



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0091258
(43) 공개일자 2012년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/107 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 47/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7013922

(22) 출원일자(국제) 2010년10월28일

심사청구일자 2012년05월29일

(85) 번역문제출일자 2012년05월29일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2010/078202

(87) 국제공개번호 WO 2011/050735

국제공개일자 2011년05월05일

(30) 우선권주장

200910236960.7 2009년10월29일 중국(CN)

(71) 출원인

인스티튜트 오브 마타리아 메디카, 차이니즈 아카데미 오브 메디칼 사이언스

중국, 100050 베이징, 쉐우 디스트릭트, 시안 농탄 스트리트, 넘버 1

(72) 발명자

리우, 월링

중국, 베이징 100050, 수완우 디스트릭트, 시안 농탄 스트리트, 1번

시아, 수에준

중국, 베이징 100050, 수완우 디스트릭트, 시안 농탄 스트리트, 1번

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강명구

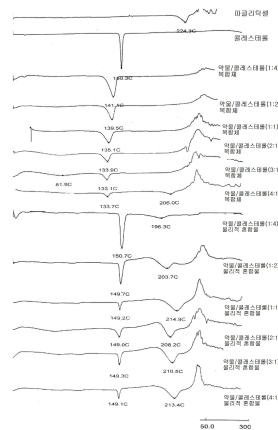
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 파클리탁셀/스테로이드 복합체

(57) 요약

파클리탁셀 및 스테로이드를 포함하는 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 공개한다. 파클리탁셀과 스테로이드의 물비는 1:0.2~4, 바람직하게는 1:0.25~2이다. 이의 조제 공정 및 서브마이크론 유액, 건조 유액, 자가-마이크로유화 시스템의 제조에 이를 사용하는 용도에 대해서도 공개한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

구오, 루이팡

중국, 베이징 100050, 수완우 디스트릭트, 시안
농 탄 스트리트, 1번

장, 쩡시아오

중국, 베이징 100050, 수완우 디스트릭트, 시안
농 탄 스트리트, 1번

조우, 쉰핑

중국, 베이징 100050, 수완우 디스트릭트, 시안
농 탄 스트리트, 1번

왕, 례?

중국, 베이징 100050, 수완우 디스트릭트, 시안
농 탄 스트리트, 1번

진, 두지아

중국, 베이징 100050, 수완우 디스트릭트, 시안
농 탄 스트리트, 1번

특허청구의 범위

청구항 1

파클리탁셀과 스테로이드가 1:0.2~4의 몰 비율로 포함된 파클리탁셀 스테로이드 복합체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 파클리탁셀과 스테로이드의 몰비율은 1:0.25~2인 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 파클리탁셀과 스테로이드의 몰비율은 1:0.33~1인 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체.

청구항 4

청구항 1-3중 임의의 한 항에 있어서, 상기 스테로이드는 천연 스테로이드 또는 이의 유도체들인 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 천연 스테로이드는 콜레스테롤, 7-데하이드로콜레스테롤, 라노스테롤, 시토스테롤, 브라시카스테롤, 미코스테롤, 굴 스테로이드, 스티그마스테롤, 시토스테롤류 또는 에르고스테롤로 구성된 군에서 선택되며; 상기 천연 스테로이드 유도체는 담즙산, 데옥시콜린산 또는 안트로포데스옥시콜린산으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체.

청구항 6

청구항 1-5중 임의의 한 항에 있어서, 상기 복합체는 항산화 안정화제를 포함하는 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 항산화 안정화제는 중아황산 나트륨염, 메타중아황산 나트륨염, 비타민 C, EDTA 및 이의 염, 비타민 E 및 이의 유도체들로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 청구항 1-7중 임의의 한 항에 따른 파클리탁셀 스테로이드 복합체의 조제 과정:

- 파클리탁셀과 스테로이드 지질 원료를 일정 비율로 혼합하고, 용해시키기 위하여 유기 용매를 첨가하고, 무작위로 항산화 안정화제를 첨가하고;
- 적절한 온도에서 교반시키고, 유기 용매를 제거하고, 진공 건조한다.

청구항 9

청구항 8에 있어서, a) 단계 동안 파클리탁셀과 스테로이드의 양을 취하고, 상이한 유기 용매로 용해시키고, 혼합하는 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체의 조제 과정.

청구항 10

청구항 8-9중 임의의 한 항에 있어서, 상기 유기 용매는 디클로로메탄, 에탄올, 메탄올, 벤질 알코올, 아세톤, 에틸 아세테이트, 테트라하이드로퓨란 또는 *tert*-부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체의 조제 과정.

청구항 11

청구항 8-9중 임의의 한 항에 있어서, 상기 유기 용매는 에탄올, 아세톤, 에틸 아세테이트 또는 테트라하이드로퓨란으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체의 조제 과정.

청구항 12

청구항 1-7중 임의의 한 항에 따른 파클리탁셀 스테로이드 복합체는 수중유 서브마이크론 유액, 건조 유액, 자가-마이크로유화 시스템(self-microemulsifying system)의 제조 또는 경구 조제에 이용되는 용도.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 파클리탁셀 스테로이드 복합체와 이의 제법(preparation)에 관한 것이며, 본 발명은 약제학적 조제의 기술 분야에 속하는 파클리탁셀 스테로이드 복합체의 용도에 또한 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파클리탁셀(paditaxel, Taxol)은 중요한 항암 활성을 가지고 있어, 현재 난소암, 유방암, 비-소세포 폐암, 머리암 및 목암 등의 임상적 치료에 광범위하게 이용된다. 물에 실질적으로 불용성인 성질로 인하여($0.006\mu\text{g}/\text{ml}$), 임상 치료용으로 의도된 통상의 주사용 Taxol은 30mg의 파클리탁셀을 Cremopher EL (폴리옥시에틸렌 피마자유)/에탄올(50:50, V/V)을 함유하는 혼합 용액 5ml에 용해시켜 준비한다. 그러나, 제제(formulation)내에 다량의 Cremopher EL을 함유하는 용매는 생체내에서 히스타민을 방출시키고, 이는 심각한 알레르기 반응을 야기할 수 있다. 이러한 부작용을 회피하기 위하여, 임상 사용전 다음과 같이 둔감화(desensitization)가 실행된다: 10mg의 텍사메타손은 치료 12시간 전 경구 투여에 의해 제공되며, 10mg의 텍사메타손은 치료 6시간 전에 경구 투여에 의해 다시 한번 제공되고, 20mg의 디펜하이드라민은 i.m.로, 300mg의 씨메티딘 또는 50mg의 라니티딘은 i.v.로 치료 전 30~60 분에 제공된다. 이러한 예방조치에도 불구하고, 환자의 5% 내지 30%는 임상에서 상이한 정도의 알레르기성 반응을 나타낸다. 더욱이, 파클리탁셀 용액의 물리적 안정성 문제는 Cremopher EL/에탄올로 희석후에 제기되는데, 예를 들면, 이 약물은 더 낮은 온도 또는 장기적 주입 시간으로 인하여 침전될 수 있고, 이는 안정성 위험을 야기할 수 있다.

[0003] 파클리탁셀 주사 문제에 관하여, 국내외 제약사들은 파클리탁셀이 시판된 이후, 20년 이상 새로운 약물 전달 체계에 대한 광범위한 연구를 실시하여 왔었고, 관련된 기술적 용액은 사이클로텍스트린 함유 복합체, 리포솜, 중합성 미셀 및 나노입자, 등과 관련있다.

[0004] 사이클로텍스트린 함유 복합체는 파클리탁셀의 용해도는 개선시킬 수 있지만, 다량의 사이클로텍스트린 함유 복합체는 심각한 신장 독성과 물로 희석시킨 후 침전을 유도할 수 있고, 따라서, 지금까지 임상적 단계로 진행되는 데 실패하였다.

[0005] 리포솜은 낮은 포집 효율, 장기간 보관이 쉽게 누출 그리고 물로 희석시킨 후 침전을 생성의 많은 단점을 가지고, 그리고 산업화된 개발에 힘쓰고 있다. 해외에서 20년간 연구를 진행하였음에도 불구하고, 시판되는 제품은 없다. 바이알당 30mg의 약물을 포함하는 주사용 파클리탁셀 리포솜(Li Pusu)은 임상 용도의 상세 및 약량은 상업적으로 가용한 주사에 따른다. 효과에는 유의적인 차이가 없으며, 중간 제조 공정 및 사용전 둔감화 전처리가 추가되었고, 따라서 기술적으로 명백한 장점들이 나타날 수 없다.

[0006] 파클리탁셀 중합성 미셀에서 국내 및 해외 연구는 상당히 활발하고, 낮은 약물 적하 및 보관후 불안정한 품질로 인하여 저장하기 위하여 냉동시켜야만 하는데, 이것이 산업적 개발을 제한시킨다. 최근 몇 년간 새로운 폴리머 물질들의 출현으로, 중합성 미셀 기술이 신속하게 발달하였지만, 신체내로 새로운 폴리머 물질의 도입 및 약물의 임상적 안정성에 대해서는 더 연구가 필요하다.

[0007] 2005년 FDA에 의해 승인된 American Bioscience Company의 주사용 알부민과 복합된 파클리탁셀 나노입자(Code No. ABI-007)가 지금까지 PCT 특허에 의해 보고되는 가장 유력한 파클리탁셀 제법이며, 이의 기술적 용액은 다음 단계들에 의해 준비된다: 약물 운반체로 인간 혈청 알부민을 이용하고, 알부민이 복합된 나노 입자안에 파클리탁셀을 넣고, 살균하고, 여과하고 냉동시켜 건조시키고, 바이알당 100mg의 파클리탁셀과 900mg의 알부민을 포함하는 파클리탁셀 주사를 얻는다. 통상의 주사와 비교하였을 때, 알부민과 복합된 파클리탁셀 나노입자는 2가지 장점을 가지는데, 1) 제제내에 Cremopher EL가 없어서, 알레르기성 반응을 완벽하게 제거하여, 국

제적으로 둔갑화 처리없이 바로 사용하는 유일한 파클리탁셀 제법이며; 2) 독성 감소 및 내성 개선으로 인하여, 환자에 의해 투여되는 약량이 135 ~ 175mg/m² 에서 260mg/m²로 증가하여, 치유 효과는 통상의 파클리탁셀 주사 보다 우수하다. 운반체로 다량의 그리고 고가의 알부민(바이알당 6200 RMB까지 비용이 상승) 뿐만 아니라 중간 생성 과정의 복합체는 알부민이 복합된 파클리탁셀 나노입자의 임상적 적용을 제한한다.

[0008] 수중유(oil-in-water) 서브마이크론(submicron) 유액의 경우, 약물 지질용해성(lipophilicity)에 유리하여, 천연 인지질을 유화제로 이용하고, 고압 균질화기를 이용하여 약물을 오일 상(oil phase)에 용해시키고, 그리고 유화시켜 600nm 미만의 평균 입자 크기를 가진 유액을 만든다. 약물은 물과 공기의 접촉 없이 내부 오일상에 포함되기 때문에, 불용성 약물이 약학적 조제로 만들어질 경우 낮은 용해도 및 열악한 안정성의 단점들을 극복하는 것이 가능하다. 리포솜 기술과 비교하였을 경우, 서브마이크론 유액은 산업화된 개발에 더 많은 장점들을 가지며; 알부민과 복합된 나노입자들과 비교하였을 때, 낮은 제조 단가를 가진 서브마이크론 유액은 최종단계에서 멸균될 수 있어, 침전을 만들지 않고 임상 치료에서 주입용으로 직접 이용될 수 있고, 또한 사용에 편리하고 안전하다. 따라서, 파클리탁셀 제법을 개발하기 위하여 운반체로 서브마이크론 유액을 이용하는 것은 명백하게 전망이 있다. 국내외 연구자들에 의해 수많은 시도가 있었지만, 실질적으로 물에 불용성이며, 오일내에서 거의 용해되지 않는(약 0.25mg/ml) 파클리탁셀로 인하여, 서브마이크론 유액을 직접적으로 준비할 경우, 약물 적하는 0.02 mg/ml 미만이며, 그리고 살균 및 보관 과정 동안 약물은 오일상에서 수상으로 용이하게 이동할 수 있어 해유화(demulsification), 적층 또는 어셈블리를 초래할 수 있다는 결과를 보였다. 오일내에서 파클리탁셀의 낮은 용해도에 의해 제한되어 국제적으로 높은 약물 적하, 열과 압력에 대한 살균 저항 및 장기간 저장에 안정적인 품질을 가진 파클리탁셀 서브마이크론 유액이 지금까지 개발되지 못하였다.

[0009] 오일 상에서 약물의 용해도를 개선시키기 위하여, 그리고 파클리탁셀 서브마이크론 유액 연구에서 물리적 그리고 화학적 성질들의 제약을 없애기 위하여, 우리는 초기 단계에서 “파클리탁셀 지질 복합체” 그리고 “중간 운반체로 지질 복합체로 준비된 파클리탁셀 서브마이크론 유액”에 대해 연구하였고, 2개의 특허 출원, 출원번호 200810168213.X의 “파클리탁셀 지질 복합체”와 출원번호200810168212.5의 “중간 운반체로 지질 복합체로 준비된 파클리탁셀 서브마이크론 유액”를 출원하였다.

