



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0075650  
(43) 공개일자 2018년07월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 9/51* (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 9/5146* (2013.01)  
*A61K 9/0014* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7015274
- (22) 출원일자(국제) 2016년10월31일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년05월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/059661
- (87) 국제공개번호 WO 2017/075565  
국제공개일자 2017년05월04일
- (30) 우선권주장  
62/248,432 2015년10월30일 미국(US)

- (71) 출원인  
더 존스 홉킨스 유니버시티  
미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 찰스 스트리트  
3400 엔.
- (72) 발명자  
헤인즈, 저스틴  
미합중국 21212 메릴랜드 볼티모어 파인히스트 로  
드 6306  
마이셀, 카타리나  
미합중국 48098 미시간 트로이 펜로즈 드라이브  
4055  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
박창남, 정대섭

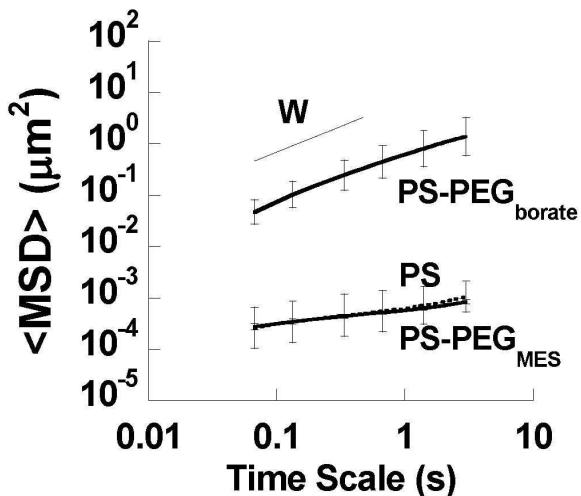
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 고분자량 및 고밀도 코팅을 갖는 점액 침투성 입자

### (57) 요 약

점액 침투성 입자(MPP)는 하나 이상의 코어 중합체, 하나 이상의 치료제, 예방제 및/또는 진단제; 및 하나 이상의 표면 개질제를 포함한다. 표면 개질제는 표면 개질되지 않은 등가의 나노 입자에 비해 점막을 통하는 개질된 나노 입자의 확산을 향상시키기에 충분한 밀도로 입자 표면을 코팅한다. 나노 입자는 약 0.1 내지 약 100 분자/ $100\text{ nm}^2$ , 바람직하게는 약 0.5 내지 약 100  $\text{nm}^2$ 의 표면 밀도로 코팅된 10 kD 내지 40 kD 이상의 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)로 충분히 조밀하게 코팅될 수 있다. 50 분자/ $100\text{ nm}^2$ , 보다 바람직하게는 약 0.9 내지 약 45 분자/ $100\text{ nm}^2$ 이다.

**대 표 도** - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 9/0031* (2013.01)

*A61K 9/0034* (2013.01)

*A61K 9/5153* (2013.01)

(72) 발명자

**엔선, 로라, 엠.**

미합중국 21286 메릴랜드 토슨 버크 애비뉴 이스트

228

**콘, 리처드**

미합중국 21210 메릴랜드 볼티모어 오크데일 로드  
302

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

치료적, 예방적 또는 진단적 제제를 점막을 통해 피하 내피의 상피에 전달하기 위한 점액 침투성 입자이고, 입자를 형성하는 하나 이상의 코어 중합체;

하나 이상의 치료적, 예방적 및/또는 진단적 제제; 및

하나 이상의 표면 개질제;를 포함하고, 상기 표면 개질제는, 폴리알킬렌 옥사이드 중합체를 포함하고, 약 5 kDa 초과 내지 약 100 kDa 초과, 바람직하게는 약 10 kDa 내지 약 40 kDa의 분자량을 가지며,

상기 표면 개질제는 약 0.1 내지 약 100 분자/100 nm<sup>2</sup>의 1H NMR에 의해 측정 될 때 충분한 밀도로 존재하며, 표면 개질되지 않은 입자에 대한 개질된 입자의 점막 확산을 향상시키는, 점액 침투성 입자.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 표면 개질제가 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리에틸렌 글리콜-폴리에틸렌 옥사이드 블록 공중합체, 폴리(비닐 피롤리돈), 폴리(아크릴아미드) 및 그의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 중성 폴리머인 점액 침투성 입자.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 하나의 표면 개질제가 약 5 kDa 내지 약 40 kDa, 보다 바람직하게는 약 20 kDa의 분자량을 갖는 폴리(에틸렌 글리콜)인 점액 침투성 입자.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, <sup>1</sup>H NMR로 측정시 폴리(에틸렌 글리콜)의 표면 밀도가 약 0.5 내지 약 50 분자/100 nm<sup>2</sup>, 보다 바람직하게는 약 0.9 내지 약 45 분자/100 nm<sup>2</sup>.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜)의 표면 충전 밀도가 하기 식 1의 함수로서 측정되는 경우 1.5 이상 1.5 이하인 점액 침투 입자.

$\Gamma / SA =$  표면 충전 밀도

$\Gamma$ 는 구속되지 않은 폴리(에틸렌 글리콜)에 의해 피복될 수 있는 총 표면적이며, SA는 전체 나노 입자 표면적이다.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 표면 개질 물질이 입자의 표면 전하를 생리적 유체에서 중성 또는 본질적으로 중성으로 만드는 데 효과적인 양으로 존재하는 점액 침투성 입자.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 입자는 약 -10 mV 내지 10 mV, 바람직하게는 약 -5 mV 내지 5 mV의 제타 전위를 가지며, 약 -2 mV 및 2 mV를 포함하는 점액 침투성 입자.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리(카프로락톤), 폴리하이드록시 산, 폴리아미노산, 폴리안하이드라이드 및 폴리오로소에스테르로 이루어진 군으로부터 선택된 코어 폴리머를 포함하는 점액 침투성 입자.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 코어 중합체가 폴리(락트산), 폴리(L-락트산), 폴리(글리콜 산), 폴리(락트산-코-글리콜산), 폴리(L-락트산-코-클리콜산), 폴리(락트산-코-락트산), 폴리(D, L-락티드), 폴리(D,L-락티드-코-카프로락톤), 폴리(D,L-락티드-코-카프로락톤-코-클리코라이드), 폴리(D,L-락티드-코-PEO-코-D,L-락티드) 및 폴리(D,L-락티드-코-PPO-코-D,L-락티드)로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리하이드록시산인 점액 침투성 입자.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 코어 중합체가 표면 개질 물질에 공유 결합되어 있는 점액 침투성 입자.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 입자는 약 50 nm 내지 500 nm, 바람직하게는 약 60 nm 내지 300 nm의 유체 역학적 직경을 갖는 점액 침투성 입자.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 직장, 비경구 또는 국소 투여로 구성된 군으로부터 선택된 경로를 통해 신체 내 또는 신체 상에 투여하기 위한 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 제형화된 점액 침투성 입자.

#### 청구항 13

하나 이상의 치료적, 예방적 및/또는 진단적 제제를 필요로 하는 대상에게 투여하는 방법이고, 상기 방법은 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 입자의 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 입자가 장, 비경구 또는 국소로 구성된 군으로부터 선택된 경로를 통해 투여되는 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 입자가 질 상피, 결장 직장, 안과 상피, 호흡 기관, 구강 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 점막 상피에 투여되는 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 입자가 상부 또는 하부 호흡 기관에서 자궁 경부 점액, 결장 직장 점액 또는 점액에 투여되는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

##### [0001] 관련 출원의 참조

본 출원은 2015년 10월30 일자로 출원된 미국 가출원 제 62/248,432 호의 우선권을 주장하며, 이는 본원에 참조로서 통합된다.

본 발명은 나노입자 분야, 특히 점액의 신속한 침투를 가능하게하는 고 문자량 중합체로 조밀하게 코팅된 나노입자 및 이의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0004] 생분해성 나노입자를 통한 치료제의 국부화된 전달은 전신 약물 부작용 감소 및 표적 부위에서의 약물 수준 조절을 포함하는 전신 약물 투여보다 이점을 제공한다. 그러나, 점막 표면에서 조절된 약물 전달은 일반적으로 보

호 점액 층의 존재에 의해 제한된다.

[0005] 모든 점막 표면을 덮고 있는 첫 번째 방어선인 점액은 점액 메쉬보다 크고 점착성이 좋으면 미립자가 상피 표면에 도달하는 것을 효과적으로 방지하는 점착성 점탄성 젤이다(Cone, Mucosal Immunology, 3rd Edition 2005, 49-72; Cone, Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61, 75-85; Lai et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104, 1482-1487; Olmsted et al., Biophys J, 2001, 81, 1930-1937; Ensign, Sci Transl Med, 2012, 4, 138ra179).

[0006] 점막은 하나 이상의 상피 세포층과 느슨한 결합 조직의 근원 점막 고유층으로 형성된 상피로 구성된다. 점막은 점액을 분비하여 결합 조직의 근원 점막 고유층을 습윤 상태로 유지하도록 한다. 점액은 입체 및 접착 메커니즘에 의해 외부 입자 및 미립자를 효율적으로 포착하여 신속한 제거 및 약물 전달을 방해한다.

[0007] 약물 입자 및/또는 전달 비히클의 점액에 대한 부착은 약물 전달 효율을 상당히 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 점막 표면에 국부적으로 전달되는 대부분의 치료제는 점액 턴오버(turnover)의 결과로서 유지 및 분포가 불량하다. 따라서, "점액 부착"은 질, 폐 및 대장 직장 조직을 통해 점막으로 직접 전달되는 약물의 제한된 분포를 초래하는 것으로 나타났다.

[0008] 전형적으로, 양극으로 대전된 표면 및/또는 비코팅된 소수성 표면은 고도의 점막 접착성으로 간주된다. PEG는 점막 접착을 향상시키는데 사용되어 왔다(Peppas, J Biomater Sci Polym Ed, 1998, 9, 535-542; Peppas et al., Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56, 1675-1687; Peppas et al., Biomaterials, 1996, 17, 1553-1561; Peppas et al., Biomater Sci Polym Ed, 2009, 20, 1-20; Sahlin et al., J Biomater Sci Polym Ed, 1997, 8, 421-436; Huang et al., J Control Release, 2000, 65, 63-71; Smart et al., Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57, 1556-1568; Serra et al., Eur J Pharm Biopharm, 2006, 63, 11-18).

[0009] 고분자량 PEG는 뮤신 섬유와 상호 침투하고 얹히거나 점액 섬유의 탄수화물 영역에 수소 결합을 형성하는 점액 접착성 "접착제"로서 작용한다고 설명되어 왔다(Deascentiis et al., J Control Release, 1995, 33, 197-201; Peppas, J Biomater Sci Polym Ed, 1998, 9, 535-542; Peppas & Huang, Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56, 1675-1687; Peppas & Sahlin, Biomaterials, 1996, 17, 1553-1561; Peppas et al., J Biomater Sci Polym Ed, 2009, 20, 1-20; Martini et al., International Journal of Pharmaceutics, 1995, 113, 223-229; Sahlin & Peppas, J Biomater Sci Polym Ed, 1997, 8, 421-436; Huang et al., J Control Release, 2000, 65, 63-71).

[0010] 10kDa 정도의 높은 분자량의 PEG는 코팅된 입자의 점액 침투에 일관성 없는 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 예를 들어, 2 kDa PEG (예를 들어, PEG 2 kDa)와 유사한 코팅 밀도의 10 kDa PEG는 점막 접착을 일으키거나 (Wang et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47, 9726-9729), 코팅되지 않은 입자와 유사한 점막 접착력을 나타낸다(Deascentiis et al., J Control Release, 1995, 33, 197-201). 또 다른 예에서, 에멀젼 방법을 사용하여 형성된 PLGA-PEG 나노입자는 느린 경화 과정에서 PEG가 입자 표면으로 분리되도록 허용하여 점액 투과성 코팅에 대해 최대 10 kDa PEG에 대해 표면 밀도를 충분히 높였다(Xu et al., J Control Release, 2013, 170, 279-286).

[0011] 다른 연구에 따르면 PEG 1 kD와 같은 저분자량 친수성 고분자로 조밀하게 코팅된 나노입자는 점액 장벽을 통과하여 상피 표면에 도달하고 균일하게 코팅할 수 있음이 입증되었다(Lai et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104, 1482-1487; Ensign, Sci Transl Med, 2012, 4, 138ra179; Suk et al., J Control Release, 2014, 178, 8-17; Maisel et al., J Control Release, 2015, 10, 197, 48-57, Epub 2014 Nov 4).

[0012] 또한, 이러한 점액 침투성 나노입자(MPP)는 점막 및 호흡 기관에서 점막과 호흡기에서 장기간 유지되어 점막 상피 미립자와 비교하여 MPP가 약물을 전체 상피 표면에 분배하고(Ensign, Sci Transl Med, 2012, 4, 138ra179; Suk et al., J Control Release, 2014, 178, 8-17), 장기간 약물 유지에 더 적합 할 수 있음을 나타낸다.

[0013] 상기 기술된 바와 같이 점액 침투 특성의 감소없이 나노 입자 내로 광범위한 약물을 캡슐화 할 수 있는 점액-침투 입자를 제조하는 새로운 방법에 대한 필요성이 존재한다. 주입을 통해 투여되는 제제에 대한 유사한 필요성이 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 점액 침투 특성을 감소시키지 않고 생체내 분해성 나노 입자에 광범위한 약물을 캡슐화 할 수 있는 입자 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 점막 표면을 비롯한 다양한 투여 경로를 통해 효과적인 약물 전달을 제공하기 위해 약물 로딩/loading) 및 표면 변경 물질의 고밀도 코팅을 갖는 나노입자 및 미세입자와 같은 입자를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

#### 발명의 요약

[0017] 점액 침투 입자 (MPP)는 하나 이상의 코어 중합체, 하나 이상의 치료제, 예방제 및/또는 진단제; 및 하나 이상의 표면 개질제를 포함한다. 표면 개질제는 표면 개질되지 않은 등가의 나노 입자에 비해 점액을 통해 개질된 나노 입자의 확산을 향상시키기에 충분한 밀도로 입자 표면을 코팅한다. 나노 입자는 10,000 달톤에서 40,000 달톤 이상의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)로 충분히 조밀하게 코팅되어 나노 입자가 점액을 통해 생체외 및 생체내에서 빠르게 확산되도록 할 수 있다.

