



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년03월26일
(11) 등록번호 10-1130756
(24) 등록일자 2012년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/427 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0035551
(22) 출원일자 2008년04월17일
심사청구일자 2008년04월17일
(65) 공개번호 10-2009-0110000
(43) 공개일자 2009년10월21일
(56) 선행기술조사문헌
논문2:Polymer(Korea)*
논문1:약제학회지*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국교통대학교산학협력단
충청북도 충주시 대소원면 대학로 50
(72) 발명자
이용규
충북 충주시 대학로 72번지 충주대학교 화공생물
공학과
신고은
인천 부평구 갈산동 동남아파트 1동 405호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김정현

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김중호

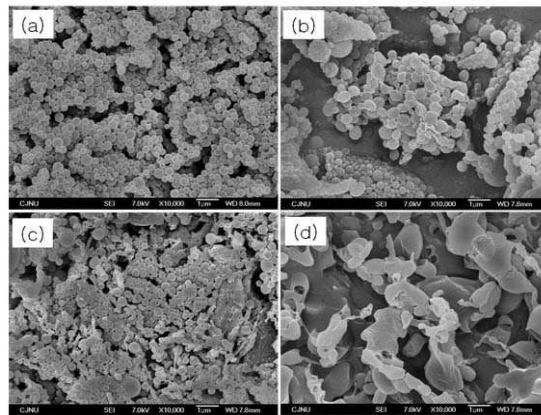
(54) 발명의 명칭 로시글리타존을 포함하는 경구투여용 나노입자 전달체 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 로시글리타존(rosiglitazone)을 포함하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 로시글리타존을 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체와 폴리비닐알콜이 일정량 조절 포함되어 제조된 생분해성 고분자 나노입자에 봉입되어, 고른 크기의 입자 분포도를 가지며, 로시글리타존이 고효율로 봉입된 나노입자 전달체를 제공하는 발명에 관한 것이다.

본 발명에 의한 나노입자 전달체는 로시글리타존의 위장흡수율과 물에 대한 용해도가 증가되고, 로시글리타존의 용출이 장시간 일정하게 이루어지는 효과를 나타내며, 생분해성 고분자의 혼합비를 조절하는 간단한 조작으로 나노입자의 크기 및 형태의 조절이 가능하다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

허강무

대전광역시 서구 복수동로 21-19, 111동 1303호 (복수동, 초록마을1단지)

김영덕

경기도 수원시 장안구 경수대로1081번길 14 (과장동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10027102

부처명 산업자원부

연구사업명 지역산업기술개발사업

연구과제명 글리타존계 당뇨병치료제의 나노제제 기술개발

주관기관 동우신테크 주식회사

연구기간 2006년04월01일~2008년03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체 95 ~ 99 중량%와 폴리비닐알콜 1 ~ 5 중량% 혼합물이 균일하게 혼합되어 이루어진 생분해성 고분자 나노입자 100 중량부에 대하여 로시글리타존(rosiglitazone) 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염 0.1 ~ 1 중량부가 구상으로 봉입된 것을 특징으로 하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체는 분자량 40,000 ~ 75,000 범위인 것을 특징으로 하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체.

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 나노입자의 직경이 100 ~ 150 nm 범위인 것을 특징으로 하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체.

청구항 5

1) 유기용매에 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체 95 ~ 99 중량%와 폴리비닐알콜 1 ~ 5 중량% 혼합물을 첨가하고 균질화시켜 생분해성 고분자 나노입자를 제조하는 과정,

2) 로시글리타존 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염이 상기 생분해성 고분자 나노입자 100 중량부에 대하여 0.1 ~ 3 중량부 범위로 혼합된 약물 조성물을 10,000 ~ 30,000rpm 범위의 속도로 교반하여 로시글리타존이 봉입된 구상의 나노입자를 제조하는 과정, 및,

3) 상기 로시글리타존이 봉입된 구상 나노입자를 정제 및 건조하여 나노입자 분말을 제조하는 과정

을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체의 제조방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 교반은 5 ~ 60 분간 수행되는 것을 특징으로 하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

