



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월04일

(11) 등록번호 10-2140989

(24) 등록일자 2020년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) **A61K 31/341** (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01) **A61K 47/34** (2017.01)
(21) 출원번호 10-2014-7033571
(22) 출원일자(국제) 2013년05월03일
심사청구일자 2018년02월02일
(85) 번역문제출일자 2014년11월28일
(65) 공개번호 10-2015-0006868
(43) 공개일자 2015년01월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/039467
(87) 국제공개번호 WO 2013/166385
국제공개일자 2013년11월07일
(30) 우선권주장
61/642,227 2012년05월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Angewandte Chemie International Ed. 2011.
Vol.50, pp.2597-2600.*
W02006094808 A2
KR1020060118455 A
Biomaterials. 2011. Vol.32, pp.6285-6290.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
칼라 파마슈티컬스, 인크.
미국 02472 매사추세츠주 워터타운 아스널 웨이
490 스위트 120
더 존스 홉킨스 유니버시티
미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 찰스 스트리트
3400 엔.
(72) 발명자
포포브, 알렉세이
미국 02453 매사추세츠주 월섬 호프 애비뉴 60
엔로우, 엘리자베스, 엠.
미국 02451 매사추세츠주 월섬 유닛 1624 블랙 베
어 드라이브 85
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 개선된 점막 수송을 나타내는 제약 나노입자

(57) 요약

점액 중에서 입자 수송이 개선된 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물 및 방법은 임의의 중합체 담체 없이, 또는 중합체 담체의 최소한의 사용으로 점액-관통 입자 (MPP)를 제조하는 것을 포함한다. 조성물은 낮은 수용해도를 갖는 약제로 형성된 입자의 표면 코팅물을 개질시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 조성물을 사용하여 약물 전달, 영상화 및 진단용 적용을 포함한 광범위한 적용을 위해 체내에서 점액 장벽을 통한 약제의 입자의 효율적 수송을 달성할 수 있다.

(72) 발명자

부라사, 제임스

미국 02145 매사추세츠주 서머빌 아파트먼트 15 브
로드웨이 425

가드너, 콜린, 알.

미국 01742 매사추세츠주 콩코드 캐터링 하이츠
140

첸, 홍밍

미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 버치 힐 로드 16

엔사인, 로라, 엠.

미국 21212 메릴랜드주 볼티모어 리지스터 애비뉴
134

라이, 사무엘, 케이.

미국 27510 노스캐롤라이나주 캐르보로 오크 스포
링 코트 106

유, 타오

미국 21231 메릴랜드주 볼티모어 노스 브로드웨이
400 스미스 빌딩 6001 베이 에이치1

한스, 저스틴

미국 21212 메릴랜드주 볼티모어 파인허스트 로드
6306

양, 밍

미국 21215 메릴랜드주 볼티모어 아파트먼트 에프
글렌 애비뉴 2900

명세서

청구범위

청구항 1

코팅된 나노입자가

코어 약제 또는 그의 염을 포함하는 코어 입자; 및

코어 입자를 둘러싸는 표면 변경제를 포함하는 코팅물을 포함하며,

여기서 약제 또는 그의 염은 pH 범위 전반에 걸쳐 임의의 지점에서 25℃에서 1 mg/mL 이하의 수용해도를 갖고, 약제 또는 그의 염은 코어 입자의 80 wt% 이상을 구성하고,

여기서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 삼블록 공중합체를 포함하고, 여기서 소수성 블록은 폴리(프로필렌 옥시드)를 포함하며 2 kDa 이상의 분자량을 갖고, 친수성 블록은 폴리(에틸렌 옥시드) 또는 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하며 삼블록 공중합체의 15 wt% 이상을 구성하고, 소수성 블록은 코어 입자의 표면과 회합하고, 친수성 블록은 코팅된 나노입자의 표면에 존재하여 코팅된 나노입자를 친수성이 되게 하고, 표면 변경제는 나노미터 제곱당 0.001 분자 이상의 밀도로 코어 입자의 표면 상에 존재하고,

여기서 코팅된 나노입자가 점액에서 0.5 초과의 상대 속도를 갖고,

여기서 상대 속도($\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$)는
$$\frac{\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{샘플}} - \langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{음성 대조군}}}{\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{양성 대조군}} - \langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{음성 대조군}}}$$
 이고, $\langle V_{\text{평균}} \rangle$ 은 앙상블 평균 궤도-평균 속도(ensemble average trajectory-mean velocity)인 것인,

다수의 코팅된 나노입자를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 표면 변경제가 코어 입자에 비공유적으로 흡착되는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 표면 변경제가 나노미터 제곱당 0.01 분자 이상의 밀도로 코팅된 나노입자의 표면 상에 존재하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 삼블록 공중합체의 친수성 블록이 삼블록 공중합체의 30 wt% 이상을 구성하는 것인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 삼블록 공중합체의 소수성 블록 부분이 3 kDa 이상의 분자량을 갖는 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 삼블록 공중합체가 폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드) 또는 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 글리콜)인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 폴리(프로필렌 옥시드) 블록이 3 kDa 이상의 분자량을 갖는 것인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 표면 변경제가 0.1% (w/v) 이상의 농도로 용액에 존재하는 것인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 코어 입자 각각이 결정질 약제 또는 그의 염을 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 코어 입자 각각이 무정형 약제 또는 그의 염을 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 코어 입자 각각이 고체 약제의 염을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 약제 또는 그의 염이 치료제 또는 진단제 중 적어도 하나인 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 약제 또는 그의 염이 소분자, 펩티드, 펩티드모방체, 단백질, 핵산 또는 지질 중 적어도 하나인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 약제 또는 그의 염이 25℃에서 0.1 mg/mL 이하의 수용해도를 갖는 것인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 약제 또는 그의 염이 코어 입자의 85 wt% 이상을 구성하는 것인 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 코어 입자가 20 nm 이상 및 1 μ m 이하의 평균 크기를 갖는 것인 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 코팅된 나노입자가 20 nm 이상 및 1 μ m 이하의 평균 크기를 갖는 것인 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 코팅된 나노입자가, 입자가 1초의 시간 척도로 물을 통해 확산하는 확산도의 1/500 초과인 확산도로 생체 외(ex vivo) 인간 자궁경질의 점액을 통해 확산하는 것인 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 코팅된 나노입자가 점액에서 0.8 초과의 상대 속도를 갖는 것인 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 점액이 생체 외 인간 자궁경질의 점액인 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 조성물 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 첨가제 및/또는 희석제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 점막에 흡입, 주사 또는 국소 투여하기에 적합한 제약 제제.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 조성물 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 첨가제 및/또는 희석제를 포함하며, 점막 장벽을 통해 고체 약제 또는 그의 염을 전달하기 위한 제약 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 코팅된 나노입자가 점막 장벽을 통과하는 것인 제약 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 점막 장벽이 점액인 것인 제약 조성물.

청구항 26

코어 입자를 표면 변경제를 포함하는 용액과 합하고,

코어 입자를 표면 변경제로 코팅하여 코팅된 나노입자를 형성시키는 것을 포함하며,

여기서 코어 입자는 고체 약제 또는 그의 염을 포함하고, 여기서 약제 또는 그의 염은 25℃에서 용액 중 1 mg/mL 이하의 용해도를 갖고, 약제 또는 그의 염은 코어 입자 각각의 80 wt% 이상을 구성하고,

여기서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 삼블록 공중합체를 포함하고, 여기서 소수성 블록은 폴리(프로필렌 옥사이드)를 포함하며 2 kDa 이상의 분자량을 갖고, 친수성 블록은 폴리(에틸렌 옥사이드) 또는 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하며 삼블록 공중합체의 15 wt% 이상을 구성하고, 소수성 블록은 코어 입자의 표면과 회합하고, 친수성 블록은 코팅된 나노입자의 표면에 존재하여 코팅된 나노입자를 친수성이 되게 하고,

여기서 코팅된 나노입자는 점액에서 0.5 초과의 상대 속도를 갖고,

여기서 상대 속도($\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$)는
$$\frac{\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{샘플}} - \langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{음성 대조군}}}{\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{양성 대조군}} - \langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{음성 대조군}}}$$
 이고, $\langle V_{\text{평균}} \rangle$ 은 앙상블 평균 궤도-평균 속도(ensemble average trajectory-mean velocity)인 것인,

코팅된 나노입자를 형성시키는 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 "점액 중에서 입자 수송을 보조하는 나노결정, 조성물 및 방법"이라는 발명의 명칭으로 2012년 5월 3일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 61/642,227에 대하여 35 U.S.C. § 119(e) 하의 우선권을 주장하며, 이 가출원은 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 발명은 일반적으로 점액 중에서 입자 수송을 보조하는 나노결정, 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

눈, 코, 폐, 위장관 및 여성 생식 기관을 포함한 신체로의 진입의 다양한 지점에 존재하는 점액층은 자연발생적으로 점착성이며, 병원체, 알레르겐 및 이물질(debris)을 효과적으로 포착하고 점액 교체(mucus turnover)를 통

해 급속히 제거함으로써 그들에 대해 신체를 보호하는 역할을 한다. 점막을 통한 치료용, 진단용 또는 영상화용 입자의 효과적인 전달을 위해, 입자는 점액층을 용이하게 관통하여 점액 부착 및 신속한 점액 클리어런스(mucus clearance)를 피할 수 있어야 한다. 몇몇 유형의 증거는 종래의 나노입자가 점막 장벽(mucosal barrier)을 통과할 수 없음을 시사한다. 그러나, 특수 표면 코팅물로 (공유적으로 또는 비공유적으로) 개질된 중합체 나노입자 (분해성이거나 아닌 것)는 이들이 물에 확산하는 것과 거의 같게 신속히 생리학상 농후한 점액 샘플 중에서 확산할 수 있는 것으로 최근에 입증되었다. 이러한 중합체-기반 점액-관통 입자(mucus-penetrating particle: MPP)는 다양한 치료제, 영상화제 또는 진단제를 캡슐화하여 약물 전달, 진단 또는 영상화 적용을 가능하게 할 수 있다.

[0006] 그럼에도 불구하고, 중합체-기반 MPP는 약제(pharmaceutical agent)의 캡슐화되지 않은 입자와 비교하여 몇몇 고유의 한계를 가질 수 있다. 특히, 약물 전달 적용을 감안하여, 이들 한계는 다음을 포함할 수 있다: 1) 고유적으로 더 낮은 약물 로딩; 2) 중합체 나노입자에 대해 건조 분말 보관 형태로부터의 복원이 필요할 수 있기 때문에, 덜 편리한 투여 형태; 3) 잠재적으로 증가된 독성; 4) 화학적 및 물리적 안정성 우려; 및 5) 증가된 제조 복잡성. 따라서, 약제의 전달을 위한 점액-관통 입자를 포함하는 조성물 및 방법에서의 개선이 유익할 수 있을 것이다.

발명의 내용

[0007] 발명의 개요

[0008] 본 설명은 일반적으로 점액 중에서 입자 수송을 보조하는 나노결정, 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 조성물 및 방법은 임의의 중합체 담체 없이, 또는 중합체 담체의 최소한의 사용으로 점액-관통 입자를 포함한다. 본 출원의 주제는, 일부 경우에, 상호관련 생성물, 특정의 문제에 대한 대안적 해결책, 및/또는 구조 및 조성물의 다수의 상이한 사용을 포함한다.

[0009] 실시양태 중 한 세트에서, 코팅된 입자를 형성시키는 방법이 제공된다. 방법은 코어 입자를 표면 변경제(surface-altering agent)를 포함하는 용액과 합하는 것을 포함하고, 여기서 코어 입자는 고체 약제 또는 그의 염을 포함하고, 여기서 약제 또는 염은 25℃에서 용액 중 약 1 mg/mL 이하의 용해도를 갖고, 여기서 약제 또는 그의 염은 코어 입자 각각의 약 80 wt% 이상을 구성한다. 방법은 또한 코어 입자를 표면 변경제로 코팅하여 코팅된 입자를 형성시키는 것을 포함하고, 여기서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 삼블록 공중합체를 포함하고, 여기서 소수성 블록은 약 2 kDa 이상의 분자량을 갖고, 친수성 블록은 삼블록 공중합체의 약 15 wt% 이상을 구성하고, 여기서 소수성 블록은 코어 입자의 표면과 회합하고, 여기서 친수성 블록은 코팅된 입자의 표면에 존재하여 코팅된 입자를 친수성이 되게 하고, 여기서 코팅된 입자는 점액에서 0.5 초과의 상대 속도를 갖는다.

[0010] 실시양태 중 또 다른 세트에서, 다수의 코팅된 입자를 포함하는 조성물이 제공된다. 코팅된 입자는 고체 약제 또는 그의 염을 포함하는 코어 입자를 포함하고, 여기서 약제 또는 염은 pH 범위 전반에 걸쳐 임의의 지점에서 25℃에서 약 1 mg/mL 이하의 수용해도(aqueous solubility)를 갖고, 여기서 약제 또는 그의 염은 코어 입자의 약 80 wt% 이상을 구성한다. 코팅된 입자는 또한 코어 입자를 둘러싸는 표면 변경제를 포함하는 코팅물을 포함하고, 여기서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 삼블록 공중합체를 포함하고, 여기서 소수성 블록은 약 2 kDa 이상의 분자량을 갖고, 친수성 블록은 삼블록 공중합체의 약 15 wt% 이상을 구성하고, 여기서 소수성 블록은 코어 입자의 표면과 회합하고, 여기서 친수성 블록은 코팅된 입자의 표면에 존재하여 코팅된 입자를 친수성이 되게 하고, 여기서 표면 변경제는 나노미터 제곱당 약 0.001 분자 이상의 밀도로 코어 입자의 표면 상에 존재한다. 코팅된 입자는 점액에서 0.5 초과의 상대 속도를 갖는다.

[0011] 실시양태 중 또 다른 세트에서, 코팅된 입자를 형성시키는 방법은 약제를 제공하고, 표면 변경제의 존재하에 수용액 중 염을 형성시킴으로써 약제를 침전시켜 약제의 코어 입자를 형성시키는 것을 포함하고, 여기서 염은 비-염 형태의 약제보다 더 낮은 수용해도를 갖고, 염의 수용해도는 pH 범위 전반에 걸쳐 임의의 지점에서 25℃에서 약 1 mg/mL 이하이고, 여기서 표면 변경제는 수용액 중 약 0.01% (w/v) 이상의 농도로 존재한다. 방법은 코어 입자를 표면 변경제로 코팅하여 코팅된 입자를 형성시키는 것을 포함하고, 여기서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 삼블록 공중합체를 포함하고, 여기서 소수성 블록은 약 2 kDa 이상의 분자량을 갖고, 친수성 블록은 삼블록 공중합체의 약 15 wt% 이상을 구성하고, 여기서 소수성 블록은 코어 입자의 표면과 회합하고, 여기서 친수성 블록은 코팅된 입자의 표면에 존재하여 코팅된 입자를 친수성이 되게 한다. 코팅된 입자는 점액에서 0.5 초과의 상대 속도를 갖는다.

[0012] 실시양태 중 또 다른 세트에서, 치료 방법이 제공된다. 방법은 이를 필요로 하는 환자 또는 대상체에게 다수의 코팅된 입자를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 코팅된 입자는 고체 약제 또는 그의 염을 포함하는 코어 입자를 포함하고, 여기서 약제 또는 염은 pH 범위 전반에 걸쳐 임의의 지점에서 25℃에서 약 1 mg/mL 이하의 수용해도를 갖고, 여기서 약제 또는 그의 염은 코어 입자의 약 80 wt% 이상을 구성한다. 코어 입자는 또한 코어 입자를 둘러싸는 표면 변경제를 포함하는 코팅물을 포함하고, 여기서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 삼블록 공중합체를 포함하고, 여기서 소수성 블록은 약 2 kDa 이상의 분자량을 갖고, 친수성 블록은 삼블록 공중합체의 약 15 wt% 이상을 구성하고, 여기서 소수성 블록은 코어 입자의 표면과 회합하고, 여기서 친수성 블록은 코팅된 입자의 표면에 존재하여 코팅된 입자를 친수성이 되게 하고, 여기서 표면 변경제는 나노미터 제곱당 약 0.001 분자 이상의 밀도로 코어 입자의 표면 상에 존재한다. 코팅된 입자는 점액에서 0.5 초과의 상대 속도를 갖는다.

[0013] 본 발명의 다른 이점 및 신규 특질은 첨부한 도면과 함께 고려시 본 발명의 다양한 비제한적 실시양태의 하기 상세한 설명으로부터 분명해질 것이다. 본 명세서 및 참조로 포함된 문서가 상반되고/거나 불일치되는 개시를 포함하는 경우에, 본 명세서가 지배할 것이다. 참조로 포함된 2개 이상의 문서가 서로에 대하여 상반되고/거나 불일치되는 개시를 포함한다면, 발효일이 더 늦은 문서가 지배하여야 한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 본 발명의 비제한적 실시양태는, 개요적이고 일정한 비율로 확대하여 도시하고자 하는 것은 아닌, 첨부한 도면을 참조로 예로 기재될 것이다. 도면에서, 예시된 각각의 동일하거나 거의 동일한 성분은 전형적으로 단일 숫자에 의해 나타내진다. 명확성을 목적으로, 모든 성분이 모든 도면에 표시되는 것은 아니고, 당업자가 본 발명을 이해할 수 있도록 하는데 예시가 필수적이지 않은 경우 본 발명의 각각의 실시양태의 모든 성분이 표시되는 것도 아니다. 도면에서,

도 1은 실시양태 중 한 세트에 따른, 코팅물 및 고체 약제의 코어를 갖는 점액-관통 입자의 개략도이다.

도 2A는 실시양태 중 한 세트에 따른, 200 nm 카르복실화 폴리스티렌 입자 (음성 대조군), 200 nm PEG화 폴리스티렌 입자 (양성 대조군), 및 나노밀링에 의해 제조되고 상이한 안정화제/표면 변경제로 코팅된 나노결정 입자 (샘플)에 대한 인간 자궁경질의 점액(cervicovaginal mucus: CVM)에서의 앙상블(ensemble) 평균낸 속도 $\langle V_{\text{평균}} \rangle$ 를 나타내는 플롯이다.

도 2B는 실시양태 중 한 세트에 따른, 나노밀링에 의해 제조되고 상이한 안정화제/표면 변경제로 코팅된 나노결정 입자에 대한 CVM에서의 상대 속도 $\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$ 를 나타내는 플롯이다.

도 3A-3D는 실시양태 중 한 세트에 따른, 상이한 표면 변경제로 코팅된 나노결정 입자의 앙상블 내에서 CVM에서의 궤도-평균 속도(trjectory-mean velocity) $V_{\text{평균}}$ 의 분포를 나타내는 히스토그램이다.

도 4는 실시양태 중 한 세트에 따른, PPO 블록의 분자량 및 PEO 중량 함량 (%)에 대해 맵핑된, 상이한 PEO-PPO-PEO 플루로닉(Pluronic)[®] 삼블록 공중합체로 코팅된 나노결정 입자에 대한 CVM에서의 $\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$ 를 나타내는 플롯이다.

도 5는 실시양태 중 한 세트에 따른, 플루로닉[®] F127 (MPP) 또는 소듐 도데실 술페이트 (CP, 음성 대조군) 중 어느 하나로 코팅된 상이한 코어 물질을 갖는 고체 입자에 대한 CVM을 통한 대량 수송(mass transport)을 나타내는 플롯이다.

도 6A-6C는 실시양태 중 한 세트에 따른, 처방 로테프레드놀 에타보네이트, 로테맥스[®], 또는 플루로닉[®] F127로 코팅된 로테프레드놀 에타보네이트의 입자의 투여 후 뉴질랜드 백색 토끼의 안검 결막 (도 6A), 안구 결막 (도 6B), 및 각막 (도 6C) 중 로테프레드놀 에타보네이트의 약물 수준을 나타낸다.

도 7A 및 7B는 실시양태 중 한 세트에 따른 CUR-1% F127 입자의 물리화학적 특성화이다. 도 7A는 F127, 생 쿠르쿠민(raw curcumin) 및 CUR-1% F127 입자의 분말 X-선 회절 (분말-XRD)도이다. 도 7B는 CUR-1% F127 입자의 대표적 투과 전자현미경 (TEM) 영상이다.

도 8A 및 8B는 실시양태 중 한 세트에 따른, 시간 척도(time scale)의 함수로서 CVM (도 8A) 및 인간 낭포성 섬유증 객담 (CFS) (도 8B)에서 CUR-1% F127 입자, 200 nm 카르복실화 폴리스티렌 (PSCOOH) 및 200 nm PEG화 폴

리스티렌 (PSPEG) 입자의 양상블 평균넢 기하 평균-제곱 변위 (<MSD>)이다. 데이터는 5개의 독립 실험의 양상블 평균을 나타내고, 각 실험에 대해 $n \geq 100$ 이다. 오차 막대(error bar)는 기하 표준 오차를 나타낸다.

도 9는 실시양태 중 한 세트에 따른, 인간 CVM에서 F127의 상이한 농도로 제제화된 CUR 입자에 대한 1 s의 시간 척도에서 기하 양상블 유효 확산도(effective diffusivity) (<Deff>)를 나타내는 플롯이다. 데이터는 3개 이상의 독립 실험의 양상블 평균을 나타내고, 각 실험에 대해 $n \geq 100$ 이다. 오차 막대는 기하 표준 오차를 나타낸다.

도 10A-10C는 실시양태 중 한 세트에 따른, 인간 CVM에서 상이한 플루로닉스®로 제제화된 CUR 입자의 확산도를 나타내는 플롯이다. 도 10A는 플루로닉스®의 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG) 세그먼트 및 폴리(프로필렌 옥사이드) (PPO) 세그먼트의 분자량 (MW)에 대하여 1 s의 시간 척도에서 <Deff>의 분포를 나타낸다. 각각의 데이터 점은 플루로닉스®의 특정 유형을 나타낸다. PPO 및 PEG MW는 제조업자에 의해 제공된 분자량을 기반으로 평가하였다. 도 10B-C는 (B) PEG 또는 (C) PPO 세그먼트의 MW의 함수로서 1 s의 시간 척도에서 <Deff>를 나타낸다. 삽도는 <Deff>의 선형 척도를 사용한 동일 플롯을 나타내며, 한편 R은 상관 계수를 나타낸다. 데이터는 3개 이상의 독립 실험의 양상블 평균을 나타내고, 각 실험에 대해 $n \geq 100$ 이다. 오차 막대는 기하 표준 오차를 나타낸다.

도 11은 실시양태 중 한 세트에 따른, 옥타놀 추출을 사용한 인산염 완충 식염수 (pH=7.4) 중에서 CUR-1% F127 입자의 누적 방출을 나타내는 플롯이다.

도 12는 실시양태 중 한 세트에 따른, 용액 중 유리(free) TFV 대 현탁액 중 TFV-Zn 입자의 투석 백(dialysis bag)으로부터 통상의 인산염 완충 식염수로의 누적 방출을 나타내는 플롯이다.

도 13A-13B는 실시양태 중 한 세트에 따른, 인간-유사 발정기(estrus phase) 마우스로부터의 평탄화된 질 조직 상에 점액 관통 / F127-코팅된 TFV 입자 (도 13A) 및 점막-부착성(muco-adhesive) / PVA-코팅된 TFV 입자 (도 13B)의 분포를 나타내는 영상이다. 질 조직을 투여 10분 이내에 제거하였다.

도 14A-14D는 마우스 발정기 CVM에서 CP 및 MPP의 수송률(transport rate)을 나타낸다. (도 14A) 1 s의 시간 척도에서 양상블 평균의 한 SEM 내에 유효 확산도를 나타내는 입자의 대표적 궤도. (도 14B) 시간 척도의 함수로서 양상블-평균넢 기하 평균 제곱 변위 (<MSD>). 생체의 인간 CVM (hCVM)에서의 동일 입자와 비교된 생체의 마우스 질 조직 (mCVM) 상에서 입자에 관한 데이터 (문헌 [S. K. Lai, Y. Y. Wang, K. Hida, R. Cone, J. Hanes, nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. P Natl Acad Sci USA 107, 598-603 (2010)]) 및 수 중 110 nm 입자의 이론상 확산 속도(theoretical diffusion rate) ($\sim 4 \mu\text{m}^2/\text{s}$). (도 14C) 1 s의 시간 척도에서 개별 입자 유효 확산도 (D_{eff})의 로그의 분포. 데이터는 3개의 독립 실험의 양상블 평균을 나타내고, 각 실험에 대해 $n \geq 150$ 입자이다. 점선의 좌측으로의 확산도 값은 입자 직경보다 작은 MSD 값을 갖는 입자를 나타낸다. (도 14D) 무작위 확산을 겪는 입자의 확산 모의(simulation)의 픽의 제2 법칙(Fick's Second Law)을 기반으로, 시간 경과에 따른 마우스 CVM의 $100 \mu\text{m}$ -두께 층을 관통할 수 있는 입자의 백분율이고, 여기서 확산도는 입자의 실험적으로 측정된 확산도와 동등하다. 도 14E는 젤, CP, 및 MPP 제제로부터 질 약물 전달을 그래프로 도시한 것이다.

도 15A-15B는 IE 마우스 질 조직 상에서 나노입자의 수송을 나타내는 플롯이다. 시간 척도의 함수로서 양상블-평균넢 기하 평균 제곱 변위 (<MSD>). (도 15A) 유도된 발정 (IE) 및 자연발생 주기 발정기 마우스의 생체의 질 조직 상에서 MPP 및 CP에 관한 데이터를 나타낸다. (도 15B) IE 조직 상의 생체분해성 MPP가 비-생체분해성 MPP와 비교되었다. 데이터는 3개 이상의 독립 실험의 양상블 평균을 나타내고, 각 실험에 대해 평균 $n \geq 150$ 입자 및 130개 이상의 입자이다. 데이터는 평균의 표준 오차 (SEM)와 함께 평균으로서 제시된다.

도 16은 마우스 질에서의 입자 분포를 예시하는 영상을 포함한다. 발정기 및 IE 마우스 질 조직의 가로 저온절개편(transverse cryosection)에서 적색 형광 비-생체분해성 및 생체분해성 CP 및 MPP의 분포. 영상은 $n \geq 3$ 마우스의 대표적인 것이다.

도 17은 질 나노입자 커버리지(coverage)의 정량화를 나타내는 영상 및 플롯을 포함한다. 평탄화된 발정기 마우스 질 조직 상의 적색 형광 비-생체분해성 및 생체분해성 CP 및 MPP의 분포. 삽도는 더 높은 배율에서 암 영역의 영상이다. 영상은 $n \geq 3$ 마우스에 대해 계산된 평균의 대표적인 것이다. 데이터는 평균 \pm SEM이다. * $P < 0.05$, 스튜던트 t 검정(Student's t test).

도 18은 자궁경부 나노입자 커버리지를 나타내는 영상을 포함한다. 발정기 마우스 자궁경부 조직 상의 적색 형광 비-생체분해성 및 생체분해성 CP 및 MPP의 자궁경부 분포. 삽도는 더 높은 배율에서 암 영역의 영상이다. 영상은 $n \geq 3$ 마우스의 대표적인 것이다. 데이터는 평균 \pm SEM이다. $*P < 0.05$, 스튜던트 t 검정.

도 19는 점액 제거가 점막부착성 나노입자에 미치는 영향을 나타내는 영상을 포함한다. 무손상(intact) 점액층(비처리) 또는 세척(lavage) 및 스와빙(swabbing)에 의해 제거된 점액(점액 제거됨) 중 어느 하나를 갖는 마우스 질 조직의 가로 저온절개면에서의 적색 형광 비-생체분해성 및 생체분해성 CP의 분포. 영상은 $n \geq 3$ 마우스의 대표적인 것이다.

도 20은 IE 마우스 질에서의 입자 분포를 나타내는 영상을 포함한다. IE 마우스 질 조직의 가로 저온절개면에서의 적색 형광 비-생체분해성 CP 및 MPP의 분포. 영상은 $n \geq 3$ 마우스의 대표적인 것이다.

도 21A-21B는 IE 마우스 자궁경질관(cervicovaginal tract)에서 비-생체분해성 MPP 및 CP의 체류를 나타내는 영상 및 플롯이다. (도 21A) 전체 자궁경질관 조직에서 CP 및 MPP에 관한 입자 형광 강도 및 명-시야(bright-field) 영상의 오버레이(overlay). (도 21B) 입자 형광성의 정량화를 기반으로 시간 경과에 따라 잔류하는 입자의 분획. 데이터는 평균 \pm SEM이다 ($n \geq 7$). $*P < 0.05$, 스튜던트 t 검정.

도 22는 생체분해성 MPP에 캡슐화되거나 겔 형태로 전달된 발정 마우스 질에서, 모델 약물, FITC의 분포 및 체류를 나타내는 영상을 포함한다. 24 h 후 평탄화된 마우스 질 조직의 형광 영상을 취했다. 영상은 $n \geq 3$ 마우스의 대표적인 것이다. 데이터는 평균 \pm SEM이다. $*P < 0.05$, 스튜던트 t 검정.

도 23은 매일 투여한 급성 독성 및 시토카인 농도를 나타내는 영상을 포함한다. 5% N9, PBS, CP, MPP, BD-CP, 및 BD-MPP의 질내 투여 후 24 h에 절제된 마우스 DP 질 조직의 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)-염색된 단면(cross-section). 스케일 바(scale bar)는 모든 영상에 적용된다. 화살촉은 호중구의 클러스터(cluster)를 지시한다. 영상은 $n \geq 5$ 마우스의 대표적인 것이다.

도 24는 매일 투여한 시토카인 농도를 나타내는 플롯이다. 7일 동안 매일 질 처리 후 DP 마우스 자궁경질 세척물(cervicovaginal lavage: CVL)에서의 시토카인 농도. 데이터는 평균 \pm SEM이다. $*P < 0.05$, 스튜던트 t 검정.

도 25는 점액 중 플루로닉® F127로 코팅된 폴리스티렌 입자의 상대 속도와 입자 표면 상의 플루로닉® F127 분자의 밀도 사이의 관계를 나타내는 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

상세한 설명

[0016]

점액 중에서 입자 수송을 보조하는 나노결정, 조성물 및 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물 및 방법은 임의의 중합체 담체 없이, 또는 중합체 담체의 최소한의 사용으로 점액-관통 입자(MPP)를 제조하는 것을 포함한다. 조성물 및 방법은, 일부 실시양태에서, 낮은 수용해도(water/aqueous solubility)를 갖는 약제로 형성된 입자의 표면 코팅물을 개질시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 방법 및 조성물을 사용하여 약물 전달, 영상화 및 진단용 적용을 포함한 광범위한 적용을 위해 체내에서 점액 장벽을 통한 약제의 입자의 효율적 수송을 달성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 입자를 포함하는 제약 조성물은 점막 장벽을 통과하는 입자와 관련된 투여 경로에 적절하다.

[0017]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 코어-셸 유형 배열을 갖는다. 코어는 비교적 낮은 수용해도를 갖는 고체 약제 또는 그의 염을 포함할 수 있다. 코어는 점액 중에서 입자의 이동성을 촉진시키는 표면 변경제를 포함하는 코팅물 또는 쉘로 코팅할 수 있다. 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 삼블록 공중합체를 포함할 수 있다. 친수성 및 소수성 블록 각각의 분자량을 선택하여 입자에 특정 수송 특징, 예컨대 점액을 통한 증가된 수송을 부여할 수 있다.

[0018]

입자의 비제한적 예가 이제 제공된다. 도 1의 예시적 실시양태에서 나타난 바와 같이, 입자 (10)는 코어 (16) (이는 본원에서 코어 입자로서 지칭된, 입자의 형태일 수 있음) 및 코어를 둘러싸는 코팅물 (20)을 포함한다. 실시양태 중 한 세트에서, 코어의 상당 부분은 특정의 유익한 및/또는 치료 효과를 야기할 수 있는 1종 이상의 고체 약제 (예를 들어, 약물, 치료제, 진단제, 영상화제)로 형성된다. 코어는, 예를 들어 약제의 나노결정 (즉, 나노결정 입자)일 수 있다. 코어는 1종 이상의 표면 변경제가 부착될 수 있는 표면 (24)을 포함한다. 예

를 들어, 일부 경우에, 코어 (16)는 내부 표면 (28) 및 외부 표면 (32)을 포함하는 코팅물 (20)에 의해 둘러싸여진다. 코팅물은, 적어도 부분적으로, 코어의 표면 (24)과 회합할 수 있는, 1종 이상의 표면 변경제 (34), 예컨대 중합체 (예를 들어, 블록 공중합체)로 형성될 수 있다. 표면 변경제 (34)는, 예를 들어 코어 입자에 공유적으로 부착, 코어 입자에 비공유적으로 부착, 코어에 흡착, 또는 이온 상호작용, 소수성 및/또는 친수성 상호작용, 정전기 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 또는 그의 조합을 통해 코어에 부착됨으로써 코어 입자와 회합될 수 있다. 실시양태 중 한 세트에서, 표면 변경제, 또는 그의 부분을 선택하여, 점막 장벽 (예를 들어, 점액 또는 점막)을 통한 입자의 수송을 촉진시킨다.

[0019] 본원에 기재된 특정 실시양태에서, 1종 이상의 표면 변경제 (34)는 입자의 코팅물에 특정 구성으로 배향된다. 예를 들어, 표면 변경제가 삼블록 공중합체, 예컨대 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 갖는 삼블록 공중합체인 일부 실시양태에서, 소수성 블록 (36)은 코어의 표면을 향해 배향될 수 있고, 친수성 블록 (38)은 코어 표면으로부터 떨어져 (예를 들어, 입자의 외부부를 향해) 배향될 수 있다. 친수성 블록은 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 점막 장벽을 통한 입자의 수송의 촉진시키는 특징을 가질 수 있다.

[0020] 입자 (10)는 임의로 1종 이상의 성분 (40), 예컨대 임의로 입자에 특이성을 부여할 수 있는, 표적 모이어티 (targeting moiety), 단백질, 핵산, 및 생물활성제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 표적 작용제 또는 분자 (예를 들어, 단백질, 핵산, 핵산 유사체, 탄수화물, 또는 소분자)는, 존재할 경우, 대상체의 신체의 특징의 위치에 입자를 지향시키는데 보조할 수 있다. 위치는, 예를 들어 조직, 특징의 세포 유형, 또는 세포내 구획일 수 있다. 1종 이상의 성분 (40)은, 존재할 경우, 코어, 코팅물, 또는 둘 다와 회합될 수 있고; 예를 들어, 이들은 코어의 표면 (24), 코팅물의 내부 표면 (28), 코팅물의 외부 표면 (32)과 회합되고/거나 코팅물에 매립될 수 있다. 1종 이상의 성분 (40)은 공유 결합, 흡수를 통해 회합되거나, 이온 상호작용, 소수성 및/또는 친수성 상호작용, 정전기 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 또는 그의 조합을 통해 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 성분은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 코팅된 입자의 1종 이상의 표면 변경제에 부착 (예를 들어, 공유적으로)될 수 있다.

[0021] 도 1에 나타내거나 본원에서 기재된 것 이외의 성분 및 구성이 특정 입자 및 조성물에 적합할 수 있고, 일부 실시양태에서 도 1에 나타난 성분 모두가 반드시 존재하는 것은 아님을 이해하여야 한다.

[0022] 실시양태 중 한 세트에서, 입자 (10)는, 대상체에 도입시, 대상체에서 하나 이상의 성분, 예컨대 점액, 세포, 조직, 기관, 입자, 유체 (예를 들어, 혈액), 그의 부분, 및 그의 조합과 상호작용할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 코팅입자 (10)의 코팅물은 대상체로부터 하나 이상의 물질과 유리한 상호작용 (예를 들어, 수송, 결합, 흡착)을 가능하게 하는 특성을 갖는 표면 변경제 또는 다른 성분을 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 코팅물은 대상체에서 특징의 상호작용을 촉진시키거나 감소시키는, 특정 친수성, 소수성, 표면 전하, 관능기, 결합에 대한 특이성, 및/또는 밀도를 갖는 표면 변경제 또는 다른 성분을 포함할 수 있다. 한 구체적인 예는 입자와 대상체의 점액 사이의 물리적 및/또는 화학적 상호작용을 감소시키는 1종 이상의 표면 변경제의 특정 친수성, 소수성, 표면 전하, 관능기, 결합에 대한 특이성, 및/또는 밀도를 선택하여, 점액을 통한 입자의 이동성을 향상시키도록 하는 것을 포함한다. 다른 예는 하기에 더 상세히 기재되어 있다.

[0023] 일부 실시양태에서, 일단 입자가 대상체에서 점막 장벽 (예를 들어, 점액 또는 점막)에 걸쳐 성공적으로 수송되면, 대상체에서 입자 사이의 추가 상호작용이 일어날 수 있다. 상호작용은, 일부 경우에, 코팅물 및/또는 코어를 통해 일어날 수 있고, 예를 들어 대상체의 하나 이상의 성분에서 입자 (10)로의, 및/또는 입자 (10)에서 대상체의 하나 이상의 성분으로의 물질 (예를 들어, 약제, 치료제, 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 핵산, 영양소)의 교환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 코어가 약제로 형성되거나 약제를 포함하는 일부 실시양태에서, 입자로부터의 약제의 분해, 방출 및/또는 수송은 대상체에서 특징의 유익한 및/또는 치료 효과를 야기할 수 있다. 그와 같이, 본원에 기재된 입자는 특정 질환 또는 신체적 병태의 진단, 예방, 치료 또는 관리에 사용될 수 있다.

[0024] 본원에 기재된 입자의 용도에 관한 구체적인 예는 대상체에서 점막 장벽 (예를 들어, 점액 또는 점막)에 투여하기에 적합하다는 맥락에서 하기에 제공된다. 본원에서 많은 실시양태가 이러한 맥락 및 점막 장벽에 걸쳐 물질의 수송과 관련되는 질환 및 병태에 유익성을 제공한다는 맥락에서 기재되지만, 본 발명이 그와 같이 제한되는 것은 아니고 본원에 기재된 입자, 조성물, 키트, 및 방법을 사용하여 다른 질환 또는 신체적 병태를 예방, 치료, 또는 관리하는데 사용할 수 있음을 알아야 한다.

[0025] 점액은 눈, 코, 폐, 위장관 및 여성 생식 기관을 포함한 신체로의 진입의 다양한 지점에서 병원체, 독소 및 이 물질에 대해 보호하는 점성의 점탄성 겔이다. 많은 합성 나노입자는 강하게 점막부착성이고 신속히 클리어런스된 주변 점액층에서 효과적으로 포착되고, 이는 점막 전반에 걸쳐 그의 분포뿐만 아니라 하층의 조직을 향한 침

투를 막대하게 제한한다. 이들 포착된 입자의 체류 시간은 주변 점액층의 교체율에 의해 제한되고, 이는 기관에 따라, 수초 내지 수시간 범위이다. 점막을 통해 약제 (예를 들어, 치료, 진단, 및/또는 영상화제)를 포함하는 입자의 효과적인 전달을 보장하기 위해, 이러한 입자는 점액 장벽을 통해 용이하게 확산되어, 점액 부착을 피해야 한다.

[0026] 점액-관통 코팅물로 중합체 나노입자의 표면을 개질시키는 것은 점액에 대한 부착을 최소화하고 따라서 점액 장벽에 걸쳐 신속한 입자 관통을 가능하게 할 수 있음이 최근에 입증되었다. 구체적으로, 500 nm 만한 크기의 중합체 나노입자는, 저분자량 PEG (2 kDa -5 kDa)의 치밀 코팅물과 공유적으로 또는 특정의 플루로닉® 분자 (예를 들어, P103, P105, F127)와 비공유적으로 코팅시, 이들이 순수한 물에서 이동하는 것만큼 거의 신속하게, 그리고 유사한-크기의 코팅되지 않은 중합체 입자보다 거의 100배 신속한 속도로 인간 점액을 관통할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0027] 그럼에도 불구하고, 중합체-기반 점액-관통 입자는 일부 실시양태에서 하나 이상의 고유의 한계를 가질 수 있다. 특히, 약물 전달 적용을 감안하여, 이들 한계는 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: A) 낮은 약물 캡슐화 효율 및 낮은 약물 로딩: 중합체 입자로의 약물의 캡슐화는, 일반적으로 제조 동안 입자로 캡슐화된 사용된 약물의 총량의 10% 미만으로, 종종 비효율적이다. 게다가, 50% 초과인 약물 로딩은 좀처럼 달성되지 않는다. B) 용법의 편의성: 약물-로딩된 중합체 입자를 기반으로 하는 제제는, 일반적으로, 전형적으로, 조기 약물 방출을 피하기 위해 건조 분말로서 보관되어야 하고, 따라서 사용 현장(point-of-use) 복원(reconstitution) 또는 고성능 투여 장치를 필요로 한다. C) 생체적합성: 반복 투여 후에 서서히 분해되는 중합체 담체의 축적 및 장기간에 걸친 그의 독성이 중합체 약물 담체에 대한 주요 우려로 존재한다. D) 화학적 및 물리적 안정성: 중합체 분해는 캡슐화된 약물의 안정성을 손상시킬 수 있다. 많은 캡슐화 공정에서, 약물은 용액 상에서 고체 상으로 전이를 겪고, 이는 신생하는 고체 상의 물리적 형태 (즉, 무정형 대 결정질 대 결정질 다형체)의 면에서 잘 제어되지 않는다. 이는 물리적 및 화학적 안정성 및 방출 속도론(release kinetics)을 포함한, 제제화 수행의 다중 측면에 대한 우려이다. E) 제조 복잡성: 약물-로딩된 중합체 MPP의 제조, 특히 확장성(scalability)은 전형적으로 다중 단계 및 상당량의 독성 유기 용매를 포함하는 상당히 복잡한 공정이다.

[0028] 본원에 기재된 일부 실시양태에서, 점막 장벽을 통한 수송을 증가시킨 입자를 제조하기 위한 특정 조성물 및 방법을 포함한, 조성물 및 입자 제조 방법은, 상기 기재된 우려 중 하나 이상, 또는 모두를 해결한다. 구체적으로, 일부 실시양태에서, 조성물 및 방법은 중합체 담체로의 캡슐화를 포함하지 않거나 중합체 담체의 최소한의 사용을 포함한다. 유리하게는, 약제 (예를 들어, 약물, 영상화제 또는 진단제)를 중합체 담체로 캡슐화할 필요를 피하거나 최소화함으로써, 약물 로딩, 용법의 편의성, 생체적합성, 안정성, 및/또는 제조의 복잡성에 대하여 중합체 MPP의 특정 한계가 해결될 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 조성물은 점액-관통 입자 기술의 임상 개발을 촉진시킬 수 있다.

[0029] 코어 입자

[0030] 도 1을 참조로 상기 기재된 바와 같이, 입자 (10)는 코어 (16)를 포함할 수 있다. 코어는 임의의 적합한 물질, 예컨대 유기 물질, 무기 물질, 중합체, 또는 그의 조합물로 형성될 수 있다. 실시양태 중 한 세트에서, 코어는 고체를 포함한다. 고체는, 예를 들어 결정질 또는 무정형 고체, 예컨대 결정질 또는 무정형 고체 약제 (예를 들어, 치료제, 진단제, 및/또는 영상화제), 또는 그의 염일 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 초과인 약제가 코어에 존재할 수 있다. 약제의 구체적 예는 하기에 더 상세히 제공된다.