[0018] 점액과의 상호 작용으로부터 입자 표면을 효과적으로 보호하기 위해 초과되어야 하는 나노 입자의 표면에 최소 PEG 충전 밀도 역치가 있다. 표면 충전 밀도가 충분하거나 불충분한 곳 사이에는 좁은 여유가 있다. 일부 실시예에서, 표면 개질제는 약 5 kDa 초과 내지 약 100 kDa 초과, 바람직하게는 약 10 kDa 내지 약 40 kDa, 보다 바람직하게는 약 20 kDa 이상의 분자량을 갖는 폴리 (에틸렌 글리콜)이다. 점액이 침투하는 나노 입자는 5-10 kD 보다 큰 분자량을 갖는 PEG로도 점액을 통한 확산을 가능하게 하는 데 충분한 밀도로 표면 개질제로 코팅된다. 일부 실시예에서, 표면 개질제의 표면 밀도는  $^1\text{H}$  NMR로 측정된다. 전형적으로, PEG가 표면 개질제일 때, MPP는 약 0.1 내지 약 100 분자/ $100 \text{ nm}^2$ , 바람직하게는 약 0.5 내지 약 50 분자/ $100 \text{ nm}^2$ , 더욱 바람직하게는 약 0.9 내지 약 45 분자/ $100 \text{ nm}^2$ 의 표면 밀도로 코팅된다.

[0019] 일부 실시예에서, 표면 충전 밀도는 아래 식의 함수로서 측정된다:

$$\Gamma / \text{SA} = \text{표면 충전 밀도}$$

[0021] 여기서  $\Gamma$ 는 입자 표면의 PEG 형태가 제약되지 않는다고 가정할 때 PEG 분자에 의해 제공될 수 있는 총 표면적 범위이며, SA는 전체 나노입자 표면적이다. PEG가 표면 개질제인 경우, MPP는 1.5 이상의 표면 충전 밀도로 코팅된다. 일부 실시예에서, 표면 개질제는 생리학적 유체에서 MPP의 표면 전하를 중성 또는 본질적으로 중성으로 만드는 데 효과적인 양이다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 나노 입자는 약 -10 mV 내지 10 mV, 바람직하게는 약 -5 mV 내지 5 mV, 가장 바람직하게는 약 -2 mV 내지 2 mV의 제타 전위를 가진다.

[0022] MPP는 전형적으로 약 50nm 내지 500nm (바람직하게는 약 60nm 내지 300nm 포함)의 유체 역학적 직경을 가진다.

[0023] 일부 실시예에서, 나노 입자는 신체 내로 또는 신체 상으로 투여하기 위한 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 예시적인 약학적 조성물은 장, 비경 구 또는 국소 투여에 의한 투여를 위해 제형화된다.

[0024] 점액이 침투하는 나노 입자를 만드는 방법 또한 제공된다. 상기 방법은 코어 폴리머 나노 입자를 보레이트 완충액(pH 7.4)에 혼탁시켜 배양 혼합물을 형성시키는 단계; 배양 혼합물에 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)-아민을 첨가하는 단계; 메톡시-폴리 (에틸렌 글리콜)-아민을 코어 중합체 나노 입자에 공유 결합시키는 단계; 혼합물로부터 점액을 투과하는 나노 입자를 분리하는 단계를 포함한다.

[0025] 하나 이상의 치료제, 예방제 및/또는 를 필요로하는 대상에게 전달하기 위해 MPP를 사용하는 방법이 또한 제공된다. 상기 방법은 목적하는 생물학적 효과를 달성하기 위해 유효량의 MPP를 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시예에서, MPP는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 진단, 예방 또는 치료하는데 효과적인 양으로 존재한다. 일반적으로, MPP는 점액을 투과하고 대상의 점막 상피에서 입자의 균일한 분포를 제공하는데 효과적인 밀도로 표면 개질제로 코팅된다. 예시적인 점막 상피 세포는 질 상피, 결장 직장, 안과 상피, 호흡관, 입 및 이들의 조합을 포함한다. 특정 실시예에서, MPP는 자궁 경부 점액, 결장 직장 점액, 호흡관 점액 또는 이들의 조합을 투과하는데 효과적인 밀도로 표면 개질제로 코팅된다.

### 도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 200 nm PS의 경우 3 초까지의 양상을 평균 제곱 변위 ( $\text{MSD}$ )를 보여 주며 200 nm의 이론적 MSD를 포함하여 보레이트 또는 MES 방법을 사용하여 10 kDa PEG로 코팅된 PS-PEG NP 물 (W)에 나노입자. 데이터는  $n \geq 3$  샘플을 나타낸다.

도 2a는 1 초의 시간 척도에서 200 nm PS의 개별 입자 MSD의 대수 분포를 보여준다.

도 2b는 1 초의 시간 척도로 MES 방법을 사용하여 10 kDa PEG로 코팅된 PS-PEG NP의 개별 입자 MSD의 대수 분포를 보여준다.

도 2c는 보레이트 방법을 사용하여 1 초의 시간 척도로 10 kDa PEG로 코팅된 PS-PEG NP의 개별 입자 MSD의 대수 분포를 도시한다.

도 3a, 3b 및 3c는 인간 자궁 경부 점액에서 200 nm PS (3a) 및 PS-PEG NP (3b, 3c)의 3 초동안 움직임에 대한 대표적인 궤적을 도시한다. PS-PEG NP는 MES 방법 (3b) 또는 보레이트 방법(borate method) (3c)을 사용하여 10 kDa PEG로 코팅된다. 데이터는  $n \geq 3$  샘플을 나타낸다.

도 4는 200 nm PS 및 물속(W)의 200 nm 입자의 이론적인 MSD를 포함하여, 보레이트법을 사용하여 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa 또는 40 kDa PEG로 코팅된 PS-PEG NP에 대한 양상을 평균화 평균 제곱 변위( $\langle MSD \rangle$ )를 최대 3 초의 시간 함수로 보여준다.

도 5a, 5b, 5c, 5d 및 5e는 인간 자궁 경부 점액에서 200 nm PS (5a) 및 PS-PEG NP (5b-5e)의 3 초 움직임에 대한 대표적인 궤도를 나타낸다. 도 5b, 5c, 5d 및 5e는 보레이트 방법을 사용하여 각각 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa 및 40 kDa PEG로 코팅된 PS-PEG NP를 나타낸다. 데이터는  $n \geq 3$  샘플을 나타낸다.

도 6은 100 nm PS 및 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa 또는 40 kDa PEG로 코팅된 PS-PEG NP의 시간 함수로서 인간 자궁 경부 점액에서의 양상을 평균화 평균 제곱 변위 ( $\langle MSD \rangle$ )를 (W)에서 100 nm 입자의 이론적 MSD (PS-PEG10kDa의 크기)를 포함하여 보레이트법으로 분석하였다.

도 7a, 7b, 7c, 7d 및 7e는 인간 자궁 경부 점액에서 100 nm PS (7a) 및 PS-PEG NP (7b-7e)의 3 초 운동에 대한 대표적인 궤도를 나타낸다. 도 7b, 도 7c, 도 7d 및 도 7e는 각각 보레이트 방법을 사용하여 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa 및 40 kDa PEG로 코팅된 PS-PEG NP를 나타낸다. 데이터는  $n \geq 3$  샘플을 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

### I. 정의

[0028]

용어 "나노 입자"는 일반적으로 약 1nm 내지 약 1 $\mu\text{m}$  이하, 보다 바람직하게는 약 5nm 내지 약 500nm, 가장 바람직하게는 약 5nm 내지 약 100nm의 직경을 갖는 입의의 형상의 입자를 지칭한다. 구형을 갖는 나노 입자는 일반적으로 "나노구체 (nanospheres)"라고 지칭한다.

[0029]

용어 "평균 입자 크기"는 일반적으로 입자 집단 내의 입자의 통계적 평균 입자 크기(직경)를 지칭한다. 본질적으로, 구형인 입자의 직경은 물리적 또는 유체 역학적 직경으로 지칭될 수 있다. 비구형 입자의 직경은 유체 역학적 직경을 우선적으로 지칭 할 수 있다. 사용된 바와 같이, 비구형 입자의 직경은 입자 표면상의 2점 사이의 최대 직선 거리를 지칭할 수 있다. 평균 입자 크기는 동적 또는 정적 광산란, 고속 단백질 액체 크로마토그래피 등과 같은 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0030]

용어 "점액"은, 호흡기, 비강, 자궁 경부암, 위장관, 직장, 시각 및 청각 체계를 포함하여 다양한 기관/조직의 상피 표면을 보호하는 점액질 당단백질 및 기타 물질을 주로 함유하는 점탄성 천연 물질을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "응혈"은 점액질 당단백질 이외에 죽은 세포로부터 방출된 DNA, 액틴 및 다른 세포 파편과 같은 다양한 거대 분자로 구성되는 점탄성 점액 분비물을 말한다. "가래(Sputum)"는 일반적으로 천식, COPD 및 CF를 포함 하나 이에 한정되지 않는 폐색성 폐질환으로 고통받는 환자의 병원성 기도에 존재한다. 본원에서 사용된 "CF 점액" 및 "CF 가래"는 낭포성 섬유증을 앓고 있는 환자의 점액 및 가래를 각각 의미한다.

[0031]

용어 "혼입된" 및 "캡슐화된"은 원하는 용도로 그러한 제제의 방출과 같은 방출을 허용하는 조성물 내로 및/또는 활성제를 혼입, 제제화 또는 달리 포함시키는 것을 지칭한다. 상기 용어는 치료제 또는 다른 물질이 종합체 매트릭스에 혼입되는 입의의 방식을 고려하며, 예를 들면, 상기 종합체의 단량체 (공유 결합, 이온 결합 또는 다른 결합 상호 작용에 의해 결합 됨), 물리적 혼화제, (공유 결합 또는 다른 결합 상호 작용에 의해) 종합체 매트릭스의 표면에 부착되거나, 종합체 매트릭스 내에 캡슐화되거나, 또는 그 밖의 다른 형태로 존재할 수 있다. 용어 "공중 합체" 또는 "공동 캡슐화 (co-encapsulation)"는 치료제 또는 다른 물질 및 적어도 하나의 다른 치료제 또는 다른 물질을 대상 조성물에 혼입시키는 것을 말한다.

[0032]

용어, "생체 적합성"은 그 자체가 숙주 (예 : 동물 또는 인간)에게 독성이 없으며, 독성이 있는 단량체 또는 올

리고며 하위 단위 또는 숙주내 독성 농도에서 기타 부산물을 생성하는 속도로 분해(중합체가 분해되는 경우)되지 않는 하나 이상의 물질을 의미한다.

[0033] 용어, "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 치료되는 장애의 하나 이상의 증상을 치료, 억제 또는 경감시키기에 충분하거나, 그렇지 않으면 원하는 약학적 및/또는 생리학적 효과를 제공하기에 충분한 투여량을 의미한다. 정확한 투여량은 대상-의준적 변수 (예 : 연령, 면역계의 건강 등), 질환 또는 장애, 및 치료가 수행되는 것과 같은 다양한 요인에 따라 달라질 것이다.

## II. 점액 침투성 나노입자(MPPs)

[0035] 점액 표면에 약물의 제어된 전달은 보호 점액층의 존재로 인해 어려움을 겪고 있다. 점막침투입자 (MPP)는 표면 밀도가 충분히 높으면 분자량이 5 kD 이상인 친수성 고분자로 입자를 코팅할 수 있다는 점에서 점막 표면에서의 약물 분포, 유지 및 효능이 개선되었음을 보여준다.

### A. 코어 폴리머

[0037] 임의의 수의 생체 적합성 중합체가 나노 입자를 제조하는데 사용될 수 있다. 일 실시예에서, 생체적합성 중합체 (들)은 생분해성이다. 또 다른 실시예에서, 입자는 비 분해성이다. 다른 실시예에서, 입자는 분해성 및 비분해 성 입자의 혼합물이다.

[0038] 예시적인 중합체는 폴리(카프로락톤)(PCL)과 같은 락톤, 폴리(락트산)(PLA), 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리(글리콜산)(폴리PGA), 폴리(락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리(L-락트산-코-글리콜산)(PLGA), 폴리(D, L-락 티드)(PDLA), 폴리(D, L-락티드-코-카프로락톤), 폴리(D, L-락티드-코-카프로락톤-코-글리콜라이드), 폴리(D, L-락티드-코-PEO-코-D, L-락티드), 폴리(D, L-락티드-코-PPG-코-D, L-락티드), 및 이들의 혼합물, 폴리-L-라이신(PLL), 폴리(발레르산) 및 폴리-L-글루타민산과 같은 폴리아미노산, 히드록시 프로필메타크릴레이트(HPMA), 폴리안하이드라이드, 폴리오르에스테르, 폴리(에스테르 아미드), 폴리아미드, 폴리(비닐 아세테이트)와 같은 폴리비닐 에스테르, 폴리(비닐 클로라이드) (PVC)와 같은 폴리비닐 할라이드, 폴리비닐피롤리돈, 폴리실록산, 폴리스티렌(PS), 알킬 셀룰로스, 하이드록시알킬 셀룰로스, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 에스테르, 니트로 셀룰로스, 하이드록시프로필셀룰로스 및 카르복시메틸셀룰로스와 같은 유도체화된 셀룰로스를 포함한 셀룰로스, 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(메틸아크릴레이트), 폴리(이소프로필 아크릴레이트), 폴리(이소부틸 아크릴 이트), 폴리(옥타데실 아크릴레이트)(이하, 합쳐서 "폴리아크릴산"으로 함), 폴리디옥사논 및 그의 공중합체, 폴록사мер, 폴리옥시메틸렌, 폴록사머, 폴리(부티르산), 트리메틸렌 카보네이트, 폴리 포스 파젠을 포함하는 아크릴산의 중합체를 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0039] 바람직한 실시예에서, 중합체는 폴리(3-부티레이트) 또는 폴리(4-부티레이트) 또는 그의 공중합체와 같은 히드록시산(PLA, PLGA, PGA), 폴리 무수물 또는 폴리히드록시알카노에이트와 같은 FDA 승인 생분해성 중합체이다.

[0040] 웬덤, 블록 또는 그래프트 공중합체 또는 상기 열거된 중합체의 블랜드와 같은 상기 공중합체도 또한 사용될 수 있다. 중합체상의 작용기를 캡핑하여 중합체의 특성을 변화시키고 및/또는 작용기의 반응성을 변형(예를 들어, 감소 또는 증가)시킬 수 있다. 예를 들어, 카복실산 함유 폴리머의 카복실 말단, 예컨대 락티드- 및 글리콜라이드-함유 폴리머는 선택적으로 예를 들어 에스테르화에 의해 캡핑될 수 있으며, 하이드록실 말단은 선택적으로 캡핑될 수 있다. 에테르화 또는 에스테르화에 의해 제조될 수 있다.

