



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0096962
(43) 공개일자 2011년08월31일

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)

C12M 1/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0016555

(22) 출원일자 2010년02월24일

심사청구일자 2010년02월24일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전 유성구 궁동 220 충남대학교

(72) 발명자

황성주

서울시 송파구 문정1동 문정래미안아파트 128동 2104호

박희준

대전광역시 서구 탄방동 78-4번지 102호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

백경업

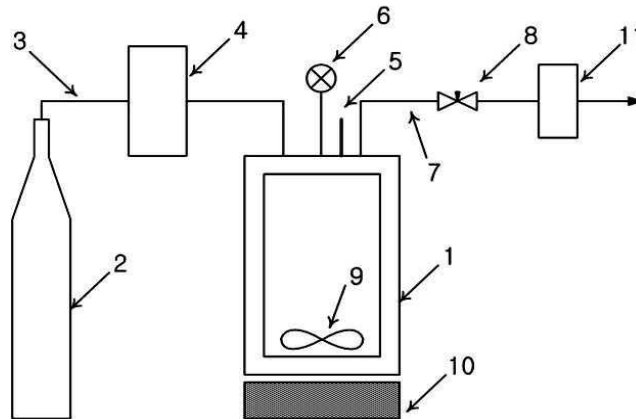
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 신규한 리포솜 제조 방법 및 장치

(57) 요약

본 발명은 리포솜 제제의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 따라, 지질 분획은 유기 용매에 용해된다. 생체활성성분과 지질 분획을 포함하는 상기 용액을 담체(carrier)와 함께 반응용기에 넣고 여기에 초임계 유체를 도입하여 생체활성성분-지질로 코팅된 입자를 제조한다. 초임계 유체를 감압에 의해 배출시켜 프로리포솜 입자를 수득한 후, 프로리포솜 입자에 물을 포함하는 수상으로 수화하여 리포솜 용액을 형성시킨다. 바람직하게는, 상기 제제는 하나 이상의 생체활성성분을 포함할 수 있다. 리포솜 제제는 원한다면 입자크기 감소, 유기용매 제거, 동결건조 등의 방법에 의해 추가로 가공될 수 있다. 상기 제조방법은 실험실적 규모 뿐 만 아니라 동일 제조방법을 사용하여, 대규모 또는 상업적 규모의 리포솜 제제의 제조에도 용이하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

조원경

전라북도 전주시 덕진구 인후동1가 위브어울림아파트 110동 2202호

차광호

대전광역시 유성구 신성동 162-3번지 204호

박준성

대전광역시 유성구 신성동 145-18번지 송일빌라 402호

박찬혁

경상남도 진해시 자은동월드메르디앙아파트 102동 1502호

구동건

대전광역시 유성구 궁동 458-5 로템나무 304호

특허청구의 범위

청구항 1

리포좀 제제를 제조하는 방법에 있어서,

- (a) 인지질 또는 스테롤로부터 1종 이상 선택된 지질 분획과 생체활성물질을 유기용매에 용해하는 단계(1공정);
 - (b) 상기 1공정의 유기용매 용액을 당류 담체와 함께 반응용기에 넣고 여기에 초임계 유체를 도입하여 지질-생체활성물질 혼합물로 코팅된 프로리포좀 입자를 제조하는 단계(2공정);
 - (c) 상기 2공정의 초임계 유체를 감압에 의해 배출시켜 프로리포좀 입자를 수득하는 단계(3공정); 및
 - (d) 상기 3공정의 프로리포좀 입자에 물을 포함하는 수상으로 수화하여 리포좀 용액을 형성시키는 단계(4공정);
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 리포좀의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 4공정 리포좀 용액을 고압유화기(microfluidizer)에 통과시켜 리포좀 입자 크기를 감소시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 인지질은 포스파티딜글리세롤류, 포스파티딜콜린류, 포스파티딜에탄올아민류, 포스파티딜세린류, 포스파티딜이노시톨류, 난황 레시틴, 대두 레시틴, Lipofect ACE, Lipofection, LipofecAMINE, CellFECTIN, DMRIE-C, DDAB, DC-Chol, DOTAP, MRX-230, MRX-220, Transfectam, TransFast™, Tfx™-10, Tfx™-20, Tfx™-50, ProFection-CaPO₄, ProFection-DEAE-Dextran, GeneSHUTTLE-40, CLONfectin™, METAFECTENE, INSECTOGENE, Effectene, FuGENE 6 또는 GENESEAL™ 중에서 적어도 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 리포좀의 제조방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 스테롤은 콜레스테롤, 콜레스테롤헥사숙시네이트, 에르고스테롤, 또는 라노스테롤 중에서 적어도 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 리포좀의 제조방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 유기 용매는 디메틸아세트아마이드, 디메틸포름아마이드, 디메틸술폭시드, 클로로포름, 메탄올, 에탄올, 또는 에테르 중에서 적어도 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 리포좀의 제조방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 생체활성성분은 자율신경조절제, 코르티코스테로이드, 이뇨제, 진통제, 성호르몬제, 마취제, 구충제, 항히스타민제, 항원충제, 성호르몬제, 항빈혈제, 심혈관계용제, 항불안제, 항천식제, 경련방지제, 항우울제, 항당뇨제, 항이뇨제, 해독제, 항간질제, 성호르몬제, 항진균제, 항히스타민제, 항고지혈증제, 항고지단백혈증제, 항고혈압제, 항저혈압제, 항생제, 진통제, 항원충제, 항편두통제, 항진균제, 항구토제, 항암제, 항우울제, 항과민성제, 항건선제, 정신신경용제, 항전간제, 항혈소판제, 진해거담제, 항궤양제, 기관지 확장제, 강심제, 이뇨제, 구토제, 항궤양제, 호르몬제, 항고지혈증제, 면역조절제, 근이완제, 신경안정제, 혈관이완제, 항바이러스제, 살충제, 단백질 약물, 유전자약물 또는 항체 중에서 적어도 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 리포좀의 제조