본 발명은 로시글리타존(rosiglitazone)을 포함하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 당뇨병(Diabetes Mellitus, DM)은 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린의 정상적인 기능이 이루어지지 않아 혈액 내 포도당의 농도가 높아지고 혈액 내 포도당이 소변으로 배출되는 질환이다.
- [0003] 이러한 당뇨병은 인슐린의 생산 유무에 따라 인슐린을 생산하지 못하는 인슐린 의존성 당뇨병(1형 당뇨병)과 인슐린 생산이 충분하지 않고 인체 세포가 인슐린의 농도에 정상적으로 반응하지 못하는 증상을 가지는 인슐린 비의존성 당뇨병(2형 당뇨병)으로 크게 구분한다.
- [0004] 1형 당뇨병은 ‘소아당뇨’라고 불리기도 하며, 한국의 경우 전체 당뇨 환자의 3 ~ 5 %정도를 차지하고 있고, 유전적인 요인이나 자가면역기전으로 인한 이자의 랑게르한스섬 베타세포의 파괴로 인하여 발생한다.
- [0005] 2형 당뇨병은 유전적인 요인 외에도 식생활의 서구화에 따른 고열량·고지방·고단백의 식단, 운동부족, 스트레스 등 환경적인 요인이 크게 작용하는 것으로 보이며, 한국의 경우 전체 당뇨 환자의 90 ~ 95 % 정도를 차지하고 있다.
- [0006] 당뇨병 치료제인 로시글리타존 (상품명: 아반디아정)은 강력한 혈당저하제로 2형 당뇨병치료에 주로 사용되고 있다.
- [0007] 상기 “아반디아”는 영국의 글락소스미스클라인 제약회사가 개발한 당뇨병 치료제로서, 1997년부터 시판된 레줄린에 이어 2형 당뇨병 치료제로는 두번째로 나온 내복약으로 1999년 6월에 FDA(Food and Drug Administration: 미국식품의약국)의 승인을 얻었고, 2000년 7월 EU(European Union: 유럽연합)로부터 유럽 15개국에 대한 판매 승인을 얻었으며, 현재 국내에서도 판매되고 있다.
- [0008] 기존의 설포닐우레아(SU)계 약물이 췌장의 베타세포를 자극하여 인슐린 분비를 증가시키는 기전으로 혈당을 떨어뜨린 데 비하여, 이 약은 지방조직, 근육조직 및 간에서 인슐린 작용과 관련된 수용체를 직접 자극하여 인슐린 저항성을 감소시키는 기전으로 혈당을 떨어뜨린다. 즉, 인슐린을 생성하지 않고 인슐린을 사용하는 방법을 개선시키는 것이다. 따라서 인슐린을 생성하지 못하는 1형 당뇨병 환자에게는 복용을 금하고 있다.
- [0009] 상기 로시글리타존의 부작용으로는 두통, 호흡기질환, 부종 등의 증상을 보이며, 최근에는 장기간 동안 대량 복용한 사람들에서 저혈당 및 심부전이 발생하여 심각한 문제가 되고 있다. 또한, 로시글리타존은 간효소와 강하게 결합하여 체제에 포함된 다른 약물들의 효과를 방해하는 것으로 나타나고 있다. 이러한 부작용들은 약물의 농도와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.
- [0010] 약물들의 부작용을 최소화하고 위장흡수 효과를 높이기 위한 방법들 중 새로운 고분자합성 및 약물 맞춤형 고분자제제들이 최근에 활발하게 개발되고 있다. 수용액에 분산되지 않는 소수성약물들을 봉입하기 위한 일례로는 마이셀(micelle) 또는 고분자공중합체가 개발되고 있으며, 약물의 위장 흡수 향상을 위한 새로운 위장흡수 촉진제 및 나노제제들은 효능이 높은 것으로 알려져 있다.
- [0011] 고분자마이셀은 친수성블록과 소수성블록이 화학적으로 결합되거나 양쪽성 블록고분자가 이중 또는 삼중으로 결합되어 자가응집형 나노구조를 형성하게 된다. 이러한 고분자마이셀은 저분자 계면활성제와 비교하여 시험관 내(in vitro)에서 높은 안정성을 가지며 약물과의 강한 응집력을 나타내어 높은 봉입률을 가지고 있으며 생체 내에서 장기-순환(long-circulation) 효과와 우수한 생체적합성 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, 생체 내에서는 고분자 농도가 임계 마이셀 농도(Critical micelle concentration, CMC) 이하로 떨어질 경우, 고분자 구조가 분산되어 약물들의 전달 효과가 떨어지는 경우가 있어 우려되고 있다.
- [0012] 이와는 달리, 천연 고분자 및 생체적합성 고분자를 이용하여 제조된 나노입자는 고분자마이셀에 비해 높은 물리적 안정성을 보인다.
- [0013] 천연고분자 재료로는 키토산, 히파린 같은 다당류가 약물전달 및 경구투여용으로 많이 사용되어 왔다. 합성고분자 재료로는 공중합체인 폴리(락타이드-co-글리콜라이드)[Poly (lactide-co-glycolide, PLGA)]가 수 십 년 동안 약물의 서방성 제제로 사용되어 왔다.
- [0014] 상기 PLGA는 높은 생체적합성, 조절 가능한 생분해 능력 이외에도 구성하는 모노머인 락타이드(lactide)와 글리콜라이드(glycolide)의 조성 및 환경에 따라 다양한 생분해 메커니즘 발현이 가능하고, 최종적으로 분해되어 무독성의 저분자로 전환되어 대사작용에 의해 생체외부로 방출될 수 있다는 장점을 가진다.

[0015] 그러나, 상기 PLGA는 주로 마이크론 이상의 크기분포를 가진 형태로 조직공학이나 복강으로 투여하는 제제로 많이 사용되어 왔을 뿐이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0016] 이에, 본 발명의 발명자들은 상기한 문제점을 해결하기 위하여 연구 노력한 결과, 로시글리타존을 생분해성 고분자 용액에 분산시켜 나노입자화 함으로써 로시글리타존이 수용액에 대하여 낮은 용해도를 가지는 문제점을 해결할 수 있고, 체내에서의 안정성을 향상시킬 수 있으며, 생체 내에서의 독성을 최소화하여 상기한 부작용을 감소시킬 수 있고, 생체 내에서의 흡수율을 향상시킬 수 있는 등의 효과를 나타낼 수 있음을 알게되어 본 발명을 완성하였다.

[0017] 따라서, 본 발명은 로시글리타존이 봉입된 2차 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

[0018] 상기한 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일례로서, 본 발명은 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체 95 ~ 99 중량%와 폴리비닐알콜 1 ~ 5 중량% 혼합물이 균일하게 혼합되어 이루어진 생분해성 고분자 나노입자에 대하여 로시글리타존(rosiglitazone) 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염이 구상으로 봉입된 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체를 포함한다.

[0019] 상기한 과제를 해결하기 위한 본 발명의 또 다른 일례로서, 본 발명은 1) 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체와 폴리비닐알콜이 95 ~ 99 중량% : 1 ~ 5 중량% 범위로 혼합된 생분해성 고분자 혼합액을 200 ~ 400 rpm 범위의 속도로 교반하여 생분해성 고분자 나노입자를 제조하는 과정, 2) 로시글리타존 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염이 상기 생분해성 고분자 나노입자 100 중량부에 대하여 0.1 ~ 1 중량부 범위로 혼합된 약물 조성물을 10,000 ~ 30,000 rpm 범위의 속도로 교반하여 로시글리타존이 봉입된 구상의 나노입자를 제조하는 과정, 및, 3) 상기 로시글리타존이 봉입된 구상 나노입자를 정제 및 건조하여 나노입자 분말을 제조하는 과정을 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체의 제조방법을 포함한다.

