



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0054221
(43) 공개일자 2018년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08J 3/12 (2006.01) C08J 3/09 (2006.01)
C08J 3/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08J 3/12 (2013.01)
C08J 3/095 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0151883
(22) 출원일자 2016년11월15일
심사청구일자 2016년11월15일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
사홍기
서울특별시 서대문구 세무서2길 64, 102동 201호 (홍제동, 현대그린아파트)
김한솔
서울특별시 강동구 상암로61길 40, 3층 (명일동)
(74) 대리인
유미특허법인

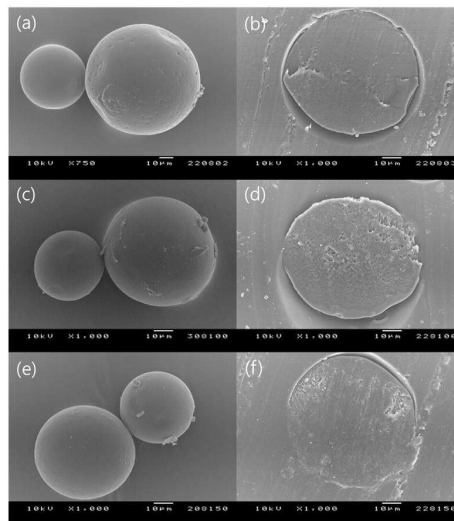
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 비할로젠 유기용매를 이용한 미립자의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 고분자를 사용하여 미립자를 제조하는 제조공정에 관한 것으로서, 보다 자세하게는 비할로젠 유기용매인 디알킬카보네이트를 고분자 화합물의 가용화 유기용매로 사용하여 고분자 미립자를 제조하는 방법, 상기 제조된 미립자 및 약물을 포함하는 미립자에 관한 것이다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

C08J 3/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A2A16054899

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-일반연구자지원사업-기본연구(한국형SGER)

연구과제명 바이오거대분자 약물전달체를 위한 스폰지 다공성 및 자기 폐쇄 기능성을 지닌 PLGA 미립자 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

고분자 화합물과 용매로서 디알킬카보네이트(dialkyl carbonate)를 이용한 고분자 미립자를 제조하는 방법으로서, 상기 알킬기는 탄소수가 1 내지 3인 것인, 고분자 미립자의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은 고분자 화합물을 디알킬카보네이트에 용해 또는 분산시켜 분산상을 형성하는 단계;

상기 분산상을 수상에 첨가하여 유제를 형성하는 단계; 및

상기 유제를 미립자로 전환시키는 단계를 포함하는 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유제를 미립자로 전환시키는 단계에서, 상기 유제에 염기 또는 산 수용액을 첨가하여 수행하는 것인 제조방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 분산상과 수상의 혼합비(분산상:수상)은 1:1.5 내지 1:50 부피비인 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 첨가되는 염기 또는 산 수용액은 유제에 포함된 디알킬카보네이트 1몰 기준으로 0.25 내지 2.5 몰인 제조방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 미립자로 전환시키는 단계에서 0.5 시간 내지 5 시간 동안 교반하여 수행하는 것인 제조방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 염기는 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 암모니아수(NH₄OH), 수산화리튬(LiOH), 수산화칼슘(Ca(OH)₂), 수산화마그네슘(Mg(OH)₂), 탄산수소나트륨(NaHCO₃), 탄산나트륨(Na₂CO₃) 및 수소화나트륨(NaH)으로 이루어진 군에서 선택되는 제조방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 산은 염산(HCl), 질산(HNO₃), 인산(H₃PO₄), 황산(H₂SO₄), 붕산(B₂O₃), 불산(HF), 브롬산(HBr) 및 과염소산(HClO₄)으로 이루어진 군에서 선택되는 제조방법.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 수상은 물과 유화제를 포함하는 것인 제조방법.

청구항 10

제2항에 있어서, 디알킬카보네이트를 수상에 첨가하는 단계를 추가로 수행하는 것인 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 수상에 첨가하는 디알킬카보네이트의 사용량은 수상 의 물 함량의 2 내지 20 (v/v)%인

제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 유화제는 폴리비닐알코올, 폴리소베이트 20, 폴리소베이트 60, 폴리소베이트 65, 폴리소베이트 80, 폴리소베이트 85, 레시틴(lecithin), 소르비탄스테아레이트(sorbitan stearate), 모노글리세라이드 및 디글리세라이드, 아세틸레이티드 모노글리세라이드, 숙시닐레이트모노글리세라이드, 에톡시레이티드 모노-글리세라이드 및 디글리세라이드, 글리세릴모노올리에이트, 글리세릴모노스테아레이트, 글리세릴베헤네이트, 글리세릴카프레이트, 세틸 알코올, 스테아릴 알코올, 라놀린, 라놀린 알코올, 폴리글리세릴 올리에이트, 폴리글리세릴 스테아레이트, 폴리글리세릴 팔미테이트, 아라비아 검, 마그네슘 스테아레이트, 알루미늄 트리스테아레이트 또는 이들의 수용액인 제조방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스포진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드(polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산, 락트산과 아미노산의 공중합체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제조방법.

청구항 14

제2항에 있어서, 상기 유제는 o/w 또는 w/o/w형태인 제조방법.

청구항 15

제2항에 있어서, 상기 분산상은 약물을 추가로 포함하는 것인 제조방법.

청구항 16

제2항에 있어서, 상기 전환된 미립자를 회수하는 단계 및 건조하는 단계를 추가로 포함하는 것인 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 미립자가 약물을 포함하는 경우, 미립자를 회수하기 전에, 미립자에 봉입되지 않은 약물 결정을 제거하는 단계를 추가로 수행하는 것인 제조방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 미립자.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 미립자는 약물을 추가로 포함하는 미립자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고분자를 사용하여 미립자를 제조하는 제조공정에 관한 것으로서, 보다 자세하게는 비할로겐 유기용매인 디알킬카보네이트를 고분자 화합물의 가용화 유기용매로 사용하여 고분자 미립자를 제조하는 방법, 상기 제조된 미립자 및 약물을 포함하는 미립자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고분자 화합물을 소재로 사용하여 다양한 종류의 미립자를 제조할 수 있다. 특히 제약산업에서는 생체 친화적 특성으로 체내에서 스스로 분해되는 생체 분해성을 갖춘 고분자 소재를 사용하여 약물을 천천히 방출하는 능력을 지닌 미립자 제품 개발에 많은 관심을 기울이고 있다. 예를 들면 단 1회 피하 주사 또는 근육주사를 통해 약

물의 방출을 1주에서 6개월까지 방출하는 미립자 제품들이 시중에 시판되고 있다. 뿐만 아니라 얼굴 주름을 개선하는 성형 목적의 미립자, 그리고 암 조직 주변의 혈관을 봉쇄하여 항암효과를 나타내는 미립자들 역시 개발되고 있다.

[0003] 이러한 제품을 개발하는데 주로 사용되는 고분자 소재는 polyester계통의 poly-lactide-co-glycolide 또는 poly-lactide이다 (약어로 PLGA로 표시함).

[0004] PLGA 미립자는 여러 제조기법을 통하여 제조할 수 있다. 표 1에서는 현재 시판 중인 PLGA 미립자들의 종류, 이들의 제조기법 및 관련 특허, 그리고 PLGA 가용화 목적으로 사용되는 유기용매에 대한 정보를 요약하고 있다.

표 1

Brand	Company	API	US Patent	Process technology	Remarks
Decapeptyl SR Neo Decapeptyl Trelstar, Pamorelin LA	Debiopharm	Triptorelin pamoate	5,192,741	Hot-melt extrusion technology	Phase separation (W/O ₁ /O ₂ emulsion) is also reported
Sandostatin LAR	Novartis Alkermes	Octreotide acetate	5,992,682	(O ₁ +O ₂)/W emulsion solvent extraction	O ₁ = MeCl ₂ O ₂ = drug + methanol
Lupron Depot	Abbvie Endocrine Inc Takeda	Leuprolide acetate	6,036,976	W ₁ /O/W ₂ emulsion solvent evaporation	MeCl ₂ , in-water drying by blowing air to the surface of the emulsion
Risperdal Consta	J&J Alkermes	Risperidone	6,803,055	O/W emulsion solvent extraction	O = ethyl acetate + BA
Arestin	Orpharma	Minocycline HCl	5,500,228	S/O ₁ /O ₂ emulsion (phase separation)	S = milled drug particles O ₁ = MeCl ₂ O ₂ = silicone oil
Bydureon	Astrazeneca Amylin Alkermes	Exendin-4	7,456,254	W/O ₁ /O ₂ emulsion (phase separation)	O ₁ = MeCl ₂ O ₂ = silicone oil Hardening by heptane/ethanol mixture

[0005]

[0006] 상기 표 1에서, O는 유기용매 상 (oil phase), W는 수용액, MeCl₂는 methylene chloride, 그리고 BA는 benzyl alcohol을 나타내는 약어이다.

[0007] 대부분의 미립자 제조공정은 유제 형성을 근간으로 하는 용매 증발법 그리고/또는 용매추출법 원리에 근간을 두고 있다. 유제 형성을 기반으로 한 용매증발법에 따라 PLGA 미립자를 제조하는 경우 가장 흔히 사용되는 유기용매는 메틸렌클로라이드와 클로로포름이다. 이들 유기용매가 사용되는 이유는 다양한 PLGA에 대한 높은 가용화 능력과 물과 섞이지 않기 때문에 쉽게 유제를 형성할 수 있는 장점을 지니고 있기 때문이다. 또한 낮은 융점으로 인한 강한 휘발성을 이용하여 용매증발 기전을 통해 유제 방울을 고형의 미립자로 경화시킬 수 있는 장점을 지니고 있다.

[0008] 메틸렌클로라이드가 주로 이용되는 이유는 미립자를 형성하는 소수성 고분자 소재를 녹이는 능력이 탁월하고, 물과 섞이지 않아 유제를 쉽게 만들 수 있으며, 또한 낮은 융점(약 40℃)를 가지고 있어 미립자 제조 도중 및 제조 후 용매 제거가 쉽기 때문이다. 하지만 할로젠 유기용매인 메틸렌클로라이드는 인체 암 유발 물질 (carcinogen)로 알려져 있으며, 대기 중의 오존층을 파괴하는 환경 유해 물질에 속한다. 또한 메틸렌클로라이드는 2007년 Agency for Toxic Substances and Disease Registry에서 명시한 CERCLA Priority List of Hazardous Substances에 해당하는 총 275종의 위해물질 중 80번째로 명시되어 있다. 그러므로 산업체 및 환경규제 행정기관에서는 메틸렌클로라이드의 사용을 엄격히 통제하고 있으며, 의약품 제품에 잔류하는 메틸렌클로라이드에 대해 엄격히 규제하며 이로 인해 제약산업체에서는 미립자와 같은 인체 투여 주사 제형 개발 시 메틸렌클로라이드의 사용을 극도로 피하는 편이다.

[0009] 메틸렌클로라이드를 대체할 수 있는 비할로젠 유기용매에 대해 지속적인 개발연구가 진행되었고, 이러한 노력 끝에 에틸 아세테이트가 유기용매로 각광받게 되었다. 실제로 리스페달콘스타(Risperdal Consta)와 같은 미립자

제품은 에틸 아세테이트를 분산용매로 사용한 방법에 따라 제조된다.

[0010] 제약산업체에서는 메틸렌클로라이드와 클로로포름과 같은 할로젠 유기용매들을 ICH 클래스 2 용매로 분류하고 있으며 이들의 사용 및 의약품에 잔류하는 양을 엄격하게 통제하고 있다. 그러므로 제약산업체에서는 이들 유기용매들을 대체할 수 있는 보다 인체와 환경에 친화적이며 독성 및 발암성 이슈가 적은, PLGA 가용화 유기용매 개발에 많은 관심을 기울이고 있다. 이러한 흐름에 반영하여 Johnson & Johnson사와 Alkermes사가 개발하여 시판하고 있는 Risperdal Consta PLGA 미립자의 경우 ethyl acetate를 PLGA 가용화 유기용매로 사용하여 용매추출법으로 제품을 생산하고 있다. 마찬가지로 학계에서는 보다 인체에 안전하며 환경 독성을 유발하지 않는 대체 유기용매 개발 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

[0011] 디메틸카보네이트를 PLGA 가용화 유기용매로 사용하여 수중 유형 유제 (oil-in-water emulsion)를 기반으로 한 미립자 제조방법이 보고된 바가 없다. 디메틸카보네이트는 현재 널리 사용되고 있는 methylene chloride에 비하여 훨씬 인체에 안전하며, 지구대기의 오존층을 파괴하는 등의 환경독성을 야기하지 않는 비할로젠 유기용매에 속한다 (표 2). 하기 표 2는 Methylene chloride와 디메틸카보네이트의 주요 물리화학적 성상 및 대표적 독성 자료의 요약한 것이다(출처: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>).

