(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0011951
(43) 공개일자 2020년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A61K 31/573* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 47/10* (2017.01)
A61K 47/32 (2017.01) *A61K 47/36* (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 27/16* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/185 (2013.01)
A61K 31/573 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7035948
(22) 출원일자(국제) 2018년05월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년12월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/063310
(87) 국제공개번호 WO 2018/215414
국제공개일자 2018년11월29일
(30) 우선권주장
17172659.9 2017년05월24일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
돔페 파르마써티씨 에스.피.에이.
이탈리아, 20122 밀라노, 비아 산 마르티노, 12
(72) 발명자
데 피졸 마리아
이탈리아 아이-20122 밀라노 (엠아이) 비아 산타 루시아 6 돔페 파르마써티씨 에스.피.에이. 내
아라미니 안드레아
이탈리아 아이-67100 라퀼라 (에이큐) 비아 캄포 디 필레 에스. 엔. 씨. 돔페 파르마써티씨 에스.피.에이. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정홍식, 김태헌

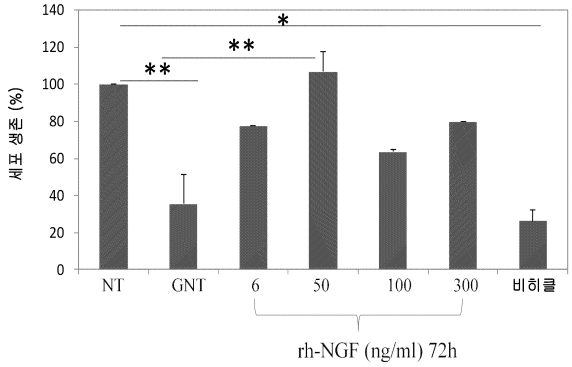
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **난청 치료에 사용하기 위한 뉴로트로핀**

(57) 요 약

본 발명은 고실경유 투여 경로를 사용한 난청과 관련된 청각 장애의 치료에서, 특히 돌발성 난청, 폭발로 유발된 난청, 귀독성, ARHL (노화와 관련된 난청) 및 소음 손상의 치료에서 뉴로트로핀의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 청각 장애의 치료에서 뉴로트로핀, 특히 NGF를 함유하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/32 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
A61K 9/0046 (2013.01)
A61P 27/16 (2018.01)

(72) 발명자
시리코 안나
이탈리아 아이-80131 나폴리 (엔에이) 비아 피에트로 카스텔리노 111 돔페 파르마써티씨 에스.피.에이. 내
지폴리 마라
이탈리아 아이-80131 나폴리 (엔에이) 비아 피에트로 카스텔리노 111 돔페 파르마써티씨 에스.피.에이. 내
아세라 주세피나
이탈리아 83023 라우로 (에이브이) 비아 마테오 카쎄세 25
마티올리 시몬 루카
이탈리아 20161 밀라노 (엠아이) 비아 아씨에타 31

명 세 서

청구범위

청구항 1

청각 장애의 치료에 사용하기 위한 뉴로트로핀으로서, 고실내 경로 (intratympanic route)로 투여되는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 뉴로트로핀은,

NGF, 뇌-유래 신경영양 인자 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF), 뉴로트로핀 3 및 뉴로트로핀 4로부터 선택되며, 바람직하게는 NGF인 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 장애는 돌발성 난청, 폭발로 유발된 난청, 귀독성, ARHL (노화와 관련된 난청: age related hearing loss) 및 소음 손상으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 조성물에 의해 투여되는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 약제학적으로 허용되는 부형제는,

히알루론산, 폴리비닐 알코올, 글리세롤, 폴리-락트-co-글리콜산 및 PEG400으로부터 선택되며, 바람직하게는 히알루론산, 폴리비닐 알코올 또는 글리세롤인 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 용액, 현탁액, 마이크로입자 또는 겔인 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 마이크로입자가 PLGA인, 뉴로트로핀.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 추가의 활성 성분과 조합하여 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 추가의 활성 성분은 덱사메타손, 메틸프레드니솔론 및 프레드니솔론으로부터 선택된 스테로이드인 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 1 ㎍ 내지 1.2 mg의 NGF, 바람직하게는 10 ㎍ 내지 200 ㎍의 NGF, 보다 바람직하게는 2 ㎍ 내지 20 ㎍의 NGF를 함유하는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 용액은 1 ㎍/ml 내지 1.2 mg/ml, 바람직하게는 10 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 2 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml 범위의 NGF 농도를 함유하는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 12

제6항에 있어서, 상기 현탁액은 1 ㎍/ml 내지 1.2 mg/ml, 바람직하게는 10 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 2 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml 범위의 NGF 농도를 함유하는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 13

