



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0122219
 (43) 공개일자 2011년11월09일

- (51) Int. Cl.
 A61K 31/357 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
 A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/18 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7022860
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2010년03월30일
 심사청구일자 2011년09월29일
- (85) 번역문제출일자 2011년09월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2010/055770
- (87) 국제공개번호 WO 2010/113984
 국제공개일자 2010년10월07일
- (30) 우선권주장
 61/164,653 2009년03월30일 미국(US)
 JP-P-2009-082521 2009년03월30일 일본(JP)

- (71) 출원인
 에자이 알앤디 매니지먼트 가부시키키가이샤
 일본국 도쿄도 분쿄구 코이시가와 4초메 6반 10고
- (72) 발명자
 기쿠치, 히로시
 일본 3002635 이바라키켄 츠클바시 도코다이 5초메 1반지 3 에자이 가부시키키가이샤 츠클바켄큐쇼내
 효도, 겐지
 일본 3002635 이바라키켄 츠클바시 도코다이 5초메 1반지 3 에자이 가부시키키가이샤 츠클바켄큐쇼내
 이시하라, 히로시
 일본 3002635 이바라키켄 츠클바시 도코다이 5초메 1반지 3 에자이 가부시키키가이샤 츠클바켄큐쇼내
- (74) 대리인
 위혜숙, 장수길

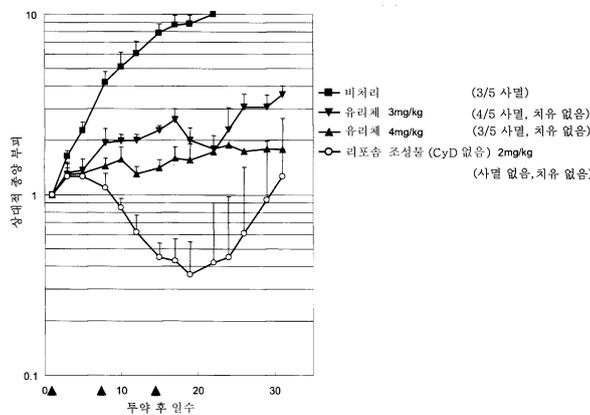
전체 청구항 수 : 총 39 항

(54) 리포솜 조성물

(57) 요약

본 발명은 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염을 포함하는 신규 리포솜 조성물 및 그의 제조 방법을 제공한다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

리포솜을 포함하며 리포솜 내상에 활성 화합물을 포함하는 리포솜 조성물로서, 활성 화합물이 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염인 리포솜 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 리포솜 조성물이 고체상 또는 액체상인 리포솜 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 리포솜 내상에 암모늄염을 더 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 암모늄염의 농도가 10 mM 이상인 리포솜 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜 내상에 염, 산, 염기 및/또는 아미노산을 더 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 염의 농도가 1 내지 300 mM인 리포솜 조성물.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 산의 농도가 1 내지 300 mM인 리포솜 조성물.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산의 농도가 1 내지 300 mM인 리포솜 조성물.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기의 농도가 1 내지 300 mM인 리포솜 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성 화합물의 농도가 0.01 내지 300 mg/mL인 리포솜 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성 화합물이 메실산에리블린인 리포솜 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜 내상에 황산암모늄, 시트르산 및 활성 화합물을 더 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜 외상에 당, 전해질 및/또는 아미노산을 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜 외상에 당 또는 전해질, 및 아미노산을 포함하는 리포솜 조

성물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 당의 농도가 2 내지 20%인 리포솜 조성물.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산의 농도가 1 내지 300 mM인 리포솜 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜 외상에 자당 또는 염화나트륨, 및 히스티딘을 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포솜 내상에 시클로텍스트린을 실질적으로 포함하지 않는 리포솜 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜이 수소 첨가 포스파티딜콜린을 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜이 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜이 메톡시폴리에틸렌글리콜 축합체를 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 메톡시폴리에틸렌글리콜 축합체가 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜 축합체인 리포솜 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜이 수소 첨가 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜 축합체를 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 수소 첨가 포스파티딜콜린을 10 내지 80%, 상기 콜레스테롤을 1 내지 60%, 상기 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜 축합체를 0 내지 50% 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜이 수소 첨가 대두 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민을 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 기재된 리포솜 조성물을 제조하는 방법으로서,
 리포솜을 포함하는 리포솜 분산액을 제공하는 스텝과,
 상기 리포솜 분산액과 상기 활성 화합물을 혼합하는 스텝과,
 상기 리포솜 분산액의 리포솜 내상에 상기 활성 화합물을 도입하는 스텝

을 포함하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 리포솜 분산액이 리포솜 외상에 암모늄염을 실질적으로 포함하지 않는 방법.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 리포솜 분산액의 리포솜 외상의 pH가 3 내지 10인 방법.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포솜 분산액의 리포솜 외상의 pH가 7 내지 10인 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 pH가 상기 리포솜 분산액과 상기 활성 화합물을 혼합하는 스텝에서의 상기 리포솜 분산액의 리포솜 외상의 pH인 방법.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포솜 분산액을 제공하는 스텝이, 리포솜을 포함하며 리포솜 내상 및 리포솜 외상에 암모늄염을 포함하는 리포솜 준비액을 제공하는 스텝과,

상기 리포솜 준비액의 리포솜 외상을 치환 또는 희석하는 스텝

을 포함하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 리포솜 외상을 치환 또는 희석하는 스텝이, 리포솜 외상의 pH를 리포솜 내상의 pH보다 높게 하는 스텝인 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 상기 리포솜 외상을 치환 또는 희석하는 스텝이, 리포솜 내상의 pH와 리포솜 외상의 pH의 차를 1 내지 5로 하는 스텝인 방법.

청구항 34

제26항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포솜 내상의 pH가 3 내지 9인 방법.

청구항 35

제26항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포솜 내상의 pH가 4 내지 9인 방법.

청구항 36

제26항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포솜 내상의 pH가 5 내지 8인 방법.

청구항 37

제26항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 활성 화합물을 도입하는 스텝에서, 리포솜 외상이 전해질을 포함하는 용액인 방법.

청구항 38

제26항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포솜 분산액이 시클로텍스트린을 리포솜 내상에 실질적으로 포함하지 않는 방법.

청구항 39

제26항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 리포솜 외상의 pH를 중성으로 하는 스텝을 더 포함하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염을 함유하는 신규 리포솜 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 리포솜 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 리포솜은 1개 이상의 지질 이중층에 의해 포위된 내상을 갖는 미세 폐쇄 소포로서, 수용성 물질을 내상에, 지용성 물질을 지질 이중층에 보유할 수 있다. 리포솜에 활성 화합물을 봉입하고, 표적 조직에 송달할 때에는, 어떻게 하여 활성 화합물을 리포솜에 높은 효율로 봉입할지, 또한 어떻게 하여 리포솜에 의한 활성 화합물의 보유 안정성을 확보할지가 중요한 포인트가 된다.

[0003] 지용성 화합물을 리포솜에 봉입하는 경우, 비교적 용이하게 높은 봉입률을 달성할 수 있지만, 암포테리신 B(리포솜 의약품 암비솜(Ambisome)의 주약)와 같은 막친화성이 매우 높은 화합물의 경우를 제외하고는, 일반적으로 혈장 중에서의 보유 안정성은 낮아, 체내 동태가 충분히 개선되는 것은 어렵다. 수용성 화합물의 리포솜에의 봉입 방법에는 리피드 필름법(볼텍스법), 역상 증발법, 계면 활성제 제거법, 동결 용해법이나 리모트 로딩법(pH 구배법, 이온 구배법) 등 다양한 방법이 있다. 그러나, 100% 가까운 높은 봉입률이 얻어지는 것은 리모트 로딩법만이고, 그 밖의 방법으로는 5 내지 30% 정도의 봉입률밖에 얻어지지 않는다.

[0004] 리모트 로딩법으로서, pH 구배나 황산암모늄 이온 구배를 이용한 것이 알려져 있다. pH 구배를 이용한 리모트 로딩법인 pH 구배법이란, 목적으로 하는 화합물의 pH에 의한 분자형/이온형의 해리 평형의 이동을 이용하여 화합물을 리포솜 내에 취입하는 기술이다.

[0005] pH 구배법에 의해 리포솜에 봉입되는 화합물의 일례로서, 예를 들면 독소루비신(DOX, pKa: 8.2)를 들 수 있다. pH 4의 완충액에 의해 리포솜 용액을 제조한 후에, 리포솜 외상을 pH 7의 완충액으로 치환한다. 이 리포솜 용액에 DOX를 가한 경우, 가해진 pH 7의 용액 중에서는 분자형의 DOX는 지용성이 되기 때문에, 수상이 아니라 리포솜막으로 이행한다. 또한 리포솜막으로 이행한 DOX가 pH 4의 리포솜 내상과 접촉한 경우, 이온형이 되어 리포솜 내상에 녹아 들어간다. 이와 같이, 해리 평형의 이동에 의해서 DOX는 리포솜 외상으로부터 내상으로 수송된다(비특허문헌 1, 비특허문헌 2 및 특허문헌 1을 참조.).

[0006] 또한, 이러한 리모트 로딩법을 개량한 다양한 기술이 보고되어 있다.

[0007] 비특허문헌 3에는, 콜레스테롤프리 리포솜이라는 특별한 조성의 리포솜에 있어서 pH 구배법을 행할 때에, 리포솜 외상에 활성 화합물과 함께 에탄올을 첨가함으로써 활성 화합물의 봉입률을 향상시키는 기술이 개시되어 있다.

[0008] 특허문헌 2에는, pH 구배에 추가로, 리포솜 내상에 구리 이온을 존재시킴으로써 활성 화합물의 봉입률을 향상시키는 기술이 개시되어 있다.

[0009] 황산암모늄 이온 구배를 이용한 리모트 로딩법인 황산암모늄법이란 pH 구배법에 있어서의 pH 구배 대신에, 2가의 황산암모늄 등의 이온 구배를 이용하여 활성 화합물을 리포솜 내상에 취입하는 기술이다(비특허문헌 1 및 특허문헌 3을 참조.).

[0010] 특허문헌 4에는, 황산암모늄에 의한 이온 구배에 추가로, 리포솜 외상에 활성 화합물과 함께 보론산을 첨가함으로써 리포솜 내에 활성 화합물을 취입하는 기술이 개시되어 있다.

[0011] 또한, 특허문헌 5에는, 황산암모늄에 의한 이온 구배 대신에, 글루쿠론산 음이온에 의한 이온 구배를 이용하여 활성 화합물을 리포솜에 취입함으로써 황산암모늄을 이용한 경우에 비하여 활성 화합물의 방출 속도를 향상시키는 기술이 개시되어 있다.

[0012] 이와 같이, 봉입률의 면에서 리모트 로딩법은 우수한 봉입 방법이다. 그러나, 리포솜 내상에 봉입된 활성 화합물이 결정화하는 독실(Doxil)(DOX의 리포솜 제제) 등의 특수한 예를 제외하면, 리모트 로딩법을 이용한 경우, 활성 화합물은 혈장 중에서 리포솜으로부터 누출하기 쉬워, 활성 화합물의 보유 안정성이 낮다는 문제점이 있다.

[0013] 이상과 같이, 종래 기술의 방법에서는, 리포솜에의 활성 화합물의 높은 봉입률과, 리포솜에 있어서의 활성 화합

물의 보유 안정성을 양립하는 것은 어려운 것이 현실이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0014] (특허문헌 0001) 미국 특허 제5192549호 명세서
- (특허문헌 0002) 국제 공개 제2006/037230호 공보
- (특허문헌 0003) 미국 특허 제5316771호 명세서
- (특허문헌 0004) 미국 특허 제6051251호 명세서
- (특허문헌 0005) 국제 공개 제2005/046643호 공보

비특허문헌

- [0015] (비특허문헌 0001) 사즈카 야스유키, "리포솜의 제조법" 「리포솜 응용의 신전개: 인공 세포의 개발을 향해서 (아기요시 가즈나리, 쓰지이 시게루 감수)」, NTS, (2005), pp.33-37.
- (비특허문헌 0002) Mayer LD et al., Biochimica et Biophysica Acta, (1986), 857: pp.123-126.
- (비특허문헌 0003) N. Dos Santos et al., Biochimica et Biophysica Acta, (2004), 1661(1): pp.47-60

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 해결하고자 하는 과제는, 활성 화합물의 보유 안정성 및 봉입률이 높은 리포솜 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해서 예의 검토한 결과, 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염을 활성 화합물로 하는 리포솜 조성물이, 리포솜 조성물에 있어서의 활성 화합물의 보유 안정성 및 봉입률이 매우 높은 것을 발견하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0018] 즉, 본 발명은 이하와 같다.
- [0019] [1]
- [0020] 리포솜을 포함하며 리포솜 내상에 활성 화합물을 포함하는 리포솜 조성물로서, 활성 화합물이 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염인 리포솜 조성물.
- [0021] [2]
- [0022] 리포솜 조성물이 고체상 또는 액체상인, 1에 기재된 리포솜 조성물.
- [0023] [3]
- [0024] 리포솜 내상에 암모늄염을 더 포함하는, 1 또는 2에 기재된 리포솜 조성물.
- [0025] [4]
- [0026] 상기 암모늄염의 농도가 10 mM 이상인, 3에 기재된 리포솜 조성물.
- [0027] [5]
- [0028] 리포솜 내상에 염, 산, 염기 및/또는 아미노산을 더 포함하는, 1 내지 4 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0029] [6]

- [0030] 상기 염의 농도가 1 내지 300 mM인, 5에 기재된 리포솜 조성물.
- [0031] [7]
- [0032] 상기 산의 농도가 1 내지 300 mM인, 5 또는 6에 기재된 리포솜 조성물.
- [0033] [8]
- [0034] 상기 아미노산의 농도가 1 내지 300 mM인, 5 내지 7 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0035] [9]
- [0036] 상기 염기의 농도가 1 내지 300 mM인, 5 내지 8 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0037] [10]
- [0038] 상기 활성 화합물의 농도가 0.01 내지 300 mg/mL인, 1 내지 9 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0039] [11]
- [0040] 상기 활성 화합물이 메실산에리블린인, 1 내지 10 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0041] [12]
- [0042] 리포솜 내상에 황산암모늄, 시트르산 및 활성 화합물을 더 포함하는, 1 내지 11 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0043] [13]
- [0044] 리포솜 외상에 당, 전해질 및/또는 아미노산을 포함하는, 1 내지 12 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0045] [14]
- [0046] 리포솜 외상에 당 또는 전해질, 및 아미노산을 포함하는, 1 내지 13 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0047] [15]
- [0048] 상기 당의 농도가 2 내지 20%인, 13 또는 14에 기재된 리포솜 조성물.
- [0049] [16]
- [0050] 상기 아미노산의 농도가 1 내지 300 mM인, 13 내지 15 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0051] [17]
- [0052] 리포솜 외상에 자당 또는 염화나트륨, 및 히스티딘을 포함하는, 1 내지 16 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0053] [18]
- [0054] 상기 리포솜 내상에 시클로텍스트린을 실질적으로 포함하지 않는, 1 내지 17 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0055] [19]
- [0056] 리포솜이 수소 첨가 포스파티딜콜린을 포함하는, 1 내지 18 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0057] [20]
- [0058] 리포솜이 콜레스테롤을 포함하는, 1 내지 19 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0059] [21]
- [0060] 리포솜이 메톡시폴리에틸렌글리콜 축합체를 포함하는, 1 내지 20 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0061] [22]
- [0062] 상기 메톡시폴리에틸렌글리콜 축합체가 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜 축합체인, 21에 기재된 리포솜 조성물.

