(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0161428
(43) 공개일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G16C 20/70 (2019.01) *A61K 47/10* (2017.01)
A61K 47/34 (2017.01) *A61K 9/107* (2006.01)
G16C 20/10 (2019.01) *G16C 20/30* (2019.01)
G16C 20/50 (2019.01) *G16C 20/80* (2019.01)
(52) CPC특허분류
G16C 20/70 (2019.02)
A61K 47/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0058562
(22) 출원일자 2023년05월04일
심사청구일자 2023년05월04일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
이계원
대전광역시 서구 둔산북로 215, 15동 1106호 (둔산동, 가람아파트)
(74) 대리인
특허법인도담

전체 청구항 수 : 총 5 항

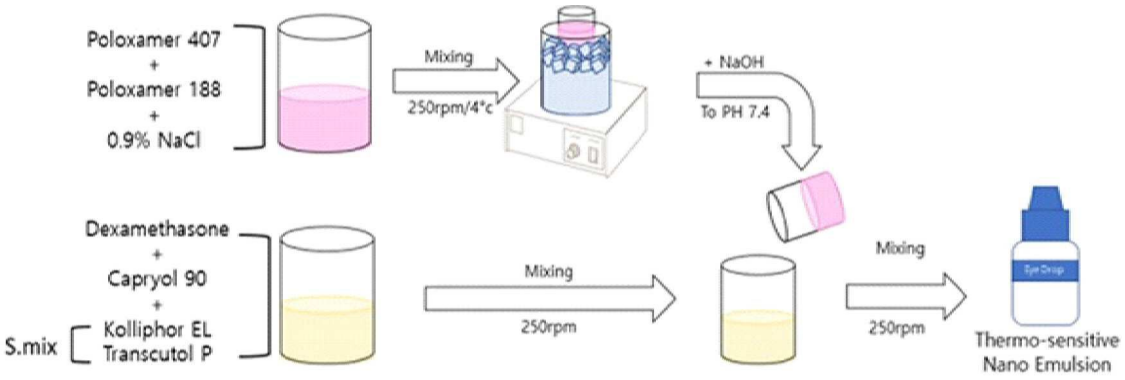
(54) 발명의 명칭 **약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법**

(57) 요 약

본 발명은, 실험계획법을 이용한 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔(Thermo-sensitive Nanoemulsion Gel)의 제조조건 최적화 방법에 있어서, a) 인체 적용 나노에멀젼 겔 제조를 위한 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 선별하는 단계; b) 상평형도(Phase Diagram) 분석을 통해 에멀젼 형성 범위가 가장 넓은 조건의 계면활성

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도6



제 혼합물(S_{mix}) 내 상기 계면활성제: 보조계면활성제의 최적 혼합비율을 선정하는 단계; c) 겔화온도(T_{gel}) 측정을 통해 상기 오일: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 혼합비율 및 전체 함량을 선정하는 단계; d) 상기 b) 및 c) 단계에서 선정된 조건을 만족시키되 목표약물 및 열감응성 고분자 존재하에 중심합성설계법(Central Composite Design)을 이용하여 상기 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2), 상기 열감응성 고분자 함량(X_3)을 독립변수로 하고, 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 및 겔화온도(Y_3)를 종속변수로 하여 복수의 처방을 확립하는 단계; e) 목표 종속변수 Y_1 내지 Y_3 값을 설정하고 바람직성 지수 최적화(Optimized Desirability Index)를 통해 이를 동시에 만족하는 영역 내에서 둘 이상의 처방을 선정하는 단계; 및 f) 상기 선정된 둘 이상 처방에서의 실제 Y_1 내지 Y_3 값을 측정한 후 상기 설정된 Y_1 내지 Y_3 값과 비교하여 가장 근접한 결과를 나타내는 최적화 처방을 결정하는 단계를 포함하는, 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류
A61K 47/34 (2013.01)
A61K 9/1075 (2013.01)
G16C 20/10 (2019.02)
G16C 20/30 (2019.02)
G16C 20/50 (2019.02)
G16C 20/80 (2019.02)

명 세 서

청구범위

청구항 1

실험계획법을 이용한 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔(Thermo-sensitive Nanoemulsion Gel)의 제조조건 최적화 방법에 있어서,

a) 인체 적용 나노에멀젼 겔 제조를 위한 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 선별하는 단계;

b) 상평형도(Phase Diagram) 분석을 통해 에멀젼 형성 범위가 가장 넓은 조건의 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 내 상기 계면활성제: 보조계면활성제의 최적 혼합비율을 선정하는 단계;

c) 겔화온도(T_{gel}) 측정을 통해 상기 오일: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 혼합비율 및 전체 함량을 선정하는 단계;

d) 상기 b) 및 c) 단계에서 선정된 조건을 만족시키되 목표약물 및 열감응성 고분자 존재하에 중심합성설계법(Central Composite Design)을 이용하여 상기 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2), 상기 열감응성 고분자 함량(X_3)을 독립변수로 하고, 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 및 겔화온도(Y_3)를 종속변수로 하여 복수의 처방을 확립하는 단계;

e) 목표 종속변수 Y_1 내지 Y_3 값을 설정하고 바람직성 지수 최적화(Optimized Desirability Index)를 통해 이를 동시에 만족하는 영역 내에서 둘 이상의 처방을 선정하는 단계; 및

f) 상기 선정된 둘 이상 처방에서의 실제 Y_1 내지 Y_3 값을 측정한 후 상기 설정된 Y_1 내지 Y_3 값과 비교하여 가장 근접한 결과를 나타내는 최적화 처방을 결정하는 단계를 포함하는, 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 a) 단계는,

a1) 인체 적용 나노에멀젼 제조를 위한 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 복수로 선정하는 단계;

a2) 상기 선정된 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제에 대한 목표약물의 용해도를 각각 측정한 후 용해도가 높은 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 각각 선별하는 단계; 및

a3) 상기 선별된 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질 사이의 혼화성을 각각 평가한 후 혼화성이 가장 높은 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질의 조합을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 열감응성 고분자는 폴록사머(Poloxamer)를 포함하며,

상기 폴록사머는 폴리에틸렌옥사이드(Polyethylene oxide, PEO) 함량이 50 내지 90 중량%인 제1폴록사머와 폴리에틸렌 옥사이드(Polyethylene oxide, PEO) 함량이 10 내지 50 중량%인 제2폴록사머의 혼합물인 것을 특징으로 하는, 약물 전달용 열감응성 나노 에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 d) 단계 수행하기 전, 겔화온도(T_{gel}) 측정을 통해 상기 제1폴록사머: 제2폴록사머의 혼합비율을 결정하는

단계를 더 포함하며,

상기 d) 단계는 상기 혼합비율을 만족하는 열감응성 고분자 존재하에 수행되는 것인, 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 f) 단계 수행 후, 상기 최적화 처방에서의 상기 목표약물 용출률(Dissolution Rate)을 평가하는 단계를 더 포함하는, 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔 제조조건 최적화 방법에 관한 것으로, 상세하게, 안정성이 높아 약물 활성을 유지하면서 투여 시 체내에서 독성 및 부작용을 발생시키지 않고 지속적인 약물의 방출을 유도할 수 있는 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔 제조조건 최적화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재까지 밝혀진 많은 신약 후보 물질의 약 30%는 수용액에 잘 녹지 않는 난용성 약물이기 때문에 의약품 개발에 제한이 많았다. 나노기술이 도입된 약물전달 기술은 약물의 가용화 및 흡수 개선, 질병 부위에 작용하는 약물의 효율을 증진시키고 부작용은 감소시키기 위한 방법으로 항암제를 비롯한 여러 난용성 약물의 개발을 촉진시킨다.

[0003] 나노에멀젼은 액적 크기가 20 내지 500 ㎚의 에멀젼으로, 상이 다른 두 용액을 혼합할 때 한쪽 액체가 미세한 입자를 형성하여 다른 액체 속에 분산되어 있는 시스템으로, 입자의 중심부가 약물 저장소 역할을 하여 난용성 약물의 가용화에 효과적이다.