제6항에 있어서, 상기 마이크로입자는 1 ㎍/ml 내지 1.2 mg/ml, 바람직하게는 10 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 2 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml 범위의 NGF 농도를 함유하는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 뮤린 또는 인간 기원이거나 인간 재조합 뉴로트로핀인 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 뉴로트로핀은 뮤린 또는 인간 기원의 NGF이거나 인간 재조합 NGF인 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 매일, 바람직하게는 하루 1회 이상 투여되는 것을 특징으로 하는, 뉴로트로핀.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고실경유 (transtympanic) 투여 경로를 사용한 난청과 관련된 청각 장애의 치료에서, 특히 돌발성 난청(sudden deafness), 폭발로 유발된 난청(blast-induced hearing loss), 귀독성(ototoxicity), ARHL (노화와 관련된 난청: age related hearing loss) 및 소음 손상(noise damage)의 치료에서 뉴로트로핀의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 청각 장애의 치료에서 뉴로트로핀, 특히 NGF를 함유하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 난청은 신생아의 0.1 내지 0.2%에서 발생하며 난청은 75세 이상 인구의 최대 70%에 영향을 미친다 (참조: Sprinzl GM et al., Gerontology 2010;56(3):351-8). 달팽이관에 위치한 청각 모발 세포에 의해 소리 신호가 전기 충격으로 전환된다. 감염, 기계적 손상, 아미노글리코시드 항생제, 음향 외상, 노화 및 화학적-유발 귀독성으로 인한 모발 세포의 퇴행은 청각 장애 또는 난청의 주요 원인이다 (참조: Delterne P et al., Acta Otolaryngol 1993; 113:312-377).

[0003] 귀독성 약물은 통상적으로 사용되는 아미노글리코시드 항생제, 예컨대 그람-음성 세균에 의해 야기된 감염 치료를 위한 젠타마이신, 널리 사용되는 화학요법제인 시스플라틴 및 이의 유사체, 퀴닌 및 이의 유사체, 살리실레이트 및 이의 유사체, 및 루프-이뇨제를 포함한다. 청각 세포 및 나선 신경절 뉴런에 대한 이들 약물의 독성 효과는 종종 치료 유용성에 대한 제한적 요소이다. 예를 들어, 항균성 아미노글리코시드, 예컨대 젠타마이신 등은 그러한 항균제의 유용성을 감소시키는 심각한 독성, 특히 귀독성 및 신독성을 갖는 것으로 공지되어 있다 (참조: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Vol 70, Issue 5, May 1981, page 581-6th ed.).

[0004] 중이염은 중이의 감염을 기술하는데 사용되는 용어이다. 전형적으로, 항생제는 중이의 감염에 대해 전신 투여된다. 항생제의 전신 투여는 일반적으로 중이에서 치료 수준을 달성하기 위해 연장된 지연 시간을 초래하며 그

러한 수준을 달성하기 위해 높은 초기 용량을 필요로 한다. 전신 투여는 감염이 진행성 단계에 도달했을 때 가장 흔히 효과적이지만, 이 시점에서 이미 중이와 내이 구조에 영구적인 손상이 초래되었을 수 있다. 명백히, 귀독성은 항생제 투여의 용량-제한적 부작용이다.

[0005] 청각 기구는 외이 및 중이, 내이 및 청신경 및 중심 청각 경로로 분할될 수 있다. 종마다 일부 변화가 있겠지만, 일반적인 특성은 모든 포유동물에 공통적이다. 청각 자극은 외이도, 고막, 및 이소골 연쇄를 통해 내이로 기계적으로 전달된다.

[0006] 많은 연구는 귀독성, ARHL (노화와 관련된 난청) 및 소음 손상에서 잠재적인 치료 중재법으로서 다양한 약물과 약제를 제안하였다. 이들은 크게 두 가지 카테고리로 나뉜다: 이들은 세포 사멸 경로의 특정 부분을 억제하는 것을 목표로 하고, 아폽토시스 및 괴사를 야기하는 신호전달 메커니즘을 방해하는 것을 목표로 한다. 중재의 몇 가지 전략은 일부 임상 시험에서 이미 사용된 N-아세틸시스테인 (NAC)과 같은 항산화제를 사용하여 ROS (활성 산소 종: Reactive Oxygen Species)의 감소를 기반으로 한다.

[0007] 지난 몇년 동안, 모발 세포 재생에 관한 많은 연구가 수행되었다. 그들 중 다수는 특정 유전자 조작 후 코르티의 포유동물 기관의 지지 세포가 분열되도록 유도될 수 있음을 보여주었다. 최근의 증거는, 출생후 포유동물 내이는 시험관내 증식하거나 오토스피어들(otospheres)을 형성하고 다수의 표현형으로 분할할 수 있는 전구 세포를 함유함을 시사한다.

[0008] 전통적으로 사용되는 재활 조치는 주로 청각 보조장치를 사용하여 들어오는 소리 신호를 증폭 및 필터링하는 기술 솔루션에 기반하며, 더 심각한 손상의 경우, 달팽이관 보철물에 의해 옵션이 제공되는데, 이는 청각 뉴런을 직접 자극한다. 모발 세포의 분화를 담당하는 특정 유전자의 발현을 변경하는 것 (참조: Mizutari K et al., Neuron 2013;77(1):58-69) 또는 줄기 세포 치료요법 (참조: Okano T et al., Trends Amplif. 2012;16(1):4-18)은 청각 기능 회복을 위한 해결책일 것이다. 퇴행 과정을 지연시킬 수 있는 모발 세포 보호를 위한 방법 또는 전략 또한 활발히 추구되고 있다. 그러나, 효과적인 임상 치료는 아직 발견되지 않았다.

