



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0054355
(43) 공개일자 2008년06월17일

(51) Int. Cl.

A61K 9/70 (2006.01) A61K 31/66 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0127908

(22) 출원일자 2007년12월10일

심사청구일자 2007년12월10일

(30) 우선권주장

1020060126553 2006년12월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

곽혜선

서울 영등포구 여의도동 공작아파트 A-308

최아영

서울 동대문구 장안동 삼성래미안 104-1302

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 6 항

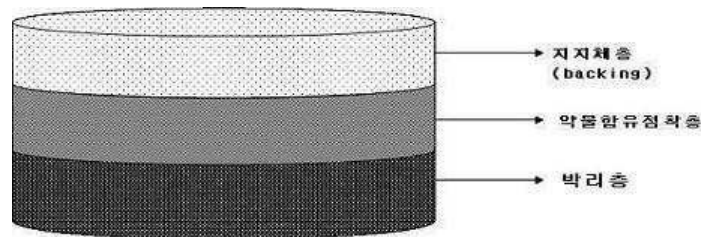
(54) 알렌드로네이트를 유효성분으로 함유하는 골다공증용플라스터 조성물

(57) 요약

본 발명은 알렌드로네이트(Alendronate)를 유효성분으로 함유하는 골다공증용 플라스터 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 알렌드로네이트(Alendronate)를 유효성분으로 함유하는 플라스터는 지지체층, 약물층, 박리층으로 구성됨을 특징으로 한다.

본 발명의 알렌드로네이트(Alendronate)를 유효성분으로 함유하는 플라스터 조성물은 알렌드로네이트 피부투과실험결과, 기존의 경구제제에 비해 지속력이 월등하고 안전성이 뛰어나며 부작용이 없는 플라스터제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

알렌드로네이트를 유효성분으로 함유하고, 용제, 경피흡수촉진제, 감압성점착제를 함유하는 골다공증의 예방 및 치료용 플라스터 조성물.

청구항 2

유효성분으로서 알렌드로네이트를 전체 조성 중 0.1 내지 10%, 용제를 5 내지 50%, 경피흡수촉진제를 0.1 내지 10%, 감압성 점착제를 30 내지 90% 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 알렌드로네이트 함유 골다공증의 예방 및 치료용 플라스터 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 용제는 이소프로필 미리스테이트, 프로필렌 글리콜 모노라우레이트, 프로필렌 글리콜 모노카프릴레이트, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 프로필렌 글리콜 또는 에탄올로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 용제임을 특징으로 하는 알렌드로네이트 함유 플라스터 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 경피흡수촉진제는 라우르산, 올레산, 리놀레산, 카프르산, 카프릴산, 미리스틴산, 올레일알콜, 이소프로필미리스테이트 또는 프로필렌글리콜라우레이트로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 경피흡수촉진제임을 특징으로 하는 알렌드로네이트 함유 플라스터 조성물.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 감압성점착제는 아크릴레이트 중합물로 이루어진 아크릴계 점착제, 천연 또는 합성고무에 석유수지, 로진수지, 오일류 등의 첨가제가 가하여진 고무계 점착제 및 수용성 점착제로부터 선택된 하나 이상의 감압성점착제임을 특징으로 하는 알렌드로네이트 함유 플라스터 조성물.

청구항 6

약물의 투과를 막아주는 지지체(1), 용제에 녹인 유효성분인 알렌드로네이트와 감압성 점착제를 함유한 약물층(2) 및 알렌드로네이트를 실리콘 처리한 박리층(3)으로 구성되어 있는 것을 특징으로 하는 알렌드로네이트 함유 골다공증의 예방 및 치료용 플라스터.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 알렌드로네이트를 유효성분으로 함유하는 골다공증용 플라스터 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

<2> [문헌 1] Keller R.K. and Fliesler S.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, pp560-3, 1999

<3> [문헌 2] Hardman J.G. and Limbird L.E., *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., pp1733-1735, 1997

<4> [문헌 3] Ansel H.C. et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Chapter 10, pp357-372, 1995

<5> [문헌 4] Gwak H.S. et al., *Arch. Pharm. Res.*, 26, pp 644-648, 2003

<6> [문헌 5] Ptacek, P. et al., *J. Chromatogr. B.*, 767, pp111-116, 2002

<7> [문헌 6] Gwak H.S. and Chun I.K., *Arch. Pharm. Res.*, 24, pp 578-583, 2001

- <8> [문헌 7] Kenneth W. Renton. et al., *Original Research.*, 18, pp98-101, 2004
- <9> [문헌 8] Ptacek, P. et al., *J. Chromatogr. B.*, 767, pp111-116, 2002

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 알렌드로네이트는 비스포스포네이트(bisphosphonate) 유도체로서 골다공증 및 페이젯(Paget's) 질환에 널리 사용되는 약물이다. 알렌드로네이트는 파골세포(osteoclast)나 그 전구체에 작용하여 뼈의 재흡수를 저해하는 작용을 지닌다. 다른 비스포스포네이트 약물들과는 달리 이 약물은 ATP 유사체로 대사를 받아 작용하는 것이 아니라 파골세포의 기능에 중요한 역할을 하는 다양한 단백질들의 페닐레이션(phenylation)에 필요한 게라닐게라닐 디포스페이트(geranylgeranyl diphosphate)와 같은 이소프레노이드 지질(isoprenoid lipids)과 콜레스테롤(cholesterol)로 메발론네이트(mevalonate)가 변환하는 과정을 저해한다(Keller R.K. and Fliesler S.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, pp560-3, 1999).
- <11> 알렌드로네이트는 위장관에 의한 흡수가 매우 낮으며(0.6-0.7%), 특히 다른 약물이나 음식에 의해 흡수가 최고 60%까지 감소되기 때문에 아침 첫 시간에 다른 음식이나 약물 복용 적어도 30분 전에는 투약해야 한다(Hardman J.G. and Limbird L.E., *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., pp1733-1735, 1997). 또한 주요 부작용인 식도염 발생 등을 예방하기 위해 많은 양의 물과 함께 복용해야 하고, 복용 후 최소 30분 이상은 똑바른 자세로 앉아 있어야 한다. 이러한 복용상의 복잡성 때문에 특히 노인들에 있어서 복용순응도가 낮고 수분섭취를 많이 해서는 안되는 환자나 오랜 시간 똑바로 앉아 있을 수 없는 환자들에 있어서는 그 사용이 제한적이다. 이런 문제점을 보완하기 위해 과거 10mg의 하루 한번 용법에서 현재는 일주일에 한 번 70mg을 투여하도록 하는 용법상의 개선이 이루어져 왔다. 그러나 이러한 개선에도 불구하고 아직까지도 이 약물의 복용을 꺼리거나 이 약물의 복용으로 인한 위장관 부작용의 보고가 계속되고 있다. 이처럼 경구 투여 시 많은 문제점을 갖고 있음에도 불구하고 알렌드로네이트의 대체 경로에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.
- <12> 상기와 같은 취약점으로 경피흡수제제는 경구투여제제의 대체경로로서 주목을 받아 왔다. 경피흡수제제는 경구투여시 위장관 부작용이 있는 약물, 위장관에서 흡수되기 어려운 약물, 간대사를 받는 약물 및 위장관에서 쉽게 분해되는 약물 등을 피부를 통해서 체내에 효과적으로 전달하여 생체이용률을 향상시키고 위장관 부작용 등을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Ansel H.C. et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Chapter 10, pp357-372, 1995). 1970년 말에 경피흡수제제로서 시바-가이키(Ciba-Geigy)사의 멸미예방용 스킨콜라민 패취(Transderm-Scop)가 개발되고, 협심증 예방 목적으로 니트로글리세린 패취(Transderm-Nitro)가 개발, 1984년에 발매되어 미국에서 괄목할 만한 시장을 확보한 이래, 여러 제약기업에서 새로운 경피치료시스템(transdermal therapeutic system, TTS) 개발에 박차를 가하게 되었다.
- <13> 본 연구의 대상물질인 알렌드로네이트는 앞에서 언급한 바와 같이, 생체이용률이 매우 낮고 위장관 부작용이 큰 약물이다. 따라서, 위 약물의 경피흡수제제로의 개발을 통해 생체이용률 향상과 부작용 최소화 및 그에 따른 복용순응도를 높일 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 현재 국내외적으로 이 약물의 경피흡수에 관한 연구는 전혀 없는 실정이다. 이는 이 약물의 낮은 투과력에 기인하는 것으로 생각되나, 경구 투여의 경우에도 생체이용률이 최대 1% 정도임을 감안하면 적절한 투과촉진제 등을 사용하여 소량만이 투과되어도 충분한 효과를 달성할 수 있을 것으로 기대된다.
- <14> 골다공증은 지속적인 치료가 이루어지는 경우에는 큰 문제가 되지 않는 질환에 속하나 제대로 약물요법이 이루어지지 않는 경우에는 골절 등 다른 문제를 야기하여 국가 의료예산 등에 큰 영향을 줄 수 있으며 환자 개개인의 삶의 질의 차원에서도 반드시 적절한 약료가 이루어져야 하는 질환이다. 따라서, 본 연구를 통해 알렌드로네이트의 경피흡수제제의 상품화의 가능성을 열 수 있다면 골다공증 치료에 큰 영향을 미칠 수 있으며 이는 국가와 환자 개개인에게 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.
- <15> 본 발명에서는 알렌드로네이트 경피흡수 시스템을 개발하고 동물과 건강한 지원자에서의 약물흡수를 경구의 경우와 비교하고자 한다. 또한, 이러한 약물동태 및 임상결과를 통해 궁극적으로는 알렌드로네이트의 경피흡수제제의 상품화를 최종 목표로 한다.
- <16> 그러나, 상기한 문헌의 어디에도 알렌드로네이트를 함유하는 경피흡수제제에 대해서는 개시되거나 교시

