(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0114971
(43) 공개일자 2021년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 31/407* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01) *A61K 47/69* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A61K 31/407 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7025254
(22) 출원일자(국제) 2020년01월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년08월10일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2020/050205
(87) 국제공개번호 WO 2020/144657
국제공개일자 2020년07월16일
(30) 우선권주장
62/791,718 2019년01월11일 미국(US)

(71) 출원인
리포메딕스 파마슈티컬스 리미티드
이스라엘 9139102 예루살렘 피오비 39262
샤아르 제덱 사이언티픽 리미티드
이스라엘 9103102 예루살렘 슈무엘 바이트 스트리트 12
(72) 발명자
가비존 알베르토
이스라엘 9640804 예루살렘 아파트먼트 77 콜리츠 로드 4
오하나 패트리샤
이스라엘 96920 예루살렘 페레츠 베렌스타인 6/14
스미다 힐러리
이스라엘 90917 기밧 지브 하마카빔 73
(74) 대리인
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **미토마이신 C의 리포좀성 전구약물를 포함하는 리포좀 조성물 및 제조 방법**

(57) 요 약

개선된 약물동역학 프로필을 갖는 미토마이신 C의 친유성 전구약물을 포함하는 리포좀 조성물이 기술된다. 적절한 비로 혼합된 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 시스템을 이용해 조성물을 제조하는 방법이 또한 기술된다. 구현예에서, 상기 리포좀 조성물은 지질 나노입자의 집단 및 약학적으로 허용가능한 비히클이며, 여기서 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/6911 (2017.08)
A61K 9/1277 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

지질 나노입자의 집단, 및

약학적으로 허용가능한 비히클을 포함하는 조성물로서,

상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이며, 상기 구형 리포좀은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분으로 구성되는 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 8, 9, 10, 11, 또는 12 몰%인 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 10 몰%인 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 5% 미만인 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 0.1-5% 사이인 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지질 나노입자의 집단은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조되는 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1인 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1인 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 마우스에서 적어도 약 15시간의 IV 혈액 순환 반감기를 갖는 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

약 15% 이상의 막대-형상 지질 나노입자를 포함하는 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물과 비교하여, 상기 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 마우스에서 페길화된 리포좀성 독소루비신의 마우스에서의 IV 혈액 순환 반감기에 대한 값과 근접한 IV 혈액 순환 반감기를 갖는 조성물.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소낭-형성 리포좀은 HSPC인 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 선택적 지질 성분은 mPEG2000-DSPE 및 콜레스테롤로부터 선택되는 조성물.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,

상기 리포좀은 HSPC/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C가 55/30/5/10의 몰 비로 존재하는 HSPC, 콜레스테롤, mPEG2000-DSPE, 및 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 포함하는 조성물.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

조성물을 마우스 내로 정맥내 주사한 후 약 24시간에, 상기 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 마우스 혈장에서 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물의 Cmax의 20% 초과인 마우스 혈장에서의 농도를 갖는 조성물.

청구항 15

소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시켜 용해된 지질 용액을 형성하는 단계; 및

지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계;를 포함하는 리포좀의 제조 방법으로서,

상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만인 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

상기 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계는 상기 용해된 지질 용액을 수성 버퍼와 혼합하여 현탁액을 형성하는 단계, 상기 현탁액을 필터를 통해 압출하는 단계, 및 에탄올 및 3차-부탄올의 혼합물을 제거하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계는 멸균 여과를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

청구항 145 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서,

상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 8, 9, 10, 11, 또는 12 몰%인 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 10 몰%인 방법.

청구항 20

청구항 15 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서,

상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 친유성 모이어티에 부착된 폴리에텔렌글리콜의 접합체로부터 선택되는 방법.

청구항 21

청구항 15 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1인 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서,

상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 7:1 내지 15:1인 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서,

상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1인 방법.

청구항 24

청구항 15 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 5% 미만인 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서,

상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 0.1-5% 사이인 방법.

청구항 26

청구항 15 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서,

상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물 접합체는 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C인 방법.

청구항 27

청구항 15 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소낭-형성 리포좀은 HSPC인 방법.

청구항 28

청구항 15 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서,

상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 mPEG2000-DSPE로부터 선택되는 방법.

청구항 29

청구항 15 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서,

상기 리포좀은 HSPC/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C가 55/30/5/10의 몰 비로 존재하는 HSPC, 콜레스테롤, mPEG2000-DSPE, 및 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 포함하는 방법.

청구항 30

소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시켜 용해된 지질 용액을 형성하는 단계; 및

상기 용해된 지질 용액을 수성 버퍼와 혼합하여 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계;를 포함하는 공정에 의해 제조되는 지질 나노입자의 집단으로서,

상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만인 지질 나노입자의 집단.

청구항 31

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항의 리포좀 조성물을 제공하는 단계; 및

상기 리포좀을 암을 치료하기 위한 치료학적-유효량의 미토마이신 C를 제공하는 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계;를 포함하는 암의 치료 방법.

청구항 32

청구항 31에 있어서,

리포좀을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계는 상기 리포좀을 (제2) 화학치료제와 조합하여 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 33

청구항 31에 있어서,

리포좀을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계는 상기 리포좀을 방사선 치료법과 조합하여 투여하는 단계를 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 명세서에 기술된 주제는 미토마이신 C의 친유성 전구약물(prodrug)을 포함하는 리포좀(liposome) 조성물, 그의 제조, 및 그의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 미국에서 사망의 선도 원인이며, 전세계적으로 사람들에게 영향을 미친다. 수술, 방사선 및 화학치료법은 가장 널리 사용되는 치료 양식이다. 화학치료법 제제는 세포 내에서 세포 성장 및 복제를 제한하는 조건을 생성하며, 암 화학치료법은 최근 몇 해 극적으로 진보되었다. 화학치료법 제제는 전형적으로 신생물성 세포 및 골수, 모낭 및 장 상피와 같이 정상 조직의 신속하게 증식하는 세포 모두에 영향을 미친다. 식욕부진, 구역질, 구토, 설사, 골수 기능의 저해 및 탈모는 화학치료법과 흔히 연관되는 부정적인 효과의 일부이다. 최소의 독성으로 항종양 치료법을 제공하는 화학치료법 제제의 개발이 유리할 것이다.

[0003] 5 몰%의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물 접합체(conjugate)를 포함하는 리포좀 제형 및 그의 제조는 US 6,365,179에 개시되어 있다. 충분한 용량의 미토마이신 C 전구약물을 운반하기 위한 지질 부형제의 양을 감소시키기 위하여, 5 몰% 이상, 예컨대 약 10 몰%의 리포좀성 미토마이신 C 전구약물을 포함하는 리포좀 제형이 요망된다. 리포좀 제형을 제조하기 위한 5 몰%의 미토마이신 C 전구약물을 포함하는 리포좀 성분을 용해시키기 위해

사용되는 용매인 에탄올은 약 10 몰%의 미토마이신 C 전구약물을 포함하는 리포좀 성분을 제대로 용해시킬 수 없는 것으로 나타났다. 3차 부탄올이 없이는 미토마이신 C 전구약물의 가용화는 어렵고 불완전한 공정이며, 침전물, 및 소낭(vesicle) 크기 성장이 일어난다. 에탄올/3차-부탄올의 용매 혼합물(50/50, v/v)은 약 10 몰%의 미토마이신 C 전구약물을 포함하는 리포좀 성분을 용해시킬 수 있다.

[0004] 리포좀 성분을 에탄올/3차-부탄올의 용매 혼합물(50/50, v/v)에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀 제형은 막대형 입자(붕괴되거나 원판형의 리포좀)의 형성, 및 빠른 혈장 제거와 같은 결점을 갖고 있다.

[0005] 본 출원은 미토마이신 C의 친유성 전구약물 접합체를 포함하는 리포좀 제형을 제조하는 새로운 방법을 개시한다. 본 명세서에서 개시된 것과 같은 리포좀 제형은 본질적으로 막대-형상 지질 나노입자가 없고, 미토마이신 C의 친유성 전구약물 접합체를 포함하는 종래의 리포좀 조성물과 비교할 때 개선된 미토마이신 C 전구약물의 혈중 농도 및 미토마이신 C 전구약물의 혈액 순환 시간을 제공한다.

발명의 내용

[0006] 아래에 기술 및 예시된 다음의 측면들 및 그의 구현예는 예시적이고 설명적임을 의미하는 것으로서, 그 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0007] 한 측면에서, 조성물이 제공된다. 상기 조성물은 지질 나노입자 및 약학적으로 허용가능한 비히클(vehicle)의 집단(population)을 포함하며, 여기서 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획(fraction) 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이며, 상기 구형 리포좀은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분으로 구성된다.

[0008] 한 구현예에서, 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 5 몰% 초과 30 몰% 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 8, 9, 10, 11, 또는 12 몰%이다.

[0009] 한 구현예에서, 상기 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 5% 미만이다.

[0010] 다른 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 0.1-5% 사이이다.

[0011] 또 다른 구현예에서, 상기 지질 나노입자의 집단은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1이다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 7:1 내지 15:1이다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1이다.

[0012] 다른 추가 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 친유성 모이어티(moiety)에 부착된 폴리에텔렌 글리콜의 접합체로부터 선택된다.

[0013] 또 다른 추가 구현예에서, 본 명세서에 개시된 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 마우스에서 적어도 약 15시간의 IV 혈액 순환 반감기를 갖는다.

[0014] 또 다른 추가 구현예에서, 본 명세서에 개시된 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 정맥내 투여 후에 마우스에서 DOXIL®로 알려진 것과 같은 페길화된(pegylated) 리포좀성 독소루비신 조성물의 정맥내 투여 후 마우스에서의 혈액 순환 반감기보다 실질적으로 약 10%, 15%, 또는 20% 더 짧은 것과 동일하거나 그 이내인 혈액 순환 반감기를 갖는다. 이와 대조적으로, 약 15% 이상의 막대-형상 지질 나노입자를 포함하는 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 정맥내 투여 후에 마우스에서 DOXIL®로 알려진 것과 같은 페길화된 리포좀성 독소루비신 조성물의 정맥내 투여 후 마우스에서의 혈액 순환 반감기보다 25%, 35% 또는 45% 더 짧은 혈액 순환 반감기를 갖는다.

[0015] 한 구현예에서, 본 명세서에 개시된 조성물을 마우스 내로 정맥내 주사한 후 약 24시간에, 상기 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 정맥내 주사 후 마우스 혈장에서 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물의 Cmax의 20% 초과의 마우스 혈장내 농도를 갖는다.

