(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월21일
(11) 등록번호 10-1462819
(24) 등록일자 2014년11월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7004524(분할)
(22) 출원일자(국제) 2005년05월02일
심사청구일자 2013년03월13일
(85) 번역문제출일자 2013년02월22일
(65) 공개번호 10-2013-0032401
(43) 공개일자 2013년04월01일
(62) 원출원 특허 10-2012-7017425
원출원일자(국제) 2005년05월02일
심사청구일자 2012년07월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/015349
(87) 국제공개번호 WO 2005/107712
국제공개일자 2005년11월17일
(30) 우선권주장
60/567,921 2004년05월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US5785987 A
전체 청구항 수 : 총 38 항

(73) 특허권자
헤르메스 바이오사이언스, 인코포레이티드
미국 캘리포니아주 (우편번호: 94080) 사우스 샌 프란시스코 에어포트 불바드 61 스위트 비
(72) 발명자
홍 키룽
미국 캘리포니아주 94107 샌 프란시스코 드 하로 스트리트 1360
드러몬드 다릴 씨
미국 캘리포니아주 94041 퍼시피카 엣지우드 드라이브 247
키르포틴 드미트리 비
미국 캘리포니아주 94121 샌 프란시스코 아파트먼트 101 43번 애비뉴 435
(74) 대리인
김성기, 김진희

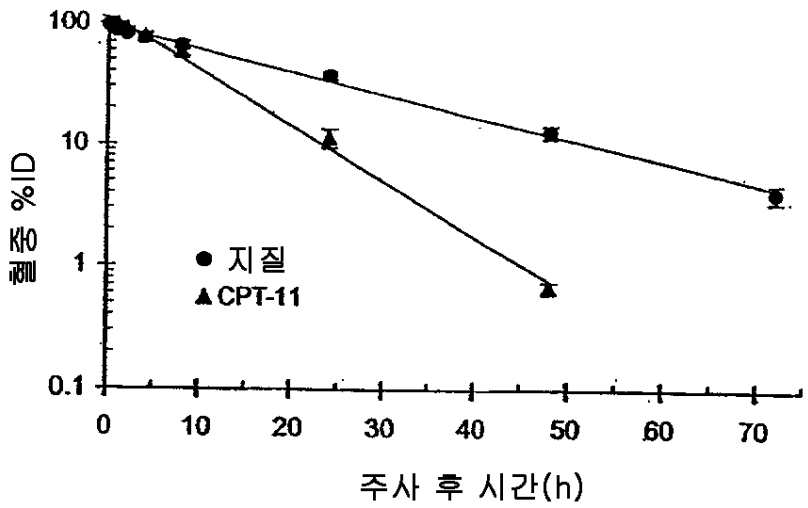
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 **약물 전달에 유용한 리포좀**

(57) 요 약

본 발명은 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온을 함유하고, 경우에 따라 목적하는 치료제 또는 영상화 물질을 함유하는 리포좀 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명에 의해 제공되는 리포좀 조성물의 제조 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

포유동물 세포 증식성 질환의 치료를 위한, 수성 매질 내에 리포좀을 포함하는 약학 조성물로서, 상기 리포좀은 하나 이상의 로딩된 리포좀을 포함하고, 상기 리포좀의 각각 로딩된 리포좀은 지질을 포함하는 막에 의해 매질로부터 격리된 내부 공간을 가지며, 상기 내부 공간은 미소세관 안정화제인 항신생물성 치료용 물질과 수크로스 옥타술페이트인 다중음이온화 당 또는 이노시톨 헥사포스페이트인 다중음이온화 폴리올인 음이온을 포함하고, 상기 물질 및 다중음이온화 폴리올 또는 다중음이온화 당은 상기 리포좀 내부에 포획된 산의 형태로 포함되거나, 또는 상기 리포좀 내부에 포획된 염의 형태로 포함된 것인 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 음이온은 수크로스 옥타술페이트인 것인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 음이온은 이노시톨 헥사포스페이트인 것인 약학 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 리포좀 내부의 상기 음이온의 농도는 0.05 g 당량/L 이상인 것인 약학 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 리포좀 내부의 상기 음이온의 농도는 1.0 g 당량/L 이상인 것인 약학 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제2항에 있어서, 미소세관 안정화제는 파클리탁셀 또는 도세탁셀의 아미노알킬 또는 아미노아실 유사체인 탁산인 약학 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 탁산의 양이 상기 지질 1 몰당 0.05 몰 이상인 것인 약학 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 탁산의 양이 상기 지질 1 몰당 0.1 몰 이상인 것인 약학 조성물.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 내부 공간은 마이셀 형성 계면활성제 화합물 및 시클로덱스트린 화합물로부터 선택된 가용화 조제(solubilizing aid)가 없는 것인 약학 조성물.

청구항 19

제2항에 있어서, 상기 지질이 친수성 중합체로 유도체화된 지질을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 친수성 중합체로 유도체화된 지질이 상기 지질의 총량의 20 몰% 이하를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 친수성 중합체로 유도체화된 지질이 상기 지질의 총량의 1 몰% 미만을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 리포좀의 포유동물에서의 혈액 순환 수명이, 상기 친수성 중합체로 유도체화된 지질이 부재하는 것을 제외하고는 동일하게 구성된 리포좀의 순환 수명보다 2배 미만 더 긴 것인 약학 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 포유동물이 래트인 것인 약학 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 친수성 중합체로 유도체화된 지질이 상기 지질의 총량의 0.1 몰% 내지 0.9 몰%를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 친수성 중합체가 폴리(에틸렌 글리콜)인 약학 조성물.

청구항 26

제19항에 있어서, 상기 친수성 중합체로 유도체화된 지질이 폴리(에틸렌 글리콜)로 유도체화된 인지질, 폴리(에틸렌 글리콜)로 유도체화된 디아실글리세롤, 폴리(에틸렌 글리콜)로 유도체화된 디알킬글리세롤, 폴리(에틸렌 글리콜)로 유도체화된 세라마이드, 폴리(에틸렌 글리콜)로 유도체화된 지방산, 폴리(에틸렌 글리콜)로 유도체화된 지방 알코올, 또는 폴리(에틸렌 글리콜)로 유도체화된 스테롤인 것인 약학 조성물.

청구항 27

제19항에 있어서, 상기 친수성 중합체가 3개 이상의 에틸렌 글리콜 단위를 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)인 것인 약

학 조성물.

청구항 28

제19항에 있어서, 상기 친수성 중합체는 분자량이 200 내지 10,000인 폴리(에틸렌 글리콜)인 것인 약학 조성물.

청구항 29

제19항에 있어서, 상기 친수성 중합체는 분자량이 500 내지 5,000인 폴리(에틸렌 글리콜)인 것인 약학 조성물.

청구항 30

제19항에 있어서, 상기 리포좀이 표적화 부분을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 표적화 부분이, 항체의 항원 결합 서열을 포함하는, 천연, 합성 또는 재조합에 의해 생성된 단백질인 것인 약학 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 표적화 부분이 항체, 이의 항원 결합 단편, 항체의 항원 결합 폴리펩티드 서열을 포함하는 단일쇄 단백질, 또는 단일 도메인 항체인 것인 약학 조성물.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 표적화 부분이 상기 리포좀 막에 연결되어 상기 매질에 노출되는 것인 약학 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 연결된 표적화 부분이 상기 리포좀 막을 상기 부분에 연결하는 링커 친수성 중합체를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 링커 친수성 중합체가 링커 폴리(에틸렌 글리콜)인 것인 약학 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 링커 폴리(에틸렌 글리콜)의 분자량이 250 내지 30,000인 것인 약학 조성물.

청구항 37

제30항에 있어서, 상기 표적화 부분이 세포에서의 상기 리포좀을 내재화시키는 것인 약학 조성물.

청구항 38

제30항에 있어서, 상기 표적화 부분이 수용체 타이로신 키나제, 성장 인자 수용체, 혈관신생 인자 수용체, 트랜스페린 수용체, 세포 부착 분자, 또는 비타민 수용체에 선택적으로 결합하는 것인 약학 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 수용체 타이로신 키나제가 성장 인자 수용체인 것인 약학 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 타이로신 키나제 성장 인자 수용체가 EGFR, ErbB-2(HER-2), ErbB-3(HER3) 또는 ErbB-4(HER4)인 것인 약학 조성물.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기 혈관신생 인자 수용체가 bFGF 수용체 또는 VEGF 수용체인 것인 약학 조성물.

청구항 42

제38항에 있어서, 상기 세포 부착 분자가 인테그린인 것인 약학 조성물.

청구항 43

제37항에 있어서, 상기 세포가 악성 세포인 것인 약학 조성물.

청구항 44

제1항 내지 제5항 및 제15항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내부 공간이 치환된 암모늄 화합물을 추가로 포함하고, 이때 상기 치환된 암모늄 화합물이 트리메틸암모늄, 트리에틸암모늄, 트리에탄올암모늄 또는 디에틸암모늄인 것인 약학 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 내부 공간 내의 치환된 암모늄 화합물의 농도가 매질 중의 치환된 암모늄 화합물의 농도보다 더 높은 것인 약학 조성물.

청구항 46

제2항에 있어서, 포유동물 세포 증식성 질환은 신생물(neoplasm)인 것인 약학 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 신생물은 암인 것인 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 우선권 주장에 관한 언급

[0002] 본 출원은, 본원에 모든 목적을 위해 전반적으로 본원에 참조로 인용되는, 2004년 5월 3일에 출원된 미국 가출원 제60/567,921호의 우선권의 이익을 주장한다.

[0003] 본 발명은 포괄적으로는 리포좀 분야에 관한 것이고, 보다 구체적으로는 치료용 또는 진단용 물질(entity)의 전달에 유용한 리포좀 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 리포좀, 혹은 지질 이중층 소낭(lipid bilayer vesicle)은 연구, 산업 및 의료 분야의 다양한 응용분야에서의 용도를 위해, 특히 생체내에서의 진단 또는 치료용 화합물의 담체로서의 용도를 위해 사용 또는 제안되어 왔다. 예를 들어, [Lasic, D. *리포좀: 물리부터 응용까지(Liposomes: from physics to applications)*. Elsevier, Amsterdam, 1993; Lasic, D. 및 Papahadjopoulos, D., 편저. *리포좀의 의학적 응용(Medical Applications of Liposomes)*. Elsevier, Amsterdam, 1998]을 참조한다. 리포좀은 통상 미시적 포낭(sack) 또는 소낭을 형성하는 하나 이상의 이중층 막에 의해 외부 매질로부터 격리되는 내부 공간을 갖는 것을 특징으로 한다. 리포좀의 이중층 막은 전형적으로 지질, 즉 공간적으로 격리된 친수성 및 소수성 영역을 포함하는, 합성 또는 천연 발생의 양친성 분자에 의해 형성된다. [Lasic, D.(1993) 이하 동문]의 상기 문헌을 참조한다. 리포좀의 이중층 막은 또한 양친성 중합체 및 계면활성제(폴리머로좀(polymerosome), 니오좀(niosome))에 의해서도 형성될 수 있다. 리포좀은 전형적으로 비제한적으로 화학적 화합물, 화합물들의 조합물, 합성 또는 천연 발생의 거대분자 착체, 유전물질, 유용한 성질을 갖거나 유용한 활성을 나타낼 수 있는 생물체, 그것의 일부 또는 그것의 유도체와 같은 물질의 담체로서 작용한다. 이 목적을 위해서는, 리포좀은 목적하는 물질을 리포좀 내에 혼입된 형태로 함유하도록 제조된다. 목적하는 물질을 리포좀 내로 혼입시키는 공정을 종종 "로딩(loading)"이라고 한다. 리포좀에 혼입된 물질은 완전히 또는 부분적으로 리포좀의 내부 공간에 위치하거나, 리포좀의 이중층 막 내에 위치하거나, 리포좀 막의 외부 표면에 붙어있을 수 있다. 물질을 리포좀 내로 혼입시키는 것을 봉입(encapsulation) 또는 포획(entrapment)이라고도 하며, 이들 세 가지 용어는 본원에서 동일한 의미를 갖는 것으로 상호 혼용된다.

[0005] 물질을 리포좀에 봉입시키는 것은 종종, 그 물질을 파괴적 환경으로부터 보호하는 한편, 봉입된 물질이 그 활성

을 활성이 유리해지는 부위 또는 환경에서는 대부분 나타내도록 하고, 그런 활성이 불필요하거나 바람직하지 못할 수도 있는 다른 부위에서는 덜 나타내도록 하는 기회를 제공하려는 의도에 따른 것이다. 이러한 현상을 전달이라고 한다. 예를 들어, 리포좀 내의 약물 물질은 체내 효소에 의한 파괴로부터 보호될 수 있으나, 질환 부위에서는 리포좀으로부터 방출되어 치료를 제공할 수 있다.

[0006] 이상적으로는, 그러한 리포좀은 목적하는 화합물을 (i) 높은 로딩 효율로, 즉 봉입 공정에 취해진 양에 비해 높은 퍼센트의 봉입된 물질을 갖도록; (ii) 리포좀 이중층 물질의 단위 당 많은 양의 봉입된 물질을 갖도록; (iii) 높은 농도의 봉입된 물질로, 그리고 (iv) 안정한 형태로 포함하도록, 즉 보관 시에, 또는 일반적으로 리포좀에 봉입된 물질이 그것의 의도된 활성을 나타내도록 예상되는 부위 또는 환경에 리포좀이 나타나기 전에는 봉입된 물질이 조금만 방출(누출)되도록 제조될 수 있다.

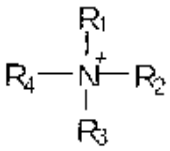
[0007] 따라서, 당업계에서는 다양한 화합물, 특히 치료용, 진단용 또는 영상화용 물질의 전달에 유용한 다양한 리포좀 조성물을 제공할 필요가 있다.

[0008] **발명의 개요**

[0009] 본 발명은, 물질을 리포좀 내부에 로딩하고 유지시킴에 있어 치환된 암모늄 및 다중음이온(polyanion)이 유용하다는 발견에 의거한다. 따라서 본 발명은 다양한 물질, 특히 치료용 물질, 즉 바람직하지 못한 상태, 예를 들어 질환의 진단, 예후(prognosis), 시험, 선별, 치료 또는 예방에 유용한 물질의, 인간, 식물 또는 동물과 같은 생물체 내 전달에 유용한 방법 및 리포좀 조성물을 제공한다.

[0010] 한 실시양태에서 본 발명은 매질 중에 리포좀을 포함하는 조성물로서, 리포좀의 내부에 하기 치환된 암모늄:

[0011] [화학식 I]

[0012] 

[0013] (식 중, R_1, R_2, R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 수소, 또는 총 탄소수 18 이하의 유기기이며, 여기에서 R_1, R_2, R_3 및 R_4 중 하나 이상이 유기기이고, 유기기는 독립적으로 탄소수 8 이하의 탄화수소이고, 알킬, 알킬리덴, 헤테로시클릭 알킬, 시클로알킬, 아릴, 알케닐 또는 시클로알케닐, 또는 그것의 히드록시-치환 유도체이고, 이는 임의적으로 그 탄화수소 사슬 내에 S, O, 또는 N 원자를 포함하여 에테르, 에스테르, 티오에테르, 아민 또는 아미드 결합을 형성하며, R_1, R_2, R_3 및 R_4 중 셋 이상은 유기기이다)을 함유하거나, 상기 치환된 암모늄이 입체 장애 암모늄, 예를 들어 상기 유기기들 중 하나 이상이 암모늄 질소 원자에 직접 연결된 이차 또는 삼차 탄소 원자를 가지는 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 리포좀에 봉입된 치환된 암모늄 화합물의, 주위 온도에서 수용액 중에 측정될 때 산(탈양성자화) 해리 상수(pKa)의 음의 대수(negative logarithm)가 약 8.0 이상, 약 8.5 이상, 약 9.0 이상, 9.5 이상 또는 10.0 이상이다.

[0014] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 매질 중에 리포좀을 포함하는 조성물로서, 상기 리포좀의 내부 공간에 다중음이온이 함유되고, 상기 다중음이온은 다중음이온화된 폴리올 또는 다중음이온화된 당(sugar)인 조성물을 제공한다. 상기 리포좀은 바람직하게는 물질을 리포좀 내부로 로딩시킬 수 있는 막 횡단 구배를 함유한다. 한 실시양태에서, 상기 막 횡단 구배는 암모늄, 사차 암모늄, 또는 주위 온도에서 희석된 수용액 중에서의 산(탈양성자화) 해리 상수(pKa)의 음의 대수가 약 8.0 이상, 약 8.5 이상, 약 9.0 이상, 9.5 이상 또는 10.0 이상인 일차, 이차 또는 삼차 치환된 암모늄 화합물의 구배이다. 리포좀은 임의적으로 포획된 물질, 예를 들어 치료제, 검출 가능한 표지, 또는 전체적으로 양이온성(globally cationic)인 유기 분자를 함유한다.

[0015] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 의해 제공되는 조성물은 본 발명의 리포좀에 봉입된 물질을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 물질은 리포좀의 내부 공간 내에 봉입된다. 예를 들어, 리포좀의 내부 공간에는 항신생물(anti-neoplastic) 치료제가 추가로 포함되며, 이 때 투여대상에 대한 상기 조성물의 독성 수준은 상기 대상에 상기 조성물 없이 투여되는 항종양 치료제의 독성 수준에 비해 적어도 동일하거나 더 낮다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 의해 제공되는 조성물이 캄프토테신(camptothecin) 화합물을 포함하는 리포좀 조성물이다. 상기 조성물은 항암 활성이 조성물의 부재 하에 유사하게 투여되는 캄프토테신 화합물에 비해 적어도 2배, 4배 또는 10배 더 높은 한편, 조성물의 독성은 조성물의 부재 하에 유사하게 투여되는 캄프토테신 화합

물의 독성을 초과하지 않거나, 적어도 2배, 또는 적어도 4배 더 낮다. 한 실시양태에서, 상기 캄프토테신 화합물은 전구약물(prodrug)이며, 리포좀 내에 리포좀 막 물질, 예를 들어 지질 1 mg 당 0.1 mg 이상, 0.2 mg 이상, 0.3 mg 이상, 0.5 mg 이상 또는 1 mg 이상으로 함유된다. 캄프토테신 화합물은 리포좀 내에서 실질적으로 리포좀의 내부 공간 내에 봉입되는 것이 바람직하다. 일례로, 상기 캄프토테신 화합물은 이리노테칸(CPT-11)이다.

[0017] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 의해 제공되는 조성물은 빈카 알칼로이드(빈카 알칼로이드) 또는 그것의 유도체의 리포좀 조성물이다. 조성물은, 포유동물의 생체내 혈중 노출된 지 24시간 후에 리포좀 내 24시간 약물 체류가 본래 약물 로딩량의 50% 이상, 60% 이상, 또는 70% 이상이다. 상기 빈카 알칼로이드 또는 그것의 유도체는 리포좀 내에서 실질적으로 리포좀의 내부 공간 내에 봉입되는 것이 바람직하다. 상기 포유동물의 한 예는 래트이다. 빈카 알칼로이드 및 유도체의 예로는 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 비노렐빈이 있다.

[0018] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 리포좀 내로 물질을 봉입하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명의 리포좀을 물질, 예를 들어 치료제 또는 검출 가능한 물질과 접촉시키는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 그 접촉은 매질 중의 본 발명의 치환된 암모늄 또는 다중음이온의 농도가 리포좀의 내부 공간 내의 농도보다 낮은 조건 하에서 수행된다. 한 실시양태에서, 상기 리포좀 조성물이 수성 매질 중에서 물질과 접촉한다.

[0019] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 리포좀 내로 물질을 봉입하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명의 리포좀 함유 조성물을 전구물질(pre-entity)과 접촉시키는 단계(여기에서, 전구물질이란 일정 조건 하에서 한 물질로 전환될 수 있는 것을 말한다), 및 상기 전구물질이 리포좀 내에서 상기 물질로 전환될 수 있도록 하는 조건을 리포좀 내에 제공하는 단계를 포함한다. 한 경우에서, 물질은 유기 화합물이고, 전구물질은 그 화합물의 염기성 유도체이다.

[0020] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 리포좀에 봉입된 물질을 제조하기 위한 키트(kit)를 제공한다. 그 키트는 본 발명의 리포좀이 담긴 용기, 및 임의적으로 한 물질 및/또는 사용자를 위한 사용설명서, 예를 들어 물질을 봉입시키기 위한 사용설명서를 함유하는 용기를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 CPT-11이 로딩된 리포좀을 래트에 정맥내 볼루스 투여(bolus administration)한 후의 리포좀 지질(원)과 약물(삼각형)의 혈중 약물동태(pharmacokinetics)를 나타낸다. 리포좀은 TEA-Pn 방법을 사용하여 로딩된다(실시예 9 참조).

도 2는 TEA-Pn 방법을 사용하여 CPT-11을 로딩한 리포좀을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 생체내 혈중 약물-대-리포좀 지질 비의 역학관계(dynamics)를 나타낸다(실시예 9 참조).

도 3은 누드 마우스에서 BT-474 인간 유방암 이종이식(xenograft)에 대한 유리 CPT-11과 리포좀형(liposomal) CPT-11의 항종양 효능을 나타낸다. "대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 10 참조).

도 4는 BT-474 종양을 가진 누드 마우스를 유리 CPT-11 또는 리포좀형 CPT-11로 처리하는 동안의 상기 동물의 체중의 역학관계를 나타낸다. "대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 10 참조).

도 5는 TEA-SOS 방법을 사용하여 CPT-11을 로딩한 리포좀을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 생체내 혈중 지질-대-리포좀 지질 비의 역학관계를 나타낸다(실시예 14 참조).

도 6은 누드 마우스에서 HT-29 인간 대장암 이종이식에 대한 유리 CPT-11과 리포좀형 CPT-11의 항종양 효능을 나타낸다. 패널상의 설명문은 약물 로딩 방법 및 주사 한 대 당 투여된 투여량을 표시한다. "염수 대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 15 참조).

도 7은 HT-29 종양을 가진 누도 마우스를 유리 CPT-11 또는 리포좀형 CPT-11로 처리하는 동안의 상기 동물의 체중의 역학관계를 나타낸다. 오차 막대(error bar)는 데이터의 표준 편차를 나타낸다. "염수 대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 15 참조).

도 8A는 토포테칸이 로딩된 리포좀을 래트에 정맥내 볼루스 투여한 후의 리포좀 지질의 혈중 약물동태를 나타낸다. 패널상의 설명문은 약물 로딩 방법 및 리포좀의 약물 함유량을 표시한다(실시예 24 참조).

도 8B는 토포테칸이 로딩된 리포좀을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 생체내 혈중 지질-대-리포좀 지질 비의 역학관계를 나타낸다. 패널상의 설명문은 약물 로딩 방법 및 리포좀의 약물 함유량을 표시한다(실시예 24 참

조).

도 9는 SKBr-3 유방암종 세포에 대한 유리 토포테칸, 리포좀형 토포테칸, 또는 HER2-표적화 면역리포좀형 토포테칸(TEA-Pn 방법)의 생체외 세포독성을 나타낸다(실시예 27 참조).

도 10은 SKBr-3 유방암종 세포에 대한 유리 약물, 리포좀형 약물, 또는 HER2-표적화 면역리포좀형 약물로서의 토포테칸(TEA-SOS 방법)의 생체외 세포독성을 나타낸다(실시예 32 참조).

도 11은 누드 마우스에서 BT-474 인간 유방암 이종이식에 대한 다양한 토포테칸(TPT) 제형물의 항종양 효능을 나타낸다. "염수 대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 29 참조).

도 12는 BT-474 종양을 가진 누드 마우스를 유리 토포테칸(TPT), 리포좀형 토포테칸(Ls-TPT), 또는 항HER2 면역리포좀형 토포테칸(F5 ILs-TPT)으로 처리하는 동안의 상기 동물의 체중의 역학관계를 나타낸다. "대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 29 참조).

도 13A는 누드 마우스에서 BT-474 인간 유방암 이종이식에 대한 토포테칸 제형물의 항종양 효능을 나타낸다. 유리 토포테칸(유리 TPT) 또는 리포좀형 토포테칸(Ls-TPT)을 최대 허용 투여량(maximum tolerated dose)의 8분의 1로 투여하였다. 오차 막대는 데이터의 표준 편차를 나타낸다. "대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 31 참조).

도 13B는 누드 마우스에서 BT-474 인간 유방암 이종이식에 대한 토포테칸 제형물의 항종양 효능을 나타낸다. 유리 토포테칸(유리 TPT) 또는 리포좀형 토포테칸(Ls-TPT)을 최대 허용 투여량의 4분의 1로 투여하였다. 오차 막대는 데이터의 표준 편차를 나타낸다. "대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 31 참조).

도 13C는 누드 마우스에서 BT-474 인간 유방암 이종이식에 대한 토포테칸 제형물의 항종양 효능을 나타낸다. 유리 토포테칸(유리 TPT) 또는 리포좀형 토포테칸(Ls-TPT)을 최대 허용 투여량의 2분의 1로 투여하였다. 오차 막대는 데이터의 표준 편차를 나타낸다. "대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 31 참조).

도 13D는 누드 마우스에서 BT-474 인간 유방암 이종이식에 대한 토포테칸 제형물들의 항종양 효능을 나타낸다. 유리 토포테칸(유리 TPT) 또는 리포좀형 토포테칸(Ls-TPT)을 최대 허용 투여량으로 투여하였다. 오차 막대는 데이터의 표준 편차를 나타낸다. "대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 31 참조).

도 14는 BT-474 종양을 가진 누드 마우스를 최대 허용 투여량으로 투여된 유리 토포테칸(유리 TPT) 또는 리포좀형 토포테칸(Ls-TPT)으로 처리하는 동안의 평균 체중의 역학관계를 나타낸다. "대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 31 참조).

도 15는 BT-474 유방암종 세포에 대한, 유리 6-(3-아미노프로필)-엘립티신(유리 AE), 리포좀형 6-(3-아미노프로필)-엘립티신(Ls-AE), 또는 HER2-표적화 면역리포좀형 6-(3-아미노프로필)-엘립티신(F5-ILs-AE)의 생체외 세포독성을 나타내다(실시예 35 참조).

도 16은 EGF 수용체의 발현이 적거나(MCF-7) 많은(MDA-MB468) 유방암종 세포에 대한, 유리 6-(3-아미노프로필)-엘립티신(유리 APE), 리포좀형 6-(3-아미노프로필)-엘립티신(Ls-APE), 또는 EGFR-표적화 면역리포좀형 6-(3-아미노프로필)-엘립티신(C225-ILs-APE)의 생체외 세포독성을 나타낸다(실시예 36 참조).

도 17은 APE 리포좀을 래트에 정맥내 볼루스 투여한 후의, 리포좀으로 제형화된 6-(3-아미노프로필)-엘립티신(APE)의 혈중 약물동태 특성: 리포좀 지질(패널 A, 흰 원), 약물(패널 A, 검은 원)의 혈중 약물동태, 및 약물-대-리포좀 지질 비의 역학관계(패널 B)를 나타낸다(실시예 37 참조).

도 18은 비노렐빈 리포좀을 래트에 정맥내 볼루스 투여한 후의, 리포좀으로 제형화된 비노렐빈(Ls-VRB), 및 항HER2 면역리포좀으로 제형화된 비노렐빈(F5-ILs-VRB)의 혈중 약물동태 특성: 리포좀 지질(패널 A), 약물(패널 B)의 혈중 약물동태, 및 약물-대-리포좀 지질 비의 역학관계(패널 C)를 나타낸다(실시예 43 참조).

도 19는 비노렐빈이 로딩된 리포좀을 래트에 정맥내 볼루스 투여한 후의 리포좀 지질의 혈중 약물동태를 나타낸다. 리포좀은 미리 포획된 트리에틸암모늄 덱스트란술페이트(DS-TEA), 암모늄 덱스트란술페이트(DS-A), 또는 암모늄 술페이트(S-A)를 사용하여 로딩되었다(실시예 44 참조).

도 20은 미리 포획된 트리에틸암모늄 덱스트란술페이트(DS-TEA), 암모늄 덱스트란술페이트(DS-A), 또는 암모늄 술페이트(S-A)를 사용하여 비노렐빈으로 로딩된 리포좀을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 생체내 혈중 약물-대-리포좀 지질 비의 역학관계를 나타낸다(실시예 44 참조).

도 21은 비노렐빈이 로딩된 리포좀을 래트에 정맥내 볼루스 투여한 후의 리포좀 지질의 혈중 약물동태를 나타낸다. 리포좀은 미리 포획된 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트(TEA-SOS)를 사용하여 로딩되고, 평균 크기는 패널상의 설명문에 표시된 바와 같다(실시예 45 참조).

도 22는 비노렐빈이 로딩된 리포좀을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 생체내 혈중 약물-대-리포좀 지질 비의 역학관계를 나타낸다. 리포좀은 미리 포획된 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트(TEA-SOS)를 사용하여 로딩되었고, 평균 크기는 패널상의 설명문에 표시된 바와 같다(실시예 45 참조).

도 23은 TEA-SOS 방법을 사용하여 리포좀으로 제형화된 비노렐빈(Ls-VRB) 또는 항HER2 면역리포좀으로 제형화된 비노렐빈(F5-ILs-VRB)을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 리포좀 지질의 혈중 약물동태를 나타낸다(실시예 46 참조).

도 24는 TEA-SOS 방법을 사용하여 리포좀으로 제형화된 비노렐빈(Ls-VRB) 또는 항HER2 면역리포좀으로 제형화된 비노렐빈(F5-ILs-VRB)을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 생체내 혈중 약물-대-리포좀 지질 비의 역학관계를 나타낸다(실시예 46 참조).

도 25는 HER2-과발현 인간 유방암 세포 MDA-MB-453에 대한 유리 비노렐빈(유리 VRB), 리포좀형 비노렐빈(Ls-VRB), 또는 HER2-표적화 면역리포좀형 비노렐빈(F5-ILs-VRB)의 생체외 세포독성을 나타낸다(실시예 48 참조).

도 26은 HER2-과발현 CaLu-3 인간 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer) 세포에 대한 유리 비노렐빈(유리 VRB), 리포좀형 비노렐빈(Ls-VRB), 또는 HER2-표적화 면역리포좀형 비노렐빈(F5-ILs-VRB)의 생체외 세포독성을 나타낸다(실시예 49 참조).

도 27은 HER2-과발현 인간 유방암 세포 SKBr-3에 대한 유리 비노렐빈(유리 VRB), 리포좀형 비노렐빈(Ls-VRB/SOS-TEA), 또는 HER2-표적화 면역리포좀형 비노렐빈(F5-ILs-VRB/SOS-TEA)의 생체외 세포독성을 나타낸다(실시예 50 참조).

도 28은 누드 마우스에서의 HT-29 인간 대장암 이종이식에 대한 유리 비노렐빈(유리 VRB) 또는 리포좀형 비노렐빈(Ls-VRB)의 항종양 효능을 나타낸다. "염수"는 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다. 오차 막대는 데이터의 표준 편차를 나타낸다(실시예 51 참조).

도 29는 유리 비노렐빈(유리 VRB), 리포좀형 비노렐빈(Ls-VRB), 또는 비히클(염수)만으로 HT-29 종양을 가진 누드 마우스를 처리하는 동안의 평균 체중의 역학관계를 나타낸다. 오차 막대는 데이터의 표준 편차를 나타낸다(실시예 51 참조).

도 30은 동계(syngeneic) C-26 쥐과동물 대장암종 모델에서의 유리 비노렐빈(유리 VRB) 또는 리포좀형 비노렐빈(Ls-VRB)의 항종양 효능을 나타낸다. 주사 한 대 당 약물의 투여량은 패널상의 설명문에 표시된 바와 같다. 오차 막대는 데이터의 표준 편차를 나타낸다. "염수"는 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 52 참조).

도 31은 다양한 투여량의 유리 비노렐빈(유리 VRB), 리포좀형 비노렐빈(Ls-VRB), 또는 비히클(염수)만으로 동계 C-26 쥐과동물 대장암종 종양을 처리하는 동안의 평균 체중의 역학관계를 나타낸다. 주사 한 대 당 약물의 투여량은 패널상의 설명문에 표시된 바와 같다(실시예 52 참조).

도 32는 누드 마우스에서의 HER2-과발현 인간 유방암종(BT-474) 이종이식에 대한 유리 비노렐빈(유리 약물), 또는 TEA-SOS 방법으로 제조된 scFv F5-접합 항HER2 면역리포좀형 비노렐빈(F5-ILs-VRB TEA-SOS), TEA-Pn 방법으로 제조된 항HER2 면역리포좀형 비노렐빈(F5-ILs-VRB TEA-Pn)의 항종양 효능을 나타낸다. "염수 대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 53 참조).

도 33은 유리 비노렐빈, TEA-SOS 방법을 사용하여 제조된 scFv F5-접합 항HER2 면역리포좀형 비노렐빈, TEA-Pn 방법에 의해 제조된 항HER2 면역리포좀형 비노렐빈, 또는 비히클만으로 HER2-과발현 인간 유방암종(BT-474) 이종이식을 가진 마우스를 처리하는 동안의 평균 체중의 역학관계를 나타낸다. 부호에 대한 설명은 도 32의 설명문을 참조한다(실시예 53도 참조).

도 34는 누드 마우스에서의 HER2-과발현 인간 유방암종(BT-474) 이종이식에 대한, 유리 비노렐빈(유리 약물),

또는 다양한 양의 PET-지질을 사용하여 제조된 scFv F5-접합 항HER2 면역리포좀형 비노렐빈의 항종양 효능을 나타낸다. 오차 막대는 데이터의 표준 편차이다. "비히클 대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 54 참조).

도 35는 누드 마우스에서의 EGFR-과발현 인간 아교모세포종(glioblastoma)(U87) 이종이식에 대한 유리 비노렐빈(유리 NAV), 리포좀형 비노렐빈(NAV Lip), 또는 FC225Fab'-접합 항EGFR 면역리포좀형 비노렐빈(C225-NAV Lip)의 항종양 효능을 나타낸다. "염수"는 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 55 참조).

도 36은 트리에틸암모늄 술페이트 방법을 사용하여 리포좀으로 제형화된 독소루비신을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 리포좀 지질의 혈중 약물동태, 및 혈중 약물/리포좀 지질 비의 역학관계를 나타낸다(실시예 56 참조).

도 37은 누드 마우스에서의 HER2-과발현 인간 유방암종(BT-474) 이종이식에 대한, 리포좀형 독소루비신(Ls-Dox), 또는 다양한 양의 PEG-지질을 사용하여 제조된 scFv F5-접합 항HER2 면역리포좀형 독소루비신(F5 ILs-Dox)의 항종양 효능을 나타낸다. 패널상의 설명문은 PEG-지질의 양을 리포좀 인지질의 몰%로 표현한 것을 나타낸다. "염수 대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 57 참조).

도 38은 래트에서의 리포좀형 빈블라스틴의 혈중 약물동태를 나타낸다(실시예 58 참조).

도 39는 리포좀형 빈블라스틴을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트의 혈중 약물/리포좀 지질 비의 역학관계를 나타낸다(실시예 58 참조).

도 40은 HER2-과발현 인간 유방암 세포 SKBr-3에 대한 유리 빈크리스틴(유리 VCR), 리포좀형 빈크리스틴(Ls-VCR), 또는 HER2-표적화 면역리포좀형 빈크리스틴(F5-ILs-VCR)의 생체외 세포독성을 나타낸다(실시예 61 참조).

도 41은 다양한 평균 크기(패널상 설명문에 표시됨)의 리포좀으로 제형화된 빈크리스틴을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트에서의 리포좀 지질의 혈중 약물동태를 나타낸다(실시예 62 참조).

도 42는 다양한 평균 크기(패널상 설명문에 표시됨)의 리포좀으로 제형화된 빈크리스틴을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트에서의 혈중 약물/리포좀 지질 비의 역학관계를 나타낸다(실시예 62 참조).

도 43은 누드 마우스에서의 HER2-과발현 인간 유방암종(BT-474) 이종이식에 대한 유리 빈크리스틴(유리 VCR), 트리에틸암모늄 시트레이트 방법에 의해 제조된 리포좀형 빈크리스틴(Ls-VCR 시트레이트), 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트 방법에 의해 제조된 리포좀형 빈크리스틴(Ls-VCR SOS), 또는 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트 방법에 의해 제조된 scFv F5-접합 항HER2 면역리포좀형 빈크리스틴(F5 ILs-VCR SOS)의 항종양 효능을 나타낸다. "염수 대조군"은 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 64 참조).

도 44는 HER2-과발현 인간 유방암종(BT-474) 이종이식을 가진 마우스를 유리 빈크리스틴(유리 VCR), 트리에틸암모늄 시트레이트 방법에 의해 제조된 리포좀형 빈크리스틴(Ls-VCR 시트레이트), 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트 방법에 의해 제조된 리포좀형 빈크리스틴(Ls-VCR SOS), 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트 방법에 의해 제조된 scFv F5-접합 항HER2 면역리포좀형 빈크리스틴(F5 ILs-VCR SOS), 또는 비히클(염수 대조군)만으로 처리하는 동안의 평균 체중의 역학관계를 나타낸다(실시예 64 참조).

도 45는 누드 마우스에서의 EGFRvIII-과발현 인간 뇌암(U87) 이종이식에 대한 유리 빈크리스틴(빈크리스틴), 리포좀형 빈크리스틴(nt-vcr), 또는 C225 Fab'-접합 항EGFR 면역리포좀형 빈크리스틴(C225-vcr)의 항종양 효능을 나타낸다. "염수"는 약물과 리포좀이 없는 비히클만으로 처리된 마우스를 가리킨다(실시예 65 참조).

도 46은 리포좀형 CPT-11을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트에서의 CPT-11 혈중 약물동태, 및 활성 (락톤) 형태로 존재하는 CPT-11의 혈중 백분율의 역학관계를 나타낸다(실시예 69 참조).

도 47은 CPT-11 용액(유리 CPT-11)을 정맥내 볼루스 투여한 후의 래트에서의 CPT-11 혈중 약물동태, 및 활성 (락톤) 형태로 존재하는 CPT-11의 혈중 백분율의 역학관계를 나타낸다(실시예 69 참조).

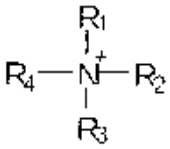
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 일반적으로 다양한 물질, 특히 치료제 및 영상화제의 전달에 유용한 방법 및 리포좀 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 발견은 치환된 암모늄 및 다중음이온이 상기 물질, 예컨대 화합물을 리포좀 내부에 로딩하고 유지시키는데 유용하다는 것이다. 따라서 본 발명은 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온을 함유하는 리포좀 조성

물과 키트, 및 그러한 리포좀 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 한 특징에 따라, 하기 화학식의 하나 이상의 치환된 암모늄 화합물을 내부 공간에 함유하는 리포좀의 조성물을 제공한다:

[0024] [화학식 I]

[0025] 

[0026] (식 중, R_1, R_2, R_3 및 R_4는 각각 독립적으로 수소 또는 유기기이며, R_1, R_2, R_3 및 R_4 중 하나 이상은 알킬, 알킬리덴, 헤테로시클릭 알킬, 시클로알킬, 아릴, 알케닐, 또는 시클로알케닐기와 같은 유기기, 그것의 히드록시-치환 유도체이고, 이는 임의적으로 그 탄화수소 사슬 내에 S, O 또는 N 원자를 포함하여, 예를 들어 에테르(아세탈 또는 케탈 포함), 에스테르, 술피드(티오에테르), 아민, 또는 아미드 결합을 사슬 내에 형성한다). R_1, R_2, R_3 및 R_4 중 세 개 미만이 유기기인 경우에는, 본 발명에 따라, 그 유기기 중 하나 이상, 바람직하게는 두 개는 이차 또는 삼차 탄소 원자(즉, 각각 탄소-탄소 결합을 2 개 또는 3 개 갖는 탄소 원자)가 암모늄 질소에 직접 연결된 것, 즉 치환된 암모늄이 입체 장애 암모늄인 것이다. 일반적으로, 적정가능한 암모늄, 예컨대 치환되지 않은 암모늄 이온(NH_4^+)을 비롯하여 일차 및 이차 직쇄 알킬암모늄 이온이 본 발명의 리포좀의 내부 공간에 존재하면, 예를 들어 "활성", "원거리(remote)" 또는 "막 횡단 구배에 의해 유도된" 로딩의 메커니즘(Haran 등, *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, v. 1152, p. 253-258; Maurer-Spurej 등, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, v. 1416, p. 1-10)을 통해 약한 양친성 염기의 봉입을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 암모니아 화합물들은 친핵성 치환 반응으로 쉽게 진행하거나, 아니면 리포좀에 포획된 물질과 화학적으로 반응하는 수소 원자를 가지므로, 리포좀에 로딩(포획)하는 공정 중에 혹은 후에 물질의 화학적 본 상태를 손상시킬 수 있다. 따라서 포획된 치환된 암모늄 화합물은, 화학적으로 보다 불활성이어서, 리포좀 성분(이는 봉입된 물질을 포함할 수도 있다)과 쉽게 반응하거나 불안정한 화학적 기능이 결핍된 것이 바람직하다. 예상치 못하게도, 본 발명자들은 치환가능한 수소를 갖지 않는 치환된 삼차 및 사차 암모늄, 또는 하나 또는 두 개의 이차 또는 삼차 탄소 원자가 암모늄 질소에 연결된 것과 같이, 이웃하는 부피 큰 유기기에 의해 암모늄 수소 원자로의 접근이 입체적으로 장애를 받는, 입체 장애 일차 또는 이차 암모늄을 내부 공간 내에 포함하는 리포좀 조성물이, 우수한 물질 로딩 능력뿐만 아니라, 생체 내에서 리포좀으로부터의 너무 이른 방출에 대해 리포좀에 포획된 물질, 예컨대 약물의 향상된 안정성을 나타낸다는 것을 발견하였다.

[0027] 한 실시양태에서, 리포좀에 포획된 치환된 암모늄 화합물이 약학적으로 불활성, 즉 살아있는 대상, 예컨대 인간 또는 동물에게, 리포좀에 포획된 물질을 유효량 전달하기에 충분한 양으로 리포좀 막 물질이 투여되었을 때 좋지 못한 생리학적 반응을 일으키지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 치환된 암모늄은 대상에 허용가능한 수준의 독성을 나타낸다. 통상 허용가능한 수준의 독성이란, 본 발명의 치환된 암모늄의 독성 투여량, 예를 들어 최대 허용 투여량(MTD), 또는 50% 사망률을 나타내는 투여량(LD50)이 본 발명의 리포좀 내부에 로딩되는, 리포좀에 포획된 물질, 예컨대 약물의 독성 투여량에 비해 2배 이상, 4배 이상, 8배 이상, 또는 10배 이상 높다는 것을 의미한다. 예를 들어, 트리에틸암모늄 술페이트는 LD50이 항암 약물인 독소루비신의 LD50에 비해 약 40배 더 높기 때문에 본 발명에 따른 허용가능한 수준의 독성을 가진다. 치환된 암모늄을 비롯한 관심 대상의 물질의 독성 수준 또는 생리학적 반응은, 이미 알려져 있지 않다면, 생체의료 분야의 당업자에게 잘 알려진 일상적 기법을 통해 쉽게 구할 수 있다. 예를 들어, [S. C. Gad. *약물 안전성 평가(Drug Safety Evaluation)*, Wiley, New York, 2002]를 참조한다. 유리 및/또는 리포좀으로 제형화된 약물의 독성을 정량화하는 한 방법이 본원의 실시예 16에 기술되어 있다.

[0028] 한 바람직한 실시양태에서, R_1, R_2, R_3 또는 R_4 중 치환하는 유기기의 크기 및 물리화학적 특성이, 치환된 암모늄이 수성 환경 중에서 실질적으로 참용액(분자 용액)을 형성하지만, 마이셀, 이중층, 또는 유사한 자기조립된(self-assembled) 구조물을 형성하지는 않게 하기에는 충분한 것이다. 따라서, 본 발명의 치환된 암모늄은 리포좀의 이중층 부분 내로는 약간 분포되거나 실질적으로 분포되지 않아서, 치환된 암모늄을 포획하고 있는 리포좀의 탈안정화, 가용화, 또는 투과화(permeabilization)의 위험성을 최소화하는 것이 바람직하다.

[0029] 상기 치환된 암모늄의 유기기는 전형적으로 8 이하의 탄소수, 6 이하의 탄소수 또는 4 개 이하의 탄소수를 갖는 탄화수소이며, 치환기는 모두 합해서 18 이하, 16 이하, 12 이하, 또는 9 이하의 탄소수를 함유한다. 이들 탄화수소 치환기는 상호연결된 일차, 이차, 또는 삼차 탄소 원자를 비롯하여, 말단에서 암모늄 질소에 직접 연결되어 복소환을 형성하거나 암모늄 수소를 치환하는 기의 탄소 원자에 직접 연결된 시클로알킬기의 임의의 조합을 포함한다. 이들 치환된 알킬기는 또한 헤테로원자, 예를 들어 산소, 질소 또는 황을 탄소 사슬에 포함하여 에테르, 아세탈, 아민 또는 술피드기와 같은 작용기를 형성하고, 또한 알킬 탄소 사슬에 연결된 히드록시기와 같은 작용기를 형성할 수도 있다. 본 발명의 유기기의 예에는 알킬, 알킬리덴, 헤테로시클릭 알킬, 시클로알킬, 아릴, 알케닐, 시클로알케닐, 또는 그것의 히드록시-치환 유도체, 예를 들어 치환된 암모늄의 N을 포함하는 고리를 형성하는 히드록시-치환 알킬리덴이 포함되나, 이들에 제한되지는 없다.

[0030] 또 다른 실시양태에서, 치환된 암모늄이: 헤테로시클릭 암모늄, 즉 R_1, R_2, R_3, 또는 R_4 중 두 개 이상이 고리를 형성하는 암모늄; 입체 장애 일차 암모늄; 또는 입체 장애 이차 암모늄이다. 일반적으로, 입체 장애 일차 또는 이차 암모늄에는, R_1, R_2, R_3, 및 R_4 중 하나 또는 두 개가 입체적으로 분자를 조밀하게 만드는 알킬기로 치환된 임의 치환 암모늄, 예를 들어 R_1, R_2, R_3, 및 R_4 중 하나 또는 두 개가, 하나 이상의 이차 또는 삼차 알킬 탄소 원자가 치환된 암모늄의 질소에 연결된 시클로알킬기 또는 알킬기 하나 또는 두 개로 치환된 임의 치환 암모늄이 포함된다. 그러한 헤테로시클릭, 입체 장애 일차 암모늄, 및 입체 장애 이차 암모늄의 예에는 이소프로필에틸암모늄, 이소프로필메틸암모늄, 디이소프로필암모늄, tert-부틸에틸암모늄, 디시클로헥실암모늄, 모르폴린의 양성자화 형태, 피리딘, 피페리딘, 피롤리딘, 피페라진, tert-부틸아민, 2-아미노-2-메틸프로판올-1,2-아미노-2-메틸-프로판디올-1,3, 및 트리스-(히드록시에틸)-아미노메탄이 포함되나, 이들에 제한되지는 없다. 이들 치환된 암모늄 화합물은 일반적으로 다양한 염의 형태로 시판되고 있거나, 산과의 중화반응에 의해 상응하는 아민으로부터 쉽게 제조된다.

[0031] 또 다른 실시양태에서, 치환된 암모늄에는 트리메틸암모늄, 트리에틸암모늄, 트리부틸암모늄, 디에틸메틸암모늄, 디이소프로필에틸암모늄, 트리이소프로필암모늄, N-메틸모르폴리늄, N-히드록시에틸피페리디늄, N-메틸피롤리디늄, 및 N,N'-디메틸피페라지늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 및 테트라부틸암모늄이 포함되나, 이들에 제한되지는 없다. 이들 치환된 암모늄 화합물은 일반적으로 다양한 염의 형태로 시판되고 있거나, 산과의 중화반응에 의해 상응하는 아민으로부터 쉽게 제조된다.

[0032] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 치환된 암모늄 화합물이 전체적으로 양이온성인 화합물, 즉 물질 봉입 조건 하에서, 전형적으로 약 pH 2 내지 약 pH 8의 수용액 중에서, 예를 들어 질소 원자의 이온화(양성자화)의 결과로 알짜 양전하를 갖는 화합물이다.

[0033] 또 다른 실시양태에서, 리포좀 내로 봉입된 치환된 일차, 이차, 또는 삼차 암모늄 화합물이, 주위 온도(전형적으로 25℃)에서의 희석된 수용액 중에서 측정된 산(탈양성자화) 해리 상수(pKa)의 음의 대수가 약 8.0 이상, 약 8.5 이상, 약 9.0 이상, 9.5 이상, 또는 약 10.0 이상인 것이다. 파라미터 pKa는 암모늄 화합물의 염기성 성질의 강도를 일반적으로 특정화하는 상기 화합물의 공지된 특성이며, pKa 측정 방법은 당업계에서 통상적이며 일상적이다. 다양한 아민 및 이들의 양성자화 형태(암모늄)의 pKa 값이 화학 및 약리학 참고서적에 도표화되어 있다. 예를 들어, IUPAC 약학적 염 핸드북(IUPAC Handbook of Pharmaceutical Salts), P.H. Stahl 및 C.G. Wermuth 편저, Wiley-VCH, 2002; CRC 화학 및 물리 핸드북(CRC Handbook of Chemistry and Physics), 제82판, D.R. Lide 편저, CRC Press, Florida, 2001, p. 8-44 내지 8-56을 참조한다. 일반적으로, 더 강한 염기는 더 높은 pKa를 갖는 특징이 있다. 예시적인 치환된 암모늄 화합물 및 치환되지 않은 암모늄(공액 아민 염기로서 나열됨)은 다음과 같은 pKa 값을 가진다: 피롤리딘, 11.31; 피페리딘, 11.12; 디이소프로필아민, 11.05; 디에틸아민, 10.93; 트리에틸아민, 10.75; 디메틸아민, 10.73; tert-부틸아민, 10.68; 시클로헥실아민, 10.66; 메틸아민, 10.66; 에틸아민, 10.65; 프로필아민, 10.54; 이소프로필아민, 10.53; N-에틸피페리딘, 10.45; 디시클로헥실아민, 10.4; N-메틸피페리딘, 10.38; 디에틸메틸아민, 10.35; 디메틸프로필아민, 10.15; 트리메틸아민, 9.8; 피페라진, 9.73(I), 5.33(II); 2-아미노-2-메틸프로판올, 9.69; N,N'-디메틸피페라진, 9.66(I), 5.2(II); 디에틸-(2-히드록시에틸)아민, 9.58; 에탄올아민, 9.5; N-히드록시에틸피롤리딘, 9.44; 디에탄올아민, 9.28; 암모니아, 9.27; 디메틸-(2-히드록시에틸)아민, 8.83; 2-아미노-2-메틸프로판디올-1,3, 8.8; 모르폴린, 8.5; 트리스-(히드록시메틸)-아미노메탄, 8.3; N-메틸글루카민, 8.03; 트리에탄올아민, 7.76; N-에틸모르폴린, 7.67; N-히드록시에틸모르폴린, 7.39; 이미다졸, 7.03; 피리딘, 5.23. 대체로, 암모늄 화합물의 수소를 알킬 또는 시클로알킬기로 치환하는 것은 pKa 값을 증가시킨다. 특히, 알킬 치환기의 다중 히드록시 또는 에테르 작용기, 또는 질소 함유 헤테로시클릭 기의 방향족성의 존재는 히드록시나 에테르 작용기가 없는 유사하게 치환된 암모니아에

비해 pKa 값을 감소시킨다. 1개 초과의 암모늄기를 가진 화합물은 통상 두 번째 및 그 다음 암모늄기의 pKa가 첫 번째 것보다 훨씬 낮다. 본 발명자들은 예상치 못하게도, pKa 값이 더 높은, 즉 더 강한 염기성 아민에 의해 형성된 치환된 암모니아가 리포좀 내 약물을 안정화시키는데 있어서는 더 약한 아민으로부터 형성된 것보다 더 효과적이라는 것을 발견하였다. 예를 들어, 트리에틸암모늄(pKa = 10.75)의 IHP 및 SOS 염은 모두 생체내에서 리포좀 내의 이리노테칸을 안정화시키는데 있어서 트리에탄올암모늄(pKa = 7.76)의 상응하는 염들에 비해 현저히 더 효과적이었다(실시예 73).

