



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0058916
(43) 공개일자 2024년05월03일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 47/36 (2017.01)
A61P 19/02 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7011687</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년09월13일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년04월08일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2022/043391</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/039298
국제공개일자 2023년03월16일</p> <p>(30) 우선권주장
63/243,638 2021년09월13일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
엘루시덤 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 92129, 샌디에고, 7163 토리 메사 코트</p> <p>(72) 발명자
홀스워스 다니엘
미국, 캘리포니아 92129, 샌디에고, 7163 토리 메사 코트, 씨/오 엘루시덤 인코포레이티드</p> <p>사라스와티 사리카
미국, 캘리포니아 92129, 샌디에고, 7163 토리 메사 코트, 씨/오 엘루시덤 인코포레이티드</p> <p>(74) 대리인
특허법인한얼</p> |
|---|--|

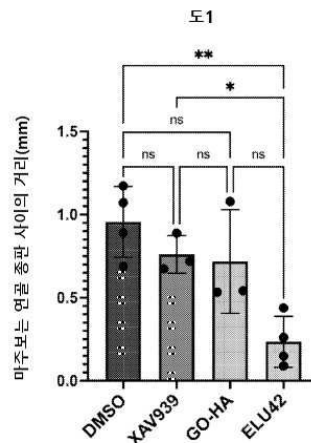
전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 발명의 명칭 부상 후의 연골 재생 및 재생장 방법에 사용하기 위한 조성물

(57) 요약

연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계, 여기에 공유적으로 연결된 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA), XAV939, 및 물을 포함하는 조성물을 적용하는 단계를 포함하는, 상처를 입은 후의 연골 재생을 증진시키는 방법이 제공된다. 방법의 조성물은 또한 PEG와 같은 계면활성제를 포함할 수 있다. 조성물은 대상의 연골 상처를 치료하기 위하여 대상에 국소적으로 투여될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 19/02 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

임의로 연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계;

임의로 부상을 당한 연골 대상체(cartilage subject to an injury)의 위치와 정도를 식별하는 단계; 및

상기 부상을 당한 연골 대상체를 유효량의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며,

조성물은

산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(conjugate)(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(matrix component)(여기에서 GO 및 HA는 링커(linker)를 통해 공유적으로 연결됨);

3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온(XAV939); 및

물을 포함하고,

임의로 여기에서 XAV939은 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는, 부상을 당한 포유류 연골 대상체의 재생을 자극하기 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 부상을 당한 연골 대상체가 급성 부상을 당한 연골 대상체인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 부상을 당한 연골 대상체가 탄력 연골(elastic cartilage)인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물이 계면활성제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

계면활성제가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 폴록사머(poloxamer)인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

계면활성제가 PEG이고 PEG는 약 200 내지 약 400 달톤(Dalton)의 분자량을 갖는 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

PEG가 총 조성물의 약 0.1 wt% 내지 약 20 wt%의 양으로 존재하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물이 증점제(thickener)를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

증점제가 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC)를 포함하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

링커가 2-25개 탄소를 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

링커가 하나 이상의 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 단위를 포함하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

링커가 $-\text{R}_x-\text{R}_y-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-\text{CO}-$, $-\text{COO}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{CS}-$, $-\text{S}-$, 및 $-\text{O}-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_y 는 비치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소(backbone carbon)를 갖는 선형 알킬렌기인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

R_x 및 R_y 가 각각 $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$ 인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

XAV939 대 GO-HA의 중량비가 약 1:2 내지 약 2:1인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

GO-HA가 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는 방법.

청구항 16

임의로 연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계;

임의로 부상을 당한 연골 대상체의 위치와 정도를 식별하는 단계; 및

상기 부상을 당한 연골 대상체를 유효량의 조성물과 48시간 마다 1회 접촉시키는 단계를 포함하며,

조성물은

산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨);

3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온(XAV939); 및

물을 포함하고,

임의로 여기에서 XAV939는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는, 부상을 당한 포유류 연골 대상

체의 재생을 자극하기 위한 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 부상을 당한 연골 대상체가 급성 부상을 당한 연골 대상체인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 부상을 당한 연골 대상체가 탄력 연골인 방법.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물이 계면활성제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

계면활성제가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 폴록사머인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

계면활성제가 PEG이고 PEG는 약 200 내지 약 400 달톤의 분자량을 갖는 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서,

PEG가 총 조성물의 약 0.1 wt% 내지 약 20 wt%의 양으로 존재하는 방법.

청구항 23

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물이 증점제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

증점제가 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC)를 포함하는 방법.

청구항 25

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

링커가 2-25개 탄소를 포함하는 방법.

청구항 26

제16항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

링커가 하나 이상의 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 단위를 포함하는 방법.

청구항 27

제16항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

링커가 $-R_x-R_y-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-CO-$, $-COO-$, $-NH-$, $-NH-NH-$, $-NH-NH-CO-$, $-CS-$, $-S-$, 및 $-O-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_5 는 비치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소를 갖는 선형 알킬렌기인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

R_x 및 R_y 가 각각 $-NH-NH-CO-$ 인 방법.

청구항 29

제16항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

XAV939 대 GO-HA의 중량비가 약 1:2 내지 약 2:1인 방법.

청구항 30

제16항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

GO-HA가 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는 방법.

청구항 31

산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨);

3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온(XAV939); 및

물을 포함하며,

임의로 여기에서 XAV939은 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는, 부상을 당한 포유류 연골 대상체의 재생을 자극하기 위한 방법에 사용하기 위한 조성물로서,

여기에서 방법은

임의로 연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계;

임의로 부상을 당한 연골 대상체의 위치와 정도를 식별하는 단계; 및

상기 부상을 당한 연골 대상체를 유효량의 상기 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 부상을 당한 연골 대상체가 급성 부상을 당한 연골 대상체인 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 부상을 당한 연골 대상체가 탄력 연골인 조성물.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물이 계면활성제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서,

계면활성제가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 폴록사머인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서,
계면활성제가 PEG이고 PEG는 약 200 내지 약 400 달톤의 분자량을 갖는 방법.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서,
PEG가 총 조성물의 약 0.1 wt% 내지 약 20 wt%의 양으로 존재하는 방법.

청구항 38

제31항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,
조성물이 증점제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서,
증점제가 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC)를 포함하는 방법.

청구항 40

제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,
링커가 2-25개 탄소를 포함하는 방법.

청구항 41

제31항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,
링커가 하나 이상의 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 단위를 포함하는 방법.

청구항 42

제31항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,
링커가 $-\text{R}_x-\text{R}_y-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-\text{CO}-$, $-\text{COO}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{CS}-$, $-\text{S}-$, 및 $-\text{O}-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_y 는 비치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소를 갖는 선형 알킬렌기인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서,
 R_x 및 R_y 가 각각 $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$ 인 방법.

청구항 44

제31항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,
XAV939 대 GO-HA의 중량비가 약 1:2 내지 약 2:1인 방법.

청구항 45

제31항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,
GO-HA가 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는 방법.

청구항 46

산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨);

3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온(XAV939); 및 물을 포함하며,

임의로 여기에서 XAV939은 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는, 부상을 당한 포유류 연골 대상체의 재생을 자극하기 위한 방법에 사용하기 위한 조성물로서

여기에서 방법은

임의로 연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계;

임의로 부상을 당한 연골 대상체의 위치와 정도를 식별하는 단계; 및

상기 부상을 당한 연골 대상체를 유효량의 상기 조성물과 48시간 마다 1회 접촉시키는 단계를 포함하는, 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서,

상기 부상을 당한 연골 대상체가 급성 부상을 당한 연골 대상체인 조성물.

청구항 48

제46항에 있어서,

상기 부상을 당한 연골 대상체가 탄력 연골인 조성물.

청구항 49

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물이 계면활성제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서,

계면활성제가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 폴록사머인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서,

계면활성제가 PEG이고 PEG는 약 200 내지 약 400 달톤의 분자량을 갖는 방법.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서,

PEG가 총 조성물의 약 0.1 wt% 내지 약 20 wt%의 양인 방법.

청구항 53

제46항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물이 증점제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 54

제53항에 있어서,

증점제가 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC)를 포함하는 방법.

청구항 55

제46항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,
링커가 2-25개 탄소를 포함하는 방법.

청구항 56

제46항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,
링커가 하나 이상의 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 단위를 포함하는 방법.

청구항 57

제46항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,
링커가 $-\text{R}_x-\text{R}_y-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-\text{CO}-$, $-\text{COO}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{NH}-$, $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$, $-\text{CS}-$, $-\text{S}-$, 및 $-\text{O}-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_y 는 비치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소를 갖는 선형 알킬렌기인 방법.

청구항 58

제57항에 있어서,
 R_x 및 R_y 가 각각 $-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$ 인 방법.

청구항 59

제46항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,
XAV939 대 GO-HA의 중량비가 약 1:2 내지 약 2:1인 방법.

