(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0031520
(43) 공개일자 2017년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/16 (2006.01) *A61K 47/42* (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1629 (2013.01)
A61K 47/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0129183
(22) 출원일자 2015년09월11일
심사청구일자 2015년09월11일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
사홍기
서울특별시 서대문구 세무서2길 64, 102동 201호 (홍제동, 현대그린아파트)
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

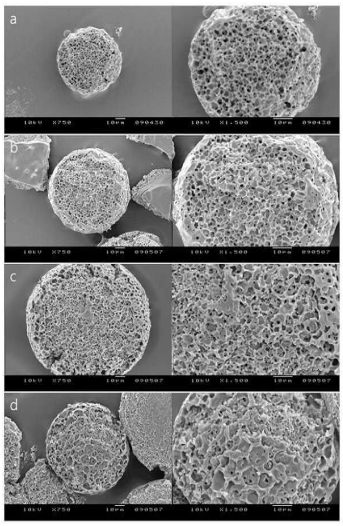
(54) 발명의 명칭 **자발적 공극 폐쇄 기능성을 갖는 고분자 미립구 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 고분자 미립구의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 고분자 미립구에 관한 것으로, 구체적으로는, 특정한 고분자 화합물과 유기용매를 사용하여 수중유형의 단일 유제를 제조한 후 이에 암모니아 용액을 첨가하여 가암모니아 반응을 수행하는 것을 특징으로 하는 고분자 미립구의 제조방법 및 이에 의해 제조된 고분자 미립구, 상기 미립구를 포함하는 생리활성물질 전달용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 제조방법은 기존의 공정과는 달리, 인체에 유해한 할로겐 유기용매를 사용하지 않으며, 포로겐을 사용하지 않고 가암모니아 분해(ammonolysis)를 이용하는 것으로, 이러한 제조방법에 따라 고분자 미립구를 제조하는 경우 제조공정이 간단하며 인체에 무해하고 자발적 공극 폐쇄기능성 및 극강의 다공성 및 공극을 가지는 것을 특징으로 하는 미립자를 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61K 47/38 (2013.01)
A61K 47/42 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/1652 (2013.01)
A61K 9/1658 (2013.01)
C08J 3/124 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A1A2A16054899
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업 (한국형 SGER)
연구과제명 바이오거대분자 약물전달체를 위한 스폰지 다공성 및 자기폐쇄 기능성을 지닌 PLGA 미립자 개발
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2017.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 중량평균분자량 1,000 내지 80,000를 갖는 고분자 화합물와 유기용매를접촉 또는 혼합하여 분산상을 제조하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)에서 제조된 분산상에 분산용매를 첨가하여 수중유(oil-in-water; O/W)형 유제를 제조하는 유제 제조 단계; 및

(b) 상기 단계 (c)에서 제조한 수중유형 유제에 암모니아 용액을 첨가하여 가암모니아 반응을 수행하는 가암모니아 반응 단계로서,

이때, 상기 유기용매는 이소프로필 포르메이트(isopropyl formate), 메틸 포르메이트(methyl formate), 에틸 포르메이트(ethyl formate) 프로필 포르메이트(propyl formate) 및 이들 유기용매와 반극성 용매(semipolar solvent)와의 혼합물로부터 선택되는 하나 이상의 비할로겐 유기용매인 것을 특징으로 하는 자발적 공극 폐쇄기능성을 가지는 스폰지 형상의 다공성 미립구의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고분자 화합물은 폴리락트산, 폴리락타이드, 폴리락틱-코-글리콜산, 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA), 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리오르쏘에스테르, 락트산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산, 셀룰로오스 에스테르류, 셀룰로오스 에테르류 및 락트산과 아미노산의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 고분자 미립구의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 반용매는 디메틸 설폭사이드, 아세톤, 아세토나이트릴, 테트라하이드로퓨란, 디메틸 포름아마이드 및 톨루엔으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 고분자 미립구의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)에서 제조된 분산상 내의 고분자 화합물의 농도가 3 내지 30(w/v)%인 것인, 고분자 미립구의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)에서, 분산상 : 분산용매의 부피비가 1:1 내지 1:100인 것인, 고분자 미립구의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)에서 사용되는 분산용매는 유화제를 포함하는 수성분산용매인 것인, 고분자 미립구의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)에서 사용되는 분산용매는 유화제로서 폴리비닐알코올을 포함하는 수용액인 것인, 고분자 미립구의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 유기용매 : 암모니아 용액의 몰비율이 1:0.5 내지 1:20인, 고분자 미립구의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되고, 공극을 가지며, 상기 공극들이 미립구 내에서 상호 연결된(interconnected) 열린(open) 구조의 스폰지 형상을 가지며 자발적 공극 폐쇄기능성을 가지는 것을 특징으로 하는 고분자 미립구.

청구항 10

제1항 내지 제8항에 따른 고분자 미립구 및 생리활성물질을 포함하되, 상기생리활성물질은 상기 고분자 미립구에 봉입된 것을 특징으로 하는 생리활성물질 전달용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생리활성물질은 바이오 거대분자인 것인, 생리활성물질 전달용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 바이오 거대분자는 펩타이드, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 단백질, DNA, RNA, 나노입자, 단일클론 항체 또는 백신인 것인, 생리활성물질 전달용 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제8항에 따른 자발적 공극 폐쇄성 고분자 미립구를 제조하는 단계; 및

상기 미립구에 생리활성물질을 봉입시키는 단계

를 포함하는 생리활성물질 전달용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고분자 미립구 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 자발적 공극 폐쇄기능성을 가지는 다공성 미립구, 이의 제조방법 및 상기 미립구를 포함하는 약물전달용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 수액제, 현탁제 및 유제와 같은 종래 주사제형들은 근육이나 피하 투여 후 재빨리 체내에서 제거되기 때문에 만성질환 치료시에는 빈번한 주사투여가 필수적이었다. 이러한 문제점을 해결하고자 고안된 마이크로캡슐화(microencapsulation)는 고분자 화합물로 구성된 미립구(microsphere, 이하의 서술에서 미립구는 초미립구(nanosphere)를 포함한다) 제형에 약물을 봉입시키는 제조공정을 지칭하는데, 미립구는 보통 um 단위의 크기를 지니므로 인체나 동물에 근육 또는 피하주사로 투여 가능하며, 다양한 약물 방출속도를 지니도록 제조할 수 있어 약물 전달기간을 제어할 수 있다. 그러므로, 단 한 번의 투여만으로도 장시간 동안 유효한 치료약물농도를 유지할 수 있어 치료에 필요한 약물 총 투여량을 극소화시킬 수 있으며, 환자의 약물치료 순응도를 향상시킬 수 있어, 현재 유수한 전 세계 제약회사에서 약물 함유 고분자 미립구 제조에 지대한 관심을 보이고 있다.

[0003] 상기와 같은 생분해성 고분자를 이용한 미립구의 제조방법으로는 용매증발 건조법(미국 특허 제4,652,441호), 상분리법(미국 특허 제4,675,189호), 분무건조법(미국 특허 제6,709,650호) 및 저온 용매추출법(미국 특허 제

5,019,400호) 등이 알려져 있다. 그러나 상기와 같이 제조되는 미립구는 대부분 비다공성(non-porous)으로서 그 제조가 용이하지 못하고 시간이 많이 소요되며, 비다공성으로 인해 봉입된 약물의 방출속도가 느리다는 단점을 가지고 있다.

[0004] 상기 비다공성으로 인해 봉입된 약물의 방출속도가 느리다는 단점을 해결한 다공성 미립자를 제조하기 위해, 포로겐(porogen)과 메틸렌 클로라이드 및 에틸 아세테이트와 같은 유기용매를 사용하는 이중 유제, 구체적으로, W1/O/W2(water-in-oil-in-water)유제 용매증발추출방법이 이용되고 있으며, 상기 W1/O/W2 유제 용매증발추출방법은 W1/O/W2 유제의 W1과 W2 사이에 큰 삼투압 차에 의해, W1에 존재하는 포로겐이 W2로 확산됨과 동시에 W2의 물이 W1으로 침투하여 최종적으로 다공성 미립자가 만들어지는 것을 이용한 방법이다. 이러한 이중 유제를 이용하여 미립자를 제조하는 상기와 같은 방법이 다수 보고되어 있고(Int J Pharm 2007;333:103, J Controlled Release 133(2009)37, Angew Chem Int Ed 51(2012)10800, ACS Macro Lett 1(2012)697 및 Ch Chem Lett 24(2013)710 등), 이들 이중 유제를 이용한 방법은 모두 분산 용매로서 메틸렌 클로라이드나 에틸 아세테이트와 같은 유기 용매를 사용하거나, 포로겐으로서 NaCl, 트레할로오스, BSA, 과산화수소, 사이클로덱스트린 등을 반드시 사용하고 있다.

[0005] 그러나, 유기용매로 사용되는 메틸렌 클로라이드는 강한 휘발성을 지니고 물과 잘 섞이지 않으며 물 보다 훨씬 낮은 비점을 갖는 등 유제를 만들기 위한 최적의 유기용매임에도 불구하고, 발암물질에 해당하며 환경독성을 야기한다는 큰 문제점을 가지고 있고, 유제로부터 이를 제거하기 위해 밤새 유제를 교반해야 하고(미국 특허 제6,884,435호), 미립구 제조시간을 단축하기 위해 반응조(reactor)의 온도를 상승시키거나 또는 감압조건을 도입하기도 하는 번거로운 공정을 필요로 한다(미국 특허 제3,691,090호, 제3,891,570호, 제6,270,700호 및 제6,572,894호 참조). 나아가, 이러한 공정상의 번거로움뿐만 아니라, 상기와 같은 공정을 거치면서 미립구에 봉입된 약물이 변성되는 문제점을 가지고 있다. 또한, 다공성을 확보하기 위해서는 W1에 높은 농도의 포로겐을 첨가해야하는데, 이때 발생하는 삼투압 증가로 인해 W1에 녹아있는 약물이 외상인 W2로 빠져나가는 문제점이 있으며, 또한 포로겐 제거 단계에서 약물 역시 제거되어 약물 봉입률이 저하되는 문제점을 가지고 있다.

[0006] 한편, 본 발명자는 고분자 화합물, 약물 및 수불용성 유기용매를 포함하는 분산상을 분산용매에 첨가하여 유제를 제조한 후, 제조된 유제에 암모니아 용액을 첨가하여 반응시키는 것을 포함하는 고분자 미립구의 제조방법을 개시한 바 있다(한국등록특허 제910892호 및 미국특허 제8,202,525호). 그러나 이러한 제조방법에서는 높은 분자량의 고분자 화합물과 메틸 클로로아세테이트 등의 할로겐 용매를 사용함으로써 비다공성의 미립구가 제조된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 약물의 봉입률 및 약물 변성의 문제를 갖지 않으면서도 적절한 약물 방출속도를 나타낼 수 있고, 간이한 공정으로 친환경적으로 제조될 수 있는 다공성 미립구를 제조하기 위하여 연구를 계속하였다. 그 결과, 특정 분산용매, 중합체를 선택하고, 포로겐을 포함시키지 않고 단일 O/W 유제를 제조하여 이를 가암모니아 분해반응을 이용하여 스폰지 형상의 다공성 미립구를 제조하는 경우, 상기 미립구가 다공성을 지님에도 불구하고, 수상에서 스스로 공극이 닫히는 자발적 공극 폐쇄 기능성을 가질 수 있음을 확인하였고, 그 결과, 바이오 거대분자를 봉입할 수 있는 다공성 고분자 미립구를 간단하고 효율적이면서도 친환경적으로 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 하나의 목적은 자발적 공극 폐쇄 기능성을 갖는 다공성 고분자 미립구의 제조방법 및 이에 따라 제조된 고분자 미립구를 제공하는 것이다.

[0009] 나아가, 또 다른 본 발명의 목적은 상기 고분자 미립구를 유효성분으로 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 자발적 공극 폐쇄기능성을 가지는 다공성 미립구의 제조방법에 관한 것이다.

[0011] 구체적으로, 본 발명에 따른 제조방법은 다공성의 미립구가 자발적 공극 폐쇄성을 갖도록 다음과 같은 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다:

[0012] (a) 중량평균분자량 1,000 내지 80,000를 갖는 고분자 화합물와 유기용매를사용하여 분산상을 제조하는 단계;

[0013] (b) 상기 단계 (a)에서 제조된 분산상에 분산용매에 첨가하여 수중유(oil-in-water; O/W)형 유제를 제조하는 유제 제조 단계; 및

[0014] (b) 상기 단계 (c)에서 제조한 수중유형 유제에 암모니아 용액을 첨가하여 가암모니아 반응을 수행하는 가암모니아 반응 단계로서,

[0015] 이때, 상기 유기용매는 이소프로필 포르메이트(isopropyl formate), 메틸 포르메이트(methyl formate), 에틸 포르메이트(ethyl formate), 프로필포르메이트(propyl formate) 및 이들 유기용매와 반극성 용매(semipolar solvent)와의 혼합물로부터 선택되는 하나 이상의 비할로겐 유기용매이다.

[0016] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다

[0017] 본 발명에서 상기 고분자 화합물은 1,000 내지 80,000의 중량평균분자량을 갖는 것을 특징으로 한다. 이러한 고분자 화합물의 종류는 상기와 같은 중량평균분자량 범위를 갖는 것이라면 당업계에 공지되어 있는 것을 제한 없이 사용할 수 있고, 생분해성 고분자뿐 아니라 생분해되지 않는 고분자 또한 가능하다. 이러한 고분자로서는, 예를 들어 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락타이드, 폴리락틱-코-글리콜산, 폴리락타이드-코-글리콜라이드, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리오르쏘에스테르, 락트산과 카프로락톤의 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리하이드록시발레이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리아미노산, 폴리다이옥산온, 락트산과 아미노산의 공중합체, 셀룰로오스에스터류 및 셀룰로오스에테르류(예를 들어 에틸 셀룰로오스)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 고분자로서는 중량평균분자량 1,000 내지 80,000을 갖는 폴리락타이드-코-글리콜라이드, 폴리락타이드, 폴리카프로락톤 또는 에틸 셀룰로오스를 사용할 수 있다.