- [0063] [23]
- [0064] 리포솜이 수소 첨가 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜 축합체를 포함하는, 1 내지 22 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0065] [24]
- [0066] 상기 수소 첨가 포스파티딜콜린을 10 내지 80%, 상기 콜레스테롤을 1 내지 60%, 상기 디스테아로일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜 축합체를 0 내지 50% 포함하는, 23에 기재된 리포솜 조성물.
- [0067] [25]
- [0068] 리포솜이 수소 첨가 대두 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민을 포함하는, 1 내지 24 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물.
- [0069] [26]
- [0070] 1 내지 25 중 어느 하나에 기재된 리포솜 조성물을 제조하는 방법으로서,
- [0071] 리포솜을 포함하는 리포솜 분산액을 제공하는 스텝과,
- [0072] 상기 리포솜 분산액과 상기 활성 화합물을 혼합하는 스텝과,
- [0073] 상기 리포솜 분산액의 리포솜 내상에 상기 활성 화합물을 도입하는 스텝
- [0074] 을 포함하는 방법.
- [0075] [27]
- [0076] 상기 리포솜 분산액이 리포솜 외상에 암모늄염을 실질적으로 포함하지 않는, 26에 기재된 방법.
- [0077] [28]
- [0078] 상기 리포솜 분산액의 리포솜 외상의 pH가 3 내지 10인, 26 또는 27에 기재된 방법.
- [0079] [29]
- [0080] 상기 리포솜 분산액의 리포솜 외상의 pH가 7 내지 10인, 26 내지 28 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0081] [30]
- [0082] 상기 pH가 상기 리포솜 분산액과 상기 활성 화합물을 혼합하는 스텝에 있어서의 상기 리포솜 분산액의 리포솜 외상의 pH인, 28 또는 29에 기재된 방법.
- [0083] [31]
- [0084] 상기 리포솜 분산액을 제공하는 스텝이, 리포솜을 포함하며 리포솜 내상 및 리포솜 외상에 암모늄염을 포함하는 리포솜 준비액을 제공하는 스텝과,
- [0085] 상기 리포솜 준비액의 리포솜 외상을 치환 또는 희석하는 스텝
- [0086] 을 포함하는, 26 내지 30 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0087] [32]
- [0088] 상기 리포솜 외상을 치환 또는 희석하는 스텝이, 리포솜 외상의 pH를 리포솜 내상의 pH보다 높게 하는 스텝인, 31에 기재된 방법.
- [0089] [33]
- [0090] 상기 리포솜 외상을 치환 또는 희석하는 스텝이, 리포솜 내상의 pH와 리포솜 외상의 pH의 차를 1 내지 5로 하는 스텝인, 31 또는 32에 기재된 방법.
- [0091] [34]
- [0092] 상기 리포솜 내상의 pH가 3 내지 9인, 26 내지 33 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0093] [35]

- [0094] 상기 리포솜 내상의 pH가 4 내지 9인, 26 내지 34 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0095] [36]
- [0096] 상기 리포솜 내상의 pH가 5 내지 8인, 26 내지 35 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0097] [37]
- [0098] 상기 활성 화합물을 도입하는 스텝에 있어서, 리포솜 외상이 전해질을 포함하는 용액인, 26 내지 36 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0099] [38]
- [0100] 상기 리포솜 분산액이 시클로텍스트린을 리포솜 내상에 실질적으로 포함하지 않는, 26 내지 37 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0101] [39]
- [0102] 리포솜 외상의 pH를 중성으로 하는 스텝을 더 포함하는, 26 내지 38 중 어느 하나에 기재된 방법.

발명의 효과

- [0103] 본 발명에 따르면, 신규 리포솜 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 리포솜 조성물은, 높은 효율로 리포솜 내상에 활성 화합물을 봉입하고, 또한 활성 화합물의 높은 보유 안정성을 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0104] 도 1은 시험관내(in vitro) 래트 혈장 중 (37℃)에서의 메실산에리블린의 리포솜 조성물의 농도 추이를 도시한다.
- 도 2는 생체내(in vivo) FaDu 담암 누드 마우스에서의 리포솜에 의한 메실산에리블린의 항종양 활성을 도시한다.
- 도 3은 생체내 ACHN 담암 누드 마우스에서의 리포솜에 의한 메실산에리블린의 항종양 활성을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0105] 본 발명을, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에 의해 구체적으로 설명하는데, 본 발명은 이하의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에 한정되는 것은 아니고, 여러가지로 변형하여 실시할 수 있다.
- [0106] 본 발명에서 참조되는 문헌에 개시되어 있는 내용은 본 발명에 참조로서 받아들인다.
- [0107] [정의]
- [0108] 「리포솜」이란 지질 이중층에 포위된 내상을 갖는 미세 폐쇄 소포를 의미한다. 본 발명에서, 리포솜은 작은 1매막 리포솜(SUV: small unilamellar vesicle), 큰 1매막 리포솜(LUV: large unilamellar vesicle), 더욱 큰 1매막 리포솜(GUV: giant unilamellar vesicle), 동심원상의 복수의 막을 갖는 다중층 리포솜(MLV: multilamellar vesicle), 동심원상이 아니라 불규칙하게 복수의 막을 갖는 리포솜(MVV: Multivesicular vesicle) 등을 포함한다.
- [0109] 「리포솜 내상」은, 리포솜의 지질 이중층에 포위된 수성 영역을 의미하고, 「내수상」 및 「리포솜 내수상」과 동의로 이용한다. 「리포솜 외상」은, 리포솜이 액체 중에 분산되어 있는 경우에, 리포솜의 지질 이중층에 포위되어 있지 않은 영역(즉, 내상 및 지질 이중층 이외의 영역)을 의미한다.
- [0110] 「리포솜 조성물」이란 리포솜을 포함하며, 리포솜 내상에 메실산에리블린을 더 포함하는 조성물을 의미한다. 본 발명에서, 리포솜 조성물은 고체상 및 액체상의 것을 포함한다.
- [0111] 「리포솜 분산액」이란 리포솜을 포함하는 조성물로서, 리포솜 내상에 활성 화합물이 도입되기 전의 조성물을 의미한다.
- [0112] 「리포솜 준비액」이란 리포솜을 포함하는 조성물로서, 리포솜 내상에 메실산에리블린을 봉입하기 위해서 리포솜 외상을 조정하기 전의 조성물을 의미한다.

- [0113] 「리포솜 시약」이란 액체상의 경우, 리포솜 분산액을 의미하고, 고체상의 경우에는, 소정의 용매에 용해 또는 현탁함으로써 리포솜 분산액을 얻을 수 있는 시약을 의미한다. 용매에 대해서는 후술한다. 후술하는 바와 같이, 고체상의 리포솜 시약은, 예를 들면 리포솜 분산액을 건조시킴으로써 얻어진다.
- [0114] 또한, 본 명세서에 있어서, 「고체와 액체를 혼합한다」란, 고체를 액체에 용해하는 것과 현탁하는 것을 포함하는 것으로 하고, 혼합, 용해, 현탁은 서로 교환 가능하게 이용한다. 마찬가지로, 용매와 분산매도 서로 교환 가능하게 이용한다.
- [0115] 또한, 본 발명의 리포솜 조성물, 리포솜 분산액, 리포솜 준비액, 리포솜 시약은, 시클로텍스트린을 실질적으로 포함하지 않는다. 「시클로텍스트린을 실질적으로 포함하지 않는다」란, 시클로텍스트린을 첨가하지 않는 것을 의미한다. 또한, 시클로텍스트린에 의한 활성 화합물의 용해도(겉보기의 용해도)의 향상이 유의하게 보이는 양의 시클로텍스트린을 포함하지 않으면 되고, 활성 화합물의 용해도의 향상이 유의하게 보이지 않는 양을 가한 경우에도, 본 발명의 실시로서 배제되는 것이 아니다.
- [0116] 또한, 본 발명의 바람직한 양태로서, 「리포솜 분산액에 있어서의 리포솜 분산액이 리포솜 외상에 실질적으로 암모늄염을 포함하지 않는다」란, 리포솜 분산액의 리포솜 외상에 암모늄염을 첨가하지 않는 것을 의미한다. 또한, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 범위의 양의 암모늄염을 가하는 것이, 본 발명의 실시로서 배제되는 것이 아니다. 또한, 리포솜 준비액의 리포솜 외상에 암모늄염을 포함하는 경우, 암모늄염을 실질적으로 포함하지 않는 용액을 이용하여 리포솜 준비액의 리포솜 외상을 치환 또는 희석함으로써, 암모늄염을 실질적으로 포함하지 않는 리포솜 분산액을 제조할 수 있다.
- [0117] [활성 화합물]
- [0118] 본 발명에서의 활성 화합물은 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염이다(이하, 「에리블린 등」이라 기재하는 경우가 있음). 약리학적으로 허용되는 염이란 무기산염, 유기산염 중 어느 것이든 에리블린과 염을 형성하는 것이면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 염산염, 황산염, 시트르산염, 브롬화수소산염, 요오드화수소산염, 질산염, 중황산염, 인산염, 과인산염, 이소니코틴산염, 아세트산염, 락트산염, 살리실산염, 타르타르산염, 판토텐산염, 아스코르브산염, 숙신산염, 말레산염, 푸마르산염, 글루콘산염, 사카린산염, 포름산염, 벤조산염, 글루탐산염, 메탄술폰산염, 에탄술폰산염, 벤젠술폰산염, p-톨루엔술폰산염, 파모산염(pamoate) 등을 들 수 있으며, 바람직하게는 염산염, 황산염, 아세트산염, 인산염, 시트르산염, 메실산염 등을 들 수 있으며, 보다 바람직하게는 메실산염이다. 즉, 본 발명에서의 활성 화합물은 바람직하게는, 메실산에리블린이다. 또한, 에리블린의 약리학적으로 허용되는 염으로서, 에리블린과, 알루미늄, 칼슘, 리튬, 마그네슘, 칼슘, 나트륨, 아연, 디에탄올아민과의 염일 수도 있다. 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염은, 국제 공개 제99/65894호 공보 또는 미국 특허 제6214865호 공보(이들 특허문헌에 기재되는 내용은 참조에 의해 받아들임)에 기재되는 화합물 또는 그의 염으로서, 항종양 및 항유사분열 활성을 포함해서 약리학적 활성을 갖는다. 그리고, 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염은, 항종양제로서, 흑색종, 섬유육종, 단구성 백혈병, 결장암, 난소암, 유방암, 골육종, 전립선암, 폐암, 및 ras-전환 섬유아세포 등에 항종양 활성을 갖는다.
- [0119] 다만, 에리블린 등과 함께 조합할 수 있는 활성 화합물로서는, 의약(진단약을 포함함), 화장품, 식품 등의 분야에서 이용되는 화합물로부터 선택할 수 있다. 활성 화합물은 에리블린 등 이외의 1종의 화합물 또는 2종 이상의 화합물의 조합일 수도 있다.
- [0120] 활성 화합물로서는 저분자 화합물 등을 들 수 있으며, 그 중에서도 항종양제, 항균제, 항염증제, 항심근경색제, 조영제로서 이용되는 화합물이 바람직하다.
- [0121] 활성 화합물은 분자량이 100 내지 2000인 것이 바람직하고, 200 내지 1500인 것이 보다 바람직하고, 300 내지 1000인 것이 더욱 바람직하다. 일반적으로 이들 범위에서, 활성 화합물의 리포솜막 투과성이 양호하며, 바람직하게 본 발명을 적용할 수 있다.
- [0122] 활성 화합물은 수용성 화합물 및 지용성 화합물을 포함하고, 물 또는 수성 용매에 적어도 다소라도 용해하는 것이면 본 발명을 적용할 수 있다.
- [0123] 본 발명에서, 항종양제로서는, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 염산이리노테칸, 염산노기테칸, 엑사테칸, RFS-2000, 루르토테칸(Lurtotecan), BNP-1350, Bay-383441, PNU-166148, IDEC-132, BN-80915, DB-38, DB-81, DB-90, DB-91, CKD-620, T-0128, ST-1480, ST-1481, DRF-1042, DE-310 등의 캄토테신 유도체; 도세탁셀 수화물, 도세탁셀, 파크리탁셀, IND-5109, BMS-184476, BMS-188797, T-3782, TAX-1011, SB-RA-31012, SBT-

1514, DJ-927 등의 탁산 유도체; 이포스파미드, 염산니무스틴, 카르보콘, 시클로포스파미드, 다카르바진, 티오테파, 부술판, 벨파란, 라니무스틴, 인산에스트라무스틴나트륨, 6-머캅토프린리보시드, 에노시타빈, 염산젬시타빈, 카름푸르, 시타라빈, 시타라빈옥포스페이트, 테가푸르, 독시플루리딘, 히드록시카르바미드, 플루오로우라실, 메토티렉세이트, 머캅토프린, 인산플루다라빈, 악티노마이신 D, 염산아클라루비신, 염산이다루비신, 염산피라루비신, 염산에피루비신, 염산다우노루비신, 염산독소루비신, 에피루비신, 피라루비신, 다우노루비신, 독소루비신, 염산피라루비신, 염산블레오마이신, 지노스타틴스티말라머, 네오카르지노스타틴, 마이토마이신 C, 황산블레오마이신, 황산페플로마이신, 에토포시드, 타르타르산비노렐빈, 황산빈크리스틴, 황산빈데신, 황산빈블라스틴, 염산암루비신, 게피니팁, 엑세메스탄, 카페시타빈, TNP-470, TAK-165, KW-2401, KW-2170, KW-2871, KT-5555, KT-8391, TZT-1027, S-3304, CS-682, YM-511, YM-598, TAT-59, TAS-101, TAS-102, TA-106, FK-228, FK-317, E7070, (8E, 12E, 14E)-7-((4-시클로헥틸피페라진-1-일)카르보닐)옥시-3,6,16,21-테트라히드록시-6,10,12,16,20-헵타메틸-18,19-에폭시트리코사-8,12,14-트리엔-11-올리드(E7107), KRN-700, KRN-5500, J-107088, HMN-214, SM-11355, ZD-0473 등을 들 수 있다. 상기 항종양제에 있어서, 염으로서 기재하고 있는 화합물은 임의의 염일 수도 있고, 유리체(free body)일 수도 있다. 또한, 유리체로서 기재하고 있는 화합물은 임의의 염일 수도 있다.