[0034] 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 치환된 암모늄은 임의의 적당한 형태, 예컨대 염의 형태로 있을 수 있다. 적당한 염에는 약학적으로 허용가능한 염이 포함된다. 예를 들어, P. H. Stahl, C. G. Wermuth(편저), *약학적 염의 핸드북*(*Handbook of Pharmaceutical Salts*), Wiley-VCH, Weinheim, 2002를 참조한다. 한 실시양태에서, 상기 치환된 암모늄은 본 발명의 다중음이온을 하나 이상 함유하는 염이다. 최적으로는, 본 발명의 치환된 암모늄 염에서의 짝이온(음이온)은 상기 염을 수용성으로 만들고, 약학적으로 불활성이며, 치료제 또는 검출 가능한 물질과의 접촉 시에 침전물 또는 젤을 형성할 수 있고, 및/또는 치환된 암모늄 또는 그것의 해리되지 않은 아민 형태보다 리포좀 막에 대한 투과성이 더 낮은 것이다. 일반적으로, 본 발명의 치환된 암모늄 염은 리포좀 내부 공간, 예를 들어 수성(aqueous)인 공간에서 참용액을 형성하며, 상당한 양의 마이셀, 이중층, 젤 또는 결정상과 같은 응축된 상을 형성하지 않는다. 치환된 암모늄 및 염 형성 음이온, 예컨대 다중음이온의 상대적 양은 화학양론적 등량의 시점이거나 그 근방이며, 전형적으로 예를 들어 상기 치환된 암모늄 이온의 공액 염기의 해리 상수에 따라 pH 범위가 3 내지 9, 보다 종종 pH 4-8이다.

[0035] 일반적으로, 상기 치환된 암모늄은 본 발명의 리포좀 내에, 즉 안쪽(내부) 공간에 함유된다. 한 실시양태에서, 치환된 암모늄이 리포좀을 에워싸는 외부 매질로부터 부분적으로 또는 실질적으로 완전히 제거된다. 그러한 제거는 당업자에게 공지된 임의의 적당한 수단, 예컨대 희석, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 투석, 한외여과, 침전 등을 통해 달성될 수 있다.

[0036] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 다중음이온을 함유하는 리포좀 조성물을 제공한다. 본 발명의 다중음이온은 1개 초과의 음으로 하전된 기를 가져서, 리포좀 내부 공간, 예컨대 수성인 공간 내에 알짜 음성 이온 전하가 두 단위 넘게 존재하는 임의의 적당한 화학적 물질일 수 있다. 본 발명의 다중음이온은 이가 음이온, 삼가 음이온, 다가 음이온, 중합체성 다가 음이온, 다중음이온화 폴리올, 또는 다중음이온화 당일 수 있다. 황산염, 인산염, 파이로인산염, 타르타르산염, 숙신산염, 말레산염, 붕산염 및 시트르산염이 상기와 같은 이가 및 삼가 음이온의 예이나, 이에 제한되지는 않는다. 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 다중음이온이 유기(탄소) 또는 무기 골격을 가지고, 복수개의 음이온성 작용기, 즉 중성 수용액 중에서 음전하로 이온화될 수 있는 작용기가 골격에 통합되거나 첨부된 다중음이온성 중합체이다. 중합체란, 통상 분자량이 높고, 각각 상대적으로 경량이고 단순한 분자인 연결 단위가 반복되어 이루어진, 천연 또는 합성 화합물이다. 다중음이온성 중합체의 예로는 폴리인산, 폴리비닐술페이트, 폴리비닐술포네이트, 음이온화된 폴리아크릴 중합체, 음이온화된, 예를 들어 폴리술폰화 폴리아민, 예컨대 폴리술폰화 폴리(에틸렌 이민); 폴리술페이트화 폴리카르복실화, 또는 폴리인산화된 다당류; 산성 폴리아미노산; 폴리뉴클레오티드; 기타 폴리인산화, 폴리술페이트화, 폴리술포네이트화, 폴리보레이트화, 또는 폴리카르복실화된 중합체가 있다. 상기와 같은 다가 음이온 및 중합체는 당업계에 잘 알려져 있으며, 다수가 시판되고 있다. 본 발명의 중합체성 음이온은 생분해성인 것, 즉 생물체 내에서 비독성 단위로 분해될 수 있는 것이 바람직하다. 예시적인 생분해성 중합체성 음이온은 폴리인산이다.

[0037] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 다중음이온이 다중음이온화 폴리올 또는 다중음이온화 당이다. 폴리올은 다수의 히드록시기가 예를 들어 선형, 분지형 또는 고리형 탄소 주쇄에 연결되어 있는 유기 분자이다. 따라서 폴리올은 다른 측면으로는 폴리히드록시화 화합물인 것을 특징으로 할 수 있다. 폴리올의 대부분의 탄소 원자가 히드록시화된 것이 바람직하다. 폴리올(다원자성(polyatomic) 알코올)은 당업계에 잘 알려진 분자이다. 직쇄(선형 또는 분지형) 및 고리형 폴리올 모두가 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리올의 예로는: 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 트레이톨, 에리트리톨, 펜타에리트리톨, 만니톨, 글루시톨, 소르비톨, 소르비탄, 자일리톨, 락티톨, 말티톨, 프룩티톨, 및 이노시톨이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 당은 통상 고리형 아세탈, 고리형 케탈, 케톤 또는 알데하이드기, 또는 그것의 첨가생성물을, 상호연결되고 대부분 히드록시화된 탄소 원자단 내에 포함한다. 당은 종종 천연 발생 화합물이다. 당을 수성 매질 중에서 가수분해하면 단당류라고 하는 단위가 생성된다. 전형적으로, 수용액 중에서 탄소수 5 또는 6의 단당류 당 분자는 고리 구조인 고리형 반아세탈(hemiacetal)을 형성한다. 바람직하게는, 본 발명의 당은 단당류이거나 이당류, 즉 각각 탄소수 3 내지 7, 바람직하게는 3 내지 6의 단당류 단위 하나 또는 두 개로 이루어진 것이다. 본 발명의 당의 예에는 글루코스(덱스트로스), 갈락토스, 만노스, 프룩토스와 같은 단당류 헥소오스; 자일로스, 라이보스, 아라비노스와 같은 단당류 펜토스; 및 락토스,

트레할로스, 수크로스, 말토스와 같은 이당류, 및 셀로바이오스(cellobiose)가 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 몇 개의 상호연결된 당 단위가 고리를 형성하여(시클로덱스트린) 이루어진 화합물, 및 그것의 유도체가 또한 사용될 수 있다. 당의 환원이 폴리올을 수득하는 한 방법이다. 보다 안정한 "비-환원성" 및 대사불가능한 이당류, 예컨대 수크로스 또는 트레할로스가 바람직하다. 다양한 폴리올, 단당류, 및 이당류가 시판되고 있다.

[0038] 다중음이온화된 폴리올 또는 당은 히드록시기가 완전히 또는 부분적으로 음이온성 기로써 개질되거나 대체된(음이온화) 폴리올 또는 당이다. 따라서 다중음이온화 폴리올 또는 다중음이온화 당은 음이온성 기가 연결되어 있는 폴리올 부분 또는 당 부분을 포함한다. 예시적인 음이온성 기에는 카르복실산염, 탄산염, 티오탄산염, 디티오탄산염, 인산염, 포스폰산염, 황산염, 술폰산염, 질산염 및 붕산염이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 다중음이온화된 당 또는 폴리올의 음이온성 기 중 하나 이상이 강음이온성 기인 것, 즉 수성 매질 중에서 50% 초과분이 넓은 범위의 pH, 예를 들어 pH 3-12, 바람직하게는 pH 2-12에서 이온화되거나, 혹은 로그 해리 상수(pKa)가 3 이하, 바람직하게는 2 이하인 것이 바람직하다. 폴리올 또는 당의 다중음이온화는 당업계에 잘 알려진 다양한 화학적 공정에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어 피리딘 또는 2-피콜린 중에서의 폴리올 및/또는 당과 삼산화황 또는 클로로술폰산과의 반응으로써 히드록시기 일부 또는 전부가 황산 잔기로 에스테르화(황산화)되어, 폴리황산화 당 또는 폴리올을 제공한다. 본 발명의 황산화 당의 예로는 수크로스 헥사술페이트, 수크로스 헵타술페이트, 및 수크로스 옥타술페이트를 포함한 황산화 수크로스가 있으나, 제한은 없다(Ohi, K. 등, 1980, *Chem, Pharm. Bull.*, 제28 권, p. 638-641 참조). 마찬가지로, 염기 촉매의 존재 하에서의 옥시염화인 또는 디에틸클로로인산염과의 반응으로써 폴리인산화된 폴리올 또는 당을 얻을 수 있다. 폴리인산화 폴리올은 또한 천연 공급원으로부터도 분리된다. 예를 들어 이노시톨 폴리포스페이트, 예컨대 이노시톨 헥사포스페이트(파이트산)는 옥수수로부터 분리된다. 본 발명의 수행에 적당한 다양한 황산화, 술폰산화, 및 인산화 당 및 폴리올이, 예를 들어 미국 특허 제5,783,568호 및 미국 특허 제5,281,237호에 개시되어 있으며, 이들은 본원에 참고문헌으로서 인용되어 있다. 예상치 못하게도, 강산 해리 단계만을 갖는 다중음이온화 폴리히드록시화 화합물, 예를 들어 pKa가 약 3.0 미만, 바람직하게는 약 2.0 미만인 기, 예를 들어 황산 모노에스테르(pKa 1.0 이하)는, 약산성 해리 단계를 갖는 다중음이온화 폴리히드록시화 화합물, 예컨대 인산 모노에스테르(단계 1, pKa 약 1.5; 단계 2, pKa 약 6.7; Stahl 및 Wermuth, 상기 문헌, 2002 참조)에 비해 리포좀 봉입 시 약물 보유율이 더 좋다는 것을 발견하였다. 하기 실시예 73이 이러한 발견을 설명한다. 폴리올 및/또는 당을 1개 초과의 부산 분자로 착체화시켜도, 다중음이온화(폴리붕산화) 생성물을 얻는다. 알칼리의 존재 하에서 폴리올 및/또는 당과 이황화탄소와의 반응으로는 다중음이온화(폴리디티오탄산화, 폴리잔토겐산화) 유도체를 얻는다. 다중음이온화 폴리올 또는 당 유도체는 유리산 형태로 분리할 수 있고, 적당한 염기, 예를 들어 알칼리 금속 수산화물, 수산화암모늄으로써, 또는 바람직하게는 순수 형태 또는 본 발명의 치환된 암모늄의 다중음이온성 염을 제공하는 치환된 암모늄의 수산화물 형태를 갖는 치환된 아민, 예를 들어 본 발명의 치환된 암모늄에 상응하는 아민으로써 중화시킬 수 있다. 대안적으로는, 다중음이온화 폴리올/당의 나트륨, 칼륨, 칼슘, 바륨 또는 마그네슘 염을 분리하고, 임의의 공지 방법, 예를 들어 이온 교환에 의해 적당한 형태, 예를 들어 치환된 암모늄 염의 형태로 전환시킬 수 있다.

[0039] 본 발명의 다중음이온은 통상 전하 밀도가 단위 당, 예를 들어 탄소 사슬 내 탄소 원자 또는 고리 당 또는 당 내 단당류 단위 당, 2개 이상, 3개 또는 4개의 음으로 하전된 기를 갖는 것이다. 본 발명의 다중음이온화된 당 또는 고리형 폴리올은 바람직하게는 이용가능한 히드록시기의 75% 이상이 다중음이온화된 것이고, 더욱 바람직하게는 이용가능한 히드록시기의 100%가 다중음이온화된 것이다. 또한, 본 발명의 리포좀 내부의 다중음이온화는 통상 리포좀 내부에 포획된 물질을 의도된 작용 부위로 전달하고 방출하기에 적절하거나 촉진시키지만, 포획된 물질을 너무 일찍, 즉 리포좀이 의도된 작용 부위에 도달하기 전에 방출하는 것은 감소시키는 수준으로 이루어진다.

[0040] 본 발명에 따라, 리포좀 내부의 다중음이온화 정도는 방출 특성, 예를 들어 방출 속도 및 리포좀 내부에 포획된 물질의 동태를 조절하는데 이용할 수 있다. 일반적으로, 다중음이온화 정도는 음이온(들)의 총량에 대한 다중음이온화 당 또는 폴리올의 양을 기준으로, 또는 다중음이온이 한 종류의 음이온인 경우에는, 본 발명의 리포좀 내 다중음이온, 예를 들어 다중음이온화 당 또는 폴리올 또는 그것의 화합물의 다중음이온화 능력에 대한 다중음이온화의 백분율을 기준으로 평가된다. 한 실시양태에서, 다중음이온화 당 또는 폴리올이 하나 이상의 기타 음이온과 혼합되며, 기타 음이온(들)의 양에 비한 다중음이온화 당 또는 폴리올의 양이 적을수록 상기 물질은 리포좀으로부터 더 빨리 방출된다.

[0041] 통상 포획된 물질이 의도된 활성 부위에서 리포좀으로부터 너무 천천히 방출되는 경우에는, 다중음이온화된 당 또는 폴리올과 하나 이상의 기타 일가 또는 다가 음이온, 예를 들어 염화물, 황산, 인산 등의 이온의 혼합물을

사용하여 목적하는 물질의 방출 속도를 달성할 수 있다. 대안적으로는, 다양한 다중음이온화 정도를 갖는 다중음이온화 당 또는 폴리올의 혼합물을 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 내부의 다중음이온화 정도는, 예를 들어 포획된 물질을 포함한 리포좀 내부의 총 음이온(들)의 0.1% 내지 99%, 10% 내지 90%, 또는 20% 내지 80%이다.

[0042] 일반적으로, 본 발명의 리포좀 조성물은 본 발명의 다중음이온을 하나 이상 임의의 적당한 형태로, 예를 들어 산 또는 다중음이온 및 양이온을 포함하는 염의 형태로 함유할 수 있다. 다중음이온, 예를 들어 다중음이온화된 당 또는 폴리올의 양은 양이온의 양과 화학양론적으로 동등하거나 상이할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 조성물이 양이온의 다중음이온 염을 하나 이상 함유하는데, 이때 리포좀 막을 가로질러 존재하는 양이온 농도 구배 또는 pH 구배가 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 조성물이 본 발명의 치환된 암모늄 다중음이온 염을 하나 이상 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 리포좀이 다중음이온을 리포좀 내부에 함유하는 반면, 리포좀을 함유하는 매질 중의 다중음이온은 당업자에게 공지된 임의의 적당한 수단, 예를 들어 희석, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 투석, 한외여과, 흡수, 침전 등에 의해 부분적으로 또는 실질적으로 제거된다. 또 다른 실시양태에서, 다중음이온, 예를 들어 다중음이온화 폴리올 또는 다중음이온화 당이 포획된 리포좀 또한 물질을 리포좀 내에 유지시키는데 효과적인 막 횡단 구배를 가진다. 그러한 막 횡단 구배의 예로는 pH 구배, 전기화학 포텐셜 구배, 암모늄 이온 구배, 치환된 암모늄 이온 구배, 또는 용해도 구배가 있다. 치환된 암모늄 구배는 전형적으로 하나 이상의 C-N 결합을 포함하는 암모늄 이온, 예컨대 일차, 사차, 삼차 또는 사차 암모늄의 치환된 형태를 포함한다. 막 횡단 구배를 생성하는 방법은 리포좀 분야에서 관례적인 것이다.

[0043] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 본 발명의 리포좀 조성물은 하나 이상의 본 발명의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온, 및 화학적 또는 생물학적 물질, 예를 들어 치료제 또는 검출 가능한 물질을 함유한다. 예를 들어, 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 물질은 치료제, 잉크, 염료, 자성 화합물, 비료, 미끼(lure), 생촉매, 맛 또는 냄새 변경 물질, 표백제, 또는 당업계에 공지된 임의의 적당한 수단, 예를 들어 자기공명영상화(MRI), 광학 영상화, 형광/발광 영상화, 또는 핵 영상화 기법으로 검출 가능한 임의 물질일 수 있다. 본 발명의 리포좀 조성물에 함유되거나 로딩가능한 물질은 약한 염기성이고 막 투과가능한(친유성) 물질, 예를 들어 아민 함유 또는 질소 염기 물질인 것이 편리하다.

[0044] 한 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 물질은 치료제이다.

[0045] 또 다른 실시양태에서, 리포좀 조성물에 함유된 물질은 항암 물질이다. 다음은, 흔히 알려져 있는, 시판 인증된 (또는 활발한 개발 중에 있는) 항신생물제의 일부를 분류한 목록의 일부이다.

[0046] 구조를 기준으로 한 부류: 플루오로피리미딘 -- 5-FU, 플루오로데옥시유리딘, 프토라풀, 5'-데옥시플루오로유리딘, UFT, S-1 카페시타빈; 피리미딘 뉴클레오사이드 -- 데옥시사이티딘, 사이토신 아라비노사이드, 5-아자사이토신, 겜시타빈, 5-아자사이토신-아라비노사이드; 퓨린 -- 6-머캡토퓨린, 티오구아닌, 아자티오프린, 알로퓨리놀, 클라드리빈, 플루다라빈, 펜토스타틴, 2-클로로 아데노신; 백금 유사체 -- 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 테트라플라틴, 백금-DACH, 오르마플라틴, CI-973, JM-216; 안트라사이클린/안트라세네디온 -- 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미톡산트론; 에피포도필로톡신 -- 에토포사이드, 테니포사이드; 캄프토테신 -- 이리노테칸, 토포테칸, 루르토테칸, 실라테칸, 9-아미노 캄프토테신, 10,11-메틸렌디옥시 캄프토테신, 9-니트로 캄프토테신, TAS 103, 7-(4-메틸-피페라지노-메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20(S)-캄프토테신, 7-(2-N-이소프로필아미노)에틸-20(S)-캄프토테신; 호르몬 및 호르몬 유사체 -- 디에틸스틸베스트롤, 타목시펜, 토레메핀, 톨무덱스, 타이미태크, 플루타미드, 바이칼루타미드, 피나스테라이드, 에스트라디올, 트리옥시펜, 드롤록시펜, 메드록시프로제스테론 아세테이트, 메게스테롤 아세테이트, 아미노글루테티미드, 테스토락톤 등; 효소, 단백질 및 항체 -- 아스파라기나제, 인터루킨, 인터페론, 류프롤라이드, 페가스파가제, 등; 빈카 알칼로이드 -- 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 빈데신; 택산 -- 파클리탁셀, 도세탁셀.

[0047] 메커니즘을 기준으로 한 부류: 호르몬 길항제 -- 호르몬 및 호르몬 유사체에 대한 부류 참조, 아나스트로졸; 항엽산제 -- 메토트렉세이트, 아미노프테린, 트리메트렉세이트, 트리메토프림, 피리트렉심, 피리메타민, 에다트렉세이트, MDAM; 항미세소관제(antimicrotubule agent) -- 탁산 및 빈카 알칼로이드; 알킬화제(전형적 및 비-전형적) -- 질소 머스타드(메클로레타민, 클로람부실, 멜팔란, 유라실 머스타드), 옥사자포스포린(이포스파미드, 시클로포스파미드, 퍼포스파미드, 트로포스파미드), 알킬술포네이트(부설판), 니트로소유레아(카머스틴, 로무스틴, 스트렙토조신), 티오테파, 다카르바진 등; 항대사제(antimetabolite) -- 상기한 퓨린, 피리미딘 및 뉴클레오사이드; 항생제 -- 안트라사이클린/안트라세네디온, 블레오마이신, 닥티노마이신, 미토마이신, 플리카

마이신, 벤토스타틴, 스트렙토조신; 토포이소머라제 억제제 -- 캄프토테신(토포 I), 에피포도필로톡신, m-AMSA, 엘립티신(토포 II); 항바이러스제 -- AZT, 잘시타빈, 겜시타빈, 디다노신 등; 기타 세포독성제 -- 히드록시유레아, 미토테인, 융합 독소(fusion toxin), PZA, 브라이오스태틴, 레티노이드, 부티르산 및 유도체, 펜토산, 퓨마질린 등.

[0048] 상기 외에도, 항암 물질에는 임의의 토포이소머라제 억제제, 빈카 알칼로이드, 예를 들어 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 빈플루닌 및 빈포세틴, 미소세관 탈중합제 또는 탈안정화제, 미소세관 안정화제, 예를 들어 탁산, 파클리탁셀 또는 도세탁셀의 아미노알킬 또는 아미노아실 유사체, 예를 들어 2'-[3-(N,N-디에틸아미노)프로피오닐]파클리탁셀, 7-(N,N-디메틸글리실)파클리탁셀, 및 7-L-알라닐파클리탁셀, 알킬화제, 수용체-결합제, 타이로신 키나제(kinase) 억제제, 포스파타제 억제제, 사이클린 의존성 키나제 억제제, 효소 억제제, 오로라 키나제 억제제, 뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 및 파르네실트랜스퍼라제 억제제.

[0049] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 물질은 안트라사이클린 화합물 또는 유도체, 캄프토테신 화합물 또는 유도체, 엘립티신 화합물 또는 유도체, 빈카 알칼로이드 또는 유도체, 워트만닌, 그것의 유사체 및 유도체, 또는 오로라 키나제 억제 특성을 갖는 피라졸로피리미딘 화합물인 치료제이다.

[0050] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 물질은 안트라사이클린 약물, 독소루비신, 다우노루비신, 미토마이신 C, 에피루비신, 피라루비신, 루비도마이신, 카르시노마이신, N-아세틸아드리아마이신, 루비다존, 5-이미도다우노마이신, N-아세틸다우노마이신, 다우노릴린, 미톡산트론; 캄프토테신 화합물, 캄프토테신, 9-아미노캄프토테신, 7-에틸캄프토테신, 10-히드록시캄프토테신, 9-니트로캄프토테신, 10,11-메틸렌디옥시캄프토테신, 9-아미노-10,11-메틸렌디옥시캄프토테신, 9-클로로-10,11-메틸렌디옥시캄프토테신, 이리노테칸, 토포테칸, 루르토테칸, 실라테칸, 7-(4-메틸피페라지노메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20(S)-캄프토테신, 7-(4-메틸피페라지노메틸렌)-10,11-메틸렌디옥시-20(S)-캄프토테신, 7-(2-N-이소프로필아미노)에틸)-20(S)-캄프토테신; 엘립티신 화합물, 엘립티신, 6-3-아미노프로필-엘립티신, 2-디에틸아미노에틸-엘립티시늄 및 그것의 염, 다텔립틈, 레텔립틴.

[0051] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 리포좀형 물질이 하기 중 어느 것이나 포함하는 약학적 물질이나, 제한은 없다: 항히스타민 에틸렌디아민 유도체(브롬페니파민, 디펜하이드라민); 항원충제(anti-protozoal); 퀴놀론(요오도퀴놀); 아미딘(펜타미딘); 항기생충제(antihelmintics)(피란텔); 항주혈흡충 약물(옥사미니퀸); 항진균 트리아졸 유도체(플리코나졸, 이트라코나졸, 케토코나졸, 미코나졸); 항미생물 세팔로스포린(세파졸린, 세포니시드, 세포탁심, 세프타지미드, 세푸옥심); 항미생물 베타-락탐 유도체(아즈트레오팜, 세프메타졸, 세폭시틴); 에리트로마이신 군의 항미생물제(에리트로마이신, 아지트로마이신, 클라리트로마이신, 올리앤도마이신); 페니실린(벤질페니실린, 페녹시메틸페니실린, 클록사실린, 메티실린, 나프실린, 옥사실린, 카르베니실린); 테트라사이클린; 기타 항미생물 항생제, 노보비오신, 스펙티노마이신, 반코마이신; 항미코박테리아(antimycobacterial) 약물: 아미노살리실산, 카프레오마이신, 에탐부톨, 이소니아지드, 피라진아마이드, 리파부틴, 리팜핀, 클로파지민; 항바이러스 아다만탄: 아만타딘, 리만타딘; 퀴니딘 유도체: 클로로퀸, 히드록시클로로퀸, 프리마퀸, 퀴오논; 항미생물 퀴오놀론: 시프로플록사신, 에녹사신, 로메플록사신, 날리딕스산, 노르플록사신, 오플록사신; 술폰아미드; 요로 항미생물제: 메텐아민, 니트로푸란토인, 트리메토프림; 니트로이미다졸: 메트로니다졸; 콜린성(cholinergic) 사차 암모늄 화합물(암베티늄, 네오스티그민, 파이소스티그민); 항알츠하이머 아미노아크리딘(타크린); 항파킨슨병 약물(벤즈트로핀, 비페리덴, 프로사이클리딘, 트리헥실헤니딜); 항머스카린제(anti-muscarinic agent)(아트로핀, 하이오사이아민, 스코폴라민, 프로판텔린); 아드레날린성 도파민, 알부테롤, 도부타민, 에페드린, 에피네프린, 노르에피네프린, 이소프로테레놀, 메타프로페레놀, 살메트롤, 테르부탈린); 에르고타민 유도체; 근육이완제 또는 큐레인 계열; 중추 작용 근육이완제; 바클로펜, 시클로벤제핀, 덴트롤렌; 니코틴; 베타-아드레노차단제(adrenoblocker)(아세부틸, 아미오다론); 벤조디아제핀(디티아젬); 항부정맥 약물(디이소피라마이드, 엔카이딘, 국부 마취제 계열 -- 프로카인, 프로카인아마이드, 리도카인, 플레카이이미드), 퀴니딘; ACE 억제제: 캅토프릴, 에넬라프릴랏, 포시노프롤, 퀴나프릴, 라미프릴; 항고지혈증제: 플루바스타틴, 겜피브로실, HMG-coA 억제제(프라바스타틴); 혈압강하 약물: 클로니딘, 구아나벤즈, 프라조신, 구아네티딘, 그라나드릴, 하이드랄라진; 및 비-관상 혈관확장제(non-coronary vasodilator): 디피리다몰.

[0052] 본 발명에 따라, 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 물질은 또한 전구물질(pre-entity), 예를 들어 전구약물(pro-drug), 또는 pH 변화 또는 불안정한(labile) 결합의 효소 절단과 같은 조건 하에서 하나 이상의 전환 단계를 거쳐 목적하는 물질로 전환될 수 있는 제재(agent)일 수도 있다. 그러한 전환은 의도된 약물/리포좀 작용 부위에서 리포좀 내부로부터 전구약물이 방출된 후에 일어나도 된다. 그러나 전구물질은 리포좀을 전달 비히클로서 사용하기 전에, 예를 들어 환자에게 투여 전에, 본 발명의 리포좀 내부에서 목적하는 활성 물질로 전환될 수

도 있다. 예를 들어, 물질은 리포좀으로 쉽게 로딩되도록 전구물질로 개질된 후에 본 발명의 리포좀 내부에 일단 들어가면 목적하는 물질로 다시 전환될 수 있다. 이러한 방식으로는, 본 발명에 따라, 일반적으로 "활성", "원거리" 또는 기타 구배를 기초로 한 로딩 방법을 쓸 수 없는 물질을 본래의 개질되지 않은 형태로서 리포좀 내로, 예를 들어 리포좀의 내부 공간 내로 효과적으로 로딩시킬 수 있다.

[0053] 전체적으로 양이온성인 화합물, 즉 리포좀 로딩 조건 하에서 알짜 양성 이온 전하를 유지할 수 있는 화합물, 특히 적정가능한 아민을 함유하는 화합물은 막 횡단 이온 구배를 나타내는 리포좀 내로 효과적으로 로딩되는 것으로 알려져 있다. 관심대상인 물질이 유기 화합물이고 적정가능한 아민을 함유하는 전체적으로 양이온성인 화합물이 아닌 경우에는, 필요한 이온 특성을 갖는 그것의 유도체를 적당한 개질(modification)에 의해, 예를 들어 WO 96/25147에서 Woodle 등이 개시한 방법에 따라 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 물질의 히드록시기를 아미노산으로 에스테르화시킴으로써 아민기를 도입할 수 있다. 다르게는, 수용성 화합물에 소수성 기를 도입하여, 리포좀 막 내로 분할되고 뒤이어 리포좀 내 구획, 즉 리포좀 내부로 막을 가로지르는 것을 돕게 할 수도 있다. 리포좀에 로딩가능한 전구물질을 생성하는데 유용한 또 다른 개질은 카보닐기 첨가생성물, 예를 들어 하이드라존, 옥심, 아세탈 또는 케탈의 형성이다. 개질된 아미노 함유 기는, 개질된 화합물을 본 발명에 따른 리포좀 내로 로딩한 후에 가수분해되거나, 다르게는 상기 개질된 화합물로부터 화학적으로 절단될 수 있다. 전구물질을 리포좀 내부에서 물질로 재생시키는 통상적인 공정은 가수분해, 광분해, 방사선 분해, 가티올분해(thiolysis), 가암모니아분해(ammonolysis), 환원, 치환, 산화 또는 제거이다. 이들 공정은 pH 변화에 의해, 또는 효소 작용에 의해 수행될 수 있으나, 제한은 없다. 예를 들어, 비이온성 물질인 파클리탁셀 또는 도세탁셀은 약염기(전구물질)인 2'-(디에틸아미노프로피오닐)- 또는 7'-(디에틸아미노프로피오닐) 에스테르로 전환된다. 제한은 없으나, "활성", "원거리", "막 횡단-구배에 의거한" 또는 "용해도 구배에 의거한" 방법을 포함하는 임의의 공지 방법, 및/또는 본 발명의 방법에 의해 리포좀 내로 로딩한 후에는, 리포좀 내의 2'-(디에틸아미노프로피오닐)-파클리탁셀은 pH를 pH 7.0 초과로 증가시켜 가수분해를 유도함으로써 원래의 파클리탁셀로 전환시킨다. 따라서 탁산 분자의 친수성 공유결합 개질(예를 들어, PEG의 부착), 시클로덱스트린 탁산 착체, 또는 탁산을 가용화시키는 마이셀 형성 계면활성제의 도움 없이도, 중성 탁산 분자를 그 내부 공간 내에 봉입하는 리포좀을, 리포좀 지질 1 몰당 0.05 몰 초과의 약물/지질 비로 얻는다.

[0054] 본 발명에 따라, 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 리포좀은 임의의 공지 리포좀 또는 당업계에서 나중에 발견된 리포좀일 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 리포좀은 임의의 리포좀 구조, 예를 들어 내부 공간이 하나 이상의 지질 이중층에 의해 외부 매질로부터 격리된 구조, 또는 반투과성 막과 그 막이 내부를 격리시키는 친유성 중앙부를 갖는 임의의 마이크로캡슐일 수 있다. 지질 이중층은, 친수성부(친수성 부분)와 소수성부(소수성 부분)로 특징지어지는 양친성 분자의 임의 배열일 수 있다. 보통, 이중층 내 양친성 분자는 이차원적 시트 구조로 배열되며, 여기에서 소수성 부분은 시트의 내부를 향해 배향되는 한편, 친수성 부분은 외부를 향해 배향된다. 본 발명의 리포좀을 형성하는 양친성 분자는 임의의 공지 또는 나중에 발견된 양친성 분자, 예를 들어 합성 또는 천연 기원의 지질 또는 생체적합성 지질일 수 있다. 본 발명의 리포좀은 또한 양친성 고분자 및 계면활성제에 의해 형성될 수 있으며, 예로는 폴리머로좀과 니오좀이 있다. 본 개시의 목적에 따르면, 비제한으로 이러한 리포좀 형성 물질을 "지질"이라고도 한다.

[0055] 본 발명에 따라, 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 리포좀은 또한 표적화 리포좀, 예를 들어 리포좀의 표면상에 하나 이상의 표적화 부분 또는 생체분포 변경제를 함유하는 리포좀일 수 있다. 표적화 부분은 목적하는 표적과 특이적으로 결합하거나 상호작용할 수 있는 임의의 제재일 수 있다. 한 실시양태에서, 표적화 부분이 리간드이다. 본 발명에 따라, 상기 리간드는 리포좀에 포획된 물질이 목적하는 효과를 나타내는 세포(표적 세포)에 우선적으로 결합하고/하거나 내재화된다. 리간드는 통상 결합한 쌍의 한 구성원으로서, 두 번째 구성원이 표적 세포상에 또는 내에, 또는 표적 세포를 포함하는 조직 내에 존재하는 것이다. 본 발명에 적당한 리간드의 예에는: 엽산, 단백질, 예를 들어 트랜스퍼린, 성장 인자, 효소, 펩티드, 수용체, 항체 또는 항체 절편, 예컨대 Fab', Fv, 단쇄 Fv, 단일영역 항체, 또는 항체 분자의 항원-결합 서열(CDR)을 포함하는 임의의 기타 폴리펩티드가 있다. 표적화 부분이 항체이거나 그것의 표적 항원-결합 절편인 리간드 표적화 리포좀을 면역리포좀이라고 한다. 바람직한 실시양태에서, 표적화 부분, 예를 들어 리간드를 지니는 리포좀이 표적 세포에 의해 흡수된다. 또 다른 실시양태에서, 표적화 부분이, 예를 들어 EGFR, HER2, HER3, HER4, PD-GFR, VEGFR, bFGFR 또는 IGFR 수용체와 같은 타이로신 키나제 수용체와 특이적으로 상호작용하는 리간드이다. 또 다른 실시양태에서, 표적화 부분이 성장 인자 수용체, 혈관신생 인자 수용체, 트랜스퍼린 수용체, 세포 유착 분자(cell adhesion molecule), 또는 비타민 수용체와 특이적으로 상호작용하는 것이다.

[0056] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따르면, 리포좀 조성물에 함유된 리포좀이 본 발명의 치환된 암모늄 및/또는 다

중음이온의 막 횡단 농도 구배를 나타낸다. 리포좀의 내부(안쪽) 공간의 농도가 더 높은 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 리포좀 조성물은 본 발명의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온에 의해 생성된 구배 외에도 하나 이상의 막 횡단 구배를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 리포좀 조성물에 함유된 리포좀은 막 횡단 pH 구배, 이온 구배, 전기화학 포텐셜 구배, 및/또는 용해도 구배를 부가적으로 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따르면, 본 발명의 리포좀 조성물은 리포좀이 담긴 용기, 및 임의적으로 물질 및 사용설명서, 예를 들어 하나 이상의 용도에 리포좀 조성물을 사용하는데 관련된 절차 또는 정보를 가지는 용기를 포함하는 키트 내에서 제공될 수 있다. 상기와 같은 사용설명서는 임의의 매체, 예를 들어 복사본, 전자 매체, 또는 상기 사용설명서가 포함된 데이터베이스 또는 웹사이트로의 접속을 통해 제공될 수 있다.

[0058] 본 발명의 리포좀 막 조성물은 당업자에게 알려진 임의의 적당한 방법 또는 당업자에 의해 나중에 발견된 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 다양한 지질 성분들을 사용하여 본 발명의 리포좀을 제조할 수 있다. 지질 성분에는 통상 (1) 하전되지 않은 지질 성분, 예를 들어 콜레스테롤, 세라마이드, 디아실글리세롤, 아실(폴리에테르) 또는 알킬폴리(에테르); (2) 중성 인지질, 예를 들어 디아실포스파티딜콜린, 스핑고마이엘린, 및 디아실포스파티딜에탄올아민, (3) 음이온성 지질, 예를 들어 디아실포스파티딜세린, 디아실포스파티딜글리세롤, 디아실포스파티데이트, 카디오리핀, 디아실포스파티딜이노시톨, 디아실글리세롤헤미석시네이트, 디아실글리세롤헤미글루타레이트, 콜레스테릴헤미석시네이트, 콜레스테릴헤미글루타레이트 등; (4) 중합체-접합 지질, 예를 들어 N-[메톡시-(폴리(에틸렌 글리콜)디아실포스파티딜에탄올아민, 폴리(에틸렌 글리콜)-디아실글리세롤, 폴리(에틸렌 글리콜)-세라마이드; 및 (5) 양이온성 지질, 예를 들어 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP), 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(DDAB), 및 1,2-디아실-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 지질의 모노아실-치환 유도체를 비롯하여 디- 및 모노알킬-유사체도 또한 이용될 수 있다.

[0059] 다양한 지질 성분을 선택하여 하나 이상의 목적하는 기능을 만족시키거나, 변경하거나 부여할 수 있다. 예를 들어, 인지질을 주요 소낭 형성 지질로 사용할 수 있다. 콜레스테롤을 포함시키면, 막의 경직성(rigidity)을 유지하고 약물 누출을 감소시키는데 유용하다. 중합체-접합 지질은, 간과 비장에 의한 리포좀 제거를 감소시킴으로써 순환 수명을 증가시키거나, 순환 연장 효과의 부재 하에 보관 중 응집에 대한 리포좀의 안정성을 개선시키기 위한 리포좀 제형물에 사용될 수 있다. 리포좀 지질의 1 몰% 이상의 양으로 PEG-지질을 포함시키면 리포좀 혈중 순환시간을 몇 배로 연장시킨다는 주장되고 있으나(예를 들어 미국 특허 제5,013,556호 참조), 본 발명자들은 놀랍게도, 본 발명의 리포좀이 매우 오래 순환되고, 리포좀 조성물에 PEG-지질을 첨가해도 순환 수명을 연장시킨다해도 2배 미만으로 연장시킨다는 것을 발견하였다. 또한, 전하 조정(적정가능한) 지질을 사용하여, 일부 부류의 물질이 엔도좀 경로(endosomal pathway)의 한계를 벗어나도록 촉진함으로써, 리포좀에 봉입된 물질이 사이토졸(cytosol) 또는 핵의 표적으로 전달되는 것을 돕는데 사용할 수 있다.

[0060] 한 실시양태에서, 본 발명의 리포좀은 레시틴, 콜레스테롤 및 양쪽성(amphipathic) 중합체를 포함한다. 본 발명의 리포좀에 포함되는 레시틴은 천연 레시틴, 수소첨가된 천연 레시틴, 합성 레시틴, 1,2-디스테아로일-레시틴, 디팔미토일 레시틴, 디미리스토일 레시틴, 디올레오일 레시틴, 1-스테아로일-2-올레오일 레시틴, 또는 1-팔미토일-2-올레오일 레시틴일 수 있는 반면, 상기 양쪽성 중합체는 폴리에틸렌 그리콜-지질 유도체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 포스파티딜에탄올아민, 폴리에틸렌 글리콜-디아실글리세롤, 또는 폴리에틸렌 글리콜-세라마이드 유도체로서, 폴리(에틸렌 글리콜) 부분의 분자량이 약 250 내지 약 20,000, 가장 흔하게는 약 500 내지 약 5,000이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 내 레시틴과 콜레스테롤의 비가 몰비로서 약 3:2이다. 또 다른 실시양태에서, 양쪽성 중합체가 본 발명의 리포좀 내 리포좀 형성 지질의 0.1 몰% 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 양쪽성 중합체의 양이 본 발명의 리포좀 내 리포좀 형성 지질의 0.1 몰% 내지 1 몰%이다. 바람직하게는, 양쪽성 중합체는 중성 중합체, 즉 약물 로딩 조건 하에서 알짜 이온 전하가 0인 것, 예를 들어 PEG-디아실글리세롤, PEG-디알킬글리세롤, 또는 PEG-세라마이드이다. 예상치 못하게도, 이온적으로 중성인 양쪽성 지질을 총 지질의 약 5.7 몰%의 PEG-지질 함량으로 포함시키면, 예를 들어 비노렐빈과 같은 빈카 알칼로이드의 리포좀 로딩을 높은 효율로 수행할 수 있는 반면, 음이온적으로 하전된 PEG-DSPE의 경우에는, 로딩 효율이 1.6 몰% 이상의 PEG-지질 함량에서 현저히 감소됨이 발견되었다(실시예 72).

[0061] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 리포좀이 캄프토테신 유도체, 예를 들어 이리노테칸과 같은 캄프토테신 전구약물을 함유하며, 레시틴과 콜레스테롤을, 예를 들어 몰비로서 약 3:2의 비로, 그리고 양쪽성 중합체를, 예를 들어 리포좀 형성 지질의 0.1 몰% 이상 또는 1% 미만의 양으로 포함하도록 이루어진다.

[0062] 본 발명의 리포좀은 당업계에 알려져 있거나 알려질 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, [G. Gregoriadis(편저), *리포좀 기술*(*Liposome Technology*), 제1-3 권, 제1판, 1983; 제2판, 1993, CRC Press,

Boca Raton, FL]을 참조한다. 본 발명의 리포좀 조성물을 제조하는데 적당한 방법의 예에는 압출법, 역상증발법(reverse phase evaporation), 초음파법, 용매(예를 들어, 에탄올) 주입, 미세유동화법(microfluidization), 세제 투석법(detergent dialysis), 에테르 주입법, 및 탈수/재수화법이 포함된다. 리포좀의 크기는 저압 압출에 사용되는 막의 세공 크기, 또는 미세유동화 또는 임의의 기타 적당한 방법에서 사용되는 압력과 통과 횟수를 조절함으로써 제어할 수 있다. 한 실시양태에서, 목적하는 지질을 먼저 박막 수화(thin-film hydration)에 의해 또는 에탄올 주입에 의해 수화시킨 후, 정의된 세공 크기; 가장 통상적으로는 0.05 ㎛, 0.08 ㎛, 또는 0.1 ㎛의 막을 통해 압출함으로써 크기를 조절한다.

[0063] 리포좀 내부에 본 발명의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온을 함유하는 리포좀 조성물은 임의의 적당한 방법에 의해, 예를 들어 염의 형태의 본 발명의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온의 존재 하에, 리포좀을 형성하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 리포좀 외부의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온은 리포좀 형성 후에 또는 목적하는 물질을 로딩하거나 포획하기 전에 제거하거나 희석시킬 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온을 함유하는 리포좀 조성물은 직접 이온 교환법을 통해, 또는 본 발명의 치환된 암모늄, 예를 들어 다중음이온화된 당 또는 폴리올의 치환된 암모늄 염의 구배를 갖는 중간 유리산 단계를 통해 제조할 수 있다. 상기와 같은 리포좀은 아민 또는 그것의 염과 휘발성 산, 예를 들어 탄산염을 사용하여 중화될 수 있다. 수득된 리포좀 용액은 직접 사용되거나, 혹은 거기에 함유된 염은, 원한다면, 예를 들어 증발 및 결정화 후에 수성 매질 중에서의 용해를 통해 제거될 수 있다.

[0064] 바람직하게, 본 발명의 리포좀 조성물은 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온의 막 횡단 농도 구배를 가지며, 예를 들어 리포좀 내부의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온 염의 농도가 리포좀 외부 매질 중의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온의 농도에 비해 더 높고, 통상 100 이상 더 높다.

[0065] 한 실시양태에서, 리포좀 내부의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온 염의 농도는 리포좀 외부 매질 중의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온 염의 농도보다 100배 이상 더 높으며, 농도가 적어도 약 10 mM, 50 mM, 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M, 또는 1.0 M이며, 여기에서 몰 농도는 치환된 암모늄을 기준으로 계산한다. 또 다른 실시양태에서, 리포좀 내부의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온 염의 농도가 리포좀 외부 매질 중의 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온 염의 농도보다 100배 이상 더 높으며, 농도가 약 0.65 M 또는 약 1.0 M이다.

[0066] 또한, 본 발명의 리포좀 조성물은, 높은 로딩 효율, 예를 들어 90% 초과의 포획률과 함께 로딩 공정 중의 목적하는 물질의 안정성을 유지하기에 적합하거나 도움이 되는 외부 pH를 가진다. 예를 들어, 4-7 범위의 pH, 또는 pH 4.5 내지 6.5가 바람직하다. 특히, 본 발명에 따라, 캄프토테신 화합물, 예를 들어 토포테칸 또는 이리노테칸의 로딩은 외부 매질의 pH가 약 4.0 내지 약 7.0 범위, 더욱 바람직하게는 약 pH 5.0 내지 pH 6.5에서 가장 잘 이루어진다. 빈카 유도체, 예를 들어 빈크리스틴, 비노렐빈 또는 빈블라스틴의 로딩은 pH 약 5.0 내지 7.0, 더욱 바람직하게는 pH 약 6.5에서 가장 잘 이루어진다.

[0067] 본 발명에 따라, 목적하는 물질은, 수성 매질 중에서 상기 목적하는 물질과 본 발명의 리포좀을 함께 적당한 온도, 예를 들어 로딩 중에는 성분 지질의 상전이 온도를 초과하나 물질의 로딩 후에는 상전이 온도 아래로 감소되는 온도에서 인큐베이션함으로써, 리포좀 내로 로딩 또는 포획될 수 있다. 상기 인큐베이션 시간은 통상 성분 지질의 성질, 리포좀 내로 로딩될 물질, 및 인큐베이션 온도에 의존한다. 전형적으로, 수분 내지 수시간의 인큐베이션 시간이면 충분하다. 85% 초과, 전형적으로 90% 초과의 높은 포획 효율이 달성되므로, 통상 포획되지 않은 물질을 제거할 필요는 없다. 하지만 그럴 필요가 있을 경우에는, 상기 포획되지 않은 물질은 다양한 수단, 예컨대 크기 배제 크로마토그래피, 투석, 한외여과, 흡착, 또는 침전에 의해 상기 조성물로부터 제거할 수 있다. 예상치 못하게도, 물질, 예컨대 특히 캄프토테신 유도체 또는 빈카 알칼로이드 유도체와 본 발명의 리포좀을 인큐베이션하는 동안에 이온 강도를 낮게 유지한 후, 인큐베이션의 마지막에 이온 강도를 증가시키면, 로딩 효율이 더 높아지고, 포획되지 않은 약물이 더 잘 제거되며, 응집에 대한 리포좀 안정성이 더 나아진다는 것이 발견되었다. 전형적으로, 인큐베이션은 예를 들어 수용액 중에서, 이온 강도가 50 mM NaCl에 등량인 이온 강도 미만에서, 또는 더욱 바람직하게는 30 mM NaCl에 등량인 이온 강도 미만에서 수행된다. 인큐베이션 후에는, 진한 염, 예컨대 NaCl의 용액을 첨가하여, 이온 강도를 50 mM NaCl의 이온 강도보다 더 높게, 또는 더욱 바람직하게는 100 mM NaCl의 이온 강도보다 더 높게 올릴 수 있다. 이론에 구애받지 않으면서, 본 발명자들은 이온 강도의 증가가 리포좀 막으로부터 물질이 해리되는 것을 도와서, 실질적으로 모든 물질이 리포좀의 내부 공간 내에 봉입되어 있게 하는 것으로 추론한다.

[0068] 일반적으로, 물질 대 지질 비, 예를 들어 물질을 로딩할 때 얻어지는 약물 로딩률은 리포좀 내부에 포획된 물질의 양, 포획된 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온, 예를 들어 염의 농도, 포획된 물질의 물리화학적 특성, 및

사용된 짝이온(음이온), 예를 들어 다중음이온의 종류에 의존한다. 본 발명의 조성물에서 및/또는 본 발명의 방법에 의해 달성되는 높은 로딩 효율로 인해, 리포좀에 포획되는 물질에 대한 물질 대 지질 비는, 로딩 공정에 취해지는 물질 및 리포좀 지질의 양("투입" 비)을 근거로 계산되는 물질 대 지질 비의 80% 초과, 90% 초과, 및 전형적으로 95% 초과이다. 실제로, 실질적으로 100%(정량적) 봉입이 통상적이다. 리포좀 내 물질 대 지질 비는 중량비(리포좀 지질의 중량 또는 몰 단위 당 물질의 중량) 또는 몰비(리포좀 지질의 중량 또는 몰 단위 당 물질의 몰)에 의해 특징화된다. 상기 물질 대 지질 비의 한 단위는 하기 예시한 바와 같이 일상적인 계산에 의해 다른 단위로 전환될 수 있다. 본 발명의 리포좀 내 물질의 중량비는 전형적으로 지질 1 mg 당 물질 0.05, 0.1, 0.2, 0.35, 0.5 mg 이상 또는 0.65 mg 이상이다. 몰 비 측면에서, 본 발명에 따른 물질 대 지질 비는 리포좀 지질 1 몰당 적어도 약물 약 0.02 내지 약 5 몰, 바람직하게는 적어도 0.1 내지 약 2 몰, 더욱 바람직하게는 약 0.15 내지 약 1.5 몰이다. 한 실시양태에서, 상기 물질 대 지질 비, 예를 들어 캄프토테신 유도체의 약물 로딩률이 0.1 이상, 예를 들어 리포좀 지질 1 몰당 캄프토테신 유도체 0.1 몰이며, 바람직하게는 0.2 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 물질 대 지질 비, 예를 들어 약물 로딩량이 리포좀 형성 지질 1 mg 당 물질(예를 들어, 빈카 알칼로이드 또는 그것의 유도체) 약 300 mg 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 물질 대 지질 비, 예를 들어 약물 로딩량이 리포좀 형성 지질 1 mg 당 물질(예를 들어, 캄프토테신 유도체 또는 캄프토테신 전구약물) 약 500 mg 이상이다. 놀랍게도, 본 발명은 캄프토테신 유도체 약물, 예를 들어 이리노테칸의 안정하고 거의 정량적인 리포좀 봉입을, 리포좀 지질 1 g 당 물질 0.8 mmol 초과, 리포좀 지질 1 g 당 물질 1.3 mmol 초과, 심지어는 리포좀 지질 1 g 당 물질 1.7 mmol만큼 높은 약물 대 지질 비로 달성할 수 있다(실시예 74 참조).