[0018] 상기와 같이, 본 발명에 따른 제조방법에서 사용되는 고분자는 중량평균분자량 범위 1,000 내지 80,000의 고분자를 사용하는 것을 특징으로 한다. 종래의 가암모니아 반응을 이용한 미립구의 제조방법에서는 분자량이 상기 범위를 넘는, 고분자량의 고분자화합물을 사용하였는데, 이와 같이 높은 분자량의 고분자 화합물을 사용하는 경우에는 비다공성의 미립구가 제조되게 된다. 구체적으로, 분자량이 너무 높으면 분산상의 점도가 높아지고 이에 따라 분산상에서의 가암모니아 반응이 억제되고 동시에 가암모니아 반응의 부산물, 즉 물에 녹는 성분들이 효과적으로 분산용매로 확산되기가 어려워지고, 그 결과, 궁극적으로 비다공성의 미립자가 제조되게 된다.

[0019] 이러한 고분자 화합물은 유기 용매와 접촉 또는 혼합되어 분산상으로 제조된다. 이때 사용되는 유기용매는 할로겐을 분자 중에 포함하지 않는 비할로겐 용매로서, 이소프로필포르메이트(isopropyl formate), 메틸포르메이트(methyl formate), 에틸포르메이트(ethyl formate), 프로필포르메이트(propyl formate)나 이들 유기용매의 혼합물일 수 있다. 나아가, 상기 유기용매로는 상기 언급된 구체적인 비할로겐 유기용매들 외에 이들과 함께, 공용매로서(cosolvent) 반극성 용매(semipolar solvent)와의 혼합물(cosolvent system)일 수 있고, 이러한 반극성 용매는, 예를 들어, 디메틸 설폭사이드, 아세톤, 아세토나이트릴, 테트라하이드로퓨란, 디메틸 포름아마이드, 톨루엔 등을 들 수 있다. 종래 한국등록특허 제910892호 및 미국특허 제8,202,525호 등에서 가암모니아 반응을 위하여 사용되던 유기용매는 모두 할로겐화된 유기용매(halogenated organic solvent)로서 용매 자체의 독성 때문에 제약산업에서는 실제적으로 사용하기 힘든 용매이고, 이에 의해서는 단지 비다공성 미립구만이 제조될 뿐이나, 본 발명에서는 상대적으로 독성이 적을 뿐만 아니라 다공성의 미립구를 제조할 수 있는 비할로겐화된 유기용매로서 제약산업에 직접적으로 응용이 가능하다는 특징을 갖는다.

[0020] 나아가, 상기 고분자 화합물과 유기용매를 사용하여 제조된 분산상은 단계 (b)에서 분산용매와 혼합되면서 수중유형(O/W)의 단일 유제를 생성하게 된다. 이때 사용되는 분산용매는 수중유형의 유제를 제조하여야 하므로, 수성 분산용매를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 수성 분산용매로는 친수성 유화제, 예컨대 폴리비닐알콜 또는 트윈(Tween) 계열과 같은 유화제를 함유하는 수용액 또는 이의 공용매를 사용할 수 있다. 상기 분산용매에 함유되어 있는 유화제의 농도는 0.1에서 4%(w/w), 바람직하게는 0.5 내지 2.0%(w/v)를 사용할 수 있다.

[0021] 상기 단계 (a)에서, 분산상을 제조하기 위한 고분자 화합물과 분산용매의 비율은, 제조된 분산상 내의 고분자 화합물의 농도가 3(w/v)% 내지 30(w/v)%, 바람직하게는 3.75(w/v)% 내지 15(w/v)%가 되도록 조절될 수 있다. 이와 관련하여, 고분자의 농도가 30(w/v)%를 초과하는 경우, 분산상의 점도가 상승하여, 후속 단계인 단계 (c)에서 가암모니아 반응이 억제되고, 가암모니아 반응 부산물의 확산이 억제되어 다공성 형성 정도가 감소하고, 3(w/v)% 미만인 경우 미립구의 기계적 강도가 약해 실용성이 떨어지는 문제점이 발생한다. 구체적인 일 실시예에서는, 0.15 내지 0.45 g의 고분자화합물을 4 ml의 유기용매에 녹여 분산상을 제조하였다.

[0022] 나아가, 상기 단계 (a)에서 제조된 분산상이 분산용매와 혼합시, 그 혼합부피비는 1:1 내지 1:100, 바람직하게는 1:4 내지 1:10이다. 이와 관련하여 분산용매의 양이 너무 많아지면 가암모니아 반응을 유도하기 전, 즉 암모니아를 넣기 전에 분산상을 구성하는 대부분의 유기용매가 바로 수상으로 확산되어 유제 방울이 아닌 경화된 미립자 형태가 되게 되고, 그 이후에 암모니아를 넣게 되면 미립자가 다공성을 갖지 않아 스폰지 형의 다공성을 갖는 미립자를 제조할 수 없다는 문제점이 발생한다.

[0023] 또한, 상기 단계 (c)에서는 단계 (b)에서 제조된 수중유형 단일 유제에 암모니아 용액을 첨가하여 가암모니아 반응을 수행하게 되는데, 이때, 암모니아 용액의 사용량은 상기 단계 (a)에서 사용되는 유기 용매의 부피를 기준으로 결정하며, 유기용매 : 암모니아 용액의 몰비율이 1:0.5 내지 1:20이 되도록 사용하는 것이 바람직하다. 이와 관련하여, 상기 범위를 벗어나도록 소량의 암모니아를 사용하는 경우 공극이 형성되지 않거나, 상기 범위를 벗어난 과량의 암모니아를 사용하는 경우 매우 공극은 많이 형성되기는 하나, 고분자의 분해가 동시에 증가되어, 미립구의 기계적 강도가 약해지는 문제가 발생할 수 있다. 구체적인 일 실시예에서는 4ml의 이소프로필 포르메이트에 대해 28%의 암모니아 3 내지 7mL를 사용하여 가암모니아 반응을 진행하였다.

[0024] 본 발명에 따른 상기 미립구 제조방법에 의하면, 기존의 다공성 미립자 제조공정들과는 달리, 고분자 화합물을 이소프로필 포르메이트와 같은 비할로겐 유기용매에 녹인 분산상을 수용액에 유화시켜 O/W 형의 유제를 형성하고, 그후에 암모니아와 같이 수상에서 유제방울로 확산되어 비할로겐 분산용매를 수용성 용매로 분해시킬 수 있는 화학반응유도체를 상기 O/W 유제에 첨가하고, 그 결과, 유제 방울을 구성하고 있는 비할로겐 유기용매가 수용성 용매(예를 들어 이소프로필 포르메이트의 경우 수용성 용매로서 이소프로판올과 포름아마이드)로 분해된다. 이들 수용성 용매에서는 고분자 화합물이 용해되지 않으므로 유제방울 내에서 고분자 화합물이 풍부한 도메인과 고분자 화합물이 없는 도메인으로 구분되어 지고, 상기 수용성 용매가 자발적으로 수상으로 확산됨에 따라 고분자 화합물의 미립자가 형성되게 된다. 상기 과정은 매우 신속하게 일어나는 것으로, 그 결과, 대량의 quenching liquid를 사용한 용매추출이나 또는 용매증발 단계가 전혀 필요하지 않게 되고, 낮은 에너지의 유화기로서 쉽게 O/W형의 유제를 제조할 수 있기 때문에, 특별한 기계장치나 high-energy 또는 high-shear mixing device가 필요하지 않게 된다. 특히, 바이오 거대분자(biomacromolecules)의 경우 분산상을 이루는 유기용매에 노출되거나 유기용매/물 계면에 노출되는 공정 또는 유제 형성을 위해 사용하는 고에너지 혼합 기기(high-energy mixing device)에 의한 전단으로 인한 바이오 거대분자 자체의 변성, 응집 또는 분해가 될 위험이 있다. 하지만 본 다공성 미립자를 활용하면 100% 수성 조건에서 안전하게 바이오 거대분자와 같은 생리활성물질을 봉입할 수 있다는 장점을 갖는다. 나아가, 본 발명에 따른 제조방법에 의해 미립자를 제조하는 경우 기존의 다공정 미립자 제조 기법에서 필수적으로 요구되는 포로겐(porogens)을 사용하지 않고도 현저한 다공성 구조를 확보할 수 있다는 장점을 갖는다.

[0026] 나아가, 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된, 자발적 공극 폐쇄성을 갖는 스펀지 형태의 미립구에 관한 것이다.

[0027] 구체적으로, 본 발명에 따른 미립구는, 표면뿐 아니라 내부에도 스폰지 형상의 공극 또는 기공들이 존재하며, 이들이 서로 유기적으로 연결되어 네트워크를 형성하는 특유의 성상을 갖는다.

[0028] 한편, 본 발명에서 사용되는"자발적 공극 폐쇄성"이라는 용어는, 미립구 내외부의 공극이 외부로부터의 다른 물질의 도움없이 스스로 닫히게 되어 미립구 표면과 접하고 있는 공극의 면적이 감소하게 되어 컴팩트한 매트릭스 형태가 되는 것을 말한다. 상기 자발적 공극 폐쇄는 유기용매를 포함하지 않는 100% 수용액 미립구를 분산시키는 경우 시작되며, 미립구의 주변 온도에 영향을 받고, 구체적으로 미립자의 유리전이온도(T_g) 부근 또는 이보다 약간 높은 온도에서 이러한 자발적 공극 폐쇄가 발생한다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 고분자 미립구는 평균 직경이 20 내지 1,000um, 바람직하게는 50 내지 350um인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 소망하고자 하는 용도에 따라서 자유롭게 변형가능하다. 이때, 미립자의 평균 직경은 유제의 점성도, 분산상의 고분자 화합물의 농도, 고분자 화합물의 분자량, 분산상과 분산용매의 용적비, 유화제의 농도 등에 의해 결정될 수 있다.

[0030] 이와 같이, 본 발명에 따른 미립구는 스펀지 형태의 다공성을 가져 약물 전달체로 사용시 장기간 지속적인 약물의 방출이 가능하고, 자발적인 공극의 폐쇄성으로 인해 우수한 약물의 봉입률을 나타낸다는 장점을 같는다.

[0032] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 자발적 공극 폐쇄성을 갖는 다공성 고분자 미립구 및 생리활성물질을 포함하는 생리활성물질 전달용 조성물에 관한 것이다.

[0033] 구체적으로, 상기 생리활성물질은 생체 내에서 소망하는 효과를 발휘할 수 있는 모든 물질을 의미한다. 상기 생리활성물질은 바이오 거대분자(biomacromolecules)일 수 있으며, 예를 들어 펩타이드, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 나노입자, DNA, RNA, 단일클론항체 또는 백신일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직한 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 생리활성물질 전달용 조성물은 상기 다공성 고분자 미립구 및 생리활성물질 외에, 약학적 조성물에 통상적으로 사용되는 담체, 부형제, 첨가제 등을 포함할 수도 있다.

[0035] 나아가, 또 다른 일 양태로서, 본 발명은 상기 생리활성물질 전달용 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 생리활성물질 전달용 조성물의 제조방법은 다음과 같은 단계를 포함한다:

[0036] 상기 자발적 공극 폐쇄성 고분자 미립구를 제조하는 단계; 및

[0037] 상기 미립구에 생리활성물질을 봉입시키는 단계.

[0039] 바람직한 일 양태에서, 상기 생리활성물질 봉입 단계는 미립구와 생리활성물질을 접촉시키는 단계 및 승온 단계를 포함할 수 있다. 바람직한 일 양태에서, 상기 승온 단계는 미립구의 유리전이온도 부근까지 승온시키는 것에 의해 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명에 따른 고분자 미립구의 제조방법에 따라 고분자 미립구를 제조하는 경우, 간이하고 친환경적인 공정에 의해 생리활성물질을 전달하는 고분자 미립구를, 종래 필수적으로 요구되는 포로겐 및 유해한 유기용매를 사용하지 않고도 안전하고 인체에 무해하게 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 그에 따라 제조된 고분자 미립구가 다공성의 미립구임에도 불구하고 자발적 공극 폐쇄 기능성을 가져, 약물을 적절한 용출율로 체내에서 용출시키면서도, 높은 생리활성물질의 봉입률을 가져 효과적인 생리활성물질의 전달이 가능하다는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 PLGA 미립자 내부·외부에 공극 및 기공 형성 기전을 도식화한 도면이다.

도 2는 이소프로필 포르메이트와 암모니아수 사용량을 각각 4 ml 및 3 ml로 고정하면서 PLGA 사용량을 (a) 0.15, (b) 0.25, (c) 0.35 그리고 (d) 0.45 g로 변화시켜 제조한 미립자들의 SEM 사진이다.

도 3은 (a) 0.15, (b) 0.25, (c) 0.35 그리고 (d) 0.45 g의 PLGA를 4 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹여 분산상을 만들고 이를 수용액에 유화시킨 후 암모니아수 3 ml을 적가하여 제조한 미립자 표면의 SEM 사진으로, 왼쪽 사진을 고배율로 찍은 것이 오른쪽 사진이다.

도 4는 (a) 0.15, (b) 0.25, (c) 0.35 그리고 (d) 0.45 g의 PLGA를 4 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹여 분산상을 만들고 이를 수용액에 유화시킨 후 암모니아수 3 ml을 적가하여 제조한 미립자 내부의 SEM 사진으로, 왼쪽 사진을 고배율로 찍은 것이 오른쪽 사진이다.