[0031] 약제는 임의의 적합한 양, 예를 들어 코어의 약 1 wt% 이상, 약 5 wt% 이상, 약 10 wt% 이상, 약 20 wt% 이상, 약 30 wt% 이상, 약 40 wt% 이상, 약 50 wt% 이상, 약 60 wt% 이상, 약 70 wt% 이상, 약 80 wt% 이상, 약 85 wt% 이상, 약 90 wt% 이상, 약 95 wt% 이상, 또는 약 99 wt% 이상으로, 코어에 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 코어는 약제 100%로 형성된다. 일부 경우에, 약제는 약 100 wt% 이하, 약 90 wt% 이하, 약 80 wt% 이하, 약 70 wt% 이하, 약 60 wt% 이하, 약 50 wt% 이하, 약 40 wt% 이하, 약 30 wt% 이하, 약 20 wt% 이하, 약 10 wt% 이하, 약 5 wt% 이하, 약 2 wt% 이하, 또는 약 1 중량% 이하로 코어에 존재할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 80 wt% 이상 약 100 wt% 이하의 양으로 존재). 다른 범위가 또한 가능하다.

[0032] 코어 입자가 비교적 다량의 약제 (예를 들어, 코어 입자의 약 50 wt% 이상)를 포함하는 실시양태에서, 코어 입자는 일반적으로 중합체 담체에 작용제를 캡슐화함으로써 형성되는 입자와 비교하여 약제의 증가된 로딩을 갖는다. 이는 약물 전달 적용에 대한 이점인데, 그 이유는 더 다량의 약물 로딩이란 중합체 담체를 함유하는 입자

의 사용과 비교하여 목적 효과를 달성하기 위해 더 적은 수의 입자가 필요할 수 있음을 의미하기 때문이다.

- [0033] 일부 실시양태에서, 코어는 비교적 낮은 수용해도 (즉, 임의로 1종 이상의 완충제와 함께, 수 중 용해도), 및/또는 고체 물질이 표면 변경제로 코팅되는 용액 중 비교적 낮은 용해도를 갖는 고체 물질로 형성될 수 있다. 예를 들어, 고체 물질은 25℃에서 약 5 mg/mL 이하, 약 2 mg/mL 이하, 약 1 mg/mL 이하, 약 0.5 mg/mL 이하, 약 0.1 mg/mL 이하, 약 0.05 mg/mL 이하, 약 0.01 mg/mL 이하, 약 1 µg/mL, 약 0.1 µg/mL 이하, 약 0.01 µg/mL 이하, 약 1 ng/mL 이하, 약 0.1 ng/mL 이하, 또는 약 0.01 ng/mL 이하의 수용해도 (또는 코팅 용액 중 용해도)를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 고체 물질은 약 1 pg/mL 이상, 약 10 pg/mL 이상, 약 0.1 ng/mL 이상, 약 1 ng/mL 이상, 약 10 ng/mL 이상, 약 0.1 µg/mL 이상, 약 1 µg/mL 이상, 약 5 µg/mL 이상, 약 0.01 mg/mL 이상, 약 0.05 mg/mL 이상, 약 0.1 mg/mL 이상, 약 0.5 mg/mL 이상, 약 1.0 mg/mL 이상, 약 2 mg/mL 이상의 수용해도 (또는 코팅 용액 중 용해도)를 가질 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 10 pg/mL 이상 약 1 mg/mL 이하의 수용해도 또는 코팅 용액 중 용해도). 다른 범위가 또한 가능하다. 고체 물질은 pH 범위 전반에 걸쳐 (예를 들어, pH 1 내지 pH 14) 임의의 시점에서 이들 또는 다른 범위의 수용해도를 가질 수 있다.
- [0034] 일부 실시양태에서, 코어는 미국 약전 협의회(U.S. Pharmacopeia Convention)에 의해 분류되는 용해도의 범위 중 하나 이내에 물질로 형성될 수 있다: 예를 들어, 매우 잘 녹는다(very soluble): > 1,000 mg/mL; 잘 녹는다(freely soluble): 100-1,000 mg/mL; 녹는다(soluble): 33-100 mg/mL; 조금 녹는다(sparingly soluble): 10-33 mg/mL; 녹기 어렵다(slightly soluble): 1-10 mg/mL; 매우 녹기 어렵다(very slightly soluble): 0.1-1 mg/mL; 및 거의 녹지 않는다(practically insoluble): <0.1 mg/mL.
- [0035] 비록 코어가 소수성 또는 친수성이긴 하지만, 본원에 기재된 많은 실시양태에서, 코어는 실질적으로 소수성이다. "소수성" 및 "친수성"은 본 기술분야에서의 그의 통상의 의미가 주어져서, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 많은 경우에, 상대적 용어이다. 물질의 상대 소수성 및 친수성은, 예를 들어 기기, 예컨대 접촉 측각기 및 코어 물질의 패킹된 분말을 사용하여, 측정되는 물질의 평면 상에 수적(water droplet)의 접촉각을 측정함으로써 결정될 수 있다.
- [0036] 일부 실시양태에서, 물질 (예를 들어, 입자 코어를 형성하는 물질)은 약 20도 이상, 약 30도 이상, 약 40도 이상, 약 50도 이상, 약 60도 이상, 약 70도 이상, 약 80도 이상, 약 90도 이상, 약 100도 이상, 약 110도 이상, 약 120도 이상, 또는 약 130도 이상의 접촉각을 갖는다. 일부 실시양태에서, 물질은 약 160도 이하, 약 150도 이하, 약 140도 이하, 약 130도 이하, 약 120도 이하, 약 110도 이하, 약 100도 이하, 약 90도 이하, 약 80도 이하, 또는 약 70도 이하의 접촉각을 갖는다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 30도 이상 약 120도 이하의 접촉각). 다른 범위가 또한 가능하다.
- [0037] 접촉각 측정은 다양한 기법을 사용하여 이루어질 수 있고; 여기서 코어를 형성시키는데 사용하게 될 출발 물질의 펠릿과 물의 비드(bead of water)와의 정적 접촉각 측정이 언급된다. 코어를 형성시키는데 사용되는 물질은 미세 분말로써 제공되거나 그렇지 않으면 절구와 절구공이를 사용하여 미세 분말로 분쇄되었다. 그에 대해 측정하는 표면을 형성시키기 위해, 분말을 인터내셔널 크리스탈 랩스(International Crystal Labs)로부터의 7 mm 펠릿 다이를 사용하여 패킹하였다. 물질을 다이에 첨가하고 압력을 손으로 인가하여 분말을 펠릿내로 패킹하였고, 어떤 펠릿 프레스 또는 고압도 사용하지 않았다. 그 다음, 펠릿을 펠릿의 최상부 및 기저부 (표면수(surface water)가 첨가되고 대향 평행 표면 각각으로 정의됨)가 어떤 표면에도 접촉되지 않도록 시험용으로 현탁시켰다. 이는 다이 세트(die set)의 칼라(collar)로부터 펠릿을 완전히 제거하지는 않음으로써 행하였다. 따라서 펠릿은 측면 상에 칼라에 닿고 최상부 또는 기저부 상에는 전혀 접촉하지 않는다. 접촉각 측정을 위해, 30초에 걸쳐 정상(steady) 접촉각을 갖는 물의 비드가 수득될 때까지 펠릿의 표면에 물을 첨가하였다. 물의 비드로의 첨가를 위해 사용되는 피펫 또는 시린지의 끝(tip)을 침수 또는 접촉시킴으로써 물을 물의 비드에 첨가하였다. 일단 안정한 물의 비드가 수득되면, 촬영을 하고 표준 관행에 따라 접촉각을 측정하였다.
- [0038] 코어가 무기 물질 (예를 들어, 영상화제로써 사용하기 위한)을 포함하는 실시양태에서, 무기 물질은, 예를 들어 금속 (예를 들어, Ag, Au, Pt, Fe, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, 및 기타 전이 금속), 반도체 (예를 들어, 규소, 규소 화합물 및 합금, 카드뮴 셀레니드, 카드뮴 술피드, 인듐 아르세니드, 및 인듐 포스피드), 또는 절연체 (예를 들어, 세라믹, 예컨대 산화규소)를 포함할 수 있다. 무기 물질은 임의의 적합한 양, 예를 들어 약 1 wt% 이상, 약 5 wt% 이상, 약 10 wt% 이상, 약 20 wt% 이상, 약 30 wt% 이상, 약 40 wt% 이상, 약 50 wt% 이상, 약 75 wt% 이상, 약 90 wt% 이상, 또는 약 99 wt% 이상으로 코어에 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 코어는 100 wt% 무기 물질로 형성된다. 일부 경우에, 무기 물질은 약 100 wt% 이하, 약 90 wt% 이하, 약 80 wt% 이하, 약

70 wt% 이하, 약 60 wt% 이하, 약 50 wt% 이하, 약 40 wt% 이하, 약 30 wt% 이하, 약 20 wt% 이하, 약 10 wt% 이하, 약 5 wt% 이하, 약 2 wt% 이하, 또는 약 1 wt% 이하의 양으로 코어에 존재할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 1 wt% 이상 약 20 wt% 이하의 양으로 존재). 다른 범위가 또한 가능하다.

[0039] 코어는, 일부 경우에, 양자점, 탄소 나노튜브, 탄소 나노와이어, 또는 탄소 나노로드의 형태일 수 있다. 일부 경우에, 코어는 생체 기원이 아닌 물질을 포함하거나 그러한 물질로 형성된다.

[0040] 일부 실시양태에서, 코어는 1종 이상의 유기 물질, 예컨대 합성 중합체 및/또는 천연 중합체를 포함한다. 합성 중합체의 예는 비분해성 중합체, 예컨대 폴리메타크릴레이트 및 분해성 중합체, 예컨대 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 그의 공중합체를 포함한다. 천연 중합체의 예는 히알루론산, 키토산, 및 콜라겐을 포함한다. 코어의 부분에 적합할 수 있는 중합체의 다른 예는 하기 기재된 바와 같이, 입자 상에 코팅물을 형성시키기에 적합한 본원의 것을 포함한다. 중합체는 임의의 적합한 양, 예를 들어 약 100 wt% 이하, 약 90 wt% 이하, 약 80 wt% 이하, 약 70 wt% 이하, 약 60 wt% 이하, 약 50 wt% 이하, 약 40 wt% 이하, 약 30 wt% 이하, 약 20 wt% 이하, 약 10 wt% 이하, 약 5 wt% 이하, 약 2 wt% 이하, 또는 약 1 wt% 이하로 코어에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 중합체는 약 1 wt% 이상, 약 5 wt% 이상, 약 10 wt% 이상, 약 20 wt% 이상, 약 30 wt% 이상, 약 40 wt% 이상, 약 50 wt% 이상, 약 75 wt% 이상, 약 90 wt% 이상, 또는 약 99 wt% 이상의 양으로 코어에 존재할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 1 wt% 이상 약 20 wt% 이하의 양으로 존재). 다른 범위가 또한 가능하다. 실시양태 중 한 세트에서, 코어는 중합체 성분이 실질적으로 없이 형성된다.

[0041] 코어는 임의의 적합한 형상 및/또는 크기를 가질 수 있다. 일부 경우에, 코어는 실질적으로 구형, 비-구형, 타원형, 막대-형상, 피라미드형, 정육면체-유사, 디스크-형상, 와이어-유사, 또는 불규칙한 형상일 수 있다. 코어는, 예를 들어 약 10 μm 이하, 약 5 μm 이하, 약 1 μm 이하, 약 800 nm 이하, 약 700 nm 이하, 약 500 nm 이하, 400 nm 이하, 300 nm 이하, 약 200 nm 이하, 약 100 nm 이하, 약 75 nm 이하, 약 50 nm 이하, 약 40 nm 이하, 약 35 nm 이하, 약 30 nm 이하, 약 25 nm 이하, 약 20 nm 이하, 약 15 nm 이하, 또는 약 5 nm 이하의 최대 또는 최소 단면 치수(cross-sectional dimension)를 가질 수 있다. 일부 경우에, 코어는, 예를 들어 약 5 nm 이상, 약 20 nm 이상, 약 50 nm 이상, 약 100 nm 이상, 약 200 nm 이상, 약 300 nm 이상, 약 400 nm 이상, 약 500 nm 이상, 약 1 μm 이상, 또는 약 5 μm 이상의 최대 또는 최소 단면 치수를 가질 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 50 nm 이상 약 500 nm 이하의 최대 또는 최소 단면 치수). 다른 범위가 또한 가능하다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 형성된 코어의 크기는 가우스형 (Gaussian-type) 분포를 갖는다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 입자/코어 크기의 측정은 최소 단면 치수를 지칭한다.

[0042] 당업자는 입자의 크기 (예를 들어, 최소 또는 최대 단면 치수)를 측정하는 기법에 친숙하다. 적합한 기법의 예는 (DLS), 투과 전자현미경법, 주사 전자현미경법, 전기저항 카운팅(electroresistance counting) 및 레이저 회절을 포함한다. 다른 적합한 기법은 당업자 또는 숙련가에게 알려져 있다. 비록 입자의 크기를 결정하는 많은 방법이 알려져 있지만, 본원에 기재된 크기 (예를 들어, 평균 입자 크기, 두께)는 동적 광 산란에 의해 측정된 것을 지칭한다.

[0043] 코어 입자 및 코팅된 입자 형성 방법

[0044] 본원에 기재된 코어 입자는 임의의 적합한 방법에 의해 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 밀링 공정을 사용하여 고체 물질의 크기를 감소시켜 마이크로미터 내지 나노미터 입자 크기 범위의 입자를 형성시킬 수 있다. 건식 및 습식 밀링 공정, 예컨대 제트 밀링, 극저온-밀링(cryo-milling), 볼 밀링(ball milling), 매체 밀링(media milling), 및 균질화는 공지되어 있으며 본원에 기재된 방법으로 사용될 수 있다. 일반적으로, 습식 밀링 공정에서, 코어로서 사용되는 물질의 현탁액을 부형제와 함께 또는 없이 밀링 매체와 함께 혼합하여 입자 크기를 감소시킨다. 건식 밀링은 코어로서 사용되는 물질을 부형제와 함께 또는 없이 밀링 매체와 혼합하여 입자 크기를 감소시키는 공정이다. 극저온-밀링 공정에서, 코어로서 사용되는 물질의 현탁액을 저온(cooled temperature)하에 부형제와 함께 또는 없이 밀링 매체와 혼합한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 코어 입자는 1종 이상의 안정화제/표면 변경제의 존재하에 고체 물질 (예를 들어, 약제)을 나노밀링함으로써 제조할 수 있다. 고체 물질의 작은 입자는, 특히 입자의 표면 상에, 1종 이상의 안정화제/표면 변경제의 존재를 필요로 하여, 액체 용액 중에 집적(agglomeration) 또는 응집(aggregation) 없이 입자의 현탁액을 안정화시키도록 할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 안정화제는, 표면 변경제로서 작용하여, 입자 상에 코팅물을 형성시킬 수 있다.

- [0046] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 코어 입자 형성 방법은 나노밀링에 및 입자 상에 코팅물을 형성 시켜 입자를 점액 관통이 되게 하는 데도 적합한 안정화제를 선택하는 것을 포함한다. 예를 들어, 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 플루로닉® F127의 존재하에 피렌을 나노밀링함으로써 제조된 모델 화합물 피렌의 200-500 nm 나노입자로 인해 정착된(well-established) 중합체-기반 MPP와 동일한 속도로 생리학적 점액 샘플을 관통할 수 있는 입자가 초래되었음이 입증되었다. 흥미롭게도, 시험된 안정화제/표면 변경제 중 단지 소수가, 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 나노밀링에 및 입자를 점액 관통이 되게 하는, 입자 상에 코팅물 형성에도 적합한 기준에 부합하는 것으로 관찰되었다.
- [0047] 습식 밀링 공정에서, 1종 이상의 안정화제 (예를 들어, 표면 변경제), 분쇄 매체(grinding medium), 밀링되는 고체 (예를 들어, 고체 약제), 및 용매를 함유하는 분산액 (예를 들어, 수분산액(aqueous dispersion)) 중에서 밀링을 수행할 수 있다. 임의의 적합한 양의 안정화제/표면 변경제를 용매에 포함시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 안정화제/표면 변경제는 용매의 약 0.001% (wt 또는 부피에 대한 %중량 (w:v)) 이상, 약 0.01% 이상, 약 0.1% 이상, 약 0.5% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 10% 이상, 약 12% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 40% 이상, 약 60% 이상, 또는 약 80% 이상의 양으로 용매에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 안정화제는 약 100% (예를 들어, 안정화제/표면 변경제가 용매인 경우에)의 양으로 용매에 존재할 수 있다. 다른 실시양태에서, 안정화제는 용매의 약 100 % 이하, 약 80% 이하, 약 60% 이하, 약 40% 이하, 약 20% 이하, 약 15% 이하, 약 12% 이하, 약 10% 이하, 약 8% 이하, 약 7% 이하, 약 6% 이하, 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 또는 약 1% 이하의 양으로 용매에 존재할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 용매의 약 5% 이하 약 1% 이상의 양). 다른 범위가 또한 가능하다. 선택된 특성의 범위는 점액을 관통하는 입자의 능력에 영향을 미칠 수 있는 인자, 예컨대 입자 표면 상의 안정화제/표면 변경제의 코팅물의 안정성, 입자 상의 안정화제/표면 변경제의 코팅물의 평균 두께, 입자 상의 안정화제/표면 변경제의 배향, 입자 상의 안정화제/표면 변경제의 밀도, 안정화제:약물 비, 약물 농도, 형성된 입자의 크기 및 다분산성, 및 형성된 입자의 형태학에 영향을 줄 수 있다.
- [0048] 약제 (또는 그의 염)는 임의의 적합한 양으로 용매에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약제 (또는 그의 염)는 용매의 약 0.001% (wt% 또는 부피에 대한 %중량 (w:v)) 이상, 약 0.01% 이상, 약 0.1% 이상, 약 0.5% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 4% 이상, 약 5% 이상, 약 6% 이상, 약 7% 이상, 약 8% 이상, 약 10% 이상, 약 12% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 40% 이상, 약 60% 이상, 또는 약 80% 이상의 양으로 용매에 존재한다. 일부 경우에, 약제 (또는 그의 염)는 용매의 약 100% 이하, 약 90% 이하, 약 80% 이하, 약 60% 이하, 약 40% 이하, 약 20% 이하, 약 15% 이하, 약 12% 이하, 약 10% 이하, 약 8% 이하, 약 7% 이하, 약 6% 이하, 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 또는 약 1% 이하의 양으로 용매에 존재할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 용매의 약 20% 이하 약 1% 이상의 양). 일부 실시양태에서, 약제는 상기 범위로 그러나 w:v로 존재한다.
- [0049] 용매 중 약제 (또는 그의 염)에 대한 안정화제/표면 변경제의 비는 또한 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 약제 (또는 그의 염)에 대한 안정화제/표면 변경제의 비는 0.001:1 이상 (중량비, 몰비, 또는 w:v 비), 0.01:1 이상, 0.01:1 이상, 1:1 이상, 2:1 이상, 3:1 이상, 5:1 이상, 10:1 이상, 25:1 이상, 50:1 이상, 100:1 이상, 또는 500:1 이상일 수 있다. 일부 경우에, 약제 (또는 그의 염)에 대한 안정화제/표면 변경제의 비는 1000:1 이하 (중량비 또는 몰비), 500:1 이하, 100:1 이하, 75:1 이하, 50:1 이하, 25:1 이하, 10:1 이하, 5:1 이하, 3:1 이하, 2:1 이하, 1:1 이하, 또는 0.1:1 이하일 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 5:1 이상 50:1 이하). 다른 범위가 또한 가능하다.
- [0050] 안정화제/표면 변경제는, 예를 들어 중합체 또는 계면활성제일 수 있다. 중합체의 예는 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이 코팅물에 사용하기에 적합한 것들이다. 계면활성제의 비제한적 예는 L- α -포스파티딜콜린 (PC), 1,2-디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 올레산, 소르비탄 트리올레에이트, 소르비탄 모노올레에이트, 소르비탄 모노라우레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 천연 레시틴, 올레일 폴리옥시에틸렌 에테르, 스테아릴 폴리옥시에틸렌 에테르, 라우릴 폴리옥시에틸렌 에테르, 옥시에틸렌과 옥시프로필렌의 블록 공중합체, 합성 레시틴, 디에틸렌 글리콜 디올레에이트, 테트라히드로프로푸릴 올레에이트, 에틸 올레에이트, 이소프로필 미리스테이트, 글리세릴 모노올레에이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 모노리시놀레이트, 세틸 알콜, 스테아릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 400, 세틸 피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 올리브유, 글리세릴 모노라우레에이트, 옥수수유, 면실유, 및 해바라기씨유를 포함한다. 상기 언급된 화합물의 유도체가 또한 가능하다. 또한, 상기 언급된 화합물과 본원에 기재된 다른 것의 조합이 본 발명의 입자에서 표면 변경제로서 사용될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서 표면 변경

제는 안정화제, 계면활성제, 및/또는 유화제로서 작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표면 변경제는 점액 중에서 입자 수송을 보조할 수 있다.

[0051] 일부 실시양태에서 밀링에 사용되는 안정화제는 입자 표면 상에 코팅물을 형성시키고, 이 코팅물은 입자를 점액 관통이 되게 하지만, 다른 실시양태에서, 안정화제는 입자가 형성된 후 1종 이상의 다른 표면 변경제와 교체될 수 있음을 알아야 한다. 예를 들어, 방법 중 한 세트에서, 제1 안정화제/표면 변경제는 밀링 공정 동안 사용될 수 있고 코어 입자의 표면을 코팅할 수 있고, 이어서 제1 안정화제/표면 변경제의 전부 또는 일부를 제2 안정화제/표면 변경제와 교체하여 코어 입자 표면의 전부 또는 일부를 코팅할 수 있다. 일부 경우에, 제2 안정화제/표면 변경제는 제1 안정화제/표면 변경제보다 더 입자를 점액 관통이 되게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다중 표면 변경제를 포함하는 코팅물을 갖는 코어 입자를 형성시킬 수 있다.

[0052] 임의의 적합한 분쇄 매체를 밀링에 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세라믹 및/또는 중합체 물질 및/또는 금속을 사용할 수 있다. 적합한 물질의 예는 산화지르코늄, 탄화규소, 산화규소, 질화규소, 규산지르코늄, 산화이트륨, 유리, 알루미늄, 알파-알루미나, 산화알루미늄, 폴리스티렌, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 티탄, 강철을 포함할 수 있다. 분쇄 매체는 임의의 적합한 크기를 가질 수 있다. 예를 들어, 분쇄 매체는 약 0.1 mm 이상, 약 0.2 mm 이상, 약 0.5 mm 이상, 약 0.8 mm 이상, 약 1 mm 이상, 약 2 mm 이상, 또는 약 5 mm 이상의 평균 직경을 가질 수 있다. 일부 경우에, 분쇄 매체는 약 5 mm 이하, 약 2 mm 이하, 약 1 mm 이하, 약 0.8 mm 이하, 약 0.5 mm 이하, 또는 약 0.2 mm 이하의 평균 직경을 가질 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 0.5 밀리미터 이상 약 1 mm 이하의 평균 직경). 다른 범위가 또한 가능하다.

[0053] 임의의 적합한 용매를 밀링에 사용할 수 있다. 용매의 선택은, 다른 인자 중에서도, 밀링되는 고체 물질 (예를 들어, 약제), 사용되는 안정화제/표면 변경제의 특징의 유형 (예를 들어, 입자를 점액 관통이 되게 할 수 있는 것), 사용되는 분쇄 물질과 같은 인자에 의해 결정될 수 있다. 적합한 용매는 고체 물질 또는 분쇄 물질을 실질적으로 용해시키지 않지만, 안정화제/표면 변경제를 적합한 정도로 용해시키는 것일 수 있다. 용매의 비제한적 예는 다른 성분, 예컨대 제약 부형제, 중합체, 약제, 염, 방부제, 점도 조절제(viscosity modifier), 장성 조절제(tonicity modifier), 맛 차폐제(taste masking agent), 항산화제, pH 조절제, 및 다른 제약 부형제를 임의로 포함할 수 있는, 물, 완충 용액, 다른 수용액, 알콜 (예를 들어, 에탄올, 메탄올, 부탄올), 및 그의 혼합물을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 유기 용매를 사용할 수 있다. 약제는 이들 또는 다른 용매 중 임의의 적합한 용해도, 예컨대 수용해도에 대해 또는 코팅 용액 중 용해도에 대해 상기 기재된 범위 중 하나 이상에서의 용해도를 가질 수 있다.

[0054] 다른 실시양태에서, 코어 입자를 침전 기법에 의해 형성시킬 수 있다. 침전 기법 (예를 들어, 마이크로침전 기법, 나노침전 기법)은 코어로서 사용되는 물질 (예를 들어, 약제) 및 용매를 포함하는 제1 용액을 형성시키는 것을 포함할 수 있고, 여기서 물질은 용매에 실질적으로 가용성이다. 용액을 또 다른 용매를 포함하는 제2 용액에 첨가할 수 있고, 여기서 물질은 실질적으로 불용성이고, 그로 인해, 물질을 포함하는 다수의 입자를 형성시킨다. 일부 경우에, 1종 이상의 표면 변경제, 계면활성제, 물질, 및/또는 생물활성제가 제1 및/또는 제2 용액에 존재할 수 있다. 코팅물을 코어를 침전시키는 공정 동안 형성시킬 수 있다 (예를 들어, 침전 및 코팅 단계를 실질적으로 동시에 수행할 수 있다). 다른 실시양태에서, 입자를 우선 침전 기법을 사용하여 형성시킨 후, 입자를 표면 변경제로 코팅한다.

[0055] 일부 실시양태에서, 침전 기법을 사용하여 약제의 염의 입자 (예를 들어, 나노결정)를 형성시킬 수 있다. 일반적으로, 침전 기법은 용매 중에 코어로서 사용되는 물질을 용해시키고, 이어서 이를 부형제와 함께 또는 없이 혼화성 항-용매에 첨가하여 코어 입자를 형성시키는 것을 포함한다. 이러한 기법은 수용액에 가용성인 약제 (예를 들어, 비교적 높은 수용해도를 갖는 작용제)의 입자를 제조하는데 유용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 하전 또는 이온화가능성 기를 갖는 약제는 반대 이온 (예를 들어, 양이온 또는 음이온)과 상호작용하여 염 착물을 형성시킬 수 있다. 예를 들어, 약제 테노포비르 (TFV)는 포스포네이트 기 및 퓨린 고리 구조를 통해 아연 양이온과 매우 강하게 상호작용한다. 아연과의 이러한 상호작용은, 본원에 기재된 코팅물에 의해 안정화되어 응집을 중단할 수 있는 결정으로의 TFV 침전을 유발한다.

[0056] 다양한 반대 이온을 사용하여 금속 (예를 들어, 알칼리 금속, 알칼리 토금속 및 전이 금속)을 포함하는, 염 착물을 형성시킬 수 있다. 양이온성 반대 이온의 비제한적 예는 아연, 칼슘, 알루미늄, 아연, 바륨, 마그네슘, 및 구리를 포함한다. 음이온성 반대 이온의 비제한적 예는 인산염, 탄산염, 및 지방산을 포함한다. 반대 이온은, 예를 들어 1가, 2가, 또는 3가일 수 있다. 다른 반대 이온은 본 기술분야에 공지되어 있고 본원에 기재된 실시양태에서 사용될 수 있다.

- [0057] 다양한 상이한 산을 침전 공정에서 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적합한 산은 데칸산, 헥산산, 뮤신산, 옥탄산을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 적합한 산은 아세트산, 아디프산, L-아스코르브산, L-아스파르트산, 카프르산 (데칸산), 탄산, 시트르산, 푸마르산, 갈락타르산, D-글루코헵톤산, D-글루콘산, D-글루쿠론산, 글루탐산, 글루타르산, 글리세로포스포르산, 글리콜산, 히푸르산, 염산, DL-락트산, 라우르산, 말레산, (-)-L-말산, 팔미트산, 포스포르산, 세바크산, 스테아르산, 숙신산, 황산, (+)-L-타르타르산, 또는 티오시안산을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 적합한 산은 알긴산, 벤젠술폰산, 벤조산, (+)-캄포르산, 카프릴산 (옥탄산), 시클람산, 도데실술폰산, 에탄-1,2-디술폰산, 에탄술폰산, 에탄술폰산, 2-히드록시-, 겐티스산, 글루타르산, 2-옥소-, 이소부티르산, 락토비온산, 말론산, 메탄술폰산, 나프탈렌-1,5-디술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, 2-나프토산, 1-히드록시-, 니코틴산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팜산, (엠본산), 프로피온산, (-)-L-피로글루탐산, 또는 *p*-톨루엔술폰산을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서 적합한 산은 아세트산, 2,2-디클로로-, 벤조산, 4-아세트아미도-, (+)-캄포르-10-술폰산, 카프로산 (헥산산), 신남산, 포름산, 브로민화수소산, DL-만델산, 질산, 살리실산, 살리실산, 4-아미노-, 또는 운데실렌산 (운데스-10-엔산)을 포함할 수 있다. 1종 이상의 이러한 산의 혼합물을 또한 사용할 수 있다.
- [0058] 다양한 상이한 염기를 침전 공정에서 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적합한 염기는 암모니아, L-아르기닌, 수산화칼슘, 콜린, 글루카민, *N*-메틸-, 리신, 수산화마그네슘, 수산화칼륨, 또는 수산화나트륨을 포함한다. 다른 실시양태에서, 적합한 염기는 베네타민, 벤자틴, 베타인, 데아놀, 디에틸아민, 에탄올, 2-(디에틸아미노)-, 히드라브아민, 모르폴린, 4-(2-히드록시에틸)-, 피롤리딘, 1-(2-히드록시에틸)-, 또는 트로메타민을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 적합한 염기는 디에탄올아민 (2,2'-이미노비스(에탄올)), 에탄올아민 (2-아미노에탄올), 에틸렌디아민, 1*H*-이미다졸, 피페라진, 트리에탄올아민 (2,2',2"-니트릴로트리스(에탄올)), 또는 수산화아연을 포함할 수 있다. 1종 이상의 이러한 염기의 혼합물을 또한 사용할 수 있다.
- [0059] 밀링에 사용될 수 있는 본원에 기재된 용매를 포함한, 임의의 적합한 용매를 침전에 사용할 수 있다. 실시양태 중 한 세트에서, 다른 성분, 예컨대 제약 부형제, 중합체, 및 약제를 임의로 포함할 수 있는, 수용액 (예를 들어, 물, 완충 용액, 다른 수용액, 알콜 (예를 들어, 에탄올, 메탄올, 부탄올), 및 그의 혼합물)을 사용한다.
- [0060] 침전 공정에서, 염은 비-염 형태의 약제보다 더 낮은 수용해도 (또는 염을 함유하는 용매 중 용해도)를 가질 수 있다. 염의 수용해도 (또는 용매 중 용해도)는, 예를 들어 25℃에서 약 5 mg/mL 이하, 약 2 mg/mL 이하, 약 1 mg/mL 이하, 약 0.5 mg/mL 이하, 약 0.1 mg/mL 이하, 약 0.05 mg/mL, 약 0.01 mg/mL 이하, 약 1 μg/mL 이하, 약 0.1 μg/mL 이하, 약 0.01 μg/mL 이하, 약 1 ng/mL 이하, 약 0.1 ng/mL 이하, 또는 약 0.01 ng/mL 이하일 수 있다. 일부 실시양태에서, 염은 약 1 pg/mL 이상, 약 10 pg/mL 이상, 약 0.1 ng/mL 이상, 약 1 ng/mL 이상, 약 10 ng/mL 이상, 약 0.1 μg/mL 이상, 약 1 μg/mL 이상, 약 5 μg/mL 이상, 약 0.01 mg/mL 이상, 약 0.05 mg/mL 이상, 약 0.1 mg/mL 이상, 약 0.5 mg/mL 이상, 약 1.0 mg/mL 이상, 약 2 mg/mL의 수용해도 (또는 용매 중 용해도)를 가질 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 0.001 mg/mL 이상 약 1 mg/mL 이하의 수용해도 (또는 용매 중 용해도)). 다른 범위가 또한 가능하다. 염은 pH 범위 전반에 걸쳐 (예를 들어, pH 1 내지 pH 14) 임의의 시점에서 이들 또는 다른 범위의 수용해도를 가질 수 있다.
- [0061] 일부 실시양태에서, 침전에 사용되는 용매는 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 표면 변경제를 포함하고, 그것이 용액으로부터 침전됨에 따라 1종 이상의 표면 변경제의 코팅물이 입자 주위에 형성될 수 있다. 표면 변경제는 임의의 적합한 농도, 예컨대 수용액 중 약 0.001 (w/v) 이상, 약 0.005% (w/v) 이상, 약 0.01% (w/v) 이상, 약 0.05% (w/v) 이상, 약 0.1% (w/v) 이상, 약 0.5% (w/v) 이상, 약 1% (w/v) 이상, 또는 약 5% (w/v) 이상의 농도로 용매에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 표면 변경제는 약 5% (w/v) 이하, 약 1% (w/v) 이하, 약 0.5% (w/v) 이하, 약 0.1% (w/v) 이하, 약 0.05% (w/v) 이하, 약 0.01% (w/v) 이하, 또는 약 0.005% (w/v) 이하의 농도로 용매에 존재한다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 0.01% (w/v) 이상 약 1% (w/v) 이하의 농도). 다른 범위가 또한 가능하다.
- [0062] 코어 입자를 형성시키는 또 다른 예시적 방법은 동결-건조 기법을 포함한다. 이 기법에서, 약제 또는 그의 염을, 임의로 표면 변경제를 함유하는 수용액에 용해시킬 수 있다. 반대 이온을 용액에 첨가할 수 있고, 용액을 즉시 급속 냉동(급속 동결)시키고 동결 건조시킬 수 있다. 건조 분말을 목적 농도에서 적합한 용매 (예를 들어, 수용액, 예컨대 물)에서 복원시킬 수 있다.
- [0063] 반대 이온을 임의의 적합한 범위로 동결 건조를 위해 용매에 첨가할 수 있다. 일부 경우에, 약제 (예를 들어, 염)에 대한 반대 이온의 비는 0.1:1 (중량비 또는 몰비) 이상, 1:1 이상, 2:1 이상, 3:1 이상, 5:1 이상, 10:1 이상, 25:1 이상, 50:1, 또는 100:1 이상일 수 있다. 일부 경우에, 약제 (예를 들어, 염)에 대한 반대 이온의

비는 100:1 (중량비 또는 몰비) 이하, 75:1 이하, 50:1 이하, 25:1 이하, 10:1 이하, 5:1 이하, 3:1 이하, 2:1 이하, 1:1 이하, 또는 0.1:1 이하일 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 5:1 이상 50:1 이하의 비). 다른 범위가 또한 가능하다.

[0064] 표면 변경제가 동결 건조 이전에 용매에 존재할 경우, 이는 임의의 적합한 농도, 예컨대 수용액 중 약 0.001% (w/v) 이상, 약 0.005% (w/v) 이상, 약 0.01% (w/v) 이상, 약 0.05% (w/v) 이상, 약 0.1% (w/v) 이상, 약 0.5% (w/v) 이상, 약 1% (w/v) 이상, 또는 약 5% (w/v) 이상의 농도로 존재할 수 있다. 일부 경우에, 표면 변경제는 약 5% (w/v) 이하, 약 1% (w/v) 이하, 약 0.5% (w/v) 이하, 약 0.1% (w/v) 이하, 약 0.05% (w/v) 이하, 약 0.01% (w/v) 이하, 또는 약 0.005% (w/v) 이하의 농도로 용매에 존재한다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 0.01% (w/v) 이상 약 1% (w/v) 이하의 농도). 다른 범위가 또한 가능하다.

[0065] 용매에 존재하는 표면 변경제의 농도는, 사용되는 특성의 표면 변경제에 따라, 표면 변경제의 임계 미셀 농도 (CMC) 초과 또는 미만일 수 있다. 예를 들어, 실시예 부분에 기재된 바와 같이, F127의 CMC 초과 (1%) 및 미만 (0.08%) 둘 다의 F127 농도를 사용하여 약제 테노포비르의 안정한 나노결정 입자를 코팅할 수 있다. 그러나, 아시클로비르 모노포스페이트의 나노결정이 계면활성제 농도에 훨씬 더 민감하였고, 안정한 나노결정 입자는 단지 CMC 미만의 F127 농도 (~0.1%)의 사용시 형성될 수 있었다.

[0066] 다른 실시양태에서, 안정한 입자는 과잉의 반대 이온을 약제를 함유하는 용액에 첨가함으로써 형성시킬 수 있다. 이어서 침전물을 원심분리와 같은 다양한 방법에 의해 세척할 수 있다. 생성 슬러리를 초음파처리할 수 있다. 1종 이상의 표면 변경제를 첨가하여 생성 입자를 안정화시킬 수 있다.

[0067] 약제의 입자를 형성시키는 다른 방법이 또한 가능하다. 소위 하향식(top-down) 기법은 예를 들어 밀링 기법 및 고압 균질화를 포함한다. 고압 균질화에서는, 갭, 밸브, 또는 개구(aperture)를 통해 가압하여 코어로서 사용되는 물질의 현탁이 강제되어 입자 크기가 감소되도록 한다. 소위 상향식(bottom-up) 기법은 예를 들어 침전, 유화 (여기서, 용매에 용해된 코어로서 사용되는 물질을 부형제와 함께 또는 없이 불혼화성 항-용매에 첨가하여 코어 입자를 형성시킨다); 및 분무 건조 (여기서, 코어로서 사용되는 물질의 용액을 기체상 항-용매 내로 분무하여 코어 입자를 형성시킨다)를 포함한다.

[0068] 본원에 기재된 방법과 다른 방법의 조합이 또한 가능하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 약제의 코어를 우선 침전에 의해 형성시킨 다음, 코어의 크기를 밀링 공정에 의해 추가로 감소시킨다.

[0069] 약제의 입자 형성 후, 입자와 회합하고/거나 입자를 코팅할 수 있는 (제2) 표면 변경제를 포함하는 용액에 입자를 임의로 노출시킬 수 있다. 약제가 이미 제1 표면 변경제의 코팅물을 포함하는 실시양태에서, 제2 표면 변경제의 전부 또는 일부를 제2 안정화제/표면 변경제로 교체시켜 입자 표면의 전부 또는 일부를 코팅할 수 있다. 일부 경우에, 제2 표면 변경제는 제1 표면 변경제보다 더 입자를 점액 관통이 되게 할 수 있다. 다른 실시양태에서, 다중 표면 변경제를 포함하는 코팅물을 갖는 입자를 형성시킬 수 있다 (예를 들어, 단일층으로 또는 다중 층으로). 다른 실시양태에서, 다중 코팅물을 갖는 입자 (예를 들어, 각각의 코팅물은 임의로 상이한 표면 변경제를 포함함)를 형성시킬 수 있다. 일부 경우에, 코팅물은 표면 변경제의 단일 층의 형태이다. 다른 구성이 또한 가능하다.

[0070] 본원에 기재된 방법 중 어느 한 방법에서, 약 1분 이상, 약 2분 이상, 약 5분 이상, 약 10분 이상, 약 15분 이상, 약 20분 이상, 약 30분 이상, 약 60분 이상, 또는 그 초과와 기간 동안 표면 변경제와 함께 용액에 입자를 인큐베이션함으로써 입자를 표면 변경제로 코팅할 수 있다. 일부 경우에, 약 10시간 이하, 약 5시간 이하, 또는 약 60분 이하의 기간 동안 인큐베이션을 실시할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 60분 이하 약 2분 이상의 인큐베이션 기간).

[0071] 입자 코팅물

[0072] 도 1에 예시된 실시양태에 나타난 바와 같이, 코어 (16)는 1종 이상의 표면 변경제를 포함하는 코팅물 (20)에 의해 둘러싸여질 수 있다. 일부 실시양태에서, 코팅물은 코어의 표면 상에 배치된 1종 이상의 표면 변경제 또는 다른 분자로 형성된다. 코팅물 및 표면 변경제(들)의 특성의 화학적 구성 및/또는 성분은 입자에 특정 기능성, 예컨대 점막 장벽을 통한 향상된 수송을 부여하도록 선택될 수 있다.

[0073] 코어를 둘러싸는 코팅물이 코어를 완전히 둘러쌀 필요는 없지만, 그러한 실시양태가 가능할 수 있음을 이해하여야 한다. 예를 들어, 코팅물은 코어의 표면적의 약 10% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 99% 이상을 둘러쌀 수 있다. 일부 경우에, 코팅물은 코어를 실질적으로 둘러싼다. 다른 경우에, 코팅물을 코어를 완전히 둘러싼다. 다른 실시양태에서, 코팅물은 코어의 표면적

의 약 100% 이하, 약 90% 이하, 약 80% 이하, 약 70% 이하, 약 60% 이하, 또는 약 50% 이하를 둘러싼다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 코어의 표면적의 80% 초과 100% 미만을 둘러싼다).

[0074] 코팅물의 성분은 일부 경우에 코어의 표면에 걸쳐 고르게, 및 다른 경우에 고르지 않게 분포될 수 있다. 예를 들어, 코팅물은 일부 경우에 어떤 물질도 포함하지 않는 부분 (예를 들어, 중공)을 포함할 수 있다. 원하는 경우, 코팅물을 특정 분자 및 성분이 코팅물 내로 또는 외부로 관통 및/또는 수송이 가능하도록 설계할 수 있지만, 다른 분자 및 성분이 코팅물 내로 또는 외부로 관통 및/또는 수송하는 것을 예방할 수 있다. 코팅물 내로 및/또는 코팅물에 걸쳐 관통하고/거나 수송되는 특정 분자의 능력은, 예를 들어 코팅물을 형성하는 표면 변경제의 충전 밀도(packing density) 및 코팅물을 형성하는 성분의 화학적 및 물리적 특성에 따라 달라질 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 코팅물은 일부 실시양태에서 물질의 하나의 층, 또는 물질의 다층을 포함할 수 있다. 표면 변경제의 단일 유형이, 또는 표면 변경제의 다중 형태가 존재할 수 있다.

