



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0142651
(43) 공개일자 2021년11월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/724 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) C08B 37/16 (2006.01)
C08L 5/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/724 (2013.01)
A61K 9/0048 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7031603
- (22) 출원일자(국제) 2020년03월03일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년09월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/020805
- (87) 국제공개번호 WO 2020/180872
국제공개일자 2020년09월10일
- (30) 우선권주장
62/814,028 2019년03월05일 미국(US)

- (71) 출원인
코넬 유니버시티
미국 뉴욕 14850 이타카 스위트 310 파인 트리 로
드 395 옛 코넬 유니버시티(씨티엘) 센터 포 테크
놀로지 라이센싱
- (72) 발명자
노시아리, 마르셀로, 엠.
미국 뉴욕 14850 이타카 스위트 310 파인 트리 로
드 395 코넬 유니버시티 센터 포 테크놀로지 라이
센싱 내
블란, 엔리케, 로드리게즈
미국 뉴욕 14850 이타카 스위트 310 파인 트리 로
드 395 코넬 유니버시티 센터 포 테크놀로지 라이
센싱 내
- (74) 대리인
특허법인 광장리앤코

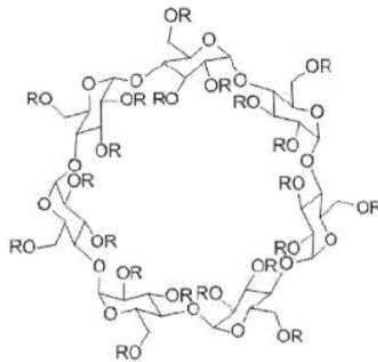
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 망막 세포로부터 리포푸신 제거 활성을 갖는 물질의 조성물

(57) 요약

본 개시내용은 일반적으로 안질환(예컨대, 망막병증)의 치료를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이고, 보다 구체적으로 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환의 치료에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



하나 이상의 R=설포부틸 에테르기(-C₄H₈SO₃-Na⁺) 또는 2-하이드록시 프로필기(-C₃H₆OH)인 베타-사이클로덱스트린

(52) CPC특허분류

A61K 9/0051 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

C08B 37/0015 (2013.01)

C08L 5/16 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에 투여하는 것을 포함하는,

망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서, 시력을 손상시키지 않으면서 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환을 예방하거나 치료하기 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환이, 스타가르트병(STGD), 색소성 망막염(RP), 노화 관련 황반 변성(AMD), 베스트병(BD) 및 원추-간상 이영양증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

안질환이 유전적이거나, 비유전적이거나, 노화와 관련된 것인, 방법.

청구항 4

유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에 투여하는 것을 포함하는,

망막 세포 리포푸신 축적의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서, 시력을 손상시키지 않으면서 망막 세포 리포푸신 축적을 예방하거나 치료하기 위한 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

유효량의 SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 투여가 대상체에서 리포푸신-관련 망막 손상의 악화를 예방하는 것인, 방법.

청구항 6

망막 색소 상피 세포를, 유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과 접촉시키는 것을 포함하는, 망막 색소 상피 세포에서 리포푸신 축적을 감소시키기 위한 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염이 망막 색소 상피 세포에 국한되도록 구성되는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염이 망막 색소 상피 세포에서 리포푸신 비스레티노이드 지질과 착체를 형성하도록 구성되는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

유효량의 SBE-βCD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 투여가 망막 색소 상피 세포내 리포푸신의 축적을 차단, 완화 또는 역전시키는 것인, 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

리포푸신 비스레티노이드 지질이, N-레티닐리덴-N-레티닐에탄올아민(A2E), A2E 이성질체, A2E의 산화된 유도체, 및 올-트랜스(all-trans)-망막 이량체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

SBE-βCD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염이, 망막 색소 상피 세포를 표적화하는 약제에 커플링되는 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

약제가 망막 색소 상피 세포내 엔도솜 또는 리소솜을 표적화하는 것인, 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

약제가 만노스 6-포스페이트인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

SBE-βCD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염이 국소(topical), 유리체내(intravitreal), 안내(intraocular), 망막하(subretinal) 또는 공막하(subscleral) 투여를 통해 투여되는 것인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

공막하 투여가 대상체에 서방성 공막하 임플란트를 이식함으로써 달성되는 것인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

SBE-βCD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염이 형광단에 커플링되는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 안질환(예컨대, 망막병증), 및 보다 구체적으로, 망막 세포 리포푸신(Lipofuscin) 축적과 관련된 안질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0003] 본 출원은 2019년 3월 5일자로 출원된 미국 가특허출원 제62/814,028호의 이익 및 우선권을 주장하며, 그의 전체 내용은 참조로서 본원에 포함된다.

[0004] 정부 지원

[0005] 본 발명은 NEI(National Eye Institute)/NIH(National Institutes of Health)에서 수여한 승인 번호 EY027422-02 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 발명에 대한 특정 권리를 가지고 있다.

[0006] 본 기술의 배경에 대한 다음의 설명은 단지 본 기술을 이해하는 데에 도움이 되기 위해 제공되는 것이며, 본 기술에 대한 선행 기술을 설명하거나 구성하는 것으로 인정되지 않는다.

[0007] 리포푸신은 리소좀 소화 후 잔여물이라고 여겨지는 비-소화성 물질로 구성된 미세한 황갈색 안료이다. 리포푸신은 대부분 지질 비스레티노이드로 알려진 레티알데하이드의 이량체와, 소량의 탄수화물, 산화된 단백질 및 금속으로 구성된다. 망막 세포내 리포푸신 축적은, 황반 변성, 눈의 퇴행성 질환 및 스타가르트병과 같은 병태와 관련된, 망막 독성을 야기한다.

발명의 내용

[0008] 본 기술의 요약

[0009] 일 양태에서, 본 기술은 유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 시력을 손상시키지 않으면서, 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환을 예방하거나 치료하기 위한 방법을 제공한다. 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환은 스타가르트병(STGD), 색소성 망막염(RP), 노화 관련 황반 변성(AMD), 베스트병(BD) 및 원추-간상 이영양증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 일부 실시양태에서, 안질환은 유전적이거나, 비유전적이거나, 노화와 관련된 것이다. 또 다른 양태에서, 본 기술은 유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 망막 세포 리포푸신 축적의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 시력을 손상시키지 않으면서, 망막 세포 리포푸신 축적을 예방하거나 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0010] 추가로 또는 대안적으로, 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, 유효량의 SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 대상체에서 리포푸신-관련 망막 손상의 악화를 예방한다.

[0011] 또한, 본원에는, 망막 색소 상피 세포를 유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과 접촉시키는 것을 포함하는, 망막 색소 상피 세포에서 리포푸신 축적을 감소시키기 위한 방법이 개시된다.

[0012] 본원에 개시된 방법의 임의의 및 모든 실시양태에서, SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 망막 색소 상피 세포에 국한되도록 구성된다. 특정 실시양태에서, SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 망막 색소 상피 세포에서 리포푸신 비스레티노이드 지질과 착체화하도록 구성된다. 리포푸신 비스레티노이드 지질은 N-레티닐리덴-N-레티닐에탄올아민(A2E), A2E 이성질체, A2E의 산화된 유도체, 또는 올-트랜스(all-trans)-망막 이량체일 수 있다.

[0013] 추가로 또는 대안적으로, 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, 유효량의 SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 망막 색소 상피 세포내 리포푸신의 축적을 차단, 완화 또는 역전시킨다.

[0014] 본원에 개시된 방법의 이전의 실시양태 중 임의의 것에서, SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 망막 색소 상피 세포를 표적화하는 약제에 커플링된다. 일부 실시양태에서, 약제, 만노스 6-포스페이트는 망막 색소 상피 세포내 엔도솜 또는 리소솜을 표적화한다. 추가적으로 또는 대안적으로, 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 형광단에 커플링된다. 형광단의 예로는 플루오레세인, 로다민, 오레곤 그린(Oregon green), 에오신, 텍사스 레드(Texas Red), 시아닌, 스트렙토시아닌, 헤미시아닌, 페쇄 색 시아닌, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 인도카보시아닌, 옥사카보시아닌, 티아카보시아닌, 메로시아닌, 프탈로시아닌, 나프탈렌 유도체(예컨대, 단실 및 프로단 유도체), 쿠마린 및 이의 유도체, 옥사디아졸 및 이의 유도체(예컨대, 피리딜옥사졸, 니트로벤족사디아졸 및 벤족사디아졸), 피렌 및 이의 유도체, 옥사진 및 이의 유도체(예컨대, 나일 레드(Nile Red), 나일 블루(Nile Blue) 및 크레실 바이올렛), 아크리딘 유도체(예컨대, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지 및 아크리딘 옐로우), 아틸메틴 유도체(예컨대, 아우라민, 크리스탈 바이올렛 및 말라카이트 그린), 및 테트라피롤 유도체(예컨대, 포르피린 및 빌리루빈)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0015] 추가로 또는 대안적으로, 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 국소, 유리체내, 안내, 망막하 또는 공막하 투여를 통해 투여된다. 특정 실시양태에서, 공막하 투여는 대

상체에 서방성 공막하 임플란트를 이식함으로써 달성된다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1a 및 도 1b는 본 기술의 조성물의 구조식을 나타낸다. 도 1a는 7개의 치환된 글루코피라노사이드 단위를 포함하는 β(베타)-사이클로덱스트린의 일반식을 나타낸다. 치환은 기호 R로 표시된다. 도 1b는 (i) 메틸 베타-사이클로덱스트린(MβCD 또는 MBCD); (ii) 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HPβCD); 및 (iii) 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린(SBEβCD)내 치환기의 정체를 나타낸다.

도 2는 본 기술의 상이한 사이클로덱스트린을 4mM의 용량으로 사용함에 의한 LB의 제거를 나타낸다. 인간 RPE 배양 세포를, 밤새 5 μM A2E와 함께 인큐베이션하는 것에 의해 리포푸신으로 미리 로딩하였다. 세포를 세척하고, 미처리되거나 4mM의 사이클로덱스트린 화합물(X축에 표시됨)로 처리하였다. 24시간 후에, 세포를 트립신으로 수확하고, 펠렛화하고, 2% 트리톤 완충제에서 용해시켰다. A2E 함량은, 430nm에서 형광에 의해 평가되었고, 단백질 함량 대 세포 수의 보정 곡선에 단백질 함량을 보간하여 세포 수를 얻었다. 100%는 미추출된 세포의 함량에 상응한다. 열(column)은 다음과 같이 라벨링된다: A0 = α-사이클로덱스트린; B0 = β-사이클로덱스트린; M1 = 메틸 β-사이클로덱스트린; M2 = 메틸 β-사이클로덱스트린; M3 = 메틸 β-사이클로덱스트린; M4 = 헵타키스(2,6-디-O-메틸) β-사이클로덱스트린; M5 = 헵타키스(2,3,6-트리-O-메틸) β-사이클로덱스트린; H1 = 하이드록시 프로필 β-사이클로덱스트린; H2 = 하이드록시 프로필 β-사이클로덱스트린; H3 = 하이드록시 프로필 β-사이클로덱스트린; SB1 = 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린; SB2 = 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린; SB3 = 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린; G0 = 감마-사이클로덱스트린. 도 2에서 나타내는 바와 같이, 모든 사이클로덱스트린이 LB 제거를 촉진하는 데에 효과적인 것은 아니다. 메틸 β-사이클로덱스트린, 2-하이드록시 프로필 β-사이클로덱스트린 및 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린은 망막 세포로부터 리포푸신 비스레티노이드의 제거를 촉진하는 반면, 비치환된 α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린 및 감마-사이클로덱스트린은 이러한 조건에서 A2E를 추출하지 않았다. 2,6-디-O-메틸-β-사이클로덱스트린(헵타키스 2,6-디-O-메틸) 또는 2,3,6-트리-O-메틸-β-사이클로덱스트린(헵타키스 2,3,6-트리-O-메틸) 또한 LB 제거를 촉진하는 데에 효과적이지 않았다. *100mM 스톱은 수용성 부족으로 인해 DMSO에서 준비되었다.

도 3a는 밀리몰 범위의 메틸 β-사이클로덱스트린을 사용한 LB의 용량 의존적 제거를 나타낸다. A2E가 로딩된 상피 세포를, 표시된 용량의 메틸 β-사이클로덱스트린으로 24시간 동안 처리하였다. 대조군으로서, A2E가 미리 로딩되지 않은 미처리 상피 세포를, 표시된 용량의 메틸 β-사이클로덱스트린으로 24시간 동안 처리하였다. 인큐베이션 기간이 끝날 때의 세포 당 A2E 함량은 메틸 β-사이클로덱스트린의 용량의 함수로서 플로팅되었다.

도 3b는 메틸 β-사이클로덱스트린에 의한 LB의 제거를 나타낸다. A2E가 로딩된 상피 세포를 24시간 동안 메틸 β-사이클로덱스트린으로 처리하였다. 인큐베이션 기간이 끝날 때에, 세포 내부의 A2E의 형광을 100X 배율에서 형광 현미경법으로 모니터링하였다. A2E를 포함하는 세포의 핵을 시각화하기 위해 세포를 획스트(Hoechst) 염료로 염색하였다. 왼쪽 열은 LB(청록색, 화살표) 및 핵(청색, 화살표 머리)에 대해 형광으로 나타난 바와 같이, 미처리 대조군(A2E-미처리)내의 리포푸신 LB 축적을 나타낸다. 오른쪽 열은 메틸 β-사이클로덱스트린 처리 후의 LB 축적(청록색, 화살표) 및 핵(청색, 화살표 머리)을 나타낸다.

도 4a 및 4b는 형광 현미경법에 의해 측정된 메틸 β-사이클로덱스트린에 의한 LB의 제거를 나타낸다. A2E가 로딩된 상피 세포를 24시간 동안 메틸 β-사이클로덱스트린으로 처리하였다. 핵을 시각화하기 위해 세포는 획스트 염료로 염색되었다. 세포(미추출 세포) 내부의 A2E의 형광을 100X 배율에서 형광 현미경법으로 모니터링하였다. 도 4a는 LB 및 핵에 대한 형광으로 나타난 바와 같이, 미처리 대조군(A2E-미처리) 내의 LB-풍부 리포푸신 축적을 나타낸다. 도 4b는 24시간 동안 4mM MβCD로 처리한 후 세포로부터 방출된 LB를 나타낸다.

도 5a는 망막 세포에서 리포푸신을 제거하는 약제를 확인하는 데에 사용되는 분석법을 나타낸다. 인간 망막 색소 상피(RPE) 배양 세포인 ARPE-19(ATCC)를 5 μM A2E(망막 RPE에 가장 풍부한 LB)와 함께 밤새 배양함으로써, ARPE-19(ATCC)에 리포푸신이 미리 로딩되었다. A2E는 눈의 RPE에서 발견되는 LB-풍부 리포푸신의 대체물로서 사용되었다. 세포를 1x10⁵ 세포/웰로 96웰 플레이트에 플레이팅하였다. DMEM-10% 배지에서 48시간 후, 배지는, 24시간 제거 분석에서 시험 약제의 존재 또는 부재 하에서, DMEM-10% 배지로 교체되었다. 제거 약제의 각 용량은 4회씩 평가되었다. 처리가 끝나면 상청액을 제거하고 부착된 세포를 1X A2E-가용화 완충제로 용해시켰다. A2E 함량은 분광광도계 플레이트 판독기(여기: 430nm, 방출 600nm)를 사용하여 용해물의 형광을 기반으로 결정되었다.

도 5b는 세포 당 A2E의 피코몰과 알려진 양의 A2E 표준 물질의 형광 사이의 상관관계를 플롯팅한다. 세포 당 A2E의 피코몰을 계산하기 위해, A2E-특이적 형광 값(A2E가 미리 로딩된 세포로부터의 용해물의 형광에서 A2E가 로딩되지 않은 대조군 세포로부터의 상응하는 용해물의 형광을 뺀 값)을, 형광(430nm 여기/600nm 방출) 대 1X A2E-가용화 완충제에 용해된 A2E 표준 물질의 알려진 양을 플롯팅하여 생성된 보정 곡선에 보간하였다. A2E-가용화 완충제의 조성은, 형광을 사용하여 A2E 양의 계산을 방해할 수 있는 사이클로텍스트린과의 용매 변색 간섭을 제거하도록, 최적화되었다.

도 5c는 도 5b에 기재된 조건 하에서 A2E의 형광이 사이클로텍스트린 착체화에 의해 영향을 받지 않고 형광 관독이 실제 A2E 양을 반영한다는 것을 나타낸다

도 6은 메틸 β-사이클로텍스트린, 2-하이드록시 프로필 β-사이클로텍스트린, 및 설포부틸 에테르 β-사이클로텍스트린에 의한 LB 제거의 이미지를 나타낸다. 미처리 A2E-로딩된 RPE 배양물은 음성 대조군으로서 사용되었다. A2E-로딩된 RPE 배양물을 7.5mM의 표시된 β-사이클로텍스트린 화합물로 48시간 동안 처리하였다. 각 사이클로텍스트린에 대해, 3개의 개별 로트를 시험하였다. 리포푸신(황색)은 많은 수의 세포를 포착하기 위해 낮은 배율(10X) 대물렌즈를 사용하여 형광 현미경법(488nm/600nm)으로 시각화되었다.

도 7은 β-사이클로텍스트린에 의한 처리 종료 시 A2E의 화학량론적 분포의 예를 나타낸다. A2E가 미리 로딩된 상피 세포를, 12.5mM의 표시된 β-사이클로텍스트린과 함께 무혈청 배지에서 4시간 동안 처리하였다. 세포 용해물 및 상청액의 A2E 함량은 도 5a에 기재한 바와 같이 형광 분석에 의해 결정되었다. 도 7에 도시된 바와 같이, 세포로부터 사라지는 A2E의 대부분은 상청액에서 나타났다.

