



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월06일
(11) 등록번호 10-2474554
(24) 등록일자 2022년12월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/107 (2006.01) A61K 49/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/107 (2013.01)
A61K 49/223 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7008825
- (22) 출원일자(국제) 2017년08월30일
심사청구일자 2020년08월21일
- (85) 번역문제출일자 2019년03월27일
- (65) 공개번호 10-2019-0042681
- (43) 공개일자 2019년04월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/071788
- (87) 국제공개번호 WO 2018/041906
국제공개일자 2018년03월08일
- (30) 우선권주장
16186356.8 2016년08월30일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
US20090274628 A1*
WO2012098937 A1*
JP소화63039810 A
US20140321231 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
브라코 스위스 에스.에이.
스위스 6814 카렘피노 비아 폰테기아 23
- (72) 발명자
세거스 팀
스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31
브라코 스위스 에스에이 내
프링킹 피터
스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31
브라코 스위스 에스에이 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 16 항

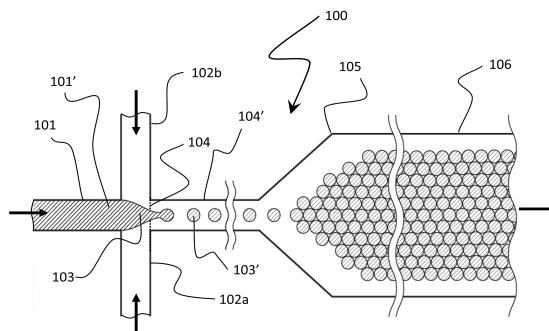
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 크기-제어 미세입자의 제조

(57) 요약

양친매성 물질의 층에 의해 안정화된 크기-제어 미세입자의 현탁액을 제조하는 방법. 미세유체 기술을 사용하는 제조에 적용될 수 있는 이 방법은 제조 과정 동안 및 바람직하게는 형성된 미세입자를 수집하는 동안 미세입자의 온도를 제어하는 것을 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 49/226 (2013.01)

(72) 발명자

라수스 앤

스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31
브라코 스위스 에스에이 내

부사트 필리페

스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31
브라코 스위스 에스에이 내

거드 엠마누엘

스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31
브라코 스위스 에스에이 내

체르카우이 사미르

스위스 1228 플랑-레-와스 루트 드 라 갈레즈 31
브라코 스위스 에스에이 내

명세서

청구범위

청구항 1

인지질을 포함하는 양친매성 물질의 층에 의해 안정화된 기체-충전 미세소포의 현탁액을 제조하기 위한 방법으로서, 상기 방법은

- 제1 유체 흐름, 및 별도로 상기 양친매성 물질을 포함하는 액체 흐름을 제공하는 단계로서, 상기 제1 유체 흐름이 기체인 단계;
- 상기 제1 유체 흐름과 상기 액체 흐름을 각각의 입구 채널을 통해서 접촉 구역을 향해 보내는 단계;
- 상기 제1 유체 흐름과 상기 액체 흐름을 접촉 구역으로부터 조정 구멍을 통해서 보냄으로써 상기 미세소포를 포함하는 현탁액을 얻는 단계; 및
- 상기 미세소포를 포함하는 상기 현탁액을 출구 채널을 향해 보내는 단계

를 포함하며, 여기서

상기 출구 채널의 시초 부분은 양친매성 물질의 전이 온도에 대하여 20% 더 낮은 제어된 온도(°C) 이상으로 유지되는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 제어된 온도(°C)는 양친매성 물질의 전이 온도에 대하여 10% 더 낮은 제어된 온도(°C) 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 시초 부분은 수성 현탁액이 출구 채널에서 정지 속도에 도달하도록 허용하도록 미리 결정된 길이만큼 연장되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 시초 부분은 조정 구멍으로부터 0.1mm 내지 100mm 연장되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 시초 부분은 조정 구멍으로부터 1mm 내지 50mm 연장되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 3 항에 있어서, 상기 시초 부분은 조정 구멍으로부터 2mm 내지 30mm 연장되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 접촉 구역과 조정 구멍이 또한 상기 제어된 온도로 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항 또는 제 7 항에 있어서, 미세소포를 포함하는 현탁액은 이어서 양친매성 물질의 전이 온도 아래의 온도로 냉각되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 냉각은 미세소포의 형성으로부터 60초 이내에 행해지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 냉각은 미세소포의 형성으로부터 5초 이내에 행해지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 현탁액은 양친매성 물질의 전이 온도보다 적어도 5% 더 낮은 온도(°C)로 냉각되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 현탁액은 양친매성 물질의 전이 온도보다 적어도 10% 더 낮은 온도(°C)로 냉각되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 인지질은 포스파티딜콜린, 에틸포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨 또는 스펅고미엘린의 지방산 디에스테르로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항 또는 제 7 항에 있어서, 상기 기체는 불화 가스를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 기체는 기체 (A)와 (B)의 혼합물이며, 여기서 기체 (B)는 불화 가스이고, 기체 (A)는 공기, 산소, 질소, 이산화탄소 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 8 항에 있어서, 상기 인지질은 포스파티딜콜린, 에틸포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨 또는 스펅고미엘린의 지방산 디에스테르로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 특히 플로우-포커싱 장치(flow-focusing device)의 사용에 의해, 기체-충전 미세소포(gas-filled microvesicles)와 같은 크기-제어 미세입자(size-controlled microparticles)를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기체-충전 미세소포는 일반적으로 조영 증강 초음파(CEUS) 영상화로서 알려진 초음파 영상화 기술에서 적합한 조영제로서 이용된다. 이들 미세소포의 기체는 전형적으로 예를 들어 유화제, 오일, 증점제 또는 당을 포함하는 안정화 외피에 갇히거나 캡슐화된다. 이들 안정화된 기체 버블(적합한 생리학적 용액에 분산된)은 일반적으로 다양한 용어로 본 분야에서 언급되는데, 전형적으로 그것의 제조에 이용된 안정화 물질에 따라, 예를 들어 "마이크로스피어", "마이크로버블", "마이크로캡슐" 또는 "마이크로벌룬"이라는 용어가 사용되며, 전세계적으로 "기체-충전 미세소포"(또는 간단히 "미세소포")라고 언급된다.

[0003] 특히 관심 있는 것은 액체 계면을 향해 기체에 배치된 매우 얇은 외피(필름)에 의해 기체/액체 계면에서 기체의 버블들이 결합되어 있는 기체-충전 미세소포의 수성 현탁액이다. 이들 현탁액은 전형적으로 분상의 양친매성 물질, 예를 들어 냉동-건조된 전-형성 리포솜 또는 냉동-건조 또는 분무-건조된 액체 용액을 교반하면서 공기나 임의의 다른 기체와 접촉시키고, 이어서 수성 캐리어와 접촉시켜 기체-충전 미세소포의 현탁액을 생성함으로써 제조되며, 이것은 이후 바람직하게는 제조 직후에 투여될 수 있다. 안정화 층은, 상기 인용된 인지질들에 더하여, 지방산과 같은 다른 양친매성 물질도 포함할 수 있다.

[0004] 참고문헌 1은 소수성 액체, 전형적으로 오일을 양친매성 물질의 수성 분산물에서 에멀전화함으로써 액체 충전 미세액적의 에멀전을 얻는 것을 포함하는 기체-충전 미세소포를 제조하는 대안의 방법을 개시한다; 이 에멀전은 이후 동결건조되고, 동결건조된 잔류물은 이어서 기체 및 수성 용매의 존재하에 복원되어 마이크로버블 현탁액

이 형성된다.

[0005] 액체 충전 미세액적(간단히 "미세액적")을 함유하는 수성 에멀전은 또한 약물 캐리어로서 사용될 수 있다. 소수성 약물이든 친수성 약물이든 양친매성 물질로 코팅된 액적에 통합될 수 있다. 첫번째 경우, 양친매성 물질은 액적 주변에 단일층을 형성한다. 두번째 경우, 양친매성 물질(리포솜)의 이중층이 수성 액적 주변에 형성된다. 상대적으로 낮은 비등점(T_b)을 가진 액체, 예를 들어 퍼플루오로펜탄($T_b = 29^\circ\text{C}$)으로 충전된, 또는 낮은 비등점을 가진 오일 중의, 예를 들어 약물 함유 나노액적의 (나노)에멀전으로 충전된 미세액적은 초음파를 사용하는 약물 송달 용도에서 상당한 잠재력을 가진다. 초음파는 생체내 용도에서 액체 액적의 증발을 촉발하기 위해 사용될 수 있으며, 이로써 그것의 탑재물이 방출된다.

[0006] 종래의 제조 방법은 일반적으로 다분산성 지수(PDI)가 상대적으로 높은 크기 분포를 가진 미세소포 또는 미세액적(여기서는 둘 다 "미세입자"로서 확인됨) 현탁액을 제공하며, 다분산성 지수는 표준 편차 "s"와 미세입자 집단의 평균 크기 "n" 사이의 비로서 수학적으로 정의된다($\text{PDI} = s/n \times 100\%$). 예를 들어, 전형적인 제조 방법은 약 2-3 마이크로미터의 평균 직경과 약 60%의 PDI를 가진 미세입자를 제공할 수 있다. 상대적으로 높은 PDI(예컨대 60%)를 가진 미세입자, 및 특히 기체-충전 미세소포는 일반적으로 대부분의 실사화(actual imaging) 기술에 아주 적합하지만, 그럼에도 이러한 PDI는 상기 영상화 기술에 대해 여전히 최적화될 수 있다.

[0007] 따라서, PDI가 10% 미만, 바람직하게 5% 미만 및 더욱더 바람직하게 2% 미만인 소위 말하는 "크기-제어" 또는 "단분산" 미세입자, 즉 기체-충전 미세소포 또는 액체 충전 미세액적 제조물을 제조하기 위한 방법이 개발되었다.

[0008] 단분산 미세입자를 제조하기 위한 적합한 방법은, 예를 들어 전형적으로 T-정선 또는 플로우-포커싱 장치의 사용에 의한, 미세유체(microfluidic) 기술의 사용을 포함한다. 간단히 말해, 플로우-포커싱 장치에서, 제1 유체 성분(예를 들어, 기체 또는 오일)의 흐름이 좁은 구멍을 통해서 제2 유체 성분의 흐름에 의해 포커싱된다. 전형적으로, 제2 유체 성분은 외피 형성 물질(전형적으로 인지질 및/또는 지방산을 포함하는 지질과 같은 계면활성제)을 포함하는 액체 유체이며, 이것은 제1 유체 성분을 포착해서 원하는 미세입자(기체-충전 미세소포 또는 액체 액적 형태의)를 형성하고, 이것은 상기 외피 형성 물질에 의해 응집 및 용해에 대해 안정화된다.

