(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0149564
(43) 공개일자 2021년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 31/573* (2021.01)
A61K 47/12 (2006.01) *A61P 27/16* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0046 (2013.01)
A61K 31/573 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0077764
(22) 출원일자 2020년06월25일
심사청구일자 2020년06월25일
(30) 우선권주장
1020200066399 2020년06월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박용호
대전광역시 중구 문화로 282 충남대학교병원 이비인후과
정성훈
대전광역시 중구 문화로 266 충남대학교의과대학 의과학과
(74) 대리인
특허법인주원

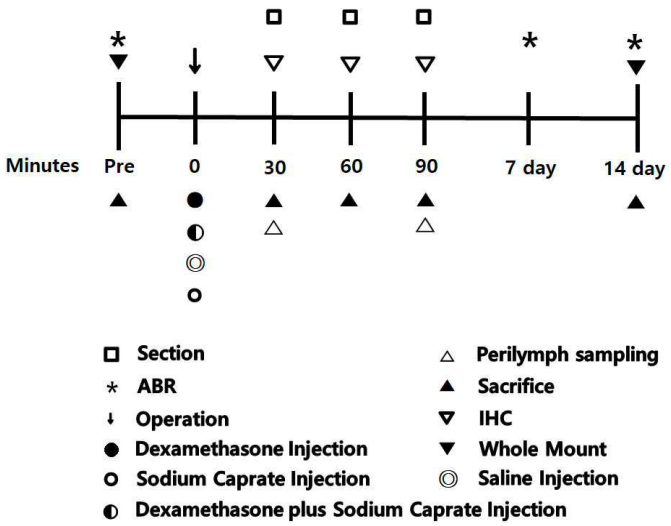
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **덱사메타손 및 소듐 카프르산을 포함하는 내이 전달용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 덱사메타손과 소듐 카프르산을 포함하는 내이 전달용 조성물에 관한 것으로, 덱사메타손의 전신투여로 인한 약물의 과다투여와 전신 부작용 없이 내이의 달팽이관으로 약물을 효과적으로 전달하기 위한 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/12 (2013.01)
A61P 27/16 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711084111
과제번호 2018R1A2B2005022
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업-중견연구
연구과제명 Mitochondria 기반 노화성 난청의 병인론 규명과 바이오마커 발굴
기 여 율 1/2
과제수행기관명 충남대학교 산학협력단
연구기간 2019.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711097237
과제번호 2019M3E5D1A02068573
부처명 다부처
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업-혁신형의과학자공동연구
연구과제명 청각기관에 효율적 약물전달을 위한 방출제어형 주입형 약물전달 제형 및 방법 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 충남대학교 산학협력단
연구기간 2019.07.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

덱사메타손 및 소듐 카프르산(sodium caprate)을 포함하는 내이 전달용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 소듐 카프르산은 달팽이관의 유모세포에 손상을 주지 않거나 청력의 변화에 영향을 주지않는 것을 특징으로 하는 내이 전달용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 소듐 카프르산은 1.94 mg/ml 농도로 투여되는 것을 특징으로 하는 내이 전달용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 덱사메타손과 소듐 카프르산은 와우의 정원창을 통해 투여되는 것을 특징으로 하는 내이 전달용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 덱사메타손과 소듐 카프르산은 고실내 주입(intratympanic injection)을 통해 투여되는 것을 특징으로 하는 내이 전달용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 달팽이관의 정원창의 세포투과율을 증가시켜 내이로 약물전달을 증가시키는 것을 특징으로 하는 내이 전달용 조성물.

청구항 7

덱사메타손 및 소듐 카프르산(sodium caprate)을 포함하는 덱사메타손의 전신투여로 인한 부작용이 발생하지 않는 제제.

청구항 8

제7항에 있어서, 덱사메타손과 소듐 카프르산은 와우의 정원창을 통해 투여되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 9

제7항에 있어서, 덱사메타손과 소듐 카프르산은 고실내 주입(intratympanic injection)을 통해 투여되는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 10

소듐 카프르산(sodium caprate)을 포함하는 덱사메타손 전신투여로 인한 부작용 감소용 조성물

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 덱사메타손 전신투여로 인한 부작용은 시상 하부-뇌하수체-부신 축 억제, 쿠싱 현상 및 대퇴골두 무혈성 괴사로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 덱사메타손 전신투여로 인한 부작용 감소용 조성물.

청구항 12

덱사메타손과 소듐 카프르산(sodium caprate)을 와우의 정원창에 투여하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 동물에서 전신투여로 인한 부작용 또는 청력 손상이 발생하지 않으면서 세포막의 투과성을 조절하여 내이 림프액내

덱사메타손의 전달을 증가시키는 방법

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 덱사메타손 및 소듐 카프르산을 포함하는 내이 전달용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 유모세포(hair cell)에 대한 보호 효과 및 항염증 효과로 인해, 덱사메타손은 급성 난청 또는 내이 손상 치료에 널리 적용되어왔다. 그러나 전신 투여 된 덱사메타손은 때때로 시상 하부-뇌하수체-부신 축 억제, 쿠싱 현상, 대퇴골두 무혈성 괴사 등과 같이 드물지만 심각한 부작용을 유발할 수 있다. 그래서 많은 이과 의사(otologist)들이 덱사메타손의 국소 투여에 초점을 맞추고 있으며, 내이 고막내 덱사메타손 주사의 보호 효과에 대한 많은 연구가 있었다. 소음 유발 청력 손실 뮤린 모델을 사용한 이전 연구에서, 중이에 주입된 글루코코르티코이드는 달팽이관 조직에서 글루코 코르티코이드 수용체의 발현에 의해 내이에 대한 항염증 및 보호 효과를 나타냈다

[0004] 중이와 내이는 귀 뼈뿐만 아니라 정원창과 난원창으로도 공간적으로 분리되어 있다. 귀 뼈는 매우 조밀 한 구조와 상당한 두께를 가지기 때문에 중이에서 내이로 dexamethasone의 전달이 정원창막의 투과성에 의해 조절된다고 말할 수 있다. 많은 분자들이 정원창막을 통해 중이에서 고실계단(scala tympani)으로 지나가는 것이 밝혀졌다.

[0005] 소듐 카프르산(sodium caprate)은 많은 기관에서 상피 조직의 세포 접합을 느슨하게 하여 투과성을 증가시키는 것으로 알려진 물질 중 하나이다. 이전 연구에서 기니피그 달팽이관 감각 상피는 소듐 카프르산으로 처리할 때 단단한 접합부가 느슨해지는 것으로 관찰되었다.

[0006] 같은 방식으로, 본 발명은 덱사메타손이 정원창막(round window membrane)을 통과하고 소듐 카프르산으로 처리할 때, 정원창막이 상피로 구성된 구조를 가지기 때문에 내이로 들어가기 쉽다는 가설을 세웠다. 본 발명은 소듐 카프르산으로 처리 후 정원창막 밀착연접(round window membrane tight junction)의 조절과 달팽이 관에서 덱사메타손 농도 변화를 포함하는 결과를 제시한다. 또한 본 발명은 내이에서 소듐 카프르산의 안전성을 기능적 및 조직병리학적 방식으로 검증하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1. Sci Rep. (2019) 9: 12646.

(비특허문헌 0002) 2. Hear Res. (2018) 362: 25-37.

(비특허문헌 0003) 3. Mol ther. (2014) 22: 873-880.

(비특허문헌 0004) 4. Otolaryngol Head Neck Surg. (2019) 161: S1-S45.

(비특허문헌 0005) 5. Plos One. (2018) 13: e0195230.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 덱사메타손과 소듐 카프르산을 포함하는 조성물이 유모세포(hair cell)에 대한 독성 또는 청력의 변화와 같은 부작용 없이 내이의 달팽이관내 외림프액(perilymph)으로 덱사메타손 전달효율을 증가시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0011]

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 덱사메타손 및 소듐 카프르산(sodium caprate)을 포함하는 내이 전달용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 덱사메타손 및 소듐 카프르산(sodium caprate)을 포함하는 덱사메타손의 전신투여로 인한 부작용이 발생하지 않는 제제를 제공한다.

[0014] 본 발명은 소듐 카프르산(sodium caprate)을 포함하는 덱사메타손 전신투여로 인한 부작용 감소용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 덱사메타손과 소듐 카프르산(sodium caprate)을 와우의 정원창에 투여하는 단계를 포함하는 인간을 제외한 동물에서 전신투여로 인한 부작용 또는 청력 손상이 발생하지 않으면서 세포막의 투과성을 조절하여 내이 림프액내 덱사메타손의 전달을 증가시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 덱사메타손과 소듐 카프르산을 포함하는 내이 전달용 조성물은 덱사메타손의 전신투여로 인한 약물의 과다투여와 전신 부작용을 방지하고, 내이의 달팽이관으로 약물을 효과적으로 전달하여 급성 청각 손상 또는 다양한 내이 손상에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 일 구현 예에 따른 실험 디자인의 개요를 나타낸 것이다.청성뇌간반응(auditory brainstem response) 기준점은 세가지 시간에서 측정하였다: 수술전, 수술후 7일 및 14일. 식염수(saline), 소듐 카프르산, 덱사메타손에 소듐 카프르산이 존재하거나 존재하지 않는 주사는 수술동안 주입되었다. 달팽이관내 외림프액(perilymph)과 조직은 수술전과 수술후 30분, 60분, 90분, 7일 및 14일에 수거하여 생화학적 분석, 면역조직화학염색, LC-MS/MS(liquid chromatography/tandem mass spectrometry)를 수행하였다.

