



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0079518  
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0133729

(22) 출원일자 2010년12월23일

심사청구일자 2010년12월23일

(30) 우선권주장

1020090134617 2009년12월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 삼양사

서울 중로구 연지동 263번지

(72) 발명자

강혜원

경기도 남양주시 오남읍 양지리 대림e-APT- 102동 702호

서민호

대전광역시 서구 둔산동 국화아파트 204동 707호  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이은선, 최규팔

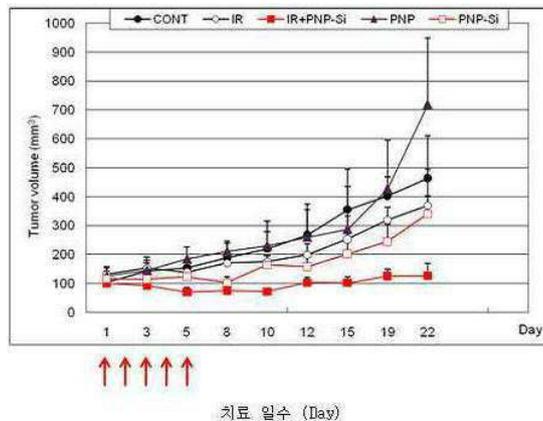
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 향상된 수용해도를 갖는 라파마이신 함유 고분자나노입자 주사제형 조성물 및 그 제조방법, 및 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물

(57) 요약

본 발명은 향상된 수용해도를 갖는 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물, 보다 상세하게는 수용해도가 낮은 라파마이신을 고분자 나노입자로 가용화하여 수용해도를 향상시킨 라파마이신 함유 주사제형 조성물 및 그 제조방법, 및 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

**이사원**

대전광역시 유성구 지족동 열매마을5단지  
502-1001호

**김봉오**

대전광역시 동구 대2동 125-11

**최은경**

서울시 송파구 아산병원길 86 서울아산병원 방사선  
종양학과

**정성윤**

서울특별시 송파구 아산병원길 86 혁신형암연구중  
심병원사업단

**우하나**

서울특별시 송파구 아산병원길 86 아산생명과학연  
구소

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (i) 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체,
- (ii) 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염, 및
- (iii) 활성성분으로서 라파마이신을 포함하며,

여기에서 상기 A-B형 이중블록 공중합체와 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염이 형성하는 미셀의 내부에 라파마이신이 봉입되는 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이중블록 공중합체의 친수성 블록(A)의 수평균분자량이 500 내지 20,000 달톤이고, 소수성 블록(B)의 수평균분자량이 500 내지 10,000 달톤이며, 이중블록 공중합체 내의 친수성 블록(A)의 함량이 이중블록 공중합체 전체 100중량%를 기준으로 40 내지 70중량%인 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 친수성 블록(A)이 폴리에틸렌 글리콜 또는 메톡시 폴리에틸렌 글리콜이고, 소수성 블록(B)가 폴리락트산, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리만델릭산, 폴리카프로락톤, 폴리디옥산-2-온, 폴리아미노산, 폴리오르소에스터, 폴리엔하이드라이드 및 그들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물

### 청구항 4

제1항에 있어서, 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체가 폴리락트산, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리만델릭산, 폴리카프로락톤, 폴리엔하이드라이드 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이며, 그 수평균 분자량이 500 내지 2,500 달톤인 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물.

### 청구항 5

제1항에서, 상기 알칼리 금속이 나트륨, 칼륨 및 리튬으로 구성된 군으로부터 하나 이상 선택되는 일가 금속인 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 2가 또는 3가의 금속이온을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 라파마이신 고분자 나노입자 주사제형 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 2가 또는 3가의 금속이온이 칼슘, 마그네슘, 바륨, 크롬, 철, 망간, 니켈, 구리, 아연 및 알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 금속의 2가 또는 3가 양이온인 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물.

### 청구항 8

제1항에 있어서, A-B형 이중블록 공중합체와 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염의 중량비가 9:1~3:7인 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 라파마이신의 농도가 0.1 ~ 25mg/ml로 재건하는 것을 특징으로 하는 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물.

**청구항 10**

(a) (i) 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체,  
 (ii) 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염 및 (iii) 활성 성분으로서 라파마이신을 유기용매에 가용화시키는 단계;  
 (b) 상기 (a)단계의 결과물로부터 유기용매를 제거하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 결과물에 수성 매질을 가하는 단계를 포함하는,  
 라파마이신 함유 고분자 나노 입자 주사제형 조성물의 제조방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 (c) 단계 이후에, 그 결과물에 2가 또는 3가 금속이온을 첨가하는 (c-1)단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물의 제조방법.

**청구항 12**

(i) 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체,  
 (ii) 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염 및  
 (iii) 활성성분으로서 라파마이신을 포함하며,  
 여기에서 상기 A-B형 이중블록 공중합체와 상기 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염이 형성하는 나노입자의 내부에 라파마이신이 봉입되는, 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 2가 또는 3가의 금속이온을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물.

**청구항 14**

제12항에 있어서, 방사선 조사 1분전 내지 7일전에 투여되는 것을 특징으로 하는, 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물.

**청구항 15**

제12항에 있어서, 화학요법과 방사선요법을 4주 내지 12주간에 걸쳐 주1회 내지 주5회 병행 실시하는 병용요법에 사용되는 것을 특징으로 하는, 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 향상된 수용해도를 갖는 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물, 보다 상세하게는 수용해도가 낮은 라파마이신을 고분자 나노입자로 가용화하여 수용해도를 향상시킨 라파마이신 함유 주사제형 조성물 및 그 제조방법, 및 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 라파마이신(분자식: C<sub>51</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>13</sub>, 분자량: 914.2)은 실로리무스(sirolimus)로도 알려져 있는 마크로라이드 락톤계 화합물로서, 면역억제 활성을 갖고 있어 장기이식환자의 이식거부 억제제(Rapamune)로 상품화되어 있다. 또한 라파마이신은 장기이식 거부억제 외에도, 폐렴(pulmonary inflammation), 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosis), 건선 등의 면역염증 피부질환(immunoinflammatory skin disorders), 면역염증 장질환(immunoinflammatory bowel disorders), 안 염증(ocular inflammation), 재협착(restenosis), 류마티스 관절염

(rheumatoid arthritis) 등의 치료에도 사용할 수 있다.