[0009] 그러나 출원인은, 특히 높은 유속(flow rate)하에서(이것은 높은 형성 속도, 예를 들어 초당 10^5 미세입자 이상을 달성하기 위해 필수적이다), 새로 형성된 미세입자가 상대적으로 높은 운동 에너지와 충돌할 수 있고 이러한 충돌은 미세입자들의 응집을 가져올 수 있다는 것을 관찰했다. 이러한 응집의 결과는 형성된 미세입자의 치수가 무작위로, 예를 들어 원하는 미세입자 부피의 2배, 3배 및 최대 n-배 부피로 가변화할 수 있다는 것이다. 따라서, 미세입자 집단의 크기 및 PDI가 제어 불가능하게 될 수 있다.

[0010] 출원인은 이제 미세유체 방법에 따라서 제조된 미세입자들의 응집을 제한하기 위해 적용될 수 있는 적합한 제조 조건을 발견했다.

[0011] 일반적인 측면에서, 출원인은 미세입자가 형성되는 구역에 가까이 온도를 제어함으로써, 및 특히 미세입자의 안정화 외피를 형성하는 양친매성 물질(들)의 전이 온도(T_m) 근처나 그 위의 온도에 미세입자를 뚫으로써, 응집 현상이 실질적으로 감소될 수 있다는 것을 관찰했다.

[0012] 또한, 출원인은 양친매성 물질의 전이 온도 아래에서 형성된 현탁액을 후속 냉각하는 것이 미세입자의 원하는 제어된 크기 및 PDI를 유지하는데 유익하게 더 도움이 될 수 있다는 것을 관찰했다.

발명의 내용

[0013] 제1 양태에 따라서, 본 발명은 양친매성 물질의 층에 의해 안정화된 미세입자의 현탁액을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 이것은:

- [0014] - 제1 유체 흐름, 및 별도로 상기 양친매성 물질을 포함하는 액체 흐름을 제공하는 단계;
- [0015] - 상기 제1 유체 흐름과 상기 액체 흐름을 각각의 입구 채널을 통해서 접촉 구역(여기서 상기 각각의 흐름이 접촉된다)을 향해 보내는 단계;
- [0016] - 상기 제1 유체 흐름과 상기 액체 흐름을 접촉 구역으로부터 조정(calibrated) 구멍을 통해서 보냄으로써 상기 미세입자를 포함하는 현탁액을 얻는 단계; 및

- [0017] - 상기 미세입자를 포함하는 상기 현탁액을 출구 채널을 향해 보내는 단계
- [0018] 를 포함하며,
- [0019] 여기서 상기 출구 채널의 시초 부분은 양친매성 물질의 전이 온도에 대하여 20% 이상 더 낮은 온도(°C)로 유지된다.
- [0020] 바람직하게, 출구 채널의 시초 부분은 양친매성 물질의 전이 온도에 대하여 10% 이상 더 낮은 온도(°C)로 유지된다.
- [0021] 출구 채널의 상기 시초 부분은 바람직하게 조정 구멍의 출구로부터 적어도 미세입자의 수성 현탁액의 흐름이 실질적으로 정지 속도에 도달하는 구역까지 연장된다.
- [0022] 바람직한 구체예에서, 현탁액은 조정 구멍으로부터 조정 채널을 통해서 출구 채널을 향해 흐른다.
- [0023] 조정 구멍(및 채널)과 출구 채널의 기하구조에 따라, 상기 시초 부분은 조정 구멍(또는 채널)의 출구로부터 적어도 0.1mm만큼, 바람직하게 적어도 1mm만큼, 더 바람직하게 적어도 2mm만큼 연장될 수 있다. 상기 시초 부분의 길이는 미소유체 장치의 출구 채널의 최대 전체 길이, 예를 들어 조정 구멍의 출구로부터 100mm일 수 있다.
- [0024] 바람직한 구체예에 따라서, 상기 제1 유체 흐름은 기체이고, 상기 미세입자는 기체-충전 미세소포이다.
- [0025] 바람직하게, 또한 접촉 구역과 조정 구멍은 원하는 온도로 유지된다. 이러한 경우, 조정 구멍과 출구 채널 사이의 선택적인 조정 채널이 또한 바람직하게 상기 온도로 유지된다.
- [0026] 본 발명의 다른 양태에 따라서, 얻어진 현탁액은 미세입자의 형성 후 상대적으로 짧은 시간 기간 내에 양친매성 물질의 전이 온도 아래의 온도로 냉각된다. 예를 들어, 현탁액은 미세입자의 형성으로부터 10초 이내에, 바람직하게 5초 이내에 및 더욱더 바람직하게 2초 이내에 냉각된다. 바람직하게, 현탁액은 T_m 보다 적어도 5% 더 낮은, 더 바람직하게 적어도 10% 더 낮은, 최하 예를 들어 T_m 의 50%의 온도(°C)로 냉각된다. 바람직한 구체예에서, 예를 들어 실온보다 더 높은 T_m 을 가진 양친매성 물질에 대해, 특히 미세입자 현탁액이 실온에서 보관될 때, 냉각 온도는 실온(예를 들어, 22°C)이다. 특정 구체예에서, 예를 들어 현탁액이 더 낮은 온도(예를 들어, 10°C)에서 보관될 때 보관 온도에 상응하여, 냉각 온도는 더 낮을 수도 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 플로우-포커싱 장치의 코어 부분의 도식적 표현이다.
- 도 2는 본 발명의 플로우-포커싱 과정에 유용한 칩의 예시적인 도식적 표현(상면도)을 도시한다.
- 도 3은 본 발명의 과정에 유용한 장치의 예시적인 도식적 도해를 도시한다.
- 도 4는 본 발명에 따른 기체-충전 미세소포의 형성 동안 온도 제어의 실험적 결과를 나타낸다.
- 도 5는 본 발명에 따른 다른 양친매성 물질을 가진 기체-충전 미세소포의 형성 동안 온도 제어의 실험적 결과를 나타낸다.
- 도 6은 기체-충전 미세소포의 현탁액에 대한 냉각 효과의 실험적 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 도 1은 본 발명의 과정에 유용한 플로우-포커싱 장치(칩)의 코어 부분(100)의 도식적 표현을 도시한다. 칩은 제1 유체 흐름(101')을 피딩하기 위한 제1 피드 채널(101) 및 양친매성 물질을 함유하는 액체 흐름을 공급하기 위한 2개의 추가 피드 채널(102a 및 102b)을 포함한다.
- [0029] 제1 유체 흐름(바람직하게 기체)과 두 액체 흐름은 접촉 구역(103)을 향해 보내진 다음, 도 1에 점선으로 도시된, 조정 구멍(104)을 통과한다.
- [0030] 도 1에 예시된 대로, 조정 구멍은, 바람직하게 구멍과 동일한 단면을 가진 조정 채널(104')과 연결되고, 이것은 차례로 출구 채널(106)의 시초 부분(105)과 연결된다. 대안의 구체예(미도시)에서, 조정 구멍(104)은 출구 채널(106)의 시초 부분(105)에 직접 연결된, 즉 사이에 조정 채널이 없는, 노출될 수 있다.
- [0031] 미세입자(103')는 조정 구멍에서 형성되고 조정 채널(104')을 통해서 출구 채널(106)의 시초 부분(105)으로 보

내진다. 출구 채널의 수력학적 직경은 일반적으로 조정 구멍의 수력학적 직경보다 크며, 전형적으로 조정 구멍의 초기 직경으로부터 출구 채널(106)의 최종 직경까지 증가하고, 이것은 실질적으로 플로우-포커싱 장치를 용기, 예를 들어 밀봉 바이알에 연결하는 수집 튜브(미도시)의 수력학적 직경에 상응한다.

[0032] 출원인에 의해 관찰된 대로, 수력학적 직경의 증가로 인해(및 특히 높은 제조 속도에서, 예를 들어 약 10^5 미세 입자/s 이상에서), 스트림의 속도는 조정 구멍의 출구에서의 상대적으로 높은 속도에서 현탁액의 정지 상태 속도로 급격히 감소한다(즉, 전형적으로 출구 채널 및 수집 튜브에서 하류에 도달한다). 이 마이너스의 속도 구배는 조정 구멍으로부터 빠져나오는 미세입자들이 출구 채널의 시초 부분에서 실질적으로 더 낮은 속도로 유동하고 있는 미세입자들 위에 충돌하는 사태를 야기할 수 있다. 미세소포의 온도가 충분히 높지 않다면, 이런 충돌은 미세입자의 제어되지 않는 붕괴를 야기할 수 있으며, 그 결과 제조물의 다분산성이 바람직하지 않게 증가한다.

[0033] 출원인에 의해 발견된 대로, 이러한 바람직하지 않은 응집 현상은 장치의 출구 채널의 시초 부분(105)에서, 그리고 바람직하게 또한 접촉 구역(103) 및 조정 구멍(104)에서 미세입자의 온도를 제어함으로써 실질적으로 감소될 수 있다.

[0034] 특히, 본 발명에 따라서, 출구 채널의 시초 부분은 바람직하게 액체 흐름에 함유되며 미세입자의 안정화 외피를 형성하는 양친매성 물질의 T_m 에 대하여 20% 이상 더 낮은 온도에서 유지된다. 더 바람직하게, 상기 온도는 양친매성 물질의 T_m 에 대하여 10% 이상 더 낮다. 일반적으로 온도가 T_m 보다 지나치게 더 높을 필요는 없지만, 이러한 온도는 양친매성 물질의 열변성 내성과 양립할 수 있는 정도에서, 필요한 만큼 높을 수 있다; 예를 들어, 온도는 양친매성 물질의 T_m 보다 최대 20% 더 높을 수 있고, 바람직하게는 최대 10% 더 높을 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 온도는 양친매성 물질의 T_m 이거나 또는 약간 위이다(예를 들어, 최대 5°C 더 높다). 온도 제어는 미세입자의 수성 현탁액의 흐름이 실질적인 정지 속도에 아직 도달하지 않은 출구 채널의 구역에서, 예를 들어 절대 속도 구배가 약 10 s^{-1} 을 초과할 때 특히 유용하다. 칩의 기하구조에 따라, 상기 구역은 조정 구멍으로부터 약 0.1mm 내지 100mm, 바람직하게 1.0 내지 50mm 및 더 바람직하게 2.0 내지 30mm의 길이만큼 연장될 수 있다.