[0041] 중량 평균 분자량은 주어진 중합체에 대해 변할 수 있지만 일반적으로 약 1kD 내지 1,000kD, 1kD 내지 500kD, 1kD 내지 250kD, 10kD 내지 100kD, 5kD 내지 100kD, 5kD 내지 75kD, 5 kD 내지 50 kD, 또는 5 kD 내지 25 kD 보다 더 크다.

### B. 표면 개질제

[0043] 나노 입자는 바람직하게는 하나 이상의 표면 개질제 또는 물질의 표면으로 코팅되거나 표면으로 형성된다. 표면 개질제는 친수성(예, 입자를 친수성으로 만든다), 표면 전하(예, 표면을 중성 또는 거의 중성 또는 더욱 음성 또는 양성)를 포함하는, 표면에 대한 입자의 하나 이상의 특성을 변형시키고, 점액과 같은 체액 및 조직 내 또는 이들을 통한 수송을 향상시킨다. 가장 바람직한 물질은 폴리(에틸렌글리콜) (PEG)과 같은 폴리(알킬렌옥사이드)이다.

[0044] 바람직한 실시예에서, 입자는 적어도 10,000 Da의 분자량을 갖는 PEG와 같은 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)로 코팅

되거나 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함한다.

- [0045] PEG(CAS 번호 25322-68-3)는 생체적합성(Powell GM. Polyethylene glycol. In: Davidson RL, editor. Handbook of water soluble gums and resins. McGraw-Hill: 1980. pp. 18-31), 수성 및 유기 배지에서의 용해도, 독성의 결핍, 매우 낮은 면역원성 및 항원성 (Dreborg et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1990, 315-65), 양호한 배설 동력학(Yamaoka et al., J Pharm Sci, 1994, 83 : 601-6)과 같은 많은 유용한 성질을 가진 선형 폴리에테르디올이다. 예를 들어 폴리-(에틸렌 글리콜)은 치료 단백질과 웹타이드를 유도체화하여 약물 안정성과 용해도를 높이고 독성을 낮추며 반감기를 증가시키고(Caliceti et al., Adv Drug Del Rev, 2003, 55, 1261-77 ), 제거 및 면역원성을 감소시키는 데 사용되어 왔다. 이러한 이점은 유도체화에서 분지형 PEG를 사용하여 특히 관찰되었다(Monfardini et al., Bioconj Chem, 1998, 9, 418-50).
- [0046] PEG 분자의 분자량 및 구조는 특정 목적을 위해 조절될 수 있다. 바람직한 실시예에서, PEG는 10,000 Da (PEG-10 kDa) 이상의 분자량을 갖는다.
- [0047] 고 분자량 PEG 또는 이의 유도체와 상술한 임의의 코어 중합체와의 공중합체를 사용하여 중합체 입자를 제조할 수 있다. 특정 실시예에서, PEG 또는 유도체는 공중합체의 내부 위치에 위치할 수 있다. 바람직하게는, PEG 또는 유도체는 공중합체의 말단 위치에 위치할 수 있다. 예를 들어, 상기 중합체 중 하나 이상은 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 옥사이드 (PLURONIC®E) 블록, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 옥사이드의 블록 공중합체로 종결될 수 있다.
- [0048] 일부 실시예에서, 코어 중합체는 베이스 중합체가 동일하거나 (예를 들어, 폴리스티렌 (PS) 및 PS-PEG) 또는 상이한 것 (예를 들어, PS-PEG 및 폴리(락틱))인 PEG화 중합체 및 비-산)).
- [0049] 고 분자량 PEG는 입자 표면에 코팅으로서 적용될 수 있다. 특정 실시예에서, 나노 입자는 PEG의 영역이 입자의 표면과 분리되거나 달리 위치할 수 있는 조건하에 형성된다. 표면-국부화된 PEG 영역 만이 표면 개질제의 기능을 수행하거나 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 입자는 표면개질 물질로서 폴리에틸렌 글리콜 블록으로 종결된 하나 이상의 중합체로부터 제조된다. PEG는 입자를 형성하는데 사용되는 코어 중합체에 공유 결합된 (예를 들어, 내부 또는 한쪽 또는 양쪽 말단에서) 블록 형태일 수 있다. 특정 실시예에서, 입자는 PEG를 함유하는 블록 공중합체로부터 형성된다. 특정 실시예에서, 입자는 PEG를 함유하는 블록 공중합체로부터 제조되며, 여기서 PEG는 기재 중합체의 말단에 공유 결합된다.
- [0050] 점액 침투성 입자로 제형화하기 위한 대표적인 PEG 분자량은 10,000 Da (10 kDa), 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 60 kDa, 100 kDa, 200 kDa, 500 kDa 및 1 MDa 및 모두 10 kDa ~ 1 MDa 범위의 값. 일부 실시예에서, PEG는 20 kDa-100 kDa, 바람직하게는 20 kDa-40 kDa와 같은 10 kDa 이상의 분자량, 또는 10 kDa 초과의 분자량을 갖는다. 임의의 주어진 분자량의 PEG는 길이, 밀도 및 분자량과 같은 다른 특성이 변할 수 있다.
- [0051] 유용한 다른 중합체는 폴리(비닐피롤리돈) 및 폴리(아크릴 아미드)를 포함한다.
- [0052] **표면 개질제의 밀도**
- [0053] 표면 개질제의 밀도는 점액을 통과하여 생체 내에서 점막 상피에 활성제를 성공적으로 전달하는 데 영향을 주는 나노 입자의 능력을 결정하는 핵심 매개 변수이다.
- [0054] 표면 전하 및 유체 역학적 직경과 같은 나노 입자의 물리 화학적 성질에 대한 변화를 직접 측정하는 것을 포함하여, 나노 기술의 표면 PEG 밀도를 측정하기 위해 다양한 기법을 사용할 수 있다. 전형적으로, 표면 밀도를 결정하는 방법은 입자 표면의  $\text{nm}^2$  당 PEG 사슬의 수에 관한 정량적인 정보를 제공한다.
- [0055] 열중량 분석(TGA)은 PEG 함량을 계산하는 데 사용할 수 있다. 전형적으로, TGA는 무기 물질로 제한되며 비교적 많은 양의 시료를 사용해야 한다.
- [0056] 기능성 PEG에 염료 및 시약 (예: 형광 염료)의 반응을 PEG 정량화에 사용할 수 있다. 이들 방법에서, 작용기(예 컨대, -SH, -NH<sub>2</sub> 등)를 갖는 미반응 PEG 분자는 특정 시약과의 반응 후 형광 분석 또는 비색 정량에 의해 정량화되고, 표면 PEG 밀도는 상등액 중 미반응 PEG 부분을 제함으로써 결정된다. 그러나, 이들 방법은 표면 PEG화 및 기능성 PEG로 제한된다. 상등액에서 미반응된 플루오레세인 -PEG의 신호 측정에 의한 PRINT 나노 입자의 표면 PEG 밀도를 정량화하는 데 사용된 유사한 방법은 PEG로 나노 입자의 표면 개질에 한정된다. 이러한 정량 분석은 널리 사용되는 폴리(락틱-코-글리콜산)-폴리(에틸렌 글리콜)(PLGA-PEG) 및 폴리(탁트산)-폴리(에틸렌 글리콜) (PLA-PEG)과 같은 PEG-함유 블록 공중합체로부터 제조된 생분해성 나노 입자의 PEG 밀도를 결정하기에는 적

합하지 않다.

[0057] 다른 실시예에서, 핵자기공명(NMR)은 정성적 및 정량적으로(PEG 피크는 전형적으로 ~ 3.65ppm으로 판측됨) PEG-함유 중합체성 나노입자상의 표면 PEG 밀도를 평가하는 데 사용된다. 나노 입자가 NMR 용매 D<sub>2</sub>O에 분산되어 있을 때, 코어 내에 매립된 PEG가 아닌 표면 PEG만이 NMR에 의해 직접 검출될 수 있다. 따라서 NMR은 PEG의 표면 밀도를 직접 측정할 수 있는 수단을 제공한다.

[0058] 일부 실시예에서, PEG 표면 밀도는 PEG화 입자 및 비PEG화 입자의 혼합물로부터 입자를 제조함으로써 조절된다. 예를 들어, PLGA 나노입자상의 PEG의 표면 밀도는 폴리(락틱-코-글리콜산) 및 폴리(에틸렌 글리콜) (PLGA-PEG)의 혼합물로부터 입자를 제조함으로써 정밀하게 제어될 수 있다. 전형적으로, 정량적 1H NMR은 나노 입자상의 표면 PEG 밀도를 측정하는데 사용된다.

[0059] 앞서, 저 분자량 PEG(예: PEG 2 kDa)의 저 밀도 코팅이 동일한 PEG의 고밀도 코팅과 비교하여 점막 접착을 일으키고, 고 분자량 PEG (예 : PEG 10 kDa) 저 분자량 PEG (예 : PEG 2 kDa)에 대한 유사한 밀도의 코팅이 점막 접착을 일으켰음(Wang et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47, 9726-9729)이 판명되었다. 고 분자량 PEG 점액-침투성 나노 입자는 보다 큰 분자량에도 불구하고 점액이 침투하는 본원에서 기술된 점액 장벽을 관통하기에 충분한 밀도의 표면 개질제를 포함한다.

[0060] 코팅제 자체의 분자량과는 대조적으로 표면 코팅의 밀도가 점액을 투과하는 나노 입자의 능력을 매개한다는 것이 확인되었다.

[0061] 표면 충전 밀도는 비제한적 PEG 표면적 범위( $\Gamma$ )를 총 입자 표면적 (SA)으로 나눈 값으로 표현된다:

$$(\Gamma / \text{SA}) = \text{충전 밀도}$$

[0063] 일부 실시예에서, 나노 입자 표면을 점액과의 상호 작용으로부터 효과적으로 차폐하기 위해 초과되어야 하는 최소 충전 밀도 역치가 있다. 특정 실시예에서, 코팅의 충전 밀도가 충분하거나 불충분한 곳 사이에는 좁은 마진이 존재한다.

[0064] 일부 실시예에서, 1.3 또는 1.3 미만의 상기 화학식에 따라 결정된 표면 밀도 값은 자궁경부점액(CVM)에서 접착을 일으킨다. 따라서, 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 또는 2.5보다 큰 PEG 표면 밀도 ( $\Gamma / \text{SA} \geq 1.5$ )를 가진다.

[0065] 점액 침투가 발생하는 역치 표면 충전 밀도 값은 유사한 크기의 물 입자 (MSDW)에 대한 이론 MSD와 비교하여 점액에서 양상을 평균 평균 제곱 변위 (MSD)를 분석하여 실험적으로 결정할 수 있다.

[0066] 전형적으로, 입자 표면적의 100 nm<sup>2</sup> 당 PEG 분자의 수는 PEG 분자량이 증가함에 따라 감소하며, 이는 MW가 증가함에 따라 각 PEG 사슬에 의해 점유되는 공간의 증가에 기인할 수 있다. 예를 들어, 제한되지 않은 5 kDa PEG 사슬이 차지하는 면적은 비구속된 40 kDa PEG 분자의 경우, ~ 180 nm<sup>2</sup>와 비교하여, ~ 23 nm<sup>2</sup>이다.

[0067] 생분해성 나노 입자에 PEG가 고밀도로 코팅되어 있어 점액 구성 성분과 나노 입자 사이의 접착력이 크게 감소하기 때문에 점액을 빠르게 침투할 수 있다. 실시예에서 입증된 바와 같이, 인간 점액의 다중 입자 추적 및 마우스 질 내 점액 결합 및 조직 분포의 연구는 PEG 밀도 임계값이 존재함을 나타냈다. 일부 실시예에서, 10,000 Da의 분자량을 갖는 PEG와 접합된 폴리스티렌 (PS) 나노 입자의 경우, 표면 충전 임계값은 관통하는 점액에 효과적일 때 약 1 내지 5 PEG 사슬/100 nm<sup>2</sup> 이상이다.

[0068] 표면 충전 밀도 문턱치는 입자 제조에 사용된 코어 중합체, 입자 크기 및/또는 PEG의 분자량을 포함하는 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.

[0069] 코팅의 밀도는 표면 개질 물질 및 입자의 조성을 포함하는 다양한 인자에 기초하여 변화될 수 있다. 한 실시예에서, <sup>1</sup>H NMR로 측정된 PEG와 같은 표면 개질 물질의 밀도는 적어도 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.8, 2.0, 2.9, 3.0, 3.3, 4.0, 4.4, 5.0 또는 100 nm<sup>2</sup> 당 5.0 이상의 체인이다. 위의 범위는 nm<sup>2</sup> 당 0.1 ~ 100 단위 사이의 모든 값을 포함한다.

[0070] 특정 실시예에서, PEG와 같은 표면 개질 물질의 밀도는 약 0.001 내지 약 2 개/nm<sup>2</sup>, 약 0.01 내지 약 0.1 개/nm<sup>2</sup>, 약 0.05 내지 약 0.5 개/nm<sup>2</sup>, 약 0.1 약 0.2 체인/ nm<sup>2</sup>, 또는 약 0.15 체인 내지 약 0.2 체인/ nm<sup>2</sup>이다.

PEG와 같은 표면 개질 물질의 농도는 또한 변화될 수 있다. 일부 실시예에서, PEG와 같은 표면 개질 물질의 목표 농도는 적어도 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 % 상기 범위는 0.5 % ~ 25 %의 모든 값을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 입자에서 표면 개질 물질, 예를 들어 PEG의 농도는 적어도 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 % 상기 범위는 0.5 % ~ 25 %의 모든 값을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 입자의 표면상의 표면 개질 물질 함량 (예를 들어, PEG)은 적어도 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 % 상기 범위는 0.5 % ~ 25 %의 모든 값을 포함한다.

[0071] 특정 실시예에서, 표면 개질 물질 (예를 들어, PEG)의 밀도는 표면 개질 물질 (예를 들어, PEG)이 연장된 브러시 형상을 채택하도록 한다.

