



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0035782
(43) 공개일자 2017년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 47/14 (2017.01) A61K 47/28 (2017.01)
A61K 47/44 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0114738
(22) 출원일자 2016년09월07일
심사청구일자 2016년09월07일
(30) 우선권주장
1020150134666 2015년09월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
임수정
서울특별시 용산구 이태원로27다길 11(이태원동)
홍순석
서울특별시 중랑구 신내역로 165, 211동 502호(신내동, 우디안2단지아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 20 항

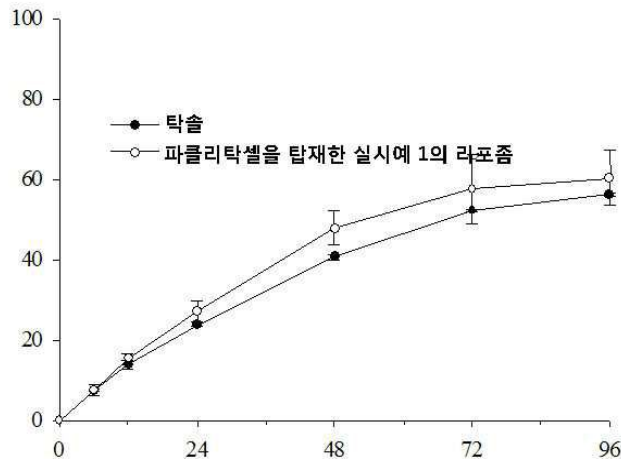
(54) 발명의 명칭 **탄산계 약물 전달용 리포솜 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 탄산계 약물 전달용 리포솜 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 리포솜은 리포솜의 PEG화에 의하여 리포솜의 혈중체류시간 연장 효과를 가져와 혈액 내 체류시간을 증가시키고 오일을 사용함으로써 입자 크기를 감소시키고 약물의 석출을 지연시켜 보관 안정성을 향상시키고 멸균 여과가 가능하여 정맥 주사가 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/14 (2013.01)

A61K 47/28 (2013.01)

A61K 47/44 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/1277 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01005783

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자사업

연구과제명 효과적인 염증성장질환 치료를 위한 대식세포형질전환 유도능 구현 오메가췌형 약물전달시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

포화레스틴, 스테롤계 화합물 및 폴리에틸렌글리콜화된 인지질(PEG-인지질)을 포함하는 지질 이중층; 및
오일
을 포함하는 탁산계 약물 전달용 리포솜.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 포화레스틴은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디헵타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dinonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diundecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디트리데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditridecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디펜타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디헵타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디노나데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dinonadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디헨아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihenarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디베헤노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dibehenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디트리코사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditricosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디리그노세로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilignoceroyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 및 하이드로제네이티드포스파티딜콜린(hydrogenated phosphatidylcholine)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 리포솜.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 스테롤계 화합물은 콜레스테롤, 3b-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀]콜레스테롤(3b-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-cabamyl]cholesterol, DC-Chol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 시토스테롤(sitosterol), 에르고스테롤(ergosterol), 라노스테롤(lanosterol), 디노스테롤(dinosterol), 고르고스테롤(gorgosterol), 아베나스테롤(avenasterol), 사린고스테롤(saringosterol), 퓨코스테롤(fucosterol), 콜레스테릴 헤미석시네이트(cholesteryl hemisuccinate), 콜레스테릴 벤조에이트(cholesteryl benzoate), 콜레스테릴 올레이트(cholesteryl oleate), 콜레스테릴 올레일 카보네이트(cholesteryl oleyl carbonate), 콜레스테릴 이소스테아레이트(cholesteryl isostearate), 콜레스테릴 리놀레이트(cholesteryl linoleate), 콜레스테릴 아세테이트(cholesteryl acetate), 콜레스테릴 팔미테이트(cholesteryl palmitate), 콜레스테릴 스테아레이트(cholesteryl stearate), 콜레스테릴 클로라이드(Cholesteryl chloride), 콜레스테릴 노나노에이트(Cholesteryl nonanoate) 및 콜레스테릴 아라키도네이트(Cholesteryl arachidonate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 리포솜.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 인지질은 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diocanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디아우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DLPE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dimyrystoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DMPE), 1,2-디펜타데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE), 1,2-디헵타데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), L- α -포스파티딜에탄올아민(L- α -phosphatidylethanolamine (egg, soy)), L- α -포스파티딜에탄올아민 트랜스포스파티딜드(L- α -transphosphatidylethanolamine transphosphatidylated), L- α -리소포스파티딜에탄올아민(L- α -lysophosphatidylethanolamine), 1,2-디팔미토에오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine ($\Delta 9$ -Cis, Trans)), 1,2-디리노에오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dilinoeoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디아라키노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-미리스토일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-Stearoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine), 및 1-올레오일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 리포좀.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 지질이중층을 구성하는 포화 레시틴, 스테롤계 화합물, 및 PEG-인지질은 55 ~ 88 몰% : 10 ~ 40 몰% : 2 ~ 8 몰%이 포함된 리포좀.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 PEG는 분자량이 2,000 내지 20,000인 리포솜.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 오일은 탄소수 6 내지 22의 지방산 트리글리세라이드인 리포솜.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 지질, 오일 및 탁산계 약물은 100 : 1 ~ 30 : 3 ~ 15의 중량비로 포함하는 리포솜.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 탁산계 약물은 파클리탁셀 또는 도세탁셀인 리포솜.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 리포솜은 평균 입자 크기가 50 nm 내지 500 nm인 리포솜.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 리포솜은 제타포텐셜 값이 -70 내지 -20 mV인 리포솜.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 리포솜의 탁산계 약물 탑재 유지율은 초기 약물 농도 대비 4 ℃에서 2개월 동안 보관 시 90% 이상이거나 상온(25 ℃)에서 1주일 보관 시 80% 이상인 리포솜.

청구항 13

- 1) 포화 레시틴, 스테롤계 화합물 및 폴리에틸렌글리콜화된 인지질(PEG-인지질)로 혼합된 지질을 알코올에 혼합하는 단계;
- 2) 상기 1)의 혼합 용액에 탁산계 약물 및 오일을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;
- 3) 상기 2) 혼합액을 동결건조하여 분말을 얻는 단계;
- 4) 상기 3)의 분말을 수화시켜 수용액을 얻는 단계; 및
- 5) 상기 4)의 수용액을 초음파 처리하고, 여과하여 리포솜을 얻는 단계

를 포함하는 탄산계 약물을 봉입한 리포솜의 제조방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 포화레스티틴은 포화레스티틴은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디헵타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dinonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diundecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디트리데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditridecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디펜타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디헵타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디노나데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dinonadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디헨아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihenarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디베헤노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dibehenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디트리코사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditricosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디리그노세로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilignoceroyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 및 하이드로제네이티드포스파티딜콜린(hydrogenated phosphatidylcholine)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 리포솜의 제조방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

상기 스테롤계 화합물은 콜레스테롤, 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바미]콜레스테롤(3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-cabamyl]cholesterol, DC-Chol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 시토스테롤(sitosterol), 에르고스테롤(ergosterol), 라노스테롤(lanosterol), 디노스테롤(dinosterol), 고르고스테롤(gorgosterol), 아베나스테롤(avenasterol), 사린고스테롤(saringosterol), 퓨코스테롤(fucosterol), 콜레스테릴 헤미석시네이트(cholesteryl hemisuccinate), 콜레스테릴 벤조에이트(cholesteryl benzoate), 콜레스테릴 올레이트(cholesteryl oleate), 콜레스테릴 올레일 카보네이트(cholesteryl oleyl carbonate), 콜레스테릴 이소스테아레이트(cholesteryl isostearate), 콜레스테릴 리놀레이트(cholesteryl linoleate), 콜레스테릴 아세테이트(cholesteryl acetate), 콜레스테릴 팔미테이트(cholesteryl palmitate), 콜레스테릴 스테아레이트(cholesteryl stearate), 콜레스테릴 클로라이드(Cholesteryl chloride), 콜레스테릴 노나노에이트(Cholesteryl nonanoate) 및 콜레스테릴 아라키도네이트(Cholesteryl arachidonate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 리포솜의 제조방법.

