



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

(45) 공고일자 2014년08월14일  
 (11) 등록번호 10-1429668  
 (24) 등록일자 2014년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A61K 47/48 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)  
 A61K 47/30 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2013-0123611(분할)  
 (22) 출원일자 2013년10월16일  
 심사청구일자 2013년10월16일  
 (65) 공개번호 10-2013-0117361  
 (43) 공개일자 2013년10월25일  
 (62) 원출원 특허 10-2011-0044081  
 원출원일자 2011년05월11일  
 심사청구일자 2011년05월11일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 Journal of Nanomaterials, volume 2010,  
 p.9(2010)  
 Polymer(Korea), 35(2), pp.119-123(2011. 3)

(73) 특허권자  
 씨제이헬스케어 주식회사  
 서울특별시 중구 동호로 330 (쌍림동, 씨제이제일제당빌딩)  
 (72) 발명자  
 김유미  
 경기 용인시 처인구 금학로 520, 103동 202호 (마평동, 푸른마을용인자이)  
 윤명식  
 경기 용인시 수지구 대지로 27, 102동 1905호 (죽전동, 한신아파트)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

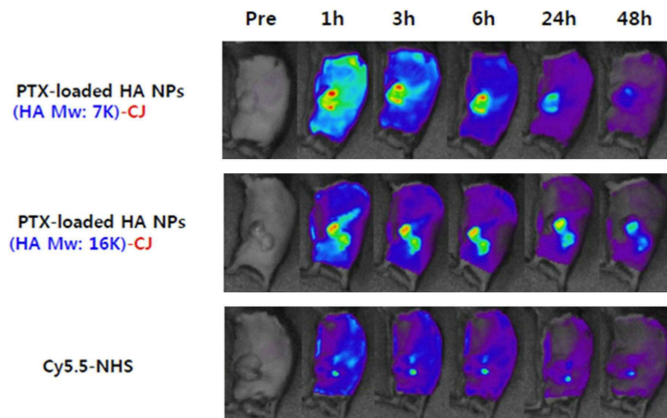
심사관 : 신동환

(54) 발명의 명칭 양친성 저분자량 히알루론산 복합체를 포함하는 나노 입자 및 그의 제조 방법

**(57) 요약**

본 발명은 5 내지 20 KDa의 저분자량 히알루론산에 소수성 담즙산이 결합되어 수중에서 자기 집합체(self-aggregation)를 형성하는 히알루론산-담즙산 복합체, 상기 복합체 내부에 소수성 약물이 봉입된 나노입자, 그 나노입자를 포함하는 주사제, 및 그 나노입자의 제조방법을 제공한다.

**대표도 - 도3**



(72) 발명자

**이하영**

전북 전주시 완산구 강변로 106, 103동 805호 (삼천동1가, 삼천하이츠아파트)

**임동권**

경기 성남시 분당구 구미로 100, 1008동 501호 (구미동, 무지개마을10단지아파트)

**임선경**

경기 용인시 수지구 풍덕천로 52, 812동 1402호 (풍덕천동, 현대성우아파트)

**기소영**

경남 창원시 마산회원구 내서읍 광려천북로 206, 101동 1006호 (화인태양맨션)

**김세환**

서울 서초구 방배천로2안길 86, 301호 (방배동, 프라임빌라)

**박지은**

서울 성북구 길음로 118, 411동 1503호 (길음동, 대림e편한세상아파트)

**박지혜**

경기 성남시 분당구 중앙공원로 17, 327동 601호 (서현동, 한양아파트)

**이정록**

부산 사하구 낙동대로233번길 1, 2005호 (괴정동, 새보람더존빌)

**이주현**

경기 이천시 대산로247번길 50, 101동 805호 (고담동, 지엠하이빌아파트)

**조일환**

서울 강서구 강서로 532, 106동 1006호 (가양동, 동신대아아파트)

**홍은미**

경기도 용인시 기흥구 지곡동 씨니벨리아아파트 101-1501

**홍혜숙**

경기 성남시 분당구 백현로 206, 411동 1405호 (정자동, 한솔마을주공4단지아파트)

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

5 이상 20 KDa 미만의 저분자량의 히알루론산에 5-β 콜란산(5-β-cholanic acid)이 결합된 양친성 복합체로서, 수중에서 자가 집합체(self-aggregate)를 형성하는 저분자량 히알루론산 - 5-β 콜란산 복합체.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 저분자량 히알루론산에 아미노에틸 5-β 콜라노아미드(cholanoamide)가 공유결합하여 생성된 것인 저분자량 히알루론산 - 5-β 콜란산 복합체.

**청구항 4**

제1항 또는 제3항에 따른 저분자량 히알루론산- 5-β 콜란산 복합체의 내부에 소수성 약물이 봉입된 나노입자.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 입자의 직경은 100 내지 500 nm이고, 상기 소수성 약물은 복합체 내부에 5 내지 40 중량%의 함량으로 봉입되는 것인 나노입자.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 소수성 약물은 항신생물제, 마취제, 항염증약, 면역억제제 및 호르몬으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 나노입자.

**청구항 7**

제5항에 있어서, 상기 소수성 약물은 항신생물제인 것인 나노입자.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 항신생물제는 아드리아마이신, 시클로포스파미드, 악티노마이신, 블레오마이신, 두아노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 미토마이신, 메토틀렉세이트, 플루오로우라실, 카르보플라틴, 카르무스틴(BCNU), 메틸-CCNU, 시스플라틴, 시스플라틴 에토포사이드, 인터페론, 캄포테신 및 그의 유도체, 페네스테린, 탁산, 파클리탁셀 및 그의 유도체, 탁소테레 및 그의 유도체, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 타목시펜, 에토포사이드, 피포술판, 도세탁셀, 아나스테로졸, 글리벡, 플록수리딘, 류프롤리드, 플루타미드, 졸레드로네이트, 쯔시타빈, 스트렙토조신, 카보플라틴, 토포테칸, 벨로테칸, 이리노테칸, 비노렐빈, 히드록시우레아, 발루비신, 레티노익산 계열, 메클로레타민, 클로람부실, 부술판, 독시플루리딘, 프레드니손, 테스토스테론, 미토산트론, 아스피린, 살리실레이트, 이부프로펜, 나프록센, 페노프로펜, 인도메타신, 페닐부타존, 시클로포스파미드, 메클로레타민, 텍사메타손, 프레드니솔론, 셀레콕시브, 발데콕시브, 니메술리드, 코르티손 및 코르티코스테로이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 나노입자.

**청구항 9**

제4항에 따른 나노입자를 포함하는 주사제.

**청구항 10**

- (a) 콜란산 구조를 갖는 5-β 콜란산을 아미노에틸 콜라노아미드로 합성하는 단계;
- (b) 5 이상 20 KDa 미만의 저분자량 히알루론산을 수용성 용매에 용해시켜 히알루론산 용액을 제조하는 단계;
- (c) 상기 단계 (a)의 아미노에틸 콜라노아미드를 유기 용매에 용해시켜 콜라노아미드 용액을 제조하는 단계;

(d) 상기 단계 (b)의 히알루론산 용액에 상기 단계 (c)의 콜라노아미드 용액을 첨가하여 반응액을 제조하는 단계;

(e) 상기 반응액으로부터 히알루론산 - 5-β 콜란산 복합체를 석출하여 수득하는 단계; 및

(f) 상기 히알루론산 - 5-β 콜란산 복합체 내부에 약물을 봉입하는 단계를 포함하는, 제4항의 나노입자의 제조 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 단계 (b)의 히알루론산 용액에 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보디이미드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)가 첨가되는 것인 제조 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 상기 단계 (c)의 유기 용매는 디메틸아세트아미드, 디메틸설폭사이드 및 메탄올로 이루어진 군에서 선택되는 것인 제조 방법.

**청구항 13**

제10항에 있어서, 상기 단계 (e)의 석출 용매는 아세톤, 이소프로필 알코올, 이소프로필 에테르, 디메틸 에테르, 헥산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제조 방법.

**청구항 14**

제10항에 있어서, 상기 단계 (e) 후에, 잔류 용매 및 불순물을 제거하여 히알루론산 - 5-β 콜란산 복합체를 정제하는 단계를 추가적으로 포함하는 것인 제조 방법.

**청구항 15**

제10항에 있어서, 상기 단계 (f)는 상기 약물을 에탄올, 메탄올, 클로로포름, 디클로로메탄, 디메틸설폭사이드 및 디메틸아세트아미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기용매에 용해시킨 용액과, 히알루론산- 5-β 콜란산 복합체의 수용액을 혼합하는 단계를 포함하는 것인 제조 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 담즙산이 결합된 히알루론산 나노입자를 포함하는 약물 전달체 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 저분자량의 히알루론산-담즙산 복합체의 내부에 약물을 봉입시킴으로써 고분자량의 히알루론산으로 제조된 나노입자에 비해 개선된 용해도를 나타내며, 독성이 적고, 고효율로 약물을 봉입시킬 수 있으며 멸균 여과가 용이하고 암세포에 대한 타겟팅 효과가 우수한 나노입자 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 양친성 고분자는 친수성과 소수성 구획을 동시에 가지므로 수용액상에서 계면에너지의 안정화를 위해 자가집합체(self-aggregate) 또는 미셀(micelle)을 형성하게 된다. 양친성 고분자에 의해 형성된 자가집합체 또는 미셀은 친수성 및 소수성의 정도에 따라 입자의 크기, 분포, 유동학적 성질 및 열역학적 안정성 등이 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 자가집합체 내부의 소수성 영역에 여러 가지의 소수성 약물을 봉입하여 약물의 선택적 및 효과적인 전달을 유도할 수 있다고 보고되어 있다 (Adv. Drug, Deliv. Rev. 2001. 47, 113-131). 이와 같은 자가집합체 내부에 소수성 약물을 봉입하여 제조된 나노입자는 체내의 순환 시간을 연장시키고 약물 방출을 조절할 뿐 아니라 암조직에 EPR(Enhanced permeation and retention) 효과에 의해 특이적으로 축적되는 성질을 나타낸다. 따라서, 소수성 약물의 독성을 현저히 감소시키고 약효는 증가시킴으로써 환자의 편의성을 증대시키고 부작용은 감소시킨다.

[0003] 양친성 고분자로 자가집합체를 이루면서 고효율로 약물을 봉입하기 위해서는 수용액상에 친수성과 소수성 구획의 적절한 균형을 유지하는 것이 매우 중요하다. 이를 위해 diblock 합성 고분자, 소수성 물질로 개질된 천연고분자, 양친성을 띠고 있는 지질 계열등 많은 고분자들이 나노입자를 제조하기 위해 개발되어 왔다. 현재 상품화된 나노입자로는 소수성 PLA에 친수성 PEG를 합성한 공중합체로 과클리탁셀을 봉입한 제넥솔 PM(Genexol PM, 삼

양사)이 있으며, 알부민의 소수성 포켓을 이용하여 파클리탁셀을 봉입한 아브락산(Abraxane, Abraxis사)이 있다. 지질 계열로는 리포솜이 대표적이며 폐경화된 지질에 독소루비신을 봉입한 독실(Doxil, Alza사)이 있다. 많은 연구자들이 자가집합체를 형성하는 양친성 고분자를 개발한 바 있으며, 항암제를 봉입하여 기존 항암제의 부작용을 줄이고 약효를 현저히 개선하기 위한 나노입자 제형을 연구해 왔다. 그러나, 실질적으로 새로운 고분자를 개발하여 나노 입자 제형으로 상품화된 것은 상기 예시된 제품들이 유일한데, 이는 주로 주사용 제제로 개발하는데 있어서 용해도, 점성, 멸균, 대량생산 등에 있어서의 기술적 어려움에 기인한다.