[0004] 한편, 열감응성 고분자는 온도 변화에 따라 상전이를 나타내는 물질로 이러한 열감응성 고분자가 적용된 나노에멀젼 겔은 상온에서는 액체거동을 보이다가 온도가 높아지면 소수성기에 결합되어 있던 물분자가 분리되면서 점도가 증가하고 가역적으로 졸-겔(Sol-gel) 현상이 일어나면서 겔로 변환하게 된다. 이에 따라 약물을 원하는 곳으로 운반하되 지속방출을 가능케 한다.

[0005] 이러한 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔 제조를 위해서는 열감응성 고분자 물질은 물론, 나노에멀젼용 오일, 계면활성제 등 반응물질을 선정하고, 혼합비, 사용함량 등 제조조건을 최적화하는 과정이 필수적이며, 실험횟수를 최소화하되 효율적이고 체계적으로 상기 제조조건을 최적화하는 방법에 대한 개발이 필요하다.

[0006] 하지만, 종래에는 대한민국 등록특허 제10-2444452호(2022.09.14)와 같이 인체 내 주입 시 빠른 겔화반응, 체내 안정성 등 성능 향상을 위한 특정 조성의 열감응성 고분자 조성물에 대한 연구가 주로 수행되었으나, 특정 목표 약물을 대상으로 이를 가장 효과적으로 인체의 목표부위에 전달하기 위한 약물 담지 열감응성 나노에멀젼 제조조건의 체계적인 최적화 방법에 대한 연구가 미미한 상황이다.

[0007] 이에, 약물 담지 열감응성 나노에멀젼 제조를 위한 각 물질의 스크린 단계부터 실험설계를 통한 최적조건 선별 단계까지 체계적으로 수행 가능한 최적화 방법의 개발이 필요한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2444452호(2022.09.14)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상술된 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 실험계획법을 도입하여 열감응성 물질 기반 나노에멀젼 겔의 성능과 안정성을 고려한 제조조건에 따른 모델을 개발하고 개발된 모델을 이용하여 최적 제조조건을 도출하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은, 실험계획법을 이용한 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔(Thermo-sensitive Nanoemulsion Gel)의 제조조건 최적화 방법에 있어서, a) 인체 적용 나노에멀젼 겔 제조를 위한 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 선별하는 단계; b) 상평형도(Phase Diagram) 분석을 통해 에멀젼 형성 범위가 가장 넓은 조건의 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 내 상기 계면활성제: 보조계면활성제의 최적 혼합비율을 선정하는 단계; c) 겔화온도(T_{gel}) 측정을 통해 상기 오일: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 혼합비율 및 전체 함량을 선정하는 단계; d) 상기 b) 및 c) 단계에서 선정된 조건을 만족시키되 목표약물 및 열감응성 고분자 존재하에 중심합성설계법(Central Composite Design)을 이용하여 상기 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2), 상기 열감응성 고분자 함량(X_3)을 독립변수로 하고, 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 및 겔화온도(Y_3)를 종속변수로 하여 복수의 처방을 확립하는 단계; e) 목표 종속변수 Y_1 내지 Y_3 값을 설정하고 바람직성 지수 최적화(Optimized Desirability Index)를 통해 이를 동시에 만족하는 영역 내에서 둘 이상의 처방을 선정하는 단계; 및 f) 상기 선정된 둘 이상 처방에서의 실제 Y_1 내지 Y_3 값을 측정한 후 상기 설정된 Y_1 내지 Y_3 값과 비교하여 가장 근접한 결과를 나타내는 최적화 처방을 결정하는 단계를 포함하는, 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법을 제공한다.

[0011] 일 양태에 따르면, 상기 a) 단계는, a1) 인체 적용 나노에멀젼 제조를 위한 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 복수로 선정하는 단계; a2) 상기 선정된 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제에 대한 목표약물의 용해도를 각각 측정한 후 용해도가 높은 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 각각 선별하는 단계; 및 a3) 상기 선별된 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질 사이의 혼화성을 각각 평가한 후 혼화성이 가장 높은 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질의 조합을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012] 일 양태에 따르면, 상기 열감응성 고분자는 폴록사머(Poloxamer)를 포함하며, 상기 폴록사머는 폴리에틸렌옥사이드(Polyethylene oxide, PEO) 함량이 50 내지 90 중량%인 제1폴록사머와 폴리에틸렌 옥사이드(Polyethylene oxide, PEO) 함량이 10 내지 50 중량%인 제2폴록사머의 혼합물인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 일 양태에 따르면, 상기 d) 단계 수행하기 전, 겔화온도(T_{gel}) 측정을 통해 상기 제1폴록사머: 제2폴록사머의 혼합비율을 결정하는 단계를 더 포함하며, 상기 d) 단계는 상기 혼합비율을 만족하는 열감응성 고분자 존재하에 수행될 수 있다.

[0014] 일 양태에 따르면, 상기 f) 단계 수행 후, 상기 최적화 처방에서의 상기 목표약물 용출률(Dissolution Rate)을 평가하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법에 의하면, 실험계획법을 이용하여 불필요한 실험을 줄일 수 있는 효과가 있고 열감응성 물질 기반 나노에멀젼 겔의 성능과 안정성을 고려한 최적 제조조건을 도출 가능한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따라 선정된 각 오일 물질, 계면활성제 물질 및 보조계면활성제 물질에 대한 덱사메타손의 용해도를 각각 측정한 결과를 나타낸 것으로, (a)는 오일 물질에 대한 결과; (b)는 계면활성제 물질에 대한 결과; (c)는 보조계면활성제 물질에 대한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 내 Kolliphor EL: Transcutol HP의 혼합비율에 따른 상평형도 측정결과로, (a)는 혼합비율 1: 2; (b)는 혼합비율 2: 1; (c)는 혼합비율 1: 3; (d)는 혼합비율 3: 1; (e)는 혼합비율 1: 1에 대한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 계면활성제 혼합물(S_{mix}): 오일 물질의 혼합비율 및 전체 함량 변화에 따른 겔화온도(T_{gel}) 측정결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 열감응성 고분자 혼합물 내 Poloxamer 407®: Poloxamer 188®의 혼합비율에 따른 겔화온도(T_{gel}) 측정결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 구현예에 따라 조건 1 및 2를 동시에 만족하는 나노에멀젼에 대해 오일 함량, 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량, Poloxamer 407® 함량 및 Poloxamer 188® 함량 변화에 따른 겔화온도, 입자크기, 다분산성 지수 및 제타 포텐셜 값 측정결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 구현예에 따라 덱사메타손이 로딩된 열감응성 나노에멀젼 제조과정을 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 중심합성설계법에 따라 확립된 31가지 처방 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2), Poloxamer 407® 함량(X_3), 및 Poloxamer 188® 함량(X_4) 변화에 따른 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 겔화온도(Y_3) 및 제타 포텐셜 값(Y_4) 측정결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 중첩등고선도 분석결과를 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 중첩등고선도 분석결과로부터 선정된 최적화 처방 1~3에 따른 실제 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2) 및 겔화온도(Y_3) 측정결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 구현예에 따른 최적화 처방 1~3에 대한 덱사메타손 용출률 분석결과를 나타낸 것으로, (a)는 처방 1에 대한 결과; (b)는 처방 2에 대한 결과; (c)는 처방 3에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 구현예에 따른 최적화 처방 1에 따라 제조된 나노에멀젼에 대한 투과전자현미경 분석 이미지를 나타낸 도면이다.

도 12는 본 발명의 일 구현예에 따른 최적화 처방 1~3에 대한 세포독성 분석결과를 나타낸 것으로, (a)는 ARPE-19 세포에 대한 결과; (b)는 Caco-2 세포에 대한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. "및/또는"은 언급된 아이템들의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.

[0018] 다른 정의가 없다면 본 명세서에서 사용되는 모든 용어(기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지 식을 가진 자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 명세서 전체에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 또한 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다.

