 있다. 표면-개질체가 나노입자 형성 전에 블록 공중합체에 부착된 펩티드일 경우에, 이는 전형적으로 용매 치환법에 의해 형성된 나노입자의

표면 상에 위치한다. 표면-개질제가 소수성이고 나노입자 형성 전에 블록 공중합체에 부착될 경우에, 이는 전형적으로 용매 치환법에 의해 형성된 나노입자 내에 위치한다. 표면-개질제, 예컨대 방사성 표지는 나노입자 내에 유용하게 위치할 수 있다.

[0122] 바람직하게는, 나노입자는 술포히드릴-반응기를 함유하는 커플링제가 부착된 개질 중합체를 포함하는 블록 공중합체로부터 형성된다. 별법으로, 나노입자는 표면 개질기가 부착된 개질 중합체를 포함하는 블록 공중합체로부터 형성된다.

[0123] 나노입자는 블록 공중합체 P 및 개질 중합체 P'로부터 형성될 수 있다. 개질 중합체 P'는 블록 공중합체 P와 하기 화학식 I의 개질 PEG의 반응에 의해 형성된다.

[0124] <화학식 I>



[0125]

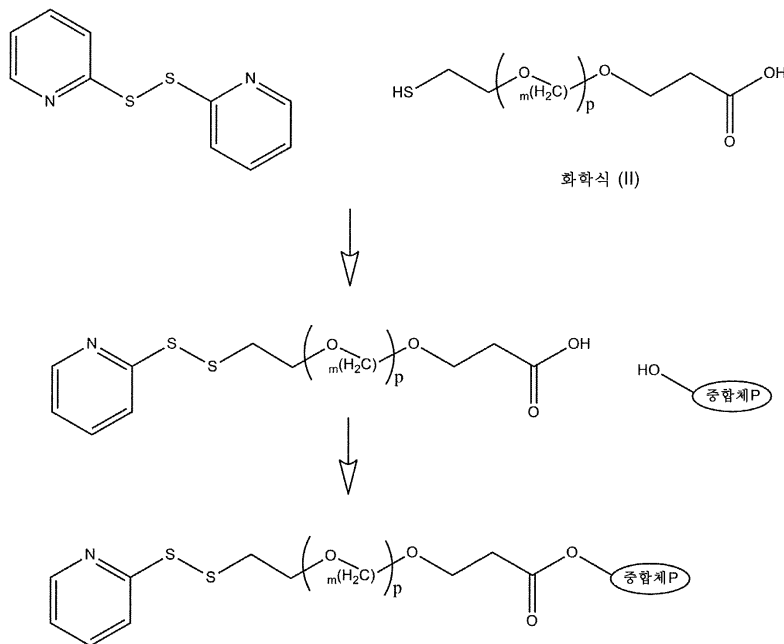
[0126] 화학식 I의 개질 PEG의 말단 히드록실은 블록 공중합체 P의 블록 A와 반응하면서 P를 분리하여, 말단 술포히드릴기를 가지며 P보다 작은 분자량을 갖는 개질 중합체 P'를 형성한다. 말단 "술포히드릴"은 당업계에 공지된 방법 또는 하기 기재내용에 기초한 방법으로 나노입자 형성 전에 또는 그 후에 표면 개질기에 커플링될 수 있다.

[0127] 커플링제는 가역적 또는 비가역적 방법으로 블록 공중합체 (또는 나노입자에 존재하는 블록 공중합체)에 도입될 수 있다. 하기 반응식 1-4에서, 용어 "중합체 P"는 나노입자 형성 전의 또는 그 후의 블록 공중합체를 나타낸다.

[0128] 바람직한 가역적 방법에서, 화학식 I의 화합물이 폴리알킬렌 글리콜 링커를 제공하고, 2,2'-디피리딜 디설피드는 술포히드릴기를 함유하는 화합물에 가역적으로 부착될 수 있는 말단 피리딘-2-일디설피파닐기를 제공한다.

[0129] 블록 공중합체가 디올 또는 디아민 기로 종결된 블록 A로 종결된 경우에, 화학식 II의 화합물이 2,2'-디피리딜 디설피드와 반응하고, 생성된 화합물은 블록 공중합체에 직접 부착된다. 하기 반응식 1에서 상세히 설명된 바와 같이, 블록 공중합체는 말단 피리딘-2-일디설피파닐기를 보유한다.

[0130] <반응식 1>

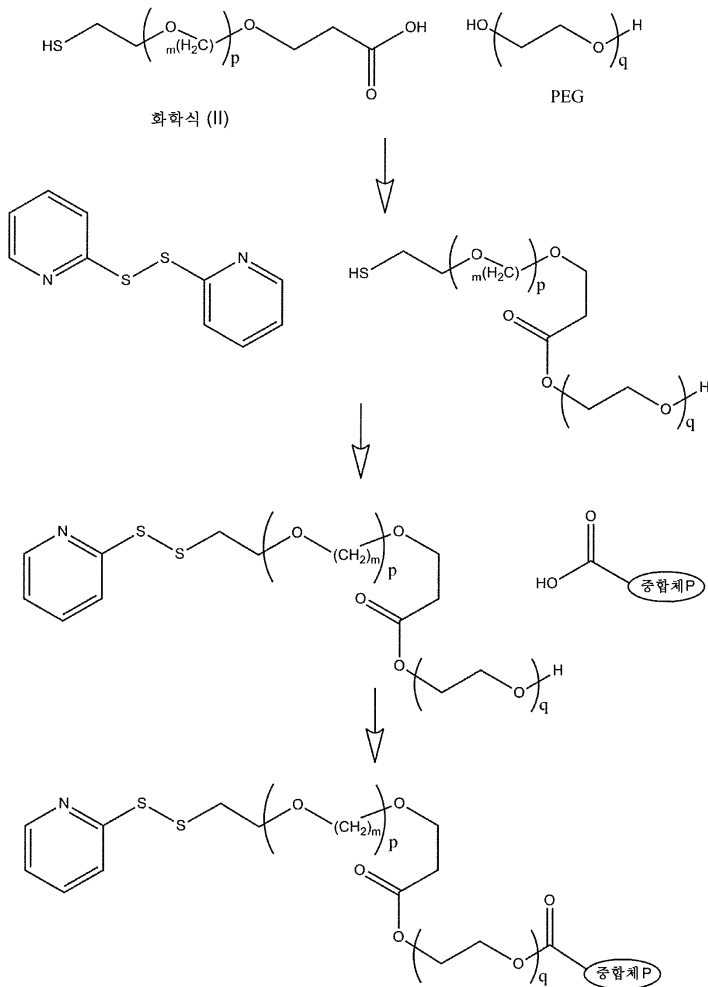


[0131]

[0132] 블록 공중합체가 디카르복실산기로 종결된 블록 A로 종결된 경우에, 화학식 II의 화합물이 폴리알킬렌 글리콜과 먼저 반응한 후에, 피리딘-2-일디설피파닐기로 개질된다. 그 후에, 이는 하기 반응식 2에서 상세히 설명된 바와

같이, 폴리알킬렌 글리콜 세그먼트를 통해 블록 공중합체에 부착되고, 여기서 폴리알킬렌 글리콜은 PEG이다.

[0133] <반응식 2>

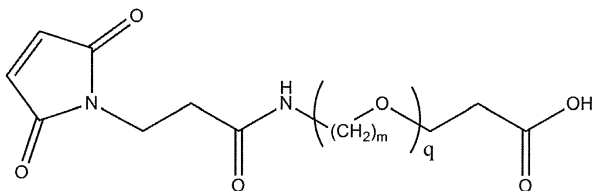


[0134]

[0135] 커플링제가 반응식 1 또는 2에서와 같이 부착되면, 예를 들어 술포히드릴기를 포함하는 관심 표면-개질제가 피리딘-2-티온을 대체하는 말단 피리딘-2-일디술폰과닐기와의 반응에 의해 블록 공중합체에 커플링된다.

[0136] 바람직한 비가역적 방법은 하기 화학식 III의 폴리알킬렌글리콜화 카르복실산-함유 말레이미드를 기반으로 한다.

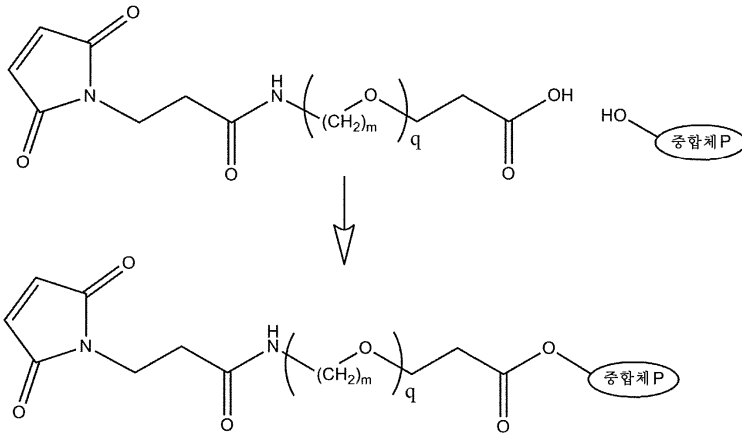
[0137] <화학식 III>



[0138]

[0139] 블록 공중합체가 히드록실 또는 아미노 기로 종결된 블록 A로 종결된 경우에, 블록 공중합체는 히드록실-종결 블록 공중합체에 대하여 하기 반응식 3에서 예시된 바와 같이, 화학식 III의 화합물과 직접 반응할 수 있다.

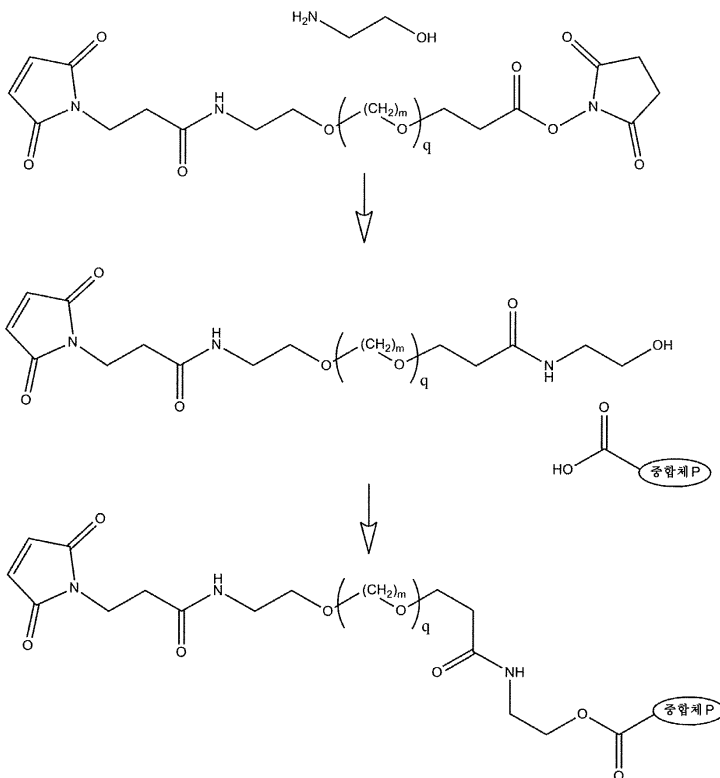
[0140] <반응식 3>



[0141]

[0142] 블록 공중합체가 카르복실기로 종결된 블록 A로 종결된 경우에, 반응은 하기 반응식 4에 따라 진행된다. 폴리 알킬렌글리콜화 말레이미드 상의 카르복실산 모이어티는 *N*-히드록시스속신이미드에 의해 활성화되고 에탄올아민과 반응한 후에, 블록 공중합체에 부착된다.