방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

생체활성성분은 암포테리신 B인 것을 특징으로 하는 리포솜의 제조방법.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 당류 담체는 락토오스, 수크로오스, 말토오스, 트레할로스, 텍스트로스, 소르비톨, 만니톨 또는 자일리톨 중에서 적어도 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 리포솜의 제조방법.

청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 초임계 유체는 초임계 이산화탄소, 초임계 일산화질소, 초임계 아세틸렌, 초임계 삼불화메탄, 초임계 프로판, 초임계 에틸렌, 초임계 염화불화탄소 또는 초임계 제논 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 제조된 리포솜을 멸균 여과하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 제조된 리포솜을 동결건조시키는 것을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

프로리포솜 입자의 제조 단계 및 리포솜 용액을 형성시키는 단계가 이루어지는 반응용기;

초임계 유체를 수용하는 초임계 유체 저장용기;

상기 반응용기에 초임계 유체 저장용기로부터 초임계 유체를 수송하기 위한 초임계 유체 저장용기로부터 상기 반응용기로 연결된 초임계 유체 제공용 튜브;

상기 초임계 유체 제공용 튜브상에 존재하여 수송되는 초임계 유체의 양을 제어할 수 있는 초임계 유체 공급량 조절용 펌프;

상기 반응용기의 내부에 연결되어 반응물질을 반응용기에 제공하기 위한 반응물질 도입부;

상기 반응용기 내부와 연결되어 반응용기 중의 압력을 측정하기 위한 압력 측정계;

상기 반응용기에 연결되어 초임계 유체를 배출시키기 위한 초임계 유체 배출용 튜브; 및

상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 감압 밸브; 및

상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 일정 압력 이상을 유지하며 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 배압(back pressure) 밸브;

