



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0047802
(43) 공개일자 2023년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/00 (2006.01) A61K 31/573 (2021.01)
A61K 47/36 (2017.01) A61K 9/16 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/0046 (2013.01)
A61K 31/573 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0131088

(22) 출원일자 2021년10월01일
심사청구일자 2021년10월01일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

허강무

대전광역시 유성구 어은로 57, 131동 1503호(어은동, 한빛아파트)

김다해

대전광역시 동구 옷발5길 127 (판암동)

박용호

대전광역시 서구 둔산북로 175(둔산동, 햇님아파트), 6-902

(74) 대리인

특허법인 천지

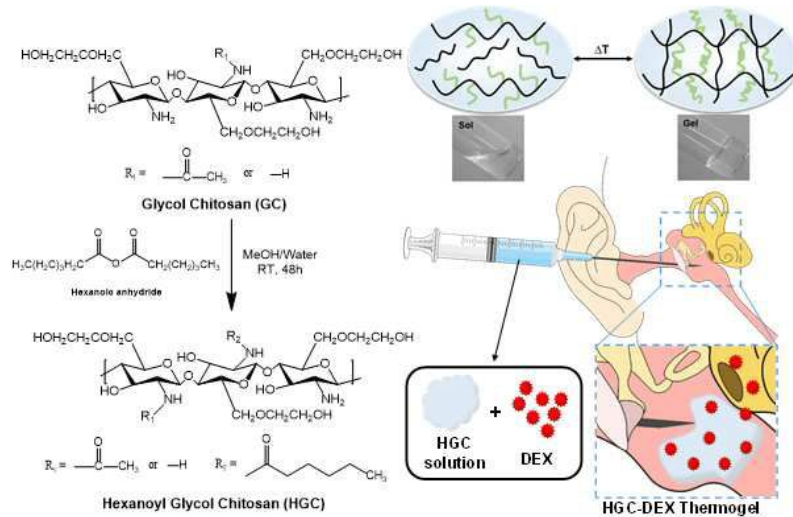
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 N-아실화된 글리콜 키토산을 포함하는 고실내 약물 제어 방출형 제형

(57) 요약

N-아실화된 글리콜 키토산은 양친매성을 가지므로 친수성 약물 및 소수성 약물을 모두 담지할 수 있고, 고실내에서 졸-겔 상전이가 일어남으로써 고실내 체류 시간을 증가시킬 수 있고, 부작용이 없으며, 약물의 종류 또는 농도에 따라 속방성 또는 서방성으로 약물을 방출할 수 있으므로 고실내 약물 전달 및 내이 질환 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/36 (2013.01)

A61K 9/1652 (2013.01)

A61P 27/16 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

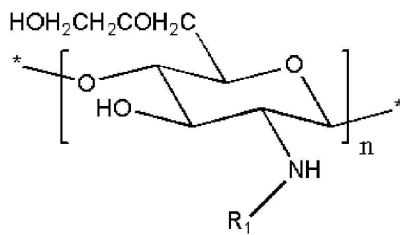
과제고유번호	1711130510
과제번호	2019M3E5D1A02068573
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명	청각기관에 효율적 약물전달을 위한 방출제어형 주입형 약물전달 제형 및 방법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 단위체가 중합된 중합체; 및 내이 질환 치료용 약물을 포함하고,
상기 중합체는 온도에 따라 졸-겔 상전이가 일어나며,
고실내 주사 투여로 내이 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물:
[화학식 1]



상기 화학식 1에서, R₁은 H 또는 탄소수 1 내지 10의 아실기이고,
상기 n은 10 내지 10000이다.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 R₁은 H, 아세틸기, 또는 헥사노일기인,
약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 중합체는 중합도(DP)가 200 내지 400인,
약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 졸-겔 상전이가 일어나는 온도는 30 내지 34℃인,
약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 중합체는 N-아세틸화 글리콜 키토산 단위체가 8 내지 10%, 및 N-헥사노일화 글리콜 키토산 단위체가 30 내지 40%, 및 잔부는 글리콜 키토산 단위체가 중합된 것인,
약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 내이 질환 치료용 조성물은 코르티코스테로이드 계열 약물인,
약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 친수성 약물은 속방성으로 방출하고, 소수성 약물은 서방성으로 방출하는 것인,
약학적 조성물.

청구항 8

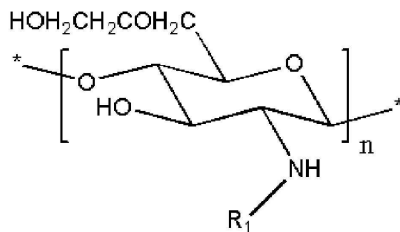
제1항에 있어서,
상기 내이 질환 치료용 약물은 약물 자체, 마이크로스피어에 담지된 형태, 또는 이들의 조합인,
약학적 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 단위체가 중합된 중합체; 및 이에 분산된 내이 질환 치료용 약물을 포함하는 약물 방출 조절형 제제로서,

상기 제제는 고실내 주사 후 졸-겔 상전이가 일어나는 제제:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, R₁은 H 또는 탄소수 1 내지 10의 아실기이고,

상기 n은 10 내지 10000이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 N-아실화된 글리콜 키토산을 포함하는 고실내 약물 제어 방출형 제형에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 내이 질환 치료를 위한 약물을 전신투여(systemic administration)하면 혈액-미로 장벽(blood-labyrinthine barrier)에 의해 내이로의 약물 전달이 효율적이지 않다. 또한 내이의 약물 농도를 달성 및 유지하기 위해 고용량으로 전신 투여하면 독성 및 부작용을 수반한다. 따라서 내이로 약물 전달은 국소 투여하는 것이 효율적이다.

[0003] 고실내 투여(intratympanic administration)는 약물을 고막 안쪽의 중이강(middle ear cavity) 또는 고실(tympanic cavity)로 불리우는 공간에 주사 투여하는 것으로, 널리 사용되는 내이로의 국소투여 방법이다. 고실내 투여는 전신 투여보다 내이로 약물을 더 효율적으로 전달하며 부작용이 더 낮다.

[0004] 고실내 투여된 약물은 원형창막(Round Window Membrane, RWM)을 통하여 내이로 확산됨으로써 전달된다. 따라서 내이로 약물을 효율적으로 전달하기 위해서는 약물이 원형창막과 높은 농도로 장시간 접촉해야 한다. 그러나 고

실내 투여에 의해 중이강(middle ear cavity)에 위치한 약물은 유스타키오관(Eustachian tube)을 통해 외부로 쉽게 배출되기 때문에 원형창막과 높은 농도로 장시간 접촉하기 어렵다. 따라서 중이강에서의 약물 체류(retention)를 연장하는 것이 내이로의 약물 전달을 향상시키기 위한 접근법으로 고려된다.

[0005] 열 가역적 졸-겔 전이 특성(thermo-reversible sol-gel transition properties)을 나타내는 써모겔(thermoge l)은 졸 상태로 주사할 수 있고 체내에서 겔화되므로 고실내 약물 전달에 적합하다. 써모겔은 졸 상태에서 약물과 혼합하여 약물을 담지할 수 있다. 약물과 혼합된 써모겔을 주사하면 체온에 의해 겔로 응고(solidified)된다. 대표적인 써모겔인 폴록사머(Poloxamer)는 내이로의 약물 전달을 위해 이용되었다. 그러나 폴록사머는 효과적인 열 겔화(thermogelation)를 위해 고농도(20 wt% 이상)가 필요하고, 생분해성 및 물리적 안전성이 충분하지 않으며, 부작용이 보고되었다.

[0006] 글리콜 키토산(Glycol chitosan, GC)은 키토산의 수용성 유도체로서 생체적합성, 생분해성, 및 중성 pH에서의 수용성 등 생체 재료로서 유망한 특성을 갖는다. 그러나 N-아실 글리콜 키토산과 약물을 혼합하여 고실내 투여 함으로써 내이로의 효율적 약물 전달이 가능한지, 그리고 부작용이 있는지 등은 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개공보 제10-2012-0020386호(2012.03.08)

발명의 내용

해결하려는 과제

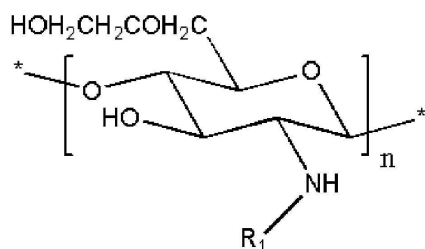
[0008] 일 구체예에 따르면 N-아실화된 글리콜 키토산을 포함하는 고실내 투여를 위한 내이 질환 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 일 구체예에 따르면 N-아실화된 글리콜 키토산을 포함하는 고실내 투여를 위한 제형을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은, 하기 화학식 1로 표시되는 단위체가 중합된 중합체; 및 내이 질환 치료용 약물을 포함하고, 온도에 따라 졸-겔 상전이가 일어나며, 고실내 주사 투여로 내이 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 상기 화학식 1에서, R₁은 H 또는 탄소수 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 또는 1 내지 6의 아실기이고, 상기 n은 10 내지 10000, 10 내지 9500, 10 내지 9000, 10 내지 8500, 10 내지 8000, 10 내지 7500, 10 내지 7000, 10 내지 6500, 10 내지 6000, 10 내지 5500, 10 내지 5000, 10 내지 4500, 10 내지 4000, 10 내지 3500, 10 내지 3000, 10 내지 2500, 10 내지 2000, 10 내지 1500, 10 내지 1000, 10 내지 900, 10 내지 800, 10 내지 700, 10 내지 600, 또는 10 내지 500이다.

[0014] 상기 아실기는 -(C=O)-알킬기일 수 있으며, 상기 아실기의 알킬기는 탄소수 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 또는 1 내지 6이며 직쇄 또는 분지쇄일 수 있다.

[0015] 일 실시예에 따르면, 상기 중합체는 상온에서 주사 투여가 가능한 졸 상태이며, 고실내 투여하면 체온에 의해 겔로 상전이가 일어나는 써모겔일 수 있다. 상기 중합체는 약물을 담지할 수 있는 약물 전달체이며, 중합체와

약물을 혼합하여 고실내 투여하면 약물을 담지한 겔로 상전이된다. 겔화된 약학적 조성물은 중이강에서의 체류 시간이 증가함으로써 약물과 원형창막과의 접촉 시간이 증가하고, 약물을 내이로 지속적으로 전달할 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 약학적 조성물을 고실내 투여하면 염증 반응 및 청각 유모 세포 손실 등의 부작용이 나타나지 않아 안전성이 높은 것으로 확인되었으며, 이러한 안전성은 기존에 알려진 바가 없다.

[0016] 또한 일 실시예에 따르면 상기 중합체는 친수성인 글리콜 키토산 백본과 소수성인 아실기(예를 들면 헥사노일기)가 포함되어 있으므로 친수성 약물 및 소수성 약물을 모두 담지할 수 있다.

[0017] 일 구체예에 따르면, 상기 R_1 은 H, 아세틸기, 또는 헥사노일기일 수 있다.

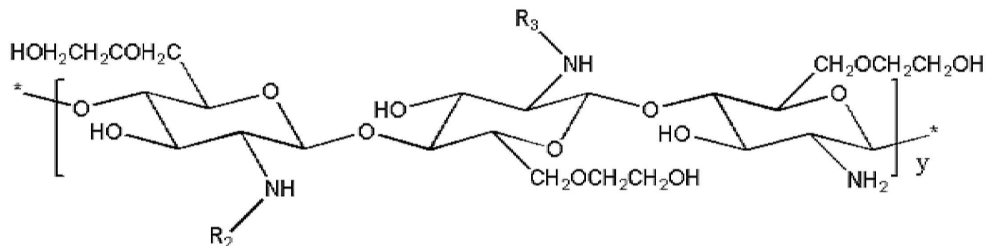
[0018] 일 구체예에 따르면, 상기 중합체는 중합도(DP)가 150 내지 400, 150 내지 350, 150 내지 300, 150 내지 250, 200 내지 400, 200 내지 350, 200 내지 300, 또는 200 내지 250일 수 있다.