청구항 16

제 13 항에 있어서,

상기 인지질은 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디아우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-

phosphoethanolamine, DLPE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DMPE), 1,2-디펜타데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE), 1,2-디헵타데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), L- α -포스파티딜에탄올아민(L- α -phosphatidylethanolamine (egg, soy)), L- α -포스파티딜에탄올아민 트랜스포스파티딜드(L- α -phosphatidylethanolamine transphosphatidylated), L- α -리소포스파티딜에탄올아민(L- α -lysophosphatidylethanolamine), 1,2-디팔미토에오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine ($\Delta 9$ -Cis, Trans)), 1,2-디리놀에오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디아라키노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-didocosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-리놀에오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-docosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-리놀에오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-docosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-미리스토일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-Stearoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine), 및 1-올레오일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 리포좀의 제조방법.

청구항 17

제 13 항에 있어서,

상기 지질을 구성하는 포화레스틴, 스테롤계 화합물, 및 PEG-인지질은 55 ~ 88 몰% : 10 ~ 40 몰% : 2 ~ 8 몰% 이 포함된 리포좀의 제조방법.

청구항 18

제 13 항에 있어서,

상기 오일은 탄소수 6 내지 22의 지방산 트리글리세라이드인 리포좀의 제조방법.

청구항 19

제 13 항에 있어서,

상기 지질, 오일 및 탁산계 약물은 100 : 1 ~ 30 : 3 ~ 15의 중량비로 포함하는 리포좀의 제조방법

청구항 20

제 1 항의 리포좀을 포함하는 정맥주사용 약학 제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탁산제 약물 전달용 리포솜 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 파클리탁셀은 자궁, 유방, 폐 및 두경부암 등 다양한 암을 치료하는데 쓰이는 대표적인 항암제 중 하나다. 하지만 0.01 mg/ml의 아주 낮은 수용해도로 인해서 적합한 제형을 만들어 환자에게 정맥 투여하는데 어려움이 있다. 파클리탁셀의 시판 제형인 탁솔은 파클리탁셀을 Cremophor EL과 에탄올의 1:1 혼합액에 용해시키고 있으며 그림에도 불구하고 파클리탁셀의 침전을 막기 위해 아주 천천히 환자에게 주사된다. 하지만 Cremophor EL로 인한 과민반응, 신독성, 신경독성 등의 부작용이 환자들에게서 나타난다. 따라서 나노입자, 리포솜, 중합성 마이셀(polymeric micelle), 바이오컨쥬게이트(bioconjugate), 덴드리머(dendrimer) 등의 캐리어를 이용해서 Cremophor EL을 사용하지 않는 파클리탁셀 제제를 만들기 위한 연구개발이 끊임없이 진행되고 있다. 이러한 연구 개발결과 상용화에 성공한 또 다른 파클리탁셀 제제인 Abraxane은 단백질인 알부민 나노입자에 파클리탁셀을 결합시킨 형태로 그 부작용이 탁솔에 비해서 낮다고 알려져있다.

[0004] 리포솜은 인지질로 구성된 구형의 이중막 구조로서 수용액에 인지질을 분산 시 자발적으로 형성되는 구조이다. 인지질의 생체적합성뿐 아니라 내부 수상에는 수용성 약물을 봉입하고 막을 구성하는 인지질 분자 사이에는 지용성 약물을 끼워 넣을 수 있는 구조적 유연성 때문에 약물의 수송체로서 활발히 연구 개발되고 있다. 리포솜에 약물을 봉입하게 되면 약물의 낮은 용해도, 화학적 불안정성, 투여 후 너무 짧은 혈중반감기 등의 약동학적인 한계점 등을 개선함으로써 치료 효과를 높이면서 부작용은 감소시키는 효과를 볼 수 있다. 이런 리포솜의 유익한 효과들은 리포솜 막 구조의 조절을 통해 더욱 증대될 수 있다. 예를 들어 콜레스테롤을 포함한 리포솜은 봉입된 약물의 누출을 막고 리포솜의 혈중 체류 시간을 증진시킨다고 알려져 있다[비특허문헌 1,2]. 포화지방산 사슬을 갖고 있는 포스파티딜콜린은 불포화된 포스파티딜콜린으로 만든 리포솜 보다 산화가 덜되고 높은 상전이 온도를 갖기 때문에 봉입된 약물을 내부에 더 잘 유지하는 특성이 있다[비특허문헌 3~5]. PEG화(PEGylation)된 리포솜은 표면의 친수성 PEG로의 코팅에 의해 세막내피계와 리포솜 표면의 상호작용을 감소시킴으로 정맥 주사된 리포솜이 급격히 세막내피세포계로 이행하는 현상을 방지하여 결국 탑재 약물의 혈중 체류 시간을 증진시킬 수 있기에 항암제 독소루비신(doxorubicin) 등의 리포솜제제는 PEG화되어 시판되어 있다(Doxil).

[0005] 항암제인 파클리탁셀은 소수성 및 구조적 비대칭성 등의 특성 때문에 리포솜 막을 구성하는 인지질 분자들의 소수성 부분들 사이에도 끼워 넣기가 쉽지 않으며 설령 끼워 넣는다 하더라도 급격히 불안정화되어 석출되는 경우가 많다. 특히, 리포솜의 혈중 체류시간 및 막 안정성을 증진시키기 위해 레시틴, 콜레스테롤 및 PEG화된 인지질을 섞어 리포솜을 제조하게 되면 파클리탁셀 탑재 리포솜의 불안정화는 가속되어 더 빠르게 약물을 석출시킨다[비특허문헌 6~9]. 이는 파클리탁셀처럼 소수성인 약물들은 콜레스테롤, PEG화된 인지질과 인지질 분자 사이의 동일 위치를 가지고 자리 차지를 위해 경쟁하기 때문이다.

[0006] 리포솜 막의 유동성 증가는 이미 탑재되어 있는 봉입 약물의 누출을 일반적으로 증가시킨다. 포화된 레시틴 및 콜레스테롤로 구성된 리포솜에 오일을 첨가하게 되면 리포솜 막의 유동성이 증가됨이 자명하며 [비특허문헌 10], 따라서 이 리포솜에 파클리탁셀 탑재는 급격한 탑재 약물의 방출 및 석출을 예상하게 한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Deniz, A., Sade, A., Severcan, F., Keskin, D., Tezcaner, A., Banerjee, S., 2010. Celecoxibloaded liposomes: effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics. Biosci. Rep. 30, 365-373

(비특허문헌 0002) Senior, J., Gregoriadis, G., 1982. Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. Life. Sci. 30, 2123-2136.

- (비특허문헌 0003) Lehtonen, J.Y., Kinnunen, P.K., 1995. Poly(ethylene glycol)-induced and temperature-dependent phase separation in fluid binary phospholipid membranes. *Biophys. J.* 68, 525-535.
- (비특허문헌 0004) Mattjus, P., Slotte, J.P., 1996. Does cholesterol discriminate between sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids? *Chem. Phys. Lipids* 81, 69-80.
- (비특허문헌 0005) Payton, N.M., Wempe, M.F., Betker, J.L., Randolph, T.W., Anchordoquy, T.J., 2013. Lyophilization of a triply unsaturated phospholipid: effects of trace metal contaminants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 306-313.
- (비특허문헌 0006) Crosasso, P., Ceruti, M., Brusa, P., Arpicco, S., Dosio, F., Cattell, L., 2000. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *J. Control. Release* 63, 19-30.
- (비특허문헌 0007) Koudelka, S., Turanek-Knotigova, P., Masek, J., Korvasova, Z., Skrabalova, M., Plockova, J., Bartheldyova, E., Turanek, J., 2010 Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: Preparation, characterisation and in vivo anticancer effect. *J. Pharm. Sci.* 99(5):2309-19.
- (비특허문헌 0008) Zhang, J.A., Anyarambhatla, G., Ma, L., Ugwu, S., Xuan, T., Sardone, T., Ahmad, I., 2005. Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposomebased paclitaxel (LEP-ETU) formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 177-187.
- (비특허문헌 0009) Immordino, M.L., Brusa, P., Arpicco, S., Stella, B., Dosio, F., Cattell, L., 2003. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel. *J. Control. Release* 91, 417-429.
- (비특허문헌 0010) Hong, S.S., Kim S.H., Lim S.J. 2015. Effects of triglycerides on the hydrophobic drug loading capacity of saturated phosphatidylcholine-based liposomes. *Int. J. Pharm.* 483, 142-150.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 포화레스틴, 스테롤계 화합물 및 PEG화된 인지질로 구성된 파클리탁셀 전달용 리포솜에 탁산계 약물을 탑재 시 오일(medium or long chain triglyceride)을 첨가함으로써 리포솜 보관 시 시간에 따른 불안정화 및 탁산계 약물의 유리/석출을 현저히 저해시킬 수 있는 새로운 탁산계 약물 탑재 리포솜을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0009] 따라서, 본 발명은 보관 안정성을 향상시키고 약물 석출을 현저히 줄일 수 있는 탁산계 약물 전달용 리포솜 및 이의 제조방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0012] 본 발명은
- [0013] 포화레스틴, 스테롤계 화합물 및 폴리에틸렌글리콜화된 인지질(PEG-인지질)을 포함하는 지질 이중층; 및
- [0014] 오일
- [0015] 을 포함하는 탁산계 약물 전달용 리포솜에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에 사용된 “리포솜(liposome)”은 활성 약물을 봉입할 수 있는 인지질 이중막(bilayer)이다.
- [0017] 또한, 본 발명의 “폴리에틸렌글리콜화된(PEGylated, PEG화된)”은 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 화학적으로 결합시