[0020] 이하 본 발명의 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체 및 이의 제조방법을 구체적으로 설명한다.

[0021] 본 발명의 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체는, 로시글리타존(rosiglitazone) 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염이 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체와 폴리비닐알콜이 혼합된 생분해성 고분자에 구상으로 봉입되어 구성된다.

[0022] 상기 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체는 분자량 40,000 ~ 75,000 범위인 것을 사용하는 것이 나노입자를 제조하는데 유리한 점이 있어 바람직하다.

[0023] 상기 로시글리타존은 그의 약학적으로 허용가능한 염의 상태로 사용될 수 있음은 물론이며, 구체적으로 항암제, 소수성약물, 단백질약물 등을 사용할 수 있다. 가장 바람직하기로는 물에 녹지 않는 소수성을 띠고 있는 약물을 사용하는 것이 좋다.

[0024] 상기 로시글리타존 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염은 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체와 폴리비닐알콜이 혼합된 생분해성 고분자 100 중량부에 대하여 0.1 ~ 1 중량부 범위로 포함되는 것이 바람직하며, 이때 로시글리타존의 함량이 상기 범위 미만이면 약물의 효능을 확인하기 힘들며, 로시글리타존의 함량이 상기 범위를 초과하면 로시글리타존이 나노입자 내에 충분히 봉입되지 않고 다시 석출하는 경향이 있어 실익이 없다.

[0025] 상기 나노입자의 직경이 50 ~ 150 nm 범위인 것을 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 100 ~ 150 nm 범위인 것을 사용하는 것이 좋다. 이는 위장내에서의 세포들 사이나 세포 안으로 흡수되기 제일 좋은 크기분포이기 때문이다. 나노입자의 직경이 상기 범위 미만이면 효소에 의해 쉽게 분해되기 쉬운 경향이 있다.

[0026] 로시글리타존의 봉입으로 나노입자의 직경에 다소 변동이 있을 수 있으나, 로시글리타존이 봉입된 본 발명의 2

형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체의 직경도 50 ~ 150 nm, 바람직하기로는 100 ~ 150 nm 범위가 되도록 조절하는 것이 생체 내에서 적용하기에 더욱 좋다.

- [0027] 이러한 본 발명의 로시글리타존(rosiglitazone)을 포함하는 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체의 제조방법은 각 과정별로 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0028] 1) 유기용매에 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체 95 ~ 99 중량%와 폴리비닐알콜 1 ~ 5 중량% 혼합물을 첨가하고 균질화시켜 생분해성 고분자 나노입자를 제조하는 과정이다.
- [0029] 상기 유기용매는 탄화수소계 유기용매를 사용할 수 있으며, 구체적으로 에틸아세테이트, 클로로포름 등을 선택 사용할 수 있으며, 바람직하기로는 에틸아세테이트를 사용하는 것이 좋다.
- [0030] 상기 유기용매에 생분해성 고분자로서 폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 공중합체와 계면활성제로서 폴리비닐알콜의 혼합물은 95 ~ 99 중량% : 1 ~ 5 중량% 범위, 바람직하기로는 97 ~ 99 중량% : 1 ~ 3 중량% 범위로 포함하는 것이 좋은데, 유기용매 중 생분해성 고분자의 함량이 상기 범위 미만이면 제조 후 분석이 어려운 경향이 있고, 상기 범위를 초과하여 과량이면 점성이 증가하여 제조공정이 어려워지는 경향이 있다.
- [0031] 상기 균질화를 위하여 다양한 균질화 수단을 채용할 수 있으며, 구체적으로 호모게나이저(homogenizer) 등을 사용할 수 있다. 균질화는 10,000 ~ 30,000 rpm 조건, 바람직하기로는 20,000 ~ 30,000 rpm 조건으로, 5 ~ 30분간, 바람직하기로는 5 ~ 20 분간 지속적으로 적용하는 것이 구상의 나노입자를 얻는데 좋다. 균질화가 수행되는 동안 온도는 10 ~ 30 °C 범위, 바람직하기로는 20 ~ 25 °C 범위를 유지하도록 하는데, 온도가 과도하게 증가하면 생분해성 고분자의 변성을 초래할 수 있으므로 주의하도록 한다.
- [0032] 2) 로시글리타존 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염은 상기 생분해성 고분자 나노입자 100 중량부에 대하여 0.1 ~ 1 중량부 범위로 혼합된 약물 조성물을 10,000 ~ 30,000 rpm 범위의 속도로 교반하여 로시글리타존이 봉입된 구상의 나노입자를 제조하는 과정이다.
- [0033] 상기 로시글리타존과 생분해성 고분자 나노입자가 혼합된 조성물은 당업계에서 통상적으로 알려진 교반수단들을 선택하여 충분히 교반할 수 있으며, 바람직하기로는 호모게나이저 수단을 선택하는 것이 효율적이다. 이때 교반은 10,000 ~ 30,000 rpm 범위, 바람직하기로는 20,000 ~ 30,000 rpm의 범위로 수행되는 것이 좋으며, 교반시간은 5 ~ 30분간, 바람직하기로는 5 ~ 20분간 수행되는 것이 좋다.
- [0034] 3) 상기 로시글리타존이 봉입된 구상 나노입자를 정제 및 건조하여 나노입자 분말을 제조하는 과정이다.
- [0035] 상기와 같은 과정을 거치면서 로시글리타존이 봉입된 구상 나노입자는 침전과 필터 방법으로 정제되고, 생분해성 고분자를 용해시키기 위하여 사용된 유기용매 등을 제거하기 위하여 20 ~ 50 °C 범위의 온도조건에 5 ~ 60 분간 가열 및 교반하도록 한다. 건조방법은 사용된 생분해성 고분자 및 로시글리타존의 안정성을 고려하여 다양한 수단을 선택할 수 있으며, 구체적으로 동결건조법을 사용할 경우 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체의 유효한 약효 성분인 로시글리타존은 미국식품의약청의 허가를 받은 성분이며, 안정성이 이미 입증된 성분이므로, 로시글리타존에 대한 독성검사 결과는 생략하였다.
- [0037] 상기한 과정을 거치면서 제조된 본 발명의 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체는 로시글리타존 사용량 1 중량부를 예로 들었을 경우 봉입률이 80 % 이상으로 높게 나타나며, 로시글리타존 자체보다 용해도가 2 ~ 2.5 배 정도로 월등히 향상되고, 수용액 또는 체내에 적용되었을 경우 안정성이 더욱 향상되는 효과를 나타낸다.
- [0038] 본 발명의 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체는 당업계에 알려진 다양한 방법을 적용하여 액제, 현탁제, 캡슐제 및 정제 등의 다양한 제형화가 가능하며, 체내에서의 안정성이 향상되므로, 기존의 로시글리타존의 다량 사용으로 인해 야기되던 독성 및 부작용이 현저히 저하된 것임을 유추할 수 있고, 1일 투여횟수를 1 ~ 2회 범위로 줄이더라도 충분히 약효의 지속효과를 얻을 수 있다.
- [0039] 로시글리타존의 하루 투여량은 체중 70 kg인 성인 남자를 기준으로 하루 4 ~ 8 mg을 투여하여 왔으나, 본 발명의 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체를 적용할 경우 하루 투여량은 로시글리타존 기준으로 3 ~ 5 mg 수준으로 조절가능하다. 또한, 나노입자 전달체에 의하여 로시글리타존이 서서히 방출되므로 상기한 수준으로도 충분한 효과를 얻을 수 있으므로, 과량의 로시글리타존 사용으로 인한 부작용을 감소시키는 효과를 기대할 수 있다.