도 8은 β-사이클로텍스트린이 용량 의존적 LB 제거 효과를 발휘함을 나타낸다. A2E가 로딩된 상피 세포를 표시된 용량의 β-사이클로텍스트린으로 48시간 동안 처리하였다. 대조군으로서, A2E가 미리 로딩되지 않은 미처리 RPE 세포를 지시된 용량의 β-사이클로텍스트린으로 48시간 동안 처리하였다. 인큐베이션 종료 시에, 세포를 A2E-가용화 완충제로 용해시키고, 각 약물 농도에 대한 A2E-특이적 형광(ASF)을, 동일한 사이클로텍스트린 용량으로 처리된 A2E-로딩된 세포 용해물의 형광으로부터 대조군 용해물의 형광을 빼서 계산하였다. ASF는 A2E 표준 곡선으로 보간되어 피코몰로 변환되었다. 세포 당 A2E 함량의 백분율은 β-사이클로텍스트린 용량의 함수로 플롯팅되었다.

도 9는 메틸 β-사이클로텍스트린(M-βCD), 2-하이드록시 프로필 β-사이클로텍스트린(HP-βCD), 및 설포부틸 에테르 β-사이클로텍스트린(SEB-βCD)에 의한 생체내 제거의 정량화를 나타낸다. RPE내의 레틴알데하이드를 재순환하는 경로의 이중 돌연변이(DKO)로 인해 비정상적인 LB 축적을 갖는 동물들에게, 물 내, 2μl 100mM M-βCD (우측 눈, OD); 1μl 500mM HP-βCD 또는 1μl 500mM SEB-βCD 중 하나를 서로 1주일 간격으로 눈 당 2번의 유리 체내 주사하였다. 대조군으로서, 개별 연령-매치 그룹에게 상응하는 체적의 비히클(물)을 주사하였다. 두 번째 주사 후 4일째에 눈을 수확하였다. 망막 색소 상피(RPE)-아이컵(eyecups)을 평평하게 장착하고 63X 배율로 자가 형광 현미경법 검사를 받았다. 복수의 사진을 함께 연결하여 완전한 아이컵을 나타내었다. 이어붙인 이미지를 그레이 스케일로 변환하고 이미지제이(Image J(NIH))를 사용하여 망막의 평균 형광 강도를 측정하였다. 용해도 제약으로 인해, M-βCD 스톱이 100 mM로 준비되었고 생체내 치료를 위해 2μl가 투여되었다. 눈에 남아 있는 리포푸신(%)을, 같은 체적의 비히클(물)을 눈에 투여한 동물의 눈과 비교하였다. 유의성은 양측, 미표본 T-검정에 의해 결정되었다. M-βCD는 리포푸신의 양을 유의미하게 감소시키지 않았지만 HP-βCD와 SEB-βCD는 효과적이었다.

도 10a 및 10b는 SEB-βCD에 의한 LB 제거가 시력을 손상시키지 않았음을 나타낸다. β-사이클로텍스트린 치료가 시각 기능에 미치는 영향을 측정하기 위해 공간 주파수(SF) 검사(시력 측정)를 시행하였다. SF는 OptoMotry(Prusky GT, et al.(2004) Rapid quantification of Adult and developmental mouse spatial vision using a virtual optomotor system. Invest Ophthalmol Vis Sci 45(12):4611-6, Douglas RM, et al.(2005) Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. Vis Neurosci 22(5):677-84, Kretschmer F, et al.(2015) A system to measure the Optokinetic and Optomotor response in mice. J Neurosci Methods 256:91-105)에 의해 평가되었다. 개략적으로, 구속되지 않은 마우스는, 흰색 배경에 검은색 막대가 있는 가상 실린더를 만드는 컴퓨터 모니터로 둘러싸인 높은 플랫폼에 서있다. 격자의 가상 회전은 시각적 반사적인 머리 움직임을 유발하며, 검은색 막대의 빈도는 막대의 두께를 조정함으로써 변경할 수 있다. 보다 얇은 막대, 즉 더 높은 SF는 인간의 시력을 평가하는 데에 사용되는 스넬렌(Snellen) 차트의 보다 작은 글자와 같다. 추적(tracking)을 유도하지 않는 가장 높은 SF가 시력의 척도로서 사용된다. 메틸 β-사이클로텍스트린 처리는 시험된 용량에서 리포푸신의 양을 유의

미하게 감소시키지 않았기 때문에, SF는 평가되지 않았다. LB 제거에 중간-효과적인 하이드록시 프로필 β-사이클로덱스트린은 실험 중 사용된 용량에서 상당한 시력 손상을 초래한 반면, 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린은 마우스의 시력에 영향을 미치지 않아 내약성이 좋았다.

도 11a는 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린(SBE-BCD)에 의한 처리가 광수용체 층(ONL)의 완전성(integrity)을 손상시키지 않음을 나타낸다. 대조군 및 SBE-BCD 처리 동물 내 외부 핵층(ONL)의 두께를 비교하는 형태학적 분석을 수행하였다. 포토샵(Photoshop)과 이미지제이(ImageJ)를 사용하여 광수용체 층을 선택하고 두께를 측정하였다.

도 11b는 대조군 및 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린(SBE-BCD) 처리된 동물의 망막이 처리 후 온전함을 나타낸다. 1μl 비히클 또는 설포부틸 β-사이클로덱스트린으로 처리된 마우스로부터의, 헤마톡실린 및 에오신 염색된 파라핀-임베디드 망막 단면의, 컬러 현미경에 의해 얻은 개별 필드로부터 젠블루(ZEN Blue, 자이스(Zeiss))를 사용하여 이어붙인 이미지를 만들었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 상세설명
- [0018] 본 기술의 실질적인 이해를 제공하기 위해 본 방법의 특정 양태, 모드, 실시예, 변형 및 특징이 다양한 상세 수준으로 이하에서 설명되었다는 것이 이해되어야 한다.
- [0019] 안구 리포푸신의 주성분인 독성 지질 비스레티노이드(LB)는, 노화함에 따라 광수용체, 광감지세포의 생존을 담당하는 주요 망막 지지세포인 망막 색소 상피의 리소솜에, 축적된다. RPE내 LB 축적은, 스타가르트병(STGD), 원추-간상 이영양증(CRD)의 ABCA4-관련 형태 및 색소성 망막염(RP)과 같은 인간 유전 질환에서 높아진다. 이러한 축적은 RPE에 유독하며 이들 질병의 병인학의 핵심 양태로 여겨진다. 또한, 노화에 따른 LB의 축적은 노인 인구의 25%에 영향을 미치는 난치병인 노화 관련 황반변성(AMD)의 위험 요소이다. 현재 LB 축적을 되돌리기 위한 의학적 치료법은 없다. 따라서, 세포성 LB를 제거하는 약제는, 인간 실명 질환의 치료에서 충족되지 않은 요구를 충족시킬 잠재력이 있다.
- [0020] 사이클로덱스트린은 α-1,4 글리코시드 결합에 의해 연결된 글루코스 서브유닛을 함유하는 고리형 올리고당이다. 사이클로덱스트린은 전분으로부터 효소적 전환에 의해 생성되며, 6개의 글루코스 서브유닛을 함유하는 α-사이클로덱스트린, 7개의 글루코스 서브유닛을 함유하는 β-사이클로덱스트린, 8개의 글루코스 서브유닛을 함유하는 γ-사이클로덱스트린으로 분류된다. α-, β- 및 γ-사이클로덱스트린은 모두 미국 식품의약국(FDA)에서 일반적으로 안전하다고 인정되어 식품, 제약, 약물 전달 및 화학 산업뿐만 아니라 농업 및 환경 공학에서 흔히 사용된다. 다른 유도체 중에서, 메틸 베타-사이클로덱스트린(M-βCD) 및 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HP-βCD)이 안전한 것으로 간주된다. HP-βCD는 니만-피크(Niemann-Pick) 타입 C1 질병의 치료를 위해 FDA로부터 IND 승인을 받았다.
- [0021] 이전 연구는 특정 사이클로덱스트린이 세포로부터 LB를 캡슐화하고 제거할 수 있음을 발견하였다. Davis ME, Brewster ME, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. Nat Rev Drug Discov 3(12):1023-35 (2004); Nociari et al., Beta cyclodextrins bind, stabilize, and remove lipofuscin bisretinoids from retinal pigment epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 111(14): E1402-E1408 (2014) 참조.
- [0022] 본 개시내용은 부분적으로, 모든 사이클로덱스트린이 상피 세포로부터 리포푸신의 생체내 제거를 촉진하는 데에 효과적인 것은 아니라는 발견에 기초한다. (i) 메틸 베타-사이클로덱스트린(MβCD); (ii) 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HPβCD); 및 (iii) 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린(SBEβCD)은 LB 제거를 촉진하는 데에 효과적인 반면, 알파-사이클로덱스트린, 감마-사이클로덱스트린, 2,6-디-O-메틸-β-사이클로덱스트린(헵타키스 2,6-디-O-메틸) 및 2,3,6-트리-O-메틸-β-사이클로덱스트린(헵타키스 2,3,6-트리-O-메틸)과 같은 다른 유도체는 세포성 LB를 효과적으로 제거하지 못한다는 것이 예기치 못하게 발견되었다. 또한, 메틸 β-사이클로덱스트린과 하이드록시 프로필 β-사이클로덱스트린은 모두 생체 내에서 상당한 시력 손상을 일으킨 반면, 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린은 시력을 손상시키지 않았다.
- [0023] 따라서, 본 개시내용은 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환을 앓고 있는 대상체를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법으로 치료할 수 있는 조건 및 질병은, 노화 관련 황반변성(AMD), 스타가르트병(SD), 베스트병(BD), 색소성 망막염 및 원추-간상 이영양증과 같은, 유전적 또는 비유전적일 수 있는, 망막 색

소 상피(RPE) 세포내 리포푸신의 축적에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 야기되는 임의의 안과 또는 망막 장애, 병태 또는 질병을 포함한다.

[0024] 정의

[0025] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 일반적으로 이 기술이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서 및 첨부된 특허 청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수형 "하나의(a)", "하나의(an)" 및 "그(the)"는 내용이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 예컨대, "세포"에 대한 언급은 둘 이상의 세포의 조합 등을 포함한다. 일반적으로, 본원에 사용된 명명법, 및 세포 배양, 분자 유전학, 유기 화학, 분석 화학과 핵산 화학 및 혼성화(후술됨)에서의 실험실 절차는 당업계에 널리 공지되고 일반적으로 사용되는 것들이다.

[0026] 본원에 사용된 바와 같이, 숫자와 관련하여 용어 "약(about)"은, 달리 명시되지 않거나, 그렇지 않으면 문맥상 명백하지 않는 한(그러한 숫자가 가능한 값의 0% 미만이거나 100%를 초과하는 경우 제외) 일반적으로 양쪽 방향(크거나 또는 작거나)으로 1%, 5%, 또는 10% 범위 내로 들어오는 숫자를 포함하는 숫자로 간주된다.

[0027] 본원에 사용된 바와 같이, 약제 또는 약물의 대상체로의 "투여"는 그의 의도된 기능을 수행하기 위해 대상체에게 화합물을 도입하거나 전달하는 임의의 경로를 포함한다. 투여는 경구, 비강내, 비경구(정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하), 직장, 척추강내 또는 국소를 포함하나 이로 제한되지 않는 임의의 적합한 경로에 의해 수행될 수 있다. 투여에는 자체 투여와 타인에 의한 투여가 포함된다.

[0028] 본원에서 사용되는 "생물학적 시료"라는 용어는 살아있는 세포로부터 유래된 시료 물질을 의미한다. 생물학적 시료는 조직, 세포, 세포의 단백질이나 막 추출물, 및 대상체로부터 단리된 생물학적 유체(예컨대, 복수액 또는 뇌척수액(CSF))뿐만 아니라 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 유체를 포함할 수 있다. 본 기술의 생물학적 시료는 눈, 유방 조직, 신장 조직, 자궁경부, 자궁내막, 두경부, 담낭, 이하선 조직, 전립선, 뇌, 뇌하수체, 신장 조직, 근육, 식도, 위, 소장, 결장, 간, 비장, 췌장, 갑상선 조직, 심장 조직, 폐 조직, 방광, 지방 조직, 림프절 조직, 자궁, 난소 조직, 부신 조직, 고환 조직, 편도선, 흉선, 혈액, 모발, 협측, 피부, 혈청, 혈장, CSF, 정액(semen), 전립선액, 정액(seminal fluid), 소변, 대변, 땀, 타액, 가래, 점액, 골수, 림프 및 눈물로 부터 얻은 시료를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 생체 시료는 내부 장기의 생검으로부터도 취득될 수 있다. 생물학적 시료는 진단 또는 연구를 위해 대상체로부터 취득될 수 있거나, 대조군 또는 기초 연구를 위해 질병이 없는 개인으로부터 취득될 수 있다. 시료는 예컨대 정맥 천자 및 외과적 생검을 포함하는 표준 방법에 의해 취득할 수 있다. 특정 실시양태에서, 생물학적 시료는 바늘 생검에 의해 취득된 조직 시료이다.

[0029] 본원에 사용된 "대조군"은 비교 목적으로 실험에 사용된 대안적인 시료이다. 대조군은 "양성" 또는 "음성"일 수 있다. 예컨대, 실험의 목적이 특정 유형의 질병의 치료를 위한 치료제의 효능의 상관관계를 결정하는 것인 경우, 양성 대조군(소망하는 치료 효과를 나타내는 것으로 알려진 화합물 또는 조성물) 및 음성 대조군(치료를 받지 않거나 위약을 받는 대상체 또는 시료)이 전형적으로 사용된다.

[0030] 본원에 사용된 용어 "유효량"은, 목적하는 치료 및/또는 예방 효과를 달성하기에 충분한 양, 예컨대, 본원에 기재된 질병 또는 병태, 또는 본원에 기재된 질병 또는 병태와 관련된 하나 이상의 싸인 또는 징후를, 예방 또는 감소를 유도하는 양을 나타낸다. 치료적 또는 예방적 적용례의 맥락에서, 대상체에게 투여되는 조성물의 양은 조성물; 질병의 정도, 유형 및 중증도; 및 일반적인 건강, 연령, 성별, 체중 및 약물 내성과 같은 개인의 특성에 따라 좌우된다. 숙련자는 이러한 요인 및 기타 요인에 따라 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 조성물은 또한 하나 이상의 추가적인 치료 화합물과 조합하여 투여될 수 있다. 본원에 기재된 방법에서, 치료 조성물은 본원에 기재된 질환 또는 병태의 하나 이상의 싸인 또는 징후를 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 조성물의 "치료학적 유효량"은 질병 또는 병태의 생리학적 효과가 완화되거나 제거되는 조성물 수준을 지칭한다. 치료 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다.

[0031] 본원에 사용된 용어 "개체", "환자" 또는 "대상체"는 개별 유기체, 척추동물, 포유동물, 또는 인간일 수 있다. 일부 실시양태에서, 개체, 환자 또는 대상체는 인간이다.

[0032] 본원에 사용된 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 약학적 투여에 적합한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 향균 및 향진균 화합물, 등장성 및 흡수 지연 화합물 등을 포함하는 것으로 의도된다. 약학적으로 허용가능한 담체 및 이들의 제형은 당업자에게 공지되어 있으며, 예컨대 Remington's Pharmaceutical Sciences(20th edition, ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.)에 기재되어 있다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예는, 활성제를 체내에 도입하는 데에 유용한, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부

형제, 제조 보조제(예컨대, 윤활제, 활석 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트, 또는 스테아르산), 또는 용제 캡슐화 재료를 포함한다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, 장애 또는 병태의 "예방", "예방하다" 또는 "예방하는"은, 통계적 샘플에서, 처리된 시료에 있어서, 미처리된 대조군 시료에 비해 장애 또는 병태의 발생을 감소시키거나, 미처리된 대조군 시료에 비해 장애 또는 병태의 하나 이상의 징후의 개시를 지연시키는, 하나 이상의 화합물을 지칭한다.

[0034] 본원에 사용된 용어 "개별적" 치료 용도는, 상이한 경로에 의해 동시에 또는 실질적으로 동일한 시간에서의 2종 이상의 활성 성분의 투여를 지칭한다.

[0035] 본원에 사용된 용어 "순차적" 치료 용도는, 동일하거나 상이한 투여 경로로, 상이한 시간에서의 2종 이상의 활성 성분의 투여를 지칭한다. 보다 구체적으로, 순차적 용도는 다른 하나 또는 다른 것들의 투여가 시작되기 전에서의 활성 성분들 중 하나의 전체 투여를 의미한다. 이에 따라, 다른 활성 성분 또는 성분들을 투여하기 전에 활성 성분 중 하나를 몇 분, 몇 시간 또는 며칠에 걸쳐 투여하는 것이 가능하다. 이 경우에는 동시 치료는 없다.

[0036] 본원에 사용된 용어 "동시" 치료 용도는, 동일한 경로, 동시에 또는 실질적으로 동시에, 2종 이상의 활성 성분의 투여를 지칭한다.

[0037] 본원에 사용된 "치료하는" 또는 "치료"는 인간과 같은 대상체에서, 본원에 기재된 질병 또는 장애의 치료를 포함하며, (i) 질병 또는 장애의 억제, 즉 그의 발달을 정지시키는 것; (ii) 질병 또는 장애의 완화, 즉 장애의 퇴행을 유발하는 것; (iii) 장애의 진행을 늦추는 것; 및/또는 (iv) 질병 또는 장애의 하나 이상의 징후의 진행을 억제, 완화 또는 감소하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는, 질환과 관련된 증상이 예컨대, 경감되거나, 감소되거나, 치유되거나 관해 상태에 놓이는 것을 의미한다.

[0038] 또한, 본원에 기재된 장애의 다양한 치료 방식은 "실질적인 것"을 의미하는 것으로 의도되고, 여기에는 전면적인 치료도 포함되지만 전면적 미만의 치료도 포함되며, 여기서 일부 생물학적 또는 의학적으로 관련된 결과가 달성된다는 것이 이해되어야 한다. 치료는 만성 질환에 대한 지속적인 연장 치료 또는 급성 병태의 치료를 위한 단일 또는 수회 투여일 수 있다.