[0010] 특허 출원 200810168213.X에 공개된 파클리탁셀 지질 복합체의 경우, 바람직한 지질 원료는 천연 난황 레시틴, 대두 레시틴 그리고 콜레스테롤이며, 파클리탁셀과 지질 원료의 중량비는 1:1~19이며, 즉 지질 원료의 양은 파클리탁셀 원료보다 1~19배 많고 (인지질을 지질 원료로 이용할 때, 파클리탁셀과 지질 원료의 몰비는 1:2.2~20이며; 콜레스테롤을 지질 원료로 이용할 때, 파클리탁셀과 지질 원료의 몰비는 1:2.2~42이며; 담즙산을 지질 원료로 이용할 때, 파클리탁셀과 지질 원료의 몰비는 1:2.1~40이다). 특허 출원 200810168212.5에 공개된 서브마이크론 유액은 특허 출원 200810168213.X에 공개된 파클리탁셀 지질 복합체를 중간 운반체로 이용하여 제조한다.

[0011] 파클리탁셀 지질 복합체를 제조하는 목적은 오일내에서 파클리탁셀의 용해도를 개선시키는데 있고, 이로써 서브마이크론 유액의 후속 제조에 우수한 중간 운반체를 제공하게 된다. 그러나, 추가 연구에서 특허 출원 200810168213.X 및 200810168212.5에 공개된 기술적 용액은 다음과 같은 단점들이 있는 것으로 나타났다:

[0012] 1. 오일내 약물의 용해도를 최대 2mg/ml로 개선시키는 조건으로 복합체를 생산하기 위하여 인지질을 지질 원료로 사용하면, 이용된 더 많은 양의 인지질은 오일내에 용해도를 일정하게 개선시킬 수 없고; 서브마이크론 유액을 만들기 위하여 중간 운반체로 사용되는 경우, 0.5mg/ml의 최대 약물 적하를 가진 인지질은 6개월 보관시 불안정하여, 임상 치료에 부합될 수 없다.

[0013] 2. 복합체를 만들기 위하여 콜레스테롤을 지질 원료로 사용할 경우, 오일내에서 약물의 용해도 개선에 있어서, 인지질보다 우수하지만 콜레스테롤은 스테로이드에 속하고, 파클리탁셀 양의 1~19배가 되어 많은 단점을 가진다: (1) **과도한 섭취**: 건강한 성인의 경우 콜레스테롤 섭취는 약 300mg~500mg (1~2개 난황내에 콜레스테롤의 양에 상응함)이며, 임상적으로 1회 사용을 위한 파클리탁셀의 양은 약 300mg이다. 특허 출원 200810168213.X에서 공개된 콜레스테롤과 이의 조제와 비교하였을 때, 콜레스테롤 섭취는 19개 난황의 최대 양에 상응하는 약 300mg~5700mg이며, 이는 안전성 위험이 상당히 높다; (2) **장기 보관시 서브마이크론 유액의 불안정성**: 서브마이크론 유액을 만들기 위하여 콜레스테롤을 중간 운반체로 사용하면, 파클리탁셀의 임상 치료용 약량과 특정 농도에 따르면, 복합체내에 지질 원료의 양이 높을수록 오일 상내에 포집된 복합체의 전체 양이 더 많다. 내부 오일 상내에 방울의 용적과 오일-물 접촉면에 의한 제한으로, 복합체의 전체 양이 오일 상과 오일-물 접촉면의 내용물을 초과할 경우, 약물의 일부가 외부 수성 상으로 유리될 수 있을 가능성이 있고, 이는 서브마이크론 유액의 낮은 포집 효율과 불안정성을 유도한다. 특허 출원 200810168212.5에 공개된

서브마이크론 유액의 연구를 통하여, 포집 효율은 85% 미만이며, 서브마이크론 유액의 질은 6 개월간 4℃에서 보관할 경우 안정하지만, 12개월 동안 보관된다면 명백한 적층이 나타나고, 이는 표시된 양이 감소되었으며, 파클리탁셀내 불순물의 양이 증가되었음을 나타낸다; (3) **높은 비용의 제조**: 공정 동안에 다량의 지질 원료 및 용매 그리고 용매를 제거하는데 오랜 시간은 제조 비용을 높이게 되고, 이는 약제경제학의 원리에 충족되지 않는다.

[0014] 따라서, 상기 2가지 특허 출원에 근거하여, 이 출원은 더 적은 양의 지질 원료를 가진, 더 낮은 비용의 복합체를 제공하기 위하여 많은 시험 연구를 실행하고 지질 원료를 선택하고, 이의 양을 최적화하여, 임상에서 안정적이고, 효과적이며, 품질 관리를 개선시켰다. 본 발명의 발명자들은 다수의 지질 원료에서, 스테로이드가 최고 지질 원료라는 것을 발견하였고, 스테로이드 지질 원료는 파클리탁셀 복합체에 강력한 능력을 보유하는 특징을 가지며 그리고 더 적은 양의 스테로이드를 사용하면 오일내 약물의 용해도를 최대로 증가시킬 수 있다. 수중유 서브마이크론 유액을 만들기 위하여 본 발명에서 설명하는 스테로이드 복합체를 중간 운반체로 이용하면, 포집된 복합체의 전체 양이 더 적고, 더 높은 포집 효율과 장기간 보관시 해유화(demulsification)가 용이하지 않기 때문에, 이의 물리적 그리고 화학적 안정성은 특허 출원 200810168212.5에서 공개된 서브마이크론 유액의 것보다 우수하다. 본 발명에서 상기 파클리탁셀 스테로이드 복합체는 후속 서브마이크론 유액의 품질 관리 및 효과 그리고 임상 실시에서 안정성에 확고한 기반을 가진다.

[0015] 발명의 내용

[0016] 본 발명의 목적은 파클리탁셀 및 스테로이드 지질 원료를 포함하는 한 종류의 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 제공하는 것이다. 파클리탁셀과 스테로이드의 몰비율은 1:0.2~4, 바람직하게는 1:0.25~2, 더욱 바람직하게는 1:0.33~1이다.

[0017] 본 발명의 상기 파클리탁셀/스테로이드 복합체, 이의 스테로이드 지질 원료는 천연 스테로이드성 물질 또는 이들의 유도체들중 한 종류로 구성된 군에서 선택되며; 상기 천연 스테로이드는 콜레스테롤, 7-데하이드로콜레스테롤 (또한 7-수소화된 콜레스테롤), 라노스테롤, 시토스테롤, 스티그마스테롤, 시토스테롤륨, 에르고스테롤, 브라시카스테롤, 미코스테롤 또는 굴 스테로이드로 구성된 군으로부터 선택되며; 그리고 이의 유도체는 담즙산, 테옥시콜린산 또는 안트로포데스옥시콜린산으로 구성된 군에서 선택된다. 바람직한 스테로이드는 콜레스테롤, 7-탈수소화된 콜레스테롤 또는 에르고스테롤로 구성된 군에서 선택되며, 더욱 바람직한 스테로이드는 콜레스테롤 또는 에르고스테롤로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0018] 본 발명에서 상기 파클리탁셀/스테로이드 복합체는 항산화 안정화제를 포함할 수 있다. 바람직한 항산화 안정화제는 아스코르브산 나트륨염, 메타아스코르브산 나트륨염, 비타민 C, EDTA 그리고 이의 염들, 비타민 E 또는 이의 유도체들로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0019] 본 발명의 또다른 목적은 파클리탁셀/스테로이드 복합체의 제법을 제공하는데 있으며, 이는 다음의 방법 1 또는 2에 따라 준비할 수 있다.

[0020] 방법 1은 다음 단계들을 포함한다:

[0021] a. 일정 비율로 파클리탁셀과 스테로이드를 혼합하고, 적정량의 유기 용매에 용해시키고, 그리고 무작위로 항산화 안정화제를 첨가한다;

[0022] b. 적절한 온도 조건하에서 교반시키고, 유기 용매를 제거하고, 진공 건조시킨다.

[0023] 방법 2는 다음 단계들을 포함한다:

[0024] a. 파클리탁셀과 스테로이드를 적정량의 상이한 유기 용매들에 용해시키고, 혼합하고, 그리고 무작위로 항산화 안정화제를 첨가하고;

[0025] b. 적절한 온도 조건하에서 교반시키고, 회전 증발에 유기 용매를 제거하고, 또는 분무 건조, 진공 건조시킨다.

[0026] 본 발명의 조제에서 설명한 것과 같이, 유기 용매들은 디클로로메탄, 에탄올, 메탄올, 벤질 알코올, 아세톤, 에틸 아세테이트, 테트라하이드로퓨란 그리고 *tert*-부탄올로부터 한 종류 또는 몇 가지가 선택되고; 바람직하게는 에탄올, 아세톤, 에틸 아세테이트 및 테트라하이드로퓨란으로부터 한 종류 또는 몇 가지가 선택된다. 몇 가지의 유기 용매들이 이용된다면, 유기 용매 혼합물이라고 한다.

[0027] 본 발명의 제법에서, 유기 용매들의 제거는 회전 증발 또는 분무 건조에 의해 이루어질 수 있다.

- [0028] 본 발명의 제법에서, “일정 비율로 혼합”이란 본 출원에서 상기 언급한 것과 같이 파클리탁셀과 스테로이드를 혼합하는 것을 말하는데, 즉, 파클리탁셀과 스테로이드의 몰비율은 1:0.2~4, 바람직하게는 1:0.25~2, 더욱 바람직하게는 1:0.33~1이며; “적정량의 유기 용매”에서 “적정량”은 통상적인 기술에 따라 당분야의 당업자에 의해 결정되는 파클리탁셀과 스테로이드를 용해시키기 위한 혼합물의 양을 말한다. 예를 들면, 용액에서 파클리탁셀 스테로이드 복합체의 농도는 파클리탁셀로 계산하였을 때, 0.5mg/ml~16mg/ml, 바람직하게는 1.0mg/ml~8.0mg/ml이며; “적합한 온도 조건”은 25 ℃~70 ℃, 바람직하게는 35~55℃, 가령 25℃, 35 ℃, 45 ℃, 55 ℃ 또는 70 ℃이다.
- [0029] 본 발명의 제법에서, 교반 및 진공 건조 시간은 통상적 기술에 따라 당업계 당업자에 의해 좌우되는데, 가령, 교반 시간은 0.5~3.0 시간, 가령, 0.5 시간, 1.0 시간, 1.5 시간 또는 2.0 시간일 수 있으며, 진공 건조 시간은 8~48 시간, 가령, 8 시간, 12 시간, 16 시간 또는 24 시간일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 제법에서, 항산화 안정화제의 적정량은 추가되는 것으로 간주될 수 있으며, 이 분야의 리포솜 복합체 제법에 통상적으로 사용되는 것에 준하며 파클리탁셀과 콜레스테롤의 합(중량)의 1%를 일반적으로 넘지 않는다.
- [0031] 본 발명은 수중유 서브마이크론 유액, 건조 유액, 자가-마이크로유화 시스템의 조제 또는 경구 조제용으로 파클리탁셀/스테로이드 복합체의 용도를 또한 제공한다. 수중유 서브마이크론 유액 또는 건조 유액이 오일 상에 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 용해시켜 수득될 경우, 암 치료를 위한 주사로 투여될 수 있다. 이 제법은 높은 약물 적하, 양호한 안정성 및 제제내 Cremopher EL의 미포함과 같은 장점들을 가지며, 통상의 조사보다 안정성이 더 우수하다. 자가-마이크로유화 시스템의 조제는 오일 상에 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 용해시키고, 그 다음 주사, 점막 또는 경구 투여를 통하여 암 치료에 이용된 적정량의 계면활성제(유화제) 및 보조 계면활성제(유화제를 지원하는)를 첨가하여 얻는다. 경구 조제, 특히 캡슐 또는 테블릿과 같은 고형 투약형은 경구 투여를 통하여 암 요법으로 의도된 파클리탁셀 스테로이드 복합체의 약제학적 용도용 부형제를 첨가하여 수득되는데, 이는 생체 이용성이 더 높다.
- [0032] 본 발명은 항암 약물의 조제에 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 사용하는 용도를 또한 제공하는데, 상기 암은 난소암, 유방암, 비-소세포 폐암, 머리 및 목 암, 그리고 위암 또는 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0033] 특별히 언급되지 않는 한, 본 발명에서 언급하는 과학, 용어 및 제목의 의미들은 이 분야에 당업자들이 이해하는 일반적인 의미에 준하며, 다른 특별한 언급이 없는 한, 이용된 물질 및 이의 함유량 또는 비율, 장치, 기구, 제법 조건들 등은 당업계 또는 본 발명에 설명된 것에 의해 공지된 것들이다.
- [0034] 상기 본 발명에서 파클리탁셀/스테로이드 복합체는 특히 다음과 같은 장점을 가진다:
- [0035] 1) **이용되는 지질 원료가 적고, 제조 단가가 낮음**: 약물과 지질 원료의 완전한 복합체는 오일내에서 약물의 용해도를 개선시키는데 필수적이다. 특허 출원 200810168213.X에 공개된 파클리탁셀 복합체와 이 분야에 공개된 파클리탁셀 복합체와 비교하였을 때, 약물과 스테로이드 지질 원료의 몰비율은 1: 0.2~4, 바람직하게는 1:0.25~2, 더욱 바람직하게는 1:0.33~1이다.
- [0036] 본 발명에서 상기 스테로이드 지질 원료의 분자량은 384.6~414.7이며, 따라서 약물과 스테로이드의 몰비율은 1:0.2이며, 상응하는 중량비는 1:0.09~1: 0.097이며; 반면 몰 비율이 1:4인 경우, 상응하는 중량비는 1:1.80~1.94이며, 약물과 스테로이드의 몰비율은 바람직한 범위내에 있는 1:0.2~4이며, 상응하는 중량비는 1:0.09~1.94이다. 따라서, 약물과 스테로이드의 몰비율은 바람직한 범위내의 1:0.25~2이며, 상응하는 중량비는 1:0.11~0.97이며; 약물 및 스테로이드의 몰비율이 더욱 바람직하게는 1:0.33~1인 경우, 상응하는 중량비는 1: 0.15~0.49이다.
- [0037] 특허 출원 200810168213.X에 공개된 것과 같이 함유량을 비교하였을 때, 본 발명에 이용된 스테로이드는 지질 원료이며, 약물과 지질 원료의 중량비는 1:1~19 에서 1:0.09~1.94 (바람직하게는 1:0.11~0.97)로 감소되었고, 이는 지질 원료의 양을 감소시키고, 사용량을 적게하여, 복합체내 파클리탁셀의 적하를 개선시키고(5%~50%에서 35%~91.7%로 증가됨), 파클리탁셀은 완전한 복합체가 되어, 파클리탁셀의 최대 용해도를 오일내에서 최대 용해도를 얻을 수 있고, 서브마이크론 유액의 후속 제조에 부합할 수 있다. 지질 원료의 양의 증가는 오일내 약물의 용해도를 지속적으로 개선시킬 수 없다.
- [0038] 2) 지질 원료 섭취가 감소: 1회 300mg의 파클리탁셀을 복용한다고 하였을 때, 스테로이드는 1회 27mg~580mg, 바람직하게는 33mg~290mg로 조절되어야만 한다. 특허 출원 200810168213.X에서 공개된 것과 같이, 300mg~5700

