



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0077508
(43) 공개일자 2010년07월08일

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0135463

(22) 출원일자 2008년12월29일

심사청구일자 2008년12월29일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

황성주

서울특별시 송파구 문정동 1번지 삼성래미안아파트 128동 2104호

김승수

대전광역시 유성구 봉명동 상그릴라플러스빌 712호

박찬혁

경상남도 진해시 자은동 월드메르디앙 102동 1502호

(74) 대리인

민병준, 이문욱, 박상선, 백경업

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 암포테리신 B 함유 리포솜을 제조하기 위한 방법 및 장치

(57) 요약

본 발명은

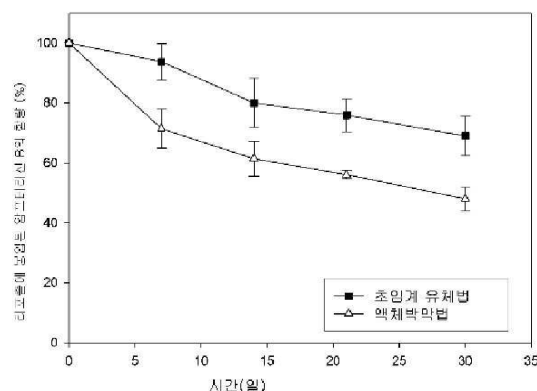
암포테리신 B, 인지질, 및 스테롤을 포함하는 혼합 용액을 제조하는 단계;

물을 포함하는 수상 및 초임계 유체를 상기 혼합 용액과 혼합하여 초임계유체/수상의 에멀전을 제조하는 단계; 및

평형상태에 도달한 다음 초임계 유체를 감압에 의해 배출시켜 리포솜 용액을 형성시키는 단계를 포함하는 암포테리신 B 함유 리포솜 제제의 제조방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 제조방법을 수행하기 위한 장치를 제공한다. 본 발명의 제조방법에 따르면 암포테리신 B의 봉입 효율이 높고, 활성성분의 안정성 및 리포솜의 제제 안정성이 우수한 리포솜을 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 암포테리신 B 함유 리포솜의 제조방법은 공정이 매우 간소화되어 간단한 장치에 의해 이루어질 수 있으며, 경제적으로 대량 생산이 가능하다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

암포테리신 B, 인지질, 및 스테롤을 포함하는 혼합 용액을 제조하는 단계;

물을 포함하는 수상 및 초임계 유체를 상기 혼합 용액과 혼합하여 초임계유체/수상의 에멀전을 제조하는 단계;
및

평형상태에 도달한 다음 초임계 유체를 감압에 의해 배출시켜 리포솜 용액을 형성시키는 단계;

를 포함하는 암포테리신 B 함유 리포솜 제제의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 인지질 및 스테롤을 포함한 총 지질의 양에 대한 암포테리신 B의 양은 10-50 중량%인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 인지질은 포스파티딜콜린류, 포스파티딜에탄올아민류, 포스파티딜세린류, 포스파티딜글리세롤류, 포스파티딜이노시톨류, 난황 레시틴, 대두 레시틴, 또는 이들이 조합인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 스테롤은 콜레스테롤, 콜레스테롤헥사숙시네이트, 에르고스테롤, 라노스테롤, 또는 이들이 조합인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 혼합 용액을 제조하기 위한 용매는 클로로포름, 메탄올, 에탄올, 에테르, 및 이들의 조합에서 선택된 친지성 용매인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 친지성 용매는 메탄올 및 클로로포름의 혼합용액인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 친지성 용매는 상기 혼합되는 초임계 유체의 양의 10 중량% 이하인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 암포테리신 B의 용해도를 증가시키기 위해 상기 혼합용액에 염산 또는 초산을 첨가하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 물을 포함하는 수상은 증류수, 식염수, 수크로오스 수용액, 락토오스 수용액, 말토오스 수용액, 또는 인산

염 완충용액인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 초임계 유체는 초임계 이산화탄소, 초임계 일산화질소, 초임계 아세틸렌, 초임계 삼불화메탄, 초임계 프로판, 초임계 에틸렌, 초임계 염화불화탄소 또는 초임계 제논인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 초임계 유체/수상의 에멀전을 제조하는 단계는 초임계 유체 상태를 유지하기 위한 온도 및 압력 이상이며 상기 인지질의 상전이 온도 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 초임계 유체를 감압시키는 속도는 10-50 bar/분인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

상기 제조된 리포솜을 동결건조하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 14

초임계 유체/수상의 에멀전의 제조 단계 및 리포솜 용액을 형성시키는 단계가 이루어지는 반응용기;

초임계 유체를 수용하는 초임계 유체 저장용기;

상기 반응용기에 초임계 유체 저장용기로부터 초임계 유체를 수송하기 위한 초임계 유체 저장용기로부터 상기 반응용기로 연결된 초임계 유체 제공용 튜브;