표 2

항목	Methylene chloride	디메틸 카보네이트
Structure		
Molecular weight	84.93	90.08
Boiling point (°C)	40	90.5
log P (octanol-water)	1.25	0.23
Water solubility (g/L)	13	138
LD ₅₀ (mouse, oral; mg/Kg)	873	6000
LD ₅₀ (rat, oral; mg/kg)	1,600	13,000
Organic halogen compounds	yes	no
Priority List of Hazardous Substances (ATSDR)	yes	no

[0012]

[0013] 현재까지 문헌조사에 따르면 디메틸카보네이트를 사용하여 electrohydrodynamic atomization (EDHA) 제조방식에 따라 PLGA 미립자를 제조한 경우가 있다 (Ghanbar H et al., Preparation of porous microsphere-scaffolds by electrohydrodynamic forming and thermally induced phase separation, Materials Science and Engineering C 2013, 33, 2488-2498). 간략히 설명하면 PLGA를 디메틸카보네이트에 녹인 용액을 매우 높은 electric filed에 통과시켜 노즐을 통해 분무되는 mm 크기의 입자를 액체 질소나 수용액에서 완전히 경화시켜 PLGA 미립자를 제조하는 방식이다.

[0014] 또 다른 연구에서는 디메틸카보네이트를 PLGA 가용화 용매로 사용하였을 때 이전의 일반적인 용매증발, 용매추출, 또는 분무 건조 기법으로 PLGA 미립자를 제조하는 것은 어려움이 있다는 것을 인지하고 microfluidic technology platform 기반으로 PLGA 미립자를 제조하였다 (Hung LH et al., PLGA micro/nanosphere synthesis by droplet microfluidic solvent evaporation. Lab Chip, 2010,10, 1820-1825).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 유기용매들을 대체할 수 있는 보다 인체와 환경에 친화적이며 독성 및 발암성 이슈가 적은 고분자 유기용매로서 디알킬카보네이트, 예를 들면 디메틸카보네이트를 사용하여 유제형성을 기반으로 한 미립자

의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 다양한 농도의 약물을 효과적으로 봉입할 수 있는, 상기 방법에 의해 제조된 미립자를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 발명의 목적을 제공하고자, 본 발명은 미립자를 형성할 수 있는 고분자 화합물의 가용화 유기용매로서 디알킬카보네이트를 사용하여 고분자 미립자를 유제 형성을 기반으로 하는 제조방법과, 이를 이용한 미립자에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에 따른 비할로겐 용매를 사용한 미립자 제조방법은 종래의 할로겐 용매를 사용한 제조방법 또는 용매증발 및 용매추출을 사용한 미립자 제조방법에 비해, 인체 안전성, 산업적 경제성, 그리고 환경 친화적인 장점이 있으며, 다양한 농도의 약물을 효과적으로 봉입할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 제조한 미립자 제조공정에서 용매제거 방법은 매우 효과적으로 진행되기 때문에 특별한 고난도의 생산시설이 필요하지 않다. 또한 본 발명의 제조공정 중 발생하는 유기용매를 포함하는 폐수의 용적은, 기존의 용매추출법에 바탕을 둔 미립자 제조공정에 비하여, 매우 적기 때문에 생산공정의 경제적 측면에서도 수월성을 지니고 있다. 결론적으로 디메틸카보네이트를 사용한 미립자 제조공정은 종래의 용매증발 그리고/또는 용매추출을 사용해 미립자를 제조하는 공정보다 인체 안전성, 산업적 경제성, 그리고 환경 친화성 측면에서 수월한 잇점을 나타낸다.

[0020] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예는 (a) 고분자 화합물을 디알킬카보네이트에 용해 또는 분산시켜 분산상을 형성하는 단계; (b)상기 분산상을 수상에 첨가하여 유제를 형성하는 단계; 및 (c)상기 유제를 미립자로 전환시키는 단계를 포함하는 미립자 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에서의 '미립자'는 입경이 1 마이크로미터 내지 1000 마이크로미터의 크기를 갖는 입자를 의미한다.

[0022] 본 발명의 제조방법에 따라 (a)분산상을 형성하는 단계는, 고분자 화합물을 디알킬카보네이트에 용해 또는 분산시켜 제조할 수 있으며, 분산상을 제조하는 방법은 통상의 방법으로 수행할 수 있다.

[0023] 상기 고분자의 가용화 용매인 디알킬카보네이트는 알킬기의 탄소수가 1 내지 3일 수 있으며, 바람직하게는 디메틸카보네이트이다. 본 발명에 따른 고분자 미립자의 제조방법은 비할로겐 유기용매인 디알킬카보네이트를 사용하므로 할로겐 유기용매인 메틸렌클로라이드에 비해 훨씬 뛰어난 안전성을 가지고 있다.

[0024] 소수성 약물을 미립자에 봉입할 때 상당량의 약물이 수상에서 결정화되어 약물 봉입률 저하뿐만 아니라 미립자 품질 성장에 해로운 영향을 끼친다. 유제형성을 기반으로 한 미립자 제조공정에 디메틸카보네이트가 활용되지 못하는 이유는 몇 가지가 있다. 첫째, 디메틸카보네이트의 물에 대한 용해도가 13.8% 내지 15.5%에 이른다. 이와 같은 높은 물에 대한 용해도로 인하여 수중 유제 (o/w emulsion)를 만드는 것이 어렵다. 왜냐하면 초기 고분자, 예컨대 PLGA와 디메틸카보네이트로 구성된 분산상을 수상에 유화할 때 상당량의 디메틸카보네이트가 곧바로 수상으로 확산되는 경향을 보여준다. 이에 따라 PLGA는 곧바로 침전되어 고분자 필름 또는 응집체를 형성하는 경향을 보여준다. 또한 디메틸카보네이트는 90.5℃의 높은 융점을 지니므로 용매증발 기전에 따라 미립자를 제조하는 것이 매우 어렵다. 그리고 미립자 수거 후 미립자에 잔류하는 디메틸카보네이트가 미립자 응집에 초래하여 미립자 재분산이 매우 힘들어지게 된다. 그러나, 본 발명에 따른 제조방법은 디메틸카보네이트를 PLGA 가용화 유기용매로 사용하여 유제형성을 기반으로 한 미립자를 제조할 수 있다.

[0025] 본 발명에 적용 가능한 고분자는 디메틸카보네이트와 미립자를 형성가능한 고분자 화합물이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면 생분해성 고분자 화합물, 비-생분해성 고분자 화합물 등을 포함한다. 상기 고분자의 예로는 폴리락트산(PLA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리락타이드, 폴리글리콜산, 폴리포스포진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리안하이드라이드 (polyanhydride), 폴리오르소에스테르(polyorthoester), 락트산/글리콜산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산, 락트산과 아미노산의 공중합체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 제조방법은 PLGA 뿐만 아니라 미립자를 형성하는 다른 소수성 고분자 화합물에도 적용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 제조방법에 따라 상기 수상을 형성하는 단계는, 물과 유화제를 혼합하여 제조할 수 있다.

[0027] 바람직하게는, 상기 수상에는 디알킬카보네이트를 첨가할 수 있다. 상기 수상에 첨가하는 디알킬카보네이트, 예

를 들면 디메틸카보네이트의 사용량은 수상의 물 함량의 2 내지 20 (v/v)%, 바람직하게는 3 내지 10 (v/v)% 일 수 있다.

- [0028] 상기 분산상을 수상에 유화시켜 유제를 형성하는 단계를 수행하기 전에, 수상에 약간의 디알킬카보네이트를 첨가하는 것은, 디알킬카보네이트는 물에 대한 용해도가 비교적 크며, 예를 들면, 디메틸카보네이트는 약 13.8% 내지 15.5% 정도의 물에 대한 용해도를 가지며, 이에 디알킬카보네이트를 함유하지 않는 수상에 분산상을 첨가하여 유화하는 경우 분산상의 디알킬카보네이트가 빨리 수상으로 확산되어 일부가 큰 입자 또는 폴리머 필름을 형성하는 것을 방지할 수 있다. 또한 디알킬카보네이트를 수상에 첨가함으로써 유제 방울의 크기 분포가 넓어지는 경향을 방지할 수 있다.
- [0029] 상기 유화제는 폴리비닐알코올, 폴리소베이트 20, 폴리소베이트 60, 폴리소베이트 65, 폴리소베이트 80, 폴리소베이트 85, 레시틴(lecithin), 소르비탄스테아레이트(sorbitan stearate), 모노글리세라이드 및 디글리세라이드, 아세틸레이티드 모노글리세라이드, 숙시닐레이드모노글리세라이드, 에톡시레이티드 모노-글리세라이드 및 디글리세라이드, 글리세릴모노올리에이트, 글리세릴모노스테아레이트, 글리세릴베헤네이트, 글리세릴카프레이트, 세틸 알코올, 스테아릴 알코올, 라놀린, 라놀린 알코올, 폴리글리세릴 올리에이트, 폴리글리세릴스테아레이트, 폴리글리세릴 팔미테이트, 아라비아 검, 마그네슘 스테아레이트, 알루미늄 트리스테아레이트 또는 이들의 수용액일 수 있다.
- [0030] 상기 유화제로서 폴리비닐알코올을 사용하는 경우, 0.01% 내지 10% (w/v) 농도의 폴리비닐알코올 수용액일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 0.1% 내지 1% (w/v) 농도의 폴리비닐알코올 수용액일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 제조방법에 따라 (b)유제를 형성하는 단계는, 상기 분산상을 수상에 첨가하여 혼합 또는 교반하여 수행할 수 있다. 상기 분산상과 수상의 혼합비(분산상:수상)은 1:1.5 내지 1:50 부피비, 바람직하게는 1:5 내지 1:10 부피비일 수 있다.
- [0032] 상기 유제를 형성하는 단계에서 유화기를 사용할 수 있으며, 구체적인 예는 균질기(homogenizer), 스태틱 믹서(static mixer), 소니케이터(sonicator), 막 유화기(Shrasu porous glass membrane emulsifier) 또는 마이크로플루다이저(microfluidizer)일 수 있다.
- [0033] 상기 유제는 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 바람직하게는 O/W 또는 W/O/W 형태로 제조될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 제조방법에 따라 (c)유제를 미립자로 전환시키는 단계는 통상적으로 알려진 용매증발 및 용매추출 대신에, 상기 유제에 염기나 산을 첨가하여 유제에서 용매를 분해 제거하여 미립자로 전환시키는 방법으로 수행된다. 다양한 온도 및 교반시간 조건하에서 교반하여 수행할 수 있으며, 예를 들면, 교반 시간은 0.5 시간 내지 5 시간 동안 수행할 수 있다.
- [0035] 상기 미립자 제조단계에서 화학적 분해반응을 이용하여 유제 방울에 존재하는 디메틸카보네이트를 효과적으로 제거하여 유제 방울을 미립자로 전환시키는 단계일 수 있다. 이때 디메틸카보네이트 분해속도를 제어하여 유제 방울이 미립자로 경화하는 속도를 조절하며 이를 통해 약물 결정화 현상의 극복, 약물 봉입률 및 입자 크기의 균일성 확보, 그리고 미립자 성상 개선 등의 미립자 주요 품질성상을 개선할 수 있다.
- [0036] 상기 첨가되는 염기 또는 산 수용액은 유제에 포함된 디알킬카보네이트, 바람직하게는 디메틸카보네이트 1몰 기준으로 0.25 내지 2.5 몰일 수 있다. 수상에 녹아있는 디알킬카보네이트의 분해는 사용하는 염기 또는 산의 농도에 비례하는데, 이들 가수분해 촉매의 농도를 조절하는 것이 미립자의 제조 및 그들의 품질 성상을 제어하는데 매우 중요하다. 본 발명의 일예에서, 수상에 디알킬카보네이트를 첨가하는 경우, 상기 산 또는 염기 수용액의 사용량의 기준이 되는 디알킬카보네이트의 사용량은 분산상 및 수상에 포함된 전체 디알킬카보네이트의 함량을 기준으로 설정될 수 있다. 상기 사용하는 산 또는 염기의 함량을 최적화함으로써 미립자 경화속도, 약물 결정화 현상, 미립자 입도 분포, 미립자 형상, 그리고 약물 봉입률을 조절할 수 있다.
- [0037] 상기 산 또는 염기를 유제에 첨가하여, 수상에 녹아있는 디알킬카보네이트를 제거한다. 이렇게 되면 유제 방울에서 디알킬카보네이트가 계속 수상으로 확산, 제거되는 기반을 마련하며, 상기 산과 알칼리는 상기 반응에서 디알킬카보네이트 분해 촉진물로서 사용된다.
- [0038] 상기 염기는 수산화나트륨(NaOH), 수산화칼륨(KOH), 암모니아수(NH₄OH), 수산화리튬(LiOH), 수산화칼슘(Ca(OH)₂), 수산화마그네슘(Mg(OH)₂), 탄산수소나트륨(NaHCO₃), 탄산나트륨(Na₂CO₃) 또는 수소화나트륨(NaH)이 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0039] 상기 산은 염산(HCl), 질산(HNO₃), 인산(H₃PO₄), 황산(H₂SO₄), 붕산(B₂O), 불산(HF), 브롬산(HBr) 및 과염소산(HClO₄)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 일예에 따라 상기 미립구가 약물을 포함하는 경우에는, 약물을 상기 분산상에 용해 또는 분산하여 제조할 수 있으며, 상기 약물을 미립구에 봉입하여 전달 가능한 약물이라면 특별히 제한되지 않으며, 상기 미립자는 수용성 및 난용성 약물을 함유할 수 있어, 약물 전달체로 사용될 수 있다. 본 발명의 미립자 제조 방법은 소수성 약물과 친수성 약물 모두에 적용 가능하다.
- [0041] 이러한 제조공정을 활용하여 소수성 약물을 미립자 내부의 매트릭스에 안전하게 봉입할 수 있으며, 수용성 약물인 경우 상기 (a) 이전 단계에 약물 수용액을 (a)에서 제조한 분산상에 먼저 유화하여 유형 수중 유제 (water-in-oil emulsion)을 형성한 후 물 또는 다른 유기용매에 혼합하여 다중 유제를 만들어 약물을 미립자 내에 봉입할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 미립자 제조방법은, 상기 (c)상기 유제를 미립자로 전환시키는 단계에 이후에 미립자를 회수 및/또는 건조하는 단계를 추가로 수행할 수 있다. 상기 미립자가 약물을 포함하는 경우, 미립자를 회수하기 전에, 미립자에 봉입되지 않은 약물 결정을 제거하는 단계를 추가로 수행할 수 있다. 약물 결정 제거단계를 거치지 않고 바로 여과를 통해 미립자를 회수하는 경우 봉입되지 않은 약물 결정 역시 같이 수거되어 미립자 품질 성상에 여러 가지 원치 않는 영향을 미치게 된다. 상기 약물 결정을 제거하는 단계는, 미립자 현탁액을 체 분리(wet sieving), 약물결정만을 가용화시키는 방법, 또는 약물결정과 미립자를 분리하는 선택적인 원심분리 방법 등으로 수행될 수 있다.
- [0043] 본 발명은 다양한 농도의 약물을 효과적으로 봉입할 수 있는 미립자 또는 약물을 함유하는 미립자를 제공한다. 본 발명에 따른 제조방법으로 제조된 미립자는 잔류 용매 함량이 매우 낮으며, 높은 약물 봉입량을 가지는 장점이 있으며, 실시예에서 33.1%까지의 높은 약물을 봉입할 수 있었다.
- [0044] 현재 약물의 주사 제형에 사용되는 미립자는 모두 구형이며, 막대(Rod)형인 경우에는 유동성 문제와, 일정한 표면적을 지니지 않기 때문에 선호되지 않는다. 따라서, 상기 미립자의 모양은 인체 주사용으로 바람직한 구형일 수 있다.

