(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 9/127

(45) 공고일자 2004년12월23일
(11) 등록번호 10-0452306
(24) 등록일자 2004년10월01일

(21) 출원번호	10-1996-0702815	(65) 공개번호	10-1996-0706328
(22) 출원일자	1996년05월29일	(43) 공개일자	1996년12월09일
번역문제출일자	1996년05월29일		
(86) 국제출원번호	PCT/IB1995/000802	(87) 국제공개번호	WO 1996/10393
(86) 국제출원일자	1995년09월28일	(87) 국제공개일자	1996년04월11일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 중국 체코 헝가리 일본 대한민국 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 우크라이나 멕시코 EA 유라시아특허 : 러시아 EP 유럽특허 : 핀랜드		

(30) 우선권주장 94810570.5 1994년09월30일 EP(EP)

(73) 특허권자 브라코 리서치 소시에떼아노님
스위스 체하-1227 카루지 루트 드 드리즈 7
(72) 발명자 투르니에, 에르베
프랑스공화국 에프-74520 발레이리 르 리옹데 300
쉬나이더, 미쉘
스위스연방 체하-1256 트르와네 루뜨 다네씨 34
귈로, 크리스띠앙
프랑스공화국 에프-74160 르 샤블르-보몽 레제쁠랑
(74) 대리인 장용식, 박종혁

심사관 : 장진아

(54) 향상된포획능을갖는리포좀,그의제조방법및용도

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 건조 지질 석출물(dry lipid deposit) 형태의 리포좀 소포 전구체, 및 반응 용기 중에서 1종 이상의 막 형성 지질을 1종 이상의 유기 용매 중에 용해시키고, 용매를 증발시켜 지질을 석출시키고, 지질 석출물을 수용액 담체상과 접촉시켜 용액을 포획하는 리포좀 소포를 제조함으로써 향상된 포획능(entrapment capacity)을 갖는 리포좀 소포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 방법을 수행하기 위한 장치, 상기 리포좀 소포 전구체를 포함하는 콘트라스트제(contrast agent) 및 상기 전구체를 사용하여 콘트라스트제를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 결합 엔벨로프(binding envelope)가 지질 분자의 이중층 또는 다중층으로 이루어진 리포좀 소포는 오랫동안 많은 약물 및 콘트라스트제의 치료 및 진단 효과를 개선시킬 수 있는 약물 전달계로서 인식되어 왔다. 다수의 상이한 항생제 및 X선 콘트라스트제를 사용한 실험은, 약물 및 콘트라스트제를 리포좀으로 캡슐화시킴으로써 보다 높은 수준의 안전성을 갖는 보다 양호한 치료 활성 또는 보다 양호한 콘트라스트가 달성될 수 있음을 보여주었다. 약물의 캡슐화계로서의 리포좀에 대한 지대한 관심은 상기 제품의 성공적인 개발 및 상업화를 위해서는 적합한 특성을 갖는 지질 소포의 재현가능한 대규모 제조 방법이 필요함을 보여주었다. 결과적으로, 지질 혼합물의 성질과는 상관없이 필요한 크기 및 농도, 크기 분포 및 포획능을 갖는 리포좀 소포를 일관적으로 제조할 수 있는 방법에 대한 연구가 시작되었다. 상기 방법은 현재 허용되는 상품 제조 관례를 침범하지 않으면서 일정한 활성 물질 대 지질 비를 갖는 리포좀을 제공해야 한다. 연구 결과, 리포좀 거동특성이 각종 제조 파라미터에 따라 실질적으로 변할 수 있다는 사실 때문에 지금까지 수많은 상이한 방법들이 제시되어 왔다.

<3> 종래의 리포좀 제조 방법들은, 둥근 바닥 플라스크 중에서 다중층 또는 이중층 형성 성분들(인지질, 또는 인지질과 기타 지질, 예를 들면 콜레스테롤의 혼합물)을 휘발성 유기 용매 또는 용매 혼합물 중에 용해시킨 후 상 분리를 막을 수 있는 조건(온도 및 압력) 하에 용매를 증발시키는 다수의 단계들을 포함한다. 용매 제거시에, 일반적으로 반응기 벽 상의 막 석출물 형태의 건조 지질 혼합물을 완충제, 염, 조절제(conditioning agent) 및 포획하고자 하는 활성 물질이 용해되어 있는 수성 매질로 수화시킨다. 수화 단계에서 리포좀이 형성되고, 이에 따라 일정 비율의 수성 매질이 리포좀 중에 캡슐화되게 된다. 교반, 초음파처리 또는 미세유동화(microfluidisation)에 의해 용액을 활력화시키면서 또는 활력화시키지 않으면서 수화 단계를 수행하고, 이어서 후속되는 1개 이상의 폴리카보네이트 필터를 통해 압출시킨다. 캡슐화되지 않은 유리 활성 물질은 분리하여 회수할 수 있고, 생성물은 여과시키고, 멸균시키고, 임의로

동결건조시켜 포장한다.

<4> 다른 어떤 단계보다도 수화 단계가 형성되는 리포좀 타입(크기, 지질층 수, 포획된 부피)에 영향을 미친다. 건조된 지질의 성질, 그의 표면적 및 그의 다공도가 특히 중요하다. 따라서, 건조 지질의 막이 얇게 유지될 때 수화 및 포획 과정이 가장 효율적임이 입증되었다. 이것은, 지질을 석출시키기 위해서 보다 많은 양의 지질, 보다 많은 표면이 필요하다는 것을 의미하고, 이것은 또한, 유리 비이드 및 기타 불활성 불용성 입자들을 사용하여 막 석출에 이용될 수 있는 표면적을 증가시킨다 하더라도 박막 방법은 여전히 주로 실험실용 방법으로 남아 있게 됨을 의미한다.

<5> 분무 건조, 동결건조, 미세유화(microemulsification) 및 미세유동화 등을 사용하여 용매를 연속적으로 제거하면서 지질의 유기 용액을 수성 매질내로 주입시키는 것을 포함하는 기타 리포좀 제조 방법들이 예를 들면 미합중국 특허 제 4,529,561호, 동 제4,572,425호 등과 같은 다수의 공고공보 또는 특허문헌에서 제안되었다.

<6> 리포좀 제조의 대량화의 문제점을 해결하기 위한 한 시도 방법이 미합중국 특허 제4,935,171호[베스타(Vestar)]에 기재되어 있다. 여기에는, 유기 용매의 증발을 통해 박막 증발기 중에서 균질하고 균일한 지질 막을 형성시킴으로써 상업적 양으로 리포좀을 제조하는 방법이 기재되어 있다. 증발기의 내벽상에 형성된 박막 지질의 건조 후, 석출물을 동일 반응기 내에서 로터에 의한 교반 하에 수용액 상으로 수화시킨다. 이 문헌에서 제시된 해결책은 바람직한 방향의 조치인 것 같지만, 지질 막 표면 대 반응기 부피 비는 실험실 규모에서 사용되는 둥근 바닥 플라스크에 비해, 가장자리가 아니라면, 단지 약간만 나아졌다. 반응기의 시공간 수율 또는 생산성은 여전히 너무 낮아 이 방법이 경제적으로 바람직하고 경쟁력있지 못하다.

<7> 상이한 측면의 리포좀 제조가 착수되어 스케일 업의 문제에 대한 다수의 개선 및 상이한 해결책들이 제시되었다. 예를 들면, 국제 특허공개 제86/00238호, 동 제87/00043호, 미합중국 특허 제4,737,323호, 동 제4,753,788호 및 동 제4,781,871호와 같은 문헌은 포획능을 개선시키기 위해서는 미리 제조한 다수개의 층판 소포를 급속 동결시키고, 이어서 동결 및 해동 처리하는 급속 동결법의 사용, 크기 분포를 개선시키기 위해서는 다층판 리포좀의 압출 기술의 사용 등을 제시하였다.

