(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0127841
(43) 공개일자 2006년12월13일

(21) 출원번호 10-2006-7004256
(22) 출원일자 2006년02월28일
심사청구일자 없음
번역문 제출일자 2006년02월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/016146
국제출원일자 2004년05월24일
(87) 국제공개번호 WO 2005/023176
국제공개일자 2005년03월17일

(30) 우선권주장 10/652,622 2003년08월29일 미국(US)

(71) 출원인 델사이트 바이오테크놀러지, 인코포레이티드
미국, 텍사스 75038, 이르빙, 1505 월넛 힐 래인

(72) 발명자 니, 야웨이
미국, 텍사스 77845, 칼리지 스테이션, 702 아스터 드라이브
야테스, 켄네스, 엠.
미국, 텍사스 76248, 켈러, 1412 크림손 글로리 코트

(74) 대리인 특허법인정직과특허

전체 청구항 수 : 총 140 항

(54) 음이온 다당을 포함하는 인 시츄 겔을 사용하는 생리적제제의 전달

(57) 요약

본 발명에서는 음이온 다당과 겔화제로서 특히 저 메톡실 펙틴을 포함하는, 약리적 활성 물질을 동물 환자의 조직, 체액, 및 점막에 전달하기 위한, 액체, 고체, 및 분말 형태의 인 시츄 겔화 조성물, 및 그 조성물의 제조 방법, 및 생리적 활성 물질, 및 특히 백신 항원을 동물의 조직 및 점막에 전달하고 지속적으로 방출하기 위하여 인 시츄 겔화 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

생리적 활성 제제를 동물에게 투여하기 위한 약제학적 고체 조성물로서,

a. 동물에게서 생리적 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제;

b. 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 가지는 서브유닛을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 다당; 및

c. 2가 또는 다가의 금속 양이온의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 고체 다당 겔 유도 조성물로 이루어지고,

상기 약제학적 조성물은 동물의 조직이나 체액과 접촉할 때 겔을 형성하는 고체 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 펙틴 물질, 알긴산염, 카라게난, 및 겔란으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 조성물이 패드, 정제, 또는 캡슐 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 상기 조성물이 분말 형태인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 상기 분말이 직경 크기가 약 250 μM인 오프닝을 가지는 체를 통과할 수 있을 정도의 적절한 입자 크기를 가지는 다수의 미소입자 및/또는 미소구를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 6.

제 4 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 하나 또는 둘 이상의 펙틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 7.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 70 % 미만의 메틸화도를 가지는 펙틴인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 8.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 50 % 미만의 메틸화도를 가지는 펙틴인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 9.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 25 % 미만의 메틸화도를 가지는 펙틴인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 10.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 10 % 미만의 메틸화도를 가지는 펙틴인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 11.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 약 4.0×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 펙틴인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 12.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 약 1.0×10^6 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 펙틴인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 13.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 약 1.0×10^6 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지고, 약 10 % 미만의 메틸화도를 가지는 펙틴인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 14.

제 6 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 펙틴이 알로에 펙틴인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 15.

제 6 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 펙틴이 약 80 % w/w보다 큰 갈락투론산 함량을 가지는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 16.

제 6 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 펙틴이 4 몰 %보다 큰 람노스 함량을 가지는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 17.

제 1 항에 있어서, 상기 조직 또는 체액이 정상 소 혈청인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 18.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 치료제, 진단제, 탄수화물, 지질, 펩티드, 핵산, 살아있는 세포, 전체 또는 일부의 죽은 세포, 전체 또는 일부의 미생물, 전체 또는 일부의 바이러스, 백신, 항원, 및 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 19.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 펩티드 또는 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 20.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 하나 또는 둘 이상의 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 21.

제 20 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 항원이 펩티드, 단백질, 전체 또는 일부의 살아있는 세포, 전체 또는 일부의 죽은 세포, 전체 또는 일부의 바이러스, 비활성화된 미생물 또는 바이러스, 살아있지만 약화된 미생물 또는 바이러스, 파지, 서브유닛 백신 단백질, 서브유닛 백신 펩티드, 서브유닛 백신 탄수화물, 레플리콘, 바이러스 벡터, 플라스미드로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 22.

제 20 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 항원이 인플루엔자에 대한 항원들로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 23.

제 1 항에 있어서, 상기 2가 또는 다가의 금속 양이온이 칼슘, 마그네슘, 구리, 망간, 니켈, 코발트, 철, 아연, 또는 알루미늄인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 24.

제 1 항에 있어서, 상기 2가 또는 다가의 금속 양이온이 칼슘 또는 알루미늄인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 25.

제 1 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 염이 최소한 약 1×10^{-5} 몰/l의 농도로 물에 녹을 수 있는 것임을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 26.

제 1 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 염이 최소한 1×10^{-5} 몰/l를 포함하는 용액을 형성하기 위해 물에 녹지 않을 것임을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 27.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염이 수산화 알루미늄 또는 인산 칼슘을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 28.

제 1 항에 있어서, 상기 다당 겔 유도 조성물이 추가로 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 29.

제 28 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제가 단일- 또는 2-당, 결합제, 충전제 또는 벌크화제, 윤활제, 풍미제, 및 맛 차단제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 30.

제 1 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 농축제를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 31.

제 29 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 농축제가 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 콜라겐, 젤라틴, 덱스트란, 히알루론산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 32.

제 29 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 농축제가 폴리비닐피롤리돈을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 33.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제, 및 하나 또는 둘 이상의 다당이 분자 수준의 고체 혼합물로서 존재하고, 상기 하나 또는 둘 이상의 고체 겔 유도 조성물이 분명한 고체 상인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 34.

제 33 항에 있어서, 상기 분자 수준의 혼합물이 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제와 하나 또는 둘 이상의 다당을 액체 담체에 녹인 후, 액체 담체를 제거하여 분자 수준의 고체 혼합물을 생성하는 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 35.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제, 하나 또는 둘 이상의 다당, 및 하나 또는 둘 이상의 고체 겔 유도 조성물이 별개의 고체 성분들의 물리적 혼합물로서 존재하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 36.

제 1 항에 있어서, 상기 동물이 사람인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 37.

제 1 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 약 30.0 내지 약 99.5 %의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 38.

제 1 항에 있어서, 상기 단일- 또는 2-당이 리보스, 아라비노스, 크실로스, 프룩토스, 글루코스, 람노스, 글루코사민, 갈락토사민, 글루콘산, 글루쿠론산, 갈락토스, 만노스, 락토스, 슈크로스, 말토스, 크실리톨, 만니톨, 및 트레할로스, 또는 이것들의 혼합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 39.

제 1 항에 있어서, 상기 단일- 또는 2-당이 락토스인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 40.

동물에게 생리적 활성 제제를 지속적으로 방출하기 위한 방법으로서, 상기 제 1 항의 약제학적 고체 조성물을, 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때에 겔을 형성하도록 동물의 조직 또는 체액에 투여하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 41.

동물에게 생리적 활성 제제를 지속적으로 방출하기 위한 방법으로서, 상기 제 1 항의 약제학적 고체 조성물 또는 그것의 성분의 액체 현탁액을, 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때에 겔을 형성하도록 동물의 조직 또는 체액에 투여하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 42.

제 40 항에 있어서, 동물의 조직 또는 체액이 점막, 혈액, 혈청, 눈물, 폐액, 세포간 액, 또는 코 분비물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43.

제 40 항에 있어서, 상기 동물이 사람인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44.

제 40 항에 있어서, 상기 동물의 조직 또는 체액이 코의 점막이거나 코 분비물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45.

제 40 항의 방법에 의해 형성된 겔.

청구항 46.

생리적 활성 제제를 동물에게 투여하는 방법으로서,

동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성하기 위하여 다음의 성분들:

a. 동물에게서 생리적 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제;

b. 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 가지는 서브유닛을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 다당; 및

c. 2가 또는 다가의 금속 양이온의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 고체 다당 겔 유도 조성물을 어떠한 순서나 조합으로 동물의 조직 또는 체액에 투여하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 47.

제 46 항에 있어서, 상기 성분들 a, b, 및 c가 분말 조성물의 성분으로서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48.

제 46 항에 있어서, 상기 성분 a와 b가 별도로 또는 혼합된 분말로서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49.

제 46 항에 있어서, 상기 성분 a와 b가 성분 a를 포함하는 하나 또는 둘 이상의 분말과, 성분 b를 포함하는 하나 또는 둘 이상의 분말의 혼합물로서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50.

제 46 항에 있어서, 상기 성분 a와 b가 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제와 하나 또는 둘 이상의 음이온성 다당을 액체 담체에 녹인 후 액체 담체를 제거하여 혼합된 고체 조성물을 형성하는 방법에 의해 제조된 고체 조성물의 성분으로서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51.

제 50 항에 있어서, 상기 혼합된 고체 조성물이 분말 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52.

제 46 항에 있어서, 상기 성분 a와 b가 액체 담체 중의 용액으로서 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53.

제 46 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 다당이 저 메톡실 펙틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54.

제 46 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 펩티드, 단백질, 또는 백신을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55.

제 46 항에 있어서, 상기 조직이나 체액이 코의 점막 또는 코 분비물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56.

제 46 항에 있어서, 상기 동물이 사람인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57.

생리적 활성 제제를 동물에게 조절된 방식으로 방출하기 위한 조성물로서,

a. 동물에게서 생리적 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제;

b. 약 30 % 미만의 메틸화도와 약 1×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 하나 또는 둘 이상의 펙틴 물질을 포함하고,

상기 조성물은 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성할 수 있는 고체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 58.

제 57 항에 있어서, 상기 조성물이 패드, 정제, 캡슐, 또는 분말의 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 59.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 약 15 % 미만의 메틸화도를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 60.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 약 5.0×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 61.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 1×10^6 달톤보다 큰 분자량과 10 % 미만의 메틸화도를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 62.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 약 90 % w/w 이상의 갈락투론산 함량을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 63.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 3-메톡시-람노스를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 64.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 4 몰%보다 큰 람노스 함량을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 65.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 알로에 펙틴인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 66.

제 57 항에 있어서, 상기 조성물이 약 20 중량 % 이하의 물을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 67.

제 57 항에 있어서, 상기 조성물이 미소입자나 미소구가 직경 크기가 약 250 μM인 오프닝을 가지는 체를 통과할 수 있도록 적절한 입자 크기를 가지는 미소입자 및/또는 미소구를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 68.

제 57 항에 있어서, 상기 조성물이 분말의 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 69.

제 68 항에 있어서, 상기 분말이 미소입자 및/또는 미소구가 직경 크기가 100 μM인 체는 통과할 수 있지만 직경 크기가 약 250 μM인 오프닝을 가지는 체는 통과할 수 없도록 적절한 입자 크기를 가지는 미소입자 및/또는 미소구를 적어도 약 80 중량 % 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 70.

제 68 항에 있어서, 상기 조성물은 본질적으로 미소입자 및/또는 미소구로 이루어지며, 상기 미소입자 및/또는 미소구는 직경 크기가 약 50 μM인 오프닝을 가지는 체는 통과할 수 있지만 직경 크기가 10 μM인 오프닝을 가지는 체는 통과할 수 없는 입자 크기를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 71.

제 57 항에 있어서, 상기 고체 조성물이 미소구를 포함하며, 상기 미소구의 90 % 미만이 0.1 내지 10 μM의 직경을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 72.

제 57 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 농축제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 73.

제 72 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 농축제가 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 콜라겐, 젤라틴, 덱스트란, 히알루론산, 또는 알긴산염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 74.

제 72 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 농축제가 폴리비닐피롤리돈을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 75.

제 72 항에 있어서, 상기 농축제가 조성물의 약 0.1 내지 90 중량 %를 차지하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 76.

제 57 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 약 30.0 내지 약 99.5 %의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 77.

제 76 항에 있어서, 상기 단일- 또는 2-당이 리보스, 아라비노스, 크실로스, 프룩토스, 글루코스, 람노스, 글루코사민, 갈락토사민, 글루콘산, 글루쿠론산, 갈락토스, 만노스, 락토스, 슈크로스, 말토스, 크실리톨, 만니톨, 및 트레할로스, 또는 이것들의 혼합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 78.

제 76 항에 있어서, 상기 단일- 또는 2-당이 락토스인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 79.

제 57 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 치료제, 진단제, 탄수화물, 지질, 펩티드, 핵산, 살아있는 세포, 전체 또는 일부의 죽은 세포, 전체 또는 일부의 미생물, 전체 또는 일부의 바이러스, 백신, 항원, 및 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 약리적 활성 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 80.

제 57 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 동물의 질병 또는 질병 상태를 치료하기에 유효한 양의 치료제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 81.

제 57 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 펩티드 또는 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 82.

제 57 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 하나 또는 둘 이상의 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 83.

제 82 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 항원이 펩티드, 단백질, 전체 또는 일부의 살아있는 세포, 전체 또는 일부의 죽은 세포, 전체 또는 일부의 바이러스, 비활성화된 미생물 또는 바이러스, 살아있지만 약화된 미생물 또는 바이러스, 파지, 서브유닛 백신 단백질, 서브유닛 백신 펩티드, 서브유닛 백신 탄수화물, 레플리콘, 바이러스 벡터, 플라스미드로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 84.

제 82 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 항원이 인플루엔자에 대한 항원들로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 85.

제 82 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 항원이 상기 조성물이 동물의 코 점막에 투여될 때 동물에게서 활발한 면역 반응을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 86.

제 82 항에 있어서, 상기 조성물이 동물에게 투여된 후에, 동물의 면역 반응이 펙틴 물질을 포함하지 않은 대조 조성물을 투여하는 대조 실험에서 얻어진 IgA 수준과 비교하여, 동물의 폐 세척물의 IgA 수준에 의해 측정되는 바 약 10 %의 인자보다 더 크게 증가하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 87.

제 57 항에 있어서, 상기 생리적 활성 제제가 조성물의 총 중량을 토대로 조성물의 약 0.01 % 내지 약 90 %를 차지하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 88.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 조성물의 약 0.0001 중량 % 내지 약 99 중량% 를 차지하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 89.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 조성물의 약 0.001 중량 % 내지 약 50 중량 %를 차지하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 90.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 조성물의 약 0.005 중량 % 내지 약 20 중량 %를 차지하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 91.

제 57 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 조성물의 약 0.01 중량 % 내지 약 10 중량 %를 차지하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 92.

제 57 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 고체 다당 겔 유도제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 93.

제 92 항에 있어서, 상기 고체 다당 겔 유도제가 2가 또는 다가의 금속 양이온의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 94.

제 93 항에 있어서, 상기 2가 또는 다가 금속 양이온이 칼슘, 마그네슘, 구리, 망간, 니켈, 코발트, 철, 아연, 또는 알루미늄인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 95.

제 93 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 물에 용해되어 물의 l 당 적어도 약 1×10^{-5} 몰의 염을 함유하는 용액을 형성하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 96.

제 93 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 염이 칼슘염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 97.

제 93 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 염이 칼슘 할로겐화물 염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 98.

제 93 항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 염이 충분히 물에 불용성이어서 물 l 당 적어도 1×10^{-5} 몰의 염을 함유하는 용액을 형성하기 위하여 물에 녹을 수 없는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 99.

제 93 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염이 수산화 알루미늄 또는 인산 칼슘을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 100.

제 93 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염이 조성물의 약 0.1 % 내지 약 80 % (w/w)를 차지하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 101.

제 93 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 2가 또는 다가의 금속 양이온 염이 펙틴 물질과 반응하여 펙틴 물질의 카르복실레이트 기와 교차결합함으로써 금속 양이온을 포함하는 겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 102.

제 93 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 2가 또는 다가 금속 양이온 염이 조성물이 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성하는 조성물을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 103.

제 57 항에 있어서, 상기 동물의 조직 또는 체액이 점막, 혈액, 혈청, 눈물, 폐액, 세포간 액, 또는 코 분비물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 104.

제 57 항에 있어서, 상기 동물의 조직 또는 체액이 코 분비물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 105.

생리적 활성 제제를 동물에게 지속적으로 방출하기 위한 방법으로서, 상기 제 57 항의 조성물을 동물의 조직 또는 체액과 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 106.

제 105 항에 있어서, 상기 조성물이 조직 또는 체액과 접촉할 때 또는 조직 또는 체액에 투여된 후에 생리적 활성 제제를 포함하는 겔을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 107.

제 105 항에 있어서, 상기 겔이 생리적 활성 제제를 조직 또는 체액에 시간에 따라 지속적으로 방출할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 108.

제 105 항에 있어서, 상기 동물의 조직 또는 체액이 코의 점막이고, 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제가 인플루엔자에 대한 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 109.

제 105 항의 방법에 의해 형성된 겔.

청구항 110.

생리적 활성 제제를 동물에게 지속적으로 방출하기 위한 방법으로서, 제 57 항의 약제학적 고체 조성물 또는 그것의 성분의 액체 현탁액을 동물의 조직 또는 체액에 투여하여, 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 111.

생리적 활성 제제를 동물에게 지속적으로 방출하기 위한 방법으로서, 제 57 항의 조성물을 동물의 눈, 점막, 또는 상처에 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 112.

생리적 활성 제제를 동물에게 지속적으로 방출하기 위한 방법으로서, 제 57 항의 조성물을 혈액, 혈청, 눈물, 폐액, 세포간액, 또는 코 분비물로 이루어지는 군으로부터 선택된 동물의 하나 또는 둘 이상의 체액과 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 113.

생리적 활성 제제를 동물에게 지속적으로 방출하기 위한 방법으로서, 제 57 항의 조성물을 사람의 코 점막 및 분비물에 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 114.

제 57 항의 조성물의 제조 방법으로서, 생리적 활성 제제, 펙틴 물질, 및 하나 또는 둘 이상의 임의의 성분을 어떤 순서로든지 혼합하고, 그 혼합물을 가공처리하여 고체 조성물을 형성하는 것으로 이루어지는 방법.

청구항 115.

제 114 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 임의의 성분이 농축제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 116.

제 114 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 임의의 성분이 폴리비닐피롤리돈을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 117.

제 114 항에 있어서, 상기 생리적 활성 제제와 펙틴 물질이 액체 담체에 용해된 후, 액체 담체의 휘발성 성분이 제거됨으로써 고체 조성물이 형성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 118.

제 114 항에 있어서, 상기 생리적 활성 제제, 펙틴 물질, 및 어떠한 임의의 성분들이 고체이고, 고체로서 혼합되며 가공처리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 119.

제 114 항에 있어서, 상기 임의의 성분이 2가 또는 다가의 금속 양이온의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 고체 겔 유도제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 120.

동물을 백신 처리하는 방법으로서,

a. 직경 크기가 약 250 μM인 오프닝을 가지는 체를 통과할 수 있는 분말 입자를 포함하고, i) 약 30 % 미만의 메틸화도와 1×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지며, 조성물이 동물의 점막과 접촉할 때 겔을 형성하기에 유효한 양의 펙틴 물질; 및 ii) 동물에게서 활발한 면역 반응을 유도할 수 있는 양의 퀩티드, 단백질, 핵산, 살아있는 세포, 죽은 세포 또는 그것의 일부, 또는 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 항원을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 분말 조성물을 제공하는 단계;

b. 상기 분말을 동물의 코 조직 및/또는 코의 유체에 투여하여 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성시키는 단계; 그리고

c. 동물에게서 하나 또는 둘 이상의 항원에 대하여 활발한 면역 반응을 유도하는 단계로 이루어지는 방법.

청구항 121.

제 120 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 약 1.0×10^6 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 펙틴의 나트륨, 칼륨 또는 NH_4^+ 염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 122.

제 1 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 음이온 다당이 약 1.0×10^6 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 펙틴의 나트륨, 칼륨 또는 NH_4^+ 염인 것을 특징으로 하는 약제학적 고체 조성물.

청구항 123.

동물의 코에 투여하기 위한 백신 조성물로서, 상기 조성물은

a. 동물에게서 활발한 면역 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 항원, 및

b. 약 30 % 미만의 메틸화도와 약 1×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 하나 또는 둘 이상의 펙틴 또는 그것의 일가 양이온 염의 나노 분산물을 포함하는 분말 입자를 포함하고,

상기 분말 입자는 직경 크기가 약 250 μM인 오프닝을 가지는 체를 통과할 수 있는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 124.

제 123 항에 있어서, 상기 분말 입자가 하나 또는 둘 이상의 항원 및 하나 또는 둘 이상의 펙틴 또는 그것의 일가 양이온 염의 실질적으로 균질한 고체 용액인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 125.

제 123 항에 있어서, 상기 펙틴이 동물의 코 점막과 접촉할 때 칼슘 이온과 교차결합되어 겔을 형성하게 되는 수용성 일가 양이온 염으로서 존재하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 126.

제 123 항에 있어서, 상기 분말 입자의 최소한 약 90 %가 직경 크기가 약 11 μM인 오프닝을 가지는 체를 통과하지 못할 것임을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 127.

제 123 항에 있어서, 상기 분말 입자의 최소한 약 90 %가 약 12 μM 내지 약 60 μM 사이의 입자 크기를 가지는 미소구 또는 미소입자인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 128.

제 123 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 항원이 펩티드, 단백질, 핵산, 살아있는 세포, 죽은 세포 또는 그것의 일부, 또는 전체 또는 일부의 바이러스로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 129.

제 123 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 항원이 인플루엔자에 대한 최소한 하나의 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 130.

제 123 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 항원이

청구항 131.

제 123 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 펙틴이 약 1.0×10^6 달톤보다 큰 평균 분자량과 약 10 % 미만의 메틸화도를 가지는 펙틴의 나트륨, 칼륨, 또는 NH_4^+ 염으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 132.

제 123 항에 있어서, 상기 펙틴 물질이 조성물의 약 0.01 내지 약 10 중량 %를 차지하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 133.

제 123 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 농축제를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 134.

제 123 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 농축제가 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 콜라겐, 젤라틴, 덱스트란, 히알루론산, 또는 알긴산염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 135.

제 123 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 농축제가 폴리비닐피롤리돈을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 136.

제 123 항에 있어서, 상기 조성물이 추가로 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 137.

제 136 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당이 리보스, 아라비노스, 크실로스, 프룩토스, 글루코스, 람노스, 글루코사민, 갈락토사민, 글루콘산, 글루쿠론산, 갈락토스, 만노스, 락토스, 슈크로스, 말토스, 크실리톨, 만니톨, 및 트레할로스로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 138.

제 136 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당이 락토스인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 139.

제 136 항에 있어서, 상기 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당이 약 10.0 내지 약 99.9 중량 %의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 140.

제 136 항에 있어서, 상기 단일- 또는 2-당이 약 50.0 내지 약 99.5 중량 %의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 사람을 포함한 동물의 조직 또는 체액에 생리적 활성 제제를 투여하는 것에 관한 것이다.

배경기술

약물의 지속적 또는 조절된 방출을 이루기 위한 다양한 중합체-기저 약물 전달 시스템이 설명된 바 있다 (Langer, Nature, 392(supplement), 5-10, 1998 참조). 그런 많은 시스템의 목표는 전형적으로 하나 또는 둘 이상의 약물 방출의

연장, 약물의 생체내 활용성의 개선, 및/또는 환자의 협력이나 편안함을 개선하는 비-주사용 약물 투여 시스템을 제공하는 것이었다. 중합체는 그것이 합성이든 천연의 것이든 중합체의 성질에 따라 다양한 메커니즘에 의해 다양한 제제를 전달해 준다.

중합체-기저 시스템은 예를 들면 액체, 현탁액, 에멀션, 미소입자 및/또는 미소구를 포함하는 분말, 필름, 또는 정제로서 다양하게 제형되어 왔다. 조성물은 다양한 경로 또는 방법, 이를테면 주사, 국소 투여, 또는 눈, 질, 항문, 위 또는 장, 구강 및 비강, 또는 폐의 점막으로의 투여에 의해 투여되었다. 중합체-기저 시스템은 치료제 및 예방 제제, 이를테면 작은 분자-또는 단백질-기저 약물, 핵산, 다당, 지방산 및 에스테르, 세포 및 그것의 단편, 바이러스, 및 전염성 질병의 예방을 위한 백신을 포함하여, 다양한 생리적 활성 제제를 투여하기 위해 사용되어 왔다.

선행 기술의 많은 약물 투여용 중합체-기저 시스템에서는, 약물 및/또는 다른 약리학적 활성 물질들은, 환자에게 투여되기 전에, 물을 흡수할 수 있지만 실질적으로 물에 녹지 않는 중합체 또는 겔에 캡슐화된다. 겔은 중합체 분자의 다공성 3차원 네트워크를 포함하는 고체이거나 변형될 수 있는 젤리-형 반-고체이고, 그 중합체 네트워크의 구멍 안에는 가역적으로 흡수된 액체 (즉 불연속 액체상)가 함유되어 있다. 겔은 때로 다량의 및/또는 예정된 양의 액체, 예컨대 물 또는 다른 수성 유체, 이를테면 생체 유체를 함유 및/또는 흡수할 수 있지만, 그럼에도 불구하고 겔화된 중합체 분자의 네트워크는 실질적으로는 벌크(bulk) 액체 또는 생체 유체에 녹지 않는다. 개별적인 중합체 분자는 교차결합되어 중합체의 성질에 따라 다양한 방식으로 불용성 네트워크를 형성한다. 중합체 분자 간의 교차결합은 공유 결합, 배위 결합, 또는 이온 상호작용, 또는 심지어 수소 결합과 같은 보다 약한 분자간 힘으로부터 유발될 수 있다.

다양한 합성 및 천연 중합체가 또한 약물 투여 제형에 사용되었는데, 이때 사용되는 중합체로는 전분 및 변형 셀룰로스, 겔란, 키토산, 히알루론산, 펙틴, 등을 들 수 있다. 예를 들어 미국 특허 제 4,613,500호에는 다양한 수용성 및 수불용성 중합체, 예컨대 펙틴을 포함하는 코 투여용의 다양한 분말형 약제학적 조성물이 개시되어 있지만, 칼슘 교차결합 겔을 형성할 수 있는 저 메톡실 펙틴의 사용에 대해서는 설명이나 제시되어 있지 않았다. 최근 미국 특허 제 5,707,644호 및 5,804,212호에는 약, 펩티드, 및 코 표면에 대한 항원성 백신을 전달하기 위해 직경이 10 미크론 미만인 생체점착성 미소구를 제형하는 데 펙틴을 포함한 많은 중합체를 사용하는 것이 개시되었고, 조성물이 인 시츄(*in-situ*)에서 겔화될 수 있는 중합체 물질과 함께 제형될 수 있다는 것이 제시되었지만, 인 시츄 겔화를 위해 저 메톡실 펙틴을 사용하는 것에 대해서는 교시나 제시가 이루어지지 않았다.

"인 시츄" 겔화는 일부 선행 기술의 약제학적 약물 전달 시스템 및 조성물에서 설명된 바 있는데, 조성물 또는 제형이 점막, 조직, 상처, 입이 아닌 신체의 공동(空洞)에 적용됨으로써 환자에게 투여된 후에 적용된 그 부위에서 겔이 형성되는 것을 말한다. "인 시츄" 겔화 조성물은 오로지 조직 또는 체액과 접촉한 후에만 생체점착성 겔을 형성한다. 인 시츄 겔화 조성물 자체의 중합체 분자는 대개 전혀 교차결합되지 않거나, 또는 적용되는 생체 부위에 적용되기 전에는 충분히 교차결합되지 않아서 생체 부위에 적용되기 전에는 수불용성 겔의 형태로 존재하지만, 생체 부위에 적용될 때 또는 적용된 직후에는 전형적으로 중합체 교차 결합이 일어나서 그것의 다공성 네트워크 구조 내에 물 및/또는 생체 유체를 포함하는 교차결합된 중합체 겔 네트워크가 형성되는 결과를 유발한다. 일단 인 시츄 겔이 형성되면 그것은 실질적으로 및/또는 효율적으로 물 또는 생체 유체에, 적어도 정상적인 생리적 조건하에서는 불용성이다. 물 및/또는 체액의 흡수는 보통 인 시츄 겔화의 과정과 동시에 일어나지만, 인 시츄 겔화를 규정하는 주된 현상은 단순한 물 또는 유체의 흡수보다는 오히려 부위에 투여될 때 불용성 중합체 네트워크가 형성되는 것이다.