[0020] 본 발명은, 실험계획법을 이용한 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔(Thermo-sensitive Nanoemulsion Gel)의 제조조건 최적화 방법에 있어서, a) 인체 적용 나노에멀젼 겔 제조를 위한 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 선별하는 단계; b) 상평형도(Phase Diagram) 분석을 통해 에멀젼 형성 범위가 가장 넓은 조건의 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 내 상기 계면활성제: 보조계면활성제의 최적 혼합비율을 선정하는 단계; c) 겔화온도(T_{gel}) 측정을 통해 상기 오일: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 혼합비율 및 전체 함량을 선정하는 단계; d) 상기 b) 및 c) 단계에서 선정된 조건을 만족시키되 목표약물 및 열감응성 고분자 존재하에 중심합성설계법(Central Composite Design)을 이용하여 상기 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2), 상기 열감응성 고분자 함량(X_3)을 독립변수로 하고, 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 및 겔화온도(Y_3)를 종속변수로 하

여 복수의 처방을 확립하는 단계; e) 목표 종속변수 Y_1 내지 Y_3 값을 설정하고 바람직성 지수 최적화(Optimized Desirability Index)를 통해 이를 동시에 만족하는 영역 내에서 둘 이상의 처방을 선정하는 단계; 및 f) 상기 선정된 둘 이상 처방에서의 실제 Y_1 내지 Y_3 값을 측정한 후 상기 설정된 Y_1 내지 Y_3 값과 비교하여 가장 근접한 결과를 나타내는 최적화 처방을 결정하는 단계를 포함하는, 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법을 제공한다.

[0021] 실험계획법(DOE, Design of Experiments)은 수리 통계학에 기반하며 불필요한 실험을 줄이고 통계적 분석을 통해 최대의 정보를 얻기 위해 실험을 계획하는 것을 말한다. 실험계획법은 어떤 요인이 반응에 유의한지 정량적으로 판단하고, 유의하지 않은 인자의 영향도와 측정오차를 판단하며, 유의한 인자의 반응에 대한 최적 값을 도출하는 것을 목적으로 한다.

[0023] 본 발명에 따른 실험계획법은 다음과 같은 방법으로 순차적으로 수행된다.

[0024] a) 단계에서는 나노에멀젼 겔 제조를 위한 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 선별한다.

[0025] 오일은 프로필렌 글리콜 모노카프릴레이트(Propylene glycol monocaprylate)[예를 들어, 카프리올™ PGMC (Capryol™ PGMC), 카프리올™ 90 (Capryol™ 90) 등], 프로필렌 글리콜 디카프릴로카프레이트(Proylene glycol dicaprylocaprate)[예를 들어, 라브라팍™ PG (Labrafac™ PG) 등], 프로필렌 글리콜 라우레이트 (Propylene glycol laurate)[예를 들어, 라우로글리콜™ FCC (Laurogrycol™ FCC), 라우로글리콜™ 90 (Laurogrycol™ 90) 등], 탄소수 8 내지 10의 미디움 체인 트리글리세라이드 (Medium chain (C_8*C_{10}) triglycerides)[예를 들어, 라브라팍 리포필™ WL 1349 (Labrafac Lipophile™ WL 1349) 등], 글리세릴-1,3-디올레이트 (Glyceryl-1,3-dioleate)[예를 들어, 플루올 올레이크™ cc497(Plurol oleique™ cc497) 등], 글리세릴 모노올레이트 (Glyceryl monooleate)[예를 들어, 퍼세올™(Peceol™) 등], 및 글리세릴 리놀레이트 (Glyceryl linoleate)[예를 들어, 마이신™ 35-1 (Maisine™ 35-1) 등]로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 계면활성제는 올레오일 마크로골글리세라이드 (Oleoyl macrogolglycerides)[예를 들어, 라브라필™ M 1944CS (Labrafil™ M 1944CS, Gattefosse사, 프랑스) 등], 리놀레오일 마크로골글리세라이드 (Linoleoyl macrogolglycerides)[예를 들어, 라브라필™ M 2125CS (Labrafil™ M 2125CS, Gattefosse사, 프랑스) 등], 카프릴로카프로일 폴리옥시글리세라이드 (Caprylocaproyl polyoxylglycerides)[예를 들어, 라브라솔™ (Labrasol™, Gattefosse사, 프랑스) 등], 폴리옥실 35 하이드로제네이트 피마자유 (Polyoxyl 35 hydrogenated caster oil)[예를 들어, 크레모포어™ EL (Cremophor™ EL, BASF사, 독일), 크레모포어™ ELP (Cremophor™ ELP, BASF사, 독일) 등], 폴리옥실 40 하이드로제네이트 피마자유 (polyoxyl 40 hydrogenated caster oil)[예를 들어, 크레모포어™ RH40(Cremophor™ RH40, BASF사, 독일) 등], 에틸렌 옥사이드와 12-히드록시스테린산의 축합 생성물 (Condensation product of ethylene oxide with 12-hydroxystearic acid)[예를 들어, 솔루톨™ HP15(Solutol™ HP15, BASF사, 독일) 등], 및 폴리소르베이트 80 (Polysorbate 80, Croda사, 영국)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 한편, 보조계면활성제는 자가유화 약물전달시스템의 가용화능력 및 안정성을 보다 향상시키기 위해 사용되는 것으로, 폴리에틸렌글리콜 (Polyethylen glycol), 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 디메틸이소소르비드 (Dimethyl isosorbide), 디에틸렌글리콜모노에틸에테르(Diethylene glycol monoethyl ether) [예를 들어, 트랜스큐톨 HP (Transcutol HP, Gattefosse, France) 등]로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 즉, 인체에 사용 가능하되 목표약물에 적용하기 위한 무독성 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 선별한다.

[0029] 목표약물을 기준으로 최적의 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 선별하기 위한 측면에서, 상기 a) 단계는 a1)선정단계; a2) 용해도 기준 선별단계; 및 a3) 혼화성 기준 결정단계를 포함하도록 구성된다.

[0031] a1) 단계에서는 인체 적용 나노에멀젼 제조를 위한 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 복수로 선정한다.

[0032] 각 후보물질은 구체적으로 적용하고자 하는 인체 부위 및/또는 목표약물의 종류를 기준으로 선정될 수 있으며, 인체 적용이 가능한 무독성 물질인 것이 유리하다. 구체적인 물질은 전술된 바와 동일하다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 목표약물 덱사메타손(Dexamethasone)을 점안제로서 안구에 적용하고자 하는 경우, 오일 물질로서 Castor Oil, Olive Oil, Isoprpyl Myristate, Capryol90, Triacetin, Oleic acid, Labrafac lipophile 등을 선정하고, 계면활성제로서 Tween20, Tween80, Solutol HS 15, Propylen Glycol, Lavrasol, PEG400, Cremophor EL, PEG200 등을 선정하며, 보조계면활성제로서 Gelucire 44/14, Gelucire 50/13, Compritol 888 ATO, Glyceryl monostearate, Stearic acid, Soluphor P, Transcutol HP 등을 선정할 수 있다.

[0035] a2) 단계에서는 상기 선정된 복수의 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질에 대한 목표약물의 용해도를 각각 측정한 후 용해도가 높은 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 각각 선별한다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 선정된 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질에 대하여 목표약물인 덱사메타손(Dexamethasone)에 대한 용해도를 각각 측정한 후, 측정결과를 바탕으로 용해도가 높은 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질을 각각 선별한다. 이때 상기 용해도 측정방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법이라면 크게 제한하지는 않으나, 바람직하게는 원심분리와 UV 및 HPLC 측정을 바탕으로 하는 액체 지질 용해도 측정방법일 수 있다.

[0038] a3) 단계에서는 상기 선별된 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질 사이의 혼화성을 각각 평가한 후 혼화성이 가장 높은 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질의 조합을 결정한다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 목표약물인 덱사메타손(Dexamethasone)을 점안제로서 안구에 적용하고자 하는 경우, 투과도 측정결과를 바탕으로 하는 각 물질간의 혼화성 결과에 따라 최종 오일 물질로서 Capryol 90, 계면활성제 물질로서 Kolliphor EL, 보조계면활성제 물질로서 Transcutol HP의 조합을 결정할 수 있다. 한편, 투과도가 높을수록 혼화성이 우수함을 시사한다.

[0041] b) 단계는 상기 최종 결정된 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질 조합을 바탕으로 상기 계면활성제 및 보조계면활성제 물질의 최적 혼합비율 조건을 선정하는 단계이다.

[0042] 이를 위해, 상기 b) 단계에서는 상평형도(Phase Diagram) 분석을 통해 에멀젼 형성 범위가 가장 넓은 조건의 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 내 상기 계면활성제: 보조계면활성제의 최적 혼합비율 조건을 선정한다. 구체적으로, 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 총 중량을 고정시키되 상기 계면활성제: 보조계면활성제의 중량비를 변경하면서 물 추가 시 백탁현상이 일어나는 시점을 기준으로 최적 혼합비율을 결정할 수 있다.