[0040] 상기한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다른데, 이는 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

효 과

[0041] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의하면 간단한 유화-증발(Emulsion-evaporation)법을 사용하여 로시글리타존이 봉입된 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체를 제조할 수 있으며, 로시글리타존의 함량이 1 중량%의 경우 봉입률을 80 % 이상으로 향상시킬 수 있고, 제조된 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체의 입자 분포가 100 내지 150 nm 크기의 고른 입자분포를 가지도록 조절할 수 있다.

[0042] 이러한 본 발명의 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체는 36시간 동안의 용출실험 결과 초기에 약물의 방출이 급격하게 일어나는 현상(Burst effect)이 관찰되었으며, 그 후 36 시간동안 일정하게 약물이 지속적으로 방출되는 특성을 나타내므로, 기존에 알려진 로시글리타존의 과량 사용에 의한 부작용을 저하시킬 수 있을 것임이 충분히 예측된다.

[0043] 따라서, 본 발명에 의하면 2형 당뇨병 치료에 보다 적합한 특성을 나타내는 경구투여용 나노입자 전달체를 제공할 수 있는 효과를 기대할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 구체적으로 설명하겠는바, 다음 실시예에 의하여 본 발명이 한정되는 것이 아님은 자명하다.

[0045] 참고예. 시약 및 재료

[0046] 본 발명의 실시예 및 실험에서 사용한 고분자와 수용성첨가제로써 PLGA (MW: 40,000 내지 75,000), 폴리비닐알콜(PVA)는 시그마 사(sigma)에서 구매하였고, 사용된 용매는 HPLC 급 이상으로 시그마(Sigma)와 피셔(Fisher)에서 각각 구매하였다. 약물인 로시글리타존(Rosiglitazone)은 동우신테크㈜에서 기증을 받아 사용한 것이다.

[0047] 실시예 1 : PLGA 나노입자의 제조

[0048] 입자크기가 균일한 나노입자를 제조하기 위해 PLGA (200 mg)를 10 ml 에틸아세테이트(ethyl acetate) 용매에 녹여 2시간 동안 교반을 한 후 폴리비닐알콜(PVA) 수용액(0.1 ~ 5 중량%)에 첨가하였다.

[0049] 두 용액을 혼합한 후, 호모게나이저(homogenizer)를 이용하여 10분 동안 13,500 rpm에서 균질화시켰다.

[0050] 균질화된 용액에서 에틸아세테이트 용액을 증발시키기 위해서 40 °C에서 2시간 동안 강하게 교반을 한 후, 원심분리를 통해 과량으로 첨가된 PVA를 제거하였다 (13,000rpm, 10분, 3번). 침전된 PLGA를 냉동건조하여 PLGA 나노입자를 얻었다.

[0051] 실시예 2. 형태학적 관찰

[0052] 상기 실시예에 제시된 방법으로 형성된 PLGA 나노입자 형태 및 입자 크기 관찰 등 형태학적 관찰은 광산란기(DLS)와 주사전자현미경(FE-SEM, JEOL)을 사용하여 수행하였다. SEM를 위하여 PLGA 나노입자를 양면테이프를 붙여 샘플 판에 올려 놓은 후 플라즈마 스퍼터에서 90초 동안 백금코팅을 하였다.

[0053] PLGA의 분자량은 40,000 내지 75,000 으로 고정하고, 균질기의 RPM은 13,500으로 일정하게 고정하였으며, PVA의 농도가 입자 크기에 미치는 영향을 관찰하기 위해 나노입자를 제조할 때 첨가되는 PVA의 양을 0.1, 1, 3, 5 중량%로 조절하여 첨가하였으며, 이렇게 얻어진 PLGA 나노입자의 형태 및 크기를 다음 표 1과 도 1에서 비교하여 정리하였다.

