



등록특허 10-2493376



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월27일

(11) 등록번호 10-2493376

(24) 등록일자 2023년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) A61K 35/36 (2015.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/062 (2013.01)
A61K 35/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7008968
(22) 출원일자(국제) 2015년09월03일
심사청구일자 2020년09월03일
(85) 번역문제출일자 2017년03월31일
(65) 공개번호 10-2017-0055497
(43) 공개일자 2017년05월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/048442
(87) 국제공개번호 WO 2016/037016
국제공개일자 2016년03월10일
(30) 우선권주장
62/051,003 2014년09월16일 미국(US)
62/045,506 2014년09월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02014039908 A1*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 36 항

(73) 특허권자
더 브리검 앤드 우먼즈 하스피탈, 인크.
미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캄브리지 메사추세츠 애브뉴 77
(72) 발명자
카프, 제프리, 엠.
미국 02446 메사추세츠 브록클린 드와이트 스트리트 36 #4
랑거, 로버트, 에스.
미국 02459 메사추세츠 뉴턴 몬트베일 로드 98
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **청력 손실의 치료를 위해 내이 털세포를 생성하기 위한 조성물, 시스템, 및 방법**

(57) 요약

말세포에서 털세포로 분화하는 능력을 유지시키면서 줄기/전구체 세포가 증식하도록 유도하는 것을 포함하는, 와우 세포 집단에 포함된 줄기/전구체 지지 세포의 자가-재생을 유도하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1a



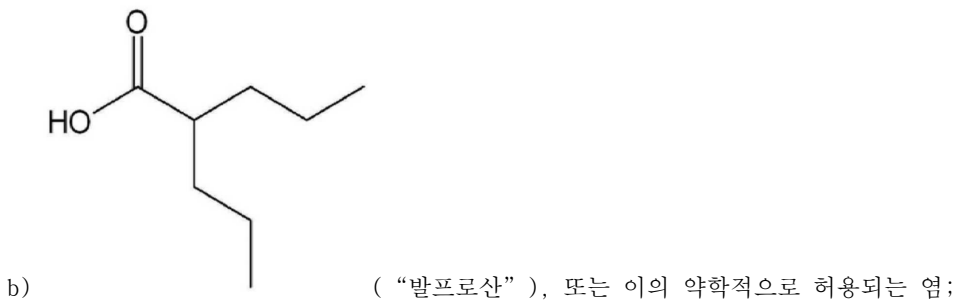
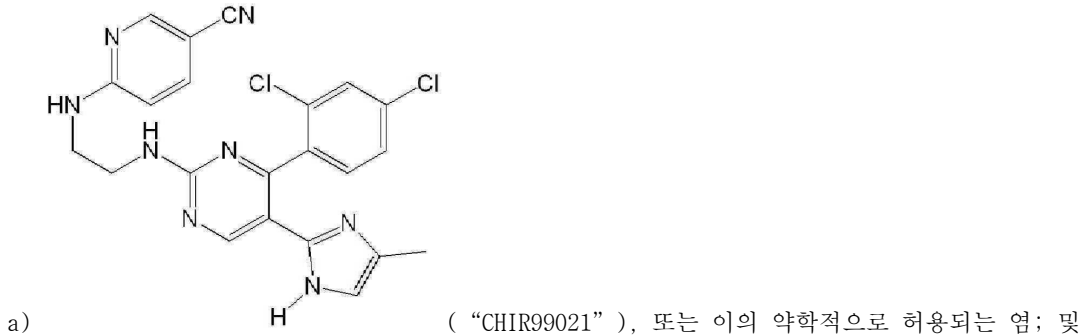
- | | |
|---|---|
| <p>(52) CPC특허분류
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2501/42 (2013.01)</p> <p>(72) 발명자
인, 시아오레이
미국 02169 매사추세츠 퀸시 그린리프 스트리트 59
아파트먼트 7
조쉬, 니틴
미국 02135 매사추세츠 보스턴 도체스터 애비뉴
928 아파트먼트 8</p> | <p>(56) 선행기술조사문헌
US20100267141 A1
JP2011518195 A*
Nature Methods volume 11, pages106-112 (2014)
STEM CELLS 2012;30:61-68
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> |
|---|---|
-

명세서

청구범위

청구항 1

다음이 분산된 생체적합성 매트릭스를 포함하며:



여기서 생체적합성 매트릭스는 히알루론산, 히알루로네이트, 레시틴 겔, 플루노닉, 폴리(에틸렌글리콜), 폴록사머, 키토산, 자일로글루칸, 콜라겐, 피브린, 폴리에스테르, 폴리(락티드), 폴리(글리콜리드), 폴리(락틱-코-글리콜산)(PLGA), 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 글리세롤 모노올레에이트, 폴리언하이드라이드, 폴리카프로락톤 수크로스, 또는 글리세롤 모노올레에이트 또는 이의 조합 중 하나 이상을 포함하는, 청력 손실을 치료 또는 예방하기 위한 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 조성물은 조절 방출 제형인, 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 대상체에 경고막적으로 투여되는 경우 조절 방출 제형은 즉시 방출, 지연 방출, 지속 방출, 연장된 방출, 가변적 방출, 박동적 방출, 또는 a) CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 b) 발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 중 하나 이상의 이중-양식 방출을 제공하는, 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.01중량% 내지 50중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.01중량% 내지 50중량%인, 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 50중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 50중량%인, 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 40중량%이며; 및
발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 40중량%인, 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 30중량%이며; 및
발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 30중량%인, 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 20중량%이며; 및
발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 20중량%인, 조성물.

청구항 9

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 10중량%이며; 및
발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 10중량%인, 조성물.

청구항 10

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 10중량%이며; 및
발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 20중량%인, 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1mg/mL 내지 70mg/mL이며; 및
발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.01중량% 내지 50중량%인, 조성물.

청구항 12

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 동결 건조된 형태이거나; 또는 발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 동결 건조된 형태인, 조성물.

청구항 13

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, CHIR99021, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 수화된 형태이거나; 또는 발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 수화된 형태인, 조성물.

청구항 14

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 생체적합성 매트릭스는 히알루론산을 포함하는, 조성물.

청구항 15

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 생체적합성 매트릭스는 폴록사머인, 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 폴록사머는 폴록사머-407인, 조성물.

청구항 17

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 청력 손실을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 것으로서, 상기 방법은 와우 조직을 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 조성물.

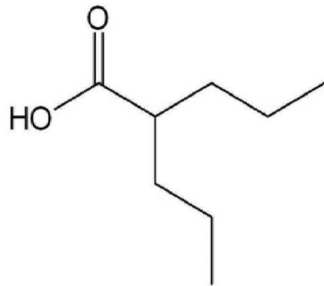
청구항 18

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 모 집단을 포함하는 와우 조직에서 와우 세포 집단을 확장시키기 위한 방법에 사용하기 위한 것으로서, 상기 방법은 와우 조직을 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 조성물.

청구항 19

다음이 분산된 생체적합성 매트릭스를 포함하며:

a) LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및



b) (“발프로산”), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;

여기서 생체적합성 매트릭스는 히알루론산, 히알루로네이트, 레시틴 겔, 플루노닉, 폴리(에틸렌글리콜), 폴록사머, 키토산, 자일로글루칸, 콜라겐, 피브린, 폴리에스테르, 폴리(락티드), 폴리(글리콜리드), 폴리(락틱-코-글리콜산)(PLGA), 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 글리세롤 모노올레에이트, 폴리언하이드라이드, 폴리카프로락톤 수크로스, 또는 글리세롤 모노올레에이트 또는 이의 조합 중 하나 이상을 포함하는, 청력 손실의 치료 또는 예방하기 위한 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서, 조성물은 조절 방출 제형인, 조성물.

청구항 21

제 20항에 있어서, 대상체에 경고막적으로 투여되는 경우 조절 방출 제형은 즉시 방출, 지연 방출, 지속 방출, 연장된 방출, 가변적 방출, 박동적 방출, 또는 a) LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 b) 발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 중 하나 이상의 이중-양식 방출을 제공하는, 조성물.

청구항 22

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,

LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.01중량% 내지 50중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.01중량% 내지 50중량%인, 조성물.

청구항 23

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,

LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 50중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 50중량%인, 조성물.

청구항 24

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,

LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 40중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 40중량%인, 조성물.

청구항 25

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,

LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 30중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 30중량%인, 조성물.

청구항 26

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,

LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 20중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 20중량%인, 조성물.

청구항 27

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,

LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 10중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 10중량%인, 조성물.

청구항 28

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,

LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 10중량%이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1중량% 내지 20중량%인, 조성물.

청구항 29

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서,

LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.1mg/mL 내지 70mg/mL이며; 및

발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 조성물의 0.01중량% 내지 50중량%인, 조성물.

청구항 30

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 동결 건조된 형태이거나; 또는 발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 동결 건조된 형태인, 조성물.

청구항 31

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, LY2090314, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 수화된 형태이거나; 또는 발프로산, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 수화된 형태인, 조성물.

청구항 32

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 생체적합성 매트릭스는 히알루론산을 포함하는, 조성물.

청구항 33

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 생체적합성 매트릭스는 폴록사머인, 조성물.

청구항 34

제 33항에 있어서, 폴록사머는 폴록사머-407인, 조성물.

청구항 35

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 청력 손실을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 것으로서, 상기 방법은 와우 조직을 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 조성물.

청구항 36

제 19항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 모 집단을 포함하는 와우 조직에서 와우 세포 집단을 확장시키기 위한 방법에 사용하기 위한 것으로서, 상기 방법은 와우 조직을 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 조성물.

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

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 2014년 9월 3일 출원된 미국 가특허 출원 제62/045,506호, 및 2014년 9월 16일 출원된 미국 가특허 출원 제62/051,003호의 이익을 주장한다. 상기 출원의 전체 교시는 본원에 참조로서 포함된다.
- [0003] 정부 지원
- [0004] 본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 부여된 허가번호 R01 DE013023 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 본 발명은 국립 보건원에 의해 부여된 허가번호 HL095722 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

배경 기술

- [0005] 발명의 배경
- [0006] 내이의 털세포에 대한 영구적인 손상은 감각신경 청력 손실을 발생시켜, 인구의 큰 비율에서 의사소통의 어려움을 초래한다. 털세포는 음향 자극을 전달하는 수용체 세포이다. 손상된 털세포의 재생은 현재 보청 장치 이외의 치료법이 없는 상황에서 치료의 활로를 제공한다. 비록 털세포가 포유동물 와우를 재생시키지는 않지만, 하등 척추동물에서 새로운 털세포는 털세포를 둘러싼, 소위 지지 세포라고 하는 상피 세포로부터 생성된다.
- [0007] 포유동물 와우에 대한 손상 후 청력 손실의 팽배는 소리를 탐지하는 주요 구성요소인 털세포 및/또는 뉴런의 자발적 재생의 결여 때문인 것으로 여겨져 왔다 (Wong and Ryan, 2015). 인간은 약 15,000개의 내이 털세포를 가지고 태어나며 털세포는 출생 후 재생되지 않는다. 정상적인 와우 상피에서 털세포를 둘러싼 지지 세포는 귀독성 손상 후 신생 마우스에서 새로운 털세포로 분화될 가능성이 있다 (Bramhall et al. 2014). 계통 추적을 이용하여, 대부분 외부 털세포인 새로운 털세포는 *Lgr5*-발현 내부 기둥 및 제 3 다이테르스 세포로부터 발생하는 것으로 나타났고, 새로운 털세포 생성은 *Notch*의 약리학적 억제에 의해 점진적으로 증가하는 것으로 나타났다 (Bramhall et al. 2014, Mizutani et al. 2014). 신생 포유동물 와우는 단독 손상 후 털세포 재생을 위한 어떤 능력을 가지고 있고 (Cox et al. 2014) *Lgr5*-양성 (*Lgr5*+) 세포는 와우에서 털세포 전구체로서 작용한다고 (Chai et al. 2011, Shi et al. 2012) 가정되었다.
- [0008] 인간에서 청각 기능장애는 이과학 및 청각학의 의학 분야에서 계속 진행 중인 문제이다. 청각 기능장애는 전형적으로 큰 소리에 대한 급성 및 만성 노출, 귀독성 화학물질, 및 노화로부터 발생한다. 85 데시벨을 초과한 소리는 청력 손실을 야기할 수 있으며 총소리, 폭탄 폭발, 제트 엔진, 전동 공구, 및 음악 콘서트와 같은 음원에 의해 발생한다. 다른 일상적인 활동 및 제품이 또한 헤어 드라이어, MP3 플레이어, 잔디 깎는 기계, 및 블렌더 사용과 같은 고강도 소음을 발생시킨다. 군인은 특히 전형적인 군대 소음 노출로 인해 소음으로 인한 청력 손실의 위험이 있다. 소음으로 인한 청력 손실의 부작용은 이명 (귀 안이 울림), 언어 이해의 감소, 청각과민, 누가 현상(recruitment) 및 다양한 유형의 청각 정보처리 장애를 포함한다. 일반적으로 사용되는 약물로의 노출도 청각 기능장애를 유발할 수 있다. 예를 들어, 항암 요법, 항생제 및 다른 약물로 치료된 환자는 종종 부작용으로서 청력 손실을 일으킨다. 또한, 산업 화학물질 및 가스로의 노출이 청각 장애를 유발할 수 있다. 청각 기능장애는 서구 사회에서 흔한 노화의 결과이다. 청력 장애는 감염 (예컨대, 중이염), 유전적 소인, 기계적 상해, 종양, 시끄러운 소리 또는 소음에 장기간 노출, 노화 및 말초 청각 시스템의 뉴런 및/또는 털세포를 손상시키는 화학물질에 의해 유발된 귀독성 (예컨대, 항생제 또는 플라틴 약물)을 포함하는 다양한 원인 때문일 수 있다. 이는 급성 소음으로 인해 야기될 수 있거나 시간 경과에 따라 점진적으로 나타날 수 있다.
- [0009] 현재, 청력 손실의 극히 소수의 병증만이 실제로 치유될 수 있다. 보청기와 같은 청력 장치는 말의 명료성을 개선시킬 수 없는 것을 포함하는 제약이 있다. 청각 장애의 영향을 받은 사람들 중 20% 미만이 현재 보청기를 사용한다. 노화-관련, 소음 또는 약물로 인한 청각 기능장애의 경우, 현재 장애를 "치료"하거나 이의 중증도를 줄이는 유일한 효과적인 방법은 흔히 과도한 소음을 피하고 귀 보호기를 사용하고, 건강한 생활 습관을 실천하고, 가능한 경우 귀독성 약물 및 물질에 대한 노출을 피하는 예방 뿐이다.
- [0010] 일단 청력 손실이 발생하면, 사람들은 보청기를 사용하여 청력 손실을 교정할 수 있다. 그러나, 이러한 보청물의 성능이 진보하였음에도 불구하고, 이들은 여전히 상당한 한계를 갖는다. 예를 들어, 보청기는 주로 소리를 증폭시키는 것이며, 말의 명료성 손상, 소음 속 담화 장애(speech in noise deficits), 이명, 청각과민, 음량

누가현상 및 다양한 다른 유형의 중추 청각 정보처리 장애와 같은 역치상 또는 후미로성 장애를 교정할 수 없다. 보청기는 손상되지 않은 세포를 자극하여 본질적으로 소리를 증폭시키지만, 손상된 세포의 회복을 돕거나 손상되지 않은 기존 세포의 기능을 최대화하는 치료법은 없다.

- [0011] 완전 또는 최중증 난청의 경우, 와우 임플란트를 이용할 수 있다. 이 장치는 와우에 수술적으로 이식된 전극을 통해 전기 자극을 전송한다. 와우 임플란트는 언어 능력이 가장 빠르게 발달하는 시기인 2 또는 3세 무렵에 이식되면 청각장애 아동에게 특히 도움이 될 수 있다. 그러나, 와우 임플란트는 침습술이며 고가이다. 또한, 와우 임플란트는 이익을 달성할 생육가능한 뉴런을 필요로 한다.
- [0012] 미국인의 약 17%는 청력 손실을 가지며 그 숫자의 절반은 65세 미만이다. 2030년까지 청력 손실을 갖는 미국인의 수는 7000만 명을 초과할 것으로 예측된다.
- [0013] 전세계적으로 약 3억 명이 현재 중등도 내지 중증도 청력 손실로 고통받고 있으며, 이 숫자는 2015년까지 7억 명으로 증가할 것으로 예상된다. 이 사람들 중 대부분은 소음으로 인한 청력 손실로 고통을 겪을 것이며, 4명의 미국인 중 1명은 소음 위험에 직업적으로 노출되어 영구적인 청력 손실이 발생할 것이다. 첨단 기술 센터 (Commercialization of Advanced Technology), 국방부 및 VA에 따르면, VA는 청력 손실 보상에 10억 달러 이상을 지출하고 있다. 해군, 해병대 및 공군(합병)은 22,000건의 새로운 청력 손실 청구를 제기하며, 청력 손실은 연간 560억 달러 이상의 경제비용을 초래한다.
- [0014] 따라서, 상해를 입기 전에 청각 세포를 보호하고 상해 후에는 기존 세포의 기능을 보존/증진할 필요성을 오랫동안 느껴 왔다. 하기 기재된 대로, 특정 구체예에서, 본 발명은 청각 기능장애를 예방하고 치료하기 위한 조성물, 시스템, 및 방법을 제공한다.
- [0015] 청력 손실을 예방하거나 치료하기 위한 새로운 요법에 의해 도움을 받을 수 있는 다수의 환자 집단, 예를 들어 현기증, 이명이 있는 환자, 또는 와우 임플란트가 필요한 환자, 청력 손실을 갖고 있지만 와우 임플란트에 적합하지 않은 환자들, 및 만성 경증/중등도 또는 중증도 청력 손실이 있는 환자들 존재한다.
- [0016] 이전의 연구에 따르면 주기 활성화의 직접 억제제 (예컨대, p27kip1, Rb1, p19ink4d, p21cip1)를 조작하는 것이 텔세포를 포함한 많은 세포의 증식을 야기하는 것으로 나타났다. 세포 주기에 재진입한 텔세포가 그 뒤에 사멸하면 청력이 나빠진다 (Salvi R.J. Hair Cell Regeneration Repair and Protection, Sage et al 2005, 2006). P27^{Kip1} 또는 Rb와 같은 세포 주기 유전자의 조작에서 비롯된 지지 세포의 증식 후에는 텔세포로의 분화가 관찰되지 않았다 (Yu et al. 2010, Liu et al. 2012).
- [0017] 줄기 세포는 신체에서 여러 세포 유형을 생성하는 탁월한 능력을 나타낸다. 배아 줄기 세포 외에도, 조직 특이적 줄기 세포는 발생 과정 뿐만 아니라 성체에서 항상성 및 손상 회복에도 중요한 역할을 한다. 줄기 세포는 분화를 통해 조직 특이적 세포 유형을 생성할 뿐만 아니라 증식을 통해 스스로를 재생한다. 상이한 줄기 세포의 특징은 조직마다 다르며, 이의 고유한 유전적 및 후성적 상태에 의해 결정된다. 그러나, 상이한 줄기 세포의 자가-재생 및 분화 사이의 균형은 모두 엄격하게 제어된다. 제어되지 않은 자가-재생은 줄기 세포의 과증식 및 아마도 종양 형성을 초래할 수 있지만, 제어되지 않은 분화는 줄기 세포 풀(pool)을 소모시켜 조직 항상성을 유지하는 능력의 손상으로 이어질 수 있다. 따라서, 줄기 세포는 지속적으로 환경을 감지하고 적절하게 증식, 분화 또는 아포토시스에 반응한다. 줄기 세포 증식 및 분화의 시점 및 정도를 제어함에 의해 재생을 유도하는 것이 바람직할 것이다. 시간 경과에 따라 제거되는 소분자로 증식을 제어하는 것은 줄기 세포의 증식 및 분화의 시점 및 정도를 조절할 수 있게 할 것이다. 놀랍게도, 상이한 조직으로부터의 조직 줄기 세포는, 매우 상황에 의존적인 방식이긴 하지만, 자가-재생 및 분화의 조절을 위해 제한된 수의 신호전달 경로를 공유한다. 이러한 경로 중 하나는 Notch 경로이다.
- [0018] Notch 경로는 간단하지만 독특한 작용 양식을 보유하는 진화적으로 보존된 신호전달 경로를 나타낸다. 핵심 Notch 경로는 소수의 구성요소만을 함유한다. 표준 Notch 경로는 신호-송신 세포의 표면 상의 Notch 리간드가 이웃한 신호-수신 세포 상의 Notch 수용체에 결합함에 의해 활성화된다. 이 사건은 Notch 세포내 도메인 (NICD)의 γ-세크레타제-매개 방출을 포함하는, Notch 수용체의 단백질분해 절단의 캐스케이드를 개시한다. 그 후 NICD 단편은 핵으로 들어가 표적 유전자 전사를 유도한다. 대부분의 상황에서, 표준 Notch 경로는 이웃한 세포들 간의 물리적 접촉을 필요로 하므로, 한 세포의 운명을 바로 옆 세포의 운명과 연결시켜, 줄기 세포의 자가-재생 및 분화를 제어하는 정교한 방법을 제공한다. Notch 경로는 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 조혈 줄기 세포 뿐만 아니라 Lgr5 상피 줄기 세포를 포함하는, 많은 유형의 줄기 세포를 조절하는 것으로 나타났다 (Koch et al, 2013; VanDussen et al, 2012).

[0019] Lgr5는 다양한 범위의 조직에 걸쳐 발현되며 장 상피 (Barker et al., 2007), 신장, 모낭, 및 위 (Barker et al., 2010; Haegebarth & Clevers, 2009)와 같은 특정 조직에서 성체 줄기 세포의 바이오마커로 확인되었다. 포유동물 내이 털세포가 LGR5⁺ 세포로부터 유래된다는 것은 2011년에 최초로 공개되었다 (Chai et al., 2011, Shi et al., 2012). Lgr5는 Wnt/베타 카데닌 경로의 공지된 구성요소이며, 분화, 증식, 및 줄기 세포 특성 유도에 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다 (Barker et al., 2007).

[0020] 종래 연구는 Atoh1의 발현을 향상시키는 메커니즘에 특히 초점을 맞춰, 털세포 형성을 유도하는 유전자의 활성화 또는 강제 발현을 통해 지지 세포를 털세포로 교차분화(transdifferentiation)하는 것에 초점을 두었다 (Birmingham et al., 1999; Zheng and Gao, 2000; Izumikawa et al., 2005; Mizutani et al., 2013). 흥미롭게도, Atoh1 벡터로 형질도입된 세포는 전정 표현형을 획득하고 (Kawamoto et al., 2003; Huang et al., 2009; Yang et al., 2012, 2013), 완전한 발생은 결여된 것으로 나타났다. 언급된 대로, 유전자 삽입을 통해 Atoh1을 상향조절하는 것은 천연 와우 내에서 발견되지 않은 방식으로 거동하는 비-와우 세포 유형을 생성하는 것으로 나타났다. 또한, 이러한 방법은 털세포 수는 증가시키나 지지 세포 수는 감소시킨다. 지지 세포는 특화된 역할을 하는 것으로 공지되어 있으므로 (Ramirez-Camacho 2006, Dale and Jagger 2010), 이러한 세포의 손실은 적절한 와우 기능에 문제를 일으킬 수 있었다.

발명의 내용

[0021] 발명의 개요

[0022] 따라서, 본 발명의 다양한 양태 중에서, 자가-재생을 위한 집단의 능력, 즉 동등한 증식 및 '세포 운명 명세서' 가능성을 지닌 딸세포의 반복 생성 및 분화의 능력, 즉 분화에 특화된 딸세포의 생성을 위한 능력을 증가시키기 위해 와우 지지 세포 집단에서 Wnt 경로를 활성화시키는 방법이 주목될 수 있다. 바람직하게는, Wnt 경로는 집단의 임의의 유전적 변형 없이 집단의 구성원에서 c-myc 유전자의 업스트림에서 활성화된다. 대신, Wnt 경로는 바람직하게는 그러한 활성을 일시적으로 유도하는 소분자에 의해 활성화된다. 추가로, 지지 세포 집단은 바람직하게는 LGR5⁺이고 코르티 기관에 내인성인 지지 세포를 포함한다.

[0023] 본 발명의 추가 양태는 와우 세포 집단으로 구성된 줄기/전구 지지 세포의 자가-재생을 유도하는 방법이다. 다시 말해, 줄기/전구 지지 세포는, 딸세포에서, 털세포로 분화되는 능력을 유지하면서, 증식하도록 유도된다 (즉, 분열되어 딸세포 형성). 반대로, 줄기/전구 지지 세포가 단순히 증식하도록 유도된 경우 (다능성을 유지하지 않음), 딸세포는 털세포로 분열할 능력이 부족할 것이다. 추가로, 단순히 기존 줄기/전구 세포 집단의 분화를 시행하는 것만으로 줄기 세포 풀을 소진할 가능성이 있다. 따라서, 본 발명은 기존 와우 지지 세포가 분화되기 전에 증식하도록 유도되고, 그 후 확장된 집단이 털세포로 분화하도록 허용하는 (또는 일부 구체예에서 심지어 유도하는) 방법을 제공한다. 바람직하게는, 증식은 집단의 임의의 유전적 변형 없이 집단의 구성원에서 c-myc 유전자의 업스트림에서 Wnt 경로를 활성화시킴에 의해 유도된다. 대신, 증식은 바람직하게는 그러한 활성을 일시적으로 유도하는 소분자에 의해 활성화된다. 추가로, 특정 구체예에서 지지 세포 집단은 바람직하게는 LGR5⁺이고 코르티 기관에 내인성인 지지 세포를 포함한다.

[0024] 특정 구체예에서, 따라서, 본 발명은 지지 세포의 집단의 자가-재생을 유도하는 능력을 갖는 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 "유도된 다능성 줄기 세포"를 생성하는데 이용되는 것들과 같이, 줄기 세포 특성 유도에 관여하는 것으로 알려진 경로 및 메커니즘을 활성화하는 능력을 지닌다 (조합된 Wnt 자극, HDAC 억제, Tgf-베타 억제, RAR 활성화, DKK1 억제). 바람직하게는, 경로는 소분자에 의해 활성화된다. 예를 들어, 시험관 내 지지 세포 집단에 적용될 때 바람직한 조성물은 줄기 세포 증식 검정에서 집단이 고도로 및 고순도로 증식하도록 유도하고, 또한 줄기 세포 분화 검정에서 집단이 털세포의 고순도 집단으로 분화하도록 한다. 한 그러한 구체예에서, 조성물은 증식에 의해 여러 세대 동안 분열할 수 있고 생성된 세포의 높은 비율이 털세포로 분화되는 능력을 유지할 수 있는 줄기 세포를 생산함에 의해 줄기 세포 특성을 유도하고 유지한다. 추가로, 증식하는 줄기 세포는 Lgr5, Sox2, Opem1, Phex, lin28, Lgr6, cyclin D1, Msx1, Myb, Kit, Gdnf3, Zic3, Dppa3, Dppa4, Dppa5, Nanog, Esrrb, Rex1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l, Utl1, Tcl1, Oct4, Klf4, Pax6, Six2, Zic1, Zic2, Otx2, Bmi1, CDX2, STAT3, Smad1, Smad2, smad2/3, smad4, smad5, 및 smad7 중 하나 이상을 포함할 수 있는 줄기 세포 마커를 발현시킨다.

[0025] 특정 구체예에서, 본 발명은 세포의 모 집단을 포함하는 와우 조직에서 와우 세포의 집단을 확장시키는 방법을 제공한다. 이러한 구체예에서, 상기 방법은 와우 조직을 줄기 세포 증식제와 접촉시켜 와우 조직에서 확장된 세

포 집단을 형성하는 것을 포함하고, 여기서

- [0026] 줄기 세포 증식체는 (i) 줄기 세포 증식 검정의 증식 검정 기간 동안 증식 검정 최초 세포 집단으로부터 증식 검정 최종 세포 집단을 형성할 수 있고, (ii) 줄기 세포 분화 검정의 분화 검정 기간 동안 분화 검정 최초 세포 집단으로부터 분화 검정 최종 세포 집단을 형성할 수 있으며, 이 때:
- [0027] (a) 증식 검정 최초 세포 집단은 (i) 증식 검정 최초 수의 총 세포, (ii) 증식 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 증식 검정 최초 수의 텔세포, (iv) 증식 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 증식 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 증식 검정 최초 수의 텔세포 대 증식 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최초 텔세포 분획을 갖고;
- [0028] (b) 증식 검정 최종 세포 집단은 (i) 증식 검정 최종 수의 총 세포, (ii) 증식 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 증식 검정 최종 수의 텔세포, (iv) 증식 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 증식 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 증식 검정 최종 수의 텔세포 대 증식 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최종 텔세포 분획을 갖고;
- [0029] (c) 분화 검정 최초 세포 집단은 (i) 분화 검정 최초 수의 총 세포, (ii) 분화 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 분화 검정 최초 수의 텔세포, (iv) 분화 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 분화 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 분화 검정 최초 수의 텔세포 대 분화 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최초 텔세포 분획을 갖고;
- [0030] (d) 분화 검정 최종 세포 집단은 (i) 분화 검정 최종 수의 총 세포, (ii) 분화 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 분화 검정 최종 수의 텔세포, (iv) 분화 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 분화 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 분화 검정 최종 수의 텔세포 대 분화 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최종 텔세포 분획을 갖고;
- [0031] (e) $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최종 수는 $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최초 수를 적어도 10배만큼 초과하고;
- [0032] (f) 텔세포의 분화 검정 최종 수는 0이 아닌 수이다.
- [0033] 특정 구체예에서, 줄기 세포 증식체는 줄기성 드라이버를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기 세포 증식체는 분화 억제제를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기 세포 증식체는 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 포함한다.
- [0034] 특정 구체예에서, 본 발명은 와우 세포의 집단에서 지지 세포의 세포 밀도를 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 지지 세포에서 줄기 세포 특성을 유도하는 경로 및 메커니즘을 활성화하고, 활성화된 지지 세포를 증식시키고 (새롭게 형성된 딸세포에서의 지지세포의 다능성 성질을 유지하면서), 그 후 확장된 집단이 텔세포로 분화하여 확장된 와우 세포 집단을 형성하도록 허용 (또는 심지어 유도)하는 것을 포함하고, 여기서 확장된 와우 세포 집단에서의 텔세포의 세포 밀도는 원래 (확장되지 않은) 와우 세포 집단에서의 텔세포의 세포 밀도를 초과한다. 일부 구체예에서, 지지 세포 집단은 시험관내 지지 세포 집단이다. 다른 구체예에서, 지지 세포 집단은 생체내 지지 세포 집단이다. 추가로, 증식 단계는 바람직하게는 와우 구조의 고유 조직을 실질적으로 유지하도록 제어된다. 바람직하게는, 증식은 c-myc의 유도에 의한다고보다 오히려 그러한 활성을 일시적으로 유도하는 소분자에 의해 집단의 임의의 유전적 변형 없이 유도된다. 추가로, 특정 구체예에서, 지지 세포 집단은 바람직하게는 $LGR5^{+}$ 이고 코르티 기관에 내인성인 지지 세포를 포함한다.
- [0035] 특정 구체예에서, 본 발명은 와우 세포의 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 세포 밀도를 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 $Lgr5^{+}$ 지지 세포에서 줄기 세포 특성을 유도하거나 유지하는 경로 및 메커니즘을 활성화하고, 활성화된 $Lgr5^{+}$ 지지 세포를 증식시키고 (그러한 줄기 세포 성질을 유지하면서), 그 후 확장된 집단이 텔세포로 분화하여 확장된 와우 세포 집단을 형성하도록 허용 (또는 심지어 유도)하는 것을 포함하고, 여기서 확장된 와우 세포 집단에서의 텔세포의 세포 밀도는 원래 (확장되지 않은) 와우 세포 집단에서의 텔세포의 세포 밀도를 초과한다. 일부 구체예에서, $Lgr5^{+}$ 지지 세포 집단은 시험관내 $Lgr5^{+}$ 줄기 세포 집단이다. 다른 구체예에서, $Lgr5^{+}$

지지 세포 집단은 생체내 지지 세포 집단이다. 추가로, 특정 구체예에서, 증식 단계는 바람직하게는 와우 구조의 고유 조직을 실질적으로 유지하도록 제어된다.

[0036] 특정 구체예에서, 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 함유하는 조성물을 와우 세포 집단에 투여하여, 줄기 세포의 증식을 유도하고 줄기 세포 집단의 요망되는 확장이 달성될 때까지 줄기 세포의 분화를 억제한다. 그 후에, 확장된 집단은 텔세포로 분화되도록 허용된다 (또는 임의로 심지어 유도된다). 추가로, 증식 단계는 바람직하게는 와우 구조의 고유 조직을 실질적으로 유지하도록 제어된다. 일부 구체예에서, 줄기성 드라이버 및 분화 억제제는 소분자이다. 일부 구체예에서, 줄기 세포 집단은 생체내 줄기 세포 집단이다. 다른 구체예에서, 줄기 세포 집단은 시험관내 줄기 세포 집단이다. 일부 구체예에서, 줄기 세포 집단은 생체내 $Lgr5^{+}$ 줄기 세포 집단이다. 다른 구체예에서, 줄기 세포 집단은 시험관내 $Lgr5^{+}$ 줄기 세포 집단이다.

[0037] 특정 구체예에서, 본 발명은 와우 세포의 최초 집단에서 텔세포의 세포 밀도를 증가시키는 방법을 제공하고, 최초 집단 (생체내 또는 시험관내 집단일 수 있음)은 텔세포, Lgr^{-} 지지 세포, 및 $Lgr5^{+}$ 지지 세포를 포함한다. 상기 방법은 최초 집단에 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하고, 이 때 조성물은 줄기 세포 증식 검정에서 집단에서의 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 수의 확장을 유도하는 능력을 갖고, 줄기 세포 분화 검정에서 집단 내 $Lgr5^{+}$ 지지 세포가 텔세포의 집단으로 분화되게 한다.

[0038] 특정 구체예에서, 상기 방법은 줄기 세포 증식 검정에서 줄기 세포 마커 $Lgr5^{+}$ 를 발현하는 줄기 세포를 생산한다. 특정 구체예에서, $Lgr5^{+}$ 및 $Lgr5^{+}$ 가 아닌 줄기의 혼합된 집단이 줄기 세포 증식 검정에 배치된 경우, 상기 방법은 집단에서 $Lgr5^{+}$ 인 세포 분획을 증가시킨다.

[0039] 와우 구조의 고유 조직을 파괴할 정도로 지지 세포 집단을 확장시키는 것은 와우 기능을 억제할 수 있었다. 소분자 신호로 기존 지지 세포의 증식을 유도하는 것은 특이적 세포 유형을 표적화할 수 없고 세포의 유전 정보를 영구적으로 변경시키는 유전자 전달을 사용한 것보다 텔세포의 더 많은 제어된 재생을 허용할 수 있다. 거의 정상적인 와우 구조는 텔세포 사이에 지지 세포를 갖는 텔세포의 열을 갖는 것이 요망되고, 텔세포는 다른 텔세포와 접촉하지 않는다. 추가로, 증식을 유도하는데 기관의 해부학을 혼란스럽게 하는 와우에서의 큰 세포 응집체를 생성하는 유전자 변형을 사용하지 않는 것이 바람직할 것이다. 특정 구체예에서, 비-종양원성인 조성물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 구체예에서, 예를 들어, c-myc 녹아웃에서 효과적이거나 c-myc이 억제되거나 침묵하는 메커니즘에서, c-myc 경로의 작동과 무관하게 줄기 세포를 증식시키는 조성물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0040] 특정 구체예에서, 본 발명은 와우 지지 세포의 선택적 확장을 유도하는데 이용될 수 있는 줄기성 드라이버를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 경우에, 줄기성 드라이버는 또한 분화 억제제가 효과적인 분화 억제 농도로 존재하지 않는 경우 텔세포로의 지지 세포의 분화를 유도할 수 있다. 증식 및 분화 둘 모두를 유도할 수 있는 줄기성 드라이버의 예는 GSK3베타 억제제 및 Wnt 효능제를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기 세포의 증식은 p27 또는 Tgf 베타 경로와 같은, 세포 주기 조절인자의 조절제를 첨가함에 의해 향상될 수 있다. 이러한 특정 구체예에서, 조성물은 방출 검정에서 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 상이한 속도로 방출하는 제형에 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 한 그러한 구체예에서, 제형은 내이 환경으로의 활성제의 일정한, 지속적인, 연장된, 지연된 또는 박동성 방출 속도를 제공하여, 약물 노출에서의 임의의 변동성을 피할 수 있다.

[0041] 일부 구체예에서, 줄기성 드라이버는 $Lgr5^{+}$ 줄기 세포의 증식을 유도하는데 이용될 수 있다. 일부 경우에, 줄기성 드라이버는 또한 분화 억제제가 효과적인 분화 억제 농도로 존재하지 않는 경우 텔세포로의 $Lgr5^{+}$ 세포의 분화를 유도할 수 있다. 증식 및 분화 둘 모두를 유도할 수 있는 줄기성 드라이버의 예는 GSK3베타 억제제 및 Wnt 효능제를 포함한다. 이러한 특정 구체예에서, 조성물은 방출 검정에서 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 상이한 속도로 방출하는 제형에 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 한 그러한 구체예에서, 제형은 내이 환경으로의 활성제의 일정한, 지속적인, 연장된, 지연된 또는 박동성 방출 속도를 제공하여, 약물 노출에서의 임의의 변동성을 피할 수 있다.

[0042] 특정 구체예에서, 본 발명은 텔세포 및 지지 세포를 포함하는 와우 세포의 최초 집단에서 텔세포의 세포 밀도를 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 최초 집단에서 지지 세포의 수를 선택적으로 확장시켜 중간 와우 세

포 집단을 형성하는 것을 포함하고, 이 때 중간 와우 세포 집단에서 지지 세포 대 텔세포 수의 비는 최초 와우 세포 집단에서 지지 세포 대 텔세포 수의 비를 초과한다. 상기 방법은 중간 와우 세포 집단에서 텔세포를 생성시켜 확장된 와우 세포 집단을 형성하는 것을 추가로 포함하고, 이 때 확장된 와우 세포 집단에서 텔세포 대 지지 세포 수의 비는 중간 와우 세포 집단에서 텔세포 대 지지 세포 수의 비를 초과한다.

[0043] 특정 구체예에서, 본 발명은 와우 세포의 최초 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 수를 증가시키거나 $Lgr5$ 활성을 증가시키는 방법을 제공하고, 여기서 최초 집단은 지지 세포 및 텔세포를 포함한다. 예를 들어, 한 그러한 방법에서, $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 수가 최초 집단에 비해 확장된 중간 집단이 형성된다. 대안적으로, 한 그러한 방법에서, 지지 세포의 $Lgr5$ 활성이 최초 집단에 비해 증가한 중간 집단이 형성된다. 대안적으로, 일반적으로 $Lgr5$ 가 부족하거나 매우 낮은 수준인 세포 유형에서 $Lgr5^{+}$ 발현을 활성화함에 의해 $Lgr5^{+}$ 세포의 수가 최초 세포 집단에 비해 증가하는 방법이다. 추가 예로서, 최초 와우 세포 집단에 비해 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 수가 확장되고 $Lgr5$ 활성이 증가한 중간 집단이 형성된다. 그 후, 중간 와우 세포 집단에서 텔세포가 생성되어 확장된 와우 세포 집단을 형성할 수 있고, 이 때 확장된 와우 세포 집단에서 텔세포 대 지지 세포의 비는 중간 와우 세포 집단에서 텔세포 대 지지 세포 수의 비를 초과한다.

[0044] 일부 구체예에서, 성체 포유동물에 적용된 방법은 S-단계에 있는 성체 포유동물 $Lgr5^{+}$ 세포의 집단을 생산한다.

[0045] 본 발명의 상기 언급된 각 구체예에서, 분화 억제제는 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제일 수 있다. 일부 그러한 구체예에서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도 및 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제를 갖는 첫 번째 증식 기간 뒤에, 효과적인 줄기성 드라이버 농도를 갖고 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제는 갖지 않는 분화 기간이 있을 수 있다. 이들 구체예 각각에서, 줄기성 드라이버 및 분화 억제제는 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 상이한 속도로 방출시키는 제형으로 와우 세포에 제공된다. 예를 들어, 제형은 내이 환경으로의 줄기성 드라이버 및 분화 억제제의 일정한, 지속적인, 연장된, 지연된 또는 박동성 방출 속도를 제공할 수 있다. 그러나, 중요하게는, 제형은 효과적인 줄기성 드라이버 농도 및 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제를 갖는 첫 번째 증식 기간 뒤에, 효과적인 줄기성 드라이버 농도를 갖고 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제는 갖지 않는 분화 기간을 제공하는 방식으로 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 방출시킨다.

[0046] 특정 구체예에서, 상기 방법은 줄기 세포 증식 검정 또는 줄기 세포 분화 검정에 이용되는 바와 같이, 줄기성 드라이버 및/또는 분화 억제제를 동정하기 위해 내이 전구체/줄기 세포에 대한 고속대량 스크리닝을 수행하는 것을 추가로 포함한다.

[0047] 본 발명의 상기 언급된 각 구체예에서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제를 갖는 첫 번째 증식 기간 뒤에, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제를 갖고 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제는 갖지 않는 분화 기간이 있을 수 있다. 따라서, 이들 구체예 각각에서, 제형은 내이 환경으로의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제의 일정한, 지속적인, 연장된, 지연된 또는 박동성 방출 속도를 제공할 수 있다. 그러나, 중요하게는, 제형은 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제를 갖는 첫 번째 증식 기간 뒤에, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제를 갖고 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제는 갖지 않는 분화 기간을 제공하는 방식으로 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제를 방출시킨다.

[0048] 일부 구체예에서, 분화 억제제는 또한 줄기성 드라이버이다. 일부 구체예에서, 분화 억제제는 Notch 효능제이고 또한 줄기성 드라이버이다. 일부 구체예에서, 분화 억제제는 줄기성 드라이버일 수 있는 발프로산이다. 분화 억제제가 또한 줄기성 드라이버인 경우, 분화 억제제의 농도는 분화 기간 동안 효과적인 분화 억제 농도 아래에 있어야 한다.

[0049] 상기 언급된 각 구체예에서, 분화 억제제 및 줄기성 드라이버는 지속 방출 폴리머 젤 내에 함유될 수 있다. 특정 구체예에서, 젤은 바늘을 통해 주입될 수 있으나 중이 공간에서 고체가 된다. 특정 구체예에서, 젤은 폴록사머 407과 같은 열가변성 폴리머로 이루어진다.

[0050] Notch 경로는 지지 세포에서 텔세포로의 분화 과정의 중요한 조절인자로 알려져 있다 (Lanford et al. 1999). 일부 구체예에서, 줄기성 드라이버 및 분화 억제제는 지지 세포에서의 Notch 활성 수준이 천연 상태의 지지 세포

포에서의 Notch 활성 수준의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100%로 유지되도록 적용된다.

- [0051] 특정 구체예에서, 본 발명은 털세포를 생성하기 위한 방법 및 조성물을 제공하고, 상기 방법은 (i) GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) Notch 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)인 둘 모두의 (i) 및 (ii)를 포함하는 조성물을 줄기 세포 집단 (예컨대, 시험관내, 생체외, 또는 생체내 샘플/대상체의)에 투여하거나 투여되도록 하여, 줄기 세포 집단에서 줄기 세포를 증식시켜 줄기 세포의 확장된 집단을 발생시키고; 줄기 세포의 확장된 집단을 GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 임의로, Notch 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)에 노출시켜, 줄기 세포의 확장된 집단으로부터 내이 털세포의 생성을 촉진시키는 것을 포함한다.
- [0052] 특정 구체예에서, 본 발명은 청각 기능장애를 예방하고 치료하기 위한 조성물, 시스템, 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 본 발명은 대상체에 (a) (i) HDAC 억제제 및/또는 Notch 활성제 및 (ii) GSK3-베타 억제제, 이의 유도체, 예를 들어, HDAC 억제제의 유도체, Notch 활성제의 유도체, 및/또는 GSK3-베타 억제제의 유도체, 이의 약학적으로 허용되는 염 [예를 들어, HDAC 억제제의 약학적으로 허용되는 염, Notch 활성제의 약학적으로 허용되는 염, 및/또는 GSK3-베타 억제제의 약학적으로 허용되는 염], 또는 이들의 조합물 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 유효량의 조성물을 투여하여, 대상체에서 청각 장애를 치료하는 것을 포함하는, 대상체에서 청각 장애를 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다. 따라서, 예를 들어, 조성물은 (a) HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 추가 예로서, 조성물은 (a) Notch 활성제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 추가 예로서, 조성물은 (a) HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), Notch 활성제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0053] 특정 구체예에서, 본 발명은 또한 본원에 기재된 세포의 생체외 용도에 관한 것이다. 예를 들어, 본원에 기재된 접근법은 하이(hi) 및 발견 목적으로 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정 구체예는 털세포 전구체를 증식시키고/거나 털세포 수를 증가시키는 작용제, 및 또한 지지 세포 및/또는 털세포를 보호하는 작용제 (예를 들어, 이들의 생존을 지지하기 위해)를 동정하고, 또한 지지 세포 또는 털세포를 포함하는 분화된 프로제니에 독성이거나 독성이 아닌 작용제를 동정하는데 유용하다.
- [0054] 특정 구체예에서, 본 발명은 대상체에 HDAC 억제제 및/또는 Notch 활성제 및 GSK3베타 억제제 또는 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 유효량의 조성물을 투여하여, 대상체에서 청각 장애를 치료하는 것을 포함하는, 치료가 필요한 대상체에서 청각 장애를 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다.
- [0055] 특정 구체예에서, 본 발명은 대상체에 유효량의 본원에 기재된 조성물 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염 및 허용되는 담체 또는 부형제를 투여하여, 대상체에서 청각 시스템의 세포 손실 또는 사멸을 억제하는 것을 포함하는, 대상체에서 청각 시스템의 세포 손실 또는 사멸을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0056] 특정 구체예에서, 본 발명은 대상체에 본원에 기재된 작용제 또는 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 허용되는 담체 또는 부형제를 유효량으로 포함하는 조성물을 투여하여 내인성 회복을 강화하거나 개시하고, 이에 의해 대상체에서 청각 시스템의 세포 성장을 유지하거나 촉진시키는 것을 포함하는, 대상체에서 청각 시스템의 세포 성장을 유지하거나 촉진시키는 방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 방법 및 조성물은 이러한 귀독성-유발 약학적 약물에 의해 야기된 귀독성 영향을 동시에 예방하거나 감소시키면서, 이러한 약물을 더 많이 및 이에 따라 더욱 효과적으로 투여할 수 있게 한다. 본 발명의 방법은 내이 조직 손상, 손실 또는 변성, 특히 소리 또는 노화-유발, 및 귀독소-유발과 관련되고, 특히 내이 털세포와 관련된 청력 장애의 예방 또는 치유적 치료를 위한 안전하고, 효과적이며, 장기간의 수단을 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 이들 또는 다른 목적들 중 하나 이상을 다룬 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0058] 본 발명은 일반적으로 내이 조직, 예를 들어, 내이 지지 세포 및/또는 내이 털세포의 성장, 증식, 또는 재생을 유도, 촉진, 또는 향상시키는 조성물, 시스템, 및 방법에 관한 것이다.

[0059] 또한 세포의 모 집단을 포함하는 와우 조직에서 와우 세포의 집단을 확장시키는 방법으로서, 모 집단은 지지 세포 및 다수의 $Lgr5^{+}$ 세포를 포함하고, 상기 방법은 와우 조직과 줄기 세포 증식제를 접촉시켜 와우 조직에서 확장된 세포 집단을 형성하는 것을 포함하며, 이 때 줄기 세포 증식제는 (i) 줄기 세포 증식 검정에서 줄기 세포 증식 검정 세포 집단에서의 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 적어도 10배만큼 증가시킬 수 있고, (ii) 줄기 세포 분화 검정에서 $Lgr5^{+}$ 세포를 포함하는 세포 집단으로부터 텔세포를 형성할 수 있는, 방법이 본원에 기재된다.

[0060] 또한 세포의 모 집단을 포함하는 와우 조직에서 와우 세포의 집단을 확장시키는 방법으로서, 모 집단은 지지 세포를 포함하고, 상기 방법은 와우 조직과 줄기 세포 증식제를 접촉시켜 와우 조직에서 확장된 세포 집단을 형성하는 것을 포함한다. 줄기 세포 증식제는 (i) 줄기 세포 증식 검정에서 증식 검정 기간 동안 증식 검정 최초 세포 집단으로부터 증식 검정 최종 세포 집단을 형성할 수 있고, (ii) 줄기 세포 분화 검정에서 분화 검정 기간 동안 분화 검정 최초 세포 집단으로부터 분화 검정 최종 세포 집단을 형성할 수 있으며, 이 때 (a) 증식 검정 최초 세포 집단은 (i) 증식 검정 최초 수의 총 세포, (ii) 증식 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 증식 검정 최초 수의 텔세포, (iv) 증식 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 증식 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 증식 검정 최초 수의 텔세포 대 증식 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최초 텔세포 분획을 갖고; (b) 증식 검정 최종 세포 집단은 (i) 증식 검정 최종 수의 총 세포, (ii) 증식 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 증식 검정 최종 수의 텔세포, (iv) 증식 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 증식 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획 및 (v) 증식 검정 최종 수의 텔세포 대 증식 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최종 텔세포 분획을 갖고; (c) 분화 검정 최초 세포 집단은 (i) 분화 검정 최초 수의 총 세포, (ii) 분화 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 분화 검정 최초 수의 텔세포, (iv) 분화 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 분화 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 분화 검정 최초 수의 텔세포 대 분화 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최초 텔세포 분획을 갖고; (d) 분화 검정 최종 세포 집단은 (i) 분화 검정 최종 수의 총 세포, (ii) 분화 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 분화 검정 최종 수의 텔세포, (iv) 분화 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 분화 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 분화 검정 최종 수의 텔세포 대 분화 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최종 텔세포 분획을 갖고; (e) $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최종 수는 $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최초 수를 적어도 10배만큼 초과하고; (f) 텔세포의 분화 검정 최종 수는 0이 아닌 수이다.

[0061] $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최종 수는 $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최초 수 보다 적어도 50배만큼, 또는 적어도 100배만큼 클 수 있다. 와우 조직에서 세포의 확장된 집단은 모 집단보다 많은 수의 텔세포를 포함할 수 있다. 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획은 분화 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 2배만큼 클 수 있다. 분화 검정 최종 텔세포 분획은 증식 검정 최초 텔세포 분획보다 적어도 2배만큼 클 수 있다. 증식 검정 최종 텔세포 분획은 증식 검정 최초 텔세포 분획보다 적어도 25% 더 적을 수 있다. 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획은 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 10% 더 클 수 있다. 와우 조직의 더 많은 형태학적 특징 중 하나가 유지될 수 있다. 천연 형태학이 유지될 수 있다. 적어도 하나의 줄기 세포 증식제는 생체적합성 젤 또는 포유일 수 있는 생체적합성 매트릭스에 분산될 수 있다. 조성물은 제어된 방출 제형일 수 있다. 와우 조직은 생체내 와우 조직 또는 생체의 와우 조직일 수 있다. 상기 방법은 s-단계에 있는 $Lgr5^{+}$ 세포의 집단을 생산할 수 있다. 적어도 하나의 줄기 세포 증식제는 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함할 수 있다. 접촉이 와우 조직에 제공될 수 있고: 초기 단계에서, 줄기성 드라이버의 적어도 효과적인 증식 농도 및 분화 억제제의 적어도 효과적인 분화 억제 농도; 및 후속 단계에서, 줄기성 드라이버의 적어도 효과적인 증식 농도 및 분화 억제제의 효과적인 농도 미만의 분화 억제 농도. 와우 조직은 대상체에 존재할 수 있고, 와우 조직과 조성물의 접촉은 대상체를 대상체에 경고막적으로 투여함에 의해 달성될 수 있다. 와우 조직과 조성물의 접촉은 대상체의 청각 기능을 개선시킬 수 있다.

[0062] 또한 생체적합성 매트릭스 및 적어도 하나의 줄기 세포 증식제를 포함하는 조성물이 본원에 기재되고, 여기서

적어도 하나의 줄기 세포 증식제는, 줄기 세포 증식 검정에서, $Lgr5^{+}$ 세포의 최초 시험 집단을 확장시켜 확장된 시험 집단을 생성할 수 있고, 확장된 시험 집단은 최초 시험 집단보다 적어도 10배 더 많은 $Lgr5^{+}$ 세포를 갖는다.

[0063] 또한 생체적합성 매트릭스 및 적어도 하나의 줄기 세포 증식제를 포함하는 조성물이 본원에 기재되고, 여기서 적어도 하나의 줄기 세포 증식제는, 줄기 세포 증식 검정에서, $Lgr5^{+}$ 세포를 함유하는 최초 세포 집단을 확장시켜 최종 세포 집단을 생성할 수 있고, 최종 세포 집단은 최초 세포 집단보다 적어도 10배 더 많은 $Lgr5^{+}$ 세포를 갖는다. 추가로, (a) 최초 세포 집단은 (i) 최초 수의 총 세포, (ii) 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 최초 수의 텔세포, (iv) 증식 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 증식 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 최초 수의 텔세포 대 최초 수의 총 세포의 비와 같은 최초 텔세포 분획을 갖고; 및 (b) 최종 세포 집단은 (i) 최종 수의 총 세포, (ii) 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 최종 수의 텔세포, (iv) 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 최종 수의 총 세포의 비와 같은 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획 및 (v) 최종 수의 텔세포 대 최종 수의 총 세포의 비와 같은 최종 텔세포 분획을 갖는다.

[0064] $Lgr5^{+}$ 세포의 최종 수는 $Lgr5^{+}$ 세포의 최초 수보다 적어도 50배만큼, 또는 적어도 100배만큼 더 클 수 있다.

[0065] 적어도 하나의 줄기 세포 증식제는 생체적합성 젤 또는 포유일 수 있는 생체적합성 매트릭스에 분산될 수 있다. 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획은 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 10% 더 클 수 있다. 적어도 하나의 줄기 세포 증식제는 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 줄기 세포 증식제는 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함할 수 있다. 줄기 세포 증식제는 분화 억제제의 효과적인 분화 억제 농도보다 적어도 100배 더 큰 농도의 줄기성 드라이버 및 분화 억제제의 효과적인 증식 농도보다 100배 더 큰 농도로 줄기성 드라이버를 포함할 수 있다. 조성물은 제어된 방출 제형일 수 있다. 제어된 방출 제형은 경고막적으로 대상체에 투여될 때 줄기 세포 증식제의 즉시 방출, 지연 방출, 지속 방출, 연장 방출, 가변 방출, 박동 방출, 또는 바이-모달 방출을 제공한다. 제어된 방출 제형은 대상체에 투여될 때 (a) 초기 단계에서, 적어도 효과적인 증식 농도의 줄기성 드라이버 및 적어도 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제; 및 (b) 후속 단계에서, 적어도 효과적인 증식 농도의 줄기성 드라이버 및 효과적인 농도 미만의 분화 억제 농도의 분화 억제제를 제공할 수 있다.

[0066] 방법 및 조성물에서, 줄기성 드라이버는 GSK3-베타 억제제, GSK3-베�타 억제제 유도체, wnt 효능제, wnt 효능제 유도체, 또는 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용되는 염일 수 있다. 방법 및 조성물에서, 분화 억제제는 Notch 효능제; Notch 효능제 유도체; hdac 억제제; hdac 억제제 유도체, 또는 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용되는 염일 수 있다. 방법 및 조성물에서, 줄기성 드라이버는 CHIR99021, LY2090314, 리튬, A1070722, BML-284 및 SKL2001로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0067] 방법 및 조성물에서, 분화 억제제는 발프로산, SAHA 및 투바스타틴(Tubastatin) A로 구성된 군으로부터 선택된 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제일 수 있다.

[0068] 청력 손실이거나 청력 손실의 발생 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법이 또한 본원에 기재된다. 상기 방법은 적어도 하나의 줄기 세포 증식제를 포함하는 조성물을 대상체의 와우 조직에 경고막적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 줄기 세포 증식제는 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 줄기 세포 증식제는 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함할 수 있다.

[0069] 줄기성 드라이버는 CHIR99021일 수 있다. 분화 억제제는 발프로산일 수 있다. 일부 방법에서, 와우 조직은 표피 성장 인자, 염기성 섬유모세포 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 1, pVc, 및 616452와 추가 접촉할 수 있다.

[0070] 또한 $Myo7a^{+}$ 와우 세포를 생성하는 방법이 본원에 기재된다. 상기 방법은 $Lgr5^{+}$ 와우 세포와 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 포함하는 조성물을 접촉시켜, $Lgr5^{+}$ 세포의 확장된 집단을 생성하고; $Lgr5^{+}$ 세포의 확장된 집단과 Notch 억제제 및 줄기성 드라이버를 접촉시켜, $Myo7a^{+}$ 와우 세포를 생성하는 것을 포함할 수 있다. 줄기성 드라이버는 CHIR99021일 수 있다. 분화 억제제는 발프로산일 수 있다. Notch 억제제는 DAPT일 수 있다.

[0071] 일부 양태에서, 본 발명은 줄기 세포 증식제와 같은 본원에 기재된 화합물 중 하나 이상을 포함하는 화합물을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 키트, 예를 들어, 키나제 억제제를 포함하는 키트를 포함한다. 일부 양태

에서, 키트는 지시서를 포함한다.

[0072]

다른 목적 및 특징은 부분적으로 명백할 것이고 부분적으로 이하에서 지적될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0073]

특허 또는 출원 파일은 컬러로 된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 컬러 도면(들)이 있는 이 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불시 청에 의해 제공될 것이다.

전술한 내용은 첨부된 도면에 예시된 바와 같이, 본 발명의 예시적인 구체 예에 대한 하기의 보다 특정한 설명으로부터 명백해질 것이고, 도면에서 유사한 참조 부호는 상이한 도면 전반에 걸쳐 동일한 부분을 나타낸다. 도면은 반드시 일정한 비례로 그려진 것이 아니며, 대신 본 발명의 구체예를 예시하는 것에 중점을 둔다.

도 1: 여러 조건에서 Lgr5-GFP 내이 지지 세포의 확장. (a) EGF, bFGF 및 IGF-1을 함유하는 배지에서 10일 동안 배양된 Lgr5-GFP 내이 전구체 세포의 명시야 및 GFP 형광 이미지. b. Lgr5-GFP 세포는 CHIR 및 VPA를 첨가한 조건에서 배양되었다. 눈금 바 100 μm .

도 2: 소분자 (CHIR99021 및 VPA)는 내이 전구체 세포의 확장을 촉진한다. (a) 여러 조건 하에 Lgr5-GFP 세포의 FACS 히스토그램 이미지. (b) (a)에 도시된 세포의 세포 증식 및 GFP 발현의 정량. (c) 상응하는 세포의 정량.

도 3: pVc의 첨가는 Lgr5 내이 전구체 세포의 세포 증식을 증가시킨다. 눈금 바: 400 μm .

도 4: bFGF 농도의 증가는 Lgr5 내이 전구체 세포의 증식을 촉진한다. 눈금 바: 400 μm .

도 5: Lgr5 내이 전구체 세포에 대한 지지 인자의 추가 스크리닝. TTNPB는 세포 증식은 증가시켰으나 GFP 발현은 증가시키지 않았다. pVc의 존재 하에, CHIR은 세포 증식 및 GFP 발현에 중요하고, EGF, bFGF는 세포 증식에는 중요하지만 GFP 발현에는 덜 중요하다. VPA는 GFP 발현에 중요하다. IGF는 세포 증식 및 GFP 발현을 촉진하는데 있어서 미미한 유익한 효과를 보여준다. (a) 세포 수. (b) GFP+백분율.

도 6: Lgr5 내이 전구체 세포에 대한 지지 인자의 추가 스크리닝. 주요 신호전달 경로 조절제에 의한 추가 스크리닝은 이러한 신호전달 경로의 조작이 Lgr5-GFP의 발현을 촉진하지 않음을 나타낸다. 스크리닝에 이용된 소분자는 PD0325901 (MEK 억제제), VX745 (p38 억제제), JNK-IN8 (JNK 억제제), 토파시티닙(Tofacitinib) (JAK 억제제), PH797804 (p38 억제제), 라파마이신(Rapamycin) (mTor 억제제), LY294002 (PI3K 억제제), SC79 (AKT 활성제), PKC412 (PKC 억제제), FR180209 (인슐린 수용체 억제제), LDN193189 (BMP 억제제), BMS536924 (인슐린 및 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제), 5IT (베타 세포 증식 증가) 및 616452 (Tgfb, ALK5 억제제)를 포함한다.

도 7: EFICVP에 대한 616452의 첨가는 Lgr5-GFP의 강도 및 집락의 크기를 증가시킨다. 눈금 바: 400 μm .

도 8은 내이 전구체 세포의 증식을 촉진시키는 배양 조건의 특성화를 도시한다. 도 8(a)는 EGF, bFGF, IGF1 (EFI); EFI 및 CHIR99021, VPA, pVc, 616452 (EFICVP6)의 존재 하에 10일 동안 단일 내이 상피 세포의 GFP 형광성 및 명시야 이미지를 도시한다. 도 8(b)는 여러 조건에서 10일 동안 배양된 내이 상피 세포에서 Lgr5-GFP 발현, 세포 증식 (살아 있는 세포의 수), 및 GFP⁺ 세포의 수의 정량을 도시한다. 세포 집락을 트립신을 이용하여 단일 세포로 분리시켰다. 세포의 총 수를 혈구계를 이용하여 계수하였다. 그 후 세포를 프로피듐 아이오다이드 (PI)로 염색하고 Lgr5-GFP 발현에 대해 유동세포계수기를 이용하여 분석하였다. GFP⁺ 세포의 수는 세포의 총 수에 GFP⁺ 세포의 비율을 곱하여 계산되었다. EFICVP6은 EGF, bFGF, IGF1, CHIR, VPA, pVc, 및 616452를 포함하는 모든 인자를 함유한 배양 조건을 나타내고, 이는 지지 세포 증식 및 GFP 발현에서 가장 좋은 결과를 보여주었다. 그 후 각각의 개별 인자를 배양 배지로부터 제거하고 시험하였다. 배지로부터 bFGF 또는 CHIR의 제거는 세포 증식에 큰 영향을 미쳤고 CHIR의 제거는 또한 GFP 발현에 큰 영향을 미쳤다. EGF, 616452를 제거하는 것은 세포 증식에 더 큰 영향을 나타낸 반면, VPA 또는 pVc를 제거하는 것은 GFP 유지에 더 큰 영향을 보여주었다. IGF-1의 제거는 세포 증식 또는 GFP 유지에 미미한 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 세포 증식 및 GFP 발현을 촉진하는데 bFGF 및 CHIR이 중요하며, 다른 인자들도 중요함을 시사한다. 도 8(c)는 (b)에 도시된 배양액의 GFP 형광성 및 명시야 이미지를 도시한다. 눈금 바: 200 μm (a) 및 400 μm (c).

