(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 31/557
A61K 9/50

(45) 공고일자 1997년04월14일
(11) 공고번호 97-005171

(21) 출원번호	특1989-0700041	(65) 공개번호	특1989-0701093
(22) 출원일자	1989년01월11일	(43) 공개일자	1989년12월19일
(86) 국제출원번호	PCT/US 88/001714	(87) 국제공개번호	WO 88/09170
(86) 국제출원일자	1988년05월18일	(87) 국제공개일자	1988년12월01일

(30) 우선권주장 053,305 1987년05월22일 미국(US)

더 리포조옴 캄파니, 인코포레이티드 알렌 부룸
미합중국, 뉴저지 08540, 프린스턴, 프린스턴 포레스탈 센터, 리써치 웨이 1
(73) 특허권자
미합중국, 뉴저지 08540, 프린스턴, 프린스턴 포레스탈 센터, 리써치 웨이1
(72) 발명자 린크 로버트 피
미합중국, 뉴저지 08530, 램버트빌, 밀 로드, 알.디
톰쇼우 미첼 엠
미합중국, 펜실베니아 19054, 레빗타운, 버논 래인 10
수디스 로버트 엘
미합중국, 뉴저지 08691, 로빈스빌, 다르벨 드라이브 8
림샥 로버트 제이
(74) 대리인 강명구

심사관 : 신동인 (책자공보 제4939호)

(54) 아라키돈산 대사물질 관련 리포좀 제조방법 및 그 제제

요약

내용없음.

명세서

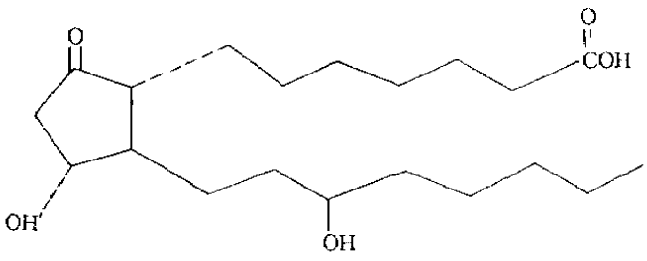
[발명의 명칭]

아라키돈산 대사물질 관련 리포좀 제조방법 및 그 제제

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 아라키돈산 대사물질 관련 리포좀(liposome) 제조방법 및 그 제제에 관한 것이다. 이러한 아라키돈산 대사물질에는 이들의 구조적인 유사체, 합성 효소억제제 및 아라키돈산 그 자체를 포함하기도 한다. 이러한 아라키돈산 대사물질의 한 부류는 프로스태그랜딘으로 알려진 생체 활성제의 그룹이다.

본 발명은 특히 프로스태그랜딘 E_1을 이용한 프로스태그랜딘 관련 리포좀에 관한 것이다. 프로스태그랜딘이란 용어에는 천연산 프로스태그랜딘과 구조적으로 관련된 합성 화합물도 포함하고 있다. 프로스태그랜딘은 거의 인간 조직과 체액에서 발견되는 물질인데 실질적으로 모든 생물학적인 기능을 포함하는 광범위한 효과를 나타내고 있다. 이들 물질은 탄소원자 수가 20인 필수지방산(아라키돈산으로서 가장 풍성한 선구물질임)으로부터 유도되며 생물학적으로 합성되어 다음과 같은 탄소원자수 20의 프로스태그랜딘 서브클래스 E_1과 같은 구조를 가진 것으로 된다.



I

기타 프로스태그랜딘 서브클래스는 시클로펜탄 고리에 잇는 치환기들에 따라 구별하여 문자로 지정

되어 있다. 이러한 서브클래스는 포르스태그랜딘 E와 Fa계열인데 서브클래스 A, B 및 C가 E의 유도체인 반면 이들은 가장 광범위하게 연구되고 있다. 프로스태그랜딘 A-F는 일차 프로스태그랜딘으로 고려되고 있고 프로스태그랜딘 G_2와 H_2(고리형 앤도퍼옥사이드류) 및 트롬복산 A2와 B2의 구조는 최근 확인된 바 있다. (Goodman et al., eds., The Pharmacological Basis of Therapeutics, MacMillan Publishing Co., New York, pp. 668-676). 본 발명에서 사용되는 기타 생체 홀성체로는 프로스타사이클린과 류우코트리앤이 있다.

프로스태그랜딘은 현관확장작용, 말초혈액 순환개선 및 지방 분해방지등과 같은 다양한 생리학적 작용을 가지고 있다. 프로스태그랜딘은 여러가지 조건에 치료학상 나타나 있는데 예를보면, 동맥 관확장, 유산과 분만유도시의 자궁수축자극, 기관지천식치료 및 동물의 위궤양 억제등이 여기에 포함되나 이에 한정하는 것은 아니다. 이들을 사용해서 동맥경화증을 예방하기도 한다.

리포좀은 내포된 수성체적을 가진 완전 밀폐된 지질 이중충막이다. 리포좀은 단일층 소포(vesicle : 단일막, 이중층을 가짐)이거나 다충소포(각층이 수성층으로 격리되어 있는 복수개의 막 이중층의 특징을 가지고 있는 양파 같은 구조)이다. 이중층은 소수성 꼬리부분(hydrophobic tail region)과 친수성 머리부분(hydrophibic head region)이 있는 두 가지 지질 단일층으로 되어 있다. 막 이중층의 구조는 지질 단일층의 소수성(비극성) 꼬리가 이중층의 중심족을 향해 있는 반면 친수성 머리는 수성상(aqueous phase)쪽을 향해 있다.

Banghanm 등의 최초의 리포좀 제조법(J.Mol. Biol., 1965. 12 : 238-252)은 유기용매 중에 인지질을 현탁시킨 다음 증발시켜 반응용기에 인지질 필름을 잔존시키는 것이다. 그 다음 적당량의 수성상을 첨가하고 혼합물을 팽윤시켜 여기서 얻은 다충소포(MLV : multilamellar vesicles)로 되어 있는 리포좀을 기계적인 수단으로 분산시킨다. 이 방법에서는 Papahadjpoulos 등(Biochim. Biophys, Acta., 1968, 135 : 624-638)에 의한 소형의 음파파쇄된 단일층 소포와 대형 단일층 소포 개발의 기초를 제공하고 있다.

단일층 소포는 Cullis 등의 방법〔PCT Application No. W086/00238(1986. 1. 16) : Extrusion Technique for Producing Unilamerllar Vesicles〕에 따라 압출장치에서 제조한다. 이 방법으로 제조한 소포는 LUVETS라고도 하는데 이것들을 막필터를 통해 가압하에 압출한다. 또한 200nm 필터를 통해 압출법으로 소포를 제조하기도 하는데, 이러한 소포는 VET200이라 한다.

리포좀을 제조하는데 이용되는 또다른 방법은 Papahadjopoulos의 역상증발법(REV Process : reverse phase evaporation process)이다 〔미국특허 제4,235,871호(1980. 11. 25)〕 이 방법에서는 캡슐화될 수성의 물질을 유기 용매 중에서 지질에다 가하여 유중 수적형(water-in-oil type)에 멀젼을 만들어 올리고라멜라지질 소포를 만든다. 유리용매를 제거하여 겔을 만든다. 이 겔을 수성매체중에 분산시켜 현탁액을 만든다. 또다른 방법은 세척제 투석법(Enoch et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., 76:145)이다. 이 방법에 있어서 지질을 수용액 중에서 데옥시콜레이트 같은 세척제와 혼합하여 음파파쇄하고 세척체를 겔 여고법으로 제거한다. 또다른 방법은 소형단일층 소포를 제조하는 Batzri 등의 에탄올 유입법(1973, Biochim, Biophys, Acta., 298:1015)인데, 이 방법에서는 지질의 에탄올 용액을 소용의 수성상중에 주입하여 직경이 약 30mn-dir 2㎛인 리포좀을 제조한다. 잔존하는 에탄올은 회전증발법으로 제거한다.

