(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월30일
(11) 등록번호 10-1741414
(24) 등록일자 2017년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/10 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01) *A61K 47/20* (2017.01)
A61K 47/32 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/10 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0041933
(22) 출원일자 2016년04월05일
심사청구일자 2016년04월05일
(56) 선행기술조사문헌
KR101021835 B1*
KR1020130028824 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박정숙
대전광역시 유성구 노은서로210번길 32, 405동 405호(지족동, 열매마을4단지)
김영호
대전광역시 유성구 봉명로 48, 801동 302호(원신흥동, 신안인스빌리베라)
김진기
서울특별시 동작구 사당로2가길 102, 107동 801호(사당동, 사당자이아파트)
(74) 대리인
특허법인 공간

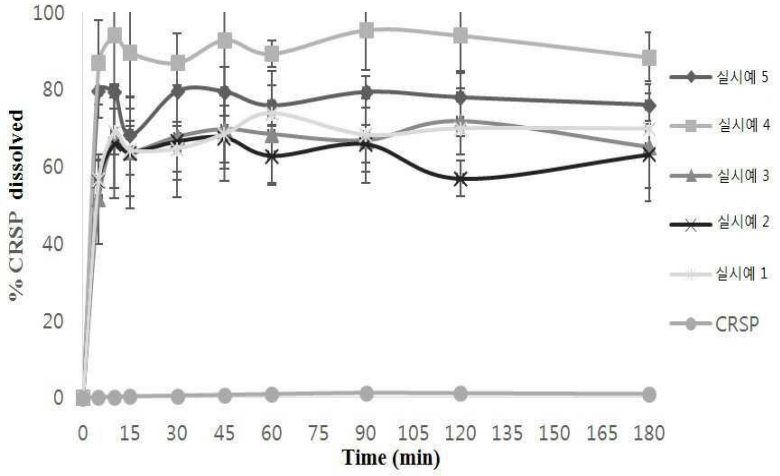
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 김훈석

(54) 발명의 명칭 **크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체, 이를 포함하는 약제학적 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 크리소스플레놀 C(chrysosplenol C), 수용성 고분자, 및 계면활성제를 포함하는 고체 분산체, 및 이를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 난용성인 크리소스플레놀 C가 무정형 상태로 존재함으로써 크리소스플레놀 C의 용해도 및 용출률이 증가되어, 생체이용률이 현저히 향상되는 효과가 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/20 (2013.01)
A61K 47/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0093815
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학 중점연구소 지원사업
연구과제명 심혈관계질환 치료제 개발 기반연구
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교
연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A2A1A10051596
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업-도약(전략)연구
연구과제명 다양한 박막 제조기술을 이용한 경구용 바이오의약품 박막 제조 연구
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

크리소스플레놀 C;

수용성 고분자로서 폴리비닐피롤리돈 및 폴리에틸렌글리콜; 및

계면활성제로서 나트륨 라우릴 설페이트;를 포함하며,

상기 크리소스플레놀 C: 폴리에틸렌글리콜: 폴리비닐피롤리돈: 나트륨 라우릴 설페이트의 중량비가 2: 0.1~1: 0.5~5: 0.1~3인 것을 특징으로 하는 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고체 분산체 중의 크리소스플레놀 C가 무정형으로 존재하는 것을 특징으로 하는 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 폴리에틸렌글리콜은 5000 내지 7000의 중량 평균 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체.

청구항 9

제1항, 제2항, 및 제8항 중 어느 한 항에 따른 고체 분산체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항, 제2항, 및 제8항 중 어느 한 항에 따른 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체의 제조방법으로서,

a) 크리소스플레놀 C, 수용성 고분자, 및 계면활성제를 혼합한 후 용융시켜 용융된 혼합물을 수득하는 단계;

b) 상기 용융된 혼합물을 급속 냉각해서 고화시킨 후 분쇄하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체의 제조방법.

발명의 설명

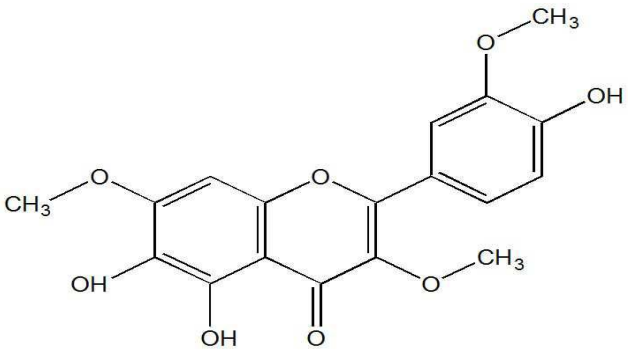
기 술 분 야

[0001] 본 발명은 크리소스플레놀 C를 함유하는 고체 분산체, 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 고체분산체를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 크리소스플레놀 C(Chrysosplenol C; 4',5,6-trihydroxy-3,3',7- trimethoxyflavone; IUPAC 명칭: 5,6-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- 3,7-dimethoxychromen-4-one; CRSP)는, 밀리우사 발란새(*Miliusa balansea*, Annonaceae), 프테로카우론 스파세라텀(*Pterocaulon sphacelatum*, Asteraceae)을 포함하는 몇몇 생약에 함유된 플라본이며, 하기의 화학구조를 갖는다.

화학식 1

[0003] 

[0004] 밀리우사 발란새는 전통의약에서 위질환 및 사구체신증을 치료하는 데에 사용되었다. 크리소스플레놀 C는 4'-히드록시-메톡시플라본(4'-hydroxy- methoxyflavone)으로, 폴리오바이러스 및 리노바이로스의 특이적 억제제로 알려진 화합물 그룹의 하나이다. 이 화합물은 또한, 항바이러스 효과를 갖는 것으로 알려져 있고, KB(EC_{50} = 4.3㎍/㎖) 및 HepG2(EC_{50} = 0.57㎍/㎖)와 같은 암세포주에 대해 세포독성 활성을 나타내는 것으로 알려져 있는 등 다양한 약리활성이 알려져 있어 다양한 질환 치료 의약품으로서의 개발이 기대되고 있다.

[0005] 경구 약물전달은 약물을 투여하는 가장 편안하고 간편한 방법인데, 경구 약물전달시 약물의 생체 이용률이 용해도 또는 용출률(dissolution rate)에 따라 결정된다(J. of Supercritical Fluids 107 (2016) 145-152). 낮은 용해도는, 종종 낮은 흡수도를 초래하여, 결국 경구 생체이용률을 감소시킨다(AAPS PharmSciTech, 10 (2009) 1172-1177).

[0006] 크리소스플레놀 C의 경우, 물에 대한 용해도가 매우 낮아 생체 내에서 높은 흡수를 기대하기 어려운 문제가 있어, 상기 약물의 용해도 및 생체이용률을 개선할 수 있는 방안이 요구되는 것으로 확인되었다.