[0039] **망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환**

[0040] 눈의 망막 색소 상피(RPE) 세포내 리포푸신의 과도한 축적과 관련된 황반 병태는 실명으로 이어진다. 리포푸신 축적을 나타내는 황반 병태에는 베스트 황반 이영양증, 스타가르트병/황반안저, ABCA4-관련 색소성 망막염, ABCA4-관련 간상-원추 이영양증 및 노화 관련 황반 변성(AMD)이 포함된다. 리포푸신은 리소좀 효소 분해에 내성이 있으며, 리소좀 소화의 잔여물로 여겨진다. 눈 안의 리포푸신은 대부분 지질 비스레티노이드 A2E, isoA2E 및 올-트랜스(all-trans)-망막 이량체-포스파티딜에탄올아민을 함유한다. 리포푸신은 또한, 반응성 질소 산화물 중 및 카복시에틸피롤로부터 생성된 니트로티로신과 같은, 산화 변형을 특징으로 하는 소량의 펩티드 및 반응성 지질 단편으로부터 생성된 이소[4]레부글란딘 E2 부가물 등을 포함한다. 예컨대, Ng K-P, et al. (2008) Retinal Pigment Epithelium Lipofuscin Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 7(7):1397-1405; Ben-Shabat S, et al. Fluorescent pigments of the retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration. *Bioorg Med Chem Lett* 11(12):1533-40 (2001) 참조.

[0041] 리포푸신은 노화와 함께 축적되며 유전적 소인 및 특정 기저 상태로 인해 증가할 수 있다. Molday RS, Zhong M, Quazi F, The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta* 1791(7):573-83 (2009); Zaneveld J, et al. Comprehensive analysis of patients with Stargardt macular dystrophy reveals new genotype-phenotype correlations and unexpected diagnostic revisions. *Genet Med* 17(4):262-270 (2015); Allikmets R et al., Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration, *Science* 277(5333):1805-7 (1997); van Driel M a, Maugeri a, Klevering BJ, Hoyng CB, Cremers FP, ABCR unites what ophthalmologists divide(s). *Ophthalmic Genet* 19(3):117-122 (1998); Fishman GA, Historical evolution in the understanding of Stargardt macular dystrophy. *Ophthalmic Genet* 31(4):183-9 (2010); Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY, Age-related macular degeneration. *Lancet* 379(9827):1728-1738 (2012); Swaroop A, Chew EY, Rickman CB, Abecasis GR, Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10:19-43 (2009); Charbel Issa P, Barnard AR, Herrmann P, Washington I, MacLaren RE (2015) Rescue of the

Stargardt phenotype in Abca4 knockout mice through inhibition of vitamin A dimerization. Proc Natl Acad Sci 112(27):8415-20 (2017) 참조.

- [0042] **망막 세포 리포푸신 축적을 표적화 하기 위한 현재 치료 전략**
- [0043] 현재 개발중인 LB 침착물을 표적화하는 약리학적 요법은, LB의 신규 형성을 차단하는 전략 및 LB를 제거하기 위한 전략을 포함한다. LB의 신규 형성을 차단하는 전략에는 펜레티나이드, 에믹서스타트(emixustat) 염산염, 중수소화 비타민 A 및 알데하이드 트랩의 투여가 포함된다. 이러한 전략의 단점은, 이들이 LB의 신규 형성을 예방할 수 있지만 기존 LB 침착물을 줄일 수 없다는 것이다. 따라서 LB의 신규 형성을 차단하는 전략은 확립된 임상징후가 있는 환자에게 거의 또는 전혀 이점을 제공하지 않을 것이다. LB를 제거하기 위한 전략에는 소프라란의 투여와 LB의 효소적 분해가 포함된다. 이러한 현존하는 전략 중 어느 것도 환자에게 임상적 이점을 제공할 만큼 충분히 진전되지 않았다.
- [0044] LB의 신규 형성을 차단하는 전략 중 압, 여드름, 낭포성 섬유증, 류마티스 관절염 및 건선에 대항하여 이미 사용 중인 비타민 A의 합성 형태인 펜레티나이드의 경구 투여는, 전구체 LB인 비타민 A의 혈액으로부터 RPE로의 RBP4 수송을 경쟁적으로 차단할 수 있다. Radu RA, et al. (2005) Reductions in Serum Vitamin A Arrest Accumulation of Toxic Retinal Fluorophores: A Potential Therapy for Treatment of Lipofuscin-Based Retinal Diseases. Invest Ophthalmol Vis Sci 46(12):4393-4401 참조. 그러나, 비타민 A는 정상 시력에 관여하는 핵심 분자인 11시스 레티날의 전구체이기 때문에 경구용 펜레티나이드는 야맹증과 가벼운 가역성 피부 건조증과 같은 부작용을 보였다. 펜레티나이드는 동물에서 새로운 LB의 형성을 늦추는 데에 효과적인 것으로 보이지만 기존의 LB 침착물에는 영향을 미치지 않으며, 이는 이미 스타가르트병 또는 AMD로 진단된 환자에서 유의미한 치료 효과를 제공하지 못한 이유를 설명할 수 있다.
- [0045] 경구용 에믹서스타트 염산염(아쿠셀라 인코퍼레이티드(Acucela Inc))은 RPE65 효소의 합성 비-레티노이드 가역적 억제제이며, 이는 올-트랜스-레티날을 11-시스-레티날로 변환시켜 후자의 내인성 합성을 촉진한다. 2016년 5월에, 2b/3상 SEATTLE 연구의 결과는 망막 퇴행성 비율이나 시력 변화에서의 임의의 유의미한 차이를 보이지 않았다. 에믹서스타트는 또한 그의 용도를 제한하는 임의의 심각한 야맹증을 야기했다. 펜레티나이드와 마찬가지로 에믹서스타트는 기존 LB 침착물에 영향을 미치지 않는다.
- [0046] 경구용 중수소화 비타민 A(ALK-001)는 수소를 안전한 비-방사성 동위원소인 중수소로 치환함으로써 개질된 비타민 A이다. 중수소화 비타민 A는, 자발적으로 LB로 이량체화되는 경향이 보다 낮다. ALK-001의 ABCA4-/-로의 장기간 경구 투여는, 리포푸신과 A2E의 축적을 각각 70%와 80% 감소시켰다. 광 신호에 대한 망막 전기 반응의 평가(망막 전위도)는 ALK-001 처리가 ABCA4-/- 마우스 모델에서 관찰된 시각 기능의 점진적인 손실을 예방하는 것으로 나타났다. 안전성 1상 임상시험(NCT02230228)을 완료했으며 STGD1 치료(NCT02402660)에 대한 2상 다기관 임상시험이 진행 중이다. ALK-001이 리포푸신의 형성을 차단한다는 점을 감안하면, AMD 환자의 기존 LB 침착물에 영향을 미칠지 여부는 불확실하다.
- [0047] 경구용 알데하이드 트랩(VM200, 비전 메디신즈(Vision Medicines))은 레틴알데하이드와 반응하여 가역적 쉬프(Schiff) 염기를 형성하여 세포의 아민기를 갖는 유리 알데하이드의 이용가능한 수준을 감소시키는 새로운 약물을 구성한다. Maeda A, et al. (2012) Primary amines protect against retinal degeneration in mouse models of retinopathies. Nat Chem Biol 8(2):170-8 참조.
- [0048] 소프라란(양성자 칼륨 경쟁적 산 차단제)의 경구 투여 1년 후의 원숭이 망막내 RPE 세포로부터 리포푸신의 성공적인 제거가 보고되었다. Julien and Schraermeyer (2012) Lipofuscin can be eliminated from the retinal pigment epithelium of monkeys. Neurobiol Aging 33(10):2390-7 참조.
- [0049] LB 침착물은 리소좀 가수분해 효소에 의한 분해에 대해 내성이 있으므로, 여러 그룹에서 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)와 같은 LB 파괴 활성을 갖는 외인성 효소에 대해 조사해오고 있다. 예컨대, Wu Y, Zhou J, Fishkin N, Rittmann BE, Sparrow JR, Enzymatic degradation of A2E, a retinal pigment epithelial lipofuscin bisretinoid. J Am Chem Soc 133(4):849-57 (2011); Sparrow JR, Zhou J, Ghosh SK, Liu Z, Bisretinoid degradation and the ubiquitin-proteasome system. Adv Exp Med Biol 801:593-600 (2014); Yogalingam G, et al. Cellular uptake and delivery of Myeloperoxidase to lysosomes promotes lipofuscin degradation and lysosomal stress in retinal cells. J Biol Chem 292:4255-4265 (2017) 참조. 그러나, 이러한 효소에 의한 분해의 부산물은 매우 독성이며 잠재적으로 심각한 망막 손상을 유발할 수 있다.
- [0050] **현재 기술의 치료 방법**

- [0051] 본 개시내용은 망막 세포로부터 LB 침착물을 격리 및 제거하는 조성물, 예컨대, 메틸 베타-사이클로텍스트린(M β CD), 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로텍스트린(HP β CD), 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린(SBE β CD), 및 그의 임의의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다. 도 1a 및 1b 참조. 한 양태에서, 본 개시내용은 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환을 앓고 있는 대상체를 예방 또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 치료적 유효량의 치환된 β -사이클로텍스트린을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 치환된 β -사이클로텍스트린은, 4와 14.5 사이의 치환도(DS)를 갖는 무작위로 치환된 베타-사이클로텍스트린을 포함한다.
- [0052] 한 양태에서, 본 기술은 유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서 시력을 손상시키지 않으면서, 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환을 예방하거나 치료하기 위한 방법을 제공한다. 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환은, 스타가르트병(STGD), 색소성 망막염(RP), 노화 관련 황반변성(AMD), 베스트병(BD) 및 원추-간상 이영양증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 본원에 기재된 방법에 의해 치료가능한 병태 및 질병은 유전적 또는 비유전적일 수 있는 망막 색소 상피(RPE) 세포의 리포푸신 축적에 의해 직접 또는 간접적으로 야기되는 임의의 안과 또는 망막 질병 또는 병태, 예컨대 노화 관련 황반변성(AMD), 스타가르트병, 베스트병(BD), 색소성 망막염 및 원추-간상 이영양증을 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 일부 실시양태에서, β -사이클로텍스트린(예컨대, SBE β CD)의 유효량은 대상체에게 투여될 때 시력을 손상시키지 않는다.
- [0053] 추가로 또는 대안적으로, 일부 실시양태에서, 안질환은 유전적이거나, 비유전적이거나, 노화와 관련이 있다. 또 다른 양태에서, 본 기술은 유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 망막 세포 리포푸신 축적의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에서, 시력을 손상시키지 않으면서 망막 세포 리포푸신 축적을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0054] 추가로 또는 대안적으로, 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, 유효량의 SBE- β CD 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 대상체에서 리포푸신-관련 망막 손상의 악화를 예방한다.
- [0055] 또한, 본원에는, 망막 색소 상피 세포를 유효량의 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린(SBE- β CD) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과 접촉시키는 것을 포함하는, 망막 색소 상피 세포내 리포푸신 축적을 감소시키는 방법이 개시된다.
- [0056] 일반적으로, 본원에서 고려되는 치료는 RPE 세포내 리포푸신 비스레티노이드 지질의 축적을 중지, 완화 또는 역전시키고, 마찬가지로 리포푸신 관련 손상 또는 관련 질병 또는 병태를 중지, 완화 또는 역전시키는 효과를 갖는다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 β -사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 RPE 세포내 리포푸신 비스레티노이드 지질을 착체화하고 제거하도록 구성된다. 이론에 얽매이지 않으면서, 하나 이상의 β -사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 파트너로서 하나 이상의 리포푸신 비스레티노이드 지질 분자를 수용하기에 적합한 공동(즉, 결합 포켓)을 갖는 것으로 여겨진다. 결과는 β -사이클로텍스트린(들)과 리포푸신 비스레티노이드 지질 분자 사이의 착체이다. β -사이클로텍스트린(들)과 리포푸신 비스레티노이드 지질 분자 사이의 상호작용은 일반적으로 수소 결합 및/또는 반 데르 발스(분산) 힘과 같은 비공유 성질을 갖는다. 리포푸신 비스레티노이드 지질은 일반적으로 A2E, A2E 이성질체, A2E의 산화된 유도체, A2-디하이드로 피리딘-포스포타이드 에탄올아민 또는 올-트랜스 레티날 이량체이다.
- [0057] 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란, 환자, 예컨대 포유동물에게 투여하기에 허용가능한 염기 또는 산으로부터 제조된 염(예컨대, 주어진 투여 요법에 대해 허용가능한 포유동물 안전성을 갖는 염)을 의미한다. 그러나, 염은 환자에게 투여하도록 의도되지 않은 중간체 화합물의 염과 같은 약학적으로 허용가능한 염일 필요는 없는 것으로 이해된다. 약학적으로 허용가능한 염은 약학적으로 허용가능한 무기 또는 유기 염기로부터 및 약학적으로 허용가능한 무기 또는 유기 산으로부터 유도될 수 있다. 또한, 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로텍스트린이 아민, 피리딘 또는 이미다졸과 같은 염기성 모이어티 및 카복실산 또는 테트라졸과 같은 산성 모이어티를 모두 포함하는 경우, 양쪽성 이온이 형성될 수 있고 본원에 사용된 용어 "염"에 포함된다.
- [0058] 한 실시양태에서, 하나 이상의 β -사이클로텍스트린은 아미노 또는 알킬아미노와 같은 염기성 작용기를 하나 이상 함유할 수 있고, 이에 의해, 약학적으로 허용가능한 산과의 반응에 의해 약학적으로 허용가능한 염을 형성할 수 있다. 이들 염은 투여 비히클 또는 투여 형태 제조 공정에서 동일반응계(in situ)에서 제조되거나, 유리 염기 형태인 본 발명의 정제된 화합물을 적합한 유기 또는 무기 산과 개별적으로 반응시키고, 이에 따라 형성된 염을 후속적인 정제 동안 단리함으로써 제조될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 β -사이클로텍스트린은 하나 이상의 산성 작용기를 함유할 수 있고, 이에 의해 약학적으로 허용가능한 염기와 반응에 의해 약학적

으로 허용가능한 염을 형성할 수 있다. 이들 염은 투여 비히클 또는 투여 형태 제조 공정에서 동일반응계(in situ)에서 제조되거나, 유리 산 형태(예컨대, 하이드록실 또는 카복실)의 정제된 화합물을 적절한 염기와 개별적으로 반응시키고, 이에 따라 형성된 염을 후속적인 정제 동안 단리함으로써 제조될 수 있다.

[0059] 약학적으로 허용가능한 무기 염기로부터 유도된 염은 암모늄, 알루미늄, 칼슘, 구리, 제2철, 제1철, 리튬, 마그네슘, 제2 망간, 제3 망간, 칼륨, 나트륨 및 아연 염 등을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 유기 염기로부터 유도된 염은, 아르기닌, 베타인, 카페인, 콜린, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 에틸아민, 디에틸아민, 2-디에틸아미노에탄올, 2-디메틸아미노에탄올, 에탄올아민, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, N-에틸모폴린, N-에틸피페리딘, 글루카민, 글루코사민, 히스티딘, 하이드라민, 이소프로필아민, 라이신, 메틸글루카민, 모폴린, 피페라진, 피페라딘, 폴리아민 수지, 프로카인, 퓨린, 테오브로민, 트리에틸아민, 트리메틸아민, 트리프로필아민, 트로메타민 등과 같은, 치환된 아민, 환형 아민, 천연 발생 아민 등을 포함하는 1차, 2차 및 3차 아민의 염을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 무기산으로부터 유도된 염은 붕산, 탄산, 할로겐화수소산(브롬화수소산, 염산, 불화수소산 또는 요오드화수소산), 질산, 인산, 설파산 및 황산의 염을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 유기산으로부터 유도된 염은 지방족 하이드록실산(예컨대, 시트르산, 글루콘산, 글리콜산, 락트산, 락토비온산, 말산 및 타르타르산), 지방족 모노카복실산(예컨대, 아세트산, 부티르산, 포름산, 프로피온산 및 트리플루오로아세트산), 아미노산(예컨대, 아스파르트산 및 글루탐산), 방향족 카복실산(예컨대, 벤조산, 2-아세톡시벤조산, p-클로로벤조산, 디페닐아세트산, 젠티스산, 히푸르산 및 트리페닐아세트산), 방향족 하이드록실산(예컨대, o-하이드록시벤조산, p-하이드록시벤조산, 1-하이드록시나프탈렌-2-카복실산 및 3-하이드록시나프탈렌-2-카복실산), 아스코르브산, 디카복실산(예컨대, 푸마르산, 말레산, 옥살산 및 숙신산), 글루쿠론산, 만델산, 뮤신산, 니코틴, 오로트산, 파모산, 판토텐산, 설펜산(예컨대, 벤젠설펜산, 캄포설펜산, 에디설펜산, 에탄설펜산, 이세티온산, 메탄설펜산, 나프탈렌설펜산, 나프탈렌-1,5-디설펜산, 나프탈렌-2,6-디설펜산 및 p-톨루엔설펜산), 크시나포산, 발레르산, 올레산, 팔미트산, 스테아르산, 라우르산, 톨루엔설펜산, 메탄설펜산, 에탄디설펜산, 시트르산, 아스코르브산, 말레산, 옥살산, 푸마르산, 페닐아세트산, 이소티온산, 숙신산, 타르타르산, 글루탐산, 살리실산, 설파닐산, 나프틸산, 락토비온산, 글루콘산, 라우릴설펜산 등의 염을 포함한다.