본 발명에서 사용되는 또다른 리포좀은 거의 동일한 라멜라 용질 분포를 가졌다는 특징이 있는 것들이다. 이러한 종류의 리포좀은 미국특허 제4,522,803호에서는 안정형 다충소포(SPLA : stable plurilamellar vesicles)라 하고 있고 미국특허 제4,558,579호에서는 단일상소포(monophasic vesicles)라 하고있으며 기타 소포를 최소한 일회의 동결-해동 사이클에 노출시켜서 되는 동결-해동 다충소포(frozen and thawed multilamellar vesicles : FATMLA)라 부르기도 한다. 이 방법에 관해서는 Bally 등의 자료〔PCT Publication No 87/00043, January 15, 1987, entitled Multiamellar Liposomes Having Improved Trapping Efficiencies〕에 나와 있다.

리포좀-약물 방출계에 있어서 약물 같은 생체 활성제를 리포좀속에 내포시키든지 리포좀에 가한 다음 환자에게 투여하여 치료한다.〔예를 들자면 미국특허 제3,993,754호, 미국특허 제4,145,410호, 미국특허 제4,235,871호, 미국특허 제4,114,179호, 미국특허 제4,522,803호, 미국특허 제4,588,578호가 있다〕

리포좀을 사용하여 약물을 투여할 경우 약물의 캡슐화와 치료도중 약물 방출과 관련하여 여러 가지 문제가 나타나고 잇다. 캡슐화의 경우에 있어서 내포효율을 크게하여 환자에게 지질부담을 극소화해 줄 필요가 항상 존재하고 있다. 더욱이 내포효율이 크다는 것은 캡슐화 공정도중 약물 소량만이 상실될 뿐 이어서 고가의 약물을 취급할 경우 중요한 장점이 있다는 것을 뜻한다. 약물방출의 경우에 있어서 여러 가지 약물이 캡슐화되고 나서는 리포좀으로 신속하게 방출되고 있음이 확인되었다. 이러한 신속방출에 의하여 리포좀 캡슐화에서 오는 유익한 효과가 없어직 되는 것이다. 따라서 이 분야에 전문가면 리포좀으로부터 약물의 방출속도를 줄일수 있는 방법을 찾고자 계속 노력을 기울이고 있는 것이다.

캡슐화와 방출에 관련해서 나타나는 이들 문제점 외에도 약물을 함유한 리포좀을 임상의에게 공급할 수 있는 상업적으로 허용되는 방법을 찾아내는 문제가 남아있다. 필요한 기준에 따라 리포좀을 제조하고 첨가하는 것이 실험적인 경우에서 허용되는 방법이라 하더라도 일반적으로 보아 임상의 경우에서는 만족스럽지 못하다. 따라서 캡슐화된 약물이 첨가되던 않던 간에 리포좀을 저정하여 종래의 유통계통을 따라 상당한 손상이 업이 이동시킬 수 있는 방법이 항상 필요한 것이다.

본 발명은 프로스태그랜딘의 격리 및 리포좀속으로의 함입을 크게 개선하면 리포좀에 함입된 프로스태그랜딘 제제의 안정성을 개선하는 캡슐화 법에 관한 것이다. 특히 비교적 염기성 pH인 수용액 중에서 우선 리포좀을 생성시킨 다음 pH를 조절하여 비교적 산성인 pH로 한다. 리포좀 외부용액을 산성화하면 프로스태그랜딘은 리포좀과 결합하게 된다. 이러한 결합은 리포좀막 속을 통한 분배에 의해 진행된다. 이러한 방법에 따라 프로스태그랜딘이 리포좀속에 50-100%나 함입된다. 따라서 함입처

리를 하는데 사용된 완충계를 격리향상 완충제라 한다.

생성된 리포좀을 크기를 축소시켜 균일한 크기분포가 되게 한다. pH 조절후 생성된 용액을 탈수 또는 동결 건조시켜 저장했다가 사용한다. 이러한 방법에서는 건조용 보호제를 가한 다음 건조방법으로 처리(탈수 또는 동결 건조)해서 재수화 후 리포좀 입자크기를 유지시킨다. 이러한 건조용 보호제가 없으면 수성현탁액 중에서의 경우 리포좀의 일체성을 유지하는 힘은 없어진다. 이러한 보호제는 수크리오스, 맥스트로오소, 말토오스, 만나오스, 갈락토오스, 라피노오스, 트레할로오스 또는 락토오스 같은 당류(糖類)이다. 만니톨을 어떠한 당류(糖類)와도 더불어 사용할 수 있다. 기타 알부민, 덱스트란, 폴리(비닐알코올) 같은 물질도 사용할 수 있다.

본 발명에서 저렴한 지질을 사용할 수 있으며 광범위한 지질 조성물에 있어서 함입효율이 약 50%정도 이거나 그 이상(바람직하게는 80-100%)인 것도 쉽게 얻을수 있다. 이러한 pH에 의한 습수법의 또 다른 독특한 장점은 리포좀에서 약물이 방출되는 속도가 감소되므로 수동적으로 함입된(pH기울기 없음)프로스태그랜딘이 있는 리포좀에 비해 그 안정성이 커진다. 이러한 함입된 생체활성제의 방출속도가 감소된 것을 제조시에 사용된 수용액(분배향상 완충계)의 pH차이에 따라 영향을 받는다. 따라서 분배향상 완충제 또는 완충계에 의하여 리포좀에서 프로스태그랜딘의 유지가 가능하다.

이와같이 본 발명에서는 아라키돈산 대사물질(프로스태그랜딘이 바람직한), 지질, 건조용 보호제 및 분배향상 완충제 또는 완충계로되어 있는 리포좀 조성물에 대하여 기술하고 있다. 프로스태그랜딘은 프로스태그랜딘 E1이 바람직하다. 리포좀에는 농도기울기와 같은 막투과 화학전위가 있는데 이것은 pH 기울기인 것이 바람직하다. 분배행상 완충계는 두 가지 용액으로 되어 있는데 그 첫 번째는 건조용 보호제의 용액, 즉 바람직하게는 당류(糖類)용액이고 그 두 번째는 시트르산 용액이다. 당류(糖類)용액은 덱스트로오스, 수크로오스 또는 말토오스가 바람직한데 이들중 어느것이나 만니톨과 혼용할 수 있다. 기타 사용 가능한 보호제는 덱스트란, 폴리(비닐알코올) 또는 알부민이 있다. 보호제 용액의 pH는 비교적 염기성인 것이 바람직한데, 약 3내지 11의 pH인 것이 좋고 가장 바람직한 pH는 약 7이다. 건조용 보호제용액, 바람직하게는 당류(糖類)용액은 약 5내지 20wt.%의 함량인데 가장 바람직한 것은 약 10내지 12%이다. 리포좀 용액을 압출이나 균질화법에 따라 크기를 축소한다. 제조된 용액을 탈수법 또는 동결 건조법으로 건조시킨다. 시트르산 용액의 pH는 약 2.5내지 4.5인 것이 바람직하고 보다 바람직한 것은 pH 3.0이다.

지질에는 인지질이 함유되는 것이 바람직하고 보다 바람직한 것은 포스파티딜콜린이 함유되는 것이고 가장 바람직한 것은 난(egg) 포스파티딜콜린이 함유된 것이다. 리포좀의 바람직한 직경은 100내지 500㎚이고 가장 바람직한 것은 약 200㎚이다. 리포좀속에 프로스태그랜딘을 함입시키는량은 약 50 내지 100%, 특히 약 60내지 100%이다. 리포좀 조성물을 환자의 정맥 내에 주사한다. 리포좀 프로스태그랜딘의 약제학적 조성물은 약제학적 담체나 부형제와의 혼합물로 만들어진다.

본 발명의 조성물에서의 지질 대 프로스태그랜딘의 중량비는 약 150:1 내지 약 1000:1인데, 보다 바람직한 것은 약 300:1 내지 800:1이고 가장 바람직한 것은 약 600:1이다.

본 발명의 리포좀 프로스태그랜딘을 동결건조하기도 한다. 본 발명의 리포좀은 막투과 pH 기울기에 의해 프로스태그랜딘과 지질을 결합하여 제조한다. 이러한 기울기는 우선 염기성 수성 매체 중에 리포좀을 생성시킨 후 프로스태그랜딘을 수성 현탁액에 가하고 리포좀의 외부(수성)매체를 산성화하여 얻는다. 염기성 외부매제는 당류(糖類)용액인 반면 산성화는 시트르산 용액 같은 산성용액을 사용하면 가능하다.

