

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 3월 23일 (23.03.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/048018 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 9/107 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/010269
- (22) 국제출원일: 2016년 9월 12일 (12.09.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0130587 2015년 9월 15일 (15.09.2015) KR
10-2016-0117053 2016년 9월 12일 (12.09.2016) KR
- (71) 출원인: 주식회사 삼양바이오팜 (SAMYANG BIO-PHARMACEUTICALS CORPORATION) [KR/KR];
03129 서울시 종로구 종로 33길 31, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 남혜영 (NAM, Hye Yeong); 28608 충청북도 청주시 서원구 신율로 43, 306동 1303호, Chungcheongbuk-do (KR). 김봉오 (KIM, Bong-Oh); 35212 대전시 서구 청사서로 65, 101동 1005호, Daejeon (KR). 서민호 (SEO, Min-Hyo); 35245 대전시 서구 둔산로 201, 204동 707호, Daejeon (KR). 손지연 (SON, Ji-Yeon); 34023

대전시 유성구 배울 2로 42 504 동 1002 호, Daejeon (KR). 최지혜 (CHOI, Ji-Hye); 05615 서울시 송파구 백제고분로 37길 12, 203호, Seoul (KR). 김상훈 (KIM, Sang Hoon); 16509 경기도 수원시 영통구 에듀타운로 101, 106동 309호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).

(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, 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, 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.

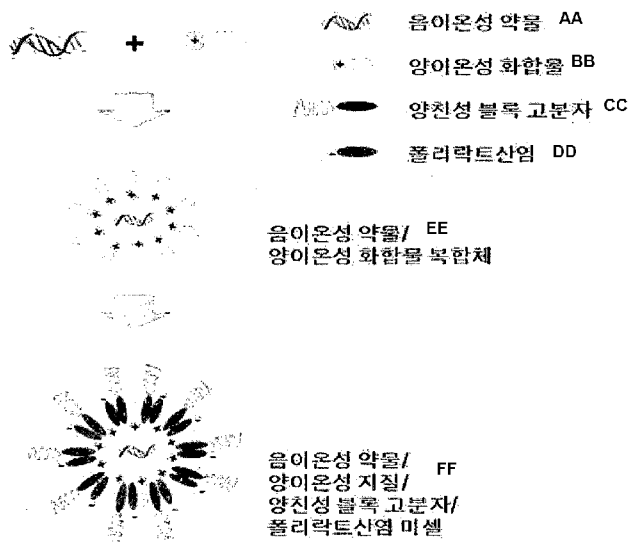
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING ANIONIC DRUG, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 음이온성 약물 함유 약제학적 조성물 및 그 제조방법

[Fig. 1]



- AA ... Anionic drug
- BB ... Cationic compound
- CC ... Amphiphilic block copolymer
- DD ... Polylactate
- EE ... Anionic drug/cationic compound complex
- FF ... Anionic drug/cationic lipid/amphiphilic block polymer/polylactate micelle

(57) Abstract: Disclosed are a pharmaceutical composition for anionic drug delivery, and a preparation method therefor, the pharmaceutical composition for anionic drug delivery containing: an anionic drug as an active ingredient; a cationic compound; an amphiphilic block copolymer; and a poly lactate, wherein the anionic drug formed a complex with the cationic lipid, and the complex is encapsulated within a micelle structure formed by the amphiphilic block copolymer and the poly lactate.

(57) 요약서: 유효성분으로서 음이온성 약물; 양이온성 화합물; 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염을 포함하며, 상기 음이온성 약물은 상기 양이온성 지질과 복합체를 형성하고, 상기 복합체가 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염이 형성하는 미셀 구조 내부에 봉입되는 것을 특징으로 하는 음이온성 약물 전달용 약제학적 조성물과 그 제조방법이 개시된다.

WO 2017/048018 A1



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 제 21 조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

음이온성 약물 함유 약제학적 조성물 및 그 제조방법

【기술분야】

5 본 발명은 음이온성 약물을 함유하고, 이를 전달하기 위한 약제학적 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

【배경기술】

 음이온성 약물, 특히 핵산 물질을 이용한 치료에 있어서, 안전하고 효율적인 약물 전달기술은 오랫동안 연구되어 왔으며, 다양한 전달체 및
10 전달기술이 개발되어 왔다. 특히, 아데노바이러스나 레트로바이러스 등을 이용한 바이러스성 전달체, 및 양이온성 지질, 양이온성 고분자 등을 이용한 비바이러스성 전달체를 이용한 전달기술들이 개발되어 왔다.

 그러나, 바이러스를 이용한 전달체를 이용하는 기술은, 비특이적 면역 반응 등의 위험성에 노출되어 있으며 생산 공정이 복잡하여 상용화하는 데 많은
15 문제점이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 최근 연구 방향은 양이온성 지질이나 양이온성 고분자를 이용하는 비바이러스성 전달체를 이용하여 그 단점을 개선하는 방향으로 진행되고 있다. 이러한 비바이러스성 전달체는, 바이러스성 전달체에 비하여 효율성에서 뒤떨어지지만, 생체 내 안전성의 측면에서 부작용이 적고, 경제성 측면에서 생산 가격이 저렴하다는 장점을 가지고
20 있다.

 핵산 물질의 전달에 이용되는 비바이러스성 전달체에 대해서 많은 연구가 이루어졌는데, 가장 대표적인 것은 양이온성 지질을 이용한 양이온성 지질과 핵산의 복합체(lipoplex) 및 폴리양이온성(polycation) 고분자와 핵산의 복합체(polyplex)이다. 이러한 양이온성 지질 혹은 폴리양이온성 고분자는,
25 음이온성 약물과 정전기적 상호 작용을 통해 복합체를 형성함으로써 음이온성 약물을 안정화시키고, 세포 내 전달을 증가시킨다는 점에서 많은 연구가 진행되어 왔다(De Paula D, Bentley MV, Mahato RI, Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting, RNA 13 (2007) 431-56; Gary DJ, Puri N, Won YY, Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological

distinctions from polymer-based DNA delivery, J Control release 121 (2007) 64-73).

그러나, 이제까지 연구된 양이온성 지질 또는 폴리양이온성 고분자들은, 충분한 효과를 얻기 위해 필요한 양을 사용할 경우에, 바이러스성 전달체보다는 덜하지만, 심각한 독성을 유발하여 의약품으로 사용이 부적당하다는 결과를 나타내었다. 또한, 양이온성 지질과 핵산의 결합을 통해 착화합물을 이루어 세포

5 내로 핵산을 전달시키는 지질-핵산 복합체의 경우는 세포주 실험에서는 매우 광범위하게 이용되지만, 혈중에서의 안정성을 가질 수 있는 구조를 나타내지 못하기 때문에 생체 내에서 이용하기에는 불가능하다(미국특허 제6,458,382호 참고).

10 또한, 핵산 물질 자체에 지질 혹은 고분자를 직접 접합시킨 후, 미셀이나 다른 고분자와 복합체를 이루게 하여 나노 입자를 형성시키는 연구도 진행되고 있는데, 핵산 물질에 직접 지질 혹은 고분자를 접합시키는 경우, 접합 효율이나 품질 관리의 측면에서 어려움을 가지고 있으며 아직까지 명확하게 핵산 전달의 효율에 있어서는 검증이 되어 있지 않다.

15 따라서, 독성을 유발할 수 있는 양이온성 고분자 또는 양이온성 지질의 사용량을 최소화하여 독성을 감소시키면서, 혈중 및 체액 내에서 안정하고, 세포 내 전달이 가능하여 충분한 효과를 얻을 수 있는 음이온성 약물 전달 기술의 개발이 필요하다. 한편, 양친성 블록 공중합체를 이용하여 고분자 미셀의 형태로 난용성 약물을 가용화하고 수용액상에서 안정하게 함으로써 약물 전달체로서

20 이용하려는 노력이 다양하게 진행되었다(WO1997-010849). 그러나, 이러한 양친성 블록 공중합체는 내부에 소수성을 띄는 고분자 미셀을 형성함으로써 소수성을 띄는 난용성 약물을 가용화할 수는 있지만, 음이온을 띄는 핵산 등의 친수성 약물은 고분자 미셀 내부에 봉입할 수 없으므로, 이들 핵산을 포함하는 음이온성 약물의 전달에는 적당하지 않다. 이에, 핵산과 양이온성 지질의 정전기적

25 상호작용에 의한 복합체를 형성하여 상기 복합체가 양친성 블록 공중합체의 미셀 구조 내부에 봉입되도록 하는 음이온성 약물 전달 조성물을 개시한 바 있다. 그러나, 이 역시 핵산의 혈중 안정성 및 암조직에 대한 특이적 표적화에 있어서 개선의 여지를 안고 있다.

한국등록특허 제1296326호에는 유효성분으로서 음이온성 약물; 양이온성

지질; 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산을 포함하며, 상기 음이온성 약물은
상기 양이온성 지질과 복합체를 형성하고, 상기 복합체가 양친성 블록 공중합체
및 폴리락트산이 형성하는 미셀 구조 내부에 봉입된 구조를 갖는 것을 특징으로
하는 음이온성 약물 전달용 조성물이 개시되어 있다. 그러나 이 특허에서 사용된
5 폴리락트산은 말단에 카르복시기를 갖는 일반적인 폴리락트산 고분자로서, 약물
전달 효과가 미흡한 문제점을 가지고 있다.

한편, 많은 질병은 여러 요인으로 인하여 질병 유전자의 발현이
증가하거나 돌연변이에 의해 비정상적인 활성이 나타남으로써 발생하게 된다.
siRNA(short interfering RNA)는, 전사 후 공정에서 서열 특이적으로 특정 유전자의
10 발현을 억제하므로, 유전자 치료제로서 많은 관심이 집중되고 있다. 특히,
siRNA의 높은 활성과 정밀한 유전자 선택성으로 인해, 기존의 안티센스
뉴클레오티드나 리보자임 등의 문제점을 해결할 수 있는 핵산 치료제로 기대되고
있다. siRNA는 짧은 이중 나선의 RNA 가닥으로, 이들과 염기 서열이 상보적인
유전자의 mRNA를 절단함으로써 해당 유전자의 발현을 억제시킨다 (McManus and
15 Sharp, Nature Rev. Genet. 3:737 (2002); Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188 (2001).

그러나, 이러한 장점에도 불구하고, siRNA는 혈중에서 핵산 분해 효소에
의해 빠르게 분해되고, 신장을 통하여 빠르게 체외로 배설되는 것으로 알려져
있다. 또한 siRNA는 강한 음전하를 띄어 세포막을 쉽게 통과하지 못하는 것으로
알려져 있다. 따라서 siRNA를 치료제로 사용하기 위해서는 siRNA를 혈액에서
20 안정화시키고, 목표로 삼은 조직이나 세포 안으로 효율적으로 전달할 수 있으며,
독성을 나타내지 않는 전달체의 개발이 필요하다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

상기와 같은 문제점을 해소하고자, 본 발명은 폴리락트산염을 함유하여
25 음이온성 약물을 체내에 효과적으로 전달할 수 있는 미셀 구조체를 포함하는
음이온성 약물 전달용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 본 발명은 상기 조성물의 음이온성 약물 전달을 위한 용도를
제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 본 발명은 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 음이온성

약물의 전달 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 본 발명은 상기와 같은 음이온성 약물을 체내에 효과적으로 전달할 수 있는 약학적 조성물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【기술적 해결방법】

5 본 발명은 폴리락트산염을 함유하여 음이온성 약물을 체내에 효과적으로 전달할 수 있는 미셀 구조체를 포함하는 음이온성 약물 전달용 조성물, 상기 조성물의 음이온성 약물 전달을 위한 용도 및 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 음이온성 약물의 전달 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 미셀 구조체를 포함하는 음이온성 약물 전달용 조성물은,
10 양친성 블록 공중합체와 폴리락트산염의 미셀 구조체에 약물 및 양이온성 화합물의 복합체가 포함된 구조로서, 구체적으로는

유효성분으로서 음이온성 약물;

양이온성 화합물;

양친성 블록 공중합체; 및

15 폴리락트산염

을 포함하며, 상기 음이온성 약물은 상기 양이온성 화합물과 정전기적 상호작용에 의해 복합체를 형성하고, 이와 같이 형성된 복합체가 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염에 의하여 형성된 미셀 구조 내부에 봉입되는 것을 특징으로 한다.

20 상기 조성물은 물에 용해가 가능하고, 미셀 구조체를 형성하는 한 성분으로서 폴리락트산염을 포함함으로써, 체내 주입시 혈중 안정성 증가 및 세망내피계(RES)를 회피하는 것을 통하여 표적 부위, 구체적으로 암조직으로의 전달 효율이 우수하므로, 세망내피계(RES) 회피 및/또는 표적화 증진 용도로도 유용하다.

25 또 다른 본 발명의 일 양태로서, 상기 음이온성 약물 전달용 조성물의 제조방법은,

(a) 음이온성 약물, 양이온성 화합물, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염을 수혼화성 유기용매 또는 수용액과 유기용매의 혼합 용매에 용해시키는 공정;

(b) 상기 (a) 공정의 유기용매층을 제거하는 공정;
 (c) 상기 (b) 공정의 유기용매가 제거된 혼합물에 수용액을 첨가하여
 미셀화하는 공정
 을 포함할 수 있다.