[0124] 항균제로서는, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 암포테리신 B, 세포티암헥세틸, 세팔로스פור인, 클로람페니콜, 디클로페낙 등을 들 수 있다. 상기 항균제에 있어서, 화합물은 임의의 염일 수도 있다.

[0125] 항염증제로서는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 프로스타글란딘류(PGE1, PGE2), 텍사메타손, 히드로코르티손, 피록시카ם, 인도메타신, 프레드니솔론 등을 들 수 있다. 상기 항염증제에 있어서, 화합물은 임의의 염일 수도 있다.

[0126] 항심근경색제로서는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 아데노신, 아데놀롤, 필시카이니드 등을 들 수 있으며, 조영제로서는 이오파미돌, 이옥사글산, 이오헥솔, 이오메프롤 등을 들 수 있다. 상기 항심근경색제 및 상기 조영제에 있어서, 화합물은 임의의 염일 수도 있다.

[0127] [지질]

[0128] 본 발명의 리포솜은, 막 구성 성분으로서, 인지질 및/또는 인지질 유도체를 포함하는 것이 바람직하다. 인지질 및 인지질 유도체로서는, 예를 들면 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤, 카르디올리핀, 스펅고미엘린, 세라마이드포스포틸에탄올아민, 세라마이드포스포틸글리세롤, 세라마이드포스포틸글리세롤포스페이트, 1,2-디미리스토일-1,2-데옥시포스파티딜콜린, 플라스말로겐, 포스파티드산 등을 들 수 있다. 인지질 및 인지질 유도체는, 이들 중에서 1종 또는 2종 이상이 조합될 수도 있다.

[0129] 인지질 및 인지질 유도체에 있어서의 지방산 잔기는 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 탄소수 12 내지 20의 포화 또는 불포화의 지방산 잔기를 들 수 있고, 구체적으로는 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산 등의 지방산 유래의 아실기를 들 수 있다. 또한, 난황 레시틴, 대두 레시틴 등의 천연물 유래의 인지질, 및 불포화 지방산 잔기에 부분적으로 또는 완전히 수소 첨가한 부분 수소 첨가 난황 레시틴, (완전) 수소 첨가 난황 레시틴, 부분 수소 첨가 대두 레시틴, (완전) 수소 첨가 대두 레시틴 등을 이용할 수도 있다.

[0130] 리포솜을 제조할 때에 이용하는 인지질 및/또는 인지질 유도체의 배합량(몰분율)은 특별히 한정되지 않지만, 리포솜막 성분 전체에 대하여 10 내지 80%가 바람직하고, 30 내지 60%가 보다 바람직하다.

[0131] 본 발명의 리포솜은, 막 구성 성분으로서, 인지질 및/또는 인지질 유도체 이외에, 막안정화제로서 콜레스테롤, 콜레스타놀 등의 스테롤류, 탄소수 8 내지 22의 포화 또는 불포화의 아실기를 갖는 지방산류, α-토코페롤 등의 산화 방지제를 포함할 수도 있다.

[0132] 리포솜을 제조할 때에 이용하는 이들 스테롤류의 배합량(몰분율)은, 특별히 한정되지 않지만, 리포솜막 성분 전체에 대하여 1 내지 60%가 바람직하고, 10 내지 50%가 보다 바람직하고, 30 내지 50%가 더욱 바람직하다.

[0133] 또한, 지방산류의 배합량(몰분율)은, 특별히 한정되지 않지만, 리포솜막 성분 전체에 대하여 0 내지 30%가 바람직하고, 0 내지 20%가 보다 바람직하고, 0 내지 10%가 더욱 바람직하다. 산화 방지제의 배합량(몰분율)은 산화 방지 효과가 얻어지는 양이 첨가되면 충분한데, 리포솜막 성분 전체의 0 내지 15%가 바람직하고, 0 내지 10%가 보다 바람직하고, 0 내지 5%가 더욱 바람직하다.

[0134] 본 발명의 리포솜은, 막 구성 성분으로서, 기능성 지질 또는 수식 지질을 함유하고 있을 수도 있다.

- [0135] 가능성 지질로서, 혈중 체류성 지질 유도체, 온도 변화 감수성 지질 유도체, pH 감수성 지질 유도체 등을 들 수 있다. 수식 지질로서, PEG화 지질, 당지질, 항체 수식 지질, 펩티드 수식 지질 등을 들 수 있다.
- [0136] 혈중 체류성 지질 유도체로서는, 예를 들면 글리코포린, 강글리오시드 GM1, 강글리오시드 GM3, 글루쿠론산 유도체, 글루탐산 유도체, 폴리글리세린인지질 유도체, 포스포에탄올아민과 메톡시폴리에틸렌글리콜의 축합체인, N-(카르보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜-2000)-1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, N-(카르보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜-5000)-1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, N-(카르보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜-750)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민, N-(카르보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜-2000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(MPEG 2000-디스테아로일포스파티딜에탄올아민), N-(카르보닐-메톡시폴리에틸렌글리콜-5000)-1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 등의 폴리에틸렌글리콜 유도체(메톡시폴리에틸렌글리콜 축합체 등) 등을 들 수 있다. 리포솜이 혈중 체류성 지질 유도체를 함유함으로써, 리포솜이 외래 이물로서 간장 등에서 포착되기 어렵게 됨으로써 리포솜의 혈중 체류성을 향상시키는 것 등이 가능해진다.
- [0137] 온도 변화 감수성 지질 유도체로서는, 예를 들면 디팔미토일포스파티딜콜린 등을 들 수 있다. 리포솜이 온도 변화 감수성 지질 유도체를 함유함으로써, 특정한 온도에서 리포솜을 붕괴시키고, 리포솜의 표면 특성을 변화시키는 등이 가능해진다. 또한 중앙 등의 표적 부위의 가온과 조합함으로써 표적 부위에서 리포솜을 붕괴하여, 표적 부위에 활성 화합물을 방출시키는 것 등이 가능해진다.
- [0138] pH 감수성 지질 유도체로서는, 예를 들면 디올레오일포스파티딜에탄올아민 등을 들 수 있다. 리포솜이 pH 감수성 지질 유도체를 함유함으로써, 엔도사이토시스에 의해 리포솜이 세포에 취입될 때에 리포솜과 엔도솜의 막융합을 촉진하여, 활성 화합물의 세포질에의 송달을 개량하는 것 등이 가능해진다.
- [0139] 당지질, 항체 수식 지질 및 펩티드 수식 지질로서는, 표적 세포 또는 표적 조직에 친화성이 있는 당, 항체 또는 펩티드를 결합한 지질을 들 수 있다. 수식 지질을 이용함으로써 능동적으로 리포솜을 표적 세포 또는 표적 조직에 송달할 수 있다.
- [0140] 리포솜을 제조할 때에 이용하는 혈중 체류성 지질 유도체의 배합량(몰분율)은, 특별히 한정되지 않지만, 리포솜 막 구성 성분 지질 전체의 0 내지 50%가 바람직하고, 0 내지 30%가 보다 바람직하고, 0 내지 20%가 더욱 바람직하다.
- [0141] [리포솜]
- [0142] 상기한 바와 같이, 리포솜은 지질 이중층에 의해 포위된 내상을 갖는 미세 폐쇄 소포이다.
- [0143] 이상적으로는, 리포솜은 a) 에리블린 등을 내상에 일단 봉입한 후에는, 에리블린 등이 리포솜 외상으로는 누출되지 않는 배리어능을 갖고 있는 것이 바람직하다. 또한, 의약으로서 이용하는 경우, 리포솜은 생체 내에서 안정적인 것이 바람직하고, 또한 리포솜은 생체에 투여했을 때에 혈중에서는 에리블린 등이 리포솜 외상으로는 누출하지 않는 배리어능을 갖는 것이 바람직하다.
- [0144] 실용 가능한 레벨에서 이러한 막 투과성을 갖는 리포솜을 위한 막 구성 성분의 조성은, 당업자이면, 필요에 따라서 후술하는 실시예를 참조함으로써 활성 화합물이나 표적 조직 등에 따라서 적절하게 설정할 수 있다(문헌 [기쿠치 히로시 등, 「리포솜 I-제조법과 검정법」, 세포공학, (1983), 2(9): pp.1136-1149] 및 해당 문헌에 인용되는 문헌 등 참조).
- [0145] 또한, 의약으로서 이용하는 경우, 리포솜이 표적 조직, 세포 또는 세포내 소기관에 도달한 후에는, 에리블린 등이 리포솜으로부터 방출되는 것이 바람직하다. 리포솜은, 일반적으로 막 구성 성분 자체는 생분해성이고, 최종적으로는 표적 조직 등에서 분해된다. 이에 따라, 봉입되어 있던 에리블린 등이 방출된다고 생각된다. 또한, 리포솜 자체가 세포에 취입될 수도 있다.
- [0146] 또한, 리포솜 조성물은 고힐암 등의 표적 조직에의 타겟팅뿐만 아니라, 혈액암 등의 활성 화합물의 송달에도 사용할 수 있어, 혈중에서의 서방성 제제(slow release formulation)나 방출 제어 제제(controlled release formulation) 등으로서 이용하는 것도 가능하다.
- [0147] 리포솜의 입경은 목적에 따라서 설정할 수 있다. 예를 들면, 주사제 등으로서 EPR(향상된 투과 및 체류; Enhanced Permeability and Retention) 효과에 의해 암 조직이나 염증 조직으로 리포솜을 송달할 것을 의도하는 경우, 리포솜의 입경은 바람직하게는 30 내지 400 nm, 보다 바람직하게는 50 내지 200 nm이다. 또한, 마크로과지로 리포솜을 송달할 것을 의도하는 경우, 리포솜의 입경은 바람직하게는 30 내지 1000 nm, 보다 바람직하

게는 100 내지 400 nm이다. 또한, 리포솜 조성물을 경구 제제나 경피 제제로서 이용하는 경우 등, 리포솜의 입경은 수 마이크로미터로 할 수 있다. 또한, (1) 정상 조직에서는 (혈관 내피 세포가 밀하게 혈관벽을 구성하고 있기 때문에) 혈관벽이 배리어가 되어, 고분자나 특정한 크기의 리포솜과 같은 미세 입자는 조직내에 분포할 수 없지만, 병변 조직에서는 (혈관 내피 세포 사이에 간극이 생겨 있음) 혈관벽이 느슨해져서 혈관 투과성이 향상하고 있어, 고분자나 미세 입자는 혈관외의 조직에 분포할 수 있고(enhanced permeability), 또한 (2) 정상 조직에서는 림프계가 발달되어 있지만, 병변 조직에서는 림프계가 발달하지 않았기 때문에 일단 취입된 고분자나 미세 입자가 전신계에 회수되지 않고서 그 병변 조직에 체류함(enhanced retention)이 알려져 있어, EPR 효과라고 불리고 있다(문헌 [마쓰무라, 마에다, Cancer Research, (1986), 46: pp.6387-6392]). 이에 따라, 리포솜의 입경을 조정함으로써 체내 동태를 제어할 수 있다.

[0148] 또한, 본 발명에서, 리포솜의 입경은, 동적 광산란법(준탄성 광산란법)에 의한 중량 평균 입경을 의미한다. 여기서는 동적 광산란(Dynamic Light Scattering)측정기(예를 들면, 멜버른 인스트루먼트사(Malvern Instruments Ltd) 제조 제타사이저 나노(Zetasizer Nano) ZS 모델이나 오오쓰카 덴시사 제조 ELS-8000)에 의해 측정된 입경을 나타낸다. 측정기는 입자의 브라운 운동을 측정하고, 확립된 동적 광산란법 이론에 기초하여 입경을 결정하고 있다.

[0149] 리포솜 내상의 용매는 특별히 한정되어야 되는 것은 아니고, 예를 들면 인산염 완충액, 시트르산염 완충액, 인산염 완충화 생리식염액 등의 완충액, 생리식염수, 세포배양용의 배지 등을 들 수 있다. 용매로서 완충액을 이용하는 경우에는, 완충제의 농도가 5 내지 300 mM인 것이 바람직하고, 10 내지 100 mM인 것이 보다 바람직하다. 리포솜 내상의 pH는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 3 내지 11이 바람직하고, 4 내지 9가 보다 바람직하다.