[0060] 추가로 또는 대안적으로, 일부 실시양태에서, 유효량의 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 대상체에서 리포푸신-관련 망막 손상의 악화를 예방한다. 본원에 개시된 방법의 임의의 및 모든 실시양태에서, 유효량의 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는 망막 색소 상피 세포내 리포푸신의 축적을 차단, 완화 또는 역전시킨다. 본원에 개시된 방법의 일부 실시양태에서, 유효량의 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 투여는, 대상체의 RPE 세포내 리포푸신-관련 손상 또는 리포푸신 축적과 직접적으로 또는 간접적으로 관련된, 리포푸신-관련 손상 또는 질병 또는 병태를, 예방하거나, 이들의 개시를 늦추거나, 이들의 중증도를 경감시킨다. 대상체는, 임의의 성별(예컨대, 남성 또는 여성)일 수 있고/있거나 또한 노인(일반적으로 60세 이상, 70세 이상 또는 80세 이상); 노인에서 성인으로서의 과도기 대상체; 성인; 성인에서 성인 전까지의 과도기 대상체; 및 청소년(예컨대, 13세 및 16세 이하, 17세 이하, 18세 이하 또는 19세 이하), 어린이(일반적으로 13세 미만 또는 사춘기가 시작되기 전) 및 유아를 포함한 성인 이전의 대상체일 수 있다. 대상체는 또한 임의의 민족 집단 또는 유전자형일 수 있다. 인간 민족 집단의 몇 가지 예로는 코카시안, 아시안, 히스패닉, 아프리카인, 아프리카 아메리칸, 네이티브 아메리칸, 씬족 및 태평양 제도민들이 포함된다.

[0061] 추가로 또는 대안적으로, 일부 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 RPE 세포에 국소화되도록 구성된다. 본원에 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 RPE 세포내 리포푸신 비스레티노이드 지질과 착체를 형성하도록 구성된다. 착체는 비-공유 분자간 힘에 의해 서로 유지되는 둘 이상의 구성 요소의 결합의 결과로부터 유발되는 조직화된 화학적 독립체로서 간주될 수 있다.

[0062] 추가로 또는 대안적으로, 특정 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은, RPE 세포에, 그의 내부로 또는 그의 인접 부근에, 주사 또는 이식과 같이 직접 투여됨으로써 RPE 세포에 국소화된다. 다른 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을, RPE 세포를 선택적으로 표적화하는 표적화제와 커플링함으로써 RPE 세포에 국소화되고, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 RPE 세포에, 그의 내부로 또는 그의 인접한 부근에, 또는 RPE 세포로부터 멀리(예컨대, 전신 투여에 의해) 그에 투여될 수 있다. 세포 표적화제(즉, "표적화제")는 RPE 세포에 결합(즉, "표적화")하는 능력을

갖는 임의의 화학적 독립체이다. 세포 표적화제는 RPE 세포의 임의의 부분, 예컨대 세포막, 소기관(예컨대, 리소좀 또는 엔도솜), 또는 세포질을 표적화할 수 있다. 한 실시양태에서, 세포-표적화제는 선택적인 방식으로 RPE 세포의 성분을 표적화한다. RPE 세포의 성분을 선택적으로 표적화함으로써, 세포-표적화제는 예컨대 다른 유형의 세포 성분에 비해 세포의 특정 성분을 선택적으로 표적화할 수 있다. 다른 실시양태에서, 표적화제는 예컨대 대부분의 또는 모든 세포에서 발견되는 세포 성분을 표적화함으로써, 세포 성분을 비선택적으로 표적화한다.

[0063] 다양한 실시양태에서, 표적화제는 예컨대 펩티드, 디펩티드, 트리펩티드(예컨대, 글루타티온), 테트라펩티드, 펜타펩티드, 헥사펩티드, 고급 올리고펩티드, 단백질, 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 고급 올리고당, 다당류(예컨대, 탄수화물), 핵염기, 뉴클레오시드(예컨대, 아데노신, 시티딘, 우리딘, 구아노신, 티미딘, 이노신 및 S-아데노실 메티오닌), 뉴클레오티드(즉, 모노-, 디- 또는 트리-포스페이트 형태), 디뉴클레오티드, 트리뉴클레오티드, 테트라뉴클레오티드, 고급 올리고뉴클레오티드, 핵산, 보조인자(예컨대, TPP, FAD, NAD, 코엔자임 A, 비오틴, 리포아미드, 금속 이온(예컨대, Mg²⁺), 금속 함유 클러스터(예컨대, 철-황 클러스터) 또는 비-생물학적(즉, 합성) 표적화 기일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 일부 특정 유형의 단백질에는 효소, 호르몬, 항체(예컨대, 단일 클론 항체), 렉틴 및 스테로이드가 포함된다.

[0064] 표적화제로 사용하기 위한 항체는 일반적으로 하나 이상의 세포 표면 항원에 특이적이다. 특정 실시양태에서, 항원은 수용체이다. 항체는 전체 항체, 또는 대안적으로 항체의 인식 부분(즉, 초가변 영역)을 보유하는 항체의 단편일 수 있다. 항체 단편의 일부 예에는 Fab, Fc 및 F(ab')₂가 포함된다. 특정 실시양태에서, 특히 본원에 기재된 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염에 대한 항체의 가교를 용이하게 하기 위한 목적으로, 항체 또는 항체 단편은 설피하이드릴 기를 갖는 항체 또는 항체 단편을 유도체화하도록 화학적으로 환원될 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화제는 표적 세포의 내재화된 수용체의 리간드이다. 예컨대, 표적화제는 다양한 물질을 리소솜으로 수송하는 산 가수분해효소 전구체 단백질에 대한 표적화 신호일 수 있다. 특히 관심을 끄는 이러한 표적화제는 트랜스 골지체 내의 만노스 6-포스페이트 수용체(MPR) 단백질에 의해 인식되는 만노스-6-포스페이트(M6P)이다. 엔도솜은 M6P-표지된 물질을 리소솜으로 수송하는 데에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0065] 다른 실시양태에서, 표적화제는 많은 유형의 세포 표면 상의 RGD 수용체에 결합하는, RGD 서열, 또는 그의 변이체를 함유하는 펩티드이다. 다른 표적화제는 예컨대 트랜스페린, 인슐린, 아밀린 등을 포함한다. 수용체 내재화는 본원에 기재된 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 세포내 전달을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나의 세포-표적화 분자 또는 그룹, 또는 몇 개(예컨대, 2개, 3개 또는 그 이상)의 동일한 유형의 세포-표적화 분자 또는 기가 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염에 직접적으로 또는 링커를 통해 부착된다. 다른 실시양태에서, 2개 이상의 상이한 유형의 표적화 분자가 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염에 직접적으로 또는 링커를 통해 부착된다.

[0066] 추가로 또는 대안적으로, 일부 실시양태에서, 형광단은 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염에 부착될 수 있다. 하나 이상의 형광단의 도입은 여러 목적을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 세포 흡수 및 보유를(예컨대, 형광 분광법에 의해) 정량화하기 위해 하나 이상의 형광단이 포함된다.

[0067] 본원에 사용된 "형광단"은 형광 능력을 갖는(즉, 형광 특성을 보유하는) 임의의 중을 지칭한다. 예컨대, 한 실시양태에서, 형광단은 유기 형광단이다. 유기 형광단은 예컨대 하전된(즉, 이온성) 분자(예컨대, 설펜네이트 또는 암모늄 기), 비하전된(즉, 중성) 분자, 포화된 분자, 불포화된 분자, 환형 분자, 이환식 분자, 삼환식 분자, 다환식 분자, 비고리형 분자, 방향족 분자 및/또는 헤테로고리형 분자(즉, 예컨대 질소, 산소 및 황으로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자에 의해 고리-치환됨)일 수 있다. 불포화 형광단의 특정 경우에, 형광단은 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 탄소-탄소 및/또는 탄소-질소 이중 및/또는 삼중 결합을 함유한다. 특정 실시양태에서, 형광단은 형광단에 있을 수 있는 임의의 방향족 기를 제외하고 적어도 2개(예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상)의 공액 이중 결합을 함유한다. 다른 실시양태에서, 형광단은 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 고리(예컨대, 나프탈렌, 피렌, 안트라센, 크라이센, 트리페닐렌, 테트라센, 아줄렌, 및 페난트렌)를 함유하는 융합된 다환 방향족 탄화수소(PAH)이고, 여기서 PAH는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 헤테로원자 또는 헤테로원자-함유 기에 의해 임의로 고리-치환되거나 유도체화될 수 있다.

[0068] 다른 실시양태에서, 유기 형광단은 크산텐 유도체(예컨대, 플루오레세인, 로다민, 오레곤 그린, 예오신 및 텍사

스 레드), 시아닌 또는 이의 유도체 또는 서브클래스(예컨대, 스트렙토시아닌, 헤미시아닌, 폐쇄쇄 시아닌, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 인도카보시아닌, 옥사카보시아닌, 티아카보시아닌, 메로시아닌 및 프탈로시아닌), 나프탈렌 유도체(예컨대, 단실 및 프로단 유도체), 쿠마린 및 이의 유도체, 옥사디아졸 및 이의 유도체(예컨대, 피리딜옥사졸, 니트로벤족사디아졸 및 벤족사디아졸), 피렌 및 이의 유도체, 옥사진 및 이의 유도체(예컨대, 나일 레드, 나일 블루 및 크레실 바이올렛), 아크리딘 유도체(예컨대, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지 및 아크리딘 옐로우), 아릴메틴 유도체(예컨대, 아우라민, 크리스탈 바이올렛 및 말라카이트 그린), 테트라피롤 유도체(예컨대, 포르피린 및 빌리루빈)이다. 여기에서 고려되는 염료의 일부 특정 계열은 Cy® 계열의 염료, Alexa® 계열의 염료, ATTO® 계열의 염료 및 Dy® 계열의 염료이다. 특히, ATTO® 염료는 쿠마린계, 로다민계, 카보피로닌계 및 옥사진계 구조적 모티프를 포함하는 여러 구조적 모티프를 가질 수 있다.

[0069] 형광단은 당업계에 알려진 임의의 연결 방법론에 의해 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염에 부착될 수 있다. 예컨대, 시판중인 단일-반응성 형광단(예컨대, NHS-Cy5) 또는 비스-반응성 형광단(예컨대, 비스-NHS-Cy5 또는 비스-말레이미드-Cy5)은, 형광단을, 적절한 반응성 기(예컨대, 아미노, 티올, 하이드록시, 알데하이드 또는 케톤 기)를 함유하는 하나 이상의 분자에 연결시키기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 1개, 2개 또는 그 이상의 이러한 반응성 기 및 적절한 반응성 기를 함유하는 형광단(예컨대, 아미노-함유 형광단)과 반응된 이들 반응성 부위로 유도체화될 수 있다.

[0070] 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 RPE 세포와의 접촉을 허용하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 투여는 예컨대, 안구, 비경구(예컨대, 피하, 근육내 또는 정맥내), 국소, 경피, 유리체내, 안와후, 망막하, 공막하, 경구, 설하 또는 협측 투여 방식일 수 있다. 상술한 예시적인 투여 방식 중 일부는 주사에 의해 달성될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 망막 부근에서 서방성 임플란트를 사용하거나(예컨대, 공막하 경로), 또는 결막에 점적액을 투여함으로써 주사를 피한다. 본 기술의 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 스타가르트르를 포함하는 리포푸신 축적, ABCA4 결손 유전자의 보인자, 건성 AMD 또는 지질 비스레티노이드(리포푸신) 축적으로 인한 망막 변성 발병 위험이 있는 환자의 눈에 국소적으로 투여될 수 있다. 국소 투여는 유리체내, 국소 안구, 경피 패치, 피하, 비경구, 안내, 결막하, 또는 안구후 또는 테논낭하 주사, 경공막(이온삼투요법 포함), 공막후방 전달, 또는 서방성 생분해성 중합체 또는 리포솜을 포함한다. 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 또한 안구 세척 용액(ocular irrigating solution)으로 전달될 수 있다. 농도는 약 0.001 μM 내지 약 100 μM, 바람직하게는 약 0.01 μM 내지 약 5 μM의 범위일 수 있다.

[0071] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 적어도 초기에, 소망하는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 낮은 수준으로 투여되고, 용량은 소망하는 효과가 달성될 때까지 점진적으로 또는 갑자기 증가된다. 다른 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 적어도 초기에, 소망하는 치료 효과를 가속화하기 위해 요구되는 것보다 더 높은 수준으로 투여되고, 용량은 소망하는 효과가 달성될 때까지 점진적으로 또는 갑자기 조절된다.

[0072] 선택된 투여량 수준은 의료 종사자에 의해 결정된 바와 같이, 여러 인자에 따라 좌우될 것이다. 이러한 요인 중 일부에는 치료 중인 질병 또는 병태의 유형, 병태 또는 질병의 단계 또는 중증도, 사용되는 치료 화합물의 효능, 및 그의 생체이용률 프로파일뿐만 아니라 예컨대 연령, 성별, 체중 및 전반적인 상태와 같은 치료 중인 대상체의 특징(예컨대, 유전자형 및 표현형)이 포함된다.

[0073] 특히 전신 투여 방식의 경우, 투여량은 예컨대, 1일 체중 1kg당 약 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 또는 10mg 내지 1일 또는 격일 또는 1일 2회, 3회, 4회 또는 그 이상으로 체중 1kg당 약 20, 50, 100, 500 또는 1000mg의 범위일 수 있다. 특히 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염이 망막에 비-전신적으로 직접 투여되는 실시양태에서, 투여량은 체중을 무시할 수 있고 더 적은 양(예컨대, 투여 당 1-1000 μg)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 1일 용량은 치료 효과를 생성하는 데에 효과적인 최저 용량이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 β-사이클로텍스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 별개의 투여량으로 투여되지 않고, 예컨대 서방성 임플란트 또는 정맥내 라인에 의해 제공되는 바와 같은 연속적인 방식으로 투여된다.

[0074] 한 양태에서, 본 개시내용은 치환된 β-사이클로텍스트린을 포함하는 약학 조성물을 제공하고, 여기서 치환된 β-사이클로텍스트린은 4 내지 14.5의 치환도(DS)를 갖는 무작위로 치환된 베타-사이클로텍스트린을 포함한다. 한 양태에서, 본 개시내용은 메틸 베타-사이클로텍스트린(MβCD), 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로텍스트린

(HP β CD), 셀포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE β CD), 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이클로덱스트린을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0075] 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 당업계에 공지된 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체(첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제형화될 수 있다. 본 기술의 약학 조성물은, (1) 경구 투여, 예컨대, 드렌치(수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액), 정제, 예컨대, 협측, 설하 및 전신 흡수를 목적으로 하는 정제, 볼루스, 분말, 과립, 혀에 도포하기 위한 페이스트; (2) 예컨대 무균 용액 또는 현탁액, 또는 지속-방출 제형으로서, 예컨대 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막외 주사에 의한 비경구 투여; (3) 국소 도포, 예컨대 크림, 연고, 또는 피부에 도포되는, 제어된 방출 패치 또는 스프레이; (4) 설하; (5) 눈; (6) 경피; 또는 (7) 비강용으로 개조된 것을 포함하는 고체 또는 액체 형태의 투여를 위해 특별히 제형화될 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 본 기술의 약학 조성물은 본원에 사용된 바와 같이, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 제조 보조제(예컨대, 윤활제, 활석 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트, 또는 스테아르산), 또는 활성제를 체내에 도입하는 데에 유용한 용매 캡슐화 물질과 같이, 일반적으로 약학적으로 허용가능한 조성물을 지칭하는 하나 이상의 "약학적으로 허용가능한 담체"를 함유할 수 있다. 각 담체는 제형의 다른 성분과 양립할 수 있고 환자에게 해를 끼치지 않는다는 의미에서 "허용가능"하여야 한다. 본 기술의 약학 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 예컨대 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 오일(예컨대, 올리브 오일), 주사가능한 유기 에스테르(예컨대, 올레산 에틸), 및 이들의 적절한 혼합물을 포함한다. 적절한 유통성은 예컨대 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0077] 일부 실시양태에서, 제형(formulations)은 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트; 분말 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 활석; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 알긴산; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 무-발열원 물; 등장 식염수; 링거액; 에틸 알코올; pH 완충 용액; 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리무수물; 방부제; 윤활제; 충전제; 및 약학 제형에 사용되는 기타 무독성 상용성 물질중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0078] 습윤제, 유화제, 윤활제(예컨대, 라우릴황산나트륨 및 스테아르산 마그네슘), 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 향미제, 보존제 및 산화 방지제와 같은 다양한 보조제가 또한 약학 조성물에 포함될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 산화 방지제의 일부 예는 (1) 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등과 같은 수용성 산화 방지제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 지용성 산화 방지제; 및 (3) 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학 제형은 예컨대 셀룰로오스, 리포솜, 미셀 형성제(예컨대, 담즙산), 및 폴리머 담체, 예컨대 폴리에스테르 및 폴리무수물로부터 선택된 첨가제를 포함한다. 현탁액은, 활성 화합물에 더하여, 예컨대 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 우무 및 트라가칸트, 및 이들의 혼합물과 같은 현탁제를 함유할 수 있다. 활성 화합물에 대한 미생물의 작용 방지는 예컨대 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제의 포함에 의해 보장될 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 약제를 도입하는 것에 의해, 주사가능한 약학적 형태의 장기적인 흡수가 일어날 수 있다.

[0079] 본 기술의 약학 제형은 약학 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 숙주 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 화합물의 양일 것이다. 일반적으로, 활성 화합물의 양은 약 0.1 내지 99%, 보다 전형적으로 약 5 내지 70%, 보다 전형적으로 약 10 내지 30%의 범위일 것이다.

[0080] 본 기술의 조성물은, 스타가르트를 포함하는 리포푸신 축적, ABCA4 결함 유전자의 보인자, 건성 AMD 또는 지질 비스레티노이드(리포푸신) 축적으로 인한 망막 변성이 발생할 위험이 있는 환자의 눈에 국소적으로 투여될 수 있다. 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 눈으로의 전달을 위

한 다양한 유형의 안과용 제형에 혼입될 수 있다(예컨대, 국소적으로, 전안방내로, 공막 옆으로, 또는 임플란트를 통해). 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 안과적으로 허용가능한 보존제, 계면활성제, 점도 증진제, 겔화제, 침투 증진제, 완충제, 염화나트륨 및 물과 조합되어 수성, 멸균 안과 현탁액 또는 용액 또는 미리 형성된 겔 또는 동일반응계(in situ)에서 형성된 겔을 형성할 수 있다.