[0004] 히알루론산(Hyaluronic acid, HA)은  $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^7$  Da 범위의 분자량을 갖는 선형 다당 중합체로서, ( $\beta$ ,1-4)-D-글루쿠론산(D-glucuronic acid, GlcUA)과 ( $\beta$ ,1-3)-N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) 단위의 반복 서열로 구성되어 있다. 대부분의 인체 조직의 세포외 기질(extracellular matrix) 및 세포 표면에서 발견되며, 특히 관절 활액(synovial fluid), 연골 등에 다량 존재한다. 따라서 히알루론산은 생체적합성을 가지며, 혈액 내의 히알루론산효소인 히알루로니다아제(hyaluronidase)에 의해 생분해되기 때문에 약물 전달체, 조직공학용 지지체 등 생체 재료로 이용된다. 특히 히알루론산은 암세포 또는 전이암세포 표면에서 과발현되는 CD44, RHAMM과 결합하여 엔도사이토시스를 통해 세포 내 흡수(internalization)되며, 리소솜과 같은 낮은 pH 환경에서 분해된다. 이러한 성질을 이용하여 암세포나 전이암세포에 대한 표적화 효과를 가지며 항암제의 세포 내 흡수율을 향상시킬 수 있는 히알루론산-항암제 복합체의 개발이 다수 이루어졌다. 예를 들면, 미토마이신과 에피루비신을 히알루론산에 결합시켜 폐암 모델 쥐에 주입한 결과 우수한 항암 효과를 보였으며, 잘 알려진 히알루론산-파클리탁셀 컨쥬게이트는 암세포에 매우 높은 특이성을 보이며 치료 효과를 증진시켰다. 또한, 히알루론산을 양친성으로 개질하여 약물 전달체로 이용하려는 연구가 다수 이루어졌으며, 히알루론산의 카르복실기에 소수성 단분자 또는 소수성 고분자를 결합시켜 생성된 양친성 고분자에 소수성 약물을 봉입하여 항암 제제로서의 효과를 증명한 예가 있다.

[0005] 약물 전달체로서 히알루론산의 단점은 물에만 용해가능하여 소수성 물질을 결합시킬 때 반응 효율이 낮고, 점성이 높아 비경구 투여 및 대량 생산이 곤란하다는 것이다. 특히 히알루론산을 약물의 봉입체로 이용하기 위해서는 고용량이 요구되는데, 약물의 유효 농도에 맞추어 약물 전달체 용액을 제조하게 되면 용액의 점성이 높아져 주사하기 어려운 경우가 많다. 공개특허 제10-2010-0037494호는 히알루론산에 담즙산을 결합시켜 양친성 복합체를 제조하는 방법을 개시한다. 이 방법에서 사용된 히알루론산의 분자량은 250 KDa 및 135 KDa인데, 이를 고농도, 즉 실질적으로 약물의 임상 용량에 적합한 농도로 제제화하게 되면 점성이 증대되어 주사용으로서 부적합하게 된다. 뿐만 아니라, 히알루론산의 양이 증가하는 경우 나노 입자를 형성하기 위해서는 결합되는 담즙산의 양도 증가시켜야 하는데, 다량의 담즙산은 인체에 독성을 유발할 수 있다. 또한 고분자량 히알루론산-담즙산 복합체는 약물을 비교적 다량으로 봉입할 수 있는 반면, 입자의 크기가 400 nm 이상이 되어 EPR 효과 및 세포 내 흡수(internalization) 효율이 낮아지고, 입자 분포도의 범위가 넓어지므로 재현성이 낮아지게 된다. 공업적 생산이 필요한 경우, 점도의 문제로 인해 제조 및 멸균처리가 곤란하여 대량생산이 불가능한 단점이 있었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 이에, 본 발명자들은 기존 고분자량 히알루론산-담즙산 복합체의 상기 명시한 단점들을 해결하기 위해 저분자량의 히알루론산 및 소수성 담즙산을 사용하여 양친성 복합체를 제조한 결과, 용해성이 현저하게 개선되고 독성이 감소하여 주사제로 상품화가능한 나노입자 제형을 개발하였다. 나아가, 히알루론산의 분자량을 낮추고 담즙산의 결합율을 최적 수준으로 조절한 결과, 약물 봉입 효율 및 용량, 입자 크기 및 분포도, 암조직에 대한 타겟팅 효과가 개선된 나노입자 제형을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은, 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체 및 상기 복합체에 약물이 봉입된 나노입자를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명에 따른 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체 및 나노입자의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또다른 목적은 상기 본 발명에 따른 나노입자를 포함하는 주사제를 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 5 내지 20 KDa의 저분자량 히알루론산에 소수성 담즙산이 결합된 양친성

복합체로서, 수중에서 자가 집합체를 형성하는 약물 전달용 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체를 제공한다.

- [0011] 또한, 본 발명은 상기 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체 내부에 약물이 봉입된 나노입자를 제공한다. 바람직하게, 상기 나노입자의 직경은 100 내지 500 nm이고, 히알루론산 단량체에 대해 소수성 담즙산은 1 내지 20의 치환도(%)로 결합되며, 상기 약물은 복합체 내부에 10 내지 40 중량%의 함량으로 봉입된다.
- [0012] 또한, 본 발명은
- [0013] (a) 콜란산 구조를 갖는 소수성 담즙산을 아미노에틸 콜라노아미드로 합성하는 단계;
- [0014] (b) 5 내지 20 KDa의 저분자량 히알루론산을 수용성 용매에 용해시켜 히알루론산 용액을 제조하는 단계;
- [0015] (c) 상기 단계(a)의 아미노에틸 콜라노아미드를 유기 용매에 용해시켜 콜라노아미드 용액을 제조하는 단계;
- [0016] (d) 상기 단계(b)의 히알루론산 용액에 상기 단계(c)의 콜라노아미드 용액을 첨가하여 반응액을 제조하는 단계;
- [0017] (e) 상기 반응액으로부터 히알루론산-담즙산 복합체를 석출하여 수득하는 단계; 및
- [0018] (f) 상기 히알루론산-담즙산 복합체 내부에 약물을 봉입하는 단계를 포함하는 본 발명에 따른 나노입자의 제조 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한 상기 나노입자를 포함하는 주사용 제제를 제공한다.

**발명의 효과**

- [0020] 본 발명에 따른 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체의 내부에 소수성 약물이 봉입된 나노입자는 기존 약물전달체에 비해 물에 대한 용해도가 우수하여 주사제로서 상품화할 수 있고, 고효율, 고용량으로 약물을 봉입할 수 있다. 또한, 나노입자의 크기 및 분포도가 현저히 개선되어, 재현성 있고 대량생산이 가능한 제조 방법에 의해 개발될 수 있다. 이와 같이 제조된 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자는 암조직에 특이적인 분포 및 축적 효과를 나타내며 기존 제품에 비해 뛰어난 항암 효과를 나타내는 것으로 확인되었으므로, 특히 암치료를 위한 새로운 약물전달시스템의 성분으로 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0021] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 히알루론산-담즙산 복합체의 수소 핵자기 공명법(<sup>1</sup>H NMR) 분석 스펙트럼을 나타낸 그래프이다. 표시된 메틸기를 나타내는 스펙트럼 면적에 의해 담즙산의 결합율을 측정한다.
- 도 2는 실험예 3에서 파클리카셀이 봉입된 히알루론산-담즙산 복합체의 입자크기 및 그 분포를 동적 광산란법(Dynamic light scattering method)를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 측정된 나노입자의 크기는 259.8 ± 14.3 nm이다.
- 도 3은 실험예 6에서 형광물질 Cy5.5를 결합시킨 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자를 암모텔 쥐에게 투여한 후 암조직 타겟팅 효과를 근적외선 조사에 의해 영상화한 사진이다.
- 도 4는 실험예 7에서, 본 발명에 따른 파클리카셀이 봉입된 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자를 암모텔 쥐에게 투여한 경우의 암의 크기 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 실험예 7에서, 본 발명에 따른 파클리카셀이 봉입된 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자를 암모텔 쥐에게 투여한 경우의 상대 암성장 억제율을 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 실험예 7에서, 본 발명에 따른 파클리카셀이 봉입된 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자를 암모텔 쥐에게 투여한 경우 체중 변화를 측정한 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0022] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명은 5 이상 20 KDa 미만의 저분자량의 히알루론산에 소수성 담즙산이 결합된 양친성 복합체로서, 수중에서 자가 집합체를 형성하는 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체를 제공한다.
- [0024] 본 발명에서는 종래 약물을 봉입한 고분자량 히알루론산-담즙산 복합체의 자기집합에 의해 형성된 나노입자의 문제점을 극복하기 위해 연구한 결과, 히알루론산-담즙산 복합체의 제조시 5 내지 20 KDa의 저분자량 히알루론



산을 사용하는 경우, 용해도가 증가하고 점성이 감소하여 주사용 제제로서의 사용 및 대량생산이 용이하고, 입자 크기가 감소하여 암조직으로의 타겟팅 및 세포내 흡수가 촉진되며, 담즙산 접합율을 낮추더라도 양친성을 나타내므로 독성문제가 해소된다는 것을 발견하였다. 상기 범위보다 큰 고분자량의 히알루론산을 사용하여 복합체를 제조하는 경우 점성이 커서 주사제로 제제화하기 어렵고 담즙산 접합율을 높임에 따른 독성 문제 등이 있으며, 상기 범위보다 낮은 분자량의 히알루론산을 사용할 경우에는 약물 봉입효율이 낮을 뿐만 아니라 나노입자의 안정성이 떨어진다.