[0019] 일 구체예에 따르면, 상기 졸-겔 상전이가 일어나는 온도는 30 내지 34℃, 30 내지 33℃, 30 내지 32℃, 31 내지 34℃, 31 내지 33℃, 31 내지 32℃, 32 내지 34℃, 또는 32 내지 33℃일 수 있다.

[0020] 일 구체예에 따르면, 상기 중합체는 N-아세틸화 글리콜 키토산 단위체가 8 내지 10%, 및 N-헥사노일화 글리콜 키토산 단위체가 30 내지 40%, 및 잔부는 글리콜 키토산 단위체가 중합된 것일 수 있다.

[0021] 일 구체예에 따르면, 상기 중합체는 하기 화학식 2로 표시되는 단위체로 이루어진 화합물일 수 있다.

[0022] [화학식 2]



[0023]

[0024] 상기 화학식 2에서 R_2 는 H또는 아세틸기($-CO-CH_3$)이고, R_3 는 헥사노일기($-CO-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)이고, 상기 y 는 10 내지 10000, 10 내지 9500, 10 내지 9000, 10 내지 8500, 10 내지 8000, 10 내지 7500, 10 내지 7000, 10 내지 6500, 10 내지 6000, 10 내지 5500, 10 내지 5000, 10 내지 4500, 10 내지 4000, 10 내지 3500, 10 내지 3000, 10 내지 2500, 10 내지 2000, 10 내지 1500, 10 내지 1000, 10 내지 900, 10 내지 800, 10 내지 700, 10 내지 600, 또는 10 내지 500 일 수 있다.

[0025] 일 구체예에 따르면, 상기 내이 질환 치료용 약물은 코르티코스테로이드 계열 약물일 수 있다.

[0026] 상기 코르티코스테로이드 계열 약물은 예를 들면 클로베타솔(clobetasol), 할로메타손(halometasone), 텍사메타손(dexamethasone), 디플로라손(Diflorasone), 플루오시노나이드(Fluocinonide), 할로베타솔(halobetasol), 암신노나이드(Amcinonide), 할로시노나이드(Halcinonide), 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 플루티카손(Fluticasone), 모메타손(Mometasone), 플루오시놀론(Fluocinolone), 데소나이드(Desonide), 프레드니손(Prednisone), 메틸프레드니솔론(Methylprednisolone), 프레드니솔론(Prednisolone), 이들의 수화물 또는 용매 화물, 또는 이들의 조합일 수 있으며, 일 실시예에 따르면 텍사메타손, 텍사메타손 포스페이트, 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0027] 상기 내이 질환 치료용 약물은 상기 중합체에 분산되어 있을 수 있다.

[0028] 일 구체예에 따르면, 상기 내이 질환 치료용 약물은 약물 자체, 마이크로스피어에 분산된 형태, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 조성물은 약물이 분산된 마이크로스피어와 중합체가 혼합되어 분산된 것이거나, 약물이 분산된 마이크로스피어, 약물 자체, 그리고 중합체가 혼합되어 분산된 것일 수 있다. 상기 마이크로스피어는 생체 적합성 및 생분해성 고분자로 이루어진 미세입자이며, 약물전달체의 기술분야에서 잘 알려져 있다. 상기 마이크로스피어를 이루는 물질은 생체 적합성 및 생분해성이 우수한 고분자라면 특별히 한정되는 것은 아니며, 예를 들면 상기 생체 적합성 고분자는 PLGA, PEG, PLA, PGA, PHA, 이들의 공중합체, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 마이크로스피어는 분자량 5000 내지 200,000의 생분해성 고분자로 이루어진 것일 수 있다. 상기 마이크로스피어의 직경은 10 내지 100 μm 일 수 있다.

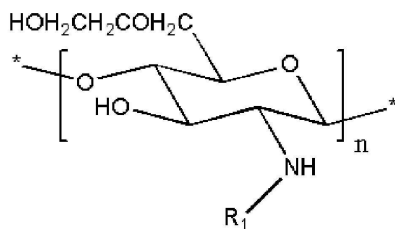
- [0029] 상기 약학적 조성물은 상기 중합체를 0.5 내지 4 중량%, 0.6 내지 4 중량%, 0.7 내지 4 중량%, 0.8 내지 4 중량%, 0.9 내지 4 중량%, 또는 1 내지 4 중량% 만큼 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 약학적 조성물은 고실내에서 30분 이상, 90분 이상, 3시간 이상, 1일 이상, 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이상, 7일 이상, 8일 이상, 9일 이상, 10일 이상, 11일 이상, 또는 12일 이상 잔류할 수 있다.
- [0031] 일 구체예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 고실내에서 친수성 약물을 속방성으로 방출하고, 소수성 약물을 서방성으로 방출하는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 속방성은 약물이 투여 후 즉시 방출되어 초기 효과가 빠르게 나타나도록 방출되는 특성을 의미하며, 상기 서방성은 약물이 서서히 지속적으로 방출되어 장시간 동안 유효 치료량 또는 유효농도를 유지할 수 있게 하는 특성을 의미한다. 상기 유효 치료량은 치료 개체에서 난청을 개선 또는 감소시키는데 유효한 양을 의미하며, 대상 개체의 중증도, 투여약물, 투여방법에 따라 달라질 수 있다.
- [0033] 상기 중합체와 상기 약물의 혼합 비율은 중량부 기준 4:0.5 내지 4:4, 4:1 내지 4:4, 4:1.5 내지 4:4, 4:2 내지 4:4, 4:2.5 내지 4:4, 4:3 내지 4:4, 4:3.5 내지 4:4, 4:0.5 내지 4:3.5, 4:1 내지 4:3.5, 4:1.5 내지 4:3.5, 4:2 내지 4:3.5, 4:2.5 내지 4:3.5, 4:3 내지 4:3.5, 4:0.5 내지 4:3, 4:1 내지 4:3, 4:1.5 내지 4:3, 4:2 내지 4:3, 4:2.5 내지 4:3, 4:0.5 내지 4:2.5, 4:1 내지 4:2.5, 4:1.5 내지 4:2.5, 4:2 내지 4:2.5, 4:0.5 내지 4:2, 4:1 내지 4:2, 4:1.5 내지 4:2, 4:0.5 내지 4:1.5, 4:1 내지 4:1.5, 또는 4:0.5 내지 4:1 일 수 있다.
- [0034] 상기 약물의 함량은 0.5 내지 4 중량%, 1 내지 4 중량%, 1.5 내지 4 중량%, 2 내지 4 중량%, 2.5 내지 4 중량%, 3 내지 4 중량%, 3.5 내지 4 중량%, 0.5 내지 3.5 중량%, 1 내지 3.5 중량%, 1.5 내지 3.5 중량%, 2 내지 3.5 중량%, 2.5 내지 3.5 중량%, 3 내지 3.5 중량%, 0.5 내지 3 중량%, 1 내지 3 중량%, 1.5 내지 3 중량%, 2 내지 3 중량%, 2.5 내지 3 중량%, 0.5 내지 2.5 중량%, 1 내지 2.5 중량%, 1.5 내지 2.5 중량%, 2 내지 2.5 중량%, 0.5 내지 2 중량%, 1 내지 2 중량%, 1.5 내지 2 중량%, 0.5 내지 1.5 중량%, 1 내지 1.5 중량%, 또는 0.5 내지 1 중량% 일 수 있다.
- [0035] 상기 약학적 조성물은 상기 약물을 30분 이상, 90분 이상, 3시간 이상, 1일 이상, 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이상, 7일 이상, 8일 이상, 9일 이상, 10일 이상, 11일 이상, 또는 12일 이상 지속 방출할 수 있다.
- [0036] 일 구체예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 담지된 약물의 농도에 따라 약물을 속방성 또는 서방성으로 방출하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 담지된 약물의 농도가 1.5 내지 4 중량%, 1.6 내지 4 중량%, 1.7 내지 4 중량%, 1.8 내지 4 중량%, 1.9 내지 4 중량%, 또는 2 내지 4 중량%이면 약물을 서방성으로 방출할 수 있고, 그 미만의 농도에서는 약물을 속방성으로 방출할 수 있다.
- [0037] 일 실시예의 시험관내 약물방출 실험결과에 따르면, 상기 약물을 0.5 중량% 또는 1 중량%로 담지한 약학적 조성물은 시험관내에서 약물이 속방성으로 방출되었으며, 상기 약물을 2 중량% 또는 4 중량%로 담지한 약학적 조성물은 시험관내에서 약물이 최대 14일 동안 서방성으로 방출되었다. (도 5 참고) 또한 일 실시예의 동물실험결과에 따르면, 상기 약물을 0.5 중량%로 담지한 약학적 조성물을 고실내 투여하면 1일 동안 지속적으로 약물을 방출하였다. 따라서 약물을 더 높은 농도로 담지한 약학적 조성물은 고실내에서 서방성 방출이 일어나 방출기간이 연장될 것으로 예상된다. (도 8 참고)
- [0038] 상기 내이 질환은 예를 들면 메니에르병; 감각신경성 난청; 해열제, 항암제, 항생제 등 약물에 의해 발생하는 이독성 난청; 소음성 난청; 노인성 난청; 이명; 전정 신경염; 청신경 종양; 이경화증; 외림프누공, 미로진탕, 및 측두골골절 등이 원인인 외상성 난청; 자가면역 내이 질환일 수 있으며, 상기 자가면역 내이 질환은 강직성 척추염, 전신 홍반성 루프스(SLE), 쇼그렌 증후군, 코칸병, 켈양성 대장염, 베케너 육아종증, 류마티스성 관절염, 경피증, 또는 베체트병이 원인인 것일 수 있다.
- [0039] 상기 고실내 투여는 고막내 투여로도 지칭할 수 있으며, 고막 뒤의 중이 또는 내이로 주사하는 방법이다. 상기 고실내 투여는 상기 조성물을 중이에 투여하여 원형창막과 접촉할 수 있도록 투여하는 것일 수 있다. 주사기, 펌프, 미세주입 장치, 스폰지재 등을 이용하여 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0040] 상기 약학적 조성물은 Na/K ATPase 조절인자, 화학요법제, 콜라겐, 감마-글로불린, 인터페론, 항균제, 항생제,

국소 작용 마취제, 혈소판 활성화 인자 길항제, 귀 보호제, 산화질소 합성효소 억제제, 현기증 억제제, 바소프레신 길항제, 항바이러스제, 제토제, 항-TNF제, 바소프레신 수용체 조절인자, 메토티렉세이트, 시클로포스파미드, 면역억제제, 마크롤라이드, 라타노프로스트, TNF 전환 효소 억제제, IKK 억제제, 글루타메이트 수용체 조절인자, 항-아포토시스제, 신경보호제, 탈리도마이드, c-jun 억제제 화합물, 히알루로니다제, 항산화제, IL-1 베타 조절 인자, ERR-베타 길항제, IGF-조절인자, Toll-유사 수용체, KCNQ 채널 조절인자, 뉴로트로핀 조절인자, ATOH 조절인자 또는 이의 조합을 더 포함할 수 있다.

[0041] 상기 약학적 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 담체, 부형제, 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유일 수 있으나 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0043] 다른 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 단위체가 중합된 중합체; 및 이에 분산된 내이 질환 치료용 약물을 포함하는 고실내 약물 방출 조절형 제제로서, 상기 제제는 고실내 주사 후 졸-겔 상전이가 일어나는 제제를 제공한다.