본 발명의 리포좀을 곧은 통로로 또는 굴곡 통로를 가진 필터를 통해 압출하거나 균질화함으로써 균일한 크기분포를 가지도록 할 수 있다. 이러한 크기축소 단계를 먼저 실시한 다음 프로스태그랜딘을 첨가하고 건조 및 막투과 pH 기울기 형성 등의 단계를 거치게 한다.

또한 본 발명의 리포좀은 프로스태그랜딘을 함유하는 건조용 보호제의 수용액과 지질을 혼합하는 수동적인 첨가방식으로 제조한다. 이러한 크기축소 단계를 먼저 실시한 다음 프로스태그랜딘을 첨가하고 건조 및 막투과 pH 기울기 형성 등의 단계를 거치게 한다.

또한 본 발명의 리포좀은 프로스태그랜딘을 함유하는 건조용 보호제의 수용액과 지질을 혼합하는 수동적인 첨가방식으로 제조한다. 이러한 지질은 건조된 지질 필름 형태이다. 이러한 수동적으로 첨가된 리포좀 역시 동결 건조시킨다.

본 발명의 리포좀은 리포좀과 결합된 아라키돈산 대사물질 특히 프로스태그랜딘을 제공한다. 이러한 결합 방법으로는 리포좀속에 프로스태그랜딘을 함입시키는 것과 리포좀의 내부 또는 외부막 표면과 프로스태그랜딘을 결합시키는 것을 포함한다.

위에 나온 바와 같이 본 발명의 리포좀을 공지의 리포좀 제조방법에 따라 제조하지만 이온화성 항종양제에 대한 Bally 등의 방법〔PCT application No. 86/01102(1986. 2. 27)〕에 따라 생체활성제를 첨가하는 것이 바람직하다.

이 방법에 의하여 막투과 농도 기울기를 리포좀의 막 전체에 대해 생성시켜 약물을 이 기울기에 따라 리포좀속에 함유시키는 방법으로 리포좀에 이온화성 생체 활성제를 첨가할 수 있다. 막투과 농도(이온) 기울기는 리포좀막에 대하여 한가지 이상의 하전된 종(species) (예 : Na^+, Cl^-, K^+, Li^+, H^+)에 대해 농도기울기를 생성시켜주므로서 발생시키게 된다. 바람직한 것은 이들 이온기울기는 pH(H^+)기울기이다. 이들 pH기울기에 따라 리포좀막에 대해 이온화성 생체 활성제(프로스태그랜딘같은 약물)의 흡수를 촉진시킬 수 있다.

본 발명에 따라 1차 수성매체(비교적 산성 또는 염기성)를 캡슐화하는 리포좀을 제조한다. PGE_1의 경우에 있어서 확인된 사실은 1차 수성매체가 비교적 염기성(2차 수성매체에 대하여)인 캡슐화에 의해 함입율이 최고로 된다는 점이다.

농도 기울기를 나타내게 하자면 1차 외부 매체를 조절(외부 pH조절에 의함)하거나 2차 외부 매체를 가한다.(예컨데 이것은 최초의 외부매체에 대하여 비교적 염기성 또는 산성인 것을 가함). PGE_1 함입의 경우에 있어서 1차 외부매체에 대하여 산성인 2차 외부매체를 첨가하는 것이 바람직하다. 1차 외부매체 또는 2차 외부매체 중에 이온화성 프로스태그랜딘 같은 이온화성 생체 활성제가 함유되면 막투과 pH(H^+)기울기(외부에 대하여 염기성인 내부)에 따라 리포좀속으로 약물을 분배해 넣음으로써 유리 소포 결합 생체 활성제 비유은(H^+)in(H^+)out 비를 나타내게 된다. 이온 기울기는 참가가 끝난 후에도 리포좀속에 그대로 잔존하게 된다.

막투과 pH 기울기 첨가법을 적당한 수성매체 중에 용해할 경우 이온화 상태로 존재할 수 있는 프로스태그랜딘에 대해 사용할 수 있다. 프로스태그랜딘의 경우 이러한 이온화성 그룹은 지방산 연쇄에 있는 카르복실그룹이다(앞서 나온 구조식(I)참조) 바람직하게는 프로스태그랜딘 역시 비교적 친유성이기 때문에 리포좀막 속으로 침투해 들어간다. 이러한 방법에 따라 리포좀속에 첨가되어 본 발명에서 사용될 수 있는 몇 가지 프로스태그랜딘의 예로서는 PGE_1, PGE_2, PGG 및 PGF등이 있다.

리포좀속에 단일의 프로스태그그랜딘을 가하는 외에 pH기울기 첨가법을 사용하여 동시 또는 순차적으로 여러 가지 프로스태그랜딘을 첨가할 수 있다.

일반적으로 본 발명에서 언급된 리포좀 제조방법을 사용하여 본 발명을 실시 할 수 있으나 단일층 소포를 형성하는 방법이 바람직하고 가장 바람직한 것은 대형 단일층 소포를 형성하는 것이다.

이들 단일층 소포 제조방법중 두 가지가 바람직하다. 그 첫 번째 방법은 위에 나온 Bally 등의 방법에 따라 막투과 농도기울기를 사용하여 생체 활성제를 처마하는 Batzri 등의 방법(1973, Biochim. et Biophus. Acta., 298:1015)과 유사한 방법으로 에탄올 중에서 지질과 생체 활성제(약물, 특히 프로스태그랜딘)를 결합시키는 것이다. 이 방법에 있어서 에탄올과 같은 수성혼화성 유기 용매 중에서 총수성체적의 5% 수준으로 지질과 프로스태그랜딘을 같이 용해시킨 다음 1차 수용액은 건조용 보호제 또는 시트르산염이나 인산염 같은 완충제의 수용액이다. 이러한 완충용액은 추가로 건조용 보호제를 함유할 수있다. 건조용 보호제는 스크로오스, 말토오스, 락토오스 또는 덱스트로오스와 같은 당류(糖類)와 만니톨과의 조합물을 함유한다. 기타 당류(糖類)로는 만나오스, 갈락토오스, 라피노오스 또는 트레할로오스 등이 있다. 또한 텍스트란, 알부민 및 롤리(비닐알코올) 같은 기타 보호제도 사용된다. 이러한 첫 번째 수용액의 pH는 비교적 염기성(2차 수용액의 pH에 비해)인데 즉 3.0 내지 약 11.0이고 가장 바람직한 것은 약 7.0이다. 다시 말하자면 2차 수용액에 비하여 1차 수요액이 훨씬 염기성이다. 이러한 완충액은 (2차 수용액의 pH에 비해) 비교적 염기성이다.

생성된 단일상의 리포좀 용액을 기공크기로 0.2 마이크론인 필터를 통한 압출법으로 균일 상태 군체로 크기 축소를 한다. 이러한 군체는 Culis 등의 방법[PCT Publication No. 86/00238(1986. 1. 16)]에 따라 생성시킨다. 이포좀을 가압하에 필터 속을 통과시키는 이러한 압출법에 의하여 크기에 대해 균일한 리포좀 군체를 얻게 된다. 곧은 통로막 필터(예 : 크기가 0.2㎛인 Nucleopore mdmbrafil filter(혼합 셀룰로오스 필터)를 수차 통과시켜 압출시킨다. 리포좀을 필터 속으로 1회이상 통과시키면 필요로 하는 통과회수는 필요로 하는 리포좀의 크기 바람직하게는 약 0.2㎛가 되게 하는데 필요로 하는 회수로 결정된다.

본 발명에 사용된 필터크기를 최종 리포좀 생성물의 소요의 크기에 따라 선택한다. 본 발명에 있어서 평균 직경이 약 0.2㎛인 리포좀이 바람직하다.

본 발명의 리포좀은 직경의 약 500nm이하인 것이 바람직한데 직경이 100nm 내지 300nm인 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서 약 200nm 정도인 리포좀이 좋은데, 그 이유는 이 정도의 크기를 가진 리포좀은 폐의 모세관 배드(bed)를 통과할 수 있어서 기타 기관과 조직 속으로 통과할 수 있기 때문이다. 따라서 기공크기가 약 0.20nm인 필터를 택하여 압출단게에 사용한다.

