(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0023507
(43) 공개일자 2020년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7005268(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년08월15일
심사청구일자 2020년02월24일
(62) 원출원 특허 10-2015-7004549
원출원일자(국제) 2013년08월15일
심사청구일자 2017년09월26일
(85) 번역문제출일자 2020년02월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/055084
(87) 국제공개번호 WO 2014/031429
국제공개일자 2014년02월27일
(30) 우선권주장
61/691,455 2012년08월21일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
옵코 파마슈티칼스, 엘엘씨
미국 플로리다 33137 마이애미 비스케인 블러바드 4400
(72) 발명자
산토스, 아르투로
멕시코, 사포판 45116, 인트. 202에이, 볼레바드 푸에르타 데 이에로 5150
프로스트, 필립
미국, 플로리다 33139, 마이애미 비치, 스타 아일랜드 21
(74) 대리인
강명구

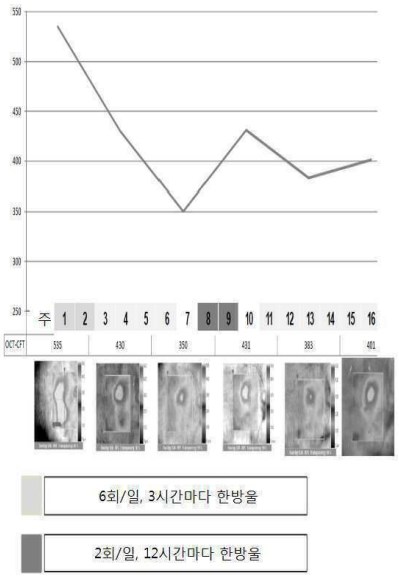
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **리포좀 제제**

(57) 요 약

본 발명은 예를 들어, VEGF의 작용을 저해하는 혈관 내피 성장 인자 결합제인, 라니비주맙(ranibizumab)에서 선택된 단일클론 항체 또는 이의 단편과 같은 항-혈관신생 화합물, 그리고 제약학적으로 허용되는 리포좀에서 선택된 전달제를 포함한 제약학적 제제와 관련된다. 제제는 동물과 인간내 여러 가지 혈관신생 장애 및 질병의 치료에서, 그리고 바람직하게는 노인황반변성, 당뇨병성황반부종 및 각막 신혈관에서 선택된 안과 장애에서 유용하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)

(30) 우선권주장
61/791,693 2013년03월15일 미국(US)
61/862,300 2013년08월05일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

비이온성 계면활성제, 제약학적 유효량의 VEGF 길항제, 그리고 PEG-기초된 지질로부터 형성된 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀을 포함하는 국부 안과 제제에 있어서, 제제의 총 무게에서 지질의 무게 백분율은 20% wt/wt 미만이고, 여기서 VEGF 길항제는 라니비주맙 및 다른 비스테로이드성 항-염증제에서 선택되고; 리포좀은 PEG-12 글리세롤 디미리스테이트 (GDM) 또는 PEG-12 글리세롤 디올리에이트 (GDO)로 구성된 군에서 선택되고, 상기 국부 안과 제제의 pH는 5.0 내지 7.5의 범위이고, 그리고 상기 제제는 유리체내 주사와 연관된 부작용 또는 합병증 없이, 후안부 질병 또는 질환을 치료하기 위한 환자의 눈의 표면에 국부 전달에 이용되는 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 2

폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 사슬 및 글리세롤 백본을 갖는 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀, 라니비주맙 및 다른 비스테로이드성 항-염증제에서 선택되는 VEGF 길항제, 계면활성제, 그리고 pH를 5 내지 7.5의 범위에서 유지시키는 완충 시약을 포함하는 국부 안과 제제에 있어서, 상기 제제는 유리체내 주사와 연관된 부작용 또는 합병증 없이, 후안부 질병 또는 질환을 치료하기 위한 환자의 눈의 표면에 국부 전달에 이용되고, 여기서 글리세롤 백본은 글리세롤 디라우레이트 (GDL), 글리세롤 디올리에이트 (GDO), 글리세롤 디미리스테이트 (GDM), 글리세롤 디팔미테이트 (GDP) 또는 글리세롤 디스테아레이트 (GDS)로 구성된 군에서 선택되고, 그리고 PEG 사슬은 PEG-12에서 선택되고, 그리고 완충 시약은 시트레이트 완충액이고, 그리고 계면활성제는 비이온성 계면활성제인 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 3

폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 사슬 및 글리세롤 백본을 갖는 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀, 라니비주맙 및 다른 비스테로이드성 항-염증제에서 선택되는 VEGF 길항제, 계면활성제, 그리고 pH를 5 내지 7.5의 범위에서 유지시키는 완충 시약을 포함하는 국부 안과 제제에 있어서, 상기 제제는 유리체내 주사와 연관된 부작용 또는 합병증 없이, 후안부 질병 또는 질환을 치료하기 위한 환자의 눈의 표면에 국부 전달에 이용되고, 여기서 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀은 PEG-12-GDM, PEG-12-N1-GDO, PEG-12-Ac2-GDO; PEG-12-N1-GDM; 또는 PEG-12-Ac2-GDM에서 선택되고; 여기서 N1은 아민이고, Ac1은 석시닐이고, Ac2는 아세틸인 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 4

디아실글리세롤-PEG 화합물에서 선택되는 PEG-기초된 지질 접합체를 포함하는 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀, 여기서 상기 접합체는 40℃ 아래의 녹는점 및 길이에서 14개 탄소보다 많거나 또는 이와 동등한 아실 사슬을 갖고, 그리고 PEG 사슬은 300 내지 5000 달톤 사이의 분자량을 갖고; 그리고 라니비주맙 및 다른 비스테로이드성 항-염증제에서 선택되는 VEGF 길항제를 포함하는 국부 안과 제제에 있어서, 상기 제제는 유리체내 주사와 연관된 부작용 또는 합병증 없이, 후안부 질병 또는 질환을 치료하기 위한 환자의 눈의 표면에 국부 전달에 이용되고, 여기서 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀은 PEG-12-글리세롤 디미리스테이트 (GDM) 또는 PEG-12 글리세롤 디올리에이트 (GDO)를 포함하는 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀의 무게 백분율 (wt/wt)은 제제의 총 무게에 근거하여 20% 미만인 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀은 PEG-12-글리세롤 디미리스테이트 (GDM)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 열역학적으로 안정한 자가-형성 리포좀은 25℃에서 액체이고, 20℃ 및 37℃ 둘 모두에서 자가-형성되고, 그리고 수성 용액과 조합될 때 형성되는 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중에서 어느 한 항에 있어서, 후안부 질병 또는 질환은 노인황반변성 또는 당뇨망막병증에서 선택되는 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 9

청구항 1 내지 7 중에서 어느 한 항에 있어서, 부작용 또는 합병증은 환자의 불편, 감염성 내안구염, 망막 박리, 안내압 변화 및 외상성 백내장으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 10

청구항 1 내지 7 중에서 어느 한 항에 있어서, VEGF 길항제는 제제의 액적 당 50-150 ug의 투여량 범위에서 환자에게 투여되고, 그리고 2시간마다 4-6X/일로 눈에 국부적으로 한 방울 적용되는 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

청구항 11

청구항 1 내지 7 중에서 어느 한 항에 있어서, 환자는 치료 후 중심와 두께 또는 시력, 또는 둘 모두에서 개선을 나타내는 것을 특징으로 하는 국부 안과 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차-참조**

[0002] 본 출원은 각각, 2012년 8월 21일; 2013년 3월 15일; 및 2013년 8월 5일에 제출된, 미국 특허 가출원 61/691,455, 61/791,693, 및 61/862,300에 대한 우선권을 주장하고, 이들 모두 이들 전체로 본 명세서에 참조로서 편입된다.

[0003] **발명 분야**

[0004] 본 발명은 유리체내 주사로 눈에 전형적으로 적용되는 안과 약물 그리고 상기 유리체내 약물의 국부 눈 적용을 허용하는 리포좀 전달제를 포함한 제약학적 제제와 관련된다. 본 발명은 또한, 예를 들어 VEGF, 및/또는 다중-키나아제 VEGFR 및 PDGFR 저해제, 예를 들어, 수니티닙(sunitinib)의 작용을 저해하는 혈관 내피 성장 인자 결합제인, 라니비주맙(ranibizumab)에서 선택된 단일클론 항체 또는 이의 단편과 같은 항-혈관신생 화합물, 그리고 제약학적으로 허용되는 리포좀에서 선택된 전달제와 관련된다. 제제는 동물과 인간내 여러 가지 혈관신생 장애 및 질병의 치료에서, 그리고 바람직하게는 노인황반변성, 당뇨병성황반부종 및 각막 혈관신생에서 선택된 안과 장애에서 유용하다.

배 경 기 술

[0005] **발명의 배경**

[0006] 안과 질병 치료는 전형적으로, 특정한 질병 또는 질환 및 특정한 약물 및 질병에 관한 투여 경로의 유효성에 따라 눈에 특정한 약물의 국부 투여 또는 유리체내 주사를 필요로 한다. 눈의 특정한 질병 또는 질환에서 효과적인 치료는 약물이 유리체내 주사에 의해 투여될 때에만 성취될 수 있다. 유리체내 주사에 의해 효과적으로 치료되는 눈 질병 및 질환이 많이 있다. 동시에, 이들 주사는 눈 감염 (내안구염), 눈 염증, 망막 박리 및 안압 증가를 비롯한, 심각한 부작용을 야기할 수 있고 및/또는 상기 부작용과 연관된다. 이들 부작용 또는 위험성으로 인해, 눈의 국부 치료는 눈 질환을 치료하기 위한 약물 투여의 바람직한 경로 및 홀리 그레일(Holy Grail)로 이루어졌는데 그 이유는 대부분의 경우에, 약물의 국부 투여가 특정한 눈 질환, 특히 눈 뒷부분에서 발생하는 이들 질환을 효과적으로 치료하지 않기 때문이다. 따라서, 상기 질환을 효과적으로 치료하고 유리체내 주사의 필요를 제거하는 제제를 개발하는 것이 필요하다. 본 발명자는 이러한 비히클을 찾았다고 믿는다. 미국 특허 번호

제6,884,879호는 다양한 항-VEGF 항체를 개시한다. 이 특허는 상품명 LUCENTIS®로 승인되고 시판되는 단일클론 항체 라니비주맙을 구체적으로 설명하고 청구한다. 상기 특허에서 개시된 항체는 다양한 질병의 증상을 예방, 반전 및/또는 완화할 수 있는 것으로서 설명되고 그리고 내피 세포의 VEGF-유도된 증식을 저해하는 능력 및 VEGF-유도된 혈관신생을 저해하는 능력을 갖는 것으로서 설명된다. LUCENTIS®은 한 달에 한 번의 유리체내 주사에 의해 0.5 mg (0.05 mL)의 투여량 강도로 신혈관 (습식형) 노인황반변성 (AMD)에 대해 승인되고, 비록 덜 효과적이지만, 승인된 치료는 적어도 4개월 동안 한 달에 한 번의 초기 양생법 후 3개월마다 주사가 투여될 수 있다. LUCENTIS®은 또한, 한 달에 한 번의 유리체내 양생법에서 0.5 mg (0.05 mL)을 이용하여 망막 혈관 폐색 (RVO)에 따른 황반부종에 대해 미국에서 승인된다. 추가로, LUCENTIS®은 주사가능 제제로 당뇨병성황반부종에 대해 유럽과 미국에서 승인된다.

[0007] 수니티닙 (SU-11248, Sutent)은 전이성 신장 세포암 및 위장관 간질성 종양의 치료를 위한 단일요법으로서 FDA에 의해 2006년 1월에 승인되었다. 수니티닙은 혈관 내피 성장 인자 수용체 1-3 (VEGFR1-VEGFR3), 혈소판-유래 성장 인자 수용체 (PDGFRα 및 PDGFRβ)를 비롯한 적어도 8개 수용체 단백질-티로신 키나아제를 저해한다. 이 화합물은 VEGFR1, VEGFR2, 및 PDGFRβ를 통한 신호전달을 감소시킴으로써 혈관신생을 저해한다. PDGFRβ는 모세혈관 내피 세포를 둘러싼 혈관주위세포에서 발견된다 [1] (Roskoski, 2007, 첨부된 PDF 문서). 항-PDGF의 조합된 용도는 몇몇 VEGF 관련 질병의 치료에서 라니비주맙 단일요법을 능가한다는 증거가 있다.