mg와 비교하였을 때, 스테로이드 섭취는 명백하게 감소되어, 안정성에 큰 위협을 감소시킬 수 있다.

[0039] 3) 서브마이크론 유액의 포집 효과 및 안정성의 개선: 본 발명의 복합체내 스테로이드 최대량은 파클리탁셀의 양의 단지 1.94배, 바람직하게는 0.97 배가 된다. 수중유 서브마이크론 유액을 준비하기 위하여 이 화합물을 식물성 오일에 용해시킬 경우, 오일 상내에 화합물의 총량의 감소는 포집 효과 및 장기간 보관시 물리적 그리고 화학적 안정성을 개선시킬 수 있다. 필적하는 연구에서 본 발명의 상기 복합체를 서브마이크론 유액을 준비하는데 중간 운반체로 이용하면, 포집 효율은 90% 이상에서 유지될 수 있으며, 4 ° C에서 12개월간 품질 안정성을 얻을 수 있으며, 반면 특허 출원 200810168212.5에 공개된 것과 같은 서브마이크론 유액의 포집 효율은 65%-85%에서 유지되며, 4 ° C에서 12개월간 보관할 경우 분명한 적층이 관찰되며, 불순물의 양이 상당히 증가되었다는 것을 보여주었다.

[0040] 4) 안정성 강화: 시판되는 이용가능한 주사와 비교하였을 때, 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체하여 준비된 서브마이크론 유액의 제제는 Cremopher EL를 배제함으로써, Cremopher EL에 의해 촉발되는 심각한 알레르기성 반응을 피할 수 있으며, 동물 독성을 감소시키고, 내성 약량을 증가시킬 수 있다.

[0041] 본 발명은 도면 및 구체예들의 설명과 관련하여 충분히 설명되어 있지만, 본 발명은 당업계 숙련자들에게 명백한 이들 구체예 및 조제 방법에 국한시키지 않는다. 더욱이, 설명에 따르면, 이 분야에 기술은 이 화합물의 대체, 복합, 교환 또는 변형을 동등하게 할 수 있으며, 이는 본 발명의 범위내에 포함될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1: 시험 실시예 3에서 상이한 물 비율과 물리적 혼합물을 가진 복합체의 DSC 곡선

도 2: 시험 실시예 6에서 X-선 회절 도표

도 3: 시험 실시예 7에서 적외선 스펙트럼

도 4: 도 4-1: 시험 실시예 8에서 자외선 스펙트럼

도 4-2: 시험 실시예 8에서 HPLC 크로마토그래피 피크 비교(피크 1: 파클리탁셀)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 실시예

[0044] 제조의 실시예들

[0045] 실시예 1

[0046] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체

[0047] 회전 증발기내에 9.0g의 파클리탁셀과 0.81g의 콜레스테롤을 넣고, 3000ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 40℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 40℃에서 12 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0048] 실시예 2

[0049] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체

[0050] 회전 증발기내에 9.0g의 파클리탁셀과 0.99g의 콜레스테롤을 넣고, 3000ml의 테트라하이드로퓨란으로 용해시키고, 1 시간 동안 25℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 25℃에서 12 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0051] 실시예 3

[0052] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체

[0053] 삼각 플라스크내에 8.5g의 파클리탁셀과 1.275g의 콜레스테롤을 넣고, 3000ml의 테트라하이드로퓨란으로 용해시키고, 1.5 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 45℃에서 16 시간 동안 진공 건조시킨다.

- [0054] 실시예 4
- [0055] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체
- [0056] 삼각 플라스크내에 8.0g의 파클리탁셀과 1.84g의 콜레스테롤을 넣고, 3000ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 35℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 35℃에서 10 시간 동안 진공 건조시킨다.
- [0057] 실시예 5
- [0058] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체
- [0059] 삼각 플라스크내에 7.0g의 파클리탁셀과 3.15g의 콜레스테롤을 넣고, 32500ml의 아세톤으로 용해시키고, 2 시간 동안 50℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 50℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.
- [0060] 실시예 6
- [0061] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체
- [0062] 삼각 플라스크내에 7.0g의 파클리탁셀과 4.2g의 콜레스테롤을 넣고, 5000ml의 에틸 아세테이트로 용해시키고, 1 시간 동안 55℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 40℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.
- [0063] 실시예 7
- [0064] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체
- [0065] 회전 증발기내에 5.2g의 파클리탁셀과 4.73g의 콜레스테롤을 넣고, 3000ml의 디클로로메탄으로 용해시키고, 2.5 시간 동안 60℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 55℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.
- [0066] 실시예 8
- [0067] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체
- [0068] 회전 증발기내에 5.2g의 파클리탁셀, 4.85g의 콜레스테롤 그리고 0.05g의 비타민 E를 넣고, 4000ml의 테트라 하이드로퓨란으로 용해시키고, 1 시간 동안 40℃에서 혼합하고, 그 다음 15시간 동안 분무 건조에 의해 용매를 제거하고, 55℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.
- [0069] 실시예 9
- [0070] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체
- [0071] 회전 증발기내에 5.1g의 파클리탁셀, 4.95g의 콜레스테롤을 넣고, 에탄올 및 *tert*-부탄올의 혼합물 5200ml로 용해시키고, 1 시간 동안 40℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.
- [0072] 실시예 10
- [0073] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체
- [0074] 회전 증발기내에 5.0g의 파클리탁셀과 7.51g의 콜레스테롤을 넣고, 에탄올 및 *tert*-부탄올의 혼합물 5200ml로

용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0075] 실시예 11

[0076] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체

[0077] 회전 증발기내에 5.0g의 파클리탁셀과 9.10g의 콜레스테롤을 넣고, 에탄올 및 *tert*-부탄올의 혼합물 5200ml로 용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0078] 실시예 12

[0079] 파클리탁셀/7-데하이드로콜레스테롤 복합체

[0080] 회전 증발기내에 5g의 파클리탁셀을 넣고, 0.55g의 7-데하이드로콜레스테롤을 추가하고, 500ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0081] 실시예 13

[0082] 파클리탁셀/7-데하이드로콜레스테롤 복합체

[0083] 회전 증발기내에 5g의 파클리탁셀을 넣고, 4.85g의 7-데하이드로콜레스테롤을 추가하고, 500ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0084] 실시예 14

[0085] 파클리탁셀/7-데하이드로콜레스테롤 복합체

[0086] 회전 증발기내에 5g의 파클리탁셀을 넣고, 9.70g의 7-데하이드로콜레스테롤을 추가하고, 500ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0087] 실시예 15

[0088] 파클리탁셀/에르고스테롤 복합체

[0089] 회전 증발기내에 5g의 파클리탁셀과 0.54g의 에르고스테롤을 함께 넣고, 500ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0090] 실시예 16

[0091] 파클리탁셀/에르고스테롤 복합체

[0092] 회전 증발기내에 5g의 파클리탁셀과 4.83g의 에르고스테롤을 넣고, 500ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0093] 실시예 17

[0094] **파클리탁셀/에르고스테롤 복합체**

[0095] 회전 증발기내에 5g의 파클리탁셀과 9.10g의 에르고스테롤을 넣고, 500ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0096] **실시예 18**

[0097] **파클리탁셀/담즙산 복합체**

[0098] 회전 증발기내에 5부분내 각 4g의 파클리탁셀을 넣고, 0.5g, 2.0g, 3.0g, 4.6g 및 7.70g의 담즙산을 별도로 추가하고, 각각 1000ml의 아세톤으로 용해시키고, 1 시간 동안 45℃에서 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0099] **실시예 19**

[0100] **파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 서브마이크론 유액**

[0101] 25g의 글리세롤을 주사용 약 720ml의 물에 용해시키고, 40-60℃로 가열시키고, 15g의 정제된 대두 레시틴과 30g의 폴옥사머 (188)를 혼합기에 첨가하고, 균일한 수성 상을 얻고, 이 온도에서 유지시키고; 실시예 1 내지 18의 파클리탁셀/스테로이드 복합체의 일정량(500mg의 파클리탁셀에 대응하는)을 취하고, 200ml의 대두 오일을 추가하고, 40-60℃로 가열시키고, 오일 상을 얻는다. 수성 상을 오일 상에 서서히 혼합시키고, 균일한 초유(colostrum)가 만들어지도록 교반한다. 이 초유를 균질화기로 몇 차례 이동시키고, 0.1mol/L 염산으로 pH를 4.0-6.0으로 조정하고, 모든 유액을 수거하고, 115℃에서 30분간 살균하고, 0.5mg/ml의 약물 적하된 서브마이크론 유액을 얻는다. Lazer 입자 크기 분석기에 의해 탐지된 평균 입자 크기는 125nm~150nm이다.

[0102] **실시예 20**

[0103] **파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 서브마이크론 유액**

[0104] 12.5g의 글리세롤을 주사용 약 300ml의 물에 용해시키고, 50℃로 가열시키고, 7.5g의 정제된 난황 레시틴과 15g의 폴옥사머(188)를 혼합기에 첨가하고, 균일한 수성 상을 얻고, 이 온도에서 유지시키고; 실시예 5, 13 및 16의 파클리탁셀/스테로이드 복합체의 일정량(500mg의 파클리탁셀에 대응하는)을 취하고, 대두 오일과 중쇄 오일(Medium Chain Oil)의 혼합물 125ml를 추가하고, 50℃로 가열시키고, 오일 상을 얻는다. 수성 상을 오일 상에 서서히 혼합시키고, 균일한 초유(colostrum)를 만들기 위해 고속에서 교반한다. 이 초유를 균질화기로 몇 차례 이동시키고, 0.1mol/L 염산으로 pH를 4.0-6.0으로 조정하고, 물을 첨가하여 500ml이 되도록 하고, 모든 유액을 수거하고, 115℃에서 30분간 살균하고, 1.0mg/ml의 약물 적하된 서브마이크론 유액을 얻는다. Lazer 입자 크기 분석기에 의해 탐지된 평균 입자 크기는 230nm~250nm이다.