- [0003] 최근 라파마이신이 면역억제제 기능뿐만 아니라 포유동물의 라파마이신 타겟(mTOR: mammalian target of rapamycin)의 억제제로서 세포예정사(apoptosis)를 유도하여 암세포를 파괴하는 항암제 기능이 있음을 보여주는 보고가 있다. 그러나, 라파마이신은 물에 대한 용해도가 매우 낮아서(1~2 ug/ml) 경구 투여 시 흡수율이 매우 낮고, 개체간 생체 이용율의 변화가 매우 심한 단점이 있다.
- [0004] 라파마이신을 포함하는 제형으로 Rapamune 정제가 소개되어 있다. 상기 정제는, 수크로스, 락토스, 폴리에틸렌 글리콜 8000, 황산칼슘, 미세결정질 셀룰로스, 포비돈(Povidone), 폴록사머 188, 글리세릴 모노올리레이트 등의 부형제를 포함하고 있다. 또한 Rapamune 경구 용액제에는 Phosal 50 PG (포스파티틸콜린, 프로필렌글리콜, 모노-글리세라이드, 디-글리세라이드, 에탄올, 대두 지방산, 아스코빌 팔미테이트)과 폴리소르베이트 80이 포함되어 있으며, 1.5 ~ 2.5%의 에탄올을 포함하고 있다.
- [0005] 그러나, 상기 Rapamune 경구 용액제를 사람에게 경구투여 했을 때 생체이용율(absolute bioavailability)은 약 14 % 정도이고, Rapamune 정제를 경구투여 했을 때는 Rapamune 용액제를 경구투여 했을 때 보다 상대적으로 약 25 % 높은 생체 이용율을 보인다. 그러나 두 제제의 생체 이용율이 모두 20 % 이하로 낮은데, 이는 라파마이신의 물에 대한 낮은 용해도에 기인한다.
- [0006] 따라서, 라파마이신을 다양한 가용화 기술을 이용하여 제제화하기 위한 여러 시도가 있어 왔다. 미국특허 5,559,121에는 계면활성제 폴리소르베이트 80, N,N-디메틸아세트아미드 및 레시틴 또는 포스포리피드 중의 하나를 포함하는 혼합용액에 라파마이신이 녹아 있는 용액을 함유하는 캡슐제제 조성물이 공지되어 있으며, 미국특허 5,616,588에는 라파마이신이 프로필렌글리콜 수용액에 0.1 ~ 4 mg/ml 농도로 녹아 있으며, 비이온성 계면활성제를 함유하지 않는 주사용 수용액 조성물이 공지되어 있다. 그러나, 기존의 라파마이신 주사용 수용액의 경우는 수용액의 안정성이 떨어져 빠른 시간 안에 투여가 이루어져야만 하는 단점이 있다. 현재로서는 상업적으로 시판되고 있는 주사제형은 없다.
- [0007] 한편 한국특허 0160957호에는 포유류의 기관 또는 조직의 이식거부를 억제하는데 유효한 양으로 라파마이신을 함유하는, 기관 또는 조직이식거부 억제용 조성물이 공지되어 있다. 그러나 이 특허는 라파마이신을 올리브오일과 같은 오일, 알코올, 프로필렌글리콜 및 폴리에틸렌글리콜 및 크레모포아 EL 및 폴리소르베이트 80 같은 계면활성제와 함께 사용하는 경우를 공지하고 있다.
- [0008] 한편 미국특허 6,322,805 와 6,616,941에는 난용성 약물을 가용화할 수 있는 기술로서 친수성 블록으로 폴리에틸렌글리콜(A)과 소수성 블록으로 폴리락타이드(B)가 A-B형태의 이중블록으로 결합된 양친성 블록 공중합체를 이용한 고분자 미셀이 공지되어 있다. 그러나 상기 고분자 미셀로 라파마이신을 가용화시킨 구체적인 예시는 제시하지 못하고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명은 상기한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하고자 한 것으로서, 유기용매를 포함하지 않고, 생체적합성이 우수하며, 생분해성인 고분자만을 사용하여 정맥주사, 피하/근육주사가 가능한 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물, 그 제조방법 및 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물을 제공하는 것을 기술적 과제로 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 상기한 기술적 과제를 해결하고자 본 발명은, (i) 친수성블록(A)과 소수성블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체, (ii) 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염 및 (iii) 활성성분으로서 라파마이신을 포함하며, 여기에서 상기 A-B형 이중블록 공중합체와 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염이 형성하는 미셀의 내부에 라파마이신이 봉입되는 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) (i) 친수성블록(A)과 소수성블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체, (ii) 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염 및 (iii) 활성성분으로서 라파마이신을 유기용매에 가용화 시키는 단계; (b) 상기 (a)단계의 결과물로부터 유기용매를 제거하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 결과물에 수성 매질을 가하는 단계를 포함하는, 라파마이신 함유 고분자 나노

입자 주사제형 조성물의 제조방법이 제공된다.

[0012] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, (i) 친수성블록(A)과 소수성블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체, (ii) 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염 및 (iii) 활성 성분으로서 라파마이신을 포함하며, 여기에서 상기 A-B형 이중블록 공중합체와 상기 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염이 형성하는 나노입자의 내부에 라파마이신이 봉입되는, 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물이 제공된다.

**발명의 효과**

[0013] 상기 주사제형 조성물은 건조 후 수용액에 재건시 라파마이신의 용해도가 0.1 mg/ml 이상인 주사액을 제공할 수 있다. 본 발명에 따르면, 라파마이신의 용해도가 0.1 mg/ml 이상 가능하며, 유기용매를 포함하지 않고, 생체적 합성이 우수하며, 생분해성인 고분자만을 사용하여 정맥주사, 피하/근육주사가 가능한 라파마이신 주사제 조성물을 얻을 수 있으며, 본 발명의 조성물을 방사선 요법과 병용하여 투여 시 항암효능을 현저하게 높여주는 효과도 기대할 수 있다.

[0014] 본 발명의 라파마이신 함유 주사제형 조성물은 상승작용에 의해 방사선 조사 효과를 극대화시킬 수 있으므로 방사선 치료시 유발되는 독성을 감소시킬 수 있다. 또한 라파마이신은 방사선 민감효과뿐만 아니라 면역억제작용 등 강력한 약리활성을 가지는 약물로 부작용도 심한 약물 중에 하나이고, 또한 물에 녹지 않기 때문에 가용화제를 사용하여 제제화해야 하는데 현재 주사제에 사용 중인 가용화제는 계면활성제로 대부분 과민반응과 같은 독성을 가지고 있지만, 본 발명의 라파마이신 함유 주사제형 조성물은 가용화제의 독성을 유발하지 않을 뿐 아니라 라파마이신의 용량을 최소화하여 부작용을 줄이면서 최대의 방사선 민감효과를 발휘할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0015] 도 1은 제조예 1에 따른 D,L-PLA-COONa의 NMR 스펙트럼이다.
- 도 2는 제조예 2에 따른 mPEG-PLA의 NMR 스펙트럼이다.
- 도 3은 실험예 1에서 얻은, 라파마이신 함유 고분자 나노입자의 체내동태 평가를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 실험예 2에서 얻은 라파마이신 함유 고분자 나노입자 조성물의 방사선 민감효과실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 실험예 3에서 얻은 라파마이신 함유 고분자 나노입자의 시험관 내 항암활성실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 실험예 4에서 얻은 라파마이신 함유 고분자 나노입자의 체내동태 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 실험예 5에서 얻은 라파마이신 함유 고분자 나노입자의 동물모델에서의 항암효능실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 실험예 6에서 얻은 라파마이신 함유 고분자 나노입자의 동물모델에서의 방사선 민감효과 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0016] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [0017] 본 발명에 있어서 용어 "라파마이신" 은 라파마이신, 그의 유도체 또는 유사체 및 이들의 제약상 허용되는 염을 모두 포함한다. 라파마이신의 유도체 또는 유사체에는 구체적으로, 벤조일 라파마이신, 에버로리무스, 템시로리무스, 피메트로리무스, 비올리무스 등이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 용어 "나노입자" 는 입경이 나노미터 수준의 입자를 총칭하는 개념으로 미셀, 혼합미셀, 나노캡슐 또는 나노스피어 등을 포함하며, 그 크기 수준은, 이로써 제한되는 것은 아니나, 예컨대 1 내지 500nm의 입경일 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서 상기 양친성 이중블록 공중합체 (i)은, 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체이며, 상기 친수성 블록(A)은 폴리에틸렌 글리콜이고, 상기 소수성 블록(B)은 폴리락트산 또는 그 유도체일 수 있다.

[0019] 상기 친수성 블록(A)의 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜, 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 등일 수 있으나, 이

에 한정되지는 않으며, 구체적으로는 메톡시 폴리에틸렌 글리콜이다. 상기 친수성 블록(A)의 수평균 분자량은 바람직하게는 500 내지 20,000달톤이고, 보다 바람직하게는 1,000 내지 10,000달톤, 보다 더 바람직하게는 1,000 내지 5,000달톤이다. 친수성 블록(A)의 수평균 분자량이 500달톤 미만이면 소수성 부분에 비해 친수성 부분이 작아서 본 발명 조성물이 물에 용해되지 않을 수 있고, 20,000달톤을 초과하면 친수성 부분이 너무 커서 미셀 형성이 어렵다. 또한 상기 양친성 이중블록 공중합체 내의 친수성 블록(A)의 함량은, 이중블록 공중합체 전체 100중량%를 기준으로 바람직하게는 40 내지 70중량%, 보다 바람직하게는 50 내지 65중량%인 것이, 안정적으로 양친성 이중블록 공중합체의 미셀을 유지할 수 있다는 측면에서 유리하다.

[0020] 상기 소수성 블록(B)의 폴리락트산 또는 그 유도체는, 예를 들어, 폴리락트산, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리만델릭산, 폴리카프로락톤, 폴리디옥산-2-온, 폴리아미노산, 폴리오르소에스터, 폴리엔하이드라이드 및 그들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 보다 구체적으로는 폴리락트산, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리만델릭산, 폴리카프로락톤 또는 폴리디옥산-2-온일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 소수성 블록(B)의 폴리락트산 또는 그 유도체는 폴리락트산, 폴리락타이드, 폴리카프로락톤, 락트산과 만델릭산의 공중합체, 락트산과 글리콜산의 공중합체, 락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 소수성 블록(B)의 수평균 분자량은 바람직하게는 500 내지 10,000달톤, 보다 바람직하게는 500 내지 5,000달톤이다. 소수성 블록(B)의 수평균 분자량이 500달톤 미만이면 친수성 부분이 커서 미셀 형성이 되지 않는 문제가 있을 수 있고, 10,000달톤을 초과하면 소수성 부분이 커져서 조성물이 물에 가용화 되지 않는 문제가 있을 수 있다. 또한 상기 양친성 이중블록 공중합체 내의 소수성 블록(B)의 함량은, 이중블록 공중합체 전체 100중량%를 기준으로 바람직하게는 30 내지 60중량%, 보다 바람직하게는 35 내지 50중량%인 것이, 안정적으로 양친성 이중블록 공중합체의 미셀을 유지할 수 있다는 측면에서 유리하다.