위에서 나온 바와 같이 리포좀을 크기축소해서 균일한 크기 분포로 하는 다른 방법은 초음파 노출법, 프렌치 스레스법(French Press Technique), 유체역학적, 전단법, 콜로이드 밀이나 aulin 균질기를 이용하는 균질화법 또는 기타 크기축소법 등이 있다. 예를 들자면 Gaulin 균질화 법을 사용할 경우 리포좀을 계속해서 저장조로부터 균질기속으로 2L/min의 유속으로 순환시켜 주는데 1ℓ 배치(batch)에 대해 리포좀을 약 14,000psi에서 4분간 순환시킨다. 열 교환기를 사용하여 배치온도를 약 30℃ 이하로 유지한다.

제조된 크기가 축소된 리포좀은 크기가 균일하다. 예를 들자면 리포좀은 가우스분포(Gaussian distribution)의 범위가 약 20-약 500nm이고 그 평균 분포는 약 200nm이다.

제조된 크기가 축소된 생성물을 수용액을 추가하여 희석하고 건조시킨 다음 저장했다가 사용하거나 또는 막투과 pH를 변화시켜 약물을 첨가한다. 그러나 크기 축소법을 먼저 실시한 다음 마지막으로 pH 조절을 한다.

본 발명의 리포좀 제조에 있어서 두 번째로 보다 바람직한 방법은 위에 나온바 있는 Batzri 등의 에탄올 주입법을 이용하여 에탄올 중에서 총수성 체적의 5% 수준에서 질과 보존제, 예컨데 부틸화히드록시톨루엔(BHT)을 우선 혼합한 다음 이 혼합물을 서서히 1차 수성매체에 가하는 것이다.

이러한 1차 수성매체는 위에 나온 것이면 어느 것이나 좋으나 말토오스 같은 당류(糖類) 용액이 바람직하다. 이러한 1차 수용액의 pH는 2차 수용액에 대하여 염기성이며 pH 3.0내지 약 11.0이 바람직하고 가장 바람직한 pH는 약 7.0이다. 이 방법에 따라 균질 군체가 되게 크기 축소를 하지만 Gaulin 균일화법이 바람직하다. 지경이 약 20 내지 500nm인 리포좀 보다 바람직하게는 약 300nm 내지 500nm, 바람직하게는 평균 크기가 200nm인 리포좀을 얻는다.

제조된 크기가 축소된 리포좀은 0.2㎛ 필터(Millipak filter ; Millipor, Inc., Bedford, MA)를 통과시켜 여과하여 무균상태로 한다. 제조된 크기가 축소되고 여과된 리포좀을 에탄올에 용해된 생체

활성제와 혼합한다. 예를 들자면 에탄올에 용해된 프로스태그랜딘을 리포좀의 교반 용액에다 가하는 것이다. 이어서 프로스태그랜딘-리포좀 생성물을 0.2㎛ 필터를 통해 여과하여 무균상태로 한다. 이 생성물을 수용액을 추가하여 희석하고/또는 건주(탈수)시킨 뒤 저장했다가 사용한다. 바람직한 실시태양에 있어서 크기가 축소된 생성물을 바이알속에 채우고 동결 건조시킨 뒤 보관했다가 사용한다.

사용하기 직전 동결 건조된 생성물을 1차 수성 매체에 대해 비교적 산성 또는 염기성인 pH를 가진 수액으로 재생시킨다. 두 번째 수성매체는 산성인 것이 바람직하다. 이 수성매체를 첨가하면 pH 기울기가 생긴다.

리포좀 제조방법과는 관계없이 막투과 pH 기울기를 형성시키자면 1차 외부 매체에 대하여 비교적 산성인 pH를 가진 2차 pH(2차 외부 매체)의 수용액을 함유한 외부 매체를 리포좀 용액에다 가한다. 이 2차 수용액의 pH는 약 2.5 내지 약 4.5이고 바람직한 것은 약 3.0 내지 3.5이며, 가장 바람직한 것은약 pH 3.0이다. 2차 수용액을 가하여 2차 외부매체를 조절하면 리포좀 용액의 pH는 약 3.0 내지 약 4.5가 되고 바람직한 pH는 약 3.0이다. 또한 1차 수용액이 비교적 산성인 경우에는 2차 수용액은 비교적 염기성이다.

외부매체의 pH를 조절하여 주면 생체 활성제(프로스태그랜딘)가 리포좀막을 통해 속으로 들어가서 효과적으로 프로스태그랜딘을 리포좀속에 첨가하게 된다. 위에 나온 pH 기울기에 따라 본 발명의 분배향상 완충쌍을 이용하면 프로스태그랜딘의 함입효율이 약 50 내지 약 100%가 되는데 특히 60 내지 100%가 되며 가장 바람직하게는 80 내지 100%가 된다.

어떠한 이론에 구애되지 않고서도 막을수 있는 것은 제제중의 건조용 보호제의 역할은 건조공정과 재수화후에 있어서 리포좀의 함입 효율은 낮아지고(약 30% 이하) 동결 건조후의 리포좀 크기를 유지할 수 없게 된다.

pH 기울기를 설정하기전이나 설정한 후에 탈수나 동결건조를 실시한다. 바람직한 것는 1차 수성 매체가 비교적 염기성인 것이고 2차 수성 매체가 비교적 산성인 것이다. 이 경우에 있어서 2차(비교적 산성인) 용액을 사용하여 건조된 리포좀-프로스태그랜딘 제제를 재 수화시키는 반면 농도 기울기가 설정되면 프로스태그랜딘이 효과적으로 리포좀속으로 첨가해 들어간다. 탈수나 동결건조 전에 산성화하면 2차 용액 중에는 건조용 보호제와 BHT 같은 보존제 및/또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 함유하기도 한다. 2차 수용액(산성화 용액)의 pH는 약 1.5 내지 약 3.5인데 약 3.0 정도가 바람직하다. 그러나 탈수나 동결 건조후에 산성화할 경우에는 수용액의 pH를 약 2.5 내지 약 4.5 바람직하게는 약 3.0으로 하여 건조용 보호제를 사용하지 않고 재수화시킨다. 이 후자의 방법 즉 건조 단계후의 용액의 산성화가 바람직하다.

이들 두가지 리포좀 제조방법들에 있어서 생선된 프로스태그랜딘 결합 리포좀을 공지 방법으로 탈수하거나 동결 건조한다. 이러한 건조법에서 필요로 하는 것은 건조용 보호제를 리포좀 현탁액에다 첨가하는 것이다. 이러한 건조용 보호제를 사용하면 리포좀내에 있는 지질의 전위가 방지되므로 건조도중과 재수화시에 크기와 내용물을 유지하게 된다. 이러한 건조용 보호제의 적절한 질은 이들이 강력한 수소결합 수용제이어야 하고 리포좀 이중층 성분의 분자내 간격을 유지하는 입체화학적인 특징을 가지고 있어야 한다는 것이다. 확인된 것은 건조용 보존제의 한가지인 당류(糖類)(설탕)을 리포좀 제제 등에 함유시킬 경우 재수화 후 리포좀의 입자ㅡ기를 특히 유용하게 유지할 수 있다는 점이다. 예컨데 이러한 특수한 무리의 당류(糖類)로는 덱스트로오스, 수크로오스 및 말토오스가 있는데 이들의 사용량은 수성사이에 대해 약 5 내지 약 200wt.%, 바람직하게는 약 10wt.%이다. 사용 가능한 기타 당류(糖類)는 만노오스, 갈락토오스, 라피노오스, 트레할로오스, 락토오스 또는 트리오소 등의 설탕이다. 만니톨을 위해 나온 당류(糖類)중 하나와 더불어 사용할 수 있으나 놀라운 것은 단독으로 사용하면 만니톨을 당류(糖類)와 더불어 0.2% 농도, 바람직하게는 1% 농도로 사용한다. 당류(糖類)의 총 사용농도 범위는 약 5% 내지 약 20% 바람직하게는 10 내지 12%가장 바람직하게는 약 10%이다. BHT나 EDTA 같은 보존제를 제제에 사용할 경우 에탄올 1μ1당 BHT 0.02㎎이고 덱스트로오스 10%중 EDTA 0.01%이다. 기타 우레아, 알부민, 덱스트란 또는 폴리(비닐알코올) 같은 물질도 사용할 수 있다.