청구항 60

제46항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서,
GO-HA가 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2021년 9월 13일자 출원된 미국 가특허 출원 제63/243,638호에 대한 우선권을 주장하며, 이 출원은 모든 목적을 위해 본 명세서에서 원용에 의해 명시적으로 포함된다.

[0002] 본 명세서에 기재된 본 개시내용은 연골 부상의 치료, 특히 연골 부상 후의 향상된 연골 재생을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 본 출원에서 인용된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 본 개시내용의 각각의 개별적인 공보, 특허 출원 또는 특허가 구체적으로 그리고 개별적으로 그 전체 내용이 원용에 의해 포함되는 것으로 표시된 것과 동일한 정도로 그 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0004] 연골은 포유류에서 결합 조직의 중요한 형태를 나타내며, 신체의 구조적 및 기능적 활성을 제공한다. 연골은 3 가지 광범위한 카테고리로 구성되며; 가장 광범위한 형태인 관절의 일부를 형성하는 뼈의 단부에서 일반적으로 발견되는 유리 연골, 신체 상의 구조를 제공하는 귀 또는 코에서 발견되는 것과 같은 탄력 연골, 및 인대 및 힘줄의 삽입부에서 발견되는 섬유연골이다.

[0005] 연골의 수복이 태아 발생 중에 또는 매우 어린 경우에 관찰되기는 하지만, 성숙한 포유류의 상처 후 연골의 수복 및 재생은 거의 전적으로 존재하지 않는다. 선행기술이 수복 과정에서 성장 인자 및 상처 병변 가장자리 통

합의 역할을 인식하기는 하였지만, 부상 후의 연골 재생 및 치유를 개선하는 치료제에 대한 필요는 충족되지 않고 있다.

[0006] Wnt 경로는 피부 섬유증 및 흉터에서 주요 역할을 하는 것으로 나타났다. Wnt 경로는 배아 발생 중의 세포 운명 결정, 세포 극성, 세포 이동, 신경 패턴형성, 및 기관형성의 결정적인 측면을 조절하는 진화론적 보존 경로이다. 이 경로는 배아의 적절한 조직 발생 및 성인의 조직 유지를 보장하는데 중요하다. Wnt 신호전달은 피부 발생의 초기 단계에 관여한다. 장배 형성 후, 외배엽 및 중배엽의 배아 세포가 분화하여 각각 표피 및 진피를 형성한다.

[0007] 신호 전달 과정에 관여하는 적어도 3가지의 구별되는 Wnt 신호전달 경로가 존재하지만, 표준형(또는 β -카테닌 의존형) Wnt 경로가 가장 이해되어 있다. β -카테닌은 표준형 Wnt 경로의 신호전달로부터 생성되는 주요 이펙터 분자이며, 그의 단백질 수준은 "분해 복합체"를 통해 조절된다. Wnt 신호 부재시, 전사 활성인자 β -카테닌은 "분해 복합체"로 명명된 단백질 복합체의 활동에 의해 세포 내에서 활발하게 분해된다. 이 복합체 내부에서, Axin-1 및 -2는 선종성 결장 폴립증과 함께 카제인-키나제 19a 및 글리코젠 신타제 키나제 3 β 에 의한 β -카테닌 포스포릴화를 촉진하는 스캐폴드를 형성한다. 포스포릴화 β -카테닌은 인식되고 유비퀴틴화되어 그의 프로테아좀 분해를 유발한다. 탄크리아제 I 및 II(TK1 및 TK2)는 Axin-1 및 -2 단백질을 파르실화하고 불안정화시켜 β -카테닌 분해 복합체를 불안정화시키는 작용을 하는 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제(PARP)이다. 일단 분해 복합체가 불안정화되면, 이는 β -카테닌이 탈포스포릴화되도록 하고, 그 후 안정화되어 세포질에 축적되고 세포핵으로 진입하며, 여기에서 Tcf/Lef 패밀리의 멤버와 상호작용하게 한다. β -카테닌은 공-활성인자 단백질을 모집함에 의해 Tcf 단백질을 강력한 전사 활성인자로 변환시키며, 따라서 Wnt 표적 유전자의 효율적인 활성화를 보장한다. 천연 리간드의 Wnt 패밀리에 의해 일단 활성화되면, Wnt 경로는 TNK1 및 TNK2를 상향 조절하여 분해 복합체의 와해를 돕는다. 연구 결과, TNK1 및 TNK2는 표준형 Wnt 신호전달의 매우 중요한 조절인자인 것으로 나타났다.

[0008] XAV939는 무세포 검정에서 11 nM/4 nM의 IC₅₀으로 TNK 1 및 TNK2 저해를 통해 Wnt/ β -카테닌-매개 전사를 선택적으로 저해하고, 악신 수준을 조절하며, CRE, F- κ B, 또는 TGF- β 에 영향을 미치지 않는 소분자이다. 마우스 귀 편지 검정에서 XAV939의 국소 적용은 XAV939가 섬유증(흉터)의 감소와 함께 상처 종료 속도를 유의적으로 증가시킴을 입증하였다. 그러나, XAV939는 그의 매우 낮은 수용해도(<1 μ g/mL)로 인하여 DMSO에 용해되어 "리서치 도구" 화합물로서만 사용되었다. 본 접근법의 문제는 국소 적용을 위한 DMSO의 사용이 바람직하지 않은 약리학적 활성 또는 불리한 반응을 유발할 수 있다는 것이다. 인간에 적합한 XAV939의 가용성 형태가 실무적인 의료 용도에 필요하다.

[0009] 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA)을 포함하는 매트릭스 구성요소는 XAV939를 위한 지지 매트릭스를 제공하고 인간 및 동물의 상처 치유를 위한 치료제로서 XAV939의 사용을 허용하는 양자 모두에 있어서 효과적인 것으로 나타났으며(참조, 예를 들어, 제US20210000959호), 여기에서 GO-HA 매트릭스 내의 XAV939는 상처 치유의 속도 및 품질에 대해 실질적인 개선을 제공하고; 구체적으로 조직으로 하여금 흉터를 초래하는 섬유증 치유 경로에 뒤따른 상처 치유를 제한하도록 한다. 추가로, 예를 들어, C57Bl/CJ 마우스의 연골 영역의 중앙에 만들어진 2 mm 생검 편지 상처에 의해, DMSO에 용해된 XAV939의 투여에 의해, 급성 부상에 뒤따른 연골 재생 및 치유의 증가가 보고되었다(문헌[Bastakoty, D. et al. 2015, 29(12): 4881-4892]).

[0010] 비-태아 포유류에서 연골의 제한된 천연 재생 능력에 비추어 볼 때 치료제 투여 후에 임의의 연골 재생이 유익하기는 하지만, 당업계에는 급성 부상 후 연골 재생을 유도하거나, 향상시키거나, 증가시키기 위한 개선된 조성물에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 개시내용은 임의로 연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계; 임의로 부상을 당한 연골 대상체(cartilage subject to an injury)의 위치와 정도를 식별하는 단계; 및 상기 부상을 당한 연골 대상체를 유효량의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하며, 조성물은 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨주게이트(conjugate)(GO-HA)로 구성된 매트릭스 구성요소(matrix component)(여기에서 GO 및 HA는 링커(linker)를 통해 공유적으로 연결됨); 3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온(XAV939); 및 물을 포함하고, 임의로 여기에서 XAV939는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는, 부상을 당한 포유류

연골 대상체의 재생을 자극하기 위한 방법을 제공한다. 일 실시 형태에서 상기 부상을 당한 연골 대상체는 급성 부상을 당한 연골 대상체이다. 추가의 실시 형태에서 상기 부상을 당한 연골 대상체는 탄력 연골(elastic cartilage)이다. 다른 실시 형태에서 조성물은 계면활성제를 추가로 포함한다. 추가의 실시 형태에서 계면활성제는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 폴록사머(poloxamer)이다. 또한 추가의 실시 형태에서 PEG는 약 200 내지 약 400 달톤(Dalton)의 분자량을 가진다. 또한 추가의 실시 형태에서 PEG는 총 조성물의 약 0.1 wt% 내지 약 20 wt%의 양으로 존재한다. 다른 실시 형태에서 조성물은 증점제(thickener)를 추가로 포함한다. 추가의 실시 형태에서 증점제는 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC)를 포함한다. 다른 실시 형태에서 링커는 2-25개 탄소를 포함한다. 추가의 실시 형태에서 링커는 하나 이상의 $-CH_2CH_2O-$ 단위를 포함한다. 다른 실시 형태에서 링커는 $-R_x-R_S-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-CO-$, $-COO-$, $-NH-$, $-NH-NH-$, $-NH-NH-CO-$, $-CS-$, $-S-$, 및 $-O-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_S 는 비치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소(backbone carbon)를 갖는 선형 알킬렌기이다. 추가의 실시 형태에서 R_x 및 R_y 는 각각 $-NH-NH-CO-$ 이다. 다른 실시 형태에서 XAV939 대 GO-HA의 중량비는 약 1:2 내지 약 2:1이다. 다른 실시 형태에서 GO-HA는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성한다.