[0044] c) 단계는 상기 최종 결정된 오일 및 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 혼합비율과 전체 함량을 선정하는 단계이다. 이때 상기 계면활성제 혼합물은(S_{mix})은 상기 b) 단계에서 결정된 계면활성제: 보조계면활성제의 최적 혼합비율로 혼합된 혼합물을 지칭한다.

[0045] 구체적으로, 상기 오일 및 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 전체 함량 5 내지 20 중량% 범위 내에서 상기 오일: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 중량비를 변경시키면서 겔화온도(T_{gel})를 측정하여 목표약물이 용해되되 에멀젼이 형성되는 조건을 기준으로 상기 조건을 선정할 수 있다. 선정되는 조건은 복수로 존재할 수 있으며 후속되는 과정을

통해 최적의 조건을 결정할 수 있게 된다.

[0047] d) 단계는 중심합성설계법을 이용한 실험설계 단계로, 상기 b) 및 c) 단계에서 선정된 조건을 동시에 만족시키되 목표약물 및 열감응성 고분자 존재하에 수행된다.

[0048] 중심합성설계법에 의한 요인(Factor; 독립변수)(X_i)은 각각 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2), 및 열감응성 고분자 함량(X_3)로 설정하였으며, 이러한 독립변수에 영향을 받을 종속변수(Y_n)로는 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 및 겔화온도(Y_3)로 설정한 후 복수의 처방을 확립한다.

[0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 열감응성 고분자는 폴록사머(Poloxamer)를 포함하며, 상기 폴록사머는 폴리에틸렌옥사이드(Polyethylene oxide, PEO) 함량이 50 내지 90 중량%인 제1폴록사머와 폴리에틸렌 옥사이드(Polyethylene oxide, PEO) 함량이 10 내지 50 중량%인 제2폴록사머의 혼합물인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 바람직한 구현예에 따르면, 상기 제1폴록사머는 Poloxamer 407®를 포함하며, 상기 제2폴록사머는 Poloxamer 188®를 포함할 수 있다. 즉, 상기 열감응성 고분자는 Poloxamer 407®와 Poloxamer 188®의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0051] 이러한 열감응성 고분자 내 제1폴록사머: 제2폴록사머의 혼합비율을 선정하기 위한 측면에서, 상기 c) 단계 수행 후 및 상기 d) 단계 수행 전에는 겔화온도(T_{gel}) 측정을 통해 상기 제1폴록사머: 제2폴록사머의 혼합비율을 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0052] 상기 열감응성 고분자의 전체 함량은 상기 열감응성 고분자를 물에 녹였을 때 목표 겔화온도(T_{gel})와 가장 근접한 값을 나타내는 시점을 기준으로 결정할 수 있다.

[0053] 상기 결정된 열감응성 고분자 전체 함량을 고정시킨 상태에서 상기 제1폴록사머: 제2폴록사머의 중량비를 변경시키면서 겔화온도(T_{gel})를 측정하여 목표 겔화온도(T_{gel})와 가장 근접한 값을 나타내는 조건으로 선정할 수 있다. 한편, 목표 겔화온도(T_{gel})는 목표약물을 적용하고자 하는 인체 부위에 따라 상이할 수 있으며, 비한정적인 예로, 점안제로서 안구에 적용하고자 하는 경우 상기 목표 겔화온도(T_{gel})는 일반적인 안구표면 온도인 32.9 내지 36.0℃ 와 근접한 값을 가지는 것이 유리하다.

[0054] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 d) 단계에서 사용되는 열감응성 고분자는 상술된 기준으로 선정된 혼합비율을 만족하도록 구성될 수 있으며, 이에 따라 상기 X_3은 제1폴록사머의 함량이고, 제2폴록사머의 함량인 독립변수 X_4가 추가하여 복수의 처방을 확립할 수 있다.

[0056] e) 단계에서는 목표 종속변수인 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 및 겔화온도(Y_3) 값을 설정하고 바람직성 지수 최적화(Optimized Desirability Index)를 통해 이를 동시에 만족하는 영역 내에서 둘 이상의 처방을 선정한다.

[0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 목표 종속변수는 제타 포텐셜(Y_4)를 더 포함할 수 있으며, 설정된 Y_1 내지 Y_4 값을 기준으로 둘 이상의 처방을 선정할 수 있다.

[0058] 상기 선정된 둘 이상의 처방은 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2), Poloxamer 407® 함량(X_3) 및 Poloxamer 188® 함량(X_4)이 결정된 것으로서, 이때 X_1 내지 X_4 중 둘 이상은 상기 b) 단계 및 c) 단계에서 선정된 복수의 조건 중 선택되는 하나를 만족시키도록 설정된다.

[0060] f) 단계에서는 상기 선정된 둘 이상의 처방에 따른 실제 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 및 겔화온도(Y_3) 값을 측정한 후 상기 e) 단계에서 설정된 Y_1 내지 Y_3 값을 비교하여 가장 근접한 결과를

나타내는 최적화 처방을 최종적으로 결정한다. 이에 따라 본 발명이 목적하는 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건을 최적화할 수 있게 된다.

[0061] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 선정된 둘 이상의 처방에 따른 실제 제타 포텐셜(Y_4) 값을 더 측정할 수 있으며, 상기 e) 단계에서 설정된 Y_1 내지 Y_4 값과 가장 근접한 결과를 나타내는 최적화 처방을 결정할 수 있다.

[0062] 상기 f) 단계 수행 후, 상기 최적화 처방에서의 목표약물 용출률(Dissolution Rate)을 추가로 평가하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔의 제조조건 최적화 방법은 실험계획법을 이용함으로써 불필요한 실험을 줄여 실험횟수를 최소화하되 효율적이고 체계적으로 제조조건 최적화가 가능하다. 또한, 열감응성 물질 기반 나노에멀젼 겔의 성능과 안정성을 고려한 최적 제조조건을 도출 가능한 장점이 있다.

[0065] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명하나, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0066] **실시예**

[0067] 덱사메타손(Dexamethasone)를 목표약물로 사용하여 점안제로서 안구에 적용하기 위한 약물 전달용 열감응성 나노에멀젼 겔을 제조하기 위해 아래와 같은 최적화 방법에 따라 최적조건을 선정하였다.

[0068] 우선, 인체에 적용 가능한 무독성 오일, 계면활성제 및 보조계면활성제 물질로서 하기 표 1에 기재된 물질을 선정하였다.

표 1

[0069]

	구체물질
오일	Castor Oil, Olive Oil, Isoprpyl Myristate, Capryol90, Triacetin, Oleic acid, Labrafac lipophile
계면활성제	Tween20, Tween80, Solutol HS 15, Propylen Glycol, Lavrasol, PEG400, Cremophor EL, PEG200
보조계면활성제	Gelucire 44/14, Gelucire 50/13, Compritol 888 ATO, Glyceryl monostearate, Stearic acid, Soluphor P, Transcutol HP

[0070] 선정된 각 오일 물질, 계면활성제 물질 및 보조계면활성제 물질에 대한 목표약물인 덱사메타손(Dexamethasone)의 용해도를 각각 측정하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1(a)는 오일 물질에 대한 결과; 도 1(b)는 계면활성제 물질에 대한 결과; 도 1(c)는 보조계면활성제 물질에 대한 결과이다.

[0071] 도 1에 나타낸 용해도 측정결과를 바탕으로 선별된 오일 물질, 계면활성제 물질 및 보조계면활성제 물질 사이의 혼화성을 평가한 후 최종적으로 혼화성이 가장 우수한 Capryol 90, Kolliphor EL 및 Transcutol HP 조합으로 결정하였다.

[0072] 이어서, 물 적정법을 이용하여 계면활성제 혼합물(S_{mix})인 Kolliphor EL 및 Transcutol HP의 혼합물 내 최적 혼합비율을 선정하였다. 구체적으로, 상기 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 전체 함량을 0.5 g으로 고정시키되, Kolliphor EL: Transcutol HP의 비율을 1: 9 내지 9:1로 변경시키면서 혼합용액을 제조한 후, 제조된 혼합용액에 물 0.05 ㎖씩 추가하면서 백탁현상이 일어나는 시점을 기준으로 하여 최적 혼합비율인 1:1 조건을 선정하였다. 각 조건에서의 상평형도 측정결과는 도 2에 나타내었다. 도 2(a)는 Kolliphor EL: Transcutol HP 혼합비율이 1: 2; 도 2(b)는 2: 1; 도 2(c)는 1: 3; 도 2(d)는 3: 1; 도 2(e)는 1: 1에 대한 결과이다.

