



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월31일

(11) 등록번호 10-2072252

(24) 등록일자 2020년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/64 (2006.01) *A61K 38/13* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7016151

(22) 출원일자(국제) 2012년11월14일

심사청구일자 2017년11월13일

(85) 번역문제출일자 2014년06월13일

(65) 공개번호 10-2014-0101790

(43) 공개일자 2014년08월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/064985

(87) 국제공개번호 WO 2013/074608

국제공개일자 2013년05월23일

(30) 우선권주장

61/559,830 2011년11월15일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US06486124 B2*

KR1019910002902 A

KR1020010041094 A

JP2002503703 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

알러간, 인코포레이티드

미합중국92612

캘리포니아알바인두폰트드라이브2525

(72) 발명자

우, 커

미합중국 캘리포니아주 92606, 알바인, 메이텐 애비뉴 14881

스미스, 스코트, 더블유.

미합중국 캘리포니아주 92692, 미션 비에조, 윈드스웨트 웨이 45

(74) 대리인

양영준, 김영

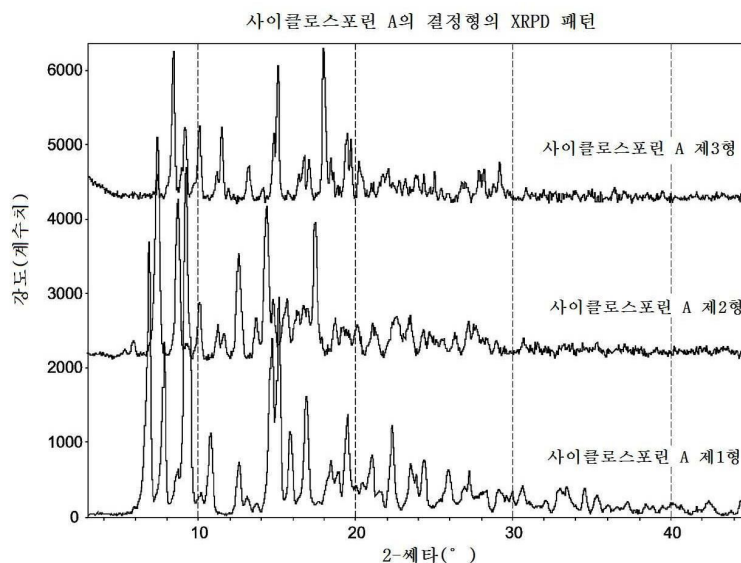
전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 사이클로스포린 A 제2형 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 명세서에는 사이클로스포린 A 제2형을 얻는 방법이 개시되어 있다.

대표도

명세서

청구범위

청구항 1

결정형의 사이클로스포린 A를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은,

- a) 아세토나이트릴, 1,4-다이옥산 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택된 성분과 물을 포함하는 용매 중에 사이클로스포린 A의 현탁액을 준비하는 단계;
- b) 상기 현탁액을 5℃ 내지 50℃의 온도로 가열하고 나서 해당 현탁액을 1℃ 내지 35℃의 온도로 냉각시키는 것을 포함하는 제1의 가열-냉각 사이클;
- c) 상기 현탁액을 5℃ 내지 50℃의 온도로 가열하고 나서, 해당 현탁액을 1℃ 내지 35℃의 온도로 냉각시키는 것을 포함하는 제2의 가열-냉각 사이클; 및
- d) 상기 현탁액을 5℃ 내지 50℃의 온도로 가열하고 나서, 해당 현탁액을 1℃ 내지 35℃의 온도로 냉각시키는 것을 포함하는 제3의 가열-냉각 사이클을 포함하는, 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 용매는 물 및 아세토나이트릴을 포함하며, 여기서 상기 용매 중 물의 물분율은 0.8 내지 1.0일 수 있는 것인, 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 용매 중 물의 물분율은 0.87인 것인, 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 용매는 물 및 1,4-다이옥산을 포함하며, 여기서 상기 용매 중 물의 물분율은 0.8 내지 1.0일 수 있는 것인, 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 용매 중 물의 물분율은 0.90인 것인, 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 용매는 물 및 에탄올을 포함하며, 여기서 상기 용매 중 물의 물분율은 0.8 내지 1.0일 수 있는 것인, 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 용매 중 물의 물분율은 0.89인 것인, 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1, 제2 또는 제3의 가열-냉각 사이클은, 상기 현탁액을 분당 0.05℃ 내지 2℃의 속도로 5℃ 내지 50℃의 온도로 가열하고 나서, 상기 현탁액을 분당 0.01℃ 내지 1℃의 속도로 1℃ 내지 35℃의 온도로 냉각시키는 것을 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가열-냉각 사이클들 중 적어도 2개는, 상기 현탁액을 분당 0.05℃ 내지 2℃의 속도로 5℃ 내지 50℃의 온도로 가열하고 나서, 상기 현탁액을 분당 0.01℃ 내지 1℃의 속도로 1℃ 내지 35℃의 온도로 냉각시키는 것을 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1, 제2 및 제3의 가열-냉각 사이클은, 상기 현탁액을 분당 0.05℃ 내지 2℃의 속도로 5℃ 내지 70℃의 온도로 가열하고 나서, 상기 현탁액을 분당 0.05℃ 내지 2℃의 속도로 1℃ 내지 35℃의 온도로 냉각시키는 것을 포함하거나, 또는 상기 제1, 제2 및 제3의 가열-냉각 사이클은, 상기 현탁액을 분당 0.1℃의 속도로 5℃ 내지 50℃의 온도로 가열하고 나서, 상기 현탁액을 분당 1℃의 속도로 5℃의 온도로 냉각시키는 것을 포함하는 것인, 제조 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 관한 교차참조

[0001]

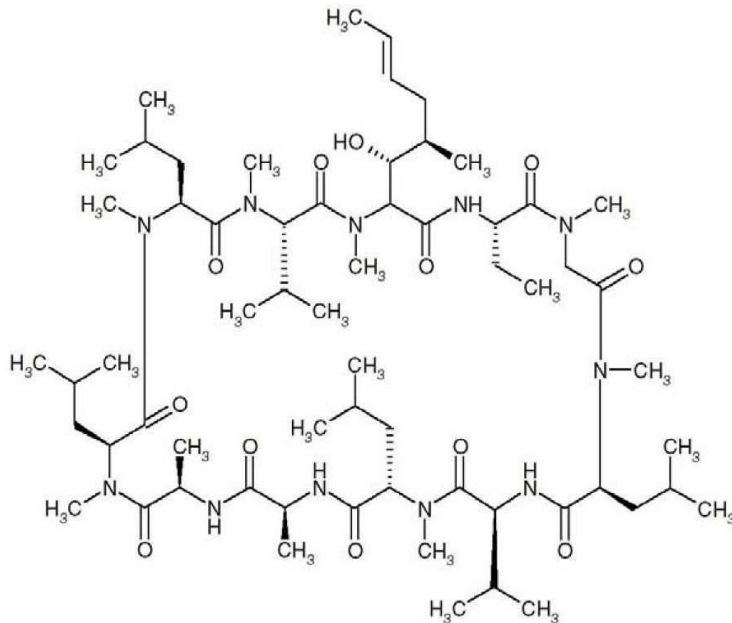
[0002] 본 출원은 미국 특허 가출원 제61/559,830호(출원일: 2011년 11월 15일)에 대한 우선권을 주장하며, 이 기초 출원의 전체 내용은 참조로 본 명세서에 포함된다.

배경 기술

[0003] 본 명세서에는 사이클로스포린 A의 새로운 결정형을 제조하는 방법이 개시되어 있다.

[0004] 사이클로스포린 A

[0005] 사이클로스포린 A(CsA)는 이하의 화학 구조를 지니는 환식 펩타이드이다:



[0006]

[0007] 그의 화학명은 사이클로[[*(E)*-(2*S*,3*R*,4*R*)-3-하이드록시-4-메틸-2-(메틸아미노)-6-옥테닐]-L-2-아미노뷰티릴-*N*-메틸글라이실-*N*-메틸-L-류실-L-발릴-*N*-메틸-L-류실-L-알라닐-D-알라닐-*N*-메틸-L-류실-*N*-메틸-L-류실-*N*-메틸-L-발릴]이다. 이것은 또한 사이클로스포린, 사이클로스포린 A, 시클로스포린(ciclosporin) 및 시클로스포린 A라는 명칭으로도 알려져 있다. 이것은 0.05% (w/v) 사이클로스포린을 포함하는 에멀전인 레스타시스(Restasis)(등록상표)(알러간 인코포레이티드(Allergan, Inc.), 캘리포니아주의 얼바인시에 소재) 중의 활성 성분이다. 레스타시스(Restasis)(등록상표)는 눈물 생산이 건성 각결막염과 관련된 안구 염증으로 인해 억제된 것으로 추정되는 환자에서 눈물 생산을 증가시키기 위하여 미국에서 승인되었다.