킨 것을 의미한다.

[0018] 본 발명에 따른 리포솜은 포화레스틴, 스테를게 화합물 및 PEG-인지질로 구성된 지질이중층; 및 오일을 포함하며, 이에 탁상계 약물이 봉입(또는 탑재)되는 형태로 제공된다.

[0019] 상기 포화레스틴은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DMPC), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디헵타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DHPC), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dinonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디테카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디운데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diundecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC), 1,2-디트리테카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditridecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디펜타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 1,2-디헵타데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC), 1,2-디노나데카노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dinonadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디헤나라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dihenarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디베헤노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dibehenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디트리코사노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-ditricosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-디리그노세로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilignoceroyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 및 하이드로제네이티드포스파티딜콜린(hydrogenated phosphatidylcholine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 상기 스테를게 화합물은 콜레스테롤, 3 β -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바밀]콜레스테롤(3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-cabamyl]cholesterol, DC-Chol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 캄페스테롤(campesterol), 시토스테롤(sitosterol), 에르고스테롤(ergosterol), 라노스테롤(lanosterol), 디노스테롤(dinosterol), 고르고스테롤(gorgosterol), 아베나스테롤(avenasterol), 사린고스테롤(saringosterol), 퓨코스테롤(fucosterol), 콜레스테릴 헤미석시네이트(cholesteryl hemisuccinate), 콜레스테릴 벤조에이트(cholesteryl benzoate), 콜레스테릴 올레이트(cholesteryl oleate), 콜레스테릴 올레일 카보네이트(cholesteryl oleyl carbonate), 콜레스테릴 이소스테아레이트(cholesteryl isostearate), 콜레스테릴 리놀레이트(cholesteryl linoleate), 콜레스테릴 아세테이트(cholesteryl acetate), 콜레스테릴 팔미테이트(cholesteryl palmitate), 콜레스테릴 스테아레이트(cholesteryl stearate), 콜레스테릴 클로라이드(Cholesteryl chloride), 콜레스테릴 노나노에이트(Cholesteryl nonanoate) 및 콜레스테릴 아라키도네이트(Cholesteryl arachidonate)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 상기 인지질은 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-phosphoethanolamine, DSPE), 1,2-디헥사노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디테카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디아우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DLPE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DMPE), 1,2-디펜타데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DPPE), 1,2-디헵타데카노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), L- α -포스파티딜에탄올아민(L- α -phosphatidylethanolamine (egg, soy)), L- α -포스파티딜에탄올아민 트랜스포스파티딜드(L- α -phosphatidylethanolamine transphosphatidylated), L- α -리소포스파티딜에탄올아민(L- α -lysophosphatidylethanolamine), 1,2-디팔미토에오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Δ9-Cis, Trans)), 1,2-디리노에오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dilinoeoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디아라키노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-

diarachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1,2-디도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-didocosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-docosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-도코사헥사에노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-stearoyl-2-docosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-미리스토일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-팔미토일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-Stearoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine), 및 1-올레오일-2-하이드록시-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 상기 지질이중층을 구성하는 포화 레시틴, 스테롤계 화합물, 및 PEG-인지질은 55 ~ 88 몰% : 10 ~ 40 몰% : 2 ~ 8 몰%이 포함될 수 있다.

[0023] 상기 PEG는 시판되는 것을 사용할 수 있으며, PEG 분자량은 2,000 내지 20,000인 것이 바람직하다. 일반적으로 리포솜 제조 시 PEG-인지질을 사용하는 경우, RES의 식균세포에 의한 파괴를 방지하는 효과를 가져와 혈액 내 체류시간을 증가시키는 장점을 갖고, 이에 리포솜 크기의 증가를 가져오게 된다. 특히, 본 발명의 리포솜은 탁산계 약물 석출이 일어나지 않아 정맥 투여하는 것이 바람직한데, 분자량 20,000을 초과하는 경우 PEG가 체내에서 분해되지 않고 신장을 통해 체외로 배출되는 가능성이 높아지며, 2,000 미만인 경우 그 이상의 분자량에 비해 혈액 내 장기간 순환하는 효과(long-circulating effect)가 저하되는 것으로 알려져 있으므로, PEG의 분자량이 2,000 내지 20,000인 것이 바람직하다.

[0024] 상기 오일은 본 발명에서 리포솜의 막 유동성을 증가시켜 약물 방출을 증진시키는 요소로 사용되며, 상기 지질이중층을 구성하는 포화레시틴 분자들 사이에 삽입되는 형태를 구성한다. 즉, 탁산계 약물과 포화레시틴, 스테롤계 화합물 및 PEG-인지질을 구성하는 리포솜에 오일을 포함시킴으로써 최종 리포솜 보관 시 안정성이 향상되고, 탑재된 탁산계 약물의 유리/석출 문제가 현저히 개선된다. 또한, 본 발명에 따른 탁산계 약물 함유 리포솜은 소량의 오일을 포함함으로써 PEG-인지질에 의해 1) 리포솜의 제조과정에서 거품이 형성되는 현상 2) 제조된 리포솜을 동결건조하여 보관하다가 사용 시 재분산을 위해 수상을 가한 후 흔들 때 거품이 형성되는 현상을 현저히 감소시켜 제조의 용이성을 증진시켜 주는 효과가 있다.

[0025] 상기 오일은 중쇄(medium-chain) 이상(중쇄 또는 장쇄)의 지방산 트리글리세라이드, 즉 탄소수 6 내지 22의 지방산 트리글리세라이드일 수 있다. 구체적으로, 탄소수 6인 카프로인산 트리글리세라이드(caproic acid triglyceride), 탄소수 8인 카프릴산 트리글리세라이드(caprylic acid triglyceride), 탄소수 10인 카프린산 트리글리세라이드(capric acid triglyceride), 탄소수 12인 라우린산 트리글리세라이드(lauric acid triglyceride) 및 이들의 혼합 오일(예: Glyceryl Tricaprylate/Tricaprate인 Captex300, Labrafac Lipophile WL 1349 등 시판 제품 많음), 중쇄(medium-chain) 이상(중쇄 또는 장쇄)의 지방산 트리글리세라이드들을 다량 포함하는 천연 오일인 콩기름, 코코넛유, 해바라기씨유, 깨기름, 피마자유, 면실유, 야자유, 홍화유, 땅콩기름, 옥수수기름, 올리브유, 카놀라유, 크릴유 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 상기 탁산계 약물은 파클리탁셀 또는 도세탁셀의 난용성 약물이다.

[0027] 본 발명에 따른 리포솜은 지질, 오일 및 탁산계 약물은 100 : 1 ~ 30 : 3 ~ 15의 중량비로 포함하는 것이 바람직하다.

[0028] 상기 오일이 이의 범위를 벗어나게 되면 적합한 입자 크기로 제조하기 어렵고, 보관 안정성 및 약물 석출 문제를 해결하기 어려우며, 약물이 너무 적거나 많으면 봉입 농도가 너무 낮거나 빠르게 침전되는 문제가 있다. 또한, 상기 탁산계 약물이 이의 범위를 초과할 경우 약물 석출이 일어나는 문제가 있다.