[0007] 이에, 본 발명자들이 예의연구한 결과, 크리소스플레놀 C를 고체분산체로 제조함으로써, 크리소스플레놀 C의 용해도 및 용출 파라미터가 모두 향상되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 종래기술로서, 한국등록특허 제10-1021835는 크리소스플레놀 C를 함유하는 심장 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 문헌으로서, 담체, 부형제, 희석제, 현탁제 등의 첨가제를 사용하는 경구형 제형을 개시하고 있으나 크리소스플레놀 C의 용해도 및 용출률 개선과 관련한 기술 구성에 대해서는 전혀 개시되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1021835호 (크리소스플레놀 시를 함유하는 심장 질환의 예방 및 치료용 조

성물, 2011.03.07. 등록)

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) P. Marizza, L. Pontoni, T. Rindzevicius, J.F. Alopaeus, K. Su, J.A. Zeitler, S.S. Keller, I. Kikic, M. Moneghini, N. De Zordi, D. Solinas, A. Cortesi, A. Boisen, Supercritical impregnation of polymer matrices spatially confined in microcontainers for oral drug delivery: Effect of temperature, pressure and time, J. of Supercritical Fluids 107 (2016) 145-152.

(비특허문헌 0002) H. Al-Obaidi, G. Buckton, Evaluation of griseofulvin binary and ternary solid dispersion with HPMCAS, AAPS PharmSciTech, 10 (2009) 1172-1177.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 크리소스플레놀 C를 함유하는 고체 분산체, 및 이를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 크리소스플레놀 C를 함유하는 고체 분산체의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 크리소스플레놀 C(chrysosplenol C), 수용성 고분자, 및 계면활성제를 포함하는, 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 고체 분산체에 있어서, 크리소스플레놀 C는 무정형으로 존재하는 것이 바람직하다.

[0015] 상기 고체 분산체에 있어서, 수용성 고분자는 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌글리콜, 및 폴리비닐알콜로 이루어진 그룹에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0016] 상기 고체 분산체에 있어서, 수용성 고분자는 폴리비닐피롤리돈 및 폴리에틸렌글리콜인 것이 바람직하다.

[0017] 상기 고체 분산체에 있어서, 계면활성제는 나트륨 라우릴 설페이트인 것이 바람직하다.

[0018] 본 발명의 고체 분산체는, 활성 성분으로서 크리소스플레놀 C, 수용성 고분자로서 폴리비닐피롤리돈 및 폴리에틸렌글리콜, 및 계면활성제로서 나트륨 라우릴 설페이트를 포함하는 것이 바람직하다.

[0019] 또한, 상기 고체 분산체에 있어서, 크리소스플레놀 C: 폴리에틸렌글리콜: 폴리비닐피롤리돈: 나트륨 라우릴 설페이트의 중량비가 2: 0.1~1: 0.5~5: 0.1~3일 수 있다.

[0020] 상기 폴리에틸렌글리콜은 5000 내지 7000의 중량 평균 분자량을 갖는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체의 제조방법으로서, a) 크리소스플레놀 C, 수용성 고분자, 및 계면활성제를 혼합한 후 용융시켜 용융된 혼합물을 수득하는 단계; b) 상기 용융된 혼합물을 급속 냉각해서 고화시킨 후 분쇄하는 단계;를 포함하는 고체 분산체의 제조방법에 관한 것이다.

[0023] 이하, 본 발명을 더 상세하게 설명한다.

[0024] 본 발명의 고체 분산체는, 활성 성분으로서 크리소스플레놀 C, 수용성 고분자, 및 계면활성제를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명의 고체 분산체는, 활성성분인 크리소스플레놀 C가 결정질 형태에서, 무정형 상태로 변화되어 존재함으로써, 크리소스플레놀 C의 용해도 및 용출률이 증가되어 생체이용률이 향상되는 효과가 발휘된다.

[0026] 본 발명의 고체 분산체에 있어서, 수용성 고분자로는 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌글리콜, 및 폴리비닐알콜로

이루어진 그룹에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0027] 상기 수용성 고분자로서, 폴리비닐피롤리돈 및 폴리에틸렌글리콜을 조합하여 사용하는 것이, 이들 수용성 고분자가 갖는 부정적 물성을 상쇄시킴으로써 크리소스플레놀 C의 용해도 및 용출률을 보다 더 향상시키는 효과가 있어 바람직하다.

[0028] 상기 폴리에틸렌글리콜은 5000 내지 7000의 중량 평균 분자량을 갖는 것(예컨대, PEG 6000)인 것이 바람직하다.

[0029] 상기 계면활성제는 크리소스플레놀 C의 습윤성을 증가시키는 물질로서, 나트륨 라우릴 설페이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(예컨대, tween 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(예컨대, tween 60), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(예컨대, tween 80), 폴리옥시에틸렌 글리콜-15-히드록시스테아레이트(예컨대, Solutol HS 15™), 및 폴리옥시에틸렌 글리콜화 천연 또는 수소화 파마자유(예컨대, Cremophore RH 40™)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이 사용될 수 있다. 계면활성제로서 나트륨 라우릴 설페이트를 사용하는 것이 바람직하다.

[0030] 본 발명의 고체 분산체는, 크리소스플레놀 C: 폴리에틸렌글리콜: 폴리비닐피롤리돈: 나트륨 라우릴 설페이트의 중량비가 2: 0.1~1: 0.5~5: 0.1~3인 것이 바람직하며, 2: 0.1~0.5: 0.5~3: 0.1~2인 것이 보다 바람직하며, 2: 0.1~0.3: 0.8~2: 0.1~1인 것이 가장 바람직하다. 이와 같이 크리소스플레놀 C: 폴리에틸렌글리콜: 폴리비닐피롤리돈: 나트륨 라우릴 설페이트가 특정 중량비로 혼합되는 경우에, 크리소스플레놀 C의 용해도 및 용출률을 동시에 증가시켜, 생체이용률을 현저하게 상승시키는 효과가 있다.

[0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0032] 본 발명의 조성물에 포함되는 상기 약제학적으로 허용가능한 담체로는 공지되어 사용되는 부형제, 붕해제, 활택제 등을 포함한다. 상기 부형제의 예는 유당, 만니톨, 소르비톨, 미결정셀룰로오스, 전분, 호화전분, 인산칼슘, 실리콘 디옥사이드, 셀룰로오스, 탄산수소나트륨 및 이들의 혼합물 등을 포함하며, 상기 붕해제의 예는 크로스카멜로오스 소디움, 크로스포비돈, 전분글리콘산나트륨, 저치환도히드록시프로필 셀룰로오스 등을 포함하고, 상기 활택제의 예는 소디움 스테아릴 푸마레이트, 스테아르산 마그네슘, 칼슘 스테아레이트, 탈크 등을 포함한다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 최종적으로 얻어지는 제형에 따라 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다.

