



공개특허 10-2024-0100472

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0100472
(43) 공개일자 2024년07월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/107 (2006.01) *A61K 47/06* (2017.01)
A61K 47/24 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/1075 (2013.01)
A61K 47/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7020626(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2016년12월20일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7020326
원출원일자(국제) 2016년12월20일
심사청구일자 2021년11월03일
- (85) 번역문제출일자 2024년06월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/067650
- (87) 국제공개번호 WO 2017/112614
국제공개일자 2017년06월29일
- (30) 우선권주장
62/270,226 2015년12월21일 미국(US)

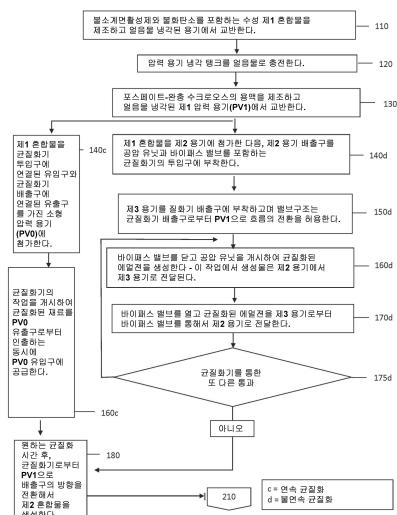
- (71) 출원인
누복스 파마 엘엘씨
미국, 애리조나 85719, 투손 스트리트 이스트 18번가 1635
용거, 예반, 씨.
미국, 애리조나주 85719, 투손 이스트 18번가 1635
- (72) 발명자
용거, 예반, 씨.
미국, 애리조나주 85719, 투손 이스트 18번가 1635
마리넬리, 에드먼드 알.
- (74) 대리인
정영수

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 나노에멀젼의 조성물

(57) 요약

본 발명은 불소계면활성제 및 인지질 중 하나 이상을 포함하는 불화탄소 나노에멀젼의 새로운 조성물, 및 증진된 산소 전달을 위한 그것의 제조 및 사용 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61K 47/24 (2013.01)

A61K 9/0026 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

퍼플루오로펜탄 나노에멀젼의 조성물로서,

퍼플루오로펜탄;

퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올들로부터 선택된 하나 이상의 계면활성제; 및

NaH_2PO_4 및 Na_2HPO_4 를 포함하는 포스페이트 완충제;

를 포함하고,

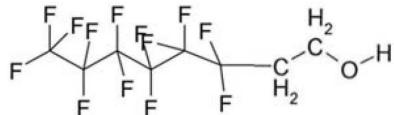
상기 나노에멀젼은,

상기 나노에멀젼에서 1% 내지 10%의 중량%를 차지하는 퍼플루오로펜탄,

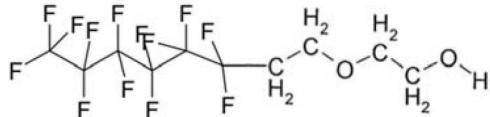
상기 나노에멀젼에서 0.10% 내지 7.5%의 중량%를 차지하는 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올,

입자의 99%가 400nm 이하의 입자 직경을 갖는 것으로 측정되는 입자 분포, 및

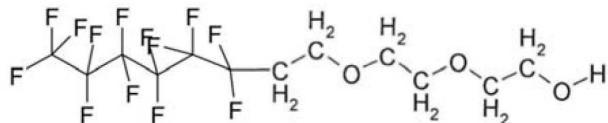
상기 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 퍼플루오로펜탄 나노에멀젼의 조성물:



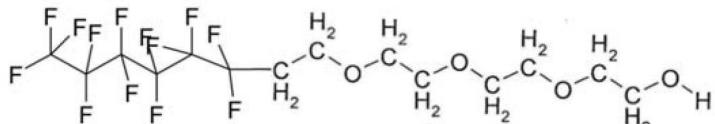
1



2



3



4

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올이 상기 나노에멀젼에서 0.10% 내지 1.5%의 중량%를 차지하는 퍼플루오로펜탄 나노에멀젼의 조성물.

청구항 3

퍼플루오로펜탄 나노에멀젼의 조성물로서,

퍼플루오로펜탄;

계면활성제로서 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올; 및

NaH₂PO₄ 및 Na₂HPO₄를 포함하는 포스페이트 완충제;

를 포함하고,

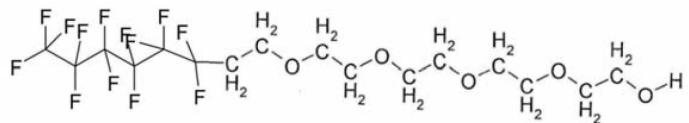
상기 나노에멀젼은,

상기 나노에멀젼에서 1% 내지 10%의 중량%를 차지하는 퍼플루오로펜탄,

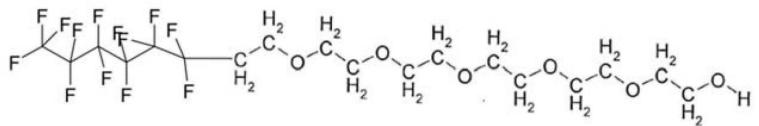
상기 나노에멀젼에서 0.10% 내지 7.5%의 중량%를 차지하는 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올,

입자의 99%가 400nm 이하의 입자 직경을 갖는 것으로 측정되는 입자 분포, 및

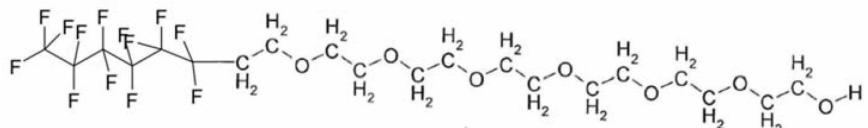
상기 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 퍼플루오로펜탄 나노에멀젼의 조성물:



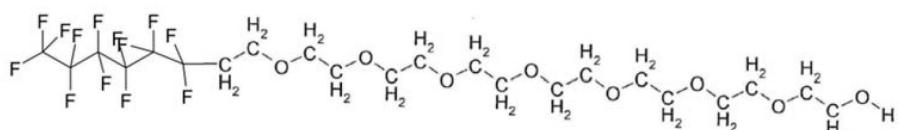
5



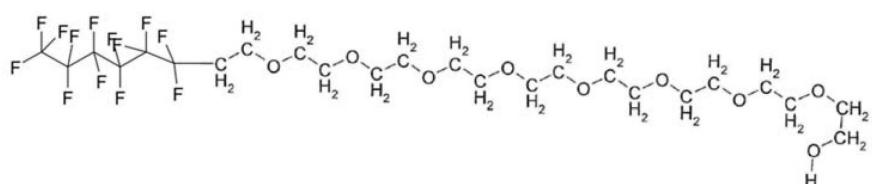
6



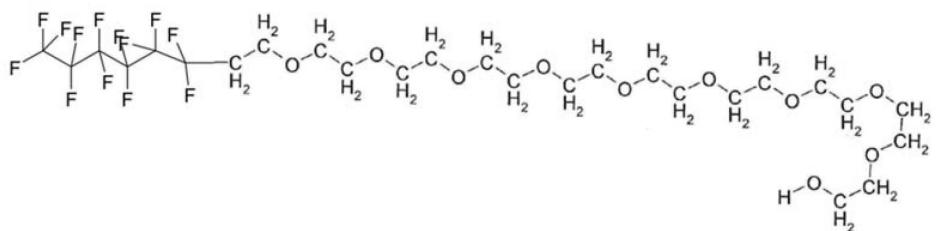
7



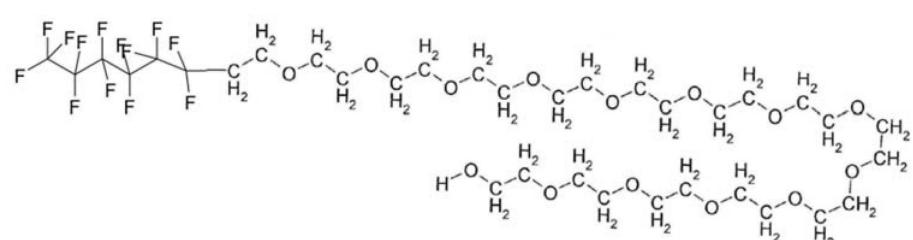
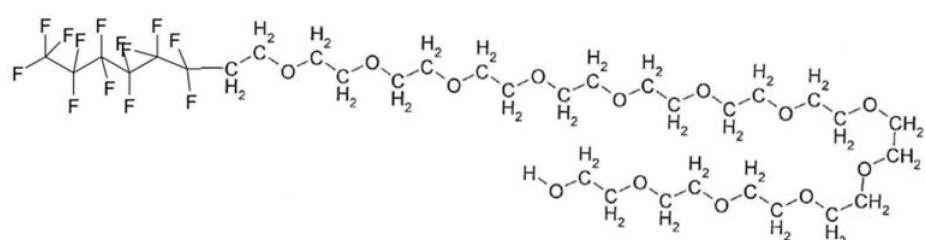
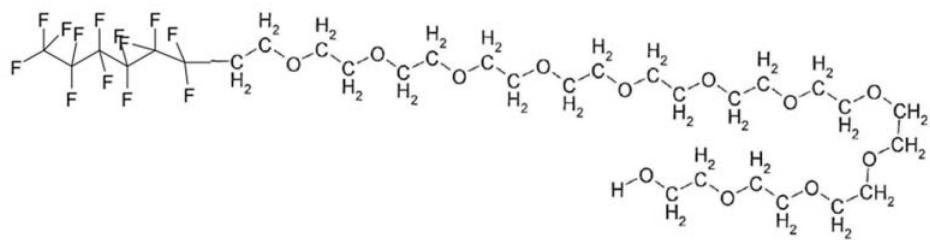
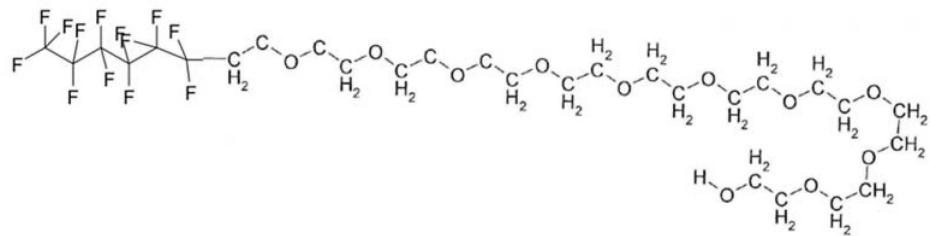
8

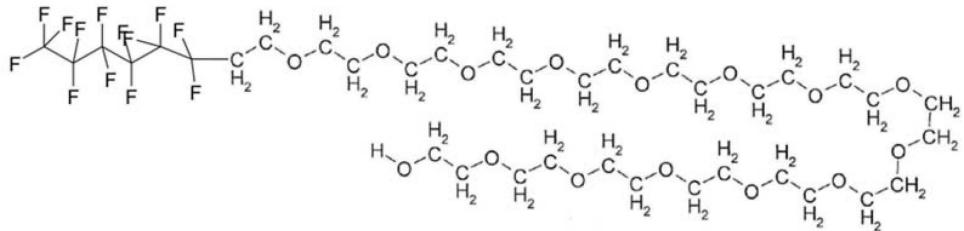


9

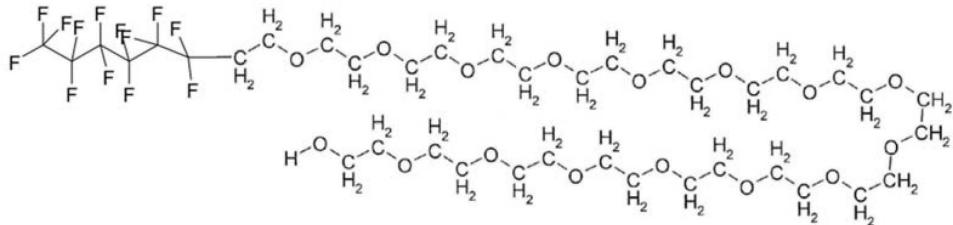


10





15



16

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올이 상기 나노에멀젼에서 0.10% 내지 1.5%의 중량%를 차지하는 퍼플루오로펜탄 나노에멀젼의 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

우선권 주장 및 관련된 특허출원

[0002]

이 출원은 2015년 12월 21일자로 제출된 미국 임시 출원 제62/270,226호로부터 우선권의 이익을 주장하며, 이것의 전체 내용은 그 전체가 여기 참고로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 발명은 일반적으로 불화탄소 나노에멀젼의 조성물 및 그것의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올 및 인지질 중 하나 이상으로 안정화된 특이한 불화탄소 나노에멀젼, 및 그것의 제조 및 적용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

통상적인 수술 및 개입 과정은 물론 외상 및 자연적 질환 상태는 혈액 손실, 허혈 또는 저산소증을 초래할 수 있고, 이것은 만약 제때 적절히 치료되지 않는다면 장기 및 조직 손상을 야기할 수 있으며, 그 결과 사망률 및 이환율을 가져온다. 허혈성 증후군으로서 나타나는 혈액 손실 사건은 몸통과 사지 전체에 널리 전파되며 뇌에서는 뇌졸중으로서 나타난다. 산소화된 혈류의 즉각적인 재혈관화와 회복이 임상 뇌졸중 치료에서 강조된다. 추가로, 공여된 혈액은 공여된 혈액의 제한된 저장수명으로 인해 계속 단점을 드러내며 바이러스 오염의 경향도 있다. 산소 캐리어나 인공 혈액이 방사선요법 및 화학요법을 포함하여 다양한 질환 및 상태의 치료를 돋는데 유용하다.

[0006]

예를 들어, 고 분자량 불화탄소를 이용한 에멀젼화된 불화탄소(FC)-기반 산소 캐리어가 보고되었다(예를 들어, 퍼플루오로데칼린 및 퍼플루오로옥틸브로마이드). 그러나, 이들 조성물은 엄격한 임상 요구를 거의 충족하지 못했고, 안전하며 신뢰할 수 있고 효과적인 산소 캐리어에 대한 긴급한 필요를 다루는데 여전히 많은 과제가 남아 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) -국제공개공보 WO2015/134735A1(UNGER, EVAN C.)[2015년 9월 11일 공개]
 (특허문헌 0002) -미국공개공보 US2005/0037083A1(SEAN BRYNJELSEN)[2005년 2월 17일 공개]
 (특허문헌 0003) -미국공개공보 US2013/0022550A1(EVAN C. UNGER)[2013년 1월 24일 공개]

발명의 내용

- [0008] 본 발명은 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올, 인지질 또는 이들의 조합으로부터 선택된 계면활성제 또는 안정제와 함께 특이하게 제제화된 불화탄소 나노에멀젼이 대사산물 및 분해 생성물의 생체축적의 임상적 문제를 해결한다는 놀라운 발견에 일부 기초하며, 이들은 6개를 초과하는 완전히 불화된 탄소의 퍼플루오로알킬기를 가진 불소계면활성제로부터 형성된다.
- [0009] 본 발명의 불화탄소 나노에멀젼은 더 큰 퍼플루오로알킬 부분이 그런 것처럼 배설 및 대사 생성물이 생체축적되지 않기 때문에 더 짧은 퍼플루오로탄소 사슬의 계면활성제를 이용하는 것으로부터 유의한 이익을 도출한다.
- [0010] 한 양태에서, 본 발명은 일반적으로 약 4 내지 약 8개 탄소의 범위의 불화탄소; 및 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올, 인지질 또는 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 계면활성제를 포함하는 불화탄소 나노에멀젼의 조성물에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 계면활성제는 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올 및/또는 3개의 인지질의 혼합물을 포함한다.
- [0011] 또 다른 양태에서, 본 발명은 일반적으로 나노에멀젼을 형성하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 PEG 텔로머 B 와 불화탄소를 포함하는 수성 제1 혼합물을 제조하는 단계; 바이패스 밸브가 열린 상태에서 바이패스 밸브 및 공압 유닛을 포함하는 균질화기를 통해서 제1 혼합물을 제1 용기와 제2 용기 사이로 전달하고 다시 제1 용기로 전달하는 단계; 닫힌 바이패스 밸브를 사용해서 공압 유닛을 개시하여 균질화된 일차 나노에멀젼을 형성하는 단계; 제1 압력 용기에 배치된, 수크로오스 또는 다른 비스코겐 및 선택적으로 제약학적으로 허용되는 베퍼 염 및 살균제 중 하나 이상의 수성 용액에 균질화된 일차 나노에멀젼을 배치하여 제2 혼합물을 형성하는 단계; 제1 압력 용기를 균질화기의 투입구에 부착하는 단계; 제2 압력 용기를 균질화기의 배출구에 부착하는 단계; 바이패스 밸브가 닫힌 상태에서 공압 유닛을 작동시켜 제2 혼합물이 전부 제2 압력 용기로 전달될 때까지 나노에멀젼을 형성하는 단계; 및 제2 압력 용기를 가압하여 0.8/0.2 마이크론 필터를 통해서 제3 압력 용기로 나노에멀젼을 전달하고 멸균하는 단계를 포함한다.
- [0012] 또 다른 양태에서, 본 발명은 일반적으로 나노에멀젼을 형성하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 올리고에틸렌옥시 부분이 1 내지 16개 단위 길이인 하나 이상의 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올 및 불화탄소를 포함하는 수성 제1 혼합물을 제조하는 단계; 바이패스 밸브가 열린 상태에서 바이패스 밸브 및 공압 유닛을 포함하는 균질화기를 통해서 제1 혼합물을 제1 용기와 제2 용기 사이로 전달하고 다시 제1 용기로 전달하는 단계; 바이패스 밸브가 닫힌 상태에서 공압 유닛을 개시하여 균질화된 일차 에멀젼을 형성하는 단계; 제1 압력 용기에 배치된 선택적으로 제약학적으로 허용되는 베퍼 염, 비스코겐 및 살균제 중 하나 이상을 포함하는 수크로오스 용액에 균질화된 일차 에멀젼을 배치하여 제2 혼합물을 형성하는 단계; 제1 압력 용기를 균질화기의 투입구에 부착하는 단계; 제2 압력 용기를 균질화기의 배출구에 부착하는 단계; 바이패스 밸브가 닫힌 상태에서 공압 유닛을 작동시켜 제2 혼합물이 전부 제2 압력 용기로 전달될 때까지 에멀젼을 형성하는 단계; 및 제2 압력 용기를 가압하여 0.8/0.2 마이크론 필터를 통해서 제3 압력 용기로 에멀젼을 전달하고 멸균하는 단계를 포함한다.
- [0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 일반적으로 나노에멀젼을 형성하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올, 수크로오스 및 선택적으로 제약학적으로 허용되는 베퍼 염, 비스코겐 및 승인된 살생물성 멸균제 중 하나 이상을 포함하는 수성 제1 혼합물을 제조하는 단계; 주사기와 주사기에 부착된 바늘을 사용하여 바이알에 제1 혼합물을 배치하는 단계; 바이알에 불화탄소를 첨가하고 바이알을 마개로 막고 크립프로 봉쇄한 후 바이알을 와동시키고 초음파처리하는 단계를 포함한다.
- [0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 일반적으로 나노에멀젼을 형성하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 하나 이상의 인지질, 물, 글리세롤, 모노베이직 소듐 포스페이트 및 다이베이직 소듐 포스페이트를 포함하는 혼합물을 형성하는 단계; 혼합물을 0.2 마이크론 필터를 통해서 멸균 용기로 전달하는 단계; 혼합물을 바이알에 배치하는 단계; 불화탄소를 바이알에 첨가하고 즉시 바이알을 마개로 막고 크립프로 봉쇄한 후 바이알을 와동시키고 초음파처리하는 단계를 포함한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 일반적으로 여기 개시된 방법에 의해 형성된 나노에멀젼에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 본 발명은 도면과 함께 다음의 상세한 설명을 읽음으로써 더 잘 이해될 것이며, 도면에서 유사한 참조표시는 유사한 요소를 나타내기 위해 사용된다.