발명의 효과

- [0045] 본 발명에 따른 비할로젠화 용매를 사용한 미립자 제조방법은 종래의 할로젠화 용매를 사용한 제조방법 또는 용매증발 및 용매추출을 사용한 미립자 제조방법에 비해, 인체 안전성, 산업적 경제성, 그리고 환경 친화적인 장점이 있으며, 다양한 농도의 약물을 효과적으로 봉입할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 디메틸카보네이트를 사용한 용매증발 제조공정 도중 시간 경과에 따른 유제 상태의 변화를 관찰한 광학 현미경 사진으로서, 수중 유형 유제를 교반하면서 (a) 150, (b) 180, (c) 210, (d) 240, (e) 270, 그리고 (f) 300분 경과하였을 때 찍은 사진이다.
- 도 2는 디메틸카보네이트를 사용한 용매증발 제조공정 도중 (a) 270, 및 (b) 300분 경과하였을 때 찍은 광학현미경 사진으로서, 화살표는 수상에 수많은 프로게스테론 결정이 출현함을 보여준다.
- 도 3은 용매증발법을 따라 제조 및 건조한 미립자의 전자현미경 사진으로서, 미립자는 여과 도중 심하게 응집되어 필름 형태가 되었으며 곳곳에 프로게스테론 결정이 관찰된다.
- 도 4는 용매추출법에 따라 제조 및 건조한 미립자의 전자현미경 사진. 미립자는 여과 도중 심하게 응집되어 필름 형태가 되었으며 곳곳에 프로게스테론 결정이 보여진다.
- 도 5는 수상에 10N-NaOH를 첨가하지 않은 경우 수상에서 관측되는 디메틸카보네이트 농도의 경시적 변화를 나타내는 GC 크로마토그램 결과로서, 시간 경과에 따라 수상에 녹은 디메틸카보네이트 농도 (peak 1)는 점차 증가되며, 수상에서는 메탄올 (peak 2)가 관측되지 않음을 나타낸다.
- 도 6은 수상에 10N-NaOH 8 ml을 첨가하였을 때 수상에서 관측되는 디메틸카보네이트 농도의 경시적 변화를 나타내는 GC 크로마토그램 결과로서, 수상에서는 디메틸카보네이트 (peak 1)가 거의 관측되지 않는 반면에, 수상에서의 메탄올 (peak 2) 농도는 점차 증가함을 나타낸다.

도 7은 수상에 첨가해준 10N-NaOH 용적이 수상에서 측정되는 디메틸카보네이트 농도에 미치는 영향을 나타낸다.

도 8은 수상에 10N-NaOH 8 ml 첨가하였을 때 수상에서 시간의 변화에 따라 관측되는 메탄올 농도를 나타낸다.

도 9은 디메틸카보네이트 (DMC)를 함유하지 않거나 2 ml의 DMC를 함유하는 수상에 분산상 (PLGA 0.25 g, 프로게스테론 50 mg, DMC 4 ml)을 유화시킨 후 1, 2, 또는 3 ml의 10N-NaOH를 첨가하고 30분 후에 광학현미경으로 관찰한 유제의 상태를 나타낸다.

도 10은 미립자 제조공정과 동일한 조건에서 유화시킨 후 5분 경과하였을 때 수상 시료의 GC 크로마토그램 결과로서, 수상에 10N-NaOH (a) 6 ml 또는 (b) 8 ml의 10N-NaOH를 적가하였다. 번호 1과 2는 각각 디메틸카보네이트와 메탄올 피크를 지칭한다.

도 11은 수상에 디메틸카보네이트 2 ml을 미리 녹인 후 분산상 (PLGA 0.25 g, 프로게스테론 50 mg, 그리고 디메틸카보네이트 4 ml로 구성)과 유화시킨 후 (a) 6 ml의 10N-NaOH 및 (b) 8 ml의 10N-NaOH를 첨가하고 20분 및 30 분 후에 관찰한 광학현미경 결과이다.

도 12는 프로게스테론 50 mg, PLGA 0.25 g, 그리고 디메틸카보네이트 4 ml로 구성된 분산상을 디메틸카보네이트 2 ml을 미리 녹인 수상에 유화하여 제조한 PLGA 미립자 현탁액의 입자분포 결과로서, 이때 용매제거를 위해 사용한 10N-NaOH 용적은 6 ml이었다.

도 13은 프로게스테론 50 mg, PLGA 0.25 g, 그리고 디메틸카보네이트 4 ml로 구성된 분산상을 디메틸카보네이트 2 ml을 미리 녹인 수상에 유화하여 제조한 PLGA 미립자 현탁액의 입자분포 결과이며, 이때 용매제거를 위해 사용한 10N-NaOH 용적은 8 ml이었다.

도 14는 수상에 미리 첨가한 10N-NaOH 용적이 프로게스테론 함유한 미립자 형상에 미치는 영향을 보여주는 전자현미경 사진으로서, 10N-NaOH 사용량을 (a, b) 68 ml, (c, d) 78 ml, 그리고 (e, f) 8 ml로 변화하였으며, 미립자 봉입을 위해 최초 사용한 프로게스테론 용량은 50 mg으로 고정하였으며, (a, c, e) 미립자의 경우 wet sieving 단계 없이 바로 여과를 통해 회수한 경우이며 (b, d, f) 미립자의 경우 wet sieving 후 여과를 통해 수거한 미립자를 건조한 것이다.

도 15는 수상에 미리 첨가한 10N-NaOH 용적 (6 ml, 7 ml, 또는 8 ml)이 프로게스테론 봉입률에 미치는 영향을 시험한 결과로서, 미립자 봉입을 위해 최초 사용한 프로게스테론 용량은 50 mg이었고, 충전 막대기(bar)는 wet sieving 없이 여과 과정만을 통해 수거한 미립자로부터 얻은 결과이며, 빗장 막대기(bar)는 wet sieving과 여과 과정을 모두 거친 후 수거한 미립자로부터 관측한 결과이다.

도 16은 미립자 제조에 사용된 약물량이 약물 봉입률에 미치는 영향. 미립자 제조공정 시 최초 약물 사용량을 50에서 100 그리고 150 mg으로 변경하였을 때 얻어진 봉입률을 나타내며, 충전 막대기(bar)는 wet sieving 없이 여과 과정을 통해 수거한 미립자로부터 얻은 결과이며, 빗장 막대기(bar)는 wet sieving과 여과 과정을 모두 거친 후 수거한 미립자로부터 관측한 결과이다.

도 17은 프로게스테론 최초 사용량을 (a, b) 50mg, (c, d) 100mg, 그리고 (e, f) 150 mg으로 변경하여 제조한 PLGA 미립자의 외부 및 내부 형상을 보여주는 전자현미경 사진으로서, 프로게스테론, PLGA 0.25 g, 그리고 디메틸카보네이트 4 ml로 구성된 분산상을 디메틸카보네이트 2 ml을 미리 녹인 수상에 유화하여 PLGA 미립자를 제조하였는데, 이때 용매제거를 위해 사용한 10N-NaOH 용적은 8 ml이었음. 실제 각 미립자들의 약물 부하량은 12.7 중량%, 22.7 중량%, 그리고 33.1 중량%이었다.

도 18은 (a) 약물을 함유하지 않는 대조 미립자와 (b, c, d) 다양한 프로게스테론을 함유하고 있는 미립자를 대상으로 실시한 열질량 분석 결과로서, 프로게스테론의 실제 부하량은 (b) 12.7 (c) 22.7 그리고 (d) 33.1 중량%이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 하기 실시예를 들어 본 발명을 더욱 자세히 설명할 것이나, 하기 실시예로 본 발명의 보호범위가 한정되는 의도는 아니다.

[0048] 실험소재

[0049] Evonik Degussa 회사의 poly-D,L-lactide-co-glycolide (lactide:glycolide 몰비는 75:25; chloroform에 0.5% 농도로 녹인 후 측정한 inherent viscosity는 0.38 dL/g)을 미립자를 형성하는 소수성 소재의 예로서 사용하였

다. Polyvinyl alcohol (88 mol% hydrolyzed; 분자량 = 25,000 g/mol)은 Polysciences 회사 (Warrington, PA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 프로게스테론 (lot no. 2P72J-AJ)은 TCI 회사 (Tokyo, Japan)을 사용하였으며. NaOH와 디메틸카보네이트는 Sigma-Aldrich회사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

[0050] <비교예 1> 용매증발법을 사용한 프로게스테론 함유 PLGA 미립자 제조

[0051] PLGA (0.25g)과 프로게스테론 (50 mg)을 4 ml의 디메틸카보네이트에 녹였다. 이 분산상을 450 rpm으로 교반되고 있는 0.5% PVA 수용액 30 ml에 부어 수중 유형 유제를 제조하였다. 실온에서 5시간 교반시킨 후 미립자 현탁액을 425 마이크로미터의 공극 크기를 지니는 체 (sieve)에 우선 통과시킨 후, 여액을 다시 11 마이크로미터의 공극 크기를 지니는 여지 (filter paper)를 사용하여 감압여과시켰다. 이때 미립자들은 심하게 응집되어 여지 위에서 필름 형성하여 딱딱한 형태가 되었다. 그러므로 여과지에 수거된 상태로 ambient temperature에서 밤새 진공건조시켰다.

[0052] 용매증발법에 따라 교반하는 도중 150, 180, 210, 240, 270, 그리고 300분 때 유제의 상태를 광학현미경을 통해 관찰하였다 (도 1). 도 1은 디메틸카보네이트를 사용한 용매증발 제조공정 도중 시간 경과에 따른 유제 상태의 변화를 관찰한 광학현미경 사진. 수중 유형 유제를 교반하면서 (a) 150, (b) 180, (c) 210, (d) 240, (e) 270, 그리고 (f) 300분 경과하였을 때 찍은 사진.