[0033] 상기 약제학적 조성물의 제형은 다양한 형태일 수 있으나, 과립제, 정제, 캡슐제, 건조시럽제, 또는 산제 등의 고형제제를 포함하며, 더욱 바람직하게는 과립제, 정제, 또는 캡슐제이다. 이들 제형은 약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 정제는 상기 고체분산체를 부형제, 붕해제, 활택제 등과 혼합하거나, 고체분산체에 부형제 등을 넣고 과립으로 제조하고, 부형제, 붕해제, 활택제 등과 혼합하여, 타정함으로써 제조할 수 있고, 캡슐제도 상기 혼합물을 캡슐에 충진함으로써 제조할 수 있다. 또한, 안정성, 복용의 편리성, 외관 등을 개선할 목적으로 필름-코팅 또는 장용-코팅을 할 수도 있다.

[0034] 본 발명의 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체의 제조방법은, a) 크리소스플레놀 C, 수용성 고분자, 및 계면활성제를 혼합한 후 용융시켜 용융된 혼합물을 수득하는 단계; b) 상기 용융된 혼합물을 급속 냉각해서 고화시킨 후 분쇄하는 단계;를 포함한다.

[0035] 상기 a) 단계는 230~240℃에서 자석교반 히터상의 자재 증발접시에서 크리소스플레놀 C, 수용성 고분자, 및 계면활성제를 지속적으로 교반하면서 용융시켜, 용융된 혼합물을 수득한다.

[0036] 상기 b) 단계는 용융된 혼합물을 교반하에 아이스-배스(약 0℃) 등에서 급속 냉각해서 고화시킨다. 고화에 의해 생성된 고체 덩어리를 분쇄하여, 분말로 제조한다.

[0037] 상기 제조방법은, a) 크리소스플레놀 C, 수용성 고분자로서 폴리에틸렌글리콜 및 폴리비닐피롤리돈, 계면활성제로서 나트륨 라우릴 설페이트를 중량비 2: 0.1~1: 0.5~5: 0.1~3로 혼합한 후 용융시켜 용융된 혼합물을 수득하는 것이 바람직하다.

[0038] 위와 같은 용융법에 의해 제조된 본 발명의 고체 분산체는, 유효 표면 증가로 약물의 습윤성이 증가하고, 수용성 고분자의 가용화 효과, 약물 미결정의 응집 부존재, 향상된 약물의 분산성 등으로 인해, 크리소스플레놀 C의 용출률이 증가되어, 약물의 생체이용률이 현저하게 증가되는 효과를 얻을 수 있다.

[0039] 또한, 상기 제조방법은 그 과정에서 유기용매를 사용하지 않음으로써, 유기용매 사용시의 잔류 용매 및 독성 문

제를 회피하고, 인체에 안전한 고체 분산체를 제공할 수 있는 이점이 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 고체 분산체는, 난용성인 크리소스플레놀 C가 무정형 상태로 존재함으로써 크리소스플레놀 C의 용해도 및 용출률이 증가되어, 생체이용률이 현저히 향상되는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 따르면, 고체분산체 내의 크리소스플레놀 C가 장기간 보관하더라도 결정형으로의 재결정화가 최소화됨으로써 안정성이 향상되는 효과가 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 제조방법은 크리소스플레놀 C의 용해도 및 용출률을 현저히 개선시킨 고체 분산체를 제공할 수 있으며, 유기용매 사용으로 인한 독성 문제를 회피할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체(실시예 1 내지 5, 및 비교예 1 내지 5)의 용해도를 나타낸 그래프이다.

도 2는 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체(실시예 1 내지 5)의 용출 프로파일을 나타낸 그래프이다.

도 3은 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체(비교예 1 내지 5)의 용출 프로파일을 나타낸 그래프이다.

도 4는 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체(실시예 4 및 비교예 1)의 용출 프로파일을 비교한 그래프이다.

도 5는 (A) 크리소스플레놀 C(CRSP), (B) 폴리비닐피롤리돈(PVP), (C) 폴리에틸렌글리콜(PEG6000), (D) 나트륨 라우릴 설페이트(SLS), (E) 비교예 6의 물리적 혼합물, 및 (F) 실시예 4의 고체 분산체에 대한 표면 형상을 FE-SEM으로 측정한 사진이다.

도 6은 (A) CRSP, (B) SLS, (C) PVP, (D) PEG6000, (E) 비교예 6의 물리적 혼합물, (F) 실시예 4의 고체 분산체에 대한 X-선 회절 패턴을 나타낸다.

도 7은 (A) CRSP, (B) PVP, (C) SLS, (D) PEG6000, (E) 비교예 6의 물리적 혼합물, (F) 실시예 4의 고체 분산체에 대한 열영상을 나타낸다.

도 8은 (A) CRSP, (B) PVP, (C) SLS, (D) PEG6000, (E) 비교예 6의 물리적 혼합물, (F) 실시예 4의 고체 분산체에 대한 FT-IR 스펙트럼을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 하지만 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않으며, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지며, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0044] **실시예 1 내지 5, 및 비교예 1 내지 5: 용융법에 의한 크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체의 제조**

[0045] 크리소스플레놀 C, 폴리비닐피롤리돈 (PVP K25), 폴리에틸렌글리콜(PEG6000), 및 나트륨 라우릴 설페이트을 준비한 후, 하기 표 1의 성분 조성 및 함량으로 혼합하였다. 그리고나서, 230℃에서 자석교반 히터상의 자재 증발접시에서 지속적으로 교반하면서 녹여, 균일한 분산액을 얻었다. 이후, 용융된 혼합물을 교반하에 아이스-배스에서 빠르게 고화시켰다. 고화에 의해 생성된 고체 덩어리를 분쇄해서 분말화하여, 실시예 1 내지 5와, 비교예 1 내지 5의 고체 분산체를 제조하였다.

표 1

[0046]

크리소스플레놀 C 함유 고체 분산체의 제조											
구분	성분	실시예					비교예				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
활성 성분	크리소스플레놀 C (g)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

수용성 고분자	폴리에틸렌글리콜 (PEG 6000, g)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	2	-	1	1
	폴리비닐피롤리돈 (PVP K25, g)	1.6	1.3	1.2	1.1	1.0	2	-	1	-	0.2
계면 활성제	나트륨 라우릴 설페이트(g)	0.2	0.5	0.6	0.7	0.8	-	-	1	1	0.8

[0047] **비교예 6: 크리소스플레놀 C 함유 물리적 혼합물의 제조**

[0048] 실시예 4와 동일한 함량으로, 크리소스플레놀 C, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈 및 나트륨 라우릴 설페이트를 준비한 후, 막자사발과 막자를 이용해서 혼합하여, 비교예 6의 물리적 혼합물을 제조하였다.

[0049] **실험예 1: 크리소스플레놀 C의 용해도 측정 시험**

[0050] 하기 방법에 따라, 크리소스플레놀 C의 용해도 시험을 수행하였다.