도 9: 소분자가 내이 전구체 세포의 유지를 어떻게 촉진하는지 보여준다. 도 9(a)는 여러 조건에서 배양된 내이 상피 세포의 GFP 발현을 도시한다. W: Wnt3a. R: R-스폰딘 1. 도 9(b)는 여러 조건에서 배양된 세포의 GFP 발현의 히스토그램 이미지를 도시한다. 도 9(c)는 지시된 조건에서 7일 동안 gr5-GFP 내이 상피 세포 배양액의 GFP

형광성 및 명시야 이미지를 도시한다. 도 9(d)는 지시된 배양 조건에서 7일 동안 Atoh1-GFP 내이 상피 세포의 GFP 형광성 명시야 이미지를 도시한다. GFP⁺ 세포는 분화된 세포였다. 결과는 VPA가 Atoh1 양성 털세포 쪽으로의 내이 전구체 세포의 분화를 억제하였음을 보여준다. 도 9(e)는 내이 전구체 세포에 대한 지지 인자에 대한 스크린을 도시한다. 여러 조건에서 배양된 Lgr5-GFP 내이 전구체 세포의 GFP 발현이 도시된다. 소분자는 대조 (EFICV) 조건에 기반하여 첨가되었다. 라미닌 511을 매트릭셀에 첨가하였다. 2개 배치의 세포를 Exp 1 및 Exp 2로서 도시된 바와 같은 스크리닝에 이용하였다. 결과는 pVc가 Lgr5-GFP 내이 전구체 세포로부터의 GFP 발현을 촉진시켰음을 보여준다. 도 9(f)는 지시된 조건에서 배양된 Lgr5-GFP 세포의 형광성 및 명시야 이미지를 도시한다. 계대 2의 10일째 세포가 도시된다. 616452는 배양된 내이 전구체 세포의 계대를 가능하게 한다. 눈금 바: 400 μ m.

도 10은 단일 분류된 Lgr5-GFP 세포의 확장을 나타낸다. 좌측, 분류된 GFP-High 세포는 높은 수준의 GFP를 균일하게 발현시키는 큰 집락으로 성장한다. 우측, GFP-Low 세포는 GFP-고 (큰 화살), GFP-저 (화살촉) 및 GFP 음성 (작은 화살) 집락을 함유한 집락으로 성장한다.

도 11은 여러 조건에서 확장된 내이 전구체의 분화를 도시한다. qPCR을 수행하여 분화 6일 후 Myo7a 발현을 측정하였다. 성장 인자 (EGF, bFGF, IGF) 또는 소분자 (616452, pVc 및 VPA)가 없는 조건이 가장 높은 Myo7a 발현을 제공한다.

도 12는 배양된 내이 전구체 세포가 시험관내에서 털세포를 생성함을 입증한다. 도 12(a)는 Gsk3 β 억제제 (예컨대 CHIR) 및 Notch 억제제 (예컨대 DAPT)와의 조합이 Myo7a 양성 및 프레스틴 양성 외부 털세포 (상부 패널) 및 Myo7a 양성 및 프레스틴 음성 내부 털세포 (하부 패널)의 생성을 유도함을 도시한다. 도 12(b)는 Wnt 억제제 IWP-2의 존재 하에, 털세포 생성이 배양된 내이 전구체 세포로부터 거의 관찰되지 않음을 도시한다. 눈금 바: 100 μ m.

도 13은 성체 마우스로부터 Lgr5-GFP 내이 전구체 세포의 시험관내 배양을 도시한다. (a) 9주령 마우스로부터 분리된 와우를 EFICVP6의 존재 하에 9일 동안 배양시켰다. Lgr5-GFP 세포의 결과물을 보여줌. (b) 13일에 같은 배양액. Lgr5-GFP 세포의 확장을 보여줌. (c) 계대 후 5일째에 계대 2의 동일한 배양액 (19일). 모든 눈금 바: 100 μ m. 구체적으로, 와우를 9주령 성체 마우스로부터 분리하고, 매트릭셀과 직접 혼합시키고, 24웰 플레이트의 웰 중심에 플레이팅하였다. 매트릭셀의 젤화 후 세포 배양 배지를 EGF, bFGF, IGF-1, CHIR99021, VPA, L-아스코르브산 2-포스페이트 (pVc) 및 TGF- β RI 키나제 억제제 II (616452)의 존재 하에 첨가하였다. 조직을, Lgr5-GFP 세포가 확장되고 결과물을 형성할 때까지 2주 동안 배양시켰다. 이어서 2주 (14일) 후 트립신을 이용하여 조직을 분리하고, 재플레이팅하고, 추가 배양하였다. 9일 내지 13일을 비교한 결과는 본 발명자들의 배양 시스템이 내이 상피로부터 성체 Lgr5-GFP 세포의 성장 및 확장을 지원하는데 사용될 수 있음을 보여준다. 상기 결과는 또한 이러한 배양 조건을 이용하여 성체 와우로부터의 Lgr5⁺ 세포가 계대될 수 있음을 보여준다 (도 13c).

도 14. 성체 마우스로부터 Lgr5-GFP 내이 세포의 확장. EFICVP6 조건에서, 세포는 느리게 성장한다. TTNPB의 첨가는 세포 증식 및 GFP⁺ 집락 형성을 증가시킨다.

도 15. 성체 마우스로부터 Lgr5-GFP⁺ 내이 세포의 확장. 세포를 EGF, bFGF, IGF1, CHIR, VPA, pVc, 616452 및 TTNPB를 함유한 조건에서 배양시켰다. 배양 중 2일 및 5일에 동일한 필드에서 이미지를 촬영하였다. 명시야 및 GFP 형광 이미지가 도시되었다.

도 16: 투석 백 설정에서 폴록사머 407 기반 하이드로겔 제형으로부터의 (A) CHIR 및 (B) VPA의 누적 방출 백분율.

도 17: 투석 백 설정에서 폴록사머 407 기반 하이드로겔 제형으로부터의 (A) CHIR 및 (B) VPA의 누적 방출. CHIR 및 VPA의 초기 부하는 각각 30 μ l 당 41.7 μ g 및 2.63 mg이었다.

도 18: CBA/CaJ 마우스에서의 청력 회복. VPA/CHIR로 처리된 동물 (n=7)은 시험된 모든 주파수에 걸쳐 상당한 회복을 나타내었다. LY411575로 처리된 동물 (n=8)은 10kHz, 28.3KHz, 및 40kHz에서 상당한 회복을 나타내었다. 대조 비히클 주입물로 처리된 동물에서는 회복이 일어나지 않았다 (n=8). [* = p<.05]

상응하는 참조 부호는 도면 전체에 걸쳐 상응하는 부분을 나타낸다.

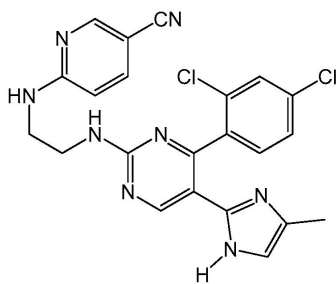
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0074] 정의
- [0075] 본 출원에서, "또는"의 이용은 달리 명시하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 본 출원에서 사용되는 용어 "포함하다" 및 이 용어의 변형, 예를 들어 "포함하는" 및 "포함하다"는 다른 첨가제, 구성요소, 정수 또는 단계를 배제하려는 것이 아니다. 본 출원에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 동등하게 사용된다. 약/대략의 유무에 관계없이 본 출원에 사용된 임의의 숫자는 당업자에 의해 인지되는 임의의 정상적인 변동을 포함하고자 한다. 특정 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 명시되지 않거나 문맥에서 달리 명백한 경우를 제외하고는 (그러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우 제외), 언급된 참조 값의 어느 쪽으로든 (그 초과 또는 그 미만) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 이내에 있는 값의 범위를 나타낸다.
- [0076] "투여"는 대상체에 물질을 도입하는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 투여는 컷바퀴, 컷바퀴내, 와우내, 전정내, 또는 경고막적으로, 예를 들어, 주입에 의해 이루어진다. 일부 구체예에서, 투여는 내이에 직접적으로 이루어지고, 예컨대, 정원창, 이랑, 또는 전정관을 통한 주입이다. 일부 구체예에서, 투여는 와우 임플란트 전달 시스템을 통해 내이 안으로 직접 이루어진다. 일부 구체예에서, 물질은 경고막적으로 중이에 주입된다. 특정 구체예에서 "투여되도록 하는(causing to be administered)"은 첫 번째 구성요소가 이미 투여된 후에 두 번째 구성요소의 투여를 나타낸다 (예컨대, 상이한 시점에 및/또는 상이한 행위자에 의해).
- [0077] "항체"는 면역원 결합 활성을 갖는 면역글로불린 폴리펩티드, 또는 이의 단편을 의미한다.
- [0078] 본원에서 사용되는 "효능제"는 표적 유전자, 단백질, 또는 경로의 발현 또는 활성에서의 증가를 각각 야기하는 작용제이다. 따라서, 효능제는 어떤 방식으로 이의 인지체 수용체에 결합하여 이를 활성화시킬 수 있고, 이는 직접적으로 표적 유전자 또는 단백질에 대한 생리학적 효과를 초래한다. 효능제는 또한 경로 구성요소의 활성을 조절함으로써, 예를 들어, 경로의 음성 조절인자의 활성을 억제함으로써 경로의 활성을 증가시킬 수 있다. 따라서, "Wnt 효능제"는 Wnt 경로의 활성을 증가시키는 작용제로서 정의될 수 있고, 이는 세포에서 TCF/LEF-매개된 전사 증가에 의해 측정될 수 있다. 따라서, "Wnt 효능제"는 Wnt 패밀리 단백질, 세포내 베타-카테닌 분해의 억제제, 및 TCF/LEF의 활성제 중 어느 하나 및 모두를 포함하는, Frizzled 수용체 패밀리 구성원에 결합하여 이를 활성화시키는 진정한 Wnt 효능제일 수 있다. "Notch 효능제"는 Notch 경로의 활성을 증가시키는 작용제로서 정의될 수 있고, 이는 Notch의 전사 활성을 측정함으로써 결정될 수 있다.
- [0079] "길항제"는 수용체에 결합하여, 결국 다른 분자에 의한 결합을 감소시키거나 없애는 작용제를 의미한다.
- [0080] "안티-센스"는 길이에 관계없이, 핵산 서열의 코딩 가닥 또는 mRNA에 상보적인 핵산 서열을 의미한다. 안티센스 RNA는 개별 세포, 조직 또는 오가나노이드(organonoid)에 도입될 수 있다. 안티-센스 핵산은 변형된 백본, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 당 분야에 공지된 다른 변형된 백본을 함유할 수 있거나, 비-자연 뉴클레오시드간 연결을 함유할 수 있다.
- [0081] 본원에서 언급되는 "상보적 핵산 서열"은 상보적 뉴클레오티드 염기 쌍으로 이루어진 또 다른 핵산 서열과 하이브리드화될 수 있는 핵산 서열이다. "하이브리드화"라 함은 엄격성의 적절한 조건 하에 상보적 뉴클레오티드 염기 (예를 들어, DNA에서 구아닌 (G)과 시토신 (C)의 경우처럼, 아데닌 (A)은 티민 (T)과 염기 쌍을 형성한다) 사이에 이중-가닥 분자를 형성하는 쌍을 의미한다 (예를 들어, 문헌[Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507]을 참조하라).
- [0082] "컷바퀴 투여"는 고막을 지나 대상체의 내이로 조성물을 투여하기 위해 카테터 또는 심지 장치를 사용하는 방법을 의미한다. 심지 또는 카테터의 삽입을 촉진하기 위해, 고막은 적절한 크기의 주사기 또는 피펫을 사용하여 피어싱될 수 있다. 장치는 또한 당업자에게 알려진 임의의 다른 방법, 예를 들어, 장치의 외과 이식을 사용하여 삽입될 수 있었다. 특정 구체예에서, 심지 또는 카테터 장치는 독립형 장치일 수 있는데, 이는 이것이 대상체의 귀에 삽입된 다음 조성물이 내이로 제어가능하게 방출됨을 의미한다. 다른 특정 구체예에서, 심지 또는 카테터 장치는 추가적인 조성물의 투여를 허용하는 펌프 또는 다른 장치에 부착되거나 커플링될 수 있다. 펌프는 투여 단위를 전달하도록 자동으로 프로그래밍되거나 대상체 또는 의료 전문가에 의해 제어될 수 있다.
- [0083] 본원에서 사용된 "생체적합성 매트릭스"는 치료제 방출을 위해 인간에게 투여가 허용된 고분자 담체이다. 생체적합성 매트릭스는 생체적합성 젤 또는 포움일 수 있다.
- [0084] 본원에서 사용된 "세포 응집체"는 증식하여 직경이 40 마이크로미터 초과인 주어진 세포 유형의 클러스터를 형성하

고/하거나 3개 초과인 세포 층이 기저막에 수직으로 존재하는 형태를 생산하는 코르티 기관에서의 체세포를 의미한다. "세포 응집체"는 또한 세포 분열이 하나 이상의 세포 유형이 그물판을 파괴하도록 하는 세포의 몸체, 또는 내림프 및 바깥림프 사이에 경계를 생성하는 과정을 나타낼 수 있다.

[0085] 특이적 세포 유형에 관해 본원에서 사용된 "세포 밀도"는 대표적인 현미경 샘플에서 면적 당 세포 유형의 평균 수이다. 세포 유형은 비제한적으로 $Lgr5^{+}$ 세포, 털세포, 또는 지지 세포를 포함할 수 있다. 세포 밀도는 비제한적으로 와우 또는 코르티 기관을 포함하는 주어진 기관 또는 조직에서 주어진 세포 유형으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 코르티 기관에서 $Lgr5^{+}$ 세포 밀도는 코르티 기관을 가로질러 측정된 $Lgr5^{+}$ 세포의 세포 밀도이다. 전형적으로, 지지 세포 및 $Lgr5^{+}$ 세포는 코르티 기관의 횡단면을 취함으로써 얻어질 것이다. 전형적으로, 대표적인 현미경 샘플에서 기재된 대로, 횡단면이 일부 경우에 사용될 수 있지만, 털세포는 코르티 기관의 표면을 내려다 보면서 얻어질 것이다. 전형적으로, $Lgr5^{+}$ 세포의 세포 밀도는 대표적인 현미경 샘플에 기재된 대로, 코르티 기관의 전체 마운트 제조물을 분석하고 상피의 표면을 따라 주어진 거리에 걸쳐 $Lgr5$ 세포의 수를 계수함에 의해 측정될 것이다. 털세포는 번들 또는 털세포 특이적 염색과 같은 이들의 형태학적 특징에 의해 확인될 수 있다 (예를 들어, 미오신(Myosin) VIIa, 프레스틴(Prestin), vGlut3, Pou4f3, 에스핀(Espin), 컨주게이션된-팔로이딘, PMCA2, Ribeye, Atoh1, 등). $Lgr5^{+}$ 세포는 특이적 염색 또는 항체 (예를 들어, $Lgr5$ -GFP 트랜스제닉 리포터, 항- $Lgr5$ 항체, 등)에 의해 확인될 수 있다.

[0086] "CHIR99021"은 화학식 $C_{22}H_{18}Cl_2N_8$ 및 대체명: CT 99021; 6-[[2-[[4-(2,4-디클로로페닐)-5-(5-메틸-1H-이미다졸-2-일)-2-피리미디닐]아미노]에틸]아미노]-3-피리딘카르보닐트릴을 갖는 화학 조성물이다. 이의 화학 구조는 다음과 같다:



[0087]

[0088] 본원에서 사용된 "와우 농도"는 샘플링 와우 유체를 통해 측정된 주어진 작용제의 농도일 것이다. 달리 명시되지 않는 한, 샘플은 와우 중 작용제의 평균 농도를 대략적으로 대표하기 위해 와우 유체의 실질적인 충분한 부분을 함유하여야 한다. 예를 들어, 샘플은 전정관으로부터 뽑아낼 수 있고, 일련의 유체 샘플은 개개 샘플이 와우의 특정 부분의 와우 유체로 구성되도록 연속하여 취해질 수 있다.

[0089] "상보적 핵산 서열"은 상보적 뉴클레오타이드 염기 쌍으로 이루어진 또 다른 핵산 서열과 하이브리드화될 수 있는 핵산 서열을 의미한다.

[0090] 특이적 세포 유형에 관해 본원에서 사용된 "횡단면 세포 밀도"는 대표적인 현미경 샘플에서 조직을 통한 단면적 당 세포 유형의 평균 수이다. 코르티 기관의 횡단면은 또한 주어진 평면에서 세포의 수를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 전형적으로, 털세포 횡단면 세포 밀도는 대표적인 현미경 샘플에 기재된 대로, 코르티 기관의 전체 마운트 제조물을 분석하고 상피의 일부분을 따라 취해진 횡단면에서 주어진 거리를 가로지르는 털세포의 수를 계수함에 의해 측정될 것이다. 전형적으로, $Lgr5^{+}$ 세포의 횡단면 세포 밀도는 대표적인 현미경 샘플에 기재된 대로, 코르티 기관의 전체 마운트 제조물을 분석하고 상피의 일부분을 따라 취해진 횡단면에서 주어진 거리를 가로지르는 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 계수함에 의해 측정될 것이다. 털세포는 번들 또는 털세포 특이적 염색과 같은 이들의 형태학적 특징에 의해 확인될 수 있다 (적합한 염색은, 예를 들어, 미오신 VIIa, 프레스틴, vGlut3, Pou4f3, 컨주게이션된-팔로이딘, PMCA2, Atoh1, 등을 포함한다). $Lgr5^{+}$ 세포는 특이적 염색 또는 항체에 의해 확인될 수 있다 (적합한 염색 및 항체는 $Lgr5$ mRNA, $Lgr5$ -GFP 트랜스제닉 리포터 시스템, 항- $Lgr5$ 항체, 등의 형광성 동일반응계내 하이브리드화를 포함한다).

[0091] "감소하는"은, 예를 들어, 참조의 수준에 비해, 적어도 5%, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30,

35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 또는 100%만큼 감소하는 것을 의미한다.

- [0092] "감소"는 또한, 예를 들어, 참조의 수준에 비해, 적어도 1배, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000배 또는 그 초과만큼의 감소를 의미한다.
- [0093] 본원에서 사용된 "분화 억제제"는 내이 줄기 세포의 내이 털세포로의 분화를 억제할 수 있는 작용제이다. 일부 분화 억제제는 생후 줄기 세포 마커의 발현을 유지한다. 일부 분화 억제제는 비제한적으로 Notch 효능제 및 HDAC 억제제를 포함한다.
- [0094] 본원에서 사용된 "분화 기간"은 효과적인 분화 억제 농도 없이 효과적인 줄기성 드라이버 농도가 존재하는 시간의 지속기간이다.
- [0095] "효과적인 농도"는 줄기성 드라이버에 대한 효과적인 줄기성 드라이버 농도 또는 확산 억제제에 대한 효과적인 확산 억제 농도일 수 있다.
- [0096] "효과적인 분화 억제 농도"는 줄기 세포 증식 검정의 끝에 줄기 세포 증식 검정의 시작과 비교하여 털세포인 세포의 총 집단의 분획에서 50% 초과를 증가하지 않는 분화 억제제의 최소 농도이다. 효과적인 분화 억제 농도를 측정함에 있어서, 세포에 대한 털세포 염색은 Atoh1-GFP 마우스가 아닌 마우스 주에 대한 털세포를 정량하기 위해 유동세포계수법으로 이용될 수 있다. 대안적으로, Atoh1-GFP 마우스 주를 이용할 수 있다.
- [0097] 본원에서 사용된 "효과적인 방출율" (질량/시간)은 효과적인 농도 (질량/부피) * 30 μ L / 1 시간이다.
- [0098] "효과적인 줄기성 드라이버 농도"는 줄기성 드라이버 없이 그리고 동일한 농도로 존재하는 모든 다른 구성요소에 의해 수행된 줄기 세포 증식 검정에서 Lgr5⁺ 세포의 수에 비해 줄기 세포 증식 검정에서 Lgr5⁺ 세포의 수에서의 적어도 1.5배 증가를 유도하는 줄기성 드라이버의 최소 농도이다.
- [0099] "제거"는 검출할 수 없는 수준으로의 감소를 의미한다.
- [0100] "생각하다" 또는 "생각"은 조직의 기존 세포와의 접촉을 통해 생체내 관심 조직으로의 줄기 또는 전구체 세포의 혼입 과정을 의미한다. "상피 전구체 세포"는 상피 세포를 발생시키는 세포 계통으로 제한될 가능성이 있는 다능성 세포를 의미한다.
- [0101] "상피 줄기 세포"는 상피 세포를 발생시키는 세포 계통을 포함하여, 다중 세포 계통으로 수입될 가능성이 있는 다능성 세포를 의미한다.
- [0102] "단편"은 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 일부를 의미한다. 이 부분은 바람직하게는 참조 핵산 분자 또는 폴리펩티드의 전체 길이의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 함유한다. 단편은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 아미노산을 함유할 수 있다.
- [0103] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "GSK3베타," "GSK3 β ," 및 "GSK3B"는 글리코겐 합성효소 키나제 3 베타에 대한 동의어이다.
- [0104] "GSK3베타 억제제"는 GSK3베타의 활성을 억제하는 조성물이다.
- [0105] 본원에서 사용되는 "HDAC"는 히스톤 데아세틸라제의 약어이다.
- [0106] "HDAC 억제제"는 HDAC의 활성을 억제하는 조성물이다.
- [0107] "하이브리드화"는 엄격성의 적합한 조건 하에 상보적 뉴클레오티드 염기 (예를 들어, DNA에서 구아닌 (G)과 시토신 (C)의 경우처럼, 아데닌 (A)은 티민 (T)과 염기 쌍을 형성한다) 사이에 이중-가닥 분자를 형성하는 페어링을 의미한다 (예를 들어, 문헌[Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507]을 참조하라).
- [0108] "억제제"는 표적 유전자 또는 단백질의 발현 또는 활성에서 각각 감소를 초래하는 작용제를 의미한다. "길항제"는 억제제일 수 있으나, 보다 구체적으로 수용체에 결합하여, 결국 다른 분자에 의한 결합을 감소시키거나 제거하는 작용제이다.
- [0109] 본원에서 사용되는 "억제성 핵산"은 포유동물 세포에 투여될 때 표적 유전자의 발현을 감소시키는 이중-가닥 RNA, RNA 간섭, miRNA, siRNA, shRNA, 또는 안티센스 RNA, 또는 이의 일부, 또는 이의 미메틱이다. 전형적으로, 핵산 억제제는 표적 핵산 분자의 적어도 일부, 또는 이의 오르톨로그를 포함하거나, 표적 핵산 분

자의 상보적 가닥의 적어도 일부를 포함한다. 전형적으로, 표적 유전자의 발현은 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 심지어 90-100%만큼 감소한다.

- [0110] "시험관내 Lgr5 활성화"는 세포의 시험관내 집단에서 Lgr5의 발현 또는 활성화 수준을 의미한다. 이는 세포를 단일 세포로 분리하고, 프로피듐 아이오다이드 (PI)로 염색하고, Lgr5-GFP 발현에 대해 세포를 유동세포계수기를 이용하여 분석함에 의해, 예를 들어, Lgr5-GFP 발현 마우스, 예컨대, B6.129P2-Lgr5tm1(cre/ERT2)C1e/J 마우스 (Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 또는 Lgr5-GFP 마우스로도 공지됨, Jackson Lab Stock No: 008875)로부터 유래된 세포에서 측정될 수 있다. 동일한 배양 및 분석 절차를 거친 야생형 (비-Lgr5-GFP) 마우스로부터의 내이 상피 세포를 음성 대조군으로서 이용할 수 있다. 전형적으로, 2개의 세포 집단이 한 변수로서 GFP/FITC를 갖는 이변수 플롯에 도시되며, 이는 GFP 양성 및 GFP 음성 집단 둘 모두를 포함한다. Lgr5-양성 세포는 GFP 양성 세포 집단을 게이팅시킴에 의해 확인된다. Lgr5-양성 세포의 백분율은 GFP 음성 집단 및 음성 대조군 둘 모두에 대해 GFP 양성 세포 집단을 게이팅시킴에 의해 측정된다. Lgr5-양성 세포의 수는 세포의 총 수에 Lgr5-양성 세포의 비율을 곱하여 계산된다. 비-Lgr5-GFP 마우스로부터 유래된 세포에 대해, Lgr5 활성화는 Lgr5 유전자에 대한 항-Lgr5 항체 또는 정량적-PCR을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0111] 본원에서 사용된 "생체내 Lgr5 활성화"는 대상체에서 Lgr5의 발현 또는 활성화 수준이다. 이는, 예를 들어, 동물의 내이를 제거하고 Lgr5 단백질 또는 Lgr5 mRNA를 측정함에 의해 측정될 수 있다. Lgr5 단백질 생산은 와우 샘플을 이미징함에 의해 결정되는 형광 강도를 측정하기 위해 항-Lgr5 항체를 이용하여 측정될 수 있고, 여기서 형광 강도는 Lgr5 존재의 척도로서 이용된다. 웨스턴 블롯은 항-Lgr5 항체로 이용될 수 있고, 이 때 세포를 처리된 기관으로부터 회수하여 Lgr5 단백질의 증가를 결정할 수 있다. 동일반응계내 하이브리드화에서의 정량적-PCR 또는 RNA를 이용하여 Lgr5 mRNA 생산에서의 상대적 변화를 측정할 수 있고, 이 때 세포를 내이로부터 회수하여 Lgr5 mRNA의 변화를 결정할 수 있다. 대안적으로, Lgr5 발현은 Lgr5 프로모터 구동된 GFP 리포터 트랜스제닉 시스템을 이용하여 측정될 수 있고, 이 때 GFP 형광의 존재 또는 강도는 유동세포계수법, 이미징을 이용하여 직접적으로 검출될 수 있거나, 항-GFP 항체를 이용하여 간접적으로 검출될 수 있다.
- [0112] "증가"는 또한, 예를 들어, 참조 표준의 수준에 비해, 적어도 1배, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000배 또는 그 초과만큼의 증가를 의미한다.
- [0113] "증가하는"은, 예를 들어, 참조의 수준에 비해, 적어도 5%, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 100% 또는 그 초과만큼 증가하는 것을 의미한다.
- [0114] "콧바퀴내 투여"는 조성물을 직접 주입함에 의한 대상체의 중이 또는 내이에 조성물의 투여를 의미한다.
- [0115] "와우내" 투여는 고막을 가로질러 그리고 정원창막을 가로질러 와우 내에 조성물의 직접 주입을 의미한다.
- [0116] "전정내" 투여는 고막을 가로질러 그리고 정원창막을 가로질러 전정 기관 내에 조성물의 직접 주입을 의미한다.
- [0117] "분리된"은 이의 천연 상태에서 발견되는 바와 같은 보통 그 물질을 동반한 구성요소로부터 다양한 정도로 유리된 물질을 의미한다. "분리되다"는 원래 공급원 또는 주변으로부터의 분리 정도를 나타낸다.
- [0118] "Lgr5"는 G-단백질 커플링된 수용체 49 (GPR49) 또는 G-단백질 커플링된 수용체 67 (GPR67)로도 공지된, 류신-풍부한 반복부-함유 G-단백질 커플링된 수용체 5에 대한 약어이다. 이는 인간에서 Lgr5 유전자에 의해 인코딩된 단백질이다.
- [0119] "Lgr5 활성화"는 세포의 집단에서 Lgr5의 활성화 수준으로서 정의된다. 시험관내 세포 집단에서, Lgr5 활성화는 시험관내 Lgr5 활성화 검정으로 측정될 수 있다. 생체내 세포 집단에서, Lgr5 활성화는 생체내 Lgr5 활성화 검정으로 측정될 수 있다.
- [0120] 본원에서 사용된 "Lgr5⁺ 세포" 또는 "Lgr5-양성 세포"는 Lgr5를 발현시키는 세포이다. 본원에서 사용된 "Lgr5⁻ 세포"는 Lgr5가 아닌 세포이다.
- [0121] 본원에서 사용된 "계통 추적(Lineage Tracing)"은 리포터 유도시에 표적 유전자를 발현시키는 임의의 세포의 운명 추적을 가능하게 하는 마우스 주를 이용하는 것이다. 이는 텔세포 또는 지지 세포 유전자 (Sox2, Lgr5, 미오신VIIa, Pou4f3, 등)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 계통 추적은 리포터 마우스와 교차된 Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 마우스를 이용할 수 있는데, 이는 유도시, 그로 하여금 유도시에 Lgr5를 발현시킨 세포의 운명을 추적할 수 있도록 한다. 추가 예로서, Lgr5 세포는 단일 세포로 분리되고 줄기 세포 증식 검정에서 배양되어 집락을 생성한 다음, 후속하여 분화 검정에서 분화될 수 있고, 텔세포 및/또는 지지 세포 단백질을 염색하고 텔세포 또

는 지지 세포 염색에 의해 리포터 동국소화(colocalization)를 결정하여 Lgr5 세포의 운명을 결정함으로써 세포 운명을 분석할 수 있다. 또한, 계통 추적은 치료 후 손상되지 않은 기관 내의 지지 세포 또는 텔세포 운명을 추적하기 위해 와우 체외이식편에서 수행될 수 있다. 예를 들어, Lgr5 세포 운명은 리포터 마우스와 교차된 Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 마우스로부터 와우를 분리하고, 치료 전 또는 동안에 Lgr5 세포에서 리포터를 유도함에 의해 결정될 수 있다. 그 후, 기관은, 텔세포 및/또는 지지 세포 단백질을 염색하고, 텔세포 또는 지지 세포 염색에 의해 리포터 동국소화를 결정하여 Lgr5 세포의 운명을 결정함에 의해 세포 운명에 대해 분석될 수 있다. 또한, 계통 추적은 치료 후 손상되지 않은 기관 내의 지지 세포 또는 텔세포 운명을 추적하기 위해 생체내에서 수행될 수 있다. 예를 들어, Lgr5 세포 운명은 리포터 마우스와 교차된 Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 마우스에서 리포터를 유도한 다음, 와우를 분리시킴에 의해 결정될 수 있다. 그 후, 기관은 텔세포 및/또는 지지 세포 단백질을 염색하고, 텔세포 또는 지지 세포 염색에 의해 리포터 동국소화를 결정하여 Lgr5 세포의 운명을 결정함에 의해 세포 운명에 대해 분석될 수 있다. 계통 추적은 당 분야의 표준인 대안적인 관심 리포터를 이용하여 수행될 수 있다.

- [0122] "포유동물"은 인간, 마우스, 래트, 양, 원숭이, 염소, 토끼, 햄스터, 말, 소 또는 돼지를 비제한적으로 포함하는 임의의 포유동물을 의미한다.
- [0123] 본원에서 사용된 "평균 방출 시간"은 작용제의 절반이 방출 검정에서 담체로부터 포스페이트 완충된 염수로 방출되는 시간이다.
- [0124] 본원에서 사용된 "천연 형태학"은 조직 구조가 건강한 조직에서의 구조를 크게 반영하는 것을 의미한다. 예를 들어, 와우에 대한 "천연 형태학"은 텔세포가 Notch의 측면 억제에 의해 형성된 로제트 패턴으로 지지 세포에 의해 둘러싸여 있고, 텔세포들이 서로 접촉하지 않으며, 2-3개의 세포 층이 코르티 기관 상피를 형성하고, 세포가 그물판을 파괴하지 않는 (즉, 내림프와 바깥림프 사이에 경계를 위반하지 않는) 것을 의미한다.
- [0125] 본원에서 사용된 "비-인간 포유동물"은 인간이 아닌 임의의 포유동물을 의미한다.
- [0126] 본원에서 사용된 "Notch 활성 검정"은, 예를 들어, qPCR을 이용하여 Hes5/Hes1의 발현을 결정하는 것과 같이, 표준 기술을 이용하여 집단에서 Notch 활성을 결정하는 검정을 의미한다.
- [0127] 본원의 관련 문맥에서 사용된 용어 세포의 "수"는 0, 1, 또는 그 초과인 세포일 수 있다.
- [0128] 본원에서 사용된 "코르티 기관"은 와우에 위치한 청각 기관의 감각 세포 (내부 및 외부 텔세포)를 의미한다.
- [0129] "오가노이드" 또는 "상피 오가노이드"는 기관, 또는 기관의 일부와 유사하고 특정 기관과 관련된 세포 유형을 지닌 세포 클러스터 또는 응집체를 의미한다.
- [0130] 세포의 "집단"은 1보다 큰 세포의 임의의 수를 의미하고, 바람직하게는 적어도 1×10^3 개 세포, 적어도 1×10^4 개 세포, 적어도 1×10^5 개 세포, 적어도 1×10^6 개 세포, 적어도 1×10^7 개 세포, 적어도 1×10^8 개 세포, 적어도 1×10^9 개 세포, 또는 적어도 1×10^{10} 개 세포이다.
- [0131] 본원에서 사용된 "전구체 세포"는 줄기 세포와 같이, 특이적 유형의 세포로 분화되는 경향을 갖지만, 이미 줄기 세포보다 더욱 특이적이고 이의 "표적" 세포로 분화하도록 압박된 세포를 의미한다.
- [0132] 본원에서 사용된 "증식 기간"은 효과적인 줄기성 드라이버 농도 및 분화 억제제의 분화 억제 농도가 존재하는 지속기간이다.
- [0133] "참조"는 표준 또는 대조 조건 (예컨대, 시험 작용제 또는 시험 작용제의 조합물로 처리되지 않음)을 의미한다.
- [0134] 본원에서 사용된 "방출 검정"은 생체적합성 매트릭스로부터 투석막을 통해 염수 환경으로의 작용제의 방출율을 측정하는 시험이다. 예시적인 방출 검정은 적합한 컷오프가 있는 염수 투석백 내부에 1 ml의 포스페이트 완충된 염수 중 30 마이크로리터의 조성물을 넣고, 투석 백을 10 mL의 포스페이트 완충된 염수 내에 37°C에서 넣음으로써 수행될 수 있다. 투석막 크기는 막을 빠져나가는 작용제를 평가할 수 있도록 작용제 크기에 기반하여 선택될 수 있다. 소분자 방출을 위해, 3.5-5 kDa 컷오프가 이용될 수 있다. 작용제는 줄기성 드라이버, 분화 억제제, 또는 다른 작용제일 수 있다. 조성물에 대한 방출율은 시간 경과에 따라 변화할 수 있고 1시간 단위로 측정될 수 있다.
- [0135] 본원에서 사용된 "대표적인 현미경 샘플"은 모든 관련 필드가 측정된 경우 측정된 평균 피쳐 크기 또는 수가 평균 피쳐 크기 또는 수를 나타낸다고 합리적으로 일컬어질 수 있는 세포 배양 시스템, 추출된 조직의 일부, 또는 전체 추출된 기관 내의 충분한 수의 시야를 기재한다. 예를 들어, 주파수 범위에서 코르티 기관에 대한 텔세포

수를 평가하기 위해, ImageJ 소프트웨어 (NIH)를 이용하여 와우 전체 마운트의 총 길이 및 개별 계수된 세그먼트의 길이를 측정할 수 있다. 내부 털세포, 외부 털세포, 및 지지 세포의 총 수는 1200-1400 μm 의 4개 와우 세그먼트 (정점, 중간-정점, 중간-기저, 및 기저) 중 어느 하나의 전체 또는 분획에서 계수될 수 있다. 100 μm 필드 크기의 적어도 3개 시야는 합리적으로 대표적인 현미경 샘플로 간주될 것이다. 대표적인 현미경 샘플은 주어진 거리에 따른 세포로서 측정될 수 있는 시야 내의 측정을 포함할 수 있다. 대표적인 현미경 샘플을 이용하여 형태학, 예컨대 세포-세포 접촉, 와우 아키텍처, 및 세포 구성요소 (예컨대, 번들, 시냅스)를 평가할 수 있다.

[0136] "로제트 패턴링"은 5% 미만의 털세포가 다른 털세포와 인접해 있는 와우의 특징적인 세포 배열이다.

[0137] 용어 "샘플"은 수득된, 제공된, 및/또는 분석된 부피 또는 질량을 나타낸다. 일부 구체예에서, 샘플은 조직 샘플, 세포 샘플, 유체 샘플 등이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 샘플은 대상체로부터 취해지거나 대상체이다 (예컨대, 인간 또는 동물 대상체). 일부 구체예에서, 조직 샘플은 뇌, 모발 (모근 포함), 협측 면봉채취물, 혈액, 타액, 정액, 근육, 또는 임의의 내부 기관, 또는 이들 중 어느 하나와 관련된 암, 전암성, 또는 종양 세포이거나 이를 포함한다. 유체는 비제한적으로 소변, 혈액, 복수, 흉막액, 척수액 등일 수 있다. 신체 조직은 비제한적으로 뇌, 피부, 근육, 자궁내막, 자궁, 및 자궁경부 조직 또는 이들 중 어느 하나와 관련된 암, 전암성, 또는 종양 세포를 포함할 수 있다. 구체예에서, 신체 조직은 뇌 조직 또는 뇌 종양 또는 암일 수 있다. 당업자는, 일부 구체예에서, "샘플"이 공급원 (예컨대, 대상체)으로부터 수득된다는 점에서 "일차 샘플"이고; 일부 구체예에서, "샘플"이, 예를 들어, 잠재적으로 오염성 특정 구성요소를 제거하고/하거나 관심 특정 구성요소를 분리 또는 정제하기 위한, 일차 샘플의 처리 결과임을 인지할 것이다.

[0138] "자가-재생"은 줄기 세포가 분열하여 모 세포와 구별할 수 없는 발달 잠재력을 지닌 1개 (비대칭 분열) 또는 2개 (대칭 분열)의 딸세포를 생성하는 과정을 의미한다. 자가-재생은 증식 및 미분화된 상태의 유지 둘 모두와 관련된다.

[0139] "siRNA"는 이중 가닥 RNA를 의미한다. 최적으로, siRNA는 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개 또는 24개 뉴클레오타이드 길이이고 이의 3' 말단에 2개의 염기 오버행을 갖는다. 이러한 dsRNA는 개별 세포 또는 배양 시스템에 도입될 수 있다. 그러한 siRNA를 이용하여 mRNA 수준 또는 프로모터 활성을 하향조절한다.

[0140] "줄기 세포"는 자가 재생하고 다수의 세포 계통으로 분화되는 능력을 갖는 다능성 세포를 의미한다.

[0141] 본원에서 사용된 "줄기 세포 분화 검정"은 줄기 세포의 분화 능력을 결정하는 검정이다. 예시적인 줄기 세포 분화 검정에서, 최초 세포 집단을 위한 세포 수는, 코르티 기관 감각 상피를 분리하고, 상피를 단일 세포로 분리시키고, 세포를 40 μm 세포 여과기를 통해 통과시킴에 의해 3 내지 7일령의 Atoh1-GFP 마우스로부터 회수된다. 약 5000개 세포를 40 μl 의 배양 기질 (예를 들어: 매트릭젤 (Corning, 성장 인자 감소됨))에 포집하고 500 μl 의 적절한 배양 배지, 성장 인자 및 시험되는 작용제를 갖는 24웰 플레이트의 웰 중심에 놓는다. 적절한 배양 배지 및 성장 인자는 배지 보충물 (1X N2, 1X B27, 2 mM 글루타맥스, 10 mM HEPES, 1 mM N-아세틸시스테인, 및 100 U/ml 페니실린/100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신)을 지닌 고급(Advanced) DMEM/F12 및 성장 인자 (50 ng/ml EGF, 50 ng/ml bFGF, 및 50 ng/ml IGF-1) 뿐만 아니라 각 웰에 첨가된 평가되는 작용제(들)를 포함한다. 2일마다 배지를 교환하면서, 세포를 10일 동안 표준 세포 배양 인큐베이터에서 37°C 및 5% CO₂에서 배양시켰다. 그 후 줄기 세포 증식 검정 작용제를 제거하고 분화를 유도하기 위한 기초 배양 배지 및 분자로 대체함에 의해 이들 세포를 배양하였다. 적절한 기초 배양 배지는 1X N2, 1X B27, 2 mM 글루타맥스, 10 mM HEPES, 1 mM N-아세틸시스테인, 및 100 U/ml 페니실린/100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신이 보충된 고급 DMEM/F12이고, 2일마다 배지를 교환하면서 10일 동안 분화를 유도하기 위한 적절한 분자는 3 μM CHIR99021 및 5 μM DAPT이다. 집단에서 털세포의 수는 GFP에 대한 유동세포계수법을 이용하여 측정될 수 있다. 털세포 분화 수준은 적합하고 조절되지 않은 참조 또는 살림 유전자 (예컨대, Hprt)를 이용하여 표준화된 털세포 마커 (예컨대, Myo7a) 발현 수준을 측정하기 위해 qPCR을 이용하여 추가로 평가될 수 있다. 털세포 분화 수준은 또한 털세포 마커 (예컨대, 미오신7a, vGlut3, 에스핀, PMCAs, Ribeye, 건유게이션된-팔로이딘, Atoh1, Pou4f3, 등)를 면역염색시킴에 의해 평가될 수 있다. 털세포 분화 수준은 또한 미오신7a, vGlut3, 에스핀, PMCAs, 프레스틴, Ribeye, Atoh1, Pou4f3에 대한 웨스턴 블롯에 의해 평가될 수 있다.

[0142] 본원에서 사용된 "줄기 세포 검정"은 세포 또는 세포 집단이 줄기 세포이거나 줄기 세포 또는 줄기 세포 마커로 풍부한 지를 결정하기 위해 세포 또는 세포 집단을 일련의 기준에 대해 시험하는 검정이다. 줄기 세포 검정에서, 세포/세포 집단은 줄기 세포 마커의 발현과 같은 줄기 세포 특징에 대해 시험되고, 또한 임의로 자가-재생 및 분화능을 포함하는 줄기 세포 기능에 대해 시험된다.

- [0143] 본원에서 사용된 "줄기 세포 증식제"는 자가-재생 및 분화능을 가진 세포 집단의 증가를 유도하는 조성물이다.
- [0144] 본원에서 사용된 "줄기 세포 증식 검정"은 출발 세포 집단으로부터 줄기 세포의 생성을 유도하는 작용제(들)의 능력을 결정하기 위한 검정이다. 예시적인 줄기 세포 증식 검정에서, 최초 세포 집단을 위한 세포 수는, 코르티 기관 감각 상피를 분리하고, 상피를 단일 세포로 분리함에 의해 3 내지 7일령의 Lgr5-GFP 마우스, 예컨대 B6.129P2-Lgr5tm1(cre/ERT2)C1e/J 마우스 (Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 또는 Lgr5-GFP 마우스로도 공지됨, Jackson Lab Stock No: 008875)로부터 회수된다. 약 5000개 세포를 40 μ l의 배양 기질 (예를 들어: 매트릭셀 (Corning, 성장 인자 감소됨))에 포집하고 500 μ l의 적절한 배양 배지, 성장 인자 및 시험되는 작용제를 갖는 24웰 플레이트의 웰 중심에 놓는다. 적절한 배양 배지 및 성장 인자는 배지 보충물 (1X N2, 1X B27, 2 mM 글루타맥스, 10 mM HEPES, 1 mM N-아세틸시스테인, 및 100 U/ml 페니실린/100 μ g/ml 스트렙토마이신)을 지닌 고급 DMEM/F12 및 성장 인자 (50 ng/ml EGF, 50 ng/ml bFGF, 및 50 ng/ml IGF-1) 뿐만 아니라 각 웰에 첨가된 평가 되는 작용제(들)를 포함한다. 2일마다 배지를 교환하면서, 세포를 10일 동안 표준 세포 배양 인큐베이터에서 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 배양시켰다. 시험관내 Lgr5 활성 검정에서 Lgr5⁺로서 확인된 세포 수를 계수함에 의해 Lgr5⁺ 세포의 수를 정량하였다. 세포 집단에서 Lgr5⁺로서 확인된 세포 수를 세포 집단에 존재하는 세포의 총 수로 나눔에 의해 Lgr5⁺인 세포 분획을 정량하였다. 집단의 평균 Lgr5⁺ 활성은 적합하고 조절되지 않은 참조 또는 살림 유전자 (예컨대, Hprt)를 이용하여 표준화된 집단의 Lgr5의 평균 mRNA 발현 수준을 측정함에 의해 정량된다. 집단에서 텔세포의 수는 텔세포 마커 (예컨대, 미오신VIIa)로의 염색에 의해, 또는 텔세포 유전자 (예컨대, Pou4f3-GFP, Atoh1-nGFP)의 내인성 리포터를 이용하고 유동세포계수법을 이용하여 분석함에 의해 측정될 수 있다. 텔세포인 세포의 분획은 세포 집단에서 텔세포로서 확인된 세포 수를 세포 집단에 존재하는 세포의 총 수로 나눔에 의해 정량된다. Lgr5 활성은 qPCR에 의해 측정될 수 있다.
- [0145] 본원에서 사용된 "줄기 세포 마커"는 줄기 세포에서 특이적으로 발현된 유전자 생성물 (예컨대, 단백질, RNA, 등)로서 정의될 수 있다. 한 유형의 줄기 세포 마커는 줄기 세포 동일성의 유지를 직접적이고 구체적으로 지지하는 유전자 생성물이다. 예로는 Lgr5 및 Sox2를 포함한다. 추가적인 줄기 세포 마커는 문헌에 기재된 검정을 이용하여 확인될 수 있다. 유전자가 줄기 세포 동일성 유지에 필요한지 여부를 결정하기 위해서는 기능 획득 (gain-of-function) 및 기능 상실(loss-of-function) 연구를 사용할 수 있다. 기능 획득 연구에서, 특정 유전자 생성물 (줄기 세포 마커)의 과발현은 줄기 세포 동일성 유지에 도움이 될 것이다. 반면 기능 상실 연구에서, 줄기 세포 마커의 제거는 줄기 세포 동일성의 상실을 초래하거나 줄기 세포의 분화를 유도할 것이다. 또 다른 유형의 줄기 세포 마커는 줄기 세포에서만 발현되고 줄기 세포의 동일성을 유지하기 위해 특별한 기능을 가질 필요가 없는 유전자이다. 이 유형의 마커는 마이크로-어레이 및 qPCR과 같은 검정에 의해 분류된 줄기 세포 및 비-줄기 세포의 유전자 발현 시그니처를 비교함에 의해 확인될 수 있다. 이 유형의 줄기 세포 마커는 문헌에서 찾아볼 수 있다 (예를 들어, Liu Q. et al., *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Mar;60:99-111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25582750>). 잠재적인 줄기 세포 마커는 Ccdc121, Gdf10, Opcml, Phex, 등을 포함한다. 주어진 세포 또는 세포 집단에서 Lgr5 또는 Sox2와 같은 줄기 세포 마커의 발현은 qPCR, 면역조직 화학, 웨스턴 블롯, 및 RNA 하이브리드화와 같은 검정을 이용하여 측정될 수 있다. 줄기 세포 마커의 발현은 또한 Lgr5-GFP 또는 Sox2-GFP와 같은 주어진 줄기 세포 마커의 발현을 지시할 수 있는 트랜스제닉 세포 발현 리포터를 이용하여 측정될 수 있다. 그 후 유동세포계수법 분석을 이용하여 리포터 발현의 활성을 측정할 수 있다. 리포터의 발현을 직접 가시화하기 위해 형광 현미경도 이용할 수 있다. 줄기 세포 마커의 발현은 글로벌 유전자 발현 프로파일 분석을 위한 마이크로어레이 분석을 이용하여 추가로 결정될 수 있다. 주어진 세포 집단 또는 정제된 세포 집단의 유전자 발현 프로파일을 줄기 세포의 유전자 발현 프로파일과 비교하여 두 세포 집단 사이의 유사성을 결정할 수 있다. 줄기 세포 기능은 집락 형성 검정 또는 구체 형성 검정, 자가-재생 검정 및 분화 검정에 의해 측정될 수 있다. 집락 (또는 구체) 형성 검정에서, 적절한 배양 배지에서 배양될 때, 줄기 세포는 세포 배양 표면 (예컨대, 세포 배양 디쉬) 상에 집락을 형성할 수 있거나 세포 배양 기질 (예컨대, 매트릭셀)에 임베딩될 수 있거나 현탁액으로 배양될 때 구체를 형성할 수 있어야 한다. 집락/구체 형성 검정에서, 단일 줄기 세포를 저 세포 밀도로 적절한 배양 배지에 시딩하고 주어진 기간 (7-10일) 동안 증식되게 한다. 그 후 형성된 집락을 계수하고 원래 세포의 줄기성의 지표로서 줄기 세포 마커 발현에 대한 점수를 매긴다. 임의로, 형성된 집락을 그 후 선택하고 계대시켜 이의 자가-재생 및 분화 잠재력을 시험한다. 자가-재생 검정에서, 적절한 배양 배지에서 배양될 때, 세포는 적어도 한 번 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 등)의 세포 분열 동안 줄기 세포 마커 (예컨대, Lgr5) 발현을 유지하여야 한다. 줄기 세포 분화 검정에서, 적절한 분화 배지에서 배양될 때, 세포는 qPCR, 면역염색, 웨스턴 블롯, RNA 하이브리드화 또는 유동세포계수법에 의해 측정된 텔세포 마커 발현에

의해 확인될 수 있는 털세포를 생성할 수 있어야 한다.

[0146] 본원에서 사용된 "줄기성 드라이버"는 $LGR5^{+}$ 세포의 증식을 유도하거나, 세포에서 $Lgr5$ 를 상향조절하거나, 세포에서 $Lgr5$ 발현을 유지하는 한편, 자가-재생을 위한 잠재력 및 털세포로 분화되는 잠재력을 유지하는 조성물이다. 일반적으로, 줄기성 드라이버는 생후 줄기 세포의 적어도 하나의 바이오마커를 상향조절한다. 줄기성 드라이버는 비제한적으로 Wnt 효능제 및 GSK3베타 억제제를 포함한다.

[0147] "대상체"는 인간 및 포유동물 (예컨대, 마우스, 래트, 돼지, 고양이, 개, 및 말)을 포함한다. 많은 구체예에서, 대상체는 포유동물, 특히 영장류, 특히 인간이다. 일부 구체예에서, 대상체는 소, 양, 염소, 젖소, 돼지, 등과 같은 가축; 닭, 오리, 거위, 칠면조, 등과 같은 가금류; 및 사육 동물, 특히 개 및 고양이와 같은 애완동물이다. 일부 구체예에서 (예컨대, 특히 연구 문맥에서) 대상체 포유동물은, 예를 들어, 설치류 (예컨대, 마우스, 래트, 햄스터), 토끼, 영장류, 또는 근교배 돼지와 같은 돼지, 등 일 것이다.

[0148] 와우 상피에 관해 본원에서 사용된 "지지 세포"는 털세포가 아닌 코르티 기관 내의 상피 세포를 포함한다. 이는 속기둥 세포, 바깥 기둥 세포, 속손가락 세포, 다이테르 세포, 바깥경계 세포, 보엣체르(Boettcher) 세포, 및/또는 클라우디우스 세포를 포함한다.

[0149] "시너지" 또는 "시너지 효과"는 별도로 취한 각 효과의 합보다 큰 효과; 부가 효과보다 더 큰 효과이다.

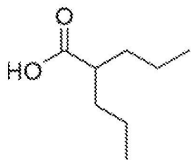
[0150] 본원에서 사용된 "Tgf 베타 억제제"는 Tgf 베타의 활성을 감소시키는 조성물이다.

[0151] "조직"은, 예를 들어, 코르티 기관과 같은 와우의 조직을 포함하는 특정 기능을 함께 수행하는 동일한 기원으로 부터의 유사한 세포의 집합이다.

[0152] "경고막" 투여는 고막을 가로질러 중이로의 조성물의 직접 주입을 의미한다.

[0153] 세포 집단과 관련하여 본원에서 사용된 "치료"는 결과를 얻기 위해 집단에 물질을 전달하는 것을 의미한다. 시험관내 집단의 경우, 물질은 집단에 직접적으로 (또는 심지어 간접적으로) 전달될 수 있다. 생체내 집단의 경우, 물질은 숙주 대상체로의 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0154] "발프로산" (VPA)은 화학식 $C_8H_{16}O_2$ 및 대체명: 2-프로필펜탄산을 갖는다. 이의 화학 구조는 다음과 같다:



[0155]

[0156] 조성물과 관련하여 본원에서 사용된 "Wnt 활성화"는 Wnt 신호전달 경로의 활성화이다.

[0157] "또는"의 이용은 달리 명시하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 본 출원에서 사용되는 용어 "포함하다" 및 이 용어의 변형, 예를 들어 "포함하는" 및 "포함하다"는 다른 첨가제, 구성요소, 정수 또는 단계를 배제하려는 것이 아니다. 본 출원에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 동등하게 사용된다. 약/대략의 유무에 관계없이 본 출원에 사용된 임의의 숫자는 당업자에 의해 인지되는 임의의 정상적인 변동을 포함하고자 한다. 특정 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 명시되지 않거나 문맥에서 달리 명백한 경우를 제외하고는 (그러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우 제외), 언급된 참조 값의 어느 쪽으로든 (그 초과 또는 그 미만) 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 이내에 있는 값의 범위를 나타낸다.

[0158] 어구 "약학적으로 허용되는"은 합리적인 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이, 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 합리적인 이익/위험 비에 상응하는 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태를 의미하기 위해 본원에서 이용된다.

[0159] 본원에서 사용되는 "약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"는 미국 식품의약국에 (FDA)에 의해 인간 또는 가축에 사용하기에 적합한 것으로 승인된 임의의 애주번트, 담체, 부형제, 활택제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 풍미 증강제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장성 작용제, 용매, 계면활성제, 또는 에멀전화제를 비제한적으로 포함한다. 예시적인 약학적으로 허용되는 담체는 당류, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스, 및 이의 유도체, 예컨대 소듐 카르

복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 트래거칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터, 왁스, 동물 및 식물성 지방, 파라핀, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 아연 옥사이드; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 잇꽃유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 아가; 완충제, 예컨대 마그네슘 하이드록사이드 및 알루미늄 하이드록사이드; 알긴산; 발열원-비함유 물; 등장성 염수; 링거액; 에틸 알콜; 포스페이트 완충액; 및 약학적 제형에 이용되는 임의의 다른 상용성 물질을 포함하지 만 이로 제한되는 것은 아니다.

[0160] "약학적으로 허용되는 염"은 산 및 염기 둘 모두의 부가염을 포함한다.

[0161] "약학적으로 허용되는 산 부가염"은 유리 염기의 생물학적 효능 및 특성을 보유하고, 생물학적으로 또는 달리 바람직하며, 비제한적으로, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등과 같은 무기산, 및 비제한적으로, 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 캄포르산, 캄포르-10-설폰산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 카르본산, 신남산, 시트르산, 사이클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-디설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 겐티스산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루탐산, 글루타르산, 2-옥소-글루타르산, 글리세로인산, 글리콜산, 히프르산, 이소부티르산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 메탄설폰산, 점액산, 나프탈렌-1,5-디설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 1-하이드록시-2-나프토산, 니코틴산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 프로피온산, 피로글루탐산, 피루브산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 세박산, 스테아르산, 석신산, 타르타르산, 티오시안산, / 톨루엔설폰산, 트리플루오로아세트산, 운데실렌산, 및 기타 등등과 같은 유기산으로 형성되는 염을 의미한다.

[0162] "약학적으로 허용되는 염기 부가염"은 유리 산의 생물학적 효능 및 특성을 보유하고, 생물학적으로 또는 달리 바람직한 염을 의미한다. 이러한 염은 유리 산에 무기 염기 또는 유기 염기의 첨가로부터 제조된다. 무기 염기로부터 유래된 염은 비제한적으로 소듐, 포타슘, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 염 등을 포함한다. 예를 들어, 무기 염은 비제한적으로 암모늄, 소듐, 포타슘, 칼슘, 및 마그네슘 염을 포함한다. 유기 염기로부터 유래된 염은 비제한적으로 일차, 이차, 및 삼차 아민, 자연 발생 치환된 아민을 포함하는 치환된 아민, 사이클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지, 예를 들어, 암모니아, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 디에탄올아민, 에탄올아민, 데아놀, 2-디메틸아미노에탄올, 2-디에틸아미노에탄올, 디사이클로헥실아민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 하이드라바민, 콜린, 베타인, 베네타민, 벤자틴, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 트리에탄올아민, 트로메타민, 푸린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등의 염을 포함한다. 특정 구체예에 사용된 예시적인 유기 염기는 이소프로필아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 트리메틸아민, 디사이클로헥실아민, 콜린 및 카페인을 포함한다.

[0163] 습윤제, 에멀전화제 및 윤활제, 예컨대 소듐 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트, 뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 풍미제 및 퍼프제, 보존제 및 향산화제도 조성물에 존재할 수 있다.

[0164] 약학적으로 허용되는 향산화제의 예는 (1) 수용성 향산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 소듐바이설페이트, 소듐 메타바이설페이트, 소듐 설페이트 등; (2) 지용성 향산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니솔 (BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함한다.

[0165] 본원에 기재된 조성물은 경고막 주입, 경고막 심지 및 카테터, 및 주입가능한 데포와 같은 요망되는 전달 경로에 적합한 임의의 방식으로 제형화될 수 있다. 전형적으로, 제형은 유도체 또는 프로드럭, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체, 또는 이의 토토머를 포함하는 모든 생리학적으로 허용되는 조성물을 임의의 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제, 및/또는 부형제와 함께 포함한다.

[0166] 발명의 상세한 설명

[0167] 본 발명의 예시적 구체예에 대한 설명이 이어진다.

[0168] 본 발명은 내이 조직, 특히 내이 털세포, 이들의 전구세포, 및 선택적으로 혈관조, 및 관련 청신경과 관련되는 내이 장애 및 청력 손상의 발생 및/또는 중증도를 예방, 감소 또는 치료하기 위한 조성물, 방법 및 시스템에 관한 것이다. 특히 흥미로운 것은 털세포 수 감소가 원인일 수 있는 영구적 청력 소실 및/또는 털세포 기능 저하

로 이어지는 그러한 병태이다. 시스플라틴 및 이의 유사체, 아미노글리코시드 항생제, 살리실레이트 및 이의 유사체, 또는 루프 이뇨제를 포함하는 귀독성 치료학적 약물의 원치않는 부작용으로서 발생하는 병태 또한 흥미롭다. 특정 구체예에서, 본 발명은 내이 조직, 특히 내이 지지 세포 및 털세포의 성장, 증식 또는 재생을 유도, 촉진 또는 향상시키는 것에 관한 것이다.

[0169] 특히, 본원에 제시된 화합물은 급성 및 만성 귀 질환 및 청력 소실, 현기증 및 균형 문제, 특히 급성 청력 소실, 음향성 외상, 만성 소음 노출로 인한 청력 소실, 노인성 난청, 내이 인공 삽입물 이식 동안의 외상 (삽입 외상), 내이 부위의 질병으로 인한 어지러움, 관련된 현기증 및/또는 메니에르병의 증상으로 관련된 현기증 및/또는 메니에르병의 증상으로 이명, 및 항생제 및 세포증식억제제 및 기타 약물로 인한 청력 소실의 예방 및/또는 치료를 위한 약학적 제형의 제조에 유용하다.

[0170] 유리하게는, 본원에 기재된 조성물은 줄기세포 특성 유발과 관련된 것으로 공지된 경로 및 메카니즘 예컨대, "유도 만능 줄기세포"를 발생시키는데 이용되는 것들 (예를 들어, 조합된 Wnt 자극, HDAC 억제, TGF-베타 억제, RAR 활성화, 및/또는 DKK1 억제)을 활성화시키는 능력을 갖는다. 와우 지지 세포 집단이 이러한 조성물로 처리되는 경우, 집단이 생체내이든지 시험관내이든지 상관없이, 처리된 지지 세포는 증식 및 분화 및 더욱 특히, 와우 털세포로의 분화 능력을 갖는다는 점에서 줄기-유사 성향을 나타낸다. 바람직하게는, 조성물은 지지 세포를 유도하고 유지하여 많은 세대 동안 분열할 수 있으며 생성 세포의 털세포로의 높은 비율의 분화 능력을 유지하는 도터 줄기세포를 생성한다. 특정 구체예에서, 증식 줄기세포는 Lgr5, Sox2, Opem1, Phex, lin28, Lgr6, 사이클린 D1, Msx1, Myb, Kit, Gdnf3, Zic3, Dppa3, Dppa4, Dppa5, Nanog, Esrrb, Rex1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l, Utf1, Tcf1, Oct4, Klf4, Pax6, Six2, Zic1, Zic2, Otx2, Bmi1, CDX2, STAT3, Smad1, Smad2, smad2/3, smad4, smad5, 및/또는 smad7를 포함할 수 있는 줄기세포 마커를 발현시킨다.

[0171] 일부 구체예에서, 본 발명의 조성물은 현저한 털세포 형성 전에 이미 존재하는 지지 세포 집단의 줄기성 (즉, 자가-재생성)을 유지하거나 심지어 일시적으로 증가시키는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 이미 존재하는 지지 세포 집단은 속기둥 세포, 바깥 기둥 세포, 내부 지골 세포, 다이테르 세포(Deiter cell), 헨센 세포(Hensen cell), 보에처 세포(Boettcher cell) 및/또는 클라우디우스 세포(Claudius cell)를 포함한다. 대표적인 현미경 샘플(Representative Microscopy Sample)에 걸친 계통 추적 및 면역염색 (세포 수 포함)을 이용한 형태학적 분석은 하나 이상의 이들 세포-유형에서 확장을 확인하는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, 이미 존재하는 지지 세포는 Lgr5⁺ 세포를 포함한다. 면역염색 (세포 수 포함) 및 qPCR과 RNA 하이브리드화를 이용한 형태학적 분석은 세포 집단간에 Lgr5의 상향조절을 확인하는데 이용될 수 있다.

[0172] 유리하게는, 본 발명의 방법 및 조성물은 유전자 조작을 사용하지 않고 이러한 목표를 달성한다. 많은 학문적 연구에 이용된 배선 조작은 청력 소실을 치료하는데 치료학적으로 바람직한 접근법이 아니다. 일반적으로, 요법은 바람직하게는 유전자 요법에 수반되지 않는 소분자, 펩티드, 항체, 또는 기타 비-핵산 분자 또는 핵산 전달 벡터의 투여를 포함한다. 특정 구체예에서, 요법은 유기 소분자의 투여를 포함한다. 바람직하게는, 청력 보호 또는 회복은 중이에 주입되어 와우 내로 확산되는 (비-유전자적) 치료제의 사용을 통해 달성된다.