[0044] [화학식 1]



[0045]

[0046] 상기 화학식 1에서, R₁은 H 또는 탄소수 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 또는 1 내지 6의 아실기이고, 상기 n은 10 내지 10000, 10 내지 9500, 10 내지 9000, 10 내지 8500, 10 내지 8000, 10 내지 7500, 10 내지 7000, 10 내지 6500, 10 내지 6000, 10 내지 5500, 10 내지 5000, 10 내지 4500, 10 내지 4000, 10 내지 3500, 10 내지 3000, 10 내지 2500, 10 내지 2000, 10 내지 1500, 10 내지 1000, 10 내지 900, 10 내지 800, 10 내지 700, 10 내지 600, 또는 10 내지 500이다.

[0047] 상기 아실기는 -(C=O)-알킬기일 수 있으며, 상기 아실기의 알킬기는 탄소수 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 또는 1 내지 6이며 직쇄 또는 분지쇄일 수 있다.

[0048] 상기 약물 방출 조절은 고실 내에서 약물의 방출 속도 및 전달 속도를 조절하는 것을 의미한다.

[0049] 일 구체예에 따르면, 상기 R₁은 H, 아세틸기, 또는 헥사노일기일 수 있다.

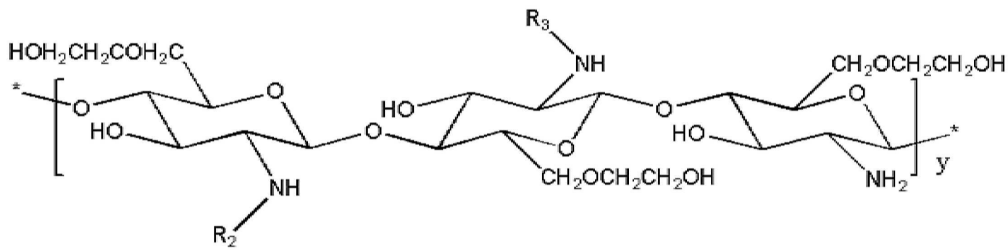
[0050] 일 구체예에 따르면, 상기 중합체는 중합도(DP)가 150 내지 400, 150 내지 350, 150 내지 300, 150 내지 250, 200 내지 400, 200 내지 350, 200 내지 300, 또는 200 내지 250일 수 있다.

[0051] 일 구체예에 따르면, 상기 졸-겔 상전이가 일어나는 온도는 30 내지 34℃, 30 내지 33℃, 30 내지 32℃, 31 내지 34℃, 31 내지 33℃, 31 내지 32℃, 32 내지 34℃, 또는 32 내지 33℃일 수 있다.

[0052] 일 구체예에 따르면, 상기 중합체는 N-아세틸화 글리콜 키토산 단위체가 8 내지 10%, 및 N-헥사노일화 글리콜 키토산 단위체가 30 내지 40%, 및 잔부는 글리콜 키토산 단위체가 중합된 것일 수 있다.

[0053] 일 구체예에 따르면, 상기 중합체는 하기 화학식 2로 표시되는 단위체로 이루어진 화합물일 수 있다.

[0054] [화학식 2]



[0055]

[0056] 상기 화학식 2에서 R₂는 H또는 아세틸기(-CO-CH₃)이고, R₃는 헥사노일기(-CO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)이고, 상기 y는 10 내지 10000, 10 내지 9500, 10 내지 9000, 10 내지 8500, 10 내지 8000, 10 내지 7500, 10 내지 7000, 10 내지 6500, 10 내지 6000, 10 내지 5500, 10 내지 5000, 10 내지 4500, 10 내지 4000, 10 내지 3500, 10 내지 3000, 10 내지 2500, 10 내지 2000, 10 내지 1500, 10 내지 1000, 10 내지 900, 10 내지 800, 10 내지 700, 10 내지 600, 또는 10 내지 500일 수 있다.

[0057] 일 구체예에 따르면, 상기 내이 질환 치료용 약물은 코르티코스테로이드 계열 약물일 수 있다.

[0058] 상기 제제는 주사용 제형일 수 있다.

[0059] 그 외 상기 제제에 대한 내용은 상기 약학적 조성물에 대한 내용을 참조하여 이해될 수 있다.

발명의 효과

[0061] 일 구체예에 따른 내이 질환 치료용 약학적 조성물은 고실내 투여시 부작용 없이 약물을 내이로 효과적으로 전달할 수 있다.

[0062] 일 구체예에 따른 약물 방출 조절형 제제는 고실내 투여시 부작용 없이 서방성 또는 속방성으로 약물을 전달할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 HGC 써모겔의 합성 방법, HGC의 열겔화 원래, 및 텍사메타손의 내이 전달을 위한 HGC와 텍사메타손 혼합물의 고실내 투여를 나타낸 개략도이다.

도 2는 GC 및 HGC의 ¹H-NMR (A), ATR-FTIR 스펙트럼 (B), HGC 농도에 따른 텍사메타손의 용해도를 나타낸 것이다.

도 3은 20℃ 및 37℃에서 GC, HGC, HGC-DSP, 및 HGC-DEX의 졸-겔 전이를 확인한 결과(A), 동결건조된 HGC, HGC-DSP, HGC-DEX 샘플의 FE-SEM 이미지(B)를 나타낸 것이다.

도 4는 (A) GC (B) HGC; (C) HGC-DSP0.5; (D) HGC-DEX0.5; (E) HGC-DSP1; (F) HGC-DEX1의 온도 의존적 유변학적 거동을 나타낸 것이다.

도 5는 DSP 농도 증가에 따른 DSP 및 HGC-DSP의 시험관내 약물 방출 프로파일(A) 및 DEX 농도 증가에 따른 DEX 및 HGC-DEX의 시험관내 약물 방출 프로파일(B)를 나타낸 것이다.

도 6은 HGC의 고실내 잔류안전성을 CT 및 T2 강조 MRI(T2-weighted MRI)로 분석한 결과이다.

도 7은 HGC의 고실내 투여의 유해효과를 H&E 염색에 의한 조직병리학적 분석(A) 및 전체 마운트 염색(B)으로 확인한 결과이다. (A)에서 좌측은 정상, 가운데는 식염수 주입 21일 후, 우측은 HGC 주입 21일 후 중이 점막의 단면 조직병리학적 소견(histopathologic finding)이다. 상단 스케일 바는 1000 μm이고 하단 스케일바는 50 μm이다. (B) HGC 주입 21일 후에 청각 상피의 전체 마운트(whole-mount)이다. 조직을 미오신-VIIa(빨간색), 로다민 팔로이딘(녹색)으로 염색하여 유모 세포(auditory hair cell)와 액틴을 시각화한 다음 병합(merge)했다. OHC는 외부 유모 세포(outer hair cell), IHC는 내부 유모 세포(inner hair cell)이고, 스케일 바는 50 μm이다.

도 8A는 DSP, HGC-DSP, 및 HGC-DEX를 고실내 주사한 군들의 외림프액(perilymph fluid)에서의 DEX(DSP) 농도를 확인한 결과이고, 도 8B는 DSP, HGC-DSP, HGC-DEX의 고실내 주사 후 30분 및 90분 경과한 시점에서 달팽이관 조직으로 흡수된 DEX(DSP)의 정량 분석결과이다.

도 9는 텍사메타손을 담지한 마이크로스피어의 SEM 이미지 및 광학 현미경 촬영 이미지를 나타낸 것이다.

도 10은 텍사메타손을 담지한 마이크로스피어가 분산된 HGC의 in vitro 약물 방출 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실험방법

1. 물질 준비

글리콜 키토산(GC, DP(Degree of polymerization)≥200, 아세틸화도 = $9.34 \pm 2.5\%$, $^1\text{H-NMR}$ 측정)은 Wako(일본)로부터 구입했다. 헥사노익산 무수물(Hexanoic anhydride, 97%)은 Sigma-Aldrich(USA)로부터 구입했다. 아세톤과 메탄올은 삼천화학(한국)에서 공급받았다. 투석막(MWCO=12~14kDa)은 Spectrum Laboratories(USA)로부터 구입했다. 중수(Deuterium oxide, D_2O) 및 Dulbeccos 인산염 완충 식염수(PBS)는 Sigma-Aldrich(미국)로부터 구입했다. 텍사메타손(Dexamethasone, DEX, micronized) 및 DEX 인산이나트륨염(DEX phosphate disodium salt, DSP)은 각각 Farmabios(이탈리아) 및 Steraloids(미국)으로부터 구입했다.

2. N-헥사노일 글리콜 키토산(HGC) 합성 및 특성분석(characterization)

HGC는 글리콜 키토산(GC)의 N-헥사노일화 반응에 의해 합성되었다. GC(3g) 및 헥사노익산 무수물(1.106 mL)을 물과 메탄올(50:50) 혼합용매 700 mL에 용해시키고 실온에서 24시간 자기 교반(magnetic stirring) 하였다. 반응 용액을 과량의 차가운 아세톤에 붓고 중합된 생성물인 HGC를 침전시켰다. 생성물을 투석막(molecular weight cut-off: 12-14 kDa)을 이용하여 2일 동안 증류수로 투석하여 HGC를 정제하고 동결건조하였다.

HGC의 화학적 조성은 AVANCE III 600 분광계(Bruker, Germany)를 사용하여 600MHz에서 $^1\text{H-NMR}$ 분광법으로 분석하였다. HGC 중합체 샘플을 D_2O 에 0.5 wt%로 용해시켰다. 4.85ppm의 D_2O 피크를 기준 피크로 설정했다. HGC의 화학적 조성은 Nicolet iS 5(Thermo Scientific, USA)를 사용한 ATR-FTIR 특성분석(characterization)으로 확인되었다. GC 및 HGC의 ATR-FTIR 스펙트럼은 4000 내지 750cm^{-1} 의 주파수 범위에서 4cm^{-1} 의 분해능으로 32회 스캔한 환경(circumstance)에서 기록되었다.

3. 용해도 시험(solubility test)

HGC 농도 변화에 따른 텍사메타손(DEX)의 수용해도 변화를 분석하였다. HGC(PBS, HGC Conc.= 0~4%,w/v) 수용액 3mL에 DEX를 과량 첨가하였다. 그 다음, 샘플을 30분 동안 교반하고 진탕 수조에서 24시간 동안 인큐베이션하였다(100rpm, 37°C). 모든 시료를 시린지 필터($0.8\mu\text{m}$)로 여과하여 침전물을 제거한 후 UV-visible spectrophotometer(V-730, JASCO, Korea)를 이용하여 분석하였다. DEX의 용해도 값은 242nm에서 얻은 다양한 DEX 농도의 표준 곡선을 사용하여 결정되었다. 테스트는 세 번 반복되었다.

4. 약물이 담지된 HGC 써모겔 준비

HGC 수용액(PBS, 4 wt%)을 DSP(친수성 형태의 DEX) 또는 DEX(소수성 형태의 DEX)와 단순히 물리적 혼합하여 약물이 로딩된 HGC 써모겔을 제조했다. 먼저, 40 mg의 HGC를 1mL의 PBS(pH 7.4)에 용해시키고 4°C 에서 냉장고에 보관하였다. DSP 또는 DEX(5 또는 10 mg)를 HGC 용액에 첨가하고 볼텍싱으로 혼합하여 0.5 또는 1.0 중량%의 약물 농도를 갖는 DSP 로딩된 HGC(HGC-DSP) 및 DEX 로딩된 HGC(HGC-DEX) 샘플을 얻었다.