[0008] 항-VEGF 항체의 유리체내 주사 및 다른 안과 약물과 연관된 환자의 불편을 비롯한, 다수의 부작용 또는 잠재적인 부작용이 있다. 유리체내 주사 절차는 정규 무균성 규칙과 전용 무균실을 요구한다; 소생 시설은 즉시 이용가능할 수 있어야 한다. 이 절차의 합병증은 감염성 내안구염; 망막 박리 및 외상성 백내장을 포함한다. 유리체내 주사의 있을 수 있는 다른 합병증은 안내압 변화, 특히 안내압 상승을 포함한다. 주사 관련 안내압 상승은 임의의 종류의 약물을 주사한 후 바로 일어날 수 있고 그리고 약물 특이적-관련 안내압 변화는 주사 후 매일 또는 심지어 매달 탐지될 수 있다. Semin. Ophthamol. 2009 Mar-Apr;24(2):100-5를 참고한다.

[0009] 이러한 항-VEGF 항체 및 효과적인 다른 안과 약물, 가령 유리체내 주사를 통해 투여되는 주요 종류의 약물인 항미생물제, 항바이러스제, 코르티코스테로이드 및 혈관 내피 성장 인자 억제제의 새로운 국부 치료 양생법에 대해 시급한 미충족 의료 수요가 있다. 본 발명은 국부 제제내 상기 약물 종류 내에서 상기 리포좀과 임의의 상기 약물의 조합을 포함한다. 미국 특허 번호 제6,884,879호는 여러 가지 가능성 있는 전달 방법 또는 리포좀을 비롯한 시약 그리고 이러한 VEGF 단일클론 항체의 국부 투여를 비롯한 투여의 다양한 경로를 일반적으로 개시하지만, 유일하게 승인된 형태의 라니비주맙은 액상 제제에서 유리체내 형태이다. 안과 장애를 비롯한 VEGF 관련 장애를 가진 사람들을 치료하는 데에서 효과적인 국부 라니비주맙 제제에 대한 필요성이 있다.

[0010] 발명자는 이 미충족 수요를 충족시켰고 이러한 VEGF 단일클론 항체 및 특정한 리포좀을 포함한 특정 리포좀 제제가 당뇨병성황반부종을 가진 환자에서 효과적인 완화를 제공한다는 점을 놀랍게도 밝혀 내었다. 제제는 발병된 눈에 국부적으로, 효과적으로 투여될 수 있고 유리체내 제제의 국부 투여보다 더 효과적이다. 미국 특허 번호 제6,958,160호는 자가-형성, 열역학적으로 안정한 리포좀을 개시하고 청구한다. 참조로서 본 명세서에 편입되는, 미국 특허 공개공보 번호 제2010/0076209호는 약물 전달 및 리포좀을 위한 PEG-지질 접합체를 개시한다. 상품명 Qsomes™ (이하 Qsome)로 시판된 이러한 자가-형성 열역학적으로 안정한 리포좀을 비롯한 다양한 지질 기반 산물은 피부로의 국부 투여에 의한 것을 비롯한 여러 가지 투여 경로를 통해 그리고 다수의 치료 용도를 위해 Biozone Laboratories에 의해 판매된다. 발명자는 라니비주맙 및 이러한 자가 형성, 열역학적으로 안정한 리포좀 및/또는 PEG-지질 접합체를 포함한 제약학적 조성물이 VEGF 관련 안과 질병 및 질환의 치료를 필요로 하는 환자의 눈에 국부적으로 전달될 수 있다는 점을 발견하였다. 본 발명은 본 명세서에서 상술된 바와 같은 Qsome (자가-형성 열역학적으로 안정한 리포좀) 및 약물을 포함한 국부 제제를 추가로 포함하며, 여기서 제제는 후안부 안과 질병 및/또는 전안부/후안부 질병 조합인 질병의 치료에 적합하다. 청구된 제제는 국부 투여에 적합하고 그리고 안주위 경로를 통해 또는 유리체내 투여 (안구내 전달)를 통해 전형적으로 치료되는 안과 질병 및 질환을 치료하는 것에 있어 특정하게 유용하다. 안주위 투여는 결막하, 건주하, 후안구 및 안주위 투여를 포함한다. 국부 투여로 후안부에 전달될 수 있는 것으로서 개시되었던 몇 가지 약물이 있다 - 이들은 ESBA105, 항-TNF-알파 단쇄 항체; 덱사메타손; 네파페낙; 메만틴 HCl; 도르졸아미드; 브리모니딘 및 베탁솔로를 포함한다. Qsome 제제에서 이들 약물의 국부 투여는 더욱 효과적인 국부 전달과 더 효과적인 후안부 전달을 야기할 수 있다는 점이 간주된다. 하지만, 바람직하게, 청구된 발명은 본 명세서에서 설명된 바와 같은 Qsome 리포좀 및 지금까지는 국부 투여를 통해 효과적으로 전달되지 않았던 약물을 비롯한 국부 제제를 포함한다.

[0011] 유리체내 주사로 전형적으로 제공되는 약물은 항미생물제, 항바이러스제, 코르티코스테로이드 및 혈관 내피 성

장 인자 억제제를 포함한다. 본 발명은 자가-형성 열역학적으로 안정한 리포좀 및 항미생물제, 항바이러스제, 코르티코스테로이드 및 혈관 내피 성장 인자 억제제 중 어느 하나 또는 이의 조합에서 선택된 활성 제약학적 물질을 포함한 리포좀 제제를 포함하며, 여기서 상기 제제는 안과 질병 또는 질환을 치료하기 위해 환자 눈으로의 국부 전달에 적합하다. 디클로페낙, 가티플록사신, 스파르플록카인 락테이트, GCV, 데메클로사이클린, 플루비프로펜, 독소루비신, 셀레콕십, 부데소니드 및 시스플라틴은 각막경유 또는 공막경유 전달을 위해 콜로이드성 제형으로 조제되었다. 페니실린 G, 트로피카미드 및 아세타졸아미드를 함유한 양이온 리포좀은 음이온 및 중성 리포좀에 비해 각막을 가로지르는 최대 약물 수송을 제공하는 데에 이용되었다. Schaeffer et al. Liposomes in topical drug deliver. Invest. Ophthalmol. Vis Sci. 1982:22(2):220-7; Nagarsenker et al. Preparation and evaluation of liposomal formulations of tropicamide for ocular delivery. Int J Pharma. 1999:190(1):63-71 및 Hathout et al. Liposome as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. AAPS PharmaSciTech. 2007;8(1):1을 참고한다.

[0012] 당뇨망막병증 (DR)은 당뇨병의 가장 흔한 미세-혈관 합병증이고 [2](Fong, 2004) 근로-연령 성인 중 시력 감소의 새로운 사례의 주요 원인이다. 당뇨병성황반부종 (DME)은 DR을 가진 환자에서 시력 감소의 가장 흔한 원인이다. DME의 발병률은 매년 75,000건의 새로운 DME 사례로 최근 진단의 3%이다. 당뇨병을 가진 전 세계적 환자의 수는 압도적인 2억 8500만명이다. DME는 1 디스크 지름의 황반 중심 내에서 경성삼출물 및 망막 비후를 초래하는, 점진적인 누출 및 삼출을 궁극적으로 야기하는 일련의 생화학 및 세포 변화에서 비롯된다. DME는 당뇨병을 가진 환자에서 손상된 시력의 가장 흔한 원인 중 하나이다 [3](Bhagat, 2009). 환자의 대략 50%가 2년의 추적-검사 후 BCVA의 ≥2 줄 감소를 경험한다 [4](Meyer, 2007).

[0013] DME에서, 손상된 혈관은 망막 (황반)의 중심부 내로 유체를 새게 하며, 이는 팽창을 초래한다. 황반은 선명한 중심 시력과 관련된다. 와(fovea)는 황반의 중심에 있다. DME는 제1형 또는 제2형 당뇨병을 가진 환자에서 발병할 수 있다. 미국에서 대략 2천 600백만명의 사람이 당뇨병을 앓고 매년 190만 건의 새로운 사례가 20세 이상의 사람에서 진단된다. 최대 75,000 건의 새로운 DME 사례가 매년 발병하는 것으로 추정된다. DME는 대부분의 선진국내 근로-연령 인구 중에서 실명의 주요 원인이다. DME에 대한 제1차 치료는 유체의 누출을 줄이고 망막내 유체의 양을 감소시키기 위해 새는 혈관을 밀봉하는 레이저 수술이다. 따라서 이들 환자에게 치료학적 완화를 제공하는 새로운 제제를 만들기 위한 유의적인 필요성있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] **발명의 요약**

[0015] 본 발명은 항-혈관신생 화합물 또는 다른 안과적 유효 성분 및 리포좀을 포함한 제약학적 제제이다. 바람직한 항-혈관신생 화합물은 항-VEGF 항체이다. 제약학적 제제는 이의 치료를 필요로 하는 환자의 눈에 국부 제제로서 바람직하게 투여된다. 제약학적 제제는 예를 들어 연령 관련 황반 변성 및 당뇨병성황반부종을 비롯한 VEGF 관련 안과 장애의 치료에서 유용하다. 본 발명은 또한, 국부 투여에 적합한 제제에 관한 것이고 상기 제제는 각막 신혈관 질병에서 효과적이다.

[0016] 바람직한 항-VEGF 항체는 라니비주맙 (LUCENTIS®)에서 선택되고 참조로서 본 명세서에 편입되는 미국 특허 번호 제6,884,879호에서 설명된 바와 같이 제조될 수 있다. 이 산물은 처방 유리체내 액상 제제로서 고체이다. 라니비주맙은 재조합 인간화 IgG1 카파 동종 단일클론 항체 단편이다. 이 항체는 VEGF-A에 결합하여 이를 저해하며 대략 48 킬로 달톤의 분자량을 갖는다. 산물은 테트라사이클린을 함유한 영양 배지내 대장균(E. coli) 발현 시스템에서 생산된다. 처방 산물은 0.05 mL의 10 mg/mL 라니비주맙을 함유한 일회용 유리 바이알에 공급된다. 다른 항-VEGF 항체, 가령 베바시주맙(bevacizumab)은 또한, 특정한 질병 및 질환, 가령 각막 신혈관 질병을 치료하는 데에 이용될 수 있다. 본 명세서에서 개시된 국부 리포좀 제제는 비정상적인 신혈관을 가진 눈에 베바시주맙과 같은 전체 항체의 침투를 촉진한다.

[0017] 본 발명에서 유용한 리포좀은 미국 특허 번호 제6,958,160호에서 설명되는 이들 리포좀을 바람직하게 포함하며, 상기 특허는 전체로 본 명세서에 참조로서 편입된다. 상기 특허에서 설명된 바와 같이, 리포좀은 자체-폐쇄 콜로이드 입자들이고, 여기서 하나 이상의 지질 이중층으로 구성된 막은 그들이 부유하는 수성 용액의 분획을 캡슐화한다. 또한 '160 특허에서 상술된 바와 같이, 모든 리포좀이 동일하지는 않으며, 실제로, 리포좀은 콜로이드 불안정성 그리고 극단적인 조건, 가령 상승된 압력 및 온도 그리고 고속 전단 조건으로 인한 제조 문제를 비

롯한 문제점들을 가질 수 있으며, 여기서 이들 모두 지질 성분을 분해시킬 수 있다. 리포좀과 연관된 다른 문제는 일반적으로 규모-확대 (scale-up) 문제를 야기하거나 악화시킬 수 있는 이중층의 크기와 수의 불균일 분포를 포함한다. 추가로, 멸균화 조건은 또한, 리포좀에 대한 문제를 형성할 수 있다. 리포좀은 또한 현탁액 내에 있는 동안 응집으로 인한 콜로이드 불안정성을 가질 수 있다. 이것은 융합 문제를 초래하고 이 문제점에 대한 해결책은 전형적으로, 고비용 추가 단계인 동결건조이다. '160 특허에서 개시된 리포좀은 이들 문제점을 극복하였고 놀랍게도, 이들 특정한 리포좀은 항-VEGF 항체, 가령 라니비주맙과 조합될 때 효과적이라는 점이 밝혀졌다.

[0018] 특정하게, 자가-형성, 열역학적으로 안정한 리포좀 및 항-VEGF 항체를 포함한 제제는 VEGF 관련 안과 질병 및 질환의 치료에서 국부 적용에 특정하게 적합하다.

[0019] 본 제제에서 유용한 리포좀은 디아실글리세롤-PEG 화합물을 포함한다. 이들 화합물의 녹는점은 약 40℃ 아래이고 아실 사슬은 길이가 약 14개 이상의 탄소이다. 이들 화합물은 '160 특허에서 상술된 바와 같이 제조된다. 바람직한 지질 PEG 접합체는 PEG-12-GDM (폴리에틸렌 글리콜 12-글리세롤 디미리스테이트)이다. PEG는 리포좀의 외부 표면에서 입체 장벽을 형성함으로써 리포좀을 안정시키고, PEG 사슬은 약 300 달톤 내지 5000 달톤의 분자량을 갖는다. 리포좀 제조는 단지 수성 용액과 지질을 혼합하는 것을 수반한다. 이러한 리포좀 종류는 지질이 존재할 수 있는 가장 낮은 에너지 상태로 존재하지만, 수성 용액에서, 리포좀 제제의 재생력은 문제가 없다.