[0173] 와우는 모든 존재하는 세포 유형에 크게 의존하며, 이들 세포의 조직화는 이들의 기능에 중요하다. 지지 세포가 신경전달물질 순환 및 와우 역학에 중요한 역할을 수행한다. 따라서, 코르티 기관 내부에서 로제트 패터닝을 유지하는 것은 기능에 중요할 수 있다. 기저막의 와우 역학은 털세포 형질도입을 활성화시킨다. 전위성 털세포는 Atoh1 바이러스 형질도입을 통해 생성되었으나, 덮개막과의 부조합 및 감각과 관련하여 이들의 잘못된 위치선정으로 인해 청력 반응에 기여할 수 있는 것으로 보이지 않는다. 게다가, 이들 세포는 전정 또는 비-포유동물 털세포와 더욱 유사한 것으로 보인다. 따라서, 단지 Atoh1 또는 Notch 억제보다는 더 많은 신호전달이 와우 털세포 발달에 필요하다. 와우 역학의 높은 감도로 인해, 대량의 세포를 피하는 것이 또한 바람직하다. 결국, 증식 후에라도 기저막을 따른 털세포 및 지지 세포의 적절한 분포 및 관계를 유지하는 것은 지지 세포 기능으로서 청력에 요망되는 특징인 것으로 보이며, 적절한 역학은 정상 청력에 필요하다.

[0174] 천연 와우에서, 털세포 및 지지 세포의 패터닝은 Notch 측면 억제를 통해 발생하며, 여기에서 털세포가 되는 세포는 근처 지지 세포로 신호를 보내어 Atoh1 (털세포 운명에 필요한 유전자)를 억제하여, 상위 로제트를 발생시킨다. 본 발명의 한 구체예에서, 와우 세포 집단에서 털세포의 세포 밀도는 와우 상피의 로제트 패턴 특징을 유지하거나 심지어 확립시키는 방식으로 확장된다.

[0175] 본 발명의 한 양태에 따르면, 털세포의 세포 밀도는 털세포 및 지지 세포 둘 모두를 포함하는 와우 세포 집단에서 증가될 수 있다. 와우 세포 집단은 생체내 집단 (즉, 대상체의 와우 상피에 의해 포함됨)일 수 있거나 와우 세포 집단은 시험관내 (생체외) 집단일 수 있다. 집단이 시험관내 집단인 경우, 세포 밀도 증가는 임의의 처리

전 및 후에 취해진 집단의 대표적인 현미경 샘플을 참조하여 측정될 수 있다. 집단이 생체내 집단인 경우, 세포 밀도 증가는 대상체의 청력에 대한 효과를 측정함으로써 직접적으로 측정될 수 있는데, 털세포 밀도 증가는 청력 향상과 관련이 있다.

[0176] 한 구체예에서, 신경 세포의 부재하에 줄기세포 증식 검정(Stem Cell Proliferation nAssay)에 놓인 지지 세포는 리본 시냅스를 형성한다.

[0177] 천연 와우에서, 털세포 및 지지 세포의 패턴은 기저막과 평행한 방식으로 발생한다. 본 발명의 한 구체예에서, 와우 세포 집단에서 지지 세포의 증식은 와우 상피 특유의 기저막 방식으로 확장된다.

[0178] 이러한 한 구체예에서, 조성물이 와우 조직에 적용되는 경우, 확장된 와우 세포 집단에서 연속 털세포의 수는 집단에서 털 세포의 5% 미만이다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 연속 털세포의 수는 집단에서 털세포의 4% 미만이다. 추가의 한 예로서, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 연속 털세포의 수는 집단에서 털세포의 3% 미만이다. 추가의 한 예로서, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 연속 털세포의 수는 집단에서 털세포의 2% 미만이다. 추가의 한 예로서, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 연속 털세포의 수는 집단에서 털세포의 1% 미만이다. 일부 구체예에서, 조성물은 내이 지지 세포를 확장시켜 추가적인 털세포를 생성시키는데, 여기에서 상피 조직은 현미경에 의해 관찰된 5% 초과 털세포에 있어서 인접한 털세포를 갖지 않는 천연 형태(Native Morphology)를 모방한다.

[0179] 일부 구체예에서, 조성물은 2주 초과령의 동물에서 내이 지지 세포를 확장시켜 추가적인 털세포를 생성시키는데, 여기에서 상피 조직은 대표적인 현미경 샘플에서 5% 초과 털세포에 있어서 인접한 털세포를 갖지 않는 천연 형태를 모방한다.

[0180] 일부 구체예에서, 조성물은 대표적인 현미경 샘플에서 지지 세포 및 뉴론 둘 모두와 접촉하는 >5%의 털세포를 유도한다.

[0181] 일부 구체예에서, 조성물은 대표적인 현미경 샘플에서 5% 미만의 시간으로 기타 털세포에 인접한 털세포를 유도한다.

[0182] 한 구체예에서, 최초 와우 세포 집단에서 지지 세포의 수는 최초 와우 세포 집단을 본 발명의 조성물 (예를 들어, 유효 농도의 줄기성 드라이버 및 유효 농도의 분화 억제제를 함유하는 조성물)로 처리함으로써 선택적으로 확장되어 중간 와우 세포 집단을 형성하며, 중간 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율은 최초 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율을 초과한다. 확장된 와우 세포 집단은 예를 들어, 생체내 집단, 시험관내 집단 또는 심지어 시험관내 외식편일 수 있다. 이러한 한 구체예에서, 중간 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율은 최초 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율을 초과한다. 예를 들어, 이러한 한 구체예에서, 중간 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율은 최초 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율을 1.1배 초과한다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 중간 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율은 최초 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율을 1.5배 초과한다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 중간 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율은 최초 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율을 2배 초과한다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 중간 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율은 최초 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 지지 세포의 비율을 3배 초과한다. 상기 구체예 각각에서, 본 단락에 기술된 바와 같이 와우 세포 집단을 확장시키는 본 발명의 조성물의 능력은 줄기세포 증식 검정에 의해 측정될 수 있다.

[0183] 한 구체예에서, 와우 세포 집단에서 줄기세포의 수는 본 발명의 조성물 (예를 들어, 유효 농도의 줄기성 드라이버 및 유효 농도의 분화 억제제를 함유하는 조성물)로 와우 세포 집단을 처리함으로써 확장되어 중간 와우 세포 집단을 형성하며, 여기에서 중간 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도는 최초 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도를 초과한다. 처리된 와우 세포 집단은 예를 들어, 생체내 집단, 시험관내 집단 또는 심지어 시험관내 외식편일 수 있다. 이러한 한 구체예에서, 처리된 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도는 최초 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도를 적어도 1.1배 초과한다. 예를 들어, 이러한 한 구체예에서, 처리된 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도는 최초 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도를 적어도 1.25배 초과한다. 예를 들어, 이러한 한 구체예에서, 처리된 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도는 최초 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도를 적어도 1.5배 초과한다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 처리된 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도는 최초 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도를 적어도 2배 초과한다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 처리된 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도는 최초 와우 세포

집단에서 줄기세포의 세포 밀도를 적어도 3배 초과한다. 시험관내 와우 세포 집단은 생체내 집단보다 현저하게 더 많이 확장된다; 예를 들어, 특정 구체예에서, 줄기세포의 확장된 시험관내 집단에서 줄기세포의 세포 밀도는 최소 와우 세포 집단에서 줄기세포의 세포 밀도보다 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2,000 또는 심지어 3,000배 더 높을 수 있다. 상기 구체예 각각에서, 본 단락에 기술된 바와 같이 와우 세포 집단을 확장시키는 본 발명의 조성물의 능력은 줄기세포 증식 검정에 의해 측정될 수 있다.

[0184] 본 발명의 한 양태에 따르면, 와우 지지 세포 집단은 본 발명의 조성물 (예를 들어, 유효 농도의 줄기성 드라이버 및 유효 농도의 분화 억제제를 함유하는 조성물)로 처리되어 집단의 Lgr5 활성을 증가시킨다. 예를 들어, 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 시험관내 집단의 Lgr5 활성을 적어도 1.2배 증가시키고 유지시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 시험관내 집단의 Lgr5 활성을 1.5배 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 시험관내 집단의 Lgr5 활성을 적어도 2, 3, 5, 10, 100, 500, 1,000, 2,000 또는 심지어 3,000배 증가시키는 능력을 갖는다. Lgr5 활성 증가는 또한 생체내 집단에서 관찰될 수 있으나, 관찰된 증가는 다소 더욱 완만할 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 생체내 집단의 Lgr5 활성을 적어도 5% 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 시험관내 집단의 Lgr5 활성을 적어도 10% 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 시험관내 집단의 Lgr5 활성을 적어도 20% 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 생체내 집단의 Lgr5 활성을 적어도 30% 증가시키는 능력을 갖는다. 상기 구체예 각각에서, Lgr5 활성에서 이러한 증가를 위한 조성물의 능력은 예를 들어, 시험관내 Lgr5⁺ 활성 검정에서 입증될 수 있으며, 생체내 집단에서는 예를 들어, 생체내 Lgr5⁺ 활성 검정에서 기관을 분리하고 Lgr5 (예를 들어, Lgr5, Sox2)의 면역염색, 내인성 형광 단백질 발현 및 Lgr5에 대한 qPCR을 이용하여 형태학적 분석을 수행함으로써 측정된 바와 같이 입증될 수 있다.

[0185] 집단의 Lgr5 활성을 증가시키는 것에 더하여, 와우 세포 집단에서 Lgr5⁺ 지지 세포의 수는 Lgr5⁺ 지지 세포 (생체내든지 또는 시험관내든지)를 함유하는 와우 세포 집단을 본 발명의 조성물 (예를 들어, 유효 농도의 줄기성 드라이버 및 유효 농도의 분화 억제제를 함유하는 조성물)로 처리함으로써 증가될 수 있다. 일반적으로, 줄기/전구 지지 세포의 세포 밀도는 하나 이상의 여러 메커니즘을 통해 최소 세포 집단에 비해 확장될 수 있다. 예를 들어, 이러한 한 구체예에서, 증가된 줄기세포 성향 (즉, 탈세포로 분화하는 더 큰 능력)을 갖는 새로 생성된 Lgr5⁺ 지지 세포가 생성될 수 있다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 딸 Lgr5⁺ 세포는 세포 분열에 의해서 발생되지 않으나, 이미 존재하는 Lgr5⁺ 지지 세포가 탈세포로 분화되도록 유도된다. 추가의 예로서, 그러한 한 구체예에서, 딸세포는 세포 분열에 의해 생성되지 않으나, Lgr5⁻ 지지 세포는 더 큰 수준의 Lgr5 활성으로 활성화되며 이어서 활성화된 지지 세포는 탈세포로 분화될 수 있다. 메커니즘에 무관하게, 한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 와우 지지 세포의 시험관내의 분리된 세포 집단 중의 Lgr5⁺ 지지 세포의 세포 밀도를 적어도 5배 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 시험관내 집단 중의 Lgr5⁺ 지지 세포의 세포 밀도를 적어도 10배 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 시험관내 집단 중의 Lgr5⁺ 지지 세포의 세포 밀도를 적어도 100, 적어도 500, 적어도 1,000 또는 심지어 적어도 2,000배 증가시키는 능력을 갖는다. Lgr5⁺ 지지 세포의 세포 밀도 증가는 또한 생체내 집단에 있어서 관찰될 수 있으며, 관찰된 증가는 다소 더욱 완만할 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 생체내 집단 중의 Lgr5⁺ 지지 세포의 세포 밀도를 적어도 5% 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 생체내 집단 중의 Lgr5⁺ 지지 세포의 세포 밀도를 적어도 10% 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 생체내 집단 중의 Lgr5⁺ 지지 세포의 세포 밀도를 적어도 20% 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 와우 지지 세포의 생체내 집단 중의 Lgr5⁺ 지지 세포의 세포 밀도를 적어도 30% 증가시키는 능력을 갖는다. 시험관내 집단 중의 Lgr5⁺의 이러한 증가에 있어서 조성물의 능력은 예를 들어, 줄기세포 증식 검정 또는 적절한 생체내 검정에서 입증될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 천연 형태를 유지하면서 단백질이 부재하거나 낮은 검출 수준을 갖는 세포에서 Lgr5의 발현을 유도함으로써

와우에서 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 증가시키는 능력을 갖는다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 세포 집괴를 유도하지 않고 천연 형태를 유지하면서 단백질이 부재하거나 낮은 검출 수준을 갖는 세포에서 $Lgr5$ 의 발현을 유도함으로써 와우에서 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 증가시키는 능력을 갖는다.

[0186] $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 세포 밀도를 증가시키는 것 이외에, 한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 와우 세포 집단에서 털세포에 대한 $Lgr5^{+}$ 세포의 비를 증가시키는 능력을 갖는다. 한 구체예에서, 최초 와우 세포 집단 중의 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 수는 최초 와우 세포 집단을 본 발명의 조성물 (예를 들어, 유효 농도의 줄기성 드라이버 및 유효 농도의 분화 억제제를 함유하는 조성물)로 처리함으로써 선택적으로 확장되어 확장된 세포 집단을 형성하며, 확장된 와우 세포 집단 중의 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 수는 털세포의 수와 적어도 동일하다. 확장된 와우 세포 집단을 예를 들어, 생체내 집단, 시험관내 집단 또는 심지어 시험관내 외식편일 수 있다. 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포 대 털세포의 비는 적어도 1:1이다. 예를 들어, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포 대 털세포의 비는 적어도 1.5:1이다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포 대 털세포의 비는 적어도 2:1이다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포 대 털세포의 비는 적어도 3:1이다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포 대 털세포의 비는 적어도 4:1이다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 확장된 와우 세포 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포 대 털세포의 비는 적어도 5:1이다. 상기 구체예 각각에서, 본 단락에 기술된 바와 같이 와우 세포 집단을 확장시키는 본 발명의 조성물의 능력은 줄기세포 증식 검정에 의해 측정될 수 있다.

[0187] 특정 구체예에서, 조성물은 감각 상피 상에서 전체 세포에 대한 $Lgr5^{+}$ 세포의 분획을 적어도 10%, 20%, 50%, 100%, 250%, 500%, 1,000% 또는 5000% 증가시킨다.

[0188] 특정 구체예에서, 조성물은 $Lgr5^{+}$ 세포가 감각 상피 예를 들어, 코르티 기관 상의 세포의 적어도 10, 20, 30, 50, 70 또는 85%가 될 때까지 $Lgr5^{+}$ 세포를 증가시킨다.

[0189] 일반적으로, 와우에서 지지 세포의 과도한 증식이 바람직하게는 회피된다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물은 와우의 천연 표면을 넘어서는 새로운 세포의 돌출 예를 들어, 세포 집괴를 생성하지 않으면서 와우 세포 집단을 확장시키는 능력을 갖는다. 일부 구체예에서, 조성물을 정원창막에 위치시킨 후 30일째에, 와우 조직은 천연 형태를 갖는다. 일부 구체예에서, 조성물을 정원창막에 위치시킨 후 30일째에, 와우 조직은 천연 형태를 지니며 세포 집괴는 갖지 않는다. 일부 구체예에서, 조성물을 정원창막에 위치시킨 후 30일째에, 와우 조직은 천연 형태를 가지며, 코르티 기관의 $Lgr5^{+}$ 세포의 적어도 10, 20, 30, 50, 75, 90, 95, 98, 또는 심지어 적어도 99%는 세포 집괴의 일부가 아니다.

[0190] 일반적으로, 지지 세포 집단, 및 특히 상기 기술된 바와 같은 $Lgr5^{+}$ 지지 세포를 확장시키는 것 이외에, 본 발명의 조성물 (예를 들어, 유효 농도의 줄기성 드라이버 및 유효 농도의 분화 억제제를 함유하는 조성물)은 말세포에서 털세포로 분화되는 능력을 유지하는 능력을 갖는다. 생체내 집단에서, 이러한 능력 유지는 대상체의 청력 향상에 의해 간접적으로 관찰될 수 있다. 시험관내 집단에서, 이러한 능력의 유지는 출발 집단과 비교하여 털세포 수의 증가에 의해 직접적으로 관찰될 수 있거나 $LGR5$ 활성, $SOX2$ 활성 또는 본원의 다른 곳에서 확인된 하나 이상의 기타 줄기세포 마커를 측정함으로써 간접적으로 관찰될 수 있다.

[0191] 한 구체예에서, 일반적으로 와우 지지 세포의 군집, 또는 특히 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 군집의 줄기성을 증가시키는 조성물의 능력은 $Lgr5$ 활성 검정에 의해 측정되는 바와 같이 분리된 $Lgr5^{+}$ 세포의 시험관내 집단의 $Lgr5$ 활성 증가와 상호관련이 있을 수 있다. 이전에 언급한 바와 같이, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 중간 세포 집단 중의 줄기세포의 $Lgr5$ 활성을 최초 세포 집단 중의 세포의 $Lgr5$ 활성과 비교하여 평균 5배 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 중간 세포 집단 중의 줄기세포 유전자의 $Lgr5$ 활성을 최초 세포 집단 중의 세포의 $Lgr5$ 활성과 비교하여 평균 10배 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 중간 세포 집단 중의 줄기세포의 $Lgr5$ 활성을 최초 세포 집단 중의 세포의 $Lgr5$ 활성과 비교하여 평균 100배 증가시키는 능력을 갖는다. 추가의 예로서, 이러한 한 구체예에서, 조성물은 중간 세

포 집단 중의 줄기세포의 Lgr5 활성을 최소 세포 집단 중의 세포의 Lgr5 활성과 비교하여 평균 1000배 증가시키는 능력을 갖는다. 상기 구체예 각각에서, 세포 집단에서 줄기세포의 활성 증가는 표적 유전자에 대한 면역염색 또는 내인성 형광 단백질 발현 및 이미지 분석 또는 유동세포계측을 통한 이들의 상대적 강도 분석에 의해 또는 표적 줄기세포 유전자에 대한 qPCR을 이용함으로써 시험관내에서 측정될 수 있다. 생성된 줄기세포 집단의 정체는 선택적으로, 줄기세포 검정에서 규정된 바와 같은, 줄기세포 마커 발현 검정을 포함하는 줄기세포 검정, 콜로니 형성 검정, 자가-재생 검정 및 분화 검정에 의해 추가로 측정될 수 있다.

[0192] 일부 구체예에서, 성체 포유동물에 적용되는 방법은 S-페이스에 있는 성체 포유동물 Lgr5⁺ 세포의 집단을 생성한다.

[0193] 한 구체예에서, 마우스의 정원창에 조성물을 적용한 후, 코르티 기관에서 세포 집단의 생체내 Lgr5⁺ 활성은 조성물에 노출되지 않은 집단에 대한 기준선보다 1.3x, 1.5x, 최대 20x 증가한다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창으로의 조성물 적용은 코르티 기관의 세포에 있어서 평균 생체내 Lgr5⁺ 활성을 증가시키며, 이는 조성물에 노출되지 않은 집단에 대한 기준선보다 1.3x, 1.5x, 최대 20x 증가한다.

[0194] 특정 구체예에서, 조성물은 Lgr5⁺ 세포 수가 지지 세포 집단의 적어도 10%, 7.5%, 10%, 최대 100%가 될 때까지 Lgr5⁺ 세포를 증가시킨다.

[0195] 일부 경우에, 분화 억제제가 효과적인 분화 억제 농도로 존재하지 않는다면, 줄기성 드라이버는 또한, 털세포로의 지지 세포의 분화를 유도할 수 있다. 증식 및 분화 둘 모두를 추진할 수 있는 줄기성 드라이버의 예는 GSK3 베타 억제제 및 Wnt 효능제를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기세포의 증식은 세포 주기 또는 가소성을 조절하는 경로 예컨대, p27 또는 Tgf 베타 경로의 조절인자를 첨가함으로써 향상될 수 있다.

[0196] 일부 구체예에서, 줄기성 드라이버는 Lgr5⁺ 줄기세포의 증식을 추진하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 분화 억제제가 효과적인 분화 억제 농도로 존재하지 않는다면, 줄기성 드라이버는 또한, 털세포로의 Lgr5⁺ 세포의 분화를 유도할 수 있다. 증식 및 분화 둘 모두를 추진할 수 있는 줄기성 드라이버의 예는 GSK3 베타 억제제 및 Wnt 효능제를 포함한다. 일부 구체예에서, 분화 억제제는 또한 줄기성 드라이버이다. 일부 구체예에서, 분화 억제제는 Notch 효능제이며, 또한 줄기성 드라이버이다. 일부 구체예에서, 분화 억제제는 발프로산이며, 이는 줄기성 드라이버일 수 있다. 분화 억제제가 또한 줄기성 드라이버인 경우, 분화 억제제의 농도는 분화 기간 동안 효과적인 분화 억제 농도보다 낮아야 한다.

[0197] 특정 구체예에서, (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제의 조합물이 사용될 수 있으며, 이는 마우스의 내이로부터 수득된 Lgr5⁺ 세포에 적용될 경우 줄기세포 집단을 투여 단계 전의 줄기세포 집단보다 적어도 3배 더 증가시키는 능력을 갖는다.

[0198] 특정 구체예에서, 조성물은 와우 중의 Lgr5⁺ 세포의 백분율을 5%, 10%, 25%, 50%, 또는 80% 증가시키는 능력을 갖는다. 특정 구체예에서, (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제의 조합물이 사용되며, 이는 와우 중의 Lgr5⁺ 세포의 백분율을 5%, 10%, 25%, 50%, 또는 80% 증가시키는 능력을 갖는다.

[0199] 줄기성 드라이버

[0200] 본 발명 내의 GSK3-베타 억제제의 예는 표 1에 나타난다.

[0201] 표 1. GSK3 β 억제제

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
알로이신	알로이신 A
알로이신	알로이신 B
아미노피리딘	CT20026
아미노피리미딘	CHIR99021 (CT99021)
아미노피리미딘	CHIR98014 (CT98014)
아미노피리미딘	CHIR98023 (CT98023)
아미노피리미딘	TWS119
아닐리노아릴말레이미드	I5
아릴인돌말레이미드	SB-216763
아릴인돌말레이미드	SB-415286 (SB-41528)
아자인돌일말레이미드	화합물 29
아자인돌일말레이미드	화합물 46
벤즈아제피논	켄파울론
벤즈아제피논	알스테르파울론
벤즈아제피논	아자켄파울론
비스-인돌	인디루빈-30-옥심
비스-인돌	6-브로모인디루빈-30-옥심 (BIO)
비스-인돌	6-브로모인디루빈-30-아세톡심

[0202]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
비스인돌릴말레이미드	스타우로스포린
비스인돌릴말레이미드	화합물 5a
비스인돌릴말레이미드	GF109203x (비스인돌릴말레이미드 I)
비스인돌릴말레이미드	Ro318220 (비스인돌릴말레이미드 IX)
비스인돌릴말레이미드	비스인돌릴말레이미드 X 하이드로클로라이드
비스인돌릴말레이미드	엔자스타우린
클로로메틸 티에닐 케톤	화합물 17
플라본	플라보피리돌
푸라노세스퀴테르펜	팔리누린
푸라노세스퀴테르펜	트리칸틴
할로메틸케톤	HMK-32
인디루빈	인디루빈-3'-모녹심
인디루빈	6-BIO
인디루빈	5-아이오도-인디루빈-3'-모녹심
인디루빈	인디루빈-5-설폰산 소듐 염
무기 원자	리튬
무기 원자	베릴륨
무기 원자	아연
무기 원자	텅스테이트
만자민	만자민 A

[0203]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
옥스인돌	SU9516
유기금속	HB12
유기금속	DW12
유기금속	NP309
유기금속	(RRu)-HB1229
유기금속	(RRu)-NP549
유기금속	GSK3 억제제 XV
파울론	켄파울론
파울론	알스테르파울론
파울론	카즈파울론
파울론	9-시아노파울론
펩티드	FRATtide
펩티드	L803
펩티드	L803-mts
페닐아미노피리미딘	CGP60474
피라졸로피리딘	피라졸로피리딘 9
피라졸로피리딘	피라졸로피리딘 18
피라졸로피리딘	피라졸로피리딘 34
피라졸로피리미딘	화합물 1A
피라졸로퀴놀살린	화합물 1

[0204]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
피리딜옥사디아졸	화합물 12
피롤로아제핀	하이메니알딘신
피롤로피라진	알로이신 A
피롤로피라진	알로이신 B
피롤로피리미딘	TWS119
티아디아졸리딘디온	TDZD-8
티아디아졸리딘디온	NP00111
티아디아졸리딘디온	NP031115
티아디아졸리딘디온	NP031112 (티데글루십)
티아졸	AR-A014418
티아졸	AZD-1080
트리아졸	화합물 8b
기타	하이메니알딘신
기타	디브로모칸타렐린
기타	KT 5720
기타	CID 755673
기타	GSK-3 β 억제제 VII
기타	하이메니딘
기타	3F8
기타	TCS 2002

[0205]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
기타	TCS 21311
기타	A 1070722
기타	TC-G 24
기타	바이키닌
기타	LY2090314
기타	10Z-하이드로니알딘
기타	NSC 693868
기타	IM-12
기타	인디루빈
기타	AZD2858 (AR28)
기타	GSK-3 β 억제제 I
기타	GSK-3 억제제 II
기타	GSK-3 β 억제제 VIII
기타	GSK-3 억제제 XXII
기타	인디루빈-3'-모노실-5-설폰산
기타	GSK-3 억제제 XIII
기타	GSK3 β 억제제 XIX
기타	GSK-3 β 억제제 XXVII
기타	GSK-3베타 억제제 XXVI
기타	GSK-3 β 억제제 XII

[0206]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
기타	GSK-3 β 억제제 XXIV
기타	GSK-3 억제제 XV
기타	GSK-3 β 억제제 VI
기타	GSK-3 β 억제제 XVIII
기타	GSK-3 억제제 XXIX
기타	GSK-3 억제제 IV
기타	GSK-3 β 억제제 VII
기타	GSK-3 억제제 IX
기타	GSK-3 억제제 X
기타	GSK-3 β 억제제 XXV
기타	GSK-3 억제제 XVI
기타	GSK-3 β 억제제 XI
기타	GSK-3 억제제 1
기타	A-1070722
기타	3-아미노-1H-피라졸로[3,4-b]퀴놀살린
기타	GSK3 억제제, 2
기타	GSK-3베타 억제제 III
기타	AR-AO 14418-d3
기타	ML320
기타	BIP-135

[0207]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
기타	CP21R7
공개	NP-103
공개	CG-301338
공개	SAR 502250
공개	XD-4241
공개	CEP-16805
리튬 클로라이드 및 기타 무기 원자.	리튬, 베릴륨, 아연, 텅스테이트
말레이미드 유도체 예컨대, SB-216763	예를 들어, 화합물 1-30, SB-216763, 등
스타우로스포린 및 유기금속 억제제	예를 들어, 화합물 31-37, 등
인돌 유도체 예컨대, 인디루빈-3'-모녹심 및 BIO	예를 들어, 화합물 38-50, BIO, 등
파울론 유도체 예컨대, 켄팔론 및 알스테르파울론	예를 들어, 화합물 51-64, 켄파울론, 등
피라졸아미드 유도체	예를 들어, 화합물 65-78, 등
피리미딘 및 푸로피리미딘 유도체 예컨대, CHIR99021 및 CHIR98014	예를 들어, 화합물 79-102, CHIR99021, CHIR98014, 등
옥사디아졸 유도체	예를 들어, 화합물 103-127, 등
티아졸 유도체 예컨대, AR-A014418	예를 들어, 화합물 128-130, AR-A01448, 등
기타 헤테로사이클릭 유도체	화합물 131-154
공개	AR79
공개	AZ13282107
공개	AR28 (AZD2858)

[0208]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
특허	GI179186X
특허	CT118637
특허	CP-70949
특허	GW784752X
특허	GW784775X
공개	CT73911
공개	CT20026
공개	LY2064827
공개	705701
공개	708244
공개	709125
특허	WO 2008077138 A1
특허	WO 2003037891 A1
특허	US 8207216 B2
특허	US 8071591 B2
특허	CN 1319968 C
특허	US 7514445 B2
특허	CN 101341138 B
특허	EP 1961748 A2
특허	WO 2010104205 A1

[0209]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
특허	US 20100292205 A1
특허	WO 2014003098 A1
특허	WO 2011089416 A1
특허	EP 1739087 A1
특허	WO 2001085685 A1
특허	US 20070088080 A1
특허	WO 2006018633 A1
특허	WO 2009017453 A1
특허	WO 2014050779 A1
특허	WO2006100490A1/EP 1863904 A1
특허	WO 2014013255 A1
특허	WO2009017455 A1
특허	EP 2765188 A1
특허	WO 2014083132 A1
특허	US 8771754 B2
특허	WO 2013124413 A1
특허	WO 2014059383 A1
특허	WO 2010075551 A1
특허	US 8686042 B2
특허	WO 2007102770 A1

[0210]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
아미노피리미딘	CHIR99021 (CT99021)
기타	LY2090314
아미노피리미딘	TWS119
아릴인돌말레이미드	SB-216763
벤즈아제피논	아자켄파울론
파울론	카즈파울론
피라졸로피리딘	피라졸로피리딘 9
기타	TCS 2002
기타	A 1070722
아미노피리미딘	CHIR98014 (CT98014)
벤즈아제피논	켄파울론
무기 원자	리튬
기타	ML320
기타	CP21R7

[0211]

[0212]

본원에 기재된 조성물 및 방법의 다양한 구체예에서 사용하기 위한 GSK3-베타 억제제의 부류는 표 1의 칼럼 A에 기록된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 조성물 및 방법의 다양한 구체예에서 사용하기 위한 특정 GSK3-베타 억제제는 표 1의 칼럼 B에 기록된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 조성물 및 방법의 다양한 구체예에 사용하기 위한 Wnt 효능제의 부류는 표 2의 칼럼 A에 기록된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 조성물 및 방법의 다양한 구체예에 사용하기 위한 특정 Wnt 효능제는 표 2의 칼럼 B에 기록된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 조성물 및 방법의 다양한 구체예에 사용하기 위한 Notch 효능제의 부류는 표 3의 칼럼 A에 기록된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 조성물 및 방법의 다양한 구체예에 사용하기 위한 특정 Notch 효능제는 표 3의 칼럼 B에 기록된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 조성물 및 방법의 다양한 구체예에 사용하기 위한 HDAC 억제제의 부류는 표 4의 칼럼 A에 기록된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 조성물 및 방법의 다양한 구체예에 사용하기 위한 특정 HDAC 억제제는 표 4의 칼럼 B에 기록된 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 표 1 칼럼 B, 표 2 칼럼 B, 표 3 칼럼 B, 표 4 칼럼 B에 기록된 모든 작용제는 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 것으로 이해된다. 표 1 칼럼 A, 표 2 칼럼 A, 표 3 칼럼 A, 표 4 칼럼 A에 기록된 모든 부류는 그러한 부류를 포함하는 작용제 및 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 둘 모두 포함하는 것으로 이해된다. 이들 부류 각각의 구성원은 또한, 부록 A의 51-55면 및 부록 A의 90-102면에 기술된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0213]

GSK3-베타 억제제는 또한, 귀 세포주 또는 귀 조직으로부터 수득된 일차세포가 약학적으로 허용되는 농도의 억제제에 노출되는 경우 GSK3-베타 활성을 5, 10, 20, 30, 또는 50% 초과 만큼 감소시키는 그러한 작용제를 포함하나 이에 제한되지 않으며, 활성은 웨스턴 블롯팅 또는 문헌의 다른 표준 방법을 통해 평가된다. 본원에 사용된 바와 같은 약학적으로 허용되는 농도는 비독성이며, 관심 조직으로 전달될 수 있는 제형 중의 활성제의 농도

이다. 특정 구체예에서, 조성물은 Notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제와 조합된, 본 단락에 기술된 조건을 이용하여 5, 10, 20, 30 또는 50% 초과 만큼 GSK3-베타 활성을 감소시키는 GSK3-베타 억제제를 포함한다. "매우 강력한 GSK3-베타 억제제는, 귀 세포주 또는 귀 조직으로부터 수득된 일차 세포가 약학적으로 허용되는 농도의 억제제에 노출될 때 50% 초과 만큼 GSK3-베타 활성을 감소시키는 것이며, 활성은 웨스턴 블롯팅 또는 문헌의 기타 표준 방법을 통해 평가된다.

[0214] Wnt 효능제

[0215] 본 발명 내의 예시적인 Wnt 효능제는 표 2에 나타낸다.

[0216] 표 2 - Wnt 효능제

칼럼 A	칼럼 B
Wnt 리간드	Wnt1/Int-1
	Wnt-2/Irp (Int-I-관련 단백질)
	Wnt-2b/13
	Wnt-3/Int-4
	Wnt-3a
	Wnt-4
	Wnt-5a
	Wnt-5b
	Wnt-6
	Wnt-7a
	Wnt-7b
	Wnt-8a/8d
	Wnt-8b
	Wnt-9a/14
	Wnt-9b/14b/15
	Wnt-10a
	Wnt-10b/12
	Wnt-11
	Wnt-16
Wnt 관련 단백질	R-스폰딘 1/2/3/4
	노린
GSK3b 억제제	
기타 Wnt 조절제	
	(헤테로)아릴피리미딘

[0217]

칼럼 A	칼럼 B
Wnt 리간드	Wnt1/Int-1
	Wnt 효능제
	IQ 1
	DCA
	QS 11
	WASP-1, ZINC00087877
	WAY 316606, HCl
	WAY-262611, HCl
	HL78
	SKL2001
	Cpd1
	Cpd2
	cmpd 109
	ISX 9
	Cmpd 71
	Cmpd 2
	셀루메티닙 (AZD6244)
	라디시쿨
	(헤테로)아릴피리미딘
	Wnt 효능제
	WAY 316606, HCl
	WAY-262611, HCl
	SKL2001
	ISX 9

[0218]

[0219]

Wnt-효능제는 또한, 귀 세포주 또는 귀 조직으로부터 수득된 일차세포가 약학적으로 허용되는 농도의 효능제에 노출되는 경우 Wnt 활성을 5, 10, 20, 30, 또는 50% 초과 만큼 증가시키는 그러한 작용제를 포함하나 이에 제한되지 않으며, 활성은 웨스턴 블롯팅 또는 문헌의 다른 표준 방법을 통해 평가된다. 특정 구체예에서, 조성물은 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제와 조합되어, 본 단락에 기술된 조건을 이용하여 5, 10, 20, 30 또는 50% 초과 만큼 Wnt 활성을 증가시키는 Wnt 효능제를 포함한다. "매우 강력한 Wnt 효능제는, 귀 세포주 또는 귀 조직으로부터 수득된 일차 세포가 약학적으로 허용되는 농도의 효능제에 노출될 때 50% 초과 만큼 Wnt 활성을 증가시키는 것이며, 활성은 웨스턴 블롯팅 또는 문헌의 기타 표준 방법을 통해 평가된다.

[0220]

분화 억제제

[0221]

Notch 효능제

[0222]

본 발명 내의 예시적인 Notch 효능제는 표 3에 나타낸다.

[0223] 표 3 - Notch 효능제

칼럼 A	칼럼 B
천연 수용체 리간드	재그드 1 (Jagged 1)
	재그드 2
	델타-유사 1
	델타-유사 2
	델타-유사 3
	델타-유사 4
	DSL 펩티드
	델타 1
	델타 D
수용체 항체	Notch 1 항체
HDAC 억제제	VPA
	TSA
	투바스타틴 A
	화합물 7

[0224]

[0225] Notch-효능제는 또한, 귀 세포주 또는 귀 조직으로부터 수득된 일차세포가 약학적으로 허용되는 농도의 효능제에 노출되는 경우 Notch 활성을 5, 10, 20, 30, 또는 50% 초과 만큼 증가시키는 그러한 작용제를 포함하나 이에 제한되지 않으며, 활성은 웨스턴 블롯팅 또는 문헌의 다른 표준 방법을 통해 평가된다. 특정 구체예에서, 조성물은 GSK3-베타 억제제 또는 Wnt 효능제와 조합되어, 본 단락에 기술된 조건을 이용하여 5, 10, 20, 30 또는 50% 초과 만큼 Notch 활성을 증가시키는 Notch 효능제를 포함한다. "매우 강력한 Notch 효능제는, 귀 세포주 또는 귀 조직으로부터 수득된 일차 세포가 약학적으로 허용되는 농도의 효능제에 노출될 때 50% 초과 만큼 Notch 활성을 증가시키는 것이며, 활성은 웨스턴 블롯팅 또는 문헌의 기타 표준 방법을 통해 평가된다.

[0226] HDAC 억제제

[0227] 본 발명 내의 예시적인 HDAC 억제제는 표 4에 나타낸다.

[0228] 표 4 - HDAC 억제제

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
하이드록사메이트	트리코스타틴 A (Tricostatin A)(TSA)
하이드록사메이트	SAHA (졸린자(Zolinza), 보리노스태트 (vorinostat))
하이드록사메이트	4-아이오도-SAHA
하이드록사메이트	SBHA
하이드록사메이트	CBHA
하이드록사메이트	LAQ-824
하이드록사메이트	PDX-101 (벨리노스태트(belinostat))
하이드록사메이트	LBH-589 (파노비노스태트(panobinostat))
하이드록사메이트	ITF2357 (기비노스태트(Givinostat))
하이드록사메이트	PCI-34051
하이드록사메이트	PCI-24781 (아벡시노스태트(Abexinostat))
하이드록사메이트	투바스타틴 A
하이드록사메이트	CUDC-101
하이드록사메이트	화합물 7
하이드록사메이트	옥삼플라틴(Oxamflatin)
하이드록사메이트	ITF2357
하이드록사메이트	부펙사막(Befexamac)
하이드록사메이트	APHA 화합물 8
하이드록사메이트	JNJ-26481585 (퀴시노스태트(Quisinostat))

[0229]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
하이드록사메이트	수베로일아닐리드-d5 하이드록삼산
하이드록사메이트	HDAC 억제제 XXIV
하이드록사메이트	투바신
하이드록사메이트	부티릴하이드록삼산
하이드록사메이트	1-나프토헤이드록삼산
하이드록사메이트	MC 1568
하이드록사메이트	SB939 (프라시노스테트(Pracinostat))
하이드록사메이트	4SC-201 (레스미노스테트(Resminostat))
하이드록사메이트	테피노스테트(Tefinostat) (CHR-2845)
하이드록사메이트	CHR-3996
하이드록사메이트	CG200745
고리 펩티드	덤사펩티드 (로미덤신(Romidepsin), FK-228, FR 901228)
고리 펩티드	트라포신 A(Trapoxin A)
고리 펩티드	HC 독소
지방족 산	발프로산
지방족 산	VAHA
지방족 산	페닐 부티레이트
지방족 산	부티레이트
지방족 산	AN-9
벤즈아미드	MS-275 (엔티노스테트(Entinostat))

[0230]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
벤즈아미드	MGCD0103 (모세티노스태트(Mocetinostat))
벤즈아미드	CI994 (타세딘알린; PD-123654; GOE-5549; 아세틸딘알린)
벤즈아미드	BML-210
하이드록사메이트	M 344
벤즈아미드	치드아미드(Chidamide)
하이드록사메이트	4-(디메틸아미노)-N-[6-(하이드록시아미노)-6-옥소헥실]-벤즈아미드
기타	루테올린
티올의 프로드러그	PTACH
기타	L-카르니틴
기타	바이페닐-4-설폰닐 클로라이드
기타	SIRT1/2 억제제 VII
하이드록사메이트	(S)-HDAC-42
하이드록사메이트	인돌-3-아세트아미드
기타	NSC 3852
기타	PPM-18
기타	라트자돈 A(Ratjadone A), 합성
벤즈아미드	N-(2-아미노페닐)-N'-페닐헵탄디아미드
기타	디하이드로클라미도신
기타	7-아미노인돌

[0231]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
기타	아피시딘
기타	파르테놀리드
하이드록사메이트	HNHA
기타	스플리토마이신
벤즈아미드	RGFP109
벤즈아미드	RGFP136
벤즈아미드	RGFP966
벤즈아미드	4SC-202
하이드록사메이트	ACY1215
기타	ME-344
기타	설포라판
CF3메틸 케톤	6H
CF3메틸 케톤	27
아릴 케톤	25
비교천적	5
	넥스투라스태트 A(Nexturastat A)
	드록시노스태트(Droxinostat)
	AR-42
	로미델신 (FK228, 덤시펩티드)
	스크립테이드(Scriptaid)

[0232]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
	소듐 페닐부티레이트
	TMP269
	타일란테핀 A(Thailandepsin A)
	BRD9757
	LMK235
	HPOB
	CAY10603
	타스퀴니모드(Tasquinimod)
	HDAC6 억제제 III
	HDAC 억제제 XXIV
	HDAC 억제제 IV
	HDAC 억제제 XIX
	HDAC 억제제 XXII
	HDAC 억제제 VII
	HDAC 억제제 II
	HDAC 억제제 VI
	(-)-데푸데신
	KD 5170
	TC-H 106
	TCS HDAC6 20b
	피록사미드
	치드아미드

[0233]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
	HDAC-IN-1
	HC 독소
하이드록사메이트	SAHA (졸린자, 보리노스태트)
하이드록사메이트	LBH-589 (파노비노스태트)
하이드록사메이트	JNJ-26481585 (퀴시노스태트)
고리 펩티드	렘시펩티드 (로미렘신, FK-228, FR 901228)
벤즈아미드	MGCD0103 (모세티노스태트)
티올의 프로드러그	PTACH
기타	라트자돈 A, 합성
기타	아피시딘
CF3메틸 케톤	27
비고전적	5
	넥스투라스태트 A
	드록시노스태트
	스크립테이드
	BRD9757
	HPOB
	CAY10603
	HDAC6 억제제 III
하이드록사메이트	ACY1215

[0234]

칼럼 A	칼럼 B
부류	작용제
하이드록사메이트	투바스타틴 A
하이드록사메이트	투바신
하이드록사메이트	트리코스타틴 A (TSA)

[0235]

[0236]

HDAC 억제제는 또한, 귀 세포주 또는 귀 조직으로부터 수득된 일차세포가 억제제에 노출되는 경우 HDAC 활성을 5, 10, 20, 30, 또는 50% 초과 만큼 감소시키는 그러한 작용제를 포함하나 이에 제한되지 않으며, 활성은 웨스

턴 블롯팅 또는 문헌의 다른 표준 방법을 통해 평가된다. 특정 구체예에서, 조성물은 GSK3-베타 억제제 또는 Wnt 효능제와 조합되어, 본 단락에 기술된 조건을 이용하여 5, 10, 20, 30 또는 50% 초과 만큼 HDAC 활성을 감소시키는 HDAC 억제제를 포함한다. "매우 강력한 HDAC 효능제는 귀 세포주 또는 귀 조직으로부터 수득된 일차 세포가 약학적으로 허용되는 농도의 억제제에 노출될 때 50% 초과 만큼 HDAC 활성을 감소시키는 것이며, 활성은 웨스턴 블롯팅 또는 문헌의 기타 표준 방법을 통해 평가된다.

[0237] HDAC 억제제를 평가하는 대표적인 방법은 하기 문헌에서 찾아볼 수 있다:

Mak BC, Takemaru K, Kenerson HL, Moon RT, Yeung RS (2003). "The tuberlin-hamartin complex negatively regulates beta-catenin signaling activity". J. Biol. Chem. 278(8): 5947-51. doi:10.1074/jbc.C200473200. PMID 12511557.

Nakamura T, Hamada F, Ishidate T, Anai K, Kawahara K, Toyoshima K, Akiyama T (1998). "Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level". Genes Cells 3 (6): 395-403. doi:10.1046/j.1365-2443.1998.00198.x. PMID 9734785.

von Kries JP, Winbeck G, Asbrand C, Schwarz-Romond T, Sochnikova N, Dell'Oro A, Behrens J, Birchmeier W (2000). "Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC". Nat. Struct. Biol. 7 (9): 800-7.

doi:10.1038/79039.PMID 10966653.

[0238]

Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, Kühl M, Schaeffer HJ, Huelsken J, Behrens J, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2002). "The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling". *Genes Dev.* 16 (16): 2073–84. doi:10.1101/gad.230402.PMC 186448. PMID 12183362.

Wang L, Lin HK, Hu YC, Xie S, Yang L, Chang C (2004). "Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells". *J. Biol. Chem.* 279 (31): 32444–52. doi:10.1074/jbc.M313963200.PMID 15178691.

Davies G, Jiang WG, Mason MD (2001). "The interaction between beta-catenin, GSK3beta and APC after mitogen induced cell-cell dissociation, and their involvement in signal transduction pathways in prostate cancer". *Int. J. Oncol.* 18 (4): 843–7. doi:10.3892/ijco.18.4.843. PMID 11251183.

Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A (1999). "DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability". *Mol. Cell. Biol.* 19 (6): 4414–22. PMC 104400. PMID 10330181.

Hong YR, Chen CH, Cheng DS, Howng SL, Chow CC (1998). "Human dynamin-like protein interacts with the glycogen synthase kinase 3beta". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (3): 697–703. doi:10.1006/bbrc.1998.9253. PMID 9731200.

Wu, Xiaoyang; Shen QT; Oristian DS; Lu CP; Zheng Q; Wang HW; Fuchs E (2011). "Skin Stem Cells Orchestrate Directional Migration by Regulating Microtubule-ACF7 Connections through GSK3b". *Cell* 144. doi:10.1016/j.cell.2010.12.033.

Li Y, Bharti A, Chen D, Gong J, Kufe D (1998). "Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin". *Mol. Cell. Biol.* 18 (12): 7216–24. PMC 109303. PMID 9819408.

Li Y, Kuwahara H, Ren J, Wen G, Kufe D (2001). "The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and beta-catenin". *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6061–4. doi:10.1074/jbc.C000754200.PMID 11152665.

Guo X, Ramirez A, Waddell DS, Li Z, Liu X, Wang XF (2008). "Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling". *Genes Dev.* 22 (1): 106–20.doi:10.1101/gad.1590908. PMC 2151009. PMID 18172167.

Foltz DR, Santiago MC, Berechid BE, Nye JS (2002). "Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability". *Curr. Biol.* 12 (12): 1006–11. doi:10.1016/S0960-9822(02)00888-6. PMID 12123574.

Espinosa L, Inglés-Esteve J, Aguilera C, Bigas A (2003). "Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways". *J. Biol. Chem.* 278 (34): 32227–35. doi:10.1074/jbc.M304001200. PMID 12794074.

Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS (2002). "Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (12): 7951–5.doi:10.1073/pnas.122062299. PMC 123001. PMID 12048243.

Dai F, Yu L, He H, Chen Y, Yu J, Yang Y, Xu Y, Ling W, Zhao S (2002). "Human serum and glucocorticoid-inducible kinase-like kinase (SGKL) phosphorylates glycogen synthases kinase 3 beta (GSK-3beta) at serine-9 through direct interaction". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (4): 1191–6. doi:10.1016/S0006-291X(02)00349-2. PMID 12054501.

[0240]

[0241]

일부 구체예에서, 분화 억제제는 수성 환경에서 줄기성 드라이버에 비해 분화 억제제의 더욱 신속한 방출을 선호하는, 줄기성 드라이버 대비 용해도 특성을 갖도록 선택된다. 일부 구체예에서, 분화 억제제는 줄기성 드라이버의 용해도보다 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 또는 5000-배 높은 인산염 완충된 염수 중의 용해도를 갖는다.

[0242]

TGF-β 억제제

[0243]

특정 구체예에서, 하나 이상의 추가의 작용제는 TGFβ 타입 I 수용체 억제제를 포함한다. 예시적인 TGF-β 억제제가 표 5에 나타난다. TGF-베타 타입 I 수용체 억제제는 비제한적으로, 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5 나프티리딘, [3-(피리딘-2-일)-4-(4-퀴놀릴)]-1H-피라졸, 및 3-(6-메틸피리딘-2-일)-4-(4-퀴놀릴)-1-페닐티오카르바모일-1H-피라졸을 포함하며, 이는 Calbiochem (San Diego, Calif.)에서 구입할 수 있다. 기타 소분자 억제제는 비제한적으로, 특히 SB-431542 (예를 들어, 문헌 [Halder et al., 2005; Neoplasia 7(5):509-521] 참조), SM16 (예를 들어, 문헌 [Fu, K et al., 2008; Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 28(4):665] 참조), 및 SB-505124 (예를 들어, 문헌 [Dacosta Byfield, S., et al., 2004; Molecular Pharmacology 65:744-52] 참조)를 포함한다.

[0244] 표 5. TGF-β 억제제

부류	작용제	대체명
Tgf-베타-R1 억제제	LY-364947	616451, TGF-β RI 키나제 억제제 I, CAS 396129-53-6, [3-(피리딘-2-일)-4-(4-퀴놀릴)]-1H-피라졸, ALK5 억제제 I, LY-364947, HTS-466284
Tgf-베타-R1 억제제	Repsox	616452, TGF-β RI 키나제 억제제 II, CAS 446859-33-2, 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘
Tgf-베타-R1 억제제	SB-505124	616453, TGF-β RI 키나제 억제제 III, CAS 356559-13-22-(5-벤조[1,3]디옥솔-4-일-2-터트-부틸-1H-이미다졸-4-일)-6-메틸피리딘, HCl, ALK5 억제제 III, SB-505124, HCl
Tgf-베타-R1 억제제	A-83-01	616454, TGF-β RI 키나제 억제제 IV - CAS 909910-43-6, 3-(6-메틸피리딘-2-일)-4-(4-퀴놀릴)-1-페닐티오카르바모일-1H-피라졸, A-83-01, ALK5 억제제 IV
Tgf-베타-R1 억제제	SD-208	616456, TGF-β RI 키나제 억제제 V, CAS 627536-09-8, 2-(5-클로로-2-플루오로페닐)프테리딘-4-일)피리딘-4-일 아민, SD-208, ALK5 억제제 V
Tgf-베타-R1 억제제	SB-431542	616461, TGF-β RI 키나제 억제제 VI, SB431542 - CAS 301836-41-9, 4-[4-(3,4-메틸렌디옥시페닐)-5-(2-피리딜)-1H-이미다졸-2-일]벤즈아미드, 디하이드레이트, 4-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-5-(2-피리딜)-1H-이미다졸-2-일]벤즈아미드, 디하이드레이트
Tgf-베타-R1 억제제	TGF-β RI 키나제 억제제 VII	616458, TGF-β RI 키나제 억제제 VII - CAS 666729-57-3, 1-(2-((6,7-디메톡시-4-퀴놀릴)옥시)-(4,5-디메틸페닐)-1-에탄논, ALK5 억제제 VII

[0245]

부류	작용제	대체명
Tgf-베타-R1 억제제	SB-525334	616459, TGF- β RI 키나제 억제제 VIII - CAS 356559-20-1, SB-525334, 6-(2-tert-부틸-5-(6-메틸-피리딘-2-일)-1H-이미다졸-4-일)-퀴놀살린, ALK5 억제제 VIII
Tgf-베타-R1 억제제	TGF- β RI 키나제 억제제 IX	616463, TGF- β RI 키나제 억제제 IX, 4-((4-((2,6-디메틸피리딘-3-일)옥시)피리딘-2-일)아미노)벤젠설포아마이드, ALK5 억제제 IX
Tgf-베타-R1 억제제	GW788388	4-(4-(3-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)피리딘-2-일)-N-(테트라하이드로-2H-피란-4-일)벤즈아미드
Tgf-베타-R1 억제제	LY2109761	7-(2-모르폴리노에톡시)-4-(2-(피리딘-2-일)-5,6-디하이드로-4H-피롤로[1,2-b]피라졸-3-일)퀴놀린
Tgf-베타-R1 억제제	갈루니세르티브 (Galunisertib) (LY2157299)	4-(2-(6-메틸피리딘-2-일)-5,6-디하이드로-4H-피롤로[1,2-b]피라졸-3-일)퀴놀린-6-카르복사미드
Tgf-베타-R1 억제제	EW-7197	N-(2-플루오로페닐)-5-(6-메틸-2-피리디닐)-4-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-6-일-1H-이미다졸-2-메탄아민
Tgfb 생산 억제제	피르페니돈(Pirfenidone)	2(1H)-피리디논, 5-메틸-1-페닐-
Tgf-베타-R1 억제제	K02288	3-[(6-아미노-5-(3,4,5-트리메톡시페닐)-3-피리디닐]페놀
Tgf-베타-R1 억제제	D 4476	4-[4-(2,3-디하이드로-1,4-벤조디옥신-6-일)-5-(2-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]벤즈아미드
Tgf-베타-R1 억제제	R 268712	4-[2-플루오로-5-[3-(6-메틸-2-피리디닐)-1H-피라졸-4-일]페닐]-1H-피라졸-1-에타놀
기타	ITD 1	4-[1,1'-바이페닐]-4-일-1,4,5,6,7,8-헥사하이드로-2,7,7-트리메틸-5-옥소-3-퀴놀린카르복실산 에틸

[0246]

부류	작용제	대체명
		에스테르
Smad3 억제제	SIS3	1,2,3,4-테트라하이드로-6,7-디메톡시-2-[(2E)-3-(1-페닐-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일)-1-옥소-2-프로페닐]-이소퀴놀린 하이드로클로라이드
Tgf-베타-R1 억제제	A77-01	4-[5-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일]퀴놀린
기타	아시아티코사이드(Asiatic oside)	
Tgf-베타-R1 억제제	SM16	4-(5-(벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)-4-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-이미다졸-2-일)바이사이클로[2.2.2]옥탄-1-카르복사미드
Tgf-베타 항체	ID11	
Tgf-베타 항체	2G7	
Tgf-베타 항체	GC-1008	프레솔리무맙
Tgf-베타 항체	CAT-152	레르델리미맙
Tgf-베타 항체	CAT-192	메텔리무맙
Tgf-베타 수용체 항체	PF-03446962	
Tgf-베타 항체	SR-2F	
Tgf-베타 항체	2G7	
Tgf-베타 항체	LY2382770	
Tgf-베타 항체	IMC-TR1	
Tgf-베타 항체	STX-100	
TGF-베타 길항제	TGF-PRII:Fc	
재조합 단백질	베타글리칸/TGF-PRIII	

[0247]

부류	작용제	대체명
올리고뉴클레오타이드 억제제	AP12009	트라베데르센, 안티센스 분자
올리고뉴클레오타이드 억제제	AP11014	
올리고뉴클레오타이드 억제제	AP15012	
	LY-550410	
	LY-580276	
	LY-364947	
	LY-2109761	
	LY-2157299	갈루니세르틴
	LY-573636	TGFb 억제제인가/예
	SB- 505124	
	SB-431542	
	SB-525234	
	SD-208	
	SD-093	
	Ki-26894	
	NPC-30345	
	SX-007	
	IN-1130	
	피롤-이미다졸 폴리아미 드	유전자 침묵
	EW-7203	
	EW-7195	구조
	EW-7197	

[0248]

부류	작용제	대체명
	GW6604	
	미국 특허 번호 7,087,626	약학적 제제로서의 피롤 유도체
	미국 특허 번호 6,476,031	의약으로서의 퀴나졸린 유도체
	미국 특허 번호 7,723,486, 및 EP 0945464	TGF-β에 대한 항체
펩티드	Trx-xFoxH1b	Smad-상호작용 펩티드 압타머
펩티드	Trx-Lef1	
펩티드	디스테르티드 (Distertide) (p144)	
펩티드	p17	
펩티드	LSKL	
디아이드로피릴리피라졸-기반 스캐폴드	미국 특허 US 8298825 B1을 참조	
이미다졸-기반 스캐폴드	미국 특허 US 8298825 B1 참조	
피라졸로피리딘-기반 스캐폴드	미국 특허 US 8298825 B1 참조	
피라졸-기반 스캐폴드		미국 특허 US 8298825 B1 참조
이미다조피리딘-기반 스캐폴드	미국 특허 US 8298825 B1 참조	
트리아졸-기반 스캐폴드		미국 특허 US 8298825 B1 참조

[0249]

부류	작용제	대체명
드		
피리도피리미딘-기반 스캐폴드	미국 특허 US 8298825 B1 참조	
피롤로피라졸-기반 스캐폴드	미국 특허 US 8298825 B1 참조	
이소티아졸-기반 스캐폴드	미국 특허 US 8298825 B1 참조	
옥사졸-기반 스캐폴드		미국 특허 US 8298825 B1 참조
Tgf-베타-R1 억제제	Repsox	616452, TGF- β RI 키나제 억제제 II, CAS 446859-33-2, 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘
Tgf-베타-R1 억제제	갈루니세르티프 (LY2157299)	4-(2-(6-메틸피리딘-2-일)-5,6-디하이드로-4H-피롤로[1,2-b]피라졸-3-일)퀴놀린-6-카르복사미드
Tgf-베타-R1 억제제	EW-7197	N-(2-플루오로페닐)-5-(6-메틸-2-피리디닐)-4-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-6-일-1H-이미다졸-2-메탄아민
Tgfb 생산 억제제	피르페니돈	2(1H)-피리디논, 5-메틸-1-페닐-
	LY-2157299	갈루니세르티프
Tgf-베타-R1 억제제	SB-505124	616453, TGF- β RI 키나제 억제제 III, CAS 356559-13-22-(5-벤조[1,3]디옥솔-4-일-2-터트-부틸-1H-이미다졸-4-일)-6-메틸피리딘, HCl, ALK5 억제제 III, SB-505124, HCl
Tgf-베타-R1 억제제	SB-525334	616459, TGF- β RI 키나제 억제제 VIII - CAS 356559-20-1, SB-525334, 6-(2-터트-부틸-5-(6-메틸-피리딘-2-일)-1H-이미다졸-4-일)-퀴녹살린,

[0250]

부류	작용제	대체명
		ALK5 억제제 VIII
Tgf-베타-R1 억제제	TGF-β RI 키나제 억제제 IX	616463, TGF-β RI 키나제 억제제 IX, 4-((4-((2,6-디메틸피리딘-3-일)옥사)피리딘-2-일)아미노)벤젠설포나미드, ALK5 억제제 IX
Tgf-베타-R1 억제제	R 268712	4-[2-플루오로-5-[3-(6-메틸-2-피리디닐)-1H-피라졸-4-일]페닐]-1H-피라졸-1-에탄올
	SB- 505124	피리딘, 2-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-2-(1,1-디메틸에틸)-1H-이미다졸-5-yl]-6-메틸-, 하이드로클로라이드 (1:1)
	SD-208	
	IN-1130	
	EW-7197	
Tgf-베타-R1 억제제	A-83-01	616454, TGF-β RI 키나제 억제제 IV - CAS 909910-43-6, 3-(6-메틸피리딘-2-일)-4-(4-퀴놀릴)-1-페닐티오카르바모일-1H-피라졸, A-83-01, ALK5 억제제 IV
Tgf-베타-R1 억제제	SB-431542	616461, TGF-β RI 키나제 억제제 VI, SB431542 - CAS 301836-41-9, 4-[4-(3,4-메틸렌디옥시페닐)-5-(2-피리딜)-1H-이미다졸-2-일]벤즈아미드, 디하이드레이트, 4-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-5-(2-피리딜)-1H-이미다졸-2-일]벤즈아미드, 디하이드레이트
Tgf-베타-R1 억제제	R 268712	4-[2-플루오로-5-[3-(6-메틸-2-피리디닐)-1H-피라졸-4-일]페닐]-1H-피라졸-1-에탄올

[0251]

[0252]

추가적인 치료제

[0253]

특정 구체예에서, 투여 단계는 (예를 들어, (i) 및 (ii)에 더하여) 하나 이상의 추가적인 작용제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여하게 되는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 추가적인 작용제는 ROS 억제제 또는 스캐빈저를 포함한다. ROS 스캐빈저는 비제한적으로, 효소 카탈라제, 글루타티온 퍼옥시다제 및 아스코르베이트 퍼옥시다제를 포함한다. 추가적으로, 비타민 A, E 및 C는 스캐빈저 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 셀레늄 및 망간과 같은 미네랄은 또한 ROS 스캐빈징에 효과적인 화합물일 수 있다.

[0254]

ROS 억제제는 비제한적으로, 알파 리포산, 슈퍼옥사이드 디스무타제 모방체, 또는 카탈라제 모방체를 포함한다. 슈퍼옥사이드 디스무타제 모방체 또는 카탈라제 모방체는 MnTBAP (Mn(III)테트라키스(4-벤조산)포르피린 클로라이드)(Calbiochem에 의해 생산됨), ZnTBAP (Zn(III)테트라키스(4-벤조산)포르피린 클로라이드), SC-55858 (망간 (II) 디클로로 (2R,3R,8R,9R-비스-사이클로헥사노-1,4,7,10,13-펜타아자사이클로펜타데칸)) Euk-134 (3,3'-메톡시살렌Mn(III)) (Eukarion에 의해 생산됨), M40403 (디클로로 [(4aR,13aR,17aR,21aR)-1,2,3,4,4a,5,6,12,13,13a,14,15,16,17,17a,18,19,20,21-에이코사하이드로-11,7-니트릴로-7H-디벤조[1,4,7,10]테트라아자사이클로헵타데신-카파NS, 카파N13, 카파N18, 카파N21, 카파N22] 망간) (Metaphore에 의해 생산됨), AEOL 10112, AEOL 10113, 및 AEOL 10150 (망간(III) 메소테트라키스(디-N-에틸이미다졸)포르피린)(모든 AEOL 화합물은 Incara Pharmaceuticals에 의해 생산됨)일 수 있다. 대안적으로, ROS 억제제는 철 킬레이터일 수

있다. 철 킬레이터 중에서, 데페록사민 또는 DFO는 가장 중요할 수 있는데, 이는 탈라세미아 중 과다 철 처리에 대해 FDA-승인되었기 때문이다. 또한, ROS 억제제는 철 킬레이터의 혼합물로 구성된 조성물일 수 있다.

[0255] ROS 억제제는 방사선 보호제일 수 있으며, 화합물 예를 들어, 요산, 부티오닌 설펍시민, 디에틸 말레에이트, 비타민 E, 비타민 C, 시스테인 예컨대, N-아세틸 시스테인, 또는 글루타티온, 메트로니다졸, 및 레티노이드 예컨대, 예를 들어, 비타민 A를 포함한다. 추가적인 ROS 스캐빈저를 찾아볼 수 있다.

[0256] 특정 구체예에서, 하나 이상의 추가 작용제는 비타민 C 또는 이의 유도체를 포함한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 추가의 작용제는 TGF β 타입 I 수용체 억제제를 포함한다. TGF-베타 유형 I 수용체 억제제는 비제한적으로, 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘, [3-(피리딘-2-일)-4-(4-퀴놀릴)]-1H-피라졸, 및 3-(6-메틸피리딘-2-일)-4-(4-퀴놀릴)-1-페닐티오카르바모일-1H-피라졸을 포함하며, 이는 Calbiochem (San Diego, Calif.)에서 구입할 수 있다. 기타 소분자 억제제는 비제한적으로, 특히 SB-431542 (예를 들어, 문헌 [Halder et al., 2005; Neoplasia 7(5):509-521] 참조), SM16 (예를 들어, 문헌 [Fu, K et al., 2008; Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 28(4):665] 참조), 및 SB-505124 (예를 들어, 문헌 [Dacosta Byfield, S., et al., 2004; Molecular Pharmacology 65:744-52] 참조)를 포함한다.