[0072] 다른 실시예에서, 표면 개질 부분의 질량은 적어도 1/10,000, 1/7500, 1/5000, 1/4000, 1/3400, 1/2500, 1/2000, 1/1500, 1/1000, 1/750, 1/500, 1/250, 1/200, 1/150, 1/100, 1/75, 1/50, 1/25, 1/20, 1/5, 1/2 또는 입자의 질량의 9/10. 위의 범위는 1/10,000에서 9/10까지의 모든 값을 포함한다.

[0073] 전형적으로, PEG화 후의 나노 입자의 유체 역학적 직경은 PEG 분자량이 증가함에 따라 증가한다; 예를 들어, PEG 사슬의 고밀도 패킹은 신장을 일으키므로 더 높은 MW PEG 사슬은 더 두꺼운 코로나를 생성한다.

### C. 치료제, 예방제, 영양제 및/또는 진단제

[0075] 점액 침투성 나노 입자 (MPP)는 점막 표면으로 전달하기 위한 하나 이상의 활성제로 제제화될 수 있다. 전형적으로, MPP는 하나 이상의 치료 학적, 예방 적, 영양 보조제 및/또는 진단제를 포함한다.

[0076] 하나 이상의 치료제, 예방제 및/또는 진단제가 중합체성 나노 입자 내에 캡슐화되거나 및/또는 나노 입자의 표면과 결합되는 실시예에 있어서, 약물 부하율은 약 1 % 내지 약 80 %, 약 1 중량 % 내지 50 중량 %, 바람직하게는 1 중량 % 내지 40 중량 %, 더욱 바람직하게는 1 중량 % 내지 20 중량 %, 가장 바람직하게는 1 중량 % 내지 10 중량 %이다. 위의 범위는 1 %에서 80 %까지의 모든 값을 포함한다. 약물의 양이 캡슐화 방법에 의해 제한되지 않기 때문에 약물이 입자의 표면과 결합되어있는 실시예에서, 약물의 양은 더 높을 수 있다. 일부 실시예에서, 전달될 제제는 나노 입자 내에 캡슐화되어 입자 표면과 결합될 수 있다.

[0077] 예시적인 활성제는 이하에서보다 상세하게 논의된다.

[0078] 일부 실시예에서, 입자는 그 안에 캡슐화되고, 분산되고, 및/또는 공유 결합 또는 비공유 결합된 하나 이상의 치료제를 표면에 갖는다. 치료제는 소분자, 단백질 또는 웹타이드, 당 또는 다당류, 핵산 분자 및/또는 지질일 수 있다.

[0079] 소분자 치료제의 예시적인 부류는 진통제(analgesics), 항염증제(anti-inflammatory drugs), 해열제 (antipyretics), 항우울제(antidepressants), 항간질약(antiepileptics), 항정신병제(antipsychotic agents), 신경 보호제(neuroprotective agents), 항암제와 같은 항증식제(anti-proliferatives), 항박테리아제, 항진균제(antifungal agents)와 같은 항감염제(anti-infectious agents), 항히스타민제(antihistamines), 항편두통제 (antimigraine drugs), 진정제(sedatives), 수면제(hypnotics), 항정신병제(antimuscarinics), 기관지 확장제 (bronchodilators), 천식약(anti-asthma drugs), 심장혈관 약물(cardiovascular drugs), 코르티코 스테로이드, 도파민계 약물(dopaminergics), 전해질(electrolytes), 위장관 약물(gastro-intestinal drugs), 근육 이완제 (muscle relaxants), 영양제(nutritional agents), 비타민(vitamins), 부교감신경 흥분제 (parasympathomimetics), 각성제(stimulants), 식욕억제제(anorectics) 및 항수면발작제(anti-narcoleptics)이다.

[0080]

[0081] 예시적인 예방제에는 백신 항원이 포함된다.

[0082] 일부 실시예에서, 약제는 하나 이상의 핵산이다. 핵산은 내인성 핵산 서열을 변경, 정정 또는 대체할 수 있다. 핵산은 암을 치료하고 다른 폐 질환 및 대사성 질환의 유전자 결함을 교정하는 데 사용된다.

[0083] 예시적인 핵산은 DNA, RNA, 화학적으로 변형된 핵산, 및 이들의 조합을 포함한다. 핵산 반감기의 안정성 및 효소 절단 저항성을 증가시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0084] 예시적인 진단제는 상자성 분자, 형광 화합물, 자성 분자 및 방사성 핵종을 포함한다. 적합한 진단제로는 엑스레이 영상 조영제 및 조영제가 포함 되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 방사성 핵종도 영상 요원으로 사용할 수

있다. 다른 적합한 조영제의 예는 방사선 투과성인 가스 또는 가스 방출 화합물을 포함한다. 나노 입자는 투여된 입자의 위치를 결정하는 데 유용한 제제를 더 포함할 수 있다. 이 목적에 유용한 요원은 형광 태그, 방사성 핵종 및 조영제를 포함한다.

[0085] 하나 이상의 치료제, 예방제 및/또는 진단제가 중합체성 나노 입자 내에 캡슐화되거나 및/또는 나노 입자의 표면과 결합되는 실시예에 있어서, 약물 부하율은 약 1 % 내지 약 80 %, 약 1 중량 % 내지 50 중량 %, 바람직하게는 1 중량 % 내지 40 중량 %, 더욱 바람직하게는 1 중량 % 내지 20 중량 %, 가장 바람직하게는 1 중량 % 내지 10 중량 %이다. 위의 범위는 1 %에서 80 %까지의 모든 값을 포함한다. 약물의 양이 캡슐화 방법에 의해 제한되지 않기 때문에 약물이 입자의 표면과 결합되어있는 실시예에서, 약물의 양은 더 높을 수 있다. 일부 실시예에서, 전달될 제제는 나노 입자 내에 캡슐화되어 입자 표면과 결합될 수 있다. 뉴트라수티컬(Nutraceuticals)도 통합할 수 있다. 비타민, 칼슘이나 비오틴과 같은 보충제, 또는 식물 추출물이나 식물 호르몬과 같은 천연 성분일 수 있다.

#### [0086] D. 입자의 성질

[0087] 입자 크기, 제타 전위 ( $\zeta$  전위), PEG 표면 밀도 (PEG/총 표면적 또는  $\Gamma$ /SA로 덮인 영역)는 나노 입자가 점액을 통과하여 침투하는 능력에 영향을 줄 수 있는 모든 요소이다. MSDw/MSD 점액에서 평균 양상을 MSD (MSD)와 유사한 크기의 물 입자 (MSDw)의 이론적 MSD를 비교하면 점액에서 나노 입자가 얼마나 천천히 움직이는지를 나타낼 수 있다.

#### [0088] 1. 표면 전하 및 입자 크기

[0089] 점액을 통한 이들의 확산을 용이하도록 하기 위해, 나노 입자는 전형적으로 중성 표면 전하를 거의 갖는다. 특정 구현 예에서, 나노 입자는 약 10 mV 내지 약 -10 mV, 바람직하게는 약 5 mV 내지 약 -5 mV, 더욱 바람직하게는 약 3 mV 내지 약 -3 mV, 가장 바람직하게는 약 2 mV 및 약 -2 mV이다.

[0090] 전형적으로, 표면 개질 물질 (예를 들어, PEG)은 양 또는 음으로 하전된 코어 중합체를 차폐하는 코로나를 형성하기에 충분한 밀도로 존재해야만 하여 실질적으로 중성 인 표면이 된다.

[0091] 본원에 기술된 입자는 전형적으로 1nm 내지 약 1 $\mu$ m의 범위의 평균 직경을 갖는 나노 입자로 지칭되는 반면, 약 1 $\mu$ m, 보다 바람직하게는 약 50nm 내지 약 900nm, 가장 바람직하게는 약 60nm의 평균 직경을 갖는다 내지 약 500nm이다. 특정 실시예에서, 입자의 평균 직경은 약 60 nm 내지 약 300 nm의 형태이다. 그러나, 미크론 범위의 크기 인 입자를 제조할 수 있다. 입자를 제조하는데 사용된 조건 및/또는 물질은 입자의 크기를 변화시키기 위해 다양할 수 있다.

[0092] 특정 실시예에서, 나노 입자는 4 °C에서 최소 1 개월, 보다 바람직하게는 최소 2 개월, 가장 바람직하게는 최소 3 개월 동안 분무 또는 저장 후에 그의 입자 크기 및  $\zeta$ - 전위를 보유한다.

[0093] 전형적인 실시예에서, 측정된 평균 제곱 평균 변위 (<MSD>) 값에 의해 지시된 바와 같이, 5 내지 40 kDa PEG (PS-PEG-NP)로 코팅된 200 nm 폴리스티렌 나노 입자 (PS NP)가 자궁 경부 점액 (CVM), 코팅되지 않은 PS NP와는 극명한 대조를 보이는 확산성 거동을 보였다 (표 1 참조).

#### [0094] III. 제약 조성물

[0095] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자 (MPP)는 신체 상에 또는 신체 내로 투여하기 위한 약학적으로 허용 가능한 조성물로 제형화된다.

[0096] 본원에 기술된 제형은 점막 표면에 투여하기에 적합한 약학적 담체 중에 유효량의 나노 입자("MPP")를 함유한다.

#### [0097] A. 용액, 유화제 및 젤

[0098] 입자는 약학적으로 허용가능한 제제, 예컨대 멸균 생리식염수, 인산 완충 식염수 또는 흡수를 증진시키는 저자극 용액으로 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 약학적 담체는 소정의 원하는 긴장도를 갖도록 조정된다. 예를 들어, 특정 실시예에서, 약학적 담체는 저 삼투압으로 조절된다. 당업자는 본원에 기술된 바람직한 장력 범위에 기초하여, 치료하고자 하는 원하는 조직이 확인되면, 약학적 담체의 긴장도를 일상적으로 조정할 수 있다.

[0099] 긴장성은 '효과적인 삼투압'이며 맴브레인을 획단하여 삼투압을 발휘할 수 있는 용질의 농도의 합과 같다. 다양한 물질을 사용하여 긴장성을 조절할 수 있다. 예를 들어, USP 29-NF 24는 텍스트로스, 글리세린을 포함하는 "

긴장성"제제로 분류된 다섯 가지 부형제를 나열한다. 염화칼륨; 만니톨; 및 염화나트륨, 예를 들어, United States Pharmacopeial Convention, Inc. United States Pharmacopeia 29-National Formulary 24. Rockville MD: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.; 2005: 3261; Day, A. Dextrose. In: Rowe RC, Sheskey PJ and Owen SC, eds. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th ed. Washington DC: American Pharmaceutical Association; 2005: 231-233; Price JC. Glycerin. In: Rowe RC, Sheskey PJ and Owen SC, eds. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th ed. Washington DC: American Pharmaceutical Association; 2005: 301-303; Price JC. Glycerin. In: Rowe RC, Sheskey PJ and Owen SC, eds. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th ed. Washington DC: American Pharmaceutical Association; 2005: 301-303; Armstrong NA. Mannitol. In: Rowe RC, Sheskey PJ and Owen SC, eds. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th ed. Washington DC: American Pharmaceutical Association; 2005: 449-453; Owen SC. Sodium Chloride. In: Rowe RC, Sheskey PJ and Owen SC, eds. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th ed. Washington DC: American Pharmaceutical Association; 2005: 671-674를 참조한다.

[0100] 만니톨 (Mannitol)은 FDA Inactive Ingredients Database (IP, IM, IV 및 SC 주사제, 주입제, 구강, 구강 및 설하 정제, 분말 및 캡슐, 식품 첨가물)에 포함된 유럽에서 식품 첨가물로 사용되는 GRAS 목록화된 성분의 예이다. 안과 용 제제, 국소용 제제)는 영국에서 허가된 비경구 및 비경구 의약품에 포함되어 있으며 캐나다 천연건강제품 성분 데이터베이스(Canadian Natural Health Products Ingredients Database)에 포함되어 있다. 5.07 % w/v 수용액은 혈청과 등삼투압성이다(iso-osmotic).

[0101] 바람직하게는 20-220 mOsm/kg 범위의 최소 저항성 제제는 상피 독성의 위험을 최소화하면서 전체 질 표면에 신속하고 균일한 MPP 전달을 제공한다. 콜론에는 삼투압이 더 높으므로 혈장 삼투압 이상의 삼투압 (일반적으로 ~300mOsm/kg에서 등장성으로 간주됨)은 대장에서의 분포가 개선된다. 대장 내 저 삼투성 비히클을 사용한 개선된 결장 분포의 범위는 제형의 용질 대부분이 Na<sup>+</sup> 이온으로 구성되어 있다면 ~ 20mOsm/kg-450mOsm/kg이다. 이들이 Na<sup>+</sup> 이온으로 구성되어 있으면 적극적으로 흡수된다. 따라서 혈액과 관련하여 과민 삼투압 임에도 불구하고 상기 배합물을 효과적으로 저 삼투성으로 만든다.

## B. 폐 제형

[0103] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자 (MPP)는 폐 투여용으로 제형화된다. 건조 분말 및 액체 제형 모두 에어로졸 제형을 형성하는데 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 에어로졸이라는 용어는 추진체를 사용하여 생성 되든 아니든 용액 또는 혼탁액에 있을 수 있는 미립자의 미세한 미스트를 의미한다. 건조 분말 제제는 공기 또는 적절한 추진체 이외의 임의의 담체의 도움없이 폐 흡입을 통해 환자에게 투여될 수 있다.

[0104] 제약 담체는 벌킹제 또는 지질 또는 계면 활성제를 포함할 수 있다. 디 팔미토일포스파티딜콜린 (dipalmitoylphosphatidylcholine: DPPC)과 같은 천연 계면 활성제가 가장 바람직하다. 합성 및 동물 유래 폐계면 활성제에는 엑소서프(Exosurf)-DPPC와 헥사데칸올(hexadecanol)과 티록사폴(thyloxapol)을 혼산제로 첨가한 혼합물, 푸막탄트(Pumactant)(인공 폐확장 화합물 또는 ALEC) - DPPC와 PG의 혼합물, KL-4-DPPC, 팔미토일-올레오일 포스파티딜글리세롤 및 팔미트산과 결합하여 SP-B, 벤티큐트(Venticute)-DPPC, PG, 팔미트산 및 재조합 SP-C의 구조적 특성을 모방한 21 아미노산 합성 웹타이드와 결합, 소 폐 세척액에서 추출한 알베오팩트 (Alveofact), 다진 돼지 폐에서 유도한 물질에서 추출한-큐로서프(Curosurf), 송아지 폐 세척액에서 추출한-인파서프(Infasurf) 및 다진 소 폐에서 추출한 추가 DPPC, 팔미틴산 및 트리탈레미틴을 함유한 Survanta로 구성되어 있다. 엑소서프(Exosurf), 큐로서프(Curosurf), 인파서프(Infasurf) 및 서반타(Survanta)는 현재 FDA가 미국에서 사용하도록 승인한 계면 활성제이다.