- [0081] 5. 온도감응형 졸-겔 상전이 (Thermo-sensitive sol-gel transition)
- [0082] HGC 써모겔 제형의 졸-겔 전이 거동은 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 가열 속도로 틸팅 튜브 방법(tilting tube method)을 사용하여 관찰하였다. 졸-겔 전이 온도는 바이알을 기울인 후 1분 이내에 흐르지 않는 겔 상태를 나타내는 것으로 결정되었다. 실험은 세 번 수행되었다.
- [0084] 6. 유변학적 분석 (Rheological analysis)
- [0085] HGC 용액 및 약물이 로딩된 HGC 용액의 유변학적 분석은 MARS-40 레오미터(Thermo Scientific, Germany)를 사용하여 수행했다. GC, HGC, HGC-DSP 및 HGC-DEX 샘플의 수용액을 평행판(직경 60mm 및 갭 1mm) 사이에 놓았다. 주파수는 1Hz이고 10Pa의 일정한 응력(stress)이 측정에 사용되었다. 온도는 $0.05^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 의 가열 속도로 10°C 에서 45°C 로 증가하였다.
- [0087] 7. In Vitro 약물 방출
- [0088] 써모겔 제형의 시험관 내 약물 방출 프로파일을 투석막을 사용하여 PBS(pH 7.4)에서 시험했다. 약물 농도가 0.5 또는 1 중량%인 제조된 써모겔 제형(HGC-DSP 및 HGC-DEX)을 투석막 백(MWCO= 12~14 kDa, 폭: 10 mm)에 주입하였다. 그런 다음 투석백을 50 mL의 PBS에 담그고 37°C 및 100 rpm 이하 조건의 진탕 수조(SI-600R, Jeio Tech, Seoul, Korea)에서 인큐베이션하였다.
- [0089] 인큐베이션 후 10ml의 방출 배지(release medium)를 꺼내고 동일한 양의 새로운 배지를 다시 첨가하였다. 수집된 샘플을 UV-vis 측정으로 분석했다. DEX 방출 프로파일은 242 nm에서 DEX의 UV 흡광도를 측정하여 결정되었다. 실험은 세 번 수행되었으며 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시하였다.
- [0091] 8. 실험동물
- [0092] 모든 동물 실험은 충남대학교 동물실험위원회(202006A-CNU-085)의 승인을 받았다. 본 연구에는 체중이 각각 200 내지 250g인 98마리의 수컷 알비노 기니피그가 사용되었다. 20마리는 HGC 써모겔의 중이(middle ear) 주사 후 잔류 안정성을 분석하기 위해 각 주사 시점(1, 3, 7, 14 및 21일)에서 마이크로 컴퓨터 단층촬영(CT) 및 자기공명영상(MRI)을 실시하고 조직병리학적 분석을 실시하는데 이용되었다. 72마리의 동물을 HGC 써모겔의 중이(middle ear) 주사 후 각 시점(30분, 90분, 3시간, 1일, 3일 및 7일)에서 바깥림프(perilymph) 샘플링에 사용했다. 다른 6마리의 동물은 CT 및 T2-체중(N=4)에 대한 정상 대조군으로 사용되었고 조직병리학적 연구를 위해 21일째에(N=2) 식염수를 고실내(intratympanic) 주사 후 사용하였다.
- [0094] 9. 고실내 주사 (Intratympanic injection)
- [0095] 수술 전 동물을 alfaxan(15 mg/mL, Careside사) 및 Rumpun(23 mg/mL, Careside사)을 근육 주사(intramuscular injection)하여 마취시켰다. 또한 국소마취(local anesthesia)를 위해 1% 리도카인(lidocaine) 0.5ml를 후이부(postauricular area)에 피하주사하였다. 마취된 동물을 온도 조절된 가열 패드에 얹드린 자세로 두었다. 컷바퀴뒤(retro auricular)를 절개 후 측두골(temporal bone)을 노출시키고 외과용 현미경(Hitachi KP-D50 컬러 디지털 현미경 카메라에 연결된 Carl Zeiss OPMI f 170 Surgical Tilting Head)으로 원형창(round window) 막을 시각화했다. HGC-DSP 및 HGC-DEX 써모겔 제형(샘플 부피= $100\mu\text{L}$, 약물 농도= 5 mg/mL(0.5 중량%에 해당))을 26 게이지 바늘을 사용하여 고막에 투여했다. 주사 후 바늘을 조심스럽게 제거하고 치과용 시멘트(Durelon™ Carboxylate Luting Cement, 3M)를 해당 부위에 도포하고 피부 절개를 봉합하였다. 이 일련의 실험에서 어떤 동물도 희생되지 않았다.
- [0097] 10. 마이크로 컴퓨터 단층 촬영(Tomography): CT 및 T2 강조(CT and T2-weighted) MRI 영상
- [0098] 컴퓨터 단층촬영(CT) 및 T2 강조 자기공명영상(MRI)을 사용하여 주사 후 각 시점(1, 3, 7, 14 및 21일)에서 영

상 분석을 수행했다. CT 이미지는 Quantum GX2 micro-CT Imaging System(PerkinElmer, Waltham, MA, US)에서 획득했다. MR 이미지는 4.7 T BioSpec, 47/40 USR(Bruker Biospin, Germany)을 사용했다.

11. HGC 씨모젤의 고실내 주사 후 조직병리학적 분석(Histopathologic analysis)

고실내 투여된 HGC 씨모젤이 중이(middle ear)에 부정적인 영향을 미치는지 조사하기 위해, 식염수 또는 HGC 씨모젤을 고실내 주사하고 21일이 지난 동물로부터 달팽이관(cochlear)을 얻고, 중이 점막 조직(middle ear mucosa tissue)의 염증을 평가하였다. 달팽이관 샘플을 PBS 중 4% 파라포름알데히드에 2시간 동안 넣고, EDTA에서 3주 동안 탈회하고(decalcified), 파라핀 포매하고(embedded), 4 μ m 두께로 연속 섹션하고 헤모톡실린과 에오신으로 염색했다. 염색된 조직 절편을 검사하고 광학현미경(Olympus BX51)을 사용하여 대표적인 필드를 촬영했다.

달팽이관 조직(cochlear tissue)에서 DEX 흡수를 평가하기 위해, 동물을 수술 후 30분 또는 90분에 희생시켰다. 조직을 PBS에서 30분 동안 행구고 10% 일반 염소 혈청(normal goat serum)(Vector Laboratories, Inc.) 및 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich Co.) 용액에서 1시간 인큐베이션하여 비특이적 항체 결합을 차단하였다.

그 다음, 조직을 4°C에서 밤새 차단 용액하에서 1:200 농도의 토끼 항-DEX 1차 항체(Abcam, Cambridge, MA)로 염색하였다. PBS에서 1시간 동안 행군 후, 조직을 1:200 희석에서 상응하는 Alexa Fluor 594 염소 항-토끼 이차 항체(Molecular Probes, Eugene, OR)와 함께 인큐베이션하였다. 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 조직을 PBS에서 30분 동안 행구고 1:200 희석된 Hoechst 33342(Invitrogen)로 5분 동안 염색했다. 실온에서 배양한 후 조직을 PBS에서 30분 동안 행구고 Crystal Mount(Biomed)를 사용하여 유리 슬라이드에 장착했다. 달팽이관 조직에서의 약물 흡수는 형광현미경(BX53F2, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

달팽이관 유모 세포(cochlear hair cell)의 생존을 평가하기 위해 HGC 씨모젤을 고막내 주사한 후 21일째에 동물을 희생시켰다. 조직을 PBS 중 4% 파라포름알데히드에 4°C에서 30분 동안 고정했다. 달팽이관 골벽(cochlear bony wall)과 측벽(lateral wall) 조직을 제거한 후, 남은 달팽이관 조직을 면역염색하였다. 조직을 PBS에서 30분 동안 행구고 10% 일반 염소 혈청 및 0.3% Triton X-100이 포함된 PBS 용액에서 1시간 인큐베이션하여 비특이적 항체 결합을 차단하였다. 차단 후, 조직은 4°C에서 밤새 1:200 희석된 모노클로날 항-미오신 VIIa 1차 항체(Proteus BioSciences, Inc.)로 염색되었다. 조직을 PBS에서 60분 동안 행구었다. 행군 후 조직을 1:200 희석된 AlexaFluor 594 염소 항-마우스 이차 항체 및 AlexaFluor 488 Phalloidin 항체로 실온에서 2시간 인큐베이션하여 염색했다. 조직을 PBS에서 15분 동안 행구었다. 행군 후 Crystal Mount를 사용하여 유리 슬라이드에 조직을 장착했다. 조직은 형광현미경(BX53F2, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

12. 달팽이관 외림프(cochlear perilymph)의 약물 농도 측정

달팽이관 외림프 내 DEX의 농도를 평가하기 위해 DEX 담지 HGC 씨모젤을 고실내 주입 후 각 시점(30분, 90분, 3시간, 1일, 3일 및 7일)에서 외림프 샘플링을 수행하였다. 마취 하에 측두골(temporal bone)을 제거하고 고실수포(tympanic bulla)를 10ml 식염수로 세척했다. sharp pick으로 작은 정점 달팽이관 절개술(Small apical cochleostomy)을 수행하고 외림프(perilymph)를 매 4 μ l 부피로 표시된 결이형 눈금 유리 모세관(hang-held graduated glass capillary tubes, IntraMAPK micropipettes)에 수집했다. 달팽이관액(Cochlear fluid)과 DEX 표준시료를 인공외림프액(artificial perilymph)으로 1:11로 희석하고, 각각의 혼합물을 50% MeOH로 1:3으로 다시 희석하였다. 모든 샘플은 외림프의 DEX 농도를 LC-MS/MS로 측정하기 위해 UHPLC/Tandem 질량 분석기(QTRAP 6500 Low Mass BL210251506)가 있는 operator system(QTRAP 6500)을 사용하여 분석되었다. 샘플을 용매 A, 0.1% 포름산/DW, 및 용매 B, MeOH와 함께 C18 컬럼(Atlantis dC18 컬럼)에 주입했다. 유속은 0.3ml/min이었다. 날짜 스캔은 MRM(다중 반응 모니터링)으로 수행되었다.

13. 통계 분석

이미지 대비(contrast), 이미지 중첩(superimposition) 및 흑백 형광 이미지(monochrome fluorescence image)의 채색(colorization)의 조정은 Adobe Photoshop(버전 7.0)을 사용하여 수행했다. 데이터 그래프 및 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 6(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)에서 수행되었다. Two-way ANOVA는 DEX 농도 측정에 사용되었다. 모든 실험은 여러 번 반복되었다. 그룹 차이는 각 경우에 $p < 0.05$ 에서 유의미한 것으

로 간주되었다.

[0112] 이하 실시예에 따르면, N-아실 글리콜 키토산 기반 써모겔은 PEG-PPG 및 PEG-PLGA와 같은 블록 공중합체 기반 써모겔보다 물리적 안전성, 생체적합성, 생분해성, 열겔화, 및 기타 생체 기능 측면에서 내이에 주입하기에 더 우수한 특성을 가지고 있음이 입증되었다.

[0114] **실시예 1: HGC의 합성 및 특성분석(characterization)**

[0115] N-아실 글리콜 키토산 중에서 N-헥사노일 글리콜 키토산(HGC)는 체온에 반응하여 졸-겔 전이를 일으키고, N-헥사노일화의 정도(degree of hexanoylation, DH)를 변화시켜 물리화학적 특성 및 열겔화 특성을 수정할 수 있으므로 고실내 주사 투여에 적합한 약물 전달 플랫폼이 될 수 있다.

[0116] 글리콜 키토산(GC)를 N-헥사노일화(N-hexanoylation)시켜 N-헥사노일 글리콜 키토산(HGC)을 합성하고 내이 전달을 위한 주사 가능한 제형으로서 평가하였다. (도 1 참고) HGC의 합성 결과는 $^1\text{H-NMR}$ 및 ATR-FTIR 측정으로 특성화하였다.