[0150] [리포솜 조성물]

[0151] 본 발명에 따르면 리포솜 조성물이 제공된다. 리포솜 조성물은, 리포솜을 포함하며, 리포솜 내상에 에리블린 등을 더 포함한다. 상기한 바와 같이, 리포솜 조성물은 고체상 및 액체상의 것을 포함한다. 리포솜 조성물이 고체상의 것인 경우, 후술하는 바와 같이 소정의 용매에 용해 또는 현탁함으로써 액체상의 것으로 할 수 있다. 또한, 리포솜 조성물이 동결된 고체인 경우에는 실온 방치 등에 의해 용해시킴으로써 액체상의 것으로 할 수 있다.

[0152] 리포솜 조성물에 있어서의 리포솜의 농도 및 활성 화합물의 농도는, 리포솜 조성물의 목적, 제형 등에 따라서 적절하게 설정할 수 있다. 리포솜 조성물이 액체인 경우에 있어서, 리포솜의 농도는 리포솜의 구성 성분인 전체 지질의 농도로서, 0.2 내지 100 mM, 바람직하게는 1 내지 30 mM로 할 수 있다. 리포솜 조성물을 의약으로서 이용하는 경우에 있어서의 활성 화합물의 농도(용량)에 대해서는 후술한다. 리포솜 조성물에 있어서의 시클로텍스트린의 양은, 에리블린 등에 대하여 0.1몰당량 미만이 바람직하고, 검출 한계 이하인 것이 보다 바람직하다.

[0153] 본 발명에서의 리포솜은, 지질 이중층에 에리블린 등이 분배되어 있을 수도 있다.

[0154] 리포솜 조성물이 액체인 경우에 있어서의 리포솜 조성물의 용매(분산매)는 특별히 한정되어야 되는 것은 아니고, 예를 들면 인산염 완충액, 시트르산염 완충액, 인산염 완충화 생리식염액 등의 완충액, 생리식염수, 세포배양용의 배지 등을 들 수 있다. 리포솜 조성물에 있어서의 리포솜 외상의 pH는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 3 내지 11이 바람직하고, 4 내지 9가 보다 바람직하다.

[0155] 리포솜 조성물에는, 또한 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스, 프룩토오스, 이노시톨, 리보오스, 자일로오스 등의 단당류, 젖당, 자당, 셀로비오스, 트레할로오스, 말토오스 등의 이당류, 라피노오스, 멜레지토오스 등의 삼당류, 시클로텍스트린 등의 다당류, 에리트ρί톨, 자일리톨, 소르비톨, 만니톨, 말티톨 등의 당알코올 등의 당이나, 글리세린, 디글리세린, 폴리글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜, 디에틸렌글리콜, 트리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 에틸렌글리콜모노알킬에테르, 디에틸렌글리콜모노알킬에테르, 1,3-부틸렌글리콜 등의 다가 알코올 등을 가할 수도 있다. 당과 알코올을 조합하여 이용할 수도 있다.

[0156] 이 용매(분산매)에 분산한 리포솜을 안정적으로 장기간 보존하기 위해서는, 응집 등의 물리적 안정성의 면에서, 용매(분산매) 중의 전해질을 최대한 제거하는 것이 바람직하다. 또한, 지질의 화학적 안정성의 면에서, 용매(분산매)의 pH를 산성 내지 중성 부근(pH 3.0 내지 8.0)으로 설정하는 것이나 질소 버블링에 의해 용존 산소를 제거하는 것이 바람직하다.

[0157] 리포솜 조성물에 포함되는 당 또는 다가 알코올의 농도는 특별히 한정되지 않지만, 리포솜이 용매에 분산된 상태에서, 예를 들면 당의 농도는 2 내지 20%(W/V)이 바람직하고, 5 내지 10%(W/V)가 보다 바람직하다. 다가

알코올의 농도는, 1 내지 5%(W/V)가 바람직하고, 2 내지 2.5%(W/V)가 보다 바람직하다. 이들 용매를 리포솜 분산액에 있어서의 리포솜 외상으로서 이용할 수도 있고, 리포솜 준비액의 리포솜 외상을 이들 용매로 치환 또는 희석함으로써 리포솜 외상의 용액을 이들 용액으로 할 수 있다.

[0158] 리포솜 조성물의 고휘형 제제는, 예를 들면 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스, 프룩토오스, 이노시톨, 리보오스, 자일로오스 당의 단당류, 젓당, 자당, 셀로비오스, 트레할로오스, 말토오스 등의 이당류, 라피노오스, 멜레지토 오스 등의 삼당류, 시클로덱스트린 등의 다당류, 에리트리톨, 자일리톨, 소르비톨, 만니톨, 말티톨 등의 당알코올 등의 당을 포함하는 것이 바람직한데, 보다 바람직하게는 글루코오스, 젓당, 자당, 트레할로오스, 소르비톨의 배합이고, 더욱 바람직하게는 젓당, 자당, 트레할로오스의 배합이다. 이에 따라, 고휘형 제제를 안정적으로 장기간 보존할 수 있다. 또한, 동결하는 경우에는, 고휘형 제제는 글리세린, 디글리세린, 폴리글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜, 디에틸렌글리콜, 트리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 에틸렌글리콜모노알킬에테르, 디에틸렌글리콜모노알킬에테르, 1,3-부틸렌글리콜 등의 다가 알코올 (수용액)을 포함하는 것이 바람직하다. 다가 알코올 (수용액)은, 글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜이 보다 바람직하고, 글리세린, 프로필렌글리콜이 더욱 바람직하다. 이에 따라, 고휘형 제제를 안정적으로 장기간 보존할 수 있다. 당과 다가 알코올을 조합하여 이용할 수도 있다.

[0159] [리포솜 조성물의 제조 방법]

[0160] 본 발명에 따르면, 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염을 함유하는 리포솜 조성물을 제조하는 방법이 제공된다. 리포솜 조성물을 제조하는 방법은, 리포솜을 포함하는 리포솜 분산액을 제공하는 스텝과, 상기 리포솜 분산액과 상기 활성 화합물(에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염)을 혼합하는 스텝과, 상기 리포솜 분산액의 리포솜 내상에 상기 활성 화합물을 도입하는 스텝을 포함하는 방법이다.

[0161] 리포솜을 포함하는 리포솜 분산액을 제공하는 스텝은, 리포솜 준비액을 제공하는 스텝과, 상기 리포솜 준비액의 리포솜 외상을 치환 또는 희석하는 스텝을 포함하는 것이 바람직하다.

[0162] 리포솜 준비액은, 예를 들면 암모늄염을 포함하는 용액 중에서 리포솜을 제조함으로써 제공할 수 있다. 암모늄염을 포함하는 용액 중에서 리포솜 준비액을 제조함으로써, 리포솜 내상에 암모늄염을 더 포함하는 리포솜 분산액으로 할 수 있다.

[0163] 리포솜 준비액을 제조할 때의 암모늄염을 포함하는 용액은, 어느 하나의 암모늄염을 포함하는 용액이면 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0164] 암모늄염으로서, 예를 들면 염화암모늄, 붕산암모늄, 황산암모늄, 포름산암모늄, 아세트산암모늄, 시트르산암모늄, 타르타르산암모늄, 숙신산암모늄, 인산암모늄을 들 수 있고, 바람직하게는 황산암모늄, 아세트산암모늄, 시트르산암모늄, 타르타르산암모늄, 인산암모늄이고, 보다 바람직하게는 황산암모늄, 시트르산암모늄, 타르타르산암모늄이고, 특히 바람직하게는 황산암모늄이다.

[0165] 이들 암모늄염 중, 어느 2종 이상의 암모늄염을 조합하여 이용할 수도 있다.

[0166] 암모늄염을 포함하는 용액에 있어서의 암모늄염의 농도는, 붕입하는 에리블린 등의 양에 따라서 적절하게 설정할 수 있는데, 높으면 높을수록 좋고, 바람직하게는 10 mM 이상이고, 보다 바람직하게는 20 mM 이상이고, 더욱 바람직하게는 50 mM 이상이다. 암모늄염을 포함하는 용액의 pH는 3 내지 9로 하는 것이 바람직하고, 붕입물과 안정성의 균형으로부터, 보다 바람직하게는 4 내지 9이고, 더욱 바람직하게는 5 내지 8이다.

[0167] 암모늄염을 포함하는 용액의 pH 조절을 위해 pH 조절제를 사용할 수 있다. 암모늄염을 포함하는 용액 내의 개개의 pH 조절제의 농도는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1 내지 300 mM이고, 보다 바람직하게는 5 내지 100 mM이다.

[0168] pH 조절제는, 예를 들면 아르기닌, 히스티딘, 글리신 등의 아미노산, 아스코르브산, 벤조산, 시트르산, 글루탐산, 인산, 아세트산, 프로피온산, 타르타르산, 탄산, 락트산, 붕산, 말레산, 푸마르산, 말산, 아디프산, 염산, 황산 등의 산, 상기 산의 나트륨염, 칼륨염, 암모늄염 등의 염, 트리스히드록시메틸아미노메탄, 암모니아수(암모니아), 수산화나트륨, 수산화칼륨 등의 알칼리성 화합물(염기) 등을 들 수 있다. pH 조절제로서는, 바람직하게는 수산화나트륨, 염산, 암모니아수, 아세트산, 락트산, 타르타르산, 숙신산, 시트르산 및 인산이고, 보다 바람직하게는 수산화나트륨, 암모니아수, 염산, 아세트산, 시트르산 및 인산이고, 더욱 바람직하게는 수산화나트륨, 암모니아수, 염산, 시트르산 및 인산이다. pH 조절제는, 어느 2종 이상의 암모늄염을 조합하여 이용할 수도 있다. 또한, pH 조절제로서, 인산염 완충액, 시트르산염 완충액, 인산염 완충화 생리식염액 등의 완충액을

이용할 수도 있다.

- [0169] 리포솜 준비액으로서, 실질적으로 시클로덱스트린을 포함하지 않고서 리포솜을 제조함으로써 얻어지는 용액을 이용하는 것이 바람직하다. 또한, 리포솜 준비액으로서, 리포솜 내상에 염, 산, 염기 및/또는 아미노산을 더 함유할 수도 있고, 이 경우 리포솜 내상에 활성 화합물, 암모늄염 및 산을 함유하는 것이 바람직하다. 암모늄염으로서는, 황산암모늄을 바람직한 예시로서 들 수 있고, 산으로서는, 시트르산을 바람직한 예시로서 들 수 있다.
- [0170] 리포솜의 제조는, 리피드 필름법(볼텍스법), 역상 증발법, 초음파법, 프리베시클(pre-vesicle)법, 에탄올 주입법, 프렌치 프레스(French Press)법, 콜산 제거법, 트리톤(Triton) X-100 배치법, Ca²⁺ 융합법, 에테르 주입법, 어닐링법, 동결 용해 융합법 등을 들 수 있다.
- [0171] 리포솜의 제조에 있어서의 각종 조건(막 구성 성분의 양, 온도 등)은, 리포솜의 제조 방법이나 목적으로 하는 리포솜의 조성, 입경 등에 따라서 적절하게 설정할 수 있다(전술, 기쿠치(1983) 등 참조).
- [0172] 필요에 따라서 임의로 리포솜의 입경을 조정할 수 있다. 입경은, 예를 들면 공경이 균일한 멤브레인 필터를 이용하여, 고압력 하에서 익스트루전(압출 여과)을 행함으로써 조정할 수 있다. 입경의 조정은, 본 발명의 리포솜 조성물의 제조에 있어서의 임의의 타이밍에 행할 수 있고, 예를 들면 리포솜 준비액에 있어서의 리포솜 외상을 조정하기 전, 리포솜 준비액에 있어서의 리포솜 외상을 조정한 후, 또는 활성 화합물을 리포솜 내상에 도입한 후에 행할 수 있다. 입경의 조정은, 활성 화합물을 리포솜 내상에 도입하기 전에 행하는 것이 바람직하고, 리포솜 준비액에 있어서의 리포솜 외상을 조정하기 전에 행하는 것이 보다 바람직하다.
- [0173] 얻어진 리포솜 준비액의 리포솜 외상을 치환 또는 회석함으로써, 리포솜 분산액을 얻을 수 있다. 리포솜 외상의 치환 또는 회석은, 1회로 행할 수도 있고, 각종 치환 또는 회석하는 방법을 조합하여 복수회 행할 수도 있다.
- [0174] 리포솜 준비액의 리포솜 외상을 치환하는 방법으로서, 투석, 원심 분리, 겔 여과 등의 방법을 들 수 있다. 리포솜 외상을 치환함으로써 리포솜 외상에 시클로덱스트린 또는 암모늄염을 실질적으로 포함하지 않도록 본 발명을 실시할 수 있다. 또한, 리포솜 외상을 치환 또는 회석함으로써, 리포솜 내상에 효율적으로 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염을 봉입할 수도 있다.
- [0175] 투석은, 예를 들면 투석막을 이용하여 행할 수 있다. 투석막으로서는, 셀룰로오스 튜브나 스펙트라포어(Spectra/Por) 등의 분자량으로 분획하는 막을 들 수 있다.
- [0176] 원심 분리는, 예를 들면 원심 가속도가 바람직하게는 100,000 g 이상, 보다 바람직하게는 300,000 g 이상으로 실시할 수 있다. 원심에 의해 리포솜 외상을 치환함으로써 리포솜 외상의 치환과 합쳐서 리포솜의 농축을 행할 수 있다.
- [0177] 겔 여과는, 예를 들면 세파덱스(Sephadex)나 세파로스(Sepharose) 등의 칼럼을 이용하여, 분자량에 기초하여 분획함으로써 실시할 수 있다.
- [0178] 리포솜 외상을 치환 및/또는 회석할 때에 이용하는 용매(분산매)로서는, 예를 들면 자당 용액, 식염수, 세포배양용의 배지 등을 들 수 있다. 이들 용매를 이용함으로써 안정적인 리포솜 조성물을 제조할 수 있다.
- [0179] 해당 용매의 pH는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 2 내지 11의 범위로 설정할 수 있고, 바람직하게는 3 내지 10, 보다 바람직하게는 6 내지 10, 더욱 바람직하게는 7 내지 10이다. 후술하는 바와 같이, 에리블린 등의 리포솜 내상에의 도입에 pH 구배를 이용할 수도 있다. 이 경우, 리포솜 외상이 목적으로 하는 pH가 되도록 용매의 pH를 설정할 수 있다.
- [0180] 해당 용매의 pH 조정을 위해 pH 조정제를 사용할 수 있다. 사용하는 농도는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1 내지 300 mM, 보다 바람직하게는 5 내지 100 mM이다.
- [0181] pH 조정제로서는, 예를 들면 아르기닌, 히스티딘, 글리신 등의 아미노산, 아스코르브산, 벤조산, 시트르산, 글루탐산, 인산, 아세트산, 프로피온산, 타르타르산, 탄산, 락트산, 붕산, 말레산, 푸마르산, 말산, 아디프산, 염산, 황산 등의 산, 상기 산의 나트륨염, 칼륨염, 암모늄염 등의 염, 트리스히드록시메틸아미노메탄, 암모니아수, 수산화나트륨, 수산화칼륨 등의 알칼리성 화합물을 들 수 있고, 바람직하게는 수산화나트륨, 염산, 히스티딘, 타르타르산, 숙신산, 시트르산 및 인산이고, 보다 바람직하게는 수산화나트륨, 염산, 히스티딘, 타르타르산, 시트르산 및 인산이고, 더욱 바람직하게는 수산화나트륨, 염산, 히스티딘, 인산이다.