[0069] 리포좀이 인지질을 포함하는 경우에는, 물질 함량을 리포좀 인지질의 몰 단위 당 약물의 중량(질량) 단위, 예를 들어 약물 mg/인지질 mmol로 표시하는 것이 편리하다. 그러나 당업자는 약물 함량이 리포좀 내 인지질의 존재와는 상관없는 방식으로 동등하게 표시될 수 있으며, 또한 리포좀 지질 함량의 단위(질량 또는 몰) 당 약물의 몰량으로 동등하게 표시될 수도 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 3 몰부의 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC, 분자량 790), 2 몰부의 콜레스테롤(분자량 387), 및 0.015 몰부의 폴리(에틸렌 글리콜)로 유도체화된 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(PEG-DSPE, 분자량 2750)을 함유하고, 약물 독소루비신(분자량 543.5)을 150 mg/인지질 mmol의 약물/지질 비로 함유하는 리포좀에서, 동일한 약물 함량이 하기와 같이 약물 mg/총 지질 mg으로 동등하게 표시될 수 있다:

[0070] (a) 성분의 몰량을 리포좀 인지질의 총 몰량으로 나누어서, 리포좀 인지질(상기 예에서는 DSPC 및 PEG-DSPE)의 몰 단위로 환산한 리포좀 지질 성분의 몰량을 계산한다:

[0071] DSPC 3/(3+0.015) = 0.99502

[0072] 콜레스테롤 2/(3+0.015) = 0.66335

[0073] PG-DSPE 0.015/(3+0.015) = 0.00498

[0074] (b) 리포좀 인지질의 단위 몰량에 상응하는 총 리포좀 지질의 질량 및 성분 분자량을 계산한다:

[0075] 총 지질, mg/인지질 mmol = 0.99502×790 + 0.66335×387 + 0.00498×2750 = 1056.48

[0076] (c) 인지질 몰 단위 당 질량 단위로 표시된 약물 함량을 단계(b)에서 구한 숫자로 나누어서, 총 지질의 질량 단위 당 약물의 질량을 계산한다:

[0077] 독소루비신, mg/총 지질 mg = 150/1056.48 = 0.14198

[0078] (d) 단계(c)에서 구한 숫자를 약물 분자량(이 경우, 543.5)으로 나누어서, 총 지질의 단위 질량 당 약물의 몰량을 계산한다:

[0079] 독소루비신, mmol/총 지질 g = 0.14198/543.5×1000 = 0.261

[0080] (e) 리포좀 지질 매트릭스 내 인지질의 몰부를 계산한다:

[0081] 인지질 몰부 = (인지질의 총 몰수)/(지질의 총 몰량) = (3+0.015)/(3+2+0.015) = 0.6012

[0082] (f) 독소루비신 대 총 지질의 몰비를 계산한다.

[0083] 독소루비신, mol/총 지질 mol = (인지질 몰부)×(독소루비신, g/인지질의 mol)/(독소루비신 분자량) = 0.6012×150/543.5 = 0.166

[0084] 따라서 다양한 단위로 표시되는 약물-대-지질과 약물-대-인지질 비 사이의 관계를 용이하게 구축한다. 본원에서 사용된 "지질"에는 리포좀 막의 임의의 막 형성 성분, 예컨대 중합체 및/또는 세제가 포함되나, 이들에 제한되지는 없다.

[0085] 본 발명의 리포좀에 포획된 치환된 암모늄 및/또는 다중음이온 염 용액은 통상 리포좀의 로딩 능력을 희생시키지 않고도 삼투압 손상(팽윤 및/또는 파열)에 대해 리포좀을 안정하게 유지하는데 도움이 되는 삼투압 강도(삼투질농도(osmolality)를 가진다. 한 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 조성물의 삼투질농도가 0.1 내지 1.5 mol/kg 또는, 바람직하게는 0.2 내지 1.0 mol/kg의 범위이다. 놀랍게도, 본 발명자들은 본 발명의 리포좀이 약물 로딩 시 높은 리포좀 내 삼투압 강도의 악영향에 대해 안정하다는 것을 밝혀내었다. 0.727 몰/kg에 달하는 리포좀 내 삼투질농도도 잘 허용되어서, 이에 따라 약물과 리포좀의 동시 인큐베이션 중의 리포좀 외부 수성 매질의 삼투질농도가 약 0.3 몰/kg의 생리학적 수치에 근접하여도, 약물 분자에 대한 리포좀 내 치환된 암모늄 이온의 화학양론적 교환의 이론적 최대치(이리노테칸의 경우, 치환된 암모늄 이온 1개 당 약물 분자 1개)에 이르는, 실질적으로 정량적인 약물의 로딩이 구현되었다(실시예 74).

[0086] 일반적으로, 본 발명의 리포좀 조성물은, 예를 들어 본 발명의 리포좀 내부의 물질의 초기 로딩으로부터 일정 기간 후에 리포좀 외부로 방출되거나 리포좀 내부에 유지된 포획된 물질의 백분율에 의해 측정될 때, 저장 중에 매우 안정하다. 예를 들어, 본 발명의 리포좀 조성물은 4℃에서 6 개월 이상 동안 안정하며, 예를 들어 포획된 물질의 초기 로딩으로부터 6 개월 후에 10% 미만의 물질이 방출된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 리포좀 조성물이 4℃에서 2년 이상 안정하고, 예를 들어 포획된 물질의 초기 로딩으로부터 2년 후에 20% 미만의 물질이 방출된다.

[0087] 리포좀에 포획된 물질은 리포좀이 의도된 작용의 부위, 예를 들어 리포좀형 항종양 약물이 환자에 투여되는 경우에는, 종양에 도달할 때까지 리포좀 내에 봉입된 채로 남아 있는 것이 유리하다. 본 발명의 리포좀은 생체내 조건 하에서, 예를 들어 포유동물의 혈중에서, 포획된 물질의 방출(누출)에 대해 놀라운 안정성을 나타내었다. 래트의 생체내 혈중에서 포획된 물질, 예를 들어 약물이 리포좀으로부터 50% 방출되는데 필요한 노출 시간(절반 방출 시간)은 24시간 초과였다. 특히, 빈카 알칼로이드 약물, 예를 들어 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈이 로딩된 리포좀은 절반 방출 시간이 24시간 이상이거나, 생체내 혈중에서 24시간 후에 봉입된 채로 남아 있는 봉입된 물질의 양이 투여 전 값의 약 50% 이상으로서, 생체내 약물 누출에 대해 현저한 안정성을 나타내었다. 전형적으로 절반 방출 시간은 33시간 초과, 또는 생체내 혈중에서 24시간 후에 봉입된 채로 남아 있는 봉입된 물질의 양은 약 60% 이상인 것으로 관찰되었고; 절반 방출 시간이 46시간 초과, 또는 생체내 혈중에서 24시간 후의 봉입된 물질의 양이 투여 전 값의 약 70% 이상인 경우도 흔하였다. 때때로 생체내 혈중에서의 봉입된 약물의 절반 방출 시간은 93시간을 초과하였고, 심지어는 120시간을 초과하였다. 캄프토테신 유도체, 예컨대 토포테칸 및 이리노테칸이 로딩된 리포좀 또한 뛰어난 혈중 생체내 안정성을 나타내었으며, 최초 약물 로딩량의 79 내지 85%가 24시간 후에 봉입된 채로 남아 있었다. 현저하게, 본 발명의 리포좀은 혈액 순환 내에서는 그와 같은 낮은 생체내 약물 방출 속도를 갖는 반면, 실질적인 생체내 항종양 활성은 유리 약물(즉 용액으로서 투여된 약물)의 활성을 초과하는 것으로 나타났다.

[0088] 본 발명의 리포좀은 포획된 치료제의 높은 효율과 낮은 독성이라는 예상치 못한 조합을 제공하였다. 일반적으로 본 발명에 따라 리포좀 내에 봉입된 치료용 물질의 활성, 예를 들어 포유동물에서의 캄프토테신 유도체의 항신생물 활성은, 상기 치료제가 일상적인 비-리포좀 제형물을 통해, 예를 들어 본 발명의 리포좀 조성물을 사용하지 않고, 동일한 양으로 투여된 경우의 치료용 물질의 활성에 비해 적어도 동등하거나, 2배 이상 더 높거나, 4배 이상 더 높은 반면, 리포좀에 봉입된 물질의 독성은, 동일한 투여량 및 스케쥴로 투여되지만 봉입되지 않은 유리 형태로 투여되는 동일한 치료용 물질의 독성을 초과하지 않거나, 2배 이상, 3배 이상, 또는 4배 이상 더 낮다. 예를 들어, 공개된 다른 발명의 방법에 의해 항암제 캄프토테신 유도체의 리포좀 봉입은 봉입되지 않은 약물에 비해 증가된 독성(더 낮은 최대 허용 투여량, 더 낮은 50% 치사율 투여량)을 초래한다는 것이 일반적으로 알려져 있다. 미국 특허 제6,355,268호; 미국 특허 제6,465,008호; Colbern 등. *Clinical Cancer Res.* 1998, 제4권, p. 3077-3082; Tardi 등, *Cancer Res.*, 2000, 제60 권, p. 3389-3393; Emerson 등, *Clinical Cancer Res.*, 2000, 제6권, p. 2903-2912를 참조한다. 리포좀 내에 봉입된 캄프토테신 전구약물, 예컨대 수용성이고 양이온성인 캄프토테신 전구약물 유도체인 이리노테칸(CPT-11)은, 생체내 종양 모델에서 평가한 항종양 활성이 리포좀 제형이 부재하는 약물, 예를 들어 유리(용액) 형태의 약물에 비해 실질적으로 더 높고, 예를 들어 4배 이상, 심지어는 10배 더 높다. 이는, 치료제 화합물, 예를 들어 캄프토테신 전구약물이, 예를 들어 내인성 비특이적 카르복실에스터라제의 작용에 의한 효소 활성화를 필요로 하나, 본 발명에 따르면 실질적으로는 리포좀의 내부 공간 내에 봉입되어 있기 때문에, 더욱 특이하다. 한편, 놀랍게도, 본 발명에 따른 리포좀 형태의

CPT-11과 같은 캄프토테신 전구약물(약물/지질 질량비가 0.1 초과, 예를 들어 0.2 내지 0.6 이상)의 독성이 유리(봉입되지 않은) 전구약물 CPT-11의 독성에 비해 2배 초과, 3배 초과, 심지어는 4배 초과로 더 낮았다. 더욱이, 생체내 CPT-11 리포좀으로부터의 약물 방출이 연장되었으며, 최초 약물 함량의 50% 초과, 심지어는 70% 초과(79 내지 86%)가 혈류 내로 투여한 지 24시간 후에서 잔존하였으며, 절반 방출 시간은 24시간을 초과하여 전형적으로 48 시간을 초과하였다. 생체내 리포좀에 약물이 잔존하는 시간이 길어짐과 함께, 항종양 효과도 더 높았다. 놀랍게도, 중합체성 음이온(폴리인산)보다는 오히려 저분자량 다중음이온화 당 유도체(수크로스 옥타술페이트)를 함유하는 리포좀에서 가장 느린 생체내 CPT-11 방출과 가장 높은 항종양 활성이 관찰되었다(실시예 15).

[0089] 본 발명의 또 다른 실시양태에 따르면, 본 발명의 리포좀 조성물은 본 발명의 리포좀 조성물 및 담체, 예를 들어 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 약학적 조성물로서 제공될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는 통상적 염수, 등장성(isotonic) 덱스트로스, 등장성 수크로스, 링거액, 및 행크 용액(Hank's solution)이다. 완충 물질을 첨가하여 보관 안정성을 위해 pH를 최적화시킬 수도 있다. 예를 들어, 약 6.0 내지 약 7.5의 pH, 더욱 바람직하게는 약 6.5의 pH가 리포좀 막 지질의 안정성에 최적이며, 포획된 물질의 우수한 체류를 제공한다. 전형적으로 2 내지 20 mM 농도의 히스티딘, 히드록시에틸피페라진-에틸술포네이트(HEPES), 모르폴리노-에틸술포네이트(MES), 숙신산염, 타르타르산염 및 시트르산염이 예시적인 완충 물질이다. 기타 적당한 담체에는 예를 들어 물, 완충 수용액, 0.4% NaCl, 0.3% 글리신 등이 포함된다. 단백질, 탄수화물 또는 중합체성 안정화제 및 긴장성(tonicity) 조정제, 예를 들어 젤라틴, 알부민, 덱스트란 또는 폴리비닐피롤리돈을 첨가할 수 있다. 조성물의 긴장성은 글루코스, 또는 락토스, 수크로스, 만니톨 또는 덱스트린과 같은 더 불활성인 화합물을 이용하여 생리적 수준인 0.25 내지 0.35 몰/kg으로 조정할 수 있다. 이들 조성물은 통상적이고 잘 알려진 살균기법에 의해, 예를 들어 여과에 의해 살균될 수 있다. 수득된 수용액은 사용을 위해 포장되거나 무균 조건 하에서 여과하고 동결건조할 수도 있으며, 동결건조된 제제는 투여 전에 살균 수성 매질과 조합된다.

[0090] 약학적 리포좀 조성물은 또한 필요에 따라 생리적 조건에 근접하기 위해 다른 약학적으로 허용가능한 보조제(auxiliary), 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 긴장성 조정제 등, 예를 들어 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 등을 함유할 수도 있다. 또한, 리포좀 현탁액은 보관 중에 자유 라디칼 및 지질-과산화성 손상으로부터 지질을 보호하는 지질 보호제를 포함해도 된다. 알파-토코페롤과 같은 친유성 자유 라디칼 제거제(quencher), 및 페리옥사민과 같은 수용성 철-특이적 킬레이트화제가 적당하다.

[0091] 유체 약학적 제형물 중 본 발명의 리포좀의 농도는 광범위하게, 즉 중량비로 통상 약 0.05% 미만 또는 적어도 약 2-10% 내지 30 내지 50%까지 다양할 수 있으며, 선택된 특정 투여방식에 따라 우선적으로 유체 부피, 점도 등에 의해 선택될 것이다. 예를 들어, 농도를 증가시켜 치료에 수반되는 유체 로딩량을 낮출 수도 있다. 이는 죽상동맥경화증과 관련된 울혈성 심부전 또는 심각한 고혈압을 앓는 환자들에 있어 특히 바람직할 것이다. 대안적으로는, 자극성인 지질로 이루어진 리포좀 약학적 조성물을 저농도로 희석시켜 투여 부위에서의 염증을 감소시킬 수도 있다.

[0092] 리포좀 약학적 조성물의 투여량은 리포좀 내부에 포획된 특정 치료용 물질, 치료되는 질환 상태, 사용되는 리포좀의 유형, 및 의료진의 판단에 의존할 것이다. 일반적으로 리포좀 약학적 조성물의 투여량은 치료 유효량의 특별한 치료용 물질을 전달하기에 충분할 것이다.

[0093] 치료 유효량을 전달하는데 필요한 리포좀 약학적 조성물의 양은 약물 시험 분야에서 통상적인 일상적 생체외 및 생체내 방법으로 구해질 수 있다. 예를 들어, [D. B. Budman, A. H. Calvert, E. K. Rowinsky(편저). *항암 약물 개발 핸드북(Handbook of Anticancer Drug Development)*, LWW, 2003]을 참조한다. 각종 치료용 물질을 위한 치료 유효량은 당업자에게 공지되어 있으며; 본 발명에 따라, 본 발명의 약학적 리포좀 조성물을 통해 전달되는 치료용 물질의 활성은, 동일한 양의 상기 치료용 물질을 일상적인 비-리포좀 제형물로 투여하여 얻는 활성에 비해 적어도 동일하거나, 2배, 4배, 또는 10배 더 높다. 전형적으로, 본 발명의 리포좀 약학적 조성물의 투여량은 체중 1 kg 당 치료용 물질 약 0.005 내지 약 500 mg의 범위이며, 가장 빈번하게는 체중 1 kg 당 치료용 물질 약 0.1 내지 약 100 mg이다.

[0094] 전형적으로, 본 발명의 리포좀 약학적 조성물은 액상 용액 또는 현탁액으로서, 국소용 또는 주사용으로 제조된다. 그러나 주사 전에 액상 비히클 내에 용해 또는 현탁시키기에 적당한 고체 형태도 제조할 수 있다. 상기 조성물은 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 장용성(enteric) 코팅 정제 또는 젤 캡슐로 제형화될 수도 있다.

[0095] 본 발명의 리포좀 조성물은, 치료되는 상태 또는 상처에 따라 달라질 수 있는, 의료적으로 허용가능한 임의 방식으로 투여할 수 있다. 가능한 투여 경로에는, 근육내, 피하, 정맥내, 동맥내, 복강내, 관절내, 경막내, 척수

강내 등과 같은 비경구 경로에 의한 주사를 비롯하여, 경구, 비강, 안구, 직장, 질, 국소 또는 예를 들어 흡입에 의한 폐 경로가 포함된다. 본 발명에 따라 제형화된 리포좀 약물을 중추신경계 종양으로 전달하기 위해서는, 리포좀을 종양으로 직접 천천히 지연 방식으로 두개내 주입하는 것이 특히 유리하다. [Saito 등, *Cancer Research*, 제64 권, p. 2572-2579, 2004; Mamot 등, *J. Neuro-Oncology*, 제68 권, p. 1-9, 2004]를 참조한다. 조성물은 또한 조직 표면에 직접 적용될 수도 있다. 예를 들어 데포(depot) 주사, 또는 침식성 임플랜트와 같은 수단에 의한, 지속성 방출, pH 의존성 방출, 또는 기타 특정 화학적 또는 환경 조건을 매개하는 방출 투여도 또한 본 발명에 구체적으로 포함된다.

[0096] [실시예]

[0097] 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로서, 어떠한 방식, 형상 또는 형태로도 본 발명을 명시적으로 또는 암시적으로 제한하지 않는다. 그것들은 사용될 수 있는 것들의 전형예인 바, 당업자에게 공지된 다른 절차, 방법 또는 기술이 대안적으로 사용될 수 있다.

[0098] **실시예 1. 치환된 암모늄 염의 용액의 제조**

[0099] 약물(예컨대, 독소루비신)을 리포좀에 로딩하는데 유용한 트리알킬암모늄 및 디알킬암모늄 술페이트 용액을, 황산을 물로 0.25 M의 농도로 희석한 후, 다양한 아민들 중 하나로 적정함으로써, 제조하였다. 본 실시예에 사용된 치환된 아민은 트리에틸아민, 트리메틸아민, 디메틸아민, 디에틸아민, 또는 디에탄올아민이었다. 아민을 첨가한 후, 수득된 용액을 0.2 M의 치환된 암모늄 염의 최종 농도로 희석하였다. 이슬점 삼투계를 이용하여, 삼투질농도를 구하였다. 수득된 치환된 알킬암모늄 술페이트 염 용액의 성질들이 하기 표 1에 나와 있다.

표 1

[0100] 각종 디알킬암모늄 및 트리알킬암모늄 술페이트 용액의 성질

염	삼투질농도(mmol/kg)	pH
디메틸암모늄 술페이트	472	5.65
디메틸에탄올암모늄 술페이트	509	5.72
디에틸암모늄 술페이트	519	5.85
트리메틸암모늄 술페이트	497	5.81
트리에틸암모늄 술페이트	559	5.33

[0101] **실시예 2. 포획된 디알킬암모늄 및 트리알킬암모늄 염을 갖는 리포좀의 제조, 및 이 리포좀 내의 물질의 로딩**

[0102] 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 콜레스테롤(Chol), 및 N-(메톡시-폴리(에틸렌글리콜)-옥시카르보닐)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민(PEG-DSPE)(분자량이 2,000인 폴리(에틸렌 글리콜)으로부터 제조됨)을 3:2:0.015의 몰비로 클로로포름에 동시 용해시켰고, 클로로포름을 회전 증발에 의해 55 내지 60℃에서 제거하였다. 이어서, 건조된 지질 필름을 30분 동안 60℃에서 실시예 1에 열거된 각 디알킬- 또는 트리알킬암모늄 술페이트의 용액에 수화시켰다. 지질 현탁액을 세공 크기가 0.1 μm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막 필터(코닝 뉴클레포어(Corning Nuclepore))를 통해 압력 하에 압출하였다. 유사 탄성 광산란법에 의해 구해진 리포좀 크기는 대략 110 내지 120 nm였다. 봉입되지 않은 트리알킬암모늄 또는 디알킬암모늄 염을 HEPES-완충 염수(pH 7.2-7.4)로 용리되는 가교결합된 덱스트란 겔(세파덱스(Sephadex) G-75, 아머샴 파마시아 바이오테크놀로지(Amersham Pharmacia Biotechnology)) 칼럼을 이용하여 겔 투과함으로써 리포좀의 외부 매질로부터 외부 매질로부터 제거하였고 리포좀을 독소루비신 히드로클로라이드 USP(1부의 독소루비신 당, 5 중량부의 락토스를 함유하는 동결건조된 분말)의 공극-체적 분획에서 수집하였고, 150 μg 약물/μmol 리포좀 인지질의 농도로 리포좀에 첨가하였다. 혼합물을 45분 동안 55℃에서 인큐베이션하였고, 10분 동안 얼음 상에서 냉각시켰고, 봉입되지 않은 약물을 HEPES-완충 염수(pH 7.4)로 용리되는 세파덱스 G-75 칼럼을 이용한 겔 여과 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 유리 독소루비신의 존재(보다 느리게 이동하는 적색 밴드의 외관에 의해 구별됨)는 시각적으로 검출하지 않았다. 정제된 독소루비신이 로딩된 리포좀을 각기 실시예 70 및 71(분광광도법)에 따라 인지질 및 독소루비신에 대해 분석하였다. 수득된 약물 로딩 효율이 표 2에 나와 있다.

표 2

[0103] 디알킬- 및 트리알킬암모늄 염의 포획된 용액을 갖는 리포좀 내로의 독소루비신의 로딩. 투입 약물/인지질 비 150 μg/μmol.

리포좀에 포획된 염:	리포좀 내 약물/인지질 비 (μg/μmol)	포획 효율(%)
트리메틸암모늄 술페이트	140.74±10.35	93.8±5.7
트리에틸암모늄 술페이트	163.81±16.41	109.2±11.6
디에틸암모늄 술페이트	158.16±18.34	105.4±7.8
디메틸에탄올암모늄 술페이트	155.08±8.51	103.4±11.6

[0104] **실시예 3. 각종 디알킬-, 트리알킬-, 및 헤테로시클릭-치환 암모늄 술페이트 염을 함유하는 리포좀의 제조, 및 이 리포좀 내로의 독소루비신의 로딩**

[0105] 시중 입수가능한 알킬-치환, 히드록시알킬-치환 및 헤테로시클릭 아민을 이용하여 실시예 1에서와 같이 치환된 암모늄 술페이트 염 용액을 제조하였다. 지질 필름 수화 단계 대신에, 순수 지질을 에탄올에 용해시키고(매 50 μmol의 인지질에 대해, 대략 100 μl의 에탄올), 치환된 암모늄 염 용액과 60 내지 65℃에서 혼합하여, 생성된 지질 분산액이 약 10 체적%의 에탄올을 함유하도록 하는 것을 제외하고는, 실시예 1에서와 같이 리포좀을 형성시켰다.

[0106] 독소루비신 용액(HEPES-완충 염수(pH 6.5) 내 2 mg/ml)을 155 μg 약물/μmol 리포좀 인지질(PL)의 비로 리포좀에 첨가하고, 고온수조에서 45분 동안 58℃에서 가열함으로써 독소루비신 로딩을 달성하였다. 수득된 리포좀을 임의의 잔류 봉입되지 않은 독소루비신로부터 분리시켰고, 실시예 1에서와 같이 약물 및 지질 함량에 대해 분석하였다. 결과가 표 3에 나와 있다.

표 3

[0107] 포획된, 입체 장애 및 치환된 알킬, 디알킬-, 트리알킬- 및 헤테로시클릭 암모늄 염 용액을 갖는 리포좀 내로의 독소루비신의 로딩

치환 암모늄 염의 제조에 사용되는 아민	삼투질 농도 (mmol/kg)	약물 로딩량 (mg/인지질 mmol)	로딩 효율 (%)
트리메틸아민	497	149.4±7.9	96.4±4.9
트리에틸아민	559	149.6±6.9	96.5±4.3
디메틸에탄올아민	509	163.1±6.6	105.3±4.5
디메틸아민	472	158.6±7.4	102.3±4.9
디에틸아민	519	156.7±13.0	101.1±8.5
디이소프로필아민	533	159.9±6.2	103.2±4.1
트리스(히드록시메틸)-모노메탄	423	179.9±15.3	116.1±11.5
1-피페리딘에탄올	506	153.5±7.1	99.0±4.5
4-메틸모르폴린	465	152.4±9.8	98.3±6.2
피페리딘	479	158.5±12.5	102.3±8.2
1-메틸피롤리딘	492	153.6±12.3	99.1±7.8
디메틸피페라진	378	158.0±6.5	101.9±4.3

[0108] **실시예 4 . 트리에틸암모늄 폴리포스페이트(TEA-Pn) 용액의 제조**

[0109] 분자당, 선형 나트륨 폴리(포스페이트) 13 내지 18개 포스페이트 단위(포스페이트 유리; 칼곤(CALGON)®, 시그마 케미칼 컴퍼니(Sigma Chemical Company)로부터 입수됨)를 물에 약 1.3 M 포스페이트의 농도로 용해시켰다. 용액을 수소 형태의 120 mL의 술폰화 폴리스티렌-디비닐벤젠 공중합체 양이온 교환 수지 비이드(다우웩스(Dowex) 50W×8-200, 다우 케미칼 컴퍼니(Dow Chemical Co.))로 충진된 칼럼에 통과시켰다. 칼럼을 수성 3 내지 3.6 M HCl로 예비 평형화하여, 수지를 수소 형태로 만들고, 탈이온수로 세정하여 중성 pH로 만들었다. 15 ml의 나트륨 폴리포스페이트 용액을 칼럼에 적용하고, 탈이온 H_2O로 용리하였다. 칼럼 용리액을 전도도 검출기로 모니터하였다. 전도도 피크에 상응하는 칼럼 유출을 순수 트리에틸아민으로 적정하여 pH 5.5 내지 6.0로 만들었다. 용액을 나트륨-민감성 유리 전극을 이용하여 전위차계에 의해 잔류 나트륨에 대해 분석하였고, 실시예 1에서와 같이 무기 포스페이트 검정을 이용하여 포스페이트 함량에 대해 분석하였다. 1% 미만의 잔류 나트륨 함량을 갖는 용액을 0.55 M의 최종 포스페이트 농도로 희석하였다. 용액은 전형적으로 0.52 내지 0.55 M의 TEA 농도, pH 5.5 내지 6.0, 및 430 내지 480 mmol/kg의 삼투질농도를 가진다.

[0110] **실시예 5. 리포좀 제제로부터의 포획되지 않은 폴리포스페이트 염의 제거**

[0111] [Kirpotin 등, *Biochemistry* 36: 66-75, 1997]에 따라, 포획된 형광 마커 8-히드록시파이렌 트리술포네이트를 갖는 리포좀(크기 120 nm)을 제조하였고, 이를 나트륨 폴리포스페이트의 용액과 혼합하였다. 혼합물을 가교결합된 덱스트란 비이드(세파덱스 G-75), 6% 아가로스 비이드(세파로스(Sepharose) 6B-CL), 또는 4% 아가로스 비이드(세파로스 4B-CL)(이 모두는 아머샴 파마시아 제조)를 갖는 크기 제외 칼럼에 로딩하였고, 이를 MES-덱스트로스 완충액(pH 5.5)로 용리하였다. 용리액을, 포스페이트 검정(Bartlett(1959))을 이용하여 포스페이트 함량에 대해 검정하였고, 분광형광계에 의해 리포좀 함량에 대해 검정하였다. 연구된 겔-크로마토그래피 운반 중, 세파로스 CL-6B는 13의 샘플/칼럼층 체적 비에서 리포좀으로부터 폴리포스페이트가 완전 분리되도록 하였다.

[0112] **실시예 6. 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트(TEA-SOS)의 용액의 제조**

[0113] 나트륨 수크로스 옥타술페이트(당량 중량 144.8)는 모든 히드록실기들이 황산 에스테르를 형성한 유도체의 나트륨 염이다. 수크로스 옥타술페이트(SOS) 나트륨 염을 토론토 리서치 케미칼즈(Toronto Research Chemicals(캐나다 토론토 소재)(p/n S699020)로부터 구매하였다. 6 g의 나트륨 수크로스 옥타술페이트를 16.57 ml의 탈이온수에 용해시켜, 약 2.5 N의 술페이트기의 최종 농도를 수득하였다. 용액을 실시예 4에서와 같이 이온 교환에 의해 처리하였다. 이온 교환 칼럼 용리액으로서 수득된 수크로스 옥타술페이트의 용액을 순수 트리에틸아민으로 pH 5.7(중화점)로 중화하였고, 용액의 pH 및 삼투질농도를 구하였다. 수득된 용액은 0.643 M의 계산된 트리에틸암모늄 농도, pH 5.7, 및 530 mmol/kg의 삼투질농도를 가졌다. 잔류 나트륨의 존재는 전위차계에 의해 검출불가능하였다(0.1% 미만).

[0114] **실시예 7. 치환된 암모늄 염을 이용한 이리노테칸(CPT-11)이 로딩된 리포좀:** 혈장의 존재 하에서의 제조 및 생체내 약물 방출

[0115] 이 실시예에서, 술페이트, 시트레이트, 파이로포스페이트, 트리포스페이트, 및 선형 폴리포스페이트(13량체 내지 18량체)를 리포좀-포획된 치환된 암모늄 염 용액 중 음이온으로서 연구하였다. 생체분해성으로 인해, 또한 다른 합성 중합체성 음이온(폴리아크릴레이트, 덱스트란 술페이트 등)과 반대로 폴리포스페이트가 세포에서 자연적으로 발견되기 때문에, 포스페이트 중합체가 선택되었다. 또한, 저분자량의 폴리포스페이트의 용액의 점도는 다른 중합체의 농도보다 낮았고, 이는 폴리포스페이트를 더 공정 친화적으로 만든다.

[0116] 염 용액의 제조를 위해, 하기 물질들을 사용하였다.

[0117] 1. 나트륨 폴리포스페이트, NaO-$[PO_3Na]_n$-Na, n=13-18(시그마로부터 구매)(제품 No. P-8510, "포스페이트 글라스, 실용 등급", 이는 또한 나트륨 헥사메타포스페이트로 알려져 있거나, 칼곤이라는 브랜드명에 의해 알려짐);

[0118] 2. 펜타나트륨 트리폴리포스페이트, $Na_5P_3O_{10}$(시그마로부터 구매)(제품 No. T-5883);

[0119] 3. 테트라나트륨 파이로포스페이트 십수화물, $Na_4P_2O_7$-$10H_2O$(시그마로부터 구매)(제품 No. P-9146).

[0120] 4. 이온 교환 수지 다우웩스 50W×4 (4% 가교결합된 술폰화 폴리스티렌 수지, 100 내지 200 메쉬)(시그마로부터 구매)(제품 No. 50X4-200) 또는 다우웩스 HCR-W2(8% 가교결합된 술폰화 폴리스티렌 수지 50 내지 100 메쉬)(시그마로부터 구매)(제품 No. I-8880)를 상호 혼용하였다. 수지를 하기 순서로 데칸테이션에 의해 세정하였다. 탈이온수로 3회, 1 N HCl로 2회(체적 기준으로 수지에 비해 3× 과량), 물로 3회, 1 N NaOH로 2회, 물로 3회, 1 N HCl로 3회, 및 물로 3회. 데칸테이션 후, 수지는 H^+-형태이었다.

[0121] 5. 트리메틸아민(TMA), 수용액 40%(알드리히 케미칼 코포레이션으로부터 구매)(제품 No. 43,326-8). 산 적정에 의해 농도가 약 5.9 N인 것으로 확립되었다.

[0122] 6. 트리에틸아민(TEA), 99%, HPLC 등급(피셔(Fisher)로부터 구매)(제품 No. 04884). 산 적정에 의해 농도가 약 6.9 내지 7.1 N인 것으로 확립되었다.

[0123] 물을 역삼투, 이온 교환 및 유기물 제거를 통해 정제하여, 유기물 비함유 "16-18 MOhm" 품질을 달성하였다.

[0124] 이온 교환법에 의해 파이로포스페이트, 트리포스페이트, 및 폴리포스페이트 염의 수용액을 제조하였다. 나트륨 폴리포스페이트(25 mL의 물 중 3 g), 파이로포스페이트(27 mL의 물 중 4 g), 또는 폴리포스페이트(30 mL의 물 중 6.7 g)의 용액을 상기와 같이 제조된 100 mL(층 체적)의 이온 교환 수지를 함유하는 칼럼에 로딩하였다. 칼럼을 물로 용리하고, 분획을 수집하였다. 산성 pH(pH<3)를 나타내는 분획을 풀링하였다. 0.5-mL 분취량의 풀링된 분획의 3벌을 20 mL의 물로 희석하고, pH 4.5 내지 5.0의 최종점이 되도록 0.100 N NaOH로 절정하여(피셔 분

석액), 노르말 농도를 구하였다. 이온 교환 후의 풀링된 분획을 pH 5.4 내지 5.5가 되도록 트리메틸아민으로 적정하였다(이에 트리메틸암모늄 염이 수득되었다). 적정 후, 용액을 필요한 경우 희석하여, 0.5 N에 근접한 트리메틸암모늄의 최종 농도를 수득하였다.

[0125] 1.39 mL의 진한 (17.9 M) 황산을 80 mL 물로 희석하고, pH-미터의 조절로 당량점(pH 5.1 내지 5.5)이 되도록 희석된 용액을 순수 트리에틸아민 또는 수성 트리메틸아민으로 적정함으로써, 트리메틸암모늄 및 트리에틸암모늄 술페이트를 제조하였다. 체적을 물로 100 mL가 되도록 조정하였다.

[0126] 1.572 g의 시트르산 일수화물 ACS(시그마로부터 구매)(제품 No. C-1909)을 20 mL의 물에 용해시키고, 당량점이 되도록 용액을 수성 트리메틸아민으로 적정함으로써, 트리메틸암모늄 시트레이트 용액을 제조하였다. 체적을 물로 25 mL가 되도록 조정하였다.

[0127] 용액을 양의 압력을 이용하여 0.2-μm 셀룰로스 아세테이트 필터를 통해 여과하였다. 용액의 삼투질농도 및 pH를, 각기 증기압 삼투계 및 유리-칼로멜 전극 pH-미터를 이용하여 측정하였다. 청색 포스포몰리브데이트 분광광도계 검정에 의해 (포스페이트 용액 중 음이온의 노르말 농도를 구하였다(실시예 70 참조). 산 가수분해(5분, 100℃, 3N H_2SO_4)후, 음이온 노르말 농도는 pH 5.5에서 실질적으로 이온화되는 산성 작용기만을 고려하였다. 부가된 첨가된 트리알킬암모늄 기재물질에 기초하여 양이온 노르말 농도를 구하였다. 수득된 용액은 하기 성질들을 가졌다(표 4):

표 4

[0128] 리포좀에 CPT-11을 로딩하기 위한 치환된 암모늄 염 용액의 성질

염	양이온 노르말농도	음이온 노르말농도	pH	삼투질농도 (mmol/kg)
TMA 시트레이트	0.58	0.60	5.1	791
TMA 술페이트	0.50	0.50	5.4	625
TMA 파이로포스페이트	0.44	0.54	5.4	651
TMA 트리포스페이트	0.57	0.68	5.4	695
TMA 폴리포스페이트	0.49	0.58	5.5	336
TEA 술페이트	0.54	0.50	5.35	719

[0129] 콜레스테롤 및 DSPC는 아반티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids)(미국 알라바마주 알라바스터 소재)로부터 구매되었다. PEG-DSPE(PEG 분자량 2,000)은 쉬어원터 폴리머즈(Shearwater Polymers)(미국 알라바마주 헌츠빌 소재)로부터 구매되었다. 3:1:0.1의 중량비(몰비: 대략 3:2:0.03)의 DSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE를 60 mg DSPC/mL로 클로로포름(피셔; 최적 등급, 아밀렌으로 안정화됨) 중에 용해시켰다. 용액을 관 당 30 mg의 DSPC(0.5 mL)로 파이렉스관으로 분배하였고, 60℃에서 회전 증발기를 이용하여 감압 하에 천천히 증발시켰다. 진공 하(100 마이크론 수은, 오일 펌프)에 실온에서 30 내지 60분 동안 지질 필름을 건조시켰다.

[0130] 건조 지질 필름을 상기 염 수용액에서 60℃에서 15 내지 20분 동안 완만히 쉐이킹함으로써 수화시켰다. 지질은 유백색(milky) 현탁액(다층형 소낭)을 형성하였다. 이 유백색 현탁액을 드라이아이스 및 이소프로판올의 혼합물 중 냉동(-80℃, 3분)하고 3분 동안 60℃에서 수조에서 해동하는 사이클을 5회 수행하였다. 이어서, 지질 현탁액을 60℃에서 가열된 수동 조작 회전 압출기(아반티 폴라 리피즈)를 이용하여 2개의 적층된 폴리카보네이트 막 필터(뉴클레오포어(Nucleopore), 와트만(Whatman), 세공 크기 0.1 μm)를 통해 10회 (이중-스트로크) 압출하였다.

[0131] 압출된 리포좀을 5분 동안 60℃에서 유지시켰고, 5분 동안 얼음(0 내지 4℃)에서 급냉하였다. 이어서, 세파덱스 G-75 상의 겔-크로마토그래피에 의해 리포좀을 구배 형성 염 용액으로부터 로딩 완충액 MES-덱스트로스(50 g/L 덱스트로스 ACS, 0.975 g/L 2-(N-모르폴리노)-에탄술폰산(MES), 및 pH를 6.4로 만들기 위한 충분량의 5 M NaOH)로 분리하였다. 리포좀이 공극 체적 분율로 나타난다(칼럼층 체적의 대략 30%).

[0132] 1 mg의 고체 당 0.860 mg의 CPT-11 기재물질을 함유하는 CPT-11(이리노테칸 히드로클로라이드)을 0.001 N HCl에 용해시켜, 16.5 mg/mL CPT-11 기재물질의 원액을 만들었다. 이 용액을 MES-덱스트로스 완충액 중 리포좀과 혼합하여, 1 μmol의 리포좀 인지질 당 150 μg CPT-11의 비를 달성하였다. 혼합물을 수조에서 55℃에서 인큐베이션하였고, 가끔 30분 동안 (대략 매 5분 마다) 완만히 흔든 후, 얼음물(0 내지 4℃) 중에서 급속히 급냉하였다. MES-덱스트로스를 용리액으로 이용하는 세파덱스 G-75 상의 겔-크로마토그래피에 의해 리포좀을 봉입되지

않은 약물로부터 분리하였다. 봉입된 약물을 분광광도계 검정에 의해 구하였고(실시예 71), 인지질을 추출 검정을 이용하여 구하였다(실시예 70).

[0133] 50% 인간 혈장의 존재 하에 상기와 같이 수득된 CPT-11이 로딩된 리포좀으로부터의 생체외 약물 방출을 하기와 같이 연구하였다. 냉동된 인간 공여자 혈장을 37℃에서 해동하고, 10분 동안 14,500 g에서 원심분리하였고, 0.45-μm 셀룰로스 아세테이트 시린지 필터를 통해 여과하였다. CPT-1이 로딩된 리포좀 제제를 0.2-μm 계면활성제-비포함 셀룰로스 아세테이트(SFCA) 무균 시린지 필터에 통과시킴으로써 살균하였다. 0.5-mL의 리포좀을 무균 1.5-mL 공중합체 에펜도르프관 내의 0.5 mL의 혈장과 혼합하고, 봉지하여, 24시간 동안 37℃에서 로킹(rocking) 플랫폼에서 인큐베이션하였다. 블랭크 샘플은 리포좀 대신에 0.5 mL의 무균 MES-덱스트로스를 함유하였다. 144 mM NaCl, 5 mM HEPES-Na, pH 7.4 완충액(HBS-5)을 이용하는, 비드형 가교결합된 2% 아가로스 겔(세파로스 CL-2B, 파마시아(Pharmacia); 10 mL 층 체적) 상의 겔-크로마토그래피에 이해 리포좀을 단리하였다. 리포좀이 공극 체적 분율로 나타났고, 한편 혈장 단백질 및 방출된 약물(존재하는 경우에 한해)을 겔에 의해 지연시켰다. 리포좀 분율을 CPT-11 및 인지질에 대해 검정하였고, 약물/인지질 비(산출 비)를 구하였다. 블랭크 샘플(혈장만 있음)의 측정값을 리포좀을 함유하는 샘플의 측정값에서 뺀다. 인큐베이션 후의 리포좀 내에 남아 있는 약물의 퍼센티지를, 산출 약물/지질 비를 약물/지질 비(플라즈마와 인큐베이션하기 전의 약물/지질 비)로 나눔으로써 구한다. 로딩 및 방출 데이터가 표 5에 요약되어 있다.

표 5

[0134] 3차 알킬암모늄 염을 이용한 리포좀 내로의 CPT-11의 로딩, 및 인간 혈장의 존재 하에서의 약물의 생체외 방출

포획된 염 용액	혈장과 함께 인큐베이션하기 전		혈장과 함께 인큐베이션한 후	
	약물/지질 비	봉입 효율(%)	약물/지질 비	봉입된 채로 남아 있는 약물(%)
TMA 술페이트	127.2±5.6	84.8±3.8	132.1±6.9	103.8±10.0
TMA 파이로포스페이트	136.2±9.0	90.8±6.0	132.3±5.0	97.1±10.1
TMA 트리포스페이트	132.9	88.6	129.2	97.3
TMA-Pn	134.4±9.3	89.6±6.2	135.0±7.4	100.4±12.4
TEA 술페이트	131.1±6.5	87.4±4.4	125.2±5.0	95.5±8.6

[0135] **실시예 8. 파이로포스페이트, 트리포스페이트, 폴리포스페이트, 시트레이트 및 술페이트 트리알킬암모늄 염을 이용하여 CPT-11이 로딩된 리포좀의 생체내 안정성**

[0136] 캄프토테신 리포좀은 생체외 혈장에서의 허용가능한 약물 누출을 나타낼 수 있으나, 약물은 생체내 혈액 순환에서 더욱 급속히 누출할 수 있다. 그러므로, CPT-11 리포좀 재형물의 패널을 마우스에서의 단일 시점 검정을 이용하여 생체내 혈액 순환에서 약물 안정성에 대해 스크리닝하였다.

[0137] 리포좀을 제조하여, 실시예 6에 기재된 바와 같이, 단 하기와 같이 변형하여, 그것에 CPT-11을 로딩하였다. 쉬어워터 폴리머즈사제 PEG-DSPE를 이용하는 대신에, 본인들은 아반티 폴라 리피즈사제의 유사한 PEG-DSPE를 사용하였다. 혈액/조직 샘플 내의 리포좀 지질 매트릭스의 정량화를 위해, 교환불가능한 방사능표지, [H]-콜레스테릴 헥사데실 에테르([^{3}H]-CHE; (아머샴, 미국 소재)를 0.25 mCi/mmol 인지질의 양으로 지질의 클로로포름 용액에 첨가하였다. 지질 용액을 파이렉스관에 12 mg의 DSPC/관으로 분배하고, 회전 증발/진공 건조에 의해 지질 필름을 형성시켰다. 지질 필름을 0.7 mL의 구배 형성 치환된 암모늄 염 용액 중에서 수화하였다. 포획된 포스페이트를 함유하는 염을 갖는 리포좀 내의 지질 농도를 방사능 섬광 계수에 의해 구하였다. 포획된 포스페이트를 함유하는 염이 없는 제제를 또한 실시예 70에 기재된 바와 같은 추출없이 인지질에 대해 검정하였고, 지질 방사능 표준물질로서 사용하였다. 로딩을 위해 제조된 리포좀-약물 혼합물이 부분을 따로 남겨두어, 로딩 전에 리포좀 지질에 대한 첨가된 CPT-11의 로딩전 비("유입 비")를 확인하기 위해 검정하였다. 리포좀 크기 분포의 체적 기준 평균 및 표준 편차를 가우스 모델을 이용하여 유사-탄성 광 산란(QELS)에 의해 구하였다. 이 리포좀들의 성질들이 표 6에 나와 있다.

표 6

[0138] 생체내 안정성 연구를 위한, [^{3}H]-CHE-표지 리포좀 내로의 CPT-11 로딩의 특징화

포획된 염 용액	로딩 전 약물/지질 비	로딩 후 약물/지질 비	로딩 효율(%)	리포좀 크기 (평균±SD)nm
TMA 시트레이트	159.2±3.5	156.7±3.6	98.5±4.4	122.1±25.3
TMA 술페이트	156.1±2.5	156.1±3.1	100.0±3.6	122.2±28.4
TMA 파이로포스페이트	164.6±5.8	156.6±4.3	95.2±6.0	121.1±19.9
TMA 트리포스페이트	163.6±5.7	156.0±3.2	95.3±5.3	122.4±12.9
TMA 폴리포스페이트	170.5±8.0	162.4±4.0	95.3±6.8	123.0±12.7
TEA 술페이트	153.±3.3	154.9±4.9	101.0±5.3	121.1±18.0

[0139] 6주령 암컷 CD-1 마우스(차알스 리버(Charles River))에 중복으로 10 mg/kg(0.2 mg CPT-11/마우스)의 투여량으로 이 리포좀형 CPT-11 제형물을 꼬리 정맥 주사하였다. 8시간 후에, 마우스를 마취하였고, 개방 심장 천자를 통해 방혈하였다. 혈액을 항응고화 시린지에 수집하여(10 내지 20 μl의 1000 U/ml 헤파린 USP), 얼음 상에 유지된 0.04% EDTA(기브코(Gibco) BRL)를 함유하는 0.4 ml의 포스페이트-완충 생리염수 용액(PBS)을 함유하는 칭량된 관에 옮겼다. 관을 칭량하여, 혈액 샘플의 중량을 구하였고, 5분 동안 9,000 g에서 원심분리함으로써 혈액 세포를 분리하였으며, PBS로 희석된 혈장을 갖는 상등액을 따로 두어 약물 및 리포좀 지질 검정을 행하였다. CPT-11을 형광측정 검정에 의해 정량화하였다(실시예 71). 리포좀 지질을 급냉-보정 방사능 섬광 계수를 이용하여 정량화하였다. 리포좀 및 인지질-방사능 표준물질을 혈장 샘플과 나란히 계수하였다. 혈장 샘플에서의 약물/방사능 비를 주사된 리포좀의 약물/방사능 비로 나눔으로써, 봉입된 채로 남아 있는 약물의 퍼센트를 계산하였다. 혈액으로부터 유리 CPT-11가 빨리 제거되고(실시예 69 참조), 지질 교환에 대해 공지된 바 [^{3}H]-CHE이 안정하기 때문에, 검정의 측정값들은 리포좀형 CPT-11 및 지질의 혈중 함량을 나타내는 것으로 간주되었다. 순환에 남아 있는 주사된 지질 용량의 퍼센트(% I.D.)는 순환으로 들어간 주사된 볼루스가 100%인 것으로 간주하여 계산하였고; 혈액 체적은 마우스 체중의 6.3%였으며, 혈구용적율이 45%였다. 결과가 표 7에 요약되어 있다.

표 7

[0140] 주사 후 단일 시점(8시간)에서 마우스에서의 CPT-11이 로딩된 리포좀의 순환 지속성 및 CPT-11-봉입의 생체내 안정성. %I.D.: 주사량에 대한 %.

리포좀에 포획된 염	약물/지질 비(주사전 값에 대한 %)	리포좀 지질(혈중 %I.D.)
TMA 시트레이트	80.2±7.8	18.8±3.4
TMA 술페이트	70.1±4.8	23.6±1.8
TMA 파이로포스페이트	67.3±9.2	23.2±3.1
TMA 트리포스페이트	70.6±6.0	24.9±8.2
TMA 폴리포스페이트	107.5±8.9	24.3±3.4
TEA 술페이트	76.6±13.1	23.6±0.1

[0141] 모든 제제들은 생체내 혈중에서 8시간 후의 약물 봉입의 수준이 주사전 수준의 70 내지 80%이었고, 한편 폴리포스페이트를 함유하는 리포좀이 가장 안정하였음(약물 봉입은 약 100%로 유지됨)을 나타냈다.

[0142] **실시예 9. 트리에틸암모늄 폴리포스페이트를 이용하여 제조된 CPT-11 리포좀의 혈중 약물동태**

[0143] 트리에틸암모늄 폴리포스페이트 염을 이용한 리포좀형 CPT-11의 제형물을 실시예 3에 나와 있는 바와 같이 제조하였다. 지질-DSPC, 콜레스테롤, 및 N-(메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)(분자량 2000)-옥시카르보닐)-DSPE(PEG-DSPE)(이 모두 아반티 폴라 리피즈 인코포레이티드 제조)를 3:2:0.015의 몰비로 건조 분말로서 조합하였고, 62 내지 65℃에서 100% 에탄올(USP급, 대략 0.15 mL/100 mg의 지질)에 용해시켰다. 약물동태 연구를 위해, H-콜레스테릴 헥사데실 에테르(^{3}H-CHE, 아머샴 파마시아로부터 구입)를 교환불가능한 방사능 지질 표지로서 0.5 mCi/mmol의 인지질의 양으로 지질에 첨가하였다. TEA-Pn(0.5 M 트리에틸암모늄, pH 5.7-6.2)의 수용액을 실시예 4에서와 같이 제조하였다. TEA-Pn 용액(첨가된 에탄올의 체적의 10배)을 60 내지 65℃에서 지질 용액과 혼합하였고, 다중층 소낭의 균질한 유백색 현탁액이 형성될 때까지 그 온도에서 교반하였다. 이 현탁액을 60 내지 65℃에서 아르곤 압력 압출기(리펙스 바이오멤브레인즈(Lipex Biomembranes)를 이용하여, 세공 크기가 100 nm인 2개의 적층 폴리카보네이트 트랙으로 에칭 필터(코닝 뉴크레포어(Corning Nuclepore))를 통해 15회 압출하였고,

생성되는 단층 리포좀을 얼음 상에서 급속히 냉각시킨 후, 상온을 달성하도록 두었다. MES-덱스트로스 완충액(5 mM MES, 50 g/L 덱스트로스, NaOH로 pH를 6.5로 조정함)로 용리되는, 세파로스 CL-4B 칼럼 상의 겔 크로마토그래피에 의해, 에탄올 및 비혼입된 폴리포스페이트 염을 제거하였다.

[0144] 물 중 20 mg/mL 이리노테칸 기재물질을 함유하는 CPT-11(이리노테칸 히드로클로라이드)의 원액을 150 내지 200 mg/인지질 mmol의 약물/지질 비로 리포좀에 첨가하였고, 혼합물을 60 내지 62℃에서 45 내지 60분 동안 가끔 교반 하에 인큐베이션하였다. 인큐베이션 혼합물을 급속히 냉각시키고, 0℃에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 상온을 달성하도록 하였다. 2.88 M NaCl의 체적의 1/20을 첨가하여, 생리학적 이온 강도를 조정하고, (리포좀 내부 내에 봉입된 약물과 반대로) 막-결합 CPT-11의 제거를 향상시켰다. 봉입되지 않은 약물을 HBS-6.5 완충액(5 mM 2-(4-(2-히드록시에틸)-피페라지노)-에틸술폰산(HEPES), 144 mM NaCl, pH 6.5)로 용리되는 세파덱스 G-25 또는 G-75 칼럼(아머샴 파마시아) 상의 겔 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 공극 체적에서 용리된 리포좀 분획을 조합하였고, 0.2 마이크론 여과로 살균하였으며, 4 내지 6℃에서 저장한 후, 사용하였다. 리포좀을 실시예 7에서와 같이 지질 농도, 약물 농도, 및 입자 크기로 특징화하였다. 리포좀은 108 nm의 평균 크기, 및 139±18 mg의 CPT-11 기재물질/mmol 인지질의 CPT-11 함량을 가졌다.

