



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2006년12월21일
A61K 9/127 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0658956
	(24) 등록일자	2006년12월12일

(21) 출원번호	10-2000-7014404	(65) 공개번호	10-2001-0053006
(22) 출원일자	2000년12월18일	(43) 공개일자	2001년06월25일
심사청구일자	2004년05월28일		
번역문 제출일자	2000년12월18일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1999/001911	(87) 국제공개번호	WO 1999/65465
국제출원일자	1999년06월16일	국제공개일자	1999년12월23일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 그라나다, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 가나, 감비아, 아랍에미리트, 남아프리카,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 짐바브웨, 감비아, 시에라리온,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 9813100.6 1998년06월18일 영국(GB)

(73) 특허권자 더 셰크러터리 오브 스테이트 포 디펜스
영국 지유14 6티디 햄프셔 판보로 디펜스 이벨루에이션 앤드 리서치 에이전시

(72) 발명자 그레고리아디스그레고리
영국런던더블유씨1엔1에이엑스브루스웍스퀘어29-39런던스쿨오브파마시

자디브라힘
영국런던더블유씨1엔1에이엑스브루스웍스퀘어29-39런던스쿨오브파마시

자야세케라프라무크날라카

영국윌트셔에스피40제이큐살리스버리씨비디포톤다운

(74) 대리인

이병호
김영관
홍동오
정상구

심사관 : 김문경

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 리포좀의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (i) 빈 리포좀을 형성시키는 단계, (ii) 단계(i)로부터의 리포좀을 당 용액 및 시약과 혼합하는 단계 및 (iii) 단계(ii)로부터의 혼합물을 건조시키는 단계를 포함하여, 시약 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 당해 조성물은 일반적으로 10%w/v 미만의 수크로스를 포함한다. 당해 방법을 사용하여 높은 포획 효율로 소형 리포좀을 형성시킬 수 있다. 이는 약제 제조에 특히 유용하다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.
삭제

청구항 10.
삭제

청구항 11.
삭제

청구항 12.
삭제

청구항 13.
삭제

청구항 14.
삭제

청구항 15.
삭제

청구항 16.
삭제

청구항 17.
삭제

청구항 18.
삭제

청구항 19.
삭제

청구항 20.
삭제

청구항 21.
삭제

청구항 22.
삭제

청구항 23.
삭제

청구항 24.

빈 리포좀을 형성시키는 단계(i),

단계(i)로부터의 리포좀을 단당류, 이당류 및 다당류로 이루어진 그룹으로부터 선택된 당 용액 및 생물학적 활성 물질 또는 화장품과 혼합하는 단계(ii) 및

단계(ii)로부터의 혼합물을 건조시키는 단계(iii)를 포함하며,

이때 단계(ii)에서 사용되는 당:지질의 질량비가 1:1 내지 5:1w/w임을 특징으로 하는,

생물학적 활성 물질 또는化妆품을 포함하는 조성물의 제조방법.

청구항 25.

제24항에 있어서, 단계(iii)으로부터의 혼합물을 재수화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26.

제24항 또는 제25항에 있어서, 단계(i)에서 형성된 리포좀이 소형 단층 소포(unilamellar vesicle)인 방법.

청구항 27.

제26항에 있어서, 소포의 평균 크기가 25 내지 100nm인 방법.

청구항 28.

제27항에 있어서, 소포의 평균 크기가 70 내지 90nm인 방법.

청구항 29.

제24항 또는 제25항에 있어서, 조성물이 10%w/v 미만의 당을 포함하는 방법.

청구항 30.

제24항 또는 제25항에 있어서, 단계(ii)에서 사용된 당 용액의 농도가 20 내지 200mM인 방법.

청구항 31.

제30항에 있어서, 당 용액의 농도가 30 내지 150mM인 방법.

청구항 32.

제24항 또는 제25항에 있어서, 단계(ii)에서 사용된 당이 이당류인 방법.

청구항 33.

제32항에 있어서, 당이 수크로스인 방법.

청구항 34.

제24항 또는 제25항에 있어서, 단계(ii)에서 사용된 당이 단당류인 방법.

청구항 35.

제34항에 있어서, 당이 글루코스인 방법.

청구항 36.

제24항 또는 제25항에 있어서, 단계(iii)이 동결 건조에 의해 수행되는 방법.

청구항 37.

제24항 또는 제25항에 있어서, 단계(iii)이 분무 건조에 의해 수행되는 방법.

청구항 38.

삭제

청구항 39.

삭제

청구항 40.

제24항 또는 제25항에 있어서, 생물학적 활성 물질이 약제를 포함하는 방법.

청구항 41.

제24항 또는 제25항에 따르는 방법으로 봉입된, 생물학적 활성 물질 또는 화장품을 포함하는 조성물.

청구항 42.

제41항에 있어서, 약제학적 조성물인 조성물.

청구항 43.

제41항에 있어서, 경구 투여, 국소 투여, 비경구 투여 또는 흡입 투여에 적합한 형태의 조성물.

명세서

본 발명은 리포솜의 제조방법, 이에 의해 수득된 리포솜 및, 특히 약제학적 용도에서의 이의 용도에 관한 것이다.

리포솜의 용도는 이들이 약물용 담체 및 피부에 도포하는 데 적합한 기타 시약으로서 사용되는 약제 및 화장품 분야를 포함한 광범위하게 다양한 분야에 공지되어 있다.

리포솜을 제조하는 다양한 방법이 공지되어 있다. 예를 들면, 이들은 지질을 유기 용매, 예를 들면, 클로로포름, 디클로로메탄 또는 알콜, 예를 들면, 메탄올 또는 에탄올에 용해시키는 탈수/재수화(dehydration/rehydration) 기술로 제조할 수 있다. 이어서, 용액을, 예를 들면, 회전 증발기를 사용하여 건조시켜 증발기 용기 벽에 지질 막을 형성시킨다. 물 또는 수용액, 예를 들면, 완충액을 건조막에 가하면 다층 리포솜(multilamellar liposome)이 형성된다. 이것은 각종 방법을 사용하여 소포(vesicle)를 제조할 때 첫번째 단계를 구성한다. 이후의 처리에 의해 탈수/재수화 소포 또는 DRV를 유도한다[참조: Kirby and Gregoriadis, Biotechnology(1984) 2, 979-984]. 또한, 이후에 지질 현탁액을 초음파 처리하여 예를 들면 단층 리포솜(unilamellar liposome)을 제조한다[참조: A.D. Bangham et al., J. Mol. Biol. 13, 238(1965)].

당해 분야에 익히 공지된 기타 방법은 세정제(detergent) 제거법[참조: Y. Kagawa et al., J. Biol. Chem. (1971, 246, 5477)], 역상 증발법[참조: F. Szoka and D. Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1978) 75, 4194] 및 에테르 주입법[참조: D. Deamer et al., Biochim. Biophys. Acta, (1976) 433, 629] 뿐만 아니라 동결 건조법[참조: Ohsawa et al., Chem. Pharm. Bull, (1984) 32, 2442-5; Kirby and Gregoriadis (1984) 상기 참조] 및 동결 해동법[참조: D.D. Lasic "Liposomes: from Physics to Application, Elsevier, 1993, p98]을 포함한다.

상이한 제조방법으로 상이한 크기 및 기타 특성을 갖는 리포솜을 제조할 수 있다. 리포솜은 생물학적 활성 물질, 예를 들면, 백신을 포함하는 약제 뿐만 아니라, 예를 들면, 피부에 영향을 미치는 물질과 같은 비-약제학적 제제, 예를 들면, 인공 선택 제제 및 기타 미용 보조제를 봉입하는 데 사용할 수 있다. 봉입 기술은 봉입할 시약의 특성 및 생성되는 리포솜의 크기와 특성에 따라 달라진다.