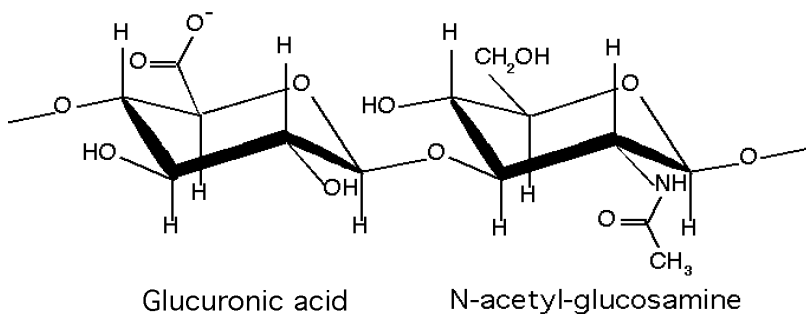
[0025] 구체적으로, 본 발명에 따른 저분자량 히알루론산을 사용하는 경우 나노입자를 형성하기에 적합한 양친성 복합체를 제조하기 위해 요구되는 담즙산 사용량 및 치환도는 고분자량 히알루론산으로 제조된 복합체에 비해 낮은 것으로 나타나 (표 3) 담즙산에 의한 독성 위험을 감소시킨다. 또한, 본 발명의 저분자량(7KDa, 16KDa) 히알루론산-담즙산 복합체는 기존의 고분자량 (60, 135 및 235KDa) 히알루론산-담즙산 복합체에 비해 점성은 감소한 반면 수용해도는 50 mg/mL 이상으로 크게 증가하여 (표 4), 주사용 제제로서의 상품화 가능성을 확인하였다. 상기 복합체에 파클리탁셀을 봉입하여 나노입자를 제조한 경우, 파클리탁셀의 봉입량은 나노입자의 크기 및 약물 사용량에 따라 달라지나, 본 발명의 특정한 실시예에서는 최대 약 30%의 봉입율을 보여 약물이 고효율 및 고용량으로 봉입된 것을 확인하였다. 상기와 같이 제조된 나노입자의 크기를 측정된 결과, 본 발명에 따른 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자의 평균 입경은 250 내지 340 nm의 범위에 분포하여, 고분자량 히알루론산으로 제조된 나노입자가 약 400 nm 이상인 것에 비해 감소한 것으로 나타났다 (표 5). 이와 같은 입자 크기의 감소는 입자분포도를 감소시켜(도 2) 제조 및 약효발현에 있어서의 재현성을 증가시키고, 암 조직, 염증 조직 등에 대한 타겟팅 및 세포내 흡수 효율을 향상시키는 효과를 야기한다.

[0026] 나노입자와 같은 미립자는 단일 약물 분자에 비해 크기가 크므로 생체 중에서 특이적인 분포 거동을 나타내며, 따라서 약물을 병소 부위로 표적화하기 위한 전달체로서 이용될 수 있다. 미립자의 분포를 좌우하는 가장 중요한 인자는 입자 크기에 따른 모세혈관벽 투과성으로, 이는 장기 또는 병소별로 모세혈관 성상이 다르다는 사실에 기인한다. 일반적으로 직경 0.3 내지 3 μm인 입자의 경우 간장의 세망내피계 조직(RES)에 의해 탐식되거나 신장으로 여과되며, 직경 0.2 μm이하의 입자는 암 또는 염증 부위의 혈관으로 누출되므로, 입자 크기를 낮춤으로써 암 또는 염증 조직으로의 선택적 축적 효과를 향상시킬 수 있다. 공개특허 10-2010-0037494에서는 고분자량의 히알루론산-담즙산 복합체로 나노입자를 제조한 경우 입자의 평균 크기가 400 nm 이상인 것으로 명시하고 있다. 본 발명자들은 히알루론산 분자량 및 담즙산 치환도를 조절하여 입자 크기를 감소시켰으며, 실제로 본 발명에 따른 파클리탁셀 봉입 나노입자를 암유발 마우스 모델에 투여한 결과, 암조직에 대한 현저한 축적을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다 (도 3). 나아가, 실질적인 항암 효능을 평가하기 위해 암의 크기 변화를 측정된 결과, 실험된 투여량 범위에서 파클리탁셀을 봉입한 시판 제제인 제넥솔보다도 우수한 암 성장 억제율을 보였다 (도 4 및 5). 이는 본 발명에 따른 저분자량 히알루론산-담즙산 나노입자가 암조직 특이적 분포를 나타낼 뿐만 아니라, 암세포에 의한 흡수(uptake) 효율 또한 우수하다는 것을 입증하는 것이다.

[0027] 따라서, 본 발명의 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체는 수용액 상태에서 용해도가 향상되고 점도가 감소하여 주사용 제제로서의 사용 및 대량생산이 가능하다. 또한, 히알루론산의 분자량 및 소수성 담즙산의 농도에 따라 나노입자의 크기, 약물 봉입 효율 및 봉입량의 조절이 가능하며, 소수성 약물을 용이하게 봉입하고 암 조직 내 축적 및 흡수 효율을 증가시킬 수 있으므로 새로운 약물전달시스템의 성분으로 이용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 복합체에서 사용되는 히알루론산은 하기 화학식 1로 표시되는 단량체로 이루어진다.

**화학식 1**

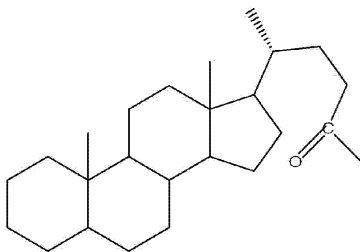


[0029]

[0030] 전술된 바와 같이, 히알루론산의 수용체인 CD44는 다양한 암세포의 표면에서 다량으로 생산된다고 알려져 있다. 또한, 일부 암으로부터 분리된 세포주 (전립선암, 폐암, 및 자궁경부암으로부터 분리한 암세포주 등) 및 다수의 세균들은 히알루론산을 분해할 수 있는 히알루로니다아제를 생산하며, 이 효소는 히알루론산의 글루코시드 결합을 가수분해한다. 따라서, 히알루론산을 주요 성분으로 포함하는 본 발명의 복합체는, 암 세포 표면에 다량 존재하는 특이적 수용체인 CD44에 의해 암세포에 선택적으로 포획될 수 있으며, 또한 암세포로부터 분리되는 히알루로니다아제에 의해 복합체가 분해되어 내부에 봉입된 약물이 암 부위에서 특이적인 항암 효과를 발휘할 수 있다. 따라서, 본 발명에 있어서, 히알루론산은 혈액 구성성분으로부터의 보호막으로서의 역할 및 표적 부위에 타겟팅하기 위한 리간드로서의 역할을 동시에 수행한다. 상기 히알루론산은 또한 낮은 독성을 갖는 폴리머로서 FDA에서 주사용으로 승인받은 물질이므로, 본 발명에서 약물전달용 복합체의 재료로서 안전하게 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서 소수성 담즙산은 친수성 히알루론산에 소수성을 부여하여, 수중에서 자가집합체를 형성할 수 있는 양친성 복합체를 제조하기 위해 사용된다. 소수성 담즙산은 콜란산(cholanic acid)을 기본 골격으로 갖는 1차, 2차 및 3차 담즙산 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 소수성 담즙산은 5-β 콜란산(5-β cholanic acid), 콜산(cholic acid), 케노데옥시콜산(chenodeoxycholic acid), 글리코콜산(glycocholic acid), 타우로콜산(taurocholic acid), 데옥시콜산(deoxycholic acid), 리소콜산(lithocholic acid) 및 7-옥소-리소콜산(7-oxo-lithocholic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 바람직하게는 하기 화학식 2로 표시되는 5-β 콜란산이 사용될 수 있다.

**화학식 2**



[0032]

[0033] 히알루론산과 담즙산을 결합시키기 위해, 담즙산에 아민기를 도입하여 히알루론산의 카르복시기와 아미드 결합을 형성시키는 방법이 이용될 수 있다, 이를 위해 소수성 담즙산의 아미노에틸아미드 유도체가 사용될 수 있으며, 예를 들면 5-β 콜란산에 아민기가 도입된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드(cholanoamide)가 바람직하다.

[0034] 본 발명의 다른 양태는 상기 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체 내부에 약물이 봉입된 나노입자이다. 상기 나노입자의 직경은 100 내지 500 nm인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 100 내지 400 nm, 가장 바람직하게는 100 내지 300 nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 히알루론산 단량체에 대해 소수성 담즙산은 1 내지 20 미만의 치환도로 결합될 수 있고, 상기 약물은 복합체 내부에 5 내지 40 중량%의 함량으로 봉입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 수용액 상에서 안정적인 나노입자를 형성하기 위해서는, 히알루론산의 분자량에 따라 소수성 담즙산의 치환도를 달리하여야 한다. 히알루론산 분자량이 100 KDa 이상인 경우는 히알루론산 단량체에 대해 담즙산의 치환도가 20% 이상이 되어야 수용액 상에서 충분한 양친성을 가져 입자를 형성할 수 있다. 히알루론산 분자량을 낮추게 되면 소수성 담즙산의 치환도 역시 낮아져야 한다. 저분자량의 히알루론산, 보다 구체적으로 5KDa 내지 20KDa의 분자량을 갖는 히알루론산 단량체에 대해서는, 소수성 담즙산은 예를 들면 1 내지 20의 치환도(%)로 결합할 수 있다. 히알루론산 단량체에 대한 담즙산의 치환도가 20 %를 초과하는 경우, 히알루론산-담즙산 복합체의 수용해도가 매우 낮아지게 되어 주사제로 부적합하며, 치환도가 1 % 미만인 경우에는 소수성 부분의 응집력이 적어 나노입자의 형성이 어려울 수 있다.

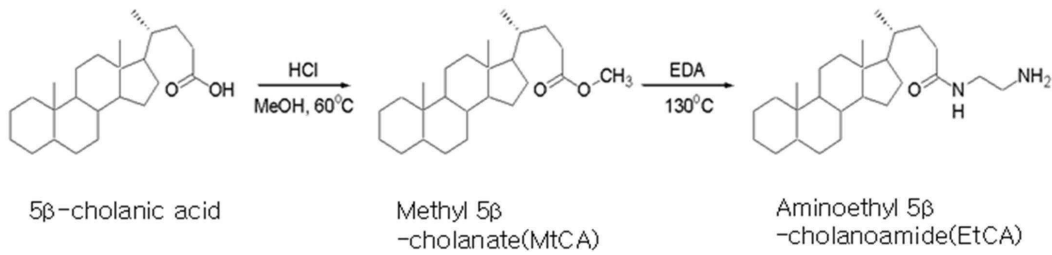
[0036] 본 발명의 히알루론산-담즙산 복합체의 내부는 소수성 담즙산으로 이루어져 있으며, 담즙산의 일부 친수성 부분은 히알루론산과 결합된 상태이므로, 상기 복합체의 내부는 소수성이 매우 강하다. 따라서, 본 발명의 히알루론산-담즙산 복합체의 내부에는 소수성 약물이 봉입되기가 용이하며, 이는 복합체의 내부 물질과 약물이 모두 소



수성을 나타내는 것에 기인한 물리적 포함이므로, 화학적 결합으로는 제한되어 있는 약물 함유량을 늘릴 수 있다.