[0051] 2ml의 캡핑된 튜브에 물 1ml를 넣고 실시예 1 내지 5, 및 비교예 1 내지 5의 고체 분산체(4mg)를 첨가하였다. 대조군으로서 크리소스플레놀 C 분말 2mg을 물 1ml에 첨가하였다. 이 튜브들을 30초 동안 볼텍싱하고, 자동 온도 조절되는 수조에서 72시간동안 37 ± 0.5 에서 흔들고, 그리고 나서, 10분 동안 10,000 ×g에서 원심분리하였다(5415C, Eppendorf, USA). 상층을 0.45-μm 막 필터(Whatman, UK)를 통해 여과하였다. 적절한 흡광도를 달성하기 위해, 여액을 에탄올로 희석하였다. UV 분광 광도계를 이용하여, 희석 용액을 분석해서 CRSP 농도를 측정하였다. 용해도를, 3개의 결과값의 평균±표준편차로 표시하여, 하기 표 2와 도 1에 나타내었다.

표 2

[0052]

용해도 시험 결과		
구분	**성분**	**용해도(㎍/㎖)**
대조군	크리소스플레놀 C	2.76 ± 0.01
실시예	실시예 1	6.69 ± 0.63
	실시예 2	7.62 ± 0.25
	실시예 3	7.06 ± 0.39
	실시예 4	10.05 ± 0.39
	실시예 5	8.50 ± 0.32
비교예	비교예 1	24.39 ± 0.01
	비교예 2	8.54 ± 0.41
	비교예 3	12.95 ± 0.78
	비교예 4	7.50 ± 0.61
	비교예 5	11.81 ± 0.76

[0053] 위 표 2에서 확인되는 바와 같이, 실시예 1 내지 5, 및 비교예 1 내지 5의 고체 분산체 모두 대조군에 비해 물에 대한 크리소스플레놀 C의 용해도가 개선되는 것으로 확인되었다. 실시예 1 내지 5의 고체 분산체는 용해도가 개선되는 것은 물론 약물 용출률이 개선되는 효과가 있으나, 비교예 1 내지 5의 고체 분산체는 용해도가 개선된 반면에 약물 용출률이 개선되지 않는 문제가 있는 것으로 확인되었다. 크리소스플레놀 C의 주된 흡수부위인 소장에서의 용출률 확인을 위해 실험예 2를 하기 조건으로 수행하였다.

[0054] **실험예 2: 크리소스플레놀 C의 용출 시험**

[0055] 제조된 고체 분산체로부터의 크리소스플레놀 C 용출 시험은 USP XXXVII 패들법에 따라 Vankel 용출 시험기(Model Vankel 7000 Dissolution test station, USA)를 이용하여 수행하였다. 37 ± 0.5℃에서 평형화된 500ml의 탈이온수(pH 5.8) 용출액(dissolution media)을 사용하였다. 실시예 1 내지 5, 및 비교예 1 내지 5의 고체분산체는 크리소스플레놀 C로서 2mg에 해당하는 중량(4mg)을 취하고, 대조군인 크리소스플레놀 C 분말은 2mg을 취하여, 100rpm의 속도로 회전되는 바스켓(basket)에 위치시켰다. 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 및 180 분의 적절한 시간 간격에서, 시료(각 5ml)를 용출액에서 분리하여 0.45 ㎛ Millipore 필터를 이용하여 여과하였다. 분리된 시료를 대신해서 동량의 신선한 용출액을 넣어 바스켓 내의 부피를 일정하게 유지시켰다. 여과된 시료를 λ=350 nm에서의 크리소스플레놀 C 농도에 대해 분석하였다.

[0056] 도 2 내지 도 4에 나타낸 바와 같이, 실시예 4 및 실시예 5의 고체 분산체는 초기 10분 동안의 용출률이 각각 94.11% 및 79.39%로서, 크리소스플레놀 C: 폴리에틸렌글리콜: 폴리비닐피롤리돈: 나트륨 라우릴 설페이트의 중량비가 2: 0.2: 1.0~1.1: 0.7~0.8인 범위에서 특히 우수한 용출률을 나타냄을 알 수 있다. 또한, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3의 고체 분산체는 초기 10분 동안의 용출률이 각각 68.94%, 65.89%, 및 66.93%를 나타낸 반면, 비교예 1 내지 5의 초기 10분 동안의 용출률은 각각 25.92%, 16.26%, 12.96%, 13.00%, 및 11.66%를 나타내었다. 즉, 상기 실시예의 고체분산체는 비교예에 비해 약 2.5~8배 높은 우수한 용출률을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0057] 또한, 대조군인 크리소스플레놀 C 분말의 경우 초기 10분 동안 거의 방출되지 않은 것(약 0.2%)에 비해, 상기 실시예의 고체 분산체 내의 크리소스플레놀 C 약물의 용출률이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0058] 위와 같이 용융법에 의해 제조된 본 발명의 고체 분산체는, 유효 표면 증가로 약물의 습윤성이 증가하고, 수용성 고분자의 가용화 효과, 약물 미결정의 응집 부존재, 향상된 약물의 분산성, 및 약물의 무정형 상태로의 전환 등으로 인해, 크리소스플레놀 C 약물의 용출률이 증가되는 것이라 할 수 있다.

[0059] **실험예 3: 고체 분산체의 표면 형상(surface morphology) 확인 시험**

[0060] 크리소스플레놀 C(CRSP), 나트륨 라우릴 설페이트(SLS), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 물리적 혼합물(physical mixtures, PM), 및 고체 분산체(SD) 제제의 형상을 3kV 가속 전압에서 FE-SEM (JEOL JSM7500, Therma, USA)를 이용하여 측정하였다. 사전에 시료를 양면 탄소 테이프 위에 올려놓고 나서, 50초 동안 금과 팔라듐의 혼합물로 스퍼터-코팅(sputter-coating) 하였다.

[0061] 실험결과, SEM에 의한 각 물질 및 제제의 표면 형상을 도 5에 나타내었다. 크리소스플레놀 C 분말의 약물 결정(도 5A)은 불규칙한 결정질 판 형상 및 크기를 갖는다. 물리적 혼합물(도 5E)에서 크리소스플레놀 C는 여전히 개별적 약물 결정으로 존재하며, 원래의 결정질 형태로 분산되었다. 크리소스플레놀 C 결정은 고체 분산체 제제인 실시예 4(도 5F)에서는, 보여지는 폴리머 입자에 포함되는 것으로 나타났다. 본 발명에 따른 실시예 4의 고체 분산체는 상대적으로 거친 표면을 갖는데, 이는 친수성 폴리머와 계면활성제가 무정형인 약물의 표면에 부착되어 있음을 암시한다. 고체 분산체 제제의 용해도는 크리소스플레놀 C에 비해 무정형의 성질 때문에 증가된다. 게다가, 입자의 매끄러운 형태는, 결정질 및 불규칙한 입자에 대비했을 때, 조직 자극을 덜 유발하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0062] **실험예 4: X-선 분말 회절(XRD) 분석**

[0063] 크리소스플레놀 C(CRSP), 나트륨 라우릴 설페이트(SLS), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 물리적 혼합물(physical mixtures, PM), 및 고체 분산체(SD) 제제의 X-선 분말 회절(XRD)이 자동화 X-선 회절 분석기(D8 DISCOVER, Bruker AXS, Germany)를 이용하여 측정되었다. 데이터는 0.01° 의 step size로 5° 와 80° 사이로 이루어진 각도 범위로 수집되었다.