상기 초임계 유체 제공용 튜브상에 존재하여 수송되는 초임계 유체의 양을 제어할 수 있는 초임계 유체 공급량 조절용 펌프;

상기 반응용기의 내부에 연결되어 반응물질을 반응용기에 제공하기 위한 반응물질 도입부;

상기 반응용기 내부와 연결되어 반응용기 중의 압력을 측정하기 위한 압력 측정계;

상기 반응용기에 연결되어 초임계 유체를 배출시키기 위한 초임계 유체 배출용 튜브; 및

상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 감압 밸브를 포함하는 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 제조방법을 수행하기 위한 장치.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 반응용기 중에 마그네틱 바가 존재하고, 상기 반응용기의 자체 또는 외부에 마그네틱 스테러가 존재하는 것을 특징으로 하는 장치.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

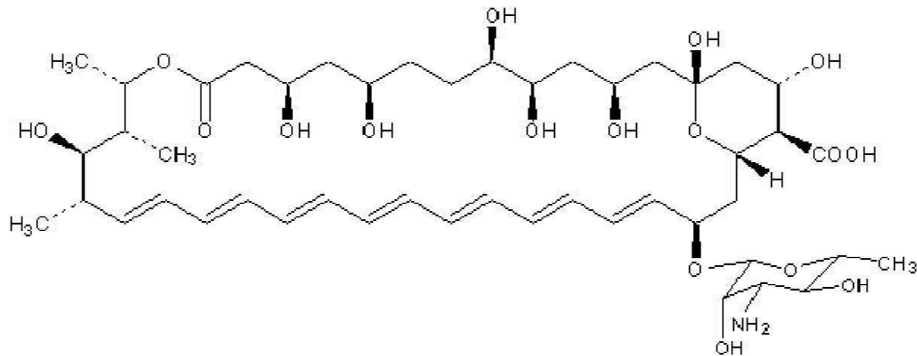
[0001] 본 발명은 암포테리신 B 함유 리포솜(이하, 암포테리신 B 리포솜이라고도 한다)을 제조하기 위한 새로운 방법

및 그 리포솜을 제조하기 위한 장치에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 암포테리신 B에 대한 안정성 및 제제 안정성을 가지며 공정을 최소화하면서 높은 수득률로 생산을 가능하게 하는 암포테리신 B 함유 리포솜을 제조하는 방법 및 그 리포솜을 제조하기 위한 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암포테리신 B는 스트렙토마이세스 노도수스 M4575(*Streptomyces nodosus* M4575)로부터 얻어지는 항진균성 폴리엔계 항생제의 일종으로 하기 화학식 1의 구조를 갖는다.

[0003] [화학식 1]



[0004]

[0005] 암포테리신 B는 거의 모든 진균 감염증에 대해 치료 효과가 있다. 특히 암포테리신 B는 전신성 진균증에 치료효과가 우수하기 때문에 암 환자, 골수이식 환자, 호중구감소 환자, 면역저하 환자, 혹은 면역결핍환자에게 있어 생명을 위협하는 심각한 진균 감염증을 효과적으로 치료할 수 있다. 암포테리신 B의 항진균 작용은 진균류의 막 스테롤인 에르고스테롤과 강하게 결합하고 세포막에 구멍을 형성함으로써 작용한다. 그러나, 포유동물의 막 콜레스테롤에도 결합함으로써 정상세포에도 독성을 나타내며, 오한, 발열, 조직괴사, 신독성 등의 부작용을 함께 수반한다.

[0006] 암포테리신 B는 물과 알콜에 난용성인 성질을 가지고 있어 정맥주사로 사용하기 위해서는 염의 형태로 하거나 마이셀, 마이크로 에멀전, 또는 리포솜으로 제제화 함으로써 가용화하여 사용한다. 암포테리신 B를 리포솜 제제화할 경우 암포테리신 B의 신독성이 현저히 감소되고 치료효과는 극대화되므로 임상적으로 큰 장점이 있다.

[0007] 그러나, 암포테리신 B는 분자 구조상 폴리올과 이온화가능영역이 친수성이고 폴리엔 부위는 소수성이므로 양친매성을 띠며, 이러한 양친매성 때문에 물과 대부분의 유기 용매에 잘 용해되지 않으며, 상업적인 양으로 리포솜을 생산하는 것이 곤란하였다.

[0008] US 4,663,167에 개시된 암포테리신 B 리포솜의 제조방법은 다량의 메탄올과 같은 휘발성 용매 중에 암포테리신 B를 용해한 용액에, 메탄올 및/또는 클로로포름과 같은 휘발성 유기 용매 중에 용해된 지질 혼합물을 첨가한 다음, 용매를 제거하여 기질-암포테리신 B 필름을 형성하고, 물을 가해서 분산시킴으로써 제조한다(액체 박막법). 이러한 방법은 큰 부피의 유기용매의 제거를 필요로 하여 시간 및 비용이 많이 소요되는 문제점이 있다.

