(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월16일
(11) 등록번호 10-2717886
(24) 등록일자 2024년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/107 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/58 (2021.01) *A61K 38/13* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 47/12* (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1075 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7027934
(22) 출원일자(국제) 2019년02월26일
심사청구일자 2022년02월24일
(85) 번역문제출일자 2020년09월28일
(65) 공개번호 10-2020-0130704
(43) 공개일자 2020년11월19일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2019/050217
(87) 국제공개번호 WO 2019/162951
국제공개일자 2019년08월29일
(30) 우선권주장
62/635,088 2018년02월26일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20170065533 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이슘 리서치 디벨롭먼트 컴퍼니 오브 더 히브루 유니버시티 오브 예루살렘 엘티디.
이스라엘, 9139002 예루살렘, 피.오.박스 39135, 지배트 램, 더 히브루 유니버시티 오브 예루살렘, 더 에드몬드 제이. 사프라 캠퍼스, 하이-테크 파크
(72) 발명자
베니타 시몬
이스라엘, 6458509 텔 아비브, 3 아담 하코헨 스트리트
나사르, 태허
이스라엘, 1695000 크파 투란, 피.오.박스 2646, 안와르 스트리트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
허용록

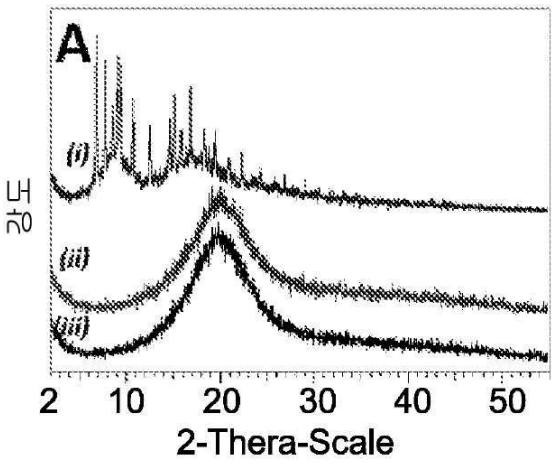
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 **약물 전달 시스템**

(57) 요 약

본 발명은 저장 안정적이고 효과적인 약물 전달 시스템을 제조하기 위한 신규한 플랫폼에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 31/58 (2013.01)
A61K 38/13 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/34 (2013.01)
A61K 9/0014 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
(72) 발명자
레비보, 레슬리
이스라엘, 9618410 예루살렘, 10/5 피르헤이 헨 스트리트
배디히, 아미트
이스라엘, 9675514 예루살렘, 14 겔버 스트리스

명 세 서

청구범위

청구항 1

적어도 하나의 액체 담체 내 분말을 포함하는 안과용 제형으로서,

상기 분말은 다수의 PLGA 나노입자를 포함하며,

각 나노입자는 적어도 하나의 비-친수성 물질로 타크로리무스 및 적어도 하나의 오일을 포함하고,

분말은 상기 나노입자를 포함하는 분산액으로부터 동결건조에 의해 제조된 건조 플레이크 형태이며,

PLGA는 적어도 50KDa의 평균 분자량을 갖고,

나노입자는 나노구 또는 나노캡슐로부터 선택되며,

분말은 베타-시클로덱스트린인 적어도 하나의 동결보호제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 안과용 제형.

청구항 2

제 1항에 있어서, 담체는 수-계 담체인 것을 특징으로 하는, 안과용 제형.

청구항 3

제 1항에 있어서, 안과용 제형은 주사용 또는 점안액용으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 안과용 제형.

청구항 4

제 1항에 있어서, 적어도 하나의 오일은 피마자유인 것을 특징으로 하는, 안과용 제형.

청구항 5

제 1항에 있어서, 즉시 사용하거나 또는 7일 내지 28일의 기간 내에 사용하기 위한, 안과용 제형.

청구항 6

제 1항에 있어서, 안과용 제형은 적어도 하나의 계면활성제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 안과용 제형.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 안구 질환 또는 장애의 치료 방법에 사용하기 위한 약학 조성물인, 안과용 제형.

청구항 8

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 정의된 동결건조된 분말 및 적어도 하나의 액체 담체; 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

청구항 9

제 8항에 있어서, 액체 담체는 물 또는 수용액 또는 무수 (물이 없는) 액체 담체인 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 독특한 전달 시스템, 재구성된 용액 및 이의 용도를 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 아토피성 피부염 (AD)의 관리는 최적의 피부 관리, 국소 요법 및 전신 치료를 포함하는 치료적 도전과제이다. 국소 코르티코스테로이드 (TCS)는 이들의 항-염증, 면역억제 및 항-증식 효과로 인해 AD 치료에 사용되는 1차 치료제이다. 그러나, 이들은 장기 요법(long-term therapy)과 관련된 많은 국소 및 전신 부작용을 가지고 있다. 타크로리무스(Tacrolimus) 및 피메크로리무스(pimecrolimus)는 TCS에 비해 더 높은 선택성, 더 높은 효율성 및 더 좋은 단기(short-term) 안전 프로파일을 나타낸다. 그러나, 장기적인 안전성 자료의 부족, 광범위한 인가되지 않은 약품의 사용(widespread off-label use) 및 피부암 및 림프종의 잠재적 위험으로 인해, FDA의 소아 자문(Pediatric Advisory)은 이러한 제제에 대한 "블랙 박스(black box)" 경고를 권고하여, 이들의 사용을 제한하였다.

[0003] 시클로스포린 A (CsA)는 타크로리무스 및 피메크로리무스와 유사한 면역조절 특성을 나타낸다. CsA는 경구 투여 시 다양한 피부 질환의 치료에서 현저한 효능을 나타낸다. 사실, CsA 요법은 중증의 AD에서 1차 단기 전신 요법이다. 실제로, CsA의 장기 전신 투여는 신장 기능 장애, 만성 신독성 및 고혈압을 포함한 심각한 부작용과 관련이 있다.

[0004] 불행하게도, 이의 큰 분자량 및 나쁜 수 용해도 때문에, 국소 적용 후 피부층으로의 CsA 침투는 제한된다. 또한, 다양한 나노담체에 의해 매개된 온전한 피부로의 CsA 전달의 약속은 거의 성공하지 못하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) WO 2012/101638

(특허문헌 0002) WO 2012/101639

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int J Phar 1989; 55: R1-R4.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 명세서에 개시된 기술의 발명자들은 다양한 제형에서 다양한 적용에 맞게 조정될 수 있고 약물 전달과 관련된 하나 이상의 요건을 충족하도록 조정될 수 있는 저장 안정적이고 효과적인 약물 전달 시스템을 제조하기 위한 신규한 플랫폼을 개발하였다.

[0008] 기술은 피부로의 약물 침투를 향상시키는 PLGA (poly lactic-co-glycolic acid)-나노구 (nanospheres, NSs) 및 나노캡슐 (nanocapsules, NCs) 형태의 나노담체 시스템을 기반으로 한다. 담체 시스템은 무수 국소 제형에 포함될 수 있고, ex vivo에서 예시된 바와 같이 다양한 피부층에서 개선된 약물 피부 흡수 및 적당한 피부-생체분포 (dermato-biodistribution, DBD) 프로파일을 제공하는 동결-건조된 나노입자 (NPs)로 제공된다.

[0009] CsA와 같은 활성제를 함유하는 다양한 PLGA 나노담체는 잘-확립된 용매 치환 방법 [1]에 따라 제조되었으며, 상세한 내용은 아래 실험 부분에 제시되어 있다.

[0010] 따라서, 대부분의 일반적인 용어로, 본 발명은 본 명세서에 개시된 일부 적용 (특히, 즉시 사용을 위한 적용)의 경우 수-계 담체일 수 있거나, 또는 다른 적용, 특히 장기간의 저장 기간을 필요로 하는 적용의 경우 실리콘-계 담체와 같은 (물이 없는) 무수 담체일 수 있는, 액체 담체에서 재구성하도록 구성된 동결건조된 고체 분말 제형을 제공한다. 고체 분말은 대안적으로 비-액체 또는 제형화된 형태로 그 자체로 사용될 수 있다.

[0011] 제 1 측면에서, 본 발명은 다수의 PLGA 나노입자를 포함하는 분말을 제공하며, 각 나노입자는 적어도 하나의 비-친수성 물질 (약물 또는 활성제)을 포함하며, 분말은 일반적으로 동결건조에 의해 달성될 수 있는 건조 플레이크 형태이다.

[0012] 일 실시예에서, 건조 분말은 시클로덱스트린, PVA, 수크로오스, 트레할로오스, 글리세린, 덱스트로오스, 폴리비닐피롤리돈, 만니톨, 자일리톨 등으로부터 임의로 선택될 수 있는 적어도 하나의 동결보호제(cryoprotectant)를 더 포함한다.

[0013] 일 실시예에서, 동결건조는 상기와 같이 선택될 수 있는 적어도 하나의 동결보호제의 존재 하에 수행된다.

[0014] 추가 측면에서, 본 발명은 다수의 PLGA 나노입자를 포함하는 재구성 가능한 (ready-for-reconstitution) 분말을 제공하며, 각 나노입자는 적어도 하나의 비-친수성 물질 (약물 또는 활성제)을 포함한다. 분말은 정의된 바와 같이 건조 고체일 수 있지만, 일부 조건 하에서 오일 또는 왁스 물질의 함량에 따라 제품은 연고의 농도를 가질 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 적어도 하나의 비-친수성 약물의 고체 제형을 제공하며, 제형은 다수의 PLGA 나노입자를 포함하는 건조 분말이고, 각 나노입자는 적어도 하나의 비-친수성 물질 (약물 또는 활성제)을 포함한다.

[0016] 일 실시예에서, 본 발명에 따른 건조 분말 또는 재구성된 제형은, 건조 분말 또는 재구성된 제형이 제조된 직후 또는 이의 제조로부터 7일 이내의 기간 동안 함유된 나노입자의 적어도 하나의 비-친수성 물질의 실질적인 (나노입자 총 집단 중 15-20% 또는 10-15% 이하) 침출을 직접적으로 또는 간접적으로 야기하지 않는 성분 또는 담체 또는 부형제를 포함한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 PLGA 나노입자에 함유된 "***적어도 하나의 비-친수성 물질***"은 수불용성인 약물 또는 치료적 활성제, 또는 소수성 또는 사실상 양친매성인 약물 또는 치료적 활성제이다. 일 실시예에서, 적어도 하나의 비-친수성 물질은 1 이상의 logP 값을 특징으로 하며, LogP 값은 활성 성분이 용해된 수상 및 유기상 액체 사이의 화합물 전체 친유성 및 분배의 추정치이다.

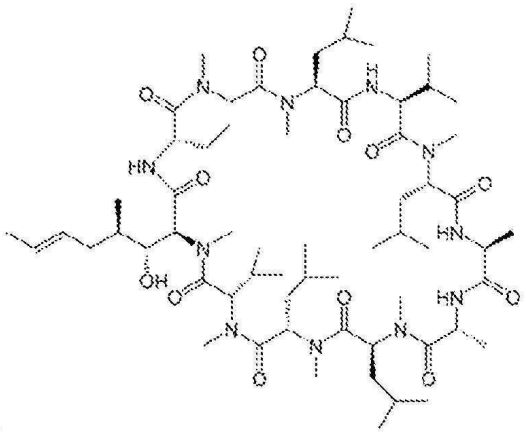
[0018] 일 실시예에서, 적어도 하나의 비-친수성 물질은 시클로스포린 A (Cys A), 타크로리무스, 피메크로리무스, 덱사메타손 팔미테이트, 테트라히드로칸나비놀 (THC) 및 칸나비디올 (CBD)과 같은 칸나비스 친유성 추출 유도체 (식물칸나비노이드(phytocannabinoids)), 또는 합성 칸나비노이드, 자피를루카스트(zafirlukast), 피나스테리드(finasteride), 옥살리플라틴 팔미테이트 아세테이트 (oxaliplatin palmitate acetate, OPA) 등으로부터 선택된다.

[0019] 일 실시예에서, 비-친수성 물질은 시클로스포린 A (Cys A), 타크로리무스 및 피메크로리무스로부터 선택된다. 일 실시예에서, 비-친수성 물질은 시클로스포린 A (Cys A) 또는 타크로리무스 또는 피메크로리무스 또는 CBD 또는 THC 또는 피나스테리드 또는 옥살리플라틴 팔미테이트 아세테이트 (OPA)이다.

[0020] 일 실시예에서, 비-친수성 물질은 시클로스포린이 아니다.

[0021] 화학식 (I)로 나타낸 ***시클로스포린***은, T 세포의 활성 및 성장을 방해하여 면역계의 활성을 감소시키는 면역억제제 거대분자이다. 알 수 있는 바와 같이, 이의 비교적 큰 크기로 인해, 시클로스포린의 국소 전달은 종래의 알려진 전달 시스템에서 어려운 것으로 입증되었다. 본 발명의 맥락에서, 시클로스포린에 대한 언급은 시클로스포린 계열의 모든 마크로리드(macrolide) (즉, 시클로스포린 A, 시클로스포린 B, 시클로스포린 C, 시클로스포린 D, 시클로스포린 E, 시클로스포린 F 또는 시클로스포린 G), 및 이의 약학적 염, 유도체 또는 유사체도 포함한다.

[0022] **[화학식 I]**

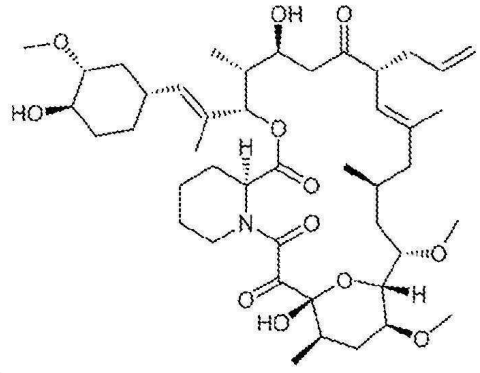


[0023]

[0024] 일 실시예에 따르면, 시클로스포린은 시클로스포린 A (CysA)이다.

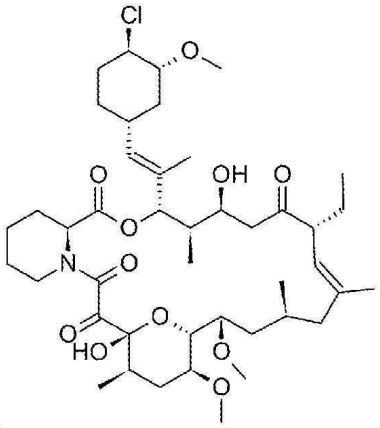
[0025] 타크로리무스 및 피메크로리무스는 아토피성 피부염 치료에서 이의 국소 항-염증 특성을 위해 피부과에서 이용된다. 이러한 비-스테로이드성 약제는 면역계를 하향-조절한다. 타크로리무스는 0.03% 및 0.1% 연고로 제조되고, 피메크로리무스는 1% 크림으로 유통된다; 둘 다 임상적 개선이 확인될 때까지 매일 2회씩 환부(affected area)에 일상적으로 적용된다.

[0026] 일 실시예에서, 적어도 하나의 비-친수성 제제는 타크로리무스이다.



[0027]

[0028] 일 실시예에서, 적어도 하나의 비-친수성 제제는 피메크로리무스이다.



[0029]

[0030] 일 실시예에서, 나노입자는 약 0.1 내지 10 wt%의 적어도 하나의 비-친수성 물질, 예를 들어 시클로스포린을 포함한다.

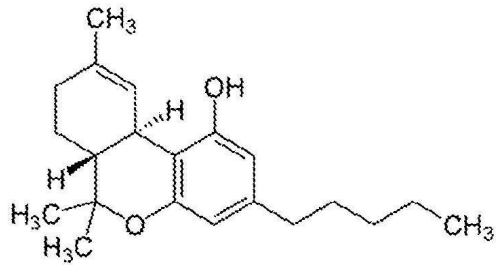
[0031] 본 발명에 따라 사용되는 칸나비스 친유성 추출 유도체는 당해 기술분야에 알려진 방법에 의해 칸나비스 식물로부터 얻어진 활성제, 조성물 또는 이들의 조합이다. 추출 유도체는 정제된 및 조(crude) 건조 식물 물질 및 추출물에 적용한다. 농축된 칸나비스-유래 물질의 제조 방법은 여러 가지가 있다, 예를 들어, 여과, 침연(maceration), 주입, 삼출(percolation), 다양한 용매의 달임(decoction), 속슬렛 추출(Soxhlet extraction), 마이크로파- 및 초음파-보조 추출 및 기타 방법.

[0032] 칸나비스 친유성 식물 추출물은 칸나비스 식물, 대부분 *사티바(Sativa)*, *인디카(Indica)*, 또는 *루데랄리스(Ruderalis)* 종에서 얻은 식물-유래 물질 또는 조성물의 혼합물이다. 추출물의 물질 조성 및 기타 특성은 다양할 수 있으며, 추가로 본 발명에 따른 병용 요법의 원하는 특성을 충족하도록 조정될 수 있음을 이해해야 한다.

[0033] 칸나비스 식물 추출물은 예를 들어 칸나비스 식물에서 직접 추출하여 얻어지기 때문에, 친유성 유도체, 즉, 2가지 주요 자연적으로 발생하는 칸나비노이드인 테트라히드로칸나비놀 (THC), 칸나비디올 (CBD), 및 CBG (칸나비게롤), CBC (칸나비크로멘), CBL (칸나비시클롤), CBV (칸나비바린), THCV (테트라히드로칸나비바 린), CBDV (칸나비디바린), CBCV (칸나비크로메바린), CBGV (칸나비게로바린), CBGM (칸나비게롤 모노메틸 에테르) 등 중 하나 또는 이들의 조합과 같은 추가 칸나비노이드 중 몇몇 자연적으로 발생하는 화합물의 조합을 포함할 수 있다.

[0034] THC 및 CBD가 주요 친유성 유도체이지만, 추출된 분획의 다른 성분도 이러한 친유성 유도체의 범위 내에 있다.

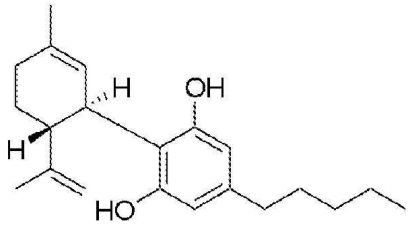
[0035] 본 명세서에서 테트라히드로칸나비놀 (THC)은 CB1 및 CB2 수용체에 대해 높은 친화도를 특징으로 하는 향정신성 칸나비노이드의 종류를 나타낸다. 분자식 $C_{21}H_{30}O_2$를 갖는 THC는, 약 314.46 Da의 평균 질량 및 하기에 나타낸 구조를 가진다.



THC

[0036]

[0037] 본 명세서에서 칸나비디올 (CBD)은 CB1 및 CB2 수용체에 대해 낮은 친화도를 갖는 비-향정신성 칸나비노이드의 종류를 나타낸다. 분자식 $C_{21}H_{30}O_2$를 갖는 CBD는, 약 314.46 Da의 평균 질량 및 하기에 나타낸 구조를 가진다.



CBD

[0038]

[0039] 본 명세서에서 용어 'THC' 및 'CBD'는 (-)-트랜스-△9-테트라히드로칸나비놀 (△9-THC), △8-THC, 및 △9-CBD와 같은 이들 분자의 이성질체, 유도체 또는 전구체, 및 이들의 각각의 2-카복실산 (2-COOH)인 THC-A 및 CBD-A로부터 유도된 THC 및 CBD를 더 포함한다.

[0040] "*PLGA 나노입자*"는 폴리락트산 (PLA) 및 폴리글리콜산 (PGA)의 공중합체로 제조된 나노입자이며, 일 실시예에서 공중합체는 블록 공중합체, 랜덤 공중합체 및 그래프트된 공중합체 중에서 선택된다. 일 실시예에서, PLGA 공중합체는 랜덤 공중합체이다. 일 실시예에서, PLA 단량체는 과량으로 PLGA에 존재한다. 일 실시예에서, PLA 대 PGA의 몰비는 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45 및 50:50 중에서 선택된다. 다른 실시예에서, PLA 대 PGA 몰비는 50:50 (1:1)이다.

[0041] PLGA는 임의의 분자량을 가질 수 있다. 일 실시예에서, PLGA는 적어도 20KDa의 평균 분자량을 가진다. 일 실시예에서, 고분자는 적어도 약 50KDa의 평균 분자량을 가진다. 일부 다른 실시예에서, 고분자는 약 20KDa 내지 1,000KDa, 약 20KDa 내지 750KDa, 또는 약 20KDa 내지 500KDa의 평균 분자량을 가진다.

[0042] 일 실시예에서, 고분자는 20KDa와 상이한 평균 분자량을 가진다.

[0043] 일 실시예에서, PLGA는 임의로 적어도 약 50KDa의 평균 분자량 또는 2 내지 20KDa의 평균 분자량과 상이하도록 선택된 평균 분자량을 가진다.

[0044] 나노입자로부터 적어도 하나의 비-친수성 물질의 투여 경로뿐만 아니라, 방출의 원하는 속도 및/또는 방식에 따라, 나노입자에 함유 (캡슐화)될 수 있고, 나노입자를 구성하는 고분자 매트릭스에 박힐 수 있으며, 및/또는 나노입자의 표면 (전체 표면 또는 이의 일부)과 화학적으로 또는 물리적으로 결합될 수 있다. 일부 적용의 경우, 나노입자는 고분자 쉘 및 유성 코어(oily core)를 갖는 코어/쉘 (이하 *나노캡슐* 또는 NCs라고도 함)의 형태일 수 있으며, 적어도 하나의 비-친수성 활성제는 유성 코어 내에 가용화된다. 대안적으로, 나노입자는 비-친수성 물질이 박힌 별개의 코어/쉘 구조를 특징으로 하지 않는 실질적으로 균일한 조성을 가진다; 본 명세서에서 *나노구* (NSs)라고 하는 이러한 나노입자에서, 물질은 고분자 매트릭스 내에, 예를 들어 균일하게 박혀, 나노입자 내의 물질의 농도가 나노입자 부피 또는 질량 전체에 걸쳐 실질적으로 균일한 나노입자를 야기할 수 있다. 나노구에서는 오일 성분이 필요하지 않을 수 있다.

[0045] 일 실시예에서, 나노입자는 나노구 또는 나노캡슐의 형태이다. 일 실시예에서, 나노입자는 PLGA 고분자로 제조된 매트릭스를 포함하는 나노구의 형태이고, 비-친수성 물질은 매트릭스 내에 박힌다.

[0046] 일 실시예에서, 나노입자는 PLGA 고분자로 제조된 쉘을 포함하는 나노캡슐의 형태이며, 쉘은 비-친수성 물질을 가용화하는 오일 (또는 오일의 조합 또는 유성 제형)을 캡슐화한다. 오일은 유성 유기 용매 또는 매질 (단일 물질 또는 혼합물)로 구성될 수 있다. 이러한 실시예에서, 오일은 올레산, 피마자유, 옥탄산, 글리세릴 트리부티레이트 및 중쇄 또는 장쇄 트리글리세리드 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0047] 일 실시예에서, 오일 제형은 피마자유를 포함한다. 다른 실시예에서, 오일 제형은 올레산을 포함한다.

[0048] 오일은 다양한 첨가제, 예를 들어 적어도 하나의 계면활성제를 더 포함할 수 있는 오일 제형의 형태일 수 있다. 계면활성제는 올레오일 마크로골-6 글리세리드 (Labrafil M 1944 CS), 폴리소르베이트 80 (Tween® 80), 마크로골 15 히드록시스테아레이트 (Solutol HS15), 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린 (Kleptose® HP), 인지질 (예를 들어, 리포이드(lipoid) 80, 포스포리폰(phospholipon) 등), 틸록사폴(tyloxapol), 폴록사머, 및 이들의 임의의 혼합물로부터 선택될 수 있다.

[0049] 일 실시예에서, 및 상기 설명된 바와 같이, 적어도 하나의 동결보호제를 사용하여 동결건조 동안 나노입자 무결성(integrity)을 보호할 수 있다. 동결보호제의 비-제한적인 예는 PVA 및 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린

(Kleptose® HP)과 같은 시클로덱스트린 및 본 명세서에 기재된 다른 것을 포함한다.

[0050] 본 명세서에 기재된 약물 또는 활성제인 비-친수성 물질은, (NSs 및 NCs 모두에) 사용된 나노입자의 유형에 관계없이, 예를 들어 직접 결합 (화학적 또는 물리적)에 의해, 표면에 흡착하여, 또는 링커 부분을 통해, 상기 나노 입자의 표면과 결합될 수 있다. 대안적으로, 나노입자가 나노구인 경우, 활성제는 나노입자 내에 박힐 수 있다. 나노입자가 나노캡슐의 형태인 경우, 활성제는 나노입자의 코어 내에 함유될 수 있다.

[0051] 일 실시예에서, 비-친수성 물질이 나노입자 내에 함유된 오일 내에, 예를 들어 나노캡슐의 코어 내에 가용화되는 경우, 비-친수성 물질은 코어 내에 가용화될 수 있거나, 고분자 쉘 내에 박힐 수 있거나, 또는 나노캡슐의 표면과 결합될 수 있다. 나노입자가 나노구인 경우, 비-친수성 물질은 고분자 내에 박힐 수 있다.

[0052] 일 실시예에서, 나노입자는 적어도 2개의 상이한 비-친수성 물질과 결합될 수 있으며, 각각은 동일한 방식 또는 상이한 방식으로 나노입자에 결합된다. 다수의 활성제, 예를 들어 적어도 2개의 비-친수성 물질인 경우, 제제는 모두 비-친수성 물질일 수 있거나 또는 이들 중 적어도 하나는 비-친수성 물질일 수 있다. 비-친수성 물질의 조합은 여러 생물학적 표적의 표적화 또는 특정 표적에 대한 친화도 증가를 허용한다.