리포솜의 크기는 이들의 용도의 견지에서 중요하다. 몇몇 경우에 있어서, 예를 들면, 세균과 같은 미생물을 포함하는 입자를, 예를 들면, 백신용으로 봉입시키고자 하는 경우에는 대형 리포솜이 필요할 수 있다[참조: WO 제95/09619호].

그러나, 대부분의 용도에서는 소형 리포솜이 바람직하다. 이는 소형 리포솜이 대형 리포솜(크기 200nm 이상)에 비해, 세 망내피계(reticuloendothelial system: RES)에 의해 보다 느리게 더 낮은 정도로 제거되기 때문이다. RES에 의한 흡수는 소포의 크기가 클수록 증가한다. 게다가, 근육내 주사된 대형 리포솜은 양호한 효율로 국소 림프절에 도달할 수 없고 이들 부위에 백신 및 기타 제제를 전달할 수 없다[참조: Gregoriadis G. Liposomes as Drug Carriers: Recent Trends and Progress, Wiley Chichester 1988].

각종 약물의 리포솜 제형은 리포솜의 물리화학적 파라미터, 예를 들면, 상 전이 온도, 크기, 크기 분포, 표면 전하, 친수성 그룹을 갖는 화합물에 의한 표면 수화 및 크기 분포를 변화시켜 약물 함량, 안정성, 생체 분포 형태 및 세포 흡수의 견지에서 최적화시킬 수 있다.

리포솜 크기는 RES에 의해 제거되는 비율을 결정하는 파라미터이다[참조: Senior et al. Biochem., Biophys. Acta (1985) 839, 1-8; Nagayasu et al., Biol. Pharm. Bull. (1995) 18(7), 1020-1023]. 소형 리포솜은 고압 균질기를 사용하여 제조할 수 있지만[참조: Talsma et al., Drug Development and Industrial Pharmacy (1989) 15(2) 197-207, Vemuri S et al., Drug Development and Industrial Pharmacy (1990) 16(15), 2243-2256], 허용 가능한 포획된 약물 대 지질 질량비를 얻기 위해서 대량의 지질이 사용되어 왔다. 또 다른 방법[참조: Gregoriadis et al., Int. J. Pharm. 65 (1990) 235-242]에서는, 봉입되지 않은 약물의 존재하에 다층 탈수-재수화 소포(dehydration-rehydration vesicle: DRV)를 미세유동화(microfluidization)시켜 최초 포획된 용질의 양을 유지하면서 크기가 200nm 미만인 소포를 제조한다.

예를 들면, 약물 함유 리포솜을 동결 건조시켜 저장한 후 재수화시켜 사용하는 경우, 리포솜 제조 후 당을 첨가하면 소포를 안정화시키는 효과가 있음이 입증되었다[참조: Crowe L. M. et al., Arch. Biochem. Biophys. 242 (1985) 240-247, Hauser et al., Biochem. Biophys. Acta (1987) 897, 331-334].

본 발명자들은 포획 효율이 높고 제조 단계의 수가 단축되며 안정한 리포솜, 특히 소형 리포솜을 형성시키는 개선된 리포솜 제조방법을 밝혀냈다.

본 발명에 따라,

빈 리포솜을 형성시키는 단계(i),

단계(i)로부터의 리포좀을 당 용액 및 시약과 혼합하는 단계(ii),

단계(ii)로부터의 혼합물을 건조시키는 단계(iii)를 포함하여, 시약을 포함하는 리포좀 조성물을 제조하는 방법이 제공된다.

단계(iii)으로부터의 건조 물질을 재수화시키는 경우, 시약이 봉입된 리포좀이 형성된다. 단계(i)에서 수득된 리포좀에 비해 이렇게 하여 수득된 리포좀의 크기 증가는, 당을 포함하지 않는 조성물에서의 리포좀의 경우에 비해 훨씬 더 작다. 따라서, 위에서 개략적으로 기술한 바와 같은 추가의 압출, 미세유동화 또는 균질화 단계가 필요하지 않을 수 있다.

적합한 농도의 당의 존재하에 건조시키는 동안, 무정형 유리의 형성[참조: Crowe et al., Arch. Biochem. Biophys. 242 (1985) 240-247] 및 당과 인지질 헤드그룹(headgroup)과의 상호작용[참조: Crowe et al., Cryobiology 31 (1994) 355-366]에 의해 리포좀의 융합 및 응집이 어느 정도 방지된다는 사실이 입증되었다. 초기 연구에서, 탈수/재수화 소포(DRV)는 안정화제로서 당을 사용하지 않고 수행되는데, 이 방법은 제어된 재수화시, 제조된 소형 단층 소포의 융합/응집이 유도됨을 기본으로 한다[참조: Kirby Gregoriadis, 1984]. 이를 근거로, 적당량의 당의 존재에 의한 소형 단층 소포의 완전한 안정화는 초기 SUV의 재구성시 매우 낮은 포획율을 유도함을 예측할 수 있다.

예기치못하게도 이것은 당해 경우가 아닌 것으로 밝혀졌다. 모든 리포좀의 경우와 같이, 시약의 포획도는 어느 정도 시스템 내의 지질:시약 비율에 따라 좌우되지만, 본 발명의 방법을 사용하여 수득된 리포좀 내에 봉입된 시약의 양은 양호한 것으로 기대된다.

게다가, 리포좀의 물리적 및 화학적 안정성은 약물 전달 시스템으로서의 이들의 용도에 필요하다. 수성 분산액 상태의 리포좀은 봉입된 약물의 누출을 포함하여 저장하는 동안 가수분해 및 물리적 변화를 받기 쉽고, 응집 또는 융합으로 인해 소포 크기가 변한다. 본 발명의 방법으로 제조한 리포좀의 물리적 및 화학적 안정성은 양호한 것으로 기대된다.

따라서, 당해 방법은 위에서 개략적으로 기재한 바와 같이 약제학적 조성물의 제조에 특히 유용할 수 있는 포획율이 높은 소형 소포 또는 리포좀의 수득 가능성을 제공한다. 따라서, 당해 방법은 다수의 유형의 봉입된 물질을 제조하는 데 사용할 수 있다.

그러나, 이것은 약제학적 용도를 위한 소형 리포좀의 제조에 특히 적합하다. 이 경우, 당해 방법에 사용되는 시약은 약제 또는 약물과 같은 생물학적 활성 물질을 포함한다. 이러한 목적을 위해, 단계(i)에서 수득된 리포좀은 적합하게는 평균 크기가, 예를 들면, 25 내지 90nm, 바람직하게는 50 내지 90nm, 용이하게는 70 내지 90nm 범위인 소형 단층 소포이다. 본 발명의 방법에 의해 최종적으로 수득된 리포좀은 평균 크기가 500nm 미만, 일반적으로 100 내지 200nm로 여전히 작다.

단계(i)에서 사용되는 리포좀은, 예를 들면 위에 기재된 전통적 방법을 이용하여, 임의의 통상적인 방법으로 수득된 빈 리포좀이다. 목적을 달성하기에는 너무 큰 평균 크기를 갖는 제조된 임의의 리포좀은 예를 들면 당해 분야에 공지된 초음파 처리, 균질화, 압출 또는 미세유동화 기술을 사용하여 감소시킬 수 있다.