[0009] NGF 계열의 뉴로트로핀은 포유동물에서 내이 신경분포에 필요한 부류의 신생 분자이다 (참조: Ernfors P et al., Neuron 1995; 14:1153-64); 인간에서 그들의 잠재적인 치료적 적용은 활발하게 평가되고 있다. 이 계열은 신경 성장 인자 (NGF), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF) 및 뉴로트로핀 3 및 4 (NT3, NT4)를 포함한다. 이들 4개의 분자들은 이들 모두가 공통 조상 유전자로부터 유래하므로 유사한 서열과 구조를 공유하며, 4개 분자 모두는 발달 동안 그리고 그 이후 뉴런 성장과 분화를 지시하는데 적극적이다 (참조: Huang EJ et al., Annu Rev Neurosci 2001;24:677-736). 각 뉴로트로핀은 높은 친화도로 Trk 수용체의 특정 서브타입에 결합하고, 다른 Trk 수용체 및 p75 수용체에 대한 일부 낮은 친화도 교차 결합 또한 발생한다.

[0010] 뇌-유래 신경영양 인자 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF)는 중추 신경계 및 말초 신경계의 특정 뉴런에 작용하여 기존 뉴런의 생존을 지원하고 새로운 뉴런 및 시냅스의 성장과 분화를 촉진하는 것을 돕는다.

[0011] 뉴로트로핀 3은 말초 및 중추 신경계의 특정 뉴런에 활성을 갖는 단백질 성장 인자이며; 기존 뉴런의 생존과 분화를 지원하며 새로운 뉴런과 시냅스의 성장과 분화를 촉진하는 것을 돕는다.

[0012] 뉴로트로핀 4는 주로 TrkB 수용체 티로신 키나제를 통해 신호를 보내는 신경영양 인자이다.

[0013] NGF는 3개의 서브유닛인 α,β 및 γ로 구성된 폴리펩티드이다. β-서브유닛 자체는 118개의 아미노산으로 구성된 펩티드의 동종이량체이며 NGF의 완전한 생물학적 활성을 담당한다. 그 구조는 뮤린과 인간 NGF 사이에 90% 상동성으로 상이한 종들 사이에서 잘 보존된다. NGF는 신경 세포의 성장과 생존을 조절하여 청년과 성인 둘 다의 신경계 발달에 크게 영향을 미친다.

[0014] 성인에서, NGF는 통증/통각과민증뿐만 아니라 신경영양 각막염, 시신경 절개, 안구 고혈압 및 망막 박리와 같은 여러 안과 질환에서 효과적인 것으로 나타났다. 상기 데이터는 뮤린 타액선으로부터 추출된 NGF에 대해 주로 보고되었으며, 심지어 이들 제제는 상이한 이량체의 이종 혼합물이다.

[0015] 최근, 인간 NGF는 유전 공학 기술 (참조: Iwane et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 171: 116, 1990; EP0994188B1, WO2013/092776)을 사용하여 합성되었으며, 이때 환자에게 투여될 보다 균질한 형태의 단백질을 얻는다는 이점이 있다. 다양한 동물 모델을 사용하여 내이에 대한 외상의 형태학적 및 생리학적 효과를 자극하고 조사하였다. 동물 모델에서 청각을 잃은 달팽이관에 투여될 때, 뉴로트로핀은 나선형 신경절 뉴런 생존을 극적으로 개선하고 말초 청각 섬유 재성장을 자극할 수 있는 것으로 나타났다.

[0016] 또한, 폭발로 유발된 난청에 의해 영향을 받고 근육내 주사에 의해 NGF로 치료된 환자는 조기 치료시 개선된 청

력을 나타냈다 (참조: S.Q. Zhai, N. YU. Eur. Rev. Med. Pharm. Sci., 2015;19:3146-51). 신경성 난청 및 이명 치료에서 NGF-포인트 주사 후 치료 효과가 관찰되었다 (참조: Shanxi et al.,J. Trad Chinese Med 2009;29:39-42).

[0017] 장기간의 NGF 작용을 원할 때 특히 근육내 및 혈관내 경로에 의한 NGF의 비경구 투여가 필요하지만, 상기 투여 경로는 특히 치료적이고 효과적인 미로내 농도를 달성하기 위해 내이에서 고용량의 NGF에 도달하는 주요 문제를 해결하지 못한다.

[0018] 또한, 전신 및 정맥내 투여를 포함하는 내이로의 NGF 전달에 대한 몇몇 공지된 전략이 공지되어 있지만, 이러한 경로는 선택적이지 않으며, 내이 내부에서 치료 농도를 달성하기가 어렵다.

[0019] 따라서, NGF의 치료 효능을 보장하기에 충분히 높은 농도의 약물로 내이에 도달할 수 있는 보다 구체적이고 국소화된 치료가 필요하다.

발명의 내용

[0020] 정의

[0021] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어, 표기법 및 다른 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 숙련가에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖도록 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어들은 명확성 및/또는 준비된 참조를 위해 본원에 정의되며; 따라서, 본원에서 그러한 정의를 포함한다는 것이 해당 기술분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적으로 상이한 것으로 해석되어서는 안된다.

[0022] 본원에서 용어 "약제학적으로 허용되는 부형제"는 그 자체의 임의의 약리학 적 효과가 없고 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때 부작용을 일으키지 않는 물질을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 부형제는 당업계에 익히 공지되어 있으며, 예를 들어 본원에 참조로 포함된 문헌 (Handbook of Pharmaceutical Excipients, sixth edition 2009)에 개시되어 있다.