[0016] 다른 측면에서, 지질 나노입자의 제조 방법이 제공된다. 상기 방법은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시켜 용해된 지질 용액을 형성하는 단계 및 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이다.

[0017] 한 구현예에서, 상기 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계는 상기 용해된 지질 용액을 수성 버퍼와 혼합하여 현탁액을 형성하는 단계, 상기 현탁액을 필터를 통해 압출하는 단계, 및 에탄올 및 3차-부탄올의 혼합물을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계는 멸균 여과를 추가로 포함한다.

[0018] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 5 몰% 초과 30 몰% 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 8, 9, 10, 11, 또는 12 몰%이다.

[0019] 다른 추가 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 친유성 모이어티에 부착된 폴리에틸렌글리콜의 접합체로부터 선택된다.

[0020] 한 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1 또는 약 7:1 내지 15:1이다. 한 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1이다.

[0021] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 5% 미만이다.

[0022] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 0.1-5% 사이이다.

[0023] 또 다른 측면에서, 공정에 의해 제조된 지질 나노입자의 집단이 제공되며, 여기서 상기 공정은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시켜 용해된 지질 용액을 형성하는 단계; 및 상기 용해된 지질 용액을 수성 버퍼와 혼합하여 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계;를 포함하며, 여기서 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이다.

[0024] 또 다른 측면에서, 암의 치료 방법이 제공된다. 상기 방법은 약학적으로 허용가능한 비히클에 현탁된 지질 나노입자의 집단으로 구성되는 리포좀 조성물을 제공하는 단계; 및 상기 리포좀을 암을 치료하기 위한 치료학적-유효량의 미토마이신 C 전구약물을 제공하는 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계;를 포함하며, 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이다.

[0025] 상기에 기술된 예시적인 측면 및 구현예에 더하여, 추가적인 측면 및 구현예는 도면을 참조하고 다음의 설명을 연구함으로써 명확해질 것이다.

[0026] 각 측면의 부가적인 구현예는 다음의 설명, 도면, 실시예, 및 청구항으로부터 명확할 것이다. 전술한 및 이후의 설명으로부터 인식될 수 있는 것과 같이, 본 명세서에 기술된 각각의 모든 특성, 이러한 특성들의 2 이상의 각각의 모든 조합은 이러한 조합에 포함되는 특성들이 상호 불일치하지 않는 한 본 개시의 범위 내에 포함된다. 또한, 임의의 특성 또는 특성들의 조합은 본 발명의 임의의 구현예로부터 구체적으로 배제될 수 있다. 본 발명의 부가적인 측면 및 이점은 특히 부속 실시예 및 도면과 접목되어 고려될 때 다음의 설명 및 청구항에 제시된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1a 내지 도 1d는 리포좀 성분을 각각 50:50(도 1d), 75:25(도 1c), 90:1(도 1a), 및 100:0(도 1b)로 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀의 초저온투과(cryotransmission) 전자 현미경(초저온-TEM) 이미지이다.

도 2a는 리포좀 성분을 50:50의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매 또는 에탄올에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀성 전구약물의 시험관내 디티오트레이톨(DTT) 절단을 보여주는 그래프이고, 도 2b는 리포좀 성분을 50:50 또는 90:10의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포

함하는 공정에 의해 제조된 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 시험관내 디티오트레이톨(DTT) 절단을 보여주는 그래프이다.

도 3a 내지 도 3c는 리포좀 성분을 50:50, 90:10, 또는 100:0의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀을 정맥내 투여한 후 시간의 함수로서 마우스에서 미토마이신 C 전구약물의 혈장 레벨을 ㎍/㎖로 보여주는 그래프이다.

도 4는 소낭-형성 지질 및 미토마이신 C의 전구약물을 50:50, 90:10, 또는 100:0의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀을 정맥내 투여한 후 24시간에 Cmax의 백분율로서 마우스에서 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 혈장 레벨을 보여주는 막대 그래프이다.

도 5a 및 도 5b는 리포좀 성분을 50:50(도 5a) 또는 90:10(도 5b)으로 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 시험관내 혈장 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 6은 리포좀 성분을 90/10 또는 50/50으로 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀성 미토마이신 C 전구약물을 IV 주사한 후 24시간 시점에서 각각의 종양에서 리포좀성 미토마이신 C 전구약물(MLP)의 농도(㎍의 MLP/g의 종양)를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 정의

[0029] 이제 다양한 측면이 아래에 보다 완전하게 기술될 것이다. 그러나, 이러한 측면은 많은 상이한 형태로 구현될 수 있고, 본 명세서에 개시된 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다; 오히려, 이들 구현예는 개시된 내용이 철저하고 완전할 것이고, 그 범위를 본 기술분야의 기술자에게 완전하게 전달하도록 제공된다.

[0030] "투여하는" 또는 "투여"는 본 명세서에서 사용될 때 외래 분자를 세포 또는 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 상기 용어는 용어 "운반" 또는 "운반하는"과 동의어임을 의도한다. 적합한 투여 경로는 비제한적으로 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하, 복강내, 흉강내, 척추강내, 방광내 또는 종양내, 활막내, 주입, 설하, 경피, 경구, 또는 국소이다.

[0031] 본 명세서에서 사용될 때, Cmax는 약물이 대상체에 투여된 후 (리포좀성 미토마이신 C 전구약물과 같은) 약물이 (예를 들면 마우스와 같은 동물 또는 인간과 같은) 대상체의 혈장에서 달성하는 최대 농도를 나타낸다. 이것은 약물동역학의 연구에서 사용되는 표준 측정법이다.

[0032] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "화학치료제"는 "항신생물제" 또는 "항증식제"와 동의어이며, 암, 또는 과증식성 세포가 증식하는 것을 방지하는 화합물을 나타낸다. 일반적으로, 항신생물제는 (1) DNA를 복제하는 세포의 능력을 방해하고 (2) 암 세포에서 세포사 및/또는 아폽토시스(apoptosis)를 유도함으로써 암 세포가 증식하는 것을 방지할 수 있다.

[0033] 투여 후 치료학적-유효량의 미토마이신 C를 생성하는 리포좀성-미토마이신 C 전구약물의 양은 단일 또는 다중 용량에서 신형성물(neoplasia)의 임상적 손상 또는 징후를 경감 또는 최소화하기에 효과적인 미토마이신 C 전구약물의 양이다.

[0034] "정맥내 혈액 순환 반감기" 또는 "IV 혈액 순환 반감기"는 (마우스와 같은)언급된 대상체에 정맥내 주사를 통해 투여된 (리포좀성 미토마이신 C 전구약물과 같은) 언급된 약물의 혈액 순환 반감기를 나타낸다.

[0035] 본 명세서에서 사용될 때, "신생물(neoplasm)" 또는 "신형성물"은 세포의 비정상적 증식에 의해 특정되는 증식성 질환을 의미한다. 전형적으로, 신형성물은 암 및 종양 형성과 연관된다. 본 명세서에서 사용될 때, "고형 종양"은 유방 또는 결장과 같은 기관에서 일어나는 것이다.

[0036] 용어 "환자"는 신형성물에 의해 특정되는 질환을 앓는 개인을 나타낸다. 특히, 환자(즉, 숙주)는 동물(즉, 포유동물) 또는 인간이다.

[0037] 본 명세서에서 사용될 때, "약학적 제형"은 현저한 부작용 없이 인간 및 수의과적 사용을 위한 제형을 포함한다. "약학적으로 허용가능한 담체"는 본 명세서에서 사용될 때 그 요망되는 활성을 위해 가장 적합한 물리적 위치에서 본 발명의 제제가 효과적으로 분포되게 하는 조성물 또는 제형을 나타내며, "약학적으로 허용가능한 담체"는 버퍼, 안정화제 또는 본 기술분야의 기술자에게 잘 알려진 다른 물질을 나타낸다. 이러한 물질은

비독성이어야 하고, 활성 성분의 효능을 간섭하지 않아야 한다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 본성은 투여 경로에 의존할 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용될 때, "전구약물"은 대상체에 투여 후 전구약물이 신생물의 세포에 독성인 생성물로 전환되는 어떤 화학적 또는 물리적 공정을 통해 생체내에서 약물을 방출하는 약물 전구체인 화합물을 의미한다.

[0039] "치료학적 유효량"에 대한 인용은 개인에게 유익을 보여 주기에 충분한 화합물의 양을 의도한다. 상기 양은 환자에서 신형성물과 연관된 징후의 증세를 종양 질량 또는 부피의 감소 또는 종양 성장 속도의 지체와 같이 방지, 완화, 저감, 또는 달리 감소시킨다.

[0040] 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료 효과"는 본 명세서에서 사용될 때 세포 증식 속도를 감소 또는 중단(예컨대, 종양 성장의 지체 또는 중단)시키거나 증식성 암 세포의 수를 감소시키는 것을 나타낸다.

[0041] 지질 나노입자의 집단에 대한 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획의 백분율은 집단에서 지질 나노입자의 수에 대한 막대-형상 지질 나노입자의 수에 의한 백분율을 나타낸다.

[0042] 수치의 범위가 제공될 때, 이것은 그 범위의 상한 및 하한의 사이에 있는 값 및 그 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 또는 사이 값이 그 개시 내에 포괄됨을 의도한다. 예를 들면, 1 ㎛ 내지 8 ㎛의 범위가 언급된다면, 이것은 2 ㎛, 3 ㎛, 4 ㎛, 5 ㎛, 6 ㎛, 및 7 ㎛뿐만 아니라 1 ㎛ 이상 범위의 값 및 8 ㎛ 이하 범위의 값이 또한 명시적으로 개시됨을 의도한다.

[0043] 단수 형태 "한", 및 "하나"는 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "리포좀"을 인용하는 것은 단일 리포좀뿐만 아니라 2 이상의 동일하거나 상이한 리포좀을 포함하고, "부형제"를 인용하는 것은 단일 부형제뿐만 아니라 2 이상의 동일하거나 상이한 부형제를 포함하는 것 등이다.

[0044] 특히 해당 함량과 관련하여, 용어 "약"은 ±5%, 10%, 15% 또는 20%의 편차를 포괄하는 것을 의미한다.

[0045] 리포좀 조성물

[0046] 한 측면에서, 조성물이 제공된다. 상기 조성물은 지질 나노입자 및 약학적으로 허용가능한 비히클의 집단을 포함하며, 여기서 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이며, 상기 구형 리포좀은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분으로 구성된다.

[0047] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 5 몰% 초과 30 몰% 미만, 예컨대 5 몰% 초과 20 몰% 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 8, 9, 10, 11, 또는 12 몰%, 예컨대 10 몰%이다.