[0009] 암포테리신 B의 리포솜을 제조하기 위한 또 다른 방법으로, 지질 혼합물을 클로로포름 등의 용매에 용해하고 침강시키고 둥근바닥 플라스크의 측면상에서 건조시켜 필름을 형성시킨 다음, 소량의 디메틸설폭시드에 용해시킨 암포테리신 B 용액을 첨가하여 리포솜을 제조하고, 리포솜을 형성하지 않은 암포테리신 B 및 디메틸설폭시드는 투석에 의해 제거한다(Tremblay, C. et al.(1984) Efficacy of liposome-intercalated Amphotericin B in treatment of systemic Candidiasis in mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 26: 170-73). 그러나, 당시에는 소량의 휘발성 용매에 암포테리신 B를 녹이는 것이 가능하지 않았으므로 대량생산이 상업적으로 용이하지 않았다.

[0010] 이러한 문제점을 극복하기 위해, US 5,965,156호는 난용성 암포테리신 B를 가용화하기 위해 산성의 유기용매를 사용하여 65 ℃의 높은 온도에서 포스파티딜글리세롤과 이온결합시킨 다음, 암포테리신 B를 리포솜에 봉입하였다. 그러나, 상기 특허의 단점은 암포테리신 B 분해에 의한 손실율이 있다는 점과 유기용매를 제거하기 위해 분무건조와 같은 중간과정이 필요하다는 점이다. 이와 같은 분무건조 공정을 수행하기 위해서는 멸균공정과 불활성 건조 기체를 사용하여야 하므로 장치 및 운전비용이 많이 소요되고 까다로운 문제점이 있다. 또한, 정맥주사용 리포솜을 만들기 위해서 필요한 전공정의 멸균화가 어려워 여과에 의한 살균이 추가로 필요하다는 점이 문제

가 된다.

- [0011] US 5,776,486은 과클리탁셀과 몇몇 소수성 약물을 대상으로 하여 초임계 유체를 이용한 리포솜 제조방법을 개시하고 있다. 리포솜의 제조에 초임계 유체를 사용하였지만 제조를 위한 장치의 구성이 복잡하고, 리포솜 제조를 위해 여러 단계를 거쳐야 하는 단점이 있다. 또한, 소수성 약물에 대해서만 리포솜 제조를 개시하고 있을 뿐이지 암포테리신 B와 같은 양친매성 약물의 리포솜 제조에 관해서는 전혀 언급하고 있지 않다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0012] 이에 본 발명자들은 우수한 안정성을 가진 암포테리신 B 리포솜 제제를 대량생산 할 수 있는 방법에 대해 연구한 결과, 암포테리신 B의 리포솜 제조에 초임계 유체를 이용하여 제조하면 리포솜으로의 약물의 봉입 효율이 높고 안정하면서, 간단한 장치에 의해 대량으로 제조할 수 있음을 알아내어, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 따라서, 본 발명의 목적은 약물의 봉입 효율이 높고 활성성분의 안정성 및 제제 안정성이 높은 암포테리신 B 리포솜을 대량생산할 수 있는 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 약물의 봉입 효율이 높고 활성성분의 안정성 및 제제 안정성이 높은 암포테리신 B 함유 리포솜을 대량생산할 수 있는 리포솜 제조 장치를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은
- [0016] 암포테리신 B, 인지질, 및 스테롤을 포함하는 혼합 용액을 제조하는 단계;
- [0017] 물을 포함하는 수상 및 초임계 유체를 상기 혼합 용액과 혼합하여 초임계유체/수상의 에멀전을 제조하는 단계; 및
- [0018] 평형상태에 도달한 다음 초임계 유체를 감압에 의해 배출시켜 리포솜 용액을 형성시키는 단계를 포함하는 암포테리신 B 함유 리포솜의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한,
- [0020] 초임계 유체/수상의 에멀전의 제조 단계 및 리포솜 용액을 형성시키는 단계가 이루어지는 반응용기;
- [0021] 초임계 유체를 수용하는 초임계 유체 저장용기;
- [0022] 상기 반응용기에 초임계 유체 저장용기로부터 초임계 유체를 수송하기 위한 초임계 유체 저장용기로부터 상기 반응용기로 연결된 초임계 유체 제공용 튜브;
- [0023] 상기 초임계 유체 제공용 튜브상에 존재하여 수송되는 초임계 유체의 양을 제어할 수 있는 초임계 유체 공급량 조절용 펌프;
- [0024] 상기 반응용기의 내부에 연결되어 반응물질을 반응용기에 제공하기 위한 반응물질 도입부;
- [0025] 상기 반응용기 내부와 연결되어 반응용기 중의 압력을 측정하기 위한 압력 측정계;
- [0026] 상기 반응용기에 연결되어 초임계 유체를 배출시키기 위한 초임계 유체 배출용 튜브; 및
- [0027] 상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 감압 밸브를 포함하는 상기 본 발명에 따른 암포테리신 B 함유 리포솜의 제조방법을 수행하기 위한 장치를 제공한다.
- [0028] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0029] 본 발명이 제공하는 암포테리신 B 함유 리포솜의 제조방법은 암포테리신 B, 인지질, 및 스테롤을 유기용매 중에 용해시킨 다음, 물을 포함하는 수상 및 초임계 유체를 상기 혼합 용액과 혼합하여 초임계유체/수상의 에멀전을 제조하고, 초임계 유체를 배출시켜 리포솜을 형성시키는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 상기 리포솜을 구성하는 인지질로는 포스파티딜콜린류, 포스파티딜에탄올아민류, 포스파티딜세린류, 포스파티딜글리세롤류, 포스파티딜이노시톨류, 난황 레시틴, 대두 레시틴 등의 천연 또는 합성 인지질을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 인지질을 조합하여 사용할 수도 있다. 상기 포스파티딜콜린류로는 디팔미토

