



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월14일

(11) 등록번호 10-2834026

(24) 등록일자 2025년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/00 (2006.01) A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01) A61K 31/7036 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/26 (2017.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/0078 (2013.01)
A61K 31/47 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7007880

(22) 출원일자(국제) 2019년04월03일

심사청구일자 2022년04월01일

(85) 번역문제출일자 2021년03월16일

(65) 공개번호 10-2021-0090607

(43) 공개일자 2021년07월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2019/025538

(87) 국제공개번호 WO 2020/040818

국제공개일자 2020년02월27일

(30) 우선권주장

62/722,048 2018년08월23일 미국(US)

62/796,822 2019년01월25일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2016534155 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

팬카인드 코퍼레이션

미국 캘리포니아 91362 웨스트레이크 빌리지 러셀
랜치 로드 30930 스위트 300

(72) 발명자

호프만 토마스

미국 18901 펜실베이니아주 도일스타운 디케이더
스트리트 215

우퍼 스테판

미국 27601 노스 캐롤라이나주 롤리 사우스 스웨
인 스트리트 41

스테이플턴 케빈

미국 92651 캘리포니아주 라구나 비치 에거트 스
트리트 605

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 이정진

(54) 발명의 명칭 클로파지민의 조성물, 이들을 포함하는 조합물, 이들의 제조 방법, 이들을 포함하는 용도 및 방법

(57) 요약

본 발명은 클로파지민이 현탁액의 형태로 제공되는, 치료적 유효 투여량의 클로파지민을 포함하는 흡입용 약학 조성물, 및 이들의 제조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐 흡입용 에어로졸의 형태의 클로파지민을 포함하는 약학 조합물을 제공한다. 본 발명에 의해 제공되는 조합물 및 조성물은 마이코박테리아 및 다른 그램 양성 박테리아에 의해 발생하는 폐 감염증, 및 폐 진균 감염증의 치료 및/또는 예방에서 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/498 (2013.01)

A61K 31/7036 (2013.01)

A61K 47/02 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 31/10 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 흡입성 액상 약학 조성물:

- (a) 치료적 유효 투여량의 클로파지민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염;
 - (b) 폴리소르베이트 80; 및
 - (c) 물, 등장성 식염수, 완충 식염수 및 수성 전해질 용액에서 선택되는 수성 액체 담체,
- 상기 클로파지민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 현탁액 중의 입자의 형태로 제공되며,
- 상기 클로파지민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 입자는 $2\ \mu\text{m}$ 미만의 중앙 크기 및 $2\ \mu\text{m}$ 미만의 D90 을 가짐.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 수성 액체 담체가 증류수, 고장성 식염수 또는 등장성 식염수인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 고장성 식염수가 1 % 내지 7 % (w/v) 염화 나트륨인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 폴리소르베이트 80 이 초순수 폴리소르베이트 80 이며, 수성 액체 담체가 등장성 식염수인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 조성물의 삼투압이 200-700 mOsm/kg 의 범위인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 조성물의 삼투압이 300-400 mOsm/kg 의 범위인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 폴리소르베이트 80 이 전체 조성물의 0.001 % 내지 5 % (v/v) 의 범위이며, 클로파지민의 양 이 전체 조성물의 0.1 % 내지 20 % (w/v) 의 범위인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 흡입성 액상 약학 조성물:

- (1) 클로파지민, 폴리소르베이트 80 및 물의 현탁액을 균질화시켜, 클로파지민을 포함하는 현탁액을 수득하는 단계;
- (2) 상기 (1) 로부터 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계;
- (3) 염화 나트륨 농도를 조정하는 단계; 및
- (4) 삼투압을 조정하는 단계.

청구항 9

제 8 항에 있어서, pH 가 7.4 로 조정되며, 염화 나트륨 농도가 154 mM 염화 나트륨으로 조정되는, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 단계 (1) 에서의 균질화가 고압 균질화, 고전단 균질화, 습식 밀링, 초음파 균질화, 또는 이러한 처리의 조합에 의해 수행되는, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 클로파지민의 균질화가 여러 단계의 균질화로 수행되는, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 12

초음파 네블라이저, 전자 스프레이 네블라이저, 진동 막 네블라이저, 제트 네블라이저 및 기계식 소프트 미스트 흡입기에서 선택되는 네블라이징 장치에 의한, 제 1 항에 따른 조성물의 에어로졸화에 의해 제조되며,

네블라이징 장치에 의해 제조되는 상기 에어로졸 입자는 1 내지 5 μm 의 질량 중앙 공기 역학적 직경을 갖는, 흡입용 에어로졸의 형태의 흡입성 액상 약학 제제.

청구항 13

마이코박테리아 또는 다른 그람 양성 박테리아에 의해 발생하는 폐 감염증을 치료하거나 이에 대한 예방을 제공할 때 항생제 활성을 제공하는데 사용하기 위한, 다음을 포함하는 흡입성 액상 시스템:

1) 다음을 포함하는 네블라이즈화된 약학 제제:

(a) 치료적 유효 투여량의 클로파지민;

(b) 폴리소르베이트 80; 및

(c) 물, 등장성 식염수, 완충 식염수 및 수성 전해질 용액에서 선택되는 수성 액체 담체,

및

2) 네블라이저,

상기 클로파지민은 현탁액의 형태로 제공되며,

상기 시스템에 의해 제조되는 에어로졸 입자는 1 내지 5 μm 의 질량 중앙 공기 역학적 직경을 가짐.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 조성물을 흡입에 의해 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서의 폐 감염증의 치료 또는 예방을 위한 것인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 감염증이 비결핵성 마이코박테리아 및 마이코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 복합체, 및 이들의 조합물에서 선택되는 마이코박테리움 속의 종에 의해 발생하는, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 비결핵성 마이코박테리움이 마이코박테리움 아비움 (*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레 (*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테리움 압세수스 (*Mycobacterium abscessus*) 및 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*), 및 이들의 조합물에서 선택되는, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 17

제 14 항에 있어서, 감염증이 낭포성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 질환 또는 후천성 면역 결핍 증후군을 앓고 있는 환자에서의, MAC 폐 질환 및 비결핵성 감염증에서 선택되는 기회적 감염증인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 감염증이 낭포성 섬유증을 앓고 있는 환자에서의 기회적 비결핵성 마이코박테리아 감염증인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 19

제 1 항에 있어서, 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 세폭시틴, 아미카신, 클라리스로마이신, 피라진아미드, 리팜핀, 목시플록사신, 레보플록사신 및 파라-아미노 살리실레이트, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에, 상기 조성물을 흡입에 의해 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서의 마이코박테리아 또는 다른 그람 양성 박테리아에 의해 발생하는 폐 감염증의 치료 또는 예방을 위한 것인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 작용제가 베다퀼린 또는 아미카신인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 작용제가 베다퀼린인, 흡입성 액상 약학 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2018 년 8 월 23 일 출원된 미국 가출원 제 62/722,048 호에 대한 우선권을 주장하고, 또한 본 출원은 2019 년 1 월 25 일 출원된 미국 가출원 제 62/796,322 호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 모두의 내용은 본원에 참고로 포함된다.

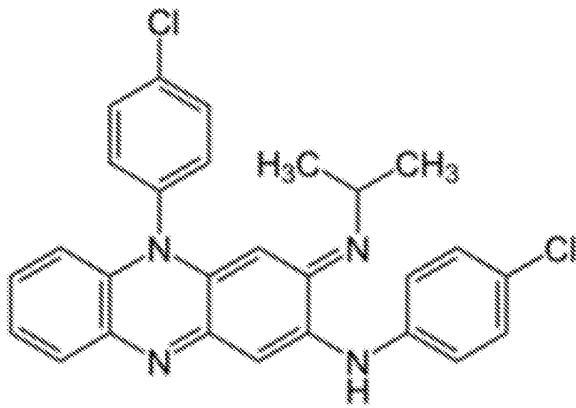
[0002] 기술분야

[0003] 본 발명은 클로파지민이 현탁액의 형태로 제공되는, 치료적 유효 투여량의 클로파지민을 포함하는 흡입용 약학 조성물; 이들의 제조 방법; 및 이들을 포함하는 치료의 용도 및 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐 흡입용 에어로졸의 형태의 클로파지민을 포함하는 약학 조합물을 제공한다.

[0004] 본 발명에 의해 제공되는 조합물 및 조성물은 마이코박테리아 및 다른 그람 양성 박테리아에 의해 발생하는 폐 감염증, 및 폐 진균 감염증의 치료 및/또는 예방에서 사용될 수 있다.

배경 기술

[0005] 클로파지민은 항-마이코박테리아 및 항-염증 활성을 갖는 극소수성 리미노페나진 항생제 (Log P = 7.66) 이며, 1957 년에 최초로 기술되었다. 이의 구조식은 다음과 같다:



[0006]

[0007]

클로파지민이 항균 효과를 발휘하는 정확한 메커니즘은 알려져 있지 않다. 그러나, 이것은 마이코박테리아 DNA에 우선적으로 결합함으로써, DNA 복제 및 세포 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 다른 제안된 작용 메커니즘은 막 손상/탈안정화, 막-탈안정화 리소인지질의 생성, 칼륨 수송의 간섭, 및/또는 세포내 산화 환원 순환을 포함한다. 다중-약물 내성 균주를 포함하여, 생체 외에서 마이코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) (MTB)에 대해 인상적으로 활성을 보였지만, 최근까지 클로파지민은 일반적으로 폐 결핵증의 치료에서 효과적이지 않은 것으로 간주되었다 (예를 들어, Cholo M et al., J Antimicrob Chemother, 2012 Feb, 67(2):290-8 참조).

[0008]

클로파지민은 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*)에 의해 유발되는 한센병의 치료를 위해 세계 보건 기구 (WHO)에 의해 권장되는 3 가지 주요 약물 중 하나이며, 약물 내성 결핵 및 비결핵성 마이코박테리아 (NTM)에 의해 유발되는 감염증과 같은 다른 마이코박테리아 감염증의 치료를 위해 최근에 점점 더 많이 사용되었다.

[0009]

클로파지민은 물 중에서 실질적으로 불용성이며, 높은 막 투과성을 나타내기 때문에, BCS (생물약제학적 분류 체계 (Biopharmaceutics Classification System)) 클래스 II 약물로서 분류되었다.

[0010]

약물의 불충분한 경구 흡수 및 불충분한 생체 이용률과 관련된 과제를 해결하기 위해서, 경구 투여 형태를 최적화하는데 미세화, 나노화, 초임계 유체 재결정화, 액체로의 분무 동결 건조, 고체 분산액 및 용액과 같은 다양한 전략이 적용되었다.

[0011]

BCS 클래스 II 약물로서 분류되는 클로파지민은 일반적으로 경구 생체 이용률의 개선을 위한 고체 분산액으로의 제제화에 대해 이상적인 후보인 것으로 간주된다 (예를 들어, Bhusnure et al. IJRPC 2014, 4(4), 906-918 참조).

[0012]

이에 따라, 이의 친유성 때문에, 클로파지민은 일반적으로 경구 흡수를 향상시키기 위해서 오일-왁스 베이스 중의 미정질 현탁액으로서 투여된다. 경구 투여 후에 인간에서의 흡수는 상당히 다양하다 (45-62 %). 클로파지민의 약영향은 투여량과 관련이 있으며, 주로 피부, 눈, 위장관, 및 QT 연장에 영향을 미친다. 부작용은 피부 및 결막의 적갈색 변색의 발생을 포함하며, 중지하면 서서히 원래대로 돌아간다. 이들은 만성 진신 축적의 결과이다.

[0013]

마이코박테리움은 이의 자체 속인 마이코박테리아세아에와 함께 악티노박테리아 속이다. 마이코박테리아는 특징적인 막대-모양 형상 및 왁스성 외부 코트를 가진다.

[0014]

따라서, 마이코박테리아는 다음의 3 가지 그룹으로 나눌 수 있다:

[0015]

● 마이코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 복합체 - 결핵의 원인 병원체

[0016]

● 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*) - 한센병의 원인 병원체

[0017]

● 비결핵성 마이코박테리아 (NTM) - 엠. 투버쿨로시스 (*M. tuberculosis*) 또는 엠. 레프라에 (*M. leprae*)가 아닌 모든 다른 마이코박테리아, 예를 들어 마이코박테리움 압세수스 복합체 (*Mycobacterium abscessus* complex, MABSC), 마이코박테리움 아비움 복합체 (*Mycobacterium avium* complex, MAC)를 포함함.

[0018]

결핵 (TB)은 마이코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 복합체 박테리아에 의해 유발되는 감

염성 질환이다. 인간에서 가장 오래된 문서화된 감염원 중 하나로서, TB 는 전세계적으로 사망률 및 발병률의 중요한 원인으로 남아 있으며, 2015 년에 1040 만 명의 새로운 TB 감염 사례가 추정되었고, 활동성 TB 질환으로 140 만 명이 사망하였다 (예를 들어, 세계 보건 기구 (WHO: World Health Organization) Global Tuberculosis Report 2016 참조). 높은 유병률 및 사망률 외에도, 다중-약물 내성 결핵 (MDR-TB) 의 발생률은 증가하는 관심사이며, 2015 년에 580,000 명의 환자가 약물-내성 TB 감염을 나타냈다. 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV) 와 같은 동반 발병률은 치료를 복잡하게 하며, 2015 년에 120 만 명의 TB 사례의 원인이 되었다.

[0019] 다중-약물 내성 (MDR) 감염증을 치료하기 위해서, WHO 는 2 차 항-TB 약물의 9 내지 12 개월 치료 계획을 시행할 것을 권장하였다. 9 내지 12 개월 방글라데시 계획과 같은 이들 계획은, MDR-TB 를 가티플록사신, 에탐부톨, 피라진아미드 및 클로파지민의 조합물로 치료하여, 87.9 % 의 환자에서 재발없는 치료를 유도하였다 (예를 들어, Sotgiu, G, et al., "Applicability of the shorter 'Bangladesh regimen' in high multidrug-resistant tuberculosis settings", International Journal of Infectious Diseases (2017) **56** 190-193 참조).