[0143] <반응식 4>



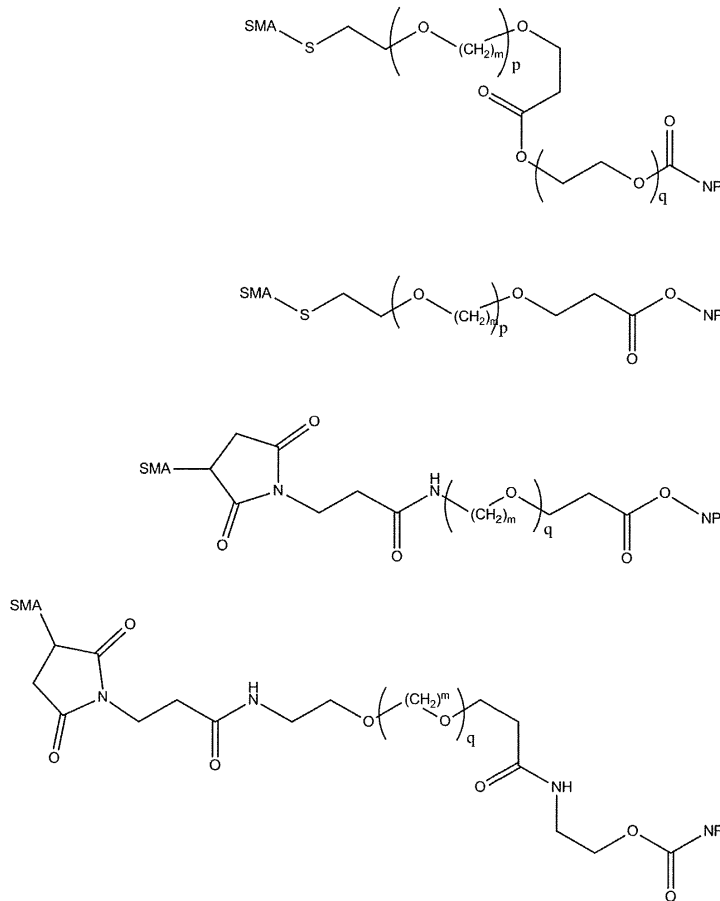
[0144]

[0145] 커플링제가 반응식 3 또는 5에서와 같이 부착되면, 예를 들어 술포히드릴기를 포함하는 관심 표면-개질제는 말레이미드 탄소-탄소 이중 결합과의 반응으로 블록 공중합체에 커플링된다.

[0146] 상기 반응식에서, m은 1 이상, 바람직하게는 1 내지 8, 보다 바람직하게는 2 내지 5, 가장 바람직하게는 2의 수치이고; p는 1 초과, 바람직하게는 2 내지 20, 보다 바람직하게는 4 내지 10, 가장 바람직하게는 7의 수치이고; q는 1 초과, 바람직하게는 10 내지 450, 보다 바람직하게는 45 내지 70의 수치이다.

[0147] 따라서, 본 발명은 하기 반응식 5에 도시된 바와 같이, 커플링제 전체 또는 그 일부에 의해 연결된 1종 이상의 표면-개질제(들)를 포함하는 나노입자 (NP)를 제공하고, 여기서 NP는 그에 혼입되었거나 캡슐화된 1종 이상의 활성제(들)를 갖거나 그러한 활성제가 없는 (활성제를 갖는 것이 바람직함), 블록 공중합체를 포함하는 나노입자를 나타내고, SMA는 1종 이상의 표면-개질제(들)를 나타낸다.

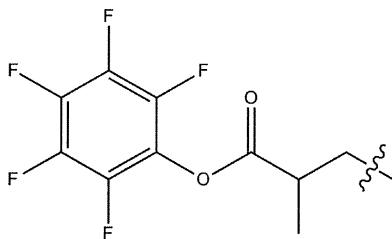
[0148] <반응식 5>



[0149]

[0150] 본 발명자들은 또한 광범위한 표적을 인식하기 위해 광범위한 표면 개질제가 나노입자와 회합가능하게 하는, 본 발명의 나노입자의 표면을 개질시키는 신속하고 효과적인 방법을 개발하였다. 상기 방법은 예비형성된 나노입자 또는 블록 공중합체 또는 나노입자 형성 전의 그의 구성요소 중합체 또는 단량체 중 어느 하나와의 접촉을 통해 나노입자 내에 또는 나노입자 상에 도입될 수 있는, 하기 화학식 IV의 기를 포함하는 커플링제를 이용한다.

[0151] <화학식 IV>



[0152]

[0153] 화학식 IV의 기를 본 발명의 나노입자에 부착시키는 것은 당업계에 공지된 방법으로 달성가능하다. 바람직한 방법에서, 나노입자를 동결건조 단계 후에 저온 플라즈마를 사용하여 처리하여, 그에 의해 나노입자 표면 상에 라디칼을 형성하고 화학식 IV의 기를 표면에 그래프팅할 수 있다. 별법으로, 나노입자를 코어 쉘 접근법으로 에멀전법에 의해 형성한다. 그 후에, 라디칼 개시제, 예컨대 퍼슬페이트를 사용하여, 예비형성된 나노입자 표면 상의 기가 펜타플루오로페닐 메타크릴레이트와 반응하여 나노입자의 쉘 상에 화학식 IV의 기를 형성할 수 있다. 또 다른 바람직한 방법에서, 단량체 단위 B 중 하나 이상이 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합(들)을 포함하고, 이는 펜타플루오로페닐 메타크릴레이트와 반응하여 화학식 IV의 기를 나노입자의 형성 후에 그의 표면에 그래프팅할 수 있다.

[0154] 화학식 IV의 기는 나노입자와 관심 표면-개질제 사이의 공유 부착을 촉진하는 반응성 에스테르 관능기를 제공한

다. 특히, 아민 모이어티를 함유하는 표면-개질기를 나노입자에 공유 부착시키기 위한 방법이 사용될 수 있다. 접착 부착을 개선하기 위해서는 티올화된 중합체에 의해, 흡수율을 모니터링하기 위해서는 형광단에 의해, 또는 표적화를 위해서는 BBB 신호 펩티드 또는 RGD 유도체에 의해 표면을 개질시키는 것이 특히 바람직하다. 따라서, 본 발명은 특히, 나노입자가 그에 공유 부착된 화학식 III의 커플링제를 포함하는, 본원에서 정의된 나노입자 및 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0155] 도 1은 본 발명의 예시적 블록 공중합체의 합성 단계를 도시한다.
- 도 2는 비-용매 (물, 메탄올, 에탄올), 용매:비-용매의 비율 (1:20, 1:10, 1:2) 및 중합체 농도 (50 mg/ml, 20 mg/ml 및 10 mg/ml)의 변화가 나노입자 크기에 미치는 영향을 도시한다.
- 도 3은 블록 공중합체 (P) 및 표면-개질제, 및 임의로 커플링제 전체 또는 그 일부가 부착된 블록 공중합체 (2P)로부터의 나노입자 (N)의 형성을 도시한다.
- 도 4는 14일의 콜로니 형성 후에 상이한 농도의 빈 나노입자 (NNP), 파클리탁셀 및 파클리탁셀-로딩 나노입자 (파클리탁셀-NNP)가 CGL-1 세포에 미치는 영향을 도시한다.
- 도 5는 21일의 콜로니 형성 후에 상이한 농도의 NNP, 파클리탁셀 및 파클리탁셀 NNP가 LN-229 세포에 미치는 영향을 도시한다.
- 도 6은 14 내지 21일의 콜로니 형성 후에 상이한 농도의 NNP, 파클리탁셀 및 파클리탁셀 NNP가 U-897 MG 세포에 미치는 영향을 도시한다.
- 도 7은 정상 인간 정상세포 (NHA)에 대한 NNP, 파클리탁셀 및 파클리탁셀 NNP의 독성을 도시한다.
- 도 8은 정상 인간 신경 전구세포 (NHNP)에 대한 NNP, DMSO 중의 파클리탁셀 및 파클리탁셀 NNP의 독성을 도시한다.
- 도 9는 불멸화 인간 신경 전구세포 (RenCe11)에 대한 NNP, 파클리탁셀 및 파클리탁셀 NNP의 독성을 도시한다.
- 도 10은 본 발명의 대표적인 나노입자로부터의 파클리탁셀의 방출 프로파일을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0156] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명된다. 실시예가 단지 예시를 위한 것이며, 상기에 기재된 발명을 제한하려는 것이 아님을 알 것이다. 본 발명의 범주로부터 이탈함이 없이 세부사항의 변화가 있을 수 있다.
- [0157] **실시예**
- [0158] *실시예 1*
- [0159] 글루타르산 12 g (0.09 몰) 및 1,8-옥탄디올 11.1 g (0.08 몰)을 마이크로파 오븐 (디스커버리 CEM(Discovery CEM))에서, 100 W의 출력으로 1시간 동안 반응시켰다. 상기 작업은, 온도를 120°C에서 일정하게 유지하기 위해 압축 공기를 이용하여 시스템을 냉각시키면서 진공하에 (100 mbar) 수행하였다. 그에 따라 양성 블록이 생성되었다.
- [0160] 그 후에, 양성 블록을 동일한 마이크로파 반응기에서, 240분 동안 100 W의 출력으로 120°C에서, 2000 폴리에틸렌 글리콜 (M_w 2000 Da; 6.5 g, 3 mM)과 압축 공기를 이용하여 냉각시키면서 진공하에 반응시켰다. 그에 따라 블록 생체중합체 10 g이 수득되었다.
- [0161] *실시예 2*
- [0162] 확산 매질은 아세톤이었고, 여기에 실시예 1의 블록 공중합체를 10, 20 및 50 mg/ml의 농도로 용해시켰고, 파클리탁셀의 양은 블록 공중합체의 3 중량%였다. 분산 매질은 밀리-큐(Milli-Q) 물, 메탄올 또는 에탄올을 포함하였다.
- [0163] 확산 매질을 분산 매질에, 1:2, 1:10 또는 1:20의 비율로, 50 μl/분의 유량으로, 시린지 펌프에 의해 제어되고, 니들에 의해 매질에 직접적으로 들어가 있는 시린지를 통해, 130 rpm의 자기 교반하에 25°C에서 첨가하였다. 그 후에, 생성된 나노현탁물을 45분 동안 6000 rpm에서 원심분리하여, 분산 매질, 미포착 파클리탁셀 및 확산

매질을 서서히 제거하였다. 상청액을 버리고 펠렛을 밀리-큐 물 (15 ml)에 재현탁시킨 후에, 최종 세척 단계에서 동일한 조건하에 다시 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 펠렛을 용액으로 보관하거나, 물에 재분산시키고 동결건조시킨 후에 보관할 수 있다.

[0164] 원심분리하여 보관하였던 나노입자가 팽윤하여, 보관한지 5일 후에 팽윤 평형에 도달할 때까지 크기의 증가가 유도되었다. 나노입자는 보관한지 15일 후에 특징분석하였다.

[0165] 실시예 3

[0166] 실시예 2에서 제조된 나노입자의 크기 및 다분산도를, 동적 광산란법으로 제타사이저 (말베른 인스트루먼츠, 영국)를 사용하여, 90°의 산란 각도로 25°C의 온도에서, 여과수로 적절하게 희석된 샘플을 사용하여 분석하였다. 그 결과가 표 2에 나타나 있다.

표 2

Ex.	비-용매	중합체 농도 ⁿ (mg/ml)	용매:비-용매의 비율 (v:v)	크기 (nm)	다분산도
2.1	물	10	1:2	116.5 ± 0.9379	0.213 ± 0.012
2.2	물	10	1:10	157.1 ± 1.278	0.178 ± 0.016
2.3	물	10	1:20	174.4 ± 1.238	0.099 ± 0.015
2.4	물	20	1:2	115.4 ± 1.433	0.196 ± 0.015
2.5	물	20	1:10	159.5 ± 1.612	0.197 ± 0.011
2.6	물	20	1:20	186.9 ± 1.642	0.118 ± 0.015
2.7	물	50	1:2	114.6 ± 0.7062	0.217 ± 0.009
2.8	물	50	1:10	140.8 ± 2.736	0.33 ± 0.029
2.9	물	50	1:20	261 ± 5.154	0.218 ± 0.014
2.10	에탄올	10	1:10	72.81 ± 0.4731	0.098 ± 0.012
2.11	에탄올	10	1:20	70.52 ± 5.282	0.201 ± 0.038
2.12	에탄올	20	1:10	102.7 ± 0.4787	0.106 ± 0.011
2.14	에탄올	20	1:20	68.43 ± 2.518	0.282 ± 0.04
2.15	에탄올	50	1:10	88.13 ± 2.354	0.243 ± 0.034
2.16	에탄올	50	1:20	159 ± 3.553	0.242 ± 0.023
2.17	에탄올	10	1:10	71.7 ± 2.779	0.204 ± 0.036
2.18	에탄올	10	1:20	91.17 ± 0.6609	0.131 ± 0.01
2.19	에탄올	20	1:10	102.7 ± 0.4787	0.106 ± 0.011
2.20	에탄올	20	1:20	108.9 ± 8.399	0.236 ± 0.036
2.21	에탄올	50	1:10	134.8 ± 1.7	0.218 ± 0.021
2.22	에탄올	50	1:20	146.2 ± 1.5	0.207 ± 0.014

[0167]

[0168] 실시예 4

[0169] 실시예 2.6에서 제조된 나노입자의 제타-전위를 전기영동 분석장치 설비로 분석하고, 전기영동 이동도로부터 제타-전위 값을 얻기 위해 1.5의 스몰루코프스키(Smoluchowsky) 상수를 이용하였다. 제타-전위는 -35 내지 -40 mV의 범위에 있는 것으로 밝혀졌다.