[0075] 입자의 코팅물은 임의의 적합한 두께를 가질 수 있다. 예를 들어, 코팅물은 약 1 nm 이상, 약 5 nm 이상, 약 10 nm 이상, 약 30 nm 이상, 약 50 nm 이상, 약 100 nm 이상, 약 200 nm 이상, 약 500 nm 이상, 약 1 μ m 이상, 또는 약 5 μ m 이상의 평균 두께를 가질 수 있다. 일부 경우에, 코팅물의 평균 두께는 약 5 μ m 이하, 약 1 μ m 이하, 약 500 nm 이하, 약 200 nm 이하, 약 100 nm 이하, 약 50 nm 이하, 약 30 nm 이하, 약 10 nm 이하, 또는 약 5 nm 이하이다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 1 nm 이상 약 100 nm 이하의 평균 두께). 다른 범위가 또한 가능하다. 다중 코팅물을 갖는 입자의 경우, 각각의 코팅층은 상기 기재된 두께 중 하나를 가질 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 코어 표면에 대한 표면 변경 모이어티의 공유 연결의 필요 없이, 코어 입자를 친수성 표면 변경 모이어티로 코팅하는 것을 가능하게 할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 소수성 표면을 갖는 코어를 본원에 기재된 중합체로 코팅할 수 있고, 그로 인해 코어 자체의 특징을 실질적으로 변경하지 않고 다수의 표면 변경 모이어티가 코어 표면 상에 초래된다. 예를 들어, 표면 변경제를 코어 입자의 외부 표면에 흡착시킬 수 있다. 그러나, 다른 실시양태에서, 표면 변경제는 코어 입자에 공유적으로 연결된다.

[0077] 표면 변경제가 코어의 표면 상으로 흡착되는 특정 실시양태에서, 표면 변경제는, 임의로 다른 성분 (예를 들어, 조성물/제제 중)과, 용액 중 표면 변경제의 다른 분자와 평형을 이룰 수 있다. 일부 경우에, 흡착된 표면 변경제는 본원에 기재된 밀도에서 코어의 표면 상에 존재할 수 있다. 표면 변경제가 용액 중 다른 성분과 평형을 이루기 때문에 밀도는 평균 밀도일 수 있다.

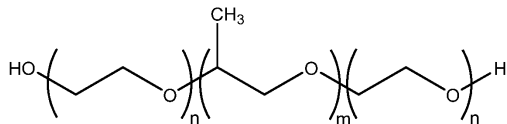
[0078] 본원에 기재된 입자의 코팅물 및/또는 표면 변경제는 임의의 적합한 물질, 예컨대 소수성 물질, 친수성 물질, 및/또는 양친매성 물질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코팅물은 중합체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 합성 중합체 (즉, 자연발생적으로 생산되지 않는 중합체)이다. 다른 실시양태에서, 중합체는 천연 중합체 (예를 들어, 단백질, 다당류, 고무)이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 표면 활성 중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 비이온성 중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 비이온성 블록 공중합체이다. 일부 실시양태에서, 중합체는, 예를 들어 예를 들어, 하나의 블록이 소수성 중합체이고 또 다른 블록이 친수성 중합체인, 이블록 공중합체, 삼블록 공중합체일 수 있다. 중합체는 하전되거나 하전되지 않을 수 있다.

[0079] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 비교적 친수성 블록 및 비교적 소수성인 블록을 갖는 블록 공중합체를 포함하는 코팅물을 포함한다. 일부 경우에, 친수성 블록은 입자의 외부 표면에 실질적으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 친수성 블록은 코팅물의 외부 표면의 대부분을 형성할 수 있고 입자를 함유하는 수용액에서 입자를 안정화시키는데 도움을 줄 수 있다. 소수성 블록은 코팅물의 내부에 및/또는 코어 입자의 표면에서 실질적으로 존재하여, 예를 들어 코어에 대한 코팅물의 부착을 촉진시킬 수 있다. 일부 경우에, 코팅물은 삼블록 공중합체를 포함하는 표면 변경제를 포함하고, 여기서 삼블록 공중합체는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함한다.

[0080] 삼블록 공중합체의 친수성 블록 및 소수성 블록의 분자량은 각각 코어의 점막부착을 감소시키고 삼블록 공중합체와 코어의 충분한 회합을 보장하도록 선택될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 삼블록 공중합체의 소수성 블록의 분자량은 삼블록 공중합체와 코어의 적당한 회합이 일어나고, 그로 인해 삼블록 공중합체가 코어에 부착된 채로 남아있을 가능성을 증가시키도록 선택될 수 있다. 놀랍게도, 특정 실시양태에서, 삼블록 공중합체의 소수성 블록의 너무 낮은 분자량 (예를 들어, 약 2 kDa 이하)으로는 소수성 코어 및 삼블록 공중합체와의 충분한 부착이 가능하게 되지 않고, 따라서, 이러한 소수성 블록을 갖는 입자는 충분한 감소된 점막부착을 나타낼 수 없는 것으로 밝혀졌다.

- [0081] 특정 실시양태에서, 삼블록 공중합체의 소수성 블록 (예를 들어, 삼블록 공중합체 PEG-PPO-PEG의 PPO 블록 (여기서, PEG 블록은 PEO 블록과 상호교체될 수 있다))의 분자량은 약 2 kDa 이상, 약 3 kDa 이상, 약 4 kDa 이상, 약 5 kDa 이상, 약 6 kDa 이상, 약 10 kDa 이상, 약 20 kDa 이상, 또는 약 50 kDa 이상이다. 일부 실시양태에서, 소수성 블록의 분자량은 약 100 kDa 이하, 약 80 kDa 이하, 약 50 kDa 이하, 약 20 kDa 이하, 약 15 kDa 이하, 약 13 kDa 이하, 약 12 kDa 이하, 약 10 kDa 이하, 약 8 kDa 이하, 또는 약 6 kDa 이하이다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 3 kDa 이상 약 15 kDa 이하). 다른 범위가 또한 가능하다.
- [0082] 또한, 특정 실시양태에서, 입자가 충분한 감소된 점막부착을 나타내기 위해 친수성 블록의 충분한 양 (중합체의 총 중량의 함수로서)이 필요했던 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 삼블록 공중합체의 약 15 wt% 이상 (예를 들어, 약 20 wt% 이상, 약 25 wt% 이상, 약 30 wt% 이상)을 구성하는 친수성 블록은 입자를 점액 관통이 되게 하였으며, 한편 이러한 한계치 미만의 친수성 블록의 중량 백분율을 갖는 입자를 사용하면 점막 부착이 일반적으로 관찰되었다. 일부 실시양태에서, 삼블록 공중합체의 친수성 블록은 삼블록 공중합체의 약 15 wt% 이상, 약 20 wt% 이상, 약 25 wt% 이상, 약 30 wt% 이상, 약 35 wt% 이상, 약 40 wt% 이상, 약 45 wt% 이상, 약 50 wt% 이상, 약 55 wt% 이상, 약 60 wt% 이상, 약 65 wt% 이상, 또는 약 70 wt% 이상을 구성한다. 일부 실시양태에서, 삼블록 공중합체의 친수성 블록은 삼블록 공중합체의 약 90 wt% 이하, 약 80 wt% 이하, 약 60 wt% 이하, 약 50 wt% 이하, 또는 약 40 wt% 이하를 구성한다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 30 wt% 이상 약 80 wt% 이하). 다른 범위가 또한 가능하다.
- [0083] 일부 실시양태에서, 친수성 블록 (예를 들어, 삼블록 공중합체 PEG-PPO-PEG의 PEG (또는 PEO) 블록 (여기서, PEG 블록은 PEO 블록과 상호교체될 수 있다))의 분자량은 약 0.05 kDa 이상, 약 0.1 kDa 이상, 약 0.2 kDa 이상, 약 0.3 kDa 이상, 약 0.4 kDa 이상, 약 0.5 kDa 이상, 약 1 kDa 이상, 약 2 kDa 이상, 약 3 kDa 이상, 약 4 kDa 이상, 약 5 kDa 이상, 약 6 kDa 이상, 약 8 kDa 이상, 약 10 kDa 이상, 약 20 kDa 이상, 또는 약 50 kDa 이상일 수 있다. 특정 실시양태에서, 친수성 블록의 분자량은 약 100 kDa 이하, 약 80 kDa 이하, 약 50 kDa 이하, 약 20 kDa 이하, 약 15 kDa 이하, 약 10 kDa 이하, 약 9 kDa 이하, 약 8 kDa 이하, 약 7 kDa 이하, 약 6 kDa 이하, 약 5 kDa 이하, 약 3 kDa 이하, 약 2 kDa 이하, 또는 약 1 kDa 이하이다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 0.1 kDa 이상 약 3 kDa 이하). 다른 범위가 또한 가능하다. 2개의 친수성 블록이 소수성 블록의 측면에 있는 실시양태에서, 2개의 친수성 블록의 분자량은 실질적으로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0084] 특정 실시양태에서, 표면 변경제의 중합체는 폴리에테르 부분을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리알킬에테르 부분을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 테일(tail)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리프로필렌 글리콜 중심부를 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리부틸렌 글리콜을 중심부로서 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리펜틸렌 글리콜을 중심부로서 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리헥실렌 글리콜을 중심부로서 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 본원에 기재된 중합체 중 하나의 삼블록 공중합체이다. 본원에 개시된 바와 같이, PEG의 임의의 설명은 폴리에틸렌 옥사이드 (PEO)로 대체될 수 있고, PEO의 임의의 설명은 PEG로 대체될 수 있다.
- [0085] 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리알킬 에테르 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜) 및 또 다른 중합체의 삼블록 공중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리알킬 에테르 및 또 다른 폴리알킬 에테르의 삼블록 공중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리프로필렌 글리콜 및 또 다른 폴리알킬 에테르의 삼블록 공중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리알킬 에테르의 1개 이상의 단위를 갖는 삼블록 공중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 2개의 상이한 폴리알킬 에테르의 삼블록 공중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함하는 삼블록 공중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 폴리프로필렌 글리콜 단위를 포함하는 삼블록 공중합체이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 2개 이상의 친수성 단위가 측면에 있는 더 소수성 단위의 삼블록 공중합체이다. 특정 실시양태에서, 친수성 단위는 중합체의 동일한 유형이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 2개 이상의 친수성 단위가 측면에 있는 폴리프로필렌 글리콜 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 더 소수성 단위를 측면에 두는 2개의 폴리에틸렌 글리콜 단위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 중합체는 2개의 폴리에틸렌 글리콜 단위가 측면에 있는 폴리프로필렌 글리콜 단위를 갖는 삼블록 공중합체이다. 중심 블록을 측면에 두는 2개의 블록의 분자량은 실질적으로 동일하거나 상이할 수 있다.

[0086] 특정 실시양태에서, 중합체는 하기 화학식이다:



[0087]

[0088] 상기 식에서, n은 2 내지 1140의 정수 모두이고; m은 2 내지 1730의 정수 모두이다. 특정 실시양태에서, n은 10 내지 170의 정수 모두이다. 특정 실시양태에서, m은 5 내지 70의 정수 모두이다. 특정 실시양태에서, n은 m의 적어도 2배, m의 적어도 3배, 또는 m의 적어도 4배이다.

[0089]

특정 실시양태에서, (폴리(에틸렌 글리콜))-(폴리(프로필렌 옥사이드))-(폴리(에틸렌 글리콜)) 삼블록 공중합체 (이하, "PEG-PPO-PEG 삼블록 공중합체")를 포함하는 표면 변경제를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, PEG 블록은 일부 실시양태에서 PEO 블록으로 상호교체될 수 있다. PEG-PPO-PEG 삼블록 공중합체의 PEG (또는 PEO) 및 PPO 세그먼트의 분자량은, 본원에 기재된 바와 같이, 입자의 점착부착을 감소시키도록 선택될 수 있다. 이론에 의해 얽매이는 것을 바라지 않으면서, PEG-PPO-PEG 삼블록 공중합체를 포함하는 코팅물을 갖는 입자는, 적어도 부분적으로, 입자 표면 상에 다수의 PEG (또는 PEO) 세그먼트의 표시로 인해, 대조군 입자와 비교하여 감소된 점착부착을 가질 수 있다. PPO 세그먼트는 코어 표면 (예를 들어, 코어 표면이 소수성인 경우에)에 부착될 수 있고, 따라서 코어와 중합체 사이에 강력한 회합을 가능하게 한다. 일부 경우에, PEG-PPO-PEG 삼블록 공중합체는 비공유 상호작용을 통해 코어와 회합된다. 비교를 목적으로, 대조군 입자는, 예를 들어 해당 코팅된 입자와 유사한 크기의 카르복실레이트-개질된 폴리스티렌 입자일 수 있다.

[0090]

특정 실시양태에서, 표면 변경제는 상표명 플루로닉®을 갖는 플록사머를 포함하는 중합체를 포함한다. 본원에 기재된 실시양태에서 유용할 수 있는 플루로닉® 중합체는 F127, F38, F108, F68, F77, F87, F88, F98, L101, L121, L31, L35, L43, L44, L61, L62, L64, L81, L92, N3, P103, P104, P105, P123, P65, P84, 및 P85를 포함하지만, 그에 제한되지는 않는다.

[0091]

특정 플루로닉® 분자의 분자량의 예를 표 1에 나타냈다.

표 1

플루로닉® 분자의 분자량

플루로닉®	평균 MW	MW PPO	PEO wt %	MW PEO
L31	1000	900	10	100
L44	2000	1200	40	800
L81	2667	2400	10	267
L101	3333	3000	10	333
P65	3600	1800	50	1800
L121	4000	3600	10	400
P103	4286	3000	30	1286
F38	4500	900	80	3600
P123	5143	3600	30	1543
P105	6000	3000	50	3000
F87	8000	2400	70	5600
F68	9000	1800	80	7200
F127	12000	3600	70	8400
P123	5750	4030	30	1730

[0092]

[0093]

비록 본원에 기재된 특정 실시양태에서 다른 범위가 가능하고 유용할 수 있긴 하지만, 일부 실시양태에서, PEG-PPO-PEG 삼블록 공중합체의 소수성 블록은 상기 기재된 분자량 중 하나를 갖고 (예를 들어, 약 3 kDa 이상 약 15 kDa 이하), 합해진 친수성 블록은 상기 기재된 범위 중 하나에서 중합체에 대하여 중량 백분율을 갖는다 (예를 들어, 약 15 wt% 이상, 약 20 wt% 이상, 약 25 wt% 이상, 또는 약 30 wt% 이상, 및 약 80 wt% 이하). 이들 기준에 속하는 특정 플루로닉® 중합체는, 예를 들어 F127, F108, P105 및 P103을 포함한다. 놀랍게도, 그리고 실시예에 더 상세히 기재된 바와 같이, 이들 특정의 플루로닉® 중합체가 이러한 기준에 속하지 않는 시험된 다

른 플루로닉® 중합체보다 더 입자를 점액 관통이 되게 한 것으로 밝혀졌다. 게다가, 입자를 점액 관통이 되게 하지 않은 다른 작용제는 특정 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈 (PVP/콜리돈(Kollidon)), 폴리비닐 알콜-폴리에틸렌 글리콜 그래프트-공중합체 (콜리코트(Kollicoat) IR), 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (메토셀 (Methocel)); 올리고머, 예컨대 트윈(Tween) 20, 트윈 80, 예컨대 솔루톨(solutol) HS 15, 트리톤(Triton) X100, 킬록사폴, 크레모포르 RH 40; 소분자, 예컨대 스팬(Span) 20, 스팬 80, 옥틸 글루코사이드, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드 (CTAB), 소듐 도데실 술페이트 (SDS)를 포함했다.

[0094] 비록 본원에서의 많은 설명이 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성 (예를 들어, PEG-PPO-PEG 삼블록 공중합체)을 포함하는 코팅물과 관련되긴 하지만, 코팅물은 이들 구성 및 물질에 제한되지는 않고 다른 구성 및 물질이 가능함을 알아야 한다. 예를 들어, 입자는 1개 초과와 코팅물 (예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 그 초과와 코팅물)을 포함할 수 있고, 각각의 코팅물은 점액 관통 물질로 형성되거나 그를 포함할 필요가 없다. 일부 경우에, 중간 코팅물 (즉, 코어 표면과 외부 코팅물 사이에 코팅물)은 코어 표면에 대한 외부 코팅물의 부착을 촉진시키는 중합체를 포함할 수 있다. 많은 실시양태에서, 입자의 외부 코팅물은 점액을 통한 입자의 수송을 촉진시키는 물질을 포함하는 중합체를 포함한다.

[0095] 그와 같이, 코팅물 (예를 들어, 내부 코팅물, 중간 코팅물, 및/또는 외부 코팅물)은 임의의 적합한 중합체를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 중합체는 생체적합성 및/또는 생체분해성일 수 있다. 일부 경우에, 중합체 물질은 1개 초과 유형의 중합체 (예를 들어, 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 그 초과와 중합체)를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 중합체는 본원에 기재된 바와 같이 랜덤 공중합체 또는 블록 공중합체 (예를 들어, 이블록 공중합체, 삼블록 공중합체)일 수 있다.

[0096] 적합한 중합체의 비제한적 예는 폴리아민, 폴리에테르, 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리카르바메이트, 폴리우레아, 폴리카르보네이트, 폴리스티렌, 폴리이미드, 폴리술폰, 폴리우레탄, 폴리아세틸렌, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌 이민, 폴리이소시아네이트, 폴리아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트, 폴리아크릴로니트릴, 및 폴리아릴레이트를 포함할 수 있다. 구체적 중합체의 비제한적 예는 폴리(카프로락톤) (PCL), 에틸렌 비닐 아세테이트 중합체 (EVA), 폴리(락트산) (PLA), 폴리(L-락트산) (PLLA), 폴리(글리콜산) (PGA), 폴리(락트산-코-글리콜산) (PLGA), 폴리(L-락트산-코-글리콜산) (PLLGA), 폴리(D,L-락티드) (PDLA), 폴리(L-락티드) (PLLA), 폴리(D,L-락티드-코-카프로락톤), 폴리(D,L-락티드-코-카프로락톤-코-글리콜리드), 폴리(D,L-락티드-코-PEO-코-D,L-락티드), 폴리(D,L-락티드-코-PPO-코-D,L-락티드), 폴리알킬 시아노아크릴레이트, 폴리우레탄, 폴리-L-리신 (PLL), 히드록시프로필 메타크릴레이트 (HPMA), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리-L-글루탐산, 폴리(히드록시산), 폴리무수물, 폴리오르토에스테르, 폴리(에스테르 아미드), 폴리아미드, 폴리에스테르 에테르, 폴리카르보네이트, 폴리알킬렌, 예컨대 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌, 폴리알킬렌 글리콜, 예컨대 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG), 폴리알킬렌 옥사이드 (PEO), 폴리알킬렌 테레프탈레이트, 예컨대 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리비닐 알콜 (PVA), 폴리비닐 에테르, 폴리비닐 에스테르, 예컨대 폴리(비닐 아세테이트), 폴리비닐 할라이드, 예컨대 폴리(비닐 클로라이드) (PVC), 폴리비닐피롤리돈, 폴리실록산, 폴리스티렌 (PS), 폴리우레탄, 유도체화 셀룰로스, 예컨대 알킬 셀룰로스, 히드록시알킬 셀룰로스, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 에스테르, 니트로 셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 아크릴산의 중합체, 예컨대 폴리(메틸(메트)아크릴레이트) (PMMA), 폴리(에틸(메트)아크릴레이트), 폴리(부틸(메트)아크릴레이트), 폴리(이소부틸(메트)아크릴레이트), 폴리(헥실(메트)아크릴레이트), 폴리(이소데실(메트)아크릴레이트), 폴리(라우릴(메트)아크릴레이트), 폴리(페닐(메트)아크릴레이트), 폴리(메틸 아크릴레이트), 폴리(이소프로필 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴레이트), 폴리(옥타데실 아크릴레이트) (본원에서 합동으로 "폴리아크릴산"으로 지칭됨), 및 그의 공중합체 및 혼합물, 폴리디옥산 및 그의 공중합체, 폴리히드록시알카노에이트, 폴리프로필렌 푸마레이트, 폴리옥시메틸렌, 폴록사머, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부티르산), 폴리(발레산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 및 트리메틸렌 카르보네이트, 폴리비닐피롤리돈을 포함한다.

[0097] 중합체의 분자량은 다를 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자량은 약 0.5 kDa 이상, 약 1 kDa 이상, 약 2 kDa 이상, 약 3 kDa 이상, 약 4 kDa 이상, 약 5 kDa 이상, 약 6 kDa 이상, 약 8 kDa, 약 10 kDa 이상, 약 12 kDa 이상, 약 15 kDa 이상, 약 20 kDa 이상, 약 30 kDa 이상, 약 40 kDa 이상, 또는 약 50 kDa 이상일 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자량은 약 50 kDa 이하, 약 40 kDa 이하, 약 30 kDa 이하, 약 20 kDa 이하, 약 12 kDa 이하, 약 10 kDa 이하, 약 8 kDa 이하, 약 6 kDa 이하, 약 5 kDa 이하, 또는 약 4 kDa 이하일 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 2 kDa 이상 약 15 kDa 이하의 분자량). 다른 범위가 또한 가능하다. 분자량은 임의의 공지된 기법을, 예컨대 광-산란 및 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 측정할 수 있다.

다른 방법이 본 기술분야에 공지되어 있다.

[0098] 특정 실시양태에서, 중합체는 생체적합성이고, 즉, 중합체는 전형적으로 생체에 삽입 또는 주입시 유해 반응(adverse response)을 유도하지 않고; 예를 들어, 이는 상당한 염증 및/또는, 예를 들어 T-세포-매개 반응을 통해, 면역계에 의해 중합체의 급성 거부반응을 포함하지 않는다. 물론, "생체적합성"은 상대적 용어이고, 일부 면역 반응의 정도는 심지어 생체 조직과 매우 적합성인 중합체에 대해 예상된다는 점을 인식할 것이다. 그러나, 본원에서 사용된 바와 같이, "생체적합성"은 면역계의 적어도 일부에 의한 물질의 급성 거부반응을 지칭하며, 즉, 대상체에 이식된 비-생체적합성 물질이 대상체에서 면역 반응을 유발하며 이는 면역계에 의한 물질이 거부 반응이 적당하게 제어될 수 없을 정도로 충분히 심하며, 종종 대상체로부터 물질을 제거해야 하는 정도이다. 생체적합성을 측정하는 한 간단한 시험은 중합체를 시험관내에서 세포에 노출시키는 것이고; 생체적합성 중합체는 중정도의 농도에서, 예를 들어 약 50 마이크로그램/10⁶ 세포의 농도에서 전형적으로 그다지 세포사를 초래하지 않는 중합체이다. 예를 들어, 생체적합성 중합체는 섬유모세포 또는 상피 세포와 같은 세포에 노출시, 비록 그러한 세포에 의해 식균되거나 그렇지 않으면 취입되지 않더라도, 약 20% 이하의 세포사를 유발할 수 있다. 일부 실시양태에서, 물질은, 시험관 내에서 세포로의 그의 첨가가 20% 이하의 세포사를 초래하고, 생체내에서 그의 투여가 원치않는 염증 또는 다른 이러한 부작용을 유도하지 않는다면 "생체적합성"이다.

[0099] 특정 실시양태에서, 생체적합성 중합체는 생체분해성일 수 있고, 즉, 중합체는 생리 환경 내에서, 예컨대 체내에서 또는 세포에 도입시, 화학적으로 및/또는 생물학적으로 (예를 들어, 세포 기구(cellular machinery)에 의해 또는 가수분해에 의해) 분해가능하다. 예를 들어, 중합체는 물 (예를 들어, 대상체 내에서)에 노출시 자발적으로 가수분해되는 것일 수 있고/거나, 중합체는 열 (예를 들어, 약 37℃의 온도에서)에 노출시 분해될 수 있다. 중합체의 분해는 사용되는 중합체 또는 공중합체에 따라, 다양한 속도로 일어날 수 있다. 예를 들어, 중합체의 반감기 (50%의 중합체가 단량체 및/또는 다른 비중합체 모이어티로 분해되는 시간)는 중합체에 따라, 대략 수일, 수주, 수개월, 또는 수년일 수 있다. 중합체는, 일부 경우에, 예를 들어 리소자임 (예를 들어, 비교적 낮은 pH를 갖는)에 노출을 통해, 예를 들어 효소 활성 또는 세포 기구에 의해, 생물학적으로 분해될 수 있다. 일부 경우에, 중합체는 세포가 세포에 대해 상당한 독성 효과 없이 (즉, 성분을 시험관내에서 세포에 첨가시 약 20% 미만의 세포가 사멸) 재사용하거나 처리할 수 있는 단량체 및/또는 다른 비중합체 모이어티로 분해될 수 있다. 예를 들어, 폴리락티드가 가수분해되어 락트산을 형성할 수 있고, 폴리글리콜리드가 가수분해되어 글리콜산을 형성할 수 있는 등이다.

[0100] 생체분해성 중합체의 예는 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 글리콜) 삼블록 공중합체, 폴리(락티드) (또는 폴리(락트산)), 폴리(글리콜리드) (또는 폴리(글리콜산)), 폴리(오르토에스테르), 폴리(카프로락톤), 폴리리신, 폴리(에틸렌 이민), 폴리(아크릴산), 폴리(우레탄), 폴리(무수물), 폴리에스테르, 폴리(트리메틸렌 카르보네이트), 폴리(에틸렌이민), 폴리(아크릴산), 폴리(우레탄), 폴리(베타 아미노 에스테르) 등, 및 이들 및/또는 다른 중합체의 공중합체 또는 유도체, 예를 들어 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLGA)를 포함하지만, 그에 제한되지는 않는다.

[0101] 특정 실시양태에서, 중합체는 목적하는 적용에 허용되는 기간 내에 생체분해될 수 있다. 특정 실시양태에서, 예컨대 생체내 요법에서, 그러한 분해는 대개 25 내지 37℃의 온도에서 6 내지 8의 pH를 갖는 생리 용액에 노출시 약 5년, 1년, 6개월, 3개월, 1개월, 15일, 5일, 3일 이하, 또는 심지어 1일 또는 그 미만 (예를 들어, 1-4 시간, 4-8 시간, 4-24 시간, 1-24 시간)의 기간에 일어난다. 다른 실시양태에서, 중합체는 목적하는 적용에 따라, 약 1시간 내지 수주의 기간에 분해된다.

[0102] 비록 본원에 기재된 코팅물 및 입자가 중합체를 포함할 수 있긴 하지만, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 중합체가 아니고 (예를 들어, 비중합체) 약제가 아닌 소수성 물질을 포함한다. 예를 들어, 입자의 전부 또는 일부는 일부 실시양태에서 부동태화 층으로 코팅될 수 있다. 비중합체 물질의 비제한적 예는 특정 금속, 왁스, 및 유기 물질 (예를 들어, 유기 실란, 퍼플루오린화 또는 플루오린화 유기 물질)을 포함할 수 있다.

[0103] 감소된 점막부착을 갖는 입자

[0104] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 방법은 그의 점막부착성을 감소시키는 것이 바람직한 입자와 같은 물질을 확인하는 것을 포함한다. 점액을 통한 증가된 확산도를 필요로 하는 물질은, 예를 들어 소수성일 수 있고, 많은 수소 결합 공여체 또는 수용체를 가질 수 있고/거나, 고도로 하전될 수 있다. 일부 경우에, 물질은 결정질 또는 무정형 고체 물질을 포함할 수 있다. 코어로서 역할을 할 수 있는 물질은, 본원에 기재된 적합한 중합체로 코팅될 수 있고, 그로 인해 표면 상에 다수의 표면 변경제를 갖는 입자를 형성시키고, 감소된 점막부착을 초래한다. 감소된 점막부착을 갖는 것으로 본원에 기재된 입자는 대안적으로 점액을 통한 증가된 수송을

갖거나, 점액 중에서 이동성이거나, 점액-관통인 것을 특징으로 하며 (즉, 점액-관통 입자), 이는 입자가 (음성) 대조군 입자보다 신속하게 점액을 통해 수송됨을 의미한다. (음성) 대조군 입자는 점막부착성인 것으로 공지된 입자, 예를 들어 비개질 입자이거나 본원에 기재된 코팅물로 코팅되지 않은 코어, 예컨대 200 nm 카르복실화 폴리스티렌 입자일 수 있다.

[0105] 특정 실시양태에서, 본원에서 방법은, 예를 들어 대상체의 점액 또는 점막 표면에 전달 (예를 들어, 국소 전달)하기에 적합화된 제제로, 개질된 물질의 제약 조성물 또는 제제를 제조하는 것을 포함한다. 표면 변경 모이 어터를 갖는 제약 조성물은, 예를 들어 감소된 점막부착으로 인해, 대상체의 점막 표면에 전달될 수 있고, 대상 체에서 점막 장벽을 통과할 수 있고/거나, 체류가 연장될 수 있고/거나, 점막 표면에서 입자의 균일 분포가 증 가될 수 있다. 당업자가 알게 되는 바와 같이, 점액은 대부분의 외인성 입자를 포착하는 점탄성이고 부착성인 물질이다. 포착된 입자는 하층의 상피에 이를 수 없고/거나 점액 클리어런스 메카니즘에 의해 급속히 제거된다. 입자가 하층의 상피에 이르고/거나 입자가 점막 조직에서의 체류를 연장하기 위해, 입자는 점액 분 비에 급속히 관통하고/거나 점액 클리어런스 메카니즘을 피해야 한다. 입자가 점액에 실질적으로 부착되지 않 는 경우, 입자는 뮤신 섬유 사이에 간질액에 확산되고 하층의 상피에 이르는 것이 가능할 수 있고/거나 점액 클 리어런스 메카니즘에 의해 제거되지 않을 수 있다. 따라서, 점막부착 물질 (예를 들어, 소수성인 약제)을 입자 의 점막부착을 감소시키는 물질로 개질시키는 것은 하층의 상피로의 입자의 효율적 전달 및/또는 점막 표면에서 의 장기간 체류를 가능하게 할 수 있다.

[0106] 더욱이, 일부 실시양태에서, 감소된 점막부착을 갖는 본원에 기재된 입자는 더 점막부착성인 입자와 비교하여, 조직 표면에서 입자의 더 양호한 분포를 촉진시키고/거나, 조직 표면에 장기간 존재를 갖는다. 예를 들어, 일 부 경우에 위장관과 같은 내강 공간(luminal space)은 점액-코팅된 표면으로 둘러싸여진다. 이러한 공간에 전 달된 점막부착성 입자는 전형적으로 체내 자연 클리어런스 메카니즘에 의해 내강 공간으로부터 및 점액-코팅된 표면으로부터 제거된다. 감소된 점막부착을 갖는 본원에 기재된 입자는 점막부착성 입자와 비교하여 비교적 더 긴 기간 동안 내강 공간에 남을 수 있다. 이러한 장기간 존재는 입자의 클리어런스를 방지 또는 감소시키고/거 나, 조직 표면 상에서 입자의 더 양호한 분포를 가능하게 할 수 있다. 장기간 존재는 또한 내강 공간을 통한 입자 수송에 영향을 미칠 수 있고, 예를 들어 입자가 점액층 내로 분포되고 하층의 상피에 이를 수 있다.

[0107] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 중합체로 코팅된 물질 (예를 들어, 코어)은 대상체에서 점액 또는 점막 장벽 을 통과하고/거나, 장기간 체류를 나타내고/거나, 점막 표면에서 입자의 균일한 분포를 증가시킬 수 있고, 예를 들어 이러한 물질은 (음성) 대조군 입자와 비교하여 대상체의 신체로부터 더 서서히 (예를 들어, 적어도 2배, 5 배, 10배, 또는 심지어 적어도 20배 더 서서히) 클리어런스된다. (음성) 대조군 입자는 점막부착성인 것으로 공지된 입자, 예를 들어 비개질 입자이거나 본원에 기재된 코팅물로 코팅되지 않은 코어, 예컨대 200 nm 카르복 실화 폴리스티렌 입자일 수 있다.

[0108] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 다음과 같이 정의되는 특정 상대 속도, $\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$ 를 갖는다:

[0109] <방정식 1>

$$\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}} = \frac{\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{샘플}} - \langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{음성 대조군}}}{\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{양성 대조군}} - \langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{음성 대조군}}}$$

[0110]

[0111] 상기 식에서, $\langle V_{\text{평균}} \rangle$ 은 앙상블 평균 궤도-평균 속도(ensemble average trajectory-mean velocity)이고, $V_{\text{평균}}$ 은 그의 궤도에 대해 평균낸 개별 입자이고, 샘플은 관심 입자이고, 음성 대조군은 200 nm 카르복실화 폴리스티렌 입자이고, 양성 대조군은 2 kDa - 5 kDa PEG로 치밀하게 PEG화 200 nm 폴리스티렌 입자이다.

[0112] 상대 속도는 다중 입자 추적 기법에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, CCD 카메라가 장착된 형광 현미경을 사 용하여, 입자의 각각의 유형, 즉 샘플, 음성 대조군, 및 양성 대조군에 대한 각 샘플 내에 몇몇 영역으로부터 100x 배율하에 66.7 ms (15개 프레임/s)의 시간 해상도(temporal resolution)에서 15 s 무비(movie)를 캡처할 수 있다. 샘플, 음성 및 양성 대조군은 추적을 관찰하는 형광 입자일 수 있다. 대안으로 비-형광 입자를 형광 분자, 형광 태깅된 표면 작용제 또는 형광 태깅된 중합체로 코팅할 수 있다. 첨단 영상 처리 소프트웨어 (예를 들어, 이미지 프로(Image Pro) 또는 메타모र्फ(MetaMorph))를 사용하여 3.335 s (50개 프레임) 이상의 시간 척도에 걸쳐 다중 입자의 개별 궤도를 측정할 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 점액에서 약 0.3 이상, 약 0.4 이상, 약 0.5 이상, 약 0.6 이상, 약 0.7 이상, 약 0.8 이상, 약 0.9 이상, 약 1.0 이상, 약 1.1 이상, 약 1.2 이상, 약 1.3 이상, 약 1.4 이상, 약

1.5 이상, 약 1.6 이상, 약 1.7 이상, 약 1.8 이상, 약 1.9 이상 또는 약 2.0 이상의 상대 속도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 점액에서 약 10.0 이하, 약 8.0 이하, 약 6.0 이하, 약 4.0 이하, 약 3.0 이하, 약 2.0 이하, 약 1.9 이하, 약 1.8 이하, 약 1.7 이하, 약 1.6 이하, 약 1.5 이하, 약 1.4 이하, 약 1.3 이하, 약 1.2 이하, 약 1.1 이하, 약 1.0 이하, 약 0.9 이하, 약 0.8 이하, 또는 약 1.7 이하의 상대 속도를 갖는다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 0.5 이상 약 6.0 이하의 상대 속도). 다른 범위가 또한 가능하다. 점액은, 예를 들어 인간 자궁경질의 점액일 수 있다.

[0114] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 대조군 입자 또는 상응하는 입자 (예를 들어, 비개질되고/거나 본원에 기재된 코팅물로 코팅되지 않은 상응하는 입자)보다 더 큰 속도 또는 확산도로 점액 또는 점막 장벽을 통해 확산할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 입자는 대조군 입자 또는 상응하는 입자보다, 적어도 약 10배, 20배, 30배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1000배, 2000배, 5000배, 10000배, 또는 그 초과로 더 높은 확산 속도로 점액 또는 점막 장벽을 통과할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 입자는 대조군 입자 또는 상응하는 입자보다 약 10000배 이하로 높은, 약 5000배 이하로 높은, 약 2000배 이하로 높은, 약 1000배 이하로 높은, 약 500배 이하로 높은, 약 200배 이하로 높은, 약 100배 이하로 높은, 약 50배 이하로 높은, 약 30배 이하로 높은, 약 20배 이하로 높은, 또는 약 10배 이하로 높은 확산 속도로 점액 또는 점막 장벽을 통과할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 대조군 입자 또는 상응하는 입자보다 약 10배 이상 약 1000배 이하로 높음). 다른 범위가 또한 가능하다.

[0115] 본원에 기재된 비교를 목적으로, 상응하는 입자는 시험 입자와 대략 동일 크기, 형상, 및/또는 밀도일 수 있지만, 점액 중 시험 입자가 이동성이 되도록 하는 코팅물은 결여되어 있다. 일부 경우에, 측정은 약 1초, 또는 약 0.5초, 또는 약 2초, 또는 약 5초, 또는 약 10초의 시간 척도를 기반으로 한다. 당업자는 기하 평균 제곱 변위 및 확산 속도를 측정하는 방법을 알 것이다.

[0116] 게다가, 본원에 기재된 입자는 상응하는 입자 또는 대조군 입자보다 적어도 약 10배, 20배, 30배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1000배, 2000배, 5000배, 10000배, 또는 그 초과로 높은 기하 평균 제곱 변위로 점액 또는 점막 장벽을 통과할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 입자는 대조군 입자 또는 상응하는 입자보다 약 10000배 이하로 높은, 약 5000배 이하로 높은, 약 2000배 이하로 높은, 약 1000배 이하로 높은, 약 500배 이하로 높은, 약 200배 이하로 높은, 약 100배 이하로 높은, 약 50배 이하로 높은, 약 30배 이하로 높은, 약 20배 이하로 높은, 또는 약 10배 이하로 높은 기하 평균 제곱 변위로 점액 또는 점막 장벽을 통과할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 대조군 입자 또는 상응하는 입자보다 약 10배 이상 약 1000배 이하로 높음). 다른 범위가 또한 가능하다.

[0117] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 상기 입자가 물을 통해 확산할 수 있는 속도 또는 확산도에 근접하는 속도로 점막 장벽을 통해 확산한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 입자는 입자가 동일한 조건하에 물을 통해 확산하는 확산도의 약 1/2 이하, 약 1/4 이하, 약 1/8 이하, 약 1/16 이하, 약 1/32 이하, 약 1/50 이하, 약 1/100 이하, 약 1/200 이하, 약 1/300 이하, 약 1/400 이하, 약 1/500 이하, 약 1/600 이하, 약 1/700 이하, 약 1/800 이하, 약 1/900 이하, 약 1/1000 이하, 약 1/2000 이하, 약 1/5000 이하, 약 1/10,000 이하인 속도 또는 확산도로 점막 장벽을 통과할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 기재된 입자는 입자가 동일한 조건하에 물을 통해 확산하는 확산도의 약 1/10,000 이상, 약 1/5000 이상, 약 1/2000 이상, 약 1/1000 이상, 약 1/900 이상, 약 1/800 이상, 약 1/700 이상, 약 1/600 이상, 약 1/500 이상, 약 1/400 이상, 약 1/300 이상, 약 1/200 이상, 약 1/100 이상, 약 1/50 이상, 약 1/32 이상, 약 1/16 이상, 약 1/8 이상, 약 1/4 이상, 또는 약 1/2 이상인 속도 또는 확산도로 점막 장벽을 통과할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 입자가 동일한 조건하에 물을 통해 확산하는 확산도의 약 1/5000 이상 1/500 미만). 다른 범위가 또한 가능하다. 측정은 약 1초, 또는 약 0.5초, 또는 약 2초, 또는 약 5초, 또는 약 10초의 시간 척도를 기반으로 할 수 있다.

[0118] 특정의 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 입자가 물을 통해 확산하는 확산도의 약 1/500 이하인 확산도로 인간 자궁경질의 점액을 통해 확산할 수 있다. 일부 경우에, 측정은 약 1초, 또는 약 0.5초, 또는 약 2초, 또는 약 5초, 또는 약 10초의 시간 척도를 기반으로 한다.

[0119] 특정 실시양태에서, 본 발명은 특정의 절대 확산도로 점액, 예컨대 인간 자궁경질의 점액을 통해 이동하는 입자를 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 입자는 적어도 약 $1 \times 10^{-4} \mu\text{m/s}$, $2 \times 10^{-4} \mu\text{m/s}$, $5 \times 10^{-4} \mu\text{m/s}$, $1 \times 10^{-3} \mu\text{m/s}$, $2 \times 10^{-3} \mu\text{m/s}$, $5 \times 10^{-3} \mu\text{m/s}$, $1 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$, $2 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$, $4 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$, $5 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$, $6 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$

$\mu\text{m/s}$, $8 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$, $1 \times 10^{-1} \mu\text{m/s}$, $2 \times 10^{-1} \mu\text{m/s}$, $5 \times 10^{-1} \mu\text{m/s}$, $1 \mu\text{m/s}$, 또는 $2 \mu\text{m/s}$ 의 확산도로 이동할 수 있다. 일부 경우에, 입자는 약 $2 \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $1 \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $5 \times 10^{-1} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $2 \times 10^{-1} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $1 \times 10^{-1} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $8 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $6 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $5 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $4 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $2 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $1 \times 10^{-2} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $5 \times 10^{-3} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $2 \times 10^{-3} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $1 \times 10^{-3} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $5 \times 10^{-4} \mu\text{m/s}$ 이하, 약 $2 \times 10^{-4} \mu\text{m/s}$ 이하, 또는 약 $1 \times 10^{-4} \mu\text{m/s}$ 이하의 확산도로 이동할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 $2 \times 10^{-4} \mu\text{m/s}$ 이상 약 $1 \times 10^{-1} \mu\text{m/s}$ 이하). 다른 범위가 또한 가능하다. 일부 경우에, 측정은 약 1초, 또는 약 0.5초, 또는 약 2초, 또는 약 5초, 또는 약 10초의 시간 척도를 기반으로 한다.

[0120] 여기서 기재된 많은 이동성 (예를 들어, 상대 속도, 확산도)이 인간 자궁경질의 점액에서 측정될 수 있지만, 이들은 마찬가지로 다른 유형의 점액에서 측정될 수 있음을 알아야 한다.

[0121] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 소정의 밀도에서 표면 변경 모이어티를 포함한다. 표면 변경 모이어티는, 예를 들어 입자를 함유하는 용매에 노출되는, 표면 변경체의 부분일 수 있다. 예로서, PEG 세그먼트는 표면 변경체 PEG-PPO-PEG의 표면 변경 모이어티일 수 있다. 일부 경우에, 표면 변경 모이어티 및/또는 표면 변경체는 nm^2 당 약 0.001 이상의 단위 또는 분자, nm^2 당 약 0.002 이상, 약 0.005 이상, 약 0.01 이상, 약 0.02 이상, 약 0.05 이상, 약 0.1 이상, 약 0.2 이상, 약 0.5 이상, 약 1 이상, 약 2 이상, 약 5 이상, 약 10 이상, 약 20 이상, 약 50 이상, 약 100 이상의 단위 또는 분자, 또는 nm^2 당 그 초과와 단위 또는 분자의 밀도로 존재한다. 일부 경우에, 표면 변경 모이어티 및/또는 표면 변경체는 nm^2 당 약 100 이하의 단위 또는 분자, nm^2 당 약 50 이하, 약 20 이하, 약 10 이하, 약 5 이하, 약 2 이하, 약 1 이하, 약 0.5 이하, 약 0.2 이하, 약 0.1 이하, 약 0.05 이하, 약 0.02 이하, 또는 약 0.01 이하의 단위 또는 분자의 밀도로 존재한다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, nm^2 당 약 0.01 이상 약 1 이하 단위 또는 분자의 밀도). 다른 범위가 또한 가능하다. 일부 실시양태에서, 표면 변경체가 용액 중 다른 성분과 평형을 이루기 때문에 상기 기재된 밀도 값은 평균 밀도일 수 있다.