[0053] 적어도 하나의 비-친수성 물질과 함께 제공되는 추가 활성제는, 비타민, 단백질, 항-산화제, 펩티드, 폴리펩티드, 지질, 탄수화물, 호르몬, 항체, 단일클론 항체, 치료제, 항생제, 백신, 예방제, 진단제, 조영제, 핵산, 기능식품제, 약 1,000 Da 미만 또는 약 500 Da 미만의 분자량의 소분자, 전해질, 약물, 면역제, 거대분자, 생체거대분자, 진통제 또는 항염증제; 구충제(anthelmintic agent); 항-부정맥제(anti-arrhythmic agent); 항-박테리아제; 항-응고제; 항-우울제; 항당뇨제; 항-간질제; 항-진균제; 항-통풍제(anti-gout agent); 항-고혈압제; 항-말라리아제; 항-편두통제; 항-무스카린제; 항-종양제 또는 면역억제제; 항-원충제(anti-protazoal agent); 항-갑상선제; 불안 완화제, 진정제, 최면제 또는 신경 이완제; 베타-차단제; 심장 강심제(cardiac inotropic agent); 코르티코스테로이드; 이뇨제; 항-파킨슨제; 위장관제(gastro-intestinal agent); 히스타민 H1-수용체 길항제; 지질 조절제; 니트레이트 또는 항-협심증제(anti-anginal agent); 영양제; HIV 프로테아제 저해제; 오피오이드 진통제; 캡사이신 성 호르몬; 세포독성제; 및 자극제, 및 상기한 것들의 임의의 조합으로부터 선택될 수 있다.

[0054] 또한, 나노입자는 적어도 하나의 비-활성제와 결합될 수 있다. 대부분의 일반적인 용어로, 비-활성제는 직접적인 치료 효과가 없지만, 나노입자의 하나 이상의 특성을 변경할 수 있다. 일 실시예에서, 비-활성제는 나노입자의 적어도 하나의 특성, 예를 들어 크기, 극성, 소수성/친수성, 전하, 반응성, 화학적 안정성, 청소율(clearance) 및 표적화 등 중 하나 이상을 조절하도록 선택될 수 있다. 비-활성제는 특히 나노입자의 침투성을 개선하고, 액체 현탁액에서 나노입자의 분산성을 개선하며, 동결건조 및/또는 재구성 동안 나노입자를 안정화시킬 수 있다. 일 실시예에서, 적어도 하나의 비-활성제는 적어도 하나의 비-치료적 및/또는 비-전신적 효과를 유도, 향상, 정지 또는 감소시킬 수 있다.

[0055] 본 명세서에 언급된 바와 같이, 본 발명은 다수의 PLGA 나노입자 및 비-친수성 물질(들)을 포함하는 동결건조된 편상(flaky) 분산성 건조 분말을 제공한다. 분말은 물기가 없는 미립자 형태일 수 있는 고체 물질이다. 본 명세서에서 사용된 용어 "건조"는 대안 중 어느 하나를 나타낸다: 물 또는 수용액이 아닌 수화 수(water of hydration)만을 포함하는, (1%-5% 이하의 물을 포함하는) 물기가 없는, 물이 없는, 물이 결여된, 실질적으로 건조. 일 실시예에서, 물의 양은 7%wt를 초과하지 않는다. 분말, 즉 분말의 총 중량에 대해 3 중량% 미만, 또는 2 중량% 미만, 또는 1 중량% 미만의 물 함량, 및/또는 임의의 첨가된 물, 즉 분말에 존재할 수 있는 물은 특히 더 결합된 물, 예를 들어 염의 결정화 수 또는 분말의 생성에 사용된 출발 물질에 의해 흡수된 미량의 물을 함유하지 않은 조성을 갖는 분말은 무수일 수 있다.

[0056] 당해 기술분야에 알려진 바와 같이, 동결건조는 제형을 동결시킨 다음 주변 압력을 감소시켜 동결된 제형이 고체상에서 기체상으로 직접 휘발, 증발 또는 승화하여 정의된 바와 같이 건조 분말을 남김으로써 제형의 동결-건조를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 건조 동결건조된 분말은 건조된 분말이다. 일 실시예에서, 분말은 예를 들어 나노분무에 의한 동결건조가 아닌 다른 방법에 의해 동일한 정도의 건조로 얻어질 수 있다 (예를 들어, 나노 분무 건조기 B-90 (Buchi, Flawill, Switzerland) 이용). 따라서, 본 발명은 동결건조에 의해 얻어지지 않는 건조 분말도 제공한다.

[0057] 본 발명의 건조 분말은 약학적으로 허용가능한 재구성 액체 매질 또는 담체에 분말을 첨가함으로써 재-분산될 수 있는 형태로 ***재구성 가능한*** 것으로 제공된다. 본 발명의 분말의 독특성(uniqueness)은 나노입자 담체로부터 활성 성분을 분리함으로써 분해에 대한 안정성에 있으며, 또한 안정적이고 다양한 방식으로 투여 및 사용될 수

있는 다양한 재구성된 액체 제형을 조정하는 능력에 있다. 재구성 매질의 예는 물, 주사용 수, 주사용 정균수(bacteriostatic water), 염화나트륨 용액 (예를 들어, 0.9% (w/v) NaCl), 글루코오스 용액 (예를 들어, 5% 글루코오스), 액체 계면활성제, pH-완충 용액 (예를 들어, 인산염 완충 용액), 실리콘-계 용액 등을 포함한다.

[0058] 일 실시예에 따르면, 재구성 매질은 본 명세서에 기재된 바와 같이 물이 없거나 또는 물로부터 건조된 무수 실리콘-계 담체이며, 따라서 오랜 기간 동안 나노입자를 온전하게 유지한다. 실리콘-계 담체는, 나노입자의 화물(cargo)이 방출되기 시작하는 시점인 나노입자가 물과 접촉할 때까지, 나노입자의 화물의 방출을 허용하지 않는다. 이 방출은 실리콘-계 제형을 피부에 도포하고 나노입자가 피부층에 침투한 후에 발생할 수 있다.

[0059] ***실리콘-계 담체***는 액체, 점성-액체 또는 반-고체 담체이며, 일반적으로 실리콘 빌딩 블록을 포함하는 고분자, 올리고머 또는 단량체이다. 일 실시예에서, 실리콘-계 담체는 적어도 하나의 실리콘 고분자 또는 실리콘 고분자, 올리고머 및/또는 단량체 중 적어도 하나의 제형이다. 일 실시예에서, 실리콘-계 담체는 시클로펜타실록산, 시클로헥사실록산(cyclohexasiloxane) (예를 들어, ST-시클로메티콘 (Cyclomethicone) 56-USP-NF), 폴리디메틸실록산 (예를 들어, Q7-9120 실리콘 350 cst (폴리디메틸실록산)-USP-NF 엘라스토머 10) 등을 포함한다.

[0060] 일 실시예에서, 실리콘-계 담체는 시클로펜타실록산 및 디메티콘 교차고분자 (crosspolymer)를 포함한다. 일 실시예에서, 실리콘-계 담체는 시클로펜타실록산 및 시클로헥사실록산을 포함한다.

[0061] 일 실시예에서, 재구성 가능한 고체는 각각 중량비 80:15:3, w/w의 시클로헥사실록산, 시클로펜타실록산 및 폴리디메틸실록산 고분자를 포함하는 반-고체 실리콘 엘라스토머 혼합물에서 혼합될 수 있다. 일 실시예에서, 적어도 하나의 비-친수성 물질을 포함하는 동결건조된 나노입자의 2%가 각각 중량비 80:15:3, w/w의 시클로헥사실록산, 시클로펜타실록산 및 폴리디메틸실록산 고분자를 포함하는 제형에 분산되어, 0.1%, w/w의 활성 최종 농도를 야기한다.

[0062] 일 실시예에서, 이러한 제형은 벤조산 및/또는 염화 벤잘코늄과 같은 적어도 하나의 보존제를 더 포함한다.

[0063] 일 실시예에서, 재구성 매질은 수-계이다.

[0064] 권고하는 대로, 활성 성분에 따라 즉시 사용하거나 또는 7일 내지 28일의 짧은 기간 내에 사용하기 위한 제형의 경우, 예를 들어, 타크로리무스 및 항생제와 같은 물-민감성 활성 성분의 경우, 제형은 정의된 바와 같이 본 발명의 분말 및 적어도 하나의 수-계 담체를 포함하는 수성 또는 수-계 매질에서 형성될 수 있다. 예를 들어, 이러한 제형은 안구 제형, 예를 들어 점안액, 또는 주사용 제형일 수 있다. 제형이 즉시 사용 가능한(ready-for-use) 제형으로 장기간 사용 또는 저장을 목적으로 하는 경우, 분말은 무수 실리콘-계 액체 담체에서 재구성될 수 있다.

[0065] 본 발명의 제형의 안정성은, 특히 제형의 구성, 사용된 특정 활성 성분(들), 분말이 재구성되는 매질 및 저장 조건에 따라 달라진다. 이론에 얽매이지 않고, 일반적으로 말하면, 제형의 안정성은 2가지 상이한 방향에서 보고 시험할 수 있다:

[0066] 1/ 하기에 제공된 자료에 나타낸 바와 같이, 시간 경과에 따른 동결건조된 편상 분말 내에 함유된 활성 성분(들), 예를 들어, 유성 코어 내의 시클로스포린과 관련된 안정성. 입증된 바와 같이, 이러한 제형은 피마자유 코어 NCs에서는 안정적이나, 올레산 코어 NCs에서는 안정적이지 않다 (표 5 및 표 8). 6개월 동안 37℃에서 시간 경과에 따른 안정성 시험은, 오일이 올레산인 경우 누출 및 활성 함량이 초기값에서 벗어난 반면 피마자유에서는 활성 성분이 화학적으로 안정적이고 누출 증가가 없음을 나타내었음을 시사한다. 이것은 이러한 동결건조된 분말이 일반적으로 실온에서 적어도 약 3년 동안 저장될 수 있음을 의미한다.

[0067] 2/ 안정성은 국소 제형에 분산된 NCs이다. 시험 조건 하에서, 3가지 상이한 온도에서 6개월 동안, NCs 내 피마자유만을 사용하면, 활성 성분, 예를 들어, CsA는 안정적으로 유지되었고, 국소 제형의 외부 상(external phase)으로 10% 이상 누출되지 않았다.

[0068] 따라서, 본 발명은 다수의 NC 나노입자를 포함하는 피부 (국소) 제형을 더 제공하며, 각각은 유성 코어 내 적어도 하나의 비-친수성 물질을 포함하고, 코어는 피마자유를 포함한다.

[0069] 안구 또는 주사용 제형이 관련된 경우, 건조 편상 NCs는 국소 적용을 위해 제형화된 NCs와 유사하게 작용한다 (하기 표 10 및 17). 멸균 수성 제형인 타크로리무스의 건조 NCs의 분산액인 분산된 제형이 안구 제형과 관련된 경우, 안정성은 활성 성분 및 이의 물에 대한 민감도에 따라 7일 내지 28일 동안 유지된다.

[0070] 예를 들어, 동결건조물(lyophilate) 재구성의 경우, 1.45% 글리세린 용액에서 NCs 재구성 안정성 (60 mg의 동결

건조된 NCs를 350uL의 물 내 1.45% 글리세린에 재-현탁하여 등장성 제형을 얻었다. 안정성은 실온에서 평가하였다):

	초기	7 일 후	14 일 후	21 일 후
크기(nm)	171.6	177.7	179.5	168.5
PDI	0.13	0.127	0.118	0.153
Tac 함량 (%)	0.57	0.57	0.56	0.51
비고	응집체 없음	응집체 없음	응집체 없음	응집체

[0071]

[0072] 2.5% 덱스트로오스 용액에서 NCs 재구성 안정성 (60 mg의 동결건조된 NCs를 350uL의 물 내 2.5% 덱스트로오스에 재-현탁하여 등장성 제형을 얻었다. 안정성은 실온에서 평가하였다):

	초기	7 일 후	14 일 후	21 일 후
크기(nm)	171.6	181	180.9	169.9
PDI	0.13	0.117	0.123	0.163
함량 (%)	0.57	0.57	0.55	0.50
비고	응집체 없음	응집체 없음	응집체 없음	응집체

[0073]

[0074] 상기 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 활성 물질, 예를 들어 타크로리무스는 실온에서 적어도 2주 동안 이 수성 제형에서 안정적으로 유지되었다.

[0075] 따라서, 본 발명은 제형 재구성의 시점으로부터 7일 내지 28일 동안 사용하기 위한 본 발명의 분말을 포함하는 안정된 수성 제형을 더 제공한다. 상기 나타낸 바와 같이, 본 발명은 예를 들어 적어도 2주의 안정된 무수 제형을 더 제공한다.

[0076] 담체의 선택은 부분적으로 활성제와의 호환성 (사용되는 경우), 및 조성물의 투여에 사용되는 특정 방법에 의해 결정될 것이다. 따라서, 액체 담체에서 분말의 재구성 후에 얻은 약학 조성물 (또는 제형)은 경구, 장, 협측(buccal), 비강, 국소, 경상피(transepithelial), 직장, 질, 에어로졸, 경점막, 표피, 경피, 진피, 안과, 폐, 피하, 피내(intradermal) 및/또는 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0077] 일 실시예에서, 제형은 국소용으로 구성되거나 또는 조정된다. 알려진 바와 같이, 인간의 피부는 3개의 주요군 층으로 나눌 수 있는 수많은 층으로 구성되어 있다: 피부의 외부 표면에 위치한 각질층, 표피 및 진피. 각질층은 세포외 지질-풍부 매트릭스에 있는 케라틴-충전된 세포층이며, 이는 사실 피부로의 약물 전달에 대한 주요 장벽이지만, 표피층과 진피층은 생존가능한 조직이다. 표피는 혈관이 없으나, 진피는 경상피 전신 분포를 위한 치료제를 전달할 수 있는 모세관 고리를 함유한다. 약물의 경피 전달이 선택 경로인 것처럼 보이지만, 이 경로를 통해 제한된 수의 약물만 투여될 수 있다. 매우 다양한 약물을 경피적으로 전달할 수 없는 것은 주로 저 분자량 (분자량이 500 Da 이하인 약물), 친유성 및 소량의 약물에 대한 요구사항에 따라 달라진다.

[0078] 본 발명의 나노입자는 이러한 장애물을 분명히 극복하였다. 상기 언급한 바와 같이, 나노입자는 매우 다양한 분자량 및 친수성의 시클로스포린 및 기타 활성제와 같은 활성 성분을 보유할 수 있다. 본 발명의 전달 시스템은 피부층 중 적어도 하나인, 각질층, 표피층 및 진피층을 가로질러 적어도 하나의 비-친수성 제제의 수송을 허용한다. 이론에 얽매이지 않고, 각질층을 가로질러 치료제를 수송하는 전달 시스템의 능력은 온전한 시스템 또는 해리된 치료제 및/또는 수화된 케라틴 층을 통해 더 깊은 피부층으로 해리된 나노입자의 확산을 포함하는 일련의 결과에 따라 달라진다.

[0079] 국소 제형은 크림, 연고, 무수 에멀젼, 무수 액체, 무수 겔, 분말, 플레이크 또는 과립으로부터 선택된 형태일 수 있다. 조성물은 국소, 경상피, 표피, 경피, 및/또는 진피 투여 경로용으로 제형화될 수 있다.

[0080] 일 실시예에서, 제형은 적어도 하나의 비-친수성 제제의 경피 투여에 적합하다. 이러한 실시예에서, 제형은 피

부층, 특히 각질층을 가로질러 비-친수성 제제의 국소 전달용으로 제형화될 수 있다. 비-친수성 제제의 전신 효과를 원하는 경우, 경피 투여는 피험자의 순환계로 제제를 전달하도록 구성될 수 있다.

[0081] 예를 들어, 국소 적용을 위한 본 발명의 제형에서 나노입자의 안정성을 증가시키는 것은 본질적으로 또는 완전히 물이 없는 담체 조성물을 제형화함으로써 달성될 수 있다. 따라서, 물이 없는 또는 무수인 국소 조성물은 실리콘-계 담체에서 설계될 수 있다.

[0082] 유사하게, 제형 조성물은 적어도 하나의 비-친수성 제제의 안과 투여용으로 구성될 수 있다. 일 실시예에서, 안과 제형은 주사용 또는 점안액용으로 구성될 수 있다.

[0083] 경구 투여, 주사에 의한 투여, 드립(drip)에 의한 투여, 액적(drops) 형태의 투여, 또는 나노입자의 현탁액의 형성을 필요로 하는 임의의 다른 형태의 투여용으로 설계된 제형에서, 용액은 식염수, 물 또는 약학적으로 허용 가능한 유기 매질로 구성될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0084] 나노입자의 양 또는 농도, 및 나노입자 내 적어도 하나의 비-친수성 제제 또는 본 발명의 제형 내 전체의 상응하는 양 또는 농도는, 양이 원하는 유효량의 비-친수성 제제를 피험자의 표적 장기(target organ) 또는 조직에 전달하기에 충분하도록 선택될 수 있다. 적어도 하나의 비-친수성 제제의 "***유효량***"은 제제의 양이 원하는 치료 효과를 달성하는데 효과적일뿐만 아니라 정의된 바와 같이 안정된 전달 시스템을 달성하는데도 효과적이도록, 당해 기술분야에 알려진 이러한 고려 사항에 의해 결정될 수 있다. 따라서, *특히*, 사용된 특정 제제, 사용된 특정 담체 시스템, 치료할 질환의 유형 및 중증도, 및 치료 요법에 따라, 각 제형은 제형시뿐만 아니라 더 중요하게는 투여시에도 효과적인 미리결정된 양을 함유하도록 조정될 수 있다. 유효량은 일반적으로 적당하게 설계된 임상 시험 (용량 범위 연구)에서 결정되며, 당해 기술분야에 정통한 사람은 유효량을 결정하기 위해 이러한 시험을 적절히 수행하는 방법을 알고 있을 것이다. 일반적으로 알려진 바와 같이, 유효량은 수용체에 대한 리간드의 친화도, 이의 체내 분포 프로파일, 체내 반감기와 같은 다양한 약리학적 매개변수를 포함하는 다양한 인자, 원치 않는 부작용, 만일 있다면, 연령 및 성별과 같은 인자 등에 따라 달라진다.

[0085] 약학 제형은 이들이 표적 약물 전달 및 제어 방출 방식 중 하나 이상, (또한 감소된 청소율로 인해) 작용 부위에서 약물 생체이용률의 향상, 투여 빈도의 감소, 및 부작용의 최소화를 용이하게 하도록, 상이한 또는 동일한 분산 물질을 이용하여 상이한 또는 동일한 분산 특성의 다양한 나노입자 유형 또는 크기를 포함할 수 있다. 전달 시스템으로 작용하는 제형 및 나노입자는 원하는 비-친수성 활성제를 적어도 약 12시간 이상, 또는 일 실시예에서, 적어도 약 24시간, 적어도 약 48 시간, 또는 다른 실시예에서, 며칠 동안, 이들의 제어 방출을 허용하는 속도로 전달할 수 있다. 이와 같이, 전달 시스템은 약물 전달, 유전자 요법, 의학적 진단, 및 예를 들어, 피부 병리학, 암, 병원체-매개 질환, 호르몬-관련 질환, 장기 이식과 관련된 반응-부산물, 및 기타 비정상 세포 또는 조직 성장에 대한 의학적 치료와 같으나 이에 한정되지 않는 다양한 적용에 사용될 수 있다.

[0086] 본 발명은 동결건조된 건조 분말을 얻는 방법을 더 제공하며, 분말은 다수의 PLGA 나노입자를 포함하고, 각 나노입자는 적어도 하나의 비-친수성 물질 (약물)을 포함하며, 방법은 PLGA 나노입자의 현탁액을 동결건조하여 건조 동결건조된 분말을 제공하는 단계를 포함한다.

[0087] 일 실시예에서, 방법은

[0088] - 적어도 하나의 소수성 물질 (약물)을 포함하는 PLGA 나노입자의 현탁액을 얻는 단계; 및

[0089] - 상기 현탁액을 동결건조하여 건조 동결건조된 편상 분말을 제공하는 단계

[0090] 를 포함한다.

[0091] 일 실시예에서, 적어도 하나의 비-친수성 물질을 포함하는 PLGA 나노입자는 PLGA를 적어도 하나의 계면활성제, 적어도 하나의 오일 및 적어도 하나의 비-친수성 물질 (예를 들어, 시클로스포린)을 함유하는 적어도 하나의 용매 (예를 들어, 아세톤)에 용해시켜 유기상을 형성하는 단계; 유기상을 수상 (유기 매질 또는 제형)에 도입하여 상기 나노담체를 포함하는 현탁액을 얻는 단계에 의해 얻어진다.

[0092] 일 실시예에서, 현탁액은 예를 들어, 증발에 의해 농축되고, 이어서 적어도 하나의 동결보호제로 처리되며 (예를 들어, 1:1의 부피비로 10% HPβCD 용액으로 희석시킴), 동결 건조된다.

[0093] 이렇게 동결건조된 고체는 물 함량이 5%를 초과하지 않으며, 재구성 가능한 분말로 더 사용될 수 있다.

[0094] 본 발명은 건조 동결건조된 분말 및 적어도 하나의 액체 담체; 및 사용 설명서를 포함하는 키트 또는 상업용 패키지를 더 제공한다. 일 실시예에서, 액체 담체는 본 명세서에 언급된 바와 같이 물 또는 수용액 또는 무수 (물

이 없는) 액체 담체이다.

[0095] 본 명세서에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 제형은 일반적으로 상이한 비-친수성 약물 실재물과 함께 사용될 수 있다. 사용된 비-친수성 약물에 따라, 제형은 다양한 질환 및 질병의 치료 또는 예방 방법에 사용될 수 있다. 일 실시예에서, 약학 제형은 본 명세서에 구체적으로 언급된 하나 이상의 비-친수성 물질로 일반적으로 치료할 수 있는 질병 또는 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 질환 또는 질병은 이식편-대-숙주 질환(graft-versus-host disease), 궤양성 대장염, 류마티스성 관절염, 건선, 동전각막염(nummular keratitis), 안구 건조증 증상, 후부 포도막염(posterior uveitis), 중간 포도막염(intermediate uveitis), 아토피성 피부염, 기무라병(Kimura diseas), 괴저성 농피증(pyoderma gangrenosum), 자가면역 두드러기(autoimmune urticaria), 전신성 비만세포증 (systemic mastocytosis)으로부터 선택된다.

[0096] 본 발명의 나노입자 및 약학 제형은 물리적 장벽에 의해 보호되는 조직에 특히 유리할 수 있다. 이러한 장벽은 피부, 혈액 장벽 (예를 들어, 혈액-흉선(blood-thymus), 혈액-뇌, 혈액-공기, 혈액-고환 등), 장기 외막 등일 수 있다. 장벽이 피부인 경우, (시클로스포린이 다른 활성제와 조합될 때) 본 명세서에 기재된 약학 제형으로 치료될 수 있는 피부 병리학은, 항진균성 장애 또는 질환, 여드름, 건선, 아토피성 피부염, 백반증(vitiligo), 켈로이드(keloid), 화상, 흉터, 건조증 (xerosis), 어린선(ichthoyosis), 각화증(keratosis), 각질피부증(keratoderma), 피부염(dermatitis), 소양증(pruritis), 습진(eczema), 통증, 피부암 및 굳은살 (callus)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0097] 본 발명의 약학 제형은 피부병을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다. 일 실시예에서, 피부병은 피부염, 습진, 접촉성 피부염, 알러지성 접촉성 피부염, 자극성 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 유아 습진(infantile eczema), 베스니에 가려움발진(Besnier's prurigo), 알러지성 피부염, 굽힘쪽 습진(flexural eczema), 범발성 신경피부염(disseminated neurodermatitis), 지루성(seborrheic) (또는 지루(seborrhoeic)) 피부염, 유아 지루성 피부염, 성인 지루성 피부염, 건선, 신경피부염, 옴(scabies), 전신성 피부염, 포진상 피부염(dermatitis herpetiformis), 입주위 피부염(perioral dermatitis), 원반모양 습진(discoid eczema), 화폐상 피부염(Nummular dermatitis), 주부 습진(Housewives' eczema), 한포진(Pompholyx dyshidrosis), 손바닥과 발바닥의 난치성 농포성 발진(Recalcitrant pustular eruptions of the palms and soles), 바버의 농포성 건선(Barber's or pustular psoriasis), 전신 박리성 피부염(Generalized Exfoliative Dermatitis), 정체 피부염(Stasis Dermatitis), 정맥류 습진(varicose eczema), 이한성 습진(Dyshidrotic eczema), 만성 단순 태선(Lichen Simplex Chronicus) (국소성 긁기 피부염 (Localized Scratch Dermatitis); 신경피부염), 편평 태선(Lichen Planus), 진균 감염(Fungal infection), 칸디다 간찰진(Candida intertrigo), 두부 백선(tinea capitis), 백점병(white spot), 파나우(panau), 백선(ringworm), 무좀(athlete's foot), 모닐리아증(moniliasis), 칸디다증(candidiasis); 피부사상균 감염 (dermatophyte infection), 수포성 피부염(vesicular dermatitis), 만성 피부염 (chronic dermatitis), 해면상 피부염(spongiotic dermatitis), 베나타 피부염 (dermatitis venata), 비달 태선(Vidal's lichen), 피부건조 습진 피부염 (asteatosis eczema dermatitis), 자가감작 습진 (autosensitization eczema), 피부암 (비-흑색종(non-melanoma)), 진균 및 미생물 내성 피부 감염(fungal and microbial resistant skin infections), 피부 통증 또는 이들의 조합 중에서 선택될 수 있다.