인 시츄 겔화를 일으킬 수 있는 중합체는 이미 설명되었는데, 예를 들면 폴록사머(Poloxamer), 플루로닉(Pluronics, Vadnere et al., *Int. J. Pharm.*, 22, 207-218, 1984), 다양한 공중합체, 예컨대 PEO-PLLA 및 PEG-PLGA-PEG (Jeong et al., *Nature* 388, 860-862, 1997; Jeong et al., *J. Controlled Release* 63,155-163, 2000), 셀룰로스 아세토프탈레이트 라텍스 (Gurny et al. *J. Controlled Release* 353-361,1985), 젤라이트(Gelrite) (Rozier et al., *Int. J. Pham.* 57, 163-168, 1989), 카보폴(Carbopol), 및 마트리겔(Matrigel)이 있다. 겔 형성은 온도 변화에 의해 (폴록사머, 플루로닉, PEO-PLLA 이중블록 공중합체, PEG-PLGA-PEG 삼중블록 공중합체, 및 마트리겔), pH 변화에 의해 (셀룰로스 아세토프탈레이트 라텍스 및 카보폴), 또는 1가- 또는 2가-양이온과의 반응에 의해 (젤라이트 및/또는 알긴산염) 유도된다. 그러나 이들 대부분은 인 시츄 겔 형성을 위해 고농도 (> 20 %)의 중합체를 필요로 한다 (폴록사머, PEO-PLLA 이중블록 공중합체, PEG-PLGA-PEG 삼중블록 공중합체, 셀룰로스 및 아세토프탈레이트 라텍스). 열에 의해 겔화되는 중합체 (폴록사머, 플루로닉, PEO-PLLA 이중블록 공중합체, PEG-PLGA-PEG 삼중블록 공중합체, 및 마트리겔) 또한 패키징이나 보관되는 동안 온도 변화로 인하여 투여 전에 겔화된다는 단점이 있다. 불행히도 이들 중합체 중 일부, 예컨대 폴록사머는 생체내에서 분해되지 않거나 투여 전에 (PEO-PLLA 이중블록 공중합체) 또는 제형되는 동안 (플루로닉스 및 젤라이트) 온도 조작을 필요로 한다. 카보폴과 플루로닉의 혼합물로 이루어지는 눈에 사용하는 인 시츄 겔화 약물 전달 제형은 다른 것으로 이루어지는 제형보다는 효과적인 것으로 밝혀졌다. 그러나 플루로닉은 14 %에서 사용된다 (Lin and Sung, *Journal of*

Controlled Release 69, 379-388, 2000). 그러므로 그런 중합체는 사람 및 동물에게 의학적으로 적용하기에는 적합하지 않다. 나아가 이들 중합체 중 많은 것들이 점성이 있긴 하지만 여전히 물이 흐르는 것처럼 유동적인 용액인 하이드로겔을 형성한다 (예컨대 폴록사머 및 플루로닉).

인 시츄 겔화 조성물은 미국 특허 제 5,958,443호에서 개시되었는데, 그 특허에는 약물, 필름 형성 중합체 및 겔 형성 이온 다당을 포함하는 액체 조성물이 개시되어 있다. 이들 조성물은 두 개의 별도로 적용되는 성분을 사용하는데, 첫 번째 성분은 "외래의" 교차결합용 2가 또는 다가의 양이온의 용액으로, 생체에 적용하고자 하는 부위에 적용된다. 별도의 단계 (첫 번째 성분 용액의 적용 전, 후 또는 동시에 진행될 수 있다)로 약물, 필름 형성 중합체 및 이온 다당 (예컨대 알긴산염)을 포함하는 두 번째 액체 성분 용액이 의도된 부위에 별도로 적용되고, 그 결과 생체 적용 부위에서 이온 다당과 2가 또는 다가의 양이온 사이에 화학적 교차결합 반응이 일어나 교차결합되고 불용성이며 생체점착성인 인 시츄 겔이 형성된다. 상기 '443호 특허에서는 펙틴이 겔 형성 이온 다당으로서보다는 많은 필름 형성 중합체 중 하나로서 설명되었다.

펙틴은 식물의 세포벽에서 분리되고 중합체 내에서 갈락투론산 잔기에 카르복실산 측면 기를 가지는, 생체 내에서 분해될 수 있는 헤테로다당이다. 시험된 모든 야채와 과일에는 펙틴이 함유되어 있는 것으로 나타난다. 당밀, 해바라기, 감자, 및 포도로부터 얻어지는 펙틴이 널리 공지되어 있는 몇 가지 예이다. 실제로 모든 천연 펙틴에서 펙틴의 50 % 이상의 카르복실산 기가 메틸 에스테르의 형태로 존재하며, 그런 펙틴은 "고 메톡실"(HM) 펙틴으로 언급된다. 50 % 미만의 카르복실산 기가 메틸 에스테르화되어 있는 펙틴 (즉 저 메톡실 (LM) 펙틴)은 자연계에서는 흔하지 않으며, 전형적으로 천연 HM 펙틴으로부터 합성 과정에 의해 제조된다. 당해 기술분야에는 LM 펙틴이 칼슘 이온과 같은 2가 또는 다가 금속 이온과 배위/교차결합에 의해 겔을 형성할 수 있다고 알려져 있다. 펙틴의 화학 및 생물학은 광범위하게 조사되었다 (Pilnik and Voragen, *Advances in plant biochemistry and biotechnology* 1, 219-270,1992 ; Voragen et al, *In Food polysaccharides and their applications.* pp287-339. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995; Schols and Voragen, *In Progress in Biotechnology 14. Pectins and pectinases*, J. Visser and A. G. J. Voragen (eds.). pp. 3-20. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 1996).

미국 특허 제 6,432,440호에는 점막과 접촉시 겔에 적용된 액체 약제학적 제형에 LM 펙틴을 사용하는 것이 개시되어 있다. 미국 특허 제 6,342,251호에는 펙틴을 포함한 매우 다양한 중합체가 발기 기능장애의 치료에 적합한 약물의 코 투여를 위한 액체 및 고체 제형에 사용되는 것이 개시되었다. 미국 특허 제 6,432,440호, 6,342,251호, 5,707,644호, 및 5,804,212호는 모두 참조로 인용된 것으로, 그 내용은 인 시츄 겔화 약제학적 조성물의 제형, 그런 조성물을 제조하기 위해 사용되는 펙틴, 및 동물 및 사람에게 그 조성물을 투여하는 것에 관한 것이다.

앤더슨 등은 동결건조된 항원과 4 mm의 나일론 볼을 섞고 탈크 분말 (탄산 칼슘)과 혼합함으로써 제조된, 동물에게 투여하기 위한, 우역에 대한 코 분말 백신을 설명하였다 (Anderson et al., *Vaccine*, 19, 840-843, 2001). 마 등은 알루미늄 염과 그 안에 흡수된 항원, 당, 아미노산, 및 경피 투여에 의해 환자에게 투여되는 다당을 포함할 수 있는 콜로이드상 물질을 포함하는 겔-형성 분말 백신 조성물을 설명하였다 (Maa et al., 미국 특허 공보 2002/0120228호).

5 미크론 미만의 작은 입자를 함유하는 분말도 폐에 사용될 약물을 투여하기 위해 폐 심부에 사용되었다. 락토스 입자가 그런 폐 약물 전달에 사용하기 위해 미분화된 입자와의 물리적 혼합을 위한 거친 입자 벌크 담체로서 사용되었다 (Malcomson and Embleton, *Pharmaceutical Science and Technology Today*, Vol 1 (9), 394-398,1998). 리칼시 등은 동결건조된 생(live) 홍역 폐 분말 백신을 제조하였다 (LiCalsi et al., *Vaccine*, Vol 19, 2629-2636, 2001). 상기 인용된 선행 기술에서 약물 또는 항원은 담체 입자의 표면에 분산되거나 그것과 물리적으로 혼합되고, 락토스 매트릭스 전체에는 분산되지 않는다.

최근에 일룸 등이 두 개의 문헌에서 약물과 백신을 코에 투여하는 기술에 대해 개괄적으로 검토하였다 ("Nasal Vaccines" in *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.51, pages 21-42, 2001, 및 "Nasal Drug Delivery: New Developments and Strategies" published at www.drugdiscoverytoday.com, in Vol. 7, No. 23, December 2002). 이 두 개의 문헌에서는 코에 백신 및/또는 약물을 전달하기 위한 분말을 제형하기 위해 중합체 및/또는 고점도의 생체점착성 물질을 사용하는 것이 논의되었지만, 두 문헌 모두 그런 코 분말 백신 조성물이 물에 매우 잘 녹을 수 있는 부형제 및/또는 희석제를 적당량 내지 다량으로 포함해야 한다는 것에 대해서는 논의 또는 제시되지 않았다. 상기 인용된 특허 및 문헌은 참조를 위해 인용된 것으로, 그 내용은 코 분말 약물 전달 조성물의 제형과 동물 및 사람에게 조성물을 투여하는 방법에 관한 것이다.

생물공학 및 관련된 약물 및 관련 생약학적 제제를 전달하는 방법은 최근 몇년동안 집중적인 연구의 대상이었지만, 이들 제제, 특히 생약학적 제제를 투여하는 분야에서는 극히 제한된 진전만이 이루어졌을 뿐이다. 생약학적 제제, 예컨대 펩티드, 및 바이러스는 보관시에나 적용 후에 불안정한 경향이 있다. 그런 제제를 동물 또는 사람의 조직에 주입하는 것은 때로 성공하기도 하지만, 특히 빈번한 투여가 필요할 경우에는 경제적으로나 마취학적으로 바람직하지 않다. 많은 생약학적 제

제, 특히 고분자량 및 극성이 큰 제제, 예컨대 단백질, 핵산, 항원 등은 과거에 경구로나 점막에 투여되는 경우에는 거의 흡수되지 않았었다. 코의 점막에 투여하는 것은 특히 도전적이라 할 수 있는데, 왜냐하면 코의 끈끈한 유체는 빠르게 전도되고 제거되기 때문이다. 즉 15분 정도의 수명으로 비강에서 제거될 수 있는 것으로 여겨진다. 일단 동물에게 성공적으로 투여되면 많은 생약학적 제제는 그것들의 원하는 기능을 효과적으로 발휘할 수 있게 되기 전에 빠르게 분해되므로, 분해로부터 보호되고 및/또는 시간에 따라 방출되는 장점을 가지는 제형이 필요하다. 그러므로 아직까지는 생약학적 제제의 투여 분야에서 오랫동안 필요를 느껴왔음에도 충족되지 않는 요구가 여전히 존재한다.

따라서 약물 및/또는 생약학적 제제를 전달하기 위한 보다 간편하고, 개선된, 및/또는 보다 효율적인 인 시츄 겔화 조성물이 크게 요구된다.

발명의 상세한 설명

본원에 개시된 발명은 사람을 포함한 동물의 조직 또는 체액에 생리적 활성 제제를 전달하는 것에 관한 것이다. 본 발명은 조직 또는 체액과 접촉했을 때 생리적 활성 제제를 포함하는 "인 시츄" 겔을 형성하는 다당, 이를테면 펙틴을 포함하는 약제학적 조성물을 제조하고 투여하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 동물 및 그것의 조직과 체액에, 선택된 크기 범위의 미소구 또는 미소입자를 포함하는 액체, 또는 고체, 또는 분말의 형태로 투여될 수 있다.

본 발명의 조성물은 펩티드, 단백질, 항원, 백신, 핵산, 바이러스, 전세포 또는 그것의 단편을 포함하여 민감한 생약학적 제제의 안정성 및/또는 보관 수명이 개선되도록 제형될 수 있다. 조성물은 주사에 의해 신체 조직, 기관, 또는 공동에 투여될 수 있어서 혈액 또는 혈청과 같은 체액에 접촉하게 되고, 그 안의 겔, 또는 조성물은 식도/소화관의 점막, 또는 코와 폐 공동의 점막을 포함하여 신체의 다양한 점막에 투여될 수 있다. 인 시츄 겔은 일단 형성되면 생리적 활성 제제의 방출을 둔화시키거나 및/또는 조절하거나, 또는 생체내 활용성을 개선할 수 있다. 어떤 구체예에서 비강에서 형성된 인 시츄 겔을 통한 백신, 항원, 펩티드, 및/또는 단백질과 같은 생체분자의 투여는 예상외로 그런 투여 기법에 의해 개선될 수 있다.

본 발명의 몇몇 측면으로, 조성물에 2가 또는 다가의 양이온을 포함하는 고체 또는 겔 유도제 및/또는 조성물의 포함 또는 공동-투여로 인해 겔 형성이 개선되고 약물 방출이 조절될 수 있다.

본 발명의 특징 및 장점은 본 발명의 이어지는 구체예에 의해 예시될 것이다.

한 측면으로 본 발명은 생리적 활성 제제를 동물에게 투여하기 위한 약제학적 고체 조성물에 관한 것으로, 그 조성물은

a) 동물에게서 생리적 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제;

b) 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 가지는 서브유닛을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 다당; 및

c) 2가 또는 다가의 금속 양이온의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 고체 다당 겔화 조성물로 이루어지고,

상기 약제학적 조성물은 동물의 조직이나 체액과 접촉할 때 겔을 형성하는 고체 형태로 존재한다.

다른 측면으로 본 발명은

a) 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제; 및

b) 하나 또는 둘 이상의 펙틴 물질로 이루어지는, 생리적 활성 제제를 동물에게 투여하기 위한 약제학적 고체 조성물에 관한 것으로, 이 약제학적 조성물은 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성할 수 있는 고체이다.

관련된 측면으로, 본 발명은 동물에게서 생리적 활성 제제를 지속적으로 방출하기 위한 조성물을 제공하는데, 그 조성물은

동물의 신체에서 생리적 반응을 나타내는 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제; 및

30 % 미만의 메틸화도와 1×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 펙틴 물질을, 조성물이 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성하기에 유효한 양으로 포함하는 건조 형태이다.

본 발명은 또한 본 발명의 조성물을 제조하기 위한 방법에도 관한 것이다.

그런 한 측면으로, 본 발명은 동물에게서 생리적 활성 제제를 지속적으로 방출하기 위한 건조 조성물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 펙틴 물질과 생리적 활성 제제의 혼합물을 담체에 녹여 용액 또는 분산액으로 제조하는 단계, 이때에 펙틴 물질의 양은 동물에게서 인 시츄 겔을 형성하기에 유효한 양이고, 담체의 휘발성 성분을 제거하여 건조 조성물을 제조하는 단계로 이루어진다.

본 발명은 또한 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔화될 고체 또는 액체 약제학적 조성물을 투여하는 방법에 관한 것이다. 한 측면으로, 본 발명은 다음 성분:

a. 동물에게서 생리적 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제;

b. 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 가지는 서브유닛을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 다당; 및

c. 2가 또는 다가의 금속 양이온의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 고체 다당 겔 유도 조성물을 어떠한 순서나 조합으로, 동물의 조직 또는 체액에 투여하여 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성하는 것으로 이루어지는 방법에 관한 것이다.

상술된 구체예에서 a, b 및 c의 성분들은 어떠한 순서로 투여되어도 좋고, a와 b 성분은 고체 또는 액체 용액의 형태일 수 있으며, a, b, 및 c 성분의 어떠한 조합 또는 하위-조합도 동시에 또는 혼합 상태로 투여될 수 있다.

본 발명은 또한 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔화될 수 있는 액체 조성물, 및 조직 및 체액에 조성물을 적용하는 방법에 관한 것이다. 그런 한 측면으로, 본 발명은 다음 단계들로 이루어지는 생리적 활성 제제를 동물에게 투여하는 방법에 관한 것이다:

a) i) 액체 담체,

ii) 동물의 조직 또는 체액에 적용될 때 액체 용액 또는 분산액을 겔화시키기에 유효한 양의, 메틸화도가 30 % 미만이고, 평균 분자량이 4.6×10^5 달톤보다 큰 펙틴 물질, 및

iii) 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제로 이루어지는 액체 용액 또는 분산액을 제공하는 단계; 그리고

b) 액체 용액 또는 분산액을 동물의 조직 또는 체액에 적용함으로써 조직 또는 체액과 접촉할 때 생리적 활성 제제를 포함하는 겔을 형성하는 단계.

다른 측면으로 본 발명은 동물의 코 점막에 투여하기 위한 백신 조성물에 관한 것으로, 그 조성물은

a. 동물에게서 면역 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 항원, 및

b. 약 30 % 미만의 메틸화도와 약 1×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 하나 또는 둘 이상의 펙틴 또는 그것의 일가 양이온 염의 나노-분산액을 포함하는 분말 입자를 포함하고, 그 분말 입자는 직경 크기가 약 250 μM인 오프닝을 가지는 체를 통과할 수 있다.

다른 측면으로 본 발명은 동물 또는 사람에게 고체 또는 액체 형태의 백신 조성물을 투여하는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 동물 또는 사람의 점막에 백신 조성물을 투여하는 것으로 이루어진다. 그런 한 측면으로 본 발명은 동물을 백신처리하는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 다음 단계들로 이루어진다:

a. i) 조성물이 동물의 점막과 접촉할 때 겔을 형성하기에 유효한 양의, 메틸화도가 약 30 % 미만이고, 평균 분자량이 1×10^5 달톤보다 큰 펙틴 물질;

ii) 동물에게서 활발한 면역 반응을 유도할 수 있는 양의, 펩티드, 단백질, 핵산, 탄수화물, 살아있는 세포 또는 미생물, 죽은 세포 미생물, 또는 그것의 일부분, 또는 바이러스 또는 그것의 일부분으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 항원을 포함하고, 직경 크기가 약 25 μM인 오프닝을 가지는 체를 통과할 수 있는 분말 입자를 포함하는 하나 또는 둘 이상의 분말 조성물을 제공하는 단계;

b. 분말을 동물의 코 조직 및/또는 코 유체에 투여함으로써 조직 또는 체액과 접촉시에 겔을 형성하는 단계; 그리고

c. 동물에게서 하나 또는 둘 이상의 항원에 대해 활발한 면역 반응을 유도하는 단계.

전술한 논의들은 본 발명에 속하는 몇 가지 특징을 대강 설명한 것이다. 이것들은 본 발명의 보다 두드러진 특징 및 적용 몇 가지를 단순히 예시하는 것으로 간주되어야 한다. 따라서 보다 상세한 본 발명에 대한 이해는 아래의 상세한 설명을 참조로 하여 이루어질 것이다.

본 발명은 본 발명의 다양한 구체예와 그 안에 포함된 실시예에 대한 아래의 상세한 설명 및 도면과 도면에 대한 설명을 참조하면 보다 쉽게 이해될 수 있다. 본 발명의 화합물, 조성물, 및/또는 방법을 개시하고 설명하기 전에 특별한 다른 언급이 없는 한, 본 발명은 특정 출발 물질, 약제학적 제제 또는 특정 합성법에 제한되지 않으며, 본 발명은 그 자체로서 달라질 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 또한 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구체예를 설명할 목적이며 제한하려는 의도는 아니라는 것도 인지되어야 한다.

정의

명세서 및 본원에 개시된 식에서 다음 용어들을 정의한다.

"임의의" 또는 "임의적으로"는 계속해서 설명되는 사건 또는 상황이 일어날 수도 있고 일어나지 않을 수도 있으며, 상기 사건 또는 상황이 일어나는 경우와 일어나지 않는 경우를 모두 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어 "임의의 부형제"란 표현은 부형제가 조성물에 포함되거나 포함되지 않을 수 있음을 의미한다.

명세서 및 첨부되는 청구범위에서 사용되는 것처럼 단일 형태의 "한" 및 "그"는 문맥상 분명하게 다른 것을 지시하는 것이 아니라면 다수의 지시대상을 포함하는 것으로 주지되어야 한다. 그러므로 예를 들어 "한 방향족 화합물"이라는 언급은 방향족 화합물들의 혼합물을 포함한다.

때로 본원에서 범위는 "약" 하나의 특정 값으로부터, 및/또는 "약" 다른 하나의 특정 값까지로 표현된다. 그런 범위가 표시될 경우 다른 구체예는 한 특정 값으로부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 마찬가지로 값이 대략적으로 "약"이라는 용어를 사용하여 표현될 때는 그 특정 값이 다른 구체예를 형성하는 것으로 이해되어야 한다. 나아가 범위의 각 종점은 둘 다 다른 종점과의 관계에서나, 다른 종점과 무관하게 중요하다.

"약제학적으로 허용되는"이란 생물학적인 것이 아니거나 그렇지 않으면 바람직하지 않은 물질, 즉 물질이 임상적으로 허용될 수 없는 생물학적 영향을 유발하거나 약제학적 조성물에 함유된 어떠한 다른 성분과 유해한 방식으로 상호 작용하는 일이 없이 관련된 활성 화합물과 함께 개체에게 투여될 수 있음을 의미한다.

본원에서 사용되는 용어인 화합물의 "유효량"은 화합물이 바람직한 기능, 예를 들면 유전자 발현, 항원 유도된 면역 반응, 단백질 기능, 또는 질병 상태의 바람직한 조절을 제공하기에 충분한 양을 의미한다. 아래에서 지적되는 바와 같이 필요한 정확한 양은 개체마다 다를 것이며, 대상의 종, 연령, 및 일반적 상태, 치료하고자 하는 질병의 심각성, 사용된 특정 제제, 그것의 투여 방식, 등에 따라 좌우될 것이다. 그러므로 정확한 "유효량"을 명시하는 것은 불가능하다. 그러나 적절한 유효량은 당업자에 의하여 기본적인 실험만을 사용해서도 측정될 수 있다.

본원에서 사용되고 규정되는 용어 "겔"은 네트워크 안에 가역적으로 흡수될 수 있는 액체를 함유하는 유기 중합체 분자의 다공성 삼차원 네트워크를 포함하는 탄성 고체 또는 변형가능한 반-고체이다. 본 발명과 관련하여 가역적으로 흡수된 액체는 전형적으로 액체 물을 포함하며, 다른 액체 물질도 또한 존재할 수 있다. 본 발명과 관련하여 중합체 분자의 네트워크는 전형적으로 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 포함하는 반복 유니트를 가지는 다당, 이를테면 펙틴을 포함한다. 본 발명의 많은 구체예에서, 인접한 다당의 최소한 일부의 카르복실레이트 또는 술페이트 기는 칼슘 또는 알루미늄과 같은 2가 또는 다가 양이온과 배위결합하여, 순수한 물에 실질적으로 녹지 않는 다당 분자의 양이온 교차결합된 삼차원 네트워크를 형성한다. 그런 양이온-교차결합된 및 수불용성 겔의 존재 및 농도는 전형적으로, 먼저 순수한 중성의 물에 여러 시간

동안 겔 샘플을 놓아두어, 겔이 그것의 반-고체 형태를 유지하고 실질적으로 수불용성이지만, 에틸렌디아민테트라아세트산의 나트륨 염 (EDTA)과 같은 금속 양이온 킬레이트화제의 첨가로 겔의 2가 또는 다가 금속 이온이 제거됨으로써 겔의 빠른 용해가 유도되는 지를 확인함으로써 실험적으로 측정될 수 있다.

본원에서 사용되는 용어 겔화는 교차결합된 중합체 네트워크의 형성 및 액체 및/또는 다른 물질이 교차결합된 중합체 네트워크 안에 흡수되어 실질적으로 벌크 액체에 녹지 않는 고체 또는 반-고체를 형성하는 것을 포함하는 겔의 형성을 말한다. 인 시츄 겔은 적당한 선구 중합체와 전형적으로 물을 포함하는 액체로부터 형성되며, 나중에는 조직 또는 체액, 또는 모조 조직 또는 체액과 접촉할 때 또는 접촉한 후에 교차결합되어 교차결합된 중합체 네트워크와 조직 또는 체액으로부터 유도된 물을 포함하는 고체 또는 반-고체가 형성된다.

"중합체"는 일반적으로 단량체로 불리는 10개 이상의 2가 또는 다가 서브유닛이 함께 공유 결합되어 형성된 거대분자이다. 본 발명의 중합체는 상대적으로 많은 수의 상이한 유형의 단량체를 함유하는 단백질, 핵산, 다당, 등과 같은 천연 중합체, 또는 단지 하나 또는 적은 수의 상이한 단량체를 함유하는 다당과 같은 인공-제조된 중합체 두 가지를 모두 포함한다.

"겔-유도제"는 중합체 또는 중합체 용액이 겔을 형성할 수 있도록 유도하는 제제이다. 겔 유도제는 때로 중합체 사슬 사이에 교차결합을 유도함으로써 겔 형성을 유도하고, 본 발명에서는 동일하거나 상이한 다당 분자 상에서 카르복실레이트 또는 술페이트 치환기와 교차결합할 수 있는 2가 또는 다가의 양이온의 염을 포함한다.

"이온 중합체"는 이온화된 또는 쉽게 이온화될 수 있는 기능기 (예를 들면 카르복실산 또는 상응하는 카르복실레이트 기, 또는 유기 술폰산, 및 그것의 상응하는 유기 술포네이트 음이온 기)를 가지고 있는 단량체를 가지는 합성 또는 천연 중합체이다.

"이오노트로픽 겔(ionotropic gel)"은 중합체와 이온의 교차결합에 의해 형성된 겔이다. "건조된 약제학적 제제", 건조된 약제학적 제형은 분말, 패드, 필름, 스폰지, 정제, 또는 캡슐의 형태로 20 % 미만의 수분 함량을 갖는다.

"분말"은 주로 매우 작은 고체 입자 또는 구를 포함하는 건조한 물질이다. 분말의 입자 또는 구의 벌크 중 가장 큰 크기는 밀리미터보다 작다. 상기 정의에서 "건조"는 분말의 정상적인 자유-흐름이라는 물리적 특성을 상당히 방해하는 경향이 있는 분말 입자 또는 구의 표면상에 자유롭게 부유하는 액체 또는 과잉 수분 (물을 포함하여)이, 있다 해도 극히 소량으로, 거의 없다는 것을 의미한다. 본 발명의 분말은 실제로는 흡수한 물을 그것의 입자 또는 중합체 네트워크 안에 포함하겠지만, 그것의 표면에는 흐를 수 있는 액체 물을 유의할만한 양으로 포함하지 않는다.

"미소구"는 대체로 연속적인 곡선과 각이 지지 않은 표면을 가지는 작고, 대략 둥근 모양의 고체 입자로, 입자의 효과적인 직경은 약 0.1 내지 약 250 미크론 (μM)이다. 본원에서 규정되는 미소구는 미소캡슐을 포함한다. 미소구와는 대조적으로 "미소입자"는 평평하고, 각이 져 있으며, 사방 육면체, 또는 불규칙적인 표면을 가지고 있다. 미소입자의 가장 긴 선형 치수는 약 0.1 내지 약 250 미크론이다.

"생리적 활성 제제"는 동물의 체내에서 생리적 반응을 유도할 수 있는 제제, 화합물, 또는 조성물을 말한다. 생리적 활성 제제로는 영양분, 작은 분자 약물 및 치료제, 큰 분자 약물 및 치료제, 약리학적 활성 물질; 진단제; 치료제; 핵산; 펩티드; 중합체; 작은 단백질; 큰 단백질; 및 살아있는 세포가 있다. 약리학적 활성 물질로는 면역 반응을 유도하는 물질, 예컨대 하나 또는 둘 이상의 항원을 포함하는 백신이 있다. 치료제의 실례로는 항균 물질, 항미생물제, 항기생충제, 항생제, 항히스타민, 소염제, 길항대사물질, 녹내장 방지제, 항암제, 항바이러스제, 항진균제, 항염증제, 당뇨 방지제, 마취제, 항-진정제, 진통제, 항응고제, 안 제제, 혈관 형성 인자, 면역억제제, 및 항-알레르기제가 있다.

"백신"은 처리된 포유류에서 면역 반응을 유도하고, 때로는 그것이 유도된 항원 또는 미생물 또는 조직에 대해 선택적으로 항체 (체액성 반응) 및/또는 세포성 (T-세포) 면역 반응의 형성을 유도하여 미생물, 바이러스, 및/또는 암에 의해 유발된 질병을 치료 또는 예방하는 하나 또는 둘 이상의 항원을, 일반적으로는 단백질, 펩티드, 탄수화물, 지질, 또는 핵산, 살아있거나 죽은 세포 또는 전체 또는 일부분의 미생물, 전체 또는 일부분의 바이러스 등의 형태로 포함한다.

본 발명에서 사용되는 용어 "펙틴 물질"은 자연적으로 발생하는 펙틴으로부터 유도된 하나 또는 둘 이상의 다당 물질의 주요 부분을 포함하는 모든 물질을 포함한다. 펙틴 물질로는 저 및 고 메톡실 펙틴, 에스테르가 제거된 펙틴, 펙틴 칼슘 겔, 알로에 펙틴 나트륨 겔, 펙트산, 펙트산염, 펙틴산, 펙틴산염, 프로토펙틴, 및 펙틴이 풍부한 물질, 예컨대 알로에 베라 내부 겔 세포벽 섬유질, 또는 이것들의 각각, 결집체, 또는 조합물이 있다. 상기에서 논의된 바와 같이 펙틴은 식물에 존재하거나 식물로부터 제조되고, 고비율의 무수 갈락투론산 단량체 유니트를 함유하는 복집한 콜로이드상 탄수화물 유도체를 대표적으로 나타내는 기이다.

"에스테르가 제거된" 펙틴은 다수의 메틸 에스테르 기가 인공적인 방법에 의해 펙틴 중합체로부터 제거된 펙틴이다.

"펙트산"은 주로 콜로이드상 폴리갈락투론산으로 구성되고 본질적으로 메틸 에스테르 기가 없는 펙틴 물질을 말한다. 전체적으로 에스테르가 제거된 펙틴은 펙트산이거나 폴리갈락투론산이다. "펙트산염"은 펙트산의 정규 또는 산 염이다. "펙틴산"은 무시해도 좋을 정도 이상의 비율의 메틸 에스테르 기를 함유하는 콜로이드상 폴리갈락투론산이다. "펙틴산염"은 펙틴산의 정규 또는 산 염이다. "프로펙틴"은 식물에 존재하고, 제한된 가수분해가 일어날 때 펙틴, 펙틴산, 등을 생성하는 원래의 수불용성 펙틴을 말한다. 수불용성 펙틴은 식물에 존재하는 셀룰로스, 예컨대 알로에 베라 내부 겔 또는 외피의 세포벽 섬유질과 결합될 수 있다.

