



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년06월15일
(11) 등록번호 10-1157260
(24) 등록일자 2012년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7014847
(22) 출원일자(국제) 2004년02월12일
심사청구일자 2009년02월04일
(85) 번역문제출일자 2005년08월11일
(65) 공개번호 10-2005-0103224
(43) 공개일자 2005년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2004/000548
(87) 국제공개번호 WO 2004/071495
국제공개일자 2004년08월26일
(30) 우선권주장
0305322.0 2003년03월07일 영국(GB)
03250868.1 2003년02월12일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
US4978713 A

(73) 특허권자
바이오컴퓨터블즈 유케이 리미티드
영국 판함 씨레이 지유9 8큐엘 웨이돈 레인 판함
비즈니스 파크 채프먼 하우스
(72) 발명자
루이스, 앤드류
영국, 판함, 씨레이 지유9 8큐엘, 웨이돈 레인,
판함 비즈니스파크, 채프먼 하우스, 바이오컴페
터블즈 유케이 리미티드
스트라포드, 피터, 윌리엄
영국, 판함, 씨레이 지유9 8큐엘, 웨이돈 레인,
판함 비즈니스파크, 채프먼 하우스, 바이오컴페
터블즈 유케이 리미티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
조영신, 이범일, 김윤배

전체 청구항 수 : 총 19 항

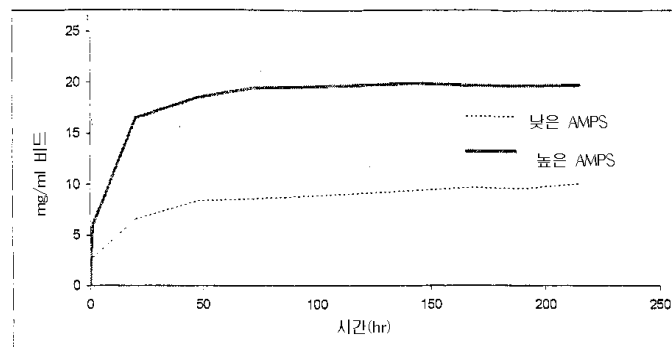
심사관 : 김문경

(54) 발명의 명칭 고품 종양의 화학색전술용 조성물

(57) 요약

본 발명의 고품종양의 화학색전술을 위한 조성물은 수-불용성 수-팽창성 합성 음이온 폴리머의 입자 및, 그안에 흡수된 안트라시클린을 포함한다. 폴리머는 바람직하게는 폴리(비닐알콜)이고 약제는 독소루비신이다.

대표도 - 도1



도 1: 독소루비신을 갖는 비드 블록의 낮은 AMPS와 높은 AMPS 제형물의 로딩

(72) 발명자

레파드, 사이먼, 윌리엄

영국, 관함, 씨레이 지유9 8큐엘, 웨이돈 레인,
관함 비즈니스파크, 채프먼 하우스, 바이오컴퓨터
블즈 유케이 리미티드

할, 브렌다

영국, 관함, 씨레이 지유9 8큐엘, 웨이돈 레인,
관함 비즈니스파크, 채프먼 하우스, 바이오컴퓨터
블즈 유케이 리미티드

곤잘레스, 파자르도, 마리아, 빅토리아

영국, 관함, 씨레이 지유9 8큐엘, 웨이돈 레인,
관함 비즈니스파크, 채프먼 하우스, 바이오컴퓨터
블즈 유케이 리미티드

가르시아, 페드로

영국, 관함, 씨레이 지유9 8큐엘, 웨이돈 레인,
관함 비즈니스파크, 채프먼 하우스, 바이오컴퓨터
블즈 유케이 리미티드

특허청구의 범위

청구항 1

수-팽창성 수-불용성 폴리머의 매트릭스를 갖는 입자들 및, 매트릭스에 흡수된 수용성 치료제를 포함하는 조성물로, 상기 폴리머가 6-8 범위의 pH에서 0.1 내지 10meq/g 범위의 음이온 전하를 갖고 가교된 폴리(비닐 알콜)을 포함하고, 상기 입자들은 물 중에서 팽창되어 평형화될 때, 40-1500 μ m 범위의 입자 크기를 갖고, 상기 치료제는 하나 이상의 아민 기를 갖는 안트라시클린 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 폴리머는 공유적으로 가교된 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

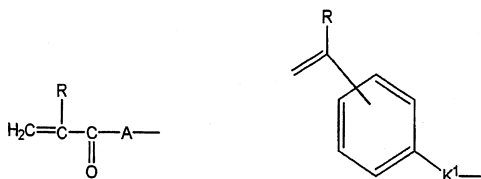
제 1항에 있어서, 분자당 2 이상의 부속 에틸렌적으로 불포화된 기를 갖는 폴리(비닐알콜)(PVA) 마크로머를 음이온성 모노머를 포함하는 에틸렌적으로 불포화된 모노머와 공중합함에 의해 형성되고, 여기서 음이온성 모노머는 아크릴산인 조성물.

청구항 5

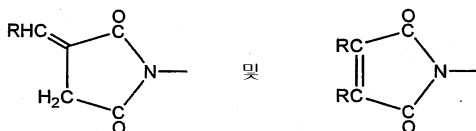
제 1항에 있어서, 분자당 2 이상의 부속 에틸렌적으로 불포화된 기를 갖는 폴리(비닐알콜)마크로머를 음이온성 모노머를 포함하는 에틸렌적으로 불포화된 모노머와 공중합함에 의해 형성되고, 상기 음이온성 모노머는 일반식 I 을 갖고;

Y^1BQ ,

여기서 Y^1 은



$CH_2=C(R)-CH_2-O-$, $CH_2=C(R)-CH_2OC(O)-$, $CH_2=C(R)OC(O)-$, $CH_2=C(R)-O-$, $CH_2=C(R)CH_2OC(O)N(R^1)-$, $R^2OOCRC=CRC(O)-O-$, $RCH=CHC(O)O-$, $RCH=C(COOR^2)CH_2-C(O)-O-$,



에서 선택되고,

상기 식들에서, R은 수소 또는 C_1-C_4 의 알킬기이고;

R^1 은 수소 또는 C_1-C_4 의 알킬기이고;

R^2 은 수소 또는 C_1-C_4 의 알킬기 또는 BQ 이고, 여기서 B와 Q는 아래와 같이

정의되고;

A는 $-O-$ 또는 $-NR^1-$ 이고;

K^1 은 기 $-(CH_2)_rOC(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)O-$, $-(CH_2)_rNR^3-$, $-(CH_2)_rNR^3C(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^3-$, $-(CH_2)_rNR^3C(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)NR^3-$, $-(CH_2)_rNR^3C(O)NR^3-$ (여기서 R^3 기는 같거나 다르다), $-(CH_2)_rO-$, $-(CH_2)_rSO_3-$, 또는 B^1 과 조합하여, 원자가 결합이고 그리고 r은 1~12이고, R^3 는 수소 또는 C_1-C_4 의 알킬기이고;

B는 1 내지 12개의 탄소원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알칸디일이고, 또는, 만약 Q 또는 Y_1 이 B에 결합된 말단 탄소원자를 포함하면, 원자가 결합이고; 그리고

Q는 카르복실레이트, 카보네이트, 설포네이트, 설페이트, 니트레이트, 포스포네이트 및 포스페이트로부터 선택되는 음이온 기인 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, Y^1 은 $CH_2=CRCOA$ 이고, 여기서 R은 수소 또는 메틸이고, A는 NH이고, B는 C_{1-12} 알칸디일인 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, Q는 설포네이트 기인 조성물.

청구항 8

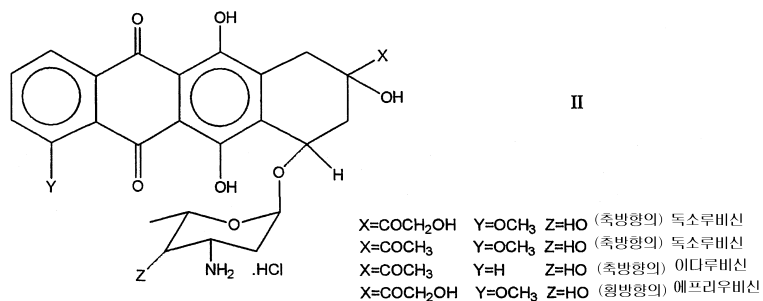
제 4항에 있어서, PVA 마크로머는 1,000~500,000 달톤(D)의 평균 분자량을 갖는 조성물.

청구항 9

제 4항에 있어서, 상기 부속 에틸렌적 기는 인접한 하이드록실 기 유래의 산소원자와 환 아세탈 결합을 통해서 결합되는 조성물.

청구항 10

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 상기 안트라시클린은 일반식 II의 화합물인 조성물:



청구항 11

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 상기 입자는 미세구체인 조성물.

청구항 12

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 상기 입자는 수성액체 중에서 팽창되고 현탁되는 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 추가로 조영제를 포함하는 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제 1항 또는 제 4항에 있어서, 건조된 조성물.

청구항 17

고형 종양의 색전 요법에 의한 치료에 사용하기 위한 제 1항 또는 제 4항에 따른 조성물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

제 1항 또는 제 4항에 따른 조성물의 제조 방법으로, 수-팽창성, 수-불용성 폴리머의 입자를 물 존재하에 안트라시클린 용액과 접촉시키고, 그것에 의해 안트라시클린이 폴리머의 매트릭스로 흡수되게 하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 접촉은 안트라시클린의 수성용액 중에 폴리머 입자를 현탁시킴에 의해 행해지는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 매트릭스에 흡수된 안트라시클린을 갖는 폴리머의 입자는 현탁액에서 회수되고 건조되는 방법.

청구항 21

제 19항에 있어서, 팽창된 폴리머의 입자는 상등액으로부터 분리되고, 팽창화 액체에 의해 여전히 팽창되는 동안 저장 용기로 전달되고, 그리고 살균되고 용기중에 저장되는 방법.

청구항 22

고형 종양의 색전술에 의한 치료에 사용하기 위한 안트라시클린 화합물을 포함하는 약제학적 조성물로, 안트라시클린이 분자당 2 이상의 부속 에틸렌적으로 불포화된 기를 갖는 폴리(비닐알콜) 마크로머와 에틸렌적으로 불포화된 음이온 모노머의 공중합에 의해 형성된 폴리머 매트릭스로부터 전달되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리머 색전 물질 및 폴리머 매트릭스에 병합되어 있는 치료제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물은 종양을 색전하고 종양에 세포독성제를 운반하는데 사용된다.

배경 기술

- [0002] 색전술(embolotherapy)은 간접적 약물의 증가하고 있는 분야이나, 보통 원하는 위치로의 카테터의 경동맥적 접근에 의존하고, 거기서 약제는 특정 혈관을 경색시키기 위해 방출된다. 이 치료는 간세포 암종과 같은 특정한 과혈관화된 종양으로 혈액의 공급을 막기 위해 사용되어 왔고, 더 최근에는 자궁섬유종의 치료제로서 각광받게 되고 있다.
- [0003] 임상에서 색전물질은 색전형성의 부위로의 카테터를 통한 운반을 요구로 하고, 거기서 그것을 막기 위해 혈류의 방향으로 유출되어야 하는 한계가 있다. 이것은 작은 입자 또는 구체(sphere)를 사용하는 혈관의 물리적 블로킹에 의해 달성되고, 또는 액상 색전제인 경우에는, 몇몇 상변화 종류 또는 흐름성 물질의 세팅 반응을 요구하고 관 내에 캐스트(cast)를 형성한다.
- [0004] 가장 많이 쓰이는 입자-기초 색전제는 폴리(비닐알콜)(PVA) 입자(e.g. Ivalon)로서 몇 십년간 사용되어 왔다. 최근에 이 물질은 시트 형태 보다는 미립자 형태로 입수 가능하고, 운반 전 외과 의사에 의한 과립화는 필요하지 않다.
- [0005] WO-A-0168720에는, 색전술을 위한 PVA-기초 조성물이 기술되어 있다. PVA는, 초기에, 부속(pendant) 아크릴기를 갖는 마크로모노머를 형성하도록 유도되어 있다. 연이어서 이들 아크릴기는 중합되고, 임의로 코모노머 존재하에, 수-불용성, 수-팽창성 폴리머 매트릭스를 형성한다. 중합반응은 인 시츄로 수행될 수 있고, 그것에 의해 관으로의 운반 후에 색전 부위에서, PVA는 수-불용성이 된다. 대안으로, 중합은 운반 전에 수행되고, 일반적으로 미세구체를 형성하는데, 그것은 수성 운반체 내에서 현탁액으로서 운반된다.
- [0006] WO-A-0168720에서, 생물학적 활성제는 색전조성물에 포함될 수 있고, 그것에 의해 활성제가 형성된 하이드로겔로부터 운반될 수 있다는 것이 제시되어 있다. 활성제의 1종류는 화학요법제이다. 화학요법제의 예로는 시스플라틴, 독소루비신 및 미토마이신이 있다. 일부 일반적인 지침서에는 색전조성물로 활성제의 병합 방법이 주어져 있다. 조성물이 인시츄 경화되는 액체이면, 활성제는 액체와 단순히 혼합될 수 있다. 상기 논문이 수행되는 경우, 활성제는 "캡슐화"로 병합되거나, 표면 코팅에 의해 병합될 수 있다는 것이 제안된다. 치료제가 어떠한 타입의 조성물로 병합된 실시예는 전혀 없다.
- [0007] 폴리(하이드록시에틸메타크릴레이트) 가수분해된 (메틸메타크릴레이트)와 글루타르알데히드와 같은 알데히드가 교제를 사용하여 가교된 PVA로부터 형성된 하이드로겔 물질의 미세구체는 색전제로서 또한 사용되어 왔다. 하이드록시에틸메타크릴레이트는 예를 들어 산성기를 갖는 코모노머와 공중합 될 수 있다. 예를 들면 0.3-1몰 % 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트에 의해 가교된 약 1-2몰% 아크릴산과 하이드록시에틸 메타크릴레이트의 가교 코폴리머는, 55-60중량% 범위의 평형 수분함량을 갖고, 오랜 동안 콘택트렌즈의 제형물로 사용되었다.
- [0008] Biosphere에 의해 시판되고 있는 색전 제품은 콜라겐 코팅된 트리스아크릴젤라틴의 미세구체를 포함한다. 콜라겐은 생리학적인 pH로 전체로 양전하를 띤다. Ball, D.S. *et al.*, J. Vasc. Interv. Radiol. (2003), 14, 83-88에서 Biosphere는 미세구체의 기계적 특성은, 통상 색전 조성물과 같이 투여된 약의 범위와 혼합할 때 나쁜 영향을 미치지 않는다고 보여준다. 독소루비신, 시스플라틴과 미토산트론은 특별히 시험되고 있다.
- [0009] 독소루비신과 그의 안트라시클린들은 폴리락타이드 또는 폴리글리콜라이드의 미세구체 및 가교된 피부리노젠 및 알부민 미세구체 같은, 다양한 폴리머 매트릭스에 기초한 운반체로 병합되어 왔다. Juni.K. *et al* in Chem. Pharm. Bull(1985), 33(1), 313-318 에서는 독소루비신의 폴리(락틴산) 미세구체로의 병합과 개의 간정맥 내로 이 조성물의 운반에 대해 기술하고 있다. 이러한 미세구체들은 저장과 운반이 용이하지 않다. 독소루비신은 가교 폴리(비닐알콜)의 표면에 공유결합되어 있고, 그것의 세포독성에 대해 검사되었다(Wingard, L B *et al.* 암 연구 (1985) 45(8) 3529-3536). 약제가 폴리머에 공유결합되어 있기 때문에, 그것은 겔표면으로부터 방출되기 전에 절단되어야만 하고 그래서 생리학적 조건에서 방출되지 않아야 한다.
- [0010] Jones, C. *et al* in Brit. J. Cancer (1985) 59(5)에서는 이온교환 미세구체로 독소루비신의 병합, 및 래트의 모델에서 종양의 화학색전술에 그 조성물의 사용에 대해 기술하고 있다.