도 5는 PLGA 0.35 g을 (a) 4, (b) 5, 그리고 (c) 6 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹여 제조한 분산상을 수상에 유화시켜 유제를 형성한 후 각각 3, 3.5, 그리고 4.1 ml의 암모니아수를 적가하여 제조한 PLGA 미립자의 표면을 보여주는 SEM 사진이다.

도 6은 PLGA 0.35 g을 (a) 4, (b) 5, 그리고 (c) 6 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹여 제조한 분산상을 수상에 유화시켜 유제를 형성한 후 각각 3, 3.5, 그리고 4.1 ml의 암모니아수를 적가하여 제조한 PLGA 미립자의 내부 형상을 보여주는 SEM 사진이다.

도 7은 0.25 g의 PLGA을 4 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹인 분산상을 수상에 유화시켜 유제를 형성한 후 암모니아수 (a) 3, (b) 5, (c) 7, 그리고 (d) 9 ml을 적가하여 제조한 미립자 표면의 SEM 사진에 관한 것이다.

도 8은 0.25 g의 PLGA을 4 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹인 분산상을 수상에 유화시켜 유제를 형성한 후 암모니아수 (a) 3, (b) 5, (c) 7, 그리고 (d) 9 ml을 적가하여 제조한 미립자 내부의 SEM 사진에 관한 것이다.

도 9는 (a) 0.15, (b) 0.25, (c) 0.35 그리고 (d) 0.45 g의 PLGA(iv = 0.49 dL/g)를 4 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹여 분산상을 만들고 이를 수용액에 유화시킨 후 암모니아수 3 ml을 적가하여 제조한 미립자 표면의 SEM 사진이다.

도 10는 (a) 0.15, (b) 0.25, (c) 0.35 그리고 (d) 0.45 g의 PLGA(iv = 0.49 dL/g)를 4 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹여 분산상을 만들고 이를 수용액에 유화시킨 후 암모니아수 3 ml을 적가하여 제조한 미립자 내부의 SEM 사진이다. 왼쪽 사진을 고배율로 찍은 것이 오른쪽 사진이다.

도 11는 PLGA 미립자를 37℃ 수용액에 (a) 분산시키기 전, 그리고 분산시킨 후 (b) 0.5, (c) 1, (d) 1.5, 그리고 (e) 2 시간이 경과한 후 관찰한 미립자의 외부 형상을 보여주는 SEM 사진이다. 왼쪽 사진을 고배율로 찍은 것이 오른쪽 사진이다.

도 12는 PLGA 미립자를 37℃ 수용액에 (a) 분산시키기 전, 그리고 분산시킨 후 (b) 0.5, (c) 1, (d) 1.5, 그리고 (e) 2 시간이 경과한 후 관찰한 미립자의 내부 형상을 보여주는 SEM 사진이다.

도 13은 PLGA 미립자를 41.7℃ 수용액에 (a) 분산시키기 전, 그리고 분산시킨 후 (b) 0.5, (c) 1, (d) 1.5, 그리고 (e) 2 시간이 경과한 후 관찰한 미립자의 외부 형상을 보여주는 SEM 사진이다. 왼쪽 사진을 고배율로 찍은 것이 오른쪽 사진이다.

도 14는 스폰지 미립자의 자발적 폐쇄 기능성을 평가하기 위해 PLGA 미립자를 41.7 ° C 수용액에 (a) 분산시키기 전, 그리고 분산시킨 후 (b) 0.5, (c) 1, (d) 1.5, 그리고 (e) 2 시간이 경과한 후 관찰한 미립자의 내부 형상을 보여주는 SEM 사진이다. 왼쪽 사진을 고배율로 찍은 것이 오른쪽 사진이다.

도 15는 FITC-dextran을 미리 제조한 다공성 PLGA 미립자로 봉입할 수 있음을 증명하는 형광현미경 시험 결과를 나타낸 도면이다.

도 16은 FITC-dextran이 미리 제조한 다공성 PLGA 미립자로 봉입될 수 있음을 증명하는 공초점레이저주사현미경 시험 결과를 나타낸 도면이다.

도 17은 미리 조제한 스폰지 형상의 다공성 PLGA을 바이오거대분자 수용액에 분산시켜 자발적 공극 및 기공 폐쇄 기능성을 이용하여 바이오거대분자를 봉입한 비다공성 PLGA 미립자의 제조를 보여주는 모식도이다.

도 18은 고분자 화합물로서 에틸셀룰로오스를 사용하여 제조한 본 발명에 따른 자발적 공극 폐쇄성을 갖는 다공성 고분자의 내외부 형상을 SEM을 통하여 관측한 사진이다.

도 19는 고분자 화합물로서 폴리카프로락톤을 사용하여 제조한 본 발명에 따른 자발적 공극 폐쇄성을 갖는 다공성 고분자의 내외부 형상을 SEM을 통하여 관측한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1. 미립자의 제조**

[0045] PLGA(lactide:glycolide ratio = 75:25; inherent viscosity = 0.25 dL/g in chloroform) 0.15, 0.25, 0.35 또는 0.45 g을 이소프로필 포르메이트 4 ml에 용해시켜 분산상을 제조하였다. 상기 분산상을 0.5% (w/v) 폴리비닐 알코올(분자량 = 25,000 g/mol; 가수분해 정도 = 88%) 수용액 40 ml에 분산시키고 자력 교반기를 사용하여 450 rpm에서 3분 동안 교반시켜 유화하여 유제를 제조하였다. 그 다음 상기 유제에 암모니아수(암모니아 농도 28%) 3 ml를 가하고 30분간 계속 교반하였다. 그 다음 40 ml의 물을 첨가하여 미립자 현탁액을 만든 다음 11 mm 공극 크기를 지닌 여과지에 여과시켜 미립자를 수득하였다. 상기 수득한 미립자를 다시 0.1% 폴리비닐알코올(PVA) 수용액 80 ml에 다시 분산시키고 2시간 교반하였다. 그 다음, 여과지에 여과하여 미립자를 수득한 다음 진공 조건 하에서 하루 밤 동안 건조하였다.

[0046] 건조한 각각의 미립자의 형태를 SEM(모델 JSM-5200; Jeol Inc.; 미국)을 통해 관찰하였다. 특히, 미립구 내부의 형태를 관찰하기 위해 2가지 방법을 사용하였다. 구체적으로, 첫 번째 방법은 스폰지 형상의 다공성 미립구를 금속 스터브에 고정된 양면 테이프에 분산시켰다. 그 다음, 또 다른 테이프를 이용하여 누른 후 테이프를 떼어내었다. 상기 과정을 통해 미립자의 표면층을 박리시켜 미립자의 내부를 노출시켰다. 다만, 나노 크기의 공극을

갖고 있거나, 공극을 가지지 않은 미립구의 경우 상기 첫 번째 방법으로 내부를 관찰할 수 없었다. 왜냐하면 미립자 표면층이 박리되지 않았기 때문이었다. 이러한 경우 두 번째 방법으로 미립자 샘플을 epoxy resin과 섞어 경화시킨 후, 칼을 이용하여 미립자를 절단하여 내부를 노출시켰다. 연후에 미립자 시료의 형상을 SEM을 이용하여 관찰하였다.

[0047] 도 2는 분산상에 사용된 PLGA의 용량을 0.15 g 에서 0.25, 0.35, 그리고 0.45 g으로 바꾸어 제조한 미립자들을 관찰한 SEM micrographs를 보여준다. 제조한 미립자는 훌륭한 유동성을 지니고 있음을 보여주고 있으며, 이는 곧 건조 과정 중 미립자 사이의 응집 현상이 심각하지 않았음을 증명한다. 본 실험 조건을 통해 제조한 미립자는 주로 20에서 200 ㎛ 사이의 크기를 지니고 있었다.

[0048] 도 3은 도 2에서 보여준 각각의 미립자를 확대하여 관찰한 것이다. 0.15 g의 PLGA를 사용하여 미립자를 제조한 경우 미립자 표면은 현저한 다공성을 보여주었다. 사용한 PLGA의 용량을 0.25, 0.35, 그리고 0.45 g으로 증가시켰을 때 상대적으로 다공성 정도와 기공의 숫자가 감소됨을 보여주었다. 도 4는 이들 미립자의 내부를 관찰한 SEM micrographs이다. 본 발명을 통해 제조한 미립자는 극강의 공극성을 지니며 또한 무수한 기공들이 서로 연결된 스폰지 형상을 띄고 있음을 보여주고 있다. 이러한 극강의 다공성은 기존 문헌에 보고된 다공성 PLGA들과 완전히 차별화된 모습을 보여주고 있다. 더욱이 특별한 사실은 기존의 다공성 미립자 제조기법에 필수적으로 요구되는 포로겐(porogens)을 사용하지 않고도, 그리고 W1/O/W2 유제방법보다 훨씬 간단한 o/w 유제방법을 사용하였음에도, 현저한 다공성을 확보하였다는 사실이다.

[0050] **실시예 2. 미립자의 제조**

[0051] PLGA(lactide:glycolide ratio = 75:25; inherent viscosity = 0.25 dL/g in chloroform) 0.35 g을 이소프로필 포르메이트 4, 5, 또는 6 ml에 용해시켜 분산상을 제조하였다. 상기 분산상을 0.5% (w/v) 폴리비닐 알코올 (분자량 = 25,000 g/mol; 가수분해 정도 = 88%) 수용액 40 ml에 분산시키고 자력 교반기를 사용하여 450 rpm에서 3분 동안 교반시켜 유화하여 유제를 제조하였다. 그 다음 상기 유제에 암모니아수(암모니아 농도 28%)를 3, 3.5, 또는 4.1 ml을 가하고 30분간 계속 교반하였다. 그 다음 40 ml의 물을 첨가하여 미립자 현탁액을 만든 다음 11 ㎛ 공극 크기를 지닌 여과지에 여과시켜 미립자를 수득하였다. 상기 수득한 미립자를 다시 0.1% 폴리비닐 알코올 수용액 80 ml에 다시 분산시키고 2시간 교반하였다. 그 다음, 여과지에 여과하여 미립자를 수득한 다음 진공 조건 하에서 하루 밤 동안 건조하였다.

[0052] 도 5는 0.35 g의 PLGA를 가용화시키기 위하여 사용한 이소프로필 포르메이트의 용량과 암모니아수 용량에 따라 미립자 표면의 공극성이 변화함을 보여주고 있다. 이소프로필 포르메이트의 사용량을 늘리면서 동시에 암모니아수 사용 용량을 늘려주었을 때 미립자 표면의 공극성 정도와 기공의 숫자가 늘어가는 경향을 나타내었다. 마찬가지로 해당 미립자 표면층을 분리시킨 후 내부의 다공성을 비교하였을 때에도 동일한 현상을 나타내었다(도 6).

[0054] **실시예 3. 미립자의 제조**

[0055] PLGA(lactide:glycolide ratio = 75:25; inherent viscosity = 0.25 dL/g in chloroform) 0.25 g을 이소프로필 포르메이트 4 ml에 용해시켜 분산상을 제조하였다. 상기 분산상을 0.5% (w/v) 폴리비닐 알코올 (분자량 = 25,000 g/mol; 가수분해 정도 = 88%) 수용액 40 ml에 분산시키고 자력 교반기를 사용하여 450 rpm에서 3분 동안 교반시켜 유화하여 유제를 제조하였다. 그 다음 상기 유제에 암모니아수 (암모니아 농도 28%)를 3, 5, 7, 또는 9 ml을 가하고 30분간 계속 교반하였다. 그 다음 40 ml의 물을 첨가하여 미립자 현탁액을 만든 다음 11 ㎛ 공극 크기를 지닌 여과지에 여과시켜 미립자를 수득하였다. 상기 수득한 미립자를 다시 0.1% 폴리비닐 알코올 수용액 80 ml에 다시 분산시키고 2시간 교반하였다. 그 다음, 여과지에 여과하여 미립자를 수득한 다음 진공 조건 하에서 하루 밤 동안 건조하였다.

[0056] 도 7에서는 PLGA와 이소프로필 포르메이트의 사용량을 고정하여 o/w 유제를 제조한 후 첨가하는 암모니아수의 사용량에 따라 미립자 표면의 공극성과 기공 숫자를 조절할 수 있음을 보여주고 있다. 예를 들어 적가하는 암모니아수의 용량을 3 ml에서 9 ml로 증가시켜주었을 때 미립자 표면의 다공성은 현저히 증가하였다. 도 8에서 나타나 있듯이, 미립자 내부의 다공성 역시 암모니아수의 사용량에 따라 증가하였다.

[0058] **실시예 4. 미립자 제조**

[0059] PLGA(lactide:glycolide ratio = 65:35; inherent viscosity = 0.49 dL/g in chloroform) 0.15, 0.25, 0.35 또는 0.45 g을 이소프로필 포르메이트 4 ml에 용해시켜 분산상을 제조하였다. 상기 분산상을 0.5% (w/v) 폴리비닐 알코올 (분자량 = 25,000 g/mol; 가수분해 정도 = 88%) 수용액 40 ml에 분산시키고 자력 교반기를 사용하여 450 rpm에서 3분 동안 교반시켜 유화하여 유제를 제조하였다. 그 다음 상기 유제에 암모니아수(암모니아 농도 28%)를 3 ml을 가하고 30분간 계속 교반하였다. 그 다음 40 ml의 물을 첨가하여 미립자 현탁액을 만든 다음 11 mm 공극 크기를 지닌 여과지에 여과시켜 미립자를 수득하였다. 상기 수득한 미립자를 다시 0.1% 폴리비닐 알코올 수용액 80 ml에 다시 분산시키고 2시간 교반하였다. 그 다음, 여과지에 여과하여 미립자를 수득한 다음 진공 조건 하에서 하루 밤 동안 건조하였다.