[0170] 실시예 5

[0171] 실시예 2에서 제조된 나노입자의 활성제 캡슐화 효율, 활성제 포착율, 활성제 방출 프로파일 및 분해 프로파일 속도론을, 역상 C-18 컬럼을 이용하고, 1 ml/분의 고정된 유량으로 아세트니트릴/물 (70/30 v/v)로 등용매 용리하며, 227 nm에서의 UV 검출에 의해 검출하는 HPLC 분석에 의해 측정하였다. 표 3은 활성제 캡슐화 효율 및 활성제 포착율 데이터를 보여준다.

표 3

중합체의 양 (mg)	14.25
활성체의 양 (mg)	0.4275
이론상의 활성제 포락율 (% w/w)	2.91%
캡슐화된 활성제 (mg)	0.305
캡슐화되지 않은 활성제 (mg)	0.0843
캡슐화 효율 (%)	71.3
활성제 포락율 (%)	2.09
활성제 손실율 (mg) (%)	0.0382 (9%)

[0172]

[0173]

실시에 6.1: 신경교종 세포에서의 세포독성

[0174]

클론형성 분석법을 수행하여 신경교종 세포주에 대한 부속된 파클리탁셀-로딩 나노입자의 독성을, 파클리탁셀 및 빈 나노입자의 독성과 비교하여 관찰하고, 장기 작용으로 (2 내지 3주의 성장) IC₅₀ 값을 측정하였다. 표면-개질제 (서열 5)를 갖거나 표면-개질제가 없는 나노입자를 실시예 2의 방법에 따라, 파클리탁셀을 포함시키거나 포함시키지 않으면서 형성하였다.

[0175]

3종의 세포주를 사용하였다. CGL-1 세포주 (온코디자인(Oncodesign); 프랑스 드종)는 누드(Nude) 래트에 피하(SC) 이식된 TG-1 종양으로부터 분리하였다. 14일째에 콜로니가 형성되었다. 인간 U-87 MG 세포주 (아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection))은 44세 백인 여성으로부터의 III기 교모세포종으로부터 유래되었다. 21일째에 콜로니가 형성되었다. 마지막으로, LN-229 세포주 (아메리칸 타입 컬처 컬렉션)은 1979년에 우전두 두정후두 교모세포종에 걸린 환자로부터 채취한 세포로부터 확립되었다. 14-21일째에 콜로니가 형성되었다.

[0176]

시험한 제제는 하기와 같다: 나노입자 (스톡 용액 NaCl 0.9%); 파클리탁셀-로딩 나노입자 (3.33 중량%의 파클리탁셀; 스톡 용액 NaCl 0.9%); 및 파클리탁셀 (스톡 용액 DMSO 100%). 모든 시험 물질은 그의 각각의 비히클로 100 μM로 희석시켜 스톡 용액을 수득하였다. 5개의 농도 (1:5 또는 1:3 희석 단계)를 삼중으로 사용하였다. 스톡 용액을 그의 각각의 비히클로 100 μM로 희석시켜 1:5 또는 1:3 희석 단계로 일련의 5개의 농도를 수득함으로써 제제를 수득하였다. 그 후에, 각각의 용액을 RPMI 1640을 이용하여 1:20으로 추가로 희석시킨 다음, 연한천으로 최종 1:10 희석시켰다.

[0177]

시험한 초기 농도는 0.8 nM, 4 nM, 20 nM, 100 nM 및 500 nM이었다. GCL-1에 대해서는 2 nM, 8 nM, 40 nM, 200 nM 및 1000 nM에서, LN-229에 대해서는 1.2 nM, 3.7 nM, 11 nM, 및 33 nM에서 반복하였다. 최고 농도에서 2회 이상의 독립 실험을 수행하였고, 희석 단계는 필요에 따라 변화시켰다. 세포를 상이하게 처리하면서 14 내지 21일 동안 인큐베이션하였다.

[0178]

결과를 표 4에 제공하였고, 초기 300개의 클론으로부터의 생존율 (%)을 나타낸다. 비히클 결과는 포함시키지 않았다 (모든 경우에 100%의 생존율). 그 결과가 도 4, 5 및 6에 그래프로 나타나 있다. 클론형성 시험은 세포 단독이 아니라, 세포의 클론을 기반으로 한다. 따라서, 주어진 IC₅₀ 값은 클론의 50%를 억제하는 농도에 상응한다.

표 4

세포주	CGL1	LN229		U87-MG	
실험 횟수	3	4	5	2	3
연속 희석	1:5	1:3	1:3	1:5	1:5
시험한 최고 농도 (nM)	1000	100	100	500	500
빈 나노입자 (IC ₅₀ ; nM)	>1000	>100	>100	>500	>500
파클리탁셀 (IC ₅₀ ; nM)	792	7.3	21	2.6	7.5
파클리탁셀 나노입자 (IC ₅₀ ; nM)	937	8.7	14	2.3	1.1
파클리탁셀 대사 검정 (히스토리컬 데이터) (IC ₅₀ ; nM)	>100	수행하지 않았음		~10	

[0179]

[0180]

3종의 종양 세포주 각각에 대하여, 빈 나노입자는 세포독성을 거의 또는 전혀 나타내지 않았고, 파클리탁셀-로

딩 나노입자는 단독의 파클리탁셀과 유사하거나 그 보다 높은 세포독성을 나타냈다. 따라서, 나노입자는 파클리탁셀 활성을 감소시키지 않았다. 3종의 중앙 세포주의 활성의 차이는, 세포를 수일간 처리하고 대사 검정법으로 분석하였을 때 관찰된 IC₅₀과 상관관계가 있었다.

- [0181] 상기 결과는 파클리탁셀-로딩 나노입자가 파클리탁셀만큼 효과적이며 빈 나노입자는 암 세포에 대하여 비독성임을 나타낸다. U87-MG에 대한 IC₅₀은 1.1 내지 2.3 nM이며, 이는 단독의 파클리탁셀에 대하여 공개된 값 (10-20 nM)보다 낮다.
- [0182] 상기 시험을 또한 U87-MG 세포에 대하여 반복하였고, 단독의 파클리탁셀에 비해 로딩된 나노입자가 우수한 경향을 나타냈다 (IC₅₀ 값이 각각 0.8-4 nM 및 4-20 nM임).
- [0183] *실시예 6.2: 정상 뉴런 세포에서의 세포독성*
- [0184] ATP-lite 검정을 48 내지 72시간 동안 수행하여 건강한 뇌 세포주에 대한 표면-개질제를 포함하는 파클리탁셀-로딩 나노입자의 세포독성을, 파클리탁셀 및 빈 나노입자의 세포독성과 비교하여 측정하고 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0185] 시험한 제제는 하기와 같다: 비히클, 빈 나노입자, 부속된 파클리탁셀-로딩 나노입자 (3.33 중량%의 파클리탁셀; 부속: 서열 5), 파클리탁셀 및 에토포시드 (에토포시드는 뇌암의 치료에서 중등도 독성을 갖는 것으로 개시됨).
- [0186] 시험한 농도는 0.00026 nM, 0.0013 nM, 0.0064 nM, 0.032 nM, 0.16 nM, 0.8 nM, 4 nM, 20 nM, 100 nM 및 500 nM이었다. 에토포시드는 50 μM이었다.
- [0187] 3종의 세포주를 시험하였다. 정상 인간 성상세포 (NHA; 론자(Lonza))는 제한된 횡수로 분열된 부착 세포의 1차-유도 배양물이다. 정상 인간 전구세포 (NHNP; 일차 세포주; 론자)는 특정 조건하에 (라미닌 코팅 플레이트, 분화 인자에 의해 유도) 부착 신경교종 세포 및 뉴런으로 분화되는, 고차 분열된 신경구 성장 세포이다. 마지막으로, 불멸화 인간 신경 전구세포 (RenCell; 밀리포어(Millipore))는 c-myc 종양유전자로 형질전환되는 태아 뇌 세포이다.
- [0188] 세포를 24시간 (성상세포) 및 72시간 (전구 세포주) 동안 처리하면서 인큐베이션하였다.
- [0189] 1) 성상세포
- [0190] 결과가 도 7에 나타나 있다. 빈 나노입자는 시험한 농도 전체에서 비독성이었고, 따라서 IC₅₀은 500 nM 초과였다. 파클리탁셀 및 부속된 파클리탁셀-로딩 나노입자는 유사한 독성을 보였으며, IC₅₀ 값은 약 100 nM이었다. 50 μM에서, 에토포시드로 처리한 세포의 12%만이 생존하였다.
- [0191] 파클리탁셀을 위한 비히클로서 식염수를 사용하여 실험을 반복하였다 (DMSO 대신: 식염수; 결과는 도 7에 나타나 있음). 이 역시 빈 나노입자는 모든 연구 범위에서 독성을 나타내지 않았고, 파클리탁셀-로딩 나노입자 및 단독의 파클리탁셀의 경우에는 감소한 독성을 나타내며, 500 nM 초과 IC₅₀을 초래한다는 것을 보여주었다. 에토포시드 생존율은 45%였고, 약 50 μM의 IC₅₀을 가졌다.
- [0192] 2) 정상 인간 신경 전구세포
- [0193] 결과가 도 8에 나타나 있다. 여기에서도, 빈 나노입자는 시험한 범위 전체에서 비독성이었다. 파클리탁셀-로딩 나노입자는 농도에 따라 독성이 증가하는 약간의 경향을 보였지만, 500 nM 초과 IC₅₀을 가졌다. DMSO:식염수에 용해된 파클리탁셀은 100 내지 500 nM의 IC₅₀을 가졌고, 식염수에서는 500 nM 초과 IC₅₀을 가졌다. 에토포시드는 성상세포 시험과 유사하게 거동하며, 50 μM에서 21%의 생존율을 나타냈다.
- [0194] 3) 불멸화 인간 신경 전구세포 (ReNcell)
- [0195] 결과가 도 9에 나타나 있다. 여기에서도, 빈 나노입자는 모든 시험한 범위에서 비독성이었다. 파클리탁셀-로딩 나노입자는 농도에 따라 독성이 증가하는 약간의 경향을 보였고, IC₅₀은 약 500 nM이었다. DMSO:식염수에 용해된 파클리탁셀은 약 2 nM의 IC₅₀을 가졌고, 식염수에서는 57 nM의 IC₅₀을 가졌다. 에토포시드는 50 μM에서 3%의 생존율을 나타냈다.

[0196] IC₅₀ 데이터의 요약이 표 6에 제공되어 있다. 빈 나노입자는 시험한 농도에서 독성이 관찰되지 않았다. 파클리탁셀-로딩 나노입자의 IC₅₀ 값은 단독의 파클리탁셀보다 높았다. 이는 나노입자와의 접촉 시간이 78시간보다 길지 않으므로, 나노입자가 함유된 파클리탁셀의 적은 백분율만을 방출하고, 이는 실험에서 단독으로 투여되었을 때의 독성의 어느 정도만을 초래하기 때문일 수 있다. 이는 나노입자가 지속 방출 거동을 나타낸다는 것을 의미한다.

표 5

세포주	정상 인간 성상세포		정상 인간 뉴런 전구세포	불멸화 인간 신경 전구세포
	Exp. 1	Exp 2		
빈 NNP (IC ₅₀ ; nM)	>500	>500	>500	>500
파클리탁셀 (IC ₅₀ ; nM)	90	>500	254	2.2
파클리탁셀 NNP (IC ₅₀ ; nM)	135	>500	>500	413
에토 포시드(생존율 %)	13	45	21	3

[0197]

[0198] 실시예 7: 신경교종 중앙 래트 모델에서의 파클리탁셀-로딩 나노입자의 생체내 활성의 관찰

[0199] 시험 물질

표 6

배치	빈 나노입자	로딩된 나노입자		
	SAG005-113/50	SAG005-122/12.5	SAG005-122/25	SAG005-122/50
투입량 (mg)	422.4	119.8	223	447.4 *
NP 중량 (mg)	249.9	66.56	123.89	248.56 *
입자 크기 (nm)	271.8 ± 0.5	241.6 ± 3.1	244.4 ± 2.1	244.2 ± 2.1
PDI	0.27 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.04
표면 전하 (mV)	-40.3 ± 0.7	-34.9 ± 0.9	-36.6 ± 1.5	-36.9 ± 0.3
오스몰농도 (Osm/kg)	297	281	285	288
pH	~5	~5	~5	~5
내독소 무함유	예	예	예	예
약물 설명	***[비로딩]***	파클리탁셀	파클리탁셀	파클리탁셀
약물 함량	***[비로딩]***	중합체 나노입자의 4.55 중량% (총 중량의 2.53%)	중합체 나노입자의 4.55 중량% (총 중량의 2.53%)	중합체 나노입자의 4.55 중량% (총 중량의 2.53%)

[0200]

[0201] 각각의 바이알을 표 7에 나타난 주사용수 (wfi, 아구에탄트(Aguettant))의 양으로 재구성하였다.