[0020] 단축된 TB 치료를 조사하는 다른 연구는, 클로파지민이 경구 투여 2 주 후에 임상적 이점을 갖지 않는다는 것을 입증하였다 (예를 들어, Diacon, A.H., et al., "Bactericidal Activity of Pyrazinamide and Clofazimine Alone and in Combinations with Pretomanid and Bedaquiline", American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (2015), **191** (8), 943-953 참조). 활성의 기여는, 순환 혈청 단백질에 높은 친화력으로 결합하는 것이 이론화되었기 때문에, 약물의 낮은 생체 이용률에 기인하였다. 클로파지민이 MDR-TB, 및 광범위-약물 내성 TB (XDR-TB) 의 치료에 효과적이라는 것이 경험적으로 입증되었다는 사실에도 불구하고, 전신 투여 후의 이의 불충분한 생체 이용률은 단기간 치료 동안에 이의 생물학적 활성을 제한하는 것으로 보인다 (예를 들어, Swanson, R.V., et al., "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clofazimine in a Mouse Model of Tuberculosis", Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2015), **59** (6), 3042-3051 참조).

[0021] 흡입된 항생제에 의한 폐 감염증의 치료는 전신 전달에 비해서, 폐에서의 보다 높은 약물 농도를 초래하고, 약영향을 감소시키며 (예를 들어, Touw, D.J., et al., "Inhalation of antibiotics in cystic fibrosis", European Respiratory Journal (1995), **8**, 1594-1604 참조), 이는 증가된 생물학적 활성 및 효능을 초래하는 (예를 들어, Hickey, A.J., "Inhaled drug treatment for tuberculosis: Past progress and future prospects", Journal of Controlled Release, (2016), **240**, 127-134 참조) 것으로 알려져 있다. 생체내 마우스 모델은, 클로파지민의 에어로졸화된 투여가 치료 개시 후 28 일 만에 클로파지민의 경구 투여에 비해서, TB-감염 모델에서 간균 청소율의 유의한 개선을 나타낸다는 것을 입증하였다 (예를 들어, Verma, R.K., et al., "Inhaled microparticles containing clofazimine are efficacious in treatment of experimental Tuberculosis in Mice", Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2013), **57** (2), 1050-1052 참조). 단기간에 걸친 이러한 개선된 효능은, 폐에서의 감염 부위에 클로파지민이 직접 전달되어, 결핵 육아종 내의 폐 대식세포에서 보다 높은 클로파지민 농도를 초래하기 때문일 수 있다.

[0022] 따라서, MDR TB 또는 XDR-TB 감염증을 앓고 있는 환자에서 클로파지민의 에어로졸화된 투여의 사용은 환자 치료 결과를 추가로 개선시켜야 하며, 현재의 치료 계획 기간을 단축시킬 수 있다.

[0023] 이전에 비정형 또는 편재성 마이코박테리아라고 명명했던 비결핵성 마이코박테리아 (NTM) 의 그룹은 150 종 이상을 함유한다. NTM 은 자연에서 보편적으로 발견할 수 있으며, 광범위한 다양성을 보여준다. 이들은 토양, 땅 및 식수에서, 뿐만 아니라, 저온 살균 우유 또는 치즈와 같은 식품에서 검출될 수 있다. 일반적으로, NTM 은 병원성이 덜한 것으로 간주된다. 그럼에도 불구하고, 이들은 인간, 특히 면역력이 약한 사람이나 또는 이전에 폐 질환으로 고통받은 사람에게서 심각한 질병을 유발할 수 있다. 현재, NTM 은 이들의 성장 속도에 따라서 분류되며, 느리게 성장하는 (SGM) 및 빠르게 성장하는 (RGM) 마이코박테리아로 구분된다.

[0024] 느리게 성장하는 마이코박테리움 아비움 복합체 (Mycobacterium avium complex, MAC) 는, 가장 중요하고 가장 빈번한 병원성 NTM 에 속하는 마이코박테리움 아비움 (Mycobacterium avium), 마이코박테리움 키마에라 (Mycobacterium chimera) 및 마이코박테리움 인트라셀룰라레 (Mycobacterium intracellulare) 의 종을 포함한다. 마이코박테리움 칸사시 (Mycobacterium kansasii), 마이코박테리움 말모엔스 (Mycobacterium malmoense), 마이코박테리움 제노피 (Mycobacterium xenopi), 마이코박테리움 시미아에 (Mycobacterium simiae), 마이코박테리움 압세수스 (Mycobacterium abscessus), 마이코박테리움 고르도나에 (Mycobacterium gordonae), 마이코박테리움 포르투이툼 (Mycobacterium fortuitum) 및 마이코박테리움 켈로나에

(*Mycobacterium chelonae*)와 마찬가지로, 이들은 주로 폐 감염증을 유발한다. 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*)은 아쿠아리움 욕아종과 같은 피부 및 연조직 감염증의 원인이 된다.

[0025] 특히, RGM은 심각한, 생명을 위협하는 만성 폐 질환을 유발하며, 확산성 및 종종 치명성 감염증의 원인이 된다. 감염증은 전형적으로 오염된 물질, 및 카테터, 비-멸균 수술 절차 또는 이물질의 주사 및 이식을 비롯한 침습적 절차에 의해 유발된다. 샤워 헤드 및 자쿠지에의 노출은 또한 감염증에 대한 위협으로서 보고되었다. NTM은 전형적으로 만성 폐 질환, 예컨대 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 낭포성 섬유증(CF)을 앓고 있는 환자, 및 다른 면역 저하 환자에서 기회적 감염증(opportunistic infection)을 유발한다.

[0026] 최근에, 하위 종인 마이코박테리움 압세수스 서브에스피. 압세수스(*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*) (엠. 에이. 압세수스(*M. a. abscessus*)), 마이코박테리움 압세수스 볼레티이(*Mycobacterium abscessus bolletii*) 및 마이코박테리움 압세수스 마실리엔스(*Mycobacterium abscessus massiliense*)를 포함하는, 빠르게 성장하는(RGM) 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) 군의 군주(마이코박테리움 압세수스 복합체(*Mycobacterium abscessus* complex, MABSC))는 중요한 인간 병원체로서 부상하였으며, 임의의 다른 RGM보다 유의하게 높은 사망률과 관련이 있다.

[0027] CF 환자에서의 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) 감염은 증가된 폐 파괴를 초래하며, 종종 60-66%의 높은 실패율로 치료하는 것이 불가능하기 때문에, 특히 문제가 된다(예를 들어, Obregon-Henao A et al, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, November 2015, Vol 59, No 11, p. 6904-6912; Qvist, T., Pressler, T., Hoiby, N. and Katzenstein, T. L., "Shifting paradigms of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis", *Respiratory Research* (2014), 15(1):pp.41-47 참조).

[0028] NTM에 의한 인간 감염은 인간 후천성 면역 결핍 증후군 대유행의 출현과 보다 많은 관련이 있다. 마이코박테리움 아비움 복합체(*Mycobacterium avium* complex, MAC)로부터의 마이코박테리아는 인간 면역 결핍 바이러스(HIV)로 감염된 환자에서의 기회적 감염증의 주요 원인으로 확인되었다.

[0029] 여러 종의 NTM은 생물막을 형성하는 것으로 알려져 있다. 생물막은 인간 면역 메커니즘에 대한 안정성과 내성을 제공하는 세포외 매트릭스에 내장된 박테리아의 마이크로콜로니이다. 최근에, 일부 종의 NTM은 소독제 및 항균제에 대한 내성을 향상시키는 생물막을 형성하는 것으로 나타났다. 생물막 조립은 가역적 부착, 비가역적 부착, 박테리아 응집, 조직 및 신호 전달을 통한 생물막 형성, 및 최종 분산을 포함하는 여러 단계를 통해 진행된다. 이 과정 동안에, 박테리아는 다당류, 지질 및 핵산과 같은 세포외 중합체 물질(EPS)을 함유하는 매트릭스를 발현하여 복잡한 3차원 구조를 형성한다(예를 들어, Sousa S. et al., *International Journal of Mycobacteriology* 4 (2015), 36-43 참조). 특히, 마이코박테리아 EPS는 마이코박테리아가 엑소다당류를 생성하지 않기 때문에, 다른 생물막과 성질이 상이하다(예를 들어, Zambrano MM, Kolter R. *Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together*. *Cell*. 2005 참조). 마이코박테리아 생물막은 종마다 상이하지만, 미콜산, 글리코펩티도리피드, 미콜릴-디아실글리세롤, 리포올리고당, 리포펩티드, 및 세포외 DNA를 함유할 수 있다(Overview and original research from: Rose SJ, Babrak LM, Bermudez LE (2015) *Mycobacterium avium* Possesses Extracellular DNA that Contributes to Biofilm Formation, Structural Integrity, and Tolerance to Antibiotics. *PLoS ONE*). 생물막의 조립은 항균제에 대한 내성을 향상시키는 것으로 알려져 있다(예를 들어, Faria S. et al., *Journal of Pathogens*, Vol 2015, Article ID 809014 참조).

[0030] NTM 폐 감염증의 치료를 위한 신규 접근법으로서, 제트 네블라이저에 의해 네블라이즈화된 에어로졸화된 리포솜 아미카신/흡입된 아미카신 용액의 전달(Rose S. et al, 2014, *PLoS ONE*, Volume 9, Issue 9, e108703, and Olivier K. et al, *Ann Am Thorac Soc* Vol 11, No 1, pp. 30-35), 뿐만 아니라, 폐 전달을 위한 항-TB 약물 건조 분말 마이크로입자의 흡입(Cholo M et al., *J Antimicrob Chemother*. 2012 Feb; 67(2):290-8 and Fourie B. and Netley O., 2015 *Inhalation Magazine*, Verma 2013 *Antimicrob Agents Chemother*)이 제안되었다.

[0031] 비경구 아미노글리코사이드, 티게시클린 및 다른 유망한 경구 항생제, 예컨대 리네졸리드, 텔라마리드 및 베다퀼린에 의한 초기 치료 후의 흡입된 아미카신과의 다중 조합 요법, 및 선택된 경우에서의 외과적 개입은 NTM 폐 질환의 치료에서 유망한 결과를 나타냈다(Lu Ryu et al., *Tuberc Respir Dis* 2016;79:74-84). 그러나, NTM 감염증, 특히 NTM 폐 질환의 증가하는 발병률과 유병률 및 제한된 치료 옵션은 클로파지민과 같은 현재 사용되고 있는 항생제의 생체 이용률을 향상시키는 신규의 투여 형태/약학 제제의 개발을 필요로 한다. 흡입은 경구 및 비경구 요법에 비해서 효능을 향상시키고, 약영향을 감소시킬 수 있다.

[0032] 클로파지민과 아미카신의 조합물은 마이코박테리움 압세수스 (Mycobacterium abscessus) 및 마이코박테리움 아비움 (Mycobacterium avium) 모두에 대해 생체 외에서 상승적으로 작용을 하는 것으로 나타났다 (예를 들어, van Ingen, J., et al., "In Vitro Synergy between Clofazimine and Amikacin in Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Disease", Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56** (12), 6324-6327 (2012) 참조). 또한, 클로파지민과 베다퀼린의 조합물의 사용은 마이코박테리움 투버쿨로시스 (Mycobacterium tuberculosis) 에 대해 상승 작용을 나타냈다 (예를 들어, Cokol, M. et al., "Efficient Measurement and factorization of high-order drug interactions in Mycobacterium tuberculosis", Sciences Advances 2017:3:e170881, 11 October 2017 참조). 클로파지민/베다퀼린 조합물은 또한 비결핵성 박테리아인 마이코박테리움 압세수스 (Mycobacterium abscessus) 에 대해 상승 작용을 나타냈다 (Ruth, M.M. et al., "A Bedaquiline/Clofazimine Combination Regimen Might Add Activity to the Treatment of Clinically Relevant Non-Tuberculous Mycobacteria", Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2019), doi.org/10.1093/jac/dky526).

[0033] 진균 병원체는 인간 사망의 주요 원인으로 부상하였다. 현재의 추정, 침습성 진균 감염증으로 인한 사망이 결핵과 같은 보다 충분히 공지된 감염성 질환과 동등하다는 것을 제안한다. 칸디다 알비칸스 (candida albicans), 크립토코쿠스 네오포르만스 (Cryptococcus neoformans) 및 아스페르길루스 푸미가투스 (aspergillus fumigatus) 는 가장 널리 퍼져 있는 인간의 진균 병원체를 나타낸다. 각각의 이들 종은 불충분한 진단 및 제한된 치료 옵션으로 인해 용납할 수 없을 정도로 높은 사망률로 매년 수십만 건의 감염증의 원인이 되고 있다. 클로파지민은 여러 진균에 대한 조합제로서 효능을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, Robbins, N., et al., "An Antifungal Combination Matrix Identifies a Rich Pool of Adjuvant Molecules that Enhance Drug Activity against Diverse Fungal Pathogens", Cell Reports 13, 1481-1492, November 17, 2015 참조). 진균은 또한 낭포성 섬유증에서 공생 생물, 콜로니 형성 인자 및/또는 병원체로서의 역할을 한다 (예를 들어, Chotirmall, S.H. and McElvaney, N.G., "Fungi in the cystic fibrosis lung: Bystanders or pathogens?", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 52 (2014), 161-173 참조).

[0034] 물 중에서의 클로파지민의 낮은 용해도는 낮은 경구 생체 이용률 및 높은 미생물 내성을 초래하며, 또한 에어로졸 입자의 하부 폐 침착을 수득하기 위해서 네블라이저에 의한 에어로졸화와 같은, 액체 수성 담체 중에서의 제제화를 위해 약물을 용해시키고 안정화시키기 위한 특정한 기술을 필요로 한다.

발명의 내용

- [0035] 본 발명의 구현예에 있어서, 다음을 포함하는 약학 조성물이 제공된다:
- [0036] (a) 치료적 유효 투여량의 클로파지민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 유도체 또는 염;
- [0037] (b) 10 초과의 친수성-친유성 균형 값을 갖는 비이온성 계면활성제; 및
- [0038] (c) 물, 등장성 식염수, 완충 식염수 및 수성 전해질 용액에서 선택되는 수성 액체 담체,
- [0039] 상기 클로파지민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 유도체 또는 염은 현탁액 중의 입자의 형태로 제공되며,
- [0040] 상기 클로파지민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 유도체 또는 염의 입자는 5 μm 미만의 중앙 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 가짐.
- [0041] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 유도체 또는 염의 입자는 2 μm 미만의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 가진다.
- [0042] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 다음을 포함하는 약학 조성물이 제공된다:
- [0043] (a) 치료적 유효 투여량의 클로파지민;
- [0044] (b) 10 초과의 친수성-친유성 균형 값을 갖는 비이온성 계면활성제; 및
- [0045] (c) 물, 등장성 식염수, 완충 식염수 및 수성 전해질 용액에서 선택되는 수성 액체 담체,
- [0046] 상기 클로파지민은 현탁액 중의 입자의 형태로 제공되며,
- [0047] 상기 클로파지민의 입자는 5 μm 미만의 중앙 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 가짐.
- [0048] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 입자는 2 μm 미만의 중앙 크기 및 3 μm 미만의 D90 을

가진다.