를 포함하는 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 제조방법을 수행하기 위한 장치.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 반응용기 중에 교반 장치가 존재하고 반응용기의 자체 또는 외부에 교반기가 존재하는 것을 특징으로 하는 장치.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 리포솜을 제조하기 위한 새로운 제조방법 및 그 리포솜을 제조하기 위한 제조장치에 관한 것으로, 바람직하게는 상기 리포솜 제제는 하나 이상의 생체활성성분을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로는 생체활성성분에 대한 안정성 및 제제 안정성을 가지며 높은 수득률로 대량 생산이 가능한 리포솜 제제를 제조하는 방법 및 그 리포솜 제제를 제조하기 위한 제조장치에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 리포솜은 인지질 및 이들의 유도체로 이루어진 소포체(vesicle)이다. 인지질 및 이들의 유도체가 물에서 분산될 때 자발적으로 소포체를 형성 하며, 내부에 수상으로 이루어진 핵을 포함하는 지질 이중층에 의한 특성을 갖는다. 다양한 리포솜은 의학, 제약학 및 생화학 분야에서 약물, 효소, 유전자 서열과 같은 치료제를 위한 담체로서 사용되었다.
- [0003] 리포솜 조성물의 예는 미국특허등록 4,983,397; 6,476,068; 5,834,012; 5,756,069; 6,387,397; 5,534,241; 4,789,633; 4,925,661; 6,153,596; 6,057,299; 5,648,478; 6,723,338; 6,627,218; 미국특허공개 2003/0224037; 2004/0022842; 2001/0033860; 2003/0072794; 2003/0082228; 2003/0212031; 2003/0203865; 2004/0142025; 2004/0071768; 국제특허공개 WO 00/74646; WO 96/13250; WO 98/33481; Papahadjopolulos D, Allen TM, Gbizon A, et al. "Sterically stabilized liposomes: Improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy" Proc Natl Acad Sci U.S.A. (1991) 88: 11460-11464; Allen TM, Martin FJ. "Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines " Semin Oncol (2004) 31: 5-15 (suppl 13). Weissig et al. Pharm. Res. (1998) 15: 1552-1556 등에 공지되었다.
- [0004] 리포솜을 제조하는 다양한 방법들이 본 발명이 속하는 기술 분야에서 알려져 있고, 이들 중 여러 가지가 Liposome Technology 2nd Edition in G. Gregoriadis, CRC Press Inc., Boca Raton (1993)에 상세히 설명되어 있다.
- [0005] 그러나, 이들 종래의 리포솜 제조기술은 소규모 실험실적 생산수준에서는 리포솜을 효과적으로 제조할 수 있는 반면에 대규모의 상업적 생산에 있어서는 인지질을 용해시키기 위해 사용한 유기용매의 제거문제 및 지질 막을 형성하기 위한 반응기의 크기 문제 등으로 인해 효과적으로 리포솜을 대량생산할 수 없다는 커다란 문제점을 가지고 있다.
- [0006] 상업적 규모의 대량생산이 가능한 리포솜 제조방법의 제공을 위해 미국특허공개 2004/0175417에 산성화된 클로로포름과 메탄올의 혼합 용액 중에서 암포테리신 B와 인지질의 복합체를 형성 하여 이를 분무 건조하여 지질분말을 획득함으로써 리포솜을 제조하는 방법이 개시되어 있다. 그러나 이 기술은 분무건조 과정에서 유기용매의 제거를 위해 가열 공기를 사용하기 때문에 일반적으로 암포테리신 B를 충분하게 용해시키면서 용해된 암포테리신 B의 안정성을 유지할 수 있는 용매로 알려진 DMA(dimethylacetamide), DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethylsulfoxide) 등의 높은 끓는점을 가지는 용매를 공정상에 적용할 수 없다는 커다란 문제점을 내포하고 있다.