[0117] 도 2A는 HGC와 GC에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 결과이다. 4.85 ppm의 D_2O 피크를 기준 피크로 설정하여 분석했다. 3.3 내지 4.0 ppm에서 나타나는 피크는 글루코피라노실(glucopyranosyl) 고리의 양성자(H-2 ~ H-8)에 해당하고, 2.7 ppm에서 나타나는 피크는 1차 아민 잔기의 양성자에 기인하며, 이들은 GC 및 HGC의 공통적인 피크이다. HGC의 특징적인 H 피크 중에서 0.8 ppm($-\text{CH}_3$)는 메틸 양성자에 해당하고, 1.3 ppm($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.6 ppm($-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.3 ppm($-\text{CO}-\text{CH}_2-$)는 헥사노일기의 메틸렌 양성자에 해당한다. 헥사노일화 정도는 글루코피라노실 고리와 헥사노일기의 양성자 피크의 적분값과 비교하여 약 36%로 계산되었다.

[0118] 도 2B는 HGC의 화학구조를 ATR-FTIR 분석으로 확인한 결과이다. 히드록시기의 신축 진동(stretching vibration)에 해당되는 넓은 피크가 3400 cm^{-1} 에서 나타나며, 이는 동일 영역의 N-H 신축진동과 중첩되었다. HGC의 특징적인 피크는 2890 cm^{-1} 에서 나타났는데, 이는 헥사노일 그룹의 메틸 및 메틸렌 그룹의 CH 신축 진동에 기인한다. GC의 아미노 굽힘 진동(bending vibration)에 의한 흡수 피크가 1596 cm^{-1} 에서 관찰된 반면, HGC는 각각 카르보닐 신축 진동 및 아마이드 II(amide II) 굽힘 진동에 해당하는 1655 cm^{-1} 및 1555 cm^{-1} 에서 흡수 피크가 관찰되었으며, 이는 GC의 N-헥사노일화 반응이 성공적으로 수행되었음을 나타낸다.

[0119] HGC 고분자는 친수성(hydrophilic) GC 백본과 소수성(hydrophobic) 헥사노일기로 구성되어 양친매성(amphiphilic)을 나타내므로 친수성 약물 및 소수성 약물 모두 담지할 수 있을 것으로 기대된다.

[0120] 이하 소수성 텍사메타손(DEX)에 대한 HGC의 가용화 효과를 평가했다.

[0121] 도 2C는 PBS에서 텍사메타손의 용해도를 HGC 농도(0 내지 4 wt%)의 함수로 나타낸 것이다. HGC의 농도가 0 wt%일 때 텍사메타손의 수용해도는 $64\text{ }\mu\text{g/ml}$ 이었다. HGC의 농도가 증가함에 따라 텍사메타손의 용해도가 증가하여, HGC가 4 wt%일 때 텍사메타손의 용해도는 $221\text{ }\mu\text{g/ml}$ (약 4배)로 증가하였다. 따라서 HGC 써모겔은 텍사메타손(DEX)의 수용해도를 향상시킴을 나타낸다.

[0123] **실시예 2: 약물이 담지된 써모겔(drug loaded thermogel) 제조**

[0124] 하기 표 1은 약물 담지 써모겔의 화학 조성을 나타낸 것이다.

표 1

Thermogel samples	Polymer Conc. (wt%)	Drug Conc. (wt%)	Sol-Gel transition ($^{\circ}\text{C}$)	
			$T_{\text{gel}}^{\text{a}}$	$T_{\text{gel}}^{\text{b}}$

HGC	4.0	–	32	30.7
HGC-DSP 0.5		0.5	30	27.3
HGC-DSP 1.0		1.0	25	22.0
HGC-DEX 0.5		0.5	30	29.7
HGC-DEX 1.0		1.0	27	25.6
a:The sol-gel transition temperature determined by tube tilting method				
b:The sol-gel transition temperature determined by rheological measurement				

[0126] 표 1에 나열된 바와 같이, 약물이 담지된 써모겔은 HGC 수용액 (4 wt%)과 DSP 또는 DEX (0.5 wt% 및 1.0 wt%)의 단순한 혼합으로 제조하였다.

[0127] DSP는 DEX의 친수성 형태이며 수성 용매 하에서 용해도가 높다. DSP는 HGC와 잘 혼합되어 투명한 HGC-DSP 혼합물이 준비되었다. (도 3A 참고)

[0128] 반면 DEX는 용해도가 낮기 때문에 HGC-DEX 혼합물은 투명하지 않았다. 그러나 겔화된 HGC-DEX의 동결건조 샘플 표면 및 단면의 FE-SEM 이미지에 따르면 마이크로화된 DEX 입자가 써모겔 매트릭스에 균일하게 분산되어 있는 것으로 관찰되었다.

[0129] 모든 HGC-DEX 써모겔은 약물 현탁액을 응집 또는 침전없이 안정적으로 유지하는 것으로 나타났다. 따라서 HGC는 양친매성을 가지고 소수성 약물을 효과적으로 분산시키므로 소수성 약물의 주사 제형으로서 사용될 수 있다.

[0131] 실시예 3: 열민감성 졸-겔 상전이(Thermo-sensitive sol-gel transition)

[0132] HGC, HGC-DSP, 및 HGC-DEX의 열민감성 졸-겔 상전이 거동을 튜브 틸팅 방법과 유변학적 분석을 통해 분석했다.

[0133] 도 3A는 20°C 및 37°C에서 GC, HGC, HGC-DSP 및 HGC DEX의 수용액(4wt%, PBS)의 이미지를 나타낸 것이다. GC에서는 상전이가 관찰되지 않았다. HGC 용액은 온도가 37°C로 증가함에 따라 유동성있는 졸 상태에서 비유동성 겔 상태로 뚜렷한 상전이를 나타냈다. HGC는 약 32°C에서 열겔화(thermogelation)을 나타내는 것으로 관찰되었다.

[0134] HGC-DSP 및 HGC-DEX의 졸-겔 전이는 친수성 DSP 또는 소수성 DEX의 존재가 HGC의 열겔화 거동에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 확인하기 위해 관찰되었다. HGC-DSP 및 HGC-DEX 모두 HGC보다 약간 더 낮은 겔화 온도를 보였고 약물의 농도가 증가함에 따라 겔화 온도는 감소하였다. 이는 DSP(DEX의 인산나트륨염 형태) 또는 소수성 DEX의 혼합이 핵노출기 간의 소수성 상호작용을 촉진했기 때문일 수 있다.

[0135] GC, HGC, HGC-DSP 및 HGC-DEX의 점탄성 특성(viscoelastic properties), 탄성(G' , elastic) 및 손실 계수(G'' , loss moduli)는 10 내지 45° C의 온도 범위에서 유변학적 실험으로 관찰되었다. G' 와 G'' 의 교차 온도(crossover temperature)는 졸-겔 상전이를 결정하기 위한 겔화점(gelation point)으로 정의되었다.

[0136] 그림 4에 따르면, GC 용액의 G' 값은 전체 온도 범위에 걸쳐 교차점이 나타나지 않고 G'' 값보다 지속적으로 낮았으며, 이는 GC 용액에서 열에 민감한 졸-겔 전이가 발생하지 않았음을 나타낸다. 그러나, HGC, HGC-DSP, HGC-DEX의 G' 값은 초기 온도에서 G'' 보다 낮았으나 온도가 증가함에 따라 급격히 증가하여 G' 값이 G'' 값보다 높아졌다. HGC-DSP 및 HGC-DEX의 경우 G' 및 G'' 값은 HGC보다 낮은 온도에서 교차하며 이는 이전 튜브 틸팅 방법의 결과와 일치한다.

[0138] 실시예 4: In vitro 방출 역학(release kinetics)

[0139] 친수성 DSP, 소수성 DEX, 이들이 로딩된 HGC-DSP 및 HGC-DEX에 대해 37° C의 PBS에서 시험관 내 약물 방출 테스트를 수행했다.

[0140] 도 5A에 따르면, DSP 및 HGC-DSP 제형은 약물 농도(0.5 또는 1.0wt%)에 관계없이 10시간 이내에 약물이 모두 방출되었다. HGC-DSP 써모겔은 DSP 보다 약간 지연된 방출을 보였지만 DSP가 수용성이 높은 저분자 약물이기 때문에 방출 속도를 지연시키는 데 효과적이지 않았다.

[0141] 한편, HGC-DEX 제형은 약물 농도(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 wt%)에 따라 4 일 내지 14 일 범위에서 다양한 약물 방출 프로파일을 나타냈다. HGC-DEX 0.5 및 HGC-DEX 1.0의 방출 속도는 방출 거동을 가속화할 수 있는 HGC 써모겔의 가용화 효과로 인해 유리된 DEX(free DEX) 형태보다 동일 농도 조건에서 더 빠른 방출속도를 나타냈다. 더 높은

약물 농도를 가진 HGC-DEX 2 및 HGC-DEX 4는 더 낮은 약물 농도를 가진 HGC-DEX 0.5 및 HGC-DEX 1.0 보다 서방성 거동을 나타냈는데, 이는 약물이 높은 농도로 담지되면 오히려 약물이 가용화되어 방출되는 데 더 많은 시간이 필요하기 때문일 수 있다. 상기 결과에 따르면, HGC 써모젤 제형은 필요에 따라 소수성 약물을 적절한 속도 및 용량으로 방출되도록 최적화될 수 있다.

[0143] **실시예 5: 고막내 잔류 안정성(Intratympanic residual stability) 평가**

[0144] HGC 써모젤은 중이강(middle ear cavity)에서 DEX의 잔류 안정성을 개선하여 내이에서 약물 흡수를 향상시킬 수 있다. 열결화가 유스타키오관(Eustachian tube)을 통한 약물의 조기 누출(early leakage)을 방지하고 체류 시간(residence time)을 연장할 수 있기 때문이다.

[0145] In vivo 실험에서, 먼저 CT 및 T2 강조 MRI(T2-weighted MRI)로 중이강에서 HGC 써모젤의 잔류 안정성을 평가했다. 도 6에 따르면, 고실내 주사한 HGC 써모젤은 기니피그의 중이강에 21일(3주) 이상 남아 있었다. 실험 결과에 따르면 HGC 기반 써모젤은 생체 내 체류 시간이 긴 장점이 있으며, 이에 담지된 약물이 원형창막과 접촉하는 시간이 증가하여 약물을 내이에 지속적으로 전달할 수 있는 장점이 있음을 알 수 있다.

[0147] **실시예 6: HGC의 안전성 평가**

[0148] 조직 병리학 분석(histopathological analysis) 및 청각 유모 세포(auditory hair cell)의 생존 관찰에 의해 HGC의 고실내 투여가 유해효과(adverse effect)를 미치는지 여부를 확인했다.

[0149] HGC의 고실내 투여 후 21일이 경과한 시점에 중이 및 내이의 조직학적 평가를 수행하였다. 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 사용하여 중이 점막(mucosa in the middle ear)의 염증을 검출했다. 도 7A의 H&E 염색 결과에 따르면, HGC 써모젤을 고실내 주입하고 21일이 경과한 군은 중이의 부종 및 섬유화를 포함한 점막의 염증 반응의 증거가 관찰되지 않았다.

[0150] 도 7B에 따르면, 내부 유모 세포(IHC) 및 외부 유모 세포(OHC)의 전체 마운트 염색(whole mount staining)에서 와우각의 모든 회전(all turns of the cochlea)에서 세포 손실 또는 사멸이 나타나지 않았다.

[0151] 상기 데이터는 HGC 써모젤이 중이 또는 내이에 대해 부작용이 없음을 시사한다. 실제로도 기니피그의 중이 점막에서 염증 반응 및 내이에서 청각 유모 세포의 손실이 관찰되지 않았다. HGC 써모젤의 고실내 주사 후 다음날 모든 기니피그는 롤링과 같은 병리학적 전정 행동(pathological vestibular behavior)을 나타내지 않고 정상적으로 활동하였다. 그러므로 HGC 써모젤은 고실내 주사하여도 급성 염증, 중이 섬유증 진행, 청력 변화 등 부작용이 없을 것으로 예상되며, 내이에 국소 약물 전달을 위한 안전한 수단이 될 수 있다.