[0023] 본원에서 용어 "동시, 별개 또는 순차적 투여"는 치료 효과를 제공하기 위해 제1 및 제2 화합물이 동시에 또는 두 화합물이 환자의 신체에서 동시에 작용하는 그러한 방식으로 또는 한 화합물 이후 나머지 화합물을 투여하는 그러한 방식으로의 투여를 지칭한다.

[0024] 본원에서 용어 "대략" 및 "약"은 측정에서 발생할 수 있는 실험 오차의 범위를 지칭한다.

[0025] 용어 "포함하는 (comprising)", "갖는", "포함하는 (including)" 및 "함유하는"은 개방형 용어 (즉, "포함하지만 이에 한정되지 않음"을 의미함)로 해석되어야하며, "~로 본질적으로 이루어지다", "~로 본질적으로 이루어진", "~로 이루어지다" 또는 "~로 이루어진"과 같은 용어에 대한 지지를 제공하는 것으로 간주되어야 한다.

[0026] 용어 "~로 본질적으로 이루어지다", "~로 본질적으로 이루어진"은 반-폐쇄된 용어로 해석되어야 하며, 이는 본 발명의 기본적 및 신규한 특성에 실질적으로 영향을 미치는 다른 성분들이 포함되지 않음을 의미한다 (따라서 임의의 부형제가 포함될 수 있음).

[0027] 용어 "~로 이루어지다", "~로 이루어진"은 폐쇄된 용어로 해석되어야 한다.

[0028] 용어 "고실내 투여"는 소량의 약물이 고막을 통해 중이로 직접 주사되는 수술 절차를 의미한다. 그것은 일반적으로 일부 약물에 투과성인 막을 호스팅하기 때문에, 정원창 (round window) 수준의 "내이에 대한 문"인 고막의 후하방 사분면에서 수행된다.

[0029] 본원에서 용어 "제어 방출"은 본 발명의 약물 전달 제형에 따라 전달되는 생물학적 활성 분자의 속도 및/또는 양의 제어를 지칭한다. 제어 방출 동력학은 연장 방출, 빠른 방출, 지연 방출 또는 박동 약물 전달 시스템일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1. 손상된 달팽이관의 rhNGF 처리 후 세포 생존.

도 2. 제형 2로부터의 rhNGF - MPS 시험관내 누적 방출 프로파일.

도 3. 제형 2로부터 매일 방출되는 rhNGF (ng)의 양.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 놀랍게도 전신 노출을 제한하는 고실내 투여를 포함한 국소 뉴로트로핀 전달은 접근법은 난청 치료에 특히 유망한데, 이는 뉴로트로핀이 내이로, 특히 미로 내 영역에서 더 빠르고 더 높은 농도로 적절한 치료 수준에 도달할 수 있도록 하기 때문인 것으로 밝혀졌다.

[0032] 이 투여 경로는 정맥내 또는 경구 투여와 같은 다른 일반적인 경로보다 더 나은 결과를 제공한다. 얻어진 결과는 젠타마이신 처리 후 모발 세포 생존력을 회복하는데 있어서 뉴로트로핀 활성과 그리고 달팽이관으로의 뉴로트로핀의 양호한 분포를 야기하는 고실경유 투여 때문이다.

[0033] 특히, 본원에 보고된 실험 데이터는 rhNGF의 고실경유 투여는 내이 조직, 특히 내이 상피 모발 세포를 재생시킬 수 있으므로, 경구 투여와 비경구 투여 둘 다에 의한 기존의 치료에 대한 개선 및 코르티코스테로이드 치료에 대한 대안을 나타낸다.

[0034] 따라서, 본 발명의 제1 구현예는 상기 뉴로트로핀이 고실내 경로로 투여되는 것을 특징으로 하는, 청각 장애의 치료에서 뉴로트로핀의 용도에 관한 것이다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 뉴로트로핀은 NGF, 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀 3 및 뉴로트로핀 4로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 NGF이다.

[0036] 바람직하게는, 상기 청각 장애는 돌발성 난청, 폭발로 유발된 난청, 귀독성, ARHL (노화와 관련된 난청) 및 소음 손상으로부터 선택된다.

[0037] 바람직한 구현예에서, 상기 뉴로트로핀은 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 조성물에 의해 투여된다.

[0038] 바람직하게는, 투여된 뉴로트로핀은 NGF, 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀 3 및 뉴로트로핀 4로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 NGF이다.

[0039] 본 발명의 목적상, 고실내 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 부형제는 히알루론산, 폴리비닐 알코올 (PVA), 글리세롤, 폴리-락트-co-글리콜산 (PLGA) 및 PEG400으로부터 선택되며, 바람직하게는 히알루론산, 폴리비닐 알코올 또는 글리세롤이다.

[0040] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 용액, 현탁액, 마이크로입자 또는 겔이다. 상기 마이크로입자는 바람직하게는 폴리-락트-co-글리콜산 (PLGA)으로 제조된다.

[0041] 바람직하게는, 조성물이 겔인 경우, 상기 겔은 감열성 겔(thermo-sensitive gel) 또는 접착제 졸-겔 전이 하이드로겔(adhesive sol-gel transition hydrogels)로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 상기 겔은 플루로닉 F127 및 히알로론산 (HA)을 포함한다.