발명의 상세한 설명

[0011] 본 발명의 새로운 조성물은 색전술에 적합한데, 이 조성물은 수-불용성, 수-팽창성(water-swellaable) 폴리머의 매트릭스를 갖는 입자 및, 매트릭스 내에서 흡수되어 있는, 수용성 치료제를 포함하고, pH 6-8범위에서 전체적으로 음전하를 띠고, 상기 입자는, 물속에서 평형상태까지 팽창하여 입자 크기가 40-1500 μ m이고, 상기 치료제는 적어도 하나 이상의 아민기를 갖는 안트라시클린 화합물인 것을 특징으로 한다.

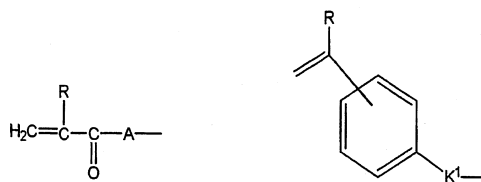
[0012] 본 발명에서 폴리머는 수-팽창성이어야 하나 수-불용성이다. 그러므로, 수성 액체의 존재하에, 폴리머는 하이드로겔을 형성할 것이다. 비록 폴리머가 적어도 부분적으로는 이온적으로 가교되기에 적합할 수 있어도, 일반적으로 폴리머는 공유적으로 가교된다. 폴리머는 2개 또는 더 많은 작용기 가교 모노머의 존재하에 에틸렌적으로 불포화된 모노머의 중합에 의해 형성 될 수 있고, 상기 에틸렌적으로 불포화된 모노머는 음이온성 모노머를 포함한다. etafilcon A기초 콘택트렌즈에 사용된 바와 같이, 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 아크릴산 및 가교 모노머의 코폴리머, 예를들면 에틸렌 글리콜 디메타크릴레이트 또는 메틸렌 비스아크릴아마이드가 사용될 수 있다.

[0013] 수-불용성이며, 수-팽창성 매트릭스를 형성하기 위해 사용될 수 있는 또다른 타입의 폴리머는 글루타르알데히드와 같은 알데히드 타입의 가교제를 사용하여 가교된 폴리비닐알콜이다. 그러한 제품을 위해, 폴리비닐알콜은, 예를 들어, 하이드록실기와 작용성 산기 함유 모노머를 반응시켜 부속 음이온 기를 제공함에 의해 음이온성이 되어야 한다. 그 적절한 예는 2가 산과, 예를 들면 디카르복시산이다.

[0014] 본 발명은 특히, 폴리머 매트릭스가 분자당 1개 이상의 에틸렌적으로 불포화 된, 부속기를 갖는 폴리비닐알콜 마크로머의 산성 모노머를 포함하는 에틸렌적으로 불포화된 모노머와의 공중합에 의해 형성될 때 가치가 있다. PVA 마크로머는 예를들면, 부속 비닐 또는 아크릴 기를 갖는, 1000-500,000D이고, 바람직하기는 10,000-100,000D와 같은 적절한 분자량의 PVA 폴리머를 제공함에 의해 형성될 수 있다. 부속 아크릴 기는 예를 들면 PVA를 아크릴산 또는 메타아크릴산과 반응시켜 하이드록실기의 일부를 통해 에스테르 결합을 형성함에 의해 제공될 수 있다. 폴리비닐알콜로 중합 가능한 비닐기를 부착하는 방법은 예를 들면, US 4,978,713, 바람직하기는 US 5,508,317과 5,583,163에 기술되어 있다. 따라서 바람직한 마크로머는, 환 아세탈 결합을 통하여 (알크)아크릴아미노알킬 모이어티로 결합되는 폴리비닐 알콜의 백본을 포함한다. 실시예 1에서는 그러한 마크로머의 합성과정을 기술한다. 바람직하기는 PVA 마크로머는 분자당 2-20개의 부속 에틸렌기를, 예를 들어 5-10개를 갖는다.

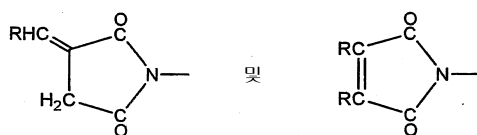
[0015] PVA 마크로머는 산성 모노머를 포함하는 에틸렌적으로 불포화된 모노머로 공중합될 경우, 산성 모노머는 바람직하게는 일반식 I 을 갖는다:

[0016] Y^1BQ , 여기서 Y^1 은,



[0017]

[0018] $CH_2=C(R)-CH_2-O-$, $CH_2=C(R)-CH_2OC(O)-$, $CH_2=C(R)OC(O)-$, $CH_2=C(R)-O-$, $CH_2=C(R)CH_2OC(O)N(R^1)-$, $R^2OOCRC=CRC(O)-O-$, $RCH=CHC(O)O-$, $RCH=C(COOR^2)CH_2-C(O)-O-$,



[0019]

[0020] 에서 선택되고,

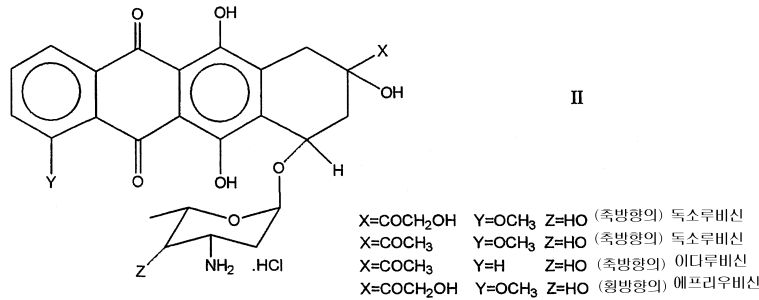
[0021] 상기 식들에서, R은 수소 또는 C_1-C_4 의 알킬기이고;

- [0022] R^1 은 수소 또는 C_1-C_4 의 알킬기이고;
- [0023] R^2 은 수소 또는 C_1-C_4 의 알킬기 또는 BQ 이고, 여기서 B와 Q는 아래와 같이 정의되고;
- [0024] A는 $-O-$ 또는 $-NR^1-$ 이고;
- [0025] K^1 은 기 $-(CH_2)_rOC(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)O-$, $-(CH_2)_rNR^3-$, , $-(CH_2)_rNR^3C(O)-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^3-$, $-(CH_2)_rNR^3C(O)O-$, $-(CH_2)_rOC(O)NR^3-$, $-(CH_2)_rNR^3C(O)NR^3-$ (여기서 R^3 기는 같거나 다르다), $-(CH_2)_rO-$, $-(CH_2)_rSO_3-$, 또는 임의로 B^1 과 조합하여, 원자가 결합이고 그리고 r은 1~12이고, R^3 는 수소 또는 C_1-C_4 의 알킬기이고;
- [0026] B는 직쇄 또는 분지쇄 알칸디일, 옥사알킬렌, 알칸디일옥사알칸디일, 또는 알칸디일올리고(옥사알칸디일)이고, 임의로 1 이상의 불소원자를 포함하고, 과불소화된 쇠를 포함하거나 또는, 만약 Q 또는 Y_1 이 B에 결합된 말단 탄소원자를 포함하면 원자가 결합이고; 그리고
- [0027] Q는 음이온 기이다.
- [0028] 음이온 기는 예를 들어, 카르복실레이트, 카보네이트, 설포네이트, 설페이트, 니트레이트, 포스포네이트 또는 포스포네이트 기, 바람직하기는 설포네이트 기일 수 있다. 모노머는 자유산 또는 염의 형태로 중합될 수 있다. 바람직하기는 컨쥬게이트 산의 pKa는 5미만이다.
- [0029] 일반식 I의 모노머에서 Y^1 은 바람직하기는 $CH_2=CRCOA-$ 기이고, 여기서 R은 수소 또는 메틸기이고, 특히 메틸이 바람직하고 A는 NH가 바람직하다. B는 C_1-C_{12} 의 바람직하게는 C_2-C_6 의 알칸디일기이다.
- [0030] 특히 바람직한 타입의 모노머는 2-아크릴아미도-2-메틸-1-프로판-설포닉 에시드(AMPS)와 같은, (알크)아크릴아미도알칸-설포닉 에시드이다.
- [0031] 에틸렌적으로 불포화된 모노머 내에 예를들면 비이온성 모노머와 같은 희석 단량체가 포함되어 있다. 그러한 모노머는 산성 기의 pKa를 조절하기에, 제품의 친수성 또는 소수성을 조절하기에, 폴리머 내의 소수성 지역을 제공하기에, 또는 단순히 비활성 희석액처럼 작용하기에 유용하다. 비이온성 희석 단량체는 예를 들면 알킬(알크)아크릴레이트와 -(알크)아크릴아미드, (특히 그러한 화합물은 1-12의 탄소원자를 갖는 알킬기를 갖고), 히드록시, 및 디히드록시-치환된 알킬(알크)아크릴레이트, 비닐락탐, 스티렌, 및 다른 방향족 모노머 들이다.
- [0032] 에틸렌적으로 불포화된 모노머는, 예를 들면 입자의 소수성, 윤활성, 생체적합성 및/ 또는 혈액적합성을 증가시키기 위해 양쪽성이온 모노머를 포함한다. 우리의 WO-A9207885, WO-A-9416748, WO-A-9416749 및 WO-A9520407에 적합한 양쪽성이온 모노머가 기술되어 있다. 양쪽성이온 모노머는 2-메타크릴로일옥시-2'-트리메틸암모늄 에틸 포스페이트 내부 염(MPC)이 바람직하다.
- [0033] 폴리머 매트릭스에서, 음이온의 수준은 0.1-10meq/g, 바람직하게는 적어도 1.0meq/g이다.
- [0034] PVA 마크로머가 다른 에틸렌적으로 불포화된 모노머와 공중합되면, 다른 모노머에 대한 PVA 마크로머의 중량비가 50:1-1:5가 바람직하고, 특히 20:1-1:2가 바람직하다. 에틸렌적으로 불포화된 모노머에서, 음이온성 모노머는 10-100몰%의 양으로 존재하고, 바람직하게는 적어도 25몰%의 양으로 존재한다.
- [0035] 수-불용성 수-팽창성 폴리머는 40-99중량%이고, 바람직하게는 75-95중량%의 중량측정 분석으로 측정된 평형 수분 함량을 갖고 있다.
- [0036] 폴리머는 몇가지 방식으로 입자로 형성될 수 있다. 예를 들어, 가교된 폴리머는 예를 들어 시트 또는 블록의 형태의 벌크 물질로 만들어 질 수 있고, 그리고연이어서 적당한 크기로 분쇄될 수 있다. 대안으로, 가교된 폴리머는 예를 들어 연속적 혼합되지 않는 운반체에 분산상으로 모노머의 작은 물방울을 중합화 함으로써,미립자 형태로 형성될 수 있다. 팽창할 때, 소정의 크기를 갖는 입자를 생성하는유중수 중합의 예가 알려져 있다. 예를 들어, US4,224,427은 현탁제의 존재하에 수용성 모노머를 연속 용매상으로 분산시킴으로써 직경 5mm까지의 균일한 구체 비드를형성하는 방법을 기술한다. 중합 후, 가교된 미세구체는 알려진 수단으로 회수되고 세척된 후 임의로 살균된다. 미세구체와 같은 이 입자들은 바람직하게는 수성 액체에서 팽창하고, 크기에 따라

나뉘진다.

[0037] 본 발명에서 사용된 치료활성은 아민 당이 부착된 안트라퀴논 기를 포함하는 안트라시클린 화합물이다. 당 상의 아미노기는 폴리머 매트릭스 내에 음이온 기와 연관되어 있어, 높은 수준의 로딩을 허용하고, 투여 후 조절된 전달을 허용한다.

[0038] 적절한 안트라시클린의 예는 일반식 II를 갖는다:



[0039]

[0040] 다양한 종양에 대해 효능이 철저히 검사된 독소루비신은 특히 흥미로운 로딩 및 방출에 특성을 갖는다는 것을 발견했다. 약물이 폴리(비닐알콜-그라프트-아크릴아미드 프로판 설포닉 에시드)에 대해 친화성을 가져서, 높은 수준의 독소루비신이 폴리머로 병합되고, 그리고 많은 날에 걸쳐 방출된다.

[0041] 본 발명에서 약물이 폴리머 매트릭스에 공유결합되지 않은 것이 중요하다.

[0042] 치료 활성은 다양한 기술에 의해 폴리머 매트릭스로 병합될 수 있다. 한 방법으로, 치료활성은 중합 또는 가교화 전에, 예를 들어 모노머 또는 마크로머 혼합물 또는 가교성 폴리머 및 가교제 혼합물의 폴리머의 전구물질과 혼합될 수 있다. 대안으로, 치료활성은 가교된 후에 폴리머로 로딩될 수 있다. 예를 들어, 건조된 폴리머 미립자는 치료활성 용액에서 바람직하게는 물 중에서 팽창 될 수 있고, 임의로 비-흡수제 및/또는 용매의 증발이 연이어 수행될 수 있다. 알콜과 같은 유기용매 중의, 더 바람직하게는 물중의 활성 용액은 움직이는 입자 베드 위로 스프레이 되고, 이에 의해 약물은 입자몸체로 용매 제거와 동시에 흡수된다. 가장 편리한 방법으로는, 물과 같은 연속 액체 운반체 중에 현탁되어 있는 팽창된 입자 약물을, 연장된 기간에 걸쳐 단순히 접촉시키는 것에 의해, 약제는 입자의 몸체로 흡수되는 것이 가능하다는 것을 발견하였다. 이는 양이온 교환 타입의 방법과 비슷하다. 팽창성 운반체는 연이어서 제거되거나, 편리하게는 색전제로서의 연이은 사용을 위한 제품의 일부로서 입자에 보유될 수 있다.

[0043] 특히, 바람직한 구현예에서, 팽창된 입자는 적절한 구멍을 갖는 여과기, 간편하게는 글래스 필터를 통하여 여과에 의함과 같이 단순 겔/용액 분리 기술에 의해 매트릭스로 흡수되지 않은 팽창성 운반체로부터 분리된다. 여분의 미립자 액체가 거의 없거나 없는 팽창된 입자의 슬러리는 살균과 저장을 위한 적절한 저장 용기로 그대로 펌프될 수 있다. 그러한 형태로 저장동안 액체의 삼출이나 약제의 손실이 없다는 점에서 슬러리는 충분히 안정하다는 것이 발견된다.

[0044] 대안으로, 현탁액은 남아있는 약물 로딩 용액을 제거하기 위해 여과될 수 있고, 약제학적-기초 제품을 건조시키기 위해 채용되는 고전적인 기술에 의해 입자가 건조될 수 있다. 실온 또는 그 이상의 온도 또는 감소된 압력하에 그리고 진공상태에서 공기건조; 고전적인 동결 건조; 대기압-동결 건조; 초임계유체의 용액 향상된 분산 (SEDS)을 포함할 수 있으나, 여기에 제한되지는 않는다. 대안으로서, 약물이 로딩된 미세구체는 일련의 단계 중에 물을 대체하는 유기용매를 사용하고 연이어서 더 휘발성의 유기용매의 증발에 의해 탈수 될 수 있다. 용매는 약제에 대한 용매이외에서 선택되어야 한다.