[0073] 다음, Kolliphor EL: Transcutol HP= 1: 1 혼합비 조건을 만족시키는 계면활성제 혼합물(S_{mix})과 Capryol 90의 혼합비율을 1: 9 내지 5: 5로 변경시키되 전체 함량은 5 내지 20 중량%로 변화시키면서 각 조건에서의 겔화온도(T_{gel})를 측정하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0074] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 상기 전체 함량이 5 중량%인 경우 덱사메타손이 용해되지 않았으며, Capryol 90: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 중량비가 5:5인 경우에는 에멀젼이 형성되지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로

Capryol 90: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 중량비 및 전체 함량의 적합한 조건을 선정하였다. 즉, Capryol 90: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 중량비가 1: 9, 2: 8, 3: 7, 4: 6을 각각 만족하되 전체 함량이 7.5 중량%, 10 중량%, 12.5 중량%, 15 중량% 및 20 중량%를 만족하는 조건들이다(이하, 조건 1이라고 함). 한편, Capryol 90: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 중량비가 2:8이고 전체 함량이 7.5 중량%인 경우 가장 높은 겔화온도(T_{gel})인 34℃를 나타내었다.

[0075] 열감응성 고분자로서 Poloxamer 407® 및 Poloxamer 188®의 혼합물을 채택하였으며, 전체 혼합물 함량은 15 중량%를 유지시키되, 혼합물 내 Poloxamer 407®: Poloxamer 188®의 중량비를 각각 14: 1, 13: 2, 및 12: 3으로 변화시키면서 각 조건에서의 겔화온도(T_{gel})를 측정하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 한편, 상기 열감응성 고분자 혼합물 전체 함량을 15 중량%인 경우 목표 겔화온도와 가장 근접하였기 때문에 15 중량%로 채택하였다. 이때 목표 겔화온도는 사용되는 인체부위의 온도에 따라 결정되나, 본 실시예의 경우 점안제로서 사용하기 위한 것으로, 안구 표면 온도 근처인 30~35℃를 목표 겔화온도로 설정하였다. 보다 상세한 내용은 후술하도록 한다.

[0076] 도 4에서 확인할 수 있듯이, Poloxamer 407®: Poloxamer 188®의 중량비가 12: 3일 경우 목표 겔화온도와 가장 근접한 겔화온도 29℃를 나타내었으므로 혼합비율을 12: 3으로 결정하였다(이하, 조건 2라고 함).

[0077] 다음, 완전요인설계방법을 이용하여 실험인자와 반응인자에 대한 주요 효과를 파악하였다. 구체적으로, 앞서 선정된 조건인 Capryol 90: 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 중량비가 1: 9, 2: 8, 3: 7, 4: 6을 각각 만족하되, Capryol 90 및 계면활성제 혼합물(S_{mix})의 전체 함량이 7.5 중량%, 10 중량%, 12.5 중량%, 15 중량% 및 20 중량%를 만족하는 조건 1; 그리고 Poloxamer 407® 및 Poloxamer 188®의 혼합물 함량은 15 중량%로 유지시키되 혼합물 내 Poloxamer 407®: Poloxamer 188®의 중량비가 12: 3을 만족하는 조건 2를 동시에 만족하는 덱사메타손이 로딩된 열감응성 나노에멀젼을 제조하였다. 제조된 나노에멀젼에 대해 오일 함량, 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량, Poloxamer 407® 함량 및 Poloxamer 188® 함량 변화에 따른 겔화온도, 입자크기, 다분산성 지수 및 제타 포텐셜 값을 측정하여 하기 도 5에 나타내었다. 구체적인 제조방법 및 측정방법은 아래와 같다.

[0078] 우선, 덱사메타손이 로딩된 열감응성 나노에멀젼은 도 6에 도시된 방법으로 제조하였다. 구체적으로, 20㎖ 바이알 A에 Capryol 90 및 계면활성제 혼합물(S_{mix})를 혼합한 후 덱사메타손 5 ㎎을 넣고 250 rpm 조건으로 10분 동안 교반하여 오일상(Oil phase)을 제조하였다. 이어서, 처방에 들어가는 0.9% NaCl 수용액의 80%를 먼저 20 ㎖ 바이알 B에 추가한 후 Poloxamer 407®과 Poloxamer 188®를 각각 추가하고 상기 바이알 B가 얼음 비커에 충분히 잠기도록 설치한 상태에서 250 rpm으로 30분 동안 용해시켜 수성상(Aqueous phase)를 제조하였다. 제조된 오일상이 수용된 바이알 A에 상기 바이알 B 내의 수성상을 스포이트로 최대한 옮긴 후, 남아있는 수성상은 0.9% NaCl 수용액 20%로 세척하면서 바이알 A로 옮겼다. 다음, 바이알 A가 얼음 비커에 잠기도록 설치한 상태에서 250 rpm으로 30분 동안 교반한 후 실온에서 30분 동안 안정화시켜 덱사메타손이 로딩된 열감응성 나노에멀젼을 제조하였다.

[0079] 다음, 상술된 조건별로 제조된 나노에멀젼에 대해 겔화온도를 측정하였다. 우선, 20℃ 항온수조에 마이크로튜브 랙을 담군 후 0.5 ㎖ 나노에멀젼 샘플을 추가한 마이크로튜브를 상기 랙에 삽입하였다. 마이크로튜브를 45° 기울였을 때 용액이 더 이상 흐르지 않는 온도를 겔화온도로 정하였다. 한편, 온도는 1 ℃/min으로 증가시키며 매 분마다 겔화온도를 확인하는 형식으로 진행하였다.

[0080] 이어서, 상술된 조건별로 제조된 나노에멀젼에 대해 입자크기 및 다분산성 지수(Poly Dispersity Index)를 측정하였다. 우선, 50 ㎖ 비커에 나노에멀젼 샘플 1 g 및 0.9% NaCl 수용액 9 g을 추가한 후 250 rpm 조건에서 5분 동안 교반한 후 실온에서 30분 동안 안정화시켰다. DLS(Nano-ZS90, Malvern)를 이용하되 평형시간 120초, 산란각 90° 및 25℃ 조건에서 입자크기 및 다분산성 지수를 각각 측정하였다.

[0081] 도 5에 나타낸 결과를 바탕으로, 중심합성설계법(Central Composite Design, CCD)을 이용하여 상기 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2), 상기 Poloxamer 407® 함량(X_3), 및 Poloxamer 188® 함량(X_4)을 독립변수로 하고, 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2), 겔화온도(Y_3) 및 제타 포텐셜 값(Y_4)을

종속변수로 하여 도 7에 나타낸 바와 같이, 31가지 처방을 확립하였다. 이때 각 독립변수의 범위는 상술된 결과를 바탕으로, 오일 함량(X_1) 값을 0.4~1.75 중량%, 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2) 값을 4.3~6.4 중량%, Poloxamer 407® 함량(X_3) 값을 10~14 중량%, 그리고 Poloxamer 188® 함량(X_4) 값을 1~5 중량%로 설정하였다.

[0082] 그 결과, 오일 함량(X_1) 및 Poloxamer 188® 함량(X_4)이 증가할수록 입자크기(Y_1) 및 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2) 값이 증가하였고, 오일 함량(X_1), 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2) 및 Poloxamer 188® 함량(X_4)이 증가할수록 겔화온도(Y_3)가 감소되었다. 특히, Poloxamer 407® 함량(X_3)이 증가할수록 겔화온도(Y_3)가 2차모델(quadratic model)에서 정점(12.9%)까지 감소되었다가 다시 증가하였다. 이러한 결과는 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 및 Poloxamer 407®의 상호작용이 입자 크기에 큰 영향을 가져다줌을 시사한다.