- [0182] 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염의 리포솜에의 봉입률을 개선하기 위해서, 리포솜 외상에 전해질을 포함하는 용액(염류 용액)을 첨가하여 이온 강도를 증대시킴으로써 봉입률을 증가시킬 수 있다. 리포솜 외상에 포함되는 전해질(염류)은, 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 염화나트륨, 염화칼륨이고, 보다 바람직하게는 염화나트륨이다. 또한, 생리식염수를 이용할 수도 있다. 또한, 리포솜 분산액 등의 리포솜 외상으로서, 당, 전해질 및/또는 아미노산을 포함하고 있을 수도 있고, 당 또는 전해질과, 아미노산을 함유하고 있을 수도 있다. 당으로서는 자당을 바람직한 예시로서 들 수 있고, 전해질로서는 생리식염수, 염화나트륨 등을 바람직한 예시로서 들 수 있고, 아미노산으로서는 히스티딘을 들 수 있다.
- [0183] 얻어진 리포솜 분산액은, 리포솜 외상 및 리포솜 내상에 실질적으로 시클로텍스트린 또는 암모늄염을 함유하지 않는 것이 바람직하데, 본 발명에서는 어떠한 이유로 리포솜 분산액의 리포솜 외상에 시클로텍스트린 또는 암모늄염을 첨가한 경우 등, 리포솜 분산액이 리포솜 외상에 시클로텍스트린 또는 암모늄염을 함유하고 있더라도, 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염을 리포솜 내상에 도입할 수 있다.
- [0184] 리포솜 분산액에 있어서의 리포솜의 지질 농도는 1 내지 100 mM인 것이 바람직하고, 1 내지 50 mM인 것이 보다 바람직하다. 이들 범위에서, 리포솜 분산액의 물성을 손상시키지 않고 보다 많은 리포솜 입자를 바람직하게 형성할 수 있다.
- [0185] 얻어진 리포솜 분산액과 에리블린 등의 활성 화합물을 혼합하고, 리포솜 분산액의 리포솜 내상에 활성 화합물을 도입함으로써 리포솜 조성물을 얻을 수 있다. 도입하는 스텝은, 리포솜 분산액과 활성 화합물의 혼합액에 있어서의 리포솜의 막 투과성을 높이는 스텝을 포함하는 것이 바람직하다. 이에 따라, 에리블린 등의 리포솜에의 봉입을 보다 단시간에 행할 수 있다. 그러나, 리포솜 분산액과 에리블린 등을 혼합한 후, 리포솜의 막 투과성을 높이기 위한 조작을 특별히 행하지 않더라도, 시간이 지나면 에리블린 등을 리포솜에 봉입할 수 있다.
- [0186] 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염을 혼합하는 스텝에 있어서, 에리블린 등으로서, 용매에 용해한 것이나, 고체상의 것을 사용할 수 있다. 용매는 특별히 한정되는 것은 아니고, 예를 들면 리포솜 분산액에 있어서의 리포솜 외상과 동일한 것을 사용할 수 있다.
- [0187] 필요에 따라서 임의로, 에리블린 등의 리포솜 내상에의 도입에 pH 구배를 이용할 수도 있다. 이 경우, 리포솜 분산액에 있어서의 리포솜 내상의 pH는 3 내지 9가 바람직하고, 4 내지 9가 보다 바람직하고, 5 내지 8이 더욱 바람직하다.
- [0188] 또한, 리포솜 외상의 pH를 리포솜 내상의 pH보다도 높게 설정하여 pH 구배를 부여할 수 있다. 바람직한 pH의 경사는 1 내지 5이고, 보다 바람직하게는 2 내지 3이다.
- [0189] 또한, 리포솜 외상의 pH를 에리블린 등의 pKa 부근에 보다 가깝게 함으로써, 리포솜에의 봉입률을 높일 수 있다. 바람직하게는 7.5 내지 12.5, 보다 바람직하게는 8.5 내지 11.5, 더욱 바람직하게는 9 내지 10.5이다(메실산에리블린의 pKa=9.6).
- [0190] 리포솜 준비액으로서, 실질적으로 시클로텍스트린을 포함하지 않고서 리포솜을 제조함으로써 얻어지는 용액을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0191] 얻어진 혼합액에 있어서의 리포솜의 막 투과성을 높이는 방법으로서, 혼합액을 가열하는 방법, 혼합액에 막유동 화제를 첨가하는 방법 등을 들 수 있다.
- [0192] 혼합액을 가열하는 경우, 일반적으로는 보다 높은 온도로 승온함으로써 보다 효율적으로 활성 화합물을 리포솜 내상에 도입할 수 있다. 구체적으로는, 활성 화합물이나 이용하는 리포솜막 구성 성분의 열적 안정성을 고려하여 승온하는 온도를 설정하는 것이 바람직하다. 특히, 승온하는 온도는 리포솜의 지질 이중막의 상전이 온도 이상으로 하는 것이 바람직하다.
- [0193] 리포솜의 지질 이중막의 「상전이 온도」란 승온 상태에서의 시차 열분석에 있어서의 흡열 개시 온도(흡열 반응이 시작되었을 때의 온도)를 의미한다. 시차 열분석이란 시료 및 기준 물질의 온도를 변화시키면서, 해당 시료와 기준 물질의 온도차를 시간 또는 온도의 함수로서 측정함으로써 시료의 열 특성을 분석할 수 있는 기술이다. 리포솜의 막 구성 성분에 대해서 시차 열분석을 행한 경우, 온도의 상승에 따라 리포솜막 성분의 유동화가 발생하여, 흡열 반응이 관찰된다. 본 기술분야에서 널리 알려져 있는 바와 같이, 리포솜의 막 성분에 따라서 흡열 반응이 관찰되는 온도역은 크게 변화한다. 예를 들면 리포솜막 성분이 순수한 지질로 구성되는 경우, 흡열 반응이 관찰되는 온도역은 매우 좁고, 흡열 반응은 흡열 피크 온도에 대하여 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 범위 내에서 관찰되는 경우가 많다. 한편, 리포솜막 성분이 복수의 지질로 구성되는 경우, 특히 천연물 유래의 지질로 구성되는 경우 등,

흡열 반응이 관찰되는 온도역이 넓게 되는 경향이 있고, 흡열 반응은 흡열 피크 온도에 대하여 예를 들면 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 의 범위 내에서 관찰되는(즉, 넓은 피크가 관찰된다) 경우가 있다. 본 발명에서, 리포솜의 지질 이중막의 상전이 온도 이상으로 승온함으로써 리포솜의 막유동성이 상승하여, 활성 화합물의 막 투과성이 상승한다고 생각된다.

- [0194] 예를 들면, 활성 화합물이나 이용하는 리포솜막 구성 성분의 열적 안정성 등에도 의존하지만, 리포솜의 지질 이중막의 상전이 온도 내지 상전이 온도+20 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위인 것이 바람직하고, 상전이 온도 내지 상전이 온도+10 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위인 것이 보다 바람직하고, 상전이 온도+5 $^{\circ}\text{C}$ 내지 상전이 온도+10 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도 범위인 것이 더욱 바람직하다.
- [0195] 승온하는 온도는 통상 20 내지 100 $^{\circ}\text{C}$ 이고, 바람직하게는 40 내지 80 $^{\circ}\text{C}$, 더욱 바람직하게는 45 내지 65 $^{\circ}\text{C}$ 이다.
- [0196] 구체적으로는, 디팔미토일포스파티딜콜린(단체로의 상전이 온도: 41 $^{\circ}\text{C}$)과 콜레스테롤을 주체로 한 리포솜막의 경우에는, 그의 조성에도 의존하지만, 일반적으로 승온 온도는 40 내지 60 $^{\circ}\text{C}$ 가 바람직하고, 45 내지 50 $^{\circ}\text{C}$ 가 보다 바람직하다. 또한, 수소 첨가 대두 포스파티딜콜린(HSPC, 단체로의 상전이 온도: 50 내지 60 $^{\circ}\text{C}$)와 콜레스테롤을 주체로 한 리포솜막의 경우에는, 그의 조성에도 의존하지만, 일반적으로 승온 온도는 50 내지 70 $^{\circ}\text{C}$ 가 바람직하고, 55 내지 65 $^{\circ}\text{C}$ 가 보다 바람직하다. 그러나, 이들 승온하는 온도는 본 발명을 전혀 한정하는 것이 아니다.
- [0197] 승온하는 스텝에 있어서, 상전이 온도 이상의 온도로 유지하는 시간은 특별히 한정되는 것은 아니고, 예를 들면 수초 내지 30분의 범위에서 적절하게 설정하는 것이 가능한데, 활성 화합물이나 지질의 열적 안정성이나, 효율적인 대량 생산을 고려하면, 단시간에 처리하는 것이 바람직하다. 즉, 승온 유지 시간은 1분 내지 30분인 것이 바람직하고, 2분 내지 5분인 것이 보다 바람직하다. 그러나, 이들의 온도 유지의 시간은 본 발명을 전혀 한정하는 것이 아니다.
- [0198] 또한, 상기한 바와 같이, 얻어진 혼합액에 막유동화제를 첨가(즉, 리포솜의 외상 측에 첨가)함으로써도 리포솜의 막 투과성을 높일 수 있다. 막유동화제로서, 수계 용매에 가용인 유기 용매, 계면 활성제, 효소 등을 들 수 있다. 보다 구체적으로는, 유기 용매로서, 예를 들면 에틸알코올, 벤질알코올 등의 1가 알코올류, 글리세린, 프로필렌글리콜 등의 다가 알코올류, 디메틸설폭사이드(DMSO) 등의 비양성자성 극성 용매를 들 수 있다. 계면 활성제로서, 지방산나트륨, 모노알킬황산염, 모노알킬인산염 등의 음이온계 계면 활성제, 알킬트리메틸암모늄염 등의 양이온계 계면 활성제, 알킬디메틸아민옥시드 등의 양쪽성 계면 활성제, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, 알킬 모노글리세릴에테르, 지방산소르비탄에스테르 등의 비이온성 계면 활성제를 들 수 있다. 효소로서, 콜린 에스테라아제, 콜레스테롤 옥시다제 등을 들 수 있다. 당업자이면, 리포솜막 구성 성분의 조성, 막유동화제 등에 따라서, 막유동화제의 첨가에 의한 활성 화합물의 봉입의 효율화의 정도나, 리포솜의 안정성 등을 고려하여, 막유동화제의 양을 설정할 수 있다.
- [0199] 본 발명의 리포솜 조성물의 제조 방법은, 상기 도입하는 스텝 후에 이어서, 얻어진 리포솜 조성물의 리포솜 외상의 pH를 조정하는 스텝을 포함할 수 있다.
- [0200] 외상의 조정하는 pH는 특별히 한정되지 않지만, 리포솜을 구성하는 인지질의 화학적 안정성의 관점에서, 바람직하게는 4 내지 10, 보다 바람직하게는 5 내지 9, 더욱 바람직하게는 6 내지 8의 중성 pH이다.
- [0201] 또한, 얻어진 리포솜 조성물을 건조시키는 스텝을 더 포함할 수 있다.
- [0202] 즉, 리포솜 조성물을 액체로 하는 경우, 상기 도입하는 스텝에 의해 얻어진 액체상의 리포솜 조성물을 그대로 최종적인 리포솜 조성물로 할 수 있고, 또는 얻어진 액체상의 리포솜 조성물에 있어서의 리포솜 외상을 조정(치환 등)함으로써 최종적인 리포솜 조성물로 할 수 있다. 이 때의 리포솜 외상의 조정은, 리포솜 준비액에 있어서의 리포솜 외상의 조정과 동일하게 행할 수 있다. 리포솜 조성물이 액체인 경우, 그대로 사용에 제공할 수 있다.
- [0203] 또한, 리포솜 조성물을 고형 제제로 하는 경우, 상기 도입하는 스텝에 의해 얻어진 액체상의 리포솜 조성물을 건조시킴으로써 최종적인 고체상의 리포솜 조성물로 할 수 있다. 리포솜 조성물을 건조시키는 방법로서는, 동결 건조나 분무 건조 등을 들 수 있다. 리포솜 조성물이 고형 제제인 경우, 리포솜 조성물은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킴으로써 액체로서 사용에 제공할 수 있다. 용매는, 리포솜 조성물의 사용의 목적 등에 따라서 적절하게 설정할 수 있고, 예를 들면 리포솜 조성물을 주사제로서 이용하는 경우, 용매는 멸균 증류수인 것이 바람직하다. 리포솜 조성물을 의약으로서 이용하는 경우, 의사나 환자에 의해, 예를 들면 고형 제제를 봉입한 바이알에 용매를 주입함으로써 이러한 사용시 제조를 행할 수 있다. 또한, 액체상의 리포솜 조성물을 동결

시킨 고형 제제의 경우, 동결 상태로 보존하고, 사용 시에 실온에서 방치 용해 또는 가온에 의한 급속 용해에 의해 액체상으로 복귀함으로써 액제로서 사용에 제공할 수 있다.