[0060] 도 9은 상기의 조건에서 각각 제조한 미립자의 표면을 보여주는 SEM 사진이다. 미립자 제조를 위해 사용한 PLGA의 용량을 0.15 g에서 0.25, 0.35, 그리고 0.45 g으로 증가시켜주었을 때 미립자 표면의 다공성은 점차 감소되는 현상을 보여주었다. 이러한 경향은 도 3에서 나타난 결과와 같다. 다만, 도 3에서 보여준 미립자는, 도 9에서 보여준 미립자에 비하여, 상대적으로 저분자량의 PLGA 소재를 사용하여 제조된 것이다. 즉 본 발명에 따라 제조한 미립자의 표면 다공성은 분산상을 구성하는 PLGA 용량뿐만 아니라 PLGA 소재의 분자량과 같은 특성에 의해서도 제어될 수 있음을 보여준다. 도 10은 도 9에서 보여준 미립자들의 내부 SEM 사진을 보여주고 있다. 테이프를 이용하여 이들 미립자의 표면을 쉽게 박리할 수 없었기 때문에 칼을 사용하여 절단해 미립자의 내부를 노출시켜 관찰한 것이다. 미립자의 표면과 마찬가지로 분산상을 구성하기 위해 사용한 PLGA 용량이 미립자의 내부 다공성에 큰 영향을 끼침을 확인할 수 있었다. 도 4에 나타난 결과와 비교하여 보았을 때, PLGA 자체의 특성(예를 들어, 점도/분자량) 역시 미립자 내부의 다공성 정도를 결정짓는 주요한 요인임을 알 수 있었다.

[0062] 도 1 내지 도 10에 나타난 결과를 종합하여 볼 때 다음과 같은 결론을 도출할 수 있다. 유제를 형성한 후 분산상에서 발생하는 이소프로필 포르메이트 분해 반응에 영향을 미치는 인자들과 분산상의 특성에 따라 미립자의 공극성과 다공성이 결정됨을 알 수 있다. 첫 번째 주요인자는 PLGA의 사용량이다. 암모니아수와 이소프로필 포르메이트의 사용량을 고정한 조건에서 PLGA 용량을 증가하면 할수록 분산상의 점도가 증가된다. 이에 따라 가암모니아 반응이 상대적으로 억제되고 반응분해산물이 분산상 전체에서 골고루 쉽게 분산되어지는 경향이 감소된다. 그러므로 분산상 내에서 PLGA-rich domains과 PLGA-rich domains들이 쉽게 분리되어지지 않는 관계로 다공성과 공극성이 저하되는 것이다. 마찬가지로 PLGA, 암모니아수, 그리고 이소프로필 포르메이트의 사용량을 고정하더라도 사용한 PLGA 분자량을 증가시키면 상기와 동일한 효과가 발생되어진다. 그러므로 저분자량의 PLGA를 사용하게 되면, 고분자량의 PLGA를 사용한 경우보다, 가암모니아 반응이 잘 발생하며 분해산물들이 쉽게 분산상으로 흩어져 궁극적으로 수상으로 빠져나오기 때문에 다공성과 공극성이 증대된다. 둘째로 PLGA와 암모니아수의 사용 용량을 고정한 채로 분산상을 제조하기 위한 이소프로필 포르메이트의 사용량을 증가시킬수록 제조한 분산상의 점도는 감소하게 된다. 이것 역시 가암모니아반응 조건을 수월하게 해주며 동시에 가암모니아분해산물들이 쉽게 분산상으로 퍼지고 나중에 수상으로 빠져나옴에 따라 미립자의 다공성과 공극성이 향진되는 것이다. 마찬가지로 PLGA 사용량을 고정시킨 후 이소프로필 포르메이트의 사용량을 증가시키고 동시에 암모니아수의 사용량을 증가시키면, 위에서 설명한 기전에 따라, 미립자의 다공성과 공극성이 증진되어짐을 알 수 있다. 상기에서 언급한 여러 가지 요인들을 조절함으로서 미립자의 다공성과 공극성을 제어할 수 있음을 본 발명을 통하여 제시하고 있다.

[0064] **실시예 5. 다공성 미립자의 자발적 공극 폐쇄 기능성 평가**

[0065] 먼저 상기 실시예 3에서 제조한 미립자(0.25 g의 PLGA를 4 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹여 분산상을 만들고 이를 수상에 유화시킨 후 3 ml의 암모니아수를 가하여 제조한 것) 50 mg을 37, 또는 41.7 로 맞춘 0.5% 폴리비닐 알코올 수용액 30 ml에 분산시켰다. 자력 교반기를 사용하여 부드럽게 교반하면서 0.5, 1, 및 2 시간마다 여과지를 사용하여 미립자를 회수한 후 진공 하에서 밤새 건조시켰다. 이들 미립자 시료들의 내부 및 외부 형상을 앞서 언급한 방법을 통하여 SEM으로 관찰하였다.

[0066] 도 11에서는 37 ° C 조건에서 시간의 경과에 따른 미립자 표면의 변화를 보여주고 있다. 미립자의 표면에 존재하는 기공들은 시간이 경과함에 따라 점점 닫히는 양상을 나타내었다. 미립자 표면뿐만 아니라 미립자 내부에 존재하는 수많은 공극들과 기공들 역시 폐쇄되는 양상을 보여주었다 (도 12). 수용액 온도를 41.7 ° C로 올려주

었을 때 미립자 표면 및 내부의 공극과 기공들이 폐쇄되는 속도가 빨라져 2시간이 경과하였을 때 내외부 공극과 기공들이 완전히 닫히는 기능성을 보여주었다 (도 13, 도 14). 본 발명에서 제조한 스폰지 형상의 다공성 PLGA 미립자는 차별화된 제조공정으로, 포로겐(porogens)의 사용없이, 극강의 다공성과 수많은 공극들이 서로 연결된 스폰지 형상을 갖추고 있다. 더욱이, 도 11, 12, 13, 그리고 14에서 나타나듯이, 이들 미립자를 유기용매를 포함하지 않는 100% 수용액에 분산시켜 놓았을 때, 표면과 내부에 존재하는 공극들이 서서히 자발적으로 닫히는 기능성을 지니고 있다. 그리고 이러한 자발적 자기폐쇄 기능은 온도에 따라 그 속도를 조절할 수 있음을 제시하였다.

[0068] **실시예 6. FITC-덱스트란을 이용한 봉입 양상 확인**

[0069] 상기 실시예 3에서 제조한 미립자(0.25 g의 PLGA를 4 ml의 이소프로필 포르메이트에 녹여 분산상을 만들고 이를 수상에 유화시킨 후 7 ml의 암모니아수를 가하여 제조한 것) 10 mg을 8 mg/ml의 FITC-dextran(분자량 = 40,000 g/mol)이 포함된 0.2% Tween 80 수용액 100 ml에 분산시키고 4 에서 하룻밤 동안 방치하였다. 그 다음, 미립자 현탁액의 온도를 41 로 맞춘 후 2시간 동안 방치하였다. 연후에 여과하면서 물로 세척한 후 수득한 미립자를 형광현미경(fluorescence microscope)과 공초점 레이저 주사현미경(모델 LSM 5140 Meta Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)을 사용하여 관찰하였다. 첫째로, Axiovert 200 반전 형광 현미경 (칼짜이쯔, 독일)을 사용하여 494 nm의 빛을 주사하여 514 nm의 형광을 측정하여 시료의 형광 이미자를 얻었다(도 15). 1 시간 지났을 때 미립자는 형광 강도를 나타내었고, 2 시간이 경과하였을 때에는 더욱 더 강한 형광 강도를 나타내었다. 형광현미경 관찰 이전에 시료를 물로서 충분히 세척하였기 때문에 미립자 내에 봉입되지 않고 미립자 표면에 존재하는 FITC-dextran에 의한 형광강도는 아닌 것으로 판단되었다. 즉 미립자가 수용액에서 자발적으로 공극들이 폐쇄되면서 수용액에 녹아있는 FITC-dextran이 미립자 내로 봉입됨에 따라 그러한 결과가 나타난 것이다. 두 번째로 공초점 레이저 주사현미경 이미지를 얻기 위해 488 nm의 아르곤 레이져 광을 자발적 공극 폐쇄 기능을 가진 미립자 시료에 주사하고, 520 nm의 형광을 방출 필터를 통해 수집하였다. 도 16에서 나타난 것처럼 미립자 현탁액의 41 ° C 노출 시간이 경과함에 따라 미립자는 자발적인 공극 폐쇄 기능성을 보여주었고, 이러한 과정을 통해 FITC-dextran이 봉입되어짐을 증명할 수 있었다. 이러한 결과는 자발적 공극 폐쇄 기능을 가진 스폰지 형상의 다공성 PLGA 미립자는 다양한 약물 및 바이오분자 또는 고체 나노파티클과 같은 넓은 범위의 유효성분을 봉입할 수 있는 능력이 있음을 보여준다(도 17). 특히 유기용매 등을 사용하지 않고 100% 수상 조건에서 여러 종류의 유효성분들을 미리 제조한 스폰지 형상의 다공성 PLGA 미립자에 봉입할 수 있다

[0071] **실시예 7. 에틸 셀룰로오즈를 고분자 화합물로 사용한 본 발명에 따른 다공성 미립구 제조**

[0072] 에틸 셀룰로오즈는 톨루엔/에탄올(toluene/ethanol) 5%에서 점도가 10 cP인 것을 사용하였다.

[0073] 에틴 셀룰로오즈는 0.25g을 이소프로필 포르메이트 4 ml에 vortexing (Vortex GENIE 2, Scientific Industries, New York, USA)을 이용하여 2시간 동안 녹였다. 이를 0.5% PVA 용액 40 ml이 담긴 비커에 가하여 450 rpm으로 교반기 (800 series, VWR scientific, Radnor, PA, USA) 를 이용하여 3분간 교반하였다. 그 후 28% 암모니아 수용액 3ml을 첨가하여 30분간 교반하였으며, 40 ml의 증류수를 넣고 5분이 지났을 때 여과하였다. 여과지에 남은 미립구를 0.1% PVA 80 ml에 재분산하여 2시간동안 450 rpm으로 교반한 후 미립자를 여과를 통해 회수하여 진공건조하였다. 이들 미립자의 내부외부 형상을 SEM을 통하여 관측하였고, 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0074] 도 18에서 확인할 수 있는 바와 같이, 에틸 셀룰로오스를 고분자 화합물로서 사용하여 본 발명에 따른 미립구를 제조하는 경우에도, 극강의 다공성과 수많은 공극들이 서로 연결된 스폰지 형상을 갖추고 있었다.

[0076] **실시예 8. 폴리카프로락톤을 고분자 화합물로 이용한 사용한 본 발명에 따른 다공성 미립구 제조**

[0077] 폴리카프로락톤은 평균 중량분자량(M_w)이 14,000이고 평균 수량분자량(M_n)이 10,000인 것을 Sigma-Aldrich(Saint Louis, MO, USA) 로부터 구매하였다

[0078] 폴리카프로락톤 0.25g을 이소프로필 포르메이트 4 ml에 vortexing (Vortex GENIE 2, Scientific Industries, New York, USA)을 이용하여 2시간동안 녹였다. 이를 0.5% PVA 용액 40 ml이 담긴 비커에 가하여 450 rpm으로

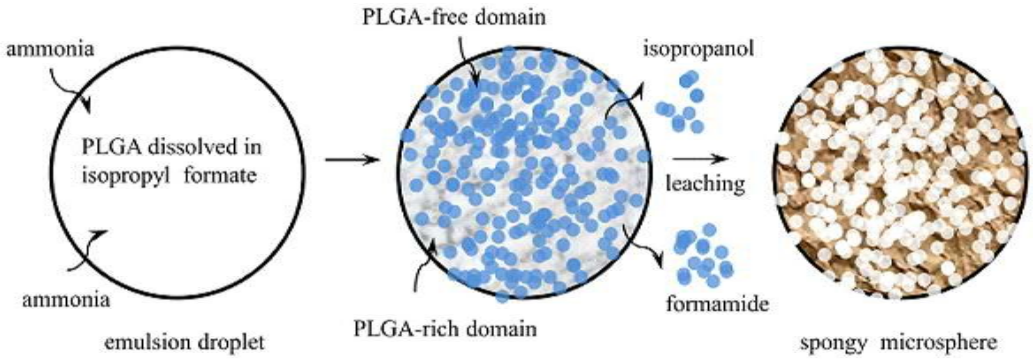
교반기 (800 series, VWR scientific, Radnor, PA, USA) 를 이용하여 3분간 교반하였다. 그 후 28% 암모니아 수용액 3 ml을 첨가하여 30분간 교반하였으며, 40 ml의 증류수를 넣고 5분이 지났을 때 여과하였다. 여과지에 남은 미립구(microsphere)를 0.1% PVA 80 ml에 재분산하여 2시간동안 450 rpm으로 교반한 후 미립자를 여과를 통해 회수하여 진공건조하였다. 이들 미립자의 내부외부 형상을 SEM을 통하여 관찰하였고, 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0079] 도 19에서 확인할 수 있는 바와 같이, 폴리카프로락톤을 고분자 화합물로서 사용하여 본 발명에 따른 미립구를 제조하는 경우에도, 극강의 다공성과 수많은 공극들이 서로 연결된 스폰지 형상을 갖추고 있었다.