[0098] 추가 실시예에서, 본 발명의 제형은 뾰루지(pimples), 여드름(acne vulgaris), 모반(birthmarks), 주근깨(freckles), 문신(tattoos), 흉터(scars), 화상, 일광 화상, 주름, 미간 주름(frown lines), 눈가의 잔주름(crow's feet), 담갈색 반점(cafe-au-lait spots); 일 실시예에서 지루 각화증(Seborrhoeic keratosis), 흑색 구진성 피부염(Dermatosis papulosa nigra), 연성 섬유종(Skin Tags), 피지선 과형성(Sebaceous hyperplasia), 한관종(Syringomas), 안검황색종 (Xanthelasma), 또는 이들의 조합인 양성 피부 종양; 양성 피부 성장(benign skin growths), 바이러스성 사마귀(viral warts), 기저귀 칸디다증(diaper candidiasis), 모낭염(folliculitis), 절종(furuncles), 부스럼(boils), 큰종기 (carbuncles), 피부의 진균 감염, 적상 저색소증(guttate hypomelanosis), 탈모 (hair loss), 농가진(impetigo), 기미(melasma), 전염성 연속종(molluscum contagiosum), 주사(rosacea), 옴, 대상포진(shingles), 단독(erysipelas), 홍색음선(erythrasma), 대상 포진(herpes zoster), 수두-대상포진 바이러스(varicella-zoster virus), 수두(chicken pox), 피부암 (예를 들어, 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma), 기저 세포 암종(basal cell carcinoma), 악성 흑색종), 전암성 성장(premalignant growths) (예를 들어, 선천성 기태(congenital moles), 광선 각화증(actinic keratosis)), 심마진(urticaria), 두드러기(hives), 백반증 (vitiligo), 어린선(Ichthyosis), 흑색가시 세포증(Acanthosis Nigricans), 수포성 유천포창(Bullous Pemphigoid), 티눈 및 굳은살(Corns and Calluses), 비듬 (Dandruff), 피부 건조증, 결절성 홍반(Erythema Nodosum), 그레이브스 피부병증 (Graves' Dermopathy), 헤노흐-쉔라인 자

반증(Henoch-Schonlein Purpura), 모공성 각화증(Keratosis Pilaris), 광택 태선(Lichen Nitidus), 편평 태선(Lichen Planus), 경화성 태선(Lichen Sclerosus), 비만세포증(Mastocytosis), 전염성 연속종(Molluscum Contagiosum), 장미색 비강진(Pityriasis Rosea), 모공성 홍색 비강진(Pityriasis Rubra Pilaris), PLEVA, 또는 무카-하베르만병(Mucha-Habermann Disease), 수포성 표피박리증(Epidermolysis Bullosa), 지루성 각화증(Seborrheic Keratoses), 스티븐스-존슨 증후군(Stevens-Johnson Syndrome), 천포창 (Pemphigus), 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[0099] 추가 실시예에서, 제형은 눈 영역과 관련된 피부병, 예를 들어 한관종, 안검황색종, 농가진, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 또는 이들의 조합; 두피, 손톱과 관련된 피부병, 예를 들어 박테리아, 진균, 효모 및 바이러스에 의한 감염, 조갑 주위염(Paronychia), 또는 건선; 입 영역과 관련된 피부병, 예를 들어 구강 편평태선(oral lichen planus), 입술 발진(cold sores) (헤르페스 잇몸 구내염 (herpetic gingivostomatitis)), 구강 백반증(oral leukoplakia), 구강 칸디다증 (oral candidiasis), 또는 이들의 조합; 또는 이들의 조합을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[0100] 일부 실시예에 따르면, 약학 조성물은 탈모증(alopecia)과 관련된 적어도 하나의 증상을 치료 또는 개선하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0101] 본 명세서에 개시된 주제를 더 잘 이해하고 그것이 실제로 수행될 수 있는 방법을 예시하기 위하여, 실시예는 이제 첨부된 도면을 참조하여 비-제한적인 예로서만 기재될 것이다.

도 1a-e는 CsA 담지된 NCs의 특성을 제공한다. (**A**) 결정화된 CsA (i), 동결건조된 CsA NCs (ii) 및 동결건조된 블랭크 NCs (iii)의 XRD 패턴. CsA-담지된 PLGA NCs의 투과 전자 현미경 영상 (**B-C**, Bar=100nm). 동결 파쇄 후 무수 실리콘 기제에 포함된 동결건조된 CsA-담지된 NCs (**D**, **D(i)**) 및 동결보호제 (**E**)의 Cryo-SEM 묘사. 척도 바(Scale bars)=1μm (**D**), 200nm (**D(i)**), 2μm (**E**).

도 2a-c는 CsA NCs의 피부 생체분포를 나타낸다. 프란츠(Franz) 세포에서 침투 분석에 의해 결정된 피부 구획에서 [^{3}H]-CsA 분포. 다양한 오일 조성 CsA-담지된 NCs 및 각각의 오일 대조군의 배양 후 6 및 24 시간에, (**a**) SC 상부 층, (**b**) 하부 SC 및 표피 및 (**c**) 진피. 값은 평균 ± SD 이다. N = 5. OL 및 LA는 각각 올레산 및 라브라필을 의미한다.

도 **3a-d**는 프란츠 세포에서 침투 분석에 의해 결정된 피부 구획에서 [^{3}H]-CsA 분포를 나타낸다. 다양한 오일 조성 CsA-담지된 NCs 및 각각의 오일 대조군의 배양 후 6 및 24 시간에, (**a**) SC 상부 층, (**b**) 하부 SC 및 표피, (**c**) 진피 및 (**d**) 수용체 구획. 값은 평균 ± SD 이다. N=3.

도 4는 마우스에서 상이한 CsA 제형이 접촉성 과민증(CHS)에 미치는 영향을 나타낸다. 단일 처리 (20μg/cm^{2})를 1% 옥사졸론으로 공격하기 전에 복부를 면도한 마우스에 국소 적용하였다. 5일 후 오른쪽 귓불(ear lobe) (0.5% 옥사졸론)에서 귀 반응 유발을 수행하였으며, 오른쪽 귀와 왼쪽 귀의 차이로 귀 부종이 나타났다. 값은 평균 ± SE 이다. N=5. *P<0.05.

도 5는 마스터사이저(MasterSizer)에 의해 얻은 NEs의 액적 크기 분포를 나타낸다.

도 6a-c는 (**a**) NE-6, (**b**) NE-7, (**c**) NE-8의 Cryo-TEM 사진을 제공한다.

도 7a-b는 NEs 및 오일 대조군의 배양 후 24h에, 각막(cornea)/면적 단위에 함유된 타크로리무스 양 (**a**) 및 수용체 유체에서 타크로리무스 농도 (**b**)를 제공한다. 값은 3회 반복실험을 기준으로 평균 ± SD 이다. *P < 0.05 NEs와 오일 대조군 사이.

도 8a-b는 수성 재구성 후 동결건조 (**a**) 전 및 후 (**b**)에 타크로리무스 담지된 나노캡슐의 TEM 사진이다.

도 9a-b는 NCs 및 오일 대조군의 배양 후 24h에, 각막/면적 단위에 함유된 타크로리무스 양 (**a**) 및 수용체 유체에서 타크로리무스 농도 (**b**)를 나타낸다. 값은 6회 반복실험을 기준으로 평균 ± SD 이다. *P<0.05, **P < 0.01 (**a**)에서 NEs와 오일 대조군 사이 및 (**b**)에서 표시된 처리 사이.

도 10은 동결건조된 NC-2 및 NEs의 배양 후 24h에, 수용체 유체에서 타크로리무스 농도를 제공한다. 값은 3회 반복실험을 기준으로 평균 ± SD 이다. *P<0.05, **P < 0.01 NEs와 동결건조된 NC-2 사이.

도 11은 배양된 *ex vivo* 돼지 각막에서 처리 적용 후 72h에 수행된 MTT 생존력 분석을 제공한다. 대조군은 미처리 각막을 나타내고, 음성 대조군은 라브라솔 (Labrasol)-처리된 각막을 나타낸다. 값은 3회 반복실험을 기준으로 평균 ± SD 이다.

도 12는 72h 동안 배양된 조직학적 *ex vivo* 돼지 각막에 대한 상피 두께 치수를 나타낸다. 값은 3회 반복실험을 기준으로 평균 ± SD 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102] **I. 실험**

[0103] ***1) 국소 제제에 포함된 활성제 및 부형제***

물질	회사
시클로스포린 A (CsA) USP	Teva Czech industries S.R.O. (오파바-코마로프, 체코 공화국)
PLGA 100kDa (LA:GA 의 50:50 혼합물의 폴리-D,L-락티드-코-글리콜리드) 목록에는 없지만 Trelstar*에서 판매됨 (US 제품)	Lactel (듀렉트 코포레이션, 버밍엄, USA)
올레산 USP 또는 피마자유 USP	각각, 피셔 화학, USA 또는 라모뜨, 프랑스
라브라필 M 1944 CS (올레오일 마크로골-6 글리세리드 EP), USP-NF	Gatefosse (생 프리스트 세덱스, 프랑스)
Tween® 80 (폴리소르베이트 80), USP	Ziv Chemical Ltd (아슈켈론, 이스라엘)
Solutol® HS 15 (마크로골 15 히드록시스테아레이트), USP	BASF (루트비히스하펜, 독일)
Kleptose® HP ((2-히드록시프로필)-β-시클로덱스트린), USP-NF	로케트 (레스트렘 세덱스, 프랑스)
ST-시클로메티콘 56- USP-NF (시클로펜타실록산 및 시클로헥사실록산)	다우 코팅 (세네페, 벨기에)
Q7-9120 실리콘 350 cst (폴리디메틸실록산)-USP-NF	다우 코팅 (세네페, 벨기에)
엘라스토머 10 (시클로펜타실록산 및 디메티콘 교차고분자), DMF	다우 코팅 (세네페, 벨기에)

*TRELSTAR DEPOT 는 트립토렐린 파모에이트(triptorelin pamoate) (펩티드 염기로 3.75 mg), 170 mg 폴리-d,l-락티드-코-글리콜리드, 85 mg 만니톨, USP, 30 mg 카복시메틸셀룰로오스 나트륨, USP, 2 mg 폴리소르베이트 80, NF 를 함유하는 단일-용량 바이알로 공급되는 멸균, 동결건조된 생분해성 미세과립 제형이다. 재구성 후 매달 근육내 주사.

[0104]

[0105] ***2) 블랭크 및 약물-담지된 NCs의 제조***

[0106] 잘-확립된 용매 치환 방법에 따라 다양한 PLGA 나노담체를 제조하였다 (Fessi et al., 1989). 간략하게, 고분자 폴리 락틱-코-글리콜산 (PLGA) 100K (락트산:글리콜산의 50:50 혼합물)를 0.2% w/v Tween® 80 및 0.6% w/v의

농도에서 상이한 조성의 최대 1% w/v 상이한 오일의 혼합물을 함유하는 아세톤에 용해시켰다. CsA를 다양한 농도로 유기상에 첨가하고, 0.1% w/v Solutol® HS 15를 함유하는 수상에 첨가하여 NCs의 형성을 야기하였다. 현탁액을 15분 동안 900 rpm에서 교반한 다음, 감압 증발에 의해 초기 수성 매질의 80%를 증발시켜 농축시켰다. 수성 매질에 분산된 NCs를 엡실론 2-6 LSC 파일럿 동결 건조기 (Martin Christ, Germany)에서 동결건조하기 전에, 1:1의 부피비로 10% HPβCD 용액으로 희석시켰다. 마지막으로, 블랭크 및 CsA의 반-고체 무수 제제는 각각 중량비 80:15:3:2의 반-고체 실리콘 엘라스토머 혼합물, 시클로헥사실록산 (및) 시클로펜타실록산, 폴리디메틸실록산 고분자 및 동결건조된 블랭크 NC 또는 CsA NCs로 구성되었다. 사실, 2%의 동결건조된 CsA NCs를 약용 제형에 분산시켜 최종 시험된 제형에서 0.1%, w/w의 CsA의 최종 농도를 야기하였다.

[0107] 또한, 벤조산 및/또는 염화 벤잘코늄도 보존 목적으로 포함될 수 있다.

[0108] ***3) CsA NCs 단독 및 국소 제형의 물리화학적 평가 프로토콜***

[0109] **수성 현탁액에 농축된 NCs의 물리화학적 평가 (PLGA 농도: 15mg/mL)**

[0110] *3.1) 입자-크기 및 제타 전위 측정*

[0111] NCs의 평균 직경 및 제타 전위는 25℃에서 말베른 제타사이저(Malvern's Zetasizer) (나노 ZSP)를 이용하여 특징지워졌다. 시료의 제조를 위해, 10μL의 농축 분산액을 990μL HPLC 물에 희석시켰다.

시료	
물질	폴리스티렌 라텍스
분산제	물
일반 옵션	크기: Mark-Houwink 매개변수 (시료 점도로 분산제 점도 사용) 제타: Model Smoluchowski (시료 점도로 분산제 점도 사용)
온도	25°C 평형 시간 (s): 120
세포	일회용 접이식 모세관 세포(Disposable folded capillary cells) DTS1070
측정	
크기: 173°C 후방산란(Backscatter) (NIBS 디폴트) 측정 기간: 자동 측정 횟수:3 측정 사이의 지연 (초):0 제타: 측정 기간: 자동 최소 실행:10 최대 실행:100 측정 횟수:3 측정 사이의 지연 (초):0	

[0112]

[0113] *3.2) CsA 담지(loading) 효율 측정*

[0114] 10μL의 농축 분산액을 990μL 아세토니트릴 (HPLC 등급) 및 CsA에 희석시켰다. CsA의 양은 후술하는 바와 같이 HPLC로 정량화하였다 (인자 희석 x 100).

[0115] ***4) 동결건조된 NCs의 물리화학적 평가***

[0116] *4.1) 입자-크기 및 제타 전위 측정*

[0117] NCs의 평균 직경 및 제타 전위는 25℃에서 말베른 제타사이저 (나노 ZSP)를 이용하여 특징지워졌다. 시료의 제조를 위해, 약 20 mg의 동결건조된 NCs를 1mL HPLC 물에 용해시켰다. 그 다음, 10μL의 재구성된 동결건조된 NCs를 990μL HPLC에 희석시켰다.

[0118] *4.2) 물 함량 측정*

[0119] 동결건조된 NCs 내 물 함량은 칼 피셔(Karl Fischer) 방법 (KF) (Coulometer 831 + KF Termoprep (oven) 860; Metrohm)으로 측정하였다. 오븐을 150℃로 설정하고 오븐의 기류(airflow)를 80ml/min으로 설정하였다. 기기를 오븐 표준 (Hydranal-Water standard KF-oven, 140-160^{0}C, Fluka, Sigma-aldrich)으로 보정하였고, 표류(drift)를 설정하기 위해 매번 사용하기 전에 3회 블랭크를 시험하였다. 시료의 제조를 위해, 약 20 mg의 동결건조된 NCs를 바이알에 칭량하였다.

[0120] *4.3) 아세톤 함량 측정*

[0121] 동결건조된 NCs 내 미량의 아세톤을 확인하기 위하여, 우리는 GCMS 기기에 결합된 90℃ 예열된 바이알의 사강 표본추출(dead space sampling)을 사용하였다.

[0122] *4.4) CsA 함량 측정*

[0123] 30 mg의 동결건조된 NCs를 1mL HPLC 물에 용해시켰다. 그 다음, 10μL의 재구성된 동결건조된 NCs를 490μL HPLC 물에 첨가하였다. 500μL 아세토니트릴도 첨가하였다. 마지막으로, 250uL의 제조된 시료를 750μL 아세토니트릴에 희석하였다 (인자 희석 x 400). CsA의 양은 후술하는 바와 같이 HPLC로 정량화하였다.

[0124] *4.5) 유리 CsA의 측정*

[0125] 프로토콜 검증: 올레산:라브라필에 용해된 약 5mg의 CsA 용액 (28% w/w)을 30mg의 블랭크 동결건조된 NCs에 첨가하였다. 하기에 기재된 대로 트리부티린 (Tributyrin)으로 CsA를 완전히 추출하였으며, 100%의 CsA를 회수하였다.

[0126] 동결건조된 NCs 내 유리 CsA: 동결건조된 NCs를 트리부티린으로 추출하여 유리 CsA를 평가하였다. 약 15mg의 동결건조된 NCs를 4mL 바이알에 칭량한 다음, 2.5mL의 트리부티린을 첨가하였다. 용액을 30초 동안 볼텍싱하고 추가로 원심분리하였다 (14 000 rpm, 10분) (Mikro 200R, Hettich). 그 다음, 100μL의 상청액을 1900μL의 아세토니트릴에 희석시키고, 용액을 볼텍싱한 다음, 원심분리하였다 (14 000 rpm, 10분). 마지막으로, 800 μL의 상청액을 모으고, HPLC로 평가하였다 (인자 희석 x 50). CsA 수준은 동결건조된 NCs에서 비-캡슐화된 CsA를 나타낸다.

[0127] ***5) 무수 국소 제제***

[0128] 80% 엘라스토머 10, 16% ST-시클로메티콘 56-NF 및 4% Q7-9120 실리콘 350 cst로 이루어진 무수 반-고체 기제를 제조하였다. 그 다음, 2% 동결건조된 NCs를 기제에 분산시켰다. 소규모로 제조된 경우, 1800rpm으로 설정된 헤드 교반기를 이용하여 혼합물을 교반하였다. 대규모 제조의 경우, 최대 1kg, IKA® LR 1000 기본 반응기를 사용하였다 (온도 제어 조건에서 100 rpm).

[0129] ***6) 무수 반-고체 제제의 물리화학적 평가***

[0130] *6.1) 입자-크기 및 제타 전위 측정*

[0131] NCs의 평균 직경 및 제타 전위는 25℃에서 말베른 제타사이저 (나노 ZSP)를 이용하여 특징지워졌다. 시료의 제조를 위해, 200 mg의 무수 반-고체 제제를 2mL HPLC 물에 용해시켰다. 시료를 볼텍싱하고 추가로 원심분리하였다 (4 000 rpm, 10분). 그 다음, 1.2mL의 상청액을 모으고, 다시 원심분리하였다 (14 000 rpm, 10분). 마지막으로, 얻어진 상청액 1mL를 모으고 평가하였다.

[0132] *6.2) CsA 함량 측정 (수정 예정)*

[0133] 200 mg의 무수 반-고체 제제를 4mL 바이알 내 2mL DMSO에 용해시켰다. 시료를 37℃에서 30분 동안 흔든 다음, 원심분리하였다 (4 000 rpm, 10분). 1mL의 상청액을 원심분리하였다 (14 000 rpm, 10분). 마지막으로, 10uL의 상청액을 990 μL 아세토니트릴에 희석하였다 (인자 희석 x 200). CsA의 양은 후술하는 바와 같이 HPLC로 정량화하였다.

[0134] *6.3) 유리 CsA의 측정*

[0135] 프로토콜 검증: 올레산:라브라필에 용해된 약 1.5mg의 CsA 용액 (28% w/w)을 500 mg의 실리콘 기제에 첨가하였다. 하기에 기재된 대로 트리부티린으로 CsA를 추출하였다. 적어도 80%의 CsA를 회수하였다.

[0136] 무수 반-고체 제제 내 유리 CsA: 추출 방법을 이용하여 유리 CsA를 평가하였다. 약 500mg의 무수 반-고체 제제를 4mL 바이알에 칭량한 다음, 2.5mL의 트리부티린을 첨가하였다. 용액을 볼텍싱하고 추가로 원심분리하였다 (14 000 rpm, 10분). 그 다음, 100 μL의 상청액을 1900 μL 아세토니트릴에 희석시키고, 용액을 볼텍싱한 다음, 원심분리하였다 (14 000 rpm, 10분). 마지막으로, 800 μL의 상청액을 모으고, HPLC로 평가하였다 (인자 희석 x 50).

[0137] ***7) CsA 정량화를 위한 HPLC 방법***

[0138] 펌프, 자동시료주입기(autosampler), 컬럼 오븐 및 UV 검출기로 이루어진 HPLC 시스템 (Dionex ultimate 300, Thermo Fisher Scientific)에 10 μl의 시료를 주입하였다. 5μm XTerra MS C8 컬럼 (3.9x150mm) (Waters corporation, Mildfold, Massachusetts, USA)으로 215 nm의 파장에서 CsA를 확인하였다. 컬럼은 60℃에서 온도 조절하였다. 6.6분의 머무름 시간을 유도한 아세토니트릴:물 (60:40 v/v)의 혼합물로 이루어진 이동상을 이용하여 CsA 측정을 달성하였다. 20mL 섬광 바이알 (scintillation vial)에 2mg CsA를 칭량하고 10mL 아세토니트릴을 첨가하여 CsA 저장 용액(stock solution) (200 μg/mL)을 제조하였다. 저장 용액을 볼텍싱하고 검정곡선 (calibration curve)을 1 내지 100 μg/mL 범위의 농도로 준비하였다.

[0139] **검정곡선 준비**

[0140]

농도 (μg/mL)	CsA 저장 용액 (μL)	아세토니트릴 (μL)
0	0	1000
1	5	995
2.4	12	988
5	25	975
10	50	950
20	100	900
25	125	875
50	250	750
100	500	500

[0141] **검정곡선**

[0142] 동결건조된 분말 내 CsA 함량을 식 (1)에 기재된 대로 결정하였다.

[0143] $$\%CsA\ (w/w) = \frac{\text{약물 양}}{\text{동결건조된 분말 양}} \qquad (1).$$

[0144] ***8) 형태학적 평가***

[0145] 마지막으로, 형태학적 평가를 위해 2가지 기법을 사용하였다: 투과 전자 현미경 (TEM) 및 극저온 동결-주사전자 현미경 (Cryo-Scanning Electron Microscope, Cryo-SEM). 포스포텅스텐산(phosphotungstic acid)으로 음성 염

색한 후 투과 전자 현미경 (*TEM*) (Philips Technai F20 100 KV)을 이용하여 및 극저온 동결-주사전자현미경 (*Cryo-SEM*), (Ultra 55 SEM, Zeiss, Germany)을 이용하여 형태학적 평가를 수행하였다. *cryo-SEM* 방법에서, 알루미늄 판상체(aluminum platelets) 사이에 스페이서로 사용되는 200 메쉬 TEM 그리드가 있는 2개의 평평한 알루미늄 판상체 사이에 시료를 끼워넣었다. 그 다음, HPM010 고압 냉동기 (Bal-Tec, Liechtenstein)에서 시료를 고압 냉동하였다. 동결된 시료를 홀더(holder)에 장착하고, VCT 100 진공 저온 이송 장치(Vacuum Cryo Transfer device) (Bal-Tec)를 이용하여 BAF 60 동결 파쇄 장치(freeze fracture device) (Bal-Tec)로 옮겼다. 시료를 -120℃의 온도에서 파쇄한 후, VCT 100을 이용하여 SEM으로 옮기고, -120℃의 온도에서 1 kV에서 2차 후방 산란 및 렌즈-내 전자 검출기(secondary back-scattered and in-lens electrons detectors)를 이용하여 관찰하였다. X-선 회절 (XRD) 측정은 2차 흑연 단색기(monochromator), 2° 솔러 슬릿(Sollers slit) 및 0.2 mm 수신 슬릿 (receiving slit)이 있는 D8 Advance 회절계(diffractometer) (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany)에서 수행되었다. 2° 내지 55° 2Θ 범위 내의 XRD 패턴은 하기의 측정 조건으로 CuKα 방사선 (λ = 1.5418 Å)을 이용하여 실온에서 기록되었다: 40 kV의 튜브 전압, 40 mA의 튜브 전류, 0.02° 2Θ의 단계 크기(step size)를 갖는 단계-스캔 모드(step-scan mode) 및 1 s/step의 계수 시간(counting time). 결정화도의 계산은 Wang *et al* (Wang et al., 2006)에 의해 기재된 방법에 따라 수행되었다. EVA 3.0 소프트웨어 (Bruker AXS)를 모든 계산에 사용하였다. 결정화도의 계산식은 하기와 같다: DC = 100%·Ac / (Ac + Aa) (여기서, DC는 결정화도이고, Ac 및 Aa는 X-선 회절도(diffractogram)에서 결정질(crystalline) 및 비정질 (amorphous) 영역이다).

[0146] *9) 돼지 조직 처리*

[0147] 약 750㎛ 두께의 손질된 돼지 귀 피부는 라하브 동물 연구소(Lahav Animal Research Institute) (Kibbutz Lahav, Israel)에서 구입하여 조심스럽게 세척하였고, 피절된 피부(dermatomed skin)는 사용 전 최대 한달 동안 -20℃에서 처리하거나 또는 냉동 저장하였다. VapoMeter 장치 (Delfin Technologies, Finland)를 이용하여 경피 수분 손실(transepidermal water loss, TEWL) (Heylings et al., 2001)을 측정하여 피부 무결성(Skin integrity)을 확인하였다. ≤15 $gh^{-1}m^{2}$의 TEWL 값을 갖는 피부 시료만 실험에 사용되었다 (Weiss-Angeli et al., 2010).

[0148] *10) Ex vivo DBD 실험*

[0149] 절제된 돼지 피부를 PBS (pH 7.4) 내 10% 에탄올을 함유하는 수여자 구획 (acceptor compartment)이 있는 프란츠 확산 세포에 놓았다. NC 제형 및 각각의 대조군에서 937.5㎍의 CsA에 상응하는 다양한 선량의 방사능을, 고정시킨(mounted) 피부에 적용하였다. 상이한 시간 간격에서, 여러 피부 구획에서 방사능-표지된 CsA의 분포를 결정하였다. 먼저, 피부 표면에 남아있는 제형을 연속 세척하여 모으고, D-SQUAME® 피부 표본추출 디스크 (CuDERM Corporation, Dallas, USA)로 모은 첫 번째 스트립과 합하여 공여자 구획(*donor* compartment)을 구성하였다. 5개의 순차적 테이프 스트리핑 커플(tape stripping couples)로 이루어진 차후 10개의 스트립은 *상부 SC*로 풀링되었다. 하부 SC도 함유하는 생존가능한 *표피*를 *진피*에서 열-분리하였다 (56℃에서 PBS에서 1분) (Touitou et al., 1998). 그 다음, 다양한 분리된 층을 Solvable®로 화학적으로 용해시켰다. 남아있는 피부 잔류물도 Solvable®에서 소화되었고 확인된 잔류 방사능은 무시할 만하였음을 강조해야 한다. *수용체* 유체의 분취량도 모았다. 모든 방사성 화합물을 Tri-CARB 2900TR 베타 계수기 내 Ultima-gold® 섬광 액체에서 측정하였다.