[0021] 본 발명에 있어서 상기 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염은, 약물이 함유된 미셀의 코어 내부를 단단하게 하여 약물의 봉입 효율을 향상시키는 역할을 하게 된다.

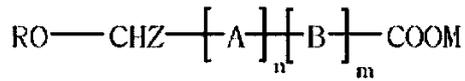
[0022] 상기 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체로는 폴리락트산, 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리만델릭산, 폴리카프로락톤, 폴리엔하이드라이드 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 폴리락트산 또는 그 유도체는 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤 또는 이들의 공중합체이다. 본 발명의 바람직한 일 구체예에 따르면, 상기 폴리락트산 또는 그 유도체는 폴리락트산, 락트산과 만델릭산의 공중합체, 락트산과 글리콜산의 공중합체 및 락트산과 카프로락톤의 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염이란, 상기한 바와 같은 폴리락트산 또는 그 유도체의 말단 카르복시산 음이온과 알칼리 금속이온이 이온결합으로 결합된 형태를 의미한다. 상기 알칼리 금속은 바람직하게는 나트륨, 칼륨 및 리튬으로 구성된 군으로부터 하나 이상 선택되는 일가 금속이며, 보다 바람직하게는 나트륨이다.

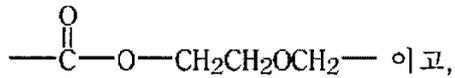
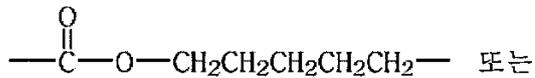
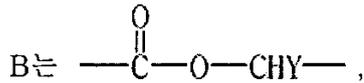
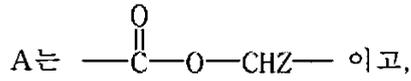
[0024] 한편 상기 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염에 있어서, 알칼리 금속이온과 이온결합한 카르복시기의 반대편 말단은, 히드록시, 아세톡시, 벤조일옥시, 데카노일옥시, 팔미토일옥시 및 알콕시로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나로 치환될 수 있다.

[0025] 구체적으로, 본 발명의 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 알칼리 금속염은 화학식 1로 나타낼 수 있다.

화학식 1



(상기 식에서,



[0026]

[0027] R은 수소, 아세틸기, 벤조일기, 데카노일기, 팔미토일기, 메틸기 또는 에틸기이며,

[0028] Z 및 Y는 수소, 메틸기 또는 페닐기이며,

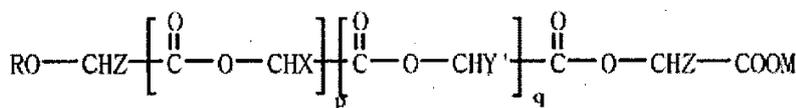
[0029] M은 나트륨, 칼륨 또는 리튬이며,

[0030] n은 1~30의 정수이며,

[0031] m은 0~20의 정수이다.)

[0032] 더욱 구체적으로는, 상기 폴리락트산 또는 그 유도체의 염은 하기 화학식 2로 나타낼 수 있다.

화학식 2



[0033]

[0034] (상기 식에서,

[0035] R은 수소, 아세틸기, 벤조일기, 데카노일기, 팔미토일기, 메틸기 또는 에틸기이며,

[0036] X는 메틸기이며,

[0037] Y'는 수소 또는 페닐기이며,

[0038] Z는 수소, 메틸기 또는 페닐기이며

[0039] M은 나트륨, 칼륨 또는 리튬이며,

- [0040] p는 0~25의 정수이며,
- [0041] q는 0~25의 정수이며,
- [0042] 단, p+q는 5~25의 정수이다.)
- [0043] 상기 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염은 바람직하게는 20 mg/ml 이상의 수용해도를 나타내며, 수성 매질에 용해되면 그 분자 내에 존재하는 카르복시산 음이온의 친수성 부분 및 폴리락트산의 소수성 부분이 균형을 이루어 미셀 형성에 관여하게 된다. 따라서, 그 분자량이 너무 크면 소수성 부분이 커져서 친수성을 나타내는 말단의 카르복시산 음이온끼리의 회합이 어려워 미셀이 잘 형성되지 않을 수 있고, 반대로 그 분자량이 너무 작으면 물에 완전히 용해되어 미셀 형성 자체가 어려워진다. 본 발명의 바람직한 일 구체예에 따르면, 상기 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염의 수평균 분자량은 500 내지 2,500달톤, 구체적으로 1,000 내지 2,000달톤이다. 이 분자량이 500달톤 미만이면 물에 완전히 용해되어 미셀 형성 자체가 어려울 수 있고, 분자량이 2,500달톤을 초과하면 소수성이 커져서 수용액에서 용해가 어려워 미셀을 형성하지 못할 수도 있다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 일 구체예에 따르면, 본 발명의 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물은 라파마이신 0.1~10중량%, 바람직하게는 0.2~5중량%, 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체 40 ~ 90중량%, 바람직하게는 45 ~ 74중량%, 및 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염 10 ~ 50중량%, 바람직하게는 25 ~ 45중량%을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예에서, A-B형 이중블록 공중합체와 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염의 중량비는9:1~3:7, 보다 구체적으로는 5:1~1:2이다.
- [0046] 한편, 상기 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산 또는 유도체의 알칼리 금속염을 혼합하여 형성된 고분자 나노입자 조성물의 경우, 나노입자의 안정성을 더 향상시키기 위하여 2가 또는 3가의 금속이온이 추가로 첨가될 수 있다. 상기 2가 또는 3가 금속이온은 고분자 나노입자 내의 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염의 말단 1가 알칼리금속 양이온과 치환반응하여 폴리락트산 또는 유도체 말단의 카르복실기와 보다 강한 이온 결합을 형성한다
- [0047] 따라서, 본 발명의 일 구체예에 따르면, (i) 친수성블록(A)과 소수성블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체, (ii) 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하며, 이 카르복시 말단이 2가 또는 3가의 금속이온으로 고정된 폴리락트산 또는 그 유도체 및 (iii) 활성성분으로서 라파마이신을 포함하며, 여기에서 상기 A-B형 이중블록 공중합체와 상기 폴리락트산 또는 그 유도체가 형성하는 나노입자의 내부에 라파마이신이 봉입되는 것을 특징으로 하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물이 제공된다.
- [0048] 상기 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체로는 상기에서 설명한 바와 같은 것들을 사용할 수 있다.
- [0049] 상기 2가 또는 3가 금속이온에 의한 이온 결합은, 강한 결합력으로 인해 고분자 나노입자의 안정성을 더욱 향상시키는 역할을 한다. 상기 2가 또는 3가의 금속이온은, 바람직하게는 칼슘, 마그네슘, 바륨, 크롬, 철, 망간, 니켈, 구리, 아연 및 알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 금속의 2가 또는 3가 양이온이며, 보다 바람직하게는 칼슘 또는 마그네슘의 2가 양이온이다.
- [0050] 상기 2가 또는 3가 금속이온의 당량은 고분자 나노입자 내부에 봉입된 약물의 방출 속도에 따라 조절될 수 있다. 구체적으로는, 고분자 나노입자 조성물에서 폴리락트산 알칼리 금속염의 카르복시기의 당량에 대하여 상기 2가 또는 3가 금속이온이 1당량 미만으로 포함되면 폴리락트산염의 카르복시 말단기와 결합되는 수가 적어 약물의 방출 속도가 빨라지게 되며, 1당량을 초과하여 포함되면 폴리락트산염의 카르복시 말단기와 결합되는 수가 많아 약물의 방출 속도가 지연된다.
- [0051] 폴리락트산 또는 그 유도체의 카르복시기 말단이 2가 또는 3가 금속이온으로 고정된 경우, 본 발명의 조성물은 바람직하게는, 조성물의 전체 중량을 기준으로, 라파마이신 0.1 내지 10중량%, 보다 바람직하게는 0.2 내지 5중량%; 상기한 양친성 블록 공중합체 40 내지 90중량%, 보다 바람직하게는 45 내지 74중량%; 및 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체 10 내지 50중량%, 보다 바람직하게는 25 내지 45중량%에 더하여, 상기한 2가 또는 3가 금속이온을 상기 폴리락트산 또는 그 유도체의 말단 카르복시기 당량에 대하여 0.01 내지 10당량, 보다 바람직하게는 1 내지 2당량으로 포함한다. 양친성 블록 공중합체의 상대적 비율이 너무 크면 고분자 나노입자로서의 성질 보다는 미셀의 성질을 가지기 때문에 희석 시 안정성에 문제가 생기며, 폴리락트산 또는 그 유도체의 금속염의 상대적 비율이 너무 크면 2가 또는 3가 금속이온 첨가 시 폴리락트산 또는

그 유도체의 2가 또는 3가 금속염으로 침전되어 균일하게 분산된 나노입자 용액을 얻을 수 없다.