표 7

배치	빈 나노입자	로딩된 나노입자		
	SAG005-113/50	SAG005-122/12.5	SAG005-122/25	SAG005-122/50
재구성을 위해 필요한 wfi의 부피 (ml)	5	5.33	4.96	4.86
나노입자 최종 농도 (mg/ml)	50	12.5	25	50
파클리탁셀 최종 농도 (mg/ml)	0	0.57	1.14	2.27

[0202]

[0203] 재구성 후에, 용액을 수초간 볼텍스시키고 30분 동안 초음파 처리하였다 (진동수: 50/60 Hz, 출력: 360 W). 그 후에, 입자 분산액 (유백색 액체)을 주사용수로 준비하였다. 주사할 때, 샘플을 0.45 μm 필터로 여과하였다 (밀리포어 밀렉스(Millex) HV - 듀라포어(Durapore) PVDF 막에 상응함).

[0204] 급성 독성의 한계: 최대 허용 용량 (MTD)의 측정

[0205] 래트를 체중에 기초하여 랜덤 분배하였다 (4개의 그룹, 3마리의 래트/그룹, 총 12마리의 래트). 활성제-로딩된 나노입자 조성물을 5, 10 및 20 mg/kg/1회 주사로 제조하였다. 연구를 위해 사용된 나노입자는 냉동-건조된 것이고, 등장성이며, 0.45 마이크로미터 메시(mesh)를 통해 어려움 없이 여과될 수 있었다.

표 8

그룹	동물 (n)	처리	나노입자 (mg/kg/inj)	파클리탁셀 (mg/kg/inj)	경로	처리 계획
1	3	비히클 (빈 입자)	440	-	IV	Q1Dx1
2	3	활성제 로딩된 나노입자	110	5	IV	Q1Dx1
3	3	활성제 로딩된 나노입자	220	10	IV	Q1Dx1
4	3	활성제 로딩된 나노입자	440	20	IV	Q1Dx1
합계	12					

IV: 정맥 주사; Q1D: 1일 1회

[0206]

[0207] 래트의 체중을 주 2회 모니터링하였다. 래트 거동 및 생존율을 매일 모니터링하였다. 부작용은 검출되지 않았고, 래트는 체중이 감소하지 않았다. 일부 경우에는, 체중 증가가 관찰되었다. 처리 후 14일째에 생존한 래트를 안락사시켜 부검하였다 (육안 검사). 래트를 기관의 거시적 변화에 대하여 검사하였다. 변화가 관찰되지 않았다.

[0208] 이러한 결과는 나노입자가 동물에 대하여 비독성이라는 것을 나타내고, 또한 최고 용량에서 독성이 관찰되지 않았으므로, 상기 결과는 지속 방출 프로파일을 의미할 수 있다. 원칙적으로, 단독의 파클리탁셀을 동일한 용량으로 주사하였다면, 특히 최고 용량에서는 부작용이 관찰되었을 것이다.

[0209] 시험한 등가의 최고 농도 (나노입자 50 mg/ml, 약물 함량 4.4%)에서, 1% 미만의 혈액-뇌 통과 및 약 2주의 지속 방출 프로파일을 가정하면, 이러한 제제는 IC₅₀ 보다 훨씬 높은 뇌 농도를 달성하기 위해 적은 부피 (200 ml)로 인간에게 제공될 수 있다는 것이 예상된다.

[0210] 처리 독성의 한계: 최대 총 허용 용량 (MTD)의 측정

[0211] 래트를 체중에 기초하여 랜덤 분배하였다 (4개의 그룹, 3마리의 래트/그룹, 총 12마리의 래트). 시험할 활성제-로딩된 나노입자 조성물을 3개의 용량으로 제조하였다.

표 9

그룹	동물 (n)	처리		경로	처리 계획
1	3	비히클 (빈 입자)		IV	TW x 4
2	3	활성제-로딩된 나노입자 조성물	용량 #1	IV	TW x 4
3	3	활성제-로딩된 나노입자 조성물	용량 #2	IV	TW x 4
4	3	활성제-로딩된 나노입자 조성물	용량 #3	IV	TW x 4
합계	12				

IV: 정맥 주사; TW x 4: 연속 4주 동안 주 2회

[0212]

[0213] 래트의 체중을 주 2회 모니터링하였다. 래트 거동 및 생존율을 매일 모니터링하였다. 처리 후 7일째에 생존한 래트를 안락사시켜 부검하였다 (육안 검사). 시험한 용량 모두가 독성이라면, 또 다른 래트에서 보다 저용량을 시험하였다. MTD가 한정되면, 항종양 활성 연구를 정위이식 U-87 MG 종양을 갖는 누드 래트 모델에서 수행할 수 있다.

[0214] 항종양 활성 연구:

[0215] U-87 MG 인간 신경교종 세포주를 시험관내에서 증식시켰다. 44마리의 암컷 누드 래트를 조사하였다. 그 후에, U-87 MG 인간 신경교종 세포를 래트의 뇌에 정위이식 주입하였다. 1 시점에서 마취 상태에 있는 모든 래트의 꼬리 정맥에 Gd-DTPA 조영제를 IV 주사한 후에, MRI 분석을 수행하여 종양 형태를 평가하였다 (44마리의 래트, 44회 스캔). 결과 영상을 분석하여 종양 부피를 측정하였다. 래트를 체중 및 종양 부피에 기초하여 랜덤 분배하였다 (5개의 그룹, 8마리의 래트/그룹, 40마리의 래트). 시험 물질은 3개의 용량으로 제조하였고, 테모졸로마이드는 50 mg/kg/1회 주사로 제조하였다.

표 10

그룹	동물수	처리	경로	용량(mg/kg/adm)	처리 계획
1	8	비허클 (빈 입자)	IP	-	TW x4
2	8	시험 물질	IP	용량 #1	TW x4
3	8	시험 물질	IP	용량 #2	TW x 4
4	8	시험 물질	IP	용량 #3	TW x 4
5	8	테모졸로마이드	PO	50	(Q1Dx5) x2
합계	40				

IP: 복강내 주사; PO: 경구; TW x 4: 연속 4주 동안 주 2회

[0216]

[0217] 래트의 체중을 주 2회 모니터링하였다. 래트 거동 및 생존율을 매일 모니터링하였다. 2 시점에서 마취 상태에 있는 모든 래트의 꼬리 정맥에 Gd-DTPA 조영제를 IV 주사한 후에, 종양 형태를 위해 MRI 분석을 수행하였다 (8마리의 래트/그룹/시점, 5개의 그룹, 2 시점, 80회의 스캔). 결과 영상을 분석하여 종양 부피를 측정하였다. 최종 2개월 후에 모든 래트를 안락사시켜 부검하였다 (육안 검사). 종양 및 뇌 샘플에서의 파클리탁셀 수준을 HPLC-MS/MS에 의해 정량화할 수 있다.

[0218] 누드 래트에서의 약물-로딩 나노입자의 약동학 및 생체내분포

[0219] 38마리의 누드 래트를 각각의 체중에 따라 3마리로 구성된 1개의 그룹 및 5마리의 래트로 구성된 7개의 그룹으로 랜덤 분배하였다. 각각의 그룹의 평균 체중은 다른 그룹과 상이하지 않았다 (분산 분석). 래트를 상기에 기재된 바와 같이 모니터링하였다.

[0220] * 그룹 1: 3마리의 래트는 처리하지 않았다.

[0221] * 그룹 2 내지 8: 35마리의 래트에 파클리탁셀-로딩 나노입자를 MTD (Q1Dx1)로 1회 IV 주사하고, 마취 상태에 있는 상이한 그룹으로부터 심장 천자에 의해 상이한 시점에 (T1 내지 T7) 안락사시켰다.

[0222] 혈액 전체를 항응고제로서 리튬-헤파린 (Ref. T-MLHG, 테루모(Terumo))을 함유하는 카피젝트(Capject)® 혈액 수집 모세관으로 수집하여, 철저히 혼합하고, 2500 rpm으로 10분 동안 +4°C에서 원심분리하였다. 생성된 혈장을 수집하고, 5개의 분취물로 분리하여, 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 뇌를 수집하여 두 부분으로 절개하였다. 샘플을 건조한 플라스틱관으로 옮기고, 이를 즉시 순간 냉동시키고 (액체 질소), 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 모든 동물을 육안 검사에 의해 부검하였다.

[0223] 주사 용액, 혈장 샘플 및 뇌 샘플에서의 파클리탁셀 수준을 측정하였다. 래트 샘플에서 파클리탁셀을 측정하기 위한 분석 절차는 혈장으로부터 분석물질을 추출하고 내부 표준으로서 도세탁셀을 사용하여 HPLC/MS-MS 분석하는 것을 포함한다.

[0224] 실시예 8

[0225] 본 발명의 대표적인 나노입자의 방출 프로파일을 측정하였다. 0.1 M 인산염 완충 식염수 (PBS) 및 10% 에탄올 용액 (2 ml) 중의 3 중량%의 파클리탁셀 함량을 갖는 실시예 2에 따라 제조된 나노입자를 투석용 백 (8-10 kDa)에 도입하였다. 투석용 백을 37°C의 0.1 M PBS 4 ml에, 150 rpm으로 교반하면서 침수시켰다. 방출된 파클리탁셀의 백분율을 일련의 시점에서 측정하였다. 결과가 표 11 및 도 10에 나타나 있다.