도 2는 본 발명의 일 구현 예에 따른 ZO-1(녹색)으로 염색한 소듐 카프르산 투여후 정원창막의 변화를 콘포칼 현미경 이미지로 나타낸 것이다. (A) 대조군; 소듐 카프르산을 투여하지 않은 대조군 귀는 세포 사이에서 간극(gap)이 없었다. (B) 소듐 카프르산 투여후 30분; 소듐 카프르산 투여후 30분에 세포의 연결(junction)은 형태학적 변화를 나타내었고, 세포사이의 세포연결 파괴와 같은 간극을 나타내었다(노란색 화살표 머리). (C) 소듐 카프르산 투여후 60분; 소듐카프르산 투여후 60분에 조직(B)보다 간극이 더 커졌고(흰색 화살표 머리), 세포는 더욱 불규칙한 형태를 나타내었다. (D) 소듐 카프르산 투여후 90분; 소듐 카프르산 투여후 90분에 세포의 형태는 간극이 없어진 것으로 보였다(흰색 화살표 머리). Scale bar=20 μm. 모든 샘플은 중이 부위로부터 촬영되었다.

도 3은 본 발명의 일 구현 예에 따른 소듐 카프르산 투여후 30분(C, D) 또는 투여하지 않은 경우(A, B)에 대한 정원창막투과전자현미경(transmission electron microscopy; TEM) 이미지를 나타낸 것이다. 소듐 카프르산을 투여하지 않은 정원창막(A, B)에서 세포 연결사이에 간극은 없었다. 그러나, 소듐 카프르산을 투여후 30분에 정원창막에서 연결은 느슨해졌고 세포 사이의 간극이 보였다(흰색 화살표머리). Section size = 100nm. Scale bar = 0.5μm. ST = Scala Tympani(고실계). ME = Middle Ear(중이)

도 4는 본 발명의 일 구현 예에 따른 덱사메타손 단독(파란색 막대) 또는 덱사메타손과 소듐 카프르산(빨간색 막대)을 투여한 후 달팽이관내 외림프액에서 덱사메타손의 농도를 LC-MS/MS로 측정한 결과를 나타낸 것이다. 덱사메타손 단독(파란색 막대) 또는 덱사메타손과 소듐 카프르산(빨간색 막대)을 투여한 후 30분 또는 90분에 외림프액에서 덱사메타손의 농도는 의미있게 증가하였다. 모든 그래프는 평균±표준편차(SD)로 나타내었고, n=3이었다. *p<0.05

도 5는 본 발명의 일 구현 예에 따른 흰쥐 달팽이관에서 덱사메타손의 위치를 나타낸 것이다. 조직은 덱사메타손(빨간색), DAPI(파란색)으로 염색하였고, 형광현미경(epifluorescence)로 촬영하였다. 30분 군에서 카프르산

을 투여하지 군(A)과 비교하여 투여한 군(B)에서 덱사메타손의 농도는 의미있게 증가하였다. 90분 군에서 카프르산을 투여하지 군(C)과 비교하여 투여한 군(D)에서 덱사메타손의 농도는 더욱 부각되었다. 또한, 카프르산을 투여하거나 투여하지 않은 군 모두에서 덱사메타손은 90분(C, D)보다 30분(A, B)에 내이로 전달되는 양이 증가하였다.

도 6은 본 발명의 일 구현 예에 따른 식염수(saline) 또는 소듐 카프르산의 ABR 기준점(auditory brainstem response thresholds)을 나타낸 것이다. ABR 기준점은 식염수(파란색 막대기) 또는 소듐 카프르산(빨간색 막대기)을 투여한 2 군에 대해 세가지 시간에서 측정하였다: 전처리, 수술후 7일 및 14일. 투여후 7일에 식염수 군과 소듐 카프르산 투여군 사이에 의미있는 차이는 없었다. 또한, 14일에 2 군간에 7일의 결과와 유사하게 나타났다. 모든 그래프는 평균±표준편차(SD)로 나타내었고, n=3이었다.

도 7은 본 발명의 일 구현 예에 따른 식염수 투여(대조군; A1-A2) 또는 소듐 카프르산(B1-B2) 투여후 14일에 획득한 귀에서 달팽이관의 유모세포(hair cell; 빨간색)과 신경 섬유(녹색)의 온조직표본(whole mount)을 나타낸 것이다. 조직은 유모세포를 강조하기 위하여 미오신(myosin) VIIa(빨간색) 및 신경섬유를 시각화하기 위하여 NF-H(녹색; 신경미세섬유, neurofilament)를 염색하여 형광현미경으로 촬영하였다. 식염수 투여(A1-A2) 후 14일에 외부와 내부의 유모세포 및 신경 섬유는 대조군 귀에서 손상이 없었다. 소듐 카프르산을 투여한 군(B1-B2)에서 동일 시간대에 유무세포와 신경섬유는 식염수를 투여한 군과 같이 손상이 없었다. A1, B1: middle turn, A2, B2: basal turn, OHC: outer hair cell, IHC: Inner hair cell.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 바람직한 구현예에 대하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명에서는 구체적인 구성요소 등과 같은 많은 특정 사항들이 도시되어 있는데, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0022] 본 발명에서 용어, "예방"이라 함은 질환의 원인으로부터 발생을 억제하거나 지연시키는 것을 의미한다.

[0023] 본 명세서에서, "치료"라 함은 완전히 치유하지 않아도 증상의 진전 및/또는 악화를 억제하여 손상의 진행을 멈추거나, 또는 증상의 일부 혹은 전부를 개선하여 치유의 방향으로 유도하는 것을 의미한다.

[0024] 본 명세서에서, "내이"는 달팽이관 및 전정 미로, 및 달팽이관을 중이와 연결하는 정원창을 포함하는, 내이를 지칭한다.

[0025] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 덱사메타손 및 소듐 카프르산(sodium caprate)을 포함하는 내이 전달용 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 조성물에서 소듐 카프르산은 달팽이관의 유모세포에 손상을 주지 않거나 청력의 변화에 영향을 주지않는 농도로 사용되며, 이는 환자의 상태, 무게 등을 고려하여 임상의가 필요에 따라 선택할 수 있다.

[0027] 또한, 소듐 카프르산은 덱사메타손의 달팽이관내 외림프액(perilymph)으로 전달을 증가시키는 농도로 사용되며, 이는 투여받는 대상에서 어떠한 독성도 나타내지 않는 농도를 포함하는 것이다.

[0028] 덱사메타손과 소듐 카프르산의 투여경로는 내이로 약물을 전달할 수 있는 모든 경로를 포함하는 것이고, 바람직하게는 와우의 정원창을 통해 투여되는 것이며, 더욱 바람직하게는 고실내 주입(intratympanic injection)을 통해 투여되는 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 소듐 카프르산이 덱사메타손의 내이 전달을 용이하게 하는 것은 달팽이관의 정원창의 세포투과율을 증가시켜서 발생하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 조성물은 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물은 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0032] 내이 질환을 위한 현재 이용가능한 치료법 역시 부수적인 부작용의 위험을 갖는다. 예를 들어, 이용가능한 방법

은 약물의 다수의 일일 용량(예컨대, 고실내 주사 또는 주입)를 필요로 한다. 특정 경우, 다수의 일일 고실내 주사는 환자의 불편함 및 불이행을 유발한다. 특정 경우, 외이도에 투여된 귀 점적액을 통해 또는 고실내 주사를 통해 활성제를 내이에 전달하는 것은 혈액-미로-장벽(BLB), 난원창 막 및/또는 정원창 막에 의해 제공되는 생물학적 장벽에 의해 방해를 받는다. 일부 경우, 활성제를 귀 점적액 또는 고실내 주사를 통해 내이에 전달하는 것은 내이 구조물에서 삼투압농도 불균형을 유발하거나, 미생물 또는 내독소 존재의 결과로서 감염 또는 다른 면역 장애를 도입하거나, 또는 영구적인 구조적 손상을 초래하여(예컨대, 고막의 천공), 청력 손실 등을 초래한다.