[0008] 사이클로스포린 A는 비정질 형태, 액정 형태, 정방정계 형태(제1형) 및 사방정계 형태(제3형)로 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 명세서에는 새로운 결정형인 사이클로스포린 A 제2형을 제조하는 방법이 개시되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 새로운 결정형(본 명세서에서 제2형이라 지칭됨), 정방정계 형태(본 명세서에서 제1형이라 지칭됨) 및 사방정계 형태(본 명세서에서 제3형이라 지칭됨)의 CsA의 특징적인 X-선 분말 회절(XRPD) 패턴을 도시한 도면;

도 2는 CsA 결정형 제2형의 XRPD 회절도를 도시한 도면;

도 3은 CsA 제2형의 물 흡착/탈착 프로파일을 도시한 도면;

도 4는 1%의 PS80을 갖는 0.04% 제형으로부터 회수된 CsA 제2형의 MDSC 분석을 도시한 도면;

도 5는 본 발명에 따른 방법에 의해 생성된 CsA 제2형을 생성하는데 이용되는 가열 및 냉각 사이클을 도시한 도면;

도 6은, 비정질 사이클로스포린 A를 출발 물질로서 이용해서, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 CsA 제2형의 x-선 회절 패턴(XRPD)을 도시한 도면;

도 7은, 비정질 사이클로스포린 A를 출발 물질로서 이용해서, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 CsA 제2형의 XRPD

를 도시한 도면;

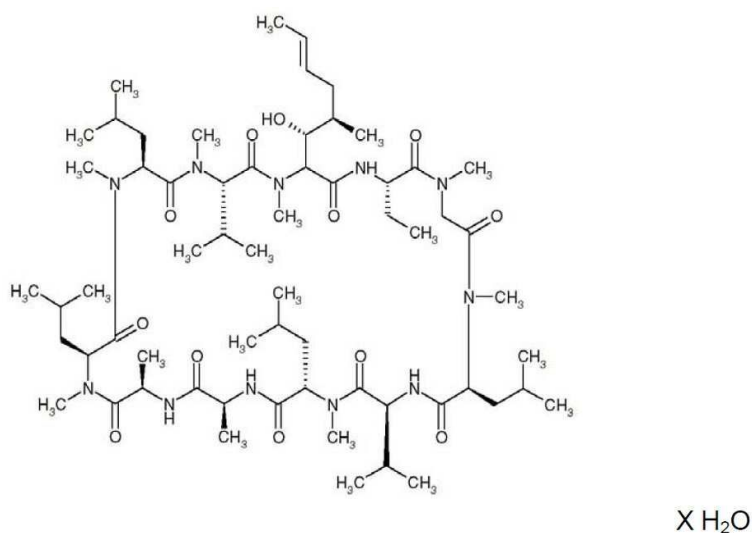
도 8은, 사방정계 사이클로스포린 A를 출발 물질로서 이용해서, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 CsA 제2형의 XRPD를 도시한 도면;

도 9는 사이클로스포린 A형의 시뮬레이션된 XRPD 패턴을 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] CsA 제2형의 XRPD 패턴은, 정방정계 형태 및 사방정계 형태와는 상당히 다르다(도 1). CsA 제2형에 대한 결정질 주 피크는, 30kV/15mA에서 Cu K α 방사선, $\lambda = 1.54\text{\AA}$ 으로서 X-선원으로 X선 회절계에 의해 스캔될 때, 7.5, 8.8, 10.2, 11.3, 12.7, 13.8, 14.5, 15.6 및 17.5의 (2θ)(각각 약 11.8, 10.0, 8.7, 7.8, 7.0, 6.4, 6.1, 5.6 및 5.1 \AA 에서의 결정 격자에서 d-간격, 도 2)에서 나타난다. 이들 주 피크는 사방정계 또는 정방정계 형태에 비해 제2형에 고유한 피크뿐만 아니라; 배경보다 5배 큰 강도를 갖는 피크로서 정의된다.

[0011] 일 실시형태에 있어서, CsA의 새로운 결정형(제2형)은 사이클로스포린 A의 비화학량론적 수화물이다. 다른 실시형태에 있어서, 제2형 결정은 하기 화학식으로 표시된다:



[0012] 상기 식 중, X는 물 분자의 수이고, 0 내지 3이다. 일 실시형태에 있어서, 상기 화학식 중 X는 2이다.

[0013]

[0014] 제2형은 수성 현탁액 중에 CsA의 동역학적으로 안정한 형태인 것으로 보인다. 제2형을 함유하는 현탁액은 저장 시 다른 공지된 다형태 또는 부정형으로의 전환은 보이지 않았다. 제1형 및 비정질형은 물의 존재 하에 제2형으로 전환되는 것으로 밝혀졌다.

[0015] CsA 제2형의 수화물 형태의 단결정 구조가 결정되었고, 그 결정 구조 파라미터가 표 2에 기재되어 있다. 이들 결과는 제2형이 다른 공지된 사이클로스포린 A의 결정형과 비교하여 독특하다는 것을 나타낸다.

[0016] [표 1]

CsA 제2형의 결정 데이터 및 결정 구조 해석의 데이터 수집 파라미터.

화학식	C ₅₂ H ₁₁₅ N ₁₁ O ₁₄
화학식 중량	1238.67
공간군	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19호)
a (Å)	12.6390(5)
b (Å)	19.7582(8)
c (Å)	29.568(2)
부피 (Å ³)	7383.8(7)
Z	4
d _{calc} (g cm ⁻³)	1.114
결정 치수 (mm)	0.27 x 0.18 x 0.12
온도 (K)	150
방사선 (Å 파장)	Cu K _α (1.54184)
모노크로메이터	공초점 광학기
선형 흡수 계수 (mm ⁻¹)	0.640
적용된 흡수 보정	경험치 ^a
투과율(최소, 최대)	0.80, 0.93
회절계	리가쿠(Rigaku) RAPID-II
h, k, l 범위	-13 내지 13 -21 내지 21 -32 내지 21
2θ 범위 (도)	5.38-115.00
모자이크시티(mosaicity)(도)	1.31
이용된 프로그램	SHELXTL
F ₀₀₀	2704.0
가중치	1/[σ ² (F _o ²)+(0.0645P) ² +0.0000P] 여기서 P=(F _o ² +2F _c ²)/3
수집된 데이터	37360
고유 데이터	9964
R _{int}	0.077
정제화에 이용된 데이터	9964
R-인자 계산에 이용된 컷오프	F _o ² >2.0σ(F _o ²)
1>2.0σ(1)을 지닌 데이터	6597
변수의 개수	834
최종 사이클에서의 최대 이동/esd	0.00
R(F _o)	0.061
R _w (F _o ²)	0.145
적합도	1.037
절대 구조 결정	플랙 파라미터 ^b (Flack parameter ^b) (0.0(3))

[0017]

[0018]

이 CsA 제2형의 비대칭 단위는 1개의 사이클로스포린 A 분자와 2개의 물 분자를 함유한다. 물에 수소 결합할 수 있는 임의의 소분자가 공간 충전제의 역할을 할 수 있어, 사방정계 이수화물로부터 왜곡된 단사정계 이수화물에 이르는 잠재적 구조 범위를 부여하는 것이 가능하다. 단결정 구조로부터 계산된 XRPD 패턴이 도 9에 도시되어 있으며, 이것은 도 2에 도시된 실험 패턴과 일치한다. 이러한 일치 패턴은 제2형이 사이클로스포린 A의 독특하고 순수한 결정형이라는 것을 추가로 입증시켜준다.

[0019]

이론에 의해 얹매이길 원치 않지만, KF 적정 및 증기 흡착 탈착 분석(vapor sorption desorption analysis: VSA)과 조합된 열 중량 분석은 CsA 제2형이 CsA의 비화학량론적 수화물이라는 것을 시사한다. 사이클로스포린 제2형의 증기 흡착 분석은 새로운 결정형의 함수량이 도 3에 도시된 바와 같이 상대 습도에 따라 가역적으로 변한다는 것을 나타낸다. 정방정계 형태와 유사하게, 새로운 CsA 형태는 변조 시차 열량계(modulated differential calorimetric: MDSC) 분석(도 4)에 의해 표시된 바와 같이 용융 전에 124.4°C에서 액체 결정 또는 비정질 형태로 상 전이를 경험한다.

[0020]

CsA 제2형에 관한 추가의 상세는 미국 특허 출원 제13/480,710호에서 찾을 수 있으며, 이 문헌의 전체 내용은 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0021]

사이클로스포린 A 제2형을 얻는 방법

[0022]

폴리솔베이트(polysorbate) 80로부터의 석출에 의해

[0023]

사이클로스포린 A 제2형은 폴리솔베이트 80(폴리옥시에틸렌 솔비탄-모노-올레에이트)를 함유하는 물 중 비정질 사이클로스포린 A를 현탁시키고 나서, 이 용액을 약 55°C 내지 약 75°C의 온도로 가열하고, 그 온도에서 적어도

약 18 내지 약 48시간 동안 보존한 후, 석출물인 사이클로스포린 A 제2형을 제거함으로써 얻어질 수 있다.