[0122] 당업자는 표면 변경 모이어티의 평균 밀도를 정량화 또는 추정하는 방법을 알 것이다 (예를 들어, 문헌 [S.J. Budijono et al., Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 360 (2010) 105-110] 및 [Joshi, et al., Anal. Chim. Acta 104 (1979) 153-160] 참조, 이들 각각은 본원에 참조로 포함됨). 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 표면 변경 모이어티의 평균 밀도는 HPLC 정량화 및 DLS 분석을 사용하여 결정할 수 있다. 표면 밀도 결정에 위한 관심 입자의 현탁액을 우선 DLS를 사용하여 사이징한다: 작은 부피를 적절한 농도 (예를 들어, $\sim 100 \mu\text{g/mL}$)로 희석하고, z -평균 직경을 입자 크기의 대표적 측정으로서 취한다. 그 다음 나머지 현탁액을 2개의 분취액으로 나눈다. HPLC를 사용하여, 제1 분취액을 코어 물질의 총 농도 및 표면 변경 모이어티의 총 농도에 대해 검정한다. 다시 HPLC를 사용하여 제2 분취액을 유리(free) 또는 미결합된 표면 변경 모이어티의 농도에 대해 검정한다. 제2 분취액으로부터 유리 또는 미결합된 표면 변경 모이어티만을 얻기 위해, 입자, 및 따라서 임의의 결합된 표면 변경 모이어티를 초원심분리에 의해 제거한다. 표면 변경 모이어티의 총 농도로부터 미결합된 표면 변경 모이어티의 농도를 감함으로써, 결합된 표면 변경 모이어티의 농도를 결정할 수 있다. 또한, 코어 물질의 총 농도를 제1 분취액으로부터 결정했기 때문에, 코어 물질과 표면 변경 모이어티와의 질량비를 결정할 수 있다. 표면 변경 모이어티의 분자량을 사용하여 코어 물질의 질량에 대한 표면 변경 모이어티의 수를 계산할 수 있다. 이 수를 표면 밀도 측정으로 변환시키기 위해, 코어 물질의 질량당 표면적을 계산할 필요가 있다. 입자의 부피는 DLS로부터 수득된 직경을 갖는 구체의 부피로서 근사치로 계산하여 코어 물질의 질량당 표면적을 계산할 수 있게 된다. 이러한 방식으로 표면적당 표면 변경 모이어티의 수를 결정할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 밀도 값은 이 방법을 사용하여 결정하였다.

[0123] 밀도는 또한 전자 현미경법, 광 산란, 또는 표면 상호작용 측정과 같은 방법에 의해 코어 물질 표면적을 정량화 또는 추정한 다음, 부착된 표면 작용체 (들)을 액체 크로마토그래피 또는 질량 분석법과 같은 방법에 의해 정량화함으로써 측정할 수 있다. (예를 들어 문헌 [Wang et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47(50), 9726-9]을 참조하고, 이는 본원에 참조로 포함된다).

[0124] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 입자는 입자의 제타 전위에 영향을 미치는 표면 변경 모이어티 및/또는 표면 변경체를 포함할 수 있다. 코팅된 입자의 제타 전위는, 예를 들어 약 -100 mV 이상, 약 -75 mV 이상, 약 -50 mV 이상, 약 -40 mV 이상, 약 -30 mV 이상, 약 -20 mV 이상, 약 -10 mV 이상, 약 -5 mV 이상, 약 5 mV 이상, 약 10 mV 이상, 약 20 mV 이상, 약 30 mV 이상, 약 40 mV 이상, 약 50 mV 이상, 약 75 mV 이상, 또는 약 100

mV 이상일 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 -50 mV 이상 약 50 mV 이하의 제타 전위). 다른 범위가 또한 가능하다.

[0125] 본원에 기재된 코팅된 입자는 임의의 적합한 형상 및/또는 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 코팅된 입자는 코어의 형상과 실질적으로 유사한 형상을 갖는다. 일부 경우에, 본원에 기재된 코팅된 입자는 나노입자일 수 있고, 즉, 입자는 약 1 마이크로미터 이하의 특징적 치수를 갖고, 여기서 입자의 특징적 치수는 입자와 동일한 부피를 갖는 완전 구체의 직경이다. 다른 실시양태에서, 더 큰 크기가 가능하다 (예를 들어, 약 1 - 10 마이크로미터). 다수의 입자는 또한, 일부 실시양태에서, 평균 크기 (예를 들어, 다수의 입자에 대한 평균 최대 단면 치수, 또는 평균 최소 단면 치수)를 특징으로 할 수 있다. 다수의 입자는 예를 들어, 약 10 μm 이하, 약 5 μm 이하, 약 1 μm 이하, 약 800 nm 이하, 약 700 nm 이하, 약 500 nm 이하, 400 nm 이하, 300 nm 이하, 약 200 nm 이하, 약 100 nm 이하, 약 75 nm 이하, 약 50 nm 이하, 약 40 nm 이하, 약 35 nm 이하, 약 30 nm 이하, 약 25 nm 이하, 약 20 nm 이하, 약 15 nm 이하, 또는 약 5 nm 이하의 평균 크기를 가질 수 있다. 일부 경우에, 다수의 입자는 예를 들어, 약 5 nm 이상, 약 20 nm 이상, 약 50 nm 이상, 약 100 nm 이상, 약 200 nm 이상, 약 300 nm 이상, 약 400 nm 이상, 약 500 nm 이상, 약 1 μm 이상, 약 5 μm 이상의 평균 크기를 가질 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 50 nm 이상 약 500 nm 이하의 평균 크기). 다른 범위가 또한 가능하다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 형성된 코어의 크기는 가우스형 분포를 갖는다.

[0126] 약제

[0127] 일부 실시양태에서, 코팅된 입자는 1종 이상의 약제를 포함한다. 약제는 입자의 코어에 존재하고/거나 입자의 코팅물에 존재할 수 있다 (예를 들어, 코어 및/또는 코팅물 전반에 걸쳐 분산됨). 일부 경우에, 약제는 입자의 표면 상에 배치될 수 있다 (예를 들어, 코팅물의 외부 표면, 코팅물의 내부 표면 상에, 코어의 표면 상에). 약제는 흔히 공지된 기법 (예를 들어, 코팅, 흡착, 공유 연결, 또는 다른 공정)을 사용하여 입자내에 함유되고/거나 입자의 일부 중에 배치될 수 있다. 일부 경우에, 약제는 입자의 코팅 이전에 또는 동안에 입자의 코어에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 약제는 본원에 기재된 바와 같이, 입자의 코어의 형성 동안 존재한다.

[0128] 약제의 비제한적 예는 영상화제, 진단제, 치료제, 검출가능한 표지를 갖는 작용제, 핵산, 핵산 유사체, 소분자, 펩티드모방체, 단백질, 펩티드, 지질, 백신, 바이러스 벡터, 바이러스, 및 계면활성제를 포함한다.

[0129] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 입자에 함유된 약제는 표적이 되는 점막 조직에서 치료, 진단, 또는 영상화 효과를 갖는다. 점막 조직의 비제한적 예는 구강 (예를 들어, 협측 및 식도 막 및 편도 표면 포함), 눈, 위장관 (예를 들어, 위, 소장, 대장, 결장, 직장 포함), 비강, 호흡기 (예를 들어, 비강, 인두, 기관 및 기관지 막 포함), 및 생식기 (예를 들어, 질, 자궁경부 및 요도 막) 조직을 포함한다.

[0130] 약제의 임의의 적합한 수가 본원에 기재된 입자에 존재할 수 있다. 예를 들어, 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 그 초과지만, 일반적으로 10개 미만의 약제가 본원에 기재된 입자에 존재할 수 있다.

[0131] 점막부착성인 약물의 수는 본 기술분야에 공지되어 있고 본원에 기재된 입자 중 약제로서 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR, Drug transfer through mucus, Advanced Drug Delivery Reviews 48 (2001) 173-193]; [Bhat PG, Flanagan DR, Donovan MD. Drug diffusion through cystic fibrotic mucus: steady-state permeation, rheologic properties, and glycoprotein morphology, J Pharm Sci, 1996 Jun;85(6):624-30]). 약제의 추가의 비제한적 예는 영상화제 및 진단제 (예컨대 방사선불투과제, 표지된 항체, 표지된 핵산 프로브, 염료, 예컨대 착색된 또는 형광 염료 등) 및 아주반트 (방사선증감제, 형질감염 향상제, 주화제 및 화학유인물질, 세포 부착 및/또는 세포 이동성을 조절하는 펩티드, 세포 투과제, 백신 증강제 (vaccine potentiators), 다제(multidrug) 내성 및/또는 유출 펌프(efflux pump)의 억제제 등)를 포함한다.

[0132] 약제의 추가의 비제한적 예는 알록시프린, 아우라노핀, 아자프로파존, 베로릴레이트, 디플루니살, 에토돌락, 펜부텐, 페노프로펜 칼슘, 플루르비프로펜, 푸로세미드, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 로테프레드놀 에타보네이트, 메클로펜남산, 메페남산, 나부메톤, 나프록센, 옥시펜부타존, 페닐부타존, 피록시칸, 숄린달, 알벤다졸, 베페늄 히드록시나프토에이트, 캄벤다졸, 디클로로펜, 이베르멕틴, 메벤다졸, 옥삼니퀸, 옥스펜다졸, 옥산텔 엠보네이트, 프라지퀸텔, 피란텔 엠보네이트, 티아벤다졸, 아미오다론 HCl, 디소피라미드, 플레카이니드 아세테이트, 퀴니딘 술페이트. 항박테리아제: 베타타민 페니실린, 시녹사신, 시프로플록사신 HCl, 클라리트로마이신, 클로팜지민, 클록사실린, 데메클로시클린, 독시시클린, 에리트로마이신, 에티온아미드, 이미페넴,

날리딕산, 니트로푸란토인, 리팜피신, 스피라마이신, 술폰벤자미드, 술폰독신, 술폰메라진, 술폰세타미드, 술폰파디아진, 술폰푸라졸, 술폰메톡사졸, 술폰피리딘, 테트라시클린, 트리메토프림, 디쿠마롤, 디피리다몰, 니쿠말론, 페니딘온, 아목사핀, 마프로틸린 HCl, 미안세린 HCL, 노르트립틸린 HCl, 트라조돈 HCL, 트리미프라민 말레에이트, 아세토희사미드, 클로르프로파미드, 글리벤클라미드, 글리클라지드, 글리피지드, 톨라자미드, 톨부타미드, 베클라미드, 카르바마제핀, 클로나제팜, 에토토인, 메토인, 메트숙시비드, 메틸페노바르비톤, 옥스카르바제핀, 파라메타디온, 페나세미드, 페노바르비톤, 페니토인, 펜숙시미드, 프리미돈, 술티암, 발프로산, 암포테리신, 부토코나졸 니트레이트, 클로트리마졸, 에코나졸 니트레이트, 플루코나졸, 플루시토신, 그리세오폴빈, 이트라코나졸, 케토코나졸, 미코나졸, 나타마이신, 니스타틴, 술폰코나졸 니트레이트, 테르비나핀 HCl, 테르코나졸, 티오코나졸, 운데센산, 알로푸리놀, 프로페네시드, 술폰-피라존, 암로디핀, 베니디핀, 다로디핀, 딜리타젬 HCl, 디아족시드, 펠로디핀, 구아나벤즈 아세테이트, 이스라디핀, 미녹시딜, 니카르디핀 HCl, 니페디핀, 니모디핀, 페녹시벤즈아민 HCl, 프라조신 HCL, 레세르핀, 테라조신 HCL, 아모디아퀸, 클로로퀸, 클로르프로구아닐 HCl, 할로판트린 HCl, 메플로퀸 HCl, 로구아닐 HCl, 피리메타민, 퀸인 술폰에이트, 디히드로에르고타민 메실레이트, 에르고타민 타르트레이트, 메티세르기드 말레에이트, 피조티펜 말레에이트, 수마트립탄 숙시네이트, 아트로핀, 벤즈헥솔 HCl, 비페리덴, 에토프로파진 HCl, 히오시아민, 메펜졸레이트 브로마이드, 옥시펜시클리민 HCl, 트로피카미드, 아미노글루테티미드, 암사크린, 아자티오프린, 부솔판, 클로르암부실, 시클로스포린, 다카르바진, 에스트라무스틴, 에토프로시드, 로무스틴, 멜팔판, 메르캅토프린, 메토평렉세이트, 미토마이신, 미토펴, 미토잔트론, 프로카르바진 HCl, 타목시펜 시트레이트, 테스토라톤, 벤즈니다졸, 클리오퀴놀, 데코퀴네이트, 디아이오도히드록시퀴놀린, 디록산니드 푸로에이트, 디니톨미드, 푸르줄리돈, 메트로니다졸, 니모라졸, 니트로푸라존, 오르니다졸, 티니다졸, 카르비마졸, 프로필티오우라실, 알프라졸람, 아밀로바르비톤, 바르비톤, 벤타제팜, 브로마제팜, 브롬페리돌, 브로티졸람, 부토바르비톤, 카르브로말, 클로르디아제폭시드, 클로르메티아졸, 클로르프로마진, 클로바잠, 클로티아제팜, 클로자핀, 디아제팜, 드로페리돌, 에티나메이트, 플루아니손, 플루니트라제팜, 플루오프라마진, 플루벤티솔 데카노에이트, 플루페나진 데카노에이트, 플루라제팜, 할로페리돌, 로라제팜, 로르메타제팜, 메다제팜, 메프로바메이트, 메타칼론, 미다졸람, 니트라제팜, 옥사제팜, 펜토바르비톤, 페르페나진 피모지드, 프로클로르페라진, 술폰피리드, 테마제팜, 티오리다진, 트리아졸람, 조피클론, 아세부톨롤, 알프레놀롤, 아테놀롤, 라베탈롤, 메토프롤롤, 나돌롤, 옥스프레놀롤, 핀돌롤, 프로파놀롤, 암리논, 디기톡신, 디곡신, 에녹시몬, 라나토시드 C, 메디곡신, 베클로메타손, 베타메타손, 부데소니드, 코르티손 아세테이트, 데스옥시메타손, 텍사메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 플루니솔리드, 플루코르톨론, 플루티카손 프로피오네이트, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트라암시놀론, 아세타졸라미드, 아밀로리드, 벤드로플루아지드, 부메타니드, 클로로티아지드, 클로르탈리돈, 에타크린산, 프루세미드, 메톨라존, 스피로노락톤, 트리암테렌, 브로모크립틴 메실레이트, 리수리드 말레에이트, 비사코딜, 시메티딘, 시사프리드, 디페녹실레이트 HCl, 돔페리돈, 파모티딘, 로페르아미드, 메살라진, 니자티딘, 오메프라졸, 온단세트론 HCL, 라니티딘 HCl, 술폰살라진, 아크리바스틴, 아스테미졸, 신나리진, 시클리진, 시프로헵타디엔 HCl, 디멘히드리네이트, 플루나리진 HCl, 로라타딘, 메클로진 HCl, 옥사토미드, 테르페나딘, 벤나피브레이트, 클로피브레이트, 페노피브레이트, 겐피프로질, 프로부콜, 아밀 니트레이트, 글리세틸 트리니트레이트, 이소소르비드 디니트레이트, 이소소르비드 모노니트레이트, 펜타에리트리톨 테트라니트레이트, 베타카로텐, 비타민 A, 비타민 B2, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 K, 코데인, 텍스트로프로피옥시펜, 디아모르핀, 디히드로코데인, 랩타지놀, 메타돈, 모르핀, 날부핀, 펜타조신, 클로미펜 시트레이트, 다나졸, 에티닐 에스트라디올, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 메스트라놀, 메틸테스토스테론, 노르에티스테론, 노르게스트렐, 에스트라디올, 접합된 에스트로겐, 프로게스테론, 스타노졸롤, 스티베스트롤, 테스토스테론, 티볼론, 암페타민, 텍스암페타민, 텍스펜플루라민, 펜플루라민, 및 마진들을 포함한다.

[0133] 용도 및 제약 조성물

[0134] 본원에 기재된 입자는 임의의 적합한 적용에 사용될 수 있다. 일부 경우에, 입자는 제약 조성물의 일부 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같음), 예를 들어 점액 또는 점막 표면을 통해 또는 그에 약제 (예를 들어, 약물, 치료제, 진단제, 영상화제)를 전달하는데 사용되는 것이다. 제약 조성물은 본원에 기재된 1종 이상의 입자 및 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제 또는 담체를 포함할 수 있다. 조성물은 대상체에서 병태를 치료, 예방, 및/또는 진단하는데 사용할 수 있고, 여기서 방법은 대상체에게 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 본원에 기재된 물질 및 방법에 의해 치료되는 대상체 또는 환자는 인간 또는 인간 이외의 동물, 예컨대 영장류, 포유동물, 및 척추동물을 의미할 수 있다.

[0135] 대상체를 치료하는 것과 관련된 방법은 질환, 장애 및/또는 병태에 걸리기 쉬울 수 있지만 아직 병에 걸린 것으로는 진단되지 않은 대상체에서 질환, 장애 또는 병태가 일어나지 못하도록 하는 것; 질환, 장애 또는 병태를

억제하는 것, 예를 들어 그의 진행을 지연시키는 것; 및 질환, 장애, 또는 병태를 완화시키는 것, 예를 들어 질환, 장애 및/또는 병태의 퇴행을 유발시키는 것을 포함한다. 질환 또는 병태를 치료하는 것은, 비록 근본적인 병리생리학이 영향을 받지 않더라도, 특정의 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상을 개선시키는 것을 포함한다 (예를 들어, 비록 진통제가 통증의 원인을 치료하지는 않더라도 그러한 진통제를 투여하여 대상체의 통증의 그러한 치료).

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물은, 예를 들어 감소된 점막부착으로 인해, 대상체의 점막 표면에 전달되고 대상체에서 점막 장벽 (예를 들어, 점액)을 통과할 수 있고/거나, 점막 표면에서 입자의 장기간 체류 및/또는 증가된 균일 분포를 나타낼 수 있다. 점막 조직의 비제한적 예는 구강 (예를 들어, 협측 및 식도 막 및 편도 표면 포함), 눈, 위장관 (예를 들어, 위, 소장, 대장, 결장, 직장 포함), 비강, 호흡기 (예를 들어, 비강, 인두, 기관 및 기관지 막 포함), 생식기 (예를 들어, 질, 자궁경부 및 요도 막)를 포함한다.

[0137] 본원에 기재되고 본원에 기재된 물질 및 방법에 따라 사용하기 위한 제약 조성물은 제약상 허용되는 부형제 또는 담체를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 부형제 또는 제약상 허용되는 담체는 임의의 적합한 유형의 무독성, 불활성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 제제화 조제를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 담체로서 역할을 할 수 있는 물질의 일부 예는 당류, 예컨대 락토스, 글루코스, 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그의 유도체, 예컨대 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 땅콩유, 면실유; 홍화유; 참기름; 올리브유; 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 세정제, 예컨대 트윈 80; 완충제, 예컨대 수산화 마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 발열물질-무함유(pyrogen-free) 물; 등장식염수; 링거액; 에틸 알콜; 및 인산염 완충액뿐만 아니라, 다른 무독성 상용성 윤활제, 예컨대 소듐 라우릴 술페이트 및 마그네슘 스테아레이트뿐만 아니라, 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 풍미제 및 방향제, 방부제 및 항산화제를 또한 제제화업자의 판단에 따라 조성물에 존재시킬 수 있다. 당업자에 의해 알 수 있게 되는 바와 같이, 부형제는 하기에 기재된 바와 같이 투여의 경로, 전달되는 약제, 작용제의 전달의 시간적 경과 등을 기반으로 선택될 수 있다.

[0138] 본원에 기재된 입자를 함유하는 제약 조성물은 본 기술분야에 공지된 임의의 경로를 통해 대상체에게 투여될 수 있다. 이들은 경구, 설하, 비강, 피내, 피하, 근육내, 직장, 질, 정맥내, 동맥내, 수조내, 복강내, 유리체내, 눈 주위, 국소 (분말, 크림, 연고, 또는 점적약제로서), 협측 및 흡입 투여를 포함하지만, 그에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 주사 (정맥내, 근육내, 또는 피하), 점적약제 주입(drop infusion) 제제, 또는 좌약으로서 비경구 투여될 수 있다. 당업자에 의해 알 수 있게 되는 바와 같이, 목적하는 생물학적 효과를 달성하는 투여 경로 및 유효 투여량은 투여되는 작용제, 표적 기관, 투여되는 제제, 투여의 시간적 경과, 치료되는 질환, 의도된 용도 등에 의해 결정될 수 있다.

[0139] 예로서, 입자를 제약 조성물이 코의 점액층에 걸쳐 전달되도록, 비강용 스프레이제로서 제제화되는 제약 조성물에 포함시킬 수 있다. 또 다른 예로서, 입자를 제약 조성물이 폐의 점액층에 걸쳐 전달되도록, 흡입기로서 제제화되는 제약 조성물에 포함시킬 수 있다. 또 다른 예로서, 조성물을 경구 투여하는 경우, 이는 정제, 캡슐, 과립, 분말, 또는 시럽으로서 제제화될 수 있다. 유사하게, 입자를 눈, 위장관, 비강, 호흡기, 직장, 요도 및/질 조직을 통해 전달되는 제약 조성물에 포함시킬 수 있다.

[0140] 안과용 점막 경로에 의한 적용의 경우, 대상 조성물은 점안액 또는 안연고로서 제제화될 수 있다. 이들 제제는 종래의 방식으로 제조될 수 있고, 원하는 경우, 대상 조성물을 임의의 종래의 첨가제, 예컨대 완충제 또는 pH-조정제, 장성 조정제, 점도 조절제, 현탁 안정화제, 방부제, 및 다른 제약 부형제와 혼합될 수 있다. 게다가, 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 대상 조성물을 동결건조시키거나 또 다른 적절한 건조 기법, 예컨대 분무 건조에 적용시킬 수 있다.

[0141] 일부 실시양태에서, 흡입제 또는 에어로졸 제제로 투여될 수 있는 본원에 기재된 입자는 흡입 요법에서 유용한 1종 이상의 약제, 예컨대 아주반트, 진단제, 영상화제, 또는 치료제를 포함한다. 미립 의학의 입자 크기는 실질적으로 모든 의학이 에어로졸 제제의 투여시 폐 내로 흡입될 수 있을 정도이어야 하며, 예를 들어 약 20 마이크로미터 이하, 예를 들어 약 1 내지 약 10 마이크로미터, 예를 들어 약 1 내지 약 5 마이크로미터의 범위일 수 있지만, 다른 범위가 또한 가능하다. 의학의 입자 크기는, 예를 들어 밀링 또는 마이크로화(micronisation)에 의해 종래의 방식으로 감소시킬 수 있다. 대안으로, 미립 의학은 현탁액의 분무에 의해 폐에 투여될 수 있다. 최종 에어로졸 제제는, 예를 들어 제제 총량에 대해 의학 0.005-90% w/w, 0.005-50%, 0.005-10%, 약 0.005-5% w/w, 또는 0.01-1.0% w/w를 함유할 수 있다. 다른 범위가 또한 가능하다.

- [0142] 결코 필요한 것은 아니지만, 본원에 기재된 제제가 성충권 오존의 분해를 유발할 수 있는 어떤 성분도 함유하지 않는 것이 바람직하다. 특히, 일부 실시양태에서, 클로로플루오로카본, 예컨대 CCl_3F , CCl_2F_2 , 및 CF_3CCl_3 을 함유하지 않거나 그로 본질적으로 이루어지지 않는 추진제(propellant)가 선택된다.
- [0143] 에어로졸은 추진제를 포함할 수 있다. 추진제는 추진제보다 더 높은 극성 및/또는 더 높은 비점을 갖는 아주 반트를 임의로 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 극성 아주반트 (예를 들어, C_{2-6}) 지방족 알콜 및 폴리올, 예컨대 에탄올, 이소프로판올, 및 프로필렌 글리콜, 바람직하게는 에탄올을 포함한다. 일반적으로, 분산액의 안정성을 개선시키기 위해 단지 소량의 극성 아주반트 (예를 들어, 0.05-3.0% w/w)가 필요할 수 있고 - 5% w/w 초과 양의 사용은 의약을 용해시키는 경향이 있을 수 있다. 본원에 기재된 실시양태에 따른 제제는 극성 아주반트의 1% w/w 미만, 예를 들어 약 0.1% w/w를 함유할 수 있다. 그러나, 본원에 기재된 제제는 극성 아주반트, 특히 에탄올이 실질적으로 없을 수 있다. 적합한 휘발성 아주반트는 포화 탄화수소, 예컨대 프로판, n-부탄, 이소부탄, 펜탄 및 이소펜탄 및 알킬 에테르, 예컨대 디메틸 에테르를 포함한다. 일반적으로, 추진제의 50% w/w 이하는 휘발성 아주반트, 예를 들어 휘발성 포화 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 탄화수소의 1 내지 30% w/w를 포함할 수 있다. 임의로, 본 발명에 따른 에어로졸 제제는 1종 이상의 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 계면활성제는 흡입에 의해 투여시 생리학상 허용될 수 있다. 이러한 범주 내에 계면활성제, 예컨대 L- α -포스파티딜콜린 (PC), 1,2-디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 올레산, 소르비탄 트리올레에이트, 소르비탄 모노-올레에이트, 소르비탄 모노라우레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 천연 레시틴, 올레일 폴리옥시에틸렌 에테르, 스테아릴 폴리옥시에틸렌 에테르, 라우릴 폴리옥시에틸렌 에테르, 옥시에틸렌과 옥시프로필렌의 블록 공중합체, 합성 레시틴, 디에틸렌 글리콜 디올레에이트, 테트라히드로프루프릴 올레에이트, 에틸 올레에이트, 이소프로필 미리스테이트, 글리세릴 모노올레에이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 모노리시놀레에이트, 세틸 알콜, 스테아릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 400, 세틸 피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 올리브유, 글리세릴 모노라우레에이트, 옥수수유, 면실유, 및 해바라기씨유가 포함된다.
- [0144] 본원에 기재된 제제는, 예를 들어 초음파처리를 활용하여, 적절한 용기에서 선택된 추진제 및/또는 공-추진제 중 입자의 분산에 의해 제조될 수 있다. 입자는 공-추진제에 현탁되고 적합한 용기에 충전될 수 있다. 그 다음 용기의 밸브는 소정의 장소에 밀폐되고 종래의 방식으로 밸브를 통해 압력 충전에 의해 추진제가 도입된다. 따라서 입자는 액화 추진제에 현탁되거나 용해되고, 계측 밸브(metering valve)를 갖춘 용기에 밀폐되고 액추에이터(actuator)에 들어맞게 될 수 있다. 이러한 계측된 용량 흡입기는 본 기술분야에 주지되어 있다. 계측 밸브는 10 내지 500 μL , 바람직하게는 25 내지 150 μL 를 계량할 수 있다. 특정 실시양태에서, 분산은 입자 (건조 분말로서 남은)에 대한 건조 분말 흡입기 (예를 들어, 스프인할러(spinaler))를 사용하여 달성될 수 있다. 다른 실시양태에서, 나노스피어(nanosphere)는, 수성 유체(aqueous fluid)에 현탁되고 미세 액적으로 분무되어 폐로 에어로졸화될 수 있다.
- [0145] 초음파 분무기는 입자의 분해를 초래할 수 있는, 작용제가 전단에 노출되는 것을 최소화하기 때문에 이를 사용할 수 있다. 보통, 수성 에어로졸은 입자의 수용액 또는 현탁액을 종래의 제약상 허용되는 담체 및 안정화제/표면 변경제와 함께 제제화함으로써 제조된다. 담체 및 안정화제/표면 변경제는 특정의 조성물의 요건에 따라 달라지지만, 전형적으로 비이온성 계면활성제 (트윈, 플루로닉[®], 또는 폴리에틸렌 글리콜), 무해한 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 소르비탄 에스테르, 올레산, 레시틴, 아미노산, 예컨대 글리신, 완충제, 염, 당류, 또는 당 알콜을 포함한다. 에어로졸은 일반적으로 등장액으로부터 제조된다.
- [0146] 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 제약상 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽, 및 액리시르를 포함한다. 활성 성분 (즉, 마이크로입자, 나노입자, 리포솜, 미셀, 폴리뉴클레오티드/지질 복합체)이외에도, 액체 투여 형태는 본 기술분야에서 통상 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일 (특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유, 및 참기름), 글리세롤, 테트라히드로프루프릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 그의 혼합물 등을 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 또한 아주반트, 예컨대 유화제 및 현탁화제, 감미제, 풍미제, 및 방향제를 포함할 수 있다.
- [0147] 주사용 제제, 예를 들어 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제제화될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한, 무독성 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중 멸균 주사용 용액, 현탁액, 또는 에멀전, 예를 들어 1,3-부탄디올 중 용액으로서 일 수 있다. 사

용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중에 물, 링거액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 게다가, 멸균, 고정유는 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로서 사용된다. 이러한 목적으로 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함한 임의의 블랜드(bland) 고정유가 사용될 수 있다. 게다가, 지방산, 예컨대 올레산이 주사제의 제조에서 사용된다. 특정 실시양태에서, 입자는 1% (w/v) 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 및 0.1% (v/v) 트윈 80을 포함하는 담체 유체에 현탁된다.

- [0148] 주사용 제제는, 예를 들어 사용 이전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사용 매질에 용해 또는 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 혼입함으로써, 또는 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다.
- [0149] 직장 또는 질 투여를 위한 조성물은 입자를 적합한 무자극성 부형제 또는 담체, 예컨대 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 좌약 왁스와 혼합함으로써 제조될 수 있는 좌약일 수 있으며 이는 주위 온도에서는 고체이지만 체온에서는 액체이고 따라서 직장 또는 질 강에서 녹아 입자를 방출한다.
- [0150] 경구 투여용 고체 투여 형태는 캡슐, 정제, 환제, 분말, 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 투여 형태에서, 입자는 1종 이상의 불활성, 제약상 허용되는 부형제 또는 담체, 예컨대 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 a) 충전제 또는 증량제(extender), 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산, b) 결합제, 예를 들어 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스, 및 아카시아 등, c) 습윤제, 예컨대 글리세롤, d) 봉해제, 예컨대 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 및 탄산나트륨, e) 용해 지연제(solution retarding agent), 예컨대 파라핀, f) 흡수 가속화제, 예컨대 4급 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예를 들어 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트 등, h) 흡수제, 예컨대 카울린 및 벤토나이트 점토, 및 i) 윤활제, 예컨대 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트, 및 그의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우에, 투여 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다.
- [0151] 유사한 유형의 고체 조성물이 또한 락토스 또는 유당과 같은 부형제뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐중 충전제로서 사용될 수 있다.
- [0152] 정제, 당의정, 캡슐, 환제, 및 과립의 고체 투여 형태는 제약 제제화 분야에 주지된 장용 코팅물 및 다른 코팅물과 같은 코팅물 및 셀을 사용하여 제조될 수 있다. 이들은 불투명화제를 임의로 함유할 수 있고 또한 활성 성분(들)만을, 또는 우선적으로, 장관의 특정 부분에서, 임의로, 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매(embedding) 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다.
- [0153] 유사한 유형의 고체 조성물이 또한 락토스 또는 유당과 같은 부형제뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐중 충전제로서 사용될 수 있다.
- [0154] 본 발명의 제약 조성물의 국소 또는 경피 투여용 투여 형태는 연고, 페이스트제, 크림, 로션, 젤, 분말, 용액, 스프레이제, 흡입제 또는 패치를 포함한다. 입자는 멸균 조건하에 제약상 허용되는 담체 및 필요할 수 있는 임의의 필요한 방부제 또는 완충제와 혼합된다. 안과용 제제, 점이제, 및 점안액이 또한 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.
- [0155] 연고, 페이스트, 크림, 및 젤은, 본원에 기재된 입자 이외에도, 부형제, 예컨대 동물 및 식물 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 그의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0156] 분말 및 스프레이제는, 본원에 기재된 입자 이외에도, 부형제, 예컨대 락토스, 탈크, 규산, 산화알루미늄, 칼슘 실리케이트, 및 폴리이미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이제는 게다가 통상의 추진제, 예컨대 클로로플루오로탄화수소를 함유할 수 있다.
- [0157] 경피 패치는 신체에 화합물의 제어된 전달을 제공한다는 부가된 이점을 갖는다. 이러한 투여 형태는 마이크로 입자 또는 나노입자를 적당한 매질에 용해 또는 분산시킴으로써 제조할 수 있다. 흡수 증진제를 또한 사용하여 피부에 걸쳐 화합물의 유동을 증가시킬 수 있다. 속도 제어막을 제공하거나 중합체 매트릭스 또는 젤 중 입자를 분산시킴으로써 속도를 제어할 수 있다.
- [0158] 약제를 포함하는 본원에 기재된 입자를 대상체에게 진단용, 예방용, 또는 치료용 처치의 부분으로서 치료상 유효량의 혼입된 약제를 전달하기에 충분한 양으로 전달되도록 대상체에게 투여할 수 있다. 일반적으로, 약제 또는 성분의 유효량은 목적하는 생물학적 반응을 도출하는데 필요한 양을 지칭한다. 입자 중 약제의 목적하는 농도는 약물의 흡수, 불활성화, 및 배출 속도뿐만 아니라 대상 조성물로부터 화합물의 전달 속도, 목적하는 생물

학적 중점, 전달되는 작용제, 표적 조직 등을 포함하지만 그에 제한되지는 않는 수많은 인자에 의해 결정될 것이다. 투여값은 또한 완화될 병태의 중증도에 따라 달라질 수 있다는 점을 주목해야 한다. 임의의 특성의 대상체의 경우에, 특정 투여 요법이 개별 필요 및 조성물의 투여를 감독하거나 투여하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간이 흐르면서 조정되어야 함을 추가로 이해하여야 한다. 전형적으로, 투여는 당업자에게 공지된 기법을 사용하여 결정될 것이다.

[0159] 약제는 임의의 적합한 양, 예를 들어 조성물 및/또는 제제의 약 0.01 wt% 이상, 약 0.1 wt% 이상, 약 1 wt% 이상, 약 5 wt% 이상, 약 10 wt% 이상, 약 20 wt% 이상으로 조성물 및/또는 제제에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 약제는 약 30 wt% 이하, 약 20 wt% 이하, 약 10 wt% 이하, 약 5 wt% 이하, 약 2 wt% 이하, 또는 약 1 wt% 이하로 조성물 및/또는 제제에 존재할 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 0.1 wt% 이상 약 10 wt% 이하의 양으로 존재). 다른 범위가 또한 가능하다. 특정 실시양태에서, 약제는 조성물 및/또는 제제의 약 0.1-2 wt%이다. 특정 실시양태에서, 약제는 조성물 및/또는 제제의 약 2-20 wt%이다. 특정 실시양태에서, 약제는 조성물 및/또는 제제의 약 0.2 wt%이다. 특정 실시양태에서, 약제는 조성물 및/또는 제제의 약 0.4 wt%이다. 특정 실시양태에서, 약제는 조성물 및/또는 제제의 약 1 wt%이다. 특정 실시양태에서, 약제는 조성물 및/또는 제제의 약 2 wt%이다. 특정 실시양태에서, 약제는 조성물 및/또는 제제의 약 5 wt%이다. 특정 실시양태에서, 약제는 조성물 및/또는 제제의 약 10 wt%이다.

[0160] 대상체에 투여되는 임의의 약제의 농도 및/또는 양은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 공지된 방법인 또한 치료 제제의 투여 전후 국소 조직 농도, 입자로부터의 확산 속도 및 국소 혈류를 검정하는데 이용가능하다.

[0161] 본원에 기재된 조성물 및/또는 제제는 임의의 적합한 오스몰농도(osmolality)를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및/또는 제제는 약 0 mOsm/L 이상, 약 5 mOsm/L 이상, 약 25 mOsm/L 이상, 약 50 mOsm/L 이상, 약 75 mOsm/L 이상, 약 100 mOsm/L 이상, 약 150 mOsm/L 이상, 약 200 mOsm/L 이상, 약 250 mOsm/L 이상, 또는 약 310 mOsm/L 이상의 오스몰농도를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및/또는 제제는 약 310 mOsm/L 이하, 약 250 mOsm/L 이하, 약 200 mOsm/L 이하, 약 150 mOsm/L 이하, 약 100 mOsm/L 이하, 약 75 mOsm/L 이하, 약 50 mOsm/L 이하, 약 25 mOsm/L 이하, 또는 약 5 mOsm/L 이하의 오스몰농도를 가질 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 또한 가능하다 (예를 들어, 약 0 mOsm/L 이상 약 50 mOsm/L 이하의 오스몰농도). 다른 범위가 또한 가능하다. 조성물 및/또는 제제의 오스몰농도는 예를 들어, 조성물 및/또는 제제의 용매에 존재하는 염의 농도를 변화시킴으로써 달리할 수 있다.

[0162] 실시양태 중 한 세트에서, 조성물 및/또는 제제는 1종 이상의 킬레이트화제를 포함한다. 본원에 사용된 킬레이트화제는 금속 이온과 반응하여 1종 이상의 결합을 통해 착물을 형성하는 능력을 갖는 화학적 화합물을 지칭한다. 1종 이상의 결합은 전형적으로 이온 또는 배위 결합이다. 킬레이트화제는 무기 또는 유기 화합물일 수 있다. 특정 화학 반응 (예를 들어, 산화 반응)을 촉매할 수 있는 금속 이온은 금속 이온이 킬레이트화제에 결합하여 착물을 형성하는 경우 그의 촉매 활성을 상실할 수 있다. 따라서, 킬레이트화제는 그것이 금속 이온에 결합하는 경우 보존 특성을 나타낼 수 있다. 보존 특성을 갖는 임의의 적합한 킬레이트화제, 예컨대 포스포산, 아미노카르복실산, 히드록시카르복실산, 폴리아민, 아미노알콜, 및 중합체 킬레이트화제가 사용될 수 있다. 킬레이트화제의 구체적 예는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 니트릴로트리아세트산 (NTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA), *N*-히드록시에틸에틸렌 디아민트리아세트산 (HEDTA), 테트라보레이트, 트리에틸아민 디아민, 및 그의 염 및 유도체를 포함하지만, 그에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제는 EDTA이다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제는 EDTA의 염이다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제는 디소듐 EDTA이다.

[0163] 킬레이트화제는 본원에 기재된 코팅된 입자를 포함하는 조성물 및/또는 제제에 적합한 농도로 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제의 농도는 약 0.0003 wt% 이상, 약 0.001 wt% 이상, 약 0.003 wt% 이상, 약 0.01 wt% 이상, 약 0.03 wt% 이상, 약 0.05 wt% 이상, 약 0.1 wt% 이상, 약 0.3 wt% 이상, 약 1 wt% 이상, 또는 약 3 wt% 이상이다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제의 농도는 약 3 wt% 이하, 약 1 wt% 이하, 약 0.3 wt% 이하, 약 0.1 wt% 이하, 약 0.05 wt% 이하, 약 0.03 wt% 이하, 약 0.01 wt% 이하, 약 0.003 wt% 이하, 약 0.001 wt% 이하, 또는 약 0.0003 wt% 이하이다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 0.01 wt% 이상 약 0.3 wt% 이하의 농도). 다른 범위가 또한 가능하다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제의 농도는 약 0.001-0.1 wt%이다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제의 농도는 약 0.005 wt%이다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제의 농도는 약 0.01 wt%이다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제의 농도는 약 0.05 wt%이다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제의 농도는 약 0.1 wt%이다.

시양태에서, 킬레이트화제의 농도는 약 0.1 wt%이다.

- [0164] 일부 실시양태에서, 킬레이트화제는 본원에 기재된 형성 공정 및/또는 회석 공정 동안 상기 언급된 범위 중 하나 이상으로 조성물 및/또는 제제에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 킬레이트화제는 최종 생성물에 상기 언급된 범위 중 하나 이상으로 조성물 및/또는 제제에 존재할 수 있다.
- [0165] 일부 실시양태에서, 항미생물제를 본원에 기재된 코팅된 입자를 포함하는 조성물 및/또는 제제에 포함시킬 수 있다. 본원에 사용된 항미생물제는 일반적으로 감염과 관련된, 미생물, 예컨대 박테리아, 미생물, 진균, 바이러스, 포자, 효모, 곰팡이 등을 억제, 예방, 또는 그에 대해 보호하는데 유효한 생물활성제를 지칭한다. 항미생물제의 예는 세팔로스포린, 클린다마이신, 클로람페니콜, 카르바페넴, 미노시클린, 림파핀, 페니실린, 모노박탐, 퀴놀론, 테트라시클린, 마크롤리드, 숄과 항생제, 트리메토프림, 푸시드산, 아미노글리코사이드, 암포테리신 B, 아졸, 플루시토신, 실로폴진, 살박테리아 니트로푸란 화합물, 금속은 또는 약 2.5 wt% 구리를 함유하는 은 합금의 나노입자, 시트르산은, 아세트산은, 벤조산은, 비스무스 피리티온, 아연 피리티온, 과탄산아연, 과붕산아연, 비스무스 염, 파라벤 (예를 들어, 메틸-, 에틸-, 프로필-, 부틸-, 및 옥틸-벤조산 에스테르), 시트르산, 벤즈알코늄 클로라이드 (BAC), 림파마이신, 및 과탄산나트륨을 포함한다.
- [0166] 항미생물제는 본원에 기재된 코팅된 입자를 포함하는 조성물 및/제제에 적합한 농도로 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항미생물제의 농도는 약 0.0003 wt% 이상, 약 0.001 wt% 이상, 약 0.003 wt% 이상, 약 0.01 wt% 이상, 약 0.03 wt% 이상, 약 0.1 wt% 이상, 약 0.3 wt% 이상, 약 1 wt% 이상, 또는 약 3 wt% 이상일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항미생물제의 농도는 약 3 wt% 이하, 약 1 wt% 이하, 약 0.3 wt% 이하, 약 0.1 wt% 이하, 약 0.03 wt% 이하, 약 0.01 wt% 이하, 약 0.003 wt% 이하, 약 0.001 wt% 이하, 또는 약 0.0003 wt% 이하일 수 있다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 0.001 wt% 이상 약 0.1 wt% 이하의 농도). 다른 범위가 또한 가능하다. 특정 실시양태에서, 항미생물제의 농도는 약 0.001-0.05 wt%이다. 특정 실시양태에서, 항미생물제의 농도는 약 0.002 wt%이다. 특정 실시양태에서, 항미생물제의 농도는 약 0.005 wt%이다. 특정 실시양태에서, 항미생물제의 농도는 약 0.01 wt%이다. 특정 실시양태에서, 항미생물제의 농도는 약 0.02 wt%이다. 특정 실시양태에서, 항미생물제의 농도는 약 0.05 wt%이다.
- [0167] 일부 실시양태에서, 항미생물제는 본원에 기재된 형성 공정 및/또는 회석 공정 동안 상기 언급된 범위 중 하나 이상으로 조성물 및/또는 제제에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항미생물제는 최종 생성물에 상기 언급된 범위 중 하나 이상으로 조성물 및/또는 제제에 존재할 수 있다.
- [0168] 일부 실시양태에서, 등장화제를 본원에 기재된 코팅된 입자를 포함하는 조성물 및/또는 제제에 포함시킬 수 있다. 본원에 사용된 등장화제는 제제의 조성을 목적하는 오스몰농도 범위로 조정하기 위해 사용될 수 있는 화합물 또는 물질을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 목적하는 오스몰농도 범위는 혈액과 적합성인 등장성 범위이다. 특정 실시양태에서, 목적하는 오스몰농도 범위는 저장성이다. 특정 실시양태에서, 목적하는 오스몰농도 범위는 고장성이다. 등장화제의 예는 글리세린, 락토스, 만니톨, 텍스트로스, 염화나트륨, 황산나트륨, 소르비톨, 식염-시트르산나트륨(SSC) 등을 포함한다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 등장화제의 조합을 사용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 등장화제는 글리세린이다. 특정 실시양태에서, 등장화제는 염화나트륨이다.
- [0169] 등장화제 (예컨대 본원에 기재된 것)는 본원에 기재된 코팅된 입자를 포함하는 조성물 및/또는 제제에 적합한 농도로 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 0.003 wt% 이상, 약 0.01 wt% 이상, 약 0.03 wt% 이상, 약 0.1 wt% 이상, 약 0.3 wt% 이상, 약 1 wt% 이상, 약 3 wt% 이상, 약 10 wt% 이상, 약 20 wt% 이상, 또는 약 30 wt% 이상이다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 30 wt% 이하, 약 10 wt% 이하, 약 3 wt% 이하, 약 1 wt% 이하, 약 0.3 wt% 이하, 약 0.1 wt% 이하, 약 0.03 wt% 이하, 약 0.01 wt% 이하, 또는 약 0.003 wt% 이하이다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 0.1 wt% 이상 약 10 wt% 이하의 농도). 다른 범위가 또한 가능하다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 0.1-1%이다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 0.5-3%이다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 0.25 wt%이다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 0.45 wt%이다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 0.9 wt%이다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 1.2 wt%이다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 2.4 wt%이다. 특정 실시양태에서, 등장화제의 농도는 약 5 wt%이다.
- [0170] 일부 실시양태에서, 등장화제는 본원에 기재된 형성 공정 및/또는 회석 공정 동안 상기 언급된 범위 중 하나 이상으로 조성물 및/또는 제제에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 등장화제는 최종 생성물에 상기 언급된 범위 중 하나 이상으로 조성물 및/또는 제제에 존재할 수 있다.