<8> 지금까지는, 제조 파라미터의 조절이 많은 부피의 액체를 비교적 작은 반응기 공간 내에서 진행시킬 수 있는 재현가능한 방법을 가능하게 하는 대규모의 공업적 방법에 대한 제안은 없었다. 공지된 모든 파일럿 또는 공업적 규모의 방법들은 전형적으로는 많은 부피의 묽은 리포좀 용액을 처리하기 위해 많은 플로어 및 반응기 공간을 필요로 할 뿐만 아니라 많은 부피의 용액 및 용매의 취급을 필요로 하는 작은 뱃치와 관계있다. 현실적으로 반응기들의 비교적 낮은 시공간 수율 또는 생산성 때문에 이들 방법은 너무 다루기가 힘들고, 또한 대규모의 상업적 제조를 위해서는 비용이 너무 많이 든다.

<9> 발명의 요약

<10> 간단히 요약하면, 본 발명은 0.1 g/cm^3 이하, 바람직하게는 0.08 g/cm^3 이하, 보다 바람직하게는 0.05 내지 0.001 g/cm^3, 더욱더 바람직하게는 0.02 내지 0.01 g/cm^{3}의 벌크 밀도를 갖는 팽창된 지질의 3차원 구조 형태의 지지되거나 또는 지지되지 않은 리포좀 소포 전구체에 관한 것이다. 지지된 구조란, 다공성 지질 석출물이 불활성 지지 물질의 배열(array) 또는 망상구조(network) 상에 형성된 것을 말한다. 석출물을 형성하는 지질은 포스파티드산, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜에탄올 아민, 포스파티딜 세린, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 이노시톨 및 이들의 혼합물을 포함하는 합성 또는 천연의 포화 또는 불포화 인지질로부터 선택된다. 지질은 디세틸포스페이트, 콜레스테롤, 에르고스테롤, 피토스테롤, 시토스테롤, 라노스테롤, α-토코페롤, 스테아르산, 스테아릴 아민 및 이들의 혼합물로부터 선택된 물질등을 추가로 함유할 수 있다.

<11> 본 발명은 또한 1종 이상의 막 형성 지질을 1종 이상의 유기 용매 중에 용해시켜 용액을 형성함으로써 향상된 포획능을 갖는 리포좀 소포체의 제조 방법에 관한 것이다. 지질 용액을 적합한 반응 용기 내에 도입시켜 증발을 행하고, 이에 따라 지질을 건조시켜 0.1 g/cm^3 이하, 바람직하게는 0.08 g/cm^3 이하, 보다 바람직하게는 0.05 내지 0.001 g/cm^3, 더욱더 바람직하게는 0.02 내지 0.01 g/cm^{3}의 벌크 밀도를 갖는 팽창된 3차원 다공성 구조를 형성시킨다. 그 후에, 다공성 구조물을 수용액 담체상과 접촉시켜 담체상 일부를 포획하는 리포좀 소포체를 제조한다.

<12> 본 발명은 또한 유입구 및 유출구를 갖는 반응 용기, 진공 연결관, 냉각 또는 가열 수단, 조절 수단 및 불활성 물질이 조밀하게 충전된 관 배열을 포함하는 팩킹(packing)을 포함하는, 상기 방법에 따라 높은 포획능을 갖는 리포좀을 제조하기 위한 장치에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 관은 0.5 mm 내지 5 mm의 내경 및 0.5 mm 내지 2 mm의 벽 두께를 갖는 스텐레스강 관이다. 별법으로는, 고정되거나 또는 이동할 수 있는, 예를 들면 유동화되는 팩킹은 라시히 링(Raschig ring), 중공 유리구, 망상 카본, 망상 유리질 카본, 망상 금속, 유리 또는 금속 울(wool) 및 유리 또는 금속 섬유를 포함할 수 있다.

<13> 본 발명의 3차원 지질 구조는 높은 포획능을 갖는 리포좀의 대규모 제조에 매우 적합하다.

<14> 콘트라스트 매질을 함유하는 수용액 담체상과 함께 배양시켰을 때, 본 발명의 3차원 지질 구조는 진단 콘트라스트제의 제조에 특히 적합하다.

도면의 간단한 설명

<15> 제1도는 본 발명의 팽창된 3차원 지질 구조를 잘라내서 보여주는, 반응기의 개략적 다이어그램이다.

<16> 제2도는 불활성 관 배열을 갖는 반응기의 개략적 다이어그램이다.

<17> 제3도는 지질 석출물 대 농도의 플롯이다.

<18> 제4도는 지질 석출물 대 선속도의 플롯이다.

<19> 제5도는 본 발명의 팽창된 지질 구조를 사용하여 콘트라스트 매질을 제조하는 방법의 흐름도이다.

발명의 상세한 설명

<20> 본 발명은, 소포를 제조하는 동안 1종 이상의 유기 용매 중의 1종 이상의 막 형성 지질의 유기 용액으로부터 용매를 증발시켜 얻은 지질 석출물을 수용액 담체 상과 접촉시키기 전에, 0.1 g/cm^3 이하, 바람직하게는 0.08 g/cm^3 이하, 보다 바람직하게는 0.05 내지 0.001 g/cm^3, 더욱더 바람직하게는 0.02 내지 0.01 g/cm^{3}의 벌크 밀도를 갖는 3차원 구조로 팽창시키는 경우 최적의 리포좀 형성 및 향상된 반응기 용량이 얻어진다는 예기치 못한 발견에 기초한 것이다. 이와 같은 예기치 못한 결과에 대한 정확한 이유는 비록 완전하게 입증되지는 않았지만, 상기 방법은 석출물의 예외적으로 큰 표면 대 부피 비를 제공하여 후속되는 수화 단계가 보다 효율적인 것으로 추정된다. 따라서 소정의 크기 및 분포를 갖는 고수율의 리포좀은 스케일 업 및 조절이 특히 용이한 방법에 의해 제조된다. 큰 표면 대 부피 비를 갖기 때문에 팽창된 지질 구조는 반응기의 시공간 효율을 개선시키고, 이에 의해 이 기술은 공업적으로 매우 매력적이다. 또한, 스케일 업을 용이하게 하고 고생산성을 촉진시키기 위하여, 상기 방법은 보다 빠른 반응기 회송 시간, 수화 단계 조절의 용이함, 감소된 처리 시간, 값싼 물질의 사용 및 최종적으로, 석출, 용매 증발, 팽창된 지질 구조의 수화 및 형성된 리포좀 소포의 멸균에 동일한 반응기 사용을 포함하는 추가의 이점들을 제공한다.

<21> 본 발명의 순수한 지질들의 다공성 구조는 매우 큰 표면 대 부피 비를 갖는 것이 입증되었다. 불행하게도, 팽창된 구조의 매우 큰 메짐성(fragility) 때문에, 팽창된 지질 구조의 단위 중량 또는 부피당 정확한 표면적이 높은 정확도로 구해지지 못하였다. 그러나, 본 발명의 팽창된 구조 1 g의 총 표면적의 줄잡은 어림은 총 표면적이, 10 내지 0.5 x 10^5 사이의 표면 대 부피 비를 의미하는 0.1 내지 50 m^2 사이에서 변할 수 있음을 제시하였다.

<22> 팽창된 3차원의 지질 구조는 지질의 석출에 대한 물질 지지체 또는 매트릭스 표면으로 사용되는 불활성 다공질 망상구조 또는 지지체를 함유하는 반응 용기로부터 유기 용매를 증발시켜 얻을 수 있다. 불활성 망상구조는 비교적 큰 표면 대 부피 비를 갖는 임의의 편리한 물질일 수 있고, 중공 유리구, 망상 카본, 망상 유리질 카본, 망상 금속, 유리, 세라믹 또는 금속 올 및 유리, 세라믹 또는 금속 섬유와 같은 불활성 팩킹 배열 또는 관 배열을 포함할 수 있다. 관 배열을 사용할 때관 치수는 최대의 표면 대 부피 비가 달성될 수 있도록 선택되어야 한다. 본 발명에 따른 반응기의 개발 및 특성화 동안에 수행되었던 실험은 제공된 형상에서 0.5 mm 내지 5 mm의 내경 및 0.5 mm 내지 2 mm의 벽 두께를 갖는 관이 바람직한 결과를 제공함을 보여주었지만, 다른 형상의 반응기는 다른 관 치수를 선호할 수 있다. 지질 용액은 중력에 의해 관의 내부 및 외부 표면 상에서 퍼지기 때문에 수직으로 배열된 관 배열이 바람직하지만, 나선형의 배치도 또한 사용가능하다.