된 바가 없다.

<17> 이에 본 발명자들은 알렌드로네이트 정량실험 및 피부투과 실험을 수행한 결과, 알렌드로네이트 함유 경피흡수 제제의 지속성 및 안전성을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

<18> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 알렌드로네이트를 유효성분으로 함유하고, 용제, 경피흡수촉진제, 감압성점착제를 함유하는 골다공증의 치료 및 예방용 플라스터 조성물을 제공한다.

<19> 본 발명의 상기 용제로는 이소프로필 미리스테이트(isopropyl myristate), 프로필렌 글리콜 모노라우레이트(propylene glycol monolaurate), 프로필렌 글리콜 모노카프릴레이트(propylene glycol monocaprylate), 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르(diethylene glycol monoethyl ether), 프로필렌 글리콜(propylene glycol) 또는 에탄올(ethanol), 바람직하게는 프로필렌글리콜(PG)을 사용 가능하다.

<20> 본 발명의 상기 경피흡수촉진제로는 라우르산, 올레산, 리놀렌산, 카프르산, 카프릴산, 미리스틴산, 올레일알콜, 이소프로필미리스테이트 또는 프로필렌글리콜라우레이트, 바람직하게는 라우르산, 올레산, 리놀렌산, 카프르산 또는 카프릴산, 보다 바람직하게는 올레산 또는 카프릴산, 가장 바람직하게는 5 내지 10%의 올레산 또는 5 내지 10%의 카프릴산 함유 프로필렌글리콜(PG)을 사용 가능하며, 상기 감압성점착제로는 아크릴레이트 중합물로 이루어진 아크릴계 점착제, 천연 또는 합성고무에 석유수지, 로진수지, 오일류 등의 첨가제가 가하여진 고무계 점착제 및 수용성 점착제, 바람직하게는 아크릴레이트 중합물로 이루어진 아크릴계 점착제를 사용 가능하다.

<21> 또한, 본 발명은 약물의 투과를 막아주는 지지체, 용제에 녹인 유효성분인 알렌드로네이트와 감압점착제를 함유한 약물층 및 실리콘 처리한 박리층으로 구성되는 알렌드로네이트 함유 플라스터를 제공한다 (도 1 참조).

<22> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<23> 본 발명에 따른 플라스터에는 유효약물, 용제, 경피흡수촉진제, 감압성점착제 및 기타 통상적으로 사용되는 첨가제가 함유되어 있다.

<24> 본 발명에서는 유효성분으로서 알렌드로네이트를 전체 조성물중에 0.1 내지 10%, 바람직하게는 0.5 내지 5%를 함유한다. 이러한 배합비율은 약물의 피부투과도, 약효의 지속성 및 약물의 안정성 등을 양호하게 유지하는 알렌드로네이트 함유 플라스터를 제공한다.

<25> 또한 상기 유효약물은 선택적으로 비스포스포네이트(bisphosphonate) 제제, 바람직하게는 파미드로네이트(pamidronate), 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 틸루드로네이트(tiludronate), 네리드로네이트(neridronate), 올파드로네이트(olpadronate), 이반드로네이트(ibandronate), 리세드로네이트(risedronate) 또는 졸레드로네이트(zoledronate), 보다 바람직하게는 파미드로네이트(pamidronate)를 사용 가능하다.

<26> 본 발명에서 용제로 사용하는 에탄올(ethanol), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 프로필렌 글리콜 모노카프릴레이트(propylene glycol monocaprylate), 프로필렌 글리콜 모노라우레이트(propylene glycol monolaurate), 이소프로필 미리스테이트(isopropyl myristate) 또는 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르(diethylene glycol monoethyl ether)는 매트릭스형 경피약물 송달시스템의 투과속도를 증가시키고 약물을 용해시키는 목적으로 사용되고, 전체 조성물중에 5 내지 50%, 바람직하게는 10 내지 30%를 함유한다.

<27> 또한, 본 발명에서는 알렌드로네이트의 피부투과를 더욱 촉진시키기위해 약물을 플라스터내에 고농도로 유지시키기 위한 용제 외에도 경피흡수촉진제로서 지방산으로는 라우르산(lauric acid), 올레산(oleic acid), 리놀렌산(linoleic acid), 카프르산(capric acid), 카프릴산(caprylic acid) 등을 사용할 수 있다. 이러한 경피흡수촉진제는 단독 혹은 2종 이상을 혼합하여 사용하며, 그 총량은 약물층을 구성하는 전체 조성물중에 0.1 내지 10% 범위로, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 5% 범위로 함유하는 것을 포함한다.

<28> 또한, 본 발명의 플라스터에 사용하는 감압성점착제로는 아크릴레이트 중합물로 이루어진 아크릴계점착제를 사용하며, 바람직하게는 Duro-Tak® 87-2196, Duro-Tak® 87-2100 또는 Duro-Tak® 87-2510 (Bridgewater, NJ, 미국)을 포함한다.

<29> 상기 감압성점착제는 단독 혹은 2종 이상을 혼합하여 사용하며, 그 총량은 약물층을 구성하는 전체 조성

물중에 30 내지 90% 범위로, 더욱 바람직하게는 50 내지 80% 범위로 함유하는 것을 포함한다.