도 1은 고압 균질화에 의해 PEG 텔로머 B-안정화된 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 생성하기 위한 본 발명에 따른 방법의 예시적인 구체예를 요약한 순서도이다.

도 2는 도 1의 본 발명에 따른 방법의 예시적인 구체예에서 추가의 단계들을 요약한 순서도이다.

도 3은 4°C에서 저장된 TDFH-PTB 나노입자 에멀젼 및 23°C에서 저장된 동일한 에멀젼의 안정성 데이터를 본 발명에 따른 방법의 예시적인 구체예를 그래프 방식으로 인용한다.

도 4는 4°C에서 저장된 TDFH-PTB 나노입자 에멀젼 및 4°C에서 저장된 TDFH-화합물 20a(DuPont Capstone FS-3100) 나노입자 에멀젼의 안정성 데이터를 본 발명에 따른 방법의 예시적인 구체예를 그래프 방식으로 인용한다.

도 5는 인지질-안정화된-퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 생성하기 위한 본 발명에 따른 방법의 예시적인 구체예를 요약한 순서도이다.

도 6은 와동 및 초음파처리에 의해 최종 생성물에서의 농도로 혼합된 성분들을 포함하는 안정화된 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 형성하기 위한 본 발명에 따른 방법의 예시적인 구체예를 요약한 순서도이다.

도 7은 퍼플루오로탄소와 계면활성제의 나노에멀젼의 시험 용액을 첨가한 전후에 용액으로부터 용존 산소의 흡수를 측정하는 예시적인 장치의 도해이다.

도 8은 실시예 5의 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 첨가한 전후에 수성 용액의 용존 산소 함량의 그래프이다.

도 9는 실시예 7의 제제의 첨가 후 수성 용액에서 용존 산소 수준의 감소를 나타낸 그래프이다.

도 10은 실시예 8의 제제의 첨가 후 수성 용액에서 용존 산소 수준의 감소를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올 및 인지질로부터 선택된 계면활성제 또는 안정제와 함께 특이하게 제제화된 불화탄소 나노에멀젼을 제공한다. 이들 불화탄소 나노에멀젼은 대사산물 및 분해 생성물의 생체축적을 포함하는, 종래의 불화탄소-기반 인공 산소 캐리어에서 직면하는 중요한 문제를 해소한다. 이들 바람직하지 않은 불순물들은 6개를 초과하는 완전히 불화된 탄소의 퍼플루오로알킬 기를 가진 불소계면활성제로부터 형성되며, 엄격한 규제 표준에 비추어 계속 차질을 초래했다. 본 발명의 불화탄소 나노에멀젼은 배설 및 대사 생성물이 더 큰 퍼플루오로알킬 부분이 그런 것처럼 생체축적되지 않기 때문에 더 짧은 퍼플루오로탄소 사슬을 사용하는 것으로부터 유의한 이익을 도출한다.

[0018] 한 양태에서, 본 발명은 일반적으로 약 4 내지 약 8개 탄소의 범위의 불화탄소; 및 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올 및 인지질로부터 선택된 하나 이상의 계면활성제를 포함하는 불화탄소 나노에멀젼의 조성물에 관한 것이다.

[0019] 특정 구체예에서, 불화탄소는 퍼플루오로부탄, 퍼플루오로펜탄, 퍼플루오로헥산, 퍼플루오로헵탄, 퍼플루오로옥탄, 또는 이들 중 둘 이상의 혼합물을 포함한다.

[0020] 바람직한 특정 구체예에서, 불화탄소는 퍼플루오로펜탄을 포함한다.

[0021] 특정 구체예에서, 하나 이상의 계면활성제는 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올 및/또는 3개의 인지질의 혼합물을 포함한다.

[0022] 예를 들어, 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올은

[0023] $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_n-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q-\text{H}$

[0024] 중 하나 이상을 포함하며, 여기서 n은 5이고, q는 1 내지 약 50의 정수이다.

- [0025] 바람직한 특정 구체예에서, 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올은
- [0026] $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_n-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q-\text{H}$
- [0027]이며, 여기서 n은 5이고, q는 1 내지 약 16의 정수이다(예를 들어, 약 3 내지 약 16, 약 6 내지 약 16, 약 10 내지 약 16, 약 3 내지 약 10).
- [0028] 불화탄소는 나노에멀젼에서 임의의 적합한 중량 퍼센트를 차지할 수 있으며, 예를 들어 약 1% 내지 약 50%를 차지할 수 있다(예를 들어, 약 1% 내지 약 40%, 약 1% 내지 약 30%, 약 1% 내지 약 20%, 약 1% 내지 약 10%, 약 1% 내지 약 5%).
- [0029] 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올은 나노에멀젼에서 임의의 적합한 중량 퍼센트를 차지할 수 있으며, 예를 들어 약 0.10% 내지 약 7.5%를 차지할 수 있다(예를 들어, 약 0.10% 내지 약 5%, 약 0.10% 내지 약 4%, 약 0.10% 내지 약 3%, 약 0.10% 내지 약 1.5%).
- [0030] 인지질은 임의의 적합한 탄소 사슬 길이, 예를 들어 약 12개 탄소 내지 약 18개 탄소(예를 들어, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) 길이의 범위를 가진다.
- [0031] 인지질은 나노에멀젼에서 임의의 적합한 중량 퍼센트를 차지할 수 있으며, 예를 들어 약 0.10% 내지 약 7.5%를 차지할 수 있다(예를 들어, 약 0.10% 내지 약 5%, 약 0.10% 내지 약 4%, 약 0.10% 내지 약 3%, 약 0.10% 내지 약 1.5%).
- [0032] 2015년 6월 12일자로 제출된 PCT/US15/35681, 발명의 명칭 "인지질 조성물 및 마이크로버블 및 그것을 사용하여 형성된 에멀젼"의 개시는 분명히 모든 취지에서 여기 참고로 포함된다.
- [0033] 조성물이 3개의 인지질의 혼합물을 포함하는 특정 구체예에서, 예시적인 인지질 및 그것의 상대적인 양은, 예를 들어 약 75 내지 약 87 mole% 포스파티딜콜린, 약 5 내지 약 15 mole% 포스파티딜에탄올아민 및 약 3 내지 약 20 mole% 포스파티딜에탄올아민-MPEG일 수 있으며, 여기서 "MPEG"는 말단 메톡시 기를 가진 PEG 기를 말한다. MPEG는 약 350 내지 약 5,000(예를 들어, 약 350 내지 약 4,000, 약 350 내지 약 3,000, 약 350 내지 약 2,000, 약 500 내지 약 5,000, 약 1,000 내지 약 5,000, 약 1,500 내지 약 5,000, 약 2,000 내지 약 5,000, 약 3,000 내지 약 5,000, 약 4,000 내지 약 5,000)의 분자량을 가질 수 있다. 분자의 올리고에틸렌옥시 부분이 MPEG 인지질에 존재하는 메톡시 말단과 반대로 하이드록실 기에서 종결되는 포스파티딜에탄올아민-PEG가 제제에서 포스파티딜에탄올아민-MPEG를 대신할 수 있다. 또한, 포스파티딜에탄올아민-MPEG와 포스파티딜에탄올아민-PEG의 조합이 이들 제제의 올리고에틸렌옥시-보유 인지질 성분으로서 임의의 상대적인 비율로 이용될 수 있다.
- [0034] 조성물이 3개의 인지질의 혼합물을 포함하는 구체예에서, 예시적인 인지질 및 그것의 상대적인 양은, 예를 들어 약 80 내지 약 85 mole% 포스파티딜콜린, 약 8 내지 약 13 mole% 포스파티딜에탄올아민 및 약 6 내지 약 11 mole% 포스파티딜에탄올아민-MPEG(또는 포스파티딜에탄올아민-PEG)일 수 있다.
- [0035] 특정 구체예에서, 포스파티딜에탄올아민 약 350 내지 약 5,000(예를 들어, 약 350 내지 약 4,000, 약 350 내지 약 3,000, 약 350 내지 약 2,000, 약 500 내지 약 5,000, 약 1,000 내지 약 5,000, 약 1,500 내지 약 5,000, 약 2,000 내지 약 5,000, 약 3,000 내지 약 5,000, 약 4,000 내지 약 5,000)의 분자량을 가진 PEG 기를 포함한다.
- [0036] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 PEG 텔로머 B(PTB), 맞춤 정제된 의료 등급의 DuPont Zonyl FS-100 또는 DuPont FSO를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올을 포함한다. 퍼플루오로-n-헥실올리고에틸렌옥시-알코올의 특정한 형태는 DuPont Capstone FS-3100라고 알려진 불소계면활성제 제품이며, 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 이 재료 또는 이 재료의 맞춤 정련된 버전을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 테트라데카플루오로-n-헥산(TDFH)을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 임의의 비율로 존재하는 그것의 가능한 구조 이성질체의 둘 이상의 혼합물로 구성될 수 있는 테트라데카플루오로헥산을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 도데카플루오로-n-펜탄(DDFP)을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 조성물은 임의의 비율로 존재하는 그것의 가능한 구조 이성질체의 둘 이상의 혼합물로 구성될 수 있는 도데카플루오로펜탄을 포함한다.
- [0037] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 도데카플루오로-n-펜탄, 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린, 1,2-팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-5000] 염, 예컨대 나트륨 염, 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 중 하나 이상을 포함한다.

[0038] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린, 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] 염, 예컨대 나트륨 염, 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 중 하나 이상을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 1,2-디도데칸오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린, 1,2-디도데칸오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] 나트륨 염, 및 1,2-디도데칸오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 중 하나 이상을 포함한다.

[0039] 본 발명의 한 양태는 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 제조하는 방법에 관한 것이다. 오직 단일 사슬 길이만을 포함하는 불화탄소 부분을 갖는 하나 이상의 불화탄소 계면활성제의 수성 혼합물이 퍼플루오로탄소의 나노에멀젼을 제조하는데 이용된다. 도 1을 참조하면, 단계 (110)에서, 방법은 용액 온도를 모니터링하고 2~5°C의 온도로 유지하면서, 15 내지 60분의 기간 동안 2~5°C 배스에 배치된, 용기 중에서 자기 교반장치를 사용하여 주사용수(WFI)에서 불소계면활성제의 약 6% wt/부피 혼합물을 제조한다.

[0040] 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소는 테트라데카플루오로-n-헥산을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 테트라데카플루오로헥산을 포함하며, 이것은 둘 이상의 구조 이성질체의 혼합물일 수 있다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소는 도데카플루오로-n-펜탄을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소는 도데카플루오로펜탄을 포함하며, 이것은 둘 이상의 구조 이성질체의 혼합물일 수 있다.

[0041] 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소는 테트라데카플루오로-n-헥산으로 구성된다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소는 테트라데카플루오로헥산으로 구성된다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소는 도데카플루오로-n-펜탄으로 구성된다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소는 도데카플루오로펜탄으로 구성된다.

[0043] *단계 (110)에 이어서, 본 발명의 방법은 용기에 냉각된(0~4°C) 퍼플루오로탄소의 알리퀴트를 재빨리 첨가하고, 용기를 캡으로 닫은 다음, 결과의 제1 혼합물을 약 1시간 동안 교반한다.

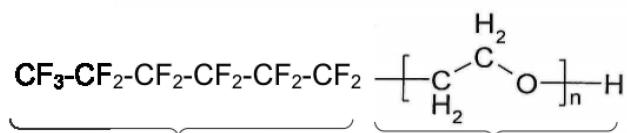
[0044] 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소 계면활성제는 Peg Telomer B(PTB), 화합물 21을 포함한다:

[0045] $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_m\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$; 21

[0046] $m = 5, 7, 9, 11, 13$; 각 m 에 대해, $n = 4$ 내지 최대 13

[0047] 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소 계면활성제는 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소 계면활성제는 상기 화합물 21로 표시된 화합물들의 혼합물인 PEG 텔로머 B로 구성된다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불화탄소 계면활성제는 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올로 구성된다.

[0048] 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 퍼플루오로-n-헥실-올리고에틸렌옥시-알코올 계면활성제(17)이며, 이것은 다양한 에틸렌 옥사이드 부분(19)과 조합하여 불변의 퍼플루오로-n-헥실 부분(18)을 가진다.



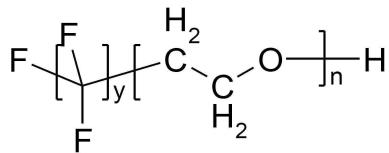
18

19

17

[0049]

[0050] 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 퍼플루오로-n-알킬-올리고에틸렌옥시-알코올(20)을 포함하며, 여기서 y 는 6을 초과한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 20을 포함하며, 여기서 y 는 7이고, n 은 1 이상 16 이하이다.

**20 a,b**

[0051]

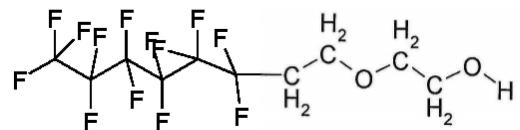
특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 퍼플루오로-n-알킬-올리고에틸렌옥시-알코올(20a)을 포함하며, 여기서 y 는 6이고, n 은 1 초과 16 이하이다(예를 들어, DuPont Capstone FS-3100 불소계면활성제). 특정 구체예에서, 화합물 20a은 제조자로부터 받은 대로 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 화합물 20a은 사용 전에 맞춤 정련 과정 또는 정제 과정을 거칠 수 있다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 20b를 포함하며, 여기서 y 는 5이고, n 은 1 이상 16 이하이다.

[0053]

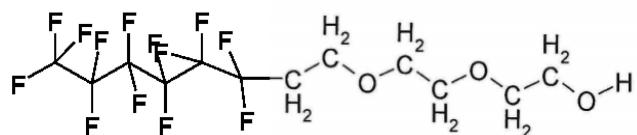
특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 1을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 2를 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 3을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 4를 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 5를 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 6을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 7을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 9를 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 10을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 12를 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 13을 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 14를 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 15를 포함한다. 특정 구체예에서, 단계 (110)의 불소계면활성제는 화합물 16을 포함한다.