[0048] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 5% 미만이다.

[0049] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 0.1-5% 사이이다.

[0050] 한 구현예에서, 상기 지질 나노입자의 집단은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1이다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 7:1 내지 15:1이다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1이다.

[0051] 한 구현예에서, 본 명세서에 개시된 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 마우스에서 적어도 약 15시간의 IV 혈액 순환 반감기를 갖는다.

[0052] 한 구현예에서, 약 15% 이상의 막대-형상 지질 나노입자를 포함하는 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물과 비교하여, 본 명세서에 개시된 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 마우스에서 페길화된 리포좀성 독소루비신의 마우스에서의 IV 혈액 순환 반감기에 대한 값과 근접한 IV 혈액 순환 반감기를 갖는다.

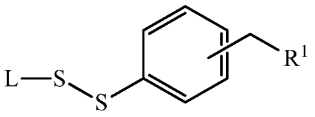
[0053] 한 구현예에서, 본 명세서에 개시된 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 정맥내 투여 후에 마우스에서 페길화된 리포좀성 독소루비신 조성물의 정맥내 투여 후 마우스에서의 혈액 순환 반감기보다 실질적으로 약 10%, 15%, 또는 20% 더 짧은 것과 동일하거나 그 이내인 혈액 순환 반감기를 갖는다. 이와 대조적으로, 약 15% 이상의 막대-형상 지질 나노입자를 포함하는 조성물의 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 정맥내 투여 후에

마우스에서 DOXIL®로 알려진 것과 같은 페길화된 리포좀성 독소루비신 조성물의 정맥내 투여 후 마우스에서의 혈액 순환 반감기보다 25%, 35% 또는 45% 더 짧은 혈액 순환 반감기를 갖는다.

[0054] 한 구현예에서, 본 명세서에 개시된 조성물을 마우스 내로 정맥내 주사한 후 약 24시간에, 상기 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물은 정맥내 주사 후 마우스 혈장에서 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물의 Cmax의 20% 초과의 마우스 혈장내 농도를 갖는다.

[0055] 리포좀성 미토마이신 C 전구약물

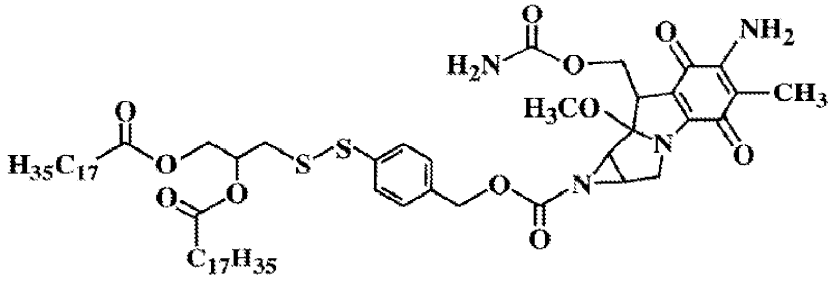
[0056] 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에서 사용하기 위해 제공되는 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물 접합체 또는 리포좀성-미토마이신 C 전구약물 접합체는 리포좀 운반 플랫폼(platform) 내로 포함된 미토마이신 C의 전구약물 접합체를 나타내며, 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 전구약물 접합체는 친유성 또는 소수성 모이어티에 방출가능하게 부착된 미토마이신 C로 구성되고, 일반적으로 다음의 형태이다:

[0057] 

[0058] 상기에서, L은 소수성 모이어티이고, R^1은 디티오벤질 모이어티에 공유결합으로 부착된 미토마이신 C 잔기를 나타낸다. CH_2R^1 기의 방향은 오르토(ortho) 위치 및 파라(para) 위치로부터 선택된다. 상기 접합체의 합성은 미국 특허 제6,365,179호; 제6,984,396호; 및 제7,303,760호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0059] 소수성 모이어티인 L은 전형적으로 디아실글리세롤, 스테롤, 인지질, 상기 지질의 유도체, 다른 자연-발생형 지질 및 그 합성 유사체와 같은 지질이다. 상기 소수성 모이어티는 미토마이신 C 접합체를 리포좀성 운반 비히클에 고정시키기 위해 리포좀성 이중층(bilayer) 내로 포함시키기에 적합하다.

[0060] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물 접합체는 다음의 구조를 갖는다:

[0061] 

파라-디아실디글리세롤디티오벤질-미토마이신 C(파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C)

[0062] 상기 리포좀성-미토마이신 C 전구약물 접합체는 환원 조건, 즉 시스테인 또는 글루타치온과 같은 환원제에 노출시 분해되어 미토마이신 C를 생성한다. 즉, 접합체의 티오분해성(thiolytic) 절단은 미토마이신 C 및 소수성 모이어티와 디티오벤질 모이어티의 비독성 부산물을 생성한다. 인식될 수 있는 것과 같이, 상기 전구약물 접합체는 생체내에서 대상체에 투여하기 위한 리포좀 내로 용이하게 포함될 수 있다. 상기 전구약물 접합체는 독성이 아니며, 투여 후 내인성(endogenous) 환원제에 노출되거나 외인성(exogenous) 환원제에 노출시, 상기 접합체는 분해되어 그 자연 상태인 생물학적 활성을 갖는 미토마이신 C를 생성한다.

[0063] 리포좀

[0064] 리포좀은 다양한 치료적 목적, 특히 리포좀의 전신 투여에 의해 치료제를 표적 영역 또는 세포로 운반하기 위해 사용되는 폐쇄된 지질 소낭이다. 특히, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 친수성 폴리머 사슬의 표면 코팅을 갖는 리포좀은 약물 담체로서 바람직한데, 그 이유는 이러한 리포좀과 같은 약물 담체는 폴리머 코팅이 없는 리포좀에 비해 연장된 혈액 순환 수명을 제공하기 때문이다. 상기 폴리머는 혈중 단백질에 대한 차단제로 작용하여서, 상기 단백질의 결합 및 대식세포 및 세망내피 시스템의 다른 세포에 의해 섭취 및 제거되기 위한 리포좀의 인식을 방지한다. 한외여과 가능한 크기 범위(200 nm 직경 미만)인 리포좀은 종종 지질성 지질 나노입자 또는 단순

히 지질 나노입자로 간주되고 불린다.

[0065] 본 개시의 범위 내의 리포좀은 한 구현예에서 소낭-형성 지질이고 선택적으로 적어도 하나의 지질 성분인 지질과 조합된 접합체를 포함할 수 있다. 본 개시에서 사용될 때 적어도 하나의 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 지질 이중층 안정화 지질, 예를 들면, 메톡시-폴리에틸렌 글리콜-디스테아로일 포스파티딜에탄올아민(mPEG-DSPE)과 같은 친유성 모이어티에 부착된 폴리에텔렌글리콜의 접합체로부터 선택될 수 있다.

[0066] "소낭-형성 지질"은 물에서 자발적으로 이중층 소낭을 형성하는 지질이다. 상기 소낭-형성 지질은 바람직하게는 2개의 탄화수소 사슬, 전형적으로 아실 사슬, 및 극성 헤드기(head group)를 갖는다. 다양한 합성 소낭-형성 지질 및 자연-발생형 소낭-형성 지질이 본 기술분야에 알려져 있으며, 상기 2개의 탄화수소 사슬은 전형적으로 약 12 내지 약 24개 탄소 원자의 길이이고, 다양한 불포화도를 갖는다. 예로는 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 포스파티드산(PA), 포스파티딜이노시톨(PI), 및 스핑고마이엘린(SM)과 같은 인지질을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 바람직한 지질은 수소화된 대두 포스파티딜콜린(HSPC)이다. 다른 바람직한 패밀리의 지질은 디아실글리세롤이다. 상기 지질은 상업적으로 수득되거나 공개된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0067] 상기 소낭-형성 지질은 유동성도 또는 강직도를 달성하고, 혈청에서 리포좀의 안정성을 제어하고, 리포좀 내에 포획된 제제의 방출 속도를 제어하기 위해 선택될 수 있다. 보다 강직성인 지질 이중층, 또는 액체 결정질 이중층을 갖는 리포좀은 상대적으로 강직성인 지질, 예를 들면, 예컨대 최대 약 65℃까지의 상대적으로 높은 상 전이 온도를 갖는 지질을 포함시킴으로써 제조될 수 있다. 강직성인, 즉 포화된 지질은 지질 이중층에서 더 큰 멤브레인(membrane) 강직성에 기여한다. 콜레스테롤과 같은 다른 지질 성분도 또한 지질 이중층 구조에서 멤브레인 강직성에 기여하는 것으로 알려져 있다.

[0068] 지질 유동성은 상대적으로 유체인 지질, 전형적으로 예컨대 실온(약 20-25℃) 이하의 상대적으로 낮은 액체 대 액체-결정질 상 전이 온도를 갖는 지질 상을 갖는 지질을 포함시킴으로써 달성된다.

[0069] 상기 리포좀은 또한 스테롤과 같이 지질 이중층 내로 포함될 수 있는 다른 지질 성분을 포함할 수 있다. 상기 다른 지질 성분은 전형적으로 이중층 멤브레인 내부의 소수성 영역과 접촉하는 소수성 모이어티, 및 멤브레인 외부의 극성 표면을 향하는 극성 헤드기 모이어티를 갖는다.

[0070] 리포좀 내의 다른 지질 성분은 친수성 폴리머로 유도체화되는 소낭-형성 지질일 수 있다. 상기 지질 성분에서, 유도체화된 지질은 지질 이중층 표면의 내부 및 외부 모두에 친수성 폴리머 사슬의 표면 코팅을 형성하게 된다. 전형적으로, 약 1-20 몰% 사이의 유도체화된 지질이 지질 조성물 내에 포함된다.

[0071] 소낭-형성 지질로 유도체화되기에 적합한 친수성 폴리머는 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐메틸에테르, 폴리메틸옥사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리히드록시프로필옥사졸린, 폴리히드록시프로필메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 폴리히드록시프로필메타크릴레이트, 폴리히드록시에틸아크릴레이트, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 폴리에텔렌글리콜, 및 폴리아스파르트아미드를 포함한다. 상기 폴리머는 호모폴리머 또는 블록(block) 또는 랜덤(random) 코폴리머로서 도입될 수 있다.

[0072] 바람직한 친수성 폴리머 사슬은 폴리에텔렌글리콜(PEG), 바람직하게는 약 500 내지 약 10,000 달톤, 바람직하게는 약 1,000 내지 약 5,000 달톤의 분자량을 갖는 PEG 사슬이다. PEG의 메톡시 또는 에톡시-캡핑 유사체가 또한 바람직한 친수성 폴리머이다. 상기 폴리머는 예컨대 약 12 내지 약 220,000 달톤의 다양한 폴리머 크기로 사업적으로 이용가능하다.