본 명세서 및 첨부되는 청구범위에서 화학 종 잔기는 특별한 반응 개략 또는 계속되는 제형 또는 화학적 생성물에서 화학종의 결과 생성물인 구조 단편 또는 부분을 말하는 것으로 구조 단편 또는 부분이 실제로 어떤 화학종에서 얻어지는 지와는 무관하다. 그러므로 펙틴의 Gal A 잔기는 펙틴의 하나 또는 둘 이상의 갈루론산 단량체 반복 단위를 말하며, 갈루론산 자체가 펙틴에 존재하는지 또는 펙틴 제조에 사용되었는 지와는 관계가 없다.

이어지는 설명에서 단위 "% (w/v)" 에 대한 언급이 자주 나온다. 이 표현에 의하면 "% (w/v)"는 액체 용액 100 ml에 녹아 있는 물질의 g 수로서 정의된다. 희석된 수용액에서 액체의 농도는 대략 1 g/ml일 것이고, 그러므로 "% (w/v)"는 100 g의 액체 중의 고체의 g수와 대략 같을 것이다. 이 "% (w/v)" 단위에서 1 % (w/v) 용액은 1 g/100 ml에 상응하고, 1 g/100 ml, 10 mg/ml과 같다.

본원에서 사용되는 약어:

CMC, 카르복시메틸 셀룰로스; Da, 달톤; DM, 메틸화도; Gal A, 갈락투론산; HEC, 히드록시에틸 셀룰로스; HM, 고메톡실; HPMC, 히드록시프로필메틸셀룰로스; kDa, 킬로달톤; LM, 저 메톡실; PBS, 인산염 완충 식염수; PEG-PLGA-PEG, 폴리에틸렌 글리콜-폴리(락틱-코-글리콜산)-폴리에틸렌 글리콜; PEO-PLLA, 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(L-락타이드); PEO-PPO-PEO, 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드).

인 시츄 겔화를 위한 약제학적 조성물

본 발명의 약제학적 조성물은 고체 또는 액체 형태의 "인 시츄" 겔화 조성물로, 하나 또는 둘 이상의 음이온 다당과 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제를 포함하며, 동물의 조직, 체액, 또는 점막에 접촉할 때 또는 접촉한 직후 조성물 중의 음이온 다당은 대개 다공성 삼차원 중합체 네트워크의 형성에 의해 인 시츄 겔을 형성한다. 조성물이 동물의 조직, 체액, 또는 점막에 적용되기 전에 본 발명의 약제학적 조성물 및 조성물의 대부분 또는 전부의 성분은 일반적으로 그것들이 조직이나 체액에 적용되기 전에는 순수한 물에 가용성이지만, 조직 또는 체액에 적용될 때에는 음이온 다당의 카르복실레이트 또는 술페이트 기가 생체 유체로부터 흡수된 "내인성" 2가 칼슘과의 배위 결합에 의해 충분히 교차결합되어 생리적 조건에서 물 또는 체액에 효과적으로 불용성인 생체점착성 겔을 형성하는 뚜렷한 성질을 갖게 된다. 본 발명의 조성물은 따라서 적용시에 추가로 교차결합되지 않는, 이미 교차결합된 중합체 조성물을 포함하는 선행 기술 조성물과는 구별된다.

본 발명의 겔과 관련하여, 중합체 네트워크의 구멍에 있는 액체는 때로 물, 식염수, 또는 처리된 동물 또는 환자로부터 유도된 물을 포함한 생체 유체를 포함하고, 약물 또는 약리학적 활성 물질은 또한 일반적으로 교차결합된 중합체 네트워크의 구멍 안에 붙들린다. 본 발명에 있어서, 겔 네트워크는 때로 인접한 다당 분자상의 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기와 카르복실레이트 또는 술페이트 기와 배위결합되어 있는 교차결합된 2가 또는 다가 양이온 사이의 배위/이온 결합에 의해 형성된다.

고체 조성물

어떤 구체예에서 본 발명은 다음:

a. 동물에게서 생리적 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제;

b. 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 가지는 서브유닛을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 다당; 및

c. 2가 또는 다가의 금속 양이온의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 고체 다당 겔 유도 조성물로 이루어지는, 동물에게 생리적 활성 제제를 전달하기 위한 약제학적 고체 조성물에 관한 것으로, 이 약제학적 조성물은 동물의 조직이나 체액과 접촉할 때 겔을 형성하는 고체 형태로 존재한다.

상술된 것과 관련된 다른 구체예에서 본 발명은

a. 동물의 신체에서 생리적 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제; 및

b. 30 % 미만의 메틸화도와 약 1×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 하나 또는 둘 이상의 펙틴 물질을 포함하는, 동물에게 생리적 활성 제제를 투여하기 위한 조성물에 관한 것으로, 이 조성물은 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성할 수 있는 고체이다.

상술된 약제학적 고체 조성물은 어떠한 고체 형태, 이를테면 패드, 정제, 캡슐 또는 분말 상태의 고체이다. 많은 구체예에서 약제학적 고체 조성물은 분말의 형태로 제형된다.

또 다른 관련 구체예에서 본 발명은

a. 동물에게서 면역 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 항원, 및

b. 약 30 % 미만의 메틸화도와 약 1×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을 가지는 하나 또는 둘 이상의 펙틴 또는 그것의 일가 양이온 염의 나노 분산물을 포함하는 분말 입자를 포함하는, 동물의 코에 투여하기 위한 백신 조성물에 관한 것이고, 이때 분말 입자는 직경 크기가 약 250 μM인 오프닝을 가지는 체를 통과할 수 있다.

분말은 다수의 미소입자 및/또는 미소구로서 존재할 수 있고, 이때 사용된 용어는 상기에서 정의된 것과 같다. 실제로 원하는 범위의 입자 크기를 가지는 분말은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 많은 방법 중 어떠한 것에 의해서든지, 이를테면 에멀션 방법, 캡슐화 방법, 분무 건조 방법, 고체의 연마 또는 분쇄 방법에 의해 제조될 수 있다. 많은 방법의 최종 단계에서 선구 고체 또는 분말은 하나 또는 둘 이상의 세트의 체를 통과한다. 그런 체는 규정된 및 바람직한 크기, 예를 들면 250, 200, 150, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 11, 10, 9, 5, 1, 및 0.1 μM의 오프닝을 가짐으로써 분말, 미소입자 및/또는 미소구에 대해 다양한 범위의 입자 크기를 생성할 수 있다. 입자 크기의 바람직한 범위로는 아래의 표 1에 나타낸 입자 크기의 대략적인 범위를 말할 수 있다. 한 구체예에서 체의 오프닝은 약 250 μM 또는 그 이하의 크기를 가지는 분말, 미소입자 또는 미소구가 체를 통과할 수 있게 한다. 임의로 그 분말은 체를 통과한 후 보다 작은 다른 체로 처리되어 가장 작은 입자들이 제거됨으로써, 예를 들면 약 11 μM과 약 250 μM 사이의 입자 크기를 가지는 고체 조성물이 생성될 수 있다.

입자 크기 분포에 대해 확실한 다른 제약을 가하는 것이 유익한 효과를 미칠 수 있다. 따라서 어떤 구체예에서는 고체 조성물의 특정 백분율의 입자가 특정한 크기 범위 내에 속할 것이다. 예를 들어 약 80 %, 또는 약 85 %, 또는 약 90 %, 또는 약 95 %의 입자가 특정 입자 크기 범위 내에 속한다. 한 실례로 어떤 구체예에서 본 발명의 고체 조성물은 미소구를 포함하는데, 미소구의 90 % 이하는 직경이 0.1 내지 10 μM이다.

본 발명의 어떤 구체예에서 생리적 활성 제제는 이온 다당 및/또는 다른 고체 성분을 포함하는 입자 표면에 침착되거나, 또는 생리적 활성 제제를 포함하는 분말이 이온 다당을 포함하는 분말과 혼합된다. 그럼에도 불구하고 본 발명의 바람직한 많은 구체예에서 생리적 활성 제제는 바람직하게는 음이온 다당, 농축제, 부형제 등의 혼합물을 포함하는 고체 매트릭스 내에 고도로 분산된다. 바람직하게도 고체 매트릭스 혼합물에서 혼합물의 다양한 성분들은 주로 개개의 분자들 및/또는 분자 수준의 이온의 혼합물 형태로 분산되지만, 유사한 분자들의 보다 큰 질서정연한 응집체 (특히 무기 염)로 존재할 수 있다. 그런 반-균질성 고체 매트릭스 혼합물은 고체 혼합물의 성분들의 "나노분산물"로서 언급될 수 있다. 보다 더 바람직한 것은 고체 혼합물의 성분들 및 그것의 구성 분자들이 고체 매트릭스의 성분들의 "고체 용액"을 위해 실질적으로는 분자 수준으로 균질하게 분산되는 것이다. 그런 "나노분산물" 및 "고체 용액"은 민감한 생물학적 활성 제제의 월등한 안정화를 제공하고, 일반적으로는 개선된 분산, 방출 속도의 조절, 및/또는 생리적 활성 제제의 생체내 활용성을 제공한다.

표 1. 본 발명의 겔-형성 조성물의 성분들에 대한 선택된 조성 범위*

건조된 제형 (% w/w)	액체 제형
다당	

0.0001 내지 99 %	0.001 내지 20 (% w/v)
0.001 내지 50 %	0.01 내지 10
0.005 내지 20 %	0.05 내지 8
0.01 내지 10 %	0.1 내지 4
약제학적 활성 제제	
0.0001 내지 90 %	0.001 내지 50 (% w/v)
0.001 내지 약 70 %	0.01 내지 25
0.01 내지 50 %	0.05 내지 10
0.1 내지 20 %	0.1 내지 8
분말, 미소구, 또는 미소입자 입자 크기	
0.1 ㎛ 내지 300 ㎛	n/a
1 ㎛ 내지 200 ㎛	n/a
10 ㎛ 내지 100 ㎛	n/a
12 ㎛ 내지 60 ㎛	n/a
15 ㎛ 내지 50 ㎛	n/a
약제학적으로 허용되는 농축제	
0.01 내지 90 %	0.01 내지 10 (% w/v)
0.1 내지 80 %	0.1 내지 8
1.0 내지 70 %	0.2 내지 6
5.0 내지 50 %	0.5 내지 5
약제학적으로 허용되는 부형제	
0.1 내지 90 %	0.1 내지 40 (% w/v)
1.0 내지 50 %	0.5 내지 30
2.0 내지 30 %	1.0 내지 20
3.0 내지 20 %	2.0 내지 10
2가 또는 다가의 금속 양이온	
0.01 내지 80 %	0.00001 내지 0.05 (% w/v)
0.05 내지 40 %	0.0001 내지 0.02
0.1 내지 10 %	0.001 내지 0.01

* 상기 표에서는 짝을 이룬 한 쌍으로 표현되었지만, 표에서 언급된 성분들의 특정 범주에 대해 열거된 종점 중 어느 것이든지 성분의 그 범주에 대해 열거된 상응하는 다른 종점 중 어느 것과도 조합되어 성분의 그 범주에 대한 새로운 범위를 형성하는 것은 분명히 예상되는 것이다.

본 발명에 사용된 하나 또는 둘 이상의 다당은 중성 또는 음이온일 수 있는데, 왜냐하면 다당이 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 가지는 단일당 서브유닛을 포함하기 때문이다. 음이온 카르복실레이트 기는 단량체 서브유닛에 부착된 카르복실산의 염이나 원래의 산 그 자체의 형태로 존재할 수 있고, 그로써 생리적 pH에서 쉽게 이온화될 수 있거나 이온화된다는 것이 인지될 것이다. 마찬가지로 단일당 서브유닛의 음이온 술페이트 기는 술폰산 기를 포함하는 단일당의 염과 술페이트의 산 형태를 포함하는 단량체 서브유닛 두 가지를 다 포함한다. 다양한 다당은 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기, 이를테면 카르복실화된 전분, 펙틴 물질, 알긴산염, 카라게난, 또는 겔란을 포함한다.

많은 구체예에서 약제학적 고체 조성물은 하나 또는 둘 이상의 펙틴을 그것의 산 형태나 카르복실산 염의 형태로 포함한다. 바람직한 많은 구체예에서 음이온 다당 및/또는 펙틴은 일가 양이온의 염 형태로 존재하고, 그런 양이온으로는 리튬, 나트륨, 칼륨, 및/또는 암모늄 (NH_4^+) 양이온이 있고, 이것들은 생리적 pH에서 쉽게 물에 녹는 경향이 있다.

펙틴은 람노스 잔기가 중간에 끼어 있는 α-(1→4)-연결된 폴리갈락투론산(Gal A)다당 중합체 골격을 가지고 있다. Gal A 잔기는 당 고리에 부착된 카르복실산 치환기를 가지고 있는데, 그것은 카르복실산, 그것의 염, 또는 그것의 에스테르의 형태일 수 있다. 대부분의 펙틴의 Gal A 함량은 약 70 내지 75 %이고, 람노스 함량은 전형적으로 <2 %이다. 람노스 잔기는 골격에서 Gal A 잔기에 α-(1→2)-로 연결되어 있고, 골격 사슬에서 T-자형 꼬임을 유도하여 다당 사슬에 더 많은 유연성을 유발한다. 중성 당 측쇄는 골격에서 람노스 잔기에 O-3 또는 O-4 위치에서 부착되고, 람노스 잔기는 골격상에서 함께 클러스터를 형성하려는 경향이 있다. 측쇄를 포함하는 영역을 함유하는 이들 람노스는 펙틴의 "구불구불한 영역"으로 언급되는 한편, 반복 부분과 곁가지가 없는 Gal A 잔기의 긴 스트레치는 펙틴의 "매끄러운 영역"으로 언급된다.

당 고리 상의 히드록실 및/또는 카르복실산 치환기는 또한 때로는 메틸 및 아세틸기와 같은 비-당 성분에 결합되기도 한다. 람노스 삽입 및 사슬과 그것의 단량체에 대한 다른 변형의 정도는 펙틴의 식물 공급원에 따라 달라진다. 메틸화는 Gal

A 잔기의 카르복실기에서 일어나므로 카르복실산 메틸 에스테르를 형성한다. 펙틴이라면 메틸화도 또는 메틸에스테르화도 ("DM")는 메탄올로 에스테르화되는 카르복실 기 (Gal A)의 백분율로서 규정된다. DM을 기초로 하여 펙틴은 2개의 부류, 즉 DM이 50 % 미만인 저 메톡실 ("LM") 펙틴과, DM이 50 % 이상인 고 메톡실 ("HM")로 나누어진다. 대부분의 천연 펙틴과 감귤 및 사과로부터 유도되는 시판중인 펙틴은 보통 HM 펙틴이다.

LM 펙틴은 전형적으로 인공 화학적 또는 생화학적 탈-에스테르화 과정을 통해 HM 펙틴으로부터 얻어진다. 시판중인 LM 펙틴은 일반적으로 20 내지 50 %의 DM을 보인다. 완전히 탈-에스테르화된 펙틴은 "펙트산" 또는 "폴리갈락투론산"으로 언급된다. 산 형태의 펙트산은 불용성이지만 염 형태에서는 가용성이다. 펙트산의 통상 염 형태는 나트륨이거나 칼륨이다.

펙틴은 전형적으로 대부분 약 3 내지 4의 산성 pH에서 안정적이다. pH 3 아래에서는 보통 메톡실기와 아세틸 기 및 천연 당 측쇄의 제거가 일어난다. 중성 및 알칼리 조건 하에서는 Gal A 잔기의 메틸 에스테르 기는 카르복실산 또는 카르복실레이트 형태로 사포닌화되는 것으로 알려져 있지만, 폴리갈락투로난 골격 또한 메틸화된 Gal A 잔기의 비-환원 단부상의 글리코시드 결합의 β-제거-절단을 통하여 깨지며, 그 결과 LM 펙틴의 분자량은 보통 그것의 원래 HM 펙틴의 분자량보다 상당히 작아진다. 일단 형성되면 펙트산과 LM 펙틴은 중성 및 알칼리 조건에서 분자량 손실에 대해 상대적으로 더 내성을 보이는데, 왜냐하면 메틸 에스테르기가 단지 제한적으로 존재하거나 거의 없어서 중합체 사슬의 β-제거-절단이 느리게 진행되기 때문이다.

HM 펙틴이나 LM 펙틴 모두 겔을 형성한다. 그러나 이들 겔은 전체적으로 상이한 메커니즘을 통하여 형성된다 (Voragen et al, *In Food polysaccliarides and their applications.* pp 287-339. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995). HM 펙틴은 낮은 pH에서 고농도의 특정 보조-용질 (예컨대 슈크로스)의 존재하에 겔을 형성한다. HM 펙틴은 전형적으로 칼슘 또는 다른 다가 이온과 반응하지 않으므로 LM 펙틴이 그런 것처럼 (아래 참조) 칼슘 겔을 형성하지 않는다. 그러나 특정 HM 펙틴은 블럭식 탈-에스테르화 과정에 의해 칼슘-반응성으로 제조될 수 있으며, 여전히 50 %보다 큰 DM을 가진다. (Christensen et al., 미국 특허 제 6,083,540호 참조).

비-에스테르화된 카르복실산 및/또는 카르복실레이트 기를 다량 가지고 있는 LM 펙틴은 충분한 농도의 칼슘 양이온의 존재하에 겔을 형성하는 것으로 알려져 있다. 칼슘 이온은 Gal A 중합체 서브유닛의 음이온 카르복실레이트 기에 배위결합하는 것으로 여겨지며, 따라서 "칼슘-반응성"인 것으로 알려져 있다. 칼슘-LM 펙틴 겔 네트워크는 Ca^{++}가 폴리갈락투론산 중합체 사슬의 두 개의 상보하는 스트레치를 따라 상보하는 카르복실레이트 기의 배위결합 및 교차결합을 유발하는, 통상 "계란-박스" 결합 조운으로 불리는 것의 형성에 의해 구성되는 것으로 여겨진다. 칼슘-LM 펙틴 겔의 형성은 DM, 이온 강도, pH, 및 펙틴의 분자량을 포함하는 여러 인자에 의해 영향을 받는다 (Garnier et al., Carbohydrate Research 240, 219-232, 1993; 256, 71-81, 1994). 현재 시판중인 LM 펙틴은 전형적으로 7 내지 14×10^4 Da의 분자량과 ~75 %의 Gal A 함량을 갖는다 (Voragen et al, I*n Food polysaccharides and their applications.* pp 287- 339. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995). 전형적인 펙틴은 2 % 미만의 람노스 함량을 갖는다.

펙틴은 주로 음식 산업에서 활용되며 FDA에 의해 "GRAS" (일반적으로 안전한 것으로 간주됨)로 분류된다. 그런 펙틴은 또한 콜로이드상 제제 및 지사제로서 사용되어 왔다. 최근에 펙틴은 의료 장치 분야에서 및 약물 전달 분야에서 사용되었다 (Thakur et al., *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 37,47-73, 1997). 약물 투여의 경우 펙틴은 창자 중에서도 결장에 존재하는 박테리아에 의해 쉽게 분해되기 때문에 약물을 결장에 경구 투여하기 위한 많은 실험용 제형에서 사용되었다. 펙틴은 겔화가 포함되지 않는 직접적인 방식으로 사용되거나, 펙틴 칼슘 겔이 투여 전에 약물 제제를 캡슐화하기 위하여 사전에 형성된다 (Ashford et al., *J Controlled Release* 26, 213-220, 1993; 30,225-232, 1994; Munjeri et al., *J. Controlled Release* 46, 273-278, 1997; Wakerly et al., *J. Pharmacy & Pharmacology* 49, 622-625, 1997; *International Journal of Pharmaceutics* 153, 219-224, 1997; Miyazaki et al., *International Journal of Phartnaceutics* 204, 127-132, 2000).

어떤 구체예에서 펙틴은 약 70 %, 50 %, 30 %, 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 15 %, 14 %, 12 %, 10 %, 9 %, 또는 5 %와 같거나 적은 메틸화도 (DM)를 갖는다. 펙틴의 겔화 성질을 결정하는 데에는 여러 다른 요인도 포함되지만 메틸화도가 낮을수록 전형적으로, 물론 언제나 그런 것은 아니지만, 겔화 성질이 개선된다.

펙틴 물질 또는 펙틴의 분자량은 그것의 겔화 성질에 중요한 요인이며, 분자량이 높을수록 더 좋은 겔화 성질이 유발된다. 펙틴의 겔화에서 분자량의 중요성은 미국 특허 제 5,929,051호에 설명되어 있는데, 그 내용은 펙틴과 알로에 펙틴의 특성에 대한 것이다. 많은 구체예에서 펙틴 물질 또는 펙틴은 약 4.6×10^5 달톤, 또는 약 5.0×10^5 달톤보다 큰 평균 분자량을

가진다. 또는 달리 펙틴 물질 또는 펙틴은 약 2×10^5 달톤, 3×10^5 달톤, 4×10^5 달톤, 6×10^5 달톤, 7×10^5 달톤, 8×10^5 달톤, 또는 9×10^5 달톤과 같거나 작은 평균 분자량을 가질 수 있다. 어떤 구체예에서 펙틴 물질 또는 펙틴은 1×10^5 달톤보다 큰 분자량과 10 % 미만의 메틸화도를 갖는다.

본 발명의 어떤 바람직한 펙틴, 예컨대 DelSite Biotechnologies Inc.로부터 구매할 수 있는 알로에 펙틴, 및/또는 그것의 수용성 일가 양이온 염은 0.5 % (w/v) LM 펙틴과 30 내지 60 mg/g Ca^{++}로 단단하고 복원력이 좋은 겔을 형성할 수 있다.

본 발명의 고체 조성물은 소량의 물, 특히 펙틴을 포함하는 물을 포함할 수 있으며, 펙틴으로 흡수된 잔류하는 물을 함유하려는 경향이 있다. 그러므로 본 발명의 고체 조성물은 약 20 중량 %의 물, 또는 약 15 %, 12 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 또는 그 이하의 물을 포함할 수 있다. 물에 대해 상술된 어떤 백분율에서든지 입자는 입자의 표면에 과잉으로 자유롭게 흐르는 액체 또는 수분이 없으므로 분말 형태에서 고체의 자유 흐름을 상당히 방해할 유의할만한 끈적거림을 유발한다는 점에서 입자는 보통 "건조하다"고 설명될 수 있다. 본 발명의 어떤 구체예에서는 생리적 활성 제제의 보관 중 안정성을 개선하거나, 고체의 물리적 특성을 개선하기 위해서는 물 중량 %가 낮을수록 바람직하다.

활성 제제

본 발명의 조성물 (고체 또는 액체)은 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제를 포함할 수 있으며, 생리적 활성 제제는 다른 곳에서 정의된 것과 같은 의미이다. 어떤 구체예에서 생리적 활성 제제는 치료제, 진단제, 탄수화물, 지질, 펩티드, 핵산, 살아있는 세포, 전체 또는 일부분의 죽은 세포, 전체 또는 일부분의 미생물, 전체 또는 일부분의 바이러스, 백신, 항원 및 단백질을 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 작은 분자 약물과 같은 치료제를 포함할 수 있다. 많은 구체예에서 본 발명의 조성물은 분자, 세포, 바이러스, 항원 등을 포함하여 더 큰 생물학적 제제를 광범위하게 포함할 수 있다.

어떤 바람직한 구체예에서 생리적 활성 제제는 백신 제조를 위한 항원, 이를테면 펩티드, 단백질, 살아있는 세포, 전체 또는 일부분의 죽은 세포, 전체 또는 일부분의 바이러스, 비활성화된 미생물 또는 바이러스, 살아있으나 기능이 약화된 미생물 또는 바이러스, 파지, 백신 단백질 서브유닛, 백신 펩티드 서브유닛, 백신 탄수화물 서브유닛, 레플리콘, 바이러스 벡터, 플라스미드, 및 다른 면역활성 유전 물질 및 재조합 물질, 또는 이것들의 혼합물이다. 어떤 구체예에서 하나 또는 둘 이상의 항원은 인플루엔자, 디프테리아, 파상풍, 및 백일해, SARS, AIDS, 콜레라, 세균성 이질, 뇌막염, 플라크, 간염, 뎅그열, 황열병, 뇌염, 말라리아, 포진, 홍역, 장티푸스, 결핵, 발진티푸스, 중이염, 탄저병에 대한 항원들 또는 그것들의 혼합물로부터 독립적으로 선택된다.

어떤 구체예에서 하나 또는 둘 이상의 항원은 인플루엔자에 대한 항원 또는 그것들의 혼합물, 예컨대 하나 또는 둘 이상의 비활성화된 또는 약화된 인플루엔자 바이러스 (전체 비리온) 또는 그것의 서브유닛 (스플릿 비리온, 서브비리온), 예컨대 하나 또는 둘 이상의 바이러스 막 당단백질, 예컨대 헤마글루티닌 (HA) 또는 뉴라미니다제 (NA), 또는 뉴클레오캡시드 단백질과 같은 바이러스 내부 단백질, 또는 그것들의 혼합물이다. 최근에는 스플릿 서브비리온과 서브유닛 항원이 인플루엔자에 대한 백신 제조에 가장 널리 사용된다. 전형적으로 과거에 계획된 집단에서 배양된 둘 또는 세 개의 바이러스 스트레인의 대표적인 인플루엔자 바이러스는 달걀의 배에서 성장되고 요막 유체로부터 수득되거나, 또는 MDCK (Madian-Darby 개 신장) 세포와 같은 특정 동물 세포에서 성장된 후 포름알데히드와 같은 화학 제제로 비활성화되고, 정제되어 정제된 전체 바이러스가 수득된다. 전체 비활성화된 또는 약화된 바이러스는 전체 비리온 백신의 제조에 사용될 수 있고, 또는 정제된 바이러스는 화학약품에 의해 파괴되어 막단백질 HA 및 NA와 같은 하위성분과 공지되어 있는 그것들의 다양한 하위유형들로 분리될 수 있고, 그런 다음 단백질 항원이 추가로 정제될 수 있다. 그런 다음 하나 또는 둘 이상의 스트레인으로부터 얻어지는 항원이 조합되어 최종 백신이 제조된다.

많은 서브비리온 인플루엔자 백신에 대한 인플루엔자 백신의 1회 분량은 때로 HA 함량을 토대로 제형된다. 바람직하게는 인플루엔자에 대한 하나 또는 둘 이상의 항원은 포유류 또는 사람에게서 ≥40의 적혈구 응집 억제 (HAI)를 유도할 수 있는 양으로 조성물에 존재하거나 및/또는 환자에게 투여된다. 코에 투여하기 위한 분말 인플루엔자 백신 조성물은 전형적으로, 단위 투여를 위해 분말 1회 분량 당 3개의 현재 사용되는 바이러스 스트레인 각각으로부터 유도된 HA를 약 5 내지 50 μg 함유하도록 제형될 것이다.

단백질 및 다른 생물학적 물질을 토대로 한 백신 항원 및 다른 약리학적 활성 제제는 때로, 다른 인공 약물 또는 치료제보다 상당히 낮은 농도로, 예를 들면 마이크로그램 수준으로 본 발명의 조성물에 존재하거나 본 발명의 방법을 통해 투여된다. 동물에게서 의학적으로 허용되는 면역성 수준을 유도하기 위해 필요한 백신 항원의 양은 물론 동물의 종과 체중, 및 포

유류 및/또는 개체의 특정 유형의 면역 시스템 특성에 따라 다를 것이다. 그러나 예를 들면 하나 또는 둘 이상의 항원은 조성물 중에 조성물의 약 0.001 중량 % 내지 약 10 중량 %, 또는 약 0.01 중량 % 내지 약 1 중량 %, 또는 약 0.05 중량 % 내지 약 0.5 중량 %의 양으로 존재할 것이다.

본 발명에 사용된 생물학적 제제는 보관중에나 적용되는 동안 및 적용된 후에 다른 물질에 비해 상당히 덜 안정적인 경향이 있다. 본 발명의 조성물은 그런 생물학적 제제의 안정화 및 보관의 견지에서 예상외로 월등할 수 있다. 특히 적절한 겔화 다당, 특히 펙틴과 혼합되고, 고체를 형성하기 위해 건조될 때, 고체 조성물 중의 다당 및 다른 담체 및/또는 부형제의 극성 특성, 및 고체 조성물의 낮은 물 함량은, 그렇지 않다면 실온에서, 또는 심지어는 저온 보관 조건하에서 보관되는 수용액 중에서 불안정할 생체 분자의 보관 수명을 상당히 연장시킬 수 있다. 더욱이 조직이나 체액에 적용된 후 일단 인 시츄 겔에 혼입된 후에는 큰 생물학적 제제는 다당 매트릭스에 의해 안정화되려는 경향이 있고, 보다 작은 화합물보다는 겔로부터 더 느리게 방출되려는 경향이 있어서 고도의 생체내 활용성이 이루어지면서도 원하는 느린 방출 속도를 얻을 수 있다. 본 발명의 조성물의 이런 바람직한 특성은 특히 백신 및 관련 항원의 투여에 중요하다.

다른 측면으로 본 발명은 생리적 활성 제제를 동물에게 투여하는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 다음 성분들:

a) 동물에게서 생리적 반응을 유도하기에 유효한 양의 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제;

b) 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 가지는 서브유닛을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 다당; 및

c) 2가 또는 다가의 금속 양이온의 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 고체 겔 유도 조성물을 어떠한 순서 또는 조합으로 동물의 조직 또는 체액에 투여하여 동물의 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성하는 것으로 이루어진다.