일 포스파티딜콜린, 디스테아로일 포스파티딜콜린 및 기타 가능한 포스파티딜콜린 유도체가 사용될 수 있다.

- [0031] 상기 스테롤로는 콜레스테롤, 콜레스테롤헥사숙시네이트, 에르고스테롤, 라노스테롤, 또는 이들의 조합이 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 콜레스테롤이 이용될 수 있다.
- [0032] 상기 암포테리신 B, 인지질, 및 스테롤을 포함하는 혼합용액을 제조하기 위한 용매로는 상기 세가지 물질을 모두 용해할 수 있는 임의의 친지성 용매를 사용할 수 있으며, 예를 들어 클로로포름, 메탄올, 에탄올, 에테르, 또는 이들의 조합이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 메탄올, 또는 메탄올 및 클로로포름의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 메탄올 및 클로로포름의 혼합물은 메탄올의 클로로포름에 대한 비율이 0.5 내지 2인 것이 더욱 바람직하다. 상기 친지성 용매는 이후에 초임계 유체의 배출 시 함께 휘발되어 나가는 성분이며, 리포솜의 형성 후에 잔류되지 않도록 하기 위해 이후에 혼합되는 초임계 유체에 대해 10 중량% 이하로 사용하는 것이 바람직하다.
- [0033] 상기 암포테리신 B, 인지질, 및 스테롤을 포함하는 혼합용액을 제조하는 단계에서 양친매성 물질인 암포테리신 B의 용해도를 증가시키기 위해 염산, 초산 등의 산용액을 소량 (예를들면, 암포테리신 B 50 mg 당 2.5M 염산 20 μ l 이하) 첨가할 수 있으며, 산 부가 후에는 중화를 위해 수산화나트륨과 같은 염기를 가해 중화할 수 있다.
- [0034] 상기 물을 포함하는 수상으로는 증류수, 식염수, 수크로오스 수용액, 당류 포함하는 수용액, 또는 인산염 완충용액이 상용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 물을 포함하며 상기 리포솜 제조에 부정적인 영향을 미치지 않는다면 임의의 수상이 이용될 수 있다. 상기 당류를 포함하는 수용액으로서, 예를 들어 락토오스 수용액, 말토오스 수용액 및 트레할로스 수용액 등을 사용할 수 있으며, 이와 같은 당류를 포함하는 수용액은 리포솜을 제조한 이후, 보관의 편의를 위해 동결 건조 시 리포솜의 물리적 구조를 안정화시키는 작용을 할 수 있다. 상기 물을 포함하는 수상은, 암포테리신 B, 인지질, 및 스테롤을 포함하는 혼합 용액에 초임계 유체를 도입하기 전 또는 후에 도입하여 현탁시킬 수 있다.
- [0035] 상기 초임계 유체로는 초임계 이산화탄소, 초임계 일산화질소, 초임계 아세틸렌, 초임계 삼불화메탄, 초임계 프로판, 초임계 에틸렌, 초임계 염화불화탄소 또는 초임계 제논이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 초임계 유체/수상의 에멀전을 제조하는 단계에서는 균질한 초임계 유체/수상의 에멀전을 형성하기 위해서 반응이 평형상태에 도달할 때까지 소정 시간이 필요하다. 소요시간은 시료의 양에 따라 약 20 분에서 1 시간 내 외일 수 있다. 상기 단계의 반응은 초임계 유체 상태를 유지하기 위한 온도 및 압력 이상으로 수행할 수 있다. 초임계 유체로서 초임계 이산화탄소를 사용할 경우 압력은 120-300 bar, 온도는 35-70 $^{\circ}$ C, 매우 바람직하기로는 55-65 $^{\circ}$ C로 하는 것이 적절하다. 또한, 인지질의 상전이 온도 이상으로 수행할 경우 크기 분포가 균질한 리포솜을 얻을 수 있다. 또한, 반응 동안 혼합이 잘 이루어지도록 하기 위해서 마그네틱 바 및 스테러를 이용하여 지속적으로 혼합할 수 있다. 마그네틱 바의 회전 속도는 400-1000 rpm이 바람직하다. 반응이 평형상태에 이르렀는지 여부는 반응 혼합물이 균질한 반투명 상태가 되는 시점으로 알 수 있다.
- [0037] 평형상태에 도달한 다음에는 리포솜을 형성시키기 위해서 초임계 유체를 감압에 의해 배출하는 과정을 수행한다. 감압속도는 10-50 bar/분이 적절하며, 감압과정에서 초임계 유체와 함께, 암포테리신 B, 인지질, 및 스테롤을 포함하는 혼합용액의 제조에 사용된 유기용매가 함께 제거된다. 이 과정에서 초임계 유체/수상의 에멀전의 내상인 초임계 유체가 제거됨으로써 리포솜은 역용매증발법과 같은 원리로 형성된다. 또한, 상기 고압을 유지하는 동안 그리고 감압되는 동안에 멸균이 이루어지는 이점이 있다.
- [0038] 상기 제조된 리포솜은 보관의 용이성을 위해 선택적으로 동결건조를 수행할 수 있다. 상기 리포솜 제조시 물을 포함하는 수상을 당류를 포함하는 수용액을 사용하여 수상에 당류를 함유시키면, 동결건조 동안에 리포솜의 물리적 구조를 안정시키는 작용을 할 수 있다. 상기 당류로는 말토오스, 락토오스, 수크로오스, 트레할로오스, 텍스트로스, 소르비톨, 만니톨, 자이리톨, 또는 이들의 조합을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 암포테리신 B 함유 리포솜을 동결건조하여 형성된 케이크, 플라그, 또는 분말은 용시 멸균수로 재구성하여 투여할 수 있다.
- [0039] 상기 본 발명의 방법에 따라 제조된 암포테리신 B 리포솜은 주사제, 경피, 경비, 및 폐로의 약물송달에 사용될 수 있다. 이러한 제제화에 필요한 기술 및 약제학적으로 적절한 담체, 첨가제 등에 관해서는 당해 제제학 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려져 있으며, 이와 관련하여 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)를 참조할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 다른 측면에 따른 상기 본 발명에 따른 리포솜의 제조방법을 수행하기 위한 장치는