[0045] 간략히, 전형적인 고전의 동결 건조 과정은 다음과 같다: 시료를 냉동건조기에서 냉장하고, 온도가 조절된 셸프에 놓아둔 부분적으로 마개된 글라스 바이알에 분취된다. 셸프 온도는 감소되고 시료는 일정하게, 규정된 온도로 동결된다. 동결 완료 후, 건조기의 압력은 1차 건조시작시 규정된 압력까지 낮춰진다. 1차 건조 동안, 수분 증기는, 셸프 온도가 일정하고 낮은 온도로 조절되는 동안, 승화에 의해 냉동된 매스로부터 점진적으로 제거된다. 2차 건조는 셸프 온도를 증가시키고 추가로 챔버 압력을 감소시킴에 의해 개시되어, 반 건조된 매스로 흡수된 물이 잔여 수분함량이 소정의 수준까지 감소될 때까지 제거될 수 있다. 바이알은 필요하다면, 보호 대기하에, 인시츄 밀봉될 수 있다.

[0046] 대기압 동결 건조는 동결 제품에 매우 건조한 공기를 빠르게 순환시킴에 의해 이루어진다. 전형적인 동결 건조

조 방법과 비교해서, 진공이 없이 동결 건조는 많은 장점을 갖고 있다. 바람 부는 날 세탁물이 더 빨리 마르는 것과 같은 방식으로 순환하는 건조 기체는 개선된 열을 공급하고 동결된 시료로부터 매스의 이동을 제공한다. 이 분야에서 대부분의 작업은 식품의 제조와 관련이 있고, 그리고 그것은 휘발성의 방향족 화합물의 보유의 증가를 보이고, 생물의 건조에 대한 이것의 잠재적인 장점은 이미 결정되어 있음이 관찰되어 왔다. 특히, 대기중 분사 건조 방법을 사용함에 의해서, 케익 대신에, 미세하고 자유 유동성 분말이 얻어진다. 입자는 서브 마이크론의 직경을 갖는 입자가 얻어지고, 이것은 밀링으로 얻어지는 것보다 10배는 작다. 그것의 높은 표면적을 갖는 과립의 성질은 쉽게 재수화성의 생성물을 초래하고, 흡입 및 피부를 통한 적용에 요구되는 입자 크기에 걸친 미세한 제어가 현재 가능하지 않으나, 이 분야에서 잠재성이 있다.

[0047] 예를 들어 간세포성 암과 같은 고형 종양을 가진 색전술이 필요한 환자에게 투여되는 조성물은, 흡수된 약물을 함유하는 팽창된 입자의 수성 현탁액이다. 겔 타입 색전 조성물에 사용된 바와 같이, 이 현탁액은 종래의 방사선 불투과제와 같은 영상화제와 전달 전에 혼합되는 것이 종종 바람직하다. 예를 들면 흡수된 약물을 함유하는 팽창된 입자의 수성 현탁액은 예를 들면 리피오들과 같은 색전제로 종래 사용된 액체 방사선 불투과제와 투여 직전에, 2:1~1:2의 범위, 바람직하기는 약 1:1의 양으로 혼합될 수 있다. 본 발명의 구체예에서, 흡수된 약물을 가지나 여분의-과립 액체는 거의 없거나 전혀 없는 팽창된 입자의 슬러리를 포함하고, 이 슬러리 및 조영(방사선 불투과)제는 유사하게 전달 직전에 예를 들면 부피로 1:5 내지 2:1의 범위, 바람직하기는 1:2 내지 1:1 범위의 양으로 서로 혼합될 수 있다. 약물 함유 조성물이 건조된 형태로 공급될 경우, 입자들은 조영제로 건조하여 첨가될 수 있거나, 또는 바람직하게는 생리학적인 염수와 같은 수성 운반체중에서 초기에 팽창되어서, 전달 전에 조영제와 배합되기 전에, 슬러리 또는 현탁액을 형성한다. 대안으로 또는 추가로 입자는 안트라시클린에 더하여, 방사선 불투과제로 예비-로딩 될 수 있다. 투여되는 조성물은 다른 치료제와 혼합되거나, 다른 치료제와 조합하여 개별적으로 투여될 수 있다. 보통 조성물은 동맥 내에 카테터와 같은 종래의 전달장치를 사용하여 주사기 중의 저장소로부터 투여된다.

[0048] 색전요법을 필요로 하는 환자에게 투여된 색전조성물은 단일의 온-오프 투여량으로 전달될 수 있다. 색전술은 전통적인 방법을 사용하여 조영제를 따라서 모니터링된다. 색전 조성물, 바람직하기는 본 발명에 유용한 화학 색전 조성물의 두번째 투여량은 첫번째 투여량 후 시간 간격을 두고 전달되는 것이 바람직한데, 예를 들어 독소루비신-함유 조성물의 첫번째 처치의 4~10주 후에 새로 형성된 혈관 공급 종양을 색전하는 두번째 투여량을 전달한다. 비록 적절한 안전성 평가에 따라 더 높은 투여량을 사용하는 것도 가능하나, 조성물은 치료당 25~100mg/m²의 범위의 약물 투여량으로 투여될 것이다. 독소루비신의 치료당 바람직한 투여량은 50mg/m² 이상이며, 예를 들어 100mg/m² 까지 또는 그 이상이다. 일반적으로 치료당 환자당 150mg 이상의 투여는 바람직하지 않다고 여겨진다.

[0049] 본 발명의 두번째 면으로서, 색전술에 의한 고형 종양의 치료에 사용을 위한 조성물의 제조에 안트라시클린 화합물의 사용이 제공되는데, 상기 치료에서 안트라시클린은, 분자당 적어도 2개의 부속 에틸렌적으로 포화된기를 갖는 폴리(비닐알콜)마크로머와 에틸렌적으로 불포화된 음이온성 모노머의 공중합에 의해 형성된 폴리머 매트릭스로부터 전달된다.

[0050] 본 발명의 이 면에서, 폴리머 매트릭스는 인시츄 형성될 수 있다. 따라서 마크로머 및 음이온성 모노머 및 안트라시클린을 포함하는 액체 조성물은 환자의 순환계로 전달될 수 있고, 표적 부위에서 중합을 개시하는 상태에 두어서, 색전화 겔이 형성되게 한다. 대안으로, 폴리머 매트릭스는 본 발명의 첫번째 면에서 기재된 바와 같이, 투여 전에 예비형성될 수 있다.

[0051] PVA 마크로머 및 음이온성 모노머는 바람직하게는 첫번째 면과 관련하여 상기에서 언급된 바와 같다. 다른 모노머들이 또한 첫번째 면과 관련하여 상기에서 언급된 바와 같이, 공중합될 수 있다.

[0052] 본 발명은 결과들이 다음의 도면들에 도시된 하기의 실시예들에 의해 예시된다.

실시예

[0059] **실시예1: 미세구체의 제조를 위한 계략적 방법**

[0060] *넬필콘 B 마크로머 합성:*

[0061] 미세구체 합성의 첫번째 단계는 넬필콘(Nelfilcon) B - 널리 사용되는 수용성 폴리머 PVA로부터 유래된 중합성 마크로머의 제조를 포함한다. Mowiol 8-88 폴리비닐알콜(PVA) 분말(88% 가수분해 됨, 12% 아세테이트 함량, 평균 분자량은 약 67,000D) (150g) (Clariant, Charlotte, NC,USA)을 2리터의 유리 반응관에 첨가했다.

천천히 저으면서, 1000ml의 물을 가하고 교반을 400rpm까지 증가시켰다. PVA의 용해를 완벽하게 하기 위해서, 온도를 2~3시간 동안 $99 \pm 9^\circ\text{C}$ 까지 올린다. 실온으로 냉각하면서, N-아크릴오일아미노아세트알데히드(NAAADA)(Ciba vision, 독일)(2.49g 또는 PVA의 0.104mmol/g)를 PVA 용액에 혼합하고, 이어서 농축된 염산(100ml)(에스테르 교환 반응에 의해 PVA로의 NAAADA의 첨가를 촉매하는)을 첨가한다. 반응은 6~7시간 동안 실온에서 진행시키고, 그리고 나서 2.5M 수산화나트륨 용액을 사용해 pH 7.4로 중화시켜 중단시켰다. 결과물의 염화나트륨과 반응되지 않은 NAAADA는 투석 여과에 의해 제거한다. (2단계)

[0062] *마크로머의 투석 여과:*

[0063] 투석 여과(탄젠트 흐름여과)는, 순환 오염물이 되는 원하지 않는 물질(NaCl, NAAADA)의 투과를 허용하는 반면에, 순환 중에 남아있는 보유액의 투과를 막을 만큼 충분히 작은 구멍을 갖는 막의 표면을 가로질러, 정제될 주입용액(이 경우에는 넬필콘 B 용액)을 연속적으로 순환시켜서 행한다.

[0064] 넬필콘 B 투석여과는 스테인레스 강철 Pellicon 2 mini 홀더를 사용하여 행하는데, 이 홀더는 분자량 3000의 컷 오프를 갖는 구멍 크기를 갖는 $0.1\mu\text{m}^2$ 셀룰로오스 막들이 적층된 것이다(Millipore Corporation, Bedford, MA USA). Mowiol 8-88은 67000의 평균분자량을 갖고, 따라서 막을 투과할 플레이트 능력이 제한되었다.

[0065] 마크로머를 포함하는 플라스크에 자석교반 바를 공급하고 교반 플레이트에 두었다. 용액을 Easy Load II 펌프 헤드에 장착된 Masterflex LS 정량(peristaltic) 펌프를 통해 그리고 LS 24 클래스 VI 튜브를 사용하여 투석 여과 어셈블리로 주입된다. 넬필콘은 투과를 가속화시키기 위해 대략 50psi로 막을 넘어 순환된다. 용액이 약 1000ml의 부피로 농축되었을 때, 부피는 여과액이 오물로 모아지는 속도와 동일한 속도로 물을 첨가하여 6000ml 추가분이 첨가될 때까지 일정하게 유지한다. 한번 획득된 용액은 25°C 에서 1700~3400cP의 점도를 가진 20~23% 고체로 농축된 것이다. 넬필콘은 GFC, NMR 및 점도로 특징화된다.

[0066] *미세구체 합성:*

[0067] 구체는 수성상 (nelfilcon B)이 유기상(부틸 아세테이트)에 첨가되는 현탁 중합(여기서 두 상은 서로 혼합되지 않는다)의 방법으로 합성된다. 빠른 혼합을 채용함으로써, 수성상은 분산되어 작은 물방울을 형성하고, 그것의 크기와 안정성은 상간의 계면에너지에 영향을 끼치는 계면 화성제 및 안정제의 사용 및 수성/유기성의 상의 비율, 점도, 교반 속도와 같은 인자들에 의해 조절될 수 있다. 낮은 AMPS 및 더 높은 AMPS, 2개의 미세구체 시리즈가 제조되고, 그것들의 조성은 아래와 같다:

[0068] A 높은 AMPS:

[0069] 수성 ca 21% w/w 넬필콘 B 용액 (약 $400 \pm 50\text{g}$)

[0070] ca 50% w/w 2-아크릴아미도-2-메틸프로판설포네이트 Na 염

[0071] ($140 \pm 10\text{g}$)

[0072] 정제수 ($137 \pm 30\text{g}$)

[0073] 포타슘 퍼설파이트($5.22 \pm 0.1\text{g}$)

[0074] 테트라메틸 에틸렌 디아민 TMEDA($6.4 \pm 0.1\text{ml}$)

[0075] 유기 n-부틸 아세테이트 ($2.7 \pm 0.3\text{L}$)

[0076] 에틸 아세테이트 중 10% w/w 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트

[0077] ($46 \pm 0.5\text{g}$) (안정화제)

[0078] 정제수 ($19.0 \pm 0.5\text{ml}$)

[0079] B 낮은 AMPS:

[0080] 수성 ca 21% w/w 넬필콘 B 용액 (약 $900 \pm 100\text{g}$)

[0081] ca 50% w/w 2-아크릴아미도-2-메틸프로판설포네이트 Na 염

[0082] ($30.6 \pm 6\text{g}$)

[0083] 정제수 ($426 \pm 80\text{g}$)

- [0084] 포타슘 퍼셀페이트($20.88 \pm 0.2g$)
- [0085] TMEDA ($25.6 \pm 0.5ml$)
- [0086] 유기 n-부틸 아세테이트 ($2.2 \pm 0.3L$)
- [0087] 에틸 아세테이트 중의 10% w/w 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트
- [0088] (CAB)($92 \pm 1.0g$)(안정화제)
- [0089] 정제수($16.7 \pm 0.5ml$)
- [0090] 자켓 씌워진 4000ml 반응 용기를, 반응 온도를 연속적으로 모니터링하는 피드백 센서를 갖는 컴퓨터 조절된 배스(Julabo PN 9-300-650)를 사용하여 가열한다.
- [0091] 부틸아세테이트를 25℃에서 반응기에 첨가하고 이어서 CAB 용액 및 물을 첨가한다. 이 시스템은 PVA 마크로머가 첨가되기 전에 15분간 질소로 정화한다. 분산된 PVA용액의 가교는 TMEDA의 첨가와 질소하에 세시간 동안 온도를 55℃까지 올림으로써 시작된다. 가교는 산화환원개시된 중합을 통해 일어나고 이에 의해 TMEDA의 아미노기는 라디칼 종들을 생성하는 포타슘 퍼셀페이트의 퍼옥사이드 기와 반응한다. 그리고 나서 이 라디칼들은 중합 및 PVA와 AMPS 상의 이중결합의 가교를 개시하여 분산된 PVA-AMPS 방울은 불용성 폴리머 미세구체로의 변형한다. 25℃로 냉각시킨 후, 생성물을 정제를 위해 여과기로 전하고 여기서, 부틸 아세테이트는 아래와 같이 여과하여 제거된다:
- [0092] ?부틸아세테이트 및 CAB를 제거하기 위해 $2 \times 300ml$ 의 에틸아세테이트로
- [0093] 세척
- [0094] ?에틸아세테이트로 30분간 평형을 유지, 그리고 나서 여과
- [0095] ?진공 여과하에 $2 \times 300ml$ 에틸아세테이트로 세척
- [0096] ?30분간 아세톤으로 평형을 유지하고, 에틸아세테이트, CAB, 및 물을 제거
- [0097] 하기 위해 여과
- [0098] ?진공 여과 하에 $2 \times 300ml$ 에틸아세테이트로 세척
- [0099] ?아세톤에서 밤새 평형화
- [0100] ?진공 하에 $2 \times 300ml$ 아세톤으로 세척
- [0101] ?잔여 용매를 제거하기 위해 2시간 동안 55℃에서 진공 건조
- [0102] 염색:
- [0103] 이 단계는 임의적이지만 약물이 착색된 활성(이것은 색을 제공한다)과 함께 로딩될 때는 일반적으로 불필요하다. 수화된 미세구체는 약 90%(w/w)의 물을 함유하고 시각화하기가 어려울 수 있다. 임상적 세팅에서 시각화를 돕기 위해서, 구체는 반응성 blue # 4 염료(RB4)를 사용해 푸르게 염색한다. RB4는 수용성 클로로트리아진 염료로, 알카라인 조건하에 공유 에테르 결합을 생성하는 PVA 백본 상의 부속 하이드록실기와 반응할 것이다. 반응은 pH12(NaOH)에서 실행되고, 이것에 의해 생성되는 HCl는 중화되어 NaCl를 얻게 할 것이다.
- [0104] 염색하기 전에, 구체는 완벽히 재수화되고 35g 분취량(개별적으로 처리된)으로 나뉜다. 염색 용액은 0.8g의 RB4를 2.5M NaOH 용액(25ml)과 물(15ml)중에 용해시키고, 그리고 나서 80g/ℓ의 염수 2ℓ에 구체를 첨가한다. 20분동안 혼합후, 생성물을 32μm 체 상으로 모으고, 반응되지 않은 염색 벌크를 제거하기 위해 행군다.
- [0105] 추출:
- [0106] 광범위의 추출 과정이 모든 결합되지 않거나 비-특이적으로 흡수된 RB4를 제거하기 위해 사용된다. 하기에 프로토콜이 있다:
- [0107] ?2ℓ 물 중에 5분간 평형화. 체 상에 수집 및 행균. 5회 반복.
- [0108] ?0.29% (w/w) 염수 중에 하이드로젠 포스페이트 80mM의 2ℓ 용액 중의
- [0109] 평형화