이 구체예에서나 본 발명의 고체 조성물을 사용하는 다른 구체예에서, 하나 또는 둘 이상의 약제학적으로 허용되는 2가 또는 다가 금속 양이온의 염을 포함하는 고체 겔 유도 조성물은 임의로 생리적 활성 제제 및/또는 다른 고체 부형제의 존재하에 또는 그것들과의 혼합물에서 화학적으로 구별되는 고체 상으로서 존재할 수 있다. 그런 고체 겔 유도 조성물의 목적은 적용 부위에서 조직 또는 체액으로부터 활용할 수 있는 인 시츄 양이온을 보충하기 위하여 겔-유도 2가 또는 다가 양이온의 보조적인 "외래" 고체 공급원을 제공함으로써, 겔 형성의 속도 및/또는 효율을 유도 및/또는 개선하는 것이다.

고체 겔-유도 조성물의 2가 또는 다가 양이온은 일반적으로 2가 또는 다가 양이온의 약제학적으로 허용되는 염의 형태로 존재하며, 그로써 체액과 접촉할 때 음이온 중합체의 겔화를 위해 필요한 2가 또는 다가 양이온의 보조 공급원을 제공함으로써, 인접한 다당 사슬의 음이온 기와 신속하고도 효율적으로 교차결합하여 겔화되는 경향이 원하는 만큼 개선되거나 겔 형성에 필요한 음이온 다당의 농도가 감소한다. 약제학적으로 허용되는 칼슘 및 알루미늄 염이 고체 겔 유도 조성물의 일부분으로서 사용하기에 바람직한 염이다.

어떤 구체예에서 2가 또는 다가 양이온의 약제학적으로 허용되는 염은 물, 식염수, 또는 혈청 또는 점막 분비물과 같은 체액에 쉽게 녹을 수 있다. 체액과 접촉할 때 2가 또는 다가 양이온의 가용성 약제학적으로 허용되는 염은 빠르게 녹아서 양이온을 수성 매질 안으로 유리시키고, 펙틴과 같은 음이온 다당과 접촉하는 용액 안으로 빠르게 확산되며, 음이온 기와 배위결합하여 음이온 다당과 교차결합하게 된다. 그런 쉽게 녹는 2가 또는 다가 양이온의 염의 실례로는 칼슘 할로겐화물, 특히 염화 칼슘이 있다.

다른 구체예에서 2가 또는 다가 양이온의 약제학적으로 허용되는 염은 생체 유체의 수성 환경에서는 거의 녹지 않거나, 체액에서 Merck Index의 명명에서 보는 것처럼 "실제로 불용성"이다. 바람직하게는 그런 난용성 2가 또는 다가 양이온의 약제학적으로 허용되는 염은 주변 온도 및 생리적 pH에서 물에 녹지 않을 것이고, 따라서 염의 리터 당 5×10^{-3}몰 이하, 또는 보다 바람직하게는 난용성 염의 리터 당 1×10^{-5} 몰 이하의 용액을 형성할 것이다. 난용성 2가 또는 다가 양이온의 약제학적으로 허용되는 염의 실례로는 인산 칼슘과 수산화 알루미늄이 있다.

그런 난용성 2가 또는 다가 양이온의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 본 발명의 조성물에서 음이온 다당은 난용성 염의 고체 입자 표면으로 확산하여, 입자의 표면에서 2가 또는 다가 양이온과 반응할 수 있어서 겔이 고체 겔 유도 조성물의 입자 표면에서 형성되기 쉽다. 그러므로 고체 겔 유도 조성물을 포함하는 것은, 거기에 고체 겔 유도 조성물의 수많은 입자가 포함된 조직 표면 또는 점막에서 생리적 활성 제제를 포함하는 음이온 다당의 겔화된 응집체의 형성을 유도하는 경

향을 띄게 한다. 그런 겔화된 응집체는 고체 겔 유도 조성물을 포함하지 않은 조성물과 비교할 때 월등한 생체내 점착성을 제공할 수 있고, 2가 또는 다가 양이온의 정상 농도보다 높은 농도로 존재하는 양이온 때문에 겔의 용해에 대해 더 내성적이고, 그것은 그런 겔에 캡슐화된 생리적 활성 제제를 예상외로 서서히 그리고 월등하게 전달할 수 있다.

상술된 방법에서, 성분 a, b 및 c는 성분 c가 고체로서 투여되고, 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔이 형성되기만 한다면 어떠한 순서, 조합 또는 물리적 형태로도 투여될 수 있다. 그 방법의 어떤 구체예에서 성분 a, b 및 c는 분말 조성물의 성분으로서 투여되는데, 이때 성분들은 하나 또는 둘 이상의 고체 상의 물리적 혼합물 형태로 존재할 수 있다. 어떤 구체예에서 고체 성분 c는 분말 입자를 포함하는 구별되는 고체 상으로서 존재하는 한편, 다른 구체예에서 고체 성분 c는 또한 생리적 활성 제제와 분자 수준의 혼합물로서 존재할 수 있다.

어떤 구체예에서 성분 a와 b는 별도의 또는 혼합된 분말로서 투여되는 한편, 성분 c는 상이하고 화학적으로 구별되는 고체 상으로 존재한다. 예를 들어 성분 a와 b는 성분 a를 포함하는 하나 또는 둘 이상의 분말과 성분 b를 포함하는 하나 또는 둘 이상의 분말의 물리적 혼합물로서 투여되고, 그것은 성분 c와는 별도로 또는 함께 투여될 수 있다.

바람직한 어떤 구체예에서 성분 a와 b는 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제와 하나 또는 둘 이상의 다당을 액체 담체에 녹인 후, 충분한 액체 담체를 제거하여 고체 혼합 조성물을 형성함으로써 제조된 고체 조성물로서 투여되는데, 그때 제제와 다당은 분자 수준으로 친밀하게 혼합된다. 성분 c는 고체 혼합 조성물의 투여 전, 동시에, 또는 후에 투여될 수 있으며, 통상 분말 형태로 투여된다.

상술된 바와 같이 본 발명의 어떤 구체예는 동물 및/또는 사람에게 백신 및/또는 항원을 투여하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 그러므로 어떤 구체예에서 본 발명은 동물의 코 점막에 백신을 투여하는 방법에 관한 것이고, 그 방법은

a) i) 조성물이 동물의 점막과 접촉할 때 겔을 형성하기에 유효한 양의, 음이온 카르복실레이트 또는 술페이트 기를 가지는 서브유닛을 포함하는 하나 또는 둘 이상의 다당;

ii) 펩티드, 단백질, 핵산, 살아있는 세포, 죽은 세포 또는 그것의 일부, 또는 바이러스로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 동물에게서 활발한 면역 반응을 유도할 수 있는 양의 하나 또는 둘 이상의 항원을 별도로 또는 함께 포함하는 미소구 또는 미소입자를 포함하는 하나 또는 둘 이상의 분말을 제조하는 단계; 및

b) 그 분말을 동물의 코 조직 및/또는 코 유체에 투여하여 조직 또는 체액과 접촉할 때 겔을 형성하는 단계, 그리고

c) 동물에게서 하나 또는 둘 이상의 항원에 대한 활발한 면역 반응을 유도하는 단계로 이루어진다.

액체 조성물

다른 어떤 구체예에서 성분 a와 b는 액체 담체 중의 용액으로서 투여되는 한편, 성분 c는 별도의 고체로서 투여된다.

다른 구체예에서 본 발명은 생리적 활성 제제를 동물에게 지속적으로 방출하기 위한 방법에 관한 것으로, 그 방법은

a) i) 액체 담체,

ii) 메틸화도가 30 % 미만이고 평균 분자량이 4.6×10^5 달톤보다 크며, 동물의 조직 또는 체액에 적용될 때 액체 용액 또는 분산액이 겔화되기에 효과적인 양의 펙틴 물질, 및

iii) 하나 또는 둘 이상의 생리적 활성 제제를 포함하는 액체 용액 또는 분산액을 제조하는 단계; 그리고

b) 액체 용액 또는 분산액을 동물의 조직 또는 체액에 적용하여 조직과 접촉할 때 생리적 활성 제제를 포함하는 겔을 형성하는 단계로 이루어진다.

액체 조성물을 적용하는 상기 방법의 어떤 구체예에서 펙틴 물질은 알로에 펙틴일 수 있으며, 그것의 유익한 특성에 대해서는 이미 설명된 바 있다. 액체 조성물을 적용하는 상기 방법의 관련된 구체예에서 생리적 활성 제제는 생물학적 제제, 예컨대 펩티드, 단백질, 항원, 백신, 살아있는 세포, 전체 또는 일부분의 죽은 세포, 전체 또는 일부분의 바이러스이다. 관련된 구체예에서 조직 또는 체액은 코의 점막을 포함한 점막일 수 있다.

액체 조성물을 적용하는 상기 방법에서, 조성물은 특정 제제로 변형되어 그것의 보관 특성이 개선될 수 있다. 하기 실시예 25 및 명세서의 다른 부분에서 설명되는 것과 같이, 염화 나트륨 및/또는 염화 암모늄과 같은 일가 양이온의 염, 또는 인산염 완충제와 같은 완충제가 생리적 pH, 및 이온 강도의 용액을 제공하기 위해 액체 조성물에 첨가될 수 있다. 더욱이 그런 용액은 먼저 보관 후 생리적 활성 제제를 적용하기 위해 사용될 때 예상외의 월등한 성질을 나타낸다. 만약 NaCl 또는 NH_4Cl이 적절한 농도로 펙틴과 제제를 포함하는 액체 용액에 첨가된다면, 용액은 냉장보관될 때 (약 4℃에서) 가역적으로 겔을 형성할 수 있다. 그렇게 형성된 겔은 민감한 생물학적 활성 제제를 침전 및/또는 파괴로부터 안정화하고 보호할 수 있다. 조성물이 동물 또는 사람에게 투여되기 위해 보관된 상태로부터 벗어날 때 겔은 녹아서 주사에 의해 점막 등에 투여하기에 적당한 맑고 침전이 없는 용액이 된다.

더욱이 소량의 2가 양이온의 염이, 하기 실시예 24에서 설명되는 것처럼 액체 용액을 겔화시키는 일 없이 액체 용액에 첨가될 수 있으며, 변형된 용액이 조직이나 체액에 적용될 때 인 시츄 겔화가 증대되는 장점이 있다.

또한 액체 용액은 본원의 다른 곳에서 설명되는 다른 농축제 및/또는 부형제를 포함할 수 있다.

백신의 코 투여는 특히 관심을 끄는데, 그것은 그런 투여가 유발하는 많은 장점 때문이다. 코 투여는 전형적으로 주사에 따르는 불편함과 비용을 피할 수 있고, 또한 대체로 민감한 항원에 미치는 소화관의 산과 효소의 파괴적 영향을 피할 수 있다. 또한 신체가 뚜렷한 전신성 및 점막 면역 시스템을 유지한다는 것과, 점막 면역 시스템이 많은 전염성 질병의 부정적 영향을 이겨내는 데 매우 중요하다는 것이 알려져 있다. 많은 경우에 항원의 코 투여는 전신성 및 점막 면역 시스템 둘 다의 면역 반응을 자극할 수 있다. 그럼에도 불구하고 백신의 코 투여는 도전해볼만한 것인데, 왜냐하면 코의 점막이 그 자체가 신속하게 재생하고 매우 짧은 시간 동안에 이물질을 제거하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 그러므로 많은 선행 기술에서 백신의 코 투여는 코 점막으로부터 백신 조성물이 빠르게 제거되어, 특히 단백질과 같이 고분자량 및 고도로 극성을 띄는 항원의 경우에, 동물에게서 원하는 수준의 면역 반응을 효율적으로 유도하기에는 시간과 접촉이 모두 불충분하게 유지되는 바람에 치료적 성공을 거두지 못하였다.

본 발명은 코의 점막에 점착하는 항원을 포함하는 인 시츄 겔을 형성하는 조성물을 제공함으로써 선행 기술의 문제점들을 예상외로 극복하고, 백신의 항원 성분에 대하여 연장된 체재 시간을 제공하는 조성물 및 그런 조성물의 투여 방법을 제공한다. (실시예 26 및 도 10 참조). 실시예 22 및 도 8에서 알 수 있는 바와 같이, 그 결과는 동물에게서 나타난 활발한 면역 반응의 기대 밖의 개선되고 월등한 유도이다.

많은 구체예에서 백신 및/또는 항원을 동물의 코 점막에 투여한 후에 동물의 면역 반응은, 다당을 포함하지 않은 대조 조성물을 투여한 대조 실험에서 얻어진 IgA 수준과 비교할 때 동물의 폐 세척물에서 얻어진 IgA 수준에 의해 측정된 바, 약 10 % 이상 증가할 수 있다. 바람직하게도, 동물의 면역 반응은 다당을 포함하지 않은 대조 조성물을 투여한 대조 실험에서 얻어진 IgA 수준과 비교할 때 동물의 폐 세척물에서 얻어진 IgA 수준에 의해 측정된 바, 약 25 % 이상, 50 % 이상, 75 % 이상, 100 % 이상, 150 % 이상, 또는 200 % 이상 증가할 것이다.

겔 형성 이온 중합체를 포함한 분말 제형의 한 가지 독특한 장점은 투여 후에 일관된 겔 형성을 보장하기 위해 건조된 겔-유도 제제와 분말 제형을 혼합할 수 있는 능력인 것이 사실이다. 그러므로 건조된 분말로서 제조된 겔 유도제는 분말 제형에 첨가될 수 있다. 유도제는 건조 상태이기 때문에 투여 또는 수화 전에는 겔 형성이 일어나지 않을 것이다. 투여된 후에는 겔 유도제는 용해되고, 그로써 겔화 이온 중합체와의 상호작용을 통해 제형 분말 입자의 겔화가 촉진된다.

펙틴, 알긴산염, 및 폴리포스파젠과 같은 중합체에 대해 겔-유도제는 다양한 2+ , 3+ 및 다른 다가 금속 이온일 수 있다. 이들 이온의 실례로는 칼슘, 아연, 마그네슘, 철, 및 알루미늄이다. 그것들은 그 자체로서 또는 부형제의 존재하에 분말로서 제조될 수 잇다. 유도제 분말 입자 밀도 및 크기는 일관되고 균일한 방식으로 활성 제제 제형 분말과 혼합될 수 있도록 조정될 수 있다.

부형제 및 보조제

또한 약제학적으로 허용되는 다른 군의 부형제, 이를테면 결합제, 충전제 또는 벌크화제, 윤활제, 풍미제, 및 맛 차단제가 사용될 수 있다. 결합제는 자유롭고 빛나는 분말을 생성하기 위해 사용되고, 충전제는 분말 부피를 증가시키기 위해 사용되며, 윤활제는 분말의 유동을 증가시키기 위해 사용되고, 맛-차단제는 의약의 불쾌한 맛을 감소시키기 위해 사용된다.

약제학적으로 허용되는 부형제의 바람직한 한 종류는 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당, 또는 그것들의 혼합물, 또는 알킬화된, 히드록시알킬화된, 또는 아실화된 그것들의 유도체이다. 그런 단일- 또는 2-당은 전형적으로 비-독성이고 및/또는 "일반적으로 안전한 것으로 인정된" 것으로서 분류되며, 물 또는 생체 유체에 쉽게 녹고, 비싸지 않다. 그런 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당의 실례로는 리보스, 아라비노스, 크실로스, 프룩토스, 글루코스, 람노스, 글루코사민, 갈락토사민, 글루콘산, 글루쿠론산, 갈락토스, 만노스, 락토스, 슈크로스, 말토스, 크실리톨, 만니톨, 및 트레할로스이다. 약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당의 바람직한 하위부류는 프룩토스, 글루코스, 만노스, 락토스, 슈크로스, 말토스, 만니톨, 및 트레할로스이다. 락토스, 특히 단일수화물 형태의 락토스가 바람직한 부형제이다.

약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당은 어떠한 농도로도 존재할 수 있지만, 어떤 구체예에서는 상대적으로 높은 농도, 즉 조성물의 약 10.0 내지 약 99.9 중량 %, 또는 바람직하게는 약 30 내지 약 99.5 중량 %, 또는 약 50 내지 약 99.5 중량 %, 또는 약 80 내지 약 99.5 중량 %로 존재한다. 단일- 또는 2-당이 고체 조성물에 상대적으로 높은 농도로 존재할 때 그 결과의 입자 분말의 입자는 체액과 접촉할 때 조성물이 겔화되기 전에 점막을 부분적으로 녹이거나 부분적으로 분해시키는 경향이 있을 수 있다. 단일- 또는 2-당은 빠르게 녹거나 흡수되어 활성 제제 및/또는 펙틴 또는 다른 음이온 다당의 점성의 농축된 생체점착성 겔 잔기가 형성되어 점막과 같은 생체 표면에 골고루 분산되고 점착되기 쉽다.

본 발명의 조성물에서 상술된 단일- 또는 2-당의 부형제로서의 용도는 특히 저농도로 투여되는 백신 항원 및 다른 생물학적 활성 제제의 코 투여를 위한 미소입자/미소구 분말 제형의 형성의 맥락에서 유익할 수 있다. 단일- 또는 2-당의 부형제, 희석제, 및/또는 벌크화제로서의 존재는, 입자가 조성물이 흡입이나 유사한 기법에 의해 투여될 때 대부분의 입자가 코 점막에 침착된 결과인 크기 범위인 것으로 알려져 있는 10 내지 250 미크론 크기 범위의 상대적으로 큰 입자로서 제조되는 것을 가능하게 하지만, 단시간 내에 단일- 또는 2-당은 용해되거나 및/또는 흡수되어 코 점막에 골고루 분산되고 및/또는 점착되는 생리적 활성 제제를 포함하는 점성의 농축된 점막-점착성 인 시츄 겔 잔기가 형성된다.

약제학적으로 허용되는 단일- 또는 2-당은 고체 제형에서 특히 바람직한 부형제인데, 이 제형에서 단일- 또는 2-당은 약리학적 활성 제제, 특히 생약학적 제제, 예컨대 일반적으로는 다소 불안정하고 저농도로 투여되는 펩티드, 단백질, 항원 등을 위한 수용성 희석제 및/또는 안정화제를 쉽게 형성할 수 있다.

본 발명의 조성물은 또한 하나 또는 둘 이상의 추가의 약제학적으로 허용되는 보조제 또는 흡수 촉진제, 또는 그것들의 혼합물을 포함할 수 있다. 보조제는 주요 약리학적 활성 제제의 효능 또는 활성을 개선하거나 그것에 기여하는 제형 중의 첨가제이다. 백신 조성물과 관련하여 보조제는 환자에게서 백신 항원에 대해 생성된 면역 반응을 개선한다. 어떤 구체예에서 본 발명의 백신 조성물은 리포다당, 대장균 열 불안정성 장독소 (LT), 콜레라 독소 (CT), 모노포스포릴리피드 A (MPL), 사포닌, 시토신 인산염 구아노신 (CpG), 사이토킨 또는 그것들의 유도체, 알루미늄 염, 칼슘 포스페이트, 칼슘 카보네이트, 또는 그것들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 백신 보조제를 포함한다.

약리학적 활성 제제의 점막 및 특히 코 점막에의 투여의 관점에서, 하나 또는 둘 이상의 흡수 촉진제를 포함하는 것은 점막, 세포막, 또는 세포간 결합부에 작용하여 활성 제제의 흡수를 개선하는 작용을 한다. 본 발명의 조성물의 점막 투여와 관련하여, 적당한 흡수 촉진제로는 계면활성제, 점액 용해제, 단백질 또는 핵산 분해 효소 억제제, 킬레이트화제 (예컨대 EGTA, EDTA), 아실 글리세롤, 지방산 및 염, 틸록사폴, 살리실산염, 담즙염 및 유사체 및 푸시데이트(fusidate), 또는 그것들의 혼합물이 있다.

<u>알로에 펙틴</u>

알로에 펙틴은 최근 미국 특허 제 5,929,051호에서 설명된 것처럼 알로에 베라 식물에서 분리된다. 알로에 펙틴은 천연적인 LM 펙틴이고 칼슘 겔화될 수 있다. 또한 알로에 펙틴은 특히 겔화와 관련된 여러 가지 독특한 성질, 이를테면 고분자량 ($> 1\times10^6$ Da), 높은 Gal A 함량 (> 75 %, 80 %, 85 %, 및 많은 경우 > 90 %), 및 저 DM (< 10 %)을 나타낸다. 10 % 미만의 DM 때문에 알로에 펙틴은 거의 펙트산이 되지만, 하기 실시예 27 및 표 8에서 알 수 있는 것과 같이 시판되는 다른 저 DM 펙틴 및 펙트산보다 상당히 더 큰 분자량을 가지고 있다. 알로에 펙틴은 또한 그것의 높은 Gal A 함량 때문에 다른 펙틴에 비교하여 중합체 내의 카르복실레이트 기의 백분율이 상당히 더 높다. 알로에 펙틴은 또한 대체로 다당 골격, 및 다른 펙틴의 약 2 %와 비교하여 > 3 % 또는 4 %보다 더 많을 수 있는 높은 람노스 함량의 결과로서 보기 드문 유연성을 나타내는 중합체 골격의 분지화 정도가 바람직하게 높다. 그런 저 DM, 고분자량, 및 높은 Gal A 및 람노스 함량을 가지는 펙틴은 미국 특허 제 5,929,051호에서는 설명되지 않았었다. 최근에 약제학적으로 활용하기에 적절한 순도로 시판되기 시작한 알

로에 펙틴은 백색에 가까운 분말이고, 최종 시판 제품으로서 물에 완전히 녹을 수 있는 반면, 이전에 시판되는 및/또는 실험용 LM 펙틴은 노란색 내지 황갈색 분말로 불용성 물질을 상당량 함유하며, 그로써 약제학에 활용하기에는 바람직하지 않다.

알로에 베라 잎은 2 부분, 즉 바깥의 녹색 외피와 펄프라고도 언급되는 투명한 내부 겔로 구성된다. 알로에 펙틴은 내부 겔 또는 바깥 외피 세포벽 섬유질로부터 추출된다. 약알칼리 pH에서 킬레이트화제를 사용하는 것이 가장 효율적인 추출법인 것으로 밝혀졌다. 알로에 펙틴은 이전에 설명된 펙틴에 비교하여 독특하다. 그것은 정제된 펙틴 제제로 4 % 보다 큰 람노스 함량을 가지는데, 그것은 감귤, 사과, 당밀, 및 해바라기와 같은 다른 펙틴에서 보이는 것보다 최소한 2배 더 많은 양이다. 람노스는 그것의 함량이 분자의 유연성에 영향을 미치는 펙틴 골격의 핵심 당이다. 알로에 펙틴은 또한 다른 어떠한 펙틴에서도 찾아볼 수 없는 희귀당인 3-OMe-람노스를 가지고 있다. 알로에 펙틴은 천연 LM으로, 대체로 30 % 미만의 DM을 가지며, DM은 10 % 미만 정도로 낮을 수도 있다. 알로에 펙틴의 Gal A 함량은 70 % 이상이며 90 % 이상으로까지 높을 수도 있다. 알로에 펙틴은 칼슘의 존재하에 겔을 형성할 수 있다. 일가 양이온, 예컨대 나트륨, 칼륨 및 리튬이 겔 형성을 가속화한다.

알로에 펙틴은 아래와 같은 특성 중 하나 또는 그 이상에 의해 다른 펙틴과 구별된다:

1. 고분자량 (> 1×10^6 Da) 및 높은 고유 점도 (> 550 ml/g);

2. 높은 람노스 함량 (> 4 %);

3. 높은 갈락투론산 함량 (> 99 %);

4. 3-OMe-람노스의 함유;

5. DM이 10 % 미만 정도로 낮은 천연 LM이라는 점;

6. 칼슘 겔 형성 능력;

7. 저온 (4 ℃)에서 일가 양이온-기초 겔을 형성할 수 있는 능력.

본 발명자들은 투여 경로로서 신체에 주사함으로써 또는 상처 표면에 국소적으로 적용함으로써, 겔화되지 않은 액체 펙틴이 투여 부위에서 인 시츄 겔을 형성할 수 있는 것을 발견하였다. 인 시츄 겔은 시험관내에서 형성된 칼슘 겔처럼 단단하고 흐르지 않는 것으로, 점성을 나타내지만 여전히 흐르는 용액인 하이드로겔과는 구별된다. 알로에 펙틴의 인 시츄 겔화는 단단한 고체 인 시츄 겔을 형성하는 데 필요한 최소 알로에 펙틴 농도가 2.5 mg/ml 또는 0.25 % (w/v)정도로 낮고, 심지어 농축제가 첨가된다면 더 낮아질 수도 있다는 점에서 특히 효율적인 것으로 밝혀졌다.

또한 일가 양이온 겔 형성 능력은 생리적 pH 및 이온 강도에서 냉장될 때 가역적으로 겔화될 나트륨 및/또는 암모늄 클로라이드를 포함하는 민감한 생체 분자를 포함하는 조성물을 제조하여, 민감한 생물학적 제제를 안정화시킬 수 있는 겔을 형성하는데 유리하게 사용될 수 있다. 그렇게 제형된 겔은 그 다음에 실온으로 복귀될 때 재용해되어 하기 실시예 25에서 설명되는 것처럼, 맑고 침전이 없는 액체 약제학적 조성물을 형성한다. 그러면 재용해된 용액은 다양한 투여 방법에 의해 조직 또는 체액에 적용되어 인 시츄 겔을 형성할 수 있다.

겔 조성물은 등장성을 가지도록 제조될 수 있고, 포유류의 체액, 예컨대 눈물의 pH로 조정될 수 있다. 그런 체액의 pH 및 삼투압은 각각 7.4 및 29 mOsm/kg이다. 약리학적 활성 의약을 원하는 pH 및 삼투압 조건, 예컨대 체액의 pH 및 삼투압과 일치하는 조건하에서 약리학적 치료를 필요로 하는 포유류 신체 부위에 전달하는 것이 유익하다. 임의로, 본 발명의 약제학적 조성물은 멸균 상태로 제공될 수 있다.

어떠한 이론에 의해 구속되는 걸 원하지는 않지만, 펙틴의 인 시츄 겔 형성은 주로 체액 중의 칼슘에 의해 조절되는 것으로 여겨진다. 혈액의 칼슘 농도는 8.5 내지 10.3 mEq/dl이다. 펙틴의 칼슘 겔화는 또한 체액의 기본 성분인 NaCl의 존재하에 증대된다. 혈액 중의 NaCl은 134 mEq/L이다.

인 시츄 겔은 또한 다양한 제제, 이를테면 작은 유기 화합물, 단백질, 핵산, 살아있는 세포, 및 피하 주사에 따른 다른 중합체의 존재 하에 형성되며, 그것은 펙틴이 광범위한 제제를 캡슐화된 형태나 트랩된 형태로 전달할 수 있는 능력을 증명한

다. 난용성 화합물, 예컨대 실바덴(silvaden)과 같은 화합물이 혼입되었을 때에도 인 시츄 겔은 여전히 형성된다. 일단 투여되면 펙틴 인 시츄 겔은 분명히 느린 방출 효과를 나타낸다. 그것은 작은 유기 모델 화합물 (패스트 그린, fast green)을 사용한 생체내 조건뿐 아니라 시험관내 조건에서도 증명되었다. 또한 bFGF가 펙틴 인 시츄 겔과 함께 투여될 때 겔 주변에 상당히 증가된 세포 증식이 관찰되었다.

알로에 펙틴은 인 시츄 겔화를 위해 현재 시판중인 펙틴, 이를테면 LM 펙틴, 및 폴리갈락투론산, 및 아미드화된 LM 펙틴보다 더 효과적이다. 적절하게 형성된 인 시츄 겔은 시판중인 폴리갈락투론산 또는 LM 펙틴을 알로에 펙틴보다 10배 더 높은 농도로 사용했을 때에만 얻어졌다. 현재 시판중인 LM 펙틴 및 폴리갈락투론산은 낮은 Gal A 함량 (~ 75 %), 훨씬 더 낮은 분자량 (7 내지 14×10^4 Da) 및 15 내지 50 %의 DM을 갖는다. 칼슘 겔을 형성할 수 있는 다른 중합체도 있다. 한 실례가 알긴산염이다. 그러나 알긴산염은 전에는 시험된 농도에서 적절하게 규정되는 인 시츄 겔을 형성할 수 있을 것으로 여겨지지 않았다. 알긴산염은 글루론산 (G)과 마누론산 (M)으로 구성되는 다당 블록 공중합체이다 (Moe et al., *In Food polysaccharides and their applications.* pp 287-339. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995). 알긴산염의 이들 두 잔기는 G-블록, M-블록으로서, 또는 달리 MG-블록으로서 존재한다. 단지 G-블록만이 칼슘 겔화에 기여한다. 총 G 함량은 공급원에 따라 크게 달라지는데, 가장 높은 G 함량은 약 70 %이다. 또한 알긴산염 칼슘 겔화는 생리적 유체에서 존재하는 NaCl의 존재에 의해 억제된다.