[0042] 본 발명의 추가의 바람직한 구현예에서, 상기 뉴로트로핀은 인간 혈청 알부민 (HAS), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 트레할로스로부터 선택된 PLGA의 고체 마이크로입자, 적어도 하나의 유기 용매 및 적어도 하나의 추가의 분자를 포함하는 제어 방출 조성물에 의해 투여된다.

[0043] 바람직하게는, 상기 유기 용매는 비할로겐화 (예를 들어, 플루오르화 또는 염소화)된다. 보다 바람직하게는, 상기 비할로겐화 유기 용매는 에틸 아세테이트 및 아세톤으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0044] 바람직하게는, 상기 마이크로입자의 조성물은 인간 혈청, 에틸 아세테이트 및 D-트레할로스 탈수물로부터의 알부민을 함유한다.

[0045] 바람직하게는, 상기 제어 방출 조성물은 서방성 조성물이다.

[0046] 추가의 구현예에서, 본 발명의 조성물은, 또한 각 활성 성분에 대해 상이한 투여 경로 후 적어도 하나의 추가의 활성 성분과 조합하여 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0047] 바람직한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 추가의 활성 성분은 덱사메타손, 메틸프레드니솔론 및 프레드니솔론으로부터 선택된 스테로이드이다.

[0048] 바람직하게는, 상기 추가의 활성 성분은 경구, 근육내 또는 국소로 투여될 수 있다.

[0049] 추가의 구현예에서, 본 발명의 조성물은 1 ㎍ 내지 1.2 mg의 뉴로트로핀, 바람직하게는 10 ㎍ 내지 200 ㎍의 뉴

로트로핀, 보다 바람직하게는 2 ㎍ 내지 20 ㎍의 뉴로트로핀을 함유한다.

[0050] 바람직하게는, 상기 뉴로트로핀은 NGF, 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀 3 및 뉴로트로핀 4이며, 보다 바람직하게는 NGF이다.

[0051] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 1 ㎍ 내지 1.2 mg의 NGF, 바람직하게는 10 ㎍ 내지 200 ㎍의 NGF, 보다 바람직하게는 2 ㎍ 내지 20 ㎍의 NGF를 함유한다.

[0052] 본 발명의 조성물이 현탁액 형태인 경우, 뉴로트로핀의 농도는 1 ㎍/ml 내지 1.2 mg/ml, 바람직하게는 10 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 2 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml의 뉴로트로핀이다.

[0053] 바람직하게는, 상기 뉴로트로핀은 NGF, 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀 3 및 뉴로트로핀 4이며, 보다 바람직하게는 NGF이다.

[0054] 보다 바람직한 구현예에서, 상기 현탁액 중 NGF 농도는 1 ㎍/ml 내지 1.2 mg/ml, 바람직하게는 10 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 2 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml의 NGF이다.

[0055] 본 발명의 조성물이 용액 형태인 경우, 뉴로트로핀의 농도는 1 ㎍/ml 내지 1.2 mg/ml, 바람직하게는 10 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 2 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml의 뉴로트로핀이다.

[0056] 바람직하게는, 상기 뉴로트로핀은 NGF, 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀 3 및 뉴로트로핀 4이며, 보다 바람직하게는 NGF이다.

[0057] 본 발명의 조성물이 용액 형태인 경우, NGF의 농도는 1 ㎍/ml 내지 1.2 mg/ml, 바람직하게는 10 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 2 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml의 NGF이다.

[0058] 본 발명의 조성물이 마이크로입자 형태인 경우, NGF의 농도는 1 ㎍/ml 내지 1.2 mg/ml, 바람직하게는 10 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 2 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml의 NGF이다.

[0059] 추가의 구현예에서, 본 발명의 뉴로트로핀은 뮤린 또는 인간 기원이거나 인간 재조합 뉴로트로핀이다.

[0060] 바람직하게는, 상기 뉴로트로핀은 뮤린 또는 인간 기원의 NGF이거나 인간 재조합 NGF이다.

[0061] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 사용하기 위한 조성물은 매일, 바람직하게는 하루 1회 이상 투여된다.

[0062] 바람직하게는, 사용을 위한 상기 조성물은 하루 1 내지 4회 용량, 적어도 4주 동안 투여된다.

[0063] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 성인과 "소아 집단" (이때 용어 "소아 집단"은 출생으로부터 18세 연령까지에 이르는 집단의 일부로 이해된다) 둘 다를 포함하도록 의도된 인간에게 투여될 수 있다.

[0064] 하기 실시예는 본 발명의 임의의 제한적 효과 없이 본 발명의 이해를 증가시키기 위해 포함된다.

[0065] 실험 데이터

[0066] 본 발명에 따른 하기 제형이 제조되었다.