- [0049] 적절한 네블라이저에 의한 본 발명의 조성물의 에어로졸화는 하부 폐 (즉, 중추 및 하부 말초 폐의 기관지, 세 기관지, 및 폐포) 로의 에어로졸화된 클로파지민의 유의하게 증가된 전달을 제공함으로써, 치료 효능을 실질적으로 향상시킨다.
- [0050] 또한, 흡입 장치는 바람직하게는 하부 폐에서의 균질한 침착을 위한 최적의 입자 크기 분포를 갖는 에어로졸의 국소화된 폐 전달을 위해 추가로 조정되어야 한다.
- [0051] 그러므로, 본 발명은 폐포 및 세기관지로의 전달을 용이하게 하는 크기의 에어로졸 입자를 갖는 에어로졸을 제공한다. 폐포 및 세기관지를 표적으로 하기 위한 적합한 공기 역학적 입자 크기는 1 내지 5 μm 이다. 이보다 큰 입자는 상부 폐, 즉, 기관지 및 기관에서, 및 입 및 목, 즉, 구인두 부위에서 선택적으로 침착된다. 따라서, 흡입 장치는 약 1 내지 약 5 μm 의 범위, 및 바람직하게는 약 1 내지 약 3 μm 의 범위의 질량 중앙 공기 역학적 직경 (MMAD: mass median aerodynamic diameter) 을 갖는 에어로졸을 생성하도록 조정된다. 또다른 구현예에 있어서, 입자 크기 분포는 좁으며, 약 2.5 미만의 기하 표준 편차 (GSD: geometric standard deviation) 를 가진다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 본 발명은 현탁액의 형태의 클로파지민의 폐 에어로졸 투여에 의해, 활성제의 하부 (즉, 보다 깊은) 폐 침착이 달성될 수 있으며, 이로써 극소수성 BCS 클래스 II 작용제의 생체 이용률을 현저하게 증가시킬 수 있고, 이는 감소된 전신 부작용과 함께 현저하게 증가된 치료 효능을 초래한다는 예기치 않은 발견에 기초한다.
- [0053] 또다른 양태에 있어서, 이러한 발견은 마이코박테리아 및 그람 양성 박테리아에 의해 발생하는 감염증, 특히 NTM 에 의한 폐 감염증, 예컨대 CF, COPD 및 면역 저하 환자, 예컨대 HIV 환자에서의 기회적 감염증에 대한 개선된 항생제 요법의 제공을 유도한다.
- [0054] 또한, 본 발명은 그람 양성 박테리아에 의한 폐 감염증, 특히 폐의 TB 및 NTM 감염증에 대한 확립된 경구 치료 계획의 전신 부작용을 극복할 뿐만 아니라, 클로파지민에 의한 치료의 투여량 및 기간을 감소시키는 것을 목적으로 한다.
- [0055] 당업자에 의해 본 출원은 또한 본원에 개시된 개별 특징의 각각의 및 임의의 조합을 개시하는 것으로 이해된다.
- [0056] 정의
- [0057] 용어 "약학적으로 허용 가능한 염" 은 본 발명의 화합물의 생물학적 효과 및 특성을 보유하며, 생물학적으로 또는 달리 비바람직하지 않은 염을 지칭한다. 많은 경우에 있어서, 본 발명의 화합물은 아미노기 및/또는 카르복실기 또는 이와 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 산 부가 염은 무기 산 및 유기 산으로 형성될 수 있다. 염이 유도될 수 있는 무기 산은, 예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등을 포함한다. 염이 유도될 수 있는 유기 산은, 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 나프토산, 올레산, 팔미트산, 파모산 (엠포산), 스테아르산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말레산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 글루코헵톤산, 글루쿠론산, 락트산, 락토비온산, 타르타르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산 등을 포함한다.
- [0058] 약학적으로 허용 가능한 염기 부가 염은 무기 및 유기 염기로 형성될 수 있다. 염이 유도될 수 있는 무기 염기는, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 등을 포함하며; 암모늄, 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 마그네슘 염이 특히 바람직하다. 염이 유도될 수 있는 유기 염기는, 예를 들어, 자연적으로 발생하는 치환된 아민, 시클릭 아민, 염기성 이온 교환 수지 등을 포함하는 1 차, 2 차 및 3 차 아민, 치환된 아민, 특히 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 히스티딘, 아르기닌, 라이신, 베타타민, N-메틸-글루카민 및 에탄올아민을 포함한다. 다른 산은 도데실황산, 나프탈렌-1,5-디술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, 및 사카린을 포함한다.
- [0059] 본 발명에 따르면, 유리 염기 이외에, 메탄술폰산, 말레산, 이소니코틴산, 니코틴산, 말론산 및 살리실산 염, 및 특히 클로파지민 메실레이트의 사용이 바람직하다.
- [0060] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "약학적으로 허용 가능한 유도체" 는, 예를 들어, US 9,540,336 에 개시된 화합물을 의미하며, US 9,540,336 의 개시 내용은 그 전체가 본원에 포함된다. 또한, 상기 유도체는 문헌

[Lu,Y., Zhen,M., Wang,B., Fu,L., Zhao,W., Li,P., Xu,J., Zhu,H., Jin,H., Yin,D., Huang,H., Upton,AM. and Ma,Z., "Clofazimine Analogs with Efficacy against experimental Tuberculosis and reduced Potential for Accumulation" Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2011), 55(11):pp.5185-5193] 에 기재된 바와 같은 의미를 가진다. 또한, 용어, 화합물의 "약학적으로 허용 가능한 유도체" 는, 예를 들어, 상기 화합물의 프로드러그이다. 일반적으로, 프로드러그는 투여시에 활성 형태의 화합물을 제공할 수 있는 화합물의 유도체이다. 이러한 유도체는, 예를 들어, 카르복실기의 에스테르 또는 아마이드, 히드록실기의 카르복실 에스테르, 또는 히드록실기의 포스페이트 에스테르일 수 있다.

- [0061] "치료적 유효량", "치료적 유효 투여량", 또는 "약학적 유효량" 은 치료 효과를 갖는, 본 발명에 대해 개시된 바와 같은, 클로파지민, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체의 양을 의미한다. 치료에 유용한 클로파지민의 투여량은 치료적 유효량이다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같은, 치료적 유효량은 임상 시험 결과 및/또는 모델 동물 감염 연구에 의해 판단되는 바와 같은, 원하는 치료 효과를 생성하는 클로파지민의 양을 의미한다.
- [0062] 클로파지민의 양 및 일일 투여량은 당업자에 의해 일상적으로 결정될 수 있으며, 관련된 특정한 미생물 균주와 같은 여러 요인에 따라 달라질 것이다. 이 양은 또한 환자의 신장, 체중, 성별, 연령 및 병력에 따라 달라질 수 있다. 예방적 치료의 경우, 치료적 유효량은 미생물 감염을 예방하는데 효과적인 양이다.
- [0063] "치료 효과" 는 감염의 증상 중 하나 이상을 어느 정도 완화시키며, 감염을 치유하는 것을 포함한다. "치유" 는 통상적인 측정에 의한 검출의 임계값 이하의 지점까지, 감염에 관련된 생존 미생물의 과도한 구성원을 전체적으로 또는 실질적으로 제거하는 것을 포함하여, 활성 감염의 증상을 제거하는 것을 의미한다. 그러나, 치유가 이루어진 후에도, 감염의 특정한 장기적 또는 영구적인 영향 (예컨대, 과도한 조직 손상) 이 존재할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은, "치료 효과" 는 인간 임상 결과 또는 동물 연구에 의해 측정되는 바와 같은, 숙주에서의 박테리아 로딩의 통계적으로 유의한 감소, 내성의 발현, 또는 감염 증상의 개선으로서 정의된다.
- [0064] 본원에서 사용되는 바와 같은, "치료하다", "치료", 또는 "치료하는" 은 예방 및/또는 치료 목적을 위해 약학 조성물/조합물을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0065] 용어 "예방적 치료" 는 아직 감염되지 않았지만, 특정한 감염에 민감하거나 또는 그렇지 않으면 위험에 처한 환자를 치료하는 것을 지칭한다. 용어 "치료적 치료" 는 이미 감염을 앓고 있는 환자에게 치료를 실시하는 것을 지칭한다. 따라서, 바람직한 구현예에 있어서, 치료는 치료적 유효량의 클로파지민을 포유 동물에게 (치료 또는 예방 목적을 위해) 투여하는 것이다.
- [0066] 본원에서 달리 명시하지 않는 한, 용어 "흡입" 은 폐 흡입을 지칭하는 것을 의미한다.
- [0067] 본원에서 달리 명시하지 않는 한, 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "감염" 은 폐 감염증을 지칭하는 것을 의미한다.
- [0068] 달리 명시하지 않는 한, 화합물의 순도를 지칭하기 위해서 사용될 때, 용어 "실질적으로" 는 95 % 이상 순도의 화합물의 순도를 나타낸다.
- [0069] 달리 명시하지 않는 한, 용어 "적절한 입자 크기" 는 조성물, 또는 환자에게 투여할 때 원하는 치료 효과를 제공하는 조성물에서의 클로파지민의 입자 크기를 지칭한다.
- [0070] 달리 명시하지 않는 한, 용어 "적절한 농도" 는 약학적으로 허용 가능한 조성물 또는 조합물을 제공하는 조성물 또는 조합물에서의 성분의 농도를 지칭한다.
- [0071] 약학 조성물 및 조합물
- [0072] 하기의 물 등급은 특히 본 발명에 적용 가능하다: 멸균 정제수, 주사용 멸균수, 관개용 멸균수, 흡입용 멸균수 (USP) 및, 예를 들어 유럽 약전 또는 국민 의약품집에 따른 상응하는 물 등급.
- [0073] 수성 액체 담체로서 본 발명에 따라서 사용되는 바와 같은 수성 전해질 용액은 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 리튬, 염화 마그네슘, 염화 칼슘 또는 이들의 혼합물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0074] 수성 액체 담체는 바람직하게는 등장성 식염수 용액 (약/대략 150 mM NaCl, 바람직하게는 154 mM NaCl 에 상응하는 0.9 % NaCl) 이다.

- [0075] 클로파지민은 4 가지 이상의 다형체 형태로 존재하는 것으로 밝혀졌다 (예를 들어, Bannigan, et al., "Investigation into the Solid and Solution Properties of Known and Novel Polymorphs of the Antimicrobial Molecule Clofazimine", Cryst. Growth Des. **2016**, 16 (12), pp. 7240-7250 참조). 클로파지민은 삼사정계 (triclinic) 형태 FI, 단사정계 (monoclinic) 형태 FII 및 사방정계 (orthorhombic) 형태 FIII 로 존재할 수 있다. 또다른 형태 FIV 는 또한 고온에서만 확인할 수 있다.
- [0076] 따라서, 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 다음을 포함하는 약학 조성물이 제공된다:
- [0077] (a) 치료적 유효 투여량의 클로파지민;
- [0078] (b) 10 초과의 친수성-친유성 균형 값을 갖는 비이온성 계면활성제; 및
- [0079] (c) 물, 등장성 식염수, 완충 식염수 및 수성 전해질 용액에서 선택되는 수성 액체 담체,
- [0080] 상기 클로파지민은 현탁액 중의 입자의 형태로 제공되고,
- [0081] 상기 클로파지민의 입자는 5 μm 미만의 중앙 크기 및 6 μm 미만의 D90, 바람직하게는 2 μm 미만의 중앙 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 가지며, 상기 클로파지민은 삼사정계 형태 FI, 단사정계 형태 FII 및 사방정계 형태 FIII, 및 이러한 형태의 혼합물에서 선택되는 다형체 형태로 제공됨.
- [0082] 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민은 실질적으로 사방정계 형태 FIII 로 제공된다.
- [0083] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 비이온성 계면활성제가 폴리소르베이트 20 (예를 들어 Tween[®] 20), 폴리소르베이트 60 (예를 들어 Tween[®] 60), 폴리소르베이트 80 (예를 들어 Tween[®] 80), 스테아릴 알코올, 14 내지 16 의 친수성-친유성 균형 값을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 유도체 (예를 들어 Cremophor[®] RH 40), 15 내지 17 의 친수성-친유성 균형 값을 갖는 수소화된 피마자유의 폴리에틸렌 글리콜 유도체 (예를 들어 Cremophor[®] RH 60), 소르비탄 모노라우레이트 (예를 들어 Span[®] 20), 소르비탄 모노팔미테이트 (예를 들어 Span[®] 40), 소르비탄 모노스테아레이트 (예를 들어 Span[®] 60), 폴리옥시에틸렌 (20) 올레일 에테르 (예를 들어 Brij[®] 020), 폴리옥시에틸렌 (20) 세틸 에테르 (예를 들어 Brij[®] 58), 폴리옥시에틸렌 (10) 세틸 에테르 (예를 들어 Brij[®] C10), 폴리옥시에틸렌 (10) 올레일 에테르 (예를 들어 Brij[®] 010), 폴리옥시에틸렌 (100) 스테아릴 에테르 (예를 들어 Brij[®] S100), 폴리옥시에틸렌 (10) 스테아릴 에테르 (예를 들어 Brij[®] S10), 폴리옥시에틸렌 (20) 스테아릴 에테르 (예를 들어 Brij[®] S20), 폴리옥시에틸렌 (4) 라우릴 에테르 (예를 들어 Brij[®] L4), 폴리옥시에틸렌 (20) 세틸 에테르 (예를 들어 Brij[®] 93), 폴리옥시에틸렌 (2) 세틸 에테르 (예를 들어 Brij[®] S2), 카프틸로카프로일 폴리옥실-8 글리세리드 (예를 들어 Labrasol[®]), 폴리에틸렌 글리콜 (20) 스테아레이트 (예를 들어 Myrj[™] 49), 폴리에틸렌 글리콜 (40) 스테아레이트 (예를 들어 Myrj[™] S40), 폴리에틸렌 글리콜 (100) 스테아레이트 (예를 들어 Myrj[™] S100), 폴리에틸렌 글리콜 (8) 스테아레이트 (예를 들어 Myrj[™] S8), 및 폴리옥실 40 스테아레이트 (예를 들어 Myrj[™] 52), 및 이들의 혼합물에서 선택되는, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다.
- [0084] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 비이온성 계면활성제가 폴리소르베이트 80 이며, 수성 액체 담체가 증류수, 고장성 식염수 또는 등장성 식염수인, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다. 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 비이온성 계면활성제가 초순수 폴리소르베이트 80 (예를 들어 NOF Corporation 폴리소르베이트 80 (Hx2)) 이며, 수성 액체 담체가 등장성 식염수인, 약학 조성물이 제공된다.
- [0085] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 조성물의 삼투압이 200-700 mOsm/kg 의 범위인, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 조성물의 삼투압은 300-400 mOsm/kg 의 범위이다.
- [0086] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 비이온성 계면활성제가 전체 조성물의 0.001 % 내지 5 % (v/v) 의 범위이며, 클로파지민의 양이 전체 조성물의 0.1 % 내지 20 % (w/v) 의 범위인, 본원에 기재된 조성물 구현예

중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다.