[0257] 한 구체예에서, ALK5 억제제 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5 나프티리딘이 본원에 기술된 방법에 따라 이용된다. 이러한 억제제는 또한 ALK5 억제제 II로서 본원에서 언급되며, Calbiochem으로부터 시중에서 입수가능하다 (Cat. No. 616452; San Diego, Calif.). 한 구체예에서, 억제제는 Sigma로부터 시중에서 입수 가능한 SB 431542 즉, ALK-4, -5, -7억제제(product no. 54317; Saint Louis, Mo.)이다. SB 431542는 또한 하기 화학명으로 언급된다: 4-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-5-(2-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]-벤즈아미드, 4-[4-(3,4-메틸렌디옥시페닐)-5-(2-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]-벤즈아미드, 또는 4-(5-벤조[1,3]디옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2-일)-벤즈아미드 하이드레이트.

[0258] TGF- β 신호전달의 소분자 억제제는 분자의 기본 스캐폴드를 기반으로 하여 분류될 수 있다. 예를 들어, TGF- β 신호전달 억제제는 디하이드로피리리피라졸-기반 스캐폴드, 이미다졸-기반 스캐폴드, 피라졸로피리딘-기반 스캐폴드, 피라졸-기반 스캐폴드, 이미다조피리딘-기반 스캐폴드, 트리아졸-기반 스캐폴드, 피리도피리미딘-기반 스캐폴드, 피롤로피라졸-기반 스캐폴드, 이소티아졸-기반 스캐폴드 및 옥사졸-기반 스캐폴드를 기초로 할 수 있다.

[0259] TGF- β 신호전달의 억제제는 예를 들어, 문헌 [Callahan, J. F. et al., J. Med. Chem. 45, 999-1001 (2002)]; [Sawyer, J. S. et al., J. Med. Chem. 46, 3953-3956 (2003); Gellibert, F. et al., J. Med. Chem. 47, 4494-4506 (2004)]; [Tojo, M. et al., Cancer Sci. 96: 791-800 (2005)]; [Valdimarsdottir, G. et al., APMIS 113, 773-389 (2005)]; [Petersen et al. Kidney International 73, 705-715 (2008)]; [Yingling, J. M. et al., Nature Rev. Drug Disc. 3, 1011-1022 (2004)]; [Byfield, S. D. et al., Mol. Pharmacol., 65, 744-752 (2004)]; [Dumont, N. et al., Cancer Cell 3, 531-536 (2003)]; WO 공개 번호 2002/094833; WO 공개 번호 2004/026865; WO 공개 번호 2004/067530; WO 공개 번호 209/032667; WO 공개 번호 2004/013135; WO 공개 번호 2003/097639; WO 공개 번호 2007/048857; WO 공개 번호 2007/018818; WO 공개 번호 2006/018967; WO 공개 번호 2005/039570; WO 공개 번호 2000/031135; WO 공개 번호 1999/058128; 미국 특허 번호 6,509,318; 미국 특허 번호 6,090,383; 미국 특허 번호 6,419,928; 미국 특허 번호 9,927,738; 미국 특허 번호 7,223,766; 미국 특허 번호 6,476,031; 미국 특허 번호 6,419,928; 미국 특허 번호 7,030,125; 미국 특허 번호 6,943,191; 미국 공개 번호 2005/0245520; 미국 공개 번호 2004/0147574; 미국 공개 번호 2007/0066632; 미국 공개 번호 2003/0028905; 미국 공개 번호 2005/0032835; 미국 공개 번호 2008/0108656; 미국 공개 번호 2004/015781; 미국 공개 번호 2004/0204431; 미국 공개 번호 2006/0003929; 미국 공개 번호 2007/0155722; 미국 공개 번호 2004/0138188 및 미국 공개 번호 2009/0036382에 기술되어 있으며, 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다.

[0260] TGF- β 신호전달의 올리고뉴클레오티드 기반 조절인자 예컨대, siRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드는 미국 특허 번호 5,731,424; 미국 특허 번호 6,124,449; 미국 공개 번호 2008/0015161; 2006/0229266; 2004/0006030; 2005/0227936 및 2005/0287128에 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다. 기타 안티센스 핵산 및 siRNA는 당업자에게 공지된 방법에 의해 획득될 수 있다.

[0261] TGF- β 신호전달의 예시적인 억제제는 비제한적으로, AP-12009 (TGF- β 수용체 타입 II 안티센스 올리고뉴클레오티드), 레르델리무마브(Lerdelimumab) (CAT 152, TGF- β 수용체 타입 II에 대한 항체) GC-1008 (인간 TGF- β 의 모든 아이소형에 대한 항체), ID11 (쥐과 TGF- β 의 모든 아이소형에 대한 항체), 가용성 TGF- β , 가용성 TGF- β

수용체 타입 II, 디하이드로피롤로이미다졸 유사체 (예를 들어, SKF-104365), 트리아릴이미다졸 유사체 (예를 들어, SB-202620 (4-(4-(4-플루오로페닐)-5-(피리딘-4-일)-1H-이미다졸-2-일)벤조산) 및 SB-203580 (4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸페닐 페닐)-5-(4-피리딘-1H-이미다졸)), RL-0061425, 1,5-나프티리딘 아미노티아졸 및 피라졸 유도체 (예를 들어, 4-(6-메틸-피리딘-2-일)-5-(1,5-나프티리딘-2-일)-1,3-티아졸-2-아민 및 2-[3-(6-메틸-피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일]-1,5-나프티리딘), SB-431542 (4-(5-벤조[1,3]디옥솔-5-일-4-피리딘-2-일)-1H-이미다졸-2-일)-벤즈아미드), GW788388 (4-(4-(3-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)피리딘-2-일)-N-(테트라하이드로-2H-피란-4-일)벤즈아미드), A-83-01 (3-(6-메틸-2-피리디닐)-N-페닐-4-(4-퀴놀리닐)-1H-피라졸-1-카르보티오아미드), 데코린(Decorin), 레프티 1(Lefty 1), 레프티 2, 폴리스타틴(Follistatin), 녹긴(Noggin), 코르딘(Chordin), 세르베루스(Cerberus), 그렘린(Gremlin), 인히빈(Inhibin), BIO (6-브로모-인디루빈-3'-옥심), Smad 단백질 (예를 들어, Smad6, Smad7), 및 시스타틴 C를 포함한다.

[0262] TGF- β 신호전달의 억제제는 또한 TGF- β 수용체 타입 I을 억제하는 분자를 포함한다. TGF- β 수용체 타입 I의 억제제는 문헌 [Byfield, S. D., and Roberts, A. B., Trends Cell Biol. 14, 107-111 (2004)]; [Sawyer J. S. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 3581-3584 (2004)]; [Sawyer, J. S. et al., J. Med. Chem. 46, 3953-3956 (2003)]; [Byfield, S. D. et al., Mol. Pharmacol. 65, 744-752 (2004)]; [Gellibert, F. et al., J. Med. Chem. 47, 4494-4506 (2004)]; [Yingling, J. M. et al., Nature Rev. Drug Disc. 3, 1011-1022 (2004)]; [Dumont, N. et al., Cancer Cell 3, 531-536 (2003)]; [Tojo, M. et al., Cancer Sci. 96: 791-800 (2005)]; WO 공개 번호 2004/026871; WO 공개 번호 2004/021989; WO 공개 번호 2004/026307; WO 공개 번호 2000/012497; 미국 특허 번호 5,731,424; 미국 특허 번호 5,731,144; 미국 특허 번호 7,151,169; 미국 공개 번호 2004/00038856 및 미국 공개 번호 2005/0245508에 기재되어 있으며, 이의 모든 내용은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0263] 작용제의 조합물

[0264] 특정 구체예에서, 조성물은 표 1, 칼럼 A의 부류 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 표 3, 칼럼 A의 부류 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 표 1, 칼럼 A의 부류 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 표 4, 칼럼 A의 부류 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 표 2, 칼럼 A의 부류 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 표 3, 칼럼 A의 부류 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 표 2, 칼럼 A의 부류 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 표 4, 칼럼 A의 부류 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다.

[0265] 특정 구체예에서, 조성물은 표 1, 칼럼 B의 작용제 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 표 3, 칼럼 B의 작용제 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 표 1, 칼럼 B의 작용제 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 표 4, 칼럼 B의 작용제 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 표 2, 칼럼 B의 작용제 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 표 3, 칼럼 B의 작용제 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 표 2, 칼럼 B의 작용제 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 표 4, 칼럼 B의 작용제 내의 작용제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다.

[0266] 특정 구체예에서, 조성물은 (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)의 조합물을 포함하며, 이들 작용제는 각각 표 1-4에서 선택된다.

[0267] 특정 구체예에서, 조성물은 (i) 아미노피리미딘, 무기 원자, 또는 티아디아졸리딘디온으로부터 선택된 GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 3-4에서 선택된 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) GSK3-베타 억제제, Wnt 리간드, 또는 Wnt 관련 단백질로부터 선택된 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 3-4에서 선택된 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) HDAC 억제제, 또는 천연 수용체 리간드로부터 선택된 notch 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 1-2에서 선택된 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서,

조성물은 하이드록사메이트, 지방족 산, 또는 벤즈아미드로부터 선택된 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 1-2에서 선택된 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함하는 작용제의 조합물을 포함하며, 이들 작용제는 각각 표 1-4에서 선택된다.

[0268] 특정 구체예에서, 조성물은 (i) CHIR99021, 리튬, 또는 NP031112(티데글루십(Tideglusib))으로부터 선택된 GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 (ii) 표 3-4로부터 착물된 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) CHIR99021, Wnt3a, 또는 R-스폰딘1로부터 선택된 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 3-4에서 선택된 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) 발프로산, SAHA (보리노스타트), 제그드 1, 델타-유사 1, 또는 델타-유사 4로부터 선택된 Notch 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 1-2에서 선택된 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 발프로산, SAHA (보리노스타트), 또는 투바스타틴 A로부터 선택된 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 1-2에서 선택된 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함하는 작용제의 조합물을 포함하며, 이들 작용제는 각각 표 1-4에서 선택된다.

[0269] 특정 구체예에서, 조성물은 (i) 아미노피리미딘, 무기 원자, 또는 티아디아졸리딘디온으로부터 선택된 GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 3-4에서 선택된 매우 강력한 notch 효능제 및/또는 매우 강력한 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) GSK3-베타 억제제, Wnt 리간드, 또는 Wnt 관련 단백질로부터 선택된 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 3-4에서 선택된 매우 강력한 notch 효능제 및/또는 매우 강력한 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) HDAC 억제제, 또는 천연 수용체 리간드로부터 선택된 Notch 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 1-2에서 선택된 매우 강력한 GSK3-베타 억제제 및/또는 매우 강력한 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 하이드록사메이트, 지방족 산, 또는 벤즈아미드로부터 선택된 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 1-2에서 선택된 매우 강력한 GSK3-베타 억제제 및/또는 매우 강력한 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다.

[0270] 특정 구체예에서, 조성물은 (i) CHIR99021, 리튬, 또는 NP031112(티데글루십(Tideglusib))으로부터 선택된 GSK3-베타 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 (ii) 표 3-4로부터 착물된 매우 강력한 notch 효능제 및/또는 매우 강력한 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) CHIR99021, Wnt3a, 또는 R-스폰딘1로부터 선택된 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 3-4에서 선택된 매우 강력한 notch 효능제 및/또는 매우 강력한 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) 발프로산, SAHA (보리노스타트), 제그드 1, 델타-유사 1, 또는 델타-유사 4로부터 선택된 Notch 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 1-2에서 선택된 매우 강력한 GSK3-베타 억제제 및/또는 매우 강력한 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 발프로산, SAHA(보리노스타트) 또는 투바스타틴 A로부터 선택된 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 표 1-2에서 선택된 매우 강력한 GSK3-베타 억제제 및/또는 매우 강력한 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함한다.

[0271] 특정 구체예에서, 조성물은 (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 제 1 작용제로부터 구별되며 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)인 제 2 작용제를 포함하는 작용제의 조합물을 포함한다.

[0272] 특정 구체예에서, 조성물은 (i) 매우 강력한 GSK3-베타 억제제 및/또는 매우 강력한 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 매우 강력한 notch 효능제 및/또는 매우 강력한 HDAC 억제제 (또

는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함하는 작용제의 조합물을 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) 매우 강력한 GSK3-베타 억제제 및/또는 매우 강력한 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함하는 작용제의 조합물을 포함한다. 특정 구체예에서, 조성물은 (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) 매우 강력한 notch 효능제 및/또는 매우 강력한 HDAC 억제제 (또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)를 포함하는 작용제의 조합물을 포함한다.

[0273] 특정 구체예에서, 조성물은 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 또는 5000 배의 줄기성 드라이버를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 효과적인 분화 억제 농도의 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 또는 5000배의 분화 억제제를 추가로 포함한다. 선택적으로, 임의의 종래 조성물은 ROS 또는 Tgf베타를 표적으로 하는 하나 이상의 작용제를 포함할 수 있다. 선택적으로, 임의의 종래 조성물은 하나 이상의 뉴로트로핀을 포함할 수 있다.

[0274] 조합된 작용제의 전달 프로파일

[0275] 일부 구체예에서, 줄기성 드라이버는 Lgr5+ 줄기세포의 증식을 추진하는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 분화 억제제가 효과적인 분화 억제 농도로 존재하지 않는다면, 줄기성 드라이버는 또한, LGR5+ 세포의 탈세포로의 분화를 유도할 수 있다. 증식 및 분화 둘 모두를 추진할 수 있는 줄기성 드라이버의 예는 GSK3베타 억제제 및 Wnt 효능제를 포함한다. 일부 구체예에서, 분화 억제제는 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제일 수 있다. 일부 구체예에서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도 및 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제로의 제 1 증식 기간 이어서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도로 처리되거나 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제로는 처리되지 않은 분화 기간이 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제로의 제 1 증식 기간 이어서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제로 처리되고 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제로 처리되지 않은 분화 기간이 존재할 수 있다. 일부 구체예에서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 GSK3 베타 억제제 및 효과적인 분화 억제 농도의 HDAC 억제제로의 제 1 증식 기간 이어서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 GSK3베타 억제제로 처리되고 효과적인 분화 억제 농도의 HDAC 억제제로 처리되지 않은 분화 기간이 존재할 수 있다.

[0276] 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192시간이다. 일부 구체예에서, 조성물은 요망되는 증식 기간에 걸쳐 효과적인 방출물의 줄기성 드라이버를 보유한다. 일부 구체예에서, 조성물은 적어도 1시간 동안 효과적인 방출물의 줄기성 드라이버를 보유한다. 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간 동안 줄기성 드라이버의 효과적인 방출물의 10, 20, 50, 100, 500, 또는 1000-배의 줄기성 드라이버 방출물을 갖는 것이 바람직하다.

[0277] 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192시간이다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물은 요망되는 증식 기간에 걸쳐 와우에서 효과적인 줄기성 드라이버 농도를 유지한다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물은 적어도 1시간 동안 와우에서 효과적인 줄기성 드라이버 농도를 유지한다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물은 적어도 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192시간 동안 효과적인 줄기성 드라이버 농도를 유지한다.

[0278] 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192시간이다. 일부 구체예에서, 조성물은 요망되는 증식 기간에 걸쳐 효과적인 방출물의 분화 억제제를 보유한다. 일부 구체예에서, 조성물은 적어도 1시간 동안 효과적인 방출물의 분화 억제제를 보유한다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물은 적어도 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192 시간 동안 효과적인 방출물의 분화 억제제를 보유한다.

[0279] 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192시간이다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물은 요망되는 증식 기간에 걸쳐 외부에서 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제를 보유한다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물은 적어도 1시간 동안 와우에서 효과적인 분화 억제 농도를 보유한다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물이 적어도 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192시간 동안 효과적인 분화 억제 농도를 유지한다.

[0280] 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192 시간이다. 일부 구체예에서, 조성물은 줄기성 드라이버와 분화 억제제 둘 모두를 동시에 방출할 수 있다. 요법에 의한 증식을 위한

Lgr5⁺ 세포 표적에서 Notch 활성을 줄기성 드라이버가 감소시키는 정도를 분화 억제제가 완화시키는 것이 유익할 수 있다. 일부 구체예에서, 조성물은, 1시간 동안의 작용제 방출량이 30ul이고 세포 배양에서 Notch 활성 검정에 첨가되는 경우, Notch 활성이 작용제가 적용되지 않은 천연 상태의 Notch 활성의 > 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90인, 증식 기간에 걸친 줄기성 드라이버 및 분화 억제제의 방출물을 갖는다.

[0281] 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192 시간이다. 일부 구체예에서, 조성물은 줄기성 드라이버와 분화 억제제 둘 모두를 동시에 방출할 수 있다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 요망되는 조성물은 작용제가 적용되지 않은 천연 상태의 Notch 활성의 >20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90의 Notch 활성을 유지하기 위한 양의 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 동시에 방출한다.

[0282] 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192 시간이다. 일부 구체예에서, 조성물은 줄기성 드라이버와 분화 억제제 둘 모두를 동시에 방출할 수 있다. 요법에 의한 증식을 위한 Lgr5⁺ 세포 표적에서 Notch 활성을 줄기성 드라이버가 감소시키는 정도를 분화 억제제가 완화시키는 것이 유익할 수 있다. 일부 구체예에서, 조성물은, 1시간 동안의 작용제 방출량이 30ul이고 세포 배양의 Notch 활성 검정에 첨가되는 경우, Notch 활성이 동일량의 줄기성 드라이버를 함유하나 분화 억제제는 전혀 함유하지 않는 조성물로 달성되는 Notch 활성의 > 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 100x인, 증식 기간에 걸친 줄기성 드라이버 및 분화 억제제의 방출물을 갖는다.

[0283] 일부 구체예에서, 요망되는 증식 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 또는 192 시간이다. 일부 구체예에서, 조성물은 줄기성 드라이버와 분화 억제제 둘 모두를 동시에 방출할 수 있다. 요법에 의해 증식을 위한 Lgr5⁺ 세포 표적에서 줄기성 드라이버가 Notch 활성을 감소시키는 정도를 분화 억제제가 완화시키는 것이 유익할 수 있다. 일부 구체예에서, 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 포함하는 조성물이 마우스의 정원창막에 위치할 경우, 와우에서 Lgr5⁺ 세포의 Notch 활성은 동일량의 줄기성 드라이버를 함유하나 분화 억제제는 전혀 함유하지 않는 조성물로 달성된 바와 같은 Notch 활성의 > 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 100x이다.

[0284] 일부 구체예에서, 요망되는 분화 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96일이다. 일부 구체예에서, 조성물은 요망되는 분화 기간의 어떠한 시간에서도 분화 억제제의 효과적인 방출물을 달성하지 못한다. 일부 구체예에서, 조성물은 1일 초과 동안 효과적인 방출물의 분화 억제제를 달성하지 못한다. 일부 구체예에서, 조성물은 적어도 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 또는 96일 동안 효과적인 방출물의 분화 억제제를 획득하지 못한다.

[0285] 일부 구체예에서, 요망되는 분화 기간은 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96일이다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물은 요망되는 분화 기간의 어느 시간에서도 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제를 보유하지 않는다. 일부 구체예에서, 마우스의 정원창막에 위치한 조성물은 1일 초과 동안 효과적인 분화 억제 농도를 유지하지 않는다. 일부 구체예에서, 조성물은 적어도 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 또는 96일 동안 효과적인 분화 억제 농도를 유지하지 않는다.

[0286] 일부 구체예에서, 분화 억제제보다 더욱 긴 기간에 걸쳐 줄기성 드라이버를 방출하는 것이 바람직하다. 일부 구체예에서, 줄기성 드라이버의 평균 방출 시간은 분화 억제제의 평균 방출 시간의 2, 4, 8, 16, 또는 32배이다.

[0287] 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 지지 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 지지 세포는 Lgr5⁺ 세포이다. 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 생후 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 털세포는 내이 털세포이다. 특정 구체예에서, 털세포는 외이 털세포이다.

[0288] 특정 구체예에서, 줄기세포는 전구 세포를 포함한다.

[0289] 특정 구체예에서, 투여 단계는 또한 HDAC 억제제인 notch 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 합성 분자를 포함하는 notch 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 줄기세포 집단에 발프로산 (VPA) (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))를 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다 (예를 들어, 여기에서 VPA는 또한, HDAC 억제제인 notch 효능제임).

[0290] 특정 구체예에서, 투여 단계는 또한 GSK3-베타 억제제인 Wnt 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 합성 분자를 포함하는 Wnt 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 줄기세포 집단에 CHIR99021 (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))를 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다 (예를 들어, 여기에서

CHIR99021은 GSK3-베타 억제제임).

- [0291] 특정 구체예에서, 투여 단계는 notch 억제제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, notch 억제제는 DAPT, LY411575, MDL-28170, 화합물 E, RO4929097; DAPT (N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-알라닌-2-페닐]글리신-1,1-디메틸에틸 에스테르); L-685458 ((5S)-(t-부톡시카르보닐아미노)-6-페닐-(4R)하이드록시-(2R)벤질헥사노일)-L-leu-L-phe-아미드); BMS-708163 (아바가세스테트(Avagacestat)); BMS-299897 (2-[(1R)-1-[(4-클로로페닐)설폰일](2,5-디플루오로페닐)아미노]에틸-5-플루오로벤젠부타노산); M-0752; YO-01027; MDL28170 (Sigma); LY41 1575 (N-2((2S)-2-(3,5-디플루오로페닐)-2-하이드록시에타노일)-N1-((7S)-5-메틸-6-옥소-6,7-디하이드로-5H-디벤조[b,d]아제핀-7-일)-1-알라닌아미드); ELN-46719 (LY41 1575의 2-하이드록시-발레르산 아미드 유사체; PF-03084014 ((S)-2-((S)-5,7-디플루오로-1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌-3-일아미노)-N-(1-(2-메틸-1-(네오펜틸아미노)프로판-2-일)-1H-이미다졸-4-일)펜탄아미드); 화합물 E ((2S)-2-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]아미노)-N-[(3S)-1-메틸-2-옥소-5-페닐-2,3-디하이드로-1H-1,4-벤조디아제핀-3-일]프로판아미드; 및 세마가세스테트(Semagacestat) (LY450139; (2S)-2-하이드록시-3-메틸-N-((1S)-1-메틸-2-[(1S)-3-메틸-2-옥소-2,3,4,5-테트라하이드로-1H-3-벤자제핀-1-일]아미노)-2-옥소에틸)부탄아미드), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))을 포함한다.
- [0292] 특정 구체예에서, 투여 단계는 줄기세포 집단에 (i) CHIR99021 (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염)) 및 (ii) VPA (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염)) (예를 들어, 여기에서 (i)는 CHIR99021을 포함하며, (ii)는 VPA를 포함함)을 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 줄기세포 집단에 DAPT (예를 들어, 여기에서 DAPT는 notch 억제제임)를 투여하거나 투여되게 하는 것을 추가로 포함한다.
- [0293] 특정 구체예에서, 투여 단계는 귀로의 하나 이상의 주입을 (예를 들어, 경막외로) 수행함으로써 수행된다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 주입이 중이내로 이루어진다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 주입이 내이내로 이루어진다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 주입을 수행하는 것은 고막 및/또는 주위 조직을 마취하고, 고막을 통해 중이 내로 바늘을 위치시키고, (i) 및 (ii) 중 하나 또는 둘 모두를 주입하는 것을 포함한다.
- [0294] 특정 구체예에서, 투여 단계는 박동 방식으로 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제를 투여하고, GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제를 지속형 방식으로 투여하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여되는 제형은 무균이다. 특정 구체예에서, 투여되는 제형은 피로젠-비함유이다. 특정 구체예에서, 약학적으로 허용되는 제형은 부록 21-36면에 기술된 바와 같이 투여된다. 특정 구체예에서, 제형은 부록 21-36면에 기술된 바와 같은 약학적으로 허용되는 제형으로 투여되는 (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제의 조합물이다.
- [0295] 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 생체내 대상체이며, 방법은 청력 손실 및/또는 전정 기능장애에 대한 치료법이다 (예를 들어, 여기에서 줄기세포의 확장된 집단으로부터 내이 털세포의 생성은 청력 손실의 부분적 또는 완전한 회복을 유도하고/거나 전정 기능을 향상시킨다). 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 생체내 대상체이며, 방법은 (예를 들어, 청력 손실 및/또는 전정 기능장애와 관련되지 않은 질환 및/또는 장애의 치료를 위해) 대상체에 대한 약물의 공지된 안전한 최대 투여량 보다 높은 농도로 약물을 대상체에 전달하는 것을 추가로 포함한다 (예를 들어, 방법으로부터 발생한 내이 털세포의 생성의 부제하에 전달되는 경우 공지된 안전한 최대 투여량) (예를 들어, 약물의 용량-제한 귀독성의 감소 또는 제거로 인해).
- [0296] 특정 구체예에서, 본 방법은 발생한 내이 털세포를 사용하여 고처리량 스크리닝을 수행하는 것을 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 본 방법은 생성된 내이 털세포를 사용하여 내이 털세포에 대한 독성에 있어서 분자를 스크리닝하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 본 방법은 생성된 내이 털세포를 사용하여 내이 털세포 (예를 들어, 상기 분자에 노출된 내이 털세포)의 생존을 향상시키는 능력에 대해 분자를 스크리닝하는 것을 포함한다.
- [0297] 또 다른 양태에서, 본 발명은 줄기세포의 확장된 집단을 생성하는 방법으로서, 줄기세포 집단 (예를 들어, 시험관내, 생체의 또는 시험관내 샘플/대상체)에 (i) 및 (ii) ((i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제) 둘 모두를 투여하거나 투여되게 하여, 줄기세포 집단의 줄기세포를 증식시키고 줄기세포의 확장된 집단을 유도하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 $Lgr5^{+}$ 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 생후 줄기세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 상피 줄기세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기세포는 전구 세포를 포함한다.

- [0298] 특정 구체예에서, 투여 단계는 또한 HDAC 억제제인 notch 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 합성 분자를 포함하는 notch 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 줄기세포 집단에 VPA (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))를 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다 (예를 들어, 여기에서 VPA는 또한, HDAC 억제제인 notch 효능제임).
- [0299] 특정 구체예에서, 투여 단계는 또한 GSK3-베타 억제제인 Wnt 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 합성 분자를 포함하는 Wnt 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 줄기세포 집단에 CHIR99021 (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))를 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다 (예를 들어, 여기에서 CHIR99021은 GSK3 베타 억제제임).
- [0300] 특정 구체예에서, 투여 단계는 귀로의 하나 이상의 주입을 (예를 들어, 경막외로 중이 및/또는 내이 내로) 수행함으로써 수행된다.
- [0301] 특정 구체예에서, 투여 단계는 박동 방식으로 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제를 투여하고, GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제를 지속형 방식으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0302] 특정 구체예에서, 줄기세포는 내이 줄기세포 및/또는 지지 세포이다.
- [0303] 특정 구체예에서, 본 방법은 줄기세포의 생성된 확장 군집을 사용하여 고처리량 스크리닝을 수행하는 것을 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 본 방법은 생성된 줄기세포를 사용하여 줄기세포 및/또는 이들의 프로제니에 대한 독성에 있어서 분자를 스크리닝하는 것을 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 본 방법은 생성된 줄기세포를 사용하여 줄기세포 및/또는 이들의 프로제니의 생존성을 향상시키는 능력에 대해 분자를 스크리닝하는 것을 추가로 포함한다.
- [0304] 또 다른 양태에서, 본 발명은 청력 소실 및/또는 전정 기능장애가 있거나 발병될 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 청력 소실 및/또는 전정 기능장애를 경험했거나 발병될 위험이 있는 대상체를 확인하고, 상기 대상체에 (i) 및 (ii) ((i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제) 둘 모두를 투여하거나 투여되게 하여, 대상체에서 청력 소실 및/또는 전정 기능장애를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0305] 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 $Lgr5^{+}$ 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 생후 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기세포 집단은 상피 줄기세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 줄기세포는 전구 세포를 포함한다.
- [0306] 특정 구체예에서, 투여 단계는 또한 HDAC 억제제인 notch 효능제를 대상체에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 합성 분자를 포함하는 notch 효능제를 대상체에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 대상체에 VPA (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))를 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다 (예를 들어, 여기에서 VPA는 또한, HDAC 억제제인 notch 효능제임).
- [0307] 특정 구체예에서, 투여 단계는 또한 GSK3-베타 억제제인 Wnt 효능제를 대상체에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 합성 분자를 포함하는 Wnt 효능제를 대상체에 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 투여 단계는 대상체에 CHIR99021 (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))를 투여하거나 투여되게 하는 것을 포함한다 (예를 들어, 여기에서 CHIR99021은 GSK3-베타 억제제임).
- [0308] 특정 구체예에서, 투여 단계는 귀로의 하나 이상의 주입을 (예를 들어, 경막외로 중이 및/또는 내이 내로) 수행함으로써 수행된다.
- [0309] 특정 구체예에서, 본 방법은 박동 방식으로 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제를 투여하고, GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제를 지속형 방식으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0310] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) 하나 이상의 조성물의 세트로서, (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제를 포함하며, 하나 이상의 조성물 각각이 약학적으로 허용되는 담체에 제공되는 세트 및 (b) 내이 장애를 치료하기 위한 하나 이상의 조성물 세트를 사용하기 위한 설명서를 포함

하는 키트에 관한 것이다.

- [0311] 특정 구체예에서, 하나 이상의 조성물의 세트는 또한, TGF β 억제제를 포함한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 조성물의 세트는 또한 ROS 스캐빈저를 포함한다. 특정 구체예에서, ROS 스캐빈저는 비타민 C 또는 이의 유도체이다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 조성물의 세트는 (예를 들어, 주사기를 통해) 주입될 수 있는 형태로 존재한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 조성물의 세트가 종이 내로 주입될 수 있는 형태로 존재한다.
- [0312] 또 다른 양태에서, 본 발명은 GSK3-베타 억제제 및 동결 건조된 형태의 notch 효능제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0313] 또 다른 양태에서, 본 발명은 GSK3-베타 억제제 및 수화된 형태의 notch 효능제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0314] 특정 구체예에서, GSK3-베타 억제제는 CHIR99021 (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))이다. 특정 구체예에서, notch 효능제는 VPA (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))이다.
- [0315] 또 다른 양태에서, 본 발명은 내이 털세포를 생성시키는 방법으로서, (예를 들어, 시험관내, 생체외 또는 생체내 샘플/대상체의) 최초 줄기세포 집단에서 줄기세포를 증식시키고, 줄기세포의 확장된 집단을 발생시키고 (예를 들어, 확장된 집단이 최초 줄기세포 집단보다 적어도 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 5, 10, 또는 20배 크도록); 줄기세포의 확장된 집단을 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및 선택적으로, notch 억제제에 노출시켜, 줄기세포의 확장된 군집으로부터 내이 털세포의 발생을 촉진시키는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0316] 또 다른 양태에서, 본 발명은 CHIR99021 (예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태 (예를 들어, 염))을 대상체 내이의 세포 집단에 투여하여 내이 털세포의 생성을 촉진하는 것을 포함하여, 내이 털세포를 생성시키는 방법에 관한 것이다.
- [0317] 또 다른 양태에서, 본 발명은 내이 털세포를 생성시키는 방법으로서, (예를 들어, 시험관내, 생체외 또는 생체내 샘플/대상체의) 최초 집단의 생후 LGR5⁺ 세포를 증식시키고, (예를 들어, 확장된 집단이 최초 줄기세포 집단보다 적어도 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 5, 10, 또는 20배 크도록) LGR5⁺ 세포의 확장된 집단을 생성시키는 것을 포함하며, 상기 LGR5⁺ 세포의 확장된 집단이 내이 털세포의 생성을 유도하는 방법에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 줄기세포는 전구 세포를 포함한다.
- [0318] 또 다른 양태에서, 본 발명은 질환 또는 질병을 치료하는 방법으로서, (생체내에서) 대상체의 최초 집단의 생후 Lgr5⁺ 상피 세포를 증식시켜 (예를 들어, 확장된 집단이 최초 생후 Lgr5⁺ 상피 세포 집단보다 적어도 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 5, 10, 또는 20배 크도록) Lgr5⁺ 상피 세포의 확장된 집단을 생성시키는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0319] 일부 구체예에서, Lgr5⁺ 세포는 털세포로 분화된다. 특정 구체예에서, 분화는 notch 억제제의 사용에 의해 유도된다. notch 경로 조절제는 기록되고 언급된 69 또는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 번호 8,377,886에 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0320] R04929097; DAPT (N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-알라닌-2-페닐]글리신-1,1-디메틸에틸 에스테르); L-685458 ((5S)-(t-부톡시카르보닐아미노)-6-페닐-(4R)하이드록시-(2R)벤질헥사노일)-L-leu-L-phe-아미드); BMS-708163 (아바가세스테트); BMS-299897 (2-[(1R)-1-[(4-클로로페닐)설폰일](2,5-디플루오로페닐)아미노]에틸-5-플루오로벤젠부타노산); M-0752; Y0-01027; MDL28170 (Sigma); LY41 1575 (N-2((2S)-2-(3,5-디플루오로페닐)-2-하이드록시에타노일)-N1-((7S)-5-메틸-6-옥소-6,7-디하이드로-5H-디벤조[b,d]아제핀-7-일)-1-알라닌아미드); ELN-46719 (LY41 1575의 2-하이드록시-발레르산 아미드 유사체; PF-03084014 ((S)-2-((S)-5,7-디플루오로-1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌-3-일아미노)-N-(1-(2-메틸-1-(네오펜틸아미노)프로판-2-일)-1H-이미다졸-4-일)펜탄아미드); 화합물 E ((2S)-2-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]아미노)-N-[(3S)-1-메틸-2-옥소-5-페닐-2,3-디하이드로-1H-1,4-벤조디아제핀-3-일]프로판아미드; 및 세마가세스테트 (LY450139; (2S)-2-하이드록시-3-메틸-N-((1S)-1-메틸-2-[(1S)-3-메틸-2-옥소-2,3,4,5-테트라하이드로-1H-3-벤자제핀-1-일]아미노)-2-옥소에틸)부탄아미드), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.
- [0321] 투여
- [0322] 정원창막은 내이 공간에 대한 생물학적 배리어이며, 청각 장애의 국소 치료를 위한 주요 장애물을 대표한다. 투

여된 약물은 내이 공간에 도달하기 위해 이러한 막을 넘어서야 한다. 약물은 수술에 의해 (예를 들어, 고막을 통한 주입) 정원창막에 국소적으로 위치할 수 있으며, 이어서 정원창막을 통과하여 관통할 수 있다. 정원창을 관통하는 물질은 전형적으로 외림프에 분포되고 따라서 털세포 및 지지 세포에 도달한다.

- [0323] 특정 구체예에서, 약학적 제형은 약물을 정원창막에 국소적으로 투여하기에 적합하다. 약학적 제형은 또한, 막 침투 증강제를 함유할 수 있으며, 이는 본원에 언급된 작용제가 정원창막을 통하여 통과하는 것을 지지한다. 따라서, 액체, 겔 또는 포움 제형이 사용될 수 있다. 또한, 경구적으로 활성 성분을 적용하거나 전달 방법의 조합을 이용하는 것이 가능하다.
- [0324] 귀로의 약물의 고막내 (IT) 전달은 임상 목적 및 연구 목적 둘 모두로 점점 더 이용된다. 일부 그룹은 마이크로 카테터와 마이크로침지를 사용하여 지속된 방식으로 약물을 적용하는 반면, 대부분은 이들을 단일 또는 반복된 IT 주입 (최대 2주의 기간에 걸쳐 최대 8회 주입)으로서 적용하였다.
- [0325] 경막내 적용된 약물은 정원창 (RW) 막을 가로질러 주로 내이의 유체로 유입되는 것으로 여겨진다. 계산은 귀로 들어가는 약물의 양 및 귀의 길이에 따른 약물의 분포 둘 모두를 제어하는 주요 인자가 중이 공간에 약물이 잔존하는 기간임을 보여준다. 단일의 '원-샷' 적용 또는 몇 시간의 기간 동안 수용액의 적용은 와우 길이에 따라 적용된 물질에 대한 급격한 약물 구배 및 와우의 기저 회전부에서 급격하게 감소하는 농도를 유도하는데, 약물이 후속하여 귀 전반에 걸쳐 분포되게 하기 때문이다.
- [0326] 기타 주입 방법은 삼투 펌프에 의해, 또는 이식된 생물질과의 조합에 의해 그리고, 더욱 바람직하게는 주입 또는 투입에 의해 포함된다. 약물의 제어된 방출 동력 및 분포를 보조할 수 있는 생물질은 하이드로겔 물질, 분해 가능한 물질을 포함한다. 가장 바람직하게는 사용되는 물질 중 한 부류는 원위치에서의 겔화 물질을 포함한다. 이들 참조에 언급된 모든 잠재적인 물질 및 방법론은 참조로서 본원에 포함된다.^{11,13-58} 기타 물질은 콜라겐 또는 피브린, 젤라틴 및 세포제거된 조직을 포함하는 기타 천연 물질을 포함한다. 겔포움이 또한 적합할 수 있다.
- [0327] 전달은 또한, 침투 증강제와 같은 전달된 조성물에 첨가된 작용제를 비제한적으로 포함하는 대안적 수단을 통해 향상될 수 있거나, 초음파, 전기천공 또는 고속 제트를 통한 장치를 통해서일 수 있다.
- [0328] 본원에 기술된 방법은 또한, PCT 출원 번호 W02012103012 A1에 기술된 그러한 세포 유형을 포함하는 당업자에게 공지된 다양한 방법을 이용하여 생성될 수 있는 내이 세포 유형에 사용될 수 있다.
- [0329] 인간 및 수의학 치료와 관련하여, 투여되는 특정 작용제(들)의 양은 치료될 질병 및 질병의 중증도; 사용되는 특정 작용제(들)의 활성; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별 및 섭식; 투여 시간, 투여 경로, 및 사용된 특정 작용제(들)의 배설율; 치료 기간; 사용되는 특정 작용제(들)와 조합되거나 합쳐서 사용되는 약물; 처방 의사 또는 수의사의 판단; 및 의학 및 수의학 분야에서 공지된 기타 인자를 포함하는 다양한 인자에 의존적일 수 있다.
- [0330] 본원에 기술된 작용제는 치료가 필요한 대상체에 치료학적 유효량으로 투여될 수 있다. 본원에 기술된 조성물의 투여는 임의의 적합한 투여 경로, 특히 경막내로 통해서일 수 있다. 기타 경로는 소화, 또는 대안적으로 비경구적 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 복강내, 경막내, 심실내, 요도내, 흉골내, 두개내, 근육내, 비내, 피하, 설하, 경피 또는 흡입 또는 취입, 또는 외이의 피부 및 고막의 막을 통한 흡수를 위한 귀 점적주입에 의한 국소적인 것을 포함한다. 이러한 투여는 단일 또는 다중 경구 용량, 규정된 수의 귀 점적, 또는 볼러스 주입, 다중 주입, 또는 단- 또는 장-기간 투입일 수 있다. 이식가능한 장치 (예를 들어, 이식가능한 투입 펌프)는 또한, 동일하거나 다양한 투여량의 특정 제형의 시간에 따른 주기적인 비경구 전달을 위해 사용될 수 있다. 이러한 비경구 투여에 있어서, 화합물은 바람직하게는, 물 또는 또 다른 적합한 용매 또는 용매의 혼합물 중의 멸균액으로서 제형화된다. 용액은 혈액과의 등장화성 용액을 만들기 위한 기타 물질 예컨대, 염, 당 (특히, 글루코스 또는 만니톨), 완충제 예컨대, 아세트산, 시트르산 및/또는 포스포산 및 이들의 소듐 염, 및 보존제를 함유할 수 있다. 적합하고 바람직하게는, 멸균된 비경구 제형의 제조는 상기 "조성물"이라는 제목의 섹션에 상세히 기술되어 있다.
- [0331] 본원에 기술된 조성물은 내이로 조성물을 전달하기에 충분한 많은 방법에 의해 투여될 수 있다. 내이로의 조성물 전달은 조성물이 정원창을 가로질러 내이로 확산될 수 있도록 중이로의 조성물 투여 및 정원창막을 통한 직접 주입에 의한 내이로의 조성물 투여를 포함한다. 이러한 방법은 비제한적으로, 낭창성 투여, 경고막적 심지 또는 카테터, 또는 비경구 투여, 예를 들어, 콧바퀴내, 경고막적 또는 와우내 주입을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

- [0332] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물 및 제형은 국소적으로 투여되며, 이는 이들이 전신 투여되지 않음을 의미한다.
- [0333] 한 구체예에서, 주사기 및 바늘 장치는 컷바퀴 투여를 이용하여 조성물을 대상체에 투여하는데 사용된다. 적당한 크기의 바늘은 고막 관통에 사용되며, 조성물을 포함하는 심지 또는 카테터가 관통된 고막을 통해 대상체의 중이 내로 삽입된다. 장치는 정원창과 접촉되거나 정원창 바로 옆에 위치하도록 삽입될 수 있다. 컷바퀴 투여에 사용되는 예시적 장치는 비제한적으로, 경고막적 심지, 경고막적 카테터, 정원창 마이크로카테터 (의약을 정원창에 전달하는 작은 카테터), 및 Silverstein Microwicks™ (정원창으로 튜브를 관통하는 "심지"를 갖는 작은 튜브로서, 이는 대상체 또는 의료 전문가에 의한 조절을 허용함)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0334] 또 다른 구체예에서, 주사기 및 바늘 장치는 중이 및/또는 내이로 경고막적 주입, 고막 뒤 주입을 이용하여 대상체로 조성물을 투여하는데 사용된다. 제형은 경고막적 주입을 통해 정원창막 상으로 직접적으로 투여될 수 있거나 와우내 주입을 통해 와우로 직접적으로 또는 전정내 주입을 통해 전정 기관으로 직접적으로 투여될 수 있다.
- [0335] 일부 구체예에서, 전달 장치는 중이 및/또는 내이로 조성물이 투여되도록 설계된 장치이다. 단지 예로서: GYRUS Medical GmbH는 정원창 니치의 가시화 및 이곳으로의 약물 전달을 위한 마이크로-검미경을 제공한다; 아렌버그 (Arenberg)는 미국 특허 번호 5,421,818; 5,474,529; 및 5,476,446에서 내부 귀구조로 유체를 전달하기 위한 의학적 치료 장치를 기술하며, 이들 각각은 이러한 기재를 위한 본원에서 참조로서 통합된다. 이러한 기재를 위해 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 출원 일련 번호 08/874,208은 내이로 조성물을 전달하기 위한 유체 전달 도관을 이식하기 위한 수술 방법을 기술한다. 이러한 기재를 위해 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 출원 공개 2007/0167918은 경고막적 유체 샘플링 및 약물 적용을 위한 조합형 귀 흡인기 및 약물 분배기를 추가로 기술한다.
- [0336] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에 한번 투여된다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에 1회 초과로 투여된다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 조성물의 제 1의 투여에 이어서 본원에 기재된 조성물의 제 2, 제 3, 제 4 또는 제 5의 투여가 뒤따른다.
- [0337] 조성물이 이를 필요로 하는 대상체에 투여되는 횟수는 의료 전문가의 재량, 질병, 질병의 중증도 및 제형에 대한 대상체의 반응에 의존적이다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 조성물은 이를 필요로 하는 가벼운 급성 병태를 갖는 대상체에 한번 투여된다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 조성물은 이를 필요로 하는 중등 또는 중등의 급성 병태를 갖는 대상체에 1회 초과로 투여된다. 대상체의 병태가 호전되지 않는 경우, 의사의 재량에 따라, 조성물은 대상체의 질환 또는 병태의 증상을 완화시키거나 그렇지 않으면 제어하거나 제한하기 위해 만성적으로, 즉 대상체의 삶의 기간 동안을 포함하는 연장된 기간 동안 투여될 수 있다.
- [0338] 대상체의 상태가 호전되지 않은 경우, 의사의 재량에 따라, 조성물은 연속적으로 투여될 수 있으며; 대안적으로, 투여되는 약물의 용량이 특정 기간 동안 일시적으로 감소되거나 일시적으로 중단될 수 있다 (즉, "휴약기"). 휴약기의 기간은 단지 예로서, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 12일, 15일, 20일, 28일, 35일, 50일, 70일, 100일, 120일, 150일, 180일, 200일, 250일, 280일, 300일, 320일, 350일 및 365일을 포함하여, 2일 내지 1년의 사이에서 다양하다. 휴약기 동안 용량 감소는 단지 예로서, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 및 100%를 포함하여 10% - 100%일 수 있다.
- [0339] 대상체의 청력 및/또는 균형이 호전되면, 유지 용량이 필요에 따라 투여될 수 있다. 후속적으로, 투여량 또는 투여 빈도 또는 이 둘 모두는 선택적으로 증상에 따라 호전된 질환, 질병 또는 병태가 유지되는 수준으로 감소된다. 특정 구체예에서, 대상체는 임의의 증상 재발시 장기간에 걸쳐 간헐적 치료를 필요로 한다.
- [0340] 제형
- [0341] 본원에 기술된 생물학적 활성 조성물 (때때로, 본원에서 "생물학적 활성 작용제" 또는 더욱 간단하게 "작용제"로서 언급됨)은 세포의 시험관내 집단 또는 생체내 집단으로 요망되는 전달 경로 예를 들어, 경고막적 주입, 경고막적 심지 및 카테터, 및 주입용 데푯에 적합한 임의의 방식으로 제형화될 수 있다. 전형적으로, 이러한 제형은 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제와 유리산 형태, 유리 염기 형태, 산 부가 염, 염기 부가 염, 이의 기타 유도체 (예컨대, 이의 프로드러그 또는 용매화물), 라세미체, 선택적으로 이들의 활성 또는 호변 이성체를 포함하는 모든 생리학적으로 허용되는 형태의 생물학적 활성 조성물을 포함한다.

- [0342] 본원에 기술된 조성물의 고체 제형 예컨대, 당의정, 캡슐, 환제 및 과립은 코팅 및 셀 예컨대, 장용 코팅 및 기타 코팅으로 선택적으로 스코어링되거나 제조된다. 고체 투약 형태는 또한 이온 채널 조절 화합물의 느린 또는 제어된 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다. 따라서, 고체 제형은 비제한적으로, 다양한 비율의 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 또는 기타 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구체를 포함하는 이온 채널 조절 화합물의 요망되는 방출 프로파일을 제공할 수 있는 임의의 물질을 포함할 수 있다.
- [0343] 약학적으로 허용되는 담체는 비제한적으로, 물, 에타놀, 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 오일을 포함하는 오일, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유, 및 기타 등등, 부형제 예컨대, 메틸셀룰로스, 카라게난, 및 기타 등등을 포함할 수 있다.
- [0344] 액체 투약 제형은 약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함할 수 있다. 또한, 액체 투약 제형은 비제한적으로, 물 또는 기타 용매; 용매화제 및 에멀전화제, 예컨대, 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에탈 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜; 오일 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 쌀, 올리브, 캐스터 및 참깨 유); 글리세롤; 테트라하이드로퓨릴 알콜; 폴리에틸렌 글리콜; 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 포함하는 당업계에 통상적으로 사용되는 불활성 희석제를 함유할 수 있다.
- [0345] 현탁 제형은 비제한적으로, 에톡실화된 이소스테아릴 알콜; 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르; 미세결정질 셀룰로스; 알루미늄 메타하이드록시드; 벤토나이트; 아가-아가; 트라가칸트; 및 이들의 혼합물을 포함한다.
- [0346] 이온 채널 조절 화합물의 액체, 현탁액 및 기타 제형의 적절한 유동성은 코팅 물질 예컨대, 레시틴을 사용함으로써; 분산액의 경우 요망되는 입자 크기의 유지에 의해; 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0347] 제형은 또한, 미생물 오염 방지를 위한 오염방지제를 포함할 수 있다. 오염방지제는 비제한적으로, 항균제 및 항진균제 예를 들어, 파라벤, 클로로부타놀, 페놀 소르브산, 항생제 및 기타 등등을 포함한다.
- [0348] 제형은 또한, 예를 들어, 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 또는 제형화 직전에 멸균수 또는 일부 기타 멸균 매질 중에 용해될 수 있는 멸균 고체 제형 형태의 멸균제를 혼입시킴으로써 멸균될 수 있다.
- [0349] 제형은 또한 내독소 비함유일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "내독소 비함유"는 최대 미량 (즉, 대상체에 생리학적으로 해로운 효과를 갖지 않는 양)의 내독소 및 바람직하게는 검출불가능한 양의 내독소를 함유하는 조성물 또는 제형을 지칭한다. "내독소를 실질적으로 함유하지 않는"은 생물체계에 대해 FDA에 의해 허용되는 것(1일당 5 EU/kg 체중의 총 내독소이며, 평균 70kg의 인간에 있어서 세포의 전체 용량 당 350 EU임)보다 세포 용량 당 내독소가 더 적음을 의미한다. 한 구체예에서, 용어 "내독소 비함유"는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 내독소 비함유인 조성물 또는 제형을 지칭한다. 내독소는 그람-양성 박테리아 예컨대, 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)에서 발견될 수 있지만, 내독소는 특정 박테리아, 전형적으로 그람-음성 박테리아와 관련된 독소이다. 가장 일반적인 내독소는 다양한 그람-음성 박테리아의 외막에서 발견되며, 이들 박테리아의 질환 초래 능력에서 중심적인 병원성 특징을 나타내는 리포폴리사카라이드(LPS) 또는 리포올리고사카라이드(LOS)이다. 인간에서 소량의 내독소는 다른 해로운 생리학적 효과 중에서 열, 혈압 저하 및 염증 및 응고 활성화를 일으킬 수 있다. 따라서, 심지어 소량이라도 인간에서 부작용을 초래할 수 있기 때문에, 의약품 용기로부터 대부분 또는 모든 미량의 내독소를 제거하는 것이 종종 바람직하다.
- [0350] 본원에 기술된 약학적 조성물은 대상체로의 조성물 투여시 조성물에 함유된 활성 성분이 생물학적으로 이용가능하게 되도록 제형화된다. 예를 들어, 본원에 기술된 약학적 조성물은 Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제 및/또는 소분자를 적절한 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합함으로써 제조될 수 있으며, 컷바퀴 투여, 경고막적 심지 또는 카테터, 또는 비경구 투여 예를 들어, 컷바퀴내, 경고막적 또는 와우내 주입에 적합한 제형을 포함하는 고체, 반고체, 액체, 겔 및 미소구체의 제조물로 제형화될 수 있다. 그러나, 특정 구체예에서, 대상 화합물은 단순히 멸균수에 용해되거나 현탁될 수 있다.
- [0351] Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제 또는 유도체 및/또는 소분자의 코팅, 겔 또는 캡슐화 제형이 또한 박동성, 지속성 또는 연장된 방출을 전달하도록 제형화될 수 있다. 예를 들어, 박동성 방출의 한 방법은 작용제 또는 유도체 및/또는 소분자의 다중 코팅을 적층하거나, 상이한 방출 시간을 갖는 제형의 상이한 영역 내부에 작용제 유도체 및/또는 소분자를 혼입시킴으로써 달성될 수 있다.

- [0352] 주입용 데포트 제형은 생물분해성 중합체에서 조성물의 마이크로캡슐화 매트릭스를 형성시킴으로써 제조될 수 있다. 생물분해성 중합체의 예는 비제한적으로, 폴리락티드-폴리글리콜리드, 폴리(오르토포스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 중합체에 대한 조성물의 비 및 사용된 특정 중합체의 성질은 조성물로부터 Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제, 또는 유도제 및/또는 소분자의 방출률에 영향을 미칠 수 있다. 데포트 주입형 제형은 또한 리포솜 또는 마이크로에멀전에서 약물을 포획함으로써 제조될 수 있다.
- [0353] 약학적 조성물은 조성물 중 Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제 유도제 및/또는 소분자, 예를 들어, 생체적합성 중합체 및/또는 겔의 느린 또는 제어된 방출을 제공하는 조성물의 활성 성분 예를 들어, 침투 증강제, 안정화제 및 하나 이상의 성분의 생체이용율을 향상시키는 하나 이상의 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0354] 특정 구체예에서, 침투 증강제를 포함하는 조성물은 중이와 내이를 분리하는 생물학적 장벽 예를 들어, 정원창을 가로질러 조성물 전달을 촉진하여 치료학적 유효량의 조성물을 내이로 효율적으로 전달할 것이다. 와우, 코르티 기관 및/또는 전정 기관으로의 효과적인 전달이 요구되는데, 왜냐하면 이들 조직이 본원에 기재된 조성물로 처리되거나 접촉될 때 감각 털세포 재생을 촉진하는 지지 세포를 관리하기 때문이다.
- [0355] "침투 증강제" 또는 "투과성 증강제"는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 글리세롤 (글리세린), 말티톨, 소르비톨 등; 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 아존, 벤즈알코늄 클로라이드 (ADBAC), 세틸페리듐 클로라이드, 세틸메틸암모늄 브로마이드, 텍스트란 설페이트, 라우르산, 멘톨, 메톡시 살리실레이트, 올레산, 포스파티딜콜린, 폴리옥시에틸렌, 폴리소르베이트 80, 소듐 글리콜레이트, 소듐 라이릴 설페이트, 소듐 살리실레이트, 소듐 타우로콜레이트, 소듐 타우로데옥시콜레이트, 설펝시드, 소듐 데옥시콜레이트, 소듐 글리코데옥시콜레이트, 소듐 타우로콜레이트 및 계면활성제 예컨대, 소듐 라우릴 설페이트, 라우레트-9, 세틸피리듐 클로라이드 및 폴리옥시에틸렌 모노알킬 에테르, 벤조산 예컨대, 소듐 살리실레이트 및 메톡시 살리실레이트, 지방산 예컨대, 라우린산, 올레산, 운데칸산 및 메틸 올레레이트, 지방 알콜, 예컨대, 옥타놀 및 노난올, 라우로카프람, 사이클로텍스트린, 티몰, 리모넨, 우레아, 키토산 및 기타 천연 및 합성 중합체를 포함한다.
- [0356] 기타 침투 증강제는 비제한적으로, 미국 특허 출원 공개 번호 US20110166060에 기술된 것들을 포함한다.
- [0357] 본원에 기술된 용액에 포함시키기에 적합한 폴리올은 글리세롤 및 당 알콜 예컨대, 소르비톨, 만니톨 또는 자일리톨, 폴리에틸렌 글리콜 및 이의 유도체를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 보존제를 추가로 포함한다. 허용되는 보존제 예컨대, 벤즈알코늄 클로라이드 및 디소듐 에테데이트 (EDTA)는 조성물의 중량을 기준으로 하여 약 0.0001 내지 0.1%의 효과적인 항균 작용에 충분한 농도로 본원에 기술된 조성물 중에 포함된다.
- [0358] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 또한 생체내에서 조성물의 치료학적 수명을 증가시키기 위해 안정화제를 포함한다. 예시적인 안정화제는 지방산, 지방 알콜, 알콜, 장쇄 지방산 에스테르, 장쇄 에테르, 지방산의 친수성 유도제, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 에테르, 폴리비닐 알콜, 탄화수소, 소수성 중합체, 흡습 중합체 및 이들의 조합물을 포함한다. 추가의 구체예에서, 선택된 안정화제는 제형의 소수성을 변경하거나(예를 들어, 올레산, 왁스) 제형의 다양한 구성 성분의 혼합을 향상시키고/거나(예를 들어, 에타놀) 제형중의 수분 수준에 영향을 미치고/거나 (예를 들어, PVP 또는 폴리비닐 피롤리돈), 상의 이동성에 영향을 미치고/거나 (실온보다 높은 용융점을 갖는 물질 예컨대, 장쇄 지방산, 알콜, 에스테르, 에테르, 아마이드 등 또는 이들의 혼합물; 왁스), 캡슐화 물질과의 제형의 혼화성을 향상시킨다 (예를 들어, 올레산 또는 왁스). 다른 구체예에서, 안정화제는 조성물 중의 Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제 유도제의 분해를 억제하기에 충분한 양으로 존재한다. 이러한 안정화제의 예는 비제한적으로, (a) 약 0.5% 내지 약 2% w/v 글리세롤, (b) 약 0.1% 내지 약 1% w/v 메티오닌, (c) 약 0.1% 내지 약 2% w/v 모노티오글리세롤, (d) 약 1 mM 내지 약 10 mM EDTA, (e) 약 0.01% 내지 약 2% w/v 아스코르브산, (f) 0.003% 내지 약 0.02% w/v 폴리 소르베이트 80, (g) 0.001% 내지 0.05% w/v 폴리소르베이트 20, (h) 아르기닌, (i) 헤파린, (j) 텍스트란 설페이트, (k) 사이클로텍스트린, (l) 펜토산 폴리설페이트 및 기타 헤파리노이드, (m) 이가 양이온 예컨대, 마그네슘 및 아연; 또는 (n) 이들의 조합물을 포함한다.
- [0359] 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 제어 방출 제형으로서 제형화된다. 일반적으로, 제어된 방출 약물 제형은 생체내에서 방출 부위 및 방출 시간과 관련하여 약물의 방출에 대한 제어를 제공한다. 제어 방출은 즉각 방출, 지연 방출, 지속 방출, 연장 방출, 가변 방출, 박동 방출 및 이중형태 방출을 포함한다.
- [0360] 제어 방출에 의해 제공된 장점은 덜 빈번한 투약; 더욱 효율적인 약물 사용; 생체내 치료 부위에서 전달 장치 또는 제형의 배치에 의한 국소적 약물 전달; 및 단일 투약 유닛에 의해, 각각 고유의 방출 프로파일을 갖는 2개

이상의 상이한 약물을 투여 및 방출하거나 상이한 속도 또는 상이한 기간 동안 동일한 약물을 방출할 기회를 포함한다.

- [0361] 제어된 방출 제형은 조성물을 생체적합성 중합체, 점성제, 겔, 페인트, 포움, 제로겔, 미세입자, 하이드로겔, 나노캡슐, 및 열가역성 겔, 또는 이들의 조합물로 제형화시킴으로써 제조될 수 있다. 특정 구체예에서, 중합체 또는 겔은 생분해성이다. 방출 특성은 종종 조성물을 제형화시키는데 사용된 중합체 또는 겔의 특정 조합에 의해 제어된다. 이들 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다.
- [0362] 본 발명의 생물학적 활성 조성물을 제형화시키기에 적합한 예시적인 중합체는 비제한적으로, 폴리아미드, 폴리 카르보네이트, 폴리알킬렌 (폴리에틸렌 글리콜 (PEG)), 아크릴 및 메타크릴 에스테르의 중합체, 폴리비닐 중합체, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 이들의 공-중합체, 셀룰로스, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 락트산과 글리콜산의 중합체, 폴리아나하이드라이드, 폴리(오르토)에스테르, 폴리(부티르산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 폴리사카라이드, 단백질, 폴리히알루론산, 폴리시아노아크릴레이트, 및 이들의 블렌드, 혼합물 또는 공중합체를 포함한다.
- [0363] 한 구체예에서, 본 발명의 생물학적 활성 조성물은 ABA-유형 또는 BAB-유형 삼블록 공중합체 또는 이들의 혼합물로 제형화되며, 여기서 A-블록은 비교적 소수성이며 생분해성 폴리에스테르 또는 폴리(오르토에스테르)를 포함하며 B-블록은 상대적으로 친수성이며 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 생분해성의 소수성 A 중합체 블록은 폴리에스테르 또는 폴리(오르토 에스테르)를 포함하며, 여기에서 폴리에스테르는 D,L-락티드, D-락티드, L-락티드, D,L-락트산, D-락트산, L-락트산, 글리콜리드, 글리콜산, ϵ -카프로락톤, ϵ -하이드록시헥사노익산, γ -부티로락톤, γ -하이드록시부티르산, δ -발레로락톤, δ -하이드록시발레르산, 하이드록시부티르산, 말산, 및 이들의 공중합체로 구성된 군으로부터 선택된 단량체로부터 합성된다.
- [0364] 본원에 기술된 조성물 제형화에 사용하는데 적합한 예시적인 점성제는 비제한적으로, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸 셀룰로스, 폴리비닐 알콜, 소듐 콘드로이틴 설페이트, 소듐 히알루로네이트, 아카시아 (검 아라빅), 아가, 아가로스, 알루미늄 마그네슘 실리케이트, 소듐 알기네이트, 소듐 스테아레이트, 블래더랙(bladderwrack), 벤토나이트, 카르보머, 카라게난, 카르보폴, 잔탄, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스 (MCC), 세라토니아, 키틴, 카르복시메틸화된 키토산, 콘드루스, 텍스트로스, 푸르셀라란, 겔라틴, 가티 검, 구아르 검, 헥토라이트, 락토스, 수크로스, 말로텍스트린, 만니톨, 소르비톨, 허니, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 겔라틴, 스테르쿨리아 검, 잔탄 검, 검 트레가칸트, 에틸 셀룰로스, 에틸하이드록시에틸 셀룰로스, 에틸메틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시메틸메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 폴리(하이드록시에틸 메타크릴레이트), 옥시폴리겔라틴, 펙틴, 폴리겔린, 포비돈, 프로필렌 카르보네이트, 메틸 비닐 에테르/말레산 무수물 공중합체(PVM/MA), 폴리(메톡시에틸 메타크릴레이트), 폴리(메톡시에톡시에틸 메타크릴레이트), 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로스(HPMC), 소듐 카르복시메틸-셀룰로스(CMC), 실리콘 디옥사이드, 또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP: 포비돈)을 포함한다.
- [0365] 겔 제형 제조에 사용하기에 적합한 겔화제는 비제한적으로, 셀룰로스, 셀룰로스 유도체, 셀룰로스 에테르 (예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 하이드록시프로필셀룰로스, 메틸셀룰로스), 구아르 검, 잔탄 검, 로커스트 빈 검, 알기네이트 (예를 들어, 알긴산), 실리케이트, 전분, 트레가칸트, 카르복시비닐 중합체, 카라기난, 파라핀, 석유 및 이들의 임의의 조합물 또는 혼합물을 포함한다.
- [0366] 다양한 적합한 생체적합성 중합체가 귀로의 화합물의 전달에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 중합체는 겔을 형성할 수 있다. 생체적합성 중합체를 형성하기에 적합한 겔의 예는 히알루론산, 히알루로네이트, 레시틴 겔, (폴리)알라닌 유도체, 플루노닉, 폴리(에틸렌글리콜), 폴록사머, 키토산, 자일로글루칸, 콜라겐, 피브린, 폴리에스테르, 폴리(락티드), 폴리(글리콜리드) 또는 이들의 공중합체 PLGA, 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 글리세롤 모노올레에이트를 포함한다.
- [0367] 히알루론산은 물에 결합하여 고점도의 생분해성 겔을 형성하는 자연-발생 생체적합성 폴리사카라이드이다. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)은 생체적합성 중합체, 친수성 중합체이다.
- [0368] 저온에서 유체이나, 더 높은 온도에서는 더욱 점성인 열경화성 중합체가 또한 적합하다. 일반적인 가역적 열경화성 시스템은 폴록사머이다. 용해되면, 용액은 저온에서 액체 상태로 유지될 수 있으나, 온도가 증가하면 더욱 점성의 고체-유사 임플란트를 형성할 수 있다.