[0081] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치환된 β -사이클로덱스트린(예컨대, 메틸 베타-사이클로덱스트린(M β CD), 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HP β CD), 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE β CD), 및 그의 약학적으로 허용가능한 염은 1일 1-10회, 1일 1회, 1일 2회, 3회, 4회 또는 그 이상, 1일 1-3회, 1일 2-4회, 1일 3-6회, 1일 4-8회 또는 1일 5-10회 투여된다. 일부 실시양태에서, 치환된 β -사이클로덱스트린은(예컨대, 메틸 베타-사이클로덱스트린(M β CD), 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HP β CD), 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE β CD), 및 그의 약학적으로 허용가능한 염)은 매일, 격일, 주 2-3회, 또는 주 3-6회 투여된다.

[0082] 일부 실시양태에서, 치환된 β -사이클로덱스트린(예컨대, 메틸 베타-사이클로덱스트린(M β CD), 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HP β CD), 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE β CD), 및 그의 약학적으로 허용가능한 염)의 용량은, 예컨대 1일 체중 1kg당 약 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 또는 100 mg 내지 체중 1kg당 약 20, 50, 100, 500, 또는 1000 mg의 범위일 수 있다. 특히 활성 물질이 망막에 직접 투여되는 실시양태에서, 투여되는 용량은 체중과 무관할 수 있고 더 적은 양(예컨대, 용량당 1-1000 μ g)일 수 있다.

[0083] 국소 투여되는 경우, 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은, pH가 약 4 내지 8인 국소 안과용 현탁액 또는 용액으로서 제형화될 수 있다. 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은, 일반적으로 0.001중량% 내지 5중량%, 또는 0.01중량% 내지 2중량%의 양으로 이들 제형에 함유될 것이다. 따라서, 국소 제시의 경우, 숙련된 임상가의 처방에 따라 이러한 제형의 1 내지 2방울을 1일 1 내지 4회 눈의 표면에 전달할 것이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효량의 하나 이상의 단량체 또는 중합체 사이클로덱스트린을 함유하는 본 기술의 약학 조성물은 주사(아마도 미소구체), 유리체내 장치를 통해 유리체내로 전달되거나, 또는 주사, 겔 또는 임플란트, 또는 위에서 논의된 다른 방법에 의해 테논낭하(sub-Tenon) 공간에 배치될 것이다. 용액으로서 전달되는 경우, 조성물 중 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 치료 유효량은, 약 20-50% 농도의 약 18-44 μ M일 수 있다. 현탁액으로서 제형화되는 경우, 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 치료 유효량은 약 20-80%이다. 또 다른 실시양태에서, 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 치료 유효량은, 각각 약 1 mg 내지 약 40 mg, 또는 약 5 mg의 중량을 갖는 소형 정제(mini-tablet)의 형태로 투여된다. 이러한 소형 정제는 투관침을 통해 한번에 1 내지 20개까지 테논낭하 공간에 [건식(dry)] 주사될 수 있으므로 50-100mg [44-88 μ M]의 총 단일 투여량이 주사된다.

[0084] 일부 실시양태에서, 치환된 β -사이클로덱스트린(예컨대, 메틸 베타-사이클로덱스트린(M β CD), 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HP β CD), 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE β CD), 및 그의 약학적으로 허용가능한 염)이 1일 1-10회, 1일 1회, 2회, 3회, 4회 또는 그 이상, 1일 1-3회, 1일 2-4회, 1일 3-6회, 1일 4-8회 또는 1일 5-10회 투여된다. 일부 실시양태에서, 치환된 β -사이클로덱스트린(예컨대, 메틸 베타-사이클로덱스트린(M β CD), 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HP β CD), 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE β CD), 및 그의 약학적으로 허용가능한 염)은 매일, 격일, 주 2-3회, 또는 주 3-6회 투여된다.

[0085] 일부 실시양태에서, 치환된 β -사이클로덱스트린(예컨대, 메틸 베타-사이클로덱스트린(M β CD), 2-하이드록시 프로필 베타-사이클로덱스트린(HP β CD), 설포부틸 에테르 β -사이클로덱스트린(SBE β CD), 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염)의 용량은, 예컨대 1일 체중 1kg당 약 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 또는 100mg 내지 체중 1kg당 약 20, 50, 100, 500, 또는 1000mg의 범위일 수 있다. 특히 활성 물질이 망막에 직접 투여되는 실시양태에서, 투여되는 용량은 체중과 무관할 수 있고 더 적은 양(예컨대, 용량당 1-1000 μ g)일 수 있다.

[0086] 경구 투여에 적합한 본 기술의 제형은, 각각 활성 성분으로서 소정량의 본 기술의 화합물을 함유하는, 캡슐, 카세, 알약, 정제, 로젠지(일반적으로 자당, 아카시아 또는 트라가칸트와 같은 향미를 가한 베이스 사용), 분말, 과립의 형태로서, 또는 용액 또는 수성이나 비수성 액체의 현탁액으로서, 또는 수증유적형 또는 유증수적형 액체 유회액으로서, 엘릭서 또는 시럽으로서, 또는 사탕형 알약(젤라틴 및 글리세린, 또는 자당 및 아카시아와 같은 불활성 베이스 사용)으로서 및/또는 구강 세정제 등일 수 있다. 활성 화합물은 또한 볼투스(bolus), 연질약 또는 페이스트로서 투여될 수 있다.

[0087] 이러한 제형의 제조 방법은, 일반적으로 본 기술의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을, 담체 및 선택적으로 하나 이상의 보조제와 혼합하는 단계를 포함한다. 고체 투여 형태(예컨대, 캡슐, 정

제, 알약, 분말, 과립, 트로치(trouche) 등의 경우, 활성 화합물은 미분된 고체 담체와 혼합될 수 있고, 전형적으로 펠렛화, 정제화, 과립화, 분말화 또는 코팅에 의해 성형될 수 있다. 일반적으로, 고체 담체는 예컨대 시트르산 나트륨 또는 포스페이이트 이칼슘, 및/또는 하기 중 임의의 것을 포함할 수 있다: (1) 충전제 또는 증량제, 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산; (2) 결합제, 예컨대 카복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 보습제, 예컨대 글리세롤; (4) 봉해제, 예컨대 우무, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산나트륨; (5) 용액 지연제, 예컨대 파라핀; (6) 흡수 촉진제, 예컨대 4차 암모늄 화합물, 및 계면활성제, 예컨대 폴록사머 및 나트륨 라우릴 설페이트; (7) 습윤제, 예컨대 세틸 알코올, 글리세롤 모노스테아레이트 및 비이온성 계면활성제; (8) 흡수제, 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토; (9) 윤활제, 예컨대 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트, 아연 스테아레이트, 나트륨 스테아레이트, 스테아르산 및 이들의 혼합물; (10) 착색제; 및/또는 (11) 방출 조절제, 예컨대 크로스포비돈 또는 에틸 셀룰로오스. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약학 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고 분자량의 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질 셀화 된 젤라틴 캡슐의 충전제로서 사용될 수 있다.

[0088] 정제는, 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 몰딩에 의해 제조될 수 있다. 압축 정제는 결합제 (예컨대, 젤라틴 또는 하이드록시 프로필메틸 셀룰로오스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 봉해제(예컨대, 나트륨 전분 글리콜레이트 또는 가교결합된 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스), 계면활성제 또는 분산제를 사용하여 제조할 수 있다. 캡슐, 알약 및 과립과 같은 활성제의 정제, 및 기타 고체 투여 형태는, 선택적으로 코팅 및 셸, 예컨대 장용 코팅 및 제약-제형 기술 분야에 널리 알려진 기타 코팅으로 스코어링(scored)되거나 제조될 수 있다. 투여 형태는 또한, 예컨대 소망하는 방출 프로파일, 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구체를 제공하기 위해 다양한 비율의, 예컨대 하이드록시 프로필메틸 셀룰로오스를 사용하여, 활성 성분의 서방성 또는 제어된 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다. 투여 형태는 대안적으로 급속 방출, 예컨대 동결 건조를 위해 제형화될 수 있다.

[0089] 일반적으로, 투여 형태는 무균일 것이 요구된다. 이러한 목적을 위해, 투여 형태는 예컨대, 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 멸균수 또는 일부 다른 멸균 주사가 가능한 매질에, 사용하기 전에 즉시 용해될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 혼입함으로써 멸균될 수 있다. 약학 조성물은 또한 불투명화제를 함유할 수 있고, 활성 성분(들)만을, 또는 우선적으로 위장관의 특정 부분에서, 선택적으로 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 매립형 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 적절한 경우, 하나 이상의 상술한 부형제와 함께 마이크로캡슐화된 형태일 수 있다.

[0090] 액체 투여 형태는 전형적으로, 활성제의 약학적으로 허용가능한 유화액, 마이크로유화액, 용액, 현탁액, 시럽 또는 엘릭서이다. 활성 성분 이외에, 액체 투여 형태는 예컨대 물 또는 기타 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물과 같은, 당업계에서 일반적으로 사용되는 불활성 희석제를 함유할 수 있다.

[0091] 국소 또는 경피 투여를 위해 특별히 의도된 투여 형태는 예컨대 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 용액 또는 패치의 형태일 수 있다. 안연고, 분말, 용액 등과 같은 안과용 제형이 또한 본원에서 고려된다. 활성 화합물은 멸균 조건 하에서, 약학적으로 허용가능한 담체 및 요구될 수 있는 임의의 방부제, 완충제 또는 분사제와 혼합될 수 있다. 국소 또는 경피 투여 형태는, 본 발명의 활성 화합물 이외에, 동물 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 활석 및 산화아연, 및 이들의 혼합물로부터 선택된 것과 같은 하나 이상의 부형제를 함유할 수 있다. 스프레이는 또한 클로로플루오로 탄화수소와 같은 통상적인 분사제와, 부탄 및 프로판과 같은 휘발성 비치환된 탄화수소를 포함할 수 있다.

[0092] 본 기술의 목적을 위해, 경피 패치는 본 기술의 화합물의 체내로의 제어된 전달을 허용하는 이점을 제공할 수 있다. 이러한 투여 형태는 화합물을 적합한 매질에 용해 또는 분산시키는 것에 의해 제조될 수 있다. 피부를 가로지르는 화합물의 흐름을 증가시키기 위해 흡수 촉진제가 포함될 수도 있다. 이러한 흐름의 속도는, 속도 조절 멤브레인을 제공하거나, 중합체 매트릭스 또는 겔에 화합물을 분산시킴으로써 조절할 수 있다.

[0093] 비경구 투여에 적합한 이 기술의 약학 조성물은, 일반적으로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 멸균 등장성

수용액 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액; 또는 설탕, 알코올, 산화 방지제, 완충제, 정균제 또는, 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 것으로서, 사용 전에 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액으로 재구성되어야 하는, 멸균 분말과 조합된, 본 발명의 하나 이상의 화합물을 포함한다.

[0094] 일부 경우에, 약물의 효과를 연장하기 위해, 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 늦추는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 수 용해성이 불량한, 결정질 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 사용함으로써 달성될 수 있다. 그 다음, 약물의 흡수 속도는 용해 속도에 따라 달라지며, 이는 결국 결정 크기와 결정 형태에 따라 달성될 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 오일 비히클에 용해 또는 현탁시킴으로써 달성된다.

[0095] 주사가 가능한 데포(depot) 형태는, 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체에서 활성 화합물의 마이크로캡슐화 매트릭스를 형성함으로써 제조될 수 있다. 약물 대 중합체의 비율 및 사용된 특정 중합체의 특성에 따라 약물 방출 속도를 제어할 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예로는 폴리(오르쏘에스테르) 및 폴리(무수물)이 포함된다. 데포 주사가 가능한 제형은 또한, 신체 조직과 상용화되는 리포솜 또는 마이크로유화액에 약물을 포획함으로써(entraping) 제조할 수 있다.

[0096] 약학 조성물은 또한 마이크로유화액의 형태일 수 있다. 마이크로유화액의 형태에서, 활성제의 생체이용률이 향상될 수 있다. 그의 전체가 본원에 참고로서 인용된 문헌[Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991] 및 [Sheen, P. C., et al., J. Pharm. Sci., 80(7), 712-714, 1991]에 기재되어 있다.

[0097] 약학 조성물은 또한, 본 발명의 화합물 및 하나 이상의 양친매성 담체로부터 형성된 미셀을 함유할 수 있으며, 여기서 미셀(micelle)은 약 100 nm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, 미셀은 약 50 nm 미만의 평균 직경, 또는 약 30 nm 미만의 평균 직경, 또는 약 20 nm 미만의 평균 직경을 갖는다.

[0098] 임의의 적합한 양친매성 담체가 본원에서 고려되지만, 양친매성 담체는 일반적으로 GRAS(일반적으로 안전하다고 인정됨) 상태가 부여되고 본 기술의 화합물을 가용화하면서 용액이 복합 수상(살아있는 생물학적 조직에서 발견되는 것과 같은)과 접촉하면, 이후의 단계에서 이를 미세유화(microemulsify)할 수 있는 것이다. 일반적으로 이러한 요구 사항을 충족하는 양친매성 성분의 HLB(친수성 대 친유성 균형)값은 2 내지 20이며, 그의 구조는 C-6 내지 C-20 범위의 직쇄 지방족 라디칼을 포함한다. 양친매성 담체의 일부 예에는 폴리에틸렌 글리콜화된 지방산 글리세리드 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다.

[0099] 일부 양친매성 담체는, 완전히 또는 부분적으로 수소화된 다양한 식물성 오일로부터 수득된 것과 같은, 포화 및 단일불포화 폴리에틸렌글리콜화된 지방산 글리세리드이다. 이러한 오일은 유리하게는 카프르산 4-10, 카프르산 3-9, 라우르산 40-50, 미리스트산 14-24, 팔미트산 4-14 및 스테아르산 5-15%를 포함하는 지방산 조성물과 같은, 상용하는 지방산의 트리-, 디- 및 모노-지방산 글리세리드 및 디- 및 모노-폴리에틸렌글리콜 에스테르로 구성될 수 있다. 양친매성 담체의 또 다른 유용한 부류는 포화 또는 단일불포화 지방산(SPAN 시리즈) 또는 상용하는 에톡실화 유사체(TWEEN 시리즈)와 함께 부분적으로 에스테르화된 소르비탄 및/또는 소르비톨을 포함한다. Gelucire®-시리즈, Labrafil®, Labrasol®, 또는 Lauroglycol®, PEG-모노-올리에이트, PEG-디-올리에이트, PEG-모노-라우레이트 및 디-라우레이트, 레시틴, 폴리소르베이트 80을 포함하는 상업적으로 입수 가능한 양친매성 담체가 특히 고려된다.

[0100] 약학 조성물에 사용하기에 적합한 친수성 중합체는 일반적으로 용이하게 수용성이고, 소포 형성 지질에 공유적으로 부착될 수 있고, 실질적인 독성 효과 없이 생체내에서 수용 가능한(즉, 생체적합성인) 것이다. 적합한 중합체는 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리락트산(폴리락티드라고도 함), 폴리글리콜산(폴리글리콜리드라고도 함), 폴리락트산-폴리글리콜산 공중합체, 및 폴리비닐 알코올을 포함한다. 예시적인 중합체는 분자량이 약 100 또는 120 달톤 내지 약 5,000 또는 10,000 달톤, 보다 바람직하게는 약 300 달톤 내지 약 5,000 달톤인 것들이다. 특정 실시양태에서, 중합체는 약 100 내지 약 5,000 달톤의 분자량, 또는 약 300 내지 약 5,000 달톤의 분자량, 또는 750 달톤의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜, 즉, PEG(750)이다. 중합체는 또한 그 안의 단량체의 수에 의해 정의될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 기술의 약학 조성물은 3개 이상의 단량체를 포함하거나 대략 150달톤인 PEG 중합체와 같은, 약 3개 이상의 단량체의 중합체를 이용한다. 본 기술에 사용하기에 적합할 수 있는 다른 친수성 중합체는 폴리비닐피롤리돈, 폴리메톡사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리하이드록시프로필 메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 및 하이드록시메틸 셀룰로오스 또는 하이드록시에틸셀룰로오스와 같은 유도체화된 셀룰로오스를 포함한다.