다른 여러 중합체가 또한 인 시츄 겔화를 일으킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나 그것들 대부분은 인 시츄 겔 형성을 위해서는 높은 중합체 농도 (> 20 %)를 필요로 한다 (폴록사머, PEO-PLLA 이중블록 공중합체, PEG-PLGA-PEG 삼중블록 공중합체, 셀룰로스 및 아세토프탈레이트 라텍스). 이들 중합체 중 일부, 예컨대 폴록사머는 생체내에서 분해되지 않으며, 투여 전에 (PEO-PLLA 이중블록 공중합체) 또는 제형 중에 (플루로닉 및 젤라이트) 온도 조작을 필요로 한다. 열에 의해 겔화되는 중합체 (폴록사머, 플루로닉, PEO-PLLA 이중블록 공중합체, PEG-PLGA-PEG 삼중블록 공중합체, 및 마트리겔) 또한 패키징 또는 보관 중에 주변 온도 변화로 인해 투여 전에 겔화된다는 단점이 있다. 나아가 이들 중합체 중 많은 것들이 점성을 보이지만 여전히 흐르는 용액인 하이드로겔만을 형성한다 (예컨대 폴록사머). 또한 어떤 중합체 제형은 겔화가 일어나기 위해 두 개의 상이한 중합체 또는 두 번째 성분이 적용될 것을 필요로 한다. 펙틴, 특히 알로에 펙틴은 인 시츄 겔화를 이루기 위해 필요한 중합체 농도가 매우 낮고 (약 0.25 %, w/v) 심지어 농축제가 첨가된다면 더 낮아질 수도 있다는 점에서 이들 중합체 또는 조성물보다 훨씬 유익하다. 제제는 인 시츄 겔화가 일어나기 위해 온도나 pH 조절, 또는 두 번째 성분의 적용을 필요로 하지 않는다. 겔은 투명하며, PEG-PLGA-PEG 삼중블록 공중합체와 플루로닉을 사용할 때처럼 특정 농도 범위를 벗어나도 극적으로 겔 혼탁도가 증가하지 않는다.

생물공학의 진보로 말미암아 좀더 많은 단백질-기초 치료제가 제조되고 있다. 단백질은 본질적으로 불안정하다. 단백질의 생체 내 작용을 위해서는 적절한 제형 및 전달이 결정적이다 (Langer, *Nature* 392, 5-10, 1998; Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16, 153-157, 1998). 펙틴 인 시츄 겔은 특히 그것의 자극성이 적은 겔화 조건 때문에 단백질 투여에 적합하다. 많은 단백질 제제, 예컨대 상처 치유를 위한 성장 인자 및 치료 목적의 혈관신생을 위한 혈관신생 인자가 또한 지속된 방식으로 국소적으로 전달되도록 고안된다. 이것 또한 펙틴 인 시츄 겔을 사용하여 이루어질 수 있다. bFGF가 알로에 펙틴 인 시츄 겔과 함께 투여될 때 겔 주변에 상당히 증가된 세포 증식이 관찰되었다.

최종 조성물 또는 제형의 중량을 토대로 생리적 활성 제제는 약 0.01 % 내지 약 90 % 이상 존재할 수 있다. 사용된 생리적 활성 제제의 양은 생리적 활성 제제의 유형, 형태, 및 성질에 따라 달라질 것이다.

펙틴 물질의 범위는 조성물의 총 중량을 토대로 약 0.01 % 내지 약 40 %, 바람직하게는 약 0.1 % 내지 약 20 %, 더욱 바람직하게는 약 0.25 % 내지 약 2 %일 수 있다. 사용된 펙틴 물질의 양은 생리적 활성 제제의 유형, 형태, 및 성질에 따라 달라질 것이다. 임의로 담체 또는 부형제가 사용될 수 있다.

본 발명을 위해 사용된 담체로는 모든 약제학적으로 허용되는 담체, 예컨대 물; 식염수; 완충된 수용액; 에멀션, 예컨대 오일/물 에멀션; 보조제; 습윤제; 정제; 및 캡슐이 있다. 최종 조성물 또는 제형의 중량을 토대로 담체는 약 0 % 내지 약 90 %로 달라질 수 있다. 존재하는 담체의 양은 생리적 활성 제제 및 그 제형 또는 조성물이 투여되는 방식에 따라 달라질 것이다.

대표적인 완충제로는 알칼리 또는 알칼리토 카보네이트, 클로라이드, 술페이트, 포스페이트, 중탄산염, 시트레이트, 보레이트, 아세테이트, 및 숙시네이트, 및/또는 암모늄 클로라이드가 있다. 대표적인 보존제로는 중아황산 나트륨, 티오황산 나트륨, 아스코르베이트, 벤즈알코늄 클로라이드, 클로로부탄올, 티메로살, 페닐머큐릭 보레이트, 파라벤, 벤질알코올, 및 페닐에탄올이 있다.

그러므로 본 발명의 한 구체예는 생리적 활성 제제를 지속적으로 전달하기 위한 조성물을 제공하는 것이고, 그 조성물은 약제학적으로 허용되는 농축제와 함께 또는 그것 없이 펙틴과 생리적 활성 화합물을 함유한다. 바람직한 것은 조성물은 동물의 신체에 조성물이 투여될 때 액체로부터 겔로 변화하고, 그로써 생리적 활성 화합물이 지속적으로 또는 조절된 방식으로 방출되는 것이다.

생체내에서 분해될 수 있는 농축제, 예컨대 폴리비닐피롤리돈 ("PVP"), 카르복시메틸셀룰로스 ("CMC"), 히드록시에틸셀룰로스 ("HPMC"), 알긴산 나트륨, 콜라겐, 젤라틴, 및 히알루론산이 제형에 첨가될 수 있다. 그런 농축제의 첨가는 아래에서 설명되는 것처럼 겔화 효능에 영향을 미치지는 않지만, 더 낮은 펙틴 농도에서 겔 매트릭스의 밀도와 인 시츄 겔 형성을 증대시키는 장점을 제공한다. 또한 pH, 이온 강도, 및 온도에 영향을 미치는 중합체도 그것이 펙틴 겔화와 상승효과를 나타낼 수 있다면 사용될 수 있다. 나아가 상이한 펙틴의 혼합물도 농축제와 함께 또는 농축제 없이 사용될 수 있다. 다른 농축제로는 카보폴, 젤라이트, 키토산, 및 크실로글루칸이 있다. 최종 조성물 또는 제형의 중량을 토대로, 농축제는 약 0 % 내지 약 90 %로 다를 수 있다. 사용된 생체내 분해가능한 농축제의 양은 생리적 활성 제제와 조성물 또는 제형이 사용되는 방식에 따라 달라질 것이다.

본 발명의 또 다른 구체예는 의료 장치로서 사용하기 위한 약제학적으로 허용되는 농축제와 함께 또는 그것 없이 펙틴으로 구성되는 조성물을 제공하는 것이다.

바람직하게도 펙틴 물질은 펙틴의 갈락투론산 단량체 서브유닛의 카르복실레이트 치환기가 배위 칼슘 이온과 반응함으로써 칼슘 교차결합된 겔을 형성할 수 있다는 점에서 칼슘 반응성이다. 그런 칼슘 반응성 겔의 형성은 다양한 분광학적 및/또는 화학적 방법, 이를테면 교차결합된 겔과 겔로부터 배위결합된 칼슘을 제거하기 위해 사용될 수 있는 칼슘 킬레이트화제, 예컨대 에틸렌디아민-테트라아세트산과 그것의 염 ("EDTA")을 반응시킴으로써 겔의 용해를 유발하는 방법에 의해 측정될 수 있다.

더욱 바람직한 것은 펙틴 물질이 LM 펙틴 또는 폴리갈락투론산이라는 것이다. 더욱 바람직한 것으로, 펙틴 물질은 알로에 펙틴이다.

치료제 또는 진단제(들)을 함유하는 펙틴 인 시츄 겔화 조성물은 다양한 수단에 의해 동물에게 투여 또는 전달될 수 있다. 예를 들어 그것은 눈, 점막, 또는 상처에 국소적으로 적용될 수 있다. 또한 그것은 비경구로, 예컨대 피하로, 근육내로, 또는 복강내 주사를 통해 투여될 수 있다. 또한 그것은 기관, 관절의 공동, 또는 종양에 주사될 수 있다.

펙틴은 상이한 많은 식물 공급원으로부터 추출될 수 있다. 감귤과 사과 외에도 펙틴은 예를 들면 감자, 포도 열매, 당밀, 및 해바라기 헤드로부터 얻어질 수 있다. 펙틴은 변형될 수도 있다. 예를 들어 아미드화된 펙틴은 암모니아로 처리함으로써 제조된다. 알로에 펙틴-유사 펙틴이 상이한 식물 종에 존재하거나 본원에 개시된 원리를 토대로 인 시츄 겔화 능력을 증대시키기 위한 방식으로 상이한 식물 공급원으로부터 펙틴이 제조되고, 재-처리되고, 및/또는 변형될 수 있다고 생각할 수 있다. 나아가 비록 DM이 50 % 미만인 LM 펙틴이 그것의 칼슘 반응성 때문에 본 발명에 사용되기에 바람직하지만, 특정 HM 펙틴 또한 칼슘에 민감하게 반응하고 칼슘 겔을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 따라서 인 시츄 겔화에 사용될 수 있다 (Tibbits et al., *Carbohydrate research* 310, 101-107, 1998). 또한 여전히 DM은 50 %보다 크지만 블록식 탈-에스테르화에 의해 칼슘에 민감하게 된 블록식 탈-에스테르화된 HM 펙틴도 또한 사용될 수 있다 (Christensen et a l ., 미국 특허 제 6,083,540호).

그러므로 당업자는 상기 개시된 구체적인 구체예들이 본 발명의 동일한 목적을 수행하기 위해 다른 구조를 디자인하거나 변형하기 위한 기초로서 쉽게 활용될 수 있음을 인지해야 한다. 또한 당업자는 그런 동등한 구조물이 첨부되는 청구범위 및/또는 실시예에 설명된 바 대로의 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않는다는 것을 인지해야 한다.

실시예

실시예 1. 알로에 펙틴의 인 시츄 겔화

알로에 펙틴의 추출

알로에 펙틴을 알로에 베라 잎의 펄프나 외피로부터 제조된 세포벽 섬유질로부터 추출하였다. 펙틴을 추출하는 일반적 방법은 이미 보고되었다 (Voragen et al, *In Food polysaccharides and their applications.* pp287-339. Marcel Dekker,

Inc. New York, 1995; 미국 특허 제 5,929,051호 참조). 알로에 펙틴의 추출은 EDTA와 같은 킬레이트화제를 사용하거나 고온수, 고온 희석 산 (HCl, pH 1.5 내지 3), 및 저온 희석 염기 (NaOH 및 Na_2CO_3; pH 10)를 포함한 다른 조건 하에서 이루어졌다.

초기 추출에 이어서, 나머지 섬유질을 거칠고 미세한 여과에 의해 제거하였다. 펙틴을 에탄올로 침전시켰다. 펙틴 침전을 추가로 에탄올 용액으로 세정한 다음 건조시켰다.

이 방법으로 펄프나 외피 세포벽 섬유질로부터 얻은 알로에 펙틴을 분자량 (>1×10^5 Da), 저 DM (<50 %), 및 Gal A 함량 (>80 %)에 의해 특성을 확인하였다. 바람직하게도 분자량은 1×10^6 Da 이상이었고, DM은 10 % 미만이었으며, Gal A 함량은 90 % 이상이었다.

펙틴의 분자량은 표준으로서 풀룰란을 사용하여 HPLC-기초 크기 축출 크로마토그래피에 의해 측정하였다. DM은 선택적 환원 방법 (Maness et al., *Analytical Biochemistry* 185, 346-352, 1990) 및 HPLC-기초 방법 (Voragen et al., *Food Hydrocolloids*, 1, 65-70, 1986)에 의해 측정하였다. Gal A 함량은 m-히드록실디페닐 방법에 의해 측정하였다 (Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489, 1973).

생체내 주사에 의해 투여된 알로에 펙틴 용액의 인 시츄 겔화

알로에 펙틴을 먼저 멸균 탈이온수에 녹인 후 동일 부피의 2× 생리 식염수 (0.3 M NaCl)와 혼합하였다. 알로에 펙틴은 염 용액에서는 쉽게 녹을 수 없다. 그러나 일단 물에 녹으면 펙틴은 염 용액과 혼합되어 생리적 이온 강도에 도달한다. 이런 방식으로 얻어진 생리 식염수 중의 펙틴 용액은 맑게 유지되었다. 펙틴 용액은 실온에서는 자유롭게 흐르며, 중합체 농도에 따라 5.0 내지 6.0의 pH를 나타냈다. 온도나 pH는 다른 지시가 없는 한 조정하지 않았다. 제제를 Swiss Webster 마우스의 배 아래쪽에 동물에 사용되는 프로토콜에 따라 피하 주사하였다 (0.05 또는 0.1 ml/부위). 마우스들을 주사 후 다양한 시간대별로 희생시켜서 겔 형성을 조사하였다.

주사 부위에서 피부의 팽창은 식염수 대조군의 경우에서처럼 사라지지 않았다. 주사 부위에 걸쳐 있는 피부를 수술로 절개했을 때 공 또는 달걀 모양의 겔 단편을 관찰할 수 있었다. 겔은 맑고 투명하였으며, 단단했다. 그것을 주변 조직으로부터 쉽게 분리할 수 있었다. 겔을 피부와 함께 수술로 적출하여 포르말린에 고정한 다음, 절개하여 H&E로 염색하고, 현미경으로 관찰하였다. 겔은 약간 염색되었을 뿐이지만 분명하게 볼 수 있었고, 피부 조직에 둘러싸여 있었다. 동일한 인 시츄 겔화가 쥐에서도 관찰되었다. 주사 부위의 팽창은 쥐에서는 두꺼운 피부와 털 때문에 마우스에서처럼 분명하지 않았다. 그러나 주사 부위의 피부를 수술로 절개했을 때 동일한 인 시츄 겔을 관찰할 수 있었다. 쥐에게는 배 아래쪽에 1 ml의 알로에 펙틴 용액을 피하 주사하였고, 따라서 더 큰 겔 단편을 관찰하였다.

겔 형성은 펙틴 농도에 의존적이다. 약 0.25 % (w/v)의 농도에서 단단한 고체 겔을 관찰하였다. 약 0.1 % (w/v)의 농도에서는 겔 형성이 관찰되지 않았다. 0.1 %와 0.25 % 사이의 농도에서는 부드러운 겔이 관찰되었다.

인 시츄 겔은 또한 알로에 펙틴 용액의 pH를 희석한 수산화 나트륨을 사용하여 약 7.2로 조정했을 때 형성되었다.

인 시츄 겔화 능력은 알로에 펙틴의 분자량에 좌우된다. 훨씬 작은 분자량 (~ 3×10^4 Da)을 가지지만 동일한 DM과 Gal A 함량을 가지는 알로에 펙틴을 사용한 경우, 0.5 % (w/v)에서 시험했을 때 인 시츄 겔화는 관찰되지 않았다.

인 시츄 겔은 또한 복강내 및 근육내 경로를 통하여 주사한 후에도 형성되지만, 형성된 겔은 피하 주사 후에 형성된 것처럼 균일한 형상을 가지지는 않았다.

실시예 2. 상처 표면에 국소 적용된 후의 인 시츄 겔화

생리 식염수 중의 알로에 펙틴 제제 (0.5 %, w/v)를 마우스 또는 쥐의 전 두께의 피부를 절개한 새로운 상처에 직접 적용하였다. 생리 식염수 중의 0.5 % (w/v) CMC 제제와 시판되는 하이드로겔 상처 드레싱을 대조군으로서 사용하였다. 상처를 동물에 사용되는 프로토콜에 따라 생검 펀치로 만들었다. 4시간 후 쥐를 희생시키고 상처를 수술로 제거하였다. 상처를 포르말린에 고정하고, 절개한 다음, H&E로 염색하였다. 알로에 펙틴을 사용해서는 상처 표면에서 겔 층을 분명하게 육안으로도 관찰할 수 있었지만 CMC나 시판되는 하이드로겔 상처 드레싱으로는 관찰하지 못하였다.

실시예 3. 겔 전선 이동 분석에 의해 측정된, 체액 중의 칼슘 이온에 의해 중재된 펙틴 인 시츄 겔화

혈액, 눈물, 폐액 및 코 분비물과 같은 체액은 칼슘 이온을 함유한다 (예를 들어 혈액 중에는 8.5 내지 10.3 mEq/dl). 알로에 펙틴이 칼슘 겔을 형성하기 때문에 알로에 펙틴의 인 시츄 겔화에서 칼슘의 역할을, 인 시츄 겔 형성을 자극하는 동물 혈청을 사용하는 시험관내 겔화 분석을 사용하여 조사하였다. 이 시험관내 분석은 겔 전선 이동 분석으로서 설명된다. 동물 혈청을 유리 튜브의 바닥에 놓고, 알로에 펙틴 용액을 혈청의 상부에 놓는다 (펙틴 용액을 또한 펙틴 용액에 관한 시험 용액의 농도에 따라 튜브의 바닥에 놓기도 한다). 조직 배양에 사용하는 정상 소 혈청을 사용하였다. 2 ml의 혈청을 유리 튜브 (0.8×11 cm)의 바닥에 놓고 1 ml 펙틴 용액 (0.5 내지 0.75 %, w/v)을 그 위에 놓았다.

겔 형성은 접촉 라인(용액의 계면)에서 즉시 일어났고, 겔 상 또는 겔 전선은 시간에 따라 점점 펙틴 용액의 상부로 이동했다. 상부 펙틴 층에 형성된 겔은 펙틴 용액과는 그것의 증가된 탁도에 의해 광원하에서 조사할 때 구별할 수 있었다. 또한 튜브를 기울여도 만약 겔이 형성되면 계면은 이동하지 않았다. 계면에 형성된 겔의 두께를 시간에 따라 측정하였다 (그런 측정은 이하 "겔 길이"로 언급한다).

그러나 만약 혈청과 같은 체액을 식염수 또는 용액으로부터 칼슘을 제거하기 위한 EDTA (2가 양이온에 대한 킬레이터)에 대해 투석한다면, 또는 EGTA (칼슘에 대한 특정 킬레이터)를 10 mM의 최종 농도로 혈청에 첨가한다면, 겔 형성은 관찰되지 않았다. 이것은 체액에 존재하는 칼슘 이온이 펙틴 인 시츄 겔화에 포함되는 것을 가리키는 증거이다.

펙틴 겔화는 또한 헤파린 처리된 전체 마우스 혈액 또는 그것으로부터 분리된 혈장을 사용한 유사한 생체내 실험으로 시험했을 때에도 일어났다.

실시예 4. 다른 체액을 사용한 펙틴 인 시츄 겔화

혈청이나 혈액 외에도 눈물, 폐액, 및 코의 유체와 같이 칼슘을 함유한 다른 유형의 체액이 많이 있다. 펙틴 겔화가 다른 체액을 사용해서도 시험관내 실험에서 일어나는 지를 측정하기 위해, 실시예 3에서 설명한 겔 전선 이동 분석을 알로에 펙틴 (식염수 중의 0.25 %)과 함께 사용하였다.

겔 형성은 중성 복강액으로 일어났다. 이 경우 단클론성 항체 생성을 위한 하이브리도마를 주사한 마우스로부터 얻은 복수를 복강액으로서 사용하였다.

겔 형성은 또한 다음과 같은 체액으로 자극했을 때에도 일어났다:

1. 눈물 (100 ml 당 0.68 g의 NaCl, 0.22 g의 $NaHCO_3$, 0.008 g의 $CaCl_2.2H_20$, 및 0.14 g의 KCl. (Stjernschantz and Asitin, in Edman, P.(ed.), "Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery," CRC Press, Boca Raton, pp. 1-15, 1993 참조). 또는 달리 100 ml 당 0.268 g의 우혈청 알부민, 0.268 g의 라이소자임, 0.134 g의 글로불린, 0.008 g의 $CaCl_2.2H_20$, 0.650 g의 D-글루코스, 및 0.658 g의 NaCl. Cohen et al., *Journal of Controlled Release* 44, 201-208, 1997 참조);

2. 폐액 (100 ml당 0.01 g의 $MgC1_2.6H_20$, 0.61 g의 NaCl, 0.03 g의 KC1, 0.027 g의 $Na_2HP0_4.7H_20$, 0.007 g의 Na_2S0_4, 0.018 g의 $CaCl_2.2H_20$, 0.095 g의 $NaHC_20_2.3H_20$, 0.26 g의 $NaHCO_3$, 및 0.01 g의 $Na_3H_5C_60_7.2H_20$. Fisher and Briant, *Radiation Protection Dosimetry*, 53, 263-267, 1994); 및

3. 코 분비물 (100 ml당 0.867 g의 NaCl, 0.44 g의 Na_2HP0_4, 0.108 g의 NaH_2P0_4, 0.058 g의 $CaCl_2.2H_20$, 0.31 g의 KCl, 0.636 g의 알부민. Lorin et al., *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 2, 275-267, 1994).

실시예 5. NaCl은 펙틴 칼슘 겔화를 증대시킨다.

혈청과 눈물과 같은 체액 또한 칼슘 이온을 함유하고 있다 (혈액 중에 135 내지 146 mEq/L). NaCl은 LM 펙틴의 칼슘 겔화를 증대시키는 것으로 밝혀졌다. 국소적으로 또는 비경구로 사용하기 위한 약리학적 제제는 통상 완충된 또는 비-완충된 생리 식염수 (0.15 M NaCl) 또는 등장 용액 중에 제조된다. NaCl 용액에 의해 유도된 겔화의 증대가 또한 알로에 펙틴을 사용해서도 일어나는 지를 측정하기 위하여 겔 전선 이동 분석을 사용하였다. 0.15 M NaCl (2 ml)중에 제조한 알로에 펙틴 (0.5 %, w/v) 용액을 튜브의 바닥에 놓고, 농도가 약한 100 mM $CaCl_2$ 용액 (0.05 ml)을 펙틴 용액의 위에 놓았다.

겔이 형성되었고, 시간이 흐름에 따라 펙틴 용액의 아래쪽으로 확장되었다. 펙틴 용액으로의 하향 겔 전선 이동을 $CaCl_2$를 첨가한 후에 간격을 두고 측정하였다. 그 결과 겔 전선이 NaCl의 존재시보다 더 빠르게 이동하는 것으로 나타났다. 즉 알로에 펙틴의 칼슘 겔화가 NaCl의 존재에 의해 증대되었다 (도 1 참조). NaCl의 효과는 또한 겔 이동 속도가 0.05 M NaCl에서보다 0.15 M NaCl에서 더 빨랐던 것처럼 칼슘 농도 용량-의존적이었다.

이들 관찰은 앞서 다른 LM 펙틴을 사용하여 관찰한 발견과 일치하였다 (Garnier et al., *Carbohydrate Research* 240, 219-232, 1993; 256,71-81, 1994). 도 1은 알로에 펙틴의 칼슘 겔화에 대한 NaCl의 관계를 나타내는 막대 그래프도이다.

실시예 6. 펙틴 인 시츄 겔화는 낮은 펙틴 농도에서 더 빠르다.

상기에서 설명한 겔 전선 이동 분석법을 사용하였다. 식염수 (1 ml) 중의 다양한 농도의 알로에 펙틴을 정상 소 혈청 (2 ml)에 적용하였다. 실온에서 18시간 후에 형성된 겔의 길이 (즉 겔 두께)를 측정하였다. 접촉 층의 초기 겔화는 펙틴 농도와 직접적으로는 무관하였다. 그러나 겔 길이가 시간에 따라 늘어나는 속도는 상이한 펙틴 농도에서 달랐다. 0.05 % (w/v)에서 형성된 겔의 길이가 0.5 % (w/v)에서 형성된 것보다 거의 5배 더 긴 것으로 보아 펙틴 농도가 낮을수록 겔화는 더 빠른 것으로 관찰되었다 (도 2 참조). 저농도 (<0.2 %, w/v)에서 형성된 겔은 훨씬 더 부드러웠고 강한 교반에 의해 깨질 수 있었다.

혈청 대신 염화 칼슘 용액을 사용했을 때도 동일한 것으로 관찰되었다. 이것은 펙틴 칼슘 겔화 속도가 더 낮은 펙틴 농도에서 더 빠르다는 것을 나타낸다.

실시예 7. 다른 중합체 또는 농축제의 첨가로 펙틴 인 시츄 겔 형성이 증대된다.

상술한 겔 전선 이동 분석법을 사용하였다. 히드록시에틸셀룰로스 (HEC, 0.45 %, w/v), 카르복시메틸셀룰로스 (CMC, 0.45 %, w/v), 또는 알긴산 나트륨 (0.45 %, w/v)과 같은 중합체를 알로에 펙틴 (0.05 %, w/v)과 혼합하였다. 알긴산 나트륨은 시험관내 조건 하에서 $CaCl_2$와 칼슘 겔을 형성할 수 있긴 하지만 혈청으로는 인 시츄 겔을 형성하지 못하였다. 1 ml의 중합체 용액을 겔 전선 이동 분석법에서 2 ml의 정상 소 혈청 위에 놓았다. 형성된 겔의 길이를 18시간 후에 측정하였다. 그 결과 다른 중합체의 첨가는 펙틴 인 시츄 겔화의 속도에 영향을 미치지 못한 것으로 나타났다 (도 3A 및 3B 참조). 중합체를 알로에 펙틴과 상이한 비율 (0.4 % 대 0.1 %)로 혼합했을 때에도 동일한 결과를 얻었다.

실시예 1에서 설명한 것과 유사한 생체내 마우스 실험에서, 식염수 중의 알로에 펙틴 (0.375 % w/v)과 CMC (0.375 %, w/v)의 혼합물은 마우스에 피하 주사된 후에 인 시츄 겔을 형성하였다. 또한 농축제 (0.4 % 또는 0.3 %, w/v의 알긴산 나트륨 또는 HEC)를 첨가한 결과 더 낮은 알로에 펙틴 농도 (0.1 % 또는 0.2 %, w/v)에서 더 좋은 인 시츄 겔이 형성되었는데, 이 인 시츄 겔은 부드럽거나 알로에 펙틴 단독으로는 형성되지 않았다 (실시예 1).

실시예 8. 다른 펙틴 및 알긴산염과의 비교

칼슘 겔화를 일으킬 수 있는 알로에 펙틴 이외의 여러 다당을 생체내 겔화 실험에 사용하였다. 다른 다당은 감귤로부터 얻은 DM이 28 %인 LM 펙틴과 사과 펙틴 (DM=0)으로부터 제조한 폴리갈락투론산 (둘 다 Sigma Chemical Co. 제품임), 및 DM이 28 내지 34 %이고 DA (아미드화도)가 16 내지 22 %인 아미드화된 펙틴이었다. 사용 전에 이것들을 탈이온화된 물에 녹이고, 여과한 후 에탄올로 침전시킨 후 건조시켰다.

피하 경로에 의해 다른 펙틴 용액으로 마우스를 주사하는 인 시츄 겔화 실험을 실시예 1에서 설명한 대로 수행하였다. 각 샘플에 대하여 2 마리의 마우스에게 4곳을 주사하였다. 그 결과 피하 주사 후에는, 1.0 또는 1.65 % (w/v)의 농도에서는 대체 다당 중 어느 것으로도 인 시츄 겔 형성이 분명하게 관찰되지 않았고, 단지 얼룩같은 겔 물질이 관찰되었다. 그러나 더 높은 농도 (3.0 또는 3.3 %, w/v)에서 시험했을 때에는 폴리갈락투론산이나 아미드화된 LM 펙틴 두 가지에서 모두 적절하게 형성된 겔이 관찰되었다.

유사하게, 실시예 1에서 설명된 저분자량의 알로에 펙틴이 고농도 (2.5 %, w/v)에서 인 시츄 겔화되었다.

DM이 64 %인 HM 감귤 펙틴을 또한 시험하였다. 그 펙틴을 LM 펙틴에 대한 것과 같은 방식으로 제조하였다. 3 % (w/v)의 농도에서 HM 펙틴에 대한 겔 형성은 관찰되지 않았다. 주사 부위는 축축하거나 젖어있었지만 고체 겔 단편은 관찰되지 않았다.

켈톤 HVCR과 높은 G 알긴산염 Manugel DMB (G 함량, 60 내지 70 %)를 포함한 알긴산염을 또한 0.5 %의 농도에서 시험하였다. 피하 주사 후 4시간째에 조사했을 때 단지 얼룩같은 겔 물질이 관찰되었고, 그것은 대부분의 물질이 겔화되지 않고 확산되었음을 나타낸다. 알긴산염은 또한 상술된 바와 같은 (실시예 7) 시험관내 인 시츄 겔화 분석에서 정상 동물 혈청과 겔을 형성하지 못하였다. 이들 결과는 모두 LM 펙틴, 폴리갈락투론산, 아미드화된 LM 펙틴, 및 알긴산염이 동일한 농도에서는 인 시츄 겔화에 대해 알로에 펙틴보다 훨씬 덜 효과적임을 나타냈다.

