명세서

발명의 명칭: 사이클로스포린을 함유하는 나노에멀젼 점안 조성물 및 그의 제조 방법

기술분야

[1] 본 발명은 사이클로스포린, 비수성용제, 유화제, 수성용제를 혼합함으로써 유효성분인 사이클로스포린의 용해도를 증가시키고 점안 조성물의 안정성을 개선시킨 나노에멀젼 점안 조성물 및 이의 제조방법, 이를 이용한 안과질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 면역억제제(Immunosuppressive drug)란 생체의 비정상적인 면역활성을 막거나 억제하여 면역 억제 치료에 사용되는 약제를 말한다. 면역억제제는 기관 또는 조직 이식 후에 나타날 수 있는 거부반응, 궤양 결장염 또는 크론병과 같은 염증성 장 질환, 류마티스 관절염, 베체트 증후군, 건선 또는 아토피성 피부염과 같은 염증성 또는 알레르기성 피부병, 만성 폐쇄 폐질환 또는 천식과 같은 염증성 또는 알레르기성 호흡기 질병, 전신 홍반 루푸스, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 안구 건조증 등의 수많은 질병의 치료제로 현재 사용되고 있다.

[3] 쇼그렌 증후군은 외분비선의 만성 염증성 질환으로, 특히 침샘과 눈물샘의 정상 조직이 파괴되어 침과 눈물의 생성이 줄어드는 것을 특징으로 하는 질환이다. 이 질환의 원인은 아직까지 완전히 밝혀지지 않았지만 가족력과 같은 유전적 요인과 바이러스, 사이토카인, 자가면역 항체들이 그 원인으로 보고되고 있다. 쇼그렌 증후군의 치료 약물로써 현재 면역억제제인 사이클로스포린이 사용되고 있으며, 증상이 심한 경우에는 비스테로이드성 항염제나 스테로이드제가 함께 사용되고 있다.

[4] 안구건조증(dry eye syndrome), 또는 면역성 건성 각결막염(Keratoconjunctivitis sicca; KCS) 환자는 일반적으로 눈이 시리고 건조감, 이물감이 있으며 콕콕 쑤시는 느낌을 호소한다. 또한 쉽게 눈이 피로하여 잘 뜰 수가 없고, 눈을 감고 있으면 편하며, 눈을 뜨면 증상이 심해진다. 외관상으론 눈이 약간 충혈되어 있으며, 심한 경우 두통을 호소하기도 한다. 이러한 안구건조증은 눈물의 생성부족 및 과다증발 등으로 인한 눈물 부족, 눈물 구성성분의 불균형, 또는 안구의 염증이나 안구내 상피세포의 손상으로 인해 발생한다. 현재 쓰이는 약으로는 일시적으로 건조감 및 이물감 등을 개선시키는 안구건조증 완화제(예: 인공눈물)와 치료제로서 건조안에서 면역억제 효과를 통해 눈물분비량을 증가시키는 사이클로스포린이 대표적이다.

[5] 사이클로스포린은 11개의 아미노산으로 이루어진 고분자 펩타이드 약물로 T-세포의 성장과 분화를 억제함으로써 강력한 면역억제 활성을 나타내는 약물이다. 미국특허 제4,839,342호에는 사이클로스포린이 면역억제 활성과

더불어 면역성 건성 각결막염(KCS)을 치료하는데 유용한 약물임이 개시되어 있다. 이처럼 면역억제 활성을 나타내는 안과용 제제의 약물로는 사이클로스포린 외에도 시롤리무스, 타크롤리무스 및 이들의 유도체가 알려져 있다.

[6] 사이클로스포린은 7개의 N-메틸화된 아미노산과 4개의 N-메틸화되지 않은 아미노산의 환형구조로, 그 구성 아미노산 잔기의 구조에 따라 사이클로스포린 A, 사이클로스포린 B, 사이클로스포린 C, 사이클로스포린 D, 사이클로스포린 G 등이 있으며, 실제로 약리학적 활성과 임상적 적용례가 가장 많이 밝혀져 있는 사이클로스포린 A가 가장 광범위하게 연구되어 왔다. 사이클로스포린은 분자 내 인력이 강하며 상대적으로 물 분자와 상호작용이 어렵기 때문에 물에 거의 녹지 않는 난용성 약물이다. 사이클로스포린의 물에 대한 용해도는 약 20 g/ml 내지 30 g/ml로 알려져 있으며, 이러한 낮은 용해도를 갖는 사이클로스포린을 수용성 약제 조성물로 제조하는 것은 매우 어려운 일이다.

[7] 현재 제품명 레스타시스(Restasis™)로 판매되고 있는 사이클로스포린 점안조성물은 우윳빛의 불투명한 에멀젼 형태로 점안 시, 결막 충혈, 소양감, 시야 혼탁 및 이물감을 동반하여 작열감을 유발하는 단점이 있다. 따라서 난용성인 사이클로스포린을 유효성분으로 포함하는 안구용 에멀젼 제제 설계에서는, 사이클로스포린의 용해도를 안정적으로 증가시킴과 동시에 눈에 투여 시, 자극성, 이물감, 작열감, 동통, 충혈, 시야 흐림 및 가려움 등을 개선함으로써 점안 시 느낄 수 있는 불쾌한 증상을 최소화시키는 것을 목표로 한다.

[8] 기존의 안과용 에멀젼은 통상적으로 단일 조성물 내에서 서로 혼합되지 않는 2개 이상의 성분을 포함하며, 이에 따라 조성물 내에 2개의 분리된 상(phase)을 형성하는 것이 일반적이다.

[9] 에멀젼은 열역학적으로 불안정한 상태이며 응집(Flocculation), 침강(Sedimentation), 크리밍(Creaming), 입자성장(Ostwald ripening), 유착(Coalescence) 등의 경로를 통해 여러 상으로 분리되려는 성질을 가지고 있다. 이러한 에멀젼의 불안정성을 해결하기 위해 입자 크기를 나노 크기로 줄인 나노에멀젼에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생산 공정 면에서, 레스타시스(Restasis™)를 비롯한 공지된 에멀젼들은 제조과정 중에 조성물에 큰 힘을 물리적으로 가하는 고압식 호모게나이져나 마이크로 플루다이져 같은 고속 교반식 또는 고속 전단식 기기를 사용하여 제조된다. 대한민국 공개특허 제10-2008-0030828호에 공지된 바와 같이, 이는 제조설비가 크고 비용이 많이 소요되며, 제조과정 중 에멀젼에 가해지는 에너지로 인한 온도 상승이 크기 때문에 열에 약한 성분에 적용하기 어려운 한계가 있다. 또한, 상기와 같은 방식으로 제조된 사이클로스포린 에멀젼은 유적 크기가 불균일하여 빠르게 응집이 일어나고, 이로 인해 크림화가 가속화 되므로 장기 안정성이 문제가 된다. 또한 분산 상의 입도 분포가 상대적으로 넓어 제조 로트마다 균질한

품질을 확보하기 어려운 문제가 있다.

[10] [선행기술문헌]

[11] [특허문헌]

[12] 미국특허 제5,660,858호

[13] 국제특허 제WO1995/31211호

[14] 대한민국등록특허 제10-1008189호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[15] 본 발명자들은 유효성분인 사이클로스포린의 용해도를 증가시킬 수 있는 점안용 나노에멀젼에 대한 연구를 수행하던 중, 나노에멀젼의 성분을 적절하게 혼합하여 점안용 나노 에멀젼을 제조하는 경우 사이클로스포린의 용해도가 증가되고 평균입자 크기가 1nm 내지 100nm, 최대 입자 크기가 220nm 이하로 형성되며, 최종적으로 제조된 나노 에멀젼은 점안 시 투과도 및 약효가 증가되고, 물리화학적 안정성, 자극성, 시야 흐림 및 이물감 등이 효과적으로 개선될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[16] 따라서 본 발명의 목적은 사이클로스포린; 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제; 1종 이상의 친수성 유화제; 1종 이상의 소수성 유화제; 및 수성용제를 포함하는 나노에멀젼 점안 조성물을 제공하는 것이다.

[17] 또한 본 발명의 목적은 조성물의 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v% 로 포함되는 사이클로스포린; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 2.5 w/v% 로 포함되는 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 소수성 유화제; 및 수성용제를 포함하는, 평균 입자 크기가 1nm 내지 100nm인 나노에멀젼 점안 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또다른 목적은, 조성물 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v%로 포함되는 사이클로스포린; 상기 사이클로스포린 함량의 8 배 이상 내지 조성물 총 함량의 2.5 w/v% 이하로 포함되는 캐스터 오일; 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제; 소르비탄 지방산

에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 소수성 유화제; 및 수성용제를 포함하는 나노에멀젼 점안 조성물을 제공하는 것이다.