탈수되거나 동결 건조된 생성물을 제수화할 때 증류수 같은 수용액(만일 pH 기울기를 설정한 후 동결 건조한 경우)을 첨가한다. 리포좀을 원래의 외부 수용액 중에서 동결 건조시킬 경우 다음에 나오는 pH 기울기를 설정하는 2차 수용액을 사용하여 재수화시킨다. 바람직한 방법에 있어서 비교적 산성인 수용액은 바람직하게는 시트르산용액을 제제에다 가하여 pH 기울기를 설정한다. 모든 경우에 있어서 약 20℃ 내지 30℃, 바람직하게는 25℃에서 재생시키면 용액을 필요에 따라 희석하여 투여한다.

본 발명에 있어서 지질이란 용어는 수성매체와 더불어 혼합하여 이중층을 형성하므로서 지질물질의 소수성 부분은 이중층쪽을 향하여 하는 반면 친수성 부분은 수성상쪽을 향하게 하는 적당한 물질을 뜻한다. 지질에 속하는 것으로는 고급 소수성 화합물(예 : 트리글리세리드), 스테롤(예 : 콜레스테롤) 및 양성지질이 있다. 본 발명의 리포좀 제제용으로 바람직한 지질은 인지질, 즉 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 포스파티딜세린(PS), 포스파티딜글리세롤(PG), 포스파티드산(PA), 포스타틸딜이노시롤(PI), 스핑고미엘린(SPM) 등 단 또는 조합물이다. 인지질은 합성한 것이던지 계란이나 대두 같은 천연물에서 유도된 것이든 어느것이라도 좋다. 바람직한 실시태양에 있어서 인지질 난 포스파티딜콜린(EPC : egg phosphatidylcholine)을 사용한다. 리포좀중에는 코프로스판올, 콜레스탄올 또는 콜레스탄 등과 같은 기타 스테로이드 서운과 EPC와 콜레스테롤과의 조합물을 함유하기도 한다. 또한 리포좀중에는 글리코리피드를 함유할 수도 있다.

1차 외부 매체가 염기성인 pH 기울기를 통해 리포좀을 충전시키는 경우에 있어서 적당한 수성 매체로는 완충제를 포함하는데 예컨데 pH 3.0 내지 약 11.0 바람직하게는 약 pH 7.0으로 조절된 시트르산, 숙신산 또는 말레산 등의 완충액이 있다. 사용된 1차 완충액이 염기성인 경우에 있어서 인산염 완충액 또는 0.9% 수성의 염화나트륨 등과 같은 완충액을 pH 7 내지 9에서 사용된다. 또한 탄산나트륨이나 탄산수소나트륨 같은 완충액을 사용할 수 있다. 기타 완충된 식염을 약 pH 8.0에서 이 혼합

물중에 함유시킨다. 이러한 완충된 식염수에 속하는 것으로는 PBS([Phosphate buffered saline) ; 트리스-(히드록시메틸)-아미노메탄염산염(tris) 완충액 또는 N-2-히드록시에틸피페라진-N'2-에탄순폰산(HEPES)또는 글리신이 있다. 가장 바람직한 것은 1차 수용액이 건조용 보호제의 용액, 즉 예컨데 말토오스 약 5 내지 20%(바람직하게는 약 10%)로된 pH dir 7.0 당류(糖類)용액이다. 이 용액 중에는 약제학적 생성물에 대해 허용되는 어떠한 농도(바람직하게는 약 0.01% EDTA)의 유사한 보존제(BHT) 나 EDTA를 함유하기도 한다.

pH 기울기를 설정하기 위해 2차 외부매체를 가하든지(바람직하게는 탈수단계후에) 1차 매체의 pH를 산성 pH로 조절한다. 1차 외부 매체와 대체되는 2차 외무 매체에는 약 pH 2.5 내지 4.5, 가장 바람직하게는 약 pH 3.0의 시트르산, 락트산 또는 인산 등과 같은 완충제를 함유한다. 0.1N 염산으로 적당한 pH로 조절된 식염수(0.9%)도 사용된다. 가장 바람직한 것은 거의 동일 체적의 시트르산용액(pH dir 2.5 내지 약 4.5, 바람직하게는 3.0)을 리포좀 용액에다 가하여 외부매체의 pH를 조절하는 것이다. 어느 경우에 있어서나 외부 리포좀 용액의 최종 pH는 약 2.5 내지 약 4.5인데 3.0-3.5가 바람직하고 가장 바람직한 pH는 3.0이다. 이 시트르산 용액중에는 건조용 보호제 5 내지 20wt.% 당류(糖類), 바람직하게는 말토오스 10wt.%와 보존제(예-BHT 및 / 또는 EDTA)를 약제학적 생성물에 대하여 허용되는 농도(바람직하게는 0.01% EDTA와 0.02㎎ BHT/최종액 ㎖)로 함유하기도 한다.

비교적 산성인 1차 외부매체인 경우에 있어서 pH 약 5 내지 6인 시트르산 인산염 완충액 또는 HCl로 pH 약 3.0되게 조절된 0.0% 염화나트륨 수용액 또는 위에 나온 기타 산성용액을 사용한다. 이 경우에 있어서 농도기울기를 설정하는데 사용된 비교적 염기성인 매체는 약 pH 8.0의 인산염 완충액, 수산화나트륨으로 약 pH 7 내지 10으로 조절된 0.9% 염화나트륨, 탄산나트륨 완충액, 탄산수소나트륨 완충액 또는 위에나온 염기성 용액중 어느 것이라도 좋다.

가장 바람직한 것은 pH 7 내지 8정도, 가장 바람직하게는 약 pH 7.0 정도의 초기 염기성매체 바람직하게는 염기성 당류(糖類) 요액을 가진 리포좀을 제조하는 것이다. 농도 기울기는 pH 약 2.5 내지 4.2인 2차의(비교적 산성인) 완충액, 바람직하게는 0.01M 시트르산을 첨가하여 설정하는데 이 완충액을 1차의(비교적 염기성인) 외부 매체에다 첨가할 경우 최종 pH가 약 3.0정도 된다. 이러한 비교적 염기성/비교적 산성인 용액쌍(완충액쌍)에 의하여 프로스태그랜딘이 리포좀속으로 크게 분배해 들어가게 된다. 농도 기울기를 탈수나 동결 건조전후에 설정되지만 위에서 언급한 바와 같이 이러한 탈수 또는 동결 건조단계를 우선적으로 실시한 다음 산성화하는 것이 바람직하다.

본 발명에 있어서 증류수, 수성완충액 또는 건조용 보호제, 예컨대 텍스트로오스 또는 말토오스용액 같은 당류(糖類)용액을 함유하는 수용액을 사용하고 수동적 방법(pH 기울기 없음)에 따라 리포좀을 충전시킨다. 이들 방법에 속하는 것으로는 다층 소포(MLV), 안정형 복층 소포(SPLV), 압출법으로 만든 대형 단일층 소포(LUVETS) 또는 기타 공지의 리포좀 제조방법등이 있다. SPLV 제조방법은 미국특허 제4,522,803호(1985. 6. 11)에 나와 있고 LUVET 제조 방법은 PCT출원 제86/00238(Cullis 등 1986. 1. 16.)에 나와 있다. 이 경우에 있어서 농도 기울기를 이용하지 않고 리포좀을 제조한다. 본 발명의 리포좀을 제조하는 또다른 방법에 잇어서 건조용 보호제와 프로스태그랜든을 함유한 수용액을 앞서 나온바 있다시피 본 발명에서 이용된 적당한 지질을 함유하는 건조된 필름에다 첨가하는 것이다. 이러한 지질필름은 튜우부, 시린지 또는 플래스크등과 같은 리셉타클(receptacle)위에 코우딩된다. 생성된 리포좀 현탁액을 앞서와 같이 탈수하고 동결 건조된다.

본 발명에서 사용되는 지질과 프로스태그랜딘의 중량 비는 약 1000:1 정도가 크다. 바람직한 것은 이들범위가 1000:1 내지 150:1인 것이고 보다 바람직한 것은 약 900:1내지 200:1이며 가장 바람직한 것은 약 600:1이다. 지질 대 약물의 중량비가 약 150:1이상이 되면 PGE1의 함입 효율이 60% 이상이 되어 결국 80 내지 100%가 된다.