- [0087] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 약학 조성물이 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다:
- [0088] (1) 클로파지민, 비이온성 계면활성제 및 물의 현탁액을 균질화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 포함하는 현탁액을 수득하는 단계,
- [0089] (2) 상기 (1)로부터 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계, 및
- [0090] (3) 염화 나트륨 농도를 적절한 농도로 조정하는 단계, 및
- [0091] (4) 삼투압을 적절한 수준으로 조정하는 단계.
- [0092] 또다른 구현예에 있어서, pH 는 7.4 로 조정되며, 염화 나트륨 농도는 154 mM 염화 나트륨으로 조정된다. 또다른 구현예에 있어서, 단계 (1) 에서의 균질화는 고압 균질화, 고전단 균질화, 습식 밀링, 초음파 균질화, 또는 이러한 처리의 조합에 의해 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 균질화는 여러 단계의 균질화로 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 5 μm 미만의 평균 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 2 μm 미만의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다.
- [0093] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 약학 조성물이 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다:
- [0094] (1) 클로파지민 및 비-수성 액체의 현탁액을 균질화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 포함하는 현탁액을 수득하는 단계,
- [0095] (2) 클로파지민을 분리시키는 단계,
- [0096] (3) 클로파지민을 비이온성 계면활성제 및 물에 첨가하는 단계,
- [0097] (4) 상기 (3) 으로부터 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계, 및
- [0098] (5) 염화 나트륨 농도를 적절한 농도로 조정하는 단계.
- [0099] 또다른 구현예에 있어서, pH 는 7.4 로 조정되며, 염화 나트륨 농도는 154 mM 염화 나트륨으로 조정된다. 또다른 구현예에 있어서, 단계 (1) 에서의 균질화는 고압 균질화, 고전단 균질화, 습식 밀링, 초음파 균질화, 또는 이러한 처리의 조합에 의해 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 균질화는 여러 단계의 균질화로 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 5 μm 미만의 평균 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 2 μm 미만의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다.
- [0100] 또다른 구현예에 있어서, 조성물이 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다:
- [0101] (1) 클로파지민을 미세화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 수득하는 단계,
- [0102] (2) 클로파지민을 비이온성 계면활성제 및 물에 첨가하는 단계,
- [0103] (3) 상기 (2) 로부터 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계, 및
- [0104] (4) 염화 나트륨 농도를 적절한 농도로 조정하는 단계.
- [0105] 또다른 구현예에 있어서, pH 는 7.4 로 조정되며, 염화 나트륨 농도는 154 mM 염화 나트륨으로 조정된다.
- [0106] 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 미세화는 제트 밀링, 분무 건조, 볼 밀링, 또는 초임계 유체 처리에 의해 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 미세화는 여러 단계의 미세화로 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 5 μm 미만의 평균 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 2 μm 미만의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다.
- [0107] 또다른 구현예에 있어서, 조성물이 적절한 농도의 염화 나트륨을 함유하며, pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정된, 클로파지민, 비이온성 계면활성제 및 물의 현탁액을 균질화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 수득하

는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 본원에 기재된 조성물 구현에 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, pH 는 7.4 로 조정되며, 염화 나트륨 농도는 154 mM 염화 나트륨으로 조정된다. 또다른 구현예에 있어서, 균질화는 고압 균질화, 고전단 균질화, 습식 밀링, 초음파 균질화, 또는 이러한 처리의 조합에 의해 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 균질화는 여러 단계의 균질화로 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 5 μm 미만의 평균 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 2 μm 미만의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다.

- [0108] 또다른 구현예에 있어서, 하기의 단계를 포함하는, 본원에 기재된 조성물 구현에 중 어느 하나에 따른 약학 조성물의 제조 방법이 제공된다:
- [0109] (1) 클로파지민, 비이온성 계면활성제 및 물의 현탁액을 균질화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 포함하는 현탁액을 수득하는 단계,
- [0110] (2) 상기 (1)로부터 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계, 및
- [0111] (3) 염화 나트륨 농도를 적절한 농도로 조정하는 단계, 및
- [0112] (4) 삼투압을 적절한 수준으로 조정하는 단계.
- [0113] 또다른 구현예에 있어서, pH 는 7.4 로 조정되며, 염화 나트륨 농도는 154 mM 염화 나트륨으로 조정된다. 또다른 구현예에 있어서, 균질화는 고압 균질화, 습식 밀링, 초음파 균질화, 또는 이러한 처리의 조합에 의해 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 균질화는 여러 단계의 균질화로 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 5 μm 미만의 평균 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 2 μm 의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다.
- [0114] 또다른 구현예에 있어서, 하기의 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 약학 조성물 구현에 중 어느 하나에 따른 약학 조성물의 제조 방법이 제공된다:
- [0115] (1) 클로파지민 및 비-수성 액체의 현탁액을 균질화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 포함하는 현탁액을 수득하는 단계,
- [0116] (2) 클로파지민을 분리시키는 단계,
- [0117] (3) 클로파지민을 비이온성 계면활성제 및 물에 첨가하는 단계,
- [0118] (4) 상기 (3) 으로부터 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계, 및
- [0119] (5) 염화 나트륨 농도를 적절한 농도로 조정하는 단계.
- [0120] 또다른 구현예에 있어서, pH 는 7.4 로 조정되며, 염화 나트륨 농도는 154 mM 염화 나트륨으로 조정된다. 또다른 구현예에 있어서, 균질화는 고압 균질화, 습식 밀링, 초음파 균질화, 또는 이러한 처리의 조합에 의해 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 균질화는 여러 단계의 균질화로 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 5 μm 미만의 평균 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 2 μm 의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다.
- [0121] 또다른 구현예에 있어서, 하기의 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 약학 조성물 구현에 중 어느 하나에 따른 약학 조성물의 제조 방법이 제공된다:
- [0122] (1) 클로파지민을 미세화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 수득하는 단계,
- [0123] (2) 클로파지민을 비이온성 계면활성제 및 물에 첨가하는 단계,
- [0124] (3) 상기 (2)로부터 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계, 및
- [0125] (4) 염화 나트륨 농도를 적절한 농도로 조정하는 단계.
- [0126] 또다른 구현예에 있어서, pH 는 7.4 로 조정되며, 염화 나트륨 농도는 154 mM 염화 나트륨으로 조정된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 미세화는 제트 밀링, 분무 건조, 볼 밀링, 또는 초임계 유체 처리에 의해 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 미세화는 여러 단계의 미세화로 수행된다. 또다른

구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 5 μm 미만의 평균 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 2 μm 의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다.

[0127] 또다른 구현예에 있어서, 조성물이 적절한 농도의 염화 나트륨을 함유하며, pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정된, 클로파지민, 비이온성 계면활성제 및 물의 현탁액을 균질화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 수득하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는, 본원에 기재된 약학 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물의 제조 방법이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, pH 는 7.4 이며, 적절한 농도의 염화 나트륨은 154 mM 염화 나트륨이다. 또다른 구현예에 있어서, 균질화는 고압 균질화, 습식 밀링, 초음파 균질화, 또는 이러한 처리의 조합에 의해 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 클로파지민의 균질화는 여러 단계의 균질화로 수행된다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 5 μm 미만의 평균 크기 및 6 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다. 또다른 구현예에 있어서, 적절한 입자 크기의 클로파지민은 2 μm 의 평균 크기 및 3 μm 미만의 D90 을 갖는 입자이다.

[0128] 또다른 구현예에 있어서, 하기의 단계: (a) 클로파지민, 비이온성 계면활성제 및 물의 현탁액을 균질화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 포함하는 현탁액을 수득하는 단계; (b) 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계; (c) 염화 나트륨 농도를 적절한 농도로 조정하는 단계; 및 (d) 삼투압을 적절한 수준으로 조정하는 단계를 포함하며; 상기 단계 (b), (c) 및 (d) 는 (b), (c), (d); (b), (d), (c); (c), (b), (d); (c), (d), (b); (d), (b), (c); 또는 (d), (c), (b) 의 순서로 발생할 수 있는, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0129] 또다른 구현예에 있어서, 하기의 단계: (a) 클로파지민 및 비-수성 액체의 현탁액을 균질화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 포함하는 현탁액을 수득하는 단계; (b) 클로파지민을 분리시키는 단계; (c) 클로파지민을 비이온성 계면활성제 및 물에 첨가하는 단계; (d) 생성된 현탁액의 pH 를 pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정하는 단계; 및 (e) 염화 나트륨 농도를 적절한 농도로 조정하는 단계를 포함하며; 상기 단계 (d) 및 (e) 는 (d), (e); 또는 (e), (d) 의 순서로 발생할 수 있는, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0130] 또다른 구현예에 있어서, 하기의 단계: (a) 클로파지민을 미세화시켜, 적절한 입자 크기의 클로파지민을 수득하는 단계; 및 (b) 클로파지민을 적절한 농도의 염화 나트륨을 함유하며, pH 5.5 내지 pH 7.5 의 pH 로 조정된, 비이온성 계면활성제 및 물에 첨가하는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0131] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 초음파 네블라이저, 전자 스프레이 네블라이저, 진동 막 네블라이저, 제트 네블라이저 및 기계식 소프트 미스트 흡입기에서 선택되는 네블라이징 장치에 의한, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 조성물의 에어로졸화에 의해 제조되며, 네블라이징 장치에 의해 제조되는 상기 에어로졸 입자는 1 내지 5 μm 의 질량 중앙 공기 역학적 직경을 갖는, 흡입용 에어로졸의 형태의 약학 조합물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 흡입용 에어로졸은 하부 폐 침착을 위한 것이다. 또다른 구현예에 있어서, 네블라이징 장치는 0.1 내지 1.0 ml/min 의 산출 속도를 나타낸다. 또다른 구현예에 있어서, 전체 흡입 부피는 1 ml 내지 5 ml 이다.

[0132] 또다른 구현예에 있어서, 네블라이즈화된 4-7 % 고장성 식염수, 메타페리오데이트, 나트륨 도데실 황페이트, 중탄산 나트륨, 트로메타민, 은 나노입자, 비스무스 티올, 에틸렌 디아민 테트라아세트산, 겐타마이신 로딩된 포스파티딜콜린-장식된 금 나노입자, 킬레이터, 시스-2-데센산, D-아미노산, D-거울상 이성질체 펩티드, 갈륨 메소포르핀 IX, 갈륨 프로토포르핀 IX, 쿠르쿠민, 파툴린, 페니실산, 바이칼레인, 나린게닌, 우르솔산, 아시아트산, 코로솔산, 지방산, 숙주 방어 펩티드, 및 항균 펩티드에서 선택되는, 생물막의 분산제 및/또는 파괴제, 점액 용해제 및/또는 점액 활성화제, 및/또는 생물막 형성의 감소제와 조합하여 사용하기 위한, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 조성물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 세콕시틴, 아미카신, 클라리스로마이신, 피라진아미드, 리팜핀, 목시플록사신, 레보플록사신 및 파라-아미노 살리실레이트, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에 투여된다.

[0133] 또다른 구현예에 있어서, 네블라이즈화된 4-7 % 고장성 식염수, 메타페리오데이트, 나트륨 도데실 황페이트, 중탄산 나트륨, 트로메타민, 은 나노입자, 비스무스 티올, 에틸렌 디아민 테트라아세트산, 겐타마이신 로딩된 포스파티딜콜린-장식된 금 나노입자, 킬레이터, 시스-2-데센산, D-아미노산, D-거울상 이성질체 펩티드, 갈륨 메

소포르피린 IX, 갈륨 프로토포르피린 IX, 쿠르쿠민, 파툴린, 페니실산, 바이칼레인, 나린게닌, 우르솔산, 아시아트산, 코로솔산, 지방산, 숙주 방어 펩티드, 및 항균 펩티드에서 선택되는, 생물막의 분산제 및/또는 파괴제, 점액 용해제 및/또는 점액 활성화제, 및/또는 생물막 형성의 감소제와 조합하여 사용하기 위한, 본원에 기재된 조합물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조합물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 조합물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 세콕시틴, 아미카신, 클라리스로마이신, 피라진아미드, 리팜핀, 목시플록사신, 레보플록사신 및 파라-아미노 살리실레이트, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에, 본 발명의 조성물을 투여하기 위해서 사용된다. 또다른 구현예에 있어서, 조성물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 및 아미카신, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에 투여된다. 또다른 구현예에 있어서, 조성물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에 투여된다.

[0134] 또다른 구현예에 있어서, 마이코박테리아 또는 다른 그람 양성 박테리아에 의해 발생하는 폐 감염증의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조합물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 비결핵성 마이코박테리아 및 마이코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 복합체, 및 이들의 조합물에서 선택되는 마이코박테리움 속의 종에 의해 발생한다. 또다른 구현예에 있어서, 비결핵성 마이코박테리아는 마이코박테리움 아비움 (*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레 (*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테리움 압세수스 (*Mycobacterium abscessus*) 및 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*), 및 이들의 조합물에서 선택된다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 낭포성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 또는 후천성 면역 결핍 증후군을 앓고 있는 환자에서의, MAC 폐 질환 및 비결핵성 감염증에서 선택되는 기회적 감염증이다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 낭포성 섬유증을 앓고 있는 환자에서의 기회적 비결핵성 마이코박테리아 감염증이다. 또다른 구현예에 있어서, 조성물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 세콕시틴, 아미카신, 클라리스로마이신, 피라진아미드, 리팜핀, 목시플록사신, 레보플록사신 및 파라-아미노 살리실레이트, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에 투여된다. 또다른 구현예에 있어서, 조성물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 및 아미카신, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에 투여된다. 또다른 구현예에 있어서, 조성물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에 투여된다.