[19] 또한 본 발명의 또다른 목적은, 조성물의 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v %로 포함되는 사이클로스포린; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 2.5w/v% 로 포함되는 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제; 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 소수성 유화제; 및 수성용제를 교반 혼합하여 혼합조성물을 제조하는 단계;를 포함하는 평균 입자 크기가 1nm 내지 100nm 인 나노에멀젼 점안 조성물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[20] 또한 본 발명의 또다른 목적은, 본원 발명의 나노에멀젼 점안 조성물을 환자에 점안하는 단계;를 포함하는 안과질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[21] 본 발명은 사이클로스포린, 비수성용제, 유화제 및 수성용제를 포함하는 나노에멀젼 점안 조성물을 제공하며 보다 구체적으로 사이클로스포린; 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제; 1종 이상의 친수성 유화제; 1종 이상의 소수성 유화제; 및 수성용제를 포함하는 나노에멀젼 점안 조성물을 제공한다.

[22] 본 발명에 따른 나노에멀젼 점안 조성물은 상기 성분을 적절하게 혼합하여 제조되며, 입자의 평균 크기가 200nm이하, 1nm 이상 100nm 이하로 제조되고 입자 분포가 좁으므로, 제균여과 방식을 통해 여과가 가능하고 사이클로스포린의 용해도가 증가되며, 안정성이 증가되는 장점이 있다.

[23] 상기 사이클로스포린은 나노에멀젼 점안 조성물의 유효성분으로, 사이클로스포린 A, 사이클로스포린 A 유도체, 사이클로스포린 B, 사이클로스포린 C, 사이클로스포린 D 또는 이들의 혼합물 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 사이클로스포린 A 또는 이의 유도체일 수 있다.

[24] 상기 사이클로스포린은 안구 건조를 개선하기 위한 목적을 달성하기 위하여 치료적으로 유효한 양으로 함유될 수 있으며, 본 발명의 목적을 위해서,

나노에멀젼 점안 조성물의 총 함량 대비 0.001 내지 1.0, 0.01 내지 1.0, 바람직하게는 0.02 내지 0.3w/v%로 포함될 수 있다.

[25] 안과용 제제의 제조에 있어서, 점안제를 투여한 후 눈에서의 사이클로스포린 석출을 막기 위하여 사용할 수 있는 계면활성제로 폴리옥시에틸레이트 피마자유, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류 등을 사용한 조성물이 개시되어 있으나, 이를 이용할 경우 점안 조성물이 우윳빛의 불투명한 에멀젼 형태로 존재하게 되므로 점안 초기에 시야 흐려짐을 유발하는 단점이 알려져 있다. 따라서 본 발명에서는 상기의 문제점을 해결하기 위하여, 비수성용제, 친수성 유화제, 소수성 유화제를 적절하게 선택하여 나노에멀젼 점안 조성물을 제조하였다.

[26] 상기 비수성용제는 식물성 오일류, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르류, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세라이드류 등으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택할 수 있다. 구체적으로 식물성 오일로서 캐스터 오일, 코코넛 오일, 시나몬 오일, 옥수수 오일, 올리브유, 면실유, 대두유; 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르류로서 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 팔미톨산, 스테아르산, 올레산, 리놀레산, α-리놀렌산, γ-리놀렌산, 에이코사펜타엔산, 에틸올리에이트, 이소프로필미리스테이트; 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤류로서 라브라팍 PG, 라브라팍 리포필레 WL 1349 등의 지방산 에스테르 글리세라이드류, 미글리올 812 등의 카프릴산-카프린산 트리글리세라이드류, 미글리올 818 등의 카프릴산-카프린산-리놀레산 트리글리세라이드류일 수 있다. 또한 바람직하게는 비수성용제로서 캐스터 오일, 미글리올 812, 에틸올리에이트, 이소프로필미리스테이트, 라브라팍 PG, 라브라팍 리포필레 WL 1349에서 1종 이상을 선택할 수 있다. 특히 바람직한 비수성용제는 캐스터 오일로서 이는 제품명 캐스터 오일(castor oil, ITHO oil chem사, 일본)로서 시판되고 있다. 캐스터 오일은 안구 표면 상의 눈물 증발을 감소시키고, 다른 오일류에 비해 퍼짐 능력이 우수하여 눈물샘의 마이봄선(Meibomian gland) 기능장애 등의 안구 건조 치료에 도움이 된다. 그러나, 캐스터 오일 등의 비수성용제를 포함한 점안 조성물이 안자극감을 포함한 통증 및 시야 혼탁을 유발할 수도 있다. 따라서, 본 발명은 사이클로스포린을 잘 용해시킬 수 있으면서 안구 이상 반응을 최소화 할 수 있는 최소 농도의 비수성용제(캐스터 오일 등)를 사용하는 것이 바람직하다. 이를 통해 오일상을 안정화시키기 위해 사용되는 유화제의 양도 최소화 할 수 있어, 시판되고 있는 사이클로스포린 에멀젼보다 안전한 안과용 나노에멀젼 조성물을 제공할 수 있다. 비수성용제의 함량은 조성물의 총 함량에 대하여 0.01 ~ 10.0 w/v%, 0.1~5.0 w/v % 일 수 있으며, 바람직하게는 0.1 ~ 2.5 w/v % 의 범위일 수 있다. 또한 상기 비수성용제가 캐스터 오일인 경우, 이는 주성분인 사이클로스포린 함량의 8배 이상 내지 조성물의 총 함량 대비 2.5 w/v % 이하로

포함될 수 있다. 상기 비수성용제인 캐스터 오일의 함량이 사이클로스포린 함량의 8배 이상 내지 조성물의 총 함량 대비 최대 2.5 w/v % 이하인 경우, 나노에멀젼 조성물이 가장 안정하게 형성되므로, 본 발명의 안정한 나노에멀젼 조성물을 제조하는데 가장 바람직하다.

[27] 본 발명의 나노에멀젼 조성물은 수성용제 안의 비수성용제의 유화를 돕는 유화제 1종 이상을 포함한다. 유화제의 선택은 비수성 용제, 바람직하게는 캐스터 오일의 Required HLB 값에 따라, 각 유화제가 가지는 HLB 값의 비율을 맞추어 1종 이상 선택할 수 있다. 유화제는 HLB(Hydrophilic-Lipophilic Balance) 값이 적어도 8, 특히 10 이상인 친수성 유화제에서 1종 이상, HLB 값이 8 미만, 특히 6 이하인 소수성 유화제에서 1종 이상 선택할 수 있다.

[28] 본 발명의 유화제는 친수성 유화제, 소수성 유화제 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[29] 친수성 유화제는 지방산, 에스테르, 에테르, 산 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 예를 들면, 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일류, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르류, 지방산 마크로골글리세라이드류, 카프릴로카프로일 폴리옥시글리세라이드, 폴록사머류, 티록사폴, 비타민 E TPGS (D-alpha tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate) 등이 사용될 수 있으며 이에 한정하지는 않는다. 바람직한 친수성 유화제는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 또한 바람직하게는 폴리옥시 35 하이드로제네이트 캐스터 오일 또는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올리에이트일 수 있고 이는 각각 제품명 크레모포어 EL™ 또는 ELP™(BASF) 및 폴리소르베이트 80 (NOF corporation)으로 시판되고 있다. 상기 친수성 유화제의 함량은 조성물의 총 함량에 대하여 0.01 ~ 10.0 w/v%, 0.01 ~ 7.0 w/v% 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 0.1 ~ 5.0 w/v% 범위일 수 있다. 비수성용제가 캐스터 오일인 경우 친수성 유화제는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상 일 수 있으며, 친수성 유화제가 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이터 캐스터 오일인 경우, 이는 비수성 용제인 캐스터 오일 함량의 최소 1.6배 이상 내지 조성물 총 함량에 대하여 5.0 w/v% 인 것이 바람직하다. 또한 비수성용제가 캐스터오일이고 친수성 유화제가 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일인 경우 친수성 유화제는 주성분인 사이클로스포린의 최소 12.8 배 이상 내지 조성물 총 함량에 대하여 최대 5.0 w/v% 로 포함되는 것이 바람직하다. 상기와 같은 함량으로 포함되는 경우, 보다 용이하게 평균입자 크기가 1nm 내지 100nm 인 안정한 나노에멀젼을 형성할 수 있으며 친수성 유화제가 조성물의 총함량에 대하여 5.0 w/v% 이하로 포함되므로 가장 우수한 점안감을 나타낼 수 있다.