[0150] **III. 결과 및 논의**

[0151] *1) CsA-담지된 다양한 나노담체의 제조 및 특성*

[0152] 본 연구를 위해 다양한 나노입자 제형을 제조하였으며, 이들의 물리적 특성을 **표 1**에 요약하였다. 다양한 나노담체의 평균 직경은, 얻은 낮은 PDI 값에 의해 반영된 비교적 좁은 분포 범위로 100 내지 200 nm로 다양하였다. MCT-함유 CsA NCs의 평균 직경은 CsA NSs의 평균 직경보다 2배 높았으며, 오일 코어의 변화는 NCs의 입자 크기 분포에 더 적은 영향을 미쳤다 (**표 1**). 오일 존재 유무에 관계없이, 활성제 CsA의 포함은 매끄럽고 구형인 PLGA-기반 NPs 표면의 음전하 특성을 변경하지 않았다. 높은 약물 캡슐화 효율 (92.15% 회수)은 NCs 내 오일 코어가 올레산:라브라필로 이루어진 경우에만 동결건조된 분말에서 4.65% (w/w)의 약물 함량을 야기한다 (**표 1**). 국소 제형에서 약물 담지된 NCs의 분산액으로부터 주요 관심사는 나노담체에서 국소 제형의 외부 상(external phase)으로 활성 화물의 누출이고, 이는 피부를 통한 활성 물질의 수송 효율에 상당한 손실을 야기한다. 또한, PLGA의 NCs는 물에 민감하며 수성 제형에서 천천히 분해될 수 있다. 따라서, 이들은 동결-건조되어야 하고, 적당한 물-없는 국소 제형 내에 포함되어야 한다. NCs는 동결-파쇄 cryo-SEM 묘사에 의해 확인된 바와 같이 실리

콘 혼합물에 효율적으로 분산되었다 [**도 1. d-d(i)**]. **도 1a**에 나타낸 X-선 회절 (XRD) 패턴에 따르면, 결정질 CsA (i)의 일반적인 피크는 블랭크 (iii) 또는 CsA-담지된 NCs (ii) 회절에서 누락되어 있음을 알 수 있다. 이것은 NCs 내에 포함될 때 CsA의 물리적 상태가 결정질보다는 비정질임을 의미할 수 있다. TEM 영상은 수성 매질에서 블랭크 및 약물-담지된 NCs의 구형 모양과 균일한 분포를 확인한다 (**도 1b-c**). **도 1d**에 나타난 바와 같이, 동결건조된 NCs는 NCs가 없는 HPβCD의 매끄러운 표면과 달리 거칠고 고르지 않은 격자를 형성한다 (**도 1e**). 동결 파쇄시 자세히 살펴보면, 동결건조된 NCs 분말은 동결보호제 내에 박힌 구형의 NCs를 나타낸다 [**도 1d(i)**]. 적당한 제형의 선택은 캡슐화 효율 및 동결건조 스트레스에 대한 내성을 포함하는 2가지 기준을 기반으로 하였다. 올레산에 비해 높은 오일 농도 때문에 우수한 동결건조된 케이크를 얻는 것이 더 어려웠지만, 5가지 제형에서 MCT 및 올레산:라브라필 함유 CsA NCs만이 동결건조 스트레스를 통과하였다. 또한, 92.15%의 이론적 약물 양을 함유하는 높은 캡슐화 효율 때문에 올레산:라브라필 제형이 선택되었다. 이 오일 코어 조합은 동결건조 과정 전후에 NCs의 형성 과정 동안 NCs 내에서 CsA를 함유하는데 명백하게 가장 효율적이었다 (**표 1**).

[0153] **[표 1]**

제형	오일 %,w/w	CsA[a] %, w/w	평균 직경 (nm)	PDI[b]	제타 전위	캡슐화 효율 (%)[c]	약물 함량 (%,w/w)[d]
CsA 담지된 (올레산) NCs	36	5.4	153.8±1.8	0.15	-40.6	70.62	NA[e]
CsA-담지된 (올레산:라브라필) NCs	13	5	162.0±0.75	0.06	-36.0	92.15	4.65
CsA-담지된 (MCT) NCs	36	5.4	192.8±3.1	0.17	-35.2	78.73	4.25
CsA-담지된 (트리부티린) NCs	36	5.4	122.1±2.7	0.17	-35.6	69.54	NA[e]
CsA-담지된 NCs	0	4.8	106.7±0.2	0.08	-34.5	54.0	NA[e]

표 1. 상이한 나노담체 제형의 조성 및 특성: [a]초기 약물 농도, [b]PDI=다분산 지수, [c]동결건조 전, [d]동결건조 후, [e]NA=자료 없음.

[0154]

[0155] *2) ex vivo 모델에서 신선한 돼지 피부를 이용한 CsA NCs의 피부 생체분포*

[0156] **도 2**에 보고된 결과는 프란츠 세포에서 6시간 및 24시간 배양 기간에 다양한 오일 조성-[^{3}H]-CsA-담지된 NCs 및 각각의 오일 대조군의 국소 적용 후 상이한 피부 구획에서 CsA의 *ex vivo* 피부 분포를 나타낸다. 상부 SC 층의 [^{3}H]-CsA 분포는 **도 2a**에 나타내었으며, 2개의 분리된 연속 테이프 스트리핑 추출로 각각 구성된 5개의 순차적 테이프 스트리핑의 합으로 이루어졌다 (모두 10개의 테이프 스트리핑). 적용된 초기 용량의 약 15%인 방사성 CsA의 상승된 수준은, 상이한 CsA NC 제형의 국소 적용 후 SC 상부 층에서 6 h 후에 검출되었다. 각각의 오일 대조군을 투여하였을 때, 초기 용량의 1.5%를 초과하지 않는 낮은 수준의 [^{3}H]-CsA가 SC에 기록되었다는 점에 유의해야 한다 (**도 2a**). 또한, 각 피부 시료의 생존가능한 표피층에서, 담지된 CsA NC 제형으로부터 계산된 동등한 CsA 농도 (부모 약물 및 아마도 일부 대사산물)는 **도 2b**에 제시된 바와 같이 각각의 오일 제형보다 상당히 더 높았다는 것이 밝혀졌다. 특히, CsA는 어느 시점에서든 각각의 오일 대조군에 투여되었을 때 생존가능한 표피층에 거의 침투하지 않았다. 대조적으로, CsA가 NCs 내에 캡슐화되었을 때, 더 높은 농도의 CsA가 적용 후 6 시간 및 24시간에 관찰되었다. 조직 중량 mg 당 300 내지 500 ng CsA가 각 시점에서 회수되었다. 진피 구획에서 유사한 패턴이 관찰되었지만 (**도 2c**), CsA 농도 (10-20 ng/mg 조직 중량)는 훨씬 더 낮았다. 오일 코어 조성에 관계없이 다양한 NC 제형간에 통계적으로 유의한 차이가 없음이 연구된 모든 구획에 대해 어느 시점에서나 관찰되었음을 강조해야 한다. 한편, 수용체 구획 유체에서 [^{3}H]-CsA 수준은 적용된 처리에 관계없이 매 시간 간격에서 초기 방사능의 1% 미만이었다 (자료는 나타내지 않음).

[0157] 동결건조 후 동결건조된 분말을 NC 수성 분산액으로 재구성한 경우, 놀랍게도 시간 0에서 누출된 CsA의 양은 **표 5**에도 나타난 바와 같이 10% 이상의 올레산:라브라필 오일 코어에서 매우 유의한 반면, 놀랍게도 동일한 비의 피마자유:라브라필에서 누출량은 **표 5**에 다시 언급된 바와 같이 현저하게 10% 미만이었음을 나타내었다.

[0158] 약물 기반 나노입자 (NP) 제형은 다양한 약물 제형에 사용하기 위해 지난 10년 동안 상당한 주목을 받았다. 고분자 NPs를 전달 시스템으로 설계하는 주요 목표는, 입자 크기 및 다분산성을 제어하고, 약물 캡슐화 효율 및 약물 담지를 최대화하며, 표면 특성 및 약리학적 활성제의 방출을 최적화하여 치료적으로 최적의 원하는 속도 및 용량 요법에서 약물의 부위-특이적 작용을 달성하는 것이다.

[0159] 향후 문제를 피하기 위해, 최적화 과정을 위해, 우리의 목표는 1:1의 올레산:라브라필 또는 피마자유:라브라필 비와 PLGA (Lactel Ltd 100K E) 또는 PLGA 17K (Purac Ltd)의 선택된 오일 조성을 이용하여 캡슐화 CsA 효율을 최적화하는 것이었다. 오일 (올레산 대 피마자유)의 특성을 제외하고 모든 실험 조건은 동일하였다.

[0160] NPs 제형은 CsA 담지된 폴리(락트산-코-글리콜산) 나노캡슐 (PLGA-CsA)을 기반으로 한다.

[0161] PLGA 나노캡슐을 하기와 같이 제조하였다: 고분자 폴리 락틱-코-글리콜산 (PLGA) 100K (락트산:글리콜산의 50:50 혼합물)를 0.2% w/v Tween® 80 및 0.6% w/v의 농도에서 상이한 조성의 0.8% w/v 상이한 오일의 혼합물을 함유하는 아세톤에 용해시켰다. CsA를 다양한 농도로 유기상에 첨가한 다음, 0.1% w/v Solutol® HS 15를 함유하는 수상에 첨가하여, 나노캡슐 (NCs)의 형성을 야기하였다. 현탁액을 15분 동안 900 rpm에서 교반한 다음, 감압 증발에 의해 초기 수성 부피의 20%로 농축시켰다 (아세톤의 완전 제거 가정). 제형의 조성은 **표 2**에 나타내었다.

[0162] 수성 매질에 분산된 NCs를 엡실론 2-6 LSC 파일럿 동결 건조기 (Martin Christ, Germany)에서 동결건조하기 전에, 1:1의 부피비로 10% HPβCD 수용액으로 희석시켰다.

[0163] [표 2]

실험실 규모	양, mg
유기상	
시클로스포린 A	150
피마자유	200
라브라필	200
Tween 80	100
PLGA (Lactel 100K E)	300
아세톤	50 ml
수상	
Solutol	100
물	100 ml
총 부피	**150 ml**

표 2. 1:1 의 피마자유:라브라필 비를 이용한 150ml 의 일반적인 실험실 배치에 대한 성분 목록 및 각각의 양

[0164]

[0165] 150ml 배치의 동결건조 과정은 **표 3**에 기재된다.

[0166] [표 3]

Sec.	공정 단계	시간 (h:min)	온도 (°C)	진공 (mbar)
1	담지	00:00	20	-
2	동결	01:00	-35	-
3	동결	01:00	-35	-
4	승화	00:15	-35	1.03
5	승화	00:15	-20	1.03
6	승화	00:10	-10	0.94
7	승화	04:00	0	0.94
8	승화	05:00	20	0.94
9	2 차 건조	05:00	20	0.001
	총 시간	**16.40**		

표 3. 실험실 배치의 동결건조를 위해 선택된 공정 매개변수의 설명 (총 시간: ~17hr)

[0167]

[0168] 올레산:라브라필로 동결건조 과정은 17K 또는 100K 분자량 PLGA를 이용하여 NCs의 벽 코팅 무결성을 손상시키는 스트레스를 유발하였음을 알 수 있다 (**표 5**).

[0169] **표 2**에 기재되고 피마자유:라브라필로 제조된 일반적인 배치의 다양한 특성에 대한 다양한 값을 **표 4**에 나타내었다.

[0170] **[표 4]**

NCs 현탁액	NCs 직경 (nm)	117.4 ± 12.9
	PDI (nm)	0.09 ± 0.01
	CsA 함량 (% w/w)	14.3 ± 1.3
	초기 함량의 CsA (%)	100.4 ± 9.0
분산액 재구성 후 NCs 동결건조된 분말	NCs 직경 (nm)	200.2 ± 5.8
	PDI (nm)	0.12 ± 0.01
	CsA 함량 (% w/w)	5 ± 0.1
	초기 함량의 CsA (%)	100 ± 2
	물 함량 (%)	3.1 ± 0.9
	유리 CsA (%)	7.7 ± 0.9
	수율 (%)	89.4 ± 0.7

[0171] **표 4.** NCs 제형 현탁액 및 재구성 후 동결건조된 분말의 결과

[0172] 다양한 물리화학적 특성은 동결건조 과정에 의해 영향을 받지 않았으며 동결건조 스트레스 후 NCs에서 CsA의 누출은 7.7 ± 0.9에 불과함을 알 수 있다.

[0173] **표 5**에 나타난 바와 같이, Lactel 100k E보다 적당한 이점이 있는 피마자유:라브라필의 혼합물로 제조된 NCs에 의해 최상의 배치가 산출되었다는 점에 유의하는 것이 중요하다.

[0174] **표 5**에 나타낸 자료로부터, 제형 내 CsA의 총 농도는 5에서 최대 9%, w/w로 증가하였음을 알 수 있다.

[0175] 분말의 동결건조 및 재구성 후, NCs의 평균 직경은 모든 NC를 둘러싸고 동결건조 과정으로부터 이를 보호하는 클렙토스(Kleptose) 동결보호제의 존재로 인해 제형 조성에 관계없이 다소 100 nm 증가하였다.

[0176] PDI 값은 특히 동결건조 전 및 분산액의 동결건조 및 재구성 후 NC 집단의 우수한 균질성을 나타내는 0.15-0.2보다 낮으며, 균질성은 주로 피마자유 혼합물, 특히 PLGA 100k에서 유지된다.

[0177] 따라서, 피마자유는 올레산 및 MCT를 포함하여 **표 1**에 제시된 다른 오일보다 동결건조 과정의 스트레스로부터 NCs를 더 잘 보호할 수 있음이 입증되었다.

[0178] 마지막으로, 가장 유망한 제형은 5% CsA의 락텔 PLGA 100k 피마자유:라브라필이다. 7% 제형은 필요한 경우 예비품(back-up)으로 사용할 수 있다.

[0179] 우리가 이해할 수 있는 한, CsA-담지된 나노담체의 많은 국소 제형은 제형 내 나노담체의 제한된 안정성 및 나노담체에서 국소 제형의 외부 상으로 활성 화물의 차후 누출 때문에 시장에 도달하지 못하여, 피부를 통한 활성 물질의 수송 효율에 상당한 손실을 야기한다. 또한, PLGA의 NPs는 물에 민감하며 수성 제형에서 천천히 분해될 수 있다. 따라서, 이들은 동결-건조되어야 하고, 물-없는 국소 제형 내에 포함되어야 한다.

[0180] 올레산:라브라필-CsA-담지된 NCs 제형은 동결건조 과정 후 달성된 만족스러운 결과를 고려하여 선택되었다 (**표 1**). NCs는 동결-파쇄 cryo-SEM 묘사에 의해 확인된 바와 같이 실리콘 혼합물에 효율적으로 분산되었다 [**도 1. d-d(i)**].

[0181] 따라서, 본 연구는 NCs 내 CsA의 단기 안정성을 보장하는 국소 무수 제형에 분산된 CsA NCs의 원래 설계를 제시하였으며, 아마도 동결건조된 NC 분말에서 언급한 바와 같이 실리콘-계 제형으로 적어도 누출을 표시하였다.

[0182] PLGA NCs를 이용한 CsA의 국소 전달은 생존가능한 피부층으로의 침투를 향상시켰으며, 초기 용량의 20%는 SC 층

에서 회수되었다 (**도 2**). 생존가능한 표피 및 진피에 도달하는 백분율은 훨씬 낮았지만, 우리가 이해하기에는 여전히 잠재적인 치료 조직 수준이었다 (**도 2**). 또한, 다른 저자들도 침투 항상제로서 모노올레인, 미셀 나노담체 또는 피부 침투 펩티드의 히드로에탄올(hydroethanolic) 용액을 이용하여 높은 수준의 CsA가 돼지 피부의 깊은 층에 도달하였다고 보고하였다. 그러나, 우리가 아는 한, 이러한 전달 시스템 중 어느 것도 아직 효능 연구에서 평가되지 않았다. 본 연구에서, NCs 제형의 국소 적용 후 6시간 및 24시간에 생존가능한 표피 및 진피의 CsA 농도는 각각 215 및 260; 11 및 21 ng/mg 이었다. Furlanut *et al.*은 건선이 있는 인간 환자에서 12시간 최저점(trough)에서 100 ng/ml 보다 높은 CsA 농도가 우수한 임상 반응과 관련이 있다고 보고하였다 (Furlanut et al., 1996). 분명히, 역치 효과(threshold effect)는 상관관계의 부족에 대한 그럴듯한 설명이다. 실제로, CsA는 혈중 최고값에 가까운 것으로 추정되는 수준 (Fisher et al., 1988) 및 치료에 반응한 플라크-형 건선으로 고통받는 환자의 최저 혈액 시료의 수치보다 약 10배 더 높은 수준 (Ellis et al., 1991)으로 피부에 농축된 것으로 보인다. 우리는 건선에 대해 활성이라고 보고된 1ng/mg에 상응하는 1000 ng/g의 피부 수준이 피부에 할당되고 AD 병리학에 관여하는 염증 세포의 활성화를 저해하기에 충분하다고 합리적으로 가정할 수 있다. 따라서, 표피 및 진피에서 CsA의 실제 수준은 앞에서 언급한 바와 같이 효율적인 것으로 간주될 수 있다. 표피 및 진피에서 CsA의 실제 수준은 효율적인 것으로 간주될 수 있다. 또한, 돼지 귀 피부를 통한 수용체 유체의 검출가능한 방사능 투과는 시간 경과에 따라 측정될 수 없었으며, 이는 매우 낮은 방사능이 있는 경우 전체 피부 장벽을 통과할 수 있음을 시사한다. 따라서, 국소 적용 후 CsA의 가능한 현저한 전신 노출이 발생하지 않을 것으로 예상할 수 있다. 그러나, 이 가정은 동물 실험에서 확인되어야 하며, 임상 약동학 연구에서 더 가능성이 높다. NC 오일 코어의 일부로 올레산을 이용한 효능 동물 연구가 이미 보고되었으며, 이전에 제출되었다. 그러나, 우리는 동결건조 후 CsA의 현저한 누출을 알지 못하였다. 따라서, 피마자유로 작업의 일부를 반복하고 올레산 NCs와 동일한 효능을 확인하기 위해 올레산과 비교하는 것이 중요하였다.

[0183] **도 3**에 제시된 자료로부터, 올레산 또는 피마자유-기반 NCs 간에 피부의 다양한 층에서 CsA의 투과 프로파일에는 차이가 없는 반면, 각각의 오일 용액은 피부층 침투를 향상시키지 않았음을 알 수 있다 (**도 3**). 올레산 또는 피마자유 코어를 기반으로 한 CsA NCs의 효능에는 차이가 없어야 하지만, 상당히 적은 CsA가 NCs에서 누출되기 때문에 개선이 기대되어야 하며 피부층을 침투하는 CsA 양을 증가시키고 훨씬 필요한 개선된 약리 활성을 이끌어내야 함을 가정할 수 있다.

[0184] 이러한 ex-vivo 실험 결과를 확인하기 위해, 이 ex-vivo 실험에서 도출된 결론을 검증하기 위한 비교 동물 연구도 수행하기로 결정하였다.

[0185] [표 5]

오일 조성	PLGA	CsA (%)	동결건조 전 (수성 분산액) 평균 직경 (nm)	PDI 값	CsA 함량 (%w/w)	초기 농도로부터 관찰된 CsA (%)	동결건조 후 분산액 재구성 수율 (%)	평균 직경 (nm)	PDI	CsA 함량 (%w/w)	초기 농도로부터 관찰된 CsA (%)	유리 CSA (%w/w)
올레산:라브라필	Purac 17k E	5	179.9 ± 23.7	0.11 ± 0.01	14.1 ± 1.3	98.8 ± 8.9	92.6 ± 2.9	286.3 ± 23.1	0.19 ± 0.07	5.5 ± 0.5	110 ± 10	16.8 ± 8.6
		7	180.6 ±1 9.3	0.11 ± 0.01	16.9 ± 0.7	89.6 ± 3.3	88.8 ± 1.9	296.5 ± 29.3	0.29 ± 0.11	6.2 ± 0.8	88.6 ± 11.4	20.1 ±11.1
		8	191.1	0.103	19.1	90.6	93.4	301	0.444	7.7	96.3	21
		9	207.2 ± 27.2	0.10 ± 0.01	19.7 ± 3.4	85.3 ± 15.0	86.4 ± 5.9	294.1 ± 18.0	0.29 ± 0.06	8.23 ± 1.7	91.4 ± 18.9	14.9 ± 0.3
	Lactel 100k E	5	165.7 ± 6.6	0.11 ± 0.01	13.7 ± 0.4	96.10 ± 2.9	91.2 ± 1.1	268.0 ± 16.8	0.16 ± 0.05	4.8 ± 0.4	96 ± 8	15.4 ± 3.9
		7	169.8 ± 7.1	0.10 ± 0.01	18.6 ± 3.7	98.3 ± 19.2	90.4 ± 1.1	265.3 ± 18.1	0.20 ± 0.02	6.8 ± 0.3	97.1 ± 4.3	16.4 ± 2.3
		8	162	0.121	19.8	94.2	90.3	240.3	0.205	7.77	97.1	12.44
		9	172 ± 2.0	0.1 ± 0.02	22.1 ± 0.7	95.4 ± 2.9	91.0 ± 0.8	272.5 ± 21.5	0.18 ± 0.01	8.5 ± 1.2	94.4 ± 13.3	18.4 ± 6.0
피마자유:라브라필	Purac 17k E	5	154.5 ± 9.1	0.12 ± 0.02	13.7 ± 0.4	95.7 ± 3.1	88.1 ± 20	221.5 ± 40.4	0.18 ± 0.01	4.9 ± 0.13	98 ± 2.6	9.2 ± 5.3
		7	155.7 ± 5.3	0.12 ± 0	17.3 ± 5.2	91.6 ± 2.8	89.8 ± 1.4	236.5 ± 27.3	0.18 ± 0.06	6.6 ± 0.6	94.3 ± 8.6	12 ± 6.1
		8	153.8	0.134	18.8	89	89.3	244.6	0.152	7.9	98.8	16.6
		9	160.4 ± 0.7	0.12 ± 0.02	21.7 ± 0.2	93.7 ± 0.6	88.5 ± 1.2	235.7 ± 20.5	0.14 ± 0.04	7.6 ± 1.5	84.4 ± 16.7	11.3 ± 3.4
	Lactel 100k E	5	117.4 ± 12.9	0.09 ± 0.01	14.3 ± 1.3	100.4 ± 9.0	89.4 ± 0.7	200.2 ± 5.8	0.12 ± 0.01	5 ± 0.1	100 ± 2	7.7 ± 0.9
		7	120.9 ± 16.3	0.1 ± 0.01	18.2 ± 1.3	96.2 ± 7.0	86.8 ± 3.2	209.2 ± 17.9	0.13 ± 0.02	6.9 ± 0.3	98.6 ± 4.3	7.96 ± 0.4
		8	114.5	0.125	19.8	94.45	87.8	201.9	0.159	7.8	97.6	6.33
		9	118.9 ± 5.8	0.09 ± 0	20.1 ± 1.4	90.3 ± 5.8	89 ± 1.1	199.9 ± 7.8	0.12 ± 0	7.8 ± 0.4	86.7 ± 4.4	9.2 ± 0.4

표 5. 올레산:라브라필 vs. 피마자유:라브라필 및 상이한 분자량의 PLGA를 이용한 CsA 초기 캡슐화 함량의 증가.

단일 배치로 수행된 8%를 제외하고 각 배치는 3 회 반복실험 하였다.

[0186]

[0187] [표 6]

		0m	1m	3m	6m	9m
	제형	16.6.16	16.7.16 39	16.9.16	16.12.16	16.3.17
외관	1 O:L 5% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	2 O:L 5% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	3 L:C 5% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	4 L:C 5% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	5 O:L 7% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	6 O:L 7% 100K	백색분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	7 L:C 7% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	8 L:C 7% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
크기/ PDI (nm)	1 O:L 5% 100K	278.4 ± 1.015 0.166 ± 0.024	279.9 ± 5.722 0.210 ± 0.026	265.6 ± 1.422 0.111 ± 0.018	261.3 ± 4.751 0.215 ± 0.040	
	2 O:L 5% 17K	283.3 ± 2.946 0.160 ± 0.017	295.8 ± 5.103 0.197 ± 0.028	273.1 ± 6.689 0.189 ± 0.008	283.2 ± 1.553 0.191 ± 0.015	
	3 L:C 5% 100K	198.5 ±0.923 0.122 ± 0.048	201.4 ± 3.559 0.155 ± 0.033	203.1 ± 0.757 0.080 ±0.033	199.9 ± 2.203 0.120 ± 0.028	
	4 L:C 5% 17K	208.1 ± 1.480 0.122 ± 0.029	210.7 ± 8.240 0.172 ± 0.038	210 ± 3.029 0.137 ± 0.019	204.4 ± 0.929 0.142 ± 0.045	
	5 O:L 7% 17K	263.7 ± 1.480 0.159 ± 0.022	265.6 ± 4.329 0.200 ± 0.025	250.7 ± 1.550 0.166 ±0.007	321.2 ± 10.49 0.256 ± 0.065	
	6 o:L 7% 100K	269.1 ± 2.108 0.174 ± 0.046	256.3 ± 6.834 0.209 ± 0.047	260.9 ±4.678 0.196 ±0.049	270.8 ± 2.829 0.161 ± 0.025	
	7 L:C 7% 17K	225.4 ± 0.776 0.139 ± 0.029	226.1 ± 2.810 0.155 ± 0.031	222 ±3.509 0.151 ±0.013	219.8 ± 3.691 0.161 ± 0.013	
	8 L:C 7% 100K	212.1 ± 3.201 0.093 ± 0.023	215.6 ± 0.586 0.144 ± 0.030	210.2 ±2.454 0.137 ±0.031	211.5 ± 2.303 0.101 ± 0.026	
% 물 함량	1 O:L 5% 100K	3.7	4.0	3.0	1.9	
	2 O:L 5% 17K	3.6	4.2	3.2	1.2	
	3 L:C 5% 100K	2.8	4.1	3.0	0.1	
	4 L:C 5% 17K	3.0	3.9	3.2	1.9	
	5 O:L 7% 17K	2.9	4.2	3.4	3.8	
	6 O:L 7% 100K	2.5	3.5	3.0	2.0	
	7 L:C 7% 17K	3.0	4.2	3.5	0.3	
	8 L:C 7% 100K	2.7	3.5	3.0	2.3	
% 유리 CsA	1 O:L 5% 100K	11.7	11.2	12.7	12.9	
	2 O:L 5% 17K	13.6	16.0	16.2	17.7	
	3 L:C 5% 100K	4.3	5.5	5.4	5.8	
	4 L:C 5% 17K	6.2	6.9	7.0	7.8	
	5 O:L 7% 17K	12.4	12.8	13.3	12.5	
	6 O:L 7% 100K	14.0	13.5	13.7	20.6	
	7 L:C 7% 17K	7.8	8.0	9.4	1.8	
	8 L:C 7% 100K	6.6	7.6	6.5	16.2	
CsA 함량 (%,W/W)	1 O:L 5% 100K	4.5	4.7	5.3	4.8	
	2 O:L 5% 17K	4.7	4.9	5.4	5.0	
	3 L:C 5% 100K	4.5	4.8	5.0	4.7	
	4 L:C 5% 17K	4.8	4.4	5.0	4.6	
	5 O:L 7% 17K	5.8	6.3	6.7	6.2	
	6 O:L 7% 100K	5.1	6.4	7.0	6.5	
	7 L:C 7% 17K	6.3	7.6	7.0	6.5	
	8 L:C 7% 100K	6.3	6.2	7.1	6.5	

표 6. 피마자유 또는 올레산 코어의 기능과 유사한 조건 하에서 제조된 동결건조된 NCs 의 5 ±3°C 에서의 장기 저장 안정성의 물리화학적 자료.