[0053] 이때 유제방울의 상태, coalescence 경향, 그리고 프로게스테론 결정 생성 여부 등을 주의 깊게 모니터링하였다. 150분때 유제 방울은 충분히 경화되지 않아 광학현미경 관측 도중 서로 fusion되는 경향을 보여주었다. 또한 270분과 300분 때 도 1의 결과를 확대하여 보았을 때 수상에 많은 프로게스테론 결정이 존재함을 알 수 있었다 (도 2). 도 2는 디메틸카보네이트를 사용한 용매증발 제조공정 도중 (a) 270, 그리고 (b) 300분 경과하였을 때 찍은 광학현미경 사진. 화살표는 수상에 수많은 프로게스테론 결정이 출현함을 보여주었다.

[0054] 최종적으로 5시간 후 여과지에 수거된 미립자를 건조하였을 때 서로 응집되어 film이 형성되었다 (도 3). 도 3은 건조한 미립자의 전자현미경 사진으로서, 미립자는 여과 도중 심하게 응집되어 필름 형태가 되었으며 곳곳에 프로게스테론 결정이 보임.

[0055] 이러한 결과들은 단순한 용매증발법에 따라 프로게스테론을 효과적으로 미립자에 봉입할 수 없을 뿐만 아니라, 유제 방울이 충분히 미립자로 경화되어지지 않음을 알 수 있었다.

[0056] <비교예 2> 용매추출법을 사용한 프로게스테론 함유하는 PLGA 미립자 제조

[0057] PLGA (0.25g)과 프로게스테론 (50 mg)을 4 ml의 디메틸카보네이트에 녹여 약물이 포함된 분산상을 제조하였다. 상기 분산상을 450 rpm으로 교반되고 있는 0.5% PVA 수용액 30 ml에 부어 수중 유형 유제를 제조하였다. 33분 동안 교반시킨 후 증류수 30 ml를 첨가하여 3분간 더 교반시켰다. 미립자 현탁액을 425 마이크로미터의 공극 크기를 지니는 체 (sieve)에 우선 통과시킨 후, 여액을 다시 11 마이크로미터의 공극 크기를 지니는 여지를 사용하여 감압여과시켰다. 여지 위에 수거된 미립자는 심하게 응집되어 0.1% PVA 수용액 80 ml에 재분산시킬 수 없었다. 여과지에 수거된 상태로 ambient temperature에서 밤새 진공건조시켰다. 건조 후 미립자의 형상을 관찰하였을 때 미립자들은 서로 응집되어져 딱딱한 고체 상태로 관측되었다 (도 4). 도 4는 건조한 미립자의 전자현미경 사진. 미립자는 여과 도중 심하게 응집되어 필름 형태가 되었으며 곳곳에 프로게스테론 결정이 보였다.

[0058] 이러한 결과는 단순한 용매추출방법으로는 유제 방울을 효과적으로 미립자로 경화시키는 것이 힘들다는 것을 제시하고 있다. 그러므로 사용하는 물 용적의 증가, 수상의 온도 변화, 감압 유지, 또는 교반 시간의 증가 등과 같은 특별한 조치가 필요하게 된다.

[0059] <실시예 1> 디메틸카보네이트와 NaOH 사이의 반응 고찰

[0060] 0.5% PVA 수용액 30 ml를 100 ml 크기의 비커에 넣은 후, 10N-NaOH 용액 0, 4, 6 또는 8 ml를 첨가하였다. 이 수용액 상단에 Sudan III를 녹인 디메틸카보네이트 용액 (Sudan III 농도 = 0.25 mg/ml) 6 ml를 조심스럽게 올려 놓았다. Control 시험의 경우에는 수상에 10N-NaOH 용액을 넣지 않고 Sudan III를 함유하는 디메틸카보네이트 용액 6 ml를 조심스럽게 넣어주었다. 수상과 유기용매상이 서로 섞이지 않도록 magnetic stirrer를 사용해 60 rpm의 속도로 천천히 교반하였다. 정해진 시점마다 수상으로부터 0.2 ml의 용액을 취하여 바로 10 ml 부탄올과 섞어 주었다. 이를 0.45 마이크로미터의 nylon filter로서 여과한 후 여액 0.4 ml를 취하였다. 여기에 내부표준액 0.2 ml를 넣어준 후 GC 분석 시료로 하였다. 이 때 사용한 내부표준액은 0.2 ml의 이소프로필 알코올을 1.8 ml의 부탄올을 섞은 후 다시 부탄올로 10배 희석하여 제조하였다. 디메틸카보네이트와 메탄올 0.2 ml에 부탄올 3.8 ml를 섞은 것을 표준원액으로 하였으며 이를 적절히 희석하여 5 가지 농도를 지닌 표준액을 제조하였

다. 위에서 제조한 GC 분석시료를 flame ionization detector가 장치된 가스크로마토그래피(GC)(model GC-2010; Simadzu Corp., Kyoto, Japan)를 이용하여 분석했다. Zebron ZB-624 column (30 m x 0.32 mm x 1.80 mm; Phenomenex, CA, USA)를 고정상으로 사용했고, 이동상으로는 질소가스를 사용하였다. 이동상의 유출속도는 1.71 ml/min로 고정하였으며, 시료 도입구와 탐지기의 온도는 각각 200 °C와 220 °C로 세팅하였다. 오븐 온도는 45°C에서 2분 동안 유지한 후, 165°C까지 20°C/min속도로 가열했고, 165°C에서 4분간 등은 유지했다.

[0061] 도 5는 수상에 10N-NaOH를 첨가하지 않은 경우 수상에서 관측되는 디메틸카보네이트 농도의 경시적 변화를 나타내는 GC 크로마토그램. 시간 경과에 따라 수상에 녹은 디메틸카보네이트 농도 (peak 1)는 점차 증가됨. 수상에서는 메탄올 (peak 2)가 관측되지 않음. 도 5에 나타난 GC 크로마토그램은 수상에 10N-NaOH를 첨가하지 않은 대조시험의 경우, 시간이 경과함에 따라 수상의 디메틸카보네이트 농도는 점차 증가하여 포화상태에 도달함을 보여주고 있다.

[0062] 이러한 결과와 극명히 다르게, 수상에 8 ml의 10N-NaOH를 첨가한 경우 수상에서 관측되는 디메틸카보네이트 피크는 미미한 수준이었다 (도 6). 도 6은 수상에 10N-NaOH 8 ml를 첨가하였을 때 수상에서 관측되는 디메틸카보네이트 농도의 경시적 변화를 나타내는 GC 크로마토그램 결과로서, 수상에서는 디메틸카보네이트 (peak 1)가 거의 관측되지 않는 반면에, 수상에서의 메탄올 (peak 2) 농도는 점차 증가함을 나타낸다.

[0063] 대신 이 경우 수상에서는 메탄올 피크가 나타났으며, 시간이 지남에 따라 메탄올 농도는 증가됨을 보여주고 있다. 이는 수상에 존재하는 디메틸카보네이트가 NaOH와 반응하여 메탄올과 CO₂로 분해됨을 나타낸다. GC 크로마토그램에서의 메탄올 피크뿐만 아니라 욕안으로 CO₂ 가스가 생성됨을 관찰하였다. 실제로 사용한 10N-NaOH 용량이 수상에서의 디메틸카보네이트 농도에 어떤 영향을 미치는가를 정량한 결과가 도 7에 나타나 있다. 도 7은 수상에 첨가해준 10N-NaOH 용적이 수상에서 측정되는 디메틸카보네이트 농도에 미치는 영향을 나타낸다.

[0064] 10N-NaOH를 전혀 사용하지 않았을 때 디메틸카보네이트의 수상에 대한 용해도는 155.311.5 mg/ml이었다. 하지만 수상에 넣어준 10N-NaOH 용량이 높을수록 수상에서의 디메틸카보네이트 농도는 현격하게 저하되었다. 이는 곧 디메틸카보네이트의 분해속도가 NaOH 농도에 비례함을 제시하는 것이다. 즉, 수상에 첨가되는 NaOH의 농도를 조절하여, 수상에 녹아있는 디메틸카보네이트의 분해속도를 제어할 수 있는 것이다. 이는 곧 이러한 기법을 사용하여 유제 방울이 미립자로의 경화되는 속도를 조절할 수 있음을 제시한다. 도 8은 예시로, 10N-NaOH 8 ml를 사용한 경우 수상에서 시간이 지남에 따라 디메틸카보네이트로부터 분해되어 생성되는 메탄올 농도를 정량한 결과를 보여준다.

[0065] <실시예 2> 미립제 제조공정 변이요소의 최적화

[0066] 분산상 (dispersed phase)을 먼저 제조하기 위하여 PLGA 0.25 g과 프로게스테론 50 mg을 4 ml의 디메틸카보네이트에 녹였다. 디메틸카보네이트 (0 또는 2 ml)을 0.5% PVA 수용액 30 ml에 첨가하여 녹인 수상(continuous phase)으로 사용하였다. 분산상을 450 rpm으로 교반되고 있는 수상에 첨가하여 수중 유형 (oil-in-water, o/w) 유제를 제조하였다.

[0067] 상기 얻어진 유제를 3분 동안 교반시킨 후, 10-N NaOH 용액 (1, 2, 3, 또는 4 ml)을 첨가하여 30분 동안 교반하였다. 연후에 유제의 상태를 광학현미경 (model S16C, Microscope Inc.)을 사용하여 관찰하였다. 모든 경우 유제는 형성되었지만 유제방울의 성상은 차이가 있었으며 미립자 경화속도는 아주 느린 것으로 보여졌다 (도 9). 도 9은 디메틸카보네이트 (DMC)를 함유하지 않는 수상, 또는 2 ml의 DMC를 함유하는 수상에 각각 분산상 (PLGA 0.25 g, 프로게스테론 50 mg, DMC 4 ml)을 유화시켜 유제를 제조하였다, 상기 유제에 1, 2, 또는 3 ml의 10N-NaOH를 첨가하고 30분 후에 광학현미경으로 관찰한 유제의 상태를 나타낸다.

[0068] 흥미롭게도, 2 ml의 디메틸카보네이트를 수상에 미리 녹인 경우, 디메틸카보네이트를 첨가하지 않은 경우에 비하여, 상대적으로 적은 크기의 유제 방울이 제조되었으며 입자 크기의 균일성이 좋았다. 상기의 결과들을 바탕으로 분산상과 유화하기 전 수상에 2 ml의 디메틸카보네이트를 미리 녹는 조건을 설정하였으며 유제 방울의 경화속도를 증가시키기 위하여 사용하는 10N-NaOH 용량을 6 그리고 8 ml로 늘려 미립자를 제조하였다.

[0069] <실시예 3> 프로게스테론 함유하는 PLGA 미립자 제조

[0070] 분산상 (dispersed phase)을 먼저 제조하기 위하여 PLGA (0.25 g)과 프로게스테론 (50, 100, 또는 150 mg)을 4 ml의 디메틸카보네이트에 녹였다. 0.5% PVA 수용액 30 ml에 디메틸카보네이트 2 ml를 첨가하여 수상 (continuous phase)으로 사용하였다. 분산상을 450 rpm으로 교반되고 있는 수상에 첨가하여 수중 유형 (oil-in-water, o/w) 유제를 제조하였다.