본 발명의 리포좀의 탈수 또는 동결건조는 리포좀의 탈수나 동결 건조에 이용되는 공지의 방법에 따라 실시한다. 예컨대 탈수의 경우에 있어서 리포좀은 공지방법[janoff et al., PCT Publication No. 86/01103. February 27, 1986]에 따라 건조 처리한다.

본 발명의 리포좀은 수성이 리포좀 현탁액 일부를 피페트로 취하여 동결 건조 스토퍼가 부착된 혈청 바이알(실시예 9)속에 넣고 이들 바이알을 동결 건조기 속에 넣는다. 이들 바이알을 0℃ 내지 50℃에서 약 1분 내지 약 24시간 바람직하게는 약 10℃에서 약 1시간 유지한다. 저장온도을 1ns당 약 20 내지 0.005℃ 바람직하게는 1분당 약 1℃의 속도로 약 -12℃ 내지 약 -80℃ 바람직하게는 -40℃내지 0℃ 바람직하게는 약 -25℃까지 올려준다.

이들 바이알을 위의 온도에서(바람직하게는 약 -25℃에서) 약 0.1 내지 약 120시간 바람직하게는 약 12시간 유지하고 나서 저장온도를 1시간당 약 20℃ 내지 약 0.005℃, 바람직하게는 1시간당 약 10℃의 속도로 약 -20℃ 내지 0℃ 바람직하게는 약 -10℃까지 올려주어 약 0.1 내지 약 120시간 바람직하게는 약 8시간 유지한다. 이어서 저장 온도를 1시간당 약 20℃ 내지0.005℃의 속도로 바람직하게는 1시간당 약 10℃의 속도로 약 2℃ 내지 약 40℃ 바람직하게는 약 10℃까지 올려주고 이 온도에서 약 0.1-약 120시간 바람직하게는 8시간 유지한 다음 다시 저장온도를 약 20℃ 내지 약 80℃ 바람직하게는 약 40℃까지 올려주고 이 온도에서 약 0.1 내지 약 120시간 바람직하게는 약 16시간 유지하고나서 마지막으로 저장온도를 1시간당 약 20℃ 내지 약 -0.005℃의 속도로 바람직하게는 1시간당 약 10℃의 속도로 약 5℃ 내지 약 30℃, 바람직하게는 약 20℃까지 강화시키고 이 온도를 유지하였다가 스토퍼링(stoppering)한다. 이어서 바이알을 질소로 백플러쉬(back- flushed)한 다음 밀봉한다.

동결 건조법이나 탈수법과는 관계없이 이 방법에서는 시료의 수성성분 함량이 약 2% 이하로 감소되는데 바람직하게는 약 1%이하이다. 기존방법들을 이용하여 리포좀 프로스태그랜든 제제를 동결 건조할 때는 수성성분 함량이 0 내지 2%되는 점까지 하는데 바람직한 것은 0 내지 1%이다.

동결 건조된 프로스태그랜든-리포좀 제제는 6℃ 또는 25℃에서 자장하면 최소한 1년 동안은 안정한다. 실시예 14의 방법에 따라 안정성 실험을 하였는데 제제에 대해서 고압 액체 크로마토그래피(HPLC : high pressure liquid chromatography) 분석법을 사용한다. 6℃에서 1년간 저장한 후에도

PGH1의 분해생성물을 존재하지 않았다.

동결 건조된 리포좀을 사용할 경우 적당 pH를 가진 수용액 예컨대 증류수, 주사용물(WFI : water for injection) 또는 완충액 등을 리포좀에 가하여 재수화 처리한다. 용액을 완만히 혼합하여주면 수용액 속에서 리포좀이 다시 현탁된다. 재수화 처리 온도는 약 25℃이다. 만일 프로스태그랜든을 리포좀에 가한 다음 탈수하고 그 이상의 조성변화가 필요치 않을 경우에는 재수화된 리포좀을 캡슐화된 약물을 투여하는 공지방법에 따라 치료에 직접 사용한다.

리포좀 제조도중 유기용매를 사용하여 지질을 현탁시킨다. 적당한 유기용매는 여러 가지 극성과 유전특성을 가지며 지질을 용해시키는 것들인데 그 예로서는 에탄올, 에탄올, 디메틸 슬폭시드(DMSO), 메틸클로라이드 및 용매 혼합물(예 : 헥산:에탄올-95:5)등이 있다. 헥산 : 에탄올(95:5)을 사용하여 지질을 우선 현탁시키고 에탄올과 지질과 프로스태그랜든의 혼합시에 사용하는 것이 바람직하다. 용매를 선택할 때의 기준은 생체적 합성, 저독성 및 용해능력등이다.

본 발명의 방법에서 제조되는 리포좀을 일간을 비롯한 동물에 있어서 생체 활성형으로 약물을 지속적으로 방출할 필요가 있는 증상이나감염증 치료에 사용한다. 이러한 증상에 속하는 것으로는 프로스태그랜든으로 치료될 수 있는 질환상태가 있다.

제제투여방식에 따라 화합물이 전달, 방출되는 유기제에 있는 세포와 위치가 결정된다. 본 발명의 리포좀을 단독으로 투여할 수 있겠으나 투여경로와 표준 약제학적 실수를 고려하여 선택된 약제학적 담체와의 혼합물로 해서 투여하는 것이 일반적이다. 예를 들자면 제제를 비경구 즉 동맥내 또는 정맥내 주사하는 것이다. 이 제제를 경구, 피하 또는 근육내 경로를 통해 투여할 수도 있다. 비경구 투여의 경우에 있어서 예컨데 이들을 기타 용질, 예를 들자면 용액을 등장성으로 할 수 있을 정도의 충분한 염이나 클루코오스 같은 것을 함유하는 무균상태의 수용액 형태로 해서 사용된다. 예를 들자면 본발명의 프로스태그랜든 E1 리포좀을 하루에 1회 또는 2회, 두시간 주기로 1분당 체중 1kg당 5.0ng의 용량으로 비경구 투여한다. 제제의 특별한 성질에 따라 기타 용도를 고려할 수도 있다.

경구 투여방식의 경우에 있어서본 발명의 프로스태그랜든-리포좀 조성물을 정제, 캡슐, 분말, 시럽, 연금액, 수용액 및 현탁액 등의 형태로 사용한다. 정체의 경우에 있어서 사용되는 담체에 속하는 것들로는 락토오스, 시트르산 나트륨 및 인산염 등이 있다. 전분과 기타 각종 부형제와 마그네슘 스테아레이트 같은 윤활제를 정제에 보편적으로 사용한다. 캡슐형으로 투여할 경우 유용한 부형제는 락토오스 및 고분자량의 폴리에틸렌 글리콜이다. 경구용으로 수성현탁액이 필요할 때는 감미제 및 또는 향미료를 첨가한다.

프로스태그랜든 치료에 응답하는 질환상태 치료시 인간에 투여할 때는 처방의사가 환자에 대해 적절한 용량을 결정하는데 그 용얄은 연령, 체중, 개인별 반응상태, 환자의 질환의 특성과 정도에 따라 달라진다. 리포좀 형태의 약물의 용량은 유리상태의 약물에 대해 사용되는 정도의 것이 일반적이다. 그러나 몇 가지 경우에 있어서는 이들 한계를 벗어나는 용량을 투여할 필요가 있다.

본 발명을 실시예에 따라 설명한다.