- <30> 이밖에도 천연 또는 합성고무에 석유수지, 로진수지, 테르펜수지 등의 점착부여수지, 오일, 산화방지제 등의 첨가제가 가하여진 고무계점착제 및 수용성점착제 등을 추가로 사용 가능하다.
- <31> 본 발명에서는 상기의 조성물 외에 제제의 물성을 개선시키기 위하여 1-멘톨, 박하유 등의 정유성분, 산화방지제, 보존제 및 무기충진제 등의 첨가제를 배합할 수 있으며, 그 사용량은 약물층을 구성하는 전체 조성물 중 0.1 내지 10%, 바람직하게는 0.2 내지 5% 함유하도록 한다.
- <32> 본 발명의 알렌드로네이트 함유 플라스틱은 상기 조성을 갖는 제제 중의 모든 성분이 응집하지 않고 균일하게 분산되어 있어, 높은 피부투과성이 안정적으로 유지되어 알렌드로네이트에 의한 효과를 장시간동안 유지시킬 수 있으며, 제제의 안정성 및 부착성도 우수하다.
- <33> 본 발명은 상기한 바와 같은 조성물을 이용하여 제형화한 플라스틱을 포함하는 바, 예를 들어 본 발명에 따른 플라스틱의 구조는 하기 도 1에 도시한 바와 같이 제조 가능하다.
- <34> 도 1에 나타난 알렌드로네이트 함유 플라스틱은 피부 적용시 효과적으로 약물을 경피투여시킬 수 있도록 3가지 구성물로 구성되어 있는데 즉, 약물의 투과를 막아주는 지지체(1), 상기한 용체에 녹인 유효성분인 알렌드로네이트와 감압성점착제를 함유한 약물층(2) 및 실리콘 처리한 박리층(3)으로 구성되어 있다.
- <35> 상기 지지체(1)는 약물층(2)내의 약물 및 기타 조성물과의 상호작용이 없는 물질로서 투습성 및 신축성이 좋은 재질로 이루어지는 것이 바람직하다. 본 발명에 사용 가능한 지지체로는 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르 및 폴리우레탄 등과 같은 합성수지 필름, 시트, 시트상 발포체, 직포 또는 부직포 및 이들의 적층체 등을 들 수 있으며, 바람직하게는 폴리에스테르 필름을 사용하였다.
- <36> 상기 약물층(2)은 주요하게는 알렌드로네이트, 감압성점착제, 용제 및 경피흡수촉진제 등으로 구성되며 필요에 따라 피부자극 방지제나 가소제 등이 첨가될 수 있다. 알렌드로네이트와 기타 조성물을 함유하는 약물층은 단층 또는 2~3층의 다층 구조를 가지며, 전체 점착층의 두께는 0.01 내지 1 mm, 바람직하게는 0.1 내지 0.5 mm가 적당하다.
- <37> 상기 박리층(3)은 약물층(2)과 접하는 면이 실리콘, 불소로 코팅된 폴리에스테르 필름, 폴리에틸렌 필름 또는 종이 등이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 실리콘을 사용할 수 있다.
- <38> 본 발명의 플라스틱은 원형, 사각형, 타원형 등 필요에 따라 당업계에 잘 알려진 형태 또는 모양으로 변형 및 개형이 가능하다.
- <39> 또한, 상기 제조방법에서의 각 조성물을 배합하는 순서는, 그 일례를 서술하는 것에 불과하고, 본 발명의 첨부제의 제조방법은 이 배합순서의 방법에 한정되는 것은 아니다.

효 과

- <40> 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 알렌드로네이트를 유효성분으로 함유하는 골다공증용 플라스틱은 기존의 경구제제에 비해 지속력이 월등하고 안전성이 뛰어나며 부작용이 없는 플라스틱으로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <41> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <42> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <43> **참고예 1. 실험동물의 준비 및 사육조건**
- <44> 시험관 내 실험(*In vitro*)용 무모 생쥐(hairless mouse, 6-8주령, 수컷)와 동물 실험(*in vivo*)용 흰쥐(8-9주령, 280-320g, 수컷)를 (주)샘타코 (경기도 오산)에서 각각 구입하여 일주일 이내에 사용하였다.
- <45> **참고예 2. 약물 및 시약**
- <46> 알렌드로네이트 나트륨(sodium alendronate)은 (주)환인제약에서, 파미드로네이트 나트륨(disodium pamidronate)은 (주)한림제약에서 제공받은 것을 사용하였고, 용제로서 이소프로필 미리스테이트(isopropyl myristate; IPM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 프로필렌 글리콜 모노라우라이트(propylene

glycol monolaurate; PGML, Lauroglycol® 90), 프로필렌 글리콜 모노카프릴레이트(propylene glycol monocaprylate; PGMC, Capryol® 90) 또는 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르(diethylene glycol monoethyl ether; DGME, Transcutol® P)는 가트포세(Gattefoss, Gennevilliers Cedex, France)에서, 시판 시약 1급인 프로필렌 글리콜(propylene glycol; PG), 에탄올(ethanol), 염화칼슘(calcium chloride), 인산수소이나트륨(disodium hydrogen phosphate), 수산화나트륨(sodium hydroxide), 염산(hydrochloric acid) 및 인산칼륨(potassium phosphate), 아세트산나트륨(sodium acetate), 아세트산(acetic acid), 구연산 나트륨(sodium citrate), 구연산(citric acid)은 덕산 이화학(Duksan Pure Chemical Co., 경기도 안산, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

<47> 아세토니트릴(Acetonitrile) 및 메탄올(methanol)은 HPLC급을 사용하였다. 물은 정제수를 가지고 초순 수제조장치 (Puris MR-UP9000, MIRRE SCI)를 통과시켜 18 MΩ 이상인 것을 사용하였다. 피부투과촉진제로 사용한 라우르산(lauric acid), 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid), 카프르산(capric acid), 카프릴산(caprylic acid)과 형광유도체물질인 9-플루오레닐 메틸클로로포름레이트(9-fluorenyl methylchloroformate; Fmoc)는 시그마(세인트루이스, MO, 미국)에서 구입한 것을 사용하였다.

<48> 감압접착제로는 Duro-Tak® 87-2196 {공중합체: 아크릴레이트-비닐아세테이트(acrylate-vinylacetate), 관능기: -COOH, 셀프-크로스링킹 아크릴 코폴리머(self-crosslinking acrylic copolymer)의 45% 용액, 3,000 cps, 용해도 파라미터 16}, Duro-Tak® 87-2100 {공중합체: 아크릴레이트(acrylate), 관능기: -COOH, 셀프-크로스링킹 아크릴 코폴리머(self-crosslinking acrylic copolymer)의 51.5% 용액, 8,500 cps, 용해도 파라미터 16} 및 Duro-Tak® 87-2510 {공중합체: 아크릴레이트(acrylate), 관능기: -OH, 논-크로스링킹 아크릴 코폴리머(non-crosslinking acrylic copolymer)의 40.5% 용액, 4,200 cps, 용해도 파라미터}를 내셔널 스타치 앤드 케미컬 컴퍼니(National Starch and Chemical Company; Bridgewater, NJ, 미국)로부터 입수하여 사용하였다. 기타 시약은 시판 시약급을 사용하였다.

<49> 참고예 3. 기기 및 장치

<50> 액체크로마토그래피는 펌프(Hitachi Pump, L-7100, 일본), 검출기 (Hitachi FL detector, L-7480, 일본) 및 기록장치(Hitachi integrator, D-7500, 일본)가 장착된 것을 사용하였다. 그 밖에 원심분리기(PLC-02, Cannic. INC. 미국), 점착제도포기(Sheen Instruments Ltd., London, UK) 등의 실험기기 및 장치를 사용하였다.

<51> 실시예 1. 알렌드로네이트 경피흡수제제의 설계

<52> 알렌드로네이트 나트륨(sodium alendronate) 90mg (알렌드로네이트로서 69.0mg)을 각각의 용제(실험예 1, 표 1 참조)와 상온에서 2 내지 3분 동안 용해시켰고, 감압 점착제 용액(Duro-Tak® 87-2196)과 고르게 섞은 후, 실리콘 처리된 박리지 (Gelroflex ALU- PET 100 μ-2S DR, 3M, 미국)에 폴리에스테르 필름의 한쪽면에 알루미늄 코팅을 하였으며, 다시 양면을 실리콘 처리한 은색 박리지 (무게 $140 \pm 7 \text{ g/m}^2$, 두께 95~106 μm)를 절단하여 유리판 위에 수평으로 고정하였고, 수동식 도포기 (film casting machine; W100 mm, 0.01 mm, Sheen)를 사용하여 10 cm x 15 cm의 넓이로 도포하였다.