[0073] 리포좀은 전형적으로 약 1 내지 약 30 몰%, 바람직하게는 약 5 내지 약 30 몰%, 보다 바람직하게는 약 5 내지 약 20 몰%, 예컨대 5 몰% 초과 30 몰% 미만, 5 몰% 초과 20 몰% 미만, 또는 약 8, 9, 10, 11, 및 12 몰%의 지질-미토마이신 C 전구약물 접합체를 포함할 수 있다.

[0074] 한 구현예에서, 상기 소낭-형성 리포좀은 HSPC일 수 있다. 한 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 mPEG2000-DSPE 및 콜레스테롤로부터 선택된다.

[0075] 한 구현예에서, 상기 리포좀은 HSCP/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C가 55/30/5/10의 몰 비로 존재하는 HSCP, 콜레스테롤, mPEG2000-DSPE, 및 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 포함할 수 있다.

[0076] 제조 방법

[0077] 리포좀 성분을 에탄올/3차-부탄올(50/50, v/v)의 용매 혼합물에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조

된 리포좀 제형은 빠른 약물동역학적 제거와 같은 결점을 갖고 있다. 용매 혼합물에서 3차-부탄올의 양을 감소시킬 때, 친유성 미토마이신 C 전구약물의 약물동역학적 제거 속도는 예상치 못하게 줄어들었고, 막대-형상 리포좀의 양도 또한 감소되었다.

[0078] 따라서, 리포좀을 제조하기 위한 새로운 방법이 제공된다. 상기 방법은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시켜 용해된 지질 용액을 형성하는 단계 및 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이다.

[0079] 한 구현예에서, 상기 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계는 용해된 지질 용액을 수성 버퍼와 혼합하여 현탁액을 형성하는 단계, 상기 현탁액을 필터를 통해 압출하는 단계, 및 에탄올 및 3차-부탄올의 혼합물을 제거하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계는 멸균 여과를 추가로 포함한다.

[0080] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 5 몰% 초과 20 몰% 미만과 같은 5 몰% 초과 30 몰% 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 8, 9, 10, 11, 또는 12 몰%이다.

[0081] 다른 추가 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 친유성 모이어티에 부착된 폴리에텔렌글리콜의 접합체로부터 선택된다.

[0082] 한 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1 또는 약 7:1 내지 15:1이다. 한 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1이다.

[0083] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 5% 미만이다.

[0084] 한 구현예에서, 상기 제2 분획 상기 지질 나노입자의 집단의 약 0.1-5% 사이이다.

[0085] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물 접합체는 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C이다.

[0086] 한 구현예에서, 상기 소낭-형성 리포좀은 HSPC이다.

[0087] 한 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 mPEG2000-DSPE를 포함한다.

[0088] 한 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 mPEG2000-DSPE를 포함한다.

[0089] 한 구현예에서, 상기 리포좀은 HSCP/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C가 55/30/5/10의 몰 비로 존재하는 HSCP, 콜레스테롤, mPEG2000-DSPE, 및 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 포함한다.

[0090] 또한, 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시켜 용해된 지질 용액을 형성하는 단계; 및 상기 용해된 지질 용액을 수성 버퍼와 혼합하여 지질 나노입자의 집단을 형성하는 단계;를 포함하는 공정에 의해 제조되는 지질 나노입자의 집단이 제공되며, 여기서 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이다.

[0091] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 5 몰% 초과 20 몰% 미만과 같은 5% 초과 30% 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 8, 9, 10, 11, 또는 12 몰%이다.

[0092] 다른 추가 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 친유성 모이어티에 부착된 폴리에텔렌글리콜의 접합체로부터 선택된다.

[0093] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 지질의 총 몰의 5 몰% 초과 30 몰% 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 리포좀의 총 몰의 약 10 몰%이다.

[0094] 한 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1 또는 약 7:1 내지 15:1이다. 한 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1이다.

[0095] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 5% 미만이다.

[0096] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 0.1-5% 사이이다.

[0097] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물 접합체는 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C이다.

[0098] 한 구현예에서, 상기 소낭-형성 리포좀은 HSPC이다.

[0099] 한 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 mPEG2000-DSPE를 포함한다.

[0100] 한 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 mPEG2000-DSPE를 포함한다.

[0101] 한 구현예에서, 상기 리포좀은 HSCP/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C가 55/30/5/10의 몰 비로 존재하는 HSCP, 콜레스테롤, mPEG2000-DSPE, 및 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 포함한다.

[0102] 치료 방법

[0103] 한 측면에서, 암의 치료 방법이 제공된다. 상기 방법은 약학적으로 허용가능한 비히클에 현탁된 지질 나노입자의 집단으로 구성되는 리포좀 조성물을 제공하는 단계; 및 상기 리포좀을 암을 치료하기 위한 치료학적-유효량의 미토마이신 C를 제공하는 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계;를 포함하며, 상기 지질 나노입자의 집단은 구형 리포좀의 제1 분획 및 막대-형상 지질 나노입자의 제2 분획으로 구성되고, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 15% 미만이다.

[0104] 한 구현예에서, 상기 구형 리포좀은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 포함한다.

[0105] 한 구현예에서, 상기 지질 나노입자의 집단은 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분을 약 2:1 내지 20:1의 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)로 에탄올 및 3차 부탄올로 구성되는 용매 혼합물에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1이다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1이다. 일부 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1이다.

[0106] 한 구현예에서, 상기 조성물 내의 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 5 몰% 초과 20 몰% 미만과 같은 5 몰% 초과 30 몰% 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 소낭-형성 지질, 미토마이신 C의 친유성 전구약물, 및 선택적 지질 성분의 총 몰의 약 8, 9, 10, 11 또는 12 몰%이다.

[0107] 다른 추가 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 친유성 모이어티에 부착된 폴리에텔렌글리콜의 접합체로부터 선택된다.

[0108] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 지질의 총 몰의 5 몰% 초과 30 몰% 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물의 양은 상기 리포좀의 총 몰의 약 10 몰%이다.

[0109] 한 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 5:1 내지 20:1 또는 약 7:1 내지 15:1이다. 한 구현예에서, 상기 에탄올/3차-부탄올 비(v/v)는 약 9:1이다.

[0110] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 5% 미만이다.

[0111] 한 구현예에서, 상기 제2 분획은 상기 지질 나노입자의 집단의 약 0.1-5% 사이이다.

[0112] 한 구현예에서, 상기 미토마이신 C의 친유성 전구약물 접합체는 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C이다.

[0113] 한 구현예에서, 상기 소낭-형성 리포좀은 HSPC이다.

[0114] 한 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 mPEG2000-DSPE를 포함한다.

[0115] 한 구현예에서, 상기 선택적 지질 성분은 콜레스테롤 및 mPEG2000-DSPE를 포함한다.

[0116] 한 구현예에서, 상기 리포좀은 HSCP/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C가 55/30/5/10의 몰 비로 존재하는 HSCP, 콜레스테롤, mPEG2000-DSPE, 및 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 포함한다.

[0117] 한 구현예에서, 리포좀을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계는 (제2) 화학치료제와 조합된 리포좀을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 제2 화학치료제는 리포좀성 미토마이신 C 전구약물 또는 미토마이신 C 또는 비-리포좀성 미토마이신 C 전구약물이 아니다. 상기 리포좀성 미토마이신 C 전구약물과 접목되어 사용하기 위해 고려되는 화학치료제는 임의의 특정 화합물 또는 화합물의 부류에 제한되는 것은 아니다. 아래의 본 명세서에 논의된 연구에 기반하여, 소정의 화학치료제와 조합하여 투여된 리포좀성-미토마이신 C 전구약물은 상승 효과를 일으키는 것이 발견되었다.

[0118] 한 구현예에서, 리포좀성-미토마이신 C 전구약물과 조합하여 투여되는 화학치료제는 젬시타빈이다. 젬시타빈은 2'-데옥시-2',2'-디플루오로-시티딘에 할당된 성분명(generic name)이다. 이것은 모노히드로클로라이드 염, 및 베타-이성질체로 상업적으로 이용가능하다. 이것은 또한 화학적으로 1-(4-아미노-2-옥소-1H-피리미딘-1-일)-2-데스옥시-2,2-디플루오로리보오스로 알려져 있다. 젬시타빈은 미국 특허 제4,808,614호 및 제5,464,826호에 개시되어 있으며, 이들은 감수성 신생물을 치료하기 위해 젬시타빈을 합성, 제형화, 및 사용하는 방법을 기술하기 위하여 인용에 의해 본 명세서에 포함된다. 젬시타빈 히드로클로라이드의 상업적 제형은 국소 진행된(절제불가한 Ⅱ 기 또는 Ⅲ 기) 또는 전이된(Ⅳ 기) 췌장의 선암종을 갖는 환자, 및 시스플라틴 또는 카르보플라틴과 조합하여 비-소세포 폐암 및 방광암을 갖는 환자를 위한 제1-선 치료로 나타낸다.

[0119] 다른 구현예에서, 리포좀성-미토마이신 C 전구약물과 조합하여 투여되는 화학치료제는 빈브라스틴, 비노렐빈, 빈크리스틴, 또는 빈데신과 같은 빈카 알칼로이드이다.

[0120] 다른 구현예에서, 리포좀성-미토마이신 C 전구약물과 조합하여 투여되는 화학치료제는 독소루비신 또는 다우노루비신과 같은 안트라시클린 항생제이다. 상기 안트라시클린 약물은 인간 암 화학치료법에 널리 사용되며, 단편화 및 단일-가닥 절단과 같은 DNA 손상을 초래한다. 안트라시클린의 작용 메커니즘은 RNA 및 DNA 합성의 억제를 수반한다. 한 구현예에서, 상기 독소루비신 또는 다우노루비신은 리포좀-포획된 형태로 제공된다. 페길화된 리포좀-포획된 독소루비신은 DOXIL® , CAELYX®, 및 LIPODOX®의 상표명으로 알려져 있고, 리포좀-포획된 다우노루비신은 DAUNOXOME®의 상표명으로 알려져 있다.

[0121] 다른 구현예에서, 리포좀성-미토마이신 C 전구약물과 조합하여 투여되는 화학치료제는 탁산이다. 탁산은 타누스(Taxus)(주목) 속의 식물에 의해 생산되는 디테르펜이며, 화학치료법 제제로 널리 사용된다. 탁산 제제는 파클리탁셀(TAXOL®) 및 도세탁셀(TAXOTERE®)을 포함한다.