[0067] 제형 1

[0068] 마이크로입자 서방성

[0069] 제형 1의 PLGA/NGF 마이크로입자는 다음과 같이 제조되었다. 수율은 0.0088% (mg NGF/100 mg mp)의 이론적 양을 갖는 74.31%이다. NGF (50 μl), HSA (1.99 mg) 및 PEG400 (50 μl) (1:40:1 비, 부피/중량/부피)를 함유하는 100 μl의 수용액은, 17500 rpm으로 설정된 8G 프로브를 사용하여 Ultraturrax 균질화기 T25 Basic (IKA)에 의해 0.5 g의 중합체를 함유하는 에틸 아세테이트 중 2.5 ml의 20% 용액 PLGA 752H에서 1분 동안 유화시켰다. 얻어진 에멀젼 (A1/O)을 300 μl의 에틸 아세테이트와 혼합된 10 ml의 수용액 PVA 1% p/v (Mowiol® 40-88)에 빠르게 첨가하고, 12600 rpm에서 30분 동안 균질화시켰다. 생성된 이중 에멀젼 (A1/O/A2)을 500 rpm으로 설정된 RW20D (IKA) 로드 교반기를 사용하여 실온에서 3시간 동안 전자기 교반하에 두어 유기 용매의 증발 및 PLGA 입자의 침전을 촉진시켰다. 현탁액을 50 ml 튜브에서 수집하고 4℃에서 7000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다.

[0070] 단리된 마이크로입자를 50 ml의 MilliQ 물로 4회 세척하고, 원심분리 (7000 rpm, 4℃, 15분)한 다음, 3 ml의 2% w/v 트레알로스 수용액에 재현탁시켰다. 얻어진 현탁액을 2개의 이중 실리콘 유리 바이알로 옮기고, -80℃에서 동결시킨 다음, 24시간 동결건조 사이클로 처리하였다.

표 1

[0071] 마이크로입자 성분 - 제형 1

성분	양
rhNGF	0.0495 mg
PLGA 752H	2.5 ml
PEG 400	0.05 ml
HSA	1.99 mg
에틸 아세테이트	2.8 ml
폴리비닐 알코올 40-88	10 ml
트레할로스	3 ml

[0072] 제형 2

표 2

[0073] 마이크로입자 성분 - 제형 2

생성물	양			%
	부피 (mL)	중량 (mg)	밀도 (g/cm^3)	
NGF	0.15	0.129		
PLGA 752H 졸	7.5	1500		20
PEG 400	0.15	0.1689	1.126	
HSA		6.05		
에틸 아세테이트	8.4			
폴리비닐 알코올 40-88	30			1
트레할로스	9	180		2

[0074] 마이크로입자의 특징

[0075] 입자 크기 분포 (PSD) 3 μm ≤ PSD (0.5) ≤ 15 μm

[0076] 모폴로지 평활-표면 구형 입자

[0077] 캡슐화 효율 > 50% (약 65%)

[0078] 제어 방출 ≥ 50 gg (평균 20 ng/다이의 rhNGF)

[0079] 생물학적 활성 (효능) 70-130% (기준 물질의)

[0080] 제형 2의 제조 절차.

[0081] 0.0076% (mg rhNGF/100 mg mps)의 이론적 양을 갖는 PLGA/rhNGF 마이크로입자는 다음과 같은 방식으로 제조된다: 제형 완충액 (FB) (150 μl), HSA (6.01 mg), 및 PEG400 (150 μl) (비 1:40:1, v/w/v) 중 rhNGF 용액을 함유하는 300 μl 수용액은 8G 프로브로를 사용하여 균질화기인 Ultraturrax t25 basic (IKA)에 의해 1.5 g의 중합체를 함유하는 에틸 아세테이트 중 7.5 mL의 20% w/v PLGA 752H 용액 에서 17400 rpm에서 3분 동안 유화시켰다.

[0082] 얻어진 에멀젼 (W1/O)을 900 μl의 에틸 아세테이트와 도핑된 30 ml의 1% w/v PVA 수용액 (Mowiol® 40-88)에 빠르게 첨가하고, 12000 rpm에서 3분 동안 다시 균질화시켰다. 생성된 이중 에멀젼 (W1/O/W2)을 PTFE 코팅된 2-블레이드 프로펠러 교반기를 갖춘 오버헤드 교반기 RW20D (IKA)를 사용하여 실온에서 500 rpm으로 3시간 동안 교반하여 유기 용매 증발 및 PLGA 마이크로입자 침전을 허용하였다. 현탁액을 50 ml PP 튜브 (팔콘)에서 수집하고 4℃에서 7400 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 단리된 마이크로입자를 50 ml의 MilliQ 물로 6회 세척하고, 4℃에서 7000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 그 후, 마이크로입자를 2% w/v 트레할로스 수용액에 재현탁시켰다. 얻어진 현탁액을 ISO 6R 유리 타입의 실리콘화된 클래스 1 바이알로 이동시키고, -80℃에서 동

결시킨 후 동결건조시켰다.

[0083] 동일한 방식으로, rhNGF가 없는 마이크로입자 배치를 제조한다 (플라시보). rhNGF 용액 대신에, 상 W1에서 제형 완충액이 사용된다.

[0084] rhNGF 방출의 동력학에 대한 연구

[0085] 절차는 마이크로입자가 필요한 시간 (40-60gg)에 rhNGF를 방출하는 능력을 평가하고 mps 시스템에 의해 방출된 단백질을 결정하기 위해 사용되었다.

[0086] 절차

[0087] - 2 mL PP LoBind 단백질 튜브 (Eppendorf)에서 1 mL의 PBS pH 7.4 (Sigma-Aldrich) 중 10 mg의 마이크로입자를 현탁시킨다.

[0088] - 3초 동안 볼텍싱시킨다.

[0089] - 튜브를 회전시킨다 (7500 rpm - 7분 - 4℃).

[0090] - 비히클을 완전히 회수하고 새로운 배지로 초기 부피 (1 mL)를 회복한다.