[0033] 치료제의 고실내 주사는 중이 및/또는 내이 내로 고막 뒤에 치료제를 주사하는 기술이다. 고실내 주사에 일부 과제가 남아 있다. 예를 들어, 내이 내 약물 흡수 부위인 정원창 막에 접근하는 것은 일부 경우 상당히 어렵다. 또한, 고실내 주사를 사용하는 현재의 요법은 외림프 및 내림프의 삼투압농도 및 pH를 변화시키는 것, 내이를 직접 또는 간접적으로 손상시키는 병원체 및 내독소를 도입하는 것을 다루지 않는다.

[0034] 본원에 기재된 조성물의 국소 투여는 활성제의 전신 투여로 인한 잠재적인 부작용을 피한다. 일부 경우, 본원에 기재된 국소 적용된 조성물은 귀 구조물과 양립가능하다. 이러한 양립가능한 귀 구조물은 외이, 중이, 및/또는 내이와 관련된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 귀 제제 및 조성물은 원하는 귀 구조물, 예컨대 달팽이관 영역에 직접 투여되거나, 또는 달팽이관 영역의 경우, 예를 들어, 비제한적으로 정원창 막, 달팽이창능선 또는 난원창 막을 포함하는, 귀 구조물의 영역과 직접 통신하는 구조물에 투여된다.

[0035] 특정 경우, 본원에 개시된 조성물은 제제로부터 약물의 일정한 방출 속도를 제공하고 귀 장애를 겪고 있는 개인 또는 환자의 내이에 귀 활성제의 노출의 일정한 연장된 공급원을 제공하여, 다른 치료 방법(예컨대, 귀 점적액 및/또는 다수의 고실내 주사)와 관련된 임의의 가변성을 감소시키거나 제거하는 제어 방출 제제 또는 조성물이다.

[0036] "담체 물질"은 귀 제제, 중이, 내이 및 귀 허용가능한 약제학적 제제의 방출 프로파일 특성과 양립가능한 부형제이다. 이러한 담체 물질은, 예컨대, 결합제, 현탁제, 붕해제, 충전제, 계면활성제, 가용화제, 안정화제, 윤활제, 습윤제, 희석제 등을 포함한다. "귀 약제학적으로 양립가능한 담체 물질"은, 비제한적으로, 아카시아, 젤라틴, 콜로이드성 이산화규소, 칼슘 글리세로포스페이트, 젖산칼슘, 말토덱스트린, 글리세린, 규산 마그네슘, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 카세인 나트륨, 대두 레시틴, 타우로콜린산, 포스파티딜콜린, 염화 나트륨, 제3인산칼슘, 제2인산칼륨, 셀룰로오스 및 셀룰로오스 접합체, 당 나트륨 스테아로일 락틸레이트, 카라기난, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 전호화 전분 등을 포함한다.

[0037] 용어 "희석제"는 전달 전에 귀 제제를 희석시키는데 사용되고 중이 및/또는 내이와 양립가능한 화학적 화합물이다.

[0038] "분산제," 및/또는 "점도 조절제" 및/또는 "증점제"는 액체 매질을 통한 귀 제제의 확산 및 균질성을 제어하는 물질이다. 확산 촉진제/분산제의 예는 비제한적으로 친수성 중합체, 전해질, 트윈® 60 또는 80, PEG, 폴리비닐피롤리돈(PVP; 플라스돈®으로 상업적으로 알려짐), 및 탄수화물계 분산제, 예를 들어, 하이드록시프로필 셀룰로오스(예컨대, HPC, HPC-SL, 및 HPC-L), 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스(예컨대, HPMC K100, HPMC K4M, HPMC K15M, HPMC E10M, 및 HPMC K100M), 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 프탈레이트, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 아세테이트 스테아레이트(HPMCAS), 비결정성 셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 트리에탄올아민, 폴리비닐 알콜(PVA), 비닐 피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체(S630), 산화 에틸렌 및 포름알데히드를 갖는 4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페놀 중합체(틸록사폴로도 알려짐), 폴록사머(예컨대, 산화 에틸렌 및 산화 프로필렌의 블록 공중합체인 Pluronics F68®, F88®, F108®, 및 F127®); 및 폴록사민(예컨대, 에틸렌디아민에 산화 프로필렌 및 산화 에틸렌의 순차적 첨가로부터 유래된 삼작용성 블록 공중합체인 폴록사민 908®로도 알려진 Tetronic 908®(BASF Corporation, Parsippany, NJ)), 폴리비닐피롤리돈 K12, 폴리비닐피롤리돈 K17, 폴리비닐피롤리돈 K25, 또는 폴리비닐피롤리돈 K30, 폴리비닐피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체(S-630), 폴리에틸렌 글리콜(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜은 약 300 내지 약 6000, 또는 약 3350 내지 약 4000, 또는 약 7000 내지 약 5400의 분자량을 가짐), 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트-80, 알긴산 나트륨, 검류, 예컨대, 검 트라가칸트 및 검 아카시아, 검 구아, 잔탄검을 포함하는 잔탄, 당류, 셀룰로오스 화합물, 예컨대, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트-80, 알긴산 나트륨, 폴리에톡실화된 소르비탄 모노라우레이트, 폴리에톡실화된 소르비탄 모노라우레이트, 포비돈, 카보머, 폴리비닐 알콜(PVA), 알긴산염, 키토산, 이산화규소, 및 이의 조합을 포함

한다. 셀룰로오스 또는 트리에틸 셀룰로오스와 같은 가소제가 또한 분산제로서 사용된다. 본원에 개시된 귀 제제의 리포좀 분산액 및 자기 유화 분산액에서 유용한 선택적인 분산제는 디미리스토일 포스파티딜 콜린, 달걀로부터의 천연 포스파티딜 콜린, 달걀로부터의 천연 포스파티딜 글리세롤, 콜레스테롤 및 이소프로필 미리스테이트이다. 일부 구현예에서, "분산제," 및/또는 "점도 조절제" 및/또는 "증점제"는 폴록사머가 아니다.

[0039] "약물 흡수" 또는 "흡수"는 국소 투여 부위, 단지 예로서, 내이의 정원창 막으로부터, 그리고 장벽(하기에 기재된 바와 같이 정원창 막)을 가로질러 내이 또는 내이 구조물 내로 귀 제제가 움직이는 과정을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "병용 투여" 등은 귀 제제를 단일 환자에게 투여하는 것을 포함하는 것을 의미하며, 귀 제제들이 동일하거나 상이한 투여 경로에 의해 또는 동일하거나 상이한 시간에 투여되는 치료 요법을 포함하도록 의도된다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 치료되는 질환 또는 병태의 증상 중 하나 이상을 어느 정도 완화할 것으로 예상되는 투여되는 귀 제제의 충분한 양을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 개시된 귀 제제의 투여 결과는 본원에 개시된 어느 하나의 질환 또는 병태의 징후, 증상, 또는 원인의 감소 및/또는 경감이다. 예를 들어, 치료적 용도를 위한 "유효량"은 과도한 부작용 없이 질환 증상의 감소 또는 개선을 제공하는데 필요한 본원에 개시된 바와 같은 제제를 포함하는 귀 제제의 양이다. 용어 "치료적 유효량"은, 예를 들어, 예방적 유효량을 포함한다. 본원에 개시된 귀 제제 조성물의 "유효량"은 과도한 부작용 없이 원하는 약리학적 효과 또는 치료적 개선을 달성하는데 효과적인 양이다. 일부 구현예에서, "유효량" 또는 "치료적 유효량"은, 투여된 화합물의 대사의 변화, 대상의 연령, 체중, 일반적인 상태, 치료되는 병태, 치료되는 병태의 중증도, 및 처방 의사의 판단 때문에, 대상마다 달라지는 것으로 이해된다. 일부 경우, 또한 연장 방출 투여 포맷에서의 "유효량"은 약동학 및 약력학적 고려사항에 근거하여 즉시 방출 투여 포맷에서의 "유효량"과 상이한 것으로 이해된다.

[0041] 본 발명의 조성물에서 소듐 카프르산은 덱사메타손을 내이로 전달할 수 있는 농도라면 모두 사용할 수 있고, 바람직하게는 1.94 mg/ml 이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상"은 동물, 바람직하게는 인간 또는 비인간을 포함하는 포유동물을 의미하기 위해 사용된다. 용어 환자 및 대상은 상호교환적으로 사용된다.