5 【발명의 효과】

본 발명에 따른 음이온성 약물 전달용 약제학적 조성물은, 양이온성
 화합물, 그리고 양친성 블록 고분자 및 폴리락트산염으로 형성된 미셀 구조체를
 사용하여 음이온성 약물을 외부로부터 격리시킴에 따라 음이온성 약물의 혈중
 혹은 체액 내 안정성을 높일 수 있다. 따라서, 본 약제학적 조성물은 체내에
 10 투여하였을 경우 음이온성 약물의 혈중 혹은 체액 내 안정성을 높일 수 있으며,
 특히 세망내피계를 회피하여 음이온성 약물이 세포 내로 효율적으로 전달될 수
 있다는 장점이 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 따른 음이온성 약물 및 양이온성 화합물의 복합체가
 15 봉입된 고분자 미셀 전달체의 개략적인 구조를 나타낸 도면이다.

도 2는 제조예 8에 따른 폴리락트산 나트륨염의 NMR 결과를 나타낸
 도면이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명에 따른 조성물의 구성성분 중, 상기 음이온성 약물과 양이온성
 20 화합물은, 양친성 블록 고분자와 폴리락트산염에 의하여 형성된 미셀 구조 내부에
 봉입되고, 이러한 음이온성 약물 및 양이온성 화합물의 복합체가 봉입된 고분자
 미셀 전달체의 대략적인 구조를 도 1에 나타내었다. 도 1을 참조하면, 음이온성
 약물은 양이온성 화합물과 정전기적 상호작용을 통해 서로 결합하여, 음이온성
 25 약물과 양이온성 화합물 복합체를 형성한다. 형성된 음이온성 약물과 양이온성
 화합물 복합체는, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염에 의해 형성되는 미셀
 구조 내에 봉입된다.

도 1에 나타낸 바와 같이, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염에 의해
 형성되는 미셀 구조체는 수성 환경에서 양친성 블록 공중합체의 친수성 부분이

미셀의 외벽을 형성하고 양친성 블록 공중합체의 소수성 부분과 상기 양친성 블록 공중합체와 별도의 성분으로 함유된 폴리락트산염이 미셀의 내벽을 형성하고, 그 형성된 미셀의 내부에 음이온성 약물과 양이온성 화합물 복합체가 봉입된 구조이다.

- 5 상기 음이온성 약물과 양이온성 화합물 복합체는 상기 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염에 의해 형성되는 미셀 구조체 내에 봉입된 상태를 유지하여 혈중 또는 체액 내에서의 안정성이 향상된다. 일실시예에서, 상기 미셀의 입자 크기는, 10 내지 200 nm이며, 더욱 구체적으로는 10 내지 150nm인 것이 좋다. 또한, 상기 미셀 입자의 표준 전하는 -20 내지 20 mV 이며, 더욱
- 10 구체적으로 -10 내지 10 mV인 것이 좋다. 상기 입자 크기 및 표준 전하는, 미셀 구조의 안정성 및 구성성분들의 함량과 체내에서 음이온성 약물의 흡수도 및 약제학적 조성물로서 평균의 편의성면에서 가장 바람직하다. 본 발명에 따른 조성물에 유효성분으로 포함되는 음이온성 약물은 수용액 중에서 분자 내에 음전하를 띠는 약리학적 활성을 가진 모든 물질을 포함하는 개념이다. 구체적인
- 15 일 양태로서, 상기 음이온성은, 카르복시기, 포스페이트기 및 설페이트기로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 작용기로부터 부여될 수 있다. 또한, 본 발명의 일 양태로서 음이온성 약물은 펩타이드, 단백질 또는 헤파린 등의 다중 음이온성 약물 또는 핵산일 수 있다.

- 또한, 상기 핵산 물질은, 디옥시리보 핵산, 리보 핵산 또는 백본(backbone),
- 20 당 또는 염기가 화학적으로 변형되거나 말단이 수식된 폴리뉴클레오타이드 유도체 등의 핵산 약물일 수 있으며, 보다 구체적으로는 RNA, DNA, siRNA(short interfering RNA), aptamer, 안티센스 ODN(antisense oligodeoxynucleotide), 안티센스 RNA(antisense RNA), 리보자임(ribozyme) 및 디엔에이자임(DNAzyme) 등으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 핵산일 수 있다. 나아가, 상기
- 25 핵산은 혈중 안정성을 증가시키거나 면역 반응을 약화시키는 등의 목적을 위해 백본(backbone), 당 또는 염기가 화학적으로 변형되거나 말단이 수식될 수 있다. 구체적으로, 핵산의 포스포다이에스테르(phosphodiester) 결합의 일부를 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 보라노포스페이트(boranophosphate) 결합으로 대체하거나, 일부 리보오스 염기의 2'-OH 위치에 메틸기, 메톡시에틸기,

불소 등의 다양한 작용기가 도입된 수식된 뉴클레오티드를 1종 이상 포함할 수 있다.

- 또한, 상기 핵산의 하나 이상의 말단은 콜레스테롤, 토크페롤 및 탄소수 10 내지 24개의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상으로 수식될 수 있다. 예를 들어, siRNA의 경우 센스 및/또는 안티센스 가닥의 5' 말단, 또는 3' 말단, 또는 양 말단에 수식될 수 있으며, 바람직하게 센스 가닥의 말단에 수식될 수 있다.

상기 콜레스테롤, 토크페롤 및 탄소수 10 내지 24개의 지방산에는 콜레스테롤, 토크페롤 및 지방산의 각 유사체, 유도체, 및 대사체가 포함된다.

- 상기 siRNA는, 표적 유전자와 동일한 세포에 존재하는 경우에 siRNA의 서열에 상보적인 mRNA의 분해를 매개함으로써, 표적 유전자의 발현을 감소시키거나 억제할 수 있는 이중가닥 RNA(duplex RNA), 또는 단일가닥 RNA 내부에서 이중가닥의 형태를 띄는 단일가닥 RNA를 지칭한다. 이중가닥 사이의 결합은, 뉴클레오티드 간의 수소 결합을 통해 이루어지며, 이중가닥 내부의 모든 뉴클레오티드가 상보적으로 서로 결합해야 하는 것은 아니며, 상기 양 가닥은 분리되어 있거나(separate) 분리되어 있지 않을 수 있다. 일 양태로서, 상기 siRNA의 길이는 약 15 내지 60 개의(이중 가닥 RNA의 한쪽 뉴클레오티드의 갯수, 즉, 염기쌍의 갯수를 의미하며, 단일 가닥 RNA인 경우에는 단일 가닥 RNA 내부의 이중 가닥의 길이를 의미한다) 뉴클레오티드이며, 구체적으로는, 약 15 내지 30 개의 뉴클레오티드이고, 보다 구체적으로는 약 19 내지 25 개의 뉴클레오티드인 siRNA를 포함한다.

일 양태로서, 이중가닥 siRNA는 3' 또는 5' 말단에 1-5 뉴클레오티드의 돌출부(overhang)를 한쪽 말단에, 또는 양쪽 말단에 가질 수 있다. 또 다른 예에서는 양 말단이 돌출부를 갖지 않는 블런트(blunt) 형태일 수 있다.

- 구체적으로는 미국특허공개 제2002-0086356호, 미국특허 제7,056,704에 개시된 siRNA일 수 있다(상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 포함된다).

또한, 상기 siRNA는 두 가닥의 길이가 동일한 대칭적인 구조를 갖거나, 한 가닥이 다른 가닥보다 짧은 비대칭적인 이중가닥 구조일 수 있다. 구체적으로, 19 내지 21 뉴클레오티드(nucleotide, nt)의 안티센스(antisense); 및 상기 안티센스에

상보적인 서열을 갖는 15 내지 19nt의 센스(sense);로 구성되는 이중가닥(double strand)의 siRNA 분자(small interfering RNA molecule)로서, 상기 siRNA는 안티센스의 5' 방향의 말단이 블런트 말단(blunt end)이고 안티센스의 3' 말단에 1-5 뉴클레오타이드 돌출부(overhang)를 갖는 비대칭 siRNA일 수 있다. 구체적으로

5 국제특허공개 제09/078685호에 개시된 siRNA일 수 있다.

본 발명에서, 음이온성 약물은, 전체 조성물의 중량을 기준으로, 0.001 내지 10 중량%, 구체적으로는 0.01 내지 5중량%로 포함되는 것이 좋다. 상기 음이온성 약물의 함량이 0.001 중량% 미만이면 약물에 비하여 사용되는 전달체의 양이 너무 많아서 전달체에 의한 부작용이 있을 수 있고, 10 중량%을 초과하면, 미셀의

10 크기가 너무 커져 미셀의 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있다.

구체적인 일 양태에서, 상기 양이온성 화합물은, 음이온성 약물과 정전기적 상호작용에 의해 결합되어 복합체를 형성하고, 상기 복합체는 양친성 블록 공중합체의 미셀 구조 내부에 봉입된다. 따라서, 상기 양이온성 화합물은,

15 음이온성 약물과 정전기적 상호작용에 의해 복합체를 형성할 수 있는 모든 형태의 화합물을 포함하며, 예를 들어, 지질과 고분자 종류일 수 있다. 양이온성 지질은, N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄클로라이드(DODAC), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄브로마이드(DDAB), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필-N,N,N-

20 트리메틸암모늄클로라이드(DOTAP), N,N-디메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DODMA), N,N,N-트리메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DOTMA), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(TAP), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판(DAP), 3베타-[N-(N',N',N'-트리메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(TC-콜레스테롤), 3베타-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤), 3베타-[N-(N'-

25 모노메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(MC-콜레스테롤), 3베타-[N-(아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(AC-콜레스테롤), 콜레스테릴옥시프로판-1-아민(COPA), N-(N'-아미노에탄)카바모일프로파노익 토코페롤(AC-토코페롤) 및 N-(N'-메틸아미노에탄)카바모일프로파노익 토코페롤(MC-토코페롤)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 조합일 수 있다. 이러한 양이온성

지질을 사용하는 경우, 양이온성 지질로부터 유발되는 독성을 감소시키기 위하여 분자 내의 양이온 밀도가 높은 폴리양이온성 지질을 적게 사용하는 것이 바람직하고, 보다 구체적으로는 분자당 수용액 상에서 양이온을 나타낼 수 있는 작용기가 하나일 수 있다. 이에 따라, 보다 바람직한 일 양태에서, 상기 양이온성

5 지질은 3베타-[N-(N',N',N'-트리메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(TC-콜레스테롤), 3베타[N-(N',N'- 디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤), 3베타[N-(N'- 모노메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(MC-콜레스테롤), 3베타[N-(아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(AC-콜레스테롤), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTAP), N,N-디메틸-(2,3-

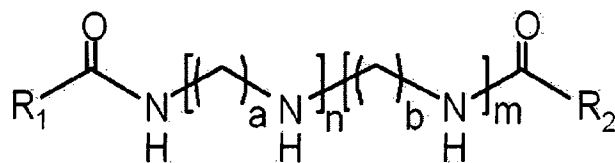
10 디올레오일옥시)프로필아민(DODMA), 및 N,N,N-트리메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DOTMA)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있다. 한편, 양이온성 고분자는 키토산(chitosan), 글라이콜 키토산(glycol chitosan), 프로타민(protamine), 폴리라이신(polylysine), 폴리아르기닌(polyarginine), 폴리아미도아민(PAMAM), 폴리에틸렌이민 (polyethylenimine), 덱스트란(dextran),

15 히알루론산(hyaluronic acid), 알부민(albumin), 고분자폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아민 및 폴리비닐아민(PVAm)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 고분자폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아민 및 폴리비닐아민(PVA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 것일 수 있다.

구체적인 일 양태에서, 양이온성 지질은 하기 화학식 7의 양이온성 지질일 수 있다:

20

[화학식 7]



상기 식에서,

n과 m은 각각 0 내지 12이되, $2 \leq n+m \leq 12$ 이며, a와 b는 각각 1 내지

25 6이며, R1과 R2는 각각 독립적으로 탄소수 11 내지 25개의 포화 및 불포화 탄화수소로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

바람직하게는, n과 m은 독립적으로 1 내지 9이며, $2 \leq n+m \leq 10$ 일 수 있다.

바람직하게는, a와 b가 2 내지 4일 수 있다.