[0188]

[0189] [표 7]

		0m	1m	3m	6m	18m
	제형	19.5.16	16.6.16	19.8.16	19.11.16	19.11.17
외관	1 O/L 5% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	2 O/L 5% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	3 L/C 5% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	4 L/C 5% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	5 O/L 7% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	6 O/L 7% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	7 L/C 7% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
	8 L/C 7% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	
크기 / PDI (nm)	1 O/L 5% 100K	254.1±5.880 0.113±0.023	278.4 ± 1.015 0.166 ± 0.024	274.7 ± 2.250 0.150 ± 0.055	287.7 ± 6.854 0.152 ± 0.032	
	2 O/L 5% 17K	269.9±2.858 0.144±0.015	283.3 ± 2.946 0.160 ± 0.017	277.7 ± 3.729 0.171 ± 0.035	294.3 ± 4.359 0.178 ± 0.005	
	3 L/C 5% 100K	178.0±0.8963 0.178±0.036	198.5 ±0.923 0.122 ± 0.048	272.3 ± 3.083 0.130 ± 0.075	213.5 ± 1.305 0.107 ± 0.031	
	4 L/C 5% 17K	178.3±0.5508 0.173±0.006	208.1 ± 1.480 0.122 ± 0.029	211.1 ± 1.069 0.152 ± 0.049	213.9 ± 2.352 0.103 ± 0.024	
	5 O/L 7% 17K	262.9±6.465 0.216±0.010	263.7 ± 1.480 0.159 ± 0.022	273.3 ± 7.778 0.194 ± 0.021	280.1 ± 5.424 0.181 ± 0.031	
	6 O/L 7% 100K	253.6±9.260 0.224±0.010	269.1 ± 2.108 0.174 ± 0.046	266.5 ± 1.300 0.222 ± 0.069	269.3 ± 1.637 0.093 ± 0.027	
	7 L/C 7% 17K	216.9±2.325 0.291±0.023	225.4 ± 0.776 0.139 ± 0.029	273.2 ± 7.580 0.185 ± 0.008	229.3 ± 2.203 0.136 ± 0.001	
	8 L/C 7% 100K	196.1±2.838 0.115±0.022	212.1 ± 3.201 0.093 ± 0.023	213.3 ± 5.320 0.116 ± 0.019	212.9 ± 2.150 0.106 ± 0.023	
% 물 함량	1 O/L 5% 100K	5.1	3.7	4.2	4.2	
	2 O/L 5% 17K	4.7	3.6	4.2	5.4	
	3 L/C 5% 100K	4.2	2.8	4.4	5.1	
	4 L/C 5% 17K	5.2	3.0	4.1	5.4	
	5 O/L 7% 17K	4.8	2.9	4.1	5.4	
	6 O/L 7% 100K	2.6	2.5	3.5	5.0	
	7 L/C 7% 17K	5.0	3.0	3.7	5.3	
	8 L/C 7% 100K	2.3	2.7	3.8	5.6	
	1 O/L 5% 100K	11.5	11.7	12.9	11.6	
	2 O/L 5% 17K	10.7	15.6	17.8	13.7	
	7 L/C 7% 17K	7.7	7.8	10.7	10.7	
	8 L/C 7% 100K	8.2	6.6	9.2	8.9	
CsA 함량 (%,W/W)	1 O/L 5% 100K	4.9	4.5	4.9	5.3	
	2 O/L 5% 17K	5.3	4.7	4.9	5.1	
	3 L/C 5% 100K	5.0	4.5	4.6	5.0	
	4 L/C 5% 17K	5.0	4.8	4.6	4.7	
	5 O/L 7% 17K	6.8	5.8	6.1	6.3	
	6 O/L 7% 100K	7.1	5.1	6.5	6.4	
	7 L/C 7% 17K	7.0	6.3	8.3	6.7	
	8 L/C 7% 100K	7.2	6.3	6.3	7.2	

표 7. 피마자유 또는 올레산 코어의 기능과 유사한 조건 하에서 제조된 동결건조된 NCs 의 25 ±3°C 에서의 장기 저장 안정성의 물리화학적 자료.

[0190]

[0191] [표 8]

		0m	2 주	1m	3m	6m
	제형	16.6.16	30.6.16	16.7.16	16.9.16	16.12.16
외관	1 O:L 5% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말
	2 O:L 5% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말
	3 L:C 5% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말
	4 L:C 5% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말
	5 O:L 7% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말
	6 O:L 7% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말
	7 L:C 7% 17K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말
	8 L:C 7% 100K	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말	백색 분말
크기/ PDI (nm)	1 O:L 5% 100K	278.4 ± 1.015 0.166 ± 0.024	279.1 ± 11.41 0.191 ± 0.014	282.7 ± 3.970 0.207 ± 0.036	265.5±0.6028 0.177 ±0.028	269.4 ± 5.839 0.178 ± 0.016
	2 O:L 5% 17K	283.3 ± 2.946 0.160 ± 0.017	225.3 ± 46.83 0.117 ± 0.067	295.6 ± 5.217 0.214 ± 0.004	283.6 ±0.300 0.163 ±0.018	256.9 ± 7.425 0.144 ± 0.074
	3 L:C 5% 100K	198.5 ±0.923 0.122 ± 0.048	202.2 ± 6.374 0.130 ± 0.05	203.5 ± 2.194 0.131 ± 0.022	198 ±1.150 0.096 ±0.030	141.2 ± 2.318 0.122 ± 0.016
	4 L:C 5% 17K	208.1 ± 1.480 0.122 ± 0.029	247.6 ± 32.6 0.168 ± 0.048	217.0 ± 3.899 0.148 ± 0.030	209.7±0.6807 0.120 ±0.021	213.8 ± 0.8386 0.113 ± 0.023
	5 O:L 7% 17K	263.7 ± 1.480 0.159 ± 0.022	263.6 ± 4.180 0.190 ± 0.037	268.4 ± 5.510 0.221 ± 0.027	255.4 ±2.914 0.156 ±0.010	286.0 ± 5.752 0.203 ± 0.021
	6 O:L 7% 100K	269.1 ± 2.108 0.174 ± 0.046	235.5 ± 25.44 0.122 ± 0.031	269.7 ± 4.917 0.245 ± 0.014	273.9 ±3.625 0.158 ±0.043	277.8 ± 2.721 0.219 ± 0.006
	7 L:C 7% 17K	225.4 ± 0.776 0.139 ± 0.029	215.2 ± 5.160 0.077 ± 0.059	231.7 ± 5.859 0.167 ± 0.031	225.2 ±4.165 0.113 ±0.013	231.7 ± 1.212 0.141 ± 0.026
	8 L:C 7% 100K	212.1 ± 3.201 0.093 ± 0.023	211.6 ± 2.778 0.067 ± 0.050	215.2 ± 6.214 0.157 ± 0.027	208.3 ±2.879 0.100 ±0.025	212.7 ± 1.682 0.101 ± 0.018
% 물 함량	1 O:L 5% 100K	3.75	3.0	3.6	1.5	2.1
	2 O:L 5% 17K	3.6	2.9	3.9	3.3	0.7
	3 L:C 5% 100K	2.8	2.8	3.6	2.9	1.6
	4 L:C 5% 17K	3.0	2.15	3.0	2.7	2.2
	5 O:L 7% 17K	2.9	2.0	3.0	3.3	ND
	6 O:L 7% 100K	2.5	2.1	2.8	2.4	ND
	7 L:C 7% 17K	3.0	2.3	3.0	2.5	ND
	8 L:C 7% 100K	2.7	2.0	3.0	2.3	ND
% 유리 CsA	1 O:L 5% 100K	11.7	12.6	11.6	12.6	11.4*
	2 O:L 5% 17K	15.6	15.5	19.6	15.7	9.2*
	3 L:C 5% 100K	4.5	4.0	4.8	5.7	5.3
	4 L:C 5% 17K	6.2	6.0	6.8	7.1	6.4
	5 O:L 7% 17K	12.4	12.8	17.6	13.4	17.6*
	6 O:L 7% 100K	14.0	13.0	18.2	15.0	18.7*
	7 L:C 7% 17K	7.8	7.0	10.8	9.7	12.5
	8 L:C 7% 100K	6.6	5.9	9.2	6.9	8.1
CsA 함량 (%,W/W)	1 O:L 5% 100K	4.5	5.2	5.2	5.1	4.4*
	2 O:L 5% 17K	4.7	4.7	4.9	4.7	3.0*
	3 L:C 5% 100K	4.5	4.8	4.5	5.1	4.5
	4 L:C 5% 17K	4.8	4.3	5.1	5.1	4.6
	5 O:L 7% 17K	5.8	6.5	6.3	6.9	5.8*
	6 O:L 7% 100K	5.1	6.5	6.2	7.1	6.4*
	7 L:C 7% 17K	6.3	7.15	6.8	7.1	6.5
	8 L:C 7% 100K	6.3	6.8	6.3	6.9	6.3

표 8. 피마자유 또는 올레산 코어의 기능과 유사한 조건 하에서 제조된 동결건조된 NCs 의 37°C 에서의 장기 저장 안정성의 물리화학적 자료.

[0192]

[0193] **접촉성 과민증 (CHS) 마우스 모델**

[0194] CHS의 유발은 하기에 기재된 바와 같이 수행되었다. CHS 감작 전 4일에, 6-7 주령 BALB/c 마우스 복부를 조심스럽게 면도하고 회복을 위해 휴식을 취하였다. 감작 당일, 다양한 국소 CsA 제형 및 Protopic®을 면도한 피부에 도포하였다 (20 mg의 Ca:La 또는 Ol:La CsA NCs 및 빈(empty) NCs 반고체 무수 제제, 모두 20 μg/cm^2 CsA에 상응). 국소 처리 후 4시간에, CHS를 유발하기 위해, 마우스를 면도한 복부에서 50 μl의 아세톤/올리브유 (AOO) 4:1 내 1% 옥사졸론으로 감작시켰다. 5일 후 오른쪽 귀의 뒤쪽에만 25 μl의 AOO 내 0.5% 옥사졸론으로 이들을 공격하였다. 왼쪽 귀는 미처리되었으며, 부종 반응은 마이크로미터 (Mytutoyo, USA)로 측정되었고, 공격 후 24, 48, 72, 96 및 168 시간에 왼쪽 귀와 오른쪽 귀의 차이를 기록하였다. 150 μm의 평균 부종은 알러지 반응으로 간주되었다.

[0195] 피마자유 기반 CsA NCs는 올레산 기반 NCs만큼 효과적이라는 점을 알 수 있다. 또한, 2일째 (**도 4**)에, 피마자유 기반 NCs가 올레산 기반 CsA NCs보다 현저히 개선된 효과를 이끌어냄을 관찰할 수 있어, 이전의 추론을 확인하였다.

[0196] 더 중요한 것은, **표 6-8**에 제시된 결과에 나타난 바와 같이, CsA NCs의 장기 안정성도 올레산보다 피마자유에 훨씬 더 유리한 것으로 관찰되었다.

[0197] 피마자유 코어에서만 다양한 매개변수가 37℃에서 6개월 동안 특히 안정적이었다.

[0198] 이러한 결과는, **표 6-8**에 나타난 바와 같이 37℃에서 6개월의 안정성이 3년의 상품의 유통 기한에 해당하는 반면, 이러한 안정된 제품은 올레산으로 달성될 수 없기 때문에, 피마자유만으로 시판용 제품의 설계가 가능함을 분명히 나타낸다.

[0199] **안구 전달**

[0200] **배경**

[0201] 인간의 눈은 다양한 세포 유형으로 이루어진 복잡한 장기이다. 약물의 국소 투여는 적용의 용이성 및 환자의 순응도 때문에 주로 안구 질환의 치료에 선호되는 경로이다. 그러나, 국소적으로 적용되는 약물의 눈에 대한 흡수는 고유한 해부학적 및 생리학적 장벽으로 인해 고용량 반복 투여가 필요하기 때문에 매우 열악하다. 먼저, 약물 분자를 약 10 μm의 총 두께로 각막앞 눈물막(precorneal tear film)에서 희석시킨다. 눈깜박 반사(blinking reflex)와 함께 이 누액(lachrymal fluid)의 외부 층의 빠른 재생 속도 (1-3 μl/min)는, 각막앞 공간에서 약물의 체류 시간 (residence tim) (<1분)을 심각하게 제한하여 주입된 약물의 안구 생체이용률 (<5%)을 제한한다. 다양한 안구 병리학의 표적 부위에 따라, 약물은 각막 및/또는 결막에 보유되거나 또는 이러한 장벽을 가로질러 눈의 내부 구조에 도달해야 한다. 결막을 통한 약물의 유입은 일반적으로 전신 약물 흡수와 관련이 있으며, 공막 (sclera)에 의해 매우 방해를 받는다. 결과적으로, 각막은 표적이 내안(inner eye)에 있는 약물의 주요 접근 경로를 나타낸다. 불행하게도, 각막 장벽을 가로지르는 것은 많은 약물의 주요 도전과제이다. 실제로, 다층 친유성 각막 상피는 외부 분자 및 입자를 효과적으로 배제하는 풍부한 융합막(tight junctions) 및 데스모좀 (desmosomes)의 존재로 고도로 조직화되어 있다. 또한, 친수성 기질(stroma)은 약물의 수송을 매우 어렵게 만든다. 저분자량 및 적당한 친유성 특성을 가진 약물만이 이러한 장벽을 적당한 방식으로 처리할 수 있다.

[0202] 봄철 각결막염 (Vernal keratoconjunctivitis, VKC)은 주로 어린이에게서 발생하는 양측성, 만성 시력-위협 및 중증 염증성 안구 질환이다. 일반적인 발병 연령은 10세 이전이다 (4-7세). 남성 우세(preponderance)가 관찰되었으며, 특히 20세 미만의 환자에서 남성:여성의 비가 4:1-3:1이다. 봄철 (봄)은 질환의 계절적 편향(seasonal predilection)을 의미하지만, 그 과정은 일반적으로 특히 열대 지방에서 주로 일년 내내 발생한다. VKC는 전 세계에서 확인될 수 있으며 거의 모든 대륙에서 보고되었다. 환자의 약 50%에서 아토피성 감작이 확인되었다. VKC 환자는 일반적으로 주로 눈 증상을 나타내며, 더 우세한 것은 가려움증, 분비물, 찢어짐, 눈 자극, 눈의 충혈, 및 가변적으로 광공포증이다.

[0203] VKC는 IgE- 및 비-IgE-매개 안구 알러지성 질환으로 안구 표면 과민증 장애의 최신 분류에 포함되었다. 그럼에도 불구하고, 모든 VKC 환자가 알러지 피부 검사에서 양성인 것은 아니라는 것도 잘 알려져 있다. 결막에서 Th2 림프구 수의 증가 및 공동-자극 분자와 사이토카인의 발현 증가는 T 세포가 VKC3의 발달에 중요한 역할을 함을 시사한다. 또한, 일반적인 Th2-유래 사이토카인, Th1-형 사이토카인, 전염증성 사이토카인, 다양한 케모카인, 성장 인자, 및 효소는 VKC 환자에서 과도하게 발현된다.

[0204] **1. VKC 치료**

[0205] 일반적인 요법은 국소 항히스타민제 및 비만 세포 안정화제를 포함한다. 이러한 요법은 드물게 충분하며, 국소 코르티코스테로이드는 종종 질환의 악화 및 더 심각한 사례의 치료에 필요하다. 코르티코스테로이드는 항-염증성 약물 및 면역억제 약물로 작용하는 안구 염증의 주된 요법으로 남아 있다. 요법의 목표는 안구 손상, 흉터 및 궁극적으로 시력 상실을 예방하는 것이다. 이러한 제제는 매우 효과적이지만, 관련 위험이 없는 것은 아니다. 모든 유형 및 투여 수단에 대한 장기간 스테로이드 사용의 안구 부작용은 백내장(cataract) 형성, 안압 증가 및 감염에 대한 더 높은 감수성을 포함한다. 국소 스테로이드의 잠재적으로 눈을 멀게하는 합병증을 극복하기 위해, 시클로스포린 A 및 타크로리무스와 같은 면역조절 약물이 더 자주 사용된다.

[0206] 타크로리무스는 시클로스포린에 난치성인 중증의 VKC 사례에서도 스테로이드 스파링제(sparing agent)로서 효과적이었다.

[0207] **2. 타크로리무스 효능 및 한계**

[0208] FK506으로도 알려진 타크로리무스는 박테리아 *스트렙토마이세스 쯔꾸바엔시스(Streptomyces tsukubaensis)*를 함

유한 일본 토양 시료의 발효액에서 생성된 마크로리드이다. 이 약물은 T 림프구 내의 FK506-결합 단백질에 결합하고 칼시뉴린 (calcineurin) 활성을 저해한다. 칼시뉴린 저해는 활성화된 T 세포의 핵 인자의 탈인산화 및 핵으로의 이동을 억제하여, T 림프구에 의한 사이토카인의 형성 억제를 야기한다. 따라서, T 림프구의 저해는 염증성 사이토카인의 방출을 저해하고 다른 염증 세포의 자극을 감소시킬 수 있다. 타크로리무스의 면역억제 효과는 T 림프구에 한정되지 않고, B 세포, 호중구 및 비만 세포에도 작용하여 VKC의 증상 및 징후를 개선할 수 있다.

[0209] 타크로리무스의 상이한 형태 및 농도는 전안부(anterior segment) 염증성 장애의 치료에서 평가되었다. 대부분의 임상 시험에서 연구된 국소 타크로리무스 제형의 주요 농도는 0.1% 였다. 일부 다른 연구는 0.005, 0.01, 0.02 및 0.03%를 포함한 낮은 농도의 타크로리무스를 평가하였으며, 국소 점안액이 국소 스테로이드를 포함한 종래의 약제에 난치성인 VKC 환자에게 안전하고 효과적인 치료 방법임을 나타내었다. 그러나, 타크로리무스는 이의 나쁜 수 용해도 및 비교적 높은 분자량 때문에 각막 상피를 침투하기 어렵고 각막 기질에 축적된다. 또한, 이 약물의 안과 시판 제형은 전 세계적으로 없으며, VKC 환자에게 아토피성 피부염을 치료하기 위한 피부과용 타크로리무스 연고를 사용하도록 해야 한다.

[0210] **3. 안구 질환의 치료를 위한 나노담체**

[0211] 빈번한 점적(instillation)의 필요없이 정확한 용량으로 약물을 전달할 수 있는 효율적인 국소 제형의 개발은 제약 과학 기술의 주요 도전과제이다. 지난 수십년 동안, 크기가 < 1000 nm인 특정 나노담체가 눈-관련 장벽을 극복할 수 있음이 밝혀졌다. 실제로, 이들은 고도의 친유성 약물을 포함하여 다양한 약물을 관련시키고, 불안정한 약물의 분해를 줄이며, 안구 표면에 관련 약물의 체류 시간을 늘리고, 각막 및 결막 상피와의 상호작용 및 결과적으로 이들의 생체 이용률을 개선하는 능력을 나타내었다. 나노콜로이드 시스템은 리포좀, 나노입자 및 나노에멀젼을 포함한다.

[0212] *3.1 고분자 나노입자*

[0213] 고분자 나노입자 (PNs)는 10 내지 1000 nm의 직경을 갖는 콜로이드 담체이며, 다양한 생분해성 및 비-생분해성 고분자를 포함한다. PNs는 나노구 (NSs) 또는 나노캡슐 (NCs)로 분류될 수 있다; NSs는 약물을 흡착하거나 또는 포획하는 매트릭스 시스템인 반면, NCs는 약물이 분산된 오일 코어를 함유하는 주위 고분자 벽이 있는 저장소-유형 시스템이다.

[0214] 이러한 시스템은 국소 안구 전달 시스템으로 연구되었으며, 안구 표면에 대한 향상된 접착력 및 약물의 제어 방출을 나타내었다. 이러한 PNs은 포획된 약물의 물리-화학적 특성을 차폐할 수 있기 때문에, 이들은 약물 안정성을 개선하고 결과적으로 약물 생체이용률을 개선할 수 있다. 또한, 이러한 콜로이드 담체는 액체 형태로 투여될 수 있어, 투여 및 환자의 순응도를 용이하게 한다.

[0215] 나노에멀젼 (NEs)은 계면활성제를 사용하여 안정화된 2개의 비혼화성 액체 (수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil))의 이종 분산액이다. 이러한 균질계는 모두 낮은 점도의 유체이므로, 눈에 국소 투여로 적용할 수 있다. 또한, 계면활성제의 존재는 막 투과성을 증가시켜 약물 흡수를 증가시킨다. 이 외에도, NEs는 약물의 지속적인 방출(sustained release)을 제공하고, 친수성 및 친유성 약물을 모두 수용할 수 있는 능력을 가지고 있다. 국소 안구 전달에서 나노담체의 수많은 이점 및 봄철 각결막염에서 이미 입증된 타크로리무스의 효율성을 고려하여, 우리의 연구는 개발에 초점을 맞추었다.

[0216] 본 연구에서는, 콜로이드 전달 시스템 (나노캡슐 및/또는 나노에멀젼)에서 타크로리무스 캡슐화가 각막 약물 보유를 개선하고 안구 침투를 증가시켜 VKC에서 더 높은 치료 효과를 가져올 것이라는 가설을 세웠다.

[0217] 전반적인 목표는 난치성 VKC 환자를 위해 전 세계적으로 상업적으로 이용가능한 치료의 필요성을 충족시키기 위해 타크로리무스가 담지된 안정된 콜로이드 안과 제형을 개발하는 것이다.

[0218] 본 연구에서, 우리는 하기의 목표에 초점을 맞추었다:

[0219] a. 타크로리무스 나노담체 (NEs/NCs)의 설계 및 특성

[0220] b. 제형의 안정화 및 눈의 생리적 조건에 대한 적응

[0221] c. 나노담체의 돼지 각막 침투에 대한 *Ex-vivo* 평가 및 절제된 돼지 각막에 대한 선택된 나노담체의 *ex-vivo* 독성 평가.

[0222] **4. 물질**

[0223] 타크로리무스 (일수화물)는 TEVA (Opava, Komarov, Czech Republic)에 의해 제공받았다; 피마자유는 TAMAR industries (Rishon LeTsiyon, Israel)에서 구입하였으며, 폴리소르베이트 80 (Tween® 80), 폴리옥실-35 피마자유 (CremophorEL), D (+) 트레할로오스, D-만니톨, 수크로오스, MTT (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드)는 Sigma-Aldrich (Rehovot, Israel)에서 구입하였다. Lipoid E80은 Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany)에서 구입하였으며, 중쇄 트리글리세리드 (MCT)는 Societe des Oleagineux (Bougival, France)에 의해 제공받았다. 글리세린은 Romical (Be'er-Sheva, Israel)에서 구입하였다. [^{3}H]-타크로리무스, Ultima-Gold® 액체 섬광 칵테일(liquid scintillation cocktail) 및 Solvable®는 Perkin-Elmer (Boston, MA, USA)에서 구입하였다. PVA (Mowiol 4-88)는 Efal Chemical Industries (Netanya, Israel)에서 구입하였다; PLGA 4.5K (MW: 4.5KDa), PLGA 7.5K (MW: 7.5KDa) 및 PLGA 17K (MW: 17KDa)는 Evonik Industries (Essen, Germany)에서 구입하였다. PLGA 50 K (MW 50 KDa)는 Lakeshore Biomaterials (Birmingham, AL, USA)에서 구입하였으며, PLGA 100K (MW 100KDa)는 Lactel® (Durect Corp., AL, USA)에서 구입하였다. 마크로골 15 히드록시스테아레이트 (Solutol® HS 15)는 BASF (Ludwigshafen, Germany)에 의해 제공받았다. (2-히드록시프로필)-β-시클로덱스트린 (HPβCD)은 Carbosynth (Compton, UK)에서 구입하였다. 모든 유기 용매는 HPLC 등급이었으며, J.T Baker (Deventer, Holland)에서 구입하였다. 모든 조직 배양 제품은 Biological Industries Ltd. (Beit Ha Emek, Israel)에서 구입하였다.

[0224] **5. 방법**

[0225] **5.1. 나노담체의 제조**

[0226] ***5.1.1. 블랭크 및 약물-담지된 NPs의 제조***

[0227] 잘-확립된 용매 치환 방법[20]에 따라 다양한 PLGA 나노입자를 제조하였다. 간략하게, (락트산:글리콜산의 50:50 혼합물)의 고분자 폴리 락틱-코-글리콜산 (PLGA)를 0.6% w/v의 농도로 아세톤에 용해시켰다. NCs 제조의 경우, MCT/피마자유 및 Tween 80/Cremophor EL/Lipoid E80을, 제형 주사(formulations scanning)의 목적으로, 다양한 농도 및 조합으로 유기상에 도입하였다. NSs 제조의 경우, 유기상에 혼합된 오일이 없다. 타크로리무스를 여러 농도로 유기상에 첨가하였으며, 최적의 농도는 0.05 및 0.1% w/v 였다. 유기상을 0.2-0.5% w/v Solutol® HS 15 또는 1.4% w/v PVA를 함유하는 수상에 부었다. 유기상과 수상 사이의 부피비는 1:2 v/v 였다. 현탁액을 15분 동안 900 rpm에서 교반한 다음, 모든 아세톤을 감압 증발로 제거하였다. 농축된 제형의 경우, 원하는 최종 부피가 달성될 때까지 물도 증발시켰다. 원심분리 (4000 rpm; 5분; 25℃)에 의해 NPs의 정제를 수행하였다. 타크로리무스에 대한 최적의 제형을 얻기 위하여, 많은 NPs, 특히 NCs 제형을 제조하였으며, PLGA MW, 활성 성분 농도, 오일 유형, 및 수상 및 유기상에서 상이한 계면활성제의 존재가 NP의 안정성 및 특성에 미치는 영향을 확인할 수 있다.

[0228] ***5.1.2. 약물-담지된 NEs의 제조***

[0229] 고분자 PLGA의 첨가 없이 NCs에 대해 기재된 동일한 방법에 의해 상이한 나노에멀젼을 제조하였다. 이러한 제형은 0.05% w/v의 타크로리무스 농도의 목표를 달성하기 위해 물로 더 희석시켰다.

[0230] 방사성 표지된 NCs/NEs가 제조되었을 때, 3 μCi의 [^{3}H]-타크로리무스를 0.05% w/v의 타크로리무스 아세톤 용액과 혼합한 다음, 수상에 첨가하였다.

[0231] **5.2. 나노담체의 물리화학적 특성**

[0232] ***5.2.1. 입자/액적-크기 측정***

[0233] *5.2.1.1. 제타사이저(Zetasizer) 나노 ZS*

[0234] 25℃에서 말베른 제타사이저 기기(Malvern's Zetasizer instrument) (Nano series, Nanos-ZS)로 다양한 NCs 및 NEs의 평균 직경을 측정하였다. 10 μL의 각 제형을 HPLC 용 990 μL 물에 희석시켰다.