[0020] 정의된 지질, 지질 혼합물, 또는 지질/화합물 혼합물은 동일한 수성 용액과 혼합될 때마다 유사한 리포좀을 형성할 것이다. 임계 농도 (부피에 대해 약 20% 무게)보다 위에서 비-리포좀 구조가 수성 용액에서 형성되기 시작할 것이다. 이들 리포좀은 그들의 가장 낮은 에너지 상태에서 존재하고 열역학적으로 안정한, 자가-형성 리포좀이다. PEG-12 GDM은 매우 작은 소포들을 형성하고 따라서 그들은 멸균 여과될 수 있다. 운동 에너지, 가령 진탕 (shaking) 또는 와동(vortexing)이 지질 용액 및 수성 용액에 제공될 수 있다. 본 제제는 또한, 6,958,160 특허에서 일반적으로 또는 구체적으로 설명된 다른 지질-PEG 접합체를 이용할 수 있다. 추가로, 다른 지질 PEG 자가-형성, 열역학적으로 안정한, 미국 특허 공개공보 번호 제2010/0076209호에서 설명된 이들 화합물을 비롯하여 접합체가 이용될 수 있다. 하기 표 1은 특정한 PEG-12 GDM 특징을 설명한다.

표 1

PEG-12 GDM 특징:

지질	녹는점 (℃)	Pa	Pv	20℃에서 자발적인 리포좀	37℃에서 자발적인 리포좀
PEG- 12 GDM	유체 @ 25	0.829	0.869	있음	있음

분자량: 1068 g/mol

최적 pH: 5-7

[0021] 용해도: 유기 용매에서 용해성.

[0022] 본 발명의 라니비주맙 국부 제제에서, 용액의 최종 부피를 기준으로 1% 무게 부피의 PEG-12 GDM이 이용되었고 5.5의 국부 용액 pH를 가졌으며 리포좀과의 작용이 적절한 범위에 있었다.

[0023] 항-혈관신생 화합물 (가령 항-VEGF 항체) 및 열역학적으로 안정한, 자가-형성 리포좀뿐만 아니라, 제제는 추가적인 제약학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 바람직한 부형제는 눈으로의 국부 투여에 적합한 부형제로 구성된 군에서 선택된다. 이들은 계면활성제, 완충 시약, pH 조절제, 염 및 이러한 다른 성분을 포함한다.

[0024] 제제는 VEGF 관련 질병 밀 질환 및/또는 다른 혈관신생 질환에서 유용하다. 따라서 본 발명은 연령 관련 황반변성, 당뇨병성황반부종을 비롯한 당뇨병성 망막 질병 및 각막 혈관신생을 치료하기 위한 이러한 제제의 용도를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 국부 제제를 포함하고 이러한 VEGF 관련 질병 및 질환의 치료를 필요로 하는 환자의 눈에 이러한 제제를 국부적으로 투여함으로써 VEGF 관련 질병 및 질환을 치료하는 방법을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 본 발명은 다음 도면에서 설명될 것이다.

도 1은 2주 동안 하루 여섯 방울씩 투약된 후, 8주 기간에 걸쳐 광 간섭 단층촬영 (OCT-CFT)을 이용하여 개선된 중심와 두께 측정치를 갖는 리포좀 라니비주맙 제제로 치료된 단일 환자로부터 얻은 데이터를 보여준다. 8주에 환자는 CFT에서의 증가를 나타내었고 치료는 하루 두 방울의 일일 용량으로 10주에 다시 시작되었다. 도 1은 12주 내지 14주 기간에 다시 발생하는 CFT에서의 개선을 보여준다.

도 2는 2주 동안 하루 여섯 방울씩 투약된 후, 8주 기간에 걸쳐 개선된 시력 측정치 (ETDRS BCVA)를 가진, 리포좀 라니비주맙으로 치료된 동일한 임상 환자를 보여준다. 8주에 환자는 VA에서의 감소를 나타내었고 치료는 하루 두 방울의 일일 용량으로 10주에 다시 시작되었다. 도 2는 12주 내지 14주 기간에 다시 발생하는 VA에서의 개선을 보여준다.

도 3은 다중라멜라 리포좀 및 단일라멜라 리포좀의 현미경 관찰 사진을 보여준다.

도 4는 시간에 따른, 라니비주맙의 리포좀 제제로 치료된 환자의 중심와 두께의 OCT 결과를 보여준다.

도 5는 시간에 따른, 환자의 대측성 눈의 중심와 두께의 OCT 결과를 보여준다.

도 6은 3명의 환자에서 눈 연구를 위해 시간에 따른 BCVA의 결과를 보여준다.

도 7은 대측성 눈에 대해 시간에 따른 BCVA의 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] **상세한 설명**

[0027] 본 발명은 제약학적 제제와 이의 용도와 관련되며, 여기서 바람직한 제제는 항-VEGF 항체 및 자가-형성, 열역학적으로 안정한 리포좀을 포함한다. 본 발명은 또한 항-VEGF 항체 및 자가-형성, 열역학적으로 안정한 리포좀을 포함한 국부 제제와 관련된다. 본 발명은 VEGF 관련 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 추가로 포함하며, 상기 방법은 이의 치료를 필요로 하는 환자에게 항-VEGF 항체 및 자가-형성, 열역학적으로 안정한 리포좀을 포함한 제제의 투여 단계를 포함한다. 바람직한 구체예에서, VEGF 관련 질병 또는 질환은 당뇨망막병증 (DR)에서 선택된다.

[0028] "일반적으로" 리포좀은 다양한 유효성분의 전달과 연관지어 설명되었지만, 기술은 항-VEGF 항체와 조합한 자가-형성, 열역학적으로 안정한 리포좀의 조합을 개시하거나 교시하지 않는다. 제제의 리포좀은 VEGF-관련 질병 또는 질환, 특히 안과 질병 또는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 항-VEGF 항체의 전달에 특정하게 적합하다. 본 발명의 리포좀 제제는 예를 들어, 당뇨병성황반부종 또는 노인황반변성 또는 각막 혈관신생의 치료를 필요로 하는 환자의 눈으로의 국부 투여에 대해 특정하게 적합하게 된다. 본 발명의 리포좀은 그들을 이들 국부 제제에 특히 적합하게 만드는 바람직한 기본 특성을 갖는다. 리포좀 현탁액은 제제의 온도에서 열역학적으로 안정하다. 리포좀을 구성하는 지질의 조성물은 여러 가지 기본 특성을 갖는다. 지질은 리포좀의 형성을 허용하는 패킹 파라미터(packing parameter)를 갖는다. 지질은 헤드기(head group)의 부분으로서, 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 또는 현탁액에서 리포좀을 입체구조적으로 안정시키는 유사한 특성의 중합체를 포함한다. 추가로, 리포좀은 그들이 물 또는 수성 용액과 혼합될 때 액상 형태로 되는 것을 허용하는 융해 온도를 갖는다.

[0029] 6,610,322 특허에서 설명된 바와 같이, 수성 용액에서 리포좀 현탁액을 형성할 때는 에너지가 추가될 필요가 거의 없다. 본 발명에서, 바람직한 방법은 유효 성분-항-VEGF 항체를 함유한 수성 용액의 존재에서 리포좀 현탁액을 형성하는 단계를 수반한다. 따라서 자가-조립은 유효 성분이 현탁액에 첨가되기 전에 일어나기 보다는 유효 성분으로 바람직하게 일어난다. 지질 분자는 분산되고 천연 저에너지 상태로 자가 조립된다. 리포좀은 Qusomes ™에 대한 Biozone Laboratories 웹사이트에서 설명된 바와 같이 크거나 작은 단일라멜라 소포 (SUV) 또는 다중라멜라 소포 (MLV)(도 3을 참고)를 형성한다.

[0030] PEG 사슬은 바람직하게, 약 300 달톤 내지 5000 달톤의 분자량을 갖는다. 적절한 지질의 예시는 PEG-12 GDO (글리세롤 디올리에이트) 및 PEG-12 GDM (글리세롤 디미리스테이트)을 포함한다. PEG-12 GDM는 25℃에서 유체이고 각각, .853 및 .889의 패킹 파라미터 P_a 및 P_v를 갖는다. 이들 지질 각각은 20℃, 37℃ 및 60℃에서 자발적인 리포좀을 형성한다. Pa는 범위가 0.84 내지 0.88 일 수 있고 Pv는 범위가 0.88 내지 0.93일 수 있다. 바람직하게, 적합한 화합물은 예를 들어, 미셀(micelle) 대신에 리포좀을 형성한다. 추가로, 지질 조성물은 약 0℃ 내지 100 ℃의 상 전이 온도를 가져야 한다 - 지질 조성물은 수성 용액과 혼합될 때 액상 형태로 되는 것을 허용하는 융해 온도를 갖는다. 또한, 조성물의 구부림 탄성률은 지질 조성물이 임의의 또는 임의의 유의적인 에너지 입력

(energy input)에 대한 필요성 없이 수성 환경에서 리포좀을 형성할 수 있도록 하는 것이어야 한다. 운동 에너지가 용액에 적용될 수 있다. 바람직한 구부림 탄성률은 약 0 kt 내지 15 kt이다. 구부림 탄성률은 주로 백본(backbone)에 의해 결정되고 그리고 구부림 탄성률 및 적절한 기능성에 관해 동일한 임의의 백본이 또한 이용될 수 있음에도 불구하고 글리세롤은 본 발명의 바람직한 백본이다. 최종 용액내 지질의 상대적인 무게 백분율은 0 초과 내지 약 20 wt 퍼센트 (w/w)의 범위일 수 있다. 범위는 약 1% 내지 15 wt % 또는 약 1% 내지 10% 또는 약 1% 내지 5% wt/wt일 수 있고 또는 0% 초과 내지 4% wt/wt일 수 있다.

[0031] 12개보다 더 긴 PEG 사슬을 갖는 지질과 다른 분자의 혼합물이 또한, 본 발명에서 이용될 수 있고, 단, 그들은 리포좀을 형성한다. 예를 들어, PEG-45 GDS (글리세롤 디스테아레이트) 및 콜레스테롤의 혼합물은 리포좀을 형성한다. '322 특허에서 설명된 바와 같이, 해당 분야의 통상의 기술자는 열역학적으로 안정한, 자유 형성 리포좀을 제조하기 위한 성분 및 PEG 사슬 길이를 비롯한 변수를 변화시킬 수 있고, 이러한 것들은 본 발명의 범위 내에서 그리고 항-VEGF 항체와 조합될 때 표함된다. 리포좀 형성 전에 지질이 첨가될 때 콜레스테롤의 양은 최대 약 10% w/w이다.

[0032] '322 특허에서 설명된 지질뿐만 아니라, 다른 지질도 또한 본 발명에서 활용될 수 있다. 미국 특허 공개공보 번호 제2010/0076209호는 구체적으로 설명된 유효 성분의 약물 전달에 적합한 리포좀을 형성하는 특정한 PEG-지질 접합체를 설명한다. 참고문헌에서 항-VEGF 항체의 전달에 대한 교시 또는 참고는 없다. 특정하게, '209 공개공보에서 설명된 바와 같은 디아실글리세롤-폴리에틸렌 글리콜 화합물은 본 발명의 제제에서 항-VEGF 항체와 조합하여 활용될 수 있다. 지질 화합물의 일반적인 구조는 '209 공개공보에서 보여지며 화학식 (R2)(R1)글리세롤-X-PEG-R1 및/또는 R1-PEG-X-글리세롤(R2)(R1)을 갖는 화합물을 포함하며, 여기서 R1은 바람직하게 -OH 또는 -OCH3이고; R2 및 R3은 라우레이트, 올레이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트 및 리놀리에이트를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 지방산이고; 그리고 X는 지질과 PEG 사이에서 단일 링커(linker) 또는 복제 링커 또는 2개 이상의 조합을 나타낸다. R2 및 R3은 동일하거나 상이할 수 있다. R2가 글리세롤의 C1 위치에 있다면, R3은 C2 또는 C3 중 하나에 위치될 수 있다. 일반적인 구조는 모든 라세머(raceme) 및 구조 이성질체 및/또는 이의 기능적 등가물을 포함한다.