[30] 본 발명의 소수성 유화제는 이온성 또는 비이온성일 수 있으나, 바람직하게는 비이온성이다. 소수성 유화제로서 소르비탄 지방산 에스테르류, 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르, 폴리에틸렌글리콜류, 프로필렌글리콜, 프로필렌글리콜 지방산 에스테르류, 글리세릴 지방산 에스테르류, 옥시알칸디올류, 레시틴, 탄소수 16 이상의 고급 지방족 알코올을 사용될 수 있으며, 바람직하게는 소르비탄 지방산 에스테르류, 글리세릴 지방산 에스테르류, 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르, 폴리에틸렌글리콜류, 프로필렌글리콜류 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르류 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 특히 바람직한 소수성 유화제는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 프로필렌글리콜, 소르비탄 지방산 에스테르 및 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르로서 이들은 각각 제품명 Super refined PEG 300 ™, Super refined PEG 400™, Super refined PEG 600™(Croda), 프로필렌글리콜(Merck), 스판 20(Span 20), 스판 80(Span 80)(Croda), 트랜스큐톨 P(Transcutol P)(Gattefosse)로서 시판되고 있다. 상기 소수성 유화제의 함량은 조성물의 총 함량에 대하여 0.01 ~ 7.0 w/v% 일 수 있으며, 바람직하게는 0.1 ~ 5.0 w/v% 일 수 있다. 또한 상기 소수성 유화제는 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌글리콜, 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르일 수 있으며 이는, 조성물의 총 함량에 대하여 최소 0.1 w/v% 내지 친수성 유화제, 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일 함량의 3배 이하로 포함되는 것이 바람직하고, 이 경우에도 조성물의 총 함량에 대하여 5.0 w/v% 를 넘지 않는 것이 가장 바람직하다. 안정한 나노에멀젼 조성물을 형성하기 위해서는 소수성 유화제가 조성물의 총 함량에 대하여 최소 0.1 w/v% 함량 이상으로 포함되는 것이 가장 바람직하며, 이와 동시에 보다 우수한 점안감을 달성하기 위해서는 친수성 유화제, 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일의 3 배 이하 및 조성물의 총 함량에 대하여 5.0 w/v% 이하로 포함되는 것이 바람직하다.

[31] 본 발명의 수성용제는 안과용 제제의 제조에 적합한 성분을 말하며, 예를 들어 멸균정제수, 생리식염수, 주사용수 일 수 있다.

[32] 따라서 본 발명은, 조성물의 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v% 로 포함되는 사이클로스포린; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 2.5 w/v% 로 포함되는, 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는, 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는, 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서

선택된 1종 이상의 소수성 유화제; 및 수성용제를 포함하는 평균 입자 크기가 1nm 이상 내지 100nm 이하인 나노에멀젼 점안 조성물을 제공할 수 있다.

[33] 본 발명에 있어서, 상기 비수성용제는 캐스터 오일, 라브라팍, 미글리올 812, 에틸올리에이트 및 이소프로필미리스테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 비수성용제는 캐스터 오일일 수 있다.

[34] 또한 상기 친수성 유화제는 바람직하게는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일 또는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르일 수 있으며, 상기 소수성 유화제는 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[35] 또한 본 발명은 상기 나노에멀젼 점안조성물에 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 안정화제를 추가로 포함하는 경우, 본 발명의 나노에멀젼 점안 조성물의 물리적, 화학적 안정성이 더욱 개선될 수 있다. 안정화제는 수성용매에 수화되어 일정한 결합 구조를 형성함으로써 나노에멀젼의 유적을 격자화시켜 점성을 주고 나노에멀젼을 물리적으로 안정화 시키는 역할을 할 수 있으며, 카르복시메틸셀룰로오스(CMC), 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스(HPMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(HEC) 등을 포함하는 셀룰로오스계 화합물; 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈(PVP) 등을 포함하는 폴리비닐계 화합물; 카보머(Carbomer) 등을 포함하는 아크릴계 화합물; 젤란검(Gellan Gum), 잔탄검(Xanthan Gum)등을 포함하는 검류 화합물; 히알루론산(HA), 히알루론산 나트륨(Sodium Hyaluronate), 알긴산나트륨(Sodium Alginate), 덱스트란(Dextran) 등을 포함하는 다당류 또는 이들의 임의의 조합 등을 포함할 수 있다. 또한 상기 안정화제는 카르복시메틸셀룰로오스, 잔탄검, 히알루론산(HA) 및 히알루론산 나트륨(Sodium Hyaluronate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[36] 따라서 본 발명의 조성물은 사이클로스포린, 비수성용제, 친수성 유화제, 소수성 유화제, 안정화제 및 수성용제를 포함하는 조성물일 수 있다.

[37] 또한 본 발명의 조성물은 사이클로스포린; 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제; 1종 이상의 친수성 유화제; 1종 이상의 소수성 유화제; 카르복시메틸셀룰로오스(CMC), 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스(HPMC), 하이드록시에틸셀룰로오스(HEC) 등을 포함하는 셀룰로오스계 화합물; 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈(PVP) 등을 포함하는 폴리비닐계 화합물; 카보머(Carbomer) 등을 포함하는 아크릴계 화합물; 젤란검(Gellan Gum), 잔탄검(Xanthan Gum)등을 포함하는 검류 화합물; 히알루론산(HA), 히알루론산 나트륨(Sodium Hyaluronate), 알긴산나트륨(Sodium Alginate), 덱스트란(Dextran) 등을 포함하는 다당류 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 안정화제; 및 수성용제를 포함하는 나노에멀젼 점안 조성물일 수 있다.

[38] 상기 안정화제의 함량은 총 조성물의 함량에 대하여, 0.001 ~ 10.0 w/v%, 0.01~5.0 w/v%, 바람직하게는 0.01~ 2.0 w/v% 범위일 수 있다.

[39] 또한 본 발명의 나노에멀젼 점안 조성물은 pH 조절제, 등장화제, 보존제, 완충제 등을 더 포함할 수 있다.

[40] 상기 pH 조절제로는 수산화나트륨, 염산 등을 사용할 수 있으며, 적절한 pH를 얻기 위하여 당업자에게 공지된 방법으로 필요한 양을 첨가하여 사용할 수 있다.

[41] 상기 등장화제로 글리세롤, 만니톨, 솔비톨, 염화나트륨, 염화칼륨, 붕산, 붕사 중 1종 이상을 사용할 수 있으며, 이의 함량은 총 조성물의 함량에 대하여, 0.01 ~ 10.0 w/v% 범위일 수 있고, 0.1~ 3.0 w/v% 로 사용할 수 있다.

[42] 본 발명의 보존제로는 벤잘코늄클로라이드, 벤제토늄클로라이드, 세탈코늄클로라이드, 폴리쿼터늄-1 (예를 들어, 폴리콰드®) 등을 포함하는 4차 암모늄 화합물; PHMB, 클로로 헥시딘 등을 포함하는 구아니딘-계 화합물; 클로로부탄올; 티로메살, 페닐수은 아세테이트 및 페닐수은 니트레이트 등을 포함하는 수은 방부제; 및 안정화된 옥시클로로 착물 (예를 들어, 퓨라이트(Purite®)), 파라옥시향산 알킬류(예를 들어, 파라옥시향산 메칠(PM)) 등을 포함하는 산화 방부제를 포함할 수 있다.

[43] 본 발명의 완충제로는 점안제에 사용하는 완충제를 제한없이 사용할 수 있으며, 아세테이트 완충제, 시트레이트 완충제, 인산 완충제(예를 들어, 인산수소나트륨 또는 그의 수화물, 인산이수소나트륨 또는 그의 수화물), 붕산 또는 그의 염과 같은 붕산 완충제 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 완충제의 사용량은 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있으며, 총 조성물의 함량에 대하여 0.001 내지 10, 바람직하게는 0.01 내지 5.0, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 2.0 w/v%로 첨가될 수 있다.

[44] 또한 본 발명의 상기 나노 에멀젼 점안 조성물은 최대 220nm 이하의 입자 크기를 갖는 조성물인 것이 바람직하며, 조성물 내 입자 크기는 0 nm 초과 220nm 이하, 0.3 nm 이상 220nm 이하일 수 있다.

[45] 또한 본 발명은 조성물 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v%로 포함되는 사이클로스포린; 상기 사이클로스포린 함량의 8 배 이상 내지 조성물 총 함량의 2.5 w/v% 이하로 포함되는 캐스터 오일; 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제; 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 소수성 유화제; 및 수성용제를 포함하는 나노에멀젼 점안 조성물을 제공한다.

[46] 상기 친수성 유화제는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일이며, 상기 캐스터 오일 함량의 1.6 배 내지 조성물 총 함량의 5 w/v% 이하일 수 있다.

[47] 또한 상기 소수성 유화제는 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌글리콜 및 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 조성물 총 함량의 0.1 w/v% 내지 상기 친수성 유화제 함량의 3 배 이하일 수 있다.

[48] 또한 본 발명은 상기 친수성 유화제는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일이며, 사이클로스포린 함량의 12.8 배 이상 내지 조성물 총 함량의 5 w/v% 이하로 포함된; 및 상기 소수성 유화제는 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌글리콜 및 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 조성물 총 함량의 0.1 w/v% 내지 5 w/v%로 포함된, 나노에멀젼 점안 조성물을 제공한다.