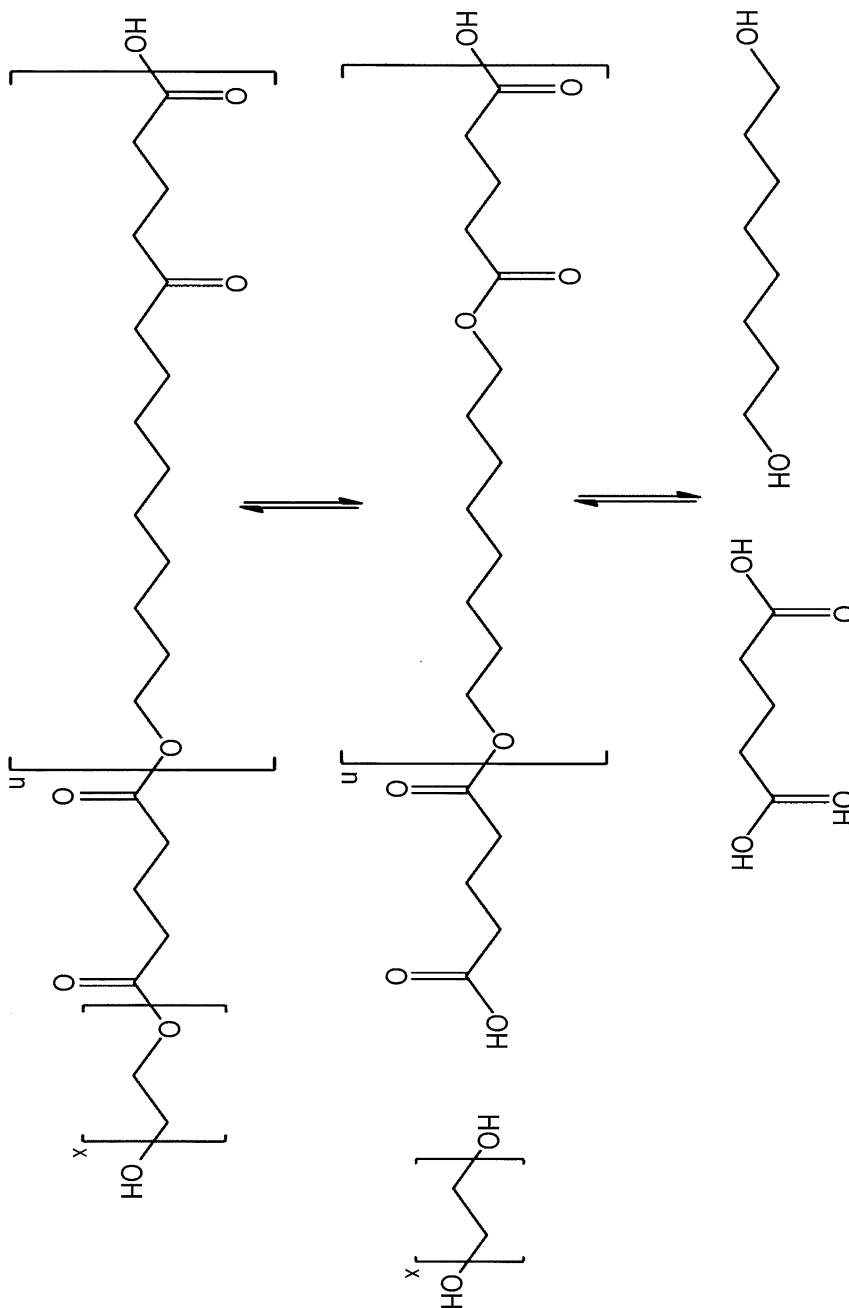
표 11

경과시간 (h)	방출된 파클리탁셀 (%)
0	0
6	0.312
24	1.32
48	3.24
72	10.828

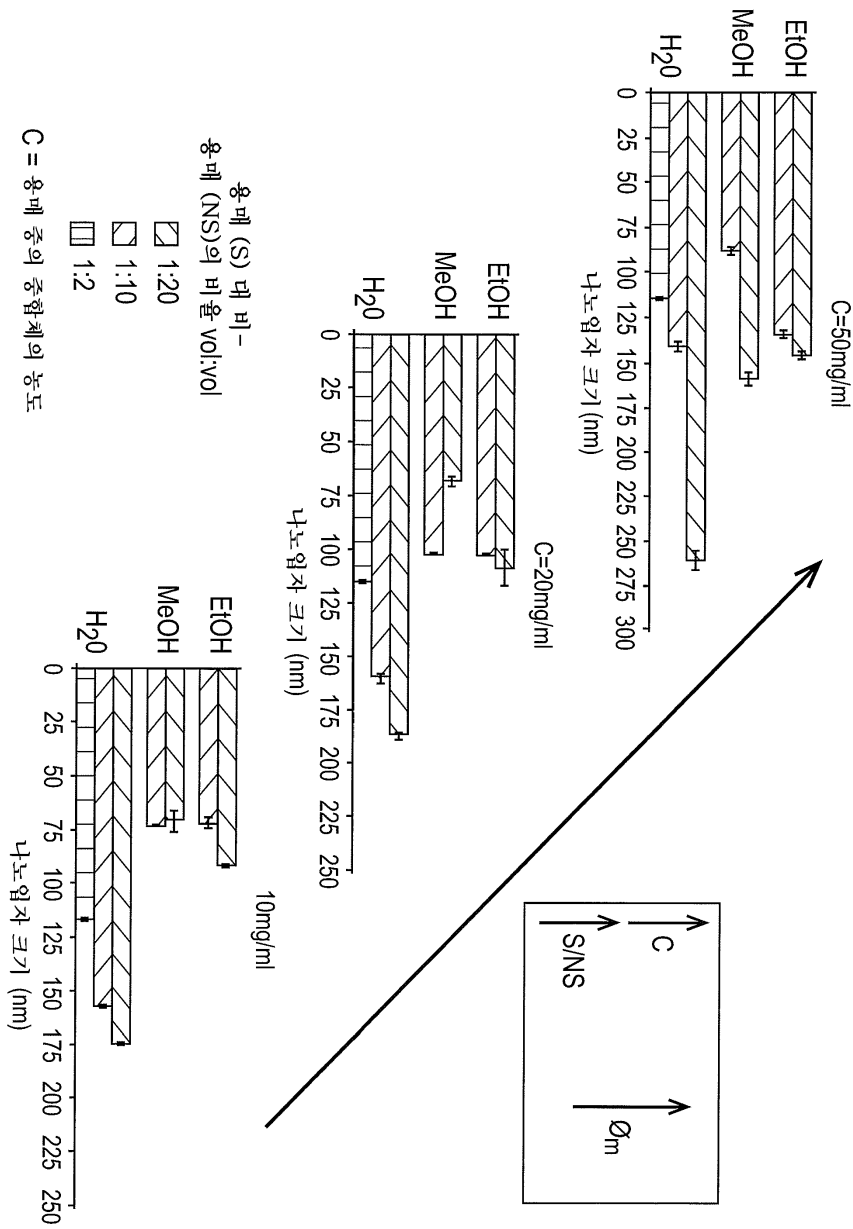
[0226]

도면

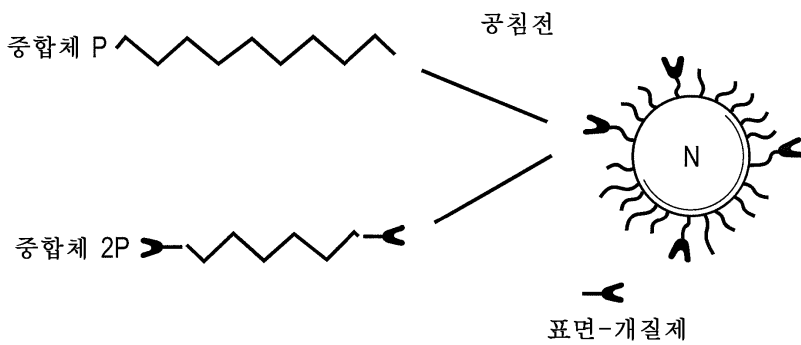
도면1



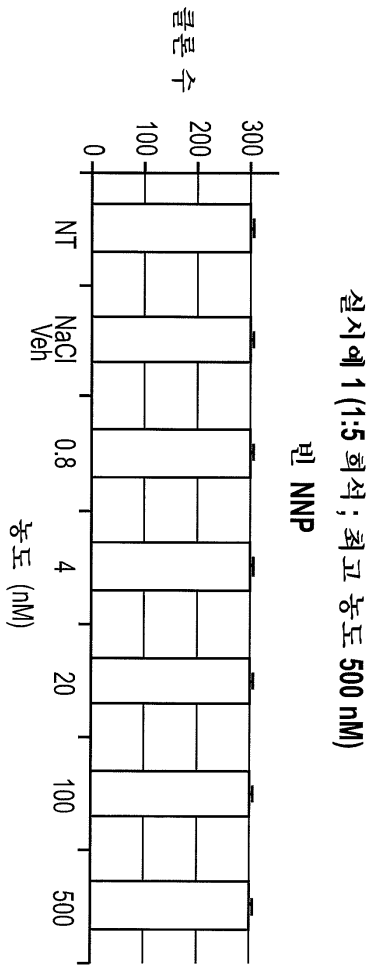
도면2



도면3

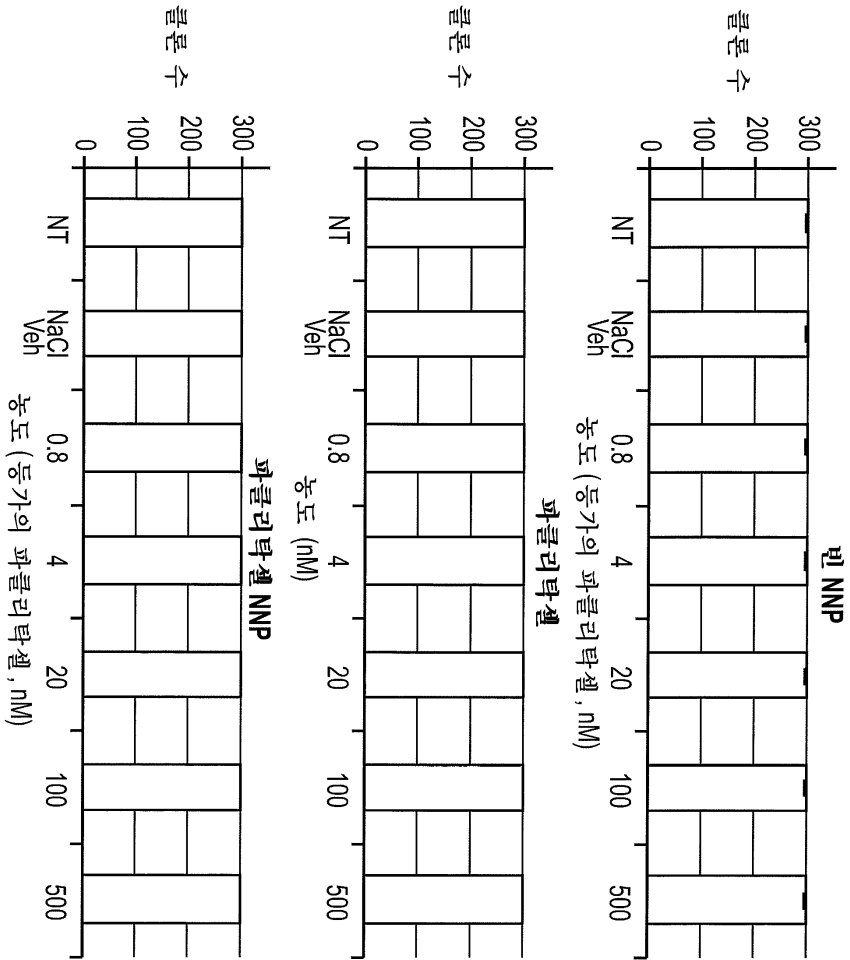


도면4a

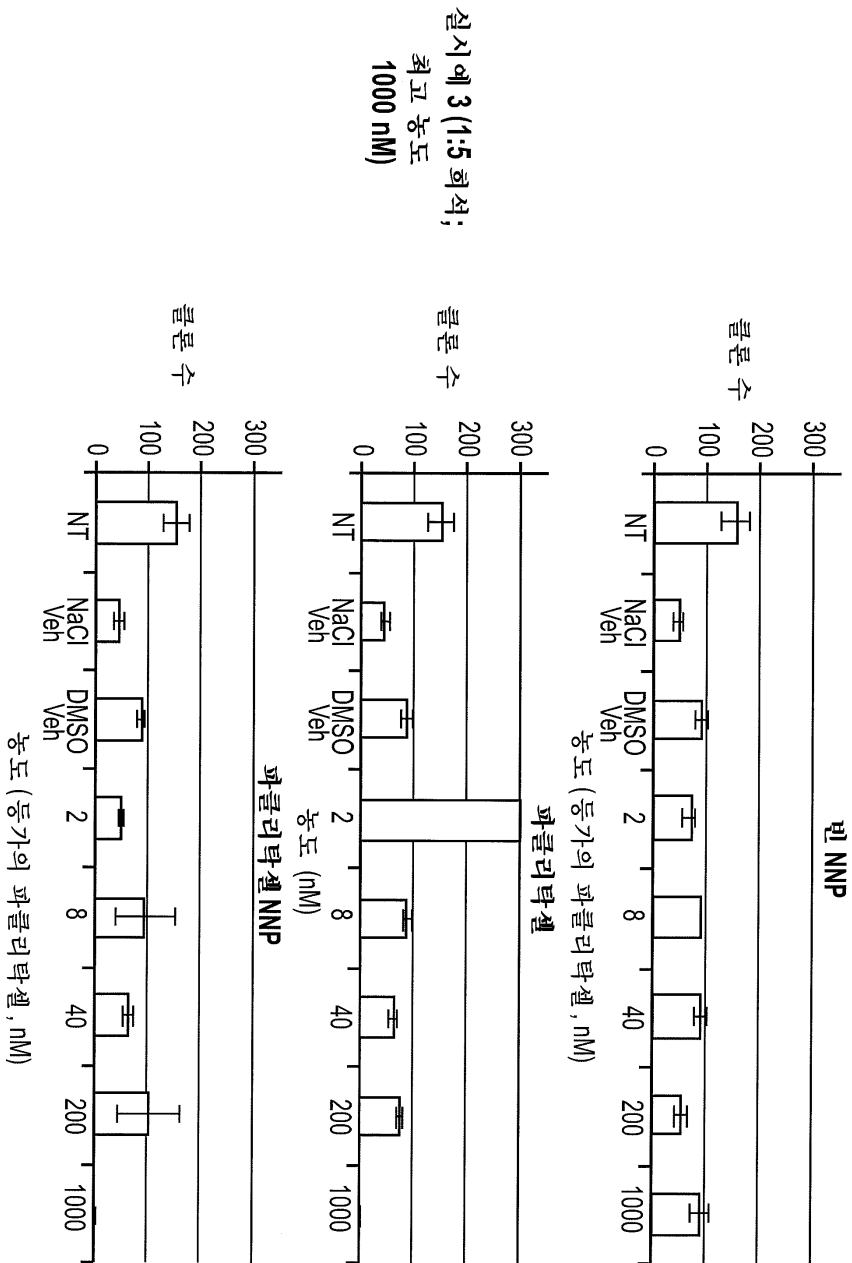


도면4b

실시예 2 (1:5 희석;
최고 농도
500 nM)