<23> 지질 막의 균일한 석출을 용이하게 하기 위하여, 불활성 팩킹을 부드럽게 유동화시키거나 또는 라시히 링 또는 상기한 바와 같은 기타 불활성 물질들로 충전된 반응기에 지질 용액을 상부 및 왼쪽으로부터 팩킹의 아랫쪽으로 서서히 방울져 떨어지도록 공급할 수 있다. 삼수 타워(trickle tower) 배치에서 얻어지는 우수한 결과들은 석출물 두께의 효율적인 조절이 지질 용액과 지지체의 삼수 방식의 접촉에 의해 달성된다는 사실에 따른 것이라 믿어진다. 과량의 액체가 일정하게 제거되고, 이에 따라 지지체 전 표면 상에서 균일한 액체 두께가 보장된다. 팩킹 상에 지질 용액의 코팅이 균일하게 형성되는 것을 추가로 돕기 위하여, 공기 또는 질소와 같은 불활성 가스를 일정 시간 동안 역류 방식으로 도입시킬 수 있다. 가스는 일반적으로 차갑지만, 특정 조건 하에서는 지질 막의 건조 및 팽창이 뜨거운 가스를 사용하여 수행되거나 또는 도움을 받도록 가스의 온도를 선택하는 것이 바람직할 수 있다.

<24> 순수하거나 또는 통상적인 순수도를 갖는 지질로 이루어진 석출물을 3차원 구조로 건조 및 팽창시킨 후, 석출물을 수용액 담체상과 접촉시킨다. 반응기의 형상에 따라, 담체상은, 예를 들면 삼수 타워 또는 유동상 형상의 경우에는, 반응기의 하부 단부에서 도입되거나 또는 반응기 컬럼의 상부에서 도입될 수 있다(고정된 관 배열의 경우). 사용되는 수용액 담체상은 순수하거나 또는 생물학적으로 활성 물질, 콘트라스트제 또는 이들 둘을 모두 함유할 수 있다. 사실상, 본 발명에 따라 제조되는 리포좀 중에는 임의의 생물학적으로 활성 물질이 포획될 수 있다. 상기 물질로서는 항균 화합물, 예를 들면 젠타마이신, 항바이러스 화합물, 예를 들면 리파마이신, 항진균 화합물, 예를 들면 암포테리신 B, 항기생충 화합물, 예를 들면 안티몬 유도체, 항신생물성 화합물, 예를 들면 미토마이신 C, 독소루비신 및 시스플라티늄, 단백질, 예를 들면 알부민 및 리포프로테인, 면역글로블린, 독소, 예를 들면 디프테리아 독소, 효소, 예를 들면 카탈라제, 호르몬, 신경전달제, 방사선불투과성 화합물, 예를 들면 ^{99}Tc, 형광 화합물, 예를 들면 카복시 플루오레스세인, 소염제, 예를 들면 살리실산 및 이부프로펜, 마취제, 예를 들면 디부카인 또는 리도카인 등을 들 수 있으나, 이들로 한정되지는 않는다.

<25> 요오드화 X선 콘트라스트제, 예를 들면 요오파미돌, 요오메프롤, 요오헥솔, 요오펜톨, 요오트롤란, 요오딕사놀, 요오글루콜 등과 함께 사용하였을 때 매우 양호한 결과 및 높은 포획 부하가 달성되었다. 본 발명에 따른 리포좀 소포의 요오드 대 지질의 비는 2.75 이상이다.

<26> 유기 용매 또는 용매 혼합물의 증발은 주위 온도 이상에서 또는 감압에서 또는 이들 모두에서 수행된다. 실험은, 증발 속도가 지질 구조의 팽창도에 강하게 영향을 미친다는 것을 보여주었다. 따라서 최적의 팽창을 위해서는, 반응기 내에서의 열의 양 및 압력을 적절하게 조절할 수 있어야 한다. 조절은 특히 용매 증발의 후반부 근처에서, 즉 용액이 농후화되고 점성으로 될 때 중요하게 된다. 이때, 약간의 압력의 감소는 비교적 빠른 팽창(발포)를 야기시키게 된다. 주어진 용매 또는 용매 혼합물에 대해 온도 및 압력의 균형을 잡음으로써, 지질 석출물의 상이한 팽창도를 달성할 수 있다. 유기 용매를 석유 에테르, 클로로포롬, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, n-부탄올, tert-부탄올, 펜탄올, 헥산올, 펜탄,

헥산, 헵탄, 시클로헥산 및 이들의 혼합물로부터 선택할 때 최상의 결과가 얻어진다. 바람직하게는 용매는 2가지 용매의 공비 혼합물이다. 에탄올과 시클로헥산, 클로로포름과 메탄올, 및 이소프로판올과 헥산의 공비 혼합물을 사용하였을 때 양호한 결과가 얻어졌다.

<27> 리포좀 소포의 제조에 사용되는 지질은 종래의 것으로서, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨 및 포스파티드산을 포함하는 합성 또는 천연의 포화 및(또는) 불포화 인지질로부터 선택된다. 디팔미토일포스파티딜 콜린, 디팔미토일포스파티딜 글리세롤, 디팔미토일포스파티딜산, 디팔미토일포스파티딜 에탄올아민 및 대응하는 디스테아로일- 및 디미리스틸- 대응기 및 이들의 혼합물과 같은 인지질이 특히 유용하다. 이들 지질 또는 이들의 혼합물은 디세틸포스페이트, 콜레스테롤, 에르고스테롤, 피토스테롤, 시토스테롤, 라노스테롤, α-토코페롤, 스테아르산, 스테아릴 아민 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 물질들을 추가로 함유할 수 있다.

<28> 본 발명은 또한 0.1 g/cm^3 이하, 바람직하게는 0.08 g/cm^3 이하, 보다 바람직하게는 0.05 내지 0.01 g/cm^{3}의 밀도를 갖는, 지지되거나 또는 지지되지 않은 3차원 구조의 팽창된 건조 지질을 포함한다. 지지된 구조란, 다공성 지질 석출물이 불활성 지지 물질의 배열 상에 형성된 것을 말한다.

<29> 팽창된 3차원 지질 구조는 특히 리포좀을 약물 또는 진단 콘트라스트제를 운반하는데 사용할 때, 높은 포획능을 갖는 리포좀의 제조에 극히 유용하다. 이 경우, 다공성 3차원 지질 구조를 활성 성분으로서 약물 또는 진단 시약을 함유하는 수용액과 접촉시키고, 이에 따라 리포좀이 형성되어 상기 성분을 캡슐화시키게 된다. 이어서 활성 물질을 함유하는 리포좀을 종래의 방식으로 적절하게 처리시킨다. 별법으로는, "빈(empty)" 리포좀 소포, 즉 단지 수용액 담체만을 함유하는 리포좀 소포의 현탁액을 먼저 형성시킬 수 있다. 후속 단계에서는 이 "빈" 리포좀을 활성 성분을 함유하는 용액과 접촉시키고 예를 들면 트랜스 막 부하 기술을 사용하여 소포들을 부하시킨다.