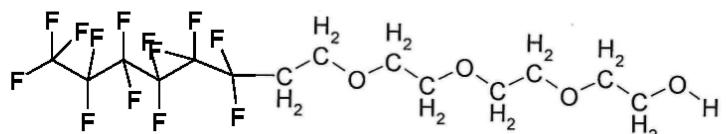
1



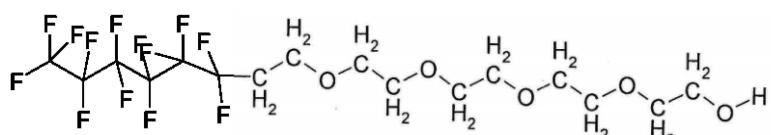
2



3

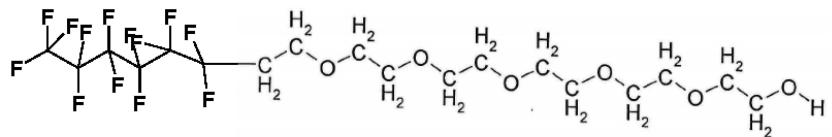


4

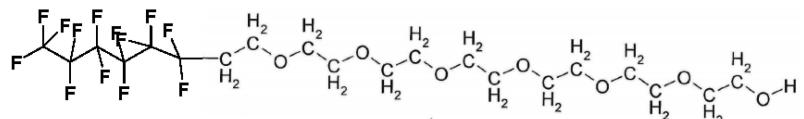


5

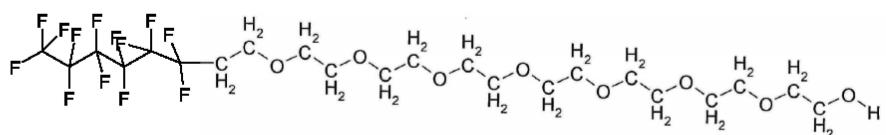
[0054]



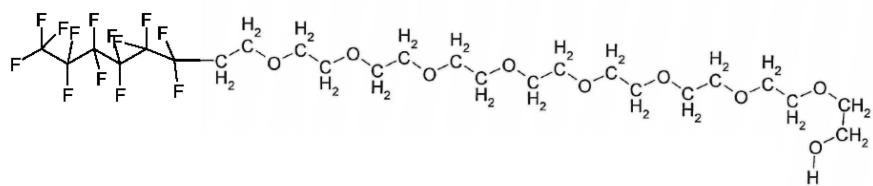
6



7

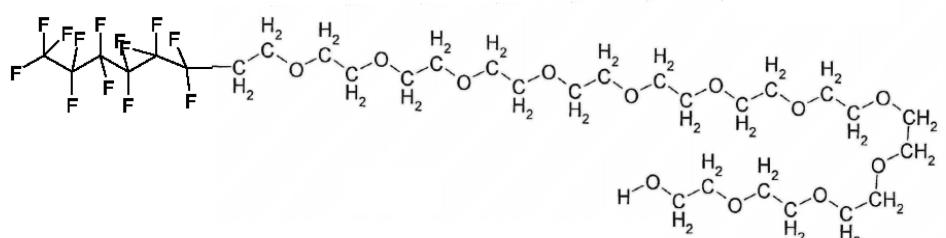
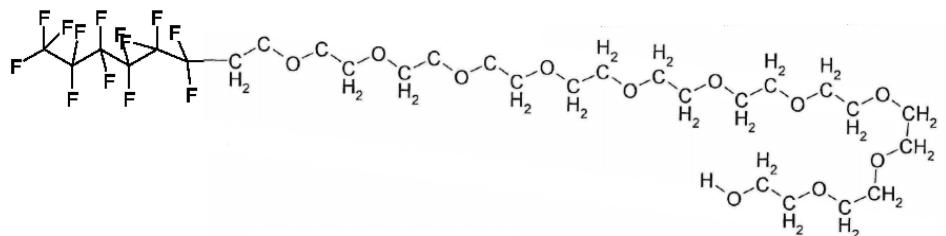
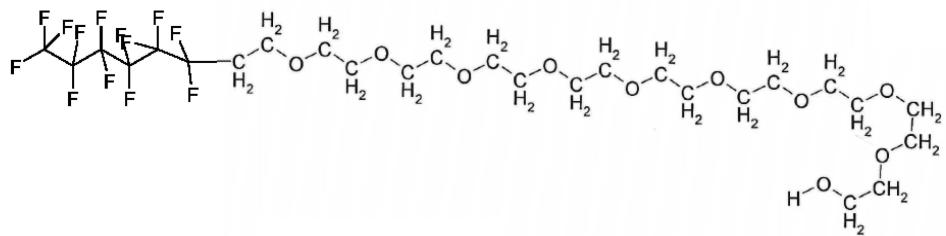


8

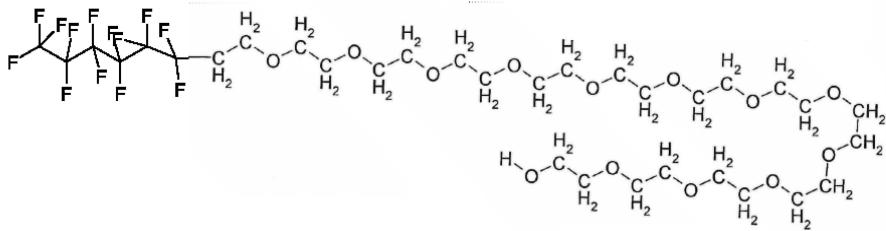


9

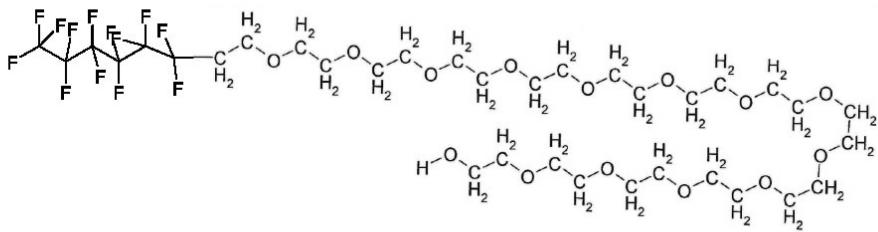
[0055]



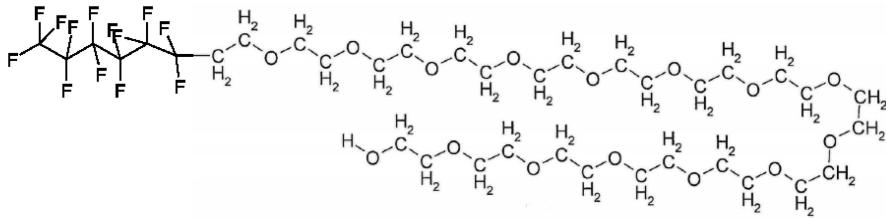
[0056]



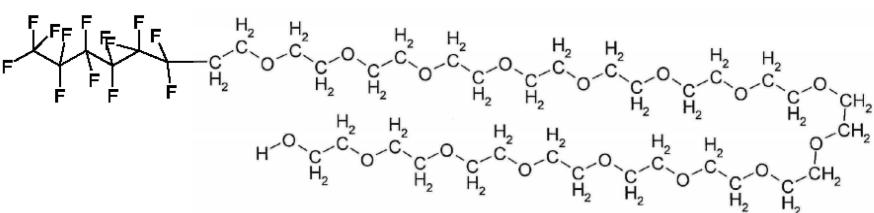
13



14



15



16

[0057]

특정 구체예에서, 불소계면활성제는 화합물 1 내지 16의 혼합물로 구성되며, 이것은 이들 화합물의 임의의 조합을 함유할 수 있고, 이들 화합물은 단독으로 또는 화합물 1 내지 16의 세트의 선택된 멤버 중 어느 것이 생략될 수 있다.

[0059]

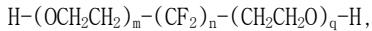
특정 구체예에서, 상이한 발포 및 습윤 특성과 조합된 퍼플루오로-부분(18)을 포함하는 다른 불화탄소 계면활성제가 본 발명의 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 형성하는데 사용된다. 예를 들어, 설폰산(DuPont FS-10)이나 인산에스테르(DuPont FS-61, FS63, FS-64)에 기초한 다른 음이온성 계면활성제; 쯔위터이온성 및 양쪽성 계면활성제(각각 DuPont FS-50 및 DuPont FS-51); 퍼플루오로알킬화된 폴리에틸렌옥시 알코올에 기초한 비이온성 계면활성제, 예컨대 DuPont FS-30, DuPont FS-31, DuPont FS-3100, DuPont FS34 및 DuPont FS-35; 등등이 이용될 수 있다.

[0061]

특정 구체예에서, 길이가 다른 에틸렌 옥사이드 부분(19)과 조합된 부분(18)을 포함하는 불화탄소-화합물이 본 발명의 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 형성하는데 이용된다. 특정 구체예에서, n은 약 3 내지 약 6이다. 다른 구체예에서, n은 1 이상이고 약 16 이하이며, 이로써 도데카플루오로펜탄 (DDFP), 테트라데카플루오로헥산 (TDFH), 헥사데카플루오로헵탄 (HDFH), 및 옥타데카플루오로옥탄 (ODFO)와 같은 저분자량 퍼플루오로탄소를 가

진 안정한 나노에멀젼이 형성된다.

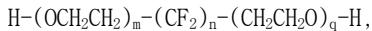
[0062] 일부 구체예에서, 화합물 22로서 도시된 형태의 폐길화된 퍼플루오로알킬올리고에틸렌옥시 알코올 계면활성제가 여기 개시된 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 형성하기 위해 이용된다:



22

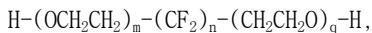
[0065] 여기서 독립적으로 n 은 1 내지 약 50의 정수이고(예를 들어, 1 내지 약 25, 1 내지 약 12, 1 내지 약 6, 6 내지 약 50, 12 내지 약 50, 25 내지 약 50), n 은 1 내지 약 50의 정수이고(예를 들어, 1 내지 약 25, 1 내지 약 12, 1 내지 약 6, 6 내지 약 50, 12 내지 약 50, 25 내지 약 50), 및 q 는 1 내지 약 50의 정수이다(예를 들어, 1 내지 약 25, 1 내지 약 12, 1 내지 약 6, 6 내지 약 50, 12 내지 약 50, 25 내지 약 50).

[0066] 더 바람직한 특정 구체예에서, 이용될 수 있는 화합물의 부류는 아래 도시된 화합물 22의 하위군으로부터 선택된다:



[0068] 여기서 $m = 1$ 내지 약 50, $n = 1$ 내지 12 및 $q = 1$ 내지 약 50

[0069] 가장 바람직한 특정 구체예에서, 이용될 수 있는 화합물의 부류는 아래 도시된 화합물 22의 하위군으로부터 선택된다:



[0071] 여기서 $m = 1$ 내지 약 50, $n = 1$ 내지 약 6 및 $q = 1$ 내지 약 50

[0072] 특정 구체예에서, 화합물 22로서 나타낸 화합물의 그룹의 개별 멤버 또는 화합물의 그룹의 개별 멤버들의 임의의 조합이 여기 개시된 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 형성하기 위해 이용되는 불화탄소 계면활성제로서 이용된다.

[0073] 특정 구체예에서, 구조 22로서 나타낸 화합물들의 혼합물은 여기 개시된 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 형성하는데 이용되기 전에 맞춤 정련 또는 정제 프로토콜을 거칠 수 있다.

[0074] 특정 구체예에서, 구조 22로서 나타낸 화합물의 그룹의 개별 멤버의 임의의 개별 문자 종들 또는 조합은 여기 개시된 퍼플루오로탄소 나노에멀젼을 형성하는데 이용되기 전에 맞춤 정련 또는 정제 프로토콜을 거칠 수 있다.

[0075] 특정 구체예에서, Ultra Turrax 또는 유사한 분산 장치가 초기의 조 에멀젼을 생성하기 위한 자기교반 시스템을 대신할 수 있다. Ultra Turrax는 고속 교반 모터(1,000-25,000 rpm)를 가지고, 여기에 분산 요소가 샤프트를 통해서 부착된다. 따라서, 자기교반 시스템을 사용하는 것과 비교해서 Ultra Turrax를 사용하는 것은 조 에멀젼의 생성에 더 적은 시간(0.5-5분)이 필요하다. 작업 내내 용액의 온도는 저비등 퍼플루오로탄소 액체의 손실을 최소화하기 위해 2-6°C에서 유지된다.

[0076] 또한, 고속 모터와 분산 부속물로 구성된 프로브 초음파발생기 또는 균질화기를 사용함으로써 발생되는 격렬한 교반이 조 에멀젼을 제조하기 위해 이용될 수 있다.

[0077] 이어서, 도 1의 단계 (140c)-(160c) 또는 (140d)-(175d)를 참조하면, 조 에멀젼은 400nm 이하의 평균 입자 직경을 포함하는 미세 에멀젼으로 균질화되며, 이것의 99% 누적 분포는 900nm 이하이다.

[0078] 한 구체예에서, 균질화기(Avestin model C5)가 사용된다. 다른 구체예에서, 균질화기(Avestin model C50)가 사용된다. 다른 구체예에서, 공압 보조 장치가 있거나 없는 Kirkland Products 핸드헬드 균질화기가 사용된다. 특정 구체예에서, 균질화 압력은 1,000 psi 내지 14,000 psi의 범위이다. 또한, 다른 구체예에서, 균질화기는 연속 균질화 모드 또는 불연속 균질화 모드에서 사용된다. 불연속 통과 횟수 또는 연속 균질화 시간은 미세 에멀젼의 달성을 보장하도록 조정될 수 있다.

[0079] 도 1, 단계 (180)을 참조하면, 미세 에멀젼을 형성하기 위한 조 에멀젼의 균질화가 완료된 후, 결과의 미세 에멀젼은 WFI로 구성된 냉각된(0-10°C) 교반된 연속상을 함유하는 다른 용기로 전달된다. 또한, 연속상은 선택적으로 완충제, 비스코jen, 부형제, 및 어떤 부주의하게 도입된 미생물 종들의 성장을 억제하기 위한 보존제(살균제)를 함유한다.

- [0080] 특정 구체예에서, 전달은 에멀젼을 제1 용기로부터 균질화기를 통해서 선택적으로 균질화기가 가압된 상태에서 제2 용기로 보냄으로써 수행될 수 있다. 분산상의 부피는 전달된 에멀젼의 1 내지 100배이다. 특정 구체예에서, 미세 에멀젼은 질소 압력(2-10 psi) 하에 10-30분 동안 교반되며, 이로써 미세 에멀젼이 연속상 전체에 균질하게 분포되는 것이 보장된다. 당업자는 장치의 구성형태 및 제조 규모가 상이한 규모의 선행 작업에서 이용된 시간이나 상이한 장비의 사용에 따라 변화될 필요가 있을 수 있음을 인정할 것이다.
- [0081] 단계 (180)에서, 방법은 미세 에멀젼을 제1 압력 용기(PV1)에 배치된 수크로오스 용액에 주사하여 제2 혼합물을 형성한다. 도 2를 참조하면, 단계 (210)에서, 방법은 단계 (210)의 제2 혼합물을 교반하면서 제1 압력 용기(PV1)를 가압한다.
- [0082] 단계 (220) 및 (230)에서, 방법은 제2 혼합물을 균질화기를 사용하여 제2 압력 용기(PV2)로 전달한다.
- [0083] 단계 (240) 및 (250)에서, 방법은 제2 압력 용기(PV2)를 0.8/0/2 마이크론 필터를 통해서 제3 압력 용기(PV3)에 연결하고, 그 다음 제2 압력 용기를 가압하여 제2 혼합물을 여과 및 살균하고, 그 제2 혼합물을 제3 압력 용기로 전달한다. 특정 구체예에서, 여과 단계는 주사기 멤브레인 필터, 카트리지 멤브레인 필터, 또는 캡슐 멤브레인 필터, 또는 매질과 양립가능한 재료로 제조되고 0.2 마이크론 또는 심지어 0.1 마이크론 정도로 작은 세균, 곰팡이, 곰팡이 포자 및 진균 오염물질과 같은 미생물을 포함하는 미립자 물질을 제거할 수 있는 임의의 다른 멤브레인들을 이용한다. 예를 들어, 멤브레인 재료는 Pall Sciences의 Supor®(폴리에테르설휠) 멤브레인, Pall EKV® 필터 시리즈 멤브레인 또는 Pall Sciences GHP Polypore® 멤브레인일 수 있다.
- [0084] 단계 (250)이 완료된 후, 방법은 여과된 용액의 균질한 분산을 보장하기 위해 결과의 멸균된 제2 혼합물을 약한 질소 압력 하에 교반한다. 특정 구체예에서, 방법은 여과된 제2 혼합물을 연동 펌프, 계량 펌프, 기어 펌프, 또는 다른 적합한 유체 전달 장치를 사용하여 봉쇄되고 크림프로 막은 바이알로 전달한다. 모든 작업 동안 미생물 오염을 피하기 위해 주의를 기울여야 하며, 무균 충전 작업에 대한 이러한 주의사항은 당업자에게 알려져 있다.
- [0085] 도 6을 참조하면, 특정 구체예에서, 예를 들어 불화탄소 계면활성제 20a 또는 21을 포함하는 나노에멀젼이 조합된 성분들의 초음파처리에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, DDFP(순(neat) 액체로서), 포스페이트-완충 수성 수크로오스(용액으로서), 및 화합물 20a 계면활성제(순 액체로서 또는 수성 포스페이트 완충 수크로오스 용액과 미리 혼합된)가 DDFP의 나노입자 에멀젼을 제조하기 위해 이용된다.
- [0086] 단계 (610)에서, 방법은 포스페이트-완충 수크로오스와 불소계면활성제 화합물 21(Peg 텔로머 B)의 수성 용액을 제조한다. 단계 (620)에서, 방법은 복수의 바이알을 단계 (610)의 용액으로 충전하고 각 바이알의 입구에 마개를 위치시킨다. 단계 (630)에서, 방법은 바이알을 서늘한 환경에 위치시켜, 퍼플루오로탄소가 바이알의 용액에 첨가될 때 퍼플루오로탄소의 유의한 양이 증발되지 않도록 하는 온도로 바이알을 만든다. 단계 (640)에서, 불화탄소가 각 바이알에 첨가되고, 이어서 즉시 각 바이알이 크림프로 봉쇄된다. 단계 (650)에서, 방법은 각 바이알을 와동시킨 후 초음파처리하며, 이로써 본 발명의 퍼플루오로탄소 나노에멀젼이 생성된다. 단계 (650)에서, 성분들은 진탕 또는 와동에 의해 마개로 막힌 크림프로 봉쇄된 바이알에서 초기에 혼합되며, 이로써 입자 크기 분포가 약 200 나노미터 내지 15 마이크론 정도의 범위일 수 있는 조 에멀젼이 생성된다. 입자 치수 크기는 예시적이며, 당업자는 실제 실시에서 치수는 주어진 범위의 아래이거나 위일 수 있다는 것을 알고 있다.
- [0087] 다음에, 본 발명의 방법은, 예를 들어 1초 내지 1시간의 시간 기간 동안 40 KHz의 초음파처리 주파수 및 약 75-80와트의 총 출력을 제공하는 VWR Aquasonic 75HT 유닛과 같은 초음파 클리닝 배스에서 바이알을 초음파처리하며, 이로써 나노입자 에멀젼의 원하는 입자 크기 분포가 형성된다.
- [0088] 도 5를 참조하면, 특정 구체예에서, 하나 이상의 인지질이 유화 계면활성제 시스템으로서 이용된다. 도 5를 참조하면, 단계 (510)에서, 방법은 모노베이직 및 다이베이직 포스페이트 버퍼를 함유하는 물과 글리세롤의 제1 혼합물을 제조하고, 이것은 주변 온도 내지 100°C의 온도에서 교반된다. 단계 (520)에서, 공정과 양립가능한 주변 온도 내지 100°C의 온도에서 인지질이 고체 물질로서 또는 적합한 용매 중의 용액으로서 제1 혼합물에 첨가되고, 이로써 제2 혼합물이 형성된다. 단계 (530)에서, 제2 혼합물은 0.2 마이크론 필터를 통해서 제2 용기로 여과된다. 단계 (540)에서, 여과된 용액은 그것의 제조 온도가 주변 온도를 초과했다면 주변 온도로 냉각된다. 단계 (550)에서, 방법은 단계 (540)의 용액을 복수의 바이알로 전달하고 바이알을 마개로 막는다. 단계 (560)에서, 유화될 선택된 불화탄소가 바이알에 첨가되고, 바이알은 즉시 크림프로 봉쇄된다. 단계 (570)에서, 방법은 단계 (560)의 상기 바이알을 1초 내지 1시간의 시간 기간 동안 와동시키고 초음파처리하여 불화탄소 에멀젼을 제공한다. 초음파처리 시간은 특정 용도에 최적일 수 있는 원하는 크기의 입자 크기 분포를 제공하도록 조정될