표 1

[0054]

시료	PVA(중량%)	로시글리타존(중량부*)	크기(nm)	형태
PLGA	0.1	0	625 ± 56	구형
	1	0	315 ± 22	구형
	3	0	165 ± 13	구형
	5	0	85 ± 9	구형
	3	0.1	185 ± 25	구형
	3	0.5	220 ± 51	구형
	3	1	250 ± 33	구형
	3	3	2,312 ± 350	형태없음
	*) PLGA와 PVA 합량 100 중량부에 대한 상대량			

[0055]

그 결과 1 중량%의 PVA가 첨가 되었을 때는 직경이 150 내지 250 nm 범위의 PLGA 나노입자가 형성됨을 확인 할 수가 있었고, 3 중량%의 PVA가 첨가되었을 경우에는 100 nm 이하의 PLGA 나노입자가 골고루 분포됨을 확인하였다. DLS로 분석한 결과와도 정확히 일치하고 있으며 평균크기가 95 ± 5 nm로 분포되었다. 5 중량% PVA가 첨가 되어 제조된 PLGA 나노입자의 경우에는 직경이 50 내지 80 nm 범위로 존재함을 확인하였다.

[0056]

한편, PLGA 나노입자 크기가 작을수록 입자의 안정성은 떨어지는 것으로 확인되었다. 특히, 50 nm 이하에서는 서로간의 상호작용이 커져서 응집현상이 일어나는 것으로 확인되었으며, PLGA 나노입자의 크기가 100 nm 이상으로 형성될 경우 가장 바람직한 안정성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0057]

실제로 혈액을 통해 전달될 경우에는 100 내지 250 nm 범위의 크기를 가진 입자들이 세포에 잘 전달되는 것으로 확인되었다. 또한, 안정성 실험에서도 3일까지 비슷한 크기분포를 가지고 있는 것으로 확인되어 수용액상에서 안정성을 유지하는 것으로 확인하였다.

[0058]

본 발명에서는 PVA의 함량을 3 중량%로 고정하고, 로시글리타존의 양을 PLGA와 PVA 합량 100 중량부에 대하여 0.1, 0.5, 1 그리고 3 중량부까지 변화시키면서 로시글리타존이 봉입된 나노입자의 크기 및 형상변화를 측정하였다. 그 결과, 1 중량부 까지의 로시글리타존은 PLGA 나노입자 안에 잘 봉입이 되는 것으로 확인되었으며, 크기도 크게 변화되지 않는 것으로 확인되었다. 그러나, 3 중량부의 로시글리타존을 첨가하여 제조된 PLGA 나노입자에 봉입할 경우 입자는 크기가 크게 변화되었고, 로시글리타존의 봉입이 완전하게 이루어지지 않았으며, 입자간 상호영김으로 입자분포가 고르지 않았다(도 2). 따라서 바람직하게 고른 형태와 크기를 갖는 나노입자는 약물의 함유량이 1 중량부 이하에서 형성될 수 있음을 알 수 있었다.

[0059]

실시예 3. 수용액상에서의 입자 크기 및 안정성

[0060]

수용액상에서의 나노입자의 크기분포를 확인하기 위해 10 mg의 나노입자를 5 ml의 수용액에 분산 시킨 후 제타사이저(Zeta Sizer, Malvern instruments)로 측정하였다. 또한, 수용액상에서 일정한 기간 동안 같은 크기를 유지하는지를 살펴보기 위해 37 ℃에서 보관 한 후, 3, 5, 12시간 그리고 3일까지 나노입자 크기 변화를 측정하였다.

[0061]

실시예 4. 약물봉입률

[0062]

PLGA 나노입자 안에 로시글리타존을 봉입하기 위해 약물의 농도를 고분자 대비 0.1, 0.5, 1, 3, 5 중량부까지 변화시켰다. 봉입방법은 나노입자 제조방식과 동일하며 균질기에 투입하기 전에 혼합되어 강하게 균질화시켰다. 약 10분 동안 균질화과정이 끝나고 2시간 동안 유기용매를 제거하기 위해 교반하였으며, 원심분리와 정제과정을 통해 냉동 건조되었다. 약물의 농도에 따른 약물봉입률을 측정하였으며 주사전자현미경을 통해 관찰하였다.

[0063]

로시글리타존을 봉입하기 위한 방법으로 W/O 방법이 사용되었으며 약물과 고분자의 질량비율을 30:1에서 1:1의 비율로 조절하여 실험하였다. 약물이 봉입된 고분자 나노입자는 동결건조 처리된 고체상 입자형태로 일정량을 고정상 용매에 녹인 뒤 HPLC분석을 통하여 함유된 로시글리타존의 농도를 측정하였고 봉입률과 약물함량은 다음

수학식을 이용하여 결정하였다.

수학식 1

$$\text{Drug Loading Content(\%)} = \frac{\text{measured amount of drug}}{\text{total amount of drug loaded micelle}} \times 100$$

수학식 2

$$\text{Drug Loading Efficiency(\%)} = \frac{\text{measured concentration of drug}}{\text{initial concentration of drug}} \times 100$$

표 2

시료	PVA(중량%)	로시글리타존(중량부*)	봉입률(%)
PLGA	3	0.1	98
	3	0.5	95
	3	1	80
	3	3	51
	*) PLGA와 PVA 합량 100 중량부에 대한 상대량		

상기 표 2에서 볼 수 있듯이 약물의 초기 투입량이 일정이상으로 증가할 경우 나노입자의 봉입률이 크게 저하되는 것으로 확인되었다. 1 중량부 약물(로시글리타존)의 경우에는 80 %의 봉입률을 나타내었으나, 3 중량부 약물이 첨가된 경우 봉입률이 51 %로 크게 저하되는 것을 확인하였다.