- [0037] 본 발명의 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자는 소수성 약물을 약 5 내지 40 중량% 범위로 함유하도록 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 입자의 안정성 및 크기 등을 고려할 때, 상기 약물의 봉입량은 10 내지 30 중량%가 가장 바람직하다.
- [0038] 상기 히알루론산-담즙산 복합체의 내부에 봉입되는 소수성 약물은, 수불용성 약물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 명세서에서 "소수성" 약물은 물과 혼화되지 않는 비극성 또는 지극성 물질에 한할 필요는 없으며, 본 발명에 따른 복합체 내부에 물리적으로 포함되어 담즙산으로 이루어진 소수성 내부 환경에서 안정하게 존재할 수 있는 물질을 모두 포함한다. 또한, 상기 "약물"은 치료 목적의 약물학적 활성제뿐만 아니라, 진단 등의 목적으로 인체에 투여될 수 있는 모든 시약 기타 의료용 제제를 포함할 수 있다. 상기 소수성 약물은 특별하게는, 항신생물제(antineoplastic), 마취제, 항염증제, 면역억제제 또는 호르몬일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 특정한 구체예에서, 상기 소수성 약물은 항신생물제일 수 있다. 본 명세서에서 용어 "항신생물제(antineoplastic)"는 종양성 질환의 치료, 개선, 또는 그 진행의 둔화를 위해 사용되는 모든 약학적 활성제를 지칭하는 광범위한 의미로 사용된다. 따라서 통상적인 "항종양제" 또는 "항암제"의 개념을 포함하며, 이들과 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 항신생물제는 종양성 질환 치료에 일반적으로 사용되는 알킬화제, 항생제, 항대사제, 호르몬, 및 핵분열 저해제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, 본 발명의 나노입자에 봉입될 수 있는 항신생물제는 아드리아마이신, 시클로포스파미드, 악티노마이신, 블레오마이신, 두아노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 미토마이신, 메토트렉세이트, 플루오로우라실, 카르보플라틴, 카르무스틴(BCNU), 메틸-CCNU, 시스플라틴, 시스플라틴 에토포사이드, 인터페론, 캄포테신 및 그의 유도체, 페네스테린, 탁산, 과클리탁셀 및 그의 유도체, 탁소테레 및 그의 유도체, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 타목시펜, 에토포사이드, 피포술판, 도세탁셀, 아나스테로졸, 글리벡, 플록수리딘, 류프롤리드, 플루타미드, 졸레드로네이트, 쟈시타빈, 스트렙토조신, 카보플라틴, 토포테칸, 벨로테칸, 이리노테칸, 비노렐빈, 히드록시우레아, 발루비신, 레티노익산 계열, 메클로레타민, 클로람부실, 부술판, 독시플루리딘, 프레드니손, 테스토스테론, 미토산트론, 아스피린, 살리실레이트, 이부프로펜, 나프록센, 페노프로펜, 인도메타신, 페닐부타존, 시클로포스파미드, 메클로에타민, 텍사메타손, 프레드니솔론, 셀레록시브, 발데록시브, 니메술리드, 코르티손 또는 코르티코스테로이드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 또다른 양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 저분자량의 히알루론산-담즙산 복합체 및 나노입자의 제조 방법을 제공한다:
- [0041] (a) 콜란산 구조를 갖는 소수성 담즙산을 아미노에틸 콜라노아미드로 합성하는 단계;
- [0042] (b) 5 이상 20 KDa 미만의 저분자량 히알루론산을 수용성 용매에 용해시켜 히알루론산 용액을 제조하는 단계;
- [0043] (c) 상기 단계 (a)의 아미노에틸 콜라노아미드를 유기 용매에 용해시켜 콜라노아미드 용액을 제조하는 단계;
- [0044] (d) 상기 단계 (b)의 히알루론산 용액에 상기 단계 (c)의 콜라노아미드 용액을 첨가하여 반응액을 제조하는 단계;
- [0045] (e) 상기 반응액으로부터 히알루론산-담즙산 복합체를 석출하여 수득하는 단계; 및
- [0046] (f) 상기 히알루론산-담즙산 복합체 내부에 약물을 봉입하는 단계.
- [0047] 구체적으로, 상기 단계 (a)에서는 소수성 담즙산을 히알루론산과 화학 결합할 수 있는 유도체로 합성한다. 본 발명의 구체예에서, 히알루론산과 담즙산의 결합은, 담즙산의 카르복시기에 에틸렌디아민을 반응시켜 담즙산 말단에 아민기가 도입되고, 상기 아민기와 히알루론산의 카르복시기가 공유결합에 의해 아마이드 결합을 형성함으로써 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 소수성 담즙산이 5-β 콜란산인 경우, 이로부터 아미노에틸 5-β 콜라노아미드를 합성하는 단계는 하기 화학식 3으로 요약될 수 있다.

화학식 3

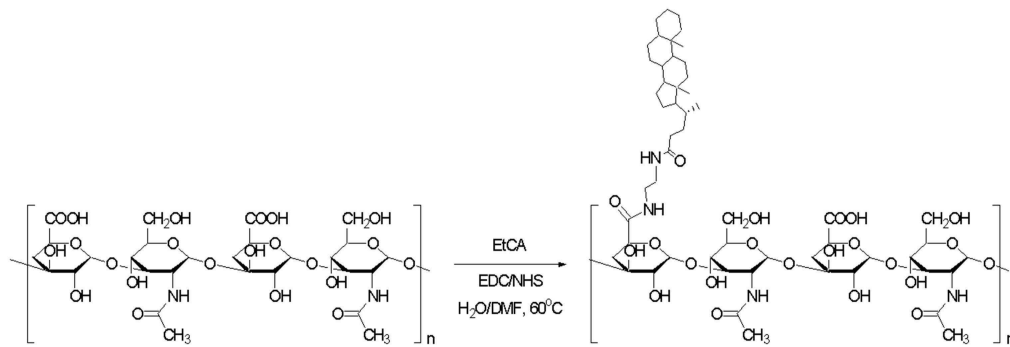


[0048]

[0049]

하기 화학식 4는 히알루론산에 상기 단계 (a)에서 제조한 담즙산 유도체를 결합시키는 단계를 간략히 나타낸 것이다. 이러한 결합은 히알루론산의 카르복시기와 담즙산에 도입된 아민기가 아미드 결합을 형성함으로써 이루어지며, 하기 단계 (b) 내지 (d)에서 구체적으로 설명한다.

화학식 4



[0050]

[0051]

단계 (b)에서는 히알루론산을 수용성 용매에 용해시킨 후, 히알루론산의 카르복시기를 활성화하기 위한 촉매제를 첨가할 수 있다. 상기 촉매제로서 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보디이미드[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; EDC] 및 N-하이드록시숙신이미드[N-hydroxysuccinimide, NHS]를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 이때 EDC 및 NHS는 히알루론산의 카르복시기를 NHS 에스테르로 전환함으로써 담즙산의 아미노기와 아미드 결합을 유도하는 역할을 한다. EDC와 NHS의 몰비는 각각 히알루론산의 카르복시기에 대해 1 내지 3배가 적절하다. 그 이자가 되면 NHS 에스테르가 빠른 속도로 가수분해되므로 반응 후 결합률이 낮아지고 몰비가 3배보다 높으면 정제 과정이 비효율적이다. 한편, 상기 수용성 용매는 히알루론산을 녹일 수 있는 모든 수용성 용매가 사용가능하며, 바람직하게는 증류수를 사용할 수 있다.

[0052]

상기 단계 (c)의 유기 용매는 소수성 담즙산의 아미드 유도체를 용해시킬 수 있는 모든 유기 용매가 가능하며, 바람직하게는 디메틸 포름아미드, 디메틸 설펝사이드, 메탄올 등, 물과 혼합이 가능한 유기 용매가 적합하다. 상기 소수성 담즙산은 유기 용매 100 mL에 대하여 6 ~ 60 mg의 양으로 첨가되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0053]

상기 단계 (d)의 반응은 담즙산 용액을 히알루론산 용액에 천천히 적가한 후 이를 교반하는 방법으로 수행될 수 있다. 히알루론산 용액과 담즙산 용액의 혼합 비율은 구체적으로 1:2 (v/v)가 가장 적절하다. 히알루론산 용액의 비율이 담즙산 용액보다 높을 경우 담즙산이 반응액 상에서 석출될 수 있고, 담즙산 용액의 비율이 1:2를 초과하는 경우에는 히알루론산이 석출될 수 있기 때문이다. 혼합 후 반응시간은 24시간 내지 3일이 적당하며, 바람직하게 반응액을 3일 동안 교반하여 반응시킬 수 있다. 반응 온도는 상온 내지 60 °C 범위일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 60 °C에서 반응시키는 것이 결합률을 가장 높이는 것으로 나타났다.

[0054]

상기 단계 (e)에서는 반응이 완료되어 히알루론산-담즙산 복합체가 형성된 반응액을 유기 용매 중에서 석출하여 히알루론산-담즙산 복합체를 수득한다. 상기 석출에 사용되는 유기 용매는 히알루론산-담즙산 복합체를 석출해 낼 수 있는 임의의 유기 용매일 수 있으며, 예를 들면 아세톤, 이소프로필알콜, 이소프로필에테르, 및 디메틸에테르로부터 선택되는 단일 용매 혹은 이들의 혼합 용매가 이용될 수 있다. 석출 후 수득된 복합체는 동일한 석

출 용매로 수 회 세척하고, 진공 건조에 의해 파우더 형태로 건조될 수 있다. 이러한 석출법은 통상적으로 사용되는 투석 및 동결건조 방법에 비해 시간 및 비용을 절약할 수 있다.