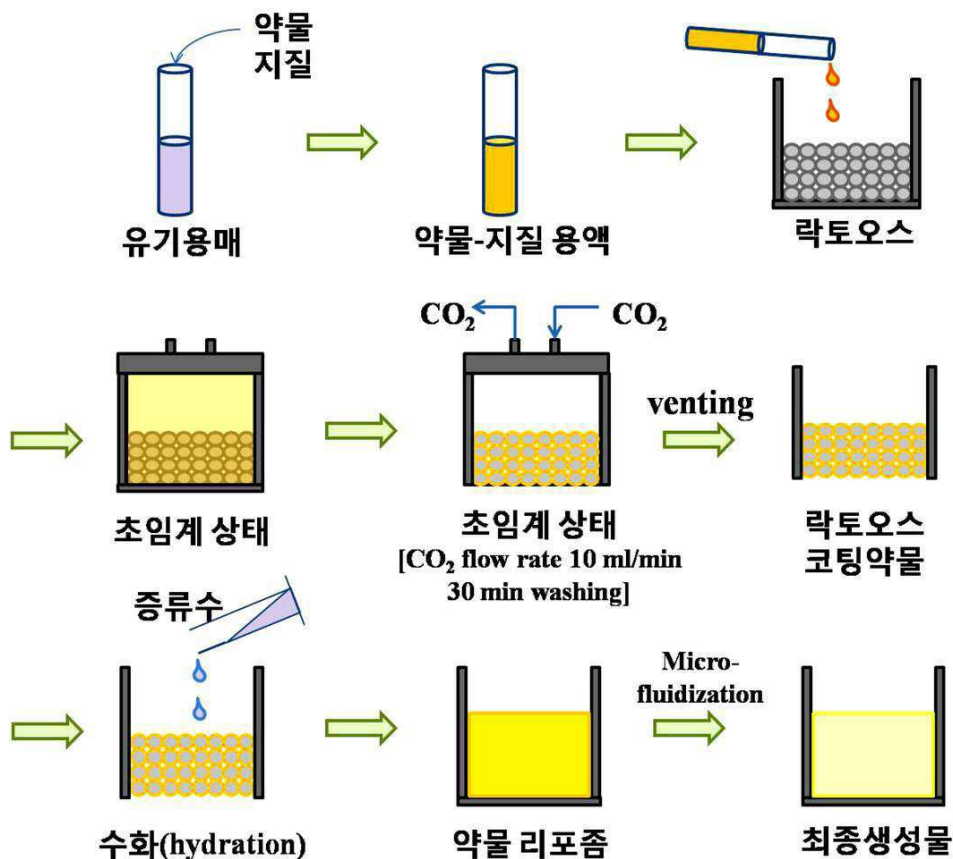
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 리포솜 제제를 대량생산 할 수 있는 새로운 방법 개발에 대하여 지속적으로 연구한 결과, 초임계 유체를 이용하여 프로리포솜을 제조하고 이를 수화시켜 얻은 리포솜 용액은 활성 성분의 함량 및 봉입 효율이 높고 안정하면서 간단한 장치에 의해 대량으로 제조할 수 있음을 알아내어 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 생체활성성분의 함량 및 봉입 효율이 높고 생체활성성분 및 제제의 안정성이 높은 리포솜 제제를 대량생산할 수 있는 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 생체활성성분의 함량 및 봉입 효율이 높고 생체활성성분 및 제제의 안정성이 높은 리포솜 제제를 대량생산할 수 있는 리포솜 제조장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위해,
- [0011] 인지질과 스테롤 중에서 최소한 하나 이상을 포함하는 지질 분획과 생체활성물질(약물)을 유기용매에 용해하는 단계;
- [0012] 상기 지질 분획을 포함하는 상기 유기용매 용액을 당류 담체(carrier)와 함께 반응용기에 넣고 여기에 초임계 유체를 도입하여 약물-지질로 코팅된 입자(리포솜으로 형성가능한 입자로서, 이하 "프로리포솜 입자"라 칭함)를 제조하는 단계;
- [0013] 초임계 유체를 감압에 의해 배출시켜 프로리포솜 입자를 수득하는 단계;
- [0014] 프로리포솜 입자에 물을 포함하는 수상으로 수화하여 리포솜을 형성시키는 단계;를 포함하는 리포솜 제제의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 한편, 상기 제조된 리포솜 제제에 추가하여 리포솜 제제를 멸균 여과하는 단계; 및/또는 리포솜 제제를 동결건조시키는 단계;를 추가할 수 있다.
- [0016] <본 발명의 리포솜 제조 순서>



- [0017]
- [0018] 본 발명은 또한,
- [0019] 프로리포솜 입자의 제조 단계 및 리포솜 용액을 형성시키는 단계가 이루어지는 반응용기;
- [0020] 초임계 유체를 수용하는 초임계 유체 저장용기;
- [0021] 상기 반응용기에 초임계 유체 저장용기로부터 초임계 유체를 수송하기 위한 초임계 유체 저장용기로부터 상기 반응용기로 연결된 초임계 유체 제공용 튜브;
- [0022] 상기 초임계 유체 제공용 튜브상에 존재하여 수송되는 초임계 유체의 양을 제어할 수 있는 초임계 유체 공급량 조절용 펌프;
- [0023] 상기 반응용기의 내부에 연결되어 반응물질을 반응용기에 제공하기 위한 반응물질 도입부;