- [0029] 일반적으로 제타포텐셜 값(리포솜의 표면 하전)이 절대값으로 30 내지 60 mV 범위이면 정전기적 반발력에 의해 리포솜의 응집 방지 안정화가 가능하다고 알려져 있으나, 오일을 첨가하지 않은 리포솜의 경우 음성 하전을 부여하는 PEG화(PEGylation)에 의해 제타포텐셜이 -50 mV인데도 불구하고 시간에 따른 리포솜의 응집 및 약물 석출이 일어나며, 이는 정전기적 반발력을 이용한 리포솜의 안정화가 탁산계 약물에서는 성립되지 않는다고 볼 수 있다. 하지만 오일을 첨가시켜 제조된 리포솜의 경우 제타포텐셜 값에는 변화가 없으면서 리포솜의 응집이 일어나지 않았고 또한 약물 석출도 지연되는 것을 확인하였다 (표 3).
- [0030] 상기 오일을 첨가한 리포솜은 제타포텐셜 값이 -70 내지 -20 mV인 것이 바람직하다.
- [0031] 또한, 본 발명의 리포솜은 탁산계 약물 탑재 유지율이 초기 약물 농도 대비 4 ℃에서 2개월 동안 보관 시 90% 이상이거나 상온(25 ℃)에서 1주일 보관 시 80% 이상으로 확인되었다. 이는 기존 파클리탁셀 탑재 리포솜에 비해 현저히 개선된 보관 안정성을 나타내는 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 리포솜은 PEG의 정전기적인 반발력에 의해 리포솜 표면의 곡률이 증가함으로써 리포솜 입자경 축소 공정인 압축(extrusion) 공정을 거치지 않고도 평균 입자 크기를 50 nm 내지 500 nm, 50 nm 내지 450 nm, 50 nm 내지 400 nm, 100 nm 내지 500 nm, 100 nm 내지 450 nm, 150 nm 내지 500 nm 또는 150 nm 내지 400 nm로 조절할 수 있다. 이렇게 입자 크기를 조절함으로써 정맥 주사가 가능한 리포솜을 제공할 수 있다.
- [0033] 따라서, 본 발명은 상기 탁산계 약물이 봉입된 리포솜을 포함하는 정맥주사용 약학 제제를 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은
- [0036] 포화 레시틴, 스테롤계 화합물 및 폴리에틸렌글리콜화된 인지질(PEG-인지질)로 혼합된 지질을 알코올에 혼합하는 단계;
- [0037] 상기 혼합 용액에 탁산계 약물 및 오일을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;
- [0038] 상기 혼합액을 동결건조하여 분말을 얻는 단계;
- [0039] 상기 분말을 수화시켜 수용액을 얻는 단계; 및
- [0040] 상기 수용액을 초음파 처리하고, 여과하여 리포솜을 얻는 단계
- [0041] 를 포함하는 탁산계 약물을 봉입한 리포솜의 제조방법을 제공한다.
- [0042] 먼저, 포화 레시틴, 스테롤계 화합물 및 폴리에틸렌글리콜로 유도체화된 인지질(PEG-인지질)로 혼합된 지질을 알코올에 혼합한다.
- [0043] 상기 포화레시틴, 스테롤계 화합물, 인지질, 지질은 상기에서 언급한 바와 같다.
- [0044] 상기 알코올은 탄소수 2 내지 6의 저급 알코올이 바람직하다.
- [0045] 상기 혼합은 1000-4000 rpm의 속도로 0.5 내지 5분 동안 교반하여 실시한다.
- [0046] 상기 혼합과정을 거쳐 제조된 혼합 용액에 탁산계 약물을 용해시킨다.
- [0047] 이때, 탁산계 약물은 지질 100 중량부에 대하여 3 내지 15 중량부를 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 1000-4000 rpm의 속도로 0.5 내지 5분 동안 교반하여 탁산계 약물을 용해시킨다.
- [0048] 그런 다음, 탁산계 약물이 용해된 혼합 용액에 오일을 혼합한다.
- [0049] 상기 오일은 상술한 바와 같으며, 탁산계 약물이 용해된 혼합 용액에 1000-4000 rpm의 속도로 0.5 내지 5분 동안 오일을 교반하여 혼합시킨다.
- [0050] 오일이 포함된 혼합액을 동결건조시켜 분말을 얻는다. 이때, -40 내지 -80 ℃에서 16 내지 30시간 동안 동결건조를 실시한다.
- [0051] 상기 동결건조하여 얻은 분말을 수화시켜 수용액을 얻는다. 상기 수용액을 초음파 처리하고 여과하여 리포솜을 제조한다. 이때, 100 ~ 280 와트, 37 ℃에서 30~60분 동안 초음파 처리하는 것이 바람직하다.
- [0052] 이렇게 제조된 본 발명의 리포솜은 탁산계 약물의 혈액 내 체류시간을 증가시켜 탁산계 약물의 항암 활성을 유지시켜주는 역할을 하는 바, 암의 예방 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

- [0053] 본 발명에 사용한 탄산계 약물은 탄산계 약물 자체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 형태일 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포나산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.
- [0054] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 탄산계 약물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.
- [0055] 동량의 탄산계 약물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0056] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0057] 상기 조성물은 약학적 조성물로 사용할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있으며, 하루에 체중 1 kg당 0.1~500 mg, 바람직하게는 1~100 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설률, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

발명의 효과

- [0060] 본 발명은 난용성의 항암제인 탄산계 약물의 봉입 농도를 안정적으로 증진시킨 리포솜에 관한 것으로, 리포솜의 PEG화에 의하여 세막내피계와 리포솜 표면의 상호작용을 감소시켜 정맥 주사된 리포솜이 급격히 세막내피세포계로 이행하는 현상을 방지하여 결국 탐제 약물의 혈중 체류 시간을 증진시켰다. 또한, 오일을 함께 사용함으로써 입자 크기를 감소시켜 멸균을 위한 막 여과 및 보관 안정성을 향상시키고 약물 석출이 일어나지 않아 정맥 주사가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 탁솔 및 파클리탁셀이 봉입된 실시예 1의 리포솜으로부터 시간에 따른 파클리탁셀 방출 양상을 비교한 그래프이다.
- 도 2는 오일 첨가에 따른 파클리탁셀이 봉입된 리포솜의 거품 형성 방지 효과를 확인한 사진이다[좌: 오일을 첨가하지 않고 제조된 리포솜, 우: 오일을 첨가하여 제조된 실시예 1의 리포솜].
- 도 3은 파클리탁셀이 봉입된 리포솜의 보관 시 형상 변화를 투과전자현미경으로 확인한 사진이다[(a) 제조 후 필터링하지 않아 미탑재 파클리탁셀이 리포솜과 혼재된 상태 (b) C300을 첨가하지 않은 파클리탁셀 리포솜 제조 1일 후 (c) C300을 첨가하지 않은 파클리탁셀 리포솜 상온 보관 7일 후 (d) C300 첨가 파클리탁셀 리포솜 제조 1일 후 (e) C300 첨가 파클리탁셀 리포솜 상온 보관 7일 후].
- 도 4는 탁솔 제형과 오일 첨가 실시예 1의 리포솜 제형에 대한 배양세포주에서의 MTT assay(A) 및 colony formation assay(B)로 항암 활성을 비교한 것이다.
- 도 5는 탁솔 제형과 오일 첨가 실시예 1의 리포솜 제형에 대한 암 이식 동물모델에서의 항암 활성을 비교한 것이다[화살표: 투여시점].
- 도 6은 탁솔 제형과 오일 첨가 실시예 1의 리포솜 제형에 대한 독성을 비교한 것이다[(A) 동물에 정맥주사 후 몸무게 변화 비교 (B) 적혈구 용액에 대한 용혈 현상 비교].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식이 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[실시예]

[0066] 실시예 1: 파클리탁셀이 봉입된 리포솜(DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:오일) 제조

- [0067] 3차 부틸 알코올에 디미리스틸포스파티딜콜린(DMPC)과 콜레스테롤 및 PEG화된 인지질(DSPE-PEG2000)을 35:5:2의 몰 비(23.7:2:5.6의 중량비)로 3,000 rpm의 속도로 1분 혼합하고 이에 파클리탁셀을 DMPC+콜레스테롤+DSPE-PEG2000의 총 지질 31.3 mg(42 μ mole)당 2.6 mg의 양으로 섞어 모두 용해시킨 후, 2 mg의 오일을 3,000 rpm의 속도로 1분 혼합하여 얻어진 혼합용액을 신속하게 -80 °C에서 얼리고, 동결건조기에서 -45 °C에서 동결 건조를 시행하였다. 24시간 동안 동결건조한 후에 얻은 지질+약물 파우더에 생리식염액 1 ml를 가해 수화시켰다. 3,000 rpm에서 30초 교반하여 수화에 의해 자발적으로 형성된 리포솜 분산액을 37 °C에서 30분간 수조 형식의 초음파 분산기에서 130 와트로 분쇄 및 균질화, 다시 수조 형식의 세포 파쇄용 초음파 분산기에서 7분간 250 와트 세기의 초음파를 처리하여 파클리탁셀이 봉입된 리포솜 제형을 얻었다.