[0204] [의약 조성물 등]

[0205] 본 발명의 리포솜 조성물은, 의약 분야에서 치료약으로서 사용할 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 리포솜 조성물은 항종양제의 의약 조성물로 하여 사용할 수 있다.

[0206] 본 발명의 리포솜 조성물을 의약 조성물로서 이용하는 경우, 리포솜 조성물은, 주사(정맥 주사, 동맥 주사, 국소 주사), 경구, 경비, 경피, 경폐, 점안에 의해 투여할 수 있고, 특히 정맥 주사, 피하 주사, 피내 주사, 동맥 내 주사 외에, 표적으로 하는 세포나 장기에 대하여는 국소 주사 등의 주사가 바람직하다. 경구 투여하는 경우의 리포솜 조성물의 제형으로서는, 예를 들면 정제, 산제, 과립제, 시럽제, 캡슐제, 내복액제 등을 들 수 있다. 비경구 투여하는 경우의 리포솜 조성물의 제형으로서는, 예를 들면 주사제, 점적제, 점안제, 연고제, 좌제, 현탁제, 파프제, 로션제, 에어졸제, 플라스틱제 등을 들 수 있고, 특히 주사제, 점적제가 바람직하다.

[0207] 의약 조성물의 투여량은, 대상이 되는 질환의 종류, 활성 화합물의 종류, 환자의 연령, 성별, 체중, 증상의 정도 등에 따라 현저히 다르지만, 통상 성인 1일당, 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염의 투여량은 특별히 한정되지 않지만, 바람직한 염인 메실산에리블린은 통상 0.1 내지 10 mg이다. 또한, 1일 1 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 리포솜 조성물로서, 리포솜 내상에 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염을, 예를 들면 0.01 내지 300 mg/mL 포함하는 리포솜 조성물을 투여할 수 있다.

[0208] [키트]

[0209] 본 발명에 따르면 리포솜 조성물을 제조하기 위한 키트가 제공된다. 키트는, 의약으로서의 리포솜 조성물을 제조하기 위해서 사용할 수 있고, 임상 현장에서 의사나 환자 자신이 사용할 수 있다.

[0210] 키트는 리포솜 시약을 포함한다. 리포솜 시약은, 고체상 또는 액체상 중의 어느 것이어도 된다. 리포솜 시약이 액체상인 경우, 상기 리포솜 분산액을 리포솜 시약으로 할 수 있다. 또한, 리포솜 시약이 고체상인 경우, 리포솜 시약은 적당한 용매에 용해 또는 현탁함으로써 리포솜 분산액을 얻을 수 있는 시약이고, 상기 리포솜 분산액을 건조시킴으로써 리포솜 시약을 얻을 수 있다. 건조는, 상기 리포솜 조성물의 건조와 동일하게 행할 수 있다. 키트를 사용할 때는, 리포솜 시약이 고체상인 경우, 리포솜 시약을 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킴으로써 리포솜 분산액으로 한다. 이 때의 용매는, 상기 리포솜 분산액에 있어서의 리포솜 외상과 동일하다.

[0211] 본 발명의 키트는, 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염(바람직한 염으로서는, 메실산에리블린)을 더 포함한다. 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염은, 고체상 또는 액체상(용매에 용해 또는 현탁된 상태) 중의 어느 것이어도 된다. 키트를 사용할 때는, 에리블린 등이 고체상인 경우, 에리블린 등을 적당한 용매에 용해 또는 현탁시켜 액체상으로 하는 것이 바람직하다. 용매는 에리블린 등의 물성 등에 따라서 적절하게 설정할 수 있고, 예를 들면 상기 리포솜 분산액에 있어서의 리포솜 외상과 동일하게 할 수 있다. 본 발명의 키트에는, 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염 이외의 활성 화합물을 포함하고 있을 수도 있다.

[0212] 키트에 있어서, 리포솜 시약과 활성 화합물은 별개로 포장되어 있을 수도 있고, 또는 리포솜 시약과 활성 화합물은 각각 고체상이며 혼합되어 있을 수도 있다.

[0213] 리포솜 시약이 고체상인 경우에, 상기한 바와 같이 용해 또는 현탁시킴으로써 리포솜 분산액으로 하는 것을 제외하면, 키트는, 상기 리포솜 조성물의 제조 방법에 있어서의 리포솜 분산액과 활성 화합물의 혼합 및 리포솜 분산액의 리포솜 내상에의 활성 화합물의 도입과 동일한 스텝을 행함으로써 사용할 수 있다. 이에 따라, 리포솜 시약의 리포솜 내상에 활성 화합물이 도입된 리포솜 조성물을 제조할 수 있다.

[0214] 리포솜 시약과 활성 화합물이 각각 고체상이며 함께 포장되어 있는 경우에는, 이 리포솜 시약과 활성 화합물의 혼합물을 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 이 때의 용매는, 상기 리포솜 분산액에 있어서의 리포솜 외상과 동일하다. 이에 따라, 리포솜 분산액과 활성 화합물을 혼합한 상태로 할 수 있고, 그 후 상기 리포솜 조성물의 제조 방법에 있어서의 리포솜 분산액의 리포솜 내상에의 활성 화합물의 도입에서의 그 밖의 스텝을 행함으로써 사용할 수 있다.

[0215] [실시에]

[0216] 본 발명을 실시예 및 비교예를 예를 들어 구체적으로 설명하는데, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [0217] [실시에 1]
- [0218] <리포솜 내상용 수용액의 제조>
- [0219] 황산암모늄 396.4 mg 및 시트르산 일수화물 189.1 mg을 순수로 용해하고, 15 mL로 메스업함으로써 200 mM 황산암모늄/60 mM 시트르산 수용액을 제조하였다. 리포솜 내상용 수용액은 200 mM 황산암모늄/60 mM 시트르산 수용액 2.5 mL를 암모니아수로 pH 5.5로 조정 후, 순수를 이용하여 5 mL로 메스업함으로써 제조하였다.
- [0220] <리포솜 준비액의 제조>
- [0221] 수소 첨가 대두 포스파티딜콜린(리포이드(Lipoid)사 제조) 317.9 mg, 콜레스테롤(시그마(Sigma)사 제조) 116.0 mg 및 폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민(젠자임(Genzyme)사 제조, MPEG 2000-디스테아로일포스파티딜에탄올아민) 130.4 mg을 클로로포름 10 mL에 용해한 후에 정확하게 3개로 분주하고, 그 중의 1개를 회전 증발기로 클로로포름을 감압 증류 제거하여 리피드 필름을 제조하였다. 얻어진 리피드 필름에 리포솜 내상용 수용액 5 mL를 약 60℃로 가온하여 첨가하고, 교반하여 리포솜 준비액을 제조하였다. 이 리포솜 준비액을 20분간 초음파 처리한 후에, 약 65℃로 가온한 익스트루더(리펙스 바이오멤브레인스(Lipex Biomembranes)사 제조)를 이용하여 정렬하여 리포솜 준비액을 얻었다. 얻어진 리포솜 준비액 내의 리포솜의 입경을 동적 광산란법으로 측정할 바, 모두 90 내지 100 nm였다.
- [0222] <리포솜 분산액의 제조>
- [0223] 세파텍스 G-50 칼럼을 이용하여, 얻어진 리포솜 준비액을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.6)으로 용출함으로써 리포솜 외상을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 치환하였다. 리포솜 외상을 치환한 후, 400,000×g에서 30분간 원심하였다. 원심 후, 재분산하고, 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액을 이용하여 액량을 5 mL로 조정하여 리포솜 분산액을 얻었다.
- [0224] <활성 화합물 용액의 제조>
- [0225] 메실산에리블린을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 1 mg/mL의 메실산에리블린 용액을 얻었다.
- [0226] <리포솜 조성물의 제조>
- [0227] 10 mL의 유리 용기 중, 0.5 mL의 리포솜 분산액과 0.5 mL의 메실산에리블린 용액을 혼합하고, 55℃의 수욕 중에서 3분간 인큐베이트함으로써 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다.
- [0228] <봉입률의 측정>
- [0229] 봉입률은 이하와 같이 하여 구하였다.
- [0230] 활성 화합물이 봉입된 리포솜 조성물을 400,000×g에서 30분간 초원심하였다. 상청 중의 활성 화합물 농도를 HPLC로 측정함으로써 리포솜에 미봉입된 활성 화합물량을 정량하였다. 봉입률을 하기 수학적식에 의해 계산하였다.

수학적식 1

$$\text{봉입률(\%)} = \frac{\text{전량 중의 활성 화합물량(mg)} - \text{초원심 후의 상청 중 활성 화합물량(mg)}}{\text{전량 중의 활성 화합물량(mg)}} \times 100$$

- [0231]
- [0232] 메실산에리블린의 봉입률은 90.9%였다.

[실시에 2]

[0234] <리포솜 내상용 수용액의 제조>

[0235] 실시예 1과 동일하게 하여, 황산암모늄 264.3 mg 및 시트르산 일수화물 126.1 mg을 순수로 용해하고, 메스플라스크를 이용하여 10 mL로 메스업함으로써 200 mM 황산암모늄/60 mM 시트르산 수용액을 제조하였다. 그 중 1 mL를 칭량하여 취하고, 암모니아수로 pH를 5.5로 조정 후, 순수로 2 mL로 메스업함으로써 리포솜 내상용 수용액을 제조하였다.

- [0236] <리포솜 준비액의 제조>
- [0237] 지질 혼합물(수소 첨가 대두 포스파티딜콜린:콜레스테롤:폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민 =58.6:19.2:22.2(중량비))을 80 mg씩 칭량하고, 리포솜 내상용 수용액 2 mL를 약 80℃로 가온하여 첨가하고, 교반하여 리포솜 준비액을 제조하였다. 이 리포솜 준비액을 약 80℃로 가온한 익스트루더(리팩스 바이오멤브레인 스사 제조)를 이용하여 정립하여 리포솜 준비액을 얻었다.
- [0238] <리포솜 분산액의 제조>
- [0239] 얻어진 리포솜 준비액을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.6)으로 10 mL로 메스업하고, 400,000×g 에서 30분간 원심하였다. 원심 후, 상청을 전부 폐기하였다. 침전을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액 으로 재분산하고, 메스플라스크를 이용하여 액량을 1 mL로 조정하여 리포솜 분산액을 얻었다.
- [0240] <약물 용액의 제조>
- [0241] 메실산에리블린(메실산에리블린)을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 5 mg/mL의 메실산에 리블린 용액을 얻었다.
- [0242] <리포솜 조성물의 제조>
- [0243] 10 mL의 유리 용기 중, 0.96 mL의 리포솜 분산액과 0.24 mL의 메실산에리블린 용액을 혼합하고, 60℃의 수욕 중 에서 3분간 인큐베이트함으로써 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다.
- [0244] <래트 혈장 중에서의 안정성>
- [0245] 제조한 메실산에리블린 봉입 리포솜 0.2 mL과 래트 혈장 1.8 mL를 혼합하고, 액상 인큐베이터를 이용하여 37℃ 에서 진탕하였다. 제조 직후, 진탕 개시 6시간 후, 12시간 후, 24시간 후, 48시간 후, 72시간 후에 샘플링을 행하여, 메실산에리블린의 리포솜 내 잔존량을 HPLC로 측정하였다.
- [0246] 측정 결과를 도 1에 도시하였다. 도 1로부터 알 수 있는 바와 같이 혈장 중에서도 120시간이라는 장기간에 걸쳐 메실산에리블린을 안정적으로 보유하고, 서방하는 것이 가능함이 나타났다.
- [0247] [실시예 3]
- [0248] <리포솜 내상용 수용액의 제조>
- [0249] 황산암모늄 264.3 mg 및 시트르산 일수화물 126.1 mg을 순수로 용해하여, 약 15 mL로 하였다. 수산화나트륨 수 용액으로 pH를 7.0으로 조정 후, 순수로 20 mL로 메스업함으로써 리포솜 내상용 수용액(100 mM 황산암모늄/30 mM 시트르산)을 제조하였다.
- [0250] <리포솜 준비액의 제조>
- [0251] 지질 혼합물(수소 첨가 대두 포스파티딜콜린:콜레스테롤:폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민 =58.6:19.2:22.2(중량비))을 378 mg 칭량하고, 상기 리포솜 내상용 수용액 10 mL를 약 80℃로 가온하여 첨가하 고, 교반하여 리포솜 준비액을 제조하였다. 50 nm의 폴리카보네이트 멤브레인 필터를 장착하고 약 80℃로 가온 한 익스트루더(리팩스 바이오멤브레인스사 제조)로 리포솜 준비액을 정립하여, 입경약 80 nm의 리포솜 준비액을 얻었다.
- [0252] <리포솜 분산액의 제조>
- [0253] 세파텍스 G-50 칼럼을 이용하여, 얻어진 리포솜 준비액을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.6)으로 용출함으로써 리포솜 외상을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 치환하였다. 리포솜 외상을 치환한 후, 약 400,000×g에서 30분간 원심하였다. 원심 후, 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.6)으 로 재분산하고, 액량을 10 mL로 메스업함으로써 리포솜 분산액을 얻었다.
- [0254] <약물 용액의 제조>
- [0255] 메실산에리블린을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.6)으로 용해하여 5 mg/mL의 메실산에리블린 용액을 얻었다.
- [0256] <리포솜 조성물의 제조>
- [0257] 10 mL의 유리 용기 중, 9.6 mL의 리포솜 분산액과 1.2 mL의 메실산에리블린 용액을 혼합하고, 수산화나트륨을

이용하여 pH를 9.5로 조정하였다. 60℃의 수욕 중에서 3분간 인큐베이트함으로써 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다. 냉각 후, 염산을 이용하여 pH를 7.5로 조정하였다. 실시예 1과 동일하게 하여 봉입률을 측정할 바, 봉입률은 99%였다.

[0258] [실시예 4]

[0259] <리포솜 내상용 수용액의 제조>

[0260] 실시예 1과 동일하게 하여 100 mM 황산암모늄/30 mM 시트르산 수용액(pH=5.5)을 제조하였다.