[0064] XRD 시험은 약물 자체 또는 폴리머 혼합물의 상태(무정형 또는 결정질)를 확인하기 위해 수행되었다. 크리소스플레놀 C, 물리적 혼합물, 및 고체 분산체의 XRD 패턴은 도 6에 나타내었다.

[0065] 폴리비닐피롤리돈 회절 패턴은 두개의 회절 halos로 분산된 백그라운드 패턴을 나타내어, 폴리머가 무정형 물질인 것을 입증한다. 순수한 크리소스플레놀 C, 나트륨 라우릴 설페이트, 및 폴리에틸렌글리콜 6000의 회절 스펙트럼은 고체가 높은 결정질 분말이고 날카로운 피크(sharp peak)를 갖는 것을 나타낸다. 크리소스플레놀 C, 폴리에틸렌글리콜 6000 및 나트륨 라우릴 설페이트에서의 주 피크 모두, PM 및 순수한 약물에서 뚜렷하다. 그러나, 실시예 4의 고체 분산체는 크리소스플레놀 C의 시그네이처(signature) 회절 피크 어떤 것도 갖지 않는데, 이는 결정질 CRSP가 고체 분산체에 존재하지 않으며, 약물의 무정형 상태를 의미하는 것을 암시한다(도 6F 참조). 본 발명에서는 크리소스플레놀 C와 폴리비닐피롤리돈이 상호작용하면서, 크리소스플레놀 C 약물의 분자 이동에 변화를 초래하여, 궁극적으로 크리소스플레놀 C가 무정형으로 유도된 것으로 볼 수 있다. 본 발명에 따른 실시예 4의 고체 분산체내 크리소스플레놀 C는 무정형 상태가 장기 보관에도 유지되고, 결정형으로의 재결정화가 최소화됨으로써 안정성이 향상되는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0066] **실험예 5: 시차주사열량계(Differential scanning calorimetry, DSC)**

[0067] 크리소스플레놀 C(CRSP), 나트륨 라우릴 설페이트(SLS), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 물리적 혼합물(physical mixtures, PM), 및 고체 분산체(SD) 제제의 열영상(thermogram)을 측정하였다. 시료를 DSC(S-650, SCINCO, Korea)로 평가하였다. 시료(정밀하게 측정된 2mg)를 알루미늄 팬 위에 놓는다. 시료의 열

거동(thermal behavior)을 고체 상태의 변화를 평가하기 위해, 0~250℃의 온도 범위를 커버하는 10℃/min의 스캐닝 속도로 확인하였다.

[0068] 도 7은 측정된 각 열영상을 나타낸다. 크리소스플레놀 C는 용융점에 해당하는 208.86℃에서 흡열피크(endothermic peak)를 나타냈다. 폴리비닐피롤리돈은 탈수로 인해 넓은 흡열(broad endotherm)을 나타냈는데, 80℃ 및 120℃ 사이며, 88℃에서 피크를 보였다. SLS의 DSC 열영상은 탈수를 나타내는 105.12℃에서 작은 흡열피크를 나타냈고, SLS의 용융으로 인해 197.21℃에서 흡열 피크를 나타냈다. 대다수의 작은 피크들은, SLS의 분해로 인해 용융점 피크 이상에서 관찰되었다.

[0069] 비교예 6의 물리적 혼합물, 및 실시예 4의 고체 분산체는, 약물 피크의 변화를 나타내었는데, 각각 185.68℃ 및 194.44℃의 낮은 용융점으로 이동하였다. 약물의 용융 흡열(melting endotherm)에서의 사소한 변화는 혼합물에서 각각의 성분의 순도를 떨어뜨리는 혼합 효과에 기인할 수 있으나, 반드시 배합불가능을 나타내는 것은 아니다. 본 발명에 따른 실시예 4의 고체 분산체는, DSC 열영상 및 XRD 패턴은 SEM 관찰결과와 일치되게, 크리소스플레놀 C가 무정형 상태에 있는 것을 입증한다.

[0070] **실험예 6: 푸리에-변환 적외선 분광법(Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)**

[0071] 크리소스플레놀 C(CRSP), 나트륨 라우릴 설페이트(SLS), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 물리적 혼합물(physical mixtures, PM), 및 고체 분산체(SD) 제제에 대해 푸리에-변환 적외선 분광법을 실시하였다. 시료를 Thermo Nicolet 380 분광광도계를 이용하여 측정하였고, 4000~500cm^{-1}의 파장 범위에서 스펙트럼을 기록하였다. 실험방법은 샘플을 KBr에서 분산하고, 압력을 가하여 디스크를 압축하는 단계를 포함한다. 팰릿을 빛의 경로에 두고, 스펙트럼을 관찰하였다.

[0072] 고체 분산체 제제에서 수용성 고분자와 크리소스플레놀 C의 상호관계를 설명하기 위해, FT-IR 분석이 수행되었다. 피크의 존재 유무, 및/또는 피크의 위치 변경은 종종 수소 결합과 같은 상호작용을 나타내는 것이다.

[0073] FT-IR 분석 스펙트럼은 도 8에 나타낸 바와 같다.

[0074] 크리소스플레놀 C의 FT-IR 스펙트럼: 1601, 1514 및 1426cm^{-1}(C=C, aromatic); 1673cm^{-1}(C=O); 1273, 및 1203cm^{-1}(C-O)

[0075] PVP: 2938cm^{-1}(C-H stretching); 1600-1700cm^{-1}(carbonyl stretching)

[0076] PEG6000: 2890cm^{-1}(C-H stretching); 1110cm^{-1}(C-O stretching)

[0077] SLS : asymmetric 1222cm^{-1} 및 symmetric 1085cm^{-1}(SO_2 stretch); 2905.7 및 2853.8 cm^{-1}(aliphatic C-H starching, 계면활성제의 긴 사슬 지방족 알킬기에 특징적인 피크임)

[0078] 실시예 4의 고체 분산체에서 크리소스플레놀 C와 수송체 사이의 수소결합 관계의 존재는 피크의 낮은 파수로 이동하는 것으로 추론될 수 있다. 2차 수소 결합은, 무정형 복합물(composites)의 구조적 균일성(structural homogenity)을 촉진하는 데에 근본적인 역할을 하는 것으로 생각된다.