- [0052] 상기한 바와 같이 2가 또는 3가 금속이온을 사용하면 결과적으로, 양친성 블록 공중합체 및 카르복시 말단이 2가 또는 3가의 금속이온으로 고정된 폴리락트산 또는 그 유도체를 포함하는 나노입자 내부에 약물이 봉입된 조성물을 얻을 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 조성물은 동결건조 또는 분무 건조된 건조 형태일 수 있다. 즉, 상기한 성분들을 함유하는 수용액에서 미셀을 생성시킨 후 동결 건조, 분무 건조 등의 방법으로 건조하면 고체상의 고분자 나노입자 조성물을 얻을 수 있다. 동결건조 조성물의 경우, 동결 건조 보조제로서 다당류, 만니톨, 솔비톨, 락토스 등을 더 포함할 수 있다. 동결건조 보조제로는 바람직하게 만니톨, 솔비톨, 락토스, 트레할로스 및 슈크로스 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 만니톨 및 락토스를 사용한다.
- [0054] 본 발명의 조성물에 있어서 라파마이신은 상기 설명한 고분자의 소수성 블록 부분과 물리적으로 회합되어 수용액에서 상기 고분자가 형성하는 나노입자의 소수성 코어에 위치하게 되며, 이 때 라파마이신 함유 고분자 나노입자의 입자크기는 바람직하게는 10 ~ 150 nm 범위이다.
- [0055] 본 발명에 따른 건조형태의 조성물을 수성 매질에 재건(reconstitution)하면 라파마이신 농도가 0.1 mg/ml 이상, 예컨대 0.1 ~ 25 mg/ml, 보다 구체적으로는 0.2 ~ 10 mg/ml인 주사제형 조성물을 얻을 수 있다. 라파마이신 농도가 0.1 mg/ml 보다 낮으면 원하는 수준의 라파마이신 투약효과를 얻을 수 없고, 25 mg/ml보다 높으면 상온보다 낮은 온도에서 수용액의 점성이 높아 주사하기 어려움이 있다. 일실시예에서, 라파마이신의 농도가 0.1 ~ 25 mg/ml인 주사제형 조성물을 제공한다.
- [0056] 본 발명의 라파마이신 함유 고분자 미셀 주사제형 조성물은 상기한 성분들 이외에도 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 약제학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있다. 본 발명의 주사제형 조성물은 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여될 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 동결건조 형태의 조성물을 주사용 증류수, 5% 포도당 및 생리 식염수 등과 같은 수성 매질로 재건하여 혈관 주사하는 형태로 투여할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) (i) 친수성블록(A)과 소수성블록(B)으로 구성된 A-B형 이중블록 공중합체, (ii) 말단에 적어도 하나의 카르복시기를 포함하는 폴리락트산 또는 그 유도체의 알칼리 금속염 및 (iii) 활성 성분으로서 라파마이신을 유기용매에 가용화 시키는 단계; (b) 상기 (a)단계의 결과물로부터 유기용매를 제거하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 결과물에 수성 매질을 가하는 단계를 포함하는, 라파마이신 함유 고분자 나노입자 조성물의 제조방법이 제공된다.
- [0058] 상기 단계 (a)에서 유기용매로는 디클로로메탄, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 아세톤, 아세토니트릴, 1,2-프로필렌글리콜, N-메틸피롤리돈, N,N-디아세트아미드, 폴리에틸렌글리콜 또는 그 유도체(분자량 300 ~ 600 달톤) 및 글리세린으로 이루어지는 그룹에서 하나 이상 선택되는 것이 바람직하게 사용된다.
- [0059] 상기 단계 (b)에서 유기용매의 제거는 통상의 방법에 의해 수행될 수 있으며, 구체적으로는 진공 증발기를 사용하여 증발시킬 수 있다.
- [0060] 상기 (c)단계에서 수성 매질로는 증류수, 주사용수, 생리식염수 또는 동결건조 보조제 수용액이 사용가능하다.
- [0061] 본 발명의 라파마이신 함유 고분자나노입자 조성물의 제조방법은, 상기 (c) 단계 이후에, 그 결과물에 2가 또는 3가 금속이온을 첨가하여 폴리락트산 또는 그 유도체의 말단기를 더욱 고정시키는 (c-1)단계를 더 포함할 수 있다. 예컨대 상기(c) 단계에서 얻어진 고분자 미셀 수용액에 2가 또는 3가 금속이온을 포함한 수용액을 가하고, 실온에서 30분 이상 교반시킬 수 있다. 상기 2가 또는 3가 금속이온은 황산염, 염산염, 탄산염, 인산염 및 수화물의 형태로 첨가될 수 있으며, 구체적으로는 염화칼슘, 염화마그네슘, 염화아연, 염화알루미늄, 염화철, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 인산칼슘, 인산마그네슘, 인산알루미늄, 황산마그네슘, 수산화칼슘, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄 또는 수산화아연이 첨가될 수 있다.
- [0062] 또한 본 발명의 라파마이신 함유 고분자 나노입자 조성물의 제조방법은, 상기 (c) 또는 (c-1) 단계에서 얻어진 고분자 나노입자 조성물을 멸균하는 단계 (d); 멸균된 미셀 수용액을 용기에 일정량씩 충전하는 단계 (e); 및 상기 (e)단계에서 충전된 용기를 동결건조하는 단계 (f)를 더 포함할 수 있다. 상기 (f)단계에서 동결건조시, 동결건조 보조제로 만니톨, 솔비톨, 락트산, 트레할로스 및 슈크로스 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는 만니톨을 사용할 수 있다. 또한, 상기 동결건조 후, 증류수, 주사용수,

생리식염수 등의 수용액으로 재건하여 재건된 라파마이신 함유 주사용액 조성물을 얻는 단계 (g)를 추가로 포함할 수 있다.

- [0063] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명의 라파마이신 함유 고분자 나노입자 조성물을 활용한, 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물이 제공된다.
- [0064] 본 발명의 항암 조성물을 방사선 요법과 병용하여 투여할 경우, 라파마이신의 체내 투여는  $30 \text{ mg/m}^2$  내지  $300 \text{ mg/m}^2$ 의 투여량으로 1 회 투여하고, 이 때 방사선은 매일 80Gy로 5회 적용할 수 있다. 본 발명의 항암 조성물의 경우 천천히 점적 정맥주사 하거나 피하 또는 근육주사 하는 것이 가능하다.
- [0065] 본 발명에 따른 고분자 나노입자 조성물을 암을 이식시킨 동물실험에서 방사선과 함께 처리했을 경우 암에 대한 유효성이 현저히 향상된다. 예를 들어, 본 발명의 항암 조성물은 수분 내지 수주의 간격으로 방사선 조사의 전 또는 후에 투여될 수 있다. 투여 방법에서 본 발명의 항암 조성물과 방사선 치료 사이의 시간 간격은 치료를 위한 시간을 유의하게 연장하는 것이 바람직할 수 있고, 따라서 2개의 요법 사이에 수일 내지 수주의 간격차이가 있을 수 있다. 본 발명의 항암 조성물과 병용가능한 방사선은 예를 들어  $\gamma$ -선, X-선 (외부 빔) 등을 포함한다. 본 발명의 일 구체예에서 방사선의 양은 약 1 내지 약 100 Gy 범위, 구체적으로 약 5 내지 약 80, 더 구체적으로 10 내지 50 Gy의 범위로 조사될 수 있으나, 방사성 동위원소에 대한 용량 범위는 동위원소의 반감기 및 방출된 방사선의 강도와 종류에 따라 결정된다.
- [0066] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 라파마이신 함유 고분자 나노입자 조성물을 활용한, 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물은 방사선 조사 1분전 내지 7일전에 투여될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 본 발명의 라파마이신 함유 고분자 나노입자 조성물을 활용한, 방사선 요법과 병용하기 위한 항암 조성물은, 그 투여에 의한 화학요법과 방사선요법을 4주 내지 12주간에 걸쳐 주1회 내지 주 5회(예컨대 주1회, 주2회, 주3회, 주5회) 병행 실시하는 병용요법에 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 포유동물의 암세포의 방사선 치료 방법에 있어서, 포유동물의 암세포에 방사선 조사시, 조사전 또는 조사후에 본 발명의 라파마이신 함유 고분자 나노입자 주사제형 조성물을 투여하여 포유동물의 암세포의 방사선 치료에 대한 감수성을 증진시킬 수 있다.
- [0069] 이하 본 발명을 제조예, 실시예 및 실험예 등을 통하여 보다 상세히 설명하지만, 이들은 본 발명을 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범주가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0070] **제조예 1.** D,L-PLA-COONa (수평균 분자량 1,200달톤)