[0122] 다른 구현예에서, 리포좀성 미토마이신 C 전구약물과 조합하여 투여되는 화학치료제는 플루오로피리미딘이다. 플루오로피리미딘은 결장직장암 및 유방암 및 공기소화기관(aerodigestive tract)의 암을 포함하는 암의 치료에 널리 사용되는 항대사물질 약물이다. 상기 플루오로피리미딘은 5-플루오로우라실(5-FU) 약물 및 카페시타빈 및 테가푸르와 같은 5-FU의 전구약물을 포함한다. 한 구현예에서, 리포좀성 미토마이신 C 전구약물과 조합하여 투여되는 플루오로피리미딘 화학치료제는 카페시타빈과 같은 5-FU에 대한 전구약물이다. 카페시타빈은 항신생물 활성을 갖는 플루오로피리미딘 카바메이트이다. 이것은 5-플루오로우라실로 전환되는 5'-데옥시-5-플루오로우리딘(5'-DFUR)의 경구 투여 전신 전구약물이다. 카페시타빈에 대한 화학명은 5'-데옥시-5-플루오로-N-[(펜틸옥시)카르보닐]-시티딘이다. 이것은 미국에서 XELODA®(Roche Laboratories)로 판매된다. 이것은 경구 경로에 의해 전이성 유방암 및 결장직장 종양을 갖는 환자의 치료용으로 표시된다. 카페시타빈은 미국 특허 제5,472,949호에 기술되어 있다.

[0123] 상기 화학치료제의 안전하고 효과적인 투여를 위한 방법은 본 기술분야의 기술자에게 알려져 있다. 또한, 그 투여는 표준 문헌에 기술되어 있다. 예를 들면, 많은 화학치료제의 투여는 ["Physicians' Desk Reference" (PDR)], 예컨대, 1996년 판(Medical Economics Company, Montvale, N.J.)에 기술되어 있다.

[0124] 리포좀성-미토마이신 C 전구약물이 적어도 하나의 다른 제제와 조합하여 투여될 때, 상기 적어도 하나의 다른 제제는 동일한 제형에서 공동-투여될 수 있다. 대안적으로, 다양한 제제는 별도의 제형에서 동시에(함께) 투여될 수 있다. 또한, 상기 제제는 별도의 제형에서 투여될 수 있으며, 상기 별도의 제형은 동시에 투여되지 않고 투여 사이에 경과가 없거나 거의 없이 순차적으로 즉시 투여되거나, 동일한 치료 기간 동안, 예를 들면, 매일

또는 매주의 치료 기간 동안에 순차적으로 투여된다.

[0125] 따라서, 본 발명의 방법에서, 제2 화학치료제와 "조합한" 리포좀성-미토마이신 C 전구약물의 투여는 공동-투여를 나타내며, 이것은 함께, 순차적으로, 또는 교대로 투여하는 것을 의도할 수 있다. 함께 투여는 본질적으로 동시에 리포좀성-미토마이신 C 전구약물 및 제2 화학치료제 모두를 투여하는 것을 나타낸다. 함께 투여는 유효량의 미토마이신 C를 생성하는 일정량의 리포좀성-미토마이신 C 전구약물 및 일정량의 제2 화학치료제 모두를 서로 물리적으로 연관되어 함유하는 단일 조합 제형을 통해 달성될 수 있다. 상기 단일 조합 제형은 일정량의 리포좀성-미토마이신 C 전구약물 및 제2 화학치료제 모두를 함유하고 대상체 내로 주사될 수 있는 액체 혼합물로 이루어질 수 있다. 일정량의 리포좀성-미토마이신 C 전구약물 및 일정량의 제2 화학치료제가 별도의 개별적인 제형으로부터 대상체에 함께 투여되는 것은 또한 본 발명의 방법의 범위 이내이다. 예를 들면, 상기 리포좀성-미토마이신 C 전구약물은 주사를 통해 투여될 수 있고, 일정량의 제2 화학치료제는 경구로 또는 상기 리포좀성-미토마이신 C 전구약물의 주사를 위해 사용된 것과 상이하거나 동일한 주사 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0126] 본 명세서에 기술된 방법에서, 상기 리포좀성-미토마이신 C 전구약물 및 제2 화학치료제는 또한 조합의 최대 효능을 수득하기 위하여 기간에 걸쳐서 간격을 둔 별도의 개별 제형으로부터 대상체에 공동-투여될 수 있다. 각각의 약물의 투여는 기간에 있어서 짧은 신속한 투여로부터 연속적 관류까지의 범위일 수 있다. 기간에 걸쳐서 간격을 둘 때, 상기 리포좀성-미토마이신 C 전구약물 및 제2 화학치료제의 공동-투여는 순차적 또는 교대적일 수 있다. 순차적 공동-투여의 경우, 제제들 중 하나가 별도로 투여된 후 다른 것이 뒤따른다. 예를 들면, 리포좀성-미토마이신 C 전구약물을 이용한 치료의 전체 과정이 완료된 후, 제2 화학치료제를 이용한 치료의 전체 과정이 뒤따를 수 있다. 대안적으로, 순차적 공동-투여의 경우, 제2 화학치료제를 이용한 치료의 전체 과정이 완료된 후, 리포좀성-미토마이신 C 전구약물을 이용한 치료의 전체 과정이 뒤따를 수 있다. 교대적 공동-투여의 경우, 각각의 약물의 전체 치료가 투여될 때까지 리포좀성-미토마이신 C 전구약물을 이용한 치료의 부분 과정이 제2 화학치료제를 이용한 치료의 부분 과정과 교대될 수 있다.

[0127] 한 구현예에서, 이를 필요로 하는 환자에게 리포좀을 투여하는 단계는 방사선 치료법과 조합하여 리포좀을 투여하는 단계를 포함한다. 방사선 치료법은 암 세포를 손상시키거나 및/또는 죽이고 종양을 줄어들게 하기 위하여 고-에너지 방사선을 이용한다. 상기 고-에너지 방사선은 X-선, 감마 선 또는 대전된 입자를 수반할 수 있다. 상기 방사선 치료법은 체외에 위치한 장치에 의해 가해질 수 있거나(외부-빔 방사선 치료법), 이것은 암 세포 근처의 체내에 위치한 방사활성 물질로부터 나올 수 있다(내부 방사선 치료법이며, 근접치료법으로도 불림). 전신 방사선 치료법은 암 세포를 죽이기 위해 혈액 내를 이동하는 방사활성 요오드와 같은 방사활성 물질을 이용한다.

[0128] 따라서, 한 구현예에서, 방사선치료법은 방사선이 체외의 기구로부터 나오는 외부 방사선치료법을 의도한다. 외부 방사선치료법은 대개 수일 또는 수주에 걸친 몇 가지 치료 과정에 제공되며, 치료 동안에 장치는 고-에너지 방사선, 대개 X-선을 암 부위 및 이를 둘러싼 작은 면적의 정상 조직에 겨냥한다.

[0129] 다른 구현예에서, 방사선치료법은 방사선이 체내에 위치한 이식물 또는 물질(액체, 고체, 반고체 또는 다른 물질)로부터 나오는 내부 방사선치료법을 의도한다. 한 구현예에서, 상기 내부 방사선치료법은 고체 방사활성 공급원이 체강 내부에 위치하거나 바늘이 종양에 위치한 근접치료법이다. 다른 구현예에서, 상기 내부 방사선치료법은 액체 방사선 공급원, 전형적으로 방사성핵종(방사성동위원소 또는 밀봉되지 않은 공급원)을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 방사선 공급원은 경구 투여될 수 있거나 정맥 내로 주사될 수 있다.

[0130] 예시적 연구

[0131] 제1 연구에서, 미토마이신 C의 전구약물 접합체는 실시예 1에 기술된 것과 같은 리포좀 운반 플랫폼 내에 포함되었다. 상기 리포좀은 HSCP/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 상이한 비(v/v)의 에탄올/3차-부탄올을 갖는 용매 혼합물에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조되었다. 상기 리포좀 샘플은 초저온-TEM을 이용해 이미지화된다. 달리 나타내지 않는 한, HSCP/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C는 55/30/5/10(75.5 ㎎/㎖ 지질 및 12.5 ㎎/㎖ 전구약물)의 몰 비로 존재하였다.

[0132] **도 1a** 내지 **도 1d**는 HSPC/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 50:50(도 1d), 75:25(도 1c), 90:10(도 1a), 또는 100:0(도 1b)의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀의 초저온-TEM 이미지이다. 초저온-TEM 이미지 분석은 3차-부탄올의 함량이 더 막대-형상 입자가 더 많이 형성됨을 보여주었다. 3차 부탄올이 용매 혼합물에서 50%였을 때, 3차 부탄올이 25%였을 때보다 막대-형상 입자가 더 많이 형성되었다. 3차 부탄올이 용매 혼합물에서 10%였을 때, 사실

상 막대가 검출되지 않았다.

[0133] 다른 연구에서, 시험관내 DTT-유도성 방출/활성화 분석법이 미토마이신 C의 리포좀성 전구약물 접합체에 대해 수행되었다. **도 2a** 및 **도 2b**는 HSPC/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 50:50의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀이 HSPC/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 100%(도 2a) 또는 90% 에탄올(도 2b)에 용해시키는 단계를 포함하는 공종에 의해 제조된 리포좀보다 DTT-유도성 절단에 보다 민감하였음을 보여준다.

[0134] 다른 연구에서, 마우스에 대한 약물동역학 연구를 수행하였다. 상기 연구는 HSPC/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 50:50, 90:10, 또는 100:0의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀을 마우스에 정맥내 투여함으로써 파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C의 혈장 레벨을 측정하는 것을 목적으로 하였다. **도 3a** 내지 **도 3c**는 미토마이신 C 전구약물의 혈장 레벨이 주사 후 3시간에는 필적하였지만, 24시간에는 낮은 함량의 3차 부탄올을 이용하여 제조된 배치(batch) 쪽으로 격차(>3배)가 생김을 보여주는데, 이는 미토마이신 C 전구약물의 더 높은 혈장 레벨 및 더 긴 순환 시간이 3차 부탄올의 함량이 낮거나 없이 제조된 리포좀에 의해 얻어짐을 나타낸다.

[0135] **도 4**는 HSPC/콜레스테롤/mPEG2000-DSPE/파라-디스테아로일-DTB-미토마이신 C를 50:50, 90:10, 또는 100:0의 에탄올/3차-부탄올의 비를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀을 마우스에 정맥내 투여한 후 Cmax(Cmax는 보통 MLP을 포함하는 리포좀 제형의 정맥내 주사 후 1시간 이내에 달성됨)의 백분율로서 정맥내 투여 후 24시간에 리포좀성 미토마이신 C(MLP) 전구약물의 마우스 혈장 레벨을 보여주는 막대 그래프이다. 90:10의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매로부터 제조된 리포좀은 24시간에 가장 높은 백분율의 Cmax를 갖는다.