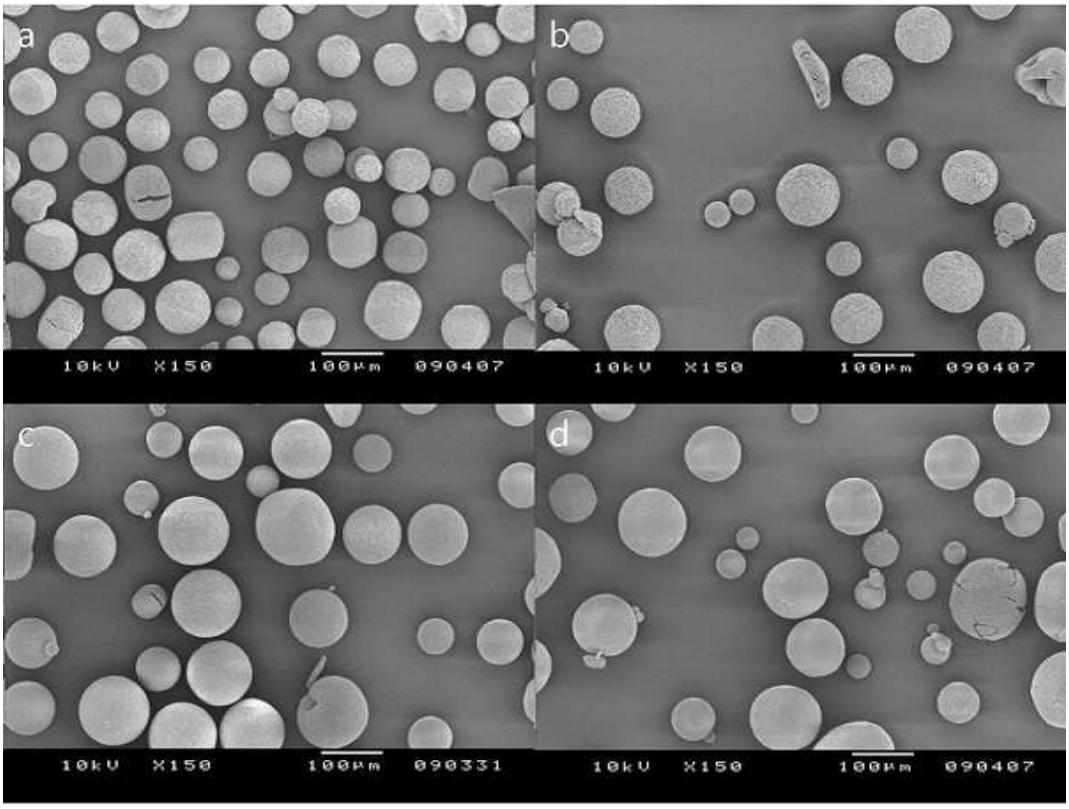
[0080] 이러한 결과들은 생분해성 PLGA 계통의 고분자뿐만 아니라 미립구를 형성하는 다른 종류의 소수성 고분자 화합물을 사용하더라도 본 발명을 활용하는 경우 극강의 다공성을 지닌 미립자를 손쉽게 제조할 수 있음을 나타낸다.

도면

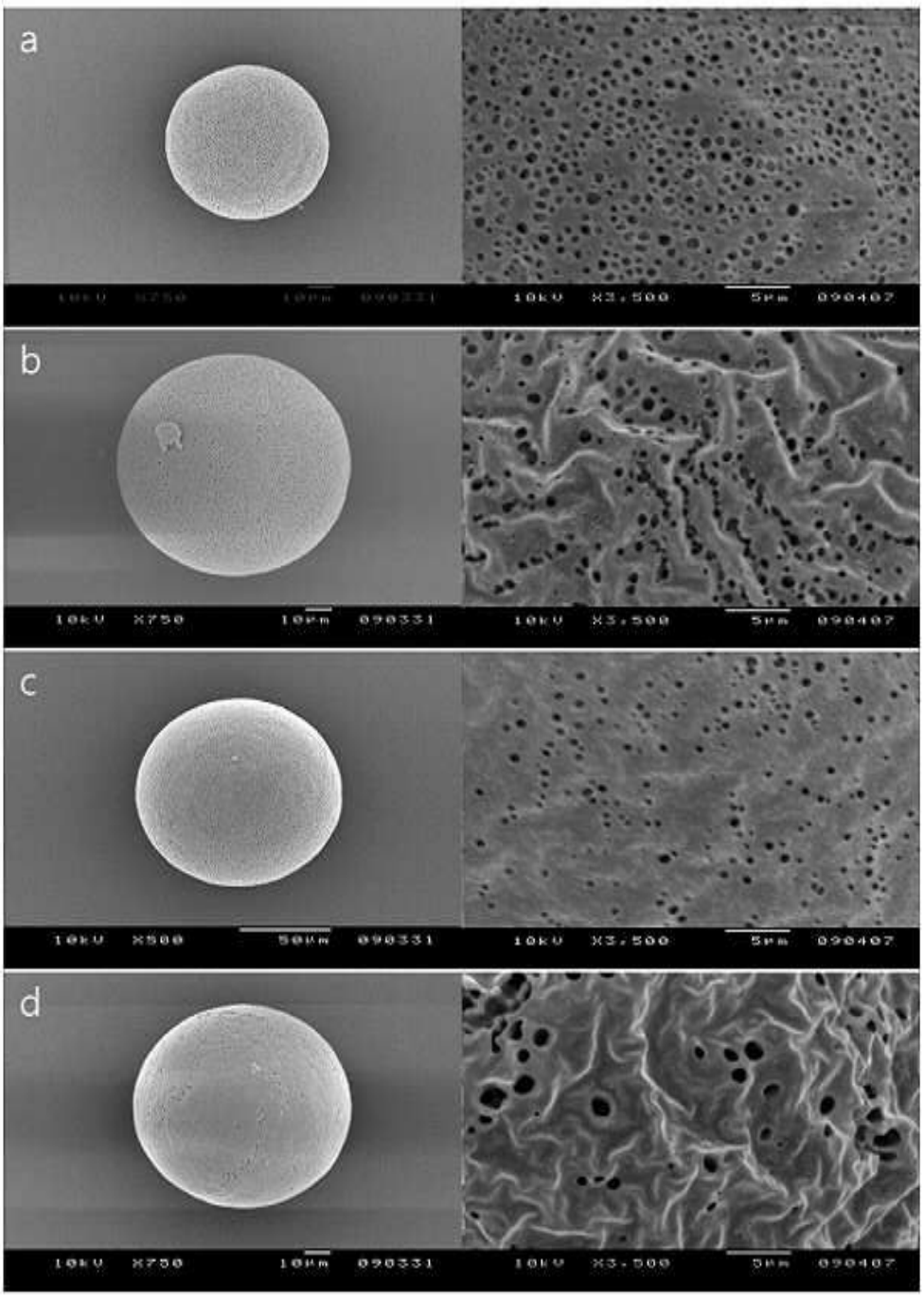
도면1



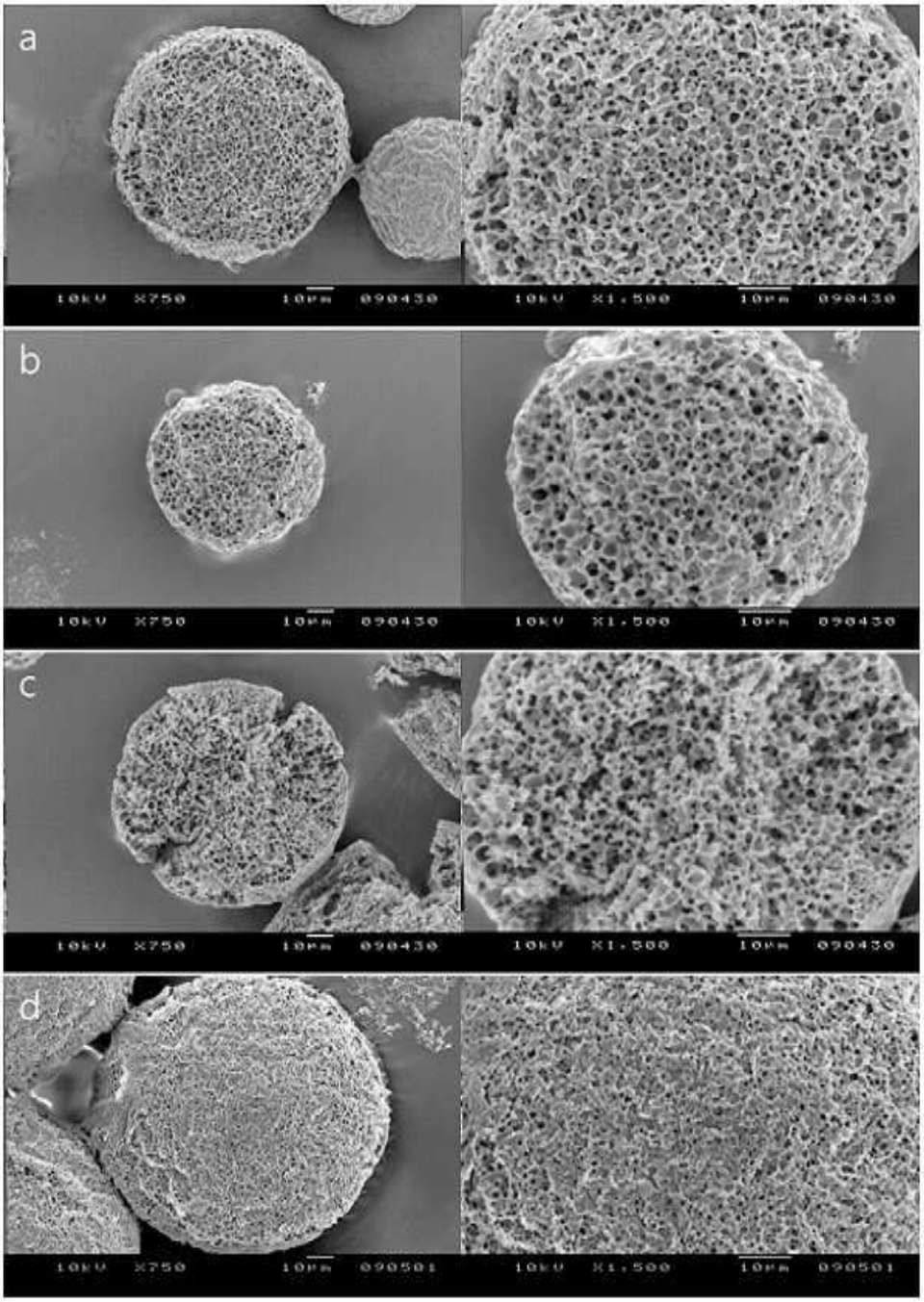
도면2



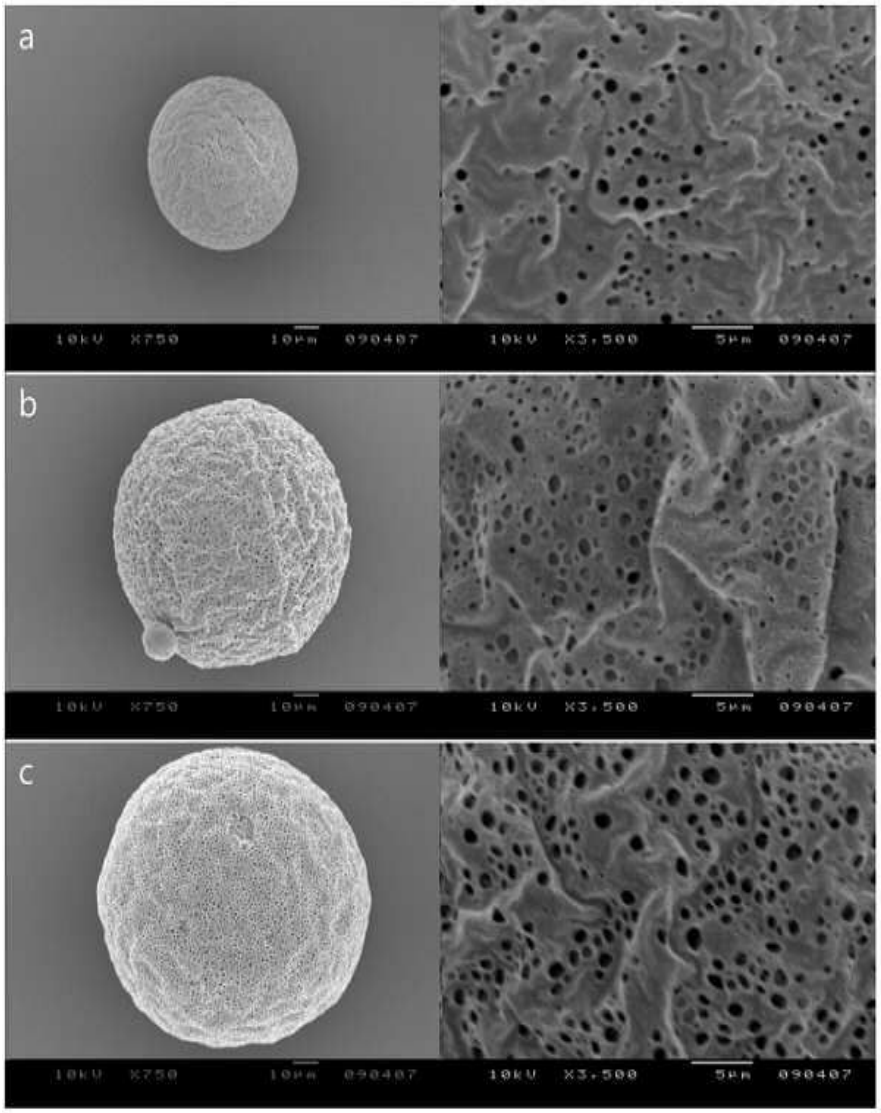
도면3


a
10kV X3,500 5μm 090407
b
10kV X750 10μm 090331
10kV X3,500 5μm 090407
c
10kV X500 50μm 090331
10kV X3,500 5μm 090407
d
10kV X750 10μm 090331
10kV X3,500 5μm 090407