- [0071] 상기 얻어진 유제를 3분 동안 교반시킨 후, 10-N NaOH 용액 (6, 7, 또는 8 ml)을 첨가하여 30분 동안 교반하였다. 교반 도중 유제 상태를 각 시점마다 광학현미경을 사용하여 유제방울의 상태, coalescence 경향, 그리고 프로게스테론 결정 생성 여부 등을 관찰하였다. 교반 후 증류수 30 ml 첨가하여 3분 동안 교반시켰다.
- [0072] 최종적으로 형성된 미립자 현탁액을 425 마이크로미터의 공극 크기를 지니는 체 (sieve)에 우선 통과시키면서 11 마이크로미터의 공극 크기를 지니는 여지 (filter paper)를 사용하여 감압여과하였다. 여지 위에 수거된 미립자를 다시 0.1% PVA 수용액 80 ml에 2시간 동안 재분산시켰다.
- [0073] 마지막으로 건조 목적으로 미립자를 수거하기 위해 두 가지 방법을 사용하였다. 첫 번째 방법은 wet sieving과 여과방법의 두 가지 방법을 사용하는 것이었다. 즉 미립자 현탁액을 425 mm 체와 25 mm 체를 통과시키고 두 체 사이에 존재하는 미립자 형성물을 물로 사용해 세척하여 주었다. 본 목적은 봉입되지 않고 존재하는 약물 결정 (주로 25 mm 크기보다 적음)을 제거하기 위해 수행하였다. 연후에 11 마이크로미터의 공극 크기를 지니는 여지를 사용하여 감압여과하여 미립자를 수거하였다. 두 번째 방법은 wet sieving 과정 없이 미립자 현탁액을 바로 11 마이크로미터의 공극 크기를 지니는 여지를 사용하여 감압여과하였다. 상기 2 가지 방법들을 통해 각각 수거한 미립자를 ambient temperature에서 밤새 진공 건조하였다.
- [0074] 위의 미립자 제조공정에서 6 ml 또는 8 ml의 10N-NaOH 첨가한 후 반응 시간 5분 후 수상 일부를 취하여 디메틸 카보네이트 소실 여부와 메탄을 생성 여부를 관찰하였다. 도 10은 미립자 제조공정과 동일한 조건에서 유화시킨 후 5분 경과하였을 때 수상 시료의 GC 크로마토그램으로서, 분산상과 유화하기 전 수상에 10N-NaOH (a) 6 ml 또는 (b) 8 ml의 10N-NaOH를 적가하였으며, 번호 1과 2는 각각 디메틸카보네이트와 메탄을 피크를 지칭한다.
- [0075] 도 10에서 나타난 바와 같이, NaOH-디메틸카보네이트 사이의 반응은 신속하게 일어났으며 8 ml의 10N-NaOH 사용하였을 때 수상에서 관측되는 디메틸카보네이트의 농도는 매우 낮았다. 이러한 결과는 도 6, 도 7, 및 도 8에서 나타난 결과를 뒷받침해준다.
- [0076] 흥미로운 사실은 미립자 제조공정 도중 첨가해주는 10N-NaOH의 용량이 미립자 경화속도에 영향을 줄뿐만 아니라 동시에 프로게스테론 결정화 현상에도 큰 영향을 끼친다는 사실이었다. 10N-NaOH 6 ml를 사용하였을 때 교반 후 20분이 경과하는 시점부터 수상에 현저한 양의 약물 결정이 관측되었다 (도 11). 도 11은 수상에 디메틸카보네이트 2 ml를 미리 녹인 후 분산상 (PLGA 0.25 g, 프로게스테론 50 mg, 그리고 디메틸카보네이트 4 ml로 구성)과 유화시킨 후, (a) 6 ml 및 (b) 8 ml의 10N-NaOH를 첨가하고 20분 및 30분 후에 관찰한 광학현미경 결과를 나타낸다. 하지만 8 ml의 10N-NaOH를 사용하였을 때에는 수상에 출현하는 약물 결정은 미미하였다.
- [0077] 이러한 경향을 구체적으로 분석하기 위해 6ml과 8 ml의 10N-NaOH를 사용하여 제조한 미립자 현탁액들의 입자 크기 및 입도 분석을 Mastersizer 3000E (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK)을 사용하여 실시하였다.
- [0078] 도 11에서 관측한 결과와 마찬가지로, 6 ml NaOH를 사용하였을 때 20 mm 크기보다 작은 약물결정이 관측되었다 (도 12). 도 12는 프로게스테론 50 mg, PLGA 0.25 g, 그리고 디메틸카보네이트 4 ml로 구성된 분산상을 디메틸 카보네이트 2 ml를 미리 녹인 수상에 유화하여 제조한 PLGA 미립자 현탁액의 입자분포 결과. 이때 용매제거를 위해 사용한 10N-NaOH 용적은 6 ml이었다.
- [0079] 이와는 대조적으로 8 ml 10N-NaOH를 사용한 경우 약물결정화 현상을 극복할 수 있었기에 미립자 현탁액에서 관측되는 약물 결정은 매우 미미한 수준이었다 (도 13). 도 13은 프로게스테론 50 mg, PLGA 0.25 g, 그리고 디메틸카보네이트 4 ml로 구성된 분산상을 디메틸카보네이트 2 ml를 미리 녹인 수상에 유화하여 제조한 PLGA 미립자 현탁액의 입자분포 결과. 이때 용매제거를 위해 사용한 10N-NaOH 용적은 8 ml이었다.
- [0080] <실시예 4> 미립자의 주요 성상 평가
- [0081] 실시예 3에서 언급한 미립자 제조공정에서 디메틸카보네이트 분해속도와 이에 따른 미립자 경화속도가 미립자의 형상과 약물 봉입률에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. 먼저 미립자 외부 및 내부 형상은 전자현미경 (model JSM-5200; Jeol Inc., Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.
- [0082] 이를 위해 specimen mount 위에 양면 접착 테이프를 부치고, 그 위에 미립자 샘플을 고르게 분포하여 고정시켰다. 미립자의 내부를 관찰하기 위해서는 미립자를 epoxy (2 Ton® Epoxy; Devcocon® home, OH, USA)에 혼합하여 굳힌 후 잘랐다. 이를 양면 접착 테이프가 부착된 specimen mount 위에 부착시켰다. SC7620 sputter coater (VG Microtech, West Sussex, UK)를 이용하여 argon atmosphere에서 금으로 코팅한 후 전자현미경을 사용해 여러 가지 미립자 시료의 형상을 조사하였다.

- [0083] 한편, 프로게스테론 봉입물을 측정하기 위해서는, 먼저 건조한 미립자 시료 중 25 mg 내외를 취하여 무게를 정확히 기록한 후 4 ml tetrahydrofuran에 녹였다. 이 용액 200 μ l를 HPLC 이동상인 메탄올과 물의 혼합액 (8:2, by v/v)으로 10배 희석했다. 이 용액을 1 ml 시린지로 취한 후, 0.45 μ m 나일론 필터(nylon filter)를 사용하여 여과한 후 여액을 HPLC 시료로 사용하였다. 프로게스테론 농도 분석을 위해 HPLC (model Shimadzu LC-20AD)를 사용하였다. 분석칼럼으로서 Luna 5 μ m C18(2) 100Å를 사용하였고, 이동상의 유출속도는 0.8 ml/min로 설정하였다. 칼럼으로부터 유출되는 프로게스테론을 탐지하기 위해 UV detector의 파장을 254 nm로 설정하였다. 프로게스테론 50 mg을 이동상 50 ml에 녹여 표준원액을 제조한 후 이를 적절히 희석하여 5 가지의 농도를 지닌 표준액을 제조하였다. 이들 표준액을 이용하여 표준검량곡선을 작성하였으며 이를 이용해 unknown samples의 농도를 산출하였다. 약물 봉입물 (encapsulation efficiency, EE%)는 다음의 식을 사용하여 계산하였다.
- [0084] $\text{약물 봉입물 \%} = (\text{실제 약물 부하량} / \text{이론 약물 부하량}) \times 100$
- [0085] 상기의 식에서, 이론 약물 부하량 %은 (사용한 프로게스테론 양 / (사용한 PLGA 및 프로게스테론의 합계 용량) $\times$ 100이며, 실제 약물 부하량(%)은 (측정된 프로게스테론의 용량 / 분석을 위해 사용한 미립자 시료 용량) $\times$ 100이다.
- [0086] 도 14에서는 수상에 미리 첨가한 10N-NaOH 용적이 프로게스테론 함유한 미립자 형상에 미치는 영향을 보여주고 있다. 도 14는 수상에 미리 첨가한 10N-NaOH 용적이 프로게스테론 함유한 미립자 형상에 미치는 영향을 보여주는 전자현미경 사진이다. 10N-NaOH 사용량을 (a, b) 6, (c, d) 7, 그리고 (e, f) 8 ml로 변화하였다. 미립자 봉입을 위해 최초 사용한 프로게스테론 용량은 50 mg으로 고정하였다. (a, c, e) 미립자의 경우 wet sieving 단계없이 바로 여과를 통해 회수한 경우이며 (b, d, f) 미립자의 경우 wet sieving 후 여과를 통해 수거한 미립자를 건조하였다.
- [0087] 10N-NaOH 사용량을 6ml, 7ml 그리고 8 ml로 증가하여 약물 결정화 현상을 감소시킬 수 있음을 보여주고 있다. 이러한 결과는 도 11, 12, 그리고 13에서 보여준 결과와 일치한다. 미립자 제조과정 중 약물결정이 생기는 경우에는 wet sieving과 같은 처리를 통하여 봉입되지 않은 약물 결정을 제거할 수 있음을 알 수 있다.
- [0088] 이러한 약물 결정 제거단계를 거치지 않고 바로 여과를 통해 미립자를 회수하는 경우 봉입되지 않은 약물 결정 역시 같이 수거되어 미립자 품질 성상에 여러 가지 원치 않는 영향을 미치게 된다. 예를 들면, 6 ml의 10N-NaOH를 사용하여 미립자를 제조하였을 때 wet sieving과 여과과정을 동시에 거치지 않고 여과 과정만을 통해 수거한 미립자로부터 관측된 봉입률은 실제 진정한 봉입률보다 약간 높게 측정되어짐을 알 수 있다 (도 15). 도 15는 수상에 미리 첨가한 10N-NaOH 용적 (6, 7, 또는 8 ml)이 프로게스테론 봉입물에 미치는 영향을 나타내는 것으로서, 미립자 봉입을 위해 최초 사용한 프로게스테론 용량은 50 mg이었고, 충전 막대기(bar)는 wet sieving 없이 여과 과정만을 통해 수거한 미립자로부터 얻은 결과이며, 빗장 막대기(bar)는 wet sieving과 여과 과정을 모두 거친 후 수거한 미립자로부터 관측한 결과이다.
- [0089] 이와는 대조적으로 8 ml의 10N-NaOH를 사용하여 미립자를 제조한 경우 약물결정화 현상이 거의 일어나지 않음을 제시하였다 (도 11, 13). 그러므로 2 가지 미립자 수거 방법이 약물 봉입률에 미치는 영향은 없음을 추론할 수 있으며, 실제로 2 가지 방법에 따른 약물 봉입률에는 통계학적으로 유의성 있는 차이가 발견되지 않았다.
- [0090] 상기의 경우 약물 봉입을 위하여 최초 50 mg의 프로게스테론을 사용한 결과를 보여주었다. 최초 약물 사용량을 100, 그리고 150 mg으로 증가시켜주었을 때 80%를 상회하는 약물 봉입률이 측정되었다(도 16). 또한 2 가지 미립자 수거방법이 약물 봉입률에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 도 16은 미립자 제조에 사용된 약물량이 약물 봉입률에 미치는 영향을 나타내는 것으로서, 미립자 제조과정 시 최초 약물 사용량을 50에서 100 그리고 150 mg으로 변경하였을 때 얻어진 봉입률을 나타내며, 충전 막대기(bar)는 wet sieving 없이 여과 과정을 통해 수거한 미립자로부터 얻은 결과이며, 빗장 막대기(bar)는 wet sieving과 여과 과정을 모두 거친 후 수거한 미립자로부터 관측한 결과이다.
- [0091] 이러한 높은 약물 봉입률은 본 발명이 약물결정화 현상을 제어하면서 약물을 매우 효과적으로 미립자 내부로 봉입할 수 있음을 제시하고 있다. 도 17은 앞서 언급한 미립자들의 외부 및 내부 형상을 보여주는 전자현미경 사진이다.
- [0092] <실시예 5> 열질량분석법
- [0093] 프로게스테론을 함유하지 않은 blank 미립구와 다양한 함량의 프로게스테론을 함유하고 있는 미립자를 대상으로 열질량 분석법 (model Q50 thermogravimetric analyzer; TA Instruments DE, USA)를 실시하였다. 10 mg 내외의