[0261] <리포솜 준비액의 제조>

[0262] 수소 첨가 대두 포스파티딜콜린 및 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민을 이하의 표 1에 기재된 양만큼 각각 칭량하였다. 각각 클로로포름 3 mL에 용해한 후에 회전 증발기로 클로로포름을 감압 증류 제거하여 리피드 필름을 제조하였다. 얻어진 리피드 필름에, 제조한 리포솜 내상용 수용액 10 mL를 약 80℃로 가온하여 첨가하고, 교반하여 리포솜 준비액을 제조하였다. 약 80℃로 가온한 익스트루더(리팩스 바이오멤브레인스사 제조)를 이용하여 정립하여, 정립한 리포솜 준비액을 얻었다. 얻어진 리포솜 준비액 내의 리포솜의 입경을 동적 광산란법으로 측정할 바, Rp.1은 77 nm, Rp.2는 95 nm, Rp.3은 79 nm, Rp.4는 128 nm였다.

표 1

Rp.	수소 첨가 대두 포스파티딜콜린	콜레스테롤	폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민
1	234 mg	76 mg	15 mg
2	234 mg	76 mg	15 mg
3	222 mg	73 mg	87 mg
4	222 mg	73 mg	87 mg

[0263]

[0264] <리포솜 조성물의 제조>

[0265] 실시예 1과 동일하게 하여 리포솜 분산액을 얻었다. 또한, 메실산에리블린을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 5 mg/mL의 메실산에리블린 용액을 얻었다.

[0266] 10 mL의 유리 용기 중, 4.8 mL의 각 리포솜 분산액과 0.6 mL의 메실산에리블린 용액을 각각 혼합하고, 60℃의 수욕 중에서 3분간 인큐베이트함으로써 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다. 각각의 리포솜 조성물에 24.6 mL의 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액을 첨가하고, 0.22 μm의 폴리불화비닐리덴(PVDF) 필터를 이용하여 여과 멸균함으로써 투여 검체(메실산에리블린 농도: 0.1 mg/mL)를 얻었다.

[0267] 실시예 1과 동일하게 하여 봉입률을 측정하여, 어느 처방에 있어서나 90% 이상인 것을 확인하였다.

[0268] 암컷 누드 마우스(NU/NU, 닛본 찰스 리버 가부시끼가이샤)에 인간 흑색종 LOX 세포를 피하에 접종하고, 11일 후 또는 12일 후에 검체를 10 mL/kg(메실산에리블린으로서 1.0 mg/kg)이 되도록 꼬리 정맥 내 투여하였다. 투여 후 일정 시간(15분, 30분, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48시간) 경과 후에 심천자에 의한 혈액 채취와 종양 조직의 적출을 실시하였다(n=3). 혈액은 헤파린을 포함하는 시험관에 취하고, 채취 후 30분 이내 4℃에서 10분간 1,500×g에서 원심 분리하여 혈장을 얻었다. 종양은 전체 조직을 적출하고 PBS로 세정하고, 흡수지로 닦아낸 후에 즉시 조직 중량을 측정·기록하였다. 조직을 시험관에 넣고 빙수 중에서 냉각한 후, 분석조작까지는 -80℃에서 보존하였다.

[0269] 혈장 중 및 종양 조직 중의 메실산에리블린은 LC/MS/MS를 이용하여 측정하였다.

[0270] PK 파라미터는 비구획 모델(non-compartment model) 해석 소프트웨어(WinNonlin v.5.0.1)를 이용하여 산출하였다. 메실산에리블린의 혈장 PK 파라미터 및 종양 조직 PK 파라미터의 결과를 각각 표 2 및 표 3에 나타내었다.

표 2

LOX 담압 마우스에서의 Rp.1 내지 4 및 메실산에리블린의 혈장 PK 파라미터

처방	AUC ₀₋₁ (ng·hr/mL)	AUC _{0-∞} (ng·hr/mL)	CL (mL/hr/kg)	V _{ss} (mL/kg)	t _{1/2} (hr)	MRT (hr)	비 1
Rp. 1	253049	258274	3.87	43.99	8.7	11.4	707.1
Rp. 2	176148	177893	5.62	56.40	6.8	10.0	487.0
Rp. 3	228151	233067	4.29	48.93	8.4	11.4	638.1
Rp. 4	221494	230541	4.34	55.88	9.4	12.9	631.2
메실산에리블린	363.02	365.247	2420	8032	3.7	3.3	1.0

비 1 = AUC_{혈장, 리포솜} / AUC_{혈장, 메실산에리블린}

[0271]

표 3

LOX 담압 마우스에서의 Rp.1 내지 4 및 메실산에리블린의 혈장 PK 파라미터

처방	C _{max} (ng/g)	t _{max} (hr)	AUC ₀₋₁ (ng·hr/mL)	AUC _{0-∞} (ng·hr/mL)	t _{1/2} (hr)	MRT (hr)	TPI (mL/g)	비 2
Rp. 1	692.1	4.0	24960.7	34581.8	22.8	38.8	0.13	5.5
Rp. 2	1002.9	8.0	16759.6	22301.1	22.2	34.5	0.13	3.5
Rp. 3	3965.7	12.0	41643.7	46297.3	16.1	23.3	0.20	7.4
Rp. 4	1132.8	12.0	28377.4	45005.6	23.7	44.3	0.20	7.2
메실산에리블린	323.425	0.25	4649.521	6294.283	17.8	27.7	17.23	1.0

비 2 = AUC_{종양, 리포솜} / AUC_{종양, 메실산에리블린}

[0272]

[0273]

표 2 및 표 3으로부터, Rp.1 내지 4의 모든 리포솜 조성물에 있어서, 유리 메실산에리블린과 비교하여 혈장 및 종양 조직의 AUC가 증대하고 있는 점에서, 메실산에리블린의 종양 이행량 및 체류성이 향상하고 있었다.

[0274]

[실시에 5]

[0275]

<리포솜 내상용 수용액의 제조>

[0276]

실시에 1과 동일하게, 100 mM 황산암모늄/30 mM 시트르산 수용액(pH=5.5)을 제조하였다.

[0277]

<리포솜 준비액의 제조>

[0278]

수소 첨가 대두 포스파티딜콜린 221.8 mg 및 콜레스테롤 72.5 mg 및 폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민 86.9 mg을 칭량하였다. 클로로포름 3 mL에 용해한 후에 회전 증발기로 클로로포름을 감압 증류 제거하여 리피드 필름을 제조하였다. 얻어진 리피드 필름에, 제조한 리포솜 내상용 수용액 10 mL를 약 80°C로 가온하여 첨가하고, 교반하여 리포솜 준비액을 제조하였다. 약 80°C로 가온한 익스트루더(리팩스 바이오멤브레인스사 제조)를 이용하여 정립하여, 정립한 리포솜 준비액을 얻었다. 얻어진 리포솜 준비액 내의 리포솜의 입경을 동적 광산란법으로 측정할 바, 약 90 nm였다.

[0279]

<리포솜 분산액의 제조>

[0280]

세파텍스 G-50 칼럼을 이용하여, 얻어진 리포솜 준비액을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.6)으로 용출함으로써 리포솜 외상을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 치환하였다. 리포솜 외상을 치환한 후, 400,000×g에서 30분간 원심하였다. 원심 후, 재분산하고, 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액을 이용하여 액량을 10 mL로 조정하여 리포솜 분산액을 얻었다.

[0281]

<약물 용액의 제조>

[0282]

메실산에리블린을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 1 mg/mL의 메실산에리블린 용액을 얻었다. 또한, 유리체의 투여 검체로서, 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 메실산에리블린 용액을 희석하고, 0.22 μm의 PVDF 필터를 이용하여 여과 멸균함으로써 투여 검체(메실산에리블린 농도: 0.3 mg/mL 및 0.4 mg/mL)를 얻었다.

- [0283] <리포솜 조성물의 제조>
- [0284] 10 mL의 유리 용기 중, 1.8 mL의 리포솜 분산액과 1.2 mL의 메실산에리블린 용액을 각각 혼합하여, 60°C의 수욕 중에서 3분간 인큐베이트함으로써 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다. 얻어진 리포솜 조성물을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 희석하고, 0.22 μm의 PVDF 필터를 이용하여 여과 멸균함으로써 투여 검체(메실산에리블린 농도: 0.2 mg/mL)를 얻었다. 실시예 1과 동일하게 하여 봉입률을 측정하고, 90% 이상인 것을 확인하였다.
- [0285] 인간 인두편평상피암세포주인 FaDu(아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수)을 10% 소태아 혈청 함유 MEM 배지로 배양하여, 증식시켰다. 세포를 0.05% 트립신-EDTA 용액을 이용하여 플라스크로부터 유리시켜 회수하였다. PBS로 세정 후, PBS로 5×10^7 개/mL가 되도록 현탁하고, 빙상에서 유지하였다. 6주령의 누드 마우스(닛본 찰스 리버 가부시끼가이샤)의 우측배측부에, 1마리당 0.1 mL의 세포 현탁액을 피하 주사하였다. 각각의 마우스를 매일 관찰하여, 상태 이상이 발견된 경우에는 적절하게 기록을 행하였다. 종양의 크기를 경시적으로 캘리퍼를 이용하여 측정하고, 종양의 크기를 계산식: 장경×(단경의 2승)÷2에 기초하여 산출하였다. 종양의 크기가 100 내지 200 mm³이 된 시점에서, 각 시험군 사이에서의 종양의 크기 및 마우스의 체중의 평균치가 균일하게 되도록 군을 나누고(각 시험군의 마우스수는 5마리), 약물의 꼬리 정맥 내 투여(0.2 mL/20 g; 7일 간격으로 3회)를 행하였다.
- [0286] 검체 투여 후의 평균 종양 부피의 추이 결과를 도 2에 도시하였다.
- [0287] 도 2에 도시된 바와 같이, FaDu는 메실산에리블린에 감수성이 낮은 세포주이기 때문에, 유리체로서는 최대 내용량인 4 mg/kg 투여라도 종양 축소 효과는 얻어지지 않았다. 한편, 리포솜 조성물의 경우에는, 최대 내용량 이하인 2 mg/kg 투여라도 종양 축소 효과가 명확히 보여서, 지금까지 메실산에리블린이 주공하지 않은 암종에 대해서도 매우 높은 약리 효과가 얻어짐이 나타났다.
- [0288] [실시예 6]
- [0289] <리포솜 내상용 수용액의 제조>
- [0290] 실시예 1과 동일하게, 100 mM 황산암모늄/30 mM 시트르산 수용액(pH=5.5)을 제조하였다.
- [0291] <약물 용액의 제조>
- [0292] 실시예 5와 동일하게 실시하여 유리체의 투여 검체(메실산에리블린 농도: 0.2 mg/mL 및 0.3 mg/mL 및 0.4 mg/mL)를 얻었다.
- [0293] <리포솜 조성물의 제조>
- [0294] 상술한 바와 같이 제작한 리포솜 내상용 수용액을 이용한 것 이외에는 실시예 5와 동일하게 하여 리포솜 조성물(메실산에리블린 농도: 0.3 mg/mL)을 얻었다. 실시예 1과 동일하게 하여 봉입률을 측정하여, 90% 이상인 것을 확인하였다.
- [0295] 인간 신장암세포주인 ACHN(아메리칸 타입 컬처 콜렉션으로부터 입수)를 10% 소태아 혈청 함유 MEM 배지로 배양하여, 증식시켰다. 세포를 0.05% 트립신-EDTA 용액을 이용하여 플라스크로부터 유리시켜 회수하였다. PBS로 세정 후, PBS로 5×10^7 개/mL가 되도록 현탁하고, 빙상에서 유지하였다. 6주령의 누드 마우스(닛본 찰스 리버 가부시끼가이샤)의 우측배측부에, 1마리당 0.1 mL의 세포 현탁액을 피하 주사하였다. 각각의 마우스를 매일 관찰하여, 상태 이상이 발견된 경우에는 적절하게 기록을 행하였다. 종양의 크기를 경시적으로 캘리퍼를 이용하여 측정하고, 종양의 크기를 계산식: 장경×(단경의 2승)÷2에 기초하여 산출하였다. 종양의 크기가 150 내지 200 mm³이 된 시점에서, 각 시험군 사이에서의 종양의 크기 및 마우스의 체중의 평균치가 균일하게 되도록 군을 나누고(각 시험군의 마우스수는 5마리), 약물의 꼬리 정맥 내 투여(0.2 mL/20 g; 7일 간격으로 3회)를 행하였다.
- [0296] 검체 투여 후의 평균 종양 부피의 추이 결과를 도 3에 도시하였다.
- [0297] 도 3에 도시된 바와 같이, ACHN은 메실산에리블린에 내성이 있는 세포주이기 때문에, 유리체 투여에서는 2 mg/kg 투여군, 3 mg/kg 투여군 및 4 mg/kg(최대 내용량) 투여군 중 어디에 있더라도 검체 투여 개시 45일 후에 있어서 무처치군과의 유의한 차는 보이지 않았다. 한편, 리포솜 조성물 3 mg/kg 투여군에 있어서는 종양 증식

억제 효과가 보이고, 검체 투여 개시 45일 후에 있어서 무처치군 및 유리체 투여군에 대하여 유의하게 작은 중앙 부피값을 나타내었다. 이와 같이 지금까지의 메실산에리블린으로는 전혀 치료 효과가 얻어지지 않는 암종에 대해서도 리포솜 제제화함으로써 종양의 증식을 지연시키는 것이 가능해짐이 나타났다.