- [0041] 초임계 유체/수상의 에멀전의 제조 단계 및 리포솜 용액을 형성시키는 단계가 이루어지는 반응용기;
- [0042] 초임계 유체를 수용하는 초임계 유체 저장용기;
- [0043] 상기 반응용기에 초임계 유체 저장용기로부터 초임계 유체를 수송하기 위한 초임계 유체 저장용기로부터 상기 반응용기로 연결된 초임계 유체 제공용 튜브;
- [0044] 상기 초임계 유체 제공용 튜브상에 존재하여 수송되는 초임계 유체의 양을 제어할 수 있는 초임계 유체 공급량 조절용 펌프;
- [0045] 상기 반응용기의 내부에 연결되어 반응물질을 반응용기에 제공하기 위한 반응물질 도입부;
- [0046] 상기 반응용기 내부와 연결되어 반응용기 중의 압력을 측정하기 위한 압력 측정계;
- [0047] 상기 반응용기에 연결되어 초임계 유체를 배출시키기 위한 초임계 유체 배출용 튜브; 및
- [0048] 상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 감압 밸브를 포함한다.
- [0049] 상기 장치는 바람직하게는 마그네틱 바가 반응용기 내부에 존재하고, 반응용기 내부의 마그네틱 바가 회전하여 반응물을 혼합시킬 수 있도록 반응용기 자체 또는 반응용기 외부에 마그네틱 스테러가 존재할 수 있다. 또한 큰 반응용기에는 마그네틱 드라이브가 장착된 교반장치를 사용할 수 있다.
- [0050] 상기 본 발명에 따른 암포테리신 B 리포솜 제조 장치의 일 구현예의 모식도를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 본 발명의 일 구현예에 따른 장치를 이용하여, 상기 암포테리신 B 함유 리포솜을 제조하는 방법을 하기 실시예에 나타내었다.
- [0051] 도 1에 나타난 본 발명의 리포솜 제조방법을 수행하기 위한 장치는 종래의 초임계 유체를 이용하여 리포솜을 제조하기 위한 장치(US 5,776,486)의 구조에 비해 매우 간단한 구조를 가지므로, 보다 간편하며 경제적으로 리포솜 제조방법을 수행할 수 있다.