- [0055] 상기 단계 (e) 후에, 수득된 복합체를 분리 및 정제하는 추가적인 단계가 수반될 수 있다. 이는 반응액 중 발생하는 부가 생성물, 잔류 용매 및 미반응 담즙산을 제거하여 의약품 기준 및 시험에 적합한 히알루론산-담즙산 복합체를 제조하기 위한 것이다. 상기 정제는 추출을 포함한, 당업자에게 통상적으로 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, (e)단계에서 수득한 히알루론산-담즙산 복합체는 이를 증류수에 용해한 후, 디메틸 클로로포름 또는 에틸 아세테이트, 그 외에 물과 분리가 가능한 유기 용매를 가하여 추출을 수행함으로써 분리 정제된다.
- [0056] 상기 단계 (f)는 소수성 약물을 히알루론산-담즙산 복합체에 봉입하는 단계로서, 상기 봉입 방법은 약물의 종류 및 봉입량에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 대표적인 방법으로는 필름 수화법 (film hydration method), 용매증발법 (solvent evaporation method)이 있으며, 그 외에도 기중 현탁포복법(예를들면, Wurster 법 등), 계면중합법, 분무건조법, 상분리법 등의 방법이 이용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명의 일 구체예에서, 봉입되는 약물이 과클리티락셀인 경우, 필름 수화법을 이용할 수 있다. 이 경우 봉입 효율은 80 % 이상이고 300 nm 정도 크기의 나노 입자가 형성된다. 구체적으로, 유기용매에 항암제를 용해하고 히알루론산은 물에 녹여 서로 혼합한다. 이때 유기용매의 종류 및 물과의 혼합비는 나노입자의 크기 및 봉입 효율을 조절하는 중요한 요소이다. 상기 항암제를 녹일 수 있는 유기용매는 에탄올, 메탄올, 클로로포름, 디메틸 클로로메탄, 디메틸 포름아미드, 디메틸 설펝시드로 및 이들의 혼합물부터 선택될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 항암제 용액과 히알루론산 용액을 혼합 후 증류농축장치(rotary evaporator)를 이용하여 용매를 증발시키면서 필름을 생성시킨다. 용매가 증발된 후, 생성된 필름에 증류수, 주사용수, 생리 식염수 등을 이용하여 수화시켜 나노입자를 형성한다. 이때 수화 과정 중, 초음파 분쇄기 등을 이용해 에너지를 부여하여 나노입자의 분포도를 줄이고 입자 크기를 줄일 수 있다. 필름 수화법은 대체적으로 봉입효율이 용매 증발법보다 높은 장점이 있지만 대량생산이 어려운 단점이 있다.
- [0058] 본 발명의 또다른 구체예로서, 소수성 약물은 용매 증발법에 의해 히알루론산-담즙산 복합체에 봉입될 수 있다. 용매 증발법은 대량생산이 가능한 장점이 있지만 필름 수화법에 비해 약물 간 봉입 효율의 격차가 심하다. 구체적으로, 항암제는 유기용매에, 히알루론산은 수용액 상에 용해시키는데, 상기 유기용매는 물과 혼합되지 않아 에멀전을 형성할 수 있는 것으로 선택한다. 예를 들면, 상기 유기용매는 디메틸클로로메탄 또는 클로로포름일 수 있다. 유기 용매와 수용액의 혼합 비율은 1:50 내지 1:1 범위일 수 있으며, 보다 바람직하게는 1:10인 경우 가장 봉입효율이 우수하다.
- [0059] 가장 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 나노 입자의 제조 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0060] (a) 5-β 콜라산을 에틸렌디아민과 반응시켜 아미노에틸 5-β 콜라노아미드를 합성하는 단계;
- [0061] (b) 5 내지 20 KDa의 저분자량 히알루론산을 증류수에 용해시키고 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보디이미드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)을 첨가하여 히알루론산 용액을 제조하는 단계;
- [0062] (c) 상기 단계 (a)의 아미노에틸 5-β 콜라노아미드를 디메틸포름아미드에 용해시켜 콜라노아미드 용액을 제조하는 단계;
- [0063] (d) 상기 히알루론산 용액에 상기 콜라노아미드 용액을 1:2(v/v)의 비율로 적가하고 이를 교반하여 반응액을 제조하는 단계;
- [0064] (e) 상기 반응액을 석출 용매 중에서 석출하여 히알루론산-담즙산 복합체를 수득하고, 이를 진공 건조시키는 단계;
- [0065] (f) 히알루론산-담즙산 복합체를 수용액 상에서 용해한 후, 디메틸 클로로포름으로 추출하여 상기 복합체를 분리 정제하는 단계; 및
- [0066] (g) 유기용매 중에 용해시킨 소수성 약물을 상기 수득한 히알루론산-담즙산 복합체의 수용액과 혼합하여 히알루론산-담즙산 복합체 내부에 소수성 약물을 봉입하는 단계.
- [0067] 본 발명의 추가적인 양태에서, 본 발명은 상기 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자를 포함하는 주사제를 제공한다.
- [0068] 상기 약물이 봉입된 복합체를 포함하는 주사제는 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상의 주사제 제조 방법에 따

라 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 주사제는 환자에게 투여시 그대로 이용될 수 있도록 멸균 매질에 분산된 형태일 수 있으며, 투여시 주사용 증류수를 가해 적절한 농도로 분산시킨 후 투여하는 형태일 수도 있다.

[0069] 상기와 같은 본 발명의 주사제는 고분자량의 히알루론산을 사용하여 제조된 나노입자를 포함하는 주사제와는 달리, 나노입자의 수용해도가 향상되어 약물의 다양한 투여 용량에 적합한 농도로 제조될 수 있다. 또한 저분자량의 히알루론산을 사용함으로써 점성이 현저히 저하되어, 주사제의 제조 및 여과와 같은 멸균 처리 과정의 효율을 향상시키며, 임상적 투여단계에서도 환자에게 보다 용이한 투여가 가능하다.

[0070] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0071] **참고예: 아미노에틸 5-β 콜라노아미드(cholanoamide) 제조**

[0072] 10 g의 콜란산 (Sigma사, USA)을 메탄올 600 ml에 녹인 후 염산 1.6 ml을 가한 후 60 °C에서 6시간 동안 교반하였다. 이후 상기 용액을 증류농축장치(rotary evaporator)를 이용하여 100 ml로 농축시킨 후 증류수 2 L에서 석출하여 여과하고, 이를 증류수로 수회 세척 후 동결건조하였다. 건조 후 수득된 메틸-5-β 콜라네이트 10 g에 에틸렌디아민(ethylenediamine) 60 ml을 첨가하여 130 °C에서 8시간 동안 교반하였다. 상온에서 100 ml 메탄올로 희석시키고 2 L 증류수에서 석출하였다. 이를 여과하고, 증류수로 수회 세척하여 동결건조하였다.

[0073] **I. 히알루론산-담즙산 복합체의 제조**

[0074] 하기 표 1의 구성에 따라 히알루론산 및 담즙산을 결합시킨 히알루론산-담즙산 복합체를 제조하였다. 히알루론산의 분자량은 시중에서 구입가능한 히알루론산 제품 (Lifecore사, USA)을 기준으로 정하였으며, 본 발명에서 사용되는 저분자량 히알루론산으로 7 KDa 및 16 KDa 히알루론산을, 비교예로서 60 KDa, 135 KDa 및 250 KDa의 고분자량 히알루론산을 사용하였다. 담즙산 사용량은 중량 기준으로 측정하였다.

**표 1**

**히알루론산-담즙산 복합체 제조**

[0075]

	히알루론산 분자량(Da)	히알루론산 단량체에 대한 담즙산 사용량 (%)
실시예 1	7K	10
실시예 2	16K	10
실시예 3	7K	20
실시예 4	16K	20
실시예 5	7K	30
실시예 6	16K	30
실시예 7	16K	40
비교예 1	60K	10
비교예 2	135K	10
비교예 3	250K	10
비교예 4	60K	30
비교예 5	135K	30
비교예 6	250K	30
비교예 7	60K	40
비교예 8	135K	40
비교예 9	250K	40

[0076] **실시예 1-2: 저분자량 히알루론산-10 % 담즙산 복합체 제조**

[0077] 1 g의 7K(실시예 1) 및 16K(실시예 2) 히알루론산을 160 ml 증류수에 가하여 교반하여 용해시켰다. 1.57 g의 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보디이미드(EDC)를 상기 용액에 첨가하고, 0.941 g의 N-하이드록시숙신이미드

(NHS)는 1 ml 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시킨 후 상기 용액에 가하여 교반하면서 히알루론산의 카르복시기를 활성화시켰다. 참고예에서 제조된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드 125 mg을 320 ml DMF 에 용해시킨 후 반응기에서 교반하면서 히알루론산 용액을 점적하였다. 이때 반응 온도는 60 °C, 반응시간은 3 일로 하였다.

[0078] 반응이 완료된 혼합액을 석출 용매에 점적하면서 파우더 형태로 히알루론산-담즙산 복합체를 수득하였다. 이소프로필알콜과 이소프로필에테르를 1:1로 혼합하여 석출 용매로 사용하였으며, 석출 용매와 반응액의 비율은 4:1로 하였다. 석출 용매에 반응액을 점적하면서 교반시킨 후, 석출 용매와 동일한 용매로 3회 세척하고 진공건조하였다. 진공건조 후 수득된 히알루론산-담즙산 복합체를 정제하였다. 불순물 및 잔류 용매를 제거하기 위해 100 ml 증류수에 복합체를 녹인 후 분리기에 넣고 100 ml 디클로로메탄을 가하여 분리 및 정제하였다. 이때 증류수의 pH는 8이상인 것이 되게 하였으며 상기 과정을 수회 반복한 후 수층만을 취하여 동결건조하였다.

[0079] **실시예 3-4: 저분자량 히알루론산-20 % 담즙산 복합체 제조**

[0080] 1 g의 7K(실시예 3), 16K(실시예 4) 히알루론산을 160 ml 증류수에 첨가하고 교반하여 용해시켰다. 1.57 g의 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보다이미드(EDC)를 상기 용액에 가하고, 0.941 g의 N-하이드록시숙신아미드(NHS)는 1 ml 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시킨 후 상기 용액에 가하여, 교반하면서 히알루론산의 카르복시기를 활성화시켰다. 참고예에서 제조된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드 250 mg을 320 ml DMF에 용해시킨 후 반응기에서 교반하면서 히알루론산 용액을 점적하였다. 이후 제조 단계는 실시예 1-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0081] **실시예 5-6: 저분자량 히알루론산-30 % 담즙산 복합체 제조**

[0082] 1 g의 7K(실시예 5), 16K(실시예 6) 히알루론산을 160 ml 증류수에서 첨가하여 교반하여 용해시켰다. 1.57 g의 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보다이미드(EDC)를 상기 용액에 가하고 0.941 g의 N-하이드록시숙신아미드(NHS)는 1 ml 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시킨 후 상기 용액에 가하여 교반하면서 히알루론산의 카르복시기를 활성화시켰다. 참고예에서 제조된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드 375 mg을 320 ml DMF에 용해시킨 후 반응기에서 교반하면서 히알루론산 용액을 점적하였다. 이후 제조 단계는 실시예 1-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0083] **실시예 7: 저분자량 히알루론산-40 % 담즙산 복합체 제조**

[0084] 7K 히알루론산은 30% 담즙산 복합체 제조시(실시예 5) 불용성인 것으로 나타났으므로, 16K 히알루론산만을 사용하여 40 % 담즙산 복합체를 제조하였다.

[0085] 1 g의 16K 히알루론산을 160 ml 증류수에서 첨가하여 교반하여 용해시켰다. 1.57 g의 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보다이미드(EDC)를 용액에 가하고 0.941 g의 N-하이드록시숙신아미드(NHS)는 1 ml 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시킨 후 상기 용액에 가하여 교반하면서 히알루론산의 카르복시기를 활성화시켰다. 참고예에서 제조된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드 625 mg을 320 ml DMF에 용해시킨 후 반응기에서 교반하면서 히알루론산 용액을 점적하였다. 이후 제조 단계는 실시예 1-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0086] **비교예 1-3: 고분자량 히알루론산-10 % 담즙산 복합체 제조**

[0087] 1 g의 60K(비교예 1), 135K(비교예 2) 및 250K(비교예 3) 히알루론산을 160 ml 증류수에 첨가하여 교반하면서 용해시켰다. 참고예에서 제조된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드 125 mg를 320ml DMF에 용해시킨 후 반응기에서 교반하면서 히알루론산 용액을 점적하였다. 이후 제조 단계는 실시예 1-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0088] **비교예 4-6: 고분자량 히알루론산-30 % 담즙산 복합체 제조**

[0089] 1 g의 60K(비교예 4), 135K(비교예 5) 및 250K(비교예 6) 히알루론산을 160 ml 증류수에 첨가하여 교반하면서 용해시켰다. 참고예에서 제조된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드 375 mg을 DMF 320 ml에 용해시킨 후, 반응기에서 교반하면서 히알루론산 용액을 점적하였다. 이후 제조 단계는 실시예 1-2와 동일한 방법으로 수행하였다.