[0145] 혈중에서의 리포좀 지질 및 리포좀 약물의 지속성, 및 생체내 리포좀으로부터의 약물 방출의 특성을 중심 정맥 카테터가 유치된 암컷 스프라그-도우리(Sprague-Dawley) 래트(190 내지 210 g)에서 연구하였다. 래트에 ^{3}H-CHE-표지 이리노테칸 리포좀(0.05 mmol 인지질, 또는 7 내지 8 mg CPT-11/kg 체중)의 0.2-0.3 mL 볼루스를 주사하였다. 혈액 샘플(0.2 내지 0.3 mL)을 헤파린-처리 시린지를 이용하여 주사후 각종 회수로 인취하였다. 회수된 혈액 체적을 포스페이트 완충 생리염수를 이용하여 보충하였다. 혈액 샘플을 0.04% EDTA를 함유하는 0.3 ml의 빙냉 PBS로 희석하였고, 혈액 세포를 원심분리에 의해 분리하였다. 상등액 유체를 수집하여, 실시예 71의 형광 측정 절차를 이용하여 CPT-11에 대해 검정하였고, 통상적 방법을 이용하여 섬광 방사능에 의해 리포좀 지질 표지에 대해 검정하였다. 기지의 약물 및 ^{3}H-CHE-지질 농도를 갖는 리포좀 제제를 표준물질로 사용하였다. 방사능 표준물질은 급냉을 위해 동등량의 희석된 래트 혈장을 함유한다. 혈액 체적(ml)을 체중(g)의 6.5%로 가정하고, 혈구용적율을 40%로 가정하여, 혈중 CPT-11 및 리포좀 지질의 양을 계산하였다. 혈중 지질 및 약물의 총 양을 주사된 투여량에 대한 %(% I.D., %ID)로서 표현하였고, 주사후 시간에 대해 플로팅하였다. 혈액 샘플 내의 약물/지질 비를 주사된 리포좀(100%로 봄) 내의 약물/지질 비로 나눔으로써 리포좀 내에 남아 있는 약물의 퍼센트를 계산하였다. 플로트가 일반적으로 단차 지수적(monoexponential) 역학관계와 양호하게 일치함(반대수 스케일에 있어 선형성)을 나타냈기 때문에, 리포좀으로부터의 약물 방출, 및 지질 및 약물의 혈중 반감기를 마이크로소프트 엑셀(Microsoft EXCEL) 컴퓨터 프로그램(마이크로소프트 코포레이션(Microsoft Corp.), 미국 소재)의 트렌드(TREND) 옵션을 이용하여 단차 지수적 붕괴 방정식에 데이터를 최적으로 적합화하여 계산하였다. 선택. 결과가도 1에 나와 있다. 최적 적합화 파라미터로부터, 지질 및 약물에 대한 혈중 반감기는 각기 16.4시간 및 6.61시간이었다. 이 조건 하에서, 유리 CPT-11는 순환으로부터 매우 빨리 제거된다(실시예 69 참조).

[0146] 혈액 약물/지질 비는 리포좀으로부터의 CPT-11 방출의 이상 특성을 나타냈다(도 2). 처음 24시간에, 이어지는 약물 방출은 시간 경과에 대해 선형이었고(R=0.992), 이는 0차 방출 역학관계를 입증한다. 단지 약물의 약 75%가 24시간 시점에서 방출된 후에야, 추가적 방출이 비선형으로 되었다. 24시간 동안, 리포좀은 약 3.5%의 초기 로딩량/시간의 일정 속도로 약물을 방출하였다. 이에 따라, 약물의 50%는 대략 14시간에 걸쳐 방출되었다. 약물의 0차 방출은 약물 방출 속도가 경시적으로 일정하게 유지됨에 따라 지연 방출 제형물에서 선호적인 특질이다.

[0147] **실시예 10. 누드 마우스에서의 유방암 이종이식에 대한 트리에틸암모늄 폴리포스페이트를 이용하여 제조된 CPT-11 리포좀의 항종양 효능**

[0148] CPT-11 리포좀의 항종양 효능을 인간 유방암종 BT-474, 즉 C-ErbB2(HER2) 수용체를 과발현하는 에스트로겐-의존성 관샘암의 모델에서 연구하였다. BT-474 세포를 미국 모식균배양수집 협회(American Type Culture Collection)(미국 매릴랜드주 록크빌 소재)로부터 입수하였다. 보다 높은 종양 성장 속도를 갖는 BT-474 서브-라인이 이하 기재된 바와 같이 성장된 고속 성장 이종이식 종양 결절로부터 확립되었다. 세포를 T-150 플라스크에서 10% 우아 혈청, 0.1 mg/mL 스트렙토마이신 술페이트, 및 100 U/ml 페니실린 G를 갖는 RPMI-1460 매질 중에 생체외 번식시켰고, 매주 1:3으로 나누었다. NCR *nu/nu* 암컷 마우스(4-6 주령; 타코닉 팜즈(Taconic Farms))를 60-일 지연 방출 0.72-mg 17β-에스트란디올 펠렛(인노베이티브 리서치 오브 아메리카 인코포레이티드(Innovative Research of America, Inc.))을 (테일 기저에) 피하 이식하였고, 2일 후에 세포 성장 매질 중에 2×10^{7} BT-474 세포를 함유하는 0.1 mL 현탁액을 상부 배면부에 피하 접종하였다. 종양 진행을 매주 1회 최장(길이)축 및 최단(폭)축을 따라 종양의 촉진 및 측경기(caliper) 측정에 의해 모니터하였다. 하기 방정식을 이

용하여 측경기 측정으로 매주 2회 종양 크기를 구하였다(Geran, R.I. 등, 1972 *Cancer Chemother. Rep.* 3:1-88):

[0149] 종양 체적 = [(길이)×(폭)^2]/2

[0150] 접촉한지 13일 후에, 종양은 200 mm^{3}의 평균 크기에 도달하였고, 동물을 13-15마리 동물의 3군으로 무작위로 분류하였다.

[0151] 리포좀형 CPT-11을 실시예 8에서와 같이(약물/인지질 비: 192 mg/mmol; 평균 리포좀 크기: 86.8 nm) 제조하였다. 유리 및 리포좀형 CPT-11을 MES-덱스트로스 비히클로 5 mg/ml의 CPT-11 기재로 희석하였고, 동물에 대해 꼬리 정맥을 통해 접종 후 단지 14, 18, 21, 및 25일에만 유리 CPT-11, 리포좀형 CPT-11, 또는 비히클 단독을 주사하였다. 약물을 함유하는 제형물을, 쥐과동물 종양 모델에서의 CPT-11 연구에 대해 문헌에 보고된 투여량의 평균인 50 mg CPT-11/kg/주사의 투여량으로 제공하였다.

[0152] 처리-관련 독성을 평가하기 위해, 동물을 또한 매주 2회 체중을 측정하였고, 에스트로겐 보충 펠렛이 소진되는 때인 접종 후 60일까지 관찰을 행하였다. 군들 전반에 걸치 평균 종양 체적을 함께 플로팅하여 시간 경과에 대해 비교하였다. 도 3에 나와 있는 바와 같이, 유리 CPT-11는 현저하게 퇴보한 리포좀형 처리 종양을 받은 군에서 종양 성장 속도를 감소시켰다. 대조군에서 36일에 종양은 평균 3,500 mm^{3}인 최대 크기에 도달하였고, 유리 약물 종양으로 처리된 군에서 46일에 평균 약 1,000 mm^{3}이었으며, 그와 동시에 리포좀으로 처리된 군에서는 모든 동물이 촉진가능(palpable) 종양을 가지지 않았다.

[0153] 처리 관련 독성을 동물의 체중의 역학관계에 의해 평가하였다(도 4). 어떠한 군도 임의의 유의적 독성을 나타내지 않았다. 대조군에서의 동물의 체중은 일관되게 증가하고 있었다. 리포좀형 CPT-11을 받은 동물의 평균 체중은 마지막 처리 일에 약 3.3% 정도 약간 감소하였다. 그러나 이 체중 감량은 역전되었고, 동물은 예상 체중에 도달하였다. 이러한 평균 체중의 감소는 처리전 체중에 비해 스튜던트 t-테스트(Student's t-test)에 의해 통계적으로 유의적이지 않았다(p=0.274). 이에 따라, 모든 처리들은 유의적 독성없이 허용되었다.

[0154] 이에 따라, 다중음이온성, 생분해성 중합체(폴리포스페이트)의 예비포획된 입체 장애 치환된 암모늄 염(트리에틸암모늄)을 통해 약물을 로딩함으로써 수득된 CPT-11의 리포좀 제형물은 독성의 상당한 증가 없이, 연구된 종양 모델에서 연장된 혈액 수명, 지연 방출 특성, 및 증가된 항종양 활성을 나타냈다.

[0155] **실시예 11. 예비포획된 트리에틸암모늄 염을 이용하여 제조된 CPT-11이 로딩된 리포좀의 비교 평가: 리포좀 크기, 약물/지질 비, 및 예비포획된 음이온의 성질의 영향**

[0156] CPT-11이 로딩된 리포좀의 2개의 원형 제형물을 제조하였으며, 즉 그 중 하나는 예비포획된 TEA-Pn를 갖는 리포좀을 이용하여 제조되었고, 다른 하나는 예비포획된 TEA-SOS를 갖는 리포좀을 이용하여 제조되었다. 이 리포좀의 제조에는 하기 단계들을 포함였다:

[0157] *1) 에탄올 내의 동시 용해에 의한 지질 조합.* 지질 매트릭스 조성물은 1,2-디스테아로일-SN-포스파티딜콜린(DSPC)(분자량 790) 3 몰부(59.8 몰%); 콜레스테롤(Chol)(분자량 387) 2 몰부(39.9 몰%); N-(오메가-메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)-옥시카르보닐)-1,2-디스테아로일포스파티딜 에탄올아민(분자량 2787)(PEG-DSPE) 0.015 몰부(대략 0.3 몰%)로 구성되었다. DSPC 및 PEG-DSPE는 아반티 폴라 리피즈(미국 알라바마주 버밍검 소재)로부터 구매되었다. 콜레스테롤(최고 순도 등급)은 칼바이오켐(Calbiochem)으로부터 구매되었다. 건조 지질을 보로실리케이트 유리 용기에서 ±0.1 mg의 정확도로 칭량하였고, 이하 지질 분산 단계에 적당한 비로 무수 에탄올과 조합하였다. DSPC의 높은 전이온도(55℃)로 인해, 전형적으로 투명 용액이 수득될 때까지 55 내지 60℃에서 용해를 수행하였다.

[0158] 2) *TEA-Pn 및 TEA-SOS 용액의 제조.* 나트륨 폴리포스페이트(n=13-18)를 시그마 케미칼 컴퍼니로부터 구매하였다(p/n P 8510). 나트륨 수크오로스 옥타술페이트를 토론토 리서치 케미칼즈(Toronto Research Chemicals)(캐나다 토론토 소재)로 구매하였다(p/n S699020). 염을 칭량하고 물에 용해시켜, 1.2 내지 2.5 N 용액을 제공하였다. 음이온 교환자 다우웩스 50W×8-200 또는 다우웩스 HCR-W2(H^+-형태)(시그마로부터 입수가능함)를 사용하여, 나트륨 염을 유리 산으로 전환시켰다. 처음 사용하기 전에, 수지를 3 체적의 하기 용액과 함께 세정한 후, 데칸테이션하였다: (1) 1.0 내지 1.2 M 수성 HCl 2회; (2) 물 2회; (3) 1.0 내지 1.2 M 수성 NaOH 2회; (4) 물 2회; (5) 1.0 내지 1.2 M 수성 HCl 2회. 물 중 세정된 수지의 현탁액을 적당한 크기 크로마토그래피 칼럼에서의 중량 유동 하에 팩킹하여, 나트륨 염 용액의 1 ml 당, 패킹된 수지를 8 ml 이상 가지도록 하였다.

수지를 2 칼럼 체적의 3.0 내지 3.6 M 수성 HCl을 통과시킨 후, 5 칼럼 체적의 물을 통과시킴으로써, 또는 용리액의 전도도가 1 마이크로-So 미만으로 떨어질 때까지 추가로 평형화하였다. 사용 후, 칼럼을 1 내지 1.2 M HCl - 3 칼럼 체적; 3.0 내지 3.6 M HCl - 2 칼럼 체적; 물 - 5 칼럼 체적 이상을 순차적으로 통과시킴으로써, 또는 용리액의 전도도가 1 μS 미만으로 떨어질 때까지 재생시키고, 실온에서 0.2-μm 여과수 하에 저장하였다. Pn 및 SOS 나트륨 염 용액을 칼럼의 배수 표면에 적용하였고(각 4 ml의 팩킹된 수지 체적에 대해 대략 1 ml), 75 내지 150 mL의 수지층 크기에 대해 약 1-2 ml/min의 속도로 중력 하에 유동시켰다. 칼럼을 물로 용리하였다. 용리액을 전도도에 대해 시험하였다. 10 mS 이상의 전도도를 갖는 분획을 수집하였다. 다중산의 더욱 농축된 용액이 필요하고, 수집은 20 내지 50 mS에서 시작할 수 있으나, 그에 대한 대가로 구배 형성 염의 손실이 다소 보다 높게 된다. 폴리인산의 경우, 수집된 용액을 낮은 pH에서 포스포디에스테르의 가수분해 불안정성으로 인해, 아민 적정 단계까지 냉각(0 내지 4℃) 유지된다. 수집된 용리액은 0.7 미만(전형적으로는 약 0 내지 4)의 pH, 및 약 120 내지 200 mS의 전도도를 가지게 된다. 임의적으로, 폴리포스페이트가 낮은 pH에서 안정하기 때문에 지체없이 아민 적정 단계를 수행한다. HPLC-등급 트리에틸아민(99.5+% 순도)(피셔, p/n 04884)을 사용하여 이온 교환으로 수득된 산 용액을 적정하였다. 순수 TEA의 노르말 농도를 침전 적정에 의해 구하였다. 0.100-mL 분취량의 TEA(0.100 ml)을 3벌로 20 ml의 물에 취한다. 분취량을 0.1 N HCl 표준 용액으로 5.5 내지 6.0의 pH 종점(유리 전극)까지 적정한다. 계산된 노르말 농도(7.07 N)는 7.17 N의 이론치에 근접하였다. 폴리인(Pn)산 또는 수크로스 옥타술페이트(SOS)산 용액의 측정된 체적을 pH (유리) 전극의 조절 하에 순수 TEA로 적정하였다. 아민을 분산시키기 위해 철저한 교반이 필요하였다. 적정 종점은 pH 5.6-6.2이었다. 첨가된 TEA의 체적을 정확히 기록하였다. 첨가된 TEA 체적 및 노르말 농도에 기초하여 적정된 용액의 체적을 측정하였고, TEA의 농도를 계산하였다. 필요한 경우, 물을 첨가하여, TEA 농도를 이하 명시된 바와 같은 필요한 0.55±0.05 N 또는 0.65±0.03 N으로 조정하였다. 수득된 TEA-Pn 또는 TEA-SOS 용액 중의 잔류 나트륨의 양을 나트륨-선택적 유리 전극(코닝(Coming))을 이용하여 전위차계에 의해 구하였다. 1 mL의 용액을 19 mL의 물로 희석하였고, 전극 제조자의 매뉴얼에 따른 증강법을 이용하여 나트륨 농도를 구하였다. 잔류 나트륨의 양은 1 mM 미만, 전형적으로는 0.5 mM 미만이었다. 수득된 TEA-Pn 또는 TEA-SOS 용액을 포지티브 압력 공급을 이용하여 0.2 μm 셀룰로스 아세테이트 무균 필터에 통과시켰다. 용액의 최종 pH 및 삼투질농도를 측정하여 기록하였다. 본 발명자들은 pH 측정을 위해 pH 칼로멜 마이크로-조합의 완전 유리 전극을 이용하고, 삼투질농도 측정을 위해 증기압/이슬점 삼투계를 사용한다. 용액을 사용 시까지 냉각 저장하였다.

[0159] *3). 지질의 에탄올성 용액 및 구배 형성 완충액의 혼합에 의한 구배 형성 완충액 중 지질 분산액의 제조.* 지질을 에탄올 혼합 방법을 이용하여 구배 형성 염 용액에 분산시켰다. 모든 단계들을 60 내지 65℃에서 수행하였다. 내약품성 유리 배모양 플라스크 또는 관에서 약 0.5 내지 0.6 M의 DSPC의 농도로 지질을 100% 에탄올 USP에 용해시켰다. 구배 형성 염 용액(TEA-Pn 또는 TEA-SOS)를 60 내지 65℃로 예비 가온하여, 에탄올성 지질 용액에 한번에 첨가하였고, 성분들을 와류 및/또는 보어텍싱에 의해 철저히 교반하였다. 에탄올의 최종 양은 약 10 체적%이었다. 과량 0.1 mmol 인지질의 규모를 제조하기 위해, 생성된 현탁액을 60 내지 65℃의 회전 증발기에 두었고, 폼 형성 종료에 의해 나타내어지는 에탄올의 진화의 중단 시까지 회전으로 진공화하였다. 0.1 mmol 인지질 이하의 규모를 위해, 이 단계에서 지질 분산액에서 에탄올이 제거되지 않았다. 생성된 지질 현탁액을 60 내지 65℃에 유지시켰고, 압출 단계를 위해 신속히 사용하였다.

[0160] *4). 한정된 세공 막을 통한 지질 분산액의 순차적 압출.* 1 mL 이하의 지질 현탁액 체적을 위해, 본 발명자들은 아반티 폴라 리피즈에 의해 공급되는 수동 조작 회전 압출기를 사용하였다. 압출기에는 19 mm 트랙으로 에칭된 필터 막이 충진되고, 금속 가열 블록으로 인해 자동 온도 조절된다. 1 내지 10 mL의 체적을 위해, 본 발명자들은 자동 온도 조절되고 기체 압력 작동되는 단일 방향성 유동 압출기(리펙스 바이오멤브레인즈(Lipex Bioemembranes)를 사용하였다. 압출기에 25 mm 필터 막을 충진한다. 지질 현탁액을 수동 공급 또는 아르곤 기체 압력을 이용하여, 적당한 경우에는 100 nm, 80 nm, 또는 50 nm의 정상적 세공 크기를 갖는 일련의 2개의 적층된 폴리카보네이트 막 필터(코닝-뉴클레포어 및 오스모닉스 코포레이션(Osmonics Corp) 제조의 필터가 동등하게 적당함)를 통해60 내지 65℃에서 반복 압출하였다. 리포좀 크기의 영향이 관심 대상인 경우, 100 nm, 80 nm, 또는 50 nm 단계에서 압출을 중단하였다. 사용된 필터의 정확한 유형 및 압출 수가 각 실험에 대해 이하에 나와 있다. 압출된 리포좀을 약 15분 동안 60 내지 65℃에서 유지시켰고, 빙조에서 급속히 2-4℃로 냉각시켰다. 빙조에서 약 15분 후, 리포좀이 실온에 도달하도록 하였다.

[0161] *5). 리포좀 외 구배 형성 완충액의 제거 및 리포좀의 약물-로딩 완충액으로의 이동.* 봉입되지 않은 구배 형성 염을 제거하였고, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용하여 리포좀을 약물 로딩 완충액으로 이동시켰다. 다른 측정가능 단계의 접선 유동 여과, 중공 섬유 투석을 스케일-업 제조에 사용할 수 있다. 리포좀을 음이온-교환 수지(예컨대, 다우웩스-1 또는 다우웩스-2 4차 암모늄 가교결합된 폴리스티렌 비이드)로 처리함으로써 리포좀외

다중음이온의 완전 제거를 확실히 하는 것이 유리하다. 약물-로딩 완충액은 NaOH로 pH 6.5로 조정된, 물 중 5 mM 조직-배양 인증 HEPES 및 50 g/L 무수 덱스트로스 USP를 함유하였다. 완충액을 0.2 마이크론 나일론 필터(와트만)을 통해 진공 여과하였다. 압출된 리포좀을 세파로스 CL-4B(파마시아)를 갖는 칼럼 상에 크로마토그래피로 정제하였고, 약물-로딩 완충액으로 용리하였다. 리포좀은 공극 체적 분획에서 나타났고, 적용된 체적의 약 2x인 체적에서, 용리액 탁도에 기초하여 수집되었다. 용리된 리포좀을 실시예 70에 따라 인지질 농도에 대해 검정하였고 입자 크기는 QELS에 의해 검정하였으며, 4-6℃에서 저장하였다.

[0162] *6) 리포좀 및 약물의 인큐베이션.* 물 중 이리노테칸 히드로클로라이드를 용해시켜 20 mg/약물 기재물질의 mL을 달성하도록 함으로써 리포좀과 혼합하기 직전에 CPT-11(이리노테칸 히드로클로라이드)의 원액을 제조하였다. 용액의 pH는 4.0 내지 5.0였다. 약물 용액을 양의 압력을 이용하여 0.2 마이크론 폴리에테르술폰(PES) 무균 필터를 통해 여과하였다. 상기 단계 5)에서 생성된 약물 로딩 완충액 중 분취량의 리포좀을 이리노테칸 원액과 실온에서 혼합하여, 1 mmol의 리포좀 인지질 당, 0.15 내지 0.55 g 범위인 약물의 약물/지질 유입 비를 달성하였다. 특별한 유입 약물/지질 비가 적당한 경우 이하에 나와 있다. 혼합물의 pH를 1 M NaOH를 이용하여 6.5로 조정하였고, 유리 바이얼 내의 혼합물을 30 내지 45분 동안 천천히 교반하면서 58 내지 62℃에서 자동 온도 조절 수조 상에서 인큐베이션하였고, 빙수조(0 내지 2℃)에서 급속 냉각시켰으며, 15분 동안 이 온도에 방치하였다. 이어서, 리포좀을 다음 단계(봉입되지 않은 약물의 제거, 및 저장 완충액으로의 이동)를 위해 실온으로 가온시켰다. 이 단계는 연구된 약물/지질 비의 전체 범위에서 95% 초과, 전형적으로는 98 내지 100%의 봉입 효율을 초래하였다.

[0163] *7). 봉입되지 않은 CPT-11의 제거, 리포좀의 저장 완충액으로의 이동, 최종* 여과, 및 저장. 봉입되지 않은 약물을 제거하였고, 리포좀을 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 저장 완충액으로 이동시켰다. 저장 완충액은 물 중 20 mM HEPES, 135 mM NaCl, pH 6.5(NaOH로 조정)을 함유하였고, 사용 전에 0.2-마이크론 진공-여과하였다. 상기 단계 2 하에 실질적으로 기재된 바와 같이 세파덱스 G-75(아머샴 파마시아 바이오테크) 상의 겔-크로마토그래피를 수행하였다. 칼럼으로부터 용리된 CPT-11 리포좀(공극 체적 분획)을 리포좀 인지질 및 CPT-11(분광광도법에 의해 실시예 70 및 71 참조)에 대해 검정하였고, 체적-중량 평균 입자 크기를 QELS에 의해 검정하였다. 필요한 경우, 약물 농도를 2.0 내지 4.0 mg/mL 범위로 조정하였다. 리포좀을 0.2 마이크론 폴리에테르술폰 무균 필터를 통해 여과하였고, 바이얼 체적의 대략 70 내지 80%로 무균 폴리프로필렌 바이얼(코닝 크리오-바이얼(Coming Cryo-Vial) 또는 PTFE로 라이닝된 나사 캡 보로실리케이트 4-mL 유리 바이얼에 분산시켰다. 바이얼을 무균 하(공기 중)에 닫고, 표지화하였으며, 4 내지 6℃에서 저장하였다.

[0164] **실시예 12. 약물 로딩 효율 및 TEA-Pn 함유의 리포좀의 생체내 약물 체류에 대한 약물/지질 비의 영향**

[0165] TEA-Pn, pH 6.1, 삼투질농도 531 mmol/kg의 포획된 0.65 N 수용액을 갖는 리포좀을 실시예 11의 하기 절차에 따라 제조하였다. 지질 분산액을 2개의 적층된 100 nm 세공 크기 폴리카보네이트 필터를 통해 10회 압출시켰다. 리포좀 지질 매트릭스는 또한 0.5 mCi/mmol 인지질로 [^{3}H]-CHE을 포함하였다. 약물 로딩 전의 리포좀 크기는 98.5±34.3 nm이었다. 리포좀을 200, 300, 400, 및 500 mg CPT-11/mmol 인지질의 초기 약물-대-인지질 비로 로딩하였다. 리포좀 내의 약물 및 인지질 양을 실시예 71에 따라 분광광도법에 의해, 또한 실시예 72의 인지질 추출-소화-청색 포스포몰리브데이트 검정에 의해 각기 구하였다.

[0166] 생체내 약물 방출 속도를 평가하기 의해, 실시예 8의 방법을 따랐다. 리포좀을 꼬리 정맥을 통해 6주령 암컷 스위스 웹스터(Swiss Webster) 마우스(체중 18 내지 22 g)에 5 mg CPT-11/kg의 투여량으로 주사하였다. 주사한지 8 및 24시간 후에, 3개 군의 마우스들을 마취하였고, 개방 심장 천자를 통해 방혈하였다. 혈액을 PBS 중 0.4 mL의 빙냉된 0.04% EDTA와 혼합하였고, 혈액 세포를 원심분리에 의해 분리하였으며, CPT-11의 혈장 농도를 실시예 71에 기재된 바와 같이 분광형광계에 의해 측정하였다. 급냉-보정 액체 섬광 계수를 이용하여 [^{3}H]-CHE의 양을 측정함으로써 지질의 양을 구하였고, 구해진 약물/지질 비를 주사된 리포좀 내의 약물/지질 비로 나눔으로써 리포좀 내에 함유된 약물의 양을 계산하였다. 유리 CPT-11의 급속 혈액 제거, 및 이에 따른 낮은 혈액 수준으로 인해, 본 발명자들은 모든 검정된 약물이 리포좀형 형태인 것으로 추정하였다.

[0167] 결과가 표 8에 나와 있다. 군들 간의 약물 체류 차이는 통계학적으로 유의적이지 않았다. 이 연구의 결과로서, 본 발명자들은 약물 로딩량을 500 mg/mmol까지 증가시키는 것이 약물 로딩 또는 생체내 안정성에 부정적 영향을 주지 않을 것으로 결론내렸다. 이 비는 추가 연구를 위해 채택되었다.

표 8

[0168] 약물 로딩, 및 이리노테칸 TEA-Pn 리포좀 내의 생체내 약물 체류(평균±표준편차)에 대한 약물/지질 비의 영향

약물/지질 비(mg/인지질 mmol)			리포좀 내 남아 있는 약물 (주사전 값에 대한 %)	
투입	산출	로딩률(%)	8시간 후	24시간 후
200	208.4	104.2	54.6±9.9	9.72±2.23
300	286.3	95.4	85.2±14.3	14.52±2.51
400	348.8	87.2	81.5±18.3	17.31±6.14
500	518.9	103.8	66.8±19.6	13.47±1.44

[0169] **실시예 13. TEA-SOS 함유의 리포좀 내로의 CPT-11 로딩의 약물 로딩 효율:** 리포좀 크기 및 마우스 내의 생체내 약물 체류의 영향

[0170] 0.643 N TEA-SOS, pH 5.7, 삼투질농도 530 mmol/kg을 갖는 구배 형성 용액을 이용하여, 포획된 용액을 함유하는 리포좀을 실시예 11에서와 같이 제조하였다. 지질 분산액을 세공 크기가 50 nm, 80 nm, 또는 100 nm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 필터를 통해 10회 압출하였다. 리포좀 지질 매트릭스는 또한 1.5 mCi/mmol의 리포좀 인지질로 [^{3}H]-CHE를 포함하였다. 역학 광 산란에 의해 리포좀 크기를 구하였다. 대략 550 mg 이리노테칸/mmol의 인지질의 초기 약물-대-인지질 비로 리포좀에 CPT-11을 로딩하였다. 약물이 로딩된 리포좀을 QELS로 사이징하였고, 실시예 70 및 71에 기재된 바와 같이 검정하였다.

[0171] 암컷 스위스 웹스터 마우스(8 내지 10주령, 평균 27 내지 30 그램)에 꼬리 정맥을 통해 이 CPT-11 리포좀 제형물을 10 mg/kg의 약물 투여량으로 주사하였다. 마우스를 24시간째에 희생시켜, 혈액을 수집하였고, 실시예 11에서와 같이 CPT-11 및 리포좀 지질에 대해 검정하였다. 결과가 표 9에 요약되어 있다.

표 9

[0172] TEA-SOS 리포좀 내의 이리노테칸 로딩 및 생체내 약물 체류

압출막 세공 크기 (nm)	리포좀 크기(nm) 평균 SD	약물 로딩량 (mg 이리노테칸/ mmol 인지질)	마우스에서 24시간 후에 리포좀 내에 남아 있는 약물 (주사전 값에 대한 %)
50	87.6±28.1	579.3±24.2	79.2±3.8
80	98.5±15.1	571.1±69.7	82.6±2.1
100	110.8±25.2	567.7±37.7	86.2±2.7

[0173] 놀랍게도, 수크로스 옥타술페이트의 트리에틸암모늄 염, 비-중합체성 다중음이온화 유기 히드록실화 유기 화합물(당)을 갖는 리포좀은, 다중음이온성 중합체 (폴리포스페이트)를 갖는 유사한 리포좀에 비해, 리포좀 내의 현저히 더 양호한(4-5배) 생체내 약물 체류를 제공하였다.

[0174] **실시예 14. 래트에서의 CPT-11이 로딩된 SOS-TEA 리포좀의 혈중 약물동태**

[0175] 리포좀(100 nm 압출 막 세공 크기)을 실시예 12에서와 같이 제조하였다. 리포좀을 10 mg CPT-11/kg(17.6 mol의 인지질/kg)의 투여량으로 중심 정맥 카테터가 유치된 2개의 9주령 암컷 스프라그 도우리 래트(하알란(Harlan)) (체중 약 200 g)에 10 mg CPT-11/kg의 투여량으로 정맥내 투여하였다. 혈액 샘플을 소정의 시점에서 취하여, 실시예 9에서와 같이 약물 및 리포좀 지질 함량에 대해 분석하였다. 데이터를 % 지질 주사량/ml 혈장, 및 각 시점에서 리포좀 내에 보유된 % 약물로 표시하였고, 주사후 시간에 대해 플로팅하였으며, 리포좀 지질에 대한 반감기 및 리포좀으로부터의 약물 방출의 반감기를 단차 지수 역학 모델에 최적으로 적합화하여 계산하였다(도 5). CPT-11이 로딩된 TEA-SOS 리포좀으로부터의 약물 방출의 반감기는, 유사한 TEA-Pn 리포좀에 비해 훨씬 더 긴 56.8시간이었다.

[0176] **실시예 15. 인간 결장암(HT-29)의 피하 이종이식을 갖는 무흉선 누드 마우스에서의 TEA-Pn 및 TEA-SOS 함유의 리포좀에 봉입된 CPT-11 및 유리 CPT-11의 항종양 활성**

[0177] 0.65 M TEA, pH 6.1, 및 삼투질농도 531 mmol/kg을 갖는 TEA-Pn 용액, 또는 0.643 M TEA, pH 5.7, 및 삼투질농도 530 mmol/kg을 갖는 TEA-SOS 용액을 이용하여 실시예 11에서와 같이 리포좀을 제조하였다. 압출은 세공 크기가 100 nm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 막을 통한 10회 통과를 포함하였다. 생성된 TEA-Pn 및 TEA-SOS 리포

좀은 각기 112.3±15.5 nm 및 120.5+42.5 nm의 크기를 가졌다(크기 분포의 평균±SD). 리포좀에 500 mg/mmol의 유입 약물/인지질 비로 CPT-11을 로딩하였다. 생성된 리포좀은 TEA-Pn 및 TEA-SOS 제형물에 대해 각기 465.6±26.5 mg의 약물 함량(93% 로딩 효율) 및 CPT-11/mmol 인지질 499.9+22.5 mg(100% 로딩 효율)을 가졌다.

[0178] HT-29 세포는 미국 모식균배양수집 협회(미국 매릴랜드주 로크빌 소재)로부터 입수하였고, 공급자에 의해 권장되는 바대로 37℃, 5% CO_2에서 10% 우아 혈청, 50 U/ml 페니실린 G, 및 50 μg/mL의 스트렙토마이신 술페이트로 보충된 DMEM 매질에서 번식시켰다. NCR *nu/nu* 동종접합 무흉선 수컷 누드 마우스(6 주령, 체중 16 g 이상)을 차알스 리버로부터 입수하였다. 마우스에 항생제가 없는 성장 매질 내에 현탁된 0.1 mL의 현탁액과 함께 우익에 피하 접종하였다. 7일 후에, 150 mm^3 내지 350 mm^3의 크기를 갖는 종양이 있는 동물을 하기 방법에 따라 처리군으로 분류하였다. 동물을 종양 크기별로 등급화하였고, 종양 크기 감소순으로 6개 범주로 나누었다. 각 크기 카테고리로부터 하나의 동물을 무작위로 선택하여 11 동물/군의 6개 처리군을 형성함으로써, 각 처리군에 있어 모든 종양 크기들이 동등하게 나타났다. 13일째에 시작하여, 동물에게 하기 제제들을 4일 간격으로 4번 꼬리 정맥 주사를 투여하였다: 1) 대조군(HEPES-완충 염수 pH 6.5); 2) 유리 CPT-11 50 mg/kg(비완충 생리염수 중 새로 제조된 5 mg/mL 용액으로 투여됨); 3) TEA-Pn 리포좀형 CPT-11(25 mg/kg/주사); 4) TEA-Pn 리포좀형 CPT-11(50 mg/kg/주사); 5) TEA-SOS 리포좀형 CPT-11(25 mg/kg/주사); 6) TEA-SOS 리포좀형 CPT-11(50 mg/kg/주사). 동물 체중 및 종양 크기를 실시예 10에서와 같이 매주 2회 모니터하였다. 종양 중량을 동물의 체중을 잰 결과 값에서 빼서, 동물 체중을 구하였다. 동물을 종양 접종 후 60일 동안 관찰하였다. 군 내의 종양이 마우스 체중의 20%에 도달하였을 때, 군 내의 동물을 안락사시켰다. 연구가 끝나면 종양 재성장의 표시 없이 일부 군들에서 완전한 종양 퇴행이 있었다. 이 동물에서 종양 접종 부위로부터의 조직을 수집하여, 잔류 종양 세포에 대한 병리학적 분석을 위해 보존하였다.

[0179] 이 연구의 결과가 도 6 및 7에 나와 있다. 유리 CPT-11은 종양 성장에 단지 적은 영향을 미쳤다. 모든 리포좀은 종양 퇴행을 초래하는 현저한 효과가 있었고, 그 이후 대부분의 동물에 있어 재성장이 있었다. TEA-Pn 및 TEA-SOS CPT-11 리포좀 모두에 있어, 25 mg/kg 투여량보다 50 mg/kg 투여량이 더욱 효과적이었다. 종양 크기 데이터(도 7)로부터 계산된 평균 종양 2배화 시간은 다음과 같았다: 대조군-4.2일; 유리 약물, 50 mg/kg-4.8일; TEA-Pn 리포좀형 약물, 25 mg/mg-43.6일; TEA-Pn 리포좀형 약물, 50 mg/kg-47.5일; TEA-SOS 리포좀형 약물, 25 mg/kg -48.2일, 및 TEA-SOS 리포좀형 약물, 50 mg/kg-56일(2배화 시간에 도달하지 않음). 이에 따라, 본 발명에 따라 제조된 리포좀형 CPT-11은 동일한 투여량 및 스케줄에 따라 투여 시에, 유리 약물보다 약 10배 이상 더 활성이었다. 예상치 못하게도, TEA-SOS CPT-11 리포좀은 동일 투여량으로 투여된 TEA-Pn CPT-11 리포좀에 비해 종양 성장을 감소시킴에 있어 현저히 더 효과적이었다. 50 mg/kg/주사로 유리 약물 및 TES-Pn 리포좀형 약물로 처리한 군에서는, 종양 재성장이 없는 동물이 없었으나, 25 mg/kg의 각 리포좀형 제형물을 투여한 군에서는, 한 동물(9.1%)에서 연구가 끝날 때 종양이 없었으며, 50 mg/kg의 TEA-SOS 리포좀형 CPT-11 제형물을 투여한 군에서는 연구가 끝날 때 4마리의 동물(36.4%)에서 재성장 표시 없이 종양이 없었다.

[0180] 약물은 약간의 독성을 나타냈다. 유리 CPT-11는 투여하였으나, 리포좀형 CPT-11은 투여하지 않은 동물은 약물 주사한지 약 1시간 후에 일시적 병적 상태(morbidity)(주의력 손실, 굽은 자세, 주름 잡힌 털, 이동성 감소)을 경험했다. 유리 CPT-11를 투여한 동물은 처리 동안 체중의 약 6%의 영구적 감량을 겪었고, 회복되지 않았다. 리포좀형 CPT-11 제형물을 모두 투여한 동물은 두 번째 주사와 세 번째 주사 사이의 시점에서 일시적 체중이 처리 전 값의 평균 약 5%(25 mg/kg), 또는 약 9%(50 mg/kg)으로 되었으며, 궁극적으로 정상 체중을 달성하였다. 그러므로, 리포좀형 약물의 독성은 유리 (비-리포좀형) 약물의 독성보다 높지 않으나, 리포좀형 약물의 효능은 실질적으로 보다 높았다. 체중 감량은 약물 처리를 마쳤을 때 역전되었고, 모든 동물들은 최종 병적 상태 또는 독성 사망없이 그들의 체중을 회복하였다. 나중에, 동물은 종양 퇴행과 함께 체중이 늘었다. 염수 대조군에서는, 큰 종양이 발달한 동물은 종양-관련 병적 상태로 인해 현저하게 체중 감량을 경험했다. 전체적으로, 예비포획된 다중음이온화 당(수크로스 옥타술페이트)를 갖는 리포좀 내에 약물을 로딩한 리포좀 약물 제형물은 비-리포좀형 약물에 비해 독성이 덜하면서 가장 효능적임이 입증되었다.

[0181] **실시예 16. 마우스에서의 유리 및 리포좀형 CPT-11의 독성**

[0182] 본 발명에 따라 제조된 유리 CPT-11 및 리포좀에 봉입된 CPT-11의 급성 독성을, 정규(면역경쟁) 마우스에 단일 정맥내 주사한 후, 최대 허용 투여량(MTD)을 구함으로써 비교하였다.

[0183] 하기 물질들을 사용하였다:

[0184] 1) HPLC에 의해 이리노테칸 히드로클로라이드 98.9%를 가지고, 수분 7.6%을 가지는 CPT-11(이리노테칸 히드로클

로라이드) 제제. 이 연구에서, 약물 제형물을 "그 자체"에 기초하여 제조하였고, 수분 함량 또는 이리노테칸 기재물질 함량에 대해 보정하지 않았다.

[0185] 2) 콜레스테롤 133 몰부, PEG-DSPE 1 몰부의 지질 매트릭스 DSPC 200 몰부; 0.65 M TEA, pH 6.4를 갖는 포획된 용액 TEA-SOS; 500 mg 약물/mmol 인지질의 유입 약물/지질 비로 30분 동안 60℃에서 5 mM HEPES 완충액, 5% 덱스트로스, pH 6.5 중에서 리포좀으로 로딩된 약물을 이용하여 실시예 11에서와 같이 리포좀형 CPT-11(Ls-CPT-11)을 제조하였다. 로딩 효율은 >99%이었다. 리포좀 크기(QELS에 의한 체적 평균 중앙값±표준편차)는 101±37 nm이었다. 비히클, 20 mM HEPES-Na, 135 mM NaCl; pH 6.5에서 리포좀을 제형하였다. 주사된 제형물 내의 약물 농도는 하기 표들에 나와 있는 바와 같다.

[0186] 3) 유리 CPT-11 용액. 이리노테칸 히드로클로라이드를 22 mg/mL로 5% 수성 덱스트로스에 용해시킴으로써 유리 약물 원액을 제조하였고, 0.2-μm 여과에 살균하였다. 이 원액을 주사 전에 무균 5% 덱스트로스로 희석하였다.

[0187] 4) 동물. 암컷 스위스 웹스터 마우스(6-8 주령)을 미국 하알란에서 입수하였다.

[0188] MTD 결정은 일반적으로 미국 국립 암 연구소 개발치료제 프로그램(United States National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program)이 채택하는 프로토콜을 따랐다. 프로토콜은 하기 세 단계를 포함하였다:

[0189] 단계 1): 1.8의 투여량 단계적 확대(escalation) 인자로 범위를 모색하는 단계. 급성 치사 또는 최종 병적 상태(주사 후 1일 이내)가 임의의 동물에서 관찰될 때까지, 60 mg/kg의 투여량에서 시작하여 유리 또는 리포좀형 이리노테칸의 투여량을 증가시키면서, 또한 1.8의 투여량 단계적 확대 인자를 유지하면서, 2개의 동물의 군의 꼬리 정맥에 주사하였다. 치사/최종 병적 상태 투여량의 한 단계에 아래에서의 투여량을 기록한다.

[0190] 단계 2): 1.15의 투여량 단계적 확대 인자로 범위를 모색하는 단계. 급성 치사 또는 최종 병적 상태(주사 후 1일 이내)가 임의의 동물에서 관찰될 때까지, 단계 1에서 기록된 투여량에서 시작하여 유리 또는 리포좀형 이리노테칸의 투여량을 증가시키면서, 또한 1.15의 투여량 단계적 확대 인자를 유지하면서, 2개의 동물의 군의 꼬리 정맥에 주사하였다. 치사/최종 병적 상태 투여량의 한 단계에 아래에서의 투여량을 임시 MTD로 기록한다.

[0191] 단계 3): 유효화 단계. 5마리 동물의 군에 단계 2에서 임시 MTD 결정된 유리 또는 리포좀형 이리노테칸을 정맥내 (꼬리 정맥) 주사하였다. 동물을 7일간 주시하고, 매주 2회 동물 체중을 기록하여 주사전 체중과 비교한다. 동물의 일반적 건강을 관찰한다(주의력, 그루밍, 섭식, 배설물, 피부, 털 및 점막 상태, 보행, 호흡, 자세). 관찰 기간 중에 치사, 진행 병적 상태 또는 주사전 체중의 15% 과량의 체중 감량이 없는 경우, 투여량은 급성 단일 주사 MTD로 유효한 것으로 간주한다. 상기 효과들 중 어느 하나라도 일어나면, 차후 투여량을 인자 1.15만큼 더 낮게 하여 실험을 반복한다.

[0192] 유효화 단계의 부가적 통계치를 얻기 위해, 생존 동물의 체중 역학관계를 주사 후 11일까지 주시하였다. 324 mg/kg 초과 투여량의 리포좀형 이리노테칸은 농도 및 주사 체적 제한으로 인해 투여 불가능하였다. 결과가 표 10에 나와 있다.

표 10

[0193] 마우스에서의 CPT-11 제형물의 MTD 모색 연구: 단계 1. 1.8 인자 만큼의 투여량 증가

단계 1: 1.8 인자만큼의 투여량 증가												
					동물 체중, 주사 후 일수							
약물	주사량 (mg/kg)	약물 농도 (mg/ml)	주사 체적 (μl)	마우스 번호	0 (g)	1 (g)	2 (g)	4 (g)	5 (g)	6 (g)	7 (g)	11 (g)
Ls-CPT11	60	8	150	1	19.2	18.0	nd	20.3	20.6	20.6	20.0	19.7
				2	19.7	19.3	nd	20.6	20.4	19.6	19.7	20.7
	100	12	165	1	19.5	18.6	nd	19.6	20.0	20.1	19.4	19.9
				2	20.1	18.9	nd	20.2	21.5	22.2	21.8	22.5
	180	22	165	1	19.4	18.4	nd	18.9	19.7	20.5	19.5	20.5
				2	20.0	19.3	nd	19.6	20.6	21.4	21.6	21.7
	324	30.6	210	1	21.8	21.2	21.2	nd	20.2	nd	20.2	nd
				2	21.6	20.4	21.3	nd	20.8	nd	21.4	nd

유리 CPT11	60	8	150	1	20.6	20.4	nd	22.1	22.1	22.2	22.0	22.5
				2	19.5	19.1	nd	20.2	20.3	20.4	20.5	21.1
	100	12	165	1	19.3	주사한지 1-2분 후에 치사						
				2	20.1	주사한지 1-2분 후에 치사						
				3	19.9	주사한지 1-2분 후에 치사						

[0194] 주사 후, 유리 CPT11로 처리한 모든 마우스들이 아팠고, 약 1시간 호흡 곤란이 있었고, 회복되었다. 주사 후, Ls-CPT-11로 처리한 모든 마우스들은 정상적이었다.

[0195] 단계 2. 1.15 인자 만큼의 투여량 증가

약물					동물 체중, 주사 후 일수				
	주사량 (mg/kg)	약물 농도 (mg/ml)	주사 체적 (μl)	마우스 번호	0 (g)	1 (g)	2 (g)	5 (g)	7 (g)
유리 CPT11	60	8	150	3	19.9	20.0	20.9	19.9	21.3
				4	19.5	18.7	19.4	18.8	18.9
	70	8	175	5	20.9	20.0	20.6	19.3	20.4
				6	22.3	21.8	22.4	22.4	22.8
	80	8	200	7	20.6	19.9	20.4	19.9	20.9
				8	20.6	20.8	21.1	20.7	21.4
	90	12	150	9	22.3	주사한지 1-2분 후에 치사			
				10	22.4	주사한지 1-2분 후에 치사			
		8	225	11	20.6	주사한지 1-2분 후에 치사			

단계 3. 입증

[0196]

					동물 체중, 주사 후 일수			
약물	주사량 (mg/kg)	약물 농도 (mg/ml)	주사 체적 (μl)	마우스 번호	0 (g)	3 (g)	5 (g)	7 (g)
유리 CPT11	80	8	200	1	20.2	19.3	20.0	21.7
				2	20.5	20.6	20.5	21.2
				3	20.7	20.6	20.8	21.9
				4	20.8	21.4	22.1	23.0
				5	21.9	21.9	21.6	21.5
Ls-CPT11	324	365	180	6	21.0	20.0	20.1	20.2
				7	20.4	20.4	20.2	19.2
				8	20.4	19.8	20.3	20.7
				9	20.9	19.9	20.5	21.5
				10	20.7	19.5	19.8	20.2

[0197] 이에 따라, 유리 CPT-11의 MTD는 80 mg/kg이었으나, 리포좀형 CPT-11의 MTD는 놀랍게도 324 mg/kg의 최고의 투여량에서도 달성되지 못했다. 그러므로, 본 발명에 따른 CPT-11의 리포좀 봉입은 4배 이상 약물 독성을 감소시켰다.

[0198] **실시예 17. 약물 누출에 대한 CPT-11이 로딩된 TEA-SOS 리포좀의 저장 안정성**

[0199] 500 내지 550 mg/인지질 mmol의 약물/지질 유입 비에서 TEA-SOS 방법(실시예 11)을 이용하여 리포좀형 CPT-11의 5개 배치를 제조하였다. 하기 표에 나와 있는 바와 같이, 세공 크기가 80 nm 또는 100 nm인 폴리카보네이트 막을 통한 막 압출을 이용하여 리포좀을 제조하였다. 리포좀을 0.2-μm 필터로 살균하였고, 4-8℃에서 135 mM NaCl, 20 mM HEPES-Na, pH 6.5(저장 완충액) 중에 3.4-14.5 mg/mL의 CPT-11로 저장하였다, 명시된 저장 시간 후에, 용리액으로서 저장 완충액을 사용하는 세파덱스 G-75 상의 겔-크로마토그래피에 의해 누출된 약물을 제거하였다. 실시예 70 및 71에 기재된 바와 같이 분광광도법 및 산 소화-청색 포스포몰리브데이트 방법을 각기 사용하여, 겔-크로마토그래피 전 및 후의 리포좀 내의 약물 및 인지질 농도를 검정하였다. 본 발명에 따라 제조된 CPT-11 리포좀은 매우 안정하였다. 저장 중의 이 리포좀으로부터의 CPT-11의 누출율은 6개월 간 5% 미만이었다

(표 10).

표 11

[0200] 저장 중의 CPT-11 리포좀의 봉입 안정성(데이터는 평균±SE임).

리포좀 로트 번호	압출 세공 크기(nm)	CPT-11 농도(mg/ml)	저장 시간(월)	봉입된 채로 남아 있는 약물(%)
1	80	3.44±0.06	6	99.02±3.77
2	80	7.88±0.19	6	102.38±4.78
3	100	4.57±0.06	6	96.38±4.69
4	100	4.62±0.11	6	95.72±4.36
5	80	14.52±0.42	3	103.4±5.92

[0201] **실시예 18. 토포테칸이 로딩된 리포좀**

[0202] 포획된 TEA-Pn 용액 및 TEA-SOS 용액을 갖는 리포좀을 실시예 11에서와 같이 제조하였다. 토포테칸 히드로클로라이드(글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline), 미국 펜실바니아 소재)의 원액을 15 내지 20 mg/ml로 물 중에 토포테칸 히드로클로라이드를 용해시킴으로써, 리포좀과의 혼합 직전에 제조하여, 사실상 토포테칸 HCl 함량을 산출한다. 1 N HCl을 이용하여 pH를 3.0으로 조정하였다. 약물 용액을 양의 압력을 이용하여 0.2 마이크론 폴리에테르술폰(PES) 무균 필터를 통해 여과하였다. 약물-로딩 완충액 내의 분취량의 TEA-Pn 또는 TEA-SOS 함유의 리포좀을 토포테칸 HCl 원액과 실온에서 혼합하여, 0.15 내지 0.45 g/mmol의 리포좀 인지질의 범위 내인 약물/지질 유입 비를 달성하였다. 바람직한 비는 1 mmol의 리포좀 인지질에 대해 0.35 g의 토포테칸 HCl이었다. 유리 용기 내의 혼합물을 30 내지 60분간 천천히 교반하면서 55 내지 62℃의 자동 온도 조절되는 수조 상에 인큐베이션하였고, 빙수조(0 내지 2℃)에서 급속 냉각하였으며, 이 온도에서 5 내지 15분 동안 방치하였다. 이 단계는 89-90%의 봉입 효율(TEA-Pn 구배) 또는 97-100%(TEA-SOS 구배)를 초래하였다. 봉입되지 않은 토포테칸을 제거하였고, 크기 배제 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 리포좀을 저장 완충액에 이동시켰다. 칼럼 상에 적용하기 전에, 1/20 체적의 2.88 M 수성 염화나트륨과 혼합함으로써 리포좀 제제의 이온 강도를 증가시켰고, 혼합물을 약 15분 동안 인큐베이션하였다. 본 발명자들은 예상치 못하게도, 로딩 동안 낮은 값(전형적으로 20 mM NaCl 이하)에서 20 mM NaCl 초과의 보다 높은 값으로, 바람직하게 50 mM NaCl 이상으로 리포좀 매질의 이온 강도를 조정하는 것은, 가능하게는 리포좀 내부에 봉입된 약물과 반대로, 막에 결합된 토포테칸의 제거를 촉진함으로써, 봉입되지 않은 약물의 제거, 및 응집으로부터의 토포테칸이 로딩된 리포좀의 안정성 증가를 증진시킴을 발견하였다. 나머지 절차는 실시예 11의 단계 7를 따랐다. 결과에 대해 하기 표 12를 참조한다.