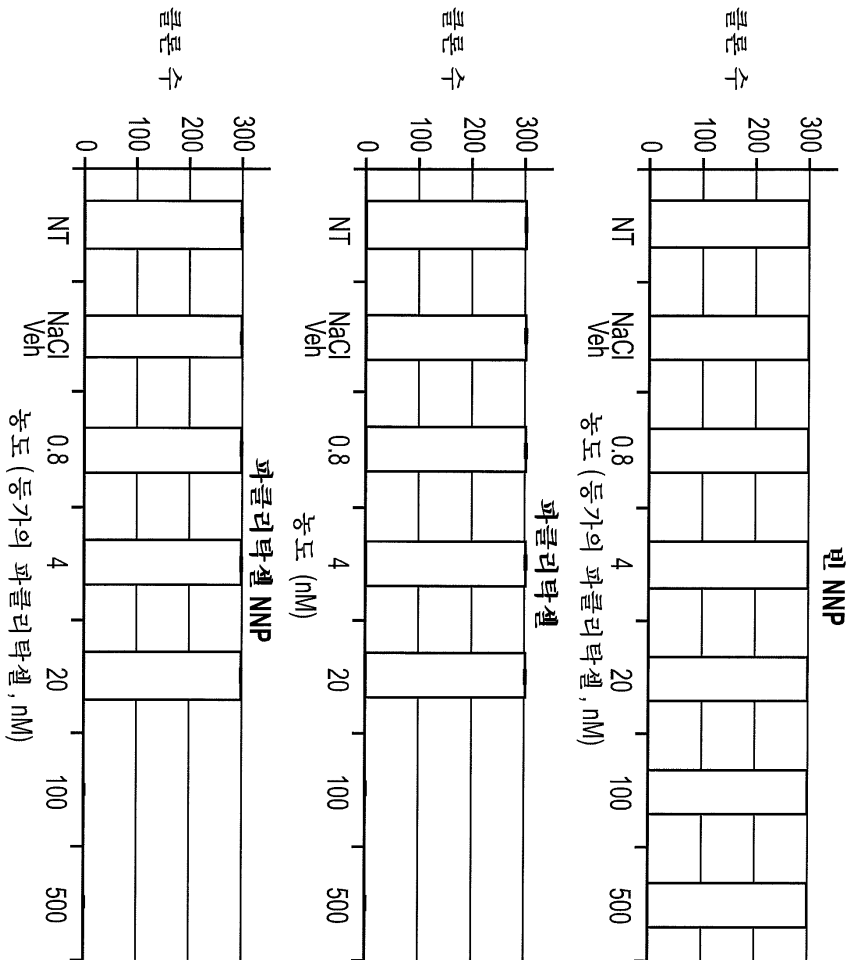


도면4c



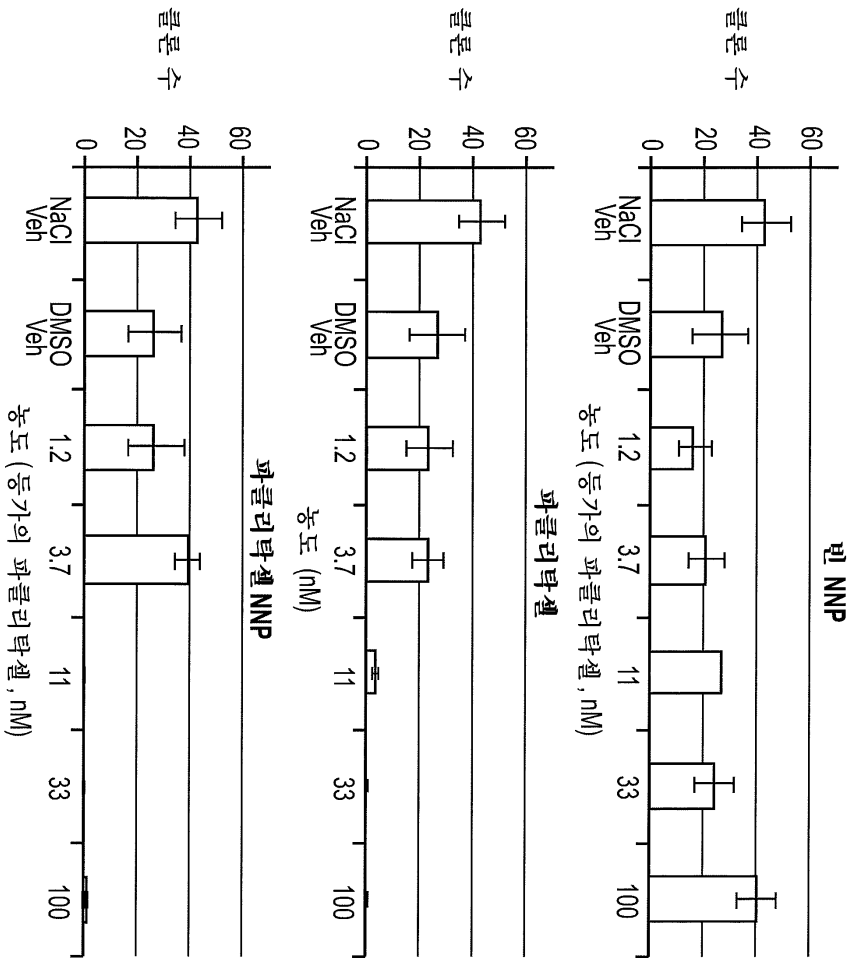
도면5a

실시예 2 (1:5 희석;
최고 농도
500 nM)



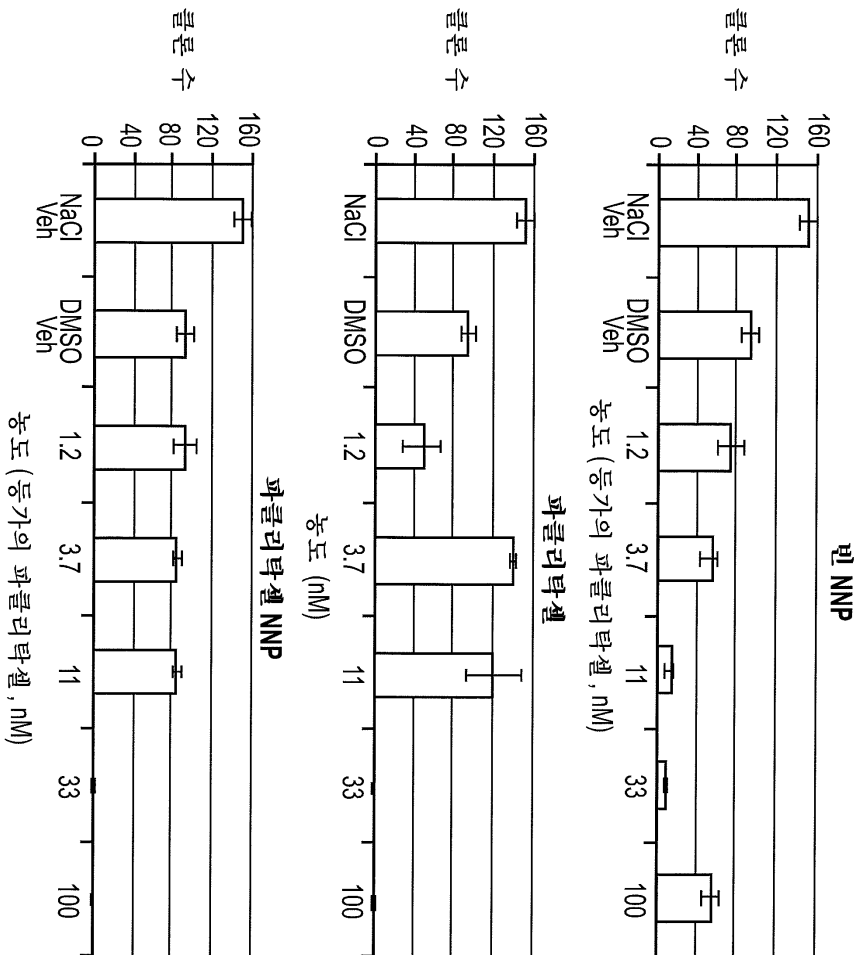
도면5b

실시예 4 (1:3 희석;
최고 농도
100 nM)



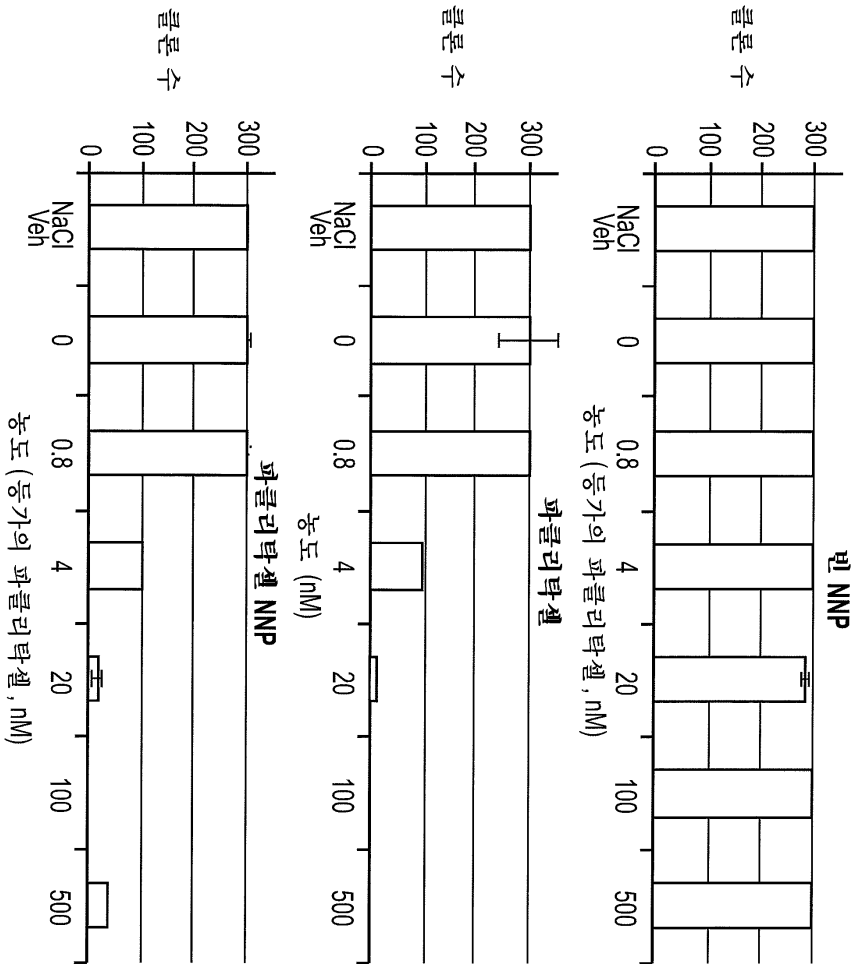
도면5c

실시예 5 (1:3 희석;
최고 농도
100 nM)