[0136] **도 5a** 및 **도 5b**는 리포좀 성분을 50:50(도 5a) 또는 90:10(도 5b)의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 제형의 시험관내 혈장 안정성을 보여주는 그래프이다. 상기 시험관내 혈장 안정성 분석법은 tBuOH-높음 및 tBuOH-낮음 사이에 차이를 보이지 않는데, 이는 막대-형상 지질 나노입자의 존재가 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 혈장 안정성에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

[0137] **도 6**은 리포좀 성분을 90/10 또는 50/50의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매에 용해시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 리포좀성 미토마이신 C 전구약물을 IV 주사한 후 24시간의 시점에서 각각의 종양에서 리포좀성 미토마이신 C 전구약물(MLP)의 농도(㎍의 MLP/g의 종양)를 보여준다. 리포좀성 미토마이신 C 전구약물을 제조하기 위해 사용된 에탄올/t-부탄올의 비(v/v)는 종양 내로의 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 섭취에 영향을 미칠 수 있다. 90/10 또는 50/50의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매를 이용하여 제조된 리포좀성 미토마이신 C 전구약물을 IV 주사한 후 24시간에, 종양에서 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 농도는 90/10의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매를 이용하여 제조된 리포좀성 미토마이신 C 전구약물보다 통계적으로 유의하게 더 높다. 50:50 비의 에탄올/3차-부탄올로 제조된 리포좀의 경우, MLP의 중앙 농도는 1.63 ㎍/g 종양으로, 1.20-9.76 ㎍/g 종양의 범위를 가졌다. 90:10 비의 에탄올/3차-부탄올로 제조된 리포좀의 경우, MLP의 중앙 농도는 6.51 ㎍/g 종양으로, 4.23-9.71 ㎍/g 종양의 범위를 가졌다. 따라서, 감소된 막대-형상 지질 나노입자의 집단을 갖는 리포좀 조성물을 투여한 후 종양에서 MLP의 농도가 더 높았다.

[0138] 막대-형상 리포좀이 시험관내 절단에 대한 높은 민감성 및 빠른 생체내 제거에 기여하는지를 입증하기 위하여 다른 연구가 수행되었다. 상기 연구에서, 리포좀성 미토마이신 C 전구약물(MLP)을 갖는 2가지 조성물이 제조되었다. 상기 2가지 조성물은 한 조성물이 5% PEG-지질이 아닌 20% PEG-지질을 갖는 것을 제외하고는 동일하게 제조되었다. PEG-지질의 양을 증가시키면 미셀형(micellar) 디스크 및 막대의 형성을 촉진한다(Sandstrom, M.C. *et al., Langmuir*, 23(8):4192 (2007); Zhang, W. *et al., European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 125:74-85 (2018)). 상기 2가지 조성물의 TEM 검사는 25% PEG-지질을 갖는 조성물에 막대-형상 리포좀이 풍부하였음을 확인하였다. 상기 2가지 조성물은 실시예 2에 기술된 방출 분석법을 이용해 시험관내에서 테스트되었다. 상당한 분획의 막대-형상 리포좀을 갖는 조성물(즉, 25% PEG-지질을 갖는 조성물)은 디티오트레이톨을 이용한 절단에 보다 민감하였다. 상기 2가지 조성물은 혈장 제거를 평가하기 위하여 실시예 3의 방법에 따라 생체내에서 테스트되었다. 상당한 분획의 막대-형상 리포좀을 갖는 조성물(즉, 25% PEG-지질을 갖는 조성물)은 작은 분획(예컨대, 약 15% 미만)의 막대-형상 리포좀을 갖도록 본 명세서에 기술된 방법에 따라 제조된 리포좀보다 순환으로부터 보다 신속하게 제거되었다.

[0139] 실시예

[0140] 다음의 실시예는 온전히 예시적인 것이며, 어떤 식으로든 제한하기 위한 의도는 아니다.

[0141] 실시예 1

[0142] 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 제조

[0143] 친유성 모이어티인 파라-디아실디글리세롤디티오벤잘-미토마이신 C에 방출가능하게 부착된 미토마이신 C의 전구약물 접합체를 인용에 의해 본 명세서에 포함된 미국 특허 제6,365,179호의 실시예 2에 기술된 것과 같이 합성하였다.

[0144] 각각 55:30:5:10의 몰 비의 HSPC, 콜레스테롤, mPEG2000-DSPE, 및 파라-디아실디글리세롤디티오벤질-미토마이신 C의 혼합물을 에탄올/3차 부탄올(50:50, 75:25, 90:10, 또는 100:0)에 용해시켰고, 5% 덱스트로오스/인산나트륨 버퍼 20 mM, pH 7.0에 20:80 v/v 비로 혼합하였다. 상기 리포좀 현탁액을 65℃에서 0.08 또는 0.10 ㎛의 구멍 크기의 적층된 폴리카보네이트 멤브레인을 통해 고압 하에 압출하였다. 상기 버퍼에 대한 투석, 또는 정용여과(diafiltration)에 의해 유기 용매를 제거하였다. 상기 리포좀 제형을 5 ㎎/㎖의 최종 전구약물 농도로 조정하였고, 0.22 ㎛ 멤브레인을 통해 멸균-여과하였다.

[0145] 상기 리포좀의 이미지를 초저온-TEM을 이용해 수득하였다. (도 1b)는 50:50(도 1d), 75:25(도 1c), 90:10(도 1a), 또는 100:0(도 1b)의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매를 이용하여 제조된 리포좀의 초저온-TEM 이미지이다.

[0146] 실시예 2

[0147] 리포좀 유래의 미토마이신 C의 DTT-유도성 절단

[0148] 리포좀성 제형으로부터의 활성 미토마이신 C(MMC)의 방출은 MLP(미토마이신 C의 리포좀성 전구약물)의 환원을 통해 일어난다. 이것은 (100%, 90% 또는 50%의 EtOH를 이용하여 제조된) MLP의 배치에서 강력한 환원제인 디티오트레이톨(DTT)을 처리하고 남아있는 MLP의 양 및 방출된 유리 미토마이신 C를 결정함으로써 조사하였다.

[0149] 전구약물로부터의 일정한 약물 방출을 확인하기 위하여 DTT와 인큐베이션함으로써 MLP로부터 MMC의 방출을 입증하기 위한 분석법을 개발하였다. 500 ㎍의 MLP(0.1 ㎖)를 37℃에서 1시간 동안 교반과 함께 다양한 농도의 DTT와 인큐베이션하였다. 이소프로판올(1:10)을 이용한 희석 미 약물 추출에 의해 상기 반응을 중단시켰다. HPLC에 의해 MLP 및 MMC를 정량하였다. 약물 추출 후, 상등액을 여과하였고, Phenomenex Hypersil BDS C18 컬럼; 130 A 150× 4.60 ㎜ 5 ㎛를 구비한 LaChrom Merck Hitachi HPLC 시스템 상에서 메탄올:이소프로판올 70/30으로 구성된 이동 상에서 1 ㎖/분의 유속으로 360 nm에서의 UV 검출로 구동하였다. 상기 조건 하에서의 MLP 머무름 시간(retention time)은 5.5분이었다. MMC 머무름 시간은 1.5분에서 앞부분에 가까웠다. 피크 면적을 정량하였고, MLP의 표준 커브와 비교하였다.

[0150] 도 2a 및 도 2b는 50:50, 90:10, 및 100:0의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매를 이용하여 제조된 리포좀으로부터 미토마이신 C의 DTT-유도성 절단을 보여준다.

[0151] 실시예 3

[0152] 생체내 약물동역학 연구

[0153] 50:50, 90:10, 또는 100:0의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매를 이용하여 제조된 MLP 리포좀의 약물동역학을 테스트하였다. 3-4마리 Sabra 마우스(도 3a 내지 도 3c) 또는 BalbC 마우스(도 4)의 군을 각각의 상기 배치에 35 ㎎/㎏의 리포좀성 MLP으로 IV 주사하였다. 리포좀 주사 후 3시간 또는 24시간에, 마우스를 이소플루란으로 마취시켰고, 안와정맥동으로부터 헤파린 함유 튜브 내로 채혈한 후, 희생시켰다. 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리함으로써 혈장을 단리하였고, IPA에서 1:10으로 추출한 후, 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 상기 기술된 것과 같이 HPLC에 의해 MLP 함량에 대해 상등액을 분석하였다.

[0154] 도 3a 내지 도 3d는 50:50, 90:10, 또는 100:0의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매를 이용하여 제조된 리포좀을 정맥내 투여한 후 시간의 함수로서 마우스에서 미토마이신 C 전구약물의 혈장 레벨을 보여준다.

[0155] 도 4는 50:50, 90:10, 또는 100:0의 에탄올/3차-부탄올의 비(v/v)를 갖는 용매를 이용하여 제조된 리포좀을 마우스에 정맥내 투여한 후 24시간에 Cmax의 백분율로서 미토마이신 C 전구약물의 마우스 혈장 레벨을 보여준다.

[0156] 실시예 4

[0157] 시험관내 혈장 안정성

[0158] 에탄올/t-부탄올(90/10, v/v)로 제조된 배치의 인큐베이션은 리포좀성 미토마이신 C 전구약물("MLP")의 혈장 안정성 프로필에 영향을 미치지 않았다. MLP를 HPLC로 측정한 결과, 양쪽 배치 모두에서 MLP는 37℃에서 24시간 동안 80% 인간 혈장에 노출되는 동안에 약 100% 온전하게 남아 있음을 확인한다. MLP의 양쪽 배치 모두의 겔 크로마토그래피 용출 프로필을 혈장에서 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 리포좀은 분획 5-7에서 용출된다; 혈장 단백질은 대부분 분획 8 -13에서 용출된다. 단백질 및 저-분자량 분획에 대한 MLP의 현저한 유출은 임의의 상기 제형에서 보이지 않았다. 도 5a 및 도 5b 참조.