[0083] 이어서, 목표 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2) 및 겔화온도(Y_3) 값을 설정하고 이를 만족하는 최적화 처방 3개를 선정하였다. 구체적으로, 도 8에 도시된 바와 같이, 계면활성제 혼합물(S_{mix}) 함량(X_2) 값을 6.4 중량%로 고정시키되 Poloxamer 188® 함량(X_4)을 1 중량%로 고정시킨 상태에서의 중첩 등고선도 분석을 통해, 겔화온도(Y_3)가 안구 표면 온도 근처인 30~35℃; 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2)가 양호한 안정성 지표인 0.3 미만; 그리고 높은 투명도를 나타내되 안구에서 쉽게 배출되지 않도록 입자크기(Y_1) 20~50 ㎚를 동시에 만족하는 영역인 최적화 처방 1~3을 선정하였으며, 선정된 최적화 처방 1~3에서의 실제 입자크기(Y_1), 다분산성 지수(Poly Dispersity Index, Y_2) 및 겔화온도(Y_3)를 측정한 후 예측 값과 비교한 결과 처방 1이 가장 근접한 결과를 나타낸 것을 확인하였다. 처방 1~3에 따른 실제 측정결과를 도 9에 나타내었다.

[0084] 다음, 상기 선정된 최적화 처방 1~3에 대해 시간에 따른 덱사메타손의 용출률 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10(a)는 처방 1에 대한 결과; 도 10(b)는 처방 2에 대한 결과; 도 10(c)는 처방 3에 대한 결과이며, 각 처방에 따라 제조된 나노에멀젼 농도에 따른 용출률 그래프를 나타낸 것으로 1, 2, 3은 각각 농도 2.5 ㎍/㎖, 5 ㎍/㎖, 15 ㎍/㎖를 의미한다.

[0085] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 실제로 용출률 측면에서 상기 처방 1이 가장 최적화된 조건인 것으로 나타났으며 이러한 결과는 상기 예측결과와 일치하였다.

[0086] 추가 검증을 위해 상기 처방 1에 따라 제조된 나노에멀젼에 대해 투과전자현미경(Transmission electron microscopy, TEM) 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내었다. 구체적으로, 처방 1에 따라 제조된 나노에멀젼을 물로 100배 희석하여 2% 인산 텅스텐산으로 25℃에서 5분 동안 염색한 후, 염색된 검체 한방울을 copper grid에 떨어뜨리고 건조시켜 TEM 분석을 수행하였다.

[0087] 도 11에서 확인할 수 있듯이, 최적조건인 처방 1에 따른 나노에멀젼의 경우 둥근 형태의 입자가 균일하게 형성되었다.

[0088] 마지막으로, 상기 선정된 최적화 처방 1~3에 대해 MTT 방법을 이용하여 세포독성 시험을 수행하였다. 구체적으로, ARPE-19 세포와 Caco-2 세포를 96 well plate에 각각 2×10^5/well과 4×10^5/well로 seeding 한 후, 5% CO_2, 습도 100%, 37℃에서 24시간 배양하였다. 각 샘플을 0~200 ㎍/㎖ 농도로 처리한 다음, 24시간 후 MTT 용액 10 ㎕를 각 well에 가하여 4시간 동안 정치하였다. MTT 용액을 완전히 제거하여 배양 plate를 건조한 후 200 ㎕ DMSO로 세포 내에 형성된 formazan 결정체를 용해하여 ELISA plate reader로 570 ㎚에서 흡광도를 측정하였으며, 이에 따른 세포독성 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12(a)는 ARPE-19 세포에 대한 결과이고, 도 12(b)는 Caco-2 세포에 대한 결과이다.

[0089] 한편, 상기 실험에서 사용된 인간 망막 상피 세포 (ARPE-19)와 Caco-2 세포는 10% FBS(Fetal bovine serum)와 1% penicillin-streptomycin(100 U/㎖ penicillin과 100 ㎍/㎖ streptomycin)이 포함된 DMEM(Dulbeco's modified Eagle's medium, Hyclone, Logan, UT, USA)을 사용하여 배양하였다. 세포는 5% CO_2, humidity 100%, 37℃에서 배양하였으며, 계대배양은 PBS로 세포를 세척하고 trypsin-EDTA를 사용하였다.

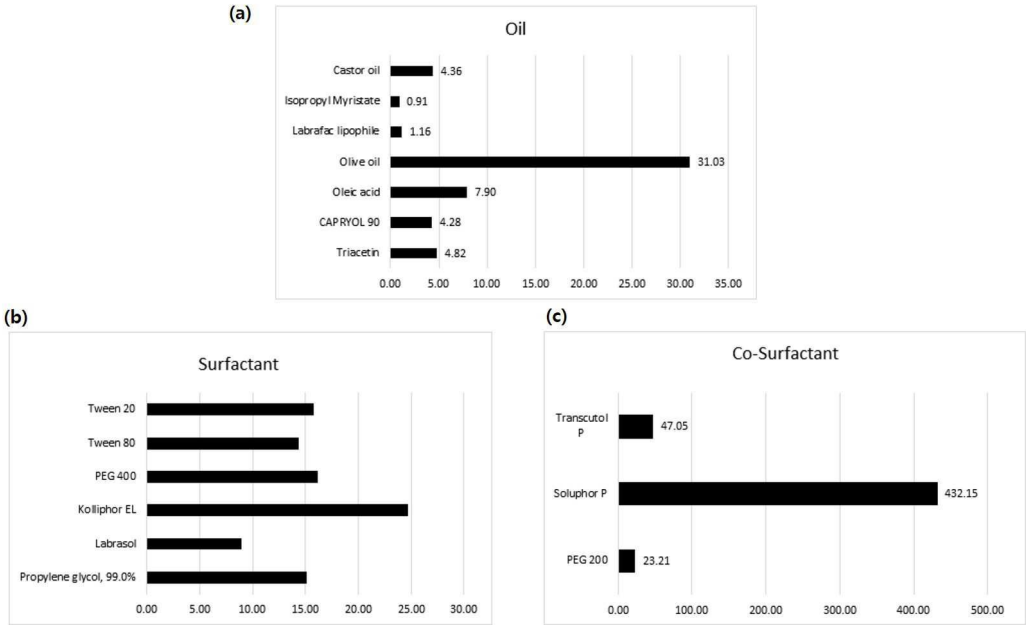
[0090] 도 12에서 확인할 수 있듯이, 200 ㎍/㎖ 농도까지 ARPE-19 및 Caco-2 세포에 대한 독성을 거의 나타내지

않았다.

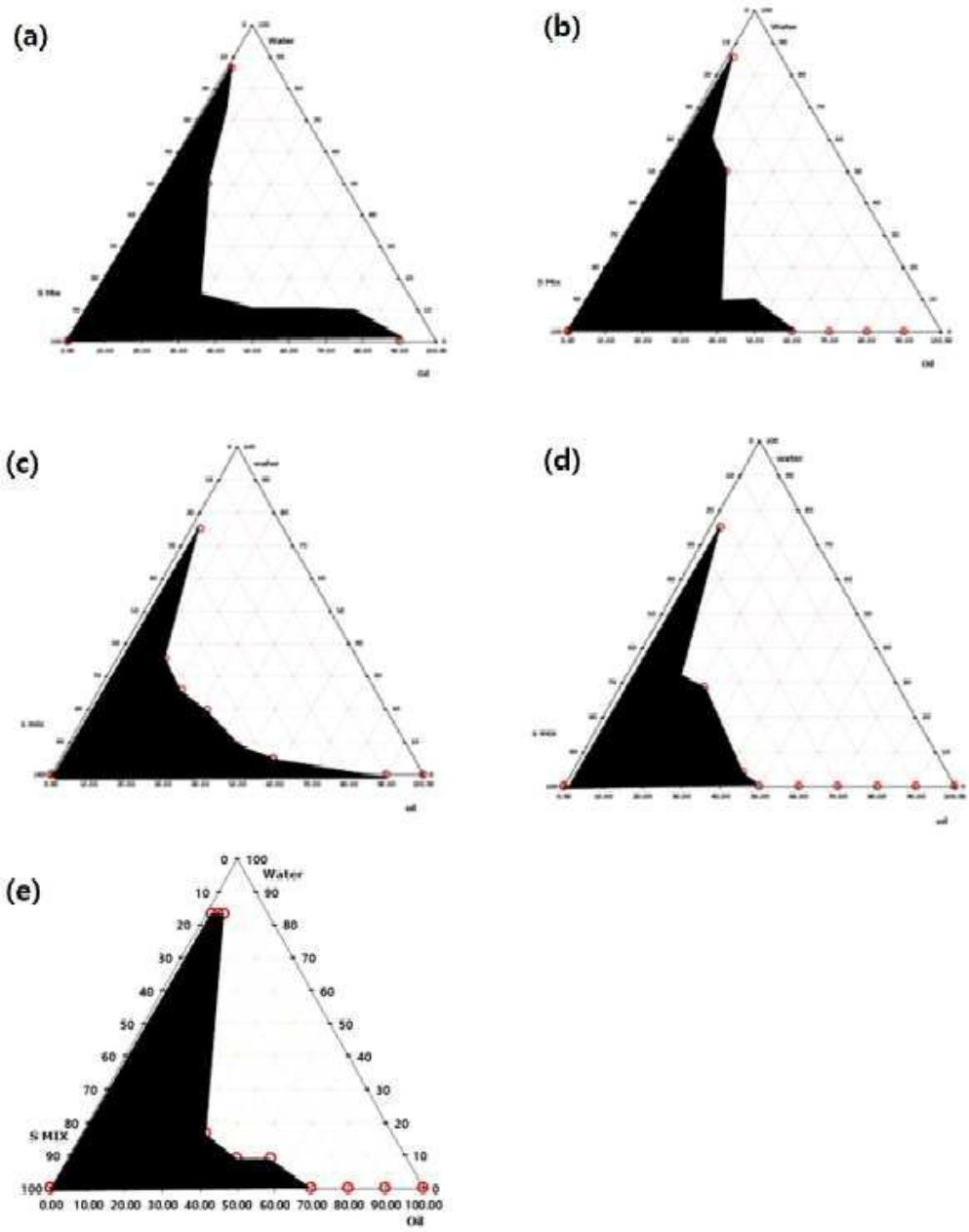
[0092] 이상에서와 같이 본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