<30> 본 발명은 또한 유입구 및 유출구를 갖는 반응 용기, 진공 연결관, 냉각 또는 가열 수단, 조절 수단 및 팩킹을 포함하고, 이 팩킹이 불활성 물질이 조밀하게 충전된 관 배열인 것을 특징으로 하는, 높은 포획능을 갖는 리포좀 제조 장치를 포함한다. 바람직하게는, 0.5 mm 내지 5 mm의 내경 및 0.5 mm 내지 2 mm의 벽 두께를 갖는 관이 수직적 방식으로 배열되지만, 코일 유사 배치도 또한 사용가능하다.

<31> 하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시한다.

<32> 실시예 1

<33> 반응기 특성화

<34> 바닥 단부가 금속 격자(grid)와 끼워 맞추어져 있는 수직의 열조절되는, 내경 50 mm를 갖는 높이 1 미터의 316 리터 스텐레스강 컬럼을 12 스텐레스강 관으로 충전시켰다. 관의 내경은 4 mm이었고 벽 두께는 1 mm이었다. 반응기 내로 삽입하기 전에, 관을 스팟 용접시켜 평행한 관 배열을 형성시켰다. 2 mm 및 3 mm의 직경을 갖는 것을 제외하고는 동일한 형상의 반응기를 또한 제조하여 시험하였다.

<35> 지질 석출물의 팽창에 관한 시험 전에, 9:1 몰비의 수소첨가된 대두 레시틴/디세틸포스페이트의 지질 조성물을 사용하여 팽창되지 않은 지질 막을 석출시켜 반응기 특성화를 수행하였다. 실험을 수행하여 관 내에서의 지질의 석출에 대한 최상의 조건을 구하여 지질 농도, 관의 내부 직경 및 성질, 및 지질 용액의 배수 속도의 영향을 입증하였다. 모든 경우에 있어서, 클로로포름 중의 지질 용액을 실온에서 관 내로 도입시키고 관을 바닥으로부터 충전시킨 후 지질 용액을 조절된 속도로 배수시켰다. 석출물을 질소하에 80 ℃에서 용매를 증발시켜 건조시키고, 건조 석출물을 소량의 클로로포름을 사용하여 3회 헹궜다.

<36> 표 1

지질 농도 g/l	침착된 지질 (지질 mg/100 cm^2)	
	3 mm 관	4 mm 관
180	33.1	23.3
220	43.7	29.7
260	62.5	40.0
300	81.5	56.5
320	94.5	80.4
340	111.3	84.2

<38> 표 1 및 제3도의 각종 지질 농도 및 상이한 2개의 스텐레스강 관 직경에서 석출된 지질의 양에서 보여지는 바와 같이, 지질 코팅은 지질 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 또한, 4 mm에서보다 3 mm 관에서 보다 두꺼운 단위 면적 당 석출물이 얻어졌다. 2가지 경우 모두에서, 석출된 지질의 양은 지질 농도의 제곱에 비례하는 것으로 나타났다.

<39> 표 2로부터 알 수 있는 바와 같이, 석출된 지질의 양은 배수 속도와 함께 증가하였다. 그러나, 이들 경과를 배수 유량(ml/분)보다는 배수 속도(cm/분)의 함수로 나타냈을 경우, 석출된 지질의 양은 실제 관 크기와는 독립적으로 거의 선속도와 비례하는 것으로 나타났다(제4도 참조).

<40> 표 2

배수 속도 (ml/분)	관 중에 침착된 지질 (지질 mg/100 cm^2)		
	2 mm 관	3 mm 관	4 mm 관
1	55.2	55.3	37.4
2	76.5	63.0	47.3
3.75	114.9	83.7	65.4
5	121.0	94.5	80.4

<42> 스텐레스강 관 대신 유리 관을 사용하는 것을 제외하고는 동일하게 설정하여 행한 추가의 실험은 지질 석출에 관하여 이들 2가지 지지체 사이에서의 중요한 차이점은 없다는 것을 보여주었다. 코팅된 강관을 상부로부터 10 cm 간격으로 절단하여 막 두께를 측정함으로써 지질 코팅의 균질성을 평가하였다. 얻은 결과를 하기 표 3에 나타냈다.

<43> 표 3

분획물	침착된 지질 mg	
	3 mm 튜브	4 mm 튜브
1	5.15	5.13
2	6.63	3.77
3	7.22	4.52
4	8.20	3.50
5	7.59	5.58
6	6.55	6.16
7	5.59	6.38
8	5.63	6.21
9	5.22	6.97
10	9.06	6.86
평균 ± S.D.	6.68 ± 1.33	5.51 ± 1.24

<45> 3개의 상이한 반응기 형상에서 얻어진 지질 석출물의 겉보기(벌크) 밀도를 계산한 결과, 2 mm 관의 경우 벌크 밀도는 0.04 내지 0.06 g/cm^3이었고, 3 mm 관의 경우 벌크 밀도는 0.02 내지 0.04 g/cm^3이었고, 4 mm 관의 경우 벌크 밀도는 0.01 내지 0.03 g/cm^3이었다.

<46> 리포좀 제조

<47> 특성화 후에, 250 스텐레스강 관을 갖는 새로운 반응기를 제조하여, 제5도에 나타낸 회로로 연결시켰다. 수소첨가된 대두 포스파티틸콜린(Nattermann) 5.26 g 을 디세틸포스페이트 2 g 및 클로로포름 106 g과 함께 교반기, 가열 자켓, 및 응축기(1)이 장착된 1 리터 유리 반응기에 넣고, 교반 하에 완전히 용해될 때까지 60℃로 가열하였다. 지질 용액을 연동 펌프(peristaltic pump)(2)를 사용하여 멸균 필터(3)을 통해 여과시키고, 평행한 1m 길이의 304 스텐레스강 관(4) 250이 충전된 가열 자켓을 갖는 316 리터 스텐레스강 컬럼내에 부하시켰다. 과량의 용액을 제거하고, 80℃에서 컬럼의 바닥으로부터 공기를 순환시켜 용매를 증발시키고 지질을 석출시켰다.

<48> 교반기, 가열 자켓, 응축기(5)를 갖는 2 리터 유리 반응기에 요오파미돌 849 g, 물 1196 g, EDTA 0.54 g 및 트리스(Tris) 1.60 g을 충전시키고, 90 ℃에서 교반하에 완전히 용해될 때까지 가열시켰다. 이어서 요오파미돌 용액을 여과시키고, 유리 반응기(6)으로 이동시키고, 이로부터 컬럼(4)로 전달시켰다. 기어 펌프(7)을 사용하여 용액을 75℃에서 반응기(6)과 컬럼(4) 사이를 순환시켰다. 이어서 형성된 리포좀 현탁액을 필터(8)을 통해 압출시키고, 반응기(9) 중에서 회수한 다음 미량여과 시스템(10)을 사용하여 펌프(11)로 농축시켰다. 농축된 용액을 식염수(12)로 세척하여 유리 요오파미돌을 제거하였다(투석여과). 상이한 실험 조건 하에서 행한 다수의 실험에 대한 대표적인 요오드 대 지질의 비(I/L)는 2.5 내지 3.5 범위이었고, 지질 농도는 25 내지 35 mg/ml이었고, 리포좀 평균 크기는 570 nm이었다.

<49> 제조 장치를 멸균시킬 수 있고(예를 들면 스팀으로), 밀폐된 회로의 무균 대규모 제조 장치로 만들 수 있다.

<50> 실시예 2

<51> 크기를 4배로 스케일 업시킨 것을 제외하고는 제5도에 나타낸 실험 장치 설정으로 실시예 1을 반복하였다. 수소첨가된 대두 포스포티틸콜린(Nattermann) 518.6 g을 디세틸포스페이트 41.4 g 및 클로로포름 2130.0 g과 함께 교반기, 가열 자켓, 및 응축기(1)이 장착된 3 리터 유리 반응기에 넣고, 교반 하에 완전히 용해될 때까지 60 ℃로 가열하였다. 지질 용액을 연동 펌프(2)를 사용하여 0.22 μm 멸균 필터(3) 상에서 여과시켰다. 이어서 지질 용액을 평행한 1 m 길이의 304 스텐레스강관(4) 1000이 충전된 가열 자켓을 갖는 316 리터 스텐레스강 컬럼으로 이동시키고, 과량의 지질 용액을 제거하였다. 80 ℃에서 컬럼의 바닥으로부터 공기를 순환시켜 클로로포름을 증발시키고 지질을 건조 석출시켰다.