- [0068] 얻은 리포솜은 봉입되지 않은 파클리탁셀을 제거하기 위해서 0.8 μ m의 필터로 여과하여 사용시까지 4 °C에 보관하였다.

[0070] 실시예 2: 오일 첨가로 인한 파클리탁셀 탑재 리포솜 보관 시 탑재된 파클리탁셀 농도 유지율 확인

- [0071] 오일 중 중쇄 지방산 트리글리세라이드의 일종인 Captex300 (Glyceryl Tricaprylate/Tricaprate, 이하 C300)을 2 mg/지질 31.3 mg의 비율로 첨가하여 실시예 1의 방법으로 리포솜을 제조하였다. 리포솜에 봉입된 파클리탁셀의 농도를 HPLC로 분석 후 각 리포솜을 상온 및 4 °C에서 보관하면서 정해진 시간에 샘플을 취하여 다시 0.8 μ m의 필터로 리포솜으로부터 방출되어 석출된 파클리탁셀을 여과 후 리포솜에 남아있는 파클리탁셀의 농도를 측정하였다. 그 결과, DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000의 리포솜에 비해 Captex 300를 포함하여 제조한 리포솜은 탑재한 파클리탁셀을 보관기간 동안 훨씬 높은 농도비율로 유지하였다. 즉, 상온(25 °C) 보관 1일 및 7일 후에 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜의 경우는 각각 제조 후 PTX 탑재 농도의 36%, 32%를 유지하였으며

DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:C300 리포솜의 경우는 각각 95%, 81%였다 (표 1). 한편, DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:C300 리포솜을 4 ℃에 2개월 보관한 경우, DMPS:CHOL:DSPE-PEG2000:C300 리포솜의 경우는 >93% 유지되었다.

표 1

보관시간(실온)	리포솜막에의 C300 첨가 여부에 따른 보관시 탑재된 PTX의 유지비율 변화 (초기 농도 대비) 단위:%	
	DMPC:CHOL:C300: DSPE-PEG2000	DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000
0 h	100	100
2 h	93.5±0.7	66.1±3.3
8 h	93.2±2.3	62.0±5.9
1 day	94.5±2.2	35.9±10.4
2 days	88.5±2.1	37.1±7.2
4 days	86.8±2.9	43.6±8.4
7 days	81.4±3.9	31.8±4.2

실시예 3: 오일 종류에 따른 파클리탁셀 탑재 리포솜 보관 시 탑재 파클리탁셀 농도 유지율 확인

오일 중 중쇄 트리글리세라이드인 C300 외에 또 다른 중쇄 트리글리세라이드인 Labrafac Lipophile WL 1349 또는 장쇄 트리글리세라이드인 콩기름(soybean oil)을 2 mg/지질 31.3 mg의 비율로 첨가하여 실시예 1의 방법으로 제조한 리포솜을 실온에 보관하며 시간에 따른 리포솜 탑재 파클리탁셀의 농도 변화를 측정된 결과, Labrafac 또는 soybean oil을 첨가한 리포솜의 경우도 오일을 첨가하지 않은 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000의 리포솜에 비해 보관 시 탑재한 파클리탁셀을 훨씬 높은 비율로 유지하였다 (표 2). 즉 상온 보관 2일 및 7일 후에 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜의 경우는 각각 제조 후 PTX 탑재 농도의 37%, 32%를 유지하는데 비해 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:Labrafac 리포솜의 경우는 각 시간에 94%, 76%를, DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:soybean oil 리포솜의 경우는 83%, 63%를 유지하였다 (표 2). 한편 단쇄 트리글리세라이드인 트리부티린(tributyrin)을 동량 첨가한 리포솜의 경우는 파클리탁셀의 초기 탑재 농도가 현저히 낮아서 (10배 이상) 안정성 실험을 진행할 수 없었다. 중쇄(문헌기준 C6 이상) 또는 장쇄 트리글리세라이드(C16 이상)의 경우 공통적으로 일어나는 안정화 효과로 판단된다.

표 2

보관 시간	0 h	8시간	2일	7일
리포솜 조성	AVE (%)	AVE (%)	AVE (%)	AVE (%)
DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000	100	62±5.9	37.1±7.2	31.8±4.2
DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:soybean oil	100	88.3±2.1	83.1±3.2	62.6±1.7
DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:LABRAFAC	100	95.3±1.9	93.5±2	75.7±1.9
DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:Captex 300	100	93.2±2.3	88.5±2.1	81.4±3.9

실시예 4: 오일 첨가로 인한 파클리탁셀 탑재 리포솜 보관 시 리포솜 크기 변화에 미치는 영향 확인

Captex300를 2 mg/지질 31.3 mg의 비율로 첨가하여 실시예 1의 방법으로 제조한 리포솜을 상온에 보관하며 시간에 따른 파클리탁셀 탑재 리포솜의 평균 입자경, 입도분포 변화 및 제타포텐셜을 측정된 결과, DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 23.7:2:5.6의 리포솜에 비해 C300를 포함하여 제조한 리포솜은 보관 시 평균 입자경 및 다분산도(polydispersity index, 분산 균일성의 척도로서, 작을수록 균일함을 의미함)의 증가가 훨씬 억제되었다. 즉, 상온 보관 7, 14일 후 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜의 경우는 초기 사이즈의 4.1배, 3.9 배로 증가하였으나 C300 첨가 리포솜의 경우는 21일까지도 1.6배 만이 증가하였다. 다분산도의 경우도 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜의 경우는 7일 후 이미 초기 분산도의 1.9 배 이상 증가하였으나 오일 첨가 리포솜의 경우는 21일까지도 유의성있는 차이를 보이지 않았다 (표 3).

일반적으로 음성 하전의 지질 첨가는 리포솜 막간의 반발력을 증진시켜 안정화한다고 알려져 있으나 파클리탁셀

을 봉입한 DMPC: CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜의 경우 DSPE-PEG2000에 의한 표면 음성 하전에도 불구하고 파클리탁셀에 의해 유도되는 리포솜의 응집 현상이 억제되지 못했고, 오일을 첨가 시 막 유연성 증가에 의해 막에 끼워 넣어진 파클리탁셀 간의 배열 위치 등이 변화되어 파클리탁셀에 의해 유도되는 리포솜 간 응집이 DSPE-PEG2000에 의해 억제되게 된 것으로 생각된다.