[0079] 따라서, PVP, PEG6000 및 SLS을 포함함으로써, PM 및 SD에서의 피크의 위치 및 경향(trend)가 변경되는 것을 나타낸다. 이러한 결과는, CRSP, PVP, PEG6000, 및 SLS사이의 분명하게 확인된 상호작용의 존재를 의미하며, 이미 분말 X-선 회절 연구로 확인되었다.

[0080] **실험예 7: 세포 독성(Cytotoxicity) 시험**

[0081] **7-1. 세포 배양(Cell culture)**

[0082] Caco-2 세포주(대장암 세포주)를 한국 세포주 은행(Korea cell line bank, Seoul, Korea)으로부터 구입하여 준비하였다.

[0083] Caco-2 세포를 10%의 소태아 혈청(FBS), 페니실린(100U/㎖), 및 스트렙토마이신(100㎍/㎖)(Hyclone, Logan, UT, USA)으로 보충한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Hyclone, Logan, UT, USA)을 이용하여 배양접시(100x20mm, Corning®, USA)에서 분리하여 배양하였다. 세포주를 95% 공기 및 5% CO_2의 가습 환경하 37℃에서 세포 배양 인큐베이터에서 성장시켰다.

[0084] **7-2. 세포독성 평가**

[0085] Caco-2 세포를 96-웰 플레이트에 1×10^4cells/ml로 분주하였다. 그리고 나서, 12시간 동안 배양하고, 세포를 크리소스플레놀 C, 크리소스플레놀 C가 로딩된 고체 분산체 함유 배지에 24시간 동안 노출시켰다. 배지를 제거하고, 100 μl의 MTT-함유 배지(5 mg/ml)를 웰에 첨가하였다. 이후, 37℃에서 4시간 동안 배양하고, MTT-함유 배지를, 형성된 어떤 포마잔 결정을 건드리지 않도록 조심스럽게 흡입하고 100 μl의 DMSO를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 30분 동안 배양하고, 마이크로플레이트 리더기(Sunrise, Tecan Trading, Switzerland)를 이용하여 565nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 세포 생존율은 처리되지 않는 대조군 세포에 대한 백분율로 표시하였다.

[0086] CRSP 및 제제의 세포독성은, MTT 어세이를 이용하여 수행되었다. 약물의 농도가 증가할수록, 순수한 약물인 크리소스플레놀 C, 크리소스플레놀 C가 로딩된 고체 분산체를 처리한 세포(Caco-2)의 생존율은 감소하였다. 시험 결과, 본 발명에 따른 실시예 4 고체 분산체의 세포 생존률(%)은, 모든 농도에서 약물 보다 일반적으로 높았다.

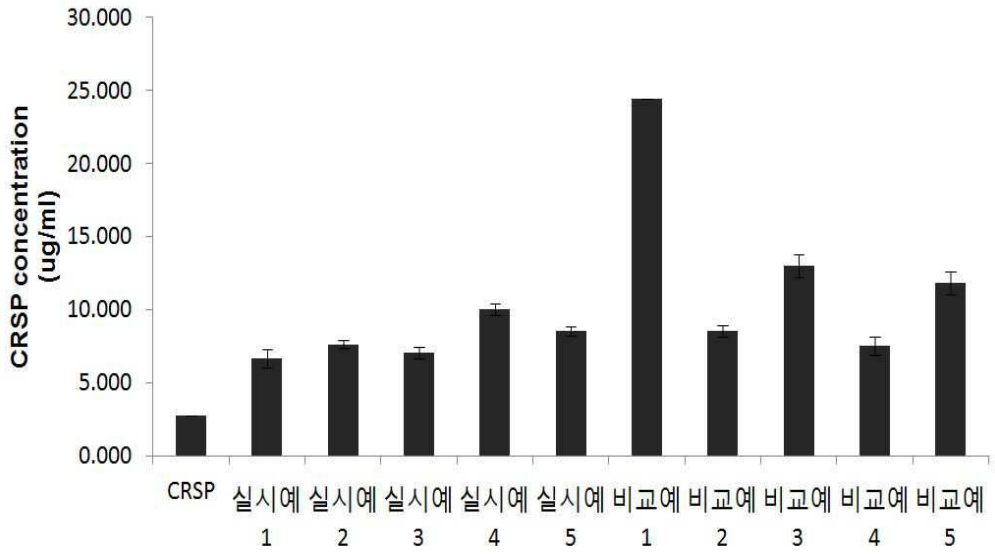
표 3

[0087]

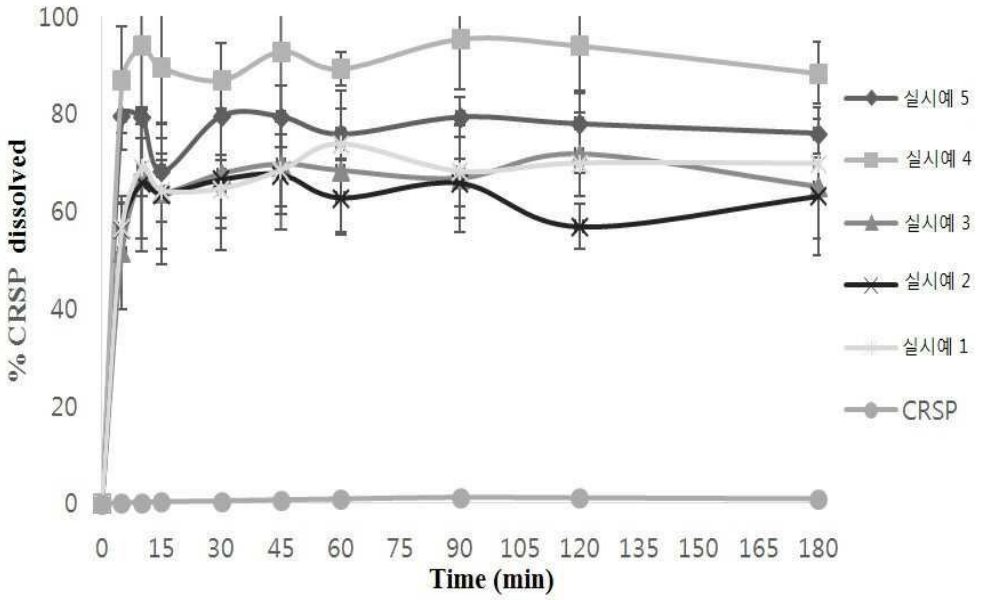
세포독성 실험결과(n=3)		
농도(μg/mL)	크리소스플레놀 C 처리시 세포 생존률(%)	실시예 4의 고체분산체 처리시 세포 생존률(%)
0.5	88.90±1.89	108.67±3.43
1	61.35±9.64	106.19±2.86
2	53.94±3.60	94.77±10.35
5	54.56±1.59	108.14±3.63
10	68.42±17.44	90.35±6.65
20	55.34±0.94	96.52±2.49
50	44.31±2.53	92.63±3.72
100	43.58±2.75	73.31±3.10