- [0024] 작업자는 이 방법에서 사이클로스포린 A를 약 0.001% 내지 약 10%의 농도로 이용할 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 값과 관련하여 이용될 경우, "약"이란 용어는 기술된 값에 합리적으로 근사한 값을 의미한다.
- [0025] 따라서, 작업자는 이 방법에서 약 0.001% (w/v), 약 0.005% (w/v), 약 0.01% (w/v), 약 0.02% (w/v), 약 0.03% (w/v), 약 0.04% (w/v), 약 0.05% (w/v), 약 0.06% (w/v), 약 0.07% (w/v), 약 0.08% (w/v), 약 0.09% (w/v), 약 0.1% (w/v), 약 0.2% (w/v), 약 0.3% (w/v), 약 0.4% (w/v), 약 0.5% (w/v), 약 0.6% (w/v), 약 0.7% (w/v), 약 0.8% (w/v), 약 0.9% (w/v), 약 1% (w/v), 약 2% (w/v), 약 3% (w/v), 약 4% (w/v), 약 5% (w/v), 약 6% (w/v), 약 7% (w/v), 약 8% (w/v), 약 9% (w/v) 또는 약 10% (w/v)의 사이클로스포린 A의 농도에서 사이클로스포린 A를 이용할 수 있다.
- [0026] 작업자는 이 방법에서 폴리솔베이트 80을 약 0.1% 내지 10%, 예컨대, 약 0.1% (w/v), 약 0.2% (w/v), 약 0.3% (w/v), 약 0.4% (w/v), 약 0.5% (w/v), 약 0.6% (w/v), 약 0.7% (w/v), 약 0.8% (w/v), 약 0.9% (w/v), 약 1% (w/v), 약 2% (w/v), 약 3% (w/v), 약 4% (w/v), 약 5% (w/v), 약 6% (w/v), 약 7% (w/v), 약 8% (w/v), 약 9% (w/v) 또는 약 10% (w/v)의 폴리솔베이트 80의 농도로 이용할 수 있다.
- [0027] 폴리솔베이트 80 중에 사이클로스포린 A를 현탁시킨 후, 작업자는 이 용액을 약 55℃ 내지 약 75℃, 예컨대, 약 55℃, 약 56℃, 약 57℃, 약 58℃, 약 59℃, 약 60℃, 약 61℃, 약 62℃, 약 63℃, 약 64℃, 약 65℃, 약 66℃, 약 67℃, 약 68℃, 약 69℃, 약 70℃, 약 71℃, 약 72℃, 약 73℃, 약 74℃ 또는 약 75℃의 온도로 가열시킬 수 있다.
- [0028] 작업자는 상기 가열된 용액을 약 18 내지 약 48시간, 예컨대, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 약 25시간, 약 26시간, 약 27시간, 약 28시간, 약 29시간, 약 30시간, 약 31시간, 약 32시간, 약 33시간, 약 34시간, 약 35시간, 약 36시간, 약 37시간, 약 38시간, 약 39시간, 약 40시간, 약 41시간, 약 42시간, 약 43시간, 약 44시간, 약 45시간, 약 46시간, 약 47시간 또는 약 48시간의 시간 길이 동안 상기 온도들 중 하나에서 저장할 수 있다.
- [0029] 용액을 준비하여 가열하고 나서, 소정의 온도에서 유지한 후, 얻어진 석출된 고체를, 예컨대, 진공 여과에 의하는 등과 같은 임의의 표준 방법에 의해 회수할 수 있다. 회수 후, 석출물을 이어서 세척하고 건조시킬 수 있다. 예를 들어, 그것을 물로 세척하고 나서, 진공 하에 상승된 온도(예를 들어, 약 40℃)에서, 이어서 실온에서 건조시킬 수 있다. 기타 세척 및 건조 수법이 또한 이용될 수 있다.
- [0030] 사이클로스포린 A 제2형을 종자 결정으로서 사용
- [0031] 사이클로스포린 A 제2형은 또한 사이클로스포린 A 제2형을 종자 결정으로서 이용해서 형성될 수 있다. 이 방법에서, 작업자는 위에서 설명된 바와 같이 폴리솔베이트 80의 수용액 중에 비정질 사이클로스포린 A를 현탁시키고 이 용액을 가열할 수 있다. 작업자는 이어서 상기 용액에 사이클로스포린 A 제2형을 과중하고 나서, 이 용액을 상기 기재된 온도에서 소정 기간 동안 유지하고, 그렇게 하는 동안 상기 용액을 끊임없이 교반할 수 있다. 이 과정의 결론으로서, 작업자는 이어서 위에서 기재된 바와 같이 석출물을 회수할 수 있다.
- [0032] 작업자는 이 과정에서 약 0.01 내지 약 1g 종자 결정/ℓ 물을 사용할 수 있다. 예를 들어, 작업자는 약 0.01 g/ℓ, 약 0.02 g/ℓ, 약 0.03 g/ℓ, 약 0.04 g/ℓ, 약 0.05 g/ℓ, 약 0.06 g/ℓ, 약 0.07 g/ℓ, 약 0.08 g/ℓ, 약 0.09 g/ℓ, 약 0.1 g/ℓ, 약 0.2 g/ℓ, 약 0.3 g/ℓ, 약 0.4 g/ℓ, 약 0.5 g/ℓ, 약 0.6 g/ℓ, 약 0.7 g/ℓ, 약 0.8 g/ℓ, 약 0.9 g/ℓ 또는 약 1g의 종자결정/ 1ℓ 물을 사용할 수 있다.
- [0033] 작업자는, 사이클로스포린 A 제2형의 비정질 사이클로스포린 A 종자 결정의 현탁액을, 상기 용액에 첨가하기 전에, 약 45℃ 내지 약 65℃의 온도로 가열할 수 있거나, 또는 작업자는 종자 결정을 첨가하기 전에 실온에서 유지시킬 수 있다. 예를 들어, 작업자는, 사이클로스포린 A 제2형의 종자 결정을, 상기 용액에 첨가하기 전에, 약 45℃, 약 46℃, 약 47℃, 약 48℃, 약 49℃, 약 50℃, 약 51℃, 약 52℃, 약 53℃, 약 54℃, 약 55℃, 약 56℃, 약 57℃, 약 58℃, 약 59℃, 약 60℃, 약 61℃, 약 62℃, 약 63℃, 약 64℃ 또는 약 65℃로 가열할 수 있다.
- [0034] 예를 들어, 작업자는 1% (w/v) 폴리솔베이트 80을 함유하는 물 900ml의 용액에 사이클로스포린 A 약 30g을 현탁시킬 수 있다. 작업자는 상기 용액을 65℃까지 가열하고 나서, 사이클로스포린 A 제2형 0.2g을 52℃의 온도에서 가열할 수 있다. 이 용액을 약 22시간 동안 약 61℃ 내지 65℃의 온도에서 교반한다. 얻어진 석출물을 위에서

기재된 바와 같이 회수할 수 있다.

[0035] 소정의 용매계 중에서의 가열 및 냉각에 의해

[0036] 매우 일반적인 조건에 있어서, 사이클로스포린 A 제2형은 1) 수중에 또는 물과 아세토나이트릴, 1,4-다이옥산 또는 에탄올의 용액 중에 사이클로스포린 A를 현탁시키고; 2) 그 현탁액을 소정의 속도로 가열하고; 3) 상기 현탁액을 소정 속도로 냉각시키고; 4) 상기 가열 및 냉각의 주기를 반복하고; 5) 그리고 결과적으로 생기는 석출물을 회수함으로써 얻어질 수 있다. 용매의 선택은 중요하다: 본 발명자들은 용매가 CsA 제2형을 형성시킬지 형성시키지 못할지를 예측하는 구조적 특성 혹은 기타 성질을 하등 발견할 수 없었다.

[0037] 작업자는 이 실시형태에서 액정, 정방정계 또는 사방정계 형태의 사이클로스포린 A를 이용할 수 있거나, 또는 작업자는 비정질 형태를 이용할 수 있다. 출발 물질의 선택은 매우 약간 상이한 특성을 지니는 CsA 제2형을 수득하였지만(도 X 및 도 Y 참조), 중요한 점은 작업자가 상이한 출발 물질을 사용하고 여전히 CsA 제2형을 얻을 수 있다는 점이다.

[0038] 이 방법의 제1 단계에서, 작업자는 물에 목적으로 하는 출발 물질(즉, 액정, 정방정계, 사방정계 형태 또는 비정질 사이클로스포린 A)을 현탁시키거나, 또는 해당 출발 물질을, 각각 물에 용해된 아세토나이트릴 중, 1,4-다이옥산 중, 또는 에탄올 중에 현탁시킴으로써 용액을 준비한다. 작업자는 이 단계에서 약 0.01 내지 약 1g 출발 물질/ℓ 물을 사용할 수 있다. 예를 들어, 작업자는 약 0.01 g/ℓ, 약 0.02 g/ℓ, 약 0.03 g/ℓ, 약 0.04 g/ℓ, 약 0.05 g/ℓ, 약 0.06 g/ℓ, 약 0.07 g/ℓ, 약 0.08 g/ℓ, 약 0.09 g/ℓ, 약 0.1 g/ℓ, 약 0.2 g/ℓ, 약 0.3 g/ℓ, 약 0.4 g/ℓ, 약 0.5 g/ℓ, 약 0.6 g/ℓ, 약 0.7 g/ℓ, 약 0.8 g/ℓ, 약 0.9 g/ℓ 또는 약 1g 출발 물질/ℓ 물을 사용할 수 있다. 목적으로 하는 용매(아세토나이트릴, 1,4-다이옥산 또는 에탄올)를, 약 0.75 내지 1의 물의 물분율을 지니는 용액이 얻어지는 양으로 첨가한다. 예를 들어, 용매는 약 0.75, 약 0.76, 약 0.77, 약 0.78, 약 0.79, 약 0.80, 약 0.81, 약 0.82, 약 0.83, 약 0.84, 약 0.85, 약 0.86, 약 0.87, 약 0.88, 약 0.89, 약 0.90, 약 0.91, 약 0.92, 약 0.93, 약 0.94, 약 0.95, 약 0.96, 약 0.97, 약 0.98, 약 0.99 및 약 1의 물분율을 지니는 용액이 얻어지는 양으로 첨가된다.