리포좀 제조에 사용되는 지질은 당해 분야에 공지되어 있다. 이들은 임의로 콜레스테롤의 존재하의, 예를 들면, 레시틴, 예를 들면, 포스파티딜콜린(PC), 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC), 디스테아로일 포스파티딜콜린(DSPC) 또는 하전된 지질, 특히 음이온성 지질, 예를 들면, 포스파티드산 또는 양이온성 지질, 예를 들면, 스테아릴아민을 포함한다. 보다 바람직한 지질은 DSPC이다. 지질의 선택은 활성 제제의 특성 및 리포좀의 목적하는 용도에 따라 어느 정도 달라진다.

단계(ii)에서 사용하는 데 적합한 당 용액은 단당류, 예를 들면, 글루코스 및 프락토스, 이당류, 예를 들면, 락토스 또는 수크로스 뿐만 아니라, 다당류의 수용액을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용하는 데 특히 바람직한 당은 이당류, 예를 들면, 수크로스 또는 락토스, 또는 단당류, 예를 들면, 글루코스이다. 특히 당은 수크로스이다.

적합하게는 단계(ii)에서 사용하는 당의 양은 당 대 지질의 질량비가 1:1 내지 6:1 w/w, 적합하게는 1:1 내지 5:1 w/w로 되도록 하는 양이다. 존재하는 당의 양이 많을수록 단계(i)에서 수득된 리포좀과 비교한 재수화 후 수득된 리포좀의 크기 증가가 더 작은 것으로 밝혀졌다. 그러나, 시약의 포획도는 더 낮을 수 있다. 따라서, 사용되는 비율의 정확한 선택은 해당 지질 함량에 대한 포획도와 리포좀 크기 간의 균형을 결정하는 요구되는 최종 용도에 따라 달라진다. 이로 인해 리포좀 형성에 나타나는 차이는 추가로 아래에서 논의하는 바와 같이 사용된 특정 시약에 따라 어느 정도 변한다. 적합하게는, 존재하는 당의 양은 조성물의 10%w/v 미만이다.

추가로, 당 용액의 농도를 감소시킴으로써 당해 방법에 사용되는 당 용액의 용적을 증가시키면 포획을 증가시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 당 용액의 적합한 농도는 20 내지 200mM, 바람직하게는 30 내지 150mM이다.

또한, 이후의 재수화가 승온, 예를 들면, 30 내지 80°C, 특히 40 내지 65°C, 특히 약 60°C에서 수행되는 경우, 포획율이 증가될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이는 일반적으로 실온에서 형성되는, PC 및 CHOL을 포함하는 리포솜의 경우에 효과적인 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 승온을 사용하는 경우 출발 리포솜에 비해 크기가 약간 증가할 수 있으므로, 특정 경우, 리포솜을 제조하는 데 사용되는 특정 조건을 선택할 때 이를 고려해야 한다.

포획에 영향을 미치는 것으로 밝혀진 다른 인자는 봉입되는 시약, 예를 들면, 약물의 특성, 특히 이의 용해도 및 존재하는 시약의 양을 포함한다. 시약의 용해도는, 특정 경우에, 단계(ii)에서 용해되어 리포솜 내에 포획될 수 있는 양을 제한할 수 있다. 시약의 포획량에 영향을 미치는 다른 인자는 시약과 리포솜을 형성하는 지질과의 상호작용 및 시약에 대한 리포솜의 투과성을 포함한다.

반응의 단계(ii)에서 사용되는 용액에 고농도의 시약이 존재하는 경우, 포획율(%)이 감소될 수 있다. 따라서, 경제적인 이유 때문에, 시약의 사용량을 감소시킬 때 이점이 있을 수 있다.

당:지질의 질량비를 포함하여 목적하는 크기와 포획량의 리포솜을 제공하는 조건의 선택, 지질의 선택, 사용되는 당 용액의 농도, 용액에 함유된 시약의 양 및 재수화 온도는 임의의 특정 시약에 대하여 통상의 방법을 사용하여 측정할 수 있다.

상기한 건조 단계(iii)는 통상적인 방법, 예를 들면, 동결 건조, 분무 건조, 플래쉬(flash) 결정화, 공기 스트림 건조(예: 유동상에서의 건조), 진공 건조, 오븐 건조 또는 당해 분야에 공지된 임의의 기타 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 비록 분무 건조방법의 생성물은 분리된, 종종 취입성인 분말이고 동결 건조는 고체 케이크(cake)를 생성하여 이들 두 가지 방법의 생성물의 기계적 특성이 상이할 수 있지만, 이들의 안정성 및 포획의 견지에서 재수화시의 리포솜의 특성은 광범위하게 유사하다.

약제학적 조성물의 제조를 포함한 다수의 용도의 경우, 분무 건조가 추가의 가공에 대한 생성물의 기계적 특성이 적합하기 때문에 바람직할 수 있다.

동결 건조방법의 생성물은 비교적 불량한 기계적 특성을 갖는 다공성 케이크 블록을 포함한다. 더 양호한 특성을 얻기 위해 케이크를 제트 분쇄(jet milling)할 수 있지만, 이 추가의 단계에서 손상이 발생할 수 있다.

분무 건조방법을 이용하여 흡입에 의해 전달되거나 물에서 재구성되거나 비경구 경로로 투여될 수 있는 양호한 기계적 특성을 갖는 건조 생성물을 얻을 수 있다.

이후의 재수화 단계는 제조 공정 동안 수행할 수 있거나, 또는 조성물을 무수 상태로 공급하여, 예를 들면, 봉입된 약제를 환자에게 투여하는 병원 또는 약국에서, 목적하는 사용 부위에 재수화시킬 수 있다.

수득된 리포솜은 안정성이 양호하여 제품의 수명이 길다. 이것은 예를 들면, 화장품, 세면용품(toiletry) 및 약제의 경우에 중요하다.

위에서 논의한 바와 같이, 당해 방법은 높은 포획량의 시약을 포함하는 비교적 소형의 리포솜을 제조하는 데 특히 적합하다. 이것은 약제학적 용도, 예를 들면, 중합체성 또는 단백질 약물, DNA 백신, 유전자 치료 벡터 또는 화학물질과 같은 물질의 전달에 특히 적합하다. 적합한 화학물질은 항생제, 예를 들면, 옥시테트라클린, β -락탐 항생제, 예를 들면, 페닐실린, 예를 들면, 페닐실린 G, 암피실린 또는 아목시실린 또는 세팔로스포린, 항암제, 호르몬, 면역치료제, 항바이러스제, 소염성 화합물 등을 포함한다.

위에 기재된 방법을 사용하여 수득한 리포솜 제품은 예를 들면, 이들을 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하여 약제학적 조성물로서 제형화할 수 있다. 제형은 경구, 비경구, 특히 정맥내 또는, 예를 들면, 피부 또는 점막 표면에 대한 국소 적용에 적합할 수 있다. 특히 유용한 본 발명의 조성물은 에어로졸 또는 흡입기로 적용하는 데 적합한 조성물이다. 이러한 목적을 위해, 예를 들면, DSPC와 콜레스테롤과의 혼합물로부터 제조된 것과 같은 높은 상 전이 중성 지질계 리포솜이 적합한 것으로 밝혀졌다. 본 발명에 따라 제조되는 경우, 건조 공정전에 압출 공정이 필요하지 않을 수 있다.