[0105] **실시예 21**

[0106] **파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 서브마이크론 유액**

[0107] 12.5g의 글리세롤을 약 300ml의 주사용 물에 용해시키고, 55℃로 가열시키고, 7.5g의 정제된 대두 레시틴과 15g의 폴옥사머 (188)를 혼합기에 첨가하고, 균일한 수성 상을 얻고, 이 온도에서 유지시키고; 실시예 1 내지 18의 파클리탁셀/스테로이드 복합체의 일정량(600mg의 파클리탁셀에 대응하는)을 취하고, 대두 오일 125ml를 추가하고, 55℃로 가열시키고, 오일 상을 얻는다. 수성 상을 오일 상에 서서히 혼합시키고, 균일한 초유(colostrum)를 만들기 위해 고속에서 교반한다. 이 초유를 균질화기로 몇 차례 이동시키고, 0.1mol/L 염산으로 pH를 4.0-6.0으로 조정하고, 물을 첨가하여 500ml이 되도록 하고, 모든 유액을 수거하고, 115℃에서 30분간 살균하고, 1.2mg/ml의 약물 적하된 서브마이크론 유액을 얻는다. Lazer 입자 크기 분석기에 의해 탐지된 평균 입자 크기는 125nm~133nm이다.

- [0108] 실시예 22
- [0109] 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 서브마이크론 유액
- [0110] 12.5g의 글리세롤을 주사용 약 300ml의 물에 용해시키고, 60℃로 가열시키고, 7.5g의 정제된 대두 레시틴과 15g의 폴옥사머 (188)를 혼합기에 첨가하고, 균일한 수성 상을 얻기 위하여 고속으로 교반시키고, 이 온도에서 유지시키고; 실시예 1 내지 18의 파클리탁셀/스테로이드 복합체의 일정량(1000mg의 파클리탁셀에 대응하는)을 취하고, 대두 오일 150ml를 추가하고, 60℃로 가열시키고, 오일 상을 얻는다. 수성 상을 오일 상에 서서히 혼합시키고, 균일한 초유(colostrum)를 만들기 위해 고속에서 교반한다. 이 초유를 신속하게 균질화기로 몇 차례 이동시키고, 0.1mol/L 염산으로 pH를 4.0-6.0으로 조정하고, 물을 첨가하여 500ml이 되도록 하고, 모든 유액을 수거하고, 115℃에서 30분간 살균하고, 2.0mg/ml의 약물 적하된 서브마이크론 유액을 얻는다. Lazer 입자 크기 분석기에 의해 탐지된 평균 입자 크기는 128nm~141nm 이다.
- [0111] 실시예 23
- [0112] 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 건조 유액
- [0113] 실시예 20 내지 22의 살균안된 서브마이크론 유액 일정량을 취하고, 3% (W/V)의 만니톨에 용해시키고, 살균하고, 0.22μm의 미세공 막을 통하여 여과하고, 냉동하여 건조시킨다.
- [0114] 실시예 24
- [0115] 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 자가-마이크로 유액
- [0116] 실시예 1-18로부터 차례로 파클리탁셀/스테로이드 복합체 일정량(100mg의 파클리탁셀에 상응하는)을 취하고, 5ml의 중쇄 오일을 첨가하고, 용해되도록 혼합하고, 1.6ml의 PEG400과 0.5ml의 Tween-80을 추가하고, 잘 혼합하고, 균일하고, 투명한 자가 마이크로 유화 시스템을 얻는다.
- [0117] 상기에서 언급한 자가-마이크로유화 시스템 10ml을 취하고, 5%의 포도당 주사를 추가하여 50ml이 되도록 하고, 그 다음 100nm 미만의 입자 크기를 가진 마이크로 유액을 증석에서 얻는다.
- [0118] 실시예 25
- [0119] 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 캡슐
- [0120] 실시예 1-18의 각 파클리탁셀/스테로이드 복합체 일정량(250mg의 파클리탁셀에 상응함)을 No.2 경도 캡슐에 넣는다.
- [0121] 실시예 26
- [0122] 파클리탁셀/스테로이드 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 태블릿
- [0123] 실시예 1-18의 각 파클리탁셀/스테로이드 복합체 일정량(500mg의 파클리탁셀에 상응함)을 취하고, 500mg의 미정질 셀룰로오즈, 500mg의 락토즈, 그리고 스테아레이트 마그네슘 일정량을 추가하고, 잘 혼합하고, 편치를 조절하여 설명서내 100-250mg의 태블릿으로 압착한다.
- [0124] 시험 실시예들
- [0125] 시험 실시예 1:
- [0126] 중국 특허 출원 200810168213.X에 공개된 기술적 용액 실증
- [0127] 중국 특허 출원 200810168213.X에서 공개된 것과 같이 바람직한 지질 원료 및 이의 양을 실행하고, 대두 레시틴 및 콜레스테롤을 지질 원료로 이용하고, 약물과 지질 원료의 중량비는 1:1.85~18.5이며, 참고 복합체를 준비하고, 대두 오일에서 용해도를 조사하고(파클리탁셀로 계산됨), 복합안된 자유 파클리탁셀과 비교한다.

표 1

특허 출원 200810168213.X에서 공개된 것과 같이 복합체로부터
실증 결과

복합체	파클리탁셀/지질 재료들의 양 비율		대두 오일내 용해도(mg/ml)
	물 비율	중량 비율	
파클리탁셀/ 인지질	1:2	1:1.85	0.68
	1:4	1:3.70	0.75
	1:6	1:5.55	2.12
	1:10	1:9.23	2.32
	1:20	1:18.46	2.25
파클리탁셀/ 콜레스테롤	1:4	1:1.82	9.04
	1:6	1:2.73	8.87
	1:10	1:4.53	9.15
	1:20	1:9.06	8.75
	1:40	1:18.12	8.69
참고 파클리탁셀	/	/	0.27

[0128]

[0129]

결과에서 인지질의 양은 파클리탁셀의 5.55배이며, 용해도는 안정한 것으로 나타나고, 2.12mg/ml ~ 2.32mg/ml에서 조절된다; 콜레스테롤의 양은 파클리탁셀의 중량의 1.82~18.12배이며, 용해도는 8.75mg/ml ~ 9.15mg/ml에서 조절되는 것으로 나타났고, 이는 콜레스테롤을 지질 원료로 이용하면 오일내에서 약물 물질의 용해도 개선 측면에서 인지질보다 우수하다는 것을 암시하고, 콜레스테롤의 양은 더 감소되고 최적화되는 것으로 예상된다.

[0130]

시험 실시예 2

[0131]

오일내 파클리탁셀/스테로이드 복합체의 영향 인자들 분석

[0132]

파클리탁셀과 스테로이드의 양 비율

[0133]

4g의 파클리탁셀을 취하고, 하기 표 2에서 명시된 바와 같은 양 비율에 따라 차례로 콜레스테롤, 7-데하이드로콜레스테롤 및 에르고스테롤을 첨가하고, 회전 증발기로 함께 이동시키고, 각각 500ml의 아세톤에 용해시키고, 45℃에서 1시간 동안 혼합하고, 그 다음 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 65℃에서 15 시간 동안 진공 건조한다. 복합체 일정량을 취하고, 주사용 대두 오일 20g을 첨가하고, 1시간 동안 수조에서 가열시키고, 교반하여 포화 용액을 얻는다. 용액을 여과시키고, 연속 여과물의 일정량을 취하고, 순수 알코올을 용적으로 추가하고, 컬럼으로 Kromasil-C18 (250mm× 4.6mm, 5μm)을 이용하고, 이동상으로 아세토니트릴-물(54:46)을 이용한 액체 크로마토그래피에 20μl를 주입하고, 유속은 1.0ml/min이며, 그리고 탐지 파장은 230nm이며, 식물성 오일내 파클리탁셀의 용해도를 계산하고, 하기 표에서 결과를 참고한다.

표 2

오일내 복합체 용해도에서 파클리탁셀과 스테로이드의 양 비율의 효과

스테로이드 지질 재료들	파클리탁셀과 스테로이드의 양 비율		대두 오일내 용해도 (mg/ml)
	몰 비율	중량 비율	
콜레스테롤	5:1 (1:0.2)	1:0.091	7.66
	4:1 (1:0.25)	1:0.112	8.25
	3:1 (1:0.33)	1:0.151	8.56
	2:1 (1:0.5)	1:0.225	9.14
	1:1	1:0.453	9.49
	1:2	1:0.906	9.06
	1:4	1:1.813	9.04
7-데하이드로콜레스테롤	5:1 (1:0.2)	1:0.090	7.47
	4:1 (1:0.25)	1:0.113	7.93
	3:1 (1:0.33)	1:0.150	8.77
	2:1 (1:0.5)	1:0.225	9.21
	1:1	1:0.450	8.85
	1:2	1:0.901	8.69
	1:4	1:1.802	9.12
에르고스테롤	5:1 (1:0.2)	1:0.093	7.23
	4:1 (1:0.25)	1:0.116	8.50
	3:1 (1:0.33)	1:0.155	9.26
	2:1 (1:0.5)	1:0.232	8.78
	1:1	1:0.465	8.59
	1:2	1:0.929	9.11
	1:4	1:1.858	8.73
파클리탁셀 참고	/	/	0.27

[0134]

[0135]

결과에서 파클리탁셀과 스테로이드의 몰비율은 1:0.2~4이며, 즉, 파클리탁셀 몰의 4배 미만이며, 오일내에서 약물의 최대 용해도를 얻는다는 것을 나타낸다.

[0136]

파클리탁셀 농도

[0137]

용매로 아세톤을 이용하고, 파클리탁셀과 콜레스테롤의 몰 비율은 1:1이며, 반응 온도는 35℃, 반응 시간은 0.5 h를 이용한 복합체 제조에서 16.0mg/ml, 8.0mg/ml, 4.0mg/ml, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml 그리고 0.5mg/ml의 파클리탁셀 농도의 효과를 조사하였다. 결과에서 하기 표에서 볼 수 있는 것과 같이, 파클리탁셀의 농도는 오일내에서 복합체의 용해도에 명백한 효과를 가지지 않는다.

표 3

오일내 콜레스테롤 복합체의 용해도에 파클리탁셀 농도의 효과

파클리탁셀 (mg/mL)	대두 오일내 용해도(mg/ml)
16.0	8.89
8.0	9.21
4.0	9.58
2.0	9.47
1.0	9.39
0.5	8.44

[0138]

[0139] 시험 실시예 3

[0140] DSC 곡선에서 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체

[0141] 시험 시료들:

[0142] ● 파클리탁셀

[0143] ● 콜레스테롤

[0144] ● 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체 (시험 실시예 2의 표 2에서 준비된 복합체, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4의 몰 비율);

[0145] ● 파클리탁셀과 콜레스테롤의 물리적 혼합물 (일정량의 파클리탁셀과 동일한 몰 비율의 콜레스테롤을 취하고, 잘 혼합하여 비교 연구용으로 사용함)

[0146] 방법: DSC 곡선의 특징들을 결정하기 위하여 시차주사열량분석기(differential scanning calorimetry: DSC)를 25~300℃ 온도에서 실행하며, 가열속도는 10℃/min이며, 질소 유속은 60ml/min이며; DSC 곡선은 도 1에 나타난다.

[0147] 결과: 파클리탁셀의 흡열성 용융 피크는 225.7℃에서 나타나며 그리고 콜레스테롤의 흡열성 용융 피크는 150.9℃에서 나타난다. 상이한 비율의 물리적 혼합물의 조제에서 콜레스테롤의 흡열성 특징은 149~150℃에서의 용융점에서 변화가 없었고; 반면, 파클리탁셀의 흡열성 피크는 약간 이동이 있으나, 용융 특징은 유지되며, 이는 단순히 물리적으로 혼합된 것이다. 물리적 혼합물내 파클리탁셀로 수득된 용융 피크의 이동 이유는 다음과 같다, 콜레스테롤의 용융점은 파클리탁셀 보다 더 낮고, 콜레스테롤 용융 후, 약물의 분산된 상태에 영향을 주며, 이는 파클리탁셀의 용융 특징을 변화시킬 것이다.

[0148] 상이한 비율의 복합체의 조제에서 콜레스테롤의 용융 특징은 명백하게 이동되었으며, 파클리탁셀의 흡열성 피크는 완전히 사라졌고, 이는 이들 모두 완전한 복합체를 가진다는 것을 말한다.

[0149] 시험 실시예 4

[0150] 상이한 오일 상에서 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체에 대한 용해도 연구

[0151] 시험 실시예 2의 표 2에서 설명된 것과 같이 일정량의 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체를 취하고, 주사용 대두 오일 중쇄 오일 그리고 대두 오일/중쇄 오일 (1:1)의 혼합물을 추가하고, 60℃로 가열시키고, 잘 혼합하여 용해시키고, 60℃에서 1 시간 동안 수조에서 가열하고, 공정 동안 일정하게 교반시키고, 포화된 용액을 얻는다. 용액을 여과시켜, 후속 여과물 일정량을 취하고, 순수 에탄올로 희석시키고, HPLC 방법을 실시하고, 오일내 복합체의 용해도를 계산하고; 파클리탁셀 일정량을 취하고, 이 공정을 반복한다. 복합체와 파클리탁셀의 용해도를 비교하였을 때, 이 결과들은 상이한 비율로 콜레스테롤을 약물에 복합하였을 때, 오일내 용해도가 개선될 수 있다는 것을 증명하였다. 하기 표 참고:

표 4

식물성 오일에서 약물 용해도 결과(mg/ml)

약물/콜레스테롤	5: 1	4: 1	3: 1	2: 1	1: 1	1: 2	1: 4	파클리탁셀
대두유	7.66	8.25	8.56	9.14	9.49	9.06	9.04	0.27
MCO	25.25	26.21	26.47	26.45	23.54	27.69	27.69	2.37
혼합오일*	15.51	13.87	14.02	16.56	15.50	16.89	16.89	1.36

주석: 혼합오일*은 대두유와 MEDIUM CHAIN OIL (1:1의 중량비)의 혼합물이다.