바람직하게는, R1과 R2는, 각각 독립적으로, 라우릴 (lauryl), 미리스틸 (myristyl), 팔미틸 (palmityl), 스테아릴 (stearyl), 아라키딜 (arachidyl), 베헨닐 (behenyl), 리그노세릴 (lignoceryl), 세로틸 (cerotyl), 미리스톨레일 (myristoleyl),
 5 팔미톨레일 (palmitoleyl), 사피에닐 (sapienyl), 올레일 (oleyl), 리놀레일 (linoleyl), 아라키도닐 (arachidonyl), 에이코사펜타에닐 (eicosapentaenyl), 에루실 (erucyl), 도코사헥사에닐 (docosahexaenyl), 및 세로틸 (cerotyl)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

양이온성 지질의 구체적인 예는 1,6-디올레오일트리에틸렌테트라마이드,
 10 1,8-디리놀레오일테트라에틸렌펜타마이드, 1,4-디미리스톨레오일디에틸렌트리아마이드, 1,10-디스테아로일펜타에틸렌헥사마이드 및 1,10-디올레오일펜타에틸렌헥사마이드로 구성된 그룹으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

본 발명에서 사용되는 양이온성 화합물은, 전체 조성물의 중량을 기준으로,
 15 0.01 내지 50중량%, 구체적으로는 0.1 내지 10중량% 포함될 수 있다. 상기 양이온성 지질의 함량이 0.01% 미만이면 음이온성 약물과 복합체를 형성할 수 있는 충분한 양이 되지 못하고, 50중량%를 초과하면, 미셀의 크기가 너무 커져 미셀의 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있다.

상기 양이온성 화합물과 음이온성 약물은, 정전기적 상호작용을 통해
 20 결합하여, 복합체를 형성한다. 구체적인 일 양태로서, 상기 음이온성 약물(P)과 양이온성 화합물(N)의 전하량의 비율(N/P; 음이온성 약물의 음이온 전하에 대한 양이온성 화합물의 양이온 전하 비율)은, 0.1 내지 128이며, 구체적으로는 0.5 내지 64, 더 구체적으로는 1 내지 32이고, 보다 더 구체적으로는 1 내지 24, 가장 구체적으로는 6 내지 24인 것이 좋다. 상기 비율(N/P)이 0.1 미만인 경우에는
 25 충분한 양의 음이온성 약물을 포함하는 복합체를 형성하기 어렵기 때문에, 0.1 이상이어야 충분한 양의 음이온 약물을 포함하는 복합체를 형성할 수 있어서 유리하다. 반면, 비율(N/P)이 128 초과시에는 독성을 유발할 우려가 있으므로, 128 이하로 하는 것이 좋다.

구체적인 일 양태에서, 상기 양친성 블록 공중합체는, 친수성 A 블록 및

소수성 B 블록을 포함하는 A-B 형 블록 공중합체일 수 있다. 상기 A-B 형 블록 공중합체는, 수용액 상에서, 소수성 B 블록이 코어(내벽)를 형성하고 친수성 A 블록이 셸(외벽)을 형성하는 코어-셸 타입의 고분자 미셀을 형성한다.

- 이와 관련하여, 상기 친수성 A 블록은 폴리알킬렌글리콜, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아미드 및 그 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 보다 구체적으로, 친수성 A 블록은 모노메톡시폴리에틸렌글리콜, 모노아세톡시폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌과 프로필렌글리콜의 공중합체 및 폴리비닐피롤리돈으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 친수성 A 블록은 수평균분자량이 200 내지 50,000달톤, 보다 구체적으로는 1,000 내지 20,000달톤, 보다 더 구체적으로는 1,000 내지 5,000달톤인 것일 수 있다.

- 또한, 필요에 따라 친수성 A 블록의 말단에 특정 조직이나 세포에 도달할 수 있는 작용기, 리간드, 또는 세포내 전달을 촉진할 수 있는 작용기를 화학적으로 결합시켜 양친성 블록 공중합체와 폴리락트산염으로 형성된 고분자 미셀 전달체의 체내 분포를 조절하거나 상기 미셀 전달체가 세포 내로 전달되는 효율을 높일 수 있다. 상기 작용기나 리간드는 단당류, 다당류, 비타민, 펩타이드, 단백질 및 세포 표면 수용체에 대한 항체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 작용기나 리간드는 아니사마이드(anisamide), 비타민 B9(엽산), 비타민 B12, 비타민A, 갈락토오스, 락토오스, 만노오스, 히알루론산, RGD 펩타이드, NGR 펩타이드, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체에 대한 항체 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

- 상기 소수성 B 블록은, 생체적합성 생분해성 고분자로서, 일실시예에서, 폴리에스테르, 폴리엔하이드라이드, 폴리아미노산, 폴리오르소에스테르 및 폴리포스파진으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 소수성 B 블록은 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리디옥산-2-온, 폴리락타이드와 글리콜라이드의 공중합체, 폴리락타이드와 폴리디옥산-2-온의 공중합체, 폴리락타이드와 폴리카프로락톤의 공중합체 및 폴리글리콜라이드와 폴리카프로락톤의 공중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 또 다른 일실시예에서, 상기 소수성 B

블록은 수평균분자량이 50 내지 50,000달톤, 보다 구체적으로는 200 내지 20,000달톤, 보다 더 구체적으로는 1,000 내지 5,000달톤인 것일 수 있다. 또한, 소수성 블록의 소수성을 증가시켜 미셀의 안정성을 향상시키기 위하여 토크페롤, 콜레스테롤, 또는 탄소수 10 내지 24개의 지방산을 소수성 블록 말단의

5 히드록시기에 화학적으로 결합시킬 수 있다.

상기 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)을 포함하는 양친성 블록 공중합체의 함량은, 조성물 전체 건조중량을 기준으로, 40 내지 99.98중량%이며, 구체적으로는 85 내지 99.8중량%, 더 구체적으로는 90 내지 99.8중량%인 것이 좋다. 상기 양친성 블록 공중합체의 함량이 40 중량% 미만이면 미셀의 크기가

10 너무 커져 미셀의 안정성이 저하되고 필터 멸균시 손실율이 커질 우려가 있고, 함량이 99.98 중량%를 초과하면 함입할 수 있는 음이온성 약물의 함량이 너무 적어지게 된다.

또 다른 일실시예에서, 상기 양친성 블록 공중합체에 있어서, 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)의 조성비는, 공중합체 중량을 기준으로, 친수성

15 블록(A)이 40 내지 70중량%, 구체적으로는 50 내지 60중량% 범위일 수 있다. 친수성 블록(A)의 비율이 40중량% 미만이면 고분자의 물에 대한 용해도가 낮아서 미셀을 형성하기 어렵기 때문에, 공중합체가 미셀을 형성하기에 충분한 물에 대한 용해도를 갖기 위하여 친수성 블록(A)의 비율이 40중량% 이상인 것이 좋은 한편, 70중량%를 초과하면 친수성이 너무 높아 고분자 미셀의 안정성이 낮아져서

20 음이온성 약물/양이온성 지질 복합체의 가용화 조성물로 사용하기 어려우므로, 미셀 안정성을 고려하여 친수성 블록(A)의 비율이 70중량% 이하인 것이 좋다.

구체적인 일 양태에서, 상기 양친성 블록 공중합체는 수용액 상에서 음이온성 약물과 양이온성 지질 복합체를 미셀 구조 내부에 봉입시키는데, 이 때 양친성 블록 공중합체의 중량(b) 대비 음이온성 약물 및 양이온성 지질 복합체의

25 중량(a) 비율 $[a/b \times 100; (\text{음이온성 약물 중량} + \text{양이온성 지질 중량}) / \text{양친성 블록 공중합체 중량} \times 100]$ 은, 0.001 내지 100중량%, 구체적으로는 0.01 내지 50중량%, 보다 구체적으로는 0.1 내지 10중량%일 수 있다. 상기 중량 비율이, 0.001중량% 미만인 경우에는 음이온성 약물 및 양이온성 지질 복합체의 함량이 지나치게 낮아져서 음이온성 약물이 효과적으로 작용할 수 있는 유효 함량을 충족시키기

어려우며, 반대로 100중량% 초과시에는 양친성 블록 공중합체의 분자량과 음이온성 약물 및 지질 복합체의 양을 고려할 때 적절한 크기의 미셀 구조를 형성하지 못하기 때문이다.

- 본 발명에 따른 조성물 중 미셀 구조체는 폴리락트산염(PLANa)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 폴리락트산염은 미셀의 코어(내벽)에 분포하여 코어의 소수성을 강화시켜 미셀을 안정시킴과 동시에 체내에서 세망내피계(RES)를 효과적으로 회피하는 역할을 한다. 즉, 폴리락트산염의 카르복실산 음이온이 폴리락트산보다 효과적으로 양이온성 복합체와 결합하여 고분자 미셀의 표면전위를 감소시켜 폴리락트산염을 포함하지 않는 고분자 미셀에 비해 표면전위의 양성 전하가 감소하여 세망내피계에 의해 덜 포획되고, 이로 인하여 목적하는 부위(예컨대, 암세포, 염증세포 등)로의 전달 효율이 우수하다는 장점이 있다.

- 상기 양친성 블록 공중합체와 별도의 성분으로 미셀 내벽 성분으로 포함되는 폴리락트산염은 수평균분자량이 500 내지 50,000달톤, 구체적으로 1,000 내지 10,000달톤인 것이 좋다. 분자량이 500달톤 미만이면 소수성이 너무 낮아 미셀의 코어(내벽)에 존재하기 어렵고, 분자량이 50,000달톤을 초과하면 고분자 미셀의 입자가 커지는 문제가 있다.

- 상기 폴리락트산염은 양친성 블록 고분자 100 중량부에 대하여 1 내지 200중량부, 구체적으로 10 내지 100중량부, 더 구체적으로 30 내지 60중량부로 사용될 수 있다. 폴리락트산염의 함량이 양친성 블록 고분자 100 중량부 대비 200중량부를 초과하면 미셀의 크기가 증가하여, 멸균막을 사용한 여과가 어렵게 되고, 1중량부 미만이면 목적하는 효과를 충분히 얻을 수 없다.

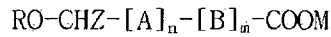
- 일 구체예에서, 음이온성 약물 1 중량부 대비 양친성 블록 공중합체를 10 내지 1,000 중량부, 폴리락트산염을 5 내지 500 중량부로 함유할 수 있다. 바람직하게는 양친성 블록 공중합체를 50 내지 800 중량부, 보다 바람직하게는 100 내지 500 중량부로 함유할 수 있다. 바람직하게는, 폴리락트산염을 10 내지 300 중량부, 보다 바람직하게는 50 내지 100 중량부로 함유할 수 있다.

한 구체예에서, 상기 폴리락트산염의 말단 중 카르복실산나트륨의 반대편의 말단은, 히드록시, 아세톡시, 벤조일옥시, 데카노일옥시, 팔미토일옥시 및

탄소수 1 내지 2개의 알콕시로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나로 치환될 수 있다.

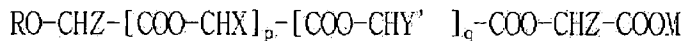
바람직한 하나의 양태로서, 본 발명의 폴리락트산염은 하기 화학식 1 내지 6의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

5 [화학식 1]



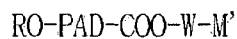
상기 식 1에서, A는 -COO-CHZ-이고; B는 -COO-CHY-, -COO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- 또는 -COO-CH₂CH₂OCH₂이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸, 또는 에틸기이고; Z와 Y는 각각 수소원자, 또는 메틸 또는 페닐기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; n은 1 내지 30의 정수이며; m은 0 내지 20의 정수이다.

[화학식 2]



상기 식 2에서, X는 메틸기이고; Y'는 수소원자 또는 페닐기이며; p는 0 내지 25의 정수이고, q는 0 내지 25의 정수이되, 단 p+q는 5 내지 25의 정수이고; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; Z는 수소 원자, 메틸 또는 페닐기이다.

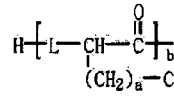
[화학식 3]



상기 식 3에서, W-M'는 $\begin{matrix} COOM \\ | \\ -C-CH_2COOM \\ | \\ CH_2COOM \end{matrix}$ 또는 $\begin{matrix} COOM \\ | \\ -CH-CH_2COOM \end{matrix}$ 이고; PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이고; M은 독립적으로 Na, K, 또는 Li이다.

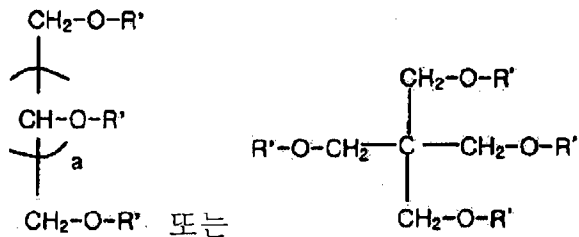
[화학식 4]





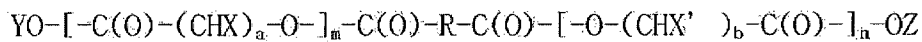
상기 식 4에서, S는 $(\text{CH}_2)_a\text{-COOM}$ 이고; L은 $-\text{NR}_1-$ 또는 $-\text{O}-$ 이며, 여기서 R_1 은 수소원자 또는 C_{1-10} 알킬이고; Q는 CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, 또는 $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 이고; a는 0 내지 4의 정수이며; b는 1 내지 10의 정수이고; M은 Na, K, 또는 Li이며; PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이다.

[화학식 5]



상기 식 5에서, R'는 $-\text{PAD-O-C(O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(O)-OM}$ 이고, 여기서 PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이고, M은 Na, K, 또는 Li이며; a는 1 내지 4의 정수이다.