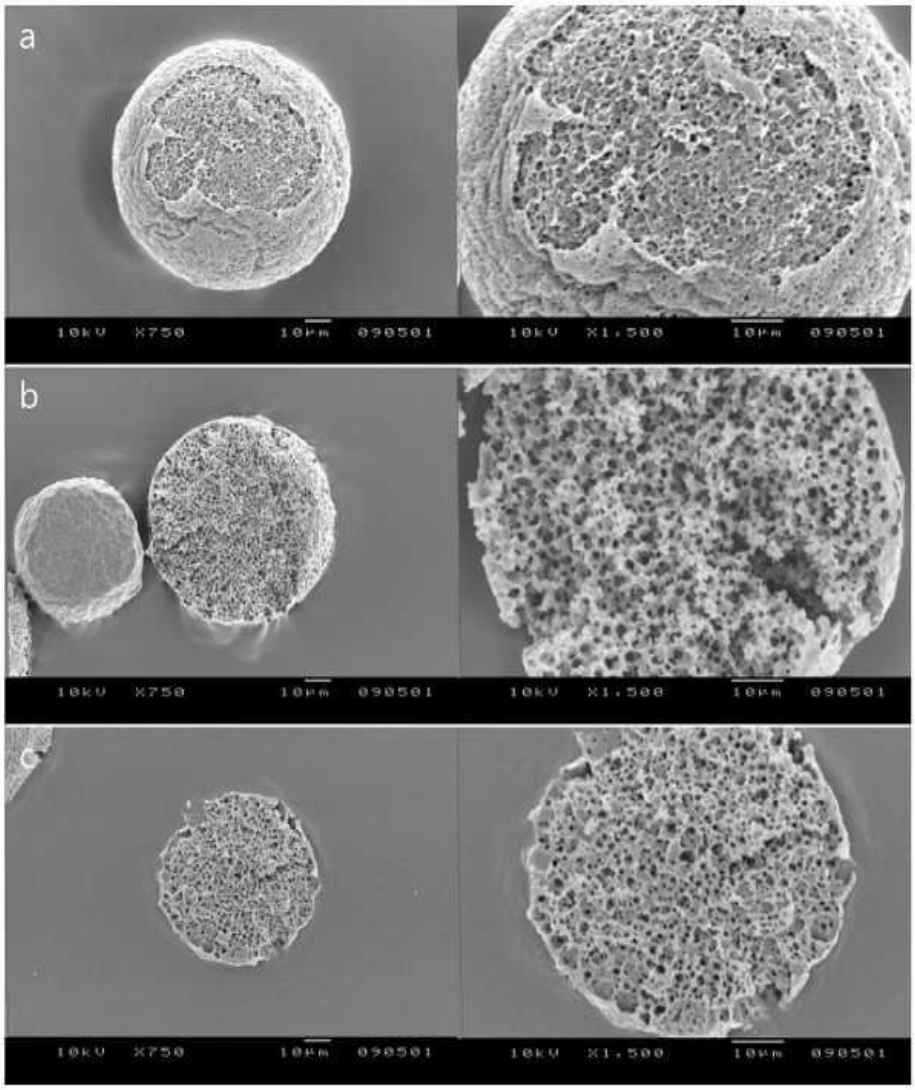
도면4


a
10kV X750 10μm 090430
10kV X1,500 10μm 090430
b
10kV X750 10μm 090430
10kV X1,500 10μm 090430
c
10kV X750 10μm 090430
10kV X1,500 10μm 090430
d
10kV X750 10μm 090501
10kV X1,500 10μm 090501

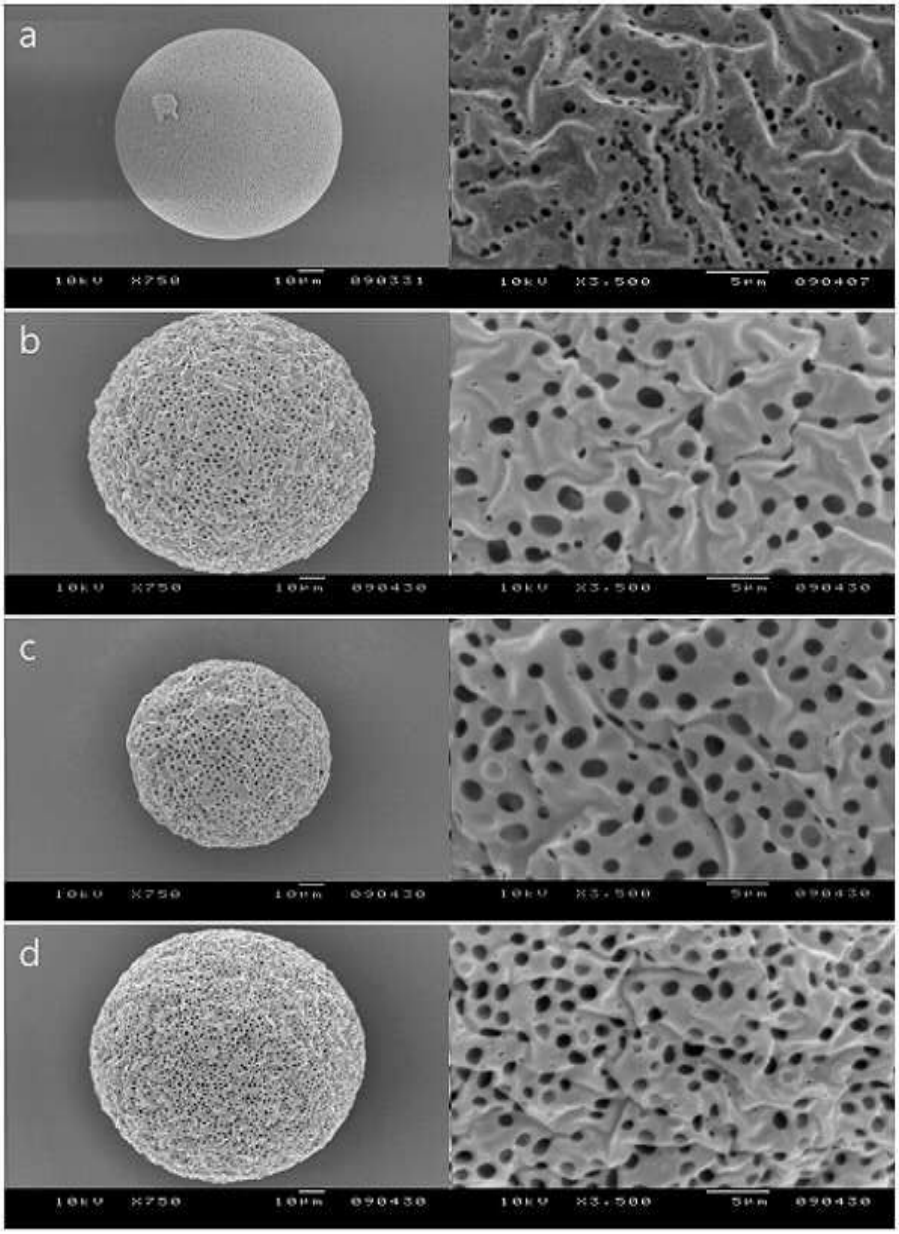
도면5


a
10kV X750 10μm 090407
10kV X3,500 5μm 090407
b
10kV X750 10μm 090407
10kV X3,500 5μm 090407
c
10kV X750 10μm 090407
10kV X3,500 5μm 090407

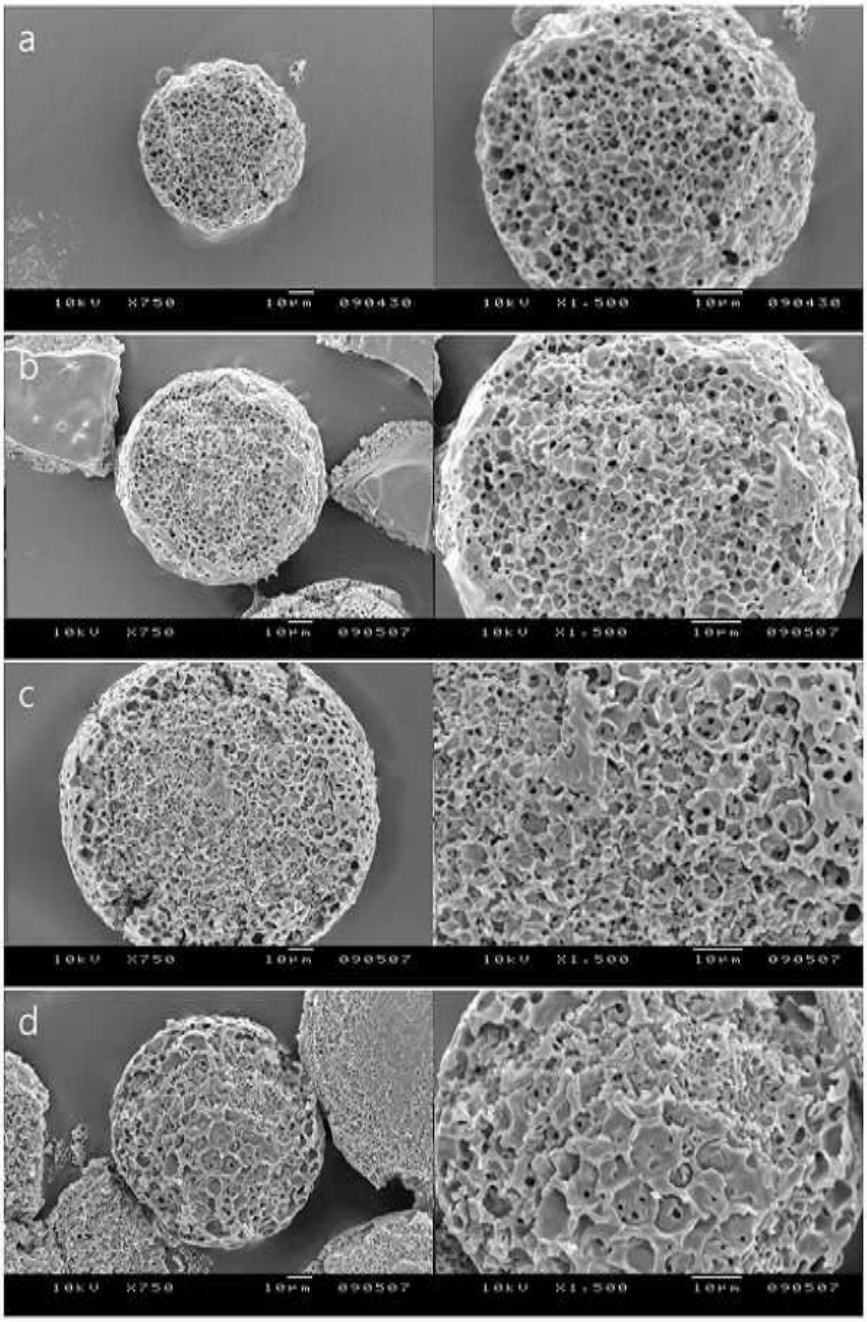
도면6


a
10kV X750 10μm 090501
10kV X1,500 10μm 090501
b
10kV X750 10μm 090501
10kV X1,500 10μm 090501
c
10kV X750 10μm 090501
10kV X1,500 10μm 090501

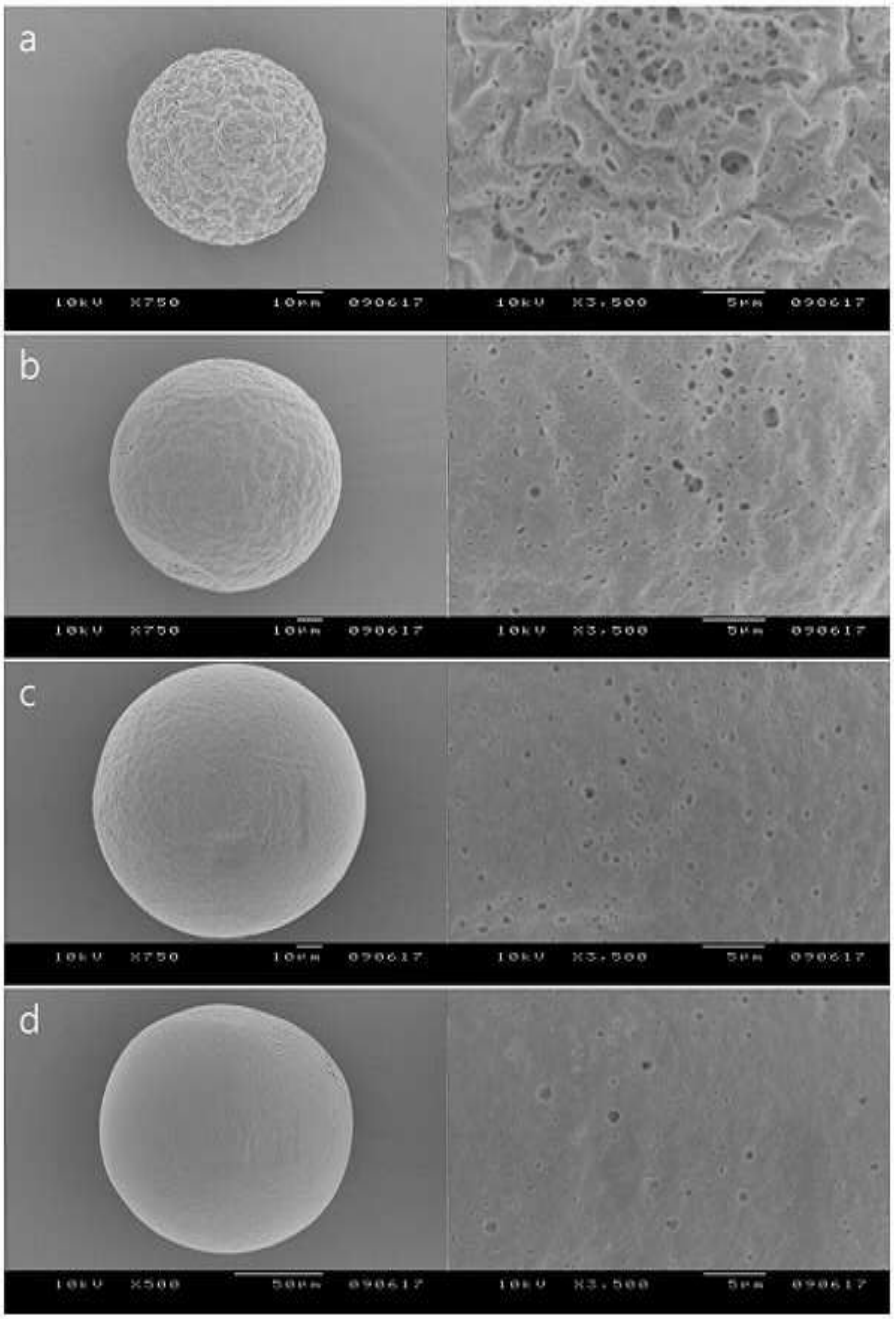
도면7


a
10kV X750 10μm 090331
10kV X3,500 5μm 090407
b
10kV X750 10μm 090430
10kV X3,500 5μm 090430
c
10kV X750 10μm 090430
10kV X3,500 5μm 090430
d
10kV X750 10μm 090430
10kV X3,500 5μm 090430