[0091] - 입자를 재현탁한다.

[0092] - 오비탈 진탕 (80 rpm)하에 37℃에서 인큐베이터 진탕기에 튜브를 둔다.

[0093] - 즉시 분석하지 않는다면, 회수 샘플을 -20℃의 냉동고에서 유지한다.

[0094] 방출 동력학 조건 (특히 37℃에서) 때문에 손상될 수 있는 rhNGF의 물리-화학적 및 생물학적 특성을 더 잘 보존하기 위해 최대 3 내지 4일 내에 샘플을 회수하는 것이 중요하다.

[0095] ELISA에 의한 샘플 분석

[0096] 샘플을 ELISA로 분석하기 전에 제형 완충액으로 희석하여 NGF의 농도가 사용된 키트의 검출 범위 한계 (14-5000 pg/mL) 내에 있는지를 확인해야 한다. ELISA 분석에는 Raybiotech, Inc.에 의해 제공된 키트 RayBio® 인간 베타-NGF, cod. ELH-NGF가 사용된다.

[0097] 도 2 및 3은 제형 2를 사용한 rhNGF - MPS 시험관내 누적 및 매일 (ng/일)의 방출 프로파일을 나타낸다.

[0098] 1. 시험관내 실험

[0099] 달팽이관 배양은 난청을 감소시키거나 예방하는데 가능하게는 효과적인 화합물의 능력을 시험하기 위한 표준 모델을 나타낸다. 여기에 기술된 실험에서, 달팽이관을 갓 태어난 마우스 (5 내지 15일)에서 적출하고 젠타마이신 처리 (14시간 동안 50 μg/ml)로 손상시켰다. 이어서, rhNGF는 72시간 동안 상이한 농도 (6-50-100-300 ng/ml)로 사용되었다. 세포 생존은 Hoechst 염색으로 평가하였다.

[0100] 비처리된 세포 (NT), 손상된 및 비처리된 세포 (GNT) 및 비히클 처리된 세포를 대조군으로서 사용하였다.

[0101] 결과

[0102] 도 1에 보고된 바와 같이, 손상된 달팽이관의 rhNGF 처리는 통계학적으로 유의한 세포 생존 증가를 초래하였다.

[0103] 특히, 실험에서 얻어진 데이터는, 마우스의 달팽이관의 기관형 배양에서 젠타마이신 노출로 인한 손상 후 모발 세포 생존력 회복에 있어서 rhNGF 능력을 입증하였다.

[0104] 2. 기니 피그에서 고실경유 투여 후 rhNGF의 약동학

[0105] 고실경유 주사는 고막의 손상을 제한하기 위해 특정 내시경을 사용하여 마취 된 동물에 대해 수행되었다. 약물을 기니 피그의 왼쪽 중이에 투여하여 가열 패드 상의 오른편에 놓았다. 외림프액은 주사 후 0.5, 2, 4, 6 및 24시간 후에 수집하였다. 단일 정맥내 (iv) (1.2 mg/kg) 및 고실경유 (TT) (30 μg/mL) 투여 후 rhNGF의 약동학적 프로파일은 암컷 알비노 Hartley 기니 피그에서 연구하였다.

[0106] rhNGF를 식염수 완충액에 가용화하고 인공 외림프액에 희석시켜 최종 농도를 수득하였다.

[0107] 고실경유 주사는 고막의 손상을 제한하기 위해 특정 내시경을 사용하여 마취된 동물에 대해 수행하였다. 약물을 기니 피그의 왼쪽 중이에 투여하여 가열 패드 상의 오른편에 놓았다.

[0108] 5마리 기니 피그/시간으로부터 5 μL의 달팽이관 유체를 투여 후 0.5, 2, 4, 6 및 24시간 째에 수집하였다. rhNGF는 외림프액 (ELISA)에서 검출되었다.

[0109] 표 3에는 단일 i.v. 및 TT 투여 후 얻어진 rhNGF의 주요 약동학적 파라미터가 나타내져 있다.

표 3

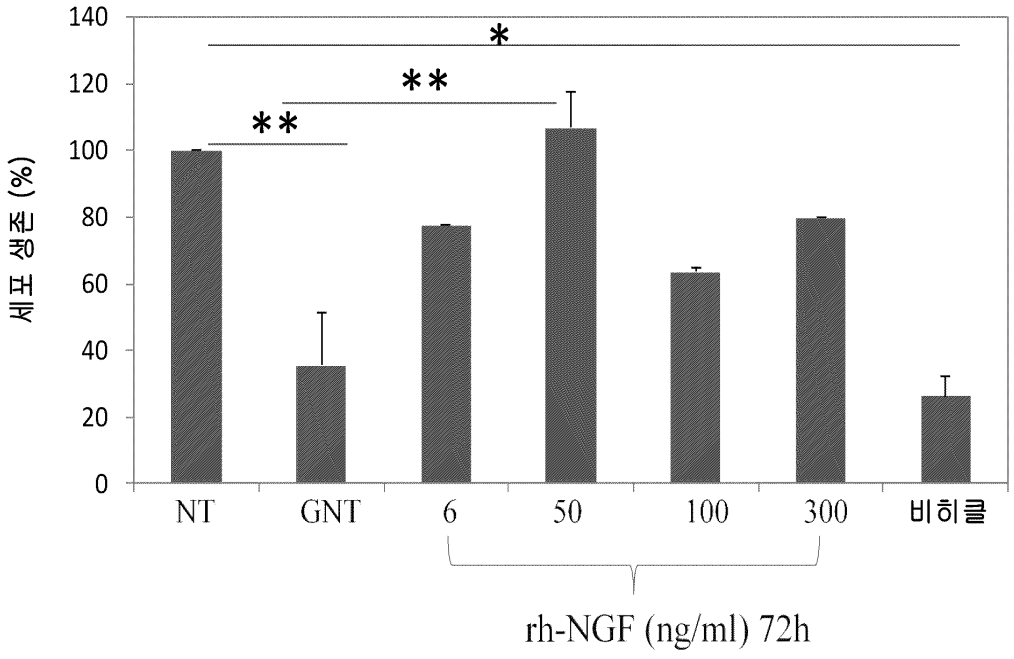
[0110] 단일 i.v. 및 TT 투여 후 rhNGF의 약동학적 파라미터