실시예 1

헥산 : 에탄올(95:5)중에 난(egg)포스파티딜콜린(200mg)을 가하는 것을 37℃의 물중탕속에서 감압하는 회전 증발시켜 플라스크벽면에 얇은 필름을 형성하였다. 이 필름은 PGE1 0.1mg과 BHT 2.0mg이 첨가될 에탄올 200.0㎕중에 다시 현탁시키고 이 에탄올 용액을 1.0㎖ 용량의 투베르 린 시린지 (tuberculin syringe)속에 흡입해서 21게이지 침을 사용하여 1초당 2방울씩 정도의 양으로 텍스트로오스 수요액 100wt.%와 수성 EDTA 0.01wt.%로된 교반용액(pH7.0) 4.0㎖ 속으로 주입하였다. 에탄올/지질 혼합물을 첨가한 결과용액은 혼탁해졌다. 이 용액을 0.2㎛ 필터를 통해 다시 5회 압출하였다. 생성된 리포좀의 입자 크기를 준 탄성 광 산란법[QELS : qyasu-elastic okght scattering] (장치 : Nicomp Particle Sizer)으로 측정한 결과 024㎛±22%였다. 이 현탁액을 10% 텍스트로오스, 0.01% EDTA로 100㎕ 되게 묽게 하고(pH 7.0) 1.0㎕를 피펫트로 취하여 바이알속에 넣고 실시예 9의 방법에 따라 동결 건조하였다. 생성물을 0.01M 시트레이트 1.0㎕로 재수화 시키고 수산화나트륨(NaOH)으로 pH3이 되게 하였다. 생성된 현탁액의 pH는 약 3.00이었다. 실시예 8의 방법에 따라 PHLC를 사용하여 리포좀내의 PGE1의 함입율을 측정하였다.

실시예 2

입자크기를 측정하고 나서 10% 덱스트로오스와 0.01% EDTA를 함유한 0.01% 시트르산(pH 2.3) 4.0㎕를 사용하여 현탁액을 2회 희석한 것외에는 실시예 1의 방법과 물질을 사용하였다. 이것을 0.01% EDTA를 함유한 10% 덱스트로오스로 묽게 하여 100㎕되게 하였다 (pH 4.5) 이 현탁액의 최종 pH는 약 3.5였다. 이 현탁액 일부(1.0㎕)를 피펫트로 취하여 바이알속에 넣고 실시예 9의 방법에 따라 동결 건조하였다. 생성물을 증류수 1.0㎕로 묽게 하여 최종농도가 약 3.4 되게 하였다. 실시예 8의 방법에 따라 함입율을 측정하였다.

실시예 3

10% 덱스트로옷, 0.01% EDTA 및 1% 만니톨(총 당류(糖類) 11%)을 함유한 교반된 수용액을 사용하고 실시예 1의 방법과 물질을 사용하였다. 실시예 8의 방법에 따라 함입율을 측정하였다. 준 탄성 광산란법으로 리포좀의 입자크기를 측정한 결과 0.247㎛±10%이었다.

실시예 4

pH 7.4의 교반수용액을 사용하고 실시예 1의 방법과 물질을 사용하였다. 실시예 8의 방법에 따라 함입율을 측정하였다. 준 탄성 광산라법으로 측정한 리포좀의 입자크기를 측정한 결과 0.288㎛±44%이었다.

실시예 5

2% 만니톨, 10% 텍스트로오스 및 0.01% EDTA로된 교반 수용액(pH 7.4)을 사용하고 2의 방법에 따랐다. 실시예 8의 방법에 따라 함입율을 측정하였다. 준 탄성 광산란법으로 측정한 리포좀의 입자크기는 0.288㎛±44%이었다.

실시예 6

10% 덱스트로오스. 0.01% EDTA 및 2% 만니톨(총 당류(糖類) 12%)을 함유한 교반 수용액을 사용하고 실시예 1의 방법과 물질을 사용하였다. 실시예 8의 방법에 따라 함입율을 측정하였다.

실시예 7

헥산 : 에탄올(95 : 5)중에 난 포스파티딜콜린(100mg)을 가한 것을 감압하여 회전 증발시켜 플라스크 벽면에 얇은 필름을 형성하였다. 이 필름을 0.3M 시트르산 용액(pH 3.0) 1.0㎖ 중에서 격렬히 혼합하여 재현탁시킨 다음 실온에서 1시간 방치하였다. 리포좀 용액의 최종 pH는 3.5이었다. 이 현탁액 0.2㎛ 곧은 통로형 폴리카보네이트 필터를 5회 통과시켜 압출하고 제조된 현탄액 pH를 NaOH를 사용하여 6.9 되게 하였다. 시료들 동결 건조시키고 물로 다시수화하였다. 실시예 8에서 사용된 Ficoll법에 따라 재생전후의 PGE1과 지질과의 결합정도를 측정하였다.

실시예 8

수용액 1.0㎖중에 실시예 1의 리포좀을 현탁시키고 15㎖ 용량의 Corex 관속으로 옮겼다. 리포좀을 함유한 바이알을 히스-토파이크피콜 용액(histopaque Ficoll solution : Sigma Chemical Co.) 2×5㎖로 세척한 다음 Coresm 튜우브의 내용물과 혼합하였다. 튜우브를 원심 분리기(Sorvall centrifuge)에서 16,320×g에서 10분간 원심분리하였다. Ficoll의 상부에 지질이 침강하였다. 바닥 세척물 0.5-1.0㎖과 지질층을 급속연동 펌프를 사용하여 튜우브로부터 제거하엿다. 주의를 해서 마이크로피페트 추출기 튜우브에 지질이 부착하여 잔존하지 않도록 하였다. 튜우브에 잔존한 지질층에다 데트라히드로푸란(THF)(2.5㎖)을 가하고 철저히 혼합하엿다. 이 용액을 박(foil)로 둘러싼 30㎖ corex 튜우브에 옮겼다. 15㎖ corex 튜우브를 0.1% 인산 10.0㎖으로 세척하고 세척물을 리포좀 용액에다 가하였다. 다시 0.1% 인산 7.0㎖을 리포좀 용액에다 가하고 이 리포좀 용액을 Sep-PaK C18 카아트리지속을 통과시켰다. 이 카아트리지는 메탕롤 5.0㎖을 통과시킨 다음 증류수 10.0㎖를 통과시켜 만든 것이다. 지질에서 해리되는 PGE1을 카아트리지에 모이게 한다. Sep- PaK 속으로 메탄올(7.0㎖)을 통과시켜 PGE1을 용리시키고 조그만 둥근 바닥 클라스크에 PGE1을 모았다. 제제중에 있는 메탄올은 35℃ 이하의 온도에서 감압하에 회전 증발시켜 제거한 다음 내부표준으로서 50㎍/㎕인 농도로 베타-나프롤을 함유한 HPLC이 동상[아세토니트릴 : pH2.0(pH2.2인산으로) 40:60 체적으로]1.0㎖로 PGE1을 용해시켰다. 이 현탁액을 0.45㎛ 시린지-팁 필터(Millipore Millex HV4형)을 통고시켜 여과한 다음 HPLC속으로 주입하였다.

실시예 2-7의 리포좀으로 위의 방법을 반복하였다.

실시예 9

상부가 분리되어 있고 부틸 고무마게가 있으며 갈색 빛깔의 동결 건조 바이알(5.0㎖ 용량에 합입된 PGE1가 있는 수성의 리포좀 현탁액 1.0㎖을 채우고 Heneywell DCP7700 Digital Control Programmer가 장치된 동결건조기(PV-24 Stokes Lyophilizer)속으로 스테인레스강 트레이로 넣었다. 이들 바이알을 10℃에서 1시간 유지한 다음 보관 온도를 1ns당 1℃의 속도로 -40℃까지 강화시키고 이 온도에서 0.005mmHg이 하의 진공을 0.6시간 가하면서 3시간 유지하였다. 이어서 보관온도를 0.005mmHg 이하의 진공에서 1시간당 10℃의 속도로 -25℃까지 상승시켰다.

이들 바이알을 0.005mmHg이하에서 -25℃에서 12시간 유지한 다음 보관온도를 1시간다아 10℃의 속도로 -10℃까지 상승시켜 8시간 유지하고 나서 1시간당 10℃의 속도로 +10℃까지 8시간 유지하였다. 이어서 보관온도를 40℃까지 상승시켜 0.005mmHg이하에서의 16시간 유지하였다. 마지막으로 보관온도를 1시간당 10℃의 속도로 0.005mnHg이하에서 20℃까지 강화시키고 이 온도에서 유지하여 스토퍼링 하였다. 이들 바이알을 질소로 백플러쉬하고나서 밀봉하였다.