[0039] 이 방법의 제2 단계에서, 작업자는 이어서 상기 용액을 분당 약 0.01℃ 내지 분당 약 1℃의 속도로 약 5℃ 내지 약 50℃의 온도로 가열한다. 일 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 5℃ 내지 약 10℃, 약 10℃ 내지 약 15℃, 약 15℃ 내지 약 20℃, 약 20℃ 내지 약 25℃, 약 25℃ 내지 약 30℃, 약 30℃ 내지 약 35℃, 약 35℃ 내지 약 40℃, 약 40℃ 내지 약 45℃ 또는 약 45℃ 내지 약 50℃의 온도로 가열할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 5℃ 내지 약 15℃, 약 15℃ 내지 약 25℃, 약 25℃ 내지 약 35℃, 약 35℃ 내지 약 45℃ 또는 약 40℃ 내지 약 50℃의 온도로 가열할 수 있다. 예를 들어, 작업자는 상기 용액을 약 1℃, 약 2℃, 약 3℃, 약 4℃, 약 5℃, 약 6℃, 약 7℃, 약 8℃, 약 9℃, 약 10℃, 약 11℃, 약 12℃, 약 13℃, 약 14℃, 약 15℃, 약 16℃, 약 17℃, 약 18℃, 약 19℃, 약 20℃, 약 21℃, 약 22℃, 약 23℃, 약 24℃, 약 25℃, 약 26℃, 약 27℃, 약 28℃, 약 29℃, 약 30℃, 약 31℃, 약 32℃, 약 33℃, 약 34℃, 약 35℃, 약 36℃, 약 37℃, 약 38℃, 약 39℃, 약 40℃, 41℃, 약 42℃, 약 43℃, 약 44℃, 약 45℃, 약 46℃, 약 47℃, 약 48℃, 약 49℃ 또는 약 50℃의 온도로 가열할 수 있다.

[0040] 일 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 0.01℃/분 내지 약 0.05℃/분, 약 0.05℃/분 내지 0.1℃/분, 약 0.1℃/분 내지 약 0.2℃/분, 약 0.2℃/분 내지 약 0.3℃/분, 약 0.3℃/분 내지 약 0.4℃/분, 약 0.4℃/분 내지 약 0.5℃/분, 약 0.5℃/분 내지 약 0.6℃/분, 약 0.6℃/분 내지 약 0.7℃/분, 약 0.7℃/분 내지 약 0.8℃/분, 약 0.8℃/분 내지 약 0.9℃/분 또는 약 0.9℃/분 내지 약 1℃/분의 속도로 가열한다. 예를 들어, 작업자는 상기 용액을 약 0.01℃/분, 약 0.02℃/분, 약 0.03℃/분, 약 0.04℃/분, 약 0.05℃/분, 약 0.06℃/분, 약 0.07℃/분, 약 0.08℃/분, 약 0.09℃/분, 약 0.1℃/분, 약 0.2℃/분, 약 0.3℃/분, 약 0.4℃/분, 약 0.5℃/분, 약 0.6℃/분, 약 0.7℃/분, 약 0.8℃/분, 약 0.9℃/분 또는 약 1℃/분의 속도로 가열할 수 있다.

[0041] 이 방법의 제3 단계에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 1℃ 내지 약 22℃의 온도로 냉각시킨다. 일 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 1℃ 내지 약 5℃, 약 5℃ 내지 약 10℃, 약 10℃ 내지 약 15℃, 약 15℃ 내지 약 20℃ 또는 약 17℃ 내지 약 22℃의 온도로 냉각시킬 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 1℃ 내지 약 10℃, 약 5℃ 내지 약 15℃, 약 10℃ 내지 약 20℃ 또는 약 15℃ 내지 약 22℃의 온도로 냉각시킬 수 있다. 예를 들어, 작업자는 상기 용액을 약 1℃, 약 2℃, 약 3℃, 약 4℃, 약 5℃, 약 6℃, 약 7℃, 약 8℃, 약 9℃, 약 10℃, 약 11℃, 약 12℃, 약 13℃, 약 14℃, 약 15℃, 약 16℃, 약 17℃, 약 18℃, 약 19℃, 약 20℃, 약 21℃ 또는 약 22℃의 온도로 냉각시킬 수 있다.

- [0042] 상기 용액은 가열되는 속도와 동일하거나 혹은 상이한 속도에서 냉각될 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 0.01℃/분 내지 약 0.05℃/분, 약 0.05℃/분 내지 0.1℃/분, 약 0.1℃/분 내지 약 0.2℃/분, 약 0.2℃/분 내지 약 0.3℃/분, 약 0.3℃/분 내지 약 0.4℃/분, 약 0.4℃/분 내지 약 0.5℃/분, 약 0.5℃/분 내지 약 0.6℃/분, 약 0.6℃/분 내지 약 0.7℃/분, 약 0.7℃/분 내지 약 0.8℃/분, 약 0.8℃/분 내지 약 0.9℃/분 또는 약 0.9℃/분 내지 약 1℃/분의 속도로 냉각시킨다. 예를 들어, 작업자는 상기 용액을 약 0.01℃/분, 약 0.02℃/분, 약 0.03℃/분, 약 0.04℃/분, 약 0.05℃/분, 약 0.06℃/분, 약 0.07℃/분, 약 0.08℃/분, 약 0.09℃/분, 약 0.1℃/분, 약 0.2℃/분, 약 0.3℃/분, 약 0.4℃/분, 약 0.5℃/분, 약 0.6℃/분, 약 0.7℃/분, 약 0.8℃/분, 약 0.9℃/분 또는 약 1℃/분의 속도로 냉각시킨다.
- [0043] 작업자는, 이어서, 위에서 기재된 방법을 이용해서, 형성된 임의의 석출물을 회수하도록 진행할 수 있거나, 또는 작업자는 동일 혹은 상이한 온도 및 동일 또는 상이한 가열 및 냉각 속도를 이용해서 가열 및 냉각 단계들을 반복할 수 있다. 일 실시형태에 있어서, 작업자는 가열 및 냉각하는 단계를 1회 반복하며, 즉, 용액을 처음에 가열하고 이어서 냉각시키고 나서, 해당 용액을 재차 가열하고 냉각시킨다. 다른 실시형태에 있어서, 작업자는 가열 및 냉각하는 단계를 2회 반복하며, 즉, 용액을 처음에 가열하고 이어서 냉각시키고, 그 후, 해당 용액을 두 번째로 가열하고 냉각시키며, 이어서 해당 용액을 세 번째로 가열하고 냉각시킨다. 다른 실시형태에 있어서, 작업자는 가열 및 냉각하는 단계를 3회 반복하며, 즉, 용액을 처음에 가열하고 이어서 냉각시키고, 그 후, 해당 용액을 두 번째로 가열하고 냉각시키며, 이어서 해당 용액을 세 번째로 가열하고 냉각시키고, 그 후에 해당 용액을 네 번째로 가열하고 냉각시킨다. 가열 단계들의 각각 동안, 작업자는 상기 용액을 동일 혹은 상이한 온도로 그리고 동일 혹은 상이한 속도에서 가열할 수 있고; 마찬가지로 냉각 단계들의 각각 동안, 작업자는 상기 용액을 동일 혹은 상이한 온도로 그리고 동일 혹은 상이한 속도에서 냉각시킬 수 있다.
- [0044] 일 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 목적으로 하는 온도로 가열한 직후 해당 용액을 냉각시키기 시작한다. 다른 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 냉각시키기 전에 약 0 내지 약 25시간 동안 상기 가열 온도에서 유지한다. 예를 들어, 작업자는 상기 용액을 약 0 내지 약 5시간, 약 5 내지 약 10시간, 약 10 내지 약 15시간, 약 15 내지 약 20시간 또는 약 20 내지 25시간 동안 유지할 수 있고; 다른 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 0 내지 약 10시간, 약 5 내지 약 15시간, 약 10 내지 약 20시간 또는 약 15 내지 약 25시간 동안 상기 냉각 온도에서 유지할 수 있다. 예를 들어, 작업자는 상기 용액을 약 0.5시간, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18 시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간 또는 약 25시간 동안 상기 가열 온도에서 유지할 수 있다.
- [0045] 가열-냉각 사이클을 반복하면, 작업자는 상기 용액을 목적으로 하는 온도로 냉각시킨 후 즉시 가열할 수 있거나, 또는 작업자는 상기 용액을 재차 가열을 시작하기 전에 약 0 내지 약 24시간 동안 상기 냉각 온도에서 유지할 수 있다. 예를 들어, 작업자는 상기 용액을 약 0 내지 약 5시간, 약 5 내지 약 10시간, 약 10 내지 약 15시간, 약 15 내지 약 20시간 또는 약 20 내지 25시간 동안 유지할 수 있고; 다른 실시형태에 있어서, 작업자는 상기 용액을 약 0 내지 약 10시간, 약 5 내지 약 15시간, 약 10 내지 약 20시간 또는 약 15 내지 약 25시간 동안 상기 냉각 온도에서 유지할 수 있다. 예를 들어, 작업자는 상기 용액을 약 0.5시간, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간 또는 약 25시간 동안 상기 냉각 온도에서 유지할 수 있다.
- [0046] 가열 및 냉각 사이클의 종료 후, 작업자는 위에 기재된 바와 같이 석출물을 회수하기 전에 상기 용액을 약 0 내지 약 24시간 동안 최종의 냉각 온도에서 유지할 수 있다.
- [0047] 실시예
- [0048] 본 발명은 이하의 실시예에 의해 더욱 설명된다.
- [0049] 실시예 1
- [0050] 비정질, 정방정계(F1) 또는 사방정계 형태 중 어느 하나의 사이클로소포린 A(CsA)을 하기 표 1에 기재된 바와 같이 물, 아세트나이트릴, 다이옥산 또는 에탄올 중에 현탁시켰다:

표 1

사이클로스포린 제 2 형을 제조하는데 이용된 사이클로스포린 현탁액

CsA 형태	용매		물의 분율
	1	2	
비정질	물	아세트나이트릴	0.87
F1	물	아세트나이트릴	0.87
F3	물	아세트나이트릴	0.87
F1	물	없음	1.00
F1	물	다이옥산	0.90
F1	물	에탄올	0.89

[0051]

[0052]

상기 용액의 각각을 분당 0.1℃의 속도로 50℃까지 가열하고, 그 온도에서 600분 유지하고; 이 용액을 이어서 동일한 속도로 20℃로 냉각시키고 나서, 그 온도에서 300분 동안 유지하고; 이 가열과 냉각 사이클을 도 5에 예시되고 표 2에 요약된 바와 같이 2회 이상 반복하였다.

표 2

열순환 프로파일

단계	온도 (℃)	가열 속도 (℃/분)	지속기간 (분)	총 시간
유지	20	---	30.00	00:30:00
상승	50	0.1000	300.00	05:30:00
유지	50	---	600.00	15:30:00
상승	20	- 0.1000	300.00	20:30:00
유지	20	---	600.00	1.06:30:00
상승	50	0.1000	300.00	1.11:30:00
유지	50	---	600.00	1.21:30:00
상승	20	- 0.1000	300.00	2.02:30:00
유지	20	---	600.00	2.12:30:00
상승	50	0.1000	300.00	2.17:30:00
유지	50	---	600.00	3.03:30:00
상승	20	- 0.1000	300.00	3.06:30:00
유지	20	---	300.00	3.13:30:00

[0053]

[0054] 이와 같이 해서, 비정질 사이클로스포린 A를 출발 물질로서 이용해서 얻어진 사이클로스포린 A 제2형의 x-선 분말 회절 패턴(XRPD)은 도 6에 예시되어 있고; 정방정계 사이클로스포린 A를 출발 물질로서 이용해서 얻어진 사이클로스포린 A 제2형의 XRPD는 도 7에 예시되어 있으며; 사방정계 사이클로스포린 A를 출발 물질로서 이용해서 얻어진 사이클로스포린 A 제2형의 XRPD는 도 8에 예시되어 있다. CsA 형태의 XRPD 패턴은 라가쿠 미니플렉스 X-선 회절계(Rigaku MiniFlex X-ray diffractometer)(30 kV 및 15 mA에서, Cu K α 방사선, $\lambda = 1.54\text{\AA}$)를 이용해서 얻었다. 이 기기는 28.44° (2-세타)에서 기준 피크를 지나는 실리콘 표준을 이용해서 교정하였다. X-선 회절 실험은 분당 0.5° 또는 1° (2-세타)의 스캔 속도 및 0.05° (2-세타)의 단차 폭에서 3° 내지 45° (2-세타)에서 수행하였다.

[0055] 사이클로스포린 A 제2형을 제조하지 못했던 실험 조건은 이하에 표 3에 표시되어 있다:

표 3

사이클로스포린 A 제2형을 제조하지 못했던 실험 조건

#	CsA 형태	CsA 중량 (mg)	용매		부피 (μl)		최종 형태	물의 물분율
			1	2	1	2		
1	비정질	53.77	물	아세톤	100	42	F1+F2	0.91
2	비정질	61.70	물	에틸렌 글라이콜	100	42	비정질	0.88
4	비정질	41.17	물	n/a	100	n/a	비정질	1.00
5	F1	65.74	물	아세톤	100	42	F1+F2	0.91
6	F1	74.51	물	에틸렌 글라이콜	100	42	F1	0.88
8	F1	68.59	물	n/a	100	n/a	비정질	1.00
9	F3	49.70	물	아세톤	100	42	F3	0.91
10	F3	69.45	물	에틸렌 글라이콜	100	42	F3	0.88
12	F3	70.87	물	n/a	100	n/a	F3	1.00
15	F1	43.07	물	메탄올	100	42	비정질 + F2	0.84

[0056]

[0057] 치료 방법

[0058] 본 발명의 방법에 의해 얻어진 CsA 제2형은 사이클로스포린 A(레스타시스(Restasis)(등록상표) 등)를 이용한 국소 치료를 받기에 적합한 것으로 알려진 안구의 각종 병태를 치료하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 안구 건조증으로 고통받는 환자를 치료하고, 안검염 및 마이봄선 질환을 치료하며, 눈에 대한 시력교정수술로 인해 손상된 각막 감도를 회복하고, 알레르기성 결막염 그리고 아토피성 및 봄철 각결막염을 치료하며, 특히 프티레지아(ptyreigia), 결막 및 각막 염증, 각결막염, 이식편 대 숙주병, 이식후 녹내장, 각막 이식, 사상균성 각막염, 티제슨의 표층 점상 각결막염, 포도막염, 및 시어도어의 상위 윤부 각결막염을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0059] 국제 안구 건조증 워크숍(International Dry Eye Workshop: DEWS)은 "불편한 증상, 시력 장애, 그리고 안구 표면의 염증 및 눈물막의 삼투압 증가에 의해 수반되는 안구 표면에 잠재적인 손상을 가지는 눈물막 불안정성을 초래하는 눈물 및 안구 표면의 다인성 질환"으로서 정의한다. 이것은 눈물 결핍 또는 과도한 눈물 발산에 의해 초래되는 건성 각결막염 등과 같은 병태들을 포함한다.

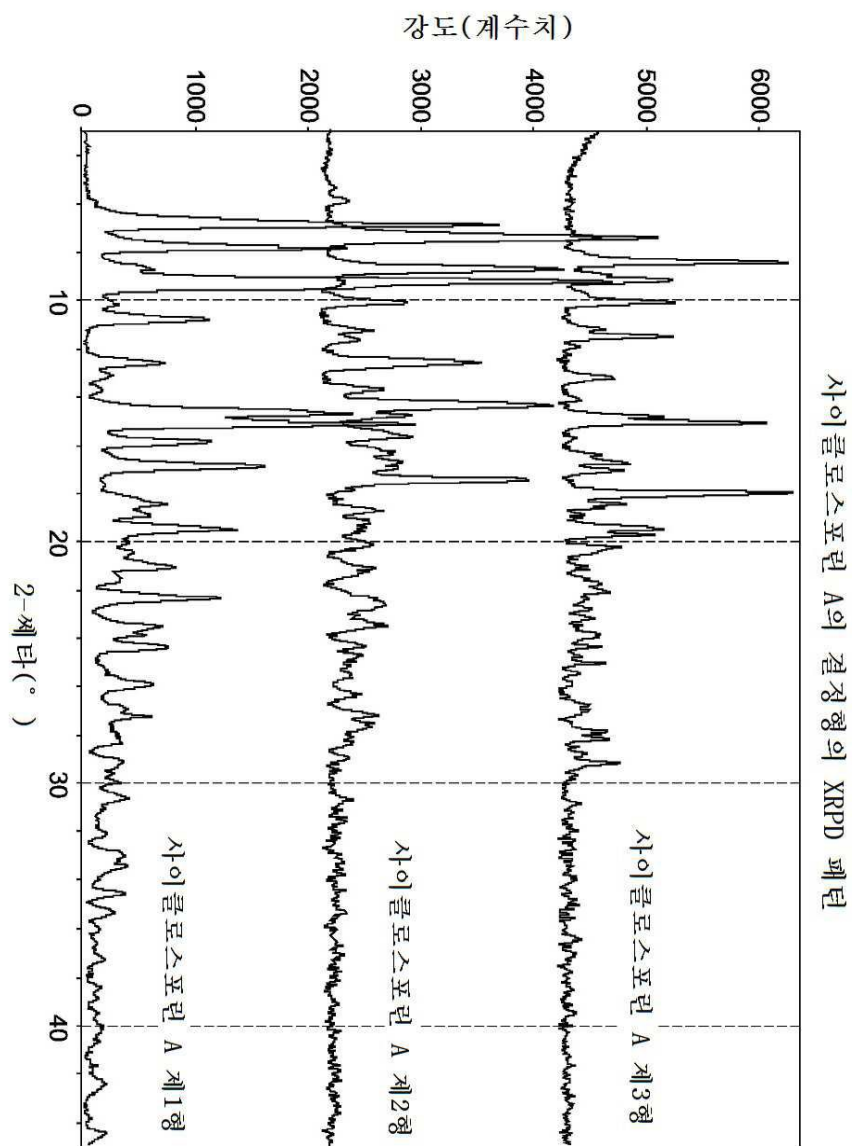
[0060] 안검염은 피부 및 그의 관련 구조(모발 및 피지선), 점막 피부접합부 및 마이봄선의 연루와 함께, 전방 및 후방 눈꺼풀 테의 염증을 발생하는 만성 장애이다. 이것은 또한 진행된 단계에서의 결막, 눈물막 및 각막 표면에 영향을 미칠 수 있고 또한 안구 건조증과 연관될 수 있다. 안검염은 통상 전방 또는 후방 안검염으로 분류되되, 전방 안검염은 눈꺼풀의 속눈썹 보유 영역에 영향을 미치고, 후방 안검염은 주로 마이봄선 분출구멍에 영향을 미친다.