[0012]

다른 태양에서 본 개시내용은 임의로 연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계; 임의로 부상을 당한 연골 대상체의 위치와 정도를 식별하는 단계; 및 상기 부상을 당한 연골 대상체를 유효량의 조성물과 48시간 마다 1회 접촉시키는 단계를 포함하며, 조성물은 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); 3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온(XAV939); 및 물을 포함하고, 임의로 여기에서 XAV939는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는, 부상을 당한 포유류 연골 대상체의 재생을 자극하기 위한 방법을 제공한다. 일 실시 형태에서 상기 부상을 당한 연골 대상체는 급성 부상을 당한 연골 대상체이다. 추가의 실시 형태에서 상기 부상을 당한 연골 대상체는 탄력 연골이다. 다른 실시 형태에서 조성물은 계면활성제를 추가로 포함한다. 추가의 실시 형태에서 계면활성제는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 폴록사머이다. 또한 추가의 실시 형태에서 PEG는 약 200 내지 약 400 달톤의 분자량을 가진다. 또한 추가의 실시 형태에서 PEG는 총 조성물의 약 0.1 wt% 내지 약 20 wt%의 양으로 존재한다. 다른 실시 형태에서 조성물은 증점제를 추가로 포함한다. 추가의 실시 형태에서 증점제는 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC)를 포함한다. 다른 실시 형태에서 링커는 2-25개 탄소를 포함한다. 추가의 실시 형태에서 링커는 하나 이상의 $-CH_2CH_2O-$ 단위를 포함한다. 다른 실시 형태에서 링커는 $-R_x-R_S-R_y-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-CO-$, $-COO-$, $-NH-$, $-NH-NH-$, $-NH-NH-CO-$, $-CS-$, $-S-$, 및 $-O-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_S 는 비치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소를 갖는 선형 알킬렌기이다. 추가의 실시 형태에서 R_x 및 R_y 는 각각 $-NH-NH-CO-$ 이다. 다른 실시 형태에서 XAV939 대 GO-HA의 중량비는 약 1:2 내지 약 2:1이다. 다른 실시 형태에서 GO-HA는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성한다.

[0013]

다른 태양에서 본 개시내용은 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); 3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온(XAV939); 및 물을 포함하며, 임의로 여기에서 XAV939는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는, 부상을 당한 포유류 연골 대상체의 재생을 자극하기 위한 방법에 사용하기 위한 조성물을 제공하며; 여기에서 방법은 임의로 연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계; 임의로 부상을 당한 연골 대상체의 위치와 정도를 식별하는 단계; 및 상기 부상을 당한 연골 대상체를 유효량의 상기 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서 상기 부상을 당한 연골 대상체는 급성 부상을 당한 연골 대상체이다. 추가의 실시 형태에서 상기 부상을 당한 연골 대상체는 탄력 연골이다. 다른 실시 형태에서 조성물은 계면활성제를 추가로 포함한다. 추가의 실시 형태에서 계면활성제는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 폴록사머이다. 또한 추가의 실시 형태에서 PEG는 약 200 내지 약 400 달톤의 분자량을 가진다. 또한 추가의 실시 형태에서 PEG는 총 조성물의 약 0.1 wt% 내지 약 20 wt%의 양으로 존재한다. 다른 실시 형태에서 조성물은 증점제를 추가로 포함한다. 추가의 실시 형태에서 증점제는 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC)를 포함한다. 다른 실시 형태에서 링커는 2-25개 탄소를 포함한다. 추가의 실시 형태에서 링커는 하나 이상의 $-CH_2CH_2O-$ 단위를 포함한다. 다른 실시 형태에서 링커는 $-R_x-R_S-R_y-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-CO-$, $-COO-$, $-NH-$, $-NH-NH-$, $-NH-NH-CO-$, $-CS-$, $-S-$, 및 $-O-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_S 는 비치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소를 갖는 선형 알킬렌기이다. 추가의 실시 형태에서 R_x 및 R_y 는 각각 $-NH-NH-CO-$

이다. 다른 실시 형태에서 XAV939 대 GO-HA의 중량비는 약 1:2 내지 약 2:1이다. 다른 실시 형태에서 GO-HA는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성한다.

[0014] 다른 태양에서 본 개시내용은 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성 요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); 3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온(XAV939); 및 물을 포함하며, 여기에서 XAV939은 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성하는, 부상을 당한 포유류 연골 대상체의 재생을 자극하기 위한 방법에 사용하기 위한 조성물을 제공하며; 여기에서 방법은 연골에 부상을 겪은 포유류를 식별하는 단계; 부상을 당한 연골 대상체의 위치와 정도를 식별하는 단계; 및 상기 부상을 당한 연골 대상체를 유효량의 상기 조성물과 48시간 마다 1회 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서 상기 부상을 당한 연골 대상체는 급성 부상을 당한 연골 대상체이다. 추가의 실시 형태에서 상기 부상을 당한 연골대상체는 탄력 연골이다. 다른 실시 형태에서 조성물은 계면활성제를 추가로 포함한다. 추가의 실시 형태에서 계면활성제는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 또는 폴록사머이다. 또한 추가의 실시 형태에서 PEG는 약 200 내지 약 400 달톤의 분자량을 가진다. 또한 추가의 실시 형태에서 PEG는 총 조성물의 약 0.1 wt% 내지 약 20 wt%의 양으로 존재한다. 다른 실시 형태에서 조성물은 증점제를 추가로 포함한다. 추가의 실시 형태에서 증점제는 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC)를 포함한다. 다른 실시 형태에서 링커는 2-25개 탄소를 포함한다. 추가의 실시 형태에서 링커는 하나 이상의 $-CH_2CH_2O-$ 단위를 포함한다. 다른 실시 형태에서 링커는 $-R_x-R_S-R_y-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-CO-$, $-COO-$, $-NH-$, $-NH-NH-$, $-NH-NH-CO-$, $-CS-$, $-S-$, 및 $-O-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_S 는 비치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소를 갖는 선형 알킬렌기이다. 추가의 실시 형태에서 R_x 및 R_y 는 각각 $-NH-NH-CO-$ 이다. 다른 실시 형태에서 XAV939 대 GO-HA의 중량비는 약 1:2 내지 약 2:1이다. 다른 실시 형태에서 GO-HA는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성한다.

[0015] 일부 또는 임의의 전기 실시 형태에서, XAV939는 총 XAV939, GO-HA, 및 물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성한다.

[0016] 일부 또는 임의의 전기 실시 형태에서, GO-HA는 총 XAV939, GO-HA, 및 물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 개시내용은 개선된 연골 재생 및 치유를 유도하기 위해 본 개시내용의 조성물을 투여하는 신규한 방법을 제공한다.

[0018] 본 명세서에 기재된 화합물, 조성물, 제제, 및 치료 방법의 설명은 실시 형태 "를 포함하는", "로 구성된", 및 "로 필수적으로 구성된"을 포함하는 것으로 이해되고자 한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 모든 조성물, 및 본 명세서에 기재된 조성물을 사용하는 모든 방법의 경우, 조성물은 열거된 구성요소 또는 단계를 포함할 수 있거나, 열거된 구성요소 또는 단계로 "필수적으로 구성될" 수 있다. 조성물이 열거된 구성요소로 "필수적으로 구성된" 것으로 기재되는 경우, 조성물은 열거된 구성요소를 함유하고, 기본적으로 신규한 특성(일부 실시 형태에서, 치료되는 병태)에 실질적으로 영향을 주지 않는 다른 구성요소를 함유할 수 있지만, 명시적으로 열거된 이들 구성요소 이외의 기본적으로 신규한 특성(일부 실시 형태에서, 치료되는 병태)에 실질적으로 영향을 주는 임의의 다른 구성요소를 함유하지 않거나; 조성물이 기본적으로 신규한 특성(일부 실시 형태에서, 치료되는 병태)에 실질적으로 영향을 주는 열거된 것들 이외의 추가 구성요소를 함유한다면, 조성물이 기본적으로 신규한 특성(일부 실시 형태에서, 치료되는 병태)에 실질적으로 영향을 주는 충분한 농도 또는 양의 추가 구성요소를 함유하지 않는다. 방법이 열거된 단계로 "필수적으로 구성된" 것으로 기재되는 경우, 방법은 열거된 단계를 함유하고, 기본적으로 신규한 특성(일부 실시 형태에서, 치료되는 병태)에 실질적으로 영향을 주지 않는 다른 단계를 함유할 수 있지만, 방법은 명시적으로 열거된 이들 단계 이외의 기본적으로 신규한 특성(일부 실시 형태에서, 치료되는 병태)에 실질적으로 영향을 주는 임의의 다른 단계를 함유하지 않는다. 비-제한적인 구체적 실시예로서, 조성물이 구성요소로 "필수적으로 구성된" 것으로 기재되는 경우, 조성물은 부가적으로 임의의 양의 약제학적으로 허용되는 담체, 비히클(vehicle), 또는 희석제 및 기본적으로 신규한 특성(일부 실시 형태에서, 치료되는 병태)에 실질적으로 영향을 주지 않는 다른 이러한 구성요소를 함유할 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "알킬"은 직쇄 또는 분지형 탄화수소를 지칭한다. 알킬은 선형, 분지형, 사이클릭, 또는 그의 조합일 수 있으며, 예를 들어, 1개 내지 60개의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 알킬기의 예로는

에틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 사이클로프로필, 부틸 이성체(예: n-부틸, iso-부틸, tert-부틸 등) 사이클로부틸 이성체(예: 사이클로부틸, 메틸사이클로프로필 등), 펜틸 이성체, 사이클로펜탄 이성체, 헥실 이성체, 사이클로헥산 이성체 등을 들 수 있으나 이로 제한되지 않는다.