실시예 9. 펙틴 인 시츄 겔에 의한 생리적 활성 제제의 전달

약물 전잘에 사용될 인 시츄 겔화를 위하여, 인 시츄 겔화가 약물 또는 진단제의 존재하에 일어나야만 한다. 그러므로 다양한 화합물 또는 제제를 생리 식염수 중의 알로에 펙틴과 최종 펙틴 농도가 0.5 % (w/v)가 되도록 혼합하였다. 실험 제제는 작은 분자 유기 화합물 (패스트 그린, N-에틸-N-(4-[(4-{에틸[(3-술포페닐)메틸]아미노}페닐)-(4-히드록시-2-술포페닐)메틸렌]-2,5-시클로헥사디엔-1-일리덴)-3-술포벤젠메탄아미늄 히드록사이드 내부 염, 2나트륨 염, 808 Da, 10 mg/ml), 작은 단백질 (bFGF, 17 kDa, 10 ㎍/ml), 중간 크기의 단백질 (소혈청 알부민, 66 kDa, 10 mg/ml), 큰 크기의 단백질 (타입 I 소 콜라겐, 2 mg/ml), 핵산 (람다 DNA HindIII 단편, 200 ㎍/ml), 탄수화물 중합체 (CMC, 0.5 % w/v), 및 Raw 264.7 세포 (마우스 마크로파지 라인, 1×10^8/ml)였다. 혼합물을 마우스에게 피하 주사하였다. 그런 다음 4시간 후에 겔 형성을 조사하였다. 그 결과 모든 제제의 존재하에 발생한 인 시츄 겔 형성이 알로에 펙틴 단독을 사용한 대조군으로 형성된 겔과 유사하게 일어났다.

나아가 겔 전선 이동 분석법에 의하면, 0.5 % (w/v)의 알로에 펙틴 용액의 인 시츄 겔화가 또한 1) 상처 치료에 통상 사용되는 난용성 항균제인 0.1 % (w/v)의 실바덴 (은 수파디아진), 2) 0.5 % (w/v)의 히드록시에틸 셀룰로스 (HEC), 및 3) 0.5 % (w/v)의 알긴산 나트륨 (Kelton HVCR, Kelco)의 존재하에 일어났다. 0.5 % (w/v)의 HEC 또는 알긴산 나트륨의 존재는 실시예 6에서 설명한 것과 같은 인 시츄 겔화의 효능에 아무런 영향도 미치지 못하였다.

그러므로 이들 많은 상이한 제제로 인해 일어난 인 시츄 겔화는 펙틴 인 시츄 겔이 광범위한 약물 제제의 전달에 사용될 수 있음을 분명하게 보여준다.

실시예 10. 시험관내 조건 하에서 펙틴 인 시츄 겔로부터의 작은 유기 화합물의 느린 방출

치료 및 진단제의 분자량은 약 100 Da으로부터 10,000 Da 이상까지 크게 차이가 난다. 일반적으로 화합물이 작을수록 느린 방출 효과를 이루기는 더 어려워진다. 식품 및 약제학 분야에서 널리 사용되는 염료인 작은 유기 화합물인 패스트 그린을 시험 화합물로서 선택하였다. 염료를 식염수 중의 알로에 펙틴 (0.5 %, w/v)과 1 mg/ml의 패스트 그린 농도로 혼합하였다. 펙틴이 없는 1 mg/ml 염료 용액을 대조군으로서 사용하였다. 1 ml의 염료/펙틴 제제 또는 대조군을 컷-오프가 12 Da인 투석 튜브 (직경 1 cm) 위에 놓았다. 그런 다음 샘플이 들어있는 투석 튜브를 30-ml의 유리 튜브에 들어있는 25 ml의 정상 소 혈청 위에 놓았다. 염료/알로에 펙틴 용액이 들어있는 한 혈청 튜브에, 칼슘 겔화를 방지하기 위하여 EDTA를 최종 농도 10 mM로 첨가하였다. 샘플을 함유한 혈청 튜브를 회전 진동기에서 100 rpm으로 계속 흔들어주었다. 다양한 시간 대에 소량 (100 ㎕)의 혈청을 샘플로 취하였다. 혈청으로 방출된 염료의 양을 620 nm에서 OD를 측정함으로써 측정하였다. 공지량의 패스트 그린을 함유한 혈청 샘플을 사용하여 표준 곡선을 만들었다. 그 결과 측정된 시간 점에서 유사한 양의 패스트 그린이 대조군 및 EDTA가 첨가된 염료/알로에 펙틴 (겔화 형성 없음)으로부터 방출되었고, EDTA가 없는 염료/알로에 펙틴 (겔 형성)으로부터 방출된 염료의 양은 상당히 더 낮았다 ($p<0.05$; 스튜던트 t-시험) (도 4 참조). 이것은 알로에 펙틴의 존재와 그것의 겔화가 모델인 작은 분자의 약제학적 제제의 방출을 상당히 둔화시켰음을 나타낸다.

실시예 11. 피하 주사 후에 펙틴 인 시츄 겔로부터의 작은 유기 화합물의 느린 방출

상기 관찰된 느린 방출이 생체내 조건에서도 얻어질 수 있는 지를 측정하기 위하여 생리 식염수 중의 패스트 그린 (1 mg/ml)/알로에 펙틴 (0.5 %, w/v) 또는 생리 식염수 중의 패스트 그린 단독만을 마우스에게 피하 주사하였다. 주사 부위 (샘플당 2 곳)를 4시간 후에 조사하였다. 펙틴의 존재하에 형성된 인 시츄 겔은 염료를 일부분 보유하였지만 색은 주사 전 원래의 제제만큼 진하지 않았다. 대조적으로 대조군의 주사 부위는 겔도 없었고, 색도 없었으므로 염료를 보유하지 않았다. 그러므로 펙틴 인 시츄 겔은 염료를 보유하였고, 실제로 생체내 조건하에서도 방출을 둔화시켰다.

실시예 12. 알로에 펙틴 인 시츄 겔에 의한 bFGF의 국소 투여

성장 인자가 투여 부위를 둘러싼 조직에 국소적 영향을 발휘하기 위해서는 그것이 느리거나 지속적인 방식으로 매트릭스에서 방출될 수 있어야 할 필요가 있다. 식염수 또는 완충액 중의 투여는 이런 관점에서는 효과적이지 못하다. 이 실시예에서는 성장 인자 (bFGF)를 사용하였다. bFGF (기본 섬유아세포 성장 인자 또는 FGF-2)는 섬유아세포 증식 및 혈관신생 또는 혈관 형성을 자극하는 것으로 알려져 있는 성장 인자이다. 그것을 생리 식염수 중의 알로에 펙틴 (0.5 %, w/v)과 1 내지 10 ㎕/ml의 농도로 혼합한 후, 마우스의 복부 영역의 왼쪽 또는 오른쪽 측면에 피하 주사하였다. 한 쪽에는 대조군 (펙틴만)을 다른 쪽에는 bFGF-함유 제제를 투여하였다. 두 마리 마우스로부터의 인 시츄 겔을 투여 후 5 내지 10일째에 피부와 함께 수득하여 포르말린에 고정하고, 절개한 다음 H&E로 염색하였다. 겔의 어느 한 쪽 끝에서, 겔 표면과 피부 근육층 사이에서 수직으로, 및 겔의 측면으로부터 수평으로 510 ㎛ 안쪽으로 2개의 동일한 영역을 선택하고, 각 겔로부터 이들 선택된 2 영역의 세포를 NIH 이미지 소프트웨어를 사용하여 계수하였다. 그 결과 세포 수는 대조군보다 bFGF-처리된 마우스에서 2배 더 높은 것으로 나타났다 (도 5). 겔 주변의 혈관 형성의 증가를 또한 높은 bFGF 농도 (10 ㎍/ml)에서 관찰하였다. 이것은 bFGF가 인 시츄 겔로부터 방출되어 주변 조직에서 그것의 기능을 발휘하였음을 나타낸다.

실시예 13. 건조된 펙틴 조성물의 인 시츄 겔화

알로에 펙틴과 CMC (각각 0.75 중량 %)의 혼합물 및 물 중의 1.5 %의 CMC를 별도로 계량 트레이에서 동결건조시켰다. 건조된 물질을 둥근 패드 (약 1 cm의 직경과 약 3 mm의 두께)로 절단하고, 페트리 접시에서 10 ml의 정상 소 혈청에 담가 두었다. 알로에 펙틴/CMC 패드는 맑은 겔을 형성하여 실험이 끝날 때까지 4일 동안 무상으로 유지된 반면, CMC 만을 함유하는 패드는 동일 조건 하에서 수시간 내에 녹거나 사라졌다. 따라서 이들 결과는 건조된 형태의 펙틴도 또한 체액에 침지된 후에 겔을 형성하는 것을 나타낸다.

실시예 14. 약물 전달을 위한 펙틴 인 시츄 겔의 사용: 제형 방법

펙틴 인 시츄 겔은 치료제 또는 진단제와 체액의 특징적인 pH와 삼투압을 가지는 저농도의 겔화 중합체 (펙틴)을 함유하고, 투여될 때 액체로부터 겔로 변화할 수 있는 능력을 가지는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제공하는 데 사용될 수 있다.

액체 제형을 제조하는 방법은 다음 단계를 포함한다.

1. 펙틴을 멸균수에 녹인다.

2. 완충된 또는 비-완충된 식염수를 제조한다.

3. 두 용액을 혼합한다.

4. 생리적 활성 제제를 단계 3의 제제에 첨가한다. 또는 달리 생리적 활성 제제는 혼합 전에 어느 용액에든지 첨가할 수 있다.

물과 완충된 또는 비-완충된 식염수 또는 수용액 외에 다른 약제학적으로 허용되는 담체도 또한 사용될 수 있는데, 이를테면 오일/물 에멀션과 같은 에멀션, 보조제, 다양한 유형의 습윤제, 정제 및 캡슐이 그것이다.

제형의 pH는 적당한 완충제, 예컨대 붕산-붕산 나트륨, 인산 나트륨(일가염)-인산 나트륨(2가염), 및 트리스-HCl로 조정한다. 제형의 삼투압은 NaCl, KCl, 및 $MgCl_2$와 같은 염, 및 다른 삼투압 조정제, 예컨대 소르비톨, 슈크로스, 글리세린, 및 만니톨로 체액의 삼투압과 비슷하게 조정한다.

약제학적으로 허용되는 농축제가 첨가될 수 있다. 농축제는 폴리비닐피롤리돈 ("PVP"), 변형 셀룰로스 중합체, 예컨대 카르복시메틸셀룰로스 ("CMC"), 히드록시메틸셀룰로스 ("HPMC"), 히드록시에틸셀룰로스 ("HEC"), 알긴산염, 젤라틴, 덱스트란, 시클로덱스트린, 또는 히알루론산일 수 있다.

제형은 실온에서 보관하거나 냉장 (4 ℃)할 수 있다. 만약 제형이 ~0.15 M NaCl을 함유한다면 그것을 4 ℃에서 보관할 때 (나트륨) 겔이 형성된다. 적용하기 전에 겔은 실온에서 용액으로 전환될 수 있다. 응집체를 형성하는 경향이 있거나 실바덴 (은 술파디아진)과 같이 수용성이 낮은 과립인 약물 또는 치료제에 대해서는 겔 메트릭스중에 보관하는 것이 응집체나 침전 형성을 방지할 수 있기 때문에 유리하다.

또는 달리 제형은 건조된 형태로 제조할 수 있다. 완충된 또는 비-완충된 물 또는 식염수 중의 펙틴과 생리적 활성 제제의 혼합물을 동결건조한다. 또는 달리 펙틴 분말과 건조한 생리적 활성 제제를 섞어서 원하는 형태로 압착한다. 건조된 형태는 패드, 정제, 캡슐, 또는 분말로서 사용할 수 있다.

제형 또는 조성물 중의 생리적 활성 제제와 펙틴 물질의 상대적 양은 투여될 특정 제제에 따라 광범위하게 달라질 것이다. 액체 제형에서 제제는 약 0.01 % 내지 약 50 % (w/v)인 반면, 펙틴 물질은 약 0.1 % 내지 약 40 % (w/v)일 수 있다. 건조되거나 현탁된 제형에서 제제 또는 펙틴 물질은 90 % (w/w) 이상으로까지 포함될 수 있다.

실시예 15. 분류된 음이온 다당을 포함하는 약제학적 분말 제형의 제조 및 그것의 겔-형성 특성

하기 표 2에서 나타낸 바와 같이 모델 활성 제제, 다양한 음이온 다당, 농축제, 및 임의의 부형제를 포함하는 분말 제형을 제조하였다. 제형을 제조하기 위해 사용한 이온 중합체를 아래에 열거한다.

고분자량 알로에 펙틴, (HMW AP), DM < 10%, Mw > 1.0×10^6 Da

저분자량 알로에 펙틴, (LMW AP) DM < 10%, Mw = 1.3×10^5 Da

폴리갈락투론산, (Poly Gal A) (Sigma), DM < 3%, Mw = 1.7×10^5 Da

저분자량 펙틴 (LM 펙틴), DM = 26%, Sigma, Mw=2.0×10^5 Da

알긴산염, 중간 점도, Sigma Chemical Co.

분자량은 표준으로서 풀룰란을 사용하여 미국 특허 제 5,929,051호의 실시예 10에서 설명된 과정에 의해 크기 축출 크로마토그래피에 의해 측정하였다. SEC를 TSK-Gel G5000 PWX 칼럼 (Toso Haas)을 사용하여 수행하였다. 샘플을 0.05 % (w/v) 나트륨 아지드를 사용하여 물에 0.3 mg/ml로 제조하였다. 50 ㎕의 샘플을 주사하고 0.05 %의 나트륨 아지드를 1 ml/분의 속도로 사용하여 용출하였다. 굴절 지수를 라인으로 측정하였다. 표준으로서 풀룰란 (4.04×10^5, 7.88×10^5, 및 1.66×10^6 Da)을 사용하였다. 분자량을 표준의 선형 회귀선에 대해 계산하였다.

현재 시판되는 알로에 펙틴은 고도로 정제되고 미세-여과된 것으로 cGMP (current Good Manufacturing Practice)하에 제조된다. 상기 표에 열거한 다른 다당은 모두 상당량의 불용성 물질을 함유하였고, 따라서 물에 녹았을 때 흐린 용액을 생성한다. 그것들을 모두 미세-여과하여 불용성 물질을 제거하고, 알코올로 침전시킨 뒤, 건조시킨 다음 사용하였다. 소 혈청 알부민 (BSA)과 라이소자임을 먼저 약제학적으로 허용되는 제제로서 사용하였다. BSA는 모델 제제로서 다양한 약제학적 제형, 특히 단백질 전달을 위한 제형을 조사하기 위해 광범위하게 사용된다. 라이소자임은 항균제로 알려져 있다. 포비돈 (폴리비닐피롤리돈, K29-32)을 농축제로 사용하고, 락토스를 부형제로서 사용하였으며, 두 가지 모두 시그마사로부터 구하였다.

하기 표 2에 열거한 모든 성분의 액체 혼합물을 제조한 후, 용액을 동결건조하여 동결건조된 고체를 형성함으로써 분말 제형을 제조하였다. 액체 선구 용액과 최종 분말 두 가지의 조성물을 하기 표 2에 나타낸다.

표 2

샘플 조성					
액체 (%, w/v) 및 건조 형태 (%, w/w)*					
	#1	#2	#3	#4	#5
중합체	HMW AP 0.4 (0.03)	LMW AP 0.8 (0.06)	LM 펙틴 0.8 (0.06)	폴리GalA 0.8 (0.06)	알긴산염 0.8 (0.06)
포비돈	7.5 (57.69)	7.5 (56.39)	7.5 (56.39)	7.5 (56.39)	7.5 (56.39)
락토스	5 (38.46)	5 (37.59)	5 (37.59)	5 (37.59)	5 (37.59)

활성 제제 (BSA 또는 라이소자임	0.1 (0.0077)	0.1 (0.075)	0.1 (0.075)	0.1 (0.075)	0.1 (0.075)

* 괄호 안의 숫자는 수분이 없는 것을 토대로 한 건조된 형태의 각 성분의 % 함량이다 (w/w).

동결건조한 고체를 미소용기가 달린 에버바흐(Eberbach) 혼합기를 사용하여 분쇄하였다. 그 결과의 분말을 멸균 100 ㎛ 나일론 막 체를 사용하여 걸러서 입자 크기가 100 ㎛보다 작은 분말을 제조한 후, 계속해서 차례로 다양한 크기의 구멍 (40, 70, 및 100 ㎛; Cell strainer, Becton Dickson Labware)을 가지는 멸균 나일론 막으로 걸러서 다양한 입자 크기를 가지는 분말 (<40, 70, 및 70 내지 100 ㎛)을 제조하였다. 입자 크기가 100 ㎛보다 큰 입자도 또한 200 ㎛ 체를 사용하여 걸러서 100 내지 200 ㎛ 입자를 준비하였다. 체질은 유리 필터 홀더를 사용하여 진공하에서 수행하였고, 분말은 0.22 ㎛ 막 위에서 수집하였다. 분말을 실온에서 보관하였다.

이온 중합체를 제외한 모든 성분을 포함하는 제형으로 대조 분말을 또한 제조하였다.

두 개의 분말 제형을 표 2에 따라 HMW 알로에 펙틴으로 제조하였는데, BSA가 첨가된 한 샘플과 BSA가 없는 다른 대조 샘플을 제조하여, 분쇄하고, 100 ㎛ 미만으로 걸렀다. 이들 두 샘플의 수분 함량을 120 ℃의 건조 온도에서 수분 분석기를 사용하여 2 내지 3 % (w/w)로 측정하였다.

실시예 16. 분말 제형의 겔화 특성

제조 방법이 실시예 15에 상세하게 설명된 분말 제형의 겔 형성 특성을 증명하기 위하여 다양한 펙틴과 알긴산염으로 제조한 분말 (10 mg, <100 ㎛)을 2 ml의 식염수액에 현탁하였다. 한 샘플의 식염수액은 3 mM의 염화 나트륨을 포함하도록 설정하였고, 다른 것은 염화 칼슘을 포함하지 않았다. 칼슘의 존재하에 분말 입자는 수화되었지만 입자 형태를 유지하였고, 현탁액은 흐린 상태를 유지하였다. 현미경하에서는 칼슘 식염수 중의 분말 입자는 맑고 투명한 겔 입자 또는 단편으로 변하였다. 대조적으로 칼슘이 없는 것에서는 입자는 약 10분 이내에 빠르게 녹아서 현탁액은 맑은 용액으로 변하였다 (고분자량 알로에 펙틴으로 제조한 분말은 제외되는데, 그것은 일반적인 NaCl 식염수에도 쉽게 녹지 않을 뿐만 아니라 식염수 중에서 겔을 형성하지도 않는다, 하기 참조).

칼슘 킬레이트화제 EDTA (10 mM)를 상술한 칼슘 식염수에 현탁된 분말에 첨가했을 때, 입자는 대략 10분 이내에 빠르게 녹았다.

유사한 결과를 펙틴 또는 알긴산염을 사용하여 제조한 분말을 정상 소 혈청에 현탁했을 때에도 관찰하였다. 즉 분말 입자는 정상 소 혈청을 함유한 칼슘에 현탁된 후에도 고체 입자 형태를 유지하였다. 그러나 EDTA를 첨가했을 때 입자는 대부분 약 10분 이내에 녹았다. 유사한 결과를 또한 자극된 코 유체에서도 얻었다 (100 ml당 0.867 g의 NaCl, 0.44 g의 Na_2HP0_4, 0.108 g의 NaH_2PO_4, 0.058 g의 $CaCl_2.2H_20$, 0.31 g의 KC1. Lorin et al., *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 2, 275-267, 1994 참조). 이들 실험은 유리 칼슘 이온을 함유한 용액에 현탁된 분말 입자가 칼슘 교차결합된 겔을 형성하지만, 칼슘이 없는 경우에, 또는 만약 칼슘이 겔로부터 킬레이트화제에 의해 제거된 경우에는 겔이 형성되지 않거나, 안정하지 않으며, 다당 입자가 녹는다는 것을 증명한다.

상기에서 주지된 바와 같이 HMW 알로에 펙틴은 물에 녹을 수 있지만, NaCl 식염수 또는 완충된 식염수에는 쉽게 녹지 않거나 단지 일부만이 녹을 수 있다. HMW 알로에 펙틴을 원심분리 (500 g, 5분)에 의해 NaCl 식염수 용액으로부터 회수하여 물에 재현탁하였는데, 수분 이내에 빠르게 녹았다. 이런 반응은 물이나 NaCl 식염수 용액에 모두 쉽게 녹을 수 있는 저분자량 LM 펙틴, 폴리갈락투론산, LMW 알로에 펙틴, 또는 알긴산염으로부터 제조된 입자와는 대조적이다. 그럼에도 불구하고 칼슘-함유 식염수 또는 정상 소 혈청 용액으로부터 분리한 입자로부터 제조한 입자는 물에 넣었을 때 입자의 형태를 유지하였고, 그것은 다양한 다당 분말 입자가 칼슘 이온의 존재하에 모두 겔화되었음을 나타낸다.

실시예 17. 겔 형성 및 약물 방출의 조절을 위한 고체 및 액체 제형의 비교

상이한 음이온 다당의 수용액과 패스트 그린 염료 (1 mg/ml)로 이루어진 액체 제형을 제조하였다. 패스트 그린은 작은 분자 치료제를 자극하기 위해 사용하였다. 사용된 음이온 다당 중합체의 농도는 HMW 알로에 펙틴에 대해서는 0.5 %, 알긴산염에 대해서는 1 %, 폴리갈락투론산, LMW 알로에 펙틴, 및 LM 감귤 펙틴에 대해서는 2 %였다. 고체 제형을 제조하기 위하여 20 ㎕의 수성 제형을 계량 트레이에 방울로서 놓고, 동결건조시킨 후 건조된 디스크로서 회수하였다.

건조된 제형 디스크 또는 20 ㎕의 액체 제형을10 mM의 EDTA가 있거나 없는, 60 mm 페트리 접시에서 3.5 ml의 정상 소 혈청에 넣었다. 약물 제제의 방출을 자극하는 패스트 그린 염료의 확산을, 시간이 경과함에 따라 제형의 초기 삽입 지점 주변에 확산된 그린 염료 원의 직경을 측정함으로써 관찰하였다.

EDTA가 없는 정상 소 혈청에서 건조된 제형 디스크는 고체 디스크의 형태를 유지하였고, 점차로 맑은 고체 겔 단편으로 변화하였다. 24시간 후에 모든 염료가 확산된 후에, 건조된 제형으로부터의 겔은 맑고 투명하게 바뀌었다. 건조된 제형의 겔 형성을 추가로 겔 디스크를 10 mM의 EDTA가 첨가된 식염수에 담금으로써 확인하였는데, 그것은 대략 30분 이내에 빠르게 용해되었다. EDTA를 함유한 정상 소 혈청에서 건조된 제형 디스크는 디스크나 필름처럼 점차로 용해되었다.

대조적으로 대부분의 액체 제형은 점차로 용해되거나 및/또는 확산되었고, 원래의 방울 모양을 닮은 뚜렷한 겔 단편의 형성은 없었으며, 2시간 후에 페트리 접시를 부드럽게 흔들어준 후 검출되는 바 단지 얇은 층의 겔 단편이 형성되었다. 그러므로 분말 제형은 액체보다 효율적으로 겔화되는 것으로 여겨진다. 그럼에도 불구하고 25 G 바늘을 통해 50 mM의 $CaCl_2$ 용액에 방울방울 떨어뜨렸을 때 액체 제형은 모두 함께 모여 겔 비드를 형성하였다. 그러나 HMW 알로에 펙틴으로 제조한 액체 제형은 함께 모여서 혈청내 원래 방울 크기보다 아주 약간만 더 큰 크기의 작은 겔 단편을 형성하였다. 이것은 고분자량 알로에 펙틴에 의해 나타난 겔 형성의 고효율을 강조하는 것이다. 이들 관찰 결과들은 함께 건조된 제형의 인 시츄 겔 형성의 효력이 액체 제형의 그것보다 월등함을 나타낸다.

EDTA가 있거나 없는 정상 소 혈청에 침지된 제형 주변에 확산된 패스트 그린 원의 직경을 시간이 흐름에 따라 건조된 제형 및 액체 제형 두 가지에 대해 측정하였다 (도 6). EDTA가 없는 고체나 액체 샘플에서의 겔 형성이, 건조된 제형일 때 겔 형성이 더 효율적이라는 관찰결과와 일치하는 염료 또는 약물 방출을 보이는 것으로 나타났다. 동일한 관찰 결과가, EDTA가 없는 것보다 EDTA가 있는 혈청에서 약간 더 빠른 염료 확산 결과를 나타낸 HMW 알로에 펙틴을 사용하여 제조한 건조된 제형을 제외한, 모든 제형으로부터 나타났다. 이것은 HMW 알로에 펙틴이 식염수에 덜 용해되거나 불용성이라는 사실, 즉 HMW 알로에 펙틴의 또 다른 분명한 특징과 관련이 있을 것이다.

실시예 18. 다당/제제 분말 제형의 인 시츄 겔 형성을 유도하기 위한 가용성 칼슘 염을 포함한 분말의 사용

단백질 활성 제제 (BSA)와 LMW 알로에 펙틴 또는 알긴산염으로부터 선택된 다당을 포함하는 2개의 분말 제형 (표 2, 샘플 2와 5)을 체로 걸러서 100 ㎛ 이하의 입자 크기를 가지는 분말을 준비하였다. 칼슘-함유 분말을 2.5 % (w/v)의 폴리비닐피롤리돈, 10 % (w/v)의 락토스, 및 1 % (w/v)의 염화 칼슘을 포함하는 액체 제형으로부터, 용액을 건조시키고 고체를 연마한 다음 분말을 40 ㎛ 미만의 입자 크기로 체로 걸러서, 건조 후 염화 칼슘 함량이 7.4 %인 겔 유도 분말을 제조함으로써 만들었다. 다당 분말과 겔 유도 분말을 4:1 중량 비율로 혼합하여 분말 혼합물의 최종 염화 칼슘 함량은 1.48 % (w/w)가 되었다.

분말 혼합물을 식염수에 현탁하였다 (5 mg/1 ml). 혼합되지 않은 세 개의 모든 분말, 즉 펙틴+ 단백질, 알긴산염+ 단백질, 및 칼슘-함유 겔 유도 분말은 NaCl 식염수에 개별적으로 현탁하였을 때 용해되었다. 그럼에도 불구하고 칼슘 겔 유도 분말과 LMW 알로에 펙틴+ 단백질, 또는 알긴산염+ 단백질을 포함하는 분말과의 혼합물은 NaCl 식염수에서 용해되지 않았다. 동일한 결과를 활성 제제로서 라이소자임을 사용하였을 때에도 얻었다. 이들 결과는 다당/단백질 분말이 체액의 식염수 용액 모델과 접촉할 때 겔화되는 것을 칼슘 함유 분말이 유도하였음을 나타낸다.

실시예 19. 다당/제제 분말 제형의 인 시츄 겔화를 유도하기 위한 난용성 다가 양이온 염을 포함하는 분말의 사용

수산화 알루미늄 ($Al(OH)_3$)은 물에 작 녹지 않지만, 사람에게 사용하기 위한 약제학적 보조제인 것으로 증명되었다. 시그마사로부터 구입한 수산화 알루미늄 현탁액은 백색을 띈, 흐리지만 균질한 입자 현탁액이었다. 알로에 펙틴 용액 (2 mg/ml 물)은 불용성 수산화 알루미늄 겔 현탁액과 혼합되었을 때, 수산화 알루미늄 입자의 가시적인 큰 응집체의 형성에 의해 나타난 바와 같이, 겔을 형성하였다. 또한 다른 펙틴과 알긴산염을 사용해도 동일한 관찰 결과가 나타났다. 응집체는 컸고, 적절한 중합체/수산화 알루미늄 비율에 도달하면 쉽게 볼 수 있었다. 유사한 결과를 인산 칼슘 (Sigma Chemical Co.)을 사용하여서도 관찰할 수 있었지만, 형성된 응집체는 수산화 알루미늄으로 형성된 것만큼 크지 않았다. 수산화 알루미늄과 인산 칼슘 두 가지 모두 상대적으로 불용성 물질이지만 (Merck Index, 13^{th}, ed), 이들 난용성 염들은 수화될 때 알로에 펙틴과의 반응에 따라 표면에서 분명히 이온화된다.

이 관찰 결과를 한층 더 탐구하기 위하여 수산화 알루미늄과 인산 칼슘 분말을 물 또는 식염수에 현탁한 후 (10 mg/ml), 다양한 최종 농도 (2.5 내지 0.0012 mg/ml)로 HMW 알로에 펙틴 용액과 혼합하였다. 큰 응집체 형성에 의해 표시된 동일한 겔 형성을 관찰하였다. 동일한 관찰 결과를 또한 알긴산염, LM 펙틴, 및 폴리갈락투론산을 사용하여서도 얻었고, 그것은 잘 녹지 않는 금속 2가 또는 다가 양이온 염을 겔-유도제로서 사용할 수 있다는 것을 가리킨다.