[0135] 또다른 구현예에 있어서, 마이코박테리아 또는 다른 그람 양성 박테리아에 의해 발생하는 폐 감염증의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 조합물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조합물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 비결핵성 마이코박테리아 및 마이코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 복합체, 및 이들의 조합물에서 선택되는 마이코박테리움 속의 종에 의해 발생한다. 또다른 구현예에 있어서, 비결핵성 마이코박테리아는 마이코박테리움 아비움 (*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레 (*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테리움 압세수스 (*Mycobacterium abscessus*) 및 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*), 및 이들의 조합물에서 선택된다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 낭포성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 또는 후천성 면역 결핍 증후군을 앓고 있는 환자에서의, MAC 폐 질환 및 비결핵성 감염증에서 선택되는 기회적 감염증이다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 낭포성 섬유증을 앓고 있는 환자에서의 기회적 비결핵성 마이코박테리아 감염증이다. 또다른 구현예에 있어서, 조합물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 세콕시틴, 아미카신, 클라리스로마이신, 피라진아미드, 리팜핀, 목시플록사신, 레보플록사신 및 파라-아미노 살리실레이트, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에, 본 발명의 조성물을 투여하기 위해서 사용된다. 또다른 구현예에 있어서, 조합물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 및 아미카신, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에, 본 발명의 조성물을 투여하기 위해서 사용된다. 또다른 구현예에 있어서, 조합물은 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에, 본 발명의 조성물을 투여하기 위해서 사용된다.

[0136] 또다른 구현예에 있어서, 마이코박테리아 또는 다른 그람 양성 박테리아에 의해 발생하는 폐 감염증을 치료하거나 이에 대한 예방을 제공할 때 항생제 활성을 제공하는데 사용하기 위한, 다음을 포함하는 시스템이 제공된다:

[0137] 1) 다음을 포함하는 네블라이즈화된 약학 조합물:

[0138] (a) 치료적 유효 투여량의 클로파지민;

[0139] (b) 10 초과의 친수성-친유성 균형 값을 갖는 비이온성 계면활성제; 및

- [0140] (c) 물, 등장성 식염수, 완충 식염수 및 수성 전해질 용액에서 선택되는 수성 액체 담체,
- [0141] 및
- [0142] 2) 네블라이저,
- [0143] 상기 클로파지민은 현탁액의 형태로 제공되며,
- [0144] 상기 시스템에 의해 제조되는 에어로졸 입자는 1 내지 5 μm 의 질량 중앙 공기 역학적 직경을 가짐.
- [0145] 또다른 구현예에 있어서, 폐 진균 감염증 또는 클로스트리듐 디피실레, 또는 이들의 조합의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 폐 진균 감염증의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 폐 진균 감염증은 칸디다 알비칸스 (*candida albicans*) 또는 아스페르길루스 푸미가투스 (*aspergillus fumigatus*), 또는 이들의 조합이다.
- [0146] 또다른 구현예에 있어서, 폐 진균 감염증 또는 클로스트리듐 디피실레, 또는 이들의 조합의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한, 본원에 기재된 조합물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조합물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 폐 진균 감염증의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한, 본원에 기재된 조합물 구현예 중 어느 하나에 따른 약학 조합물이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 폐 진균 감염증은 칸디다 알비칸스 (*candida albicans*) 또는 아스페르길루스 푸미가투스 (*aspergillus fumigatus*), 또는 이들의 조합이다.
- [0147] 또다른 구현예에 있어서, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 조성물을 흡입에 의해 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서의 폐 감염증의 치료 또는 예방 방법이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 비결핵성 마이코박테리아 및 마이코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) 복합체, 및 이들의 조합물에서 선택되는 마이코박테리움 속의 종에 의해 발생한다. 또다른 구현예에 있어서, 비결핵성 마이코박테리움은 마이코박테리움 아비움 (*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레 (*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테리움 압세수스 (*Mycobacterium abscessus*) 및 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*), 및 이들의 조합물에서 선택된다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 낭포성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 질환 또는 후천성 면역 결핍 증후군을 앓고 있는 환자에서의, MAC 폐 질환 및 비결핵성 감염증에서 선택되는 기회적 감염증이다. 또다른 구현예에 있어서, 감염증은 낭포성 섬유증을 앓고 있는 환자에서의 기회적 비결핵성 마이코박테리아 감염증이다.
- [0148] 또다른 구현예에 있어서, 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 세콕시틴, 아미카신, 클라리스로마이신, 피라진아미드, 리팜핀, 목시플록사신, 레보플록사신 및 파라-아미노 살리실레이트, 및 이들의 혼합물에서 선택되는 작용제의 투여 이전에, 동시에 또는 이후에, 본원에 기재된 조성물 구현예 중 어느 하나에 따른 조성물을 흡입에 의해 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서의 마이코박테리아 또는 다른 그람 양성 박테리아에 의해 발생하는 폐 감염증의 치료 또는 예방 방법이 제공된다. 또다른 구현예에 있어서, 작용제는 베다퀼린 또는 아미카신이다. 또다른 구현예에 있어서, 작용제는 베다퀼린이다.
- [0149] 입자 크기 및 분포
- [0150] 에어로졸화된 요법의 치료 효과는 침착되는 투여량 및 이의 분포에 의존한다. 에어로졸 입자 크기는 침착되는 투여량 및 폐에서의 약물 에어로졸의 분포를 정의하는데 있어서 중요한 변수 중 하나이다.
- [0151] 일반적으로, 흡입된 에어로졸 입자는 다음의 2 가지 메커니즘 중 하나에 의해 침착된다: 통상적으로 보다 큰 에어로졸 입자에 대해 우세한 충격, 및 보다 작은 에어로졸 입자에 대해 일반적인 침강. 충격은, 흡입된 에어로졸 입자의 운동량이 충분히 커서 입자가 공기 흐름을 따르지 않고 생리학적 표면과 만날 때, 발생한다. 반대로, 침강은, 흡입된 공기 스트림과 함께 이동한 매우 작은 에어로졸 입자가 중력 침강의 결과로서 생리학적 표면과 만날 때, 하부 폐에서 주로 발생한다.
- [0152] 폐 약물 전달은 입 및 목을 통한 에어로졸의 흡입에 의해 달성될 수 있다. 약 5 μm 초과와 공기 역학적 직경을 갖는 에어로졸 입자는 일반적으로 폐에 도달하지 않는다; 대신, 이들은 목의 뒷쪽에 영향을 미치는 경향이 있으며, 삼켜지고, 가능하게는 경구적으로 흡수된다. 약 3 내지 약 5 μm 의 직경을 갖는 에어로졸 입자는 상부에서 중간 폐 영역 (전도 기도) 에 도달할 만큼 충분히 작지만, 폐포에 도달하기에는 너무 크다. 보다 작은 에어로졸 입자, 즉, 약 0.5 내지 약 3 μm 는 폐포 영역에 도달할 수 있다. 약 0.5 μm 미만의 직경을 갖는 에어로졸 입자는 평상시 호흡 동안에 내쉬는 경향이 있지만, 또한 호흡 유지에 의해 폐포 영역에 침착될

수 있다.

- [0153] 폐 약물 전달에 사용되는 에어로졸은 광범위한 에어로졸 입자 크기로 이루어지며, 따라서 통계적 설명이 사용된다. 폐 약물 전달에 사용되는 에어로졸은 전형적으로 이들의 질량 중앙 직경 (MMD) 에 의해 설명되며, 즉, 질량의 절반은 MMD 보다 큰 에어로졸 입자에 함유되고, 질량의 절반은 MMD 보다 작은 에어로졸 입자에 함유된다. 균일한 밀도를 갖는 입자의 경우, 부피 중앙 직경 (VMD) 은 MMD 와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. VMD 및 MMD 의 결정은 레이저 회절에 의해 이루어진다. 분포의 폭은 기하 표준 편차 (GSD) 에 의해 설명된다. 그러나, 호흡기에서의 에어로졸 입자의 침착은 입자의 공기 역학적 직경에 의해 보다 정확하게 설명되며, 따라서 전형적으로 질량 중앙 공기 역학적 직경이 사용된다. MMAD 결정은 관성 충격 또는 비행 시간 측정에 의해 이루어진다. 수성 입자의 경우, VMD, MMD 및 MMAD 는 동일해야 한다. 그러나, 에어로졸이 임팩터를 통과할 때 습도가 제어되지 않는 경우, MMAD 결정값은 탈수로 인해 MMD 및 VMD 보다 작을 것이다. 이 설명의 목적을 위해, VMD, MMD 및 MMAD 측정값은, VMD, MMD 및 MMAD 의 설명이 비교 가능하게 되도록 제어된 조건하에 있는 것으로 간주된다.
- [0154] 그럼에도 불구하고, 설명의 목적을 위해, 에어로졸 입자의 에어로졸 입자 크기는 문헌 [US Pharmacopeial Convention. In Process Revision <601> Aerosols, Nasal Sprays, Metered-Dose Inhalers, and Dry Powder Inhalers, Pharmacopeial Forum (2003), Volume Number 29, pages 1176-1210 also disclosed in Jolyon Mitchell, Mark Nagel "Particle Size Analysis of Aerosols from Medicinal Inhalers", KONA Powder and Particle Journal (2004), Volume 22, pages 32-65] 에 따라서 NGI (Next Generation Impactor) 로 실온에서 측정함으로써 결정되는 바와 같은 MMAD 로서 주어질 것이다.
- [0155] 본 발명에 따르면, 에어로졸의 입자 크기는 감염 부위에서 클로파지민의 침착을 최대화하고, 내성을 최대화하도록 최적화된다. 에어로졸 입자 크기는 질량 중앙 공기 역학적 직경 (MMAD) 으로 표현될 수 있다. 큰 입자 (예를 들어, MMAD > 5 μm) 는 기도에서의 굴곡부를 탐색하기에는 너무 크기 때문에, 흉부 외 및 상부 기도에서 침착하는 경향이 있다. 내약성 (예를 들어, 기침 및 기관지 경련) 은 큰 입자의 상부 기도 침착으로부터 발생할 수 있다.
- [0156] 따라서, 바람직한 구현예에 따르면, 에어로졸의 MMAD 는 약 5 μm 미만, 바람직하게는 약 1 내지 5 μm , 보다 바람직하게는 3 μm 미만 (< 3 μm) 이어야 한다.
- [0157] 그러나, 유도 호흡 운동을 사용하면, 보다 큰 입자가 흉부 외 및 상부 기도를 통과하고, 평상시 호흡 동안과 비교해서 폐에 보다 깊숙이 통과할 수 있기 때문에, 에어로졸의 중앙 및 하부 폐 침착이 증가할 것이다. 유도 호흡 운동은 100 ml/min 로 느릴 수 있다. 따라서, 유도 호흡 운동과 함께 사용할 때, 바람직한 에어로졸의 MMAD 는 약 10 μm 미만이어야 한다.
- [0158] (에어로졸 입자 크기 외에도) 또다른 동등하게 중요한 요소는 고체 입자의 입자 크기 및 크기 분포, 이 경우, 클로파지민 입자 크기 및 분포이다. 주어진 에어로졸 입자에서의 고체 입자의 크기는, 이것이 함유되는 에어로졸 입자보다 작아야 한다. 보다 큰 에어로졸 입자는 하나 이상의 고체 입자를 함유할 수 있다. 또한, 묽은 현탁액을 취급하는 경우, 에어로졸 입자의 대부분은 고체 입자를 함유하지 않을 수 있다.
- [0159] 이 때문에, 에어로졸 입자의 MMAD 보다 유의하게 작은 고체 약물 입자를 갖는 것이 바람직하다. 예를 들어, 에어로졸 입자의 MMAD 가 3 μm 인 경우, 원하는 고체 입자는 1 μm 이하가 될 것이다.
- [0160] 또다른 고려 사항, 예를 들어 진동 메시 네블라이저를 사용할 때, 제제는 플레이트에서의 구멍을 통해 펌핑되며, 이는 현탁액을 액적으로 분해시킨다. 따라서, 통과를 위해서 고체 입자는 또한 이들 구멍보다 작아야 한다.
- [0161] 현탁액 중에서의 고체 입자 크기는 입자의 평균 크기에 의해, 및 또한 입자의 분포에 의해 제공될 수 있다. D90 값은 현탁액 내의 입자의 90 % 가 평균 크기 이하인 것을 나타낸다.
- [0162] 네블라이저
- [0163] 수성 및 다른 비-가압된 액체 시스템의 경우, 다양한 네블라이저 (소용량 네블라이저 포함) 는 제제를 에어로졸화시키는데 이용 가능하다. 압축기 구동 네블라이저는 제트 기술을 통합하고, 압축 공기를 사용하여 액체 에어로졸을 생성한다. 이러한 장치는, 예를 들어, Healthdyne Technologies, Inc.; Invacare, Inc.; Mountain Medical Equipment, Inc.; Pari Respiratory, Inc.; Mada Medical, Inc.; Puritan-Bennet; Schuco, Inc.; DeVilbiss Health Care, Inc.; 및 Hospitak, Inc. 로부터 상업적으로 입수 가능하다. 초음파 네블라

이저는 압전 결정의 진동 형태의 기계적 에너지에 의존하여 호흡 가능한 액체 액적을 생성하며, 예를 들어, Omron Heathcare, Inc. 및 DeVilbiss Health Care, Inc.로부터 상업적으로 입수 가능하다. 진동 메시 네블라이저는 압전 또는 기계적 펄스에 의존하여 호흡 가능한 액체 액적을 생성한다. 본원에 기재된 클로파지민과 함께 사용하기 위한 네블라이저의 다른 예는 미국 특허 제 4,268,460 호; 제 4,253,468 호; 제 4,046,146 호; 제 3,826,255 호; 제 4,649,911 호; 제 4,510,929 호; 제 4,624,251 호; 제 5,164,740 호; 제 5,586,550 호; 제 5,758,637 호; 제 6,644,304 호; 제 6,338,443 호; 제 5,906,202 호; 제 5,934,272 호; 제 5,960,792 호; 제 5,971,951 호; 제 6,070,575 호; 제 6,192,876 호; 제 6,230,706 호; 제 6,349,719 호; 제 6,367,470 호; 제 6,543,442 호; 제 6,584,971 호; 제 6,601,581 호; 제 4,263,907 호; 제 5,709,202 호; 제 5,823,179 호; 제 6,192,876 호; 제 6,644,304 호; 제 5,549,102 호; 제 6,083,922 호; 제 6,161,536 호; 제 6,264,922 호; 제 6,557,549 호; 및 제 6,612,303 호에 기재되어 있으며, 이들은 모두 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

본원에 기재된 클로파지민 조성물과 함께 사용될 수 있는 네블라이저의 상업적 예는 Aerogen 제의 Respigard II[®], Aeroneb[®], Aeroneb[®] Pro 및 Aeroneb[®] Go; Aradigm 제의 AERx[®] 및 AERx Essence[™]; Respironics, Inc. 제의 Porta-Neb[®], Freeway Freedom[™], Sidestream, Ventstream 및 I-neb; 및 PARI, GmbH 제의 PARI LCPlus[®], PARI LC-Star[®] 및 e-Flow7m 을 포함한다. 또다른 비-제한적인 예는 US 6,196,219 에 개시되어 있다.