[0203] **실시예 19. 토포테칸의 항HER2-면역리포좀형 제형물의 제조**

[0204] HER2-과발현 세포로의 높은 내재화를 위해 파지 표시 라이브러리로부터 선택된 항HER2 단쇄 인간 Fv 항체 단편, F5에 토포테칸 리포좀을 접합함으로써, HER2(C-ErbB-2) 표면 수용체 타이로신 키나제 종양단백질을 과발현하는 암세포에 의해 특별히 내재화가능한 토포테칸 면역리포좀을 제조하였다(Poul 등, 2000, J. Molecular Biology, v. 301, p. 1149-1161). F5는 약 150 nM의 친화도를 갖는 HER2 수용체의 세포외 도메인에 결합하여 급속 내재화를 유발하는 27-KDa 단백질이다(Neve 등, 2001, Biophys. Biochim. Res. Commun. v. 280, p. 274-279). 리포좀 접합에 대해, 미국 특허 제6,210,707호, 및 [Nielsen 등(2002), Biochim. Biophys. Acta, v. 1591, p. 109-118]의 방법을 일반적으로 따랐다. F5의 친수성 리포중합체 접합체를 먼저 제조하였다. F5 아미노산 사슬의 C-말단은 부가된 최종 말단 시스테인기(F5Cys)를 가졌다. F5Cys 구축물이 E. 콜라이(E.coli)에서 발현되었고, 이를 단백질 A 칼럼 크로마토그래피에 의해 세균 용해물로부터 단리하였다. 단백질 A 용리된 분획을 음이온-교환 수지 상에 흡착시켜, 발열원 및 숙주 DNA를 제거하였고, 티올 환원제로 처리하여, 말단 시스테인의 티올기를 분리시켰다. 환원된 F5Cys를 SP 세파로스 패스트 플로우(아머샴 파마시아)를 이용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가 정제하였다. 정제된 단백질을, 아반티 폴라 리피즈 인코포레이티드(미국 아라바마주 소재)에 의해 상업적으로 생산되는 분자량 2,000을 갖는 PEG의 유도체인(도 4.1), 티올-반응성 지질-폴리(에틸렌 글리콜) 링커, N-(3-(N-말레이미도)프로피오닐아미도)-폴리(옥시에틸렌)-옥시카르보닐)-1,2-디스테아로일포스파티딜 에탄올아민(Mal-PEG-DSPE)에 접합시켰다. 단백질 및 링커를 1:4의 몰비로 완충액 수용액에서 인큐베이션하였고, 미반응 링커를 1 mM 시스테인으로 급냉시켰다. 반응 동안, F5Cys의 최종 시스테인을 링커의 말레이미도기에 공유결합시켰다. 수득된 F5-PEG-DSPE 접합체는 높은 겉보기 분자량(500 내지 850 KDa)을 갖는 마이셀 형태로 수용성이고, 크기 배제 크로마토그래피에 의해 미반응 단백질로부터 분리되었다(약 25%). 정제된 접합체 중 단백질의

양을 280 nm에서 UV 분광광도법에 의해 구하였고, 링커의 양을 인지질 정량화에 사용된 것과 동일한 분광광도법을 이용하여 검정하였다(실시예 70 참조). 정제된 F5-PEG-DSPE 접합체는 물 중에서 안정하였고, 완전 면역 반응성이었으며, 65℃에서 1시간 이상 동안 및 37℃에서 3개월 이상 동안의 반응성 손실 및 변성에 대해 안정하였다.

[0205] 항-HER2 면역리포좀형 토포테칸을 제조하기 위해, 실시예 18의 토포테칸이 로딩된 리포좀을 15 마이크로그램의 단백질/1 마이크로몰의 인지질(약 45 F5 복사체/리포좀)의 비로 수성 염수 완충액 중에서 F5-PEG-DSPE와 혼합하였다. 혼합물을 60℃에서 40분 동안 인큐베이션하였고, 얼음 상에서 냉각시켰으며, 세파로스 CL-4B(가교결합된 4% 아가로스 비이드, 아머샴 파마시아)를 이용한 칼럼 상의 크로마토그래피를 행하여, 잔류 마이셀형 접합, 비접합 단백질, 및 인큐베이션 중에 방출되었을 수도 있는 임의의 미량의 리포좀외 유형의 약물을 제거하였다. 막에 혼입된 F5-PEG-DSPE를 갖는 리포좀을 5 mM HEPES-144 mM NaCl 완충액(pH 7.4)으로 용리하였고, 칼럼의 공극 체적으로 수집하여, 무균-여과시켰으며, 분배하여 저장하였다(4-6℃). 리포좀에 혼입된 F5의 양은 전형적으로 첨가된 접합체의 >80%이었다. 그것은 밀도측정에 의해 쿠마시 염색 F5 밴드의 정량화와 함께 리포좀의 SDS-PAGE에 의해 구해졌다. 면역리포좀 제제 내의 약물 및 지질 농도를 비표적화 리포좀과 유사한 방식으로 구하였다. 토포테칸 리포좀 및 F5-면역리포좀(실시예 18-19)의 성질들이 표 12에 요약되어 있다.

표 12

[0206] 토포테칸 리포좀 및 면역리포좀의 특성

리포좀에 봉입된 염	F5 scFv 결합 여부:	약물/지질 비 (g/인지질 mol)		포획률(%)	리포좀 크기 (평균±SD)(nm)
		투입	산출		
TEA-Pn	비결합	173.6	155.2±5.9	89.4±3.4%	96.4±38.7
TEA-Pn	결합	173.6	156.2±5.2	90.0±3.0%	96.2±33.8
TEA-SOS	비결합	347.2	340.8±14.7	98.2±4.2%	99.1±32.6

[0207] **실시예 20. 리포좀 내로의 토포테칸 로딩에 대한 로딩 완충액 pH 및 약물/지질 비의 영향**

[0208] 포획된 0.5 N TEA-Pn, pH 6.2, 삼투질농도 413 mmol/kg를 갖는 리포좀(DSPC/Chol/PEG-DSPE, 3:2:0.015 몰비)을 에탄올 주사 방법(실시예 18)을 이용하여 제조하였고, 세공 크기가 100 nm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 필터를 통해 5회 및 세공 크기가 50 nm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 필터를 통해 10회 압출하였다. 로딩 완충액은 5.0 내지 6.5 범위의 각종 pH로 조정된 5 mM MES, 50 g/L 덱스트로스이었다. 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정 시에 73.1±21.3 nm이었다. 100 mg/mmol의 유입 약물-대-인지질 비로 토포테칸 원액(20 mg/ml)을 로딩 완충액 중 리포좀과 혼합하고, 혼합물을 45분 동안 60℃에서 인큐베이션하며, 15분 동안 얼음 상에서 급냉하고, 20 mM HEPES, 135 mM NaCl, pH 6.5를 이용하여 용리되는 세파덱스 G-75 칼럼을 이용하여 봉입되지 않은 약물을 제거함으로써, 리포좀에 로딩하였다. 토포테칸 및 인지질을 분광광도법에 의해 정량화하였다(실시예 70 및 71). 결과(표 13)는 토포테칸 로딩이 pH 5.5 내지 6.5 범위 내에서 거의 정량적임을 나타냈다.

표 13

[0209] 포획된 TEA-Pn을 갖는 리포좀 내로의 토포테칸 봉입률 %에 대한 로딩 완충액 pH의 영향

로딩 완충액 pH	봉입률 %
5.0	50.1±2.1
5.5	97.2±8.1
6.0	115.5±15.0
6.5	102.1±8.1

[0210] 로딩 효율에 대한 약물 대 지질 비(0.15 내지 0.45 mg/인지질 mmol)의 영향을 또한 연구하였다. 포획된 TEA-Pn(0.5 M TEA, pH 5.8, 삼투질농도 480 mmol/kg)을 갖는 리포좀을, 2개의 적층된 0.08 μm 폴리카보네이트 필터를 통해 10회 행한 것을 제외하고는 상기와 같이 제조하였다. 로딩은 pH 6.5에서 행해졌다. 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정 시에 93.1±15.1 nm이었다. 결과(표 14)는 연구된 약물/지질 비의 전체 범위에 걸쳐 85% 초과임을 나타냈다.

표 14

[0211] TEA-Pn 함유의 리포좀 내로의 토포테칸의 봉입 효율에 대한 약물/지질 비의 영향

토포테칸/인지질 비(mg/mmol)		봉입률 %(평균±SE)
투입 비	(로딩 후) 산출 비	
168.2	166.9±11.1	99.2±6.6
224.4	232.5±47.6	103.7±21.2
280.3	253.5±19.8	90.4±7.0
336.4	298.3±18.0	88.7±5.3
392.5	361.2±36.8	92.0±9.4
448.5	394.9±29.5	88.0±6.6

[0212] **실시예 21. 혈장의 존재 하에서의 생체내 토포테칸 리포좀 안정성**

[0213] 포획된 0.5 N TEA-Pn, pH 6.2, 삼투질농도 413 mmol/kg을 갖는 리포좀(DSPC/Chol/PEG-DSPE, 몰비 3:2:0.015)을 실시예 18에서와 같이 제조하였다. 크기가 96.4±29.3 nm인 리포좀을 2개의 적층된 100 nm 세공 크기 폴리카보네이트 필터를 통해 10회 압출함으로써 제조하였다. 혈장 내 리포좀 지질의 정량화를 위해, [^{3}H]-CHE를 0.5 μCi/μmol의 DSPC로 지질 용액 내에 포함시켰다. 토포테칸을 150 mg/mmol의 약물/인지질 비로 45분 동안 pH 6.0, 58℃에서 로딩하였다. 로딩 효율은 148.48±10.26 μg 토포테칸/μmol 인지질(99.0±6.8%)이었다.

[0214] 리포좀을 다중웰 마이크로투석 장치(스펙트라-포르 마이크로다이얼라이저(Spectra-Por MicroDialyzer) 10-웰, 스펙트럼, 미국)에서 50% 인간 혈장과 함께 인큐베이션하였다. 인간 공여자 혈장을 0.02% 나트륨 아지드를 함유하는, 동량 체적의 HEPES-완충 염수(20 mM HEPES, 135 mM NaCl)(pH 6.5)로 희석하였고, 투석기의 하부 비축기에 충진하였다(32 mL). 웰(0.4 mL)을, 30 nm 세공 크기를 갖는 폴리카보네이트 막에 의해 비축기로부터 분리시켜, 리포좀을 제외한 혈장 단백질 및 소분자의 유리 통과를 제공하였다. 리포좀을 계산된 양의 혈장 및 HEPES-완충 염수와 혼합하여, 2.5 mM 인지질 및 50 체적%의 혈장의 농도를 달성하였다. 장치를 37℃에서 인큐베이션하였고, 비축기의 내용물을 천천히 교반하였다. 8시간의 인큐베이션 후에, 하부 비축기의 내용물을 새 50% 혈장로 바꾸었다. 주어진 시점들(이하 참조)에, 50-μL 분취량을 웰에서 인취하여, 2.2-2.4 mL의 세파로스 CL-2B, 용리액 HEPES-완충 염수를 함유하는 칼럼 상에 크로마토그래피하여, 혈장 단백질 및 유리 약물로부터 리포좀을 분리하였다. 리포좀을 공극 체적 분획으로 수집하였다. 90% 수성 이소프로판올-0.1 N HCl 내의 혈장 샘플을 가용화한 후에, 384 nm에서의 여기, 및 524 nm에서의 방출을 이용하는 형광측정에 의해 토포테칸을 정량화하였고, 지질을 섬광 계수([^{3}H]-CHE 보정)에 의해 정량화하였다. 시간 별로 구해진 약물 대 지질 비를 인큐베이션 전의 초기 비와 비교하여, 각 시점에 봉입된 채로 남아 있는 토포테칸의 %를 수득하였다. 8시간의 인큐베이션 후에, 리포좀에 남아 있는 약물의 양은 초기 값의 약 55%이었다(표 15).

표 15

[0215] 37℃에서 50% 인간 혈장 내의 TEA-Pn 구배에 의해 로딩된 리포좀으로부터의 토포테칸의 생체외 방출

인큐베이션 시간(h)	봉입된 채로 남아 있는 약물(%)
1	95.5±5.4
4	76.8±7.3
8	55.9±4.1
24	55.4±16.8

[0216] **실시예 22. 각종 약물/지질 비에서 포획된 TEA-Pn 구배를 갖는 토포테칸 리포좀: 마우스에서의 생체내 약물 체류 및 순환 지속성.**

[0217] 2개의 적층된 100 nm 세공 크기의 폴리카보네이트 필터를 통해 12회 압출함으로써 실시예 18에서와 같이, 봉입된 구배 형성 염 용액(0.5 N TEA-Pn, pH 6.2, 삼투질농도 413 mmol/kg)을 갖는 리포좀(3:2:0.015 몰비의 DSPC/Chol/PEG-DSPE, 0.5 mCi/mmol DSPC에서의 [^{3}H]-CHE 함유)를 제조하였다. 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정시에 107.7±19.1 nm이었다. 5 mM HEPES, 50 g/L 덱스트로스(pH 6.5) 내의 리포좀을 토포테칸의 수성 원액(20 mg/ml)과 130 내지 360 μg/μmol 범위의 약물/인지질 비로 혼합한 후, 혼합물을 45분 동안 58℃에서 인큐베이

션하고, 얼음 상에 15분 동안 두고, 세파덱스 G-75 크로마토그래피에 의해 봉입되지 않은 약물을 제거하였다. 12-주령 암컷 FvB 마우스에 토포테칸/kg 체중(대략 0.2 mg 토포테칸/동물)의 투여량으로 꼬리 정맥을 통해 리포좀을 3벌로 주사하였다. 명시된 시간들에서, 전형적으로는 주사 후 8시간 또는 24시간에, 마우스를 마취하였고, 방혈하였으며, 실시예 8에서와 같이 혈액 샘플을 약물 및 리포좀 지질에 대해 검정하였다. 결과가 표 16에 나와 있다. 24시간 후에, 초기 약물 로딩량의 약 6-32%은 봉입된 채로 남았다. 약물의 보다 높은 로딩량(>200 mg/인지질 mmol)은 약물 체류 시간을 보다 길게 하였다.

표 16

[0218] 상이한 약물/지질 비로 TEA-Pn 구배 방법을 이용하여 로딩된 원형 토포테칸 리포좀의 생체내 약물 체류 및 순환 지속성

봉입된 약물/인지질 비(mg/mmmol)	순환 시 남아 있는 약물 (주사 투약량에 대한 %)		봉입된 채로 남아 있는 토포테칸 (초기 투여량에 대한 %)	
	8시간 후	24시간 후	8시간 후	24시간 후
127.2±10.9	36.1±2.0	18.7±8.1	51.7±7.1	6.72±2.5
207.2±21.6	32.1±5.2	9.84±1.88	75.6±13.0	13.8±3.5
301.3±24.5	34.4±3.2	8.04±4.25	79.2±4.2	25.6±4.4
360.3±35.6	33.6±2.4	8.68±4.96	73.5±7.0	32.3±9.8

[0219] **실시예 23. 상이한 포획된 암모늄 및 트리에틸암모늄 염을 이용하여 로딩된 토포테칸 리포좀의 생체내 약물 체류 및 순환 지속성**

[0220] 압출 단계가 2개의 적층된 200-nm 세공 필터를 통한 10회 통과, 2개의 적층된 100-nm 세공 필터를 통한 10회 통과, 및 2개의 적층된 50-nm 세공 필터를 통한 20회 통과를 포함하는 것을 제외하고는, 실시예 18에서와 같이 0.22 mCi/mmol DSPE로 [^{3}H]-CHE를 함유하는, DSPE, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE(3:1:0.1 중량비)로 구성된 리포좀을 제조하였다. 리포좀은 하기 염 용액을 함유하였다:

[0221] 시그마로부터 구매한 나트륨 덱스트란 술페이트(분자량 5000)을 통해 0.5 N 암모늄 덱스트란 술페이트 용액(A-DS)을 제조하였고, 이를 실시예 4에서와 유사한 이온 교환 절차에 의해 암모늄 염으로 전환시켰다. 덱스트란 황산의 황산을 12.4 M 수성 암모니아로 즉시 적정하였다. A-DS 용액은 pH 5.66, 삼투질농도 208 mmol/kg를 가졌다.

[0222] 실시예 6에서와 유사한 방식으로, 0.48 N 암모늄 수크로스 옥타술페이트(A-SOS)를 제조하였고, 다만 암모늄 히드록시드를 적정을 위해 사용하였다. 용액은 pH 6.27, 삼투질농도 258 mmol/kg를 가졌다.

[0223] 실시예 6에서와 유사한 방식으로, 0.47 M 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트(TEA-SOS)를 제조하였다. 용액은 pH 6.6, 삼투질농도 297 mmol/kg를 가졌다.

[0224] 61 내지 62℃ 및 346±1 mg/mmol의 유입 약물/인지질 비로 약물을 갖는 리포좀을 40분 동안 인큐베이션한 후, 10 분 동안 얼음 상에서 인큐베이션함으로써, 토포테칸을 10 mM MES-Na, 50 g/L 덱스트로스(pH 6.5)의 수용액 중 리포좀에 로딩하였다. 세파덱스 G-25, 용리액-수성 2 mM 히스티딘, 144 mM NaCl, pH 6.6(HCl) 상의 크로마토그래피에 의해 봉입되지 않은 약물로부터 리포좀을 정제하였다.

[0225] 7 내지 9 주령 암컷 스위스 웹스터 마우스에 5 mg 토포테칸/kg 체중(대략 0.2 mg 토포테칸/동물)의 투여량으로 꼬리 정맥을 통해 이 리포좀형 토포테칸 제형물을 3벌로 주사하였다. 주사한지 8시간 또는 24시간 후에, 혈액을 수집하여 실시예 22에서와 같이 토포테칸 및 리포좀 지질에 대해 분석하였다.

[0226] 결과가 하기 표 17에 나와 있다. 3개 모든 리포좀 제형물들이, 주사된 투여량의 약 23 내지 28%가 주사한지 24시간 후에 혈중 남아 있는, 매우 근접한 리포좀 순환 지속성을 나타냈으나, 예상치 못하게도 TEA-SOS 리포좀 및 A-SOS 리포좀 내의 약물 체류는 등급(약물 체류에 있어 약 2배 향상) 및 통계적 유의성(각기 2-테일 쌍을 이루지 않은 스튜던트 t-테스트 p=0.0257 및 p=0.00995에 의한 95% 신뢰도 수준에서의 통계적 유의성, 및 만 유-테스트(Mann's U-test)에 의해 차는 α=0.01로 유의적이지 않았음)의 모두의 측면에서 A-DS 리포좀에서보다 더 양호하였다. TEA-SOS 함유 토포테칸 리포좀에서의 약물 체류는 A-SOS 함유 토포테칸 리포좀에서보다 더 양호하였다.

표 17

[0227] TEA-SOS, 암모늄-SOS(A-SOS), 및 암모늄 덱스트란 술페이트(A-DS)를 이용하여 제조된 토포테칸 리포좀의 생체 내 약물 체류 및 순환 지속성

구배	약물/인지질 비(mg/mmmol)	로딩 효율(%)	리포좀 크기(nm)	순환 시에 남아 있는 약물(주사 투약량에 대한 %)		봉입된 채로 남아 있는 토포테칸(초기 투여량에 대한 %)	
				8시간 후	24시간 후	8시간 후	24시간 후
A-DS	288.1±20.6	83.3±6.0	76.9±22.7	43.7±1.2	27.7±1.5	43.6±6.8	18.7±1.5
A-SOS	346.2±14.3	100.0±4.1	99.7±28.9	42.3±2.2	23.4±2.0	53.3±0.8	31.3±3.2
TEA-SOS	340.8±14.7	98.5±4.2	99.1±32.6	42.1±2.3	23.0±2.9	57.0±5.6	38.1±6.1

[0228] **실시예 24. 래트에서의 리포좀형 토포테칸의 약물 및 지질 혈장 약물동태**

[0229] 순환 지속성 및 토포테칸 방출 파라미터들을 래트에서 평가하였다. 에탄올 혼합/압출 방법에 의해 리포좀(DSPC/콜레스테롤/PEG-DSPE 몰비 3:2:0.015)을 제조하였고, 실시예 18에 기재된 바와 같이 TEA-Pn 구배 또는 TEA-수크로스 옥타술페이트(TEA-SOS) 구배를 이용하여 그것에 토포테칸을 로딩하였으며, 각종 약물/지질 비(15 내지 450 mg/인지질 mmol)로 로딩하였다. 지질 매트릭스 정량화에 있어, 리포좀 지질은 0.5 내지 1.5 mCi/mmol DSPC로 [^{3}H]-CHE를 함유하였다. 중심 정맥 카테터가 유치된 암컷 스프라그 도우리 래트(6 내지 8 주령; 체중 약 200 g)에 4 내지 5 mg/kg 체중의 투여량으로 토포테칸 리포좀을(카테터)를 통해 정맥내 주사하였다. 카테터를 염수로 플러싱하였다. 선택된 시점들(주사 후 48시간 이내)에서, 혈액 샘플(0.2 내지 0.3 mL)을 카테터를 통해 항응고화 시린지로 인출하여, 0.04% EDTA를 갖는 0.4 mL의 냉 포스페이트 완충 염수와 혼합하였고, 혈액 세포를 원심분리에 의해 분리하였으며, 상등액(PBS-희석 혈장)을 지질에 대해서는 ^{3}H-CHE 방사능 계수(급냉 보정)에 의해, 또한 토포테칸에 대해서는 형광측정(실시예 71)에 의해 검정하였다. 검정 결과를 헤마토크리트(Hematocryt)를 40%로 가정하여, 수득된 혈액 샘플의 중량으로부터 계산되는, 혈장 희석에 대해 보정하였다. 약물 및 지질의 총 혈액 투여량을 체중의 6.5%로 계산되는 혈액 체적으로부터 평가하였다. 리포좀 내에 함유된 토포테칸의 퍼센트를 주어진 시점에서의 약물/지질 비를 주사된 리포좀의 약물/지질 비와 비교함으로써 계산하였다. 하기 표 18에는 지질, 약물의 혈중 반감기, 및 약물 방출에 대한 반감기, 및 리포좀의 기타 성질들이 요약되어 있다. 약물동태(PK) 곡선이 도 8A(지질) 및 8B(약물/지질 비)에 나와 있다. 요약컨대, 약물 및 지질 모두에 대한 혈액 PK 곡선은 단차 지수 모델(R^2 0.984 내지 0.999)과 잘 부합한다. 그것의 90 내지 100 nm 크기, 및 매우 적은 양의 PEG화 지질(0.3몰%)로 인해, 리포좀은 예상치 못하게도 양호한 순환 지속성을 나타냈다(지질 성분의 혈장 반감기는 11 내지 16시간 범위 내임). 토포테칸의 최저속 방출(반감기 22.9시간)이 TEA-SOS 방법을 이용하여 로딩된 리포좀에서 관찰되었다.

표 18

[0230] 래트에서의 지질, 약물의 순환 반감기($t_{1/2}$), 및 원형 토포테칸 리포좀으로부터의 약물 방출에 대한 반감기

포획된 염 및 농도	토포테칸 로딩량(mg/인지질 mmol)	리포좀 크기(nm) (평균±SD)	주사량(mg/kg)	지질 $t_{1/2}$(h)	약물 $t_{1/2}$(h)	약물 방출의 $t_{1/2}$(h)	군당 동물의 수
TEA-Pn 0.5 N	124.3±9.7	92.3±23.3	4	15.8	4.13	5.34	3
TEA-Pn 0.5 N	360.3±35.6	107.7±19.1	5	12.8	6.06	9.97	2
TEA-SOS 0.643 N	439.2±15.9	108.8±13.4	5	10.8	7.36	22.87	2

[0231] **실시예 25. 토포테칸 리포좀의 저장 동안의 누출에 대한 약물 안정성**

[0232] 상기 연구를 위해 제조된 수개의 원형 제형물의 샘플을 각종 시간들에 대해 4 내지 6℃에서 저장하여, 리포좀으로부터의 약물 누출에 대한 봉입된 토포테칸의 저장 안정성을 평가하였다. 리포좀 샘플을 20 mM HEPES, 135 mM NaCl(pH 6.5)로 용리되는 세파덱스 G-75 칼럼에 통과시켜, 리포좀외 약물을 제거하였고, 약물 함량에 대해서는 분광광도법에 의해 분석하였고, 지질에 대해서는 [^{3}H]-CHE 방사능 계수에 의해 분석하였다. 결과(표 19)는 저장 중의 리포좀 내의 토포테칸의 양호한 체류를 나타냈다.

표 19

[0233] 저장 동안의 원형 토포테칸 리포좀 내의 약물 체류

리포좀 구배 형성 염	리포좀 크기 (평균±SD)(nm)	초기 약물 로딩량 (mg 약물/mmol 인지질)	저장 시간(월)	저장 후의 약물 로딩량(초기 양에 대한 %)
TEA-Pn 0.500 N pH 6.2	96.4±29.3	148.5±10.3	8	101.6±5.5
TEA-Pn 0.500 N pH 6.2	107.7±19.1	127.2±10.9	6	94.6±6.2
TEA-Pn 0.500 N pH 6.2	107.7±19.1	207.2±21.6	6	113.9±9.4
TEA-Pn 0.500 N pH 6.2	107.7±19.1	301.3±24.5	6	112.9±9.3
TEA-SOS 0.643 N pH 5.6	108.8±13.4	439.2±15.9	2	97.8±9.4

[0234] **실시예 26. HER2-과발현 암세포에 의한 리포좀형 및 면역리포좀형 토포테칸의 생체외 흡수**

[0235] 이 연구는 본 발명에 따라 제조된 토포테칸이 로딩된 항HER2-면역리포좀의, 세포 배양 시에 HER2-과발현 세포로 토포테칸을 특이적으로 전달하는 능력을 평가하기 위한 것이었다. (면역)리포좀을 제조하였고, 그것에 실시예 19의 TEA-Pn 방법을 이용하여 토포테칸을 로딩하였다. 37℃, 5% CO_2에서 T-75 플라스크 내에 10% 우아 혈청, 50 μg/mL 스트렙토마이신 술페이트 및 50 U/ml 페니실린 G(완전 성장 매질)로 보충된 변형된 McCoy 5A 매질(트리신 비함유)에서 HER-2 과발현 인간 유방암종 세포(SKBr-3, ATCC)를 완전 성장시켰다. 세포를 트립신화에 의해 수확하여, 0.5 mL의 완전 성장 매질 내에 150,000개 세포/웰로 24-웰 세포 배양 플레이트에 접종하였고, 하룻밤 동안 순응시켰다. 매질을 0.01 내지 0.1 mM 인지질 범위에서의 선택된 농도로 토포테칸 제형물을 함유하는 0.5 mL의 완전 성장 매질로 대체하였다. 각 조건에 대해 3벌 웰을 사용하였다. 대조군 웰을 (약물 검정을 위한 배경 측정값을 수득하기 위해) 약물 및/또는 리포좀 부재 하에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 4-8시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 천천히 교반하면서 인큐베이션하였다. 매질을 흡기시키고, 세포를 Ca 및 Mg 염을 함유하는, 1 mL씩의 밸런스 염 용액 4회 헹구었다. 물 중 0.1 mL의 1% 트리톤 X-100을 첨가함으로써 세포를 가용화하였고, 세포 용해물 내의 약물의 양을 형광측정에 의해 구하였다(실시예 71). 표준 곡선이 10 내지 2500 ng 토포테칸/웰 범위에서 수득되었고, 세포 자동형광 배경을 뺀 후 2차 다항에 부합하였다(이는 보다 높은 약물 농도에서 자기급냉에 의한 것임). 마이크로플레이트 형광측정을 사용한 경우, 필터 선택은 여기의 경우 400/30 nm이었고, 방출의 경우 530/25 nm이었다. 쿠벳- 및 마이크로플레이트 형광측정은 동일한 결과를 제공하였다.

[0236] 2개 실험의 결과가 하기 표 20에 요약되어 있다. HER2-표적화 리포좀형 약물의 현저한 세포 흡수가 있었다(비표적화 리포좀형 토포테칸보다 50 내지 300배 더 높았다). 흥미롭게도, 유리 토포테칸의 흡수는 또한 HER2-표적화 면역리포좀형 토포테칸보다 상당히 더 낮았다. 이는 혈청의 존재 하에서 세포 성장 매질 내의 캄프토테신 락톤환의 토포테칸 분자의 급속 가수분해(이는 보다 낮은 세포 투과성 및 보다 낮은 세포 독성을 가질 수 있는 약물의 카르복실레이트 형태를 발생시킴)에 의해 조사될 수 있다. 요약컨대, 세포-표적화, 내재화가능한 리간드-접합 면역리포좀의 세포내 토포테칸 전달 능력이 확인되었다.

표 20

[0237] TEA-Pn를 함유하는 항HER2 면역리포좀 및 토포테칸 리포좀의 생체외 세포 흡수(nd: 비결정). 리포좀 특성에 대해서는 표 12를 참조한다.

리포좀 농도 (인지질 mM)	토포테칸 농도 (μg/ml)	노출 시간(h)	SK-Br-3 세포에 의한 토포테칸 흡수율 (ng/10,000 세포)		
			비표적화 리포좀	F5-면역리포좀	유리 약물
0.1	15.5	4	1.45±0.09	163±5.7	nd
0.01	1.55	4	0.185±0.03	60.2±2.0	nd
0.033	5.0	8	3.62±2.03	169.6±13.7	5.56±0.91

[0238] **실시예 27. 생체외 HER2-과발현 암세포에 대한 리포좀형 및 면역리포좀형 토포테칸의 세포독성**

[0239] 항-HER2 토포테칸 면역리포좀의 HER2-과발현 암세포로의 세포내 약물 전달 능력이 일단 확립되면(실시예 26), 내재화 리포좀이 활성 형태로 약물을 방출할 수 있도록 확실히 하는 것이 중요하다. 이러한 취지에서, 유리 토포테칸(즉, 용액으로 제조된 토포테칸), 리포좀형 토포테칸, 및 항HER2-면역리포좀형 토포테칸의 생체외 세포독

성을 연구하였다. 리포좀형 토포테칸 제형물을 제조하였고, 실시예 26에 기재된 바와 같이 SKBr-3 세포를 성장시켜 수확하였다. 세포를 0.1 mL의 완전 성장 매질 내 5,000 세포로 96-웰 세포 배양 플레이트에 3벌로 접종하였고, 하룻밤 동안 순응시켰다. 플레이트의 가장 마지막 열 및 칼럼을 비워두었다. 토포테칸 리포좀, 면역리포좀, 또는 유리 약물(이는 토포테칸 20 mg/mL 원액(pH 3)을 비완충 염수에 2 mg/mL로 희석함으로써 새로 제조된 것임)의 무균 제제를 완전 약물 매질로 희석하여, 90, 30, 또는 10 μg/mL로 출발하여, 인자 3씩 매질 내에 일련으로 희석되도록 하는 농도를 달성하였다. 웰 내의 매질을 0.2 mL의 약물/리포좀 희석물로 대체하였고, 명시된 시간(4 내지 6시간) 동안 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션하였다. 각 열에서 한 웰을 약물-비함유 매질과 함께 인큐베이션하여 비처리 대조군으로 작용하도록 하였다. 약물을 함유하는 매질을 웰로부터 웰로부터 흡기시켰고, 세포를 0.2 mL의 약물-비함유 매질로 헹구었으며, 0.2 mL의 새 약물-비함유 매질을 모든 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO_2에서 4일 동안 인큐베이션하였다. 매질 변화없이, 혈청-비함유 매질 내의 테트라졸륨 염료(티아졸릴 블루, MTT)(시그마 케미칼 컴퍼니)의 0.03 mL의 2 mg/mL 용액을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO_2에서 추가 2-3시간 동안 인큐베이션하였다. 매질을 흡기하였고, 웰에 0.2 mL의 70 체적% 수성 이소프로판올, 0.075 N HCl을 충진하여, 포르마잔 염료가 용해될 때까지(15 내지 30분) 완만히 교반하였다. 포르마잔 용액의 광학 밀도를 540 nm에서 마이크로플레이트 포토미터를 이용하여 구하였다. 비처리 대조군에 대한 %로서의 세포 생존율을 비처리 세포를 함유하는 웰에서의 광학 밀도에 대한 실험 웰 내의 광학 밀도의 비로서 계산하였고, 이를 배경에 대해 보정하였다. 데이터를 약물 농도에 대해 플로팅하였고, IC_{50} 투여량을 50% 생존율 선과 생존율-농도 곡선의 교차로부터 그래프에 의해 평하였다.

[0240] 결과가 도 9에 나와 있다. 유리 토포테칸 또는 비표적화 리포좀형 토포테칸에 대해 50% 성장 억제(IC_{50})를 초래하는 약물 투여량은 30 μg/mL 과량이었고; F5-면역리포좀형 토포테칸의 경우 0.15 μg/mL이었다. 이 결과는 표적화 약물 흡수 데이터와 일치한다.

[0241] **실시예 28. 마우스에서의 리포좀형 및 F5-면역리포좀형 토포테칸의 안정성 및 혈장 약물동태 비교**

[0242] 1.5 mCi/mmol의 인지질로 방사능 지질 표지 [^{3}H]-CHE를 함유하는 토포테칸 리포좀을 하기 조건 하에서 에탄올 지질 용액 혼합-압출 절차를 이용하여 실시예 11 및 19에 따라 제조하였다: 구배 형성 염 용액: 0.643 N 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트; 폴리카보네이트 막 압출: 2개의 적층된 PCTE 필터(80 nm 세공 크기)를 통한 15회 통과; 토포테칸 로딩: 약물/인지질 유입 비 350 mg/mmol(토포테칸 유리 기재물질에 대한 계산); F5 scFv 접합을 실시예 19에 기재된 바와 같이 수행하였다. 리포좀은 하기 특성들을 가졌다:

[0243] QELS에 의한 크기: 중량 평균 101.2 nm; 표준편차, 20.1 nm.

[0244] 약물 봉입: 토포테칸 리포좀(Topo-Ls) 359.3±27.4 mg/인지질 mmol; 토포테칸 F5scFv-면역리포좀(Topo-F5-ILs) 326.3±1 5.9 mg/인지질 mmol.

[0245] 일반적으로 실시예 22에서와 같이 연구를 수행하였다. 9마리 수컷 스위스 웹스터 마우스(8 내지 10 주령, 24 내지 27 g)의 군에 5 mg 토포테칸 기재물질/kg 체중(14 내지 16 μmol 인지질/kg 체중의 지질 투여량과 동등함)의 투여량으로 비완충 염수 내 Topo-Ls, Topo-F5ILs, 또는 새로 제조된 토포테칸 1 mg/mL을 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 주사한지 1, 8 또는 24시간 후의 시점에서, 시점 당 3마리 동물을 케타민/자일라진 마취 하에 개방 심장 천자를 통해 방혈하였고, 혈액을 PBS-EDTA 함유 관에 수집하여, 토포테칸(형광측정) 및 리포좀 지질(방사능 섬광 계수)에 대해 검정하였다. 동물 당 혈액 양을 체중의 6.3%로, 또한 팩킹된 혈액 세포 분획을 45%로 가정하여, 주어신 시점에서의 혈중에 남은 약물 및 지질 투여량의 양을 투여된 투여량을 100%로 했을 때로부터 계산하였다. 각 시점에서 리포좀 내에 봉입된 채 유지된 약물의 양을, 주사된 리포좀의 약물/지질 방사능 비를 혈장 샘플의 약물/지질 방사능 비와 비교함으로써 개별적으로 각 동물에 대해 계산하였다. 주사한지 1시간 후에 수집된 혈장 샘플 내의 유리 토포테칸의 양은 주사된 투여량의 1% 미만이었고(실제로, 그것은 본 발명자들의 검정 방법의 검출 한도 미만임); 이에 따라 유리 토포테칸 군의 추가 시점들은 연구하지 않았다. 빠른 혈액 제거 및 유리 토포테칸의 낮은 혈액 수준으로 인해, 본 발명자들은 모든 시점들에서의 혈중에 발견된 실질적으로 모든 토포테칸이 리포좀 내 봉입된 토포테칸을 나타낸 것으로 추정하였다.

[0246] 결과가 하기 표 21에 요약되어 있다. 주목할 만하게, 본 발명에 따른 리포좀은 동물의 혈류에 주사한지 24시간 후에도 원래의 약물 로딩량의 79 내지 85%를 보유하였다. 리포좀 및 면역리포좀 군들 간의 지질 또는 약물의 평균 혈장 값들 간의 차이는 1.8 내지 13.6% 범위 내였고, 검정 오차에 근접하거나 그 범위 내였다. 스튜던트 t-테스트를 이용하여 계산된, 각 시점에서의 약물 또는 지질에 대한 리포좀 및 면역리포좀 간의 널(null) 가설의

확률은 0.543 내지 0.938 범위 내였다. 본 발명자들은 2개의 제제 간의 약물 또는 지질의 잔류 혈액 수준의 차이는 무시할만 하고, 통계적으로 분별불가능한 것으로 결론지었다.

표 21

[0247] 리포좀 지질, 토포테칸의 양, 및 정맥내 주사 후 각종 시점들에서의 마우스 혈장 내에서의 리포좀 내에 봉입된 채로 남아 있는 토포테칸의 양

주사후 시간	지질(주사량에 대한 %)	약물(주사량에 대한 %)	약물/지질(주사전 값에 대한 %)
F5-접합 리포좀형 토포테칸(Topo-F5ILs)			
1시간	57.58±4.95	55.45±7.23	96.14±7.32
8시간	35.37±3.84	34.18±5.87	96.31±11.92
24시간	15.51±11.84	12.30±9.02	79.36±8.03
리포좀형 토포테칸(비접합)(Topo-Ls)			
1시간	58.88±9.51	57.63±9.45	97.90±5.29
8시간	39.61±1.99	38.82±1.49	98.06±4.44
24시간	15.84±3.85	13.45±2.64	85.25±7.03

[0248] **실시예 29. BT-474 이종이식 모델에서의 리포좀형 및 항HER2-면역리포좀형 토포테칸의 항종양 효능**

[0249] 이 연구에서, 본 발명자들은 약물 포획에 대해 트리에틸암모늄-폴리포스페이트 구배를 사용하는 첫 번째 원형 토포테칸 면역리포좀을 사용하였다. 일반적으로 실시예 11 및 19의 방법에 따라 리포좀을 제조하였다. 지질 매트릭스 성분-DSPC(아반티 폴라 리피즈; 3 몰부), 콜레스테롤(칼바이오켐(Calbiochem), 98.3%; 2 몰부) 및 메톡시-PEG(2000)-DSPE(아반티 폴라 리피즈, 0.015 몰부)를 100% 에탄올 USP와 조합하여, 60℃에서 0.5 mM 인지질을 함유하는 용액을 수득하였다. 에탄올 지질 용액을 60℃에서 수성 트리에틸암모늄 폴리포스페이트 용액(0.608 M 트리에틸아민, 0.65 N 포스페이트, pH 6.1, 삼투질농도 531 mmol/kg)과 조합하고, 철저하게 혼합하여, 60℃에서 자동 온도 조절된 기체-압력 압출기(리펙스 바이오멤브레인즈)를 이용하여 세공 크기가 100 nm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 막(뉴클레포어, 코닝)을 통해 10회 압출하였다. 압출된 리포좀을 얼음 상에 냉각하고, 봉입되지 않은 트리에틸암모늄 폴리포스페이트를 5% 덱스트로스-5 mM HEPES-Na 완충액(pH 6.5)을 용리액으로 이용하는 세파로스 CL-4B 상의 겔 크로마토그래피를 이용하여 제거하였다. 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정 시에 103.8±35.1 nm이었다. 이 완충액 내의 리포좀을 0.35 mg 토포테칸 기재물질/μmol 인지질의 비로 30분 동안 60℃에서 토포테칸 히드로클로라이드와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 끝나면, 리포좀을 얼음 상에 냉각시키고, 용리액 20 mM HEPES-Na, 135 mM NaCl(pH 6.5)을 이용하는 세파덱스 G-75 상의 크로마토그래피 하여, 모든 봉입되지 않은 약물을 제거하였다. 이전에 보고된 바와 같이 형광측정에 의해 약물 함량을 구하였고, 포스페이트 검정에 의해 지질 함량을 구하였다. 이와 같이 수득된 리포좀형 토포테칸은 365.4±23.1 mg 토포테칸 기재물질/mmol 인지질을 가졌다. HER2-표적화 토포테칸 면역리포좀을 제조하기 위해, 일반적으로 실시예 19에 기재된 바와 같이, 이 리포좀형 토포테칸 제제의 일부분을 항HER2 scFv F5 및 말레이미도-PEG-DSPE 링커의 정제된 접합체와 함께 인큐베이션하였다. 간략히, 수성 10% 수크로스-10 mM Na 시트레이트 용액(pH 6.5) 내의 F5-PEG-DSPE 접합체를 15 mg 단백질/mmol 리포좀 인지질의 비로 토포테칸 리포좀과 조합하였고, 30분 동안 60℃에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 혼합물을 얼음 상에서 냉각하였고, 용리액 20 mM HEPES-Na, 135 mM NaCl(pH 6.5)을 이용하여 세파로스 CL-4B 상에 크로마토그래피하여, 모든 혼입되지 않은 scFv 접합체를 제거하였다. 이 부가적 인큐베이션 후에, 약물 대 지질 비가 14%만큼 감소되었다.

[0250] 1 내지 2 mg/mL의 토포테칸을 함유하는 토포테칸 리포좀 및 면역리포좀 제형물을 0.2 마이크론 무균 시린지 필터에 통과시키고, 폴리프로필렌 바이얼에 무균 분배하여 사용 전 1개월까지 4 내지 6℃에서 저장하였다.

[0251] 5% 덱스트로스 내에 2 mg/mL로 토포테칸 히드로클로라이드 분말을 용해시킴으로써 유리 토포테칸을 새로 제조하였고, 0.2-마이크론 시린지 필터에 통과시킴으로써 살균하였다.

[0252] HER2-과발현 BT-474 인간 유방선암 이종이식 모델을 실시예 10에 기재된 바와 같이 확립하였다. 종양 접종한지 13일 후에, 120 내지 350 mm^3 범위의 종양을 갖는 동물을 선택하여, 각기 12마리 동물의 1개 대조군 및 3개 처리군으로 무작위 분류하였다. 종양 접종한지 14, 18 및 21일 후에, 마우스를 5 mg/kg 체중의 주사량의 토포테칸 제형물의 정맥내(꼬리 정맥) 주사로, 또는 동일 체적의 생리염수로 처리하였다. 동물의 일반적 건강을 매일 모니터하였다. 종양 크기 및 체중을 종양 접종 후 53일까지 매주 2회 모니터하였다. 종양이 체중의 20%에 도달한

동물, 또는 진행 체중 감량이 20% 이상에 도달하는 동물을 안락사시켰다.

[0253] 도 11 및 12는 종양 성장 및 동물 체중 데이터를 각기 나타낸다. 리포좀형 토포테칸 제형물은 유리 약물보다 종양 성장 현탁액에서 더욱 활성이었고, F5-표적화 리포좀형 제형물은 비표적화 제형물에서보다 더욱 활성이었다. 관찰 기간이 끝날 때의 평균 종양 크기는 처리군들 간에 상당히 상이하였다(쌍을 이루지 않은 2-테일 스튜던트 t-테스트에 의한 p 값은 유리 v. 면역리포좀형 약물의 경우 1.2×10^{-6}이었고, 유리 v. 리포좀형 약물의 경우에는 0.000114이었으며, 리포좀형 v. 면역리포좀형 약물의 경우에는 0.00718이었다). 이에 따라, 리포좀 내 봉입된 토포테칸은 유리 약물보다 더욱 활성이었고, 항HER2 면역리포좀형 토포테칸은 비표적화 리포좀형 약물보다 더욱 활성이었다. 리포좀형 및 면역리포좀형 군에서, 초기 퇴행 후, 종양 재성장이 마지막 처리 10일 내에 일어났다. 유리 약물 군에서는 종양 퇴행이 없었다. 주어진 투여량에서 토포테칸의 리포좀형 제형물이 유리 약물보다 더욱 독성임을 알 수 있었다. 위장관 독성이 있었다. 리포좀형 토포테칸을 투여한 동물은 설사를 발달시켰고, 피크에서 약 14%의 체중 감량을 겪었다. 비표적화 리포좀형 군에서는 동물이 회복되었으나, 다만 연구가 끝날 때 한 마리(12.5%)가 지속적 15% 체중 감량을 가졌고, F5-표적화 군에서는 5마리 동물(41.6%)이 최종 병적 상태를 발달시켰으며 만료되었고, 2마리 이상(16.7%)이 약 15%의 지속적 체중 감량을 가졌다. 대조군 및 유리 약물 군에서, 체중 감량 또는 처리-관련 병적 상태가 없었다.

[0254] **실시예 30. 정맥 내 주사로 매주 3회 제공된 마우스에서의 유리 및 리포좀형 토포테칸의 최대 허용 투여량(MTD)**

[0255] 이 연구는 트리에틸암모늄 폴리포스페이트 용액을 0.65 M 트리에틸암모늄(pH 6.2)를 갖는 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트 용액으로 대체하고; 압출을 위해100-nm 대신에 80-nm 폴리카보네이트 막 필터를 사용한 것을 제외하고는 실시예 29와 같이 제조된 리포좀 토포테칸 제형물을 사용하였다. 가우스 어림법(QELS)으로 유사 탄성 광 산란 방법에 의해 구해진 체적-중량 측정 리포좀 크기는 95.1±19.6 nm(평균±SD)이었고; 약물/지질 비는 369.1±18.3 mg/인지질 mmol이었다. 2마리로 된 군에서의 5 내지 6 주령 암컷 스위스-웹스터 마우스(18 내지 20 g)에, 2 mg/kg 토포테칸 기재물질/주사의 투여량에서 출발하여 각기 다음 군에 대해서는 37.8 mg/kg의 투여량으로 1.8 인자씩 증가시켜 매주 1회의 스케줄에 맞추어 유리 또는 리포좀형 토포테칸을 3회 정맥내(꼬리 정맥) 주사 투여하였다. 면역리포좀형 토포테칸이 이 연구에 포함되지 않았다. 동물 체중 및 일반적 건강을 매일 모니터하였다. 처음 처리 이후 10일 이내의 기간 동안 2마리 동물 중 임의의 동물에서의 20% 초과의 진행 체중 감량 또는 임의의 때에서의 자연사는 독성 투여량을 나타내는 것으로 간주하였다. 동물 치사 및 체중 데이터에 따라, MTD는 유리 토포테칸의 경우에는 11.7 내지 21 mg/kg 범위 내, 리포좀형(원형 2) 토포테칸의 경우에는 2.0 내지 3.6 mg/kg 범위 내에 속하는 것으로 구해졌다. 두 번째 연구에서, 마우스에 2.0 mg/kg(리포좀형/면역리포좀형 토포테칸) 또는 12 mg/kg(유리 토포테칸)에서 출발하여 확립된 MTD 간격의 상위 범위 다음의 투여량이 달성될 때까지 1.15의 인자씩 각기 후속 군으로 증가시켜 유리, 리포좀형, 또는 F5-면역리포좀형 토포테칸(실시예 29에 기재된 바와 같이 이 실시예의 리포좀형 토포테칸으로부터 제조됨)을 주사하였다. 동물들 중 임의의 동물에서 치사 또는 최종 병적 상태를 초래하지 않은 최고의 투여량을 MTD로 간주하였고, 이는 유리 토포테칸의 경우에는 18.4 mg/kg, 리포좀형 토포테칸의 경우에는 3.0 mg/kg, 면역리포좀형 토포테칸의 경우에는 3.0 mg/kg인 것으로 나타났다. 이에 따라, 리포좀형 토포테칸은 유리 약물보다 더 큰 독성을 나타냈다.

[0256] **실시예 31. 0.125 내지 1.0×MTD 범위에서 BT-474 이종이식 모델에서의 리포좀형 토포테칸의 항종양 효능**

[0257] 이 연구에서는 실시예 30의 토포테칸 리포좀 및 F5-면역리포좀을 사용하였다. BT-474 피하 이종이식을 실시예 29에서와 같이 누드 마우스에서 성장시켰다. 종양 세포를 접종한지 18일 후에, 종양(105 내지 345 mm^3, 평균 약 200 mm^3)을 갖는 동물들을 6마리 동물/군의 처리군, 및 8마리 동물/군의 대조군으로 무작위로 분류하였다. 종양 접종한지 19, 23 및 27일 후에 3회 정맥내(꼬리 정맥) 주사로써 1×MTD, 0.5×MTD, 0.25×MTD, 또는 0.125×MTD로 동물에게 유리 또는 리포좀형 토포테칸을 투여하였다. 대조군에게는 생리염수를 주사 투여하였다. 종양 크기 및 동물 체중을 실시예 29에서와 같이 모니터하였다. 동물 체중 측정값을 수득하기 위해, (종양 밀도를 1.0으로 간주했을 때의 종양 크기로부터 계산된) 종양 중량을 총 동물의 체중 측정값에서 뺐다. MTD에서의 모든 약물 제형물은 항종양 활성을 나타냈다(도 13A 내지 13D). 각각의 MTD로, 또는 그것의 동일 분율(1/2, 1/4 또는 1/8)로 주입된 유리 및 리포좀형 약물 간의 효능 차이는 유의적이지 않았다. 이에 따라, TEA-SOS 구배를 이용한 약물의 리포좀 봉입은 항종양 활성의 약 6배 증가를 초래하였으나, 마찬가지의 약물 독성 증가도 초래하였다. 동물 체중의 역학관계는, 이후 치유되는 체중의 일시적 감소(전처리 값의 약 15%)를 나타낸 MTD에서의 유리 토포테칸 처리를 제외하고는 모든 처리들은 비독성이었음을 나타냈다(도 14).

[0258] **실시예 32. 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트 포획 방법을 이용하여 제조된 토포테칸 리포좀의 제조 및 표**

적화 생체외 세포독성

[0259] 일반적으로 643 mM TEA pH 5.7, 삼투질농도 530 mmol/kg, 및 약물/인지질 비 170 mg/mmol를 갖는 TEA-SOS의 포획된 용액을 이용하여, 실시예 18의 절차에 따라 리포좀형 토포테칸을 제조하였다. 리포좀은 155 mg 약물/mmol 인지질; 90% 로딩 효율, 및 입자 크기 105 nm를 가졌다. 이 리포좀을 일반적으로 실시예 19에 기재된 바와 같이, 1시간 동안 60℃에서 약 30 scFv/리포좀(15 mg 항체/mmol 인지질)로 F5-PEG-DSPE 접합체의 마이셀 용액과 함께 인큐베이션하였다. 항체-접합 리포좀을 세파로스 CL-4B를 이용하는 SEC에 의해 분리하였고, HBS-6.5 HEPES-완충 염수로 제형하였다. 항HER2 scfv(F5)의 결합 중에 약물/지질 비의 검출 가능한 변화는 없었다.