효 과

- [0052] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 방법에 따르면 암포테리신 B의 봉입 효율이 높고, 활성성분의 안정성 및 리포솜의 제제 안정성이 우수한 리포솜을 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 암포테리신 B 리포솜의 제조방법은 공정이 매우 간소화되어 간단한 장치에 의해 이루어질 수 있으며, 경제적으로 대량 생산이 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0053] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0054] **실시예 1-14 : 암포테리신 B 리포솜의 제조**
- [0055] 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC) 및 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC) 중 어느 하나의 포스파티딜콜린과 콜레스테롤을 7:3의 몰 비율로 하여 200 mg을 메탄올과 클로로포름 1:1 혼합용매 4 ml 중에 용해하였다.
- [0056] 암포테리신 B는 암포테리신 B/총지질량이 각각 10, 20, 30, 35, 40, 45, 및 50 중량%가 되도록 상기 지질 혼합용액과 혼합하여 녹였다. 반응 용기(1)에 상기 암포테리신 B와 지질을 녹인 메탄올:클로로포름 1:1 혼합용액을 총 양이 1 ml가 되도록 추가하였다. 암포테리신 B가 다 녹지 않을 경우 2.5M의 염산을 10 μ l 추가하여 녹이고 이후 2.5M의 수산화나트륨 6 μ l를 가하여 중화하였다.
- [0057] 반응기(1)에 증류수 10 ml를 반응물질 도입부(5)를 통해 넣고, 반응기의 온도를 60℃로 맞춘 후 상기 제조한 암포테리신 B 및 지질의 혼합용액을 반응물질 도입부(5)를 통해 넣고 현탁시켰다. 여기에 펌프(4)를 작동시켜 기체저장용기(2)로부터 초임계유체 제공용 튜브(3)을 통해 반응용기(1)로 초임계 이산화탄소를 주입하고, 압력측정계(6)를 이용하여 압력을 200 bar로 유지시키고, 마그네틱 스테러(10)를 작동시켜 마그네틱 바(9)를 40 분간 800 rpm으로 회전시킴으로써 혼합하였다. 반응 혼합물이 투명해지고 평형상태가 되었을 때 감압 밸브(8)를 열어 40 bar/분의 속도로 초임계 이산화탄소를 초임계유체 배출용 튜브(7)을 통해 배출시켰다.
- [0058] 상기 과정으로 제조한 리포솜의 입자크기를 입자분석기(Electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000)로 측정하고, 봉입효율을 측정하여 하기 표1 및 표2에 나타내었다.

[0059] 표1 은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC):콜레스테롤 7:3 지질을 사용하여 제조한 리포솜에 대해 측정된 것이고, 표2 는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC):콜레스테롤 7:3 지질을 사용하여 제조한 리포솜에 대해 측정된 것이다.

[0060] 표1.

[0061]

실시예 번호	암포테리신B/총 지질 중량%	입자크기(nm)	봉입효율(%)
1	10	805.5 2000이상: 25.3%	96.62
2	20	826.9 2000이상: 21.1%	94.58
3	30	572.7 2000이상: 8.2%	95.05
4	35	570.3 2000이상: 13%	94.92
5	40	566.5 2000이상: 13.7%	89.33
6	45	583.7 2000이상: 18.8%	89.88
7	50	592.4 2000이상: 8%	89.68

[0062] 표2.

[0063]

실시예 번호	암포테리신B/총 지질 중량%	입자크기(nm)	봉입효율(%)
8	10	511.8 2000이상: 15.8%	96.62
9	20	431.9 2000이상: 10.4%	94.58
10	30	408.6 2000이상: 9.9%	95.05
11	35	322.7 2000이상: 8.1%	94.92
12	40	471.0 2000이상: 13.7%	89.33
13	45	541.9 2000이상: 15.9%	89.88
14	50	554.4 2000이상: 8.5%	89.68

[0064] 실시예 15-28: 암포테리신 B 리포솜의 제조

[0065] 상기 실시예 1-14에서 공용매를 메탄올 및 클로로포름 혼합용액 대신 메탄올만을 사용하는 것만을 달리하고 동일한 방법으로 암포테리신 B 함유 리포솜을 제조하였다. 그 결과를 하기 표3 및 표4 에 나타내었다.

[0066] 표3 은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC):콜레스테롤 7:3 지질을 사용하여 제조한 리포솜에 대해 측정된 것이고, 표4 는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC):콜레스테롤 7:3 지질을 사용하여 제조한 리포솜에 대해 측정된 것이다.

표3.

실시예 번호	암포테리신B/총 지질 중량%	입자크기(nm)	봉입효율(%)
15	10	107.9 2000이상: 0%	89.76
16	20	96.4 2000이상: 0%	84.52
17	30	90.4 2000이상: 0%	81.31
18	35	116.1 2000이상: 2%	74.84
19	40	101.0 2000이상: 0%	76.25
20	45	119.5 2000이상: 2.6%	68.71
21	50	137.6 2000이상: 3.9%	70.4

표4.