- [0101] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 폴리아미드, 폴리카보네이트, 폴리알킬렌, 아크릴과 메타크릴 에스테르의 중합체, 폴리비닐 중합체, 폴리글리콜리드, 폴리실록산, 폴리우레탄 및 그의 공중합체, 셀룰로오스, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 락트산과 글리콜산의 중합체, 폴리무수물, 폴리(오르쏘)에스테르, 폴리(부트산), 폴리(발레르산), 폴리(락티드-코-카프로락톤), 다당류, 단백질, 폴리히알루론산, 폴리시아노아크릴레이트 및 이들의 블렌드, 혼합물 및 공중합체로부터 선택된 생체적합성 중합체를 포함한다.
- [0102] 약학 조성물은 또한 리포솜 형태일 수 있다. 리포솜은 수성 내부 구획을 둘러싸는 하나 이상의 지질 이중층 막을 포함한다. 리포솜은 막 유형 및 크기로 특징화될 수 있다. 소형 단층 소포(SUVs)는 단일 막을 가지며 전형적으로 직경이 0.02 내지 0.05 μm 의 범위이고, 대형 단층 소포(LUVs)는 전형적으로 0.05 μm 보다 크다. 올리고라멜라 대형 소포 및 다중층 소포는 일반적으로 동심원인 다중 막 층을 갖고 전형적으로 0.1 μm 보다 크다. 리포솜은 또한 더 큰 소포 내에 함유된 몇 개의 더 작은 소포를 함유할 수 있는, 즉 다소포형 소포이다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 리포솜을 포함하며, 여기서 리포솜 막은 증가된 운반 능력을 제공하도록 제형화된다. 대안적으로 또는 추가로, 본 기술의 하나 이상의 β -사이클로덱스트린 또는 약학적으로 허용가능한 염은, 리포솜의 리포솜 이중층 내에 내포되거나 위에 흡착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성제는 지질 계면활성제와 응집되어 리포솜의 내부 공간 내에서 운반될 수 있다. 이러한 경우, 리포솜 막은 활성제-계면활성제 응집체의 파괴 효과에 저항하도록 제형화된다. 특정 실시양태에서, 리포솜의 지질 이중층은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 유도체화된 지질을 함유하여, PEG 쇄가 지질 이중층의 내부 표면으로부터 리포솜에 의해 캡슐화된 내부 공간으로 연장되고, 지질 이중층의 외부로부터 주변 환경으로 연장된다.
- [0104] 리포솜 내에 함유된 활성제는 바람직하게는 가용화된 형태이다. 계면활성제 및 활성제의 응집체(관심 활성제를 함유하는 유화액 또는 미셀과 같은)는 리포솜의 내부 공간 내에 포획될 수 있다. 계면활성제는 전형적으로 활성제를 분산시키고 가용화시키는 역할을 한다. 계면활성제는, 예컨대 약 14 내지 20개의 탄소와 같은 다양한 쇄길이를 갖는 생체적합성 리소포스파티딜콜린(LPCs)을 포함하나 이로 한정되지 않는, 임의의 적합한 지방족, 지환족 또는 방향족 계면활성제로부터 선택될 수 있다. PEG-지질과 같은 중합체 유도체화 지질은, 미셀/막 용해를 억제하는 작용을 하고, 계면활성제 분자에 중합체를 첨가하면 계면활성제의 임계 미셀 농도(CMC)를 감소시키고 미셀 형성을 돕기 때문에, 미셀 형성에 사용될 수 있다. 마이크로몰 범위의 CMC를 갖는 계면활성제가 바람직하고; 더 높은 CMC 계면활성제는 본 기술의 리포솜 내에 포획된 미셀을 제조하는 데에 사용될 수 있지만, 미셀 계면활성제 단량체는 리포솜 이중층 안정성에 영향을 미칠 수 있고 소망하는 안정성의 리포솜을 설계하는 데에 요인이 될 수 있다.
- [0105] 본 기술에 따른 리포솜은, 당업계에 알려진 임의의 다양한 기술에 의해 제조될 수 있으며, 예컨대 미국 특허 제 4,235,871호 및 국제공개출원 WO 96/14057에 기술된 것과 같은 것이며, 그 내용은 그의 전체가 참고로서 본원에 인용된다. 예컨대, 리포솜은 친수성 중합체로 유도체화된 지질을 미리 형성된 리포솜으로 확산시키는 것에 의해, 예컨대, 미리 형성된 리포솜을, 리포솜에서 소망하는 유도체화된 지질의 최종 몰%에 상응하는 지질 농도로, 지질-그래프트화된 중합체로 구성된 미셀에 노출시키는 것에 의해 제조될 수 있다. 친수성 중합체를 함유하는 리포솜은 또한 당업계에 알려진 바와 같이 균질화, 지질-필드(lipid-field) 수화 또는 압출 기술에 의해 형성될 수 있다. 다른 방법론에 의해, 활성제는 먼저, 소수성 분자를 용이하게 가용화하는 리소포스파티딜콜린 또는 기타 낮은 임계 미셀 농도(CMC) 계면활성제(중합체 그래프트화된 지질 포함)에서 초음파 처리에 의해 분산된다. 활성제의 생성된 미셀 현탁액은, 그 다음, 적절한 몰%의 중합체-그래프트화된 지질 또는 콜레스테롤을 함유하는 건조된 지질 시료를 재수화하는 데에 사용된다. 이어서, 지질 및 활성제 현탁액은 당업계에 잘 알려진 압출 기술을 사용하여 리포솜으로 형성되고, 생성된 리포솜은 표준 컬럼 분리에 의해 캡슐화되지 않은 용액으로부터 분리된다.
- [0106] 일부 실시양태에서, 리포솜은 선택된 크기 범위에서 실질적으로 균질한 크기를 갖도록 제조된다. 하나의 효과적인 사이징 방법은, 선택된 균일한 기공 크기를 갖는 일련의 폴리카보네이트 막을 통해 리포솜의 수성 현탁액을 압출하는 것을 포함한다. 막의 기공 크기는, 막을 통한 압출에 의해 생성된 리포솜의 가장 큰 크기와 대략 상응할 것이다(미국 특허 제 4,737,323호, 그 내용은 그의 전체가 본원에 참고로서 인용됨).
- [0107] 본 기술의 제형의 방출 특성은, 예컨대 캡슐화 물질의 유형 및 두께, 캡슐화된 약물의 농도, 및 방출 개질제의 존재를 포함하는 여러 요인에 좌우된다. 소망하는 경우, 방출은 위 안에서와 같이 낮은 pH에서만 방출하거나, 장 안에서와 같이 높은 pH에서 방출하는 pH 민감성 코팅을 사용하는 것과 같이, pH 의존적으로 조작될 수 있다. 위를 통과할 때까지 방출이 발생하지 않도록 장용 코팅이 사용될 수 있다. 상이한 물질로 캡슐화된 시안아미드

의 다중 코팅 또는 혼합물을 사용하여, 위 안에서 초기 방출한 다음 장 안에서 나중에 방출할 수 있다. 방출은 또한 염 또는 기공 형성제의 포함에 의해 조작될 수 있으며, 이는 캡슐로부터의 확산에 의해 약물의 수분 흡수 또는 방출을 증가시킬 수 있다. 약물의 용해도를 개질하는 부형제를 사용하여 방출 속도를 조절할 수도 있다. 매트릭스의 분해 또는 매트릭스로부터의 방출을 향상시키는 약제가 또한 도입될 수 있다. 약제는 약물에 첨가되거나, 개별 상으로서(즉, 미립자로서) 첨가되거나, 화합물에 따라 중합체 상에서 동시 용해될 수 있다. 모든 경우에, 양은 바람직하게는 0.1 내지 30%(w/w 중합체)이다. 일부 유형의 분해 촉진제는, 황산 암모늄 및 염화 암모늄과 같은 무기 염; 시트르산, 벤조산 및 아스코르브산 등의 유기산; 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산칼슘, 탄산아연 및 수산화아연 등의 무기 염기; 프로타민 설페이트, 스페르민, 콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민 및 트리에탄올아민과 같은 유기 염기; 및 트윈(Tween™) 또는 플루로닉(Pluronic™) 상업용 계면활성제와 같은 계면활성제를 포함한다. 매트릭스에 미세구조를 추가하는 기공 형성제(즉, 무기 염 및 당과 같은 수용성 화합물)는 일반적으로 미립자로서 포함된다.

[0108] 흡수(uptake)는 또한 체내 입자의 체류 시간을 변경함으로써 조작될 수 있다. 이것은 예컨대 점막 접착성 중합체로 입자를 코팅하거나, 점막 접착성 중합체를 캡슐화 재료로서 선택하는 것에 의해 달성될 수 있다. 예로는 키토산, 셀룰로오스, 특히 폴리아크릴레이트와 같은 유리 카복실기를 갖는 대부분의 중합체가 포함된다(본원에 사용되는 바와 같이, 폴리아크릴레이트는 아크릴레이트기, 및, 시아노아크릴레이트 및 메타크릴레이트와 같은 개질된 아크릴레이트기를 포함하는 중합체를 나타낸다).

[0109] **실시예**

[0110] 본 기술은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원의 실시예는 본 기술의 이점을 설명하고, 추가로 본 기술의 조성물 및 시스템을 제조하거나 사용하는 당업자를 돕기 위해 제공된다. 실시예는 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같이 본 기술의 범위를 제한하는 것으로 결코 해석되어서는 안된다. 실시예는 전술된 본 기술의 변형, 양태 또는 실시양태 중 임의의 것을 포함하거나 도입할 수 있다. 전술된 변형, 양태 또는 실시양태는 또한 본 기술의 임의의 또는 모든 다른 변형, 양태 또는 실시양태의 변형을 각각 추가로 포함하거나 통합할 수 있다.

[0111] 실시예 1: 재료 및 방법

[0112] 세포내 리포푸신 비스레티노이드의 양을 평가하기 위한 민감하고 정량적인 방법은 LB의 고유 자가형광에 기초하여 개발되었다.

[0113] 형광 현미경법: LB는 그의 소수성 아암에 풍부한 공액 이중 결합으로 인한 자가 형광 분자이다. 430 nm(청색광)에서 여기되면, 610 nm에서 정점을 이루는 황색을 띤 주황색 형광을 방출한다. 형광의 강도는 그의 양에 비례한다. 최신티 청색 형광 염료는 사이클로텍스트린으로 처리된 세포의 핵을 염색하는 데에 사용되었다. 이러한 방식으로, 이미징된 필드의 세포 수와 관련하여 610 nm 방출 피크(LB의 양)를 표현할 수 있다. 각 용량은 3세트씩 분석되었고 웰 당 10개의 무작위 필드가 평가되었다.

[0114] 형광 플레이트 판독기 방법: 메틸 β-사이클로텍스트린은 형광 현미경법 및 HPLC를 사용하여, 시험관내 및 생체 내에서, 지질 비스레티노이드(LB) 함량을 감소시킨다(Nociari et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 111(14): E1402-E1408(2014)). 그러나 이러한 방법은 LB 양에 대한 강력하고 편견 없는 평가를 제공하기에 충분한 선형성과 민감도가 부족하다. 이러한 한계를 극복하기 위해, LB 제거를 정량화하는 간단하고 민감한 마이크로플레이트 분석이 개발되었다. 개략적으로, 무독성 용량의 A2E(5 μM)에 의한 RPE 세포의 합류 배양물을 미리 로딩하는 조건이 최적화되었다. 세포는 적어도 분석 일주일 전에, 하나 또는 반복적인 단계로 낮은 용량의 A2E로 미리 로딩되었다. 이들 세포는 제거 분석을 위해 필요해질 때까지 몇 달 동안 로딩된 상태로 유지될 수 있다. 분석 48 시간 전에, 세포를 트립신 처리하고, 계수하고, 1×10⁵ 세포/웰의 밀도로 96웰 유리 바닥 플레이트에 시딩하였다. 48시간 후, 세포를 β-사이클로텍스트린 제형으로 0/N(적어도 4세트씩) 처리하였다(도 5a). β-사이클로텍스트린으로 처리한 후, 상청액을 제거하고, 세포를 A2E-추출 완충액으로 수집하여 A2E 자가형광을 최대화하는 동시에 β-사이클로텍스트린 착체에 의한 용매변색 간섭을 방지하여(도 5b), 5×10⁻⁴ 내지 2×10³ 피코몰 A2E 사이의 놀라운 선형성을 산출하였다(도 5c).

[0115] 형광을 사용하여 A2E 양을 결정하고, A2E가 사이클로텍스트린과 착화될 때 더 강한 형광을 나타낸다는 점을 고려하여, 이러한 간섭을 극복하고 A2E의 형광 검출을 최대화하는 A2E 추출 완충제가 개발되었다. A2E 추출 완충제는, PBS에 2% 트리톤 X-100과 1% SDS의 믹스를 포함한다. 트리톤-100은 A2E보다 높은 친화력으로 β 사이클로텍스트린과 착체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 2% 트리톤에서는, 로딩된 세포로부터 잠재적으로 방출될 수

있는 임의의 A2E의 양에 대해 세제가 과도하게 존재한다. 이것은 두 가지 역할을 한다: (i) 모든 A2E 분자를 사이클로텍스트린 공동 밖으로 밀어내는 것 및 (ii) A2E를 세제 분자로 균일하게 둘러싸서, 이에 따라 물 켄칭 (water quenching)에 대해 A2E를 보호하여, 방출 강도를 증가시켜 결과적으로 분석의 감도를 개선하는 것.

[0116] 본 연구에 사용된 사이클로텍스트린(CD)을 표 1에 나타냈다. CD 분자의 치환도는 1에서 21까지 다양할 수 있다. DS는 CD 분자당 치환기의 평균 수이다. 도 1a 및 1b는 본 기술의 특정 CD 분자의 조성의 구조식을 나타낸다.

[0117] [표 1]

	시험된 사이클로텍스트린	업체	카탈로그 넘버	로트 넘버	치환도
A0	α-사이클로텍스트린	TCI 아메리카, 미국 오레곤주 포틀랜드	C0776	TUJH-BB	0
B0	β-사이클로텍스트린	사이클로랩(Cyclolab), 헝가리 부다페스트	CY-2009	CYL-4264	0
M1	메틸 β-사이클로텍스트린	시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트루이스	C4555	98H0545	11.0
M2	메틸 β-사이클로텍스트린	시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트루이스	332615	STBH0439	10.8
M3	메틸 β-사이클로텍스트린	시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트루이스	332615	STBF5361V	11.9
M4	헵타키스 (2,6-디-O-메틸) β-사이클로텍스트린	시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트루이스	H0513	SLBD0504V	15.1
M5	헵타키스 (2,3,6-트리-O-메틸) β-사이클로텍스트린	플루카(Fluka), 멕시코 멕시코시티	51707	1421422	19.6
H1	하이드록시 프로필 β-사이클로텍스트린	시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트루이스	C0926	077k0680v	4-10
H2	하이드록시 프로필 β-사이클로텍스트린	카보신스(Carbosynth), 미국 캘리포니아주 샌디에고	OH053931	OH053931501	5.4
H3	하이드록시 프로필 β-사이클로텍스트린	카보신스(Carbosynth), 미국 캘리포니아주 샌디에고	OH053931	OH053931801	4.9
SB1	설포 부틸 에테르 β-사이클로텍스트린	카보신스(Carbosynth), 미국 캘리포니아주 샌디에고	OC15979	OS159791402	7.1
SB2	설포 부틸 에테르 β-사이클로텍스트린	카보신스(Carbosynth), 미국 캘리포니아주 샌디에고	OC15979	OC159791801	6.6
SB3	설포 부틸 에테르 β-사이클로텍스트린	카보신스(Carbosynth), 미국 캘리포니아주 샌디에고	OC15979	OC159791601	6.7
G0	감마-사이클로텍스트린	TCI 아메리카, 미국 오레곤주 포틀랜드	C0869	6ZNIH-0B	0

[0118] [0119] 실시예 2: 세포성 LB 침착물에 대한 본 기술의 사이클로텍스트린 화합물의 효과

[0120] 도 5a에 기재된 시험관내 검정은 세포성 LB를 제거하는 사이클로텍스트린의 능력의 신속한 평가를 가능하게 한다. 모든 사이클로텍스트린은 중앙에 소수성 포켓을 갖기 때문에, 모든 사이클로텍스트린은 상피 세포로부터 리포푸신 비스레티노이드의 제거를 촉진하는 데에 효과적일 것이라고 가정되었다. 이 가설을 시험하기 위해 인간 RPE 세포를 5 μM A2E와 함께 밤새 인큐베이션함으로써, 인간 RPE 세포를 리포푸신으로 미리 로딩하였다. 세포를 세척하고, 미처리 상태로 두거나 4mM의 시험 사이클로텍스트린 화합물로 처리하였다. 48시간 처리 후, 세포를 2% 트리톤/2% SDS-PBS 완충제에서 용해시켰다. 세포내 A2E 함량은 형광(430nm에서 여기 및 600nm에서 방출)으로 측정되었다.