[0035] 유익하게, 온도는 또한 접촉 구역 및 조정 구멍(그리고 존재한다면 조정 채널)에 상기 특정된 변수를 적용함으로써 유사하게 제어될 수 있다.

[0036] 출원인에 의해 관찰된 대로, 제어된 온도는 형성된 미세입자들 사이에서 응집의 실질적인 감소를 제공한다.

[0037] 응집 퍼센트는 플로우-포커싱 장치의 출구 채널에서 광학 현미경으로 얻어진 영상으로부터의 크기 분포 피크로부터 응집된 미세입자의 총수를 계산함으로써 결정될 수 있으며, 예를 들어 다음과 같이 결정될 수 있다:

[0038] - 초기 형성된 미세입자의 부피 V_i 의 2배(크기 분포의 2번째 피크)와 동일한 부피를 가진 미세입자의 총수에 인수 2(응집된 미세입자가 2개의 미세입자로부터 기원하므로)를 곱하고;

[0039] - 이 수를 인수 3을 곱한 초기 부피의 3배(크기 분포의 3번째 피크)를 가진 미세입자의 총수에 더하고, 이것을 측정된 크기 분포에서 최대 n번째 피크까지 행한다.

[0040] 따라서, 응집 퍼센트는 다음과 같이 생성된 미세입자의 총수에 의해 응집된 미세입자의 총수를 정규화함으로써 계산될 수 있다:

[0041]
$$\text{응집 \%} = \frac{\sum_{i=2}^n n_i N_i V_i}{\sum_{i=1}^n n_i N_i V_i} \times 100\%$$

[0042] 일반적으로, 최하 예를 들어 0.01%의 응집 퍼센트까지, 약 10% 미만, 바람직하게 약 5% 미만 및 더욱더 바람직하게 약 1% 이하의 응집 퍼센트가 바람직하다.

[0043] 또한, 장치가 작동되는 유속이 미세입자의 응집에 영향을 미칠 수 있다. 특히, 소위 말하는 "드립핑" 방식에서 흐름의 속도는 상대적으로 낮고(예를 들어, 약 $600 \mu\text{m}^2$ 의 조정 구멍에 대해 약 $45 \mu\text{L}/\text{min}$), 미세입자 크기는 전형적으로 더 크며(전형적으로 조정 구멍의 단면에 상응), 응집 현상이 상대적으로 감소된다. 한편, 소위 말하는 "젯팅" 방식에서는, 감소된 미세입자 크기와 관련된 증가된 흐름의 속도(예를 들어, 약 $600 \mu\text{m}^2$ 의 조정 구멍에 대해 약 $55 \mu\text{L}/\text{min}$ 이상)(전형적으로, 유속이 빠를수록 미세입자는 더 작다)가 형성된 미세입자의 응집의

증가를 결정한다. 그러나 드립핑 방식에서 미세입자의 형성 속도는 초당 약 $10^2 - 10^4$ 미세입자이지만, 젯팅 방식에서는 이러한 형성 속도가 전형적으로 초당 10^5 미세입자 이상으로 증가된다. 따라서, 응집 측면에서는 단점이 있지만 높은 흐름 속도는 산업적 규모에서 허용되는 미세입자의 형성 속도를 달성하기 위해 필요하다(참고문헌 2).

[0044] 실험 부문에 상세히 나타낸 대로, 양친매성 물질의 T_m 으로 또는 근처로 온도를 유지함으로써, 실질적으로 더 낮은 농도의 양친매성 물질을 사용함에 의해 감소된 응집이 관찰된다(가열이 적용되지 않는 경우 필요한 더 높은 농도와 비교하여).

[0045] 플로우-포커싱 장치는, 예를 들어 참고문헌 3에 설명된, 본 분야에 공지된 것들 중 어느 것일 수 있다. 바람직하게, 플로우-포커싱 장치는, 예를 들어 참고문헌 4에 설명된 것과 같은 칩을 포함한다.

[0046] 도 2의 도해를 참조하면, 칩(200)은 제1 유체(바람직하게 기체) 흐름이 공급되는 제1 입구 채널(201) 및 액체 흐름이 공급되는 2개의 입구 채널(202' 및 202'')을 포함할 수 있다. 상기 입구 채널의 각각은 각각의 튜빙(미도시)을 통해서 각각의 저장소와 연결된다. 칩은 각각의 튜빙을 통해서 미세입자의 현탁액을 수집하도록 된 용기(미도시)에 연결된 출구 채널(203)을 더 포함한다. 조정 구멍에 가까이 있는, 입구 채널(201a 및 202a)의 최종 부분의 단면은 채널(201b 및 202b)의 나머지에 대하여 실질적으로 감소된다. 이 최종 부분(201a 및 202a)의 단면은 25 내지 $1 \cdot 10^4 \mu m^2$, 바람직하게 200 내지 $1 \cdot 10^3 \mu m^2$ 로 가변적일 수 있으며, 유익하게는 조정 구멍의 단면에 실질적으로 상응한다. 입구 채널의 초기 부분의 단면은 $1 \cdot 10^3$ 내지 $1 \cdot 10^6 \mu m^2$, 바람직하게 $1 \cdot 10^4$ 내지 $1 \cdot 10^5 \mu m^2$ 로 가변적일 수 있고, 이들의 길이는 50mm 내지 1mm, 바람직하게 2mm 내지 5mm로 가변적일 수 있다. 유사하게, 출구 채널의 시초 부분(203a)의 단면(도 1에서 조정 채널에 상응하는)도 또한 상대적으로 감소된다; 그것의 단면은 일반적으로 제조될 미세입자의 원하는 직경에 따라서 조정된다(예를 들어, 참고문헌 4 참조). 예를 들어, $5 \mu m$ 의 평균 직경을 가진 단분산 미세입자를 제조하기 위해, 조정 구멍 및 조정 채널은 약 250 내지 $2500 \mu m^2$ 의 단면적을 가질 것이다. 유익하게, 입구 채널의 단면과 출구 채널의 단면은 실질적으로 동일하며, 또한 이들 각각의 최종 및 시초 부분의 단면도 실질적으로 동일하다. 조정 채널(203a)의 길이는 약 0.05mm 내지 약 10mm로 가변적일 수 있고, 출구 채널의 전체 길이는 최대 100mm, 바람직하게 최대 50mm 및 더 바람직하게 최대 30mm일 수 있다. 전형적으로, 칩은 석영 유리, 융합 실리카, 또는 임의의 플라스틱(예를 들어, 폴리(메틸메타크릴레이트)) 재료로 절반씩 2개로 이루어진다. 채널은 전체적인 원하는 깊이와 너비에 맞춰 각 절반의 내부 표면을 건식 또는 습식 에칭함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 표면은 접촉 구역에 가까운 각각의 조정 부분에 대해 15-20 μm 의 너비로, 나머지 부분에 대해 0.5-1.0mm의 너비로 하고, 길이는 14 μm 로 일정하게 에칭될 수 있다. 본 발명의 과정에서 사용하기 위한 적합한 상업적으로 이용가능한 칩은, 예를 들어 Dolomite microfluidics(Royston, 영국) 또는 Micronit(Enschede, 네덜란드)로부터 이용할 수 있다.

[0047] 바람직한 구체예에 따라서, 형성된 미세입자의 단분산성을 유지하기 위해, 현탁액은, 바람직하게는 일단 수집 구역에서 현탁액의 흐름이 실질적으로 정지 속도에 도달한 다음, 양친매성 물질의 T_m 아래의 온도로 빠르게 냉각될 수 있다.

[0048] 도 3을 참조하면, 플로우-포커싱 장치의 코어 부분을 포함하는 유닛(300)(예를 들어, 도 2에 설명된 것과 같은 칩)은, 예를 들어 항온조에 의해 상기 설명된 대로 양친매성 물질의 T_m 근처이거나 약간 위의 원하는 온도에서 유지될 수 있다. 제1 유체 흐름과 양친매성 물질을 포함하는 액체 흐름은 각각의 공급 튜빙(예를 들어, 100 내지 $1000 \mu m$, 바람직하게 150 내지 $250 \mu m$ 의 내경)을 통해서 각각의 저장소(301 및 302)로부터 유닛(300)으로 공급된다. 출구 튜빙(303)은 유닛(300)의 출구 채널(미도시)을 적합한 수집 용기(304), 예를 들어 밀봉 바이알에 연결한다. 출원인에 의해 관찰된 대로, 미세입자의 형성으로부터 수 초 이내에, 바람직하게는 현탁액의 흐름이 실질적으로 정지 속도에 도달하자마자 미세입자의 현탁액의 냉각을 시작하는 것이 유익하다. 전형적으로, 상기 냉각은 미세소포의 형성으로부터 180초 이내, 바람직하게 60초 이내, 더 바람직하게 10초 이내 및 더욱더 바람직하게 2초 이내에 개시될 수 있다. 플로우-포커싱 장치의 기하구조에 따라, 정지 흐름은 일반적으로 미세입자 형성 후 수 밀리초 이내에 또는 심지어 더 적은 시간 이내에 도달된다; 따라서, 냉각은 미세입자의 형성 후 1 밀리초로부터 시작하는 것이 적용될 수 있다. 전형적으로 미세입자의 현탁액이 형성 후 수 밀리초 미만 이내에 유닛(300)의 출구에 도달하기 때문에, 냉각은 유익하게 유닛(300)을 빠져나오는 출구 튜빙의 시초 부분에 적용될 수 있다. 따라서, 출구 튜빙의 시초 부분은 유익하게 적합한 냉각 수단(305), 예를 들어 열 교환기에 의해 냉각이 행해지며, 이로써 기체-충전 미세입자의 현탁액의 온도가 미세소포의 안정화 외피를 형성하는 양친매성

물질의 T_m 아래로 감소한다. 냉각되는 출구 튜빙의 시초 부분의 길이는, 예를 들어 유닛(300)의 가열 온도, 적용된 냉각 효율, 접촉 시간 등에 따라, 예를 들어 1cm 내지 100cm, 바람직하게 5cm 내지 10cm로 가변적일 수 있다.