- [0164] 본 발명에 따르면, 약학 조성물은 바람직하게는 초음파 네블라이저, 전자 스프레이 네블라이저, 진동 막 네블라이저, 제트 네블라이저 또는 기계식 소프트 미스트 흡입기에서 선택되는 네블라이징 장치를 사용하여 에어로졸화될 수 있다.
- [0165] 장치는 전기적 또는 기계적 공정에 의해 환자의 흡입 유속을 제어하는 것이 바람직하다.
- [0166] 또다른 바람직한 구현예에 있어서, 장치에 의한 에어로졸 생성은, 예컨대 AKITA 장치를 사용하여 환자의 흡입에 의해 촉발된다.
- [0167] 본 발명에 따라서 사용될 상기 네블라이저/장치의 바람직한 (상업적으로 입수 가능한) 예는 Vectura fox, Pari eFlow, Pari Trek S, Philips Innospire mini, Philips InnoSpire Go, Medspray device, Aeroneb Go, Aerogen Ultra, Respironics Aeroneb, Akita, Medspray Ecomyst 및 Respimat 이다.
- [0168] 치료 및/또는 예방에서의 용도
- [0169] 본 발명에 따른 약학 조성물 및 약학 조합물 (에어로졸, 에어로졸화된 제제) 및 시스템은 마이코박테리아 또는 다른 클로파지민 민감성 박테리아, 예컨대 스태필로코쿠스 아우레우스 (Staphylococcus aureus) (메티실린 내성 및 반코마이신 중간체 내성 균주 포함), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 (Streptococcus pneumoniae) 및 엔테로코쿠스 에스피피. (Enterococcus spp.) 에 의해 발생하는 폐 감염증의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 것이다. 본 발명의 약학 조성물 및 약학 조합물은 또한 폐 진균 감염증의 치료 및/또는 예방에서 사용될 수 있다.
- [0170] 클로파지민의 투여량
- [0171] 본 발명에 따르면, 약학 조성물은 약 1-5 ml, 바람직하게는 1-2 ml 의 본 발명의 약학 조성물로 네블라이즈화에 의해 전달된다.
- [0172] 따라서, 목표 충전 투여량은 약 20 mg/ml 의 약학 조성물에서의 클로파지민 농도에 대해서, 20-100 mg 클로파지민에 상응하는 약 1-5 ml 이다.
- [0173] 본 발명에 따라서 투여될 클로파지민의 1 일 폐 투여량 (즉, 폐 내에 침착되는 투여량) 은 약 5-10 mg 이며, 이는 엠. 압세수스 (M. abscessus) 감염증의 경우에서의 15-30 mg (장치 투여량) 의 명목 투여량에 상응한다.
- [0174] 당업자는, 당업계에서 충분히 확립된 각각의 박테리아 균주에 대한 클로파지민의 최소 억제 농도 (MIC) 에 대해서, 투여될 클로파지민의 폐 투여량 (및 따라서 네블라이즈화될 충전/명목 투여량/부피) 을 일상적으로 조정할 것으로 이해된다.
- [0175] 투여 빈도에 따라, 1 일 1 회 또는 2 회, 1 일 폐 투여량이 그에 따라 분할될 것이다.
- [0176] 본 발명에 따르면, 클로파지민은 약 5 내지 10 mg 의 결과적인 총 1 일 폐 투여량으로 1 일 1 회 또는 2 회 투여된다.

- [0177] 상기 양이 클로파지민 유리 염기에 관한 것임은 당업자에게 명백할 것이며, 그에 따라 유도체 및 염에 대한 투여량은 각각의 화합물 및 균주의 MIC 에 대해서 조정되어야 할 것이다.
- [0178] 점액 용해제/생물막 개질제
- [0179] 에어로졸 처리 동안에 가래 점도를 감소시키고, 또한 존재하는 생물막을 파괴하기 위해서, 본 발명에 따른 치료 및/또는 예방은 점액 용해제 및/또는 생물막 파괴제의 추가의 투여를 포함할 수 있다.
- [0180] 이들 작용제는 고정된 조합물로 제조될 수 있거나, 또는 본 발명에 따른 클로파지민을 포함하는 약학 조성물/에어로졸 조합물과 동시에 또는 이후에 투여될 수 있다.
- [0181] 본 발명에 따라서 사용될 생물막의 분산제/파괴제, 점액 용해제 및/또는 점액 활성화제 및/또는 생물막 형성의 감소제는 네블라이즈화된 4-7 % 고장성 식염수, 메타페리오테이트, 나트륨 도데실 황화물, 중탄산 나트륨, 트로메타민, 은 나노입자, 비스무스 티올, 에틸렌 디아민 테트라아세트산, 겐타마이신 로딩된 포스포타타르산-장식된 금 나노입자, 킬레이터, 시스-2-데센산, D-아미노산, D-거울상 이성질체 펩티드, 갈륨 메소포르피린 IX, 갈륨 프로토포르피린 IX, 쿠르쿠민, 파툴린, 페니실산, 바이칼레인, 나린게닌, 우르솔산, 아시아트산, 코로솔산, 지방산, 숙주 방어 펩티드, 및 항균 펩티드에서 선택된다.
- [0182] 더욱이, 다른 약학적 활성화제는 또한 본 발명에 따른 약학 조성물/에어로졸 조합물과 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 활성화제는 베다퀼린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 유도체, 세폭시틴, 아미카신, 클라리스로마이신, 피라진아미드, 리팜핀, 목시플록사신, 레보플록사신 및 파라-아미노 살리실레이트, 및 이들의 혼합물에서 선택될 수 있다.
- [0183] 이들 작용제는 고정된 조합물로 제조될 수 있거나, 또는 본 발명에 따른 클로파지민을 포함하는 약학 조성물/에어로졸 조합물 이전에, 동시에 또는 이후에 투여될 수 있다.
- [0184] 실시예
- [0185] 하기의 실시예는 상기에서 기술한 발명을 사용하는 방식을 보다 완전하게 설명할 뿐만 아니라, 본 발명의 다양한 양태를 수행하기 위해 고려되는 최상의 모드를 제시하는 역할을 한다. 본 발명에 따른 실시예는 본원의 청구항의 범위 내에 속하는 것이다.
- [0186] 실현
- [0187] 하기의 예시적인 조성물 및 조합물은 본원에 기재된 방법에 따라서 제조하였다.
- [0188] 실시예 1
- [0189] 200 mg 의 클로파지민 (삼상정제 형태 I), 90 mg 의 염화 나트륨, 및 9.5 ml 의 물을 Ultra-Turrax 균질화기에 서 10,000 rpm 으로 5 분 동안 2 회 혼합하였다. 0.5 ml 의 폴리소르베이트 80 (NOF Hx2) 을 첨가하였다. 이 혼합물을 초음파 프로브 (Bandelin Sonoplus Probe MS73 을 갖는 Branson Digital Sonifier™ 250D) 로 7 회, 각각 3 분 씩, 70 % 의 진폭으로 처리하였다. 부피를 물을 사용하여 10 ml 로 조정하였다. 이 현탁액을 VWR 접힌 정성적 여과지 (303, 입자 보유 5-13 μm , 크기: 150 mm) 를 통해 여과하여, 실시예 1 의 조성물을 수득하였다. 실시예 1 의 조성물은 3.9 μm 의 클로파지민의 중앙 입자 크기, 6.7 μm 의 D90 을 가졌다. 클로파지민의 농도는, 이동 상 중에 희석시킨 1 mg/ml 의 클로파지민의 저장 용액으로 보정하는, 280 nm 에서 자외선/가시광선 분광법에 의해 결정하였으며, 7.16 mg/ml 인 것으로 결정되었다.
- [0190] 실시예 1 의 조성물을 표 1 에 나타낸다.
- | | |
|-----------------------------|----------------|
| 클로파지민 형태 FI | 71.6 mg |
| 폴리소르베이트 80 (NOF Hx2) | 0.5 ml |
| 염화 나트륨 | 90.0 mg |
| 물 (V/V) | 9.5 ml |
- [0191]
- [0192] 표 1
- [0193] 사방정제 형태 III 의 클로파지민의 제조
- [0194] 톨루엔 (20 ml) 중의 클로파지민 (10 g) 의 슬러리를 800 rpm 에서 자석 교반기를 사용하여, 오일 중탕에서 72 시간 동안 40 °C 에서 교반하였다. 슬러리의 고체 부분을 크러시블을 통한 여과에 의해 수집하고, 오븐에서

진공하에 40 ℃ 의 최대 온도에서 건조시켰다. 이것은 8.64 g 의 클로파지민을 실질적으로 순수한 ($\geq 98\%$) 사망정계 형태 III 으로서 산출하였다.

[0195] 실시예 2

[0196] 0.5 % 폴리소르베이트 80 (NOF Hx2) 및 0.6 % 염화 나트륨을 함유하는 100 ml 의 물 중의 사망정계 형태 III 의 클로파지민 6 g 을 함유하는 현탁액을 Ultra-Turrax[®] 을 사용하여 10,000 rpm 으로 대략 40 초 동안 사전 미세화시켰다. 예비 제제는 0.6 % 염화 나트륨을 물에 첨가하여 300 ml 의 부피를 생성함으로써 제조하였다. 300 ml 의 이러한 현탁액을 균질화기, M-110EH-30 Microfluidizer (Microfluidics, Westwood, MA, USA) 의 주입구에 첨가하고, H30Z 챔버를 통해 현탁액을 5,000 psi 로 순환시켜 사전-균질화 단계를 15 분 동안 수행하였다. 이어서, 제 2 H10Z 챔버를 제 1 챔버와 직렬로 설치하고, 현탁액을 25,000 psi 로 23 분 동안 추가로 균질화시켰다. 입자 크기 분석은 HORIBA LA 950 으로 수행하였으며, 0.83 μm 의 중앙 입자 크기 및 1.17 μm 의 D90 값을 나타냈다. 16.05 mg/ml 의 클로파지민의 농도는, 이동 상 중에 희석시킨 1 mg/ml 의 클로파지민의 저장 용액으로 보정하는, 280 nm 에서 자외선/가시광선 분광법에 의해 결정하였다.

[0197] 실시예 2 의 조성물을 표 2 에 나타낸다.

실시예 2 의 조성물	
클로파지민 형태 III	4.81g (16.05 mg/ml)
폴리소르베이트 80 (NOF Hx2)	1.5ml (0.5% v/v)
염화 나트륨	1.8g (0.6% w/v)
물	298.5 ml

[0198] 표 2

[0200] 실시예 3

[0201] 물, 염화 나트륨 및 폴리소르베이트 80 의 용액 중의 클로파지민 (결정 변형 사망정계 형태 III) 의 현탁액을, H30Z-G10Z 구성을 갖는, 28,250 psi 의 압력에서 30 분 동안 작동하는 M-110EH-30 Microfluidizer[®] Processor (챔버: H30Z 및 G10Z) 를 사용하여 처리함으로써, 실시예 3 의 조성물을 제조하였으며, 생성된 클로파지민의 입자는 1.28 μm 의 중앙 입자 크기 및 2 μm 미만의 D90 을 가졌다.

[0202] 실시예 3 의 조성물을 표 3 에 나타낸다.

실시예 3 의 조성물 3	
클로파지민 (형태 FIII)	20 mg/ml
폴리소르베이트 80 (NOF Hx2)	0.5% (v/v)
염화 나트륨	0.9% (w/v)
물	99.5% (v/v)

[0203] 표 3

[0205] 점도 측정

[0206] 실시예 3 의 조성물의 점도는 응력 제어 모드의 STRESSTECH Rheometer 를 사용하여 시험하였다. 이중 갭 기하학을 사용하고, 스프인들을 지속적으로 회전시켜, 미립자가 온도 지점 동안에 현탁액 중에 잔류하는 지를 확인하였다. 점도는 각각 20 ℃, 25 ℃ 및 30 ℃ 에서 0.01, 0.05 및 0.1 Pa 응력에 걸쳐 측정하였다. 2 개의 개별 로딩을 수행하여, 하기 표 4 에 나타낸 평균 점도를 획득하였다.