[화학식 6]



상기 식 6에서, X 및 X'은 독립적으로 수소, 탄소수가 1~10인 알킬 또는 탄소수가 6~20인 아릴이고; Y 및 Z는 독립적으로 Na, K, 또는 Li이며; m 및 n은 독립적으로 0 내지 95의 정수이되, $5 < m+n < 100$ 이고; a 및 b는 독립적으로 1 내지 6의 정수이며; R은 $-(\text{CH}_2)_k-$, 탄소수가 2~10인 2가 알케닐(divalent alkenyl), 탄소수가 6~20인 2가 아릴(divalent aryl) 또는 이들의 조합이고, 여기서 k는 0 내지 10의 정수이다.

상기 폴리락트산염은 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물인 것인 바람직하다.

일 구체예에서, 본 발명의 조성물은 음이온성 약물의 세포 내 전달 효율을

증가시키기 위하여 전체 조성물의 중량을 기준으로 0.01 내지 50중량%,
구체적으로는 0.1 내지 10중량%의 융합성 지질을 추가로 포함할 수 있다.

상기 융합성 지질은 음이온성 약물과 양이온성 지질의 복합체에 혼합시,
소수성 상호작용으로 결합하여 음이온성 약물, 양이온성 지질 및 융합성 지질의
5 복합체를 형성하고, 상기 융합성 지질을 포함하는 복합체는 양친성 블록
공중합체의 미셀 구조 내부에 봉입된다. 일 구체예에서, 상기 융합성 지질은
인지질, 콜레스테롤, 및 토크페롤로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 둘
이상의 조합일 수 있다.

구체적으로, 상기 인지질은 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamin,
10 PE), 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC) 및 포스파티딘산(phosphatidic acid)으로
이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기
포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamin, PE),
포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC) 및 포스파티딘산은 하나 또는 2 개의 C10-
24 지방산과 결합된 형태일 수 있다. 상기 콜레스테롤 및 토크페롤에는
15 콜레스테롤 및 토크페롤의 각 유사체, 유도체, 및 대사체가 포함된다.

구체적으로는 융합성 지질은 디라우로일 포스파티딜에탄올아민(dilauroyl
phosphatidylethanolamine), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민(dimyristoyl
phosphatidylethanolamine), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민(dipalmitoyl
phosphatidylethanolamine), 디스테아로일 포스파티딜에탄올아민(distearoyl
20 phosphatidylethanolamine), 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(dioleoyl
phosphatidylethanolamine), 디리놀레오일 포스파티딜에탄올아민(dilinoleoyl
phosphatidylethanolamine), 1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딜에탄올아민(1-palmitoyl-
2-oleoyl phosphatidylethanolamine), 1,2-디피타노일-3-sn-포스파티딜에탄올아민(1,2-
diphytanoyl-3-sn-phosphatidylethanolamine), 디라우로일 포스파티딜콜린(dilauroyl
25 phosphatidylcholine), 디미리스토일 포스파티딜콜린(dimyristoyl phosphatidylcholine),
디팔미토일 포스파티딜콜린(dipalmitoyl phosphatidylcholine), 디스테아로일
포스파티딜콜린(distearoyl phosphatidylcholine), 디올레오일 포스파티딜콜린(dioleoyl
phosphatidylcholine), 디리놀레오일 포스파티딜콜린(dilinoleoyl phosphatidylcholine), 1-
팔미토일-2-올레오일 포스파티딜콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine), 1,2-

- 디피타노일-3-sn-포스파티딜콜린(1,2-diphytanoyl-3-sn-phosphatidylcholine), 디라우로일 포스파티딘산(dilauroyl phosphatidic acid), 디미리스토일 포스파티딘산(dimyristoyl phosphatidic acid), 디팔미토일 포스파티딘산(dipalmitoyl phosphatidic acid), 디스테아로일 포스파티딘산(distearoyl phosphatidic acid), 디올레오일 포스파티딘산(dioleoyl phosphatidic acid), 디리놀레오일 포스파티딘산(dilinoleoyl phosphatidic acid), 1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딘산(1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidic acid), 1,2-디피타노일-3-sn-포스파티딘산(1,2-diphytanoyl-3-sn-phosphatidic acid), 콜레스테롤 및 토코페롤로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 조합일 수 있다.
- 10 바람직한 구체예에서, 상기 융합성 지질은 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(dioleoyl phosphatidylethanolamine, DOPE), 디팔미토올레오일포스포콜린(1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 디올레오일포스포콜린 (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPC), 디팔미토올레오일포스포에탄올아민 (1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- 15 구체적인 일 양태로서, 본 발명에 따른 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염 미셀 구조체에 봉입된 음이온 약물-양이온성 화합물 복합체 함유 조성물은, 혈관, 근육, 피하, 경구, 뼈, 경피 또는 국소 조직 등의 투여 경로를 통하여 투여될 수 있고, 이러한 투여 경로에 적합하게, 다양한 경구 또는 비경구 투여 제제로 제형화될 수 있다. 상기 경구 투여 제제로는 정제, 캡슐, 분체 제제, 액제 등, 비경구 투여 제제로는 점안제, 주사제 등 다양한 제제를 예시할 수
- 20 있는데, 바람직한 일 양태로서, 상기 조성물은 주사용 제제일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조성물을 동결건조하는 경우, 이를 주사용 증류수, 0.9% 생리식염수 및 5% 텍스트로스 수용액 등으로 재건하여 주사용 제제 형태로
- 25 제조할 수 있다.

본 발명은 또한, 상기 음이온성 약물을 함유하는 양친성 블록 공중합체 미셀을 포함하는 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

구체적인 일 양태로서, 상기 음이온성 약물, 양이온성 지질, 양친성 블록

공중합체 및 폴리락트산염을 포함하는 음이온성 약물 전달용 조성물을 제조하는 방법은,

- (a) 음이온성 약물, 양이온성 화합물, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염을 수혼화성 유기용매, 또는 수용액 및 유기용매의 혼합 용매에 용해시키는 공정;
- (b) 상기 (a) 공정에서 제조된 혼합물에서 유기용매층을 제거하는 공정;
- (c) 상기 (b) 공정의 유기용매가 제거된 혼합물에 수용액을 첨가하여 미셀화하는 공정을 포함한다.

보다 구체적으로, 상기 제조방법은,

- 10 상기 (a) 공정에서는, 수혼화성 유기용매, 또는 수용액 및 유기용매의 혼합 용매 내에서 음이온성 약물, 양이온성 화합물, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염을 혼합하여 복합체를 형성한다. 구체적으로는, 상기 수혼화성 유기용매는 아세톤, 에탄올, 메탄올 및 아세트산으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 상기 혼합 용매의 유기용매는 아세트산 에틸, 15 아세토니트릴, 메틸렌클로라이드, 클로로포름 및 다이옥산으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 수용액은 증류수, 주사용수, 또는 완충액일 수 있다. 상기 혼합 용매 중의 유기용매와 수용액의 혼합비는 특별한 한정은 없으며, 예컨대 부피 기준으로 1:0.1 내지 50, 보다 구체적으로 1:0.5 내지 10(유기용매 부피:수용액 부피)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- 20 상기 (b) 공정에서, 상기 (a) 단계에서 제조된 혼합물에서 유기용매를 증발시킴으로써 제거한다.

- 25 상기 (c) 공정은 유기용매가 증발되고 남은 혼합물을 수용액 중에 용해시킴으로써, 음이온성 약물과 양이온성 화합물과의 복합체를 양친성 블록 공중합체와 폴리락트산염이 형성하는 미셀 구조체 내부에 봉입시킨다. 상기 수용액 및 그 사용량은 상기에서 기재한 바와 같다.

또 다른 하나의 추가적인 양태로서, 상기 (c) 공정 이후에, (d) 동결건조 보조제를 가하여 동결건조 하는 공정을 더 포함할 수 있다.

또 다른 하나의 추가적인 양태로서, 상기 제조방법은, 상기 (d) 공정의 동결 건조 전에 (c) 공정에서 얻은 고분자 미셀 수용액을 멸균 필터로 멸균하는

공정을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 동결건조 보조제는 동결건조된 조성물이 케이크 형태를 유지할 수 있도록 하거나, 양친성 블록 공중합체 조성물을 동결건조 후, 재건(reconstitution)하는 과정에서 빠른 시간 내에 균일하게 녹는 것을 도와주기 위해 첨가하는 것으로, 구체적으로, 락토스, 만니톨, 솔비톨 및 슈크로스 5 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 동결건조 보조제의 함량은, 동결건조 조성물 전체 건조중량을 기준으로, 1 내지 90 중량%, 더 구체적으로는 10 내지 60 중량% 이다.

이러한 본 발명에 따른 제조방법을 통해 음이온성 약물과 양이온성 10 화합물 복합체가 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염 미셀 구조체에 봉입된 형태의 조성물이 제조된다. 구체적으로 제조된 조성물 내의 미셀 입자는 혈중에서 안정하며, 그 크기는 10 내지 200 nm이며, 더욱 구체적으로는 10 내지 150 nm이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

15 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 자세하게 설명하나, 이들은 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 이들에 의하여 본 발명의 범위가 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[제조예 1] 1,6-디올레오일 트리에틸렌테트라마이드 (1,6-dioleoyl triethylenetetramide)의 합성

20 WO2012-091523의 실시예 1에 기재된 공정에 따라 표제 화합물을 합성 및 확인하였다.

[제조예 2 및 3] 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드 (mPEG-PLA) 블록 공중합체 (A-B)의 중합

25 WO2012-091523의 제조예 1에 기재된 공정에 따라 수평균 분자량은 5,000-4,000 달톤의 mPEG-PLA를 합성하였다 [제조예 2].

동일한 방법으로 모노메톡시폴리에틸렌글리콜 (분자량 2,000 달톤 이하, NOF corporation)을 사용하여 수평균 분자량이 2,000-1,750 달톤인 mPEG-PLA 블록

공중합체를 합성하였다 [제조예 3].

[제조예 4 및 5] mPEG-PLA-토코페롤의 중합

WO2012-091523의 제조예 2에 기재된 공정에 따라 mPEG-PLA-토코페롤
5 (수평균 분자량 5,000-4,000-530 달톤) 을 얻었다 [제조예 4].

동일한 방법으로 수평균 분자량이 2,000-1,75-530 달톤인 mPEG-PLA-
토코페롤을 얻었다 [제조예 5].

[제조예 6 및 7] 폴리락트산 (PLA) 합성

10 한국등록특허 제1296326호의 제조예 8에 기재된 공정에 따라 PLA(수평균
분자량 1,700 달톤) 이며, 수율은 87% 였다 [제조예 6].

동일한 방법으로 24 시간 반응하여 수평균 분자량이 4,000 달톤인
폴리락트산을 중합하였다. 정제된 폴리락트산은 ¹H-NMR 을 통해 확인하였고,
수율은 85% 였다 [제조예 7].

15

[제조예 8 및 9] D,L-폴리락틱산 나트륨염 (PLANa) 합성

제조예 6에서 얻어진 폴리락틱산 (수평균 분자량 1,700) 100 g에
아세트니트릴 150 ml를 첨가하여 용해시켰다. 그런 다음, 탄산수소나트륨 수용액
(0.1 g/ml) 150 ml를 서서히 첨가하고, 60에서 2 시간 동안 100 rpm에서 교반하였다.
20 상온에서 염화나트륨 15 g을 첨가하고 교반하면서 용해시킨 후, 분별 깔대기를
이용하여 수용액층을 제거하였다.

남아있는 유기용매층에 증류수 100 ml와 염화나트륨 10 g을 첨가하여
교반하면서 용해시켰다. 다시 분별 깔대기를 이용하여 유기용매층만 회수한 후,
얻어진 유기용매층을 80에서 진공조건으로 2시간 동안 분별 증류하여, 유기용매와
25 증류수를 완전히 제거하였다.

그런 다음, 무수 아세톤 150 ml를 첨가하여 고분자를 용해시키고, 용해되지
않은 침전물은 여과 분리하여 제거하였다. 80에서 진공조건으로 2 시간 동안 분별
증류하여, 아세톤을 제거하였다. 그 결과, 정제된 폴리락틱산 나트륨염 69 g을
얻었다. 정제된 폴리락틱산 나트륨염은 NMR 을 통하여 확인되었다 [제조예 8].

제조예 7에서 얻어진 폴리락트산 (수평균 분자량 4,000)을 이용하여 폴리락틱산 나트륨염을 얻었다 [제조예 9].