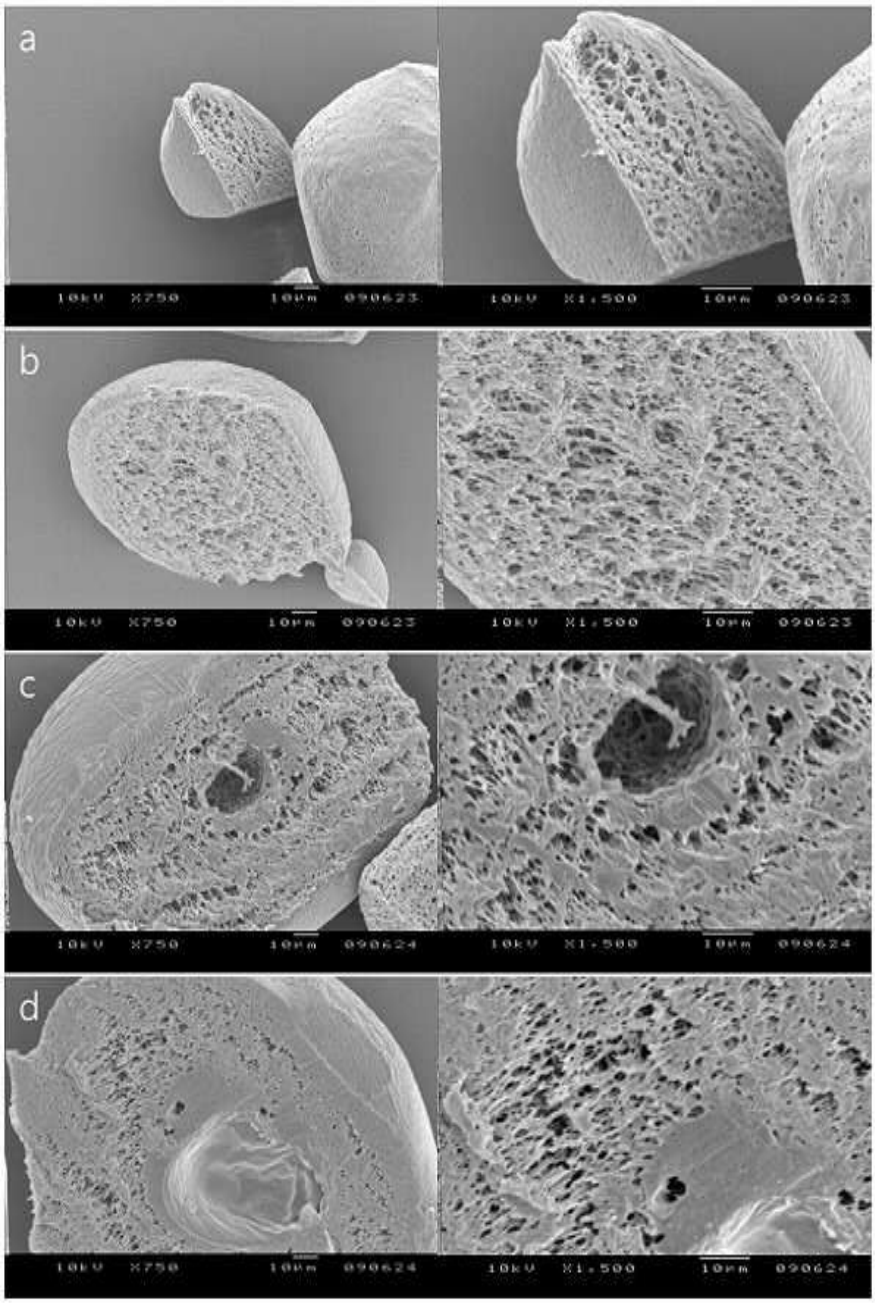
도면8


a
10kV X750 10μm 090430
10kV X1,500 10μm 090430
b
10kV X750 10μm 090507
10kV X1,500 10μm 090507
c
10kV X750 10μm 090507
10kV X1,500 10μm 090507
d
10kV X750 10μm 090507
10kV X1,500 10μm 090507

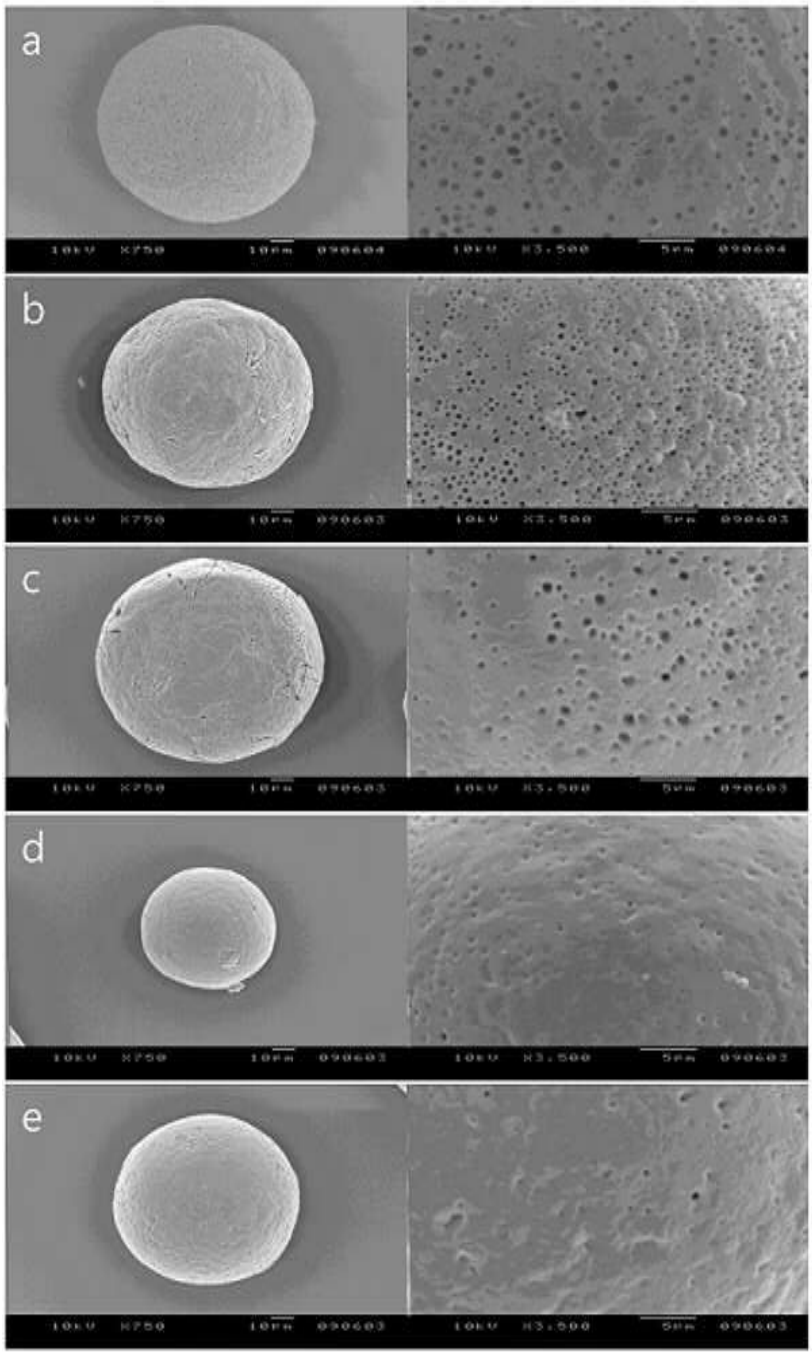
도면9


a
10kV X750 10μm 090617
10kV X3,500 5μm 090617
b
10kV X750 10μm 090617
10kV X3,500 5μm 090617
c
10kV X750 10μm 090617
10kV X3,500 5μm 090617
d
10kV X500 50μm 090617
10kV X3,500 5μm 090617

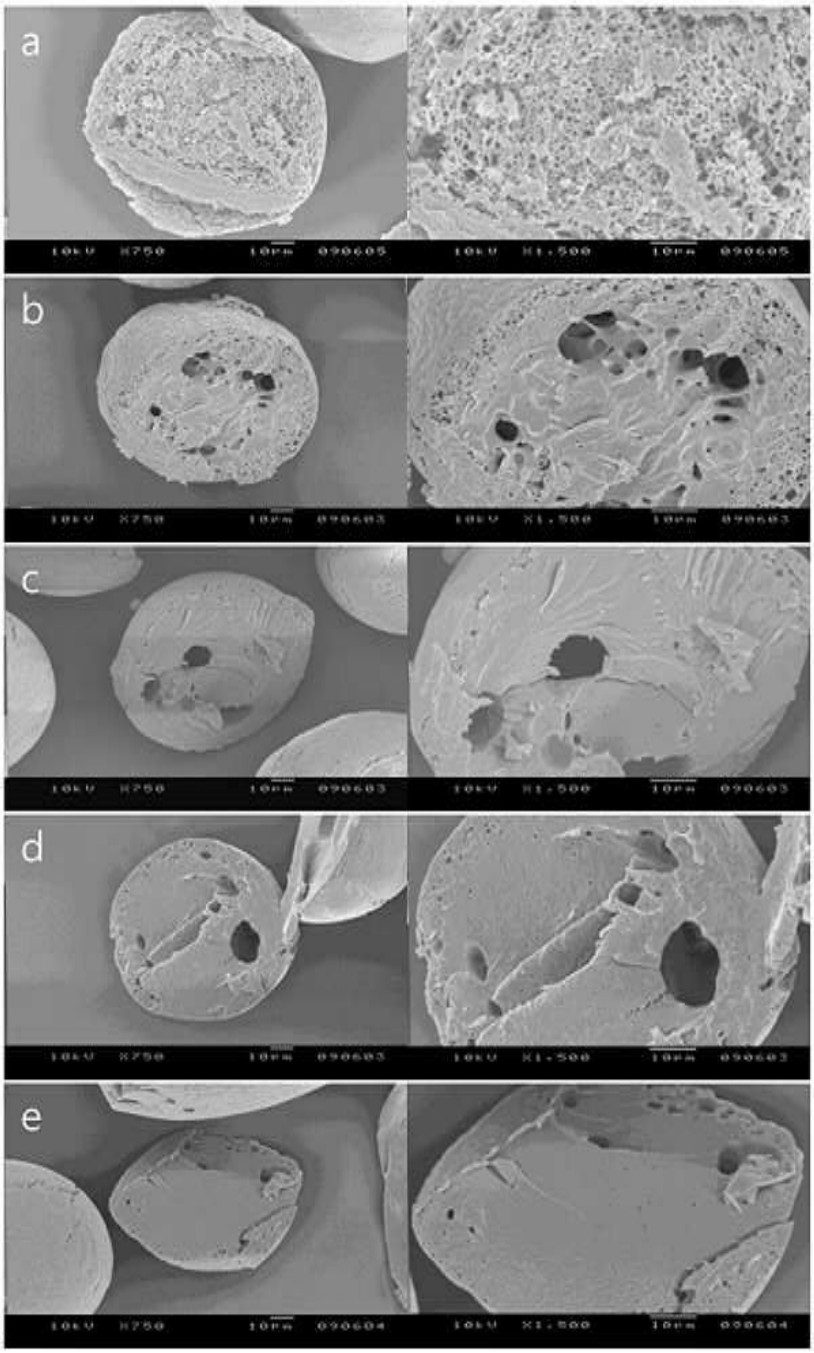
도면10


a
10kV X750 10μm 090623
10kV X1,500 10μm 090623
b
10kV X750 10μm 090623
10kV X1,500 10μm 090623
c
10kV X750 10μm 090624
10kV X1,500 10μm 090624
d
10kV X750 10μm 090624
10kV X1,500 10μm 090624