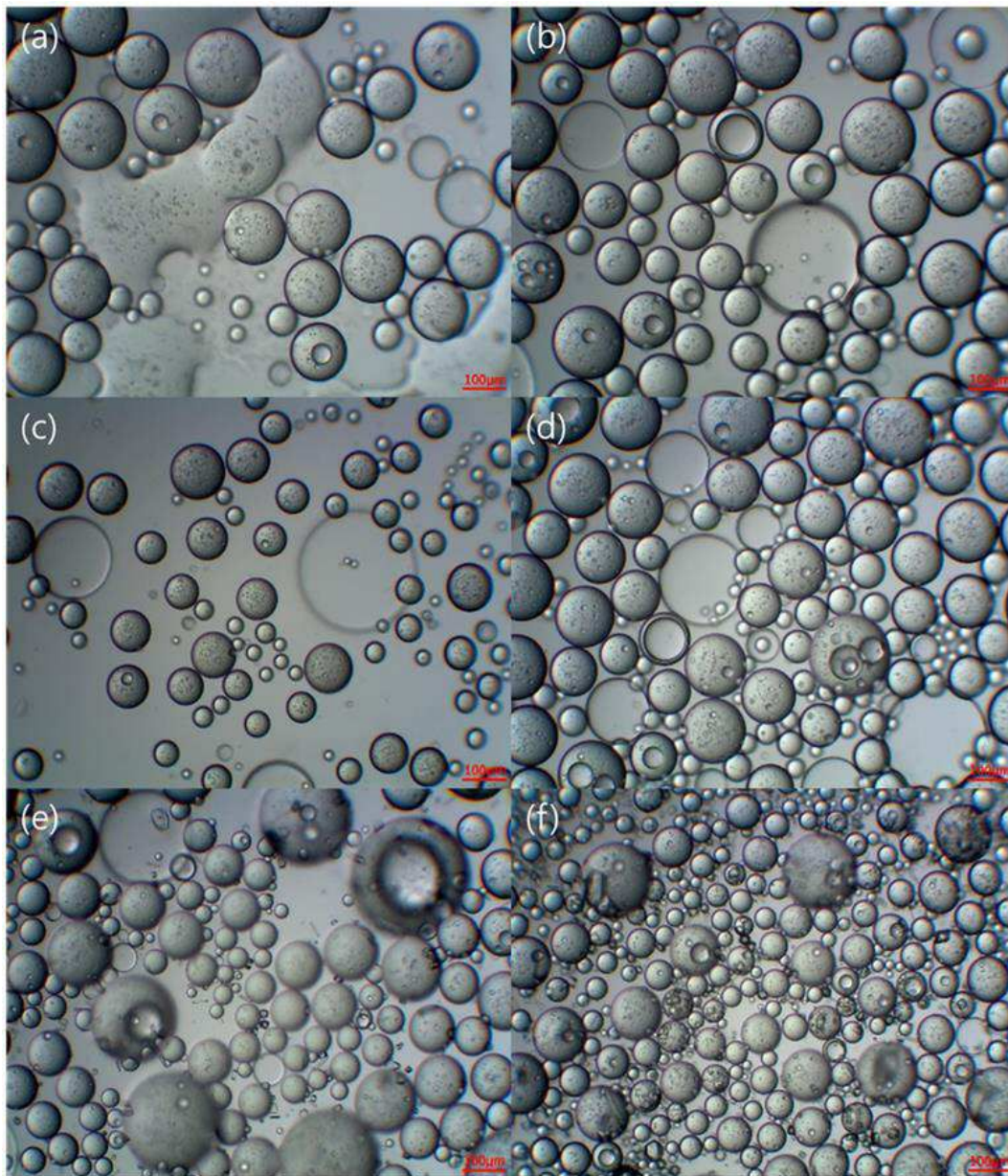
TGA 시료를 백금 팬에 넣은 후 열질량 분석을 시작하였다. 30 ℃에서 5분동안 평형 상태를 유지하고 연후에 550 ℃까지 20℃/min의 속도로 가열시켜주었다. 온도변화에 따른 TGA 시료의 질량 분석은 TA Universal Analysis 2000 software program을 사용하여 자동적으로 실시하였다 (도 18). 도 18은 (a) 약물을 함유하지 않는 대조 미립자와 (b, c, d) 다양한 프로게스테론을 함유하고 있는 미립자를 대상으로 실시한 열질량 분석 결과. 프로게스테론의 실제 부하량은 (b) 12.7중량%, (c) 22.7중량%, 그리고 (d) 33.1 중량%이었다.

[0094]

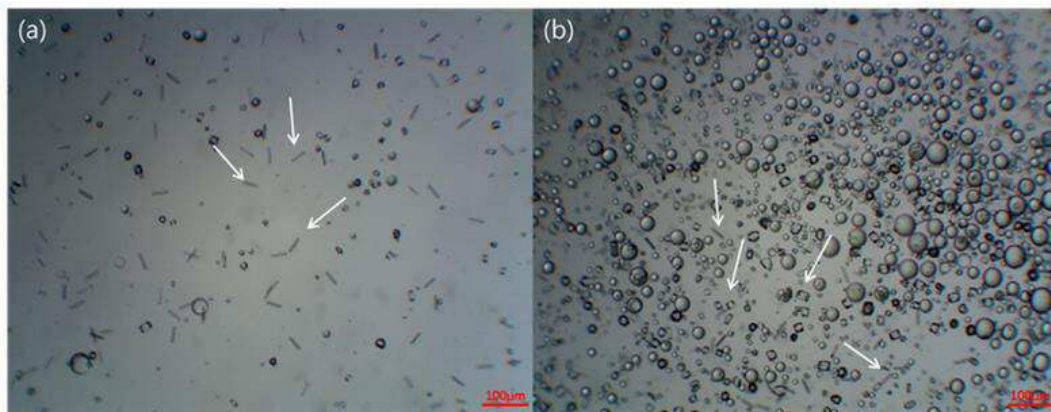
본 실험 결과 약물을 함유하지 않는 대조 미립자의 잔류 용매량은 1.89 중량%로 관측되었다. 프로게스테론을 함유하는 실제로 12.7중량%, 22.7중량%, 그리고 33.1 중량% 함유하고 있는 미립자의 경우 1.29에서 1.44%의 잔류 용매량이 관측되었다. 이러한 결과는 본 발명이 제시하는 미립자 제조기술을 통해 효과적으로 유제방울에 존재하는 디메틸카보네이트를 제거할 수 있으며 최종적으로 진공 건조한 미립자에는 매우 낮은 용량의 잔류 용매가 관측됨을 알 수 있다. 진공건조 조건을 변화를 통하여 더욱더 낮은 잔류 유기용매량을 달성할 수 있을 것이다.