- [0298] [실시예 7]
- [0299] <리포솜 내상용 수용액의 제조>
- [0300] 이하의 표 4에 나타내는 12 종류의 내상용 수용액을 제조하였다.
- [0301] <리포솜 준비액의 제조>
- [0302] 지질 혼합물(수소 첨가 대두 포스파티딜콜린:콜레스테롤:폴리에틸렌글리콜 2000-포스파티딜에탄올아민 =58.6:19.2:22.2(중량비))을 120 mg씩 시험관에 칭량하고, 80℃로 가온한 각 내상용 수용액 3 mL로 수화하였다.
- [0303] 이 리포솜 준비액을 약 80℃로 가온한 익스트루더를 이용하여 정립하여 리포솜 준비액을 얻었다.
- [0304] <리포솜 분산액의 제조>
- [0305] 세파텍스 G-50 칼럼을 이용하여, 얻어진 리포솜 준비액을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용출함으로써 리포솜 외상을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 치환하였다.
- [0306] 리포솜 외상을 치환한 후, 400,000×g으로 1시간 원심하고, 상청을 완전히 제거하였다. 침전물을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 약 2 mL가 되도록 재현탁하였다.
- [0307] 얻어진 리포솜 분산액의 입경을 동적 광산란법으로 측정하면, 모두 약 80 nm였다.
- [0308] <약물 용액의 제조>
- [0309] 메실산에리블린을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 5 mg/mL의 메실산에리블린 용액을 얻었다.
- [0310] <리포솜 조성물의 제조>
- [0311] 10 mL의 유리 용기 중, 리포솜 분산액과 메실산에리블린 용액을 메실산에리블린: 0.2 mg/mL, 총 지질 농도: 16 μmol/mL가 되도록 혼합하였다. 60℃에서 5분간 승온하여, 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다.
- [0312] <봉입률의 측정>
- [0313] 봉입률은 실시예 1과 동일하게 하여 측정하였다. 결과를 표 4에 나타내었다. 표 4로부터 알 수 있는 바와 같이, 어느 하나의 암모늄염을 내상에 이용한 경우이나 메실산에리블린의 봉입률이 향상되는 것이 분명해졌다. 특히 황산암모늄, 시트르산암모늄, 인산암모늄, 타르타르산암모늄을 이용했을 때에 현저히 봉입률이 향상하였다.

표 4

No.	조성	pH	침투압	봉입률(%)
1	50mM 황산암모늄	7.5 (염산 또는 수산화 나트륨에 의해 조정함)	300mOsm (수크로오스에 의해 조정함)	69.4
2	50mM 황산나트륨			7.2
3	50mM 아세트산암모늄			36.8
4	50mM 아세트산나트륨			16.2
5	50mM 인산암모늄			45.8
6	50mM 인산나트륨			14.6
7	50mM 시트르산암모늄			65.8
8	50mM 시트르산나트륨			8.7
9	50mM 숙신산암모늄			14.7
10	50mM 숙신산나트륨			16.0
11	50mM 타르타르산암모늄			74.7
12	50mM 타르타르산나트륨			11.6

- [0314]
- [0315] [실시예 8]
- [0316] <리포솜 내상용 수용액의 제조>

- [0317] 실시예 7과 동일하게 하여 100 mM 황산암모늄/30 mM 시트르산 수용액(pH=7.5)의 리포솜 내상용 수용액을 제조하였다.
- [0318] <리포솜 준비액의 제조>
- [0319] 상기 리포솜 내상용 수용액을 이용하여 실시예 7과 동일하게 리포솜 준비액을 제조하였다.
- [0320] <리포솜 분산액의 제조>
- [0321] 세파텍스 G-50 칼럼을 이용하여, 얻어진 리포솜 준비액을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용출함으로써 리포솜 외상을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 치환하였다.
- [0322] 리포솜 외상을 치환한 후, 400,000×g으로 1시간 원심하고, 상청을 완전히 제거하였다. 침전물을 96 mg/mL/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 재현탁하고, 리포솜 외상을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 치환하여 리포솜 분산액을 얻었다. 얻어진 리포솜 분산액의 입경을 동적 광산란법으로 측정하면, 약 80 nm였다.
- [0323] 리포솜 분산액을 7개로 분주하고, 기지량의 황산암모늄(수산화나트륨 수용액에 의해 pH를 7.5로 조정 완료)을 표 5의 각 농도가 되도록 리포솜 외상에 각각 첨가하여, 리포솜 외상 중에 황산암모늄이 기지 농도 존재하는 리포솜 분산액을 얻었다.
- [0324] <약물 용액의 제조>
- [0325] 메실산에리블린을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 5 mg/mL의 메실산에리블린 용액을 얻었다.
- [0326] <리포솜 조성물의 제조>
- [0327] 10 mL의 유리 용기 중, 리포솜 분산액과 메실산에리블린 용액을 메실산에리블린: 0.2 mg/mL, 총 지질 농도: 16 mM가 되도록 혼합하였다. 60°C에서 5분간 승온하여, 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다.
- [0328] <봉입률의 측정>
- [0329] 봉입률은 실시예 1과 동일하게 하여 측정하였다. 결과를 표 5에 나타내었다. 리포솜 외상 중에 황산암모늄이 0.4 mM 존재하는 것만으로 봉입률은 현저히 저하되고, 10 mM 존재하면 거의 봉입되지 않음이 나타났다.

표 5

No.	내수상	외상 중 황산암모늄 농도(mM)	봉입률(%)
1	100mM 황산암모늄 30mM 시트르산 pH=7.5	0	90.4
2		0.916	90.8
3		0.08	91.3
4		0.4	75.9
5		2	36.8
6		10	16.1
7		50	8.6

- [0330]
- [0331] [실시예 9]
- [0332] <리포솜 내상용 수용액의 제조>
- [0333] 실시예 7과 동일하게 하여 100 mM 황산암모늄/30 mM 시트르산 수용액(pH=7.5)의 리포솜 내상용 수용액을 제조하였다.
- [0334] <리포솜 준비액의 제조>
- [0335] 상기 리포솜 내상용 수용액을 이용하여 실시예 7과 동일하게 리포솜 준비액을 제조하였다.
- [0336] <리포솜 분산액의 제조>
- [0337] 세파텍스 G-50 칼럼을 이용하여, 얻어진 리포솜 준비액을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용출함

으로써 리포솜 외상을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 치환하였다.

- [0338] 리포솜 외상을 치환한 후, 400,000×g으로 1시간 원심하고, 상청을 완전히 제거하였다. 침전물을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 재현탁하고, 리포솜 외상을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 치환하여 리포솜 분산액을 얻었다. 얻어진 리포솜 분산액의 입경을 동적 광산란법으로 측정한 바, 약 80 nm였다.
- [0339] 그 후, 리포솜 분산액을 7개로 분주하였다.
- [0340] <약물 용액의 제조>
- [0341] 메실산에리블린을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 5 mg/mL의 메실산에리블린 용액을 얻었다.
- [0342] <리포솜 조성물의 제조>
- [0343] 10 mL의 유리 용기 중, 리포솜 분산액과 메실산에리블린 용액을 메실산에리블린: 0.2 mg/mL, 총 지질 농도: 16 mM가 되도록 각각 혼합하였다. 1 M 수산화나트륨 수용액을 이용하여 표 6에 나타낸 바와 같이 각각 리포솜 외상의 pH를 조정하였다. 60℃에서 5분간 승온하여, 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다. 이어서, 염산을 이용하여 외상의 pH를 7.5로 조정하였다.
- [0344] <봉입률의 측정>
- [0345] 봉입률은 실시예 1과 동일하게 하여 측정하였다. 결과를 표 6에 나타내었다. 리포솜 외상의 pH의 상승에 따라 에리블린의 봉입률은 대폭 향상하여, 거의 100%의 봉입률을 달성하였다.

표 6

No.	내수상	외상의 pH	봉입률(%)
1	100mM 황산암모늄 30mM 시트르산 pH=7.5	7.5	72.9
2		8.0	79.8
3		8.5	86.4
4		9.0	92.8
5		9.5	98.5
6		10.0	100.0
7		10.5	99.3

- [0346] [실시예 10]
- [0347] <리포솜 내상용 수용액의 제조>
- [0348] 실시예 7과 동일하게 하여 100 mM 황산암모늄/30 mM 시트르산 수용액(pH=7.5)의 리포솜 내상용 수용액을 제조하였다.
- [0349] <리포솜 준비액의 제조>
- [0350] 상기 리포솜 내상용 수용액을 이용하여 실시예 7과 동일하게 리포솜 준비액을 제조하였다.
- [0351] <리포솜 분산액의 제조>
- [0352] 세파텍스 G-50 칼럼을 이용하여, 얻어진 리포솜 준비액을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용출함으로써 리포솜 외상을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 치환하였다.
- [0353] 리포솜 분산액을 4개로 분주하여, 400,000×g으로 1시간 원심하고, 상청을 완전히 제거하였다. 그 중 2개의 침전물은 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 재현탁하고, 리포솜 외상을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 치환하였다. 나머지의 2개의 침전물은 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 재현탁하고, 리포솜 외상을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)으로 치환하였다. 얻어진 리포솜 분산액의 입경을 동적 광산란법으로 측정한 바, 모두 약 80 nm였다.
- [0354] <약물 용액의 제조>
- [0355] 메실산에리블린을 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 5 mg/mL의 메실산에리블린 용액을 얻었다. 또한, 마찬가지로 메실산에리블린을 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액으로 용해하여 5 mg/mL의

메실산에리블린 용액을 얻었다.

[0357] <리포솜 조성물의 제조>

[0358] 10 mL의 유리 용기 중, 리포솜 분산액과 메실산에리블린 용액을 메실산에리블린: 0.2 mg/mL, 총 지질 농도: 16 mM가 되도록 각각 혼합하였다. 리포솜 외상이 96 mg/mL 수크로오스/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)인 2개 중 1개의 리포솜 외상의 pH를 수산화나트륨의 첨가에 의해 9.5로 조정하였다. 마찬가지로, 리포솜 외상이 0.9% 염화나트륨/10 mM 히스티딘 수용액(pH=7.5)인 2개 중 1개의 리포솜 외상의 pH를 수산화나트륨의 첨가에 의해 9.5로 조정하였다. 60°C에서 5분간 승온하여, 리포솜 내에 메실산에리블린이 도입된 리포솜 조성물을 얻었다.

[0359] <봉입률의 측정>

[0360] 봉입률은 실시예 1과 동일하게 하여 측정하였다. 결과를 표 7에 나타내었다. 리포솜 외상이 비전해질인 수크로오스의 경우와 비교하여, 전해질인 염화나트륨의 경우에는 매우 높은 봉입률이 얻어지는 것이 분명해졌다. 또한, 전해질의 효과에 추가로, 리포솜 외상을 알칼리로 하는 pH 구배를 적용함으로써 100%의 봉입률을 달성하였다.

표 7

No.	내수상	외상의 조성	봉입률(%)
1	100mM 황산암모늄 30mM 시트르산 pH=7.5	96mg/mL 수크로오스 10mM 히스티딘 pH=7.5	72.9
2		0.9% 염화나트륨 10mM 히스티딘 pH=7.5	95.9
3		96mg/mL 수크로오스 10mM 히스티딘 pH=9.5	98.5
4		0.9% 염화나트륨 10mM 히스티딘 pH=9.5	100.0

[0361]

[0362] 본 출원은, 2009년 3월 30일 출원된 일본 특허 출원(일본 특허 출원 제2009-082521호) 및 미국 특허 가출원(제 61/164653호)에 기초하는 것으로서, 그 내용은 여기에 참조로서 받아들인다.

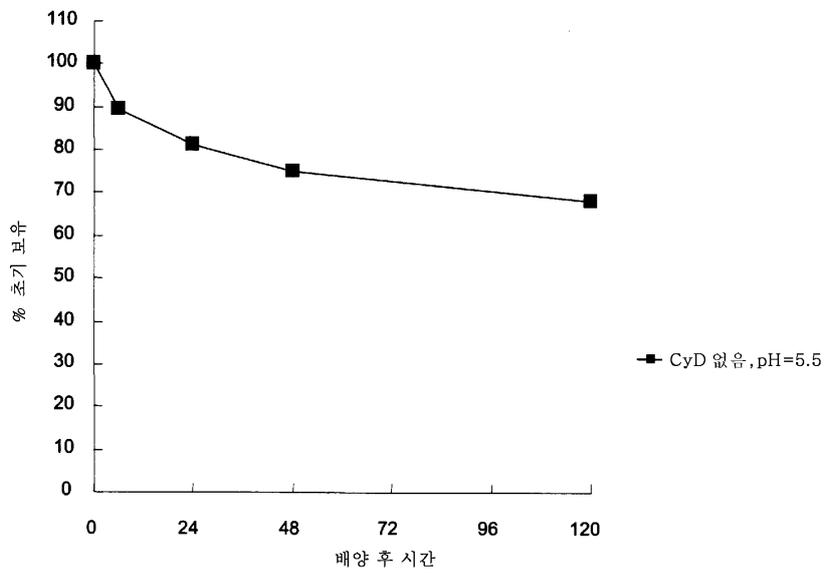
산업상 이용가능성

[0363] 본 발명은 활성 화합물의 보유 안정성이 높은 리포솜을 높은 봉입률로 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

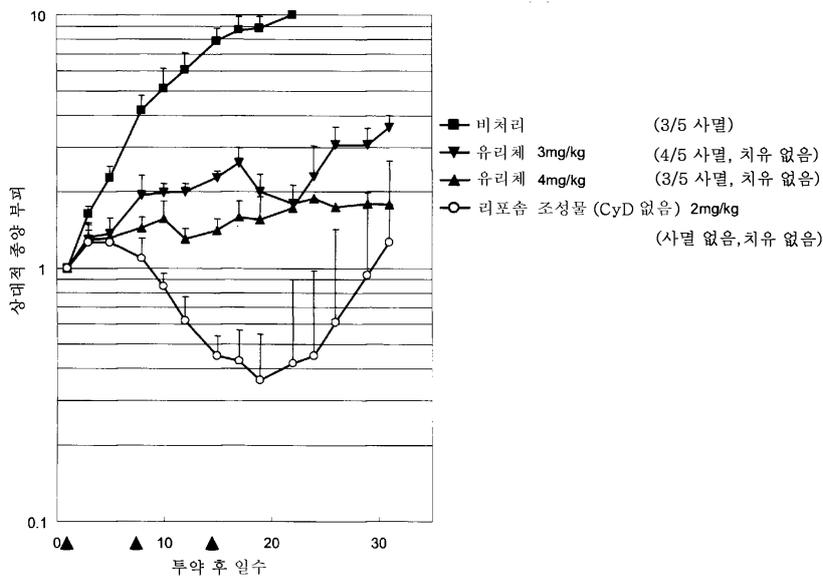
[0364] 본 발명의 리포솜 조성물은, 에리블린 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염의 약리 작용에 의해 치료 용도에 이용하는 것이 바람직하다.

도면

도면1



도면2



도면3