[0020] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "선형 알킬"은 탄소 및 수소 원자 쇄를 지칭한다(예: 에탄, 프로판, 부탄, 펜탄, 헥산 등).

[0021] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "분지형 알킬"은 이중 또는 삼중결합 없이 쇄 내에 갈라짐(fork), 가지(branch) 및/또는 분할(split)을 함유하는 탄소 및 수소 원자 쇄를 지칭한다. "분지"는 탄소 쇄의 갈라짐(divergence)을 지칭하는 한편, "치환"은 모이어티(moiety) 내에 비-탄소/비-수소 원자의 존재를 지칭한다.

[0022] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "사이클로알킬"은 완전히 포화된 단일- 또는 다중-사이클릭 탄화수소 환 시스템을 지칭한다. 2개 이상의 환으로 구성되는 경우, 환들은 융합되거나, 브릿지(bridge)되거나 스피로-연결된(spiro-connected) 방식으로 서로 연결될 수 있다. 사이클로알킬기는 비치환된, 치환된, 분지형, 및/또는 비분지형일 수 있다. 전형적인 사이클로알킬기로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등을 들 수 있으나 이로 제한되지 않는다. 치환된 경우, 치환체(들)는 알킬이거나 달리 표시되지 않는 한 알킬기의 치환에 관하여 상기 표시된 것들 중에서 선택될 수 있다. 달리 특정되지 않는 한(예: 치환된 사이클로알킬기, 헤테로사이클릴, 사이클로알콕시기, 할로사이클로알킬, 사이클로알킬아민, 티오사이클로알킬 등), 알킬기는 탄소 및 수소 원자 만을 함유한다.

[0023] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로알킬"은 하나 이상의 탄소 원자가 독립적으로 하나 이상의 헤테로원자(예: 산소, 황, 질소, 인, 규소 또는 그의 조합)에 의해 대체된 알킬기를 지칭한다. 비-탄소 치환(들)을 함유하는 알킬기는 선형 알킬, 분지형 알킬, 사이클로알킬(예: 사이클로헤테로알킬), 또는 그의 조합일 수 있다. 비-탄소는 말단에 위치하거나(예: 2-헥산올) 알킬기 내에 통합될 수 있다(예: 디에틸 에테르).

[0024] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단독으로 또는 조합되어 사용된 "알콕시"는 $-O-$ 알킬기를 의미한다.

[0025] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단독으로 또는 조합되어 사용된 "알케닐"은 적어도 2개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 쇄를 의미하며, 이는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 함유한다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단독으로 또는 조합되어 사용된 "알키닐"은 적어도 2개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 쇄를 의미하며, 이는 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 함유한다.

[0027] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "아민" 또는 "아미노"는 화학식 $NA_1A_2A_3$ 로 나타내며, 여기에서 A_1 , A_2 및 A_3 는 독립적으로 본 명세서에 기재된 바와 같은 수소 또는 임의로 치환된 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 사이클로알케닐, 알키닐, 사이클로알키닐, 아릴, 또는 헤테로아릴기일 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 아민은 NH_2 , NH (알킬), NH (아릴), N (알킬) $_2$, N (알킬)(아릴) 및 N (아릴) $_2$ 중의 임의의 것을 지칭한다.

[0028] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "급성 부상"은 다른 것 중에서도 외상력(traumatic force), 화학 독성, 열성 화상, 동상, 급성 허혈 및 재관류 부상에 의해 야기된 손상 또는 상처를 의미한다. 예시적인 외상력 부상은 다른 것 중에서도 외과적 절차 및 둔기에 의한 외상(예: 총상, 자상 등)을 포함한다. 조성물은 영향을 받은 조직 위에 적용되거나 그 안으로 주입되어 이와 같이 손상된 조직의 혈관형성, 수복 및 재생을 촉진할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "재생"은 잔류 조직으로부터의 파괴되거나 약화된 조직의 성장을 의미한다. 이는 신체의 수복 시도이며, 연골과 관련해서는 연골 세포의 이동 또는 복제, 또는 간세포의 연골 세포로의 변형을 나타내고; 상기 연골 세포의 조직화를 일으켜 유리, 탄력 또는 섬유연골을 형성한다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "증점제"는 액체의 화학적 또는 생물학적 특성에 대한 실질적인 변형 없이 액체의 점도를 증가시키는 물질이다.

[0031] 용어 "약제학적으로 허용되는 담체" 또는 "약제학적으로 허용되는 부형제"는 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 임의의 및 모든 용매, 공-용매, 착화제, 분산 매질, 코팅제, 향균 및 항진균제, 등장화제 및 흡수지연제 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 주지되어 있다. 임의의 관용적인 매질 또는 제제가 활성 성분과 비상용성인 경우를 제외하고는, 치료 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 보충적 활성 성분도 조성물 내로 혼입될 수 있다. 또한, 당업계에서 통상 사용되는 바와 같은 다양한 아쥬반트(adjunct)가 포함될 수 있다. 이들 및 기타 이러한 화합물이, 예를 들어, 문헌[예: Merck Index(Merck & Company, Rahway, N.J.)]에 기재되어 있으며, 약제학적 조성물 중의 다양한 구성요소의 포함에 대한 고려가

기재되어 있다(예: 문헌[Gilman et al.(Eds.), 2010, Goodman and Gilman's: Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th Ed., McGraw-Hill Companies]).

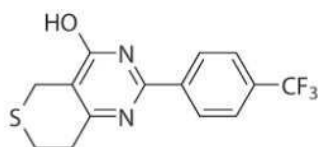
[0032] 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 본 명세서에 제공된 화합물의 생물학적 유효성 및 특성을 보유하는 염을 지칭하며, 이는 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아니다. 많은 경우에, 본 명세서에 제공된 화합물은 아미노 및/또는 카르복실기 또는 이와 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기염을 형성할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 산부가염은 무기산 및 유기산으로 형성될 수 있다. 이로부터 염이 유래될 수 있는 무기산으로는, 예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등을 들 수 있다. 이로부터 염이 유래될 수 있는 유기산으로는, 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말레산, 말론산, 석신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 살리실산 등을 들 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염기부가염은 무기 및 유기 염기로 형성될 수 있다. 이로부터 염이 유래될 수 있는 무기 염기로는, 예를 들어, 소듐, 포타슘, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 등을 들 수 있으며; 특히 바람직한 것은 암모늄, 포타슘, 소듐, 칼슘 및 마그네슘염이다. 이로부터 염이 유래될 수 있는 유기 염기로는, 예를 들어, 1차, 2차 및 3차 아민, 천연 발생 치환된 아민을 포함하는 치환된 아민, 사이클릭아민, 염기성 이온 교환 수지 등, 구체적으로, 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 및 에탄올아민을 들 수 있다. 이러한 많은 염이 제WO 87/05297호에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0033] 본 명세서에 제공된 바와 같은 화합물의 "치료적 유효량" 또는 "약제학적 유효량"은 목적하는 효과를 달성하기에 충분한 양이며 질환 병태의 성질 및 중증도 및 화합물의 역가에 따라 변화할 수 있다. "치료적 유효량"은 또한 급성 부상 후에 연골 재생 증가를 초래하도록 본 개시내용의 하나 이상의 조성물을 포함하도록 의도된다. 화합물 및/또는 조성물의 조합은 바람직하게 상승적 조합이다. 당업계(예를 들어, 문헌[Chou, 2010, Canc. Res. 70(2):440-446])에 기재된 바와 같은 상승은 조합하여 투여된 화합물의 효과가 단일 제제로서 단독으로 투여된 경우의 화합물의 상가적 효과보다 클 때 발생한다. 일반적으로, 상승적 효과는 화합물의 차선 농도에서 가장 명백하게 입증된다. 활성 질환의 치료보다는 예방을 목적으로 상이한 농도가 채용될 수 있음이 이해될 것이다. 이러한 양은 환자의 키, 체중, 성별, 연령 및 의료이력에 추가로 의존할 수 있다.