- [0110] 30분간 끓도록 가열. 냉각하고, 체 상에 수집하고 1ℓ 염수로 세척. 2회
- [0111] 더 반복.
- [0112] ?체 상에 수집, 세척, 10분간 2ℓ 물에서 평형화.
- [0113] ?수집하고 1ℓ 아세톤으로 30분간 탈수.
- [0114] ?모든 분취량을 합하여 2ℓ 아세톤에서 밤새 평형화.
- [0115] *거르기(sieving):*
- [0116] 제조된 미세구체 생성물은 범위 100~1200 μm 의 크기 범위이고, 아래 열거된 명목 분포를 획득하기 위해 메쉬 크기의 범위를 사용해 거르기 과정을 통해 분획화를 겪어야만 한다:
- [0117] 1. 100 - 300 μm
- [0118] 2. 300 - 500 μm
- [0119] 3. 500 - 700 μm
- [0120] 4. 700 - 900 μm
- [0121] 5. 900 - 1200 μm
- [0122] 거르기 전에 구체는 진공 건조하여 용매를 제거하고, 완전히 재수화물로 물 중에서 60℃에서 평형화한다. 구체를 32~1000 μm 범위의 메쉬 크기를 갖는 15" 스테인레스 강철 거르기 트레이를 갖는 316L 스테인레스 강철 볼티시브(vortisieve)유니트(MM Industries, Salem Ohio)를 , 사용해 걸러낸다. 여과된 염수를 분획화를 돕기 위해 유니트를 통하여 재순환한다. 32 μm 체에 모아진 구체는 폐기한다.
- [0123] **실시예 2: 독소루비신의 로딩**
- [0124] 이 실험을 위해, 실시예 1에서와 같이 제조된 낮은 AMPS의 미세구체를 사용했다. 사용된 비드의 각각의 크기를 위해, 0.5ml가 2개의 1ml 주사기로 옮겨지고, 약물을 위해 하나가 취해지고, 두번째는 대조구이다. 실험에서 선택된 크기는 106-300 μm , 300-500 μm , 500-710 μm , 및 850-1000 μm 였다. 부가적으로 500-710 μm 의 3개의 주사기를 과정을 확인하기 위해 준비했다. 11개의 10ml 유리 바이얼을 실험 동안에 빛에 의해 독소루비신이 분해되지 않도록 호일로 덮었다. 표준곡선을 만들었다. 80ml, 20mg/ml 약물용액을 사용해, 아래의 농도를 제조하고 그들의 흡광도 (483nm)를 측정했다: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 3.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 흡광도 결과는 그래프에 도시하고 직선 방정식을 실험에서 비드에 의해 섭취된 약물의 농도를 계산하기 위해 사용하였다. 4개의 바이얼에 비드가 첨가되었을때, 대조구로서 사용될 증류수(ROMIL)가 채워졌다. 남아 있는 7개의 바이얼에 소정 농도의 약물 용액 5ml를 첨가했다. 초기 흡광도와 용액의 농도는 표준 곡선의 준비로부터 이미 알려져 있다. 20mg/ml 용액의 흡광도를 측정하기 위해, 농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 사용해 그것을 200배 희석할 필요가 있었다. 이 1:200 희석은 비드에 의한 용액의 흡수를 측정하는 동안 수행된다. 미세구체의 첫째 세팅을 첫번째 약물 함유 바이얼에 첨가하자마자, 스톱워치를 시작했고, 미세구체를 가장 작은 것에서부터 가장 큰 것까지의 작동하는 남아있는 6개의 바이얼, 각각에 첨가했다. 캡을 사용하며 봉하면, 그것들을 회전식 믹서에 두었다. 이 공정을 대조구 시료에 대해 반복한다. 흡광도는 바이얼이 0.167시간(10분), 0.5시간, 1시간, 2시간, 24시간, 및 96시간의 시간간격으로 구성된바와 같은 순서로 측정했다. 데이터로부터 미세구체 1ml당 약물의 양과 미세구체에 의한 약물의 흡수%를 계산할 수 있었다. 결과는 도 1에 도시하였다.
- [0125] **실시예 3: 로딩시 약물 농도의 효과**
- [0126] 실시예 2에 개요된 순서에 따라, 독소루비신의 상이한 농도의 범위를 높은 AMPS 미세구체 제형물로 로딩할 수 있었다. 대다수의 약물은 미세구체(500-710 μm 크기 범위)로 몇시간 내에 (도 2 참고)로딩될 수 있음이 보여졌다. 로딩은 중량에 기초로한 낮은 AMPS 제형물을 위한 것보다 훨씬 더 높음을 알 수 있다.
- [0127] **실시예4: 로딩시 미세구체 크기의 효과**
- [0128] 독소루비신의 로딩은 몇몇 다른 크기 범위의 미세구체 상에 수행하여 흡수의 비교를 가능케 했다. 더 작은 미세구체가 약물을 더 빠르게 로딩하는 것처럼 보이는 동안, 24시간의 기간에 걸쳐 연속되는 로딩은 미세구체의 당량이 거의 동일한 약물의 로딩으로 평형시킬 것이라는 것을 제시한다. 더 빠른 흡수는 더 작은 미세구체의 증가된 표면에 기여한다(도 3 참고).

[0129] 실시예 5: 로딩의 재생산성

[0130] 실시예 2에 개요된 로딩 실험은 독소루비신의 로딩에 재생산성을 측정하기 위해 여러번 반복했다. 500-710 μ m 크기 범위의 높은 AMPS 미세구체를 물 중의 20mg/ml 약물 용액으로부터 로딩하였고 약물의 흡수를 시간에 따라 모니터 했다(도 4).

[0131] 실시예 6: 미세구체로부터의 독소루비신의 용출

[0132] 높은 AMPS 미세구체에 다양한 농도의 독소루비신을 로딩했고 미세구체를 증류수 250ml로 용출했다(도 5).

[0133] 133.2 μ g/ml 및 2mg/ml의 로딩된 미세구체로부터 약물의 용출은 여전히 3시간 동안 검출 한계 아래였다. 더 높은 약물 로딩을 위해, 파열 효과가 처음 몇 분내에 분명하고, 연장된 기간 동안 느린 방출이 뒤 따른다. 파열이 미세구체 내에 보유된 물로부터 용출하는 유리약물을 나타내는 반면에, 연장된 용출은 하전된 기 사이의 이온성 상호작용에 의해 필수적으로 구체내로 "결합된" 약물로부터 조래한다고 생각된다. 가장 높은 약물의 로딩(20mg/ml 로딩용액으로부터)을 위하여, 파열효과는 구체의 전체 약물 로딩의 45%를 나타내고, 며칠에 걸쳐 잔여물은 운반체로부터 완전히 용출된다. 연구는 약물 100%가 결국 미세구체로부터 용출되었음을 보여주었다.

[0134] 실시예 7: 높은 AMPS 미세구체에 의한 독소루비신 격리(sequenstration)의**[0135] 시각화**

[0136] 850-1000 μ m(수작업 거르기된)의 크기범위의 높은 AMPS 미세구체의 ca 0.5g을 함유하는 바이얼에, PBS(포스페이트 완충된 염수)(66.6 μ g/ml) 중의 독소루비신 1ml와 PBS 3ml를 첨가했다. 미세구체를 CCD 카메라 하에 두고, 영상을 2.5시간동안 매 2분 간격으로 찍었다. 이 기간동안 일어나는 시료의 교반은 없었으나, 광원으로 부터 국소화된 열 가열에 기인하여, 작은 움직임이 관찰되었다. 따라서 초기 및 최종 미세구체는 동일하고, 기간동안 비교될 수 있다. 약물의 흡수는 미세구체 중의 붉은색의 증가 및 주변 용액의 고갈에 의해 관측되었다(도 6).

[0137] 실시예 8: 건조된 약물-로딩된 미세구체의 제조

[0138] 미세구체는 실시예 2에 개요된 방법에 의해 독소루비신이 로딩될 수 있다. 미세구체는 다음의 과정을 사용하여 탈수된다: 탈수될 미세구체는 플라스틱 용기에 두고 PBS(Inverclyde Biologicals)중에 만들어진 10% 아세톤(ROMIC) 용액으로 덮었다. 미세구체는 몇 회 30초 동안 교반하면서 10분간 그 용액에 두었다. 그리고 나서 용액을 버리고, 이 과정을 2회 반복했다. 이 과정은 25%, 50%, 75% 및 최종 100%의 증가하는 아세톤 농도로 반복했다. 최종 100% 탈수 단계 후, 아세톤은 버리고, 비드를 50℃로 설정된 오븐에 두고, 일정한 매스로 건조시켰다.

[0139] 결과의 건조된 생성물을 색전술 과정 전에 염수/조영제 배지 중에서 재현탁/재수화될수 있다. 수화는 완전히 수화된 크기의 >80%로 단지 수초 내에 신속히 팽창하게 한다.

[0140] 실시예 9: 미세구체 슬러리의 제조

[0141] 상기 실시예 1에 따라 제조된 높은 AMPS 미세구체를 30분간 물 중의 20mg/ml 독소루비신 용액에서 팽창시킨다. 여분의 미립자 액체는 이 기간 동안 실질적으로 탈색되고, 색(붉은색)은 실질적으로 미세구체 내에 위치된 것으로 보여졌다. 현탁액을 소결유리 깔대기로 여과하여 상등액을 제거하였다. 여과를 하는 동안, 약간의 음압하에, 미세구체의 부피의 2배인 물로 세척했다. 그리고 나서 미세구체를 병에 옮기고, 병에서 유리 주사기로 연동식 정량 펌프(peristaltic pump)를 사용하여 펌프했다. 펌프의 제거 후에, 주사기를 주사기 락으로 밀봉하고 감마-방사선 조사로 살균했다.

[0142] 실시예 10: 로딩 - 목표/실제 로딩량

[0143] 일련의 독소루비신 용액을 물중에 22-80mg/ml로부터 제조했다. 이 용액들의 1ml를 높은 AMPS 미세구체 1ml에 첨가하고, UV로 흡수를 모니터했다. 시료들을 롤러믹서로 교반했다. 시점은 10, 20, 30, 60분, 및 그리고 나서 2시간, 24시간으로 했다. 흡수는 용액 내 남아있는 독소루비신으로부터 계산했다. 미세구체는 수화된 미세구체 ml당 80mg까지 다른 양으로 로딩될 수 있었고, 30분 미만 내에, 약물 용액의 99%가 미세구체에 위치된다.

[0144] 실시예 11: 높은 양의 독소루비신

- [0145] 실시예 10에서, 독소루비신 용액 80mg/ml을 제조했다. 이것은 진한 젤라틴 혼합물로, 매일 사용하는 것에는 적합하지 않을 수 있다. 높은 양을 반복하였으나, 20mg/ml 독소루비신 용액 4ml를 사용했다. 흡수는 UV로 모니터링했고, 수화된 높은 AMPS의 미세구체 1ml로의 약물 80mg의 최종 로딩이 다시 이루어 졌다.
- [0146] **실시예 12: 로딩-약물 원(sources)**
- [0147] 독소루비신의 3가지 원을 25mg/ml의 로딩으로 본 발명의 미세구체를 제조하기 위해 사용했다.
- [0148] ?아드리아마이신TM PFS는 농도 2mg/ml의 상업적으로(Pharmacia and Upjohn)
- [0149] 입수가 가능한 용액이다.
- [0150] ?아드리아마이신TM PFS는 디스솔루션(dissolution) 용이성을 위해 락토스가
- [0151] 첨가된 상업적으로(Pharmacia and Upjohn) 입수가 가능한 분말 제형물이다.
- [0152] ?독소루비신 EP.
- [0153] 아드리아마이신 RDF와 독소루비신 EP 용액 2ml에 미세구체 2ml를 첨가했고, 흡수를 UV로 모니터링 했다. 2mg/ml 용액의 아드리아마이신 PFS 용액 50ml에 미세구체 2ml를 첨가했고, 흡수를 모니터링했다. 30분 후에, 두 25mg/ml 용액이 완전히 로딩되었고, 2mg/ml의 용액은 24시간 뒤에 완전한 흡수를 보였다(도8).
- [0154] **실시예 13: 그외 안트라시클린의 로딩**
- [0155] 8ml의 유리 용기로의 수화된 높은 AMPS 미세구체(900-1200 μ m) 1ml의 4개 시료를 제조했다. 10ml-유리 실린더로 측정된, PBS 중의 미세구체 1ml를, 유리 용기로 옮겼다. 이에 이어서, 각 시료에서 모든 PBS를 파스퇴르 유리 피펫으로 제거했다. 로딩 용액은 다음과 같이 제조했다: 20mg의 독소루비신(Beacon Pharmaceuticals)의 바이얼 1개를 1ml의 물(ROMIL)로 최종 농도 20mg/ml가 되도록 재구성했다. 에피루비신 신속 디스솔루션(Pharmacia) 50mg의 1 바이얼을 2.5ml 물로 최종농도 20mg/ml가 되도록 재구성했다. 20mg/ml 독소루비신(Dabur Oncology) 용액을 이전 실시예들과 비교하기 위해 제조했다. 제조되면, 용액들의 흡광도를 483nm에서 UV로 읽고, 희석이 각각의 약물 용액의 표준 곡선을 만들기 위해 제조되었다.
- [0156] 각각의 로딩 용액 1ml와 물 1ml(대조용)을 위와 같이 제조된 미세구체 1ml 함유 바이얼 각각에 첨가했고 시간 재기를 시작했다. 바이얼들은 전 실험동안 롤러믹서상에 두었다. 예정된 시점(0, 10, 20, 30, 45, 65분)에서, 50 μ l를 제거하고, 필요에 따라 희석하고 483nm에서 흡광도를 읽었다. 이러한 관독치들로부터, 각 시점에서 용액의 농도를 각 경우의 대응 표준 곡선으로부터 계산했다. 미소구체로 로딩된 약물의 양을, 장치에 대해 추출될 때, 용액내의 약물의 고갈로 측정했다. 데이터로부터 수화된 미세구체 1ml당 로딩된 mg약물을 계산했고, 그래프로 도시했다(도 9). 이것은 검사된 안트라시클린이 같은 방법으로 로딩했음을 보여준다.
- [0157] **실시예 14: 그외 안트라시클린의 용출**
- [0158] 실시예 13에 기술된 바와 같이 로딩된 미세구체를 약물 방출 프로파일을 결정하기 위해 사용했다. 각각의 로딩된 미세구체 타입 1ml를 PBS 100ml로 채워진 갈색 유리 용기로 옮기고 시간재기를 시작했다. 용기들은 전 실험 동안 37 $^{\circ}$ C의 워터배스에 두었다. 예정된 시점에서 (0, 0.16, 0.5, 1.2 및 72시간), 용액 1ml를 제거하고, 관독한 뒤, 다시 용기에 넣어서, 부피가 일정하게 유지되게 했다. 483nm에서 시료를 관독했고 농도를 실시예 12에서 결정된 개별적인 안트라시클린 표준곡선의 방정식으로부터 계산했다. 데이터로부터, 미세구체 1ml당 용출된 약물의 mg을 계산했고, 그래프로 도시했다(도 10과 도 11). 이것은 실험의 안트라시클린이 동일한 총 프로파일로 미세구체로부터 용출됨을 보여주었다.
- [0159] **실시예 15: 미세구체 크기에 대한 안트라시클린의 효과**
- [0160] 실시예 13에 기술된 미세구체를 사용했고 크기분포를 현미경과 CCD카메라를 사용해서 찍은 미세구체의 영상을 이용해 결정했고, 그리고 나서 직경을 Image Pro Plus 4.05 로 풀었다. 다른 안트라시클린들로 로딩된 미세구체를 작은 세포 배양 플라스크로 옮겼고 50-1500 미소구체가 영상당 찍혔다. Image Pro Plus 4.05는 크기범위에 의존하는 100~1500 미세구체의 직경을 풀었다. 직경을 표로 만들고, 크기 범위 대 빈도수의 히스토그램으로 전환하였고, 엑셀을 사용하여 표준화하고 그래프로 나타냈다(도 12). 이것은 안트라시클린이 미세구체 크기에 대한 동일한 효과를 가짐을 보여주었다.
- [0161] **실시예 16: 그외 상업적인 미세구체의 약물 로딩**