[0152]

[0153] 시험 실시예 5

[0154] n-옥탄올내에서 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 용해도

[0155] 표 2에서 설명하는 파클리탁셀 콜레스테롤의 일정량을 50ml의 원뿔형 플라스크에 취하고, 10g의 n-옥탄올을 추가하고, 24시간 동안 자동온도 진동자(thermostatic oscillator)내 25℃에서 교반시키고, 포화 용액을 얻는다. 5ml의 용액을 취하고, 0.45μm 막으로 여과시키고, 연속 여과물의 일정량을 취하고, 순수 에탄올로 희석시키고, 자외선 분광법을 실시하고, n-옥탄올내에 물리적 혼합물과 콜레스테롤의 겔보기 용해도를 계산하고, 파클리탁셀과 그 결과를 비교하였다. 결과에서 n-옥탄올에서의 용해도는 상이한 비율로 콜레스테롤을 약물과 복합하였을 때 개선될 수 있다는 것을 증명하였다. 하기 표 참고:

표 5

n-옥탄올에서 약물 용해도 결과 (mg/ml, 25℃)

약물/콜레스테롤	4: 1	3: 1	2: 1	1: 1	1: 2	1: 4	파클리탁셀
용해도	23.59	24.28	20.70	25.83	28.32	32.41	8.86

[0156]

[0157] 시험 실시예 6

[0158] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 X-선 회절(XRD) 분석

[0159] 시험 시료들: 파클리탁셀, 콜레스테롤, 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체 (실시예 5의 시료), 파클리탁셀과 콜레스테롤의 물리적 혼합물 (1:1의 몰 비율).

[0160] 탐지 조건: Cu-K 표적, 튜브 전압 40kV, 튜브 흐름 200mA, 회절 범위 3° <2θ<60° .

[0161] 결과: 회절 결과는 도 2에 나타난다.

[0162] 결과들은 회절각 (2θ) 5.480, 8.840 및 12.180에서 No. 2, 4, 7의 파클리탁셀의 특징적인 회절 피크, 피크 강도는 23567, 11319, 13277이며; No. 1에서 콜레스테롤의 최강 회절 피크는 5.160의 회절각 (2θ)에서 35506이며; 이들 특징적인 회절 피크는 모두 회절 스펙트럼에서 명백하게 볼 수 있으며, 이는 파클리탁셀과 콜레스테롤 프로파일의 합계 프로파일이지만; 복합체의 회절 스펙트럼은 변화되었다. 파클리탁셀과 콜레스테롤의 특징적인 회절 피크 강도는 상당히 약화되었거나, 피크는 사라졌고, 새로운 특징적인 회절 피크들은 15.240, 16.759, 17.160 및 17.960의 각에서 볼 수 있었고, 회절 피크 강도는 4492, 3588, 2604 및 3186으로, 개별적으로 파클리탁셀 및 콜레스테롤의 것보다 더 낮았다. 이는 파클리탁셀이 복합체내에서 미정질 또는 무정형 상태로 분산되어 있음을 나타낸다.

[0163] 시험 실시예 7

[0164] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 적외선 분광(IR) 분석

[0165] 차례로 파클리탁셀, 콜레스테롤, 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체(실시예 5의 몰비율이 1:1인 시료)를 취하고, 압착시키기 위하여 브롬화물 칼륨을 이용하여 파클리탁셀과 콜레스테롤 (1:1의 몰 비율)의 물리적 혼합물은

400~4000 cm^{-1} 범위내에서 적외선 분광 방법을 실시하였고, 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0166] IR 스펙트럼에서 파클리탁셀의 주요 흡수 피크는 카르보닐 기 C=O로써 1733.8 cm^{-1} 와 1714.4 cm^{-1} 에서 2개의 분열 피크를 가지며, 아실아미노 기는 1646.4 cm^{-1} 에서 카르보닐 피크를 가지며, 뿐만 아니라 3300-3500 cm^{-1} 에서 옥시하이드릴 기 O-H의 스트레칭 진동 흡수 피크를 가지는 것으로 나타났고; 콜레스테롤 IR 스펙트럼에서, 특징적인 흡수 피크들은 2933.1 cm^{-1} , 2901.0 cm^{-1} 및 2866.4 cm^{-1} 에서 포화된 C-H 결합 스트레칭 진동 피크와 3402.3 cm^{-1} 에서 옥시히드릴 기의 스트레칭 진동 흡수 피크이며; 물리적 혼합물의 IR 스펙트럼은 기본적으로 콜레스테롤과 파클리탁셀로 수득한 흡수 피크의 합이며; 복합체의 특징적인 흡수 피크는 변화되었고, 이는 파클리탁셀에서 카르보닐 기와 아실아미노 기의 특징적인 피크가 변화되어, 카르보닐 기의 2개 분열 피크는 17247 cm^{-1} 에서 강력한 흡수를 가진 블런트(blunt) 피크로 전환되었고, 아실아미노 기에서 카르보닐기의 피크 모양은 1646.4 cm^{-1} 에서 둔해져 있었고; 콜레스테롤의 경우, 옥시히드릴 기의 흡수 피크 모양은 콜레스테롤에서 3432.9 cm^{-1} 에서 확장되었고 그리고 흡수 강도가 강화되었다. 이는 파클리탁셀의 카르보닐 기가 콜레스테롤의 옥시히드릴기와 반응하여 새로운 복합체가 생성될 수 있음을 나타낸다.

[0167]

[0168] 시험 실시예 8

[0169] 콜레스테롤 복합체의 UV 흡수 분광학(UV) 및 HPLC 크로마토그래피 피크 연구

[0170] 파클리탁셀과 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체 (실시예 5의 몰 비율이 1:1인 시료)를 순수 에탄올에 개별적으로 용해시키고, 블랭크(blank)로 순수 에탄올을 이용하여 200~400nm 범위내에서 UV 주사법(scanning method)을 실행하고, 그 결과는 도 4-a에 나타내었다. 파클리탁셀의 UV 특징은 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 것에 따르며, 이는 복합체내 파클리탁셀의 발색단 기가 변화되지 않았음을 나타내고, 즉, 새로운 화학적 결합의 형성 없이 분자간 에너지 반응에 의해 두 개 성분들이 화합물로 전환된다는 것으로 결론짓는다.

[0171] 상기에서 설명된 파클리탁셀 및 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 에탄올 용액 20 μl 를 컬럼으로 Kromasil-C18 (250mm $\times$ 4.6mm, 5 μm)을 이용한 액체 크로마토그래피에 주사하고, 아세토니트릴-물(54:46)을 이동상으로 이용하여, 1.0ml/min의 유속과 230nm의 탐지 파장에서, 체류 시간(retention time)을 기록하고, 그 결과는 도 4-b에 나타내었다. 파클리탁셀로부터 수득된 주요 피크의 체류 시간은 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 것에 준한다는 결론을 내리며, 이는 양성자가 제공된(protonated) 에탄올 용액내에서 복합체로부터 자유 파클리탁셀이 전리될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0172]

[0173] 시험 실시예 9

[0174] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 안정성 연구

[0175] 실시예 1-18에서 준비된 약물 스테로이드 복합체의 고체 분말을 취하고, 25 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하고, 주기적으로 샘플링하고, 외양의 변화를 검사한다. 순수 에탄올을 적정 농도로 추가하고, 컬럼으로 Kromasil C-18 (250mm $\times$ 4.6mm, 5)을 이용한 HPLC로 20 μl 를 주사하고, 아세토니트릴-물 (54:46)을 이동상으로 하며, 1.0ml/min의 유속 및 230nm의 탐지 파장에서 내용물 및 불순물을 결정한다. 결과에서 외형, 함량 및 불순물에서 유의적인 변화는 없었으며, 초기와 비교하였을 때 적절한 품질을 가지는 것으로 나타났다.

표 6

장기간 보관시 파클리탁셀 스테로이드 복합체의 안정성

온도/시간		외형	함량(%)	분해된 산물들(%)
25℃	0 개월	백색 분말	98.05~102.10	ND
	1 개월	백색 분말	98.25~102.23	<0.2
	3 개월	백색 분말	97.78~101.74	<0.3
	6 개월	백색 분말	98.90~102.36	<0.3
	9 개월	백색 분말	98.55~101.76	<0.2
	12 개월	백색 분말	98.36~101.87	<0.2
	24 개월	백색 분말	98.71~101.88	<0.2

[0176]

[0177] 시험 실시예 10

[0178] 시험 실시예 10-1

[0179] 파클리탁셀 스테로이드 복합체

[0180] 실험용 복합체 1-6: 본 발명의 기술적 필요 조건에 따라, 1:1-1:4의 물 비율을 가진 파클리탁셀 스테로이드 복합체를 준비하기 위하여 콜레스테롤, 7-데하이드로콜레스테롤 그리고 에르고스테롤을 이용한다. 상세한 과정은 다음과 같다, 파클리탁셀과 스테로이드를 삼각 플라스크에 취하고, 2000ml의 아세톤으로 용해시키고, 40℃에서 1 시간 동안 혼합시키고, 회전 증발 방법에 의해 용매를 제거하고, 40℃에서 24 시간 동안 진공 건조시킨다.

[0181] 참고 복합체 1-4: 특허 출원 200810168212.5의 기술적인 필요 조건에 따라, 대두 레시틴과 콜레스테롤을 지질 원료로 이용하여 비교 연구에 사용하기 위하여 동일한 방법으로 4가지 군의 참고 복합체를 준비하고, 이때 파클리탁셀 인지질 복합체의 물 비율은 1:6과 1:10이며, 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 물 비율은 1:10과 1:20이다. 하기 표에서 상세하게 설명한다.

표 7

파클리탁셀 콜레스테롤 복합체의 조성물

복합체 번호/지질 재료들	파클리탁셀의 양	지질 재료들의 양	파클리탁셀/ 지질 재료들	
			물 비율	중량 비율
실험용 복합체 1/ 콜레스테롤	8.0 g	3.6 g	1:1	1:0.45
실험용 복합체 2/ 콜레스테롤	8.0 g	7.2 g	1:2	1:0.90
실험용 복합체 3/ 7-데하이드로콜레스테롤	3.0 g	1.35g	1:1	1:0.45
실험용 복합체 4/ 7-데하이드로콜레스테롤	3.0 g	5.406g	1:4	1:1.80
실험용 복합체 5/ 에르고스테롤	3.0g	1.40g	1:1	1:0.46
실험용 복합체 6/ 에르고스테롤	3.0g	5.58g	1:4	1:1.86
참고 복합체 1/ 인지질	3.0 g	16.65g	1:6	1:5.55
참고 복합체 2/ 인지질	3.0 g	6.78g	1:10	1:9.23
참고 복합체 3/ 콜레스테롤	3.0g	13.5g	1:10	1:4.50
참고 복합체 4/ 콜레스테롤	3.0g	27.18g	1:20	1:9.06

시험 실시예 10-2

파클리탁셀 콜레스테롤 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 파클리탁셀 서브마이크론 유액

[제제]

성분들	서브마이크론 유액 1	서브마이크론 유액 2	서브마이크론 유액 3	서브마이크론 유액 4
실험용	145mg	290mg	580mg	1160mg
복합체 1*				
난황 레시틴	2g	2.4g	3g	3g
폴리옥사머(188)	1g	2g	4g	6g
글리세롤	5g	5g	5g	5g
대두유	40ml	40ml	50ml	50ml
기재된 용적으로				
주사용 물을 추가함				
	200ml	200ml	200ml	200ml
총합	200ml	200ml	200ml	200ml

[0186] *실험용 복합체 1은 실시예 1에서 준비된 1:0.45의 파클리탁셀/콜레스테롤 중량비를 가진 복합체다.