[비교예 1] siRNA/1,6-디올레오일 트리에틸렌테트라미드 (dioTETA)/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 함유 고분자 미셀 제조

1,6 dioTETA 1.89 mg (N/P 비율 18)을 클로로포름 94.63 μ l에 녹이고 siRNA 100 μ g을 증류수 80 μ l에 녹였다. mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 60 mg을 클로로포름 200 μ l에 녹였다. 전체적으로 수층에 대한 유기층의 부피비율이 10배가 되도록 클로로포름 505.37 μ l을 추가하였다. 1,6 dioTETA 와 mPEG-PLA-토코페롤을 클로로포름에 녹인 용액 혼합물에 siRNA를 한 방울씩 가하면서 초음파 분쇄기를 이용하여 유상액을 제조하였다. 유상액을 증류수 2320 μ l에 더하면서 초음파 분쇄기를 이용하여 복합 유상액을 제조하였다. 제조한 복합 유상액을 1-구 둥근 플라스크에 넣고 증류농축장치 (rotary evaporator)에서 감압 증류함으로써 클로로포름을 선택적으로 제거하여 siRNA/1,6-디올레오일 트리에틸렌테트라아미드(dioTETA)/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 함유 고분자 미셀을 제조하였다 (표 1 참조).

【표 1】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자
비교예 1	siRNA/ dioTETA/ mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)	5-18-3	100 μ g	1.89 mg	60 mg

(조성비에서 각 성분의 단위는 siRNA μ g, 지질 N/P 비율, 고분자 mg이다.

이하 표에서 동일하게 적용된다.)

20

[비교예 2] siRNA/1,6-디올레오일 트리에틸렌테트라미드 (dioTETA)/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLA (1.7k) 함유 고분자 미셀 제조

1,6 dioTETA 2.52 mg (N/P 비율 16)을 클로로포름 126.18 μ l에 녹이고 siRNA 150 μ g을 증류수 120 μ l에 녹였다. PLA-COOH (1.7k) 9 mg을 클로로포름 180 μ l에 녹이고 mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 30 mg을 클로로포름 100 μ l에 녹였다. 전체적으로 수층에 대한 유기층의 부피비율이 10배가 되도록 클로로포름 813.82

25

μl을 추가하였다. 상기 mPEG-PLA-토코페롤 30 mg을 클로로포름에 녹인 용액 중 mPEG-PLA-토코페롤 6 mg (20중량%)에 해당하는 양인 20 μl에 클로로포름 1564 μl을 첨가하여 1-구 둥근 플라스크에 넣고 증류농축장치(rotary evaporator)에서 감압 증류하여 용매를 제거하였다.

5 상기 dioTETA 용액, PLA 용액 그리고 mPEG-PLA-토코페롤 24 mg 용액을 섞어주고, siRNA 수용액을 한 방울씩 가하면서 초음파 분쇄기를 이용하여 유상액을 제조하였다. 유상액을 mPEG-PLA-토코페롤 6 mg이 도포된 1-구 둥근 플라스크에 넣고 증류농축장치 (rotary evaporator)에서 감압 증류하여 용매를 제거하였다. 플라스크에 증류수 3 ml을 가하고, 부드럽게 흔들어 녹임으로써
10 siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLA 함유 고분자 미셀을 제조하였다 (표 2 참조).

【표 2】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자 1	고분자 2
비교예 2	siRNA/dioTETA/ mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLA (1.7k)	5-16-1-0.3	150 μg	2.52 mg	30 mg	9 mg

(고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLA)

15 [실시예 1-2] siRNA/1,6-디올레오일 트리에틸렌테트라미드 (dioTETA)/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 조성물 제조
 1,6 dioTETA 2.52 mg을 클로로포름 126.18 μl에 녹이고 siRNA 150 μg을 증류수 120 μl에 녹였다. PLANa (1.7k) 9 mg을 클로로포름 180 μl에 녹이고 mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 30 mg을 클로로포름 100 μl에 녹였다. 전체적으로 수층에
20 대한 유기층의 부피비율이 10배가 되도록 클로로포름 813.82 μl을 추가하였다. 상기 mPEG-PLA-토코페롤 30 mg을 클로로포름에 녹인 용액 중 mPEG-PLA-토코페롤 6 mg (20중량%)에 해당하는 양인 20 μl에 클로로포름 1564 μl을 첨가하여 1-구 둥근 플라스크에 넣고 증류농축장치 (rotary evaporator)에서 감압 증류하여 용매를 제거하였다.

25 상기 dioTETA 용액, PLANa 용액 그리고 mPEG-PLA-토코페롤 24 mg

용액을 섞어주고, siRNA 수용액을 한 방울씩 가하면서 초음파 분쇄기를 이용하여 유상액을 제조하였다. 유상액을 mPEG-PLA-토코페롤 6 mg이 도포된 1-구 둥근 플라스크에 넣고 증류농축장치 (rotary evaporator) 에서 감압 증류하여 용매를 제거하였다. 플라스크에 증류수 3 ml을 가하고, 부드럽게 흔들어 녹임으로써

5 siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa 함유 조성물을 제조하였다.

위와 유사한 방법으로 dioTETA 와 PLANa 양을 달리하여 고분자 미셀 2을 제조하였다.

【표 3】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자 1	고분자 2
실시예 1	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-1-0.3	150 µg	2.52 mg	30 mg	9 mg
실시예 2	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-24-1-0.5	150 µg	3.78 mg	30 mg	15 mg

(고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLANa)

10

[실시예 3-6] siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) /PLANa (1.7k) 함유 조성물 제조

실시예 1과 동일한 방법으로 dioTETA 또는 mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 양을 달리 하여 siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유

15 조성물 3-6을 제조하였다.

실시예 3 내지 6에서 얻어진 조성물은 아래의 표 4에 정리하였다:

【표 4】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자 1	고분자 2
실시예 3	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-8-1-0.3	150 µg	1.26 mg	30 mg	9 mg
실시예 4	siRNA/dioTETA/mPEG-	5-24-1-0.3	150 µg	3.79 mg	30 mg	9 mg

	PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)					
실시예 5	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-0.5-0.3	150 µg	2.52 mg	15 mg	9 mg
실시예 6	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-3-0.3	150 µg	2.52 mg	90 mg	9 mg

(고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLANa)

[실시예 7 및 8] siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) /PLANa (1.7k) 함유 조성물 제조

- 5 실시예 1과 동일한 방법을 사용하되, PLANa (1.7k)의 양을 달리하여 siRNA /dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 고분자 미셀을 제조하였다 (표 5).

【표 5】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자 1	고분자 2
실시예 7	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-1-0.1	150 µg	2.52 mg	30 mg	3 mg
실시예 8	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-1-0.5	150 µg	2.52 mg	30 mg	15 mg

(고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLANa)

10

[실험예 1] siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) /PLANa (1.7k) 미셀의 조성비 변화에 따른 입자 크기 및 표면 전하 비교

- 15 siRNA/dioTETA 의 비율 (N/P 비율), 양친성 블록 공중합체 (2k-1.7k) 양 및 PLANa (1.7k) 양에 따른 나노 입자 형성 여부를 확인하기 위하여 미셀의 크기와 표면 전하를 확인하였다. 동적 광산란 (DLS; dynamic light scattering) 방법을

이용하여 입자의 크기를 측정하였다. 구체적으로, He-Ne 레이저를 광원으로 사용하였으며, MALVERN사의 Zetasizer Nano ZS90 기기를 매뉴얼에 따라 작동하였다.

N/P 비율에 따른 실시예 1 내지 4 미셀의 크기와 표면 전하는 아래의 표 5 6에 나타내었다:

【표 6】

	조성물 종류	조성비	입자 크기	표면 전하
실시예 1	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-16-1-0.3	32.67 nm	-5.74 mV
실시예 2	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-24-1-0.5	35.59 nm	-4.31 mV
실시예 3	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-8-1-0.3	22.59 nm	-7.31 mV
실시예 4	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-24-1-0.3	23.79 nm	3.09 mV

양친성 블록 공중합체 (2k-1.7k) 양을 달리한 실시예 1, 5 및 6의 크기와 표면 전하는 아래의 표 7에 나타내었다.

10 【표 7】

mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 양의 변화

	조성물 종류	조성비	입자 크기	표면 전하
실시예 1	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-16-1-0.3	28.67 nm	-5.74 mV
실시예 5	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-16-0.5-0.3	28.03 nm	-9.16 mV
실시예 6	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-16-3-0.3	23.97 nm	-4.02 mV

PLANa (1.7k) 양을 달리한 실시예 1, 7 및 8의 크기와 표면 전하는 아래의 표 8에 나타내었다.

【표 8】

PLA-COONa (1.7k) 양의 변화

	조성물 종류	조성비	입자 크기	표면 전하
실시예 1	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-16-1-0.3	28.67 nm	-5.74 mV
실시예 7	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-16-1-0.1	26.52 nm	4.2 mV
실시예 8	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-16-1-0.5	24.86 nm	-9.79 mV

[실시예 9-11] siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤/PLANa 함유 조성물

제조

- 5 실시예 1과 동일한 방법을 사용하되, mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 대신 mPEG-PLA-토코페롤 (5k-4k) 를 사용하거나 PLANa (1.7k) 대신 PLANa (4k) 를 사용하여 고분자 미셀 9, 10, 11을 제조하였다.

【표 9】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자 1	고분자 2
실시예 9	siRNA/dioTETA/mPEG- PLA-토코페롤 (5k- 4k)/PLANa (1.7k)	5-16-1-0.3	150 µg	2.52 mg	30 mg	9 mg
실시예 10	siRNA/dioTETA/mPEG- PLA-토코페롤 (2k- 1.7k)/PLANa (4k)	5-16-1-0.3	150 µg	2.52 mg	30 mg	9 mg
실시예 11	siRNA/dioTETA/mPEG- PLA-토코페롤 (5k- 4k)/PLANa (4k)	5-16-1-0.3	150 µg	2.52 mg	30 mg	9 mg

10 (고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLANa)

[실험예 2] siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤/PLANa 미셀의 조성물과 조성비 변화에 따른 입자 크기 및 표면 전하 비교

양친성 블록 공중합체 분자량과 PLA-COONa 분자량에 따른 나노 입자 형성 여부를 확인하기 위하여 실시예 1, 9, 10 및 11 미셀의 크기와 표면 전하를 실험예 1과 동일한 방법으로 확인하였다. 얻어진 결과를 아래의 표 10에 나타내었다:

5

【표 10】

	조성물 종류	조성비	입자 크기	표면 전하
실시예 1	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-16-1-0.3	28.67 nm	-5.74 mV
실시예 9	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (4k-5k)/PLANa(1.7k)	5-16-1-0.3	36.47 nm	-1.54 mV
실시예 10	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa(4k)	5-16-1-0.3	27.49 nm	-0.82 mV
실시예 11	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (4k-5k)/PLANa(4k)	5-16-1-0.3	35.4 nm	-0.99 mV

[실시예 12] siRNA-콜레스테롤/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 조성물 제조

10 siRNA-콜레스테롤을 사용하여 실시예 1와 동일한 과정을 거쳐 siRNA-콜레스테롤/ dioTETA /mPEG-PLA-토코페롤(2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 조성물을 제조하였다. 이 혼합물을 회전증류농축장치에서 감압 증류하여 용매를 제거하였다. 플라스크에 증류수 3 ml을 가하고, 부드럽게 흔들어 녹임으로써 조성물을 제조하였다.

15

[실시예 13] siRNA-PEG/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 조성물 제조

20 siRNA-PEG를 사용하여 실시예 1와 동일한 과정을 거쳐 siRNA-PEG/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 조성물을 제조하였다. 이 혼합물을 회전증류농축장치에서 감압 증류하여 용매를 제거하였다. 플라스크에 증류수 3 ml을 가하고, 부드럽게 흔들어 녹임으로써 조성물을 제조하였다.

실시에 12 내지 13에서 얻어진 조성물을 아래의 표 11에 정리하였다:

【표 11】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자 1	고분자 2
실시에 12	siRNA- 콜레스테롤/dioTETA/mPEG- PLA -토코페롤(2k- 1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-1- 0.3	150 µg	2.52 mg	30 mg	9 mg
실시에 13	siRNA-PEG/dioTETA/mPEG- PLA-토코페롤 (2k- 1.7k)/PLANa (1.7k)					

(고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLANa)

5 **[실시에 14] siRNA/bPEI/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)**
 함유한 조성물 제조

 bPEI 0.3 mg을 증류수 15 µl에 녹이고 siRNA 150 µg을 증류수 120 µl에
 녹였다. 상기 bPEI 수용액과 siRNA 수용액을 HBS 완충수용액 (10 mM HEPES, 1
 mM NaCl) 105 µl에 혼합한다. PLANa (1.7k) 9 mg을 클로로포름 180 µl에 녹이고
 10 mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) 30 mg을 클로로포름 100 µl에 녹였다. 전체적으로
 수층에 대한 유기층의 부피비율이 10배가 되도록 클로로포름 2140 µl을
 추가하였다. 상기 mPEG-PLA-토코페롤 30 mg을 클로로포름에 녹인 용액 중
 mPEG-PLA-토코페롤 6 mg (20중량%)에 해당하는 양인 20 µl에 클로로포름 1564
 µl을 첨가하여 1-구 둥근 플라스크에 넣고 증류농축장치 (rotary evaporator)에서
 15 감압 증류하여 용매를 제거하였다.