실시예 10

헥산 : 에탄올(95:5)중에 100㎎/㎖ 용액으로서의 난 포스파티딜콜린(1㎖) (총 EPC 4.428㎎)을 500㎖ 용량의 둥근바닥 플라스크에 옮겨 측정하고 37℃의 물중탕속에서 헥산:에탄올을 회전 증발시켜 제거하였다.

BHT 30㎎을 함유한 에탄올(2.0㎎)을 플라스크에 가하고건조한 지질필름을 현탁시켰다. 다시 에탄올 1.0㎖을 가하여 EPC를 완전히 현탁시켰다.

10% 말토오스 용액 1ℓ를 만들어 0.1N 수산화나트륨으로 pH 7.4되게 하였다. 이 용액을 멸균수로 미리 습윤시킨 0.22㎛ Millipak 40필터를 통과시켜 멸균 처리하였다.

21게이지 침이 부착된 1.0㎖ 시린지로 EPC/BHT/에탄올 약 1.0㎖/min의 속도로 방울식 10% 말토오스 약 800㎖로된 교반 용액에다 가하였다. 이것을 EPC/BHT/에탄올 총량의 약 8.0㎖인 것에 대하여 반복하였다. 지질을 모두 첨가하고 나서 말토오스 용액 약 3.0㎖ 2회에 걸쳐 취하여 둥근 바닥 플라스크를 세척하고 말토오스가 있는 비이커에 가하였다. 이 용액에 말토오스 용액에 10% 말토오스 용액을 추가하여 1000㎖되게 하였다.

실시예 11

실시예 10의 방법으로 만든 리포좀을 균질기(Gaulin Model 30 CD)를 사용하여 균질화하였다. 위의 Gaulin 장치에 튜우브를 연결한 316L 스테인레스강으로된 위생 외피와 튜우브식 열 교환기가 아래쪽 말단에 부착된 5L 용량의 밀폐된 저장기속에 리포좀을 넣고 리포좀 용액의 온도를 30℃이하로 유지하였다. 5L용량의 저장기에다 질소 공급원(20psi)을 연결하여 리포좀을 위의 Gaulin 장치속으로 가

압하여 공급하였다. 14,000psi의 압력에서 1분당 1/2 갈론정도의 유속으로 리포좀용액을 Gaulin 장치속을 약 4분간 순환시켰다. 균질화한 후 Nicomp Particle Sizer(Nicomp Instruments, Inc., Goleta, CA)를 사용하여 준 탄성 광 산란법으로 측정한 리포좀의 평균 직경은 약 150-200nm 이었다.

실시예 12

실시예 11의 방법에 따라 균질화한 리포좀(700㎖)을 0.2㎛ Millipak 필터로 여고하고 1500㎕ 용량의 비이커중에서 교반하였다. 프로스태그랜딘 E(에탄올 1.4㎖중의 PGE 3.85㎎)의 에탄올성 용액을 5.0㎖ 피페트로 방울씩 첨가하였다. PGE1을 첨가한 후 현탁액을 0.2㎛ Millipak 필터로 멸균 여과하고 1.0㎖를 취하여 혈청 바이알속에 넣은 다음 실시예 9의 방법에 따라 동결 건조하였다.

실시예 13

멸균된 시트르산(pH 3.0) 1.0㎖을 사용하여 실시예 12의 PGE1 리포좀의 바이알을 재생시키고 바이알을 손으로 진탕시켜 완전히 재현탁시켰다.

실시예 14

이동상 HPLC 표준물(물 6%, pH 2.2., HPLC급 아세토니트릴 40%, β-나트롤을 50㎍/㎖ 함유) 1.0㎖중에 실시예 12의 동결 건조된 리포좀의 바이알을 다시 현탁시킨후 이 시료를 Millpore HV4 0.45㎛ 필터 시린지팁 필터를 통해 여과하여 2.0㎖ 용량의 HPLC 바이알속으로 넣었다. 이 시료를 가지고 50㎕ 장치 부하를 이용하여 205nm로 고정된 Gilson 116 검출기에 부착된 15cm 역상 칼롬(Rainin C-18 칼럼)에 1.25㎖/min의 유속으로 20㎕부하 루우프로 처리하였다. 크로마토그래피 칼럼을 13분 실시하였다. PGE1과 β-나프롤에 상응한 피이크를 확인하였다.

시료 바이알의 PGE1 농도를 피이크 면적에 대한 표준 선형 회귀 분석법으로 계산하고 PGE1 HPLC 표준 곡선과 비교하였다. 시험에 사용된 각 시료에 대하여 세 개의 바이알을 사용하여 실시하였고 평균 농도를 계산하였다.

실시예 15

실시예 1의 방법에 따라 제조된 리포좀에 대하여 1주, 2주, 30일 3개월, 6개월, 9개월 및 1년 간격을 두고 실시예 14의 방법을 반복하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

혈관 확장작용, 말초혈액순환개선, 지방 분해 작용 방지, 동맥 확장, 유산과 분만 유도시에 자궁수축 자극, 기관지 천식자료와 동물의 위궤양억제와 같은 치료학적 효과가 있는 아라키돈산 대사물질, 지질 및 건조용 보호제를 함유하여 분배향상용 완충액을 함유해서 만들어지는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 아라키돈산 대사물질을 프로스태그랜딘 E1을 포함하는 프로스태그랜딘이며, 지질은 포스포티딜콜린을 포함하는 인지질로구성되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 분배향상용 완충액은 건조용 보호제 용액과 시트르산 용액으로 구성되고, 지질과 프로스태그랜딘의중량비는 300:1 내지 1000:1이 되며, 리포좀에는 pH는 차에 의한 막투과 이온농도 기울기가 형성되며, 리포좀의 평균 직경은 100nm 내지 50nm가 되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 건조용 보호제 용액은 pH값이 3.0 내지 11.0인 사카라이드 용액이며, 덱스트로스, 슈크로스 또는 말토스에서 선택된 사카라이드가 5% 내지 20%로 이루어진 용액이도며, 시트르산 용액의 pH 값은 2.5 내지4.5가 되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 리포좀 조성물은 동결건조 되는 것을 특징으로하는 리포좀 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 포스파티딜콜린은 난(egg) 포스포티딜콜린으로 구성되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서, 리포좀내의 프로스태그랜딘의함입율이 약 50% 내지 100%가 되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 리포좀은 프로스태그랜딘 E1, 난 포스포티딜콜린, 10% 말토즈와 분배향상용 완충액으로 구성되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 리포좀 조성물은 환자의정맥 내로 주사하는데 이용되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 리포좀 조성물은 제약학적으로허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하여 제약학적 조성물로 이용되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 11

막투과 pH 기울기에 의해 프로스태그래딘과 리포좀을 결합시키는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 리포좀-프로스태그랜딘 조성물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 막투과 pH 기울기를 a)비교적 여미성인 수용액 중에서 리포좀을 제조하고 ; b) (a)단계의 현탁액에 프로스태그랜딘을 처마하고; c)리포좀의 외부매체를 산성화시키는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 리포좀-프로스태그랜딘 조성물의 제조방법

청구항 13

지질, 프로스태그랜딘 E1 건조용 보호제 그리고 분배향상용 완충액으로 구성된 리포좀-프로스태그랜딘 조성물의 제조방법의 구성에 있어서 ; a)지질의 에탄올성 용액과 염기성인 건조용 보호제 용액을 혼합하여 리포좀을 만들고; b)리포좀의크기를 축소시키고; c)리포좀과 프로스태그랜딘 E1의 에탄올성 용액을 혼합하고 ; d) c)단계의 리포좀을 동결 건조시키고, 그리고 e) 산성인 시트르산 용액으로 리포좀을 재생시키는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 리포좀0프로스태그랜딘 조성물의 제조방법

청구항 14

제13에 있어서 b) 단계에서, 굴곡형 통로를 가진 필터 또는 곧은 통로형의 막틸터를 통해 리포좀을 여고시켜 리포좀의 크기를 축소시키거나 또는 균질화에 으해 리포좀의 크기를 축소시키는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 리포좀을 동결 건조시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 리포좀과 프로스태그랜딘의 중량비가 300:1 내지 1000:1, 적절하게는 300:1내지 800:1이 되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 지질은 난 포스포티딜콜린이며, 건조용 보호제는 덱스트로스, 슈크로스와 말토스에서 선택된 사카라이드로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.