[0260] 암세포에 의한 토포테칸 제형물의 흡수율은 하기와 같이 구하였다. HER2-과발현 인간 유방선암 세포(SK-Br-3, ATCC HTB-30)를 150,000 세포/웰로 24-웰 세포 배양 플레이트에 도말하였고, 하룻밤 동안 순응시켰다. 세포를 37℃에서 4시간 동안 0.1 mM 및 0.01 mM의 리포좀 농도로 완전 성장 매질에서 F5-표적화 및 비표적화 리포좀형 토포테칸과 함께 (3벌로) 인큐베이션하였다. 세포를 0.1% 트리톤(Triton) X-100-70% 산성화 이소프로판올 혼합물 1:10 중에 가용화된 밸런스 염 용액으로 4회 헹구고, 각 웰 당 세포-연합 토포테칸의 양을 형광측정에 의해 구하였다. 결과(평균±표준오차)가 표 22에 요약되어 있다. 표적화 리포좀은 비표적화 리포좀보다 표적화 세포로 100 내지 300배 더 많은 약물을 전달하였다.

표 22

[0261] SK-Br-3 유방암 세포에 의한 리포좀형 토포테칸의 흡수율

제형물	0.1 mM 인지질에서의 토포테칸 흡수율(ng/웰)	0.01 mM 인지질에서의 토포테칸 흡수율(ng/웰)
비표적화 리포좀	4.76±0.24	0.607±0.088
HER2-표적화 리포좀	533.8±13.7	197.0±4.6
비: 표적화/비표적화	112.1±8.6	324±55

[0262] SKBr-3 유방암 세포에 대한 이 토포테칸 제형물의 세포독성을 실시예 27에 기재된 바와 같이 구하였다. SKBr-3 세포를 5,000 세포/웰로 96-웰 플레이트에 접종하여, 하룻밤 동안 순응시켰으며, 4시간 동안 37℃에서 세포 성장 매질 내의 유리, 리포좀형, 또는 F5-면역리포좀형 토포테칸의 농도(0.004 내지 30 μg/mL)를 증가시키면서 인큐베이션하였다. 약물을 함유하는 매질을 제거하였고, 세포를 72시간 동안 약물-비함유 매질에서 성장하도록 하였다. 웰 당 생존율 세포의 양을 티아졸릴 블루(MTT) 테트라졸륨 검정을 이용하여 구하였고, 이를 대조군(비처리) 세포에서의 그 양에 대한 %로 나타냈다. 결과가 도 10에 나와 있다. 토포테칸 면역리포좀이 비표적화 토포테칸 리포좀(IC_{50}≥3.1 μg/mL) 및 유리 토포테칸(IC_{50}±2.3 μg/mL)보다 더 큰 세포독성(IC_{50} 0.15 내지 0.5 μg/mL)을 가졌다.

[0263] **실시예 33. 상이한 크기의 토포테칸 리포좀의 생체내 안정성**

[0264] TEA-Pn을 함유하는 리포좀을, 100 nm 세공 크기 폴리카보네이트 막을 통해 12회 압출하거나, 50 nm 세공 크기 폴리카보네이트 막을 통해 12회 부가 압출하여, 실시예 22에서와 같이 제조하였다. 토포테칸(TPT)을 150 μg/μmol 인지질의 비로 첨가하였다. 열수조에서 45분 동안 58℃에서 로딩을 완료한 후, 얼음 상에서 급냉하였다. 50-nm 및 100-nm로 압출된 리포좀에 대한 로딩 효율은 각기 126.80±19.24 μg TPT/μmol PL(84.5±12.8%) 및 148.48±10.26 μg TPT/μmol PL(99.0±6.8%)이었다. 3마리로 된 군 내의 암컷 스위스 웹스터 마우스에 5 mg TPT/kg의 투여량으로 Ls-TPT의 2개의 제형물 중 하나를 정맥내 주사하였다. 6시간 동안 마우스를 희생시켰고, 혈액을 수집하였다. 혈장을 실시예 22에서와 같이 TPT 및 리포좀 지질에 대해 분석하였다. 결과가 표 23에 나와 있다.

표 23

[0265] TEA-Pn 포획 방법을 이용하여 로딩된 상이한 크기의 Ls-TPT의 생체내 안정성

리포좀 크기(nm)	혈장 내 약물 (주사량에 대한 %)	혈장 내 리포좀 지질 (주사량에 대한 %)	약물/지질 비 (주사전 값에 대한 %)
74.2±21.6	32.93±1.97	45.7±2.2	72.06±5.51
96.4±29.3	33.26±3.56	37.6±5.3	88.41±15.68

[0266] **실시예 34. 6-(3-아미노프로필) 엘립티신(6-APE)의 합성 및 리포좀 봉입**

[0267] [Werbel 등, *J. Med. Chem.* 1986, v. 29, p. 1321-1322]에 의한 절차에 기초한 2-단계 방법으로 엘립티신으로부터 6-(3-아미노프로필)엘립티신을 제조하였다. 501.4 mg의 엘립티신 기재물질(NSC 71795)(알드리히 케미칼 컴퍼니)를 실온에서 30분 동안 5 ml의 건조 디메틸포름아미드(DMF) 중에서 대략 100 mg의 수소화나트륨(시그마; 무수 석유 에테르로 세정됨)과 함께 교반하였다. 이 혼합물에, 2 mL의 건조 DMF 중 678 mg의 N-브로모프로필프탈이미드(알드리히)의 용액을 적가하였다. 자주색 반응 혼합물을 하룻밤 동안 아르곤 하에서 교반하고, 1 mL의 물로 처리하여, 60 ml의 물에 주입하였다. 혼합물을 25 mL의 메틸렌 클로라이드로 2회 추출하였고, 추출물을 무수 나트륨 술페이트로 건조시켜, 중성 알루미나 층에 통과시켰다. 알루미나층을 10 mL의 메틸렌 클로라이드로 2회 셍구고, 조합된 여과액 및 린스액을 진공 건조시켰다. 생성물을 하룻밤 동안 20 ml의 무수 에탄올 및 2 ml의 무수 히드라진과 함께 실온에서 교반하였다. 수득된 슬러리를 진공 하여 여과하였고, 황색 여과액을 50 mL의 0.2 N NaOH로 희석하여 클로로포름의 2부분(75 ml 및 50 ml)으로 추출하였다. 클로로포름 추출물을 Na_2SO_4로 건조시켜, 진공 건조시켰다. 조생성물(수율 408 mg)을 건조 트리메틸아민으로 포화된 클로로포름-메탄올 혼합물(체적비: 7:3)로 등용리하는 실리카 60 칼럼 상에 크로마토그래피하였다. 미반응 엘립티신에 이어 2번째 황색 밴드에서 용리된 분액은 대략 30% 수율로 목적 화합물을 함유하는 것으로 나와 있다. 구조를 ^{1}H-NMR로 확인하였다. TLC: R_f 0.29-0.31(실리카 60; $CHCl_3$-MeOH 체적비 7:3, 트리메틸아민으로 포화). 엘립티신, R_f 0.81-0.83. 수득된 화합물을 무수 에탄올 중에 용해시키고, 건조 이소프로판올 중 6 N HC1 용액으로 적정함으로써 디히드로클로라이드 염으로 전환시켰다. 6-APE 디히드로클로라이드(NSC 176328)의 오렌지색 결정을 여과하여 분리하여, 에테르로 헹구고, 진공 건조시켰다. 디히드로클로라이드의 수율 86%.

[0268] 0.5 M TMA, pH 5.6, 60℃에서 트리메틸암모늄 폴리포스페이트(TMA-Pn)의 용액 중에 DSPC, 콜레스테롤 및 PEG(분자량 2,000) - DSPE(3:2:0.015 몰비)의 순수 지질 필름을 수화시킨 후, 급속 냉동(-78℃) 및 해동(60℃)의 사이클을 6회 행하고, 2개의 적층된 50-nm 세공 크기 폴리카보네이트 필터를 통해 10회 압출함으로써, 리포좀을 제조하였다. HEPES-덱스트로스(5 mM HEPES, 5% 덱스트로스, pH 5.5)으로 용리되는 세파로스 CL-4B 칼럼을 이용하여, 봉입되지 않은 TMA-Pn을 제거하였다. 리포좀 크기는 85.7±32.1 nm이었다.

[0269] 농축된 6-APE 용액(10 mg/ml)을 100 μg APE/μmol 인지질의 약물-대-인지질 비로 TMA-Pn 함유의 리포좀에 첨가하였고, 혼합물을 58℃에서 45분 동안 인큐베이션하고, 15분 동안 얼음 상에 급속 냉각시켰다. HEPES-덱스트로스 완충액(5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스, pH 6.5)로 용리되는 세파덱스 G-75 칼럼 상의 겔 크로마토그래피에 의해 봉입되지 않은 약물을 제거하였다. 이어서, 리포좀-포획된 APE을 실시예 71에서와 같이 분광광도법에 의해 정량화하였고, 리포좀 인지질을 실시예 70의 추출 검정을 이용하여 구하였다. 약물 봉입은 실질적으로 정량적이었다.

[0270] **실시예 35. HER2-표적화 면역리포좀형 6-APE의 제조, 및 생체외 HER2-과발현 BT-474 유방암 세포에 대한 6-APE 제형물의 세포독성**

[0271] 봉입된 6-APE를 갖는 리포좀(Ls-APE)을 상기 실시예 34에서와 같이 제조하였다. 봉입된 6-APE를 갖는 항HER2 면역리포좀(F5-ILs-APE)을 실시예 19의 방법에 의해 Ls-APE로부터 제조하였다. 실시예 27의 MTT-기재의 세포 생존율 검정을 사용하여, HER2-과발현 인간 유방암종 세포(BT-474)에 대해 용액, Ls-APE으로서, 또는 HER2-표적화 F5-ILs-APE로서 전달된 6-APE의 세포독성을 구하였다. 세포를 6시간 동안 약물을 함유하는 매질에 노출하였고, 3일 동안 약물-비함유 매질 중에 후-인큐베이션하였다. 결과가 도 15에 나와 있다. 유리 APE의 IC_{50}는 0.26 μg APE/ml이었고, F5-ILs-APE에서의 IC_{50}는 0.756 μg APE/ml이었으며, 비표적화 Ls-APE의 IC_{50}는 51.0 μg APE/ml이었다. 표적화 및 비표적화 리포좀형 6-APE 간에 67.5배 차이가 있었고, 이는 상당한 표적화 전달 효과를 나타낸다.

[0272] **실시예 36. 6-APE의 EGFR-표적화 면역리포좀형 제형물, 및 생체외 암세포에 대한 세포독성**

[0273] 6-APE이 로딩된 리포좀을 실시예 34에서와 같이 제조하였다. 하기와 같이 EGFR-특이적 Fab' 항체 단편의 결합에 의해 EGFR-표적화 면역리포좀을 제조하였다. EGFR-특이적 IgG MAb C225(세툭시맙(cetuximab), 에르비툭스(ERBITUX)™, 임클론 시스템즈(Imclone Systems))를 펩신으로 소화하여, $(Fab')_2$ 단편을 생성시켰다. 정제된 $(Fab')_2$ 단편을 37℃에서 15분 동안 10 내지 20 mM 2-메르캅토에틸아민으로 처리함으로써 환원시켰고, Fab' 단편을 세파덱스 G-25를 이용한 겔 여과에 의해 정제하였다. 반응성 티올기의 존재는, 전형적으로 단백질 분자당

약 0.9 티올기가 있었다(엘만(Ellmann) 시약에 의한 정량화). C225Fab'를 2 내지 4시간 동안 실온에서 또는 하룻밤 동안 4 내지 6℃에서, pH 6.2 내지 6.5 및 단백질-링커 몰비 1:4로 수용액 중 양친성 링커 Mal-PEG-DSPE(아반티 폴라 리피즈, 미국 알라바마주 소재)에 공유 결합시켜, 수율이 30 내지 50% 단백질 수율인 C225Fab'-PEG-DSPE 접합체를 생성시켰다. 이 마이셀 형성 접합체를 HBS-6.5 완충액으로 용리되는 3% 아가로스-4% 폴리아크릴아미드 비드 겔(울크로겔(Ultrogel) AcA34, 시그마 케미칼 컴퍼니로부터 입수) 상의 크기 배제 칼럼 크로마토그래피에 의해 비반응 단백질로부터 분리하였다. 접합체를 공극 체적 분획에서 회수하였다. 60℃에서 30분 동안 30 mg C225 단백질/mmol 리포좀 인지질의 비로 약물이 로딩된 리포좀 및 C225 Fab'-PEG-DSPE와 함께 상기 리포좀을 인큐베이션함으로써 면역리포좀형 6-APE를 형성시켰고, 이를 15분 동안 얼음 상에서 급냉시켰고, HBS-6.5 완충액으로 용리되는 세파로스 CL-4B 칼럼 상의 겔 크로마토그래피에 의해 면역리포좀을 정제시켰다(리포좀은 칼럼의 공극 체적 내 또는 그 부근에 나타난다).

[0274] 낮은 EGFR 발현(ATCC, 미국 매릴랜드주 로크빌 소재)를 갖는 MCF-7 인간 유방암 세포 및 MDA-MB-468 EGFR-과발현 인간 유방암 세포를 그것의 공급자 추천 성장 매질에서 배양하였고, 이 세포에 대한 유리, 리포좀형 및 항 EGFR-면역리포좀형 6-APE의 세포독성을 실시예 27의 방법에 따라 연구하였다. 세포를 6시간 동안 약물을 함유하는 매질와 함께 인큐베이션한 후, 3일간 약물-비함유 매질에서 후-인큐베이션하였다. 결과가 도 16에 나와 있다. MDA-MB-468 세포에서 IC_{50}는 유리 6-APE의 경우에는 약 0.1 μg/ml이었고, C225-ILs-APE의 경우에는 약 0.9 μg/ml이었다. MCF-7 세포에서 IC_{50}는 유리 6-APE의 경우 약 0.5 μg/ml이었으며, C225-ILs-APE의 경우에는 약 14 μg/ml이었다. 양 세포주 모두에서의 Ls-APE의 IC_{50}는 >30 μg/ml이었다. 이에 따라, EGFR-표적화 6-APE이 로딩된 면역리포좀은 EGFR-과발현 MDA-MB-468 유방암 세포에서는 항원-특이적 세포독성 활성을 나타냈으나, EGFR을 과발현하지 않는 MCF-7 유방암 세포에서는 나타내지 않았다. MCF-7 세포에서, 표적화 및 비표적화 6-APE 리포좀은 동등하게 활성이었다.

[0275] **실시예 37. 래트에서의 리포좀형 6-APE의 약물동태**

[0276] 포획된 TEA-Pn 용액(557 mM 포스페이트기, 500 mM TEA, pH 5.8, 삼투질농도 480 mmol/kg), 및 DSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE(몰비: 3:2:0.015)의 지질 조성을 갖는 리포좀을 상기 실시예 11에서와 같이 제조하였다. 지질의 에탄올성 용액을 60℃에서 10 체적의 TEA-Pn 수용액과 조합하였고, 2개의 적층된 80 nm 세공 크기 폴리카보네이트 막을 통해 10회 압출하였다. MES-덱스트로스(5 mM MES-Na, 5% 덱스트로스, pH 5.5)으로 용리되는 세파로스 CL-4B 칼럼을 이용하여 봉입되지 않은 TEA-Pn을 제거하였다. 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정 시에 92.3±23.3 nm였다. 교환불가능한 방사능 지질 표지 [^{3}H]-CHE를 0.5 mCi/mmol 인지질로 지질 매트릭스 내에 포함시켰다. 리포좀에 실시예 34에 기재된 바와 같이 6-APE를 로딩하였다.

[0277] 약물동태 연구는 실시예 9의 프로토콜을 따랐다. 암컷 심 알비노(Sim Albino) 래트(9주령, 200 g)에 10 mg 6-APE/kg의 투여량으로 정맥내 주사하였다. 소정의 시점들에서 혈액을 인취하였고, 혈장을 형광측정에 의해 6-APE에 대해 분석하였다. 혈장 분취량(0.05 내지 0.2 ml)을 1 내지 2 mL의 90% 수성 이소프로판올-0.1 N HCl과 혼합하였고, 6-APE를 실시예 71과 같이 형광에 의해 정량화하였다. 지질을 [^{3}H]-CHE 방사능 섬광 계수에 의해 정량화하였다.

[0278] 결과가 도 17에 나와 있다. 약물의 혈중 반감기($t_{1/2}$)는 13.7시간이었고, 리포좀 지질의 혈중 반감기($t_{1/2}$)는 16.6시간(패널 A)이었다. 리포좀으로부터의 약물 방출의 반감기는 77.9시간이었고, 이는 현저한 봉입 안정성(패널 B)을 나타낸다.

[0279] **실시예 38. 2-(2-(N,N-디에틸아미노)에틸)엘립티시늄(2-DAE)의 합성 및 리포좀형 봉입**

[0280] 트리에틸아민의 존재 하에 엘립티신을 메탄올 중 2-(N,N-디에틸아미노) 에틸클로라이드로 알킬화함으로써 제조되는 2-(2-(N,N-디에틸아미노)에틸-엘립티시늄 클로라이드(NSC 359449)는 항암 엘립티신 유도체이다([Werbel, L. M., Angelo, M., Fry, D. M., 및 Worth, D. F. *J. Med. Chem.* 1986, **29**:1321-1322] 참조). 포획된 TEA-Pn을 함유하는 리포좀을 실시예 37에 기재된 바대로 제조하였다. 2-DAE. 2HCl을 5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스, pH 7.4에서 100 μg/μmol의 2-DAE-대-인지질 비로 TEA-Pn 리포좀과 함께 인큐베이션하였다. 로딩된 약물의 양은 88.2 μg APE/μmol PL(효율 88.2%)이었다.

[0281] **실시예 39. 래트에서의 리포좀형 2-DAE의 약물동태**

[0282] 리포좀형 2-DAE(실시예 38)의 혈중 약물동태를 실시예 37에서와 같이 래트에서 연구하였다. 2-DAE의 $t_{1/2}$는 17.8

h이었고, 리포좀 지질 매트릭스의 $t_{1/2}$는 18.2 h(A)이었다. 혈중 리포좀으로부터의 약물 방출의 반감기는 $t_{1/2}$ = 677 h(B)이었다. 이에 따라, 이 리포좀은 혈류에서 약물 누출에 대해 매우 안정하였다.

[0283] **실시예 40. TEA-Pn 방법을 이용한 리포좀 내로의 비노렐빈의 로딩. pH의 영향**

[0284] 0.608 M TEA, 0.65 M 포스페이트기, pH 6.1, 및 삼투질농도 531 mmol/kg의 TEA-Pn 용액을 이용하여, 실시예 11에서와 같이 에탄올 주입법에 의해 또한 지질 현탁 압출을 2개의 적층된 100 nm 세공 크기 폴리카보네이트 막을 통해 15회 수행함으로써, 리포좀을 제조하였다. 수득된 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정 시에 108.3±17.1 nm이었다. 비노렐빈 비타르트레이트 10 mg/mL USP의 원액 형태의 비노렐빈(VRB)을, 350 μg/μmol의 약물-대-인지질 비로 수성 5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스, pH 6.5에서 리포좀에 첨가하였고, pH를 1-5 N NaOH를 이용하여 목적값으로 조정하였으며, 혼합물을 30분 동안 58±2℃에서 인큐베이션하였다. 이어서, 혼합물을 15분 동안 얼음 상에서 냉각하였고, HBS-6.5 완충액(20 mM HEPES-Na, 135 mM NaCl, pH 6.5)으로 용리하는 세파덱스 G-75 겔 여과 크로마토그래피에 의해 봉입되지 않은 약물을 제거하였다. 이어서, 분취량의 정제된 리포좀을 산 이소프로판올 중에 가용화하여, 270 nm에서 분광광도법을 이용하여 비노렐빈에 대해 분석하였다. 메탄올-클로로포름 추출 후에, Bartlett(1959)의 포스페이트 검정을 이용하여 리포좀 인지질을 정량화하였다.

[0285] 로딩 후의 계산된 약물 대 지질 비는 표 24에 나와 있는 바와 같았다. 비노렐빈 로딩을 정량적이었고(즉, 실질적으로 100%), 연구된 범위에서 pH와 무관하였다.

표 24

[0286] 외부 완충액의 각종 pH 값에서의 포획된 TEA-Pn을 갖는 리포좀 내로의 비노렐빈 로딩

pH	약물 대 인지질 비(μg/μmol)	로딩 효율(%)
4.5	351.2±52.88	100.4±15.2
5.0	347.6±6.35	99.3±1.8
5.75	355.2±11.2	101.5±3.2
6.25	377.0±21.5	107.7±6.6
7.0	374.3±29.58	106.9±9.0

[0287] **실시예 41. 각종 약물/지질 비들에서 TEA-Pn 방법에 의해 제조된 리포좀형 비노렐빈: 마우스에서의 봉입 효율 및 생체내 안정성**

[0288] [^{3}H]-CHE을 1.5 mCi/mmol 인지질로 지질 매트릭스에 포함시키는 것을 제외하고는 실시예 40에 따라 포획된 TEA-Pn 용액을 갖는 리포좀을 제조하였다. 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정 시에 98.5±34.3 nm이었다. 150 내지 450 mg VRB/mmol의 약물-대-인지질 비로 5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스, pH 6.5의 수성 완충액에서 비노렐빈 비타르트레이트 USP와 혼합하였고, 이를 30분 동안 58±2℃에서 인큐베이션하였다. 약물 첨가 후에 pH 조정을 행하지 않았다. 비노렐빈이 로딩된 리포좀(Ls-VRB)을 단리하여, 실시예 40에서와 같이 약물 및 인지질에 대해 분석하였다.

[0289] 3마리 군 내의 암컷 5-6주령 스위스 웹스터 마우스(하알란 리서치)에 5 mg VRB/kg의 투여량으로 Ls-VRB-Pn을 정맥내 주사하였다. 지질 투여량은 로딩 정도에 따라 달랐고, 상기 계산된 약물 대 지질 비로부터 구해질 수 있다. 주사한지 8시간 또는 24시간 후에, 동물을 마취하여 방혈하였고, 혈액을 얼음 상에서 수집하여 0.04% EDTA와 함께 기지량의 PBS를 함유하는 칭량된 관으로 보냈다. 혈액 세포를 원심분리에 의해 분리하였고, 상등액을 [^{3}H]-CHE에 의해 리포좀 지질에 대해 분석하였다. 방사능 섬광 계수 및 비노렐빈에 대해서는 HPLC의 이용은 하기와 같다. 샘플을 빈블라스틴(내부 표준)으로 스파이킹하였고, 디에틸 에테르로 추출하였으며, 증발시켰고, 잔류물을 수성 50 mM 트리에틸암모늄 아세테이트(pH 5.5) 및 아세토니트릴(58:42 체적비)로 구성된 이동상에 용해시켰다. C-18 가드 칼럼에 의해 선행되는 C_{18} 역상 실리카 칼럼(수펠코(Supelco) C-18 칼럼, 250 mm×4 mm 내경, 입자 크기 5 μm) 상에 샘플을 로딩하였다. 칼럼을 1.0 ml/min의 유속으로 상기 이동상과 등용리하였다. 280 nm에서 흡광도 검출기를 이용하여 VRB를 검출하였다. VRB 및 빈블라스틴(내부 표준)에 대한 전형적인 체류 시간은 각기 9.1분 및 7.8분이었다.

[0290] 결과가 표 25에 나와 있다. 약물/지질 비가 증가함에 따라 로딩 효율이 감소하였는데, 150 mg/mmol에서는 실질적으로 100%이었으나 이는 450 mg/mmol에서 약 66%가 되었다. 250 mg 비노렐빈/mmol 인지질 초과의 비로 비노렐빈 비타르트레이트르 첨가하면, 리포좀 현탁액의 실질적 산화를 유발하였고(pH <4.0), 이는 로딩 효율을 감소시

켰음을 알 수 있었다. 이에 따라, 약물 로딩 단계 동안의 pH 조절에 대한 필요가 있었다. 8시간 후의 혈중에서 검출된 리포좀 매트릭스의 양은 주사된 투여량의 30.4±6.6%(%id)의 범위 내지 38.6±5.2% id 범위 내였고, 이는 주사된 지질의 절대적 양과 명백한 관계가 없었다. 24시간 후에, 혈중 검출 가능한 지질 매트릭스의 6.4%ID 내지 14.8%ID가 여전히 있었다. 8시간 후에 봉입된 채로 남아 있는 약물의 양은 37% 내지 63%에서 다양하였다. 그러나, 주사한지 24시간 후에 약물 수이 이용된 분석 방법의 검출 한도 미만으로 떨어졌다.

표 25

[0291] TEA-Pn 방법을 이용하여(로딩 완충액의 pH 조정 없음) 상이한 약물/지질 비로 제조된 리포좀형 비노렐빈의 봉입 효율 및 생체내 약물 체류. 약물 체류 데이터는 평균±SD(N=3)이다.

비노렐빈/인지질 비			주사한지 8시간 후에 봉입된 채로 남아 있는
계산 투입량(mg/mmol)	측정 산출량(mg/mmol)	봉입 효율(%)	약물(%)
150	156	104.0	36.6±4.2
250	238	95.2	56.3±1.3
350	260	74.3	65.9±2.3
450	299	66.4	63.0±4.1

[0292] **실시예 42. 각종 약물/지질 비에서 TEA-SOS 방법을 이용한 리포좀 내로의 비노렐빈 로딩**

[0293] 0.65 M TEA, pH 5.4, 삼투질농도 521 mmol/kg를 갖는 TEA-SOS 용액을 TEA-Pn 용액 대신에 사용하고, 리포좀을 80 nm 세공 크기 폴리카보네이트 막을 통해 압출한 것을 제외하고는 실시예 40에서와 같이 약물 로딩에 대한 TEA-SOS 리포좀을 제조하였다. 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정 시에 86.6±12.9 nm였다. VRB를 각종 약물-대-인지질 비로 수성 5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스, pH 6.5 중 리포좀에 첨가하였고, 혼합물을 후속하여 30분 동안 60℃에서 인큐베이션하였다. 이어서 VRB이 로딩된 리포좀을 단리하여 실시예 40에서와 같이 분석하였다.

[0294] VRB 리포좀에서의 계산된 약물 대 지질 비가 표 26에 나와 있다. 현저하게, 중합체성 음이온 지지 로딩과 반대로, 다중음이온화 당(수크로스 옥타술페이트)과 함께 리포좀 내의 비노렐빈 로딩은 450 mg VRB/mmol 인지질 이하의 약물/지질 비와 무관하게 실질적으로 정량적이며, 단지 550 mg VRB/mmol 인지질에서 단지 약간 더 적었다(88%).

표 26

[0295] 약물 대 지질 비에 대한 리포좀 내로의 비노렐빈 로딩의 의존성

비노렐빈/인지질 비(mg/mmol)		로딩 효율(%)
총	리포좀 내로의 봉입	
150	159.9±11.5	106.6±8.1
250	255±12.4	102.2±5.1
350	381.8±16.3	109.1±5.1
450	456.1±29.5	101.4±6.6
550	486.2±26.0	88.4±4.2

[0296] **실시예 43. TEA-Pn 방법에 의해 비노렐빈이 로딩된 HER2-표적화 면역리포좀의 제조, 및 래트에서의 HER2-표적화 및 비표적화 비노렐빈 리포좀의 혈중 약물동태 비교**

[0297] 실시예 19에서와 같이 항HER2 scFv F5-PEG-DSPE 접합체를 제조하였다. 30분 동안 60℃에서 수성 20 mM HEPES-Na, 135 mM NaCl, pH 6.5 완충액 내에 15 mg/mmol의 단백질/인지질 비로 비표적화 비노렐빈 리포좀(실시예 41, 350 mg/mmol의 약물/인지질 비로 로딩됨)을 F5-PEG-DSPE 접합체(실시예 19)와 함께 인큐베이션함으로써, HER2-표적화 비노렐빈 면역리포좀을 제조하였다. 비혼입 F5 접합체를 동일한 완충액으로 용리되는 세파로스 4B 칼럼 상의 겔 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 비표적화 리포좀(Ls-Pn-VRB) 및 HER2-표적화 리포좀(F5-ILs-Pn-VRB)을 5 mg VRB/kg의 투여량으로 암컷 알비노 래트(8-9주령, 200 g)에 정맥내 투여하였다. 각종 시점들에서, 실시예 9에 기재된 바대로 혈액을 수집하여, 실시예 41에서와 같이 VRB 및 리포좀 지질에 대해 분석하였다. 리포좀 지질의 혈중 반감기 및 50% 약물 방출 사건을, 지질 농도-시간 플로트로부터, 또는 약물/지질 비-시간 플로트에 의해, 마이크로소프트 엑셀(MICROSOFT EXCEL)(마이크로소프트 코포레이션(Microsoft Corp.)) 스프레드시

이트 트렌드(TREND) 함수를 이용하여 단차 지수 역학관계에 대한 최적 적합을 찾음으로써 각기 계산하였다. 결과(도 18)는 표적화 및 비표적화 비노렐빈 리포좀 모두가 약 12.1시간의 지질 반감기, 및 약 4.3시간의 약 50% 약물 방출 시간과 함께 동일한 약물 및 지질 약물동태를 가짐을 나타냈다.

[0298] **실시예 44. 암모늄 및 치환된 암모늄 염을 이용하여 제조된 비노렐빈 리포좀의 제조 및 생체내 안정성 비교**

[0299] pH 5.8, 0.65 M NH_4^+, 삼투질농도 390 mmol/kg을 갖는 암모늄 덱스트란 술페이트(DS-A) 용액, 및 pH 6.0, 0.65 M NH_4^+, 삼투질농도 465 mmol/kg을 갖는 트리에틸암모늄 덱스트란 술페이트 용액(DS-TEA)을, 12.4 M 수성 암모니아 또는 순수 트리에틸아민으로의 적정을 이용하여, 실시예 4의 방법에 따라 분자량 10,000을 갖는 덱스트란 술페이트(시그마 케미칼 컴퍼니)로부터 각기 제조하였다. 암모늄 술페이트(S-A) 수용액(325 mM, pH 5.1, 삼투질농도 703 mmol/kg)을 분석용 등급 암모늄 술페이트로부터 제조하였다. 3개 모든 용액들은 1% 미만의 Na^+ 함량인 총 양이온 함량을 가졌다. 이 용액을 포획하는 리포좀을 실시예 41의 에탄올 혼합-압출 방법(DSPC/콜레스테롤/PEG-DSPE 3:2:0.015 몰비)을 이용하여 제조하였다. 방사능 지질 표지 [^{3}H]-CHE는 1.5 mCi/mmol 인지질로 지질 매트릭스 내에 포함되었다. 압출 단계는 2개의 적층된 0.1 μm 폴리카보네이트 막을 통한 10회 통과로 구성되었다. VRB를 350 mg/mmol의 약물-대-인지질 비로 5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스, pH 6.5에서 리포좀에 첨가하였고, pH를 1 N NaOH를 이용하여 6.5로 조정하였으며, 혼합물을 30분 동안 58 내지 60℃에서 인큐베이션하였다. 이어서, 반응물을 15분 동안 얼음 상에서 냉각하였고, 수성 20 mM HEPES-Na, 135 mM NaCl, pH 6.5로 용리하는 세파덱스 G-75 겔 여과 크로마토그래피에 의해 봉입되지 않은 약물을 제거하였다. 정제된, 비노렐빈이 로딩된 리포좀을 분광광도계에 의해 VRB에 대해 분석하였고, Bartlett(1959)의 포스페이트 검정을 이용하여 인지질에 대해 분석하였다(실시예 70, 71 참조). 리포좀형 지질 및 약물의 혈중 약물동태를 실시예 43에서와 같이 래트에서 연구하였다.

[0300] 결과가 도 19-20, 및 표 27에 나와 있다. 트리에틸암모늄 덱스트란술페이트로 로딩된 리포좀을 덱스트란 술페이트의 암모늄 염으로 로딩된 리포좀과 비교하였다. 예상치 못하게도, 트리에틸암모늄 염을 이용하여 로딩된 리포좀은 암모늄 염을 이용하여 로딩된 리포좀보다 상당히 더 안정하였다. 리포좀형 운반체 자체의 약물동태는 세개의 상이한 제형물의 약물동태와 유사하였고, 따라서 이는 주로 이용되는 지질 조성에 의존하였다. 트리에틸암모늄 덱스트란 술페이트를 이용하여 로딩된 Ls-VRB로부터의 비노렐빈의 누출은 암모늄 덱스트란술페이트를 이용하여 로딩된 Ls-VRB보다 약 3배 더 느렸다. 암모늄 술페이트를 이용하여 로딩된 리포좀은 가장 빠른 약물 누출 속도를 가졌다.

표 27

[0301] 포획된 암모늄 및 치환된 암모늄 염을 이용한 리포좀 내로의 약물 봉입의 생체내 안정성 비교

제형물 (리포좀에 포획된 염)	리포좀 크기(nm) (평균±SD) (QELS에 의해 측정)	지질 매트릭스의 혈중 반감기(h)	혈중 50% 약물 방출되는 시간(h)
DS-TEA	120.8±28.5	9.5±3.3	66.3±13.4
DS-A	107.8±15.4	11.2±0.6	22.9±1.7
S-A	114.5±15.6	10.7±0.2	1.77±0.16

[0302] **실시예 45. 비노렐빈이 로딩된 각종 크기의 리포좀의 제조 및 생체내 안정성**

[0303] 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트(0.65 M TEA, pH 6.4, 삼투질농도 502 mmol/kg)의 포획된 용액을 갖는 [^{3}H]-CHE-표지 리포좀(1.5 mCi/mmol 인지질)을, 실시예 11의 에탄올 혼합-압출 방법에 의해 제조하였다. 압출 단계는 세공 크기가 0.05, 0.08, 또는 0.1 μm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 막을 통한 15회 통과를 포함하였다. 비노렐빈 로딩, 비노렐빈 리포좀의 단리, 및 리포좀 특징화는 실시예 40의 방법을 따랐다. 암컷 알비노 래트(8-9주령; 200 g)를 사용하여 리포좀의 생체내 안정성을 연구하였다. 리포좀 지질 및 약물 약물동태를 실시예 43에서와 같이 래트에서 연구하였다.

[0304] 결과가 도 21, 22, 및 하기 표 28에 나와 있다. 0.05, 0.08 및 0.1 μm 폴리카보네이트 필터를 통해 압출된 리포좀들을 비교하였고, 이는 유사한 약물 및 리포좀형 운반체 약물동태, 및 유사 정도의 내용물 누출을 나타냈다. 혈중 리포좀으로부터의 약물 방출은 24시간을 족히 초과하는 대략 40 내지 80시간 범위의 50% 방출

시간을 그 특징으로 하였다.

표 28

[0305] 비노렐빈 리포좀의 특징화

리포좀 크기(nm) (평균±SD) (QELS에 의해 측정)	약물 로딩량 (mg/인지질 mmol)	로딩 효율(%)	지질 매트릭스의 혈중 반감기(h)	혈중 50% 약물 방출되는 시간(h)
87.6±28.1	352.4±13.9	100.7±4.0	14.6±0.7	19.7±3.1
98.5±15.1	322.6±22.7	92.2±6.5	13.0±0.2	47.9±3.8
109.6±24.6	357.0±10.5	102.0±3.0	14.3±0.3	78.0±1.4

[0306] **실시예 46. TEA-SOS 포획 방법을 이용한 HER2-표적화 비노렐빈 리포좀의 제조, 및 래트에서의 HER2 scFv-표적화 및 비표적화 면역리포좀형 비노렐빈의 약물동태**

[0307] 350 mg/mmol의 약물-인지질 비로 비노렐빈이 로딩된 리포좀을 제조하였고, 이를 실시예 45의 TEA-SOS 용액을 TEA-Pn 용액으로 대체한 것을 제외하고는 실시예 43에 기재된 바대로 분석하였다. 압출 단계는 0.08 μm 세공 크기 폴리카보네이트 필터를 통한 15회 통과를 포함하였다. 리포좀 크기는 QELS에 의해 측정 시에 95.0±26.0 nm이었다. 이 비노렐빈 리포좀으로부터 F5scFv-연결 항HER2 비노렐빈 면역리포좀을 제조하였고, HER2-표적화 및 비표적화 리포좀 비노렐빈의 약물 및 리포좀형 지질의 혈중 약물동태를 실시예 43에 기재된 바대로 래트에서 연구하였다. F5-ILs-VRB 및 Ls-VRB에 대해, 리포좀 지질의 순환 반감기는 각기 11.4시간 및 10.3시간이었고, 50% 약물 방출 시간은 각기 30.9시간 및 30.3시간이었다. 이에 따라, Ls-VRB 및 F5-ILs-VRB의 지질 및 약물 약물동태는 매우 근접하였고, 이는 scFv-PEG-DSPE 접합체의 도입이 운반체 자체의 제거에 영향을 주지 않았을 뿐만 아니라, 순환하는 동안 운반체로부터의 약물의 누출 증가를 초래하지도 않았다(도 23 및 24).

[0308] **실시예 47. 폴리(에틸렌 글리콜)의 비이온성 지질 유도체를 포함하는 비노렐빈 리포좀의 제조 및 약물동태 성질**

[0309] 합성 C_{20}-세라마이드(PEG-세라마이드)의 메톡시-PEG(분자량 2,000)-유도체를 노던 리피즈 인코포레이티드(캐나다)로부터 입수하였다. 메톡시-PEG(분자량 2,000)-디스테아로일글리세롤(PEG-DSG)(선브라이트(SUNBRIGHT) GS20)는 NOF 코포레이션(일본)으로부터 입수하였다.

[0310] 실시예 11의 에탄올 혼합/압출 방법에 의해 3:2:0.3 몰비로 된 DSPC, 콜레스테롤 및 PEG-지질(PEG-세라마이드 또는 PEG-DSG)의 지질 조성, 및 포획된 TEA-SOS 용액(0.65 M TEA, pH 6.4, 삼투질농도 502 mmol/kg)을 가지는 리포좀을 제조하였다. 압출 단계는 세공 크기가 0.2 μm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 막 필터를 통한 2회 통과, 및 세공 크기가 0.08 μm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 막 필터를 통한 10회 통과의 2가지 통과를 포함하였다. 리포좀에 350 mg/mmol의 약물/인지질 비로 비노렐빈을 로딩하였고, 이를 크기, 약물, 및 지질 농도에 의해 특징화하였으며, 그것의 약물동태를 실시예 46에서와 같이 래트에서 연구하였다. 양 제형물 모두 지질 매트릭스의 연장된 순환 시간, 및 생체내 약물의 저속 방출을 나타냈고, 하기 표 29에 나와 있는 바와 같이, 약물의 50% 이상이 생체내 혈중 24시간 후에 봉입된 채로 남았다.

표 29

[0311] 각종 PEG-지질을 갖는 비노렐빈 리포좀의 특징화

PEG-지질	리포좀 크기(nm) (평균±SD) (QELS에 의해 측정)	약물 로딩량 (mg/인지질 mmol)	로딩 효율(%)	지질 매트릭스의 혈중 반감기(h)	혈중 50% 약물 방출되는 시간(h)
PEG-세라마이드	103.3±30.9	291.4±18.0	83.26±5.14	14.0	102.7
PEG-DSG	101.3±20.1	359.3±7.2	102.7±2.1	15.1	24.6

[0312] 현저하게, 이 리포좀(PEG 지질 함량: 총 지질의 약 5.7 몰%)의 증가된 PEG화는 실질적으로 총 지질의 약 0.3 몰%의 저 PEG화를 갖는 유사한, 크기로 매칭된 리포좀에 비해, 리포좀 혈액 순환 지속성에 실질적으로 영향을 주지 않았다(실시예 45, 109.6 nm, $t_{1/2}$=14.3시간; 98.5 nm, $t_{1/2}$=13.0시간).

[0313] **실시예 48. HER2-표적화 리포좀형 비노렐빈의 제조, 및 생체외 MDA-MB-453 세포에 대한 유리, HER2-표적화, 및 비표적화 리포좀형 비노렐빈의 세포독성**

[0314] pH 6.0 및 350 μg 비노렐빈/μmol 인지질에서의 약물 로딩을 이용하여 실시예 42에서와 같이([^{3}H]-CHE 비사용) 비노렐빈이 로딩된 리포좀(Ls-VRB)을 제조하였다. [^{3}H]-CHE을 첨가하지 않은 것을 제외하고는 상기 실시예 19 및 42에 기재된 바대로 이 리포좀을 F5-PEG-DSPE 접합체와 함께 인큐베이션함으로써, 항HER2 면역리포좀형 비노렐빈(F5-ILs-VRB)을 형성시켰다. 비노렐빈 비타르트레이트 10 mg/ml 용액 USP를 희석하여 세포 배지가 되도록 함으로써 "유리" 비노렐빈을 제조하였다.

[0315] MDA-MB-453는 HER2 수용체(약 3×10^4 내지 1×10^5 복제수/세포)를 적당히 과발현하는 인간 유방선암 세포(미국 모식균배양수집 협회, 미국 매릴랜드주 로크빌 소재)이다. 공급자 추천 성장 조건(10% 우아 혈청을 가지고, CO_2 보충이 없는 라이보우비츠(Leibowitz) L-15) 하에서 96 웰 마이크로티터 플레이트에 10,000 세포/웰의 밀도로 도말하고, 약물 제형물을 0.03 내지 0.1 mg/ml에서 출발하여 일련의 1:3 단계별 희석으로 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 27에 기재된 바대로 MDA-MB-453 세포에 대한, 유리 약물, 비표적화 리포좀형 비노렐빈, 또는 HER2-표적화 (F5)-면역리포좀형 비노렐빈으로서 전달된 VRB의 세포독성을 구하였다. 세포 생존율 데이터를 약물 농도에 대해 플로팅하였고(도 25), 세포 생존율을 50%로 감소시키는데 필요한 약물 농도(IC_{50})를 그래프로부터 평가하였다. F5-표적화 비노렐빈 리포좀의 IC_{50}(0.06 μg/ml)는 유리 약물의 IC_{50}(0.07 μg/ml)와 근접하였고, 비표적화 리포좀의 IC_{50}(2.2 μg/ml)보다 실질적으로 더 낮았다. 이는 약물의 암세포-특이적 표적화 전달의 결과로서 활성의 37배 증가를 나타냈다.

[0316] **실시예 49. 생체외 CaLu-3 세포에 대한 유리, HER2-표적화, 및 비표적화 리포좀형 비노렐빈의 세포독성**

[0317] 상기 실시예(실시예 48)의 리포좀 및 방법을 사용하여, HER2-과발현 인간 비-소세포 폐암종 세포 CaLu-3(미국 모식균배양수집 협회, 미국 매릴랜드주 로크빌 소재)에서 유리 비노렐빈, Ls-VRB, 및 F5-ILs-VRB의 세포독성을 연구하였다. 5% CO_2의 존재 하에 10% 우아 혈청을 갖는 RPMI-1460 매질에서 세포를 성장시켰다. 결과가 도 26에 나와 있다. 유리 VRB에 대한 IC_{50}는 1.2 μg/ml이었고, F5-ILs-VRB에 대한 IC_{50}는 10 μg/ml이었으며, 비표적화 Ls-VRB에 대한 IC_{50}는 50 μg/ml이었다. 이는 세포에 대한 표적화 전달의 함수로서 리포좀에 봉입된 약물 활성의 5배 증진을 나타낸다.

[0318] **실시예 50. 생체외 SKBr-3 세포에 대한 유리, HER2-표적화, 및 비표적화 리포좀형 비노렐빈의 세포독성**

[0319] 5,000 세포/웰의 밀도에서 도말된, 5% CO_2의 존재 하에 10% 우아 혈청을 갖는 변성 McCoy 5A 매질에서 세포를 성장시키고, 약물을 6시간 동안 세포와 함께 인큐베이션한 것을 제외하고는, 실시예 48의 리포좀 및 방법을 사용하여, HER2-과발현 인간 유방암종 세포 SKBr-3(미국 모식균배양수집 협회, 미국 매릴랜드주 로크빌 소재)에서 유리 비노렐빈, Ls-VRB, 및 F5-ILs-VRB의 세포독성을 연구하였다.

[0320] 결과가 도 27에 나와 있다. 유리 VRB에 대한 IC_{50}은 0.28 μg/ml이었고, F5-ILs-VRB에 대한 IC_{50}은 0.17 μg/ml이었으며, 비표적화 Ls-VRB에 대한 IC_{50}은 0.8 μg/ml이었다. 이는 표적화 전달의 함수로서 약물 활성의 4.7배 증진을 나타낸다.

[0321] **실시예 51. 마우스에서 HT29 인간 결장암 이종이식에서의 리포좀형 비노렐빈의 생체내 항종양 효능**

[0322] 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트(0.6 M 트리에틸암모늄, pH 5.7 내지 6.2)의 수용액 중 농축된 에탄올성 용액으로부터 수화시킨 후, 폴리카보네이트 막(100 nm 세공 크기)을 통해 반복 압출하고, 리포좀외 다중음이온성 염을 제외하고, 실시예 42에 기재된 바와 같이 60℃에서 325 mg VRB/mmol 인지질의 약물/지질 비로 등삼투 완충액(pH 6.5) 내 리포좀을 인큐베이션함으로써 비노렐빈을 로딩함으로써, 디스테아로일포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-DSPE(3:2:0.045 몰비)로부터 작은 단층상 소낭 리포좀(QELS에 의해 측정 시에 93.2±26.4 nm)을 제조하였다.

[0323] 암컷 BALB/c 동종접합 누드 마우스(6 내지 8주령, 체중 17 내지 20 g)의 플랭크 부위에 HT-29 인간 결장암 세포(미국 모식균배양수집 협회, 미국 매릴랜드주 로크빌 소재) 1×10^6개를 피하 주사하였다. 종양 접종한지 16일 후부터 시작하여, 평균 종양 직경이 5 내지 8 mm에 도달하면, 마우스를 각기 6마리 동물로 된 군으로 나누고,

총 4회 주사에 대해 3일마다 꼬리정맥을 통해 5 mg/kg의 투여량으로 유리 또는 리포좀형 비노렐빈을 이용하여 처리하였다. 대조군의 경우, 마우스를 동체적의 염수로 처리하였다. 각 마우스의 종양 크기를 측경기를 이용하여 측정하였고, 종양 체적을 하기 방정식을 이용하여 계산하였다: (종양 길이)×(종양 폭)^2/2. 처리-관련 독성을 평가하기 위해, 동물을 또한 매주 2회 중량 측정하였다. 리포좀형 비노렐빈은 유리 비노렐빈보다 HT-29 종양의 성장을 억제하는 효능이 상당히 더 커서, 종양을 퇴화시키는 것으로 나타났고, 한편 유리 약물 군의 경우, 종양은 항상 계속 성장하였다(도 28). 처리 동안에 동물의 체중에 변화가 거의 없었고, 이는 처리가 잘 허용되었으며, 리포좀화하는 것이 약물 독성을 증가시키지 않았음을 가리킨다(도 29).

[0324] **실시예 52. C-26 동계 쥐과동물 결장암 종양에 대한 리포좀형 비노렐빈의 생체내 항종양 효능**

[0325] 리포좀형 비노렐빈 및 유리 비노렐빈을 실시예 48와 같이 제조하였다. 수컷 BALB/c 마우스(6 내지 8주령, 체중 17 내지 20 g)에 C-26 쥐과동물 결장암 세포 2×10^{5}개를 피하 접종하였다. 접종한지 17일 후에, 평균 종양 직경이 5 내지 8 ㎜에 도달하면, 마우스를 5마리 동물/군의 6가지 처리군으로 무작위로 나누었다. 종양을 가진 마우스에 총 4회 주사에 대해 3일마다, 6 mg/kg, 8 mg/kg, 또는 12 mg/kg로 유리 비노렐빈을, 또한 6 mg/kg, 8 mg/kg, 또는 12 mg/kg로 리포좀형 비노렐빈을 꼬리정맥을 통해 주사하였다. 대조군의 경우, 마우스를 동체적의 노르말 염수를 주사하였다. 종양 크기 및 동물 체중은 실시예 51에서와 같았다. 심지어 4 mg/kg에서의 리포좀형 비노렐빈도 12 mg/kg의 유리 약물보다 종양 성장을 감소시킴에 있어 상당히 더 효능적이었다(도 30). 처리 과정 중 동물 체중이 변화를 거의 나타내지 않았고(감소율 <10%), 이는 리포좀형 비노렐빈의 독성이 유리 약물의 독성에 비해 증가되지 않았음을 가리킨다(도 31).

[0326] **실시예 53. 마우스에서의 BT-474 인간 유방암 이종이식 종양에 대한 HER2-표적화 리포좀형 비노렐빈의 생체내 항종양 효능: 짝이온 로딩 효과**

[0327] [^{3}H]-CHE를 첨가하지 않은 것을 제외하고는, 각각 실시예 41의 TEA-Pn 방법, 및 실시예 42의 TEA-SOS 방법에 의해, 크기가 99.5±10.2 nm인 VRB이 로딩된 리포좀을 제조하였다. 350 mg/mmol의 약물/인지질 비로 VRB를 로딩하였다. 실시예 43에 기재된 바대로 이 리포좀을 F5-PEG-DSPE 접합체(실시예 19 참조)와 함께 인큐베이션함으로써 HER2-표적화 리포좀형 비노렐빈을 형성시켰다. BT-474 HER2-과발현 인간 유방암종 이종이식을 실시예 10에서와 같이 동종접합 누드 마우스에서 성장시켰다. 종양 세포 접종한지 25일 후에, 종양의 크기가 약 200 ㎣(144 내지 309 ㎣ 범위)에 도달하면, 마우스를 8마리 동물/군의 4가지 군으로 무작위 분류하고, 총 3회 주사에 대해 매주 5 mg/kg의 투여량으로 5 mg/kg의 유리 VRB, F5-ILs-VRB(짝이온이 Pn임), 또는 F5-ILs-VRB(짝이온이 SOS임)을 정맥내 처리하였다. 대조군에는 동체적의 노르말 염수를 투여하였다. 실시예 10에서와 같이 종양 및 동물 체중을 모니터하였다. 수크로스 옥타술페이트를 이용하여 로딩된 HER2-표적화 리포좀형 비노렐빈은 폴리(포스페이트)를 이용하여 로딩된 동일 표적화 구축물보다 종양 성장을 감소시킴에 있어 현저하게 더 효능적이었고, 양 면역리포좀형 제제 모두는 5 mg VRB/kg의 투여량으로 투여될 때 유리 비노렐빈보다 상당히 더 효능적이었다(도 32). 약물로 처리된 마우스는 체중 변화를 거의 나타내지 않았고, 이는 처리가 잘 허용됨을 가리킨다(도 33).

[0328] **실시예 54. 마우스에서의 BT-474 인간 유방암 이종이식 종양에 대한 HER2-표적화 리포좀형 비노렐빈의 생체내 항종양 효능: PEG화의 효과**

[0329] DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG 분자량 2,000(GS-20, NOF 코포레이션, 일본 소재)의 PEG-디스테아로일 글리세롤(몰비: 3:2:0.015)("0.5% PEG") 또는 3:2:0.3("10% PEG")의 지질 매트릭스를 수성 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트 중 에탄올성 용액 방법에 의해 실시예 48에 따라 수화시킴으로써, 몰비 3:2의 DSPC 및 콜레스테롤의 리포좀을 제조한 후, 실시예 48에 따라 막 압출하였다. VRB를 350 mg/mmol의 약물/인지질 비로 리포좀에 로딩하였다. 실시예 43에 기재된 바대로 이 리포좀을 F5-PEG-DSPE 접합체(실시예 19)와 함께 인큐베이션함으로써, F5 면역리포좀형 비노렐빈을 형성시켰다. BT-474 이종이식을 갖는 누드 마우스를 성장시켜, 이를 실시예 53에서와 같이 5 mg/kg로 유리 VRB, F5-ILs-VRB-"0.5% PEG", 또는 F5-ILs-VRB-"10% PEG"로 정맥내 처리하였다. 도 34에 나와 있는 바와 같이, 비이온성 PEG 지질 유도체 PEG-DSG가 제공된, 보다 높은 PEG화를 갖는 F5-ILs-VRB는 보다 적은 양의 PEG-DSG을 갖는 F5-ILs-VRB보다 종양 성장을 감소시킴에 있어 현저히 더 효능적이었으나, 양 제제 모두는 유리 약물보다 더 활성이었다.