이는 과량의 약물을 첨가한 경우 나노입자의 형성이 어려워 약물이 나노입자의 내부로 봉입되지 않고 외부에 남아있어 정제과정에서 제거되는 양이 상대적으로 많아지기 때문이라 사료된다.

일반적으로 봉입률은 고분자와 약물 사이의 친화성에 의해 좌우 되는데, 이러한 친화성에 영향을 주는 고분자-약물간의 상호작용은 소수성 상호작용, 반데르발스 상호작용, 수소결합, π-π 스택킹(stackng), 구조적 친화성 등 여러 가지 복합적인 요인들에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다. 높은 봉입률은 PLGA 분자와 약물간의 상호작용과 소수성 힘에 따른 약물 봉입 효율이 다른 고분자에 비해 더 유리하기 때문이라 사료된다.

실시예 5. 약물용출 및 분해거동

로시글리타존은 소수성이 매우 강하여 물에 낮은 용해율을 가지고 있다. 용출된 약물의 양은 나노입자 안에 남아 있는 약물의 양으로부터 계산하였다. 10 mg의 약물이 봉입된 나노입자를 셀룰로오스 아세테이트 멤브레인(MWCO.: 8,000)에 넣고 20L의 PBS 용액에 넣어 37 °C에서 용출되는지를 확인하였다.

또한, 바닥 조건(sink condition)을 유지하기 위해 정기적으로 PBS용액을 교환하여 용출되고 남은 약물의 양을 계산하였다. 총 시간은 36시간 정도이며, 2, 4, 8, 14, 24, 36시간에 나노입자에서 용출된 약물의 양을 측정하였다.

남아 있는 로시글리타존은 이동상에 녹여 HPLC를 이용하여 측정하였다. 분석조건으로 자동 샘플주입기(NS-6000A, Futecs)와 Prontosil C18-ace-EPS 컬럼(250× 4.6 mm, 5.0-μm, Bischoff)이 장착되어있으며 이동상과 고정상 용매로 아세토니트릴(acetonitrile) : 0.1 mol/L 암모늄 아세테이트(ammonium acetate) : 아세트산(acetic acid) (25:25:1)를 사용하였다.

로시글리타존의 UV-흡수과장 235 nm에서 1 ml/min의 유속으로 상온에서 측정하였다. 분해거동을 살펴보기 위해 위의 조건과 동일시하에 PLGA 나노입자만을 멤브레인 안에 넣고 시간별로 추출하여 분자량을 측정하였다.

[0075] 약물 함량이 사용된 고분자 함량대비 0.1,0.5 그리고 1 중량부로 조절된 PLGANANO입자를 이용하여 생체 외 방출 거동을 알아본 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 초기에는 용출율이 증가하다가 5시간 이후에는 용출율이 감소하는 것으로 확인하였다. 이는 나노입자 표면에 붙어 있거나 가까이에 봉입된 약물들에 의해 나오는 전형적인 초기방출 형태이다. 0.5와 1 중량부의 약물이 들어가 있는 PLGA 나노입자의 경우에는 용출이 시작되고 35시간이 지나면 90% 이상의 약물들이 방출됨을 알 수가 있다.

[0076] 나노입자를 이루는 PLGA의 생분해성이 약물방출속도에 영향을 미칠 수 있으므로 약물이 함유되지 않은 PLGA 나노입자의 분해거동을 분자량을 통해 측정해 보았다. 용출되는 조건하에서 1일 동안 고분자의 분자량이 급격히 줄어드는 것을 확인할 수가 있었고, 이후로도 10일의 관찰기간 동안 분자량이 계속해서 완만하게 감소되는 것을 확인할 수가 있었다(도 3). 따라서 초기단계의 급격한 고분자의 분자량 감소 또한 초기의 빠른 용출속도에 기여하는 것으로 사료된다.

[0077] 수용액상에서의 PLGA 나노입자의 크기변화를 용출되는 조건하에서 측정하였다. 그 결과로 처음에는 나노입자 크기가 150 ~ 200 nm로 존재하는 것으로 확인되었으며, 하루가 지난 후에는 나노입자는 800 nm까지 넓게 분포하였다. 3일이 지난 후에는 두 가지의 입자크기분포를 보였다 (도 4). 이러한 결과로부터 약물의 용출율은 나노입자의 분해속도와 입자크기 변화가 많은 영향을 준다는 것을 확인하였다.

[0078] **실시예 6. 고분자 분자량 측정**

[0079] 생분해성 고분자의 분자량은 GPC (Agilent 1100 series, USA)를 통하여 분석하였다. 두 개의 컬럼(pLgel 5 μm MIXED-D & E columns), RI 탐지기, 콰터너리(quaternary)펌프를 장착했으며, 폴리스티렌(polystyrene)을 기준 시료로 하여 1ml/min의 유속으로 측정하였다. 이동상 용매는 THF 를 이용하였으며 컬럼과 탐지기의 온도는 모두 40 °C를 유지하였다.

[0080] 이하, 본 발명에 따른 2형 당뇨병 치료를 위한 경구투여용 나노입자 전달체를 다양한 제형으로 제제화한 제조예를 설명하기로 한다. 이하에서 사용된 나노입자 전달체는 별도의 기재가 없는 한 PVA가 3 중량%로 혼합된 생분해성 고분자 나노입자에 대해 로시글리타존이 1 중량부가 함유된 경구투여용 나노입자 전달체 건조분말을 의미한다.

[0081] **제조예 1: 정제**

[0082] 하기의 조성에 따라 통상의 정제 제조방법으로 제조하였다.

[0083] 정제 조성물

[0084]	나노입자 전달체	500.0 mg
[0085]	유당	500.0 mg
[0086]	탈크	5.0 mg
[0087]	마그네슘 스테아레이트	1.0 mg

[0088] **제조예 2 : 캡슐제**

[0089] 하기와 같은 방법에 따라 다음과 같은 조성으로 캡슐제를 제조하였다.

