



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0059809
(43) 공개일자 2020년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/16 (2006.01) A61K 31/381 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1647 (2013.01)

A61K 31/381 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0144994

(22) 출원일자 2018년11월22일

심사청구일자 2018년11월22일

(71) 출원인

주식회사 메디포럼제약

경기도 남양주시 경강로 27 (일패동)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

사홍기

서울특별시 서대문구 세무서2길 64, 현대그린 10 2동 201호

(74) 대리인

조영신

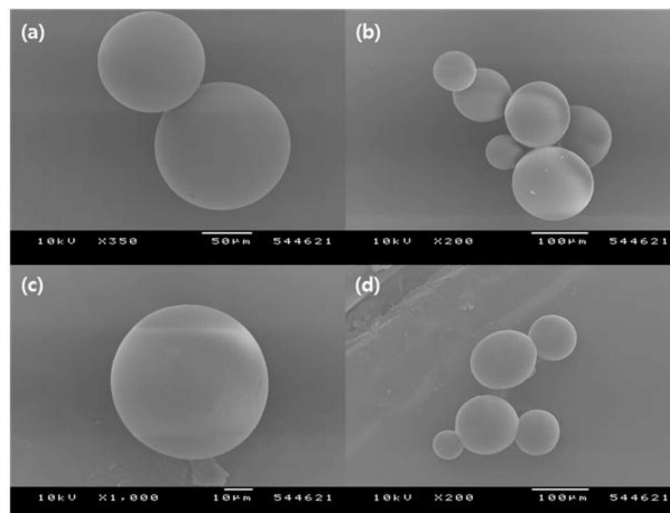
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 로티고틴 함유 고분자 미립자의 제조방법

(57) 요약

본 발명에서는 로티고틴 함량이 현저히 높고, 높은 약물함량에서도 고분자와 훌륭한 적합성을 보여주며, 수상이나 미립자 표면에 로티고틴 결정이 형성이 방지되고, 건조과정 중 미립자의 응집을 억제할 수 있으며, 잔류 유기용매가 현저히 저하되고 건조 후 재분산이 용이한 로티고틴 함유 고분자 미립자의 제조방법 및 이로부터 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자가 개시된다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/1682 (2013.01)

A61P 25/16 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- i) 로티고틴 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과 고분자를 비할로겐 유기용매에 용해하여 분산상을 형성하는 단계;
- ii) 분산상을 수상에 첨가하여 수중유형 유제를 형성하는 단계;
- iii) 비할로겐 유기용매를 1차 추출하여 배아 반고체 미립자 (embryonic semisolid microspheres)를 형성하는 단계; 및
- iv) 비할로겐 유기용매를 2차 추출하여 고분자 미립자를 얻는 단계를 포함하는 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 단계 iii)에서 비할로겐 유기용매의 1차 추출은 유제를 유화제가 용해된 수상과 혼합하여 2 ~ 30분 교반하여 수행하는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 단계 iii)에서 유제에 첨가하는 수상의 용량은 사용된 비할로겐 유기용매의 물 용해도의 0.5배 내지 5배로 사용하는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 iv)에서 비할로겐 유기용매의 2차 추출은 배아 반고체 미립자가 포함된 현탁액을 유화제가 용해된 수상에 첨가하여 실온 ~ 40 °C에서 1시간 이상 교반하여 수행하는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 단계 iv)에서 용매 추출용으로 사용하는 수상의 용량은 사용된 비할로겐 유기용매의 물 용해도의 3배 이상으로 사용하는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 비할로겐 유기용매는 5 내지 15%의 수용해도를 갖는 비할로겐 유기용매인 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 비할로겐 유기용매는 에틸아세테이트, 에틸포르메이트 및 메틸프로피오네이트로 구성되는 군에서 선택되는 하나 이상인 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 고분자는 소수성 폴리에스테르계 고분자인 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 및 폴리락타이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 고분자와 로티고틴 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 중량비(w/w)는 1:0.05 ~ 1:1 인 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 단계 ii)에서 수상에 미리 비할로젠 유기용매를 용해시켜주는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 수상은 유화제를 포함하고 있는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 유화제는 폴리비닐알코올(PVA), 폴리소베이트 20, 폴리소베이트 60, 폴리소베이트 65, 폴리소베이트 80, 폴리소베이트 85, 레시틴, 소르비탄스테아레이트, 모노글리세라이드, 디글리세라이드 및 로틸 황산나트륨으로 구성되는 군에서 선택되는 하나 이상인 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 14

제 1항에 있어서, 단계 iv)로부터의 고분자 미립자를 실온에서 유기용매의 끓는점 이하의 온도로 예온된 수상에 재분산하여 미립자를 경화하는 단계를 추가로 포함하는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 단계 iv)로부터의 고분자 미립자를 회수하여 건조하는 포함하는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 건조는 진공 건조 또는 동결보존제(cryoprotectant)를 함유하는 수용액에 재분산하여 동결건조로 수행되는 것인 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 17

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자.

청구항 18

제 17항에 따른 로티고틴 함유 고분자를 포함하는 주사제형.

청구항 19

- a) 로티고틴 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과 고분자를 비할로젠 유기용매에 용해하여 분산상을 형성하는 단계;
- b) 분산상을 비할로젠 유기용매가 용해된 수상에 첨가하여 수중유형 유제를 형성하는 단계; 및
- c) 비할로젠 유기용매를 추출하여 고분자 미립자를 얻는 단계를 포함하는 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법.

청구항 20

제 19항의 제조방법으로 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 로티고틴 함유 고분자 미립자의 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 로티고틴 함량이 현저히 높고, 높은 약물함량에서도 고분자와 우수한 적합성을 보여주며, 수상이나 미립자 표면에 로티고틴 결정의 형성이 방지되고, 건조과정 중 미립자의 응집을 억제하고, 잔류 유기용매가 현저히 저하되고 건조 후 재분산이 용이한 로티고틴 함유 고분자 미립자의 제조방법 및 이로부터 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 로티고틴(rotigotine), (-)-5,6,7,8-테트라하이드로-6-[프로필-[2-(2-티에닐)에틸]아미노]-1나프탈레놀인은 도파민 작용제(non-ergoline dopamine agonist)로서 파킨슨병(Parkinson's disease)과 흔들다리증후군(restless legs syndrome)의 치료에 사용된다.
- [0004] 로티고틴의 투여는 주로 경피 약물전달 시스템 (TDS)을 통하여 이루어져 왔다. 그 일례로는 탄화수소 수지를 포함하는 스티렌계 접착제 및 지방산으로 구성된 로티고틴 함유 접착제층, 지지층 및 박리층을 포함하는 경피흡수제제 (등록특허 10-1686987호) 및 접착제 매트릭스가 핫 멜트형 접착제를 함유하며, 그 중에서 작용물질 로티고틴이 분산되어 있거나, 부분적으로 또는 완전히 용해되어 있는 경피흡수제제 (등록특허 10-1041512호) 등이 있다. 그런데 도파민 연관 질환자들의 부주의로 부착된 경피흡수제제가 떨어지거나 떼어내기 쉬워서 의도된 로티고틴의 혈장 농도를 유지하기 어려운 경우가 종종 발생하였다. 이에 로티고틴의 주사형 제제의 개발 필요성이 대두되고 있다.
- [0005] 현재까지 개발된 로티고틴의 주사형 제제로는 할로젠 용매인 메틸렌 클로라이드를 사용하여 용매증발법으로 제조한 로티고틴을 함유하는 미소구체 조성물이 있다(미국특허 9265835호, 한국특허 10-1481643호). 상기 조성물 제조에 사용된 메틸렌 클로라이드는 미립자를 형성하는 소수성 고분자 소재를 용해하는 능력이 탁월하고, 물과 섞이지 않아 유제를 쉽게 만들 수 있으며, 낮은 끓는점 (boiling point는 약 40℃)을 가지고 있어 미립자 제조 도중 용매 제거가 쉬워 많이 사용되어 왔으나, ICH class 2 할로젠 유기용매로서 발암성물질(carcinogen)로 알려져 있으며 대기 중의 오존층을 파괴하는 환경 유해 물질에 속하여 산업체 및 환경규제 행정기관에서는 메틸렌 클로라이드의 사용을 엄격히 통제하고 있으며, 의약품 제품에 잔류하는 메틸렌클로라이드에 대해 엄격히 규제되고 있다. 또한 용매증발법을 기반으로 하는 로티고틴과 같은 소수성 약물의 미립자의 제조공정은 소수성 약물이 미립자 제조과정 도중 수상에 결정으로 석출되거나 미립자 표면에 결정이 침착(deposit)되어 봉입되는 약물의

함량이 감소되는 현상이 발생하였고 미립구 품질에 악영향을 미쳤다 (Birnbaum DT et al., J Control Release 64 (2000) 375-387; Benelli P et al., J Microencapsul 15 (1998) 431-443).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 비할로겐 유기용매를 사용하고 용매추출법 기반으로 하면서도 로티고틴의 함량이 현저히 높고, 수상이나 미립자 표면에 로티고틴 결정의 형성이 방지되고, 건조과정 중 미립자의 응집을 억제하고, 잔류 유기용매가 현저히 저하되고 건조 후 재분산이 용이한 로티고틴 함유 고분자 미립자의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 로티고틴의 함량이 현저히 높고, 수상이나 미립자 표면에 로티고틴 결정의 형성이 방지되고, 건조과정 중 미립자의 응집을 억제하고, 잔류 유기용매가 현저히 저하되고 건조 후 재분산이 용이한, 상기 제조방법으로 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은
- [0011] i) 로티고틴 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과 고분자를 비할로겐 유기용매에 용해하여 분산상을 형성하는 단계;
- [0012] ii) 분산상을 수상에 첨가하여 수중유형 유제를 형성하는 단계;
- [0013] iii) 비할로겐 유기용매를 1차 추출하여 배아 반고체 미립자를 형성하는 단계; 및
- [0014] iv) 비할로겐 유기용매를 2차 추출하여 고분자 미립자를 얻는 단계를 포함하는 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 제조방법은, 필요에 따라서, 단계 iv) 후에, v) 고분자 미립자를 수상에 재분산하여 미립자를 추가 경화하는 단계, 및/또는 vi) 고분자 미립자를 회수하여 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0016] 단계 i): 분산상 형성
- [0017] 로티고틴 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과 고분자를 비할로겐 유기용매에 용해하여 분산상을 형성한다.
- [0018] 본 발명에서 로티고틴 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이 약물로 사용된다.
- [0019] 본 발명에서 로티고틴은 로티고틴 (유리 염기 형태의) 및 로티고틴 유도체를 포함하는 개념이다. 로티고틴의 약제학적으로 허용가능한 염은 로티고틴의 유리 염기 및 염산, 아세트산, 인산, 황산, 락트산, 또는 시트르산 간에 형성된다. 바람직한 로티고틴의 유도체 및 약제학적으로 허용가능한 염은 로티고틴 아세테이트, 로티고틴 벤조에이트, 로티고틴 프로피오네이트, 로티고틴 부티레이트, 및 로티고틴 이소-부티레이트, 그리고 이들의 염염이다.
- [0020] 본 발명에서 고분자는 로티고틴과 미립자를 형성가능한 고분자 화합물이면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 생분해성 고분자이며, 더 바람직하게는 소수성 폴리에스테르계 고분자이다. 상기 고분자의 예로는 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리락타이드-코-글리콜리드, 폴리글리콜산, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드 (polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산, 락트산과 아미노산의 공중합체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 가장 바람직하게는 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리락타이드-코-글리콜리드 및 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 분산용매는 ICH class 3에 속하는 비할로겐 유기용매들이 사용된다. 이들은 ICH class 2 용매군에 비하여 상대적으로 훨씬 낮은 독성을 가져서 GMP에서 훨씬 더 선호되는 용매이며, 또한 잔류허가농도 한계가 0.5% 이하로 미립자와 같은 인체 주사 제형에 적합하다. 비할로겐 유기용매의 예로는 에틸아세테이트(ethyl

acetate), 메틸아세테이트(methyl acetate), 메틸포르메이트(methyl formate), 에틸포르메이트(ethyl formate), 아이소프로필포르메이트(isopropyl formate), 프로필포르메이트(propyl formate), 메틸프로피오네이트(methyl propionate), 에틸프로피오네이트(ethyl propionate) 등이 있다. 바람직하게는 에틸아세테이트, 에틸포르메이트 또는 메틸프로피오네이트를 사용할 수 있다. 바람직하게는 5 내지 15%의 수용해도를 갖는 비할로겐 유기용매 중에서 단독 또는 조합으로 선택하여 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 에틸아세테이트, 에틸포르메이트, 및 메틸프로피오네이트 중에서 단독 또는 조합으로 선택하여 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 고분자와 로티고틴의 첨가 중량비(w/w)는 1:0.05 ~ 1:1으로 사용하는 것이 바람직하다.

[0023] 단계 ii): 유제 형성

[0024] 단계 i)로부터의 분산상을 수상에 첨가하여 수중유형 유제(o/w emulsion)를 형성한다.

[0025] 본 발명에서 수상(연속상)은 물과 유화제를 혼합하여 제조한 수용액이다.

[0026] 본 발명에서 유화제는 폴리비닐알코올(PVA), 폴리소베이트 20, 폴리소베이트 60, 폴리소베이트 65, 폴리소베이트 80, 폴리소베이트 85, 레시틴, 소르비탄스테아레이트, 모노글리세라이드, 디글리세라이드 또는 로틸황산나트륨일 수 있다. 가장 바람직하게는 폴리비닐알코올(PVA)이다.

[0027] 본 단계에서 유화제는 0.05% 내지 5% (w/v) 농도로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 0.1% 내지 2.2% (w/v) 농도로 사용한다.