- [0162] 본 발명의 미세구체로의 다른 상업적으로 입수가 가능한 색전 미세구체(Embolsphere)(콜라겐으로 코팅된 트리아실 미세구체)로의 독소루비신 로딩의 비교가 이전 실시예에서 개요된 순서에 따라 행해졌다. 도 15로부터, 본 발명의 미세구체는 약물을 격리시키는(sequester) 능력이 있음이 입증되었으나, 표준의 상업제품은 그렇지 않았다.
- [0163] **실시예 17: 로딩 - 물리적 효과**
- [0164] 높은 AMPS 미세구체에 대한 독소루비신 로딩과 용출의 효과를 약물의 로딩 및 용출 후의 크기와 압축에 대한 측정 및 독소루비신 로딩된 미세구체의 전달성에 의해 평가했다. 약물은 효율적으로 수화된 구체로부터 물을 취함에 따라, 약물의 로딩은 전체 크기 범위에서 작은 감소를 가져왔다(도 14); 이것은 압축성에서의 작은 감소가 동반된다. 용출시에, 크기는 영구적으로 영향을 받은 것이 아니었고 또한 압축성(인스트론 장력 검사기를 Young의 Modulus 측정에 의해 결정된)도 아닌 것으로 보여졌다. 표준 카테터를 통한 구체의 운반능력은 약물 로딩 과정에 의해 바뀌지않고 유지되었다.
- [0165] **실시예 18: 용출 - 비드 크기의 효과**
- [0166] 본 발명의 각 크기의 미세구체에 70mg/ml의 독소루비신 용액으로 로딩했다. 그리고나서 미세구체를 PBS 500ml에 두었고, 방출을 UV로 측정했다. 생체의 용출 프로파일은 로딩된 독소루비신의 40%까지 처음 2시간 내에 과열로서 방출되고, 그리고 나서 적어도 12일에 걸쳐 잔여 약물이 용출한다. 모든 크기 범위는 동일한 특성 또는 $\pm 5\%$ 이내로 방출한다(도 15).
- [0167] **실시예 19: 용출 - 배지 효과**
- [0168] 25mg/ml 독소루비신으로 로딩된 본 발명의 미세구체를 다양한 배지에 두었고, 용출을 60분에 걸쳐 모니터 했다. 혈장 및 PBS는 최초 60분에 걸쳐 느리게 방출한다. 물로의 방출은 UV의 탐지한계 미만이었다. 이것은 약물의 방출이 음이온적으로 하전된 폴리머 매트릭스로부터 이온적으로 결합된 약물을 치환하는 이온의 존재에 의존적이다.
- [0169] **실시예 20: 독소루비신의 안정성**
- [0170] 약물의 안정성에 대한 로딩 및 방출 공정의 효과가 결정되었다. 다른 조건에서 저장된 독소루비신 용액의 안정성을 결정하였다. 본 발명의 미세구체로부터의 독소루비신의 로딩 및 방출 후에 USP 방법을 이용한 HPLC를 행하여 독소루비신이 공정에 의해 영향을 받는 지를 결정했다. 결과의 크로마토그램은 모두 유사한 보유시간을 갖는 단일의 피크를 보이고, 이것은 미세구체의 로딩 및 방출 중에 독소루비신에 아무런 유해효과가 없음을 보여준다.
- [0171] **실시예 21: 독소루비신 - 로딩된 미세구체 - 물질 적합성(compatability)**
- [0172] 본 발명의 미세구체에 25mg/ml 독소루비신을 로딩했다. 그리고 나서 조영 배지와 염수에 현탁하고 그리고 나서 운반 카테터(ProgreatTM, Temuro) 및 주사기(Merit)에 24시간 동안 방치시켰다. 다양한 시점에 독소루비신의 안정성과 구성성분들을 측정했다(독소루비신을 위한 UV/HPLC, 구성성분들을 위한 Visual 검사/SEM). 실온에서 24시간에 걸쳐 약물과 구성성분의 분해는 관찰되지 않았다.
- [0173] **실시예 22: 로딩 전 생성물 - 로딩된 용량**
- [0174] 본 발명의 미세구체의 크기 범위에 걸쳐 5, 10, 20, 45mg/ml의 용량으로 설정된 시료를 제조했다. 각 시료의 로딩은 UV 측정에 의해 결정됐다. 25개의 개별적 런(run)의 데이터를 아래의 표에 나타내었다:

[0175]

표 1: 로딩 용액의 UV 측정으로부터 얻은 실제 용량

목표용량 mg/ml	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	
평균 용량 mg/ml	44.79	45.25	46.60	46.56	45.66	46.56	45.74	46.57	44.025	
SD	0.42	0.45	0.02	0.06	0.06	0.02	0.02	0.02	0.0397	
%CV	0.93	1.00	0.05	0.12	0.14	0.04	0.04	0.04	0.0901	
미세구체 크기 μm	100-300	100-300	300-500	500-700	500-700	700-900	700-900	700-900	900-1200	
N° 측정량	30	28	9	15	23	24	13	15	5	
목표용량 mg/ml	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0				
평균용량 mg/ml	21.31	21.12	21.05	21.04	21.02	19.65				
SD	0.01	0.01	0.03	0.02	0.03	0.0099				
%CV	0.04	0.05	0.15	0.09	0.16	0.0504				
미세구체 크기 μm	100-300	100-300	300-500	500-700	700-900	900-1200				
N° 측정량	33	28	9	9	9	5				
목표용량 mg/ml	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
평균용량 mg/ml	4.99	5.14	4.98	4.98	5.13	9.98	9.98	9.96	9.93	9.93
SD	0.01	0.006	0.00	0.01	0.009	0.00	0.00	0.01	0.009	0.007
%CV	0.12	0.12	0.08	0.21	0.18	0.01	0.04	0.11	0.09	0.07
미세구체 크기 μm	100-300	300-500	500-700	700-900	900-1200	100-300	300-500	500-700	700-900	900-1200
N° 측정량	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

[0176]

[0177]

측정된 용량의 범위는 다음과 같다:

[0178]

45mg/ml: 44.31-45.77mg/ml (3.11%범위)

[0179]

20mg/ml: 21.11-21.32mg/ml(1.05%범위)

[0180]

10mg/ml: 9.93-9.98mg/ml(0.5%범위)

[0181]

5mg/ml: 4.98-5.14mg/ml (3.2%범위)

[0182]

이 데이터는 런(run) 간에 변화가 거의 없고, 정확한 약물 로딩이 달성될 수 있음을 입증한다.

[0183]

실시예 23: 로딩전 생성물 - 동결 건조 중량 손실

[0184]

본 발명의 독소루비신 로딩된 미세구체로 제조자 사이클을 사용하여 동결 건조 시켰다. 중량 손실%는 25개의 개별 런에 대해 모든 미세구체의 크기 범위(표 2, 로딩된 미세구체의 %로 표현되는)에 대해 5, 10, 20 및 45mg/ml의 용량에 대해 결정되었다. 일정한 중량 손실이 생겼고, 동결 건조전에 로딩된 미세구체들의 중량에서 변화는 동결 건조후 생성물 상에는 아무런 영향을 끼치 않는다는 것을 나타냈다. 도 17의 데이터는 물 손실로 인한 동결 건조시 일관되게 82%중량 감소보다 더 크다는 것을 보여준다.

표 2: 독소루비신이 로딩된 미세구체의 동결 건조시 중량 손실

용량 mg/ml	45	45	45	45	45	45	45	45	45	
미세구체 크기 μm	100-300	100-300	300-500	500-700	500-700	700-900	700-900	700-900	900-1200	
손실 평균 %	85.7	84.4	85.76	84.10	81.57	84.51	82.1	86.82	83.98	
SD	1.4	3.5	3.89	1.69	1.53	3.88	1.9	1.90	3.99	
%CV	1.7	4.2	4.53	2.01	1.87	4.59	2.3	2.18	4.75	
N° 측정량	30	28	9	15	23	24	13	15	5	
용량 mg/ml	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0				
미세구체 크기 μm	100-300	100-300	300-500	500-700	700-900	900-1200				
손실 평균 %	90.6	92.7	91.92	92.48	91.38	90.65				
SD	3.3	1.3	5.03	1.35	2.34	0.85				
%CV	3.6	1.4	5.48	1.46	2.56	0.94				
N° 측정량	33	28	9	9	9	5				
용량 mg/ml	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
미세구체 크기 μm	100-300	300-500	500-700	700-900	900-1200	100-300	300-500	500-700	700-900	900-1200
손실 평균%	94.8	94.26	93.2	93.1	94.90	93.7	93.30	90.3	94.5	93.04
SD	0.2	1.11	0.5	0.5	0.78	0.2	0.26	8.3	0.2	0.29
%CV	0.2	1.18	0.6	0.6	0.82	0.2	0.28	9.2	0.2	0.31
N° 측정량	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

실시예 24: 로딩전 생성물 - 잔여 수분 함량

전체 크기 범위에 걸쳐서 독소루비신 5, 10, 20, 및 45mg/ml로 로딩된 본 발명의 미세구체를 제조했고, 동결 건조했고 그리고 나서 멸균을 위해 감마-방사선을 조사했다. 시료의 잔여 수분함량을 일정한 중량이 얻어질 때까지, 70℃에서 미세구체의 가열을 포함하는 중량 정량 방법에 의해 결정했다. 모든 시료에서 5%보다 낮은 잔여 수분 함량을 측정했다.

표 3

약물용량 mg/ml	약물 용량 mg/ml				
	0	5	10	20	45
크기 범위	잔여 수분 %				
100-300 μm	2.65	2.10	2.46	3.70	3.52
300-500 μm	2.74	2.13	2.17	1.60	1.86
500-700 μm	2.68	2.34	2.58	0.90	4.50
700-900 μm	2.83	2.42	2.51	1.07	1.40
900-1200 μm	2.71	1.64	2.71	2.88	2.85

실시예 25: 로딩전 생성물 - 탈수의 이온 방출

전체 크기 범위에 걸쳐 5, 20, 및 45mg/ml의 독소루비신으로 로딩된 본 발명의 미세구체를 제조했고, 동결 건조했고, 감마-방사선으로 조사했다. 그리고 나서 시료는 물속에서 재-수화했고, PBS의 약물의 방출을 UV에 의해 100시간 정도 측정했다(도 8).

실시예 26: 재-수화된 독소루비신-로딩된 미세구체의 크기

20mg/ml의 독소루비신으로 로딩된 본 발명의 미세구체(300-500 μm)를 제조했고, 동결 건조 했고, 그리고 나서 일부 시료들은 감마-방사선을 조사했다. 시료들을 물속에서 재-수화했고, 보정된 이미지 분석 장치(Image Pro Plus, 도 19)를 사용해 크기를 잴다.

약물 없이 로딩된 시료를 마찬가지로 처리하고 크기를 잴다. 도 20에 나타나있는 데이터는 다양한 처리시 크기에 대해 일부 미세한 변화가 있었으나, 250-500 μm 의 용인범위를 넘는 생성물은 없었다.

실시예 27: 간암에 걸린 래빗 모델에서 카테터 통한 동맥 화학색전술에

뒤이은 독소루비신-로딩된 미세구체로부터의 독소루비신의

서방성 방출(Vx-2)

[0199] 본 실험의 목적은 카테터 통한 동맥 화학색전술(Transcatheter Arterial Chemembolisation)을 통하여 간암 래빗 모델에서 본 발명의 독소루비신이 로딩된 미세구체의 성능을 평가하기 위함이다. 실험은 발티모어의 존 홉킨스 병원에서 실행되었다.

[0200] **27.1 재료와 방법:**

[0201] 동물을 6 그룹으로 분류(1, 2, 3, 4, 5, 6 그룹)하고, 각 그룹에 5마리 씩(4 마리는 실험용, 1마리는 대조구)으로 했다. 모든 그룹의 대조구용 동물에게 독소루비신 동맥 주사를 주었고(처치된 동물과 같은 농도), 처치된 동물은 독소루비신을 함유하는 약물 용출 구체로 수정된 화학색전술 프로토콜에 따라 처치했다. 각 그룹의 동물을 다음과 같은 시점에 사살했다:

[0202] 1 그룹: 화학색전술 후 1시간

[0203] 2 그룹: 화학색전술 후 12시간

[0204] 3 그룹: 화학색전술 후 24시간

[0205] 4 그룹: 화학색전술 후 3일

[0206] 5 그룹: 화학색전술 후 7일

[0207] 6 그룹: 화학색전술 후 14일

[0208] **27.2 동물의 제조:**

[0209] VX2 종양 세포라인을 캐리어 래빗(뉴질랜드산 흰색)의 뒷다리로 주사했고 14일 동안 키웠다. 결과의 종양을 각각의 캐리어 래빗으로부터 수확하고 종양 브레이(brei)를 생존가능한 종양 조직의 해부, 무균 다지기(mincing), 스테인레스 강철 체를 통한 패시지(passage)에 의해 각각으로부터 제조했다. 래빗을 근육내 아세프로마지딘(1mg/kg)과 케타민 하이드로클로라이드(20mg/kg)의 혼합물로 미리 마취시켰다. 약 15분 후에, 정맥 확보는 가장자리 귀 정맥을 통해 수립했고, 동물에게 외과 수술시 마취를 유지하기 위해 소듐 펜토탈IV(40mg/kg)를 주입했다. 복부를 면도하고 벤지딘으로 준비 완료 후, 정중선 절개를 행했다. 래빗의 간을 중앙 개복술로 노출시킨 뒤, 브레이 분취량(0.2ml)을 적절한 주위 간 실질(parenchyma)을 갖는 고립 병변으로 발견시키기 위해, 노출된 간의 왼쪽 로브(lobe)로 21G angiocath를 사용해 직접 주입하였다. 하나의 종양 브레이를 2마리의 래빗 각각에 사용했다. 종양을 래빗간에서 14일간 자라게 해서 직경 2.5cm~3.5cm의 범위로 기대되는 이전 실험에 기초를 둔 크기로 되게 했다. 출혈은 전기소작법으로 제어했다. 그리고 나서 복부를 러닝(running)봉합으로 밀봉하고, 피부를 봉합으로 밀봉하고, 밴드를 붙였다. 적당한 무균기술이 과정 전체에 지켜졌다. 수술 후에, 동물을 우리에 가두고, 담요를 덮어 따뜻하게 유지하고, 마취에서 깨어날 때까지 호기 말(end tidal) CO₂를 모니터 했다. 동물이 아파하거나 물리적 고통을 겪으면, 3일간 SQ q 12시간으로 부프레노르핀 진통제 0.02-0.05mg/kg를 투여하였다.