이제, 본 발명을 첨부된 도면을 참조하여 예를 들어 상세하게 기재한다:

도 1은 초음파처리로부터 수크로스 0.0357M의 존재하의 동결 건조 및 재수화까지 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC) 및 콜레스테롤(CHOL)의 리포솜의 크기 발전을 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 방법에서, FITC-알부민이 포획된 PC:CHOL 리포솜의 동결 건조 및 재수화 후에 수득된 크기 분포[분포율(%):강도]에 대한 수크로스의 물 농도의 영향을 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 방법에서, 표피 성장 인자(EGF)가 포획된 PC:CHOL 리포솜의 재수화 후의 크기 분포에 대한 수크로스 물 농도의 영향을 나타내는 그래프이다.

도 4는 압출된 FITC-알부민이 포획된 PC:CHOL 리포솜 및 재수화된 본 발명에 따라 제조된 FITC-알부민이 포획된 PC:CHOL 리포솜의 크기 분포를 비교한 그래프이다.

도 5는 압출된 카복시플루오레세인(CF)이 포획된 리포솜 및 동결 건조된 본 발명의 방법으로 수득된 카복시플루오레세인(CF)이 포획된 리포솜의 크기 분포를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 각종 리포솜 조성물의 크기 분포를 나타내는 그래프이다.

아래의 실시예에서, 난(egg) 포스파티딜콜린(PC), 디팔미토일 포스파티딜콜린(DPPC) 및 디스테아로일 포스파티딜콜린(DSPC)은 독일 루드빅샤펜 소재의 리포이드 게엠베하(Lipoid GmbH)에서 시판중이고, 콜레스테롤, 카복시플루오레세인(CF), 플루오레세인 이소티오시아네이트 표지된 알부민(FITC-알부민), 리보플라빈, 다우노루비신, 독소루비신, 트리톤(Triton) X-100, 수크로스, 글루코스 및 나트륨 도데실설페이트(SDS)는 런던 소재의 시그마(Sigma)에서 시판중이다. 표피 성장 인자(EGF)는 쿠바 하바나 소재의 더 센터 오브 바이오라지컬 사이언시즈(the Centre of Biological Sciences)에서 시판중이다. Na^{125}I , C^{14} -표지된 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린, C^{14} -표지된 페니실린은 아머삼 인터내셔널(Amersham International)(영국 아머삼 소재)에서 시판중이다. ^{125}I 로 표지된 EGF는 클로라민 T 방법에 따라 제조한다. 모든 기타 시약은 분석용 등급이다.

실시예 1

동결 건조방법

용질 함유 DRV 리포솜을 아래와 같이 제조한다: 각종 지질 혼합물, 특히 물 비 1:1의 PC:CHOL 및 DPPC:CHOL의 혼합물을 클로로포름에 용해시킨다. 37℃의 회전 증발기에서 용매를 증발시킨 후, 환저형 둥근 플라스크의 벽에 막이 형성된다. 지질 전이 온도($>T_c$)(특정의 경우에는 실온임)보다 높은 온도에서 2회 증류수를 사용하여 지질 막을 분산시킴으로써 다층 소포(MLV)를 형성시킨다. 현탁액을 적합하게 초음파처리하여 소형 단층 소포(SUV)를 제조하고 이를 원심분리하여 금속 입자를 제거한다.

이어서, SUV 현탁액을 바이알에 옮기고, 여기에 용액 중의 목적하는 양의 선택된 약물[FITC-알부민(1mg), CF(1mg), 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린(2mg) 또는 EGF(150 μg)] 뿐만 아니라, 0.0357M의 수크로스 및 목적하는 물 농도의 수크로스를 수득하도록 가해진 물을 첨가한다.

이어서, 조성물을 동결시키고 충분한 시간(최종 용적에 따름) 동안 동결 건조시킨다. 이어서, 증류수 100 μl 를 가하여 건조 케익을 T_c 보다 높은 온도(예를 들면, 60℃)에서 15분 동안 조절하에 재수화시킨다. 조성물을 PBS 중에 희석시켜 초원심분리에 의해 리포솜으로부터 유리 약물을 분리할 수 있는 비중을 갖게 한다.

재수화 후의 리포솜 크기는 25mw 헬륨/네온 레이저가 장착된 오토사이저(Autosizer) 2C-맬버튼(Malvern)[맬버튼 인스트루먼트(Malvern Instruments, 영국 소재)]을 사용하여 광자 상관 분광법(photon correlation spectroscopy)으로 측정한다. 평균 직경과 크기 분포를 수득한다.

평균 직경(Z), 누적 다분산 지수 및 시차 분포를 수크로스 물 농도의 함수로서 기록하고, 여기서 DRV를 이들의 크기에 따라 압출시킨다. 크기가 큰(6 μm 이하) 조성물의 경우, 마스터사이저(Mastersizer)(맬버튼)를 사용한다.

40,000×g에서 리포솜을 초원심분리한 후에 약물에 대한 포획율을 측정한다. 봉입된 물질의 양은 사용된 전체 CF, FITC-알부민, EGF 또는 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린에 대한 백분율로서 계산한다.

카복시플루오레세인 및 FITC-알부민의 총량 및 봉입량은 트리톤 또는 SDS로 용해시킨 펠렛(최종 농도 5%)으로부터, CF의 경우에는 $\lambda_{\text{방출}}=486\text{nm}$, $\lambda_{\text{여기}}=514\text{nm}$, FITC-알부민의 경우에는 $\lambda_{\text{방출}}=495\text{nm}$, $\lambda_{\text{여기}}=520\text{nm}$ 에서 형광 광도법으로 측정한다. 표지된 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린으로부터의 탄소 14 방출은 β 신틸레이션 계수기로 방사능 검정에 의해 측정한다.

결과는 표 1에 나타내었다.

[표 1]

포획된 물질	수크로스 물 농도	재수화 후의 크기 ± (SD) nm	포획율(%) ± (SD)
FITC-알부민 *	40mM	286.9 (29.2)	87.5 (0.5)
	65mM	265.4 (6)	70.2 (8.5)
	135mM	254.8 (6.5)	52.7 (2.3)
	수크로스를 포함하지 않음	5250 (25)	84.2 (2.7)
카복시- 플루오레세인 #	35.7mM	163.8 (25)	31.5 (0.1)
	71.4mM	124.9 (2)	30.75 (0.05)
	135mM	129.35 (1)	30.7 (0.05)
	수크로스를 포함하지 않음	6200 (40)	55.45 (0.05)
EGF# EGF ** EGF # EGF# EGF⊕ EGF⊕	35.7mM	144.8 (32)	33.5 (6.9)
	64.6mM	167.4 (6.8)	42 (1.5)
	126mM	146.4 (1.3)	29.6 (1)
	수크로스를 포함하지 않음	1276.7 (100.7)	22.3 (2.10)
	35.7mM	127.6 (2.8)	25.5 (0.2)
	수크로스를 포함하지 않음	2495.7 (329)	31.9 (0.85)
하이드록시프로필- β-사이클로덱스트린 #	40mm	133	26
	수크로스를 포함하지 않음	10,000	24.4
여기서 *는 32:32 μmoles PC:CHOL의 혼합물로부터 형성된 리포솜을 나타낸다; # = 16:16 μmoles PC:CHOL; ** = 64:64 μmoles PC:CHOL; 및 ⊕ = 16:16 μmoles DPPC:CHOL			

결과에 의하면, 수크로스에 의한 적절한 안정화도에서, 어느 정도의 융합을 허용하는 재구성은 매우 높은 포획율(%)을 유도할 수 있다(도 1).

비록 수크로스 40mM의 존재 또는 부재하에 유사한 FITC-알부민 봉입율(%)이 획득되지만(각각 87% 및 84%), 수크로스가 사용된 조성물의 경우에 최종 크기는 훨씬 더 작다.