- [0369] 키토산은 생체적합성이며, 항균성을 가지며, 키토산-글리세롤포스페이트 용액은 가역성 열경화성 겔을 형성할 수 있다.
- [0370] 겔은 또한, 효소로 분해가능한 폴리펩티드 중합체로부터 형성될 수 있다. 폴리펩티드 중합체에서 폴리펩티드 결합은 PEG/PLGA 중합체 시스템에서 에스테르 결합보다 가수분해에 대해 더욱 안정적이며, 폴리펩티드는 또한 제 2 중합체 블록에 결합되어 그래프트 또는 선형 중합체를 형성하는 생물분해성 폴리펩티드 블록을 갖는 생물분해성 중합체를 또한 포함할 수 있다. 폴리펩티드 중합체의 예는 폴리(알라닌) 및 이의 유도체이다. 폴리펩티드 담체는 또한, 피브린으로서 공지된 단백질 매트릭스일 수 있다. 피브리노겐은 자연 발생 단백질이며, 이는 또 다른 자연 발생 단백질인 효소 트롬빈과 조합되는 경우 피브린으로서 공지된 생물-매트릭스를 형성한다.
- [0371] 기타 생체적합성 중합체는 전분, 셀룰로스, 젤라틴-플루로닉, 테트로닉을 포함하며, 후자 두개는 폴리(에틸렌 옥사이드)/폴리(프로필렌 옥사이드) 물질이다. 사용될 수 있는 기타 물질은 콘드로이틴 설페이트 및 일반적 부류의 무코폴리사카라이드 (예를 들어, 글리코사미노글리칸)을 포함하며, 기타 생체적합성 중합체는 히알루론산과 유사한 특징을 갖는다.
- [0372] 일부 예에서, 생체적합성 중합체는 가교될 수 있다. 생물분해성 물질을 위한 다양한 가교제는 당업계에 공지되어 있다. 바람직하게는, 전달 유닛을 위한 최종 가교된 물질이 실질적으로 비독성인 되도록 가교가 달성된다 (예를 들어, 열가교, 감마선 조사, 자외선 조사, 화학적 가교 등을 이용하여). 일반적으로, 가교 정도는 성형된 중합체 구조에 의한 물의 팽창 또는 흡수 정도에 반비례한다. 팽창 또는 수분 흡수의 정도는 중합체 구조에 의한 약물 전달 속도를 조절한다.
- [0373] 일부 구체예에서, 약물은 예를 들어, 피어싱, 주사 등에 의해 고막을 가로질러 투여된다. 일부 구체예에서, 약물은 피어싱 없이 고막을 가로질러 투여되며, 예를 들어, 고막을 가로질러 흡수된다.
- [0374] 일부 구체예에서, 제형은 충분히 점성이어서 적합한 기간 예를 들어, 1분, 5분, 10분, 30분, 1시간, 5시간, 12시간, 1일, 2일, 7일 동안 투여 영역에 유지되는 것이 바람직하다. 요망되는 영역은 수용 대상체가 똑바로 있을 때 고막 외부에 그러나, 고막과 접촉되어 있을 수 있으며, 예를 들어, 용액 층이 고막과 접촉된채 (예를 들어, 귀 밖으로 흐르지 않게) 유지되는 것이 바람직할 수 있다; 점성 제형의 일부가 외이도 밖으로 나가는 경우에도, 일부 구체예에서, 층의 점성 필름은 고막과 접촉된채 남아 있을 수 있다. 유사하게는, 구체예에서, 예를 들어, 고막을 가로질러 투여된다.
- [0375] 일부 구체예에서, 제형은 약물로 로딩되는 동안 신속하고 재생가능하도록 액체-겔 전이를 조절함으로써 조정될 수 있음을 이해해야 한다.
- [0376] 한 담체인 폴록사머 407에 있어서, 겔화는 적어도 약물의 부재하에 폴록사머 407의 농도가 증가함에 따라 감소할 수 있다. 일부 약물 예를 들어, VPA 및 pVc를 포함하는 친수성 약물의 각각 88mg/ml 및 14mg/ml 초과 농도의 첨가는 폴록사머-407 용액의 겔화를 억제하였다. 따라서, 겔은 각각 88mg/ml 및 14mg/ml 또는 그 미만이 되는 VPA 및 pVc의 농도의 18% (w/w) 폴록사머 용액을 사용하여 제조되었다. CHIR, Repsox 및 TTNPB를 포함하는 소수성 약물을 DOSO 중의 이들의 모액으로부터 적절한 용적으로 친수성 약물을 함유하는 폴록사머-407 용액에 첨가하여 4℃에서 피펫팅에 의해 혼합하였다. 모액에서 약물의 농도는 CHIR, Repsox 및 TTNPB에 있어서 각각 55.6-69.5 mg/ml, 23-28.75 mg/ml 및 35 mg/ml로 유지되어 최종 제형 중의 총 DMSO 농도가 5-6% 미만이 되도록 보장하였다. 더 높은 농도의 DMSO는 제형의 겔화 온도를 현저히 저하시켰다. 최종 제형은 저장 온도 (4℃)에서 점성 액체이며, 이의 액체-겔 전이 온도 (37℃)를 초과하면 반고체 겔을 형성하였다.
- [0377] 일부 경우, 조성물의 점도는 25℃에서 100,000 센티포이즈 (cps) 미만이다. 조성물은 또한, 고막에 붙여 제형을 유지시키기에 충분한 최소 항복 응력을 갖는다. 항복 응력은 고체 물질이 추가의 응력 증가 없이 변형이 계속되게 하는 액체-유사 거동을 나타내게 하는 힘의 양이다. 최소 항복 응력은 적용된 겔의 두께에 따라 다르지만 겔의 형상(geometry)과 환경 온도와는 무관하다. 조성물의 최소 항복 응력은 두께가 4 mm이고 밀도가 1 g/L인 도포된 겔을 나타낸다. 항복 응력 (σ_0)은 $\sigma_0 = \rho gh$ 로 표현되며, 여기에서 ρ 는 밀도이며, g 는 중력 가속도이고, h 는 층 두께이다. 전형적으로, 최소 항복 응력은 약 39 파스칼 (Pa)이다.
- [0378] 점도유발제(viscogenic agent)는 전형적으로 중합체 또는 유체의 점도를 증가시키는 기타 화학적 모이어티이다. 조성물에 포함되는 경우 적합한 점성유발제는 조성물이 25℃에서의 액체-유사 상태 (예를 들어, 유동성)로부터 고막과의 접촉 후 고체-유사 상태 (예를 들어, 겔)로 변형되게 하며, 비-생물분해성일 수 있다 (예를 들어, 포유동물에 자연적으로 존재하는 화학물질 또는 효소에 의해 분해되지 않거나 생물분해성이 아님). 조성물은 25℃에서 100,000cps 미만 (예를 들어, 90,000, 60,000, 30,000, 20,000, 또는 10,000 cps 미만)의 조성물 점도 및

일반적으로, 고막에 적용된 후 39Pa의 최소 항복 응력을 갖게 하기에 효과적인 양의 점성유발제를 포함한다. 전형적으로, 조성물은 0.05 내지 50%의 점성유발제 (예를 들어, 0.15 내지 25, 5 내지 45, 10 내지 40, 12 내지 37, 15 내지 35, 17 내지 33, 또는 20 내지 30 %의 점성유발제)를 포함한다.

[0379] 예시적인 점성유발제는 젤란 (GELRITE 또는 KELCOGEL), 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 (HPMC)를 갖는 CARBOPOL 940, 소듐 아크릴레이트 및 n-N-알킬아크릴아미드를 갖는 N-이소프로필 아크릴아미드 (NiPAAm), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 갖는 폴리아크릴산 또는 PEG를 갖는 폴리메타크릴산, 셀룰로스 아세테이트 하이드로겐 프탈레이트 라텍스 (CAP), 소듐 알기네이트, 및 비이온성 계면활성제 예컨대, 플록사머 (PLURIONIC) 및 폴리옥사민 (TETRONIC) 가역적 온도 의존성 겔화 시스템을 포함한다. 젤란은 슈도모나스 엘로데아 (*Pseudomonas elodea*)가 분비하는 천연 중합체인 음이온성 탈아세틸화된 세포외 다당류이다. 사당류 반복 단위는 하나의 α -L-람노스, 하나의 β -D-글루쿠론산, 및 2개의 β -D-글루코스 모이어티로 구성된다. 젤란의 원위치 겔화 메카니즘은 양이온-유도되고 (예를 들어, 칼슘 이온의 존재), 온도-의존적 (예를 들어, 생리학적 온도)이다. 겔화는 열적으로 가역적이다. HPMC 겔을 갖는 CARBOPOL 940은 pH-의존적 방식으로 원위치에서 겔 상태이다. CARBOPOL은 겔화제이며, HPMC는 겔의 점도를 향상시키는데 사용된다. 소듐 아크릴레이트 및 n-N-알킬아크릴아미드를 갖는 NiPAAm은 온도 기반 가역적 졸-겔 변환을 겪을 수 있는 삼원중합체 하이드로겔이다. 소듐 아크릴레이트 및 n-N-알킬아크릴아미드는 하이드로겔의 특성 및 특히, 전이 온도를 변경하는데 사용된다.

[0380] PEG를 갖는 폴리아크릴산 또는 PEG를 갖는 폴리메타크릴산은 수소 결합을 기초로 한 젤인 것으로 생각된다. 폴리아크릴산은 하이드로알콜 용액에 용해될 수 있고, 이후 주사될 수 있고, 알콜이 확산되어 중합체가 침전되도록 하고, 용액을 겔화시킨다. CAP는 pH-의존성 방식으로 겔화되는 나노미립자 시스템이다. 활성 화합물(약리학적 작용제)은 중합체 입자의 표면으로 부분적으로 흡착된다. 소듐 알기네이트는 칼슘 또는 다른 다가 이온의 존재하에서 겔화된다.

[0381] 플록사머는 폴리(옥시에틸렌)-폴리(옥시프로필렌)-폴리(옥시에틸렌)의 트리블록으로 배열된 트리블록 공중합체 (즉, 친수성 폴리(옥시에틸렌) 블록 및 소수성 폴리(옥시프로필렌) 블록)이다. 플록사머는 프로필렌 옥사이드 블록 소수성 및 에틸렌 옥사이드 친수성을 갖는 블록 공중합체 표면활성제의 한 부류이다. 플록사머는 상업적으로 이용 가능하다(예를 들어, Pluronic® 폴리올은 BASF Corporation으로부터 이용 가능하다). 대안적으로, 플록사머는 공지된 기술에 의해 합성될 수 있다.

[0382] 본원에 기재된 제형은 흡입 또는 정맥내, 복막내, 근내, 피하, 점막피부, 경구, 직장, 경피, 국소, 협측, 피내, 위내, 피내, 비내, 협내, 경피 또는 설하 투여에 적합하다. 특정 구체예에서, 투여는 중이로의 주사 뿐만 아니라 고막으로의 국소 투여를 통한다. 제형은 또한 내이로 직접 투여될 수 있다. 제형은 생체재료, 용액, 장치(보청기, 와우 이식물, 헤드폰, 및 이어버드(earbud)를 포함하나, 이에 제한되지는 않음)를 포함하는 다수의 비히클을 통해 투여될 수 있다.

[0383] 약학적 조성물은 경피 전달 시스템(패치 필름), 점적제, 환약, 정제, 필름-코팅된 정제, 다층 정제, 젤, 연고, 시럽, 과립, 좌약, 에멀전, 분산액, 미세캡슐, 나노입자, 마이크로입자, 캡슐, 분말 또는 주사용 용액의 형태로 제조되고 투여될 수 있다. 약학적 제형은 바람직하게는 리포솜, 에멀전 및 젤 및 이들의 조합물의 형태이다.

[0384] 본원에 기재된 구체예는 또한 본원에 기재된 적어도 하나의 화합물 또는 이의 염을 이용하여 제조된 약학적 조성물을 포함한다.

[0385] 약학적 조성물은 또한 약리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및/또는 용매를 함유할 수 있다.

[0386] 상기 제형은 흡입 또는 정맥내, 복막내, 근내, 피하, 점막피부, 경구, 직장, 경피, 국소, 협측, 근내, 위내, 피내, 비내, 협내, 경피 또는 설하 투여에 적합하다. 특정 구체예에서, 투여는 중이로의 주사 뿐만 아니라 고막으로의 국소 투여를 통한다.

[0387] 약학적 조성물은 경피 전달 시스템(패치 필름), 점적제, 환약, 정제, 필름-코팅된 정제, 다층 정제, 젤, 연고, 시럽, 과립, 좌약, 에멀전, 분산액, 미세캡슐, 캡슐, 분말 또는 주사용 용액의 형태로 제조되고 투여될 수 있다. 약학적 제형은 리포솜, 에멀전 및 젤의 형태일 수 있다.

[0388] 좌약을 제조하기 위해, 저 융해 왁스, 지방산 에스테르 및 글리세라이드가 이용될 수 있다. 베타-카르볼린의 임의의 투여 경로를 위한 약학적 조성물은 β -카르볼린 및 필요시 무기 또는 유기 고체 또는 액체의 약학적으로 허용되는 담체의 양에 대해 충분한 치료 효과를 함유한다. 장관 또는 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 정제 또는 젤라틴 캡슐 또는 수용액 또는 현탁액을 포함한다.

- [0389] 약학적 조성물은 멸균될 수 있고/있거나, 애쥘번트, 예를 들어, 보존제, 안정화제, 습윤제 및/또는 유화제, 삼투압을 조절하기 위한 염 및/또는 완충제를 함유할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 필요시 다른 활성 성분을 함유할 수 있다. 이들 약학적 조성물은 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있고, 예를 들어, 통상적 방법, 예를 들어, 혼합, 과립화, 패키징, 및 동결건조 용액에 의해 제조될 수 있고, 이는 동결건조물 내에서 약 0.01 내지 100 퍼센트, 바람직하게는 0, 1, 및 50 퍼센트의 범위일 수 있고, 100 퍼센트 이하의 β -카르볼린을 함유한다.
- [0390] 국소 투여를 위한 본 발명의 특정 조성물은 다른 약학적으로 허용되는 물질 및/또는 물질일 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 귀, 귀내 또는 외이도에 존재하는 경우 혈액 순환계 또는 중추신경계의 베타-카르볼린 및 임의로 추가의 활성 성분 또는 성분들의 전달을 증가시키지 않는 국소 부형제가 선택된다. 예를 들어, 국소 부형제는 점막을 통한 전신 순환계의 경피 전달을 향상시키는 실질적인 배제 특성을 갖지 않는 것이 바람직할 수 있다. 상기 담체는 하이드로-카르복실산, 예를 들어, 무수 흡수성 친수성 광유(바셀린) 및 무수 라놀린(예를 들어, 아쿠아포르(Aquaphor)), 및 물-오일 에멀전을 기초로 한 수단, 예를 들어, 라놀린 및 콜드 크림을 포함한다. 특정 구체예는 실질적으로 배타적이지 않고, 통상적으로 수용성인 지지 물질, 뿐만 아니라 수용성 에멀전을 기초로 한 물질(크림 또는 친수성 연고) 및 수용성 베이스 물질, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜-기반 부형제 및 다양한 작용제, 예를 들어, 메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스 및 하이드록시프로필메틸셀룰로스로 젤화된 다양한 용액을 포함하는 담체를 포함한다.
- [0391] 미국 특허 번호 5,837,681호 및 6,593,290호에 언급된 모든 전달 방법 및 물질은 참조로서 본원에 포함된다.
- [0392] 요망시, 투여되는 조성물은 또한 적은 양의 비독성 보조 담체 또는 부형제 물질, 예를 들어, 습윤제, 유화제, 또는 용해보조제, 항산화제, 향미생물제, pH 완충제 등, 예를 들어, 소듐 아세테이트, 소듐 시트레이트, 사이클로덱스트린 유도체, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 아세테이트, 트리에탄올아민 올레이트 등을 함유할 수 있다. 상기 투여 형태를 제조하는 실제 방법은 공지되어 있거나, 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 20th Edition, 2000]을 참조한다. 투여되는 조성물 또는 제형은 임의의 경우에 치료되는 대상체의 증상을 경감시키는 데 효과적인 양으로 일정량의 활성 화합물을 함유할 것이다. 당업자가 인지할 바와 같이, 본원에 기재된 작용제는 또한 대상체에서 조직 또는 세포의 부분집합으로의 표적화된 전달을 위해 제형화될 수 있다. 일반적으로, 표적화된 전달은 작용제의 화합물과 표적화 모이어티를 제형화시킴으로써 달성된다. 상기 모이어티는 지질, 리포솜, 및 생체 내에서 다른 분자에 결합하거나 결합되는 분자에 대한 리간드를 포함한다.
- [0393] 작용제(예를 들어, 합성 또는 천연) 또는 이의 컨쥬게이트의 임의의 유래 형태는 산 또는 염기 염 뿐만 아니라 유리 산 또는 유리 염기 형태로 제조될 수 있다. 청력 기능이상을 예방하거나 치료하기 위해 사용되는 경우 상기 조성물은 본원에 기재된 특정 구체예에 포함된다.
- [0394] 일부 구체예에서, 본원의 조성물은 또한 Lgr5를 발현하지 않는 지지 세포를 표적으로 한다. 특정 구체예에서, 지지 세포의 증식을 촉진하는 것에 더하여 본원에 기재된 작용제는 또한 지지 세포의 청력을 향상시키는 것을 도울 수 있는 세포 유형으로의 분화에 영향을 미친다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 작용제는 또한 지지 세포의 생존에 영향을 미친다.
- [0395] 치료에 사용하기에 필요한 작용제의 양은 선택되는 특정 작용제 및 염 뿐만 아니라 다른 요인 중에서 투여 경로, 치료되는 질환의 특성, 및 환자의 연령 및 상태에 따라 다양할 수 있고, 궁극적으로는 주치의 또는 임상 의의 판단에 따라 결정된다. 요망되는 용량은 편리하게는 단일 용량 또는 적절한 간격, 예를 들어, 하루에 2, 3, 4회 이상의 하위-용량으로 투여되는 나누어진 용량으로 제공될 수 있다. 하위-용량 자체는 다수의 별개의 떨어진 간격의 투여, 예를 들어, 환약 용량 또는 액체 용량의 다수의 섭취로 추가로 나누어질 수 있다.
- [0396] 또한, 작용제, 및 이의 각각의 산 또는 염기 염은 액체, 바람직하게는 저장 및 투여를 위한 수성 제형 뿐만 아니라, 예를 들어, 투여를 위해 분말로 이용될 수 있거나, 대상체로의 투여 직전에 액체 형태로 재구성될 수 있는 건조된 제형으로 제형화될 수 있다. 액체의 약학적으로 투여 가능한 조성물은, 예를 들어, 수성 담체 중에 특정 작용제 및 임의의 약학적 애쥘번트를 용해시키거나, 분산시키거나 그 밖의 수단에 의해 제조될 수 있다. 수성 담체는 물(특히, 인간으로의 주사를 위한 물), 알콜성/수성 용액, 에멀전 및 현탁액을 포함한다. 약학적으로 허용되는 수성 담체는 멸균 완충된 등장성 염수 용액을 포함한다. 비히클은 소듐 클로라이드 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스, 및 소듐 클로라이드, 락테이트화 링거액, 또는 고정유를 포함할 수 있다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제, 전해질 보충제(예를 들어, 링거 텍스트로스를 기초로 한 것) 등을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예를 들어, 향미생물제, 항산화제, 킬레이트제, 및 비활성 가스 등이 또한 제공될 수 있다. 프

로필렌 글리콜, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예를 들어, 올리브유, 및 주사용 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레이트를 포함하는 비수성 용매가 또한 이용될 수 있다. 건조되거나 액체이건 간에 작용제의 건강기능식품, 약학적 및 수의 조성물은 바람직하게는 경구 투여를 위해 제형화될 수 있다.

[0397] 본원에서 사용되는 페인트(필름 형성제로도 공지됨)는 용매, 단량체 또는 중합체, 활성화제, 및 임의로 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제로 구성된 용액이다. 조직으로의 적용 후, 용매는 증발되어 단량체 또는 중합체, 및 활성화제로 구성된 얇은 코팅을 남긴다. 비제한적인 예로, 페인트는 콜로디온(예를 들어, 가요성 콜로디온, USP), 및 당류 실록산 공중합체 및 가교제를 포함하는 용액을 포함한다. 본원에서 사용하기 위해 고려되는 페인트는 이들이 귀를 통한 기압과의 전파를 방해하지 않도록 가요성이다. 추가로, 페인트는 액체(즉, 용액, 현탁액, 또는 에멀전), 반고체(즉, 젤, 포말, 페이스트, 또는 젤리) 또는 에어로졸로 적용될 수 있다.

[0398] 본원에 개시된 조성물에서 사용하기에 적합한 포말 형성 가능한 담체의 예는 알기네이트 및 이의 유도체, 카르복시메틸셀룰로스 및 이의 유도체, 콜라겐, 다당류, 예를 들어, 텍스트란, 텍스트란 유도체, 펙틴, 전분, 변형된 전분, 예를 들어, 추가의 카르복실 및/또는 카르복사미드기를 갖고/갖거나 친수성 측쇄를 갖는 전분, 셀룰로스 및 이의 유도체, 아가 및 이의 유도체, 예를 들어, 폴리아크릴아미드, 폴리에틸렌 옥사이드, 글리콜 메타크릴레이트로 안정화된 아가, 젤라틴, 검, 예를 들어, 잔툼(xanthum), 구아(guar), 카라야(karaya), 젤란(gellan), 아라빅(arabic), 트래거캔스(tragacanth) 및 로커스트 빈 검(locust bean gum), 또는 이의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 제형은 임의로 표면활성제 또는 외부 분사제를 포함하는 포말의 형성을 촉진하는 발포제를 추가로 포함한다. 적합한 발포제의 예는 세트리미드, 레시틴, 비누, 실리콘 등을 포함한다. 상업적으로 이용 가능한 계면활성제, 예를 들어, TweenTM이 또한 적합하다.

[0399] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 방법을 실시하는데 유용한 젤 제형은 글리세린-기반 젤, 글리세린-유도 화합물, 컨쥬게이션되거나, 가교된 젤, 매트릭스, 하이드로젤, 및 중합체, 뿐만 아니라 젤라틴 및 이의 유도체, 알기네이트, 및 알기네이트-기반 젤, 및 다양한 천연 및 합성 하이드로젤 및 하이드로젤-유도 화합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0400] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 조성물은 조성물의 중량을 기준으로 약 0.01% 내지 약 90%>, 약 0.01) 내지 약 50%), 약 0.1% 내지 약 70%>, 약 0.1% 내지 약 50%, 약 0.1% 내지 약 40%>, 약 0.1% 내지 약 30%, 약 0.1%) 내지 약 20%, 약 0.1% 내지 약 10%, 또는 약 0.1% 내지 약 5%)의 각각의 활성 성분의 각각의 약학적 활성 성분(즉, Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제 또는 이의 유도체, 소분자, 약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체, 또는 토토머)의 농도를 갖는다.

[0401] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 조성물은 조성물의 중량을 기준으로 약 1% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 또는 약 10% 내지 약 30%의 활성 성분 또는, 이의 약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체, 또는 토토머의 각각의 활성 약학적 작용제의 농도를 갖는다.

[0402] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 제형은 제형의 부피를 기준으로 약 0.1 내지 약 70 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 70 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 약 1 mg 내지 약 70 mg/mL, 약 1 mg 내지 약 50 mg/mL, 약 1 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 약 1 mg/mL 내지 약 10 mg/mL, 또는 약 1 mg/mL 내지 약 5 mg/mL의 활성화제, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체, 또는 토토머의 활성 약학적 성분의 농도를 갖는다.

[0403] 한 구체예에서, 본원에 개시된 제형은 추가로 조성물로부터의 하나 이상의 약학적 활성 성분(즉, Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제 또는 이의 다른 소분자, 약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체, 또는 토토머)의 즉시 방출, 또는 1분 이내, 또는 5분 이내, 또는 10분 이내, 또는 15분 이내, 또는 30분 이내, 또는 60분 이내 또는 90분 이내의 방출을 제공한다. 다른 구체예에서, 적어도 하나의 약학적 활성 성분(즉, Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제 또는 이의 유도체, 소분자, 약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체, 또는 토토머)의 치료적 유효량은 즉시, 또는 1분 이내, 또는 5분 이내, 또는 10분 이내, 또는 15분 이내, 또는 30분 이내, 또는 60분 이내 또는 90분 이내에 조성물로부터 방출된다.

[0404] 다른 구체예에서, 조성물은 연장 방출 제형으로 제형화된다. 특정 구체예에서, 제형으로부터의 적어도 하나의 약학적 활성 성분(Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성화제, 이의 소분자, 약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체, 또는 토토머를 포함함)의 확산은 5분, 또는 15분, 또는 30분, 또는 1시간, 또는 4시간, 또는 6시간, 또는 12시간, 또는 18시간, 또는 1일, 또는 2일, 또는

는 3일, 또는 4일, 또는 5일, 또는 6일, 또는 7일, 또는 10일, 또는 12일, 또는 14일, 또는 18일, 또는 21일, 또는 25일, 또는 30일, 또는 45일, 또는 2개월 또는 3개월 또는 4개월 또는 5개월 또는 6개월 또는 9개월 또는 1년을 초과하는 기간 동안 발생한다. 다른 구체예에서, 적어도 하나의 약학적 활성 성분(Notch 활성제 및/또는 HDAC 억제제 및 GSK3b 억제제 및/또는 WNT 활성제를 포함함)의 치료적 유효량은 5분, 또는 15분, 또는 30분, 또는 1시간, 또는 4시간, 또는 6시간, 또는 12시간, 또는 18시간, 또는 1일, 또는 2일, 또는 3일, 또는 4일, 또는 5일, 또는 6일, 또는 7일, 또는 10일, 또는 12일, 또는 14일, 또는 18일, 또는 21일, 또는 25일, 또는 30일, 또는 45일, 또는 2개월 또는 3개월 또는 4개월 또는 5개월 또는 6개월 또는 9개월 또는 1년을 초과하는 기간 동안 제형으로부터 방출된다.

[0405] 추가 구체예에서, 제형은 즉시 방출 및 연장 방출 제형 둘 모두를 제공한다. 특정 구체예에서, 제형은 0.25:1 비, 또는 0.5:1 비, 또는 1:1 비, 또는 1:2 비, 또는 1:3, 또는 1:4 비, 또는 1:5 비, 또는 1:7 비, 또는 1:10 비, 또는 1:15 비, 또는 1:20 비의 즉시 방출 및 연장 방출 제형을 함유한다. 추가 구체예에서, 제형은 첫번째 약학적 활성 성분(즉, 이의 소분자, 약학적으로 허용되는 염, 프로드러그, 용매화물, 입체이성질체, 라세미체, 또는 토토머)의 즉시 방출 및 두번째 약학적 활성 성분 또는 다른 치료제의 연장 방출을 제공한다. 일부 구체예에서, 제형은 0.25:1 비, 또는 0.5:1 비, 또는 1:1 비, 또는 1:2 비, 또는 1:3, 또는 1:4 비, 또는 1:5 비, 또는 1:7 비, 또는 1:10 비, 또는 1:15 비, 또는 1:20 비의 첫번째 약학적 활성 성분 및 두번째 약학적 활성 성분의 즉시 방출 및 연장 방출 제형을 제공한다.

[0406] 즉시 방출, 지연 방출 및/또는 연장 방출 조성물 또는 제형의 조합물은 다른 약학적 작용제, 뿐만 아니라 부형제, 희석제, 안정화제, 담체 작용제 및 본원에 개시된 다른 성분과 조합될 수 있다. 이와 같이, 조성물의 성분, 요망되는 두께 또는 점도, 또는 선택된 전달 방식에 따라, 본원에 개시된 구체예의 대안적 양태가 이에 따라 즉시 방출, 지연 방출 및/또는 연장 방출 구체예와 조합된다.

[0407] F. 투여

[0408] 특정 구체예에서, 약학적 제형은 정원창막으로 국소적으로 약물을 투여하도록 적합화된다. 약학적 제형은 또한 정원창막을 통한 본원에 언급된 작용제의 통행을 뒷받침하는 막 투과 향상제를 함유할 수 있다. 따라서, 상기 구체예에서, 액체 또는 젤 제형이 이용될 수 있다. 또한, 활성 성분을 경구 적용시키거나, 전달 접근법의 조합물을 이용하는 것이 가능하다.

[0409] 약물 방출을 연장시키고/시키거나 안정성을 개선시키는 장기 작용 제형은 거대분자, 예를 들어, PEG 및 폴리프로필렌 글리콜 동중중합체 및 폴리옥시에틸렌 폴리올로부터 선택된 수용성 중합체, 즉, 실온에서 물에 가용성인 중합체와 복합체화되거나, 공유적으로 컨주게이션된(가역적 또는 비가역적 결합) 본원에 언급된 작용제의 형태일 수 있다. 대안적으로, 본원에 언급된 작용제는 이의 약물 방출 및/또는 반감기를 증가시키기 위해 중합체와 복합체화되거나 이에 결합될 수 있다. 이러한 목적에 유용한 폴리에틸렌 폴리올 및 폴리옥시에틸렌 폴리올의 예는 폴리옥시에틸렌 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨, 폴리옥시에틸렌 글루코스 등을 포함한다. 폴리옥시에틸렌 글리세롤의 글리세롤 백본은, 예를 들어, 모노-, 디-, 및 트리글리세라이드로 동물 및 인간에서 발생하는 동일한 백본이다. 본원에 언급된 작용제는 물질 내에 캡슐화되고/되거나 물질에 컨주게이션될 수 있다. 하나 이상의 작용제의 전달을 위해, 하나 이상의 전달 비히클이 이용될 수 있다. 다수의 작용제에 대한 전달 동역학은 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 한 경우에, 한 약물의 짧은 펄스를 포함시키고, 또 다른 약물이 더 긴 기간 동안 방출되도록 하는 것이 유리할 수 있다.

[0410] 액체 제형은 용액, 현탁액, 에멀전 및 스프레이를 포함한다. 예를 들어, 비경구 주사를 위한 주사 용액, 물-기반 또는 물-프로필렌 글리콜.

[0411] 종이에서의 국소 투여에 적합한 약학적 조성물은 단독으로 또는 담체와 함께 본 발명의 개시의 조성물을 함유하는 동결건조된 제형의 경우에서와 같이 종이에서의 투여 전에 제조될 수 있는 수용액 또는 현탁액을 포함한다. 약학적 조성물은 생분해성 또는 비-생분해성, 수성 또는 비수성 또는 미세구를 기초로 한 젤을 추가로 포함한다. 상기 젤 및 다른 적합한 물질의 예는 폴록사머, 히알루로네이트, 자일로글루칸, 키토산, 폴리에스테르, 폴리락티드, 폴리글리콜리드 및 이의 공중합체 PLGA 중합체, 폴리언하이드라이드, 폴리카프로락톤 수크로스 및 글리세롤 모노올레에이트를 포함한다.

[0412] 약학적 조성물은 멸균되고/되거나 애췌번트, 예를 들어, 보존제, 안정화제, 습윤제 및/또는 유화제, 삼투압을 조절하기 위한 염 및/또는 완충제를 함유할 수 있다. 약학적 조성물은 요망시 본원에 이전에 기재된 것에 더하여 다른 활성 성분을 함유할 수 있다.

- [0413] 이들 약학적 조성물은 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있고, 예를 들어, 통상적 방법, 예를 들어, 혼합, 과립화, 패키징, 및 동결건조 용액에 의해 제조될 수 있다.
- [0414] 약학적 조성물은 또한 미국 특허 출원 번호 US20110166060호에 기재된 조절된 전달 및/또는 부형제를 돕는 작용제를 포함할 수 있다.
- [0415] 특정 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 국소 투여를 위해 제형화된다. 이성 투여에 적합한 담체는 약학적으로 허용되고, 기재된 작용제와 반응하지 않는 유기 또는 무기 물질, 및/또는 다른 활성 화합물, 예를 들어, 염수, 알콜, 식물성 오일, 벤질 알콜, 알킬글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린트리아세테이트, 젤라틴, 탄수화물, 예를 들어, 락토스 또는 전분, 마그네슘 옥사이드(마그네시아, 초크(chalk)), 스테아레이트(왁스), 탈크(talc) 및 광유(바셀린)이다. 상기 기재된 조성물은 멸균되고/되거나, 보조물질, 예를 들어, 윤활제, 보존제, 예를 들어, 티메로살(예를 들어, 50 중량 퍼센트), 안정화제 및/또는 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충 물질, 착색제 및/또는 착향제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 필요시 하나 이상의 다른 활성 성분을 함유할 수 있다. 이성의 본 발명의 조성물은 다른 생물학적 활성 물질, 예를 들어, 항생제, 항염증 작용제, 예를 들어, 스테로이드, 코르티손, 진통제, 안티피린, 벤조카인, 프로카인 등을 포함하는 다양한 재료 및/또는 물질을 포함할 수 있다.
- [0416] 귀로의 약물의 고막내(IT) 전달은 임상 및 연구 목적 둘 모두에 사용 증가되고 있다. 일부 그룹에서는 마이크로 카테터 및 마이크로웁(microwick)을 이용하여 지속된 방식으로 적용되는 약물인 한편, 대다수는 단일한 또는 반복된 IT 주사(2주 이하의 기간에 걸쳐 8회 이하의 주사)로 약물이 적용된다.
- [0417] 고막내로 적용된 약물은 정원창(RW) 막을 가로지름으로써 주로 내이의 유체로 진입하는 것으로 생각된다. 계산은 귀로 진입하는 약물의 양 및 귀의 길이에 따른 약물의 분포 둘 모두를 조절하는 주요 요인은 약물이 중이 공간에 남아 있는 시간인 것을 나타낸다. 몇 시간의 기간 동안 수용액의 단일한 '원-샷(one-shot)' 적용 또는 적용들은 와우의 길이에 따른 적용된 물질에 대한 가파른 약물 구배 및 약물이 이후 귀 전체에 걸쳐 분포됨에 따라 와우의 기초 회전에서의 신속하게 감소하는 농도를 발생시킨다.
- [0418] 내이로 전달되는 약물을 전달(관련 물질 및 이의 순열을 포함함)하기 위한 방법 및 내이로 전달되는 약물의 분포 및 동역학을 연구하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 폴록사머 407 젤(Spectrum Chemical MFG Corp., Gardena, Calif., USA)의 20% (w/w) 스톱 용액은 이를 pH 7.4에서 저온의 10 mM 포스페이트-완충 염수에 천천히 첨가함으로써 제조된다. 다른 폴록사머 또는 다른 물질이 이용될 수 있다. 폴록사머 407 젤의 17% w/w 농도를 획득하기 위해 추가의 완충 용액이 첨가된다. 이러한 용액은 냉각되거나 실온에 있는 경우 액체이나, 체온에서 고체화된다. 젤은 에반스 블루 염료(50 ppm)와 같은 염료로 청색으로 물들어질 수 있고, 여과에 의해 멸균될 수 있다. 무균 기술을 이용하여, 멸균된 미분화된 텍스(결정, 분말 형태의 순수한 텍스; Pfizer Inc., Kalamazoo, Mich., USA)는 적절한 양의 멸균 폴록사머 407 용액으로 현탁되어 4.5% 용액이 획득된다. 제형의 샘플은 냉동하에서 저장되고, 투여 직전에 재현탁된다.
- [0419] 폴록사머-407 하이드로젤은 "저온-방법"을 이용하여 제조되었다. 간단히, 칭량된 양의 폴록사머-407이 40 ml의 저온 초순수 또는 저온 PBS(pH 7.4)에 첨가되고, 자기 교반 플레이트에서 4℃에서 밤새 교반되어, 완전한 가용화가 수행된다. 18%(w/w) 내지 25%(w/w) 범위의 폴록사머-407 용액의 다수의 농도가 제조되었다. 발프로산(VPA) 및 인산화된 아스코르브산(PAC)을 포함하는 친수성 약물이 5 ml 폴록사머-407 용액에 첨가되고, 자기 교반 플레이트에서 4℃에서 용해되었다. 폴록사머-407의 젤화 특성에 대한 약물의 효과를 이해하고, 친수성 약물의 최대 가능한 로딩으로 37℃에서 젤화되는 최적 제형을 결정하기 위해 폴록사머-407 대 약물의 중량비를 다양화시켰다. 제형의 젤화 온도는 "시각 튜브 반전법"에 의해 결정되었다. 간단히, 친수성 약물을 갖거나 갖지 않는 폴록사머 407 용액을 함유하는 유리 바이알이 수조 내에 배치되었다. 온도는 천천히 증가되었고, 유리 바이알을 기울이는 경우 용액이 유동을 멈추는 온도가 젤화 온도로서 기록되었다.
- [0420] CHIR 99021 (CHIR), Repsox 및 TTNPB를 포함하는 소수성 약물을 캡슐화시키기 위해, DMSO 중 이의 스톱 용액으로부터의 적절한 부피가 친수성 약물을 함유하는 폴록사머-407 용액에 첨가되고, 4℃에서의 피펫팅에 의해 혼합되었다. 소수성 약물과 함께 첨가되는 최대 DMSO 농도는 젤의 전체 부피와 관련하여 5-6%(v/v)로 제한되었다. 높은 농도의 DMSO는 젤의 젤화 온도를 감소시켰다. 제형의 젤화 온도는 이전에 기재된 바와 같은 "시각 튜브 반전법"에 의해 결정되었다.
- [0421] 본 발명의 개시의 생물학적 활성 작용제는 산 염 또는 염기 염, 뿐만 아니라 자유 산 또는 자유 염기 형태로 제조될 수 있다. 치료에 사용하기에 필요한 작용제의 양은 선택되는 특정 작용제 및 염 뿐만 아니라 다른 요인 중

에서 투여 경로, 치료되는 질환의 특성, 및 환자의 연령 및 상태에 따라 다양할 수 있고, 궁극적으로는 주치의 또는 임상주의 판단에 따라 결정된다. 요망되는 용량은 편리하게는 단일 용량 또는 적절한 간격으로 투여되는 나뉘어진 용량으로 제공될 수 있다.

[0422] 또한, 활성제, 및 이의 각각의 산 또는 염기 염은 액체, 바람직하게는 저장 및 투여를 위한 수성 제형 뿐만 아니라, 예를 들어, 투여를 위해 분말로 이용될 수 있거나, 대상체로의 투여 직전에 액체 형태로 재구성될 수 있는 건조된 제형으로 제형화될 수 있다. 액체의 약학적으로 투여 가능한 조성물은, 예를 들어, 수성 담체 중에 특정 작용제 및 임의의 약학적 애드밴트를 용해시키거나, 분산시키거나 그 밖의 수단에 의해 제조될 수 있다. 수성 담체는 물(특히, 인간으로의 주사를 위한 물), 알콜성/수성 용액, 에멀전 및 현탁액을 포함한다. 약학적으로 허용되는 수성 담체는 멸균 완충된 등장성 염수 용액을 포함한다. 비히클은 소듐 클로라이드 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스, 및 소듐 클로라이드, 락테이트화 링거액, 또는 고정유를 포함할 수 있다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제, 전해질 보충제(예를 들어, 링거 텍스트로스를 기초로 한 것) 등을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제, 및 비활성 가스 등이 또한 제공될 수 있다. 프로필렌 글리콜, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예를 들어, 올리브유, 및 주가 가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트를 포함하는 비수성 용매가 또한 이용될 수 있다.

[0423] 청력 측정

[0424] 청력은 행동 및/또는 전기 청력검사를 이용하여 측정될 수 있다.

[0425] 인간에서 청력 손실을 진단하기 위한 시험은 하기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다:

[0426] 일반적인 스크리닝 시험. 의사는 한번에 하나의 귀를 덮어달라고 요청하여 다양한 음량으로 말하는 말을 얼마나 잘 듣고, 이들이 다른 소리에 대해 얼마나 반응하는지 알아볼 수 있다.

[0427] 소리 굽쇠(Tuning fork) 검사. 소리 굽쇠는 타격을 받으면 소리를 발생시키는 두갈래의 금속 악기이다. 소리 굽쇠를 이용한 간단한 검사는 의사가 청력 손실을 검출하는 것을 도울 수 있다. 소리 굽쇠 평가는 또한 청력 손실이 중이(고막을 포함함)의 진동 부분에 대한 손상, 내이의 센서 또는 신경에 대한 손상, 또는 둘 모두에 대한 손상에 의해 야기되는지의 여부를 나타낼 수 있다.

[0428] 청력계 검사. 청력학자에 의해 수행된 이들 더욱 철저한 검사 동안, 이어폰을 착용하고, 한번에 하나의 귀로 향하는 소리를 듣는다. 청력학자는 다양한 음색의 소리를 제시하고, 소리를 들을 때마다 알려주라고 요청한다. 간신히 들을 수 있는 경우를 알아내기 위해 각 음색이 희미한 수준에서 반복된다. 청력학자는 또한 청음 능력을 결정하기 위해 다양한 단어를 제시할 수 있다.

[0429] 다른 시험은 하기를 포함할 수 있다:

[0430] 소리에 대한 뇌의 반응을 확인하는 청성 뇌간 반응(ABR) 검사 또는 뇌간 청각 유발 반응(BAER) 검사. 이러한 검사는 환자의 반응 행동에 의존하지 않기 때문에, 검사를 받는 사람은 검사 동안 잠들 수 있다.

[0431] 이음향 방사(OAE)는 소리에 대한 내이 반응을 확인하는 검사이다. 이러한 검사는 환자의 반응 행동에 의존하지 않기 때문에, 검사를 받는 사람은 검사 동안 잠들 수 있다.

[0432] 행동 반응 청력검사는 사람이 전반적으로 소리에 반응하는 방법을 시험한다. 행동 반응 청력검사는 귀의 모든 부분의 기능을 시험한다. 검사되는 사람은 깨어 있어야 하며, 검사 동안 들리는 소리에 능동적으로 반응해야 한다.

[0433] 아동의 경우, 부모의 허락하에, 청력학자는 아동의 주치의 및 다음과 같은 다른 전문가들과 결과를 공유할 것이다:

[0434] 이비인후과 의사로도 언급되는 귀, 코 및 인후 의사, 안과 의사로도 언급되는 안구 의사, 임상 유전학자 또는 유전자 상담사로도 언급되는 유전학에서 훈련된 전문가.

[0435] 예시적 구체예

[0436] 본 발명의 개시는 하기 예시적 구체예를 추가로 포함한다.

[0437] 일부 구체예에서, "줄기세포"는 전구 세포를 포함한다.

[0438] 일부 구체예에서, FGF1 효능제가 사용된다. 일부 구체예에서, 이는 Notch 활성제 및/또는 HDAC 억제제를 대체할 수 있거나, Notch 활성제 및/또는 HDAC 억제제에 추가될 수 있다. 일부 구체예에서, FGF1 유전자 프로모터를 환

성화시키는 분자가 선택된다. (예를 들어, FGF-1B)

- [0439] 특정 구체예에서, 본원에 기재된 세포 집단은 내이에 거주하고/하거나 청력을 향상시키기 위해 내이에 전달될 수 있다. 세포 집단은 특허 CN103361300 A호 및 논문에 기재된 바와 같이 내이로의 이식 후에 생존하는 것으로 이전에 밝혀졌다.
- [0440] "또한, 기니아 피그의 내이로 이식된 인간 양막 상피 세포는 3주까지 생존하고, 항상성을 유지하는 중요한 단백질 발현을 나타내었다(Yuge, 1.et al (2004): 77 (9) 1452 -. 1471)."
- [0441] 특정 구체예에서, 내이로부터의 Lgr5⁺ 세포는 적어도 하나의 WNT 활성화제 및 적어도 하나의 NOTCH 억제제의 조합물을 이용하여 분화된다.
- [0442] 특정 구체예에서, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 트리블록 공중합체 또는 이의 유도체가 본원에 기재된 분자 또는 인자를 중이로 전달하고/하거나 조절된 방출을 위해 이용될 수 있다.
- [0443] 특정 구체예에서, 방법은 조성물을 투여하기 전 하나 이상의 주파수에서의 청력의 기준선 수준, 및 조성물을 투여한 후 동일한 하나 이상의 주파수에서의 청력의 이후의 수준을 결정하고, 하나 이상의 주파수에서 요망되는 수준의 청력이 회복될 때까지 조성물의 하나 이상의 추가 용량을 투여하는 것을 포함한다.
- [0444] 특정 구체예에서, 청력의 이후의 수준은 조성물의 투여 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 6개월 및/또는 12개월 후에 결정된다.
- [0445] 포유동물이, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13세 연령 이상의 아동, 청소년 또는 성인인 방법이 본원에 제시된다.
- [0446] 포유동물이 적어도 40세의 연령, 예를 들어, 적어도 45, 50, 55, 60, 65, 70세의 연령의 성인인 방법이 본원에 제시된다.
- [0447] 조성물이 포유동물에 전달되는 방법이 본원에 제시된다.
- [0448] 포유동물이 인간인 방법이 본원에 제시된다.
- [0449] 귀독성 검정에서 사용하기 위한 세포 집단의 용도, 예를 들어, 지지 세포의 생성을 부스팅시키는 작용제, 또는 지지 세포에 의해 발현된 단백질, 및/또는 지지 세포의 분화 등을 스크리닝(또는 단백질 발현을 억제하는 작용제를 스크리닝)하거나, 귀독성에 대해 털세포를 생성시키는 작용제 또는 털세포에 대한 손상 후 청력을 유지시키거나, 재생 후에 털세포를 유지시키는데 유용한 털세포의 생존을 부스팅시키는 작용제를 확인하거나, 필요시 특정 세포 집단(Lgr5⁺ 세포 또는 털세포를 포함하는 이의 프로제니)을 사멸시키는 특정 작용제를 스크리닝하기 위한 96 또는 384 웰 플레이트(또는 다른 플레이트 포맷)에서의 Lgr5⁺ 세포의 용도가 본원에 기재된다. 또한, 재프로그래밍 또는 프로그래밍 프로토콜을 위한 세포 집단으로 제공하기 위해 Lgr5⁺ 세포의 사용이 본원에서 발생되었다.
- [0450] 특정 구체예에서, 지지 세포의 털세포로의 분화를 촉진하기 위해 GSK3b 억제제에 더하여 감마-세크레타제 억제제가 이용된다.
- [0451] 적어도 하나의 wnt 활성화제 및 적어도 하나의 notch 활성화제(및/또는 HDAC 억제제)로 Lgr5⁺ 지지 세포를 확장시킨 후, 적어도 하나의 WNT 활성화제(바람직하게는, 구체예는 CHIR을 이용함) 및 하나의 notch 억제제를 이용하여 털세포로 분화시키는 방법이 본원에 제공된다.
- [0452] 청력 손실 또는 전정 기능 이상을 경험했거나, 발달 위험이 있는 대상체를 확인하는 단계; 대상체의 귀 내의 세포에서 wnt 발현 또는 활성을 증가시키고, HDAC를 억제하는(및/또는 NOTCH를 활성화시키는) 하나 이상의 화합물을 포함하는 조성물을 대상체의 귀로 투여하는 단계; 이에 의해 대상체의 청력 손실 또는 전정 기능 이상을 치료하는 단계를 포함하는, 청력 손실 또는 전정 기능 이상이 있거나, 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법.
- [0453] 청력 손실 또는 전정 기능 이상을 경험하거나, 청력 손실 또는 전정 기능 이상이 발생할 위험이 있는 대상체를 확인하고, CHIR99021을 포함하는 조성물을 대상체의 귀로 투여하는 것을 포함하는, 청력 손실 또는 전정 기능 이상을 갖거나, 청력 손실 또는 전정 기능 이상이 발생할 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법.
- [0454] 치료를 필요로 하는 대상체를 선택하고, 털세포로 분화할 수 있는 세포의 집단을 획득하고, 시험관내 세포의 집단을 충분한 시간 동안 wnt 발현 또는 활성을 증가시키고, HDAC를 억제하는(및/또는 NOTCH를 활성화시키는) 하

나 이상의 화합물을 포함하는 유효량의 조성물을 접촉시켜, 세포의 적어도 일부가 WNT 중 하나 이상을 발현하도록 유도하거나, HDAC의 발현을 감소시키거나 제한하고/하거나, NOTCH 또는 이의 동족체를 발현시키고, 세포 또는 이의 부분집합의 집단을 대상체의 귀로 투여하는 것을 포함하는, 청력 손실 또는 전정 기능이상을 갖거나, 청력 손실 또는 전정 기능 이상이 발생할 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법.

- [0455] 한 구체예에서, 본원에 기재된 세포 집단은 내이 줄기세포로부터 털세포 분화를 유도하는 γ -세크레타제 억제제를 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다.
- [0456] 한 구체예에서, 고막 내의 관이 중이로의 연속 및/또는 반복 투여에 놓여진다.
- [0457] 특정 구체예에서, 조성물은 생물분해성 중합체를 포함한다.
- [0458] 또 다른 구체예에서, 조성물은 Atoh1의 유전자 발현을 감소시키는 하나 이상의 소분자를 포함한다.
- [0459] 한 구체예에서, 조성물은 Atoh1의 단백질 발현을 감소시키는 하나 이상의 소분자를 포함한다.
- [0460] 또 다른 구체예에서, 조성물은 Atoh1의 유전자 발현을 증가시키는 하나 이상의 소분자를 포함한다.
- [0461] 한 구체예에서, 조성물은 Atoh1의 단백질 발현을 증가시키는 하나 이상의 소분자를 포함한다.
- [0462] 특정 구체예에서, 조성물은 Atoh1 단백질의 활성을 증가시키는 하나 이상의 소분자를 포함한다.
- [0463] 추가 구체예에서, Atoh 1의 유전자 발현을 증가시키거나, Atoh1의 단백질 발현을 증가시키거나, Atoh1 단백질의 활성을 증가시키는 하나 이상의 소분자는 CHIR99021, 1-아자켄파울론(1-Azakenpaulone), 및 (2'Z,3'E)-6-브로모인디루빈-3'-옥심(BIO)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0464] 특정 구체예에서, 조성물은 생물분해성 중합체를 포함한다.
- [0465] 추가 구체예에서, 조성물은 대상체의 중이로 투여된다.
- [0466] 또 다른 구체예에서, 조성물은 정원창막으로 투여되거나, 정원창막에 인접하여 투여된다.
- [0467] 한 구체예에서, 조성물은 대상체의 내이로 투여된다.
- [0468] 한 특정 구체예에서, 조성물은 대상체의 와우로 투여된다. 한 특정 구체예에서, 조성물은 대상체의 코르티 기관으로 투여된다.
- [0469] 한 추가 구체예에서, 조성물은 경고막 투여에 의해 투여된다.
- [0470] 한 추가 구체예에서, 조성물은 경고막 위크(wick)에 의해 투여된다.
- [0471] 또 다른 구체예에서, 조성물은 경고막 카테터에 의해 투여된다.
- [0472] 또 다른 구체예에서, 조성물의 와우내 주사에 의해 투여된다.
- [0473] 다양한 구체예에서, 본 발명의 개시는 부분적으로 와우 털세포 증식을 촉진시키기에 충분한 시간 동안 와우 털세포 증식을 촉진시키는데 효과적인 양의 notch 활성제(및/또는 HDAC 억제제) 및 wnt 활성제를 포함하는 조성물의 대상체의 중이 또는 내이에 투여하고, 이에 의해 와우 털세포 재생을 촉진시키는 것을 포함하는 와우 털세포 재생을 촉진시키기 위한 방법을 고려한다.
- [0474] 한 구체예에서, 대상체는 청력 또는 균형의 부분적 또는 완전한 손실을 갖는다.
- [0475] 특정 구체예에서, 대상체는 귀독성 화합물에 대한 급성 또는 만성 노출, 소음에 대한 급성 또는 만성 노출로 인한 감각신경성 청력 손실, 연령 관련 청력 손실, 유전 관련 청력 손실을 갖거나, 청각 신경병증을 갖는다.
- [0476] 특정 구체예에서, 대상체는 감각신경 청력 손실 또는 청각 신경병증이 발생할 위험이 있는 대상체이다.

[0477] 하기 참고문헌에 기재된 방법 및 작용제의 전체내용이 본원에 포함된다.

Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, Groves AK, Segil N. Nature. 2006 Jun 22;441(7096):984-7.

Lgr5-positive supporting cells generate new hair cells in the postnatal cochlea. Bramhall NF, Shi F, Arnold K, Hochedlinger K, Edge AS. Stem Cell Reports. 2014 Feb 20;2(3):311-22. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.01.008. eCollection 2014 Mar 11.

Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. Mizutani K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge AS. Neuron. 2013 Jan 9;77(1):58-69. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.032. Erratum in: Neuron. 2013 Apr 24;78(2):403.

Generation of hair cells in neonatal mice by β -catenin overexpression in Lgr5-positive cochlear progenitors. Shi F, Hu L, Edge AS. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 20;110(34):13851-6. doi: 10.1073/pnas.1219952110. Epub 2013 Aug 5.

Notch signaling alters sensory or neuronal cell fate specification of inner earstem cells. Jeon SJ, Fujioka M, Kim SC, Edge AS. J Neurosci. 2011 Jun 8;31(23):8351-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6366-10.2011.

Wnt-responsive Lgr5-expressing stem cells are hair cell progenitors in the cochlea. Shi F, Kempfle JS, Edge AS. J Neurosci. 2012 Jul 11;32(28):9639-48. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1064-12.2012. PMID:

Spontaneous hair cell regeneration in the neonatal mouse cochlea in vivo. Cox BC, Chai R, Lenoir A, Liu Z, Zhang L, Nguyen DH, Chalasani K, Steigelman KA, Fang J, Rubel EW, Cheng AG, Zuo J. Development. 2014 Feb;141(4):816-29. doi: 10.1242/dev.103036.

[0478]

[0479] 당업자는 본원에 기재된 작용제 또는 이의 유도체가 어떻게 사용되고 전달될 수 있는지에 대한 많은 변경이 존재하는 것을 인지할 것이다. 다른 작용제와의 조합물이 또한 이용될 수 있다. 본원에 기재된 작용제와 조합하여 사용될 수 있는 다른 작용제를 기재하는(또한 이용될 수 있는 방법을 기재함) 관련 특허 참고문헌(이에 제한되지는 않음): US20130324594 A1호, W02011079841 A1호, US7498031 B2호, US6177434 B1호, CA2268331 C호, W02008010852 A2호, US7387614 B2호, W01996040094 A1호, W02008076556 A2호.

[0480] 추가 배경 정보

[0481] 새에서의 청각 털세포

[0482] 현재, 포유동물에서의 청각 손실은 영구적이다. 청력 손실을 갖는 개구리, 물고기, 및 새는 청력을 자연적으로 회복하지만, 포유동물은 이러한 능력을 3억년 전에 잃어버렸고, 지금까지 과학자들은 이러한 문제를 해결하지 못하였다. 털세포 재생의 궁극적 목적은 기능적 청력을 회복시키는 것이다. 새는 생애 초기에 지저귀는 소리를 인지하고 발생시키기 시작하므로, 이들은 손실된 털세포의 재생이 청각적 민감성을 되돌릴 수 있을 뿐만 아니라 이러한 재생된 주변부가 복잡한 청각적 지각과 발생을 회복시킬 수 있는지의 여부를 연구하기 위한 유리한 모델을 제공한다. 이들은 털세포 손실 후 털세포 재생이 자연적으로 발생하고, 복잡한 음향 신호를 정확하게 인지하고 발생시키는 능력이 생식과 생존에 중요한 희귀한 예이다. 따라서, 청력을 향상시키거나 회복시키기 위한 내이 세포의 재생에 대해 생물학이 존재한다.

[0483] 중요하게는, 음향 과자극은 청각 상피에서의 감각 세포(털세포) 손실을 발생시킬 수 있다. 코르티 기관(포유류 청각 말단-기관) 내의 손상된 털세포는 퇴행성이며, 비가역적 반흔을 만드는 비-감각 세포(지지 세포)에 의해 대체된다. 그러나, 새에서는, 청각 외상 또는 귀독성 약물에 의해 손상되는 청각 털세포가 새로운 털세포에 의해 대체될 수 있다. 조류 청각 상피의 손상된 영역의 지지 세포는 소음 노출 1일 후만큼 초기에 DNA-특이적 마커 브로모데옥시우리딘을 통합시킨다. 조류 내이에 대한 음향 손상 후, 각각 상피 내에 존재하는 지지 세포는 관내 표면 근처에서 분열하고, 상피를 재증식시킨다. 이들 결과는 지지 세포가 털세포 재생 동안 반흔 형성에 관여하고, 재생을 위한 새로운 세포를 발생시키는 것을 암시한다.

- [0484] 청력 손실 및 털세포의 파괴
- [0485] 내이의 털세포는 청력 및 전정 기능에 중요하다. 포유동물에서, 감각 털세포의 손실은 영구적인데, 이는 이들 세포의 재생을 위한 유의한 능력이 없기 때문이다. 약물, 예를 들어, 아미노글리코시드 항생제 및 많은 항-신생물 약물이 불행한 부작용에도 불구하고 종종 사용된다. 이러한 부작용 중 하나는 내이의 감각 털세포의 사멸로 인한 청력 손실이다. 아미노글리코시드는 용량-의존적 감각신경 청력 손실을 야기시키고(Smith et al., New Engl J Med.(1977) 296:349-53), 포유류 내이 내의 털세포를 사멸시키는 것으로 공지된(Theopold, Acta Otolaryngol (1977) 84:57-64) 임상적으로 사용되는 약물이다. 미국에서, 200만명이 넘는 사람이 해마다 아미노글리코시드 치료를 받는다. 내성 박테리아 감염을 치료하는데 있어서의 이들 약물의 임상 효능 및 이의 낮은 비용이 전세계적으로 이들의 지속된 사용 및 필요성을 설명한다. 화학요법제인 시스플라틴이 또한 내이의 털세포에 대한 이의 독성 효과에도 불구하고 생명에 대해 유익하므로 사용된다. 고주파수 청력 손실(>8 kHz)이 시스플라틴 치료를 받고 있는 아동에게서 90%만큼 높은 것으로 보고되었다(Allen, et al., Otolaryngol Head Neck Surg (1998) 118:584-588). 상기 약물의 환자 집단에 대한 전정독성 효과의 발생률은 덜 잘 연구되어 왔다. 3% 내지 6% 범위의 추정치가 아미노글리코시드 유도 전정독성을 갖는 환자의 문헌에서 계속 보고되고 있다(Dhanireddy et al., Arch Otolaryngol Head Neck Surg (2005) 131:46-48). 루프 이노제(Greenberg, Am J Med Sci. (2000) 319:10-24) 및 항말라리아 퀴닌(Claessen, et al., Trop Med Int Health, (1998) 3:482-9) 및 살리실레이트(Matz, Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl (1990) 148:39-41)를 포함하는 다른 임상적으로 중요하고 일반적으로 사용되는 약물이 또한 귀독성 효과를 기록하고 있다.
- [0486] 지난 수십년 동안의 연구는 털세포 사멸을 야기시킬 수 있는 주요 세포내 사건의 일부를 밝혀내었다. 항산화제, 카스파제 억제제, 및 jun 키나제 억제제와 같은 여러 후보 보호제가 평가되었다(Kopke R D, et al. Am J Otol 1997, 18:559-571; Liu W, et al. Neuroreport 1998, 9:2609-2614; Yamasoba T. et al. Brain Res 1999, 815:317-325; Matsui J I, et al. J Neurosci 2002, 22:1218-1227; Sugahara K, et al. Hear Res 2006, 221:128-135). 이들 후보 중 몇몇개가 인간 시험으로 진행되었다(Sha S H, et al. N Engl J Med 2006, 354:1856-1857; Campbell K C, et al. Hear Res 2007, 226:92-103). 또한, 다양한 세포 사멸 경로가 다양한 형태의 손상에 반응하여 촉발될 수 있고, 많은 보호 분자가 불완전한 털세포 보호를 제공하며, 이는 다중약물요법 접근법이 가장 큰 이점을 제공할 수 있음을 암시한다. 털세포를 보호하기 위해 연구되는 작용제의 여러 예가 미국 특허 출원 공개 번호 US20110135756 A1호에 포함되어 있다.
- [0487] 청력 손실 또는 손상은 포유동물에서 흔히 발생한다. 청각 경로를 따라 외이도로부터 중추신경계까지 어느 곳에서든 손상은 청력 손실을 발생시킬 수 있다. 청각 기관은 외이 및 중이, 내이 및 청각 신경 및 중심 청각 경로로 나뉘어질 수 있다. 종마다 약간의 변화가 있으나, 일반적인 특징은 모든 동물에 대해 공통적이다. 청각 자극은 외이도, 고막, 및 이소골연쇄를 통해 내이로 기계적으로 전달된다. 중이 및 유양 돌기는 일반적으로 공기 채워진다. 외이 및 중이의 장애는 보통 기계적 전달을 방해하여 전도성 청력 손실을 발생시킨다. 전도성 난청의 일반적인 원인은 외이도 폐쇄증 또는 귀지에 의해 야기될 수 있는 외이도의 폐쇄, 외상 또는 감염에 의해 야기될 수 있는 고막의 비후 또는 천공, 이소골연쇄 성분의 고착 또는 재흡수, 및 유체가 채워진 중이 공간을 발생시키는 유스타키오 관의 폐쇄를 포함한다. 청각 정보는 내이에서 신경-상피 세포(털세포) 및 SGN의 작용에 의해 기계적 신호로부터 신경 전도되는 전기적 자극으로 전환된다. SGN의 모든 중심 섬유는 교뇌 뇌간의 와우 핵 내에서 시냅스를 형성한다. 와우 핵으로부터의 청각 돌출부는 양측에 있으며, 주요 핵은 하구, 시상의 내측무릎체, 및 관자엽의 청각피질에 위치한다. 청력과 관련된 뉴런의 수는 와우에서 청각 뇌간과 청각 피질까지 극적으로 증가한다. 모든 청각 정보는 내이의 감각 수용체인 제한된 수의 털세포에 의해 전달되며, 여기서 비교적 소수의 번호를 붙이는 소위 속털세포는 매우 중요한데, 이는 이들이 1차 청각 뉴런의 약 90%와 시냅스를 형성하기 때문이다. 비교에 의해, 와우 핵의 수준에서, 관련된 신경 요소의 수는 수십만개로 측정된다. 따라서, 청각 주변부의 상대적으로 적은 세포에 대한 손상은 상당한 청력 손실을 초래할 수 있다. 그러므로, 감각신경 손실의 많은 원인이 내이의 병변에 기인될 수 있다. 이러한 청력 손실은 진행적일 수 있다. 또한, 청력은 동물이 나이가 들수록 귀의 해부학적 구조에서의 변화로 인해 유의하게 덜 민감하게 된다.
- [0488] 배아발생 동안, 전정 신경절, 나선형 신경절, 및 귀소포는 동일한 신경성 외배엽인 귀기원관으로부터 유래된다. 따라서, 전정 및 청각계통은 털세포의 주변 신경분포 및 뇌간 핵으로의 중심 돌출부를 포함하는 많은 특징을 공유한다. 이들 계통 둘 모두는 치료 약물, 항신생물 작용제, 식품 또는 의약 내의 오염물질, 및 환경 및 산업 오염물질을 포함하는 귀독소에 민감하다. 귀독성 약물은 널리 사용되는 화학요법제인 시스플라틴 및 이의 유사체(Fleischman et al, 1975; Stadnicki et al., 1975; Nakai et al., 1982; Berggren et al., 1990; Dublin, 1976; Hood and Berlin, 1986), 그람-음성 박테리아에 의해 야기되는 감염의 치료를 위한 일반적으로 사용되는

아미노글리코시드 항생제, 예를 들어, 겐타마이신(Sera et al., 1987; Hinojosa and Lerner, 1987; Bareggi et al., 1990), 퀴닌 및 이의 유사체, 살리실레이트 및 이의 유사체, 및 루프-이뇨제를 포함한다.