[0105] 약제 담체는 또한 하나 이상의 안정화제 또는 분산제를 포함할 수 있다. 약제 담체는 또한 하나 이상의 pH 조절제 또는 완충제를 포함할 수 있다. 적합한 완충액은 유기산 및 염기, 예를 들어 시트르산 나트륨 또는 아스코르브 산 나트륨으로부터 제조된 유기 염을 포함한다. 약제 담체는 또한 염화나트륨 또는 염화칼륨과 같은 하나 이상의 염을 포함할 수 있다. 건조 분말 제제는 전형적으로 하나 이상의 점액 침투성 나노 입자를 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체와 블렌딩함으로써 제조된다. 선택적으로, 추가 활성제가 하기 논의된 바와 같이 혼합물에 혼입될 수 있다. 이어서, 동결 건조, 분무 건조, 응집, 분무 코팅, 코아세르베이션(coacervation), 저온 주조, 분쇄 (예를 들어, 에어 - 마찰 분쇄 (제트 분쇄), 공분쇄), 고압 균질화 및/또는 초임계 유체 결정화를 포함한다.

[0106] 특정 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자(MPP)는 에어로졸로서의 투여를 위해 제형화된다. 전술한 건조 분말 및 액체 제제는 폐 투여용 에어로졸 제형을 형성하는데 사용될 수 있다. 호흡 기관으로의 치료제 및/또는 다른 활

성제의 전달을 위한 에어로졸은 당업계에 공지되어있다. 본 명세서에서 사용된 에어로졸이라는 용어는 가스 중에 혼탁된 고체 또는 액체 입자의 미세한 미스트의 임의의 제조를 말한다. 어떤 경우에는 가스가 추진체일 수 있다. 그러나 이것은 필수는 아니다. 에어로졸은 초음파 또는 고압 처리와 같은 다양한 표준 기술을 사용하여 생산될 수 있다.

[0107] 어떤 경우에는 폐에 제제를 투여하는 장치가 사용된다. 적합한 장치는 건조 분말 흡입기, 압력측정 계량 흡입기, 분무기 및 전기 유체 역학 에어로졸 장치를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 흡입은 환자의 코 및/ 또는 입을 통해 발생할 수 있다. 투여는 흡입 동안 또는 제형의 인공 호흡기를 통한 인공 호흡기로 환자에게 투여함으로써 투여될 수 있다.

#### C. 국소 및 안과용 제제

[0109] 특정 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자 (MPP)는 눈의 점막 표면에 투여하기 위해 제형화된다. 국소 또는 장의 제제는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 수성 조성물로서 제조될 수 있다. 전형적으로, 상기 조성물은 용액 또는 혼탁액으로서 제조될 수 있다; 주사 전에 재구성 배지를 첨가할 때 용액 또는 혼탁액을 제조하는데 사용하기에 적합한 고체 형태; (w/o) 유화액, 수중유 (o/w) 유제 및 이들의 마이크로 유제, 리포좀, 유화액, 스프레이, 젤, 크림 또는 연고와 같은 유제를 포함한다.

[0110] 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 하나 이상의 폴리올 (예 : 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 식물성 오일 (예 : 땅콩 유, 옥수수 유, 참깨 유 등) 및 이들의 조합 물을 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제의 사용, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지 및/또는 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 설탕이나 염화나트륨과 같은 약제를 첨가하여 긴장도를 조절하는 것이 바람직하다.

[0111] 유리 산 또는 염기 또는 이의 약학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액 및 분산액은 물 또는 다른 용매 또는 분산매, 계면 활성제, 분산제, 유화제를 포함 하나, 이에 제한되지 않는 하나 이상의 제약 상 허용되는 부형제와 적절하게 혼합하여 제조할 수 있다, pH 개질제 및 이들의 조합 물을 포함한다.

[0112] 적합한 계면 활성제는 음이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 비이온성 계면 활성제일 수 있다. 적합한 음이온성 계면 활성제는 카복실레이트, 설포네이트 및 설페이트 이온을 함유하는 것들을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0113] 음이온성 계면 활성제의 예로는 나트륨, 칼륨, 장쇄 알킬 술폰산염의 암모늄 및 도데실벤젠술폰산 나트륨과 같은 알킬 아릴 술폰산염; 소듐 도데실벤젠포네이트와 같은 디알킬 소듐 술포숙신산염; 소디움 비스-(2-에틸티옥실)-술포숙시네이트와 같은 디알킬 나트륨 술포숙신산염; 및 라우릴 황산나트륨과 같은 알킬 설페이트를 포함한다.

[0114] 양이온성 계면 활성제는 염화벤즈알코늄, 염화벤제토늄, 브롬화세트리모늄, 염화스테아릴디메틸벤질암모늄, 폴리옥시 에틸렌 및 코코넛 아민과 같은 4 차 암모늄 화합물을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 비이온성 계면활성제의 예로는 에틸렌글리콜 모노스테아레이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 스테아레이트, 폴리글리세릴-4-올레이트, 소르비탄 아실 레이트, 수크로오스 아실레이트, PEG-150 라우레이트, PEG-400 모노라우레이트, 폴리옥시에틸렌 모노라우레이트, 폴리소르베이트, 폴리옥시에틸렌 옥틸페닐에테르, PEG-1000 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 트리데실 에테르, 폴리 프로필렌 글리콜 부틸 에테르, Poloxamer<sup>®</sup> 401, 스테아로일 모노이소프로판을 아미드 및 폴리옥시에틸렌 경화 탈로우아미드를 포함한다.

[0115] 양쪽성 계면 활성제의 예로는 소듐 N-도데실-베타-알라닌, 소듐 N-라 우릴-베타-이미노디프로페오네이트, 미리스토아암푸아아세테이트, 라우릴 베타 인 및 라우릴 설포베타인이 포함된다.

[0116] 제제는 미생물의 성장을 막기 위한 방부제를 함유할 수 있다. 적합한 방부제는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 및 티메로살을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 제형은 또한 활성제(들)의 분해를 방지하기 위한 항산화제를 함유할 수 있다.

[0117] 제제는 전형적으로 재구성시 투여를 위해 pH 3 내지 8로 완충된다. 적절한 완충제는 인산염 완충액, 아세테이트 완충액 및 시트르산 완충액을 포함 하나 이에 한정되지 않는다.

[0118] 수용성 중합체는 종종 약제에 사용된다. 적합한 수용성 중합체는 폴리비닐피놀리돈, 텍스트란, 카르복시메틸셀룰로오스 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 멸균 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 적절한 용매 또는 분산 매질 중에 필요에 따라 상기 나열된 부형제 중 하나 이상과 함께 혼합한 후 여과 멸균함

으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 다양한 분산된 활성 성분을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 성분 중 필요한 다른 성분을 함유하는 무균 비허클에 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분 분말과 그 이전에 멸균 여과된 용액으로부터 임의의 추가의 원하는 성분을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조 기술이다. 입자는 입자가 본질적으로 다공성 인 방식으로 제조될 수 있으며, 이는 입자의 용해를 증가시킬 수 있다. 다공성 입자를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0119] 안구 투여용 약제는 바람직하게는 하나 이상의 중합체 - 약물 접합체로부터 형성된 입자의 무균 수용액 또는 혼탁액 형태이다. 수용 가능한 용매는 물, 링거 용액, 삼투압 (PBS) 및 이소 삼투 염화 나트륨 용액을 포함하며, 이들은 삼투압에 의해 유발된 물의 흐름 (눈물)을 관찰하기 위해 MPP를 사용하여 결정된 눈의 원하는 저 삼투압으로 조절된다 (유동체). 제제는 또한 1,3-부탄디올과 같은 비독성, 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 용액, 혼탁액 또는 에멀젼일 수 있다.

[0120] 일부 경우, 제형은 용액 (점안제), 혼탁액, 젤, 크림 또는 연고와 같은 액체 또는 반고체 형태로 분산되거나 포장된다. 다르게는, 안구 투여용 제제는 예를 들어 적합한 액체 제제의 동결 건조에 의해 고체로서 포장될 수 있다. 고체는 투여하기 전에 적절한 담체 또는 희석제로 재구성될 수 있다.

[0121] 안구 투여용 용액, 혼탁액 또는 에멀젼은 안구 투여에 적합한 pH를 유지하는데 필요한 완충액의 유효량으로 완충될 수 있다. 유용한 완충제의 예는 아세테이트, 봉산염, 탄산염, 시트르산 및 인산 완충액이다. 안구 투여용 용액, 혼탁액 또는 에멀젼은 또한 제형의 강성을 적당한 저 삼투압 범위로 조정하기 위한 하나 이상의 긴장제를 함유할 수 있다. 적합한 긴장제는 당업계에 공지되어 있으며, 일부 예는 글리세린, 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨 및 다른 전해질을 포함한다.

[0122] 안구 투여용 용액, 혼탁액 또는 유제는 또한 안과용 제제의 세균 오염을 방지하기 위해 하나 이상의 방부제를 함유할 수 있다.

[0123] 적합한 방부제는 당업계에 공지되어 있으며, 폴리헥사메틸렌비구아니딘 (polyhexamethylenebiguanidine) (PHMB), 염화벤잘코늄(benzalkonium chloride) (BAK), 안정화된 옥시클로로 복합체 (Purite<sup>®</sup>) (등록 상표)로도 공지됨), 페닐파수소 아세테이트, 클로로부탄올, 소르브산, 클로르헥시딘, 벤질 알코올, 파라벤, 티메로살 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0124] 안구 투여용 용액, 혼탁액 또는 에멀젼은 또한 분산제, 습윤제 및 혼탁제와 같은 당업계에 공지된 하나 이상의 부형제를 함유할 수 있다.

[0125] 또 다른 실시예에서, 나노 입자는 점막으로의 국소 투여를 위해 제형화된다. 국소 투여를 위한 적합한 투여 형태는 크림, 연고, 스프레이, 젤, 로션 및 유화액을 포함한다.

[0126] 상기 제제는 피부 연화제, 계면 활성제 및 유화제와 같은 하나 이상의 부형제를 함유할 수 있다. "피부 연화제"는 피부를 부드럽게 하거나 진정시키는 외용제이며 일반적으로 당업계에 공지되어 있고, "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 4th Ed., Pharmaceutical Press, 2003와 같은 목록에 나와 있다.

[0127] 이들은, 아몬드 오일, 피마자 오일, 세라토니아 추출물, 세토스테아로일 알코올, 세틸 알코올, 세틸 에스테르 왁스, 콜레스테롤, 면실유, 시클로메티콘, 팔미토스테아린산 에틸렌 글리콜, 글리세린, 모노스테아르산 글리세린, 미리스테이트 글리세릴, 미리스틴산 이소 프로필, 팔미틴산 이소 프로필, 라놀린, 레시틴, 경질 미네랄 오일, 중간-사슬 트리글리 세라이드, 미네랄 오일 및 라놀린 알콜, 바셀린, 바셀린 및 라놀린 알콜, 콩기름, 전분, 스테아릴 알콜, 해바라기 오일, 자일리톨 및 이들의 조합을 포함한다. 일 실시예에서, 연화제는 에틸헥실 스테아 레이트 및 에틸헥실팔미테이트이다.

[0128] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 하나 이상의 계면 활성제로 제형화된다. 계면 활성제는 표면 장력을 낮추어 제품의 유화, 발포, 분산, 퍼짐 및 습윤 특성을 증가시키는 계면 활성제이다. 적합한 비이온성 계면 활성제는 유화 왁스, 글리세릴 모노올레아이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시 에틸렌 캐스터 유도체, 폴리소르베이트, 소르비탄 에스테르, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 시클로덱스트린, 글리세린 모노스테아레이트, 폴록사머, 포비돈 및 이들의 조합을 포함한다. 일 실시예에서, 비이온성 계면 활성제는 스테아릴 알콜이다.

[0129] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 하나 이상의 유화제로 제형화된다. 유화제는 한 액체가 다른 액체에 혼탁되도록 촉진하고 오일과 물의 안정한 혼합물 또는 에멀젼의 형성을 촉진시키는 표면 활성 물질이다. 일반적인 유화제는 금속성 비누, 특정 동물성 및 식물성 오일 및 다양한 극성 화합물이다. 적합한 유화제는,

아카시아, 음이온성 유화 왁스, 칼슘 스테아레이트, 카보머, 세토스테릴 알콜, 세틸 알콜, 콜레스테롤, 디에탄 올아민, 에틸렌 글리콜 팔미토 스테아레이트, 모노에탄올아민, 비이온성 유화 왁스, 올레산, 폴록사며들, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 피마자유 유도체, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 프로필렌 글리콜 알긴산염, 자기 유화형 글리세릴 모노스테아레이트, 시트르산 나트륨 탈수물, 나트륨 라우릴 설페이트, 소르비탄 에스테르, 스테아르산, 해바라기유, 트라가칸트, 트리에탄올아민, 크산탄 겹 및 이들의 조합을 포함한다. 일 실시예에서, 유화제는 글리세롤 스테아레이트이다.

[0130] 적합한 침투 증강제의 종류는 당업계에 공지되어 있고, 지방 알콜, 지방산, 지방 알코올 에테르, 아미노산, 인지질, 레시틴, 콜레이트염, 효소, 아민 및 아미드, 착화제(리포좀, 사이클로텍스트린, 변형된 셀룰로오스, 디아미드), 매크로 사이클릭 락톤, 케톤 및 무수물 및 사이클릭 우레아와 같은 매크로 사이클릭, 계면 활성제, N-메틸 피롤리돈 및 이의 유도체, DMSO 및 관련 화합물, 이온성 화합물, 아존 및 관련 화합물, 및 알코올, 케톤, 아미드, 폴리올(예, 글리콜)과 같은 용매를 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0131] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 "오일"로서 제형화된다. 오일은 적어도 95 중량%의 친유성 물질을 함유하는 조성물이다. 친유성 물질의 예는 천연 및 합성 오일, 지방, 지방산, 레시틴, 트리글리세라이드 및 이들의 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0132] "연속 상 (continuous phase)"은 고체가 부유되거나 다른 액체의 액적이 분산되어 있는 액체를 말하며, 때로 외부 상으로 불린다. 이것은 고체 또는 유체 입자가 분산되어 있는 콜로이드의 유체 상을 의미한다. 연속 상 (continuous phase)이 물(또는 다른 친수성 용매)인 경우, 수용성 또는 친수성 약물은 연속 상에 용해될 것이다 (분산되는 것과 반대로).