비록 포획율이 물 농도의 증가에 따라 감소하지만, FITC-알부민 함유 리포솜의 상이한 조성물(표 1) 중의 수크로스의 물 농도를 변화시킴으로써, 상이한 크기 분포의 리포솜을 얻을 수 있다(도 2).

EGF 및 CF의 봉입을 상이한 물 농도의 수크로스의 존재하에 수행한다. 포획율(%)은 동량의 지질을 사용하되 수크로스의 부재하에 제조된 다른 조성물을 사용하여 획득한 포획율과 동일하다(표 1 참조). 이 경우, 수크로스의 물 농도는 포획율(%)에는 영향을 미치지 않지만 크기 및 크기 분포에 영향을 미친다(도 3).

수크로스의 존재 또는 부재하에 제조된 DRV 리포솜의 평균 직경(Z)을 표 1에 나타내었다. 결과에 의하면, 좁은 크기 분포 및 이에 따른 적절한 포획율(%)에 상응하는 높은 물 농도로 수크로스를 사용하는 경우에 소형의 소포 크기가 수득된다. 포획율(%)은 크기 및 크기 분포 폭에 비례한다.

수크로스의 상이한 두가지 물 농도에서, 본 발명자들은 분포 폭은 상이하고 두 개의 평균 직경은 거의 동일한 두 집단의 소포를 측정할 수 있다(도 3).

수크로스 농도 35.70mM 및 126mM에서 제조된 EFG를 포획한 리포솜의 경우, 재수화 후의 두 개의 평균 직경은 각각 $144.8 \pm 32\text{nm}$ 및 $146.4 \pm 1.3\text{nm}$ 이다.

크기 분포를 보면, 수크로스 126mM의 조성물의 경우에 크기 분포가 더 좁은 것으로 관찰된다. 높은 물 농도(36mM 이상)의 수크로스를 사용하여 리포솜의 크기를 감소시키고 크기 분포를 좁히더라도 낮은 포획율이 유도되는 것은 아니다. 수크로스의 두 가지 상이한 농도(35.7mM 및 135mM)를 사용하는 경우, 수크로스 135mM에서 제조된 리포솜과 비교하여 더 좁은 크기 분포(PDI=0.13)를 갖는, 동량의 CF(약 30%)를 포획한 리포솜이 제조될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

실시예 2

본 발명의 리포솜과 압출된 리포솜의 비교

소포 크기 감소를 유도하는 압출 방법을 본 발명의 방법과 비교하기 위해, 본 발명자들은 수크로스를 사용하지 않고 제조된 DRV 리포솜을 압출기를 사용하여 처리하였다. 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 리포솜을 압출 공정에 의해 수득된 리포솜과 비교하였다.

수크로스를 사용하지 않고 제조한 DRV 리포솜을 고압 여과기 홀더(holder)를 사용하여 압출시킨다. 리포솜을 공극 크기가 $1.2\mu\text{m}$, $0.4\mu\text{m}$, $0.2\mu\text{m}$ 및 $0.1\mu\text{m}$ 인 폴리카보네이트 멤브레인을 통해 통과시킨 후, 포획되지 않은 용질을 제거한다. 각각의 압출 단계에서, 동일한 멤브레인을 통해 5회 통과시킨다.

이어서, 유리 용질을 압출된 소포로부터 초원심분리에 의해 분리시킨다. 이 펠렛을 PBS(pH=7.4) 1mL에 현탁시킨다.

이어서, 리포솜의 크기를 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정한다. 크기 분포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 수득된 유사한 리포솜의 크기 분포와 비교한다. 결과는 도 4 및 5에 나타나 있다. 압출된 리포솜은 더 좁은 분포의 소포 크기를 갖는 것으로 밝혀졌다.

비교용 리포솜 내의 물질의 포획율을 압출 전 및 압출 후 모두 측정한다. 결과는 표 2에 나타내었다.

[표 2]

멤브레인 공극 크기(nm)	시약 물질	압출 전의 크기 $\pm$ (SD)	압출 후의 크기 $\pm$ (SD)	최종 포획율(%) $\pm$ (SD)
200	FITC-알부민	5250 (25)	210.75 (4)	29 (2)
200	CF	6300 (150)	213.9 (0.7)	6.3 (1)
100	CF	6220 (130)	158.7 (0.3)	6 (0.5)
400	EGF	2495 (329)	327.4 (12.68)	9.15 (0.35)
200	EGF	3128 (763)	220.7 (4.12)	6.35 (1.25)

평균 직경과 포획율을 표 2에 나타내었다. 이에 의하면, 압출된 리포솜의 경우, 낮은 포획율과 좁은 크기 분포(PDI $\leq$ 0.1)가 수득된다. 소형 리포솜을 제조하기 위해 추가의 단계(압출)가 필요하고 포획율이 낮기 때문에, 당해 방법의 실질적인 용도는 상당히 적다.

도 5는 CF를 포획한 압출된 리포솜(포획율 6%) 및 30%의 CF가 포획된 수크로스 135Mm의 존재하에 동결 건조된 리포솜의 크기 분포를 겹쳐 놓은 것이다.

압출에 의해 수득된 좁은 분포의 소포 크기는 상응하는 포획율(%)이 불량하기 때문에 중요하지는 않다.

실시예 3

본 발명의 리포솜의 크기 분포

높은 전이 온도를 갖는 인지질을 사용하여 크기 분포 폭과 관련하여 당해 기술을 개선시킬 수 있다. 이는 EGF를 포획한 등몰량의 DPPC:CHOL 리포솜을 수크로스 35.71mM의 존재하에 실시예 1에 기재된 바와 같이 제형화하는 경우 달성된다. EGF 포획율은 25%이다. 그러나, 리포솜은 상응하는 PC:CHOL 조성물의 경우보다 더 좁은 크기 분포(Z 평균=128nm)를 나타낸다. 결과는 표 6에 나타내었다. 따라서, 이 경우 높은 상 전이 온도를 갖는 지질을 선택하는 것이 좁은 크기 분포를 갖는 리포솜을 수득하기 위해 바람직한 것으로 보인다.

실시예 4

소형 리포솜으로의 리보플라민의 높은 포획율

등몰량의 포스파티딜콜린(390 μ mol) 및 콜레스테롤을 사용하여 초음파처리에 의해 소형 단층 소포(SUV)를 제조한다. 이어서, SUV를 리보플라민(12mg) 및 증가된 양의 수크로스(총 지질 mg당 0 내지 5mg)와 혼합한다. 혼합물을 분무 건조시킨 후, 재수화시킨다. 원심분리한 조성물의 현탁된 펠렛에서 약물 포획율을 측정한다. 최종 소포 조성물 중의 SUV의 크기를 광자 상관 분광법에 의해 또는 마스터사izer로 측정한다. 결과는 표 3에 나타내었다.

[표 3]

SUV z 평균 크기 (nm $\pm$ SD)	수크로스의 양/ 지질의 양	(사용한 약물의) 포획율(%)	소포 z 평균 크기 (nm $\pm$ SD)
78.1 $\pm$ 0.5	0	45.8%	4690
77.0 $\pm$ 0.4	1	47.5%	313.2 $\pm$ 1.5
67.0 $\pm$ 0.1	3	18.8%	155.4 $\pm$ 1.5
80.5 $\pm$ 0.9	5	11.0%	106.8 $\pm$ 1.5

약물 및 수크로스(1mg/지질mg)의 존재하에 소형 리포솜(SUV)을 분무 건조시키면 약물 사용량의 거의 절반(47.5%)을 포획하는 비교적 소형인 리포솜을 유도하는 것으로 보인다. 존재하는 수크로스의 양을 증가시킴으로써, 소포 크기가 더욱 감소하지만 포획율도 함께 감소한다.