[0210] **27.3 독소루비신 방출 미세구체의 제조:**

[0211] 100-300 마이크론의 크기 범위의 그리고 독소루비신 45mg/kg로 로딩된 본 발명의 미세구체를 실시예 22에서와 같이 제조했고, 실시예 23에서와 같이 동결 건조 시키고, 감마-방사선으로 살균했다. 사용하기 직전에, 미세구체 1ml를 살균수에서 수화시키고, 2ml의 옴니페이크(omnipaque)와 염수 1ml를 첨가했다. 주사되기 적어도 10분전에 용액을 제조하였고, 전체 용액의 1ml를 각각의 래빗에 동맥내 주사했다(아래기술된 대로).

[0212] **27.4 화학색전술의 과정:**

[0213] 래빗 간에 예비 종양을 이식하고 2주 후, "화학색전술"을 하기 위해 동물으로 데려왔다. 예비 마취의 투여, IV확보 및 소듐펜토탈 마취를 상기에서 기재된 바와 같이 수행했다. 카테터를 경간 동맥으로 조작한 후 IV확보는 경대동맥으로 획득했다. 2F JB1카테터가 가능한한 종양에 밀접하도록 진행된 후, 조영제의 주사는 종양의 위치를 증명했다. 만약 필요하다면, 트랜스센드(Transsend)가이드 와이어가 표적 정맥으로의 카테터를 가이드하기 위해 사용되었다. 일단 카테터가 적절히 위치되면, 독소루비신-용출 구체를 위에 기술된 대로 종양으로 주입하였다. 대조구에 색전없이 독소루비신의 동등 농도를 주사했다. "화학색전술"이 끝난 후에, 카테터를 제거하고, 지혈하기 위해서 재흡수성 봉합물질을 사용해 동맥을 연결했다. 적당한 무균 기술이 전체 절차와 절차 후에도 보증되었다. 종양이식의 절개를 제한하고, 고통을 최소화 하기 위한 부프레노르핀의 피하주사, 동물의 상태와 고통, 및 불편한 수준의 평가를 위해 요구될때마다 콜(call)을 주는 것을 포함하여 고통과 불편을 최소화하기 위한 모든 노력이 행해졌다. 그리고 나서 동물들을 우리에 돌려보냈다. 모든 동물들은 위

에 기술한 시점에 따라 사살했다.

[0214] 수의학적 범규정에 따라 동물들을 사살했다. 처치 후 시험에 따라 각 동물 그룹의 동물들은 티오펜탈IV 100mg/kg의 IV주사에 의해 깊은 마취하에 사살되었다.

[0215] 27.5 병리학적 및 조직학적인 평가:

[0216] 래빗의 간을 해부해내고, 주의깊게 제거하고 5% 포름알데히드를 함유한 용기에 두었다. 간은 육안(gross)검사를 위해 5mm간격으로 잘랐다. 각 섹션을 4μ로 자르고, H&E 염료로 처리하여 파라핀으로 완전히 뒤덮었다. 종양의 생존 능력은 육안적인 검사에 의해서 평가되고, 각 절편(slice)당 보이는 종양 면적의 %로 나타냈다. 종양 내에 독소루비신 농도와 종양이 없는 간조직의 농도를 HPLC를 이용해 결정했다.

[0217] 27.6 독소루비신 분석을 위한 채혈:

[0218] 전체 혈액의 3ml를 약물 용출 비드의 주입시부터 20', 40', 60', 120' 및 180'에 각각 귀에 삽입된 동맥 카테터를 통해 모집했다. 헤파린이 첨가된 진공시험관(vacutainer)으로 옮겨서 실온에서 10분간 2000g 원심분리했다. 혈장을 분리해내고, 라벨된 폴리프로필렌 캡을 가진 튜브로 옮겼다. 메탄올/얼음 중에서 잠시 냉각시켰다. 그리고 분석물의 분석시까지 -20℃에서 저장했다.

[0219] 27.7 종양 및 종양이 없는 간조직에서 독소루비신 농도 결정을 위한 조직

[0220] 처리:

[0221] 종양 및 종양이 없는 간 조직(대략 100mg)을 잘라내고, 덮고 있는 피부와 파편의 잔여물을 제거했다. 조직의 중량을 정확히 측정하고 미리 중량된 튜브를 사용해 기록하고 즉시 드라이아이스에 위치시키고, 분석하기까지 -80℃에서 저장했다.

[0222] 27.8 결과:

[0223] 약물 분포 요약:

- [0224] 1. 종양 내에 독소루비신의 가장 높은 농도는 처치 7일 후에 얻어지고
[0225] 3-일 그룹이 뒤따랐다(도 20).
- [0226] 2. 종양 내에 독소루비신의 농도는 심지에 14-일 그룹에서도 높았는데, 이것
[0227] 은 비드로부터 독소루비신의 연속적인 용출을 제시하는 것이다.
- [0228] 3. 모든 시점에서 혈장 내의 독소루비신 및 파괴 생성물(독소루비시놀)이
[0229] 최소 농도였다. 이것은 투여 20분 후에 현저했고, 혈장 내의 독소루비신
[0230] 농도는 20~180분 사이에 선형으로 감소했다. 독소루비신의 농도는 비드
[0231] 없이 동맥내에 주사했을 때보다 10~17배 더 높았다(도 21).

[0232] 조직학적 관측:

- [0233] 1. 종양의 괴사는 7-14일에 가장 많았다(도 22).
- [0234] 2. 1-12시간 그룹은 대조구로 고려될 수 있는데, 왜냐하면 화학요법제로
[0235] 세포를 죽이기 시작하기에는 너무 이르기 때문이라는 것을 주시하라.
- [0236] 3. 최종적으로 3- 및 7일 그룹에서 각각 암세포의 50- 및 37%가 거의 죽지
[0237] 않았고, 완전히 보이지도 않았다. 이 세포들은 아마도 "손상"되거나
[0238] 세포 자멸사 되었을 것이다.
- [0239] 4. 비드의 분포에 관하여, 예측대로, 대조구 동물들에서는 찾아볼 수
[0240] 없었다. 실험 동물에서, 비드들은 100-300마이크론 크기의 소동맥
[0241] (arterides) 내에 남아있음이 모두 확인되었다. 혈관을 벗어난 비드는
[0242] 없었다.

- [0243] 5. 14일 그룹에서는, 종양이 이식된 왼쪽에 있는 간조직의 대부분이 괴사되
 [0244] 었다. 죽은 암세포와 정상 세포간의 구별은 수립되기가 매우 어려웠다.
 [0245] 이런 이유로 우리는 약물-용출 비드의 효능이 최대 14일이 지난 후에
 [0246] 최대라고 추정할 수 있다. 이 결과들은 일정했다.
- [0247] 6. 조직학적 분석은 또한 암세포를 죽이는데에, 약물-용출 비드의 효능을
 [0248] 입증했다. 이전의 많은 실험들로부터 동맥내 독소루비신 또는 카보플라틴
 [0249] (같은 농도)을 주사하는 것은 종양의 30%괴사만을 일으키는데, 치료되지
 [0250] 않는(대조구) 동물의 것과 거의 동일하다. 대조적으로, 약물-용출 비드로
 [0251] 래빗을 처치하는 것은 50-100%의 괴사를 일으켰고, 괴사는 14일에 가장
 [0252] 완전하다. 이것은 단독 동맥내 주사보다 명백히 더 크다는 것을 시사한다
 [0253] (도 22).

[0254] **실시예 28: 임상적 시험**

[0255] 실시예 9에 따라 만들어진 미세구체 슬러리를, 절제될 수 없는 간세포 암종(HCC)을 갖는 환자의 치료에서의 안정성, 약동학 및 효능의 확보를 위해 임상적 시험에 사용했다. 이 시험에 적합한 환자는 18-75세의 절제, 간 이식, 경피적 치료 와 같은 근본적 치료에 적합하지 않는 HCC를 갖고 있고, 잘 보전된 간 기능(Child-Pugh A급)을 갖고, 어떠한 간의 대상부전(decompensation)도 없는 환자이다. 다음과 같은 경우는 제외된다:

- [0256] a) 이전에 HCC를 위해 항암치료를 받은 환자;
 [0257] b) 또다른 1차(primary)종양을 갖는 환자;
 [0258] c) 발전된 간질환을 갖는 환자: Child-Pugh B-C 클래스 또는 활성 위장
 [0259] 출혈, 뇌질환 또는 복수, 비릴루빈 농도 $>3\text{mg/dL}$ 인 환자;
 [0260] d) 종양성 질환을 갖는 환자: BCLC 클래스 C(혈관 침투-포함 분절 문맥 폐색
 [0261] -, 간외성 확산 또는 암-관련된 증상=1-4의 PST) 또는 D 클래스 (WHO활동
 [0262] 도 3 또는 4, Okuda III단계);
 [0263] e) 간 색전술을 시술할 수 없는 환자: 문맥 간정맥 단락, 이간성 혈류, 부전
 [0264] 응고검사(혈소판수 $<50.000/\text{mm}^3$, 또는 프로트롬빈 활성도 $<50\%$), 신부전증
 [0265] 심한 죽종증(artheromatosis); 및
 [0266] f) 독소루비신 투여를 할 수 없는 환자:(혈청 비릴루빈 농도 $\geq 5\text{mg/dL}$,
 [0267] 백혈구 수 $\leq 3000\text{세포}/\text{mm}^3$, 심장박출계수 $<50\%$).

[0268] 화학적 색전술은 0시와 2개월째에 수행될 것이다. 치료는 배재기준의 발생 또는 환자의 결정에 따라 중지될 것이다. 색전술은 흐름정체를 획득할 때까지, 투여 직전에 조영제와 혼합된 독소루비신-로딩된 미세구체를 주사함으로써 수행할 것이다. PVA 미세구체의 직경은 외과의사에 의해 선택될 것이고, 대략 $500\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는다. 항생제 예방은 사용되지 않을 것이다.

[0269] 독소루비신-미세구체의 약동학적 프로파일을 분석하기 위해 단계적 상승 용량을 비릴루빈 수준 $<1.5\text{mg/dL}$ 에 대해, 치료당(환자 2인) $25\text{mg}/\text{m}^2$, $50\text{mg}/\text{m}^2$, $75\text{mg}/\text{m}^2$ (환자 2인)로 시작했다. 비릴루빈 수준이 $1.5-3\text{mg/dL}$ 인 환자에게는 치료당(환자 2인) $25\text{mg}/\text{m}^2$, $50\text{mg}/\text{m}^2$, $75\text{mg}/\text{m}^2$ (환자 2인), $100\text{mg}/\text{m}^2$ (환자 2인)로 시작한 용량 수준에서 용량-제한 독성이 보여지지 않으면, 1회 치료에서 독소루비신의 총량을 최대 150mg 으로 해서 용량을 다음 그룹에서 상승시킨다.

[0270] 약동학적 평가: 독소루비신 수준을 위한 시료를 절차 후에 병원에서 머무르는 중에 또는 외래환자 진료소에서

말초혈액으로부터 1시간, 6시간, 24시간, 48시간, 7일에서 채취한다.

[0271] 안전성: 치료와 관련된 합병증을 기록하고 6개월 실험기간을 통해 분석된다. 0개월과 2개월에 병원에서 머무르는 동안(4일간) 부작용을 기록했다. 환자는 임상검사와 실험적 파라미터에 의해 7일째 날, 14일째 날, 1, 3, 및 6개월에 외래환자 진료소로 방문했다. 치료의 시작으로부터 모든 방문시에 부작용을 도출해낸다. 이것은 골수 억제와 그외 독소루비신-관련된 독성들, 간부전, 신부전, 감염-췌관염, 간농양, 자연발생적인 박테리아 복막염, 균혈증(bacteremia), 허혈감염 또는 담즙성 협착, 위장 출혈 등의 기록을 포함한다.

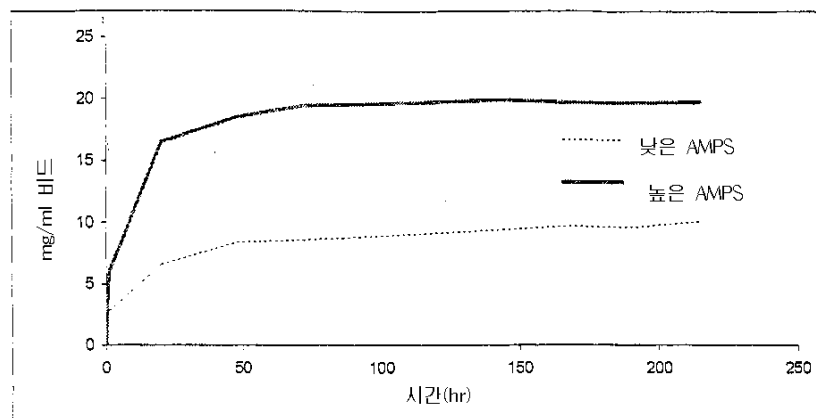
[0272] 효능: 목표 반응은 조영-증진된 나선형의 컴퓨터 X선 단층 촬영으로 3개월 및 6개월에 측정한다. 그것의 등급은 ESAL Consensus 기준에 따라 정해진다: 완전한 반응: 신생세포 질환의 증거가 없다; 부분적 반응: > 50%의 전체 종양의 부하가 감소되었다; 변화없음: < 50% 감소 또는 < 25% 증가; 진행성 질환: > 25% 증가. 따라서 목표 반응은 완결 반응과 부분적 반응에 대해 계수한다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 실시예 2의 결과를 도시하고;
- [0054] 도 2는 실시예 3의 결과를 도시하고;
- [0055] 도 3은 실시예 4의 결과를 도시하고;
- [0056] 도 4는 실시예 5의 결과를 도시하고;
- [0057] 도 5는 실시예 6의 결과를 도시하고;
- [0058] 도 6a 및 6b는 실시예 7의 결과를 도시한다.