점도 측정	
온도 (°C)	점도 Pa•s
20	1.146E-03
25	1.049E-03
30	9.831E-04

[0207]

- [0208] 표 4
- [0209] 동물 모델 및 효능 시험
- [0210] 본 발명의 조성물을, 전신 투여에 반대되는 직접적인 호흡기 전달 후에 폐 조직에서 클로파지민 농도 수준을 확립하기 위한 예비 데이터를 획득하기 위해서, 급성 생체내 폐 감염증 마우스 모델에서 임상 NTM 종의 성장을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 관심 박테리아 종에 따라, 2 개의 별개의 마우스 모델을 사용하여 폐 NTM 감염을 조사한다. 시험을 위해, 마이코박테리움 아비움 (*Mycobacterium avium*) 2285 및 마이코박테리움 압세수스 (*Mycobacterium abscessus*) 103 박테리아 균주를 사용하였다 (균주 세부 사항은 "Phylogenetic analysis of Mycobacterial species using whole genome sequences". Hazbon M.H., Riojas M.A., Damon A.M., Alalade R., Cantwell B.J., Monaco A., King S., Sohrabi A. Submitted (SEP-2014) to the EMBL/GenBank/DBJ databases 에서 확인할 수 있다). 이들 2 가지 종은 NTM 감염의 모델로서 이전에 문헌에서 사용되었다 (Obregon-Henao et al. 2015 Antimicrob Agents Chemother; and Chan et al. Animal Models of Non-Tuberculous Mycobacterial Infections, *Mycobact Dis* 2016).
- [0211] Balb/C 마우스에서의 생체내 안전성 연구:
- [0212] 생체내 안전성 및 내약성을 위해, Charles River로부터 6-8 주령 Balb/C 암컷 마우스를 수득한다. 마우스는 투여 전에 1 주일 동안 휴식을 취한다. 각각의 투여량의 클로파지민에 대해, 3 마리의 건강한 마우스에 격일로 총 3 회 투여량을 제공한다. 마우스에 실시 1 의 조성물에서의 10.0, 5.01 및 2.51 mg/kg 의 클로파지민을 제공하였다. 화합물은 Microsprayer[®] 에어로졸 기관내 투여에 의해, 격일로 총 3 회 투여량을 3 마리의 건강한 마우스에게 제공하였다.
- [0213] 클로파지민은 20 mg/kg (위관 영양, 200 μ l) 에서 안전한 것으로 확인되었다. 실시 1 의 조성물은 시험한 최고 투여량 (10.0 mg/kg; 35 μ l 기관내에서 0.2506 mg/투여) 에서 독성을 나타내지 않았다. 따라서, 제제 I 의 조성물은 10.0 mg/kg 에서 안전하며, 충분히 견디는 것으로 간주되었다.
- [0214] 최소 억제 농도의 결정
- [0215] 최소 억제 농도 (MIC) 시험은 CLSI 표준 M7-A7 (Becton Dickinson) 에서 권장하는 칼슘 및 마그네슘 이온 농도로 Mueller Hinton (MH) 브로스 (Cation Adjusted) 를 사용하여 마이크로브로스 희석 방법에 의해 수행하였다. MIC 시험은 또한 7H9 브로스 (Sigma-Aldrich) 를 사용하여 마이크로브로스 희석 방법에 의해 수행하였다. 화합물 스크리닝을 위해 MH 및 7H9 브로스 모두를 사용하는 이유는, 항-마이코박테리아 화합물이 MIC 분석 (assay) 에서 사용되는 브로스에 따라 상이한 MIC 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다는 점이다.
- [0216] 엠. 압세수스 (*M. abscessus*) 는 7H11 한천 플레이트 (Sigma-Aldrich) 상에서 3 일 동안 주위 공기 중에 35-37 °C 에서 성장하였으며 (박테리아 균주에 따라 다름), 엠. 아비움 (*M. avium*) 은 7H11 한천 플레이트 (Sigma-Aldrich) 상에서 21-30 일 동안 주위 공기 중에 37 °C 에서 성장하였다.
- [0217] 콜로니 형성 단위 (CFU) 를 한천 플레이트로부터 취득하고, 0.05 % tween-80 을 갖는 MH 또는 7H9 브로스에 넣고, 성장 3 일 후 (엠. 압세수스 (*M. abscessus*)) 또는 12 일 후 (엠. 아비움 (*M. avium*)) 에 취득한 광학 밀도 (OD) 흡광도가 (OD) 0.08 - 0.1 (0.5 McFarland Standard) 이 될 때까지, 주위 공기 중에 35-37 °C 에서 성장시킨다. 이어서, 박테리아 세포 현탁액을 (OD) 0.08 - 0.1 (0.5 McFarland Standard) 과 일치하는 식염수에서 제조하여 확인한다. 화합물을 1.28 mg/ml 의 농도로 DMSO 에 현탁시켜 화합물 저장 용액을 제조하고, 시험 범위 64-0.062 μ g/ml 에 대해 즉시 사용하였다. 그 후, 180 μ l 의 브로스 (MH 또는 7H9) 를 96 웰 플레이트에서의 제 1 컬럼에 첨가하고, 100 μ l 의 브로스를 96 웰 플레이트에서의 나머지 컬럼에 첨가하였다. 20 μ l 의 화합물 저장 용액을 상기 웰의 제 1 컬럼에 첨가하고, 연속적으로 희석시켰다. 마지막으로, 100 μ l NTM 세포 현탁액을 배지 전용 대조군 웰을 제외한 모든 웰에 첨가하였다. 각 유기체에 특이적인 QC 작용제 1) 박테리아 전용 음성 대조군 2) 배지 전용 음성 대조군 3) 클라리스로마이신 양성 약물 대조군.
- [0218] 엠. 압세수스 (*M. abscessus*) OD 를 3 일째에 분석하였으며, 엠. 아비움 (*M. avium*) OD 를 12 일째에 분석하였다. 이들 측정 후, 레자주린 마이크로타이터 분석 플레이트 (Resazurin Microtiter Assay Plate) 방법을 사용하여 플레이트를 분석하였다. 간단히 말해서, 상기 방법은 레자주린 (7-히드록시-3H-페녹사진-3-온 10-옥사이드) 을 96 웰 플레이트에 첨가하는 것을 사용한다. 레자주린은 청색 염료이며, 그 자체는 분홍색 및 매우 적색의 형광 레조루핀으로 비가역적으로 환원될 때까지 약한 형광이다. 이것은 MIC 분석에서 박테리아

세포 생존력을 결정하기 위한 산화-환원 지표로서 사용된다.

[0219] 분석은 삼중으로 수행하였다. 분석 #1 은 실시예 1 의 조성물을 4 ℃ 에서 2 개월 동안 저장한 후에 수행하였고, 분석 #2 는 4 개월 후에 수행하였으며, 분석 #3 은 5 개월 후에 수행하였다.

[0220] CF 가래의 존재 및 부재하에서의 최소 억제 농도

[0221] 최소 억제 농도 분석은 상기에서 기술한 바와 같이 수행하였다.

[0222] 클로파지민 (CFZ) 및 실시예 1 의 조성물의 항균 활성에 대한 낭포성 섬유증 (CF) 환자 가래의 효과를 조사하기 위해서, 이전 48 시간 동안 항생제를 투여하지 않은 환자로부터 가래를 수집하고, 이들의 가래를 UV 광에 노출하여 멸균시킴으로써 내인성 박테리아를 제거하였다. 멸균 후, 엠. 압세수스 (M. abscessus), 엠. 아비움 (M. avium), 엠. 인트라셀룰라레 (M. intracellulare) 및 엠. 키마에라 (M. Chimaera) 를 10 % CF 가래에서 배양한 후, MIC 시험을 실시하였다. 낭포성 섬유증 환자 가래의 존재 및 부재하에서, 상기에서 기술한 것과 동일한 CLSI 프로토콜을 수행하여 실시예 1 의 조성물의 MIC 를 측정하였다. 모든 연구는 이중으로 수행하였다.

[0223] 가래의 존재 및 부재하에서의 클로파지민 및 실시예 1 의 조성물의 MIC 값을 표 5 에 나타낸다.

종	식별 번호	CFZ (μg/ml)	실시예 1 의 조성물 (μg/ml)	CFZ + SP (μg/ml)	실시예 1 의 조성물 + SP (μg/ml)
엠. 아비움	ATCC 700898	0.25	0.125	>2	>2
엠. 인트라셀룰라레	DSM 43223	1	0.125	>2	>2
엠. 키마에라	CIP 107892	0.5	0.125	>2	>2
엠. 아비움	B18101968	0.5	0.125	>2	>2
엠. 압세수스	CIP104536	0.25	0.125	>2	>2
엠. 압세수스	B18104072	1	0.25	>2	>2
엠. 압세수스	B15029863	2	2	>2	>2
엠. 압세수스	B12052284	2	0.5	>2	>2

[0224]

[0225] 표 5

[0226] 표 5 에 제시한 결과는 다양한 비결핵성 마이코박테리아 종에 대한 클로파지민 및 실시예 1 의 조성물 모두의 일관된 MIC 를 나타낸다.

[0227] 이들 데이터는, 실시예 1 의 조성물이 엠. 압세수스 (M. abscessus) 및 엠. 아비움 (M. avium) 모두에 대해 강력한 생체외 활성을 보여주며, 적어도 이 기간 동안 안정하다는 것을 나타낸다.

[0228] SCID 마우스에서의 엠. 압세수스 (M. abscessus) 의 마우스 모델

[0229] 6-8 주령 SCID 암컷 마우스는 Charles River 에서 주문하였다. 마우스는 감염 전에 1 주일 동안 휴식을 취했다.

[0230] 엠. 압세수스 (M. abscessus) 균주 103 의 작업 스톱을 1 ml 분취량으로 냉동시키고, 사용하기 전에 -80 ℃ 에서 저장하였다. 감염을 위해, 분취량을 해동시키고, 26 g 바늘이 장착된 1 ml 루어-록 주사기로 20 회 파쇄시키고, 멸균 1x PBS 에 희석시켰다.

[0231] 급성 SCID 마우스 모델은 1×10^6 CFU/마우스 (엠. 압세수스 (M. abscessus) 균주 103) 로 비-침습성 기관내 주입 폐 감염증을 수용하였다.

[0232] 박테리아 흡수를 결정하기 위해서 3 마리의 마우스를 감염 후 1 일째에 희생시켰다. 전체 폐, 비장 및 간을 추출하고, 4.5 ml 의 1x PBS 에서 균질화시킨다. 균질물을 1:10 희석액에서 연속적으로 희석시키고, 희석액 (0-1-2-3-4-5-6-7) 을 7H11 한천 플레이트 상에 플레이팅하였다. 플레이트를 32 ℃ 건조-공기 인큐베이터 (변형 의준) 에 7 일 동안 넣는다.

[0233] 실시예 1 의 조성물 10.0 mg/kg 을 Microsprayer[®] (35 μl) 에 의해 폐 경로를 통해, 그리고 클로파지민 (위관

영양), 아미카신 (피하) 을 마우스 당 200 μ l 의 부피로 투여하였으며, 이것은 감염 후 2 일 째에 시작하고, 연속 8 일 동안 격일로 계속하였다.

[0234] 마지막 투여량의 화합물을 투여한 지 2 일 후에 마우스를 희생시켰다. 모든 군 (미처리 대조군, 클로파지민 (위관 영양), 실시예 1 의 조성물, 및 아미카신 처리된 마우스) 의 6 마리의 마우스를 희생시키고, 박테리아 로딩을 결정하였다. 0-1-2-3-4-5-6-7 에서 폐 균질물, 0-1-2-3-4-5-6-7 에서 비장 균질물, 및 0-1-2-3-4-5-6-7 에서 간 균질물의 플레이팅.

[0235] 0.60 이상의 Log 10 보호 값은 활성이 통계적으로 유의하다는 것을 나타낸다. 통계적 분석은, 먼저 CFU 를 로그로 변환한 후, 이것을 일원 배치 분산 분석 (one-way ANOVA), 이어서 일원 배치 터키 검정 (one-way Tukey test) (GraphPad Prism 분석 소프트웨어) 에 의한 변화의 다중 비교 분석에 의해 평가함으로써 수행하였다. 차이는, 95 % 신뢰 수준에서 유의한 것으로 간주된다.

[0236] 표 6 은 SCID 마우스 엠. 압세수스 (M. abscessus) 감염 후의 평균 Log₁₀ CFU 데이터 및 평균의 표준 오차 (SEM) 를 나타내며, 여기에서 "n" 은 희생 시점에서 군에서의 동물의 총수이다.

군	폐	비장	간
	Log ₁₀ CFU ±SEM	Log ₁₀ CFU ±SEM	Log ₁₀ CFU ±SEM
1 일 (전처리 대조군) (n=3)	5.08±0.03	4.42±0.04	5.00±0.11
처리 종료			
식염수 대조군 (IT) (n=6)	5.51±0.06	6.33±0.85	6.45±0.34
아미카신 (SQ) 150 mg/kg (n=6)	3.94±0.11	4.37±0.31	3.07±0.10
클로파지민 (경구) 20 mg/kg (n=6)	3.33±0.17	3.79±0.10	4.78±0.18
실시예 1 의 조성물 (IT, 에어로졸) 10.0 mg/kg (n=6)	2.66±0.28	3.29±0.25	4.57±0.14

[0237]

표 6

[0238]

[0239] 표 6 에서의 데이터는, 실시예 1 의 조성물에 의한 처리가 엠. 압세수스 (M. abscessus) 로 감염된 동물의 폐 및 비장에서 박테리아 회복의 최대 감소를 유도한다는 것을 나타낸다. 이 박테리아 감소는 아미카신, 또는 경구 클로파지민에 의한 치료에 비해서 통계적으로 개선되었다.

[0240] 베이지색 마우스에서의 엠. 아비움 (M. avium) 감염의 마우스 모델

[0241] 6-8 주령 베이지색 암컷 마우스는 Charles River 에서 주문하였다. 마우스는 감염 전에 1 주일 동안 휴식을 취했다.

[0242] 급성 베이지색 마우스 모델은 1×10^8 콜로니 형성 단위 (CFU)/ml (엠. 아비움 (M. avium) 균주 2285 러프) 로 비-침습성 에어로졸 노출 폐 감염증을 수용하였다. 엠. 아비움 (M. avium) 균주 2285 러프의 작업 스톱을 1 ml 분취량으로 냉동시키고, 사용하기 전에 -80 °C 에서 저장하였다. 감염을 위해, 분취량을 해동시키고, 26 g 바늘이 장착된 1 ml 루어-록 주사기로 20 회 파쇄시키고, 멸균 1 x 포스페이트 완충 식염수 (PBS) 에 희석시켰다.

[0243] 박테리아 흡수를 결정하기 위해서 3 마리의 마우스를 감염 후 1 일째 및 7 일째에 희생시켰다. 전체 폐, 비장 및 간을 추출하고, 4.5 ml 의 1x PBS 에서 균질화시키고, 1:10 으로 희석시켰다. 희석액 (0-1-2-3-4-5-6-7) 을 7H11/OADC, TSA 및 차콜 한천 플레이트 상에 플레이팅하고, 건조-공기 인큐베이터 (변형 의존) 에서 30 일 동안 32 °C 에서 배양한다.