- [0171] 다분산성은 제제 중 입자 크기의 불균일성의 척도이다. 입자 크기의 불균일성은 제제 중 개별 입자 크기의 차이 및/또는 응집의 존재로 인할 것일 수 있다. 입자가 본질적으로 동일 크기, 형상, 및/또는 질량을 갖는 경우 입자를 포함하는 제제는 실질적으로 균일인 것으로 또는 "단분산성인" 것으로 간주된다. 다양한 크기, 형상, 및/또는 질량의 입자를 포함하는 제제는 불균일인 것으로 또는 "다분산성인" 것으로 여겨진다.
- [0172] 일부 실시양태에서, 첨가된 이온 강도의 존재하에 및/또는 조성물 및/또는 제제의 첨가된 이온 강도가 비교적 일정하게 유지되거나 증가되는 경우 (예를 들어, 형성 및/또는 희석 공정 동안) 조성물 및/또는 제제의 다분산성은 비교적 일정하다. 특정 실시양태에서, 이온 강도가 50% 이상으로 증가하는 경우, 다분산성은 약 200% 이하, 약 150% 이하, 약 100% 이하, 약 75% 이하, 약 50% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하, 약 10% 이하, 약 3% 이하, 또는 약 1% 이하로 증가한다. 특정 실시양태에서, 이온 강도가 50% 이상으로 증가되는 경우, 다분산성은 약 1% 이상, 약 3% 이상, 약 10% 이상, 약 30% 이상, 또는 약 100% 이상으로 증가한다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 50% 이하 1% 이상의 다분산성의 증가). 다른 범위가 또한 가능하다.
- [0173] 다양한 수단, 예컨대 1종 이상의 이온 등장화제 (예를 들어, 염, 예컨대 NaCl)를 제제에 첨가하는 것에 의해 본원에 기재된 제제의 이온 강도는 제어 (예를 들어, 증가)될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 제제의 이온 강도는 약 0.0005 M 이상, 약 0.001 M 이상, 약 0.003 M 이상, 약 0.01 M 이상, 약 0.03 M 이상, 약 0.1 M 이상, 약 0.3 M 이상, 약 1 M 이상, 약 3 M 이상, 또는 약 10 M 이상이다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 제제의 이온 강도는 약 10 M 이하, 약 3 M 이하, 약 1 M 이하, 약 0.3 M 이하, 약 0.1 M 이하, 약 0.03 M 이하, 약 0.01 M 이하, 약 0.003 M 이하, 약 0.001 M 이하, 또는 약 0.0005 M 이하이다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 0.01 M 이상 약 1 M 이하의 이온 강도). 다른 범위가 또한 가능하다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 제제의 이온 강도는 약 0.1 M이다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 제제의 이온 강도는 약 0.3 M이다.
- [0174] 본원에 기재된 제제의 다분산성은 다분산 지수 (PDI)에 의해 측정될 수 있다. PDI는 입자 크기 분포의 폭을 기술하기 위해 사용되며 동적 광 산란 (DLS) 측정된 강도 자기상관(intensity autocorrelation) 함수의 누적 분석(cumulants analysis)으로부터 종종 계산된다. 이들 파라미터의 계산은 기준 ISO 13321: 1996 E 및 ISO 22412:2008에 규정되어 있다. PDI는 무차원이고, DLS에 의해 측정시, 0.05 미만의 값은 고도 단분산성 샘플을 나타내며, 한편 0.7 초과인 값은 매우 넓은 크기 분포를 나타내도록 규격화된다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 제제 및/또는 조성물의 PDI는 약 1 이하, 약 0.9 이하, 약 0.8 이하, 약 0.7 이하, 약 0.6 이하, 약 0.5 이하, 약 0.4 이하, 약 0.3 이하, 약 0.2 이하, 약 0.15 이하, 약 0.1 이하, 약 0.05 이하, 약 0.01 이하, 또는 약 0.005 이하이다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 제제 및/또는 조성물의 PDI는 약 0.005 이상, 약 0.01 이상, 약 0.05 이상, 약 0.1 이상, 약 0.15 이상, 약 0.2 이상, 약 0.3 이상, 약 0.4 이상, 약 0.5 이상, 약 0.6 이상, 약 0.7 이상, 약 0.8 이상, 약 0.9 이상, 또는 약 1 이상이다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 0.1 이상 약 0.5 이하의 PDI). 다른 범위가 또한 가능하다. 특정 실시양태에서, 제제의 PDI는 약 0.1이다. 특정 실시양태에서, 제제의 PDI는 약 0.15이다. 특정 실시양태에서, 제제의 PDI는 약 0.2이다.
- [0175] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및/또는 제제는 고도 분산성일 수 있고 응집체를 형성하는 경향이 없다. 심지어 입자가 응집체를 형성하는 경우에도, 조성물 및/또는 제제를 엄밀히 휘저어 섞지 않고도 응집체는 용이하게 개별 입자로 분해될 수 있다.
- [0176] 본원에 기재된 조성물 및/또는 제제는 임의의 적합한 pH 값을 가질 수 있다. 용어 "pH"는, 달리 제공되지 않는 한, 주위 온도 (예를 들어, 약 20℃, 약 23℃, 또는 약 25℃)에서 측정된 pH를 지칭한다. 조성물 및/또는 제제는, 예를 들어 산성 pH, 중성 pH, 또는 염기성 pH를 갖고, 예를 들어 조성물 및/또는 제제가 체내에 전달되는 곳에 의해 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물 및/또는 제제는 생리적 pH를 갖는다. 특정 실시양태에서, 조성물 및/또는 제제의 pH 값은 약 1 이상, 약 2 이상, 약 3 이상, 약 4 이상, 약 5 이상, 약 6 이상, 약 6.2 이상, 약 6.4 이상, 약 6.6 이상, 약 6.8 이상, 약 7 이상, 약 7.2 이상, 약 7.4 이상, 약 7.6 이상, 약 7.8 이상, 약 8 이상, 약 8.2 이상, 약 8.4 이상, 약 8.6 이상, 약 8.8 이상, 약 9 이상, 약 10 이상, 약 11 이상, 또는 약 12 이상이다. 특정 실시양태에서, 조성물 및/또는 제제의 pH 값은 약 12 이하, 약 11 이하, 약 10 이하, 약 9 이하, 약 8.8 이하, 약 8.6 이하, 약 8.4 이하, 약 8.2 이하, 약 8 이하, 약 7.8 이하, 약 7.6 이하, 약 7.4 이하, 약 7.2 이하, 약 7 이하, 약 6.8 이하, 약 6.6 이하, 약 6.4 이하, 약 6.2 이하, 약 6 이하, 약 5 이하, 약 4 이하, 약 3 이하, 약 2 이하, 또는 약 1 이하이다. 상기 언급된 범위의 조합이 가능하다 (예를 들어, 약 5 이상 약 8.2 이하의 pH 값). 다른 범위가 또한 가능하다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재

된 조성물 및/또는 제제의 pH 값은 약 5 이상 약 8 이하이다.

[0177] 실시양태 중 한 세트에서, 다수의 코팅된 입자를 포함하는 조성물이 제공된다. 코팅된 입자는 고체 약제 또는 그의 염을 포함하거나 그로 형성된 코어 입자를 포함하고, 여기서 약제 또는 염은 pH 범위 전반에 걸쳐 임의의 지점에서 25℃에서 약 1 mg/mL 이하 (예를 들어, 25℃에서 약 0.1 mg/mL 이하)의 수용해도를 갖고, 여기서 약제 또는 그의 염은 코어 입자의 약 80 wt% 이상 (예를 들어, 약 90 wt%, 약 95% 이상, 약 99 wt% 이상)을 구성한다. 코팅된 입자는 또한 코어 입자를 둘러싸는 표면 변경제를 포함하는 코팅물을 포함하고, 여기서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 삼블록 공중합체를 포함하고, 여기서 소수성 블록은 약 3 kDa 이상의 분자량을 갖고, 친수성 블록은 삼블록 의 약 30 wt% 이상을 구성하고, 여기서 친수성 블록은 약 2 kDa 이상의 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 옥시드)이거나 그를 포함하고, 여기서 소수성 블록은 코어 입자의 표면과 회합하고 (예를 들어, 흡착에 의해), 여기서 친수성 블록은 코팅된 입자의 표면에 존재하여 코팅된 입자를 친수성이 되게 하고, 여기서 표면 변경제는 나노미터 제곱당 약 0.001 분자 이상 (예를 들어, 나노미터 제곱당 약 0.01 분자 이상)의 밀도로 코어 입자의 표면 상에 존재한다. 코팅된 입자는 점액에서 0.5 초과의 상대 속도를 갖는다. 코팅된 입자는 약 20 nm 이상 약 1 μ m 이하 (예를 들어, 약 500 nm 이하)의 평균 크기를 가질 수 있다. 코팅물의 두께는, 예를 들어 약 50 nm 이하 (예를 들어, 약 30 nm 이하, 약 10 nm 이하)일 수 있다. 조성물은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 첨가제 및/또는 희석제를 포함하는 제약 조성물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 다수의 코팅된 입자는 조성물 중 1종 이상의 유리 표면 변경제 (예를 들어, 플루로닉® P123, 플루로닉® P103, 플루로닉® P105, 플루로닉® F127, 플루로닉® F108 및 그의 조합물로부터 선택된 폴록사머)와 함께 용액 (예를 들어, 수용액)에 있다. 용액 중 유리 표면 변경제(들)와 입자의 표면 상의 표면 변경제는 동일한 표면 변경제(들)일 수 있고 조성물에서 서로 평형을 이룰 수 있다. 조성물에 존재하는 표면 변경제의 총량은, 예를 들어 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량% (예를 들어, 약 0.01 중량% 내지 약 5 중량%, 또는 약 0.1 중량% 내지 약 5 중량%)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물의 PDI는 약 0.1 이상 약 0.5 이하 (예를 들어, 약 0.3 이하, 또는 약 0.2 이하)이다. 환자 또는 대상체로의 (예를 들어, 점액 또는 점막으로의) 이러한 조성물의 사용 및/또는 전달 방법이 또한 제공된다.

[0178] 실시양태 중 한 세트에서, 다수의 코팅된 입자를 포함하는 조성물이 제공된다. 코팅된 입자는 고체 약제 또는 그의 염을 포함하거나 그로 형성된 코어 입자를 포함하고, 여기서 약제 또는 염은 pH 범위 전반에 걸쳐 임의의 지점에서 25℃에서 약 1 mg/mL 이하 (예를 들어, 25℃에서 약 0.1 mg/mL 이하)의 수용해도를 갖고, 여기서 약제 또는 그의 염은 코어 입자의 약 80 wt% 이상 (예를 들어, 약 90 wt%, 약 95% 이상, 약 99 wt% 이상)을 구성한다. 코팅된 입자는 또한 코어 입자를 둘러싸는 표면 변경제를 포함하는 코팅물을 포함하고, 여기서 표면 변경제는 친수성 블록-소수성 블록-친수성 블록 구성을 포함하는 폴록사머이고, 여기서 폴록사머는 플루로닉® P123, 플루로닉® P103, 플루로닉® P105, 플루로닉® F127, 플루로닉® F108 및 그의 조합물로부터 선택되고, 여기서 소수성 블록은 코어 입자의 표면과 회합하고 (예를 들어, 흡착에 의해), 여기서 친수성 블록은 코팅된 입자의 표면에 존재하여 코팅된 입자를 친수성이 되게 하고, 여기서 표면 변경제는 나노미터 제곱당 약 0.001 분자 이상 (예를 들어, 나노미터 제곱당 약 0.01 분자 이상)의 밀도로 코어 입자의 표면 상에 존재한다. 코팅된 입자는 점액에서 0.5 초과의 상대 속도를 갖는다. 코어된 입자는 약 20 nm 이상 약 1 μ m 이하 (예를 들어, 약 500 nm 이하)의 평균 크기를 가질 수 있다. 코팅물의 두께는, 예를 들어 약 50 nm 이하 (예를 들어, 약 30 nm 이하, 약 10 nm 이하)일 수 있다. 조성물은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 첨가제 및/또는 희석제를 포함하는 제약 조성물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 다수의 코팅된 입자는 조성물 중 1종 이상의 유리 폴록사머 (예를 들어, 플루로닉® P123, 플루로닉® P103, 플루로닉® P105, 플루로닉® F127, 플루로닉® F108 및 그의 조합물로부터 선택됨)와 함께 용액 (예를 들어, 수용액)에 있다. 용액 중 유리 폴록사머(들)와 입자의 표면 상의 폴록사머는 동일한 폴록사머(들)일 수 있고 조성물에서 서로 평형을 이룰 수 있다. 조성물에 존재하는 폴록사머의 총량은, 예를 들어 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량% (예를 들어, 약 0.01 중량% 내지 약 5 중량%, 또는 약 0.1 중량% 내지 약 5 중량%)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물의 PDI는 약 0.1 이상 약 0.5 이하 (예를 들어, 약 0.3 이하, 또는 약 0.2 이하)이다. 환자 또는 대상체로의 (예를 들어, 점액 또는 점막으로의) 이러한 조성물의 사용 및/또는 전달 방법이 또한 제공된다.

[0179] 상기 기재된 실시양태 중 일부에서, 폴록사머는 플루로닉® P123, 플루로닉® P103, 플루로닉® P105, 플루로닉® F127, 및 그의 조합물로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 폴록사머는 플루로닉® F68 또는 플루로닉® F108이 아니다.

[0180] 본 발명의 이들 및 다른 측면은 하기 실시예를 고려시 추가로 인식될 것이고, 이는 본 발명의 특정 특성의 실시양태를 예시하는 것으로 의도되지만, 특허청구범위에 의해 규정된 바와 같이, 그의 범위를 한정하고자 하는 것

은 아니다.

실시예

실시예 1

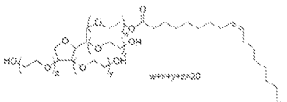
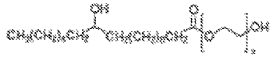
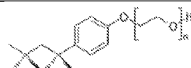
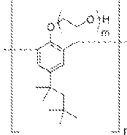
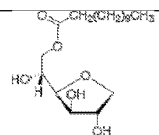
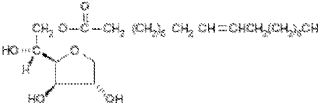
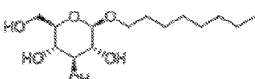
다음은 비중합체 고체 입자를 점액-관통 입자로 형성시키는 방법의 비제한적 예를 기재한다. 피렌, 소수성의 자연 형광성 화합물을 코어 입자로서 사용하고 다양한 표면 변경제의 존재하에 나노밀링 공정에 의해 제조하였다. 안정화제는 표면 변경제로서 작용하고 코어 입자 주위에 코팅물을 형성하였다. 상이한 안정화제/표면 변경제를 평가하여 점액을 관통하는데 있어 코팅된 입자의 유효성을 결정하였다.

피렌을 다양한 안정화제/표면 변경제의 존재하에 수분산액에서 나노밀링하여 특정 안정화제/표면 변경제가, 1) 수백 나노미터로의 입자 크기 감소에 보조할 수 있는지 및 2) 점액 구성성분과의 입자 상호작용을 최소화하고 점액 부착을 방지할 것인 점막불활성(mucoinert) 코팅물로 생성된 나노입자의 표면을 물리적으로 (비공유적으로) 코팅할 수 있는지를 결정하였다. 이들 실험에서, 안정화제/표면 변경제는 코어 입자 주위에 코팅물로서 작용을 하였고, 생성 입자를 점액 중 그의 이동성에 대해 시험하였지만, 다른 실시양태에서, 안정화제/표면 변경제를 점액 중 입자의 이동성을 증가시킬 수 있는 다른 표면 변경제로 교체할 수 있다. 시험된 안정화제/표면 변경제는 제약상 관련 부형제, 예컨대 폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드) 블록 공중합체 (플루로닉스®), 폴리비닐피롤리돈 (콜리돈) 및 히드록시프로필 메틸셀룰로스 (메토셀) 등을 포함한, 표 2에 열거된 다양한 다른 중합체, 올리고머 및 소분자를 포함하였다.


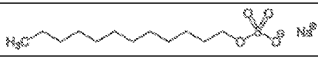
표 2

중합체 안정화제/표면 변경제			
안정화제	두문자어 또는 상표명	등급 또는 분자량	화학 구조
폴리(에틸렌 옥시드)-폴리(프로필렌 옥시드)-폴리(에틸렌 옥시드) 블록 공중합체	플루로닉®	F127, F108, F68, F87, F38, P123, P105, P103, P65, L121, L101, L81, L44, L31	
폴리비닐피롤리돈	PVP	콜리돈 17 (9K), 콜리돈 25 (26K), 콜리돈 30 (43K)	
PVA-폴리(에틸렌 글리콜) 그라프트-공중합체		콜리코트 IR	
히드록시프로필 메틸셀룰로스	HPMC	메토셀 E50, 메토셀 K100	
올리고머 안정화제/표면 변경제			
트윈 20			

[0185]

트윈 80	
솔루볼 HS 15	
트리톤 X100	
틸록사폴	
크레모포르 RH 40	
소분자 안정화제/표면 변경제	
스판 20	
스판 80	
옥틸 글루코시드	

[0186]

세틸트리메틸암모늄 브로마이드 (CTAB)	
소듐 도데실 술페이트 (SDS)	

[0187]

[0188]

피렌 및 상기 열거된 안정화제/표면 변경제 중 하나를 함유하는 수분산액을 입자 크기가 500 nm 미만으로 감소될 때까지 밀링 매체와 함께 밀링하였다. 표 3은 다양한 안정화제/표면 변경제의 존재하에 나노밀링에 의해 수득된 피렌 입자의 입자 크기 특징을 열거한다. 동적 광 산란에 의해 입자 크기를 측정하였다. 플루로닉스® L101, L81, L44, L31, 스팬 20, 스팬 80, 또는 옥틸 글루코시드를 안정화제/표면 변경제로서 사용한 경우, 안정한 나노현탁액을 수득할 수 없었다. 따라서, 입자 크기 감소를 효과적으로 보조하지 못함으로 인해 이들 안정화제/표면 변경제를 추가 조사에서 제외시켰다.

표 3

다양한 안정화제/표면 변경제를 사용하여 피렌의 밀링에 의해 수득된 나노현탁액 중 DLS에 의해 측정된 입자 크기

안정화제	N-Ave. D (nm)
플루로닉® F127	239
플루로닉® F108	267
플루로닉® P105	303
플루로닉® P103	319
플루로닉® P123	348
플루로닉® L121	418
플루로닉® F68	353
플루로닉® P65	329
플루로닉® F87	342
플루로닉® F38	298
플루로닉® L101	측정 불가능*
플루로닉® L81	측정 불가능*
플루로닉® L44	측정 불가능*
플루로닉® L31	측정 불가능*
PVA 13K	314
PVA 31K	220
PVA 85K	236
폴리코트 IR	192
폴리톤 17 (PVP 9K)	163
폴리톤 25 (PVP 26K)	210
폴리톤 30 (PVP 43K)	185
메토셀 E50	160
메토셀 K100	216
트윈 20	381
트윈 80	322
솔루블 HS	378
트리톤 X100	305
틸록사폴	234
크레모포르 RH40	373
SDS	377
CTAB	354
스팬 20	측정 불가능*
스팬 80	측정 불가능*
옥틸 글루코사이드	측정 불가능*

*플루로닉스® L101, L81, L44, L31, 스펠 20, 스펠 80, 옥틸 글루코사이드를 사용한 밀링은 피렌 입자 크기를 효과적으로 감소시키고 안정한 나노현탁액을 생성시킬 수 없었다.

[0189]

[0190]

인간 자궁경질의 점액 (CVM) 중 제조된 나노현탁액으로부터의 피렌 나노입자의 이동성 및 분포를 형광 현미경 검사 및 다중 입자 추적 소프트웨어를 사용하여 특성화하였다. 전형적인 실험에서, $\leq 0.5 \mu\text{L}$ 의 나노현탁액 (필요한 경우, $\sim 1\%$ 의 계면활성제 농도로 희석)을 대조군과 함께 $20 \mu\text{L}$ 의 새로운 CVM에 첨가하였다. 종래의 나노입자 (200 nm 황록색 형광 카르복실레이트-개질된 폴리스티렌 마이크로스피어(microsphere), 인비트로젠 (Invitrogen)으로부터 입수)를 음성 대조군으로서 사용하여 CVM 샘플의 차단 특성을 확인하였다. PEG 5 kDa로 공유적으로 코팅된 적색 형광 폴리스티렌 나노입자를 정착된 MPP 거동을 갖는 양성 대조군으로서 사용하였다. CCD 카메라가 장착된 형광 현미경을 사용하여, 입자의 각각의 유형, 즉 샘플 (피렌), 음성 대조군, 및 양성 대조군 (대조군으로부터 별개로 피렌 나노입자의 관찰을 가능하게 한 피렌의 네추럴 블루 형광)에 대한 각 샘플 내에 몇몇 영역으로부터 $100\times$ 배율하에 66.7 ms (15 개 프레임/s)의 시간 해상도에서 15 s 무비를 캡처하였다. 그 다음, 첨단 영상 처리 소프트웨어를 사용하여, 3.335 s (50 개 프레임) 이상의 시간 척도에 걸쳐 다중 입자의 개별 궤도를 측정하였다. 생성 수송 데이터를 궤도-평균 속도 $V_{\text{평균}}$, 즉, 그의 궤도에 대해 평균낸 개별 입자의 속도, 및 앙상블-평균 속도 $\langle V_{\text{평균}} \rangle$, 즉, 입자의 앙상블에 대해 평균낸 $V_{\text{평균}}$ 의 형태로 여기에 제시하였다. 상이한 샘플 간의 용이한 비교를 가능하게 하고 CVM 샘플의 관통성의 자연 가변성에 대하여 속도 데이터를 규정화하기 위해, 방정식 1에 나타난 식에 따라 상대 샘플 속도 $\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$ 를 결정하였다.

[0191]

제조된 나노입자의 이동성을 정량화하기 전에, 점액 샘플 중의 그의 공간 분포를 낮은 배율 ($10\times$, $40\times$)로 현미

경 검사에 의해 평가하였다. 피렌/메토셀 나노현탁액은 CVM 중에서 균일 분포를 달성하지 않았고 점액 메시(mesh) 크기보다 훨씬 큰 도메인으로 강력하게 응집된 것으로 밝혀졌다(데이터는 나타나지 않음). 이러한 응집은 점막부착 거동의 징표가 되며 점액 관통을 효과적으로 방지한다. 따라서, 입자 이동성의 추가의 정량적 분석은 불필요한 것으로 여겨졌다. 양성 대조군과 유사하게, 모든 다른 시험된 피렌/안정화제 시스템은 CVM 중에서 상당히 균일한 분포를 달성하였다. 다중 입자 추적에 의하면, 양성 대조군에 대한 $\langle V_{\text{평균}} \rangle$ 이 음성 대조군에 대한 것보다 상당히 크다는 것에 의해 입증된 바와 같이, 모든 시험된 샘플에서 음성 대조군은 매우 제약을 받았으며, 한편 양성 대조군은 매우 이동성인 것으로 확인되었다(표 4).

표 4

CVM 중 피렌/안정화제 나노입자(샘플) 및 대조군에 대한 앙상블-평균 속도 $\langle V_{\text{평균}} \rangle$ ($\mu\text{m/s}$) 및 상대 샘플 속도 $\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$

안정화제	음성 대조군		양성 대조군		샘플		샘플(상대)	
	$\langle V_{\text{평균}} \rangle$	SD	$\langle V_{\text{평균}} \rangle$	SD	$\langle V_{\text{평균}} \rangle$	SD	$\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$	SD
플루로닉 F127	0.58	0.18	5.97	0.54	6.25	0.72	1.05	0.18
플루로닉 F108	0.43	0.64	5.04	1.88	4.99	1.47	0.99	0.55
플루로닉 P105	0.56	0.52	4.38	1.36	4.47	2.11	1.02	0.69
플루로닉 P103	0.58	0.77	4.5	2.01	4.24	1.95	0.93	0.74
플루로닉 P123	0.56	0.44	4.56	1.44	3.99	1.66	0.86	0.54
플루로닉 L121	0.42	0.3	4.27	2.04	0.81	0.51	0.10	0.16
플루로닉 F68	0.56	0.52	4.38	1.36	0.81	0.7	0.07	0.23
플루로닉 P65	0.26	0.25	4.52	2.15	0.53	0.56	0.06	0.15
플루로닉 F87	0.95	1.6	5.06	1.34	0.74	0.78	-0.05	-0.43
플루로닉 F38	0.26	0.1	5.73	0.84	0.54	0.29	0.05	0.06
플루로닉 L101*								
플루로닉 L81*								
플루로닉 L44*								
플루로닉 L31*								
폴리코트 IR	0.62	0.62	5.39	0.55	0.92	0.81	0.06	0.22
콜리돈 17	1.69	1.8	5.43	0.98	0.82	0.59	-0.23	-0.52
콜리돈 25	0.41	0.34	5.04	0.64	1.29	1.09	0.19	0.25
콜리돈 30	0.4	0.2	4.28	0.57	0.35	0.11	-0.01	0.06
메토셀 E50**								
메토셀 K100**								
트윈 20	0.77	0.93	5.35	1.76	1.58	2.02	0.18	0.49
트윈 80	0.46	0.34	3.35	1.89	0.94	0.5	0.17	0.24
솔루볼 HS	0.42	0.13	3.49	0.5	0.8	0.6	0.12	0.20
트리톤 X100	0.26	0.13	4.06	1.11	0.61	0.19	0.09	0.07
틸록사폴	0.5	0.5	3.94	0.58	0.42	0.23	-0.02	-0.16
크레모포르 RH40	0.48	0.21	3.2	0.97	0.49	0.24	0.00	0.12
스팬 20*								
스팬 80*								
옥틸 글루코사이드*								
SDS	0.3	0.12	5.99	0.84	0.34	0.15	0.01	0.03
CTAB	0.39	0.09	4.75	1.79	0.32	0.31	-0.02	-0.07

* 안정한 나노현탁액을 생성시키지 않았고, 따라서 점액-관통이 아님(CVM 중 속도는 측정되지 않음)

** CVM 중에서 응집되었고, 따라서 점액-관통이 아님(CVM 중 속도는 측정되지 않음)

[0192]

[0193]

특정(그러나, 중요하게는, 모두는 아님) 안정화제/표면변경제의 존재하에 수득된 나노입자는 양성 대조군과 동일 속도로 또는 거의 동일 속도로 CVM을 통해 이동하는 것으로 밝혀졌다. 구체적으로, 플루로닉스® F127, F108, P123, P105, 및 P103으로 안정화된 피렌 나노입자는, 표 4 및 도 2A에 나타난 바와 같이, 음성 대조군의 $\langle V_{\text{평균}} \rangle$ 을 대략 10배까지 초과하고, 실험 오차 내에서 양성 대조군의 것과 구분이 안 되는 $\langle V_{\text{평균}} \rangle$ 을 나타냈다. 이들 샘플에 대해, $\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$ 값은 도 2B에 나타난 바와 같이, 0.5를 초과하였다.

[0194]

다른 한편으로는, 다른 안정화제/표면 변경제를 사용하여 수득된 피렌 나노입자는 0.4 이하의 각각의 $\langle V_{\text{평균}} \rangle_{\text{상대}}$ 값에 의해 입증되는 바와 같이 대부분 또는 완전히 부동화되었고, 대부분의 안정화제/표면 변경제를 사용한 경우는 0.1 이하이었다(표 4 및 도 2B). 게다가, 도 3A-3D는 입자의 앙상블 내에서 $V_{\text{평균}}$ 의 분포를 나타내는 히스토그램이다. 이들 히스토그램은 플루로닉스® 87 및 콜리돈 25(대표적인 점막부착성 샘플로서 선택됨)로 안정

화된 샘플의 점막부착 거동과는 대조적으로 플루로닉® F127 및 플루로닉® F108로 안정화된 샘플의 점액-확산 (muco-diffusive) 거동 (플루로닉® P123, P105, 및 P103으로 안정화된 샘플에 대해 유사한 히스토그램이 수득되었지만, 여기에 나타내지 않음)을 예시한다.

[0195] 피렌 나노결정을 점액 관통이 되게 하는 플루로닉스®의 특징을 확인하기 위해, 피렌/플루로닉® 나노결정의 $\langle V_{\text{중}} \rangle$ $\langle V_{\text{상대}} \rangle$ 를 사용된 플루로닉스®의 PPO 블록의 분자량 및 PEO 중량 함량 (%)에 대하여 맵핑하였다 (도 4). 적어도, 3kDa 이상의 PPO 블록 및 약 30 wt% 이상의 PEO 함량을 갖는 그러한 플루로닉스®가 나노결정을 점액-관통이 되게 한 것으로 결론지었다. 어떤 이론에 의해서도 구속되는 것을 바라지 않으면서, 소수성 PPO 블록은 그 블록의 분자량이 충분한 경우 (예를 들어, 일부 실시양태에서 약 3 kDa 이상) 코어 입자의 표면과 효과적인 회합을 제공할 수 있으며; 한편 친수성 PEO 블록은 코팅된 입자의 표면에서 존재하고 플루로닉®의 PEO 함량이 충분한 경우 (예를 들어, 일부 실시양태에서 30 wt% 이상) 뮤신 섬유와의 부착 상호작용으로부터 코팅된 입자를 차폐할 수 있는 것으로 여겨진다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서 표면 변경제의 PEO 함량은, 10 wt% PEO 분량은 입자를 점막부착성이 되게 하였기 때문에, 약 10 wt% 이상 (예를 들어, 약 15 wt% 이상, 또는 약 20 wt% 이상)이 되도록 선택할 수 있다.

[0196] 실시예 2

[0197] 본 실시예는 다양한 비중합체 고체 입자를 사용한 점액-관통 입자의 형성을 기재한다.

[0198] 실시예 1에 기재된 기법을 다른 비중합체 고체 입자에 적용하여 접근법의 범용성을 확인하였다. F127을 코어 입자로서 사용된 다양한 활성 약제를 코팅하는 표면 변경제로서 사용하였다. 소듐 도데실 황페이트 (SDS)를 음성 대조군으로서 선택하여 각각의 약물을 동일 화합물의 유사한 크기의 나노입자와 비교하였다. 약제 및 플루로닉® F127 또는 SDS를 함유하는 수분산액을 입자 크기가 300 nm 미만으로 감소될 때까지 밀링 매체와 함께 밀링하였다. 표 5는 이 방법을 사용하여 밀링된 약물의 대표적 선택에 관한 입자 크기를 열거한다.

표 5

SDS 및 F127의 존재하에 밀링된 약물의 대표적 선택에 관한 입자 크기

약물	안정화제	Z-Ave D (nm)	PDI
플루터카손 프로피오네이트	F127	203	0.114
	SDS	202	0.193
푸로세미드	F127	217	0.119
	SDS	200	0.146
이트라코나졸	F127	155	0.158
	SDS	168	0.163
프레드니솔론	F127	273	0.090
	SDS	245	0.120
로테프레드놀 에타보네이트	F127	241	0.123
	SDS	241	0.130
부테소니드	F127	173	0.112
	SDS	194	0.135
인도메타신	F127	225	0.123
	SDS	216	0.154

[0199]

[0200] 점액을 관통하는 약물 나노입자의 능력을 측정하기 위해 점액 샘플로의 나노 입자의 대량 수송을 측정하는 새로운 검정을 개발하였다. 대부분의 약물은 자연발생적으로 형광성은 아니고 따라서 입자 추적 현미경 검사 기법으로 측정하는 것은 곤란하다. 새로이 개발된 벌크 수송 검정은 분석된 입자가 형광성이거나 염료로 표지되는 것을 필요로 하지 않는다. 이 방법에서, 20 μ L의 CVM을 모세관에 수집하고 한쪽 말단을 점토로 밀봉하였다. 그 다음, 모세관의 개방 말단을 20 μ L의 입자의 수성 현탁액 (이는 0.5% w/v 약물임)에 잠기게 하였다. 목적하는 시간, 전형적으로 18시간 후, 현탁액으로부터 모세관을 제거하고 외부를 청결히 닦았다. 점액 샘플을 함유하는 모세관을 초원심분리관에 위치시켰다. 추출 매질을 관에 첨가하고 혼합하면서 1시간 동안 인큐베이션하였으며, 이는 모세관으로부터 점액을 제거하고 점액으로부터 약물을 추출하는 것이었다. 그 다음, 샘플을 스피닝하여 뮤신 및 다른 불용성 성분을 제거하였다. 그 다음, 추출된 샘플 중 약물의 양을 HPLC를 사용하여 정량

화할 수 있었다. 이들 실험의 결과는 현미경 검사법의 것과 아주 일치하며, 이는 점액 관통 입자와 종래의 입자 (CP)와의 수술에서의 분명한 차별화를 나타낸다. 약물의 대표적 선택에 대한 수술 결과를 도 5에 나타냈다. 이들 결과는 피렌을 사용한 현미경 검사 / 입자 추적에 대한 조사 결과들을 확증하고 통상의 활성 제약 화합물의 확장; F127로 비중합체 고체 나노입자를 코팅하는 것이 점액 관통을 향상시킨다는 것을 입증한다.

[0201] 실시예 1-2에서, 자궁경질의 점액 (CVM) 샘플을 18세 이상의 건강한 여성 지원자로부터 얻었다. 30초 내지 2분 동안 상품 팜플렛(product literature)에 의해 기재된 바와 같이 소프트컵(Softcup)® 월경 수집 컵(menstrual collection cup)을 질관(vaginal tract)에 삽입함으로써 CVM을 수집하였다. 제거 후 그 다음, 50 mL 원심분리 관에서 ~30xG 내지 ~120xG에서의 온화한 원심분리에 의해 소프트컵®으로부터 CVM을 수집하였다. 실시예 1에서, CVM은 희석되지 않고 새로운 것 (냉장 조건하에 7일 이하 동안 보관됨)이 사용되었다. 실시예 1에서 사용된 모든 CVM 샘플의 장벽 및 수술을 음성 (200 nm 카르복실화 폴리스티렌 입자) 및 양성 (PEG 5K로 개질된 200 nm 폴리스티렌 입자) 대조군과 함께 입증하였다. 실시예 2에서, CVM을 동결건조시키고 복원시켰다. 실시예 2에서, 점액을 -50℃에서 동결시킨 다음 건조할 때까지 동결건조시켰다. 그 다음, 샘플을 -50℃에서 보관하였다. 사용 전에, 고체를 질구와 절구공이를 사용하여 미세 분말로 분쇄한 다음 원래 부피 내지 원래 부피의 2 배에 상당하는 최종 부피까지 물을 첨가하여 점액을 복원시켰다. 그 다음, 복원된 점액을 12시간 동안 4℃에서 인큐베이션하고 실시예 2에 기재된 바와 같이 사용하였다. 실시예 2에서 사용된 모든 CVM 샘플의 장벽 및 수술을 음성 (200 nm 카르복실화 폴리스티렌 입자) 및 양성 (F127 코팅된 200 nm 폴리스티렌 입자) 대조군과 함께 입증하였다.

[0202] 실시예 3

[0203] 본 실시예에는 약물 로테프레드놀 에타보네이트 (LE)를 포함하는 코어를 사용한 점액-관통 입자의 형성을 기재한다.

[0204] 비중합체 고체 입자의 전달에서 향상된 점액 관통의 값을 입증하기 위해, 로테프레드놀 에타보네이트의 MPP 제제 (LE MPP; 실시예 2에 기재된 방법에 의해 제조된 플루로닉® F127로 코팅된 LE 입자)를 현재 시판되는 제제, 로테맥스®와 비교하였다. 로테맥스®는 안구 표면 염증의 치료를 위해 승인된 스테로이드 점안액이다. 종래의 입자, 예컨대 로테맥스® 중의 것은 눈 속에서 주변의 신속히 클리어런스된 점액층에 의해 널리 포착되고, 따라서 또한 신속히 클리어런스된다. LE MPP는 점액에 부착하는 것을 피하고, 점액을 효과적으로 관통할 수 있어, 하층의 조직으로 직접 지속된 약물 방출을 촉진시킨다. 표적 부위에서 약물 노출을 향상시키는 것으로 전체 용량이 감소가능하게 될 것이고, 이는 환자의 순응도 및 안전성을 증가시킨다. 생체내에서, 뉴질랜드 백색 토끼에 LE MPP의 단일 국소 점적 주입으로 인해, 로테맥스®의 등가 용량과 비교하여 안검 결막, 안구 결막, 및 각막에서 상당히 더 높은 약물 수준이 초래되었다 (도 6A-6C). 2시간에서 MPP로부터의 LE 수준은 로테맥스®로부터보다 6, 3, 및 8배가 더 높았다 (안검, 안구, 및 각막, 각각). 특히, MPP로부터의 LE 수준은 30분에서 로테맥스®로부터의 수준보다 2시간에서 대략 2배 더 높다. 이들 결과는 비중합체 고체 MPP 접근법의 유용성을 입증한다.

[0205] 실시예 4

[0206] 본 실시예에는 쿠르쿠민 (CUR)을 포함하는 코어를 포함하는 점액-관통 입자의 형성을 기재한다.

[0207] 다양한 용해도를 갖는 분자를 고체 약제의 코어를 갖는 입자를 형성시키기 위한 모델 치료제로서 선택하였다. 그들 중 하나인, 쿠르쿠민은 항산화제, 항종양 및 항염증 특성을 갖는 것으로 제안되어 있다. 이는 그의 넓은 잠재적 의학적 적용뿐만 아니라, 그의 높은 소수성 및 자연 형광성 때문에도 흥미로운 후보이다. 전자의 특질은 CUR이 수용액에 난용성(poorly soluble)이라는 의미이며, 한편 후자는 입자의 신속하고 무표지(label-free) 검출 및 특성화를 가능하게 한다. 입자를 계면활성제 (예를 들어, 플루로닉® F127, 실시예 4 및 5에서 F127로서 약기)로 코팅하여 입자를 점액 관통이 되게 하였다.

[0208] 초음파처리를 기반으로 한 간단한 절차를 개발하여 CUR의 입자를 제제화하였다. 간단히, 5 mg CUR을 7 mL 섬광 바이알에서 F127 (또는 다른 계면활성제)를 함유하는 2 mL 수용액에 분산시켰다. 현탁액을 20분 동안 수조에서 초음파처리하였다. 그 다음, 쿠르쿠민 현탁액을 30분 동안 100% 진폭에서 3 mm 단차형 프로브(stepped probe)를 갖춘 초음파처리기를 사용하여 초음파처리하였다. 현탁액을 10분 동안 2000 rpm에서 원심분리하여 미과괴 결정을 제거하였다. 상청액을 2시간동안 4℃에서 보관하였다. 상청액을 20분 동안 16,500 rpm에서 원심분리한 다음, 펠릿을 수집하였다. 입자 수집 전에 충분한 인큐베이션 시간 없이는, 코팅된 입자의 확산도가 훨씬 낮았다(데이터는 나타내지 않음)는 점을 주목하였고, 이는 점액-관통 입자의 생성에서 치밀한 F127 코팅물의 중요성

을 시사한다.

[0209]

표 6 및 (도 7A-7B)는 상기 방법을 사용하여 제조된 생성 코팅된 CUR 입자의 물리화학적 특성을 요약한다. 1% (w/v) F127 (CUR-1% F127 입자)에서 제제화된 CUR 입자는 133 nm의 평균 크기를 가졌고, 이는 TEM 영상을 통한 관찰과 일치되었다 (도 7B). 제타-전위는 중성에 가까웠다. 초음파처리 동안 CUR 현탁액 중의 F127 농도가 감소됨에 따라, 아마도 CUR 입자에 대한 약화된 안정화 효과를 야기하는 감소된 F127 코팅물 밀도의 결과로서, CUR 입자 크기 및 다분산성 (PDI) 각각이 증가되었다 (표 6). F127 농도가 입자 제타-전위에 거의 영향을 미치지 않았으며, 이는 아마도 pH 4에서 쿼크쿠민의 탈이온화에 기인한 것으로 본다. CUR-1% F127 입자에 대한 분말-XRD 측정은 CUR의 화학 구조 및 결정화도가 F127의 초음파처리 또는 혼입 중 어느 하나에 의해서도 변경되지 않았음을 나타냈다 (도 7A).

표 6

F127의 상이한 농도에서 제조된 CUR 입자의 크기 및 제타-전위, 및 물 (D_w) 중에서도 비교된 인간 자궁경질의 점액 (D_m) 중의 그의 확산도

샘플 설명 ***	크기 (nm)*	다분산 지수	제타-전위 (mV)*	D_w/D_m^*
CUR-1% F127 입자	133 ± 12	0.33 ± 0.05	-0.8 ± 0.1	9
CUR-0.1% F127 입자	154 ± 4	0.50 ± 0.02	-1.4 ± 0.4	11
CUR-0.01% F127 입자	176 ± 11	0.57 ± 0.03	-1.6 ± 0.3	35
CUR-0.001% F127 입자	184 ± 30	0.72 ± 0.03	-1.3 ± 0.5	10000

* 크기 및 제타-전위를 동적 광 산란 및 레이저 도플러 풍속측정법(laser Doppler anemometry) 각각을 통해 10 mM NaCl (pH=4) 중에서 측정하였다. 데이터는 평균 ± 표준 오차 (n=3)를 나타낸다.