[0043] 달팽이관은 청력과 관련된 내이의 부분이다. 달팽이관은 달팽이를 닮은 모양으로 감긴 테이퍼드 튜브 유사 구조이다. 달팽이관의 내부는 전정 막 및 기저 막의 위치에 의해 추가로 정의되는 3개의 영역으로 나뉜다. 전정 막 위의 부분은 전정계(scala vestibuli)이며, 이는 난원창에서 달팽이관의 꼭대기까지 확장되고 칼륨이 낮고 나트륨 함량이 높은 수성 액체인 외림프 유체를 함유한다. 기저 막은 고실 계단 영역을 정의하며, 이는 달팽이관의 꼭대기에서 정원창까지 확장되고 또한 외림프를 함유한다. 기저 막은 정원창에서 달팽이관의 꼭대기까지 길이가 점진적으로 증가하는 수천개의 뻣뻣한 섬유를 함유한다. 기저 막의 섬유는 소리에 의해 활성화될 때 진동한다. 전정계 및 고실 계단 사이에는 달팽이관이 있으며, 이는 달팽이관의 꼭대기에 폐쇄된 주머니로서 끝난다. 달팽이관은 내림프 유체를 함유하며, 이는 뇌척수액과 유사하며 칼륨이 높다.

[0044] 본원에 기재된 조성물은 내이와 관련된 질환 또는 병태의 치료 및/또는 예방에 적합하다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 귀 질환 또는 병태, 예컨대 본원에 개시된 것 중 어느 하나의 증상을 감소, 역전 및/또는 개선한다. 이러한 장애 또는 병태는 많은 원인을 가지며, 이는 비제한적으로, 감염, 부상, 염증, 종양 및 약물 또는 다른 화학 물질에 대한 부작용을 포함한다.

[0045] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 메니에르병, 감각신경성 청력 손실, 소음성 청력 손실, 노인성 난청(연령 관련 청력 손실), 자가 면역 귀 질환, 이명, 이독성, 흥분독성, 내림프 수종, 미로염, 람세이헌트 증후군, 전정 신경염, 미세혈관 압박 증후군, 청각과민, 노인성 어지럼증, 중추 청각 처리 장애, 또는 청각 신경병증의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 달팽이관 이식물 성능의 개선에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 메니에르병의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 감각신경성 청력 손실의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 소음성 청력 손실의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 노인성 난청(연령 관련 청력 손실)의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 자가 면역 귀 질환의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 이명의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 이독성의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 흥분독성의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 내림프 수종의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 미로염의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 람세이 헌트 증후군의 치료 및/또는

[0046] 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 귀 제제 및 조성물은 전정 신경염의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 귀 제제 및 조성물은 미세혈관 압박 증후군의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 귀 제제 및 조성물은 청각과민의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 귀 제제 및 조성물은 노인성 어지럼증의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 귀 제제 및 조성물은 중추 청각 처리 장애의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 귀 제제 및 조성물은 청각 신경병증의 치료 및/또는 예방에 사용된다. 일부 구현예에서, 귀 제제 및 조성물은 달팽이관 이식물 성능의 개선에 사용된다.

[0047] 청력 손실은 청력에 부분적 또는 전체적인 손상이다. 청력 손실은 3개의 유형인 전도성 청력 손실, 감각신경성 청력 손실, 및 혼합성 청력 손실로 분류된다. 전도성 청력 손실은 소리가 외이도를 통해 고막 또는 귀청으로 효율적으로 전달되지 않을 때 발생한다. 일부 구현예에서, 전도성 청력 손실은 소리 수준의 감소 또는 희미한 소리를 듣는 능력을 포함한다. 치료는 교정 의학 또는 수술 절차를 포함한다. 감각신경성 청력 손실은 달팽이관(내이)에, 또는 달팽이관에서 뇌로의 신경 경로에 손상이 있을 때 발생한다. 이러한 유형의 청력 손실은 일반적으로 영구적인 청력 손실을 초래한다. 혼합성 청력 손실은 외이 및 내이 영역 모두를 따라 손상이 발생하는 전도성 청력 손실 및 감각신경성 청력 손실의 조합이다.

[0048] 감각신경성 청력 손실은 전정달팽이 신경(두개 신경 VIII으로도 알려짐), 또는 내이의 감각 세포에서의 결함(선천성 및 후천성)으로부터 비롯되는 청력 손실의 유형이다. 내이의 결함의 대부분은 귀 유모 세포의 결함이다.

[0049] 달팽이관의 무형성, 염색체 결함, 및 선천성 진주종은 감각신경성 청력 손실을 초래하는 선천성 결함의 예이다. 비제한적인 예로서, 염증성 질환(예컨대, 화농성 미로염, 수막염, 이하선염, 홍역, 바이러스 매독, 및 자가면역 장애), 메니에르병, 이독성 약물(예컨대, 아미노글리코시드, 루프 이뇨제, 항대사산물제, 살리실레이트, 및 시스플라틴)에 대한 노출, 물리적 외상, 노인성 난청, 및 음향 외상(90 dB을 초과하는 소리에 장기간 노출)은 모두 후천성 감각신경성 청력 손실을 초래한다.

[0050] 일부 경우, 감각신경성 청력 손실은 내이의 성분 또는 수반되는 신경 성분이 영향을 받고 신경을 함유할 때, 즉 뇌에서의 청각 신경 또는 청각 신경 경로가 영향을 받거나, 또는 감각 성분일 때, 발생한다. 감각 청력 손실은 유전적이거나, 또는 그것은 음향 외상(즉, 매우 큰 소음), 바이러스 감염, 약물 유도성 또는 메니에르병에 의해 유발된다. 일부 경우, 신경 청력 손실은 뇌 종양, 감염, 또는 다양한 뇌 및 신경 장애, 예컨대 뇌졸중의 결과로서 발생한다. 일부 유전 질환, 예컨대 레프섬병(분지된 지방산의 결함있는 축적)은, 또한 청력 손실에 영향을 미치는 신경 장애를 유발한다. 청각 신경 경로는 탈수초성 질환, 예컨대 특발성 염증성 탈수초성 질환(다발성 경화증 포함), 횡단 척수염, 데빅병(Devic's disease), 진행성 다초점 백색질뇌증(progressive multifocal leukoencephalopathy), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 만성 염증성 탈수초성 폴리신경병증 및 항-MAG 말초 신경병증에 의해 손상된다.

[0051] 일부 구현예에서, 치료제의 국소 전달은 전신 전달의 독성 및 수반되는 부작용을 극복한다. 일부 구현예에서, 전정 및 달팽이관 기관에의 접근은 중이를 통하며, 정원창 막, 난원창/등골족판, 환상 인대 및 이낭/측두골을 통한 것을 포함한다.

[0052] 본원에 포함된 귀 조성물 또는 제제는 또한 선택적으로 담체, 보조제, 예컨대 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제, 삼투압농도 압력을 조절하기 위한 염, 및/또는 완충제를 포함한다. 이러한 담체, 보조제, 및 다른 부형제는 외이, 중이 및/또는 내이에서의 환경과 양립가능하다. 따라서, 표적화된 영역 또는 부위에서 최소한의 부작용을 가지고 본원에 고려된 귀 장애를 효과적으로 치료하기 위해 이독성이 없거나 최소한의 이독성인 담체, 보조제 및 부형제가 특히 고려된다. 이독성을 예방하기 위해, 본원에 개시된 귀 조성물 또는 제제는, 비제한적으로 고실, 전정 골 및 막성 미로, 달팽이관 골 및 막성 미로 및 내이 내에 위치한 다른 해부학적 또는 생리학적 구조를 포함하는, 외이, 중이 및/또는 내이의 구별되는 영역에 선택적으로 표적화된다.

[0053] 귀 질환 또는 병태는 이구분해 또는 질환 또는 병태와 관련된 이구분해를 포함한다. 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 귀 소양증, 외이염, 이통, 이명, 현기증, 이충만감, 청력 손실, 또는 이의 조합이다.

[0054] 다른 귀 질환 또는 병태는 자가면역 내이 장애(AIED), 메니에르병, 내림프 수종, 소음성 청력 손실(NIHL), 감각신경성 청력 손실(SNL), 이명, 이경화증, 균형 장애, 현기증 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 귀와 관련된 질환 또는 병태는 메니에르병, 감각신경성 청력 손실, 소음성 청력 손실, 노인성 난청(연령 관련 청력 손실), 자가 면역 귀 질환, 이명, 이독성, 홍분독성, 내림프 수종, 미로염, 람세이 헌트 증후군, 전정 신경염, 미세혈관 압박 증후군, 청각과민, 노인성 어지럼증, 중추 청각 처리 장애, 청각 신경병증, 또는 달팽이관 이식물 성능의 개선을 포함한다.