<52> 교반기, 가열 자켓, 응축기(5)를 갖는 7 리터 스텐레스강(316 리터) 반응기에 요오파미돌 2920 g, 물 4110 g, EDTA 1.87 g 및 트리스(pH 7.2를 위한 HCl qsp) 5.50 g을 부하시키고, 90 ℃에서 교반 하에 완전히 용해될 때까지 가열시킨다. 이어서 요오파미돌 용액을 멸균 필터(보이지 않음)를 통과시키고, 기어 펌프(7)을 사용하여 컬럼(4)로 전달시키고, 잠시 동안 75 ℃에서 반응기(6)과 컬럼(4) 사이를 순환시켰다. 형성된 리포좀 현탁액을 반응기(6)중에서 회수하여, 75 ℃에서 필터(8)을 통해 압출시키고, 리포좀을 반응기(9)에서 회수하였다. 이어서 리포좀 용액을 미량여과 시스템(10)을 사용하여 농축시켰다. 상이한 실험 조건 하에서 행한 다수의 실험에 대한 대표적인 요오드 대 지질의 비(I/L)는 2.5 내지 3.5 범위이었고, 지질 농도는 25 내지 35 mg/ml이었고, 리포좀 평균 크기는 570 nm이었다. 지질 석출물의 벌크 밀도는 실험 조건의 함수로서 변하여, 0.08 내지 0.05 g/cm^{3}인 것으로 측정되었다. 그러나, 최상의 리포좀은 0.01 내지 0.02 g/cm^{3}의 벌크 밀도로 제조되었다.

<53> 실시예 3

<54> 용매로서 클로로포름 및 메탄올(87/13 = v/v)의 공비 혼합물을 사용하여 실시예 2를 반복하였다. 용매를 감압 하에 증발시킨 후 60 ℃의 따뜻한 증류수를 반응기에 첨가하였다. 첨가되는 물의 온도는 사용한 지질의 전이 온도(54℃) 이상이었다. 얻은 3차원의 팽창된 지질 석출물을 수화시키고, 형성된 리포좀을 액체를 통해 균질하게 분포시켰다. MLV 타입의 리포좀이 고수율로 형성되었다. 약 1시간 후, 지질 5 mg/ml를 함유하는 리포좀 현탁액을 60 ℃에서 2 μm 폴리카보네이트 막(Nuclepore)을 통해 압출시키고, 실온으로 냉각시킨 후, 0.22 μm 마이크로필터 시스템 프로스탁(Millipore)을 사용하여 미량여과시켜 30 mg/ml로 농축시켰다.

<55> 농축된 리포좀 현탁액에, (S)-N,N'-비스 [2-히드록시-1-(히드록시메틸)-에틸]-2,4,6-트리요오도-5-락타미도-이소프탈아미드(요오파미돌) 1040 g, 즉 공유 요오드 520 g/l를 함유하는 수용액 1 리터를 60 ℃에서 첨가하였다. 260 g/l 의 요오드 농도를 갖는 생성된 혼합물(2 리터)를 60 ℃에서 약 30분 동안 배양시킨 후, 리포좀 코어 안과 밖의 요오드 농도가 동일하게 되었다. 생성된 제제를 지질 30 g/l로 농축시켰다. 포획된 요오드 대 지질 비(I/L)는 약 4.0이었다.

<56> 실시예 4

<57> 유리 컬럼(높이 500 mm 및 직경 50 mm)을 라시히 링으로 충전시키고, 삼수 타워 반응기로서 작동시켰다. 클로로포름 중에 몰비 5:4:1을 갖는 디스테아로일포스파티딜 콜린(DSPC), 콜레스테롤 및 디세틸 포스페이트의 혼합물 50 g/l를 함유하는 지질 용액을 지지체로서의 니켈 메쉬 상에 퍼져 있는 라시히 고리의 35개 층이 끼워 맞추어져 있는 컬럼 아래로 바닥의 마지막 층이 용액으로 완전히 잠길 때까지 똑똑 방울져 내려가게 하였다. 과량의 용액을 제거하고, 뜨거운(80 ℃) 질소 스트림을 바닥으로부터 위로 반응기를 통해 불어넣었다. 지질 석출물을 2시간 동안 건조시켰다. 질소 흐름을 중단시키고, 반응기를 진공(1 내지 2 토르)에 연결시키고, 모든 클로로포름이 제거될 때까지 석출물을 건조시켰다. 용매의 증발 후, 260 g/l의 요오드 농도를 갖는 요오메프롤 용액을 60 ℃에서 반응기에 첨가하였다. 팽창된 3차원 지질 석출물을 30분 동안 수화시켰다. 리포좀 현탁액을 60 ℃에서 2 μm 폴리카보네이트 막(Nuclepore)을 통해 압출시키고 실온으로 냉각시킨 후 30 g 지질/l로 농축시켰다. 포획된 요오드 대 지질 비(I/L)는 4.0 이상이었다.

<58> 이어서 망상 카본, 망상 니켈 및 망상 유리질 카본을 컬럼 팩킹으로 사용하여 동일한 실험을 반복하였다. 이들 실험에서 얻어진 3차원 지질 구조의 벌크 밀도는 0.05 내지 0.005 g/cm^{3}이었다. 3.5 내지 4.5의 지질 대 요오드 비를 갖는 리포좀이 얻어졌다.

<59> 실시예 5

<60> 유리 컬럼(높이 500 mm 및 직경 50 mm)에 중공 유리 비이드를 불활성 팩킹 배열로서 충전시키고, 유동상 반응기로서 작동시켰다. 시클로헥산/메탄올 공비 혼합물(69.5/30.5 v/v) 중에 몰비 5:4:1을 갖는 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 콜레스테롤 및 디팔미토일포스파티드산(DPPA)의 혼합물 50 g/l를 함유하는 지질 용액을 다공성 유리 프릿에 의해 지지되는 100 mm 높이의 중공 유리구 베드를 함유하는 컬럼 내로 도입시켰다. 용액이 유리 비이드를 완전히 습윤시키게 하고 과량을 제거하였다. 뜨거운(80 ℃) 공기 스트림을 바닥으로부터 반응기를 통해 불어넣고, 지질 석출물이 거의 건조될 때까지 구를 유동시켰다. 이어서 공기 흐름을 중단시키고, 반응기를 진공(1 내지 2 토르)에 연결시키고, 모든 용매가 완전히 제거될 때까지 석출물을 건조시켰다. 용매의 증발 후, 물 중의 4중량% 리도카인 HCl 용액(pH 7.2)을 60 ℃에서 반응기에 첨가하였다. 형성된 리포좀 용액을 80 ℃에서 2 μm 폴리카보네이트 막(Nuclepore)을 통해 압출시키고 실온으로 냉각시킨 후 35 mg 지질/ml로 농축시켰다. 리포좀 중에 포획된 리도카인은 0.35 mmol 리도카인/g 지질 이었다.

<61> 유동화 동안 베드의 각종 팽창(20 내지 80%)는 석출물의 품질에는 거의 영향을 미치지 않았다.