[49] 또한 본 발명은, 상기 나노에멀젼 점안 조성물을 환자에 점안하는 단계;를 포함하는 안과질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[50] 상기 안과질환은 내인성 질환 또는 외상 또는 하드콘택트 렌즈 착용에 따른 외인성 질환일 수 있으며, 바람직하게는 쇼그렌 증후군 또는 안구건조증일 수 있고, 더욱 바람직하게는 안구건조증일 수 있다.

[51] 또한 본 발명은 사이클로스포린, 비수성용제, 친수성 유화제, 소수성 유화제, 수성용제를 교반 혼합하여 혼합조성물을 제조하는 단계; 를 포함하는 평균 입자 크기가 1nm 내지 100nm 인 나노에멀젼 점안 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

[52] 보다 구체적으로, 본 발명은 유효성분인 사이클로스포린을 비수성용제에 충분히 용해시킨 후 용해된 조성물에 친수성 유화제 및 소수성 유화제, 수성용제를 첨가하여 교반 혼합함으로써 혼합 조성물을 제조하는 단계; 를 포함하는 평균 입자 크기가 1nm 내지 100nm 인 나노에멀젼 점안 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

[53] 보다 구체적으로 본 발명은 조성물의 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v %로 포함되는 사이클로스포린; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 2.5w/v% 로 포함되는 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제; 조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제; 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 소수성 유화제; 및 수성용제를 교반 혼합하여 혼합조성물을 제조하는 단계; 를 포함하는 평균 입자 크기가 1nm 내지 100nm 인 나노에멀젼 점안 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

[54] 상기 혼합 조성물의 제조에 있어서, 추가적으로 안정화제 또는 등장화제를 수성 용제에 용해시키고, 제조된 혼합 조성물과 함께 혼합하여 충분히 교반하고, pH를 조절하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[55] 본 발명의 제조방법에 따르면, 성분들이 적절하게 혼합됨으로써 평균 입자 크기가 1nm 내지 100nm 인 나노에멀젼이 형성될 수 있으며, 입자크기가 최대

220nm 이하인 나노에멀젼 점안 조성물이 제조되어, 기존의 고압식 호모게나이져나 마이크로 플루다이져 같은 고속 교반식 또는 고속 전단식 기기를 사용하지 않고 0.22㎛의 필터를 사용한 통상의 제균여과 방법을 사용할 수 있으며, 낮은 제조비용으로 220nm 이하의 입자크기를 갖는 나노에멀젼 점안 조성물을 제조할 수 있다.

[56] 본 발명에 따라 제조된 나노에멀젼 조성물은 점안 시 자극감, 이물감 및 시야흐림이 거의 없는 우수한 효과를 나타내며, 약물의 방출을 평가하는 시험인 셀룰로오스 멤브레인 방출시험에서, 유효성분인 사이클로스포린 A를 적절한 속도로 방출한다.

[57] 본 발명의 제조방법으로 제조된 나노에멀젼 조성물을 점안용 안약 조성물로 이용 시, 환자들이 느끼는 부적절한 자극 및 이물감 등의 부작용이 개선됨과 동시에 높은 안구건조증 치료 효과를 나타내므로 안구 건조용 치료제로 효과적으로 이용될 수 있으며, 눈물발생량을 증가시키고 효과적으로 눈물막 유지시간을 증가시킬 것이다. 또한 점안 후 안구조직 내 사이클로스포린 A의 잔류량이 높게 나타날 것이 예상된다.

발명의 효과

[58] 본 발명에 따른 나노에멀젼 점안 조성물은 평균 입자크기가 200nm 이하, 바람직하게는 100nm 이하이며 입자 분포가 좁게 나타나는 특징이 있다. 따라서, 제균여과가 가능하고, 안정성이 개선되며 임상적으로 이물감 및 시야 흐림 개선 효과가 우수하므로 점안제용 조성으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[59] 도 1은 실시예 33의 나노에멀젼 점안 조성물 및 레스타시스™ 점안액의 입자크기 분포를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[60] 도 2는 실시예 62 및 63의 나노에멀젼 점안 조성물, 에멀젼, 현탁액의 분산 안정성을 TSI(Turbiscan Stability Index)를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[61] 도 3은 점안감 테스트에서 측정된 실시예 62와 대조약인 레스타시스의 작열감과 이물감의 평균값을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[62] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[63] **시험예 1. 비수성용제의 종류 및 함량 변화에 따른, 나노에멀젼의 제조 및 이의 평균 입자크기 측정**

[64] 비수성용제를 캐스터오일, 라브라팍 리포필레 WL1349, 미글리올 812로 달리하고 이의 함량을 변화시킨 나노에멀젼 조성물을 제조한 후, 이의 평균 입자크기를 측정하였다. 구체적인 나노에멀젼 조성물의 제조방법은 다음과 같다. 사이클로스포린 A와 비수성용제를 하기 표 1의 질량비로 혼합한 후

교반기(Super-Nuova™ Multi-place, Thermo Scientific)를 통해 600 ~ 800 rpm, 70℃ 조건에서 완전히 용해시켰다. 제조된 혼합 용액에 표 1에 기재된 함량의 친수성 및 소수성 유화제를 첨가한 후 교반 과정을 통해 충분히 혼화시켜 오일상을 제조하였다. 제조된 액을 실온으로 식힌 후, 수성용제에 오일상을 여러 번 세척하여 넣은 후 교반기(Super-Nuova™ Multi-place, Thermo Scientific)를 통해 400 ~ 500 rpm, 실온조건에서 교반하였다. 30분 이상 교반 후 최종부피가 100 mL 이 되도록 수성용제를 첨가하여 맞춰주었다. 상기 나노에멀젼은 자가 유화 방법(SNEDDS: Self Nano-Emulsifying Drug Delivery system)을 통해 자발적으로 안정한 단일상을 형성하였다. 상기의 방법에 따라 제조된 나노에멀젼 점안액의 입자크기를 입자크기 측정 장비인 Zetasizer(Malvern Instruments, 영국)를 사용하여 측정하였으며 제조된 나노 에멀젼 조성물의 구성과 측정된 평균 입자크기(nm)를 표 1 에 나타내었다.

[65] [표 1]

[66]

성분명		실시예														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
주성분(w/v%)	사이클로스포린	0.05	0.03	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03
비수성용제 (w/v%)	캐스터오일	0.42	0.25	0.84												
	라브라팍				2	1.8	1.8	1.8	2	1.2						
	미글리올812										0.75	0.66	0.66	0.66	0.75	0.45
친수성 유화제 (w/v%)	폴리소르베이트 80								1.6	0.8					1.6	0.8
	크레모포어 ELP	1	1	4.8	2.4	2.4	1.6	1.6			2.4	2.4	1.6	1.6		
소수성 유화제 (w/v%)	폴리에틸렌글리콜 400	0.4	0.3	0.8	0.6	0.4	0.4		0.4	0.2	0.6	0.4	0.4		0.4	0.2
	프로필렌글리콜	0.3	0.2	0.6		0.3	0.3					0.3	0.3			
	트랜스큐톨 P							0.4						0.4		
수성용제	정제수	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량
	평균입자크기	41.05	31.04	35.29	45.92	48.33	58.51	54.21	76.15	73.25	30.72	32.76	42.16	44.8	62.95	60.31

[67] 실시예 1 내지 15의 나노에멀젼 조성물의 입자 크기는 모두 최대 220nm 이하로 나타났으며, 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 특히 평균 입자 크기가 모두 100nm 이하이며 투명한 나노에멀젼 조성물이 제조됨을 확인하였다. 사이클로스포린을 주성분으로 포함하는 나노에멀젼 점안액은 최대 입자 크기가 220nm 이하인 경우 적합한 입자 크기를 갖는 것으로 판단할 수 있으므로, 본 발명의 조성에 따르면 매우 작은 평균 입자 크기를 갖는 나노에멀젼 점안용 조성물을 제조할 수 있음을 확인하였다. 특히 실시예 1 내지 3은 다른 비수성용제인 라브라팍, 미글리올 812과 비교하여 0.42, 0.25, 0.84 w/v% 의 비교적 적은 함량의 캐스터 오일을 구성으로 하고, 이에 따라 적은 함량의 유화제를 구성으로 하면서도 평균입자 크기가 각각 41.05, 31.04, 35.29nm 로 나타나 우수한 나노에멀젼 형성 효과를 나타내었다. 비수성용제는 점안시 눈에 자극감을 줄 수 있다는 것을 고려하면, 캐스터 오일은 점안 조성물에서 오일 성분에 의한 자극감을 최소할 수 있는 장점이 있으므로, 캐스터 오일이 나노에멀젼 점안 조성물에 바람직한 비수성용제 중에 하나인 것을 확인하였다.