[0033] R1은 예를 들어, -NH2, -COOH, -OCH2CH3, -OCH2CH2CH3, -OCH2CH2OH, -COCH=CH2, -OCH2CH2NH2, -OSO2CH3, -OCH2C6H6, -OCH2COCH2CH2COONC4H4O2, -CH2CH2=CH2 및 -OC6H6에서 또한 선택될 수 있다. 또한 R1은 리포좀 표면에 치료제 또는 표적화제를 연결하는 것을 돕는 작용기일 수 있다. 이들은 아미노 알킬 에스테르, 말레이미드, 디글리시딜 에테르, 말레인이미도 프로피오네이트, 메틸 카르바메이트, 토실하이드라존 염, 아지드, 프로파르길-아민, 프로파르길 알코올, NHS 에스테르, 하이드라지드, 석신이미딜 에스테르, 석신이미딜 타르트레이트, 석신이미딜 석시네이트, 및 톨루엔설포네이트 염을 포함할 수 있다. 본 발명은 리포좀 제제 내에서 항-VEGF 항체를 갖는 리포좀 제제를 포함하고 R1 작용기를 통해 리포좀에 공유 결합된 또는 연결된 항-VEGF 항체를 포함한 임의의 다른 치료 화합물을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 경우에서, 본 발명은 조합 제제 또는 비-공유 결합 유효 성분 및 공유 결합 유효 성분 둘 모두를 가진 제제이거나 이를 포함할 것이고 여기서 상기 유효 성분은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0034] 이러한 유형의 리포좀 제제에서 유용하거나 적합한 링커는 '209 공개공보에서 설명된 것들을 포함하고 상기 공개공보는 참조로서 본 명세서에 편입된다. 상기 공개공보의 표 1은 이러한 적합한 링커를 설명하거나 나열하며 이때 상기 링커는 아미노, 석시닐아미노 아세트아미도, 2-아미노펜탄아미도, 2(2')-R'-아미노아세틸 등을 포함한다. 각각의 경우에, 지질은 '209 공개공보의 표 4에서 나타난 바와 같이 20 및 37℃에서 자발적인 리포좀을 형성한다. 따라서 본 발명은 PEG-12-N1-GDO; PEG-23-N2-GDO; PEG-18-N3-GDO; PEG-23-N4-GDO; PEG-8-S1-GDO; PEG-18-S2-GDO; PEG-12-S3-GDO; PEG-18-Ac1-GDO; PEG-12-Ac2-GDO; PEG-12-N1-GDM; PEG-12-N1-GDLO; PEG-12-S3-GDM; PeG-12-S3-GDLO; PEG-12-Ac2-GDM; PEG-12-Ac2-GDLO; PEG-23-N1-GDL; PEG-12kN1-GDP; PEG-23-Ac2-GDL 및 PEG-12-Ac2-GDP로서 설명된 이들 지질을 포함한다. GDLO는 글리세롤 디리놀리에이트를 의미하고 GDP는 글리세롤 디팔미테이트를 의미한다. 화합물 각각은 25℃에서 유체이고 범위가 .830 내지 .869인 패킹 파라미터 Pa 그리고 범위가 0.872 내지 0.924인 Pv를 갖는다.

[0035] 본 발명은 본 명세서에 상술된 물리적 요건을 충족시키는 공지된 지질을 추가로 포함하며 여기서 상기 지질은 예를 들어 25℃에서 액체이고 20℃ 및 37℃에서 자가-형성되고 기능적으로 동등한 또는 동등한 패킹 파라미터를 가지고 그리고 수성 용액과 조합될 때 에너지 입력이 거의 없는 열역학적으로 안정한 리포좀을 형성한다.

[0036] 본 제제에서 유용한 항-VEGF 항체는 임의의 공지된 항-VEGF 항체를 포함한다. 이들 항체는 전체 항체 또는 항체 단편을 포함하고, 단, 그들은 필수적인 항-VEGF 생물학적 특성을 갖는다. 바람직한 구체예에서, 항체는 필수적

인 항-VEGF 생물학적 및 약물학적 특성을 갖는 항체 단편이다. 미국 특허 번호 제6,884,879 호는 본 발명에서 유용한 항-VEGF 항체를 개시한다. 이러한 항체는 VEGF에 대해 강한 결합 친화도를 포함하는 특성을 가진 인간화 항-VEGF 항체 및 항-VEGF 항체 변이체를 포함한다; VEGF를 저해하는 능력은 내피 세포의 증식을 촉진시켰고 VEGF를 저해하는 능력은 혈관 신생을 유도하였다. 바람직한 결합 친화도 (Kd)는 단지 약 5 x 10^{-9}M이고 시험관 내에서 내피 세포의 VEGF-유도 증식을 저해하기 위한 ED50 값은 단지 약 5 nM이다. 항체는 5 mg/kg의 항체 용량으로 A673 생체내 종양 모델에서 적어도 약 50% 종양 성장을 저해하는 것들을 포함한다. 가장 바람직한 항체는 상품명 LUCENTIS® (라니비주맙)로 판매되고 유리체내 제제로서 노인황반변성 및 여러 가지 형태의 황반부종의 치료를 위해 승인된다. 용어 "항-VEGF 항체"는 전제 항체 그리고 항체 단편을 포함한다. 항-VEGF 항체로 치료될 수 있는 질병의 범위는 혈관신생과 연관된 이러한 질병 또는 질환 또는 병리학적 혈관신생 질환을 포함한다. 이들은 암 그리고 안구내 신혈관 증후군, 가령 증식성 망막증 또는 노인황반변성 (AMD), 류마티스 관절염 및 건선을 포함한다. 투여의 바람직한 경로는 눈에 대한 국부적인 치료이고 바람직한 질병 양상은 당뇨병성황반부종이지만, 본 명세서에서 상술된 제제는 다른 전달 방식 (즉, 주사가능; 정맥내 주입) 및 많은 VEGR 관련 질병 및 질환의 치료에서도 또한 유용할 수 있다.

[0037] 항-VEGF 항체는 모 항-VEGF 항체의 인간화 변이체를 인코딩하는 단리된 핵산으로부터 생산된 것들을 포함하며, 여기서 모 항체는 비-인간 가변 도메인을 포함하고, 상기 인간화 변이체는 인간 VEGF를 결합시키고 그리고 6,884,879 특허에서 설명되고 청구된 바와 같은 이들 중쇄 상보적 결정 영역 아미노산 서열을 가지며, 상기 특허는 참조로서 본 명세서에 편입된다. 항-VEGF 항체는 이러한 CDR 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 가진 벡터 그리고 이러한 벡터를 함유한 숙주 세포를 이용하여 생산될 수 있는 것들을 포함한다. 숙주 세포는 이러한 서열을 생산하기 위해 배양될 수 있고 인간화 항-VEGF 항체는 이러한 숙주 세포 배양물로부터 회수될 수 있다. 상기 상술된 단리된 핵산은 '879 특허에서 상술된 바와 같은 이들 서열로 경쇄 상보적 결정 영역 (CDR)을 갖는 인간화 변이체에 대해 추가로 인코딩할 수 있다. 이러한 인간화 변이체는 '879 특허에서, 서열 번호: 7과 같이 나타난 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 그리고 서열 번호: 8과 같이 나타난 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 인간화 변이체는 또한 '879 특허에서, 서열 번호: 116의 중쇄 가변 도메인 서열 그리고 서열 번호: 115의 경쇄 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다.

[0038] 미국 특허 번호 제7,060,269호도 또한 참조로서 본 명세서에 편입된다. 이 특허는 라니비주맙을 청구하고 개시한다. '269 특허의 청구항 제1항은 대상에서 VEGF-유도 혈관신생을 저해하기 위한 방법을 청구하고, 상기 방법은 단지 약 1 x 10^{-8}의 Kd 값으로 인간 VEGF를 결합시키는 인간화 항-VEGF 항체의 유효량을 상기 대상에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 인간화 항-VEGF 항체는 서열 번호: 116의 중쇄 가변 도메인 서열 그리고 서열 번호: 115의 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 라니비주맙은 안구내 용도를 위해 고안된 재조합 인간화 IgG1 카파 동종 단일클론 항체 단편이다. 이 단일클론 항체는 인간 혈관 내피 성장 인자 A (VEGF-A)에 결합하여 이를 저해한다. 라니비주맙은 약 48,000 달톤의 분자량을 갖고 테트라사이클린을 함유한 영양 배지내 대장균(E. coli) 발현 시스템에서 생산된다. 이 산물은 상표명 LUCENTIS®로 상업적으로 이용가능하고 5.5의 pH에서 그리고 10 mM 히스티딘 HCl, 10% 알파, 알파, 트레할로오스 탈수물, 0.01% 폴리소르베이트 20과 함께 0.05 mL의 10 mg/mL 라니비주맙 수성 용액을 전달할 수 있는 일회용 유리 바이알에서 무보존제, 무균 용액으로서 공급된다.

[0039] 라니비주맙은 1999년에 "Selection and Analysis of an Optimized Anti-VEGF Antibody: Crystal Structure of an Affinity-matured Fab in complex with Antigen"의 명칭으로 Chen et al.에 의해 Journal of Molecular Biology (JMB)에서 발행된 과학 학술지에서 설명된다 [5](Chen et al. JMB, 293:865-881 (1999). 라니비주맙의 중쇄 및 경쇄 서열은 이 논문에서 Y0317로서 명시되고 논문의 도 1에서 나타난다. 이 설명뿐만 아니라, 논문은 또한 VEGF에 대한 이 항체 단편의 결합 친화도에 관해서 데이터를 제공한다 (논문의 870 페이지의 표 6). 라니비주맙은 안구 혈관신생 모델에서 신혈관 형성 및 누출을 야기하는 VEGF-A에 결합하여 이의 생물학적 활성을 저해하는 것으로 공지된다. 라니비주맙은 VEGF-A에 결합하여 이를 저해하고 내피 세포의 표면 상에서 VEGF 수용체와 상호작용하는 것으로부터 VEGF-A를 방지하고 따라서 새로운 혈관 형성 (혈관신생); 혈관 누출 및 내피 세포 증식을 감소시킨다. 라니비주맙의 제약학적 유효량의 투여는 VEGF 유도 혈관신생을 저해한다. 용어 항-VEGF 항체는 전장 항체 및 항체 단편, 가령 Fab, Fab', $F(ab)_2$ 및 F_v를 포함하고, 단, 상기 단편은 인간 VEGF에 결합함으로써 바람직한 약물학적 활성을 나타낸다. 라니비주맙은 단지 약 1 x 10^{-8} M의 VEGF에 대한 결합 친화도 (Kd)를 갖는다 - 즉 약 1.4 x 10^{-10}의 결합 친화도 (Chen et al. 870 페이지를 참고). '269 특허의 도 10A 및 10B는 라니비주맙의 경쇄 가변 및 중쇄 가변 도메인의 서열을 제공한다 (Chen et al.에서 나타난 바와 같은 Fab Y0317).

이들 서열은 '269 특허의 서열 번호: 115 및 서열 번호: 116과 동일하다.

[0040] 상기 논문과 특허에서 설명된 라니비주맙 및 다른 항-VEGF 저해제 또는 약물뿐만 아니라, 추가적인 항-VEGF 또는 항-혈관신생 약물도 또한 본 제제에서 활용될 수 있다. 발명자는 항체 단편인 항-VEGF 항체가 건강한 각막 또는 각막의 최소한의 신혈관 형성을 가진, 하지만 몇몇은 다른 안구 질환 (가령 연령 관련 황반 변성 또는 당뇨병성황반부종)을 가진 환자의 눈으로의 국부 투여를 수반하는, 질병 및 질환의 치료를 위한, 리포좀 제제에서 바람직하다는 점을 발견하였지만, 전체 항-VEGF 항체 및 자가-형성, 열역학적으로 안정한 리포좀을 포함한 제제도 또한 각막 혈관신생 및 이들 다른 안구 질병의 치료에서 유용하고 (두 질병 모두 가진 환자에서), 단, 각막 혈관신생은 거대 전체 항체 및 이의 제제의 진입을 허용하거나 촉진시킨다. 완전 또는 전체 항-VEGF 항체의 예시는 상품명 AVASTIN® (베바시주맙)으로 Genentech에 의해 판매된다. 이 항체는 VEGF의 생물학적 활성을 저해하는 재조합 인간화 IgG1 항체이다. 이것은 VEGF에 결합하는 쥣과 항체의 인간 프레임워크 영역(framework region) 및 상보적-결정 영역을 함유하고 대략 149 kD의 분자량을 갖는다. 이 항체는 젠타마이신(Gentamycin)을 함유한 영양 배지내 포유류 세포 (중국 햄스터 난소) 발현 시스템에서 생산된다. 미국 특허 번호 제6,054,297호 (이의 전체로 참조로서 본 명세서에 편입됨)는 베바시주맙 또는 베바시주맙을 만들기 위한 공정을 청구하고 개시한다 (상기 특허에서 청구항 제1항, 제6항, 제7항, 제8항, 제9항, 제10항, 제12항, 제29항 및 제30항을 참고).