** D_w 는 평균 입자 크기를 사용하여 스토크스-아인슈타인(Stokes-Einstein) 방정식으로부터 계산하고 D_m 은 1 s의 시간 척도에서 계산된 기하 양상률 평균 유효 확산도 (<Def>)이다.

*** F127의 백분율은 CUR 입자의 제조 동안 그의 농도 (%w/v)를 나타낸다.

[0210]

[0211]

CUR-F127 입자의 점액-관통 특성을 조사하기 위해, CUR-1% F127 입자의 수송을 인간 자궁경질의 점액 (CVM) 및 인간 낭포성 섬유증 객담 (CFS) 샘플 둘 다에서 다중 입자 추적 (MPT)을 사용하여 연구하였다. 간단히, 입자를 점액 샘플에 첨가하고 그의 이동을 고 해상도 에피-형광(epi-fluorescence) 현미경 검사를 사용하여 기록하였다. 그 다음, 그의 궤도 및 수송률을 분석하고 정량화하였다. 도 8A-8B는 CVM 및 CFS 둘 다에서 CUR-1% F127 입자의 시간-의존성 양상률 평균낸 기하 평균 제곱 변위 (<MSD>)를 나타낸다. 200 nm PEG화 (PEG) 및 카르복실화 (COOH) 폴리스티렌 (PS) 입자를 점막-불활성 및 점막-부착성 대조군 각각으로서 선택하였다. 연구된 시간 척도의 전체 범위에 대해, CUR-1% F127 입자의 <MSD>는 CVM에서의 PSPEG의 것과 필적하였고, 두 유형의 점액 샘플 중의 PSCOOH의 것보다 상당히 높았다. 1 s의 시간 척도에서, CUR-1% F127 입자의 <MSD>는 CVM 및 CFS 각각에서의 PSCOOH의 것보다 4400배 및 220배 더 높았다. 1 s의 시간 척도에서 CUR-1% F127 입자의 기하 양상률 평균낸 유효 확산도 (<Def>)는 물 중에서 계산된 이론상 확산도보다 단지 9배 낮았다 (표 6).

[0212]

F127의 코팅 밀도가 점액 중 CUR 입자의 수송에 미치는 영향을 추가로 조사하기 위해, 입자를 다양한 F127 농도에서 제제화하고 그의 확산도를 인간 CVM에서 특성화하였다 (도 9, 표 6). CUR-0.1% 및 0.01% F127 입자의 <Def>는 CUR-1% F127 입자의 것과 비교하여 유사하거나 약간 감소되었지만, CUR-0.001% F127 입자의 수송은 극적으로 지체되었다 (도 9). CUR-0.001% F127 입자의 확산도는 물 중에서도 비교하여 인간 CVM에서 10000배 더 늦었고, CVM에서 CUR-1% F127 입자의 것보다 약 1000배 더 낮았다. 일반적으로, CUR 입자의 제법에서 F127 농도를 감소시키면, 확산도가 감소되었는데, 아마도 감소된 F127 농도가 평형 상태에서 F127의 표면 밀도를 저하시켰기 때문이다 (그로 인해 PEG가 브러시(brush)된다). F127 농도를 0.01% (w/v) 미만으로 저하시킨 경우 이러한 효과가 그렇게 확연하게 되리라고는 자명하지 않았다.

표 7

상이한 플루로닉스®에서 제조된 CUR 입자의 크기 및 제타-전위, 및 물 (Dw) 중에서의 비교된 인간 자궁경질의 점액 (Dm) 중의 그의 확산도

샘플 설명	크기 (nm)*	다분산 지수	제타-전위 (mV)*	Dw/Dm*
CUR-1% F38 입자	232 ± 46	0.56 ± 0.01	-1.2 ± 0.5	60
CUR-1% P65 입자	187 ± 34	0.48 ± 0.05	-1.5 ± 0.3	1600
CUR-1% P68 입자	154 ± 20	0.53 ± 0.02	-1.4 ± 0.5	150
CUR-1% P84 입자	138 ± 12	0.38 ± 0.02	-1.3 ± 0.5	30
CUR-1% P85 입자	149 ± 16	0.43 ± 0.05	-1.3 ± 0.3	30
CUR-1% F88 입자	130 ± 19	0.51 ± 0.04	-0.5 ± 0.5	20
CUR-1% F98 입자	123 ± 34	0.50 ± 0.02	-0.8 ± 0.1	12
CUR-1% P103 입자	141 ± 4	0.50 ± 0.02	-1.4 ± 0.3	8
CUR-1% P104 입자	110 ± 18	0.45 ± 0.01	-1.8 ± 0.6	12
CUR-1% P105 입자	90 ± 8	0.54 ± 0.02	-1.0 ± 0.5	15
CUR-1% F108 입자	135 ± 21	0.52 ± 0.03	-0.6 ± 0.1	11
CUR-1% P123 입자	123 ± 11	0.60 ± 0.06	-2.3 ± 0.5	9

* 입자의 크기 및 제타-전위를 동적 광 산란 및 레이저 도플러 풍속측정법 각각을 통해 10 mM NaCl (pH=4) 중에서 측정하였다. 데이터는 평균 ± 표준 오차 (n=3)를 나타낸다.

** Dw는 평균 입자 직경을 사용하여 스토크스-아인슈타인 방정식으로부터 계산하고 Dm은 1 s의 시간 척도에서 계산된 양상을 평균 유효 확산도이다.

[0213]

[0214]

F127 이외에도, 다양한 플루로닉스®가 제약 적용에 사용되었다. 상이한 플루로닉스®를 시험하여 이들이 동등하게 잘 작용할 것인지, 또는 단지 특성의 것만 CUR 입자를 점액-관통 입자로 변환시킬 것인지를 알아보았다. 표 7에 (PPO MW이 증가하는 순으로) 열거된 바와 같은 12개의 추가의 플루로닉스®를 선택하고 상응하는 CUR 입자를 제조하였다. 생성 크기는 90 내지 232 nm 범위이었으며, 대부분은 100-150 nm에 머물렀다. 모든 입자 유형은, 대부분 0.4-0.6 사이에 속하는 CUR-1% F127 입자 (0.33)의 것보다 더 큰 PDI를 나타냈다. 이들 결과는 F127가 모든 시험된 플루로닉스® 중에서 가장 강한 안정화 효과를 가질 수 있음을 의미하였다. 제타-전위는 모든 연구된 CUR 입자에 대해 균일하게 중성이었다.

[0215]

다양한 플루로닉스®로 코팅된 CUR 입자의 수송률을 인간 CVM에서 특성화하였다 (표 7). 그의 확산도를 CUR-1% F127 입자의 것과 비교 (Dw/Dm = 9)함으로써, 이들은 3개의 군으로 모아졌다: 입자 이동이 강하게 지체됨 (F65, F68; Dw/Dm > 100), 입자 이동이 지체됨 (F38, F84, F85, F88; 20 ≤ Dw/Dm ≤ 100), 및 입자가 신속히 관통 (F98, P103, P104, P105, F108, F123; Dw/Dm < 20). 입자 모두가 거의 중성 표면 전하를 가졌지만, 특정 플루로닉스® 코팅물을 갖는 제제 (예를 들어, F65 및 F68)만이 강하게 지체된 확산도를 나타냈다는 사실은, 이들 CUR 입자와 점액 성분 사이의 부착성은 소수성 상호작용에 의해 지배될 가능성이 있음을 시사한다.

[0216]

상이한 플루로닉스®로 코팅된 CUR 입자의 확산도를 결정하는 입자를 확인하기 위해, CUR 입자의 <Def> (1 s의 시간 척도에서)를 사용된 플루로닉스®의 PPO 및 PEG MW에 대하여 맵핑하였다 (도 10A). <Def>의 일반적 증가가 PPO 세그먼트의 성장 길이에 따라 관찰되었으나 (Y-축), 아직 <Def>와 PEG MW (X-축) 사이의 어떤 특정 패턴도 없었다. 놀랍게도, 이러한 전이는 대략 2000 Da의 PPO MW에서 일어났고, 이는 플루로닉스® 코팅된 폴리스티렌 입자에 대해 이전에 발견된 것보다 작다. 입자 확산도는 PPO MW와 강한 상관관계를 나타냈지만 (R=0.92), PEG MW와는 거의 상관관계를 나타내지 않았다 (R=0.14). 더 긴 PPO 세그먼트를 갖는 플루로닉스®가 CUR 입자의 소수성 표면에 더 높은 친화도를 갖고, 따라서 더 단단하게 고정하고 표면 상에 더 치밀하고 안정한 차폐를 제공할 수 있는 가능성이 있다.

[0217]

점액-관통 입자를 잠재적으로 생성시키는 플루로닉스® 이외의 계면활성제의 능력을 탐구하기 위해, 모두 PEG 세그먼트를 함유하는, 트윈 20, 트윈 80 및 비타민 E TPGS를 시험하였다. 이들 계면활성제 중에서 제조된 CUR 입자의 특징을 표 8에 나타냈다. 비록 모든 3개의 군이 대략 150 nm의 입자 크기 및 중성에 가까운 제타-전위를

나타냈긴 했지만, 그의 확산도는 물에서와 비교하여 인간 CVM에서 크게 감소하였다. 더 낮은 수송률은 CUR 입자의 표면 상에 계면활성제 분자의 무효한 코팅물을 나타낼 수 있고, 이는 F127과 비교하여 그의 더 짧은 소수성 세그먼트에 기인한 것으로 볼 수 있다.

표 8

플루로닉스® 이외의 계면활성제 중에서 제조된 CUR 입자의 크기 및 제타-전위, 및 물 (D_w) 중에서도 비교된 인간 자궁경질의 점액 (D_m) 중의 그의 확산도

샘플 설명	직경 (nm)*	다분산 지수	제타-전위 (mV)*	D_w/D_m^{**}	N_b^{\dagger}	N_m^{\ddagger}
CUR-1% 트윈 20 입자	153	0.56	-3.2	13000	1	1
CUR-1% 트윈 80 입자	155	0.60	-2.9	480	1	1
CUR-1% VitE-TPGS [†] 입자	135	0.68	-2.5	1700	1	1

* 입자의 크기 및 제타-전위를 동적 광 산란 및 레이저 도플러 풍속측정법 각각을 통해 10 mM NaCl (pH=4) 중에서 측정하였다. 데이터는 평균 \pm 표준 오차 (n=3)를 나타낸다.

** D_w 는 평균 입자 크기를 사용하여 스토크스-아인슈타인 방정식으로부터 계산하고 D_m 은 1 s의 시간 척도에서 계산된 양상을 평균 유효 확산도이다.

[†] VitE-TPGS: 비타민-E TPGS (비타민-E-TPGS (d-알파 토코페릴 폴리에틸렌 글리콜 1000 숙시네이트), 안타레스 헬스 프로덕츠, 인크(Antares Health Products, Inc) (일리노이아주 바타비아)로부터 입수)

[‡] N_b : 시험된 입자의 배치의 수; N_m : 시험된 인간 CVM 샘플의 수.

[0218]

[0219]

지속된 방식으로 CUR을 전달하는 CUR 입자의 능력을 평가하기 위해, CUR-1% F127 입자의 방출 프로파일을 특성화하였다. 간단히, 알려진 양의 CUR 입자를 최상부에 옥타놀의 층이 첨가된 50 mL 시험관에서 인산염 완충 식염수 (PBS, pH 7.4) 중에 현탁시켜 용해된 CUR을 추출하였다. 현탁액을 휘저어 섞으면서 37°C에서 인큐베이션하였다. 옥타놀을 수집하고 매 시점에서 대체하였다. 옥타놀 중 CUR의 농도를 형광측정법에 의해 결정하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, CUR-1% F127 입자는 시험관내에서 24-48 시간 동안 연속 방출을 제공했다. CUR 합량의 약 80%가 최초 24시간 내에 방출되었다.

[0220]

실시예 5

[0221]

소수성 약물, 5, 10, 15, 20-테트라(p-히드록시페닐)포르피린 (p-THPP)을 사용하여 점액-관통 입자의 개발을 기재한다.

[0222]

CUR 이외에도, 실시예 4에서 기재된 동일한 방법을 소수성 약물 p-THPP에 적용하였다. p-THPP는 암을 치료하기 위해 광역학 요법에 사용되는 치료제이고 이전 연구에서 모델 광민감제로서 선택되어 왔다. 크기, 제타-전위 및 인간 CVM에서의 확산도를 포함한, p-THPP-1% F127 입자의 기본 특성을 이전에 기재된 절차에 따라 결정하였다 (표 9). CUR-1% F127 입자와 유사하게, p-THPP-1% F127 입자는 187 nm의 크기 및 중성에 가까운 표면 전하를 나타냈다. 인간 CVM에서 p-THPP-1% F127 입자의 확산도는 물 중에서의 것보다 단지 8배 느렸고, 이는 입자가 점액 중에서 부착 성분에 의해 부동화되지 않고 CUR 입자-1% F127의 것과 필적하는 속도로 점액 겔을 통해 확산가능함을 나타낸다.

표 9

플루로닉® F127에서 제조된 p-THPP 입자의 크기 및 제타-전위, 및 물 (D_w) 중에서도 비교된 인간 자궁경질의 점액 (D_m) 중의 그의 확산도

샘플 설명	크기 (nm)*	다분산 지수	제타-전위 (mV)*	D_w/D_m^{**}
p-THPP-1% F127 입자	187 \pm 7	0.51	0.3 \pm 0.4	8

* 입자의 크기 및 제타-전위를 동적 광 산란 및 레이저 도플러 풍속측정법 각각을 통해 10 mM NaCl (pH=4) 중에서 측정하였다. 데이터는 평균 \pm 표준 오차 (n=3)를 나타낸다.

** D_w 는 평균 입자 크기를 사용하여 스토크스-아인슈타인 방정식으로부터 계산하고 D_m 은 1 s의 시간 척도에서 계산된 양상을 평균 유효 확산도이다.

[0223]

[0224]

실시예 6

- [0225] 본 실시예는 테노포비르 (TFV) 및 아시클로비르 모노포스페이트 (ACVp), 고도로 수용성인 약물을 사용하여 점액-관통 입자의 개발을 기재한다.
- [0226] 테노포비르 (TFV)는 감염 질환을 치료하기 위해 사용되는 강력한 항바이러스 약물이다. 테노포비르 (TFV)가 고도로 수용성이라는 사실로 인해, 테노포비르의 점액-관통 입자를 제제화하기 위한 방법을 개발하였다. TFV의 수용성은 15 mg/mL 이상이고, 따라서 불용성 입자의 제조를 위한 종래의 기법 또는, 대안으로, 소수성 중합체 나노입자로의 캡슐화는, 성공적이지 않았다. TFV의 수용성을 감소시키기 위해, 양이온과 뉴클레오타이드/뉴클레오타이드 유사체 사이의 상호작용을 활용하였다. TFV는 포스포네이트 기와 퓨린 고리 구조를 통해, 아연 양이온 (Zn)과 매우 강하게 상호작용한다. 아연과의 이러한 상호작용은, 본원에 기재된 코팅물에 의해 안정화되어 응집을 중단하고 결정 표면 특성을 결정할 수 있는 결정으로의 TFV 침전을 유발한다. 게다가, Zn은 질액에 자연 발생적으로 존재하고 공지된 항균 특성을 갖고 최근에는 항-HIV 활성을 포함하는 것으로 확대되었다.
- [0227] TFV-Zn 입자가 완충제로의 연장 방출을 나타낼 것이라는 것을 보장하는 것이 필수적인데, 그 이유는 결정 및 코팅물이 전적으로 비공유 상호작용으로 형성되기 때문이다. 유리 TFV의 용액과 비교한 경우, 입자는 100 kDa 투석막 (24 h에 걸쳐 약 40%)으로부터 훨씬 더 느린 방출을 나타냈다 (도 12).
- [0228] 그 다음, TFV-Zn 입자를 F127 또는 PVA 코팅물 중 어느 하나를 사용하여 제제화하였다. 표 10에 나타낸 바와 같이, 코팅물의 존재는, 더 작은 평균 크기 및 감소된 다분산성에 의해 입증된 바와 같이, 입자를 안정화시켰다. 표면 상에 코팅물의 존재는 또한 더 중성인 전하를 향한 제타 전위의 변화를 암시한다. 게다가, 이들 입자를 TFV 상의 유리 아민에 대한 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 염료의 공유적 부착을 통해, 영상화 목적으로 형광 표지하였다. 결정은 1:50 표지:비표지 TFV의 비로 제조될 경우 불안정한 것으로 밝혀졌지만, 1:200 표지:비표지 TFV의 비에서 형광 현미경 검사를 통해 가시적이고 안정하였다.

표 10

TFV 입자의 크기 및 제타 전위

코팅물	MPP/CP	크기 (nm)	ζ 전위 (mV)
0.08% F127	MPP	154 ± 4	-8.7 ± 1.6
0.1% PVA	CP	165 ± 14	-7.3 ± 0.4
없음	CP	328 ± 91	-21.5 ± 0.9

- [0229]
- [0230] 안정하고, 형광 표지된 입자를 수득한 후, F127 코팅물이, 코팅된 중합체 나노입자 사용시 일치되게 나타난 바와 같이, 동물에서 점막 표면에서 입자 분포를 개선시키는지를 결정하였다. F127 또는 PVA 중 어느 하나로 코팅된 TFV 입자를 마우스의 질에 투여한 다음, 마우스를 희생시키고, 그의 질을 절개해 내고 현미경 슬라이드 상에 평탄화하고, 영상화하였다. 도 13A-13B에 나타낸 바와 같이, F127-코팅된 입자는 전체 질 표면에 잘 분포되었으며, 한편 PVA-코팅된 입자는, 질 주름 (vaginal fold) (점막 주름(rugae))에 진입하지 않은 징표가 되는 "스트라이핑(striping)" 거동으로서 명백한, 질 표면의 불완전한 커버리지를 나타냈다.

표 11

HSV-2 질 시험감염(challenge) 결과

군	약물 형태 및 농도	비히클	마우스 수	감염 수	% 감염	p-값**
1	위약	PBS	100	88	88.0	<0.000001
2	가용성 ACV(1mg/mL)	PBS	25	21	84.0	0.002
3	가용성 ACV(10 mg/mL)	PBS	100	62	62.0	0.10
4	가용성 ACV(10 mg/mL)	물	75	52	69.3	0.02
5	ACV-MPP(1 mg/mL)*	물	45	21	46.7	N/A

* 크기 65.3 ± 10 nm, ζ 전위 -6.3 ± 1.0 mV.

** p-값 대 ACV-MPP.

- [0231]
- [0232] 그 다음 MPP 입자를, 2형 단순 포진 바이러스 (HSV-2)에 의한 감염을 예방하는데 있어서 MPP 입자의 잠재적 효능을 시험하는데 사용하기 위한 아시클로비르 모노포스페이트 (ACVp)를 사용하여 제조하였다. ACVp는 바이러스

저항성을 야기할 수 있는 초기 포스포릴화 단계를 위한 바이러스 티미딘 키나제에 의존성이 아니다. 이는 또한, 비록 낮은 효능이긴 하지만, ACVp 항-HIV 활성을 제공한다.

[0233] 생후 6-8주 암컷 CF-1 마우스에게 메덱로시프로게스테론 아세테이트를 피하 주사하였고, 파이어-폴리시(fire-polished) 용적식(positive displacement) 모세 피펫 (와이어트롤(Wiretrol), 드럼몬드 사이언티픽(Drummond Scientific))을 사용하여 1주 뒤에 20 μ L의 검사제(test agent) 또는 PBS를 질내 제공하였다. 30분 후, 마우스에게 HSV-2 균주 G (ATCC #VR-734, mL 당 2.8×10^7 TCID₅₀)를 함유하는 10 μ L의 접종물을 시험감염시켰다. HSV-2를 바텔 배지(Bartel's medium)로 10배 희석하여 10 ID₅₀ (전형적으로 대조군 마우스의 ~85%를 감염시키는 용량)을 전달하였다. 이전에 기재된 바와 같이 (문헌 [R. A. Cone, T. Hoen, X. Wong, R. Abusuwwa, D. J. Anderson, T. R. Moench, Vaginal microbicides: detecting toxicities in vivo that paradoxically increase pathogen transmission. BMC Infect Dis 6, 90 (2006)]), 인간 포피 섬유모세포 상에서 PBS 질 세척물을 배양함으로써 접종 후 3일 후에 감염에 대해 마우스를 평가하였다 (다이하그노스틱 하이브리즈(Diagnostic Hybrids), MRHF 로트(Lot) #440318W). 이 모델에서, 시험감염 후 12시간 초과에서 수집되는 경우 투입 (시험 감염) 바이러스는 세척액(lavage fluid)에서 더 이상 검출되지 않았다.

[0234] ACVp 입자를 TFV에서와 유사한 상호작용 (포스페이트 기 및 퓨린 고리)을 통해, 아연의 존재하에 제조할 수 있음이 밝혀졌다. MPP 나노결정의 형태로 가용성 ACVp 또는 ACVp를 생(live) HSV로 시험감염 이전 30분에 마우스에게 투여하였다. 약물 및 바이러스 둘 다를 질내 투여하였다. MPP-약물과 동일 농도에서 투여된 가용성 약물은 무효하였으며 (대조군의 88%와 비교하여 84% 감염됨), 한편 MPP-약물 군에서 단지 마우스의 46.7%가 감염되었다. MPP-약물이 제공된 용량의 10배로 가용성 약물이 제공된 마우스의 군은 62% (PBS 중 약물) 또는 69.3% (물 중 약물)의 비율로 감염되었다. 가용성 약물을 동일 비히클 (순수한 물) 중에서 투여된 MPP-약물과 비교하면, 가용성 약물은 MPP-약물보다 심지어 10배 더 높은 농도에서도 덜 보호적이었다 ($p=0.02$).

[0235] 유리 포스페이트 기를 갖는 약물의 안정한 나노결정은 동결-건조 접근법 및 초음파처리 절차 둘 다를 사용하여 Zn를 사용하여 형성될 수 있음을 주목한다. 동결 건조를 위해, 약물을 F127의 수용액에 용해시켰다. 아세트산 아연을 1:50 내지 1:5 (Zn: 약물)의 범위로 첨가하였고, 용액을 즉시 급속 동결시켰다. 건조된 분말을 목적하는 농도에서 물에서 복원시켰다. F127의 임계 미셀 농도 (CMC) 초과 (1%) 및 미만 (0.08%) 둘 다의 F127 농도를 사용하여 안정한 TFV 나노결정을 제조할 수 있다. 그러나, ACVp 나노결정이 계면활성제 농도에 훨씬 더 민감하였다. 안정한 나노결정은 단지 CMC 미만의 F127 농도 (~0.1%)의 사용시 형성될 수 있었다. CMC 초과 F127 농도는 시험된 제제화 방법에 상관없이, ACVp 나노결정의 상당한 응집 및 침강을 유발하였다.

[0236] 게다가, 안정한 나노결정은 과잉의 아세트산아연을 약물 용액에 첨가함으로써 형성될 수 있다. 침전물을 원심분리에 의해 3+ 배 세척하였다. 생성 슬러리를 프로브 초음파처리기(probe sonicator)를 사용하여 초음파처리하였다 (계면활성제 없이; 버블링은 응집 및 불안정성을 유발함). 밀링과 같은 다른 방법이 또한 효과가 있을 수 있다. 그 다음, 계면활성제를 첨가하여 생성 나노결정을 안정화시켰다. 계면활성제의 존재 없이는, 상당한 응집 및 침강이 일어난다. 이러한 제제화 기법을 사용하여, 안정한 TFV 나노결정을, 예를 들어 1% 이하의 F127 농도를 사용하여 제조할 수 있었다. 유사하게, 이들 실험에서, 안정한 ACVp 나노결정은 단지 CMC 미만의 F127 농도 (전형적으로 0.08% 사용)를 사용하여 형성될 수 있었다.

[0237] 실험실 4-6에서, 더 존스 홉킨스 유니버시티(the Johns Hopkins University)의 임상시험 심사위원회 (Institutional Review Board)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 자가-샘플추출 월경 수집 장치를 사용하여 정상 질내 균총(vaginal flora)을 가진 여성으로부터, 희석되지 않은 자궁경질의 분비물을 수집하였다. 장치를 ~30 s 동안 질에 삽입하고, 제거하고, 50 mL 원심분리관에 넣었다. 샘플을 2분 동안 1,000 rpm에서 원심분리하여 점액 분비물을 수집하였다.

[0238] 실시예 4-6에서, 100x 유침용 대물렌즈(oil-immersion objective) (N.A., 1.46) 및 적절한 필터가 장착된 도립 에피형광 현미경(inverted epifluorescence microscope) (차이스, 뉴욕주 쏘우드)에 탑재된 전자 증배 전하 커플링 장치 (electron multiplying charge coupled device: EMCCD) 카메라 (이볼브(Evolve) 512, 포토메트릭스 (Photometrics), 아리조나주 투슨)를 사용하여 기록된, 형광 또는 형광 표지된 입자의 궤도를 분석함으로써 입자 수송률을 측정하였다. 주문 제작한 챔버 슬라이드에서 실험을 수행하였고, 여기서 희석된 입자 용액 (0.0082% wt/vol)을 20 μ L의 새로운 점액에 3% v/v (최종 입자 농도, 8.25×10^{-7} wt/vol)의 최종 농도로 첨가하고 현미경 검사 전에 실온에서 안정화시켰다. $n \geq 100$ 입자의 궤도를 각각의 실험에 대해 분석하고, 각각의 조건에 대해 3개 이상의 독립 실험을 수행하였다. 20 s 동안 66.7 ms의 시간 해상도에서 메타모프 소프트웨어

어 (유니버설 이미징, 위스콘신주 글렌데일)를 사용하여 무비를 캡처하였다. 추적 해상도는, 강한 부착제로 부동화된 입자의 변위를 추적함으로써 결정된 바와 같이, 10 nm이었다. 나노입자 무게중심(centroid)의 배위를 시간-평균낸 MSD로 변환시켰고, 이는 $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = [x(t+\tau) - x(t)]^2 + [y(t+\tau) - y(t)]^2$ (여기서 x 및 y는 소정의 시간에서 나노입자 배위를 나타내고 τ 는 시간 척도 또는 시간 지체(time lag)이다)로서 계산되었다. MSD 및 유효 확산도의 분포를 이 데이터로부터 계산하였다. 픽의 제2 법칙 및 추적 실험으로부터 수득된 확산 계수를 사용하여 점액층으로의 입자 관통을 모델링하였다.

[0239] 실시예 7

[0240] 본 실시예는 마우스 질의 점막 표면에 약물 전달을 개선시키는 점액-관통 입자의 개발을 기재한다.

[0241] 질에 지속되고 더 균일한 약물 전달을 위한 개선된 방법은 여성의 건강에 영향을 주는 병태, 예컨대 자궁경부암, 박테리아성 질염, 및 성감염(sexually transmitted infection)의 더 효과적인 예방 및 치료를 제공할 수 있다. 예를 들어, 여성은, 부분적으로 여성-제어된 예방법의 결여로 인해, HIV에 불균형적으로 감염된다. 질 HIV 전염(transmission)에 대해 여성을 보호하기 위한 용이하게 투여된, 신중한, 및 효과적인 방법은 전세계적으로 수백만의 감염을 예방할 수 있을 것이다. 그러나, 성교 및 출산 동안 확장을 도모하는, 질 주름, 또는 "점막 주름"은, 전형적으로 복강내압에 의해 접어지고(collapse), 이는 이들 주름의 표면이 약물 및 약물 담체에 덜 접근하도록 한다. 심지어 모의된 성교 후에도 질 주름 내로의 불량한 분포는, 감염으로부터 감수성인(susceptible) 질 표면을 보호하지 못하는 중대한 인자로서 인용되어 왔다. 전체 감수성 표적 표면에 걸친 분포는 감염을 예방 및 치료하는데 중요한 것으로 입증되어 있다. 게다가, 사용자의 수용성을 증가시키기 위해, 질에 전달되는 약물은 장기간 동안에 걸쳐 유효 농도로 질관에 보유되어야 한다. 지속된 국소 약물 농도를 달성하는 것은 도전 과제인데, 그 이유는 질 상피는 소분자에 매우 투과성이고 또한 가용성 약물 투여 형태(겔, 크림)는 복강내압 및 보행에 의해 배출될 수 있기 때문이다. 마지막으로, 약물 전달 방법은 안전하고 질 상피에 무독성이어야 한다. 질 투여 형태의 분포, 체류, 및 안전성 프로파일은 효능의 상당한 증가 및 자궁경 질 감염 및 질환에 대해 주로 무효한 전신 치료에 의해 유발된 부작용의 감소를 야기할 수 있다.

[0242] 나노입자는 질에 지속된 국소 약물 전부를 제공하는 그의 능력으로 인해 상당히 주목받아왔다. 그러나, 질 상피를 코팅하는 점액층은 질관에서 균일한 분포 및 장기간 체류를 달성하는 장벽으로서 존재한다. 점액은 부착 및 입체 상호작용 둘 다를 통해, 종래의 중합체 나노입자 (CP)를 포함한 대부분의 미립자를 효율적으로 포착한다. 점액이 외인성 병원체 및 미립자를 포착하는 효율성은, CP가 내강 점액층(lumenal mucus layer)과 접촉시 즉시 포착될 것이고, 이는 점막 주름으로의 진입, 및 따라서 보호를 방지함을 의미한다. 표재성 내강 점액층에 포착된 입자 및 병원체는 조직으로부터 신속히 클리어런스될 것으로 예상되고, 이는 CP와 같은 점막부착성 물질의 체류 시간을 제한한다.

[0243] 점액 장벽을 관통하기 위해 진화된 바이어스를 모방함으로써, 점액-관통 입자 (MPP)는 최근 CP를 유난히 높은 밀도의 낮은 분자량 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)로 코팅함으로써 점막 약물 전달을 위해 가공되었다. MPP는 물을 통한 그의 이론상 확산과 필적하는 속도로 인간 자궁경질의 점액 (CVM)을 통해 확산한다. 여기서, MPP가 점막 주름에서 더 서서히 클리어런스된 점액을 포함한, 가장 깊은 점액층으로 관통하고, 그로 인해 효율적인 조직 흡수를 위한 최적의 위치에 약물을 방출함으로써 생체내 질내에서 향상된 분포 및 증가된 체류를 제공할 것이라는 가설을 시험하고자 하였다 (도 14E). 통상의 프로게스트인-유도된 발정 간기(diestrus phase) (DP) 마우스 모델 이외에도, 에스트라디올-유도된 발정기 (IE) 마우스 모델의 사용을 도입하고, 여기서 마우스 CVM (mCVM)은 인간 CVM (hCVM)을 더 가까이 모방하고, 따라서, 인간의 사용을 위해 MPP를 개발하고 변환시키기 위한 더 인간-유사 모델을 제공한다.

[0244] 카르복실산-코팅된, 형광 폴리스티렌 나노입자 (PS-COOH)를, 이전에 보고된 바와 같이 (문헌 [Y. Y. Wang, S. K. Lai, J. S. Suk, A. Pace, R. Cone, J. Hanes, Angew Chem Int Ed Engl 47, 9726-9729 (2008)]; [S. K. Lai, D. E. O'Hanlon, S. Harrold, S. T. Man, Y. Y. Wang, R. Cone, J. Hanes, Proc Natl Acad Sci U S A 104, 1482-1487 (2007)]), 저 분자량 PEG의 치밀 코팅물을 공유적으로 부착시킴으로써 MPP로 제조하였다. 게다가, 생체분해성 MPP (BD-MPP)는, 이전에 보고된 바와 같이 (문헌 [M. Yang, S. K. Lai, Y. Y. Wang, W. Zhong, C. Happe, M. Zhang, J. Fu, J. Hanes, Biodegradable Nanoparticles Composed Entirely of Safe Materials that Rapidly Penetrate Human Mucus. Angew Chem Int Ed Engl 50, 2597-2600 (2011)]), 폴리(락트-코-글리콜산) (PLGA) 코어 및 물리적으로 흡착된 PEG 코팅물로 제제화되는데, 그 이유는 생체분해성 입자는 약물로 로딩될 수 있고 인간에게 투여하기에 적합하기 때문이다. PS-COOH 및 PLGA 나노입자는 고도로 음성인 표면 전하를 갖고, 이는 PEG로 치밀 코팅되는 경우 거의 중화된다. 나노입자는 이전에 기재된 바와 같이 (문헌 [S. K. Lai,

D. E. O'Hanlon, S. Harrold, S. T. Man, Y. Y. Wang, R. Cone, J. Hanes, Proc Natl Acad Sci U S A 104, 1482-1487 (2007)]), 제타 전위를 측정함으로써 잘-코팅되는 것으로 결정되었다 (표 12). -10 mV보다 더 중성인 제타 전위는 hCVM 중에서 점액-관통 특성에 필수적인 것으로 이전에 밝혀졌다 (문헌 [Y. Y. Wang, S. K. Lai, J. S. Suk, A. Pace, R. Cone, J. Hanes, Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that "slip" through the human mucus barrier. Angew Chem Int Ed Engl 47, 9726-9729 (2008)]). MPP가 천연(native) 발정기 mCVM에서 점액-관통인 것을 보장하기 위해, 입자를 발정기 마우스에게 질내 투여하였다. 그 다음 전체 질을 절제하고 개방하여 수백의 개별 입자의 이동을 다중 입자 추적 (MPT) 방법으로 가시화하였다 (문헌 [J. Suh, M. Dawson, J. Hanes, Adv Drug Deliv Rev 57, 63-78 (2005)]). MPP에 관한 입자 궤도는 mCVM에서 물기가 많은 구멍을 통한 신속 확산의 징표가 되었으며, 한편 코팅되지 않은 PS-COOH 나노입자 (CP)의 이동은 입자 직경 (~100 nm)보다 작았다 (도 14A). mCVM에서 MPP의 앙상블 평균낸 평균 제곱 변위 (<MSD>)는 hCVM에서 MPP에 대해 보고된 것 (문헌 [S. K. Lai, Y. Y. Wang, K. Hida, R. Cone, J. Hanes, Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. P Natl Acad Sci USA 107, 598-603 (2010)])과 필적하는 것으로 밝혀졌으며 (도 14B), 수 중 110 nm 입자의 이론상 확산 (~4 $\mu\text{m}^2/\text{s}$)보다 단지 ~8배 더 느린 앙상블 평균낸 유효 확산도 (<Deff>)에 상응한다.

표 12

입자 특성화. 모든 입자 제제에 대한 크기, 제타 전위 및 다분산 지수.

입자 유형	크기 (nm)	ζ 전위 (mV)	PDI
PSPEG (MPP)	112 \pm 3	-4.2 \pm 0.6	0.03
PS (CP)	87 \pm 4	-39.0 \pm 2.4	0.10
PLGA/F127 (BD-MPP)	152 \pm 6	-4.2 \pm 0.3	0.06
PLGA/PVA (BD-CP)	161 \pm 15	-6.7 \pm 0.1	0.06
ACVp-MPP	65.3 \pm 10	-6.3 \pm 1.0	0.37

[0245]

[0246]

개별 입자에 대한 측정된 D_{eff} 를 기반으로, 픽의 확산 제2 법칙으로 MPP의 약 절반은 약 4 h 후 mCVM의 100 μm -두께 층을 확산할 것이며 (도 14D), 한편 심지어 24 h 후에도 CP에 의해 어떤 인식가능한 관통도 없을 것으로 평가되었다. 1 s의 시간 척도에서 CP에 관한 D_{eff} 값은 입자 직경보다 작은 MSD 값에 상응하였으며 (점선, 도 14C), 이는 아마도 입자 확산이 아니라 미신 섬유에 부착하는 입자의 열 변동을 나타낸다. 전반적으로, 발정기 mCVM에서 MPP 및 CP 둘 다의 수송 거동은 hCVM에서 그의 수송 거동과 매우 유사하였다.

[0247]

체류 연구에 관한 발정기에서 마우스의 다수의 동기화(synchronizing)는 호르몬 치료를 필요로 했다. 입자 수송 거동을 IE 마우스에서 시험하여 에스트라디올 처리 (통상적으로 많은 동물 모델에서 발정-유사 거동을 유도 하는데 사용되어 옴) (문헌 [J. R. Ring, The estrogen-progesterone induction of sexual receptivity in the spayed female mouse. Endocrinology 34, 269-275 (1944)]; 및 [C. A. Rubio, The exfoliating cervico-vaginal surface. II. Scanning electron microscopical studies during the estrous cycle in mice. Anat Rec 185, 359-372 (1976)])는, 분포 및 체류 연구 이전에 MPP 및 CP 수송을 변경시키지 않았다는 것 (도 15 A)을 확인하였다. 게다가, BD-MPP 수송 거동은 IE 점액에서의 MPP와 구분이 안 되었다 (도 15B).

[0248]

그 다음, 발정기 마우스 및 IE 마우스에서 점액을 신속히 관통하는 능력이 CP와 비교하여 MPP의 더 신속하고 균일한 질 분포를 야기할 것인지를 조사하였다. MPP 및 CP를 저장성 매질에 적용하여 삼투압적으로 구동된 물의 유동 (이류 수송(advective transport))이 소장 내강에서 술 가장자리 상피 표면으로 영양분을 신속히 수송하는 방식을 모방하였다. 입자 투여 후 10분에, 전체 질을 절개해 내고 세포 핵을 염색하였다. CP는 내강 점액에서 응집되었고 질 점막 주름 (도 16)을 관통하지 않았다. 그에 반해서, MPP는 점막 주름의 모든 표면을 포함한, 전체 질 상피를 코팅한 연속 입자 층을 형성시켰다. MPP는 이들이 점액을 통해 그 거리를 확산하는데 걸릴 ~4 시간과 비교하여 10분 이내에 이류를 통해 ~100 μm 초과로 점액을 관통하였다 (도 14D). 이러한 거동은 또한 IE 마우스에 투여된, BD-CP 및 BD-MPP, 및 CP 및 MPP에 일치되었다 (도 16). hCVM을 통한 MPP의 운동이 점막-부착성 CP를 통과하는 것을 예시하는 비디오는 비디오 1 (유도 없음, 확산) 및 비디오 2 (유동과 함께, 이류)에서 발견될 수 있다.

[0249]

MPP 및 CP의 분포의 차이를 정량화하기 위해, 새로이 절제되고, 개방되고, 평탄화된 마우스 질 조직으로부터 형광 영상을 획득하였다. 도 17에 나타난 바와 같이, 내강 질 점액층에 대한 CP의 부착은 점액의 "스트라이프

(stripe)"를 창출하였고, 여기서 입자는 입자 없이 점액의 암(dark) "스트라이프"와 교대로 나타났고, 후자는, 질 조직이 평탄화되는 경우 개방되는 점막 주름에 상응한다. 그에 반해서, 상피를 향하고 점막 주름 내로의 MPP의 수송은 평탄화된 질 표면 상에 연속 입자 코팅물을 창출시켰다 (도 17). 질 및 자궁경부 조직 상의 형광성의 정량화는 평탄화된 질 표면의 88% 및 자궁경부의 87%가 MPP로 치밀하게 코팅되었으며, 한편 질 표면의 단지 30% 및 자궁경부 표면의 36%는 CP로 코팅된 것으로 나타났다. 질 및 자궁경부 표면의 더 어두운 영역의 더 높은 배율에서 추가 검사시, MPP의 연속의 덜 농축된 코팅물이 나타났으며 (도 17-18, 삽도), 이는 질 및 자궁경부 상피의 거의 완전한 커버리지가 있음을 의미한다. CP의 경우, 덜-농축된 코팅물이 더 높은 배율에서 발견되지 않았다 (도 17-18, 삽도). 85% 질 커버리지 및 86% 자궁경부 커버리지로 BD-MPP 사용시, 뿐만 아니라 31% 질 커버리지 및 27% 자궁경부 커버리지로 BD-CP에서 유사한 경향이 발견되었다 (도 17-18).

[0250] 그 다음, BD-MPP의 개선된 분포가 겔 투여 형태와 비교하여 소분자의 전달을 개선시킬 수 있는지를 결정하고자 하였다. 친유성 분자는 이들이 접촉하는 제1 표면에 진입하여, 점막 주름에서 세포와 접촉하지 못할 개연성이 있다. 정반대로, 친수성 분자는 질 상피를 통해 신속히 확산하고 혈액 및 림프 순환에 의해 운반되어 제거되어 짧은 기간의 커버리지를 야기할 수 있다. BD-MPP에 형광, 수용성 소분자, 플루오레세인 이소티오시아나이트 (FITC)를 모델 약물 (FITC/MPP)로서 로딩하였다. 종래의 질 전달을 모방하기 위해, 가용성 FITC (FITC/겔)을 범용 질 위약 겔 히드록시에틸셀룰로스 (HEC)에 투여하였다. 발정기 마우스에게 투여 후 24시간에, 질 조직을 절제하고 평탄화하여 질 주름을 노출시켰다. FITC의 패치는 FITC/겔로서 투여시 질 표면의 42%를 코팅하였으며, 한편 FITC/MPP는 입자 투여 후 심지어 24 h에도 질 표면의 87%의 잘-보유된 FITC 코팅물을 제공하였다 (도 22).

[0251] 점액 장벽의 효과를 추가로 특성화하기 위해, 본 발명자들은 입자 투여 이전에 세척에 의해 질 점액을 제거하는 것 (문헌 [Y. Cu, C. J. Booth, W. M. Saltzman, In vivo distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. Journal of Controlled Release 156, 258-264 (2011)]; 및 [K. A. Woodrow, Y. Cu, C. J. Booth, J. K. Saucier-Sawyer, M. J. Wood, W. M. Saltzman, Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA. Nat Mater 8, 526-533 (2009)])이 CP 분포를 현저히 개선시켰으며, 이는 그의 점막부착성 특성이 질 내에 균일한 분포를 저지함을 나타낸다 (도 19).

[0252] 그 다음, 본 발명자들의 IE 모델을 사용하여 점막부착성 CP와 비교하여 MPP의 질 체류를 결정하고자 하는 것이었다. 형광 MPP 및 CP를 IE 마우스에 질내 투여하였다. 특정된 시점에서, 전체 생식 기관 (질 및 자궁각)을 절제하고 형광 영상화로 정량적으로 분석하였다 (도 21A). MPP 및 CP에 관해 유사한 입자 형광성의 초기 감소 후 (아마도 점액 관통에 선행하는 초기 "스퀴즈 아웃(squeeze out)"으로 인한 것), 나머지 양의 MPP가 대략 60%로 일정하게 유지되었다 (도 21B). 그에 반해서, CP의 양은 10%로 시간이 흐름에 따라 꾸준히 감소되었다 (6 h). 중요하게는, 비록 CP가 질의 길이를 따라 분포되었긴 하지만, 이러한 세로 커버리지는 도 16에 나타낸 바와 같이, CP가 점액을 관통하여 상피에 이르는 것을 나타내지도 않고, 질 주름 내부에 표면에 이르는 것도 나타내지 않는다.