[0235] *5.2.1.2. 마스터사이저(Mastersizer)*

[0236] 마스터사이저 2000 (Malvern Instruments, UK)을 이용하여 NEs의 액적 크기도 측정하였다. 측정 당 약 5 mL의 각 NE를 사용하고, 120 mL의 DDW에 분산시킨 다음, 일정한 교반 (~1,760 rpm) 하에서 측정하였다.

[0237] *5.2.2. 형태학적 평가*

[0238] *5.2.2.1. 투과 전자 현미경 (TEM) 영상*

[0239] 투과 전자 현미경 (TEM) 관찰은 JEM-1400plus 120 kV (JEOL Ltd.)를 이용하여 평가되었다. 음성 염색을 위해 시료를 우라닐 아세테이트와 혼합하여 표본을 준비하였다.

[0240] *5.2.2.2. 극저온 투과 전자 현미경(Cryo-transmission electron microscopy, Cryo-TEM) 영상*

[0241] 극저온 투과 전자 현미경 (Cryo-TEM) 관찰을 위해, NEs/NPs 현탁액 한 방울을 300 메쉬 Cu 그리드 (Ted Pella Ltd.)에 지지된 탄소-코팅된 천공 고분자 막에 놓고, 액체 에탄에서 -170℃까지 빠른 담금질(quench)에 의해 Vitrobot Mark-IV (FEI)를 이용하여 표본을 자동으로 유리화시켰다(vitrified). -180℃로 유지된 가탄 극저온-홀더(Gatan cryo-holder)와 함께 120kV에서 Tecnai T12 G2 Spirit TEM (FEI)를 이용하여 시료를 연구하였다.

[0242] **5.3 NPs의 동결건조**

[0243] 일부 동결보호제를 1:20 내지 1:1 (PLGA:동결보호제) 범위의 다양한 질량비로 시험하였다. 동결보호제 수용액의 한 부분을 신선한 NPs 현탁액의 한 부분에 첨가하고 잘 혼합하였다. 그 다음, 제제를 엡실론 2-6D 동결-건조기 (Christ)로 17 h 동안 동결건조시켰다. 필요한 경우, 1 mL NPs의 계산된 중량에 상응하는 양의 건조된 분말을 1 mL의 물에 분산시켜 초기 분산액을 재구성하였고, 재구성은 입자-크기 분포를 특징으로 한다.

[0244] **5.4. 등장성 조정 및 측정**

[0245] 등장성을 달성하기 위해, 글리세린을 상이한 제형에 첨가하였다. NEs 및 신선한 NPs의 경우, 2.25% w/v 글리세린의 농도가 필요한 반면, 동결건조되고 재구성된 NPs의 경우 2% w/v로 충분하였다. 삼투압 측정은 3MO Plus Micro Osmometer (Advanced Instruments Inc., Massachusetts, USA)에서 수행되었다.

[0246] **5.5. 타크로리무스 정량화**

[0247] *5.5.1. NEs/신선한 NPs 내 약물 함량*

[0248] NEs 내 타크로리무스 함량 (중량/부피)은 HPLC로 결정하였다. 50 μl의 NEs를 950 μl의 아세토니트릴에 첨가하고 UV 검출기가 장착된 HPLC 시스템 (Dionex ultimate 300, Thermo Fisher Scientific)에 주입하였다. 5μm Phenomenex C18 컬럼 (4.6x150mm) (Torrance, California, USA), 60℃에서 0.5 mL/min의 유속, 및 이동상으로 95:5 v/v의 아세토니트릴:물의 혼합물을 이용하여, 타크로리무스는 213 nm의 파장에서, 5.1분의 머무름 시간으로 검출되었다.

[0249] *5.5.2. 동결건조된 NPs에 담지된 약물*

[0250] 20mg의 동결건조된 NPs를 2.5mL의 물에서 재구성하고, 10분 동안 더 초음파 처리하였다. 1mL의 이 분산액을 9mL의 아세토니트릴에 첨가한 다음, 5분 동안 볼텍싱하였다. 동결건조된 NPs에서 타크로리무스의 담지 효율은 HPLC로 측정하였다. 1mL의 후자의 용액을 앞에서 기재한 HPLC 시스템에 주입하였다. 동결건조된 분말에 담지된 타크로리무스는 식 (1)에 기재된 바와 같이 결정되었다.

[0251] $$\%Tac(w/w) = \frac{\text{약물 양}}{\text{동결건조된 분말 양}} \qquad (1)$$

[0252] **5.6. 타크로리무스 NPs 캡슐화 효율 분석**

[0253] 신선한 NPs의 캡슐화 효율 (EE) 측정을 위해, 1 mL 제형을 1.5 mL 캡이 있는 폴리프로필렌 튜브 (Beckman Coulter)에 놓고 4℃에서 75분 동안 45000 rpm으로 초-원심분리하였다 (Optima MAX-XP ultracentrifuge, TLA-45 Rotor, Beckman Coulter). HPLC 분석을 위해 상청액을 분리하였다. 100 μL의 상청액을 900 μL 아세토니트릴에 용해시켜 유리 타크로리무스 양을 결정하였다. EE는 식 (2)에 따라 계산되었다.

[0254] $$EE(\%) = \frac{\text{초기 약물의 양} - \text{유리 약물의 양}}{\text{초기 약물의 양}} * 100 \qquad (2)$$

[0255] 동결건조된 NPs의 캡슐화 효율 측정을 위해, 8 mg의 동결건조된 분말을 1 mL의 물에서 재구성하고, 4℃에서 40분 동안 40000 rpm의 속도로 초-원심분리하였다. 캡슐화 효율은 신선한 NPs에 대해 앞에서 기재된 대로 결정되

었다.

[0256] **5.7. 타크로리무스 담지된 나노담체 안정성 분석**

[0257] ***5.7.1. NEs의 안정성 평가***

[0258] 신선한 타크로리무스 NEs를 1 mL의 시료로 나누고, 4℃, 실온 및 37℃에서 밀봉시키고 빛으로부터 보호하였다. NEs의 안정성은 이전에 기재된 것과 동일한 프로토콜을 이용하여 액적 크기 분포 및 함량에 대한 시료를 취하여, 1, 2, 4 및 8 주에 평가되었다.

[0259] ***5.7.2. NPs의 안정성 평가***

[0260] 타크로리무스 NPs 건조된-분말을 150 mg의 시료로 나누고, 4℃, 실온 및 37℃에서 밀봉시키고 빛으로부터 보호하였다. 분말을 1, 2, 4, 8, 12 및 17 주에 분석하였다. 각 기간이 끝날 때, 관련 시료에서 분말을 취하여 물에 재-분산시켰다. 이전에 기재된 프로토콜을 이용하여 입자-크기 분포 및 함량 분석으로 현탁액 안정성을 평가하였다.

[0261] ***5.8. Ex Vivo* 각막 약물 침투 실험**

[0262] 라하브 동물 연구소 (Kibbutz Lahav, Israel)에서 돼지 눈을 얻었다. 적출된 (enucleated) 눈은 운송 동안 얼음에 보관하였으며, 적출 후 3시간 이내에 사용하였다. 약 5 mm의 공막으로 둘러싸인 각막을 절개하고, 1.0 cm^2의 유효 확산 영역 (effective diffusion area) 및 8 mL의 수용자 구획(receiver compartment)이 있는 프란츠 확산 세포 (Permegear Inc., Hellertown, PA, USA)에 놓았다. 10% 에탄올과 혼합된 둘베코스 인산염-완충 식염수 (PBS) (pH = 7.0)를 35℃로 유지된 수용자 챔버에 놓고 계속 교반하였다. NEs/NPs 제형에 담지된 ^{3}H-타크로리무스 및 피마자유 내 ^{3}H-타크로리무스를 함유하는 대조군을 고정시킨 각막에 적용하였다. 실험 시작 후 24h에, 여러 구획에서 방사능-표지된 ^{3}H-타크로리무스의 분포를 결정하였다. 먼저, 각막 표면에 남아있는 제형을 수용체 매질로 연속 세척하여 모았다. 그 다음, 각막은 조직이 완전히 분해될 때까지 60℃로 유지되는 수조에서 Solvable®로 화학적으로 용해되었다. 마지막으로, 수용체 유체의 분취량도 모았다. 방사성 표지된 타크로리무스를 Tri-Carb 4910 TR 베타 계수기 (PerkinElmer, USA) 내 Ultima-gold® 섬광 액체에서 측정하였다.

[0263] **5.9. *Ex vivo* 각막 독성 평가**

[0264] ***5.9.1. MTT 생존력 분석***

[0265] 이전에 기재된 것과 동일한 조건 하에서 보관된 돼지 눈을 생존력 분석에 사용하였다. 약 5 mm의 공막으로 둘러싸인 각막을 절개하고, 20mL 포비돈-요오드 용액에서 5분 동안 소독하였다. 그 다음, 각막을 PBS에서 세척하고, 10 μL의 상이한 농도의 NCs로 처리한 다음, 72h 동안 1.5 mL DMEM에서 37℃에서 배양하였다. 상이한 처리 후 각막 세포 생존력을 평가하기 위해, MTT 생존력 분석을 수행하였다. 먼저 MTT 분말을 PBS에 용해시켜 5mg/mL의 저장 용액을 제조하였다. 이 용액을 PBS에서 0.5mg/mL로 더 희석시키고, 500 μL의 희석된 용액을 배양 1h 전에 각 각막에 첨가하였다. 각 각막에 대해 700 μL 이소프로판올을 사용하고 실온에서 30분 동안 흔들어 염료 추출을 수행하였다. 후자의 과정 후, 100 μL의 추출물을 취하여 570nm의 파장에서 BioTek의 Cytation 3 영상 판독기에서 판독하였다.

[0266] ***5.9.2. 상피 두께 측정***

[0267] 이전에 기재된 것과 동일한 프로토콜에 따라 처리되고 배양된 절개된 각막을, 12시간 동안 파라포름알데히드에 담그고, 조직학적 절편이 될 때까지 에탄올에 더 옮겼다. 시료를 4 μm로 자르고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 조직학 사진은 Olympus B201 현미경 (X40의 광학 배율(optical magnification), Olympus America, Inc., MA, USA)으로 촬영하였다. Image J 소프트웨어를 이용하여, 측정된 상피 영역을 이의 길이로 나누어 상피 두께를 얻었다.

[0268] **6. 결과**

[0269] **6.1. 나노에멀젼 (NEs)**

[0270] ***6.1.1. 조성 및 특성***

[0271] 계면활성제와 약물 농도를 변화시켜 수많은 NEs를 제조하였으며, 스크리닝은 좁은 크기 분포를 나타내는 초미세

액적(submicronic droplets)을 갖는 물리적 및 화학적으로 안정된 제형을 찾는 것을 목표로 하였다. 얻어진 NEs의 물리-화학적 특성은 **표 9**에 요약되어 있다. 수상에 계면활성제로 PVA를 함유하고 유기상에 피마자유를 함유하는 제형만이 물리적으로 안정하였다 (NE-5 내지 NE-8). 추가 평가를 위해 NE-6 내지 NE-8를 선택하였다. 이러한 NEs는 주로 유기상 계면활성제 Tween 80의 농도가 달랐으며, 제타사이저 나노 ZS로 측정한 낮은 다분산 지수 (PDI) 및 176 내지 201 nm의 다양한 평균 액적 직경을 나타내었다.

[0272] **[표 9]**

			유기상에서 계면활성제		수상에서 계면활성제				
제형	타크로리무스 W/V %[a]	오일 유형	Tween 80 W/V %[a]	Lipoid E80 W/V %[a]	Solutol W/V %[a]	PVA W/V%[a]	평균직경 (nm)	PDI	비고
NE-1	0.25	피마자유 MCT	0.5	-	0.5	-	164.3	0.11	응집체
NE-2	0.25	피마자유 MCT	-	0.8	0.5	-	124.1	0.12	응집체
NE-3	0.25	피마자유	-	0.8	0.5	-	132.6	0.13	응집체
NE-4	0.25	피마자유 MCT	-	0.8	-	1.4	120.2	0.1	응집체
NE-5	0.25	피마자유	3.8	-	-	1.4	232.3	0.24	-
NE-6	0.1	피마자유	1.4	-	-	1.4	201.2	0.15	-
NE-7	0.1	피마자유	0.9	-	-	1.4	195.8	0.10	-
NE-8	0.1	피마자유	0.4	-	-	1.4	176.7	0.11	-

표 9. 상이한 NEs 제형의 조성 및 특성. [a]증발 후 제형 내.

[0273]

[0274] 일반 제타사이저 나노 ZS는 미세 입자의 측정에 제한되어 있으므로, NEs의 액적에 대한 입자 크기 분포의 확인은 0.02 - 2000 μm의 크기 범위를 포함하는 마스터사이저 2000 (Malvern Instruments, UK)을 이용하여 레이저 회절법에 의해 이루어질 수 있다. 기기로 얻은 **도 5**에서 알 수 있는 바와 같이, 선택된 제형 (NE-6 내지 NE-8)은 시험된 모든 NEs에 대해 유사한 초미세 프로파일을 나타내어, 제타사이저 나노 ZS에 의해 얻은 결과를 확인하였다.

[0275] 선택된 NEs의 형태학적 검사를 수행하여 이들의 물리화학적 특성을 완료하였다. 모든 제형에서 구형-모양의 NEs 액적이 관찰되었다 (**도 6**).

[0276] *6.1.2. Ex vivo 각막 침투 실험*

[0277] **도 7**에 보고된 결과는 24h 후 [^{3}H]-타크로리무스-담지된 NEs 및 오일 대조군의 국소 적용 후 면적 단위 당 각막에서 [^{3}H]-타크로리무스의 양 (**도 7a**) 및 수용체 구획에서 [^{3}H]-타크로리무스의 농도 (**도 7b**)를 나타낸다. 모든 시험된 NEs를 희석하여 0.05%의 타크로리무스 농도를 얻었으며, 등장성으로 조정하였다.

[0278] NE-8에 담지된 타크로리무스는 오일 대조군에 비해 각막에서 훨씬 더 많이 함유되었다 ($p<0.05$). 수용체 유체에서 약물 농도는 대조군에 비해 NE-6, 7 및 NE-8에서 4배 더 높았으며 ($p<0.05$), 나노 에멀젼에 담지되었을 때 각막을 통한 타크로리무스 침투의 현저한 증가를 강조하였다. 그러나, 시험된 NEs간에, 투과 차이는 발견되지 않았다 ($p>0.05$).

[0279] *6.1.3. 안정성 평가*

[0280] 3개의 선택된 NEs는 4℃ 및 실온에서 저장하였을 때, 8주 후에 보존된 물리-화학적 특성 및 약물 함량을 나타내었다. 그러나, 37℃에서 동일한 기간 후, 타크로리무스 함량 (w/v)은 **표 10**에서 알 수 있는 바와 같이 초기 약물 함량보다 최소 20% 감소하였다.

[0281] [표 10]

	4°C			37°C			Room Temperature		
	Size (nm)	PDI	Content (%)	Size (nm)	PDI	Content (%)	Size (nm)	PDI	Content (%)
Initially	201.2	0.15	0.06	201.2	0.15	0.06	201.2	0.15	0.06
8 weeks	200.3	0.11	0.04	200.3	0.11	0.04	201.1	0.14	0.05
Initially	195.8	0.1	0.05	195.8	0.1	0.05	195.8	0.1	0.05
8 weeks	195.3	0.12	0.05	194.8	0.09	0.04	195.1	0.1	0.05
Initially	176.7	0.11	0.05	176.7	0.11	0.05	176.7	0.11	0.05
8 weeks	180.3	0.11	0.05	178.7	0.11	0.04	177.1	0.11	0.05

[0282] 표 10. 상이한 저장 온도에서 8주 후 선택된 NEs의 안정성 결과.

[0283] 6.2. 나노입자

[0284] PLGA MW, 오일, 계면활성제, 약물 및 이의 농도를 변화시키고 나노캡슐 (NCs) 또는 나노구 (NSs)를 제조하여 수많은 나노입자의 제형을 제조하였다. 이 스크리닝은 좁은 크기 분포 및 높은 캡슐화 효율을 나타내는 입자로 안정된 제형을 찾는 것을 목표로 하였다.

[0285] *6.2.1. 나노구 (NSs)*

[0286] NSs에서 타크로리무스를 제형화하려는 모든 시도는 실패하였으며, 몇 시간 후 응집체가 형성되었다 (**표 11**). 타크로리무스를 용해시키는 오일은 약물을 제형화하고 안정된 제품을 얻기 위해 필수적인 것으로 보였다.

[0287] [표 11]

			유기상에서 계면활성제		수상에서 계면활성제	
제형	PLGA		Tween 80	Lipoid E80	Solutol	비고
	MW(kDa)	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	
NS-1	100	0.7	0.1	-	0.5	응집체
NS-2	100	0.7	0.1	-	0.5	응집체
NS-3	100	0.7	0.5	-	0.5	응집체
NS-4	60	0.7	0.5	-	0.5	응집체
NS-5	50	0.7	-	0.5	0.5	응집체

[0288] 표 11. 상이한 NSs 제형의 조성.[a]증발 후 재형 내

[0289] *6.2.2. 나노캡슐 (NCs)*

[0290] *6.2.2.1. 조성 및 특성*

[0291] 유일한 오일 유형으로 피마자유로 제형화하였을 때 NEs의 물리적 안정성을 기반으로 하여, 동일한 성분으로 NCs를 제형화하였다. PLGA 분자량, 및 수상 및 유기상에서 사용되는 계면활성제의 농도 및 유형과 같은 다양한 매개변수는 제형에서 변경되었다 (**표 12**).

[0292] [표 12]

					유기상에서 계면활성제			수상에서 계면활성제	
제형	PLGA		타크로리무스	피마자유	Tween 80	Cremophor EL	Lipoid E80	Solutol	PVA
	MW (kDa)	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]	(W/V %)[a]
NC-1	50	0.6	0.05	1.05	-	0.25	-	-	1.4
NC-2	50	0.6	0.05	1.05	0.2	-	-	0.2	-
NC-3	50	0.6	0.05	1	0.4	-	-	0.2	-
NC-4	50	0.6	0.05	1	0.3	-	-	-	1.4
NC-5	50	0.6	0.1	1	0.2	-	-	0.2	-
NC-6	50	0.6	0.05	1.1	-	0.25	-	0.2	-
NC-7	50	0.6	0.05	1.1	-	0.5	-	0.2	-
NC-8	50	0.6	0.05	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-9	50	0.6	0.07	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-10	50	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-11	50	0.6	0.1	1	-	-	0.3	0.2	-
NC-12	50	0.6	0.1	0.9	-	-	0.5	0.5	-
NC-13	50	0.6	0.1	1.2	-	-	0.3	0.5	-
NC-14	50	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.25	-
NC-15	4.5	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-16	7.5	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-17	17	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-18	100	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-19	100	0.6	0.1	1.2	-	-	0.3	0.5	-

표 12. 상이한 NCs 제형의 조성.

[0293]

[0294] 추가 특성화를 위해 가장 안정된 제형을 선택하였다 (**표 13**). PLGA 100KDa로 제형화된 NC-18을 제외하고, 모든 NCs는 PLGA 50 KDa으로 제형화되었다. NCs의 크기는 90에서 165 nm 까지 다양하였고, PDI가 0.1 이하로 나타났으며, 형성된 NCs의 균질성을 강조하였다. 얻은 캡슐화 효율 (EEs)은 다른 매개변수를 변경할 때 크게 다르지 않았으며, 최대 81%에 도달하였다.

[0295] [표 13]

제형	평균 직경 (nm)	PDI	EE (%)
NC-1	165.7	0.08	79
NC-2	165.1	0.1	79
NC-5	162.8	0.1	77
NC-6	155.9	0.08	81
NC-10	106.5	0.09	61
NC-18	90.8	0.08	73

표 13. 선택된 NCs 제형의 특성.

[0296]

[0297] *6.2.2.2. 동결건조*

[0298] 수성 매질에서 PLGA NCs의 불안정성 때문에, 동결건조를 수행하였다. 입자 응집을 방지할 수 있는 가장 효율적인 화합물을 확인하기 위하여, 다양한 비의 동결보호제의 스크리닝이 이루어졌다. 최종 재구성된 제품에서 이러한 화합물의 농도는 FDA 요구 사항을 충족하기 위해 시험된 비를 고려하였다. 수크로오스 및 트레할로오스는 1:1에서 1:20 까지 변화하는 PLGA:동결보호제의 비로 케이크가 부족하기 때문에 NCs 동결건조에 적합하지 않은 것으로 밝혀졌다. 만니톨은 케이크를 제공하였지만, 재구성 후 응집체는 1:1에서 1:6의 비로 나타났다 (**표 14**).

[0299] [표 14]

동결보호제	비 PLGA:동결보호제	재구성 전	재구성 후	평균 직경 (nm)	PDI
수크로오스/트레할로오스	1:1	케이크 없음	-	-	-
	1:2	케이크 없음	-	-	-
	1:5	케이크 없음	-	-	-
	1:10	케이크 없음	-	-	-
	1:15	케이크 없음	-	-	-
	1:20	케이크 없음	-	-	-
만니톨	1:1	우수한 케이크	응집체	-	-
	1:2	우수한 케이크	응집체	-	-
	1:4	우수한 케이크	응집체	-	-
	1:6	우수한 케이크	응집체	-	-

표 14. 상이한 비의 다양한 동결보호제를 이용한 선택된 NCs 의 외관, 입자 크기 및 PDI 값

[0300]

[0301] 선택된 NCs의 경우, β-시클로덱스트린은 물에서 우수한 케이크 및 빠른 재분산을 제공하는 유일한 동결보호제였다. 공정 전후의 크기 유사성과 관련하여, 비교적 낮은 PDI와 함께, NC-1 및 NC-2 제형에 대해 최상의 동결건조 결과를 얻었다. PLGA:β-시클로덱스트린의 바람직한 비는 두 NCs 모두에 대해 1:10 이었다 (**표 15**).

[0302] [표 15]

제형	비 PLGA:β-시클로덱스트린	재구성 전	재구성 후	평균 직경 (nm)	PDI
NC-1	1:1	우수한 케이크	큰 응집체	-	-
	1:3	우수한 케이크	큰 응집체	-	-
	1:5	우수한 케이크	큰 응집체	-	-
	1:7	우수한 케이크	우수	233.7	0.37
	1:8	우수한 케이크	우수	225.9	0.25
	1:10	우수한 케이크	우수	165.4	0.18
NC-2	1:1	우수한 케이크	소립종(Small grains)	250.2	0.24
	1:3	우수한 케이크	소립종	225.3	0.19
	1:6	우수한 케이크	우수	200.4	0.19
	1:8	우수한 케이크	우수	190.3	0.17
	1:10	우수한 케이크	우수	170.2	0.15

표 15 상이한 비의 β-시클로덱스트린을 이용한 NC-1 및 NC-2 의 외관, 입자 크기 및 PDI 값

[0303]

[0304] 결과적으로, 선도 제형은 수상 및 유기상에서 사용되는 계면활성제가 다른 NC-1 및 NC-2 이었다. NC-1은 Cremophor EL 및 PVA를 함유하는 반면 NC-2는 Tween 80 및 Solutol로 제형화되었다. 이러한 2개의 NCs 제형은 **표 16**에서 알 수 있는 바와 같이 동결건조 과정 후 낮은 PDI 및 70%의 캡슐화 효율로, 약 170nm의 초기 크기를 보존하였다.

[0305] **[표 16]**

제형	NC-1	NC-2
동결건조 전		
크기 (nm)	165.7	165.1
PDI	0.08	0.1
EE(%)	81	79
동결건조 후		
크기 (nm)	165.4	170.2
PDI	0.18	0.15
EE(%)	70	71

[0306] 표 16. 동결건조 전후의 선도 NCs 특성

[0307] 또한, TEM으로 형태학적 검사를 평가하였다 (**도 8**). 평가된 2개의 제형은 동결건조 전에 구형-모양의 NCs를 제시하였다 (**도 8a**). 물에서 동결건조 및 분말 재구성은 입자의 물리적 측면에 영향을 미치지 않았으며, 응집이 보이지 않았다 (**도 8b**).

[0308] ***6.2.2.3. Ex vivo 각막 침투 실험***

[0309] NCs에 담지되었을 때, 타크로리무스가 각막에 투과할 가능성을 평가하는 것을 목표로, 방사성 표지된 제형의 침투 실험을 수행하였다. **도 9**에 보고된 결과는 24h 후 [^{3}H]-타크로리무스-담지된 NCs 및 오일 대조군의 국소 적용 후 면적 단위 당 각막에서 [^{3}H]-타크로리무스의 양 (**도 9a**) 및 수용체 구획에서 [^{3}H]-타크로리무스의 농도 (**도 9b**)를 나타낸다. 2개의 NCs 제형을 동결건조 전후에 물에서 재구성하여 0.05% w/v의 타크로리무스 농도를 얻었다.

[0310] 모든 NCs 처리는 오일 대조군에 비해 각막에서 더 많은 타크로리무스를 유의하게 함유하였다 (*$p<0.05$, **$p<0.01$). 대조군에 비해 유의하게 더 높은 수용체 유체에서의 약물 농도에 대해서도 동일한 결과를 얻었다 (**$p<0.01$). 또한, 이러한 결과는 NC-1에 비해 NC-2에 담지되었을 때 각막을 통한 약물 투과가 더 우수하다는 것을 나타내었으며 (**$p<0.01$), 이는 제형에 사용된 계면 활성제의 중요성을 강조하였다. 동결건조 및 수성 재구성 ($p>0.05$) 후 이러한 관찰에서 차이가 보이지 않았으며, 이는 이 과정이 NCs의 특성을 변경하지 않았음을 시사한다.

[0311] ***6.2.2.4. 안정성 평가***

[0312] 2개의 선택된 NCs 제형은 상이한 온도에서 시간 경과에 따라 저장될 때 상이한 안정성 프로파일을 나타내었다. 8주 후, 37℃에서 NC-1의 크기 및 PDI는 증가하였고, 초기 약물 함량 (w/w)은 약 20% 감소하였다 (**표 17**). 반대로, NC-2는 시험된 저장 시간 동안 물리-화학적 특성 및 초기 약물 함량을 보존하였다 (**표 18**). 이러한 결과는 제형에서 계면활성제의 선택이 시간 경과에 따라 초기 NCs의 특성을 유지하는데도 중요하다는 것을 시사하였다.