[0028] 필요에 따라서, 본 발명의 제조방법은 상기 수상에 분산용매(비할로겐 유기용매)를 포화 농도 이하의 용량으로 첨가하여 용해하는 단계를 포함할 수 있다. 분산상을 수상에 혼화하기 전에 분산용매를 포화농도 이하로 수상에 미리 용해시켜 놓으면 분산상과 수상의 혼합시 분산상에 존재하는 유기용매가 수상으로 급속히 확산되는 것을 방지하여 일시적으로 안정한 유제를 형성하며 또한 유제 방울의 입도 분포가 균일하게 해주는 이점이 있다.

[0029] 본 유제를 형성하는 단계는 분산상을 수상에 첨가하여 혼합하고 교반하여 수행할 수 있다. 교반에는 저에너지 믹서(low energy mixer), rotar/stator 믹서 및 static 믹서와 고에너지 믹서, 균질기(homogenizer) 및 유화기(Shrasu porous glass membrane emulsifier) 또는 마이크로 플루다이저(microfluidizer)일 수 있다.

[0030] 본 단계에서 분산상과 수상의 혼합비(부피비)는 분산상과 수상을 혼화시키는 유화방법에 따라 얼마든지 조절이 가능하다. 예를 들어 저에너지 믹서(low energy mixer), rotar/stator 믹서, 또는 static 믹서를 사용하는 경우는 분산상과 수상의 용적비는 1:1 내지 1:100, 고에너지 믹서나 개별적인 분산상 방울을 제조하는 경우는 분산상 용적의 100배 이상의 수상을 사용할 수도 있다.

[0031] 상기 유제는 로티고틴이 소수성 약물이므로 수중유형(O/W) 형태로 제조된다.

[0032] 단계 iii): 배아 반고체 미립자 형성 (유기용매 1차 추출)

[0033] 상기 수중유형 유제에서 분산용매인 비할로겐 유기용매를 1차 추출하여 배아 반고체 미립자를 형성한다.

[0034] 비할로겐 유기용매의 1차 추출은 단계 ii)에서 형성된 유제를 유화제가 용해된 수상과 혼합하여 2~30분 동안 교반하는 공정으로 수행한다. 이와 같은 공정으로 인하여 유기용매 일부가 수상으로 추출되어 유제 방울들은 반고체 상태로 경화되어 배아 반고체 미립자 (embryonic semisolid microspheres)로 형성된다.

[0035] 본 단계에서 유제에 첨가하는 수상의 용량은 사용한 비할로겐 유기용매의 물 용해도 0.5배 내지 5배로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 1배 내외가 되도록 한다.

[0036] 본 발명에서 '물 용해도'는 일정량의 유기용매가 물에 포화농도로 용해될 때의 물의 양을 의미한다.

[0037] 본 단계에서 유화제는 0.05% 내지 1% (w/v) 농도로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 0.1% 내지 0.5% (w/v) 농도로 사용한다.

[0038] 본 단계에서 교반은 단계 ii)에서 정의된 바와 같다.

[0039] 단계 iv): 로티고틴 함유 고분자 미립자 형성 (2차 유기용매 추출)

[0040] 비할로겐 유기용매를 2차 추출하여 로티고틴 함유 고분자 미립자를 얻는다.

[0041] 비할로겐 유기용매의 2차 추출은 단계 iii)으로부터의 배아 반고체 미립자가 포함된 현탁액을 유화제가 용해된 수상에 첨가하여(dumping) 실온 ~ 40℃ 온도에서 1시간 이상 교반하는 공정으로 수행한다. 이와 같은 공정으로

인하여 유기용매가 수상으로 추출되어 배아 반고체 미립자가 경화되어 로티고틴 함유 고분자 미립자를 형성하게 된다.

[0042] 본 단계에서 수상의 용량은 바람직하게 사용한 비할로젠 유기용매의 물 용해도 3배 이상으로 사용할 수 있다.

[0043] 본 단계에서 유화제 농도 및 교반은 상기 단계 iii)에서 정의된 바와 같다.

[0044] 단계 v): 추가 미립자 경화

[0045] 본 발명은, 필요에 따라서, 로티고틴 함유 고분자 미립자를 수상에 재분산하여 미립자를 추가 경화하는 단계를 포함할 수 있다.

[0046] 본 단계는 단계 iv)로부터의 로티고틴 함유 고분자 미립자를 여과하여 미립자를 수거한 후 예온된(pre-warmed) 유화제가 용해된 수상에 첨가하여 2.5 ~ 5시간 동안 교반하는 재분산하는 공정으로 수행한다. 이와 같은 공정으로 인하여 고분자 미립자는 건조 공정에서 응집 현상이 극소화되는 완전히 경화된 미립자를 얻을 수 있다.

[0047] 상기 예온은 수상의 온도를 실온에서 유기용매의 끓는점 이하의 온도로 미리 준비하는 것을 의미하며, 바람직하게는 30 ~ 35 ℃이다. 온도를 더 상승시키면 교반 시간을 줄일 수 있지만 온도와 교반 시간은 사용하는 미립자 형성 소재의 유리 전이 온도나 봉입되는 약물 함량에 영향 등을 고려하여 조정하는 것이 바람직하다.

[0048] 본 단계에서 유화제 농도 및 교반은 상기 단계 iii)에서 정의된 바와 같다.

[0049] 단계 vi): 고분자 미립자 회수 및 건조

[0050] 본 발명은, 필요에 따라서, 단계 vi) 또는 단계 v)로부터의 고분자 미립자를 회수하여 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 본 단계는 미립자 현탁액을 여과 또는 원심분리를 통해 미립자를 수거하여 진공 건조하거나, 또는 동결보존제(cryoprotectant)를 함유하는 수용액에 재분산하여 동결건조하는 것으로 수행될 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은

[0053] a) 로티고틴 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과 고분자를 비할로젠 유기용매에 용해하여 분산상을 형성하는 단계;

[0054] b) 분산상을 비할로젠 유기용매가 용해된 수상에 첨가하여 수중유형 유제를 형성하는 단계; 및

[0055] c) 비할로젠 유기용매를 추출하여 고분자 미립자를 얻는 단계를 포함하는 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조방법을 제공한다.

[0056] 본 발명의 제조방법은, 필요에 따라서, 단계 c) 후에, d) 고분자 미립자를 수상에 재분산하여 미립자를 추가 경화하는 단계, 및/또는 e) 고분자 미립자를 회수하여 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0057] 상기 단계 a), c), d) 및 e)는 각각 상기 단계 i), iv), v) 및 vi)에서 정의된 바와 같다.

[0058] 단계 b)에서는, 상기 단계 ii)와는 수상에 유기용매가 필수적으로 첨가되는 것을 제외하고는 동일한 방식으로 수행된다.

[0059] 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자는 봉입되는 로티고틴의 함량이 30% 이상으로 매우 높으며, 수상이나 미립자 표면에 약물 결정의 형성이 방지되고, 미립자가 매끈한 구형의 형태로 균일하게 형성되고, 미립자의 응집이 방지되고, 잔류 유기용매의 농도가 0.5% 미만으로 의약품 규제 허가시 요구되는 한 계량 보다 현저히 적어, 인체 주사제형으로서 사용될 수 있다 (실시예 1 ~ 실시예 7).

[0060] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 상기 제조방법에 따라 제조되고, 로티고틴의 함량이 현저히 높고, 수상이나 미립자 표면에 로티고틴 결정이 형성이 방지되고, 미립자가 완벽한 구형의 형상을 지니고, 미립자의 응집이 방지되고, 잔류 유기용매가 현저히 저하되는, 상기 제조방법으로 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자를 제공한다.

[0061] 본 발명은 또한 상기 로티고틴 함유 고분자를 포함하는 주사제형을 제공한다.

발명의 효과

- [0063] 본 발명에 따른 제조방법에 의하면, 종래 용매증발법에 의해 제조되는 로티고틴 함유 고분자 미립자에 비하여 (비교예 1), 현저히 우수한 성상을 가진 로티고틴 함유 고분자 미립자를 제조할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 로티고틴 함유 고분자 미립자는 로티고틴이 고함량으로 분입되며 로티고틴이 분자수준으로 고분자 미립자 매트릭스에 분산되어 완전히 녹는 적합성을 갖는다.
- [0065] 또한 본 발명에 따른 로티고틴 함유 고분자 미립자는 수상에 약물 결정현상 또는 미립자 표면에 약물 결정이 침착되는 현상이 방지되어 초기 약물방출 효과 (burst effect)를 극소화할 수 있고, 잔류유기용매가 허가 규제에 충족되는 현저히 낮은 농도이다.
- [0066] 용매추출법에 따라 소수성 약물을 함유하는 고분자 미립자를 제조하는 경우 대량의 물(quenching liquid)을 사용하여 유기용매를 추출하는데, 이때 용매추출을 급격하게 시행함으로써 미립자 형상이 구형을 벗어나 불규칙적인 형상을 지닌 입자로 만들어지거나 또는 미립자 표면에 주름(wrinkles/groves) 등이 형성되는 경우가 빈번하게 발생하는데, 본 발명에 따른 제조방법에 의하면, 매끈하며 완전한 구형을 지닌 균일한 미립자를 제조할 수 있는 효과가 있다.
- [0067] 또한 본 발명에 따른 고분자 미립자는 고함량의 로티고틴을 함유하여도 건조 과정 중에 미립자 간의 응집을 극소화하여 건조 후 물에 재분산시키기가 용이한 장점을 가진다.
- [0068] 또한 본 발명에 따른 제조방법은 유제 형성 및 용매추출시 교반에 고에너지 혼합장치뿐만 아니라 아주 단순한 저에너지 혼합장치/기기(믹서)를 사용하여 할 수 있어서 제약산업에서의 기술 상용화/실용성 측면에서 큰 이점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0070] 도 1은 종래 용매증발법으로 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조과정 중에 수중유형 유제(o/w emulsion)를 관찰한 광학현미경 사진이다. (a)는 유제 교반 2.5시간, (b)는 유제 교반 5시간의 광학현미경 사진이다 (그림 막대의 크기는 100 μm).
- 도 2는 종래의 다른 용매증발법으로 제조한 미립자 현탁액을 촬영하여 확대한 광학현미경 사진이다. 검은 화살표는 미립자를 나타내고, 흰 화살표는 수상에서 로티고틴 결정을 나타낸다 (그림 막대의 크기는 20 μm)이다.
- 도 3은 종래 용매제거법으로 로티고틴 함유 고분자 미립자의 제조 원리를 보여주는 모식도이다.
- 도 4는 에틸 아세테이트를 분산 유기용매로 사용하고 종래 용매제거법에 의해 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조과정 중에 유제를 관찰한 광학현미경 사진이다. (a)는 NaOH 첨가한 후 10분 경과시 유제를 광학현미경으로 관찰한 결과이고, (b)는 약물 결정을 관찰하기 위해 (a)사진 크기를 확대한 것이다. (a)와 (b) 사진에 표시된 막대의 크기는 각각 100 μm 과 20 μm 을 나타낸다.
- 도 5는 메틸 프로피오네이트를 분산 유기용매로 사용하고 종래 용매제거법에 의해 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조과정 중에 유제를 관찰한 광학현미경 사진이다. (a)는 NaOH 첨가한 후 10분 경과시 유제를 광학현미경으로 관찰한 결과이고, (b)는 약물 결정을 관찰하기 위해 (a)사진 크기를 확대한 것이다. (a)와 (b) 사진에 표시된 막대의 크기는 각각 100 μm 과 20 μm 을 나타낸다.
- 도 6은 실시예 1의 로티고틴 초기 부하량이 150mg인 경우 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자의 물에 재분산성을 광학현미경으로 관찰한 결과 사진이다. (a)는 8% 만니톨 수용액, (b)는 8% 만니톨 + 1% 저분자량 CMC 수용액, 및 (c)는 8% 만니톨 + 1% 고분자량 CMC 수용액을 사용한 경우의 사진이다.
- 도 7은 실시예 1의 로티고틴 초기 부하량이 180mg인 경우 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자의 물에 재분산성을 광학현미경으로 관찰한 결과 사진이다. (a)는 8% 만니톨 수용액, (b)는 8% 만니톨 + 1% 저분자량 CMC 수용액, 및 (c)는 8% 만니톨 + 1% 고분자량 CMC 수용액을 사용한 경우의 사진이다.
- 도 8은 실시예 1의 8% 만니톨 + 1% 저분자량 CMC 수용액을 사용하여 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자들의 전자현미경 사진이다. a) 및 b)는 로티고틴 초기 부하량이 150mg인 경우, c) 및 d)는 로티고틴 초기 부하량이 180mg인 경우의 사진이다.
- 도 9는 PLGA 분말 (a)과 로티고틴 분말 (b)의 열적 거동을 보여주는 DSC 결과이다.

도 10은 실시예 1의 미립자의 열적 거동을 보여주는 DSC 결과이다. 로티고틴의 초기 부하량이 각각 150mg (함량 31.2% (a)) 및 180 mg (함량 34.7% (b))인 PLGA 미립자의 결과이다.

도 11은 실시예 1의 로티고틴 함량이 31.2%인 미립자(8% 만니톨 수용액을 사용 경우)의 열질량분석결과를 보여주는 thermogram 이다.

도 12는 실시예 3의 로티고틴 초기 부하량이 200mg인 경우 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자의 물에 재분산성을 광학현미경으로 관찰한 결과 사진이다. (a)는 8% 만니톨 수용액, (b)는 8% 만니톨 + 1% 저분자량 CMC 수용액, 및 (c)는 8% 만니톨 + 1% 고분자량 CMC 수용액을 사용한 경우의 사진이다.