[0330] **실시예 55. 마우스에서의 U87 인간 뇌암 이종이식 종양에 대한 EGFR-표적화 리포좀형 비노렐빈의 생체내 항종양 효능**

[0331] 봉입된 0.65 M TEA-SOS 용액을 갖는 리포좀(QELS에 의해 측정된 크기: 86.6±12.9 nm)을 제조하여, 실시예 42에 따라 그것에 VRB를 로딩하였다. 실시예 36에 기재된 바대로 항EGFR 항체 Fab' 단편의 PEG-DSPE 접합체와 함께 VRB 리포좀을 인큐베이션함으로써, 항EGFR-면역리포좀형 VRB(C225Fab'-ILs-VRB)를 제조하였다.

[0332] 수컷 NCR *nu/nu* 마우스(5 내지 6주령, 체중 17 내지 20 g)의 플랭크 부위에 총 체적 150 l에서 성장 매질 내에 현탁된 U87 인간 아교모세포종 세포(ATCC) 1×10^7개를 피하 주사하였다. 종양의 평균 크기가 250 mm^3에 도달하면, 마우스를 10 내지 12마리 동물의 4가지 군으로 무작위로 나누었다. 마우스를, 5 mg VRB/kg의 투여량으로 "유리" VRB, 비표적화 Ls-VRB, 또는 C225Fab'-ILs-VRB를 매주 3회 정맥내 주사함으로써 처리하였다. 대조군에 동체적의 염수를 투여하였다. 실시예 10에서와 같이 종양 크기 및 동물 체중을 모니터하였다. C225-Fab'-ILs-VRB는 동등한 투여량으로 비표적화 리포좀형 비노렐빈 또는 유리 비노렐빈 중 어느 일방보다도 EGFR-과발현 인간 뇌암 이종이식 종양의 성장을 억제함에 있어 현저히 더 효능적이었다(도 35).

[0333] **실시예 56. 트리에틸암모늄 술페이트 방법을 이용하여 리포좀 내에 봉입된 독소루비신의 제조 및 약물동태**

[0334] (하기 표에 나와 있는 바와 같은) 각종 지질 매트릭스 조성을 갖는 리포좀을 실시예 2에 기재된 바대로 형성시켰다. N-글루타릴-DSPE(Glu-DSPE)는 아반티 폴라 리피즈(미국 알라바마주 소재)로부터 입수하였다. 회전 증발을 이용하여 클로로포름 중 지질 용액으로부터 순수 지질 필름을 형성시켰고, 미량의 휘발물질을 진공 하에 제거하였으며(90 μm Hg, 2시간), 지질 필름을 트리에틸암모늄 술페이트(TEA-SO_4) 용액(0.,65 N TEA) 내에 수화시켜, 급속 냉동 및 해동의 6회 사이클에 적용하였으며, 2개의 적층된 0.1 μm 세공 크기 폴리카보네이트 필터를 통해 10회, 또한 2개의 적층된 0.05 μm 세공 크기 폴리카보네이트 필터를 통해 10회 압출시켰다. 혈액 샘플 내의 지질 매트릭스 정량화에 대해, [^{3}H]-CHE를 0.5 내지 1.5 mCi/mmol 인지질로 지질 매트릭스 내에 포함시켰다. 포획된 TEA-SO_4 용액을 갖는 리포좀에 실시예 2에 따라 독소루비신을 로딩하였다. HEPES-완충 염수(20 mM HEPES-Na, 135 mM NaCl, pH 6.5) 내의 리포좀을 40분 동안 60℃에서 독소루비신 히드로클로라이드(약물/인지질 비: 140 내지 170 mg/mmol)와 함께 인큐베이션한 후, 얼음 상에서 급냉시키고 겔 크로마토그래피에 의해 봉입되지 않은 독소루비신을 제거하였다. 분광광도법(실시예 71)에 의해 독소루비신을 검정하였고, Bartlett 방법(실시예 70)에 의해 인지질을 검정하였다. 생성된 리포좀의 성질들이 하기 표 30에 요약되어 있다.

표 30

[0335] 각종 지질 조성들에서의 리포좀형 독소루비신의 성질

지질 조성(몰비)	리포좀 크기(nm) (평균±SD) (QELS에 의해 측정)	약물/인지질(mg/mmol)
DSPC/Chol/PEG-DSPE(3:2:0.015)	81.8±27.3	163.6±4.4
DSPC/Chol(3:2)	79.1±27.9	137.0±17.5
DSPC/Chol/Glu-DSPE(2.85:2:0.15)	83.6±27.2	141.7±10.4
DSPC/Chol/PEG-DSPE(2.7:2:0.3)	83.7±23.1	175.0±6.8

[0336] DSPC/Chol/PEG-DSPE 2.7:2:0.3의 지질 조성을 갖는 이 독소루비신 함유의 리포좀의 혈중 약물동태를, 래트에서 실시예 9에 기재된 바대로 5 mg 독소루비신/kg의 정맥내 단일 투여량으로 연구하였다. 리포좀은 오래 순환하였다(반감기: 약 28시간)(도 36). 안정한 독소루비신-대-인지질 비는 제형물이 48시간에 걸쳐 약물 중 25% 미만이 손실되어, 순환에 있어 약물 누출에 대해 주목할 만하게 안정함을 가리킨다.

[0337] **실시예 57. TEA-술페이트 방법에 의해 제조된 항HER2 면역리포좀 및 독소루비신이 로딩된 리포좀: 제조, 및 HER2-과발현 인간 유방암 이종이식에 대한 생체내 항종양 효능**

[0338] (하기 표에 열거된) 각종 지질 조성들 및 성질들을 갖는 독소루비신이 로딩된 리포좀을 실시예 56에 기재된 바대로 제조하였다. 실시예 19에 기재된 바대로 항HER2 scFv F5-PEG-DSPE 접합체(대략 30 scFv/리포좀)과 함께 동시 인큐베이션함으로써, 독소루비신이 로딩된 리포좀으로부터 독소루비신이 로딩된 항HER2 면역리포좀을 제조하였다. 피하 인간 유방 종양 이종이식(BT-474)을 갖는 NCR *nu/nu* 마우스를 성장시켜, 종양의 평균 크기가 200 mm^3에 도달하면 (10 내지 12마리 동물들의 군에) 리포좀형 또는 항HER2 면역리포좀형 독소루비신을 5 mg/kg의 투여량으로 처리하였고, 실시예 29에 기재된 바대로 종양 진행 및 동물 체중을 모니터하였다. 비표적화 독소루

비신 리포좀 제형물에 대해서는, 무 PEG-DSPE, 0.5 몰% PEG-DSPE, 또는 10 몰% PEG-DSPE를 함유하는 지질 조성을 연구하였고; F5-면역리포좀형 독소루비신에 대해서는, 0.5몰% PEG-DSPE 및 10 몰% PEG-DSPE를 갖는 제형물을 연구하였다(여기에서, PEG-DSPE의 양은 리포좀 인지질에 대한 몰%로 표시됨). 결과(도 37, 표 31)는 모든 독소루비신 처리들이 종양 성장의 지연에 효과적임을 나타낸다. 접종한지 53일 후의 종양 크기에 기초하여, 3개의 모든 비표적화 리포좀 군들 간의 종양 성장 억제의 차이가 통계적으로 유의한 차이에 달하지 않았으나(ANOVA p=0.081), 면역리포좀 독소루비신은 비표적화 리포좀형 독소루비신보다 상당히 더 효능적이었고(ANOVA p=5.5×10^{-10}), "10% PEG-DSPE" 제형물은 "0.5% PEG-DSPE"보다 더 효능적이었다(스튜던트 t-테스트, p=0.027). "10% PEG-DSPE" F5-ILs 군에서, 종양은 동물들 중 67%에서 1 mm^3 이하로 퇴화되었으나, "0.5% PEG-DSPE" F5-ILs 군에서는 단지 9%만이 퇴화되었다. 대조군(염수 처리)에서, 종양은 38 내지 43일째에 15% 체중의 수용가능한 크기 한도를 초과하였다.

표 31

[0339] 리포좀형 독소루비신의 생체내 항종양 효능 연구: 리포좀 특성 및 처리 성과

지질 조성	리포좀 크기(nm) (평균±SD) (QELS에 의해 측정)	약물/인지질 비 (mg/mmol) (평균±SD)	58일째의 평균 종양 크기(mm^3) (평균±SEM)
DSPC/Chol/PEG-DSPE (3:2:0.015)	83.4±23.3	136.7±6.7	490±74
DSPC/Chol(3:2)	80.5±26.6	151.2±1.9	587±61
DSPC/Chol/PEG-DSPE(2.7:2:0.3)	81.0±24.7	140.1±4.2	365±60
DSPC/Chol/PEG-DSPE (3:2:0.015)+F5 scFv-PEG-DSPE	측정되지 않음	140.7±2.8	119±39
DSPC/Chol/PEG-DSPE(2.7:2:0.3) +F5 scFv-PEG-DSPE	측정되지 않음	132.9±2.2	15.5±7.6

[0340] **실시예 58. 리포좀형 빈블라스틴의 제조, 및 래트에서의 리포좀형 빈블라스틴의 혈중 약물동태**

[0341] 포획된 TEA-SOS 수용액(0.65 M TEA, pH 6.4, 삼투질농도 502 mmol/kg) 및 크기 99.5±10.2 nm(QELS에 의해 측정된 평균±SD)를 갖는 리포좀을, 2개의 적층된 0.2 μm 폴리카보네이트 막을 통해 2회 압출, 및 2개의 적층된 0.08 μm 폴리카보네이트 막을 통한 10회 압출을 이용하여, 실시예 11의 방법에 의해 제조하였다. 빈블라스틴 술페이트 USP 형태의 빈블라스틴(VBL)을 150 mg/mmol의 약물-대-인지질 비로 첨가하였다. 약물-리포좀 혼합물의 pH를 1 N NaOH을 이용하여 6.5로 조정하였고, 후속하여 혼합물을 30분 동안 60℃에서 인큐베이션하였다. 이어서, 반응물을 15분 동안 얼음 상에서 냉각시켰고, 5 mM HEPES-Na, 135 mM NaCl, pH 6.5를 이용하여 용리하는 세파덱스 G-75 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 봉입되지 않은 약물 제거하였다. 이어서, 정제된 리포좀을 분광광도계를 이용하여 VBL를 분석하였고, 실시예 70 및 71에서와 같이 Bartlett 방법에 의해 인지질에 대해 분석하였다. [^{3}H]-CHE는 1.5 mCi/mmol 인지질의 비로 제형물 내에 포함되었다. 리포좀형 빈블라스틴은 152.4±12.0 mg VBL/mmol 인지질(정량적 봉입)을 가졌다.

[0342] 실시예 9에 기재된 바대로 5 mg VBL/kg의 투여량에서의 암컷 알비노 래트(8 내지 9주령; 200 g) 내의 리포좀형 빈블라스틴의 혈중 약물동태를 연구하였다. 실시예 41에 기재된 바대로(내부 표준물질로 비노렐빈을 이용함) 혈장 샘플 내 빈블라스틴을 정량화하였다. 빈블라스틴 리포좀은 양호한 순환 지속성(지질 성분의 혈장 반감기: 12.8±0.04시간)(도 38), 및 24시간 후 봉입된 채로 남아 있는 양이 초기 빈블라스틴 로딩된 양의 70% 초과인, 리포좀으로부터의 약물 누출에 대한 매우 양호한 안정성을 나타냈다(도 39). 봉입된 약물의 50% 방출을 달성하기 위한 주사후 시간은 40.6±1.2시간인 것으로 나타났다.

[0343] **실시예 59. TEA-SOS 방법을 이용하여 빈크리스틴이 로딩된 리포좀의 제조 및 로딩 효율에 대한 pH의 영향**

[0344] 2개의 적층된 0.08 μm 세공 크기 폴리카보네이트 막을 통한 15회 통과의 압출 단계를 이용하여 실시예 11의 방법에 의해, (QELS에 의해 측정된) 86.6±12.9 nm의 크기, 3:2:0.015의 몰비의 DSPC/Chol/PEG-DSPE의 지질 조성, 및 포획된 TEA-SOS 수용액(0.65 M TEA, pH 5.4, 삼투질농도 521 mmol/kg)을 갖는 리포좀을 제조하였다. 빈크리스틴(VCR)을, 350 μg 빈크리스틴/μmol 인지질의 약물-대-인지질 비로 빈크리스틴 술페이트로서 5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스 수성 완충액, pH 6.5 내의 리포좀에 첨가하였고, 1 N NaOH를 이용하여 pH를 표시된 비

로 조정하였으며, 혼합물을 30분 동안 60℃에서 인큐베이션하였으며, 15분 동안 얼음 상에서 냉각하였고, HBS-6.5(20 mM HEPES, 135 mM NaCl, pH 6.5)으로 용리하는 세파덱스 G-75 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 봉입되지 않은 약물로부터 리포좀을 분리하였다. 이어서, 정제된 리포좀을, 산 이소프로판올 내의 가용화 후에 265 nm에서의 흡광도를 이용하여 분광광도법에 의해 빈크리스틴에 대해 분석하였고, Bartlett (1959)의 포스페이트 검정을 이용하여 인지질 함량에 대해 분석하였다.

[0345] 결과가 표 32에 나와 있다. 약물 로딩률은 pH 4.5 내지 7.5 범위에서 90% 과량이었고, pH 5.0 내지 7.5 범위에서 실질적으로 정량적이었다. 약물 첨가 후의 리포좀 혼합물에서 관찰되나 pH 조정을 하지 않은 pH인 pH 3.5에서, 로딩량은 상당히 더 낮았다.

표 32

[0346] 포획된 TEA-SOS를 갖는 리포좀 내로의 빈크리스틴 로딩의 pH-의존성

pH	약물/인지질 비(μg/μmol)	로딩 효율(%)
3.5	39.7±4.9	11.3±0.2
4.5	327.2±20.6	93.5±5.4
5.0	360.6±5.8	103.0±1.7
5.5	371.2±30.2	106.1±9.1
6.0	347.7±20.4	99.3±5.8
6.5	347.7±20.9	99.4±5.9
7.0	377.3±22.2	107.8±6.8
7.5	371.5±24.9	106.1±7.6

[0347] **실시예 60. TEA-SOS 방법을 이용하여 빈크리스틴이 로딩된 리포좀의 제조: 로딩 효율에 대한 약물/지질 비의 영향**

[0348] 실시예 59에서와 같이 SOS-TEA 함유의 리포좀을 제조하였고, 실시예 59의 절차에 따라 pH 6.5에서 150 내지 550 μg 빈크리스틴/μmol 인지질의 약물-대-인지질 비로 빈크리스틴 술페이트를 로딩하였다. 이어서, 봉입되지 않은 약물로부터 정제된 리포좀을, 분광광도법에 의해 VCR에 대해 분석하였고, Bartlett(1959)의 검정을 이용하여 리포좀 인지질에 대해 분석하였다. 약물 로딩 효율은 약물/지질 비의 전체 연구된 범위에 걸쳐 90% 과량이었고, 150 내지 450 μg 빈크리스틴/μmol 인지질 내에서 실질적으로 정량적이었다(표 33).

표 33

[0349] 상이한 약물 대 지질 비로 TEA-SOS를 함유하는 리포좀 내로의 빈크리스틴 로딩

투입된 약물-대-인지질 (μg/μmol)	봉입된 약물-대-인지질 (μg/μmol)	로딩 효율(%)
150	163.6±6.6	109.0±4.8
250	251.1±17.0	100.5±6.8
350	347.7±20.9	99.4±5.9
450	452.0±18.8	100.4±4.2
550	521.6±24.9	94.8±4.3

[0350] **실시예 61. 면역리포좀형 빈크리스틴의 제조, 및 생체외 암세포에 대한 리포좀형 및 면역리포좀형 빈크리스틴의 세포독성**

[0351] 350 mg/mmol의 약물/인지질 비를 이용하여 실시예 59에 기재된 바대로 리포좀형 빈크리스틴(Ls-VCR)을 제조하였다. 실시예 19에 기재된 바대로 항HER2 scFv F5-PEG-DSPE 접합체와 함께 동시 인큐베이션함으로써 리포좀형 빈크리스틴으로부터 HER2-특이적 F5-면역리포좀형 빈크리스틴(F5-ILs-VCR)을 제조하였다. 물 내에 빈크리스틴 술페이트 USP를 희석한 후, 무균 여과함으로써, "유리" 빈크리스틴(VCR) 용액을 제조하였다. HER2-과발현 인간 유방암종 세포 SKBr-3(ATCC)에 대한 VCR, Ls-VCR, 및 F5-ILs-VCR의 세포독성을 실시예 27의 절차를 이용하여 MTT-기재의 세포 생존율 검정에 의해 구하였고, 여기에서 세포를 5,000 세포/웰로 96-웰 마이크로티터 플레이트로 접종하였고, 하룻밤 동안 순응시켰으며, 4시간 동안 약물을 함유하는 매질과 함께 인큐베이션한 후, 3일 동안 약물-비함유 매질에서 후-인큐베이션하였다. 결과가 도 40에 나와 있다. 유리 VCR의 IC_{50}는 75 ng/ml였고,

F5-ILs-VCR의 IC_{50}는 11 ng/ml였으며, Ls-VCR의 IC_{50}는 3 μg/ml였다. 본 발명에 따라 제조된 표적화 리포좀형 빈크리스틴은 유리 약물보다 6.8배 더 활성이었고, 비표적화 리포좀형 약물보다 273배 더 활성이었으며, 이는 세포-특이적 약물 전달의 함수로서 항암 활성이 실질적으로 증진되었음을 나타낸다.

[0352] **실시예 62. 래트에서의 Ls-VCR의 혈중 약물동태**

[0353] 포획된 SOS-TEA 용액(0.65 M TEA, pH 5.8, 삼투질농도 530 mmol/kg), 및 DSPC/Chol/PEG-DSPE(몰비: 3:2:0.015)이 지질 조성을 가지고, 또한 1.5 mCi/mmol 인지질로 [^{3}H]-CHE를 함유하는 리포좀을, 세공 크기가 80 nm 또는 100 nm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 막을 통한 10회 통과의 압출 단계를 이용하여 실시예 11의 방법에 의해 제조하였다. 리포좀에 실시예 59에 기재된 바대로 pH 6.5, 350 mg/mmol의 약물/인지질 비로 VCR를 로딩하였다. VCR이 로딩된 리포좀을 5 mg VCR/kg의 투여량으로 암컷 알비노 래트(180 내지 220 g)의 투여량으로 정맥내 투여하였고, 약물 및 리포좀 지질의 혈중 약물동태를 실시예 9에 기재된 바대로 연구하였다. 혈액 샘플 내의 VCR의 양을, 이동상 내의 수성 트리에틸암모늄 아세테이트(pH 5.5) 및 아세토니트릴의 체적 비가 65:35인 것을 제외하고는 실시예 41에 기재된 바대로 VCR에 의해 정량화하였다. VCR에 대한 전형적인 체류 시간은 8.8 분이었다. 결과가 도 41 및 표 34에 나와 있다. 양 제제 모두는 연장된 순환 지속성(혈중 반감기: 12-17시간)을 가졌다. 리포좀형 빈크리스틴은 양 제제 모두에 대해 약물 누출에 대해 현저하게 안정하였다(120시간에 걸친 절반 방출 시간)(도 42).

표 34

[0354] TEA-SOS 방법을 이용하여 350 mg/인지질 mmol로 빈크리스틴이 로딩된 리포좀의 특성

압출 세공 크기(nm)	리포좀 크기(nm) (평균±SD)	약물 로딩량 (mg/인지질 mmol)	지질 $t_{1/2\beta}$ (h)	VCR $t_{1/2\beta}$ (h)	VCR 방출 $t_{1/2}$ (h)
80	101.2±20.2	347.7±20.93	17.5±1.5	16.0±2.0	>120
100	125.6±32.0	366.8±18.11	12.1±0.7	12.0±0.8	검출불가능

[0355] **실시예 63. 래트에서의 각종 약물/지질 비에서의 Ls-VCR의 혈중 약물동태**

[0356] 세공 크기가 50 nm 또는 80 nm인 2개의 적층된 폴리카보네이트 막을 통한 10회 통과의 압출 단계를 이용하여 실시예 11의 방법에 의해, 포획된 SOS-TEA 용액(0.65 M TEA, pH 6.4, 삼투질농도 485 mmol/kg), 및 DSPC/Chol/PEG-DSPE(몰비: 3:2:0.015)의 지질 조성을 가지고, 또한 1.5 mCi/mmol 인지질로 [^{3}H]-CHE를 함유하는 리포좀을 제조하였다. 100, 200, 또는 350 mg/인지질 mmol의 계산된 약물/지질 비로 20 mg/mL 수성 VCR 술페이트 원액을 첨가함으로써 실시예 59에 기재된 바대로 pH 6.5에서 VCR를 리포좀에 로딩하였다. 약물 로딩의 효율은 모든 제제들에 있어 96% 초과였다. VCR이 로딩된 리포좀을 5 mg VCR/kg의 투여량으로 암컷 알비노 래트(8 내지 9 주령, 190 내지 220 g)로 정맥내 투여하였고, 약물 및 리포좀 지질의 혈중 약물동태를 실시예 62에 기재된 바대로 연구하였다. 결과가 표 35에 나와 있다. 리포좀형 빈크리스틴은 양호한 순환 지속성(약물의 혈중 반감기: 약 20 내지 30시간)을 가졌고, 모든 연구된 크기 및 약물 대 지질 비(93시간에 걸친 약물 방출의 반감기)에서 특히 안정하였다.

표 35

[0357] 각종 약물/지질 비에서의 TEA-SOS 방법을 이용하여 빈크리스틴이 로딩된 리포좀의 특성

압출 세공 크기(nm)	리포좀 크기(nm) (평균±SD)	VCR(mg/인지질 mmol)		지질 $t_{1/2}$ (h)	VCR $t_{1/2}$ (h)	약물 방출 $t_{1/2}$ (h)
		첨가	봉입			
50	76.8±27.2	100	96.1±3.0	35.6±2.7	30.3±4.0	227±96
		200	193.3±3.9	20.8±2.2	18.4±0.7	244±130
		350	375.2±10.0	24.8±0.9	19.6±0.9	93.2±6.7
80	101.6±25.3	100	104.5±2.1	33.0±7.6	26.8±4.8	153±10

[0358] **실시예 64. HER2-표적화 리포좀형 빈크리스틴의 제조, 및 마우스에서의 HER2-과발현 인간 유방암 이종이식에 대**

한 비표적화 및 HER2-표적화 리포좀형 빈크리스틴의 항종양 효능

[0359] TEA-SOS 방법을 이용하여 빈크리스틴이 로딩된 리포좀(Ls-VCR-SOS)을, 50 nm 세공 크기 막 압출, 및 100 mg/mmol의 약물/인지질 비의 약물 로딩을 이용하여, ([^{3}H]-CHE 성분 없이) 실시예 63에 따라 제조하였다. 실시예 43에 기재된 바대로 Ls-VCR-SOS를 항HER2 scFv F5-PEG-DSPE 접합체(실시예 19)와 함께 인큐베이션함으로써, F5 면역리포좀형 빈크리스틴(F5-ILs-VCR)을 형성시켰다. 트리에틸암모늄 시트레이트 용액(수성 시트르산을 순수 트리에틸아민으로 pH 5.1로 적정하고, 농도를 0.65 M 트리에틸아민으로 조정함으로써 제조됨)을 TEA-SOS 용액으로 대체한 것을 제외하고는, Ls-VCR-SOS 리포좀과 유사하게, TEA-시트레이트를 이용하여 빈크리스틴이 로딩된 리포좀(Ls-VCR-Cit)를 제조하였다. 처리 연구 설계는 실시예 10의 방법을 따랐다. BT-474 인간 유방암종의 피하 이종이식 종양을 누드 마우스에서 성장시켰고, 종양 크기가 250 mm^{3}에 달하면(144 내지 309 mm^3 범위), 8-9 마리로 된 군 내의 마우스를, 종양 접종한지 19일 후부터 시작하여 총 3주 동안 2 mg VCR/kg의 매주 정맥내 투여량으로 유리 VCR, Ls-VCR, 또는 F5-ILs-VCR로 처리하였다. 실시예 10에 기재된 바대로 종양 크기 및 동물 체중을 모니터하였다. 대조군에 대해, 마우스를 동체적의 염수로 처리하였다. 처리군들 간의 종양 크기의 차이를, 만-위트니(Mann-Whitney) 시험을 이용하여 종양 접종한지 63일 후에 통계적으로 평가하였다. 군 내의 평균 종양 크기들의 역학관계가 도 43에 나와 있다. F5-ILs-VCR은 Ls-VCR 또는 유리 VCR에 비해 최대 효능을 나타냈고, 이는 8마리 동물들 중 6마리(75%)에서 완전 종양 퇴행을 유발하였다. Ls-VCR-Cit도 또한 효과적이었고, 이는 9마리 동물들 중 2마리 동물(22%)에서 63일째에 여전히 관찰되는 완전 종양 퇴행을 유발하였다. 그러나, 그것은 F5-ILs-VCR보다 덜 효과적이었다(p<0.005). Ls-VCR-SOS 및 유리 VCR는 동등하게 효과적이었고(p>0.2), F5-ILs-VCR 또는 Ls-VCR-Cit보다 덜 효과적이었다. 이에 따라, 놀랍게도, 세포-표적화 전달로, 본 발명의 다가 음이온을 이용하여 봉입된 리포좀형 약물은 비결합 음이온을 통해 봉입된 약물보다 더 효능적임이 입증되었다. 동물 체중 역학관계는 모든 리포좀형 VCR 제제들이 유리 VCR보다 덜 독성이어서, 처리 동안의 체중 경감을 덜 하게 만들었음을 나타냈다(도 44).

[0360] **실시예 65. EGFR-표적화 리포좀형 빈크리스틴의 제조, 및 마우스에서의 EGFR-과발현 인간 뇌암 이종이식에 대한 비표적화 및 EGFR-표적화 리포좀형 빈크리스틴의 항종양 효능**

[0361] 실시예 64에서와 같이 TEA-SOS 방법을 이용하여 빈크리스틴이 로딩된 리포좀(Ls-VCR)을 제조하였다. 실시예 36에 기재된 바대로 항HER2 Fab' C225Fab-PEG-DSPE 접합체와 함께 리포좀을 동시 인큐베이션함으로써, EGFR-표적화 면역리포좀형 빈크리스틴을 제조하였다.

[0362] 수컷 NCR *nu/nu* 마우스(5 내지 6 주령, 체중 17 내지 20 g)의 플랭크 부위에 상피 성장 인자 수용체(HER1) 변이체 EGFRvIII를 안정하게 발현하는 1±10^{7}개 U87 인간 아교모세포종 세포를 함유하는 0.15 ml의 세포 성장 매질을 피하 주사하였다. 1일째, 평균 종양 크기가 300 내지 400 mm^{3}에 도달하면, 마우스를 10 내지 12마리 동물/군의 4가지 군으로 무작위로 나누었다. 1.5 mg/kg의 정맥내 투여량으로의 유리 VCR(염수 중 빈크리스틴 술페이트 1 mg/mL), Ls-VCR, 또는 C225Fab-ILs-VCR를 종양 접종한지 11, 18 및 25일 후에 투여하였다. 유사하게 대조군 내의 마우스에 동체적의 노르말 염수를 주사하였다. 실시예 10에서와 같이 종양 크기 및 마우스 체중을 모니터하였다. 결과가 도 45에 나와 있다. VCR 제형물로 처리된 모든 동물들은 대조군 동물에 비해 종양 성장의 지연을 나타냈다. 유리 VCR 및 Ls-VCR로 처리된 군들 간에 유의적 차가 없었다. EGFR-표적화 C225Fab-ILs-VCR는 유리 또는 비표적화 리포좀형 VCR보다 더 효능적이었다.

[0363] **실시예 66. 포획된 트리에틸암모늄 이노시톨 헥사포스페이트(TEA-IHP) 용액을 갖는 리포좀의 제조**

[0364] 다중음이온화 폴리올, 이노시톨 헥사포스페이트(IHP) 도데카나트륨 염은 시그마(미국 미조리주 세인트 루이스 소재)로부터 입수하였다. 0.65 M 트리에틸암모늄 및 0.681 M의 포스페이트기, pH 6.5, 및 718 mmol/kg의 삼투질 농도를 갖는 수용액을, 다우웩스 50W×8-200 가교결합된 술폰화 폴리스티렌 수지 상의 이온 교환한 후, 실시예 4의 절차에 따라 순수 TEA를 이용한 적정 및 물 희석에 의해 제조하였다. 잔류 나트륨 함량은 양이온 총량의 1% 미만이었다. 건조 지질(150 μmol DSPC, 100 μmol Chol, 0.75 μmol PEG-DSPE)을 60℃에서 0.5 ml의 100% 에탄올 USP 중에 용해시켜, 동일 온도로 예비 가열된 4.5 ml의 트리에틸암모늄 이노시톨 헥사포스페이트 용액과 혼합하였다. 혼합물이 버블링을 나타내지 않을 때까지, 30 내지 40 mm Hg 및 40 내지 45℃에서의 회전 증발에 의해 에탄올을 부분 제거하였다. 이어서, 지질 현탁액을 60 내지 65℃에서 2개의 적층된 0.1 μm 세공 크기 폴리카보네이트 막을 통해 15회 압출하였다. 생성된 리포좀은 QELS에 의해 측정 시에 크기가 104.3±39.0 nm였다. 봉입되지 않은 트리에틸암모늄 IHP을, 5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스, pH 6.5 완충액으로 용리되는 세파로스 4B 칼럼 상의 겔 크로마토그래피에 의해 제거하였고, 실시예 70에 따라 추출하면서 Bartlett 방법을 이용하여 인지

질 농도에 의해 리포좀을 정량화하였다.

[0365] **실시예 67. 포획된 TEA-IHP 용액을 갖는 리포좀 내로의 약물의 로딩**

[0366] 실시예 67의 리포좀에 CPT11 또는 비노렐빈을 로딩하였다. 비노렐빈을 175 또는 350 g/mol의 약물-대-인지질 비로 로딩하였고, 및 CPT11는 250 또는 500 g/mol의 약물-대-인지질 비로 로딩하였다. 약물을 유입 약물/인지질 비로 HEPES-텍스트로스 완충액(실시예 67) 내의 리포좀에 첨가하였고, 이는 하기에 나와있다(표 36 참조). 필요한 경우, pH를 1 N NaOH를 이용하여 6.5 내지 6.8로 조정하였다. 혼합물을 30분 동안 60℃에서 인큐베이션하였고, 15분 동안 얼음 상에서 냉각시켜, 5 mM HEPES-Na, 145 mM NaCl, pH 6.5로 용리되는 세파덱스 G-25 겔 여과 칼럼 상에 크로마토그래피하였다. 분취량의 정제된 리포좀을 산성화 메탄올에 가용화하여, 분광광도법에 의해 분석하였다(실시예 71). 추출하면서(실시예 70), Bartlett(1959)의 방법에 의해 인지질을 정량화하였다. 리포좀에 정량적으로(즉, 실질적으로 100%) 로딩된 양 약물 모두가 하기 표 36에 나와 있다.

표 36

[0367] 포획된 이노시톨 헥사포스페이트를 갖는 리포좀 내로 로딩된 약물의 성질

약물	투입된 약물/지질 비 (g/인지질 mol)	봉입된 약물/지질 비 (g/인지질 mol)	로딩 효율(%)
비노렐빈	175	175.3±8.0	100.2±4.5
비노렐빈	350	352.3±11.8	100.6±3.3
CPT-11	250	265.1±11.2	106.1±4.7
CPT-11	500	518.7±27.8	103.7±5.8

[0368] **실시예 68. 생체외 마우스 혈장의 존재 하에서의 유리 또는 리포좀형 CPT-11의 화학적 안정성**

[0369] 신체 내, 전구약물인 CPT-11는 화학적 변형을 겪어, SN-38로 알려진 활성 약물 대사물을 형성한다. SN-38 및 CPT-11 모두는 또한 활성 락톤 형태에서 SN-38 또는 CPT-11 카르복실레이트로 알려진 불활성 생성물로 전환된다. 이 실시예에서, 혈장의 존재 하에서의 CPT-11의 상기 생성물로의 전환에 대한 본 발명에 따른 CPT-11의 리포좀화의 영향을 연구하였다. 포획된 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트(0.65 M TEA, pH 6.4, 삼투질 농도 485 mmol/kg), 및 3:2:0.015의 몰비의 DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG-DSPE의 지질 조성을 갖는 리포좀을, 2개의 적층된 0.08 μm 폴리카보네이트 필터를 통한 10회 압출을 이용하여 실시예 11에 따라 제조하였다 , 리포좀은 QELS에 의해 측정 시에 크기가 87.4±19.2 nm였다. 60℃에서 30분 동안 수성 5 mM HEPES-Na, 5% 덱스트로스, pH 6.5에서 인큐베이션한 후, 15분 동안 얼음 상에서 급냉함으로써, CPT-11을 대략 500 mg의 CPT-11 기재물질/mmol 리포좀 인지질로 로딩하였다. 이어서, CPT-11이 로딩된 리포좀을 HEPES 완충 염수(5 mM HEPES, 145 mM NaCl, pH 6.5)로 용리되는 세파덱스 G-75 칼럼 상에 정제하였다. 수득된 CPT-11 리포좀은 536.5±20.1 mg CPT-11/mmol의 인지질을 가졌다. 희석된 HCl로 pH 3으로 산성화된 144 mM 수성 NaCl 내에 1 mg/ml로 이리노테칸 히드로클로라이드 USP을 새로 용해시킴으로써 유리 CPT-11 용액을 제조하였다. 10-μl 분취량의 유리 또는 리포좀형 CPT-11 또는 유리 CPT-11을 90 μl의, 헤파린으로 안정화된 마우스 혈장(하알란 바이어프로덕츠, 미국)과 혼합하여, 쉐이킹 수조에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 주어진 시점에서, 3벌의 리포좀 샘플을 HBS-6.5로 용리되는 세파로스 CL-4B 크기 배제 칼럼(2 ml 층 체적) 상에 크로마토그래피하였고, 약물을 함유하는 분획을 형광 검출하였다. 첫 번째(공극 체적) 및 두 번째(잔류량) 약물을 함유하는 피크를 수집하였고, 이를 리포좀 내 봉입되고 방출된 약물 분획으로 간주하였다. 샘플을 10초 동안 보어텍싱한 후, 5분 동안 14,100×g에서 원심분리함으로써 400 μl의 빙냉 메탄올로 추출하였다. 상등액을 [Warner 및 Burke, *J Chromatogr., Ser. B Biomed. Sci. Appl.* 1997, vol. 691, p. 161-71]에 의한 방법의 변형법을 이용하여 HPLC에 의해 CPT-11 및 그것의 전환 생성물에 대해 분석하였다. 이동상은, 14분이 지나면 20 체적% B 내지 50 체적% B의 선형 구배로 1.0 ml/min로 전달되는, 3% 트리에틸암모늄 아세테이트 pH 5.5(용액 A) 및 아세토니트릴(용액 B)로 구성되었다. 용리된 생성물을 375 nm에서 여기하고 500 nm에서 방출하는 형광에 의해 검출하였다. 체류 시간은 5.3분(CPT-11 카르복실레이트), 6.8분(SN-38 카르복실레이트), 9.3분(CPT-11) 및 11.0분(SN-38)이었다. 결과(표 37)는 리포좀으로부터 방출된 유리 CPT-11 및 CPT-11이 전환을 겪는 동안, 리포좀내 CPT-11은 매우 안정함을 나타냈다.

표 37

[0370] 생체외 마우스 혈장에서의 유리 및 리포좀형 CPT-11의 SN-38 및 카르복실레이트 형태로의 전환

샘플	시간(h)	CPT-11(%)		SN-38(%)	
		락톤	카르복실레이트	락톤	카르복실레이트
유리 CPT-11	2	1.9±0.4	35.2±1.9	4.4±0.1	58.4±2.1
	12	<0.1	11.5±0.9	9.9±0.8	78.6±1.3
	24	<0.1	<0.1	22.5±9.8	77.5±9.8
Ls-CPT-11 (봉입)	12	97.7±0.1	<0.1	2.3±0.1	<0.1
	24	97.7±0.1	<0.1	2.3±0.1	<0.1
Ls-CPT-11 (방출)	12	60.5±10.4	25.0±7.1	5.0±0.3	9.5±3.0
	24	78.3±6.7	14.0±5.2	6.5±0.5	1.2±1.7

[0371] **실시예 69. 래트에서의 유리 또는 리포좀형 CPT-11의 생체내 화학적 안정성**

[0372] 0.65 M TEA, pH 6.4, 및 삼투질농도 502 mmol/kg를 갖는 트리에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트를 이용하여 실시예 68에서와 같이 리포좀형 CPT-11을 제조하였다. 리포좀 크기는 98.5±18.4 nm였고, CPT-11의 봉입은 510.1±16.5 mg CPT-11/mmol 인지질이었다. 리포좀형 및 유리 CPT-11을 중심 정맥 카테터가 유치된 암컷 알비노 래트(180-220 g)에 25 mg/kg의 투여량으로 정맥내 투여하였고, 혈액 샘플을 48시간의 간격으로 인취하였다. 혈액 샘플을 0.04% EDTA를 함유하는 빙냉 PBS와 혼합하였고, 급속 원심분리하여 혈액 세포를 제거하였다. 분취량을 상등액 유체를 상기 실시예 68에서와 같이 HPLC에 의해 CPT-11, SN-38, 및 그것의 카르복실레이트 형태에 대해 분석하였다. 결과가 도 46 및 47에 나와 있다. 유리 CPT-11가 매우 급속히 제거되었고, 30분 후에 검출불가능한 반면, 리포좀형 CPT-11은 24시간에 혈중 약물의 37.8%로 순환 시에 지속적이었고($t_{1/2}$ 15.2 시간), 48시간 후 순환 시에 여전히 약물이 대략 10%이었다. 리포좀 형태의 CPT-11의 SN-38 또는 카르복실레이트 형태의 CPT-11로의 검출 가능한 전환이 없었다. 유리 CPT-11, 즉 용액으로서 투여된 CPT-11는 매우 빨리 제거되었고(반감기: 약 16분), 카르복실레이트 형태의 약물로의 인식가능한 전환이 있었다.

[0373] **실시예 70. 리포좀 인지질의 정량화**

[0374] *변형된 산 소화 - 블루 포스포노몰리브데이트 방법 I.* 이 방법은 Bartlett(1959) 후에 변형된 것이다. 10 내지 20 ml 분취량의 리포좀을 내열성 유리관에 두고, 110 내지 130℃에서 2시간 동안 0.5 ml의 10 N 황산으로 가열함으로써 소화시키며, 50 ml의 9% 과산화수소를 첨가함으로써 무기질화하고, 표시지 스트립에 의해 과산화수소가 검출되지 않을 때까지 부가 30분 동안 가열한다. 주위 온도에서의 소화된 샘플을 1 ml의 0.2% 수성 암모늄 몰리브데이트로 희석하고, 0.1 ml의 5% 수성 아스코르브산과 혼합하였고, 10분 동안 열수조에서 인큐베이션한다. 환원된 포스포몰리브데이트 착체의 흡광도를 800 nm에서 측정하고, 무기 포스페이트 표준 용액을 이용하여 동시 제조된 표준 곡선과 비교한다.

[0375] *변형된 산 소화 - 블루 포스포노몰리브데이트 방법 II.* 이 방법은 Morrison(1964)에 의한 방법의 변형법이다. 1-10 mM 인지질을 갖는 5 μl 분취량의 리포좀을 내열성 유리관에서 60 μl의 농축 황산 및 10 μl의 30% 과산화수소와 혼합한다. 혼합물을 10분 동안 200 내지 220℃에서 10분 동안 가열하고, 0.7 μl의 탈이온수로 희석하고, 10 μl의 10% 수성 나트륨 술피트와 혼합하여, 5분 동안 열수조 상에서 인큐베이션하며, 주위 온도로 냉각시킨다. 200 μl의 2% 수성 암모늄 몰르비데이트 및 10 μl의 10% 수성 아스코르브산을 첨가하고, 샘플을 10분 동안 열수조에서 인큐베이션한다. 샘플을 주위 온도로 급속히 냉각시키고, 환원된 포스포몰리브데이트 착체의 흡광도를 블랭크 샘플에 대해 825 nm에서 구한다. 2, 4, 6, 8 및 10 nM 인산이수소칼륨을 갖는 표준 용액을 이용하여 동일 운용(run)에서 수득된 표준 곡선으로부터 인지질의 양을 구한다.

[0376] *추출 방법.* 25 내지 100 μl 분취량의 리포좀을 200 μl 부분의 메탄올-클로로포름 혼합물(체적비: 1:2)로 3회 추출한다. 유기상을 내열성 유리관에서 조합하고, 용매를 진공 제거한다. 잔류물을 10 N 황산으로 처리하고, 상기 방법 I에 따라 인에 대해 추가 검정한다.

[0377] 달리 명시되지 않는 한, 분석 데이터는 3벌 운용의 평균±표준오차로 나타낸다.

[0378] **실시예 71. 리포좀 내 약물의 정량화**

[0379] *분광광도 정량화.* 분취량의 리포좀(10-50 μl)을 0.075-0.1 N HCl을 함유하는 1 ml의 70 체적% 수성 이소프로판올과 혼합하고, 블랭크 샘플에 대한 흡광도를 하기 파장에서 측정한다: 독소루비신 485 nm; CPT-11 및 토포테칸 372 nm; 엘립티신 306 nm; 비노렐빈 270 nm; 빈크리스틴 및 빈블라스틴 265 nm. 약물의 양을 동시 운용 표준 곡

선과 비교함으로써 구한다.

[0380] *형광측정 정량화.* 분취량의, 리포좀 함유 샘플(예컨대, 혈장)을 산성화 이소프로판올(0.02 내지 0.1 ml 분취량; 1 ml의 70% 이소프로판올 - 0.075 N HCl; >0.1 ml 분취량: 90% 이소프로판올 - 0.1 N HCl 내지 1 ml)로 희석한다. 단백질 석출이 일어나면, 샘플을 1 내지 2 시간 동안 얼음 상에서 인큐베이션하고, 12,000×g으로 10분간 원심분리하여 제거한다. 상등액의 형광도를 하기 파장에서 측정한다: CPT-11, 여기 370 nm, 방출 423 내지 425 nm; 토포테칸, 여기 380 내지 385 nm, 방출 520 내지 525 nm; 엘립티신, 여기 306 nm, 방출 520 nm. 블랭크 형광을 뺀 후, 동시 운용 표준 곡선과 비교함으로써 약물의 양을 계산한다.

[0381] **실시예 72. 비노렐빈의 리포좀 내로의 로딩 효율에 대한 리포중합체의 영향**

[0382] 압출 단계를 위해 80 nm 세공 크기 막을 이용하여, 실시예 11의 방법에 따라 DSPC 200 몰부, 콜레스테롤 133 몰부, 및 폴리(에틸렌 글리콜)(분자량 2,000)-유도체화 지질 PEG-DSPE(1-20 몰부) 또는 PEG-DSG(20 몰부)로 구성하고, 봉입된 0.65 M TEA-SOS 용액을 함유하는 리포좀을 제조하였다. 리포좀에 350 mg/mmol의 약물/인지질 비로 비노렐빈을 로딩하고, 실시예 40의 방법에 따라 봉입되지 않은 약물로부터 정제하였다. 리포좀을 실시예 70 및 71에 기재된 바대로 약물 및 지질 함량에 대해 검정하였고, 체적-칭량화 가우스 어림법을 이용하여 QELS에 의해 리포좀 크기에 대해 검정하였다. 결과(표 38)는 1 몰% 초과 양의 리포좀 인지질(총 지질의 0.3 몰%)에서의 음이온성 PEG 유도체인 PEG-DSPE는 약물 로딩 효율에 대해 부정적 영향을 미쳤으나, 중성 유도체인 PEG-DSG는 놀랍게도, 9.1 몰%의 리포좀 인지질(총 지질의 5.7 몰%)에서도 로딩 효율에 영향을 미치지 않았음을 나타냈다.

표 38

[0383] 각종 양의 PEG-지질 유도체에서 TEA-SOS 방법에 의해 제조된 비노렐빈 리포좀의 성질

PEG-지질	PEG-지질 양 (총 지질에 대한 몰%)	리포좀 크기(nm) (평균±SD)	약물 로딩량 (mg/인지질 mmol)	로딩 효율 (봉입률 %)
PEG-DSPE	0.3	108±32	359.5±17.8	102.7±5.2
PEG-DSPE	0.6	110±18	346.6±14.5	99.0±4.1
PEG-DSPE	1.8	104±35	332.0±14.0	94.9±3.8
PEG-DSPE	2.9	94±33	259.8±9.5	74.2±2.0
PEG-DSPE	4.0	100±36	155.4±7.0	44.4±0.9
PEG-DSPE	5.7	103±31	61.2±5.2	17.5±0.3
PEG-DSG	5.7	97±36	362.7±14.2	103.6±4.2

[0384] **실시예 73. 마우스에서의 CPT-11의 혈중 지속성에 대한 리포좀내 약물-포획제의 영향**

[0385] 이노시톨 헥사포스페이트(IHP, 파이트산) 또는 수크로스 옥타술페이트의 트리에틸암모늄(TEA) 또는 트리에탄올암모늄(TEOA) 염의 포획된 0.65 N 용액을 갖는 리포좀을 제조하였고, 실시예 66의 일반적 절차에 따라 500 g/mol 인지질로 CPT-11을 로딩하였다. 리포좀을 5 mg CPT-11/kg 체중의 투여량으로 스위스-웹스터 마우스에 정맥내 투여하였다. 24시간 후에, 마우스를 마취하였고, 개방 심장 천자를 통해 방혈하였다. 혈액을 수집하였고, 실시예 68에 기재된 바대로 HPLC에 의해 혈장 내의 CPT-11 함량에 대해 분석하였고, 약물 양을 혈중의 남아 있는 주사된 투여량에 대한 %로 표시하였다(%ID). TEOA-IHP는 TEA-IHP, TEOA-SOAS, 및 TEA-SOS보다 약물의 혈중 지속성을 향상시킴에 있어 덜 효과적이었다(표 39).

표 39

[0386] 마우스에서의 CPT-11 리포좀의 정맥내 투여한지 24시간 후의 CPT-11의 혈중 잔류

리포좀내 약물-포획제	혈중 남아 있는 %ID
TEOA-1HP	2.74±0.54
TEA-1HP	5.86±0.20
TEOA-SOS	7.03±0.17
TEA-SOS	11.32±0.46

[0387] **실시예 74. 1.05 N 디에틸암모늄 수크로스 옥타술페이트를 함유하는 리포좀 내로의 약물 로딩**

[0388] 순수 디에틸아민(99.5% 순도)을 이용하여, 실시예 6의 이온-교환/적정 방법을 이용하여, 1.05 N 디에틸암모늄

수크로스 옥타술페이트(DEA-SOS) pH 6.0, 삼투질농도 727 mmol/kg의 수용액을 제조하였다. 3 몰부 DSPC, 2 몰부 콜레스테롤, 및 0.015 몰부 PEG2000 내지 DSPE의 지질 매트릭스를 DEA-SOS 용액의 존재 하에 리포좀(체적-중량 측정 평균 크기 92.4 nm)으로 제형하였고, CPT-11를 실시예 11의 방법을 이용하여 각종 약물/지질 유입 비로 리포좀 내에 로딩하였다. 겔-크로마토그래피에 의해 봉입되지 않은 약물을 제거하였고, 단위 지질 당 봉입된 약물의 양(약물/지질 산출 비)을 구하였다. 봉입 효율을 유입 비에 대한 약물/지질 산출 비의 %로 계산하였다. 결과가 표 40에 나와 있다. 로딩은 약물 분자에 대한 리포좀내 디에틸암모늄 이온을 화학양론 교환으로 하고, 평가된 리포좀내 포획된 체적을 대략 1.7 ℓ/인지질 mol로 가정하여, 리포좀의 디에틸암모늄 함량에 기초한 양(1.78 mol 디에틸암모늄/mol 인지질)과 잘 일치하는, 그것의 최대 수준(1.67 내지 1.70 mol 약물/g 총 지질)인 약 1.76 mol 약물/mol 인지질을 달성하였다.

표 40

[0389] 1.05 N DEA-SOS를 함유하는 DSPC/Chol/PEG-DSPE 리포좀 내로의 CPT-11의 로딩

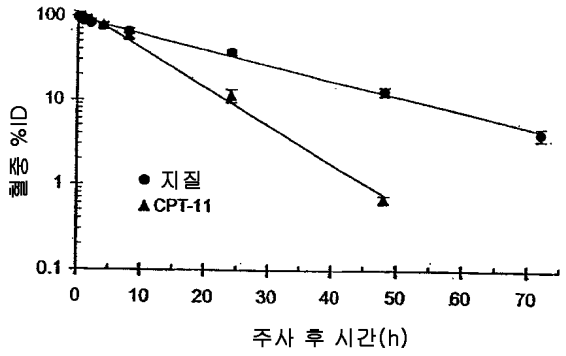
약물/지질 투입 비(mol/g)	약물/지질 산출 비(mol/g)	봉입 효율(%)
1.25	1.247±0.038	99.8±3.0
1.50	1.534±0.052	102.3±3.5
1.80	1.669±0.043	92.7±2.4
2.06	1.690±0.054	82.0±2.6
2.20	1.704±0.062	77.5±2.8
2.42	1.685±0.103	69.6±4.3

[0390] 달리 명시되지 않는 한, 분석적 데이터는 3벌 운용의 평균±표준오차로 표시된다. 래트 혈장 약물동태 데이터는 2벌 운용의 평균±표준오차이다.

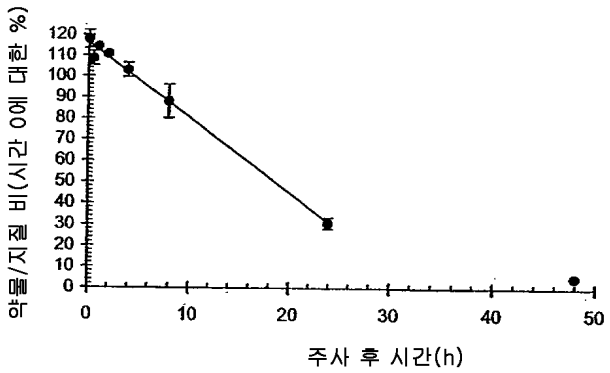
[0391] 본 발명은 현 바람직한 실시양태를 참조로 하여 기재되었으나, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 한 각종 변형들이 가해질 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명의 범주는 청구범위에 권리부여된 균등 내용의 전체 범주와 함께, 첨부된 특허청구범위를 참조로 하여 결정되어야 한다. 특허 출원 및 공보들을 비롯한, 인용된 문헌 목록 및 참조문들의 개시내용은 모든 목적을 위해 참고로 본원에 인용된다.