실시예 번호	암포테리신B/총 지질 중량%	입자크기(nm)	봉입효율(%)
22	10	94.6 2000이상: 0%	77.50
23	20	90.8 2000이상: 0%	62.18
24	30	81.1 2000이상: 0%	52.40
25	35	89.7 2000이상: 0%	59.75
26	40	143.8 2000이상: 2.5%	46.50
27	45	102.6 2000이상: 0%	52.40
28	50	132.9 2000이상: 2.2%	61.58

상기 표1 내지 표4 의 결과로 볼 때, 전반적으로 높은 봉입 효율로 2000 nm 미만의 균질한 입자크기를 갖는 리포솜이 제조된 것으로 확인되었다.

그중에서도 특히, 공용매로 메탄올을 사용하고, 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC):콜레스테롤 7:3 지질을 사용하며, 암포테리신B/총 지질 중량% 가 20~30 % 일 때, 100 nm 이하의 평균입자 크기를 가지면서 봉입효율이 80% 이상인 암포테리신 B 리포솜을 얻을 수 있어 바람직한 것으로 나타났다.

실시예 29: 락토오스 5% 함유 암포테리신 B 리포솜의 제조

상기 실시예 16에서 물 대신 락토오스 5 % 함유 수용액을 사용하는 것만을 제외하고 동일한 방법으로 하여 암포

테리신 B 함유 리포솜을 제조하였다.

[0075] 시험예 1 : 암포테리신 B 함유 리포솜의 안정성 시험

[0076] 상기 실시예 10에서 제조한 본 발명에 따른 암포테리신 B 함유 리포솜과 종래의 액체 박막법(조성은 실시예 10과 동일하게 하고 방법만 액체박막법을 이용하여 샘플 제조)으로 제조한 암포테리신 B 함유 리포솜의 안정성을 비교 실험하였다.

[0077] 암포테리신 B의 분해가 적은 -5 °C 조건에서 리포솜에 봉입된 암포테리신 B의 총량의 변화를 측정하였다. 암포테리신 B가 리포솜 밖으로 방출되거나 분해된 양을 측정하기 위한 것이다.

[0078] 분석은 액체 크로마토그래피법으로 측정하였고, 분석조건은 하기 표5 와 같이 하였다.

[0079] 표5

분 류	조 건
칼 럼	Xterra RP18 (c18 4.60 × 250 mm)
칼럼온도	25℃
이동상	아세토니트릴 - 9% 아세트산 (60:40)
주입량	20 μ l
유 속	1.0 ml/분
검출기	407 nm

[0081] .

[0082] 또한, 시간의 경과에 따른 리포솜의 직경의 변화도 측정하였다. 불안정한 리포솜일수록 응집이 더 빠르게 일어난다.

[0083] 그 결과를 각각 도 2 와 도 3 에 도시하였다.

[0084] 도 2 는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 암포테리신 B 리포솜을 종래의 액체박막법을 이용하여 제조한 암포테리신 B 리포솜에 대해 시간의 경과에 따라 리포솜에 봉입된 암포테리신 B의 총량의 변화를 측정한 결과를 도시한 그래프이다.

[0085] 도 3은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 암포테리신 B 함유 리포솜을 종래의 액체박막법을 이용하여 제조한 암포테리신 B 함유 리포솜에 대해 시간의 경과에 따라 리포솜의 직경 변화를 측정한 결과를 도시한 그래프이다.

[0086] 도 2 와 도 3 에 도시한 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 암포테리신 B 함유 리포솜은 종래의 액체 박막법으로 제조한 리포솜 보다 봉입된 약물의 안정성 및 리포솜 입자의 응집 안정성 측면 모두에서 현저히 우수한 효과를 가지고 있는 것으로 확인되었다.

[0087] 시험예 2 : 암포테리신 B 함유 리포솜의 동결건조에 대한 안정성

[0088] 본 발명에 따른 암포테리신 B 리포솜의 보관의 용이성을 위해서 동결건조를 실시한 다음, 그 안정성을 평가하였다.

[0089] 상기 실시예 16에서 제조된 리포솜 및 상기 실시예 29에서 제조된 리포솜(락토오스 5 % 함유 수용액으로 제조된 리포솜)에 대해 동결건조를 수행한 다음, 재분산 용액으로서 생리식염 주사액을 사용하여 재구성하였다. 동결 건조 전 후의 각각의 리포솜의 크기 및 봉입된 약물의 양(리포솜 제조 직후, 동결건조 후 2주 후에 측정)을 측정하였다. 그 결과를 하기 표6 에 나타내었다.

표6.

리포솜 제조용액	상태	평균 크기(nm)	약물 양(mg)
중류수	동결건조 전	89.4	2.76
	동결건조 2주 후	1470.7	2.69
5% 락토오스	동결건조 전	89.4	2.72
	동결건조 2주 후	92.7	2.71
	동결건조 6개월 후	91.5	2.70

상기 결과에 따르면, 5% 락토오스를 함유한 수용액으로 제조된 리포솜은 동결건조 후에도 리포솜의 평균 크기를 유지하였고, 장기간(6개월 이상) 약물의 함량이 유지되었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 암포테리신 B 함유 리포솜 제조 장치의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 암포테리신 B 리포솜을 종래의 액체박막법을 이용하여 제조한 암포테리신 B 리포솜에 대해 시간의 경과에 따른 리포솜에 봉입된 암포테리신 B의 총량의 변화를 측정한 결과를 도시한 그래프이다.