실례로서, 실시예 15에서처럼 알로에 펙틴 (HMW)으로 제조한 분말 제형을 수산화 알루미늄 분말과 3:1 비율로 혼합하였다. 그 혼합물 (10 mg)을 2 ml의 식염수에 현탁하였다. 큰 응집체가 바로 형성되었다. 톨루이딘 블루를 현탁액에 첨가하여 이온 중합체 분말 입자를 염색하였다. 30분 또는 그 이상의 시간이 지난 후, 작은 현탁액 방울을 유리 슬라이드 위에 놓고 현미경으로 관찰하였다. 응집체는 분홍색으로 염색된 제형 분말 입자와 불투명한 회색의 수산화 알루미늄 입자로 구성되었고, 그것은 응집체 형성을 확증하는 것이다.

두 번째 실례로서 LMW 알로에 펙틴으로 제조된 분말 제형을 수산화 알루미늄 분말과 3:1의 비율로 혼합하여, 그 혼합물을 식염수에 현탁하였다. 응집체가 형성되긴 하였지만, 현미경으로 볼 때 분홍색으로 염색된 제형 분말 입자는 거의 관찰되지 않았고, 응집체는 주로 수산화 알루미늄 입자로 구성된 것으로 나타났다. 이것은 제형 분말 입자가 용해되었고, 불용성 염은 전체 제형 입자의 겔화를 유발하지 못하였음을 나타낸다.

그러나 다당 제형/수산화 알루미늄 분말 혼합물을 3 mM의 염화 칼슘을 함유하는 식염수에 현탁하였을 때 다당 제형 입자가 다시 관찰되었고, 제형 입자와 수산화 알루미늄 입자로 구성된 응집체도 형성되었다. 혼합물을 정상 소 혈청에 현탁했을 때에도 동일한 응집체 형성을 관찰할 수 있었다.

난용성 금속 이온 염은 제형 입자를 함유하는 다당을 쉽게 통과할 수 없고, 따라서 전체 입자의 겔화를 유발할 수 없으며, 단지 중합체 교차 결합 또는 입자의 표면에서의 겔화만을 유발할 수 있다. 그것들이 난용성이거나 불용성에 가깝기 때문에 용해되지 않은 다가 양이온-함유 입자는 겔에 대한 물리적 담체로서, 또는 교차결합하는 2가 또는 다가 양이온의 장기간에 걸친 공급원으로서 작용할 수 있다. 또한 제형 분말 입자와 난용성 고체 겔-유도제는 겔화된 응집체 조성물의 형성을 유발할 수 있다. 혼합물 중의 이들 두 가지 상이한 분말의 비율과 상대적인 입자 크기에 따라, 형성된 응집체의 크기 및 다른 특성들이 달라지거나 및/또는 조절될 수 있다. 높거나 낮은 비율에서, 응집체 입자 크기는 매우 작을 수 있으며, 이때 한 유형의 한 입자는 다른 유형의 입자들에 의해 둘러싸이는 한편, 약 1의 비율에서는 입자는 네트워크로서 상호연결되어 큰 네트워크를 형성할 수 있다. 그러므로 다양한 조건하에서 형성된 응집체 겔 복합체는 점막 및/또는 콧구멍과 같은 투여 부위에서 형성된 인 시츄 겔의 물리적 특성, 용해도, 및 시간 방출 특성을 조절하는 데 사용될 수 있다.

실시예 20. 분말 제형으로부터의 약제학적 활성 제제의 지속적인 방출

활성 제제의 방출에 미치는 인 시츄 겔화 분말의 효과를, 방출 매질로서 모조 코 유체 (SNF)를 사용하여 평가하였다. 분말 제형을 다양한 양의 포비돈과 락토스를 사용하여 상기와 같이 제조하였고, 이때 모든 제형은 동일한 단백질 (BSA) 함량을 가졌다 (건조 중량을 토대로 0.1 %) (표 3 참조). 대조 분말은 이온 중합체 (HMW 알로에 펙틴)를 제외한 모든 성분을 함유하였다.

표 3

제형 조성 액체 (%, w/v) 및 건조 형태 (%, w/w)*				
	1	1 대조군	2	2 대조군
HMW AP	0.4 (2.6)	0 (0)	0.4 (3.1)	0 (0)
포비돈	15 (97.3)	15 (99.93)	2.5 (19.3)	2.5 (19.97)
락토스	0 (0)	0 (0)	10 (77.4)	10 (79.9)
BSA	0.015 (0.097)	0.015 (0.099)	0.0125 (0.097)	0.0125 (0.099)

* 수분이 없는 것을 기초로 함.

10 mg의 분말을 0.25 ml의 SNF에 현탁하였다. 30분 후에 용액 또는 상층액을 입자 또는 펠릿으로부터 원심분리에 의해 분리하고, 상층액 또는 펠릿 중의 단백질을 SDS 겔 전기영동과 밀도 분석에 의해 분석하였다. 각 제형으로부터 단백질 제제가 방출되는 백분율을 다음 식으로 측정하였다: [상층액 중의 단백질/(상층액 중의 단백질+ 펠릿 중의 단백질)]×100 %. 단백질은 거의 모두 대조 분말로부터 방출되었고 (> 90 % 방출), 모두 완전히 용해된 것으로 관찰되었다. 대조적으로 단백질 방출은 알로에 펙틴을 함유한 분말로부터는 상당히 느렸다; 이온 중합체로 제조된 분말로는 단지 55 % (제형 1) 또는 68 % (제형 2)만이 방출되었다 (도 7). 유사한 결과를 또한 활성 제제로서 라이소자임을 사용하여 얻었다. 단백질 방출은 제형 1보다 제형 2로부터 더 빠른 것으로 나타났다. 제형 2는 2.5 %의 PVP와 10 % 락토스를 함유한 반면, 제형 1은 15 %의 PVP를 함유하였고 락토스는 함유하지 않았다 (표 3). 이것은 방출 속도가 사용된 부형제의 양과 유형에 의해 추가로 조정될 수 있음을 나타낸다.

실시예 21. 약제학적 활성 제제, 다당, 겔 유도 조성물, 및 다른 부형제의 분말의 물리적 혼합물

표 2에서와 같은 분말 제형을 활성 제제 없이 제조하여 적절한 크기로 거른다. 그런 다음 약제학적으로 허용되는 부형제가 있거나 없이 제조된 활성 제제의 분말을 중합체 분말과 혼합한다. 본원에서 설명된 것과 같은 하나 또는 둘 이상의 고체 겔 유도 조성물을 또한 임의로 첨가할 수 있다. 그런 다음 분말 혼합물을 동물에게 투여한다.

실시예 22. 동물에 대한 항원을 포함하는 분말 백신 제형의 비강내 투여

고분자량의 알로에 펙틴과 디프테리아 독소 돌연변이 CRM (DT-CRM) 항원을 포함하는 분말 백신 제형을, 하기 표 4에 열거한 성분들을 수용액에 용해시키고, 그 용액을 동결건조하여 분말을 제조한 다음, 분말을 연마하고 체에 거름으로써 제조하였다. 항원을 제외한 모든 성분을 함유한 대조 제형을 유사하게 제조하였다.

표 4

성분	항원 제형 액체 (%, w/v) 및 건조 (%, w/w)	대조 제형 액체 (%, w/v) 및 건조 (%, w/w)
HMW AP	0.4 (3.1)	0.4 (3.1)
포비돈	2.5 (19.4)	2.5 (19.4)
락토스	10 (77.5)	10 (77.5)
DT-CRM	0.01 (0.077)	0 (0)

10 mg의 분말 제형 당 7.75 ㎍의 항원을 투여하기 위하여 백신 제형을 제조하였다. 200 내지 250 g의 쥐를 먼저 마취하고 10 mg의 분말을 5 ml의 주사기에 연결된 200 ㎕ 피펫 팁을 사용하여 앞서 설명된 것처럼 3 ml의 공기가 관통하는 고무 튜브를 통하여 양 콧구멍에 투여하였다 (Ryden and Edman, *Int. J. Pharm.* 83 (1992), pp. 1-10; Schipper et al., *Pharm. Res.* 10 (1993), pp. 682-686).

혈청 샘플을 접종 후 1주일 후에 쥐로부터 수집하여, 특정 혈청 IgG (면역글로불린 G)를 ELISA (효소-결합 면역 흡착 분석법)를 사용하여 분석하였다. IgG 역가에 대한 종점은 흡광도가 바탕값 (혈청이 첨가되지 않은 항원-코팅된 웰의 흡광도)보다 50 % 더 큰 가장 높은 희석률에 반비례하는 것으로서 측정하였다.

DT 분말을 받은 2마리의 쥐는 DT-CRM 항원에 대한 특정 항체를 발현하였는데, 단지 1주일 후의 평균 IgG 역가가 800이었다. DT-CRM 항원이 없는 대조 제형을 받은 2마리의 대조 쥐는 그런 항체를 발현하지 않았다 (도 8). 이 결과는 코로 분말 백신 제형을 투여하는 것이 쥐에서 특정 면역 반응을 효율적으로 유도하였음을 나타낸다.

실시예 23. 분말 제형의 동물로의 비경구 투여

실시예 16에서 설명된 것과 같이 분말 입자는 칼슘-함유 식염수에 현탁될 때 입자 상태를 유지하거나 겔 입자로 변화한다. 그러므로 분말은 칼슘 식염수 또는 칼슘 완충된 식염수 중에 현탁된 후에 입자 현탁액으로서 주사될 수 있다. 또는 달리 제형 분말은, 분말이 식염수 또는 완충 식염수에 현탁된 후 동물의 조직에 주사되는 실시예 17에서 설명된 것처럼 칼슘 분말과 사전에 혼합될 수 있다. 실시예 16에서 설명된 제형 분말은 입자 크기가 100 ㎛ 미만인 분말이 사용되었지만, 보다 작은 분말 입자 크기도 현탁된 분말의 주사와 관련된 구체예에 바람직할 것이다.

각 분말 (80 mg)을 3 mM의 $CaCl_2$를 함유한 0.4 ml의 식염수에 현탁하고, 마우스에 피하 주사하였다 (주사 부위당 0.1 ml, 2 부위/마우스). 주사 후 4시간이 지나서 마우스들을 희생시키고, 피부를 벗겨낸 다음 주사 부위를 조사하였다. 이온 중합체를 포함한 분말 제형으로 주사한 부위에서 수화되고 겔화된 입자를 나타내는 작은 혹 또는 팽창된 부분을 관찰하였다. 대조적으로 이온 중합체 없이 제조된 대조 분말로는 그런 작은 혹이나 팽창된 부분을 관찰하지 못하였다. 따라서 주사 부위는 아마도 물에 대한 흡수력이 매우 높은 중합체인 폴리비닐피롤리돈의 존재 때문에 대조 마우스의 주사 부위를 포함하여 매우 축축하였다.

실시예 24. 외래 겔-유도제와 조성물에 의해 영향을 받는 액체 제형의 겔화

물 중의 0.6 % (w/v) HMW 알로에 펙틴 용액을 다양한 농도의 염화 칼슘 2수화물 용액과 1:1 비율 (1 ml 대 1 ml)로 혼합하여 0.3 % (w/v)의 최종 중합체 농도와 0.0019 내지 0.5 % (w/v)의 최종 염화 칼슘 2수화물 농도를 이루었다. (하기 표 5 참조). 그 혼합물을 즉시 함께 격렬하게 휘저은 후, 튜브를 실온에서 유지하였다가 시간에 따라 관찰하였다. 완전하거나 부분적인 겔 형성이 분명히 0.03125 % (w/v)(2.125 mM) 이상의 최종 염화 칼슘 농도에서 혼합할 때 일어났는데, 왜냐하면 용액이 완전히 또는 부분적으로 고체화되었고 튜브를 기울였을 때 더 이상 자유롭게 흐르는 용액은 없었기 때문이다. 0.0156 %의 $CaCl_2$의 농도에서 용액의 점도는 증가하였고, 과립형의 겔 단편이 존재하였다. 그러나 0.0078 % (0.53 mM) 미만 또는 그 이하의 최종 농도에서는 겔 형성에 대한 표시가 전혀 없었고, 혼합물은 균질한 채로 24시간 이상을 그렇게 유지하였다.

표 5

농도 (%, w/v, 최종)*										
	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0
$CaCl_2.2H_2O$	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-
$ZnCl_2$	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-

* + 는 전체 겔 형성을 나타내고, ±는 부분적인 겔 형성을 나타내며, -는 겔형성이 없고 용액이 맑고 균질한 상태를 유지하는 것을 나타낸다.

2가 양이온의 통합이 인 시츄 겔화를 증가시킬 수 있다는 것을 증명하기 위하여, 정상 소 혈청을 사용한 겔 전선 이동 분석법을 실시예 3에서 설명한 것처럼 수행하였다. 따라서 0 %, 0.0039 %, 또는 0.0078 %의 염화 칼슘 또는 염화 아연을 함유한 1 ml의 3 mg/ml 펙틴 용액을, 10×75 mm 유리 시험관에 들어있는 3 ml의 정상 소 혈청 위에 부드럽게 놓았다. 계면에서 출발하여 겔은 점차로 펙틴 용액 층에서 형성되었다. 겔은 광원 하에서 용액과 비교하여 그것의 약간 증가된 혼탁도로 인해 쉽게 확인할 수 있었다. 따라서 계면에서 펙틴 용액 층의 겔의 길이 (두께)를 시간의 흐름에 따라 측정하였다. 그 결과는 겔 형성이 염화 칼슘이 첨가되지 않은 대조군과 비교할 때 시험된 두 가지 외래 염화 칼슘 농도에서 모두 증가하였음을 나타낸다 (도 9).

상기 표 5의 결과는 소량 (즉 약 0.0156 % (w/v))의 칼슘 또는 아연과 같은 2가 양이온을 유의할만한 겔화를 유발하지 않으면서 펙틴/제제 용액에 첨가할 수 있고, 그 용액을 칼슘 이온을 포함한 조직 또는 체액에 투여할 때 유도되는 겔화가 개선된다는 예상외로 놀라운 결과를 나타낸다는 점에서 유익하게 사용될 수 있다.

실시예 25. 다양한 일가 양이온이 LM 펙틴의 용액 성질에 미치는 영향

NaCl과 NH_4Cl을 물 중에서 다양한 농도로 제조하였다. 그것들을 LM 펙틴, HMW 알로에 펙틴, 또는 HM 펙틴 용액과 1:1 v/v로 혼합하였다. HM 펙틴 (DM=64 %, Sigma Chemical Co.)을 여과하여 실시예 15에서와 같이 불용성 물질을 제거하였다. 그런 다음 용액을 실온에서 1시간 동안 관찰하였다. 그런 다음 용액을 4 ℃에서 2시간 또는 더 오랫동안 냉각하였다가 다시 조사하였다.

메틸화도가 50 % 미만인 펙틴은 실온에서 염 농도-의존성 펙틴 침전을 나타냈다 (표 6 및 7 참조). HMW 알로에 펙틴은 대부분 LM 펙틴에 이어서 침전을 형성하기 쉽다. HMW 알로에 펙틴을 사용하여 펙틴 농도-의존성 효과를 또한 관찰하였다. 즉 더 낮은 농도에서 펙틴은 침전을 덜 형성시킬 수 있다. 예를 들어 침전 형성은 0.5 %의 HMW 알로에 펙틴 용액을 사

용하여 0.15 NaCl에서 느리게 일어나지만, 0.1 % 펙틴 용액에서는 그렇지 않다. 또한 0.15 M NaCl 중의 0.5 % LMW 알로에 펙틴으로는 침전이 관찰되지 않았기 때문에 분자량의 효과도 있었다. HM 펙틴 용액은 시험된 어떠한 농도 또는 온도에서 어느 염으로든지 침전 또는 겔을 형성하지 않았다.

표 6

NaCl (M)								
	0	0.1	0.15	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
HMW AP 0.1%	-(-)	-(-)	-(G)	-(G)	P(P)	P(P)	P(P)	P(P)
(MW=15×10^5) 0.5%	-(-)	-(G/P)	P(G/P)	P(P)	P(P)	P(P)	P(P)	P(P)
LM 펙틴 (0.5 %)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	P(P)	P(P)	P(P)
HM 펙틴 (0.5 %)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)

"-"는 변화 없음; "P"는 침전 형성; "G"는 맑은 겔 형성, "G/P"는 흐린 겔 형성; 괄호 안의 문자 또는 기호는 4 ℃에서 2시간 동안 샘플을 보관한 후 관찰한 것을 나타냄.

4 ℃에서 냉각하면 침전 형성이 증가한다. 그럼에도 불구하고, 0.1 % HMW 알로에 펙틴을 사용했을 때 맑은 겔이 0.15와 0.2 M NaCl에서 형성되었다. 이 겔은 가역적이었고, 실온으로 되돌렸을 때 용액으로 바뀌었다. 이런 가역적인 겔화는 4 ℃와 실온 사이로 온도를 바꿈으로써 여러 번 수행할 수 있었다. 일단 실온에서 용액으로 되돌아오면 제제는 여전히 실시예 25에서 설명된 것처럼 정상 소 혈청으로 인 시츄 겔화된다.

이런 관찰결과들은 침전 또는 겔 형성이 낮은 DM 및 HMW와 관련이 있음을, 즉 DM이 더 낮을수록 그리고 분자량이 클수록 더 많은 펙틴이 염에 의해 침전이 되기 쉽다는 것을 나타낸다.

그러나 NaCl과 NH_4Cl 사이에 현저한 차이가 발견되었다; 침전 형성에 필요한 NH_4Cl의 농도는 NaCl를 사용하여 필요한 농도보다 훨씬 더 높았다. 유사한 펙틴 농도-의존성 효과가 또한 관찰되었다. 표 7 참조. 0.5 %의 HMW 알로에 펙틴을 사용하면 침전은 0.6 M에서 실온에서 일어났으며 0.4 M로는 4 ℃에서 일어났다.

침전은 약간 흰 색이었고, 염 농도에 따라 미세하거나 큰 과립형이었다. 침전은 컷-오프 점에서 또는 침전이 처음 나타나는 염 농도에서 가장 미세하였다. 이것은 실제로 약물 투여에 사용될 수 있는 펙틴 미세 입자의 제조에 효과적인 한 방법이다.

표 7

NH_4Cl (M)								
	0	0.1	0.15	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
HMW AP 0.1 %	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(P)	P(P)
0.5 %	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(G/P)	P(P)	P(P)	P(P)
LM 펙틴(0.5%)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
HM 펙틴(0.5%)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)

"-"는 변화 없음; "P"는 침전 형성; "G"는 맑은 겔 형성, "G/P"는 흐린 겔 형성; 괄호 안의 문자 또는 기호는 4 ℃에서 2시간 동안 샘플을 보관한 후 관찰한 것을 나타냄.

상이한 단백질의 기초적인 성질을 나타내는 것 외에, 이들 관찰 결과는 생리적 이온 강도에서 또는 등장성 용액으로서 HMW 알로에 펙틴을 사용하여 액체 제형을 만들기 위해 (0.9 % (w/v)-0.154 M NaCl에 의해 구체화됨), 만약 제형이 4 ℃에서 용액으로서 보관될 필요가 있고 1 mg/ml보다 큰 펙틴 농도가 사용될 것이라면, 액체 인 시츄 겔화 제형을 위해서는 냉장고에서 보관할 필요가 있는 단백질과 같은 불안정한 활성 제제의 생리적 이온 강도를 생각해보아야 하는 것처럼 NaCl을 대신하는 것이 필요할 것이라는 것을 나타낸다. 저온 보관시에 그런 용액으로부터 일부 또는 전부의 펙틴의 침전은 매우 바람직하지 않을 것이다. 그런 제형에 사용할 수 있는 한 가지 대체 염은 특히 그것의 등장성 용액에 대한 농도 (0.84 % (w/v) 또는 0.157 M, 그것은 또한 이온 강도에서 0.154 M NaCl과 동등하다)에서의 NH_4Cl이다. 이 농도에서 NH_4Cl은 또한 그런 액체 펙틴-기초 약제학적 조성물의 인 시츄 겔화를 개선한다.

실시예 26. 비강에서 알로에 펙틴의 인 시츄 겔화

0.5 %의 알로에 펙틴 용액을 단백질 (BSA)이 있거나 없는 10 mM의 NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 완충액, 0.84 %의 NH_4Cl, pH 7.4 중에 제조하였다. 메토판 흡입에 의해 마취시킨 후에 두 개의 콧구멍 사이를 균등하게 나누어서 마우스 당 20 ㎕의 액체 제형을 마우스의 콧구멍에 직접 방울방울 떨어뜨림으로써 코 안에 투여하였다. 접종 후 4시간이 지나서, 마우스를 희생시키고 조직을 포르말린에 고정하였다. 안와 앞에서부터 출발하여 비강의 연속적인 횡단면을 제조하였다.

톨루이딘 블루와 H&E로 조직 단면을 염색함으로써 겔을 검출하였다. 톨루이딘 블루는 분홍색/자주색 물질로서 인 시츄 겔을 나타낸 반면, H&E는 겔을 연분홍색으로 염색하였다 (도 10). 겔의 모양과 크기는 다양하였고, 격막에 가까운 영역과 가운데 및 아래 외이를 포함하여 다양한 비강 영역에서 발견할 수 있었다.

알로에 펙틴 농도의 효과를 측정하기 위하여 0.25 % 또는 0.5 %의 알로에 펙틴 용액을 비강 내로, 한 가지 농도에 대하여 2 마리씩의 마우스에게 투여하였다. 투여 후 4시간 후 현미경으로 겔 형성을 조사하였다. 각 단면에서 겔의 영역을 ImageJ 소프트웨어 (National Institute of Health)에 의해 측정하고, mm^2으로 표시하였다. 동일 위치에서 단면상의 겔 영역을 비강에 존재하는 겔의 상대적인 양의 간접적인 척도로서 사용하였다. 따라서 그 결과는 더 많고 더 큰 겔이 0.25 %보다는 0.5 %에서 검출되었고, 그것은 비강에 형성된 겔의 양이 중합체 농도-의존적이라는 것을 시사한다.

실시예 27. 비강에서 인 시츄 겔화를 위한 다른 펙틴과의 비교

시판중인 다양한 LM 펙틴을 HMW 알로에 펙틴과 함께 사용하였다 (표 8). 시판중인 펙틴, 즉 시그마사 제품인 Genu 펙틴과 폴리갈락투론산을 구입한 대로 사용하였다. Genu 펙틴 LM12G를 재처리함으로써 얻어진 한 샘플을 또한 사용하였다. 그것을 물에 녹이고, 미세여과한 다음, 알코올 침전에 의해 회수하고, 진공하에 건조시킨 다음 Genu 펙틴 LM12G(R)로 표시하였다. Genu 펙틴 스플렌디드 타입 100의 분자량은 다른 저분자량 펙틴과 유사하였다 (표 8). 두 가지 상이한 HMW 알로에 펙틴 샘플은 A와 B로 표시하여 사용하였다.

시판되는 모든 펙틴 샘플을 물 중에 2 % (w/v) 용액으로서 제조한 후, 2×식염수 용액 (0.3 M NaCl)으로 1:1로 희석하였다. 이들 시판되는 펙틴은 용해되었을 때 낮은 pH, 즉 3 내지 4의 pH를 초래하였다. 용액의 pH를 NaOH로 6.5로 조정하였다. HMW 알로에 펙틴을 상술한 것과 같이, 0.84 % (w/v) NH_4Cl중에 0.5 % (w/v)의 최종 농도로 제조하였다. HMW 알로에 펙틴 용액의 pH는 5.5 내지 6.0이었고, pH 조정은 하지 않았다. 모든 샘플을 마우스의 비강에, 샘플당 2 마리의 마우스에게 상기와 같이 투여하였다. 겔 형성을 상기와 같이 4시간 후에 조사하였다.

표 8

펙틴	DM	MW ($DA \times 10^5$)	농도(%, w/v)	겔 영역(mm^2)
Genu 펙틴 LM12G	31 %	NA	1	0.0075
Genu 펙틴 LM12G(R)	31 %	<2.0	1	0.0015
Genu 펙틴 LM18G	40 %	NA	1	관찰되지 않음
Genu 펙틴 스플렌디드 타입100	15 %	3.8	1	관찰되지 않음
폴리갈락투론산, 시그마사 제품	<3 %	1.7	1	0.0023
HMW AP (A)	<10 %	>10	0.5	0.049
HMW AP (B)	<10 %	>10	0.275	0.051

각 마우스로부터 안와의 앞쪽에서 출발하여 비강의 2개의 단면을 제조하였다. 동일한 위치에서 단면상의 겔 영역을 비강에 존재하는 겔의 상대적인 양의 간접 척도로서 사용하였다. 각 군으로부터 2 마리 마우스로부터의 4 단면 모두에 있는 총 겔 영역을 측정하였고, 4로 나누어서 코 단면당 평균 겔 영역을 계산하였다. 그 결과 겔은 Genu 펙틴 LM12G, Genu 펙틴 LM12G(R), 폴리갈락투론산, 및 HMW 알로에 펙틴으로 검출되었지만, 낮은 메틸화도와 전형적인 분자량을 가지는 펙틴인 LM18G와 스플렌디드 타입 100 펙틴을 사용하는 제형으로는 겔이 형성되지 않은 것으로 나타났다. Genu LM12G와 폴리갈락투론산으로 검출된 겔의 영역은 매우 한정적이었거나, 최소한 2배 낮은 농도에서 사용된 HMW 알로에 펙틴으로부터 제조된 제형에 대해 측정된 겔 영역과 비교하여 6.5 내지 33배 더 작았다 (표 8 참조). 이들 결과는 또한 선행 기술 펙틴과 비교하여 HMW 알로에 펙틴의 예상외의 월등한 겔화 특성을 보여준다.

실시예 28. 인 시츄 겔의 코 체재 시간

인 시츄 겔의 코 체재 시간을 측정하기 위하여 0.84 % (w/v) NH_4Cl 중의 HMW 알로에 펙틴 용액 (5 mg/ml)을 비강내로 투여하였고, 겔 형성을 다양한 시간점에서, 시간점마다 2마리의 마우스를 사용하여 조사하였다. 존재하는 겔의 상대적인 양을 상기와 같이 비강 조직 단면상의 겔 영역을 측정함으로써 측정하였다.

그 결과 겔은 24시간 내내 비강에 존재하였지만, 48시간 째에는 사라졌다 (표 9). 비강의 단면에서 측정된 겔 영역을 토대로, 50 % 제거는 24시간째에 일어났다. 따라서 겔은 비강에 24시간과 48시간 사이에 존재하였다.

표 9

시 간					
	1	4	8	24	48
겔의 존재	예	예	예	예*	아니오

* 비강에 투여 후 24시간이 지나면 비강의 겔의 양은 비강의 단면에 있는 겔 영역에 의해 측정되는 바 50 % 이상 감소하였다.

실시예 29. 액체 제형을 동물에게 비강내 투여한 후 DT-CRM과 인플루엔자 항원에 대해 증가된 면역 반응

항원, 동물 및 접종: 두 개의 항원, DT-CRM (디프테리아 독소 돌연변이 CRM)과 비활성화된 서브비리온 스플릿 인플루엔자 바이러스 항원 (A/New Caledonia/20/99, H1N1)을 사용하였다. 6 내지 8주 된 Balb/c 마우스 7마리씩으로 구성된 군을 비강내로 2 또는 3회 접종하는데, 항원 (0.5 mg/ml), HMW 알로에 펙틴 (DT-CRM에 대해서는 5 mg/ml, 인플루엔자에 대해서는 2.75 mg/ml), 또는 이 두 가지의 조합으로 이루어진 제형으로, 10일 간격을 두고 마우스의 콧구멍에 직접 방울방울 떨어뜨림으로써 접종하였다 (20 ㎕/마우스). 항원 제형을 0.84 % NH_4Cl 및 10 mM의 인산염 완충액, pH 7.4에서 제조하였다.

샘플 수집 및 ELISA: 최종 접종 후 2주가 지나서 혈액과 폐 세척물 샘플을 수집하였다. 특정 혈청 IgG (면역글로불린 G)와 폐 IgA (면역글로불린 A)를 간접 ELISA (효소-결합 면역흡착 분석법)에 의해 측정하였다. 인플루엔자 (Flu)에 대하여, Protein Science Co.로부터 얻은 A/New Caledonia/20/99 (H1N1)의 재조합 HA (혈구 응집소) 단백질을 또한 HA-특정 반응을 검출하기 위한 항원으로서 사용하였다. IgG 역가의 종점을 흡광도가 바탕값 (혈청이 첨가되지 않은 항원-코팅된 웰의 흡광도)보다 50 % 더 큰 가장 높은 희석률에 반비례하는 것으로서 측정하였다. 각 폐 세척물을 항원-특정 및 총 IgA에 대하여 2개의 별도의 ELISA 프로토콜로 분석하였다. 그 결과는 ng(특정)/㎍(총)으로 표시하였다. 항원-특정 IgA의 수준을 측정하기 위하여 플레이트를 항원으로 코팅하고, 또한 연속적으로 정제된 마우스 IgA 표준을 희석하였다 (1.0 내지 0.002 ㎍/ml). 항원-특정 IgA의 수준을 정제된 IgA 표준의 흡광도 값으로 제작한 표준 곡선으로부터 계산하였다. 총 IgA를 정제된 마우스 IgA를 표준으로서 사용하여 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다.

혈청 중의 평균 IgG 역가와 폐 세척물 중의 총 IgA 비율에 특정한 평균 IgG 역가 및 그것들의 표준 편차를 모든 마우스 군에 대해 측정하였다. 평균을 스튜던트 t 시험을 사용하여 비교하였다. 역가가 10 이상인 혈청 샘플 또는 대조군보다 2배 더 높은 특정/총 IgA 비율을 가지는 폐 세척물을 반응자(responder)로 간주하였다.