<62> 실시예 6

<63> 불활성 팩킹을 하지 않은 높이 500 mm 유리 컬럼을 사용하여 실시예 4를 반복하였다. 컬럼을 에탄올/시클로헥산, 클로로포름/메탄올 및 이소프로판올/헥산의 공비 혼합물로부터 제조한 지질 용액 (80 g/l) 100 ml로 충전시켰다. 유기 용매를 발포상 건조 석출물이 형성될 때까지 먼저 55 ℃ 및 300 mmHg의 압력에서 증발시킨 다음 70 ℃ 및 10 mmHg에서 증발시켰다. 모든 경우에서, 얻어진 3차원의 팽창된 지질 구조를 70 ℃에서 요오메프를 수용액으로 수화시켜 리포좀 캡슐화된 요오메프롤 현탁액을 제조하였다. 70 ℃에서 0.6 μm 폴리카보네이트 막(Nuclepore) 상에서 압출시킨 후, 리포좀 현탁액을 농축시켰다. 상이한 실험 조건 하에서 행한 다수의 실험에 대한 대표적인 요오드 대 지질 비(I/L)는 1.9 내지 2.5이었고, 지질 농도는 25 내지 35 mg/ml이었다. 팽창된 지질 구조와 벌크 밀도는 0.05 내지 0.001 g/cm^{3}인 것으로 측정되었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

지질 석출물이 0.1 g/cm^3 이하의 벌크 밀도를 갖는 팽창된 3차원 구조이고, 지질은 포스파티드산, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜에탄올 아민, 포스파티딜 세린, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 이노시톨 및 이들의 혼합물을 포함하는 합성 또는 천연의 포화 및 불포화 인지질로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건조 지질 석출물 형태의 리포좀 소포 전구체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 팽창된 3차원 지질 석출물의 벌크 밀도가 0.05 내지 0.001 g/cm^{3}인 소포 전구체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 팽창된 3차원 지질 석출물의 벌크 밀도가 0.02 내지 0.01 g/cm^{3}인 소포 전구체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 팽창된 3차원 구조가 불활성 다공질 물질의 망상구조에 의해 지지되는 소포 전구체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 불활성 다공질 물질이 관 배열 또는 불활성 팩킹 배열을 포함하는 소포 전구체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 관이 0.5 ㎜ 내지 5 ㎜의 내경 및 0.5 ㎜ 내지 2 ㎜의 벽 두께를 갖는 소포 전구체.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 불활성 팩킹이 중공 유리구, 망상 카본, 망상 유리질 카본, 망상 금속, 유리 또는 금속 울 및 유리 또는 금속 섬유로부터 선택되는 소포 전구체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 팽창된 3차원 지질 석출물의 벌크밀도가 0.08g/cm^3 이하인 소포 전구체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 지질이 디세틸 포스페이트, 콜레스테롤, 에르고스테롤, 피토스테롤, 시토스테롤, 라노스테롤, α-토코페롤, 스테아르산, 스테아릴 아민 및 이들의 혼합물로부터 선택된 물질을 추가로 함유하는 소포 전구체.

청구항 10

반응용기 중에서 막 형성 지질을 유기 용매 중에 용해시켜 용액을 형성시키고, 용매를 증발시켜 지질을 석출시키고, 지질 석출물을 수용액 담체상과 접촉시켜 담체 용액을 포획하는 리포좀 소포를 제조함으로써 향상된 포획능을 갖는 리포좀 소포를 제조하는 방법에 있어서, 용매를 증발시켜 얻은 지질 석출물이 0.1 g/cm^3 이하의 벌크 밀도를 갖는 팽창된 3차원 구조인 것을 특징으로 하는 리포좀 소포 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 벌크 밀도가 0.05 g/cm^3 내지 0.001 g/cm^{3}인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 반응 용기가 지질의 석출을 위한 지지체 또는 매트릭스로서 사용되는 팩킹 또는 불활성 다공질 물질의 망상구조를 함유하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 팩킹이 망상 카본, 망상 유리질 카본, 망상 금속, 유리 또는 금속 울 및 유리 또는 금속 섬유로부터 선택되는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 불활성 다공질 팩킹이 유동화된 중공 유리구인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 불활성 팩킹이 반응 용기로서의 컬럼 중에 충전된 라시히 링을 포함하고, 지질 용액을 상부로부터 삼수 방식으로 도입시키는 방법.

청구항 16

제10항에 있어서, 유기 용매의 증발 후에, 지질 석출물을 컬럼의 하부 단부에서 도입시키는 수용액 담체상과 접촉시키는 방법.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 증발을 주위 온도 이상에서 또는 감압에서 수행하는 방법.

청구항 18

제10 또는 12항에 있어서, 상기 증발을 공기 또는 불활성 가스, 바람직하게는 질소를 반응 용기를 통해 불어 넣어 수행하는 방법.

청구항 19

제10 또는 12항에 있어서, 상기 유기 용매가 클로로포름, 석유 에테르, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, n-부탄올, tert-부탄올, 펜탄올, 헥산올, 펜탄, 헥산, 헵탄, 시클로헥산 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 유기 용매가 2가지 용매의 공비 혼합물인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 용매가 에탄올과 시클로 헥산, 클로로포름과 메탄올, 또는 이소프로판올과 헥산의 혼합물인 방법.

청구항 22

제10항에 있어서, 상기 수용액 담체상이 생물학적으로 활성 물질을 함유하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 활성 물질이 콘트라스트제인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 콘트라스트제가 요오드화 X선 콘트라스트제인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 리포좀 소포의 요오드 대 지질 비가 2.75 이상인 방법.

청구항 26

리포좀 소포가 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항 기재의 리포좀 소포 전구체를 담체액 중에 수화 및 분산시켜 얻어진 것을 특징으로 하는 담체액 중의 수화된 지질 입자의 분산액을 포함하는 리포좀 소포 현탁액.

청구항 27

제26항 기재의 리포좀 소포 현탁액을 포함하는 콘트라스트제.

청구항 28

제1항 내지 제9항중 어느 한 항에 따른 3차원 지질 구조를 갖는 높은 포획능을 가진 리포좀.

청구항 29

제1항 내지 제9항중 어느 한 항에 따른 3차원 지질 구조를 갖는 진단 콘트라스트제.

청구항 30

유입구 및 유출구를 갖는 반응 용기, 진공 연결관, 냉각 또는 가열 수단, 조절 수단 및 팩킹을 포함하는, 제10항 내지 제25항중 어느 한 항 기재의 방법에 따라 높은 포획능을 갖는 리포좀 제조용 장치에 있어서, 상기 팩킹이 불활성 물질이 조밀하게 충전된 0.5 ㎜ 내지 5 ㎜의 내경 및 0.5 ㎜ 내지 2 ㎜의 벽 두께를 갖는 관 배열인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 31

제10항에 있어서, 상기 벌크 밀도가 0.08 g/cm^3 이하인 방법.

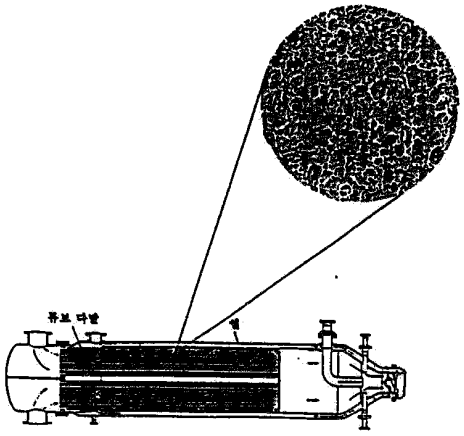
요약

본 발명은 리포좀 소포의 전구체로서의 건조 석출물에 관한 것으로, 상기 전구체는 0.01 g/cm^3 내지 0.001 g/cm^3의 벌크 밀도를 갖는 팽창된 3차원 구조이다. 본 발명은 또한 반응 용기 중에서 1종 이상의 막 형성 지질을 1종 이상의 유기 용매 중에 용해시켜 용액을 형성시키고, 용매를 증발시켜 팽창된 3차원의 다공성 지질 구조를 형성시키고, 지질 석출물을 수용액 담체상과 접촉시켜 담체상을 포획하는 리포

좀 소포를 제조함으로써 향상된 포획능을 갖는 리포좀 소포의 제조 방법 뿐만 아니라, 본 발명의 방법에 따라 제조된 지질의 석출을 위한 물질 지지체 또는 매트릭스 표면으로서 사용되는 불활성 팩킹 또는 관 배열을 포함하는 장치에 관한 것이다.