도 13은 실시예 3의 8% 만니톨 + 1% 저분자량 CMC 수용액을 사용하여 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자들의 전자현미경 사진이다 (로티고틴 초기 부하량은 200mg).

도 14는 실시예 3의 로티고틴 함유 고분자 미립자의 열적 거동을 보여주는 DSC 결과이다. 로티고틴의 초기 부하량이 200mg PLGA 미립자의 결과이다.

도 15는 실시예 3의 로티고틴 함유 고분자 미립자(로티고틴 함량이 35.9%의 경우)의 열질량분석결과를 보여주는 thermogram 이다.

도 16은 실시예 4의 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조과정 중에 수중유형 유제(o/w emulsion)를 관찰한 광학현미경 사진이다 (그림 막대의 크기는 100 μm).

도 17은 실시예 4에서 제조된 로티고틴 함유 미립자들의 전자현미경 사진이다 (그림 막대의 크기는 10 μm).

도 18은 실시예 4의 로티고틴 함유 고분자 미립자의 열질량분석결과를 보여주는 thermogram 이다.

도 19는 실시예 5에서 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자들의 전자현미경 사진이다 (그림 막대의 크기는 100 μm).

도 20은 실시예 6에서 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자들의 전자현미경 사진이다 (그림 막대의 크기는 10 μm).

도 21은 비할로젠 유기용매 에틸아세테이트(a), 에틸포르메이트(b), 메틸프로피오네이트(c) 3종을 분산 유기용매로 하여 제조한 로티고틴 함유 고분자 미립자의 입도분포를 측정한 결과이다.

도 22는 비할로젠 유기용매 에틸아세테이트(a), 에틸포르메이트(b), 메틸프로피오네이트(c) 3종을 분산 유기용매로 사용하여 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조과정 중에 유제를 관찰한 광학현미경 사진이다(막대의 크기는 100 μm).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 제조예 및 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0072] 실험 소재

[0073] 고분자로는 Evonik Industries사의 PLGA (Poly(d,l-lactic-co-glycolic acid); 상품명: Resomer 75:25 DLG 3A, Lactide:glycolide ratio = 75:25, Inherent viscosity (0.1% CHCl_3)=0.28dL/g, $M_w(\text{GPC})/M_n(\text{GPC}) = 28,800/15,000$, $T_g = 45^\circ\text{C}$, End group: Free carboxyl end groups)을 사용하였다.

[0074] 로티고틴은 Olon Spa사의 Rotigotine을 사용하였고, 분산상 용매로는 3가지 비할로젠 유기용매는 Sigma Aldrich사의 에틸포르메이트(Ethyl formate), Avant Performance Materials사의 에틸아세테이트(Ethyl acetate), Glentham Life Sciences사의 메틸프로피오네이트(Methyl propionate)를 사용하였다. 폴리비닐 알코올(Polyvinyl alcohol; PVA, 88 mol% hydrolyzed; 분자량, 25,000 g/mol)은 Polysciences, Inc사로부터 구입하여 사용하였다.

[0076] **비교예 1: 용매증발법에 기반한 로티고틴 함유 고분자(PLGA) 미립자 제조**

[0077] 분산 유기용매인 메틸렌 클로라이드 4 ml에 PLGA 250 mg과 로티고틴 100 mg을 녹여 분산상을 제조하였다. 이 분

산상을 420 rpm으로 교반되고 있는 0.5% PVA(polyvinyl alcohol) 수용액 40 ml에 적가하여 수중유형 유제 (o/w emulsion)을 제조하였다. 이 유제를 실온에서 5시간 교반하였고, 교반하는 도중에 2.5 및 5 시간 시점에서 유제의 상태를 광학현미경을 사용하여 관찰하였고, 그 결과를 도 1에 나타냈다.

[0078] 도 1에 도시된 바와 같이, 2.5시간 경과시 유제방울 (emulsion droplets)들이 보였으며 유제방울은 일정하지 않고 매우 다양한 크기를 지니고(heterogeneous) 있었다 (도 1의 (a)). 유제를 5시간 교반시 수많은 로티고틴 결정들이 수상/연속상에서 관측되었다 (도 1의 (b)에서 화살표로 표시됨).

[0079] 도 2에 나타난 바와 같이, 종래의 다른 용매증발법을 활용한 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조과정 도중에는 로티고틴이 고분자 미립자 (검은 화살표로 표시됨)의 내부로 봉입되지 않고 수상/연속상에서 결정(흰 화살표로 표시됨)으로 석출되는 경향을 나타낸다.

[0080] 상기와 같은 결과로부터 종래의 메틸렌 클로라이드를 분산용매로 사용한 용매증발법으로 로티고틴 함유 고분자 미립자의 제조시 로티고틴은 수상에서 결정화되어 고분자 미립자 내로 제대로 봉입되지 못하고, 수상/연속상에서 결정으로 석출되어 봉입률 감소 현상이 발생함을 확인할 수 있다. 이와 같은 약물의 결정화 현상은 최종 생산되는 미립자 품질에 악영향을 미친다. 예를 들어 미립자 경화단계가 끝난 후, 미립자를 수거할 목적으로 미립자 분산액(microsphere suspension)을 여과하면 미립자와 약물 결정들이 같이 회수되어져 미립자 표면에서 약물 결정을 볼 수 있으며, 이와 같은 미립자를 대상으로 입자 크기 또는 입도분포, 약물 봉입률 등의 품질평가를 실시하면 필연적으로 잘못된 정보를 얻게 된다.

[0082] 비교예 2. 용매제거법에 기반한 로티고틴 함유 고분자(PLGA) 미립자 제조

[0083] 용매제거법은 수중유형 (o/w) 유제에 NaOH와 같은 알칼리를 넣어주어 수상에 녹아 있는 유기용매를 재빨리 분해하여 싱크 상태 (sink condition)를 유도하여 수중 유제 방울에 존재하는 유기용매가 수상으로 계속 확산될 수 있는 환경을 제공하는 방법으로, 유제 방울이 매우 빠르게 미립자로 경화되도록 하는 동력을 제공해 준다 (도 3).

[0084] 도 3에 도시된 바와 같이, 유기용매로 에틸아세테이트를 사용한 수중유형 유제에 NaOH를 첨가하면 수상에 녹아 있는 에틸아세테이트는 에탄올과 소듐아세테이트로 가수분해된다. 이로 인해 수상은 싱크 상태가 되어 유제 방울에 있는 에틸아세테이트가 수상으로 계속 확산되며, 에틸아세테이트에 대한 NaOH 촉매 가수분해가 계속 진행되면서 용매 제거가 이루어지고 그에 따라 유제 방울이 효과적으로 미립자로 고형화된다.

[0085] 이와 같은 용매제거법에 기반하여 에틸아세테이트 및 메틸프로피오네이트를 각각 PLGA 분산 유기용매로 사용하고 NaOH 첨가로 유기용매를 가수분해하는 방식으로 로티고틴 PLGA 미립자를 제조하였다.

[0086] 구체적으로는 에틸아세테이트 및 메틸프로피오네이트 각각 4 ml에 PLGA 250 mg과 로티고틴 120 mg을 녹여 분산상을 제조한 후, 400 rpm 속도로 교반되고 있는 0.5% PVA 40 ml에 적가하여 수중유형 유제를 제조하여 3분 교반한 후 10N-NaOH 4 ml를 적가하여 시간의 경과에 따른 유제 상태를 광학현미경을 사용하여 관찰하고, 그 결과를 각각 도 4 및 도 5에 나타냈다.

[0087] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, NaOH 첨가한 후 10분 경과하였을 때 유제의 상태를 광학현미경 사진으로 관찰한 결과, 20~150 μ m 크기의 미립자와 다수의 작은 막대 모양의 로티고틴 결정들이 동시에 관찰되었다.

[0088] 상기와 같은 결과로부터 기존의 유기용매 가수분해 원리를 활용한 용매제거법은 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조에 적합하지 않음을 알 수 있다.

[0090] 실시예 1. 에틸아세테이트를 이용한 로티고틴 함유 고분자 미립자(1)

[0091] 1-1. 에틸아세테이트를 사용한 로티고틴 PLGA 미립자 제조(1)

[0092] PLGA 250 mg과 로티고틴 150mg 또는 180 mg을 4 ml의 에틸아세테이트에 녹여 분산상을 제조하였다. 이 분산상을 450 rpm으로 교반되고 있는 30 ml의 0.5% PVA 수용액(수상/연속상)에 첨가하여 5분 동안 교반시켜 수중유형 유제를 제조하였다.

[0093] 그리고 나서 0.1% PVA 수용액 50 ml를 상기 수중유형 유제에 첨가하고 450 rpm의 교반속도로 5분간 교반시켜 유제 방울에 존재하는 에틸아세테이트를 수상으로 추출하여 유제 방울이 배아 반고체 미립자(embryonic semisolid

microspheres)로 변화되도록 하였다.

[0094] 상기 배아 반고체 미립자가 포함된 현탁액(embryonic microsphere suspension)를 550 rpm 속도로 교반되고 있는 200 ml의 0.1% PVA 수용액에 첨가하여 실온(RT)에서 2시간 교반한 후 Whatman 여과지 (등급 1)로 여과하여 PLGA 미립자를 수거하였다.

[0095] 수거한 미립자를 다시 100 ml의 0.1% PVA 수용액에 재분산시켜 30 ℃에서 350 rpm 속도로 5시간 교반시킨후, 여과지로 여과하여 수거된 PLGA 미립자를 8% 만니톨 수용액, 8% 만니톨과 1% 저분자량 CMC (sodium carboxymethyl cellulose; CMC, 분자량 90,000)을 함유하는 수용액, 또는 8% 만니톨과 1% 고분자량 CMC (분자량 250,000)을 함유하는 수용액 각각으로 재분산시킨 후 액체질소에서 미립자 현탁액을 동결건조(lyophilization)하여 최종 로티고틴 고분자(PLGA) 미립자를 얻었다.

[0096] 1-2. 미립자 주요 성상 평가

[0097] 상기에서 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자에 대하여 하기와 같은 주요 성상을 평가하였다.

[0098] <고분자 미립자에 봉입된 로티고틴 함량 분석>

[0099] 제조된 미립자 내에 봉입된 로티고틴 함량과 약물 봉입률 (drug encapsulation efficiency %, EE %)을 다음과 같이 측정하였다:

[0100] 봉입된 로티고틴 함량 분석

[0101] 동결건조한 PLGA 미립자 케이크를 물에 재분산한 후 미립자를 수거하여 진공건조시킨 후 미립자 시료를 20~30 mg을 5 ml 크기의 유리 바이알에 담은 후, 여기에 4 ml의 테트라하이드로푸란(tetrahydrofuran)을 첨가하여 30 분간 진탕하여 로티고틴과 PLGA를 녹였다. 이 용액을 16 ml의 로티고틴 HPLC 분석용 이동상 (2% 인산 수용액 : acetonitrile, 6:4(v/v))과 혼합하였다. 이 때 PLGA는 침전되어져 뿌연 상태의 콜로이드상의 분산액이 형성되고, 로티고틴은 녹은 상태로 유지된다.

[0102] HPLC 주입 전에 PLGA를 제거하기 위하여 콜로이드상의 분산액 700 내지 800 μ l를 취해 Costar[®] Spin-X 마이크 로센트리퓨즈 튜브 필터(0.22 μ m 나일론 필터가 폴리프로필렌 튜브에 장착되어 있는)에 넣어준 후, mini centrifuge를 사용하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 맑은 여과액(clear, PLGA-free filtrate)을 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

[0103] 로티고틴 함량 분석을 위한 HPLC 분석조건을 하기 표 1과 같이 하였다:

표 1

Column	Luna 5 mm C18 column (100 Å, 150 × 4.6 mm)
Rotigotine 표준원액 제조 용매	이동상
이동상	2% 인산 수용액:acetonitrile (6:4 (v/v))
Total Analysis Time	5 min
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	230 nm, UV
Injection Volume	10 μ l

[0105] 분석 결과 PLGA 미립자에 봉입된 로티고틴 함량은 각각 31.2% (로티고틴 150mg 부하량에서) 및 34.7% (로티고틴 180mg 부하량에서)으로 고품량이었다.

[0106] 약물(로티고틴) 봉입률

[0107] 하기 식들에 따라, 약물의 이론부하량(%) 및 실제부하량(%)을 구하여 그 백분율을 약물의 봉입률(%)로 정의하였다.