[0153] **실시예 7: HGC 써모젤을 이용한 내이 약물 전달 효능 평가**

[0154] HGC-DEX를 고실내 투여하고 와우내 외림프(intracochlear perilymph)의 DEX 농도와 와우(cochlear) 조직의 DEX 분포의 변화를 관찰함으로써 HGC 써모젤 제형의 효과를 평가했다. 텍사메타손은 항염증 및 유모세포 보호 효과가 있고 내이 질환 치료에 가장 많이 사용되는 약물 중 하나이기 때문에 모델 약물로 선택되었다.

[0155] DSP 단독, HGC-DSP(DSP 0.5 중량%), 또는 HGC-DEX(DEX 0.5 중량%)를 고실내 주사하고 30분, 90분, 3시간, 1일, 3일 또는 7일이 경과한 후에, 달팽이관에서 외림프를 채취하고 액체 크로마토그래피/탠덤 질량 분광계(LC-MS/MS)를 사용하여 DEX 농도를 측정했다.

[0156] 도 8A에 따르면, DSP, HGC-DSP, 및 HGC-DEX를 고실내 주사한 군들은 주사 후 30분부터 외림프액(perilymph fluid)에서 유의한 DEX 농도가 검출되었다. DSP가 단독으로 포함된 수성 제형은 투여 후 30분 경과한 시점에 상대적으로 가장 높은 초기 농도를 보였으나, 90분 후에는 농도가 감소하였고, 3시간 후에는 DSP가 검출되지 않았다. 반면 써모젤 제형인 HGC-DSP 및 HGC-DEX는 모두 높은 약물 농도를 더 오랜 기간 동안 유지할 수 있었다. 특히, HGC-DEX 제형 투여군의 DEX 농도는 투여 후 90분에서 최고점에 도달하였으며 DSP 대조군보다 더 높은 것으로 나타났다. 또한 투여 후 1일이 경과한 시점에서도 상당한 DEX 농도가 검출되었다.

[0157] 도 8B의 면역조직화학 염색(immunohistochemical staining)의 강도분석 결과에 따르면, HGC-DEX 투여군은 DSP 단독 투여군 및 HGC-DSP 투여군에 비해 달팽이관 조직으로의 약물 흡수가 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는

소수성 약물을 담지한 HGC 씨모겔 제형이 달팽이관 조직으로의 약물 흡수를 크게 향상시킬 수 있음을 나타낸다. DSP 단독 제형은 초기 흡수가 높을 수 있으나 유스타키오관을 통해 신속히 배출되므로 지속시간이 매우 짧다. 대조적으로 씨모겔 제형은 더 오랜 시간 내이강에서 겔 상태로 머무를 수 있으며, 원형창막(RWM)과 접촉할 수 있는 시간이 더 길어서 내이로의 약물 전달 효율을 높일 수 있다. 다만 상기 동물실험 결과는 약물의 흡수를 측정하는 것으로, 흡수량은 방출된 약물의 특성 및 흡수 시간에 따라 달라지므로 약물 방출 속도와 흡수량이 반드시 일치하는 것은 아니다. 즉 상기 흡수량은 고실내 약물의 서방성 방출이 가능함을 시사하나, 서방성 방출의 속도를 직접적으로 나타내는 것은 아니다.

[0158] 앞서 In vitro 약물 방출 테스트에 따르면 HGC-DEX 씨모겔은 약물 방출 속도가 약물 농도에 의존적이었으며, 담지된 약물 농도가 높을수록 방출속도가 오히려 느려졌다. 따라서 약물 농도가 더 높은 HGC 씨모겔 제형을 사용하면 더 오랜 시간 동안 유효 약물 농도를 유지할 수 있을 것이다. 따라서 HGC 씨모겔 제형은 내이로의 국소 약물 전달을 위한 효과적이고 유용한 수단이 될 수 있다.

[0160] 상기 실험결과들에 따르면, HGC 기반 씨모겔은 소수성 약물(예를 들면 텍사메타손) 및 친수성 약물(예를 들면 텍사메타손 포스페이트 이나트륨염(Dexamethasone phosphate disodium salt, DSP) 모두를 담지할 수 있는 고실내 주사 가능한 약물 전달 플랫폼임이 확인되었다. HGC 기반 씨모겔은 졸 상태에서 약물과 물리적으로 혼합하는 간단한 방법으로 약물을 담지할 수 있으며, 특히 소수성 약물 (DEX)를 효과적으로 분산 및 가용화시켰다. 동물 실험 결과에 따르면, HGC 씨모겔은 중이 및 내이강에서 유의한 세포 독성이나 염증없이 최대 21일까지 유지되었으므로, 잔류 안전성이 우수하여 내이에서 약물 농도를 오랜 시간 높은 수준으로 유지하기에 적합함을 확인하였다. 또한 HGC 씨모겔 제형은 약물 유형 및 농도에 따라 다양한 방출 역학(versatile release kinetics)을 나타냈다. In vitro 약물 방출 실험에 따르면, HGC 씨모겔은 약물을 0.5 중량% 또는 1.0 중량% 담지하면 약물을 속방성으로 방출하였으며, 약물을 2 중량% 또는 4 중량% 담지하면 약물을 2주 동안 지속적으로 방출할 수 있었다. 또한 약물을 0.5 중량% 담지한 HGC 씨모겔은 고실내 투여 실험결과 1일간 약물을 방출하였다.

[0161] HGC 씨모겔은 In vitro 약물 방출 실험에서 약물의 농도에 따라 속방성 또는 서방성 방출이 일어남을 확인하였으므로, 약물의 농도에 따라 고실내 서방성 방출이 가능할 것으로 예상된다. 따라서 HGC 씨모겔은 효과적이고 안전한 내이 약물 전달 플랫폼으로써 큰 잠재력을 가지고 있음이 확인되었다.

[0163] 실시예 8: 약물을 담지한 마이크로스피어를 포함하는 HGC 씨모겔

[0164] 생체적합성 및 생분해성이 우수한 고분자로 제작된 약물 담지 마이크로스피어는 약물의 서방성 방출에 이용될 수 있다. 그러나 마이크로스피어는 고실내 주사하여도 다른 부위로 쉽게 이동할 수 있으므로 고실내에서 머무르면서 지속적으로 약물을 전달하기 어려운 단점이 있다.

[0165] 이를 보완하기 위해 텍사메타손을 담지한 마이크로스피어가 분산된 HGC 씨모겔을 제작하고 이의 in vitro 약물 방출 속도를 측정하였다.

[0167] 제형화 방법, 약물함량, 입자크기 측면에서 차이가 있는 4가지 마이크로스피어(GB-5313-023, GB-5313-061, GB-5313-062, GB-5313-075)를 준비하였다. (이하 023, 061, 062, 075로 지칭한다) 이들의 조성은 하기 표 2 및 표 3과 같다.

표 2

	GB-5313-023/061/075	GB-5313-062
고분자	RESOMER RG502H	RESOMER RG503H
조성(LA:GA)	50:50	50:50
분자량(g/mol)	13,000~15,000	24,000~38,000

표 3

Lot No.	제형화 방법	고분자	약물함량 (중량%)	입자크기 (D50, μm)
GB-5313-023	O/W	502H	14.8	27.04
GB-5313-061	S/O/W	502H	24.4	31.78
GB-5313-062	S/O/W	503H	12.5	33.28
GB-5313-075	O/W	502H	16.4	21.88

상기 입자크기(D50)는 입자 50%의 평균 직경을 의미한다.

상기 S/O/W는 Solid-in-Oil-in-Water Emulsion으로써, 각각 061 또는 062로 캡슐화된 고체 약물(S)을 폴리머/오일상(O)에 첨가하고, 물을 가하여 에멀전화시켜 제조한 것이다. 상기 O/W는 캡슐화되지 않은 고체 약물을 폴리머/오일상(O)에 첨가하고, 물을 가하여 에멀전화시켜 제조한 것이다.

상기 061은 023 대비 약물 함량이 높아 약물 방출이 빠를 것으로 예상되는 제형이다. 상기 062는 023 대비 높은 분자량을 가지는 503H 고분자를 사용하여 방출이 느릴 것으로 예상되는 제형이다. 상기 075는 023과 동일 조건으로 제조한 제형으로 입자크기가 더 작은 점에서 차이가 있다. 제작된 마이크로스피어는 도 9에 나타내었다.

In vitro 약물 방출 테스트는 다음과 같이 진행하였다.

텍사메타손을 담지한 023 마이크로스피어를 HGC 하이드로겔 4wt%와 혼합하였다. 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 PBS(pH 7.4, 50ml) 환경에서 in vitro 약물 방출 테스트를 수행하였다. 샘플링은 0, 0.5, 1, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 30 Day 간격으로 수행했다. 투석막의 두께는 10 mm이고, MWCO는 12 내지 14 kDa이었다. 023 마이크로스피어 등의 in vitro 약물 방출 테스트 조건은 하기 표 4와 같다.

표 4

Sample	HGC (mg)	Drug (mg)	Microsphere (mg)	Total drug (mg)	Sample volume (ml)
Free DEX	-	5	-	5	1
HGC + DEX	40	5	-		
023 + HGC	40	-	33.78 (약물 5 mg 기준)		
023 + DEX + HGC	40	2.5	16.89 (약물 2.5 mg 기준)		
023	-	-	33.78 (약물 5 mg 기준)		

텍사메타손을 담지한 061 또는 062 마이크로스피어를 HGC 하이드로겔 4wt%와 혼합하고, 상기 023 실험과 동일한 방법으로 in vitro 약물방출 실험을 수행하였다. 061 마이크로스피어 등의 in vitro 약물 방출 테스트 조건은 하기 표 5와 같다.

표 5

Sample	HGC (mg)	Drug (mg)	Microsphere (mg)	Total drug (mg)	Sample volume (ml)
061	-	-	20.5 (약물 5 mg)	5	1
061 + HGC	40	-	20.5 (약물 5 mg)		
061 + DEX + HGC	40	2.5	10.25 (약물 2.5 mg)		
062	-	-	40 (약물 5 mg)		
Free DEX	-	5	-		

도 10A에 따르면, 023+HGC(023 마이크로스피어(DEX 담지)가 분산된 HGC)는 HGC+DEX 또는 023+HGC+DEX(DEX 담지 023과 DEX자체가 분산된 HGC)보다 방출이 지연되었다. 023+HGC+DEX의 경우 초기 2일까지 속방성 방출이 일어나

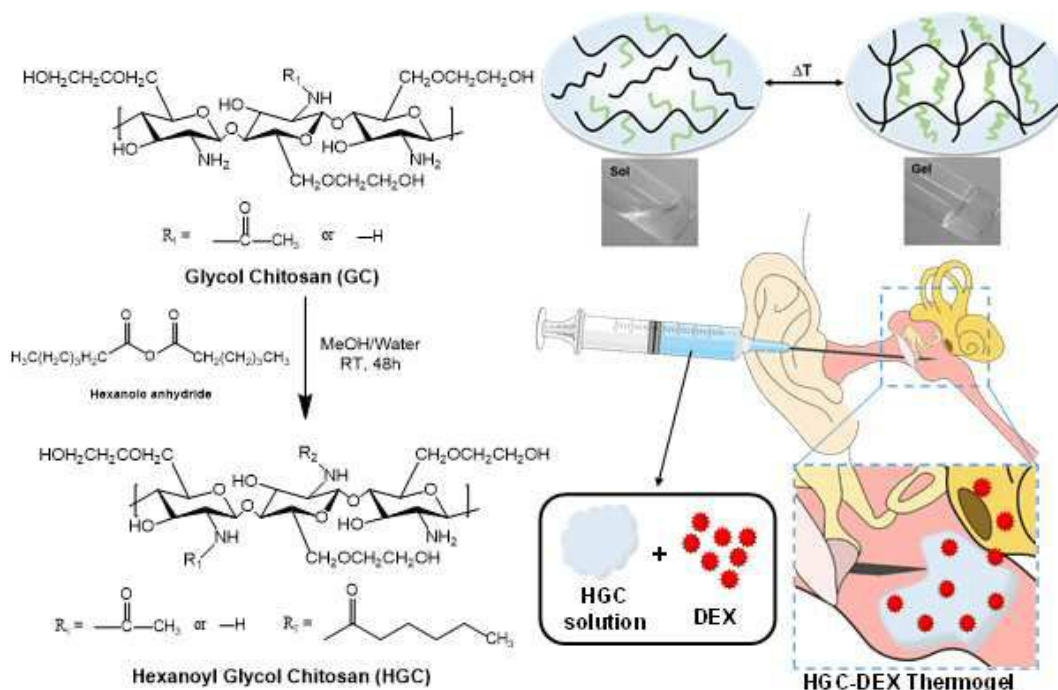
다가 3일째부터 방출속도가 느려지면서 20일 이상 지속방출되었는데, 이는 HGC에 담지된 DEX는 HGC의 가용화 효과로 속방성 방출이 일어나며, 023에 담지된 DEX는 서방성으로 지속방출된 결과에 따른 것이다. 이러한 약물 방출 특성은 초기 속방성 방출 및 지속 방출의 조합이 필요한 환자에게 유용할 수 있다.