[0133] 다중 상 제제 (예를 들어, 에멀젼)에서, 별개의 상은 연속 상에 혼탁되거나 분산된다. 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 유탁액으로서 제형화된다. 에멀젼은 균질하게 혼합된 비혼화성 성분의 혼합물을 함유하는 조성물이다. 특정 실시예에서, 비혼화성 성분은 친유성 성분 및 수성 성분을 포함한다. 유체는 두 번째 액체의 몸 전체에 작은 작은 덩어리에 분포된 하나의 액체의 준비물이다. 분산된 액체는 불연속 상이고, 분산 매질은 연속 상이다. 오일이 분산액이고 수용액이 연속 상인 경우에는 수 중유 에멀젼으로 알려져 있고, 물 또는 수용액이 분산 상이고 오일 또는 유성 물질이 연속 상인 경우에는 유중수 에멀젼으로 알려져 있다.

[0134] 오일 상 및 수성 상 중 하나 또는 둘 모두는 하나 이상의 계면 활성제, 유화제, 에멀젼 안정화제, 완충제 및 다른 부형제를 함유할 수 있다. 바람직한 부형제는 계면 활성제, 특히 비이온성 계면 활성제; 유화제, 특히 유화 왁스; 및 액체 비휘발성 비수성 물질, 특히 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜을 포함한다. 오일상은 다른 유성 약학적으로 승인된 부형제를 함유할 수 있다. 예를 들어, 하이드록사이드화 피마자유 또는 함께 오일과 같은 물질은 계면 활성제 또는 유화제로서 오일 상에 사용될 수 있다.

[0135] 에멀젼의 서브-세트는 자가-유화 시스템이다. 이들 약물 전달 시스템은 전형적으로 계면 활성제와 오일 또는 다른 수-비혼화 액체와 같은 친유성 액체의 혼합물에 분산되거나 용해된 약물로 구성된 캡슐(하드 켐 또는 소프트 켐)이다. 캡슐이 수성 환경에 노출되고 외부 젤라틴 켐이 용해 될 때, 수성 매질과 캡슐 내용물 사이의 접촉은 순간적으로 매우 작은 에멀젼 방울을 생성시킨다. 이들은 전형적으로 미셀 또는 나노 입자의 크기 범위 내에 있다. 전형적으로 에멀젼 제제 공정에서와 같이 에멀젼을 생성시키기 위해 어떠한 혼합력도 요구되지 않는다.

[0136] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 로션으로서 제제화된다. 로션은 저점도에서 중간 점도의 액상 제형이다. 로션은 혼탁제 및 분산제의 사용을 통해 분산 매질에 용해되는 미세하게 분말화된 물질을 함유할 수 있다. 대안 적으로, 로션은 비히클과 섞이지 않는 액체 물질을 분산상으로서 가질 수 있고, 일반적으로 유화제 또는 다른 적합한 안정화제에 의해 분산된다. 한 실시예에서, 로션은 100 내지 1000 센티 스토크 (centistokes) 사이의 점도를 갖는 에멀젼의 형태이다. 로션의 유동성은 넓은 표면적에 대해 신속하고 균일 한 적용을 가능하게 한다. 로션은 일반적으로 피부에서 건조되어 피부 표면에 약용 성분이 얇은 코팅을 남기고자 한다.

[0137] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 크림으로서 제제화된다. 크림은 "수중 유적 (oil-in-water)" 또는 "유중수 형태 (oil-in-oil type)"의 점성 액체 또는 반고체 유제이다. 크림은 유화제 및/또는 다른 안정제를 함유 할 수 있다. 한 실시예에서, 제형은 1000 센티 스토크 (centi stokes)보다 크고, 전형적으로 20,000 내지 50,000 센티 스토크 범위의 점도를 갖는 크림 형태이다. 크림은 종종 퍼지기 쉽고 제거하기 쉽기 때문에 종종 연고보다 선호된다.

[0138] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 연고로서 제형화된다. 연고는 연고 염기 및 임의로 하나 이상의 활성제를 함유하는 반고체성 제제이다. 적합한 연고 염기의 예는 탄화수소 염기(예 : 바셀린, 백색 바셀린, 황색

연고 및 광유); 흡수 염기(친수성 페트롤 라툼, 무수 라놀린, 라놀린, 콜드 크림); 수 - 제거성 염기 (예 : 친수성 연고) 및 수용성 염기 (예 : 폴리에틸렌 글리콜 연고)가 포함된다. 일반적으로 페이스트는 고형분 비율이 높다는 점에서 연고와 다르다. 일반적으로 페이스트는 흡수성이 크고 기름기가 없어 연고가 동일한 성분으로 제조된다.

[0139] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 젤로서 제형화된다. 젤은 액체 비히클 중에 용해되거나 혼탁되는 중점체 또는 중합체 물질의 작용에 의해 반고체로 된 액체 비히클 중의 소형 또는 대형 분자의 분산액을 함유하는 반고체 계이다. 액체는 친유성 성분, 수성 성분 또는 이들 모두를 포함할 수 있다. 일부 유제는 젤이거나 그렇지 않으면 젤 성분을 포함할 수 있다. 그러나 일부 젤은 혼합할 수 없는 성분의 균질화된 블렌드를 포함하지 않기 때문에 유제가 아니다. 적합한 젤화제는 히드록시프로필 셀룰로오스 및 히드록시에틸 셀룰로오스와 같은 개질된 셀룰로오스; 카르보폴 호모폴리머 및 코폴리머; 및 이들의 조합물을 포함한다. 액체 비히클 중의 적합한 용매는 디글리콜 모노에틸에테르; 알킬렌 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 디메틸 이소소르바이드; 이소프로필 알콜 및 에탄올과 같은 알코올을 포함한다. 용매는 전형적으로 약물을 용해시키는 능력을 위해 선택된다. 제형의 피부 느낌 및/또는 피부 윤활성을 개선시키는 다른 첨가제가 또한 혼입될 수 있다. 이러한 첨가제의 예는 이소프로필 미리스테이트, 에틸 아세테이트, C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub> 알킬 벤조에이트, 미네랄 오일, 스쿠알란, 시클로메치콘, 카프릭/카프릴산 트리글리세라이드 및 이들의 조합물을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0140] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 밤포체로서 제형화된다. 품은 가스 추진체 또는 가스 방출 성분과 함께 에멀젼으로 구성된다. 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 조성물의 pH를 조절하는데 사용되는 하나 이상의 완충액으로 제형화된다. 바람직하게는, 완충액은 조성물을 약 4 내지 약 7.5의 pH, 보다 바람직하게는 약 4 내지 약 7의 pH, 가장 바람직하게는 약 5 내지 약 7의 pH에서 완충시킨다.

#### D. 장내 제형

[0142] 일부 실시예에서, 점액 침투성 나노 입자는 장내 투여를 위해 제형화된다. 적합한 경구 투여 형태는 정제, 캡슐, 용액, 혼탁액, 시럽 및 로젠지(lozenge)를 포함한다. 정제는 당업계에 공지된 압축 또는 성형 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 젤라틴 또는 비-젤라틴 캡슐은 경질 또는 연질 캡슐 껍질로서 제조될 수 있으며, 이는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 액체, 고체 및 반고체 충전 물질을 캡슐화할 수 있다. 제제는 희석제, 방부제, 결합제, 윤활제, 붕괴제, 팽윤제, 충전제, 안정화제 및 이들의 조합을 포함하는 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 사용하여 제조될 수 있다.

[0143] 가소제, 안료, 착색제, 안정제 및 활택제를 포함하는 부형제는, 또한 경장 투여용 코팅 조성물을 형성하는데 사용될 수 있다. 지연 방출 투여량 제제는 "Pharmaceutical dosage form tablet", eds, (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington-The science and practice of pharmacy", 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, and "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6th Edition, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995)와 같은 표준 참고 문헌에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 이러한 참고 자료들은 정제, 캡슐 제 및 정제, 캡슐 및 과립의 지연 방출 제형을 제조하기 위한 부형제, 재료, 장비 및 공정에 대한 정보를 제공한다.

[0144] 캡슐은 예를 들어 일단 입자가 위의 산성 환경을 통과하면 방출을 지연시키기 위해 코팅될 수 있다.

#### IV. 제조 방법

[0146] 나노 입자를 제조하는 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 WO / 2013/110028에 기재된 바와 같이 용매 증발, 용매 제거, 분무 건조, 상 반전, 저온 주조 및 나노 석출을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0147] 일부 실시예에서, 나노 입자는 하나 이상의 코어 중합체, 하나 이상의 표면 개질 물질 및 하나 이상의 저 분자량 유화제의 에멀젼에 의해 형성된다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 나노 입자는 하나 이상의 코어 중합체를 유기 용매에 용해시키고, 하나 이상의 코어 중합체의 용액을 유화제의 수용액 또는 혼탁액에 첨가하여 에멀젼을 형성시킨 다음 에멀젼을 유화제의 제 2 용액 또는 혼탁액에 첨가하여 나노 입자의 형성을 수행한다.

[0148] pH 조절제, 붕괴제, 방부제 및 항산화제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 부형제는 입자 형성 중에 선택적으로 입자에 혼입될 수 있다. 전술한 바와 같이, 하나 이상의 추가의 활성제가 입자 형성 동안 나노 입자에 혼입될 수 있다. 하나 이상의 표면 개질제는 또한 입자 제형화 동안 및/또는 입자 표면에 이어서 부착될 때 입자에 혼입된다.

#### V. 사용 방법

- [0150] 고 분자량 폴리(에틸렌) 글리콜로 조밀하게 코팅된 나노 입자는 치료적, 예방적, 영양적 및/또는 진단적 제제를 대상에게 전달하기 위해 점액을 통과할 수 있다는 것이 확인되었다.
- [0151] MPP는 대상(subject)의 특정 신체 부위에 직접 투여된다. 예를 들어, 일부 실시예에서, MPP는 눈, 질, 소화관, 결장, 직장, 입, 코, 귀 또는 폐의 점막 표면에 직접 전달된다. 일부 실시예에서, MPP는 점막 위 또는 내로 국소 투여에 의해 직접 투여된다. 추가의 실시예에서, 투여 경로는 MPP를 특정 기관에 직접 표적으로 한다.
- [0152] MPP를 포함하는 약학 조성물은 국소 투여 또는 전신 투여가 바람직한 지의 여부 및 치료 영역에 따라 다양한 방식으로 투여될 수 있다.
- [0153] MPP의 조성물은 질병의 증상의 발병 전, 도중 또는 후에, 또는 하나 이상의 질병 증상의 발병 전, 발병 중 또는 발병 후 기간의 임의의 조합으로 투여될 수 있다.
- [0154] 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 치료되는 장애의 하나 이상의 증상을 치료, 억제 또는 경감시키기에 충분하거나, 그렇지 않으면 원하는 약리학 적 및/또는 생리학적 효과를 제공하기에 충분한 투여량을 의미한다. 정확한 투여 량은 대상-의존적 변수(예 : 연령, 면역계의 건강 등), 질환 또는 장애, 및 치료가 수행되는 것과 같은 다양한 요인에 따라 달라질 것이다.
- [0155] MPP의 효과는 대조군과 비교할 수 있다. 적합한 대조군은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 비처리 세포 또는 비처리 대상을 포함한다. 일부의 실시예에 있어서, 대조군은 치료되는 대상의 미처리 조직 또는 미처리된 대상이다. 바람직하게는 대조군의 세포 또는 조직은 처리된 세포 또는 조직과 동일한 조직으로부터 유도된다. 일부 실시예에서, 치료되지 않은 대조 대상은 치료 대상과 동일한 질병 또는 상태를 앓고 있거나 위험이 있다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 치료되지 않은 대조 대상체는 MPP에 의해 부여된 바람직한 치료, 예방 또는 진단 효과를 받지 못한다.
- [0156] **실시예 1. 반응 완충액은 고 분자량 PEG의 코팅 밀도에 영향을 미친다.**
- [0157] **재료 및 방법**
- [0158] **나노입자(NP) 코팅 방법**
- [0159] PEG로 코팅된 나노 입자를 앞에서 설명한 두 가지 방법으로 합성하였다(Nance et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 149-119). "MES 버퍼 방법"을 위해, 과잉 메톡시-폴리에틸렌 글리콜(mPEG)-아민(10 kDa)을 pH 6의 50 mM 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산(MES) 완충액(시그마)에 용해시켰다.
- [0160] 200 nm 크기(Molecular Probes)의 카르복실레이트 변형 폴리스티렌(PS)의 나노 입자를 MES/PEG 용액에 첨가하고 10 분간 초음파 처리하였다. 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC, Sigma) 및 N-히드록시술포숙신이미드 (NHS, Sigma)를 0.1:1:1 COOH : PEG : EDC : NHS의 비율로 첨가하였다. 혼합물을 37 °C에서 밤새 배양한 후, 원심 분리에 의해 나노 입자를 수집하고 DI수로 2회 세척 하였다. "보레이트 버퍼 방법"을 위해, 40 nm, 100 nm 또는 200 nm의 카르복실레이트 변형 PS 나노 입자(Molecular Probes)를 분자량이 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa 또는 40 kDa 인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)으로 코팅하였다. PS 나노 입자를 200 mM 붕산 완충액(pH 7.4)에 혼탁시키고, 메톡시-PEG-아민을 과량으로 첨가하였다. 과량의 NHS와 EDC가 추가되었다. 나노 입자 혼합물을 실온에서 하룻밤 배양한 후, 탈이온수로 2회 세척 하였다.
- [0161] **제형화한 나노 입자의 특성**
- [0162] 나노 입자를 10mM NaCl 용액에 부유시키고 세타시저 나노(Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments))을 사용하여 동적 광산란(DLS) 및 레이저 도플러 풍속 측정법을 사용하여 사이즈 및  $\zeta$ - 전위를 각각 특성화했다. DLS는 90°. 산란 각도에서 수행되었으며 모든 측정은 기기 설정에 따라 25 ± 0°C에서 수행되었다.
- [0163] **결과**
- [0164] PS 나노 입자(PS NP)의 표면에 10 kD PEG를 그래프팅(grafting)할 때, MES와 보레이트 버퍼의 반응 완충액을 비교했다. MES 방법 (PS-PEG<sub>MES</sub>, 220 ± 10 nm; -12 ± 0.4 mV)을 사용하여 10 kDa PEG로 코팅된 PS NP를 CVM에 접착 고정시켰다; PS-PEG<sub>MES</sub> NP에 대한 양상블-평균화 평균 제곱 변위 (<MSD>)는 물에서 비슷한 크기의 나노 입자의 이론적 확산 속도와 비교하여 점액에서 10,000배 이상 감소했다(표 1). 대조적으로 보레이트법(PS-PEG borate, 260 ± 7 nm; -0.7 ± 0.5 mV)을 사용하여 10 kDa PEG로 코팅된 동일한 PS NP는 CVM에서 빠르게 확산되었다. PS-PEG 보레이트 NP의 양상블-평균화 평균 제곱 변위<MSD>는 물에서 이론적인 확산 속도인 MSDw에 비해

CVM에서 단지 11배 느려졌으며(표 1, 도 1), 코팅되지 않은 PS NP (180 ± 1 nm; -59 ± 2 mV) 또는 PS-PEG<sub>MES</sub> 보다 1,000배 빨랐다(도 1, 표 1). PS-PEG<sub>MES</sub> NP에 대한 <MSD>(도 1) 및 개별 MSD 값의 대수 분포(도 2A, 도 2B)는 이전에 보고된 것처럼 코팅되지 않은 PS 나노 입자와 유사했다 (Wang et al, Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47, 9726-9729).