[0108] 이론 부하량 % =

[0109] $100 \times \text{사용된 약물용량(mg)} / (\text{사용한 PLGA용량(mg)} + \text{사용한 약물용량(mg)})$

[0110] 실제 부하량 % =

[0111] $100 \times \text{미립자에 존재하는 약물용량(mg)} / \text{부하량 측정위해 사용한 미립자용량(mg)}$

- [0112] 약물봉입률 % = $100 \times \text{실제 부하량} / \text{이론 부하량}$
- [0113] 상기 식에 따라 산출된 약물 봉입률은 각각 $83.1 \pm 1.5\%$ (로티고틴 150mg 부하량에서)와 $82.9 \pm 1.3\%$ (로티고틴 180mg 부하량에서)이었다.
- [0114] <미립자 응집 현상 분석>
- [0115] 동결건조후 형성된 케이크(cake)에 물을 넣고, (sonication 처리없이) 진탕 (gentle vortexing)시킨 후 미립자의 재분산 용이성을 광학현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 6 및 도 7에 각각 나타냈다.
- [0116] 도 6 및 도 7에 나타낸바에 의하면, 상기와 같이 고함량의 로티고틴 함유 PLGA 미립자들이 sonicator와 같은 기기 사용없이도 응집(aggregation) 현상없이 물에 잘 분산되어졌으며, 또한 PLGA 미립자에 봉입되지 않은 유리 로티고틴 결정들도 보이지 않았다. 이와 같은 결과로부터 본 발명에 따른 제조방법에 의해 제조한 로티고틴 PLGA 미립자의 경우는 건조과정 중에 흔히 발생하는 미립자간의 응집 현상을 극복할 수 있음을 알 수 있다.
- [0117] 또한 물에 쉽게 재분산시킬 수 있어 주사제형으로서 활용성이 크다는 것을 알 수 있다.
- [0118] <전자현미경을 사용한 미립자 형상 조사>
- [0119] 전자현미경 (SEM; model JSM-5200; Jeol Inc., Tokyo, Japan)을 사용하여 건조된 미립자들의 형상을 관찰하였다.
- [0120] 구체적으로는 견본 마운트(Specimen mount) 위에 양면 탄소 테이프를 붙이고, 그 위에 8% 만니톨 + 1% 저분자량 CMC 수용액을 사용하여 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자의 동결건조한 케이크를 물에 재분산시킨 후 건조한 미립자 시료를 고르게 분포하여 고정시킨 후, SC7620 sputter coater (VG Microtech, West Sussex, UK)를 이용하여 아르곤 대기(argon atmosphere)에서 금으로 코팅한 후 전자현미경을 사용해 미립자들의 형상을 조사하였고, 그 결과를 도 8에 나타냈다.
- [0121] 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 로티고틴 함유 PLGA 미립자는 완전한 구형 형태를 띄고 있다. 또한 PLGA 미립자 표면에 로티고틴 결정으로 추정되는 침전체/오염체(precipitates/contaminants)가 보이지 않았다. 이와 같은 SEM 결과는 본 발명의 제조방법은 미립자 제조 중에 (wet-sieving 등의) 약물 결정 제거 공정을 사용하지 않았음에도 불구하고 로티고틴 결정이 형성되지 않음을 증명해 주고 있다.
- [0122] <미립자 열적 거동 분석>
- [0123] 시차주사열량분석기 (DSC; model Q2000 Differential Scanning Calorimeter, TA Instruments, DL, USA)를 사용하여 미립자 제조 전의 PLGA 분말, 로티고틴 분말 및 여러 종류의 로티고틴 PLGA 미립자들의 열적 거동을 분석하였다.
- [0124] 약 5~10 mg 범위로 각각의 DSC 시료를 취해 Tzero aluminum pan에 넣어 Tzero hermetic lid로 밀봉한 후, DSC 시료를 25~160 °C까지 노출시켰다. 이때 온도 상승속도는 10 °C/min로 설정하였다. 발란스 챔버(Balance chamber)와 시료 셀 (sample cell) 챔버에 질소 가스를 사용하여 각각 40, 60 ml/min의 속도로 퍼지(purge)하였다. DSC 결과를 각각 도 9 및 도 10에 나타냈다.
- [0125] 도 9에 도시된 바와 같이, 미립자 형성 소재로 사용된 PLGA 분말은 약 40과 42 °C사이에서 유리전이 온도 (T_g)를 보여주는 무정형 고분자임을 알 수 있고 (a), 봉입 전의 로티고틴 분말은 약 100 °C 부근에서 융점 (melting point)을 보이는 열적 거동을 나타냈다 (b).
- [0126] 도 10에 도시된 바와 같이, 로티고틴의 초기 부하량이 각각 150mg (함량 31.2% (a)) 및 180 mg (함량 34.7% (b))인 PLGA 미립자는 DSC 열적거동 분석결과, 로티고틴의 융점이 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과로부터 본 발명에 따른 제조방법으로 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자에는 30% 이상의 고농도의 로티고틴이 분자수준으로 고분자 매트릭스(matrix)에 잘 분산되어져 (molecularly dispersed) 로티고틴 융점이 사라지고, 또한 PLGA의 특이적인 T_g 역시 없어진 것으로 판단된다. 즉, 로티고틴이 PLGA 미립자 매트릭스에 특이적인 결정 상태로 존재하는 것이 아니라 분자 수준으로 잘 분산되어져 있으며, PLGA와 우수한 적합성 (compatibility)를 보여주고 있음을 알 수 있다.
- [0127] <미립자 열질량분석 (thermogravimetric analysis)>
- [0128] 제조된 로티고틴 PLGA 미립자에 잔류용매 양(%)을 분석하기 위하여 열질량분석기(TGA; model Q50 thermogravimetric analyzer; TA Instruments DE, USA)를 사용하였다.

[0129] 구체적으로는 동결건조한 PLGA 미립자 케이크를 물에 재분산한 후 미립자를 수거하여 진공건조 후 10 mg 내외의 건조된 미립자의 TGA 시료를 백금 팬에 넣은 후, 25 °C에서 5분동안 평형상태를 유지한 후에 550 °C까지 20 °C/min의 속도로 가열시켰다. 온도변화에 따른 TGA 시료의 질량 분석은 TA Universal Analysis 2000 software program을 사용하여 자동적으로 실시하였고, 100 °C에 도달할 때까지 관측된 용매의 감소량을 %로 표시하여 그 결과를 표 2 (동결건조 후 관측한 PLGA 미립자 내 잔류용매량(%))에 나타냈다.

표 2

동결건조용 수용액 조성	로티고틴 초기 부하량	
	150 mg	180 mg
8% 만니톨 수용액 사용	0.31	0.18
8% 만니톨 + 1% 저분자량 CMC 수용액 사용	0.33	0.20
8% 만니톨 + 1% 고분자량 CMC 수용액 사용	0.11	0.13

[0131] 표 2의 예시로서 8% 만니톨 수용액을 사용하여 동결건조시킨 로티고틴 함유 PLGA 미립자를 100 °C까지 승온하였을 때 감소하는 질량을 검체의 백분율로 표시한 결과를 도 11에 나타냈다.

[0132] 표 2와 도 11에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 미립자 잔류 유기용매(에틸아세테이트) 함량은 모두 0.33% 이하였다. PLGA 미립자 의약품 허가신청에서 중요한 이슈 중의 하나가 미립자 제조에 사용된 잔류용매의 양이다. 에틸아세테이트의 경우는 ICH class 3에 속하는 용매이기 때문에 잔류허가농도 한계는 0.5% 이하인데, 본 발명에 따라 제조된 미립자들은 한계값보다 훨씬 낮은 정도였음을 알 수 있다. 게다가 본 발명의 제조방법은 잔류 유기용매 기준을 충족하기 위한 별도의 건조 장치나 특별한 처리가 필요하지 않다는 장점이 있다.

[0134] 실시예 2. 에틸아세테이트를 사용한 로티고틴 PLGA 미립자(2)

[0135] <에틸아세테이트를 사용한 로티고틴 PLGA 미립자 제조(2)>

[0136] 30 ml의 0.5% PVA 수용액에 1 ml의 에틸아세테이트를 미리 녹여서 만든 수상을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방식으로 제조하였다.

[0137] 구체적으로는 PLGA 250 mg과 로티고틴 150mg을 4 ml의 에틸아세테이트에 녹여 분산상을 제조하였다. 이 분산상을, 450 rpm으로 교반되고 있는, 1 ml의 에틸아세테이트를 미리 30 ml의 0.5% PVA 수용액에 녹여 만든 수용액(수상/연속상)에 첨가하여 5분 교반시켜 수중유형 유제를 제조하였다. 그리고 나서 0.1% PVA 수용액 50 ml을 상기 수중유형 유제에 첨가하고 450 rpm의 교반속도로 5분간 교반시켜 유제 방울에 존재하는 에틸아세테이트를 수상으로 추출하여 유제 방울이 배아 반고체 미립자(embryonic semisolid microspheres)로 변화되도록 하였다.

[0138] 상기 배아 반고체 미립자가 포함된 현탁액(embryonic microsphere suspension)를 550 rpm 속도로 교반되고 있는 200 ml의 0.1% PVA 수용액에 첨가하여 실온(RT)에서 2시간 교반한 후 여과지로 여과하여 PLGA 미립자를 수거하였다. 수거한 미립자를 다시 100 ml의 0.1% PVA 수용액에 재분산시켜 30 °C에서 350 rpm 속도로 5시간 교반시킨 후, 여과지로 여과하여 수거된 PLGA 미립자를 8% 만니톨 수용액으로 재분산후 액체질소에서 미립자 현탁액을 동결건조(lyophilization)하여 최종 로티고틴 함유 고분자 미립자를 얻었다.

[0139] 제조된 미립자 케이크를 물로 재분산시킨 후 여과를 통해 수거한 미립자를 진공 건조한 후 건조된 미립자의 봉입률을 상기 실시예 1의 1-2에서와 동일한 방식으로 산출하였다. 그 결과 약물(로티고틴) 봉입률은 79.3 ± 1.2%로 또한 높았다.

[0141] 실시예 3. 에틸포르메이트를 이용한 로티고틴 함유 고분자 미립자(1)

[0142] 3-1. 에틸포르메이트를 사용한 로티고틴 PLGA 미립자 제조(1)

[0143] PLGA 250 mg과 로티고틴 180mg 또는 200 mg을 4 ml의 에틸포르메이트에 녹여 분산상을 제조하였다. 이 분산상을 450 rpm으로 교반되고 있는 30 ml의 0.5% PVA 수용액에 첨가하여 5분 동안 교반시켜 수중유형 유제를 제조하였다.

- [0144] 그리고 나서 0.1% PVA 수용액 50 ml을 상기 수중유형 유체에 첨가하고 450 rpm의 교반속도로 5분간 교반시켜 유제 방울에 존재하는 에틸포르메이트를 수상으로 추출하여 유제 방울이 배아 반고체 미립자(embryonic semisolid microspheres)로 변화되도록 하였다.
- [0145] 상기 배아 반고체 미립자가 포함된 현탁액(embryonic microsphere suspension)를 550 rpm 속도로 교반되고 있는 200 ml의 0.1% PVA 수용액에 첨가하여 실온(RT)에서 2시간 교반한 후 여과지로 여과하여 PLGA 미립자를 수거하였다.
- [0146] 수거한 미립자를 다시 100 ml의 0.1% PVA 수용액에 재분산시켜 30 °C에서 350 rpm 속도로 5시간 교반시킨후, 여과지로 여과하여 수거된 PLGA 미립자를 8% 만니톨 수용액, 8% 만니톨과 1% 저분자량 CMC를 함유하는 수용액, 또는 8% 만니톨과 1% 고분자량 CMC를 함유하는 수용액 각각으로 재분산후 액체질소에서 미립자 현탁액을 동결건조(lyophilization)하여 최종 로티고틴 함유 고분자(PLGA) 미립자를 얻었다.
- [0147] **3-2. 미립자 주요 성상 평가**
- [0148] 상기에서 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자에 대하여 상기 실시예 1의 1-2에서와 동일한 방식으로 주요 성상을 평가하였고 그 결과는 다음과 같다.
- [0149] **<고분자 미립자에 봉입된 로티고틴 함량 분석>**
- [0150] 분석 결과 PLGA 미립자에 봉입된 로티고틴 함량은 각각 32.4% (로티고틴 초기 부하량 180mg) 및 35.9% (로티고틴 200mg 초기 부하량에서)으로 고품량이었다. 또한 상기 식에 따라 산출된 약물 봉입률은 각각 $77.5 \pm 2.2\%$ (로티고틴 180mg 초기 부하량에서)와 $80.8 \pm 1.8\%$ (로티고틴 200mg 초기 부하량에서)이었다.
- [0151] **<미립자 응집 현상 분석>**
- [0152] 로티고틴 200mg 초기 부하량을 사용한 미립자에 대해서 분석 결과를 도 12에 나타냈다.
- [0153] 도 12에 나타난 바에 의하면, 로티고틴 함유 PLGA 미립자들이 sonicator와 같은 기기 사용없이도 진탕만으로도 물에 재분산되었으며, PLGA 미립자에 봉입되지 않은 유리 로티고틴 결정들도 보이지 않았다. 이와 같은 결과로부터 실시예 3에 의해 제조된 로티고틴 PLGA 미립자의 경우도 건조과정 중에 흔히 발생하는 미립자간의 응집 현상을 극복할 수 있음을 알 수 있다. 따라서 환자에게 미립자를 주사할 때 미립자 응집이 없기 때문에 환자에게 투여할 수 있는 장점이 있다.
- [0154] **<전자현미경을 사용한 미립자 형상 조사>**
- [0155] 로티고틴 200mg 부하량(함량이 35.9%)을 사용한 미립자에 대해서 SEM 결과를 도 13에 나타냈다.
- [0156] 도 13에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제조된 로티고틴 함유 PLGA 미립자도 완전한 구형 형상을 지니고 있음을 확인할 수 있다.
- [0157] **<미립자 열적 거동 분석>**
- [0158] 로티고틴 PLGA 미립자 (로티고틴의 부하량이 200mg (함량 35.9%))에 대한 DSC 결과를 각각 도 14에 나타냈다.
- [0159] 도 14에 도시된 바와 같이, 로티고틴의 융점이 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과로부터 실시예 3의 미립자의 경우도 로티고틴이 PLGA 미립자 매트릭스에 분자 수준으로 잘 분산되어져 있으며 PLGA와 우수한 적합성이 있음을 보여준다.
- [0160] **<미립자 열질량(thermogravimetric) 분석>**
- [0161] 제조된 로티고틴 PLGA 미립자에 잔류하는 용매 수준(%)을 분석하기 위하여 TGA 분석결과로서 미립자에 100 °C까지 승온하였을때 감소하는 질량을 검체의 백분율로 thermogram에 표시하여 그 결과를 도 15에 나타냈다.
- [0162] 도 15에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제조된 미립자 잔류 유기용매(에틸포르메이트) 함량은 0.16% 이었다. 이와 같은 결과는 실시예 3의 미립자도 잔류 유기용매의 함량이 허가농도 한계인 0.5% 이하로 매우 낮음을 확인할 수 있다.
- [0164] **실시예 4. 에틸포르메이트를 사용한 로티고틴 PLGA 미립자(2)**
- [0165] **<에틸포르메이트를 사용한 로티고틴 PLGA 미립자 제조(2)>**