실시예 5

글루코스를 함유하는 리포솜

실시예 1의 방법을 반복하되 활성 성분으로서 리보플라민을 용액(총 1mL) 중의 농도가 1mg이 되는 양으로 사용하고, 몇몇 경우, 수크로스 대신에 글루코스를 사용한다. 재수화시의 리포솜 크기를 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정한다. 방출 파장 480nm 및 여기 파장 520nm에서 형광 측광법으로 총 리보플라민 및 봉입된 리포솜을 측정함으로써 리보플라민 봉입 효율을 계산한다. 결과는 표 4 및 5에 나타내었다.

[표 4]

수크로스/지질 질량비	크기(nm)	글루코스/지질 질량비	크기(nm)
0/1	1243.4	0/1	5210
1/1	591.8	1/1	908
3/1	168.9	3/1	306.8
5/1	144.9	5/1	267

[표 5]

수크로스/지질 질량비	포획율(%)	글루코스/지질 질량비	포획율(%)
0/1	59.3	0	45.87
1/1	78.0	1	52.97
3/1	47.83	3	45.21
5/1	34.81	5	39.4

품질의 견지에서, SUV 리포솜에 수크로스 대신에 글루코스를 가하는 경우, 동일한 안정화 효과가 나타난다. 리보플라민의 포획율은 글루코스 또는 수크로스의 지질 대 당의 비 3g/g 및 5g/g에서 유사하다(표 5).

동량의 글루코스를 가하여 제조한 리포솜은 수크로스 존재하에 제조된 샘플에 비해 재수화시 소포 크기가 더 크다(표 4).

실시에 6

리포솜 형성에 대한 재수화 온도의 영향

실시에 1의 방법을 반복하되 활성 성분으로서 등몰량의 PC:CHOL 리포솜, 수크로스 용액(68.7mM) 및 5mg의 ¹⁴C 페니실린(Pen G)을 사용한다. 그러나, 이 경우, 다양한 온도에서 재수화를 수행한다. 특히, 일부 조성물은 실온에서 재수화시키는 반면, 다른 조성물은 60℃에서 15분 동안 가열한다.

제조된 리포솜을 40,000g에서 초원심분리한 후 포획 효율을 측정한다 다음, ¹⁴C 페니실린의 방사능을 상등액 및 펠렛 중의 총량(%)으로서 나타낸다. 결과는 표 6에 나타내었다.

[표 6]

EPC: CHOL	25℃에서 재수화			EPC: CHOL	60℃에서의 재수화		
수크로스 mol=68.7mM				수크로스 mol=68.7mM			
SUV 크기=68nm				SUV 크기=85.8nm			
Pen G	5mg			Pen G	5mg		
수크로스/ 지질	크기(nm)	포획율(%)	PDI	수크로스/ 지질	크기(nm)	포획율(%)	PDI
0/1	5605	38.5	-				
	4920	45.5	-				
AV	5262	42	-				
SD	342.5	3.5	-				
1g/g	95.7		0.38				

	69.7		0.38	1g/g	973		0.12
	95.7		0.38		926.4		1.0
AV	96	12.9	0.38	AV	949.7	34.4	0.56
SD	0.47		00	SD	23.3		0.44
1g/g	104		0.33				
	102.9		0.4	1g/g	1135		0.33
	101.5		0.43		1063.4		0.40
AV	102.8	14.1	0.39	AV	1099	40	0.36
SD	1.02		0.04	SD	35.8		0.03
3g/g	89.5		0.24				
	92.8		0.22	3g/g	232		0.31
	90.4		0.21		229		0.29
AV	90.9	6.2	0.22	AV	230.5	24.1	0.3
SD	1.39		0.01	SD	1.45		0.01
3g/g	93.7		0.2				
	88.8		0.43	3g/g	247.7		0.29
	84.5		0.53		244.6		0.27
AV	89	6.1	0.39	AV	246.15	23.6	0.28
SD	3.76		0.14	SD	1.55		0.01
5g/g	88.8		0.19				
	92.1		0.14	5g/g	271.6		0.30
	90.9		0.16		276.2		0.21
AV	90.6	6.3	0.16	AV	273.9	17.2	0.25
SD	1.36		0.02	SD	2.3		0.04
5g/g	89		0.16				
	88.7		0.12	5g/g	268.3		0.37
	86.9		0.15		266.3		0.27
AV	88.2	6.9	0.14	AV	267.3	17.9	0.32
SD	0.93		0.02	SD	1		0.05

표 6 뿐만 아니라 아래의 표에서, "AV"는 평균 리포솜 크기를 나타내고, "SD"는 표준 편차이고, "PDI"는 크기 분포 또는 다분산 지수를 나타낸다.

실온에서 재수화된 리포솜은 68nm(초음파처리된 SUV) 내지 단지 평균 90nm로 단지 약간의 크기 증가를 나타내지만, 평균 봉입율이 최초 첨가된 페니실린의 6.5%이다. 수크로스의 농도가 높을지라도, 어느 정도의 봉입율을 달성할 수 있다. 100nm의 소포는 봉입율이 14%이다.

재수화 단계 동안 유사한 조성물을 가열하면, 더 큰 소포가 형성된다. 평균 직경 230nm의 리포솜은 최초 첨가된 ^{14}C 페니실린의 24%를 봉입할 수 있다(수크로스 3g/지질g의 비). 당/지질 질량비를 3에서 5로 증가시켜 당의 양을 증가시키면, 더 낮은 봉입율(%)을 나타내는 약간 더 큰 소포가 형성된다.

실시예 7

다양한 수크로스 농도에서의 ^{14}C 페니실린의 봉입

활성 성분으로서 등몰량의 PC:CHOL 리포솜 및 ^{14}C 페니실린(5mg)을 사용하여 실시예 6의 방법을 반복하되, 높은 몰 농도의 수크로스 용액(68.78mM) 또는 더 희석된 수크로스 용액(35mM) 중 하나를 사용한다.

결과는 표 7에 위의 표 6에 나타난 25°C 재수화 결과와 나란히 나타내었다.

[표 7]

EPC:CHOL 25℃에서 재수화				EPC:CHOL 25℃에서 재수화			
수크로스 mol=68.7mM, SUV 크기 =68nm				수크로스 mol=35mM, SUV 크기 =83.5nm			
Pen G	5mg			Pen G	5mg		
수크로스/지질	크기 (nm)	포획율(%)	PDI	수크로스/지질	크기 (nm)	포획율(%)	PDI
0/1	5605	38.5	-				
	4920	45.5	-				
AV	5262.5	42	-				
SD	342.5	3.5	-				
1g/g	95.7		0.38				
	69.7		0.38	1g/g	211.6		0.3
	95.7		0.38		213.5		0.34
AV	96	12.9	0.38	AV	212.55	29.1	0.32
SD	0.47		00	SD	0.95		0.02
1g/g	104		0.33				
	102.9		0.4	1g/g	212.2		0.25
	101.5		0.43		215.3		0.27
AV	102.8	14.1	0.39	AV	213.75	31.8	0.26
SD	1.02		0.04	SD	1.55		0.01
3g/g	89.5		0.24				
	92.8		0.22	3g/g	200.8		0.06
	90.4		0.21		198.8		0.09
AV	90.9	6.2	0.22	AV	199.8	19.9	0.075
SD	1.39		0.01	SD	1		0.015
3g/g	93.7		0.2				
	88.8		0.43	3g/g	190		0.2
	84.5		0.53		192.3		0.16
AV	89	6.1	0.39	AV	191.15	19.0	0.18
SD	3.76		0.14	SD	1.15		0.02
5g/g	88.8		0.19				
	92.1		0.14	5g/g	198.7		0.04
	90.9		0.16		200		0.1
AV	90.6	6.3	0.16	AV	199.35	16.2	0.07
SD	1.36		0.02	SD	0.65		0.03
5g/g	89		0.16				
	88.7		0.12	5g/g	195.2		0.08
	86.9		0.15		196		0.06
AV	88.2	6.9	0.14	AV	195.6	14.8	0.07
SD	0.93		0.02	SD	0.4		0.01

낮은 몰 농도의 당 용액을 사용하여 제조한 리포솜은 약 200nm의 평균 크기를 나타내며, 이는 높은 몰 농도의 당 용액을 사용하여 제조한 리포솜보다 더 큰 것이다. 그러나, 포획율은 더 크고 다분산 지수는 더 작다.