 상기 PLANa 용액 그리고 mPEG-PLA-토코페롤 24 mg 용액을 섞어주고,
 bPEI와 siRNA가 혼합된 HBS 완충수용액을 한 방울씩 가하면서 초음파 분쇄기를
 이용하여 유상액을 제조하였다. 유상액을 mPEG-PLA-토코페롤 6 mg이 도포된 1-
 구 둥근 플라스크에 넣고 증류농축장치(rotary evaporator)에서 감압 증류하여
 20 용매를 제거하였다. 플라스크에 증류수 6 ml을 가하고, 부드럽게 흔들어
 녹임으로써 siRNA/bPEI/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 조성물을
 제조하였다 (표 12).

【표 12】

	조성물	조성비	siRNA	bPEI	고분자 1	고분자 2
실시예 14	siRNA/bPEI/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k- 1.7k)/PLANa (1.7k)	5-2-1-0.3	150 µg	0.3 mg	30 mg	9 mg

(고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLANa)

5 **[실시예 15 및 16] siRNA/양이온성 지질/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k) /PLANa (1.7k) 함유 조성물 제조**

실시예 1과 동일한 방법으로 양이온성 지질을 달리하여 siRNA/ 1,10-디올레오일 펜타에틸렌헥사마이드 (dioPEHA)/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 조성물 9와 siRNA/ 1,8-디리놀레오일 테트라에틸렌펜타마이드

10 (dilTEPA)/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k) 함유 조성물 10을 제조하였다 (표 13).

【표 13】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자 1	고분자 2
실시예 15	siRNA/dioPEHA/mPEG- PLA-토코페롤 (2k- 1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-1-0.3	150 µg	1.42 mg	30 mg	9 mg
실시예 16	siRNA/dilTEPA/mPEG- PLA-토코페롤 (2k- 1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-1-0.3	150 µg	1.78 mg	30 mg	15 mg

(고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLANa)

15 **[실시예 17 및 18] siRNA-PEG/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤(2k-1.7k)/PLANa (1.7k)/DOPE(dioleoylphosphatidylethanolamine) 함유 조성물 제조**

siRNA-PEG를 사용하여 실시예 1와 동일한 과정을 거쳐 siRNA-PEG/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)/DOPE 함유 조성물을 제조하였다. DOPE 양은 dioTETA 양의 1배, 4배로 각각 넣어주었다. 이 혼합물을

회전증류농축장치에서 감압 증류하여 용매를 제거하였다. 플라스크에 증류수 3 ml을 가하고, 부드럽게 흔들어 녹임으로써 조성물을 제조하였다 (표 14).

【표 14】

	조성물	조성비	siRNA	lipid	고분자 1	고분자 2	DOPE
실시예 17	siRNA/dioPEHA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)/DOPE	5-18-1-0.3-0.1	150 µg	1.42 mg	30 mg	9 mg	1.42mg
실시예 18	siRNA/diTTEPA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)/DOPE	5-16-1-0.3-0.4	150 µg	1.78 mg	30 mg	15 mg	5.68 mg

(고분자 1: mPEG-PLA-토코페롤, 고분자 2: PLANa)

5

[실험예 3] siRNA/양이온성 물질/양친성 블록 공중합체/PLANa(/DOPE)

미셀의 크기 및 표면 전하 비교

siRNA 종류, 양이온성 물질, PLANa 및 DOPE 여부에 따른 나노 입자 형성 여부를 확인하기 위하여 미셀의 크기와 표면 전하를 실험예 1과 동일한 방법으로

10 확인하였다. 얻어진 결과를 아래의 표 15에 나타내었다:

【표 15】

	조성물 종류	조성비	입자 크기	표면 전하
비교예 1	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)	5-18-3	25.32 nm	12.37 mV
비교예 2	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLA (1.7k)	5-16-1-0.3	25.71 nm	5.48 mV
실시예 1	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-1-0.3	28.07 nm	-1.29 mV
실시예 12	siRNA-콜레스테롤/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa	5-16-1-0.3	27.73 nm	-4.38 mV

	(1.7k)			
실시예 13	siRNA-PEG/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-16-1-0.3	28.23 nm	-3.09 mV
실시예 14	siRNA/bPEI/mPEG-PLA-토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)	5-2-1-0.3	25.49 nm	-6.46 mV
실시예 17	siRNA-PEG/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)/DOPE	5-18-1- 0.3-0.1	26.21 nm	1.02 mV
실시예 18	siRNA-PEG/dioTETA/mPEG-PLA- 토코페롤 (2k-1.7k)/PLANa (1.7k)/DOPE	5-18-1- 0.3-0.4	25.47 nm	4.42 mV

[실험예 4] siRNA/양이온성 물질/양친성 블록 공중합체/PLANa 미셀의 혈중 농도 분석

실험예 1에서 제조된 제형을 동물에 투여하고 투여 0.5시간, 6시간 후에
5 채혈을 하여 RT (Reverse Transcription)과 qRT-PCR (quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 방법을 이용해 아래와 같은 방법으로 미셀의 혈중 농도를 분석한다.

제형을 1mg/kg로 Balb/c 마우스에 정맥주사하여 0.5시간, 6시간 후에 각각 채혈한다. 혈액을 13000 rpm, 4에서 15분간 원심분리기를 돌려 상층 부분만 새
10 튜브에 모으고, 스탠다드용 제형의 농도는 4 μM에서 0.00256 μM까지 총 11개의 농도로 PBS에 희석하여 준비한다. PCR용 96웰 플레이트에 스탠다드용으로 희석한 제형을 1 μl 넣고 9 μl의 Balb/c 마우스 혈청과 90 μl의 0.25% triton X-100을 넣어준다. 실험군 혈액 샘플 10 μl에 90 μl의 0.25% Triton X-100 를 넣어준 후
15 전달체를 풀어주는 전처리 단계를 거친다. 제형이 풀어짐으로써 노출된 siRNA를 역전사 (RT) 단계를 거쳐 cDNA로 합성하고 합성된 cDNA를 이용하여 qRT-PCR (Bio-Rad CFX96 Real-Time System) 을 수행하였다. 분석은 Bio-Rad CFX Manager 프로그램을 이용하여 분석하였다.

【표 16】

	혈중 농도 (ng/mL)	
	0.5시간	6시간
비교예 1	1565.6	856.82
비교예 2	808.43	158.75
실시예 1	7483.83	3449.33
실시예 2	11650.82	5362.87

표 16에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 실시예 1 및 2 에서 제조된 제형은 비교예 1 및 2 에 비해 혈중에서 존재하는 제형의 농도가 0.5시간에서 5 내지 8배 정도 높은 편으로 혈중 안정성이 뛰어난 것을 알 수 있다.

5

[실험예 5] siRNA/양이온성 물질 /양친성 블록 공중합체/PLANa 미셀의 생체 내 조직 분포

siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤/PLANa 고분자 미셀이 생체 내에서, 간과 암조직에 분포된 양을 확인하였다.

10

Balb/c 누드 마우스에 A2780cis 인간 난소암 세포주를 피하에 주입하여 암이 유발된 생쥐를 제조하였다. 제형을 1 mg/kg의 용량으로 이들에 한번씩 총 4회 정맥투여 하였다. 마지막 투여 후 24시간에 간과 암조직을 적출하여 200 mg씩 무게를 잰 후 1.8 mL의 0.25% Triton X-100 에 넣고 조직분쇄기로 조직을 갈아준다. 스탠다드용 조직샘플은 생리식염수를 투여한 조직을 이용하고 같은 방법으로

15

조직을 갈아준다. 스탠다드용 제형의 농도는 4 μM에서 0.00256 μM까지 총 11개 농도로 PBS에 희석하여 준비한다. PCR용 96웰 플레이트에 스탠다드용으로 갈아준 조직을 99 μl 넣고 스탠다드용으로 희석한 제형 1μl를 넣어준다. 실험군으로 분석할 조직 샘플은 100 μl씩 넣고 제형을 풀어주는 전처리 단계를 거친다.

20

노출된 siRNA를 역전사(RT) 단계를 거쳐 cDNA로 합성하고 합성된 cDNA를 이용하여 qRT-PCR (Bio-Rad CFX96 Real-Time System)을 수행하였다. 분석은 Bio-Rad CFX Manager 프로그램을 이용하여 분석하였다.

분석 결과는 아래의 표 17에 나타내었다.

【표 17】

	조직 농도 (ng/g)		암/간 비율
	암	간	
비교예 1	5.47	401.48	0.014
실시예 2	51.04	208.45	0.245

표 17에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 2는 비교예 1에 비하여 간조직 분포는 감소하고, 암조직 분포량이 증가한 것으로 나타났다.

5 이러한 결과는 본 발명에 따른 PLANa 포함 고분자 미셀 전달체가 암조직에 특이적으로 표적화할 수 있는 가능성을 제시해 주는 것이라 할 수 있다.

[실험예 6] siRNA/양이온성 물질 /양친성 블록 공중합체/PLANa 미셀의 생체 내 활성 (유전자 억제능력 분석)

10 siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-토코페롤/PLANa 고분자 미셀의 생체 내 활성을 유전자 억제 능력 분석을 통해 확인 하였다.

Balb/c 누드 마우스에 A549 인간 폐암 종양편을 이식해서 암이 유발된 생쥐를 제조하였다. 제형을 0.5 mg/kg의 용량으로 이틀에 한번씩 총 3회 정맥투여 하였다. 대조군으로는 생리식염수를 투여하였고, 각 제형당 5 마리씩 실시하였다. 15 마지막 투여 후 24시간에 암조직을 적출하여 액체 질소 하에서 막자 사발을 이용하여 일차 분쇄 후, QIAGEN 조직 분쇄기 (TissueLyser)를 이용하여 다시 한번 조직을 갈아준다. 두 번에 걸쳐 파쇄된 암조직 10 mg 에 미리 준비해 놓은 작업용 용액 (working homogenizing solution, Homogenizing solution 600µl + Proteinase K (23mg/mL) 6µl) 600µl을 이용하여 HPRT mRNA를 세포 밖으로 꺼낸다. 상기의 20 방법으로 확보된 샘플을 bDNA assay kit 을 이용하여 분석하였다. 분석방법은 kit 제조사 (Panomics bDNA 분석법) 의 지시에 따랐다.

HPRT siRNA 의 영향을 받지 않는 유전자인 GAPDH mRNA 도 동일한 방법으로 분석하여, 측정된 HPRT mRNA 양을 보정하여 암조직에서의 HPRT mRNA 의 상대적 발현량을 평균값을 계산하였다. 분석 결과는 아래 표 18에 25 나타내었다.

【표 18】

	HPRT mRNA 상대적 발현양 (%)
대조군	100
비교예 1	98
실시예 2	46

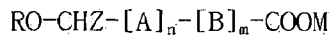
표 18에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 2는 생체 내 암조직에서 타겟 유전자 HPRT의 mRNA 54% 억제함을 알 수 있다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

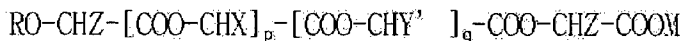
유효성분으로서 음이온성 약물;
 양이온성 화합물;
 양친성 블록 공중합체; 및
 하기 화학식 1 내지 6의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인
 폴리락트산염을 포함하며,
 상기 음이온성 약물은 상기 양이온성 화합물과 정전기적 상호작용에 의해
 복합체를 형성하고, 상기 복합체는 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염이
 형성하는 미셀 구조 내부에 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물
 전달용 조성물:

[화학식 1]



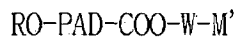
상기 식 1에서, A는 -COO-CHZ-이고; B는 -COO-CHY-, -COO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- 또는 -COO-CH₂CH₂OCH₂이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸, 또는 에틸기이고; Z와 Y는 각각 수소원자, 또는 메틸 또는 페닐기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; n은 1 내지 30의 정수이며; m은 0 내지 20의 정수이다.

[화학식 2]



상기 식 2에서, X는 메틸기이고; Y'는 수소원자 또는 페닐기이며; p는 0 내지 25의 정수이고, q는 0 내지 25의 정수이되, 단 p+q는 5 내지 25의 정수이고; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; Z는 수소 원자, 메틸 또는 페닐기이다.

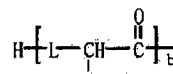
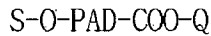
[화학식 3]



상기 식 3에서, W-M'는 $\begin{matrix} COOM \\ | \\ -C-CH_2COOM \\ | \\ CH_2COOM \end{matrix}$ 또는 $\begin{matrix} COOM \\ | \\ -CH-CH_2COOM \end{matrix}$ 이고; PAD는

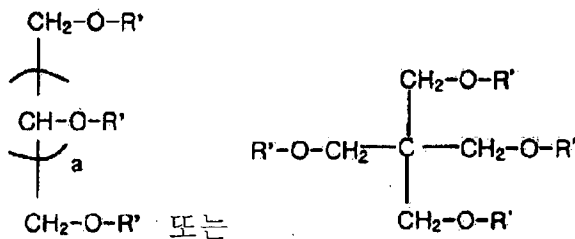
D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이고; M은 독립적으로 Na, K, 또는 Li이다.