- [0166] 30 ml의 0.5% PVA 수용액에 1 ml의 에틸포르메이트를 미리 녹여서 만든 수상을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 3과 동일한 방식으로 제조하였다.
- [0167] 구체적으로는 PLGA 250 mg과 로티고틴 180mg을 4 ml의 에틸포르메이트에 녹여 분산상을 제조하였다. 이 분산상을 550 rpm으로 교반되고 있는 1 ml의 에틸포르메이트를 미리 30 ml의 0.5% PVA 수용액에 녹여 만든 수용액에 첨가하여 5분 교반시켜 수중유형 유제를 제조하였다. 그리고 나서 0.1% PVA 수용액 50 ml을 상기 수중유형 유제에 첨가하고 550 rpm의 교반속도로 5분간 교반시켜 유제 방울에 존재하는 에틸포르메이트를 수상으로 추출하여 유제 방울이 배아 반고체 미립자(embryonic semisolid microspheres)로 변화되도록 하였다.
- [0168] 상기 배아 반고체 미립자가 포함된 현탁액(embryonic microsphere suspension)를 500 rpm 속도로 교반되고 있는 200 ml의 0.1% PVA 수용액에 첨가하여 실온(RT)에서 2시간 교반한 후 여과지로 여과하여 PLGA 미립자를 수거하였다. 수거한 미립자를 다시 100 ml의 0.1% PVA 수용액에 재분산시켜 30 °C에서 350 rpm 속도로 5시간 교반시킨 후, 여과지로 여과하여 수거된 PLGA 미립자를 8% 만니톨 수용액으로 재분산후 액체질소에서 미립자 현탁액을 동결건조(lyophilization)하여 최종 로티고틴 함유 고분자(PLGA) 미립자를 얻었다.
- [0169] 제조과정 도중 미립자 현탁액을 실온에서 2시간 교반한 후 유제의 상태를 광학현미경을 사용하여 관찰하였고, 그 결과를 도 16에 나타냈다.
- [0170] 도 16에 나타낸 바와 같이, 미립자 현탁액에 로티고틴 결정이 관찰되지 않았다.
- [0171] 도 17에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1의 1-2에서와 동일한 방식으로 SEM 분석 결과, 미립자의 표면에서 로티고틴 결정이 존재하지 않음을 확인할 수 있었다.
- [0172] 제조된 미립자 케이크를 50 ml의 증류수로 재분산시킨 후 여과를 통해 수거한 미립자를 진공 건조한 후 건조된 미립자의 약물 함량 및 봉입률을 상기 실시예 1의 1-2에서와 동일한 방식으로 산출하였다. 그 결과 약물(로티고틴) 함량은 35.4%이고 봉입률은 82.3%로 또한 높았다.
- [0173] 도 18에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1의 1-2에서와 동일한 방식으로 열질량 분석 결과 미립자에 잔존하는 용매용량은 0.22%로 0.5% 이하의 수준까지 제조할 수 있었음이 확인된다.
- [0175] **실시예 5. 메틸프로피오네이트를 이용한 로티고틴 함유 고분자 미립자(1)**
- [0176] **5-1. 메틸프로피오네이트를 사용한 로티고틴 PLGA 미립자 제조(1)**
- [0177] PLGA 250 mg과 로티고틴 120mg을 4 ml의 메틸프로피오네이트에 녹여 분산상을 제조하였다. 이 분산상을 550 rpm으로 교반되고 있는 1 ml의 메틸프로피오네이트를 미리 30 ml의 0.5% PVA 수용액에 녹여 만든 수용액에 첨가하여 5분 교반시켜 수중유형 유제를 제조하였다
- [0178] 그리고 나서 0.1% PVA 수용액 50 ml을 상기 수중유형 유제에 첨가하고 550 rpm의 교반속도로 5분간 교반시켜 유제 방울에 존재하는 메틸프로피오네이트를 수상으로 추출하여 유제 방울이 배아 반고체 미립자(embryonic semisolid microspheres)로 변화되도록 하였다.
- [0179] 상기 배아 반고체 미립자가 포함된 현탁액(embryonic microsphere suspension)를 550 rpm 속도로 교반되고 있는 200 ml의 0.1% PVA 수용액에 첨가하여 30 °C에서 2시간 교반한 후 여과지로 여과하여 PLGA 미립자를 수거하였다.
- [0180] 수거한 미립자를 다시 100 ml의 0.1% PVA 수용액에 재분산시켜 30 °C에서 350 rpm 속도로 2.5시간 교반시킨 후, 여과지로 여과하여 수거된 PLGA 미립자를 진공건조하여 최종 로티고틴 고분자(PLGA) 미립자를 얻었다.
- [0181] **5-2. 미립자 주요 성상 평가**
- [0182] 상기에서 제조된 로티고틴 함유 고분자 미립자에 대하여 상기 실시예 1의 1-2에서와 동일한 방식으로 주요 성상을 평가하였고 그 결과는 다음과 같다.
- [0183] 상기 제조예에 따랐을 때, 수월한 상태의 PLGA 미립자를 만들 수 있었으며, 미립자 수득율은 68.2% 이었다.
- [0184] 또한 제조과정 도중 수상에서 로티고틴 결정은 관측되지 않았고, 로티고틴 봉입률은 90.2%로 관측되었으며, 이 결과에 따라 PLGA 미립자의 로티고틴 함량은 29.2%로 판명되었다.
- [0185] 도 19에 나타낸 바와 같이, SEM 분석결과 실시예 5에서 제조된 로티고틴 함유 PLGA 미립자도 구형 형상을 지니

고 있음을 확인할 수 있고, 미립자 표면에는 로티고틴 결정이 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과는 실시예 5에 따라 미립자 제조시 로티고틴이 PLGA 미립자 내부로 잘 봉입되며 상기의 높은 약물 봉입률 결과를 뒷받침해 준다.

[0187] 실시예 6. 메틸프로피오네이트를 사용한 로티고틴 함유 PLGA 미립자(2)

[0188] <메틸프로피오네이트를 사용한 로티고틴 함유 PLGA 미립자 제조(2)>

[0189] PLGA 250 mg과 로티고틴 150mg을 4 ml의 메틸프로피오네이트에 녹여 분산상을 제조하였다. 이 분산상을 450 rpm으로 교반되고 있는 30 ml의 0.5% PVA 수용액에 첨가하여 5분 교반시켜 수중유형 유제를 제조하였다. 그리고 나서 0.1% PVA 수용액 50 ml을 상기 수중유형 유제에 첨가하고 450 rpm의 교반속도로 5분간 교반시켜 유제 방울에 존재하는 메틸프로피오네이트를 수상으로 추출하여 유제 방울이 배아 반고체 미립자(embryonic semisolid microspheres)로 변화되도록 하였다.

[0190] 상기 배아 반고체 미립자가 포함된 현탁액 (embryonic microsphere suspension)를 500 rpm 속도로 교반되고 있는 200 ml의 0.1% PVA 수용액에 첨가하여 35 °C에서 2시간 교반한 후 여과지로 여과하여 PLGA 미립자를 수거하였다. 수거한 미립자를 다시 100 ml의 0.1% PVA 수용액에 재분산시켜 35 °C에서 350 rpm 속도로 2.5시간 교반시킨 후, 여과지로 여과하여 수거된 PLGA 미립자를 8% 만니톨 수용액으로 재분산후 동결건조시켜 만든 케이크를 50 ml의 증류수를 사용해 재분산하고 여과 처리하여 로티고틴 함유 PLGA 미립자를 수거한 후 진공건조시켜 최종 로티고틴 함유 고분자 미립자를 얻었다.

[0191] 미립자 제조 도중에 유제의 상태를 광학현미경을 사용하여 관찰한바, 미립자 현탁액에 로티고틴 결정이 관찰되지 않았다.

[0192] 도 20에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1의 1-2에서와 동일한 방식으로 SEM 분석 결과, 미립자는 완벽한 구형 형상을 나타내고 있으며, 미립자의 표면에서 로티고틴 결정이 존재하지 않음을 확인할 수 있었다.

[0193] 실시예 6에 따라 메틸프로피오네이트를 분산용매로 하여 PLGA 미립자를 제조한 경우, 로티고틴 봉입률은 83.8%이었으며 실제 PLGA 미립자의 약물 함량은 31.4%로 측정되었다.

[0195] 실시예 7. 미립자 입도 분포 분석

[0196] 비할로젠 유기용매 에틸아세테이트(a), 에틸포르메이트(b), 메틸프로피오네이트(c) 3종을 분산 유기용매로 하여 제조한 로티고틴 고분자 미립자의 제조 중 경화단계 종결 후 미립자 현탁액의 입도분포를 측정하였다.

[0197] 구체적으로는 PLGA 250 mg과 로티고틴 120 mg을 4 ml의 각각의 분산 유기용매에 녹여 분산상을 제조하였다.

[0198] 수상으로 30 ml의 0.5% PVA 수용액을 사용하였고, 에틸포르메이트를 분산 유기용매로 사용하는 경우는 미리 1 ml의 에틸포르메이트를 상기 수상에 첨가하여 완전히 섞어주고(pre-dissolving 단계), 에틸아세테이트나 메틸프로피오네이트를 사용한 경우에는 이러한 pre-dissolving 단계를 생략하였다.

[0199] 위에서 제조한 분산상을 450 rpm으로 교반되고 있는 상기와 같이 준비한 30 ml의 0.5% PVA 수용액에 첨가하여 5분 교반시켜 수중유형 유제를 제조하였다.

[0200] 그리고 나서 0.1% PVA 수용액 50 ml을 상기 수중유형 유제에 첨가하고 500 rpm의 교반속도로 5분간 교반시켜 유제 방울에 존재하는 메틸프로피오네이트를 수상으로 추출하여 유제 방울이 배아 반고체 미립자(embryonic semisolid microspheres)로 변화되도록 한 후, 전체 미립자 현탁액을 500 rpm 속도로 교반되고 있는 200 ml의 0.1% PVA 수용액에 첨가하여 30 °C에서 1시간 교반한 후 미립자 현탁액의 입자 크기 및 입도 분포를 Mastersizer 3000E (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK)를 사용하여 측정하였고, 그 결과를 도 21에 나타냈다.

[0201] 도 21에 의하면, D_{50%}는 모두 100 ~ 137 μm에 존재하였다. 이와 같은 결과는 아주 간단한 저에너지 혼합장치(low energy mixing device)를 사용하여 손쉽게 근육 또는 피하 주사에 적합한 크기를 가진 미립자를 제조할 수 있음을 보여주는 것이다.

[0202] 또한 입자 크기 및 입도 분포는 미립자 조성, 분산상과 수상의 조성, 그리고 유화조건 등을 변화하여 원하는 크

기로 조절 가능하다.

실시에 8. 비할로젠 용매 3종을 사용한 로티고틴 함유 고분자 미립자 제조 중의 유제 관찰

PLGA 250 mg과 로티고틴 120mg을 3 ml의 3종의 비할로젠 유기용매인 에틸아세테이트, 에틸포르메이트, 메틸프로피오네이트 각각에 녹여 분산상을 제조하였다. 이 분산상을 550 rpm으로 교반되고 있는 각각의 비할로젠 유기용매 1ml를 미리 용해시켜준 30ml의 0.5% PVA 수용액에 첨가하여 5분 동안 교반시켜 수중유형 유제를 제조하였다.

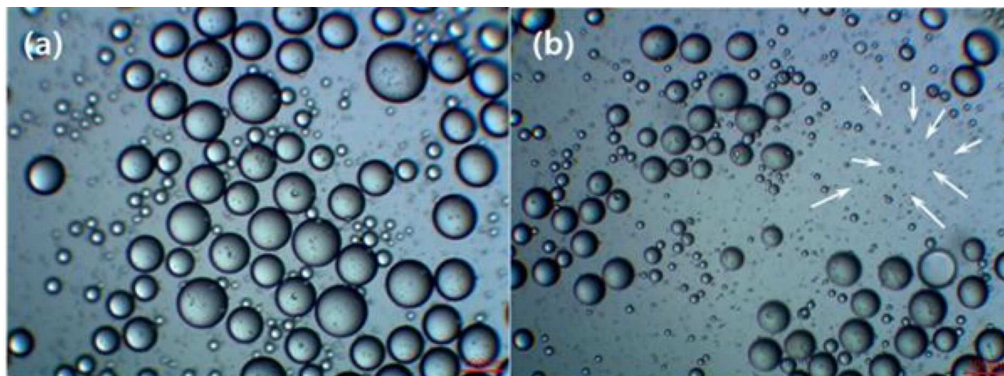
그리고 나서 유제를 500 rpm 속도로 교반되고 있는 200 ml의 0.1% PVA 수용액에 첨가하여 30 ℃에서 2시간동안 교반한 후 여과지로 여과하여 PLGA 미립자를 수거하였다. 수거한 미립자를 다시 100 ml의 0.1% PVA 수용액에 재분산시켜 30 ℃에서 350 rpm 속도로 2.5시간 교반한 후, 여과지로 여과하여 수거된 로티고틴 함유 PLGA 미립자를 진공건조하여 최종 로티고틴 함유 고분자 미립자를 얻었다.