따라서, 리포솜 제조 동안 수크로스의 몰 농도를 감소시키는 것은 포획율을 향상시키기 위해 재수화 단계 동안 높은 온도(실시예 6 참조)를 적용하는 방법에 대한 보다 적절한 대안인 것으로 보인다. 비록 유사한 봉입율(%)이 달성되더라도, 낮은 몰 농도의 수크로스를 사용하는 경우, 리포솜은 더 작은 크기를 유지한다.

실시예 8

DSPC 리포솜 제조

DSPC 및 등몰량의 콜레스테롤을 사용하여 실시예 6의 방법을 반복함으로써 리포솜을 제조한다. 이 시험에서는, 높은 수크로스 몰 농도(71mM) 및 페니실린(5mg)을 사용한다.

결과는 표 8에 나타내었다.

[표 8]

DSPC: CHOL	60℃에서 15분 동안 가열		
수크로스 몰 농도	71.16mM		
SUV 크기(nm)	77.2	PD1=0.27	
당/지질 질량비	크기(nm)	봉입율(%)	PD1
0/1	4645	50.35	—
	5005	51.43	—
AV	4825.0	50.9	—
SD	180.00	0.54	—
1	302		0.17
	282		0.34
	277.2		0.3
AV	287.1	41.9	0.3
SD	10.74		0.07
1	252.9		0.28
	241.3		0.25
	239.7		0.27
AV	244.6	37.7	0.27
SD	5.88		0.01
3	158		0.08
	152.3		0.18
	152.4		0.15
AV	154.2	18.8	0.14
SD	2.66		0.04
3	160.8		0.18
	158.8		0.14
	154.2		0.17
AV	157.9	19.3	0.16
SD	2.78		0.02
5	171.2		0.1
	166.9		0.14
	164.5		0.12
AV	167.5	13.9	0.12
SD	2.77		0.02
5	143.9		0.13
	142.4		0.11
	139.5		0.14
AV	141.9	15.3	0.13
SD	1.83		0.01

이들 결과에 의하면, 수크로스의 양을 증가시키면, ^{14}C 페니실린의 포획율이 감소하고 평균 직경도 감소한다. DSPC:CHOL 리포솜은 PC:CHOL 리포솜에 비해 더 높은 포획율과 더 작은 크기를 나타낸다. 이는 가열시 더 높은 안정성을 제공하는 DSPC의 높은 상 전이 온도(T_c) 때문일 수 있다.

실시예 9

독소루비신 봉입

독소루비신 함유 리포솜을 표 9에 기재된 시험 조건을 이용하여 제조한다.

[표 9]
시험 조건

독소루비신 (1.3mg/ml)				
각각 480nm 및 560nm의 여기 파장 및 방출 파장에서 독소루비신을 검정함				
<u>리포솜 조성</u>				
EPC:CHOL (총 38.2mg); 소포 크기 68.2nm 독소루비신 사용량 0.5mg				
수크로스 사용량(mg)	0	38	114	190
동결 건조 전의 용적(ml)	1.51	1.51	4.5	7.5
DSPC:CHOL (총 40mg); 소포 크기 59.7nm 독소루비신 사용량 0.5mg				
수크로스 사용량(mg)	0	40	120	200
동결 건조 전의 용적(ml)	1.58	1.58	4.73	7.9

재수화된 리포솜의 크기는 앞의 실시예에 기재된 바와 같이 측정한다. 위에 기재된 바와 같이 초원심분리 후 독소루비신에 대한 포획율을 측정한다. 방출 파장 490nm 및 여기 파장 560nm에서 형광 광도법으로 총 독소루비신 및 봉입된 독소루비신의 양을 측정한다. 결과는 표 10에 나타내었다.

[표 10]

	수크로스/지질 질량비	포획율	크기(nm)	PDI
	0/1	53	2276	0.99
EPC:CHOL	1/1	54.5	281.96	0.34
	3/1	47.1	133.5	0.15
	5/1	45.45	116.4	0.15
DSPC:CHOL	0/1	74	2373.8	1
	1/1	71.6	686.9	0.51
	3/1	67.95	179.53	0.28
	5/1	66.4	131.23	0.11

독소루비신이 성공적으로 소형 리포솜 내에 봉입된다. 지질 1g에 대하여 수크로스 5g을 사용하여 제조한 등몰량의 PC:CHOL 리포솜은 크기가 116nm이고 봉입 효율이 45%이다. 수크로스 대 지질 비율을 증가시키더라도 봉입율(%)에 실질적으로 영향을 미치지 않는다. PC를 DSPC로 대체하는 경우, 봉입율(%)이 더 높은 리포솜이 생성된다.

실시예 10

수크로스 농도를 증가시킨 효과

실시예 4의 방법을 반복하되 수크로스의 농도를 점차적으로 증가시킨다. 리보플라민 포획율 및 리포솜 크기와 함께 사용 농도를 표 11에 나타내었다.

[표 11]
리보플라민의 포획율에 대한 수크로스 농도의 효과

SUV	크기 (nm)	수크로스 (mM)	수크로스/지질 질량비(%w/v 당)	포획율 (%±SD)	크기 (nm ±SD)	PDI ±SD
PC, CHOL	57.0	0.0	0.0	43.7	5200	
		40.0	1.0	78.0	591.8	
			3.0	47.8	168.9	
		292.1	10.0 (10.0%)	6.1±0.8	113.4±3.4	0.12±0.0
			15.0 (10.0%)	4.1±0.3	116.3±0.4	0.14±0.0

이들 결과에 의하면, 높은 수크로스/지질 질량 비에서, 특히 수크로스 10%w/v를 넘는 경우, 리포솜 크기에 대한 안정화 효과가 양호할지라도 포획율은 낮다.

실시예 11

데속시프락토-세로토닌(DFS)의 봉입

아래의 표 12에 요약되어 있는 조건을 사용하여 DFS 함유 리포솜을 제조한다. 포획율 및 재수화 후의 크기를 포함한 결과도 표 12에 나타내었다.