[0071] 본 발명의 폴리락트산 알칼리 금속염은 한국출원 제2002-63955호 등 공지의 방법대로 제조하였다. 즉, D,L-락트산 1,000g을 2 L의 삼구 둥근바닥 플라스크에 넣고 교반기를 장치하였다. 그런 다음, 80℃로 가열한 기름 중탕에서 가열 및 감압 아스피레이터로 25mmHg로 감압하면서 1시간 동안 반응시켜, 과량으로 존재하는 수분을 제거하였다. 반응 온도를 160℃로 상승시키고, 압력을 5~10mmHg로 감압한 조건에서, 7시간 반응시킨 후 반응을 종결하였다. 그 결과, 정제되지 않은 상태의 폴리락트산 646g을 얻었고, 하기 NMR 분석법으로 측정된 결과, 제조된 폴리락트산의 수평균 분자량은 1,200 달톤이었다. 상기 폴리락트산 500 g에 아세트니트릴 750 mL를 첨가하여 용해하였다. 여기에 탄산수소나트륨 수용액(0.1g/mL) 750 mL를 서서히 첨가하였다. 상온에서 2시간 동안 교반하여 고분자를 중화시켰다. 중화된 고분자 용액에 염화나트륨 75g을 첨가하여 층분리시켰다. 층분리된 유기용매층을 취한 다음, 유기용매를 분별증류하여 제거하여 폴리락트산 나트륨염을 제조하였다.

[0072] 폴리락트산 나트륨염에 대한  $^1\text{H-NMR}$  측정결과는 도 1에 나타내었다.

[0073] < $^1\text{H-NMR}$  스캔의 피크면적으로부터 수평균 분자량의 계산>

[0074] [계산식]

[0075] 수평균 분자량 (달톤) =  $\{(A + B) / (C/N)\} \times 72.1$

[0076] 상기 계산식에서,

- [0077] A는 D,L-폴리락트산의 메틸렌 양성자의 피크 면적이고,
- [0078] B는 고분자 말단 D,L-락트산의 메틸렌 양성자의 피크 면적이며,
- [0079] C는 디카르복실산의 메틸렌 양성자의 피크 면적이고,
- [0080] N은 디카르복실산의 메틸렌 양성자의 갯수이다.

[0081] **제조예 2.** mPEG-PLA (분자량 2,000-1700달톤)

[0082] 500g의 모노메톡시폴리에틸렌 글리콜 (수평균 분자량: 2,000)을 100 ml 2구 둥근바닥 플라스크에 가하고, 2 내지 3시간 동안 감압 하에 100℃로 가열하여 탈수하였다. 반응 플라스크에 건조 질소를 채우고, 주사기를 이용하여 반응 촉매인 스테이너스 옥토에이트 (Sn(Oct)<sub>2</sub>)를 D,L-락타이드의 약 0.1중량% (1g, 2.5mol)로 가하고, 30분 동안 교반한 후 130℃에서 1시간 동안 감압 (1mmHg)하여 촉매를 용해시킨 용매(톨루엔)를 제거하였다. 여기에 정제한 락타이드 1,375g을 가한 후, 130℃에서 18시간 가열하였다. 생성된 고분자를 메틸렌 클로라이드에 용해시킨 후 디에틸 에테르에 가하여 고분자를 석출시켰다. 얻어진 고분자를 진공 오븐에서 48시간 동안 건조하였다. 상기 과정을 통해 얻어진 mPEG-PLA의 수평균 분자량은 2,000-1,750달톤이며, 도 2의 <sup>1</sup>H-NMR에 의해 A-B 타입인 것으로 확인되었다.

[0083] **실시에 1.** 라파마이신 함유 D,L-PLA-COONa/mPEG-PLA 혼합 고분자 나노입자 조성물

[0084] 라파마이신 20 mg, 제조예 2의 mPEG-PLA 895 mg, 제조예 1의 D,L-PLACOONa 329 mg을 에탄올에 가용화시킨 후 진공증발기로 유기용매를 증발시켰다. 상기 건조물에 라파마이신 농도가 2 mg/ml이 되도록 주사용 멸균수를 가하여 미셀을 형성하였다. 여기에 추가로 2가의 칼슘 금속이온을, D,L-PLACOONa 몰량의 1/2 몰량이 되도록 약 26 mg을 정제수에 녹인 후, 200 rpm으로 교반 중인 미셀 수용액에 점적 투하 시키면서 폴리락트산 염 말단기를 이온결합으로 고정시켜 라파마이신이 봉입된 고분자 나노입자를 형성시키고, 이 용액을 0.2 μm 막여과기로 멸균여과 한 후 바이알에 넣어 동결건조하였다. 제조된 조성물의 라파마이신 함량 및 고분자 나노입자의 크기 측정결과를 아래와 같다.

- [0085] - 함량: 99.8%
- [0086] - 입자크기: 19.5 nm

[0087] **실험예 1.** 라파마이신 함유 고분자 나노입자의 체내동태 평가

[0088] 실시예 1에서 라파마이신이 봉입된 나노입자 조성물의 체내동태를 평가하였다. 동물실험을 위해, 체중 210-250g의 웅성 스프레그-도울리 랫트를 사용하였고, 라파마이신 기준으로 5 mg/kg 용량을 정맥 및 피하주사 후 5, 15, 30분 및 1, 2, 4, 8, 24시간 마다 0.3 ml의 전혈을 꼬리 동맥으로 채혈하였다. 채혈한 전혈은 체단백 침전법 (Protein Precipitation, PPT, Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 5, 2003, Pages 199-254)으로 처리 후 원심분리하여 0.15 ml의 맑은 상등액을 얻어 LC/MS/MS법으로 혈중 라파마이신 농도를 분석하였다.

- [0089] ① HPLC 조건
- [0090] i) Analytical column: Zorbax XDB-C18 (2.1 × 100 mm, 3.5 mm, Agilent)
- [0091] ii) Mobile phase: 10mM Ammonium acetate / MeOH (1/99, v/v)
- [0092] iii) Flow rate: 0.3 mL/min
- [0093] ② Tandem Mass Spectrometry 조건
- [0094] i) Ionization: Electro spray Ionization, Negative (ESI-)
- [0095] ii) MS Method: Multiple Reaction Monitoring (MRM)
- [0096] iii) Capillary Voltage: 2.95 kV

- [0097] iv) Cone Voltage: 134 V
- [0098] v) Collision Energy: 22 eV
- [0099] vi) Source Temperature: 100°C
- [0100] vii) Desolvation Temperature: 200°C
- [0101] viii) Mass Transition: Sirolimus 912.6 → 321.4 amu

[0102] 라파마이신의 체내동태 프로파일을 도 3에, 그 체내동태 파라메타를 표 1에 나타내었다. 정맥투여와 피하투여의 C<sub>max</sub>는 정맥투여 시가 피하투여 시보다 약 7배 높게 나타났으며 소실상에서의 반감기(t<sub>1/2</sub>)는 약 3시간으로 거의 유사하였으나 24시간에서의 혈중 농도는 피하투여 시가 정맥투여 시보다 약 2배 정도 높았다. 정맥투여 시를 100으로 보았을 때 피하투여 시의 생체내 이용율 (F%)는 약 74%로 나타났다.