수 있다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 인지질은 포화되거나, 부분 포화되거나, 또는 완전히 불포화된다. 예를 들어, 제1 나노에멀젼이 DPPC(16:0), DPPE-MPEG-2000, 또는 DPPE-MPEG5000, 및 선택적으로 DPPE(16:0)를 사용하여 형성된다. 제2 나노에멀젼이 난황 인지질을 단독으로 또는 다른 첨가된 인지질이나 유도된 인지질과 조합하여 사용하여 형성된다. 제3 나노에멀젼이 16:0-18:1 PC, 16:0-18:1 PE 및 16:0-18:1 PE-MPEG2000, 또는 16:0-18:1PE-MPEG5000을 사용하여 형성된다. 제4 나노에멀젼이 DPPC(16:1), DPPE-MPEG-2000 또는 DPPE-MPEG-5000, 및 선택적으로 DPPE(16:1)를 사용하여 형성된다. 제5 나노에멀젼이 DMPC, DMPE 및 DMPE-MPEG2000, 또는 DMPE-MPEG5000을 사용하여 형성된다. 제6 나노에멀젼이 14:1($\Delta 9$ -시스) PC, 14:1($\Delta 9$ -시스) PE, 14:1($\Delta 9$ -시스) MPEG2000, 또는 14:1($\Delta 9$ -시스) MPEG5000을 사용하여 형성된다. 제6 나노에멀젼이 14:1($\Delta 9$ -트랜스)PC, 14:1($\Delta 9$ -트랜스) PE, 14:1($\Delta 9$ -트랜스) MPEG2000, 또는 14:1($\Delta 9$ -트랜스) MPEG5000을 사용하여 형성된다. 제7 나노에멀젼이 DLPC(12:0), DLPE-MPEG-2000 또는 DLPE-MPEG-5000, DLPE(12:0)를 사용하여 형성된다.

[0089] 또한, 특정 구체예에서, 여기 설명된 인지질 성분의 상대적인 비율은 용해성, 에멀젼 안정성, 및 산소 흡수 및 방출 동력학과 관련하여 제제를 최적화하기 위해 변화될 수 있다. 예를 들어, 제1 나노에멀젼은 물-프로필렌 글리콜-글리세롤 85/10/5 v/v/v이고 총 지질 농도가 0.75mg/mL 내지 50mg/mL 정도인 용액 중에서 82 DPPC(16:0), 8 DPPE(16:0)-MPEG-2000, 및 10 DPPE(16:0)의 물 비율로 제제화될 수 있다. 주어진 희석제에서 지질 용해성이 불량한 경우, 프로필렌 글리콜 및 글리세롤의 상대적인 양은 물에 비해 증가될 수 있다. 이용될 수 있는 인지질 성분은 상기 인용된 예들에 설명된 것들에 제한되지 않는다. 특정 제제는 불포화 동종물의 주어진 분획과 조합된 완전히 포화된 인지질의 주어진 분획으로 구성된 인지질 혼합물을 필요로 할 수 있다. 젤에서 액체 결정상으로의 전이 온도와 같은 특성의 조정 및 조율은 당업자에 의해 잘 이해된다.

[0090] 일부 구체예에서, 일군의 예들에 언급된 것들과 동종성인 머리기를 가진 인지질의 첨가가 필요할 수 있다. 예를 들어, MPEG2000 대신에 MPEG350가 이용되었을 때, MPEG2000을 이용한 시스템에서 성분들의 상대적 비율은 콜린 머리기를 가진 것들과 비교하여 MPEG 인지질의 더 큰 비율이 필요하다는데 차이가 있을 수 있다. 이것은 또한 PEG화된 인지질 또는 MPEG-인지질과 PEG-인지질의 조합이 계면활성제 시스템으로서 이용되는 경우에도 적용된다.

[0091] 일부 구체예에서, 콜린 타입 머리기는 더 크거나 작은 알킬 기, 또는 3개 미만의 알킬기를 함유할 수 있다.

[0092] 일부 구체예에서, 디아실 포스파티딜에탄올아민 인지질과 같은 머리기에 양이온성 부분을 가진 인지질은 디아실 포스파티딜 글리세롤 인지질과 같은 중성 머리기 또는 디아실포스파티드산과 같은 음이온성 머리기를 지닌 인지질로 완전히 또는 부분적으로 치환될 수 있다.

[0093] 특정 구체예에서, 소 분자 물질이 비스코젠크로뮴 부형제로서 이용될 수 있고, 이것은 나노미립자 불화탄소 에멀젼의 침강(역 크리밍)을 억제하고 용액의 전체적인 밀도, 점도 및 장성을 제품 용액이 주사되는 혈액에 균접하도록 조정할 수 있다. 예를 들어, 프로필렌글리콜, 글리세린, 및 당 알코올, 예컨대 소르비톨, 자일리톨, 만니톨 및 에리트리톨과 같은 물질이 비스코젠크로뮴으로서 사용될 수 있다. 유사하게, 매질에서 적절한 용해성을 가진 단당류, 이당류 또는 삼당류와 같은 다른 폴리하이드록시 화합물들도 비스코젠크로뮴으로서 사용될 수 있다. 예들은 프럭토오스, 글루코오스, 자일로오스, 수크로오스, 트레할로오스, 라피노오스, 스타키오스, 알기네이트, 사이클로덱스트린, 치환된 사이클로덱스트린, 및 덱스트란이다. 또한, 직쇄 또는 멀티암 폴리에틸렌글리콜, 예컨대 PEG300, PEG400, PEG600 및 최대 MW 10,000의 고분자량 PEG가 비스코젠크로뮴으로서 또한 이용될 수 있다.

[0094] 특정 구체예에서, 의료 분야의 전문가는 나노에멀젼의 용액과 혈액 간 장성 불일치의 효과를 최소화하기 위해 나노에멀젼의 주사 속도를 제어하는 것을 필요로 한다. 그러나, 주사되는 나노에멀젼이 등장성일 필요는 없다. 나노에멀젼의 상기 주사되는 용액은 등장성과의 편차 정도가 일시적 영향을 넘어서 환자에게 불편함이나 조직 손상을 가져오지 않는 한에서 저장성 또는 고장성일 수 있다.

[0095] 특정 구체예에서, 상기 나노에멀젼은 포스페이트 완충 식염수의 제조를 위해 이용된 것과 같은 포스페이트 버퍼와 같은 다른 성분들을 선택적으로 함유하는 0.9% 식염수와 같은 희석제의 큰 부피에 넣어져 주사될 수 있다.

[0096] 특정 구체예에서, 나트륨 포스페이트 완충 시스템 이외의 다른 버퍼가 상기 나노에멀젼의 pH를 유지하기 위해 이용될 수 있다. 상기 버퍼는, 예를 들어 아세트산, 아르기닌, 아스파르트산, 벤조산, 카본산, 시트르산, 글루콘산, 글루콘산 락톤, 글리신, 히스티딘, 리신, 메글루민, 인산, 또는 트로메타민의 염 또는 자유 산 형태와 염 형태의 조합일 수 있다; 여기서 산 염은 완충 시스템의 일부이다. 또한, 반대이온은 일반적으로 나트륨, 메글루민, 또는 생화학적으로 양립성이고 비경구로 사용이 허용되는 다른 양이온들이다.

[0097] 특정 구체예에서, 디소듐 EDTA와 같은 킬레이트화제가 Fe^{3+} 와 같은 산화 금속 이온의 양을 격리시켜 불포화 인지

질을 함유하는 나노에멀젼을 보호하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 다른 항산화물질 부형제, 예컨대 아세톤 나트륨 바이설페이트, 헤드스페이스에 아르곤 100%, 아스코르빌 팔미테이트, 아스코르베이트(나트륨/산), 바이설파이트 나트륨, 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 시스테인/시스테이네이트 HC1, 디티오나이트 나트륨(Na하이드로설파이트, Na설폭설페이트), 젠티스산, 젠티스산 에탄올아민, 글루타티온, 폼알데하이드 설폭설페이트, 나트륨 메타바이설파이트, 칼륨 메타바이설파이트, 메티오닌, (헤드스페이스에) 질소 100%, 프로필갈레이트, 아황산나트륨, 토코페롤 알파, 알파 토코페롤 수소 석시네이트, 또는 티오글리콜레이트 나트륨이 상기 보호를 달성하기 위해 첨가될 수 있다.

[0098] 또한, 특정 구체예에서, 항균제, 예컨대 염화벤잘코늄, 벤질알코올, 벤조산, 클로로부탄올, m-크레졸, 미리스틸감마피콜리늄 클로라이드, 파라벤 메틸, 파라벤 프로필, 또는 티메로살이 이들 중 이용되는 것에 따라서 0.005% 내지 5% w/v의 범위일 수 있는 양으로 제제에 첨가될 수 있다.

실시예 1

[0100] 나노에멀젼의 입자 크기 분포를 연구하기 위한 실험을 수행했다. 도데카플루오로펜탄[(DDFP) FluoroMed, 텍사스 라운드록]을 생리학적 pH(-7)로 완충된 30% (w/w) 수크로오스 용액에 2% (w/w)로 에멀젼화했다. 정제된 의료등급 형태의 불소계면활성제, 화합물 21(PEG-텔로머 B)을 Emulsiflex C-5 균질화기(Avestin, 캐나다 온타리오)와 조합해서 0.3% (w/w) 농도로 사용하여 입자 크기를 ~250nm로 감소시키고 안정화했다. DDFP(BP 29 °C)의 휘발성 때문에 화합 과정의 3단계 동안 생성물의 온도 및 압력을 제어하기 위해 냉각 재킷이 있는 스테인리스 스틸(316L) 압력 용기(PV)를 설계하고 제작했다. PV들 사이의 모든 공정 유로는 1/4 인치 내경 플렉시블 나일론 투빙으로 마감되었다. 투빙 라인의 끝에는 소형 1/2 인치 위생 삼발크립프 피팅을 장착했는데, 이것은 균질화기와 PV 사이의 유로를 원활히 무균 상태로 연결하기 위해 선택되었다. 따라서, 생성물은 전체 제조 공정 동안 주변 환경으로부터 완전히 차폐되었다. 공정 온도는 4-6°C로 제어했고, 용기 헤드스페이스의 압력은 압축 질소를 사용하여 5-7 psi로 제어했다. 에멀젼을 14,000 psi에서 6회 통과 동안(유효하게) 균질화 밸브를 통해서 재순환시킨 다음(연속 균질화), 즉시 0.2 μm 멀균 여과 캡슐을 통해서 여과했다. Unispence®(Wheaton, Millville, NJ) 충전 기계를 사용하여 결과의 생성물을 5mL 바이알에 충전하고, 즉시 손으로 마개를 닫고 공압 Power Crimper(Kebby Industries)를 사용하여 크립프로 봉쇄했다.

[0101] 에멀젼의 입자 크기 분포를 0, 1, 2, 3주와 1, 2, 4, 6 및 11개월에 3번씩 평가했다. 각 시간 지점에서 3개의 바이알을 무작위 선택하고 PSS Nicomp 380 DLS 서브마이크론 입자 크기측정기(Particle Sizing Systems, Port Richie, FL)를 사용하여 동적 광 산란에 의해 분석했다. 크기 결정 동안 점진적 온도 증가의 영향을 최소화하기 위해 샘플 온도를 19°C로 제어했다.

[0102] 강도 가중 평균 직경(IWMD)으로서 주어진 평균 입자 크기는 26nm를 초과하지 않았다. 또한, 입자의 99%는 연구 전체적으로 400nm 이하의 직경을 갖는 것으로 측정되었다. 입자의 총 부피의 0.8% 미만은 0.5 μ 내지 50 μ의 입자로 구성되었다.

실시예 2

[0104] TDFH/화합물 21(PTB)을 사용하여, 서브마이크론 입자의 크기, 0.5 내지 50 마이크론 범위에서 입자의 크기, 상이한 온도에서 나노입자 에멀젼의 안정성을 연구하기 위한 실험을 수행했다.

[0105] 화합물 21(여기서 y는 5이고, n은 1 내지 16이다)의 1.2g 알리퀴트를 조합하고, 주사용수((HyPure®, Hyclone)로 유리 섬광 바이알에서 미리측정된 20mL 부피의 표지까지 회석시키고, 작은 십자모양 자기 교반장치를 사용하여 0.5시간 동안 5°C에서 교반함으로써 맞춤 정제된 의료 등급 화합물 21(J.Tech Sales, Boca Raton, FL)의 6% 용액을 제조했다. 용액을 4°C에서 냉장고에 저장했다. 미리 제조된 화합물 21의 수용액을 냉장고에서 꺼내고, 그 중 12.12mL를 작은 통모양 자기교반막대를 구비한 15mL RB 플라스크(총 용량 21mL)에 첨가했다. 다음에, 차가운(4°C) TDFH(Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO) 3.17 mL(5.29g)를 첨가하고, 플라스크를 14/20 고무 격막으로 봉쇄하고 2°C 얼음수조에 담갔다. 혼합물을 1시간 동안 교반했다.

[0106] 교반 기간 동안 주사기 냉각 탱크와 PV1-PV3 냉각 탱크를 얼음물로 채웠다. 부유형 자기 교반장치를 함유하는 압력 용기에, 0.25" OD 316SS 딥 투브에 부착된 Swagelok™ 바텀 엔트리 2-위치 기기 볼 밸브 및 질소 유입구 및 환기 시스템으로서 작용하는 쓰리-웨이 3-위치 스탑콕을 각각 지닌 캡을 설치했다. 캡과 큰 십자형 교반장치를 가진 PV1을 포스페이트-완충 수크로오스의 용액(216.8mL)으로 충전하고 PV1-PV3 냉각 탱크에 위치시키고 교반을 개시했다. 양쪽 교반장치가 작동하도록 PV2를 PV1 근처에 적절히 배치하여 탱크에 위치시켰다. PV3은 PV2로부터 생성물을 수용하기 전에 냉각을 위해 얼음조에 위치시켰다. 0.8/0.2 마이크론 Pall Acrodisc™(Supor

membrane)를 PV3의 기기 밸브 유입구에 부착하기 위해 준비했다.

[0107] Kirkland Products 핸드헬드 균질화기("균질화기")에서 남아 있는 WFI를 퍼지해서 없앤 다음 차가운 WFI(25mL)로 행졌다. 유리 플런저를 가진 냉각-재킷을 구비한 25mL 유리 Perfektum MicroMate™ 주사기를 균질화기의 투입 및 배출 루어 락 부속에 부착했다. 수용 주사기에 루어 부속을 가진 투-웨이 스탑콕을 설치했다. 투입 가스 라인(80 psi)을 균질화기의 공압 피스톤 유닛에 연결했다. 일차 에멀젼을 위한 교반 기간의 완료시 배출 주사기를 균질화기로부터 제거하고 17-게이지 바늘을 설치했다. 일차 에멀젼을 주사기로 인출한 다음, 바늘을 제거하고 주사기를 균질화기의 투입측에 재빨리 고정했다. BioRad Econopump 연동 펌프를 이용해서 주사기 배스 냉각 탱크로부터 일렬로 주사기를 통해서 열음물을 펌핑했다. 연동 펌프에 2가지 길이의 1/8" 직경 Pharmed® 튜빙을 설치하고, 이것을 Y 커넥터를 사용한 투입측과 배출측에 연결하여 38mL/min의 총 유속에 접근했다. 연동 펌프로부터의 냉각제 라인을 배출 주사기 및 투입 주사기에 일렬로 부착하고, 냉각제의 순환을 개시했다. 균질화기의 바이패스 밸브를 열고 주사기 플런저를 교대로 눌러서 배출 주사기와 투입 주사기 사이에 일차 에멀젼을 몇 번 전달했다; 일차 에멀젼의 최종 위치는 투입 주사기였다. 바이패스 밸브를 닫고, 30mL/min의 펌핑 속도로 공압 유닛 작동을 개시했다. 투입 주사기의 내용물이 배출 주사기로 완전히 전달되었을 때 바이패스 밸브를 재빨리 연 다음, 배출 주사기의 플런저를 눌러서 균질화된 일차 에멀젼을 다시 투입 주사기로 빠르게 전달하고, 그 다음 바이패스 밸브를 닫고 2차 통과를 시작했다. 이 방식에서, 일차 에멀젼은 균질화기를 통해 20회의 불연속적인 통과를 거쳤다. 이 작업이 끝났을 때 일차 에멀젼은 배출 주사기에 있었다.