[0253] 면역계는 점막 표면 (문헌 [O. P. Mestecky J, McGhee JR, and Lambrecht BN, Mucosal Immunology. (Elsevier Academic Press, Burlington, ed. Third, 2005)]), 특히 생체 세포, 예컨대 인간의 자궁경관내막의 원주 상피로 커버된 표면을 갖는 것들에서 고도로 활성화이다. 나노입자의 염증 작용을, 데포-프로베라(Depo-Provera), 발정 간기 (이 동안, 질 상피는 얇아지고 생체 세포로 커버된다)에서 마우스를 동기화하는 장시간 작용성 프로게스틴 처리로, 예비-처리된 마우스를 사용하여 조사하였다. 그에 반해서, 발정기에서, 마우스 질은 4 내지 7개의 세포층 내지 약 12개의 세포층으로 두꺼워지고 상피 표면은 사멸 및 사멸하는 세포의 많은 층으로 보호된다 (문헌 [Biology of the laboratory mouse. Edited by George D. Snell. Dover Publications, Inc., New York, 1956 (Reprint of first edition, 1941)]. [Journal of the American Pharmaceutical Association 45, 819-819 (1956)]). 게다가, 프로게스틴-유도 발정 간기 (DP) 마우스의 질 상피는 증가된 면역 세포 집단을 갖고, 이는 향상된 급성 염증 반응을 야기하며; 한편 발정기는 면역 세포의 부재를 특징으로 한다 (문헌 [C. H. Hubscher, D. L. Brooks, J. R. Johnson, A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. Biotech Histochem 80, 79-87 (2005)]). 데포-프로베라는 수일 내지 수주 동안 발정 간기-유사 상태에 마우스를 동기화하고, 이는 실험이 24 h 이상 동안 지속하는데 중요하다.

[0254] 표준 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색을 사용하여 질내 투여된 나노입자의 잠재적 독성 효과를 조사하였다. 논옥시놀-9 (N9), 질 독성을 유발하는 것으로 공지된 비이온성 세정제 (문헌 [G. Ramjee, A. Kamali, S. McCormack, The last decade of microbicide clinical trials in Africa: from hypothesis to facts. AIDS 24

Suppl 4, S40-49 (2010))를, 양성 대조군으로서 사용하였고, PBS (식염수)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 분포 및 체류 연구에 사용된 동일 (BD-) MPP 및 (BD-) CP를 독성에 대해 시험하였다. 예상된 바와 같이, N9는 PBS 처리 후에는 나타나지 않았던 24 h에서 급성 염증을 유발하였다 (도 23). CP, 예컨대 N9는, 내강으로의 확산 호중구 침윤을 유발하였으나, MPP는 이러한 염증 작용을 유발하지 않았다 (도 23, 화살촉).

[0255] 최근 연구에 의하면 특정 질용 제품에 반응하여, 질 상피가 성감염에 대한 감수성을 향상시킬 수 있는 면역 매개체를 분비할 수 있는 것으로 나타나 있다 (문헌 [J. E. Cummins, Jr., G. F. Doncel, Biomarkers of cervicovaginal inflammation for the assessment of microbicide safety. *Sex Transm Dis* 36, S84-91 (2009)]; 및 [S. S. Wilson, N. Cheshenko, E. Fakioglu, P. M. Mesquita, M. J. Keller, B. C. Herold, Susceptibility to genital herpes as a biomarker predictive of increased HIV risk: expansion of a murine model of microbicide safety. *Antivir Ther* 14, 1113-1124 (2009)]). 따라서, 질용 제품이, 특히 반복 투여 후, 이러한 면역 반응을 유도하지 않는 것은 중요하다. 본 발명자들의 궁극적인 목표는 HSV-2에 대한 보호를 위해 MPP를 시험하는 것이었기 때문에, 아시클로비르 모노포스페이트 (ACVp)를 함유하는 MPP 제제를 최근 테노포비르 임상 시험에서 사용된, N9, HEC 위약 겔, PBS, 및 겔 비히클 (TFV 비히클)과 비교하였다. 나노입자 및 대조군 제제를 7일 동안 매일 데포 프로베라-처리된 마우스에게 질에 투여하였다. 각 마우스로부터 제 8일에 질 세척물을 수집하고 상피 자극에 반응하여 상승된 것으로 밝혀진 시토카인에 대해 평가하였다: 인터류킨 1 β (IL-1 β), 인터류킨 1 α (IL-1 α), 종양 괴사 인자 α (TNF- α), 및 인터류킨 6 (IL-6). IL-1 α 및 IL-1 β 수준 둘 다 TFV 비히클 및 N9 용액 둘 다에 반응하여 향상된 것으로 밝혀졌다 (도 24). 이것은 IL-1 α 및 IL-1 β 가 손상에 반응하여 질 상피에 의해 분비된다는 것을 고려하면, N9 처리의 경우에 놀랄만한 것은 아니었다 (문헌 [J. E. Cummins, Jr., G. F. Doncel, Biomarkers of cervicovaginal inflammation for the assessment of microbicide safety. *Sex Transm Dis* 36, S84-91 (2009)]). 그에 반해서, ACVp-MPP와 연관된 시토카인 수준은 HEC 위약 겔과 연관된 수준과 등가이었다 (도 24) (이는, 감염에 감수성에서 어떤 연관된 증가 없이 임상 시험에서 사용되어 왔다) (문헌 [Q. A. Karim, S. S. A. Karim, J. A. Frohlich, A. C. Grobler, C. Baxter, L. E. Mansoor, A. B. M. Kharsany, S. Sibeko, K. P. Mlisana, Z. Omar, T. N. Gengiah, S. Maarschalk, N. Arulappan, M. Mlotshwa, L. Morris, D. Taylor, C. T. Grp, Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women. *Science* 329, 1168-1174 (2010)]; 및 [D. Tien, R. L. Schnaare, F. Kang, G. Cohl, T. J. McCormick, T. R. Moench, G. Doncel, K. Watson, R. W. Buckheit, M. G. Lewis, J. Schwartz, K. Douville, J. W. Romano, In vitro and in vivo characterization of a potential universal Placebo designed for use in vaginal microbicide clinical trials. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21, 845-853 (2005)]). 비처리 대조군과 비교하여 임의의 질 처리와 연관된 IL-6 또는 TNF- α 중 어느 하나의 어떤 검출가능한 상승이 없었다.

[0256] 마지막으로 MPP의 개선된 분포, 체류, 및 독성 프로파일은 마우스에서 질 HSV-2 시험감염에 대해 개선된 보호를 유발할 것인지에 대해 조사하였다. 데포 프로베라 처리는 감염에 대한 마우스의 질 감수성을 현저히 증가시키고, 후보 살미생물제는, 심지어 감염 접종물 직전에 투여된 경우에도, 여기서 사용된 마우스 모델에서 단지 부분적 보호를 제공하였다 (문헌 [S. L. Achilles, P. B. Shete, K. J. Whaley, T. R. Moench, R. A. Cone, Microbicide efficacy and toxicity tests in a mouse model for vaginal transmission of Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Dis* 29, 655-664 (2002)]; 및 [L. Zeitlin, K. J. Whaley, T. A. Hegarty, T. R. Moench, R. A. Cone, Tests of vaginal microbicides in the mouse genital herpes model. *Contraception* 56, 329-335 (1997)]). 더욱이, 몇몇 질용 제품 부형제는 실제로 이 모델에서 감염에 대한 감수성을 증가시킨다 (문헌 [R. A. Cone, T. Hoen, X. Wong, R. Abusuwwa, D. J. Anderson, T. R. Moench, Vaginal microbicides: detecting toxicities in vivo that paradoxically increase pathogen transmission. *BMC Infect Dis* 6, 90 (2006)]; 및 [T. R. Moench, R. J. Mumper, T. E. Hoen, M. Sun, R. A. Cone, Microbicide excipients can greatly increase susceptibility to genital herpes transmission in the mouse. *BMC Infect Dis* 10, 331 (2010)]). HSV-2 감염의 질 전염을 차단하기 위해 ACVp를 시험하는 것을 선택하였는데, 그 이유는 아시클로비르가 매일 반복 투여 다수회로 동물에게 바이러스 억제제를 제공하기 때문이다 (문헌 [E. R. Kern, Acyclovir Treatment of Experimental Genital Herpes-Simplex Virus-Infections. *Am J Med* 73, 100-108 (1982)]). 그러나, 기니아 피그에서 50 mg/mL (5%) ACVp로 단일의 질 예비처리의 결과 대조군과 비교하여 70%의 동물이 감염되었다 (문헌 [E. R. Kern, J. Palmer, G. Szczech, G. Painter, K. Y. Hostetler, Efficacy of topical acyclovir monophosphate, acyclovir, or penciclovir in orofacial HSV-1 infections of mice and genital HSV-2 infections of guinea pigs. *Nucleos Nucleot* 19, 501-513 (2000)]). 따라서, ACVp는, MPP가 단일 적용 후 치료 관련 약물 농도를 연장시킴으로써 수용성이고 신속히 대사된 약물에 의한 보호를 상당히 개선

시킬 수 있는지를 결정하는 시험 사례를 제공하였다. 게다가, 뉴클레오티드 유사체, 예컨대 ACVp의 작용의 메카니즘은, 세포내 바이러스 복제의 예방이고, 따라서 성공적인 보호는 질 및 자궁경부 점막에서 감수성 표적 세포 집단에서의 효율적인 흡수 및 체류를 의미하게 된다.

[0257]

ACVp 나노입자를 모든 다른 연구를 위해 사용된 동일한 점막-불활성 코팅물로 제제화하였다. ACVp-MPP의 크기 및 ζ -전위는 폴리스티렌 (PS)-기반 MPP와 유사하였다 (표 12). HSV-2로 시험감염 이전 30분에 가용성 ACVp 또는 ACVp-MPP를 마우스의 질에 투여하였다. ACVp-MPP (1 mg/mL)과 동일 농도에서 투여된 가용성 약물은 바이러스 감염으로부터 마우스를 보호하는데 무효하였으며 (대조군의 88.0%와 비교하여 84.0% 감염됨), 한편 ACVp-MPP 군에서 단지 마우스의 46.7%가 감염되었다 (표 11). ACVp-MPP의 농도의 10배로 가용성 약물이 제공된 마우스의 군은 62.0% (PBS 중 약물) 또는 69.3% (물 중 약물)의 비율로 여전히 감염되었다. 가용성 약물을 동일 비히클 (순수한 물) 중 ACVp-MPP와 비교하면, 가용성 약물은 ACVp-MPP보다 심지어 10배 더 높은 농도에서도 상당히 덜 보호적이었다 (표 11). 질 점막 표면에서 나노입자의 분포 및 체류 및 반복 투여의 효과를 연구하기 위해, 생후 6-8주 CF-1 마우스 (할란(Harlan))를 사용하였다. 마우스를 역 광주기 시설 (12 h 명/12 h 암)에 수용하였다. 자연발생 주기 발정을 위해, 마우스를 외부 발정 출현에 대해 선택하고 절개시 확인하였다 (문헌 [A. K. Champlin, D. L. Dorr, A. H. Gates, Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. Biol Reprod 8, 491-494 (1973)]; [E. Allen, The oestrous cycle in the mouse. American Journal of Anatomy 30, 297-371 (1922)]). 호르몬에 의해 유도된 발정 (IE)을 위해, 마우스를 3주 동안 순응시키고 실험 이전 2일에 100 μ g의 17- β 에스트라디올 벤조에이트 (시그마(Sigma))를 피하 주사하였다. 수많은 연구에서 에스트라디올을 사용한 치료가 유사한 상피 특징 및 질 세포 집단을 갖는 "발정-유사" 상태를 유도하는 것으로 입증되었다 (문헌 [C. G. Rosa, J. T. Velardo, Histochemical localization of vaginal oxidative enzymes and mucins in rats treated with estradiol and progesterone. Ann N Y Acad Sci 83, 122-144 (1959)]; [C. A. Rubio, The exfoliating cervico-vaginal surface. II. Scanning electron microscopical studies during the estrous cycle in mice. Anat Rec 185, 359-372 (1976)]; [A. E. Gillgrass, S. A. Fernandez, K. L. Rosenthal, C. Kaushic, estradiol regulates susceptibility following primary exposure to genital herpes simplex virus type 2, while progesterone induces inflammation. Journal of Virology 79, 3107-3116 (2005)]). 질 독성 및 시토키인 방출을 위해, 마우스에게 2.5 mg의 데포-프로베라 (메드록시프로게스테론 아세테이트, 150 mg/mL) (파마시아 앤 업존 컴퍼니(Pharmacia & Upjohn Company))를 실험 이전 7일에 피하 주사하였다.

[0258]

물을 모든 입자 용액을 위한 저장성 매질로서 사용하였다. 생체의 추적을 위해, 5 μ L의 입자를 질내 투여하였다. 대략 10분 후, 질을 제거하고 조심스럽게 슬라이싱하여 개방하여 평탄하게 놓았다. 커버 슬립이 최상부에 놓여져 조직이 변형됨이 없이 점액과 접촉하도록 전체 조직을 주문 제작한 작제된 웰에 놓았다. 웰은 표준 유리 슬라이드에 부착된 전기 테이프의 3층으로부터 절단된 대략 1 mm \times 0.5 mm의 직사각형이었다. 커버 슬립을 가장자리 주위를 초강력 접착제로 밀봉하고 건조를 방지하기 위해 즉시 영상화하였다.

[0259]

마우스를 경추 탈구에 의한 희생을 포함하여, 실험 절차 이전에 마취시켰다. 모든 실험을 위해, 복부 주위에 약한 접착 테이프의 고리(collar)에 의해 마우스가 자기-털손질(self-grooming)을 하지 못하게 하고 개별 케이지에 수용함으로써 상호-털손질(inter-grooming)을 하지 못하게 했다.

[0260]

중래의 점막부착성 입자 (CP)용으로, 100 nm 크기의 형광, 카르복실 (COOH)-개질된 폴리스티렌 (PS) 나노입자 (몰레큘라 프로브즈(Molecular Probes))를 사용하였다. 이들 입자는 중성 pH에서 음으로 하전된 표면을 특징으로 한다 (표 12). 점액-관통 입자 (MPP)를 제조하기 위해, 표준 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 커플링 반응을 통해 5-kDa 아민-개질된 PEG (크리에이티브 PEG웍스(Creative PEGworks))로 CP를 공유적으로 개질시켰다. 입자 크기 및 ζ -전위를 제타사이저 나노(Zetasizer Nano) ZS90 (맬번 인스트루먼트즈(Malvern Instruments))을 사용하여 동적 광 산란 및 레이저 도플러 풍속측정법 각각에 의해 결정하였다. 크기 측정은 90°의 산란 각에서 25°C에서 수행하였다. 샘플을 10 mM NaCl 용액 (pH 7)에 용해시키고 기기 사용설명서에 따라 측정을 수행하였다. 레이저 도플러 풍속측정법에 의해 측정된 거의-중성의 ζ -전위를 사용하여 PEG 접합을 확인하였다.

[0261]

생체분해성 입자용으로는, PLGA산 2A (50:50 레이크쇼어 바이오머테리얼즈(Lakeshore Biomaterials)), 루트론 F127 (BASF), 및 폴리(비닐 알콜) (PVA 25 kDa, 폴리사이언시스(Polysciences))를 사용하였다. 알렉사 플루오르 555를 PLGA에 화학적으로 접합시키고, 이를 이전에 기재된 바와 같이 나노침전에 의해 나노입자를 제조하였다 (문헌 [M. Yang, S. K. Lai, Y. Y. Wang, W. Zhong, C. Happe, M. Zhang, J. Fu, J. Hanes, Biodegradable Nanoparticles Composed Entirely of Safe Materials that Rapidly Penetrate Human Mucus. Angew Chem Int

Ed Engl 50, 2597-2600 (2011)). 간단히, 10 mg/mL의 표지된 PLGA를 아세톤 또는 THF에 (2 mg FITC와 함께 또는 없이) 용해시키고, 40 mL의 수성 계면활성제 용액에 적가하였다. 2 h 동안 교반 후, 입자를 5- μ m 시린지 필터를 통해 여과하고 원심분리에 의해 수집하고 (소르볼(Sorvall) RC-6+, 써모사이언티픽(ThermoScientific)) 세척하였다. 입자 크기 및 ξ -전위를 기재된 바와 같이 결정하였다.

[0262] 루트롤 F127을 함유하는 초순수 물에 ACVp를 용해시킴으로써 ACVp-MPP를 제조하였다. 아세트산아연을 5:1 ACVp:Zn의 몰비로 첨가하여, ACVp를 킬레이트화하고 이를 수불용성이 되게 한 다음, 즉시 급속 동결시키고 동결 건조시켰다. 입자 특성화를 복원 후에 수행하였다. 투여 이전에 초순수 물을 사용하여, 최종 농도 1 mg/mL ACVp 및 0.8 mg/mL 루트롤로 분말을 복원하였다. 가용성 ACVp를 필요한 경우 NaOH로 적정하여 pH 6-7에 이르렀다. 입자 크기 및 ξ -전위를 기재된 바와 같이 결정하였다.

[0263] 100X 유침용 대물렌즈 (개구수 1.3)가 장착된 도립 에피형광 현미경이 탑재된 규소-강화된 표적 카메라 (VE-1000, 데이지(Dage)-MTI)를 사용하여 생체의 질 조직 샘플에서 형광 입자의 궤도를 기록하였다. 20 s 동안 66.7 ms의 시간 해상도에서 메타모르프 소프트웨어 (유니버설 이미징 코퍼레이션(Universal Imaging Corp.))를 사용하여 무비를 캡처하였다. $n > 130$ 입자의 궤도를 각각의 실험에 대해 분석하였고, 상이한 마우스로부터의 조직을 사용하여 3개의 독립 실험을 수행하였다. 입자 무게중심의 배위를 시간-평균낸 평균 제곱 변위 (<MSD>)로 변환시켰고, 이는,

[0264]
$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = [x(t+\tau) - x(t)]^2 + [y(t+\tau) - y(t)]^2$$

[0265] (여기서 τ 는 시간 척도 (또는 시간 지체)이고, x 및 y 는 시간 t 에서 상응하는 입자 배위이고, Δr^2 는 MSD이다)로서 계산되었다. 이 방정식을 사용하여 입자 MSD 및 유효 확산도 (D_{eff})를, 이전에 입증된 바와 같이 계산하였다 (문헌 [S. K. Lai, D. E. O'Hanlon, S. Harrold, S. T. Man, Y. Y. Wang, R. Cone, J. Hanes, Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 1482-1487 (2007)]; [B. C. Tang, M. Dawson, S. K. Lai, Y. Y. Wang, J. S. Suk, M. Yang, P. Zeitlin, M. P. Boyle, J. Fu, J. Hanes, Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 19268-19273 (2009)]). 계산된 D_{eff} 값을, 이전에 기재된 바와 같이, 점액 판(mucus slab)을 통한 입자 관통의 모델링을 위해 사용하였다 (문헌 [B. C. Tang, M. Dawson, S. K. Lai, Y. Y. Wang, J. S. Suk, M. Yang, P. Zeitlin, M. P. Boyle, J. Fu, J. Hanes, Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 19268-19273 (2009)]).

[0266] 점액 제거에 의한 분포를 위해, 입자 투여 이전에, 마우스에게 50 μ L의 PBS와 함께 2 \times 질 세척물을 제공한 후 면봉(cotton-tipped applicator)으로 1회 스와빙하였다. 후속적으로, 5 μ L의 CP 또는 MPP 중 어느 하나를 질 내 투여하였다. 그 다음 전체 질을 제거하고 티슈-텍(Tissue-Tek) O.C.T. 화합물 (사쿠라 피넨텍 유 에스 에이 인크(Sakura Finetek U.S.A., Inc.))에서 동결시켰다. 마이크롬(Microm) HM 500 M 크리오스타트(Cryostat) (마이크롬 인터내셔널(Microm International))를 사용하여 조직의 길이를 따라 다양한 지점 (질구 및 자궁경부 사이)에서 가로 절개편(transverse section)을 수득하였다. 절개편의 두께를 6 μ m로 설정하여 단일 세포층 두께를 달성하였다. 그 다음 절개편을 프로롱 골드(ProLong Gold) (인비트로젠) 안티페이드(antifade) 시약과 DAPI로 염색하여 세포 핵을 가시화하고 입자 형광성을 유지하였다. 도립 형광 현미경으로 절개편의 형광 영상을 수득하였다. 나노입자 분포를 정량화하기 위해, 5 μ L의 CP 또는 MPP 중 어느 하나를 질 내 투여하였다. 10 분 이내에, 어떤 입자도 투여되지 않은 "블랭크(blank)" 조직을 포함한 질 조직을 세로로 슬라이싱하여 개방하고 2개의 유리 슬라이드 사이에 클램핑하여 초강력 접착제로 단단히 밀봉하였다. 이러한 절차로 조직이 완전히 평탄화되고 주름이 노출되었다. "블랭크" 조직을 사용하여 배경(background) 조직 형광 수준을 평가하여 취해진 모든 영상이 반드시 배경 수준을 훨씬 초과하게 하였다. 저배율의 6개의 형광 영상 및 고 배율의 1개 이상의 영상을 각각의 조직으로부터 취하였다. 영상을 역치(threshold)화하여 형광 신호 주위에 경계를 그은 다음, 커버된 영역을 이미지제이(ImageJ) 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 평균 커버리지를 각각의 마우스에 대해 결정한 다음, 이들 값을 $n \geq 3$ 마우스 군에 대해 평균냈다. 각각의 마우스로부터의 자궁경부를 자궁각으로부터 절단하고 생체의 입자 추적에 사용되는 동일한 주문 제작한 웰을 사용하여 탑재시켰다. 웰을 커버 슬립으로 밀봉하고 배경 형광 수준을 블랭크 조직을 사용하여 결정하였다. 거의 전체 자궁경부 표면을 구성하는 한 형광 영상을 조직 배경 수준 초과 저배율에서 취하였다. 이들 영상을 동일한 방식으로 역치화하여 입자로 커버된 영역을 결정하였다. 각각의 조직에 대해 1개 이상의 더 고배율의 영상을 취하여 개별 입자를 나타냈다.

- [0267] MPP 및 CP의 이류를 주문 모세관 셉업(custom capillary tube setup)을 사용하여 가시화하였다. 플랫폼 모세관(0.4 mm × 4 mm × 50 mm; 비트로콤(VitroCom))을 한 가닥의 유연한 플라스틱 배관(flexible plastic tubing)을 통해 1 mL 튜베르쿨린 시린지(벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))에 부착시켰다. 배관을 모세관의 한쪽 말단에 클램핑하고, 실리콘 그리스(silicone grease)를 사용하여 밀봉하였다. 시린지 및 배관에 식염수, 뒤이어 3% (v/v)의 ~500 nm 코팅되지 않은 (적색 형광) 및 PEG-코팅된 (녹색 형광) 폴리스티렌 비드(bead) (인비트로젠)와 혼합된 새로운, 희석되지 않은 인간 CVM을 로딩하였다. PEG-코팅된 비드를 마우스 연구에서 사용된 100 nm MPP에 대해 상기 기재된 바와 같이 제조하였다. 모세관을 충전하는데 대략 80 μ L의 점액이 필요했으며, 기포가 도입되지 않도록 주의를 기울였다. 모세관 내에서 MPP 및 CP의 이동을 나타내는 저속(time lapse) 비디오를, 인가된 압력과 함께 및 없이, 차이스 LSM 510 공초점 현미경 (칼 차이스 마이크로이미징 엘엘씨(Carl Zeiss MicroImaging, LLC)) 상의 40× 대물 렌즈를 사용하여 기록하였다.
- [0268] FITC 염료 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))를 티 모엔치(T. Moench) (리프로텍트(Reprotect))에 의해 호의적으로 제공된 HEC 겔 중 1 mg/mL에서 혼합하였다. 생체분해성 MPP를 기재된 바와 같이 제조하고, FITC 염료를 로딩하고 1% 루트룰 F127에 현탁시켰다. 분포를 평가하기 위해, 10 μ L의 겔 또는 입자 용액 중 어느 하나를 질내 투여하였다. 24 h 후, 질 조직을 제거하여 절단 개방하여 평평하게 놓았다. 그 다음 조직을 2개의 현미경 슬라이드 사이에 탑재시키고 스퀴징하여 점막 주름을 평탄화하였다. "블랭크" 조직을 포함시켜 질 조직으로부터 배경 자발형광을 결정하여, 사용된 노출 설정이 반드시 FITC 존재의 징표가 되도록 하였다. 평탄화 조직 표면 상의 염료 분포의 형광 영상을 2× 대물 렌즈가 장착된 니콘(Nikon) E600 도립 현미경을 사용하여 수득하였다. 이들 영상을 이미지제이를 사용하여 동일한 방식으로 역치화하여 커버리지 면적을 결정하였다
- [0269] 나노입자 체류를 평가하기 위해, 5 μ L의 적색 형광 CP 또는 MPP를 질내 투여하였다. 전체 자궁경질관을 0, 2, 4, 및 6 h에서 수득하고 표준 조직 배양 접시에 놓았다. 각각의 조건 및 시점에 대해, n > 7 마우스를 사용하였다. 크세논(Xenogen) IVIS 스펙트럼 영상화 장치 (캘리퍼 라이프 사이언시즈(Caliper Life Sciences))를 사용하여 조직의 형광 영상을 수득하였다. 크세논 리빙 영상(Xenogen Living Image) 2.5 소프트웨어를 사용하여 단위 면적당 형광 카운트의 정량화를 계산하였다.
- [0270] 5 μ L의 입자 또는 대조군 용액을 DP 마우스 모델에 질내 투여하였다. 24 h 후, 전체 자궁경질관을 수득하고 24 h 동안 4% 파라포름알데히드 용액 중에 고정시켰다. 조직을 70% 에탄올에 넣고 파라핀 포매 및 표준 H&E 염색을 위해 더 존스 홉킨스 표준 조직학 실험실(Reference Histology Laboratory)로 가져갔다.
- [0271] 20 μ L의 각각의 검사제를 칠 (7)일 동안 1일 1회 DP 마우스 모델에게 질내 투여하였다. HEC 겔 및 N9은 티 모엔치 (리프로텍트)에 의해 제공되었고, TFV 비히클 겔은 씨 데추티(C. Dezzutti) (유니버시티 오브 피츠버그(University of Pittsburgh))에 의해 호의적으로 제공되었다. 제8일에, 각각의 마우스를 50 μ L의 PBS로 2회 세척하였다. 각각의 세척 샘플을 추가 200 μ L의 PBS로 희석하고 원심분리하여 점액전(mucus plug)을 제거하였다. 상청액 (200 μ L)을 제거하고 4개 (IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , 및 IL-6)의 퀀티킨(Quantikine) ELISA 키트 (R&D 시스템즈 인크(Systems, Inc.) 각각에 대해 50 μ L로 나누었다. 제조업자의 사용설명서에 따라 ELISA를 수행하였다.
- [0272] 모든 데이터를 명시된 평균의 표준 오차 (SEM)를 사용한 평균으로서 제시하였다. 통계상 유의성을 부등 분산을 추정하는 양방적(two-tailed), 스튜던트 t 검정 ($\alpha = 0.05$)에 의해 결정하였다. HSV-2 시험감염의 경우에, 통계상 유의성을 피셔 정확 검정(Fisher's exact test), 양방적 분포를 사용하여 결정하였다.
- [0273] 여성 생식 기관은 광범위한 성감염에 감수성이다 (문헌 [R. Mallipeddi, L. C. Rohan, Nanoparticle-based vaginal drug delivery systems for HIV prevention. Expert Opin Drug Deliv 7, 37-48 (2010)]). 생물학적 취약성, 여성-제어된 예방법의 결여, 및 콘돔 사용을 협상하지 못하는 것은 모두 전세계적으로 남성에서 여성으로의 전염(male-to-female transmission)의 한 원인이 된다 (문헌 [R. Mallipeddi, L. C. Rohan, Nanoparticle-based vaginal drug delivery systems for HIV prevention. Expert Opin Drug Deliv 7, 37-48 (2010)]; [V. M. Ndesendo, V. Pillay, Y. E. Choonara, E. Buchmann, D. N. Bayever, L. C. Meyer, A review of current intravaginal drug delivery approaches employed for the prophylaxis of HIV/AIDS and prevention of sexually transmitted infections. AAPS PharmSciTech 9, 505-520 (2008)]). 질 HIV, HSV-2, 및 다른 바이러스 전염에 대해 여성을 보호하기 위한 용이하게 투여된, 신중한, 및 효과적인 방법은 전세계에 수백만의 감염을 예방할 수 있을 것이다. 11회의 성공하지 못한 살미생물제 시험후, 카프리스아(CAPRISA) 004는 겔 제제로 질 투여된 살미생물제 (테노포비르)로 HIV에 대해 부분적 보호를 입증한 최초의 것이었다 (문헌 [Q. A. Karim, S. S. A. Karim, J. A. Frohlich, A. C. Grobler, C. Baxter, L. E. Mansoor, A. B. M. Kharsany,

S. Sibeko, K. P. Mlisana, Z. Omar, T. N. Gengiah, S. Maarschalk, N. Arulappan, M. Mlotshwa, L. Morris, D. Taylor, C. T. Grp, Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women. *Science* 329, 1168-1174 (2010)]. 이전 세대의 살미생물제, 예컨대 N9와 현 세대의 살미생물제의 중요한 차이는 작용의 부위이다. 많은 현 세대 살미생물제, 예컨대 뉴클레오타이드 유사체 테노포비르 및 아시클로비르 모노포스페이트는 세포내에서 작용하여 바이러스 복제를 억제하며, 한편 이전 세대는 질 내강에서 병원체를 직접 불활성화시켰다. 그러나, 일부 이전 세대 살미생물제는 감염에 대한 감수성을 증가시킨 질 상피에 독성을 유발했다 (문헌 [O. J. D'Cruz, F. M. Uckun, Dawn of non-nucleoside inhibitor-based anti-HIV microbicides. *J Antimicrob Chemother* 57, 411-423 (2006)]).

[0274] 질 약물 전달을 최대 효율적으로 하기 위해, 국소 전달된 약물은 균일하게 분포되고, 충분히 높은 농도로 유지되고, 접혀진 질 상피 (점막 주름) 및 자궁경부 점막에 매우 인접하게 남아있어야 한다. 질 투여에 의하여 겔 및 약물의 분포를 관찰하기 위해 몇몇 기법, 예컨대 MRI (문헌 [C. K. Mauck, D. Katz, E. P. Sandefer, M. D. Nasution, M. Henderson, G. A. Digenis, I. Su, R. Page, K. Barnhart, Vaginal distribution of Replens and K-Y Jelly using three imaging techniques. *Contraception* 77, 195-204 (2008)]), 감마-신티그래피(gamma-scintigraphy) (문헌 [C. K. Mauck, D. Katz, E. P. Sandefer, M. D. Nasution, M. Henderson, G. A. Digenis, I. Su, R. Page, K. Barnhart, Vaginal distribution of Replens and K-Y Jelly using three imaging techniques. *Contraception* 77, 195-204 (2008)]; 및 [B. E. Chatterton, S. Penglis, J. C. Kovacs, B. Presnell, B. Hunt, Retention and distribution of two ^{99m}Tc-DTPA labelled vaginal dosage forms. *Int J Pharm* 271, 137-143 (2004)]), 질경검사 (문헌 [N. Poelvoorde, H. Verstraelen, R. Verhelst, B. Saerens, E. De Backer, G. L. dos Santos Santiago, C. Vervaet, M. Vanechoutte, F. De Boeck, L. Van Bortel, M. Temmerman, J. P. Remon, In vivo evaluation of the vaginal distribution and retention of a multi-particulate pellet formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 73, 280-284 (2009)]), 및 섬유 광학 (문헌 [C. K. Mauck, D. Katz, E. P. Sandefer, M. D. Nasution, M. Henderson, G. A. Digenis, I. Su, R. Page, K. Barnhart, Vaginal distribution of Replens and K-Y Jelly using three imaging techniques. *Contraception* 77, 195-204 (2008)])이 사용되어 왔다. 이들 기법은 질관을 따라 총 분포를 관찰하는데 적당하지만, 질 주름으로의 진입을 밝히지 못한다. 본 발명자들의 연구는, 비록 국소 처리가 질관을 따라 세로로 잘-분포될 수 있지만, 접힌 상피의 많은 부분이 비처리되고 보호되지 못한 채로 남을 수 있음을 입증한다. 이러한 비처리 표면은 임상 시험에서 HIV에 대해 몇몇 후보 살미생물제의 최근 실패의 한 원인이 될 수 있다 (문헌 [C. W. Hendrix, Y. J. Cao, E. J. Fuchs, Topical microbicides to prevent HIV: clinical drug development challenges. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 349-375 (2009)]). 게다가, 유체 또는 겔이 질에 투여되는 경우, 이는 신속히 세딩된(shed) 외측 내강 점액층과 직접 접촉한다. 점막부착성 입자, 예컨대 CP는 이러한 표재성 점액층에서 포착되고 그로 인해 점막 주름으로부터 배제된다. 그에 반해서, 본 발명자들은 MPP가 마우스 점막 주름으로 깊게 진입가능하고, 저장성으로 전달될 경우, 단지 10분 내에 상피의 완전한 커버리지를 제공할 수 있음을 입증하였다.

[0275] 입자의 확산은 이러한 균일한 상피 코팅물을 수분 내에 초래할 만큼 충분히 신속하지 않다. ~ 100 μ m에 걸친 확산은 약 수시간 걸릴 수 있다. 그러나, 질 상피는 삼투 구배에 의해 유도된 유체를 흡수하는 큰 능력을 갖는다. 점액 장벽을 통한 물의 흡수는 MPP가 이류에 의해 전체 상피 표면에 신속히 도달하는 것을 돕고, 여기서 약물 적재량(payload)이 최적 조직 흡수를 위해 방출될 수 있다. 그에 반해서, 물 흡수는 CP에 대해서는 유익하지 않은데, 그 이유는 이들은 부착적으로 포착되고 내강 점액에서 부동화되었기 때문이다 (비디오 2).

[0276] 질관에서 치료 활성 화합물의 불충분한 체류가 질 보호에 대한 또 다른 제한 인자이다. 예를 들어, 많은 질 살정제는 불과 1 h 동안 보호를 제공한다 (문헌 [L. J. D. Zaneveld, D. P. Waller, N. Ahmad, J. Quigg, J. Kaminski, A. Nikurs, C. De Jonge, Properties of a new, long-lasting vaginal delivery system (LASRS) for contraceptive and antimicrobial agents. *J Androl* 22, 481-490 (2001)]). 다른 질용 제품은 심지어 6 h 후에도 잘-보유되지 않으며 (문헌 [R. F. Omar, S. Trottier, G. Brousseau, A. Lamarre, G. Alexandre, M. G. Bergeron, Distribution of a vaginal gel (Invisible Condom) before, during and after simulated sexual intercourse and its persistence when delivered by two different vaginal applicators: a magnetic resonance imaging study. *Contraception* 77, 447-455 (2008)]; [N. Poelvoorde, H. Verstraelen, R. Verhelst, B. Saerens, E. De Backer, G. L. dos Santos Santiago, C. Vervaet, M. Vanechoutte, F. De Boeck, L. Van Bortel, M. Temmerman, J. P. Remon, In vivo evaluation of the vaginal distribution and retention of a multi-particulate pellet formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 73, 280-284 (2009)]; [B. E. Chatterton, S. Penglis, J. C. Kovacs, B. Presnell, B. Hunt, Retention and distribution of two ^{99m}Tc-

DTPA labelled vaginal dosage forms. *Int J Pharm* 271, 137-143 (2004)]), 적당한 보호를 위해 반복 투여를 필요로 한다. 유사하게, 90% 초과 CP가 6 h 이내에 질로부터 세팅되었는데, 그 이유는 이들이 점액층에 깊숙이 진입하지 않았기 때문이다. 그에 반해서, 제공된 MPP는, 겔 제제 중의 가용성 약물과 비교하여, 24 h 이상 동안 캡슐화된 모델 약물 (FITC)의 전달을 향상시켰다. 따라서, MPP는 성병에 대해 살미생물제와 같은 치료에 대해 강력한 1일 1회 국소 질 투여를 달성하기 위한 수단을 제공할 수 있다.

[0277] 질관에 대한 점막 약물 전달 시스템을 개발하기 위한 이전의 시도에서, 점액 장벽을 감소시키는 다양한 "예비처리"가 사용되어왔다. 점막부착성 전달 비히클의 투여 이전에, 유체 (문헌 [Y. Cu, C. J. Booth, W. M. Saltzman, In vivo distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. *J Control Release*, (10.1016/j.jconrel.2011.06.036)]; [K. A. Woodrow, Y. Cu, C. J. Booth, J. K. Saucier-Sawyer, M. J. Wood, W. M. Saltzman, Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticle densely loaded with small-interfering RNA. *Nat Mater* 8, 526-533 (2009)]; [T. Kanazawa, Y. Takashima, S. Hirayama, H. Okada, Effects of menstrual cycle on gene transfection through mouse vagina for DNA vaccine. *Int J Pharm* 360, 164-170 (2008)]; [T. Kanazawa, Y. Takashima, Y. Shibata, M. Tsuchiya, T. Tamura, H. Okada, Effective vaginal DNA delivery with high transfection efficiency is a good system for induction of higher local vaginal immune responses. *J Pharm Pharmacol* 61, 1457-1463 (2009)]), 스와브 (문헌 [K. A. Woodrow, Y. Cu, C. J. Booth, J. K. Saucier-Sawyer, M. J. Wood, W. M. Saltzman, Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA. *Nat Mater* 8, 526-533 (2009)]; [A. S. Kask, X. Chen, J. O. Marshak, L. Dong, M. Saracino, D. Chen, C. Jarrahan, M. A. Kendall, D. M. Koelle, DNA vaccine delivery by densely-packed and short microprojection arrays to skin protects against vaginal HSV-2 challenge. *Vaccine* 28, 7483-7491 (2010)]), 또는 분해 효소 (M. M. Seavey, T. R. Mosmann, Estradiol-induced vaginal mucus inhibits antigen penetration and CD8(+) T cell priming in response to intravaginal immunization. *Vaccine* 27, 2342-2349 (2009)])를 투여하는 것이 이들 연구에서 달성된 약물 또는 유전자 전달에 필수적이었던 것 같다. 여기서, 세척에 더하여 스와브 예비처리가 질에서의 CP의 분포를 현저히 개선시켰으며, 이로 인해 입자가 MPP와 유사하게 상피를 코팅하게 될 수 있음이 밝혀졌다 (도 19). 장벽-제거 예비처리는 인간에 사용하기에는 비현실적이고, 특히 성병을 예방하도록 의도된 살미생물제에는 부적절할 수 있다. 건강한 CVM 자체는 바이러스 감염에 대해 어느 정도 효과적인 장벽이다 (S. K. Lai, K. Hida, S. Shukair, Y. Y. Wang, A. Figueiredo, R. Cone, T. J. Hope, J. Hanes, Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J Virol* 83, 11196-11200 (2009))). 점액 장벽을 분해하거나 제거할 필요 없이 MPP를 사용함으로써 효과적인 상피 커버리지가 달성될 수 있는 것으로 나타났다.

[0278] PEG 코팅물은 면역계에 의해 용이하게 인식되지 않는 중합체 약물 담체를 개발하는데 있어서 널리 사용되어 왔다 (문헌 [B. C. Tang, M. Dawson, S. K. Lai, Y. Y. Wang, J. S. Suk, M. Yang, P. Zeitlin, M. P. Boyle, J. Fu, J. Hanes, Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19268-19273 (2009)]). 치밀 PEG 코팅물은 마우스 질관에서 염증을 유발함이 없이 점액을 신속히 관통하는 MPP를 초래하는 것이 입증되었다. 그에 반해서, 코팅되지 않은 CP의 투여는 N9의 투여와 유사한 급성 염증 반응을 초래하였다. 게다가, MPP의 매일 투여와 연관된 시토키인 수준은 HEC 위약 겔과 구분이 안 되었다. 상피 손상과 연관된, 상승된 수준의 IL-1 α 및 IL-1 β 는, N9 및 TFV 비히클 겔의 둘 다를 매일 투여한 후에 일어났다. 이러한 겔의 테노포비르-함유 형태는 조직 체외이식편(explant) 모델에서 HIV에 대한 완전한 보호력, 및 가시적 상피 세팅에도 불구하고 일어나는 완전한 보호력을 갖는 것으로 나타났다 (문헌 [L. C. Rohan, B. J. Moncla, R. P. Kunjara Na Ayudhya, M. Cost, Y. Huang, F. Gai, N. Billitto, J. D. Lynam, K. Pryke, P. Graebing, N. Hopkins, J. F. Rooney, D. Friend, C. S. Dezzutti, In vitro and ex vivo testing of tenofovir shows it is effective as an HIV-1 microbicide. *PLoS One* 5, e9310 (2010)]). 이전 연구는 TFV 겔 중의 글리세롤이 마우스에서 관찰된 독성에 원인이 될 수 있음을 시사한다 (문헌 [T. R. Moench, R. J. Mumper, T. E. Hoen, M. Sun, R. A. Cone, Microbicide excipients can greatly increase susceptibility to genital herpes transmission in the mouse. *BMC Infect Dis* 10, 331 (2010)]).

[0279] 마우스는 질용 제품을 개발하는데 유용한 동물 모델이나, 마우스와 인간 사이에 질 생리에는 주요 차이가 있다. 우선, 28일 인간 월경 주기와 대조적으로 발정 주기가 4 내지 5일 기간에 걸쳐 일어난다. 마우스 발정 주기의 네 단계 전반에 걸쳐, 상당한 성장에 뒤이어 상피의 붕괴가 있으며, 한편 월경 주기에 걸쳐 인간 질 상피에서는 비교적 적은 변화가 있다 (문헌 [B. G. Smith, E. K. Brunner, The structure of the human vaginal mucosa in relation to the menstrual cycle and to pregnancy. *American Journal of Anatomy* 54, 27-85 (1934)]; [A.