[0103] [표 1]

체내동태 파라미터	실시에 1	
	정맥투여	피하투여
AUC(last) (ng·hr/mL)	3132.6	2304.5
AUC(inf) (ng·hr/mL)	3145.1	2333.3
C <sub>max</sub> (ng/mL)	2010.0	288.0
T <sub>max</sub> (hr)	0.25	4.00
t <sub>1/2</sub> (hr)	3.32	3.45
F(%)	100.0	73.6

[0104]

[0105] **실험예 2.** 라파마이신 함유 고분자 나노입자 조성물의 방사선 민감효과 평가

[0106] 방사선 요법과 병용시 실시예 1의 조성물의 항암활성을 살펴보았다.

[0107] 세포를 액체 질소에서 저장된 것으로부터 채취하고 시험관 내 세포배양으로 확립하였다. 세포를 수확한 후, 멸균 이산 완충 식염수(PBS)로 세척하고, 생존 세포 수를 측정하였다. 세포를 7 x 10<sup>7</sup> 세포/ml의 농도로 멸균 PBS에 재현탁하였다.

[0108] 건강한 누드(nu/nu) 비흉선 마우스(20-25 g, 8-주령)의 오른쪽 옆구리에 7 x 10<sup>5</sup> 인간 폐암세포(A549)를 함유하는 0.1 ml의 세포현탁액을 피하 주사하였다. A549의 경우는 방사능과 일부 항암제를 포함하는 화학요법에 내성을 가진 암으로 잘 알려져 있다. 암이 일정한 크기에 도달한 후, 3회 이종 이식하여 3~4mm의 이종이식편을 형성하였다. 이종이식 단편을 건강한 누드(nu/nu) 비흉선 마우스(20-25 g, 8주령)의 오른쪽 옆구리에 12게이지 트로카 니들로 피하 주사하였다. 암 부피가 100~300mm<sup>3</sup>에 도달한 후, 약물을 투여하고 이 시점을 1일로 기록하였다. 1일에, 마우스를 5그룹으로 나누고 5일 동안 매일 실시예 1의 조성물을 꼬리 정맥을 통해 라파마이신 5 mg/kg 용량으로 투여하고 3시간 후 2Gy의 방사능을 조사하였다. 시간 경과에 따라 종양의 장축 및 단축을 측정하였으며, 이로부터 종양 부피를 하기 수학적 1에 의해 계산하였다. 또한, 치료효과를 평가하기 위해 상대적 종양 부피를 아래의 수학적 2와 같이 계산하였다.

**수학적 1**

[0109] 종양부피(TV) = 0.5 x L x W<sup>2</sup> (L: 장축, W: 단축)

**수학적 2**

[0110] 상대적 종양부피(RTV) = (Vt/Vo) x 100% (Vt: t 일의 TV, Vo: 0 일의 TV)

[0111] 실험을 유의한 것으로 인정하기 위하여, 처리당 4마리 이상의 마우스와 그룹당 4개 이상의 종양을 사용하였다.

처리개시 시점에서, 최소 종양 직경은 4 또는 30 mm<sup>3</sup> 부피이었다. 최종 약물투여 후, 2주 내에 죽는 동물을 독성사멸로 간주하고 평가에서 제외하였다. 3마리당 1마리 보다 많은 독성 사멸이나 평균체중이 15% 초과하여 감소한 후 완전히 회복되지 않는 처리군은 항종양 효능이 없는 것으로 간주하였다. 실험결과는 도 4에 나타내었다.

[0112] 도 4에 나타난 바와 같이 실시예 1의 조성물 단독투여 군(PNP-Si)과 방사선 단독치료 군(IR)의 항암효능은 무처리군 (CONT) 및 고분자나노입자 담체투여군 (PNP)에 비해서는 좋은 암 성장억제를 보였다. 하지만 실시예 1의 조성물과 방사선 치료를 병용한 군 (IR + PNP-Si)의 경우는 CONT 및 PNP군 뿐만 아니라 PNP-Si군 및 IR군에 비해서도 더욱 크게 항암효능을 발휘하여 암의 성장을 거의 멈추게 하는 것으로 나타났다.

[0113] **실시예 2.** 라파마이신 함유 D,L-PLA-COONa/mPEG-PLA 혼합 고분자나노입자 조성물

[0114] 라파마이신 25 mg, 제조에 2의 mPEG-PLA 1,650 mg과 제조에 1의 D,L-PLACOONa 825 mg을 디클로로메탄에 완전히 녹인 후 회전식감압증류기를 이용하여 유기용매를 휘발시켰다. 상기 건조물에 라파마이신 농도가 1.0 mg/ml이 되도록 가하여 미셀을 형성하였다. 여기에 추가로 100 mg/mL 염화칼슘용액을 염화칼슘으로 67.5 mg이 되도록 취하여 가한 후 교반하였다. 이 용액을 0.2 μm 막여과지로 멸균여과 한 후 바이알에 넣어 동결건조하였다. 제조된 조성물의 라파마이신 함량 및 고분자 나노입자의 크기 측정결과는 아래와 같다.

[0115] - 함량: 101.9%

[0116] - 입자크기: 19.7 nm

[0117] **실험예 3 :** 라파마이신 함유 고분자나노입자 조성물의 시험관 내 항암활성 평가

[0118] 실시예 2의 라파마이신 함유 고분자나노입자 조성물을 이용하여 라파마이신이 고분자 나노입자에 봉입된 후에도 암세포의 증식 억제 효과가 유지되는지 여부를 평가하기 위하여 다음의 실험을 실시하였다.

[0119] 폐암세포인 A549, NCI-H460 세포주와 유방암 세포인 MDA-MB-231, MCF7을 각각 DMEM (A549, MCF7), RPMI1640 (NCI-H460, MDA-MB-231) 세포 배양액에서 배양하였다. 처리 하루 전에 각각 50개 (saline 실험군, 라파마이신 비함유 고분자 나노입자 조성물), 100개 (라파마이신 함유 고분자 나노입자 조성물, 라파마이신)의 세포를 6-well 배양 접시에 분주하였다. 배양기에서 24시간 동안 배양하여 세포를 배양 접시 바닥에 부착시켰다. 배양액을 제거하고 2 ml의 새로운 배양액에 각각 10, 100, 500 nM로 시료를 희석하여 세포에 처리하였다. 배양기에서 14일간 배양하여 세포 콜로니를 얻었다. 0.5%의 crystal violet 용액으로 세포를 고정 및 염색한 후, 생성된 콜로니의 수를 계수하였다. Saline 실험군에서 얻은 세포 콜로니 수를 이용하여 배양효율 (plating efficiency)을 계산하였다(수학식 3).

**수학식 3**

배양효율 (plating efficiency)

[0120] = saline 처리군의 콜로니 수/saline 처리군의 분주한 세포의 수 x 100

[0121] 각 실험군에서의 생존분획 (surviving fraction)은 아래의 수학식 4에 의해 계산하였다.

**수학식 4**

생존분획 (surviving fraction)

[0122] = 처리군의 콜로니 수/(처리군의 분주한 세포의 수 x 배양효율/100)

[0123] 실험 결과는 도 5에 나타내었다.

[0124] 도 5 결과를 참조하면, 라파마이신 비함유 고분자나노입자 담체(vehicle)는 세포의 증식 능력에 미치는 영향이 거의 없으며, 라파마이신 함유 고분자나노입자 조성물 (PNP-sirolimus)는 라파마이신 자체 (rapamycin)와 동일하게 암세포의 증식 능력을 현저히 떨어뜨리는 것을 확인하였다. 이것은 라파마이신이 고분자 나노입자에 봉입이 되어도 약효가 유지됨을 알 수 있는 결과이다.

[0125] **실험예 4** 라파마이신 함유 고분자나노입자 체내동태 평가

[0126] 실시예 2에서 라파마이신이 봉입된 조성물의 체내동태를 실험예 1과 같은 방법으로 평가하였다. 다만, 라파마이신 기준으로 10 mg/kg 용량을 경구, 정맥 또는 피하주사 후 15, 30분 및 1, 2, 4, 8, 24, 48시간 마다 0.3 ml의 전혈을 꼬리 동맥으로 채혈하였다.

[0127] 라파마이신 혈중농도 분석결과를 도 6에 나타내었고, 체내동태 파라메타를 표 2에 나타내었다.