[0108] 배출 주사기를 균질화기 유출구로부터 분리하고, PV1의 교반된 용액의 표면에서 약 2 인치 아래에 바늘을 두었다. 일차 에멀젼을 주사기로부터 PV1에 주사했다. PV1을 질소(~8-10 psi)로 가압하고 혼합물을 약 5분 동안 교반했음, 그동안 1/16" 튜빙(편복형 실리콘-백금 경화)을 PV1의 딥 투브 스탑콕으로부터 균질화기의 투입측에, PV2 딥 투브 스탑콕으로부터 균질화기의 배출측에 연결했다. PV1에서는 질소 압력을 유지했고, PV2는 대기로 환기시켰다. PV2의 딥 투브 볼 밸브를 열고, 이어서 PV1의 밸브를 여는 동시에 균질화기를 시작했다. 이것은 균질화기를 통한 단일 통과시 32% 수크로오스 용액 중 일차 에멀젼의 교반된 용액이 PV1에서 PV2로 전달되도록 했다. PV2로 용액의 전달 후, PV1-PV3 냉각 탱크로부터 PV1을 제거하고, PV2-PV3 쌍을 둘 다 교반되도록 위치 시켰다. Pall Sciences Acrodisc 20™ 마이크론 필터를 딥 투브 볼 밸브 유입구/유출구를 통해서 PV2와 PV3 사이에 부착했다. 다음에, PV2를 초기에 ~12 psi로 질소로 가압하여 PV2에 있는 용액의 PV3으로의 여과 및 전달을 개시했다. 여과를 완료하기까지 약 30-40분이 필요했고, 전달은 거의 정량적이었다.

[0109] PV3의 여과된 용액을 열음물을 함유하는 결정화 접시로 전달하고 클램프로 안정화하고 질소로 약 8 psi로 가압하고, 그 안의 용액을 약 15분 동안 교반했다. 이후, 회색 부틸 고무 마개를 가진 50개의 공칭 2mL 혈청 바이알(총 용량 3mL)을 가진 2개의 Wheaton 바이알 트레이를 냉장고에서 꺼냈다. 12-게이지 SS 투브에 배출측에 설치된 1/16" 내경의 편복형 실리콘 투브를 PV3에서 기기 밸브의 배출구에 연결했다. PV3의 압력을 약 5 psi로 조정하고, 딥 투브 스탑콕을 투빙 쪽으로 열었다. 바이알로부터 노치형 마개를 제거하고, PV3에 부착된 투빙의 원단부에서 스탑콕을 열고 닫고, 노치형 마개를 다시 제자리에 돌려놓음으로써 바이알을 충전했다(10개의 그룹으로).

[0110] 10개 바이알이 충전된 후 이들을 마개로 막고 크럼프 봉쇄했다. PV3의 용액이 다 소모될 때까지 이것을 반복했다. 이것은 2.6-2.7mL의 충전 부피를 가진 65개의 바이알을 제공했다. 트레이의 바이알을 안정성 연구를 위해 4°C에 저장했다. 2회차의 재료를 동일한 방식으로 제조했고, 입자 안정성에 대한 저장 온도의 효과를 조사하기 위해 23°C에 저장했다.

표 1

바이알 No.	IWMD (nm)	표준편차 (nm)	99% 누적 분포 (nm)
1	186.9	56.1	<358.9
10	184.5	67.7	<404.8
18	187.8	45.8	<321.3
26	189.2	45.4	<321.1
34	183.7	54.7	<351.2
평균	186.4	53.9 (28.9%)	<351.5
표준편차	2.29	9.13	34.39
RSD (%)	1.23	16.93	9.79

[0112] [표 1] Nicomp 380 DLS를 사용하는 동적 광 산란에 의한 4°C에 저장된 TDFH-화합물 21 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기측정

[0113] 제조 직후 얻어진 PSS Nicomp 380 DLS 서브마이크론 입자 크기측정기(Particle Sizing Systems, Port Richie, F1)를 사용한 서브마이크론 입자 크기측정 데이터가 표 1에 제시된다. IWMD로 측정된 TDFH-화합물 21 나노에멀젼의 평균 입자 크기는 변화가 없으며 방출 규격 내에서 잘 유지된다. 또한, 연구 전체적으로 입자의 99%는 400nm 이하의 직경을 갖는 것으로 측정되었다.

표 2

바이알 No.	0.5 마이크론의 역치를 초과하는 크기의 입자의 총 수	5.02-50.45 마이크론 크기의 입자의 수	5.02-50.45 마이크론 크기의 입자에 의해 점유된 전체 애밀전 중 부피 %
2	62145	690	0.899
16	58232	779	0.746
31	55441	544	0.714
평균	58606	671	0.786
표준편차	3368	118.65	0.10
%RSD	5.75	17.68	12.57

[0115] [표 2] PSS Accusizer 780 SIS 0.5-500 마이크론을 사용하는 단일 입자 광학 감지에 의한 4°C에 저장된 TDFH-화합물 21 나노에멀젼의 입자 크기측정

[0116] 0.5 내지 50 마이크론의 영역에서 입자 크기 데이터가 PSS 780 SIS 광 차폐 기기(Particle Sizing Systems, Port Richie, FL)를 사용하여 얻어졌고 표 2에 제시된다. 입자의 총 부피의 0.8% 미만은 0.5 μ 내지 50 μ의 입자로 구성되었고, 입자의 대부분의 부피는 0.5 마이크론의 역치보다 작은 입자들로 구성되었다. 4°C 및 23°C에서 입자 크기 및 99% 누적 분포의 데이터가 각각 표 3 및 4에 제공된다.

표 3

제조 후 시간 (주)	IWMD (nm)	표준편차 (nm)	SD%	99% 누적 분포 < (nm)
0	186.4	53.9	28.9	351.5
1	200.1	43.3	21.6	326.4
6	211.3	47.1	22.3	346.7
11	220.9	39.6	17.9	330.3
23	225.9	49.5	21.9	370.0

[0118] [표 3] 4°C에 저장된 TDFH-화합물 21 나노에멀젼에 대한 시간에 따른 입자 안정성

[0119] TDFH-화합물 21 나노에멀젼이 4°C에 저장되었을 때, IWMD로 측정된 입자의 평균 입자 크기는 매우 느리게 변화하며 방출 규격 내에서 잘 유지된다. 또한, 입자의 99%는 연구 전체적으로 직경 = 400nm를 갖는 것으로 측정되었다.

표 4

제조 후 시간 (주)	IWMD (nm)	표준 편차 (nm)	99% 누적 분포 (nm)
0	220.2	49.7	<363
1	223.7	54.3	<382.2
4	257.4	42.7	<374.5
6	270.7	55.6	<427.3
8	282.4	48.9	<417.6
10	291.1	52.6	<436.1
13	305.3	51.0	<443.9

19	322.1	65.6	<506.7
24	339.2	67.0	<526.8

[0121] [표 4] 23°C에 저장된 TDFH-화합물 21 나노에멀젼에 대한 시간에 따른 입자 크기 안정성

TDFH-화합물 21 나노에멀젼이 23°C에 저장되었을 때, IWMD로 측정된 입자의 평균 입자 크기는 느리게 변하지만 여전히 방출 규격 내에서 잘 유지된다. 또한, 입자의 99%는 연구 전체적으로 직경 = 530nm를 갖는 것으로 측정되었다.

표 5

제조 후 시간 (주)	IWMD (nm), 4°C	IWMD (nm), 23°C	99% 누적 분포 < (nm), 23°C	99% 누적 분포 < (nm), 4°C
0	186.4	220.0	363.0	351.5
1	200.1	223.7	382.2	326.4
6	211.3	270.7	427.3	346.7
10		291.1	436.1	
11	220.9			330.3
13		305.3	443.9	
23	225.9			370.0
24		339.2	526.8	

[0124] [표 5] 4°C 및 23°C에 저장된 TDFH-화합물 21에 대한 시간에 따른 입자 크기 및 99% 누적 분포 <의 변화

표 3, 표 4 및 표 5에 제시된 상기 데이터는 TDFH-화합물 21 나노에멀젼이 4°C 및 23°C의 저장 온도에서 방출 및 저장 수명에 대한 규격 내에서 잘 유지된다는 것을 명백히 증명한다. 또한, 데이터의 경향은 저장 수명 규격이 26주를 초과하지 않았음을 나타낸다.

실시예 3

고압 균질화에 의해 제조된 테트라데카플루오로-n-헥산(TDFH)과 화합물 20a의 나노입자 에멀젼

TDFH와 화합물 20a의 나노입자 에멀젼의 입자 크기, 4°C에서 TDFH와 화합물 20a의 나노입자 에멀젼의 입자 크기, 23°C에서 TDFH와 화합물 20a의 나노입자 에멀젼의 입자 크기의 안정성, 및 TDFH-화합물 20a 및 4°C에 저장된 TDFH-화합물 20a에 대한 시간에 따른 입자 크기 및 99% 누적 분포의 변화를 분석하기 위한 실험을 수행했다.

[0129] 계면활성제의 1.2g 알리퀴트를 첨가하고, 주사용수(HyPure, Hyclone)로 유리 섬광 바이알에서 미리측정된 20mL 부피의 표지까지 희석시키고, 작은 십자모양 자기 교반장치를 사용하여 0.5시간 동안 5°C에서 교반함으로써 화합물 20a(J. Tech Sales, Boca Raton, FL)의 6% 용액(20mL)을 제조했다. 용액은 5°C에서 투명했으며 냉장고(3°C)에 저장했다. 이 용액은 상이한 실험들을 위해 저장되고 이용될 수 있다.

[0130] 화합물 20a의 용액 중 6.25mL를 작은 통모양 자기교반막대를 구비한 15mL 혈청 바이알에 첨가했다. 다음에, 차가운(4°C) TDFH(Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO) 1.52mL(2.53g)를 첨가하고, 바이알을 고무 격막으로 봉쇄하고 얼음수조(2°C)에 담그고, 이 온도에서 혼합물을 1시간 교반했다.

[0131] 주사기 냉각 재킷을 통한 순환을 위한 냉각조 탱크 및 압력 용기를 위한 별도의 냉각조를 함유하는 직사각형 스테인리스 스틸 팬을 냉장고에서 꺼내서 둘 다 얼음물로 충전했다. 각각 실시예 2에 설명된 큰 십자모양 자기 교반장치를 함유하는 대형 용기에 관한 부속품이 설치된 125mL 용기인 PV1, PV2, 및 PV3에 생성물 및 질소 가스를 위한 적절한 밸브기능 유입구 및 유출구를 가진 캡을 설치했다. PV1에 10mM 포스페이트-완충(pH 7) 수크로오스(32% wt/vol 수크로오스, 104mL)를 충전하고, PV1-PV3 냉각 탱크에 위치시키고 교반을 개시했다. PV2 및 PV3도 탱크에 위치시키고 교반을 개시했다.

[0132] 공압 펌핑 유닛에 설치된 균질화기에서 남아 있는 WFI를 퍼지해서 없앤 다음 차가운 WFI(25mL)로 행웠다. 유리 플런저를 가진 냉각-재킷을 구비한 10mL 유리 Popper and Sons 주사기를 균질화기의 투입 및 배출 루어 락 부속에 부착했다. 균질화기의 바이패스 밸브를 열고 주사기 플런저를 교대로 눌러서 배출 주사기와 투입 주사기 사

이에 일차 에멀젼을 몇 번 전달했으며, 일차 에멀젼의 최종 위치는 투입 주사기였다. 바이패스 밸브를 닫고, 30mL/min의 대략적인 펌핑 속도로 공압 유닛 작동을 개시했다. 투입 주사기의 내용물이 배출 주사기로 완전히 전달되었을 때 바이패스 밸브를 재빨리 연 다음, 배출 주사기의 플런저를 눌러서 균질화된 일차 에멀젼을 다시 투입 주사기로 빠르게 전달하고, 그 다음 바이패스 밸브를 닫고 2차 통과를 시작했다. 이 방식에서, 일차 에멀젼은 균질화기를 통해 20회의 불연속적인 통과를 거쳤다. 이 작업이 끝났을 때 일차 에멀젼은 배출 주사기에 있었다.

[0133] 배출 주사기를 PV1에 부착된, 균질화기 유출구로부터 분리하고, 일차 에멀젼을 주사기로부터 PV1에 주사했다. PV1을 질소(~8-10 psi)로 가압하고, 혼합물을 약 5분 동안 교반했다. PV1에서는 질소 압력을 유지했고, PV2는 대기로 환기시켰다. PV1에 들어 있는 32% 수크로오스 용액과 혼합된 일차 에멀젼의 교반된 용액을 PV2로 전달하는 것은 균질화기를 통한 단일 통과시 달성되었다. 다음에, Pall Sciences 32mm 0.8/0.2 마이크론 Acrodisc 주사기 필터를 PV2와 PV3 사이에 부착했다. PV2를 ~12 psi로 질소로 가압하고, PV3은 대기로 환기시켜 PV2로부터 PV3으로 용액의 여과/전달을 개시했다. 약 5분 후 압력을 15 psi로 증가시켰고 약 10분 후에는 최대 25 psi로 증가시켰다. 여과를 완료하기까지 약 30-40분이 필요했고, 전달은 거의 정량적이었다.

[0134] ~4°C로 냉각된 PV3을 질소로 약 8 psi로 가압하고 그 안의 용액을 약 15분 동안 교반했다. 이후, 회색 부틸 고무 노치형 마개가 설치된 40개의 2mL(공칭 부피) 혈청 바이알을 채워넣은 Wheaton 바이알 트레이를 냉장고에서 꺼냈다. 투입측에 수 루어 락 커넥터가 설치되고 배출측에 이중 수 루어 커넥터에 연결된 암 루어 부속이 설치된 1/16" 내경의 편복형 실리콘 투브, 원-웨이 스탑콕(닫힌 위치에서) 및 마지막으로 16-게이지 바늘을 PV3의 딥 투브 스탑콕에 고정했다. PV3의 압력을 5 psi로 조정하고, 용액의 처음 2mL를 제거했다. 다음에, 바이알로부터 노치형 마개를 제거하고, PV3에 부착된 투빙의 원단부에서 스탑콕을 열고 닫고, 노치형 마개를 다시 제자리에 돌려놓음으로써 바이알을 충전했다(10개의 그룹으로). 10개 바이알이 충전된 후 이들을 손으로 크럼프 봉쇄했다. PV3의 용액이 다 소모될 때까지 이 과정을 반복했으며, 이로써 대략 2.6-2.7mL(~88-91% 생성물 수율) 가 충전된 34개의 바이알을 얻었다. 바이알의 크럼프 견고성을 검사하고, 필요한 경우 다시 크럼프로 봉쇄하여 견고한 크럼프를 확보했다. 바이알을 안정성 연구를 위해 4°C에서 냉장고에 저장했다.

표 6

바이알 No.	IWMD (nm)	표준편차 (nm)	99% 누적 분포 (nm)
1	217.0	17.8	<261.6
10	213.2	28.8	<289.1
18	220.0	22.7	<278.0
26	213.5	56.6	<381.6
34	216.3	55.6	<380.4
평균	216.0	36.3 (16.8%)	<318.1
표준편차	2.79	18.5	58.2
RSD (%)	1.29	51.0	18.3

[0136] [표 6] PSS Nicomp 380 DLS를 사용하는 동적 광 산란에 의한 4°C에 저장된 TDFH-화합물 20a 나노에멀젼의 서브 마이크론 입자 크기측정

[0137] 충전된 바이알의 전 범위에 걸쳐서 선택된 재료의 5개 바이알에 대해 Nicomp 380 DLS 서브마이크론 입자 크기측정기(Particle Sizing Systems, Port Richie, FL)를 사용하여 제조 직후 생성물의 입자 크기 분석을 수행했다. IWMD로 측정된 TDFH-화합물 20a 나노에멀젼의 평균 입자 크기는 약 216nm이며, 상이한 샘플들 사이에서 크게 변하지 않았다. 또한, TDFH-화합물 20a 나노에멀젼의 평균 99% 누적 분포는 318nm 미만이다.

표 7

바이알 No.	0.5 마이크론의 역치를 초과하는 크기의 입자의 총 수	5.0-50 마이크론 크기의 입자의 수	5.02-50.45 마이크론 크기의 입자에 의해 점유된 전체 에멀젼 중 부피 %
2	134919	422	1.12
16	182911	405	0.53
33	180519	296	1.12
평균	166116	374	0.923

표준편차	27044	68.37	0.340
%RSD	16.28	18.26	36.69

[0139] [표 7] PSS Accusizer 780 SIS 0.5-500 마이크론을 사용하는 단일 입자 광학 감지에 의한 4°C에 저장된 TDFH-화합물 20a 나노에멀젼의 입자 크기측정

[0140] PSS Accusizer 780 SIS(Particle Sizing Systems, Port Richie, FL)를 사용하여 광 차폐에 의해 0.5 내지 50 마이크론 설정에서 입자 크기측정을 수행했다. 평균적으로 전체 TDFH-화합물 20 나노에멀젼의 총 부피의 약 0.9%는 5.02-50.45 마이크론의 크기를 가진 입자들을 함유한다.