<53> 상기 도포물은 90 °C 오븐에서 20분간 방치하여 용제를 휘산 시켰고, 다시 실온에서 24시간 이상 방치하여 건조한 후, 지지체 (저알레르기 유발성의 살색 폴리에스테르 박층 필름, Scotchpak 1109, 3M, 미국)를 밀착시켜 제조하였다(도 1 참조).

<54> 실험예 1. 알렌드로네이트 플라스틱의 제조 및 평가

<55> 매트릭스형 경피약물 송달시스템을 개발하기 위해서는 투과속도를 증가시키고 약물을 용해시킬 수 있는 적절한 용제의 선택이 요구된다. 따라서, 최적 투과촉진 용제 또는 촉진제를 확인하기 위해 아크릴계 PSA 점착제 매트릭스로부터 알렌드로네이트의 방출 및 투과에 미치는 단일 및 공용제의 영향을 검토하였다. (Gwak H.S. et al., Arch. Pharm. Res., 26, pp 644-648, 2003)

<56> 하기 표 1의 제조예 1로 구성된 용제를 선택하여 약물을 용해시켰고, 피부적용 PSA 점착제로 Duro-Tak® 87-2100, Duro-Tak® 87-2196 및 Duro-Tak® 87-2510의 3종을 선택하여 처방조건을 달리하여 약물 함유 점착 매트릭스를 제조하였다.

<57> 우선 점착제가 약물 함유 용제와 혼합되어 건조되었을 때, 양호한 피부 부착성과 박리력이 확보될 필요가 있으므로 유기용매에 녹여 액상으로 공급된 감압 점착제 5 g, 용제 2 mL 및 알렌드로네이트 나트륨을 90 mg을 분산

시킨 용액을 혼합하여 고르게 섞었고, 수동식 도포기를 써서 두께 0.45 mm, 넓이 10 cm × 15 cm로 박리지에 고르게 도포한 후, 90℃ 오븐에서 20분간 점착제 용제를 휘산시켰으며, 다시 실온에서 24시간 이상 건조한 후, 지지체를 밀착시켜 경피흡수제제를 제조하였다 (표 1 참조).

표 1

<58>

제조예	알렌드로네이트 나트륨 용량 (mg)	용액(Vehicles)
제조예 1	90	프로필렌 글리콜(PG)
제조예 2	90	3% 카프릴산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 3	90	6% 카프릴산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 4	90	10% 카프릴산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 5	90	3% 카프르산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 6	90	6% 카프르산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 7	90	10% 카프르산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 8	90	3% 라우르산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 9	90	6% 라우르산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 10	90	10% 라우르산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 11	90	3% 올레산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 12	90	6% 올레산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 13	90	10% 올레산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 14	90	3% 리놀레산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 15	90	6% 리놀레산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 16	90	10% 리놀레산을 포함하는 프로필렌 글리콜
제조예 17	90	에탄올(Ethanol)
제조예 18	90	프로필렌 글리콜 모노카프릴레이트(PGMC)
제조예 19	90	프로필렌 글리콜 모노라우라이트(PGML)
제조예 20	90	이소프로필 미리스테이트(IPM)
제조예 21	90	디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르(DGME)
제조예 22	70	6% 카프릴산을 포함하는 프로필렌 글리콜
- 제조예 22번은 임상 실험(실험예 4)에 사용.		

<59>

사용한 감압점착제 중 Duro-Tak® 87-2100, Duro-Tak® 87-2510은 약물분산액과 잘 섞이지 않고 분리되어 경피흡수제제 설계에는 부적합하였음을 확인하였다. 따라서, 본 발명에서는 Duro-Tak® 87-2196를 사용하였고, 다양한 용제 중의 약물분산액을 혼합하여 알렌드로네이트 경피흡수제제를 제조하였다.

<60>

상기 제제를 실온에서 방치 시킨지 1주일 경과 후, 점착제층에 대해 현미경 관찰을 수행한 결과, 결정이나 침전물의 생성은 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 용제 중 용해성이 낮거나 초기 용량(loading dose)이 높은 경우, 경시 보존 중 흔히 일어날 수 있는 결정 성장에 따른 방출 및 투과 감소의 문제점이 없을 것임을 확인할 수 있었다.

<61>

실험예 2. 알렌드로네이트 경피흡수제제의 시험관 내(In vitro) 실험

<62>

2-1. 검량선 작성

<63>

알렌드로네이트의 표준품을 물에 녹여 1,000 /mL로 만든 후, 이 액을 표준원액으로 하여 4℃에서 냉장 보관시켰고, 표준원액을 물로 적절하게 희석하여 최종 농도가 각각 50, 100, 200, 500, 1,000 및 2,000 ng/mL가 되게 하였다.

<64>

각각의 표준액 1 mL에 물 4 mL를 넣고 여기에 내부표준액 (150 /mL 파미드로네이트 수용액) 300 를 넣어 혼합 후, 0.1 M 염화칼슘(calcium chloride) 100 μl를 넣고 혼합하였으며, 0.1 M 인산칼륨(potassium phosphate) 100 μl를 넣어 섞은 후, 1 M 수산화나트륨(sodium hydroxide) 400 μl를 넣고 혼합하였다.

<65>

상기 혼합액을 5분간 원심분리 후, 침전물을 취하여 0.2 M 아세트산(acetic acid) 500 μl로 녹이고 5 mL 증류수로 희석하여 이 용액에 다시 1 M 수산화 나트륨 400 μl를 넣어 혼합 후, 5분간 원심분리 하였다.

<66> 상층액을 버리고 남은 침전물에 0.2 M 아세트이트 완충액(acetate buffer) (pH 6.0) 1 mL로 녹이고 2 mL 증류수를 넣어 희석한 후, 아세트산 25 μ l를 첨가하였다.

<67> 증류수로 세척한 본드 일루트 DEA(Bond Elute DEA) 고체상 추출 카트리지(solid phase extraction cartridge; Varian, U.S.A.)에 먼저 1 mL 증류수로 세척하였고, 상기 혼합액을 로딩(loading)한 후, 마지막으로 0.2 M 구연산 나트륨(sodium citrate) 1.6 mL로 용출하였다.

<68> 상기 용출액 270 μ l에 탄산나트륨 완충액(sodium carbonate buffer) (pH 11.9) 100 μ l와 Fmoc 용액 (0.25 mg/mL) 100 μ l를 가하여 섞은 후, 실온에서 3분간 반응시켰고 1 M 구연산(citric acid) 100 μ l를 가하여 반응을 종료시켰다.

<69> 최종 반응액 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 검량선을 작성하였고, 결과는 하기 표 2 및 도 2에 나타내었다 (Ptacek, P. et al., *J. Chromatogr. B.*, 767, pp111-116, 2002).

표 2

농도 (ng/mL)	내부표준물질의 피크면적 (IS)	약물의 피크면적 (Drug)	비율 (Drug/IS)
0	14891210	0	0
50	13497684	467020	0.0346
100	15476141	1201972	0.077666
200	16543980	2309540	0.1396
500	14981188	5405739	0.360835
1000	13073076	9707396	0.742549
2000	14569807	20391902	1.3996

2-2. 피부의 적출

<71> 6-8주령 된 무모 생쥐(hairless mouse) 수컷의 등쪽 피부를 1.5 cm $\times$ 1.5 cm로 적출하여 사용하였다.

<73> 먼저 무모 생쥐를 밀폐된 챔버(chamber)내에서 에테르(ether)로 마취사시켜 수술대 위에 고정시킨 다음, 각질층이 손상되지 않도록 조심스럽게 피하지방, 조직 및 혈관 등을 제거하였다. 적출한 피부는 약 1.5 cm $\times$ 1.5 cm의 크기로 자른 후, 즉시 투과시험에 사용하였다.