K. Ildgruben, I. M. Sjoeborg, M.-L. K. C. Hammarstroem, Influence of hormonal contraceptives on the immune cells and thickness of human vaginal epithelium. *Obstetrics & Gynecology* 102, 571-582 (2003)]). 마우스 발정 주기의 늦은 발정전기 및 조기 발정기는 인간 질 상피의 것과 가장 유사하다 (문헌 [B. G. Smith, E. K. Brunner, The structure of the human vaginal mucosa in relation to the menstrual cycle and to pregnancy. *American Journal of Anatomy* 54, 27-85 (1934)]; [A. W. Asscher, C. H. De Boer, C. J. Turner, Cornification of the human vaginal epithelium. *J Anat* 90, 547-552 (1956)]). 이들 단계에서, 락토바실러스의 존재하에 피크를 포함한, 상당한 박테리아 집락형성이 존재한다 (문헌 [H. M. Cowley, G. S. Heiss, Changes in Vaginal Bacterial Flora During the Oestrous Cycle of the Mouse. *Microbial Ecology in Health and Disease* 4, 229-235 (1991)]). 게다가, 에스트라디올 영향은 점액의 활발한 분비를 유발하며 (문헌 [H. M. Cowley, G. S. Heiss, Changes in Vaginal Bacterial Flora During the Oestrous Cycle of the Mouse. *Microbial Ecology in Health and Disease* 4, 229-235 (1991)]; [L. B. Corbeil, A. Chatterjee, L. Foresman, J. A. Westfall, Ultrastructure of cyclic changes in the murine uterus, cervix, and vagina. *Tissue Cell* 17, 53-68 (1985)]; [C. G. Rosa, J. T. Velardo, Histochemical localization of vaginal oxidative enzymes and mucins in rats treated with estradiol and progesterone. *Ann N Y Acad Sci* 83, 122-144 (1959)]), 이는 마우스에서, 인간과 유사하게, MPP에 의해 관통가능하고 또한 수시간 안에 클리어런스 되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, IE 마우스 모델은 질 전달 방법을 조사하기 위해 통상 사용되는 DP 모델이외에도 귀중한 모델인 것으로 여겨진다. 에스트라디올을 사용하여 발정기에서 마우스를 동기화할 수 있지만, 발정에서 이들을 "정지"시키지는 않는다. 이들은 주기를 계속하며, 한편 DP 치료는 수일 내지 수주 동안 발정 간기-유사 기에서 마우스를 정지시킬 수 있다 (문헌 [C. Kaushic, A. A. Ashkar, L. A. Reid, K. L. Rosenthal, Progesterone increases susceptibility and decreases immune responses to genital herpes infection. *J Virol* 77, 4558-4565 (2003)]).

[0280] MPP가 인간 자궁경질 및 마우스 질 점액을 신속히 관통할 수 있고 MPP가 종래의 점막부착성 나노입자와 비교하여 커버리지의 속도 및 균일성 및 체류 시간을 상당히 개선시키는 것으로 나타났다. CP는 공지된 자극제 N9와 유사하나, 위약 겔과 유사한, 급성 염증 반응을 도출하였고, MPP는 어떤 검출된 염증 반응도 유발시키지 않았다. 아시클로비르 모노포스페이트가 로딩된 질에 투여된 MPP는 가용성 약물, 심지어 더 10배 더 높은 가용성 약물 농도보다 질 HSV-2 감염에 대해 마우스를 보호하는데 더 효과적이었다. 이들 결과는 성감염의 예방 및 치료, 피임, 및 다른 자궁경질 장애의 치료를 위해, 안전하고 유효한 질 약물 전달을 위해, MPP의 추가 개발에 동기를 부여한다.

[0281] 실시예 8

[0282] 본 비제한적 실시예는 점액 중의 플루로닉® F127로 코팅된 폴리스티렌 (PS) 입자의 상대 속도와 입자 표면 상의 플루로닉® F127의 밀도와 관계를 나타낸다.

[0283] 실험 중 한 세트에서, 카르복실화 PS 나노입자의 수분산액 (200 nm, 0.5% w/v)을 24시간 이상 동안 실온에서 다양한 농도의 플루로닉® F127의 존재하에 평형시켰다. 수득된 PS/플루로닉® F127 나노입자의 표면 상의 플루로닉® F127의 밀도를 다음과 같이 정량화하였다. PS/플루로닉® F127 혼합물을 입자의 완전한 침강으로 초원심분리하였다. 결과적으로, PS에 결합된 플루로닉® F127이 입자와 함께 침강되었고; PS에 결합하지 않은 플루로닉® F127은 상청액에 남았다. 수득된 상청액 중 플루로닉® F127의 농도 ($C_{F127, \text{유리}}$)를 겔 투과 크로마토그래피 (GPC)에 의해 측정하였다. 이 실험에서, G1362A 굴절률 검출기를 갖춘 애질런트(Agilent) 1100 HPLC 시스템 및 분석용 애질런트 PLgel 5 μm 혼합-C 칼럼을 이용하였다. 결합된 플루로닉® F127 ($C_{F127, \text{결합}}$)의 농도를 계산하였다:

$$[0284] C_{F127, \text{결합}} = C_{F127} - C_{F127, \text{유리}}$$

[0285] 상기 식에서, C_{F127} 은 혼합물에 존재하는 플루로닉® F127의 총 농도이다. 그 다음, PS 표면적당 플루로닉® F127 분자의 수 ($F127/\text{nm}^2$)를 다음과 같이 계산하였다:

$$[0286] F127/\text{nm}^2 = \frac{N_A \times C_{F127, \text{결합}}}{SA \times C_{PS}}$$

- [0287] 상기 식에서 N_A 는 아보가드로 수이고, CF_{127} 결합은 결합된 플루로닉[®] F127의 몰 농도 (몰/L로)이고, S_A 는 제조업자 (인비트로젠) 시방서로부터 계산된 PS 입자의 비표면적 (nm^2/g 으로)이고, C_{PS} 는 혼합물 중의 PS의 질량 농도 (g/L로)이다. 제조업자 (바스프(BASF))에 의해 명시된 플루로닉[®] F127의 수평균 분자량을 계산에서 사용하였다.
- [0288] 점액을 관통하는 PS/플루로닉[®] F127 입자의 능력을 실시예 1 및 4-6에 기재된 바와 같이 형광 현미경 검사 및 다중 입자 추적 소프트웨어를 사용하여 인간 자궁경질의 점액 중 상대 속도로서 측정하였다. 특히, 샘플은 관심 입자였고, 음성 대조군은 중합체 코팅물 없이 200 nm 형광 카복실레이트-개질된 폴리스티렌 입자였고, 양성 대조군은 2 또는 5 kDa PEG의 치밀 코팅물을 갖는 200 nm 형광 폴리스티렌 입자 (이는 정착된 감소된 점막 부착 거동을 가짐)이었다. 샘플, 음성 대조군, 및 양성 대조군은 그의 형광색에 의해 서로 차별화되었다.
- [0289] 실시예 1 및 4-6에 기재된 바와 같이 형광 현미경 검사 및 다중 입자 추적 소프트웨어를 사용하여 인간 자궁경질의 점액 중 입자의 상대 속도를 특성화하였다. 전형적인 실험에서, $\leq 0.5 \mu L$ 의 입자 현탁액을 양성 및 음성 대조군과 함께 20 μL 의 새로운 자궁경질의 점액에 첨가하였다. CCD 카메라가 장착된 형광 현미경을 사용하여, 입자의 각각의 유형, 즉 샘플, 음성 대조군, 및 양성 대조군에 대한 각 샘플 내에 몇몇 영역으로부터 $100\times$ 배율하에 66.7 밀리초 (15개 프레임/s)의 시간 해상도에서 15 초(s) 무비를 캡처하였다. 그 다음, 첨단 영상 처리 소프트웨어를 사용하여, 3.335 s (50개 프레임) 이상의 시간 척도에 걸쳐 다중 입자의 개별 궤도를 측정하였다.
- [0290] 도 25에 나타낸 결과는, 점액 중의 플루로닉[®] F127로 코팅된 PS 입자의 상대 속도가 입자 표면 상에 플루로닉[®] F127 분자의 밀도가 증가될 경우 증가됨을 나타냈다.
- [0291] 다른 실시양태
- [0292] 본 발명의 몇몇 실시양태가 본원에 기재되고 예시되었지만, 당업자는 기능을 수행하고/거나 결과 및/또는 본원에 기재된 이점 중 하나 이상을 획득하기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 구상할 것이고, 이러한 변화 및/또는 수정은 각각 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 여겨진다. 더 일반적으로, 당업자는 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 물질, 및 구성이 예시적인 것을 의미하는 것이고, 실제 파라미터, 치수, 물질, 및/또는 구성은 본 발명의 교시가 사용되는 구체적인 적용 또는 적용들에 의해 결정될 것임을 용이하게 알 것이다. 당업자는 불과 통상의 실험을 사용하여, 본원에 기재된 발명의 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나, 알아낼 수 있을 것이다. 따라서, 전술한 실시양태는 단지 예로 제시되는 것이고, 첨부된 특허청구범위 및 그에 대한 등가물의 범위 내에서, 구체적으로 기재되고 청구된 바와 달리 본 발명이 실시될 수 있음을 이해하여야 한다. 본 발명은 본원에 기재된 각각의 개별 특질, 시스템, 물품, 물질, 키트, 및 /또는 방법에 관한 것이다. 게다가, 이러한 특질, 시스템, 물품, 물질, 키트, 및 /또는 방법 중 2개 이상의 임의의 조합은, 이러한 특질, 시스템, 물품, 물질, 키트, 및 /또는 방법이 상호 일치하지 않는 것이 아니라면, 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0293] 명세서 및 특허청구범위에서 본원에서 사용된 바와 같은, 부정 관사 "a" 및 "an"는, 달리 분명히 명시되지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0294] 명세서 및 특허청구범위에서 본원에서 사용된 바와 같은, 어구 "및/또는"은, 그렇게 결합된 요소 중 "하나 또는 둘 다", 즉, 일부 경우에 결합하여 존재하고 다른 경우에 분리적으로 존재하는 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 달리 분명히 명시되지 않는 한 구체적으로 확인된 그러한 요소에 관련되든 관련되지 않든, "및/또는" 절에 의해 구체적으로 확인되는 요소 이외에 다른 요소가 임의로 존재할 수 있다. 따라서, 비제한적 예로서, "A 및/또는 B"에 대한 언급은, "포함하는"과 같이 개방형 표현(open-ended language)과 함께 사용되는 경우, 한 실시양태에서, B 없이 A (임의로 B 이외에 요소를 포함)를; 또 다른 실시양태에서, A 없이 B를 (임의로 A 이외에 요소를 포함)를; 또 다른 실시양태에서, A 및 B 둘 다 (임의로 다른 요소를 포함) 등을 지칭할 수 있다.
- [0295] 명세서 및 특허청구범위에서 본원에서 사용된 바와 같은, "또는"은 상기 정의된 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목을 분리하는 경우, "또는" 또는 "및/또는"은 모든 것을 포함한 것으로서, 즉, 요소의 수 또는 목록 중 적어도 하나를 포함하나, 또한 하나 초과, 및 임의로, 추가의 열거되지 않는 항목을 포함하는 것으로서 해석되어야 한다. 달리 분명히 명시되는 유일한 용어, 예컨대 "중 단지 하나" 또는 "중 정확히 하나" 또는, 특허청구범위에서 사용되는 경우, "로 이루어진"은 요소의 수 또는 목록 중

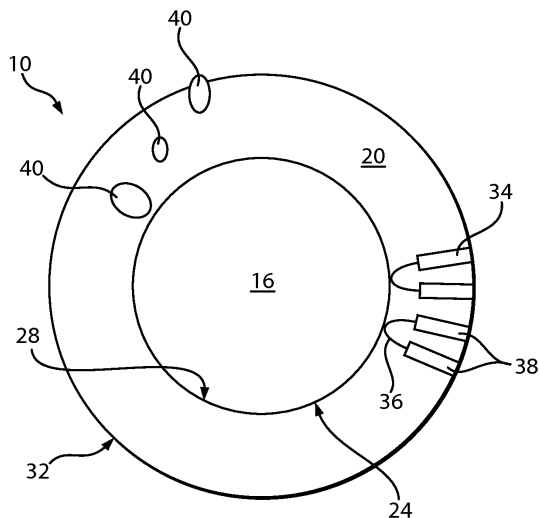
정확히 하나의 요소를 포함하는 것을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "또는"은, 배타성의 용어, 예컨대 "둘 중 어느 하나", "중 하나", "중 단지 하나", 또는 "중 정확히 하나"가 선행되는 경우 배타적 대안 (즉 "하나 또는 다른 하나이지만 둘 다는 아님")을 나타내는 것으로서 단지 이해되어야 한다. "로 본질적으로 이루어진"은 특허청구범위에서 사용되는 경우, 특허법 분야에서 사용되는 바와 같은 그의 통상의 의미를 가져야 한다.

[0296] 명세서 및 특허청구범위에서 본원에서 사용된 바와 같은, 어구 "적어도 하나"는, 하나 이상의 요소의 목록과 관련하여, 요소의 목록에서 요소 중 어느 하나 이상의 요소로부터 선택된 적어도 하나의 요소를 의미하지만, 요소의 목록 내에 구체적으로 열거된 각각 및 모든 요소 중 적어도 하나를 반드시 포함하는 것은 아니고 요소의 목록에서 요소의 임의의 조합을 배제하는 것은 아닌 것으로 이해되어야 한다. 이러한 정의는 또한 구체적으로 확인된 그러한 요소에 관련되든 관련되지 않든, 어구 "적어도 하나"가 지칭하는 요소의 목록 내에 구체적으로 확인된 요소 이외에 요소가 임의로 존재할 수 있도록 한다. 따라서, 비제한적 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나" (또는, 동등하게, "A 또는 B 중 적어도 하나", 또는, 동등하게 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는, 한 실시양태에서, 어떤 B도 존재하지 않고, 임의로 하나 초과를 포함하는, 적어도 하나의 A (및 임의로 B 이외에 요소를 포함)를; 또 다른 실시양태에서, 어떤 A도 존재하지 않고, 임의로 하나 초과를 포함하는, 적어도 하나의 B (및 임의로 A 이외에 요소를 포함)를; 또 다른 실시양태에서, 임의로 하나 초과를 포함하는, 적어도 하나의 A, 및 임의로 하나 초과를 포함하는, 적어도 하나의 B (및 임의로 다른 요소를 포함) 등을 지칭할 수 있다

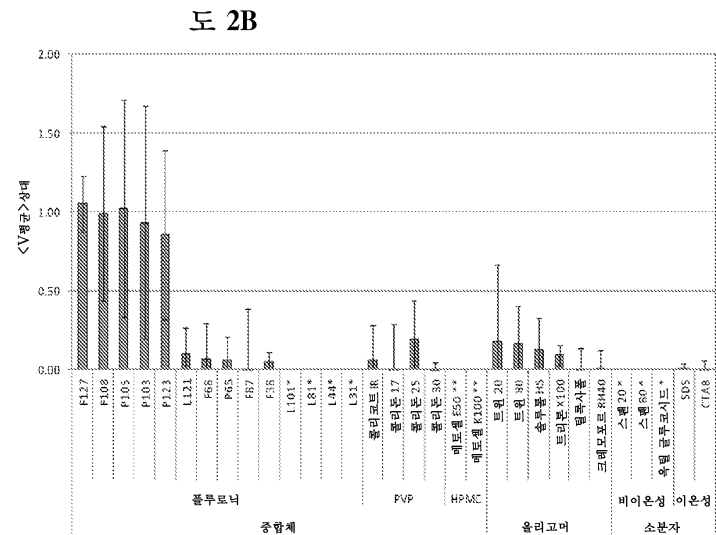
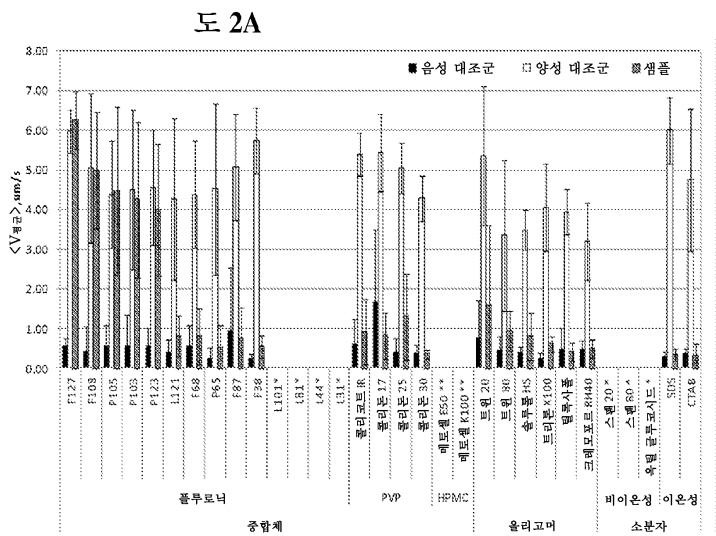
[0297] 특허청구범위에서만 아니라, 상기 명세서에서, 모든 이행 어구, 예컨대 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "지닌", "갖는", "함유하는", "포함하는(involving)", "보유하는" 등은 개방형으로서, 즉, 포함하지만 그에 한정되지 않음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 단지 이행 어구"로 이루어진" 및 "로 본질적으로 이루어진"은 각각 미국 특허청의 특허 심사 절차의 매뉴얼 섹션 2111.03에 명기된 폐쇄형 또는 반폐쇄형 이행 어구이어야 한다.

도면

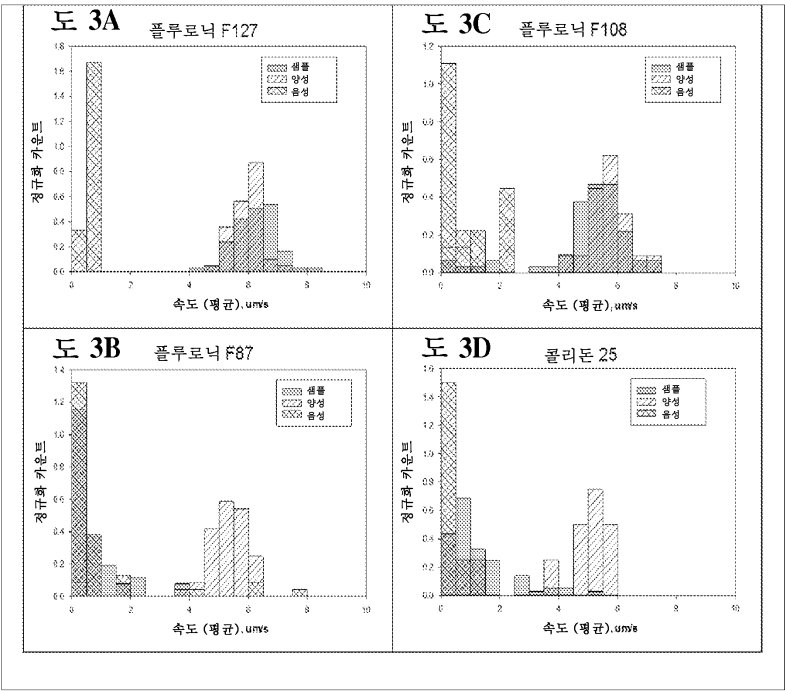
도면1



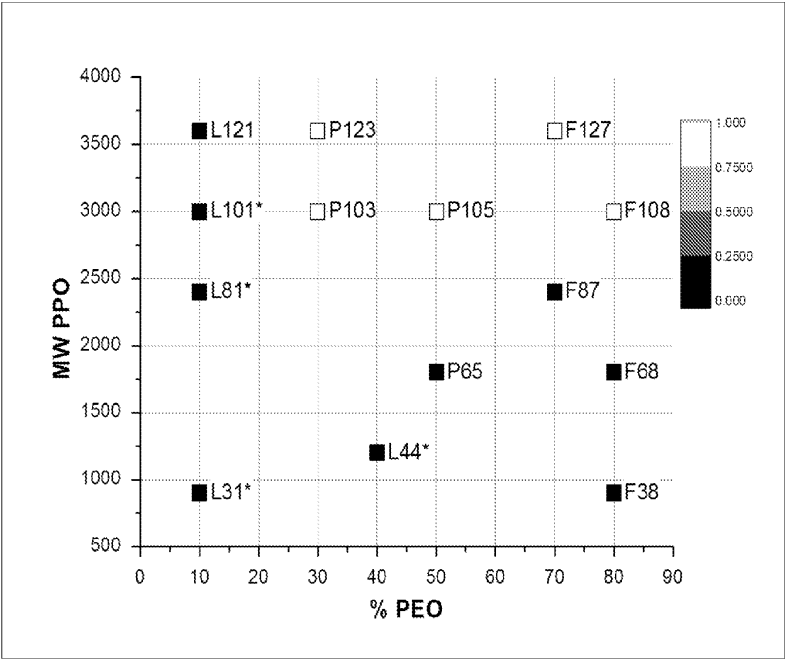
도면2



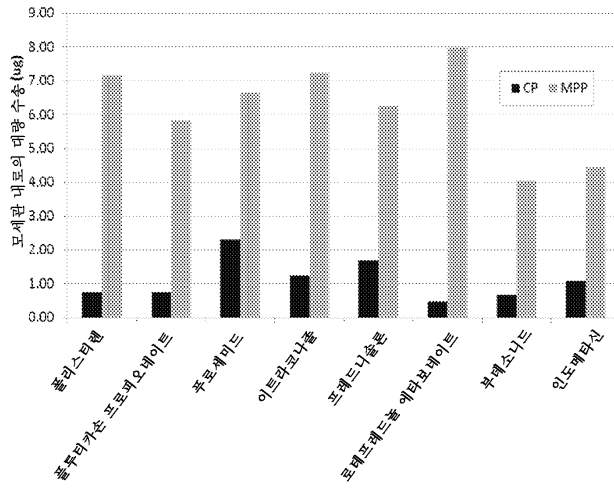
도면3



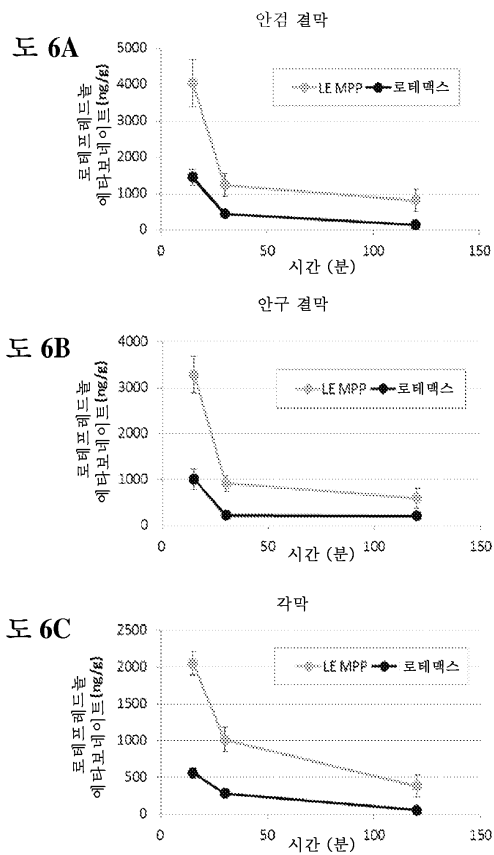
도면4



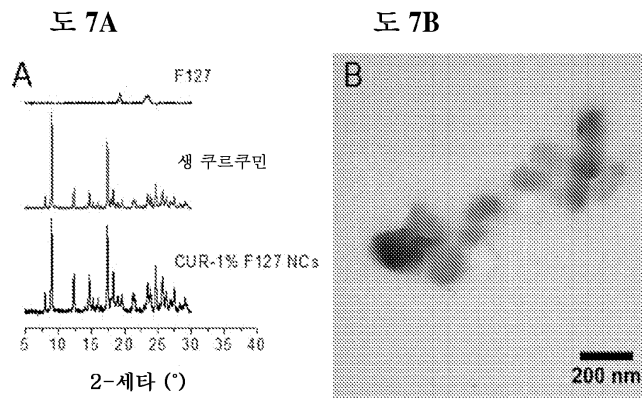
도면5



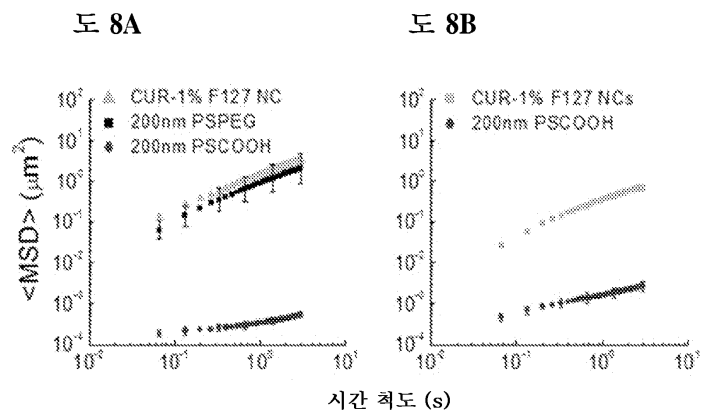
도면6



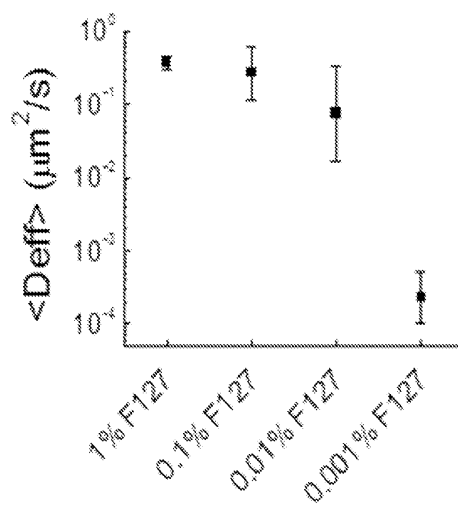
도면7



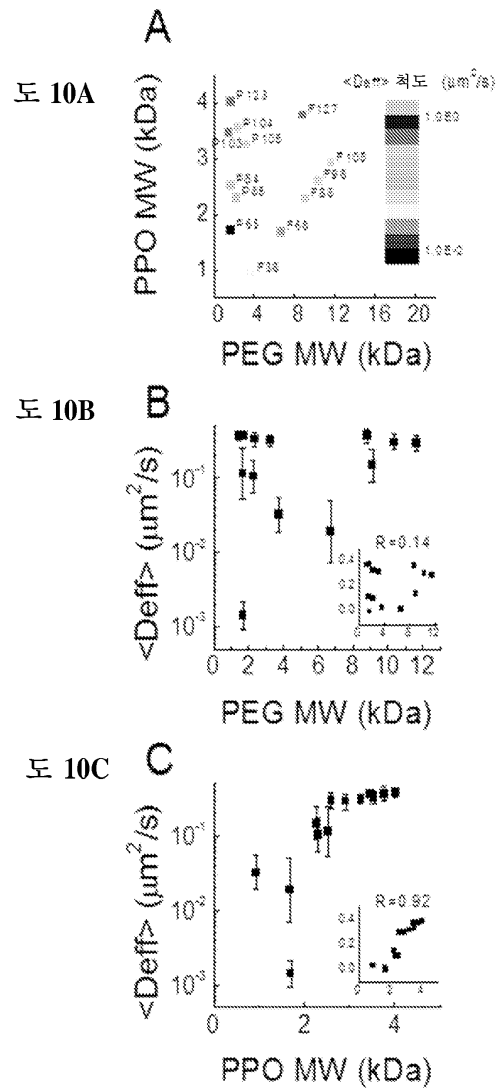
도면8



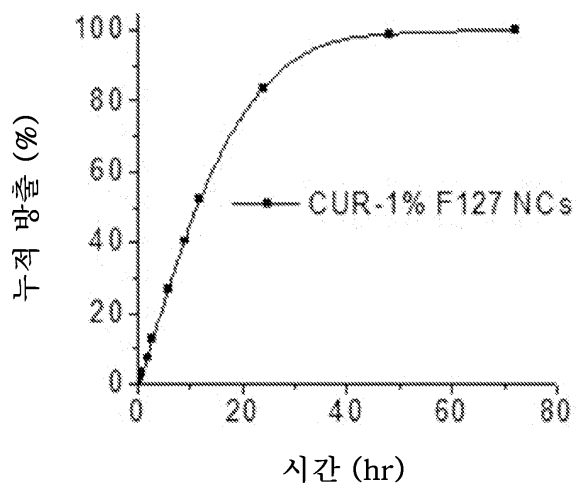
도면9



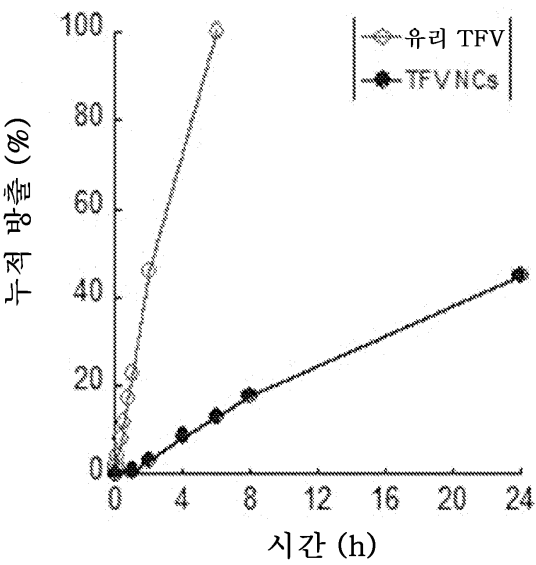
도면10



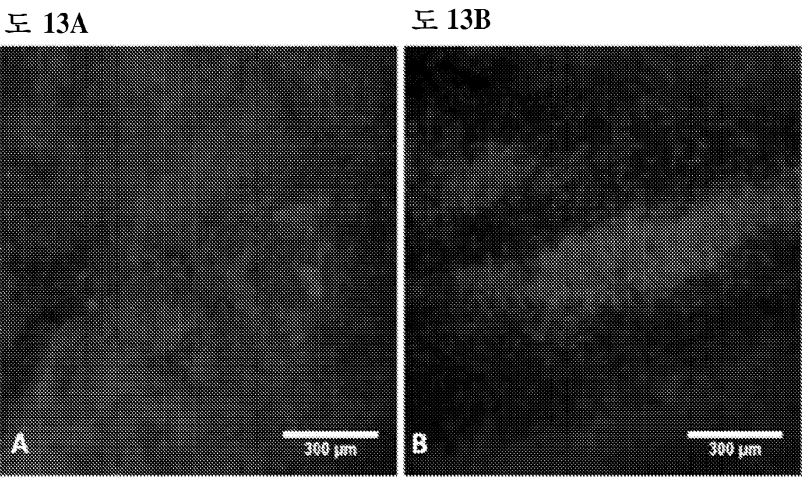
도면11



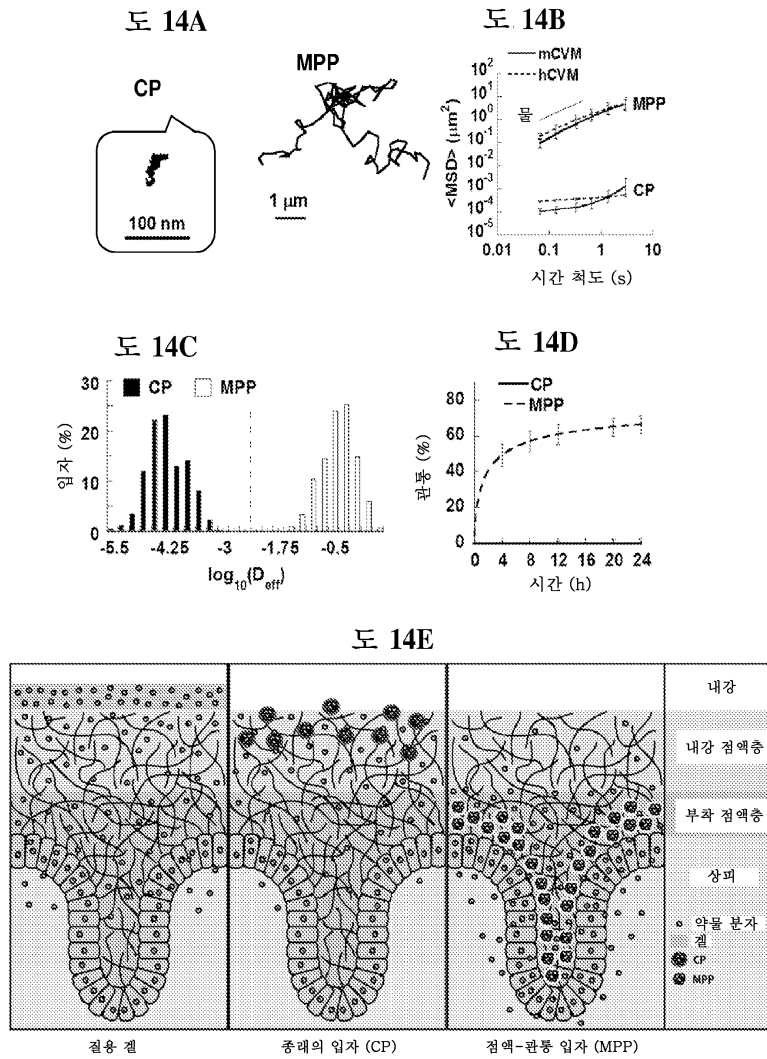
도면12



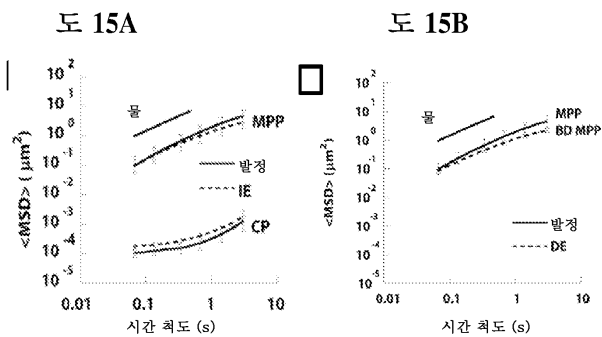
도면13



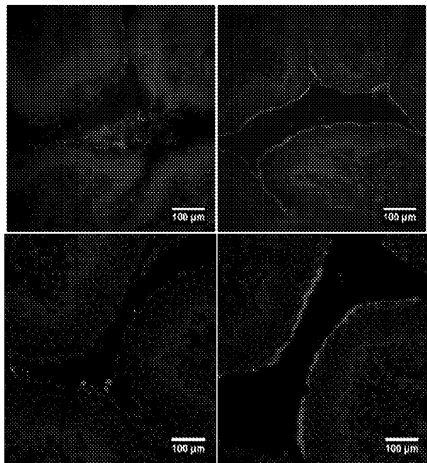
도면14



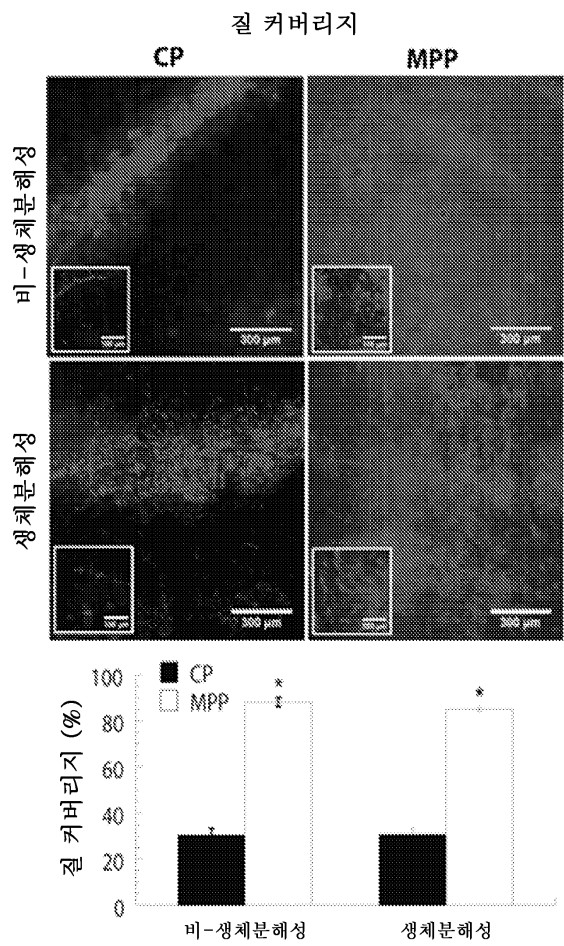
도면15



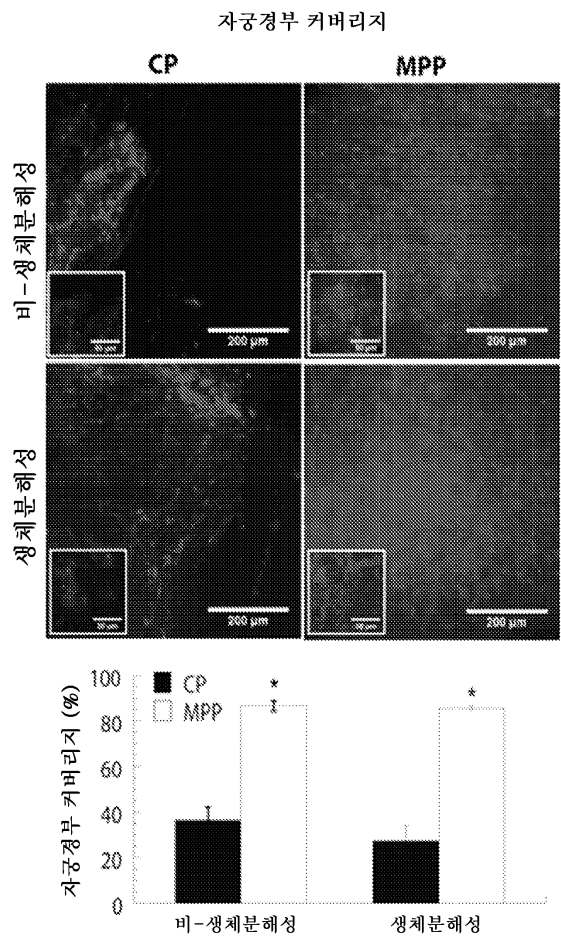
도면16



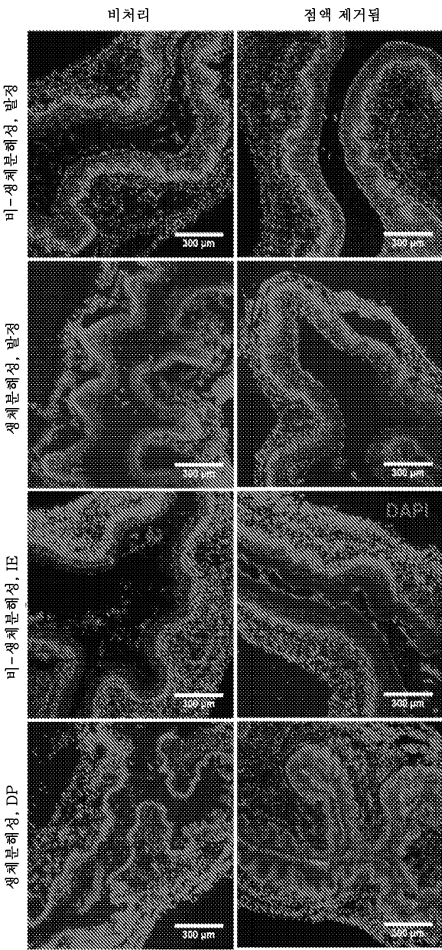
도면17



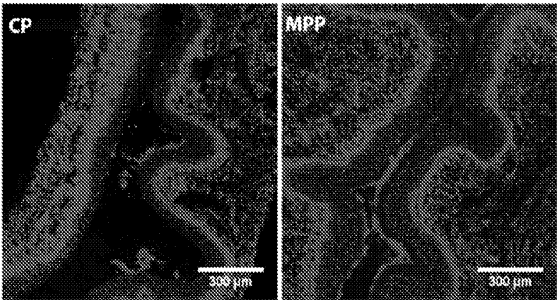
도면18



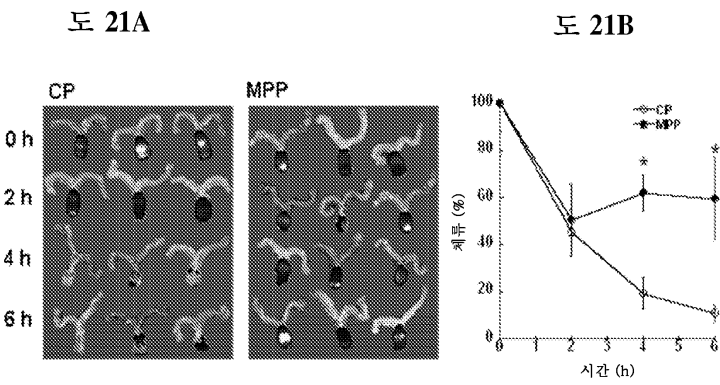
도면19



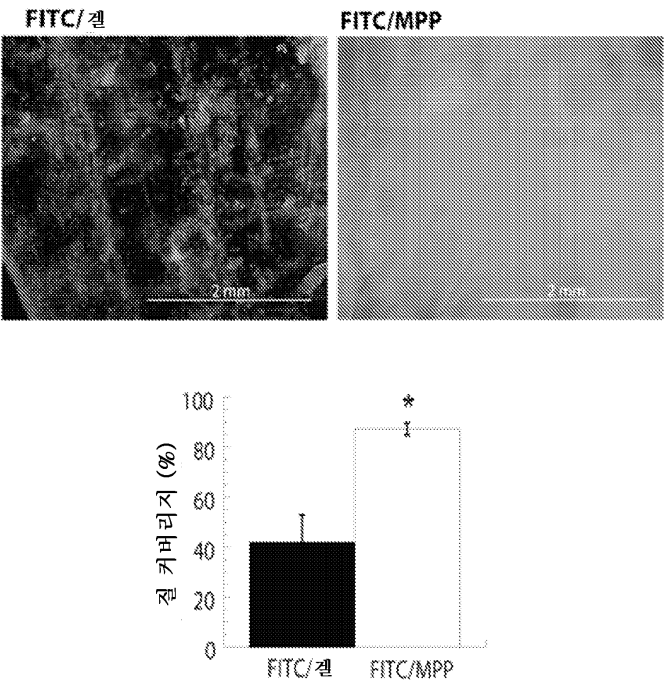
도면20



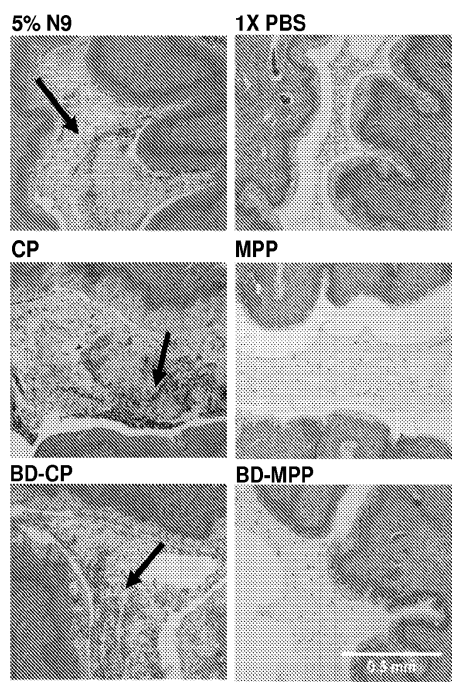
도면21



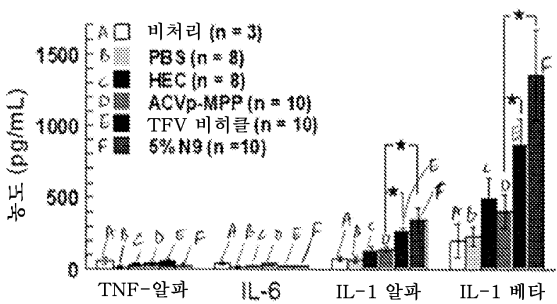
도면22



도면23



도면24



도면25