[0034] 용어 "포유류"는 그의 보통의 생물학적 의미로 사용된다. 따라서, 이는 구체적으로 인간, 소, 말, 개, 및 고양이 포함하나, 많은 다른 종들도 포함한다.

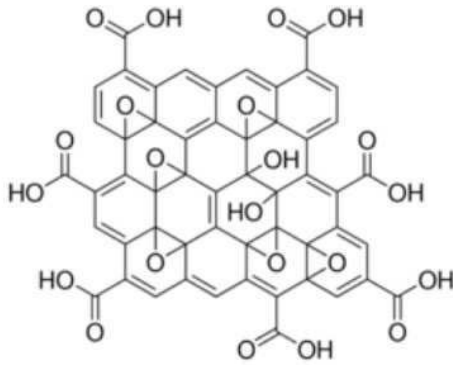
[0035] 본 개시내용의 일 태양에서, 급성 부상을 당한 연골 대상체 치료용 조성물이 제공되며, 이는 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA)의 컨쥬게이트를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); XAV939; 및 물을 포함한다. 공유적으로-연결된 GO 및 HA는 또한 본 명세서에서 GO-HA 컨쥬게이트 또는 단순히 GO-HA로 지칭된다.

[0036] XAV939는 3,5,7,8-테트라하이드로-2-[4-(트리플루오로메틸)페닐]-4H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-온의 화학명을 갖는 강력한 탄키라제 저해제이다. XAV939의 구조는 하기에 나타내었다:



[0037]

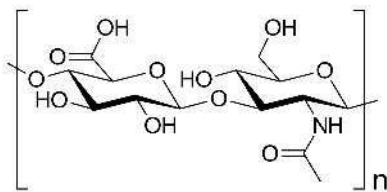
[0038] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 산화그래핀(GO)은 그래핀의 산화된 형태를 지칭하며, 이는 흑연의 단일층 형태이다. GO는 강한 산화제로 흑연을 처리하여 얻어질 수 있다. GO는 그것이 어떻게 만들어졌는지에 따라 탄소, 산소, 및 수소를 다양한 양으로 함유한다. 이는 그의 평면 방향으로 수백 나노미터에서 수 마이크로미터까지 가질 수 있으며, 두께가 약 0.7-1.2 nm이다. GO는 황산을 사용하여 제조되는 경우(예: 허머스법), 다양한 산소 함유 모이어티, 예컨대 산소 에폭사이드기, 카르복실산(-COOH), 페놀 등을 포함할 수 있다. GO 구조의 예를 하기에 나타내었다.



[0039]

[0040]

히알루론산(HA)은 인체를 통해 천연 발생하는 음이온성의 매우 친수성인 비-황산화 글리코스아미노글리칸이다. 이는 수천의 탄수화물 단위 길이일 수 있으며 물과 결합하여 매우 점성의 품질인 겔을 제공할 수 있다. HA 구조의 예를 하기에 나타내었다:



[0041]

[0042]

본 개시내용의 조성물에서, GO 및 HA는 공유적으로 연결되어 매트릭스 구성요소(또는 담체)를 형성하며, 이는 XAV939를 가용화하는 작용을 할 수 있을 뿐 아니라 동시에 상처 치유에 다른 이익을 제공한다. 공유 연결은 링커(또는 링커 모이어티)를 사용하여 달성될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 링커는 2-25개 탄소를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 링커는 선형이다. 다른 실시 형태에서, 링커는 분지형이다. 링커는 포화되거나 불포화될 수 있다.

[0043]

일부 실시 형태에서, 링커는 C_2 - C_{25} 알킬렌기를 포함할 수 있으며, 여기에서 알킬렌기 중의 탄소 및 수소는 산소 또는 다른 원자 또는 기, 예컨대 하이드록시, 카르복시, 아미노, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 니트로 등에 의해 치환될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 링커는 하나 이상의 $-CH_2CH_2O-$ 단위를 포함할 수 있다.

[0044]

일부 실시 형태에서, 링커는 $-R_x-R_s-R_y-$ 를 포함하며, 여기에서 R_x 및 R_y 는 각각 독립적으로 $-CO-$, $-COO-$, $-H-$, $-H-H-$, $-H-H-CO-$, $-CS-$, $-S-$, $-O-$ 로 구성된 그룹 중에서 선택되고, 여기에서 R_s (이는 또한 본 출원에서 스페이서기로도 지칭된다)는 비치환되거나 치환된, 포화되거나 불포화된, 2-20개의 골격 탄소를 갖는 선형 알킬렌기일 수 있다. 특정 실시 형태에서, R_x 및 R_y 는 양자 모두 $*-H-H-CO-$ ($*$ 는 R_s 에서 먼 쪽의 링커 단부를 표시함)이다.

[0045]

조성물의 일부 실시 형태에서, XAV939 대 GO-HA의 중량비는 약 1:100 내지 100:1, 예를 들어, 약 1:2 내지 약 2:1일 수 있다. 일부 실시 형태에서, GO-HA 컨주게이트에서, GO:HA의 중량비는 약 1:1 내지 약 1:20, 또는 약 1:6 내지 약 1:10일 수 있다.

[0046]

다른 비-이온 친수성 재료, 예컨대 PEG 및 PPG(폴리프로필렌 글리콜)의 공중합체, 예를 들어, 폴록사머가 또한 사용될 수 있다. 일 실시예에서, 폴록사머-188(이는 약 8400 달톤의 평균 분자량을 가짐)이 사용될 수 있다.

[0047]

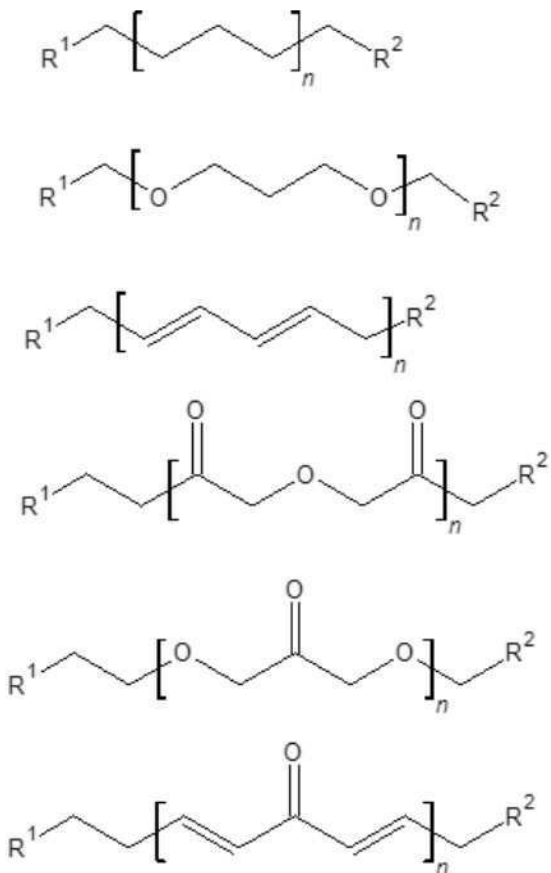
일부 실시 형태에서, 조성물은 추가로 약제학적 담체, 부형제, XAV939 이외의 화합물(들), 또는 조성물이 국소적으로 투여가능한 반-고체 수성 겔 형태로 제시되도록 하는 재료를 포함한다. 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스가 겔-형성제로서 사용될 수 있다. 그러나, 다른 셀룰로스 유도체, 예컨대 미세결정질 셀룰로스 뿐만 아니라 폴리사카라이드, 예컨대 알기네이트, 아가로스, 트라가칸트, 구아검 및 잔툼검도 겔-형성제로 적합하다. 필요한 경우, 상대적으로 탄력있는 겔-형성 재료, 예컨대 가교결합된 섬유성 단백질, 예를 들어, 포름알데히드와 가교결합된 젤라틴 또는 콜라겐의 첨가에 의해 겔은 더 겔쫄해지고/해지거나 뻣뻣해질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 크림의 형태일 수 있으며, 이는 크림 제제용으로 적합한 이들 부형제, 예컨대 파라핀 오일, 바셀린, 왁스, 유기 에스테르, 예컨대 세틸 팔미테이트 등을 포함할 수 있다.