[0061] 마이봄선 질환은 3가지 형태: 1차 마이봄선염, 2차 마이봄선염 및 마이봄 지루 중 하나로서 가장 자주 일어난다. 마이봄 지루는 염증(과다분비 마이봄선 질환)의 부재 시 과도한 마이봄 분비를 특징으로 한다. 대조적으로, 1차 마이봄선염은 울혈성 및 농축성 마이봄 분비(폐쇄성 과다분비 마이봄선 질환)로 구별된다. 2차 마이봄선염은, 마이봄선이 전방 눈꺼풀 테 안검염으로부터 반점 형식으로 이차적으로 염증을 일으키는 국소 염증

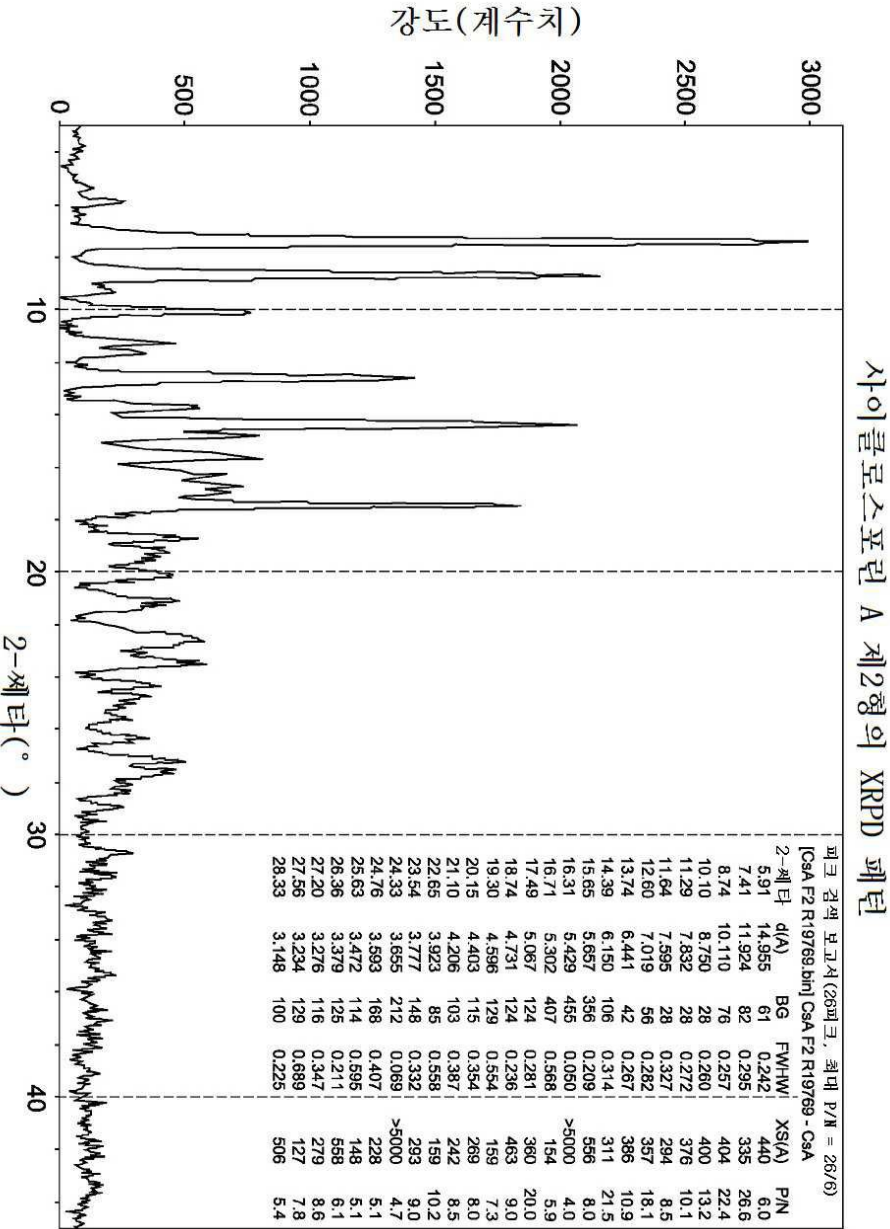
성 반응을 나타낸다.

- [0062] 각막 감각 손상은 시력교정수술, 예컨대, 굴절교정 레이저각막절제술(photorefractive keratectomy), 라섹수술(laser assisted sub-epithelium keratomileusis: LASEK), 에피-라섹(EPI-LASEK), 맞춤형 경상피 비접촉 절제술(customized transepithelial non-contact ablation), 또는 각막 신경들이 절단되는 기타 시술 후에 종종 일어난다. 각막 감각 손상은 예컨대 HSV-1, HSV-2 및 VZV 바이러스 등과 같은 바이러스 감염 후에 일어날 수도 있다. 각막 감각 손상 환자는, 눈물 생산 및 증발이 정상일 수 있더라도, 종종 그들의 눈이 건조함을 느끼는 것을 불평하는 바, 이러한 환자에서의 "건조함"은 실제로 각막 신경이 수술에 의해 절단되거나 또는 바이러스 감염 후에 염증을 일으킬 때 유발되는 각막 신경장애의 한 형태인 것을 시사한다.
- [0063] 알레르기성 결막염은 1개 이상의 알레르기항원에 대한 과민성에 기인하는 결막의 염증이다. 이것은 급성, 간헐적 혹은 만성일 수 있다. 이것은 계절적으로, 즉, 한 해의 단지 소정 시기에만 일어나거나, 또는 사계절에, 즉, 한 해의 전체를 통해서 만성적으로 일어난다. 계절 및 다년성 알레르기성 결막염의 증상으로는, 결막의 염증 이외에도, 누루(lacrimation), 눈물흘림(tearing), 결막 혈관 팽창, 소양증, 유두상 과증식, 결막부종, 눈꺼풀 부종 및 눈으로부터의 분비물을 포함한다. 분비물은 야간의 수면 후 눈에 대해서 눈썹을 형성할 수 있다.
- [0064] 아토피성 각결막염은 종종 시각장애를 초래하는 만성적 중증 형태의 알레르기성 결막염이다. 증상으로는 소양증, 작열감, 통증, 발적, 이물감, 광민감성 및 흐려보임을 포함한다. 특히 야간의 수면에서 깨어났을 때 분비물이 종종 있으며; 그 분비물은 실 형태, 로프 형태 및 뮤코이드일 수 있다. 하부 결막은 상부 결막보다 더 두드러지게 자주 병에 걸린다. 결막은 창백함, 부종, 및 진행된 질환의 특성을 지니는 무특색(featureless)의 범위일 수 있으며, 상기 진행된 질환으로는 유두상 비대, 상피하부 섬유증, 원개 단축(formix foreshortening), 눈썹 난생증(trichiasis), 안검내반 및 눈썹탈락증을 포함한다. 몇몇 환자에 있어서, 질환은 점상 상피 미란(punctate epithelial erosions), 각막 신혈관형성, 및 시각을 손상시킬 수 있는 각막병증의 기타 특성으로 진행된다. 전형적으로 결막에서의 배상 세포 증식, 상피 유사관 형성(epithelial pseudotubular formation), 그리고 상피 내 호산구 및 비만세포를 탈과립화 수의 증가가 있다. CD25+T 림프구, 대식세포 및 수지상 세포(HLA-DR.sup.+, HLA-CD1+)는 고유질(substantia propria)에서 유의하게 높아진다.
- [0065] 아토피성 각결막염과 마찬가지로, 봄철 각결막염은 알레르기성 결막염의 중증 형태이지만, 하부 결막보다 더 두드러지게 상부 결막에 영향을 미치는 경향이 있다. 이것은 2가지 형태로 일어난다. 눈꺼풀 형태에 있어서, 정상 각형의 경질이면서 평탄화된 치밀하게 채워진 유두상이 존재하며; 안구(윤부) 형태에 있어서, 각막주위 결막은 비대해지고 회색을 띠게 된다. 이들 두 형태는 종종 뮤코이드 분비물을 동반한다. 각막 상피 소실이 일어나, 중앙의 각막 플라크 및 트랜타스 도트(Trantas' dot)일 수 있는 바와 같은, 통증 및 광선협기증을 동반할 수 있다.