[0041] 승인된 산물 사용 설명서에서 설명된 바와 같이, 베바시주맙은 시험관내 및 생체내 어세이 시스템에서 인간 혈관 내피 성장 인자에 결합하여 이의 생물학적 활성을 저해하는 재조합 인간화 단일클론 IgG1 항체이다. 이 항체는 VEGF에 결합하는 쥣과 항체의 인간 프레임워크 영역을 함유한다 [6](L.G. Presta et al. (1997) Cancer Res. 57: 4593-99를 참고). 베바시주맙의 분자량은 약 149 킬로 달톤이다. 이 논문은 인간화 F(ab) 항체 단편의 가변 도메인, "F(ab)1-12"의 상호작용을 개시한다. 베바시주맙은 경쇄 (V_L) 에서 위치 46 그리고 중쇄 (V_H)에서 위치 49, 69, 71, 73, 78 및 94의 가변 도메인에서 프레임워크 치환뿐만 아니라 쥣과 항체의 서열로부터 파생된 비-인간 CDR을 가지며, 여기서 상기 치환은 Presta et al.의 도 1에서 나타난 바와 같이, F(ab)-12의 상응 위치에서 나타난 치환과 동일하다. Presta et al.은 베바시주맙의 분자 특징 및 결합 특징에 대한 정보를 갖는다.

[0042] 이전에 명시된 바와 같이, 라니비주맙 및 베바시주맙 뿐만 아니라, 공지된 다른 항-VEGF 항체 또는 항-혈관신생 약물도 또한 본 발명에서 활용될 수 있다. 본 발명의 항-VEGF 항체는 동일한 것에 관해 상기 인용된 특허 참고문헌에서 설명된 바와 같이 제조될 수 있다. 일반적으로, 단리된 핵산은 항체를 인코딩하고; 핵산을 포함한 벡터는 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식되는 대조 서열에 작동가능하게 연결되고; 상기 벡터를 가진 숙주 세포는 상기 세포를 배양한 후 관심 항체를 생산하고, 수집하고 항체를 정제하기 위한 공정에서 모두 일괄적으로 이용된다. 임의의 적합한 제약학적 부형제는 항체에 첨가될 수 있고 항체는 또한, 원한다면 동결건조될 수 있다. "항-VEGF 항체"는 다양한 형태를 포함하고 완전한 인간 Fc 영역 또는 항체 단편 - 가령 Fab, Fab' 또는 $F(ab')_2$를 갖는 전장일 수 있다. 리포좀 제제를 형성하기 위해 본 명세서에서 개시된 지질과 조합하는 것이 적합한 다른 항-혈관신생 약물은 페갑타닙 또는 에타너셉트 (TNF 저해제)를 포함한다. 후자의 경우, 이 제제는 다양한 자가 면역 질병 또는 질환을 치료하는 데에 이용될 수 있다. 에타너셉트는 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염 및 건선성 관절염, 판상형 건선 및 강직성 척추염을 치료하는 데에 이용되는 상표명 Enbrel®로 판매된다. 다른 적합한 약물은 VEGF 및 PDGF 수용체 단백질 키나아제 및 혈관신생 저해제인, 수니티닙 (명칭 SUTENT®으로 판매되는 2-옥신돌) 그리고 이는 참조로서 본 명세서에 편입된 미국 특허 번호 제6,573,293호에서 설명되고 청구됨) 또는 혈소판 유래 성장 인자 B (PDGF-B)의 조절제 (1.5 mg/.5 mg 라니비주맙)인, FOVISTA™ (이전에 E10030로서 공지됨)를 포함한다. 조합하여 이용되는 다른 적합 약물은 인터페론-알파-2a 또는 템시롤리무스 또는 다른 mTOR 저해제, 가령 라파마이신을 포함한다. 조합하여 이용될 수도 있는 안구 질병에 대한 약물의 종류는 또한, 프로테아좀 저해제, 자식 작용 저해제, 레티노이드, 리소좀 저해제, 열 충격 반응 활성자, Hsp90 샤페론 저해제, 단백질 수송 저해제, 글리코시다아제 저해제, 티로신 키나아제 저해제 및 히스톤 데아세틸라아제 저해제를 포함한다. 이들 약물은 리포좀 제제에서 단독으로 활용될 수 있고 또는 항-VEGF 화합물 또는 항체와의 조합 제제에서 이용될 수 있고 또는 순차적인 조합에서 그리고 바람직하게는 국부 제제에서 이용될 수 있다. FOVISTA™ (0.5 mg 라니비주맙 또는 다른 항-VEGF 화합물 및/또는 PDGF 저해 활성을 가진 다른 약물과 조합하여 0.03-3.0 mg/눈) 및 라니비주맙을 조합할 때 바람직한 지표는 노인황반변성의 치료이다. 아플리버셉트 (2.0 mg/0.05 mL)(Eylea™)도 또한 리포좀 제제에서 단독으로 또는 라니비주맙 또는 다른 유효 성분과 조합하여 이용될 수 있다. 본 발명은 FOVISTA 및 아플리버셉트를 포함한 본 명세서에서 상술된 바와 같은 국부 리포좀 제제 및/또는 임의의 다른 항-혈관신생 약물을 추가로 포함하고, 단, 유효 성분 중 적어도 하나는 본 발명의 열역학적으로 안정한, 자가 형성 리포좀과 혼합/조합된다. FOVISTA (PDGF-B를 표적으로 하는 압타머)는 또한 미국

특허 공개공보 번호 제2012/0100136호에서 "길항제 A"로서 공지되고 설명되며, 상기 공개공보는 이의 전체로 참조로서 본 명세서에 편입된다. 길항제 A의 합성은 '136 공개공보의 실시예 4에서 설명된다 (상기 공개공보에서도 7을 또한 참고). 상기 공개공보에서 설명된 개별적인 VEGF 길항제 및 PDGF 길항제 각각은 적어도 하나의 물질이 열역학적으로 안정한, 자가 형성 리포좀을 형성하는 본 명세서에서 설명된 지질로 조제될 때 본 발명의 범위에 또한 포함된다. 본 명세서에서 상술된 유효 성분 중 어느 하나 또는 상기 유효 성분의 임의의 조합을 갖는 국부 제제는 유리체내 주사로 투여되는 약물 또는 이의 조합보다 이롭다. 추가로, 안구 질병을 위해 눈으로의 국부 적용은 전신적 경구 투여보다 더 바람직하다. 본 발명에서 유용한 조성물은 리포좀 제제 또는 (a) (PDGF 저해제) ARC-127, 길항제 A, 길항제 B, 길항제 C, 길항제 D, 1B3 항체, CDP860, IMC-3G3, 이마티닙, 162.62 항체, 163.31 항체, 169.14 항체, 169.31 항체, αR1 항체, 2A1E2 항체, M4TS.11 항체, M4TS.22 항체, A10, 브레펠딘 A, 수니티닙, Hyb 120.1.2.1.2 항체, Hyb 121.6.1.1.1 항체, Hyb 127.5.7.3.1 항체, Hyb 127.8.2.2.2 항체, Hyb 1.6.1 항체, Hyb 1.11.1 항체, Hyb 1.17.1 항체, Hyb 1.18.1 항체, Hyb 1.19.1 항체, Hyb 1.23.1 항체, Hyb 1.24 항체, Hyb 1.25 항체, Hyb 1.29 항체, Hyb 1.33 항체, Hyb 1.38 항체, Hyb 1.39 항체, Hyb 1.40 항체, Hyb 1.45 항체, Hyb 1.46 항체, Hyb 1.48 항체, Hyb 1.49 항체, Hyb 1.51 항체, Hyb 6.4.1 항체, F3 항체, 인간화 F3 항체, C1 항체, 인간화 C1 항체, 6.4 항체, 항-mPGDF-C 염소 IgG 항체, C3.1 항체, 5-메틸-7-디에틸아미노-s-트리아졸로 (1,5-a) 피리미딘, 인터페론, 프로타민, PDGFR-B1 단일클론 항체, PDGFR-B2 단일클론 항체, 6D11 단일클론 항체, S is 1 단일클론 항체, PR7212 단일클론 항체, PR292 단일클론 항체, HYB9610 단일클론 항체, HYB 9611 단일클론 항체, HYB 9612 단일클론 항체, HYB 9613 단일클론 항체, 4-(2-(N-(2-카르복사미도-인돌)아미노에틸)-벤젠설포네이트, 4-(2-(N-(-2-카르복사미드인돌)아미노에틸)-설포닐우레아, CGP 53716, 인간 항체 g162, 피라졸로[3,4-g]퀴녹살린, 6-[2-(메틸카르바모일)페닐설파닐]-3-E-[2-(피리딘-2-일)에텐일]-인다졸, 1-{2-[5-(2-메톡시-에톡시)-벤조이미다졸-1-일]-퀴놀린-8-일}-피페리딘-4-일아민, 4-{4-[N-(4-니트로페닐)카르바모일]-1-피페라지닐]-6,7-디메톡시퀴나졸린, 4-아미노-5-플루오로-3-(6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일)1H-퀴놀린-2-원, (4-삼차-부틸페닐){4-[(6,7-디메톡시-4-퀴놀릴)옥시]페닐}메타논, 5-메틸-N-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4-이소옥사졸카르복사미드, 트랜스-4-[(6,7-디메톡시퀴녹살린-2-일)아미노]사이클로헥사놀, (Z)-3-[(2,4-디메틸-5-(2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-1H-피롤-3-일)-프로피온산, 5-(5-플루오로-2-옥소-1,2-디하이드로인돌-3-일리덴메틸)-2,4-디메틸-1H-피롤-3-카르복실산, 1-(4-클로로아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진, N-{4-(3-아미노-1H-인다졸-4-일)페닐-N"-(2-플루오로-5-메틸페닐)우레아, 1,2-디메틸-7-(2-티오펜)이미다졸[5,4-g]퀴녹살린, 1,2-디메틸-6-페닐-이미다졸로[5,4-g]퀴녹살린, 1,2-디메틸-6-(2-티오펜)이미다졸로[5,4-g]퀴녹살린, AG1295, AG1296, 3-아릴퀴놀린, 4-피리딜-2-아릴피리미딘, 소라페닙, MLN518, PKC412, AMN107, 수라민, 네오마이신 이의 제약학적으로 허용되는 염 및 (b) (VEGF 저해제) 라니비주맙, 베바시주맙, 아플리버셉트, KH902 VEGF 수용체-Fe 융합 단백질, 2C3 항체, ORA102, 페갑타닙, 베바시라닙, 둔단 베바시라닙, SIRNA-027, 데쿠르신, 데쿠르시놀 피크로포도필린, 구굴스테론, PLG101, 에이코사노이드 LXA4, PTK787, 파조파닙, 악시티닙, CDDO-Me, CDDO-Imm, 시코닌, 베타하이드록시이소발레릴시코닌, 강글리오사이드 GM3, DC101 항체, Mab 25 항체, Mab73 항체, 4A5 항체, 4E10 항체, 5F12 항체, VA01 항체, BL2 항체, BECG-관련 단백질, sFLT01, sFLT02, 펩티드 B3, TG100801, 소라페닙, G6-31 항체 또는 VEGF 관련 혈관신생을 저해하는 다른 화합물과 조합한 리포좀 제제 및/또는 임의의 다른 제제를 포함한다. 항체뿐만 아니라, 전안부 질병, 가령 각막 질병을 비롯한 안과 질병 또는 질환 치료 또는 수술 절개; 외상 또는 궤양으로 인해 필요한 치유에 적합한 다른 단백질 기반 유효 성분은 예를 들어, 인간 성장 호르몬 또는 공지된 다른 호르몬성 펩티드 또는 이의 변이체를 포함한다.

[0043] 리포좀 제제는 임의의 순서로 다음 일반적인 단계에 따름으로써 제조된다: (1) VEGF 항체 및/또는 상기 설명된 바와 같은 다른 활성제 또는 활성제들을 함유한 수성 용액의 준비; (2) 단계 (1)의 상기 수성 용액에 리포좀을 형성할 수 있는 열역학적으로 안정한, 자가-형성 지질의 첨가 및 (3) 제약학적으로 허용되는 부형제의 선택적인 첨가. 리포좀 현탁액 제제를 제조하기 위한 공정의 임의의 변형은 항-VEGF 항체 (또는 VEGF 저해제 또는 PDGF 저해제) 및 지질을 조합하고 그 다음 수성 용액을 첨가하거나 수성 용액에 개별적으로 각각의 성분을 첨가하는 것을 포함하여 활용될 수 있다. 현탁액은 예상되는 전달 경로 (가령 국부적)에 기반하여 제조되고 추가적인 부형제도 이러한 루트에 기반하여 선택된다. 담체, 안정화제 및/또는 부형제는 완충액, 가령 포스페이트, 시트레이트 또는 다른 무기산; 항산화제 가령 아스코르빈산 및/또는 메티오닌; 보존제; 저분자량 폴리펩티드; 단백질, 가령 젤라틴, 혈청 알부민 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 가령 PVP; 아미노산; 모노사카라이드 또는 디사카라이드 또는 다른 탄수화물; 킬레이트제; 당; 반대-이온 형성 염; 비-이온 계면활성제 등을 포함한다. 리포좀 제제는 또한 용액의 형태로 될 수 있다.