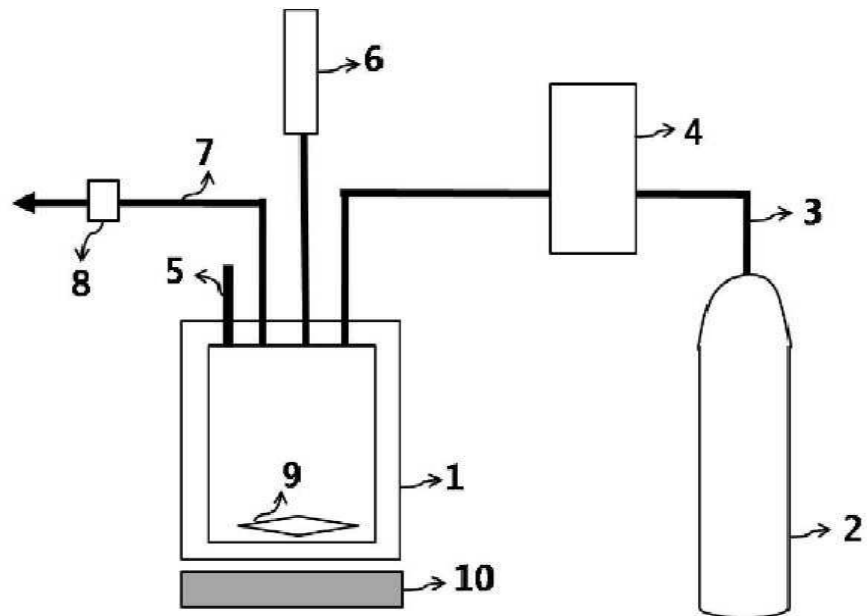
도 3은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 암포테리신 B 리포솜을 종래의 액체박막법을 이용하여 제조한 암포테리신 B 리포솜에 대해 시간의 경과에 따른 리포솜의 직경 변화를 측정한 결과를 도시한 그래프이다.

<도면의 주요 기호에 대한 설명>

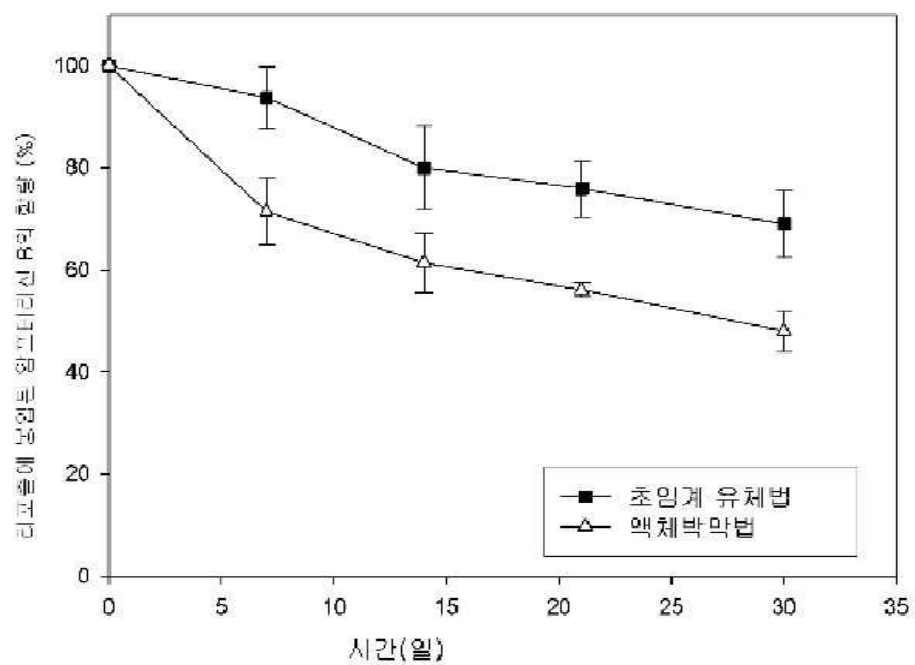
- | | |
|------------------|-------------------|
| 1: 반응용기; | 2: 초임계 유체 저장용기; |
| 3: 초임계 유체 제공용 튜브 | 4: 초임계 유체 공급량 조절용 |
| 펌프 | |
| 5: 반응물질 도입부 | 6: 압력 측정계 |
| 7: 초임계 유체 배출용 튜브 | 8: 감압 밸브 |
| 9: 마그네틱 바 | 10: 마그네틱 스테러 |

도면

도면1



도면2



도면3