[0180] 도 10B에 따르면, 061 마이크로스피어(DEX 담지)가 분산된 HGC(061+HGC)는 서방성 방출이 일어났으며, 061+HGC+DEX 또한 2일까지 속방성 방출이 일어나다가 3일째부터 방출속도가 느려지면서 20일 이상 지속방출되었는데, 이 또한 앞서 설명한 바와 같다.

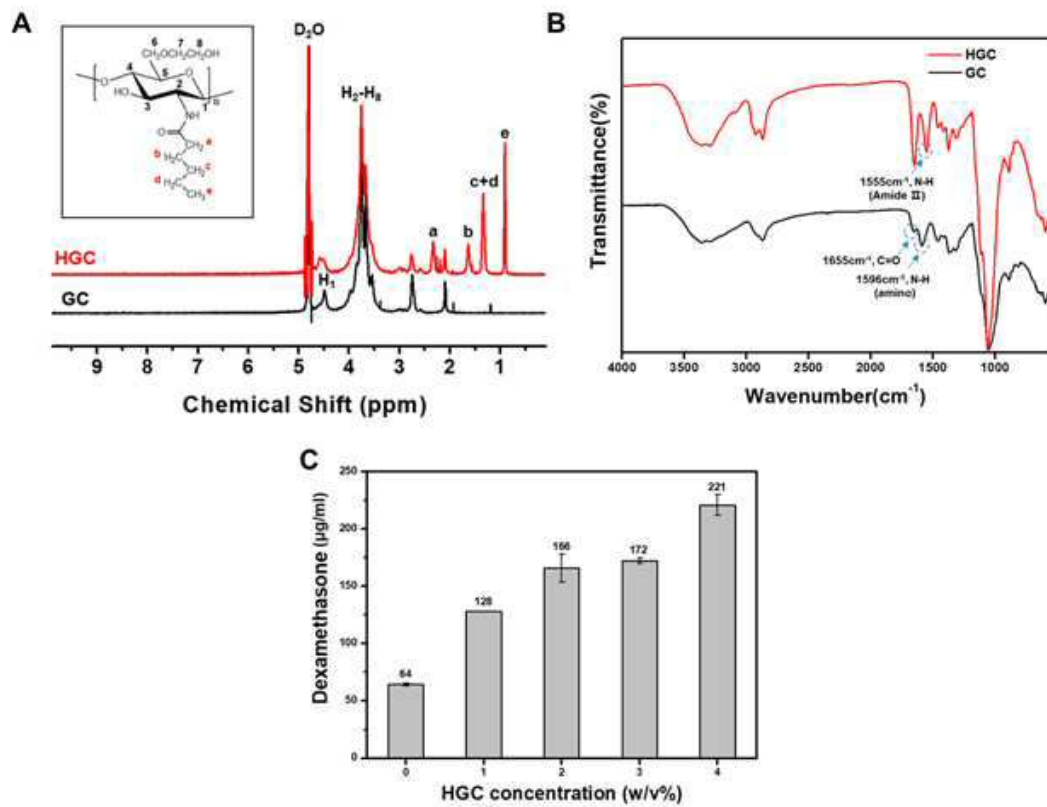
[0181] 상기 실험결과에 따르면, HGC에 담지된 DEX는 HGC의 가용화 효과로 인해 방출이 촉진될 수 있고, DEX는 생체적 합성 고분자로 제작된 마이크로스피어에 담지됨으로써 지속 방출될 수 있으며, HGC에 DEX 및 마이크로스피어에 담지된 DEX가 모두 혼합되면 초기에는 높은 방출이 일어남과 동시에 장기간 지속방출도 일어날 수 있다. 또한 HGC는 고실내 주입시 체온에 의해 겔화됨으로써 약물이 다른 곳으로 이동하는 것을 억제하므로, HGC에 약물, 마이크로스피어에 담지된 약물, 또는 이들의 조합을 적절히 선택하여 혼합함으로써 목적하는 약물방출 특성을 달성할 수 있다.