[0044] 제제는 VEGF 관련 질병 및 장애의 치료에서 유용하다. 본 명세서에서 설명된 제제로 치료되어야 할 바람직한 질

병 또는 질환은 안구 질병이다. 상기 설명된 바와 같이, 본 발명에 대해 바람직한 질병 또는 질환은 당뇨병성황반부종의 치료이다. 상기 참고된 바와 같이, DME는 1 디스크 지름의 황반 중심 내에서 경성삼출물 형성 및 망막 비후를 초래하는, 점진적인 누출 및 삼출을 궁극적으로 야기하는 일련의 생화학 사건 및 세포 사건에서 비롯된다. 레이저 광응고화는 치료의 중축이고 약 505로 중도의 시력 감소의 위험을 방지하는 데에 효과적이다 [ETDRSRG, 1985]. 레이저 광응고화는 라인 스코어(line score)를 판독하는 데에서 개선을 초래하지만 흉터의 점진적인 확장, 중심안점, 감소된 대비 민감도 및 손상된 색각과 같은 합병증과 연관되었다.

[0045] 리포좀 제제는 특정한 유효 성분에 따라 VEGF 및/또는 PDGF 또는 임의의 다른 안과 질병 또는 질환과 연관된 종양 또는 망막 장애를 광범위하게 치료할 수 있다. 항-VEGF 항체는 VEGF에 의해 야기되는 하나 이상의 생물학적 활성을 저해한다. 치료학적 적용은 특정한 질병 또는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여되는 제약학적으로 허용되는 제형을 수반한다. 바람직하게 국부적이지만 적합한 제형은 또한, 볼러스(bolus)로서 정맥내 수단으로 또는 지속적인 주입으로; 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액내, 척수강내, 경구 또는 흡입으로의 투여를 포함할 수 있다. 추가로, 이러한 항체 제제는 또한, 종양내, 종양부근, 병소내 또는 병소 주위 경로로 투여될 수 있다. 항제 제제로 치료하기 쉬운 신생 질병은 유방암, 폐암, 위암, 식도암, 직장암, 간암, 난소암, 남성배세포종, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁내막이상증식, 자궁내막증식증, 섬유육종, 융모암, 두경부암, 비인두암, 후두암, 간아세포종, 카포시(Karposi) 육종, 흑색종, 피부암, 혈관종, 해면상 혈관종, 혈관아세포종, 췌장암 및 다른 유형의 암을 비롯한, 다양한 암종을 포함한다. VEGF 관련된 비-신생 질환은 류마티스 관절염, 건선, 죽상동맥경화증, 미숙아 망막병증, 수정체후섬유증식증, 신혈관 녹내장, 노인황반변성, 당뇨병성황반부종 및 다른 형태의 황반부종을 비롯한, 당뇨병성 및 다른 증식성 망막증, 그레이브(Grave) 병을 비롯한 갑상선 비후, 각막 및 다른 조직 이식, 만성 염증, 폐 염증, 신염 증후군, 임신 중독증, 복수, 심낭 삼출 및 흉수를 포함한다. 바람직한 국부 제제로 치료되는 바람직한 질환 또는 질병은 당뇨병성황반부종이다. 투여되는 투여량 및 투여의 빈도는 질병의 유형과 중증도 그리고 특정한 환자의 상태에 의존할 것이다. 예를 들어, 항-VEGF 항체는 이의 치료를 필요로 하는 환자에게 1 μg/kg 내지 약 50 mg/kg 또는 약 0.1-20 mg/kg의 투여량 범위로 투여될 수 있다. DME의 치료를 위한 그리고 라니비주맙의 국부 제제에 관한 바람직한 투여 계획은 본 명세서의 실시예 3에서 설명된다. 유효 성분의 농도와 양은 특정한 환자 및 치료 일수에 따라 변화될 수 있고 하루 또는 매주 또는 매월 제공되는 양도 또한 환자의 반응 그리고 시력과 망막 비후 둘 모두에서의 개선 징후에 따라 변화될 수 있다.

[0046] DME 또는 다른 VEGF 관련 안구 질환을 치료하는 목적을 위한 이상적인 치료 양상은 신속하고 오래 지속될 수 있는 시력 개선을 초래하는 양상일 것이다. DME의 치료를 위해 현재 이용되는 다른 치료 양상은 선별적 PKCβ 저해제 (루복시스타우린); 스테로이드 (트리암시놀론 아세토니드, 플루오시놀론 아세토니드); VEGF 저해제 (베바시주맙; 라니비주맙 및 페갑티닙-주사가능 물질) 및 유리체 해부법을 포함한다. 리포좀 제제는 예를 들어 현재 시중에 있는 유리체내 제제보다 더 유의적인 개선이 있는 국부 치료 양생법을 제공한다. 본 제제는 본 명세서에서 상술된 및/또는 상기 설명된 바와 같은 안구 또는 VEGF 관련 질병 또는 질환에 대한 공지된 다른 치료와 조합하여 이용될 수 있고, 단, 이때에는 사용금지 사유는 없다. 이러한 치료 양생법 또는 치료 기법은 예를 들어 siRNA 분자, 가령 베바시라닙 그리고 현재 발명에서 활용되는 열역학적으로 안정한, 자가 형성 리포좀을 비롯한 적절한 전달 비히클을 포함한다.

[0047] 리포좀 제제에서 단독으로 또는 임의의 다른 유효 성분과 조합하여 활용될 수 있는 안과적 스테로이드는 덱사메타손, 플루오시놀론, 로테프레드놀, 디플루프레드네이트, 플루오로메톨론, 프레드니솔론, 메드리손, 트리암시놀론 아세토니드, 리멕솔론 및 이의 다양한 염 형태를 포함한다. 다른 안과적 항-염증제 (예를 들어 NSAID)도 또한 리포좀 제제에서 활용될 수 있다. 유효 성분에 따라, 열역학적으로 안정한, 자가-형성 리포좀뿐만 아니라 또는 상기 리포좀의 대안으로서 다른 리포좀이 활용될 수 있다.

[0048] 다음 실시예는 본 발명의 특정한 구체예를 추가로 설명하려는 의도이고 제한되지는 않는다:

[0049] **실시예**

[0050] ***실시예 1**-리포좀과 라니비주맙의 용액*

[0051] 10 mg/mL (0.05 mL)의 농도로 0.5 mg의 라니비주맙을 함유한 유리병을 얻었다. 0.015 그램의 PEG-12 글리세롤 디미리스테이트 (PEG-12 GDM) Qsomes™을 이 용액에 첨가하였다 (PEG 뒤에 붙은 숫자는 PEG 사슬에서 C_2H_4O 하위단위의 수를 나타냄). 지질 현탁액내 0.333 mg/mL의 리나비주맙 농도 및 약 1%의 지질 백분율 (10 mg/mL)을 제공하기 위해 포스페이트, 나트륨 클로라이드 및 폴리옥실 40 스테아레이트로 구성된 1.45 mL의 완충 용액을 이용하여 리포좀 현탁액의 부피를 1.5 mL의 최종 부피로 희석시켰다. 나트륨 퍼보레이트 (0.28 mg/mL)를 보존제

로서 첨가하였다. 1 mL의 이 현탁액은 20 방울과 당량이다. 각각의 액적은 대략 17㎍ 라니비주맙을 함유한다.

[0052] 5 mL의 나트륨 퍼보레이트 용액과 15 mL 용액의 폴리옥실 40 스테아레이트, 나트륨 클로라이드, 제1염기성 나트륨 포스페이트 및 제2염기성 나트륨 포스페이트 완충 용액을 조합함으로써 완충 용액을 제조하였다 (V= 20 mL, pH 5.5). 이후 1.45 mL의 이 용액을 바로 위에서 설명한 바와 같이 활용하였다. 안과적 리포좀 현탁 제제내 부형제 각각의 농도는 0.142 mg/mL (제2염기성 나트륨 포스페이트); 6.7 mg/mL (제1염기성 나트륨 포스페이트); 50 mg/mL (폴리옥실 40 스테아레이트); 5.1 mg/mL (나트륨 클로라이드); 0.333 mg/mL (라니비주맙); 10 mg/mL (PEG-12 GDM) 및 2.8 mg/mL (나트륨 퍼보레이트)였다. pH는 HCl 또는 NaOH로 조정할 수 있고 저분자량 아미노산 또는 유기산을 또한 활용할 수 있다. 도 3은 지질이 수성 용액과 혼합될 때 형성되는 적어도 두 가지 유형의 리포좀 (Qusomes®)을 보여준다.

[0053] ***실시예 2***- *토끼 각막에서의 확산 챔버 연구*

[0054] 하기 설명된 방법을 이용하여 토끼 각막에 적용되는 리포좀 제제의 확산 챔버 데이터를 발생시켰다. 요약하자면, 10, 20 및 30 분에 그리고 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 24 시간에 샘플을 채취하였다. 데이터는 국부적으로 적용된 리포좀 라니비주맙 제제의 경우 섭씨 34도에서 토끼 각막의 수양액 내로의 유의적인 침투 속도를 보여주었다. 비-리포좀 제제의 경우 토끼에서 이전에 보고된 7일 및 14일과 대비하여, 리포좀 제제에서 라니비주맙은 투여 후 3시간에 시작하여 식별되고 최대 24시간까지 남아있었다 (데이터는 나타나지 않음 - Chen et al., Eye London 2011 Nov;25(11):1504-11을 참고.). 수평적인 유동으로 유리, 발리아-치엔(Valia-Chien) 챔버에서 실험을 수행하였다. 물은 섭씨 34도의 온도에서 재순환한다. 막은 챔버의 접합 지점 사이에 위치하였고, 이 실시예에서, 토끼 각막은 막으로서 이용되었다. 수용 챔버(receptor chamber)를 3.2 mL의 식염수로 채워 눈 앞 부분에서의 수양액의 함유물을 자극시켰다. 라니비주맙 및 열역학적으로 안정한, 자가-형성 지질을 포함한 3 mL의 안과 제제가 공여 챔버(donor chamber)에 제공되었다. 확산 챔버를 지속적으로 휘저었다. 여러 시점에 수용 챔버로부터 샘플을 수집하였다 - 400 μL 샘플을 채취하였고 각각의 시간에 400 μL의 식염수로 대체시켰다. 샘플을 다음 시점에 채취하였다: 10 분; 20 분; 30 분; 1 시간; 2 시간; 3 시간; 4 시간; 5 시간; 6 시간 및 24 시간. 이미 3번째 시간에 HPLC에 의해 라니비주맙이 검출되었다. HPLC 표준을 위해 대조 용액으로서 Lucentis® 이용하였다. 토끼 각막 막을 통해 리포좀 제제의 통과를 평가하는 데에 전기영동을 또한 이용하였고 결과는 HPLC 데이터와 일치하였다.

[0055] ***실시예 3***- *DME를 가진 환자에서의 시험적 임상 연구*

[0056] DME를 가진 환자를 2주 동안 매일 (6x/일) 3시간마다 1 방울의 제제로 6회/일 치료하였다. 라니비주맙의 총 용량/일은 6 x 17 ug 또는 102 ug이었다. 이 2주의 기간 후 6주에 걸쳐 평균 중심와 두께 (CFT)의 감소 및 시력의 증가의 개선이 나타났다 (도 1과 도 2를 참고). 8주에, 망막 두께의 증가 및 시각적 선명도의 감소가 일어났고, 10주에 매일 두 방울씩 치료를 다시 시작했다 (34 ug/일). 제14주에 OCT 및 BCVA에서의 개선에 대한 뚜렷한 경향이 관찰되었다 (도 1과 2를 참고). 동일한 프로토콜을 이용하여 2명의 추가 환자도 또한 치료하였다. 3명의 환자 모두의 결과는 도 4-7에서 나타나고 대조에 비해 CFT 및 VA에서의 개선을 보여준다.

[0057] ***실시예 4***- 트리암시놀론 아세토니드를 이용하여 *환자에서의 시험적 임상 연구*

[0058] 단일 중심 개방 표지 시험적 연구에서 DME를 가진 적격 환자는 트리암시놀론 (TA)를 포함한 국부 제제를 받았다. 황반 중심과 관련된 DME를 가진 3명의 환자 (평균 연령 58세, 53-64세 평균)의 총 3개의 눈 그리고 ETDRS 시험을 이용하여 눈 연구에서 65 내지 40개 글자의 최대-보정 시력 (BCVA). 환자는 그들이 12주의 제어 치료 기간 동안 깨어 있는 동안 (6회), 눈 연구에서 2시간마다 133 ug (마이크로그램)의 TA를 함유한 한 방울을 적용하도록 지시받았다. 시간에 따른 광간섭단층촬영장치 (OCT)로 측정된 바와 같이, 주요 결과 측정은 3개월째에 안구 및 전신적인 부작용의 빈도 및 중증도 그리고 중심와 두께 (CFT)에서 기준에서의 변화와 같은 일차 평가 변수(primary end point)를 포함하였다. 부차적인 결과는 시간에 따른 기준 BCVA에서의 변화, 안저 사진 (FP) 상에서 ETDRS 망막증 중증도의 기준으로부터 >3-단계 진행을 가진 환자의 비율, 형광 혈관 조영검사 (FA)에서 누출이 해결된 환자의 비율 그리고 시간에 따른 황반 레이저 치료의 필요성이었다. TA 제제는 상업적으로 이용가능한 시작 물질로부터 라니비주맙 제제와 유사한 방식으로 제조하였다.