[0187] [조제]

[0188] ▶주사용 물 130-140ml을 취하고, 제제에 따라 난황 레시틴, 폴록사머 (188) 및 글리세롤을 첨가하고, 분산시키기 위하여 혼합기로 옹기고, 균일한 수성 상을 수득하고, 40℃로 가열시키고, 이 온도에서 유지시키고;

[0189] ▶제제에 따라 대두 오일 일정량을 취하여 40℃로 사전 가열시키고, 실시예 1에서 준비된 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체 1을 취하고, 사전 가열된 대두 오일에 용해시키고, 분산시키기 위하여 혼합기로 옹기고, 균일한 오일 상을 수득하고;

[0190] ▶일정하게 교반시키면서 수성 상을 천천히 오일 상에 첨가하고, 분당 10,000 rpm에서 5분간 혼합하고, 균일한 초유를 얻고, 고압 균질화기로 신속하게 이동시키고, 6 회 균질화시키고, 유액 모든 유액을 수거하고, 0.1mol/L의 염산으로 pH를 4.0 ± 0.5로 조정하고, 물을 첨가하여 200ml이 되도록 하고, 교반시키고, 포장하고, 115℃에서 30 분간 살균시킨다.

[0191] 서브마이크론 유액 1-4의 경우, 유화제(난황 레시틴)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 1.0% (g/ml), 1.2% (g/ml), 1.5% (g/ml) 및 1.5% (g/ml)이며, 보조계면활성제 폴록사머(188)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 0.5% (g/ml), 1.0% (g/ml), 2.0% (g/ml) 및 3.0% (g/ml)이며, 그리고 파클리탁셀의 약물 적하는 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml, 4.0mg/ml이다. 입자 크기 분석기로 측정하였을 때, 4개 군의 유액 평균 입자 크기는 225 nm, 233 nm, 245nm 및 230nm이다.

[0192] 시험 실시예 10-3

[0193] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체를 중간 운반체로 사용하여 준비한 파클리탁셀 서브마이크론 유액

[제제]

성분들	서브마이크론 유액 5	서브마이크론 유액 6	서브마이크론 유액 7	서브마이크론 유액 8
실험용	190mg	380mg	760mg	1520mg
복합체 2*				
난황 레시틴	2g	2.4g	3g	3g
폴리옥사머(188)	2.4g	4g	4g	6g
글리세롤	5g	5g	5g	5g
비타민 E	/	/	/	40mg
대두유	40ml	40ml	50ml	50ml
기재된 용적으로				
물을 추가함	200ml	200ml	200ml	200ml
합계	200ml	200ml	200ml	200ml

[0194]

[0195] *실험용 복합체 2는 실시예 1에서 준비된 1:0.90의 파클리탁셀/콜레스테롤 중량비를 가진 복합체다.

- [0196] [조제]
- [0197] ▶주사용 물 130-140ml을 취하고, 제제에 따라 폴옥사머 (188)를 첨가하고, 분산시키기 위하여 혼합기로 옮기고, 균일한 수성 상을 수득하고, 80℃로 가열시키고, 이 온도에서 유지시키고;
- [0198] ▶제제에 따라 대두 오일 일정량을 취하여 80℃로 사전 가열시키고, 제제에 따라 복합체 2, 난황 레시틴 그리고 비타민 E를 취하고, 사전 가열된 대두 오일에 용해시키고, 분산시키기 위하여 혼합기로 옮기고, 균일한 오일 상을 수득하고;
- [0199] ▶일정하게 교반시키면서 수성 상을 천천히 오일 상에 첨가하고, 분당 20,000 rpm에서 5분간 혼합하고, 균일한 초유를 얻고, 고압 균질화기로 신속하게 이동시키고, 6 회 균질화시키고, 모든 유액을 수거하고, 0.1mol/L의 염산으로 pH를 5.5 ± 0.5로 조정하고, 물을 첨가하여 200ml이 되도록 하고, 교반시키고, 포장하고, 115℃에서 30 분간 살균시킨다.
- [0200] 서브마이크론 유액 5-8의 경우, 유화제(난황 레시틴)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 1.0% (g/ml), 1.2% (g/ml), 1.5% (g/ml) 및 1.5% (g/ml)이며, 보조계면활성제 폴옥사머 (188)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 1.2% (g/ml), 2.0% (g/ml), 2.0% (g/ml) 및 3.0% (g/ml)이며, 그리고 파클리탁셀의 약물 적하는 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml, 4.0mg/ml이다. 입자 크기 분석기로 측정하였을 때, 4개 군의 유액 평균 입자 크기는 246 nm, 262 nm, 231nm, 242nm이다.

[0201] 시험 실시예 10-4

[0202] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 파클리탁셀 서브마이크론 유액

[제제]

성분들	서브마이크론 유액 9	서브마이크론 유액 10	서브마이크론 유액 11	서브마이크론 유액 12
실험용	145mg	290mg	580mg	1450mg
복합체 1*				
폴리옥사머(188)	4g	4g	4g	4g
글리세롤	5g	5g	5g	5g
비타민 E	/	/	/	40mg
MCO	40ml	40ml	50ml	50ml
기재된 용적으로				
물을 추가함	200ml	200ml	200ml	200ml
합계	200ml	200ml	200ml	200ml

- [0203]
- [0204] *실험용 복합체 1은 실시예 1에서 준비된 1:0.45의 파클리탁셀/콜레스테롤 중량비를 가진 복합체다.
- [0205] MCO : 중쇄 오일

[0206] [조제]

[0207] 시험 실시예 10-3과 동일한 과정이며, pH는 5.0 ± 0.5로 조정한다.

[0208] 서브마이크론 유액 9-12의 경우, 유화제(대두 레시틴)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 1.2% (g/ml), 1.2% (g/ml), 1.2% (g/ml) 및 1.5% (g/ml)이며, 보조계면활성제 폴옥사머 (188)의 양은 서브마이크론 유액의 총량

의 2.0% (g/ml)이며, 그리고 파클리탁셀의 약물 적하는 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml and 5.0mg/ml이다. 입자 크기 분석기로 측정하였을 때, 4개 군의 유액 평균 입자 크기는 165nm, 153nm, 127nm, 138nm이다.

[0209] 시험 실시예 10-5

[0210] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 파클리탁셀 서브마이크론 유액

[제제]

성분들	서브마이크론	서브마이크론	서브마이크론	서브마이크론
	유액 13	유액 14	유액 15	유액 16
실험용	290mg	435mg	580mg	1450mg
복합체 1*				
대두 레시틴	2.4g	2.4g	2.4g	4.0g
폴리옥사머(188)	3g	3g	4g	4g
글리세롤	5g	5g	5g	5g
오일 혼합물**	40ml	40ml	40ml	50ml
기재된 용적으로				
주사용 물을 추가함	200ml	200ml	200ml	200ml
합계	200ml	200ml	200ml	200ml

[0211]

[0212] *실험용 복합체 1은 실시예 1에서 준비된 1:0.45의 파클리탁셀/콜레스테롤 중량비를 가진 복합체다.

[0213] **오일 혼합물은 대두 오일과 중쇄 오일 (1:1의 용적 비율)의 혼합물이다.

[0214] [조제]

[0215] 실시예 3과 동일한 과정이며, pH는 4.5 ± 0.5로 조정한다.

[0216] 서브마이크론 유액 13-16의 경우, 유화제(대두 레시틴)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 1.2% (g/ml), 1.2% (g/ml), 1.2% (g/ml) 및 2.0% (g/ml)이며, 보조계면활성제 폴옥사머 (188)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 서브마이크론 유액의 총량의 1.5%(g/ml), 1.5%(g/ml), 2.0%(g/ml) 및 2.0% (g/ml)이며, 그리고 파클리탁셀의 약물 적하는 1.0mg/ml, 1.5mg/ml, 2.0mg/ml 및 5.0mg/ml이다. 입자 크기 분석기로 측정하였을 때, 4개 군의 유액 평균 입자 크기는 145nm, 138nm, 133nm, 146nm이다.

[0217] 시험 실시예 10-6

[0218] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 파클리탁셀 서브마이크론 유액

[제제]

성분들	서브마이크론	서브마이크론	서브마이크론	서브마이크론
	유액 17	유액 18	유액 19	유액 20
실험용	190mg	380mg	760mg	1520mg
복합체 2*				
난황 레시틴	3.0g	3.0g	4.0g	6.0g
폴리옥사머(188)	4g	4g	6g	6g
글리세롤	5g	5g	5g	5g
오일 혼합물**	30ml	40ml	50ml	60ml
기재된 용적으로				
주사용 물을 추가함	200ml	200ml	200ml	200ml
합계	200ml	200ml	200ml	200ml

[0219]

[0220] *실험용 복합체 2는 실시예 1에서 준비된 1:0.90의 파클리탁셀/콜레스테롤 중량비를 가진 복합체다.

[0221] **오일 혼합물은 대두 오일과 중쇄 오일 (1:1의 용적 비율)의 혼합물이다.

[0222] [조제]

[0223] 실시예 2와 동일한 과정이며, pH는 5.5 ± 0.5로 조정한다.

[0224] 서브마이크론 유액 17-20의 경우, 유화제(난황 레시틴)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 1.5% (g/ml), 1.5% (g/ml), 2.0% (g/ml) 및 3.0% (g/ml)이며, 보조계면활성제 폴옥사머(188)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 서브마이크론 유액의 총량의 2.0%(g/ml), 2.0%(g/ml), 3.0%(g/ml) 및 3.0% (g/ml)이며, 그리고 파클리탁셀의 약물 적하는 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml 및 5.0mg/ml이다. 입자 크기 분석기로 측정하였을 때, 4개 군의 유액 평균 입자 크기는 255nm, 263nm, 285nm, 232nm이다.

[0225] 시험 실시예 10-7

[0226] 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 파클리탁셀 서브마이크론 유액

[제제]

성분들	서브마이크론 유액 21	서브마이크론 유액 22	서브마이크론 유액 23	서브마이크론 유액 24
실험용	145mg	290mg	580mg	1160mg
복합체 1*				
지방 글리세리드	3.0g	4.0g	/	/
폴리옥시에틸렌	/	/	4.0g	6.0g
소르비탄 지방산 에스테르				
폴리옥사머(188)	3g	4g	4g	6g
글리세롤	5g	5g	5g	5g
올레산	0.2g	0.2g	0.2g	0.2g
오일 혼합물**	30ml	40ml	50ml	60ml
기재된 용적으로				
주사용 물을 추가함	200ml	200ml	200ml	200ml
합계	200ml	200ml	200ml	200ml

[0227]

[0228] *실험용 복합체 1은 실시예 1에서 준비된 1:0.45의 파클리탁셀 콜레스테롤 중량비를 가진 복합체다.

[0229] **오일 혼합물은 대두 오일과 증쇄 오일 (1:1의 용적 비율)의 혼합물이다.

[0230] [조제]

[0231] 실시예 3과 동일한 과정이다.

[0232] 서브마이크론 유액 21과 22의 경우, 유화제(지방 글리세리드)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 1.5% (g/ml) 및 2.0% (g/ml)이며, 서브마이크론 유액 23 및 24의 경우, 유화제(폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르)의 양은 서브마이크론 유액의 총량의 2.0% (g/ml) 및 3.0% (g/ml)이며; 서브마이크론 유액 21-24의 경우, 보조계면활성제 폴옥사머(188)의 양은 서브마이크론 유액 총량의 1.5%(g/ml), 2.0%(g/ml), 2.0%(g/ml) 및 3.0% (g/ml)이며, 그리고 파클리탁셀의 약물 적하는 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml 및 4.0mg/ml이다. 입자 크기 분석기로 측정하였을 때, 4개 군의 유액 평균 입자 크기는 145nm, 133nm, 126nm, 158nm이다.

[0233] 시험 실시예 10-8

[0234] 7-데하이드로콜레스테롤 또는 에르고스테롤을 중간 운반체로 사용하여 준비한 서브마이크론 유액

[제제]

성분들	서브마이크론 유액 25	서브마이크론 유액 26	서브마이크론 유액 27	서브마이크론 유액 28
실험용	290mg	/	/	/
복합체 3*				
실험용	/	5604mg	/	/
복합체 4*				
실험용	/	/	292mg	/
복합체 5*				
실험용	/	/	/	5720mg
복합체 6*				
대두 레시틴	2.4g	2.4g	2.4g	4.0g
폴리옥사머(188)	3g	3g	4g	4g
글리세롤	5g	5g	5g	5g
오일 혼합물**	40ml	40ml	40ml	50ml
기재된 용적으로				
주사용 물을 추가함	200ml	200ml	200ml	200ml
합계	200ml	200ml	200ml	200ml

[0235]

[0236] *실험용 복합체 3-6은 실시예 1에서 준비된 파클리탁셀 7-데하이드로콜레스테롤 복합체와 파클리탁셀 에르고스테롤 복합체의 혼합물이다.

[0237] **오일 혼합물은 대두 오일과 중쇄 오일 (1:1의 용적 비율)의 혼합물이다.

[0238] [조제]

[0239] 실시예 5와 동일한 과정이다.

[0240] 서브마이크론 유액 25와 28의 경우, 파클리탁셀의 약물 적하는 1.0mg/ml이다. 입자 크기 분석기로 측정하였을 때, 4개 군의 유액 평균 입자 크기는 143nm, 138nm, 141nm, 132nm이다.