[0165]

PS-PEG borate NP에 대한 개별 MSD 값의 대수 분포는 코팅되지 않은 PS 나노 입자 및 PS-PEGMES NP보다 훨씬 컸다(도 2C). CVM에서 3 초의 움직임을 나타내는 나노 입자 궤도는 PS-PEG borate NP의 운동이 확산 운동을 반사함에 따라 전달 동작의 차이를 더욱 강조하는 반면 PS 및 PS-PEG<sub>MES</sub> NP의 궤적은 매우 제한적이었다(도 3A-3C).

### 표 1

크기,  $\zeta$ - 전위, PEG 표면 밀도 (PEG/총 표면적 또는 Γ / SA)로 피복된 면적) 및 접액에서의 양상을 평균 MSD(<MSD>)와 다양한 방법으로 제조된 100 및 200 nm PS와 PS-PEG NP의 수중에서의 유사한 크기의 입자의 이론 MSD (MSD<sub>w</sub>)의 비교.

크기 (nm)	타입	PEG MW (kDa)	유체역학 직경 (nm)	$\zeta$ -전위(mV)	Γ/SA	# PEG 체인/ 100 nm <sup>2</sup>	MSD <sub>w</sub> /<>MSD>
40	PS	-	56 ± 2	-33 ± 0.6	NA	NA	NA
	PS- PEG	5	60 ± 1	-2.2 ± 0.2	NA	NA	NA
		10	68 ± 0.4	-2.9 ± 0.4	NA	NA	NA
		20	84 ± 3	-2.6 ± 0.2	NA	NA	NA
		40	97 ± 1	-3.4 ± 0.5	NA	NA	NA
100	PS	-	90 ± 1	-51 ± 1.6	0	0	>10,000
	PS- PEG	5	110 ± 2	-3.1 ± 0.3	>2*	~9*	10
		10	120 ± 7	-0.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1	4.4 ± 0.2	18
		20	130 ± 4	-0.4 ± 0.1	3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	6
		40	170 ± 8	-1 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.2 ± 0.1	20
200	PS	-	180 ± 1	-59 ± 2	0	0	>10,000
	PS- PEG	5	230 ± 5	-1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	7.1 ± 0.4	9
		10	260 ± 7	-0.7 ± 0.5	1.5 ± 0.1	3.3 ± 0.1	11
		10 (MES)	220 ± 10	-12 ± 0.4	1.3 ± 0.1	2.9 ± 0.3	>10,000
		20	270 ± 7	-2 ± 0.7	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.2	10
		40	300 ± 5	-1 ± 0.6	1.7 ± 0.1	1 ± 0.1	15

Nance et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 149-119에 근거 함.

달리 명시하지 않는 한, PS-PEG NP는 보레이트 방법을 통해 제조되었다. 값은  $n \geq 3$  개 샘플에 대해 평균하였다.

[0166]

[0167] 실시예 2. PS NP 표면에 코팅된 10 kD PEG의 밀도.

[0168] 재료 및 방법

[0169] PEG 표면 밀도의 측정

[0170] PEG 밀도는 이전에 기재된 바와 같이 계산되었다 (Nance et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 149–119, Xu 등, J Control Release, 2013, 170, 279–286). 요약하면, 나노 입자는 중수 소화 클로로포름 (CDC13, 시그마), 트리플루오로 아세트산 -d (TFAd, 시그마) 및 테트라 메틸 실란 (TMS, 1 % w / v)의 공지된 농도로 완전히 용해되었다.  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼은 Bruker REM400을 400  $\text{mHz}$ 로 사용하여 수득 하였다. PEG 밀도 ( $\Gamma$  / SA)는 PEG 피크 (3.6ppm)와 내부 표준 TMS 피크 (0ppm)의 적분으로부터 계산되었다. 각 입자에서 PEG 사슬이 차지하는 면적을 계산하기 위해 일정한 길이의 PEG가 차지하는 면적을 찾기 위해 임의 도보 통계 모델을 사용했다. 이러한 계산은 직경  $d = 0.76 (\text{nm})$  0.5를 갖는 구를 산출하는데, 여기서  $\text{nm}$ 는 해당 PEG의 분자량이고,  $A = \pi (d / 2)^2$ 의 PEG가 차지하는 면적을 산출한다 (Boylan et al., J Control Release, 2012, 157, 72–79). 점유된 영역을 사용하여 100  $\text{nm}^2$  당 PEG 사슬의 수와 PEG 사슬이 차지하는 면적 / 총 입자 표면적 ( $\Gamma$  / SA)을 계산했다. PEG 5 kDa는 용액 중의 PEG 농도를 보정하기 위해 사용되었다. PEG 표면 밀도 계산을 위해, 나노 입자의 표면은 매끈하고 직경은 DLS에 의해 측정된 것과 동일하다고 가정했다.

[0171] 결과

[0172] PS-PEG NP상의 PEG 표면 밀도의 정량화에서, 정량적 NMR 방법을 사용하여 패킹 밀도 ( $\Gamma$  / SA, 여기서  $\Gamma$ 는 비구속된 표면적 임)에 기초하여 PEG 사슬의 물리적 형태를 추정 하였다 (Nance et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 149–119, Xu 등, J Control Release, 2013, 170, 279–286). PS-PEG 봉산 NP (1.5 ± 0.0)의  $\Gamma$  / SA는 PS-PEGMES NP (표 1)의 경우 1.3 ± 0.1에 비해 증가되어 PEG 쇄가 PS-PEG 봉산의 NP 표면에보다 밀집되어 있음을 나타낸다.  $\Gamma$  / SA 값은 PS-PEGMES NP의 경우 100  $\text{nm}^2$  당 2.9 ± 0.3 10 kDa PEG 사슬과 비교하여 PS-PEG borate NP의 경우 100  $\text{nm}^2$  당 3.3 ± 0.1 10 kDa PEG 사슬에 해당한다. 이전에, PEG 표면 밀도를 정량하기 위한 간접적 방법은 PEG 접합 후 나노 입자 표면에 남아있는 미 반응 카르복시산기에 형광 염료를 결합시키는 것을 포함하여 사용되었다(Wang et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47, 9726 –9729). 이 간접적인 방법에서, PS NP 표면상의 약 69 %의 카르복시산 그룹이 2 kDa PEG에 접합되었으며, PS NP 표면상의 약 65 %의 카르복시산 그룹이 10 kDa PEG에 접합되었다 (Wang et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47, 9726–9729).

[0173] 정량적 NMR 방법 및 계산의 결과는 PS NP 표면을 CVM과의 상호 작용으로부터 효과적으로 보호하기 위해 초과되어야 하는 최소 PEG 밀도 임계값이 있고 코팅이 충분하거나 불충분한 곳 사이에 좁은 마진이 있음을 의미한다.

[0174] 유사하게, Nance et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 149–119의 결과는 PEG 코팅의 요구되는 밀도가 또한 나노 입자 크기 및 PEG MW에 의존한다는 것을 의미한다. 적어도 2.0의  $\Gamma$  / SA는 5 kDa PEG로 코팅된 100 nm PS 나노 입자가 뇌 세포 외 기질을 효과적으로 통과하기 위해 필요하지만 (Nance et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 149–119),  $\Gamma$  / SA = 1.7은 코팅이 불충분했다.

[0175] PEG 코팅 밀도는 반응의 공정 및 기질에 따라 상이한 수준에서 달성된다. Xu et al., J Control Release, 2013, 170, 279–286은 PEG (MW 10kDa)와 폴리락틱 코글리콜산 (PLGA-PEG)의 블록 공중합체로 구성된 생분해성 나노 입자가 PEG를 충분히 조밀하게 코팅하여 사람의 CVM에서 빠르게 확산되도록 한다. PLGA-PEG 나노 입자는 예비 성형된 나노 입자의 표면에 PEG를 그라프트하기보다는 느린 경화 과정에서 PEG를 나노 입자 표면으로 분할 할 수 있는 에밀션 방법을 사용하여 형성되었으므로  $\Gamma$  / SA 값은 2.3 이상 ( $\Gamma$  / SA = 10 kDa PEG에 대해 3.0)이 달성되었다(Xu 등, J Control Release, 2013, 170, 279–286).

[0176] 실시예 3. 고밀도 코팅의 고 분자량 (HMW) PEG는 입자의 점액 침투를 용이하게 한다.

[0177] 재료 및 방법

[0178] 나노 입자 (NP) 코팅 제형

[0179] 나노 입자는 Nance et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 149–119; Lai 등, Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104, 1482–1487. 간단히 말하자면, 40, 100 및 200 nm의 카르복실레이트 – 변형 폴리스티렌 (PS) 비드를 지정된 완충액을 사용하여 5 kDa ~ 40 kDa의 메톡시-PEG-아민으로 코팅하였다.

[0180] 인간 자궁 경부 점액에서의 다중 입자 추적

[0181] 이전에 기술된 바와 같이 인간 자궁 경부 점액 (CVM) 샘플을 수득하였다 (Lai et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104, 1482–1487; Boskey et al., 2003, 30, 107–109). 간단히 말하자면, 정상적인 질 미생물이 있

는 여성의 희석되지 않은 CVM은 Johns Hopkins Medical Institutional Board의 승인을 받은 프로토콜에 따라 월경액 수집 장치를 사용하여 자체 수집 방법을 사용하여 획득했다. 점액 시료는 사용 전 4°C에서 보관하고 4시간 이내에 수집했다. 주문 제작 웰 (well)에서 최대 2 μL의 입자 용액 (0.02–0.08 % w / v)을 30 μL CVM의 부피에 첨가했다. 웰은 슈퍼 글루로 부착된 커버 슬립으로 봉인되었다. 영상은 반전된 epifluorescence 현미경 설정 (Zeiss Axio Observer)의 일환으로 EMCCD 카메라 (Evolve 512; Photometrics)를 통해 100x / 1.46 NA 오일 침직 대물 렌즈로 얻었다. 영상은 20 초 동안 66.7ms의 시간 해상도에서 Metamorph 소프트웨어 (Molecular Devices)로 캡처되었다. 나노 입자 궤도와 평균 제곱 변위 (MSD)는 각 입자에 대해 추적된 최소 30 프레임을 갖는 MATLAB (Schuster et al., Biomaterials 2013, 34, 3439–3446)을 사용하여 얻었으며 MSD는  $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = [x(t + \tau) - x(t)]^2 + [y(t + \tau) - y(t)]^2$  = τ = 시간 스케일 또는 시간 지연 (문헌 [Proc Natl Acad Sci USA, Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104, 1482–1487; Suh 등, Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57, 63–78], Dawson et al., Biotechnol Prog, 2004, 20, 851–857]. 적어도 150 개의 입자가 n = 3 개의 독립적 인 샘플에서 추적되었다. 우리의 이전 연구는 정적 오류가 평균 입자 변위보다 훨씬 적은 20 nm 이하로 추정 될 수 있음을 보여 주었다 (Suh 등, Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57, 63–78; Suk et al., J Control Release, 2014, 178, 8–17).

#### [0182] 결과

[0183] 봉산법 (PS-PEG5-40kDa, 최종 크기 230–300 nm, 표 1)을 사용하여 5–40 kDa PEG로 코팅된 200 nm PS NP는 높은 <MSD> 값이 측정됨에 따라 CVM을 빠르게 침투할 수 있었다 (도 4). 또한 모든 PS-PEG5-40kDa NP에 대한 3 초의 궤적은 코팅되지 않은 PS NP와 뚜렷한 대조를 이루며 확산 작용을 반영한다 (도 5A–5E). PS-PEG5-40kDa NP는 또한 높은 PEG 밀도, Γ / SA ≥ 1.5를 가졌다 (표 1). PEG MW가 증가함에 따라 100 nm<sup>2</sup> 당 PEG 분자의 수가 감소하는 것이 명백했으며, 이는 MW가 증가함에 따라 각 PEG 사슬에 의해 점유된 공간의 증가에 기인할 수 있다. 제약되지 않은 5 kDa PEG 사슬이 차지하는 면적은 제약되지 않은 40 kDa PEG 분자의 ~ 180 nm<sup>2</sup>와 비교하여 ~ 23 nm<sup>2</sup>이다. 또한, PEG 화 후의 나노 입자의 유체 역학적 직경은 PEG 분자량이 증가함에 따라 증가했다. PEG 사슬의 고밀도 패킹은 신장을 야기하므로 더 높은 MW PEG 사슬은 더 두꺼운 코로나를 생성할 것이다.

[0184] PEG 쇄를 나노 입자 표면에 조밀하게 패킹함으로써, PEG는 PEG 분자에 관계없이 점액 겔에 침투하는 것을 입체적으로 제한하고 정렬되는 것으로 가정된다. 접착력은 PEG 사슬 운동에 의존하는 것으로 나타났으므로 사슬이 충분히 구속되면 점액 메쉬와 상호 침투할 수 없어 점액 접착이 감소될 수 있다 (Huang 등, J Control Release, 2000, 65, 63–71).