[0059] 트리암시놀론 + 1% 리포좀 안과 현탁액

[0060] 최종 용액은 멸균된 수성 현탁액이다. 이의 함유물은 다음과 같다:

TA 제제	
	mg/mL
트리암시놀론 아세토니드 *	2.667
하이드록시프로필메틸셀룰로오스	3.000
제 1 염기성 나트륨 포스페이트	10.000
제 2 염기성 나트륨 포스페이트	3.000
폴리소르베이트 80	0.500
EDTA	0.100
나트륨 클로라이드	2.500
벤즈알코늄 클로라이드 50%	0.200
PEG-12-GDM	10.0000
물	1 mL
pH 5.0 - 7.5로 조정하기 위한 NaOH 또는 HCl	각각의 현탁액 액적은 133.35 μg을 함유한다.

PEG-12-GDM: 리포좀; 디아실글리세롤-폴리에틸렌글리콜 (PEG 12),

글리세롤 디미리스테이트 (GDM).

[0061] * TA는 최종 산물이다. 이는 TA 미분화 (대략 12 mm)된 것이고 보존제가 없다.

[0062] 트리암시놀론 + 1% 리포좀 안과 현탁액의 제조 프로토콜

[0063] 1. 비커에 증류수의 최종 부피의 40%를 넣고 이를 70 내지 80℃까지 가열한다.

[0064] 2. 하이드록시프로필메틸셀룰로오스를 첨가하고 실온에 도달할 때까지 혼합을 멈추면 이는 투명하고 균일한 혼합물이 된다.

[0065] 3. 이를 고압멸균하고 일단 멸균되면 교반을 하면서 실온에 도달하게끔 한다.

[0066] 4. 또 다른 비커에 증류수의 최종 부피의 40%를 넣는다. 다음 시약을 하나씩 첨가하고 완전히 용해될 때까지 혼합한다:

[0067] a) 제1염기성 나트륨 포스페이트

[0068] b) 제2염기성 나트륨 포스페이트

[0069] c) EDTA

[0070] d) 나트륨 클로라이드

[0071] e) 폴리소르베이트 80

[0072] 5. 물의 남은 부피의 10%에, 벤즈알코늄 클로라이드를 50%로 첨가하고 완전히 섞일 때까지 혼합한다. 일단 용해되면, 포스페이트, EDTA, 나트륨 클로라이드 및 폴리소르베이트 80을 함유한 상기 용액에 이 새로운 용액을 첨가한다. 멸균하기 위해, 0.22 μm 막으로 여과시킨다.

[0073] 6. 하이드록시프로필메틸셀룰로오스의 멸균 용액을 염 및 보존력이 있는 벤즈알코늄 클로라이드를 함유한 다른 멸균 용액과 혼합하고 투명하고 균일한 혼합물이 될 때까지 혼합한다.

[0074] 7. 완충액과 벤즈알코늄 클로라이드가 있는 상기 용액에 트리암시놀론 아세테이트를 첨가하고 완전히 섞일 때까지 교반한다.

[0075] 8. 이 혼합물에 리포좀을 첨가하고 자석 교반기로 15분 동안 교반하여 최종 현탁액을 얻는다.

[0076] 9. 특수한 점안기에 현악액을 포장한다. 각각의 점안기 병은 이 트리암시놀론 안과 현탁액을 1.5 mL 함유하였다.

[0077] ***결과:*** 임상적으로 유의적인 중심-관련 DME를 가진 환자에서 리포좀 제제내 TA를 포함한 국부 제제의 사용은 잘 용인되었다. 안구 또는 전신적인 부작용 어느 것도 보고되지 않았다. 제2개월에, 3명의 환자 모두의 CFT는 기준에 비해 감소되었다. 3명의 환자 중 2명은 적어도 100 um의 CFT에서의 감소가 있었다. 제3개월에는, 3명의 환자 모두 시력 개선을 나타내었다. 환자 중 한 명은 > 15 개 글자를 얻었다.

[0078] 청구된 발명이 이의 특이적인 구체예에 대한 참조와 함께 그리고 상세하게 설명되었지만, 청구된 발명에 대해 이의 정신 및 범위로부터 벗어남 없이 다양한 변화와 변형이 이루어질 수 있다는 점이 해당 분야의 통상의 기술자에게 명확할 것이다. 따라서, 예를 들어, 해당 분야의 통상의 기술자는 단지 정례적인 실험을 이용하여, 명확히 설명되지 않았을 수도 있는 청구된 발명의 많은 구체예를 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 구체예는 본 발명의 범위 내에 있다.

[0079] **참고문헌**

[0080] 1. Roskoski Jr, Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. BBRC, 2007.

[0081] 2. Fong D, Diabetic Retinopathy. Diabetes Care, 2004.

[0082] 3. Bhagat N, Diabetic Macular Edema: Pathogenesis and Treatment. Survey of Ophthalmology 2009.

[0083] 4. Meyer C, Current Treatment Approaches in Diabetic Macular Edema, Ophthalmologica, 2007.

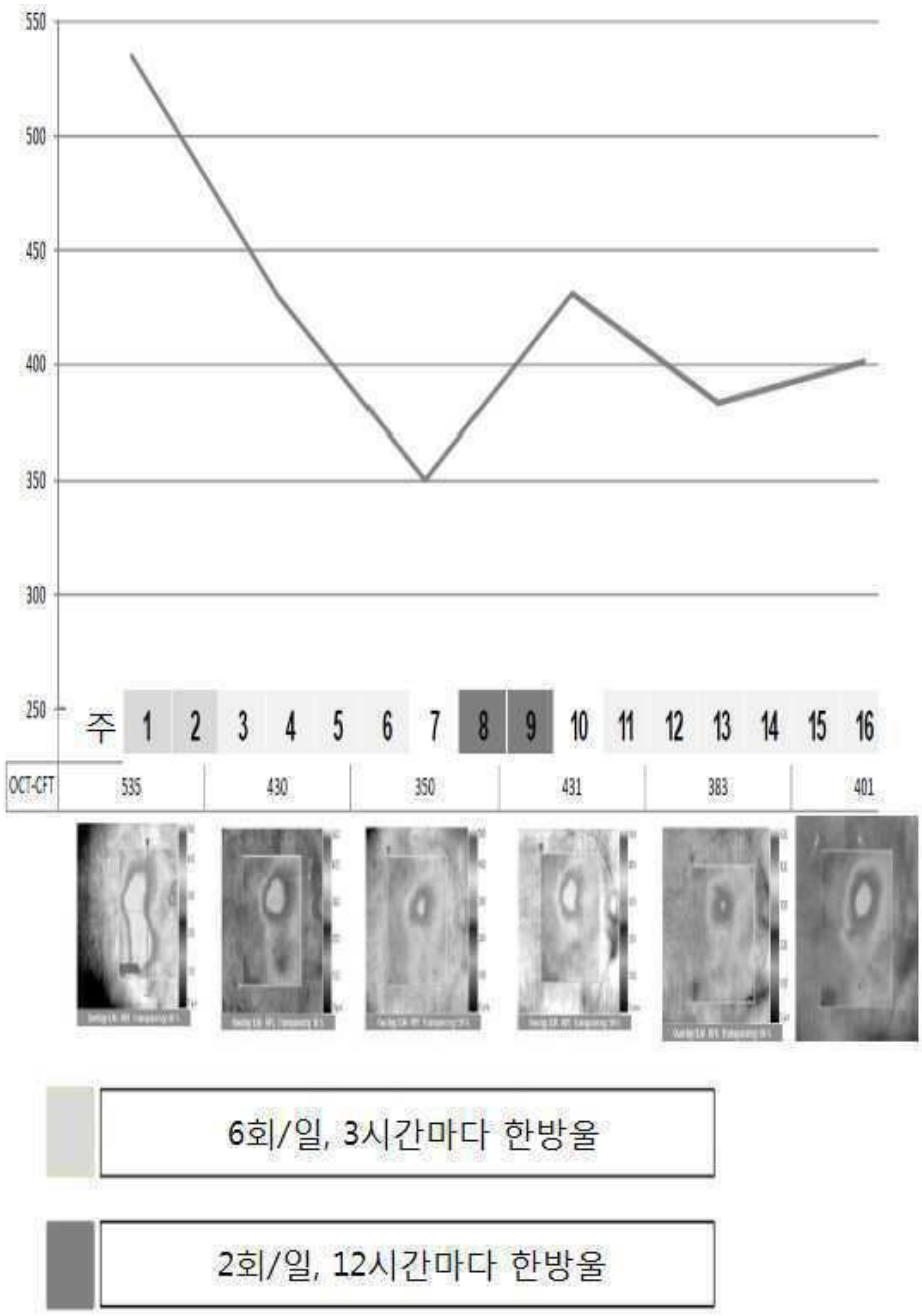
[0084] 5. Chen Y, Selection and analysis of an optimized Anti-VEGF antibody: Crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen, JMB, 1999.

[0085] 6. Presta L, Humanization of an Anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders.

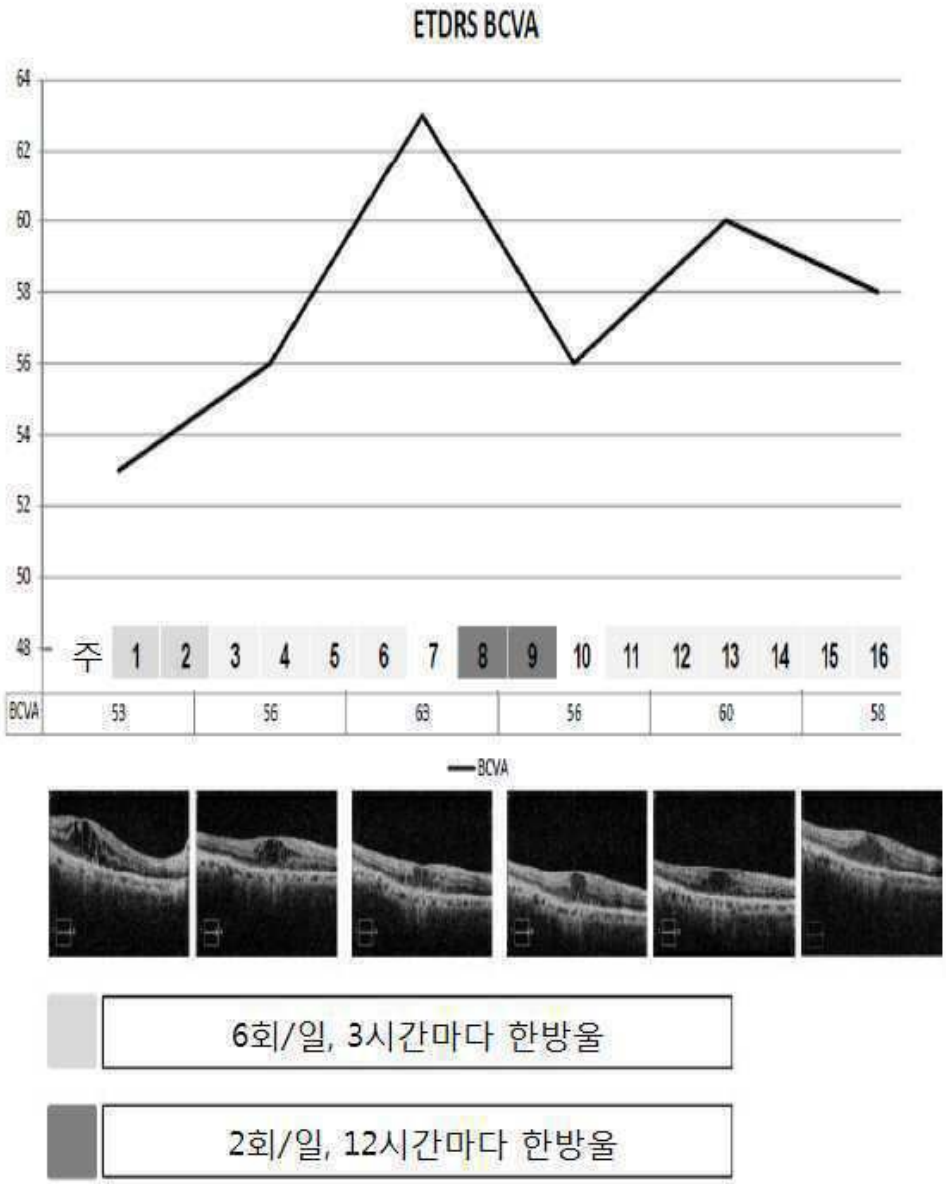
[0086] 7. ETDRSR, Photocoagulation for macular Edema, Report 1, 1985.