도면

도면1



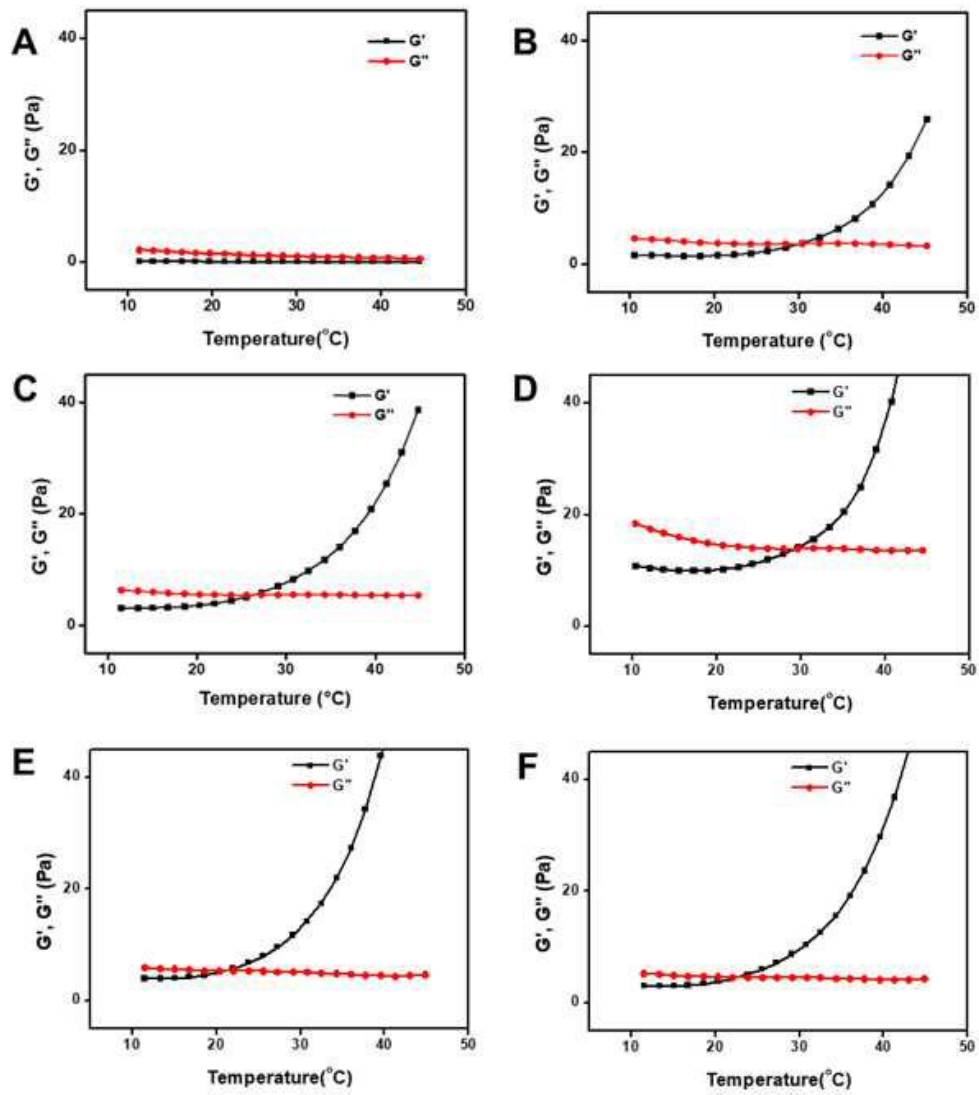
도면2



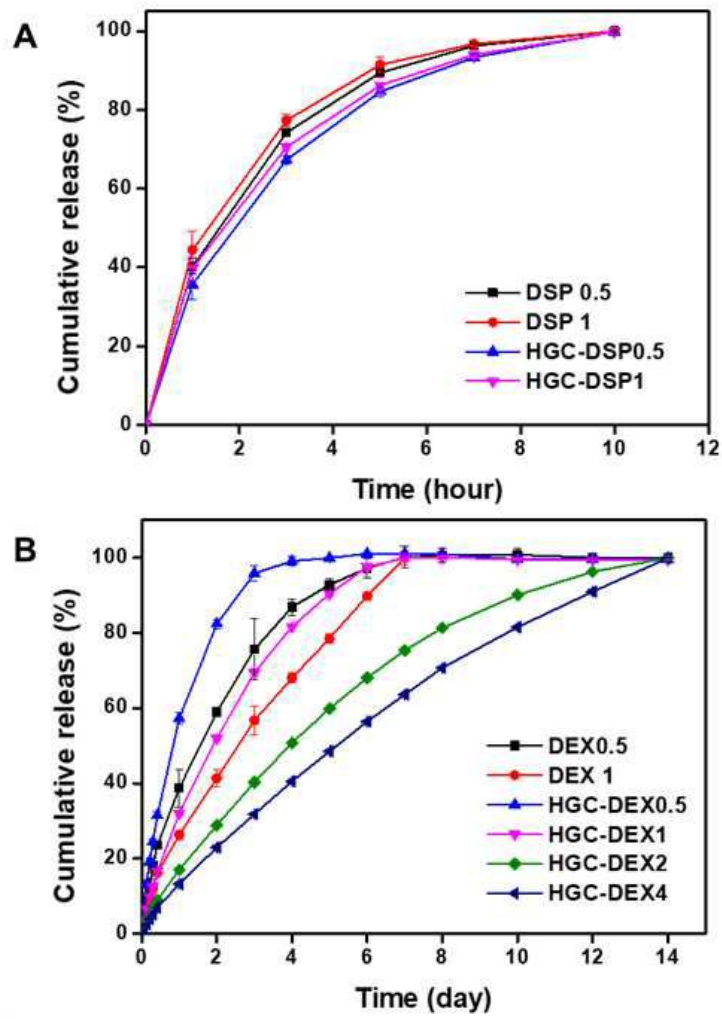
도면3



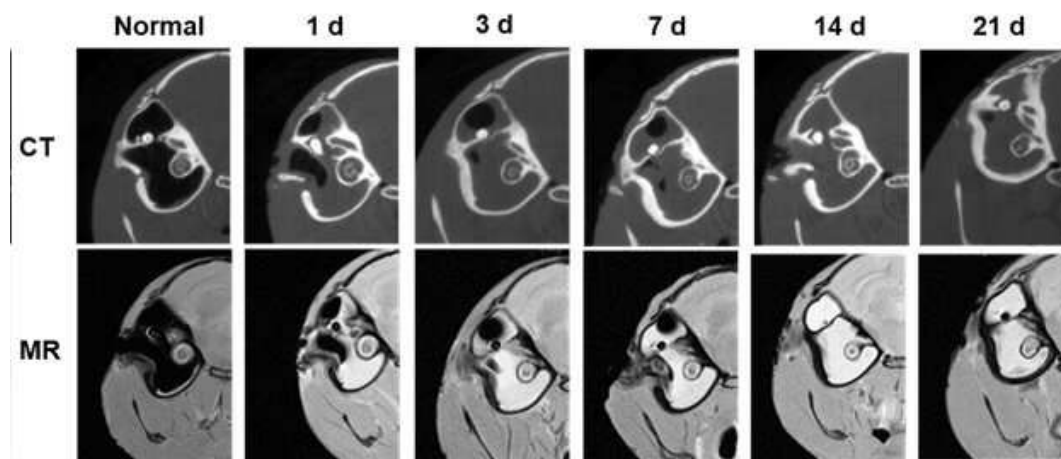
도면4



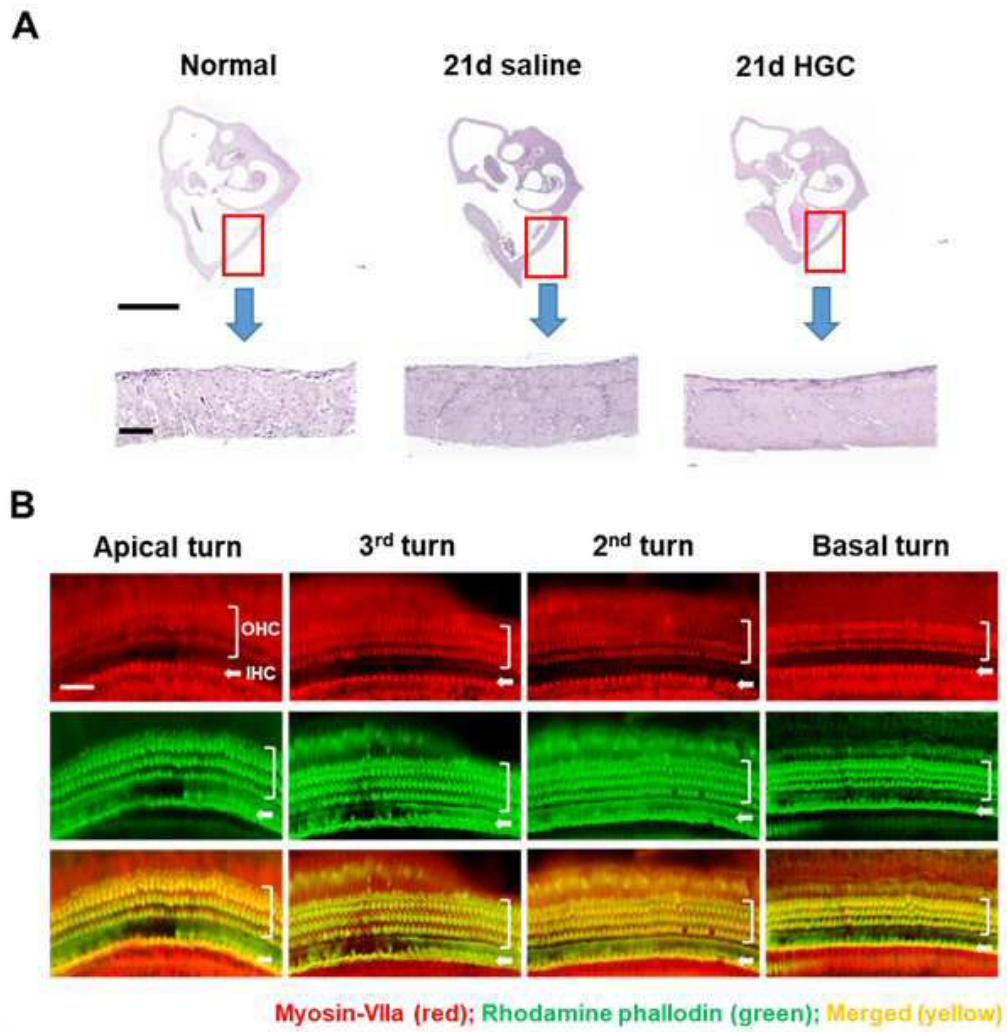
도면5



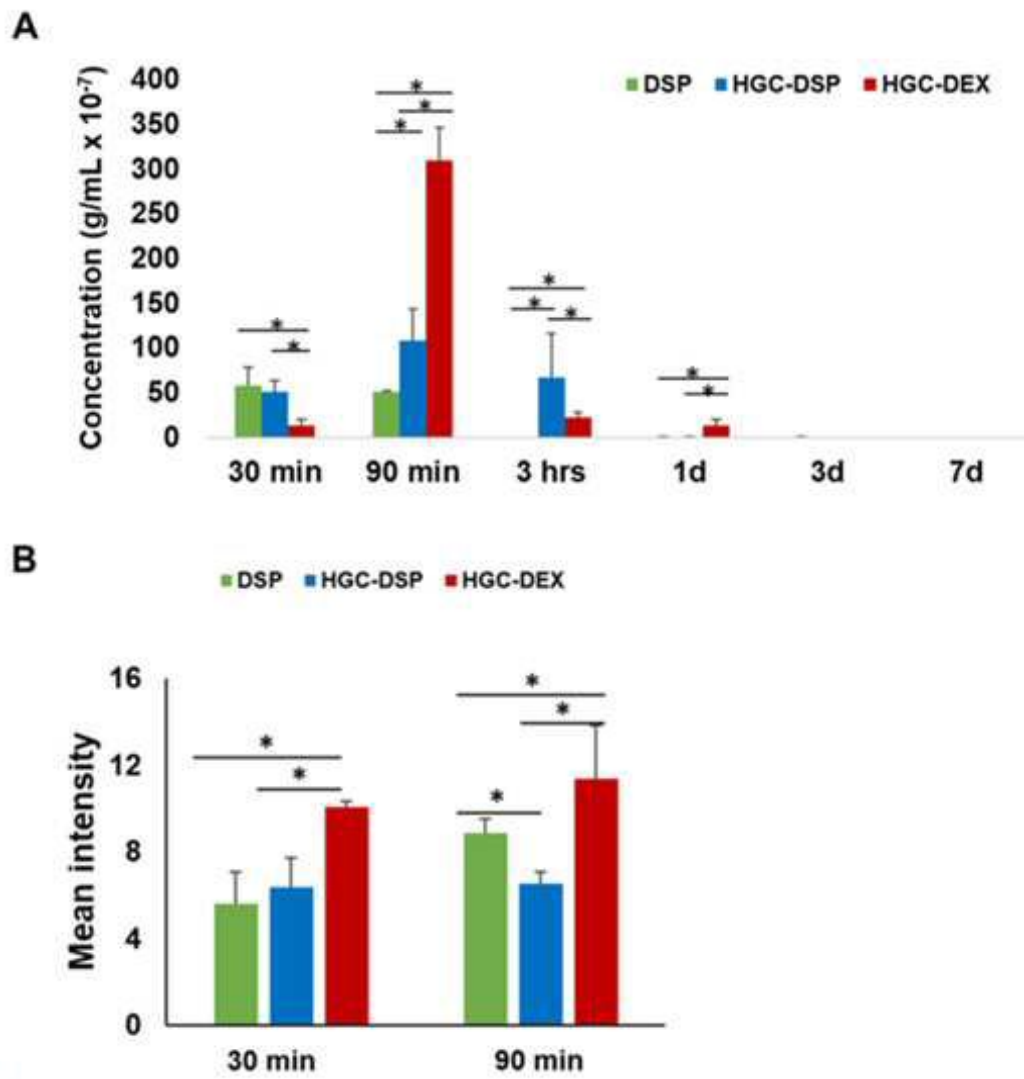
도면6



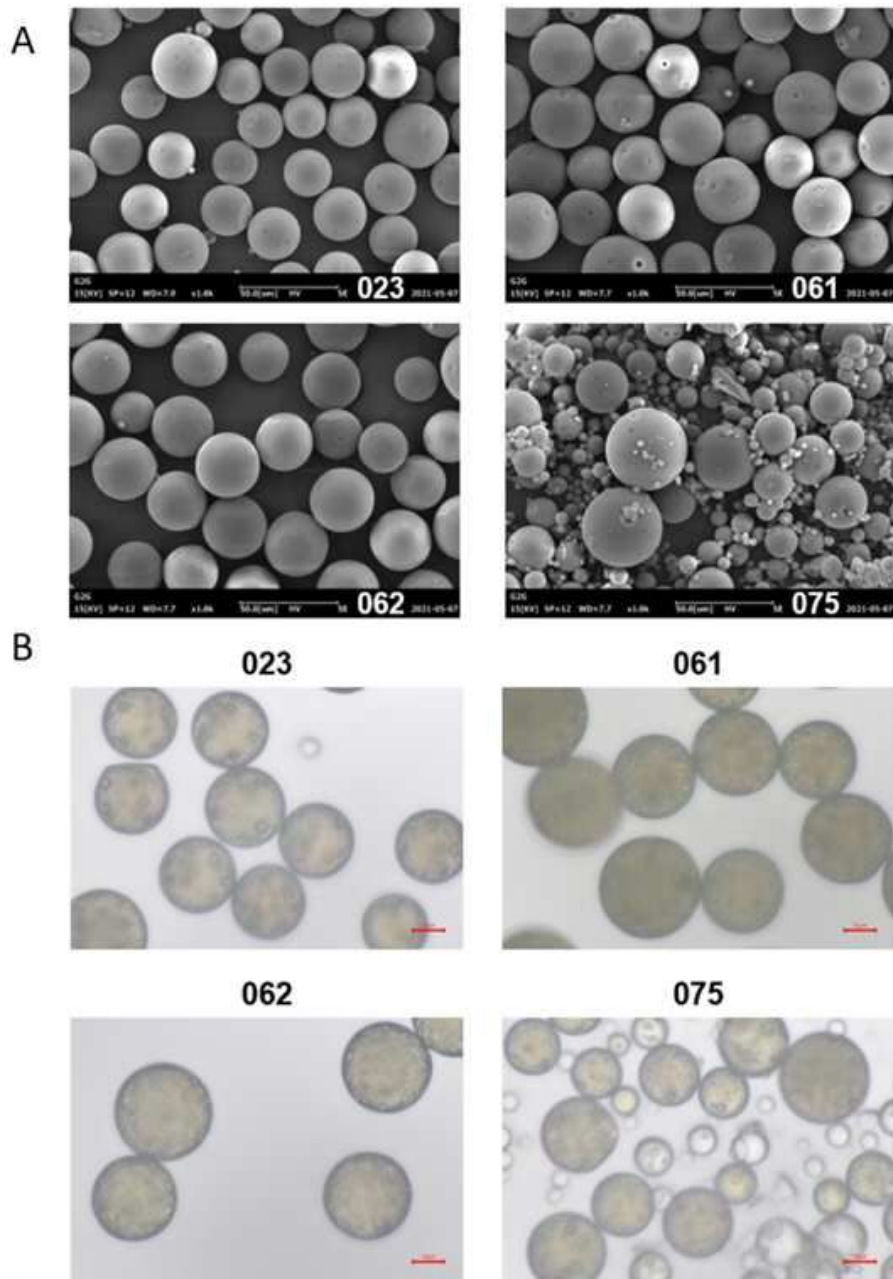
도면7



도면8



도면9



도면10