도면

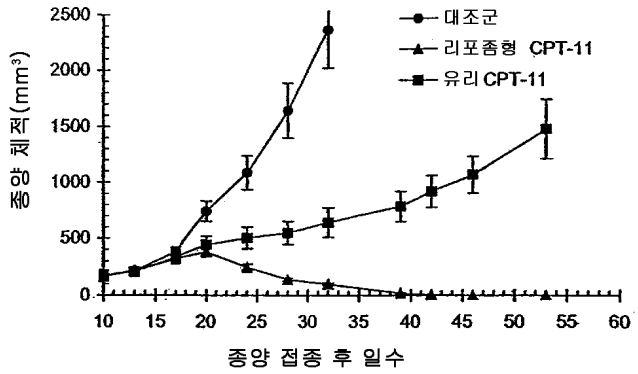
도면1



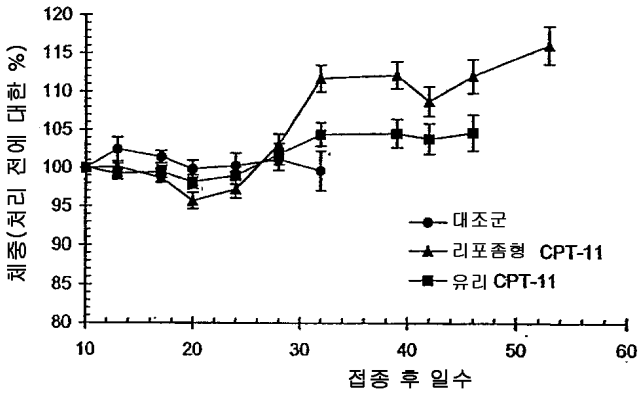
도면2


약물/지질 비(시간 0에 대한 %)
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
주사 후 시간(h)

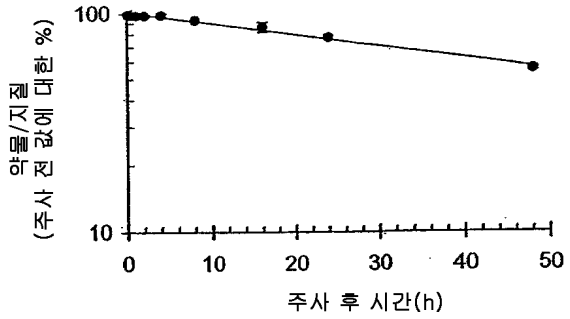
도면3


종양 체적(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
종양 접종 후 일수
대조군
리포좀형 CPT-11
유리 CPT-11

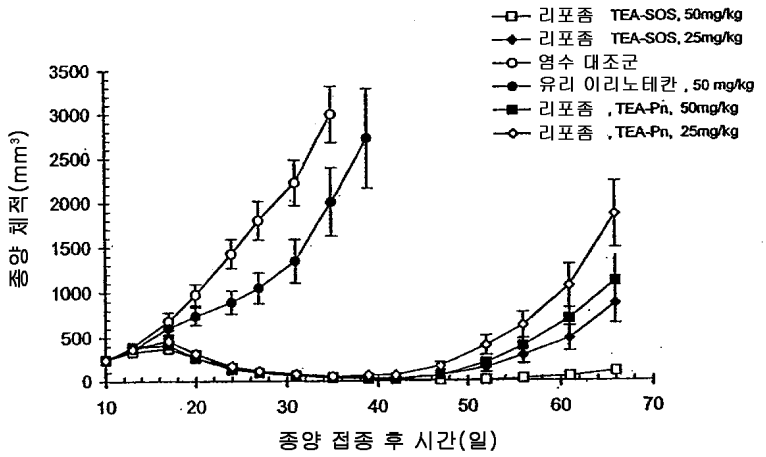
도면4


체중(처리 전에 대한 %)
120
115
110
105
100
95
90
85
80
10
20
30
40
50
60
접종 후 일수
대조군
리포좀형 CPT-11
유리 CPT-11

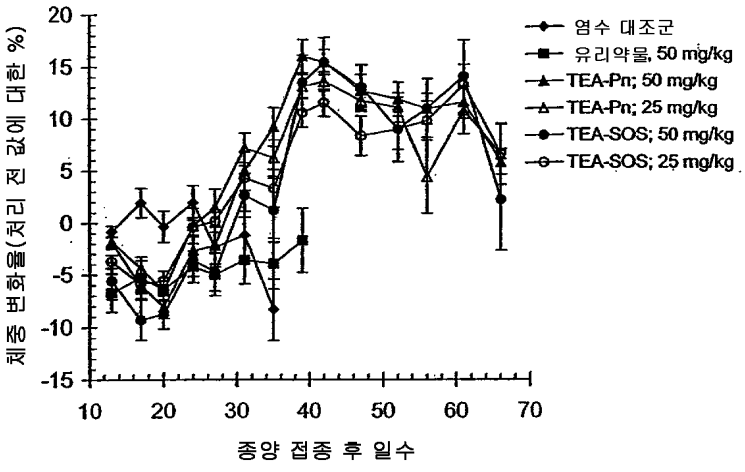
도면5


100
10
약물/지질
(주사 전 값에 대한 %)
0
10
20
30
40
50
주사 후 시간(h)

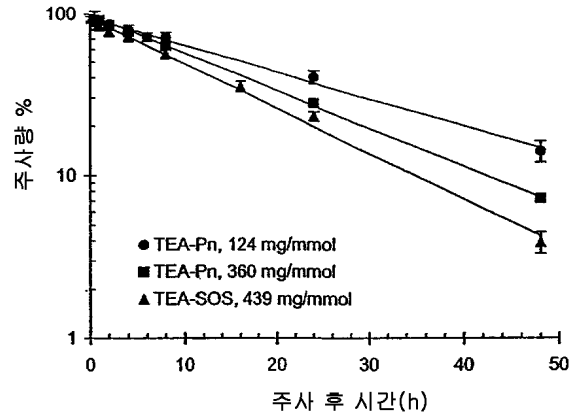
도면6


리포좀 TEA-SOS, 50mg/kg
리포좀 TEA-SOS, 25mg/kg
염수 대조군
유리 이리노테칸 , 50 mg/kg
리포좀 , TEA-Pn, 50mg/kg
리포좀 , TEA-Pn, 25mg/kg
종양 체적(mm³)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
40
50
60
70
종양 접종 후 시간(일)

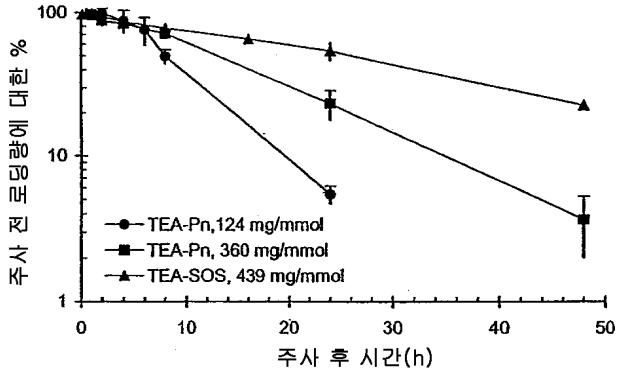
도면7


염수 대조군
유리약물, 50 mg/kg
TEA-Pn; 50 mg/kg
TEA-Pn; 25 mg/kg
TEA-SOS; 50 mg/kg
TEA-SOS; 25 mg/kg
체중 변화율(처리 전 값에 대한 %)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
10
20
30
40
50
60
70
종양 접종 후 일수

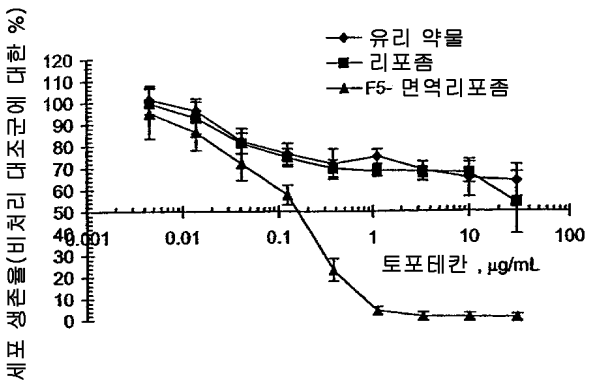
도면8a



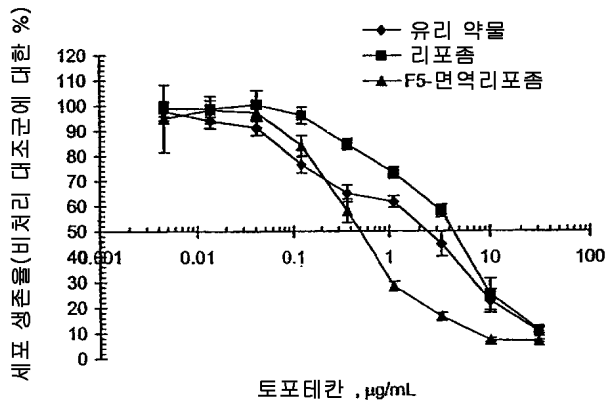
도면8b



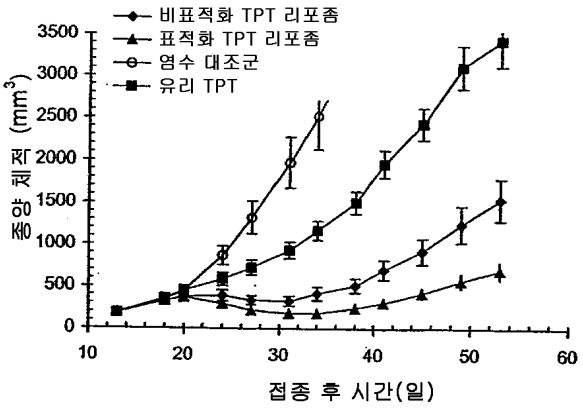
도면9



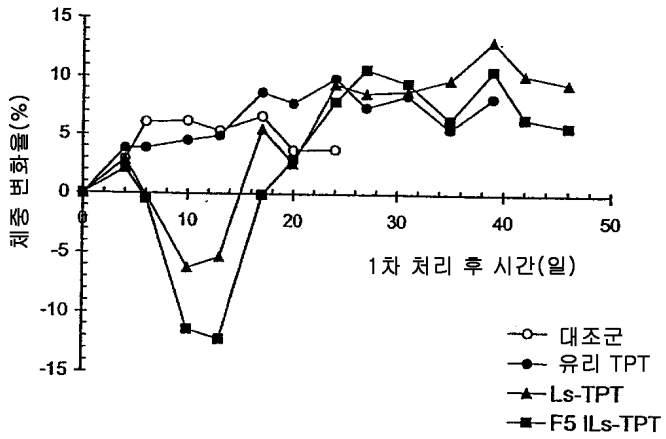
도면10



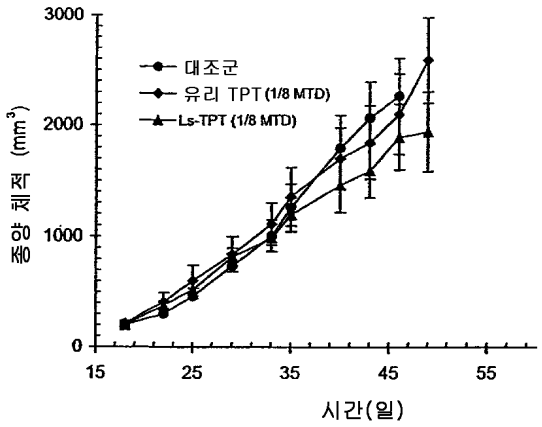
도면11



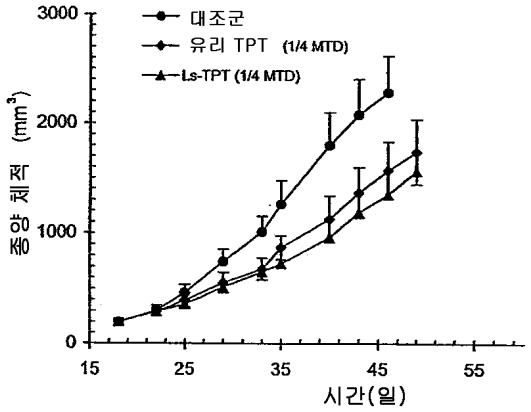
도면12



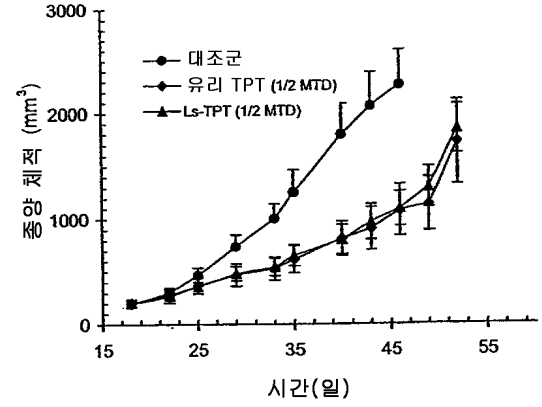
도면13a



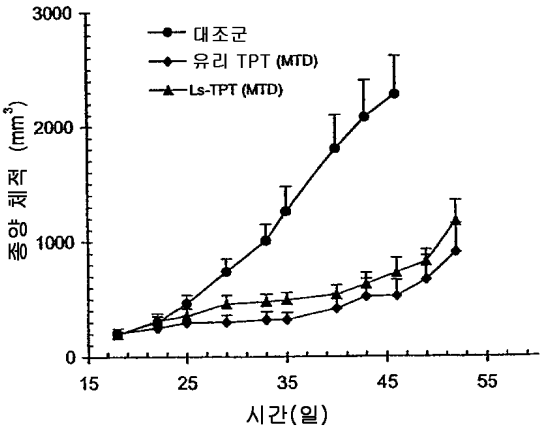
도면13b



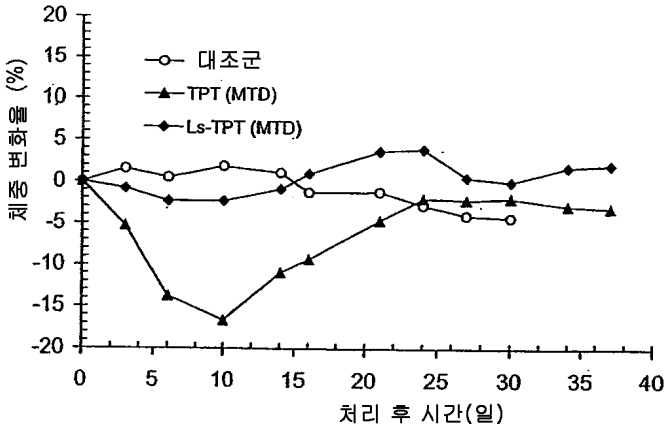
도면13c



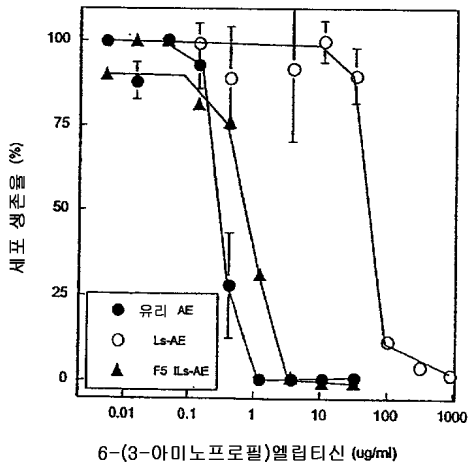
도면13d



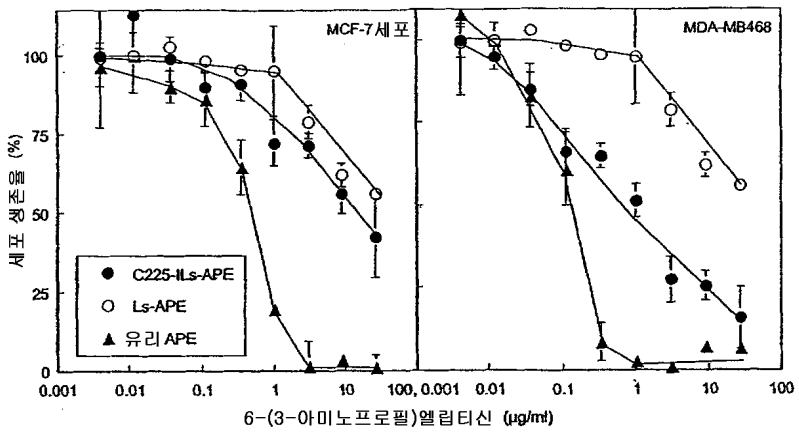
도면14



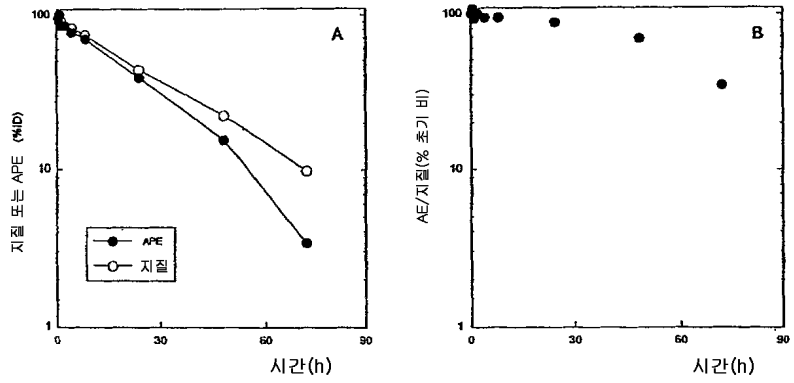
도면15



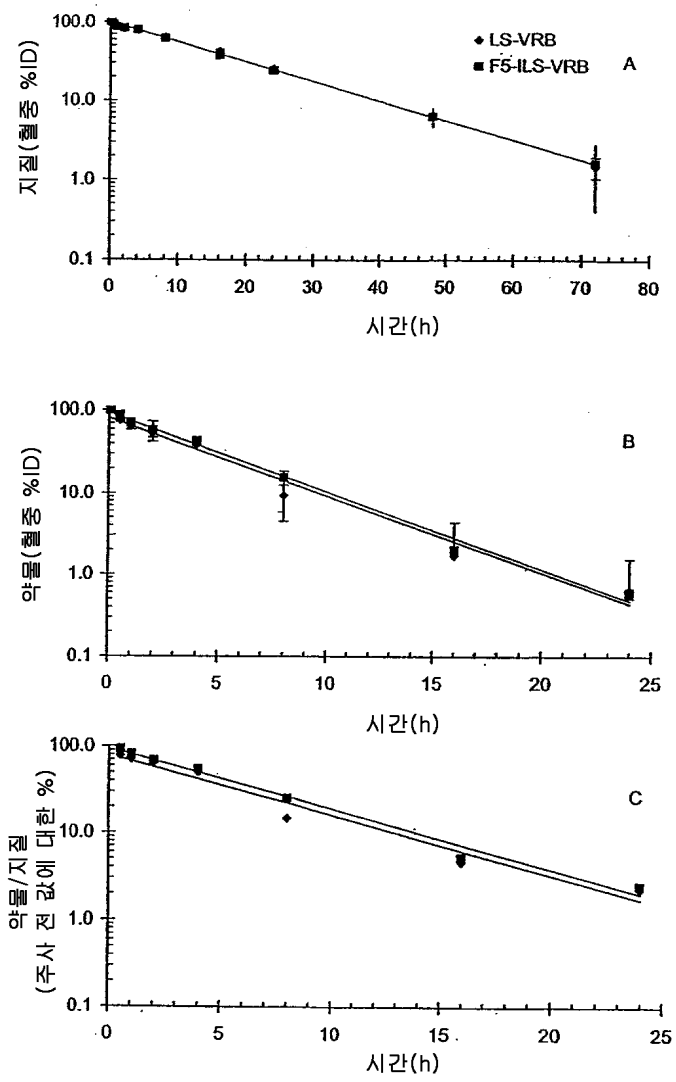
도면16


MCF-7세포
MDA-MB468
세포 생존율 (%)
100
75
50
25
0
C225-ILs-APE
Ls-APE
유리 APE
0.001
0.01
0.1
1
10
100
6-(3-아미노프로필)엘립티신 (μg/ml)

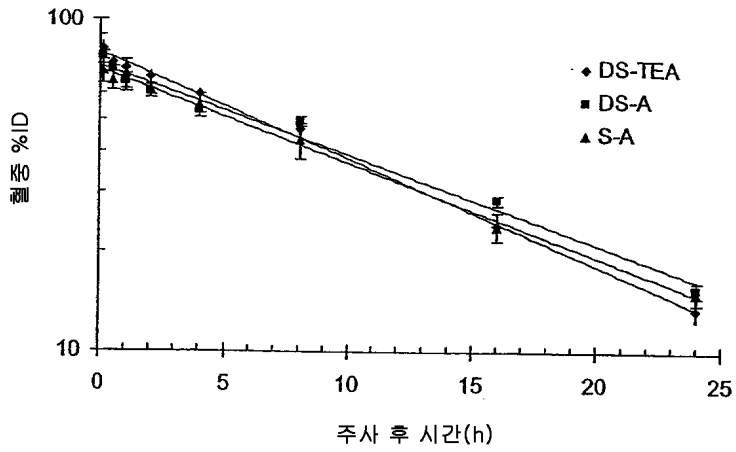
도면17


A
B
지질 또는 APE (%ID)
AE/지질(% 초기 비)
APE
지질
100
10
1
0
30
60
90
시간(h)

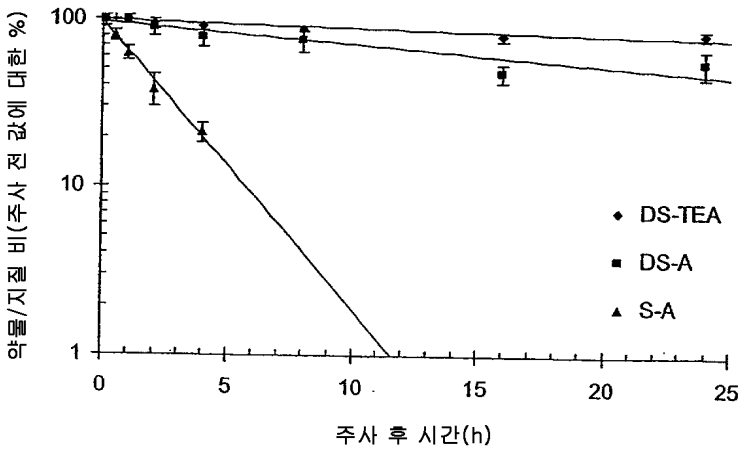
도면18


LS-VRB
F5-ILS-VRB
A
지질(혈중 %ID)
100.0
10.0
1.0
0.1
0
10
20
30
40
50
60
70
80
시간(h)
B
약물(혈중 %ID)
5
15
25
C
약물/지질
(주사 전 값에 대한 %)

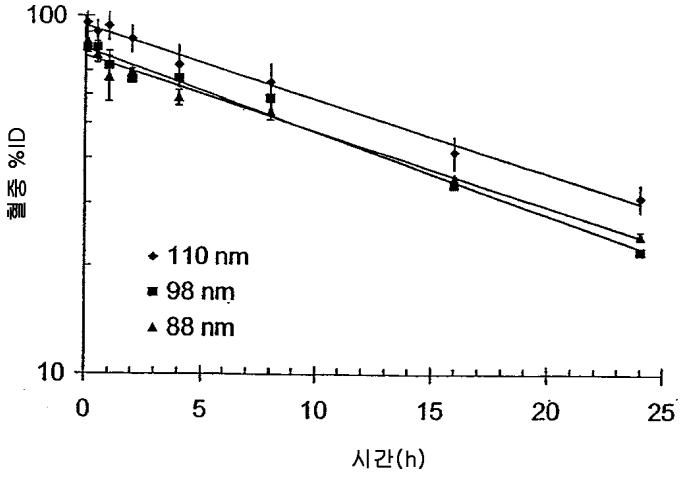
도면19


DS-TEA
DS-A
S-A
혈중 %ID
100
10
0
5
10
15
20
25
주사 후 시간(h)

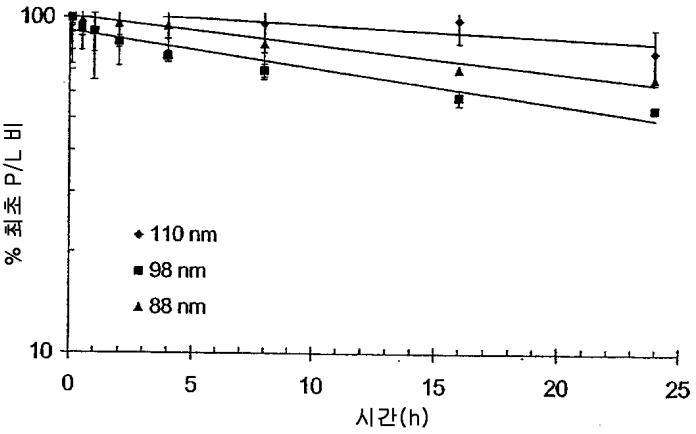
도면20



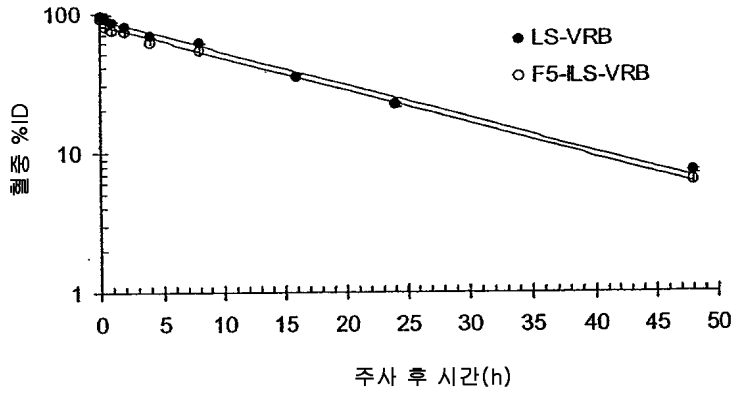
도면21



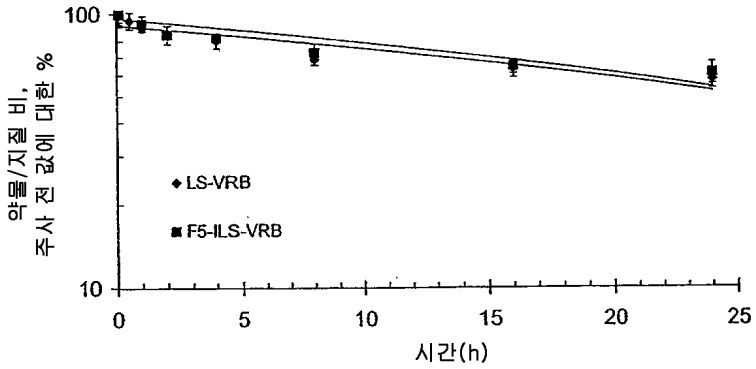
도면22



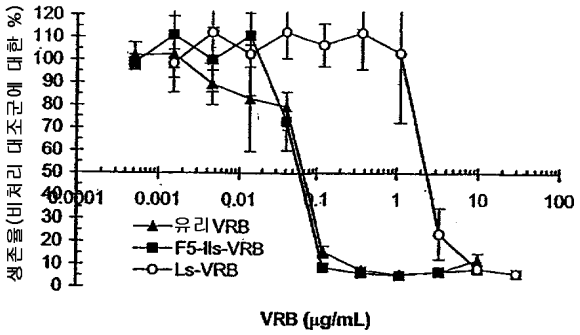
도면23



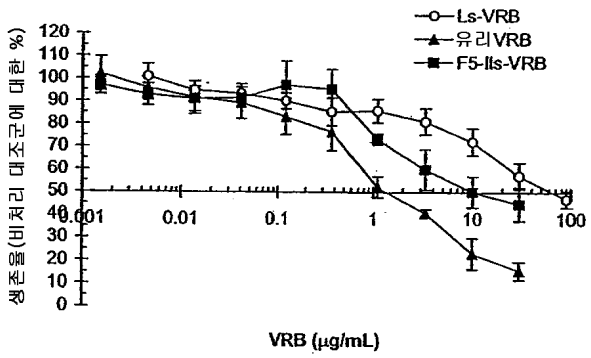
도면24



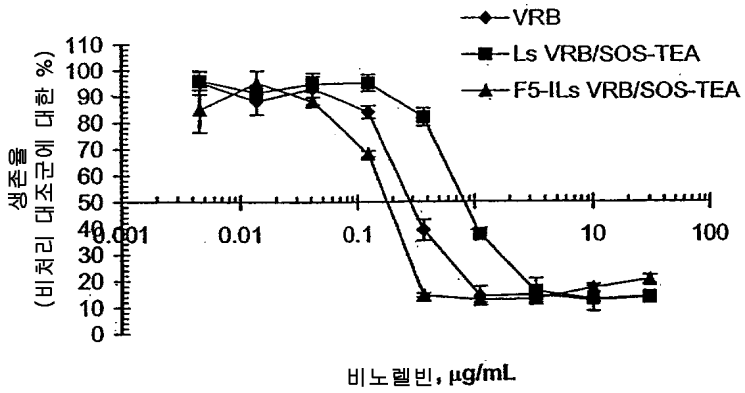
도면25



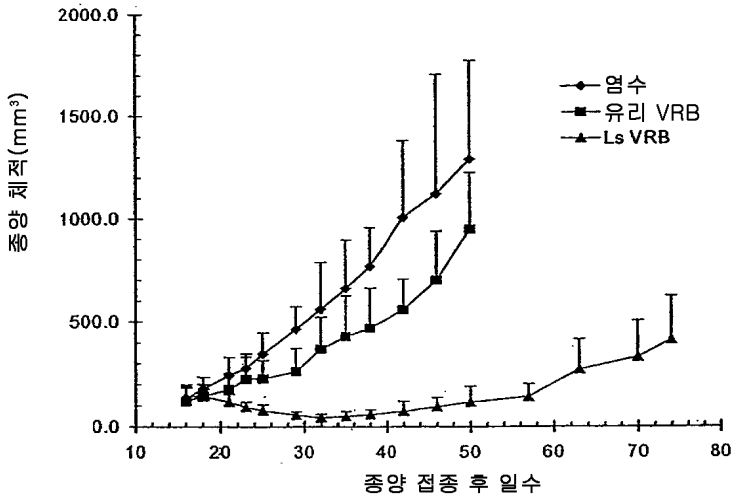
도면26



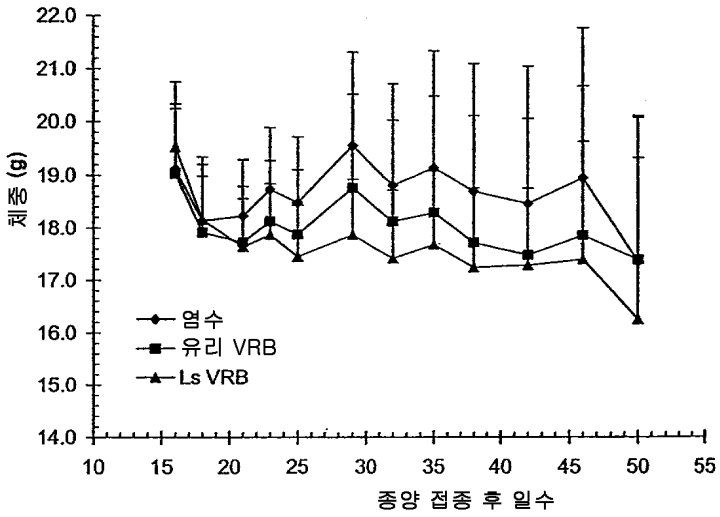
도면27



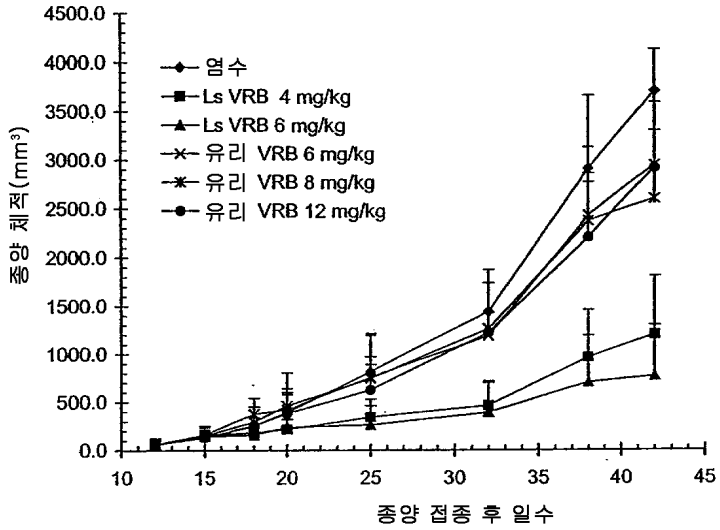
도면28



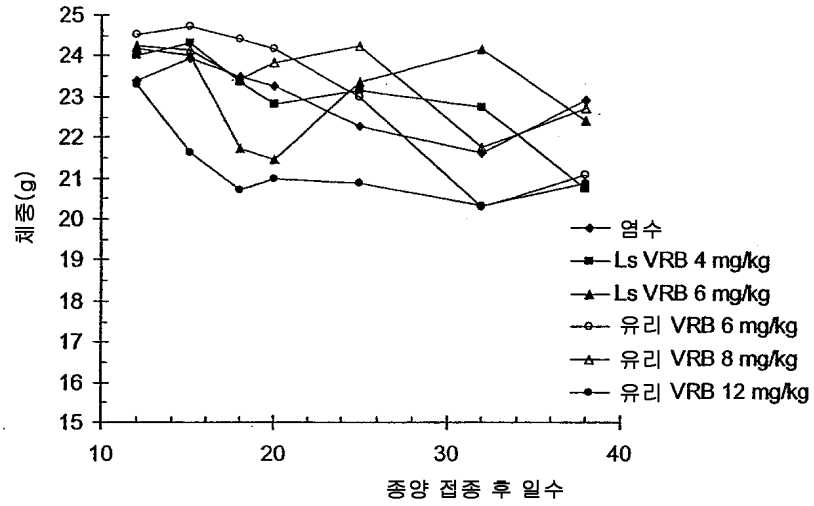
도면29


22.0
21.0
20.0
19.0
18.0
17.0
16.0
15.0
14.0
체중 (g)
염수
유리 VRB
Ls VRB
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
종양 접종 후 일수

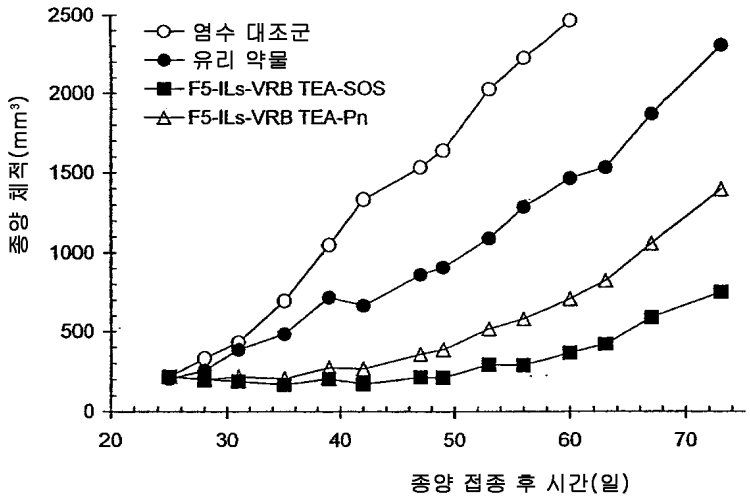
도면30


4500.0
4000.0
3500.0
3000.0
2500.0
2000.0
1500.0
1000.0
500.0
0.0
종양 체적 (mm³)
염수
Ls VRB 4 mg/kg
Ls VRB 6 mg/kg
유리 VRB 6 mg/kg
유리 VRB 8 mg/kg
유리 VRB 12 mg/kg
10
15
20
25
30
35
40
45
종양 접종 후 일수

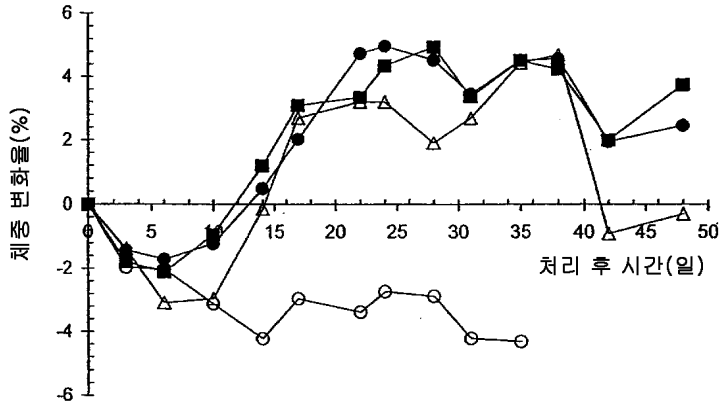
도면31



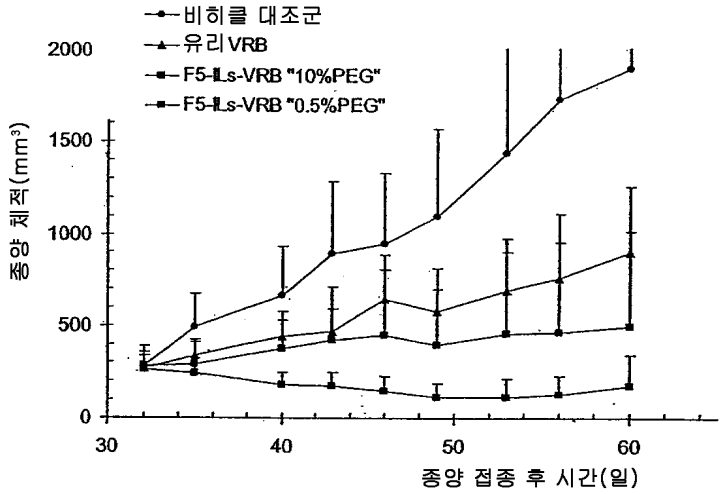
도면32



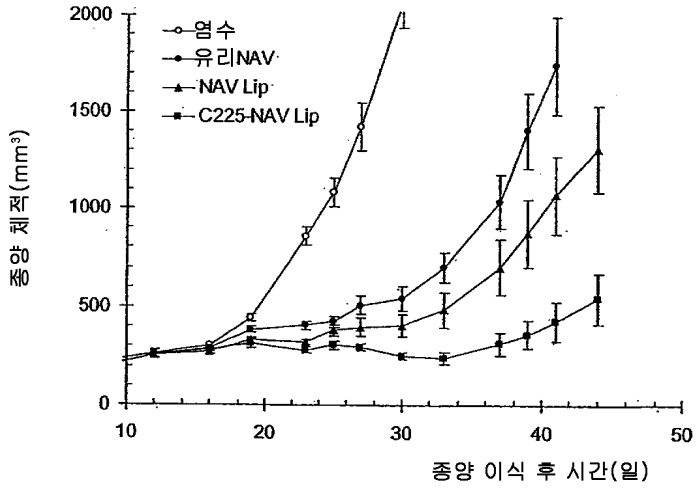
도면33



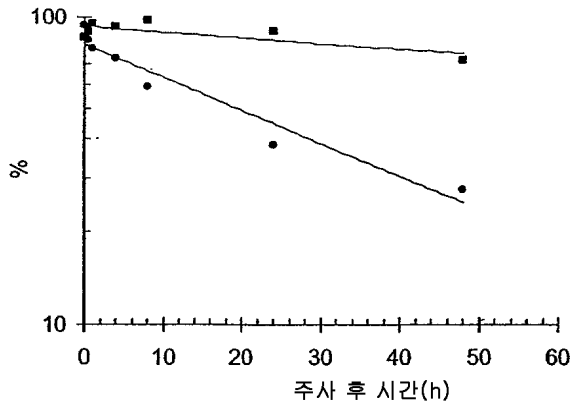
도면34



도면35

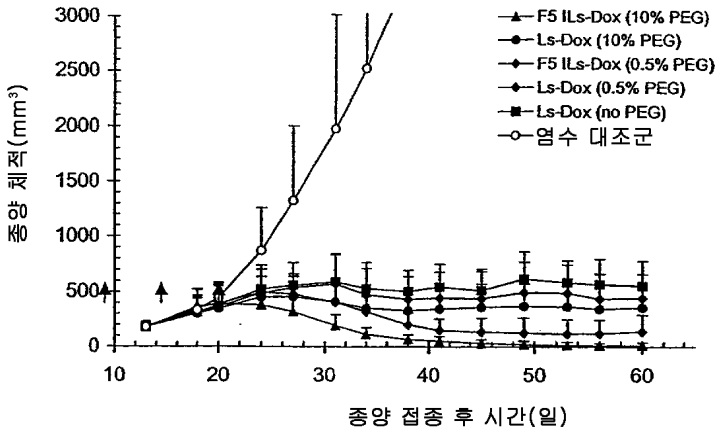


도면36

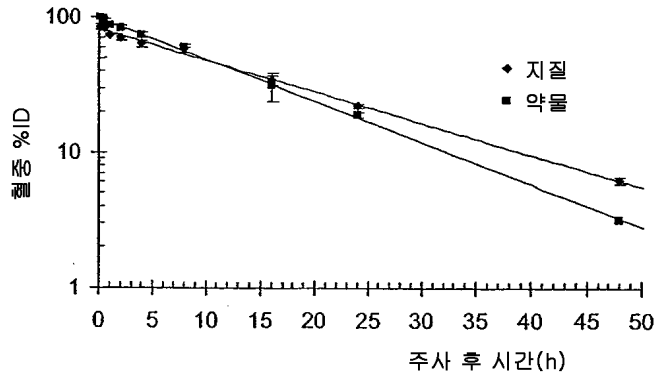


- 리포좀 지질(혈중 %i.d.)
- 약물/지질 비(주사 전 값에 대한 %)

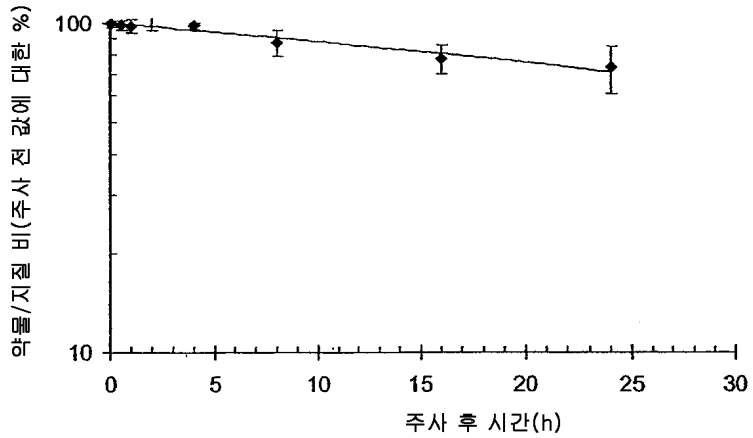
도면37



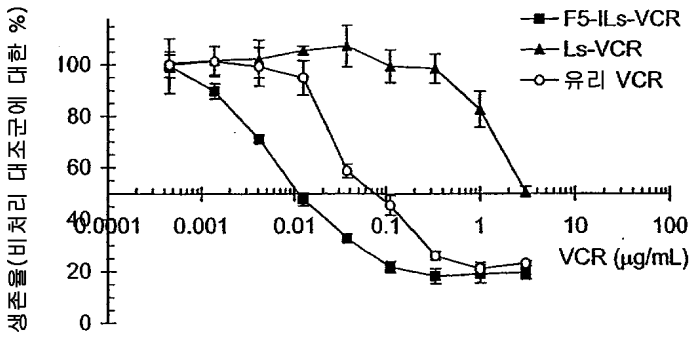
도면38



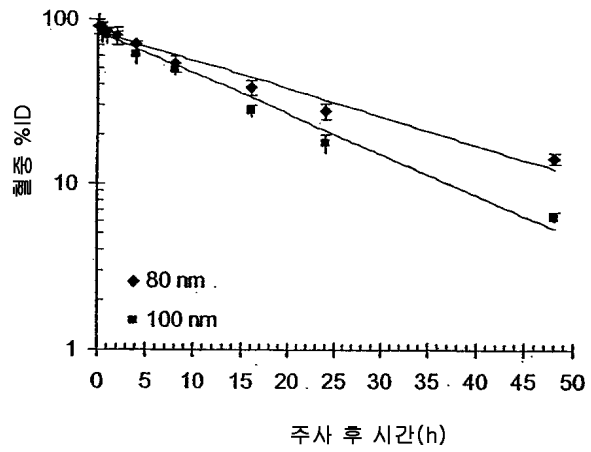
도면39



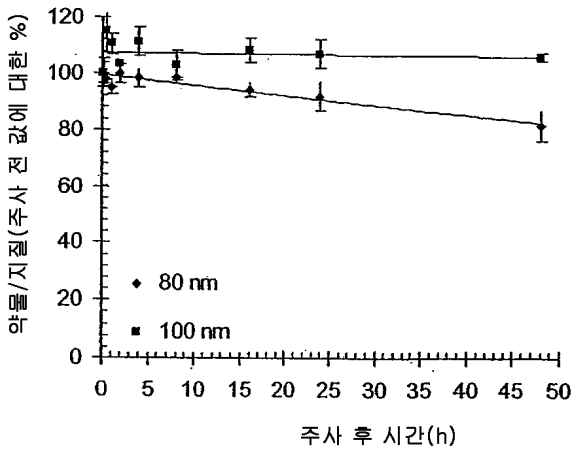
도면40



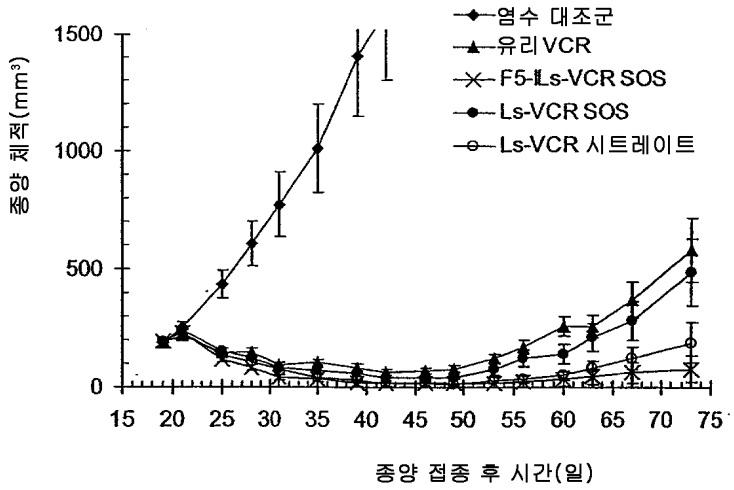
도면41



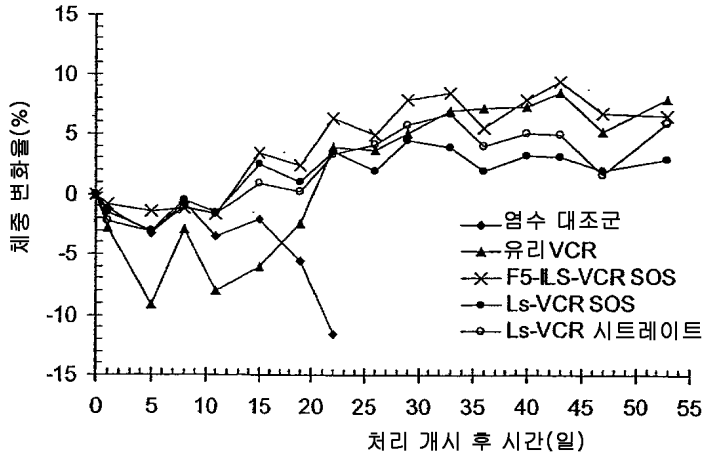
도면42



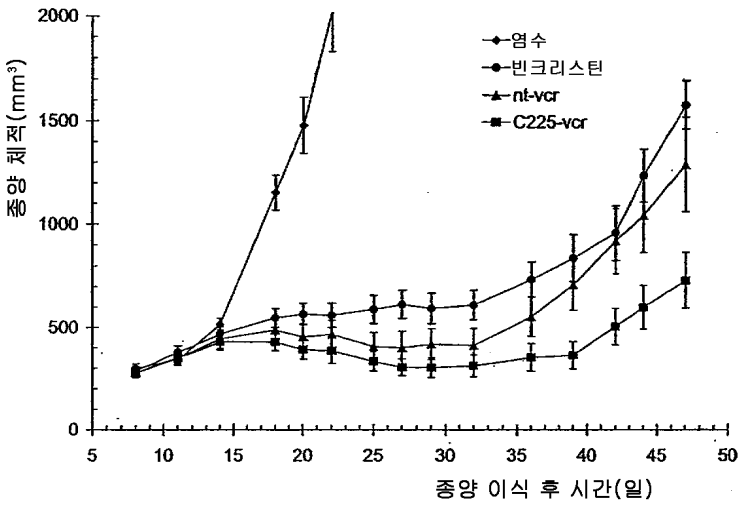
도면43



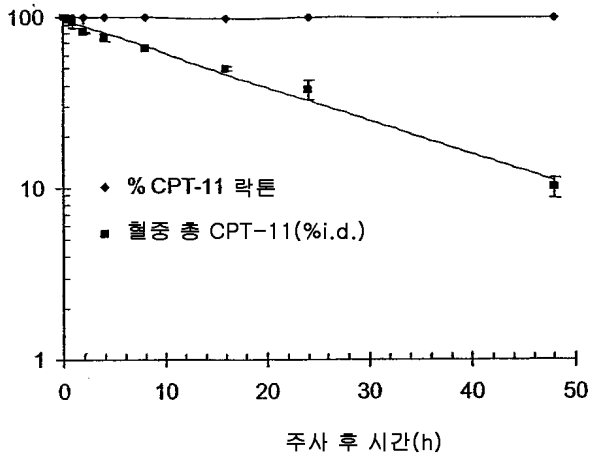
도면44



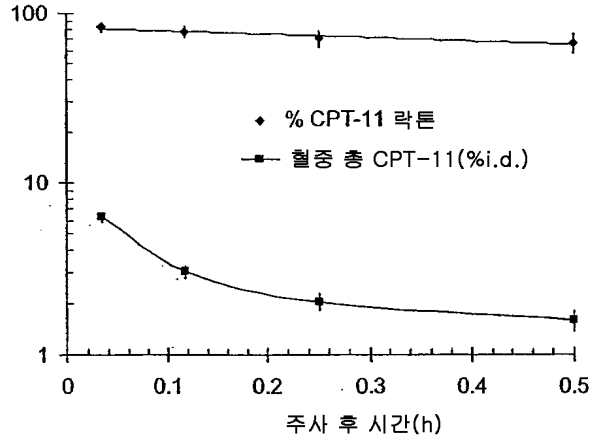
도면45



도면46


100
10
1
0
10
20
30
40
50
% CPT-11 락톤
혈중 총 CPT-11(%i.d.)
주사 후 시간(h)

도면47


100
10
1
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
% CPT-11 락톤
혈중 총 CPT-11(%i.d.)
주사 후 시간(h)