표 3

리포솜의 평균입자경, 다분산도 변화 및 제타포텐셜		
보관시간 (상온)	리포솜의 평균입자경 (nm)	
	DMPC:CHOL: DSPE-PEG2000:C300	DMPC:CHOL: DSPE-PEG2000
0일	204±27	410 ± 34
7일	310±5	1512±47
14일	366±47	1428±94
21일	320±47	ND
보관시간 (상온)	리포솜의 다분산도(PI)	
	DMPC:CHOL:DSPE-PEG:C300	DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000
0일	0.181±0.054	0.203 ± 0.024
7일	0.129±0.006	0.368±0.037
14일	0.158±0.008	0.384±0.019
21일	0.137±0.008	ND
보관시간 (실온)	리포솜의 제타포텐셜(mV)	
	DMPC:CHOL:DSPE-PEG:C300	DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000
0일	-51.2 ± 1.0	-49.5 ± 1.2

실시에 5: 멸균여과 가능 여부 및 멸균여과 후의 리포솜 물성 변화 확인

리포솜과 같은 입자분산형 정맥주사 제형의 경우 6-8 μm 인 적혈구 보다 큰 입자가 존재하는 경우 혈전을 일으킬 우려가 있으며, 또한 0.2 μm 의 멤브레인으로 막 여과가 가능해야 멸균이 가능하다. 이를 고려하여 실시예 1의 방법으로 리포솜을 제조 후 여과멸균을 위하여 리포솜 분산액을 0.2 μm 의 구멍을 가지는 멤브레인필터를 장착한 주사기를 통과시키고자 하였다. 그 결과, DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜의 경우는 압력의 증가로 멤브레인필터가 빠르게 막히는 현상을 보였다. 한편 C300 첨가한 DMPC:CHOL:DSPE-PEG-2000 리포솜의 경우는 막필터를 쉽게 통과할 수 있어서 여과멸균이 가능했다. 이는 오일에 의한 유동성 증가 효과로 생각된다. DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜의 경우 여과 멸균이 불가능함과 더불어 제조 직후부터 > 5 μm 입자가 12.3% 존재하였으며 C300을 첨가하여 제조한 리포솜의 경우는 해당 입자가 0% 존재하였다. 또한, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 8 주 보관 후에도 C300 첨가 리포솜에서만 > 5 μm 입자는 전혀 발견되지 않았다.

여과멸균 전후 리포솜의 특성은 하기 표 4와 같다. 이러한 결과로, 실시예 1의 리포솜의 경우 오일에 의해 정맥주사가 가능함을 확인하였다.

표 4

구분	DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:C300	DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000
평균 입자경(nm, 멸균 전)	204±27	410±34
평균 입자경(nm, 멸균 후)	200±22	여과불가능
다분산도(멸균 전)	0.181±0.054	0.203±0.024
다분산도(멸균 후)	0.150±0.042	여과불가능
파클리탁셀 탑재 농도 (mg/ml, 멸균 전)	2.29±0.15	1.52±0.24
파클리탁셀 탑재 농도 (mg/ml 멸균 후)	1.93±0.11	여과 불가능
제조 직후 >5 μm 입자(%)	0	12.3±7.5
4 $^{\circ}\text{C}$ 8주 보관 후 >5 μm 입자(%)	0	측정 불가능

[0088] 실시예 6: 오일 함량과 시간에 따른 PTX의 유지율(석출 양상) 확인

[0089] 오일의 리포솜 안정화 효과가 오일 함량에 따라 어떻게 달라지는지 보기 위하여 C300을 0, 2, 4, 6 mg 함유하는 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜을 실시예 1의 방법으로 제조하여 그 후 상온에서 보관하면서 시간에 따른 PTX 유지율을 고찰한 결과(표 5), 2-6 mg 범위에서 유의성있는 차이는 보이지 않았다. 즉, 오일을 소량 함유하기만 하면 PTX의 석출이 억제되었으며 오일을 더 증가시켜도 PTX의 석출이 더 억제되지는 않았다. 이는 오일의 직접적인 PTX 가용화 효과에 의해 PTX의 석출이 지연된 것은 아님을 시사한다.

표 5

[0090]

보관시간 (상온)	리포솜 중 첨가된 오일량 (지질 31.3 mg당mg)			
	C300 0 mg	C300 2 mg	C300 4 mg	C300 6 mg
0 h	100	100	100	100
8 h	62.0±5.9	93.2±2.3	99.2±4.9	100.2±2.3
2 days	37.1±7.2	88.5±2.1	92.4±3.2	94.1±3.1
7 days	31.8±4.2	81.4±3.9	81.0±1.3	86.1±4.5

[0092] 실험예 7: 파클리탁셀 봉입 리포솜의 *in vitro*에서 약물 방출 확인

[0093] 오일로 안정화시킨 리포솜으로부터의 시간에 따른 파클리탁셀의 방출이 기존 시판제제인 탁솔(Taxol)과 비교 시 어떻게 달라지는지 확인하기 위하여 C300을 2 mg 함유하는 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜을 실시예 1의 방법으로 제조하였다. Franz-type vertical diffusion cell 의 상부에 1 mg/ml로 희석된 파클리탁셀이 봉입된 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:C300 리포솜 또는 Taxol 0.1 ml을 넣고 1.35 M 소듐 살리시아에이트(sodium salicylate) (pH 6.5)를 넣어 방출된 파클리탁셀이 침전되지 않도록 하여 준 후 하부에 역시 1.35 M 소듐 살리시아에이트를 약 5 ml 넣었다. 분자량 cut-off 10,000의 투석용 멤브레인을 상부와 하부 사이에 장착 후 37도에서 자석으로 600 rpm으로 교반하였다. 96시간에 이를 때까지 적당한 시간 간격으로 하부에서 샘플을 1 ml씩 취했다. 샘플을 취한 후 하부에는 동부피의 소듐 살리시아에이트를 보충하여 주었다. 취한 샘플 중 파클리탁셀의 양, 즉 파클리탁셀이 봉입된 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:C300 리포솜이나 탁솔로부터 방출된 약물의 양은 HPLC 분석법으로 정량하였다. 그 결과 시판제제 및 파클리탁셀이 봉입된 실시예 1의 리포솜 제제 둘 다 파클리탁셀은 2단계 방출 양상, 즉 초기 48시간 동안의 빠른 방출에 이은 이후 48시간 동안의 느린 양상을 보였다[도 1]. 즉, 파클리탁셀이 봉입된 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:C300 리포솜으로부터의 파클리탁셀 방출 양상은 시판제제와 매우 비슷하여서 두 가지 제제 둘 다 소듐 살리시아에이트에 의해 약물 방출을 촉진시킨 조건에서 96시간 후 약 60%의 약물을 방출시켰다. 수난용성 약물의 수송체로서 바람직함을 의미하는데 이는 약물을 천천히 방출시킴으로써 정맥 주사 후 급격한 방출로 인한 침전의 가능성이 낮기 때문이다.

[0095] 실험예 8: 오일 첨가에 의한 파클리탁셀 봉입 리포솜의 거품 형성 방지 효과

[0096] 오일 중 중쇄 지방산 트리글리세라이드의 일종인 Captex300 (Glyceryl Tricaprylate/Tricaprate, 이하 C300)을 2 mg/지질 31.3 mg (DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000, 23.7:2:5.6의 중량비) 비율로 첨가하여 실시예 1의 방법으로 리포솜을 제조하였다.

[0097] 또한, 오일을 첨가하지 않은 것을 제외하고 실시예 1의 방법과 동일하게 리포솜을 제조하였다.

[0098] 도 2에 나타난 바와 같이, 오일을 첨가하지 않은 리포솜을 제조하는 과정에서 거품이 형성된 것을 확인할 수 있었다[도 2의 좌]. 반면에, 오일을 첨가한 실시예 1의 리포솜의 경우에는 거품이 형성되지 않았다[도 2의 우].

[0100] 실험예 9: 파클리탁셀 봉입 리포솜 보관 안정성 확인

[0101] Captex300 (이하 C300)을 2 mg/지질 31.3 mg의 비율로 첨가하여 실시예 1의 방법으로 제조한 리포솜 분산액을 동결건조보조제로서 트레할로즈(trehalose) 240 mM을 녹인 증류수 동 부피와 혼합하였다. 혼합액을 -80도에서 하룻밤 얼린 후 동결건조기로 건조시켜 분말상의 리포솜을 얻었다. 리포솜 분말 제형을 하룻밤 냉장 보관 후 원 부피의 증류수를 넣어 vortex하여 잘 섞은 후 다시 0.8 um의 필터로 리포솜으로부터 방출되어 석출된 파클리탁셀을 여과 후 리포솜에 남아있는 파클리탁셀의 농도를 측정하였다.

[0102] 그 결과, DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 23.7:2:5.6의 중량비)의 리포솜에 비해 C300를 2 mg 포함하여 제조한 리포솜은 탑재한 파클리탁셀을 동결건조 후 훨씬 높은 농도 비율로 유지하였다 (표 6).

표 6

[0103] 동결건조 후 리포솜에 탑재된 채로 남아있는 파클리탁셀의 농도에 오일 삽입이 미치는 영향.