도면

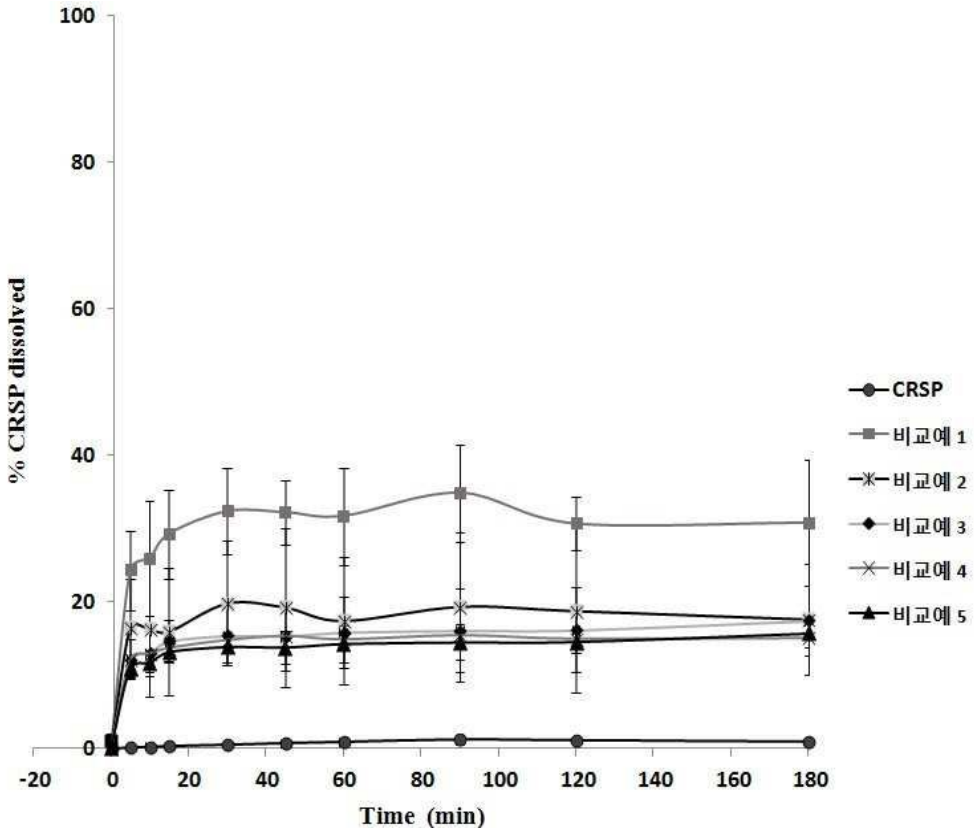
도면1



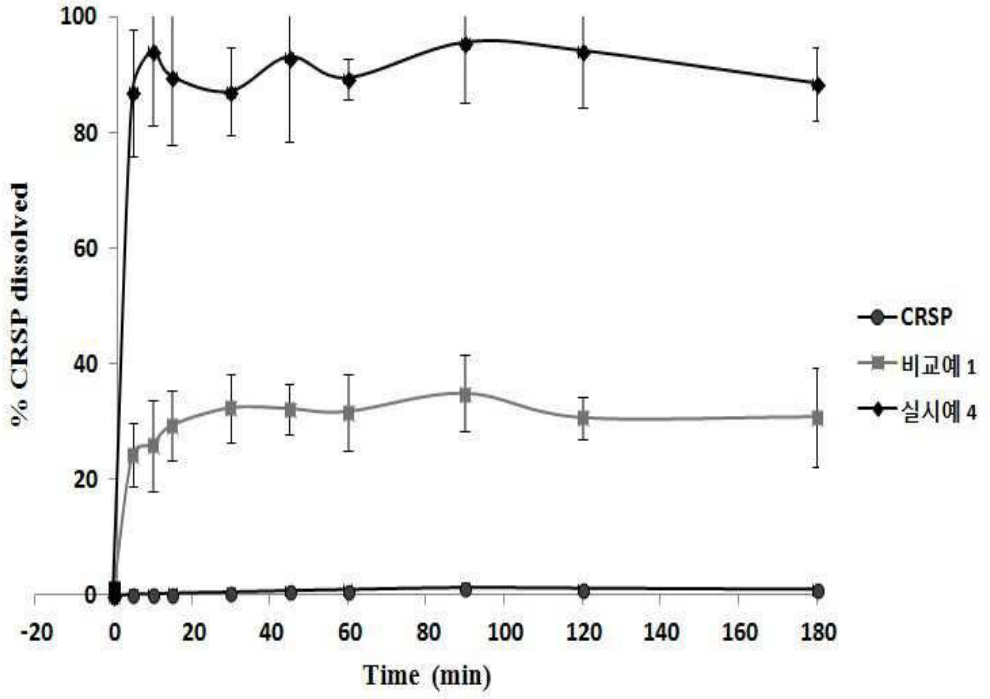
도면2


100
80
60
40
20
0
% CRSP dissolved
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180
Time (min)
실시예 5
실시예 4
실시예 3
실시예 2
실시예 1
CRSP

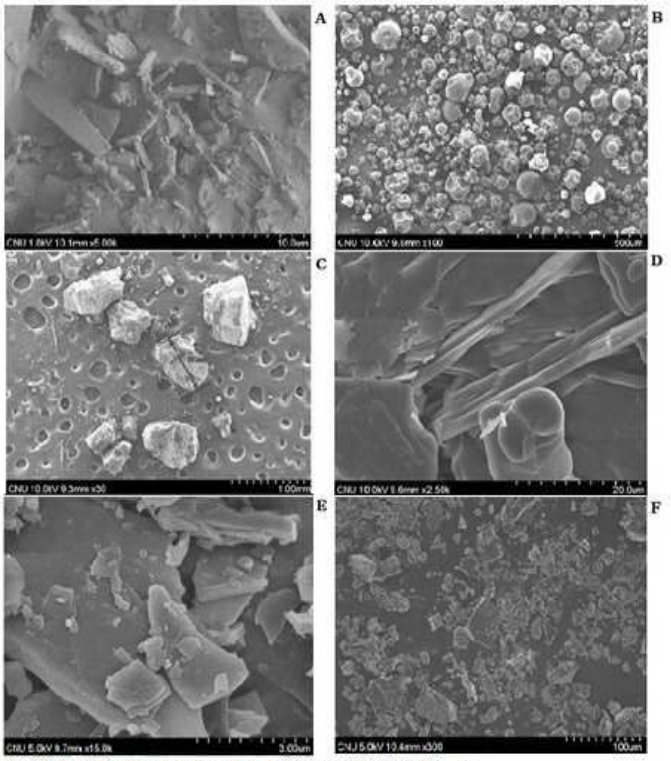
도면3


100
80
60
40
20
0
% CRSP dissolved
-20 0 20 40 60 80 100 120 140 160 180
Time (min)
CRSP
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
비교예 5