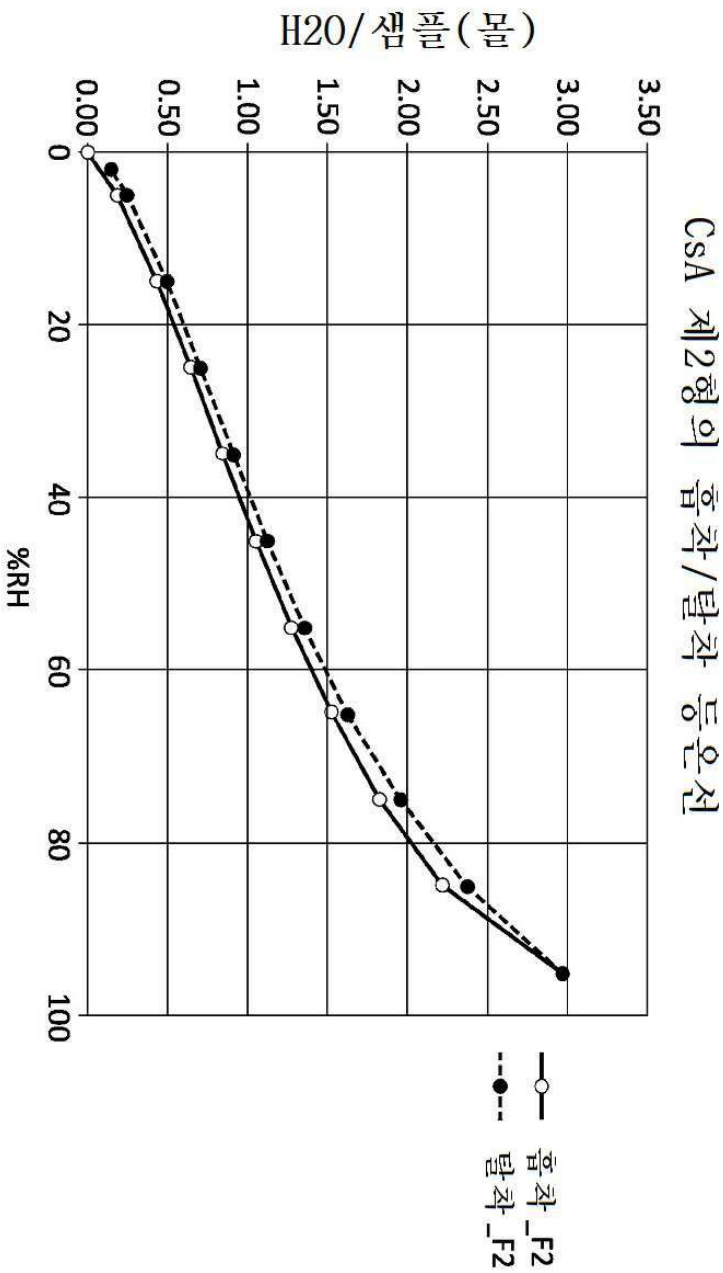
도면
도면1



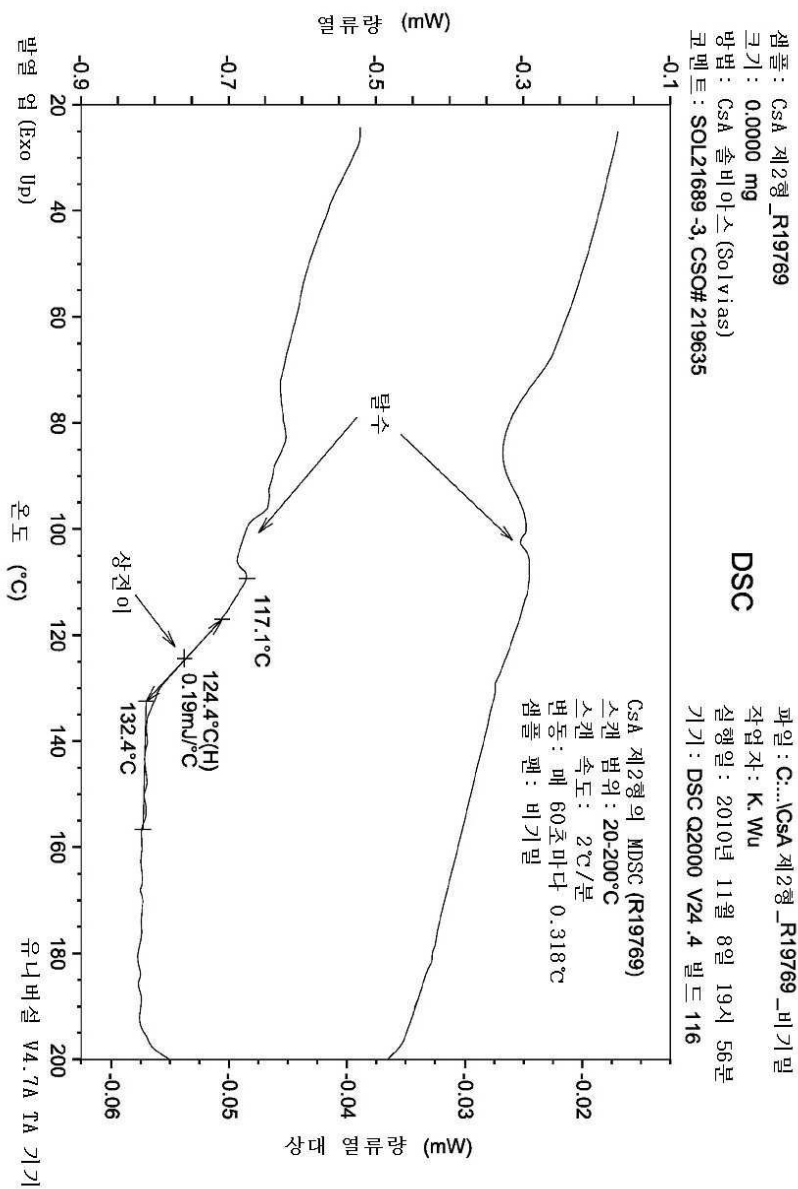
도면2



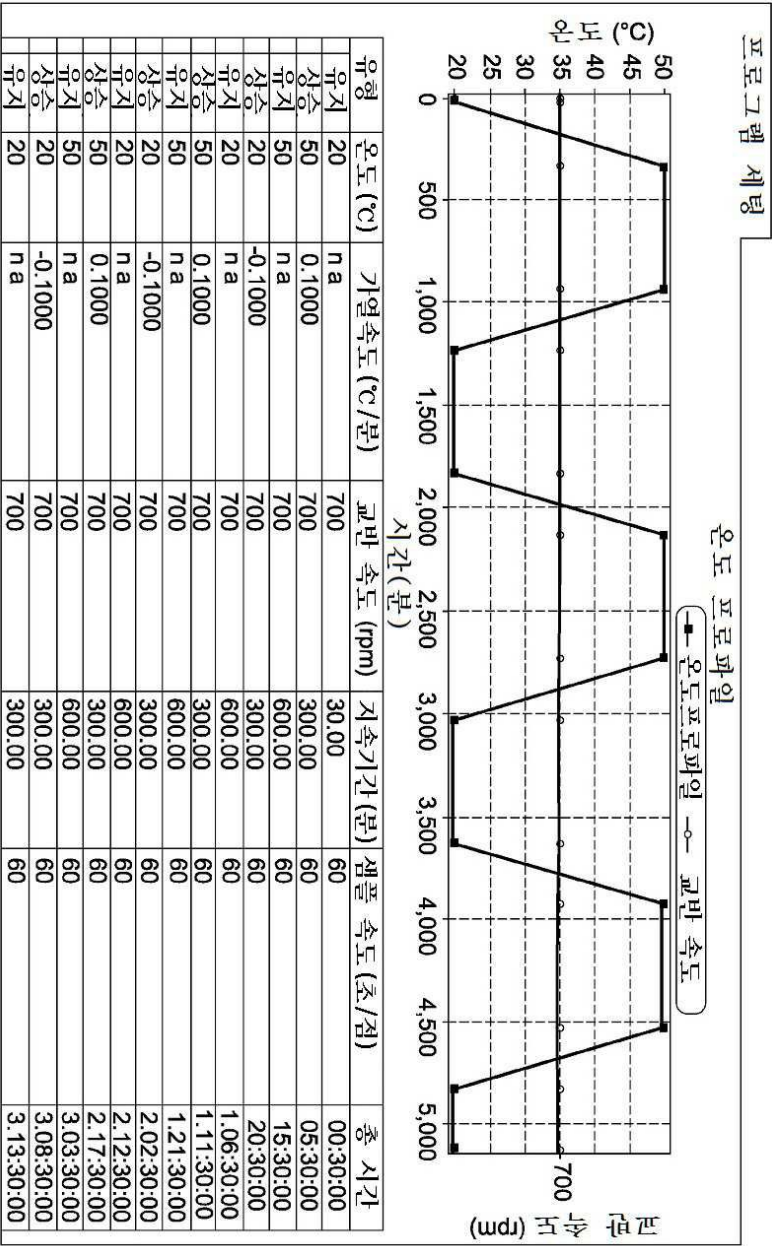
도면3