리포솜 조성	남아 있는 파클리탁셀(%)
DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000	49.0±0.6
DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000:Captex 300	84.0±1.0

[0105] 실험예 10: 전자현미경으로 확인한 오일 첨가 파클리탁셀 봉입 리포솜의 안정화 효과

[0106] 오일 첨가에 의한 리포솜의 크기와 형상의 변화를 투과형 전자현미경으로 확인하기 위해, 지질 31.3 mg(DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000, 23.7:2:5.6의 중량비)에 C300을 2 mg 첨가한/첨가하지 않은 두 종의 리포솜 분산액을 실시예 1의 방법으로 제조하였다. 각 리포솜 분산액 소량을 생리식염액으로 70배 희석 후 탄소로 코팅한 200 메쉬 구리 격자판에 떨어뜨렸다. 이어서 2% uranyl acetate 용액으로 음성 염색 후 건조시켜 Tecnai G2 spirit (FEI company, Hillsboro, Oregon, USA)로 120 kV에서 이미지를 촬영하였다. 이미지 사진은 30,000-42,000배로 확대하였다.

[0107] 그 결과, C300이 혼합되지 않은 리포솜을 제조 1일 후 리포솜의 융합(fusion)과 응집(aggregation)이 관찰되기 시작했으며, 상온에서 7일 보관 후 얻은 이미지에서는 매우 거대한 융합/응집된 리포솜과 함께 막대형 결정체가 관찰되었다. 리포솜에의 미탑재 파클리탁셀을 필터하지 않아 리포솜과 혼재된 상태에서 얻은 이미지에서 막대형 결정체가 파클리탁셀임을 확인할 수 있었다. 반면 C300을 혼합한 리포솜의 크기와 형태는 동일 조건에서 보관시 별 변화를 보이지 않았다 (도 3). 이상의 결과는 C300의 첨가가 PEG화되고 포화지방산으로 구성된 리포솜의 융합과 응집을 억제함으로써 파클리탁셀의 유리와 석출을 지연시켜줌을 시사한다.

[0109] 실시예 11: 배양세포주를 이용한 TAXOL과 오일 첨가 파클리탁셀 봉입 리포솜의 항암 활성 비교

[0110] 오일로 안정화시킨 파클리탁셀 봉입 리포솜과 탁솔(Taxol)의 항암 활성을 비교하기 위하여, C300을 2 mg 함유하는 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜을 실시예 1의 방법으로 제조하였다. 인간 폐암 H460 세포주를 96-well plate에 5,000개씩 접종 후 24시간 후 실시예 1의 리포솜 또는 탁솔을 1 nM부터 1000 nM까지 다양한 파클리탁셀 농도로 생리식염액으로 가하였다. 48시간 세포 배양 후 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 가하고 이어 생성된 formazan 결정을 dimethylsulfoxide에 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 재어 세포의 성장도를 평가하였다.

[0111] 반복 투여 시의 항암 활성 비교를 위해 암세포의 군집체 형성 정도를 측정하였다. 60 mm 직경의 디쉬에 마우스 유래의 B16-F10 흑색종 세포주를 500개씩 접종 하룻밤 방치 후 다양한 파클리탁셀 농도의 리포솜 또는 탁솔과 방치하였다. 3일마다 배지를 동일 농도의 파클리탁셀을 함유하는 새 배지로 바꿔 준 후 8일째 되는 날 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 colony들을 염색하여 육안으로 식별 가능한 colony의 개수를 세었다.

[0112] MTT assay 결과, H460 세포주의 성장을 50% 억제하는 파클리탁셀 농도는 탁솔 제형과 리포솜 제형의 경우 각각 21, 14 nM로 유사한 항암 활성을 나타내었다(도 4의 (A)).

[0113] Colony formation assay 결과, B16-F10 세포주에 8 nM의 파클리탁셀 투여 후 탁솔 제형과 리포솜 제형의 경우 형성된 colony의 수를 각각 64.7%, 75.8% 억제함으로써 반복 투여시도 역시 유사한 항암 활성을 나타내었다(도 4의 (B)).

[0115] **실험예 12. 동물모델에서의 TAXOL과 오일 첨가 파클리탁셀 봉입 리포솜의 항암 활성 비교**

[0116] 오일로 안정화시킨 파클리탁셀 봉입 리포솜과 탁솔(Taxol)의 암 이식 동물모델에서의 항암 활성을 비교하기 위하여, C300을 2 mg 함유하는 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜을 실시예 1의 방법으로 제조하였다. 인간 유래의 두경부암 SCC7 세포주 2×10^6 개를 Balb/c nude mice의 오른쪽 넓적다리(flank)에 이식하였다. 이식한 암세포주의 부피가 약 30 mm^3 에 도달한 후 마우스들을 미투여 군 (미처치 그룹), 파클리탁셀을 탑재하지 않은, 빈 오일 첨가 리포솜 군 (빈 리포솜 그룹), 탁솔 투여 군 (탁솔 그룹), 파클리탁셀 탑재 오일 첨가 리포솜 군 (리포솜 그룹)로 무작위로 나누었다. 그룹 마다 15 mg/마우스 kg의 파클리탁셀 농도로 희석한 각 샘플을 3일에 한번씩 4회 정맥 주사하였다. 암 덩어리의 가장 짧은 직경(L)과 가장 긴 직경(W)을 미리 정한 시간마다 측정 후 암부피를 $(L \times W^2)/2$ 의 공식에 의해 계산하였다.

[0117] 그 결과, 오일 첨가 리포솜 제형은 탁솔과 유사하게 암세포의 성장을 억제시켰다(도 5).

[0119] **실험예 13: TAXOL과 오일 첨가 파클리탁셀 봉입 리포솜의 부작용/독성 비교**

[0120] 탁솔은 사용한 계면활성제(Cremophor EL)로 인한 과민성 반응 등 부작용이 있어 환자에게 투여 시 과민성 반응을 경감시키기 위한 전처치 등을 필요로 한다.

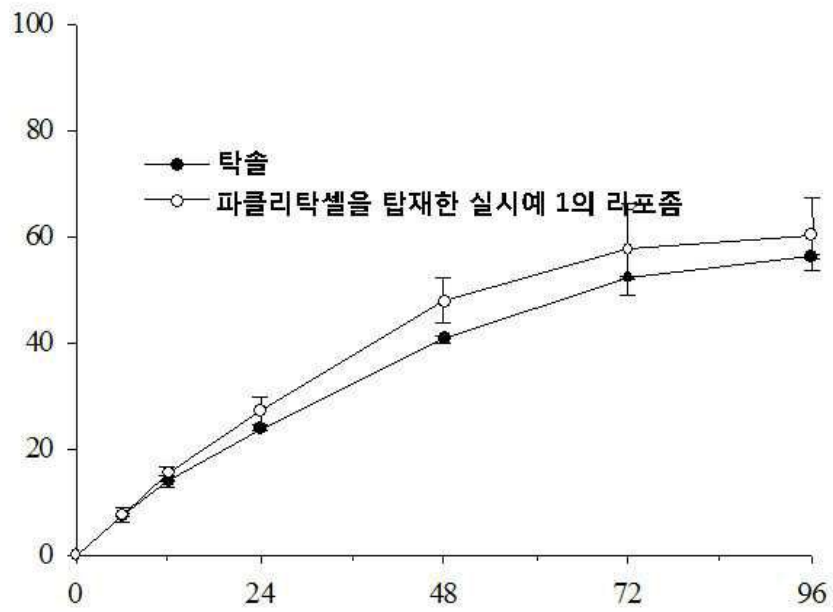
[0121] 오일로 안정화시킨 파클리탁셀 봉입 리포솜과 탁솔(Taxol)의 독성 유발 정도를 비교하기 위하여, C300을 2 mg 함유하는 DMPC:CHOL:DSPE-PEG2000 리포솜을 실시예 1의 방법으로 제조하였다. 상기 실험예 12의 암 이식 동물모델에 정맥 주사 후 독성의 지표로서 마우스 몸무게의 변화를 측정하였다. 그 결과 네 개의 그룹 중 탁솔을 투여한 그룹 쥐들만이 관찰기간 동안 몸무게가 일시적으로 감소되었다 (11%) 다시 회복되는 현상을 보였으며 다른 그룹에서는 그러한 현상이 관찰되지 않았다. 즉, 리포솜 투여 그룹에서는 미처치 그룹에 속한 마우스들과 유사하게 관찰기간 내내 몸무게가 점차적으로 증가되었다(도 6의 (A)).