[0313] [표 17]

	4°C			Room Temperature			37°C		
	Size (nm)	PDI	Content (%w/w)	Size (nm)	PDI	Content (%w/w)	Size (nm)	PDI	Content (% w/w)
Initially	165.4	0.18	0.6	165.4	0.18	0.6	165.4	0.18	0.6
1 week	165	0.19	0.6	164.1	0.18	0.6	167.2	0.19	0.6
2 weeks	164	0.19	0.6	164.3	0.19	0.6	169.3	0.19	0.6
4 weeks	170	0.20	0.6	161.7	0.22	0.6	173.2	0.23	0.6
8 weeks	165.9	0.22	0.6	165.3	0.23	0.6	178.3	0.23	0.5

표 17. 상이한 저장 온도에서 시간 경과에 따른 NC-1 안정성 결과

[0314]

[0315] [표 18]

	4°C			Room Temperature			37°C		
	Size (nm)	PDI	Content (%w/w)	Size (nm)	PDI	Content (%w/w)	Size (nm)	PDI	Content (%w/w)
Initially	170.2	0.15	0.5	170.2	0.15	0.5	170.2	0.15	0.5
2 weeks	169.1	0.11	0.5	170.1	0.14	0.5	169.3	0.13	0.5
4 weeks	169.9	0.11	0.5	170.8	0.12	0.5	170	0.12	0.5
8 weeks	169.2	0.12	0.5	172.2	0.13	0.5	171.7	0.14	0.5
12 weeks	167.6	0.12	0.5	172.7	0.12	0.5	173.3	0.13	0.5
17 weeks	178.7	0.13	0.5	171.6	0.13	0.5	178.3	0.13	0.5

표 18. 상이한 저장 온도에서 시간 경과에 따른 NC-2 안정성 결과

[0316]

[0317] *6.2.3. NCs 대 NEs의 ex vivo 각막 침투 비교*

[0318] 각막 침투와 관련하여 타크로리무스 담지된 나노담체 중 하나가 두 번째 것보다 잠재적 우위인지 평가하기 위하여, 얻은 결과의 비교를 수행하였다. 통계 분석은 동결건조된 NC-1과 함께 신선한 NCs가 NEs에 비해 각막에 더 많이 침투하지 않았음을 시사하였다 ($p>0.05$). 그러나, 동결건조된 NC-2는 **도 10**에서 볼 수 있는 바와 같이 각막을 통해 상이한 NEs보다 더 높은 타크로리무스 양을 전달하였다 (*$p<0.05$, **$p<0.01$).

[0319] *6.2.4. Ex vivo 독성 평가*

[0320] *6.2.4.1. MTT 생존력 분석*

[0321] 각막 침투 실험의 성공 및 시간 경과에 따른 이의 보존된 안정성의 결과로서, NC-2가 선도 제형이 되었다. 각막 세포에 대한 독성을 평가하기 위하여, 상이한 농도의 등장성, 재구성된 NC-2를 장기 배양(organ culture)에서 72h 동안 배양된 *ex vivo* 돼지 각막에서 시험하였다. 이후에 수행된 MTT 분석은, **도 11**에 나타난 바와 같이 NCs가 대조군 미처리 각막 ($p>0.05$)에 비해 평가된 농도에서 조직의 생존력에 영향을 미치지 않았음을 시사하였다.

[0322] *6.2.4.2. 상피 두께 측정*

[0323] NC-2 적용에 의해 유발된 각막 상피의 잠재적 피해(potential harm)를 평가하기 위하여, 처리된 *ex vivo* 돼지 각막의 조직학적 및 H&E 염색을 72h 배양한 다음 상피 두께 측정을 수행하였다. 얻어진 결과는 NC-2 처리된 각막 및 미처리 대조군 사이에 유사한 상피 두께를 나타내었으며 ($p> 0.05$), 이는 시험된 NCs의 농도가 각막 형태에 영향을 미치지 않았음을 시사한다 (**도 12**).

[0324] **7. 논의**

[0325] 눈을 표적하는 면역억제제 약물 전달 시스템의 설계는 먼저 면역억제제를 캡슐화하고 눈의 고도로 선택적인 각막 장벽을 효율적으로 침투할 수 있는 잠재력을 가진 나노담체의 개발을 필요로 하였다.

[0326] 본 연구에서, 면역 억제제 타크로리무스는 생분해성 PLGA-기반 나노입자 전달 시스템 내에 캡슐화되거나 또는 수중유 나노에멀젼에 담지되었다. 친유성 약물 캡슐화에 널리 사용되고 적합한 기법인 용매 치환 방법은, 상이

한 계면활성제, PLGA MWs, 타크로리무스 및 오일 농도를 가진 NEs, NSs 및 NCs의 제조를 위해 본 연구에서 채택되었다. 고분자의 아세테이트 기가 안정화 사슬의 강력한 용매화 (수화)와 함께 오일 액적의 소수성 표면에 흡착하는 능력 때문에, 아마 수상에서 계면활성제로 PVA를 함유하는 NEs 제형만이 물리적으로 안정적이었고, 효과적인 입체 장애를 야기한다. 또한, PVA와 같은 고분자 계면활성제는 현탁액에서 나노액적을 유지하는 수상의 점도를 증가시킨다. 유기상 계면활성제 (Tween 80) 농도를 변화시켜 선택된 NEs 제형은, 원하는 모든 물리화학적 특성을 나타내었다. 실제로, 나노액적은 176에서 201 nm까지 변화하는 평균 크기, 낮은 다분산 지수 (~ 0.1) 및 물리적 안정성을 나타내었다. 타크로리무스 NEs를 특성화하고 최적화한 후, 프란츠 확산 세포를 이용하여 이들의 각막 침투/투과 프로파일을 평가하였다. NEs 및 오일 대조군의 [^{3}H]-타크로리무스 분포는 상이한 구획에서 결정되었다. 결과는 각막을 통한 [^{3}H]-타크로리무스의 침투가 오일 대조군보다 2배 이상 더 큰 것으로 나타났다 (**도 7b**).

[0327] 이 결과는 타크로리무스가 이의 나쁜 수 용해도 및 비교적 높은 분자량으로 인해 각막 상피를 침투하기 어렵고 각막 간질에 축적되기 때문에 특히 중요하다, 그러나, 나노에멀젼에 담지되면, 세포 수용체 유체에 더 많이 투과된 타크로리무스는 약물이 복잡한 각막 조직을 구성하는 친유성 부분 및 친수성 부분 모두에 침투하였음을 시사한다.

[0328] 이러한 결과는 문헌에 있는 이전 보고서의 결과와 일치하며, 이는 나노에멀젼 담체의 사용이 각막 상피에 의한 콜로이드 액적의 흡수로 인해 각막을 통한 약물의 침투를 개선시킬 수 있음을 나타낸다.

[0329] 이러한 프란츠 세포 실험 결과에서, Tween 80 농도를 NE-6의 1.4%에서 NE-8의 0.4%로 감소시켰을 때 각막 침투의 현저한 감소가 없었다는 점을 또한 강조해야 하고, 이는 이 계면활성제의 최소량이 침투 향상제로 작용하는 잠재력에 영향을 주지 않고 사용될 수 있음을 시사한다.

[0330] 가속화된 온도 조건에서 수행된 물리-화학적 안정성 평가는, 3개의 선택된 NEs (NE-6 내지 NE-8)에 대해 NEs의 물리적 안정성이 시험된 모든 온도에서 액적의 유사한 크기 및 PDI로 보존되었지만, 37℃에서 약물 함량은 8주 후 초기 타크로리무스 농도의 80%로 감소하였음을 나타내었다. 이러한 결과는 오일상 및 수상 사이의 약물의 분할을 고려할 때, 타크로리무스가 물의 존재로 인해 분해되었을 가능성이 있음을 시사한다.

[0331] 따라서, 수성 매질에서 NEs 제형의 불안정성을 극복하기 위해, 사용 전에 동결건조 및 재구성이 적용될 NP 제형의 최적화에 모든 노력을 집중하기로 결정하였다. 고도로 친유성인 타크로리무스를 NSs로 캡슐화하려는 시도는 실패하였다. 실제로, 몇분 후, 약물이 응집되었다. 이 나노담체의 불안정성은 여러 가지 이유를 가질 수 있다. 첫째, 타크로리무스는 PLGA 고분자보다 계면활성제에 더 높은 친화도를 가질 수 있으며, 이는 캡슐화 대신 약물의 미셀화를 야기할 수 있다. 또한, 타크로리무스는 고분자 표면에 흡착되어 약물이 수상으로 이동할 때 평형 상태에서 약물 응집을 야기할 수 있다.

[0332] 또한, NSs의 작은 크기는 깁스(Gibbs)의 자유 에너지를 증가시키므로, 입자가 스스로 조립하여 이들의 충돌, 약물 방출 및 이의 결정화를 유발하는 표면 에너지를 감소시키는 경향이 있다. NCs를 설계하는 것은 약물을 용해시킬 오일 성분 때문에 타크로리무스를 캡슐화하는데 더 좋은 해결책인 것처럼 보였다. 많은 제형의 스크리닝은 NCs의 성분 및 이의 농도를 변경함으로써 이루어졌다. 선택된 NCs는 170nm 미만의 평균 크기, 낮은 PDI (≤0.1) 및 NC-10의 61%에서 NC-6의 81%까지 변화하는 캡슐화 효율을 나타내었다. 따라서, 필요한 다음 단계는 수성 환경에서 타크로리무스 및 PLGA 분해를 모두 방지하기 위하여 NCs의 동결건조를 수행하는 것이었다.

[0333] 적당한 동결건조 방법은 3가지 필수 기준이 있다: 원래의 동결된 덩어리와 동일한 부피를 차지하는 온전한 케이크; 재구성된 NCs는 응집체 없이 균질한 현탁액 외관을 가진다; 마지막으로, 물 재구성시, NCs의 초기 물리화학적 특성이 유지되어야한다. 동결보호제의 유형 및 농도를 포함하여 수많은 매개변수는 동결건조에 의해 부과되는 스트레스에 대한 NCs의 내성에 영향을 미친다. 적당한 동결보호제를 선택하기 위하여, 다양한 농도에서 이들 중 많은 수의 스크리닝이 수행되었다. 선택된 모든 NCs의 경우, 수크로오스 및 트레할로오스의 상이한 비는 보존된 케이크를 제공하지 않았다. 동결보호제로 만니톨을 사용한 후 얻은 온전한 케이크에도 불구하고, 수성 재구성은 균질하지 않았다. 그러나, β-시클로덱스트린의 경우, 1:10의 비에서, 동결건조는 보존된 케이크, 균질한 수성 재구성 및 6개의 선택된 NCs 중 2개에 대한 물리-화학적 특성의 변경 없이 최적이었다. 수상 및 유기상에서 사용되는 계면활성제가 다른 NC-1 및 NC-2는, 다음 실험을 위한 선도 제형이 되었다. 형태학적 검사는 2개의 제형에 대해 동결건조 전후에 높은 유사성을 나타내었으며, 입자의 구형 모양이 보존되고 응집이 발견되지 않았다. 이 2개의 제형은 각막 보유 및 침투의 가능성을 평가하기 위해 프란츠 세포에서 더 시험하였다. NC-1, NC-2로부터의 [^{3}H]-타크로리무스의 분포, 각각의 동결건조된 분말 및 오일 대조군은 상이한 구획에서

결정되었다. 첫 번째 결과는 신선한 제형 및 동결건조된 제형 사이에 각막 보유 또는 이의 침투에 차이가 없음을 밝혀내었으며, 이는 이 과정이 NCs의 특성을 변경하지 않았음을 시사한다. 둘째, [^{3}H]-타크로리무스는 오일 대조군보다 NCs에서 각막 내에 2-배 이상 더 많이 보유되었다 (**도 9a**). 또한, 약물 농도는 오일 대조군보다 수용체에서 최대 4배 더 높았다 (**도 9b**). 셋째, NC-1 및 NC-2 사이의 수용체 유체 내 [^{3}H]-타크로리무스 농도의 유의한 차이를 강조하는 것도 중요하다. 이들을 구성하는 계면활성제가 다른 이들 제형은 침투 향상에 대한 이들 화합물의 영향을 평가하기 위해 시험되었다. 유기상에 Tween 80을 함유하고 수상에 Solutol을 함유한 NC-2는, 유기상에 Cremophor EL을 함유하고 수상에 PVA를 함유하는 NC-1보다 더 좋은 각막 침투를 나타내었다. 폴리옥시에틸화 비이온성 계면활성제인 Tween 80 및 Cremophor EL은 이러한 차이에 관여하지 않는 것으로 가정하였다. 반대로, 수상에 사용된 PVA는 이전에 말한 것처럼 입체 장애로 이루어진 상이한 작용 메커니즘을 가진 고분자 계면활성제이다. 또한, PLGA 나노입자의 제형에서, PVA의 소수성 부분은 고분자 표면에 네트워크를 형성하여 입자의 표면 소수성을 변경한다. 또한, 이러한 변경은 안구 침투와 관련된 메커니즘인 이들 입자의 세포 흡수에 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다. 따라서, PVA로 제형화된 NC-2의 감소된 침투는 콜로이드 약물 전달 시스템이 눈에 국소적으로 적용될 때 발생하는 각막 상피 흡수의 감소 때문일 수 있다. NEs 및 NCs의 비교는 두 나노담체가 각막을 통한 약물 침투를 달성하기 위해 대조군보다 우수하다는 것을 시사하였으나, 이미 보고된 바와 같이 신선한 NCs 및 NEs 간에 유의한 차이가 발견되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 동결건조된 NC-2의 각막 침투는 NEs보다 현저히 우수하였다. 이 결과는 콜로이드 나노담체의 각막 침투 사이에 차이가 없고 β-시클로덱스트린을 이용한 입자의 동결건조가 안구 투과를 감소시켰음을 나타내는 이전에 발표된 연구와 모순된다. 우리의 결과는 유리 약물이 동결보호제와 착화될 때 발생하지 않는 과정인, 나노캡슐의 흡수를 통해 약물 침투의 증가를 야기하는 비포획된(nonentrapped) 타크로리무스 및 β-시클로덱스트린 사이의 덜 복잡한 형성으로 이어지는 약물의 더 좋은 캡슐화 때문일 수 있다. 동결건조된 선택된 NCs의 안정성 평가는 NC-2에서만 초기 약물 함량이 가속화된 조건에서 시간 경과에 따라 보존되었음을 나타내었다. 반대로, NC-1 타크로리무스 함량은 37℃에서 8주 후에 17%까지 감소하였으며, 이는 아마도 일부 계면활성제가 약물 분해 촉진에 가속화할 수 있는 영향 때문일 것이다. NC-2에 의해 달성된 더 좋은 침투 및 안정성 결과를 고려할 때, 이것은 미래 실험을 위한 선도 제형이 되었다. 각막 상피에 대한 NC-2 독성은 MTT 실험 및 조직학적 측정으로 평가되었다. 상이한 약물 농도를 얻기 위해 물로 재구성된 동결건조된 분말은, 각막 세포의 생존력을 보존하고 각막 상피 무결성을 보존하는 것으로 입증되었으며, 이는 이 제형의 국소 안구 주입이 환자에게 안전할 수 있음을 시사한다.

[0334] **8. 덱사메타손 팔미테이트**

[0335] *8.1 안과용 FDA 승인된 오일의 용해도*

[0336] 덱사메타손 팔미테이트 용해도를 광유, 피마자유 및 MCT에서 평가하였다.

[0337] **[표 19]**

	농도 (mg/mL)
광유	1.3
피마자유	33.6
MCT	46.6

[0338] **표 19: 다양한 오일에서 평가된 덱사메타손**

[0339] MCT 오일에서 약물의 가장 높은 용해도를 얻었으므로, 이 오일은 제형 개발을 위해 선택되었다.

[0340] *8.2 나노담체 개발*

[0341] 덱사메타손 팔미테이트에 가장 적합한 나노담체를 선택하기 위하여, 나노에멀젼, 나노구 및 나노캡슐을 시험하였다. 가장 중요한 매개변수는 크기, PDI, 나노 입자의 캡슐화 효율 및 물리적 안정성이었다. 두 번째 목표는 높은 약물 농도 및 동결건조 가능성을 확보하는 것이었다.

[0342] [표 20]

성분 (mg)	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
DexP.	16.42	16.09	40.45	40.47	39.99	40	39.99	40.01	30.49	30.05	40.02	40.12	60	60.14	40.02	40.06
PLGA (0.15-0.25g/dL)	60.43	60.32	0	0	60.29	0	60.18	60.31	0	0	0	0	0	0	0	59.98
PLGA 17k Purac	0	0	0	0	0	60.39	0	0	0	0	60.14	0	60.34	60.02	60	0
Tween 80	20.54	25.5	52.95	53.01	26.89	27.89	24.51	0	0	48.39	0	0	30.66	0	25	0
TYLOXAPOL	0	0	0	0	0	0	0	17.49	0	0	11.44	16.14	0	12.46	0	14.46
피마자유	0	0	0	41.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MCT	0	25.96	45.1	0	52.35	50.27	100.1	51.03	0	0	0	50.45	50.35	50.03	49.54	49.86
아세톤 (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Solutol	20	20	20	20	20	20	20	20	0	20	20	20	20	20	0	0
Kolliphor RH 40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50.2	50.2
물 (mL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
최종 부피 (mL)	10	10	6	5	10	10	10	10	10	10	10	5	10	10	10	10.12
농도 (mg/mL)	1.684	1.911	7.611	8.968	N/A	4.23	N/A	4.31	3.05	3.005	4.1	8	6.35	6.15	4.26	4.1
EE(%)	58.6	82	N/A	N/A	N/A	91	N/A	98	N/A	N/A	N/A	N/A	92.5	96	84	92

신선한 제형	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
크기 (nm)	99.49	121.1	108.4	113.9	149	127.2	167.9	156.4	144.8	66.78	111.8	153.4	140.2	151.9	126.2	140.9
PDI	0.093	0.078	0.102	0.084	0.103	0.069	0.103	0.102	0.055	0.08	0.083	0.078	0.058	0.062	0.067	0.082

[0343] **표 20:** 나노담체 개발

[0344] *8.3 PLGA와 상이한 비의 히드록시프로필-β-시클로덱스트린을 이용한 동결건조를 수행하였다.*

[0345] **표 21**에 나타난 바와 같이, 빈 상자는 물에 의한 분말 재구성이 균질하지 않았음을 의미한다. 회색 상자는 동결보호제의 최소 비로 얻은 최상의 물리적 매개변수를 나타낸다.

[0346] [표 21]

PLGA:HPBCD		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D11	D12	D13	D14	D15	D16
1:2	크기			95.34*											
	PDI			0.123											
1:5	크기			140.6							333.9		333.9		
	PDI			0.133							0.418		0.418		
1:7	크기				293.2										
	PDI				0.244										
1:10	크기				251.2		159.1		172.6		184.6	191.1	180.8	139.8	142.4
	PDI				0.197		0.103		0.119		0.197	0.172	0.122	0.093	0.11
1:12	크기		138		208.2	217.3	150.7		172.2		176.1	177.7	172.7		
	PDI		0.092		0.139	0.233	0.091		0.103		0.175	0.111	0.093		
1:15	크기				180.8	194.4	147	214.8	168.8		169.1	172.8	171.8		
	PDI				0.106	0.158	0.049	0.226	0.099		0.116	0.136	0.083		

[0347] **표 21:** 나노에멀젼의 동결건조. *이러한 동결건조 과정 결과는 재현할 수 없었다.

[0348] *8.4 나노구*

[0349] 며칠 후, 나노구에서 응집체가 보였다 (D11). 또한, 동결건조는 시험된 모든 비에서 전혀 작동하지 않았다. 따라서, 나노에멀젼 및 나노캡슐을 계속 사용하기로 결정하였다.

[0350] *8.5 나노에멀젼*

[0351] 나노에멀젼의 물리적 안정성에서 성분의 중요성을 연구하기 위하여, 시료 D9 및 D10을 오일 및/또는 다른 계면활성제 없이 제형화하였다. 둘 다 며칠 후 상 분리를 나타내었다.

[0352] 시료 D3, D4 및 D12는 성공하였다, 그러나, D3는 최소 동결보호제 농도에서 동결건조되었으나 재현할 수 없었다. 그럼에도 불구하고, 동결건조된 나노캡슐과 비교할 목적으로, 추가 연구를 위해 후자를 선택하였다.

[0353] *8.6 나노캡슐*

[0354] D6, D8 및 D13 내지 D16에 대해 가장 높은 약물 농도 및 캡슐화 효율성이 얻어졌다. 동결 건조는 1:10 내지 1:15의 PLGA;HPBCD 비에서도 성공적이었다.

[0355] *8.7 안정성*

[0356] [표 22]

	초기	3 주			6 주		
D3	저장 온도 ℃	4	25	40	4	25	40
크기	114.7	116.2	115.5	114.9	197.8	119	114.7
PdI	0.092	0.088	0.093	0.094	0.513	0.2	0.08
함량 (%)	100	98	98	102	107	105	96

표 22: 나노에멀젼의 안정성 – 동결건조되지 않음.

[0357]

[0358] **표 22**에 나타난 바와 같이, 6주 후, 특히 4℃ 및 25℃ 저장 온도에서 액적의 크기 및 PDI가 변경되었으며, 이는 나노에멀젼이 안정적이지 않았음을 의미한다. PDI 값의 현저한 증가는 액적 크기 집단이 더 균질하지 않다는 것을 분명히 나타내고, PDI의 증가는 많은 오일 액적의 직경 크기를 증가시키는 오일 액적의 현저한 합체(coalescence)를 시사한다. 이 과정은 비가역적이다.

[0359] 시료 D6 및 D8은 둘 다 12주 후에 약간의 크기 변화만 보였으므로 시료 후보이다.

[0360] [표 23]

	초기	2 주			4 주			8 주			12 주		
D6	저장 온도 ºC	4	25	40	4	25	40	4	25	40	4	25	40
크기	153.9	155.3	153.4	156.9	160.2	155.8	161.4	160.1	160.8	172.3	165.7	161.9	177.1
PdI	0.058	0.053	0.068	0.082	0.057	0.069	0.078	0.085	0.113	0.094	0.079	0.077	0.085
함량 (%)	5.34	100	99	99	98	97	99	96	97	96	96	92	93
W. 함량 (%)	5.4	5.59	5.39	5.43	6.13	5.7	5.99	5.99	5.65	6.31	4.58	4.82	5.51

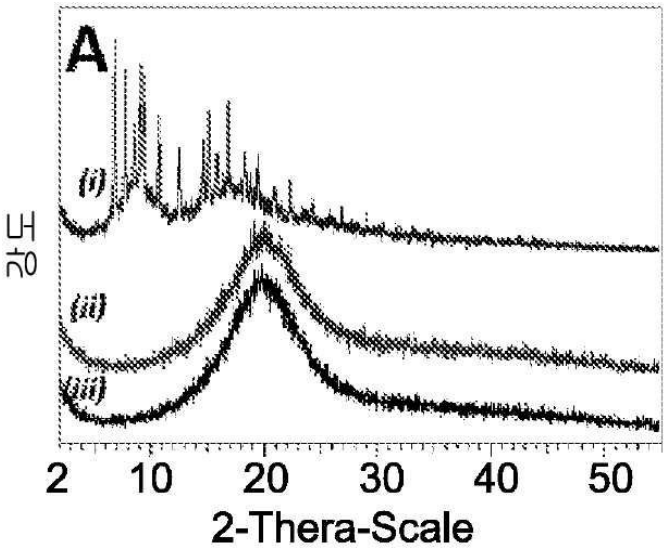
	초기	2 주			4 주			8 주			12 주		
D8	저장 온도 ºC	4	25	40	4	25	40	4	25	40	4	25	40
크기	166.5	167.6	168.2	169.8	167.6	167	172.1	170.3	173.4	170.8	168	170.3	182.3
PdI	0.09	0.09	0.1	0.097	0.094	0.081	0.074	0.113	0.139	0.068	0.136	0.113	0.121
함량 (%)	5.48	99	100	103	99	97	97	99	97	95	92	95	93
W. 함량 (%)	5.4	5.9	5.44	5.48	5.39	5.54	5.69	5.58	5.55	6.14	4.30	4.37	4.43

표 23: 나노캡슐의 안정성 – 동결건조 및 재구성됨.