rhNGF	TT	i.v
DOSE	30 ㎍/mL	1.2mg/kg
Cmax (ng/mL)	711.927	17.3877
Tmax (h)	4	2
AUClast (㎍/mL*min)	305.595	11.4342
$T_{1/2}$ (h)	17.4846	10.1469

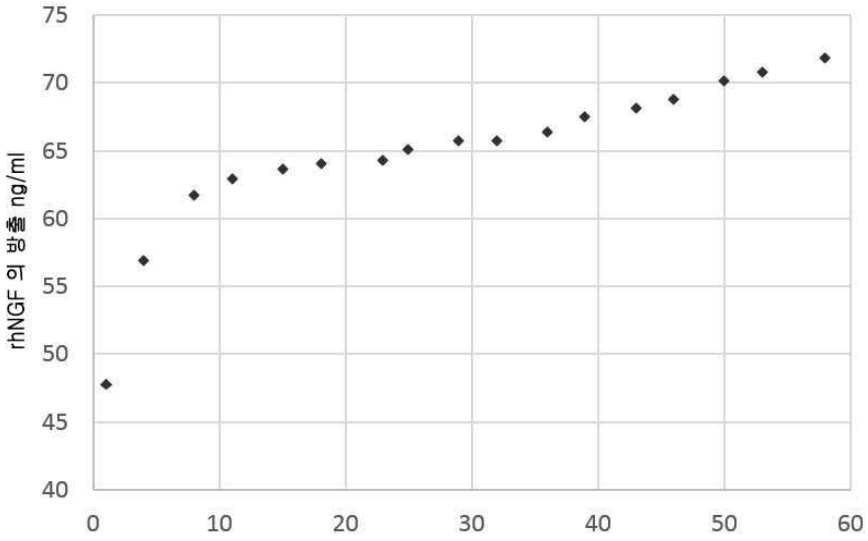
[0111] 이들 데이터는 고실경유 주사 (TT)가 i.v.보다 더 낫다는 것을 나타내는데, 이는 rhNGF 용량이 i.v. 투여에서보다 TT에서 40배 더 낮음에도 불구하고, $C_{최대}$가 40배 더 높고 AUC_{tot} (외림프액에 투여 후 약물의 최대 농도) (곡선 아래 면적은 약물 노출 24시간 후 각각 마지막 투여된 시간의 AUC 및 모든 투여된 시간의 AUC인 AUC 마지막 및 추가의 합으로 제시된 시간 경과에 따른 총 약물 노출을 나타낸다) (544,799 μg/mL*분)가 38배 더 높으며 $t_{1/2}$가 대략 2배 더 길기 때문이다.

도면

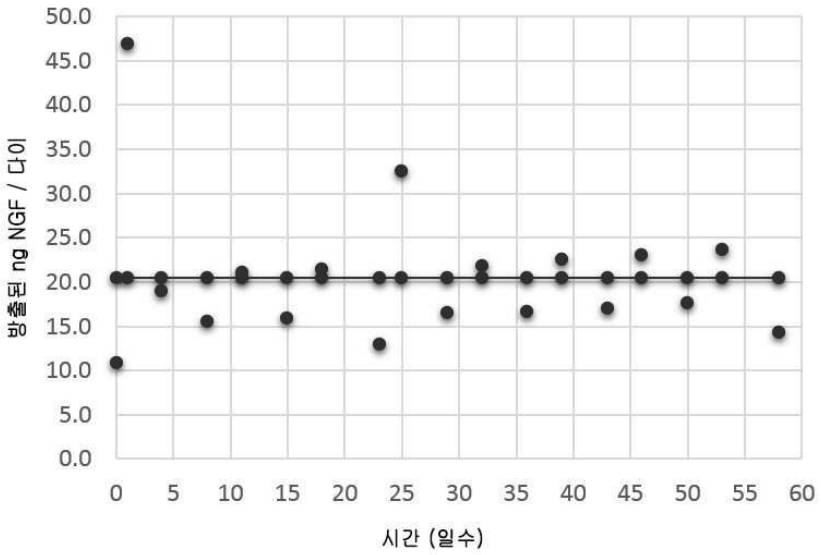
도면1



도면2


rhNGF 의 방출 ng/ml
75
70
65
60
55
50
45
40
0
10
20
30
40
50
60

도면3


방출된 ng NGF / 다이
50.0
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
시간 (일수)