표 8

제조 후 시간	IWMD (nm)			표준 (nm)			99% 누적 분포 < (nm)		
	평균 (nm)	평균 표준 편차	RSD	평균 (nm)	평균 표준 편차	RSD	평균 (nm)	평균 표준 편차	RSD
0	216.0	2.79	1.29	36.3	18.49	50.95	318.1	58.21	18.3
1	257.9	2.34	0.91	37.7	13.68	36.27	360.0	41.81	11.6
5	299.0	7.98	2.67	74.3	23.26	31.32	520.1	82.63	15.9
10	318.0	4.65	1.46	116.7	7.92	6.78	698.0	36.88	5.28
22	351.0	7.45	2.12	155.7	10.32	6.63	892.0	48.52	5.44

* N = 각 시간 지점마다 3개

[0142] [표 8] 4°C에 저장된 화합물 TDFH-화합물 20a 나노에멀젼에 대한 입자 크기 안정성 데이터*

표 9

제조 후 시간 (주)	TDFH-화합물 21 IWMD (nm), 4°C	TDFH-화합물 20a IWMD (nm), 4°C	TDFH-화합물 21 99% 누적 분포 < (nm), 4°C	TDFH-화합물 20a 99% 누적 분포 < (nm), 4°C
0	186.4	216	351.5	318.1
1	200.1	257.9	326.4	360.0
5		299.0		520.1
6	211.3		346.7	
10		318.0		698.0
11	220.9		330.3	
22		351.0		892.0
23	225.9		370.0	

* N = 각 시간 지점마다 3개

[0144] [표 9] 4°C에 저장된 TDFH-화합물 21 및 TDFH-화합물 20a에 대한 시간에 따른 입자 크기 및 99% 누적 분포 <의 변화*

실시예 4

[0145] 고압 균질화에 의해 제조된 DDFP와 화합물 20a의 나노입자 에멀젼

[0146] 고압 균질화에 의해 제조된 DDFP-화합물 20a 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기를 연구하기 위한 실험을 수행했다. TDFH 대신에 DDFP(Fluoromed, Round Rock, TX)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 3의 방법에 의해 나노에멀젼을 제조했다. 서브마이크론 입자 크기측정을 PSS Nicomp 380 DLS 서브마이크론 입자 크기측정 기기 (Particle Sizing Systems, Port Richie, FL)를 사용하여 수행했다.

표 10

바이알 No.	IWMD (nm)	표준 편차 nm, %	99% 누적 분포 (nm)
19	238	68.8, 28.9%	446.8
7	234.8	52.4, 22.3%	384.6
평균	236.4	60.6, 25.6%	415.7

[0149] [표 10] 고압 균질화에 의해 제조된 DDFP-DuPont 화합물 20a 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기측정: Nicomp 380 DLS 서브마이크론 입자 크기측정기 사용

[0150] DDFP-화합물 20 나노입자의 서브마이크론 입자 크기의 236.4nm의 강도 가중 평균 직경 및 415.7nm 미만의 99% 누적 분포는 DDFP-화합물 21, TDFH-화합물 21 및 TDFH-화합물 20a의 나노에멀젼에 대해 얻어진 초기 값들과 본 질적으로 동등하다.

실시예 5

와동 후 초음파처리에 의해 제조된 DDFP와 화합물 20a의 나노입자 애멀젼

[0153] 와동 후 초음파처리에 의해 제조된 DDFP-화합물 20a 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기를 연구하기 위한 실험을 수행했다. 262mL 총 용량 실린더형 유리병에 부유형 자기교반막대 및 2개의 가스 유입구와 2-위치 밸브 엔트리 볼 밸브-딥 튜브 조합을 구비한 나사형 뚜껑을 장치하고, 건조 초순수 질소 가스로 퍼지했다. 다음에, 수성(WFI, Hypure, Hyclone) 포스페이트 완충(10mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH6.9) 수크로오스(30% w/v) 210mL와 화합물 20(J. Tech Sales, Boca Raton, FL) 용액(0.2 마이크론 여과된 증류된 탈이온수 10.68mL 중에 0.672g)을 이 262mL 용기에서 조합하고 4°C에서 냉각하면서 교반했다. 5분 교반한 후 용기를 질소로 3 psi까지 가압했다. 볼 밸브의 유출구 중 하나에 Dow Corning Silastic® 투빙(1/8" o.d.)을 설치하고, 이것을 1/8" 미늘형 어댑터에 맞는 루어를 통해서 쓰리-웨이 멀균 일회용 스탑콕에 연결했다. 나머지 2개의 포트에는 10mL Becton and Dickinson(Franklin Lakes, NJ) 멀균 일회용 주사기와 18-게이지 1.5" 멀균 일회용 바늘을 설치했다.

[0154] 주사기에 7.8mL의 부피가 로딩될 때까지 용기로부터 주사기로 용액의 흡인이 가능하도록 쓰리-웨이 스탑콕을 위치시켰다. 다음에, 18-게이지 바늘을 통해서 주사기로부터 용액의 송달이 가능하도록 스탑콕의 위치를 설정했다. 25개의 공칭 5mL 용량(9mL 총 용량) 혈청 바이알의 트레이(건조 질소 가스 퍼지, 할로부틸 마개 설치, 1시간 동안 4°C 냉장고에 보관)에 스토퍼를 약간 들어올리고 바이알의 입구에 바늘 끝을 위치시키고 주사기 플런저를 누른 다음 재빨리 마개를 닫는 방식으로 용액의 7.8mL 알리쿼트를 충전했다. 바이알이 모두 용액으로 충전된 후, Becton and Dickinson 0.5 mL Lo Dose U-100 인슐린 주사기를 사용하여 각 바이알을 재빨리 차가운(~0°C) DDFP(0.156g, 0.089mL)로 충전했으며, 즉시 마개로 막고 크림프로 봉쇄했다.

[0155] 나노입자의 제조를 위해, 바이알을 똑바로 세워서 1분, 거꾸로 세워서 1분, 그리고 똑바로 세워서 1분 동안 4500 rpm으로 와동시켰다. 다음에, 바이알을 VWR Aquasonic 75HT 초음파 클리닝 배스의 중앙에 목까지 위치시키고 5분 동안 초음파처리했다. 두 번째 바이알을 동일한 방식으로 처리하고, PSS Nicomp 380 DLS 서브마이크론 입자 크기측정기(Particle Sizing Systems, Port Richie, FL)를 사용하여 입자 크기 및 분포를 분석했다.

표 11

바이알 No.	IWMD (nm)	표준편차 nm, %	99% 누적 분포 (nm)
2	274	95.1, 34.7%	578
22	275	105.3, 38.3%	622
평균	274.5	100.2, 36.5%	600

[0157] [표 11] Nicomp 380 DLS 서브마이크론 입자 크기측정기를 사용한 와동 및 초음파처리에 의해 제조된 DDFP-화합물 20a 나노입자 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기측정

[0158] DDFP-화합물 20a 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기에서 274.5nm 미만의 평균 직경 및 600nm 미만의 99% 누적 분포는 DDFP-화합물 21, TDFH-화합물 21 및 TDFH-화합물 20a의 나노에멀젼에 대해 얻어진 초기 값들을 초과하지만, 여전히 여기 설명된 나노에멀젼에 대해 논의된 방출 및 저장 수명 규격 이내이다. 산소 부화 영역에서

페플루오로카본에 산소를 흡수시키고 저산소성 긴장을 가져오는 산소 결핍인 조직(저산소성 조직)으로 수송시 산소를 방출하도록 제제를 설계한다. 이로써, 산소-부화 환경이나 애멸전화된 페플루오로카본에서보다 산소 농도가 높은 환경에 제제가 주사되었을 때, 그것은 먼저 그것이 존재하는 용액으로부터 용존 산소를 흡수한다. 나노에멀젼 입자가 저산소성 조직, 또는 용존 산소 농도가 나노입자에서보다 낮은 조직으로 수송되었을 때는 산소 농도의 물리적 구배에 기초하여 예상된 대로 나노입자로부터 산소가 방출된다. 이 실시예의 제제가 수성 용액으로부터 산소를 흡수할 수 있는지 평가하기 위해, 도 7에 도시된 셋업을 사용하여 시험관내 시험을 수행했다. 교반막대와 함께 0.9% 식염수를 대략 200mL 함유하는 재킷을 구비한 비이커를 순환 수조(온도 = 37 °C ± 0.3°C)에 연결하고 교반 플레이트(속도 = 550 RPM)에 위치시켰다. Oakton DO 110(Vernon Hills, IL) 용존 산소 프로프용 접근 구멍 및 제제의 도입을 위한 작은 구멍을 함유한 고무 마개를 사용하여 비이커 위를 덮었다. 온도 및 용존 산소 값이 평형을 이룬 후, 제제 5mL를 작은 접근 구멍을 통해서 0.9% 식염수 용액에 주사했다. 다음에, 접근 구멍을 루어 플러그 부속을 사용하여 밀봉하고, 파라필름으로 용기 위를 감싸서 산소가 용기로 들어가는 것을 방지했다. 30초 간격으로 90분 동안 용존 산소 값을 얻었고, 용존 산소 미터 상의 시리얼 포트에 접속해서 판매자 공급된 CyberComm 휴대용 데이터 획득 소프트웨어를 사용하여 자동으로 랙탑 컴퓨터로 전송했다. 측정 기간에 걸친 산소 수준의 명백한 감소가 도 8에 그래프 형태로 도시된다. 식염수 대조군을 사용한 상응하는 그래프는 동일한 기간에 걸쳐 용존 산소의 감소를 나타내지 않았다.

[0159] 실시예 6

[0160] DDFP의 나노에멀젼의 제조를 위한 C16-기반 인지질 계면활성제 시스템의 사용

팔미토일-기반 인지질 계면활성제 시스템에서 제조된 DDFP 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기를 연구하기 위한 실험을 수행했다. 50mL 비이커에 들어 있는 프로필렌 글리콜의 22mL 알리퀴트를 교반하면서 55°C로 가열했다. 2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(399mg), 1,2-팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-5000] 나트륨 염(305mg), 및 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(45.88mg)을 교반하면서 순차적으로 첨가했고, 혼합물을 인지질이 용해될 때까지 교반한다(5-15분). 다음에, 인지질의 프로필렌 글리콜 용액을 55°C에서 모노베이직 소듐 포스페이트 · H₂O(173.9mg) 및 무수 다이베이직 소듐 포스페이트(137.87mg)를 함유하는 물/글리세롤 95/5 v/v(200.7mL)의 교반된 혼합물에 약 2분의 기간에 걸쳐서 적가했다. 인지질의 글리세롤 용액의 첨가 후 용액을 5분 동안 교반했다. 용액을 즉시 32mm Pall Sciences GH Polypro® 0.2 마이크론 필터를 통해서 250mL 병으로 여과해 밀어냈고, 그 다음 즉시 건조 초순소 질소로 펴지한다. 용액을 주변 온도로 냉각했다. 다음에, 공칭 5mL 혈청 바이알(실제 용량 9mL)을 인지질 혼탁액의 7.56mL 알리퀴트로 충전했고, 이어서 헤드스페이스를 건조 초순수 질소로 펴지하고 할로부틸 고무 마개로 막았다. 마개로 막은 바이알(트레이에 넣어)을 바이알 내용물이 온도 평형에 이를 때까지 4°C에서 냉장고에 넣어 두었다. 다음에, 트레이를 꺼내고 바이알을 MODDFP(Fluoromed, Round Rock, TX)로 충전했고, 실시예 5에 설명된 대로 크림프로 봉쇄했다. 실시예 5에 설명된 대로 바이알을 와동시키고 초음파처리하여(상이한 시간 시간 동안) 나노에멀젼을 제조했다. 초음파처리 기간은 2분, 8분, 및 16분이었다.

표 12

[0162]	샘플 가공	IWMD (nm)	표준편차 (nm)	% 표준편차	99% 분포 < (nm)	Chi ²	VWMD* (nm)	NWMD* (nm)
	와동 1분 초음파처리 2분	396	163.8	41.41	950.7	0.11	451.8	201.3
	와동 1분 초음파처리 8분	372	139.7	37.51	830.1	0.12	414.2	222.3
	와동 1분 초음파처리 16분	360	103.7	28.81	674.6	0.58	386.9	286

[0163] [표 12] 혼합된 성분들의 와동 및 초음파처리에 의해 제조된 DDFP-DPPC-DPPE-DPPE-MPEG5000 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기측정

[0164] *VWMD = 부피 가중 평균 직경, NWMD = 수 가중 평균 직경 표 12의 데이터에 따르면, 16분의 초음파처리 후 얻어진 나노에멀젼은 강도 가중 평균 입자 직경에 대해 최적 값 이내이고, 99% 누적 분포 < 값은 페플루오로탄소-기반 계면활성제 시스템을 사용한 DDFP 나노에멀젼에 대한 바람직한 값과 비슷하다.

실시예 7

계면활성제로서 C14-기반 인지질 시스템 및 혼합된 성분들의 바이알의 초음파처리를 사용하여 DDFP 나노에멀젼의 제조

팔미토일-기반 인지질 계면활성제 시스템에서 제조된 DDFP 나노에멀젼의 서브마이크론 입자 크기를 연구하기 위한 실험을 수행했다. 50mL 비이카에 들어 있는 프로필렌 글리콜의 22mL 알리퀴트를 교반하면서 55°C로 가열했다. 2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(677.9mg), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] 나트륨 염(174mg), 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(50.95mg)을 교반하면서 순차적으로 첨가했고, 혼합물을 인지질이 용해될 때까지 교반했다(약 15분). 다음에, 인지질의 프로필렌글리콜 용액을 55°C에서 모노베이직 소듐 포스페이트 · H₂O(173.9mg) 및 무수 다이베이직 소듐 포스페이트(137.87mg)를 함유하는 물/글리세롤 95/5 v/v(200.7 mL)의 교반된 혼합물에 약 2분의 기간에 걸쳐서 적가했다. 인지질의 글리세롤 용액의 첨가 후 용액을 5분 동안 교반했다. 용액을 즉시 32mm Pall Sciences GH Polypro® 0.2 마이크론 필터를 통해서 250mL 병으로 여과해 밀어냈고, 그 다음 즉시 질소로 퍼지했다. 용액을 주변 온도로 냉각했다. 다음에, 공정 5mL 혈청 바이알(실제 용량 9mL)을 인지질 혼탁액의 7.56mL 알리퀴트로 충전했고, 이어서 헤드스페이스를 건조 초순수 질소로 퍼지하고 할로부틸 고무 마개로 막았다. 마개로 막은 바이알(트레이에 넣어)을 바이알 내용물이 온도 평형에 이를 때까지 4°C에서 냉장고에 넣어 두었다. 다음에, 트레이를 꺼내고 바이알을 MODDFP(Fluoromed, Round Rock, TX)로 충전했고, 실시예 5에 설명된 대로 크림프로 봉쇄했다. 실시예 5에 설명된 대로 바이알을 와동시키고 초음파처리하여 나노에멀젼을 제조했다.

표 13

	IWMD (nm)	VWMD (nm)	NWMD (nm)	표준 (%)	X _i ²	IW99% CUM< (nm)	VW99% CUM< (nm)
[0168]	301.6	313.6	240.7	25.9	0.22	532.4	553.7

[표 13] 실시예 7의 DDFP-인지질-30% 완충 수크로오스 제제에 대한 서브마이크론 입자 크기측정 데이터

실시예 5의 제제 평가에서 설명된 대로 산소 부화 환경으로부터 산소를 흡수하는 능력에 대해 제제를 평가했다. 측정 기간에 걸친 명백한 산소 수준 감소가 도 9에 그래프 형태로 도시된다. 식염수 대조군을 사용한 상응하는 그래프는 동일한 기간에 걸쳐서 용존 산소 수준의 감소를 나타내지 않았다.

실시예 8

계면활성제로서 화합물 20a(DuPont FS-3100)와 조합된 C14-기반 인지질 시스템 및 혼합된 성분들의 바이알의 초음파처리를 사용하여 DDFP 나노에멀젼의 제조

1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(677.9mg), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] 나트륨 염(174mg), 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(50.95mg), 및 순 DuPont Capstone FS-3100 화합물 20a(16 μL, 23mg, 0.3% w/v) 및 DDFP(0.153g, 89 μL, 2% w/v)의 제제를 제조했다. 바이알을 즉시 똑바로 세워서 1분, 거꾸로 세워서 1분 동안 와동시켰다. 다음에, 바이알을 8분 동안 VWR Aquasonic 75HT 초음파 클리닝 배스에서 초음파처리했다. 이후, 에멀젼의 5.2mL 알리퀴트를 바이알로부터 제거하고, 0.1mL 알리퀴트는 PSS Nicomp 380 DLS 서브마이크론 입자 크기측정기를 사용하여 입자 크기측정을 수행했고, 5mL 알리퀴트는 상기 설명된 산소 흡수 분석에 이용했다. 초음파처리 후 이 제제에 대한 입자 크기측정 데이터가 표 14에 제시된다.