[0090] **비교예 7-9: 고분자량 히알루론산-40% 담즙산 복합체 제조**

[0091] 1 g의 60K(비교예 7), 135K(비교예 8) 및 250K(비교예 9) 히알루론산을 160 ml 증류수에 첨가하여 교반하여 용해시켰다. 참고예에서 제조된 아미노에틸 5-β 콜라노아미드 625 mg을 320 ml DMF에 용해시킨 후, 반응기에서 교반하면서 히알루론산 용액을 점적하였다. 이후 제조 단계는 실시예 1-2와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0092] **II. 약물이 봉입된 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자의 제조**

[0093] 표 2의 구성에 따라 저분자량의 히알루론산-담즙산 복합체 내부에 파클리탁셀이 봉입된 나노입자를 제조하였으며, 후술되는 실험예에서 그의 크기, 약물 봉입률 등을 고분자량 히알루론산-담즙산 복합체로 제조된 나노입자와 비교평가하였다. 파클리탁셀을 복합체 내부에 봉입하기 위해 필름 수화법(film hydration method)을 이용하였다.

**표 2**

히알루론산-담즙산 복합체에 파클리탁셀이 봉입된 나노입자의 제조

	히알루론산 분자량(Da)	담즙산 사용량(%)	복합체 제조예	파클리탁셀 봉입량(중량%)
실시예 8	7K	10	실시예 1	10
실시예 9	16K	30	실시예 6	10
실시예 10	7K	10	실시예 1	20
실시예 11	16K	30	실시예 6	20
실시예 12	7K	10	실시예 1	30
실시예 13	16K	30	실시예 6	30
실시예 14	7K	10	실시예 1	40
실시예 15	16K	30	실시예 6	40
비교예 10	135K	30	비교예 5	30
비교예 11	250K	40	비교예 9	30

[0095] **실시예 8-9: 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체에 10 중량% 파클리탁셀 봉입**

[0096] 7K 및 16K 히알루론산에 각각 담즙산을 10 % 및 30 % 사용하여 결합시킨 실시예 1 및 6의 복합체를 90 mg씩 칭량하여 10 ml 증류수에 용해시켰다. 10 mg 파클리탁셀을 30 ml 에탄올에 용해시킨 후 상기 복합체 수용액과 혼합하여 둥근 플라스크에서 교반하였다. 증류농축장치(rotary evaporator)를 이용하여 용매를 증발시키고 둥근플라스크 주변에 필름을 형성시켰다. 필름이 완전히 형성된 것을 확인한 후 50 ml 증류수를 첨가하여 수화시켰다. 필름이 완전히 수화된 것을 확인한 후 초음파 분쇄기를 이용해 나노입자를 분산시켰다.

[0097] 실시예 8은 7KHA-10%CA에 10% 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이며, 실시예 9는 16KHA-30%CA에 10% 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이다.

[0098] **실시예 10-11: 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체에 20 중량% 파클리탁셀 봉입**

[0099] 7KHA-10%CA 복합체(실시예 1) 및 16KHA-30%CA 복합체(실시예 6)를 각각 80 mg씩 칭량하여 10 ml 증류수에 용해시켰다. 20 mg 파클리탁셀을 30 ml 에탄올에 용해시킨 후 상기 복합체 수용액과 혼합하여 둥근 플라스크에서 교반하였다. 이후 제조 단계는 실시예 8-9와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0100] 실시예 10는 7KHA-10%CA에 20% 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이며 실시예 11은 16KHA-30%CA에 20% 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이다.

[0101] **실시예 12-13: 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체에 30 중량% 파클리탁셀 봉입**

[0102] 7KHA-10%CA 복합체(실시예 2)와 16KHA-30%CA 복합체(실시예 7)를 각각 70 mg씩 칭량하여 10 ml 증류수에 용해

시켰다. 30 mg 파클리탁셀을 30 ml 에탄올에 용해시킨 후 상기 복합체 수용액과 혼합하여 둥근 플라스크에서 교반하였다. 이후 제조 단계는 실시예 8-9와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0103] 실시예 12는 7KHA-10%CA에 30% 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이며 실시예 13은 16KHA-30%CA에 30% 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이다.

[0104] **실시예 14-15: 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체에 40 중량% 파클리탁셀 봉입**

[0105] 7KHA-10%CA 복합체(실시예 2) 및 16KHA-30%CA 복합체(실시예 7)를 각각 60 mg씩 칭량하여 10 ml 증류수에 용해시켰다. 40 mg 파클리탁셀을 30 ml 에탄올에 용해시킨 후 상기 복합체 수용액과 혼합하여 둥근 플라스크에서 교반하였다. 이후 제조 단계는 상기 실시예 8-9와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0106] 실시예 14는 7KHA-10%CA에 40% 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이며 실시예 15는 16KHA-30%CA에 40% 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이다.

[0107] **비교예 10-11: 고분자량 히알루론산-담즙산 복합체에 20 중량% 파클리탁셀 봉입**

[0108] 고분자량 히알루론산-담즙산 복합체로서 표 2에 제시된 바와 같이 135KHA-30%CA 복합체(비교예 5) 및 250KHA-40%CA 복합체(비교예 9)를 사용하였다. 80 mg의 비교예 5 및 비교예 9의 복합체를 각각 80 mg씩 칭량하여 10 ml 증류수에 용해시켰다. 20 mg 파클리탁셀을 30 ml 에탄올에 용해시킨 후 상기 복합체 수용액과 혼합하여 둥근 플라스크에서 교반하였다. 이후 제조 단계는 상기 실시예 8-9와 동일한 방법으로 수행하였다.

[0109] 비교예 10은 135KHA-30%CA에 20 % 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이며 비교예 11은 250KHA-40%CA에 20 % 파클리탁셀을 봉입한 나노입자이다.

[0110] **실험예 1: 제조 조건에 따른 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체 내의 담즙산 결합 효율 측정**

[0111] 본 실험예에서는 주사제로서 사용하기에 적합한 히알루론산-담즙산 복합체의 제조 조건을 찾기 위해 히알루론산 분자량에 따른 담즙산의 치환도 및 치환효율을 측정하였다. 이를 위해, 히알루론산-담즙산 복합체 내의 담즙산 함량을 수소 핵자기 공명법(<sup>1</sup>H NMR)을 이용하여 분석하였다.

[0112] **방법**

[0113] 실시예 1-7 및 비교예 1-9에 따라 제조된 히알루론산-담즙산 복합체를, D<sub>2</sub>O/DMSO의 혼합물(1:1, v/v)을 NMR 용매로 하여 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트로미터(spectrometer; Bruker, 400 MHz)로 분석하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, NMR 스펙트럼상에서 담즙산이 결합된 히알루론산의 메틸기 면적을 이용하여 담즙산의 결합량을 구하였다. 히알루론산의 단량체에 대한 담즙산의 치환도(DS, degree of substitution) 및 치환 효율을 하기 식에 따라 결정하여, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

[0114] 담즙산 치환도 (%)

[0115] = (담즙산 결합 개수/히알루론산 분자당 반응기 개수) × 100

[0116] 담즙산 치환 효율 (%)

[0117] = (담즙산 치환도/담즙산 사용량) × 100

[0118] **결과**

[0119] 도 1로 대표되는 <sup>1</sup>H NMR 분석 스펙트럼에 따르면 히알루론산-담즙산 복합체가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

[0120]

히알루론산 분자량과 담즙산의 사용량에 따른 담즙산 치환도

	히알루론산 분자량(Da)	히알루론산 단량체에 대한 담즙산 사용량(%)	히알루론산 단량체에 대한 담즙산 치환도(%)	치환효율(%)
실시예 1	7K	10	8	80
실시예 2	16K	10	8	80
실시예 3	7K	20	불용성	-
실시예 4	16K	20	10-12	80
실시예 5	7K	30	불용성	-
실시예 6	16K	30	14	47
실시예 7	16K	40	불용성	-
비교예 1	60K	10	8	80
비교예 2	135K	10	9	90
비교예 3	250K	10	9	90
비교예 4	60K	30	14	46
비교예 5	135K	30	25	83
비교예 6	250K	30	27	90
비교예 7	60K	40	불용성	-
비교예 8	135K	40	불용성	-
비교예 9	250K	40	30	75

[0121]

표 3에 나타난 바와 같이, 담즙산 치환도는 히알루론산의 분자량 및 담즙산의 사용량에 따라 다르게 나타났다. 실시예 1-2와 비교예 1-3에 따르면 담즙산을 10 % 첨가한 경우, 히알루론산의 분자량이 증가하더라도 치환도에 큰 차이가 없었다. 반면, 실시예 6과 비교예 4-6을 보면 30 % 담즙산을 사용한 경우 히알루론산의 분자량이 커질수록 담즙산의 치환 효율이 증가하는 것을 알 수 있었다.

[0122]

치환 효율 및 치환도에 따른 복합체의 용해도를 고려하여 나노입자 형성에 적합한 히알루론산-담즙산 복합체의 제조 조건을 찾고자 하였다. 따라서 불용성이 되는 치환도보다는 낮고 나노입자가 형성될 수 있는 최대 치환도를 갖는 담즙산 사용량을 구하였다. 상기 결과로부터, 히알루론산의 분자량에 따라 최대 치환도를 가지는 담즙산 사용량이 달라지는 것을 알 수 있으며, 구체적으로 히알루론산 분자량이 7KDa인 경우는 10% 담즙산 사용량(실시예 1), 16KDa인 경우는 30% 담즙산 사용량(실시예 6)이 적합한 것으로 확인되었다. 한편, 비교예에서 60KDa인 경우는 30% 담즙산 사용량(비교예 4), 135KDa인 경우는 30% 담즙산 사용량(비교예 5), 250KDa인 경우는 40% 담즙산 사용량(비교예 9)이 적합한 것으로 나타났다.

[0123]

**실험예 2: 저분자량의 히알루론산-담즙산 복합체의 수용해도 측정**

[0124]

약물을 봉입한 나노입자의 용해도는 주사용 제제로서 약물의 임상 용량에 적합한 농도를 달성해야 한다는 점에서 중요하며, 약물의 전임상 시험 단계에서 독성시험 및 불용성 이물 시험 등의 기준에 따라 제제를 받지 않을 정도로 충분히 높아야 한다. 본 실험예에서는 증류수를 용매로 하여 히알루론산의 분자량에 따른 히알루론산-담즙산 복합체의 용해도를 측정하였다.