2-3. 방출실험

<75> 알렌드로네이트 플라스터의 방출양상을 살펴보기 위해, 용제로 상기 실시예 1의 제조예 2, 3, 6, 7 및 11로 제조한 경피흡수제제를 사용하여 약물을 90 mg/mL 농도가 되도록 분산시킨 분산액 2 mL와 Duro-Tak® 87-2196 5 g을 섞어 상기 실험예 1의 표 1과 같이 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제의 약물 방출시험을 행하였다.

<76> 제조된 플라스터를 2 cm x 2 cm 넓이로 각각 3개씩 잘라 박리지를 떼어내고 약물 함유 접착층을 프란츠 셀 투과시스템(Franz Cell Permeation System)에 잘 부착하여 마운팅(mounting)하였다. 시험액으로 pH 7.4 인산염 완충액 12 mL를 각각 넣은 후 37℃의 항온을 유지하면서 36시간 동안 magnetic stir-head bar로 교반하였다. 3, 6, 9, 12, 24 및 36시간 간격으로 1 mL씩을 취하여 물 4 mL를 넣고 내부표준액 (150 μ g/mL 파미드로네이트 수용액) 300 μ l와 섞은 후 실험예 2-1의 검량선 작성과 같은 방법으로 검체를 전처리 한 후 이 액 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 피크면적비를 구하여 누적 방출량을 산출하였고, 그 결과를 하기 도 3에 나타내었다.(Gwak H.S. and Chun I.K., *Arch. Pharm. Res.*, 24, pp 578-583, 2001). (도 3 참조)

2-4. 피부투과시험 방법

<78> 상기 실험예 2-2에서 적출한 무모 생쥐의 적출 피부의 등쪽에 용제로서 에탄올(ethanol), 프로필렌 글리콜(PG), 프로필렌 글리콜 모노카프릴레이트(PGMC), 프로필렌 글리콜 모노라우라이트(PGML), 이소프로필 미리스테이트(IPM) 및 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르(DGME) 각각에 알렌드로네이트 나트륨 농도를 90 mg/mL가 되도록 분산시킨 분산액 2 mL와 Duro-Tak® 87-2196 5 g을 섞어 상기 실시예 1과 같이 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제를 밀착시켜 첨부하였고, 37 ℃로 유지된 프란츠 셀 투과시스템(Franz Cell Permeation System)에 마

운팅(mounting)한 다음, 수용체 세포(receptor cell)에는 pH 7.4 인산염 완충액 12 mL를 넣었다.

<79>

경시적으로 3, 6, 9, 12, 24 및 36시간마다 수용체 세포로부터 투과액 1 mL씩 취하였고, 즉시 같은 양의 수용체 액으로 보충하였다. 투과액 1 mL을 물 4 mL를 넣고 내부표준액 (150 /mL 파미드로네이트 수용액) 300 μ l와 섞은 후 실험에 2-1의 검량선 작성과 같은 방법으로 검체를 전처리 한 후, 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 피크면적비를 구하여 누적 투과량을 산출하였다(Gwak H.S. et al., *Arch. Pharm. Res.*, 25, pp 392-396, 2002).

<80>

실험결과, 하기 표 3 및 표 4에 나타난 바와 같이, 단독용제 중 프로필렌 글리콜이 가장 높은 투과율을 나타내었고, 여기에 투과 촉진제로 지방산을 첨가하였을 때에는 프로필렌 글리콜 단독에 비해 최고 2.9배의 투과촉진효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

<81>

사용한 지방산들 중 포화지방산인 카프릴산(caprylic acid) 6%, 불포화지방산인 올레산 6% 및 10%를 사용한 경우, 매우 높은 투과 플럭스(flux)를 나타냄을 확인할 수 있었다.

표 3

<82>

용 액	투과도 파라미터(Permeation Parameters)	
	J_s (ng/cm ² /시간)	T_L (시간)
에탄올(Ethanol)	29.19 $\pm$ 10.09	1.0 $\pm$ 0.2
폴리필렌 글리콜(PG)	67.25 $\pm$ 5.77	0.5 $\pm$ 0.4
프로필렌 글리콜 모노카프릴레이트(PGMC)	15.10 $\pm$ 7.42	NA
프로필렌 글리콜 모노라우라이트(PGML)	32.90 $\pm$ 8.51	NA
이소프로필 미리스테이트(IPM)	31.09 $\pm$ 8.20	1.3 $\pm$ 0.4
디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르(DGME)	15.82 $\pm$ 8.31	1.1 $\pm$ 0.4
- 수치는 평균 $\pm$ 표준편차 (n = 3)로 나타냄. - J_s : 정상 상태 플럭스(steady state flux), T_L : 래그 타임(lag time) - NA: 이용불가(not available)		

표 4

<83>

용 액	투과도 파라미터(Permeation Parameters)	
	J_s (ng/cm ² /시간)	T_L (시간)
- (No enhancer)	67.25 $\pm$ 5.77	0.5 $\pm$ 0.4
카프릴산 (3%)	86.46 $\pm$ 1.34	3.2 $\pm$ 0.03
카프릴산 (6%)	195.68 $\pm$ 26.60	0.6 $\pm$ 0.3
카프릴산(10%)	55.05 $\pm$ 6.80	0.2 $\pm$ 0.1
카프르산(3%)	74.44 $\pm$ 11.47	1.3 $\pm$ 0.5
카프르산 (6%)	30.07 $\pm$ 23.25	1.2 $\pm$ 0.9
카프르산 (10%)	22.18 $\pm$ 8.42	0.9 $\pm$ 0.5
라우르산 (3%)	62.51 $\pm$ 3.47	NA
라우르산 (6%)	32.75 $\pm$ 2.54	NA
라우르산 (10%)	51.61 $\pm$ 4.04	NA
올레산 (3%)	46.28 $\pm$ 1.89	0.04 $\pm$ 0.04
올레산 (6%)	128.22 $\pm$ 10.28	0.4 $\pm$ 0.3
올레산 (10%)	142.63 $\pm$ 2.75	0.5 $\pm$ 0.3
리놀레산 (3%)	41.06 $\pm$ 4.17	0.1 $\pm$ 0.1
리놀레산 (6%)	74.29 $\pm$ 4.17	0.3 $\pm$ 0.1
리놀레산 (10%)	79.78 $\pm$ 8.14	0.1 $\pm$ 0.1

- 수치는 평균 $\pm$ 표준편차 (n = 3)로 나타냄.
- J_s : 정상 상태 플럭스(steady state flux), T_L : 래그 타임(lag time)
- NA: 이용불가(not available)

<84> 2-5. HPLC법에 의한 알렌드로네이트의 정량

<85> 검체의 분석조건은 칼럼으로 세큐어리티가드 가드 카트리지 KJ0-4282(SecurityGuard Guard Catridges KJ0-4282; C18, Phenomenex, 미국)가 장착된 루나(Luna) 5u C18 100A 칼럼 (5 μ m, 150 $\times$ 4.60mm, Phenomenex, 미국)을 사용하였고, 이동상으로는 아세토니트릴(acetonitrile)과 메탄올(methanol)을 1:1로 섞은 액 A와 25mM 구연산완충액과 25mM 인산염완충액을 1:1로 섞은 액 B를 28:72로 13분간 흘린 후 13분째에 A액, B액 및 메탄올(methanol)을 20:28:52로 섞어 다시 13분간 흘려 사용하였다.

<86> 상기 이동상을 유속 1.5 mL/분(min)으로 유출시켜 여기파장 260 nm, 형광파장 310 nm에서 검출하여 얻은 크로마토그램으로부터 피크면적비를 구하여 정량하였고, 그 결과 중 하나의 예를 하기 표 5에 나타내었다(Kenneth W. Renton, et al., *Original Research.*, 18, pp98-101, 2004).