[0049] 전이 온도

[0050] 양친매성 물질의 전이 온도(T_m)가 여기 언급될 때, 상기 온도는 단일 양친매성 성분 또는 양친매성 성분들의 혼합물로 언급될 수 있다. 특히, 안정화 외피를 형성하는 양친매성 물질이 상이한 양친매성 성분들의 혼합물일 때, 상기 T_m 은 일반적으로 양친매성 성분들의 상기 혼합물의 T_m 으로서 언급된다. 양친매성 물질의 혼합물에 대해, 측정된 T_m 은 일반적으로 혼합물의 개별 성분의 T_m 의 물 비 가중 평균에 상응한다.

[0051] 지질의 전이 온도(T_m)는 정렬된 겔 상에서 무질서한 액체 결정질 상으로의 지질의 물리적 상태의 변화를 반영한다. 겔 상에서 지질의 탄화수소 사슬은 충분히 연장되고 밀접히 충전된다. 액체 상에서 탄화수소 사슬은 무작위 배향되고 유체와 유사하다.

[0052] 수성 지질 혼합물의 T_m 은 유익하게 시차 주사 열량계(DSC)를 사용하여 측정될 수 있다. 열량 또는 열 분석은 제어된 분위기에서 시간 및 온도의 함수로서 물질의 전이와 관련된 열 유량의 측정을 허용한다. DSC는 일정한 속도($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)로 샘플을 가열 또는 냉각함으로써 샘플과 비활성 기준물질의 열 유량의 차이를 측정한다. 인지질을 포함하는 양친매성 물질(순수한 또는 혼합물)의 T_m 의 측정은, 예를 들어 DSC-Q2000 장치(TA Instruments, New Castle, DE, USA)를 사용하여 수행될 수 있다. T_m 을 결정하기 위해 전이가 시작되고 그것의 피크에 도달하는 온도 및 전이 엔탈피와 같은 변수가 측정된다. 측정의 상세한 내용은 실험 부분에 제공된다.

[0053] 양친매성 물질

[0054] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 적합한 양친매성 물질은, 예를 들어 인지질; 라이소인지질; 지방산, 예컨대 팔미트산, 스테아르산, 아라키돈산 또는 올레산; 지질 보유 고분자, 예컨대 키틴, 히알루론산, 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)("폐기화 지질"이라고도 함); 지질 보유 설포화 당당, 이당, 올리고당 또는 다당; 콜레스테롤, 콜레스테롤 설페이트 또는 콜레스테롤 헤미석시네이트; 토크페롤 헤미석시네이트; 에테르 또는 에스테르-결합 지방산을 가진 지질; 중합된 지질; 디아세틸 포스페이트; 디세틸 포스페이트; 세라마이드; 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르(예컨대 폴리옥시에틸렌 지방산 스테아레이트), 폴리옥시에틸렌 지방 알코올, 폴리옥시에틸렌 지방 알코올 에테르, 폴리옥시에틸화 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세롤 폴리에틸렌 글리콜 리시놀리에이트, 에톡실화 대두 스테롤, 에톡실화 피마자유 또는 에틸렌 옥사이드(EO) 및 프로필렌 옥사이드(PO) 블록 공중합체; 콜레스테롤 글루쿠로나이트, 라노스테롤 글루쿠로나이트, 7-디하이드로콜레스테롤 글루쿠로나이트, 에르고스테롤 글루쿠로나이트, 콜레스테롤 글루코네이트, 라노스테롤 글루코네이트, 또는 에르고스테롤 글루코네이트를 포함하는 당 산의 스테롤 에스테르; 라우릴 글루쿠로나이트, 스테아로일 글루쿠로나이트, 미리스토일 글루쿠로나이트, 라우릴 글루코네이트, 미리스토일 글루코네이트, 또는 스테아로일 글루코네이트를 포함하는 당 산 및 알코올의 에스테르; 수크로오스 라우레이트, 프럭토오스 라우레이트, 수크로오스 팔미테이트, 수크로오스 스테아레이트, 글루쿠론산, 글루콘산 또는 폴리우론산을 포함하는 지방산과 당의 에스테르; 사르사사포게닌, 스밀라게닌, 헤데라게닌, 올레아놀산, 또는 디기톡시게닌을 포함하는 사포닌; 글리세롤 모노팔미테이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 글리세롤 모노미리스테이트 또는 글리세롤 모노라우레이트를 포함하는 지방산을 가진 글리세롤 또는 글리세롤 모노에스테르; n-데실 알코올, 라우릴 알코올, 미리스틸 알코올, 세틸 알코올 또는 n-옥타데실 알코올을 포함하는 장쇄 알코올; 6-(5-콜레스텐-3 β -일옥시)-1-티오- β -D-갈락토피라노사이드; 디갈락토실-디글리세라이드; 6-(5-콜레스텐-3 β -일옥시)핵실-6-아미노-6-데옥시-1-티오- β -D-갈락토피라노사이드; 6-(5-콜레스텐-3 β -일옥시)핵실-6-아미노-6-데옥실-1-티오- β -D-만노피라노사이드; 12-(((7'-디에틸아미노-쿠마린-3-일)카보닐)메틸아미노)옥타데카노산; N-[12-(((7'-디에틸아미노-쿠마린-3-일)카보닐)메틸아미노)옥타데칸오일]-2-아미노팔미트산; N-석신일디올레일포스파티딜에탄올아민; 1,2-디올레일-sn-글리세롤; 1,2-디팔미토일-sn-3-석신일글리세롤; 1,3-디팔미토일-2-석신일글리세롤; 1-헥사데실-2-팔미토일글리세롤-포스포에탄올아민 또는 팔미토일-호모시스테인; 적어도 하나의 (C_{10} - C_{20}), 바람직하게 (C_{14} - C_{18}), 알킬 사슬을 포함하는 알킬아민 또는 알킬암모늄 염, 예컨대 예를 들어 N-스테아릴아민, N,N'-디스테아릴아민, N-헥사데실아민, N,N'-디헥사데실아민, N-스테아릴암모늄 클로라이드, N,N'-디스테아릴암모늄 클로라이드, N-헥사데실암모늄 클로라이드, N,N'-디헥사데실암모늄 클로라이드, 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(DDAB), 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드(CTAB); (C_3 - C_6) 알킬렌 브릿지를 통해서 N-원자에 결합된 하나 또는 바람직하게 2개의 (C_{10} -

C₂₀), 바람직하게 (C₁₄-C₁₈), 아실 사슬을 포함하는 3차 또는 4차 암모늄 염, 예컨대 예를 들어 1,2-디스테아로일-3-트리메틸암모늄프로판(DSTAP), 1,2-디팔미토일-3-트리메틸암모늄프로판(DPTAP), 1,2-올레일-3-트리메틸암모늄프로판(DOTAP), 1,2-디스테아로일-3-디메틸암모늄프로판(DSDAP); 및 이들의 혼합물 또는 조합을 포함한다.

- [0055] 바람직한 구체예에 따라서, 미세입자의 외피를 형성하는 화합물 중 적어도 하나는 인지질이며, 선택적으로 나머지 상기 인용된 물질 중 어느 것과 혼합된다. 본 설명에 따라서, 용어 인지질은 임의의 양친매성 인지질 화합물을 포괄하는 것으로 의도되며, 이들의 분자는, 특히 최종 미세소포의 현탁액에서 기체-물 계면에서, 물질의 안정화 필름(전형적으로 단-분자 층 형태의)을 형성할 수 있다. 따라서, 이들 물질은 본 분야에서 "필름-형성 인지질"이라고 언급되기도 한다.
- [0056] 양친매성 인지질 화합물은 전형적으로 적어도 하나의 포스페이트기와 적어도 하나의, 바람직하게는 2개의 친유성 장쇄 탄화수소기를 함유한다.
- [0057] 적합한 인지질의 예들은 하나 또는 바람직하게 2개(동일하거나 상이한)의 지방산 잔기 및 인산을 가진 글리세롤의 에스테르를 포함하며, 여기서 인산 잔기는 예를 들어 콜린(포스파티딜콜린 - PC), 세린(포스파티딜세린 - PS), 글리세롤(포스파티딜-글리세롤 - PG), 에탄올아민(포스파티딜에탄올아민 - PE), 이노시톨(포스파티딜이노시톨)과 같은 친수성기에 결합된다. 오직 하나의 지방산 잔기를 가진 인지질의 에스테르는 일반적으로 본 분야에서 인지질의 "라이소" 형태 또는 "라이소인지질"이라고 언급된다. 인지질에 존재하는 지방산 잔기는 일반적으로 장쇄 지방족 산이며, 전형적으로 12 내지 24개 탄소 원자, 바람직하게 14 내지 22개 탄소 원자를 함유한다; 지방족 사슬은 하나 이상의 불포화를 함유하거나 또는 바람직하게는 완전히 포화된다. 인지질에 포함되는 적합한 지방산의 예들은, 예를 들어 라우르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 베헨산, 올레산, 리놀레산, 및 리놀렌산이다. 바람직하게, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산 및 아라키드산과 같은 포화 지방산이 이용된다.
- [0058] 인지질의 추가의 예들은 포스파티드산, 즉 글리세롤-인산과 지방산의 디에스테르; 스펅고리피드, 예컨대 스펅고미엘린, 즉 지방산을 가진 글리세롤 디에스테르의 잔기가 세라마이드 사슬로 치환된 포스파티딜콜린 유사체; 카디오리핀, 즉 1,3-디포스파티딜글리세롤과 지방산의 에스테르; 글리코리피드, 예컨대 강글리오사이드 GM1(또는 GM2) 또는 세레브로사이드; 글루코리피드; 셀파타이드 및 글리코스펅고리피드이다.
- [0059] 여기 사용된 용어 인지질은 자연발생, 반합성 또는 합성 제조된 생성물을 포함하며, 이들은 단독으로 또는 혼합물로서 이용될 수 있다.
- [0060] 자연발생 인지질의 예들은 천연 레시틴(포스파티딜콜린(PC) 유도체), 예컨대 전형적으로 대두 또는 난황 레시틴이다.
- [0061] 반합성 인지질의 예들은 자연발생 레시틴의 부분적으로 또는 완전히 수소화된 유도체이다. 바람직한 인지질은 포스파티딜콜린, 에틸포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티드산, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨 또는 스펅고미엘린의 지방산 디에스테르이다.
- [0062] 바람직한 인지질의 예들은, 예를 들어 디라우로일포스파티딜콜린(DLPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디아라키도일포스파티딜콜린(DAPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC), 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-에틸포스포콜린(에틸-DSPC), 디펜타데칸오일포스파티딜콜린(DPDPC), 1-미리스토일-2-팔미토일포스파티딜콜린(MPPC), 1-팔미토일-2-미리스토일포스파티딜콜린(PMPC), 1-팔미토일-2-스테아로일포스파티딜콜린(PSPC), 1-스테아로일-2-팔미토일포스파티딜콜린(SPPC), 1-팔미토일-2-올레일포스파티딜콜린(POPC), 1-올레일-2-팔미토일포스파티딜콜린(OPPC), 디라우로일포스파티딜글리세롤(DLPG) 및 그것의 알칼리금속염, 디아라키도일포스파티딜글리세롤(DAPG) 및 그것의 알칼리금속염, 디미리스토일포스파티딜글리세롤(DMPG) 및 그것의 알칼리금속염, 디팔미토일포스파티딜글리세롤(DPPG) 및 그것의 알칼리금속염, 디스테아로일포스파티딜글리세롤(DSPG) 및 그것의 알칼리금속염, 디올레오일포스파티딜글리세롤(DOPG) 및 그것의 알칼리금속염, 디미리스토일포스파티드산(DMPA) 및 그것의 알칼리금속염, 디팔미토일포스파티드산(DPPA) 및 그것의 알칼리금속염, 디스테아로일포스파티드산(DSPA), 디아라키도일포스파티드산(DAPA) 및 그것의 알칼리금속염, 디미리스토일포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디팔미토일포스파티딜에탄올아민(DPPE), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디올레일포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디아라키도일포스파티딜에탄올아민(DAPE), 디리놀레일포스파티딜에탄올아민(DLPE), 디미리스토일포스파티딜세린(DMPS), 디아라키도일포스파티딜세린(DAPS), 디팔미토일포스파티딜세린(DPPS), 디스테아로일포스파티딜세린(DSPS), 디올레오일포스파티딜세린(DOPS), 디팔미토일 스펅고미엘린(DPSP), 및 디스테아로일스펅고미엘린(DSSP), 디라우로일포스파티딜이노시톨(DLPI), 디아라키도일