도면

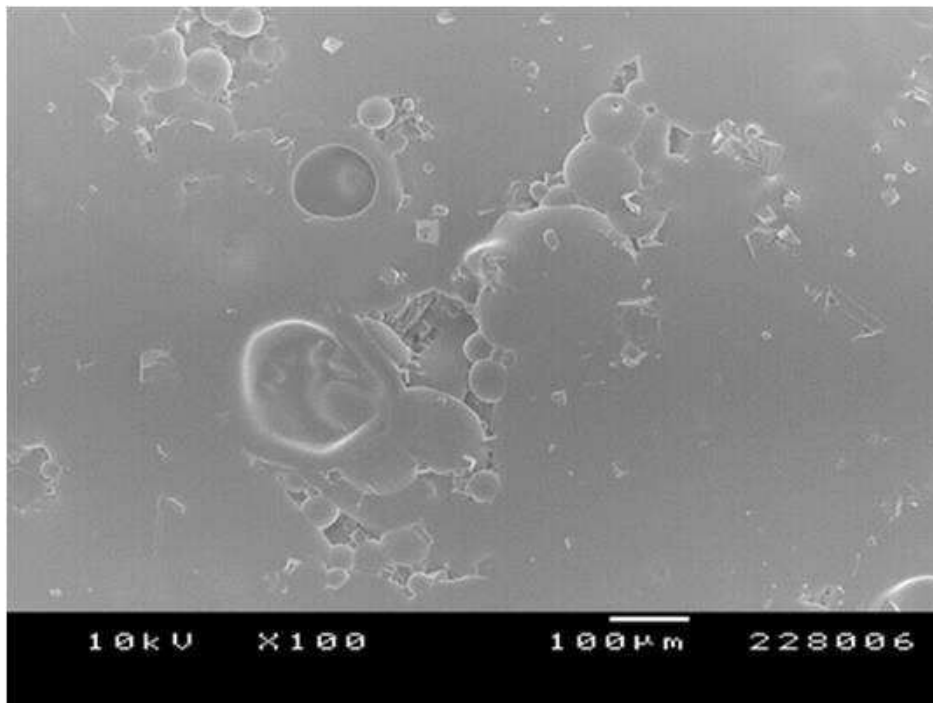
도면1



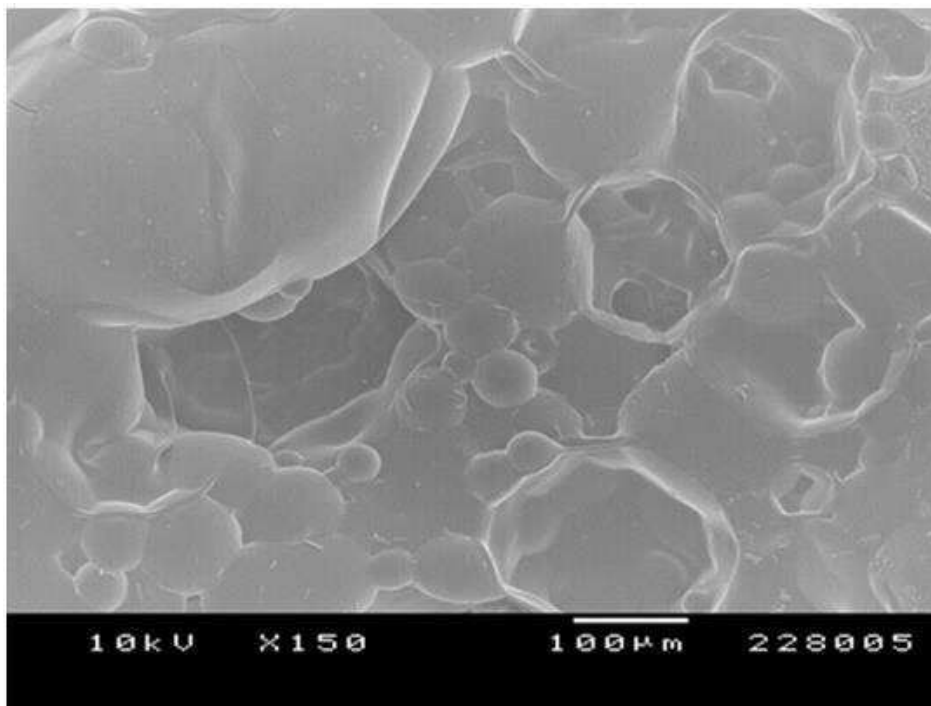
도면2



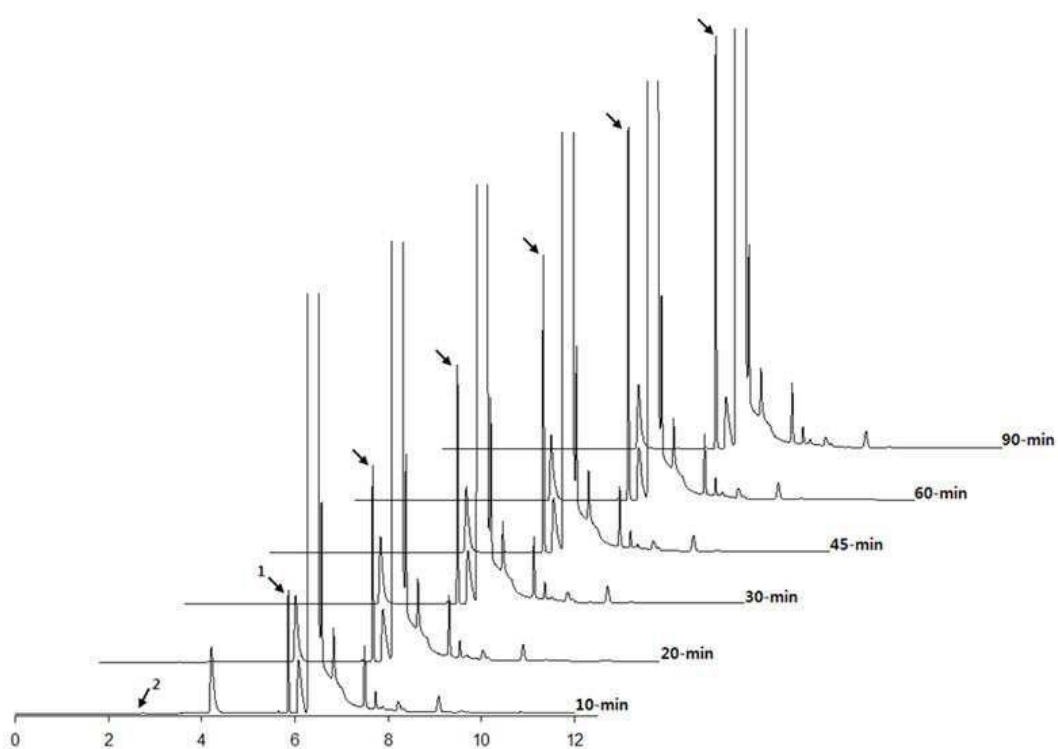
도면3



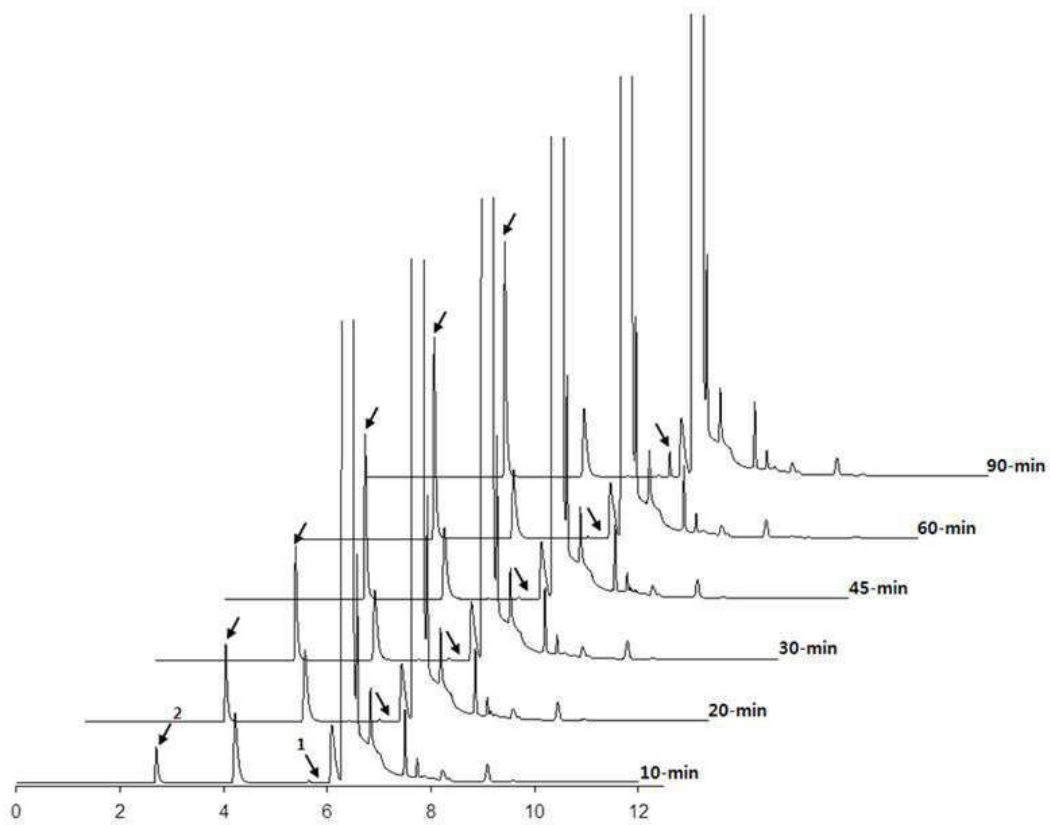
도면4



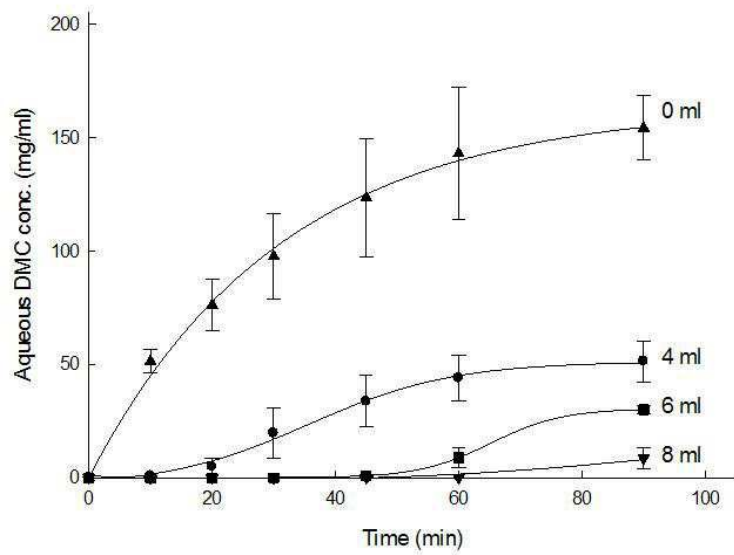
도면5



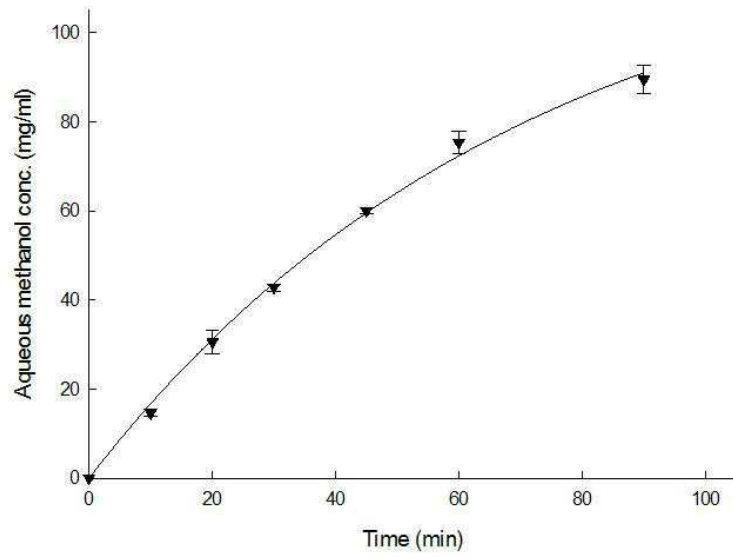
도면6



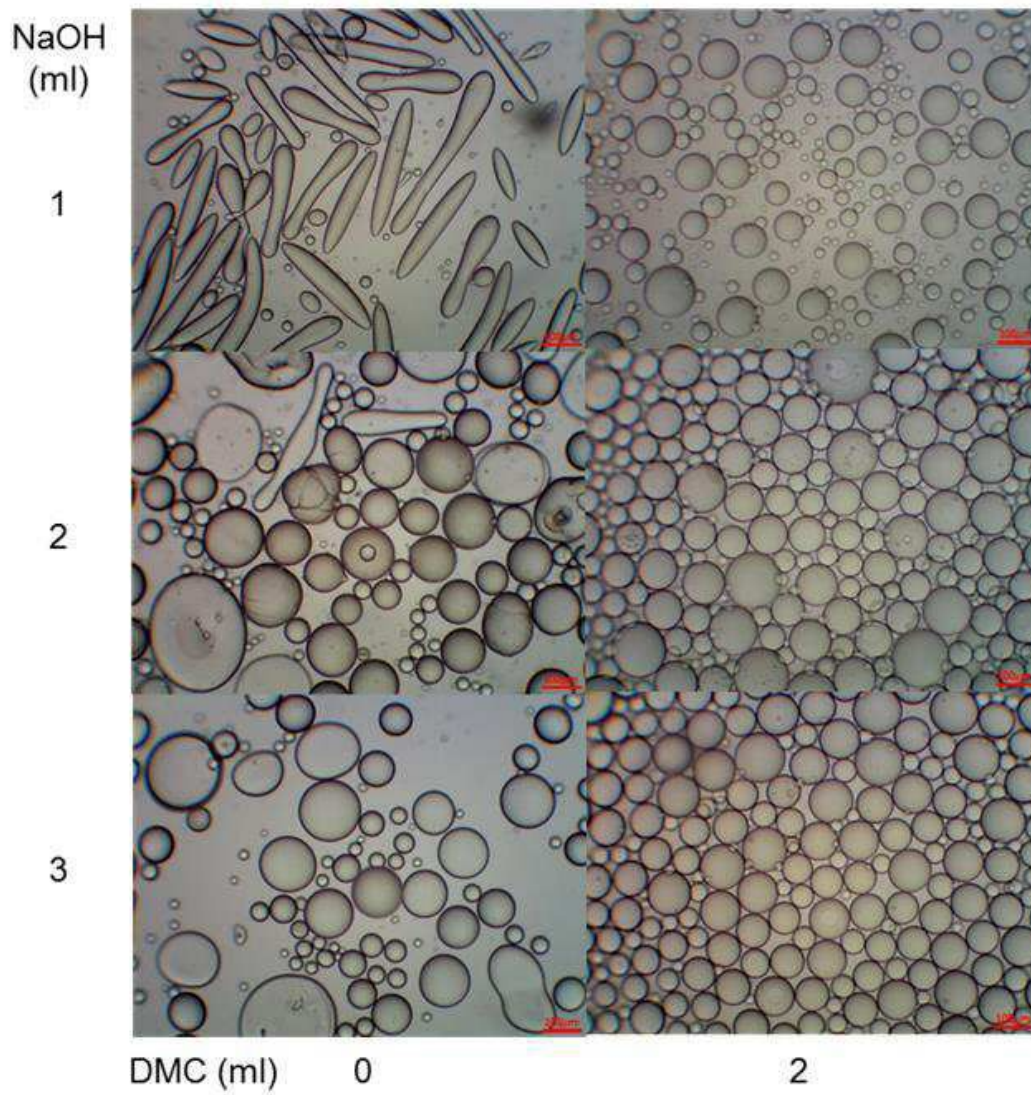
도면7



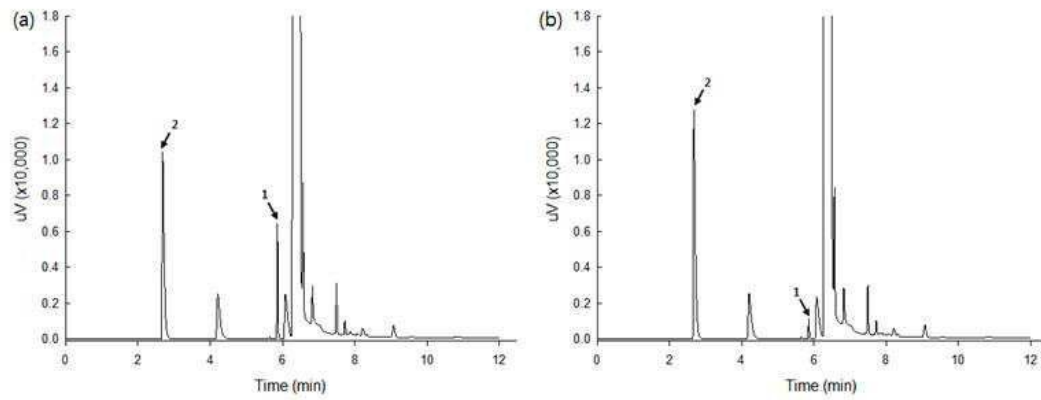