[0055] 본 발명의 조성물은 귀 내로 주사하기 위한 치료제를 안정화시키기에 충분한 양의 소듐 카프르산을 포함한다. 일부 예에서 조성물은 귀에서 충분한 체류 시간을 제공하기에 충분한 양의 소듐 카프르산을 포함한다. 바람직하게는 50 중량% 내지 99.9 중량%의 소듐 카프르산을 포함하고, 더욱 바람직하게는 90 중량% 내지 95 중량%를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 점도 조절제를 추가로 포함할 수 있다. 적어도 하나의 점도 조절제는 이산화규소, 포비돈, 카보머, 폴록사머, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 일반적으로, 내림프는 외림프보다 더 높은 삼투질농도를 갖는다. 예를 들어, 내림프는 약 304 mOsm/kg H2O의 삼투질농도를 갖는 반면, 외림프는 약 294 mOsm/kg H2O의 삼투질농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 제제 또는 조성물은 약 250 내지 약 320 mM의 삼투압농도(약 250 내지 약 320 mOsm/kg H2O의 삼투질농도); 및 바람직하게는 약 270 내지 약 320 mM의 삼투압농도(약 270 내지 약 320 mOsm/kg H2O의 삼투질농도)를 제공하도록 제제화된다. 특정 구현예에서, 본 제제 또는 조성물의 삼투질농도/삼투압농도는, 예를 들어, 적절한 염 농도(예컨대, 칼륨 염의 농도)의 사용 또는 제제 또는 조성물을 내림프 양립가능하고/하거나 외림프 양립가능하게 만드는(즉, 내림프 및/또는 외림프와 등장성이게 만드는) 등장화제의 사용에 의해 조절된다. 일부 경우, 본원에 기재된 내림프 양립가능하고/하거나 외림프 양립가능한 제제 또는 조성물은 내이의 환경에 최소한의 방해를 유발하며, 투여시 포유동물에게 최소한의 불편함(예컨대, 현기증 및/또는 구역질)을 유발한다.

[0058] 유용한 귀 제제 또는 조성물은 조성물의 삼투질농도를 허용가능한 범위로 조절하는데 필요한 양의 하나 이상의 염을 포함한다. 이러한 염은 나트륨, 칼륨 또는 암모늄 양이온 및 염화물, 구연산염, 아스코르브산염, 붕산염, 인산염, 중탄산염트, 황산염, 티오황산염 또는 중아황산염 음이온을 갖는 것을 포함하며; 적합한 염은 염화나트륨, 염화칼륨, 티오황산나트륨, 아황산수소나트륨 및 황산암모늄을 포함한다.

[0059] 또한 본 발명은 소듐 카프르산(sodium caprate)을 포함하는 덱사메타손 전신투여로 인한 부작용 감소용 조성물을 제공한다.

[0060] 상기 덱사메타손 전신투여로 인한 부작용은 시상 하부-뇌하수체-부신 축 억제, 쿠싱 현상, 대퇴골두 무혈성 괴사를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0064] **<실시예 1> 실험동물**

[0065] 모든 동물실험은 충남대학교 동물실험 위원회(CNU-01116)에서 승인되었다. 전체 26마리 수컷 Spargue Dawley 흰쥐로 각 흰쥐의 무게는 250-300g인 것이 사용되었다. 정상 흰쥐는 실험목적에 따라 3 군으로 분류되었고, 이는 연결(junction) 조절(n=8), 덱사메타손 농도측정(n=12) 또는 소듐 카프르산의 부작용 측정(n=6)에 관한 것이었다. 연결 조절을 위한 군에서, 6 마리의 흰쥐는 양쪽 귀의 고실내ntratympanic) 투여에 사용되었다: 왼쪽 귀는 소듐 카프르산을 30분(n=2), 60분(n=2), 90분(n=2) 동안 투여된 후 콘포칼 현미경으로 촬영되었고, 오른쪽 귀는 소듐 카프르산으로 30분간 투여된 후 투과전자현미경으로 영상화하였다. 남은 흰쥐(n=2)는 대조군(무처리군)으로 사용되었다.

[0066] 12 마리의 흰쥐는 양쪽 귀를 수술 후 덱사메타손(n=6) 또는 덱사메타손과 소듐 카프르산(n=6)을 30분 또는 90분 동안 주입받았다. 약물투여 후 각 달팽이관내 외림프액(cochlear perilymph fluid)을 LC-MS/MS로 측정하였고, 각 달팽이관 조직은 면역조직화학염색에 사용되었다. 소듐 카프르산의 효과를 측정하기 위하여 6 마리의 흰쥐의 양쪽 귀에 식염수(n=3) 또는 소듐 카프르산(n=3)을 고실내 주입(intratympanic injection) 방식으로 투여하였고, 청성뇌간반응(auditory brainstem response; ABR)을 수술전, 수술후 7 일 또는 14 일에 3회 측정하였다. 14일에 유모세포 및 신경(온조직표본; whole mount) 생존의 측정을 위해 모든 달팽이관 조직을 샘플링하였다. 시험 스케쥴은 도 1에 나타낸 바와 같다.

[0068] **<실시예 2> 조직 준비 및 면역조직화학염색**

[0069] 정원창막 세포의 밀착연접(tight junction) 또는 달팽이관내 덱사메타손의 위치를 측정하기 위하여 고실내 주입 방식으로 덱사메타손 또는 소듐 카프르산을 내이로 투여한 후 30, 60 또는 90 분에 동물을 희생하였다. 깊은 마취 후 참수한 다음 관자놀이 뼈(temporal bone)를 제거하고 내이의 유액공간(fluid space)는 4% 파라포름알데히드를 포함하는 PBS로 30분동안 4℃에서 관류시켰다. 반응후 뼈의 벽을 제거하고 면역조직화학염색을 위하여 섹션하였다.

[0070] 조직은 30분간 PBS로 세척하고 10% Normal Goat Serum(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)과 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louise, MO)이 함유된 PBS로 1시간 동안 반응시켜 비특이적 항체 결합을 제거하였다. 블록킹 후 조직은 생쥐 항-ZO-1 1차 항체(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)를 1:100으로 희석한 것이나 토끼 항-덱사메타손 1차 항체(abcam, Cambridge, MA)를 1:200으로 희석하여 밤새 4℃에서 염색하였다. PBS로 1시간 동안 세척하였다. 세척 후 조직은 AlexaFluor 488 염소 항-생쥐 2차 항체(Molecular Probes, Eugene, OR) 또는 AlexaFluor 594 goat anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR)를 1:200으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 염색하였다. 30분간 PBS로 세척한 후 CrystalMount (Biomeda, Foster City, CA)를 사용하여 유리 슬라이드에 올렸다. Confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 또는 epiflourscence microscope (BX53F2, Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 조직을 관찰하였다.

[0071]

[0072] **<실시예 3> 투과전자현미경(trnasmission lectronic microscopy; TEM)**

[0073] 소듐 카프르산이 정원창막(round window membrane; RWM)에서 세포의 밀착연결을 느슨하게 하는지 알아보기 위하여, SD 흰쥐에 소듐 카프르산을 1.94 mg/ml 투여하거나 투여하지 않았다. 소듐 카프르산을 고실내 주입법으로 투여한 후 30분에 깊은 마취를 하여 동물을 희생시켰다. 채취한 달팽이관 조직을 2.5% 글루타르알데히드로 4℃에서 밤새 고정한 후 각 RWM을 수거하였다. RWM을 다시 1% OsO4 tetroxide 에서 2시간 동안 고정하였다. Ultra-Microtome (ULTRACUT UCT, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany, Installed at Korea Basic Science Institute)을 사용하여 100 nm로 섹션한 조직을 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하고, 탈수한 후 epoxy resin으로 임베딩하였다. 각 RWM을 grid 상에 마운트하여 TEM microscope (Tecnai G2 Spiri TWIN, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA)로 관찰하였다.

[0075] **<실시예 4> 달팽이관 절제술(cochleostomy)을 위한 동물 수술 및 고실내 주사(intratympanic injection)**

[0076] 수술하기 전 Alfaxalone(15mg/mL)과 Rumpun(23mg/mL) 조합으로 동물을 마취하였다. 리도카인(20 mg/mL)을 귓바퀴뒤 주사(retroauricular injection)로 추가 투여하였다. 마취된 동물은 온도조절 열 패드에서 첨단 위치(apical position)로 위치시키고, 귓바퀴뒤 절개를 형성하였으며, 인슐린 주사기를 사용하여 노출된 주변 혈관에서 혈액을 채취하였다. 관자놀이 뼈(temporal bone)를 노출시켜 정원창이 보이도록 열었다. 덱사메타손(5 mg/mL)을 인슐린 주사기로 주사하였다. 덱사메타손 주사 후 관자놀이 뼈의 노출된 부위를 카르복실레이트 시멘트로 막고 피부 절개를 닫았다. 이 실험을 수행하는 동안 죽은 동물은 없었다.