도 22에 위의 제조과정 도중 30 ℃에서 2시간 교반한 후 유제 상태를 광학현미경으로 관찰한 결과를 나타냈다.

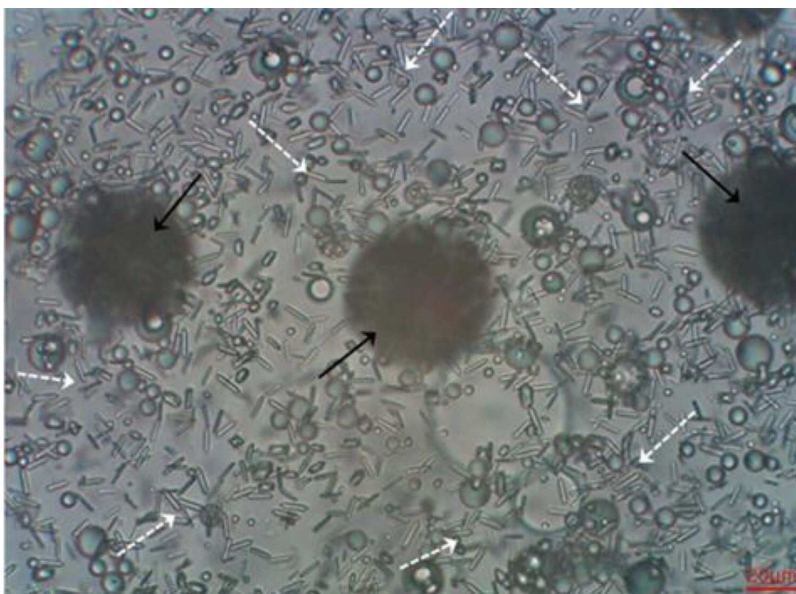
도 22에 나타낸 바와 같이, 3종의 비할로젠 유기용매를 사용한 경우 모두 미립자 현탁액의 수상 및 미립자 표면에서 로티고틴 결정이 관찰되지 않고, 미립구도 매끈한 구형으로 미립자들의 품질 성상이 우수하였다. 이러한 결과는 종래의 미립자 제조과정 도중 흔히 발생하는 약물 결정화 현상을 극복할 수 있음을 보여준다.