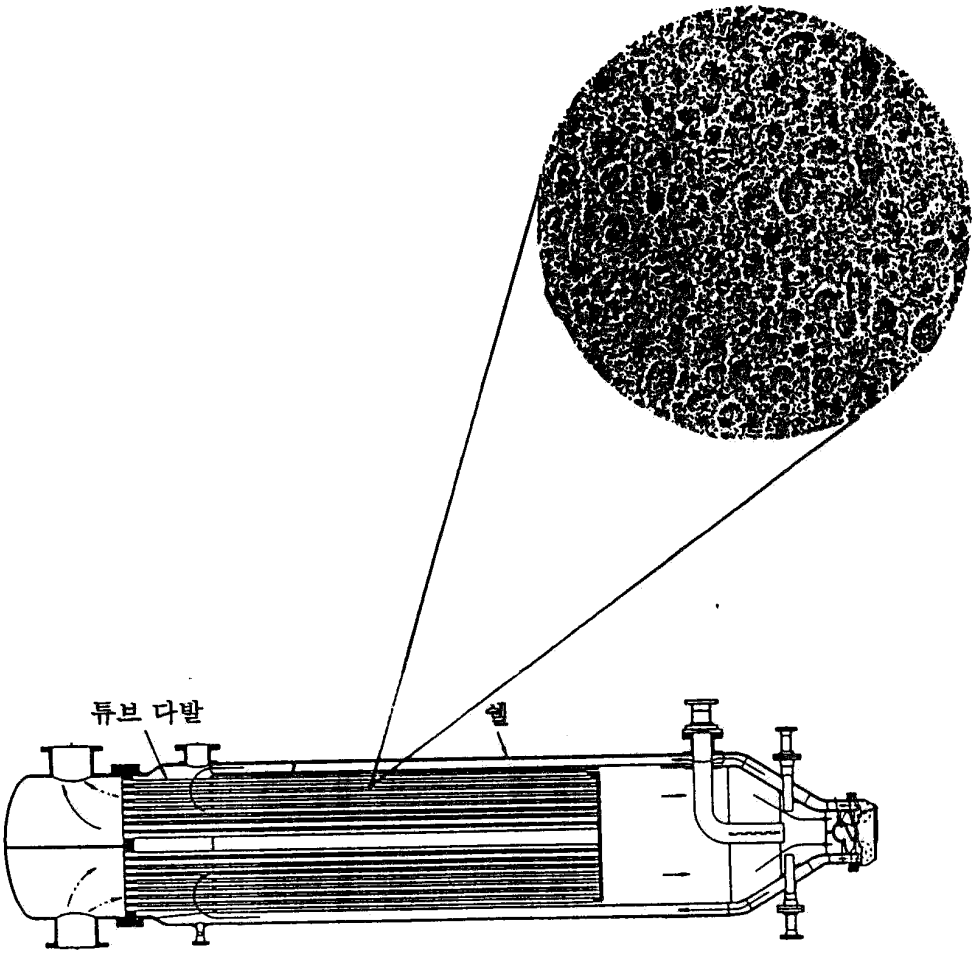
대표도

제 1 도

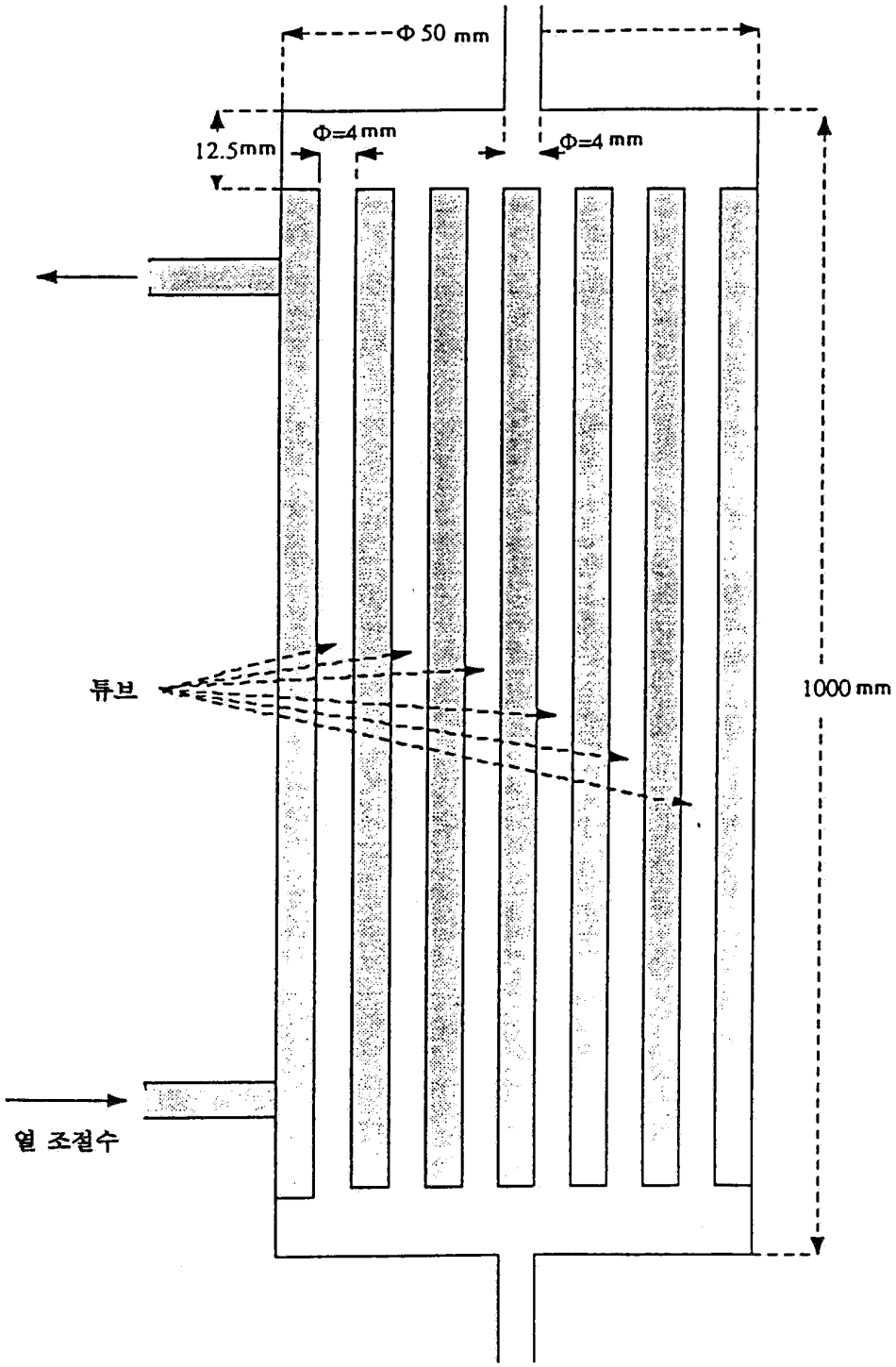


도면

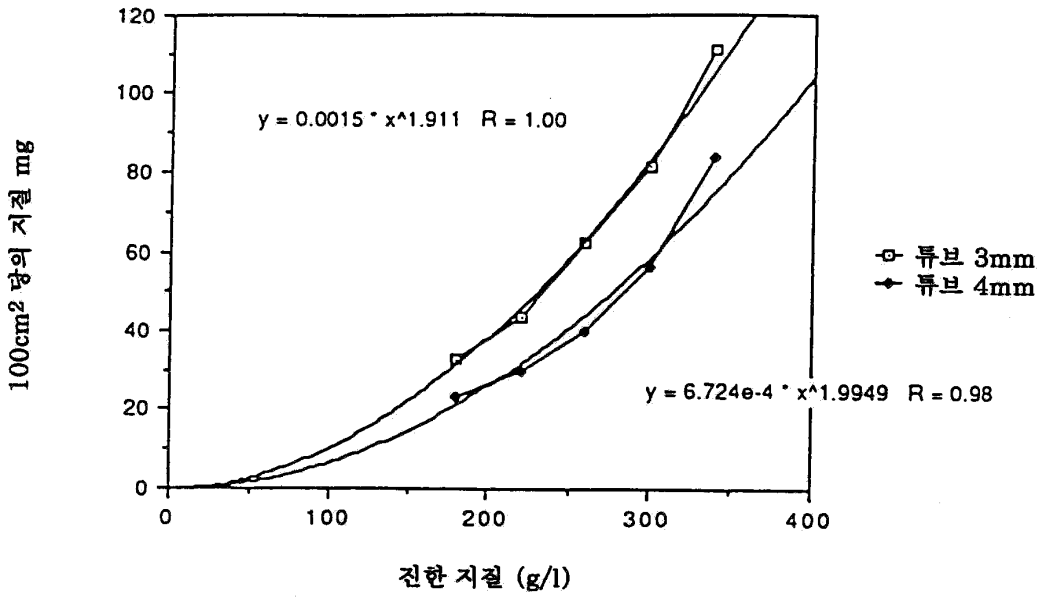
도면1



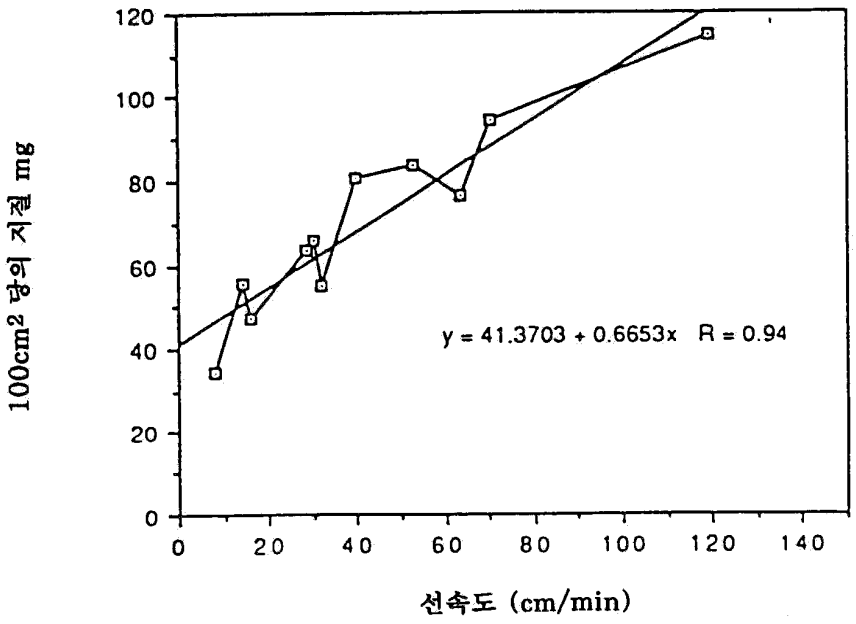
도면2



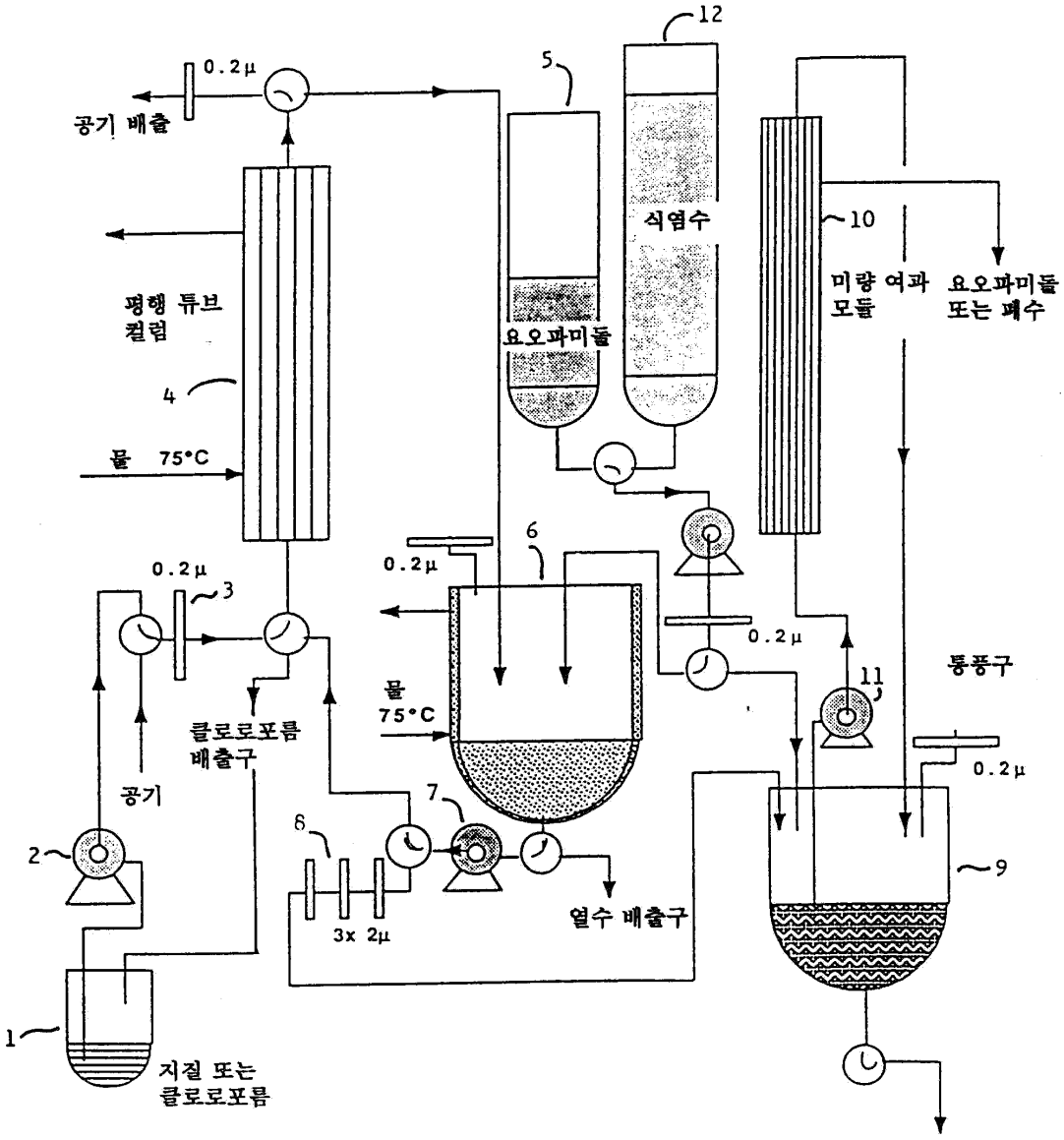
도면3


120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
y = 0.0015 * x^1.911 R = 1.00
y = 6.724e-4 * x^1.9949 R = 0.98
튜브 3mm
튜브 4mm
100cm² 당의 지질 mg
진한 지질 (g/l)

도면4


120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140
y = 41.3703 + 0.6653x R = 0.94
100cm² 당의 지질 mg
선속도 (cm/min)

도면5


0.2μ
공기 배출
12
5
식염수
요오파미돌
10
미량 여과 모듈
요오파미돌 또는 폐수
평행 튜브 컬럼
4
물 75°C
0.2μ
3
6
0.2μ
0.2μ
통풍구
11
물 75°C
클로로포름 배출구
공기
7
6
2
3x 2μ
열수 배출구
9
0.2μ
1
지질 또는 클로로포름