표 5

시간 (h)	내부표준물질의 피크면적 (IS)	약물의 피크면적 (Drug)	비율(Drug/IS)
3	16959764	224712	0.01325

<88> HPLC 분석법에 의해 얻어진 내부표준물질의 피크면적비(IS)와 약물간의 피크면적비(Drug)를 이용하여 도 2의 검량선으로부터 하기 수식식 1을 이용하여 미지의 약물농도를 산출하였다.

수식식 1

$$\text{약물의 농도} = (y - 0.006) / 0.0007$$

(도 2의 검량선 식 참조; $y = 0.0007x + 0.006$ 에서 y : 약물의 피크면적 (Drug)/내부표준물질의 피크면적 (IS), x : 약물의 농도)

<89> 산출결과, 표 5의 상기 제조예 3의 3시간째 샘플 농도(Concentration)는 약 10.357 ng/mL임을 확인할 수 있었다.

<91> 실험예 3. 제조된 알렌드로네이트 경피흡수제제의 동물(In vivo) 실험

<92> 3-1. 검량선 작성

<93> 알렌드로네이트 나트륨 표준품을 물에 녹여 1,000 /mL로 만든 후, 이 액을 표준원액으로 하여 냉장 보관시켰고, 표준원액을 적절하게 희석한 후, 뇨와 적절히 섞어 뇨 5 mL 중 최종 농도가 각각 50, 100, 200, 500, 1,000 및 2,000 ng/mL가 되게 하였다.

<94> 여기에 내부표준액 (150 /mL 파미드로네이트 수용액) 300 μ L를 넣고 혼합 후, 0.1 M 염화칼슘(calcium chloride) 100 μ L를 넣고 혼합하였으며, 0.1 M 인산칼륨(potassium phosphate) 100 μ L를 넣어 섞은 후, 1 M 수산화나트륨(sodium hydroxide) 400 μ L를 넣고 혼합하였다.

<95> 상기 혼합액을 5분간 원심분리 후, 침전물을 취하여 0.2 M 아세트산(acetic acid) 500 μ L로 녹이고 5 mL 증류수로 희석하여 이 용액에 다시 1 M 수산화 나트륨 400 μ L를 넣어 혼합 후, 5분간 원심분리 하였다.

<96> 상층액을 버리고 남은 침전물에 0.2 M 아세테이트 완충액(acetate buffer) (pH 6.0) 1 mL로 녹이고 2 mL 증류수를 넣어 희석한 후, 아세트산 25 μ L를 첨가하였다.

<97> 증류수로 세척한 본드 일루트 DEA(Bond Elute DEA) 고체상 추출 카트리지(solid phase extraction cartridge; Varian, U.S.A.)에 먼저 1 mL 증류수로 세척하였고, 상기 혼합액을 로딩(loading)한 후, 마지막으

로 0.2 M 구연산 나트륨(sodium citrate) 1.6 mL로 용출하였다.

<98> 상기 용출액 270 μ l에 탄산나트륨 완충액(sodium carbonate buffer) (pH 11.9) 100 μ l와 FMOC 용액 (0.25 mg/mL) 100 μ l를 가하여 섞은 후, 실온에서 3분간 반응시켰고 1 M 구연산(citric acid) 100 μ l를 가하여 반응을 종료시켰다.

<99> 최종 반응액 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 검량선을 작성하였고, 결과는 하기 표 6 및 도 4에 나타내었다 (Ptacek, P. et al., *J. Chromatogr. B.*, 767, pp111-116, 2002).

표 6

<100>

농도 (ng/mL)	내부표준물질의 피크면적(IS)	약물(Drug)	비율 (Drug/IS)
0	16629323	0	0
50	18366232	416272	0.02266507
100	17761632	841220	0.04736164
200	17242633	2543918	0.14753652
500	13632934	4509471	0.33077773
1000	13153055	8794506	0.66862839
2000	9584386	13260968	1.3836012

<101> 본 발명의 투과시험에 적용한 HPLC법에 있어 알렌드로네이트 나트륨의 농도를 50-2,000 ng/mL로 변화시켜 크로마토그램을 얻어 피크면적비를 구하여 검량선을 작성한 결과, 하기 도 4에 나타난 바와 같이, 양호한 직선상 ($y = 0.0007x - 0.0095$, $R^2 = 0.9999$)이 얻어졌음을 확인할 수 있었다.

<102> 3-2. 알렌드로네이트 분석법의 정확도, 정밀도 및 정량한계

<103> 상기 실험에 3-1과 같이, 알렌드로네이트 나트륨 표준품(alendronate quality control sample)의 농도 중 농도가 50, 100, 200, 500, 1,000 및 2,000 ng/mL이 되게 처리한 후, 하루에 시험을 5회 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

<104> 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 정량한계는 S_N 이 10배 이상인 농도로 결정하였다.

<105> 농도 50, 100, 200, 500, 1,000 및 2,000 ng/mL의 6가지 농도의 알렌드로네이트 표준시료를 문헌에 기재된 방법을 참고하여 하기와 같은 방법으로 검체 처리를 수행하였다(Ptacek, P. et al., *J. Chromatogr. B.*, 767, pp111-116, 2002).

<106> 알렌드로네이트와 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차를 알렌드로네이트와 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성 (% CV로 표시)을 구하였고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성 (% CV로 표시)을 구하였다.

<107> 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.

<108> 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S_N ratio)를 10 이상으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80-120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다.

<109> 실험결과, 하기 표 7에 나타난 바와 같이, 본 분석방법의 정밀성 CV (%)은 일내 정밀성이 평균 12.4%, 검량선의 최저농도(50 ng/mL)에서의 일내 정밀성은 7.0%이었으며, 일간 정밀성은 평균 14.6%, 검량선의 최저농도에서의 일간 정밀성은 13.4%이었다. 정확성은 평균 98.9%, 검량선의 최저농도에서의 정확성은 96.8이었으며, 알렌드로네이트의 정량한계농도는 적어도 50 ng/mL임을 확인할 수 있었다.

표 7

<110>

농도(ng/mL)	정밀성 (C.V. %)		정확성(%)
	일내(n=5)	일간(n=5)	
50	7.0	13.4	96.8

100	11.2	14.6	91.5
200	12.4	10.3	98.4
500	10.2	7.5	102.7
1000	5.4	4.0	102.4
2000	6.1	5.4	101.8
- C.V. (%) = 표준편차(S.D.)/평균(mean) * 100			

3-3. 알렌드로네이트 경피흡수제제와 경구제제 투여 후의 뇨중 약물량 측정

3-3-1. 경구투여

일정한 조건하에서 사육한 무게 280-320 g의 흰쥐 수컷을 12시간 절식시켰고, 실험 전까지 물은 자유로이 공급하였다.

건강한 쥐 6마리를 한 개의 군으로 하여 0.1 % 알렌드로네이트 나트륨 수용액을 만든 후, 30 mg/kg의 양으로 소식자(sonde)를 이용하여 경구투여 하였다.

경구투여 후, 12, 24, 36 및 48 시간 동안 채뇨하였다. 채뇨액 5 mL에 내부표준액 (150 /mL 파미드로네이트 수용액)에 300 μ l를 섞은 후, 실험에 3-1의 검량선 작성과 같은 방법으로 검체를 전처리하여 이 액 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 피크면적비를 구하여 정량하였고, 그 결과 중 하나의 예를 하기 표 8에 나타내었다(Ptacek, P. et al., *J. Chromatogr. B.*, 767, pp111-116, 2002).

표 8

시간 (시)	내부표준물질의 피크면적 (IS)	약물(Drug)	비율(Drug/IS)
36	4076301	7347	0.001802

HPLC 분석법에 의해 얻어진 내부표준물질의 피크면적(IS)과 약물간의 피크면적비를 이용하여 도 4의 검량선으로부터 하기 수식식 2를 이용하여 미지의 약물농도를 산출하였다.