[0128] [표2]

체내동태 파라미터	Free sirolimus	실시예 2		
	정맥투여	정맥투여	피하투여	경구투여
AUC(last) (ng·hr/mL)	5366.7	16901.7	5275.2	1559.8
AUC(inf) (ng·hr/mL)	5597.5	16991.2	5576.4	1983.7
C <sub>max</sub> (ng/mL)	2890	11303.3	350	129.7
T <sub>max</sub> (hr)	0.25	0.25	8.00	1.17
t <sub>1/2</sub> (hr)	10.48	5.68	10.14	21.27
F(%)	100	315	98	29

[0129]

[0130] 정맥투여 시 실시예 2의 조성물의 AUC는 라파마이신 자체 (Free sirolimus)의 AUC에 비해 3배 이상 높게 나타나 본 발명의 고분자 나노입자 조성물이 혈중체류성을 가지는 것을 알 수 있었다. 입자성 약물전달체가 혈중체류성을 가진다는 의미는 EPR (Enhanced Permeability and Retention)효과에 의한 암조직 축적성을 가진다는 의미이며 저용량으로도 동일한 효과를 나타낼 수 있음을 의미한다.

[0131] 한편 실시예 2의 조성물을 피하로 투여할 경우의 생체내 이용율 (BA%)은 100%로 정맥투여 시보다 AUC는 33%수준이었으나 24시간 및 48시간에서 혈중농도가 약 2배 이상으로 오랜 시간 지속적으로 유효농도이상으로 유지되었다. 경구투여 시 생체내 이용율은 약 30%로 나타나 기존의 경구제형 (20%미만) 보다 본 발명의 조성물 이 더 높은 생체내 이용율을 나타내었다.

[0132] **실험예 5:** 라파마이신 함유 고분자나노입자 조성물의 암 이식 동물모델에서의 항암효능 평가

[0133] 실시예 2의 라파마이신 함유 고분자나노입자 조성물에 대한 동물모델에서의 항암효능을 아래와 같이 평가하였다.

[0134] 폐암 세포주인 A549 세포를 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포를 수확한 후, 멸균 이산 완충 식염수 (PBS)로 세척하고 계수하였다. 건강한 누드 (nu/nu) 비흉선 마우스 (20-25g, 6주령)의 오른쪽 허벅지에 1 x 10<sup>6</sup>개의 A549 세포를 함유하는 0.1 ml의 현탁액을 피하 주사하였다. 3주 후에 암종의 크기가 약 70 mm<sup>3</sup>에 도달한 후, 마우스를 다섯 그룹으로 나누고 이 시점을 1일로 기록하였다. 이 시점에서부터 20 mg/kg의 용량으로 라파마이신 함유, 비함유 고분자 미셀 조성물을 각각의 실험군에 꼬리 정맥주사를 통해 투여하였다. 1일부터 일주일에 2번씩 종양의 장축 및 단축을 측정하여 이로부터 종양의 부피를 수학적 식 5에 의해 계산하였다. 종양 부피 측정과 동시에 마우스의 몸무게도 측정하였다.

**수학적 식 5**

[0135] 
$$\text{종양부피} = 0.5 \times \text{장축의 길이} \times \text{단축의 길이}^2$$

[0136] 도 7에 나타낸 바와 같이, 라파마이신 함유 고분자나노입자 조성물은 콘트롤 군 및 Vehicle 투여군에 비해 현저

한 A549 암종의 성장 지연 효과를 보였으며, 주 3회 4주간 투여한 군 (q3d x 3 days x 4 weeks)이 주 1회 4주간 투여한 군 (qw x 4 weeks)에 비해 항암효능이 약간 우수 하였으나 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 이것 으로부터, 본 발명에 따른 제제는 약물의 과량 투여시 약물의 독성발현을 고려할 때 저용량으로도 효능을 발휘 할 수 있으리라 판단된다. 한편, 약물 투여에 따른 마우스의 몸무게 변화는 10%미만으로 투여완료 후 회복되는 경향을 보였는데 주 3회 4주간 투여한 군이 주 1회 4주간 투여한 군에 비해 회복이 더디었다.

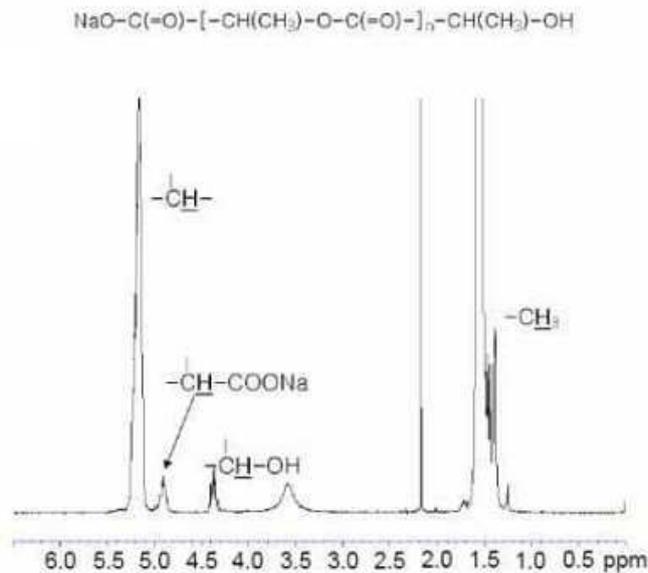
[0137] **실험예 6.** 라파마이신 함유 고분자나노입자 조성물의 방사선 민감 효과 평가

[0138] 방사선 요법과 병용시 실시예 2의 조성물의 항암활성을 실험예 2와 동일한 방법으로 평가하였고 그 실험결과는 도 8에 나타내었다. 본 실험은 실시예 2에서와는 달리 용량을 매일 5일간만 5 mg/kg용량을 투여한 후 방사선 조사군 (2Gy 처리) 과 미처리 군을 비교하였다.

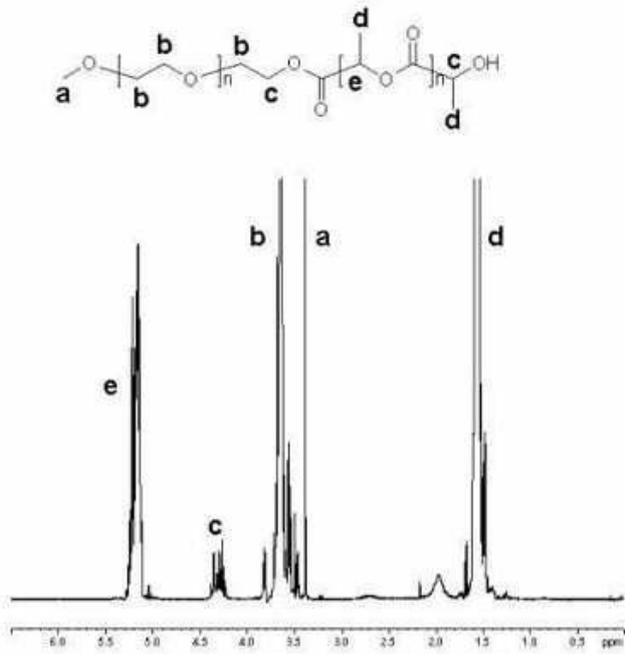
[0139] 도 8에 나타낸 바와 같이 실시예 2의 조성물 단독투여 (실시예 2)과 방사선 단독치료(IR) 군은 컨트롤군 보다는 우수한 항암효능을 보였으나 실시예 2 군과 IR 군 사이에는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 그러나, 실시예 2의 조성물을 투여하고 3시간 후 2 Gy의 방사선 조사를 군 (실시예 2 + IR)은 모든 대조군에 비해 높은 암 성장 억제율을 나타내었다.