- [0024] 상기 반응용기 내부와 연결되어 반응용기 중의 압력을 측정하기 위한 압력 측정계;
- [0025] 상기 반응용기에 연결되어 초임계 유체를 배출시키기 위한 초임계 유체 배출용 튜브;
- [0026] 상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 감압 밸브; 및
- [0027] 상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 일정 압력 이상을 유지하며 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 배압 (back pressure) 밸브;
- [0028] 를 포함하는 상기 본 발명에 따른 리포좀 제제의 제조방법을 수행하기 위한 장치를 제공한다.
- [0029] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 본 발명이 제공하는 리포좀 제제의 제조방법은 지질 분획을 유기 용매에 용해시킨 다음, 이 혼합 용액을 담체와 함께 반응용기에 넣고 여기에 초임계 유체를 도입하여 프로리포좀 입자를 제조하고 초임계 유체를 감압에 의해 배출시켜 프로리포좀 입자를 수득한 후, 이 프로리포좀 입자에 물을 포함하는 수상으로 수화하여 리포좀 용액을 형성시키는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 상기 리포좀을 구성하는 지질 분획 중 인지질로는 포스파티딜글리세롤류, 포스파티딜콜린류, 포스파티딜에탄올아민류, 포스파티딜세린류, 포스파티딜이노시톨류, 난황 레시틴, 대두 레시틴, Lipofect ACE, Lipofection, LipofecAMINE, CellFECTIN, DMRIE-C, DDAB, DC-Chol, DOTAP, MRX-230, MRX-220, Transfectam, TransFastTM, TfxTM-10, TfxTM-20, TfxTM-50, ProFection-CaPO₄, ProFection-DEAE-Dextran, GeneSHUTTLE-40, CLONfectinTM, METAFACTENE, INSECTOGENE, Effectene, FuGENE 6 또는 GENESEALTM 중에서 선택되어 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 인지질을 조합하여 사용할 수도 있다. 상기 포스파티딜글리세롤류로는 디스테아로일 포스파티딜글리세롤, 디팔미토일 포스파티딜글리세롤 및 기타 가능한 포스파티딜글리세롤 유도체가 사용될 수 있다.
- [0031] 상기 리포좀을 구성하는 지질 분획 중 스테롤로는 콜레스테롤, 콜레스테롤헥사숙시네이트, 에르고스테롤, 라노스테롤, 또는 이들의 조합이 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 콜레스테롤이 이용될 수 있다.
- [0032] 상기 지질 분획을 포함하는 상기 유기용매 용액을 제조하기 위한 용매로 생체활성성분을 용해할 수 있는 용매와 지질 분획을 용해할 수 있는 용매로 구분된다. 생체활성성분을 용해할 수 있는 용매로는 디메틸아세트아마이드, 디메틸포름아마이드, 디메틸설폭시드, 메탄올, 에탄올, 또는 이들의 조합이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 디메틸아세트아마이드를 사용할 수 있다. 지질 분획을 용해할 수 있는 용매로는 클로로포름, 메탄올, 에탄올, 에테르, 또는 이들의 조합이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 메탄올 및 클로로포름의 혼합물을 사용할 수 있다. 생체활성성분 용액과 지질 분획 용액의 혼합 시 석출이 일어나지 않는 것이 바람직하다. 상기 용매는 이후에 초임계 유체에 의해 제거되는 성분이며, 유기용매를 제거하는 단계의 공정시간을 줄이기 위해 최소한의 양을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0033] 상기 생체활성성분은 생리활성을 갖는 물질로 자율신경조절제, 코르티코스테로이드, 이뇨제, 진통제, 성호르몬제, 마취제, 구충제, 항히스타민제, 항원충제, 성호르몬제, 항빈혈제, 심혈관계용제, 항불안제, 항천식제, 경련방지제, 항우울제, 항당뇨제, 항이뇨제, 해독제, 항간질제, 성호르몬제, 항진균제, 항히스타민제, 항고지혈증제, 항고지단백혈증제, 항고혈압제, 항저혈압제, 항생제, 진통제, 항원충제, 항편두통제, 항진균제, 항구토제, 항암제, 항우울제, 항파킨슨제, 항건선제, 정신신경용제, 항진간제, 항혈소판제, 진해거담제, 항궤양제, 기관지 확장제, 강심제, 이뇨제, 구토제, 항궤양제, 호르몬제, 항고지혈증제, 면역조절제, 근이완제, 신경안정제, 혈관이완제, 항바이러스제, 살충제, 단백질 약물, 유전자약물 또는 항체 중에서 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0034] 상기 생체활성성분 용액을 제조하는 단계에서는 당분야에서 통상적인 방법으로서 생체활성성분의 물리화학적 성질을 고려하여 용해도를 증가시키기 위해 산이나 알칼리 성분을 소량 첨가할 수 있으며, 산 조건에서 용해도가 증가할 경우, 아스코르빈 산, 염산, 또는 초산 등의 산을 소량 첨가할 수 있으며, 산 부가 후에는 중화를 위해 수산화나트륨과 같은 염기를 가해 중화할 수 있다. 마찬가지로, 염기성 조건에서 용해도가 증가할 경우, 알칼리 금속 등과 같이 염기성을 띠는 것을 첨가하여 녹이고, 산을 가해 중화할 수 있다.
- [0035] 상기 당류 담체로는 락토오스, 수크로오스, 말토오스, 트레할로스, 텍스트로스, 소르비톨, 만니톨, 자이리톨, 또는 이들의 조합을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 락토오스를 사용할 수 있다. 이와 같은 당류는 담체로서의 역할 뿐만 아니라, 수화시켜 리포좀으로 제조한 이후, 보관의 편의를 위해 동결

건조 시 리포좀의 물리적 구조를 안정화시키는 작용을 할 수 있다.