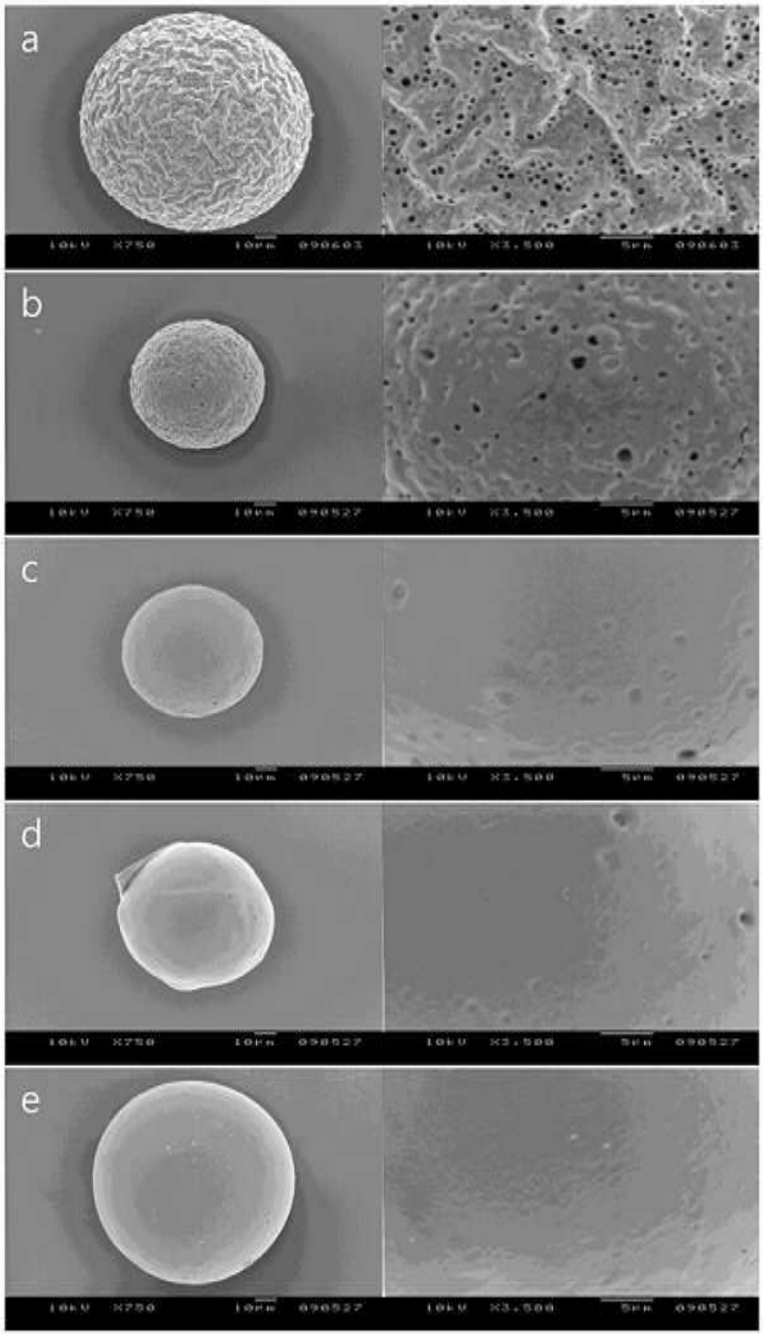
도면11



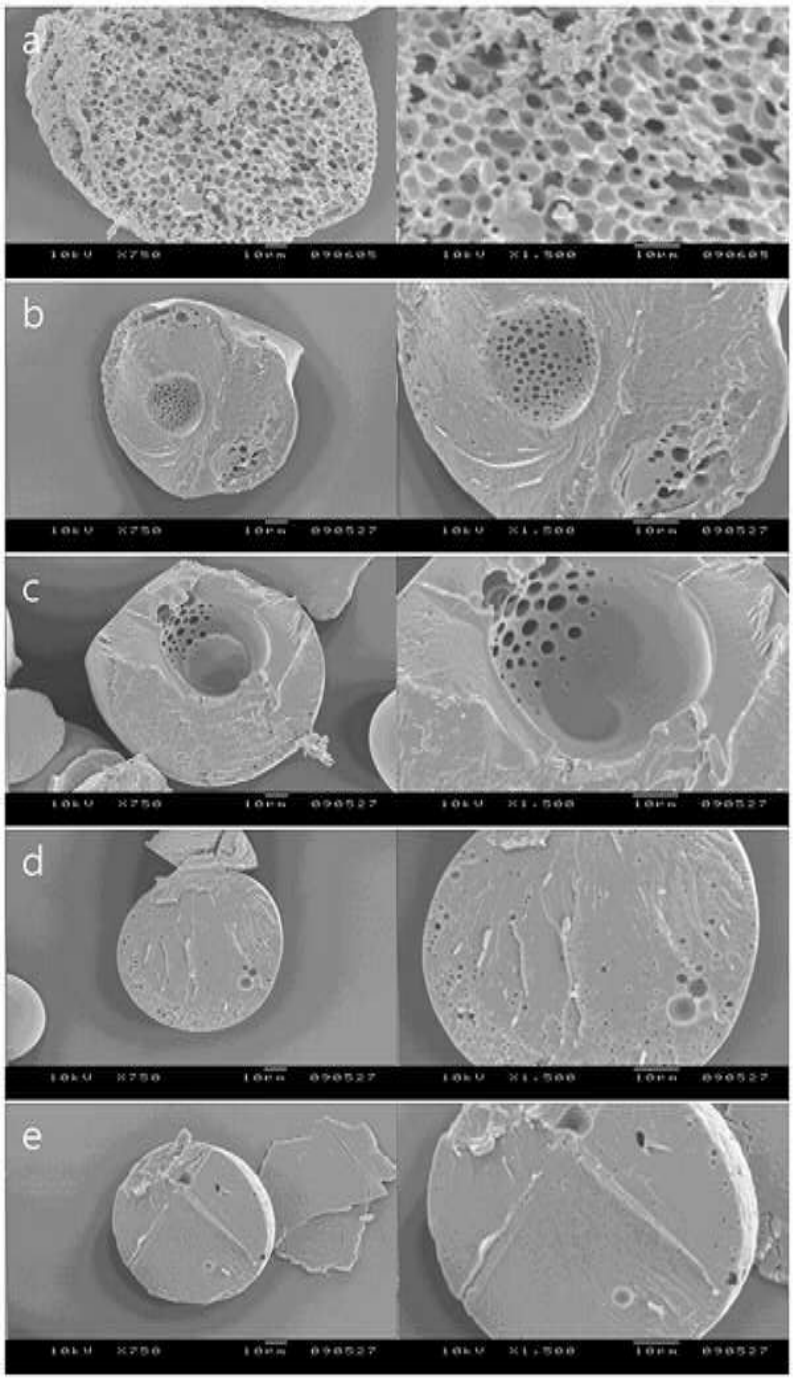
도면12



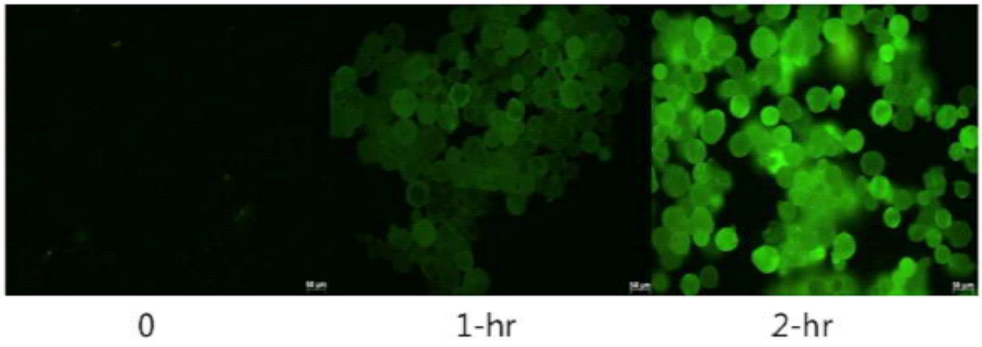
도면13



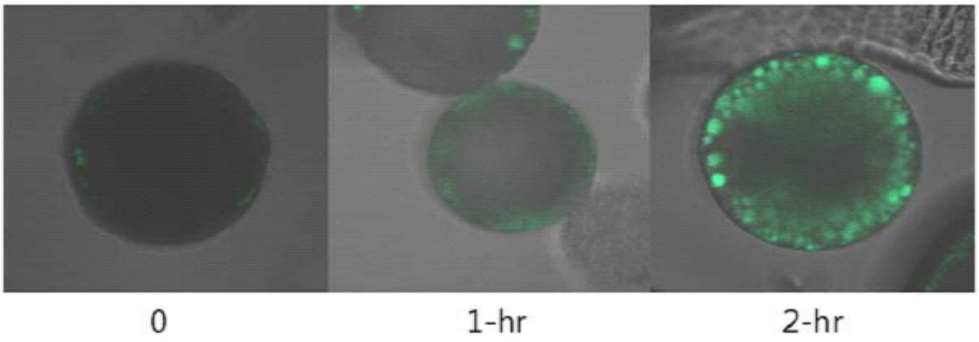
도면14



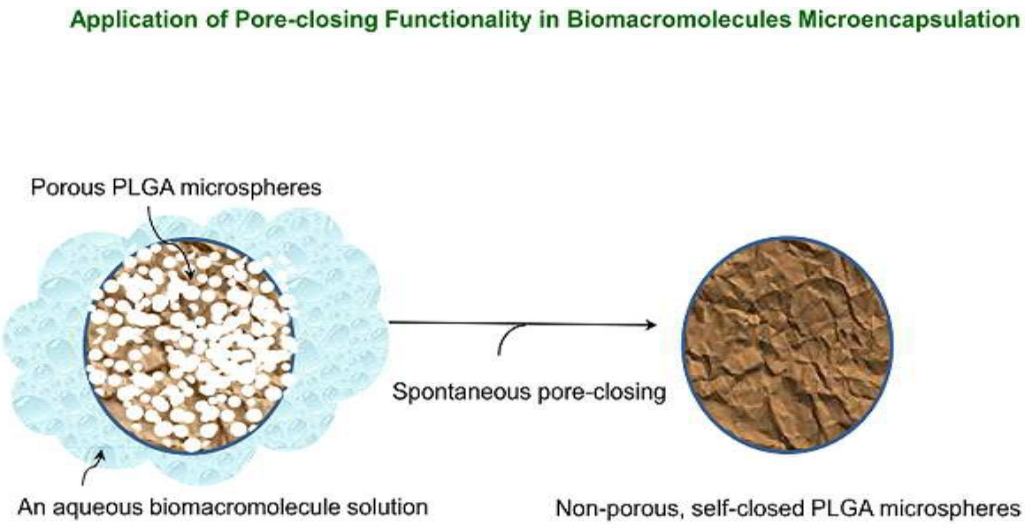
도면15



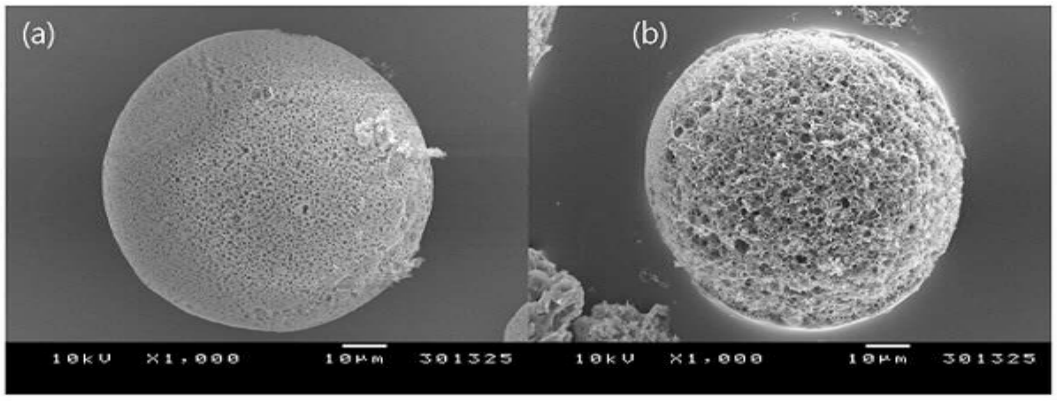
도면16



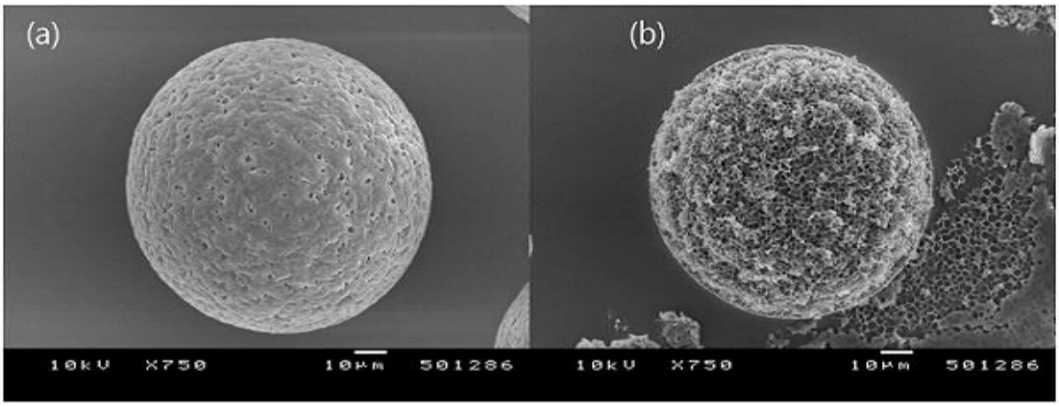
도면17



도면18


(a)
(b)
10kV X1,000 10μm 301325
10kV X1,000 10μm 301325

도면19


(a)
(b)
10kV X750 10μm 501286
10kV X750 10μm 501286