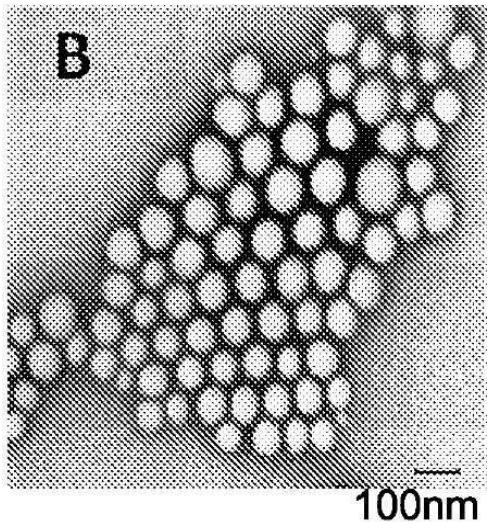
[0361]

도면

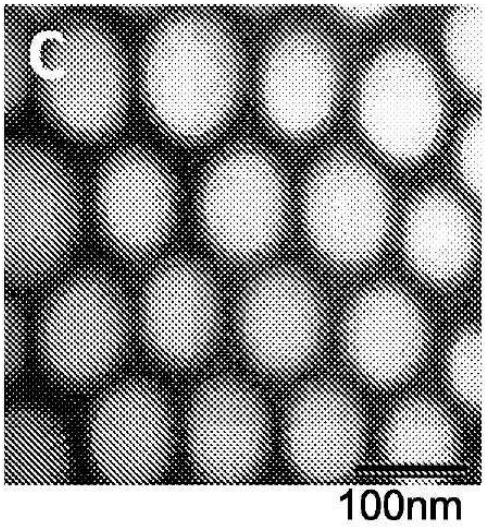
도면1a



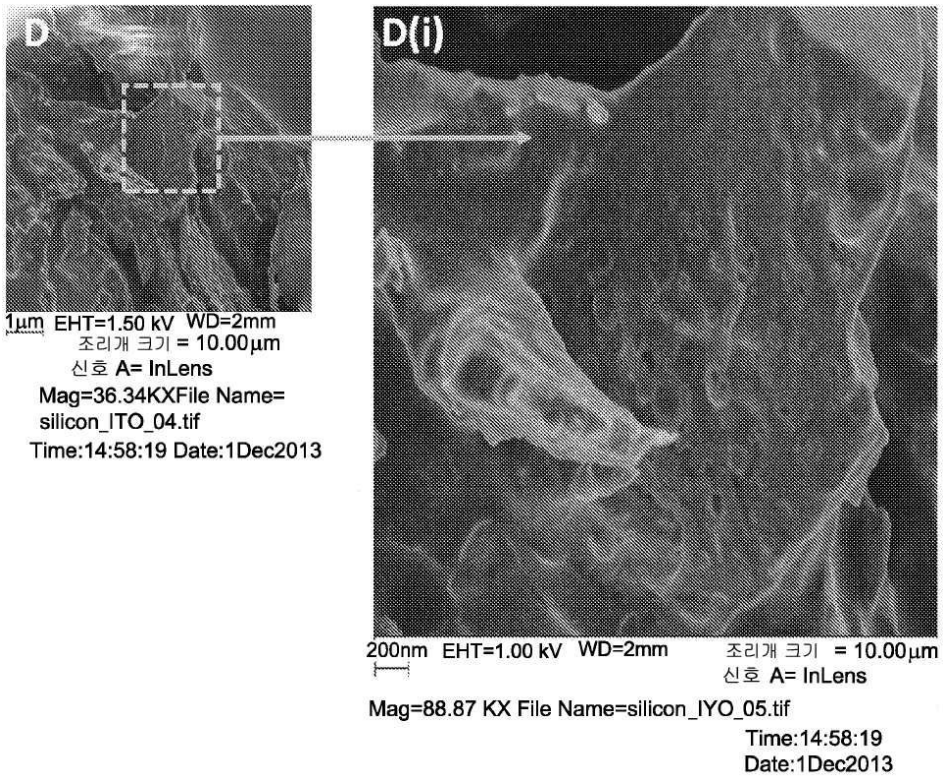
도면1b



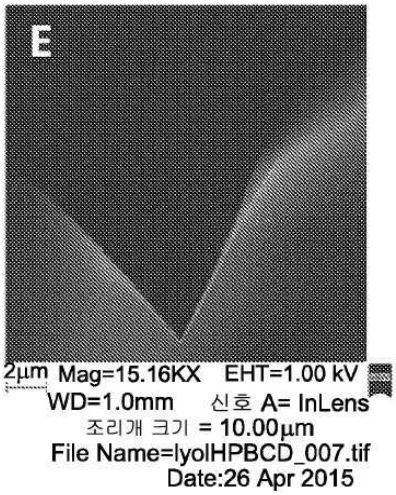
도면1c


C
100nm

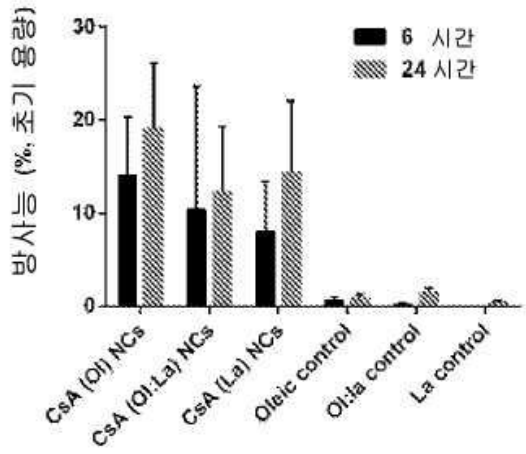
도면1d


D
1μm EHT=1.50 kV WD=2mm
조리개 크기 = 10.00μm
신호 A= InLens
Mag=36.34KXFile Name=
silicon_ITO_04.tif
Time:14:58:19 Date:1Dec2013
D(i)
200nm EHT=1.00 kV WD=2mm
조리개 크기 = 10.00μm
신호 A= InLens
Mag=88.87 KX File Name=silicon_IYO_05.tif
Time:14:58:19
Date:1Dec2013

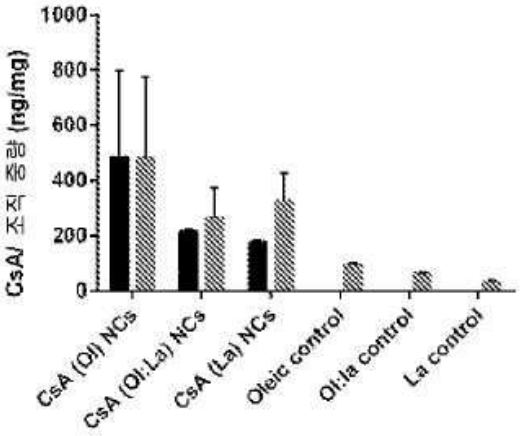
도면1e



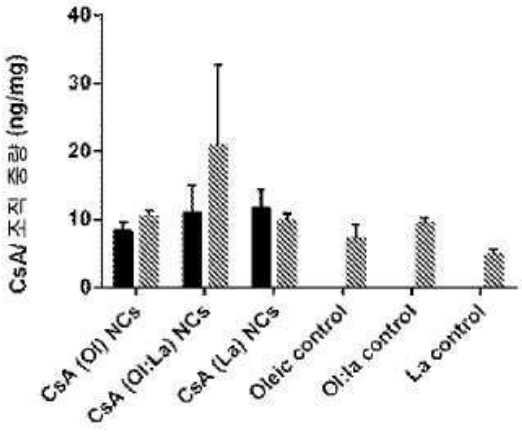
도면2a



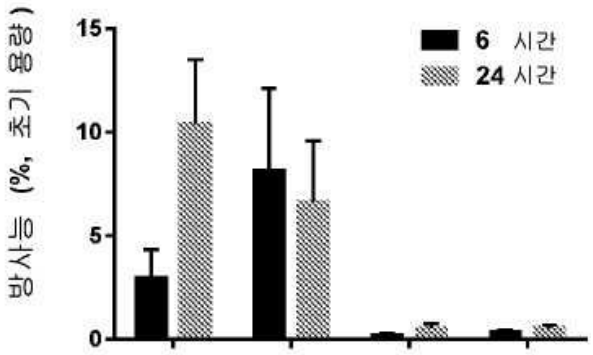
도면2b



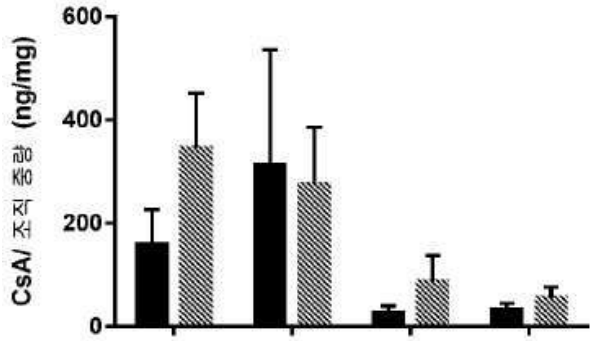
도면2c



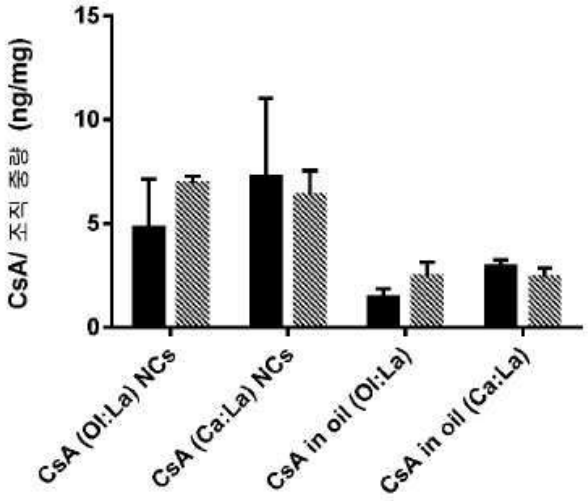
도면3a



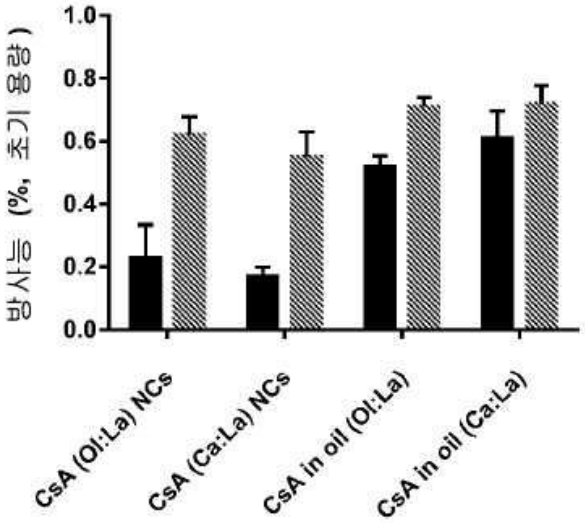
도면3b



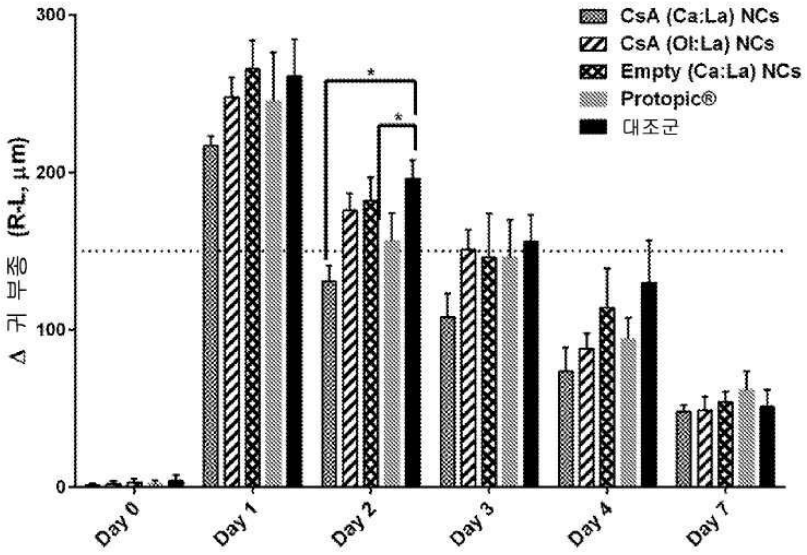
도면3c


CsA/ 조직 중량 (ng/mg)
15
10
5
0
CsA (Ol:La) NCs
CsA (Ca:La) NCs
CsA in oil (Ol:La)
CsA in oil (Ca:La)

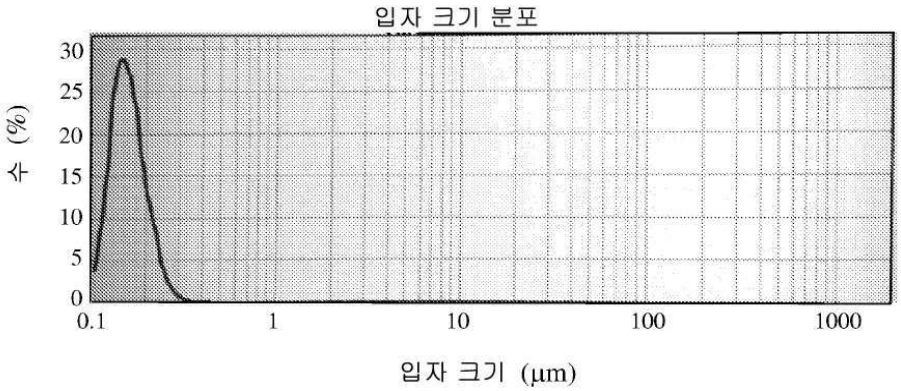
도면3d


방사능 (%, 초기 용량)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CsA (Ol:La) NCs
CsA (Ca:La) NCs
CsA in oil (Ol:La)
CsA in oil (Ca:La)

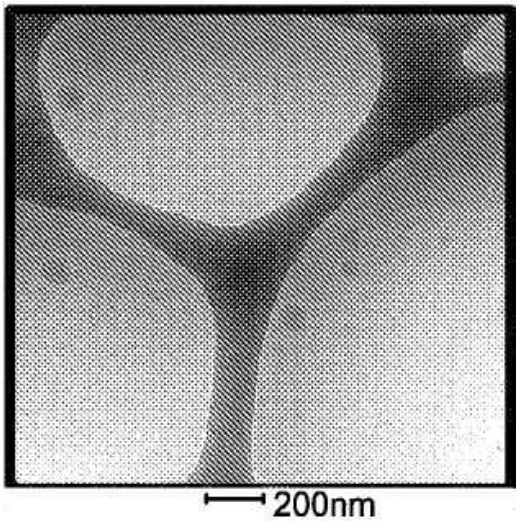
도면4


CsA (Ca:La) NCs
CsA (Ol:La) NCs
Empty (Ca:La) NCs
Protopic®
대조군
Δ 귀 부종 (R-L, μm)
300
200
100
0
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 7
*
*

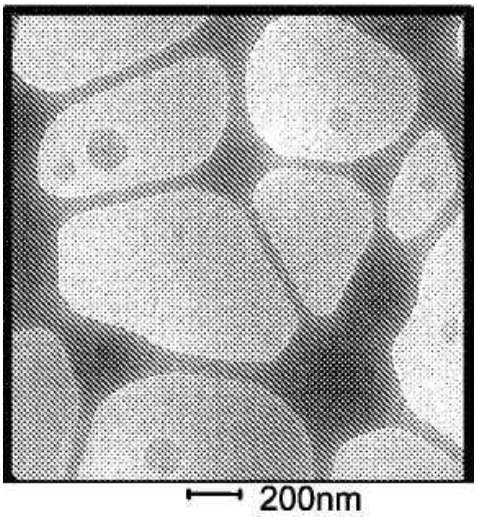
도면5


입자 크기 분포
수 (%)
30
25
20
15
10
5
0
0.1
1
10
100
1000
입자 크기 (μm)

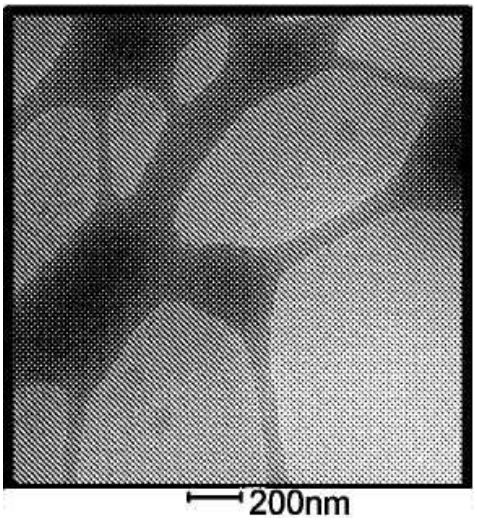
도면6a


200nm

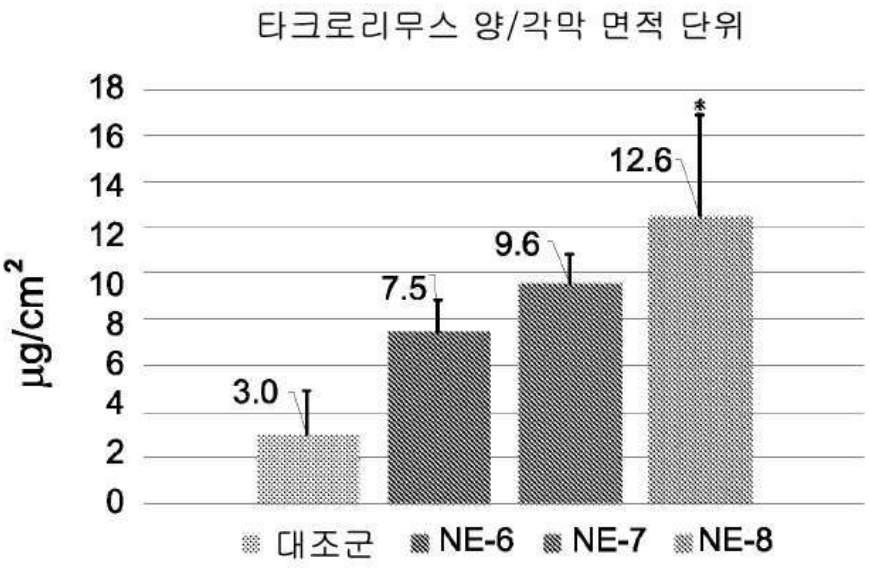
도면6b



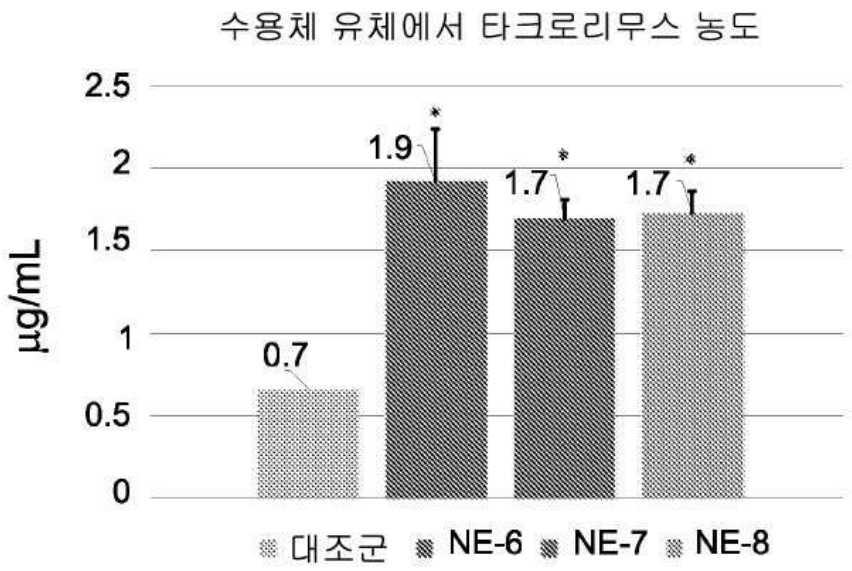
도면6c



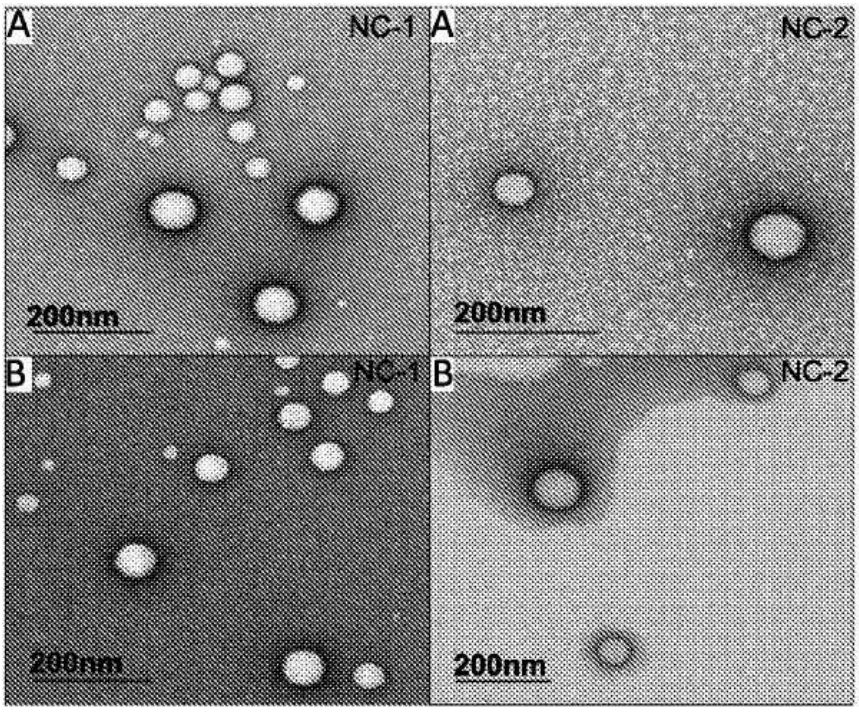
도면7a



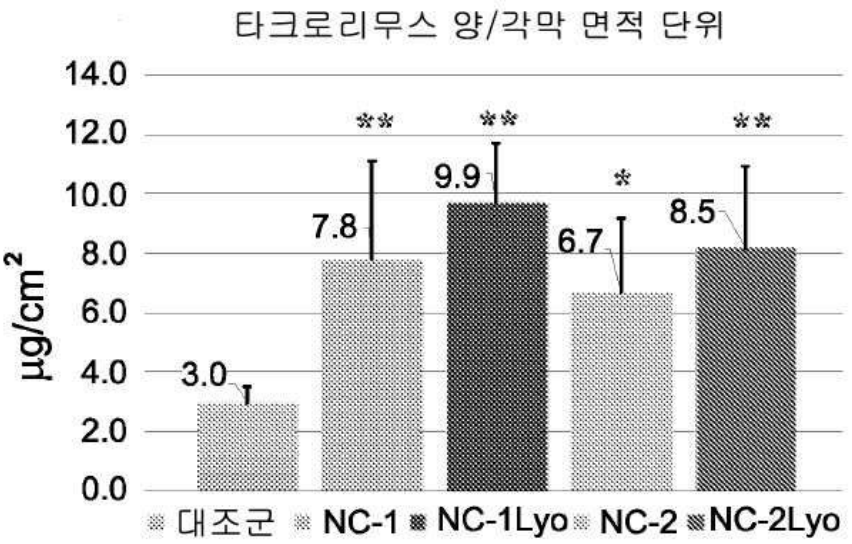
도면7b


수용체 유체에서 타크로리무스 농도
2.5
2
1.5
1
0.5
0
μg/mL
0.7
1.9
1.7
1.7
*
대조군
NE-6
NE-7
NE-8

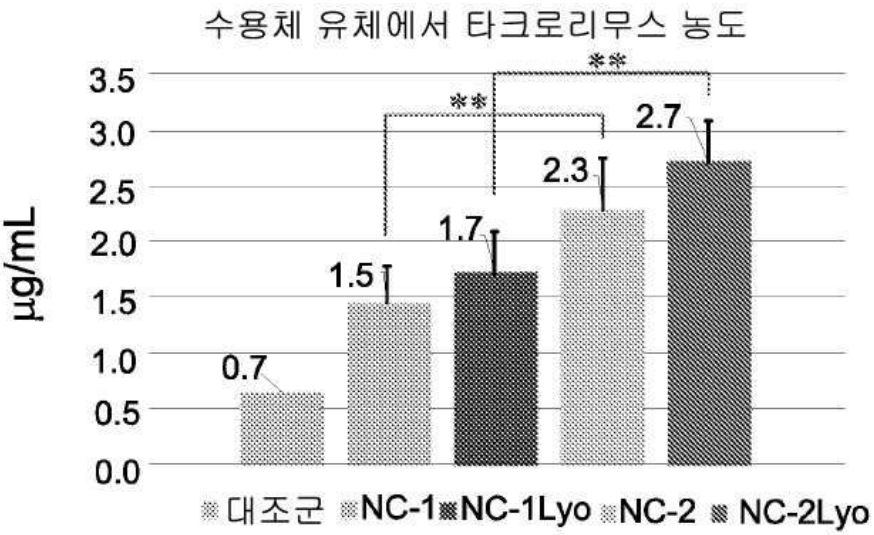
도면8


A
NC-1
200nm
A
NC-2
200nm
B
NC-1
200nm
B
NC-2
200nm

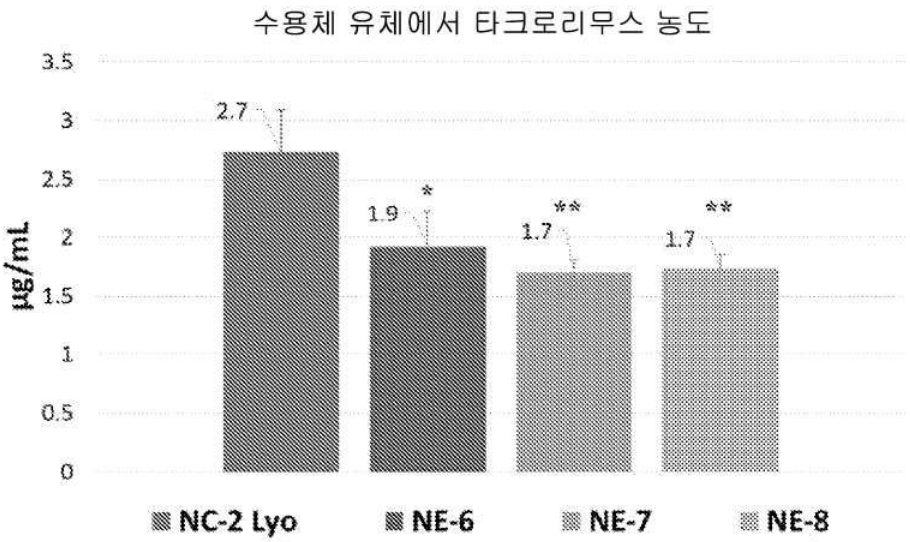
도면9a


타크로리무스 양/각막 면적 단위
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
μg/cm²
3.0
7.8
9.9
6.7
8.5
**
**
*
**
대조군
NC-1
NC-1Lyo
NC-2
NC-2Lyo

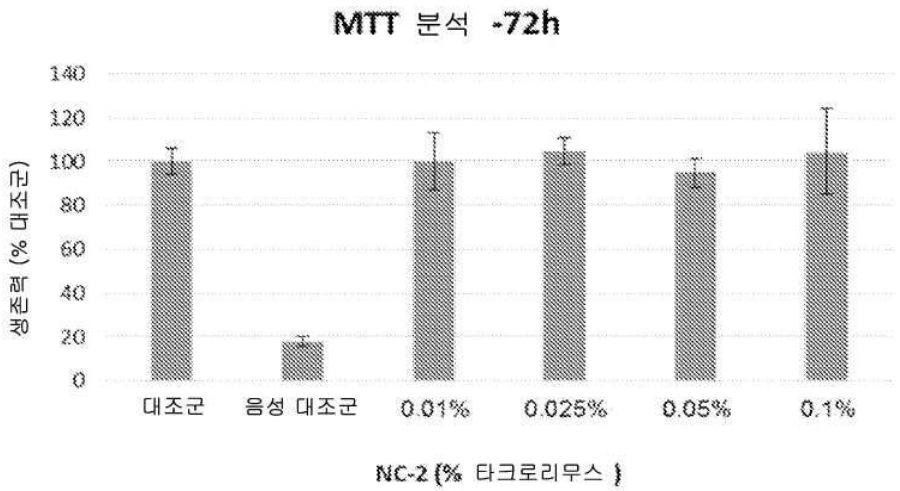
도면9b


수용체 유체에서 타크로리무스 농도
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
μg/mL
0.7
1.5
1.7
2.3
2.7
**
**
대조군
NC-1
NC-1Lyo
NC-2
NC-2Lyo

도면10



도면11



도면12