수식식 2

$$\text{약물의 농도} = (y + 0.0095) / 0.0007$$

(도 3의 검량선 식 참조; $y = 0.0007 x - 0.0095$ 에서 y : Drug/IS, x : 약물의 농도)

산출결과, 표 8의 경구투여 후 36시간째 뇨중 농도(Concentration)는 약 16.15 ng/mL임을 확인할 수 있었다.

또한, 경구투여 후, 흰쥐에서 알렌드로네이트의 시간에 따른 뇨중 배설량은 도 5에 나타내었다. 실험결과, 48시간까지의 뇨중 축적배설 약물량은 604.9 ng이었고, 12시간 이내에 상당부분 검출되었음을 확인할 수 있었다(표 10 참조).

3-3-2. 경피제제 투여

무게 280-320 g의 수컷 흰쥐의 옆구리를 동물용 면도기로 조심스럽게 털을 제거한 후, 제조한 경피흡수제제를 3 cm x 4 cm의 크기로 부착한 후, 12, 24, 48 및 72시간 동안 채뇨하였다.

채뇨액 5 mL에 내부표준액 (150 /mL 파미드로네이트 수용액)에 300 μ l를 섞은 후, 실험에 3-1의 검량선 작성과 같은 방법으로 검체를 전처리하여 이 액 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 피크면적비를 구하여 정량하여 그 결과 중 하나의 예를 하기 표 9에 나타내었다 (Ptacek, P. et al., *J. Chromatogr. B.*, 767, pp111-116, 2002).

표 9

<124>

시간 (시)	내부표준물질의 피크면적(IS)	약물(Drug)	비율(Drug/IS)
24	13701876	120701	0.010269

<125>

HPLC 분석법에 의해 얻어진 IS와 약물간의 피크면적비를 이용하여 도 4의 검량선으로부터 하기 수식식 3을 이용하여 미지의 약물농도를 산출하였다.

수식식 3

$$\text{약물의 농도} = (y + 0.0095) / 0.0007$$

(도 3의 검량선 식 참조; $y = 0.0007 x - 0.0095$ 에서 y : Drug/IS, x : 약물의 농도)

<126>

<127>

산출결과, 표 9와 같이 제조예 3의 24시간째 뇨중 농도(Concentration)는 약 28.24 ng/mL 임을 확인할 수 있었다.

<128>

또한, 제조한 경피흡수제제 (실험예 1의 제조예 1-1 내지 1-7 및 1-11 내지 1-16)를 흰쥐에 적용한 후, 72시간 동안의 뇨중 총 배설약물량을 하기 표 10에 나타내었다.

<129>

실험결과, 하기 표 10에 나타난 바와 같이, 뇨 중에서 검출된 총 약물량은 지방산으로 6% 카프릴산(caprylic acid)을 사용하였을 때, 1042.9 ng으로 가장 높았고, 그 다음으로 카프르산(capric acid) 6% 순이었다. 그 밖에 프로필렌 글리콜(PG) 단독과 프로필렌 글리콜에 3% 및 10% 카프릴산, 3% 및 6% 카프르산, 3% 및 10% 올레산(oleic acid) 및 6% 리놀레산(linoleic acid)을 첨가한 경우, 72시간 동안의 총 배설량이 200 ng 이상을 나타냄을 확인할 수 있었다.

<130>

대체로 가장 높은 약물량을 나타낸 6% 카프릴산의 경우, 12시간이후부터 약물이 검출되기 시작하였고 시간이 지남에 따라 검출량이 증가하는 추세를 나타낸 반면, 6% 카프르산의 경우, 초반에 높은 배설량을 나타내다가 48시간까지 감소추세를 보였으며 72시간에는 다시 증가하는 양상을 나타내었다. 경구투여의 경우에는 초기 12시간 까지 높은 흡수를 보이다가 48시간째에는 1.8 ng만이 흡수되었고 PG단독의 경우에는 초기 48시간 동안 고른 흡수양상을 나타내었다 (도 5 참조).

표 10

<131>

용액(Vehicles)	축적량(ng)
경구(Oral)	604.9 ± 93.3
실시에 1-제조예 1의 폴리필렌 글리콜(PG)을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	235.3 ± 37.8
실시에 1-제조예 2의 3% 카프릴산을 포함하는 폴리필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	282.4 ± 52.6
실시에 1-제조예 3의 6% 카프릴산을 포함하는 폴리필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	1042.9 ± 226.7
실시에 1-제조예 4의 10% 카프릴산을 포함하는 폴리필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	209.6 ± 32.2
실시에 1-제조예 5의 3% 카프르산을 포함하는 폴리필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	232.9 ± 34.2
실시에 1-제조예 6의 6% 카프르산을 포함하는 폴리필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	516.4 ± 177.9
실시에 1-제조예 7의 10% 카프르산을 포함하는 폴리필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	114.6 ± 68.5
실시에 1-제조예 11의 3% 올레산을 포함하는 프로필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	202.4 ± 92.0

실시에 1- 제조예 12의 6% 올레산을 포함하는 프로필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	73.4 ± 10.2
실시에 1-제조예 13의 10% 올레산을 포함하는 프로필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	219.7 ± 30.6
실시에 1-제조예 14의 3% 리놀레산을 포함하는 프로필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	82.0 ± 25.4
실시에 1-제조예 15의 6% 리놀레산을 포함하는 프로필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	219.4 ± 31.2
실시에 1-제조예 16의 10% 리놀레산을 포함하는 프로필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제	58.5 ± 10.1
-뇨는 경구(48시간)를 제외하고 72시간에서 채뇨되었음. -수치는 평균 ± 표준오차 (n = 6)로 나타냄.	

<132> 3-4. HPLC법에 의한 알렌드로네이트의 정량

<133> 검체의 분석조건은 칼럼으로 세큐어리티가드 가드 카트리지 KJO-4282(SecurityGuard Guard Catridges KJO-4282; C18, Phenomenex, USA)가 장착된 CAPCELL PAK C18 UG 120 칼럼 (5, 150 × 4.60 mm, Shiseido)을 사용하였고, 이동상으로는 아세토니트릴(acetonitrile)과 메탄올(methanol)을 1:1로 섞은 액 A와 25mM 구연산완충액과 25mM 인산염완충액을 1:1로 섞은 액 B를 28:72로 13분간 흘린 후 13분째에 A액, B액 및 메탄올(methanol)을 20:28:52로 섞어 다시 13분간 흘려 사용하였다.

<134> 이동상을 유속 1.5 mL/분(min)으로 유출시켜 여기파장 260 nm, 형광파장 310 nm에서 검출하였다.

<135> 실험예 4. 임상실험

<136> 3명의 건강한 지원자(여 24세, 여 28, 여 45)에게 상기 실시예 1의 제조예 22에서 알렌드로네이트 나트륨 70 mg을 함유한 제조 경피흡수제제(알렌드로네이트로서 53.8 mg)와 경구제제 70 mg(알렌드로네이트로서 70 mg)을 투여한 후, 시간에 따른 뇨중 약물량을 측정하였다.

<137> 경피흡수제제와 경구제제 투여간에는 1주일간의 휴약기를 두었고 약물을 적용하기 전 공시험(blank) 뇨를 수거하여 약물의 잔존여부를 측정하였다. 뇨분석법은 상기 실험예 3의 동물(*in vivo*) 실험에서 사용된 방법을 준용하였다.

<138> 동물실험에서 가장 높은 뇨중 약물량을 나타낸 6% 카프릴산(caprylic acid)을 사용한 경피흡수제제를 사람에게 적용하여 시간에 따른 뇨중 약물량을 측정하였다.