표 14

	IWMD (nm)	VWMD (nm)	NWMD (nm)	표준 (%)	X _i ²	IW99% CUM< (nm)	VW99% CUM< (nm)
[0174]	204.1	171.1	105.1	34.9	0.25	432.3	363.7

[표 14] 실시예 7의 DDFP-Capstone FS-3100-인지질-30% 완충 수크로오스 제제에 대한 서브마이크론 입자 크기측정 데이터

- [0176] 측정 기간에 걸친 명백한 산소 수준 감소가 도 10에 그래프 형태로 도시된다. 식염수 대조군을 사용한 상응하는 그래프는 동일한 기간에 걸쳐서 용존 산소 수준의 감소를 나타내지 않았다.
- [0177] **선험적 실시예 1**
- [0178] 계면활성제로서 C14-기반 인지질 시스템 및 일차 에멀젼의 균질화 후 균질화 전달 및 서브마이크론 여과를 사용하는 DDFP 나노에멀젼의 제조
- [0179] 50mL 비이커에 들어 있는 프로필렌 글리콜의 22mL 알리퀴트를 교반하면서 55°C로 가열한다. 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(677.9mg), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000] 나트륨 염(174mg), 및 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(50.95mg)을 교반하면서 순차적으로 첨가하고, 혼합물을 인지질이 용해될 때까지 교반한다(약 15분). 용액을 주변 온도로 냉각하고, 이어서 10°C로 냉각한 주사용수(20mL)를 첨가하고, 차가운 DDFP(4.51g, 2.61mL)를 첨가하고, 10°C에서 30분 동안 빠르게 교반한다. 결과의 재료에 Kirkland Products 핸드헬드 균질화기를 사용하여 5°C에서 총 20회의 불연속적 균질화를 행한다. 다음에, 이 재료를 주사용수 중의 글리세롤의 용액에 첨가한다. 다음에, 이 나노에멀젼을 30% 수크로오스 205.4mL의 교반된 용액에 첨가하고 질소 분위기(5 psi) 하에 10분 동안 교반한다. 이후, 용액을 균질화기를 통해서 2-5°C로 유지된 제2 용기로 전달하고, 그후 그것을 15분 동안 교반하고, Pall Sciences 0.8/0.2 마이크론 Acropak 200 필터를 통해서 여과하여 2-5°C로 유지된 제3 용기로 보내고, 전달 후 그 온도에서 15분 동안 교반한다. 다음에, 이 재료를 공칭 5mL Wheaton 바이알에 충전하고, 회색 할로부틸 고무 마개로 막고 크립프로 봉쇄하여 저장한다.
- [0180] **선험적 실시예 2**
- [0181] 계면활성제로서 C14-기반 인지질 시스템을 사용하는 TDFH 나노에멀젼의 형성
- [0182] 50mL 비이커에 들어 있는 프로필렌 글리콜의 22mL 알리퀴트를 교반하면서 55°C로 가열한다. 실시예 1의 인지질을 교반하면서 첨가하고, 혼합물을 인지질이 용해될 때까지 교반한다(약 15분). 다음에, 인지질의 프로필렌 글리콜 용액을 55°C에서 모노베이직 소듐 포스페이트 · H₂O(173.9mg) 및 무수 다이베이직 소듐 포스페이트(137.87mg)를 함유하는 물/글리세롤 95/5 v/v(200.7mL)의 교반된 혼합물에 약 2분의 기간에 걸쳐서 적가한다. 인지질의 글리세롤 용액의 첨가 후 용액을 5분 동안 교반한다. 용액을 즉시 32mm Pall Sciences GH Polypro® 0.2 마이크론 필터를 통해서 250mL 병으로 여과해 밀어내고, 그 다음 즉시 질소로 펴지한다. 용액을 주변 온도로 냉각한다. 다음에, 공칭 5mL 혈청 바이알(실제 용량 9mL)을 인지질 혼탁액의 7.56mL 알리퀴트로 충전하고, 이어서 헤드스페이스를 건조 초순수 질소로 펴지하고 할로부틸 고무 마개로 막는다. 마개로 막은 바이알(트레이에 넣어)을 바이알 내용물이 온도 평형에 이를 때까지 4°C에서 냉장고에 넣어 둔다. 다음에, 트레이를 꺼내고 바이알을 TDFH(Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO)로 충전하고, 실시예 5에 설명된 대로 크립프로 봉쇄한다. 실시예 5에 설명된 대로 바이알을 와동시키고 초음파처리하여 나노에멀젼을 제조한다.
- [0183] **선험적 실시예 3**
- [0184] 공-계면활성제로서 화합물 20a와 함께 C14-기반 인지질 시스템 및 혼합된 성분들의 바이알의 초음파처리를 사용하는 DDFP 나노에멀젼의 제조
- [0185] 계면활성제 시스템이 C14-인지질-기반 시스템에 더하여 30몰 퍼센트의 화합물 20a를 포함하는 것을 제외하고 실시예 6의 방법을 따른다. 다음에, 나노에멀젼을 유사하게 제조한다. 실시예 1-6 및 선험적 실시예 1 및 2와 유사한 과정 및 기술이 라우로일(C12)-기반 인지질 계면활성제 시스템에 기초한 나노에멀젼의 제조에서 이용될 수 있다.
- [0186] 본 발명의 바람직한 구체예들이 상세히 예시되었지만, 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 이들 구체예에 대한 변형 및 개조가 일어날 수 있다는 것이 당업자에게 자명하다.
- [0187] **선험적 실시예 4**
- [0188] 계면활성제로서 C12-기반 인지질 시스템 및 일차 에멀젼의 균질화 후 균질화 전달 및 서브마이크론 여과를 사용하는 DDFP 나노에멀젼의 제조
- [0189] 50mL 비이커에 들어 있는 프로필렌 글리콜의 22mL 알리퀴트를 교반하면서 55°C로 가열한다. 1,2-디도데칸오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(677.9mg), 1,2-디도데칸오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000] 나트륨 염(174mg), 및 1,2-디도데칸오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(50.95mg)을 교반하

면서 순차적으로 첨가하고, 혼합물을 인지질이 용해될 때까지 교반한다(약 15분). 용액을 주변 온도로 냉각하고, 이어서 10°C로 냉각한 주사용수(20mL)를 첨가하고, 차가운 DDFP(4.51g, 2.61mL)를 첨가하고, 10°C에서 30분 동안 빠르게 교반한다. 결과의 재료에 Kirkland Products 핸드헬드 균질화기를 사용하여 5°C에서 총 20회의 균질화를 행한다. 다음에, 이 재료를 주사용수 중의 글리세롤의 용액에 첨가한다. 다음에, 이 나노에멀전을 30% 수크로오스 205.4mL의 교반된 용액에 첨가하고 질소 분위기(5 psi) 하에 10분 동안 교반한다. 이후, 용액을 균질화기를 통해서 2~5°C로 유지된 제2 용기로 전달하고, 그후 그것을 15분 동안 교반하고, Pall Sciences 0.8/0.2 마이크론 Acropak 200 필터를 통해서 여과하여 2~5°C로 유지된 제3 용기로 보내고, 전달 후 그 온도에서 15분 동안 교반한다. 다음에, 이 재료를 공칭 5mL Wheaton 바이알에 충전하고, 회색 할로부틸 고무 마개로 막고 크림프로 봉쇄하여 저장한다.

[0190] 출원인의 개시는 도면을 참조하여 바람직한 구체예에서 여기 설명되며, 도면에서 유사한 숫자는 동일하거나 유사한 요소를 표시한다. 본 명세서 전체적으로 "하나의 구체예", "한 구체예"라는 언급이나 유사한 말은 구체예와 관련하여 설명된 특정한 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구체예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체적으로 "하나의 구체예에서", "한 구체예에서"라는 문구 및 유사한 말의 출현은 반드시 그런 것은 아니지만 모두 동일한 구체예를 말한다.

[0191] 출원인의 개시에서 설명된 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 여기 설명에서 다수의 구체적인 세부내용은 본 발명의 구체예의 완전한 이해를 제공하기 위해 인용된다. 그러나, 당업자는 출원인의 조성을 및/또는 방법이 구체적인 세부내용 중 하나 이상이 없이도, 또는 다른 방법, 성분, 재료 등이 있어도 실시될 수 있다는 것을 인정할 것이다. 다른 예에서, 잘 공지된 구조, 재료, 또는 작업은 본 개시의 양태가 모호해지는 것을 피하기 위해 상세히 제시되거나 설명되지 않는다.

[0192] 포함된 도식적 순서도 도해는 일반적으로 논리 순서도 도해로서 제시된다(예를 들어, 도 1, 2, 3, 4 및 5). 이와 같이, 묘사된 순서 및 표지된 단계들은 제시된 방법의 하나의 구체예를 나타낸다. 기능, 논리, 또는 효과에 있어서 예시된 방법의 하나 이상의 단계, 또는 그것의 일부와 동등한 다른 단계 및 방법들도 구상될 수 있다. 추가로, 이용된 포맷 및 심볼은 방법의 논리 단계를 설명하기 위해 제공되며, 방법의 범위를 제한하지 않는다고 이해된다. 다양한 화살표 형태 및 선 종류가 순서도 도해에서 이용될 수 있지만, 이들은 상응하는 방법의 범위를 제한하지 않는다고 이해된다(예를 들어, 도 1, 2, 3, 4 및 5). 실제로, 일부 화살표나 다른 연결기호들은 오직 방법의 논리 흐름을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 화살표는 묘사된 방법의 열거된 단계들 사이의 명시되지 않은 지속기간 중 대기 또는 모니터링 기간을 나타낼 수 있다. 추가로, 특정한 방법이 수행되는 순서는 도시된 상응하는 단계들의 순서를 염격히 따를 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.

[0193] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서, 단수형 "한" 및 "그"는 문맥상 명백히 다른 의미가 아니라면 복수의 언급을 포함한다.

[0194] 달리 정의되지 않는다면 여기 사용된 모든 기술과학 용어들은 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 여기 설명된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 또한 본 개시의 실시나 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료는 이제 설명된 것이다. 여기 인용된 방법은 개시된 특정한 순서에 더하여 논리적으로 가능한 임의의 순서로 수행될 수 있다.

참고자료의 포함

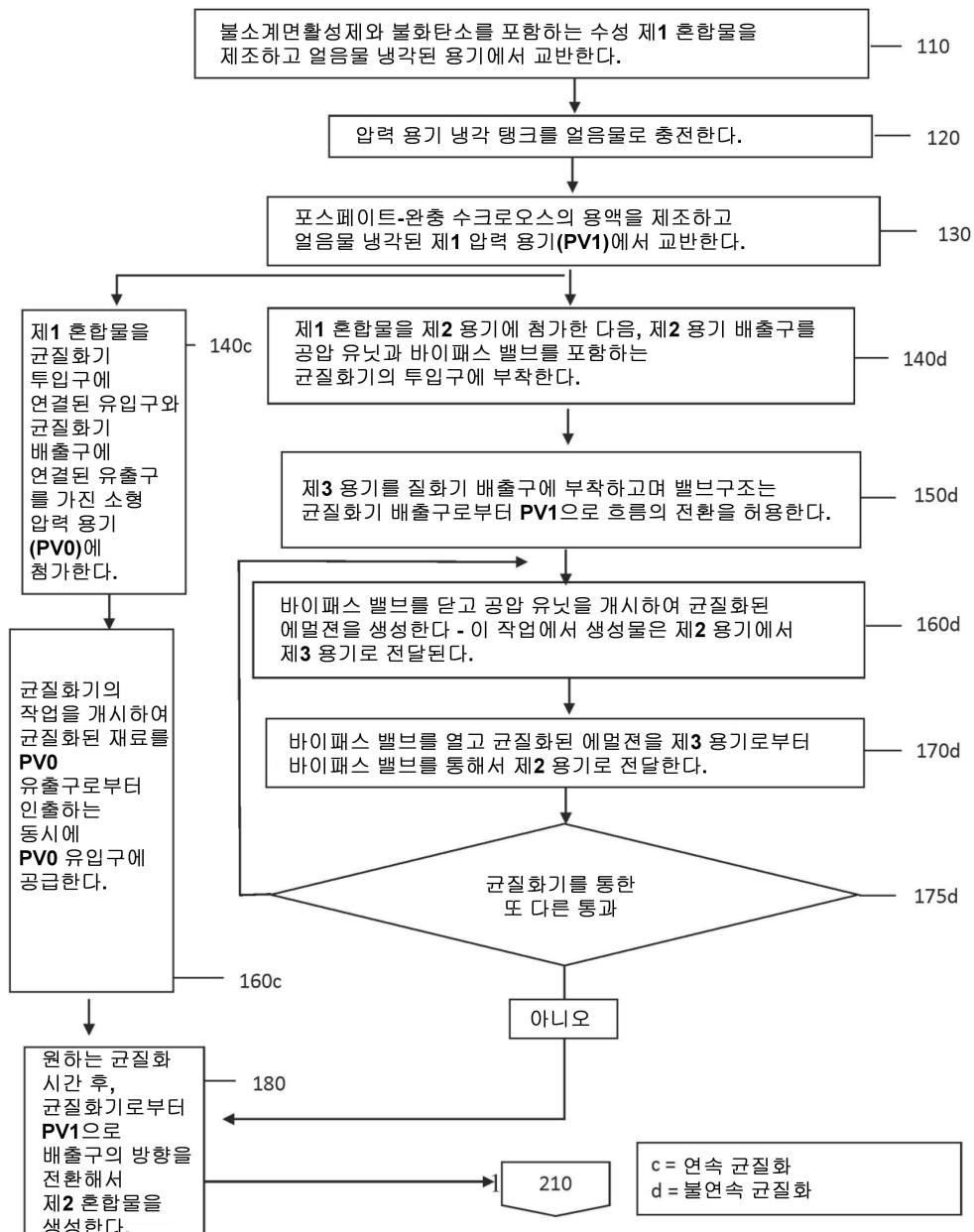
[0196] 특히, 특허출원, 특허공개, 저널, 책, 논문, 웹 콘텐츠와 같은 다른 문서들에 대한 참조 및 인용이 본 개시에서 이루어졌다. 모든 이러한 문서는 모든 취지를 위해 그 전체가 여기 참고로 포함된다. 여기 참고로 포함된다고 말하지만 기준의 정의, 서술 또는 여기 분명히 제시된 다른 개시 재료와 상충되는 임의의 재료, 또는 그것의 일부는 그 포함된 재료와 본 개시 재료 간에 모순이 생기지 않는 범위에서만 포함된다. 상충되는 경우 그 모순은 본 개시를 바람직한 개시로 우선함으로써 해소될 수 있다.

등가물

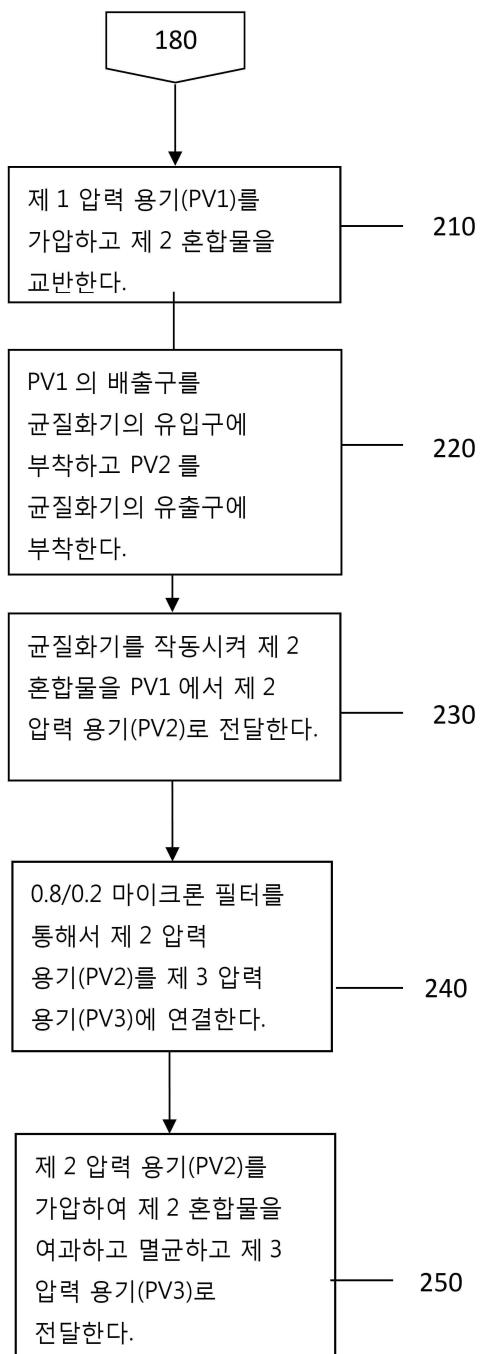
[0198] 대표적인 실시예들은 본 발명을 예시하는 것을 돋기 위한 것이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되어서도 해석되어서도 안 된다. 실제로, 본 발명의 다양한 변형 및 그것의 많은 추가의 구체예들이 여기 제시되고 설명된 것들에 더하여 여기 포함된 실시예 및 과학 참고문헌과 특허문헌을 포함하는 이 문서의 전체 내용으로부터 당업자에게 자명할 것이다. 실시예는 그것의 다양한 구체예 및 등가물에 있어서 본 발명의 실시에 따라 개조될 수 있는 중요한 추가적인 정보, 예증 및 지침을 함유한다.