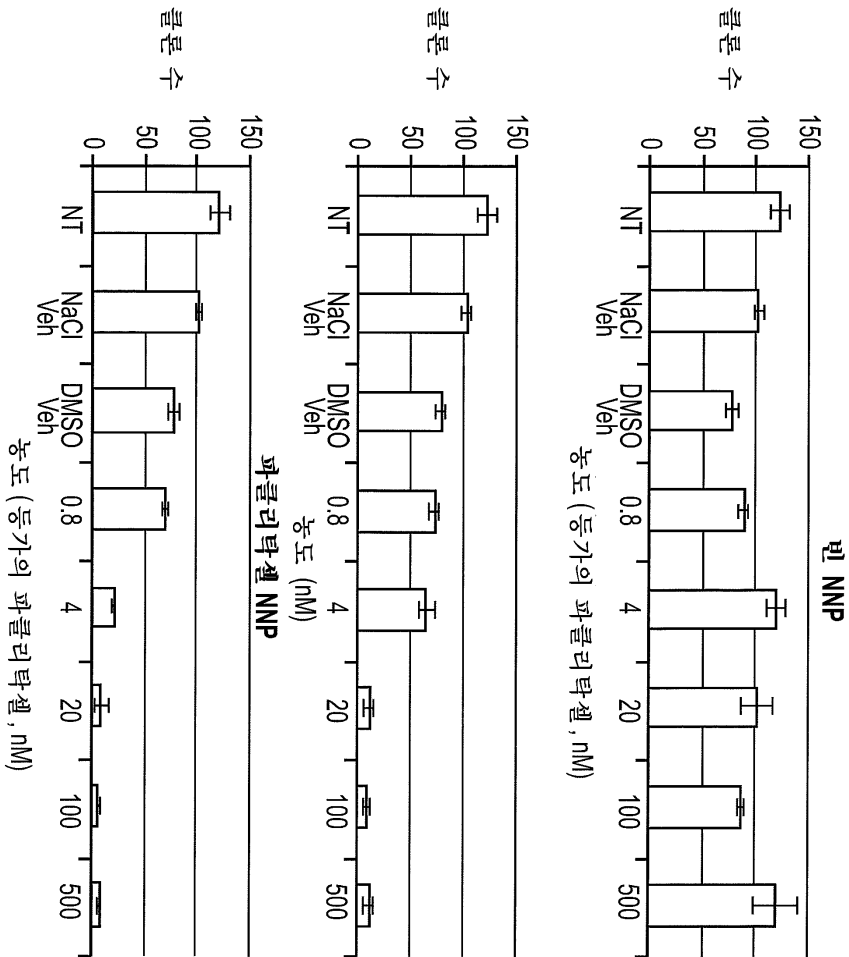
도면6a

실시예 2 (1:5 희석;
최고 농도
500 nM)

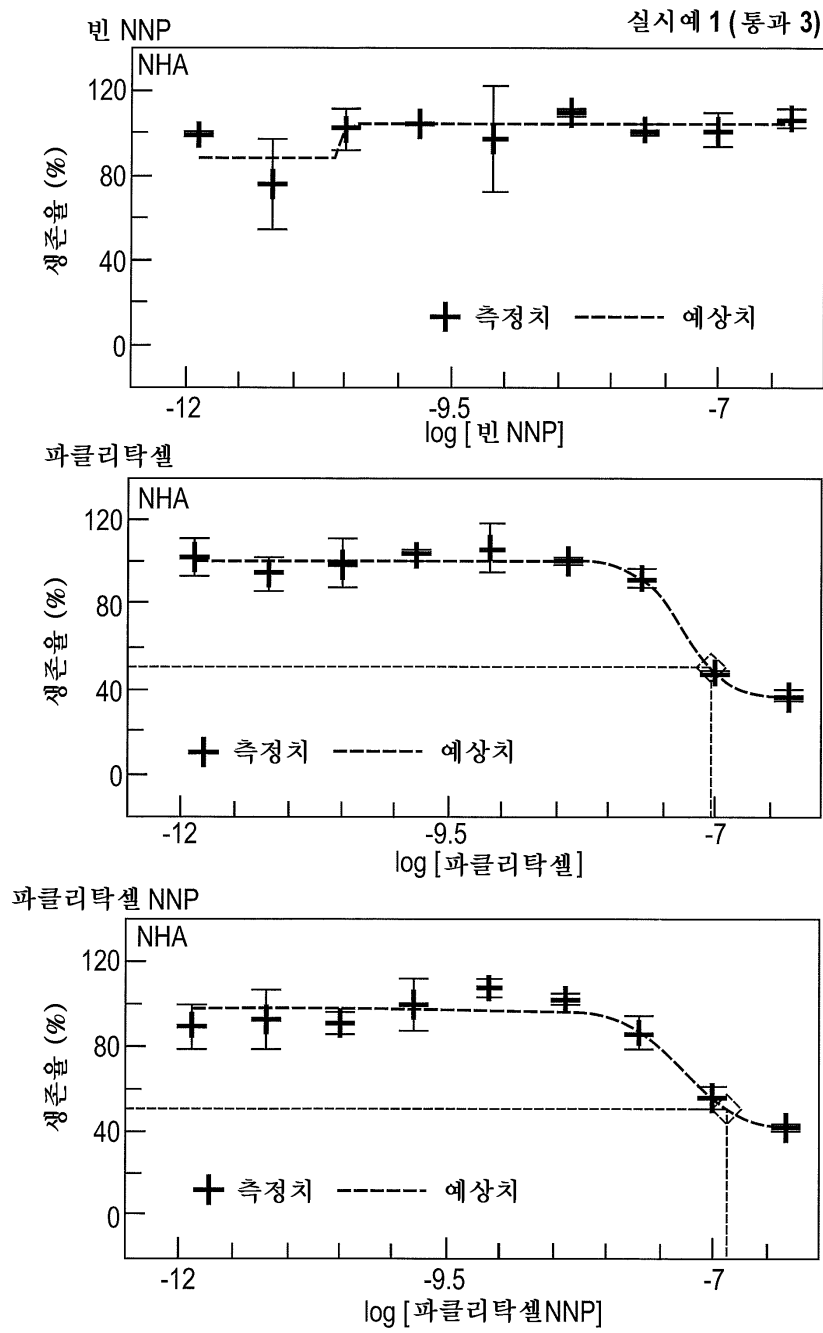


도면6b

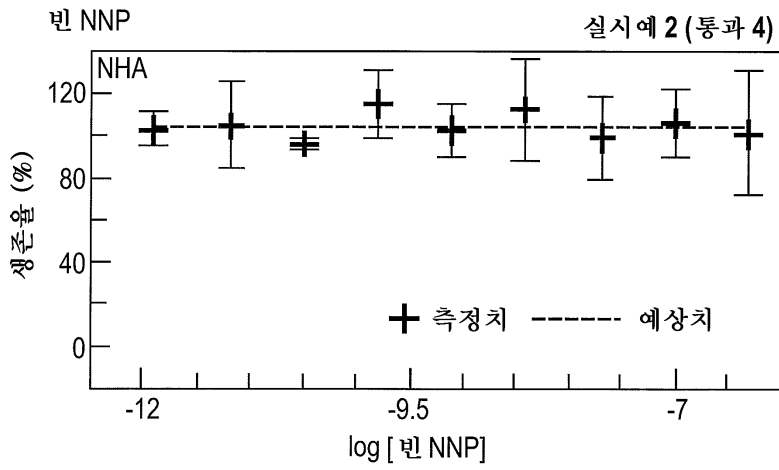
실시예 3 (1:5 희석;
 평균 농도
 500 nM)



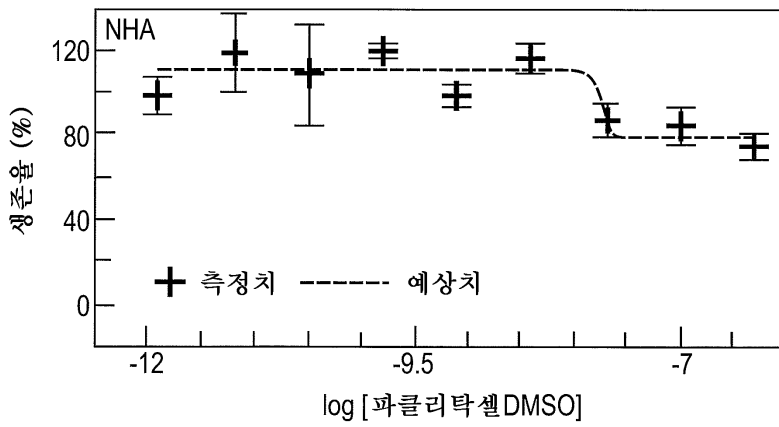
도면7a



도면7b

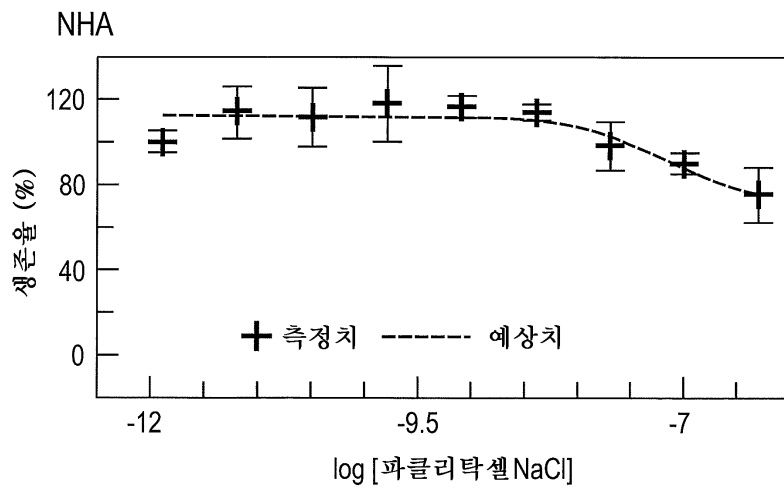
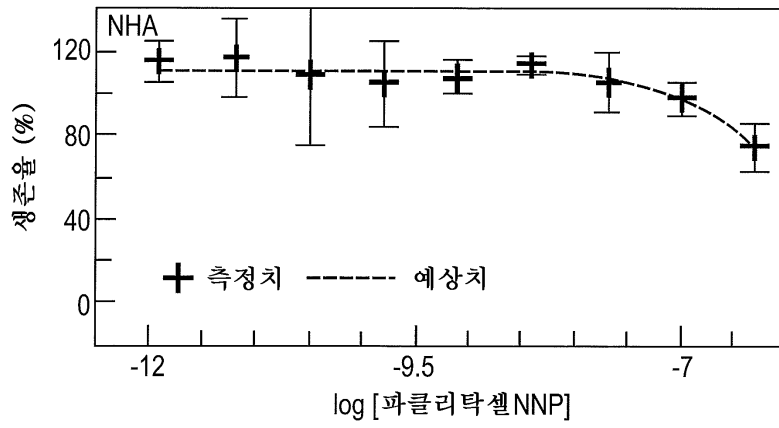


파클리탁셀

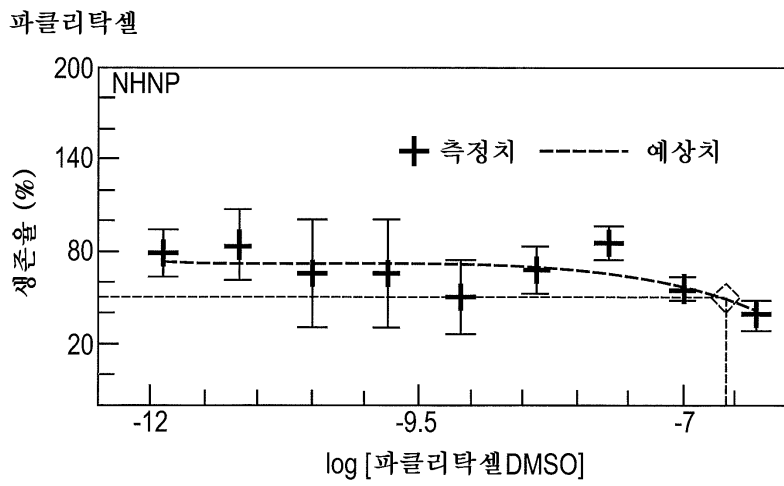
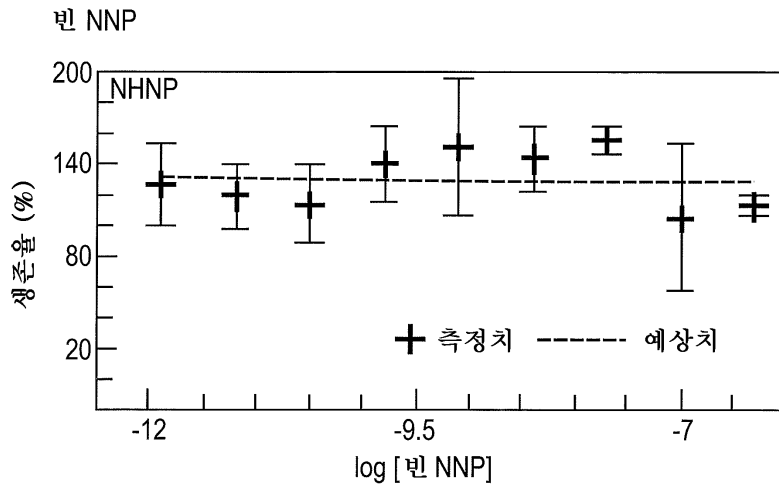