[0159] 실시예 5

[0160] 종양에서 리포좀성 미토마이신 C 전구약물의 생체내 섭취

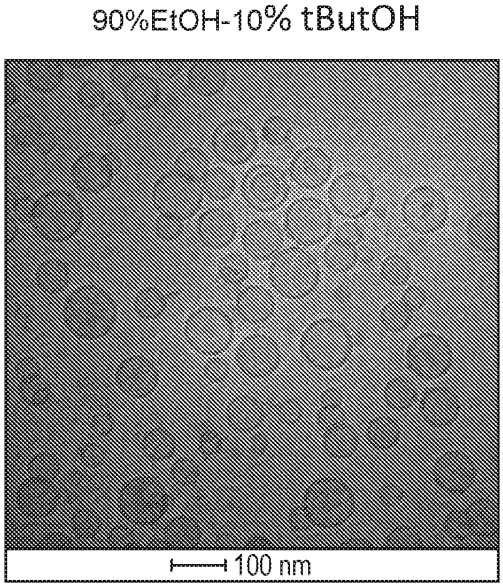
[0161] 지질(HSPC 및 MLP)(HSPC:콜레스테롤:mPEG-DSPE:MLP, 몰 비 55:30:510)을 에탄올/3차-부탄올 50:50 v/v 비 또는 에탄올/3차-부탄올 90:10 v/v 비의 용매 혼합물에 용해시킴으로써 2가지 제형의 MLP-포함 리포좀을 제조하였다. 이후, 상기 제형을 가공하여 5 mg/㎖의 농도로 MLP를 갖는 리포좀 현탁액을 생성하였다.

[0162] 8-10 주령의 BALB/c 암컷 마우스를 M109 종양 세포(마우스 당 백만 세포)로 피하 접종하였다. 종양 접종 20일 후, 감지가능한 종양을 갖고 있는 마우스를 2개의 군으로 나누고, 각각의 군을 리포좀 조성물(에탄올/3차-부탄올 50:50 및 에탄올/3차-부탄올 90:10)의 30 mg/kg 리포좀성 MLP로 IV 주사하였다. 리포좀 주사 후 24시간에 마우스를 희생시켰다. MLP의 조직 추출을 위하여, 대략 140-200 mg의 무게인 (종양을 포함하는) 조직 샘플을 0.5 ㎖(최종 부피)의 이소프로판올에서 균질화하였고, 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상등액을 여과하였고, HPLC 시스템에서 구동하여 각각의 종양에서 MLP의 농도(㎍의 MLP/g의 종양)를 결정하였다. 결과는 도 6에 나타나 있다.

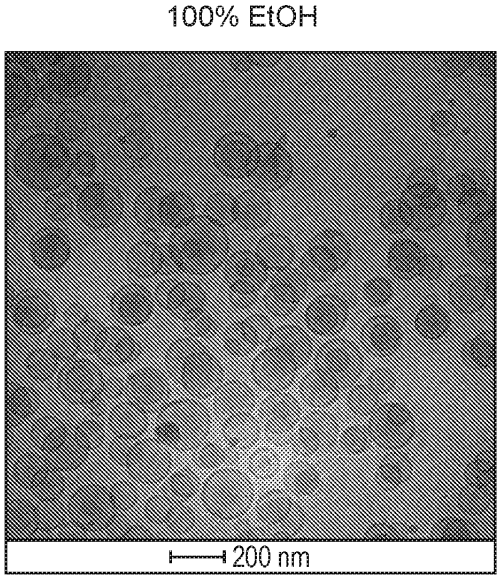
[0163] 다수의 예시적인 측면 및 구현예가 상기에 논의되었지만, 본 기술분야의 기술자는 그의 소정의 변형, 치환, 부가 및 하위-조합을 인식할 것이다. 따라서, 다음의 부속 청구항 및 이후 도입된 청구항은 이러한 모든 변형, 치환, 부가 및 하위-조합이 그 진정한 사상 및 범위 내에 포함되는 것으로 해석됨을 의도한다.

도면

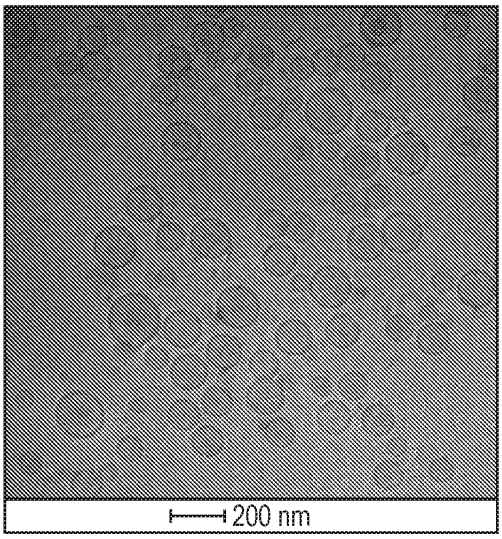
도면1a



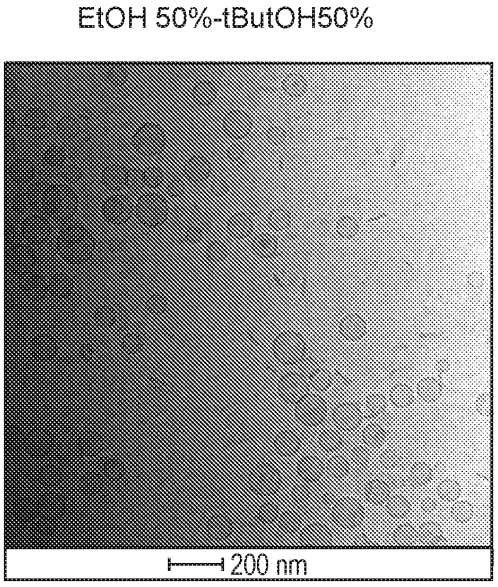
도면1b



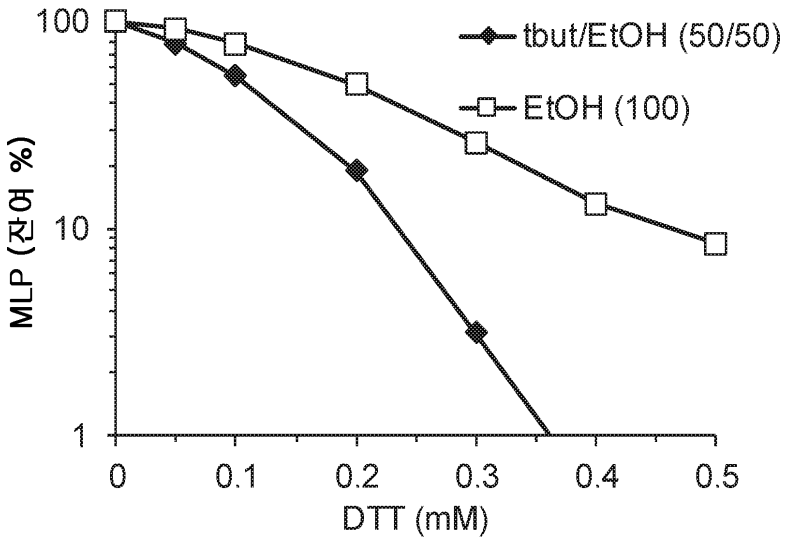
도면1c



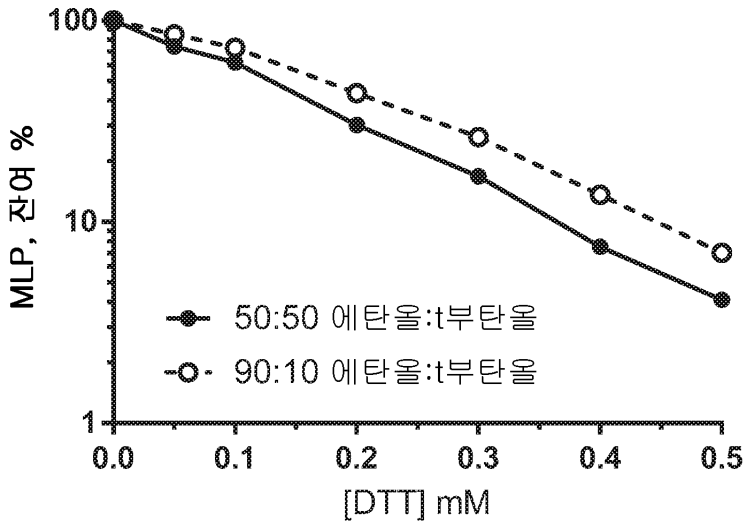
도면1d


EtOH 50%-tButOH50%
200 nm

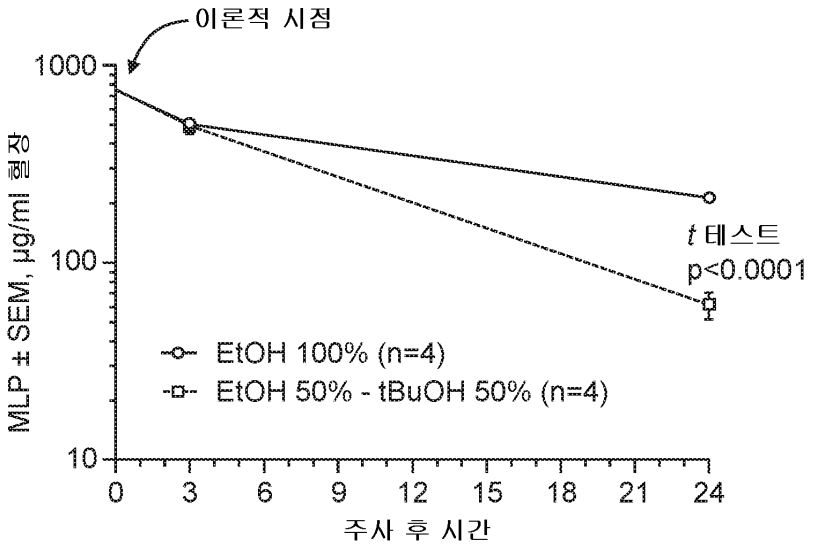
도면2a


100
10
1
MLP (잔여 %)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
DTT (mM)
tbut/EtOH (50/50)
EtOH (100)