도면

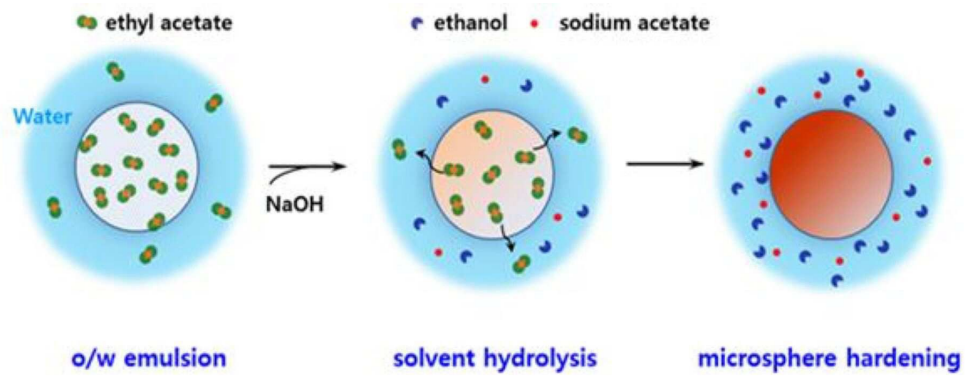
도면1



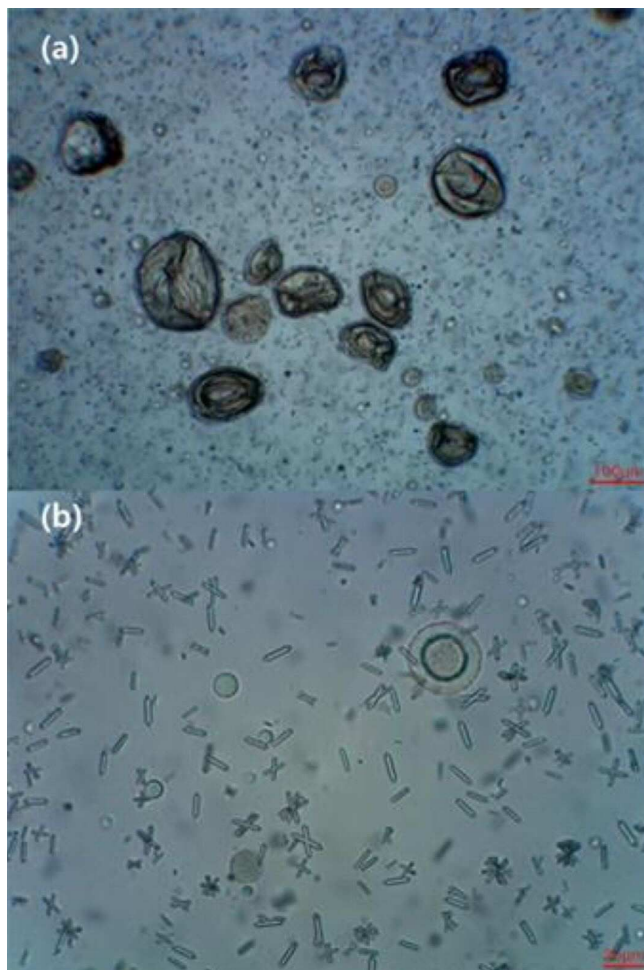
도면2



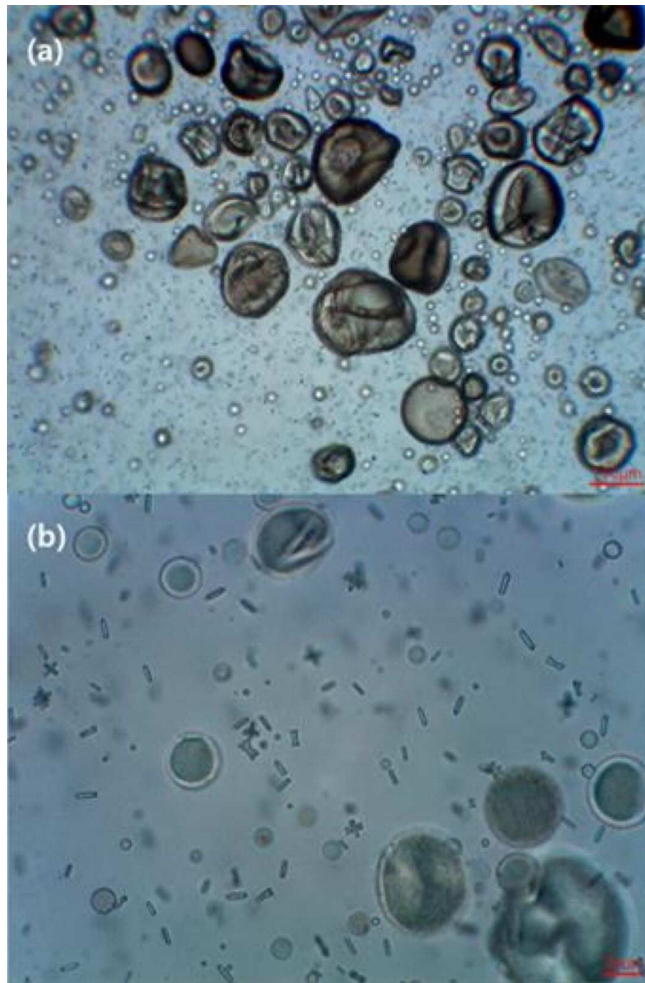
도면3



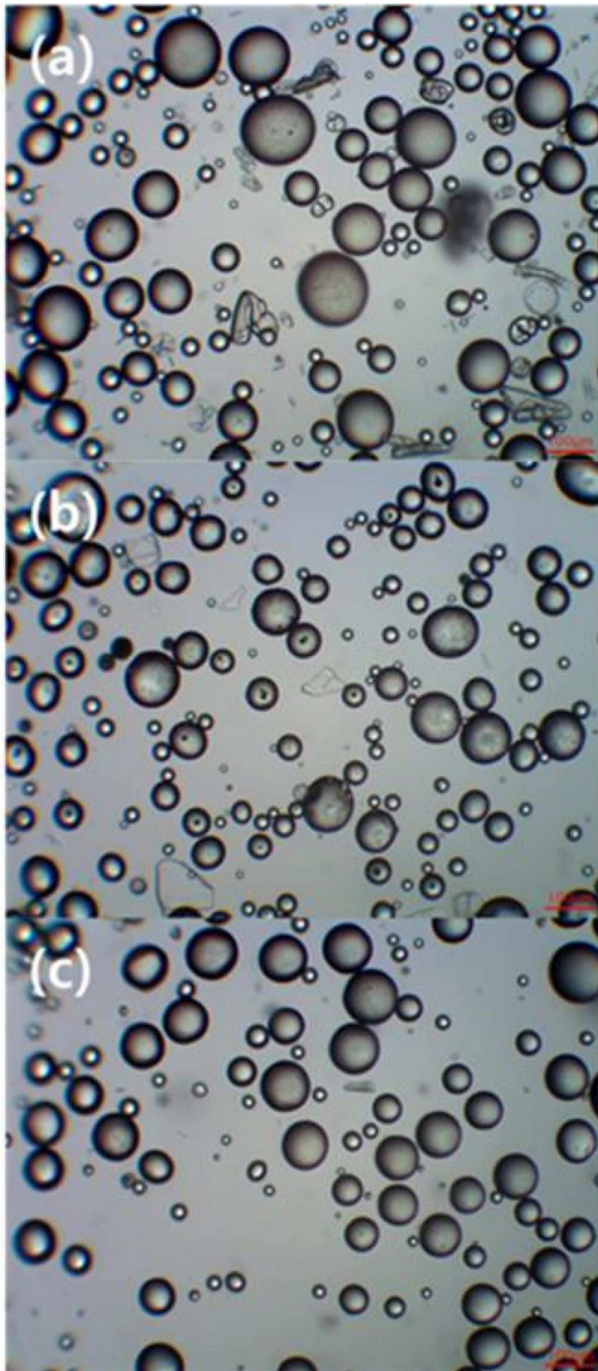
도면4



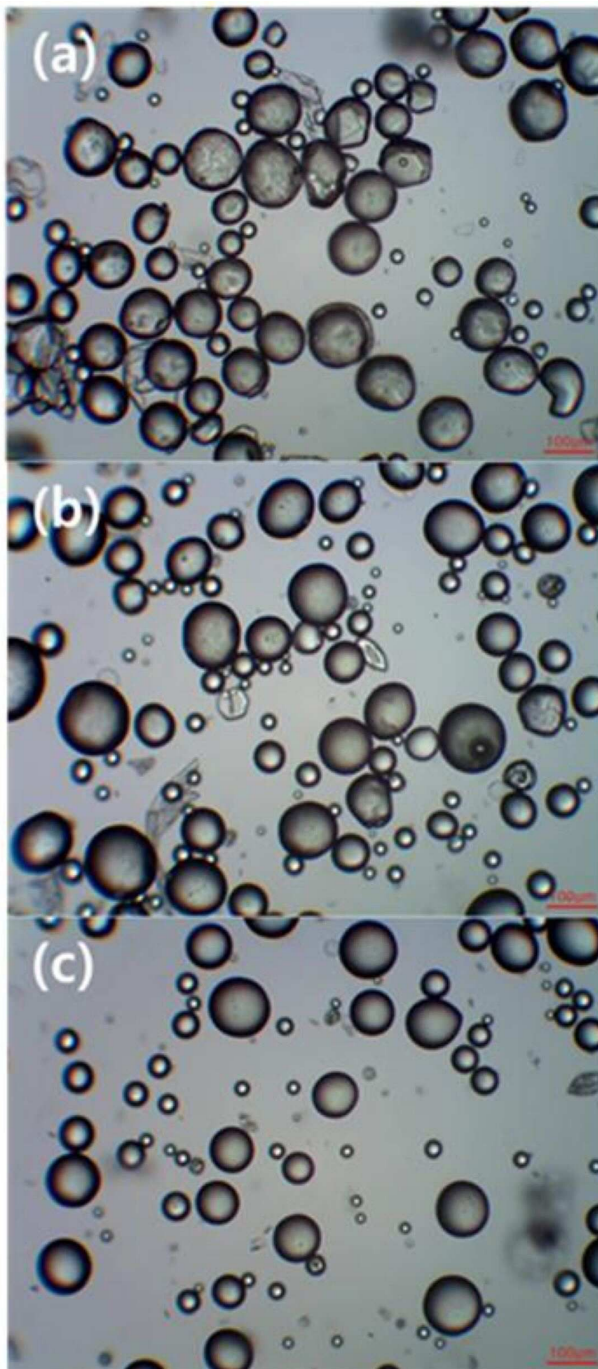
도면5



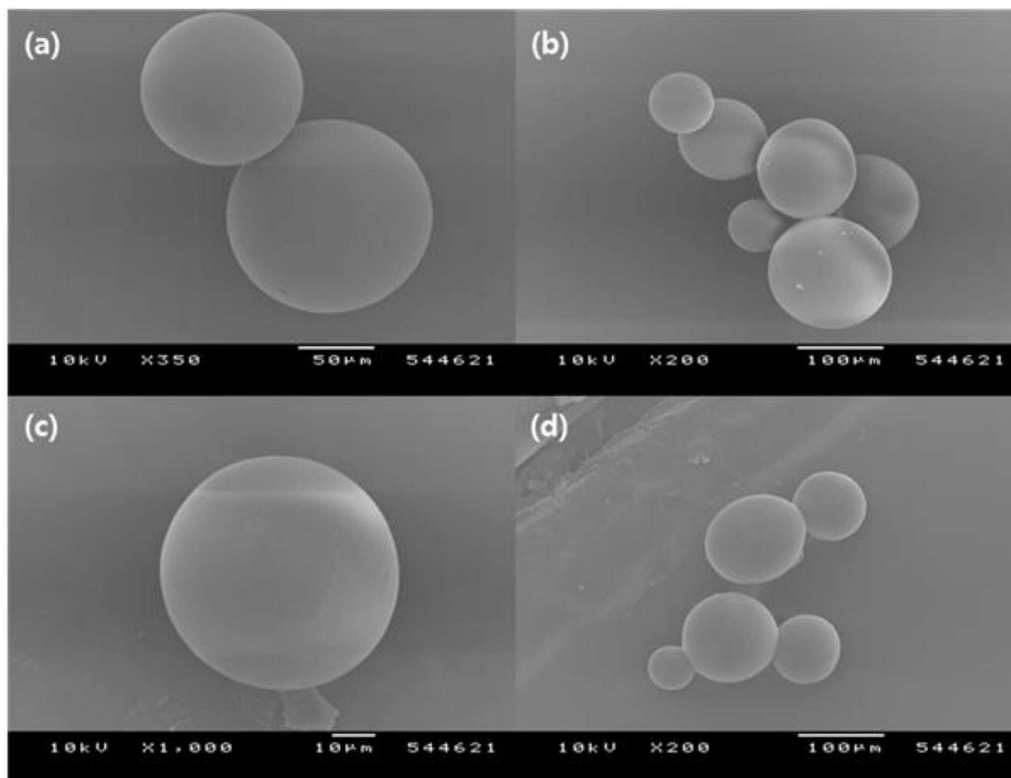
도면6



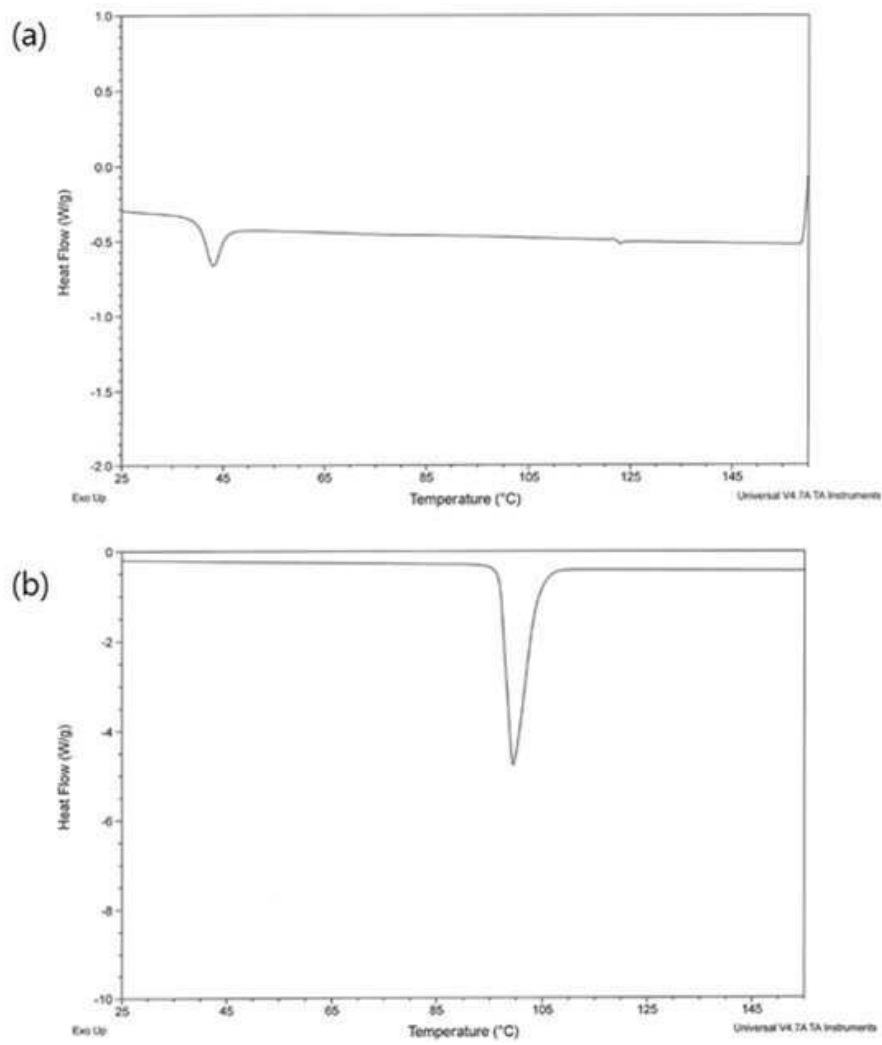
도면7



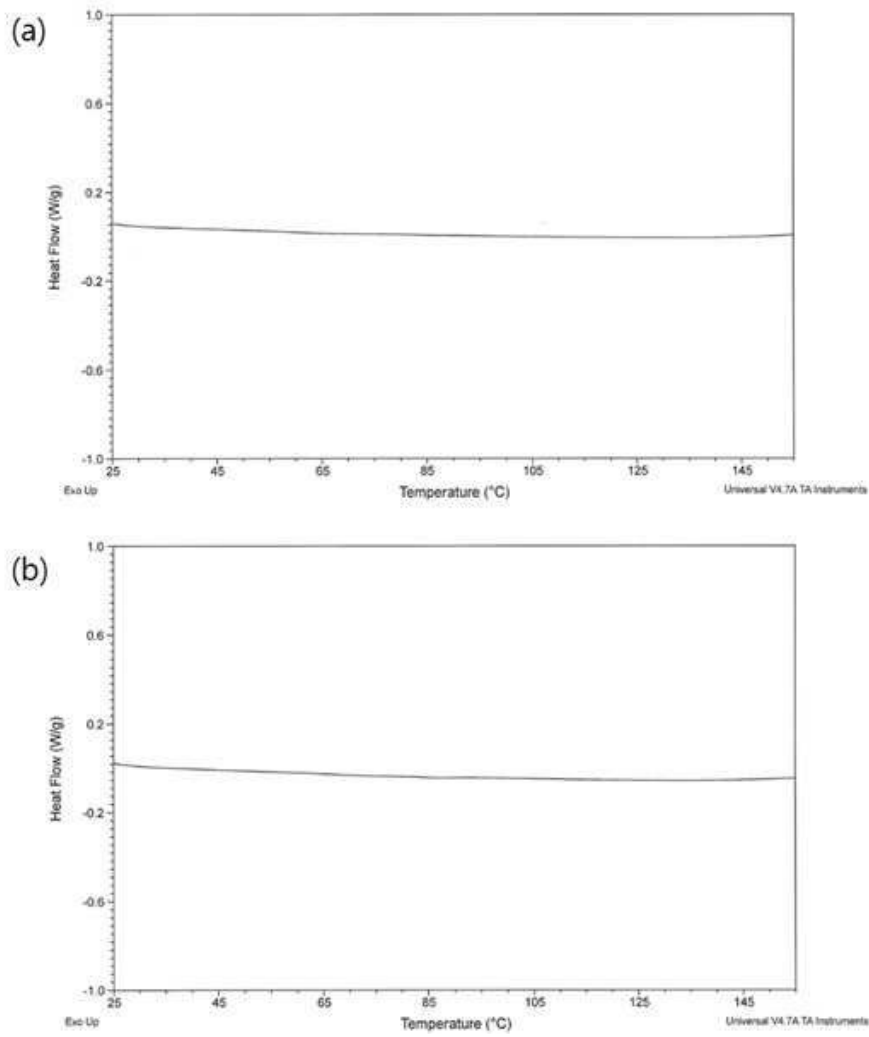
도면8



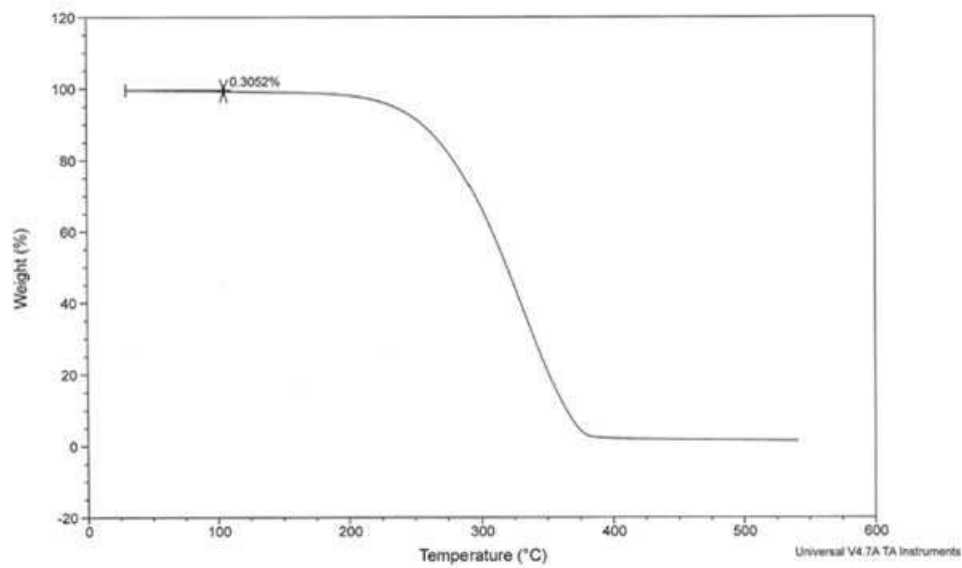
도면9