[0489] 청각 세포 및 나선형 신경절 뉴런에 대한 이들 약물의 독성 효과는 종종 이들의 치료적 유용성에 대한 제한 요소이다. 예를 들어, 항박테리아 아미노글리코시드, 예를 들어, 겐타마이신, 스트렙토마이신, 카나마이신, 토브라마이신 등은 심각한 독성, 특히 상기 항미생물제의 유용성을 감소시키는 귀독성 및 신독성을 갖는 것으로 공지되어 있다(문헌[Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th ed., A. Goodman Gilman et al., eds; Macmillan Publishing Co., Inc., New York, pp. 1169-71 (1980)] 또는 가장 최근의 판본 참조). 아미노글리코시드 항생제는, 예를 들어, 그람-양성, 그람-음성 및 항산성 박테리아에 대해 효과적인 광범위한 항미생물제로 일반적으로 사용된다. 감수성 미생물은 에스케리키아 종(*Escherichia* spp.), 헤모필루스 종(*Hemophilus* spp.), 리스테리아 종(*Listeria* spp.), 슈도모나스 종(*Pseudomonas* spp.), 노카르디아 종(*Nocardia* spp.), 예르시니아 종(*Yersinia* spp.), 클렙시엘라 종(*Klebsiella* spp.), 엔테로박터 종(*Enterobacter* spp.), 살모넬라 종(*Salmonella* spp.), 스태필로코커스 종(*Staphylococcus* spp.), 스트렙토코커스 종(*Streptococcus* spp.), 미코박테리아 종(*Mycobacteria* spp.), 시겔라 종(*Shigella* spp.), 및 세라티아 종(*Serratia* spp.)을 포함한다. 그럼에도 불구하고, 아미노글리코시드는 그람-음성 박테리아에 의해 야기되는 감염을 치료하기 위해, 예를 들어, 상승작용적 효과를 위해 페니실린과 조합하여 주로 이용된다. 상기 패밀리에 대한 일반적인 이름에 의해 암시되는 바와 같이, 모든 아미노글리코시드 항생제는 글리코시드 결합에서 아미노당을 함유한다. 중이염은 중이의 감염을 기재하는데 사용되는 용어이며, 이러한 감염은 특히 아동에게서 매우 흔하다. 통상적으로, 항생제는, 예를 들어, 반응적 또는 예방적 방식으로 중이의 감염에 대해 전신 투여된다. 중이 감염에 대항하기 위한 항생제의 전신 투여는 일반적으로 중이에서 치료 수준을 달성하기 위한 연장된 지연 시간을 발생시키며, 이러한 수준을 달성하기 위해 높은 최초 용량을 필요로 한다. 이러한 단점은 치료 수준을 획득하는 능력을 복잡하게 만들고, 일부 항생제의 전체적인 사용을 배제시킬 수 있다. 전신 투여는 감염이 진행 단계에 이르렀을 때 가장 효과적이거나, 이 시점에서 중이 및 내이 구조에 대해 영구적인 손상이 이미 발생했을 수 있다. 명백히, 귀독성은 항생제 투여의 용량-제한적인 부작용이다. 예를 들어, 60 내지 120일 동안 매일 2그램의 스트렙토마이신이 제공된 환자의 거의 75%는 일부 전정 손상을 나타낸 반면, 하루 1그램에서는, 발생률이 25%로 감소하였다(미국 특허 5,059,591호). 1주 초과 동안 하루에 1그램을 제공한 환자의 4 내지 15%에서 청각 손상이 관찰되어 측정 가능한 청력 손실이 발생하였으며, 이는 천천히 악화되어, 치료가 지속되는 경우 완전한 영구적 난청을 초래시킬 수 있다. 귀독성은 또한 고환암, 난소암, 방광암, 및 두경부암을 포함하는 다양한 인간 암에 대해 효과적인 것으로 입증된 백금 배위결합 복합체인 시스플라틴에 대한 심각한 용량-제한 부작용이다. 시스플라틴은 청각 및 전정계를 손상시킨다(Fleischman et al, 1975, Stadnicki et al, 1975, Nakai et al, 1982, Carezza et al, 1986, Sera et al, 1987, Bareggi et al, 1990). 살리실레이트, 예를 들어, 아스피린은 항염증제, 진통제, 해열제 및 항혈전 효과를 위해 가장 일반적으로 사용되는 치료 약물이다. 불행히도, 이들은 귀독성 부작용을 갖는다. 이들은 종종 이명("귀 내에서 울리는 소리") 및 일시적 청력 손실을 발생시킨다(Myers and Bernstein, 1965). 그러나, 장기간 동안 높은 용량으로 약물이 사용되는 경우, 임상적으로 보고된 바와 같이 청력 손상은 지속되고, 비가역적이 될 수 있다(Jarvis, 1966).

[0490] 관련 생물학

[0491] 물고기 및 새는 와우 내의 지지 세포가 전구 세포로 작용하는 내이 털세포를 생성한다. 털세포 재생은 지지 세포가 직접 털세포가 되는 직접 교차분화(transdifferentiation); 및 지지 털세포가 분열되고, 생성된 세포 중 하나 또는 둘 모두가 털세포로 발달하는 유사분열 재생의 두 방법에 의해 발생하는 것으로 생각된다.

[0492] 청각 및 전정계에서의 털세포 재생은 닭 및 인간이 아닌 다른 비-포유동물에서 발생하는 것이 확립되었다. 이러한 자발적 재생은 청력 및 균형을 회복시킨다.

[0493] 추가 구체예 및 관련 양태

[0494] 1. 내이 털세포의 생성을 촉진하는 방법으로서,

[0495] (i) GSK3-베타 억제제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염 및/또는 Wnt 효능제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (ii) notch 효능제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염 및/또는 HDAC 억제제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 제1 조성물을 줄기세포 집단에 투여하거나 투여되도록 하여 줄기세포 집단을 확장시키고;

[0496] 확장된 줄기세포 집단을 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및, 임의로, notch 억제제를 포함하는 제2 조성

물에 노출시켜, 이에 의해 줄기세포의 확장된 집단으로부터 내이 털세포의 발생을 촉진시키는 것을 포함하는, 방법.

- [0497] 1A. 구체예 1에 있어서, 줄기세포 집단이 시험관내 줄기세포 집단인 방법.
- [0498] 1B. 구체예 1에 있어서, 줄기세포 집단이 생체외 줄기세포 집단인 방법.
- [0499] 1C. 구체예 1에 있어서, 줄기세포 집단이 생체내 줄기세포 집단인 방법.
- [0500] 1D. 구체예 1에 있어서, 줄기세포 집단이 대상체에 포함된 생체내 줄기세포 집단이고, 제1 조성물이 대상체로의 제1 조성물의 투여에 의해 줄기세포 집단으로 투여되는 방법.
- [0501] 1E. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제1 조성물이 Wnt 효능제를 포함하는 방법.
- [0502] 1F. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제1 조성물이 GSK3-베타 억제제를 포함하는 방법.
- [0503] 1G. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제1 조성물이 notch 효능제를 포함하는 방법.
- [0504] 1H. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제1 조성물이 HDAC 억제제를 포함하는 방법.
- [0505] 1I. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제2 조성물이 Wnt 효능제를 포함하는 방법.
- [0506] 1J. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제2 조성물이 GSK3-베타 억제제를 포함하는 방법.
- [0507] 1K. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제2 조성물이 notch 효능제를 포함하는 방법.
- [0508] 1L. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제2 조성물이 HDAC 억제제를 포함하는 방법.
- [0509] 1M. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제1 및 제2 조성물이 동일 조성물인 방법.
- [0510] 1N. 구체예 1 또는 구체예 1A 내지 구체예 1L 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 조성물이 상이한 조성물인 방법.
- [0511] 2. 임의의 이전 구체예에 있어서, 줄기세포 집단이 지지 세포를 포함하는 방법.
- [0512] 3. 구체예 2에 있어서, 지지 세포가 Lgr5+ 세포인 방법.
- [0513] 4. 임의의 이전 구체예에 있어서, 줄기세포 집단이 출생후 세포를 포함하는 방법.
- [0514] 5. 임의의 이전 구체예에 있어서, 털세포가 내이 털세포인 방법.
- [0515] 6. 임의의 이전 구체예에 있어서, 털세포가 외이 털세포인 방법.
- [0516] 7. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 HDAC 억제제이기도 한 notch 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0517] 8. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 합성 분자를 포함하는 notch 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0518] 9. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 VPA(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))(예를 들어, 여기서 VPA는 HDAC 억제제이기도 한 notch 효능제임)를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0519] 10. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 GSK3-베타 억제제이기도 한 Wnt 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0520] 11. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 합성 분자를 포함하는 Wnt 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0521] 12. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 CHIR99021(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))(예를 들어, 여기서 CHIR99021은 GSK3-베타 억제제임)를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0522] 13. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 notch 억제제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.

- [0523] 14. 구체예 13에 있어서, notch 억제제가 DAPT(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))를 포함하는 방법.
- [0524] 15. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 (i) CHIR99021(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염)) 및 (ii) VPA(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))(예를 들어, 여기서 (i)은 CHIR99021을 포함하고, (ii)는 VPA를 포함함)를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0525] 16. 구체예 15에 있어서, 투여 단계가 DAPT(예를 들어, 여기서 DAPT는 notch 억제제임)를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0526] 17. 임의의 이전 구체예에 있어서, 귀로의 하나 이상의 주사(예를 들어, 경고막적)를 수행함으로써 투여 단계가 수행되는 방법.
- [0527] 18. 구체예 17에 있어서, 하나 이상의 주사가 중이로의 주사인 방법.
- [0528] 19. 구체예 17에 있어서, 하나 이상의 주사가 내이로의 주사인 방법.
- [0529] 20. 구체예 17에 있어서, 하나 이상의 주사를 수행하는 것이 고막 및/또는 주위 조직을 마취시키고, 바늘을 고막을 통해 중이로 위치시키고, (i) 및 (ii) 중 하나 또는 둘 모두를 주사하는 것을 포함하는 방법.
- [0530] 21. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 하나 이상의 추가 작용제(예를 들어, (i) 및 (ii)에 더함)를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0531] 22. 구체예 21에 있어서, 하나 이상의 추가 작용제가 ROS 억제제를 포함하는 방법.
- [0532] 23. 구체예 21 또는 구체예 22에 있어서, 하나 이상의 추가 작용제가 비타민 C 또는 이의 유도체를 포함하는 방법.
- [0533] 24. 구체예 21 내지 구체예 23 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 추가 작용제가 TGF β 타입 I 수용체 억제제를 포함하는 방법.
- [0534] 25. 임의의 이전 구체예에 있어서, 줄기세포의 확장된 집단이 투여 단계 전의 줄기세포 집단보다 적어도 3배 더 큰 방법.
- [0535] 26. 임의의 이전 구체예에 있어서, 투여 단계가 박동 방식으로 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제를 투여하고, 지속 방식으로 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제를 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0536] 27. 임의의 이전 구체예에 있어서, 줄기세포 집단이 생체내 대상체의 줄기세포 집단이고, 방법이 청력 감소 및/또는 전정 기능장애에 대한 치료(예를 들어, 확장된 집단의 줄기세포로부터의 내이 털세포의 생성은 청력 손실의 부분적 또는 완전한 회복 및/또는 개선된 전정 기능을 발생시킴)인 방법.
- [0537] 28. 임의의 이전 구체예에 있어서, 줄기세포 집단이 생체내 대상체의 줄기세포 집단이고, 방법이 대상체에 대한 약물의 공지된 최대 안전 투여량(예를 들어, 상기 방법으로부터 발생하는 내이 털세포의 생성의 부재하에서 전달되는 경우 공지된 최대 안전 투여량)보다 높은 농도(예를 들어, 약물의 용량-제한 귀독성의 감소 또는 제거로 인함)로 약물을 대상체로 전달(예를 들어, 청력 손실 및/또는 전정 기능장애와 관련되지 않은 질병 및/또는 장애의 치료를 위함)하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0538] 29. 임의의 이전 구체예에 있어서, 생성된 내이 털세포를 이용하여 고 처리량 스크리닝을 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0539] 30. 구체예 29에 있어서, 내이 털세포에 대한 독성에 대해 분자를 스크리닝하기 위해 생성된 내이 털세포를 이용하는 것을 포함하는 방법.
- [0540] 31. 구체예 29에 있어서, 내이 털세포(예를 들어, 상기 분자에 노출된 내이 털세포)의 생존을 개선시키는 능력에 대해 분자를 스크리닝하기 위해 생성된 내이 털세포를 이용하는 것을 포함하는 방법.
- [0541] 32. 줄기세포의 확장된 집단을 생성시키는 방법으로서,
- [0542] (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및
- [0543] (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 둘 모두를 줄기세포 집단(예를 들어, 시험관내, 생체외, 또는 생체내

샘플/대상체의 줄기세포 집단)에 투여하거나 투여되도록 하고,

- [0544] 이에 의해 줄기세포 집단 내의 줄기세포를 증식시키고, 줄기세포의 확장된 집단을 발생시키는 것을 포함하는, 방법.
- [0545] 33. 구체예 32에 있어서, 줄기세포 집단이 Lgr5+ 세포를 포함하는 방법.
- [0546] 34. 구체예 33에 있어서, 줄기세포 집단이 출생후 줄기세포를 포함하는 방법.
- [0547] 35. 구체예 32 내지 구체예 34 중 어느 하나에 있어서, 줄기세포 집단이 상피 줄기세포를 포함하는 방법.
- [0548] 36. 구체예 32 내지 구체예 35 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 HDAC 억제제이기도 한 notch 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0549] 37. 구체예 32 내지 구체예 36 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 합성 분자를 포함하는 notch 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0550] 38. 구체예 32 내지 구체예 37 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 VPA(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))(예를 들어, 여기서 VPA는 HDAC 억제제이기도 한 notch 효능제임)를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0551] 39. 구체예 32 내지 구체예 38 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 GSK3-베타 억제제이기도 한 Wnt 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0552] 40. 구체예 32 내지 구체예 39 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 합성 분자를 포함하는 Wnt 효능제를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0553] 41. 구체예 32 내지 구체예 40 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 CHIR99021(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))(예를 들어, 여기서 CHIR99021은 GSK3 베타 억제제임)를 줄기세포 집단에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0554] 42. 구체예 32 내지 구체예 41 중 어느 하나에 있어서, 귀로의 하나 이상의 주사(예를 들어, 중이 및/또는 내이로 경고막적으로 주사)를 수행함으로써 투여 단계가 수행되는 방법.
- [0555] 43. 구체예 32 내지 구체예 42 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 박동 방식으로 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제를 투여하고, 지속 방식으로 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제를 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0556] 44. 구체예 32 내지 구체예 43 중 어느 하나에 있어서, 줄기세포가 내이 줄기세포인 방법.
- [0557] 45. 구체예 32 내지 구체예 44 중 어느 하나에 있어서, 생성된 줄기 세포의 확장된 집단을 이용하여 고 처리량 스크리닝을 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0558] 46. 구체예 45에 있어서, 줄기세포 및/또는 이의 프로제니에 대한 독성에 대해 분자를 스크리닝하기 위해 생성된 줄기세포를 이용하는 것을 포함하는 방법.
- [0559] 47. 구체예 45에 있어서, 줄기세포 및/또는 이의 프로제니의 생존을 개선시키는 능력에 대해 분자를 스크리닝하기 위해 생성된 줄기세포를 이용하는 것을 포함하는 방법.
- [0560] 48. 청력 손실 및/또는 전정 기능 이상을 갖거나, 청력 손실 및/또는 전정 기능 이상이 발생할 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서,
- [0561] 청력 손실 및/또는 전정 기능 이상을 경험하거나, 청력 손실 및/또는 전정 기능 이상이 발생할 위험이 있는 대상체를 확인하고,
- [0562] (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및
- [0563] (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 둘 모두를 대상체에 투여하거나, 투여되도록 하고,
- [0564] 이에 의해 대상체에서 청력 손실 및/또는 전정 기능 이상을 치료하거나 예방하는 것을 포함하는, 방법.
- [0565] 49. 구체예 48에 있어서, 줄기세포 집단이 Lgr5+ 세포를 포함하는 방법.
- [0566] 50. 구체예 48 또는 구체예 49에 있어서, 줄기세포 집단이 출생후 세포를 포함하는 방법.

- [0567] 51. 구체에 48 내지 구체에 50 중 어느 하나에 있어서, 줄기세포 집단이 상피 줄기세포를 포함하는 방법.
- [0568] 52. 구체에 48 내지 구체에 51 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 HDAC 억제제이기도 한 notch 효능제를 대상체에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0569] 53. 구체에 48 내지 구체에 52 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 합성 분자를 포함하는 notch 효능제를 대상체에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0570] 54. 구체에 48 내지 구체에 53 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 VPA(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))(예를 들어, 여기서 VPA는 HDAC 억제제이기도 한 notch 효능제임)를 대상체에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0571] 55. 구체에 48 내지 구체에 54 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 GSK3-베타 억제제이기도 한 Wnt 효능제를 대상체에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0572] 56. 구체에 48 내지 구체에 55 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 합성 분자를 포함하는 Wnt 효능제를 대상체에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0573] 57. 구체에 48 내지 구체에 56 중 어느 하나에 있어서, 투여 단계가 CHIR99021(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))(예를 들어, 여기서 CHIR99021은 GSK3-베타 억제제임)를 대상체에 투여하거나, 투여되도록 하는 것을 포함하는 방법.
- [0574] 58. 구체에 48 내지 구체에 57 중 어느 하나에 있어서, 귀로의 하나 이상의 주사(예를 들어, 중이 및/또는 내이로 경고막적으로 주사)를 수행함으로써 투여 단계가 수행되는 방법.
- [0575] 59. 구체에 48 내지 구체에 58 중 어느 하나에 있어서, 박동 방식으로 notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제를 투여하고, 지속 방식으로 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제를 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0576] 60. 임의의 이전 구체예의 제1 또는 제2 조성물을 포함하는 조성물.
- [0577] 61. (a) (i) GSK3-베타 억제제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염 및/또는 Wnt 효능제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (ii) notch 효능제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염 및/또는 HDAC 억제제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.
- [0578] 62. (a) (i) GSK3-베타 억제제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (ii) notch 효능제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.
- [0579] 63. (a) (i) Wnt 효능제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (ii) notch 효능제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염; 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.
- [0580] 64. (a) (i) GSK3-베타 억제제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (ii) HDAC 억제제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.
- [0581] 65. (a) (i) Wnt 효능제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (ii) HDAC 억제제 또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염, 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.
- [0582] 65A. 구체에 61 내지 구체에 65 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 GSK3-베타 억제제를 포함하는 조성물.
- [0583] 65B. 구체에 61 내지 구체에 65 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 Wnt 효능제를 포함하는 조성물.
- [0584] 65C. 구체에 61 내지 구체에 65 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 notch 효능제를 포함하는 조성물.
- [0585] 65D. 구체에 61 내지 구체에 65 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 HDAC 억제제를 포함하는 조성물.
- [0586] 66. 동결건조된 형태의 GSK3-베타 억제제 및 notch 효능제를 포함하는 약학적 조성물.
- [0587] 67. 수화된 형태의 GSK3-베타 억제제 및 notch 효능제를 포함하는 약학적 조성물.
- [0588] 68. 구체에 66 또는 구체에 67에 있어서, GSK3-베타 억제제가 CHIR99021(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))인 약학적 조성물.
- [0589] 69. 구체에 66 내지 구체에 68 중 어느 하나에 있어서, notch 효능제가 VPA(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태

태(예를 들어, 염))인 약학적 조성물.

- [0590] 70. 내이 털세포를 생성시키는 방법으로서,
- [0591] 최초 줄기세포 집단(예를 들어, 시험관내, 생체외, 또는 생체내 샘플/대상체의 최초 줄기세포 집단)에서 줄기세포를 증식시켜, 줄기세포의 확장된 집단(예를 들어, 확장된 집단이 최초 줄기세포 집단보다 적어도 2배, 3배, 5배, 10배, 또는 20배 많도록 확장)을 발생시키고;
- [0592] 줄기세포의 확장된 집단을 GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및, 임의로, notch 억제제에 노출시켜, 이에 의해 줄기세포의 확장된 집단으로부터 내이 털세포의 생성을 촉진시키는 것을 포함하는, 방법.
- [0593] 71. 대상체의 내이 내의 세포 집단으로 CHIR99021(예를 들어, 약학적으로 허용되는 형태(예를 들어, 염))를 투여함으로써 내이 털세포의 생성을 촉진하는 것을 포함하는, 내이 털세포를 생성시키는 방법.
- [0594] 72. 최초 집단(예를 들어, 시험관내, 생체외, 또는 생체내 샘플/대상체의 최초 집단)에서 출생후 LGR5+ 세포를 증식시켜 LGR5+ 세포의 확장된 집단을 발생(예를 들어, 확장된 집단이 최초 줄기세포 집단보다 적어도 2배, 3배, 5배, 10배, 또는 20배 더 많도록 발생)시키는 것을 포함하는, 내이 털세포를 생성시키는 방법으로서, 상기 LGR5+ 세포의 확장된 집단이 내이 털세포를 발생시키는, 방법.
- [0595] 73. 대상체(생체내)의 최초 집단에서 출생후 Lgr5+ 상피 세포를 증식시켜 Lgr5+ 상피 세포의 확장된 집단을 발생(예를 들어, 확장된 집단이 최초 출생후 Lgr5+ 상피 세포 집단보다 적어도 2배, 3배, 5배, 10배, 또는 20배 더 많도록 발생)시키는 것을 포함하는, 질병 또는 장애를 치료하는 방법.
- [0596] 74. 줄기세포를 증식시키는 방법으로서,
- [0597] (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및
- [0598] (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제 둘 모두를 줄기세포 집단(예를 들어, 시험관내, 생체외, 또는 생체내 샘플/대상체의 줄기세포 집단)에 투여하거나, 투여되도록 하고, 이에 의해 줄기세포 집단에서 줄기세포를 증식시키고, 줄기세포의 확장된 집단을 발생시키고;
- [0599] 줄기세포의 확장된 집단으로부터 내이 털세포를 생성시키는 것을 포함하는, 방법.
- [0600] 75. (a) (i) GSK3-베타 억제제 및/또는 Wnt 효능제, 및 (ii) notch 효능제 및/또는 HDAC 억제제를 포함하는 하나 이상의 조성물의 세트로서, 하나 이상의 조성물 각각이 약학적으로 허용되는 담체에 제공되는, 하나 이상의 조성물의 세트, 및
- [0601] (b) 내이 장애를 치료하기 위해 하나 이상의 조성물의 세트를 이용하기 위한 설명서를 포함하는, 키트.
- [0602] 76. 구체에 75에 있어서, 하나 이상의 조성물의 세트가 또한 TGF β 억제제를 포함하는 키트.
- [0603] 77. 구체에 75 또는 구체에 76에 있어서, 하나 이상의 조성물의 세트가 또한 ROS 억제제를 포함하는 키트.
- [0604] 78. 구체에 77에 있어서, ROS 억제제가 비타민 C 또는 이의 유도체인 키트.
- [0605] 79. 구체에 75 내지 구체에 77 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 조성물의 세트가 주사(예를 들어, 주사기를 포함)될 수 있는 형태로 존재하는 키트.
- [0606] 80. 구체에 79에 있어서, 하나 이상의 조성물의 세트가 증이로 주사될 수 있는 형태로 존재하는 키트.
- [0607] 81. 와우 지지 세포 집단의 줄기세포 잠재성을 향상시키기 위한 방법.
- [0608] 82. 구체에 81에 있어서, 방법이 와우 지지 세포 집단에서 Wnt 경로를 활성화시키는 것을 포함하는 방법.
- [0609] 83. 임의의 이전 구체에 있어서, 방법이 와우 지지 세포 집단의 c-myc의 업스트림에서 Wnt 경로를 활성화시키는 것을 포함하는 방법.
- [0610] 84. 임의의 이전 구체에 있어서, 와우 지지 세포가 코르티 기관에 대해 내인성인 방법.
- [0611] 85. 임의의 이전 구체에 있어서, 와우 지지 세포 집단이 Lgr5⁺ 지지 세포의 집단을 포함하는 방법.
- [0612] 86. 임의의 이전 구체에 있어서, 와우 지지 세포 집단이 Lgr5⁺ 지지 세포를 포함하고, 방법이 Lgr5⁺ 지지 세포를 분열시키는 것을 유도하여 다능성 Lgr5⁺ 딸세포를 발생시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

- [0613] 87. 임의의 이전 구체예에 있어서, 모 및/또는 딸 $Lgr5^{+}$ 세포가 계속하여 털세포(들)로 분화하는 방법.
- [0614] 88. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제공된 지지 세포에서의 $Lgr5$ 발현이 이의 기준선 수준의 25% 내에서 유지되는 방법.
- [0615] 89. 임의의 이전 구체예에 있어서, $Lgr5$ 가 이의 기준선 발현 수준의 적어도 1.25, 1.5, 2, 5, 10, 100, 또는 1,000배만큼 지지 세포에서 상향조절되는 방법.
- [0616] 90. 임의의 이전 구체예에 있어서, $Lgr5$ 가 평균적으로 지지 세포 집단에 대한 기준선 발현 수준의 적어도 1.25, 1.5, 2, 5, 10, 100, 또는 1,000배만큼 지지 세포 집단에서 상향조절되고, 지지 세포가 계속하여 증식하는 방법.
- [0617] 91. 임의의 이전 구체예에 있어서, $Lgr5$ 가 평균적으로 지지 세포 집단에 대한 기준선 발현 수준의 적어도 1.25, 1.5, 2, 5, 10, 100, 또는 1,000배만큼 지지 세포 집단에서 상향조절되고, 지지 세포 집단의 일원이 분열하고 털세포로 분화하는 방법.
- [0618] 92. 딸세포에서 털세포로 분화하는 능력을 유지시키면서 줄기/전구 세포가 증식하는 것을 유도하는 것을 포함하는, 와우 세포 집단에 포함된 줄기/전구 지지 세포의 자가-재생을 유도하기 위한 방법.
- [0619] 93. 구체예 92에 있어서, 딸세포가 털세포로 분화하는 것을 가능케 하는 방법.
- [0620] 94. 구체예 92에 있어서, 딸세포가 털세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0621] 95. 구체예 92에 있어서, 집단의 임의의 유전적 변형 없이 $c-myc$ 유전자의 업스트림에서 Wnt 경로를 활성화시킴으로써 딸세포가 털세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0622] 96. 구체예 92에 있어서, $c-myc$ 유전자의 업스트림에서 Wnt 경로를 활성화시키는 활성을 일시적으로 유도하는 작은 유기 분자로 $c-myc$ 유전자의 업스트림에서 Wnt 경로를 활성화시킴으로써 딸세포가 털세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0623] 97. 구체예 92 내지 구체예 96 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 코르티 기관에 대해 내인성인 $LGR5^{+}$ 지지 세포를 포함하는 방법.
- [0624] 98. 줄기 세포 특성 유도와 관련된 경로의 활성화 또는 억제에 의해 지지 세포 집단의 자가-재생을 유도하는 능력을 갖는 조성물.
- [0625] 99. 구체예 98에 있어서, 경로가 Wnt, HDAC, Tgf-베타, RAR, DKK1, 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0626] 100. 구체예 98 또는 구체예 99에 있어서, 조성물이 경로를 활성화시키거나 억제하는 작은 유기 분자를 포함하는 조성물.
- [0627] 101. 구체예 98, 구체예 99 또는 구체예 100에 있어서, 조성물이 생체적합성 매트릭스를 포함하는 조성물.
- [0628] 102. 구체예 98 내지 구체예 101 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단으로 시험관내 적용되는 경우, 조성물이 줄기세포 증식 검정에서 높은 정도 및 높은 순도로 집단이 증식하도록 유도하고, 또한 줄기세포 분화 검정에서 집단이 털세포의 높은 순도 집단으로 분화하는 것을 가능케 하는 조성물.
- [0629] 103. 구체예 98 내지 구체예 102 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 지지 세포 집단을 증식시켜 많은 세대 동안 분열할 수 있는 줄기 세포를 생성시킴으로써 줄기세포 특성을 유도하고 유지하고, 생성된 세포의 높은 비율이 털세포로 분화하도록 하는 능력을 유지시키는 조성물.
- [0630] 104. 구체예 98 내지 구체예 102중 어느 하나에 있어서, 증식 세포가 $Lgr5$, $Sox2$, $Opem1$, $Phex$, $lin28$, $Lgr6$, $cyclin\ D1$, $Msx1$, Myb , Kit , $Gdnf3$, $Zic3$, $Dppa3$, $Dppa4$, $Dppa5$, $Nanog$, $Esrrb$, $Rex1$, $Dnmt3a$, $Dnmt3b$, $Dnmt3l$, $Utf1$, $Tcl1$, $Oct4$, $Klf4$, $Pax6$, $Six2$, $Zic1$, $Zic2$, $Otx2$, $Bmi1$, $CDX2$, $STAT3$, $Smad1$, $Smad2$, $smad2/3$, $smad4$, $smad5$, 및 $smad7$ 중 하나 이상을 포함하는 줄기세포 마커를 발현하는 조성물.
- [0631] 105. 지지 세포에서 줄기세포 특성을 유도하는 경로 및 메커니즘을 활성화시키고, 새로이 형성된 딸세포에서 지지 세포의 다능성 특성을 유지시키면서 활성화된 지지 세포를 증식시키고, 이후 확장된 집단이 털세포로 분화하도록 하거나 분화하도록 유도하여 확장된 와우 세포 집단을 형성시키는 것을 포함하는, 와우 세포 집단에서 지

지 세포의 세포 밀도를 증가시키기 위한 방법으로서, 확장된 와우 세포 집단 내의 털세포의 세포 밀도가 본래의 (확장되지 않은) 와우 세포 집단 내의 털세포의 세포 밀도를 초과하는, 방법.

- [0632] 106. 구체예 105에 있어서, 확장된 집단이 털세포로 분화하는 것을 가능케 하는 방법.
- [0633] 107. 구체예 105에 있어서, 확장된 집단이 털세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0634] 108. 구체예 105 내지 구체예 107 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 와우 조직으로 구성되는 방법.
- [0635] 109. 구체예 105 내지 구체예 108 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 시험관내 지지 세포 집단인 방법.
- [0636] 110. 구체예 105 내지 구체예 108 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 생체내 지지 세포 집단인 방법.
- [0637] 111. 구체예 105 내지 구체예 110 중 어느 하나에 있어서, 증식 단계가 바람직하게는 와우 구조의 본래의 조직을 실질적으로 유지하도록 조절되는 방법.
- [0638] 112. 구체예 105 내지 구체예 111 중 어느 하나에 있어서, 증식이 집단의 임의의 유전적 변형 없이 c-myc의 업스트림의 경로의 유도에 의해 일시적으로 유도되는 방법.
- [0639] 113. 구체예 105 내지 구체예 112 중 어느 하나에 있어서, 증식이 집단의 임의의 유전적 변형 없이 작은 유기 분자를 이용한 c-myc의 업스트림의 경로의 유도에 의해 일시적으로 유도되는 방법.
- [0640] 114. 구체예 105 내지 구체예 113 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 $Lgr5^{+}$ 이고, 코르티 기관에 대해 내인성인 지지 세포를 포함하는 방법.
- [0641] 115. $Lgr5^{+}$ 지지 세포에서 줄기세포 특성을 유도하거나 유지시키는 경로 및 메커니즘을 활성화시키고, 상기 줄기세포 특성을 유지시키면서 활성화된 $Lgr5^{+}$ 지지 세포를 증식시키고, 이후 확장된 집단이 털세포로 분화하도록 하거나 분화하도록 유도하여 확장된 와우 세포 집단을 형성시키는 것을 포함하는, 와우 세포 집단에서 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 세포 밀도를 증가시키기 위한 방법으로서, 확장된 와우 세포 집단 내의 털세포의 세포 밀도가 본래의 (확장되지 않은) 와우 세포 집단 내의 털세포의 세포 밀도를 초과하는, 방법.
- [0642] 116. 구체예 115에 있어서, 확장된 집단이 털세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0643] 117. 구체예 115에 있어서, 확장된 집단이 털세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0644] 118. 구체예 115 내지 구체예 117 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 와우 조직으로 구성되는 방법.
- [0645] 119. 구체예 115 내지 구체예 118 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 시험관내 지지 세포 집단인 방법.
- [0646] 120. 구체예 115 내지 구체예 118 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 생체내 지지 세포 집단인 방법.
- [0647] 121. 구체예 115 내지 구체예 120 중 어느 하나에 있어서, 증식 단계가 바람직하게는 와우 구조의 본래의 조직을 실질적으로 유지하도록 조절되는 방법.
- [0648] 122. 구체예 115 내지 구체예 121 중 어느 하나에 있어서, 증식이 집단의 임의의 유전적 변형 없이 c-myc의 업스트림의 경로의 유도에 의해 일시적으로 유도되는 방법.
- [0649] 123. 구체예 115 내지 구체예 122 중 어느 하나에 있어서, 증식이 집단의 임의의 유전적 변형 없이 작은 유기 분자를 이용한 c-myc의 업스트림의 경로의 유도에 의해 일시적으로 유도되는 방법.
- [0650] 124. 구체예 115 내지 구체예 123 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 코르티 기관에 대해 내인성인 $LGR5^{+}$ 세포를 포함하는 방법.
- [0651] 125. 와우 세포의 최초 집단에서 털세포의 세포 밀도를 증가시키기 위한 방법으로, 최초 집단이 털세포, Lgr^{-} 지지 세포, 및 $Lgr5^{+}$ 지지 세포를 포함하고, 상기 방법이 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 함유하는 줄기세포 증식제 조성물을 최초 집단에 투여하는 것을 포함하고, 조성물이 줄기세포 증식 검정에서 집단 내의 $Lgr5^{+}$ 지지 세포의 수의 확장을 유도하는 능력을 갖고, 줄기세포 분화 검정에서 집단 내의 $Lgr5^{+}$ 지지 세포가 털세포의 집단으로 분화하는 것을 가능케 하는, 방법.

- [0652] 126. 구체예 125에 있어서, 확장된 집단이 텔세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0653] 127. 구체예 125에 있어서, 확장된 집단이 텔세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0654] 128. 구체예 125 내지 구체예 127 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 와우 조직으로 구성되는 방법.
- [0655] 129. 구체예 125 내지 구체예 128 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 시험관내 지지 세포 집단인 방법.
- [0656] 130. 구체예 125 내지 구체예 128 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 생체내 지지 세포 집단인 방법.
- [0657] 131. 구체예 125 내지 구체예 130 중 어느 하나에 있어서, 증식 단계가 바람직하게는 와우 구조의 본래의 조직을 실질적으로 유지하도록 조절되는 방법.
- [0658] 132. 구체예 125 내지 구체예 131 중 어느 하나에 있어서, 증식이 집단의 임의의 유전적 변형 없이 c-myc의 업스트림의 경로의 유도에 의해 일시적으로 유도되는 방법.
- [0659] 133. 구체예 125 내지 구체예 132 중 어느 하나에 있어서, 증식이 집단의 임의의 유전적 변형 없이 작은 유기 분자를 이용한 c-myc의 업스트림의 경로의 유도에 의해 일시적으로 유도되는 방법.
- [0660] 134. 구체예 125 내지 구체예 133 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 코르티 기관에 대해 내인성인 $Lgr5^{+}$ 세포를 포함하는 방법.
- [0661] 135. 구체예 125 내지 구체예 134 중 어느 하나에 있어서, 방법이 줄기세포 증식 검정에서 Sox2, Opem1, Phex, lin28, Lgr6, cyclin D1, Msx1, Myb, Kit, Gdnf3, Zic3, Dppa3, Dppa4, Dppa5, Nanog, Esrrb, Rex1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l, Utf1, Tcf1, Oct4, Klf4, Pax6, Six2, Zic1, Zic2, Otx2, Bmi1, CDX2, STAT3, Smad1, Smad2, smad2/3, smad4, smad5, 및 smad7로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 줄기세포 마커를 발현하는 줄기세포를 생성하는 방법.
- [0662] 136. 구체예 125 내지 구체예 135 중 어느 하나에 있어서, $Lgr5^{+}$ 인 집단 내의 세포의 분획이 증가되는 방법.
- [0663] 137. 텔세포 및 지지 세포를 포함하는 와우 세포의 최초 집단에서 텔세포의 세포 밀도를 증가시키기 위한 방법으로서,
- [0664] 최초 집단에서 지지 세포의 수를 선택적으로 확장시켜 중간 와우 세포 집단을 형성시키고, 여기서 중간 와우 세포 집단에서의 지지 세포 대 텔세포의 수의 비는 최초 와우 세포 집단에서의 지지 세포 대 텔세포의 수의 비를 초과하고,
- [0665] 중간 와우 세포 집단에서 텔세포의 수를 선택적으로 확장시켜 확장된 와우 세포 집단을 형성시키고, 여기서 확장된 와우 세포 집단에서의 텔세포 대 지지 세포의 수의 비는 중간 와우 세포 집단에서의 텔세포 대 지지 세포의 수의 비를 초과하는 것을 포함하는, 방법.
- [0666] 138. 구체예 137에 있어서, 중간 집단이 텔세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0667] 139. 구체예 137에 있어서, 중간 집단이 텔세포로 분화하도록 유도되는 방법.
- [0668] 140. 구체예 137 내지 구체예 139 중 어느 하나에 있어서, 최초 와우 세포 집단이 와우 조직으로 구성되는 방법.
- [0669] 141. 구체예 137 내지 구체예 139 중 어느 하나에 있어서, 최초 와우 세포 집단이 시험관내 집단인 방법.
- [0670] 142. 구체예 137 내지 구체예 139 중 어느 하나에 있어서, 최초 와우 세포 집단이 생체내 집단인 방법.
- [0671] 143. 구체예 137 내지 구체예 142 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포의 선택적 확장이 와우 구조의 본래의 조직을 실질적으로 유지하도록 조절되는 방법.
- [0672] 144. 구체예 137 내지 구체예 143 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포의 선택적 확장이 집단의 임의의 유전적 변형 없이 c-myc의 업스트림의 경로의 유도에 의해 일시적으로 유도되는 방법.
- [0673] 145. 구체예 137 내지 구체예 144 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포의 선택적 확장이 집단의 임의의 유전적 변형 없이 작은 유기 분자를 이용한 c-myc의 업스트림의 경로의 유도에 의해 유도되는 방법.
- [0674] 146. 구체예 137 내지 구체예 145 중 어느 하나에 있어서, 지지 세포 집단이 코르티 기관에 대해 내인성인

Lgr5⁺ 세포를 포함하는 방법.

- [0675] 147. 구체예 137 내지 구체예 146 중 어느 하나에 있어서, 방법이 줄기세포 증식 검정에서 Lgr5, Sox2, Opem1, Phex, lin28, Lgr6, cyclin D1, Msx1, Myb, Kit, Gdnf3, Zic3, Dppa3, Dppa4, Dppa5, Nanog, Esrrb, Rex1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l, Utf1, Tcl1, Oct4, Klf4, Pax6, Six2, Zic1, Zic2, Otx2, Bmi1, CDX2, STAT3, Smad1, Smad2, smad2/3, smad4, smad5, 및 smad7로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 줄기세포 마커를 발현하는 줄기세포를 생성하는 방법.
- [0676] 148. 구체예 137 내지 구체예 147 중 어느 하나에 있어서, Lgr5⁺인 중간 집단 내의 세포의 분획이 Lgr5⁺인 최초 집단 내의 세포의 분획보다 큰 방법.
- [0677] 149. Lgr5⁺ 지지 세포의 수를 증가시키거나 와우 세포의 최초 집단에서의 Lgr5 활성을 증가시키는 방법으로서, 최초 집단이 지지 세포 및 털세포를 포함하는, 방법.
- [0678] 150. 구체예 149에 있어서, Lgr5⁺ 지지 세포의 수가 최초 집단에 비해 확장된 중간 집단이 형성되는 방법.
- [0679] 151. 구체예 149 또는 구체예 150에 있어서, 최초 집단에 비해 지지 세포의 Lgr5 활성이 증가된 중간 집단이 형성되는 방법.
- [0680] 152. 구체예 149 내지 구체예 151 중 어느 하나에 있어서, 일반적으로 Lgr5가 결핍되거나, 매우 낮은 수준의 Lgr5를 갖는 세포 유형에서 Lgr5⁺ 발현을 활성화시킴으로써 Lgr5⁺ 세포의 수가 최초 세포 집단에 비해 증가되는 방법.
- [0681] 153. 구체예 149 내지 구체예 151 중 어느 하나에 있어서, 최초 와우 세포 집단에 비해 Lgr5⁺ 지지 세포의 수가 확장되고, Lgr5 활성이 증가된 중간 집단이 형성되는 방법.
- [0682] 154. 구체예 149 내지 구체예 151 중 어느 하나에 있어서, 최초 와우 세포 집단에 비해 Lgr5⁺ 지지 세포의 수가 확장되고, Lgr5 활성이 증가된 중간 집단이 형성되고, 중간 와우 세포 집단 내의 털세포의 수가 이후 선택적으로 확장되어 확장된 와우 세포 집단을 형성하고, 확장된 와우 세포 집단에서의 털세포 대 지지 세포의 비가 중간 와우 세포 집단에서의 털세포 대 지지 세포의 수의 비를 초과하는, 방법.
- [0683] 155. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 154 중 어느 하나에 있어서, 방법이 합성기(S-phase)인 Lgr5⁺ 세포의 집단을 생성시키는 방법.
- [0684] 156. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 154 중 어느 하나에 있어서, 방법이 성체 포유동물 와우 세포와 함께 이용되고, 방법이 합성기인 성체 포유류 Lgr5⁺ 세포의 집단을 생성시키는 방법.
- [0685] 157. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 156 중 어느 하나에 있어서, 방법이 와우 세포 집단과 줄기세포 증식제를 접촉시키는 것을 포함하는 방법.
- [0686] 158. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 156 중 어느 하나에 있어서, 방법이 와우 세포 집단과 줄기성 드라이버를 함유하는 줄기세포 증식제를 접촉시키는 것을 포함하는 방법.
- [0687] 159. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 156 중 어느 하나에 있어서, 방법이 와우 세포 집단과 분화 억제제를 접촉시키는 것을 포함하는 방법.
- [0688] 160. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 156 중 어느 하나에 있어서, 방법이 와우 세포 집단과 줄기성 드라이버를 함유하는 줄기세포 증식제 및 분화 억제제를 접촉시키는 것을 포함하는 방법.
- [0689] 161. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 160 중 어느 하나에 있어서, 줄기성 드라이버가 Lgr5⁺ 줄기세포의 증식을 유도하기 위해 사용되는 방법.
- [0690] 162. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 161 중 어느 하나에 있어서, 분화 억제제가 효과적인 분화 억제 농도로 존재하지 않는 경우, 줄기성 드라이버가 LGR5⁺ 세포의 털세포로의 분화를 유도하기 위해 사용되는 방법.
- [0691] 163. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 162 중 어느 하나에 있어서, 증식 및 분화 둘 모두

를 유도하는 줄기성 드라이버가 GSK3베타 억제제 및 Wnt 효능제를 포함하는 방법.

- [0692] 164. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 163 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 방출 검정에서 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 상이한 속도로 방출하는 제형 내에 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 포함하는 방법.
- [0693] 165. 구체예 81 내지 구체예 97 및 구체예 105 내지 구체예 163 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 내이 환경으로의 활성제의 일정하거나, 지속되거나, 연장되거나, 지연되거나, 박동적인 방출 속도로 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 방출하는 제형 내에 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 포함하는 방법.
- [0694] 166. 임의의 이전 구체예에 있어서, 분화 억제제가 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제일 수 있는 방법 또는 조성물.
- [0695] 167. 임의의 이전 구체예에 있어서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도 및 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제를 갖는 제1 증식 기간 후, 효과적인 줄기성 드라이버 농도를 갖고 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제는 갖지 않는 분화 기간이 존재하는 방법 또는 조성물.
- [0696] 168. 임의의 이전 구체예에 있어서, 줄기성 드라이버 및 분화 억제제가 상이한 속도로 줄기성 드라이버 및 분화 억제제를 방출하는 제형 내의 와우 세포로 제공되는 방법 또는 조성물.
- [0697] 169. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제형이 내이 환경으로의 줄기성 드라이버 및 분화 억제제의 일정하거나, 지속되거나, 연장되거나, 지연되거나, 박동적인 방출 속도를 제공하는 방법 또는 조성물.
- [0698] 170. 임의의 이전 구체예에 있어서, 제형이 효과적인 줄기성 드라이버 농도 및 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제를 갖는 제1 증식 기간 후, 효과적인 줄기성 드라이버 농도를 갖고 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제는 갖지 않는 분화 기간을 제공하는 방식으로 줄기성 드라이버 및 분화 억제제제를 방출하는 방법 또는 조성물.
- [0699] 171. 임의의 이전 구체예에 있어서, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제를 갖는 제1 증식 기간 후, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제를 갖고 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제는 갖지 않는 분화 기간이 존재하는 방법 또는 조성물.
- [0700] 172. 구체예 171에 있어서, 제형이 내이 환경으로의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제의 일정하거나, 지속되거나, 연장되거나, 지연되거나, 박동적인 방출 속도를 제공하는 방법 또는 조성물.
- [0701] 173. 구체예 171 또는 구체예 172에 있어서, 제형이 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제를 갖는 제1 증식 기간 후, 효과적인 줄기성 드라이버 농도의 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제를 갖고 효과적인 분화 억제 농도의 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제는 갖지 않는 분화 기간을 제공하는 방식으로 Wnt 효능제 또는 GSK3베타 억제제 및 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제를 방출하는 방법 또는 조성물.
- [0702] 174. 임의의 이전 구체예에 있어서, 분화 억제제가 또한 줄기성 드라이버인 방법 또는 조성물.
- [0703] 175. 임의의 이전 구체예에 있어서, 분화 억제제가 Notch 효능제이고, 또한 줄기성 드라이버인 방법 또는 조성물.
- [0704] 176. 임의의 이전 구체예에 있어서, 분화 억제제가 발프로산인 방법 또는 조성물.
- [0705] 177. 임의의 이전 구체예에 있어서, 분화 억제제가 또한 줄기성 드라이버인 경우, 분화 억제제의 농도가 분화 기간 동안 효과적인 분화 억제 농도 아래로 떨어지는 방법 또는 조성물.
- [0706] 178. 임의의 이전 구체예에 있어서, 분화 억제제 및 줄기성 드라이버가 지속 방출 중합체 젤 내에 함유되는 방법 또는 조성물.
- [0707] 179. 임의의 이전 구체예에 있어서, 젤이 바늘을 통해 주사되고(또는 바늘을 통한 주사되도록 적합화되고), 중이 공간에서 고체가 되는 방법 또는 조성물.
- [0708] 180. 구체예 179에 있어서, 젤이 열가역성 중합체를 포함하는 방법 또는 조성물.

- [0709] 181. 구체예 179에 있어서, 젤이 폴록사머 407을 포함하는 방법 또는 조성물.
- [0710] 182. 임의의 이전 구체예에 있어서, 지지 세포에서의 Notch 활성화 수준이 본래 상태의 지지 세포에서의 Notch 활성화 수준의 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100%를 유지하는 방법 또는 조성물.
- [0711] 183. (i) GSK3-베타 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및/또는 Wnt 효능제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (ii) Notch 효능제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및/또는 HDAC 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)의 (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함하는 조성물을 줄기세포 집단(예를 들어, 시험관내, 생체외, 또는 생체내 샘플/대상체의 줄기세포 집단)에 투여하거나 투여되도록 하여, 이에 의해 줄기세포 집단 내의 줄기세포를 증식시키고, 줄기세포의 확장된 집단을 발생시키고; 줄기세포의 확장된 집단을 GSK3-베타 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및/또는 Wnt 효능제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및, 임의로, notch 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염)에 노출시켜, 이에 의해 줄기세포의 확장된 집단으로부터의 내이 털세포의 생성을 촉진하는 것을 포함하는, 털세포를 생성시키기 위한 방법 및 조성물.
- [0712] 184. 대상체에서 청각 장애를 치료하기 위해 유효량의 (a) (i) HDAC 억제제 및/또는 Notch 활성화제 및 (ii) GSK3-베타 억제제, 이의 유도체[예를 들어, HDAC 억제제의 유도체, Notch 활성화제의 유도체, 및/또는 GSK3-베타 억제제의 유도체], 이의 약학적으로 허용되는 염[예를 들어, HDAC 억제제의 약학적으로 허용되는 염, Notch 활성화제의 약학적으로 허용되는 염, 및/또는 GSK3-베타 억제제의 약학적으로 허용되는 염], 또는 이의 조합물 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 청각 장애를 예방하거나 치료하기 위한 방법. 따라서, 예를 들어, 조성물은 (a) HDAC 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 GSK3-베타 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 추가의 예에서, 조성물은 (a) Notch 활성화제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염) 및 GSK3-베타 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 추가의 예에서, 조성물은 (a) HDAC 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), Notch 활성화제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 GSK3-베타 억제제(또는 이의 유도체 또는 약학적으로 허용되는 염), 및 (b) 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다.
- [0713] 185. 털세포 전구체를 증식시키고/시키거나 털세포의 수를 증가시키는 작용제, 및 또한 지지 세포 및/또는 털세포를 보호하는 작용제(예를 들어, 지지세포 및/또는 털세포의 생존을 지지하기 위함)를 확인하고, 또한 지지 세포 또는 털세포를 포함하는 분화된 프로제니에 대해 독성이거나 독성이 아닌 작용제를 확인하기 위한 방법.
- [0714] 186. 대상체에서 청각 장애를 치료하기 위해 유효량의 HDAC 억제제 및/또는 Notch 활성화제 및 GSK3베타 억제제 또는 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 치료를 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 청각 장애를 예방하거나 치료하기 위한 방법.
- [0715] 187. 유효량의 본원에 기재된 조성물 또는 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 허용되는 담체 또는 부형제를 대상체에 투여하고, 이에 의해 대상체의 청각계의 세포의 손실 또는 사멸을 억제하는 것을 포함하는, 대상체의 청각계의 세포의 손실 또는 사멸을 억제하기 위한 방법.
- [0716] 188. 내인성 복구를 증가시키거나 개시시키기에 효과적인 양의 본원에 기재된 작용제 또는 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물을 대상체에 투여하고, 이에 의해 대상체의 청각계의 세포의 성장을 유지시키거나 촉진시키는 것을 포함하는, 대상체의 청각계의 세포의 성장을 유지시키거나 촉진하기 위한 방법.
- [0717] 189. 임의의 이전 구체예에 있어서, 줄기세포 증식 검정의 완료시 세포 집단에서의 평균 시험관내 Lgr5 활성이 줄기세포 증식 검정의 시작시의 세포 집단에서의 평균 시험관내 Lgr5 활성의 25, 50, 75, 또는 90% 이상인 방법.
- [0718] 190. 임의의 이전 구체예에 있어서, 줄기세포 증식 검정의 완료시 세포 집단에서의 평균 시험관내 notch 활성이 줄기세포 증식 검정의 시작시의 세포 집단에서의 평균 시험관내 notch 활성의 25, 50, 75, 또는 90% 이상인 방법.
- [0719] 191. 지지 세포를 포함하는 모 집단의 세포를 포함하는 와우 조직에서 와우 줄기세포의 집단을 확장시키기 위한

방법으로서, 와우 조직과 줄기세포 증식제를 접촉시켜 와우 조직에서 확장된 집단의 세포를 형성시키는 것을 포함하고, 줄기세포 증식제가 (i) 줄기세포 증식 검정에서 줄기세포 증식 검정 세포 집단 내의 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 적어도 10배만큼 증가시킬 수 있고, (ii) 줄기세포 분화 검정에서 $Lgr5^{+}$ 세포를 포함하는 세포 집단으로부터 털세포를 형성시킬 수 있는, 방법.

- [0720] 192. 구체예 191에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기세포 증식 검정에서 줄기세포 증식 검정 세포 집단 내의 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 적어도 50배만큼 증가시킬 수 있는 방법.
- [0721] 193. 구체예 191에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기세포 증식 검정에서 줄기세포 증식 검정 세포 집단 내의 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 적어도 100배만큼 증가시킬 수 있는 방법.
- [0722] 194. 구체예 191 내지 구체예 193 중 어느 하나에 있어서, 세포의 확장된 집단이 모 집단보다 많은 수의 털세포를 포함하는 방법.
- [0723] 195. 구체예 191 내지 구체예 194 중 어느 하나에 있어서, $Lgr5^{+}$ 세포인 줄기세포 증식 검정 세포 집단 내의 총 세포의 분획이 줄기세포 증식 검정의 시작으로부터 종료까지 적어도 2배만큼 증가하는 방법.
- [0724] 196. 구체예 191 내지 구체예 195 중 어느 하나에 있어서, 털세포인 줄기세포 분화 검정 세포 집단 내의 총 세포의 분획이 줄기세포 분화 검정의 시작으로부터 종료까지 적어도 2배만큼 증가하는 방법.
- [0725] 197. 구체예 191 내지 구체예 196 중 어느 하나에 있어서, 털세포인 줄기세포 증식 검정 세포 집단 내의 총 세포의 분획이 줄기세포 증식 검정의 시작으로부터 종료까지 적어도 25%만큼 감소하는 방법.
- [0726] 198. 구체예 191 내지 구체예 197 중 어느 하나에 있어서, 줄기세포 증식 검정 세포 집단 내의 세포당 평균 $Lgr5^{+}$ 활성이 줄기세포 증식 검정에서 적어도 10%만큼 증가하는 방법.
- [0727] 199. 구체예 191 내지 구체예 198 중 어느 하나에 있어서, 줄기세포 증식 검정의 완료시 세포 집단에서의 평균 시험관내 $Lgr5$ 활성이 줄기세포 증식 검정의 시작시의 세포 집단에서의 평균 시험관내 $Lgr5$ 활성의 25, 50, 75, 또는 90% 이상인 방법.
- [0728] 200. 구체예 191 내지 구체예 199 중 어느 하나에 있어서, 줄기세포 증식 검정의 완료시 세포 집단에서의 평균 시험관내 notch 활성이 줄기세포 증식 검정의 시작시에 사용된 세포 집단에서의 평균 시험관내 notch 활성의 25, 50, 75, 또는 90% 이상인 방법.
- [0729] 201. 구체예 191 내지 구체예 200 중 어느 하나에 있어서, 와우 조직이 본래의 형태를 유지하는 방법.
- [0730] 202. 구체예 191 내지 구체예 201 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 생체적합성 매트릭스에 분산되는 방법.
- [0731] 203. 구체예 202에 있어서, 생체적합성 매트릭스가 생체적합성 젤 또는 포말인 방법.
- [0732] 204. 구체예 191 내지 구체예 203 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 조절 방출 제형인 방법.
- [0733] 205. 구체예 191 내지 구체예 204 중 어느 하나에 있어서, 와우 조직이 생체내 와우 조직인 방법.
- [0734] 206. 구체예 191 내지 구체예 204 중 어느 하나에 있어서, 와우 조직이 생체외 와우 조직인 방법.
- [0735] 207. 구체예 191 내지 구체예 205 중 어느 하나에 있어서, 방법이 합성기인 $Lgr5^{+}$ 세포의 집단을 생성시키는 방법.
- [0736] 208. 구체예 191 내지 구체예 207 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함하는 방법.
- [0737] 209. 구체예 191 내지 구체예 208 중 어느 하나에 있어서, 접촉이,
- [0738] 최초 단계에서, 적어도 줄기성 드라이버 농도 및 적어도 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제; 및
- [0739] 이후 단계에서, 적어도 줄기성 드라이버 농도 및 효과적인 분화 억제 농도 미만의 분화 억제제를 와우 조직에 제공하는, 방법.
- [0740] 210. 구체예 191 내지 구체예 209 중 어느 하나에 있어서, 와우 조직이 대상체 내의 와우 조직이고, 와우 조직

과 조성물을 접촉시키는 것이 조성물을 대상체에 경고막적으로 투여함으로써 달성되는 방법.

- [0741] 211. 구체예 210에 있어서, 와우 조직과 조성물을 접촉시키는 것이 대상체의 개선된 청각 기능을 발생시키는 방법.
- [0742] 212. 생체적합성 매트릭스 및 적어도 하나의 줄기세포 증식제를 포함하는 조성물로서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기세포 증식 검정에서 $LGR5^{+}$ 세포의 최초 시험 집단을 확장시켜 확장된 시험 집단을 생성시킬 수 있고, 확장된 시험 집단이 최초 시험 집단보다 적어도 10배 더 많은 $LGR5^{+}$ 세포를 갖는, 조성물.
- [0743] 213. 구체예 212에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기세포 증식 검정에서 줄기세포 증식 검정 세포 집단 내의 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 적어도 50배만큼 증가시킬 수 있는 조성물.
- [0744] 214. 구체예 212에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기세포 증식 검정에서 줄기세포 증식 검정 세포 집단 내의 $Lgr5^{+}$ 세포의 수를 적어도 100배만큼 증가시킬 수 있는 조성물.
- [0745] 215. 구체예 212 내지 구체예 214 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 생체적합성 매트릭스에 분산되는 조성물.
- [0746] 216. 구체예 215에 있어서, 생체적합성 매트릭스가 생체적합성 젤 또는 포말인 조성물.
- [0747] 217. 구체예 215에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기세포 증식 검정에서 줄기세포 증식 검정 세포 집단에서의 세포당 평균 $Lgr5^{+}$ 활성을 적어도 10%만큼 증가시킬 수 있는 조성물.
- [0748] 218. 구체예 212 내지 구체예 217 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 중 적어도 하나를 포함하는 조성물.
- [0749] 219. 구체예 212 내지 구체예 218 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함하는 조성물.
- [0750] 220. 구체예 212 내지 구체예 219 중 어느 하나에 있어서, 줄기세포 증식제가 효과적인 줄기성 드라이버 농도보다 100배 더 큰 농도의 줄기성 드라이버 및 분화 억제제의 효과적인 분화 억제 농도보다 적어도 100배 더 큰 농도의 분화 억제제를 포함하는 조성물.
- [0751] 221. 구체예 212 내지 구체예 220 중 어느 하나에 있어서, 조성물이 조절 방출 제형인 조성물.
- [0752] 222. 구체예 221에 있어서, 대상체에 경고막적으로 투여되는 경우 조절 방출 제형이 줄기세포 증식제의 즉시 방출, 지연 방출, 지속 방출, 연장된 방출, 가변적 방출, 박동적 방출, 또는 이중-양식 방출을 제공하는 조성물.
- [0753] 223. 구체예 221 또는 구체예 222에 있어서, 대상체에 투여되는 경우 조절 방출 제형이 (a) 최초 단계에서, 적어도 효과적인 줄기성 드라이버 농도 및 적어도 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제; 및 (b) 이후 단계에서, 적어도 효과적인 줄기성 드라이버 농도 및 효과적인 분화 억제 농도 미만의 분화 억제제를 제공하는 조성물.
- [0754] 224. 구체예 191 내지 구체예 211 또는 구체예 212 내지 구체예 223 중 어느 하나에 있어서, 줄기성 드라이버가 GSK3-베타 억제제, GSK3-베타 억제제 유도체, Wnt 효능제, Wnt 효능제 유도체, 또는 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용되는 염인 방법 또는 조성물.
- [0755] 225. 구체예 191 내지 구체예 211 또는 구체예 212 내지 구체예 223 중 어느 하나에 있어서, 분화 억제제가 notch 효능제, notch 효능제 유도체; HDAC 억제제; HDAC 억제제 유도체, 또는 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용되는 염인 방법 또는 조성물.
- [0756] 226. 구체예 191 내지 구체예 211 또는 구체예 212 내지 구체예 223 중 어느 하나에 있어서, 줄기성 드라이버가 CHIR99021, LY2090314, 리튬, A1070722, BML-284 및 SKL2001로 구성된 군으로부터 선택되는 방법 또는 조성물.
- [0757] 227. 구체예 191 내지 구체예 211 또는 구체예 212 내지 구체예 223 중 어느 하나에 있어서, 분화 억제제가 발프로산, SAHA 및 Tubastatin A로 구성된 군으로부터 선택되는 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제인 방법 또는 조성물.
- [0758] 228. 청력 손실을 갖거나, 청력 손실이 발생할 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 대상체의 와우 조직

으로 적어도 하나의 줄기세포 증식제를 포함하는 조성물을 경고막적으로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

- [0759] 229. 구체예 228에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 중 적어도 하나를 포함하는 방법.
- [0760] 230. 구체예 228 또는 구체예 229에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함하는 방법. 청구항
- [0761] 231. 세포의 모 집단을 포함하는 와우 조직에서 와우 세포의 집단을 확장시키기 위한 방법으로서, 와우 조직과 줄기세포 증식제를 접촉시켜 와우 조직에서 세포의 확장된 집단을 형성시키는 것을 포함하고, 줄기세포 증식제가 (i) 줄기세포 증식 검정에서 증식 검정 기간에 걸쳐 증식 검정 최초 세포 집단으로부터 증식 검정 최종 세포 집단을 형성할 수 있고, (ii) 줄기세포 분화 검정에서 분화 검정 기간에 걸쳐 분화 검정 최초 세포 집단으로부터 분화 검정 최종 세포 집단을 형성시킬 수 있으며, 여기서,
- [0762] (a) 증식 검정 최초 세포 집단이 (i) 증식 검정 최초 수의 총 세포, (ii) 증식 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 증식 검정 최초 수의 텔세포, (iv) 증식 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 증식 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 증식 검정 최초 수의 텔세포 대 증식 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최초 텔세포 분획을 갖고;
- [0763] (b) 증식 검정 최종 세포 집단이 (i) 증식 검정 최종 수의 총 세포, (ii) 증식 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 증식 검정 최종 수의 텔세포, (iv) 증식 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 증식 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획 및 (v) 증식 검정 최종 수의 텔세포 대 증식 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 증식 검정 최종 텔세포 분획을 갖고;
- [0764] (c) 분화 검정 최초 세포 집단이 (i) 분화 검정 최초 수의 총 세포, (ii) 분화 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 분화 검정 최초 수의 텔세포, (iv) 분화 검정 최초 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 분화 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 분화 검정 최초 수의 텔세포 대 분화 검정 최초 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최초 텔세포 분획을 갖고;
- [0765] (d) 분화 검정 최종 세포 집단이 (i) 분화 검정 최종 수의 총 세포, (ii) 분화 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포, (iii) 분화 검정 최종 수의 텔세포, (iv) 분화 검정 최종 수의 $Lgr5^{+}$ 세포 대 분화 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획, 및 (v) 분화 검정 최종 수의 텔세포 대 분화 검정 최종 수의 총 세포의 비와 같은 분화 검정 최종 텔세포 분획을 갖고;
- [0766] (e) $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최종 수가 $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최초 수를 적어도 10배만큼 초과하고;
- [0767] (f) 텔세포의 분화 검정 최종 수가 0이 아닌 수인, 방법.
- [0768] 232. 구체예 231에 있어서, $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최종 수가 $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최초 수보다 적어도 50배만큼 더 많은 방법.
- [0769] 233. 구체예 231에 있어서, $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최종 수가 $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최초 수보다 적어도 100배만큼 더 많은 방법.
- [0770] 234. 구체예 231 내지 구체예 233 중 어느 하나에 있어서, 와우 조직 내의 세포의 확장된 집단이 모 집단보다 많은 수의 텔세포를 포함하는 방법.
- [0771] 235. 구체예 231 내지 구체예 234 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 2배만큼 더 많은 방법.
- [0772] 236. 구체예 231 내지 구체예 235 중 어느 하나에 있어서, 분화 검정 최종 텔세포 분획이 분화 검정 최초 텔세포 분획보다 적어도 2배만큼 더 많은 방법.