도면8



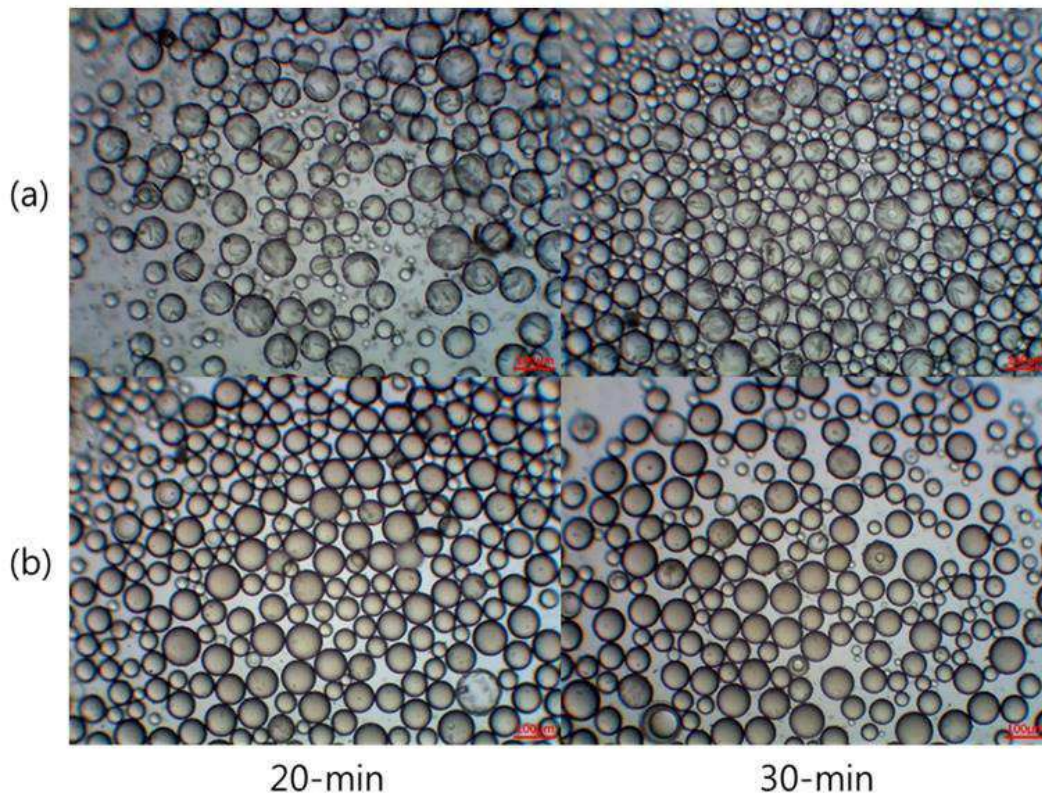
도면9



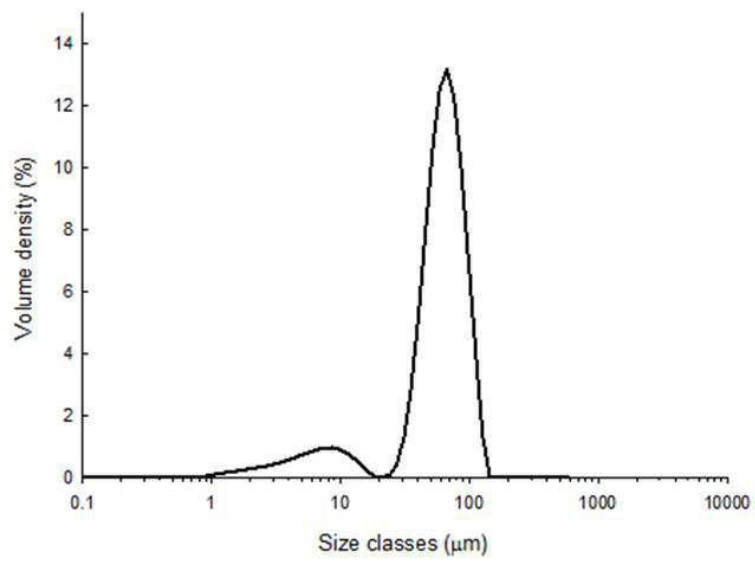
도면10



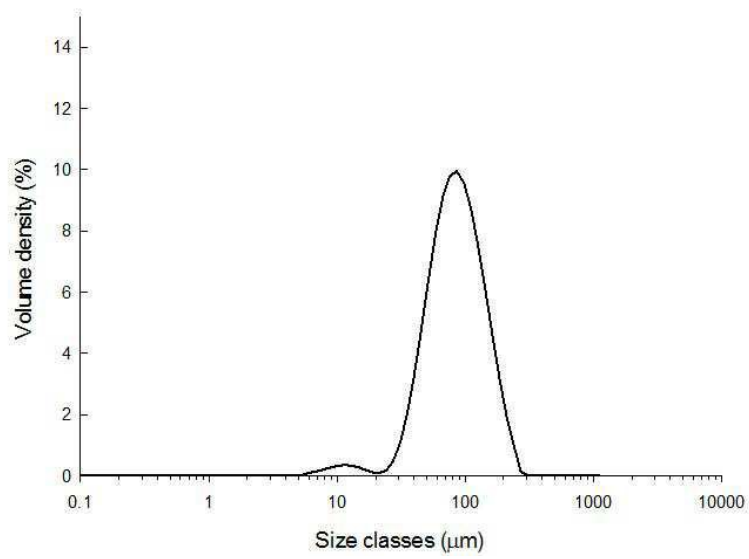
도면11



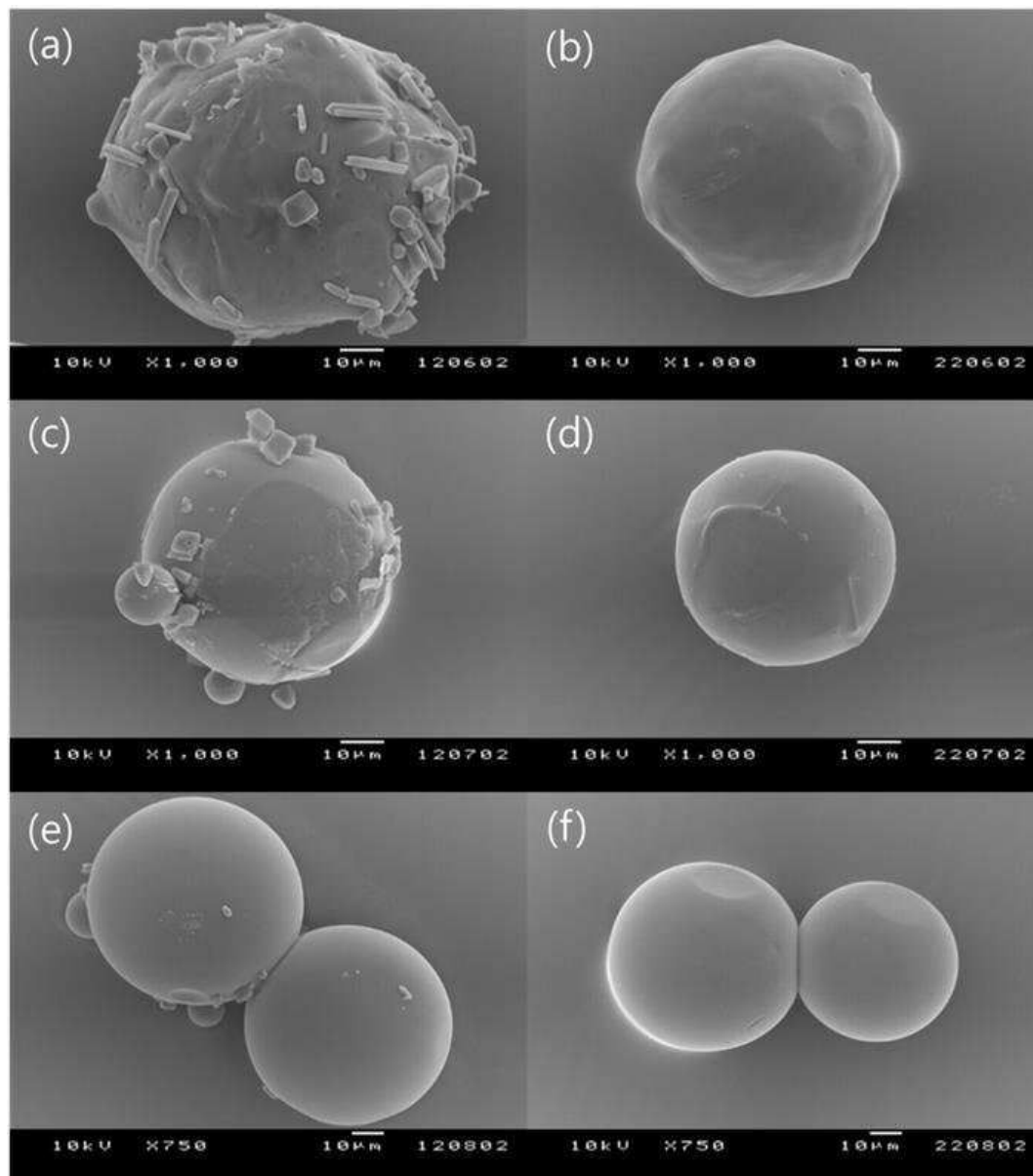
도면12



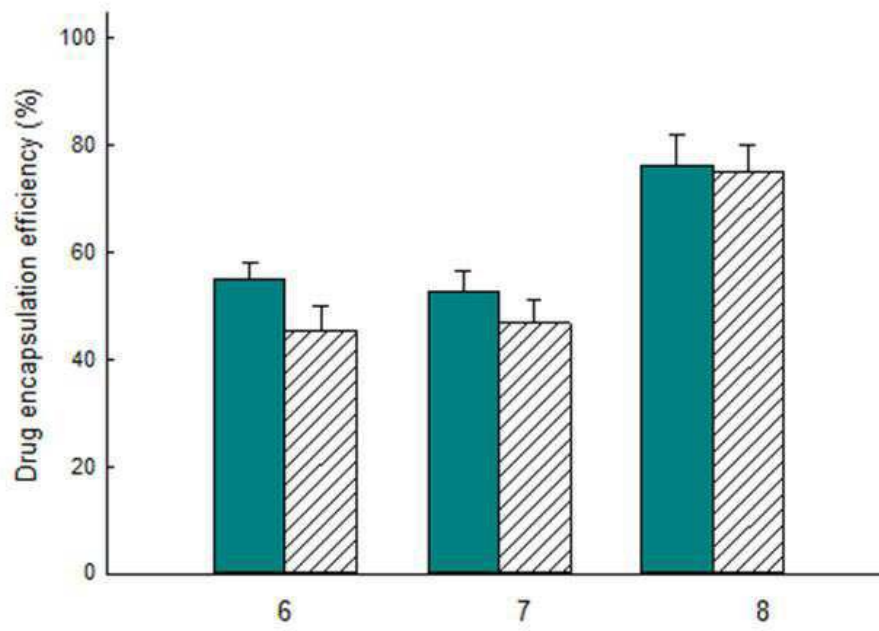
도면13



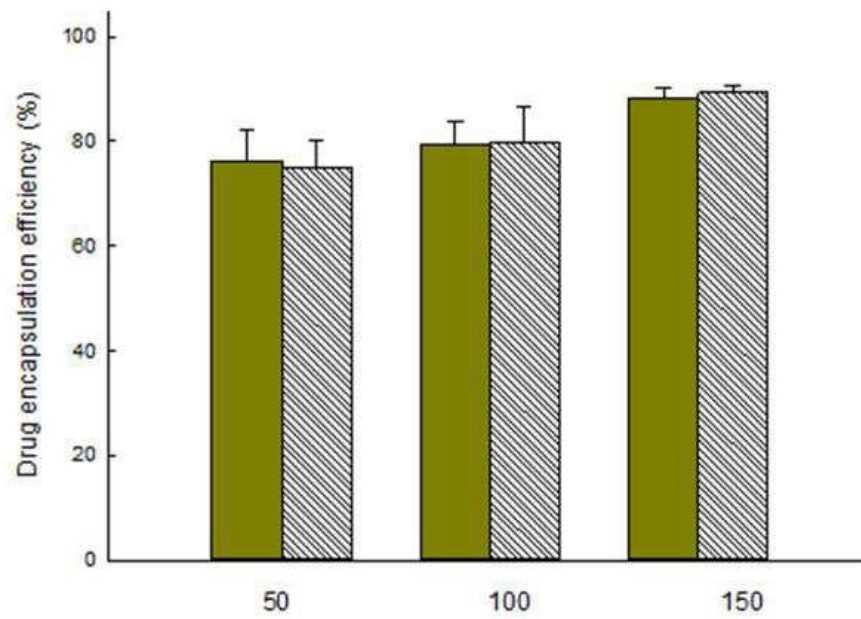
도면14



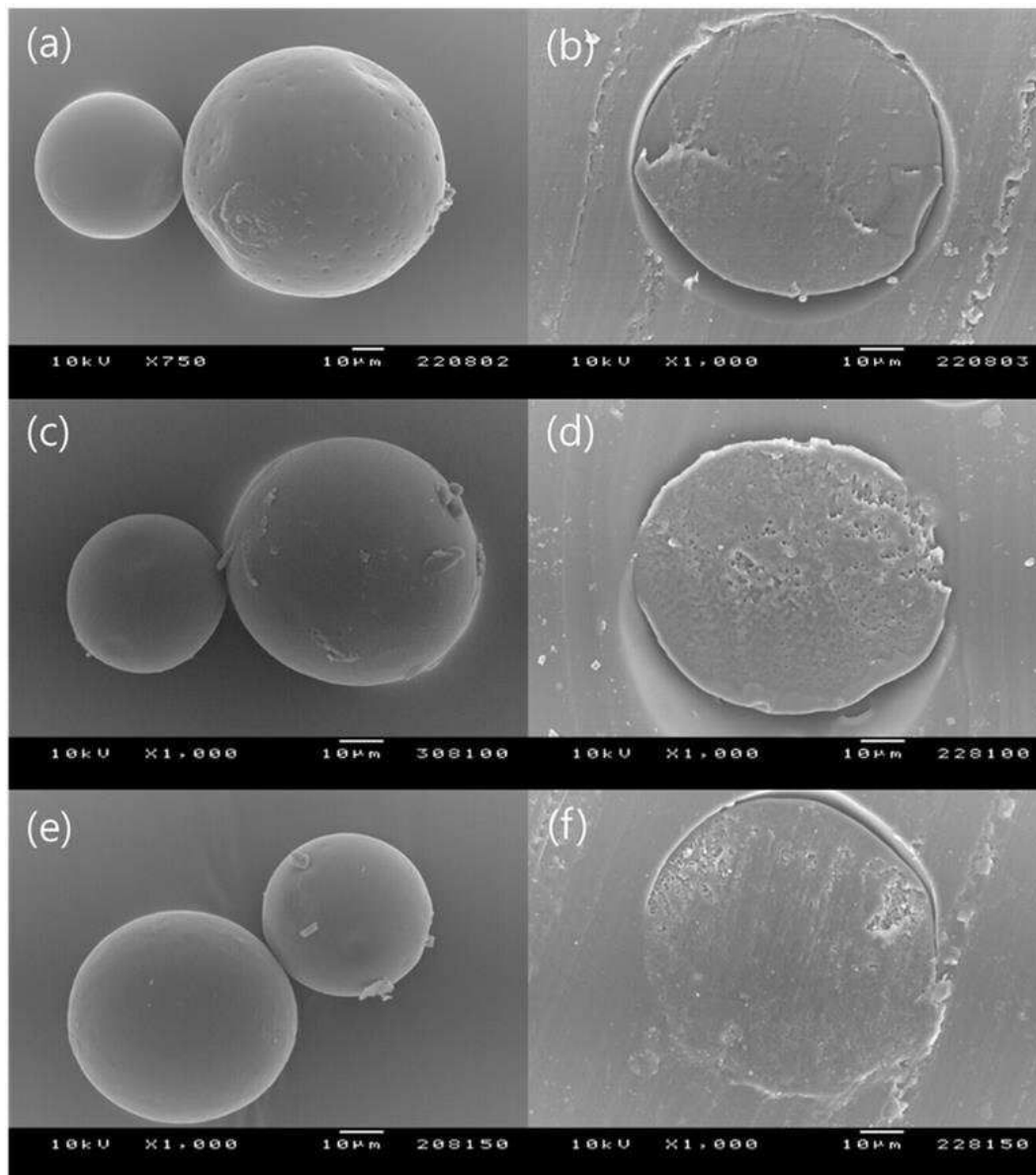
도면15



도면16



도면17



도면18