포스파티딜이노시톨(DAPI), 디미리스토일포스파티딜이노시톨(DMPI), 디팔미토일포스파티딜이노시톨(DPPI), 디스테아로일포스파티딜이노시톨(DSPI), 디올레오일포스파티딜이노시톨(DOPI)이다.

- [0063] 적합한 인지질은 또한 폴리에틸렌글리콜(PEG) 또는 폴리프로필렌글리콜(PPT)와 같은 친수성 고분자를 결합시킴으로써 변형된 인지질을 포함한다. 바람직한 고분자-변형 인지질은 "폐길화 인지질", 즉 PEG 고분자에 결합된 인지질을 포함한다. 폐길화 인지질의 예들은 폐길화 포스파티딜에탄올아민(간단히 "PE-PEG"), 즉 친수성 에탄올아민 부분이 다양한 분자량(예를 들어, 300 내지 20000, 바람직하게 500 내지 5000 달톤)의 PEG 분자, 예컨대 DPPE-PEG(또는 DSPE-PEG, DMPE-PEG, DAPE-PEG 또는 DOPE-PEG)에 결합된 포스파티딜에탄올아민이다. 예를 들어, DPPE-PEG2000은 약 2000의 평균 분자량을 가진 PEG 고분자가 부착된 DPPE를 말한다.
- [0064] 특히 바람직한 인지질은 DAPC, DSPC, DPPC, DMPA, DPPA, DSPA, DMPG, DPPG, DSPG, DMPS, DPPS, DSPS 및 에틸-DSPC이다. 가장 바람직한 것은 DPPG, DPPS 및 DSPC이다.
- [0065] 인지질의 혼합물, 예컨대 예를 들어 DPPE 및/또는 DSPE(폐길화 유도체를 포함하는), DPPC, DSPC 및/또는 DAPC와 DSPS, DPPS, DSPA, DPPA, DSPG, DPPG, 에틸-DSPC 및/또는 에틸-DPPC의 혼합물이 또한 사용될 수 있다.
- [0066] 예를 들어, 인지질의 혼합물은 포스파티딜콜린 유도체, 포스파티드산 유도체 및 폐길화 포스파티딜에탄올아민, 예를 들어 DSPC/DPPA/DPPE-PEG, DPPC/DPPA/DPPE-PEG, DSPC/DPPA/DSPE-PEG, DPPC/DPPA/DSPE-PEG, DAPC/DPPA/DPPE-PEG, DAPC/DPPA/DSPE-PEG, DSPC/DSPA/DPPE-PEG, DPPC/DSPA/DSPE-PEG, DSPC/DSPG/DPPE-PEG, DPPC/DSPG/DSPE-PEG를 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 한 구체예에 따라서, 인지질은 미세세포의 안정화 외피의 주 성분이며, 기체-충전 미세세포의 외피를 형성하는 성분의 전체 양의 적어도 50% (w/w), 바람직하게 적어도 75%를 차지한다. 바람직한 구체예의 일부에서, 실질적으로 외피 전체가 인지질로 형성될 수 있다(즉, 적어도 90% w/w).
- [0068] 인지질은 편리하게 상기 열거된 양친매성 화합물 중 어느 것과 혼합될 수 있다.
- [0069] 따라서, 예를 들어 지질, 예컨대 콜레스테롤, 에르고스테롤, 피토스테롤, 시토스테롤, 라노스테롤, 토코페롤, 프로필갈레이트 또는 아스코르빌팔미테이트, 지방산, 예컨대 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산 및 이들의 유도체 또는 부틸화 하이드록시톨루엔 및/또는 다른 비-인지질 화합물이 선택적으로 전술한 인지질 중 하나 이상에, 예를 들어 바람직하게 0 내지 50 중량%, 더 바람직하게 최대 25% 범위 비율로 첨가될 수 있다. 예를 들어, DSPC/DPPG/팔미트산, DPPC/DPPE-PEG/팔미트산, DSPC/DSPE-PEG/팔미트산, DPPC/DSPE-PEG/팔미트산, DSPC/DPPE-PEG/스테아르산, DPPC/DPPE-PEG/스테아르산, DSPC/DSPE-PEG/스테아르산 또는 DPPC/DSPE-PEG/스테아르산을 포함하는, 인지질을 포함하는 양친매성 물질과 지방산의 혼합물이 유익하게 사용될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 방법에 따라서 제조된 미세입자는 선택적으로 표적화 리간드를 포함할 수 있다.
- [0071] 용어 "표적화 리간드"는 그것의 의미 안에서 생체 내의 임의의 생물학적 또는 병리학적 부위를 향한 본 발명의 조성물의 미세입자의 표적화 활성(예를 들어, 선택적 결합을 포함하는)을 가지거나, 또는 표적화 활성을 촉진할 수 있는 임의의 화합물, 부분 또는 잔기를 포함한다. 표적화 리간드가 결합될 수 있는 표적은, 예를 들어 심근 조직(심근 세포 및 심근세포를 포함하는), 막성 조직(내피 및 상피를 포함하는), 라미나, 결합 조직(간질 조직을 포함하는) 또는 종양과 같은 조직; 응혈; 및 수용체, 예컨대 예를 들어 펩타이드 호르몬, 신경전달물질, 항원, 보체 단편 및 면역글로불린에 대한 세포-표면 수용체 및 스테로이드 호르몬에 대한 세포질 수용체를 포함한다.
- [0072] 표적화 리간드는 합성, 반합성, 또는 자연발생 리간드일 수 있다. 표적화 리간드로서 작용할 수 있는 재료 또는 물질은, 예를 들어 항체, 항체 단편, 수용체 분자, 수용체 결합 분자, 당단백질 및 렉틴을 포함하는 단백질; 올리고펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 펩타이드; 펩타이드미메틱스; 단당류 및 다당류를 포함하는 당류; 비타민; 스테로이드, 스테로이드 유사체, 호르몬, 보조인자, 생물활성제 및 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 물질을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 표적화 리간드는 양친매성 화합물 자체이거나(이것은 미세세포의 나머지 성분과 혼합된다) 또는 미세입자의 형성에 이용된 양친매성 분자(예를 들어, 인지질)에 결합된 화합물일 수 있다.
- [0074] 하나의 바람직한 구체예에서, 표적화 리간드는 공유 결합을 통해서 미세입자의 안정화 외피를 형성하는 양친매성 분자(예를 들어, 인지질)에 결합될 수 있다. 원하는 표적화 리간드를 공유 결합시키기 위해, 미세입자 외피를 형성하는 양친매성 화합물의 적어도 일부는 적합한 반응성 부분을 함유해야 하고, 상보적 관능성을 함유하는 표적화 리간드가 공지된 기술에 따라서, 예를 들어 미세입자의 양친매성 성분을 포함하는 분산물에 그것을 첨가

함으로써 거기에 결합될 것이다. 바람직하게, 양친매성 화합물은 지질 보유 친수성 고분자, 예컨대 앞서 언급된 것들, 바람직하게 폐길화 인지질이다. 이 경우, 표적화 리간드는 친수성 고분자 상의 적합한 반응성 부분에 결합된다. 양친매성 화합물은 미세소포를 제조하기 전에 원하는 표적화 리간드와 조합될 수 있고, 이렇게 얻어진 조합물이 미세소포의 제조에 사용될 수 있다. 대안으로, 미세소포가 먼저 제조될 수 있으며, 이것은 표적화 리간드의 상응하는 상보적 부분과 상호작용할 수 있는 적합한 부분을 가진 화합물(지질 또는 고분자-변형 지질)을 포함한다; 이후, 원하는 표적화 리간드가 미세소포 현탁액에 첨가됨으로써 미세소포 상의 상응하는 상보적 부분에 결합된다. 대안의 구체예에 따라서, 표적화 리간드는 또한 물리적 및/또는 정전기적 상호작용을 통해서 미세입자와 결합될 수 있다.