[0090] 캡슐제 조성물

[0091]	나노입자 전달체	500.0 mg
[0092]	전분 1500	10.0 mg
[0093]	스테아르산마그네슘	100.0 mg

[0094] **제조예 3 : 과립제**

[0095] 하기의 성분을 통상의 과립제의 제조방법으로 과립제를 제조하였다.

[0096] 과립제 조성물

[0097]	나노입자 전달체	500.0 mg
[0098]	유당	100.0 mg
[0099]	탈크	5.0 mg

[0100] [참고문헌]

[0101] 1. R. Jalil and J.R. Nixon (1990), J. Microencapsul. 7, 297.

[0102] 2. R.A. Jain (2000), Biomaterials 21, 2475.

[0103] 3. S. Freiberg and X. Zhu (2004), Int. J. Pharm. 282, 1.

[0104] 4.C. Berkland, M. King, A. Cox, K. Kim and D.W. Pack (2002), J. Control. Release 82, 137.

[0105] 5.W. Jiang, R.K. Gupta, M.C. Deshpande and S.P. Schwendeman (2005), Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 391.

[0106] 6.S.H. Lee and H. Shin (2007), Adv Drug Deliv Rev. 59, 339.

[0107] 7.H. Hirabayashi and J. Fujisaki (2003), Clin Pharmacokinet 42, 1319.

[0108] 8.P. Masarachia, M. Weinreb, R. Balena and G.A. Rodan (1996), Bone 19, 281.

[0109] 9.H. Uludag and J. Yang (2002), Biotechnol. Prog. 18, 604.

[0110] 10. R. Niemi, J. Vepsalainen, H. Taipale and T. Jarvinen (1999), J Med Chem, 2, 5053.

[0111] 11.A. Ezra, A. Hoffman, E. Breuer, I.S. Alferiev, J. Monkkonen and N. El Hanany-Rozen (2000), J. Med. Chem. 43, 3641.

[0112] 12.K. Ogawa, T. Mukai, Y. Inoue, M. Ono and H. Saji (2006), J. Nucl. Med. 47, 2042.

[0113] 13.T. Musumeci, L. Vicari, C.A. Ventura, M. Gulisano, R. Pignatello and G. Puglisi, (2006), J Nanosci Nanotechnol. 6, 3118.

도면의 간단한 설명

[0114] 도 1은 PVA 함량((a)0.1 중량% (b) 1중량%, (c) 3중량%, (d) 5중량%)에 따른 PLGA 나노입자의 크기 변화를 나타낸 SEM 사진이다.

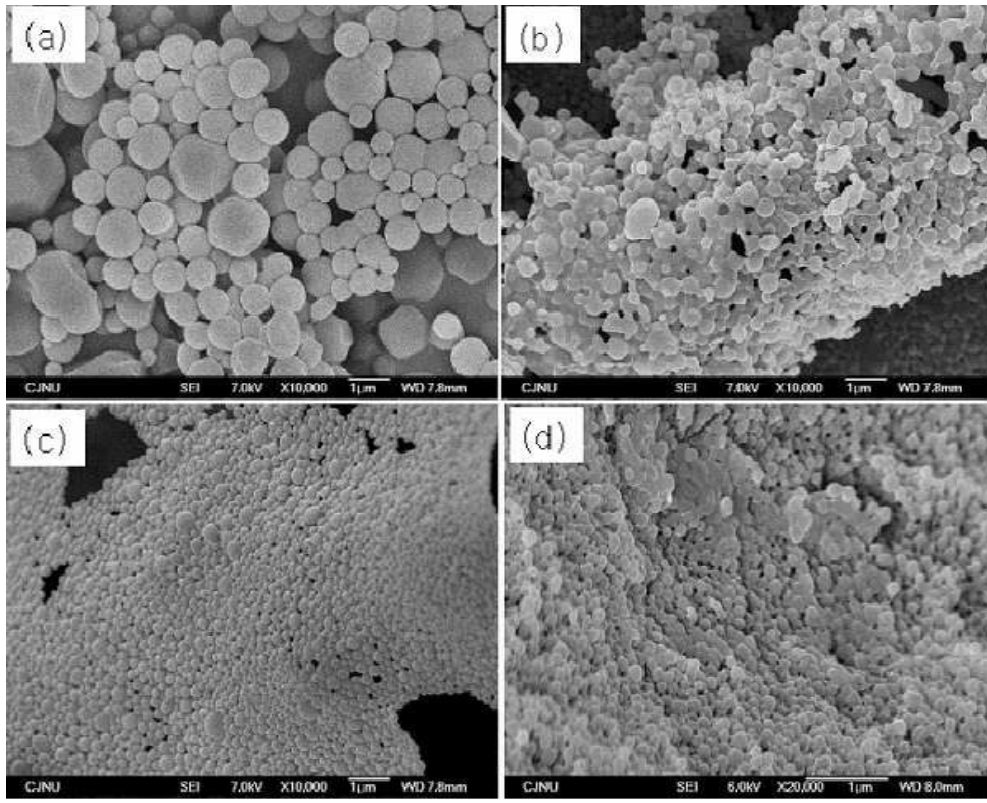
[0115] 도 2는 약물 봉입량((a)0.1중량부 (b) 0.5중량부, (c) 1중량부, (d) 3중량부)에 따른 PLGA 나노입자(PVA 3 중량%)의 형상 변화를 나타낸 SEM 사진이다.

[0116] 도 3은 PGLA 나노입자 붕괴에 따른 PLGA 나노입자로부터 로시글리타존의 방출(In vitro)을 나타낸 그래프이며, (a)에서 ●는 0.1 중량부, ■는 0.5 중량부 및 ▲는 1 중량부로 포함된 로시글리타존 함량을 의미하고, (b)에서 ●는 GPC에 의하여 측정된 PLGA의 분자량을 의미한다.