- [0048] 일부 실시 형태에서, 본 개시내용의 조성물은 피부 전달용 조성물의 목적하는 점도를 위해 증점제를 추가로 포함한다. 예를 들어, 증점제는 하이드록시프로필 셀룰로스(HPC), 또는 잔탄검을 포함할 수 있다. HPC는 용이한 적용을 위해 조성물을 매끄러운 필름으로 만들 수 있다. 이는 또한 증발을 감소시키며 상처가 더 오래 축축한 상태로 머무르게 하는데, 이는 치유를 개선하고 흉터 감소를 초래하는 요인이다. 소정 농도의 HPC 수용액의 분자량 또는 점도에 따라 이용가능한 상이한 등급의 HPC가 있다.
- [0049] 조성물의 일부 실시 형태에서, XAV939는 총 조성물(물 포함)의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, XAV939는 총 조성물의 약 0.01 wt% 내지 약 2 wt%, 약 0.02 wt% 내지 약 1 wt%, 또는 약 0.05 wt% 내지 약 0.5 wt%를 구성할 수 있다. 일부 실시 형태에서, GO-HA는 총 조성물의 약 0.001 wt% 내지 약 5 wt%를 구성한다. 일부 실시 형태에서, GO-HA는 총 조성물의 약 0.01 wt% 내지 약 2 wt%, 약 0.02 wt% 내지 약 1 wt%, 또는 약 0.05 wt% 내지 약 0.5 wt%를 구성할 수 있다. 일부 또는 임의의 전기 실시 형태에서, XAV939의 wt%는 XAV939, GO-HA, 및 물 전체를 기준으로 한다. 일부 또는 임의의 전기 실시 형태에서, GO-HA의 wt%는 XAV939, GO-HA, 및 물 전체를 기준으로 한다.
- [0050] XAV939는 점성 현탁액 중에 고르게 분산되며, 이는 수개월간 실온에서 안정하다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 소수성 물질의 수산화성 또는 수용해성을 증진시키는 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 계면활성제는 비-이온 친수성 재료, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다. PEG는 약 100 내지 약 10,000 달톤, 또는 약 200 내지 약 4000 달톤, 예를 들어, 약 200 내지 약 1000, 약 200 내지 약 800, 약 200 내지 약 500, 약 200 내지 약 400, 약 300 내지 약 400, 약 350 내지 약 450, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 약 550, 약 600, 약 650, 약 700, 약 750, 약 800, 약 850, 약 900, 약 950, 약 1000 달톤 등의 수-평균 분자량을 가질 수 있다. 일부 실시 형태에서, PEG는 총 조성물의 약 0.1 내지 약 20 wt%의 양으로 조성물 내에 존재할 수 있다. 예를 들어, PEG는 총 조성물의 약 0.2 wt% 내지 약 10 wt%, 또는 약 0.5 wt% 내지 약 10 wt%, 또는 약 1 wt% 내지 약 10 wt%일 수 있다.
- [0051] 리포솜 제제인 조성물이 제공된다. 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); XAV939; 물; 및 부틸렌 글리콜을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 또는 임의의 실시 형태에서, 조성물은 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); XAV939; 물; 및 폴리스อร์베이트 20을 포함한다. 일부 또는 임의의 실시 형태에서, 조성물은 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); XAV939; 물; 및 포스파티딜콜린을 포함한다. 일부 또는 임의의 실시 형태에서, 조성물은 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); XAV939; 물; 및 에탄올을 포함한다. 일부 또는 임의의 실시 형태에서, 조성물은 산화그래핀(GO) 및 히알루론산(HA) 컨쥬게이트(GO-HA)를 포함하는 매트릭스 구성요소(여기에서 GO 및 HA는 링커를 통해 공유적으로 연결됨); XAV939; 물; 및 하이드록시프로필셀룰로스를 포함한다. 본 단락의 임의의 전기 실시 형태는 서로 조합될 수 있으며; 특히, 리포솜 제제는 XAV939, 부틸렌 글리콜, 폴리스อร์베이트 20, 포스파티딜콜린, 에탄올, GO-HA, 물, 및 하이드록시프로필셀룰로스를 포함한다. 일부 또는 임의의 실시 형태에서, 리포솜 제제는 청구범위의 것들을 포함하여 본 명세서에 기재된 임의의 실시 형태를 실시하는데 사용된다.
- [0052] 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물에서, 다른 약제학적 또는 치료적 화합물이 XAV939에 부가하여 포함될 수 있다. 즉, XAV939가 존재하는 조성물은 또한 염기 분산 매질로서 작용할 수 있으며 이때 다른 약제학적 제제 또는 치료제, 특히 소수성 제제가, 예를 들어, 급성 부상을 당한 연골 대상체에의 국소 투여를 위해 분산될 수 있다. 이들 제제는 항염증성 화합물, 예컨대 피르페니돈, 할로푸기논, 닌테다닙, 토실리주맙, 티로나셉트 등, 항암제, 항염증제, 진통제, 항생제 등을 포함할 수 있다.
- [0053] 일 태양에서, 본 개시내용은 유효량의 본 명세서에 기재한 바와 같은 조성물을 연골에 접촉시키는 단계를 포함하는, 급성 부상을 당한 연골 대상체의 재생을 자극하기 위한 방법을 제공한다. 급성 부상을 당한 연골 대상체는 연골의 구조 및 기능에 지장을 주는 물리적 충격에 의해 유발된 외과적 상처로부터 발생하거나(예컨대 나이프, 메스 또는 다른 날카롭거나 무딘 물체에 의한 열상, 찰과상, 자상, 스크래치 또는 펑크) 연골의 구조 및 기능에 지장을 주는 비-외과적 세팅에서의 물리적 충격으로부터 발생한(예컨대, 나이프, 총알, 또는 다른 날카롭거나 무딘 물체에 의한) 것들을 포함하는 것으로 고려되지만 이로 제한되지는 않는다. 본 개시내용은 화상과 같은 과도한(낮거나 높은) 온도, 전리 방사선, 화학요법에 의한 급성 부상, 또는 사고 또는 불운으로부터 발생한 불시의 급성 부상을 당한 연골 대상체를 고려한다.

[0054] 일부 실시 형태에서, 치료 방법은 하나 이상의 코르티코스테로이드, 세포독성 약물, 항생제, 소독제, 니코틴, 항-혈소판 약물, NSAID, 콜히친, 항-응고제, 혈관수축 약물 또는 면역억제제, 성장 인자, 항체, 프로테아제, 프로테아제 저해제, 항균 펩티드, 점착성 펩티드, 지혈제, 생존 세포, 꿀, 또는 산화질소를 포함하는 제2 의약(second medication) 또는 치료제를 급성 부상을 당한 연골 대상체에 전달하는 단계를 포함할 수 있다. 이들 치료제는 본 명세서에 기재된 조성물과 별도의 투여형(seperate dosage form)으로 전달될 수 있거나, 본 명세서에 기재된 조성물의 부가적인 구성요소로서 포함되어 XAV939와 함께 전달될 수 있다.

[0055] 본 명세서에 기재된 본 개시내용의 조성물(들)은 급성 부상을 당한 연골 대상체 위에 국소적으로 조성물(들)을 적용함에 의해 투여될 수 있다. 조성물이 패치 또는 패드와 같은 기재를 포함하는 본 명세서에 기재된 의료 디바이스에 포함된다면, 의료 디바이스가 급성 부상 부위에 고정되어 조성물이 연골에 접촉할 수 있다.

[0056] 본 개시내용의 방법에 사용되는 조성물의 제조 방법에서, 스페이서기는 비치환되거나 치환되고, 포화되거나 불포화된, 2-20개 골격 탄소를 갖는 선형 알킬렌기일 수 있다. 제한이 아닌 예시를 목적으로, HA 유도체화 시약이 하기로부터 선택될 수 있다:



[0057]

[0058] 상기 식에서 R^1 및 R^2 는 독립적으로 ---CO NH_2 , ---SH , ---H_2 , ---OH , 또는 다른 친핵체일 수 있고, n 은 정수이며, 예를 들어, 1-20, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 등일 수 있다. 일부 실시 형태에서, HA 유도체화 시약은 디하이드라지드, 예컨대 아디프산 디하이드라지드일 수 있다.

[0059] 일부 실시 형태에서, 본 개시내용의 조성물을 제조하는 방법은 GO-HA를 얻는 단계(예: 상기 방법에 의해), GO-HA 컨쥬게이트를 물에 용해시켜 GO-HA 수용액을 얻는 단계, 및 XAV939를 GO-HA 수용액에 첨가하여 혼합물을 형성하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 이는 먼저 XAV939를 비-이온 친수성 중합체, 예를 들어, PEG-400(또는 약 400의 평균 분량량을 갖는 PEG 400)에 용해시킨 다음, XAV939 용액을 GO-HA 컨쥬게이트 수용액에 첨가함에 의해 달성된다.

발명의 효과

[0060] 본 개시내용은 재생장의 양 뿐아니라 연골 재생 및 재생장의 품질 양자 모두에 있어서, 포유류의 급성 부상에 따른 연골의 재생이 유의적으로 증가한다는 신규하고 비예측성의 발견에 기인한다. XAV939와 같은 Wnt 저해제의

투여 후에 연골의 재생이 증가한다는 것이 당업계에 공지되어 있기는 하지만, GO-HA 매트릭스 내에 XAV939를 제공하는 것의 이익 뿐 아니라; GO-HA를 포함하는 매트릭스 내의 XAV939의 적시 투여에 의해 부상당한 연골의 연골 재생을 유의하게 증가시키는 것은 신규하고 비예측성의 것이다.