[0075] 액체 흐름

[0076] 본 발명의 방법에서 사용된 액체는 양친매성 물질(상기 정의된 것과 같은)을 바람직하게는 수성 캐리어에 분산된 상태로, 예를 들어 5.0 내지 20 mg/mL, 바람직하게 7.5 내지 15 mg/mL의 농도로 포함한다. 바람직하게 생리학적으로 허용되는, 적합한 수성 캐리어는 물(바람직하게 멸균수), 식염수와 같은 수성 용액(이것은 유익하게 최종 주사 제품이 저장성(hypotonic)이 되지 않도록 균형을 맞출 수 있다), 또는 하나 이상의 장성(tonicity) 조정 물질의 용액을 포함한다. 장성 조정 물질은 염 또는 당, 당 알코올, 글리콜 또는 다른 비-이온성 폴리올 물질(예를 들어, 글루코오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 등), 키토산 유도체, 예컨대 카복시메틸 키토산, 트리메틸 키토산 또는 겔화 화합물, 예컨대 카복시메틸셀룰로오스, 하이드록시메틸 녹말 또는 텍스트란을 포함한다.

[0077] 대안의 구체예에서, 특히 제1 유체 흐름이 기체일 때, 미세소포에 치료적 소수성 물질을 통합시키기 위해 추가의 오일상이 첨가될 수 있다. 이를 위해, 예를 들어 참고문헌 5에 설명된 대로, 원하는 오일상을 공급하기 위한 2개의 추가 도관이 장치에 제공될 수 있다. 따라서, 형성된 기체-충전 미세소포는, 원하는 치료제가 탑재될 수 있는 양친매성 물질의 안정화 층과 기체 사이의 계면에 배치된 오일의 필름을 가질 것이다. 적합한 오일은 실온에서 액체인 임의의 생체적합성 오일을 포함할 수 있으며, 이들은 예를 들어 글리세롤과 포화 또는 불포화(C₂-C₁₈) 알킬 사슬의 모노-, 디- 또는 트리-에스테르(호모- 또는 헤테로-알킬에스테르를 포함하는), 예컨대 글리세롤 모노부티린, 글리세롤 모노리놀리에이트, 1,2-디핵산오일글리세롤, 1,2-디옥탄오일글리세롤, 1,2-디올레일-sn-글리세롤, 트리아세틴, 트리부티린, 트리카프로인, 트리카프릴린, 트리카프린, 및 이들의 혼합물; 또는 천연 오일, 예컨대 콩 오일, 올리브 오일, 홍화씨 오일, 해바라기씨 오일, 땅콩 오일 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0078] 제1 유체 흐름

[0079] 바람직한 구체예에 따라서, 제1 유체 흐름은 기체 또는 그것의 전구체이다.

[0080] 본 발명의 목적에 있어서, 임의의 생체적합성 기체, 기체 전구체 또는 이들의 혼합물이 미세소포의 제조를 위해 이용될 수 있다(이후 "미세소포-형성 기체"로서 확인됨).

[0081] 기체는, 예를 들어 공기; 질소; 산소; 이산화탄소; 수소; 아산화질소; 희가스 또는 비활성 기체, 예컨대 헬륨, 아르곤, 제논 또는 크립톤; 저분자량 탄화수소(예를 들어, 최대 7개 탄소 원자를 함유하는), 예를 들어 알칸, 예컨대 메탄, 에탄, 프로판, 부탄, 이소부탄, 펜탄 또는 이소펜탄, 시클로알칸, 예컨대 시클로부탄 또는 시클로펜탄, 알켄, 예컨대 프로펜, 부텐 또는 이소부텐, 또는 알킨, 예컨대 아세틸렌; 에테르; 케톤; 에스테르; 할로겐화 가스, 바람직하게 불화 가스, 예컨대 또는 할로겐화, 불화 또는 과불화 저분자량 탄화수소(예를 들어, 최대 7개 탄소 원자를 함유하는); 또는 전술한 것들 중 어느 것의 혼합물을 포함할 수 있다. 할로겐화 탄화수소가 사용되는 경우, 상기 화합물에서 할로겐 원자의 바람직하게 적어도 일부, 더 바람직하게 전부는 불소 원자이다.

[0082] 불화 가스, 특히 과불화 가스가 바람직하다. 불화 가스는 적어도 하나의 불소 원자를 함유하는 물질, 예컨대 예를 들어 불화 탄화수소(하나 이상의 탄소 원자와 불소를 함유하는 유기 화합물); 황 육불화물; 불화, 바람직하게 과불화, 케톤, 예컨대 퍼플루오로아세톤; 및 불화, 바람직하게 과불화, 에테르, 예컨대 퍼플루오로디에틸 에테르를 포함한다. 바람직한 화합물은 과불화 가스, 예컨대 SF₆ 또는 퍼플루오로카본(과불화 탄화수소), 즉 모든 수소 원자가 불소 원자로 치환된 탄화수소이며, 이것은 특히 안정한 기체-충전 미세소포 현탁액을 형성하는 것으로 알려져 있다.

[0083] 용어 퍼플루오로카본은 포화, 불포화, 및 환형 퍼플루오로카본을 포함한다. 생체적합성, 생리학적으로 허용되

는 퍼플루오로카본의 예들은 퍼플루오로알칸, 예컨대 퍼플루오로메탄, 퍼플루오로에탄, 퍼플루오로프로판, 퍼플루오로부탄(예를 들어, 퍼플루오로-n-부탄, 선택적으로 퍼플루오로이소부탄과 같은 다른 이성질체와의 혼합물), 퍼플루오로펜탄, 퍼플루오로헥산 또는 퍼플루오로헵탄; 퍼플루오로알켄, 예컨대 퍼플루오로프로펜, 퍼플루오로부텐(예를 들어, 퍼플루오로부트-2-엔) 또는 퍼플루오로부타디엔; 퍼플루오로알킨(예를 들어, 퍼플루오로부트-2-인); 및 퍼플루오로시클로알칸(예를 들어, 퍼플루오로시클로부탄, 퍼플루오로메틸시클로부탄, 퍼플루오로디메틸시클로부탄, 퍼플루오로트리메틸시클로부탄, 퍼플루오로시클로펜탄, 퍼플루오로메틸시클로펜탄, 퍼플루오로디메틸시클로펜탄, 퍼플루오로시클로헥산, 퍼플루오로메틸시클로헥산 및 퍼플루오로시클로헵탄)이다. 바람직한 포화 퍼플루오로카본은, 예를 들어 CF_4 , C_2F_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} , C_5F_{12} 및 C_6F_{14} 를 포함한다.

[0084] 또한, 임의의 비율로 상기 기체들 중 어느 것의 혼합물을 사용하는 것이 유익할 수 있다. 예를 들어, 혼합물은 종래의 기체, 예컨대 질소, 공기 또는 이산화탄소와 상기 나타난 것과 같은 안정한 미세소포 현탁액을 형성하는 기체, 예컨대 황 옥불화물 또는 퍼플루오로카본을 포함할 수 있다. 적합한 기체 혼합물의 예들은, 예를 들어 참고문헌 6에서 찾을 수 있다.

[0085] 다음의 조합이 특히 바람직하다: 기체 (A)와 (B)의 혼합물로서, 기체 (B)는 앞서 예시된 것들 중에서 선택된 이들의 혼합물을 포함하는 불화 가스이고, (A)는 공기, 산소, 질소, 이산화탄소 또는 이들의 혼합물로부터 선택된다. 기체 (B)의 양은 전체 혼합물의 약 0.5% 내지 약 95% v/v, 바람직하게 약 5% 내지 80%일 수 있다.

[0086] 특히 바람직한 기체는, 선택적으로 공기, 산소, 질소, 이산화탄소 또는 이들의 혼합물과 혼합된, SF_6 , C_3F_8 , C_4F_{10} 또는 이들이 혼합물이다.

[0087] 특정 환경에서, 기체상 물질의 전구체를 포함하는 것이 바람직할 수 있다(즉, 생체내에서 기체로 전환될 수 있는 물질). 바람직하게, 기체상 전구체와 그로부터 유래된 기체는 생리학적으로 허용된다. 기체상 전구체는 pH-활성화되거나, 광-활성화되거나, 온도 활성화되거나, 등등 일 수 있다. 예를 들어, 특정한 퍼플루오로카본이 온도 활성화 기체상 전구체로서 사용될 수 있다. 이들 퍼플루오로카본, 예컨대 퍼플루오로펜탄 또는 퍼플루오로헥산은 실온(또는 해당 체제가 생성 및/또는 보관되는 온도) 위지만 체온 아래인 액체/기체 상 전이 온도를 가진다; 따라서, 이들은 액체/기체 상 전이를 겪고 인체 내에서 기체로 전환될 수 있다.

[0088] 대안의 구체예에 따라서, 제1 유체 흐름의 성분은 액체일 수 있다.

[0089] 한 구체예에서, 상기 액체는 실질적으로 물과 비혼화성이다. 적합한 액체는, 예를 들어 참고문헌 1에 열거된 것들이며, 이들은 예를 들어 알칸, 예컨대 분지형 또는 바람직하게 선형 (C_5 - C_{10}) 알칸, 예를 들어 펜탄, 헥산, 헵탄, 옥탄, 노난, 데칸; 알켄, 예컨대 (C_5 - C_{10}) 알켄, 예를 들어 1-펜텐, 2-펜텐, 1-옥텐; 시클로알칸, 예컨대 선택적으로 하나 또는 2개의 메틸기로 치환된 (C_5 - C_8)-시클로알칸, 예를 들어 시클로펜탄, 시클로헥산, 시클로옥탄, 1-메틸시클로헥산; 방향족 탄화수소, 예컨대 벤젠 및 하나 또는 2개의 메틸 또는 에틸 기로 치환된 벤젠 유도체, 예를 들어 벤젠, 톨루엔, 에틸벤젠, 1,2-디메틸벤젠, 1,3-디메틸벤젠; 알킬 에테르 및 케톤, 예컨대 디부틸에테르 및 디이소프로필케톤; 할로겐화 탄화수소 또는 에테르, 예컨대 클로로폼, 사염화탄소, 2-클로로-1-(디플루오로메톡시)-1,1,2-트리플루오로에탄(엔플루란), 2-클로로-2-(디플루오로메톡시)-1,1,1-트리플루오로에탄(이소플루란), 테트라클로로-1,1-디플루오로에탄, 및 특히 과불화 탄화수소 또는 에테르, 예컨대 퍼플루오로펜탄, 퍼플루오로헥산, 퍼플루오로헵탄, 퍼플루오로메틸시클로헥산, 퍼플루오로옥탄, 퍼플루오로노난, 퍼플루오로벤젠 및 퍼플루오로데칼린, 메틸퍼플루오로부틸에테르, 메틸퍼플루오로이소부틸에테르, 에틸퍼플루오로부틸에테르, 메틸퍼플루오로이소부틸에테르; 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0090] 대안으로, 상기 액체는, 예를 들어 상기 예시된 것과 같은 글리세롤의 에스테르 또는 천연 오일을 포함하는 생체적합성 오일일 수 있다.