[0244] 실시예 1 의 조성물 10.0 mg/kg 을 Microsprayer[®] (35 μ l) 에 의해 폐 경로를 통해, 그리고 클로파지민 (위관 영양) 을 마우스 당 200 μ l 의 부피로 투여하였으며, 이것은 감염 후 7 일 째에 시작하고, 연속 10 일 동안 격일로 계속하였다.

[0245] 마지막 투여량의 화합물을 투여한 지 5 일 후에 마우스를 희생시켰다. 모든 군 (미처리 대조군, 클로파지민 (위관 영양), 및 실시예 1 의 조성물) 의 6 마리의 마우스를 희생시키고, 박테리아 로딩을 결정하였다. 0-1-2-3-4-5-6-7 에서 폐 균질물, 0-1-2-3-4-5-6-7 에서 비장 균질물, 및 0-1-2-3-4-5-6-7 에서 간 균질물의 플레이트링.

[0246] 0.60 이상의 Log 10 보호 값은 활성이 통계적으로 유의하다는 것을 나타낸다. 통계적 분석은, 먼저 CFU 를 로그로 변환한 후, 이것을 일원 배치 분산 분석 (one-way ANOVA), 이어서 일원 배치 터키 검정 (one-way Tukey test) (SigmaStat 소프트웨어 프로그램) 에 의한 변화의 다중 비교 분석에 의해 평가함으로써 수행하였다. 차이는, 95 % 신뢰 수준에서 유의한 것으로 간주된다.

[0247] 표 7 은 베이지색 마우스 엠. 아비움 (M. avium) 감염 후의 평균 Log₁₀ CFU 데이터를 나타낸다.

군	폐	비장	간
	Log ₁₀ CFU ±SEM	Log ₁₀ CFU ±SEM	Log ₁₀ CFU ±SEM
1 일 (전처리 대조군) (n=3)	4.74±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00
7 일 (전처리 대조군) (n=3)	5.19±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00
처리 종료			
식염수 대조군 (IT) (n=6)	5.20±0.03	3.24±0.08	3.63±0.34
클로파지민 (경구) 20 mg/kg (n=6)	3.95±0.03	3.14±0.03	3.01±0.03
실시예 1 의 조성물 (Sus.) (IT, 에어로졸) 10.0 mg/kg (n=6)	3.43±0.18	2.93±0.25	3.10±0.02

[0248]

[0249] 표 7

[0250] 표 7 에서의 데이터는, 실시예 1 의 조성물에 의한 처리가 엠. 아비움 (M. avium) 으로 감염된 동물의 폐 및 비장에서의 박테리아 회복의 보다 큰 감소를 유도한다는 것을 나타낸다.

[0251] 만성 베이지색 마우스 모델

[0252] 6 내지 8 주령 베이지색 마우스는 감염 전에 1 주일 동안 휴식을 취했다. 마우스는 0 일째에 엠. 아비움 (M. avium) 2285 러프의 1x10⁸ CFU 의 폐 감염증을 수용하였다. 박테리아 흡수 및 전처리 박테리아 로딩을 결정하기 위해서, 3 마리의 마우스를 1 일째에, 그리고 6 마리의 마우스를 27 일째에 희생시켰다. 전체 폐, 비장 및 간을 추출하고, 4.5 ml 의 1xPBS 에서 균질화시키고, (0-1-2-3-4-5-6-7) 희석액으로 7H11 및 차콜 한천 플레이트 상에 플레이트링하였다. 플레이트를 37 °C 건조-공기 인큐베이터에 25 내지 30 일 동안 넣었다.

[0253] 나머지 감염된 베이지색 마우스를 총 14 회 처리를 위해 28 일째에 시작하여 격일로 처리하였다. 동물은 다음의 처리 중 하나를 수용하였다: 식염수 (Microsprayer[®], 35 μl); 클로파지민 (경구 위관 영양, 20 mg/kg, 200 μl); 실시예 1 의 조성물 (IT, Microsprayer[®], 10 mg/kg, 35 μl).

[0254] 마우스를 최종 처리 2 일 후인 57 일째에 희생시켰다. 플레이트를 37 °C 건조-공기 인큐베이터에 30 일 동안 넣었다.

[0255] 통계적 분석은, 먼저 CFU 를 로그로 변환한 후, 이것을 일원 배치 분산 분석 (one-way ANOVA), 이어서 일원 배치 터키 검정 (one-way Tukey test) 에 의한 변화의 다중 비교 분석에 의해 평가함으로써 수행하였다. 차이는, 95 % 신뢰 수준에서 유의한 것으로 간주된다.

[0256] 베이지색 마우스 엠. 아비움 (M. avium) 만성 감염 후의 평균 Log₁₀ CFU 데이터를 표 8 에 나타낸다.

군	폐	비장	간
	Log ₁₀ CFU ±SEM	Log ₁₀ CFU ±SEM	Log ₁₀ CFU ±SEM
1 일 (전처리 대조군) (n=3)	5.24±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00
27 일 (전처리 대조군) (n=6)	6.02±0.07	5.37±0.35	6.52±0.12
처리 종료 (57 일)			
식염수 대조군 (IT) (n=6)	6.40±0.06	6.15±0.16	6.69±0.14
클로파지민 (경구) 20 mg/kg (n=6)	5.94±0.12	3.08±0.04	4.07±0.04
실시에 1 의 조성물 (Sus.) (IT, 에어로졸) 10.0 mg/kg (n=6)	2.45±0.09	4.83±0.22	3.89±0.011

[0257]

[0258] 표 8

[0259] 이들 데이터는, 클로파지민이 확립된 "만성" 동물 NTM 감염 모델에 의해 형성된 육아종 같은 구조를 관통하는데 어려운 시간을 가진다는 것을 시사한다. 본 발명의 조성물은 동일한 문제점을 갖지 않으며, 감염 후에도 항-마이코박테리아 활성이 충분히 확립된 상태로 유지될 수 있는 것으로 보인다.

[0260] 생체외에서 폐 상피 세포에 노출 후 장벽 완전성 및 염증에 대한 실시예 3 의 조성물의 효과

[0261] 세포 생존력

[0262] 폐 상피 세포 생존력을 평가하기 위해서, 2 가지 생체외 조건하에서 3 가지 상이한 세포 유형인 Calu-3; A549; 및 hAELVi 세포를 사용하였다. 세포를 "침수 상태" 하에서 (즉, Transwell™ 플레이트 상의 세포 배양 배지에서), 또는 세포의 정점 측으로부터 제거된 세포 배양 배지를 가진 "공기-액체 계면" 모방 상태 (ALI) 하에서 처리하였다. "침수 상태" 에 있어서, Calu-3 세포를 3 가지 투여량의 실시예 3 의 조성물 (10 %, 50 %, 또는 100 %) 에 4 시간 동안 노출시켰다. 세포 생존력을 추정하기 위해서, 세포를 아크리딘 오렌지/요오드화 프로피듐 (AO/PI) 염색을 사용하여 염색함으로써 생존/사멸 세포를 분화시켰다. 적색 형광은 세포 사멸을 알렸다.

[0263] 대식세포 흡수

[0264] THP-1 세포를 124 ng/ml 포르볼 12-미리스테이트 13 아세테이트 (PMA) 로 3 일 동안 배양한 후, 대식세포 같은 세포로 분화시켰다. 세포가 성숙되면, 이들을 실시예 3 의 조성물 (뱅크 완충 염 용액 (HBSS) 에 1:200 으로 희석됨) 에 4 시간 동안 노출시켰다. 세포를 상기에서 기술한 바와 같이, AO/PI 를 통해 염색시켜, 노출 후의 세포 생존력을 결정하였다.

[0265] 경상피 전기 저항 (TEER) 측정

[0266] Calu-3 세포를 Transwell™ 3460 상에 1x10⁵ 세포/웰로 파종하고, 12 일 동안 정치시켜 합류로 성장시켰다. TEER 측정은 EVOM2 (World Precision Instruments, Friedberg, Germany) 를 사용하여, 제조사의 지침에 따라서 수행하였다. 파종 후, Calu-3 세포를 식염수 (음성 대조군) 또는 실시예 3 의 조성물 (농도: 20 mg/ml, 10 mg/ml, 또는 2 mg/ml) 에 노출시켰다. 세포를 2 내지 4 시간 동안 노출시킨 후, TEER 을 측정하였다.

[0267] 염증성 사이토카인 생산

[0268] 분화된 THP-1 세포 (dTHP-1) 를 실시예 3 의 조성물에 4 시간 또는 24 시간 동안 노출시켰다 (1:200 HBSS 희석). HBSS 노출 단독을 음성 대조군으로서 사용하였으며, 지질다당류 (LPS) (100 ng/ml) 를 양성 대조군으로서 투여하였다.

[0269] 배양 후, 상청액을 세포로부터 t = 4 시간 또는 24 시간 제거하고, 폴딩하였다. 폴딩된 상청액 샘플에 대해, ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) 를 수행하였다. 제조사의 지침에 따라서, TNF-α, IL-6, IL-8 및 IL-10 에 대해 개별 ELISA 키트를 사용하였다.

[0270] 통계적 분석은 변화의 일원 배치 분산 분석 (ANOVA), 이어서 터키 후-hoc 시험 (Tukey post-hoc test) 에 의해

수행하였다. 통계적 유의성은 확률 값 < 0.05 에서 결정하였다.

[0271] 결과

[0272] "침수" 상태하에서, 실시예 3 의 조성물은 투여된 임의의 농도에서 4 시간 배양에 걸쳐 세포 생존력의 시각적 감소를 초래하지 않았다.

[0273] "ALI" 상태하에서, 3 가지 상이한 세포 유형 (Calu-3, A549, 및 HAELEVi 세포) 을 3 가지 상이한 시점 (5 시간, 2 일, 및 7 일) 에 걸쳐 조사하였다. 임의의 세포에서 4 시간째에, 또는 Calu-3 세포에서 2 일째에 세포 독성이 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다. A549 세포에서 2 일 및 7 일째에, 및 Calu-3 세포에서 7 일째에 약간의 독성이 나타났다. 기술적 한계는 세포 사멸의 정량화를 허용하지 않았다.

[0274] 대식세포 흡수와 관련하여, 분화된 THP-1 세포를 1:200 HBSS 에서 4 시간 동안 배양하여, 노출 후의 대식세포 세포 생존력을 결정하였다. 실시예 3 의 조성물은 세포 사멸을 유도하지 않았지만, 대식세포에 의한 클로파지민 흡수를 나타냈다.

[0275] TEER 측정과 관련하여, Calu-3 세포를 HBSS 또는 3 가지 농도의 실시예 3 의 조성물에 4 시간 동안 노출시키고, TEER 측정을 노출 내내 다양한 시점에서 샘플링하였다. 임의의 주어진 시점에서 대조군과 비교하여 $\geq 50\%$ 의 TEER 의 감소는, 장벽 완전성의 유의한 손실로 간주하였다.

[0276] Calu-3 세포의 실시예 3 의 조성물에서의 노출은 1 시간 노출 후에 장벽 완전성에 영향을 미치지 않았다. 20 mg/ml 에서의 노출은 2 시간 후에 유의한 (즉, $\geq 50\%$) 감소를 초래하였다. 10 mg/ml 의 농도에서, 2 시간 후의 모든 시점에서 약간의 감소 (즉, 25-35 %) 를 나타냈다. 2 mg/ml 에서의 노출은 전체 연구 기간 동안 장벽 기능에서 임의의 감소를 나타내지 않았다.

[0277] 염증성 사이토카인 생산

[0278] 양성 대조군 LPS 는 이 모델에서 예상대로 작동하였다. 실시예 3 의 조성물은 조사한 임의의 시점에서 사이토카인의 유의한 변화가 없음을 입증하였다.

[0279] 결과를 표 9 에 나타낸다.

[0280] dTHP-1 세포 노출 후의 사이토카인 생산

처리군	사이토카인 농도 (pg/ml)			
	TNF- α (4 hr)	IL-8 (4 hr)	IL-10 (4hr)	IL-6 (24 hr)
대조군	603.0 $\pm$ 23.0	398.3 $\pm$ 12.0	16.5 $\pm$	7.9 $\pm$ 0.3
LPS	2130.7 $\pm$ 23.0*	2596.8 $\pm$ 84.0*	65.1 $\pm$ 7.0*	22.6 $\pm$ 0.7*
실시예 3 의 조성물	441.9 $\pm$ 48.3	978.9 $\pm$ 395.4	18.9 $\pm$ 7.1	6.5 $\pm$ 1.4

[0281]

[0282] 표 9 (* $P < 0.05$)

[0283] 생체내 안전성 및 내약성

[0284] 6-8 주령 pld Balb/C 암컷 마우스에 격일로 총 3 회 투여량을 제공하였다. 마우스에 실시예 1 의 조성물을 사용하여 10.0, 5.01 및 2.51 mg/kg 으로 투여하였다. 조성물은 Microsprayer[®] 에어로졸 기관내 (IT) 투여를 통해 35 μ l/마우스의 부피로 제공하였다. 주입 후, 마우스를 투여 후 10 분, 1, 2 및 4 시간째에 관찰하고, 그 후 매일 관찰하였다.

[0285] 표 10 은 투여 후의 전체적인 관찰을 나타낸다. "BAR" 은 동물이 밝고, 활동적이며, 반응이 좋았음을 나타낸다.

<u>처리군</u>	<u>1 일</u>	<u>2 일</u>	<u>3 일</u>
군 1 10.0 mg/kg	BAR	BAR	BAR
군 2 5.01 mg/kg	BAR	BAR	BAR
군 3 2.51 mg/kg	BAR	BAR	BAR

[0286]

[0287]

[0288]

표 10

표 11 은 시험한 3 일 동안 동물의 체중을 나타낸다.

<u>마우스</u>	<u>투여량</u>	<u>체중 (그램)</u>		
		<u>1 일</u>	<u>2 일</u>	<u>3 일</u>
1	10 mg/kg	20.1	20.2	22.1
2	"	21	21.2	22
3	"	21.1	20.2	22.2
1	5.01 mg/kg	22.3	22.3	23.1
2	"	22.1	22	23.2
3	"	22	21.9	23.2
1	2.51 mg/kg	22	22	23.3
2	"	22.2	22.2	22.8
3	"	22.4	22	23.1

[0289]

[0290]

[0291]

[0292]

표 11

이들 데이터는 처리 3 일 동안 체중에 통계적으로 유의한 변화가 없었음을 나타낸다.

이들 결과는 본 발명의 조성물이 시험한 투여량에서 충분히 내성이 있음을 나타낸다.