<139> 실험결과, 하기 도 6에 나타난 바와 같이, 72시간까지의 총 배설 약물량은 경구가 237.20 g이고 경피흡수제제의 경우에는 112.03 으로 나타남을 확인할 수 있었다. 경구의 경우에는 24시간 이후에는 검출되지 않아 체내로 흡수된 총량으로 간주될 수 있으나 경피흡수제제의 경우에는 적용시간을 72시간으로 국한시킨 후, 분석하였을 때 72시간까지의 총량은 경구에 비해 낮으나 시간에 따라 배설량이 증가함을 고려할 때 더 장시간 동안 적용하는 경우에는 더 많은 양이 뇨중에서 검출될 수 있을 것으로 사료되었다. 또한 경구제제 중 알렌드로네이트의 양은 70 mg인데 반해 경피흡수제제 중의 알렌드로네이트 양은 53.8 mg으로 산출되어 상대적 생체이용률은 더 증가할 것으로 예측되었다.

<140> 이상의 실험결과로부터 알렌드로네이트의 경피흡수제제의 설계의 가능성을 발견할 수 있었고, 이는 특히 프로필렌 글리콜(propylene glycol)과 같은 알콜(alcohol)류에 다양한 농도의 지방산을 혼합하였을 때, 최적의 경피흡수제제 설계가 가능할 것임을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<141> 도 1은 알렌드로네이트 경피흡수제제의 단면도이고,

<142> 도 2는 알렌드로네이트의 수용액 중 검량선을 나타낸 도이며,

<143> 도 3은 알렌드로네이트 경피흡수제제 방출시험결과를 나타낸 도이고,

<144> 도 4는 알렌드로네이트의 뇨 중 검량선을 나타낸 도이며,

<145> 도 5는 흰쥐에서 경구제제와 프로필렌글리콜 단독, 6% 카프릴산을 포함하는 프로필렌 글리콜 및 6% 카프르

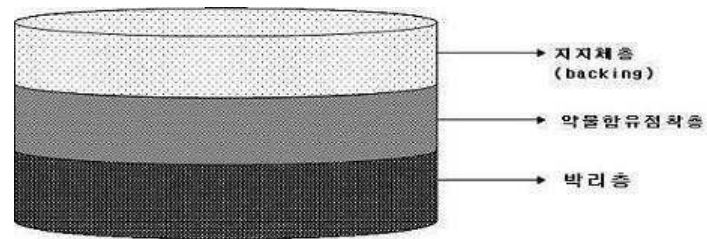
산을 포함하는 프로필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제를 투여 시 알렌드로네이트의 시간에 따른 뇨중 배설량을 나타낸 도이고,

<146>

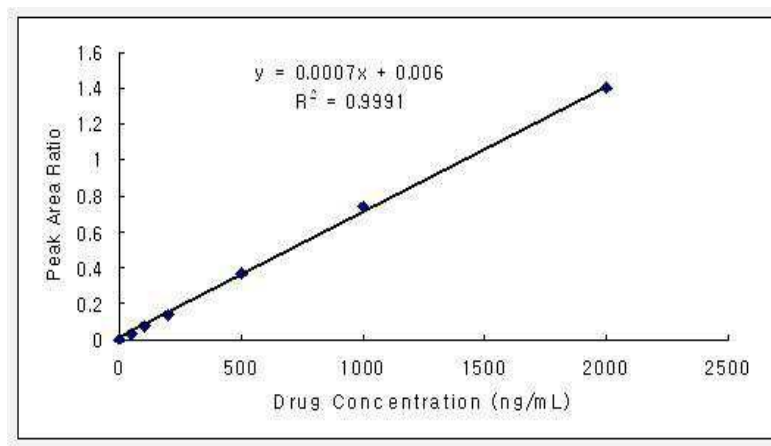
도 6은 건강한 지원자에서 알렌드로네이트를 경구 투여 및 6% 카프릴산을 포함하는 프로필렌 글리콜을 사용하여 제조한 알렌드로네이트 경피흡수제제를 투약한 후의 알렌드로네이트의 시간에 따른 뇨중 배설량을 나타낸 도이다.

도면

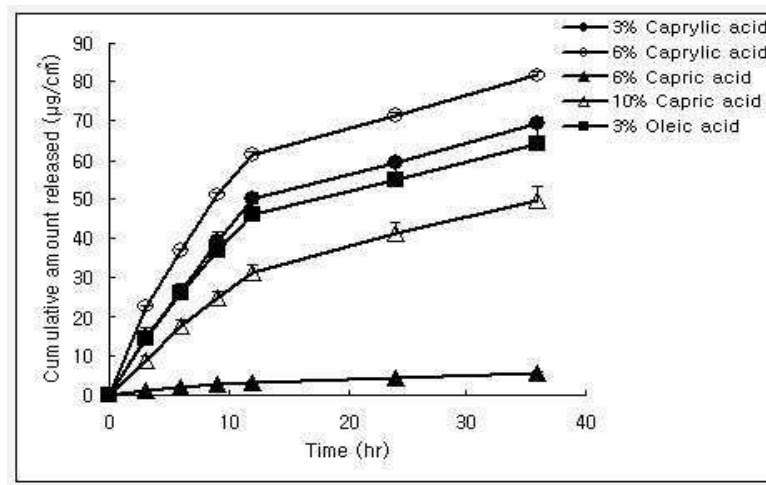
도면1



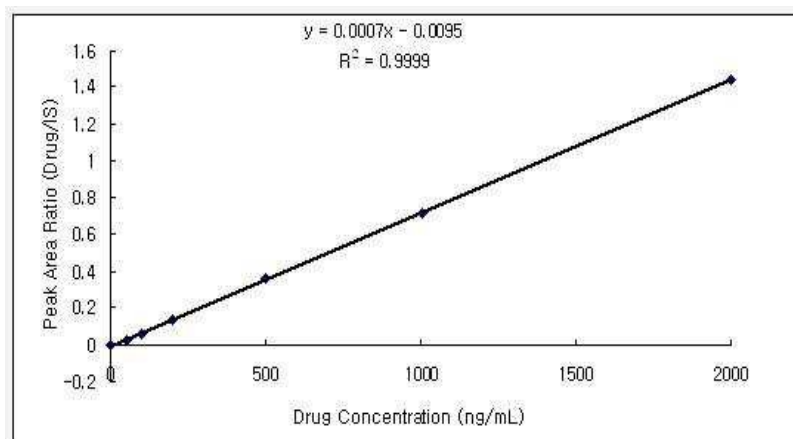
도면2



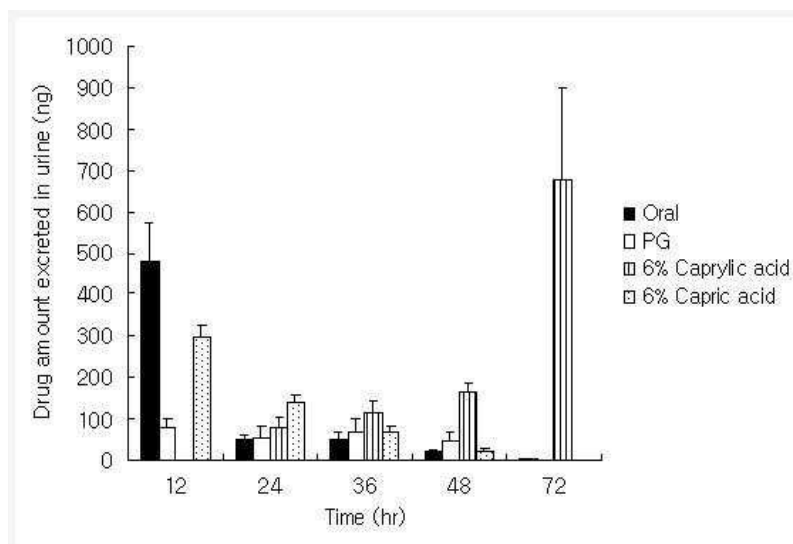
도면3



도면4



도면5



도면6