[0078] **<실시예 5> 달팽이관 액(cochlear fluid) 채취와 분석**

[0079] 각 군의 달팽이관에서 시간에 따른 덱사메타손의 농도를 알아보기 위하여 달팽이관의 정점에서 수술 후 30 분 또는 90 분에 채취한 외림프관액에서 약물의 농도를 측정하였다. 고실불룩(tympanic bulla)를 10 mL 식염수로 세척하였다. 달팽이관 정점의 점막을 제거한 후 날카로운 핏으로 작은 정점의 달팽이관 조직을 적출하고 hand-held graduated glass capillary tubes (IntraMARK micropipettes, BRAUBAND, Wertheim, Germany)로 외림프관액을 4㎕ 마다 수거하였다. 각 달팽이관의 유액 샘플과 표준 덱사메타손을 인공 외림프액 또는 50% 메탄올로 희석하였다. UHPLC/Tandem mass spectrometer (QTRAP 6500 Low Mass BL210251506, SCIEX, Framingham, MA)을 포함하는 operator system(QTRAP 6500, SCIEX, Framingham, MA)을 사용하여 외림프관액에 포함되어 있는 덱사메타손의 농도 분석을 위하여 LC-MS/MS를 사용하였다. 샘플은 C18 column (Atlantis dC18 Column, Waters, Milford, MA)에 solvent A, 0.1% formic acid/DW and solvent B, MeOH 순의 용매를 사용하여 주입되었다. 유속

은 0.3 ml/min 였고, 결과 스캔은 MRM (Multiple reaction mornitoring)을 사용하였다.

[0081] **<실시예 6> 청성뇌간반응(auditory brainstem response)**

[0082] 소듐 카프르산의 독성을 평가하기 위하여, Auditory brainstem respose(ABR) thresholds 이동을 4 에서 32 kHz에서 측정하였고 클릭 사운드는 양쪽 귀에서 평가하였다. ABR은 수술 전, 수술 후 7일 및 14일에 기록되었다. TDT System-3(Tucker Davies Technologies, Gainseville, FL, USA) 하드웨어와 소프트웨어을 사용하였고, 자극은 컴퓨터로 생산한 tone tips 였다. 마취는 알팍살론과 럼푼의 조합으로 근육내 주사하였고, 피하 바늘 전극을 두개골의 꼭대기와 양쪽 귓바퀴 뒤 영역에 삽입하였다. 클릭과 톤 자극은 4 ms 지속시간과 1 ms의 증감시간으로 4, 8, 16 및 32 kHz에서 수행하였다. 사운드 밀도는 한계점 근처에서 tone burst sounds 는 10-dB 간격으로, 클릭 사운드는 5-dB 간격으로 진행하였다. 파형은 연구자 블라인드 테스트로 custom program(Biosig RP, ver.4.4.1; Tucker Davis Technologies)으로 분석되었고, 한계점은 가장 낮은 자극 밀도로 0.2 mV 이상의 wave III 반응을 야기시키도록 정의하였다. 한계점 이동은 수술전 또는 수술후 값의 차이로 정의하였다.

[0084] **<실시예 7> 유모세포(hair cell)과 신경 섬유의 생존**

[0085] 달팽이관 유모 세포(cochlear hair cells) 및 신경 섬유의 생존을 측정하기 위하여 식염수 또는 소듐 카프르산의 고실내 투여후 14일에 동물을 희생하였다. 깊은 마취 동안 참수한 후 관자놀이 뼈를 제거하였고, 4% 파라포름알데히드를 포함하는 PBS로 4℃에서 30분간 내이 유액 공간을 관류하였다. 반응 후 골벽을 제거하고 조직은 면역조직화학염색을 위해 준비되었다.

[0086] PBS로 30분간 조직을 세척하고 10% Normal goat serum과 0.3% 트리톤 X-100을 포함하는 PBS에서 1시간 동안 비특이적 반응을 제거하기 위한 블록킹 과정을 수행하였다. 블록킹 후 monoclonal anti-Myo7a (Proteus BioSciences, Ramona, CA)과 anti-Neurofilament H (Sigma-Aldrich Co., St. Louise, MO)을 1:200으로 희석하여 4℃에서 밤새 염색하였다. PBS로 60분간 세척하였다. 세척 후 AlexaFluor 594 goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR)와 AlexaFluor 488 goat anti-chicken secondary antibody (Invitrogen-Molecular Probes, Eugene, OR)를 1:200으로 희색하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS로 15분간 세척한 후 CrystalMount를 사용하여 유리 슬라이드에 마운팅하였다. 형광현미경으로 조직을 관찰하였다.

[0088] **<시험예 1> 소듐 카프르산 투여로 인한 세포 밀접연결의 형태학적 변화**

[0089] 깊은 마취 상에서 소듐 카프르산을 30 분, 60 분 또는 90 분간 고실내로 주입하였다. 동물을 희생한 후 각 달팽이관을 분리하여 항 ZO-1 항체로 염색하였고, 콘포칼 현미경으로 관찰하였다.

[0090] 소듐 카프르산을 고실내 경로로 투여한 후 정원창막의 세포 밀접연결이 느슨해졌다. 세포의 연결은 투여전에 안정적이었다(도 2A). 그러나, 소듐 카프르산을 투여하고 30 분 사이에 연결이 변화하여 느슨해졌다(도 2B). 느슨해진 경우 세포의 형태가 변화하였고, 불안정해졌으며, 빈 공간이 전처리와 유사하게 나타났다. 60분 투여군에서 정원창막의 연결은 30분 투여군과 유사하게 유지되었지만(도 2C), 형태학적으로 30분군과 비교하여 더욱 안정되었다. 90분 투여군에서 세포의 연결과 형태는 의미있게 변화하였다. 이는 소듐 카프르산이 세포의 밀접 연결에 영향을 주어 변화시켰음을 나타내는 것이다.

[0092] **<시험예 2> 소듐 카프르산 투여로 인한 세포 밀접연결의 형태학적 변화: TEM**

[0093] 정원창막의 세포 밀접연결을 분석하기 위하여 TEM을 사용한 단면분석을 수행하였다. 비처리군의 정원창막에서 세포의 층은 서로 연결되어 있었다(도 3A, 3B). 소듐 카프르산을 30분간 투여한 군에서 정원창막의 세포 연결은 느슨해졌고, 여기서 세포의 층은 단순히 열렸을 뿐 전체 세포의 형태는 여전히 유지되었다. 이 결과는 소듐 카프르산이 세포를 파괴시킨 것이 아니라 단순히 세포 밀접 연결의 변화만을 유발한다는 것을 나타낸다.

[0095] **<시험예 3> 달팽이관 외림프액에서 덱사메타손의 농도: LC-MS/MS**

[0096] 덱사메타손 단독 또는 덱사메타손과 소듐 카프르산을 투여한 후 달팽이관에서 외림프액을 수거하였고, LC-MS/MS를 사용하여 각 조직에서 덱사메타손의 농도를 측정하였다(도 4A). 고실내 투여 후 30분에 외림프관액에서 덱사메타손의 농도는 소듐 카프르산을 추가한 경우에 의미있게 증가하였다. 90분 군에서 덱사메타손만 투여한 군과 비교하여 소듐 카프르산을 추가한 군에서 덱사메타손의 농도가 증가하였다. 이 결과는 달팽이관의 외림프액에서 덱사메타손의 농도는 소듐 카프르산에 의해 의미있게 증가된다는 것을 나타내는 것이다.

[0098] **<시험예 4> 덱사메타손 측정: 면역조직화학염색**

[0099] 각 달팽이관을 크로스섹션하여 덱사메타손 항체(빨간색)과 DAPI(파란색)으로 면역염색하였다. 덱사메타손으로 30분간 처리한 달팽이관에서 덱사메타손은 유모세포, 혈관부위(strai vascularises), 나선인대(spiral ligaments), 경계(limbuses) 및 달팽이관 신경(cochlear nerves)에서 관찰되었다(도 5A). 30분에 덱사메타손은 소듐 카프르산을 투여한 군에서 투여하지 않은 군과 비교하여 더 많이 관찰되었다(도 5B). 90분에 덱사메타손의 농도는 소듐 카프르산을 투여한 군(도 5D)에서 투여하지 않은 군(도 5C)보다 증가되었다. 또한, 관찰은 덱사메타손 단독 또는 소듐 카프르산과 병용 투여한 군의 양쪽 조직 모두에서 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 결과적으로, 덱사메타손이 외림프액에서 조직으로 전달되는 것이 소듐 카프르산이 투여되는 경우 의미있게 증가되는 보장되었다.