[화학식 4]



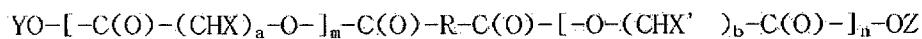
상기 식 4에서, S는 $(\text{CH}_2)_a\text{-COOM}$ 이고; L은 $-\text{NR}_1-$ 또는 $-\text{O}-$ 이며, 여기서 R₁은 수소원자 또는 C₁₋₁₀알킬이고; Q는 CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₂CH₃, 또는 CH₂C₆H₅이고; a는 0 내지 4의 정수이며; b는 1 내지 10의 정수이고; M은 Na, K, 또는 Li이며; PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이다.

[화학식 5]



상기 식 5에서, R'는 $-\text{PAD-O-C(O)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(O)-OM}$ 이고, 여기서 PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이고, M은 Na, K, 또는 Li이며; a는 1 내지 4의 정수이다.

[화학식 6]



상기 식 6에서, X 및 X'은 독립적으로 수소, 탄소수가 1~10인 알킬 또는 탄소수가 6~20인 아릴이고; Y 및 Z는 독립적으로 Na, K, 또는 Li이며; m 및 n은

독립적으로 0 내지 95의 정수이되, $5 < m + n < 100$ 이고; a 및 b는 독립적으로 1 내지 6의 정수이며; R은 $-(CH_2)_k-$, 탄소수가 2~10인 2가 알케닐(divalent alkenyl), 탄소수가 6~20인 2가 아릴(divalent aryl) 또는 이들의 조합이고, 여기서 k는 0 내지 10의 정수이다.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 음이온성 약물은 핵산인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 3】

제2항에 있어서,

상기 핵산은 RNA, DNA, siRNA(short interfering RNA), 압타머(aptamer), 안티센스 ODN(antisense oligodeoxynucleotide), 안티센스 RNA(antisense RNA),

리보자임(ribozyme) 및 디엔에이자임(DNAzyme)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 4】

제3항에 있어서,

상기 핵산은 하나 이상의 말단이 콜레스테롤, 토크페롤, 및 탄소수 10 내지 24개의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상으로 수식된 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 양이온성 화합물은 양이온성 지질 및 양이온성 고분자로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 6】

제5항에 있어서,

상기 양이온성 지질은 N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄클로라이드(DODAC), N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄브로마이드(DDAB), N-(1-(2,3-디올레오일옥시)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTAP), N,N-디메틸-(2,3-디올레오일옥시)프로필아민(DODMA), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(TAP), 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판(DAP), 3-베타-[N-(N',N',N'-

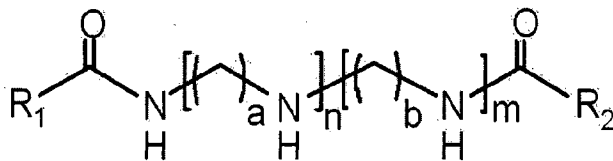
트리메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(TC-콜레스테롤), 3베타[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(DC-콜레스테롤), 3베타[N-(N'-모노메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(MC-콜레스테롤), 3베타[N-(아미노에탄)카바모일]콜레스테롤(AC-콜레스테롤), 콜레스테릴옥시프로판-1-아민(COPA), N-(N'-아미노에탄)카바모일프로파노익 토크페롤(AC-토크페롤) 및 N-(N'-메틸아미노에탄)카바모일프로파노익 토크페롤(MC-토크페롤)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 7】

제5항에 있어서,

상기 양이온성 지질은 하기 화학식 7의 양이온성 지질인, 음이온성 약물 전달용 조성물:

[화학식 7]



상기 식에서,

n과 m은 각각 0 내지 12이되, $2 \leq n+m \leq 12$ 이며, a와 b는 각각 1 내지 6이며, R1과 R2는 각각 독립적으로 탄소수 11 내지 25개의 포화 및 불포화 탄화수소로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

【청구항 8】

제7항에 있어서, n과 m은 독립적으로 1 내지 9이며, $2 \leq n+m \leq 10$ 인, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 9】

제7항에 있어서, a와 b가 2 내지 4인, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 10】

제7항에 있어서, R1과 R2는, 각각 독립적으로, 라우릴 (lauryl), 미리스틸 (myristyl), 팔미틸 (palmityl), 스테아릴 (stearyl), 아라키딜 (arachidyl), 베헨닐 (behenyl), 리그노세릴 (lignoceryl), 세로틸 (cerotyl), 미리스트올레일 (myristoleyl), 팔미트올레일 (palmitoleyl), 사피에닐 (sapienyl), 올레일 (oleyl), 리놀레일 (linoleyl),

아라키도닐 (arachidonyl), 에이코사펜타에닐 (eicosapentaenyl), 에루실 (erucyl), 도코사헥사에닐 (docosahexaenyl), 및 세로틸 (cerotyl)로 이루어진 군에서 선택된 것인, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 11】

제1항에 있어서,
상기 양이온성 고분자는 키토산(chitosan), 글라이콜 키토산(glycol chitosan), 프로타민(protamine), 폴리 라이신 (polylysine), 폴리 아르기닌 (polyarginine), 폴리아미도아민 (PAMAM), 폴리에틸렌이민 (polyethylenimine), 덱스트란(dextran), 히알루론산(hyaluronic acid), 알부민(albumin), 고분자폴리에틸렌이민(PEI), 폴리아민 및 폴리비닐아민으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 12】

제5항에 있어서,
상기 음이온성 약물(P)과 양이온성 지질(N)의 전하량의 비율(N/P)은 0.1 내지 128인 것을 특징으로 하는 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 13】

제1항에 있어서,
상기 양친성 블록 공중합체는 친수성 A 블록과 소수성 B 블록으로 구성되는 A-B 형 이중 블록 공중합체이며, 상기 친수성 A 블록은 폴리알킬렌글리콜, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아미드 및 그 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이며, 상기 소수성 B 블록은 폴리에스테르, 폴리엔하이드라이드, 폴리아미노산, 폴리오르소에스테르 및 폴리포스파진으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 14】

제13항에 있어서,
상기 소수성 B 블록의 말단 히드록시기는 콜레스테롤, 토크페롤, 및 탄소수 10 내지 24개의 지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상으로 수식된 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 15】

제14항에 있어서,
상기 친수성 A 블록의 수평균 분자량은 200 내지 50,000달톤이고, 친수성 B 블록의 수평균 분자량은 50 내지 50,000달톤인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 16】

제5항에 있어서,
상기 양친성 블록 공중합체의 중량(b) 대비 음이온성 약물 및 양이온성 지질 복합체의 중량(a) 비율($a/b \times 100$)은, 0.001 내지 100 중량%인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 17】

제1항에 있어서,
상기 폴리락트산염은 화학식 1 또는 화학식 2로 나타내어지는 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 18】

제1항에 있어서, 상기 폴리락트산염의 수평균 분자량이 500 내지 50,000달톤인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 19】

제13항에 있어서,
음이온성 약물 1 중량부 대비 양친성 블록 공중합체를 10 내지 1,000 중량부 및 폴리락트산염을 5 내지 500 중량부로 함유하는 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 20】

제1항에 있어서, 미셀의 표면 전하가 -20 내지 20 mV인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 21】

제1항에 있어서, 입자 크기가 10 내지 200 nm인 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 22】

제1항에 있어서, 동결건조 보조제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 23】

제1항에 있어서, 융합성 지질(fusogenic lipid)을 추가로 포함하는, 음이온성 약물 전달용 조성물.

【청구항 24】

제23항에 있어서, 상기 융합성 지질은 디라우로일 포스파티딜에탄올아민(dilauroyl phosphatidylethanolamine), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민(dimyristoyl phosphatidylethanolamine), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민(dipalmitoyl phosphatidylethanolamine), 디스테아로일 포스파티딜에탄올아민(distearoyl phosphatidylethanolamine), 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(dioleoyl phosphatidylethanolamine), 디리놀레오일 포스파티딜에탄올아민(dilinoleoyl phosphatidylethanolamine), 1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딜에탄올아민(1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylethanolamine), 1,2-디피타노일-3-sn-포스파티딜에탄올아민(1,2-diphytanoyl-3-sn-phosphatidylethanolamine), 디라우로일 포스파티딜콜린(dilauroyl phosphatidylcholine), 디미리스토일 포스파티딜콜린(dimyristoyl phosphatidylcholine), 디팔미토일 포스파티딜콜린(dipalmitoyl phosphatidylcholine), 디스테아로일 포스파티딜콜린(distearoyl phosphatidylcholine), 디올레오일 포스파티딜콜린(dioleoyl phosphatidylcholine), 디리놀레오일 포스파티딜콜린(dilinoleoyl phosphatidylcholine), 1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딜콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine), 1,2-디피타노일-3-sn-포스파티딜콜린(1,2-diphytanoyl-3-sn-phosphatidylcholine), 디라우로일 포스파티딘산(dilauroyl phosphatidic acid), 디미리스토일 포스파티딘산(dimyristoyl phosphatidic acid), 디팔미토일 포스파티딘산(dipalmitoyl phosphatidic acid), 디스테아로일 포스파티딘산(distearoyl phosphatidic acid), 디올레오일 포스파티딘산(dioleoyl phosphatidic acid), 디리놀레오일 포스파티딘산(dilinoleoyl phosphatidic acid), 1-팔미토일-2-올레오일 포스파티딘산(1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidic acid), 1,2-디피타노일-3-sn-포스파티딘산(1,2-diphytanoyl-3-sn-phosphatidic acid), 콜레스테롤, 및 토코페롤로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 음이온성

약물 전달용 조성물.

【청구항 25】

(a) 음이온성 약물, 양이온성 화합물, 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염을 수혼화성 유기용매, 또는 수용액 및 유기용매의 혼합 용매에 용해시키는 공정;

(b) 상기 (a) 공정의 유기용매층을 제거하는 공정;

(c) 상기 (b) 공정의 유기용매가 제거된 혼합물에 수용액을 첨가하여 미셀화하는 공정을 포함하는,

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 음이온성 약물 전달용 조성물의 제조방법.

【청구항 26】

유효성분으로서 음이온성 약물;

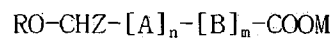
양이온성 화합물;

양친성 블록 공중합체; 및

하기 화학식 1 내지 6의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 폴리락트산염을 포함하며,

상기 음이온성 약물은 상기 양이온성 화합물과 정전기적 상호작용에 의해 복합체를 형성하고, 상기 복합체는 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염이 형성하는 미셀 구조 내부에 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물의 음이온성 약물 전달을 위한 용도:

[화학식 1]



상기 식 1에서, A는 -COO-CHZ-이고; B는 -COO-CHY-, -COO-

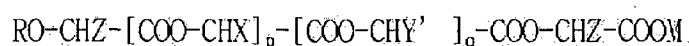
CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- 또는 -COO-CH₂CH₂OCH₂이며; R은 수소원자, 또는 아세틸,

벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸, 또는 에틸기이고; Z와 Y는 각각 수소원자, 또는

메틸 또는 페닐기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; n은 1 내지 30의 정수이며; m은 0

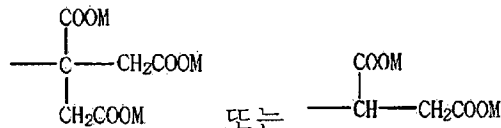
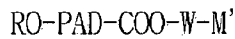
내지 20의 정수이다.

[화학식 2]



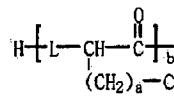
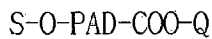
상기 식 2에서, X는 메틸기이고; Y'는 수소원자 또는 페닐기이며; p는 0 내지 25의 정수이고, q는 0 내지 25의 정수이되, 단 p+q는 5 내지 25의 정수이고; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; Z는 수소 원자, 메틸 또는 페닐기이다.

[화학식 3]



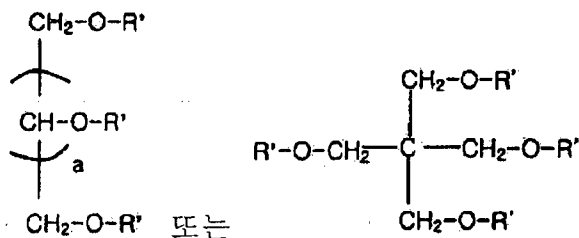
상기 식 3에서, W-M'는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이고; M은 독립적으로 Na, K, 또는 Li이다.

[화학식 4]



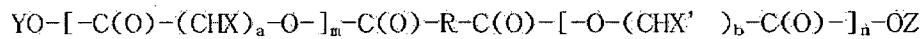
상기 식 4에서, S는 (CH₂)_a-COOM 이고; L은 -NR₁- 또는 -O-이며, 여기서 R₁은 수소원자 또는 C₁₋₁₀알킬이고; Q는 CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₂CH₃, 또는 CH₂C₆H₅이고; a는 0 내지 4의 정수이며; b는 1 내지 10의 정수이고; M은 Na, K, 또는 Li이며; PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이다.

[화학식 5]



상기 식 5에서, R'는 -PAD-O-C(O)-CH₂CH₂-C(O)-OM이고, 여기서 PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이고, M은 Na, K, 또는 Li이며; a는 1 내지 4의 정수이다.