도면

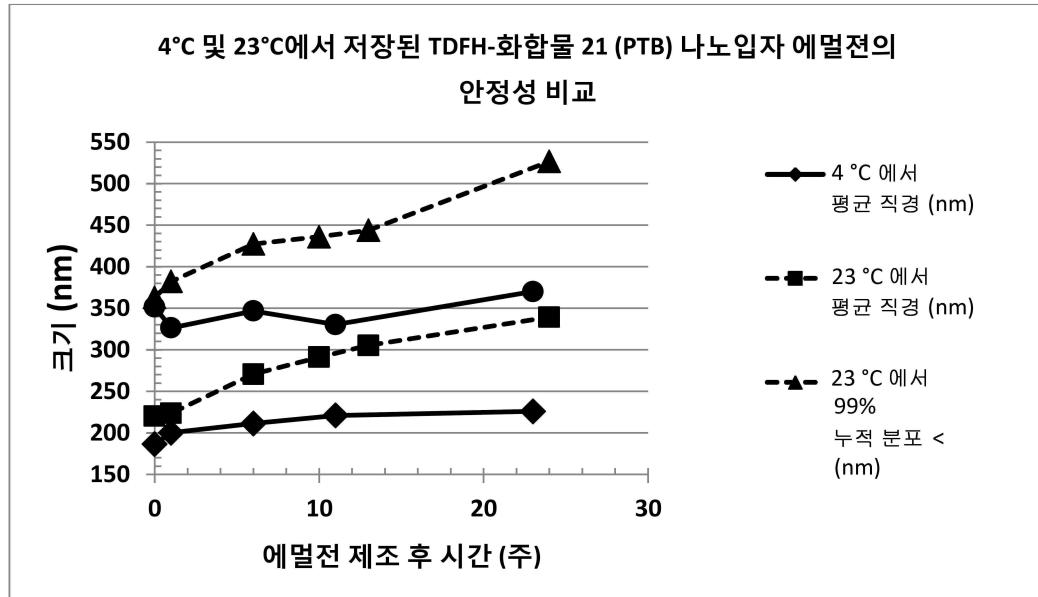
도면1



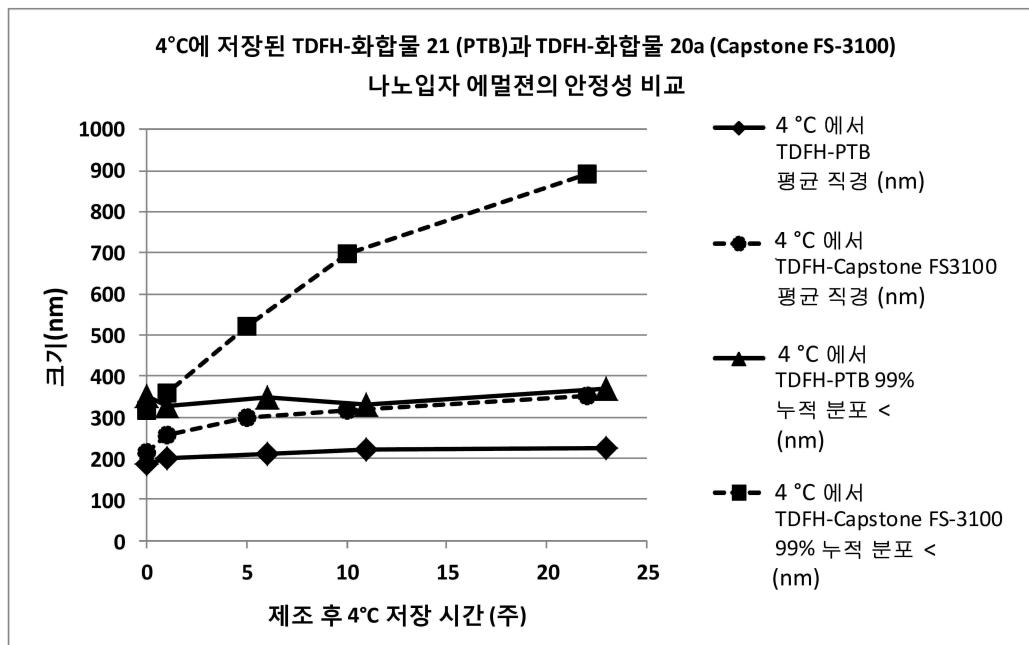
도면2



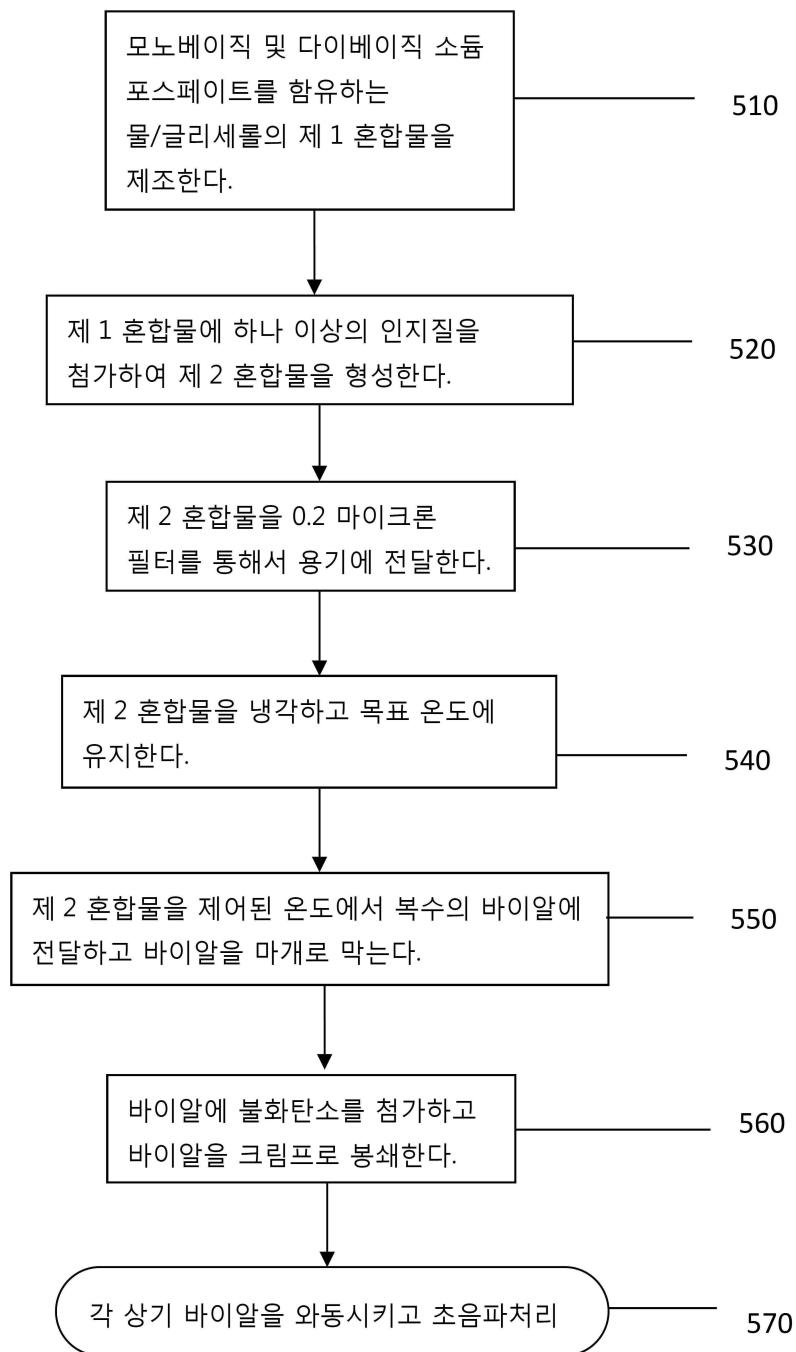
도면3

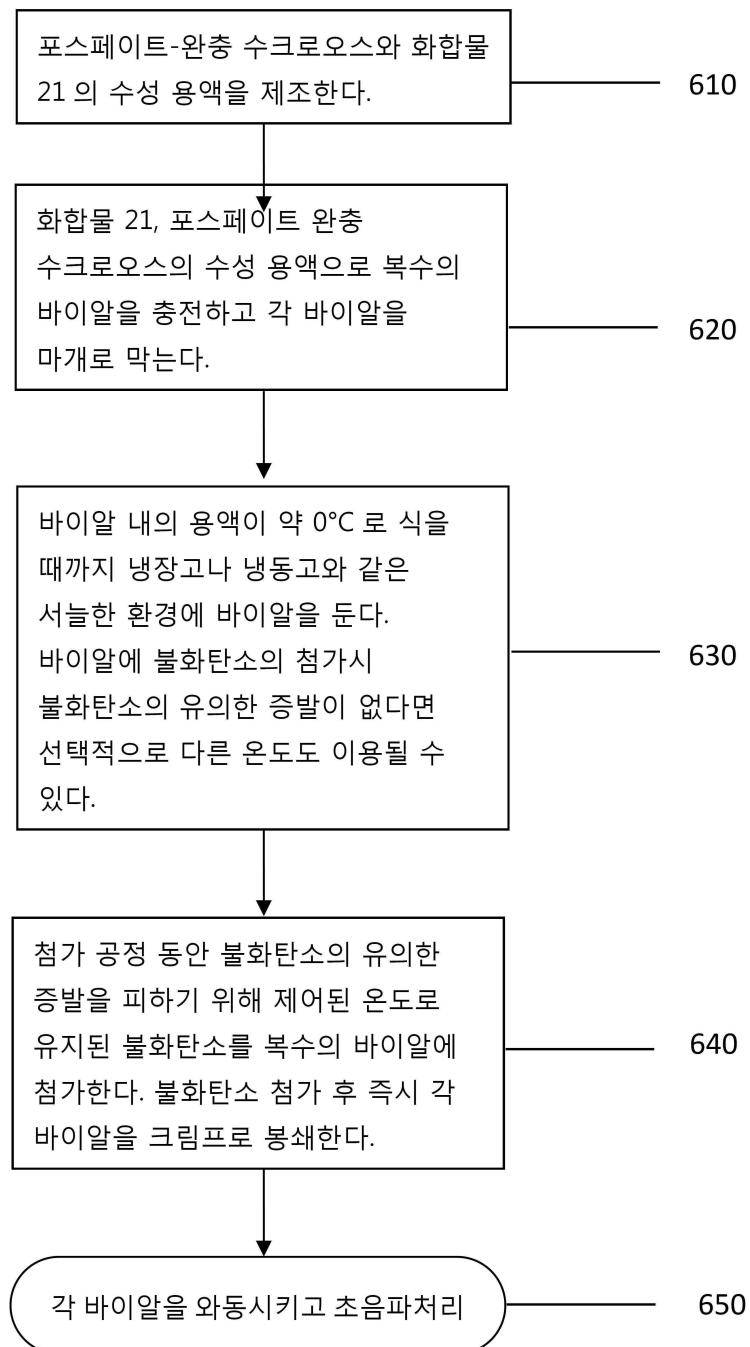


도면4

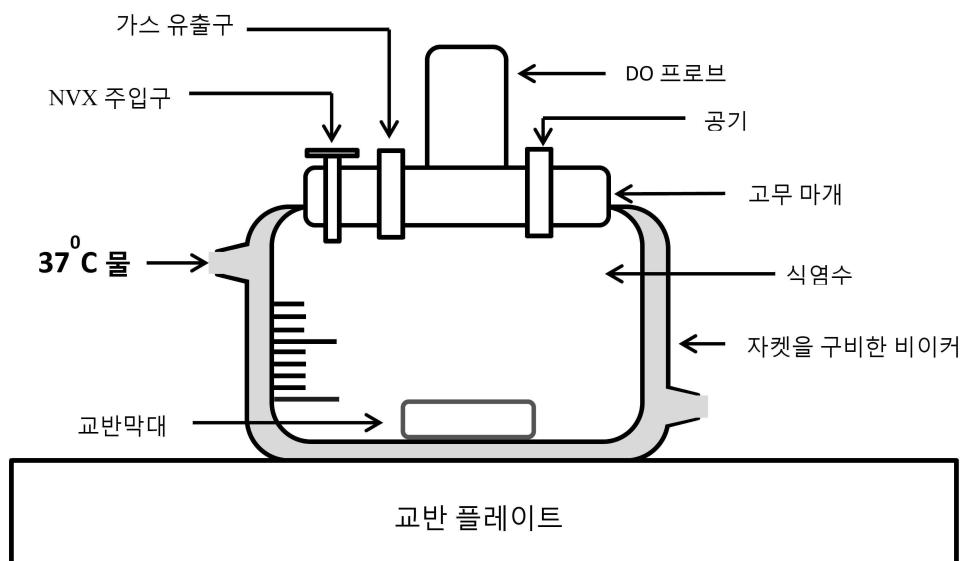


도면5



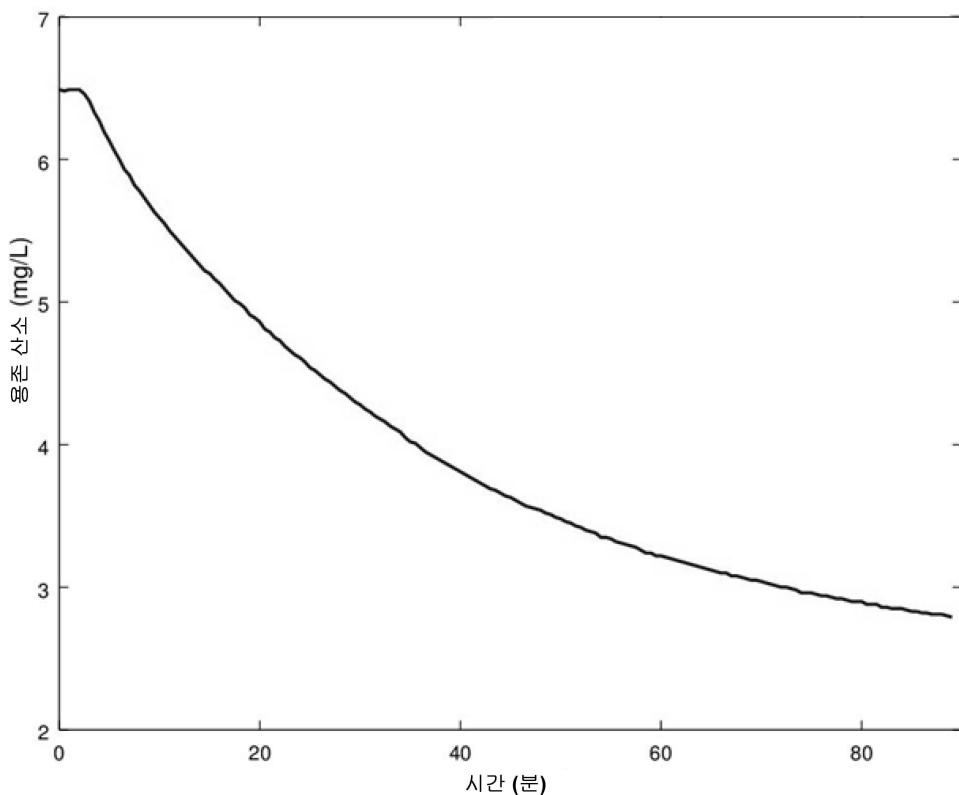
도면6

도면7



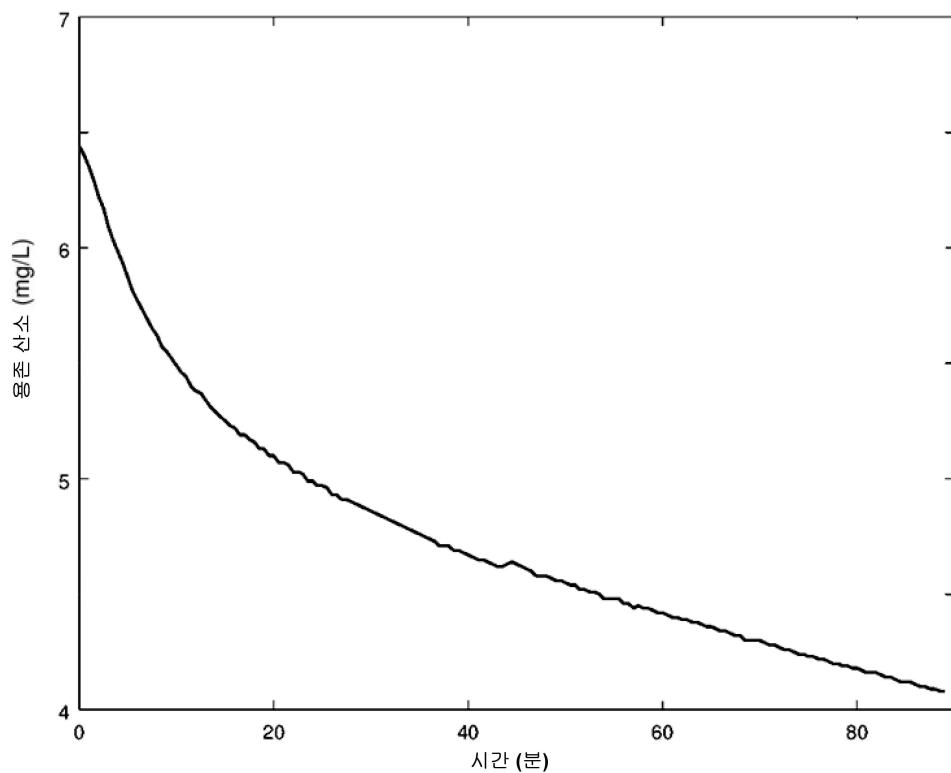
도면8

실시예 5의 제제(DDFP-화합물 20a)의 첨가 후
수성 용액에서 용존 산소 수준의 감소



도면9

실시예 7의 제제(DDFP-C14 인지질-완충 수크로오스)의 첨가 후
수성 용액에서 용존 산소 수준의 감소

**도면10**

실시예 8의 제제(DDFP-C14 인지질-화합물 20a-완충 수크로오스)의
첨가 후 수성 용액에서 용존 산소 수준의 감소