도면7c

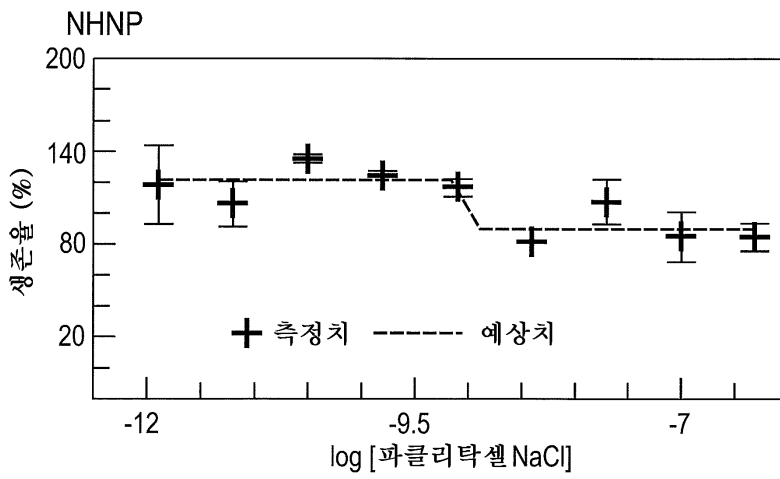
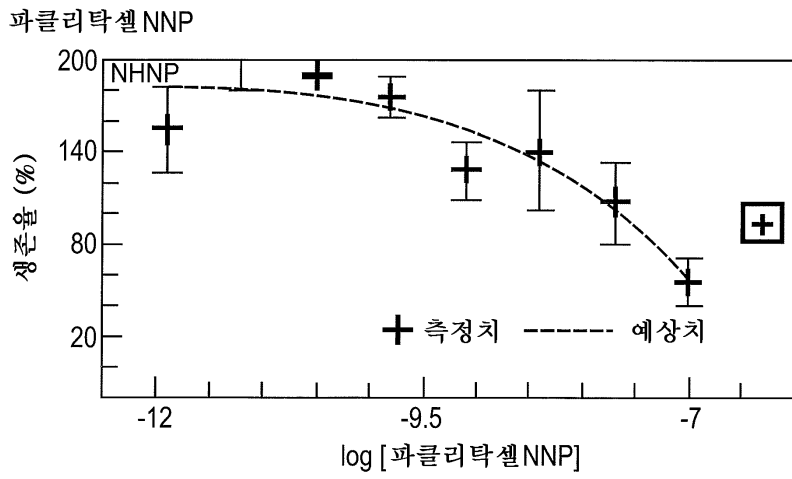
파클리탁셀 NNP



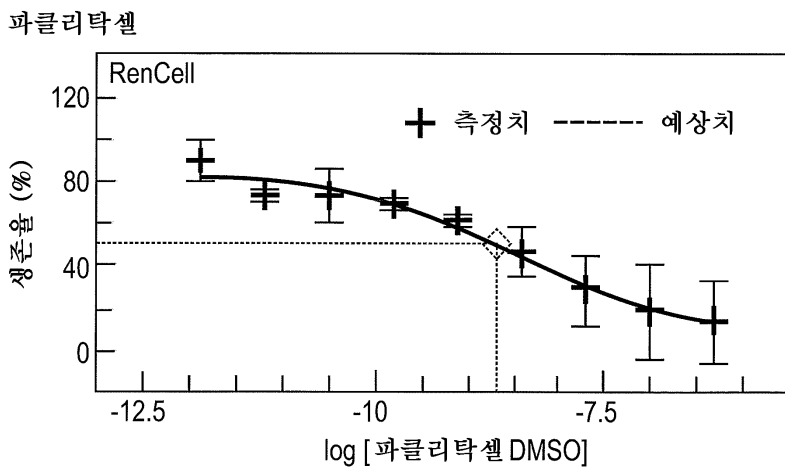
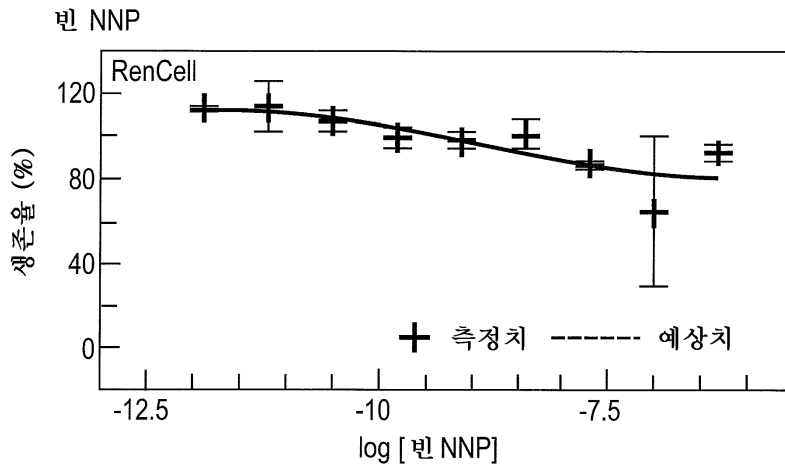
도면8a



도면8b

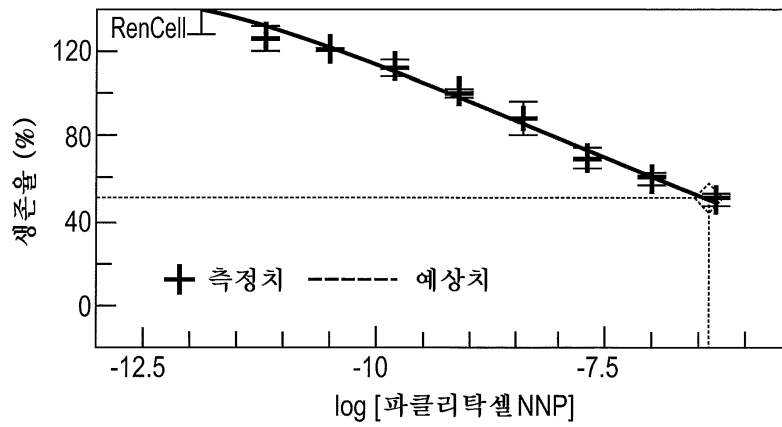


도면9a

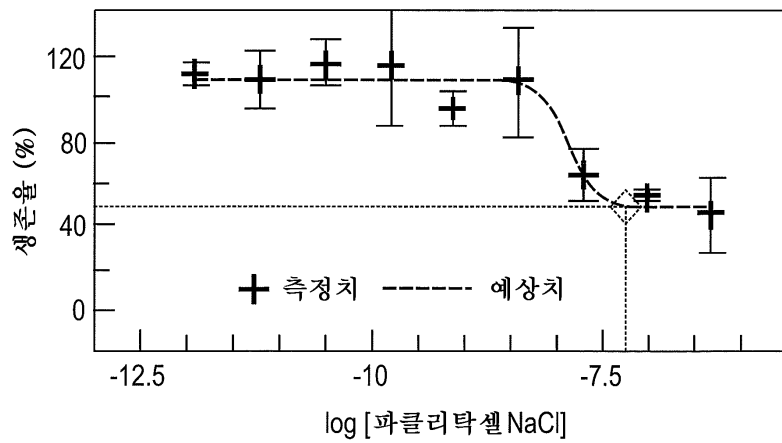


도면9b

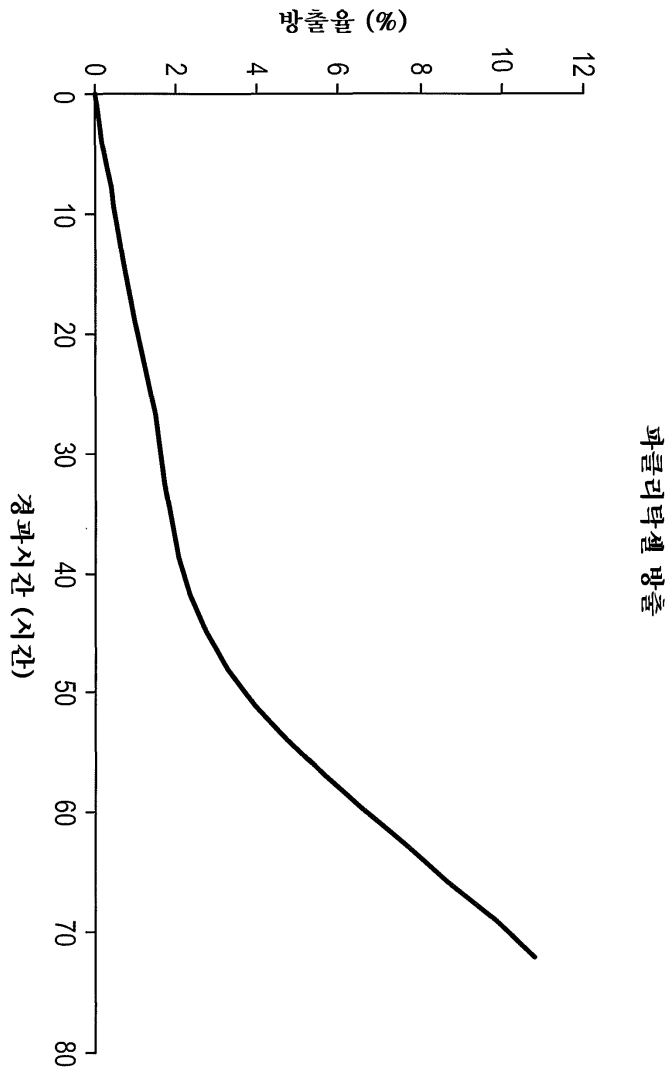
파클리탁셀 NNP



RenCell



도면10



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> INSTITUT QUIMIC DE SARRIA
- <120> Polymeric nanoparticles for drug delivery

- <130> P056882W0
- <141> 2012-05-09
- <150> 1107719.5
- <151> 2011-05-09
- <150> 1205979.6
- <151> 2012-04-03
- <160> 8
- <170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Peptide
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = 5-carboxytetramethylrhodamine modified histine
 <400> 1
 Xaa Lys Lys Trp Gln Phe Asn Ser Pro Phe Val Pro Arg Ala Asp Glu

1 5 10 15
 Pro Ala Arg Lys Gly Lys Val His Ile Pro Phe Pro Leu Asp Asn Ile
 20 25 30
 Thr Cys Arg Val Pro Met Ala Arg Glu Pro Thr Val Ile His Gly Lys
 35 40 45
 Arg Glu Val Thr Leu His Leu His Pro Asp His
 50 55

<210> 2
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Peptide
 <220>
 <221> AMIDATION
 <222> (23)..(23)
 <400> 2
 Cys Gly Gly Lys Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn

1 5 10 15
 Asn Phe Lys Thr Glu Glu Tyr
 20

<210> 3
 <211> 23

<212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Peptide
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> Xaa = Biotinylated cysteine
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Glycosylated lysine
 <220>
 <221> AMIDATION
 <222>
 > (23)..(23)
 <400> 3
 Xaa Gly Gly Xaa Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn
 1 5 10 15
 Asn Phe Lys Thr Glu Glu Tyr
 20
 <210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> Peptide
 <400> 4
 Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
 1 5 10 15
 Glu Glu Tyr
 <210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220><223> Peptide

<400> 5

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr

1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Peptide

<400> 6

Cys Gly Gly Lys Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn

1 5 10 15

Asn Phe Lys Thr Glu Glu Tyr

20

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Peptide

<400> 7

Cys Gly Gly Lys Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn

1 5 10 15

Asn Phe Lys Thr Glu Glu Tyr

20

<210> 8

<211> 59

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Peptide

<400> 8

His Lys Lys Trp Gln Phe Asn Ser Pro Phe Val Pro Arg Ala Asp Glu

1 5 10 15

Pro Ala Arg Lys Gly Lys Val His Ile Pro Phe Pro Leu Asp Asn Ile

20

25

30

Thr Cys Arg Val Pro Met Ala Arg Glu Pro Thr Val Ile His Gly Lys

35

40

45

Arg Glu Val Thr Leu His Leu His Pro Asp His

50

55