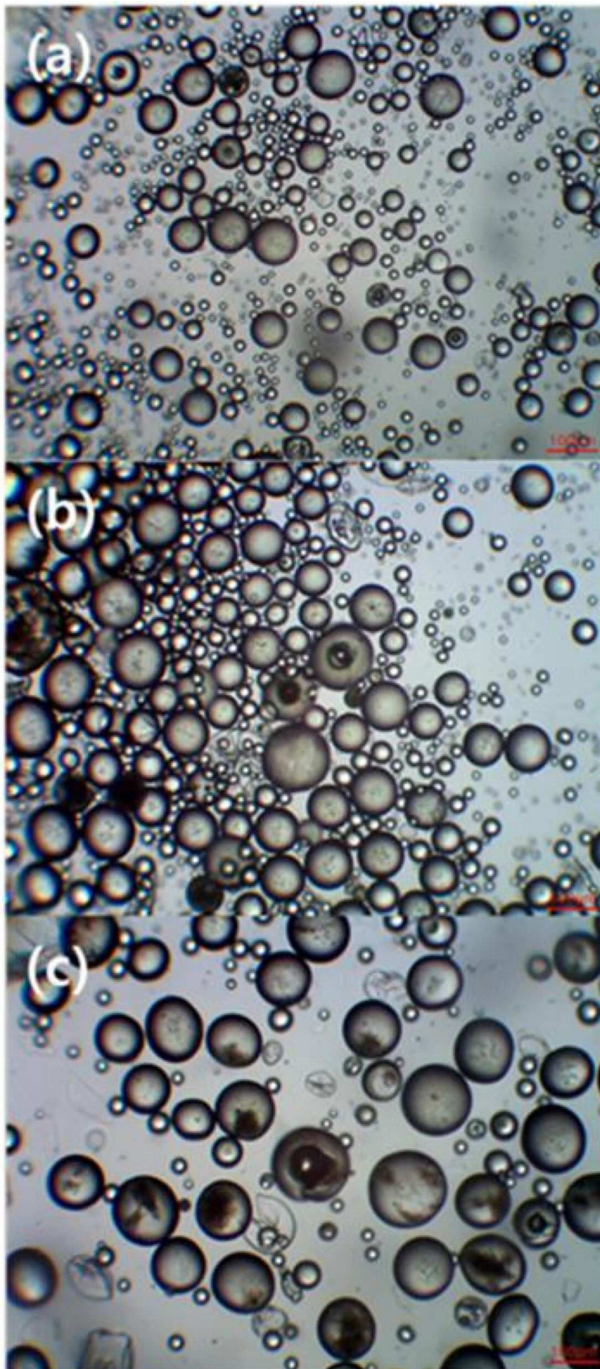
도면10



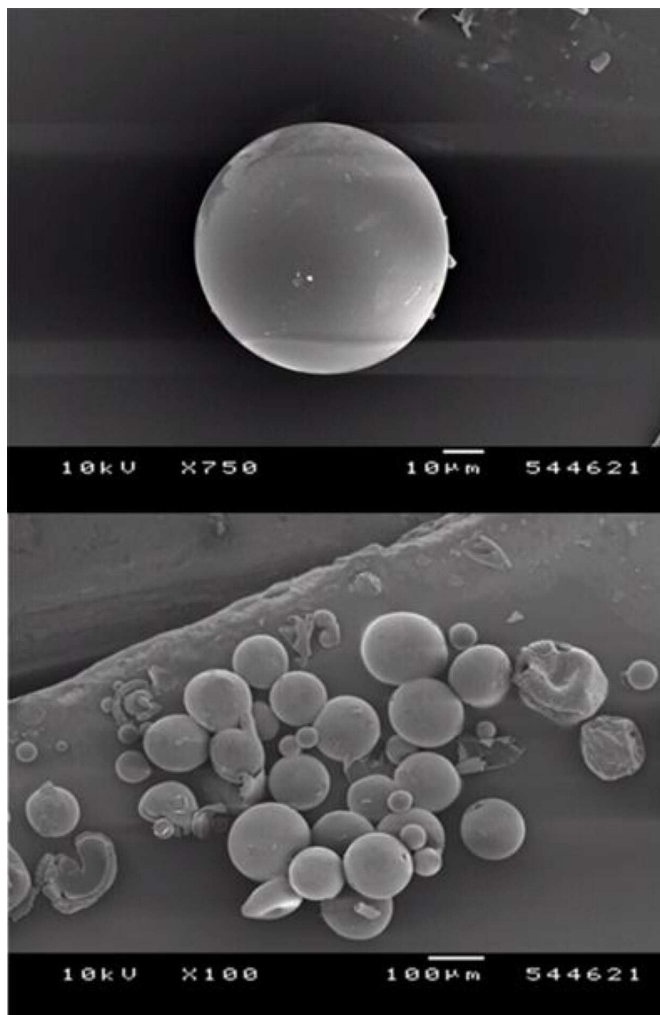
도면11



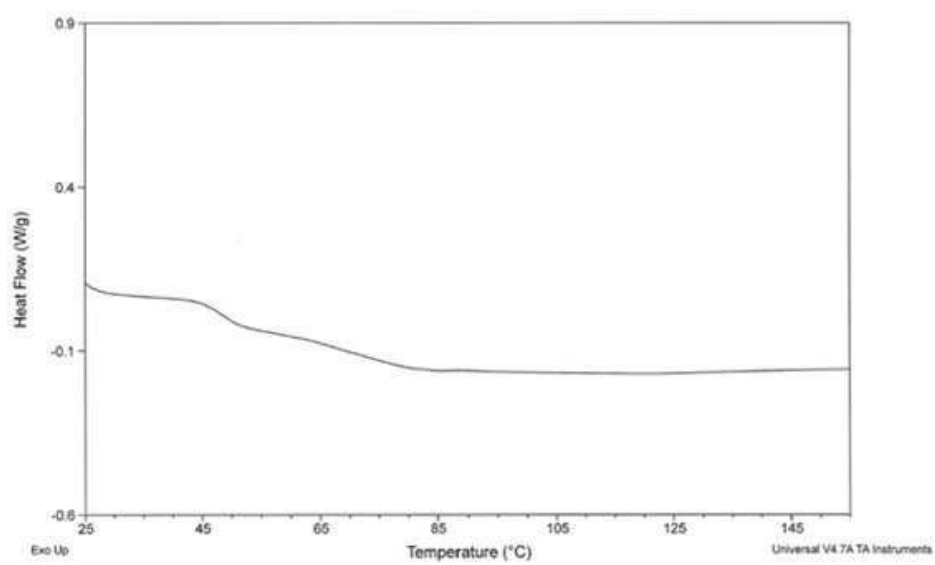
도면12



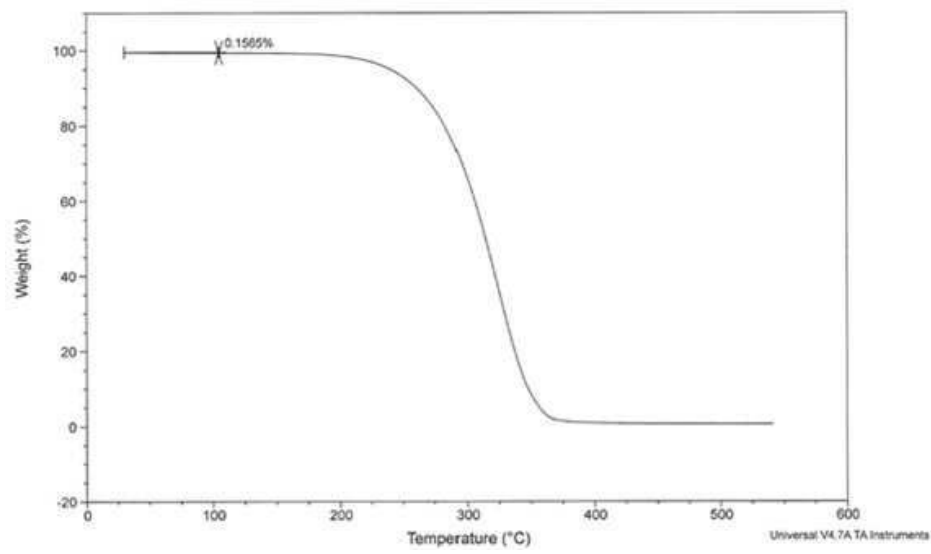
도면13



도면14



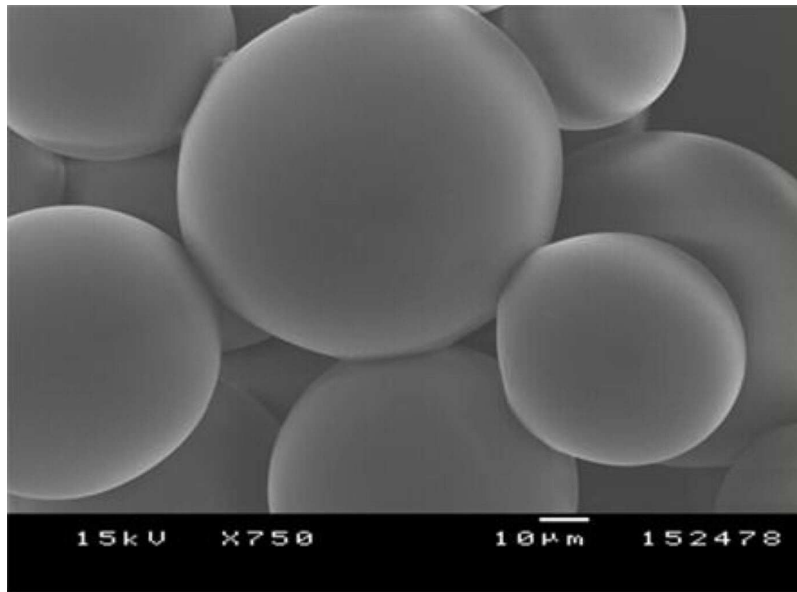
도면15



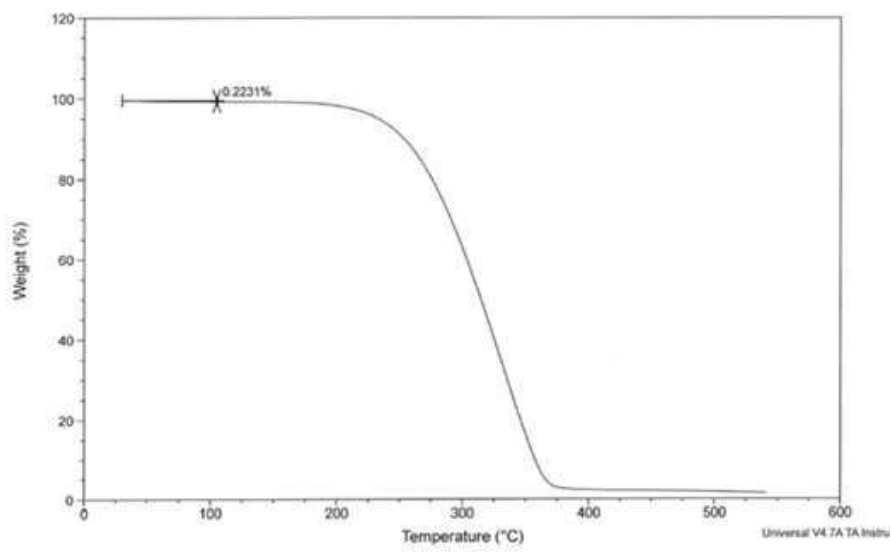
도면16



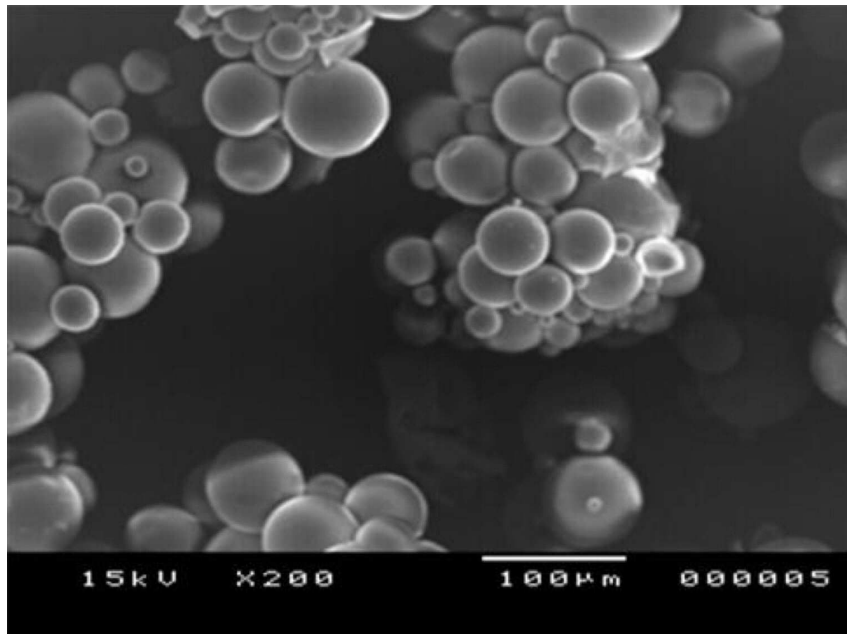
도면17



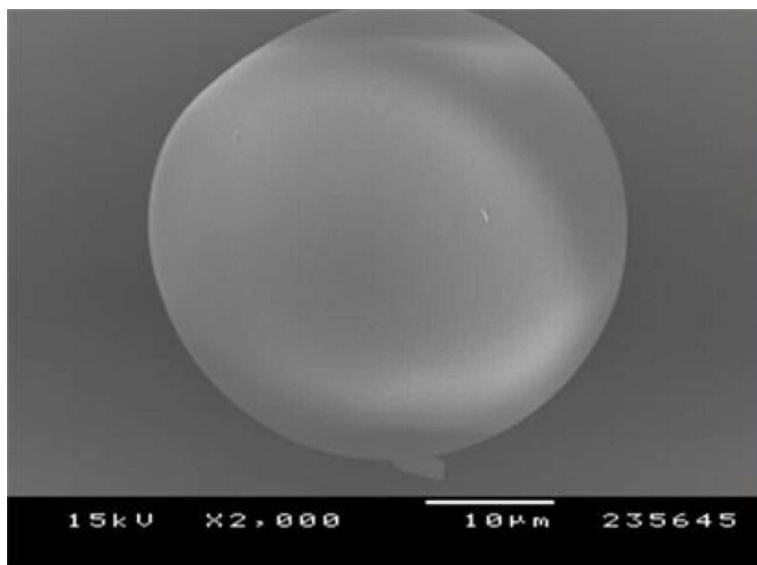
도면18



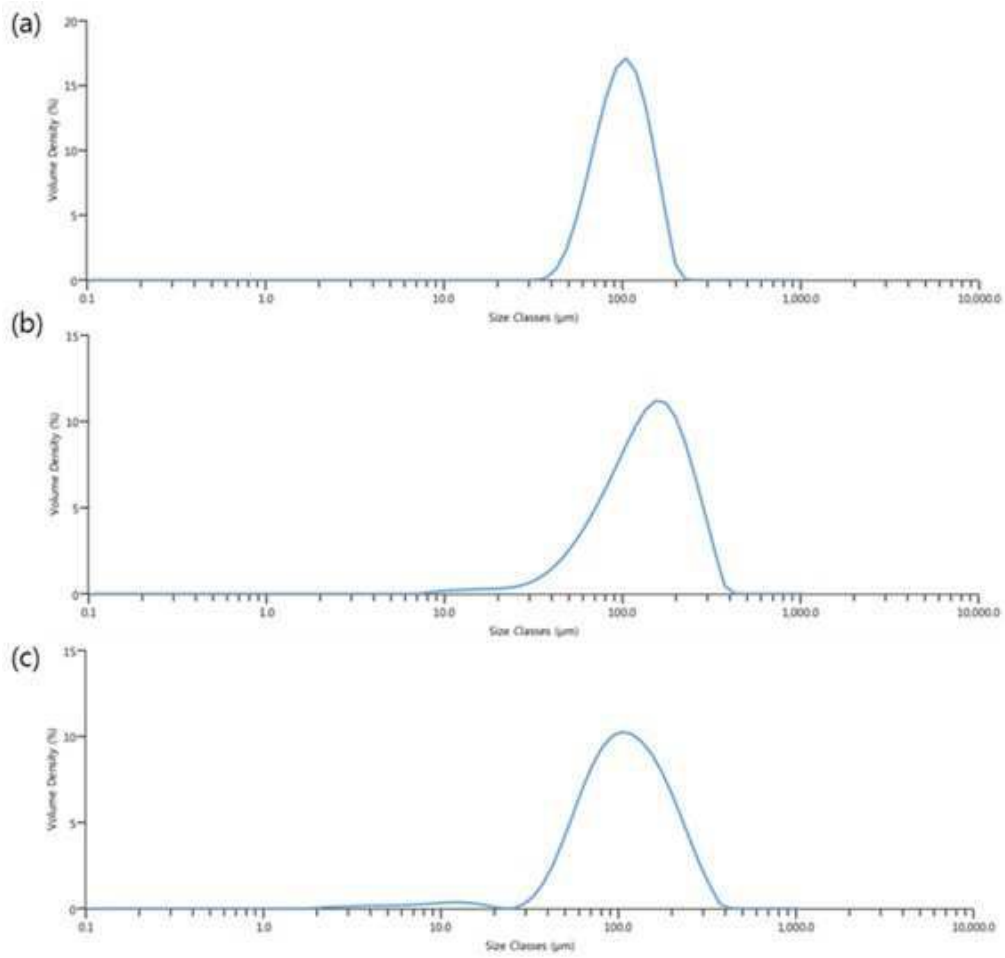
도면19



도면20



도면21



도면22