[0122] 한편, 실시예 1의 방법으로 제조한 오일 첨가 리포솜 제형과 탁솔의 용혈 독성을 비교하였다. SD 랫트의 경동맥으로부터 혈액을 얻은 후 10분간 3,000g에서 원심분리하여 적혈구를 얻었다. 적혈구를 생리식염수로 2회 세척 후 생리식염수를 가해 2%의 적혈구 분산액을 얻었다. 탁솔 및 리포솜 각각을 생리식염수로 희석하여 파클리탁셀 농도로서 0.3, 0.6, 0.9 mg/ml로 맞춘 샘플들을 제조 후 이 샘플들을 각각 적혈구 분산액과 1:1의 부피비로 혼합하였다. 혼합액을 37도 수조에서 1시간 방치 후 4도에서 5분간 방치하여 용혈반응을 중단시켰다. 짧게 원심 분리 후 상등액을 0.2 mm 필터로 여과하여 간섭물질을 없앤 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 파클리탁셀이 없는 생리식염수와 방치한 적혈구 용액의 흡광도를 0% 용혈로, 증류수와 방치한 적혈구 용액의 흡광도를 100% 용혈로 간주하여 각 샘플의 용혈유발 정도를 %로 계산하였다.

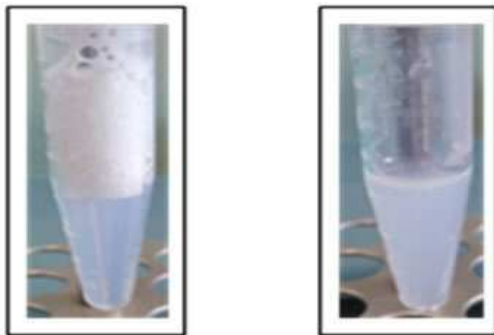
[0123] 탁솔과 방치한 적혈구 용액의 경우 탁솔 농도 의존적으로 적혈구의 용혈 현상이 증가하여 0.6 mg/ml 파클리탁셀과 방치 1시간 후 69.7%의 적혈구 용혈이 일어났으며 리포솜과 방치한 적혈구 용액의 경우는 같은 조건에서 용혈유발 정도가 13.1%로 탁솔 대비 약 5.3배 감소하였다(도 6의 (B)). 이상의 결과는 오일 첨가 리포솜 제형이 시판 탁솔에 비해 현저히 낮은 독성을 보임을 시사한다.

도면

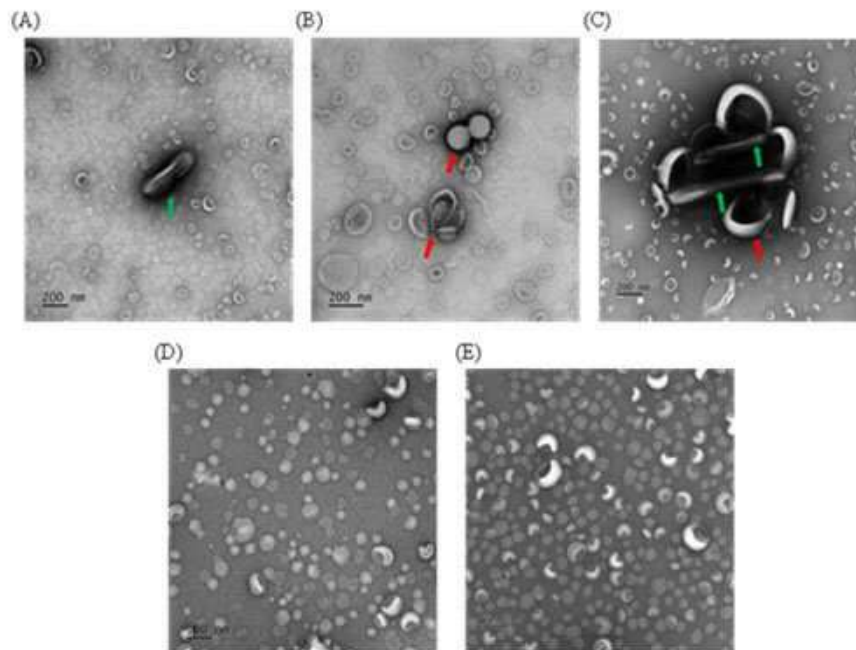
도면1



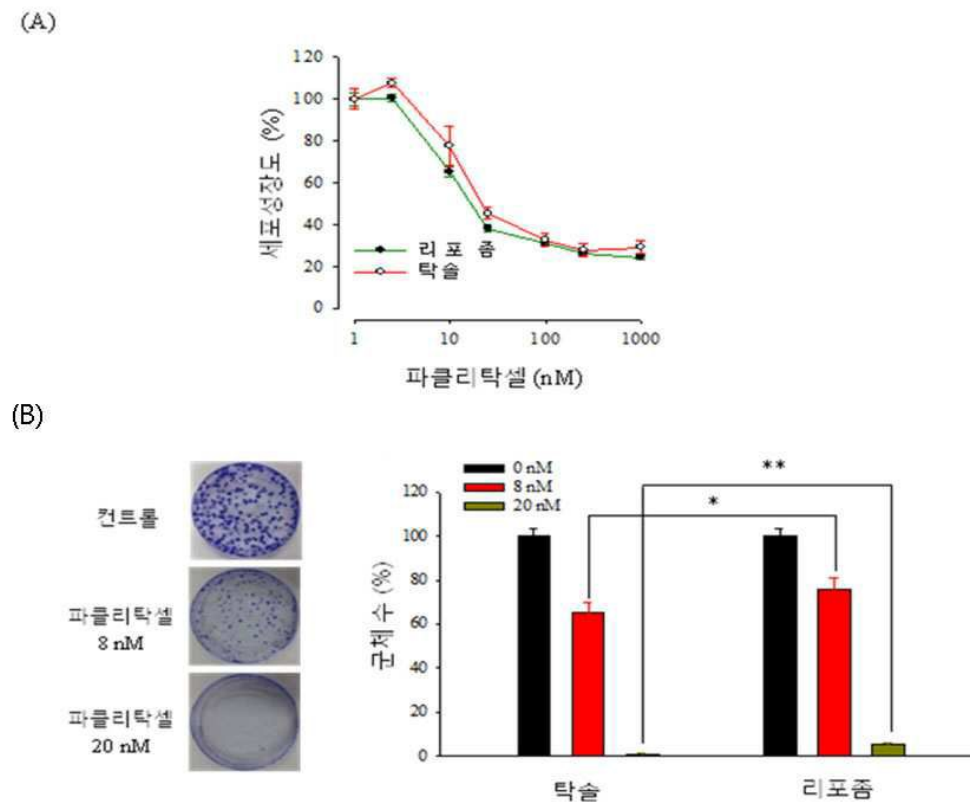
도면2



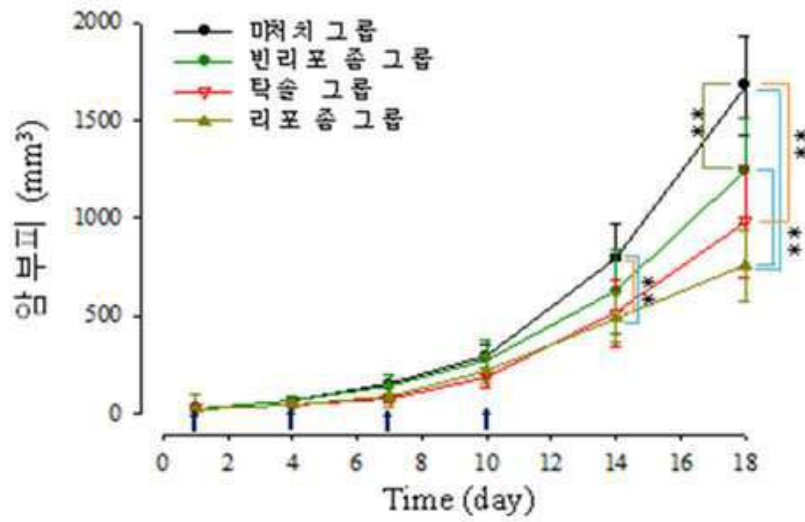
도면3



도면4



도면5



도면6