**도면**

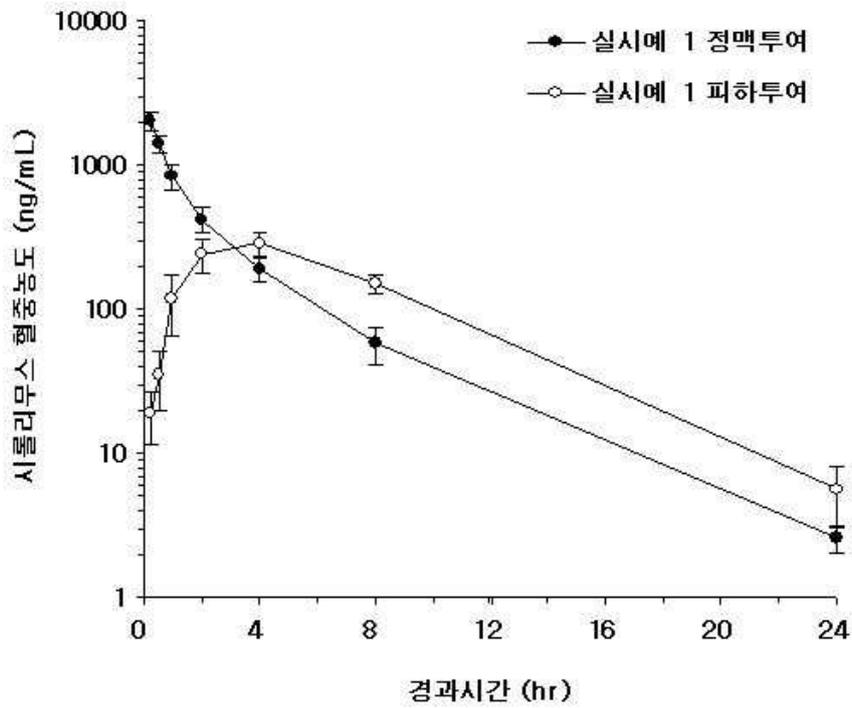
**도면1**



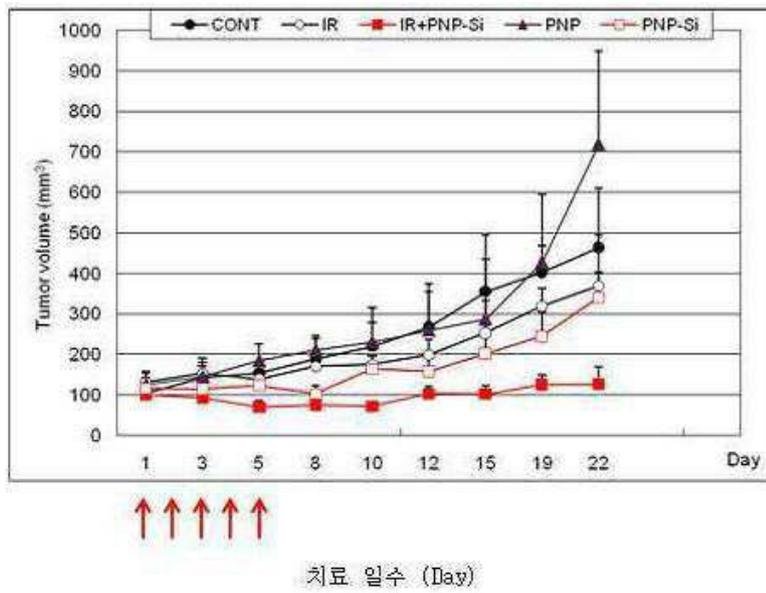
도면2



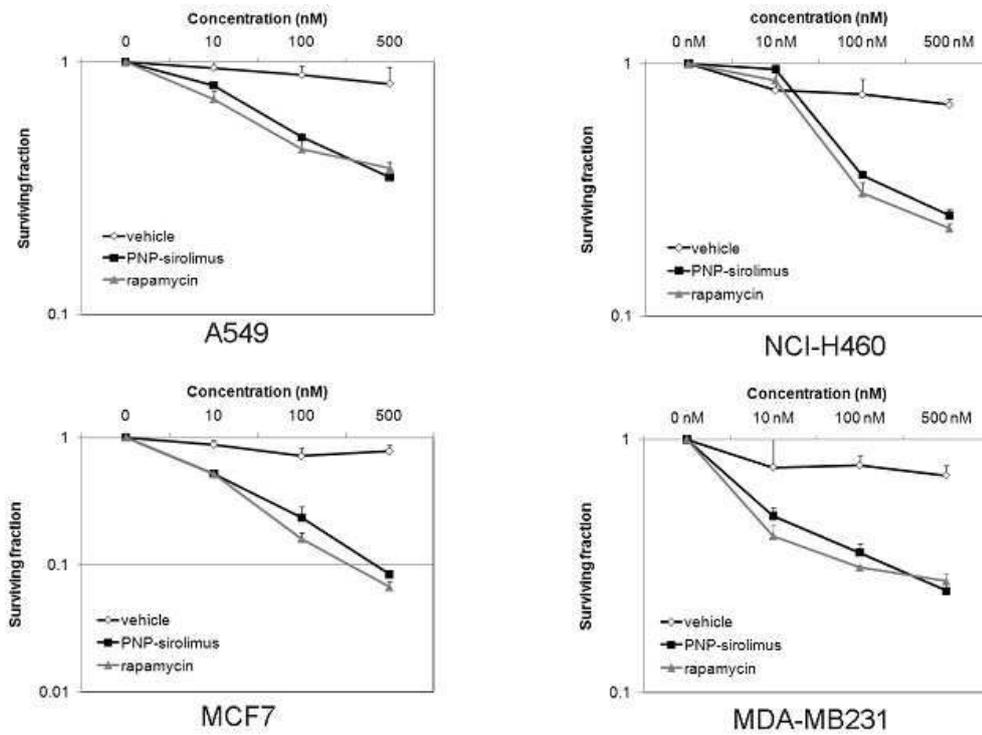
도면3



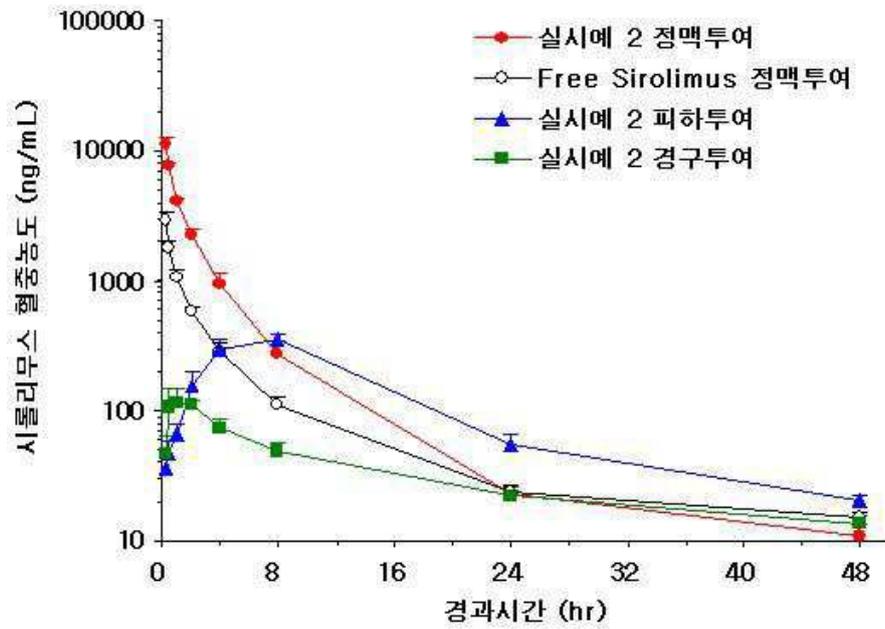
도면4



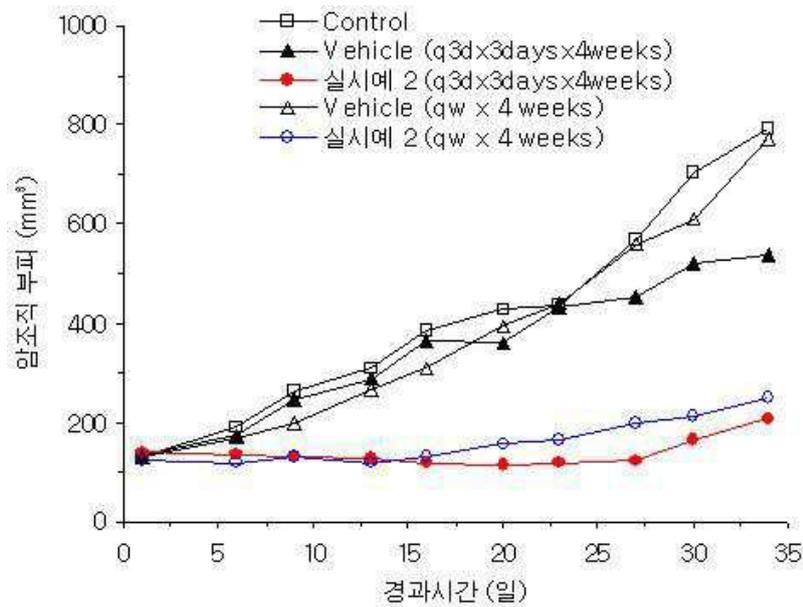
도면5



도면6



도면7



도면8