[68] **시험예 2. 유화제의 종류 및 함량 변화에 따른, 나노에멀젼의 제조 및 이의 평균 입자크기 측정**

[69] 비수성용제로 캐스터 오일을 고정한 후, 캐스터 오일의 함량, 유화제의 종류 및 함량을 달리하여 시험예 1과 동일한 방법으로 실시예 16 내지 36의 나노에멀젼 조성물을 제조하였다. 제조된 나노에멀젼 조성물의 조성 및 함량을 표 2에 나타내었다.

[70] [표 2]

[71]

성분명		실시예																				
		16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
주성분(w/v%)	사이클로스포린	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05
비수성 용제 (w/v%)	캐스터오일	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.25	0.84	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.25	0.84	0.42	0.42	0.42	0.42
친수성 유화제 (w/v%)	폴리소르베이트 80	1.6	0.4	1.4	0.8	0.8	0.4	1.6													0.8	
	크레모포어 ELP								2.4	1.6	1.2	1.6	2.4	1.6	2.4	1.6	1.2	4.8	2.4	1.8		2.4
소수성 유화제 (w/v%)	스판 80	0.4	0.1				0.1	0.4	0.6	0.4	0.8											
	스판 20			0.6																		
	폴리에틸렌글리콜 300											0.4	0.6									
	폴리에틸렌글리콜 400				0.2									0.4	0.6		0.3	1.2	0.4	0.4		
	프로필렌글리콜																		0.3	0.3		
	트랜스큐톨 P					0.2										0.4						
수성 용제	정제수	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량
	평균입자크기	73.52	84.3	59.18	67.64	67.21	61.94	73.46	30.11	43.41	48.5	49.26	40.38	41.5	19.53	25.04	39.62	25.5	31.6	32.25	118.3	98.52

[72] 표 2에 나타낸 바와 같이, 실시예 16 내지 실시예 34의 나노에멀젼 조성물에서 평균 입자크기가 100nm이하인 것을 확인하였으며, 입자 크기 분포도 매우 좁게 형성되는 것을 확인하였다. 따라서 상기와 같은 조성으로 사이클로스포린, 캐스터 오일, 친수성 유화제, 소수성 유화제 및 수성용제를 혼합하는 경우 평균 100nm이하의 입자 크기와 좁은 입자분포를 갖는 나노 에멀젼 점안액을 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

[73] 표 2에 나타난 실시예 35 및 36은 소수성 유화제를 포함하지 않고 친수성 유화제 1종만 이용하여 제조한 조성물로 넓은 입자크기 분포를 가지는 불투명한 에멀젼이 형성되었으며, 특히 실시예 36 경우 17.02~382.5의 넓은 입자 크기 분포를 가지므로 입자 분포가 매우 부적절한 것을 확인하였다. 따라서 바람직한 입자 크기 및 분포를 갖는 나노에멀젼을 제조하기 위해서는 친수성 유화제 및 소수성 유화제의 조합이 바람직한 것을 확인하였다.

[74] 적정 입자 크기 분포를 갖는 것이 점안용 조성물을 제조하는데 중요하므로, 본 방법의 제조방법에 따라 제조된 실시예 33의 입자크기 분포를 시판중인 레스타시스™ 점안액의 입자 크기 분포와 비교하였다.

[75] 결과를 도 1에 나타내었다.

[76] 도 1에 나타낸 바와 같이, 레스타시스™ 점안액은 21.04~712.4의 매우 넓은 입자크기 분포를 나타낸 반면, 본 발명에 따라 제조한 조성물(실시예 33)의 경우 8.721~43.82 범위의 매우 작은 입자 크기 분포를 형성하였다. 즉, 기존

레스타시스™ 점안액보다 본 발명에 따른 나노에멀젼 조성물이 점안용 조성물 제조에 적합한 조성물을 형성할 수 있다는 것을 확인하였고 또한 본 발명의 나노에멀젼 조성물은 최대 입자 크기가 220nm 이하이므로, 0.22㎛ 여과필터를 사용한 제균여과가 가능함을 알 수 있었다.

[77] **시험예 3. 나노에멀젼 조성물 성분의 최적 함량**

[78] 본 발명의 사이클로스포린 나노에멀젼 점안 조성물을 제조하기에 적절한 비수성용제, 친수성 유화제 및 소수성 유화제의 상대적인 함량을 결정하기 위하여, 각 구성성분들의 함량을 달리하여 나노에멀젼 형성 여부를 확인하였다.

[79] **3.1 비수성용제의 함량**

[80] 사이클로스포린과 친수성 유화제, 소수성 유화제의 함량을 고정하고 캐스터 오일을 각각 2.5, 3.0, 3.5w/v%로 달리한 후, 시험예 1의 방법과 동일하게 조성물을 제조하고 나노에멀젼 형성 여부를 확인하였다.

[81] 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[82] [표 3]

[83]

사이클로스포린	0.05 g	0.05 g	0.05 g
캐스터오일	2.5 g	3.0 g	3.5 g
크레모포어 ELP	5.0 g	5.0 g	5.0 g
PEG 400	2.0 g	2.0 g	2.0 g
주사용수	적량 -> 100 ml	적량 -> 100 ml	적량 -> 100 ml
평균 입자크기(nm)	45.75	105.0	측정불가

[84] 표 3에 나타낸 바와 같이, 캐스터 오일이 조성물 총 함량 대비 2.5w/v% 포함되는 경우 입자크기가 45.75nm로 나노에멀젼이 우수하게 형성되는 것을 확인하였으나, 캐스터 오일의 함량을 3.0 w/v%로 증가시키는 경우 입자의 크기가 증가하였고, 3.5 w/v%까지 증가시키는 경우 측정이 불가능한 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 나노에멀젼 조성물을 제조하기 위해서는 비수성용제인 캐스터 오일이 주성분인 사이클로스포린의 8 배 이상 포함되는 것이 바람직하며, 친수성 계면활성제를 최대 5w/v%로 포함하는 조성물에서 캐스터 오일의 최대 함량은 2.5 w/v% 이하인 것이 바람직함을 확인하였다.

[85] **3.2 유화제의 함량**

[86] 친수성 유화제 및 소수성 유화제는 나노에멀젼 형성을 위하여 필요한 구성성분이나, 과량 함유되는 경우 점안감이 저하되는 문제점이 있고, 부족한 경우 나노에멀젼이 형성되지 않는 문제점이 있어 적절한 함량의 선택이 중요하다. 따라서 본 발명의 점안용 나노에멀젼 조성물을 제조하기 위하여 필요한 친수성 유화제 및 소수성 유화제의 함량을 비교 실험을 통해 확인하였다. 비수성용제인 캐스터 오일은 사이클로스포린 함량의 8배 이상이 되도록 하였으며, 친수성 유화제로 크레모포어 ELP, 소수성 유화제로 PEG 400을

구성으로 하여 시험예 1과 동일한 방법으로 제조하였다. 각각의 함량 및 그에 따른 나노에멀젼 형성 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[87] [표 4]

[88]

성분명	1	2	3	4	5
사이클로스포린	0.05 g	0.05 g	0.05 g	0.05 g	0.03 g
캐스터오일	0.42 g	0.42 g	0.42 g	0.42 g	0.25 g
크레모포어 ELP	1.8 g	1.8 g	0.6 g	0.4 g	0.4 g
폴리에틸렌글리콜 400	2.0 g	5.0 g	2.0 g	2.5 g	0.1 g
주사용수	적량 -> 100 ml	적량 -> 100 ml	적량 -> 100 ml	적량 -> 100 ml	적량 -> 100 ml
평균 입자크기(nm)	22.96	27.25	74.53	127.9	48.67
비 고	-	-	- 입자분포범위 넓음 - 불투명한 조성물 형성	-	-

[89] 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 친수성 유화제 크레모포어 ELP를 캐스터오일 함량의 1.6 배 이상으로 포함하거나 소수성 유화제 폴리에틸렌글리콜400을 친수성 유화제의 최대 3 배 이하로 포함하는 조성물에서는 모두 평균 입자 크기가 100nm 이하인 나노 에멀젼이 형성되었으나, 크레모포어 ELP가 캐스터오일 함량의 1.6 배 미만이고 소수성 유화제인 폴리에틸렌글리콜 400이 친수성 유화제 크레모포어 ELP 함량의 3배를 초과하는 조성물에서는 나노에멀젼 형성이 상대적으로 어려운 것을 확인하였다. 또한 소수성 유화제를 조성물 총 함량 대비 0.1w/v% 미만으로 포함하는 경우 나노에멀젼은 형성되나 안정성이 떨어져 상을 유지하지 못하였다. 친수성 유화제와 소수성 유화제가 각각 조성물 총 함량 대비 5w/v% 를 초과하는 경우, 눈에서의 점안감이 나빠지므로, 우수한 점안감과 동시에 안정성이 우수한 나노에멀젼 조성물을 제조하기 위해서는 친수성 유화제를 비수성용제인 캐스터오일 함량의 최소 1.6 배 내지 조성물 총 함량의 5 w/v% 이하로 포함하고, 소수성 유화제를 조성물 총 함량의 0.1 w/v% 내지 친수성 유화제 함량의 3 배 이하 및 조성물 총 함량의 5 w/v% 이하로 포함하는 것이 가장 바람직한 것을 확인하였다.