결과: 강력한 혈청 IgG 및 폐 IgA 반응은 오직 항원이 알로에 펙틴과 함께 투여되었을 때 얻어졌다. 항원만으로는 최소한의 반응이 검출되었거나 전혀 반응이 없었다.

DT-CRM: 혈청 IgG 및 폐 IgA 반응은 항원이 단일 또는 여러 번 접종된 후에 항원 단독으로 투여될 때보다는 알로에 펙틴과 조합되었을 때 상당히 더 높았다. 피크 반응을 단일 접종 후 알로에 펙틴/DT-CRM으로 3주 후에 검출하였다. 반응은 또한 알로에 펙틴/DT-CRM으로 더 빠르게 개시되었는데 2주째에 검출가능하였다.

3회 접종 후 알로에 펙틴/DT-CRM 군의 마우스들의 혈청 IgG와 폐 IgA 역가는 DT-CRM 단독 군보다 상당히 더 높았다 (각각 50 또는 100배)(도 11a 및 11b). 또한 알로에 펙틴/DT-CRM 군의 마우스는 7마리 모두 혈청 IgG와 폐 IgA 두 가지에 다 반응한 반면, DT-CRM만을 받은 군의 마우스들은 7마리 중 4마리만이 혈청 IgG와 반응하였고 3마리는 폐 IgA와 반응하였다.

인플루엔자: 2회 접종 후 알로에 펙틴/Flu 항원을 받은 마우스들은 Flu 항원만을 받은 군보다 상당히 더 높은 혈청 IgG (6배)와 폐 IgA (60배) 역가를 나타냈다 (도 11c 및 11d). 혈청 IgG에 대해서는 알로에 펙틴/Flu 항원과 Flu 항원만을 받은 군의 모든 마우스가 반응하였다. 그러나 폐 IgA에 대해서는 알로에 펙틴/Flu 항원 군에서는 7마리 중 6마리가, Flu 항원만을 받은 군에서는 7마리 중 1마리만이 반응하였다. 알로에 펙틴 단독 군에서는 반응이 검출되지 않았다.

동일한 결과를 또한 HA-특정 IgG 또는 IgA를 측정하기 위한 ELISA에서 재조합 HA 단백질을 항원으로서 사용했을 때 얻을 수 있었다.

실시예 30. 락토스 및 알로에 펙틴을 포함하는 인 시츄 겔화 인플루엔자 코 분말 백신 조성물

분말형 코 인플루엔자 백신 조성물을, 락토스 (시그마사 제품, 또는 NF 등급, Fisher Scientific), DelSite Biotechnologies Inc (Irving Texas)로부터 얻은 그대로의 매우 낮은 메톡실 및 고분자량의 알로에 펙틴, 및 인플루엔자 항원 용액을 혼합함으로써 제조하였다. 항원은 A/New Caledonia/20/99 스트레인, H1N1으로부터 유도된 스플릿 서브비리온 항원이었다.

락토스와 알로에 펙틴 (AP)을 물에 녹이는 한편, 항원을 물 또는 완충 식염수 (10 mM의 인산염, pH 7.2; 150 mM의 NaCl 또는 NH_4Cl)중에 표 1에 제시된 농도에서 제조한 후 표시된 부피대로 혼합하였다. 그런 다음 액체 혼합물을 동결건조하였다. 동결건조를 위해서는 액체 혼합물을 -80 ℃에서 1시간 동안 냉동시킨 후 진공하에, Hg (Centrivap, Labconco)가 100 미크론 미만이 될 때까지 건조시켰다. 동결건조로 다공성 고체가 생성되는데, 그것을 마이크로믹서에서 분쇄하여 진공하에 멸균 40 및 100 ㎛ 나일론 막 (cell strainers, BD)을 사용하여 크기가 40 내지 100 ㎛인 분말을 제조하였다. 믹서 속도와 혼합 시간에 따라 40 내지 100 ㎛ 입자의 수율은 달라질 수 있지만 건조된 제형의 50 % 이상일 것이다. 항원이 없는 유사한 대조 제형을 또한 항원을 포함하지 않고 제조하였다.

표 9

용액 성분	부피 (ml)	% w/v (액체 혼합물)	% w/w (계산치, 건조후)
알로에 펙틴(1 g/100 ml)	1	0.1	1
락토스(20 g/100 ml)	5	10	98.7
인플루엔자 항원 (0.29 g/100 ml)	1	0.029	0.289
물과 완충 식염수	3	-	-

상기 표 9에서 알 수 있는 바와 같이, 분말은 약 98.7 중량 %의 락토스, 1 중량 %의 알로에 펙틴, 및 0.289 중량 %의 인플루엔자 항원을 포함하는 것으로 계산되었고, 10 mg의 분말 제형 당 28 ㎕의 항원을 투여하기 위해 제형하였다. 항원이 없는 대조 제형을 또한 제조하였다.

200 g의 Sprague-Dawley 쥐 3마리로 이루어진 군을 항원 함유 제형으로 비강내 접종하였고, 3마리의 다른 군은 대조 제형으로 비강내 접종하였다. 쥐를 먼저 마취시키고, 10 mg의 분말을 양 콧구멍에 5 ml의 주사기에 연결된 200 ㎕의 피펫 팁을 사용하여, 앞서 설명된 것과 같이 3 ml의 공기가 통하는 고무 튜브를 사용하여 투여하였다 (Ryden and Edman, *Int. J. Pharm.* 83 (1992), pp. 1-10; Schipper et al., *Pharm. Res.* 10 (1993), pp. 682-686). 쥐를 10일 후에 다시 동일한 과정으로 처리하였다.

혈액 샘플을 두 번째 접종 후 제 2, 4, 및 6주에 쥐들로부터 수집하였다. 폐 세척 샘플을 실험이 종결될 즈음에 (6주) 또한 수집하였다. 폐 세척은 3 ml의 인산염 완충 식염수를 사용하여 도관에 삽입하는 것을 통해 동물을 마취시킨 후에 수행하였다. 특정 혈청 IgG (면역글로불린 G)와 폐 IgA를 간접 ELISA에 의해 분석하였다. 96-웰 플레이트를 인플루엔자 항원으로 코팅하고, 항원에 결합된 혈청 샘플로부터 특정 IGg를 항-쥐 IgG-알칼리성 포스파타제 콘쥬게이트를 사용하여 검출하였다. IgG 역가에 대한 종점을 흡광도가 바탕값 (혈청이 첨가되지 않은 항원-코팅된 웰의 흡광도)보다 50 % 더 큰 흡광도 값 (410 nm)을 가지는 가장 높은 혈청 희석률에 반비례하는 것으로서 측정하였다.

각 폐 세척물을 두 개의 별도로 진행되는 ELISA 프로토콜에서 항원-특정 및 총 IgA에 대해 분석하였다. 그 결과는 ng(특정)/㎍(총)으로 표시하였다. 항원-특정 IgA의 수준을 측정하기 위하여, 플레이트를 항원 및 연속적으로 희석된 정제된 쥐 IgA 표준 (1.0 내지 0.002 ㎍/ml)으로 코팅하였다. 항원-특정 IgA의 수준을 정제된 IgA 표준의 흡광도 값으로 제작한 표준 곡선으로부터 계산하였다. 총 IgA를 정제된 쥐 IgA를 표준으로서 사용하여 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다.

특정 혈청 항체를 또한 병아리 적혈구 (RBC)를 사용하여 적혈구 응집 억제 분석법 (HAI)에 의해 측정하였다. HAI 역가의 종점은 RBC의 적혈구 응집을 포지티브로 억제하는 가장 높은 희석률이었다. 혈청의 평균 IgG 및 HAI 역가와 폐 세척물의 총 IgA 비율에 특정한 평균 IgG 및 HAI 역가를 모든 쥐 군에 대해 측정하였다.

대조군에서는 항체 반응이 검출되지 않았다. ELISA 및 HAI에 의해 나타난 바와 같은 높은 혈청 항체 반응은 인플루엔자 항원 분말 제형을 받은 세 마리의 모든 쥐에서 관찰되었다 (표 2 참조). 사람에게서, 40 이상의 적혈구 응집 억제 (HAI) 역가는 일반적으로 보호 역치로 간주된다. 처리된 쥐로부터 관찰된 HAI 역가는 모두 1:40 보다 높았고, ELISA에 의해 IgG 역가에 비례하였다. 또한 상당한 수준의 특정 폐 IgA가 실험의 종료시에 (즉 제 6주) 검출되었다.

표 10. 평균 항체 역가

시간 (주)	혈청 IgG (ELISA)	혈청 HAI	폐 IgA (ng/㎍)
2	15360	87	--
4	17066	173	--
6	20480	187	10

실시예 31. 락토스, 알로에 펙틴, 및 폴리비닐피롤리돈을 포함하는 인 시츄 겔화 인플루엔자 코 분말 백신 조성물

분말형 코 인플루엔자 백신 조성물을, 락토스 (시그마사 제품, 또는 NF 등급, Fisher Scientific), 알로에 펙틴, 폴리비닐피롤리돈 (Povidone K29-32, USP; Sigma Chemical Co.), 및 인플루엔자 항원 용액 (스플릿 서브비리온; A/New Caledonia/1/99, H1N1)을 표 11의 내용대로 혼합함으로써 제조하였다. 락토스, 알로에 펙틴, 및 포비돈을 물에 녹이는 한편, 항원을 물 또는 완충 식염수 (10 mM의 인산염, pH 7.2; 150 mM의 NaCl 또는 NH_4Cl)중에 제조하였다. 그런 다음 액체 혼합물을 동결건조하고 상술한 것처럼 분말로 제조하였다. 항원이 없는 대조 제형을 또한 항원을 포함하지 않고서 제조하였다.

분말은 약 98.8 중량 %의 락토스, 0.5 중량 %의 알로에 펙틴, 및 0.2 중량 %의 항원을 포함하는 것으로 계산되었고, 10 mg의 분말 제형 당 20 ㎕의 항원을 투여하기 위해 제형하였다. 항원이 없는 대조 제형을 또한 제조하였다.

표 11

성분	부피(ml)	% w/v	% w/w (건조후)
알로에 펙틴 (1 g/100 ml)	0.5	0.05	0.5
락토스(20 g/100 ml)	5	10	98.8
포비돈(30 g/100 ml)	0.017	0.05	0.5
인플루엔자 항원 (0.2 g/100 ml)	2	0.02	0.2
물과 완충 식염수	2.483	-	-

동물 실험 및 항체 측정은 상기와 동일하게 수행하되, 폐 세척 샘플을 측정하지 않았다. 대조군에서는 항체 반응이 검출되지 않았다. ELISA 및 HAI에 의해 나타난 것과 같은 높은 혈청 항체 반응이 인플루엔자 항원 분말 제형을 받은 세 마리의 모든 쥐에서 관찰되었다 (표 4 참조).

표 12. 평균 항체 역가

시간(주)	혈청 IgG (ELISA)	혈청 HAI
2	5133	163
4	20507	113
6	13867	113

실시예 32. 분말 제형의 겔화 또는 침전 형성을 조절하기 위한 pH의 사용

pH에 대한 반응으로 겔이나 침전을 형성하는 중합체가 많이 있다. 예를 들어 키토산 글루타메이트는 6.5 이하의 pH에서 녹을 수 있다. 그러나 pH 6.5를 넘어가면 불용성이 되고, 침전을 형성하거나 겔과 같은 물질을 형성하여 약물 투여 조절에 사용할 수 있다. 따라서 키토산을 포함하는 액체 약물 제형은 pH 6.5 이하에서 제조하고, 상술한 방법을 사용하여 건조 분말로 제조하였다. 투여 후에 이들 입자는 그것의 내부 완충 능력 때문에 부분적으로나 완전히 용해될 수 있지만, pH 7.0 내지 7.4의 체액 또는 분비물에 의해 수화될 수도 있다. 그러나 비강내 투여의 경우에 코의 유체가 산성이고, 5.5 정도로 낮은 pH를 가질 수 있다 (England et al., Clinical Otolaryggology 24, 67-68, 1999; Ireson et al., Clinical Science 100, 327-333, 2001).

그러므로 제형 분말을 다음 단계로 적절한 양의 완충 분말, 예컨대 인산염 완충액, pH 7.4와 혼합한다. 투여 및 수화될 때 완충제는 빠르게 수화시에 녹을 것이며, 국소적으로 pH 7.4의 환경을 보장하고, 그로써 제형 입자를 불용성으로 유지하거나 더 긴 시간 동안 불용성으로 유지한다.

본 명세서를 통해서 다양한 공보 및 특허를 인용하였다. 그런 공보 및 특허의 내용은 본원에서 본원의 모든 목적에 대해, 특히 약제학적 조성물의 제형과 관련하여 참조로 제시된 것이다.

본 발명의 바람직한 조성물 또는 제형 및 방법이 개시되었는데, 당업자들은 많은 변형 및 변경이 상기 내용에 따라 가능하다는 것을 명백하게 인지할 것이다. 또한 당업자들은 그러한 변형 및 변경이 첨부되는 청구범위에서 설명되는 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않는다는 것을 인지해야 한다.

산업상 이용 가능성

본 발명의 전달 시스템에 의해 생리적 활성 제제를 포함한 약제학적 조성물이 동물 또는 사람의 조직 또는 체액에 투여되었을 때 그 적용 부위에서 생리적 활성 제제를 포함하는 "인 시츄" 겔이 형성됨으로써, 단백질과 같은 생체 분자 또는 치료제가 시간의 흐름에 따라 서서히, 그리고 지속적으로 방출될 수 있어서 질병의 치료 효과가 개선된다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 바람직한 구체예를 보다 완전하게 이해하기 위하여, 아래의 상세한 설명이 첨부하는 도면을 참조로 이루어질 것이다.

도 1은 알로에 펙틴의 칼슘 겔화에 대한 NaCl의 관계를 나타내는 막대 그래프도이다.

도 2는 다양한 알로에 펙틴 농도에서 정상 동물 혈청을 사용한 알로에 펙틴 인 시츄 겔화를 도시한다.

도 3A는 HEC 농축제의 존재하에 정상 동물 혈청을 사용한 알로에 펙틴 인 시츄 겔화를 도시한다.

도 3B는 알긴산 나트륨 농축제의 존재하에 정상 동물 혈청을 사용한 알로에 펙틴 인 시츄 겔화를 도시한다.

도 4는 작은 유기 화합물 (패스트 그린, fast green)을 사용한 알로에 펙틴 인 시츄 겔을 사용하여 얻어진 느린 방출 효과를 도시한다.

도 5는 규정된 영역에서 bFGF 처리와 세포 수 사이의 관계를 나타내는 막대 그래프도이다.

도 6은 액체 또는 건조된 제형으로부터 패스트 그린이 방출되는 속도를 도시한다. 도 6a는 LM 펙틴에 대한 결과를 도시하고, 도 6b는 LMW 알로에 펙틴에 대한 결과를 도시한다. 실시예 17에서 설명되는 것과 같이 정상 소 혈청에 놓인 제형 주위에 확산된 원의 직경을 시간에 따라 측정하였다.

도 7은 실시예 20에서 설명되는 것과 같이, 고분자량의 알로에 펙틴을 포함하는 분말 제형과 모조 코 유체에 현탁된 분말 제형으로부터의 조절된 단백질 방출을 도시한다.

도 8은 실시예 22에서 설명되는 것과 같이, 분말 백신 제형을 쥐의 코 안에 투여한 후에 DT-CRM 항원에 대해 나타난 특정 혈청 IgG 반응을 도시한다.

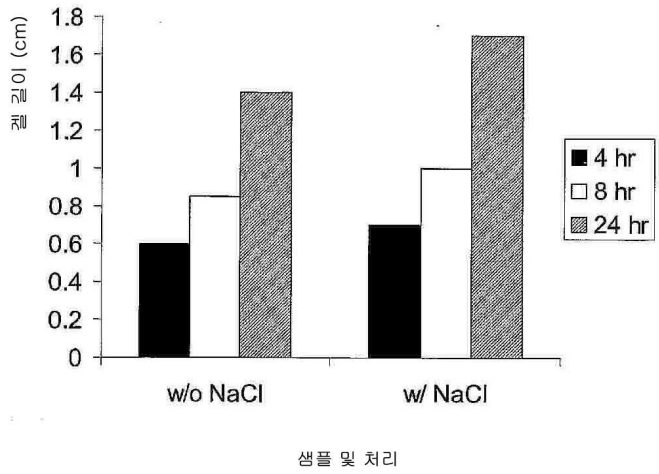
도 9는 실시예 24에서 설명되는 것과 같이, 정상 소 혈청과 접촉할 때 펙틴 제형의 인 시츄 겔화가 외래 칼슘의 첨가에 의해 개선되는 것을 도시한다.

도 10은 실시예 26에서 설명되는 것과 같이, 코 점막에서 겔이 형성되는 것을 보여주는, HMW 알로에 펙틴 용액 (0.5 %, w/v)을 코 안에 투여하고 4시간 후에 측정한 마우스의 비강의 연속적인 단면도이다.

도 11은 실시예 29에서 설명되는 것과 같이, 알로에 펙틴과 단백질 항원 (DT-CRM)(a 및 b) 또는 비활성화된 인플루엔자 스플릿 서브비리온 항원 (A/New Caledonia/20/99, H1N1)(c 및 d)을 포함하는 액체 백신 조성물을 코에 투여한 것에 대하여 마우스가 보이는 혈청 IgG와 폐 IgA 면역학적 반응을 도시한다.

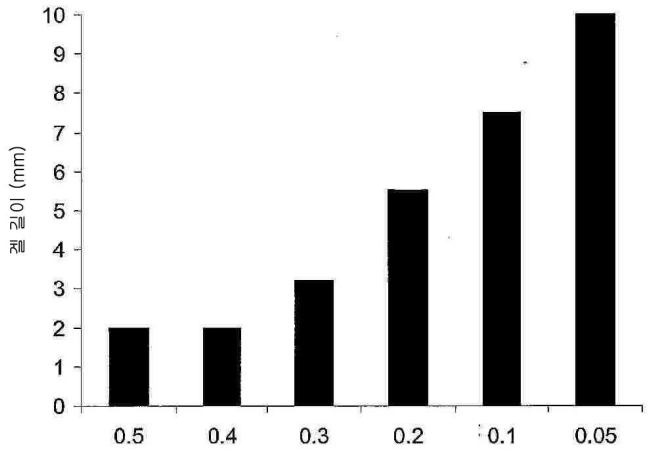
도면

도면1



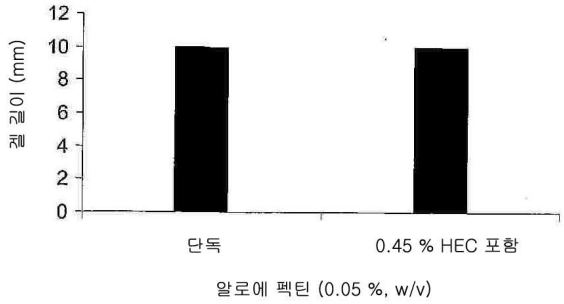
샘플 및 처리

도면2

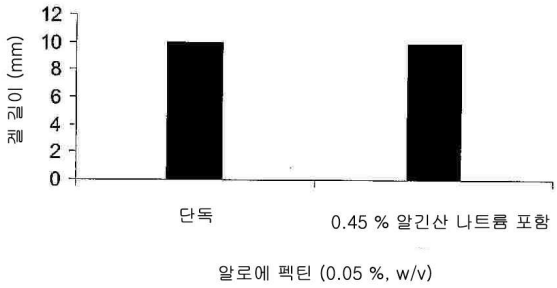


알로에 펙틴 농도 (%, w/v)

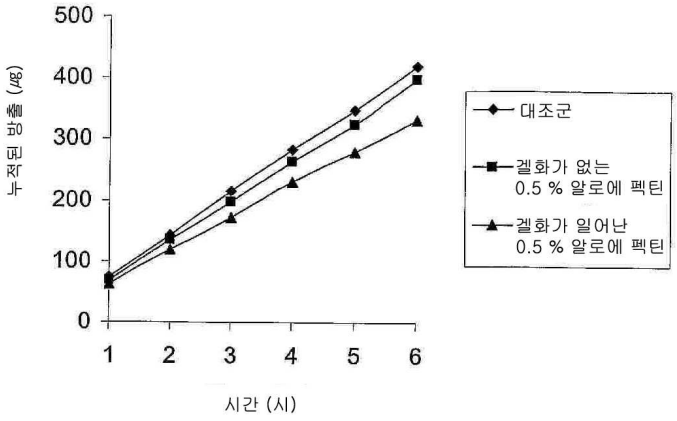
도면3a



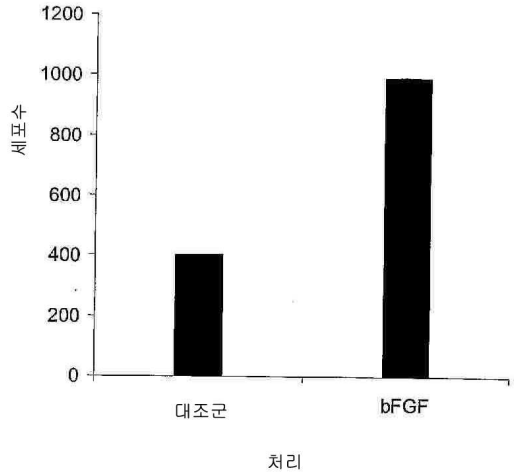
도면3b



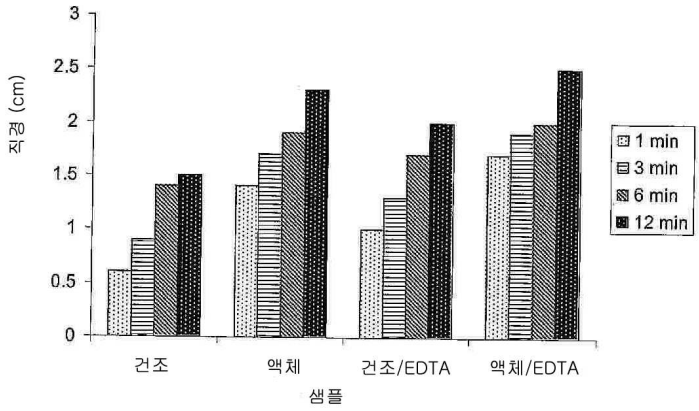
도면4



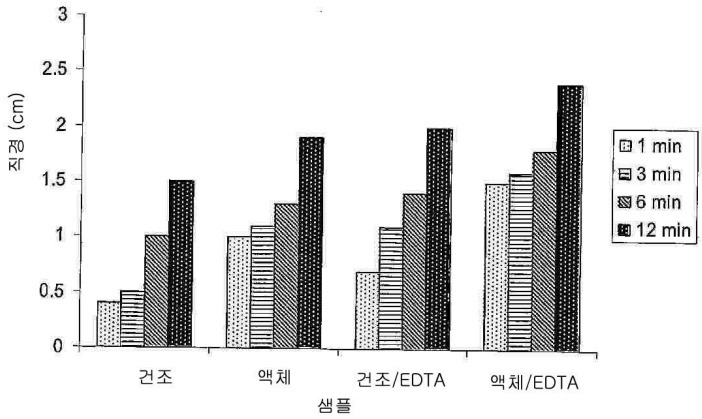
도면5



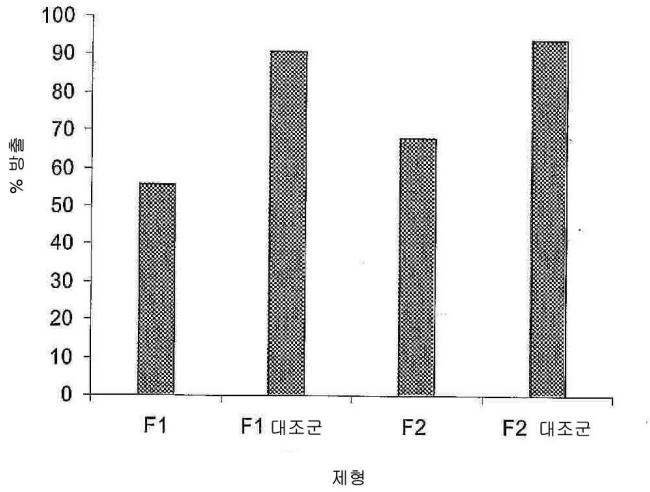
도면6a



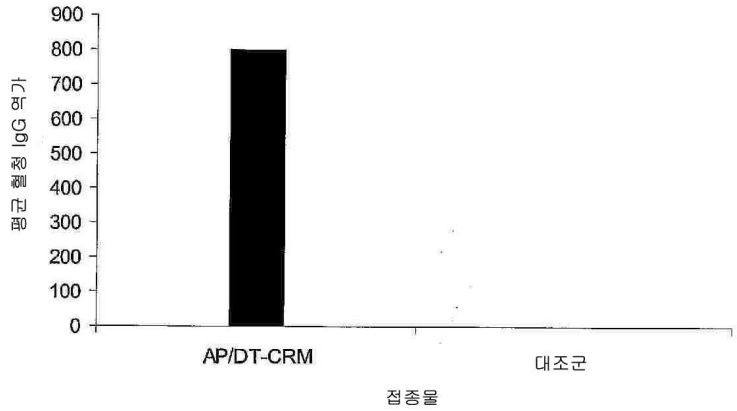
도면6b



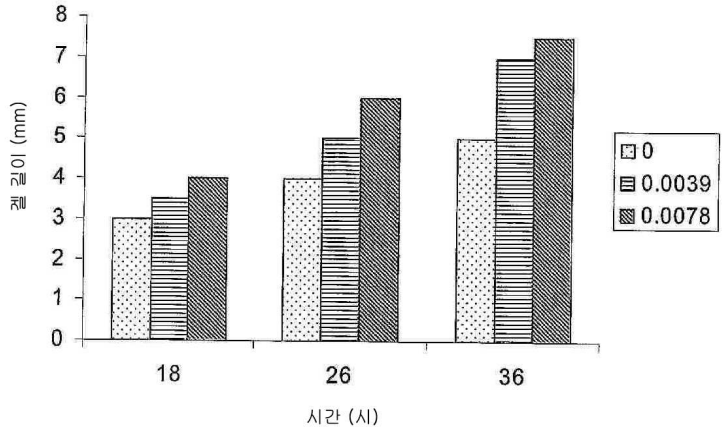
도면7


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% 방출
F1
F1 대조군
F2
F2 대조군
제형

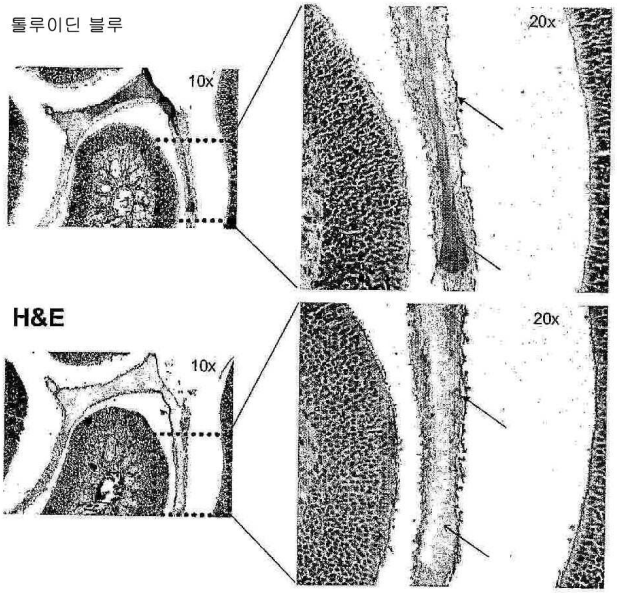
도면8


900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
평균 혈청 IgG 역가
AP/DT-CRM
대조군
접종물

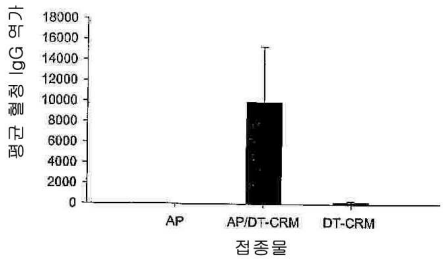
도면9


8
7
6
5
4
3
2
1
0
겔 길이 (mm)
18
26
36
시간 (시)
0
0.0039
0.0078

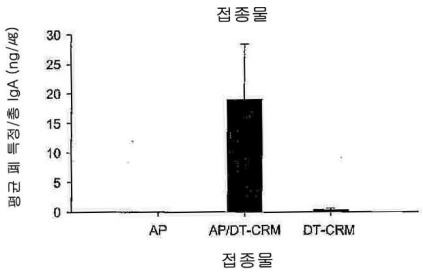
도면10



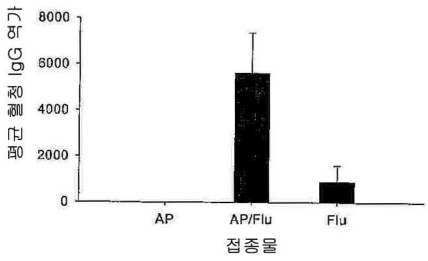
도면11a



도면11b



도면11c



도면11d