[0241] 시험 실시예 10-9

[0242] 참고 복합체를 중간 운반체로 하여 준비된 파클리탁셀 서브마이크론 유액

[0243] 시험 실시예 1로부터 준비한 참고 복합체 1-4를 취하여, 상기 실시예에서 설명된 것과 같이 서브마이크론 유액의 조제에 대한 방법을 실행하여, 5mg/ml, 1.0mg/ml, 1.0mg/ml 및 2.0mg/ml의 약물 적하를 가진 서브마이크론 유액 29-32를 수득하고, 비교 연구에 이용하였다.

[0244] 상세한 제제, 조제 방법 및 포집 효율의 결과는 다음에서 나타낸다:

[제제]

성분들	서브마이크론	서브마이크론	서브마이크론	서브마이크론
	유액 29	유액 30	유액 31	유액 32
참고	655mg	/	/	/
복합체 1*				
참고	/	1023mg	/	/
복합체 2*				
참고	/	/	1100mg	/
복합체 3*				
참고	/	/	/	4024mg
복합체 4*				
난황 레시틴	3g	3g	3g	3g
폴리옥사머(188)	3g	3g	3g	3g
글리세롤	5g	5g	5g	5g
대두유	40ml	40ml	50ml	50ml
기재된 용적으로				
주사용 물을 추가함	200ml	200ml	200ml	200ml
합계	200ml	200ml	200ml	200ml

[0245]

[0246] *참고 복합체 1 및 2는 시험 실시예 1에서 준비된 1:5.55 및 1:9.23의 파클리탁셀/인지질의 중량비를 가진 참고 복합체의 2개 균이다.

[0247] *참고 복합체 3 및 4는 시험 실시예 1에서 준비된 1:4.50 및 1:9.06의 파클리탁셀/인지질의 중량비를 가진 참고 복합체의 2개 균이다.

[0248] [조제]

[0249] ▶주사용 물 130-140ml을 취하고, 제제에 따라 난황 레시틴, 폴옥사머 (188)를 첨가하고, 분산시키기 위하여 혼합기로 옮기고, 균일한 수성 상을 획득하고, 40-80℃로 가열시키고, 이 온도에서 유지시키고;

[0250] ▶제제에 따라 대두 오일 일정량을 취하여 40-80℃로 사전 가열시키고, 실시예 1로부터 준비된 파클리탁셀 콜레스테롤 복합체를 취하고, 사전 가열된 대두 오일에 용해시키고, 분산시키기 위하여 혼합기로 옮기고, 균일한 오일 상을 획득하고;

[0251] ▶일정하게 교반시키면서 수성 상을 천천히 오일 상에 첨가하고, 분당 10,000-20,000 rpm에서 5분-10분간 혼합하고, 균일한 초유를 얻고, 고압 균질화기로 신속하게 이동시키고, 6 회 균질화시키고, 모든 유액을 수거하고, 0.1mol/L의 염산으로 pH를 4.5 ± 0.5로 조정하고, 물을 첨가하여 200ml이 되도록 하고, 교반시키고, 포장하고, 115℃에서 30 분간 살균시킨다.

[0252] 상기 실험 실시예들에서 준비된 서브마이크론 유액의 안정성 연구 및 비교

- [0253] 시험 실시예 10-2 내지 10-8의 서브마이크론 유액 28개 군, 그리고 시험 실시예 10-9의 서브마이크론 유액 4개군을 취하고, 각각 12개월 동안 4℃에 보관하고, 0개월, 6개월, 12개월에서 샘플링하고, 외형, 입자 크기, 함량 및 불순물에서 변화를 검사하기 위하여 하기에서 설명하는 방법을 실행한다.
- [0254] 특징: 시각적 검사, 설명된 서브마이크론 유액의 색깔에 충족되는 표면에 나타낸 오일 방울 또는 적층을 기록한다.
- [0255] 입자 크기: 서브마이크론 유액을 취하고, MASTER SIZER 2000 레이저 입자 크기 분석기(malvern)를 이용하여 입자 크기를 검사한다.
- [0256] 함량 및 관련된 물질: 파클리탁셀 서브마이크론 유액의 양을 정확하게 취하고, 무수 에탄올을 추가하여 해유화시키고, 시험 용액의 적절한 농도를 얻는다. 시험 용액 20 μ l을 정확하게 크로마토그래피에 주사하고, 컬럼으로 Kromasil-C18 (300mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m)을 이용하여 HPLC 방법을 실행하고, 아세토니트릴-물(54:46)을 이동상으로 하고, 1.0ml/min의 유속 및 230nm를 탐지 파장으로 하며, 컬럼 온도는 실온이며, 크로마토그램을 기록하고, 외부 표준 방법에 의해 피크에 대해 유액내 약물 물질의 함량을 계산하고, 표준화 방법으로 불순물의 함량을 계산한다.
- [0257] 결과: 하기 표에서 상세하게 나타낸다.

표 8

서브마이크론 유액 안정성의 비교 결과

시험번호./ 약물 적하	초기 (제조후 1주일 이내 검사)				4℃에서 12 개월 동안 보관			
	외형	입자 크기	함량	불순물	외형	입자 크기	함량	불순물
유액 1 /0.5 mg/ml	균일한 유액	225nm	100.2%	0.33%	균일한 유액	221nm	99.7%	0.67%
유액 2 /1.0mg/ml	균일한 유액	233nm	97.6%	0.31%	균일한 유액	245nm	97.3%	0.62%
유액 3 /2.0mg/ml	균일한 유액	245nm	98.5%	0.31%	균일한 유액	236nm	98.2%	0.64%
유액 4 /3.0mg/ml	균일한 유액	230nm	97.6%	0.37%	균일한 유액	237nm	97.0%	0.93%
유액 5 /0.5mg/ml	균일한 유액	246nm	99.5%	0.35%	균일한 유액	228nm	98.8%	0.52%
유액 6 /1.0mg/ml	균일한 유액	262nm	100.3%	0.30%	균일한 유액	255nm	99.5%	0.61%
유액 7 /2.0mg/ml	균일한 유액	231nm	98.1%	0.36%	균일한 유액	240nm	98.6%	0.57%
유액 8 /4.0mg/ml	균일한 유액	242nm	99.6%	0.42%	균일한 유액	251nm	97.3%	1.01%
유액 9 /0.5mg/ml	균일한 유액	165nm	98.8%	0.35%	균일한 유액	126nm	99.2%	0.56%
유액 10 /1.0mg/ml	균일한 유액	153nm	101.6%	0.30%	균일한 유액	133nm	100.7%	0.52%
유액 11 /2.0mg/ml	균일한 유액	127nm	102.2%	0.32%	균일한 유액	131nm	100.9%	0.55%
유액 12 /5.0mg/ml	균일한 유액	138nm	99.8%	0.45%	균일한 유액	155nm	99.4%	1.24%
유액 13 /1.0mg/ml	균일한 유액	145nm	97.4%	0.31%	균일한 유액	138nm	98.0%	0.57%
유액 14 /1.5mg/ml	균일한 유액	138nm	100.3%	0.35%	균일한 유액	136nm	98.7%	0.65%
유액 15 /2.0mg/ml	균일한 유액	133nm	99.2%	0.31%	균일한 유액	137nm	98.5%	0.63%
유액 16 /5.0mg/ml	균일한 유액	146nm	98.5%	0.43%	균일한 유액	173nm	97.2%	1.68%
유액 17 /0.5mg/ml	균일한 유액	255nm	97.8%	0.32%	균일한 유액	244nm	97.6%	0.57%
유액 18	균일한	263nm	99.2%	0.36%	균일한	259nm	99.5%	0.53%

[0258]

/1.0mg/ml	유액				유액			
유액 19	균일한	285nm	100.4%	0.33%	균일한	272nm	98.8%	0.61%
/2.0mg/ml	유액				유액			
유액 20	균일한	232nm	101.4%	0.48%	균일한	258nm	97.8%	1.76%
/5.0mg/ml	유액				유액			
유액 21	균일한	145nm	98.7%	0.36%	균일한	136nm	99.1%	0.59%
/0.5mg/ml	유액				유액			
유액 22	균일한	133nm	98.2%	0.32%	균일한	127nm	97.6%	0.57%
/1.0mg/ml	유액				유액			
유액 23	균일한	126nm	101.1%	0.38%	균일한	134nm	99.5%	0.56%
/2.0mg/ml	유액				유액			
유액 24	균일한	158nm	98.8%	0.41%	균일한	163nm	97.9%	1.25%
/4.0mg/ml	유액				유액			
유액 25	균일한	143nm	99.5%	0.33%	균일한	128nm	98.9%	0.56%
/1.0mg/ml	유액				유액			
유액 26	균일한	138nm	97.8%	0.35%	균일한	132nm	97.4%	0.58%
/1.0mg/ml	유액				유액			
유액 27	균일한	141nm	99.4%	0.30%	균일한	145nm	99.1%	0.61%
/1.0mg/ml	유액				유액			
유액 28	균일한	132nm	98.6%	0.36%	균일한	126nm	98.2%	0.54%
/1.0mg/ml	유액				유액			
유액 29	균일한	253nm	97.5%	0.92%	부유	323nm	90.8%	7.63%
/0.5mg/ml	유액				오일로			
유액 30	적층화	522nm	93.2%	6.27%	적층화			
/1.0mg/ml					오일-물	탐지안됨	탐지안됨	탐지안됨
유액 31	균일한	247nm	98.6%	0.62%	분리			
/1.0mg/ml	유액				균일한	263nm	94.7%	3.58%
유액 32	균일한	266nm	98.9%	0.78%	유액			
/2.0mg/ml	유액				약간	311nm	92.8%	4.64%
					적층화			

[0259]

[0260]

본 발명에서 중간 운반체로 스테로이드성 복합체로 준비한 서브마이크론 유액 1-28은 12개월 동안 냉장고(4℃)에 보관하고, 초기 것과 비교한다. 1) 5.0mg/ml의 약물 적하 유액의 경우, 평균 입자 크기는 더 크다. 이 유액은 적층화되지 않았고, 입자 크기, 외형 및 함량은 명백하게 변화되지 않았고, 불순물은 증가되었지만 2.0%를 초과하지 않는다; 2) 4.0mg/ml의 약물 적하를 가진 유액은 적층화되지 않았고, 입자 크기, 외형 및 함량에서 명백한 변화는 없었고, 불순물은 증가되었지만 1.3%를 초과하지 않는다; 3) 3mg/ml의 약물 적하를 가진 유액은 적층화되지 않았고, 입자 크기, 외형 및 함량에서 명백한 변화는 없었고, 불순물은 증가되었지만 1.0%를 초과하지 않는다; 4) 2mg/ml 또는 2mg/ml 미만의 약물 적하를 가진 유액은 적층화되지 않았고, 입자 크기, 외형 및 함량에서 명백한 변화는 없었고, 불순물은 증가되었지만 0.7%를 초과하지 않는다.

[0261]

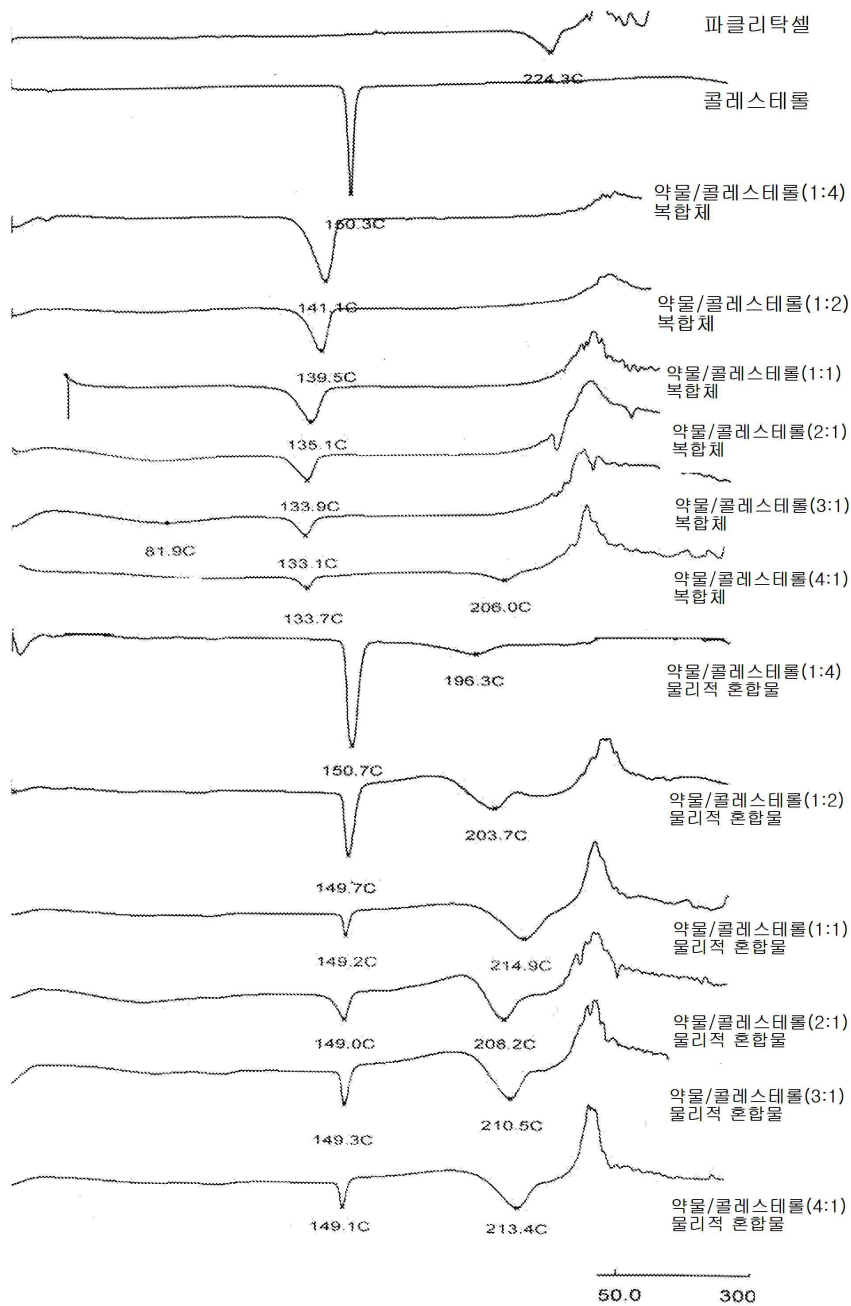
참고 파클리탁셀/인지질 복합체를 운반체로 사용한 서브마이크론 유액에서, 1) 0.5mg/ml의 약물 적하를 가진 유액을 6개월간 두면 균일한 유액 (서브마이크론 유액 29)이 형성되었고, 외형 및 입자 크기에서 명백한 변화는 없었고 그리고 불순물은 3.0%까지 증가하였으며, 반면 12 개월간 두면, 입자 크기는 유의적으로 변화하였으며, 불순물은 7% 또는 그이상으로 증가하였고, 함량은 적층과 부유 오일과 함께 감소되었고; 2) 약물 적하가 1.0mg/ml로 증가되면, 균일한 유액이 형성되지 않았고(서브마이크론 유액 30), 약물 결정과 오일 방울이 시작부터 나타났다.