[90] **시험예 4. 안정화제를 추가한 나노에멀젼 조성물**

[91] 상기 시험예 1 내지 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 사이클로스포린, 비수성용제, 친수성 및 소수성 유화제의 첨가만으로도 평균 100nm 이하의 입자를 갖는 나노에멀젼 조성물이 제조될 수 있다. 이에 더하여 점안용 나노에멀젼 조성물은 제조 후에도 입자 크기가 유지되는 안정성이 중요하므로 안정성을 더욱 높이기 위하여 선택적으로 안정화제를 추가하여 제조할 수 있다. 따라서, 안정화제를 추가하여도 본 발명의 바람직한 나노에멀젼의 입자 크기가 유지되는지 여부 및 이에 따른 안정성을 확인하였다.

[92] **4.1 안정화제가 추가된 나노에멀젼 조성물의 제조 및 이의 평균 입자크기**

[93] 구체적으로 하기 표 5에 기재된 함량에 따라, 나노에멀젼 조성물을 제조하였다.

수성용제에 하기 표 5의 안정화제 및 등장화제를 수화시킨 후, NaOH와 HCl을 이용하여 pH 7.2로 조절하였다. 그 후 시험예 1과 동일한 방법으로 하기 표 5에 기재된 함량의 사이클로스포린, 비수성용제, 유화제를 완전히 용해시킨 오일상을 제조한 후, 이를 수성용제에 투입하고, 교반기(Super-Nuova™ Multi-place, Thermo Scientific)를 통해 400 ~ 500 rpm, 실온조건에서 교반 혼화시켰다. 시험예 1에서와 같이 자가 유화에 의하여 단일상이 형성되었다. 제조되는 나노에멀젼 조성물의 입자크기는 시험예 1의 방법과 동일하게 측정하였다. 각 나노에멀젼의 평균입자크기는 하기 표 5에 기재된 바와 같다.

[94] [표 5]

[95]

성분명		실시예							
		37	38	39	40	41	42	43	44
주성분(w/v%)	사이클로스포린	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
비수성용제(w/v%)	캐스터오일	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
유화제(w/v%)	크레모포어 ELP	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
	폴리에틸렌글리콜 400	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
안정화제(w/v%)	히알루론산 나트륨	0.1	-	-	-	-	-	-	-
	알긴산 나트륨	-	0.2	-	-	-	-	-	-
	히드록시프로필메틸셀룰로오스	-	-	0.5	-	-	-	-	-
	폴리비닐피롤리돈	-	-	-	1.2	-	-	-	-
	하이드록시에틸셀룰로오스	-	-	-	-	0.5	-	-	-
	폴리비닐알코올	-	-	-	-	-	1.4	-	-
	잔탄검	-	-	-	-	-	-	0.2	-
	카르복시메틸셀룰로오스나트륨	-	-	-	-	-	-	-	0.5
등장화제(v/v%)	글리세롤	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
pH 조절제	NaOH, HCl	적량->7.2	적량->7.2	적량->7.2	적량->7.2	적량->7.2	적량->7.2	적량->7.2	적량->7.2
수성용제	정제수(ml)	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량
	평균입자크기	28.15	25.62	61.75	40.41	60.33	41.03	33.93	33.15

[96] 상기 표 5에 나타낸 바와 같이, 안정화제를 추가적으로 포함하여도 평균입자크기가 100nm 이하인 나노에멀젼 조성물이 형성되었으며 생성된 조성물의 입자크기 분포도 좁게 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 안정화제를 추가로 포함하더라도 본 발명의 바람직한 입자 크기 및 입자 크기 분포가 유지될 수 있음을 확인하였다.

[97] **4.2 나노에멀젼 조성물의 고온 안정성 평가**

[98] 상기 시험예 4.1의 방법과 동일하게 하기 표6 과 같은 함량의 나노에멀젼 조성물을 제조하였다. 나노에멀젼 조성물의 물리화학적 안정성을 평가하고자 70±2℃ 고온 조건으로 2주 동안 보관하면서 사이클로스포린의 함량 및 나노에멀젼 조성물의 평균 입자크기 변화를 분석하였다. 사이클로스포린의 함량은 크로마토그래피, ACQUITY Ultra Pressure Liquid Chromatography(UPLC)

system(Waters Asia Ltd., 396 Alexandra Road #04-06 BP Tower, Singapore 119954)로 하기 표 7의 분석 조건을 사용하여 분석하였다.

[99] [표 6]

[100]

성분명		실시예																
		45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
주성분 (w/v%)	사이클로스포린	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
비수성용제 (w/v%)	캐스더오일	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
유화제 (w/v%)	크레모포어 ELP	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
	폴리에틸렌글리콜 400	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
	프로필렌글리콜							0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
안정화제 (w/v%)	히알루론산 나트륨		0.1						0.1									
	폴리비닐피롤리돈			1.8						1.8					1.8			
	알긴산 나트륨				0.2						0.2							
	카르복시메틸셀룰로오스나트륨					0.5						0.5				0.5	0.2	
	폴리비닐알코올						1.4						1.4					
	잔탄검														0.1	0.1		0.2
등장화제 (v/v%)	글리세롤	2	2	2	2	2	2	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
pH 조절제	NaOH, HCl	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2
수성용제	정제수(ml)	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량

[101] [표 7]

[102] UPLC 분석 조건

[103]

컬럼	UPLC 컬럼 1HSS T3.8μm 2.1 × 100mm
검출파장	210 nm
컬럼온도	75 ℃
샘플온도	25 ℃
유속	0.250 ml/분
주입량	5 μl
Run time	20 분
이동상	아세토니트릴(ACN) : 물 = 68 : 32

[104] 2주 동안 고온 보관되었던, 나노에멀젼 조성물에서의 사이클로스포린의 함량(%) 및 평균 입자크기(nm)의 변화를 측정한 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

[105] [표 8]

[106]

항목	기간	실시예																
		45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
함량	0주	101.97	102	101.66	98.32	99.91	98.32	101.87	100.6	100.36	101.7	100.91	101.64	100.76	101.4	100.35	102.24	102.24
	1주	97.17	103.8	103.55	100.7	103.3	101.1	97.85	98.02	97.08	100.1	99.45	99.93	97.03	99.58	99.6	98.7	98.7
	2주	92.96	99.93	102.47	96.83	94.64	96.83	90.32	91.86	98.73	96.93	98.18	94.64	91.15	98.04	100.5	99.26	99.26
사이즈	0주	17.85	30.59	25.41	24.06	33.15	36.11	18.53	32.64	30.14	23.19	32.44	37.8	25.04	41.85	38.38	48.13	36.88
	1주	30.12	27.9	28.26	24.34	35.15	50.85	21.02	34.57	31.66	23.55	34.54	46.91	31.81	42.39	35.98	44.33	34.08
	2주	50.04	23.92	29.86	23.63	33.66	50.8	53.06	34.29	38.84	27.79	35.31	51.53	54.98	42.5	36.27	44.19	38.62

[107] 상기 표 8에 나타낸 바와 같이, 실시예 45 내지 61의 사이클로스포린 함량은 모두 함량 시험의 기준(90 ~ 110 %)에 적합하고, 70±2℃ 의 고온에서 2주 경과 후에도 평균입자 크기가 초기의 100nm 이하를 유지하였다. 안정화제가 첨가되지 않은 실시예 45, 51, 57에서도 사이클로스포린 함량이 모두 90% 이상이며, 입자크기가 100nm 이하를 유지함이 확인되었으나, 이들을 제외한 나머지 안정화제를 포함한 실시예에서 사이클로스포린의 함량 저하률 및 입자 크기의 변화가 특히 매우 적게 나타난다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 나노에멀젼 조성물은 고온의 조건에서도 물리적 및 화학적 안정성을 유지함을 알 수 있으며, 특히 안정화제가 추가되는 경우 물리적 및 화학적 안정성이 더욱 개선될 수 있음을 확인하였다.