- [0773] 237. 구체예 231 내지 구체예 236 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 텔세포 분획이 증식 검정 최초 텔세포 분획보다 적어도 25% 더 적은 방법.
- [0774] 238. 구체예 231 내지 구체예 237 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 10% 더 많은 방법.
- [0775] 239. 구체예 231 내지 구체예 238 중 어느 하나에 있어서, 와우 조직이 본래의 형태를 유지하는 방법.
- [0776] 240. 구체예 231 내지 구체예 238 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식체가 생체적합성 매트릭스에 분산되는 방법.
- [0777] 241. 구체예 231 내지 구체예 240 중 어느 하나에 있어서, $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최종 수가 $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최초 수보다 적어도 100배만큼 더 많은 방법.
- [0778] 242. 구체예 231 내지 구체예 240 중 어느 하나에 있어서, $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최종 수가 $Lgr5^{+}$ 세포의 증식 검정 최초 수보다 적어도 500배만큼 더 많은 방법.
- [0779] 243. 구체예 231 내지 구체예 242 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 2배만큼 더 많은 방법.
- [0780] 244. 구체예 231 내지 구체예 242 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 4배만큼 더 많은 방법.
- [0781] 245. 구체예 231 내지 구체예 242 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 8배만큼 더 많은 방법.
- [0782] 246. 구체예 231 내지 구체예 242 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 16배만큼 더 많은 방법.
- [0783] 247. 구체예 231 내지 구체예 242 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 32배만큼 더 많은 방법.
- [0784] 248. 구체예 231 내지 구체예 247 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 텔세포 분획이 증식 검정 최초 텔세포 분획보다 적어도 25% 더 적은 방법.
- [0785] 249. 구체예 231 내지 구체예 247 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 텔세포 분획이 증식 검정 최초 텔세포 분획보다 적어도 50% 더 적은 방법.
- [0786] 250. 구체예 231 내지 구체예 247 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 텔세포 분획이 증식 검정 최초 텔세포 분획보다 적어도 75% 더 적은 방법.
- [0787] 251. 구체예 231 내지 구체예 250 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 10% 더 많은 방법.
- [0788] 252. 구체예 231 내지 구체예 250 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 10% 더 많은 방법.
- [0789] 253. 구체예 231 내지 구체예 250 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 20% 더 많은 방법.
- [0790] 254. 구체예 231 내지 구체예 250 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 $Lgr5^{+}$ 세포 분획이 증식 검정 최초 $Lgr5^{+}$ 세포 분획보다 적어도 30% 더 많은 방법.

- [0791] 255. 구체예 231 내지 구체예 250 중 어느 하나에 있어서, 증식 검정 최종 Lgr5⁺ 세포 분획이 증식 검정 최종 Lgr5⁺ 세포 분획보다 적어도 50% 더 많은 방법.
- [0792] 추가 구체예는 하기를 포함한다:
- [0793] 1. 와우 조직과 적어도 하나의 줄기세포 증식제를 포함하는 조성물을 접촉시키는 것을 포함하는, LGR5+ 세포 집단을 갖는 와우 조직에서 LGR5+ 세포의 집단을 확장시키기 위한 방법.
- [0794] 2. 제 1항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기세포 증식 검정에서 LGR5+ 세포의 최초 시험 집단을 확장시켜 확장된 시험 집단을 생성시킬 수 있고, 확장된 시험 집단이 최초 시험 집단보다 적어도 10배 더 많은 LGR5+ 세포를 갖는, 방법.
- [0795] 3. 제 2항에 있어서, 확장된 시험 집단이 최초 시험 집단보다 적어도 2배 더 분화 가능한 LGR5+ 세포를 갖는 방법.
- [0796] 4. 제 2항에 있어서, 확장된 시험 집단이 최초 시험 집단보다 적어도 10배 더 분화 가능한 LGR5+ 세포를 갖는 방법.
- [0797] 5. 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 와우 조직의 하나 이상의 형태학적 특징이 유지되는 방법.
- [0798] 6. 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 생체적합성 매트릭스에 분산되는 방법.
- [0799] 7. 제 6항에 있어서, 생체적합성 매트릭스가 생체적합성 젤 또는 포말인 방법.
- [0800] 8. 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 조절 방출 제형인 방법.
- [0801] 9. 제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 와우 조직이 생체내 와우 조직인 방법.
- [0802] 10. 제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 와우 조직이 생체외 와우 조직인 방법.
- [0803] 11. 제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 중 적어도 하나를 포함하는 방법.
- [0804] 12. 제 11항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함하는 방법.
- [0805] 13. 제 12항에 있어서, 접촉이,
- [0806] 최초 단계에서, 적어도 효과적인 증식 농도의 줄기성 드라이버 및 적어도 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제; 및
- [0807] 이후 단계에서, 적어도 효과적인 증식 농도의 줄기성 드라이버 및 효과적인 분화 억제 농도 미만의 분화 억제제를 제공하는, 방법.
- [0808] 14. 제 1항 내지 제 9항 또는 제 11항 내지 제 13항 중 어느 하나에 있어서, 와우 조직이 대상체 내의 와우 조직이고, 와우 조직과 조성물을 접촉시키는 것이 조성물을 대상체에 경고막적으로 투여함으로써 달성되는 방법.
- [0809] 15. 제 14항에 있어서, 와우 조직과 조성물을 접촉시키는 것이 대상체의 개선된 청각 기능을 발생시키는 방법.
- [0810] 16. 적어도 하나의 줄기세포 증식제를 포함하는 조성물로서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기세포 증식 검정에서 LGR5+ 세포의 최초 시험 집단을 확장시켜 확장된 시험 집단을 생성시킬 수 있고, 확장된 시험 집단이 최초 시험 집단보다 적어도 10배 더 많은 LGR5+ 세포를 갖는, 조성물.
- [0811] 17. 제 16항에 있어서, 확장된 시험 집단이 최초 시험 집단보다 적어도 2배 더 분화 가능한 LGR5+ 세포를 갖는 조성물. [이것이 적절한 요소인지 확인 요망].
- [0812] 18. 제 16항에 있어서, 확장된 시험 집단이 최초 시험 집단보다 적어도 10배 더 분화 가능한 LGR5+ 세포를 갖는 조성물.
- [0813] 19. 제 16항 또는 제 18항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 생체적합성 매트릭스에 분산되는 조성물.

- [0814] 20. 제 19항에 있어서, 생체적합성 매트릭스가 생체적합성 젤 또는 포말인 조성물.
- [0815] 21. 와우 투여에 적합한 생체적합성 매트릭스에 분산된 적어도 하나의 줄기세포 증식제를 포함하는 조성물.
- [0816] 22. 제 16항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 중 적어도 하나를 포함하는 조성물.
- [0817] 23. 제 16항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함하는 조성물.
- [0818] 24. 제 16항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 조절 방출 제형인 조성물.
- [0819] 25. 제 24항에 있어서, 대상체에 경고막적으로 투여되는 경우 조절 방출 제형이 줄기세포 증식제의 즉시 방출, 지연 방출, 지속 방출, 연장된 방출, 가변적 방출, 박동적 방출, 또는 이중-양식 방출을 제공하는 조성물.
- [0820] 26. 제 24항 또는 제 25항에 있어서, 대상체에 투여되는 경우 조절 방출 제형이 (a) 최초 단계에서, 적어도 효과적인 증식 농도의 줄기성 드라이버 및 적어도 효과적인 분화 억제 농도의 분화 억제제; 및 (b) 이후 단계에서, 적어도 효과적인 증식 농도의 줄기성 드라이버 및 효과적인 분화 억제 농도 미만의 분화 억제제를 제공하는 조성물.
- [0821] 27. 제 11항 내지 제 15항 또는 제 16항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기성 드라이버가 GSK3-베타 억제제, GSK3-베타 억제제 유도체, Wnt 효능제, Wnt 효능제 유도체, 또는 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용되는 염인 방법 또는 조성물.
- [0822] 28. 제 11항 내지 제 15항 또는 제 16항 내지 제 26항 또는 제 27항 중 어느 한 항에 있어서, 분화 억제제가 notch 효능제, notch 효능제 유도체; HDAC 억제제; HDAC 억제제 유도체, 또는 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용되는 염인 방법 또는 조성물.
- [0823] 29. 제 27항 또는 제 28항에 있어서, 줄기성 드라이버가 CHIR99021, LY2090314, 리툼, A1070722, BML-284 및 SKL2001로 구성된 군으로부터 선택되는 방법 또는 조성물.
- [0824] 30. 제 27항 내지 제 29항 중 어느 한 항에 있어서, 분화 억제제가 발프로산, SAHA 및 Tubastatin A로 구성된 군으로부터 선택되는 Notch 효능제 또는 HDAC 억제제인 방법 또는 조성물.
- [0825] 31. 청력 손실을 갖거나, 청력 손실이 발생할 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 대상체의 와우 조직으로 적어도 하나의 줄기세포 증식제를 포함하는 조성물을 경고막적으로 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [0826] 32. 제 31항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 중 적어도 하나를 포함하는 방법.
- [0827] 33. 제 31항 또는 제 32항에 있어서, 적어도 하나의 줄기세포 증식제가 줄기성 드라이버 및 분화 억제제 둘 모두를 포함하는 방법.
- [0828] 34. 증식하지 않는 본래의 상태에 비해 감소된 히스톤 데아세틸라제 및 더 높은 Notch 중 적어도 하나를 발현하는 증식성 Lgr5 출생후 포유류 내이 세포 집단으로서, 임의로 세포가 지지 세포이고/이거나; 지지 세포가 Lgr5+이고/이거나; notch 효능제가 HDAC 억제제이고/이거나; Wnt 효능제가 또한 포함되고/되거나; Wnt 효능제가 GSK3-베타 억제제이고/이거나; GSK3-베타 억제제가 CHIR99021인, 증식성 Lgr5 출생후 포유류 내이 세포 집단.
- [0829] 35. VPA를 포함하는 조성물을 대상체의 귀로 투여하는 방법.
- [0830] 36. CHIR99021을 포함하는 조성물을 대상체의 귀로 투여하는 방법.
- [0831] 37. VPA 및 CHIR99021을 포함하는 조성물을 대상체의 귀로 투여하는 방법.
- [0832] 38. Wnt 경로의 효능제 및 notch 경로의 효능제 또는 히스톤 데아세틸라제의 길항제를 제공함으로써 털세포 대 Lgr5 지지 세포의 비를 증가시키는 방법으로서, 임의로 여기서 WNT 활성화가 GSK3b의 하나 이상의 길항제 및/또는 히스톤 데아세틸라제의 길항제를 제공함으로써 달성되거나, Notch 활성화가 VPA를 제공함으로써 달성되는, 방법.
- [0833] 39. 하나 이상의 Wnt 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 또는 notch 효능제의 하나 이상의 길항제를 제공함으로써 Lgr5 세포를 적어도 3배까지 확장시키고/시키거나 Lgr5 발현을 적어도 3배까지 상향조절하는 방법.

- [0834] 40. 세포와 Notch의 하나 이상의 효능제 또는 히스톤 데아세틸라제의 길항제 및 Wnt의 효능제를 접촉시켜 세포를 증식시킴으로써 내이 전구체 세포를 확장시키는 방법으로서, 임의로 시험관 내에서 세포가 추가의 성장 인자에 노출되고/되거나; 추가의 인자가 Notch의 하나 이상의 효능제 또는 히스톤 데아세틸라제의 길항제 및 Wnt의 효능제를 포함하고, 생체 내에서 투여되어 일시적 증식 반응을 달성하는, 방법.
- [0835] 41. 하나 이상의 Notch 효능제 및/또는 히스톤 데아세틸라제의 효능제 및/또는 하나 이상의 wnt 효능제로 배양 확장된 Lgr5 세포로부터 획득된 털세포의 시험관내 분화된 집단.
- [0836] 42. 세포와 일정량의 Notch 억제제 및 CHIR99021을 접촉시키는 것을 포함하는 Lgr5 전구체 세포의 분화를 위한 방법으로서, 임의로 분화가 털세포로의 분화인, 방법.
- [0837] 43. Lgr5 발현 세포와 CHIR99021 및 Notch 길항제를 접촉시키는 것을 포함하는 Lgr5 전구체 세포의 털세포로의 분화를 위한 방법.
- [0838] 44. Lgr5 발현 및/또는 세포수 확장을 향상시키기 위해 ROS의 길항제가 첨가된 본원의 임의의 조성물.
- [0839] 45. Notch 효능제가 HDAC 억제제인 본원의 임의의 조성물.
- [0840] 46. HDAC 억제제가 VPA인 본원의 임의의 조성물.
- [0841] 47. Wnt 효능제가 CHIR99021인 본원의 임의의 조성물.
- [0842] 48. Lgr5+ 지지 세포를 확장시키고/시키거나 Lgr5+ 지지 세포의 발현을 증가시키기 위한 귀로의 CHIR의 전달.
- [0843] 49. 털세포의 수를 증가시키기 위한 귀로의 CHIR의 전달.
- [0844] 50. Lgr5+ 지지 세포를 확장시키고/시키거나 Lgr5+ 지지 세포의 발현을 증가시키기 위한 귀로의 HDAC 억제제(예를 들어, VPA)의 전달.
- [0845] 51. Lgr5+ 지지 세포의 발현을 증가시키기 위한 귀로의 HDAC 억제제(예를 들어, VPA) 및 CHIR99021 둘 모두의 전달.
- [0846] 52. 중이 및/또는 내이로 전달되는 본원의 임의의 조성물.
- [0847] 53. Notch 효능제 또는 히스톤 데아세틸라제의 길항제가 박동 방식으로 전달되고, Wnt 효능제가 지속 방식으로 전달되는, 본원의 임의의 조성물.
- [0848] 54. 약학적으로 관련된 비히클 중의 CHIR99021의 투여를 통해 청력 손실을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 임의로 본원에서 사용되는 비히클이 염수인, 방법.
- [0849] 55. 중이 및/또는 내이로 투여되는 본원의 임의의 조성물.
- [0850] 56. 고막 및/또는 주위 조직이 마취되고, 바늘이 중이에 배치되고, 본원에 기재된 작용제가 주사되는 방법.
- [0851] 57. 투과 향상제, 초음파, 전기천공, 및 당 분야에 기재된 것에 대해 기재되는 다른 방법을 통해 귀 내에서 기재된 작용제의 운반을 향상시키는 방법.
- [0852] 58. 지지 세포 및 털세포의 생존을 증가시킬 수 있는 작용제와 조합하여 이용되는 본원에 기재된 임의의 방법.
- [0853] 59. 용량-제한 귀독성과 관련된 약물의 더 높은 농도의 전달을 가능케 하기 위한 환자에게 전달되는 본원에 기재된 임의의 적합한 작용제.
- [0854] 60. 본원에 기재된 작용제 또는 방법으로부터 시험관내 생성된 세포가 연구 목적 및/또는 고 처리량 스크리닝에 사용되는 방법.
- [0855] 61. 스크리닝이 Lgr5+ 지지 세포의 증식을 부스팅시키고/시키거나, 지지 세포 및/또는 이의 프로제니에 대한 약물의 독성을 시험하고/하거나, 털세포의 생존을 개선시키는 작용제의 능력을 시험하기 위해 이용되는 방법 또는 조성물.
- [0856] 62. 적어도 하나의 보호 약물(털세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 내이 내의 세포의 생존을 향상시키거나, 상기 세포의 사멸을 예방할 수 있음)을 또한 포함하는 본원의 임의의 조성물.
- [0857] 63. 약학적으로 허용되는 담체 중에 GSK3 β 억제제와 조합된 내이 지지 세포 증식을 유도하는 양의 Notch 활성화제 및/또는 HDAC 억제제를 포함하는 용기; 및 내이 장애를 치료하기 위해 용기의 내용물을 이용하기 위한 설명

서를 포함하는 키트.

- [0858] 64. 약학적으로 관련된 비히클 중의 GSK3b 억제제의 투여를 통해 청력 손실을 치료하거나 예방하는 방법.
- [0859] 65. CHIR99021을 이용한 처리에 의해 내이 세포에서 Atoh-1+를 생성시키는 방법으로서, 임의로 내이 세포가 Lgr5+이고, CHIR99021의 존재하에서 분화하여 Atoh-1+ 세포를 생성시키고/시키거나, Atoh-1+ 세포가 털세포인, 방법.
- [0860] 66. atoh-1을 발현하도록 분화할 수 있는 상피 줄기세포의 증식을 촉진하는 후보 작용제를 확인하는 방법.
- [0861] 67. atoh-1을 발현할 수 있는 상피 줄기세포의 분화를 촉진하는 후보 작용제를 확인하는 방법.
- [0862] 68. 상피 줄기세포 또는 atoh-1 발현 세포의 생존을 촉진하는 후보 작용제를 확인하는 방법.
- [0863] 방법에 관한 추가 설명:
- [0864] 실험을 위한 일반 방법.
- [0865] 당업자는 본원에 기재된 작용제를 적용하고, 시험하고, 처리하기 위한 많은 방법이 존재하는 것을 인지할 것이다. 일부 비제한적인 예가 하기에 기재된다.
- [0866] 동물
- [0867] 내이 구체를 이용한 실험을 위해, 양성의 C57BL/6(The Jackson Laboratory) 또는 Atoh1-nGFP 리포터 마우스(Lumpkin et al., 2003)(텍사스 대학의 제인 존슨(Jane Johnson)이 제공함)를 이용하였다. 털세포가 제거된 코르티 기관 체외이식편을 생성시키기 위해, 본 발명자는 Mos-iCsp3 마우스(계통 17)(Fujioka et al., 2011)와 Pou4f3-Cre 마우스(Sage et al., 2005)(터프즈 대학(Tufts University)의 더글라스 베티(Douglas Vetter)가 제공함)를 교배시켰다. 모든 생체내 실험을 위해, 본 발명자는 4주령에서 Sox2-CreER 마우스(Arnold et al., 2011)(매사추세츠 종합병원(Massachusetts General Hospital)의 콘라드 호체드링거(Konrad Hochedlinger)가 제공함)와 교배된 Cre 리포터 계통, mT/mG(The Jackson Laboratory)를 이용하였다. 유전자형 분석 후, 계통 추적 을 위해 이중-트랜스제닉 동물을 이용하였다. 본 발명자는 배경에 따라 달라지는 것으로 공지된 소음에 대한 반응에서의 피로 효과를 방지하기 위해 어린 성체 야생형 한배새끼의 mT/mG; Sox2-CreER 마우스를 이용하였다(Harding et al., 2005; Wang et al., 2002). 마우스를 PCR에 의해 유전자형 분석하였다. 모든 프로토콜은 실험 동물의 인도적 관리 및 이용에 대한 공중 보건 서비스 정책에 따라 매사추세츠 안이과병원(Massachusetts Eye and Ear Infirmary)의 동물 실험 윤리 위원회 또는 게이오 대학 연합의 윤리 위원회에 의해 승인받았다.
- [0868] 내이 구체의 분리
- [0869] 양성의 1 내지 3일된 출생후 마우스의 타원낭 및 와우를 해부하고, 신경줄기 및 중간엽 조직의 조심스러운 제거 후, 트립신 처리하고, 분리시켰다. 분리된 세포를 원심분리시키고, 펠렛을 재현탁시키고, N2/B27 보충물, EGF(20 ng/ml), IGF1(50 ng/ml), bFGF(10 ng/ml), 및 해파란 설페이트(50 ng/ml)(Sigma)를 갖는 DMEM/F12 배지 중에서 70 μ m 세포 스트레이너(strainer)(BD Biosciences Discovery Labware)를 통해 여과시켰다. 단일 세포를 비부착성 페트리 접시(Greiner Bio-One)에서 배양하여 구체의 클론 성장을 개시시켰다(Martinez-Monedero et al., 2008). 배양 2-3일 후에 형성된 구체를 4-6일마다 계대배양하였다. 구체를 원심분리시키고, 펠렛을 피펫 말단을 이용하여 기계적으로 분리시키고, 배지 중에 재현탁시켰다. 계대배양 3-4 구체를 본원에 기재된 실험에 이용하였다. 이들 세포는 분화의 개시 전 털세포 마커에 대해 음성이다(Oshima et al., 2007). 분화를 위해, 부유하는 구체를 이전에 기재된 바와 같이 섬유결합소-코팅된 4-웰 플레이트(Greiner Bio-One)로 옮겼다(Martinez-Monedero et al., 2008; Oshima et al., 2007). 부착된 구체를 N2/B27 보충물을 가지나, 성장인자는 없는 DMEM/F12 배지에서 5-7일 동안 분화시켰다. γ -세크레타제 억제제, DAPT, L-685458, MDL28170(Sigma), 및 LY411575(Santa Cruz)를 세포 부착 다음날에 여러 농도로 첨가하였다.
- [0870] 신생아 와우 체외이식편
- [0871] 양성의 3일된 출생후 C57BL/6 또는 Mos-iCsp3; Pou4f3-Cre 이중-트랜스제닉 마우스의 와우를 헵크스 용액(Invitrogen)에서 해부하였다. 편평한 와우 표면 제조물을 획득하기 위해, 본 발명자는 나선신경절, 레이즈너막, 및 가장 기초적인 와우 세그먼트를 분리시켰다. 체외이식편을 폴리-L-오르니틴(0.01%, Sigma) 및 라미닌(50 μ g/ml, Becton Dickinson)으로 코팅된 4-웰 플레이트(Greiner Bio-One)에 플레이팅하였다. 와우 체외이식편을 10% 소 태아 혈청을 갖는 DMEM(Invitrogen)에서 배양하였다. 모든 배양물을 5% CO2/20% O2-가습 인큐베이터(Forma Scientific)에서 유지시켰다.

- [0872] 음향 과다노출
- [0873] 4주령의 마우스는 작은 반향 챔버에서 자유 음장 노출되고, 깨어 있었고, 구속되지 않은 상태였다(Wang et al., 2002). 116 dB SPL에서 제시된 8-16 kHz 옥타브 대역 노이즈에 대한 2시간의 노출에 의해 음향 외상을 발생시켰다. 노출 자극은 맞춤 화이트 노이즈 소스에 의해 생성시켰고, 필터링시켰고(60 dB/옥타브 기울기를 갖는 브릭월(Brickwall) 필터를 이용함), 증폭시켰고(크라운 파워(Crown power) 증폭기), 반향 박스의 상부의 구멍에 단단히 고정된 지수형 혼(exponential horn)을 통해 전달하였다(JBL 압축 드라이버). 음향 노출 수준을 0.25 인치 Bruel 및 Kjaer 콘덴서 마이크로폰을 이용하여 각각의 케이지 내의 4개의 위치에서 측정하였고, 음압은 이들 측정 위치에서 0.5 dB미만만큼 변하는 것으로 밝혀졌다.
- [0874] 표적 작용제(예를 들어, LY411575)의 전신 또는 정원창 투여
- [0875] 12-16 g 체중의 4주령 마우스를 이용하였다. 수술 전, 동물을 케타민(20 mg/kg, 복막내[i.p.]) 및 크실라진(100 mg/kg, i.p.)으로 마취시키고, 리도카인(1%)의 국소 투여 후 외이도 부근의 귓바퀴 뒤쪽을 절개하였다. 귀 불라(otic bulla)를 개방하여 정원창와에 접근시켰다. PE 10 관류(tubing)(Becton Dickinson) 단편의 말단을 화염 속에서 미세한 말단으로 잡아 늘리고, 정원창와로 서서히 삽입하였다. LY411575를 DMSO에 용해시키고, 4 mM의 최종 농도로 폴리에틸렌 글리콜 400(Sigma) 중에서 10배 희석시켰다. 이러한 용액(총 부피 1 μ l)을 좌측 귀의 정원창와에 주입하였다. 10% DMSO를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 400을 대조군으로서 우측 귀에 주입하였다. 용액을 2분 동안 투여하였다. 이러한 접근법은 임상적으로 널리 사용되며, 내이를 상하지 않게 하며 내이로의 약물의 전달을 위해 정원창막에 의해 제공되는 국소 경로의 장점을 여전히 활용하는 장점을 갖는다(Mikulec et al., 2008). 용액을 유지시키기 위해 젤라틴을 와에 두고, 상처를 막았다.
- [0876] 전신 투여를 위해, 0.5%(w/v) 메틸셀룰로스(WAKO)에 용해된 LY411575(50 mg/kg)를 5일 연속 동안 하루에 1회로 경구 주입하였다. 청력을 소음 노출 1일 전, 소음 노출 2일 후, 1주 후, 2주 후, 및 1개월 후, 2개월 후 및 3개월 후에 ABR에 의해 측정하였다.
- [0877] qRT-PCR
- [0878] 코르티 기관을 HBSS(Invitrogen) 중에서 해부하고, 추가 사용때까지 -80°C에서 RNAlater(Ambion)에서 보관하였다. 전체 RNA를 제조업체의 설명서에 따라 RNeasy Mini Kit(QIAGEN)를 이용하여 추출하였다. 역전사를 위해, SuperScript II(Invitrogen)를 무작위 헥사머와 함께 이용하였다. 역전사 조건은 10분 동안 25°C 후, 60분 동안 37°C였다. 반응을 5분 동안 95°C에서 종료시켰다. cDNA를 제조업체의 설명서에 따라 Taqman Gene Expression Mastermix(Applied Biosystems) 및 Hes5, Atoh1, 또는 18S 프라이머(Applied Biosystems)와 혼합하였다. 샘플을 qPCR(Applied Biosystems 7900HT)에 의해 삼중으로 96웰에서 분석하였고, PCR 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 2분 동안 95°C에서의 최초 변성, 15초 동안 95°C에서의 변성, 및 45주기의 1분 동안 60°C에서의 어닐링 및 신장. 조건을 각각의 프라이머에 대해 일정하게 유지시켰다. 각각의 PCR 반응을 삼중으로 수행하였다. 상대 유전자 발현을 $\Delta\Delta$ CT 방법을 이용하여 분석하였다. 유전자 발현을 18S RNA에 비해 계산하였고, 적용된 cDNA의 양을 18S RNA에 대한 Ct 값이 8 내지 11이 되도록 조정하였다.
- [0879] 면역조직화학
- [0880] 구체에 대해, 세포를 PBS 중 4% 파라포름알데하이드로 10분 동안 고정시켰다. 면역염색을 1% BSA 및 5% 염소 혈청(PBT1)이 보충된 PBS 중 0.1% Triton X-100을 이용하여 1시간 동안 블로킹시킴으로써 개시시켰다. 고정되고 투과화된 세포를 미오신 VIIa에 대한 폴리클로날 항체(Proteus Biosciences)를 갖는 PBT1 중에서 밤새 인큐베이션하였다. 샘플을 PBS를 이용하여 20분 동안 3회 세척하였다. 일차 항체를 Alexa 488와 컨쥬게이션된 이차 항체(Molecular Probes)로 검출하였고, 이차 항체 단백을 음성 대조군으로 이용하였다. 샘플을 10분 동안 DAPI(Vector Laboratories) 또는 Hoechst 33258(Invitrogen)로 대조염색하였고, 에피형광 현미경검사법(Axioskop 2 Mot AxioCam, Zeiss)에 의해 관찰하였다.
- [0881] 체외이식편에 대해, 코르티 기관을 PBS 중 4% 파라포름알데하이드로 15분 동안 고정시켰다. 면역염색을 5% 당나귀 혈청(PBT1)이 보충된 PBS 중 0.1% Triton X-100을 이용하여 1시간 동안 블로킹시킴으로써 개시시켰다. 고정되고 투과화된 단편을 미오신 VIIa에 대한 항체(Proteus Biosciences), Sox2(Santa Cruz), GFP(Invitrogen), 프레스틴(prestin)(Santa Cruz), 신경미세섬유 H(Chemicon), 및 CtBP2(BD Biosciences)를 갖는 PBT1 중에서 밤새 인큐베이션하였다. 샘플을 PBS를 이용하여 20분 동안 3회 세척하였다. 일차 항체를 Alexa 488 및 647과 컨쥬게이션된 이차 항체(Molecular Probes)로 검출하였다. 샘플을 15분 동안 로다민 팔로이딘(Invitrogen)으로 염색시키고, 공초점형광 현미경검사법(TCS SP5, Leica)에 의해 관찰하였다.

- [0882] 성숙 와우의 수거를 위해, 깊이 마취된 마우스를 8.6% 수크로스를 함유하는 0.01 M 인산염 완충액(pH 7.4)으로 경심 관류시킨 후, 0.1 M 인산염 완충액(pH 7.4) 중 새로이 분해된 4% 파라포름알데하이드로 구성된 고정액을 경심 관류시켰다. 머리제거 후, 측두골을 분리시키고, 4℃에서 동일 고정액에 즉시 두었다. 정원창, 난원창, 및 와우의 꼭지에 작은 개구부를 만들었다. 4℃에서 밤새 고정액 중에 담근 후, 측두골을 2일 동안 4℃에서 교반과 함께 5% 수크로스를 함유하는 0.1 M EDTA(pH 7.4) 중에서 탈회시켰다. 탈회 후, 와우를 전체 설치 준비를 위해 4개의 단편으로 미세해부하였다. 면역염색을 5% 당나귀 혈청(PBT1)이 보충된 PBS 중 0.1% Triton X-100을 이용하여 1시간 동안 블로킹시킴으로써 개시시켰다. 고정되고 투과화된 단편을 미오신 VIIa에 대한 항체(Proteus Biosciences), Sox2(Santa Cruz), 및 GFP(Invitrogen)를 갖는 PBT1 중에서 밤새 인큐베이션하였다. 샘플을 PBS를 이용하여 20분 동안 3회 세척하였다. 일차 항체를 Alexa 488, 568 및 647과 컨쥬게이션된 이차 항체(Molecular Probes)로 검출하고, 공초점 형광 현미경검사법(TCS SP5, Leica)에 의해 관찰하였다. 와우 길이를 각각의 경우에 대해 획득하고, 와우 주파수 맵을 계산하여 5.6, 8.0, 11.3, 16.0, 22.6, 32 및 45.2 kHz 영역으로부터 내부 털세포를 정확히 국한시켰다. 횡단면에 대해, 고정된 측두골을 4℃에서 PBS 중 30% 수크로스에 침지시키고, 1시간 동안 실온에서 OCT에서 인큐베이션하고, 액체 질소에서 동결시켰다. 염색 프로토콜은 DAPI(Vector Laboratories)를 이용한 대조염색을 제외하고는 상기 기재된 것과 동일하였다. 표본을 에피형광 현미경검사(Axioskop 2 Mot Axiocam, Zeiss)에 의해 관찰하였다.
- [0883] 세포수
- [0884] 구체에 대한 세포 계수를 MetaMorph 소프트웨어로 수행하였다. 세포수를 DAPI- 또는 Hoechst-양성 핵으로부터 결정하였다. 반복된 세포 계수는 1% 미만의 시험 변동을 나타내었다. 체외이식편에 대해, 내부 털세포, 외부 털세포, 및 외부 털세포 영역 내의 지지 세포를 와우 전체 마운트에서 계수하였다. 털세포를 Atoh1-nGFP 마우스에서 미오신 VIIa 항체 또는 내인성 GFP로 확인하였다. 전장 와우 또는 와우 체외이식편 배양물의 고출력 이미지를 조립하고, PhotoShop CS4(Adobe)에서 분석하였다. ImageJ 소프트웨어(NIH)를 이용하여 와우 전체 마운트의 전체 길이 및 개별적 계수 세그먼트의 길이를 측정하였다. 내부 털세포, 외부 털세포, 및 외부 털세포 영역 내의 지지 세포의 총 수를 1,200-1,400 μm 의 4개의 와우 세그먼트(첨단, 중간첨단, 중간기부, 및 기부) 각각에서 계수하였다. 이후, 밀도(100 μm 당 세포)를 각각의 세그먼트에 대해 계산하였다. 성숙 와우에 대해, 계산된 주파수 맵에 따라 주파수-특이적 영역(5.6, 8.0, 11.3, 및 16.0 kHz)의 고출력 이미지를 조립하고, 분석하였다. 100 μm 내의 내부 털세포, 외부 털세포, 및 외부 털세포 영역 내의 지지 세포의 수를 와우의 4개의 주파수-특이적 영역 각각에서 계수하였다. GFP에 의해 확인된 Sox2 계통-양성 세포의 수를 동일 방법에 의해 계수하였다.
- [0885] ABR 측정
- [0886] 청각 뇌줄기 반응(Kujawa and Liberman, 1997; Maison et al., 2003)을 소음 노출 전 및 소음 노출 1일 후, 및 수술 1주 후, 1개월 후, 및 3개월 후에 7개의 로그-간격 주파수(5.6으로부터 45.2 kHz까지 반 옥타브 단계)로 각각의 동물에서 측정하였다. 마우스를 케타민(100 mg/kg, i.p.) 및 크실라진(20 mg/kg, i.p.)으로 마취시켰다. 바늘 전극을 두정파 껏바퀴에 삽입하고, 꼬리 근처의 땅에 삽입하였다. ABR을 5 ms 톤 펄스(tone pip)(cos2 온셋 엔벨로프가 35/s로 전달된 경우 0.5 ms 상승-하강)으로 유발시켰다. 반응을 LabVIEW-유도 데이터 획득 시스템에서 증폭시키고, 필터링시키고, 평균을 내었다. 음향 수준을 역치 아래의 10 dB 이상으로부터 80 dB 미만의 SPL까지 5 dB 단계로 상승시켰다. 각각의 음향 수준에서, 1,024개의 반응을 "아티팩트 제한(artifact reject)"을 이용하여 평균(자극 극성 교대를 이용함)을 내었고, 이에 의해 피크-대-피크 반응 진폭이 15 μV 를 초과한 경우에 응답 파형을 폐기하였다. 적층된 파형의 시각 검사시, "ABR 역치"는 임의의 파가 검출될 수 있는 가장 낮은 SPL 수준으로 정의되었는데, 이는 보통 피크-대-피크 반응 진폭이 잡음 플로어(약 0.25 μV)보다 유의하게 상승한 수준 단계 바로 아래의 수준 단계에 해당한다. 이용 가능한 가장 높은 음향 수준에서 반응이 관찰되지 않은 경우, 역치는 통계 시험이 수행될 수 있는 수준보다 큰 5 dB인 것으로 지정되었다. 진폭 대 수준 함수에 대해, I 과 피크를 각각의 음향 수준에서의 시각 검사에 의해 확인하고, 피크-대-피크 진폭을 계산하였다.
- [0887] 정량적 및 통계적 분석
- [0888] 처리 그룹 사이의 차이를 비교하기 위해 양측 만-휘트니 U 검정(Mann-Whitney U test)을 이용하였다. 동일 동물의 처리 전 및 후의 변화를 양측 윌콕슨 t 검정(Wilcoxon t test)에 의해 분석하였다. 그룹 사이의 시간-의존적 차이를 비교하기 위해 반복-측정 ANOVA를 이용하였다. 데이터는 본문 및 도면에서 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다. 0.05 미만의 p 값을 유의한 것으로 간주하였다.
- [0889] 유전자형 분석 프라이머

[0890] 본 발명자는 다음과 같은 유전자형 분석 프라이머를 이용하였다: Mos-iCsp3 마우스에 대해 LacZ F: 5'-ttcactggccgtcggttttacaacgtcgtga-3' 및 LacZ R: 5'-atgtgagcgcagtaacaacccgtcggatttct-3'; Pou4f3Cre 및 Sox2CreER 마우스에 대해 Cre F: 5'-tgggcggcatggtgcaagtt-3' 및 Cre R: 5'-cggtgctaaccagcgttttc-3'; 및 mT/mG 마우스에 대해 oIMR7318 야생형 F: 5'-ctctgctgcctcctggcttct-3', oIMR7319 야생형 R: 5'-cgaggcgatcacaagcaata-3', 및 oIMR7320 돌연변이체 R: 5'-tcaatggcgggggtcgtt-3'.

[0891] 참고문헌:

1. Balak KJ, Corwin JT, Jones JE. Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 1990;10:2502-12.

[0892]

2. Stone JS, Cotanche DA. Identification of the timing of S phase and the patterns of cell proliferation during hair cell regeneration in the chick cochlea. The Journal of comparative neurology 1994;341:50-67.

3. Stone JS, Rubel EW. Temporal, spatial, and morphologic features of hair cell regeneration in the avian basilar papilla. The Journal of comparative neurology 2000;417:1-16.

4. Warchol ME, Corwin JT. Regenerative proliferation in organ cultures of the avian cochlea: identification of the initial progenitors and determination of the latency of the proliferative response. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 1996;16:5466-77.

5. Mizutari K, Fujioka M, Hosoya M, et al. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. Neuron 2013;77:58-69.

6. Ryals BM, Dent ML, Dooling RJ. Return of function after hair cell regeneration. Hearing research 2013;297:113-20.

7. Raphael Y. Evidence for supporting cell mitosis in response to acoustic trauma in the avian inner ear. Journal of neurocytology 1992;21:663-71.

8. Salt AN, Hartsock J, Plontke S, LeBel C, Piu F. Distribution of dexamethasone and preservation of inner ear function following intratympanic delivery of a gel-based formulation. Audiology & neuro-otology 2011;16:323-35.

9. Salt AN, Gill RM, Plontke SK. Dependence of hearing changes on the dose of intratympanically applied gentamicin: a meta-analysis using mathematical simulations of clinical drug delivery protocols. The Laryngoscope 2008;118:1793-800.

10. Plontke SK, Biegner T, Kammerer B, Delabar U, Salt AN. Dexamethasone concentration gradients along scala tympani after application to the round window membrane. Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology 2008;29:401-6.

11. Plontke SK, Salt AN. Simulation of application strategies for local drug delivery to the inner ear. ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties 2006;68:386-92.

12. Plontke SK, Lowenheim H, Mertens J, et al. Randomized, double blind, placebo controlled trial on the safety and efficacy of continuous intratympanic dexamethasone delivered via a round window catheter for severe to profound sudden

[0893]

idiopathic sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy. *The Laryngoscope* 2009;119:359-69.

13. Van Tomme SR, Storm G, Hennink WE. In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International journal of pharmaceutics* 2008;355:1-18.

14. Mundada AS, Avari JG. In situ gelling polymers in ocular drug delivery systems: a review. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 2009;26:85-118.

15. Almeida H, Amaral MH, Lobao P, Lobo JM. In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug discovery today* 2014;19:400-12.

16. Shoichet MS, Tator CH, Poon P, Kang C, Baumann MD. Intrathecal drug delivery strategy is safe and efficacious for localized delivery to the spinal cord. *Progress in brain research* 2007;161:385-92.

17. Gupta D, Tator CH, Shoichet MS. Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord. *Biomaterials* 2006;27:2370-9.

18. Wise AK, Gillespie LN. Drug delivery to the inner ear. *Journal of neural engineering* 2012;9:065002.

19. Swan EE, Mescher MJ, Sewell WF, Tao SL, Borenstein JT. Inner ear drug delivery for auditory applications. *Advanced drug delivery reviews* 2008;60:1583-99.

20. Surovtseva EV, Johnston AH, Zhang W, et al. Prestin binding peptides as ligands for targeted polymersome mediated drug delivery to outer hair cells in the inner ear. *International journal of pharmaceutics* 2012;424:121-7.

21. Staecker H, Brough DE, Praetorius M, Baker K. Drug delivery to the inner ear using gene therapy. *Otolaryngologic clinics of North America* 2004;37:1091-108.

22. Seidman MD. Glutamate Antagonists, Steroids, and Antioxidants as Therapeutic Options for Hearing Loss and Tinnitus and the Use of an Inner Ear Drug Delivery System. *The international tinnitus journal* 1998;4:148-54.

23. Salt AN, Plontke SK. Principles of local drug delivery to the inner ear. *Audiology & neuro-otology* 2009;14:350-60.

24. Salt AN, Plontke SK. Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug discovery today* 2005;10:1299-306.

25. Salt A. Guest editorial: drug delivery for treatment of inner ear disease: current state of knowledge. *Ear and hearing* 2010;31:155.

[0894]

26. Sakamoto T, Nakagawa T, Horie RT, et al. Inner ear drug delivery system from the clinical point of view. *Acta oto-laryngologica Supplementum* 2010;101-4.
27. Roy S, Johnston AH, Newman TA, et al. Cell-specific targeting in the mouse inner ear using nanoparticles conjugated with a neurotrophin-derived peptide ligand: potential tool for drug delivery. *International journal of pharmaceutics* 2010;390:214-24.
28. Roy S, Glueckert R, Johnston AH, et al. Strategies for drug delivery to the human inner ear by multifunctional nanoparticles. *Nanomedicine* 2012;7:55-63.
29. Rivera T, Sanz L, Camarero G, Varela-Nieto I. Drug delivery to the inner ear: strategies and their therapeutic implications for sensorineural hearing loss. *Current drug delivery* 2012;9:231-42.
30. Richardson RT, Wise AK, Andrew JK, O'Leary SJ. Novel drug delivery systems for inner ear protection and regeneration after hearing loss. *Expert opinion on drug delivery* 2008;5:1059-76.
31. Plontke SK, Zimmermann R, Zenner HP, Lowenheim H. Technical note on microcatheter implantation for local inner ear drug delivery: surgical technique and safety aspects. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 2006;27:912-7.
32. Plontke SK, Siedow N, Wegener R, Zenner HP, Salt AN. Cochlear pharmacokinetics with local inner ear drug delivery using a three-dimensional finite-element computer model. *Audiology & neuro-otology* 2007;12:37-48.
33. Plontke SK, Plinkert PK, Plinkert B, Koitschev A, Zenner HP, Lowenheim H. Transtympanic endoscopy for drug delivery to the inner ear using a new microendoscope. *Advances in oto-rhino-laryngology* 2002;59:149-55.
34. Plontke SK. Evaluation of the round window niche before local drug delivery to the inner ear using a new mini-otoscope. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 2011;32:183-5.
35. Plontke S, Zenner HP. Pharmacokinetic considerations in intratympanic drug delivery to the inner ear. *Acta oto-rhino-laryngologica Belgica* 2002;56:369-70.
36. Plontke S, Siedow N, Hahn H, Wegener R, Zenner HP, Salt AN. [1D-and 3D-computer simulation for experimental planning and interpretation of pharmacokinetic studies in the inner ear after local drug delivery]. *Altex* 2004;21 Suppl 3:77-85.

[0895]

37. Paulson DP, Abuzeid W, Jiang H, Oe T, O'Malley BW, Li D. A novel controlled local drug delivery system for inner ear disease. *The Laryngoscope* 2008;118:706-11.
38. Pararas EE, Chen Z, Fiering J, et al. Kinetics of reciprocating drug delivery to the inner ear. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2011;152:270-7.
39. Pararas EE, Borkholder DA, Borenstein JT. Microsystems technologies for drug delivery to the inner ear. *Advanced drug delivery reviews* 2012;64:1650-60.
40. Paasche G, Gibson P, Averbeck T, Becker H, Lenarz T, Stover T. Technical report: modification of a cochlear implant electrode for drug delivery to the inner ear. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 2003;24:222-7.
41. Nakagawa T, Ito J. Local drug delivery to the inner ear using biodegradable materials. *Therapeutic delivery* 2011;2:807-14.
42. Mimura T, Funatsu H, Usui T, Yamagami S, Noma H, Amano S. Topical ocular drug delivery to inner ear disease and sinusitis. *Southern medical journal* 2006;99:1287-9.
43. McCall AA, Swan EE, Borenstein JT, Sewell WF, Kujawa SG, McKenna MJ. Drug delivery for treatment of inner ear disease: current state of knowledge. *Ear and hearing* 2010;31:156-65.
44. Li ML, Lee LC, Cheng YR, et al. A novel aerosol-mediated drug delivery system for inner ear therapy: intratympanic aerosol methylprednisolone can attenuate acoustic trauma. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 2013;60:2450-60.
45. Lehnert R, Brugger H, Maassen MM, Zenner HP. A totally implantable drug delivery system for local therapy of the middle and inner ear. *Ear, nose, & throat journal* 1997;76:567-70.
46. Lajud SA, Han Z, Chi FL, et al. A regulated delivery system for inner ear drug application. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2013;166:268-76.
47. Kim DK, Park SN, Park KH, et al. Development of a drug delivery system for the inner ear using poly(amino acid)-based nanoparticles. *Drug delivery* 2014.
48. Kanzaki S, Fujioka M, Yasuda A, et al. Novel in vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery system in mice: comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections. *PloS one* 2012;7:e48480.

[0896]

49. Herraiz C, Miguel Aparicio J, Plaza G. [Intratympanic drug delivery for the treatment of inner ear diseases]. *Acta otorrinolaringologica espanola* 2010;61:225-32.
50. Engleder E, Honeder C, Klobasa J, Wirth M, Arnoldner C, Gabor F. Preclinical evaluation of thermoreversible triamcinolone acetonide hydrogels for drug delivery to the inner ear. *International journal of pharmaceutics* 2014;471:297-302.
51. Chen Z, Kujawa SG, McKenna MJ, et al. Inner ear drug delivery via a reciprocating perfusion system in the guinea pig. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2005;110:1-19.
52. Chen G, Hou SX, Hu P, Jin MZ, Liu J. [Preliminary study on brain-targeted drug delivery via inner ear]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 2007;42:1102-6.
53. Bohl A, Rohm HW, Ceschi P, et al. Development of a specially tailored local drug delivery system for the prevention of fibrosis after insertion of cochlear implants into the inner ear. *Journal of materials science Materials in medicine* 2012;23:2151-62.
54. Hoskison E, Daniel M, Al-Zahid S, Shakesheff KM, Bayston R, Birchall JP. Drug delivery to the ear. *Therapeutic delivery* 2013;4:115-24.
55. Staecker H, Rodgers B. Developments in delivery of medications for inner ear disease. *Expert opinion on drug delivery* 2013;10:639-50.
56. Borenstein JT. Intracochlear drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery* 2011;8:1161-74.
57. Pritz CO, Dudas J, Rask-Andersen H, Schrott-Fischer A, Glueckert R. Nanomedicine strategies for drug delivery to the ear. *Nanomedicine* 2013;8:1155-72.
58. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology* 2007;2:751-60.
59. Zahnert T. The differential diagnosis of hearing loss. *Deutsches Arzteblatt international* 2011;108:433-43; quiz 44.
60. Sataloff RT, Sataloff J. Differential diagnosis of occupational hearing loss. *Occupational health & safety* 2001;70:126-9.
61. Mills DM. Determining the cause of hearing loss: differential diagnosis using a comparison of audiometric and otoacoustic emission responses. *Ear and hearing* 2006;27:508-25.
62. Isaacson JE, Vora NM. Differential diagnosis and treatment of hearing loss. *American family physician* 2003;68:1125-32.
63. Lasak JM, Allen P, McVay T, Lewis D. Hearing loss: diagnosis and management. *Primary care* 2014;41:19-31.

[0897]

64. Brazilian Association of O, Brazilian College of R. Sensorineural hearing loss: radiologic diagnosis. *Revista da Associacao Medica Brasileira* 2012;58:519-29.
65. Alford RL, Amos KS, Fox M, et al. American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2014;16:347-55.
66. Shi F, Cheng YF, Wang XL, Edge AS. Beta-catenin up-regulates Atoh1 expression in neural progenitor cells by interaction with an Atoh1 3' enhancer. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:392-400.
67. Jeon SJ, Fujioka M, Kim SC, Edge AS. Notch signaling alters sensory or neuronal cell fate specification of inner ear stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2011;31:8351-8.
68. Bramhall NF, Shi F, Arnold K, Hochedlinger K, Edge AS. Lgr5-positive supporting cells generate new hair cells in the postnatal cochlea. *Stem cell reports* 2014;2:311-22.
69. Purow B. Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Advances in experimental medicine and biology* 2012;727:305-19.
70. Wu L, Griffin JD. Modulation of Notch signaling by mastermind-like (MAML) transcriptional co-activators and their involvement in tumorigenesis. *Seminars in cancer biology* 2004;14:348-56.
71. Shih Ie M, Wang TL. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer research* 2007;67:1879-82.
72. Olsauskas-Kuprys R, Zlobin A, Osipo C. Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *Oncotargets and therapy* 2013;6:943-55.
73. Meng RD, Shelton CC, Li YM, et al. gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity. *Cancer research* 2009;69:573-82.

[0898]

[0899]

예시

[0900]

실시예 1

[0901]

세포 배양: 이형접합 Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 마우스를 Jackson Labs로부터 획득하고, 신생아 P2-P5 마우스를 세포 분리에 이용하였다. 코르티 기관을 Lgr5-GFP 마우스로부터 분리시키고, 트립신을 이용하여 단일 세포로 추가로 분리시켰다. 이후, 세포를 이전에 기재된 바와 같이 배양하였다(Yin et al, 2014). 간단히, 세포를 매트릭셀에 엔트랩핑시키고, 24-웰 플레이트 내의 웰 중심에 플레이팅하였다. 매트릭셀의 중합 후, 성장 인자, 예를 들어, EGF(50 ng/ml)(표피 성장 인자), bFGF(20 ng/ml)(섬유모세포 성장 인자), 및 IGF1(50 ng/ml)(인슐린-유사 성장 인자 1), 및 소분자, 예를 들어, CHIR99021(5 μ M), 발프로산(1 mM), 2-포스포-L-아스코르브산(280 μ M), 및 616452(2 μ M)를 함유하는 500 μ l의 배양 배지(N2 및 B27을 갖는 Advanced DMEM/F12)를 첨가하였다. Y-27632(10 μ M)를 처음 2일 동안 첨가하였다. 일부 실험에서, bFGF를 50 ng/ml로 사용하였다.

[0902]

단일 세포 분리를 위해, 코르티 기관을 이후 1시간 동안 Cell Recovery Solution(Corning)으로 처리하여 밑에 있는 중간엽으로부터 와우 상피를 분리시켰다. 이후, 상피를 수거하고, 37°C에서 15-20분 동안 트립신(Life Technologies)으로 처리하였다. 기계적 분쇄에 의해 획득된 단일 세포를 세포 스트레이너(40 μ m)에 의해 필터링시키고, 세포 배양 배지로 세척하였다. Lgr5-고 및 Lgr5-저 세포의 FACS 분류를 위해, FACS ARIA(BD)를 이용하였고, Lgr5 수준의 지표로서 Lgr5-GFP를 이용하였다. 분류된 단일 세포를 보충 성장 인자 및 소분자를 갖는 내이 세포 배양 배지 중 매트릭셀에서 배양하였다. Y-27632를 처음 2일 내에 첨가하였다.

[0903]

FACS 분석: 세포 배양 배지를 제거하고, 트립신을 첨가하였다. 10-20분 동안 37°C에서의 인큐베이션 후, 콜로니를 단일 세포로 분리시켰다. 살아 있는 세포수를 혈구계 및 트리판 블루 염색을 이용하여 계수하였다. 이후, 세포를 프로피듐 아이오다이드(PI)로 염색하고, 흐름세포측정법으로 분석하였다. 세포의 총 수를 GFP-양성 세포의 백분율과 곱하여 GFP-양성 세포의 수를 계산하였다.

[0904]

결과

[0905]

Lgr5 세포는 와우 상피 내의 지지 세포의 하위집합 내에 존재한다. Lgr5-GFP 마우스 계통을 이용하여, 본 발명

자는 매트릭셀 기반 3D 배양 시스템에서 와우로부터 분리된 단일 Lgr5⁺ 지지 세포를 확장시키기 위해 다수 경로의 활성화 또는 억제 시험하였다. 내이 상피 세포는 성장 인자, 예를 들어, 상피 성장 인자(EGF 또는 E), 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF 또는 F), 및 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1 또는 I)의 존재하에서 신경구(neuro-sphere)로 배양될 수 있는 것으로 밝혀졌다(Li et al., 2003). 그러나, 이러한 조건에서, Lgr5-GFP 세포 성장은 관찰되지 않았다(도 1a). 본 발명자는 먼저 소분자, 예를 들어, 글리코겐 신타제 키나제 3β(GSK3β) 억제제, CHIR99021(CHIR 또는 C) 및 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제, 발프로산(VPA 또는 V)과 성장 인자 콤보의 조합을 시험하였다. 본 발명자는 CHIR 및 VPA가 Lgr5-GFP 세포의 확장을 크게 촉진시킨 것을 발견하였고, Lgr5-GFP+ 세포의 큰 콜로니를 배양물에서 관찰하였다(도 1b). 흐름세포측정법 분석은 CHIR 및 VPA의 조합이 GFP+ 세포 백분율을 크게 증가시킨 것을 나타내었다(도 2a). 내이 Lgr5 세포를 장 LGR5+ 세포에 대해 이전에 사용된 배양 조건(Yin et al., 2014)을 이용하여 배양한 경우 유사한 표현형이 또한 관찰되었으나, 덜한 정도로 관찰되었다(도 2b). 세포수 정량은 CHIR 및 VPA의 첨가가 세포 증식 및 세포의 Lgr5-GFP 발현을 유의하게 증가시켜, Lgr5-GFP 세포를 500배 증가시키는 것을 나타내었다(도 2c).

[0906] 장 콜로니와 달리, 내이 상피로부터의 세포는 계대배양 후에 증식 능력을 상실하였다. 본 발명자는 세포의 장기 배양에 다른 인자가 필요하다고 추론하였고, 추가 인자를 확인하기 위한 스크리닝을 수행하였다. 비타민 C의 안정적 형태인 2-포스포-L-아스코르브산(pVc, Sigma)의 첨가는 Lgr5+ 세포 확장을 추가 2-3배만큼 증가시켰고(도 3 및 도 8b), 이는 배양 배지에 추가로 포함되었다(EFI.C.V.P). 본 발명자는 또한 증가된 bFGF 농도(20 ng/ml로부터 50 ng/ml)가 세포 증식을 증가시킨 것을 발견하였고(도 4), 이에 따라 bFGF를 추후 실험에서 50 ng/ml로 사용하였다. RAR 효능제인 TNPB를 첨가하는 것은 세포 증식을 약간 증가시켰으나 GFP 발현은 그렇지 않았고(도 5), 따라서 본 발명자는 신생아 세포에 대한 배양 조건에 TNPB를 포함시키지 않았다. 주요 신호전달 경로의 소분자 조정자의 추가 스크린은 이들 신호전달 경로 조정자가 Lgr5-GFP 발현을 증가시키지 않은 것을 나타내었다(도 6). 흥미롭게도, 본 발명자는 Lgr5의 발현을 촉진하는데 필수적인 소장 줄기세포에서의 BMP 억제의 역할과 달리, BMP 억제제 LDN193189의 첨가가 Lgr5-GFP 발현을 크게 감소시킨 것을 발견하였다(도 6). 또한, Tgf-β 수용체(ALK5) 억제제 616452(Calbiochem, 6, Repsox로도 공지됨)는 Lgr5-GFP 발현을 증가시키지 않았으나, 본 발명자는 616452를 이용한 조건에서의 콜로니가 대조군 조건에서의 것보다 더 크게 성장하는 경향이 있고, 더 명백한 GFP 발현을 갖는 것을 관찰하였다(도 7). 추가 확인은 616452의 첨가가 또한 계대배양 전 및 후에 세포 확장을 증가(2-3배만큼 증가)시켰고, 5세대까지 콜로니의 계대배양을 가능케 한 것을 나타내었다(도 8b 및 도 9f). 집합적으로, 소분자(CVP6)의 첨가는 성장 인자 단독(EFI)에 비해 Lgr5+ 세포수를 2000배 미만만큼 증가시켰다(도 8 및 도 9).

[0907] 본 발명의 배양 시스템(계대배양 없음)에서의 개별적 인자의 상대적 중요성을 시험하기 위해, 본 발명자는 배지로부터 각각의 인자를 분리시키고, 배양 10일 후 세포 증식 및 내이 상피 세포의 Lgr5 발현을 정량하였다(도 8b). CHIR 또는 bFGF의 제거는 증식에 대해 가장 큰 영향을 미친 한편, CHIR의 제거는 Lgr5 발현에 대해 가장 큰 영향을 미쳤다. EGF 또는 616452의 제거는 증식에서 유의한 감소를 야기시킨 한편, VPA 또는 pVc 제거는 Lgr5 발현을 크게 감소시켰다. IGF1의 존재는 세포 증식 및 Lgr5 발현에 대해 한계적인 이로인 효과를 가졌다. 조합된 작용제(EFICVP6)를 이용한 처리는 배양 10일 후 가장 많은 수의 총 세포, Lgr5+ 세포 및 Lgr5+ 세포의 백분율을 발생시켰다. 이들 결과는 bFGF 및 CHIR이 가장 중요한 한편, 다른 인자가 최대 증식 및 Lgr5 발현을 촉진한 것을 암시한다. GFP 발현 및 세포 성장의 직접 시각화에 의해 유사한 결과를 획득하였다(도 8c).

[0908] 본 발명자는 개별적 인자의 잠재적 기능을 추가로 시험하였다. 세포 증식 및 Lgr5 발현을 촉진하는데 있어서 CHIR의 효과는 R-spondin1과 조합된 Wnt3a로 부분적으로 복제될 수 있으며(도 9a), 이는 Wnt 경로 활성화에서의 CHIR의 역할을 암시한다. Atoh1-nGFP 마우스 계통을 이용하여, 본 발명자는 VPA가 털세포의 자발적 분화를 억제한 것을 발견하였고(도 9d), 이는 장 줄기세포에서 Notch 활성화를 유지하는데 있어서의 VPA의 역할과 일치한다(Yin et al., 2014).

[0909] 단일 분류된 Lgr5-GFP 세포가 본 발명의 확장 조건(EFICVP6)에서 GFP+ 콜로니로 성장할 수 있는지 입증하기 위해, 본 발명자는 내이 상피로부터의 단일 Lgr5-GFP 세포를 GFP-고 및 GFP-저 분획으로 분류하였다. EFICVP6 조건에서의 확장 14일 후, 단일 GFP-고 세포로부터 개시된 배양물은 Lgr5-GFP를 고도로 발현하는 높은 순도의 콜로니를 함유하였다. 반면, GFP-저 세포로부터 개시된 배양물은 GFP-고 및 GFP-저 및 GFP 음성 콜로니 모두를 함유하였다(도 10). 이러한 실험은 단일 분류된 Lgr5-GFP 세포가 EFICVP6 조건에서 확장될 수 있음을 입증하였다.

[0910] 실시예 2: 확장된 Lgr5-양성 세포의 털세포로의 분화

[0911] 재료 및 방법

- [0912] 분화 프로토콜: 확장된 Lgr5-양성 세포의 분화를 위해, 세포 확장 조건(EFICVP6)에서의 10일의 배양 후, 세포 콜로니를 새로운 매트릭스로 옮기고, 분화 배지에서 추가로 배양하였다. 분화 배지는 Gsk3 β 억제제(예를 들어, CHIR99021)와 함께 또는 Gsk3 β 억제제(예를 들어, CHIR99021) 없이 Notch 경로 억제제(예를 들어, DAPT, D, 5 μ M, 또는 LY411575, LY, 5 μ M)를 함유한다. 배지를 격일로 교체하였다. 분화 배지와는 또 다른 6-10일의 인큐베이션 후, 콜로니를 qPCR 분석을 위해 수거하고, 4% PFA로 고정시키고, 텔세포 마커 Myo7a 및 프레스틴로 면역염색시켰다.
- [0913] RNA 추출 및 정량적 실시간 PCR(qPCR): RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 배양된 세포(RNeasy Mini Kit; Qiagen)로부터 분리시켰다. 정량적 실시간 PCR을 상업적으로 이용 가능한 프라이머 및 TaqMan 프로브(Myo7a 및 Hprt Life Technologies)를 이용하여 QuantiTect Probe PCR 키트(Qiagen)로 수행하였다.
- [0914] 면역세포화학 염색: 콜로니를 15-20분 동안 4% 파라포름알데하이드/PBS 중에서 실온에서 고정시킨 후, 0.1% BSA를 함유하는 PBS로 2회 세척하였다. 이후, 세포를 30분 동안 4°C에서 PBS 중에서 0.25% Triton X-100으로 투과화시켰다. 0.1% BSA를 함유하는 PBS로 2회 세척 후, 세포를 1시간 동안 블로킹 용액(Power Block, Biogenex)과 함께 인큐베이션하였다. 희석된 일차 항체(Power Block 용액 내)를 실온에서 4시간 또는 4°C에서 밤새 적용시켰다. 사용된 일차 항체는 미오신 VIIA(1:500, Proteus Biosciences로부터의 토끼 폴리클로날) 및 프레스틴(1:400, Santa Cruz로부터의 염소 폴리클로날)이었다. 각각 5분 동안 3회 세척 후, 이차 항체(Alexafluor 594 및 647-컨쥬게이션됨; Invitrogen)를 1:500 희석액으로 첨가하고, 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 핵을 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI, Vector Laboratories)로 시각화시켰다. 염색을 도립 형광 현미경(EVOS; Advanced Microscopy Group)으로 시각화시켰다.
- [0915] 결과
- [0916] 확장된 Lgr5-양성 세포가 줄기세포라는 중요한 기능적 증명으로서, 본 발명자는 시험관 내에서 확장된 세포의 분화 능력을 시험하였다. Notch 억제는 생체내에서 Lgr5 지지 세포의 텔세포로의 분화를 촉진하는 것으로 나타났다(Jeon et al., 2011). 또한, β -카테닌 발현에 의해 달성된 Wnt 경로 활성화는 또한 Atoh1 발현 및 텔세포 분화를 촉진하는 것으로 밝혀졌다(Shi et al., 2013). 따라서, 본 발명자는 확장된 Lgr5 세포의 텔세포 분화를 유도하는데 있어서의 이들 조건을 시험하였다.
- [0917] 본 발명자는 먼저 텔세포 마커 Myo7a의 발현을 위해 성장 인자(EGF, bFGF, IGF1) 또는 소분자(CHIR, VPA, 616452, pVc) 및 Notch 억제제(예를 들어, LY411575)의 다양한 조합으로 다수의 조건을 시험하였다. 성장 인자 또는 소분자는 없으나 CHIR 및 Notch 억제제를 갖는 조건은 Myo7a 발현의 가장 높은 증가를 발생시켰으며(도 11), 이는 성장 인자(EGF, bFGF, IGF1) 또는 소분자(VPA, 616452 및 pVc)가 텔세포의 분화를 억제하고, 분화 배지에서 제거되어야 하는 것을 암시한다.
- [0918] 본 발명자는 DAPT, γ -세크레타제 억제제 및 CHIR, GSK3 억제제로 상기 절차에 의해 확장된 Lgr5-GFP 세포를 처리하였다. 10일의 분화 후, 텔세포의 생성을 미오신 VIIA 및 프레스틴을 포함하는 텔세포 마커로 염색시킴으로써 시각화시켰다. DAPT와 CHIR의 조합은 미오신 VIIA 및 프레스틴 양성 콜로니(외부 텔세포)(도 12a, 상부 패널) 및 미오신 VIIA 양성이나 프레스틴 음성인 콜로니(내부 텔세포)(도 12a, 하부 패널)에 의해 나타나는 텔세포 생성을 유도하였다. GSK3 억제제에 의한 Wnt 신호전달의 활성화 없이, 또는 소분자 Wnt 경로 억제제(IWP-2, 2 μ M)에 의한 Wnt 신호전달의 억제로, 텔세포 생성은 거의 관찰되지 않는다(도 12b).
- [0919] 실시예 3: 성체 내이 조직으로부터의 Lgr5-발현 세포의 확장 및 텔세포 분화
- [0920] 재료 및 방법
- [0921] 성체 조직에 대해, 추출될 수 있는 온전한 와우의 제한된 양으로 인해 밑에 있는 중간엽으로부터 혈관줄무늬를 제거하였으나, 상피는 제거하지 않았다. 성체 세포에 대해, 추가 소분자 TTNPB(2 μ M, Tocris)를 첨가하였고, 완전 배지는 EGF, bFGF, IGF-1, CHIR99021, VPA, pVc, 616452 및 TTNPB를 함유한다.
- [0922] 결과
- [0923] 본 발명자는 조건 EFICVP6가 성체 마우스로부터의 Lgr5 내이 세포의 생존 및 성장을 지지하나(도 13), 증식이 매우 느린 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명자는 성체 마우스로부터 Lgr5 세포의 증식을 촉진할 수 있는 추가 인자에 대한 추가 스크리닝을 수행하였다. 본 발명자는 소분자 RA 신호전달 경로 효능제, TTNPB가 배양된 세포의 증식을 유의하게 촉진한 것을 발견하였다(도 14). 따라서, 이를 Lgr5 내이 세포에 대한 확장 배지에 추가로 혼합시켰다.