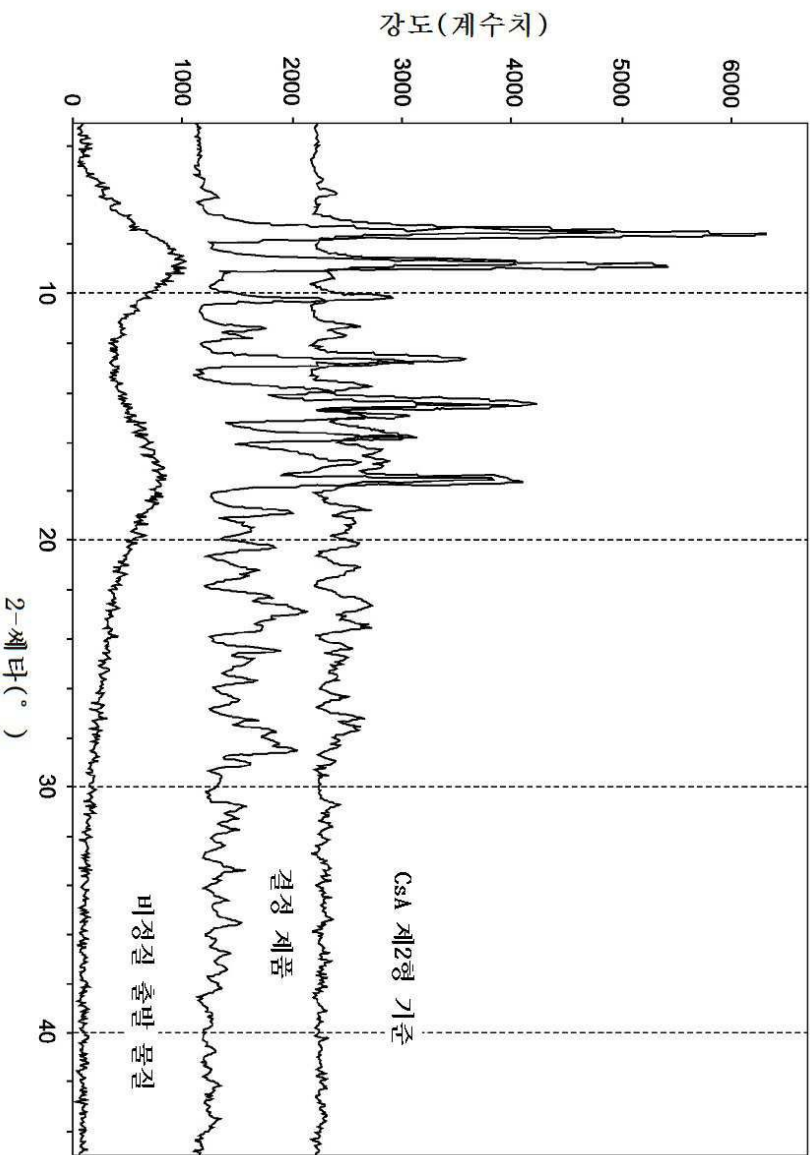
도면4



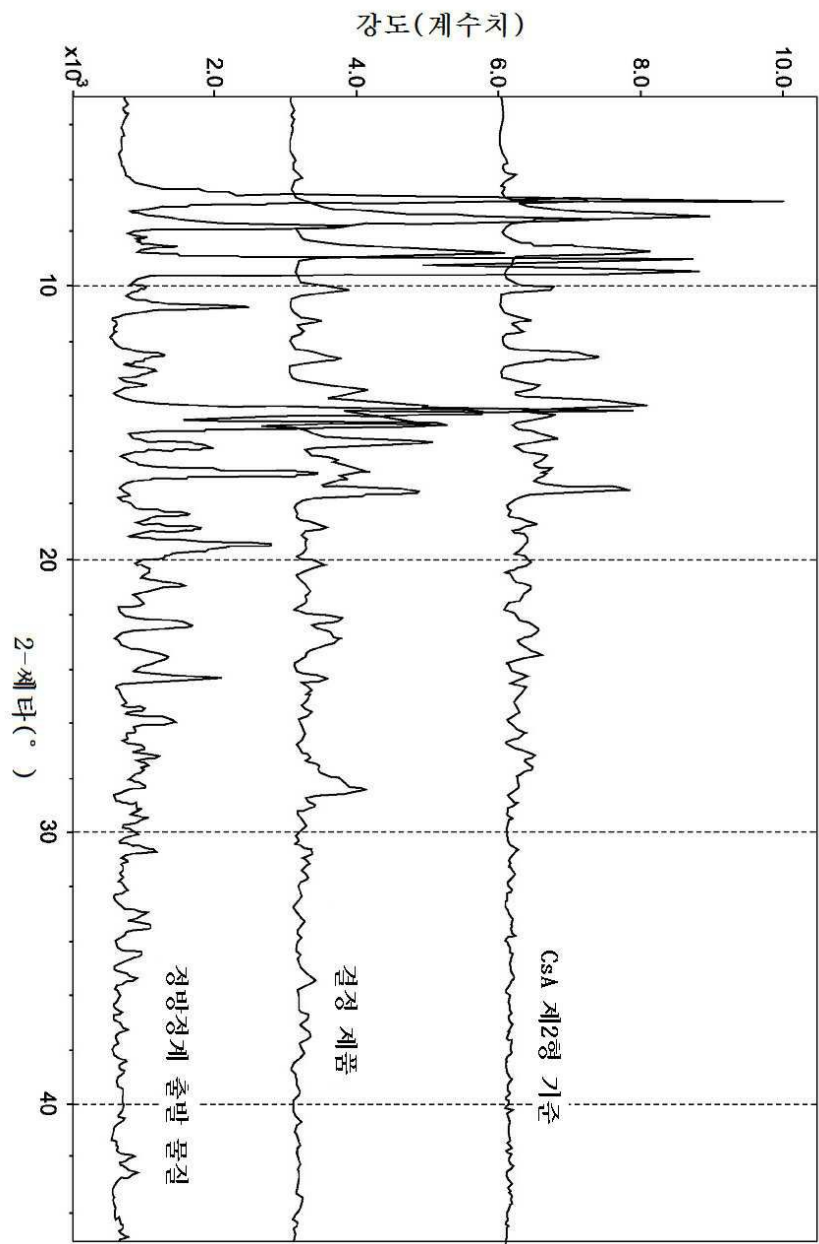
도면5



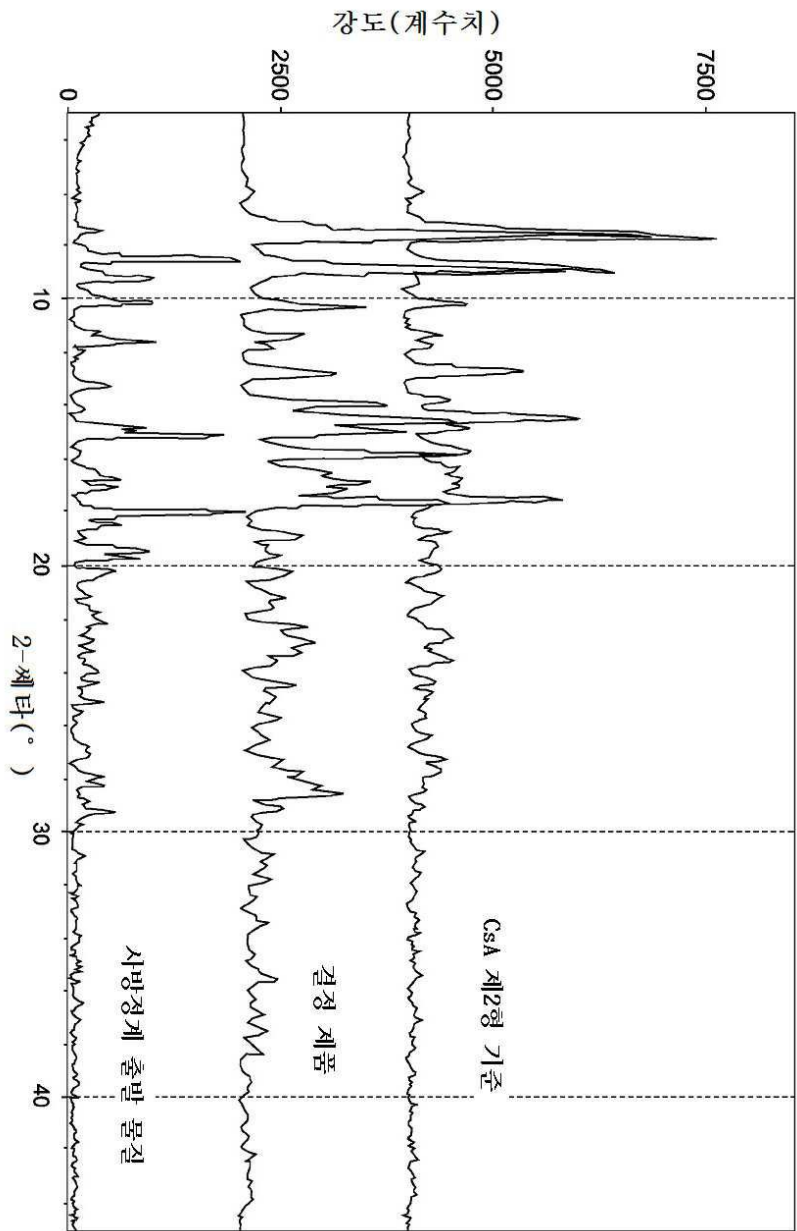
도면6



도면7



도면8



도면9