[108] **시험예 5. 나노에멀젼 조성물의 안정성 평가**

[109] **5.1 나노에멀젼 조성물의 장기 안정성 평가**

[110] 점안용 조성물로 사용하기 위해서는, 실온(25±2℃, 40±5%RH) 및 24~36개월의 장기보존시험자료 이전에 허가를 위해 6개월의 단기 안정성 자료로 시료의 안정성을 확인할 수 있는 조건인 가속(40±2℃, 25%RH이하) 보관 조건에서 장기적인 물리적 및 화학적 안정성이 확보되어야 한다. 따라서, 실시예 45 내지 61의 나노에멀젼 조성물을 실온 및 가속 보관 조건에서 6개월 동안 보관하고, 0, 3, 6개월 경과시점에서 사이클로스포린의 함량 및 나노에멀젼 조성물의 입자 크기를 측정하였다. 사이클로스포린의 함량 및 입자 크기 측정 방법은 상기 시험예 3의 방법과 동일하게 수행하였다.

[111] 결과를 표 9 및 표 10에 나타내었다.

[112] 표 9 및 표 10에 나타낸 바와 같이, 표 9의 실온조건 및 표 10의 가속조건에서 실시예 45 내지 61의 나노에멀젼 조성물은 장기간 동안 함량 및 입자크기의 변화가 적어 매우 안정한 것으로 나타났다.

[113] [표 9]

[114]

항목	기간	실시예																
		45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
함량	0M	101.97	102.0	101.66	98.32	99.91	98.32	101.87	100.6	100.36	101.7	100.91	101.64	100.76	101.4	100.35	102.24	102.24
	3M	96.08	103.43	101.37	99.45	100.63	100.56	96.24	102.57	101.36	100.64	101.17	102.74	96.07	103.89	103.60	104.26	102.68
	6M	96.33	103.26	101.49	101.85	104.24	103.62	98.84	104.22	102.57	101.08	104.85	102.23	99.37	103.51	104.58	105.97	100.18
사이즈	0M	17.85	30.59	25.41	24.06	33.15	36.11	18.53	32.64	30.14	23.19	32.44	37.8	25.04	41.85	38.38	48.13	36.88
	3M	21.08	31.44	26.97	24.24	35.44	45.79	18.62	32.96	31.20	25.77	32.75	44.30	19.19	41.90	50.55	36.68	39.26
	6M	20.86	31.14	26.52	24.20	35.25	45.66	18.63	33.05	31.20	22.16	32.36	44.46	19.64	48.30	52.81	36.47	41.18

[115] [표 10]

[116]

항목	기간	실시예																
		45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
함량	0M	101.97	102.0	101.66	98.32	99.91	98.32	101.87	100.6	100.36	101.7	100.91	101.64	100.76	101.4	100.35	102.24	102.24
	3M	102.27	99.79	100.47	101.39	103.49	101.97	105.02	96.70	100.28	99.10	105.87	106.93	106.18	99.27	100.60	104.49	104.62
	6M	102.86	100.87	102.21	102.01	101.95	102.31	102.01	102.54	101.87	99.95	102.18	103.35	107.29	102.39	104.02	103.43	99.84
사이즈	0M	17.85	30.59	25.41	24.06	33.15	36.11	18.53	32.64	30.14	23.19	32.44	37.8	25.04	41.85	38.38	48.13	36.88
	3M	31.99	41.36	41.45	34.02	54.54	74.07	29.10	48.86	47.68	31.80	60.35	71.25	23.77	44.96	58.16	41.02	40.46
	6M	31.47	40.70	40.88	33.80	54.79	73.64	29.20	49.81	47.56	31.62	58.92	71.62	23.78	45.39	55.42	41.15	43.02

[117] **5.2. 나노에멀젼 조성물의 분산 안정성 평가**

[118] 나노에멀젼 조성물의 장기 안정성 여부를 에멀젼, 현탁제(suspension)에서 비교 평가하기 위하여 Turbiscan(Turbiscan Ageing Station, Formulaction, France)을 이용하여 분산 안정성 실험을 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 나노에멀젼 조성물, 에멀젼 및 현탁제의 구성은 하기 표 11과 같으며 나노에멀젼 조성물은 시험예 4.1과 동일한 방법으로 제조하였다. 에멀젼의 제조방법은 다음과 같다. 수성용제에 하기 표 11의 안정화제 및 등장화제를 수화시킨 후, NaOH와 HCl을 이용하여 pH 7.2로 조절하였다. 그 후 시험예 1과 동일한 방법으로 하기 표 11에 기재된 함량의 사이클로스포린, 비수성용제, 유화제를 완전히 용해시켜 오일상을 제조한 후, 이를 수성용제에 투입하고, 교반기(Super-Nuova™ Multi-place, Thermo Scientific)를 통해 400 ~ 500 rpm, 실온조건에서 교반 혼화시켰다. 그 후 고속교반장치(Homomixer T-Basic 25, IKA ™를 통해 9000 ~ 17500 rpm 사이의 속도로 유화시켰다. 이후 기포제거공정, 실온으로의 냉각공정을 통해 에멀젼을 제조하였다. 본 실시예의 현탁제는 다음의 방법으로 제조하였다. 수성용제에 하기 표 11 의 안정화제 및 등장화제를 수화시킨 후, NaOH와 HCl을 이용하여 pH 7.2로 조절하였다. 그 후 하기 표 11에 기재된 함량의 사이클로스포린, 유화제를 수성용제에 투입하고, 교반기(Super-Nuova™ Multi-place, Thermo Scientific)를 통해 400 ~ 500 rpm, 실온조건에서 약 10분간 교반하였다. 그 후 고속교반장치(Homomixer T-Basic 25, IKA™를 통해 9000 ~ 13500 rpm 사이의 속도로 분산시켰으며 이 후 기포제거공정, 실온으로의 냉각공정을 통해 현탁제를 제조하였다.

[119] [표 11]

[120]

성분명(w/v%)		실시예		에멀젼	현탁제
		62	63		
주성분	사이클로스포린	0.05	0.05	0.05	0.05
비수성용제	캐스터오일	0.42	0.42	1.26	-
유화제	크레모포어 ELP	1.8	1.8	-	-
	폴리소르베이트 80	-	-	1.0	1.0
	폴리에틸렌글리콜 400	0.4	0.4	-	-
	프로필렌글리콜	0.3	0.3	-	-
안정화제	카르복시메틸셀룰로오스나트륨	0.1	1.0	-	0.5
	잔탄검	0.1	0.6	0.6	0.3
완충제	붕산	0.2	1.0	-	-
등장화제	글리세롤	1.7	0.3	2.2	2.2
pH 조절제	NaOH	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 ->7.2	적량 >7.2
수성용제	정제수(ml)	적량	적량	적량	적량

[121] Turbiscan 장치를 이용하면 일정한 온도 조건 하에서 시간에 따른 분산안정성의 변화를 측정할 수 있으므로, 50℃의 온도조건 하에서 제조사의 메뉴얼에 따라 분산 안정성을 측정하였다. 구체적으로 나노에멀젼 조성물, 에멀젼, 현탁액을 각각 흔들어 장치에 주입한 후, 50℃에서 48시간 동안 방치하였으며, 이 후 각각 샘플의 변화 양상을 기기에서 측정되는 안정성 지수 값인 TSI(Turbiscan Stability Index) 값의 변화에 따라 관찰하였다.

[122] 실시예 62 및 63 의 TSI 결과를 도 2에 나타내었다.

[123] 도 2에 나타낸 바와 같이, 48시간이 지난 후 나노에멀젼 조성물의 TSI 값은 9.2(실시예 62), 10.6(실시예 63)로 나타났다. 이러한 TSI 값은 동일 조건에서 측정된 에멀젼의 TSI 값인 62.4와 현탁액의 TSI 값인 93.8과 비교하여 매우 낮은 수치이다. 이를 통해 제조된 나노에멀젼 조성물이 기존의 에멀젼이나 현탁액 제형과 비교하여 매우 현저한 안정성을 갖는 것을 확인하였다.

[124] **시험예 6. 나노에멀젼 조성물의 방출 실험**

[125] 제조된 나노에멀젼 조성물이 유효성분인 사이클로스포린 A를 적절한 속도로 방출하는지 확인하기 위하여, 약물의 방출을 평가하는 시험인 in vitro셀룰로오스 멤브레인 방출실험을 수행하였다. 본 방출실험에 사용하기 위한 나노에멀젼 조성물의 조성은 시험예 5.2의 실시예 62 및 63과 동일하며, 시험예 4.1과 동일한 방법으로 제조하였다. 대조약으로는 시판 중인 레스타시스(Restasis™)를 사용하였다.