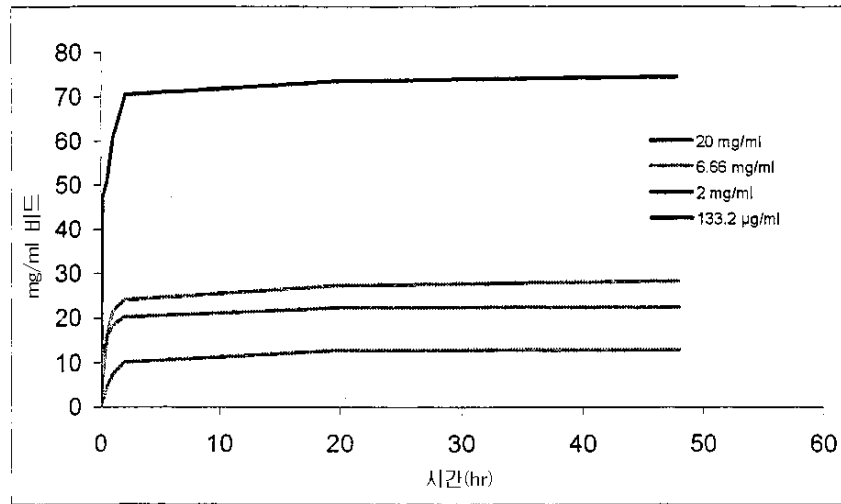
도면

도면1



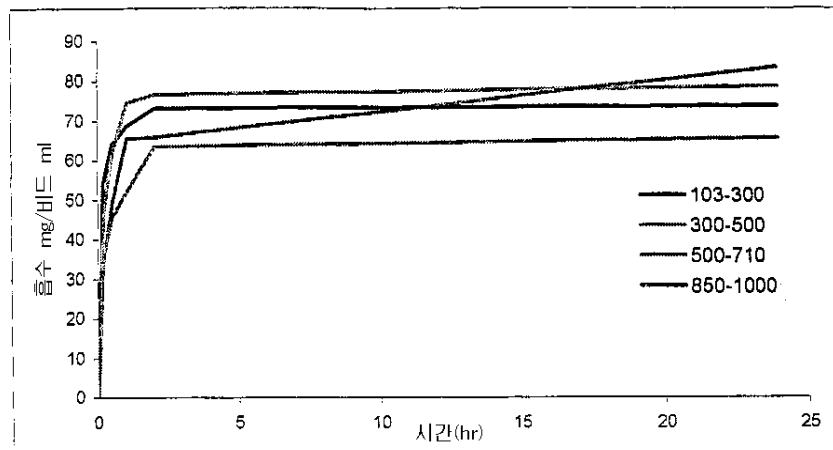
도 1: 독소루비신을 갖는 비드 블록의 낮은 AMPS와 높은 AMPS 제형물의 로딩

도면2



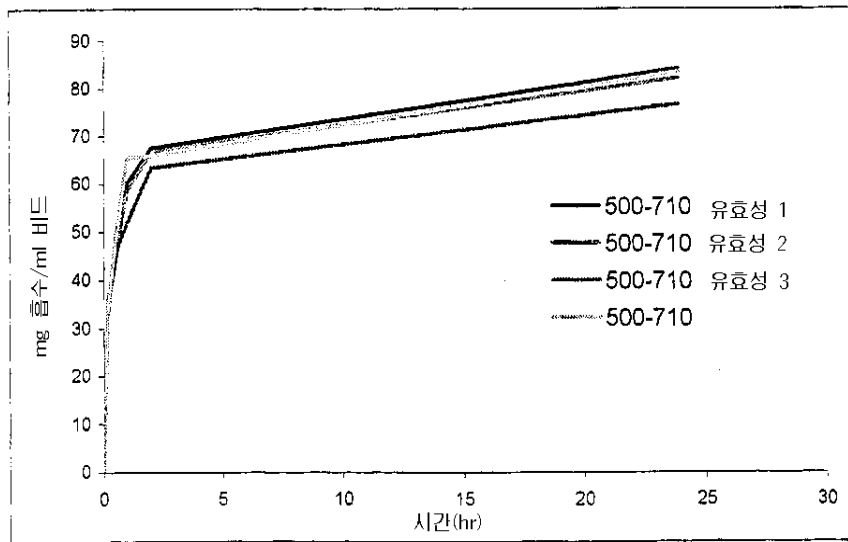
도 2: 높은 AMPS 비드 블록을 위한 로딩 프로파일에 대한 독소루비신의 농도의 효과

도면3



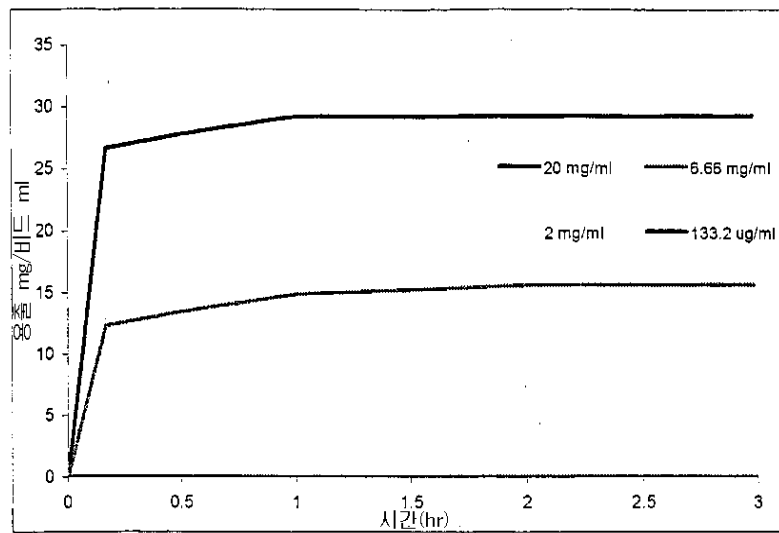
도 3: 독소루비신 로딩 프로파일에 대한 미세구체 크기 범위의 효과

도면4



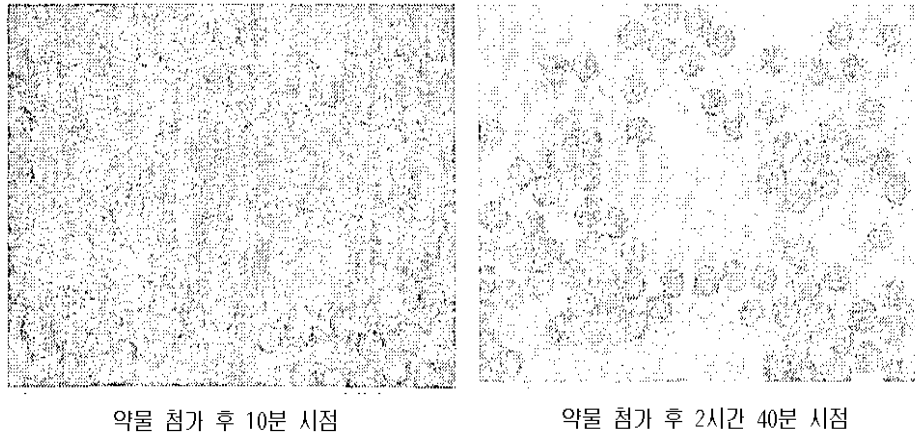
도 4: 높은 AMPS 비드 블록으로 독소루비신 로딩의 재생산성

도면5



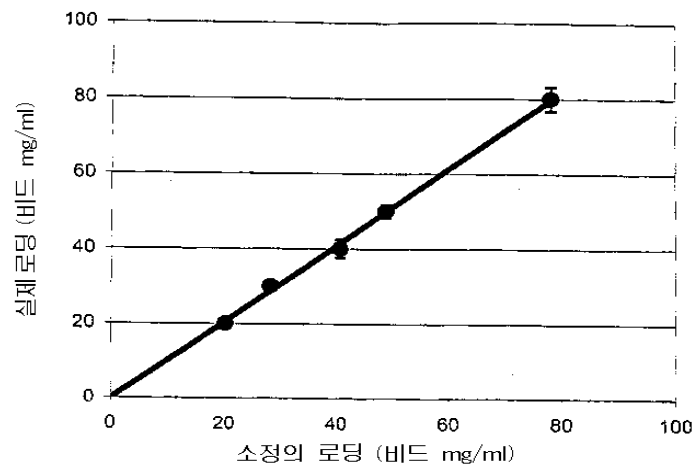
도 5: 높은 AMPS 비드 블록으로부터의 독소루비신 생체의 용출

도면6



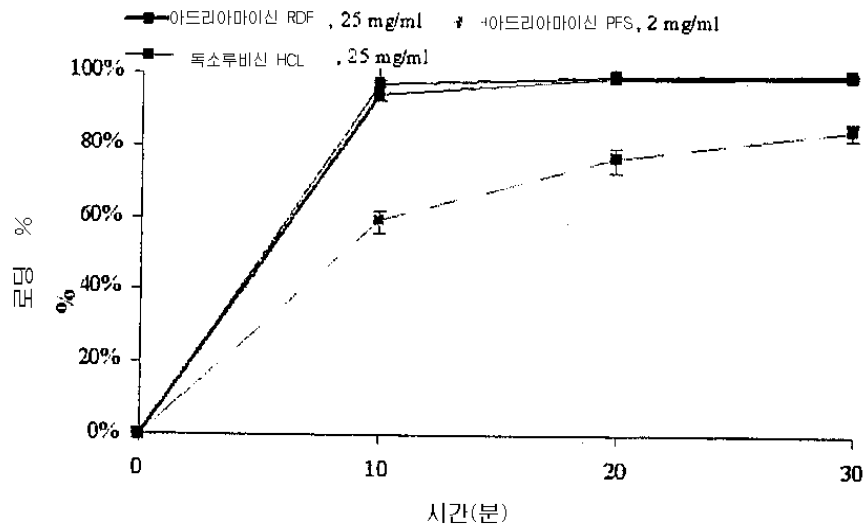
도 6: 높은 AMPS 비드 블록에 의한 독소루비신 격리화(sequestration)