도면1



도면2


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
Water
S MIX
Oil
0.00 10.00 20.00 30.00 40.00 50.00 60.00 70.00 80.00 90.00 100.00

도면3

Oil/Smix ratio	Parameter	Amount (W/W%)					
		5	7.5	10	12.5	15	20
1:9	Gelatiom temperatire (℃)	x	28	24	20	< 20	<20
	Particle size (nm)		26.70±0.2	29.98±0.2	35.99±0.3	42.52±0.5	37.62±0.5
	PDI		0.162±0.01	0.258±0.01	0.392±0.00	0.473±0.00	0.112±0.01
2:8	Gelatiom temperatire (℃)	x	34	31	23	23	<20
	Particle size (nm)		28.42±0.02	32.20±0.25	31.85±0.11	38.12±0.06	21.66±0.05
	PDI		0.224±0.00	0.375±0.02	0.372±0.01	0,473±0.00	0.112±0.00
3:7	Gelatiom temperatire (℃)	x	28	23	21	<20	<20
	Particle size (nm)		24.7±0.05	33.75±0.25	41.52±0.4	49.31±0.25	47.68±0.4
	PDI		0.134±0.01	0.392±0.00	0.481±0.00	0.751±0.01	0.512±0.02
4:6	Gelatiom temperatire (℃)	x	24	21	<20	<20	<20
	Particle size (nm)		32.11±0.3	44.11±0.6	31.32±0.88	34.21±0.2	66.43±0.29
	PDI		0.304±0.02	0.532±0.07	0.267±0.02	0.324±0.01	0.581±0.26
5:5		x	x	x	x	x	x

도면4

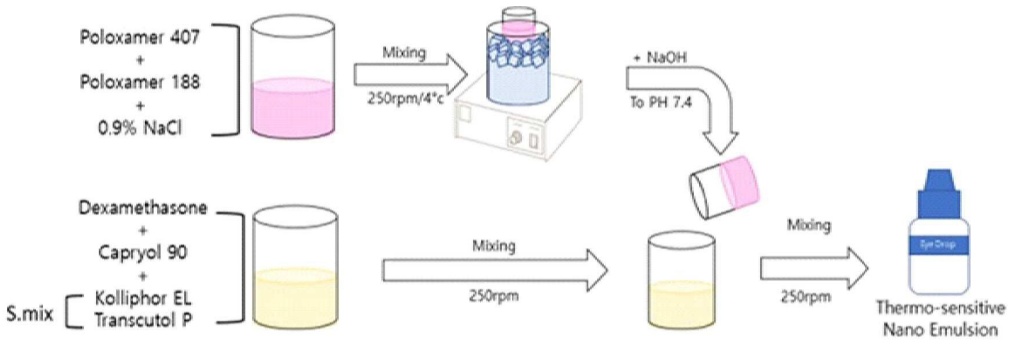
#	Amount (W/W%)				Gelation temperature (℃)
	Oil	Smix	407	188	
1	2	8	14	1	10
2	2	8	13	2	26
3	2	8	12	3	29

All formulation contained 0.1% dexamethasone

도면5

#	Amount (W/W%)			Parameter			
	Oil	Smix	Oil-Smix	Gelation temperature (℃)	Size (nm)	PDI	Zeta potentials
1	0.75	6.75	7.5	28	26.7±0.2	0.162±0.01	-2.54
2	1	9	10	24	29.98±0.2	0.258±0.01	-3.52
3	1.25	11.25	12.5	<20	35.99±0.3	0.392±0.00	-2.65
4	1.5	13.5	15	<20	42.52±0.5	0.473±0.001	-2.96
5	2	18	20	<20	37.62±0.2	0.428±0.01	-3.51
6	1.5	6	7.5	34	28.42±0.02	0.224±0.00	-22.9
7	2	8	10	31	32.2±0.25	0.375±0.02	-4.38
8	2.5	10	12.5	23	31.85±0.11	0.372±0.01	-2.96
9	3	12	15	23	38.12±0.06	0.473±0.00	-2.55
10	4	16	20	<20	21.66±0.05	0.112±0.01	-2.48
11	2.25	5.25	7.5	28	24.7±0.05	0.134±0.01	-2.51
12	3	7	10	23	33.75±0.25	0.392±0.01	-2.37
13	3.75	8.75	12.5	21	41.52±0.4	0.481±0.00	-2.81
14	4.5	10.5	15	<20	49.31±0.25	0.751±0.01	-3.27
15	6	14	20	<20	47.68±0.4	0.512±0.02	-3.24
16	3	4.5	7.5	24	32.11±0.3	0.304±0.02	-3.76
17	4	6	10	21	44.11±0.6	0.532±0.07	-3.36
18	5	7.5	12.5	<20	31.32±0.88	0.267±0.02	-2.62
19	6	9	15	<20	34.21±0.2	0.324±0.01	-3.42
20	8	12	20	<20	66.43±0.29	0.581±0.26	-2.79