[0091] 제1 유체 흐름의 성분의 비등 온도에 따라, 상기 성분은 현탁액의 제조 과정 및/또는 후속 보관 동안 상이한 전이 상을 거칠 수 있다.

[0092] 예를 들어, 성분이 상대적으로 낮은 비등점을 가진다면(예를 들어, 실온보다 약간 위), 그것은 실온에서 액체로서 공급되고, 이후 T_m 위에서의 가열로 인해 기체(또는 증기)로 변형되며, 이어서 다시 실온에 보관된 최종 미세입자에서는 액체가 될 수 있다. 대안으로, 액체 성분은 그것의 비등점 위에서 가열될 수 있고(예를 들어, T_m 에서 또는 근처에서), 이로써 그것은 기체 또는 증기로서 공급될 수 있다; 실온으로 미세입자의 냉각시에 성분은 응축되고, 따라서 액체-중전 미세액적이 제공된다.

[0093] 한 구체예에서, 조정된 액체-충전 미세액적의 결과의 현탁액은 후속 동결건조 과정으로 진행될 수 있고, 이로써 동결건조된 케이크가 얻어질 수 있으며, 이것은 이후 예를 들어 참고문헌 1에 설명된 대로, 기체(상기 예시된 것들과 같은)의 분위기하에 바이알에 보관될 수 있다. 다음에, 케이크가 부드러운 교반에 의해 적합한 수성 액체와 함께 복원됨으로써 기체-충전 미세소포의 현탁액이 얻어질 수 있다. 이 경우, 동결보호제(예를 들어, 참고문헌 1에 예시된 것들 중 하나)가 액체 흐름에 직접 첨가되든 미세액적의 형성된 수성 현탁액에 첨가되든, 현탁액에 첨가될 수 있다.

[0094] 사용

[0095] 본 발명의 방법에 따라서 제조된 미세입자는 특히 초음파 및 자기공명을 포함하는 여러 가지 진단 및/또는 치료 기술에서 사용될 수 있다.

[0096] 진단 기술은 기체-충전 미세소포의 사용이 전임상 및 임상 연구 목적의 영상화를 포함하여 동물(인간을 포함하는) 신체의 일부 또는 부분의 시각화의 증강을 허용하는 임의의 방법을 포함한다.

[0097] 예를 들어 펀더멘탈 및 하모닉 B-모드 영상화, 진폭 변조, 펄스 또는 상 반전 영상화 및 펀더멘탈 및 하모닉 도플러 영상화를 포함하는 여러 가지 영상화 기술이 초음파 용도에서 이용될 수 있다; 원한다면 3-차원 영상화 기술이 사용될 수 있다.

[0098] 진단적 사용을 위한 미세소포는, 예를 들어 각각의 조성, 영상화될 조직이나 장기 및/또는 선택된 영상화 기술에 따라 환자 kg 당 약 0.01 내지 약 1.0 μL의 농도로 투여(예를 들어, 주사에 의해)될 수 있다. 물론 이 일반적인 농도 범위는 구체적인 영상화 적용에 따라, 예를 들어 진폭 변조 및 펄스 반전 영상화와 같이 매우 낮은 용량에서 신호가 관찰될 수 있는 경우에는 변할 수 있다.

[0099] 가능한 다른 진단 영상화 용도는 신티그래피, 광 영상화, 및 엑스선 조영 영상화를 포함하는 엑스선 영상화를 포함한다.

[0100] 치료 기술은 미세입자 그대로(예를 들어, 허혈성 뇌졸중, 응혈 용해 등의 초음파 매개 치료) 또는 그것과 치료제와의 조합(예를 들어, 유전자 요법이나 백신으로서의 사용과 같은 선택된 부위 또는 조직에 생물활성 화합물의 송달)의 사용을 포함하는 환자의 임의의 치료 방법(상기 정의된 것과 같은)을 포함하며, 이것은 스스로 또는 다양한 물리적 방법(예를 들어, 초음파 매개 송달을 포함하는)에 의한 특정한 활성화시에 시험관내 및/또는 생체내에서 생물학적 효과를 발휘할 수 있거나 발휘하는 것을 책임질 수 있다.

[0101] 치료적 치료를 위한 미세소포는 전형적으로, 예를 들어 각각의 조성, 치료중인 대상의 타입, 치료될 조직이나 장기 및/또는 적용된 치료 방법에 따라 환자 kg 당 약 0.01 내지 약 5.0 μL의 농도로 투여될 수 있다.

[0102] 아래의 실시예는 본 발명을 더 예시하는 것을 도울 것이다.

[0103] 실시예

[0104] 재료

DPPC	디팔미토일-포스파티딜콜린	(1)
DSPC	디스테아로일-포스파티딜콜린	(1)
DPPA	디팔미토일 포스파티드산	(1)
DPPE-PEG5000	디팔미토일포스파티딜에탄올아민-폴리에틸렌글리콜 5000	(1)

(1) CordenPharma International, Plankstadt, Germany

[0105] 실시예 1

[0107] 양친매성 물질의 수성 분산물의 제조

[0108] 상이한 상 전이 온도(T_m)를 가진 양친매성 물질의 두 혼합물을 사용했다:

[0109] M1: DSPC:DPPA:DPPE-PEG5000 ($T_m = 55^\circ\text{C}$)

[0110] M2: DPPC:DPPA:DPPE-PEG5000 ($T_m = 44^\circ\text{C}$)

[0111] (둘 다 8:1:1의 몰비)

[0112] 물질들을 60°C에서 교반하면서 2:1(부피비) 클로로폼/메탄올 혼합물에 20 mg/mL의 농도로 상기 물비로 첨가하고 양친매성 물질을 완전히 용해시켰다. 다음에, 용매를 감압하에 증발시키고 얻어진 필름을 감압하에 하룻밤 건조시켰다. 다음에, 건조된 물질을 30분 동안 교반하면서 60°C에서 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 물의 혼합물 (GPW, 5:5:90의 부피비)에 다시 분산시켰다("미세소포의 제조" 부문에 상세히 설명된 대로, 5 내지 15 mg/mL의 농도로). TRIS 버퍼(20mM)를 첨가하여 pH 값을 pH 7로 조정했다. 다음에, 이 분산물을 텡 소니케이터(Branson Sonifier 250)를 사용하여 소니케이션해서 물질을 균질하게 분산시켰다. 다음에, 제조물을 폴리카보네이트 필터(0.45 μm 기공 크기)를 사용하여 여과하고 실온으로 냉각하고 탈기했다.

[0113] 전이 온도의 측정

[0114] 양친매성 물질(순수한 DPPC 또는 DSPC, 및 DPPC:DPPA:DPPE-PEG5000의 혼합물 또는 DSPC:DPPA:DPPE-PEG5000의 혼합물)의 전이 온도를 Tzero 알루미늄 도가니(TA Instruments, New Castle, DE USA)에서 상업용 시차 주사 열량계 DSC-Q2000을 사용하여 결정했다. 온도 및 열 유량을 포함하는 시스템 캘리브레이션은 인듐 금속을 가지고 수행했다(융합 엔탈피 28.71 J/g ± 0.5 J/g; 융합 개시 온도 156.6°C ± 0.25°C).

[0115] GPW/TRIS 중의 양친매성 물질(순수한 또는 혼합물)의 분산물을 DSC 측정을 위해 상기 설명된 과정에 따라서 제조했다(각각 약 30 μL, 농도 10 mg/mL).

[0116] DSC 측정은 20°C 내지 80°C의 온도 범위에 걸쳐서 2°C/min의 일정한 온도 속도로 가열함으로써 수행했다. 질소를 50mL/min의 유속으로 퍼징 기체로 사용했다.

[0117] 결과가 아래 표에 예시된다:

	시작 전이 온도 (°C)	전이 피크 T _m (°C)
DPPC	40	42
DSPC	52	55
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	41	44
DSPC/DPPA/DPPE-PEG5000	52	55

[0118] 실시예 2

[0120] 기체-충전 미세소포의 제조

[0121] 기체 및 액체 공급 튜빙(Peek Upchurch, 1/16 인치 O.D, 150 μm I.D)과 칩의 누출방지(leak tight) 연결을 허용하는 상업적으로 이용가능한 칩 홀더(Dolomite microfluidics, 부품번호: 3000024, 3000109, 3000021)에 장착된, 상업적으로 이용가능한 미세유체 플로우-포커싱 장치(Dolomite microfluidics, 소형 액적 칩, 14 m 식각 깊이, 부품번호: 3200136)를 사용하여 미세소포를 합성했다. 미세소포 형성 채널은 너비 17 μm 및 길이 135 μm 를 가졌다. 전체 채널 깊이는 14 μm였다. 칩과 그것의 홀더를 20배 배율 대물렌즈(Olympus, LMPLAN 20x)와 CCD 카메라(Lumenera, LM156M)를 구비한 도립 현미경 상에 장착된 광학적으로 투명한 온도 제어 수조에 배치했다. 액체 공류(co-flow) 속도를 주사기 펌프(Harvard PHD4400)를 사용하여 제어했다. 기체(SF₆) 압력은 압력 센서(Omega, DPG1000B-30G)에 연결된 압력 조절장치(Omega, PRG101-25)를 사용하여 제어했다. 개별 미세소포는 기록된 광학 이미지로부터 자동 검출되었고, 이로써 PC에서 Matlab 소프트웨어(The Mathworks Inc., Natick, MA)를 사용하여 오프라인으로 그것의 크기를 측정할 수 있다. 두 상이한 액체 공류 속도를 시험하여 (45 μL/min 또는 55 μL/min), 드립핑 방식 또는 더 바람직한 젯팅 방식하에 플로우-포커싱 장치를 각각 작동 시켰다.

[0122] 밀봉 바이알에 미세소포 현탁액을 수집하고 실온에 보관했다.