도면7



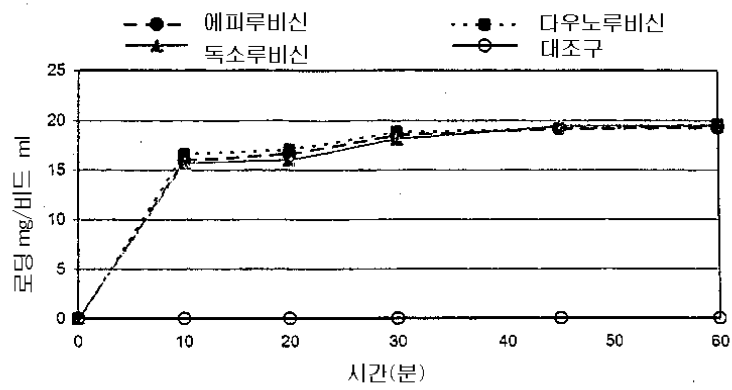
도 7: 목표 투여량 대 실제 투여량

도면8



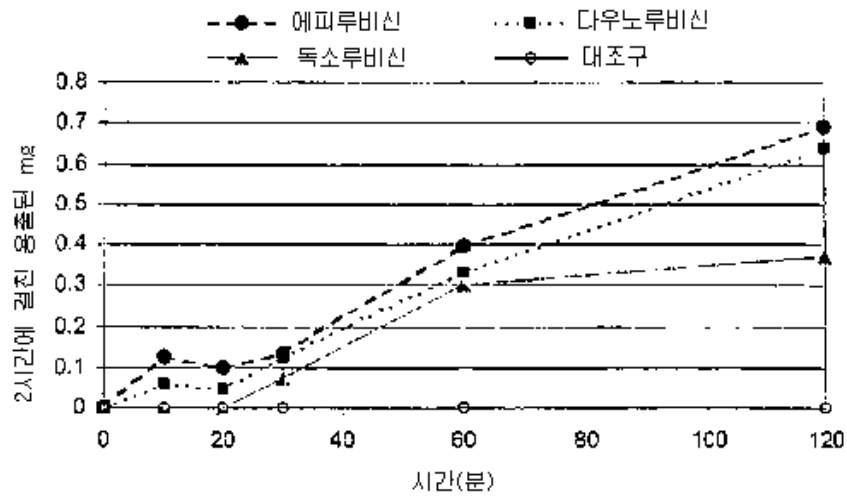
도 8: 다른 독소루비신 용액의 로딩 프로파일

도면9



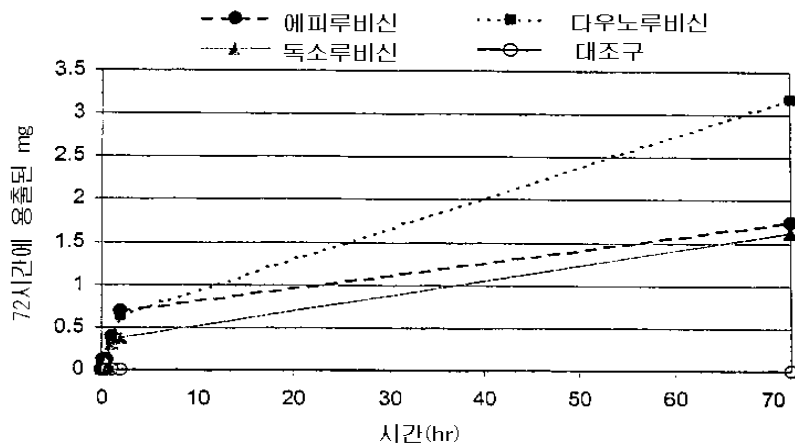
도 9: 미세구체로의 다양한 안트라시클린의 로딩

도면10



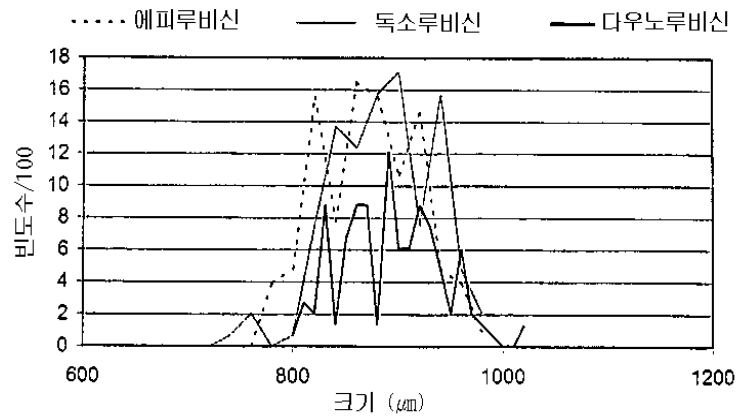
도 10: 2시간에 걸친 안트라시클린의 용출

도면11



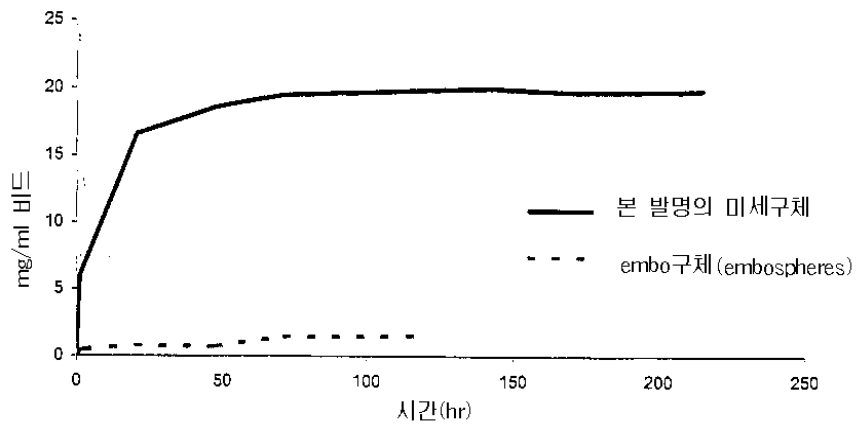
도 11: 72시간에 걸친 안트라시클린의 용리

도면12



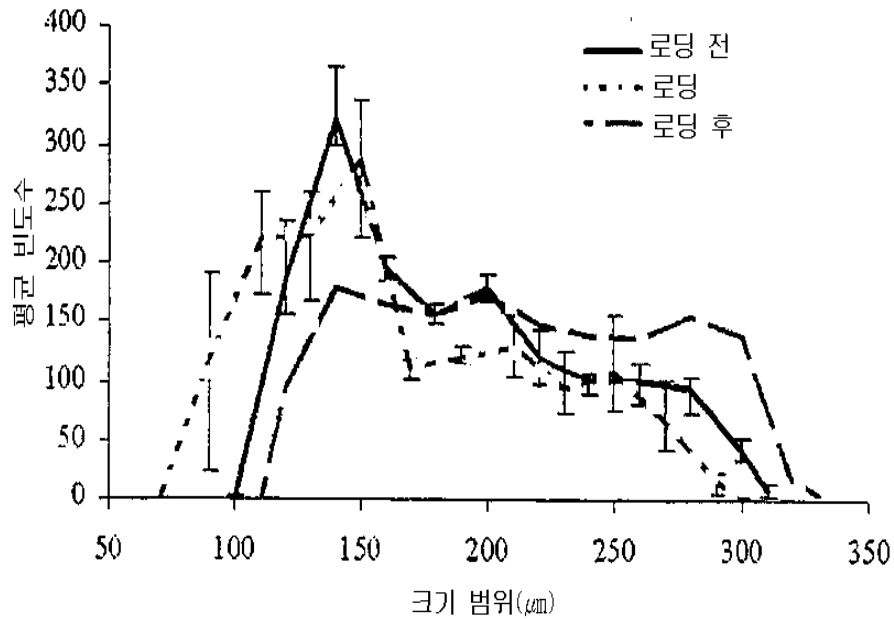
도 12: 미세구체 크기에 대한 안트라시클린의 효과

도면13



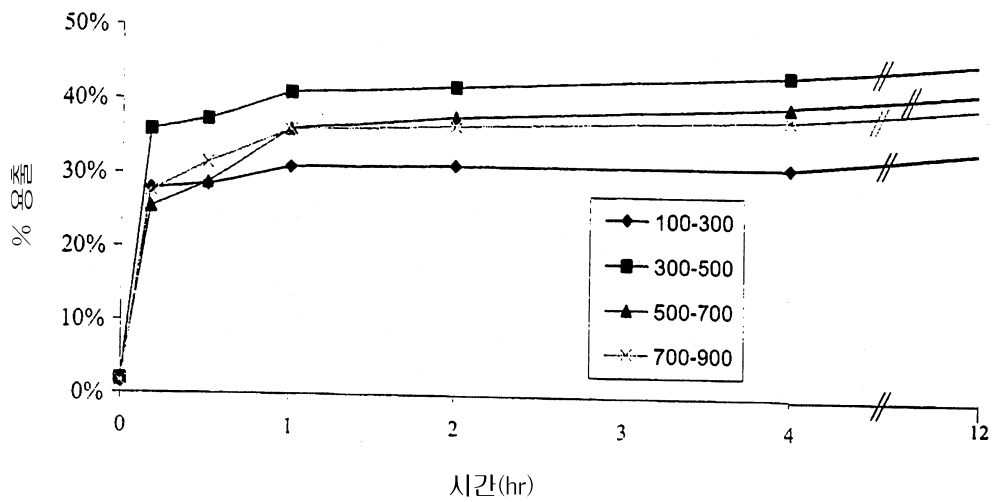
도 13: 다른 미세구체(900-1200μm)로의 독소루비신 로딩

도면14



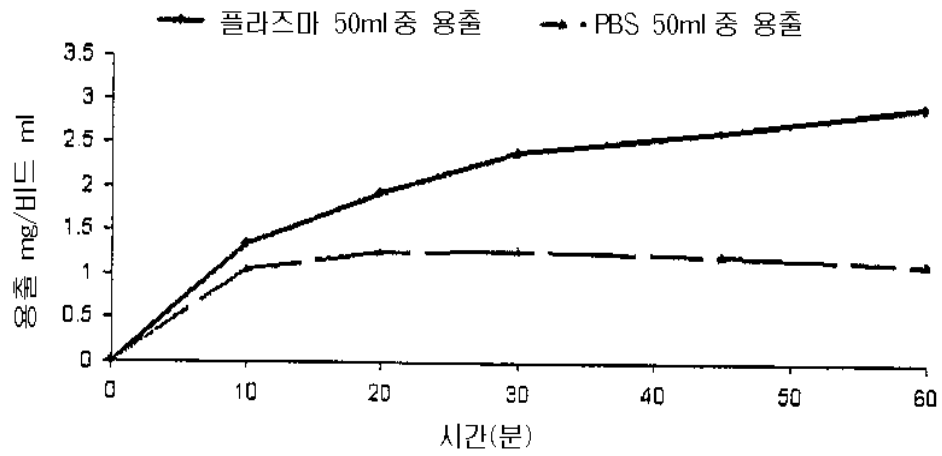
도 14: 크기 분포(100-300μm의 미세구체)에 따른 약물 로딩의 효과

도면15



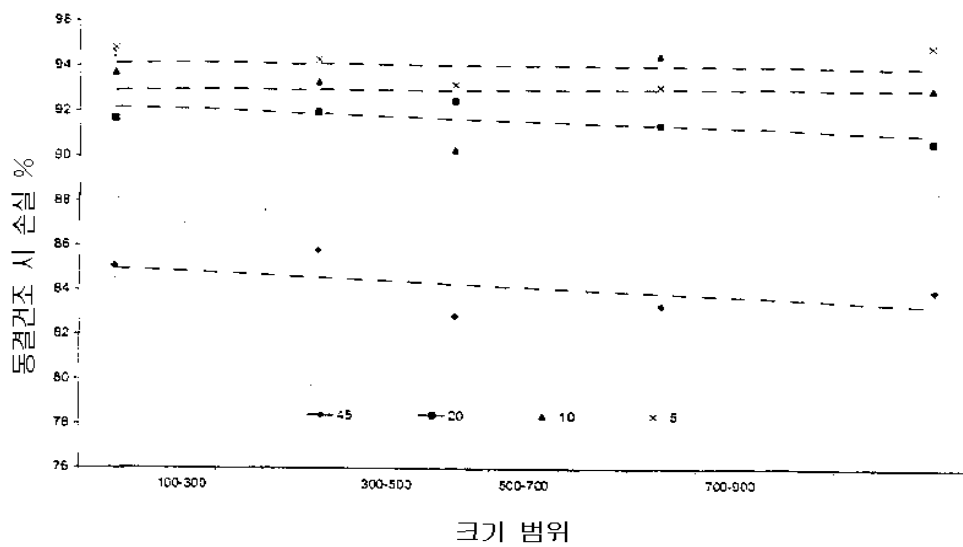
도 15: 독소루비신 용출프로파일에 대한 미소구체 크기의 효과

도면16



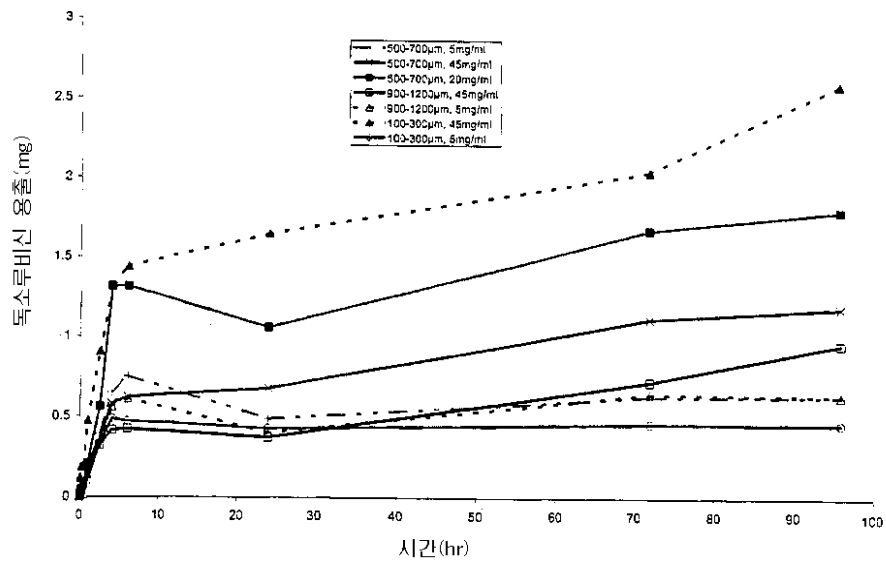
도 16: PBS와 플라스마 중의 미세구체의 독소루비신 용출

도면17



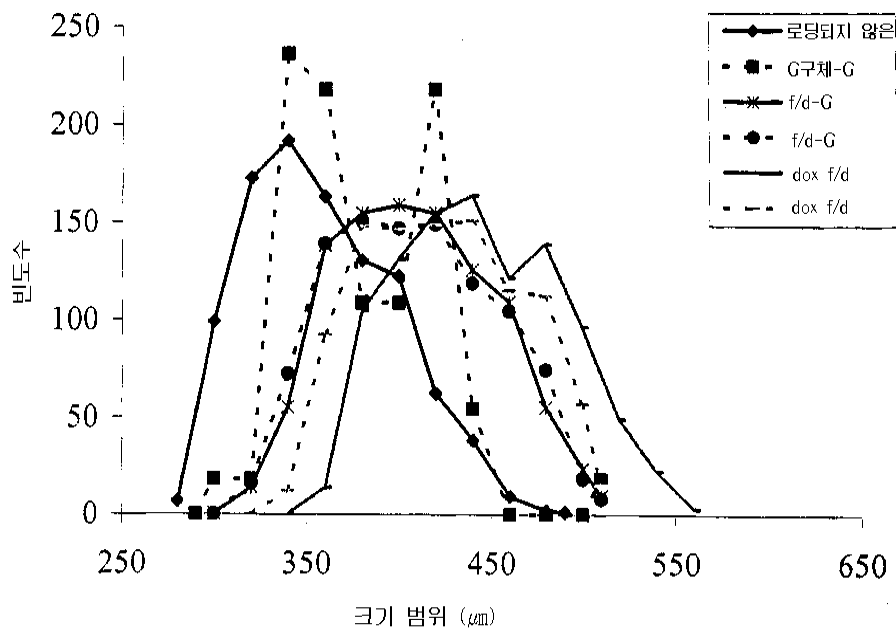
도 17: 미세구체 크기와 약물 투여량의 변화에 관한 중량 손실

도면18



도 18: 100시간에 걸친 독소루비신의 용출 프로파일

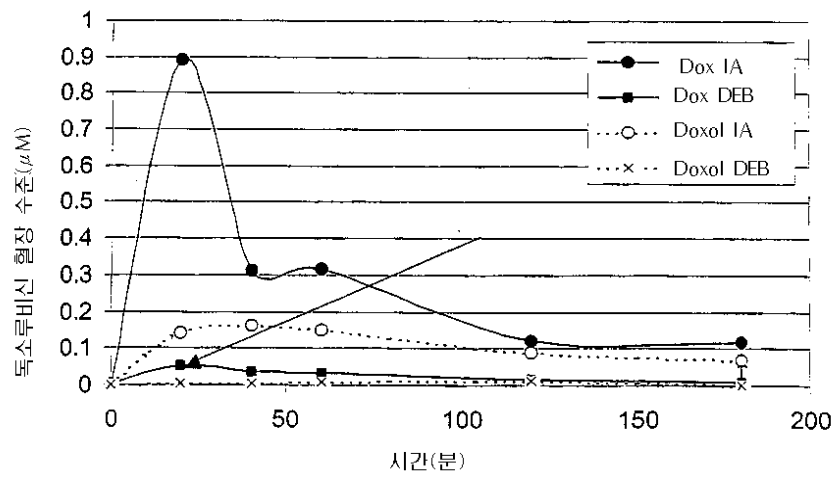
도면19



도 19: 미세구체 크기 범위에 대한 과정의 효과

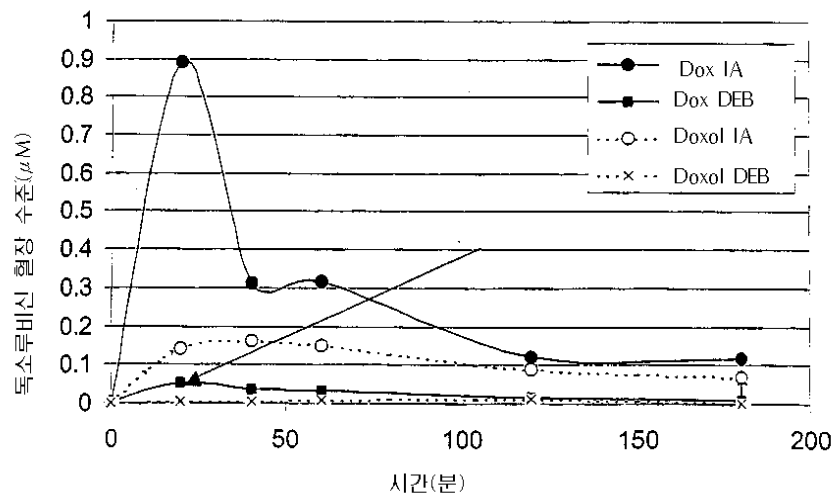
(f/d - 동결건조 G - 감마-방사선 조사 dox - 약물 로딩됨)

도면20



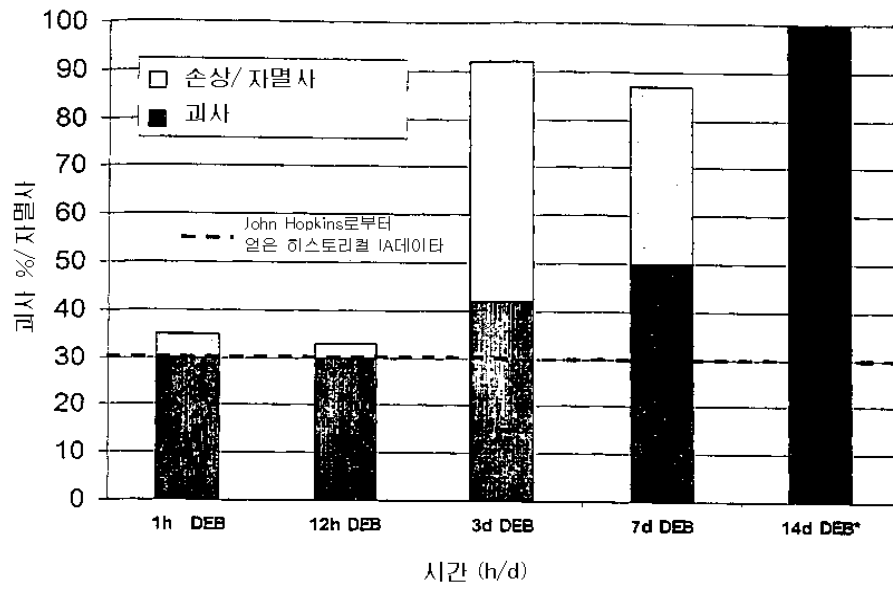
도 21: 독소루비신-로딩된 미세구체와 비교된 동맥내 독소루비신 주사로 부터 독소루비신 및 독소루비시놀의 혈장 수준의 약동학 프로파일

도면21



도 21: 독소루비신-로딩된 미세구체와 비교된 동맥내 독소루비신 주사로 부터 독소루비신 및 독소루비시놀의 혈장 수준의 약동학 프로파일

도면22



도 22: 독소루비신-용출 비드(DEB)로 색전 후에 시간에 따른 종양의 괴사