도면2b

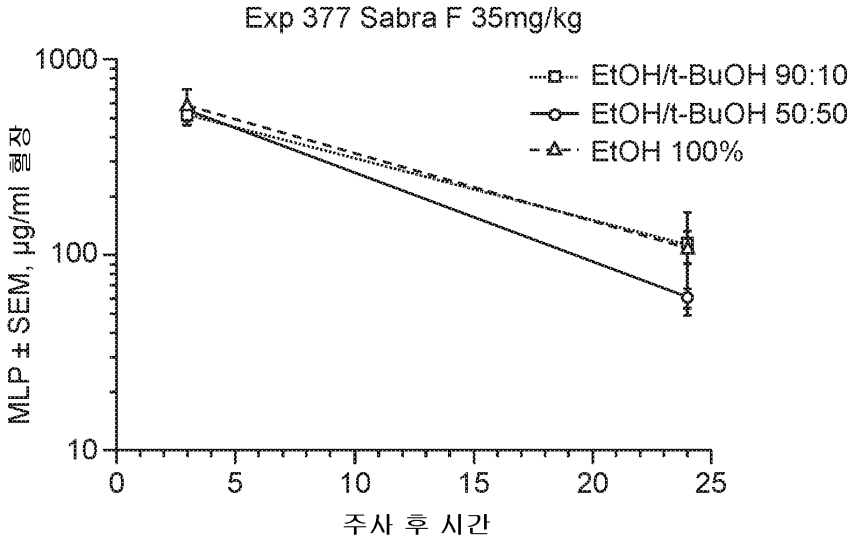


도면3a

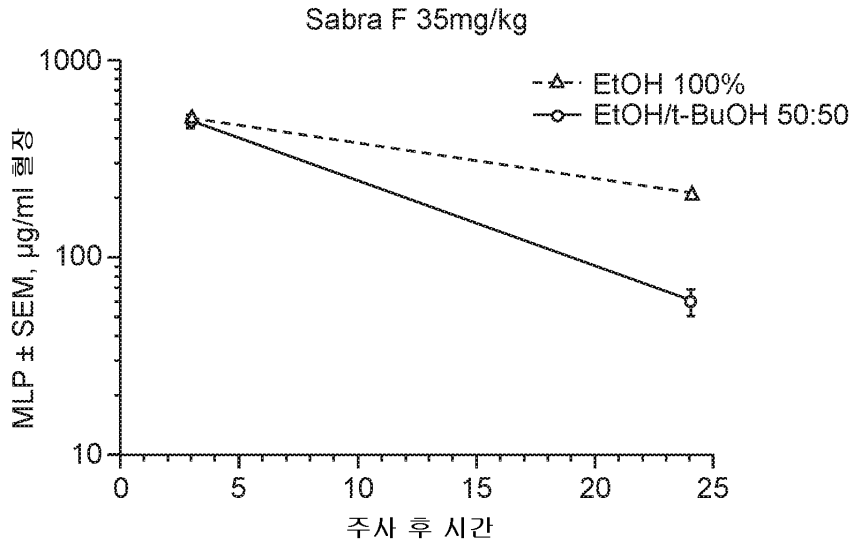


Sabra 암컷 마우스 – 30 mg/kg PL-MLP, i.v.

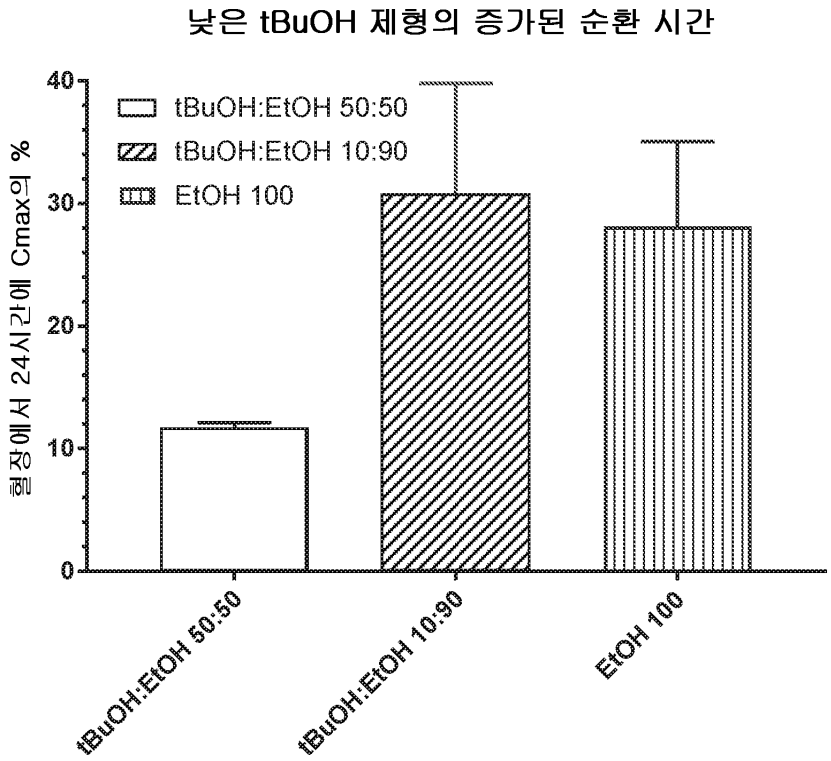
도면3b


Exp 377 Sabra F 35mg/kg
EtOH/t-BuOH 90:10
EtOH/t-BuOH 50:50
EtOH 100%
MLP ± SEM, µg/ml 혈장
1000
100
10
0
5
10
15
20
25
주사 후 시간

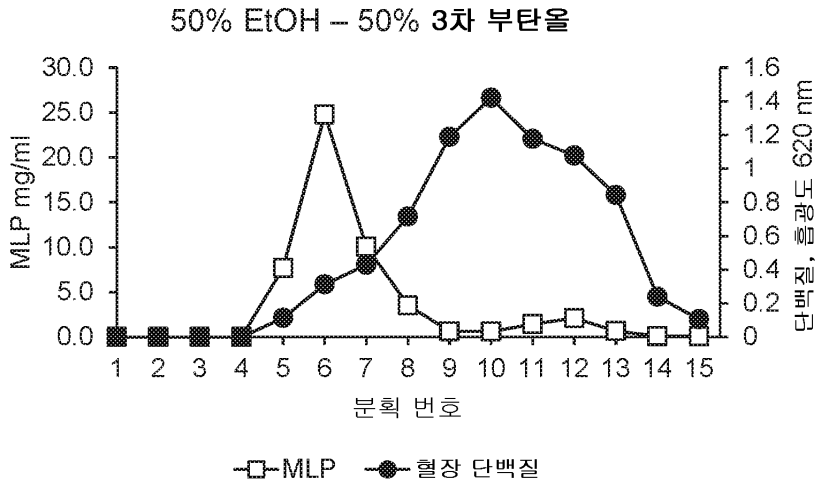
도면3c


Sabra F 35mg/kg
EtOH 100%
EtOH/t-BuOH 50:50
MLP ± SEM, µg/ml 혈장
1000
100
10
0
5
10
15
20
25
주사 후 시간

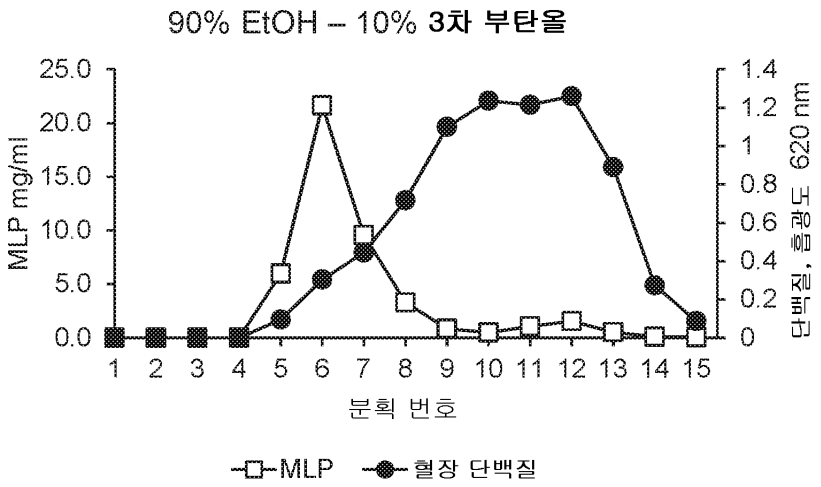
도면4


낮은 tBuOH 제형의 증가된 순환 시간
tBuOH:EtOH 50:50
tBuOH:EtOH 10:90
EtOH 100
혈장에서 24시간에 Cmax의 %
40
30
20
10
0
tBuOH:EtOH 50:50
tBuOH:EtOH 10:90
EtOH 100

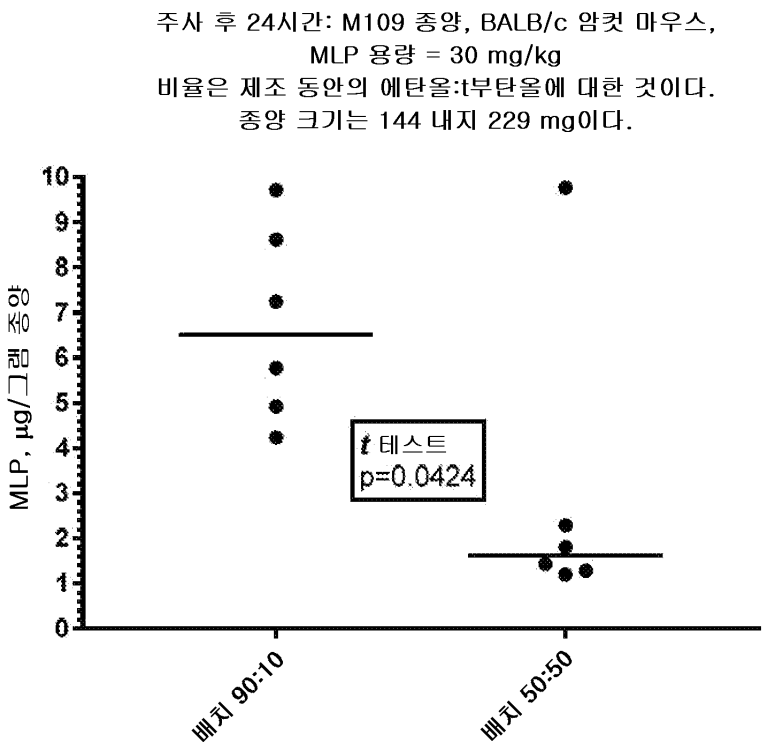
도면5a


50% EtOH – 50% 3차 부탄올
MLP mg/ml
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
단백질, 흡광도 620 nm
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
분획 번호
MLP
혈장 단백질

도면5b


90% EtOH – 10% 3차 부탄올
MLP mg/ml
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
단백질, 흡광도 620 nm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
분획 번호
MLP
혈장 단백질

도면6


주사 후 24시간: M109 종양, BALB/c 암컷 마우스,
MLP 용량 = 30 mg/kg
비율은 제조 동안의 에탄올:t부탄올에 대한 것이다.
종양 크기는 144 내지 229 mg이다.
MLP, μg/그램 종양
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
t 테스트
p=0.0424
배지 90:10
배지 50:50