- [0036] 상기 초임계 유체로는 초임계 이산화탄소, 초임계 일산화질소, 초임계 아세틸렌, 초임계 삼불화메탄, 초임계 프로판, 초임계 에틸렌, 초임계 염화불화탄소 또는 초임계 제논이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 상기 프로리포좀 입자를 제조하는 단계에서는 초임계 유체와 유기용매가 혼합되어 평형상태에 도달할 때까지 소정 시간이 필요하다. 소요시간은 시료의 양에 따라 약 1 분에서 30 분 내외일 수 있다. 상기 단계의 반응은 초임계 유체 상태를 유지하기 위한 온도 및 압력 이상으로 수행할 수 있다. 초임계 유체로서 초임계 이산화탄소를 사용할 경우 압력은 120-300 bar, 바람직하기로는 150 bar, 온도는 35~70 ℃, 바람직하기로는 45 ℃로 하는 것이 적절하다. 또한, 반응 동안 혼합이 잘 이루어지도록 하기 위해서 교반 장치를 이용하여 지속적으로 혼합할 수 있다. 교반기의 회전 속도는 200-500 rpm이 바람직하다. 반응이 평형상태에 이르렀는지 여부는 초임계 유체와 유기용매의 혼합물이 균질한 상태가 되는 시점으로 알 수 있다.
- [0038] 평형상태에 도달한 다음 잔류하고 있는 유기용매를 제거하기 위해 추가적인 초임계 유체를 공급하는 과정을 수행한다. 초임계 유체의 공급속도는 5~20 ml/분이 적절하며, 이 과정에서 반응용기 내부의 초임계 상태가 유지되도록 일정 압력, 온도를 유지한다. 이 과정의 소요시간은 유기용매의 양에 따라 약 10 분에서 1 시간 내외일 수 있다. 또한, 초임계 유체는 휘발성 유기용매의 제거뿐만 아니라 기존의 방법으로 제거가 힘든 비휘발성 유기용매(디메틸아세트아마이드, 디메틸포름아마이드, 디메틸술폭시드)의 제거도 용이하다는 이점이 있다.
- [0039] 유기용매를 완전히 제거한 다음에는 프로리포좀 입자를 수득하기 위해 초임계 유체를 감압에 의해 배출시키는 과정을 수행한다. 감압속도는 10~200 bar/분이 적절하며, 감압과정에서 프로리포좀 입자의 소실이 없도록 주의한다. 또한, 상기 고압을 유지하는 동안 그리고 감압되는 동안에 멸균이 이루어지는 이점이 있다.
- [0040] 상기 수득된 프로리포좀 입자를 리포좀 용액으로 형성시키기 위해 선택적으로 상전이온도 이상의 물을 포함하는 수상으로 수화하는 과정을 수행할 수 있다. 수상의 부피는 5~20 ml이 적절하며, 수상의 온도는 45~95 ℃, 바람직하기로는 65~80 ℃로 하는 것이 적절하다. 이 과정은 담체표면에 얇은 막을 형성하고 있는 약물-지질 필름이 상전이온도 이상의 수상에서 액체 박막법과 같은 원리로 리포좀이 형성된다. 일반적으로 상기 약물-지질 필름은 액체 박막법보다 더 넓은 표면적을 가지므로 수화 후 더 작고 균일한 리포좀 입자를 형성한다.
- [0041] 상기 제조된 리포좀은 입자 크기를 감소시키기 위해 선택적으로 고압유화기(microfluidizer)에 통과시키는 과정을 수행할 수 있다. 이 과정의 소요시간은 1~10분이 적절하며, 온도는 45~95 ℃, 바람직하기로는 65~85 ℃로 하는 것이 적절하다.
- [0042] 상기 제조된 리포좀은 보관의 용이성을 위해 선택적으로 동결건조를 수행할 수 있다. 상기 프로리포좀 제조시 담체로 사용된 당류가 수화 시 물을 포함하는 수상에 용해되어 동결건조 동안에 리포좀의 물리적 구조를 안정시키는 작용을 할 수 있다. 상기 당류로는 말토오스, 락토오스, 수크로오스, 트레할로오스, 텍스트로스, 소르비톨, 만니톨, 자이리톨, 또는 이들의 조합을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 리포좀 용액을 동결건조하여 형성된 케이크, 플라그, 또는 분말은 사용시 멸균수로 재구성하여 투여할 수 있다.
- [0043] 상기 본 발명의 방법에 따라 제조된 리포좀 제제는 주사제, 경피, 경비, 및 폐로의 약물송달에 사용될 수 있다. 이러한 제제화에 필요한 기술 및 약제학적으로 적절한 담체, 첨가제 등에 관해서는 당해 제제학 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려져 있으며, 이와 관련하여 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)를 참조할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 측면에 따른 상기 본 발명에 따른 리포좀의 제조방법을 수행하기 위한 장치는
- [0045] 프로리포좀 입자의 제조 단계 및 리포좀 용액을 형성시키는 단계가 이루어지는 반응용기;
- [0046] 초임계 유체를 수용하는 초임계 유체 저장용기;
- [0047] 상기 반응용기에 초임계 유체 저장용기로부터 초임계 유체를 수송하기 위한 초임계 유체 저장용기로부터 상기 반응용기로 연결된 초임계 유체 제공용 튜브;
- [0048] 상기 초임계 유체 제공용 튜브상에 존재하여 수송되는 초임계 유체의 양을 제어할 수 있는 초임계 유체 공급량 조절용 펌프;
- [0049] 상기 반응용기의 내부에 연결되어 반응물질을 반응용기에 제공하기 위한 반응물질 도입부;
- [0050] 상기 반응용기 내부와 연결되어 반응용기 중의 압력을 측정하기 위한 압력 측정계;