[0061] DMSO에 용해된 활성 XAV939의 투여와 비교하여 본 개시내용의 조성물의 투여 속도 감소는 치유 속도의 감소를 제공하는 것으로 당업계에 인식된 동물 모델(참조, 예를 들어, 문헌[Sullivan S.R., 2004, Plast. Reconstr. Surg. 113:953-60])에서 급성 연골 부상 후에 연골 재생 증가를 입증하며, 이는 DMSO 중의 XAV939와 비교하여 절반의 시간에 유의하게 개선된 연골 재생장의 양 및 개선된 연골 재생의 품질을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 식염수 및 DMSO 중의 XAV939를 사용한 생검 펀치 상처의 30-일 치료 및 GO-HA, 및 ELU42를 사용한 15-일 치료 사이의, 마우스에서 마주보는 연골 종점(endpoint) 사이의 거리를 보여주고;

도 2는 DMSO 중의 XAV939를 사용한 생검 펀치 상처의 30-일 치료 및 ELU42를 사용한 15-일 치료 사이의, 마우스에서 마주보는 연골 종점 사이의 거리를 보여주며;

도 3은 GO-HA 및 ELU42를 사용한 15-일 치료 사이의, 마우스에서 마주보는 연골 종점 사이의 거리를 보여주고;

도 4는 식염수를 사용한 생검 펀치 상처의 21-일 치료 및 ELU42를 사용한 21-일 치료 사이의, 토끼에서 마주보는 연골 종점 사이의 거리를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 하기 실시예는 본 명세서 기재의 소정의 태양을 예시하기 위한 목적으로 제공되며, 어떤 방식으로든 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0064] 실시예 1: 상처-치료 조성물의 제조

[0065] 조성물의 제조 과정은 미국 특허 제11,369,685 B2호에 개시되어 있다. 간략히, 산화그래핀(탈이온수 중의 5 mg/mL GO 분산액 1.25 g, 250 mL; 공급자: Goographene Inc.)을 250 mL의 초순수 탈이온수에 첨가하고 5 분간 교반하였다. 수산화나트륨 펠렛(3 g(0.075 몰; 공급자: Sigma-Aldrich)을 30 분에 걸쳐 작은 고체 부분으로 혼합물에 첨가하였다. 첨가가 완료되면, 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 이어서 용액을 30 분간 초음파처리한 다음, 클로로아세트산(3.54 g, 0.0375 몰; 공급자: Alfa Aesar)을 20 분에 걸쳐 작은 고체 부분으로 첨가하였다. 이어서 반응 혼합물을 실온에서 18 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 염산(7 mL, 12 N)으로 산성화하였다. 이어서 용액을 원심분리 튜브로 옮겨 5,000 rpm에서 15 분간 원심분리하였다. 이어서 수층을 경사 분리하고 더 많은 초순수 탈이온수(~30 mL)를 튜브에 첨가한 후 재원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복하였다. 원심분리 튜브에 남아있는 침전되고 변형된 산화그래핀에 메탄올(~30 mL)을 첨가하고 5,000 rpm에서 15 분간 원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복하였다. 메탄올을 경사분리한 다음, 건조를 위해 튜브를 실온에서 48 시간 동안 진공하에 놓았다. 이어서 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸 카르보디이미드 하이드로클로라이드(52 mg, 0.00027 몰, 공급자: Alfa Aesar)를 첨가하여 생성물을 유도체화하는 한편 0.1 N 염산을 사용하여 pH를 유지한 다음, 실온에서 5 mL의 초순수 탈이온수 중에 아디프산 디하이드라지드(17 mg, 0.00027 몰; 공급자: Alfa Aesar)를 함유하는 별개의 혼합물에 적가하였다. 첨가가 완료되면, 실온에서 18 시간 동안 교반하였다. 이어서 용액을 24 시간 동안 투석(MWC=3500)하고 동결건조시켜 본 명세서에서 GO-HA로 언급되는 것을 얻었다.

[0066] 11 mg의 GO-HA를 11 mL의 초순수 물에 용해시켜 1 mg/mL의 유효 농도를 생성하였다. 용액을 10 분간 초음파처리하였다. XAV939(11 mg; 공급자: APEBIO)를 PEG-400(0.5 mL)에 첨가하고 30 분간 초음파처리하였다. XAV939 용액을 GO-HA에 적가하고 5 분간 격렬하게 교반하였다. 이어서 조합된 용액을 1 시간 동안 초음파처리한 다음 실온에서 18 시간 동안 교반하였다. 하이드록시프로필 셀룰로스(0.2 g; 공급자: Sigma-Aldrich)를 실온에서 적은 부분으로 나누어 첨가하면서 격렬하게 교반하였다. 첨가가 완료되면, 용액을 실온에서 24 시간 동안 교반하여 GO-HA/XAV939 복합체의 점성 용액을 형성하였다. 복합체를 1.0 mg/mL GO-HA 및 0.182 g/mL 하이드록시프로필 셀룰로스 중의 최종 농도 1.0 mg/mL XAV939(ELU42)로 사용하였다.

[0067] 실시예 2: 본 개시내용의 화합물 투여 후 마우스에서의 연골 재생장

[0068] C57B1/6J 마우스를 The Jackson Laboratory(미국 메인주 바 하버)로부터 구입하여 PPY에 의해 유지하였다. C57B1/6J 마우스(적어도 3 월령)를 탁상 실험실 동물 마취 시스템(VetEquip Inc., 미국 캘리포니아 플레전턴)을

사용하여 투여된 O₂ 중의 3-5% 이소플루란으로 마취시켰다. 앞서 기재된 바와 같이(문헌[Rai, M.F. et al, 2021, *Arthritis Rheum.*, 64:2300-2310]), 일회용 생검 펀치(Acuderm Inc., 미국 플로리다 포트 로더데일)를 사용하여 각각의 귀의 연골 영역의 중앙에 2 mm 생검 펀치 상처를 만들었다. 디메틸 설폭사이드(DMSO)에 5 μM 로 용해된 XAV939(Selleck Chemicals, 미국 텍사스 휴스턴 S1180) 또는 DMSO 대조군 용액을 30 일 동안 매일 귀당 5 μL를 사용하여 귀를 국소적으로 치료함으로써 1일 7.81 μg의 XAV939를 투여하였다.

[0069] 30 일의 치료 후, 니콘 쿨픽스 8700 디지털 카메라(Nikon Corporation, 일본)를 사용하여 귀를 영상화하였다. 상처 종료를 정량화하기 위하여, 마우스를 희생시킨 후 귀를 절제하고, 고정시키고, 마이크로마스터 도립 현미경(Thermo Fisher Scientific, 미국 메사추세츠 월섬)에 부착된 디지털 카메라에 의한 검사용 현미경 슬라이드 상에 놓았다. 고정은 24 시간 동안 10% 완충된 포르말린에 침지시키고 부상 부위를 가로질러 세로로 자른 다음 절편용 파라핀 안에 임베딩(embedding)시켜 이루어졌다. 이어서 조직 절편을 트리콤 블루(Trichome blue)로 염색하고, 영상화하고, 올림푸스 DP71 현미경 카메라(Olympus America, 미국 펜실베이니아 센터 밸리)로 분석하였다.

[0070] ELU42 투여의 경우, STZ-유도 I형 당뇨병 C57B1/6J 마우스를 사용하였다. 270-478 mg/dL 사이의 혈청 글루코스 수준을 갖는 8 내지 12-주령의 당뇨병 유도된 마우스를 사용하여 연구를 개시하였다. 마우스를 탁상 실험실 동물 마취 시스템(VetEquip Inc., 미국 캘리포니아 플레전턴)을 사용하여 투여된 O₂ 중의 3-5% 이소플루란으로 마취시켰다. 앞서 기재된 바와 같이(문헌[Rai, M.F. et al, 2021, *Arthritis Rheum.*, 64:2300-2310]), 일회용 생검 펀치(Acuderm Inc., 미국 플로리다 포트 로더데일)를 사용하여 각각의 귀의 연골 영역의 중앙에 2 mm 생검 펀치 상처를 만들었다. 1 mg/mL의 XAV939(n=6)를 함유하는, 실시예 1에 기재된 바와 같이 준비된, 50 μL의 ELU42 또는 GO-HA의 대조군 용액으로 15 일 동안 하루 걸러 귀를 국소적으로 치료하였다. 상처 종료(wound closure)의 정량화를 위해, 마우스를 희생시킨 후 귀를 절제하고, 현미경 슬라이드(Denville Scientific, 미국 뉴저지 사우스 플레인필드) 상에 놓고, 마이크로마스터 도립 현미경(Thermo Fisher Scientific, 미국 메사추세츠 월섬)에 부착된 니콘 쿨픽스 8700을 사용하여 영상화하였다. 절제된 귀를 24 h 동안 10% 완충된 포르말린에서 고정시키고, 부상 부위를 가로질러 세로로 절단하고 파라핀 블록 안에 임베딩시켰다. 임베딩된 조직 절편을 트리콤 블루로 염색하고, 영상화하고, 올림푸스 DP71 현미경 카메라(Olympus America, 미국 펜실베이니아 센터 밸리)를 사용하여 분석하였다.