[0185] Yang과 동료들은 20 kDa PEG로 코팅된 나노 입자의 <20 %가 Γ / SA > 2.8에 대한 전신 순환계에서 제거됨을 발견했다. 이 PEG 표면 밀도에서 그들은 인접한 PEG 사슬이 동시에 입자 표면을 단백질 흡착에 노출시킬 수 있는 확장된 구성에 도달할 가능성이 거의 없음을 결정했다. 또한 PEG 농도가 약간만 감소하더라도 체내 순환 시간이 2 시간 미만으로 감소한다는 것을 발견했다 (Yang et al., Mol Pharm, 2014, 11, 1250–1258). 유사하게, 우리는 나노 입자 PEG 표면 밀도의 작은 감소가 비 접막 표면 특성에서 접막 접착성 표면 특성으로의 전이를 초래한다는 것을 발견했다.

#### [0186] 실시예 4. 나노 입자의 코어 크기는 PEG 코팅 밀도 및 점액 침투에 영향을 미친다.

#### [0187] 재료 및 방법

[0188] 나노 입자는 Nance et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 149–119; Lai 등, Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104, 1482–1487. 간단히 말하자면, 40, 100 및 200 nm의 카르복실레이트 – 변형 폴리스티렌 (PS) 비드를 지정된 완충액을 사용하여 5 kDa ~ 40 kDa의 메톡시-PEG-아민으로 코팅 하였다.

#### [0189] 결과

[0190] 100 nm PS NP를 봉산법 (PS-PEG5-40kDa, 최종 크기 110–170 nm)을 사용하여 5 kDa–40 kDa PEG로 코팅 하였다. 표 1과 도 6은 100 nm PS-PEG5-40 kDa NP에서 Γ / SA 값이 모두 > 2이며 CVM을 통한 NP 확산이 빨라짐을 보여준다. PEG 코팅된 나노 입자 궤적은 코팅되지 않은 PS와는 대조적으로 확산 운동을 반영했다 (도 7A–7E). 모든 100 nm 및 200 nm PS-PEG5-40 kDa NP 제제는 물에서의 이론적 인 확산 속도와 비교하여 CVM에서 20 배 미만으로 감속되었다 (표 1).

[0191] PEG 쇄를 나노 입자 표면에 조밀하게 패킹함으로써, PEG는 PEG 분자에 관계없이 점액 겔에 침투하는 것을 입체

적으로 제한하고 정렬되는 것으로 가정된다. 접착력은 PEG 사슬 운동에 의존하는 것으로 나타났으므로 사슬이 충분히 구속되면 점액 메쉬와 상호 침투할 수 없어 점액 접착이 감소될 수 있다 (Huang 등, J Control Release, 2000, 65, 63 -71).

[0192] 실시예 5. 생체 내 코팅된 입자의 분포에 대한 PEG 분자량의 영향.

[0193] 재료 및 방법

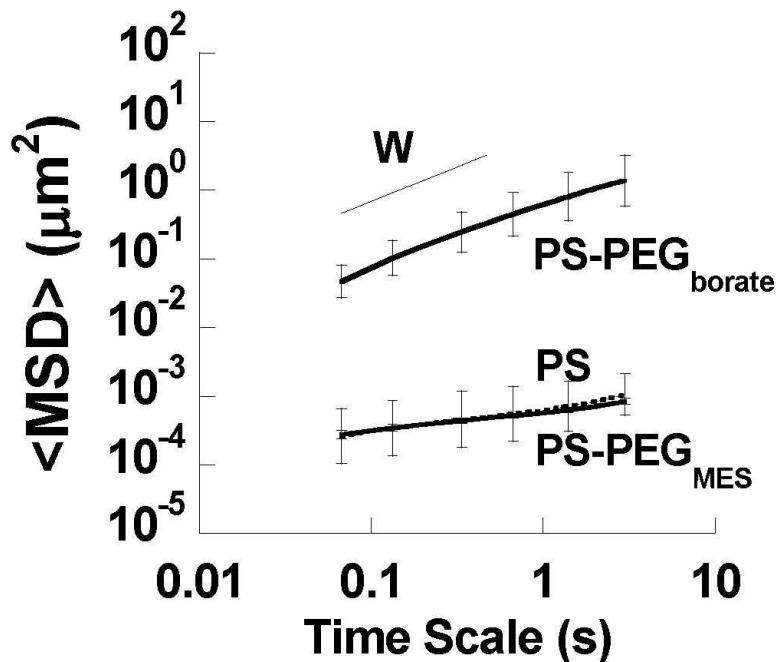
[0194] 6-8 주령의 암 CF-1 마우스를 역전주기 시설 (12 시간 빛, 12 시간 암흑)에 1 주간 넣어 순응시켰다. 질분포를 위해 마우스는 이전에 기술된 것처럼 (Champlin et al., Biol Reprod, 1973, 8, 491-494) 소공의 시작적 출현으로 자연 순환 발정을 위해 선택되었다. 발정 단계에서 생쥐의 질은 인간의 질과 가장 유사하다 (Asscher et al., J Anat, 1956, 90, 547-552; Smith et al., Am J Anat, 1934, 54, 27-85), 자궁 경부 점액은 인간 CVM과 유사한 장벽 특성을 가지고있다(Ensign et al., Mol Pharm, 2013, 10, 2176-2182). 대장 암 분포를 위해서, 생쥐는 24 시간 동안 굶어 죽었고, 이는 덜 빈번하고 부드러운 펠렛을 유도한다 (Maisel et al., J Control Release, 2015, 10, 197, 48-57, Epub 2014 Nov 4). 마우스를 이소플루란(isoflurane)을 사용하여 마취시키고, 텔 이온수 내 100 nm (질내) 또는 40 nm (내선) 나노 입자의 0.02 % w / v를 5 μL (질내) 또는 20 μL (내선) 투여 하였다(Maisel et al., J Control Release, 2015, 10, 197, 48-57, Epub 2014 Nov 4, Ensign et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 138-179; Maisel et al., J Control Release, 2015, 209, 280-287 ). 5 내지 10 분 후에 마우스를 회생시키고 조직을 절제하고 Tissue-Tek O.C.T. 화합물. 조직은 라이카 CM-3050-S 저온 유지 장치를 사용하여 질 및 결장 전체 길이를 따라 6 μm 슬라이스로 구분되었다. 조각을 10 % 포르말린으로 고정시키고 ProLong Gold antifade 를 시약을 사용하여 DAPI로 염색하여 핵을 염색하고 입자 형광을 유지했다. 역상 epifluorescence 현미경 설정 (Zeiss Axio Observer)을 사용하여 이미지를 얻었다. 모든 실험은 존스 홉킨스 대학 동물 관리 및 사용위원회의 승인을 받았다.

[0195] 결과

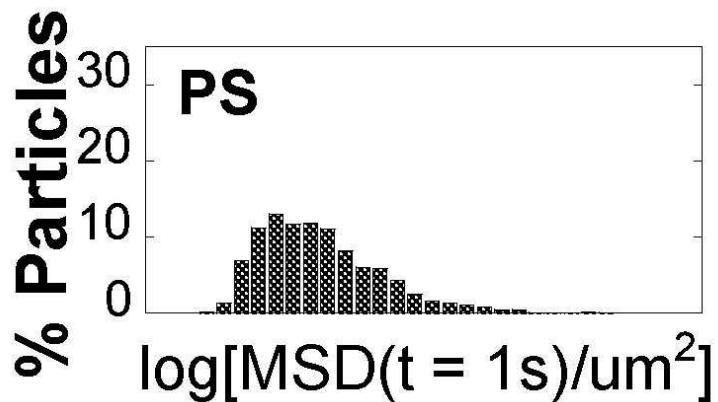
[0196] 투여 후 5-10 분에 걸쳐 획득된 횡대 질 및 결장 직장 절제술에서 관찰된, 다양한 MW PEG (5 kDa, 10 kDa, 20 kDa, 40 kDa)로 조밀하게 코팅된 PS-PEG NP를 생쥐의 자궁 경관 및 결장에 균일하게 분포시켰다. 코팅된 PS-PEG NP가 함유된 용액 PS-PEG NP는 이전에 관찰된 마우스의 질 (~ 100 nm) 및 결장 (~ 40 nm)에 균일하게 분포하는 본원 출원인이 적절한 크기로 투여하였으며, 충분히 잘 PEG화되고 저 흡수성 비히클로 투여하여 (Ensign et al., Sci Transl Med, 2012, 4, 138-179, Ensign et al., Biomaterials, 2013, 34, 6922-6929; Maisel 등, J Control Release, 2015, 10, 197, 48 -57, Epub 2014 Nov 4; Maisel et al., J Control Release, 2015, 209, 280-287). 출원인의 이전 관찰과 유사하게, 관류 점액 층에서 응집된 비코팅된 PS NP, 그러나 생체내 점액 샘플 (PS-PEG5-40kDa)에서의 확산을 위한 충분히 조밀한 PEG 코팅을 갖는 모든 PS-PEG NP 제제는 신속하고 균일하게 질 및 생체 내 결장 상피 표면. 이 결과는 생체 내 점액에서의 나노 입자의 확산이 생체 내에서 점막 표면에서 관찰된 분포와 잘 일치한다는 점과 일치한다. 즉 점액에서 급속히 확산/방해 받지 않는 점액이 점막 표면보다 훨씬 균일하게 분포하고 점막 조직에 국부적으로 투여될 때 더 오래 지속된다. 개선된 나노 입자 분포는 자궁 경부 질관에서의 헤르페스 (HSV-2) 감염 예방, 천식 유발폐 염증 예방 및 자궁 경부암 치료와 같은 점막 부위에서보다 효과적인 치료 및 예방을 제공한다 (Ensign et al., Sci Translated Med, 2012, 4, 138-179; Suk et al., J Control Release, 2014, 178, 8-17, Yang 등, Adv Healthc Mater, 2014, 3, 1044-1052; da Silva et al., J Control Release, 2014, 180, 125-133).

도면

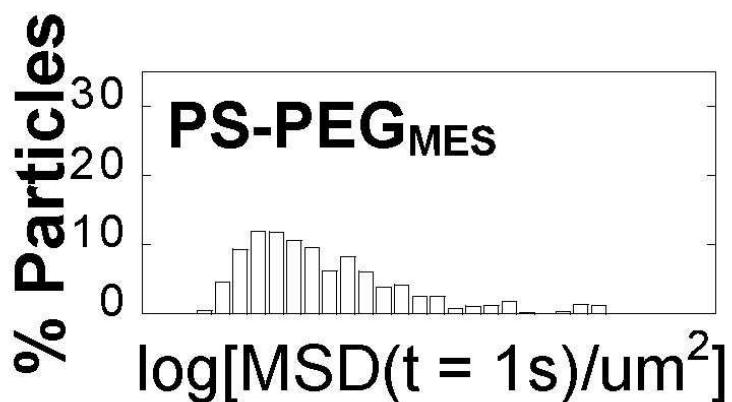
도면1



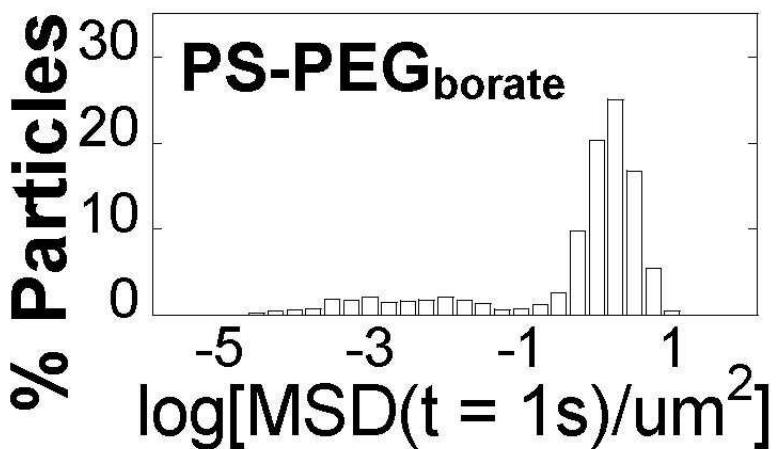
도면2a



도면2b



도면2c



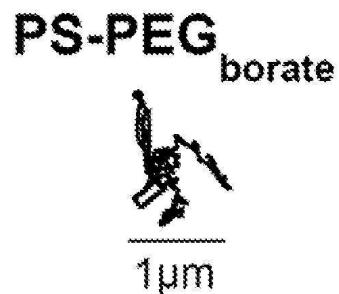
도면3a

PS

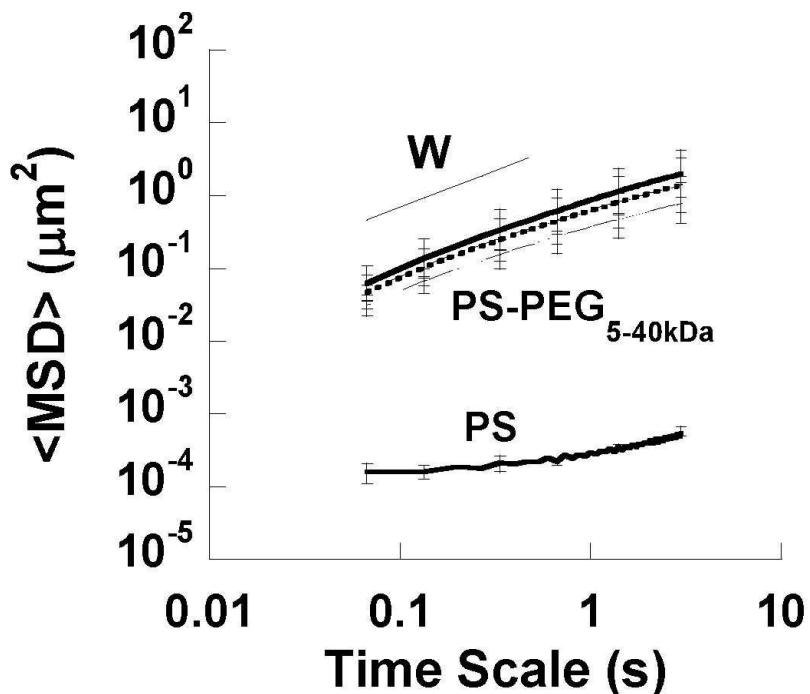
도면3b

PS-PEG<sub>MES</sub>

도면3c



도면4



도면5a

PS

.

도면5b

**PS-PEG<sub>5kDa</sub>**



도면5c

**PS-PEG<sub>10kDa</sub>**



도면5d

**PS-PEG<sub>20kDa</sub>**



도면5e

**PS-PEG<sub>40kDa</sub>**



— 1μm —

도면6