- [0051] 상기 반응용기에 연결되어 초임계 유체를 배출시키기 위한 초임계 유체 배출용 튜브;
- [0052] 상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 감압 밸브; 및
- [0053] 상기 초임계 유체 배출용 튜브 상에 존재하여 일정 압력 이상을 유지하며 초임계 유체를 배출시킬 수 있는 배압(back pressure) 밸브;를 포함한다.
- [0054] 상기 장치는 바람직하게는 교반 장치가 반응용기 내부에 존재하고, 반응용기 내부의 교반기가 회전하여 반응물을 혼합시킬 수 있도록 반응용기 자체 또는 반응용기 외부에 교반기가 존재할 수 있다.
- [0055] 상기 본 발명에 따른 리포솜 제조 장치의 일 구현예의 모식도를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타낸 본 발명의 일 구현예에 따른 장치를 이용하여, 암포테리신 B 함유 리포솜을 제조하는 방법을 하기 실시예에 나타내었다.
- [0056] 도 1에 나타낸 본 발명의 리포솜 제조방법을 수행하기 위한 장치는 종래의 초임계 유체를 이용하여 리포솜을 제조하기 위한 장치(US 5,776,486)의 구조에 비해 매우 간단한 구조를 가지므로, 보다 간편하며 경제적으로 리포솜 제조방법을 수행할 수 있다.

발명의 효과

- [0057] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 방법에 따르면 생체활성성분의 함량 및 봉입 효율이 높고, 활성성분의 안정성 및 리포솜의 제제 안정성이 우수한 리포솜을 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 리포솜 제제의 제조방법은 공정이 매우 간소화되어 간단한 장치에 의해 이루어질 수 있으며, 실험실적 규모로의 제조도 용이할 뿐만 아니라, 이와 동일한 방법을 사용하여 대량 생산이 가능하므로 경제적이다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 암포테리신 B 함유 리포솜 제조 장치의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0060] 실시예 1a-f 및 2a-d: 암포테리신 B 리포솜의 제조