도면6

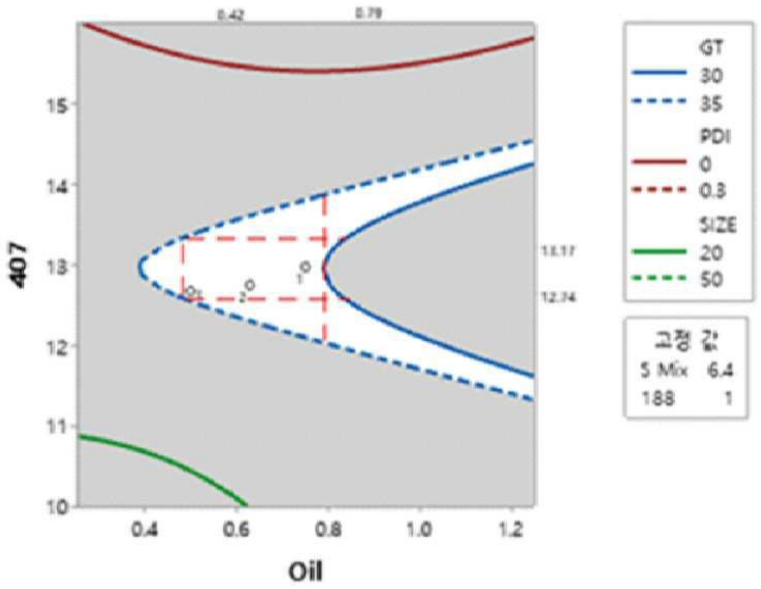


도면7

	Independent Variables				Dependent variables		
RUN#	X1	X2	X3	X4	Y1	Y2	Y3
1	1.6	4.3	10	1	28.86±0.11	0.338±0.004	>100
2	0.4	6.4	10	5	21.10±0.07	0.144±0.005	66
3	0.4	4.3	10	5	25.80±0.41	0.305±0.005	>100
4	1	5.35	12	1	21.40±0.08	0.095±0.24	40
5	1	4.3	12	3	23.73±0.07	0.182±0.008	42
6	1	5.35	14	3	22.35±0.05	0.134±0.003	33
7	0.4	6.4	14	1	23.48±0.27	0.115±0.014	32.5
8	1.6	6.4	14	1	24.79±0.60	0.118±0.017	20
9	1.6	4.3	14	1	25.06±0.42	0.096±0.011	26
10	1	6.4	12	3	23.66±0.14	0.112±0.01	39
11	0.4	4.3	14	1	23.81±0.18	0.157±0.012	>100
12	1.6	4.3	14	5	25.02±0.22	0.156±0.011	31
13	0.4	6.4	14	5	24.64±0.14	0.148±0.011	40
14	1	5.35	12	3	23.45±0.12	0.222±0.006	38
15	1	5.35	10	3	22.53±0.12	0.083±0.006	>100
16	1	5.35	12	3	22.73±0.39	0.159±0.029	40
17	1	5.35	12	3	24.68±0.19	0.246±0.014	42
18	0.4	5.35	12	3	22.40±0.35	0.196±0.009	43
19	0.4	4.3	10	1	22.23±0.14	0.156±0.018	>100
20	1	5.35	12	3	25.23±0.03	0.306±0.038	38
21	1.6	4.3	10	5	30.93±0.20	0.361±0.007	52
22	1.6	6.4	14	5	34.18±0.43	0.585±0.008	28
23	1	5.35	12	3	26.18±0.30	0.299±0.004	35
24	0.4	6.4	10	1	20.44±0.05	0.158±0.008	>100
25	1	5.35	12	3	25.21±0.07	0.288±0.005	38
26	1.6	6.4	10	5	31.68±0.08	0.394±0.008	49
27	0.4	4.3	14	5	23.42±0.21	0.223±0.001	40
28	1	5.35	12	3	26.13±0.36	0.340±0.016	42
29	1.6	5.35	12	3	24.90±0.27	0.193±0.014	34
30	1.6	6.4	10	1	27.18±0.32	0.315±0.009	50
31	1	5.35	12	5	23.34±0.14	0.179±0.016	47

X1 : Amount of oil, X2 : Amount of Smix, X3 : Amount of poloxamer 407. X4 : Amount of poloxamer 188 Y1 : particle size(nm), Y2 : PDI. Y3 : Gelation Temperature (℃)

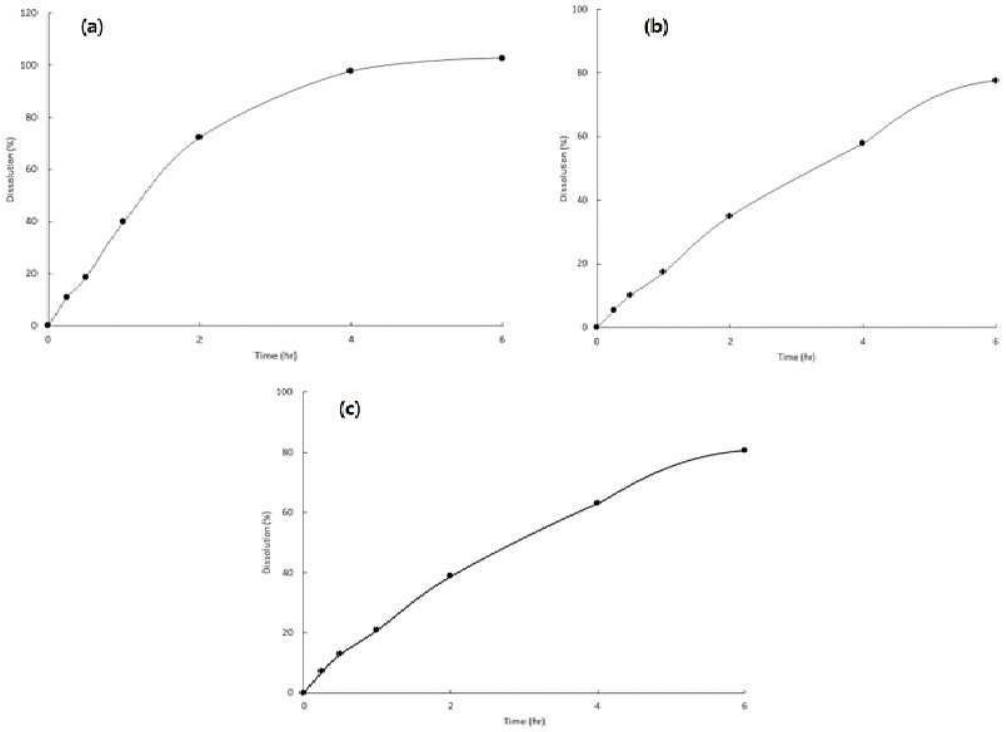
도면8



도면9

RUN#	W/W %				Y1(nm)	Y2	Y3(℃)
	X1	X2	X3	X4			
1	0.7152	6.4	12.9091	1	20.93±	0.105±	31
2	0.5939	6.4	12.8283	1	14.27±	0.530±	33
3	0.4242	6.4	12.7475	1	20.39±	0.107±	35

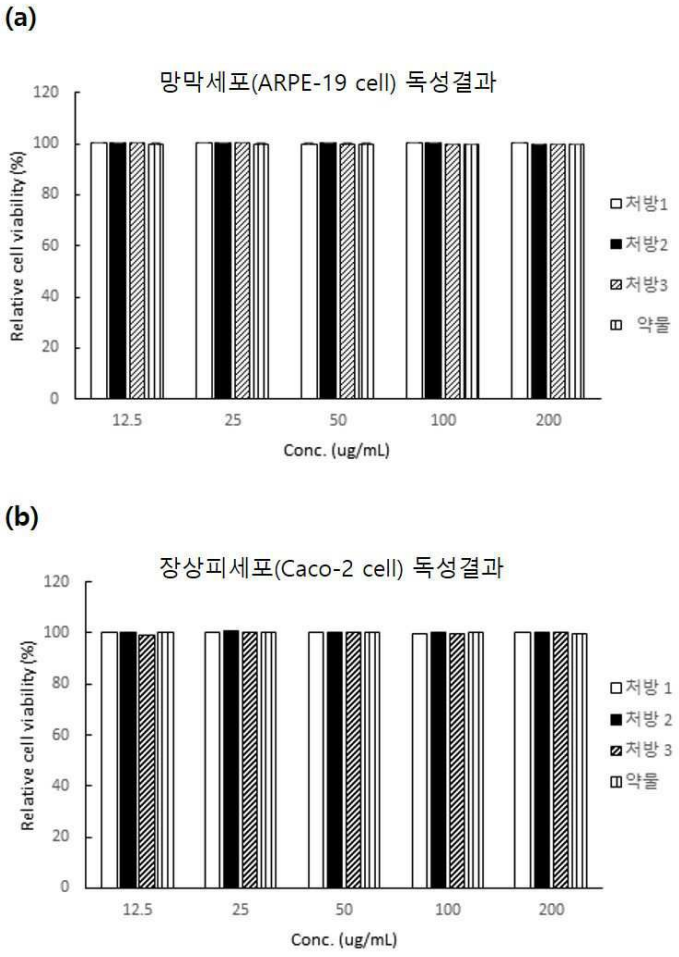
도면10



도면11


HV
30.00 kV
curr
25 pA
WD
10.5 mm
mag
250 000 ×
det
STEM 3+
HFW
1.66 µm
500 nm
Apreo 2

도면12


(a)
망막세포(ARPE-19 cell) 독성결과
Relative cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
12.5
25
50
100
200
Conc. (ug/mL)
저방1
저방2
저방3
약물
(b)
장상피세포(Caco-2 cell) 독성결과
Relative cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
12.5
25
50
100
200
Conc. (ug/mL)
저방 1
저방 2
저방 3
약물