도면

도면1


550
500
450
400
350
300
250
주
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
OCT-CFT
535
430
350
431
383
401
6회/일, 3시간마다 한방울
2회/일, 12시간마다 한방울

도면2

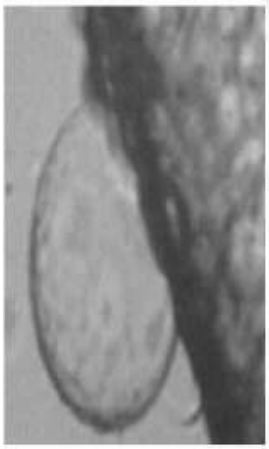

ETDRS BCVA
64
62
60
58
56
54
52
50
48
주 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
BCVA 53 56 63 56 60 58
BCVA
6회/일, 3시간마다 한방울
2회/일, 12시간마다 한방울

도면3

QuSomes™ 의 현미경 관찰 사진



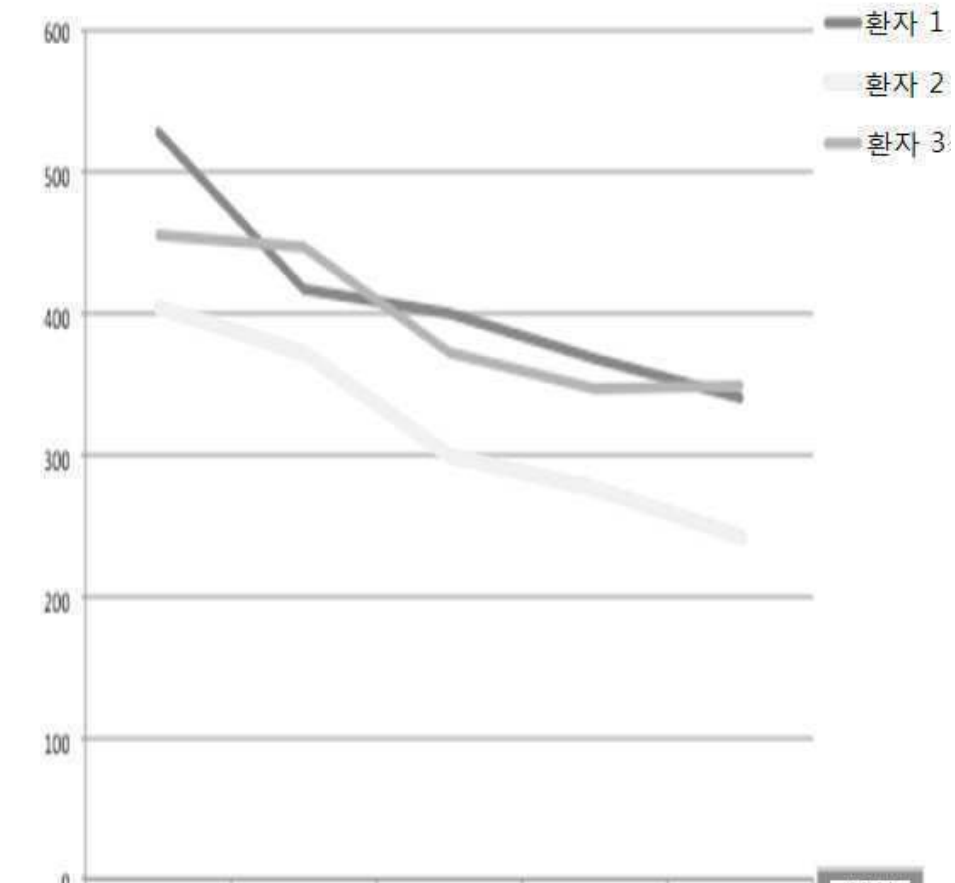
다중라멜과 QuSome



거대 단일라멜과 QuSome

QuSome의 위상차 광학 현미경:
다중라멜과 소포(왼쪽) 및 거대 단일라멜과 소포(오른쪽), 물 첨가후 10분

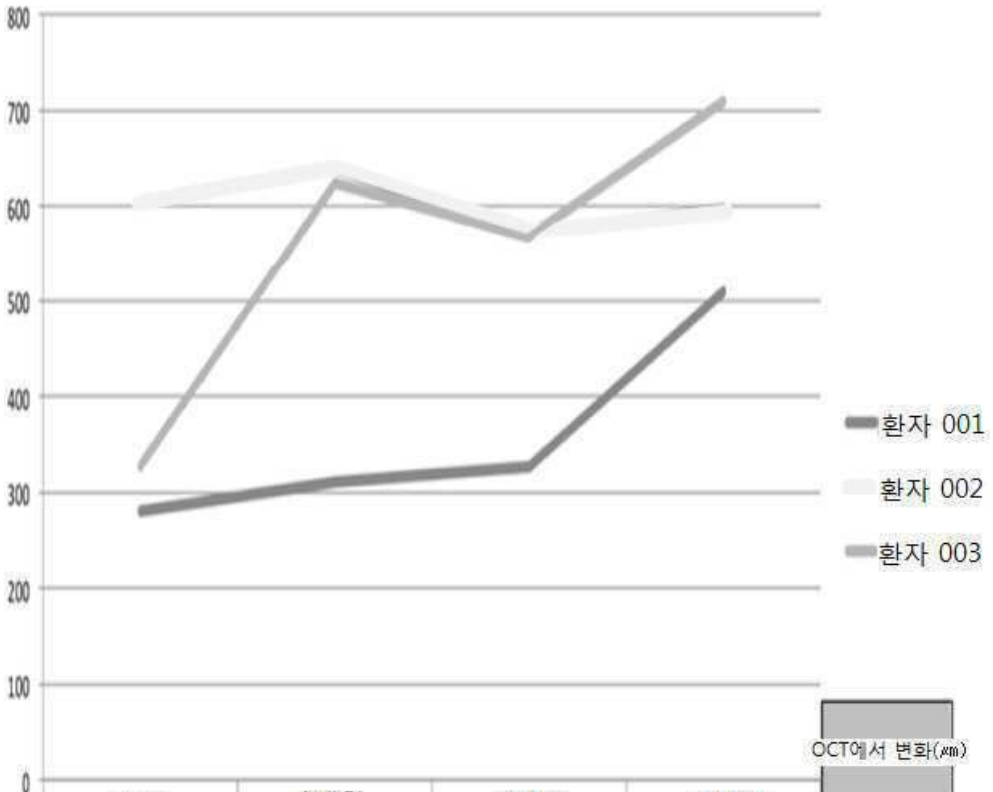
도면4



	기준	1개월	2개월	3개월	4개월	변화
환자 1	527	417	400	369	340	-187
환자 2	404	373	301	278	243	-161
환자 3	455	448	372	347	350	-105

결과: 시간에 따른 중심와 두께-눈 연구

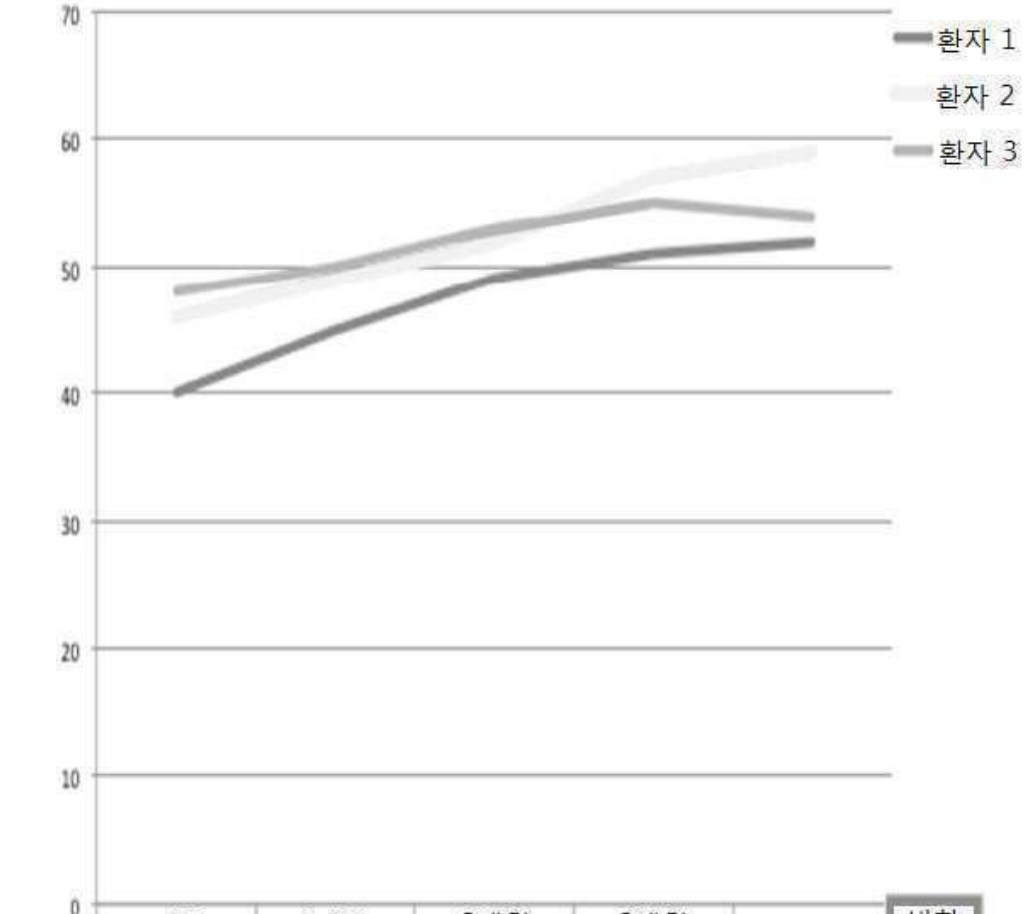
도면5



	기준	1개월	2개월	3개월	OCT에서 변화(㎛)
환자 001	280	310	326	509	+229
환자 002	604	640	570	597	-7
환자 003	327	624	568	709	+336

결과: 중심와 두께 - 대측성 눈

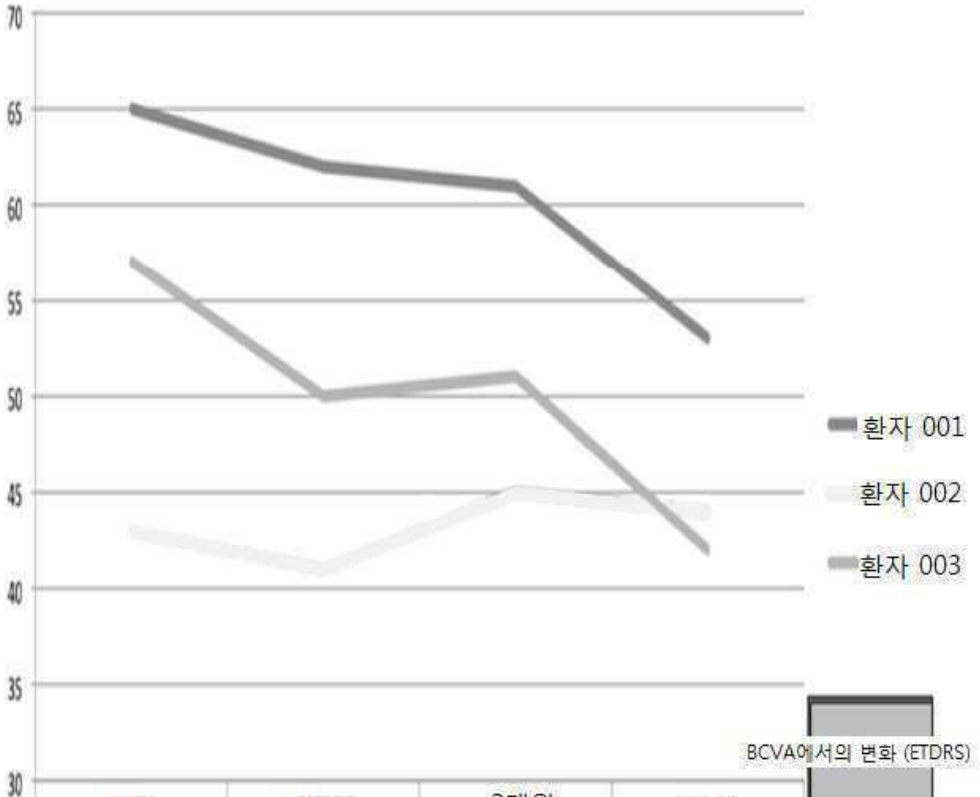
도면6



	기준	1개월	2개월	3개월	4개월	변화
환자 1	40	45	49	51	52	+12
환자 2	46	49	52	57	59	+13
환자 3	48	50	53	55	54	+6

결과: BCVA - 눈 연구

도면7



	기준	1개월	2개월	3개월	BCVA에서의 변화 (ETDRS)
환자 001	65	62	61	53	-12
환자 002	43	41	45	44	+1
환자 003	57	50	51	42	-5

결과: BCVA 대측성 눈