[0101] **<시험예 5> ABR 기준점 이동**

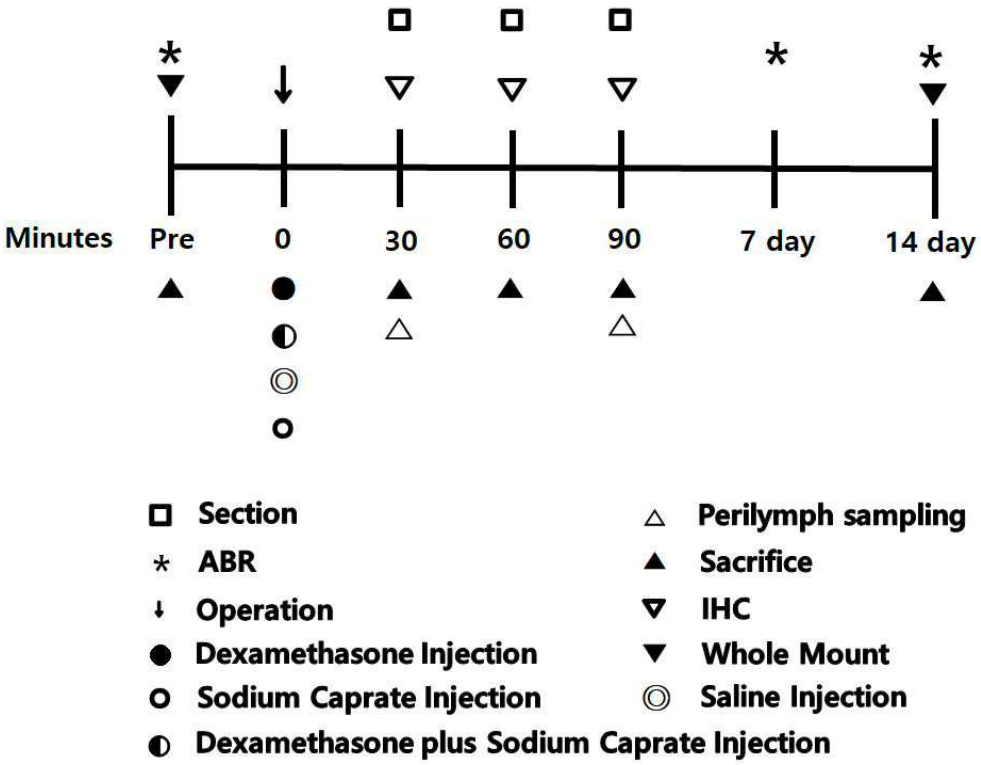
[0102] 수술 전과 수술 후 14일에 소듐 카프르산의 투여에 따른 청각 능력에 대한 부정적 영향이 있는지 여부를 확인하기 위하여 ABR 기준점 이동을 관찰하였다(도 6). 소듐 카프르산 투여에 따른 이동은 식염수 투여관과 비교하여 많이 다르지 않았다. 또한 소듐 카프르산을 투여한 쥐에서 ABR 기준점 이동에 따른 손상이 관찰되지 않았다. 이 결과는 소듐 카프르산을 내이로 투여한 동물에서 청각 능력에 부정적 효과가 없음을 나타내는 것이다.

[0104] **<시험예 6> 유모세포와 신경 섬유의 생존**

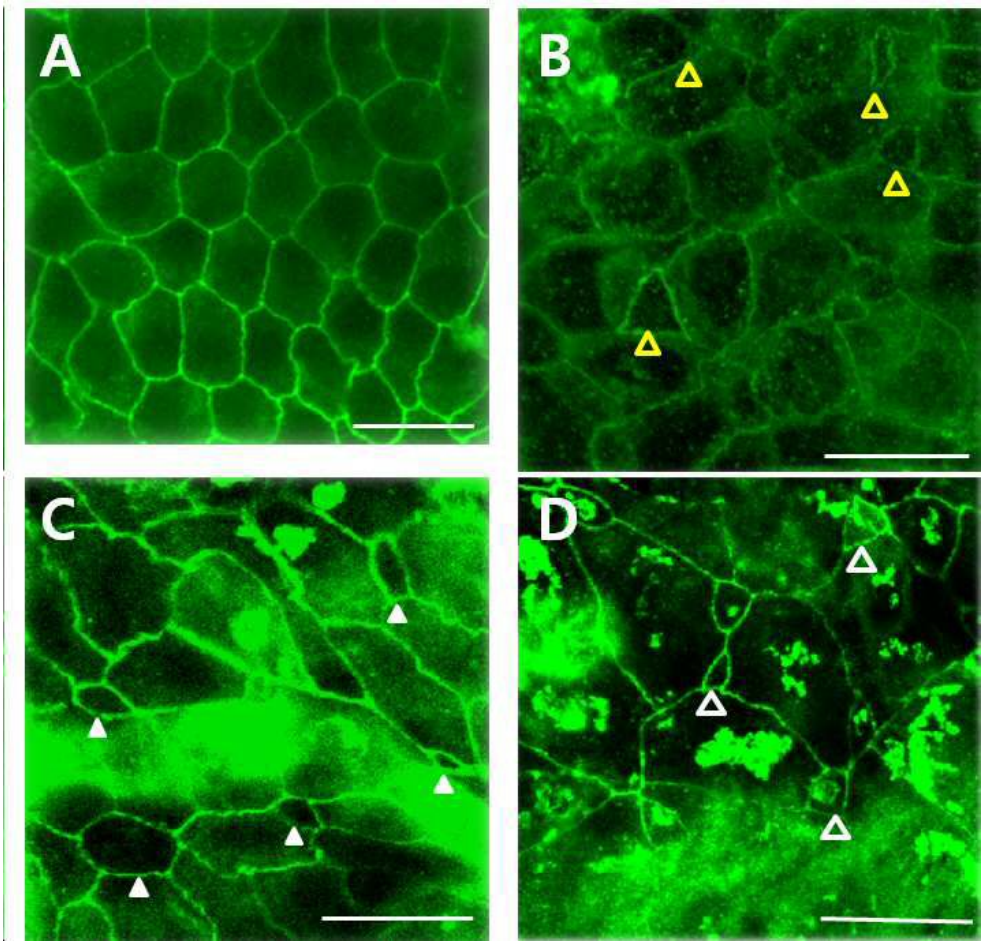
[0105] 각 동물에서 소듐 카프르산의 유모세포 및 신경 섬유에 대한 효과를 알아보기 위하여, 식염수 또는 소듐 카프르산 투여후 14일에 각 달팽이관을 분리하여 검사하였다. 소듐 카프르산을 투여받은 세포와 섬유(도 7B1~2)는 식염수 투여군(도 7A1~2)과 비교하여 다르지 않았다. 이 결과는 소듐 카프르산을 사용한 경우 청각 능력에 중요한 역할을 하는 조직에 별다른 영향일 미치지 않는다는 것을 나타내는 것이다.

도면

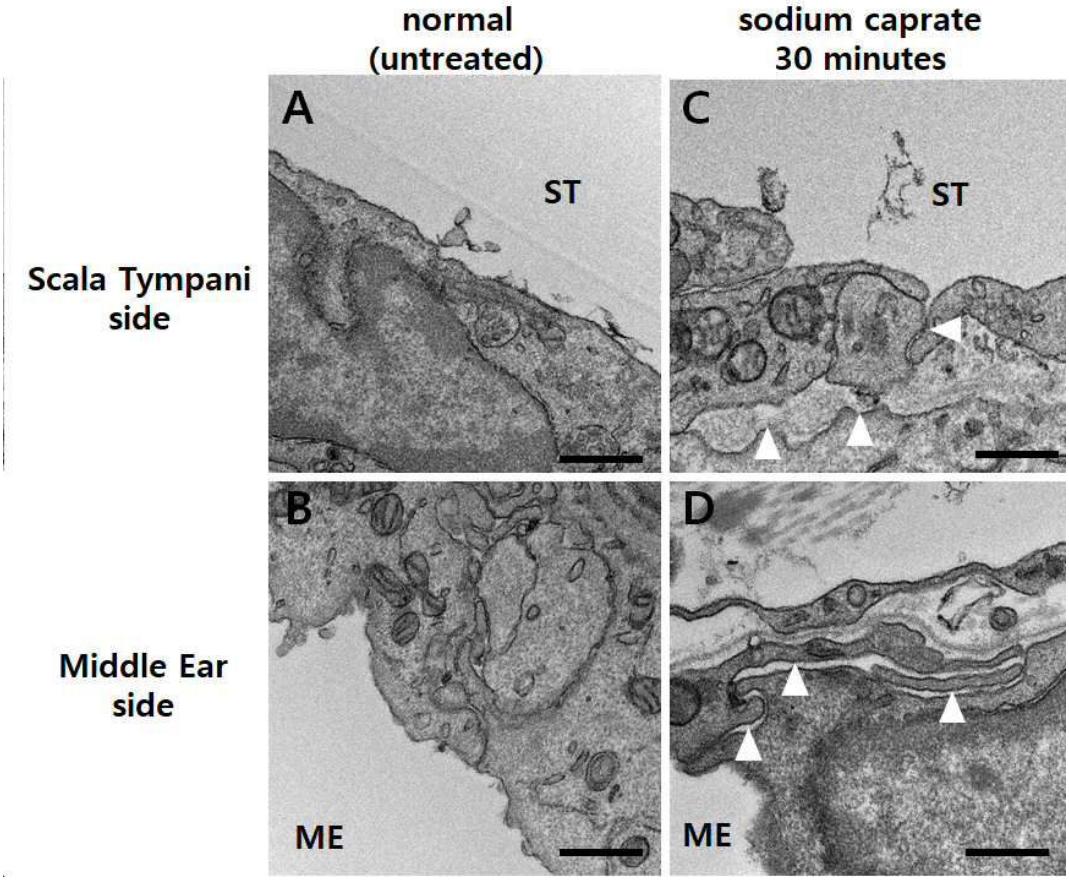
도면1


Minutes
Pre
0
30
60
90
7 day
14 day
Section
ABR
Operation
Dexamethasone Injection
Sodium Caprate Injection
Dexamethasone plus Sodium Caprate Injection
Perilymph sampling
Sacrifice
IHC
Whole Mount
Saline Injection