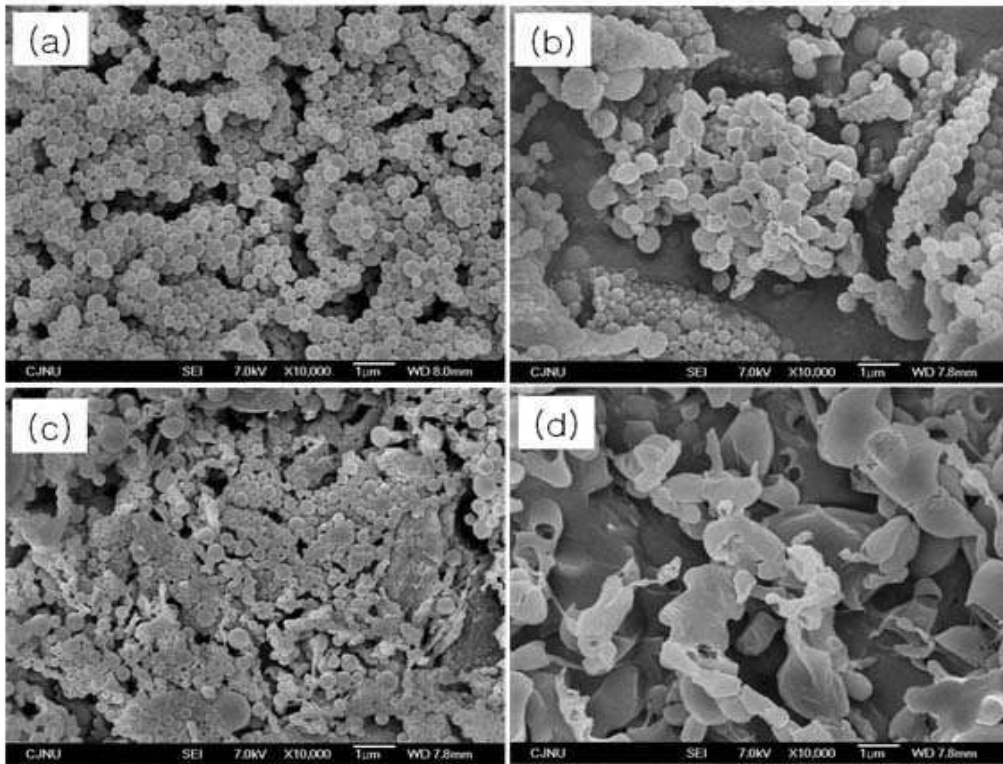
[0117] 도 4는 수용액상 중 PLGA 나노입자의 시간에 따른 입자 크기 분포를 나타내며, 입자 크기는 DLS(dynamic light scattering)에 의하여 측정된 것이다.

도면

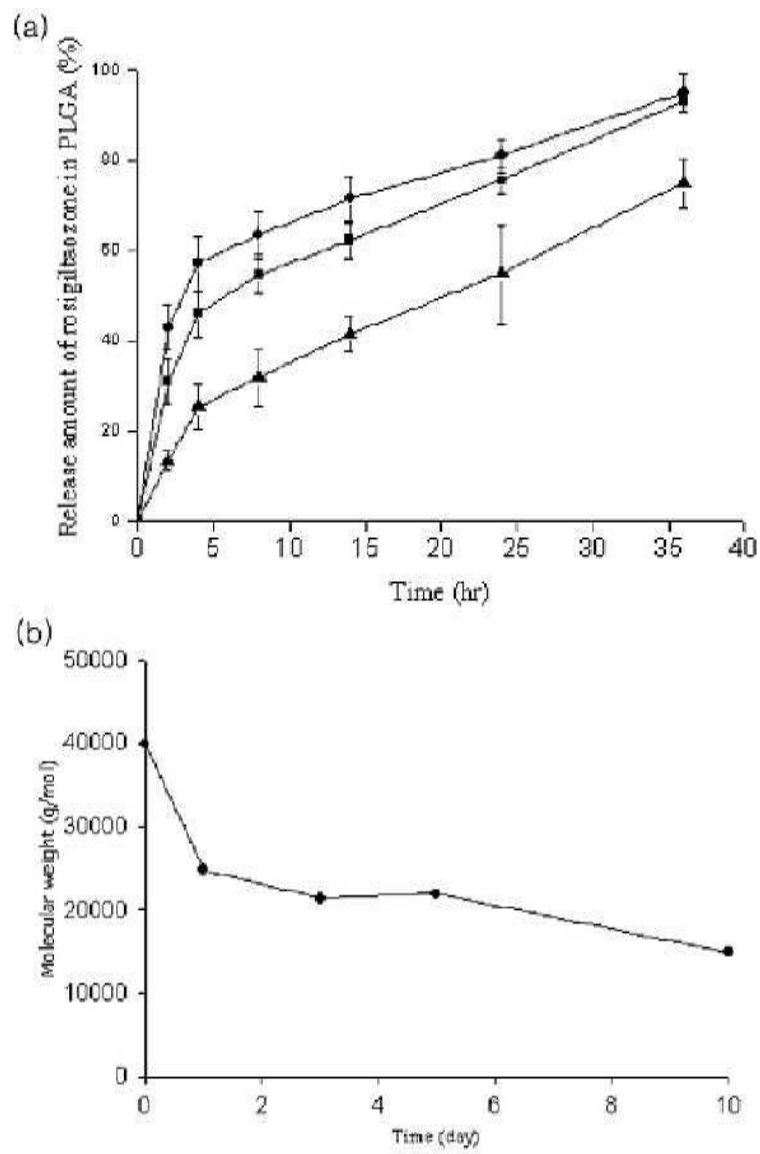
도면1



도면2



도면3



도면4