[0125]

**방법**

[0126]

실시예 1, 6, 비교예 4, 5, 및 9 (사용된 히알루론산 분자량 7K, 16K, 60K, 135K 및 235K)에 따라 제조된 히알루론산-담즙산 복합체를 증류수에 용해시켜 포화 용액에 도달하기까지 필요한 용질의 양을 구하여 농도로 나타내었다. 구체적으로, 10 ml 증류수에 분말 상태로 건조시킨 히알루론산-담즙산 복합체 10 mg을 첨가하고, 포화 상태까지 녹인 후 필터링하였다. 여과액을 동결건조하여 수득된 복합체의 중량을 측정하여, 첨가량과 필터링 및 건조 후 수득량이 동일한 때를 포화 용액으로 정의하였다. 상기 수득된 복합체의 양을 이용하여 용해도(mg/ml)를 구하고, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

[0127]

**결과**

**표 4**

**히알루론산-담즙산 복합체의 수용해도**

	분자량(Da)-담즙산 사용량	수용해도(mg/ml)
실시예 1	7K-10%	80
실시예 6	16K-30%	50
비교예 4	60K-30%	30
비교예 5	135K-30%	25
비교예 9	235K-40%	10

[0129] 표 4에 나타난 바와 같이, 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체인 실시예 1 및 6의 경우 수용해도가 각각 80 및 50 mg/ml로, 고분자량 히알루론산-담즙산 복합체(비교예 4, 5, 및 9)의 경우 10 내지 30 mg/ml인 것에 비해 현저하게 개선된 것을 확인하였다.

[0130] 임상 용량은 파클리탁셀의 경우 봉입량 20 중량%를 기준으로 했을 때, 복합체 제제의 전체 농도가 25 mg/ml 이상이 되어야 한다. 고분자량 히알루론산-담즙산 복합체의 경우 최대 용해도가 30 mg/ml로서 임상 용량의 1배 정도에 불과하므로 약물을 봉입하는데 제약이 많으며, 특히 치료적 유효량이 높은 약물의 경우 제제화하기 어렵다. 반면, 본 발명에 따른 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체의 경우 최대 용해도가 50 mg/ml 이상인 것으로 나타나 임상적 용도에 적합하다.

[0131] **실험예 3: 파클리탁셀이 봉입된 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체의 입자 크기 및 분포도 측정**

[0132] 약물의 타겟팅 전략에 있어서, 약물의 입자 크기는 흡수 후 입경에 따라 분포 및 축적되는 조직이 달라진다는 점에서 중요하다. 입자의 크기가 400 nm 이상일 경우는 암조직에 축적되기 보다는 비장 및 신장으로 가는 경우가 많고, 세포 내로의 나노입자의 흡수(uptake) 효율도 매우 낮아진다. 또한 입자 크기가 큰 경우, 필터링상의 어려움으로 인해 산업적 규모의 생산이 어렵다. 본 실험예에서는 본 발명에 따른 저분자량 히알루론산을 사용하여 제조된 나노입자의 크기를 측정하고, 히알루론산의 분자량 및 약물 사용량에 따른 입자 크기의 변화를 분석하였다.

[0133] **방법**

[0134] 실시예 8 내지 15에서 얻어진 나노입자를 2 mg/ml의 농도로 증류수에 균질하게 분산시켰다. NICOMP 380ZLS를 이용하여 동적 광산란법(Dynamic light scattering method)에 의해 입자 크기를 측정하고, 그 결과를 표 5에 나타내었다.

[0135] **결과**

**표 5**

**파클리탁셀을 봉입한 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자 크기 측정**

	HA-CA (히알루론산 분자량- 담즙산 사용량)	파클리탁셀 사용량 (중량%)	크기(nm)
실시예 8	7KHA-10%CA (실시예1)	10	791.2 ± 629
실시예 9	16KHA-30%CA (실시예 6)	10	318.4 ± 35
실시예 10	7KHA-10%CA (실시예 1)	20	337.7 ± 28
실시예 11	16KHA-30%CA (실시예 6)	20	316.4 ± 76.8
실시예 12	7KHA-10%CA (실시예 1)	30	260.6 ± 113.3

실시예 13	16KHA-30%CA (실시예 6)	30	292.4 ± 84.5
실시예 14	7KHA-10%CA (실시예 1)	40	봉입 안됨
실시예 15	16KHA-30%CA (실시예 6)	40	250.5 ± 72
비교예 10	135KHA-30%CA (비교예 5)	20	430.7 ± 302.4
비교예 11	250KHA-40%CA (비교예 9)	20	383.4 ± 192.6

[0137] 파클리탁셀을 봉입한 경우 전반적으로 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자의 크기는 250 내지 400 nm의 범위에 분포하는 것으로 나타났다. 고분자량 히알루론산을 사용한 비교예 10 및 11의 입자 크기가 각각 약 430.7 및 383.4 nm인 것에 비해, 저분자량 히알루론산을 사용한 실시예 8 내지 15는 도 2에 의해 대표되는 바와 같이 입자 크기가 약 250 내지 340 nm 범위에 분포하여, 입자 크기가 작고 입자분포도도 좁은 것으로 나타났다.

[0138] 약물 봉입량에 따른 입자 크기를 분석하면, 실시예 8-15의 결과에 의하면 약물(파클리탁셀) 사용량이 많을수록 입자의 크기가 작아지는 것을 알 수 있다. 구체적으로, 약물 사용량이 10 중량%인 실시예 8 및 9 (약 791.2 및 318.4 nm)에 비해 30 중량%인 실시예 12 및 13 (약 260.6 및 292.4 nm)의 경우 평균 입자 크기가 작고 입자분포도도 좁게 나타났다. 저분자량의 히알루론산 7K와 16K를 비교하면, 16K는 약물 사용량이 10 중량% 내지 40 중량%인 경우 모두 나노입자를 형성하고 약물을 봉입할 수 있지만, 7K의 경우 사용량이 10 중량%인 경우에는 입자 크기가 700 nm 정도로 실질적인 EPR 효과를 갖는 나노입자라 보기 어렵고, 40 중량%인 경우는 약물 봉입이 되지 않았다.

[0139] **실험예 4: 저분자량 히알루론산-담즙산 복합체의 약물 봉입량 측정**

[0140] 상기 실험예 3의 결과를 바탕으로, 실험된 약물량 범위 전체에서 적절한 나노입자 크기를 갖는 것으로 나타난 실시예 9, 11, 13 및 15를 선택하여 파클리탁셀의 사용량에 따른 약물의 봉입효율 및 봉입량을 측정하였다.

[0141] **방법**

[0142] 실시예 9, 11, 13 및 15에 따라 16K 히알루론산-담즙산 복합체에 각각 10 중량%, 20 중량%, 30 중량% 및 40 중량%이 되도록 파클리탁셀을 첨가한 경우, 나노입자 내에 실제 봉입된 파클리탁셀의 양을 HPLC(High performance liquid chromatography, Waters, USA)를 이용하여 측정하였다. HPLC 분석을 위해 C18 컬럼(150 mm L. x 4.6 mm I.D.)을 사용하였으며 입자 크기는 5 μm였다. 시료의 용매 및 이동상은 80 % 메탄올을 사용하였으며, 분석은 1 ml/분의 유속으로 25 °C에서 진행하였다. 약물의 검출은 UV 검출기를 이용하여 240 nm 파장에서 측정하였다.

[0143] 정량화를 위해 파클리탁셀의 농도와 그에 따른 특성 피크의 면적 변화를 이용하여 검량선을 작성한 후, 이를 이용하여 시료 내 파클리탁셀의 농도를 계산하였다. 하기 식에 의해 약물의 봉입효율 및 최종 봉입량을 구하고, 그 결과를 표 6에 나타내었다.

[0144] 봉입 효율 (%)

[0145] = (나노입자내 약물량)/(초기 약물 사용량) × 100

[0146] 최종 봉입량 (%)

[0147] = (나노입자내 약물량)/(전체 나노입자 중량) × 100

[0148] **결과**

**표 6**



[0149] **파클리탁셀 봉입효율 및 봉입량**

	HA-CA	파클리탁셀 사용량(중량%)	봉입효율(%)	최종 봉입량(%)
실시예 9	16KHA-30%CA (실시예 6)	10	88.2	8.8
실시예 11	16KHA-30%CA (실시예 6)	20	79.6	16
실시예 13	16KHA-30%CA (실시예 6)	30	85.2	25.6
실시예 15	16KHA-30%CA (실시예 6)	40	77.5	31

[0150] **실험예 5: 마우스 암 모델에서 파클리탁셀이 봉입된 저분자량의 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자의 암조직 축적 효과**

[0151] 나노입자 제형의 장점은 봉입 약물을 효과적으로 차폐 및 전달할 뿐만 아니라, 입자 크기를 조절함으로써 약물을 표적 부위에 특이적으로 분포시킬 수 있다는 것이다. 본 실험예에서는 실시예 12 또는 13에 따라 제조한 파클리탁셀 봉입 저분자량 히알루론산-담즙산 나노입자를 형광물질로 표지하여 암 유발 마우스에 투여함으로써 암 조직에 대한 타겟팅 효과를 평가하였다.

[0152] **방법**

[0153] 실시예 1(7KHA-10%CA)과 실시예 6(16 KHA-30%CA)에 형광물질 Cy5.5(Sigma aldrich, USA)를 접합시켜 히알루론산-담즙산에 형광물질이 표지된 복합체를 제조하였다.

[0154] 실시예 1의 히알루론산-담즙산 복합체 20 mg을 인산염 완충액 (pH 8)에서 녹인 후 EDC를 히알루론산 내 카르복실기의 당량만큼 첨가하였다. 뒤이어 NHS를 EDC 당량만큼 500  $\mu$ l DMSO에 용해시킨 후 첨가하여 히알루론산의 카르복실기를 활성화시켰다. 그 다음, 1 mg Cy5.5를 500  $\mu$ l 인산염 완충액 (pH 8)에 용해시켜 반응액에 첨가하였다. 상온에서 24시간 동안 반응시킨 후, 생성된 복합체를 투석에 의해 정제하고 동결건조시켰다. 실시예 12와 동일한 방법으로 30 중량% 파클리탁셀을 봉입시키고, 2 mg/ml 농도로 나노입자 용액을 제조하였다. 실시예 6의 히알루론산-담즙산 복합체도 상기 설명한 바와 동일한 방법으로 형광물질을 표지한 후, 실시예 13에서와 같이 30 중량% 파클리탁셀을 봉입시켜 나노입자 용액을 제조하였다.

[0155] 실험동물로서 누드 마우스(BALB/c)를 이용하였으며, 편평세포암주 (Squamous cell carcinoma 7 cell line)를 주입하여 암을 유발시켰다. 상기 마우스에 제조한 나노입자 용액 100  $\mu$ l을 정맥 주사하였으며, 대조군으로서 UV 분광광도계를 사용하여 상기 나노입자와 동일한 형광량을 나타내는 Cy5.5의 양을 구하여 정맥 주사하였다. 일정 시간 경과 후 근적외선 조사를 실시하여 암 조직 영상을 획득하였다 (도 3).