- [0924] 본 발명자는 6주령 성체 마우스로부터 분리된 세포의 세포 콜로니 형성을 추적하였다. EFICVP6+TTNPB 조건에서의 5일의 배양 후, 단일 세포는 큰 GFP+ 콜로니를 형성하며, 이는 이러한 조건에서의 성체 Lgr5 세포의 증식을 확증한다(도 15). 단일 와우로부터, 많은 수의 GFP+ 콜로니가 확장될 수 있다(도 14).
- [0925] 실시예 1-3의 논의
- [0926] 도 1-14에 예시된 실험은 하기를 제시한다:
- [0927] 도 1 및 도 2
- [0928] 성장 인자 및 소분자, 예를 들어, CHIR 및 VPA를 함유하는 각테일은 시험관 내에서 Lgr5 내이 전구체 세포의 증식 및 GFP 발현을 촉진하며, 이들 세포의 확장을 가능케 한다.
- [0929] 도 3
- [0930] pVc (2-포스포-L-아스코르브산)의 첨가는 Lgr5 내이 전구체 세포의 세포 증식을 증가시킨다.
- [0931] 도 4
- [0932] bFGF 농도를 증가시키는 것은 Lgr5 내이 전구체 세포의 증식을 촉진한다. 도 5-7
- [0933] 추가의 소분자(616452)는 Lgr5 내이 전구체 세포의 증식을 촉진한다.
- [0934] 도 8
- [0935] 1. 성장 인자 및 소분자를 함유하는 각테일은 시험관 내에서 Lgr5+ 내이 전구체를 유지시킨다.
- [0936] 2. 모든 인자(EGF, bFGF, IGF1, CHIR99021, VPA, pVc, 616452 (EFICVP6))를 함유하는 각테일은 4.7×10^5 의 세포의 총 수, 58% GFP+ 세포 및 2.7×10^5 의 GFP+ 세포로 지지 세포 증식 및 GFP 발현에서 우수한 결과를 나타낸다.
- [0937] 3. 각테일 내의 인자 대부분은 중요하다:
- [0938] CHIR은 세포 증식 및 GFP 발현을 촉진하는데 중요하다:
- [0939] CHIR을 제거하는 것은 전체 세포주의 약 100배 감소(4.7×10^5 대 5.0×10^3) 및 GFP+ 세포의 약 50배 감소(58% 대 1.3%)를 발생시킨다. GFP+ 세포의 약 4000배 감소(2.7×10^5 대 약 65). bFGF는 세포 증식을 촉진시키는데 중요하고, GFP 발현에 중요하다: bFGF를 제거하는 것은 세포수의 10배 감소(4.2×10^4 의 세포의 총 수) 및 GFP+ 백분율의 약 2배 감소(58% 대 32%) 뿐만 아니라 GFP+ 세포수의 20배 감소(2.7×10^5 대 1.4×10^4 GFP+ 세포)를 발생시킨다.
- [0940] 4. EGF, 616452는 세포 증식을 촉진하는데 중요하다. EGF를 제거하는 것은 총 세포수(2.2×10^5) 및 GFP+ 세포수(1.1×10^5)의 약 2배 감소를 발생시킨다. 616452를 제거하는 것은 총 세포수(1.7×10^5) 및 GFP⁺ 세포수(9.8×10^4)의 약 3배 감소를 발생시킨다.
- [0941] 5. VPA 및 pVc는 GFP 유지를 촉진시키는데 중요하다. VPA를 제거하는 것은 GFP 백분율 28% 및 GFP+ 세포수(1.1×10^5)의 2배 감소를 발생시킨다. pVc를 제거하는 것은 GFP 백분율 25% 및 GFP⁺ 세포수(1.1×10^5)의 2배 감소를 발생시킨다.
- [0942] 6. IGF-1은 세포 증식(4.1×10^5 총 세포) 또는 GFP 유지(58% 대 53% GFP 백분율)를 촉진하는 한계 효과를 갖는다.
- [0943] 도 9
- [0944] 1. CHIR은 Wnt 경로를 통해 기능한다.
- [0945] 2. R-spondin1과 조합시, Wnt3a는 CHIR을 대체할 수 있으나, 효과적이진 않다.
- [0946] 3. VPA는 분화 억제(아마도, Notch 활성화를 활성화/유지시킴에 의함)를 통해 기능한다.
- [0947] 4. HDAC6 억제제는 HDAC6 억제제가 VPA 대신에 사용되는 경우에 작동하지 않는다(데이터는 제시되지 않음, Tubastatin A, ACY1215 및 CAY10603 시도).

- [0948] 5. pVc는 GFP 발현을 촉진한다.
- [0949] 6. 라미닌 511은 GFP 발현을 촉진한다.
- [0950] 7. Tgf β 타입 I 수용체(Tgf β R1, ALK5) 억제제 616452는 세포의 연장된 배양을 가능케 한다.
- [0951] 8. CHIR은 Atoh-1+ 세포로의 분화를 촉진할 수 있다.
- [0952] 도 10
- [0953] 단일 분류된 Lgr5-GFP 세포는 성장 인자 및 소분자를 함유하는 각테일에서 확장될 수 있다.
- [0954] 도 11
- [0955] 1. Wnt 경로/CHIR의 존재는 Notch 억제제의 분화 효율을 증가시킨다.
- [0956] 2. 배양된 Lgr5 전구체 세포는 내부 털세포 및 외부 털세포 둘 모두를 생성시킬 수 있다.
- [0957] 일부 생체내 구제예에서, 성장 인자는 필요하지 않다.
- [0958] 도 13
- [0959] 1. LGR5+ 세포에 대한 확장 프로토콜은 마우스로부터의 성체 와우에서 작동하며, 세포는 Lgr5 발현을 잃지 않고 계대배양될 수 있다.
- [0960] 도 14-15
- [0961] 소분자 TTNPB는 성체 Lgr5 내이 전구체 세포의 증식을 촉진한다.
- [0962] 실시예 4: 털세포의 재생을 위한 내이로의 소분자의 전달을 위한 폴록사머-407 하이드로젤
- [0963] 1. 방법
- [0964] 1.1 제형의 제조
- [0965] 폴록사머-407 하이드로젤을 "저온-방법(cold-method)"을 이용하여 제조하였다. 간단히, 칭량된 양의 폴록사머-407을 40 ml 저온 초순수 또는 저온 PBS(pH 7.4)에 첨가하고, 자기 교반 플레이트에서 4℃에서 밤새 교반하여, 완전히 용해시켰다. 18%(w/w) 내지 25%(w/w) 범위의 다양한 농도의 폴록사머-407 용액을 제조하였다. 발프로산(VPA) 및 인산화된 아스코르브산(PAC)을 포함하는 친수성 약물을 5 ml 폴록사머-407 용액에 첨가하고, 자기 교반 플레이트에서 4℃에서 용해시켰다. 폴록사머-407의 젤화 특성에 대한 약물의 효과를 이해하고, 친수성 약물의 최대 가능한 로딩으로 37℃에서 젤화되는 최적 제형을 결정하기 위해 폴록사머-407 대 약물의 중량비를 다양화시켰다. 제형의 젤화 온도를 "시각 튜브 반전법"에 의해 결정하였다. 간단히, 친수성 약물을 갖거나 갖지 않는 폴록사머 407 용액을 함유하는 유리 바이알을 수조 내에 배치하였다. 온도를 천천히 증가시키고, 유리 바이알을 기울이는 경우 용액이 유동을 멈추는 온도를 젤화 온도로서 기록하였다.
- [0966] CHIR 99021(CHIR), Repsox 및 TTNPB를 포함하는 소수성 약물을 캡슐화시키기 위해, DMSO 중 이의 스톱 용액으로부터의 적절한 부피를 친수성 약물을 함유하는 폴록사머-407 용액에 첨가하고, 4℃에서의 피페팅에 의해 혼합시켰다. 소수성 약물과 함께 첨가되는 최대 DMSO 농도는 젤의 전체 부피와 관련하여 5-6%(v/v)로 제한되었다. 높은 농도의 DMSO는 젤의 젤화 온도를 감소시켰다. 제형의 젤화 온도를 이전에 기재된 바와 같은 "시각 튜브 반전법"에 의해 결정하였다.
- [0967] 1.2 시험관내 약물 방출
- [0968] 폴록사머-407 하이드로젤로부터의 캡슐화된 약물의 방출 동역학을 이해하기 위해, pH 7.4 및 37℃ 온도 조건에서 투석 백 방법을 이용하여 시험관내 방출 연구를 수행하였다. 간단히, 1 ml PBS에 재현탁된 30 μ L 젤을 함유하는 밀봉된 투석 백(3.5-5 kDa 컷오프)을 10 mL의 방출 배지(PBS)에 배치하였다. 막과 외부 용액 계면에서의 정체 층의 형성을 방지하기 위해 방출 배지를 100 rpm에서 교반하였다. 1 mL의 분취액을 HPLC를 이용한 약물의 분석을 위해 소정의 간격으로 배지로부터 취하고, 동일 부피의 새로운 배지로 대체하였다.
- [0969] 결과
- [0970] 2.1 제형화 및 젤화: 모든 약물을 로딩하면서 실온과 체온 사이의 신속하고 재현가능한 액체-젤 전이를 제공하는 최적 제형을 결정하기 위해 다양한 제형의 열 젤화 거동을 연구하였다. 약물이 없는 폴록사머 407 용액에 대

해, 젤화 온도는 폴록사머 407의 농도를 증가시킴에 따라 감소하였다. 88 mg/ml 및 14 mg/ml를 초과하는 농도로 VPA 및 pVc를 각각 포함하는 친수성 약물의 첨가는 폴록사머-407 용액의 젤화를 억제하였다. 따라서, 각각 88 mg/ml 및 14 mg/ml 이하의 VPA 및 pVc 농도를 갖는 18%(w/w) 폴록사머 용액을 이용하여 젤을 제조하였다. CHIR, Repsox 및 TTNPB를 DMSO 중 이들의 스톱 용액으로부터의 적절한 부피로 포함하는 소수성 약물을 친수성 약물을 함유하는 폴록사머-407 용액에 첨가하고, 4℃에서의 피페팅에 의해 혼합시켰다. 최종 제형 내의 전체 DMSO 농도를 5-6% 미만으로 되도록 보장하기 위해 스톱 용액 내의 약물의 농도를 CHIR, Repsox 및 TTNPB에 대해 각각 55.6-69.5 mg/ml, 23-28.75 mg/ml 및 35 mg/ml에서 유지시켰다. 높은 농도의 DMSO는 제형의 젤화 온도를 유의하게 낮추었다. 최종 제형은 저장 온도(4℃)에서 점성 액체였고, 이의 액체-젤 전이 온도(37℃)보다 높은 반고체 젤을 형성하였다.

[0971] 2.2 시험관내 약물 방출: 하이드로젤 제형으로부터의 캡슐화된 약물의 시험관내 방출을 투석 백 방법을 이용하여 연구하였다. CHIR 및 VPA 둘 모두는 각각 2시간에서 10% 및 0.5시간에서 17%의 초기 폭발 방출 후, 다음 48 시간에 걸친 지속된 방출을 나타내었다. 또한, VPA의 방출 동역학은 CHIR의 방출 동역학에 비해 유의하게 신속한 것으로 밝혀졌다. 정량적으로, 48시간에서 CHIR에 대해 33% 누적 방출이 관찰된 한편, 48시간에서 VPA에 대해 98% 누적 방출이 관찰되었다. 상세한 방출 프로파일은 도 16 및 17에 제시되어 있다.

[0972] 실시예 5: 마우스에서의 청력 회복

[0973] 폴록사머 407 젤(Sigma-Aldrich)의 17%(w/w) 스톱 용액을 이를 pH 7.4에서 저온 1x 인산염-완충 염수에 천천히 첨가함으로써 제조하였다. 이러한 용액은 냉장 또는 실온에서 액체이나, 체온에서는 응고된다. 젤을 투여 동안 시각화를 위해 에반스 블루 염료(50 ppm)로 청색으로 착색되었다.

[0974] 제형을 5% DMSO를 갖는 17% 폴록사머 407 중 527mM VPA 및 2.975mM CHIR("VPA/CHIR")로 실시예 4에 기재된 바와 같이 제조하였다. 비교를 위해, Notch 억제제, LY411575를 5% DMSO를 갖는 17% 폴록사머 407 중 4mM로 제조하였다("LY411575"). 또한, 5% DMSO를 갖는 17% 폴록사머 407의 비히클-단독 대조군을 제조하였다("대조군").

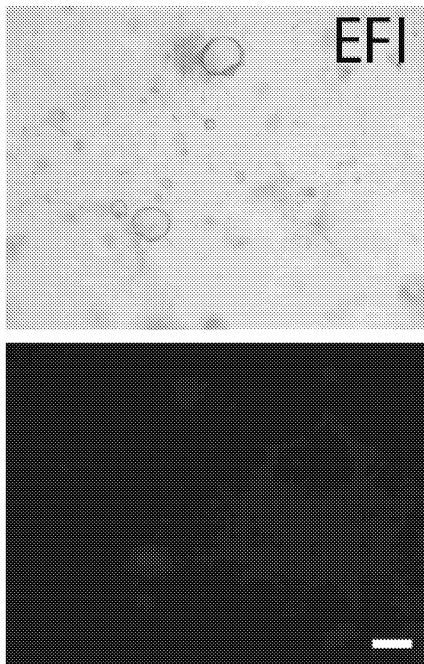
[0975] CBA/CaJ 마우스를 120 dB SPL에서 2시간 동안 8-16 kHz 옥타브 대역 노이즈 대역에 대한 노출에 의해 노이즈 챔버에서 청각 장애를 발생시켰다. 노이즈 노출 24시간 후, 청각 뇌줄기 반응(ABR)을 측정함으로써 이들의 청력을 평가하였다. ABR I 파의 시각적 검출에 필요한 최소 음압 수준(SPL)은 5, 10, 20, 28.3, 및 40 kHz로 결정되었다. ABR 측정 후, 폴록사머 젤 약물 혼합물("VPA/CHIR", "LY411575", 또는 "대조군"으로 상기 기재됨)의 경고막 주사를 전달하여 중이 공동을 충전시켰다. 30일 후, ABR을 평가하고, 노이즈 노출 후 24시간으로부터 30일까지의 청력 역치에서의 개선을 결정하였다. 결과는 도 18에 제시되어 있다.

[0976] 역치에서의 10 dB 개선은 제공된 음향에 대한 소리세기에서의 배가를 발생시키며, 임상적으로 의미있는 것으로 간주된다. "VPA/CHIR" 제형은 10 dB 회복을 달성하였다. 통계적으로 유의한 개선이 별표로 표시된다(*는 $p < 0.05$ 를 의미한다).

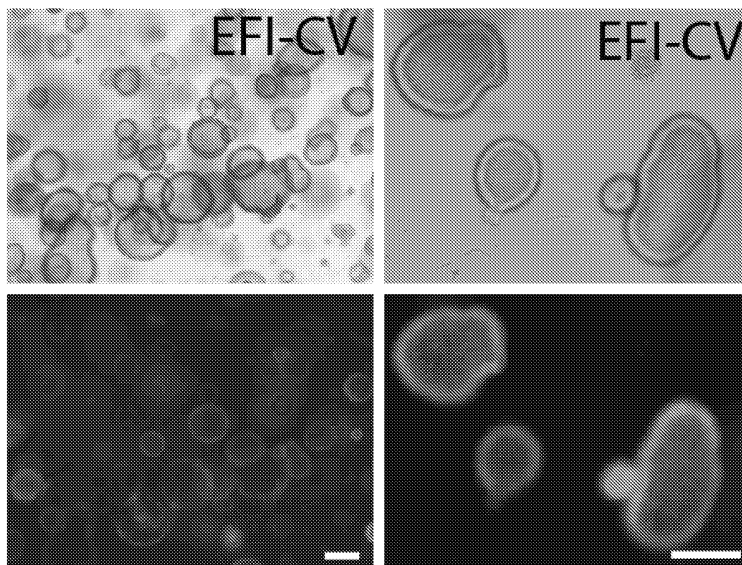
[0977] 상기 기재로부터, 다양한 용도 및 조건에 적합화시키기 위해 본원에 기재된 발명에 대한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음이 명백할 것이다. 방법 및 물질은 본 발명에서 사용하기 위해 본원에 기재되며; 당 분야에 공지된 다른 적합한 방법 및 물질이 또한 이용될 수 있다. 물질, 방법, 및 예는 단지 예시이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 상기 구체예는 또한 하기 청구항의 범위 내이다. 본원의 변수의 임의의 정의에서의 요소의 목록의 언급은 나열된 요소의 임의의 단일한 요소 또는 조합(또는 하위조합)으로서의 상기 변수의 정의를 포함한다. 본원의 구체예의 언급은 임의의 하나의 구체예로서의 구체예 또는 임의의 다른 구체예 또는 이의 일부와 조합된 구체예를 포함한다. 본원에 인용된 모든 특허 공개된 간행물 및 참고문헌의 교시내용은 이들의 전체내용이 참조로서 포함된다. 본 발명은 특히 이의 예시적 구체예를 참조로 하여 제시되고 기재되었으나, 첨부된 청구항에 의해 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 형태 및 세부사항에 있어서의 다양한 변화가 그 안에서 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.

도면

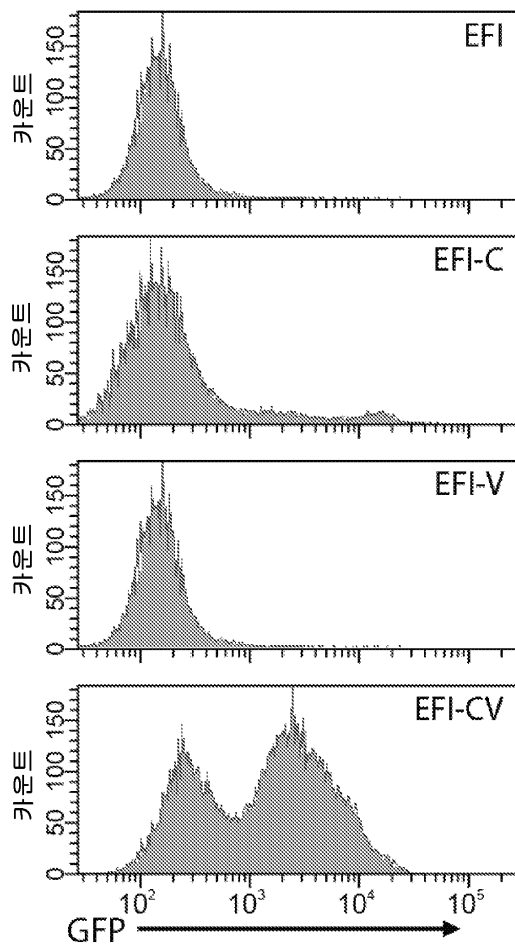
도면1a



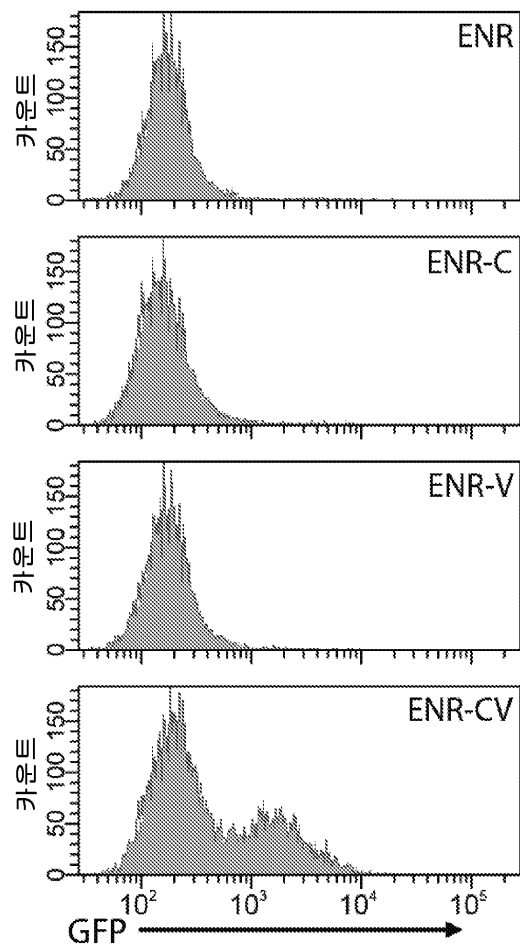
도면1b



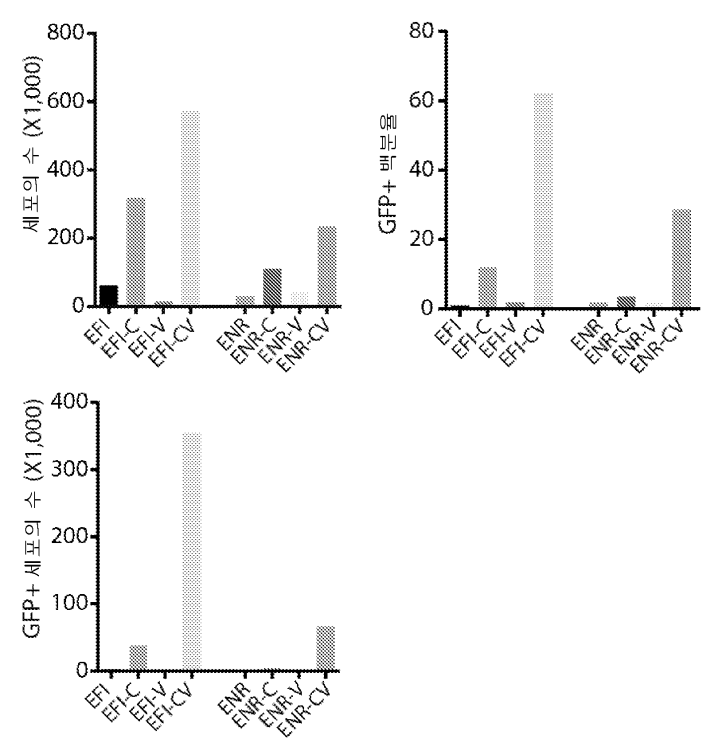
도면2a



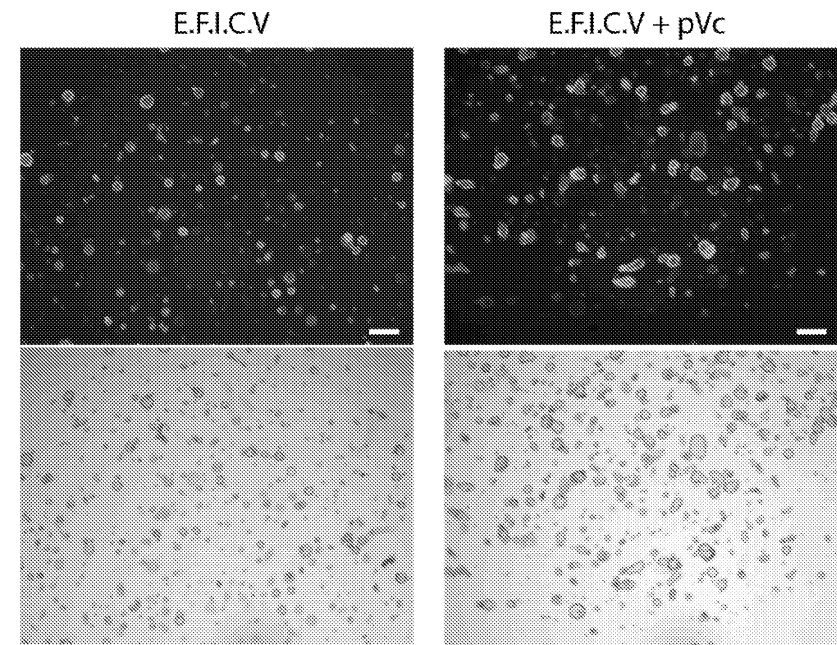
도면2b



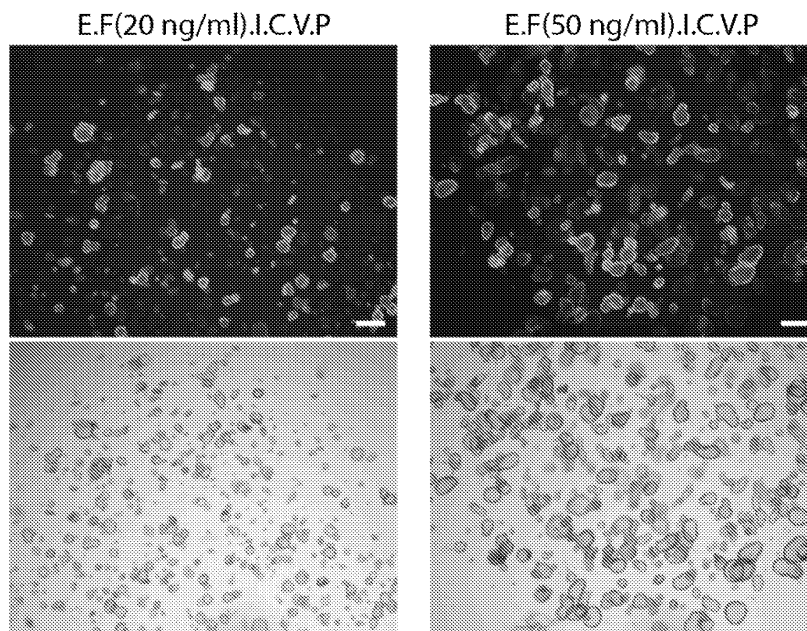
도면2c



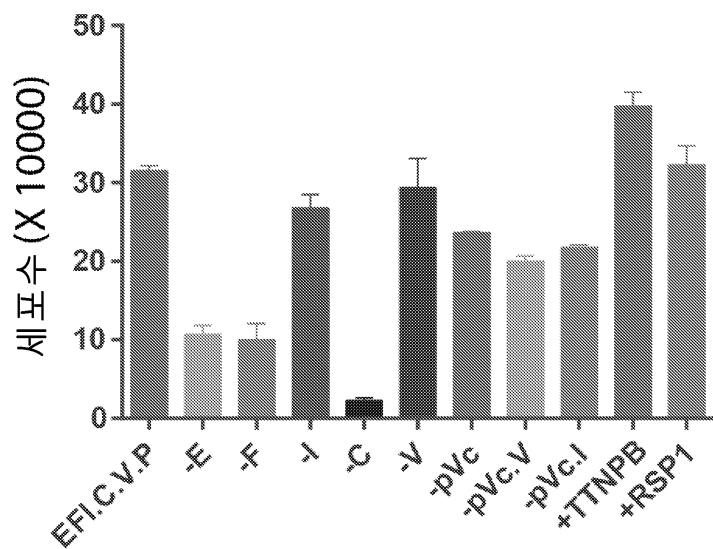
도면3



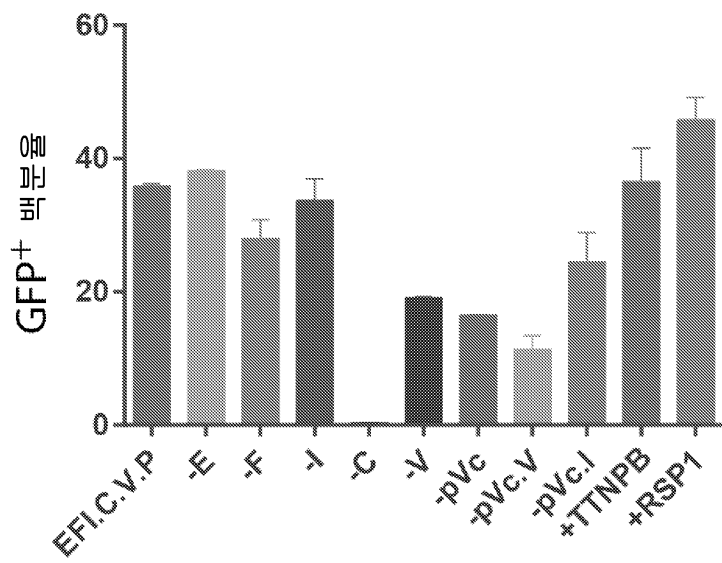
도면4



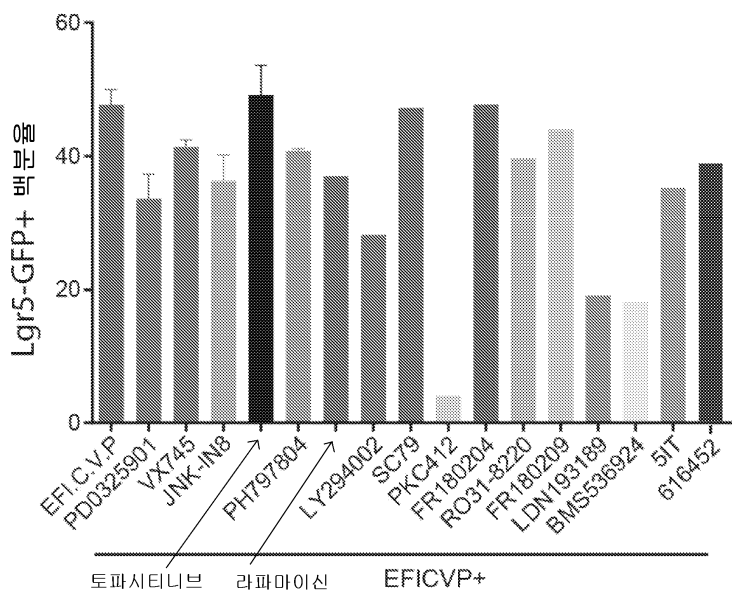
도면5a



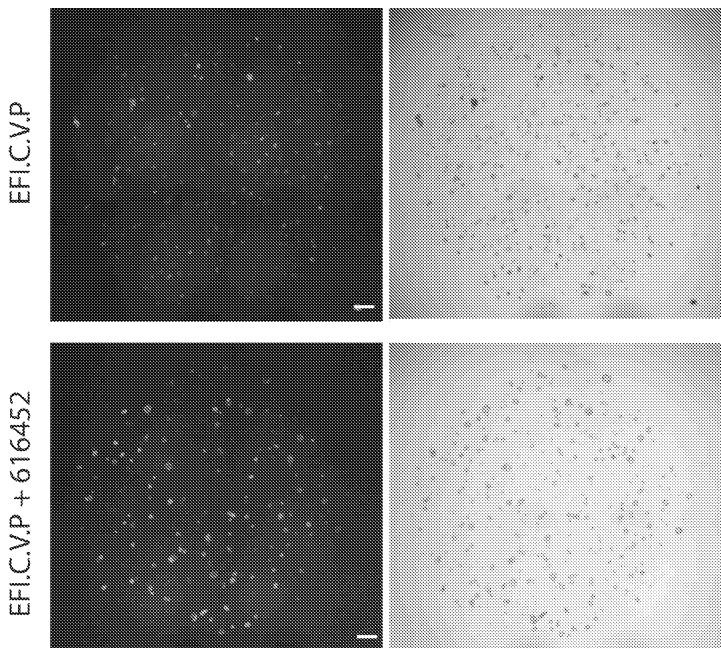
도면5b



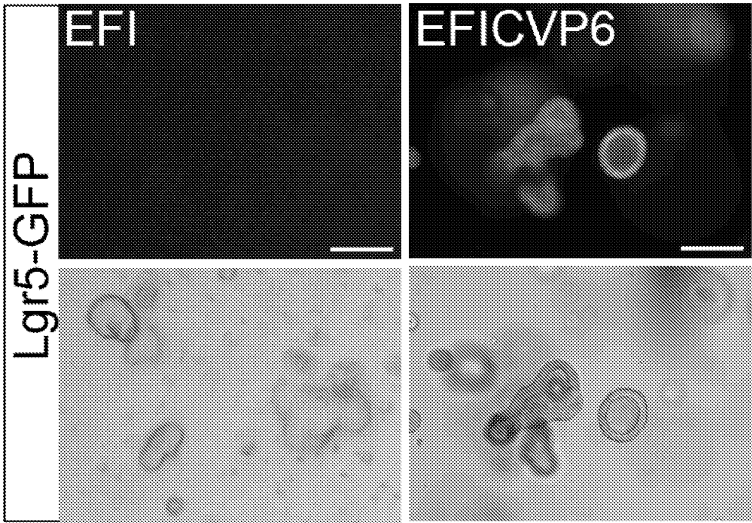
도면6



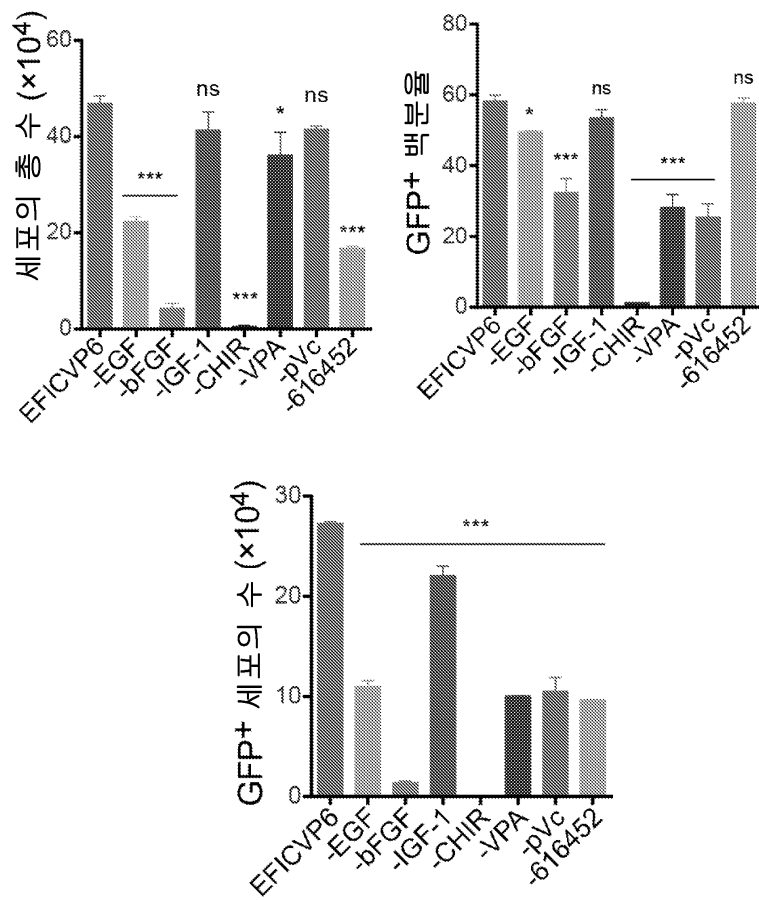
도면7



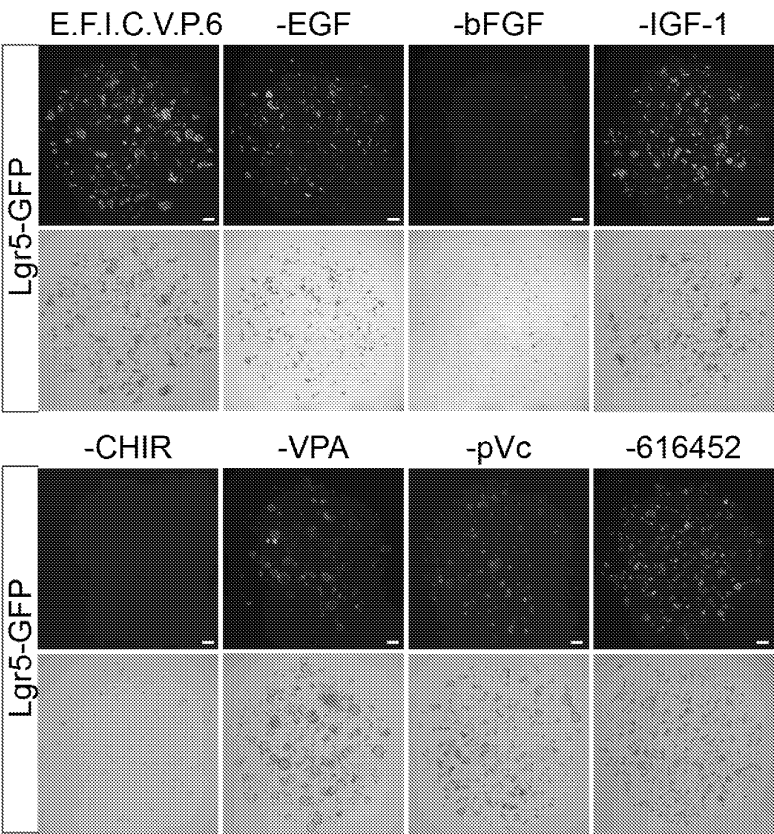
도면8a



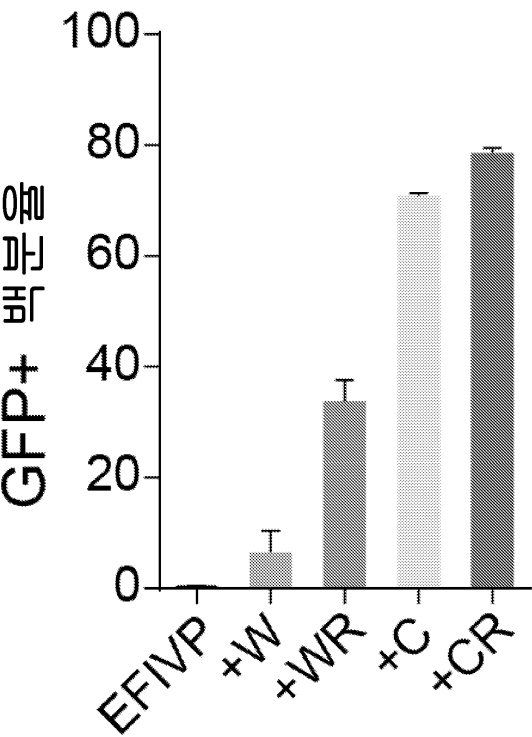
도면8b



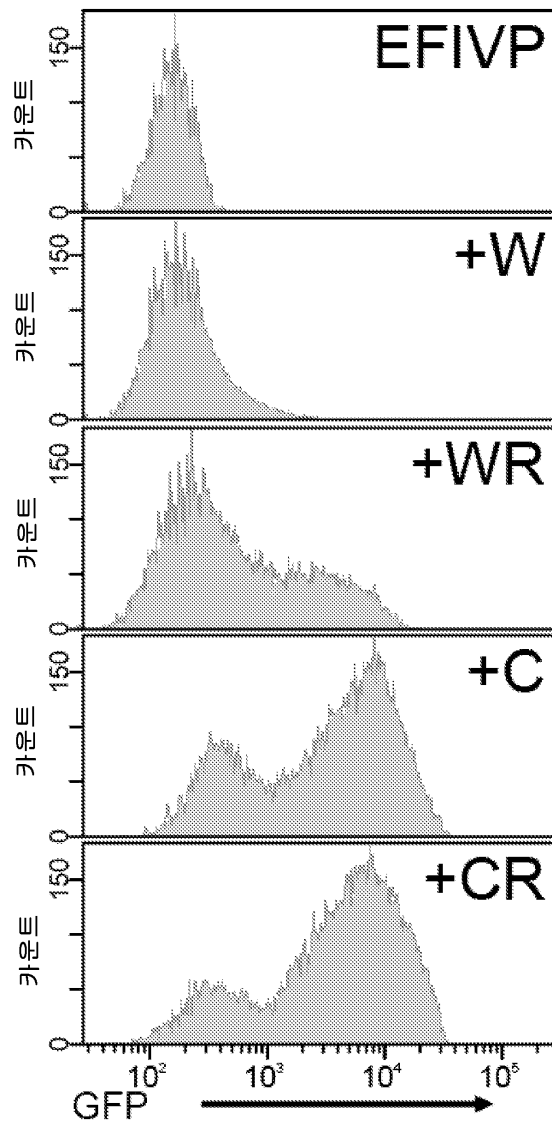
도면8c



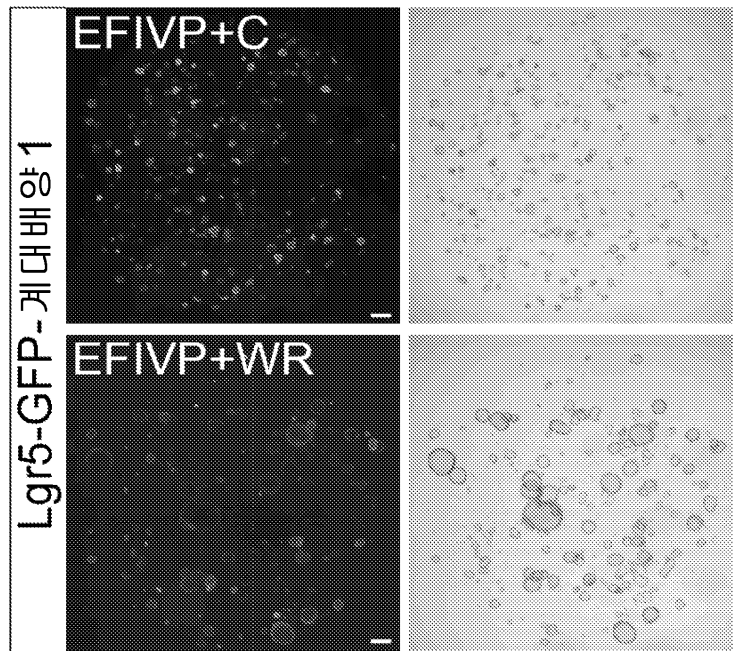
도면9a



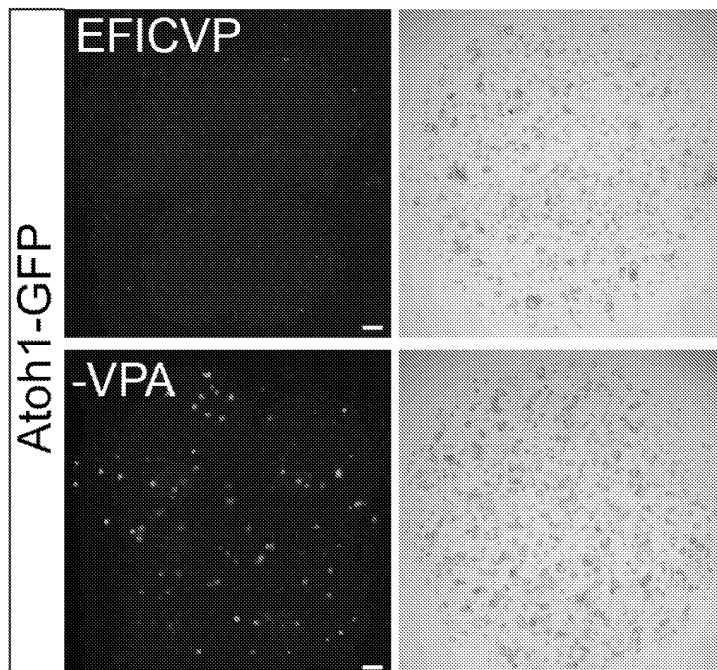
도면9b



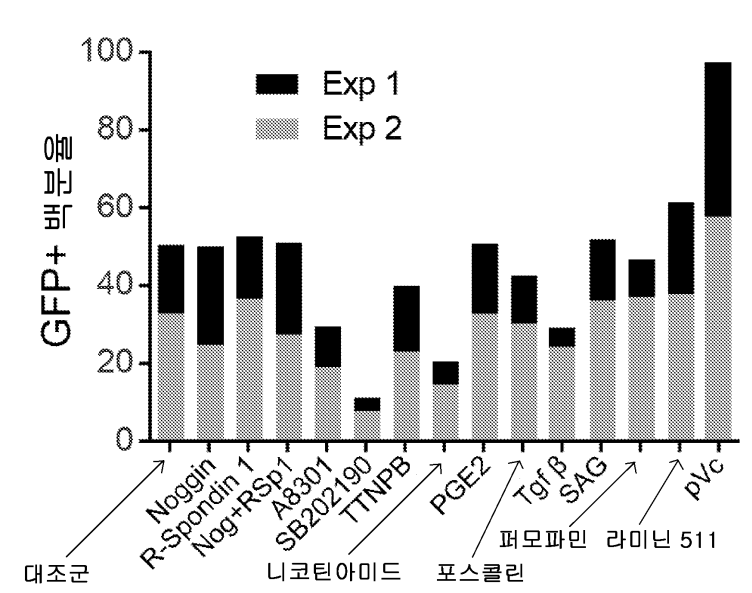
도면9c



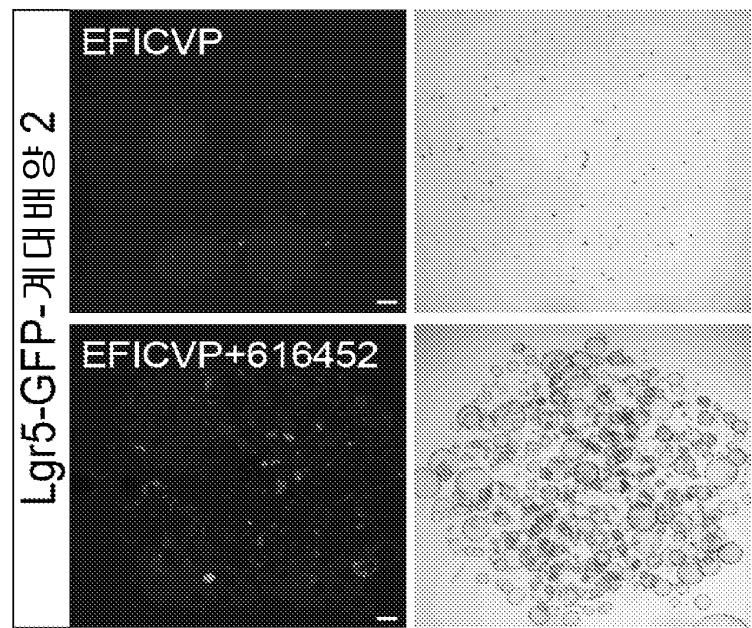
도면9d



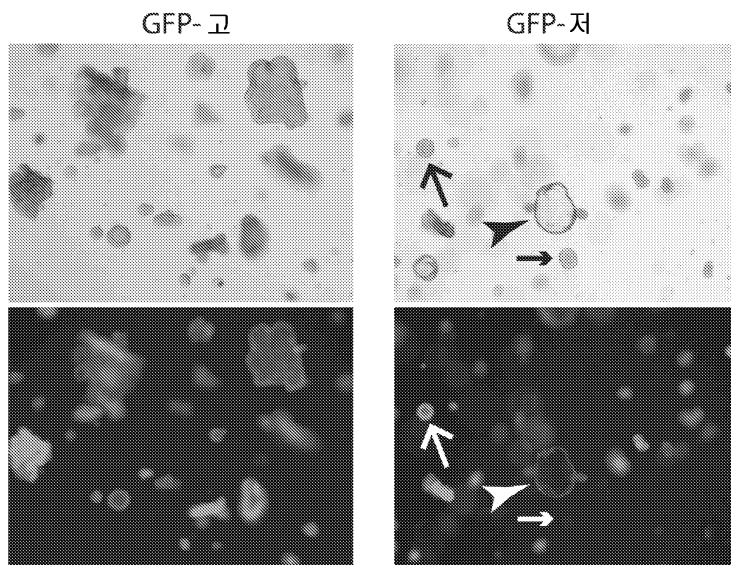
도면9e



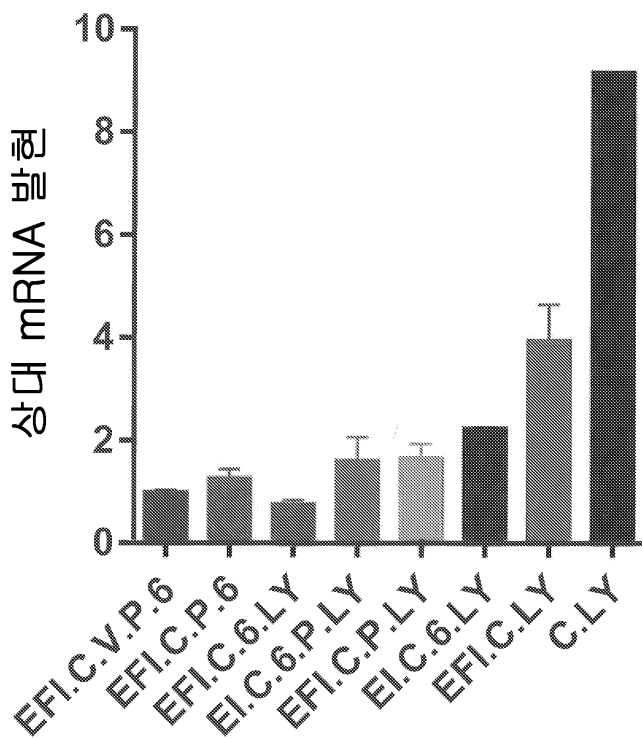
도면9f



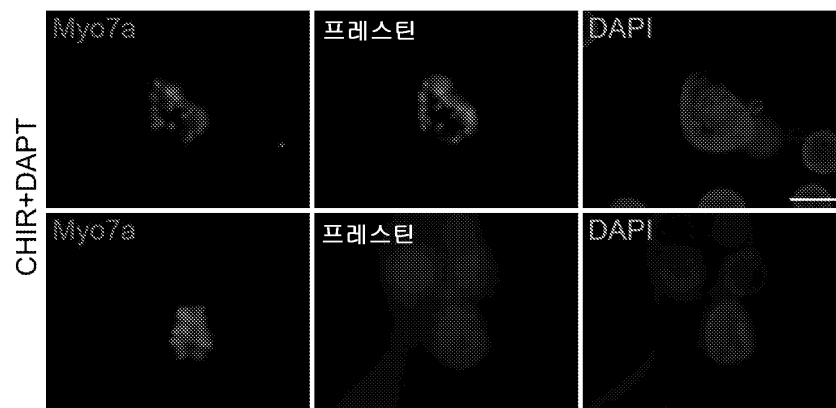
도면10



도면11



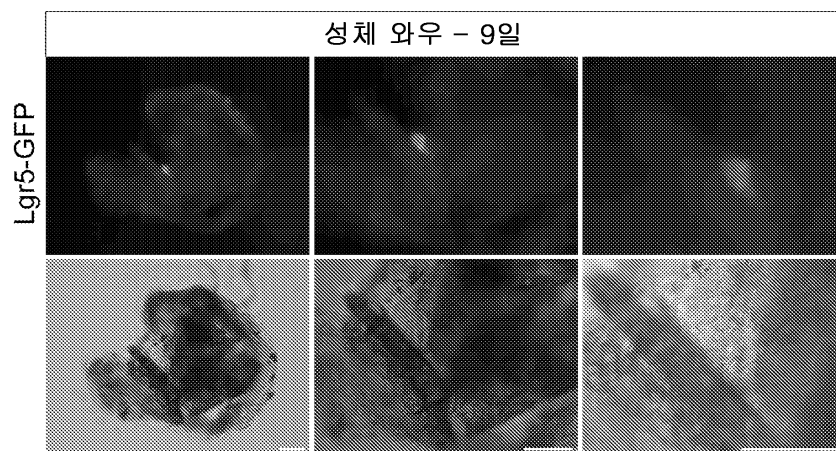
도면12a



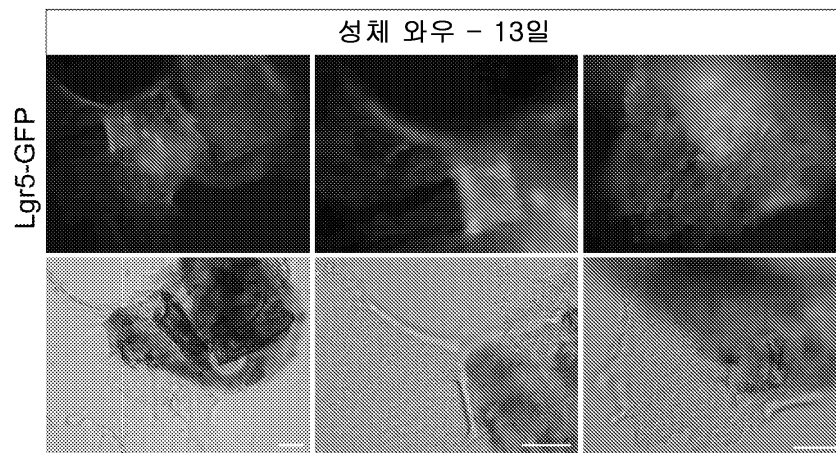
도면12b



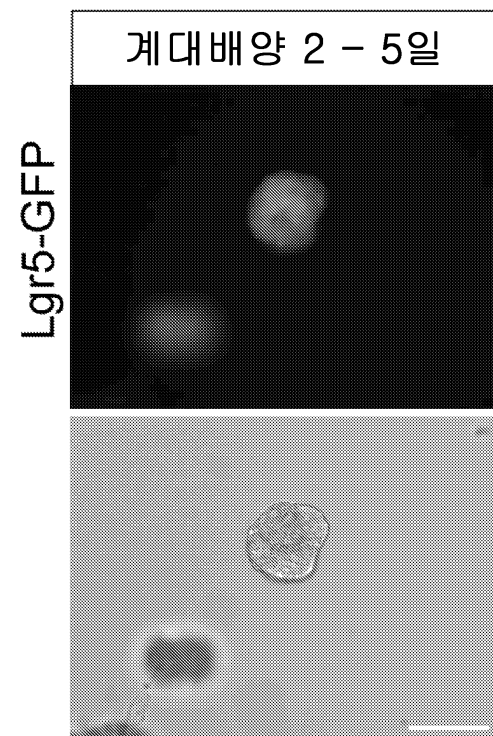
도면13a



도면13b

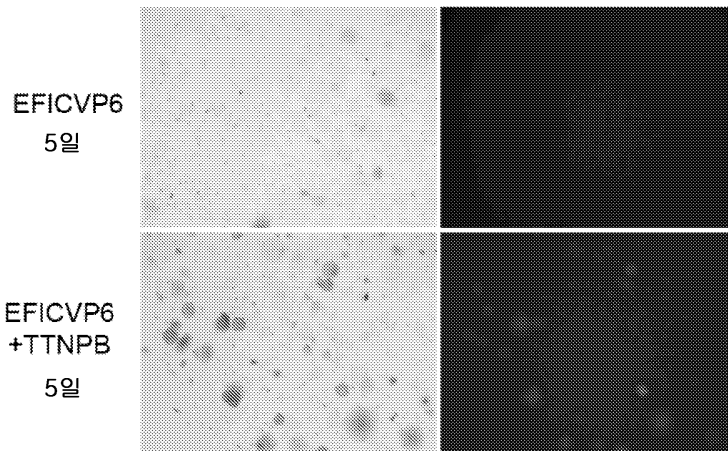


도면13c



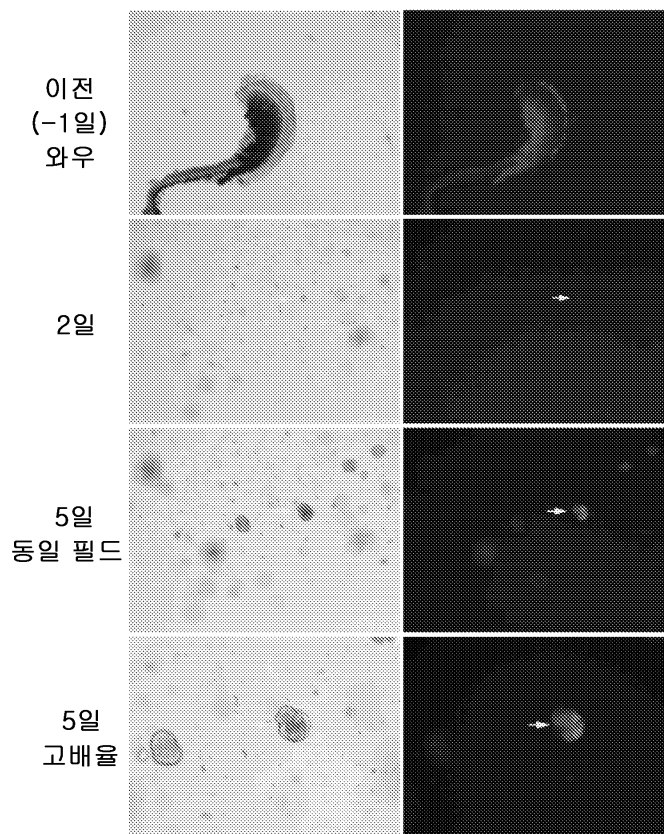
도면14

6주령 성체 마우스로부터의 세포

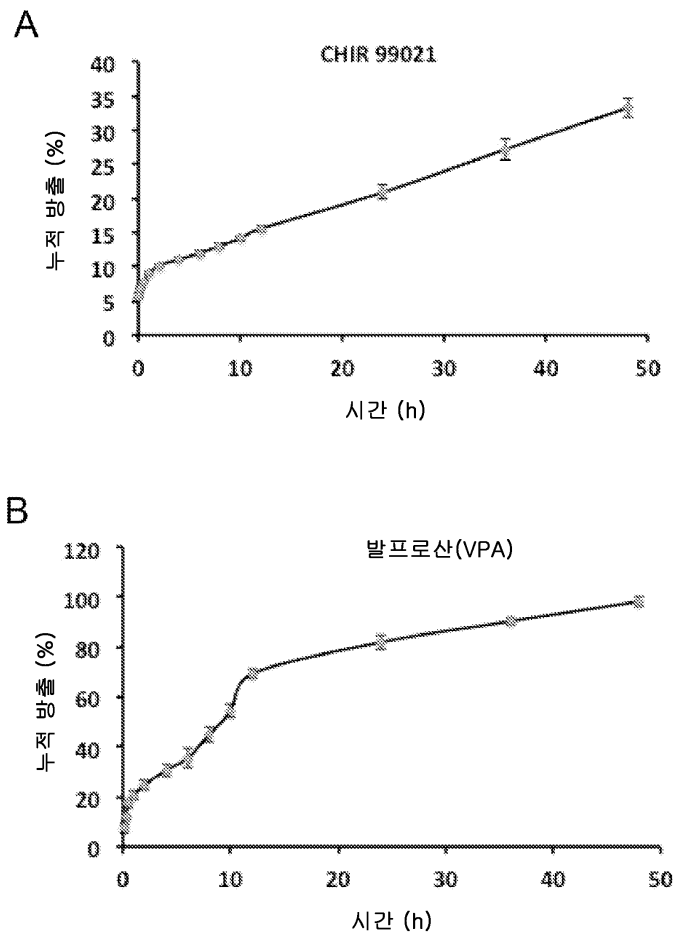


도면15

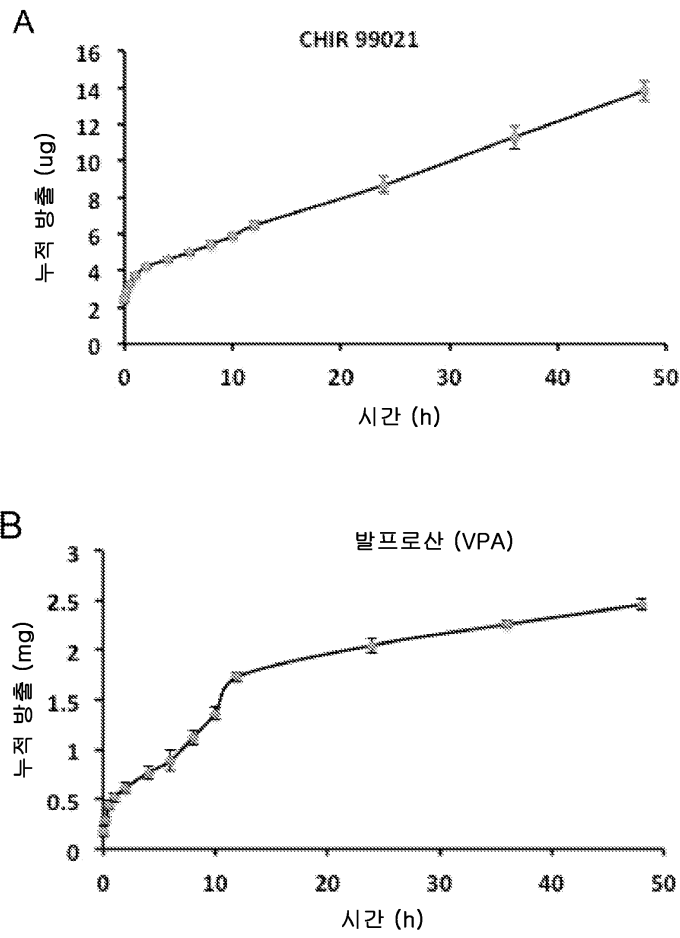
6주령 성체 마우스로부터의 세포



도면16



도면17



도면18