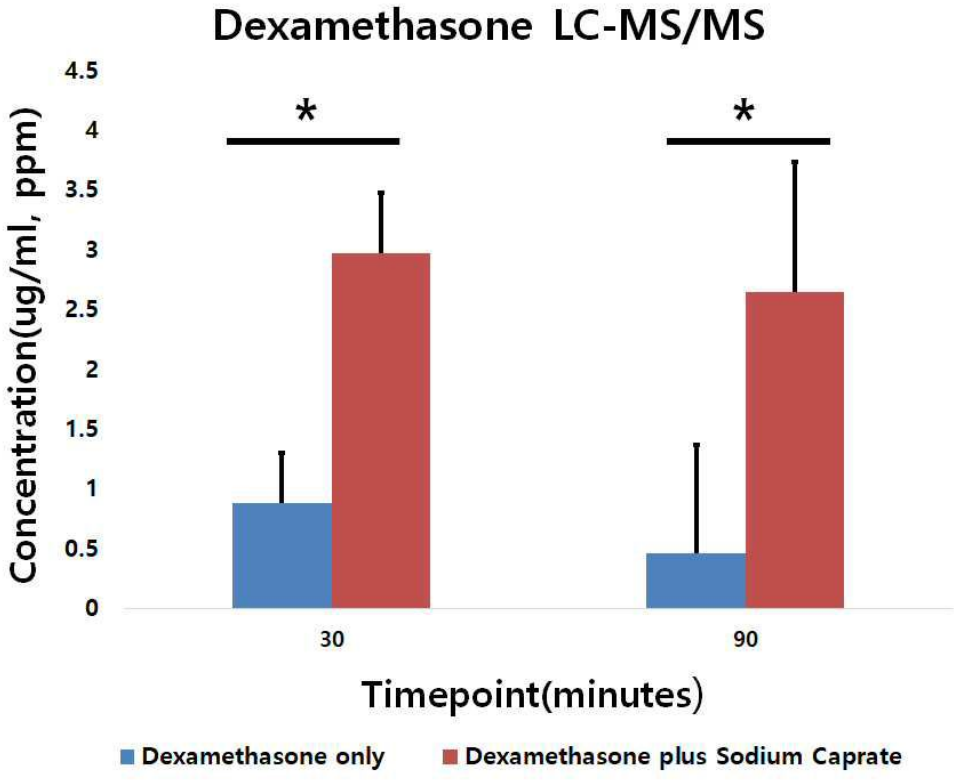
도면2



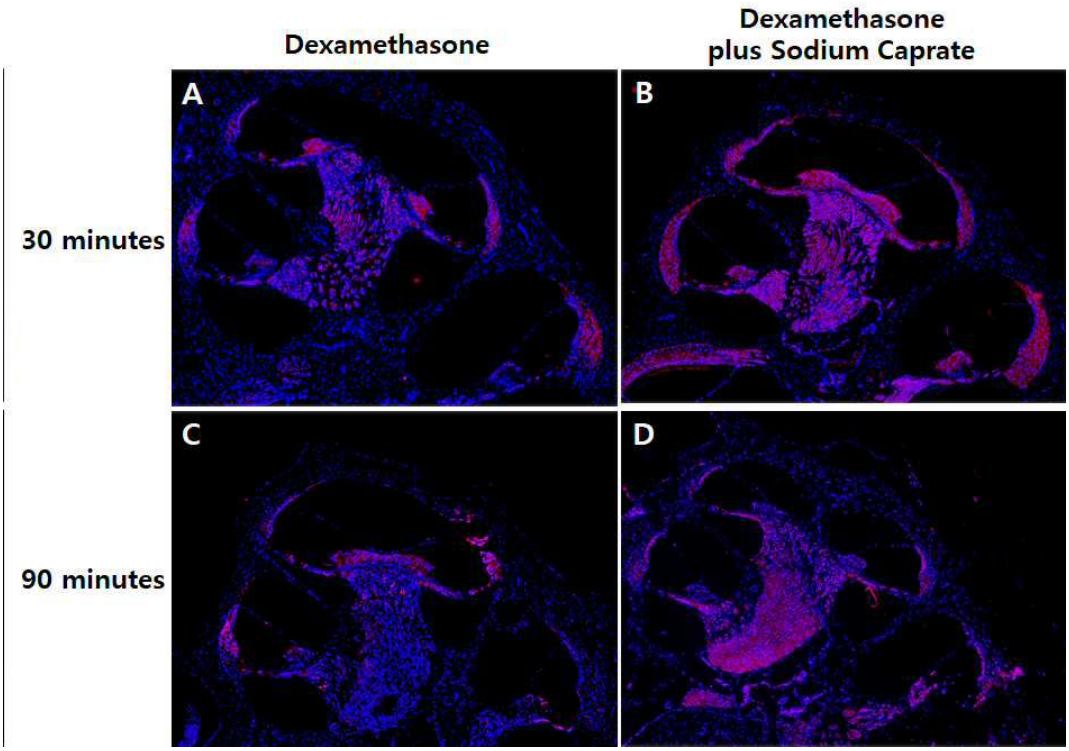
도면3


normal
(untreated)
sodium caprate
30 minutes
A
ST
C
ST
Scala Tympani
side
B
ME
D
ME
Middle Ear
side

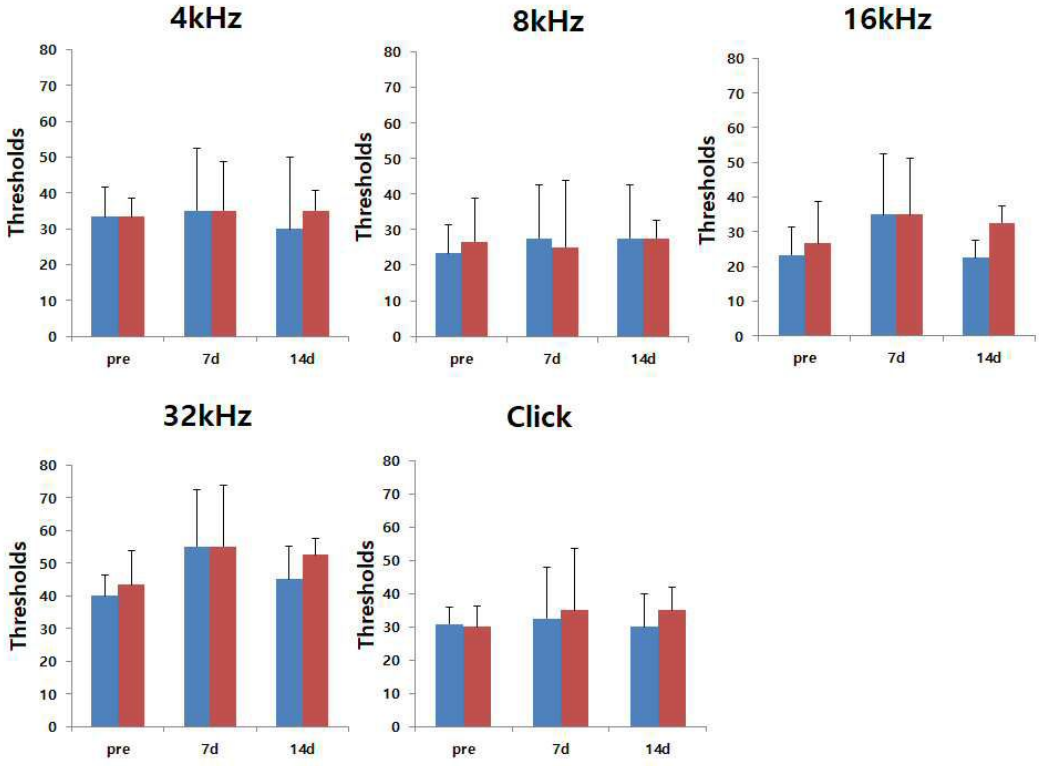
도면4


Dexamethasone LC-MS/MS
Concentration(ug/ml, ppm)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
30
90
Timepoint(minutes)
Dexamethasone only
Dexamethasone plus Sodium Caprate

도면5


Dexamethasone
Dexamethasone plus Sodium Caprate
30 minutes
90 minutes
A
B
C
D

도면6


4kHz
8kHz
16kHz
32kHz
Click
Thresholds
0
10
20
30
40
50
60
70
80
pre
7d
14d

도면7