- [0121] 도 2에 나타난 바와 같이, 모든 사이클로텍스트린이 LB 제거를 촉진하는 데에 효과적인 것은 아니다. 메틸 β -사이클로텍스트린, 2-하이드록시 프로필 β -사이클로텍스트린 및 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린은 망막 세포로부터 리포푸신 비스레티노이드의 제거를 촉진하는 반면, 비치환된 α -사이클로텍스트린, β -사이클로텍스트린 및 감마-사이클로텍스트린은 이러한 조건 하에서 A2E를 추출하지 못하였다. 2,6-디-0-메틸- β -사이클로텍스트린(헵타키스 2,6-디-0-메틸) 또는 2,3,6-트리-0-메틸- β -사이클로텍스트린(헵타키스 2,3,6-트리-0-메틸)은 또한 LB 제거를 촉진하는 데에 효과적이지 않았다.
- [0122] LB 침착물의 제거가 발생했음을 확인하기 위해, 10X 배율 대물렌즈로 형광 현미경하에서 세포를 분석하였다. 리포푸신의 황색 자가형광 특성은 7.5mM β -사이클로텍스트린으로 처리한 후 48시간 동안 극적으로 감소하였다(도 6).
- [0123] 시험된 β -사이클로텍스트린에 의해 촉진된 LB 제거 과정을 추가로 설명하기 위해, A2E-로딩된 세포를 광학적으로 순수한 유리 바닥 플레이트에 시딩하고, 7.5mM β -사이클로텍스트린으로 48시간 동안 처리하고, 고배율 대물렌즈를 사용하여 이미지화하였다(100X). 도 4a 및 4b는, 핵을 시각화하기 위해 1시간 동안 Hoechst 염료로 염색한 후, 100X 배율 대물렌즈로 형광 현미경법에 의해 모니터링한 세포(미추출 세포) 내부의 A2E 형광을 나타낸다. 상단 패널은 미처리 대조군(A2E-미처리)에서 LB가 풍부한 리포푸신 축적을 나타낸다. 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이 미처리 세포는 세포질에서, 청색 DNA 형광 및 황색 반점상 LB 형광을 나타냈다. 이 국소화는 이전에 보고된 리소좀 내부의 국소화와 일치하였다. 하단 패널은 LB가 메틸 β -사이클로텍스트린으로 처리된 후 세포 외부로 배출되었음을 나타낸다. 실제로, A2E 과립의 세포외 방출은 처리에 의해 유도되는 것으로 나타났다.
- [0124] 리포푸신 제거 과정이 리포푸신의 세포외 방출을 포함한다는 것을 확인하기 위해, 웰 당 1×10^5 의 A2E-로딩된 세포 및 대조군 세포를 무혈청 배지내에서 배양하고, 4시간 후, 12.5mM 메틸 β -사이클로텍스트린(MBCD); 하이드록시 프로필 β -사이클로텍스트린(HPBCD); 또는 설포부틸 에테르 β -사이클로텍스트린(SBE-BCD)으로 처리하였다. 부착 세포를 1X A2E 추출 완충제에서 용해시키고, 상청액을 새로운 웰 세트에 옮기되, 여기에는 농축된 A2E 추출 완충제가 첨가되어 1X 최종 농도를 얻었고, 이로써 배지로 분비된 A2E의 정량화를 허용하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 세포에 존재하지 않는 모든 A2E 형광은 상청액에 존재하였다. 그 다음, 이 과정 동안 A2E가 분해되지 않았는지 확인하기 위해, 용해물 및 상청액에서 HPLC 분석을 수행하였다(데이터 도시하지 않음).
- [0125] 이들 결과는 본 기술의 사이클로텍스트린 조성물이 이를 필요로 하는 대상체에서 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환을 치료하기 위한 방법에 유용하다는 것을 입증한다.
- [0126] 실시예 3: β -사이클로텍스트린에 의한 LB의 용량 의존적 제거
- [0127] 메틸 β -사이클로텍스트린의 유효량을 결정하기 위해, A2E가 로딩된 상피 세포를, 증가하는 용량의 메틸 β -사이클로텍스트린과 함께 인큐베이션하였다. 24시간 동안 인큐베이션한 후, 메틸 β -사이클로텍스트린을 세포로부터 제거하고 세포와 여전히 화합된 A2E의 양을 결정하였다. 도 3a에 도시된 바와 같이, A2E 제거에 대한 메틸 β -사이클로텍스트린의 효과는 용량 의존적이었다. 가장 낮은 시험 용량은 미처리 대조군에 비해 약 75% 제거를 나타냈다. 10-20 μ M 정도의 낮은 메틸 β -사이클로텍스트린만큼 낮은 용량은 상피 세포로부터 검출가능한 대부분의 LB 침착물을 제거하였다.
- [0128] LB 침착물의 제거를 평가하기 위해, DAPI로 핵을 염색한 후, 세포를 형광 현미경하에서 100X 배율로 분석하였다. 미처리 대조군 세포도 동일한 조건하에서 관찰되었다. 도 3b에 도시된 바와 같이, 미처리 세포는 청색 DNA 형광 뿐만 아니라 LB 침전물로 인한 청록색 형광을 나타냈다. 이에 반해, 메틸 β -사이클로텍스트린을 24시간 처리한 세포는 청색 형광을 나타내었고, 청록색 형광이 전혀 없어, LB의 추출 및 제거를 입증할 수 있었다.
- [0129] β -사이클로텍스트린의 효능을 비교하기 위해, A2E로 로딩된 상피 세포를 증가하는 용량의 지시된 β -사이클로텍스트린과 함께 인큐베이션하였다. 48시간 동안 인큐베이션한 후, β -사이클로텍스트린 상청액과 함께 배지를 제거하고 세포와 여전히 화합된 A2E의 양을 도 5a에 기재된 정량적 형광분석법에 의해 결정하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, A2E 제거에 대한 β -사이클로텍스트린의 효과는 용량 의존적이었다. 밀리몰 범위의 β -사이클로텍스트린 용량은 상피 세포로부터 LB 침착물을 제거하였다.
- [0130] 이러한 결과는, 본 기술의 사이클로텍스트린 조성물이 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환을 치료하기 위한 방법에 유용함을 입증한다.

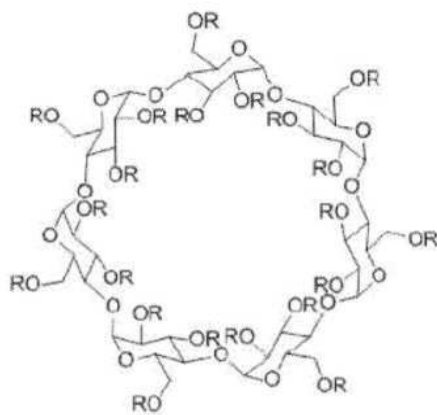
- [0131] 실시예 4: 유리체내 주사로 치료된 눈으로부터의 LB 제거
- [0132] 메틸 β-사이클로렉스트린(MBCD); 하이드록시 프로필 β-사이클로렉스트린(HPBCD); 및/또는 설포부틸 에테르 β-사이클로렉스트린(SBE-BCD)이 생체내에서 눈으로부터 LB를 추출할 수 있는지를 추가로 결정하기 위해, 다음 실험이 수행되었다. ABCA4 및 RDH8 유전자의 돌연변이로 인해 LB 축적이 약화된 동물인 DKO 마우스의 우측 눈(OD)(Maeda A, et al. (2008) Retinopathy in Mice Induced by Disrupted All-trans-retinal Clearance. J Biol Chem 283(39):26684-93)을, 2μl 100mM MβCD; 1μl 500mM HPβCD; 또는 1μl 500mM SBE-βCD의 유리체내 주사 2회로 처리하였고, 좌측 눈(OS)을 비히클 단독으로 모의(mock) 처리하였다. 연령이 매치되는 대조군 동물의 개별적인 그룹을 비히클 단독으로 처리하여 이들 마우스의 눈에서 기준선 자가형광을 안정화시켰다. 두 번째 동일한 주사가 일주일 후에 투여되었다. 두 번째 주사 4일 후에 눈을 채취하고 망막 색소 상피(RPE)-아이컵을 평평하게 장착하였다. 평평하게 장착된 RPE-아이컵의 자가형광 현미경법은 630X 배율로 수행되었으며, 전체 아이컵의 이미지는 젠블루(Zen blue) 소프트웨어(자이스(Zeiss))를 사용하여 개별 이미지를 이어붙여 구성되었다. 망막의 평균 형광 강도는 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 정량화되었다. 도 9는, MBCD가 아닌 SBE-BCD 및 HP-BCD가, 시험된 농도에서 망막으로부터 LB를 유의미하게 제거할 수 있음을 입증한다. SBE-BCD가 HPBCD보다 우수하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, 총 LB의 42.6, 28.5 및 18.2%가 각각 SBE-BCD, HP-BCD 및 MBCD의 2회의 유리체내 주사에 의해 추출되었다.
- [0133] 이들 결과는 본 기술의 사이클로렉스트린이 LB 제거를 촉진하고 안내 주사, 서방성 장치의 이식 또는 국소(점안약)를 통해 리포푸신 관련 실명 장애를 치료하기 위한 방법에 유용하다는 것을 입증한다.
- [0134] 실시예 5: 시력에 대한 본 기술의 사이클로렉스트린의 생체내 효과
- [0135] 2μl 100mM M-βCD; 1μl 500mM HP-βCD; 또는 1μl 500mM SBE-βCD를 1주일 간격으로 양쪽 눈에 두 번 주사하고 2μl H2O를 연령-매치된 대조군에 유리체내 주사하였다. 치료의 가시적 독성을 평가하기 위해, 공간 주파수 응답(SF)은 각 주사 직전과 마우스를 희생시키기 전, 즉 두 번째 주사 후 4일째에 결정되었다. SF는 옵토모트리(OptoMotry(OMT)) 챔버를 사용하여 측정된 원추체-매개 시각 반응이다. 개략적으로, 높은 플랫폼에 구속없이 서 있는 마우스는 흰색 배경에 검은색 막대가 있는 가상 실린더를 만드는 컴퓨터 모니터로 둘러싸여 있다. 격자의 가상 회전은 시각 반사 머리 움직임을 유발하고, 추적을 유도하지 않는 가장 높은 공간 주파수(SF)가 시력의 척도로서 사용된다. SF는 M-βCD 처리된 마우스에서 측정할 수 없었다. HP-βCD를 사용하면, 상당한 시각 반응 손상을 보이는 일부 동물에서 관찰 가능한 변화가 있었다. 대조적으로, SBE-βCD는, 물로 처리 및 비주사 음성 대조군으로부터 구별되지 않는 SF를 나타내는 양호한 내약성이었다. 도 10a-10b 참조. 설포부틸 에테르 β-사이클로렉스트린(SBE-BCD) 처리는 광수용체 층(ONL)의 무결성을 손상시키지 않았으며, SBE-BCD 처리된 동물의 망막의 전체 구조는 처리 후에도 손상되지 않은 상태로 유지되었다. 도 11a 및 11b 참조.
- [0136] 이러한 결과는 본 기술의 사이클로렉스트린이 LB 제거를 촉진하고 안내 주사, 서방성 장치의 이식 또는 국소 적용(점안약)을 통해 리포푸신 관련 실명 장애를 치료하기 위한 방법에 유용하다는 것을 입증한다. 따라서, 본 기술의 사이클로렉스트린 조성물은 대상체에서 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 망막 세포 리포푸신 축적과 관련된 안질환을 치료하기 위한 방법에 유용하다.
- [0137] **등가물**
- [0138] 본 기술은, 본 기술의 개별 양태의 단일 예시로서 의도된 본 출원에 기재된 특정 실시양태의 측면으로 제한되어서는 안 된다. 본 기술의 많은 수정 및 변형이 그의 진의 및 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있으며, 이는 당업자에게 명백할 것이다. 여기에 열거된 것들에 더하여, 본 기술의 범위 내에서 기능적으로 동등한 방법 및 장치는 전술한 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 수정 및 변형은 본 기술의 범위에 속하는 것으로 의도된다. 이러한 본 기술은, 물론 다양할 수 있는 특정 방법, 시약, 화합물 조성 또는 생물학적 시스템으로 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위한 것이며, 한정하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.
- [0139] 또한, 본 개시내용의 특징 또는 양태가 마쿠쉬(Markush) 그룹과 관련하여 설명되는 경우, 당업자는 본 개시내용이 이에 의해 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별적인 구성원 또는 구성원의 하위 그룹의 관점에서 설명된다는 것을 인식할 것이다.
- [0140] 당업자가 이해하는 바와 같이, 임의의 모든 목적을 위해, 특히 서면 설명을 제공하는 측면에서, 본원에 개시된 모든 범위는 또한 임의의 및 모든 가능한 하위 범위 및 이들의 하위 범위의 조합을 포함한다. 나열된 임의의 범위는, 동일한 범위를 적어도 동일한 절반, 3분의 1, 4분의 1, 5분의 1, 10분의 1 등으로 나눌 수 있도록 충분히

설명하고 가능하게 하는 것으로 쉽게 인식될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본원에 논의된 각 범위는 하위 3분의 1, 중위 3분의 1, 상위 3분의 1 등으로 용이하게 분류될 수 있다. 또한 당업자가 이해하는 바와 같이 "이하", "이상", "초과", "미만" 등과 같은 모든 언어는 인용된 숫자를 포함하고, 위에서 논의한 바와 같이 차후에 하위 범위로 나눌 수 있는 범위를 나타낸다. 마지막으로, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 범위는 각각의 개별 구성원을 포함한다. 따라서, 예컨대, 1-3개의 세포를 갖는 그룹은 1개, 2개 또는 3개의 세포를 갖는 그룹을 의미한다. 유사하게, 1-5개의 세포를 갖는 그룹은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 세포를 갖는 그룹 등을 의미한다.

[0141] 본원에 언급되거나 인용된 모든 특허, 특허 출원, 가출원 및 간행물은 본 명세서의 명시적 교시와 일치하지 않는 범위 내에서 모든 도면 및 표를 포함하여 그 전체가 참고로서 원용된다.

도면

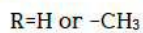
도면 1a



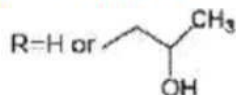
하나 이상의 R=설포부틸 에테르기(-C₄H₈SO₃⁻Na⁺) 또는 2-하이드록시 프로필기(-C₃H₆OH)인 베타-사이클로덱스트린

도면 1b

메틸 베타-사이클로덱스트린 (MβCD)



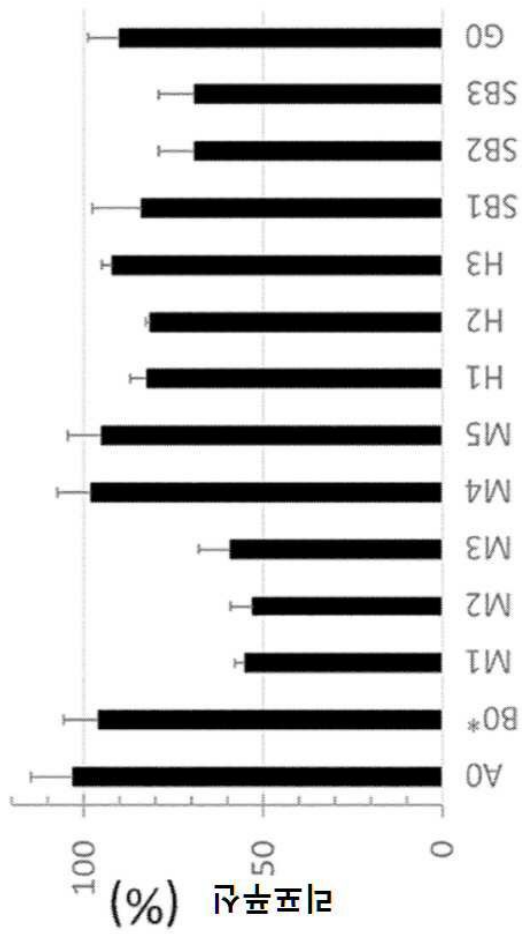
2-하이드록시프로필 베타-사이클로덱스트린 (HPβCD)



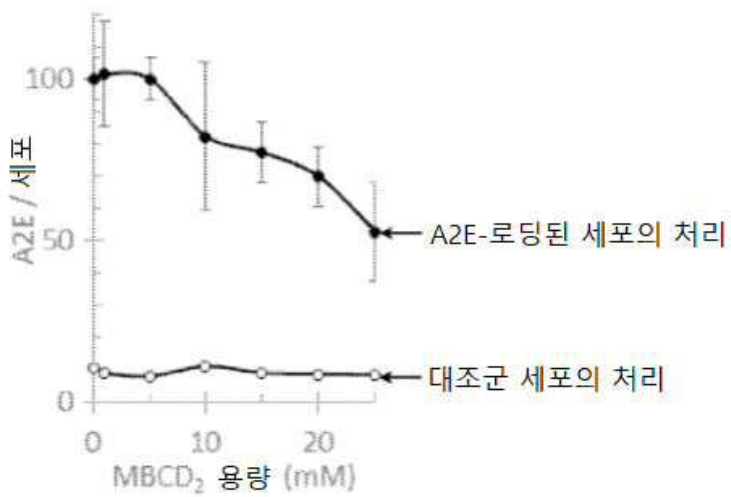
설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린 (SBEβCD)