도면4

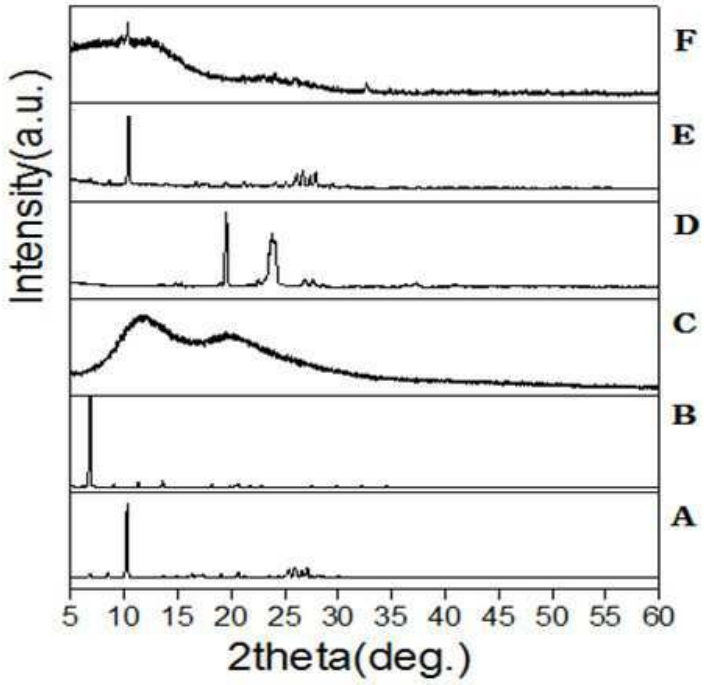


도면5



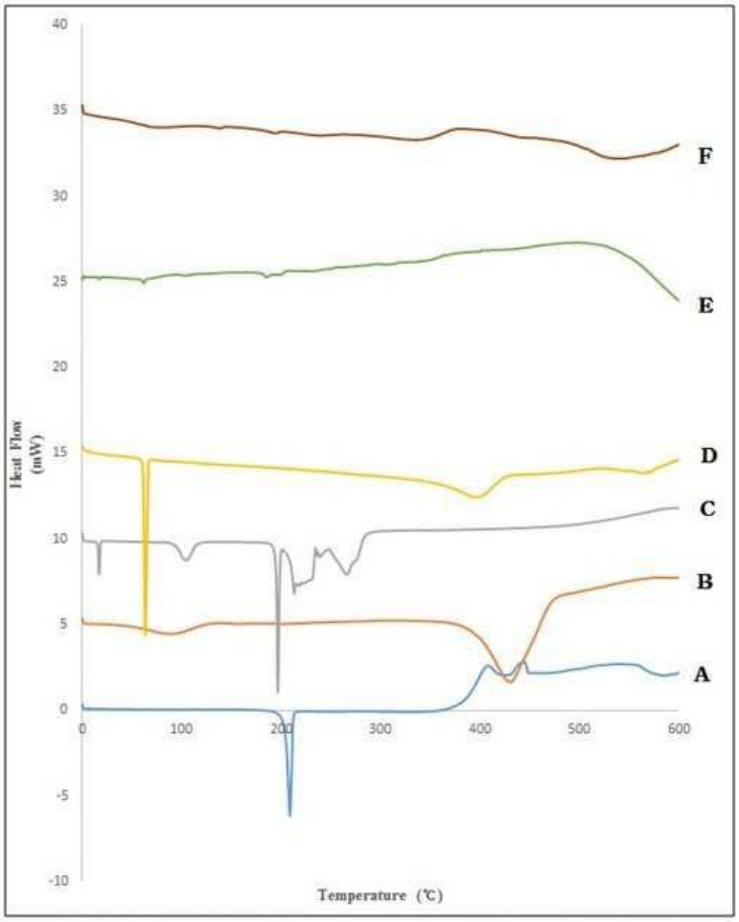
(A) CRSP; (B) PVP; (C) PEG6000; (D) SLS;
(E) 비교예 6(PM); (F) 실시예 4(SD)

도면6



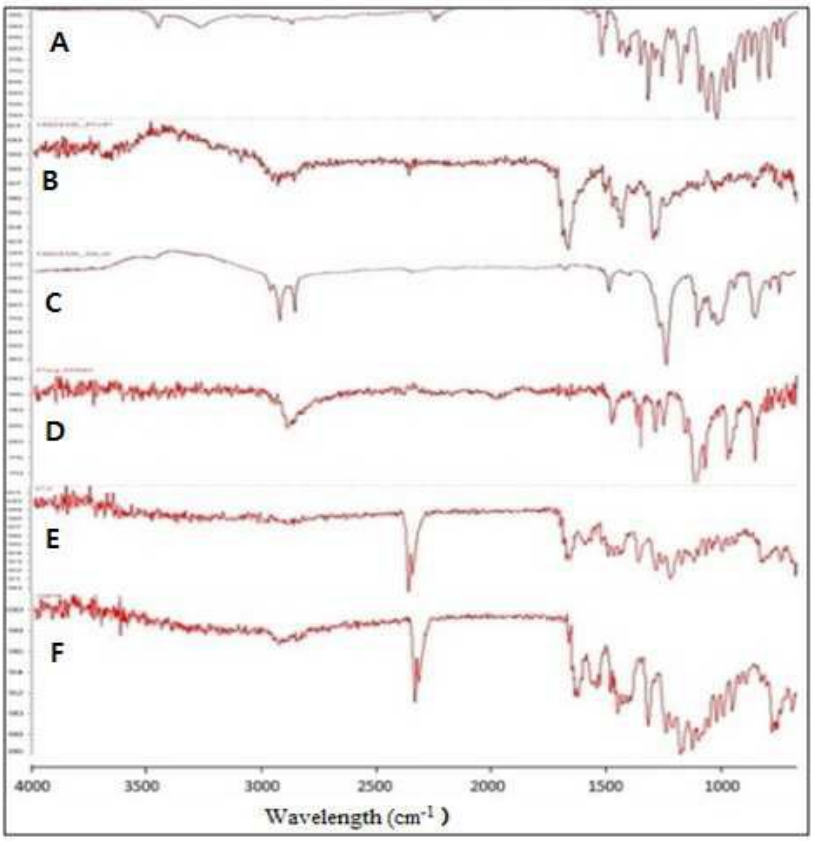
(A) CRSP; (B) SLS; (C) PVP; (D) PEG6000; (E) 비교예 6(PM);
(F) 실시예 4(SD)

도면7



(A) CRSP; (B) PVP; (C) SLS; (D) PEG6000; (E) 비교예 6(PM); (F) 실시예 4(SD)

도면8



(A) CRSP; (B) PVP; (C) SLS; (D) PEG6000; (E) 비교예 6(PM); (F) 실시예 4(SD)