[0262]

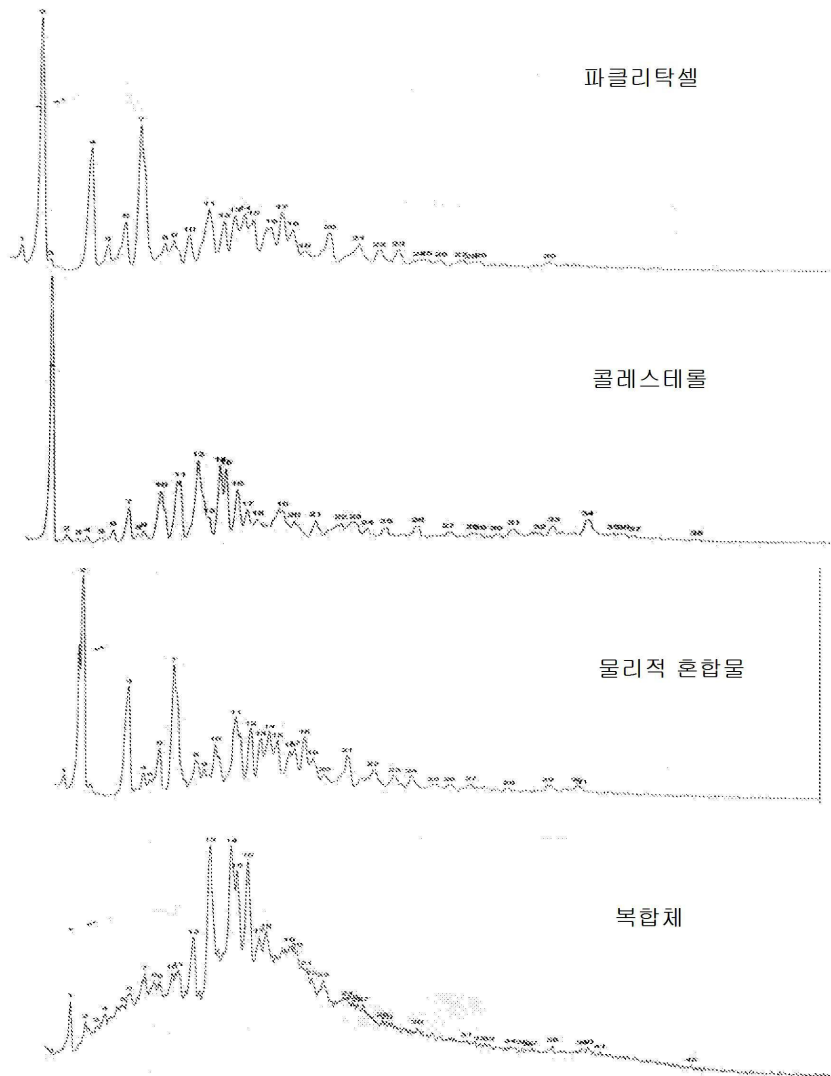
참고 파클리탁셀/콜레스테롤 복합체를 운반체로 사용하여 준비한 서브마이크론 유액은, 1) 1.0mg/ml 및 2.0mg/ml의 약물 적하를 6개월간 두면 균일한 유액 (시료 31-32)이 형성되었고, 외형, 입자 크기 및 함량에서 명백한 변화가 없었고, 불순물은 증가하지만 1.5%를 초과하지 않고; 2) 12 개월간 두면, 입자 크기는 상당히 변화되며, 함량은 감소되고, 불순물은 3.58% 및 4.64%로 증가되고, 이때 2.0mg/ml의 약물 적하를 가진 유액은 약간 적층화된다.

도면

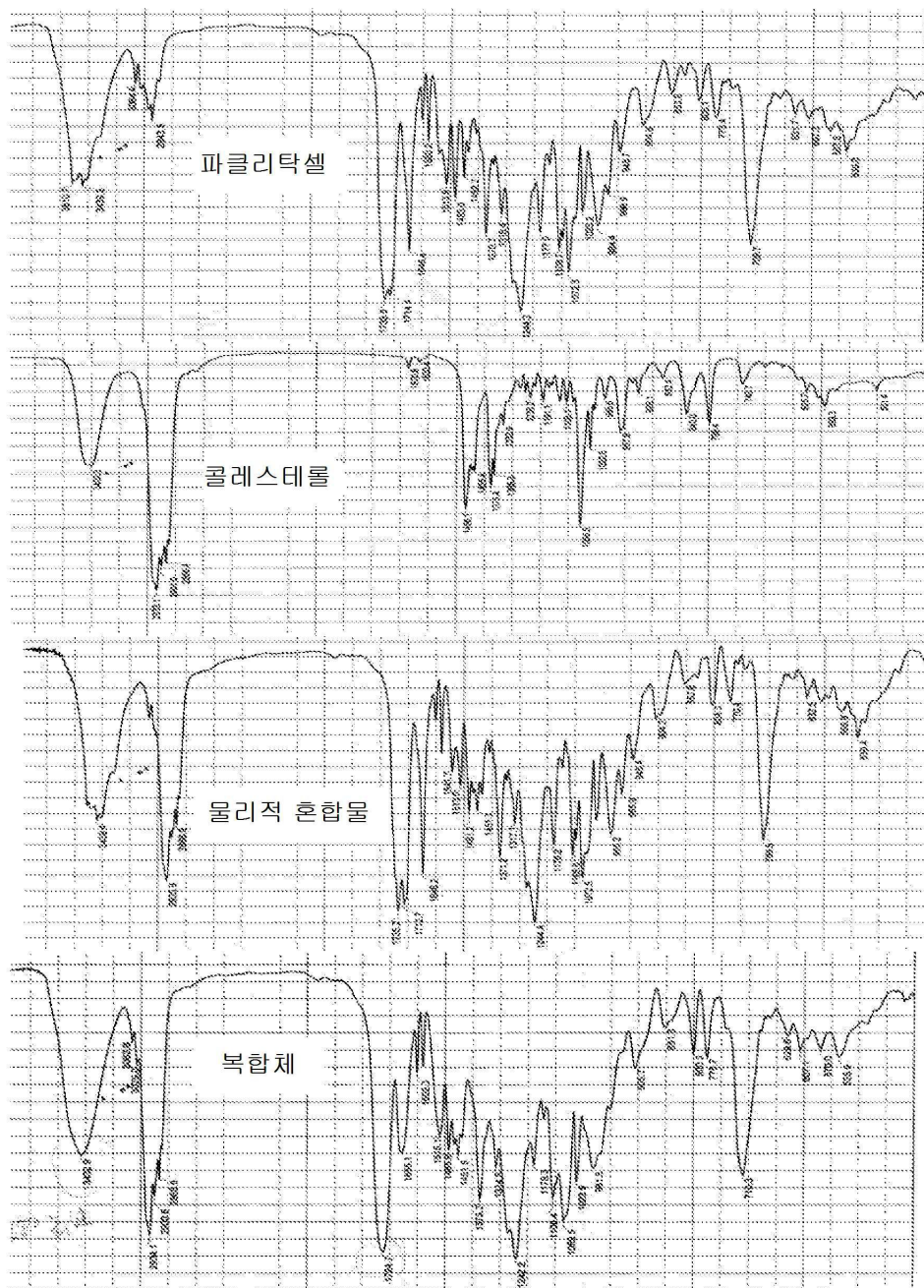
도면1



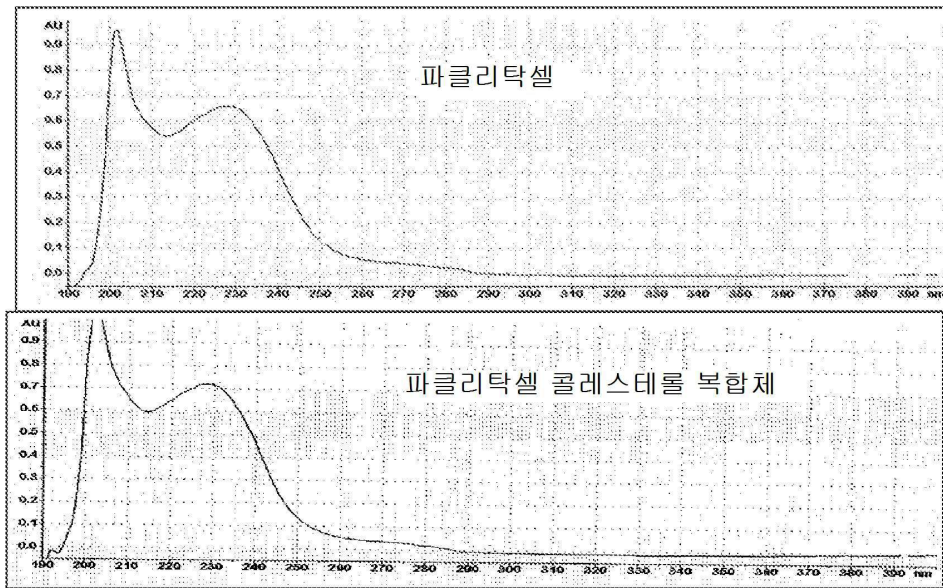
도면2



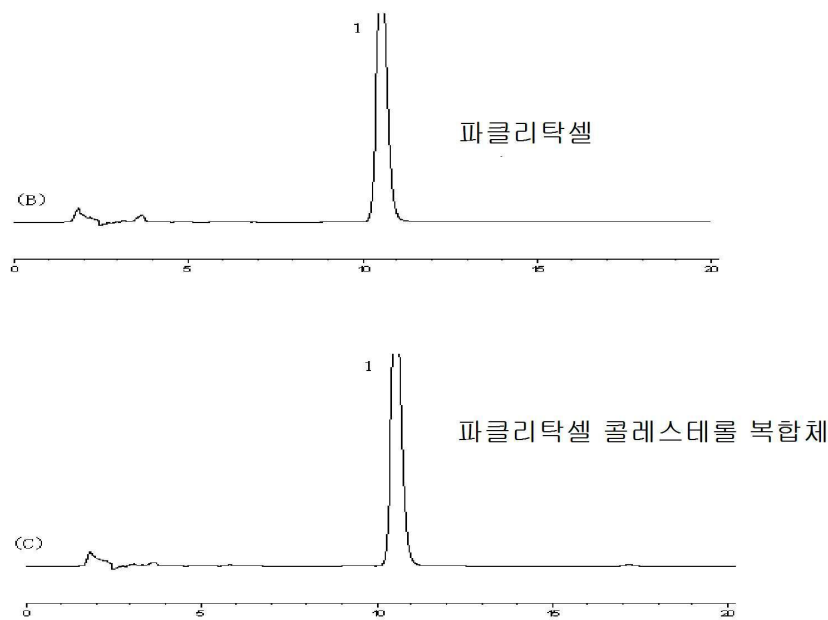
도면3



도면4



도 4-1



도 4-2