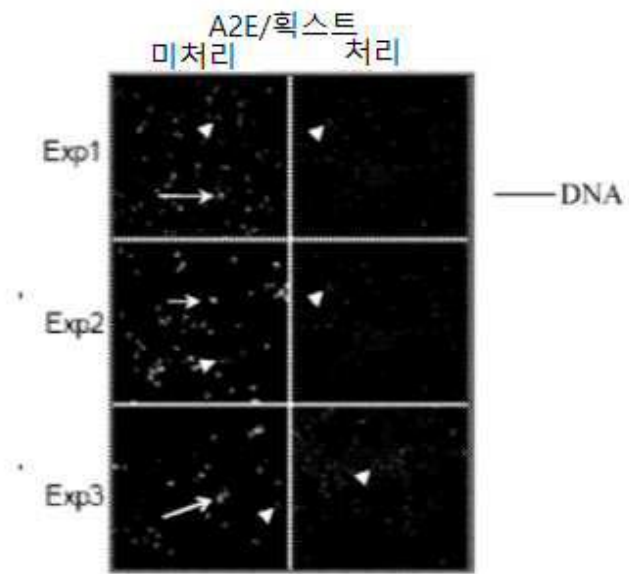
도면2



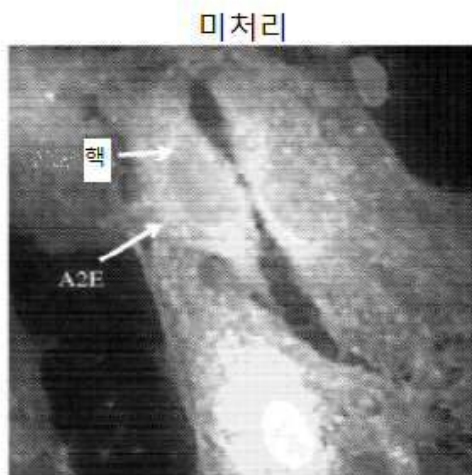
도면3a



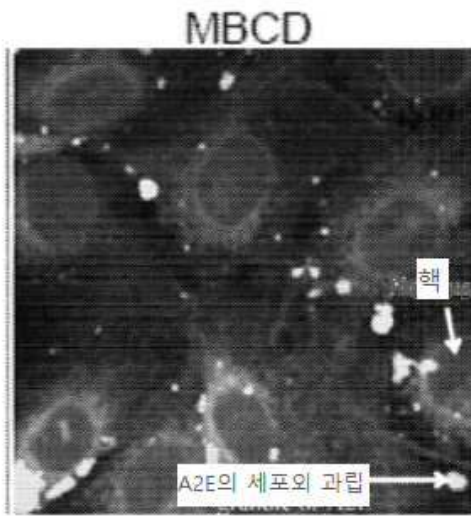
도면3b



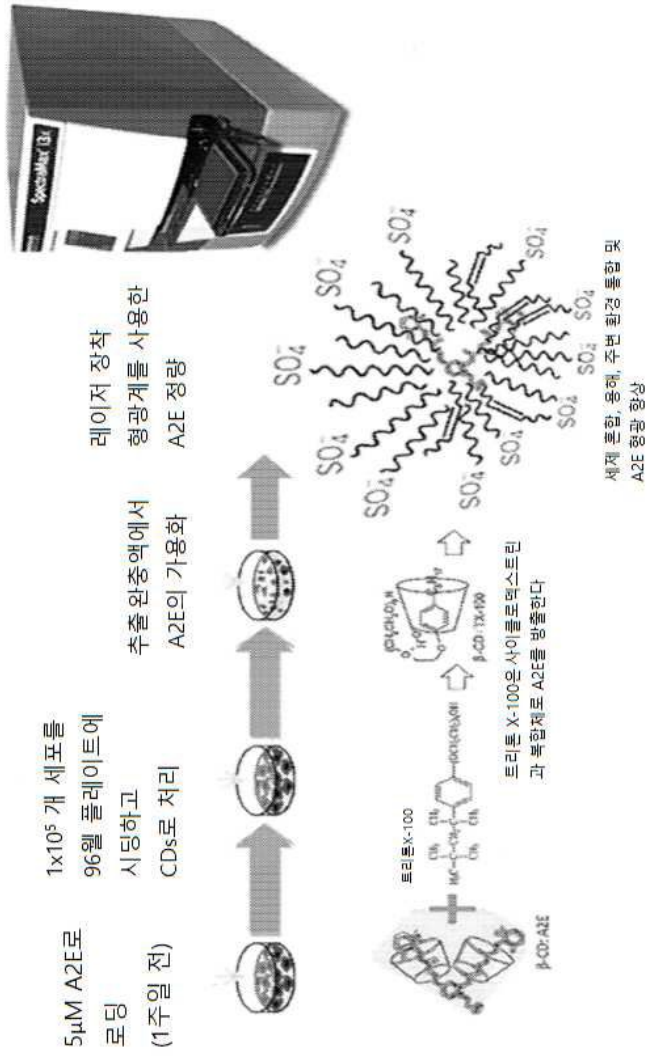
도면4a



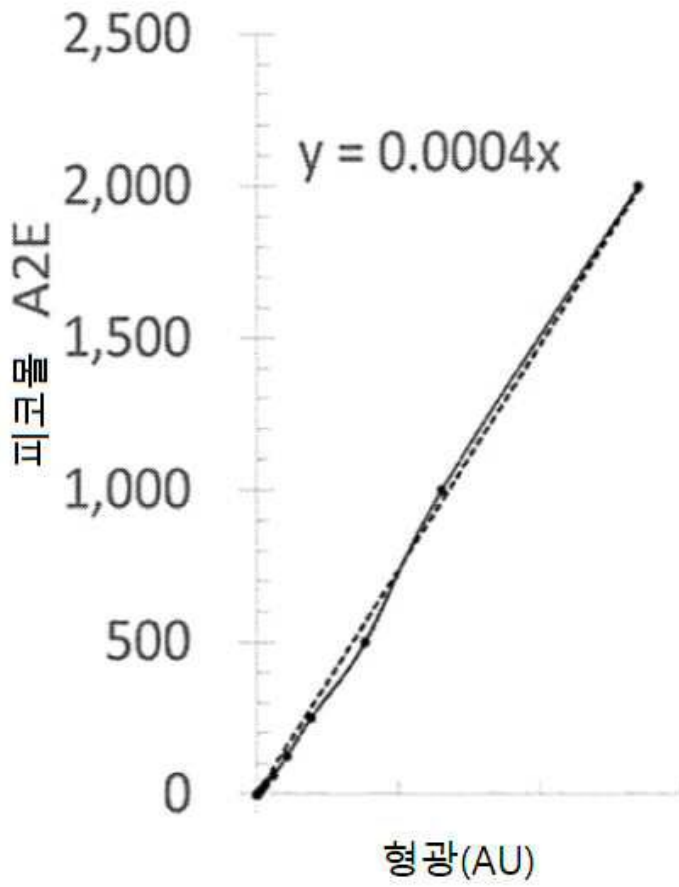
도면4b



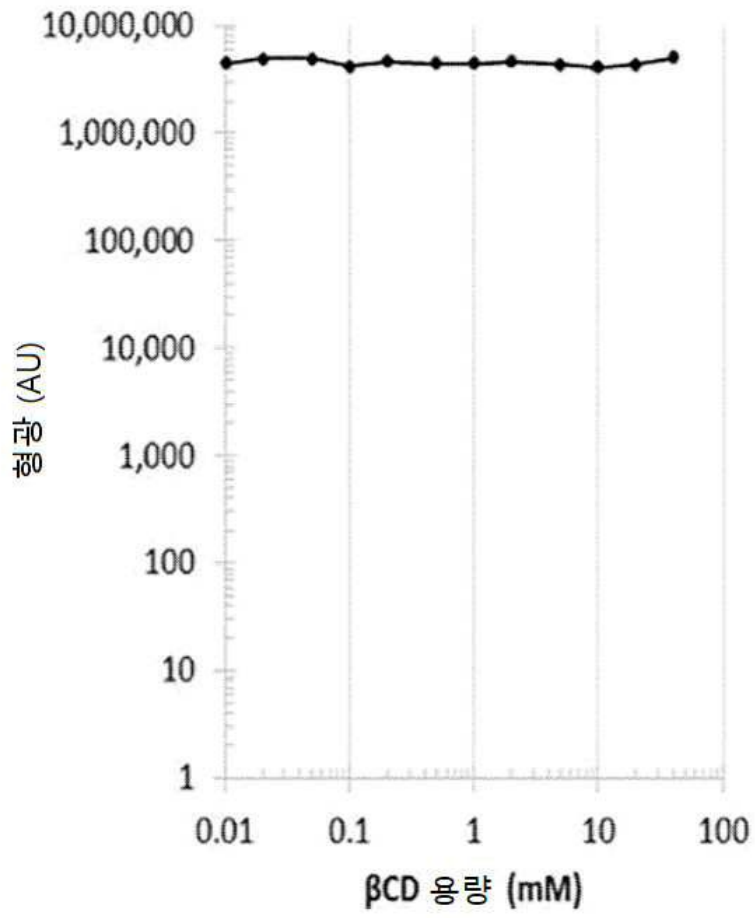
도면5a



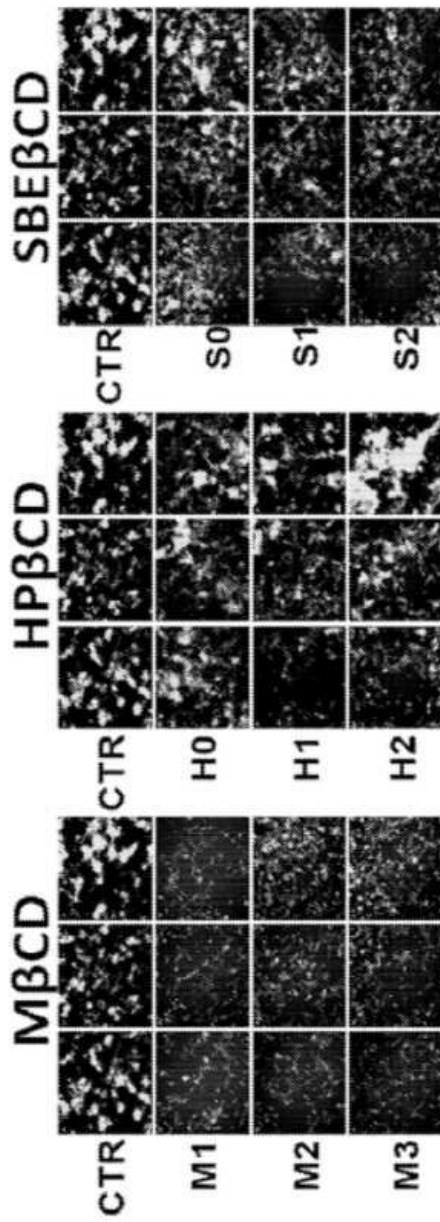
도면5b



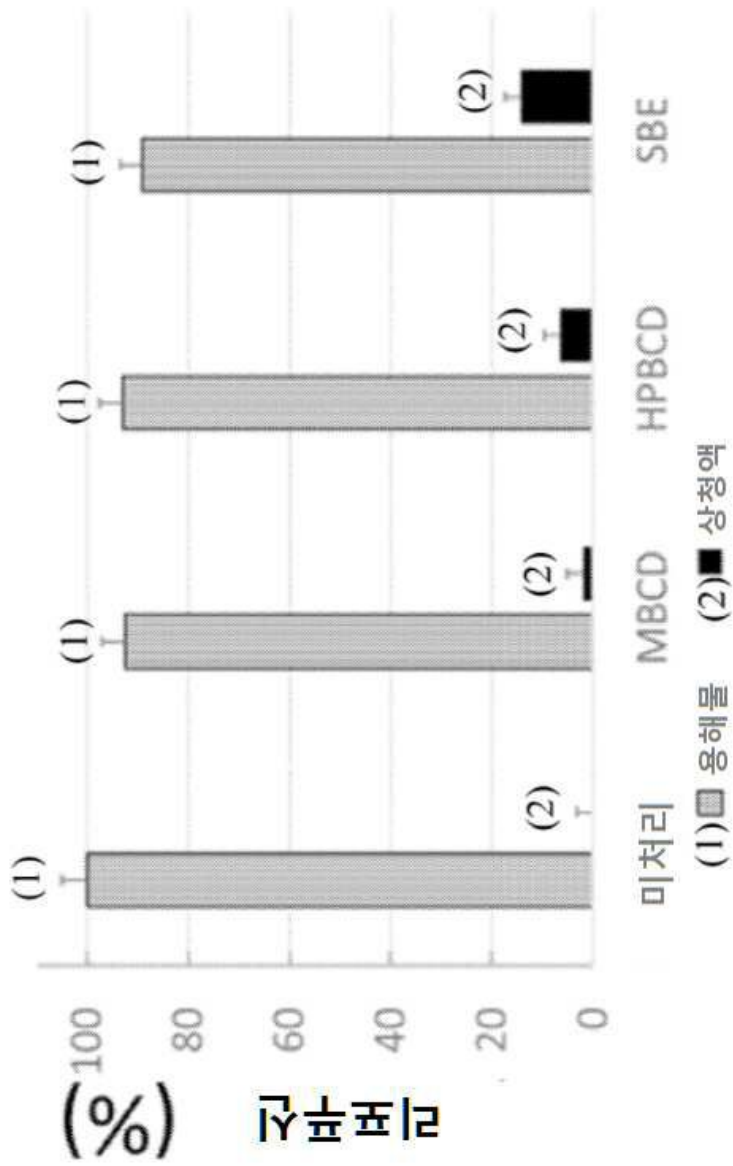
도면5c



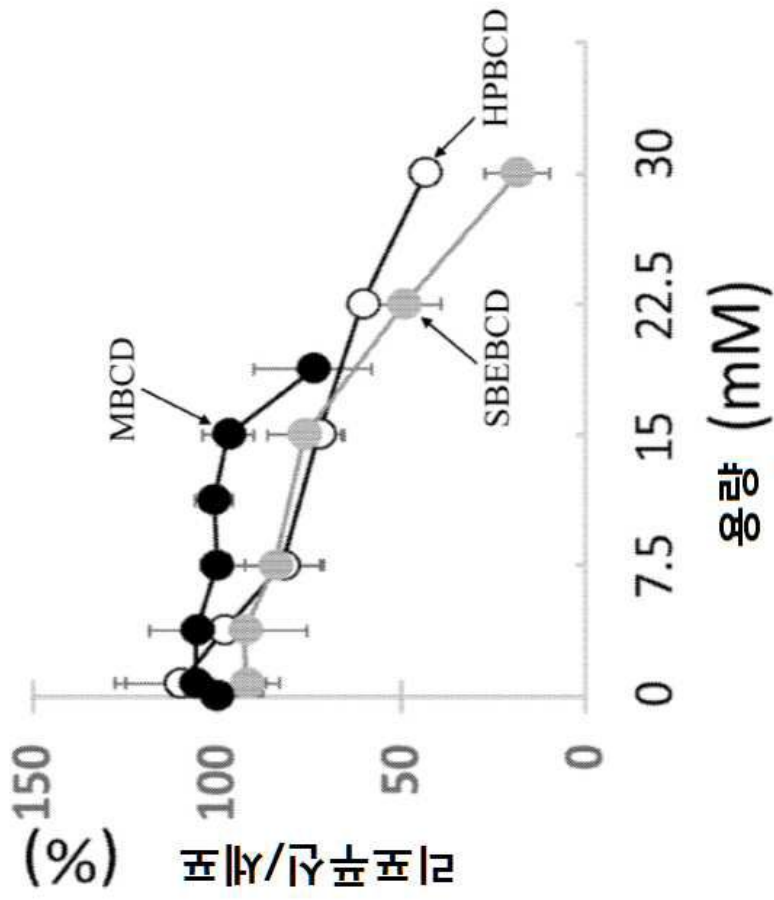
도면6



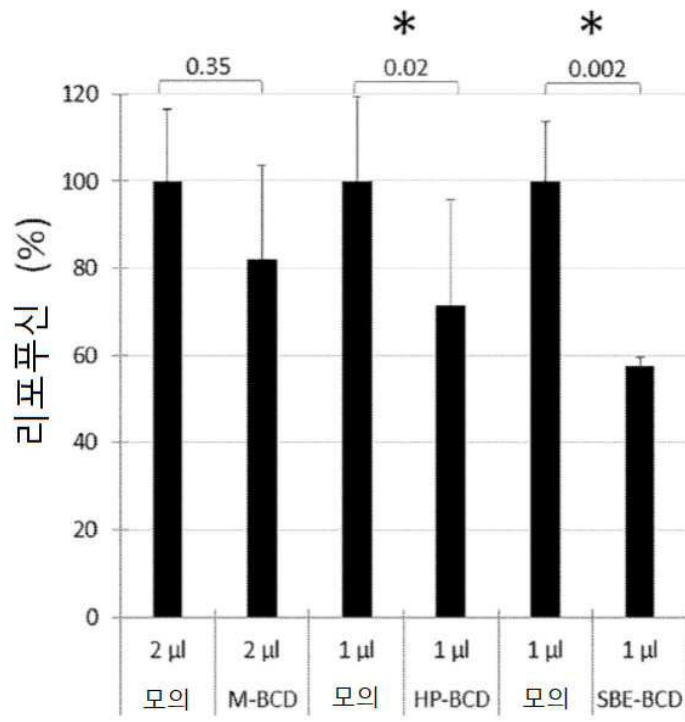
도면7



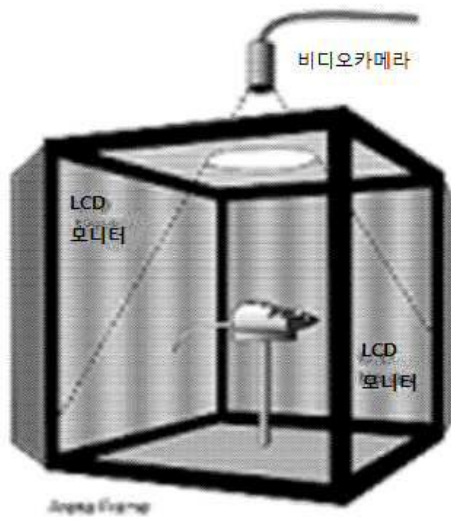
도면8



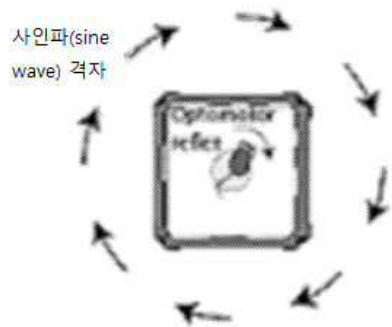
도면9



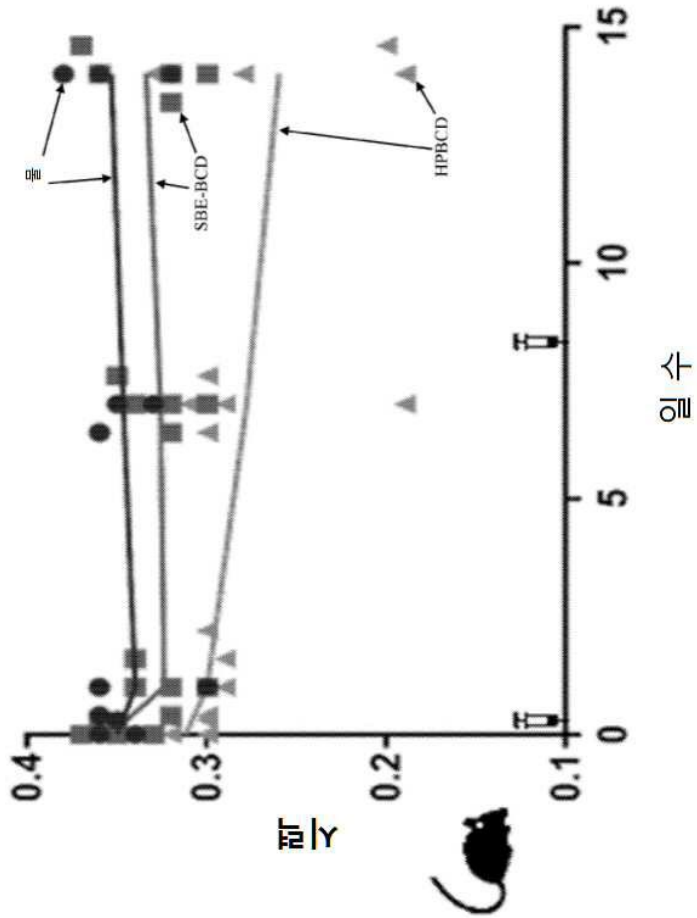
도면10a



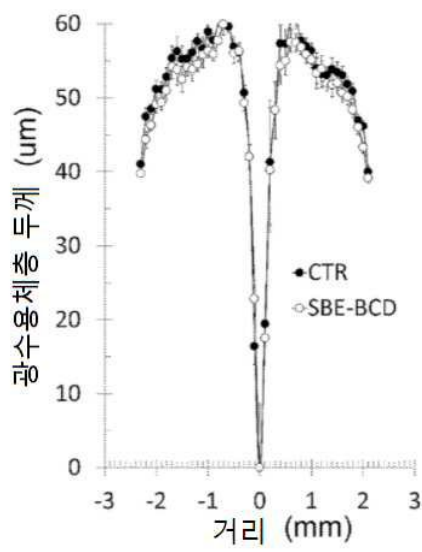
가상 광운동 시스템



도면10b



도면11a



도면11b