[0123] 형성된 미세소포의 가열 효과

[0124] 도 4a 내지 4e는 5 내지 15 mg/mL의 범위의 양친매성 물질의 농도하에(각각 도 4a-4e) 미세유체 칩(도 2에 예시된 것과 유사한)을 함유하는 상이한 온도의 항온조에서, 상기 제조된 것과 같은 DSPC/DPPA/DPPE-PEG5000 현탁액 (T_m 55°C)의 액체 공류를 사용하여 얻어진 결과를 보여준다. 사각형(■)은 드립핑 방식하에 수행된 실험을 나타내고, 삼각형(▲)은 더 바람직한 젯팅 방식하에 수행된 실험을 나타낸다.

[0125] 이들 도면에서 관찰될 수 있는 대로, 미세소포의 응집 퍼센트(C[%])는 일반적으로 젯팅 방식과 비교하여 드립핑 방식에서 더 낮다. 또한, 드립핑 방식과 젯팅 방식에서 모두, 온도를 증가시킴으로써 응집이 감소하는 유의한

효과가 드러난다. 특히 젯팅 방식을 고려하면, 7.5 mg/mL의 농도에서(도 4b) 온도를 양친매성 물질의 T_m (55°C) 이상으로 증가시키는 것은 약 10% 이하의 미세소포의 응집을 가져온다. 젯팅 방식에서 또 중요한 점은 양친매성 물질의 T_m 이상으로 가열하는 것이 10 mg/mL의 양친매성 물질의 농도에서(도 4c) 1% 미만의 응집을 제공한다는 것이다. 양친매성 물질의 농도를 15 mg/mL(도 4e)로 증가시킴으로써 유사한 결과가 실온에서 얻어질 수 있다. 이 경우, 양친매성 물질의 농도는 50%만큼 증가될 필요가 있다는 것을 주지한다.

[0126] 따라서, 이들 결과는 양친매성 물질의 T_m 근처의 온도를 유지함으로써 응집 효과의 감소가 얻어질 수 있다는 것을 증명한다(더 낮은 온도의 동일한 제조물에 대해 측정된 더 높은 응집과 비교하여). 이 결과는 또한 양친매성 물질의 T_m 근처의 온도를 유지함으로써 실질적으로 더 낮은 농도의 양친매성 물질을 사용함에 의해 유사한 응집 퍼센트가 얻어질 수 있다는 것을 보여준다(가열이 적용되지 않은 경우 필요한 더 높은 농도와 비교하여).

[0127] 도 5는 상이한 온도의 항온조에서 10 mg/mL의 양친매성 물질의 농도하에 상기 제조된 것과 같은 DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000 현탁액(T_m 44°C)의 액체 공류를 사용하여 얻어진 결과를 나타낸다. 상기 논의된 결과와 유사하게, 이 경우에도 양친매성 물질의 T_m 근처나 그보다 높은 온도로 가열했을 때 1% 이하의 응집이 얻어진다.

[0128] 현탁액의 하류 냉각의 효과

[0129] 미세소포의 분산성에 대한 하류 냉각의 효과를 평가하기 위해 상이한 냉각 조건을 시험했다.

[0130] 셋업 A(초기-냉각 현탁액)에 따라서, 미세소포 형성 후 3ms에 현탁액을 열교환기(20°C에서)를 통과시켜 현탁액의 온도를 T_m 아래로, 특히 실온으로 급히 감소시켰다. 따라서, 항온조에서 칩으로부터 빠져나온 튜빙은 칩의 출구로부터 약 0.5mm 뒤에서 열교환기를 통과했다.

[0131] 셋업 B(후기-냉각 현탁액)에 따라서, 미세소포 형성 후 3분에 현탁액을 동일한 열교환기를 통과시켰다. 따라서, 이 두 번째 구성에서 칩으로부터 빠져나온 튜빙은 내경이 1mm인 튜빙으로 대체되었고, 이 튜빙은 약 20cm의 길이만큼 항온조에서 유지된 후 열교환기를 통과했다.

[0132] 두 셋업 모두 55, 65 및 75 μ L/min의 유속에서 시험했고, 결과는 도 6a, 6b 및 6c에 각각 도시된다(X 축 = 직경(mm), Y 축 = 상대적 미세소포 수). 도 6a-6c에서 점선은 후기-냉각 제조물의 크기 분포를 나타내고, 실선은 초기-냉각 제조물의 크기 분포를 나타낸다. 이들 도면으로부터 초기-냉각 현탁액의 PDI가 상응하는 후기-냉각 현탁액의 PDI와 비교하여 더 낮다는 것이 분명하다. 또한, 이들 도면으로부터 미세소포의 평균 크기는 흐름 속도의 증가에 따라 감소한다는 것이 인정될 수 있다.

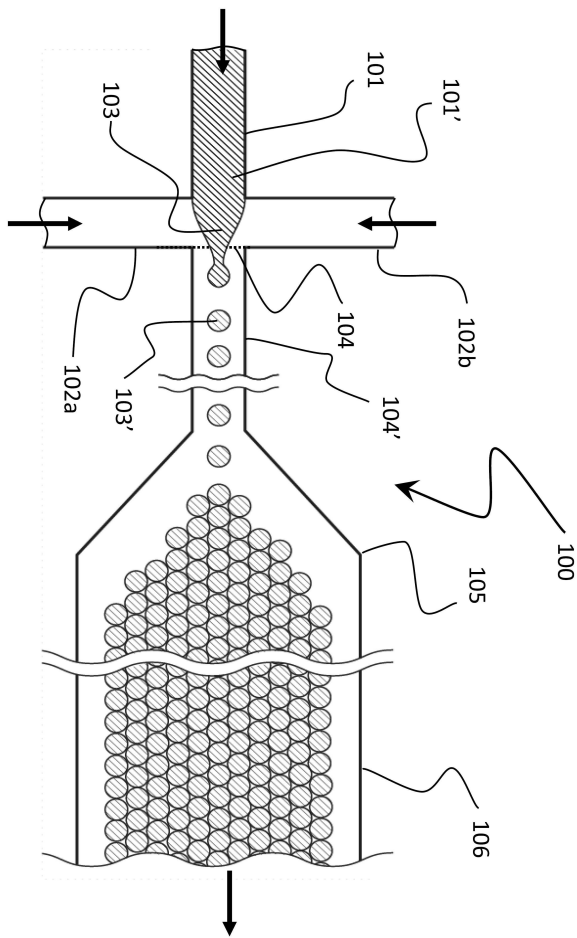
[0133] 양친매성 물질의 다른 혼합물, 특히 앞서 예시된 양친매성 물질들의 조합에서도 유사한 결과가 얻어질 수 있다.

[0134] 참고문헌

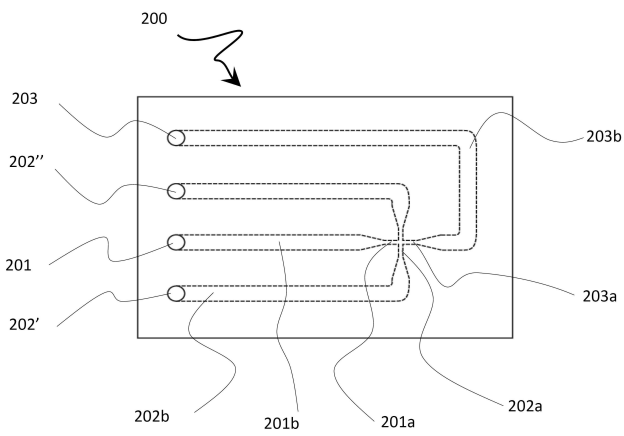
- [0135] 1. WO 04/069284
- [0136] 2. Utada, A. S et al., "Dripping to jetting transitions in co-flowing liquid streams", Phys. Rev. Lett. 2007, 99, 094502
- [0137] 3. 국제특허공개 WO 2013/141695
- [0138] 4. Castro-Hernandez, E. et al., "Microbubble generation in a co-flow device operated in a new regime", Lab. Chip. 2011, 11 (12), 2023-9
- [0139] 5. R. Shih et al., "Flow-focusing regimes for accelerated production of monodisperse drug-loadable microbubbles toward clinical-scale applications", Lab. Chip 13, 4816-4826 (2013)
- [0140] 6. 국제특허공개 WO 95/16467

도면

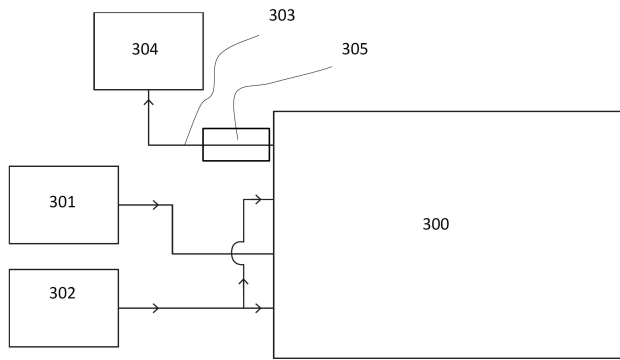
도면1



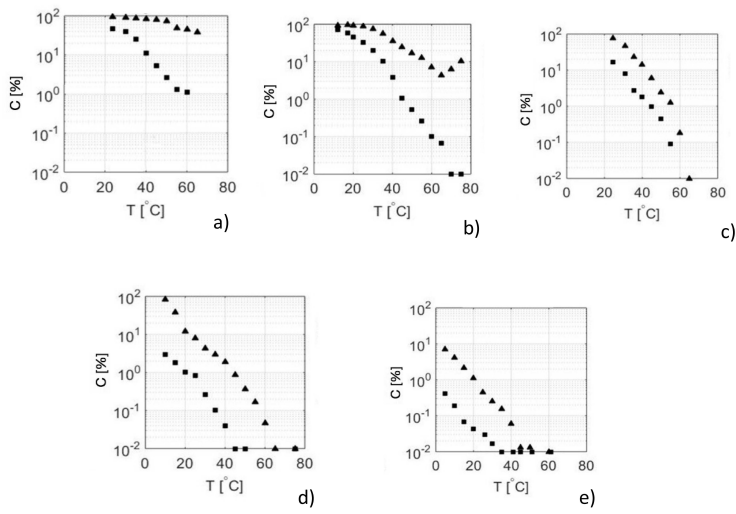
도면2



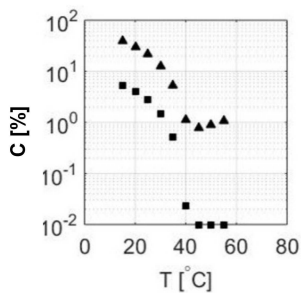
도면3



도면4



도면5



도면6