[0071] 생검 펀치 상처의 치료: 30 일 동안 매일 DMSO 중의 XAV939, 30 일 동안 매일 DMSO(대조군으로서), 15 일 동안 하루 걸러 ELU42, 및 15 일 동안 하루 걸러 GO-HA(대조군으로서) 후에 4 가지 분리된 동물군에서 마주보는 연골 종판 사이의 거리를 측정하였다. 도 1은 DMSO 중의 XAV939를 사용한 생검 펀치 상처의 30 일 치료, GO-HA를 사용한 생검 펀치 상처의 15 일 치료, 식염수를 사용한 생검 펀치 상처의 30 일 치료, 및 ELU42를 사용한 15-일 치료 사이의, 마주보는 연골 종판 사이의 거리를 보여주며; 여기에서 ELU42의 투여는 비교된 바와 같이 절반의 시간 동안 투여된 더 적은 용량의 활성 성분 XAV939를 사용하여 연골 재생장에 있어서 유의한(ANOVA *p<0.05, 독립 표본 t-검정 **p<0.001) 정량적 개선을 제공하였으며, ELU42 및 DMSO 사이에는 상당한 차이가 관찰되었다(ANOVA **p<0.0001). GO-HA와 비교하여 ELU42의 경우 상당히 유의한 개선이 관찰되었다(독립 표본 t-검정 *p<0.05). 추가로, 상처에서 연골 재생장의 성질 및 특징은 각각 DMSO 및 GO-HA 대조군과 비교하여 DMSO 중의 XAV939 및 ELU42에서 개선된 것으로 관찰되었다. 도 2는 DMSO 중의 XAV939를 사용한 생검 펀치 상처의 30-일 치료와 ELU42를 사용한 15-일 치료 사이의, 마주보는 연골 종판 사이 거리의 직접적인 비교를 보여준다. 도 3은 GO-HA를 사용한 생검 펀치 상처의 15-일 치료와 ELU42를 사용한 15-일 치료 사이의, 마주보는 연골 종판 사이 거리의 직접적인 비교를 보여준다.

[0072] 실시예 3: 본 개시내용의 화합물 투여 후 토끼 귀에서의 연골 재생장

[0073] 토끼에서 연골 상처 후 연골 재생 증가에 대한 본 개시내용의 조성물의 시험을 위하여; 인지질의 일부로서 본 개시내용의 예시적인 조성물을 다음과 같이 제제화하였다.

[0074] XAV939(0.09 wt%)를 2 mL(4.6 wt%)의 부틸렌 글리콜 및 2 mL(4.6 wt%)의 폴리소르베이트 20에 현탁시키고 교반 하면서 10 min 동안 60 °C로 가열하였다. 이어서 혼합물을 초음파처리조에 넣고 30 분 동안 초음파처리하였다. 포스파티딜콜린(1.2 wt%)을 2 mL(4.6 wt%)의 에탄올에 서서히 용해시켰다. 일단 용해되면, 용액을 XAV939/부틸렌 글리콜/폴리소르베이트 20 혼합물에 첨가하고 실온에서 5 min 동안 교반한 다음 30 분간 초음파처리하였다. 30 분 후, 용액을 미리 만들어진 물(84%) 중의 GO-HA(0.09 wt%) 용액에 첨가하고 이 새로운 용액을 30 min 동안 초음파처리하였다. 초음파처리 후, 하이드록시프로필셀룰로스(0.75 wt%)를 혼합물에 첨가하고, 혼합물을 사용하

기 전에 실온에서 24 시간 동안 교반하여 ELU42의 리포솜 제제를 제공하였다.

[0075] 뉴질랜드 흰색 토끼를 웨스턴 오레곤 래빗 컴퍼니로부터 구입하였다. 이소플루란(1-5% 이소/ 2.0 L O₂)의 흡입 또는 근육내 투여된 케타민/질라진 각테일에 의해 본 명세서에 기재된 생검 절차를 완료하기에 가능한 최소량의 시간 동안 동물을 마취시켰다. 수술 전, 각각의 귀의 복부(ventral side) 상의 털을 면도칼 또는 다른 적절한 방법(예: 제모제)을 사용하여 완전히 제거하고 생검 부위를 클로르헥시딘 및 알코올을 사용하여 외과적으로 스크러빙하였다. 일회용 생검 펀치를 사용하는 펀치 생검을 통해 6 mm 크기의 상처를 만들었는데, 상처는 귀 전체에 걸쳐 연장되었다. 동물 당 8개 이하의 총 상처를 만들었고, 절제된 조직을 폐기하였다. 상처를 만든 후, 필요한 경우 상처창을 멸균 식염수 및/또는 거즈를 사용하여 세정함으로써 임의의 외래 물질/성긴 조직 잔해를 제거하였다.

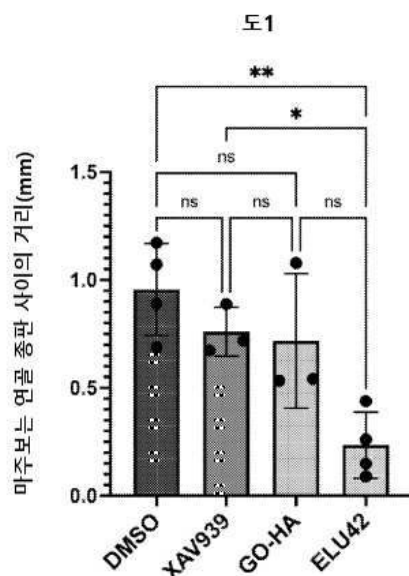
[0076] 21 일 동안 하루 걸러 0.3 mL의 식염수 또는 0.3 mL의 1 mg/mL ELU42의 리포솜 제제로 상처에 투여하였다. 각각의 투여일에 멸균 재료(즉, 식염수로 적신 멸균 거즈)로 상처 표면을 세정하여 임의의 혈병, 과잉 삼출물, 드레싱 잔해, 시험 품목 잔류물 또는 상처창 상의 조직 빌드업을 제거하였으나, 상처 표면을 건드리지 않도록 주의하였다. 멸균 적용기를 사용하여 상처 부위에 걸쳐 균일하게 얇은 층으로 지정된 상처 부위에 시험 품목을 직접 적용하였다. 각각의 투여 후 연구 프로토콜에 따라 또는 담당 수의사에 의해 권고되는 대로 상처 부위를 감싸거나/붕대로 감았다. 각각의 투여일에 상처가 철저히 세정된 후 투여일 상의 용량 투여 전에 영상을 얻었다. 정확한 측정을 보장하기 위해 각각의 영상을 상처 앞에서 직접 취하였고 적절한 식별장치로서 자를 포함시켰다.

[0077] 도 4는 식염수를 사용한 치료 및 ELU42의 리포솜 제제를 사용한 치료 사이의, 토끼 귀에 걸쳐 있는 생검 펀치 상처의 21-일 치료 사이의, 마주보는 연골 종판 사이의 거리에 대한 직접적인 비교를 보여준다. 알 수 있는 바와 같이, ELU42는 식염수와 비교하여 연골 재생의 통계적으로 유의한 개선(ANOVA *p<0.05, 독립 표본 t-검정)을 갖는다.

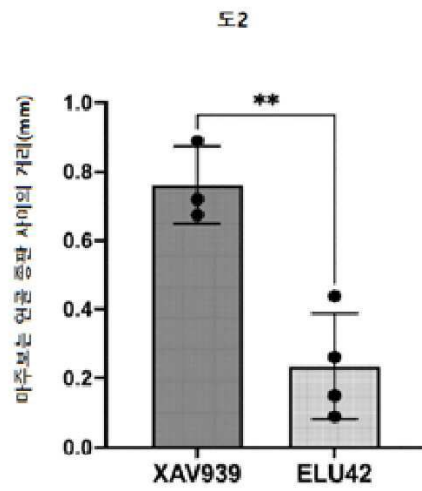
[0078] 본 발명의 특정 실시 형태가 전기에 기재되어 있지만, 본 발명의 범위 내에서 다른 실시 형태도 가능하며 이들은 본 명세서에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 예시적인 실시 형태를 통해 입증된 바와 같이 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않고 본 발명의 변형 및 이에 대한 조정(나타내지 않음)이 가능함은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구범위의 범위에 의해서만 제한되는 것으로 간주된다.

도면

도면1



도면2



도면3