- [0061] 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC) 84 mg을 65 ℃에서 클로로포름과 메탄올 1:1 혼합용매 1 ml 중에 용해시킨다. 아스코르빈 산(Vit-C) 200 mg을 *N,N*-디메틸아세트아마이드(DMA) 2 ml에 10분간 초음파 처리하여 완전히 녹인다. 암포테리신 B 50 mg을 65 ℃에서 상기 DMA-Vit C 용액에 녹인 다음, 이 용액에 상기 DSPC 용액을 혼합한다. 수소화된 대두 포스파티딜콜린 213 mg과 콜레스테롤 52 mg을 65 ℃에서 각각 클로로포름과 메탄올 1:1 혼합용매 1 ml에 용해시킨다. 수소화된 대두 포스파티딜콜린과 콜레스테롤 용액을 상기 암포테리신 B-DSPC 용액에 혼합한다.
- [0062] 상기 암포테리신 B-지질 용액과 락토오스 900 mg을 반응 용기(1)에 넣고 봉입한다. 반응 용기의 온도는 각각 45, 55, 65 ℃로 유지한다. 여기에 펌프(4)를 작동시켜 기체저장용기(2)로부터 초임계유체 제공용 튜브(3)을 통해 반응용기(1)로 초임계 이산화탄소를 주입하고, 압력측정계(6)를 이용하여 압력을 각각 150, 200, 250, 300 bar로 유지한다. 교반기를 작동시켜(10)를 작동시켜 40 분간 500 rpm으로 회전시킴으로써 평형상태가 될 때까지 혼합하였다. 여기에 추가적인 초임계 이산화탄소를 주입하여 잔류하는 유기용매를 제거한다. 그 후 감압 밸브(8)를 열어 초임계 이산화탄소를 초임계유체 배출용 튜브(7)을 통해 배출시켜 반응 용기를 대기압까지 서서히 감압한다. 감압 후 반응 용기에서 약물과 지질로 코팅된 락토오스 입자를 얻는다. 상기 입자에 각각 55, 65, 75, 85 ℃의 물을 포함하는 수상(10ml 물사용)을 가하여 30분간 교반하면 리포솜 용액이 형성된다.
- [0063] 상기 과정으로 제조한 리포솜의 입자크기를 입자분석기(Electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000)로 측정하고, 약물함량을 측정하여 하기 실시예의 결과에 나타내었다.
- [0064] 실시예 1 은 초임계 공정 시 반응 용기의 온도와 압력에 따른 리포솜 용액의 특성에 관한 것으로 표 1에 실시예 1a-f의 반응 용기의 온도와 압력에 따른 입자크기 및 약물함량을 나타내었으며, 실시예 2 는 실시예 1a에 해당하는 초임계 공정시 반응 온도와 압력은 45도 200bar로 제조된 프로리포솜 입자에 물을 포함하는 수상을 가하여 수화할 때 수화 온도에 따른 리포솜 용액의 특성에 관한 것으로 표 2에 실시예 2a-d의 수화 온도에 따른 입자크기, 약물함량, 리포솜 형성 여부를 나타내었다.

표 1

실시예 1	초임계 공정시 반응용기		입자크기 (nm)	약물함량 (%)
	온도 (℃)	압력 (bar)		
a	45	200	949.3	90.5
b	55	200	801.6	86.3
c	65	200	839.1	77.1
d	45	150	761.0	91.1
e	45	250	855.7	84.2
f	45	300	821.3	79.7

표 2

실시예 2	수화온도 (℃)	입자크기 (nm)	약물함량 (%)	비고
a	55	N/A	N/A	리포솜 형성되지 않음
b	65	949.3	90.5	리포솜이 형성됨
c	75	866.2	88.1	리포솜이 형성됨
d	85	752.1	84.3	리포솜이 형성됨

시험예 1 : 암포테리신 B 함유 리포솜의 동결건조에 대한 안정성

본 발명에 따른 암포테리신 B 리포솜의 보관의 용이성을 위해서 동결건조를 실시한 다음, 그 안정성을 평가하였다.

상기 실험 조건 중, 45도 200 bar에서 프로리포솜을 제조를 하고, 65도에서 수화를 시켜 제조된 리포솜을 고압 유화기(Microfluidizer)에 통과시켜 입자크기를 감소시킨 리포솜에 대해 동결건조를 수행한 다음, 재분산 용액으로서 증류수를 사용하여 재구성하였다. 동결 건조 전 후의 각각의 리포솜의 크기, 제타 전위, 약물의 함량 및 봉입률을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 3에 요약하여 나타내었다.

표 3

상태	입자크기 (nm)	제타 전위	약물함량 (%)	봉입률 (%)
동결건조 전	137.35	- 42.49	91.6	89.2
동결건조 후	146.85	- 43.64	90.2	83.5

상기 결과에 따르면, 초임계 공정으로 제조된 리포솜은 동결건조 후에도 리포솜의 평균 크기, 제타 전위, 약물의 함량 및 봉입률을 유지하였고, 따라서 동결건조를 이용하여 리포솜 제제의 장기간 보존이 가능하다.

부호의 설명

- | | |
|------------------|----------------------|
| 1: 반응용기; | 2: 유체 저장용기; |
| 3: 초임계 유체 제공용 튜브 | 4: 초임계 유체 공급량 조절용 펌프 |
| 5: 반응물질 도입부 | 6: 압력 측정계 |
| 7: 초임계 유체 배출용 튜브 | 8: 감압 밸브 |
| 9: 마그네틱 바 | 10: 마그네틱 스테러 |

11: 배압조절 장치

도면

도면1