[0156] **결과**

[0157] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 본 발명의 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자를 투여한 경우 Cy5.5 투여군에 비해 현저히 암조직에 나노입자가 축적되어, 암에 대한 우수한 타겟팅 효과를 갖는 것을 알 수 있었다.

[0158] **실험예 6: 마우스 암 모델에서 파클리탁셀이 봉입된 저분자량의 히알루론산-담즙산 복합체 나노입자의 항암 효과**

[0159] 항암제와 같이 세포 내에서 작용하는 의약 제제가 약효를 발현하기 위해서는 표적 조직으로 선택적으로 분포될 뿐만 아니라, 조직내 세포에 의해 효과적으로 흡수(uptake)되어야 한다. 본 실험예에서는 실시예 13에서 제조된 파클리탁셀 봉입 히알루론산-담즙산 복합체 투여시 종양 크기의 변화를 측정하여 실질적인 항암 효과 발현 여부를 확인하였다.

[0160] **방법**

[0161] 누드 마우스(BALB/c)에 사람의 유방암 세포주 MDA-MB231를 이식하여 암을 유발하였다. 마우스에 실시예 13에서 제조된 파클리탁셀이 봉입된 히알루론산-담즙산 복합체 20 mg/kg 또는 40 mg/kg를 4일에 1번씩 총 3회 투여하였

다. 대조군으로는 상업적으로 판매되고 있는 주사용수(음성대조군) 및 20 mg/kg 제넥솔 (Genexol INJ, 제조: 삼양사)(양성대조군)을 사용하였다. 32일 동안 마우스를 관찰하면서 종양 크기 및 체중 변화를 측정하였으며, 그 결과를 도 4 내지 6에 나타내었다.

[0162] 통계 처리를 위해 종양의 크기 및 체중을 t-test를 이용하여 대조군의 측정값과 비교하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0163] 결과

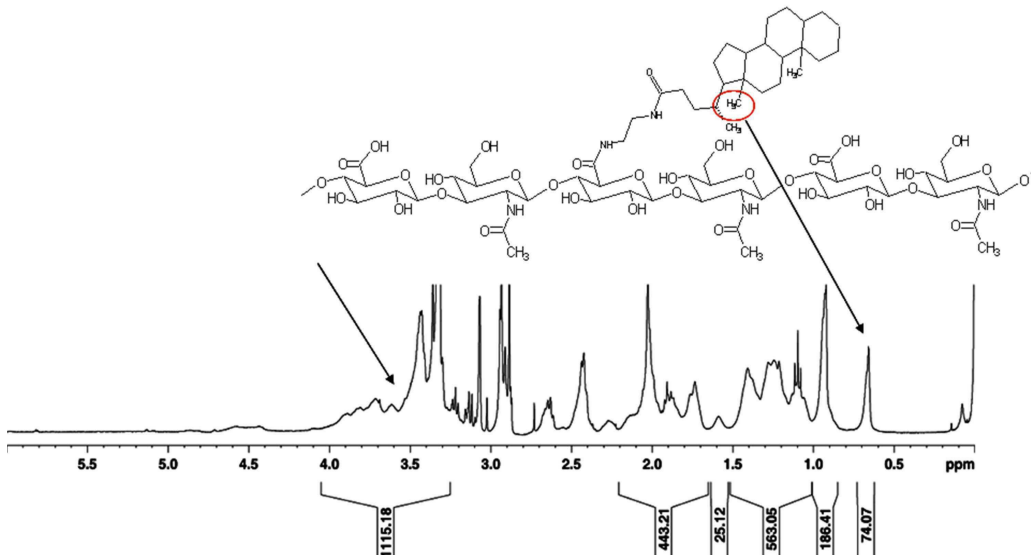
[0164] 도 4에 나타난 바와 같이, 음성대조군(주사용수 투여군)에 비해 본 발명의 히알루론산-담즙산 복합체 및 제넥솔 투여군은 모두 암 성장이 유의하게 억제되었다. 실시예 13은 20 mg/kg 및 40 mg/kg의 투여량 모두에서 지표약물인 제넥솔과 동등한 수준의 암 성장 억제 효과를 보여주었다.

[0165] 도 5는 암 크기 측정값을 상대 암성장 억제율로 환산한 것으로, 실험물질 및 대조물질을 투여한 후 암의 크기 변화를 초기 암의 크기에 대한 백분율로 나타내었다. 제넥솔 투여군의 경우 시간이 지남에 따라 (27일차 이후) 암이 다시 성장하는 것으로 나타나는데 비해, 실시예 13의 복합체를 투여한 경우 투여량과 무관하게 암성장이 지속적으로 억제되어 시간이 지나도 재성장을 보이지 않았다.

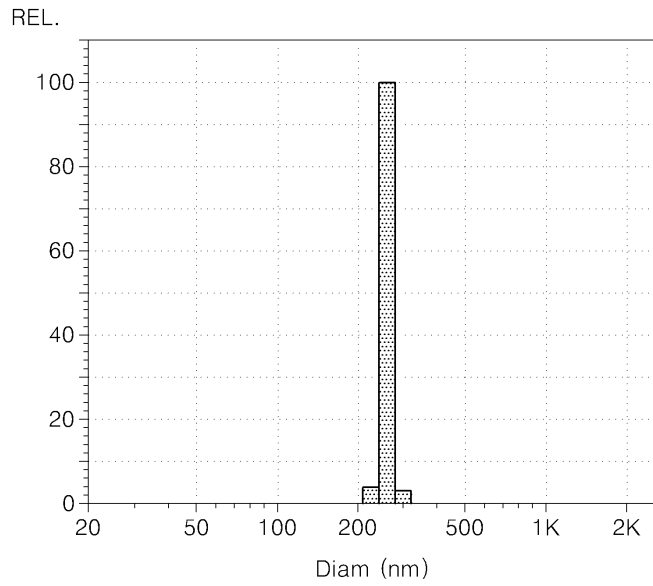
[0166] 도 6에 나타난 바와 같이, 주사용수, 제넥솔 및 실시예 13의 복합체 투여군 모두 특징적인 체중의 변화를 보이지 않았다. 다만, 본 발명의 복합체 40 mg/kg 투여군은 체중이 약 10% 정도 감소하여 제넥솔 대비 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )의 체중 감소가 있었으나, 투여 12일차 이후 회복되기 시작하여 17일차부터는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

**도면**

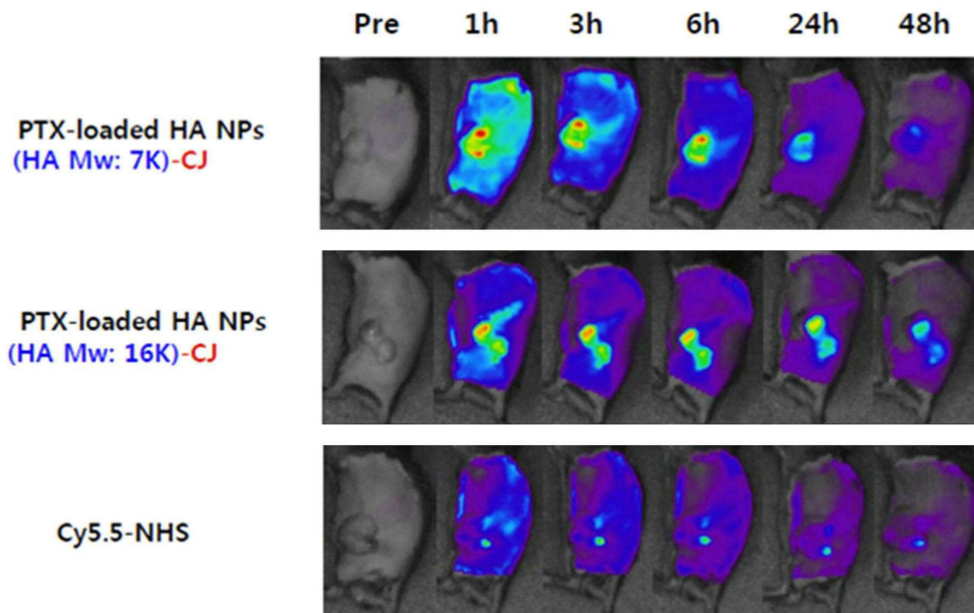
**도면1**



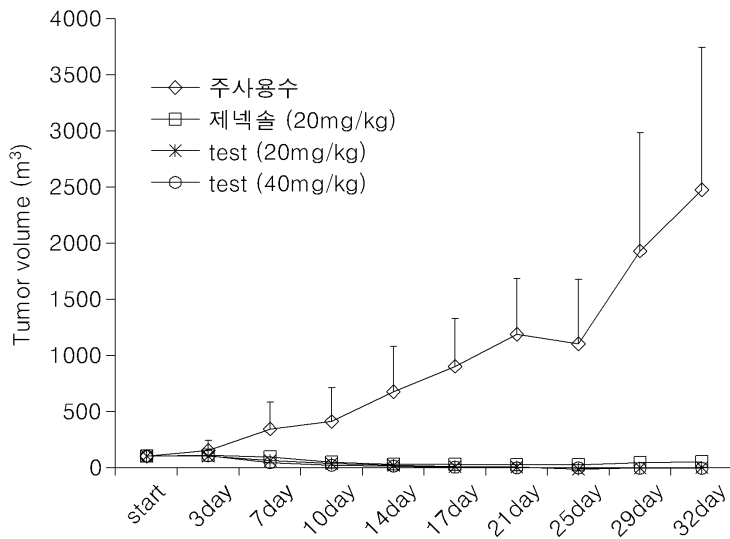
도면2



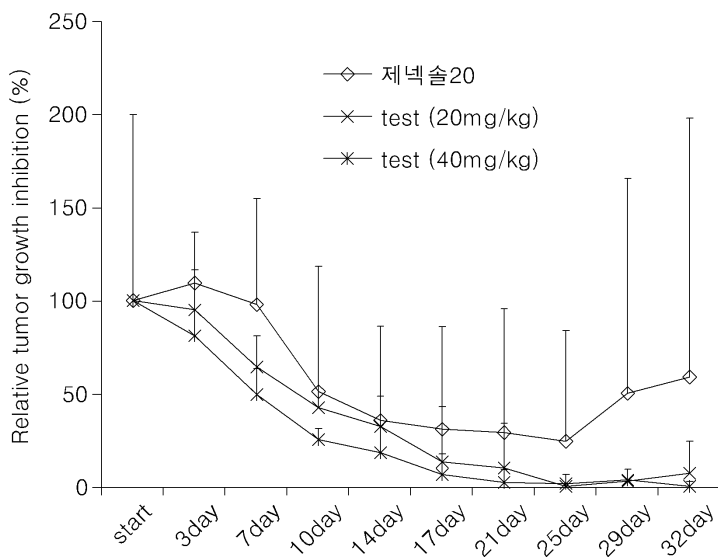
도면3



도면4



도면5



도면6