[화학식 6]



상기 식 6에서, X 및 X'은 독립적으로 수소, 탄소수가 1~10인 알킬 또는 탄소수가 6~20인 아릴이고; Y 및 Z는 독립적으로 Na, K, 또는 Li이며; m 및 n은 독립적으로 0 내지 95의 정수이되, 5 < m + n < 100이고; a 및 b는 독립적으로 1 내지 6의 정수이며; R은 -(CH₂)_k-, 탄소수가 2~10인 2가 알케닐(divalent alkenyl), 탄소수가 6~20인 2가 아릴(divalent aryl) 또는 이들의 조합이고, 여기서 k는 0 내지 10의 정수이다.

【청구항 27】

유효성분으로서 음이온성 약물;

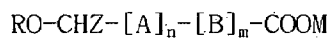
양이온성 화합물;

양친성 블록 공중합체; 및

하기 화학식 1 내지 6의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 폴리락트산염을 포함하며,

상기 음이온성 약물은 상기 양이온성 화합물과 정전기적 상호작용에 의해 복합체를 형성하고, 상기 복합체는 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산염이 형성하는 미셀 구조 내부에 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물을, 음이온성 약물의 전달을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 음이온성 약물의 전달 방법;

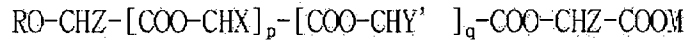
[화학식 1]



상기 식 1에서, A는 -COO-CHZ-이고; B는 -COO-CHY-, -COO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- 또는 -COO-CH₂CH₂OCH₂이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸, 또는 에틸기이고; Z와 Y는 각각 수소원자, 또는

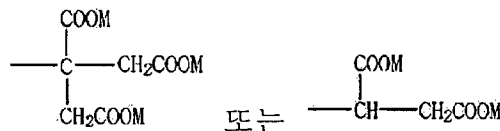
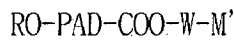
메틸 또는 페닐기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; n은 1 내지 30의 정수이며; m은 0 내지 20의 정수이다.

[화학식 2]



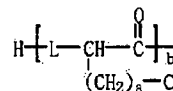
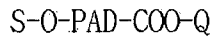
상기 식 2에서, X는 메틸기이고; Y'는 수소원자 또는 페닐기이며; p는 0 내지 25의 정수이고, q는 0 내지 25의 정수이되, 단 p+q는 5 내지 25의 정수이고; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이며; M은 Na, K, 또는 Li이고; Z는 수소 원자, 메틸 또는 페닐기이다.

[화학식 3]



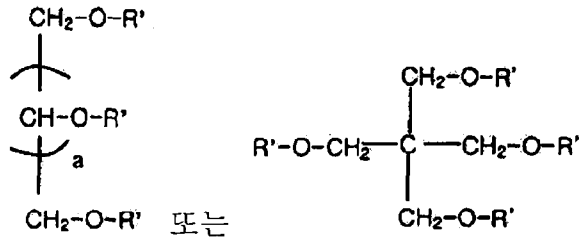
상기 식 3에서, W-M'는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이며; R은 수소원자, 또는 아세틸, 벤조일, 데카노일, 팔미토일, 메틸 또는 에틸기이고; M은 독립적으로 Na, K, 또는 Li이다.

[화학식 4]



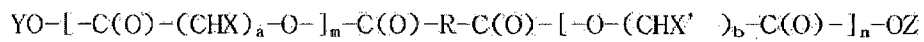
상기 식 4에서, S는 R₁은 수소원자 또는 C₁₋₁₀알킬이고; Q는 CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₂CH₃, 또는 CH₂C₆H₅이고; a는 0 내지 4의 정수이며; b는 1 내지 10의 정수이고; M은 Na, K, 또는 Li이며; PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이다.

[화학식 5]



상기 식 5에서, R'는 -PAD-O-C(O)-CH₂CH₂-C(O)-OM이고, 여기서 PAD는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델릭산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체, D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것이고, M은 Na, K, 또는 Li이며; a는 1 내지 4의 정수이다.

[화학식 6]

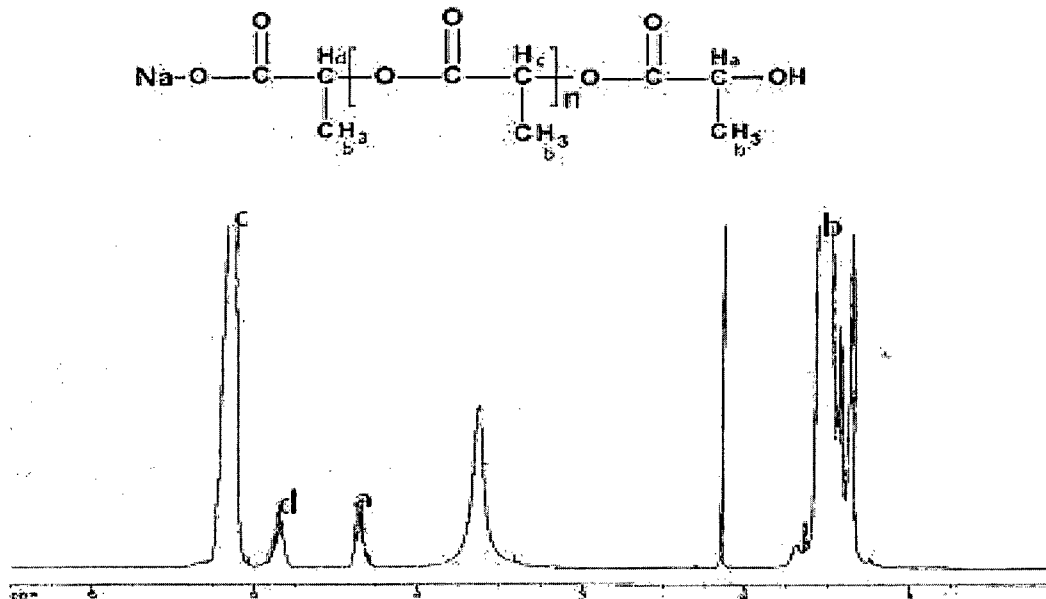


상기 식 6에서, X 및 X'은 독립적으로 수소, 탄소수가 1~10인 알킬 또는 탄소수가 6~20인 아릴이고; Y 및 Z는 독립적으로 Na, K, 또는 Li이며; m 및 n은 독립적으로 0 내지 95의 정수이되, 5 < m+n < 100이고; a 및 b는 독립적으로 1 내지 6의 정수이며; R은 -(CH₂)_k-, 탄소수가 2~10인 2가 알케닐(divalent alkenyl), 탄소수가 6~20인 2가 아릴(divalent aryl) 또는 이들의 조합이고, 여기서 k는 0 내지 10의 정수이다.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



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.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 27 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and to a diagnostic method, and thus pertains 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

International application No.

PCT/KR2016/010269**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 9/107(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/34(2006.01)i, A61K 48/00(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 9/107; A61K 47/44; A61K 9/127; A61K 39/00; A61K 47/48; A61K 47/34; A61K 48/00

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), STN(Registry, Caplus), Google & Keywords: anionic drug, cationic compound, block copolymer, polylactic acid salt, complex, micelle structure, drug delivery

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0077818 A (SAMYANG CORPORATION) 07 July 2011 See abstract; claims 1-22; paragraphs [0006], [0037], [0049], [0052], [0088]-[0090], [0094].	1-26
Y	KR 10-2010-0076863 A (SAMYANG CORPORATION) 06 July 2010 See abstract; paragraphs [0009], [0011]-[0015], [0030]-[0068].	1-26
Y	KR 10-2012-0078661 A (SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS CORPORATION) 10 July 2012 See abstract; claims 1-5; paragraph [0021].	7-10
A	WO 03-059382 A2 (SUPRATEK PHARMA. INC.) 24 July 2003 See the entire document.	1-26
A	WO 2014-169007 A2 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION INC.) 16 October 2014 See abstract; claims 1-29.	1-26

 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

"I" 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

21 DECEMBER 2016 (21.12.2016)

Date of mailing of the international search report

21 DECEMBER 2016 (21.12.2016)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/010269

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0077818 A	07/07/2011	KR 10-1296326 B1	14/08/2013
KR 10-2010-0076863 A	06/07/2010	AU 2009-331027 A1	01/07/2010
		AU 2009-331027 B2	13/12/2012
		CA 2746985 A1	01/07/2010
		CA 2746985 C	22/04/2014
		CN 102264350 A	30/11/2011
		EP 2376062 A1	19/10/2011
		JP 2012-513985 A	21/06/2012
		JP 5390634 B2	15/01/2014
		KR 10-1308591 B1	13/09/2013
		US 2011-0257253 A1	20/10/2011
		WO 2010-074380 A1	01/07/2010
KR 10-2012-0078661 A	10/07/2012	CA 2823182 A1	05/07/2012
		CA 2823182 C	23/02/2016
		CN 103476431 A	25/12/2013
		CN 103476431 B	26/08/2015
		EP 2658577 A2	06/11/2013
		JP 05836394 B2	24/12/2015
		JP 2014-502615 A	03/02/2014
		US 2013-0266641 A1	10/10/2013
		US 9220779 B2	29/12/2015
		WO 2012-091523 A2	05/07/2012
		WO 2012-091523 A3	06/12/2012
WO 03-059382 A2	24/07/2003	CA 2472170 A1	24/07/2003
		EP 1463518 A2	06/10/2004
		JP 2005-519063 A	30/06/2005
		US 2003-0191081 A1	09/10/2003
		WO 03-059382 A3	27/11/2003
WO 2014-169007 A2	16/10/2014	EP 2983648 A2	17/02/2016
		EP 2983648 A4	12/10/2016
		JP 2016-526011 A	01/09/2016
		US 2016-0045445 A1	18/02/2016
		WO 2014-169007 A3	08/01/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 9/107(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/34(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i

B. 조사된 분야
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
 A61K 9/107; A61K 47/44; A61K 9/127; A61K 39/00; A61K 47/48; A61K 47/34; A61K 48/00

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), STN(Registry, Caplus), Google & 키워드: 음이온성 약물, 양이온성 화합물, 양친성 블록 공중합체, 폴리락트산 염, 복합체, 미셀 구조, 약물 전달


C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0077818 A (주식회사 삼양사) 2011.07.07 요약; 청구항 1-22; 단락 [0006], [0037], [0049], [0052], [0088]-[0090], [0094] 참조.	1-26
Y	KR 10-2010-0076863 A (주식회사 삼양사) 2010.07.06 요약; 단락 [0009], [0011]-[0015], [0030]-[0068] 참조.	1-26
Y	KR 10-2012-0078661 A (주식회사 삼양바이오팜) 2012.07.10 요약; 청구항 1-5; 단락 [0021] 참조.	7-10
A	WO 03-059382 A2 (SUPRATEK PHARMA INC.) 2003.07.24 전체 문헌 참조.	1-26
A	WO 2014-169007 A2 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION INC.) 2014.10.16 요약; 청구항 1-29 참조.	1-26

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
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2016년 12월 21일 (21.12.2016)	국제조사보고서 발송일 2016년 12월 21일 (21.12.2016)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 박정민 전화번호 +82-42-481-3516
---	------------------------------------

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: 27
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 제27항은 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 10-2011-0077818 A	2011/07/07	KR 10-1296326 B1	2013/08/14
KR 10-2010-0076863 A	2010/07/06	AU 2009-331027 A1	2010/07/01
		AU 2009-331027 B2	2012/12/13
		CA 2746985 A1	2010/07/01
		CA 2746985 C	2014/04/22
		CN 102264350 A	2011/11/30
		EP 2376062 A1	2011/10/19
		JP 2012-513985 A	2012/06/21
		JP 5390634 B2	2014/01/15
		KR 10-1308591 B1	2013/09/13
		US 2011-0257253 A1	2011/10/20
		WO 2010-074380 A1	2010/07/01
KR 10-2012-0078661 A	2012/07/10	CA 2823182 A1	2012/07/05
		CA 2823182 C	2016/02/23
		CN 103476431 A	2013/12/25
		CN 103476431 B	2015/08/26
		EP 2658577 A2	2013/11/06
		JP 05836394 B2	2015/12/24
		JP 2014-502615 A	2014/02/03
		US 2013-0266641 A1	2013/10/10
		US 9220779 B2	2015/12/29
		WO 2012-091523 A2	2012/07/05
		WO 2012-091523 A3	2012/12/06
WO 03-059382 A2	2003/07/24	CA 2472170 A1	2003/07/24
		EP 1463518 A2	2004/10/06
		JP 2005-519063 A	2005/06/30
		US 2003-0191081 A1	2003/10/09
		WO 03-059382 A3	2003/11/27
WO 2014-169007 A2	2014/10/16	EP 2983648 A2	2016/02/17
		EP 2983648 A4	2016/10/12
		JP 2016-526011 A	2016/09/01
		US 2016-0045445 A1	2016/02/18
		WO 2014-169007 A3	2015/01/08