[126] 구체적으로 멤브레인(100 kDa 셀룰로오스 에스터 멤브레인(Cellulose Ester Membrane))을 적당한 크기로 잘라 Medium 액(70% MeOH + 30% BSS(Balanced Salt Solution))에 1시간 이상 적셔두었다. 동일한 크기의 비커에 제조된 Medium을 100 ml씩 분주하고, 각각의 비커에 동일한 모양과 크기의 마그네틱 바를 위치시켰다. 멤브레인의 끝을 접어 Sealing Bar로 밀봉한 후 멤브레인 안쪽에 나노에멀젼 조성물과 대조약을 각각 넣고 약물이 담긴 멤브레인을 동일 높이에서 비커에 완전히 잠기면서 마그네틱 바와 닿지 않게 투입하였다. 이 후 150 rpm의 동일한 속도로 동시에 교반을 수행하였다. 적절한 시간 간격으로 샘플을 취하여 시험예 4.2의 UPLC를 통한 함량시험 분석법과 동일한 방법으로

사이클로스포린의 함량을 측정하였다.

[127] 약물 방출 실험결과, 실시예 62 및 실시예 63 의 나노에멀젼 조성물은 공통적으로 실험 시작 후 약 5시간 이후에 일정한 약물 농도를 유지하였으며 약물평형농도(Css)에 도달하였음을 확인하였다. 이에 따라 실험 시작 후 6시간을 약물 방출시험의 종결점으로 결정하였다. 실시예 62의 약물농도를 5시간 이후 측정한 결과 52.0%인 것을 확인하였으며 종결점인 6시간에서는 54.2%의 약물농도를 나타내었다. 이와 같은 약물농도는 대조약인 시판 레스타시스의 약물농도인 55.3(5시간), 56.3(6시간)%과 매우 유사한 것으로, 제조된 나노에멀젼 조성물이 점안제에 적합한 조성물임을 확인하였다.

[128] **시험예 7. 나노에멀젼 조성물의 안자극성 평가**

[129] 제조된 나노에멀젼 조성물 중 실시예 62의 조성물을 이용하여 점안감 테스트를 위한 안자극성 평가를 수행하였다. 40인의 건강한 성인을 대상으로 양안에 각각 30 1씩 실시예 62의 나노에멀젼 조성물을 투여하였으며, 투여 약 10분후에 개인이 느끼는 작열감 및 이물감을 아래 표 12의 기준에 따라 점수화하여 점안감을 평가하였다. 대조약으로는 레스타시스를 이용하였다.

[130] [표 12]

[131]

표기계수	작열감	이물감
0	소양감 없음, 매우 부드러움	이물감 없음, 점성 느낌 없음
1~2	약간의 소양감(따끔거림)이 느껴짐	약간의 이물감 및 점성이 있음
3~4	소양감(따끔거림)이 느껴짐	이물감이 지속되어 약간의 동통이 수반되거나, 점성이 강하게 느껴짐
5	자극이 바로 느껴지며 매우 불쾌함	이물감이나 점성이 오래 지속되어 동통을 강하게 느낌

[132] 결과를 하기 표 13및 도 3에 나타내었다.

[133] [표 13]

[134]

피시험자	작열감		이물감	
	실시예 62	레스타시스	실시예62	레스타시스
1	0	4	0	4
2	1	3	1	3
3	1	0	1	0
4	2	2	0	2
5	2	0	1	0
6	2	4	1	3
7	3	2	0	0
8	2	0	1.5	1
9	2	1	0	0
10	1	0	0	0
11	0	0	1	1
12	1	3	0	0
13	0	2	0	0
14	0	1	0	0
15	2	1	0	2
16	0	0	2	2
17	2	1	1	1
18	0	3	0	0
19	1	3	1	2
20	0	0	0	0
21	3	2	3	1
22	1	3	3	1
23	1	0	2	0
24	0	3	0	0
25	0	1	0	0
26	1	4	0	4
27	0	0	2	1
28	3	4	1	1
29	0	0	1	0
30	0	2	0	2
31	4.5	3.5	3	3
32	0	1	0	1
33	0	1	0	0
34	3	4	2	1
35	0	2	1	1
36	1	2	0	1
37	3	2	0	1
38	0	2	1	1
39	0	1	0	1
40	0	2	1	1
종합	42.5	69.5	30.5	42
평균	1.1	1.7	0.8	1.1

[135] 상기 표 13 및 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 실시예 62의 나노에멀젼 점안액은 평균 1.1의 작열감과 0.8의 이물감을 나타내어 대조약인 레스타시스의 1.7과 1.1과 비교하여 더 낮은 작열감 및 이물감을 나타내었다. 즉, 나노에멀젼 점안액은 기존의 점안액인 레스타시스와 비교하여 점안감이 더욱 개선된 조성물임을 확인하였다.

산업상 이용가능성

[136] 본 발명에 따른 나노에멀젼 점안 조성물은 평균 입자크기가 200nm 이하, 바람직하게는 100nm 이하이며 입자 분포가 좁게 나타나는 특징이 있으므로, 제균여과가 가능하고, 안정성이 개선되며 임상적으로 이물감 및 시야 흐림 개선 효과가 우수하므로 점안제용 조성으로 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 사이클로스포린;
식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제;
1종 이상의 친수성 유화제;
1종 이상의 소수성 유화제; 및
수성용제를 포함하는 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 2] 조성물의 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v% 로 포함되는 사이클로스포린;
조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 2.5 w/v% 로 포함되는 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제;
조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제;
조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 소수성 유화제; 및
수성용제를 포함하는, 평균 입자 크기가 1nm 내지 100nm인 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 비수성용제는 캐스터 오일, 라브라팍, 미글리올 812, 에틸올리에이트 및 이소프로필미리스테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 비수성용제는 캐스터 오일인 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 친수성 유화제는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일 또는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르인 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 소수성 유화제는 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 7] 제2항에 있어서, 상기 조성물에 카르복시메틸셀룰로오스(CMC),

하이드록시프로필메틸 셀룰로오스(HPMC),
하이드록시에틸셀룰로오스(HEC), 폴리비닐알코올(PVA),
폴리비닐피롤리돈(PVP), 카보머(Carbomer), 젤란검(Gellan Gum),
잔탄검(Xanthan Gum), 히알루론산(HA), 히알루론산
나트륨(Sodium Hyaluronate), 알긴산나트륨(Sodium Alginate) 및
덱스트란(Dextran) 중에서 선택된 1종 이상의 안정화제를 추가로
포함하는, 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 안정화제는 조성물의 총 함량 대비 0.01 내지 2.0 w/v%로 포함된, 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 9] 제2항 내지 제8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노에멀젼 점안 조성물은 최대 입자 크기가 220nm이하인 나노 에멀젼 점안 조성물.

[청구항 10] 조성물 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v%로 포함되는
사이클로스포린;
상기 사이클로스포린 함량의 8 배 이상 내지 조성물 총 함량의 2.5 w/v% 이하로 포함되는 캐스터 오일;
폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제;
소르비탄 지방산 에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 소수성 유화제; 및
수성용제를 포함하는 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 친수성 유화제는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일이며, 상기 캐스터 오일 함량의 1.6 배 내지 조성물 총 함량의 5 w/v% 이하인, 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 소수성 유화제는 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌글리콜 또는 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 조성물 총 함량의 0.1 w/v% 내지 상기 친수성 유화제 함량의 3 배 이하인 것인, 나노 에멀젼 점안 조성물.

[청구항 13] 제10항에 있어서,
상기 친수성 유화제는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일이며, 사이클로스포린 함량의 12.8 배 이상 내지 조성물 총 함량의 5 w/v% 이하로 포함되고; 및
상기 소수성 유화제는 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌글리콜 및

디에틸렌글리콜 모노에틸에테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 조성물 총 함량의 0.1 w/v% 내지 5.0 w/v%로 포함된, 나노에멀젼 점안 조성물.

[청구항 14] 조성물의 총 함량 대비 0.02 내지 0.3 w/v %로 포함되는 사이클로스포린;

조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 2.5w/v% 로 포함되는 식물성 오일, 탄소수 14 내지 20으로 이루어진 지방산 에스테르, 탄소수 6 내지 12로 이루어진 지방산 에스테르 글리세롤 중에서 선택된 1종 이상의 비수성용제,

조성물의 총 함량 대비 0.1 내지 5.0 w/v% 로 포함되는 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이트 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 친수성 유화제; 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세릴 지방산 에스테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 프로필렌글리콜 지방산 에스테르 중에서 선택된 1종 이상의 소수성 유화제;

및 수성용제를 교반 혼합하여 혼합조성물을 제조하는 단계;를 포함하는 평균 입자 크기가 1nm 내지 100nm 인 나노에멀젼 점안 조성물을 제조하는 방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 혼합 조성물에 안정화제를 추가로 혼합하는 것을 포함하는, 나노에멀젼 점안 조성물을 제조하는 방법.

[청구항 16] 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항의 나노에멀젼 점안 조성물을 환자에 점안하는 단계;를 포함하는 안과질환을 예방 또는 치료하는 방법.

[청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 안과질환은 쇼그렌 증후군 또는 안구건조증인, 방법.