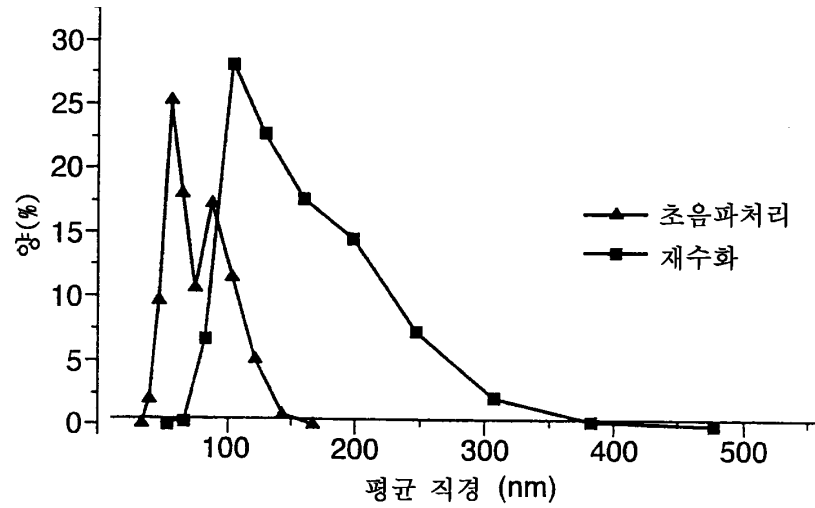
[표 12]

데속시프락토-세로토닌 (DFS) (투입량 2mg)				
실온에서 재수화				
수크로스 몰 농도 = 52mM				
지질 조성	수크로스/지질 질량비	포획율(%) (±SD)	크기(nm) (±SD)	PDI (±SD)
EPC:CHOL	0	92.73 (0.23)	1152.9 (60.6)	1 (0)
	1	36.9 (0.42)	121.1 (7)	0.29 (0.01)
	5	12 (2.7)	134.5 (24)	0.15 (0.07)

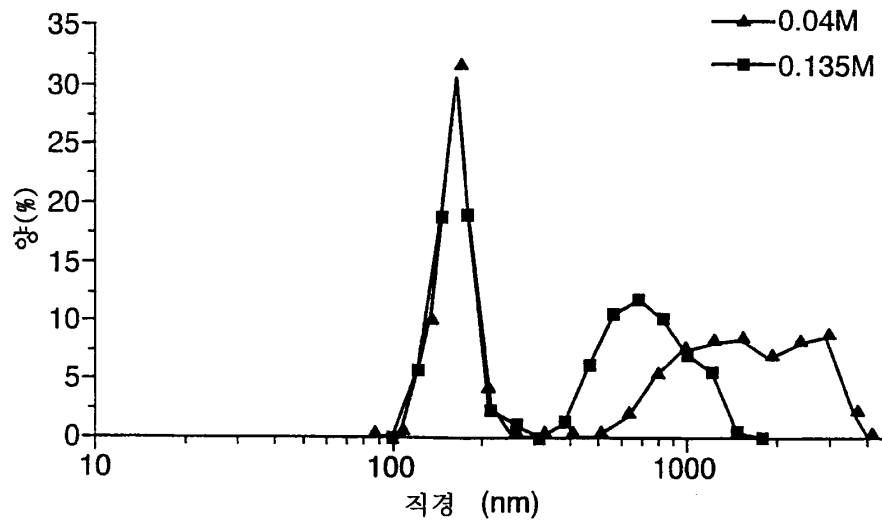
실시예 11에서, 양호한 수준의 포획율 뿐만 아니라 허용가능한 크기 안정화가 달성된다.

도면

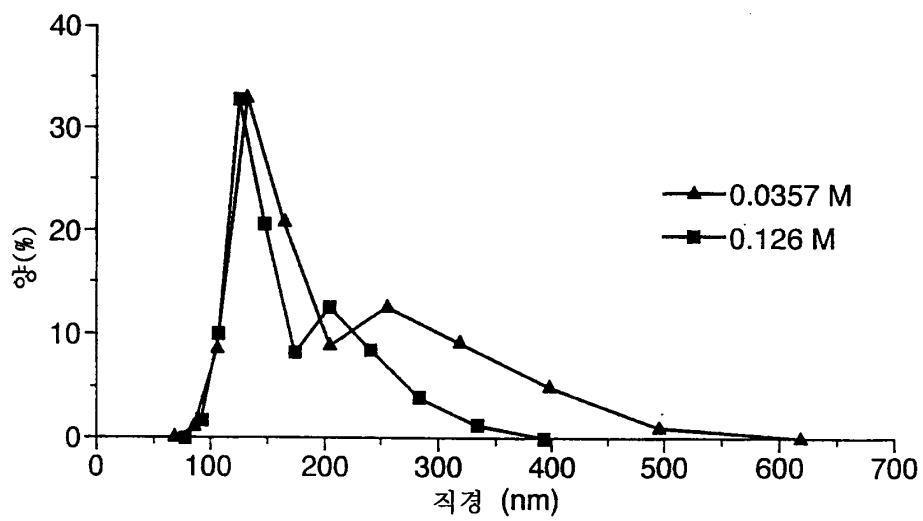
도면1



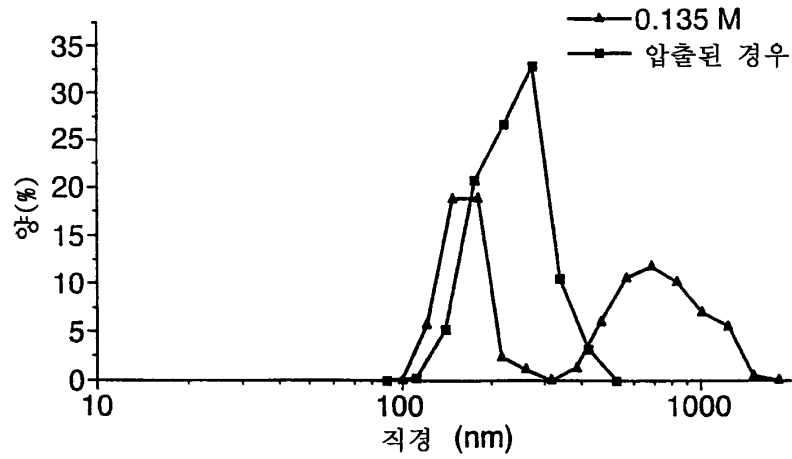
도면2



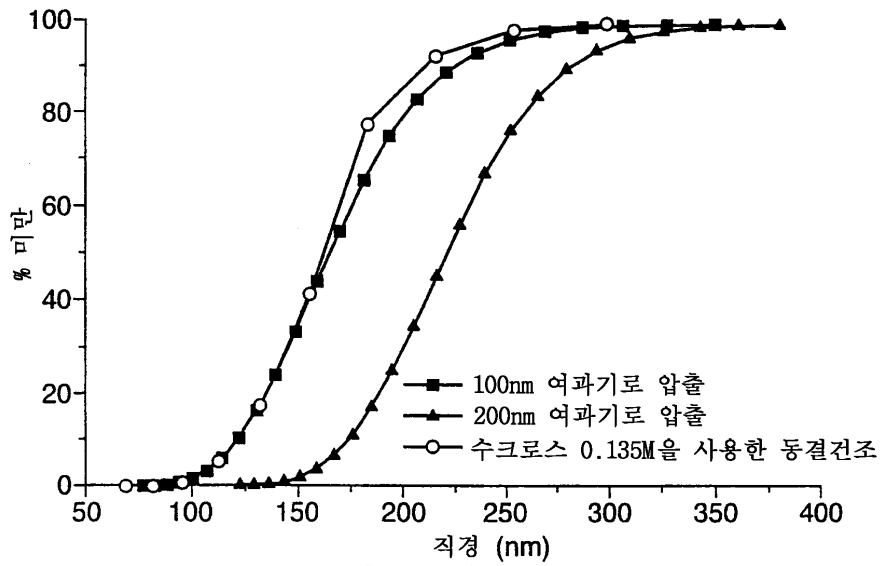
도면3



도면4



도면5



도면6

