

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0072140

(43) 공개일자

2016년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/16 (2006.01) A61K 31/787 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1652 (2013.01)

A61K 31/787 (2013.01)

(21) 출원번호

10-2016-7011935

(22) 출원일자(국제)

2014년11월05일

심사청구일자

없음

(85) 번역문제출일자

2016년05월04일

(86) 국제출원번호

PCT/EP2014/073762

(87) 국제공개번호

WO 2015/067632

국제공개일자

2015년05월14일

(30) 우선권주장

13191742.9 2013년11월06일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

얀센 사이언시즈 아일랜드 유씨

아일랜드 코 코크 리틀 아일랜드 이스트게이트 이스트게이트 빌리지

(72) 발명자

클린게레르스 디디어 마리오 로테비즈크

벨기에 베-3511 스톡루이에 쿠일베르크슈트라트 26

반 디지크 알렉스 헨리

벨기에 베-3920 롬멜 스토크르지슈트라트 38

멘쉬 위르겐

벨기에 베-2430 라크달 메르라르슈트라트 189

(74) 대리인

특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **상기도 감염 치료용 폴리이노신산-폴리사이티딜산(폴리 (I:C)) 제형**

(57) 요약

본 발명은 상기도의 바이러스성 감염 또는 보통감기의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한, 폴리이노신산-폴리사이티딜산(폴리 (I:C)) 및 완두콩 전분, 전호화 감자 전분, 락토스, 미결정 셀룰로스, 히알루로네이트 또는 글루코사민 그룹으로부터 선택된 담체 중합체의 마이크로입자들을 포함하는 조성물, 및 감염 또는 보통감기의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 사용하기 위한, 상기 조성물을 포함하는 장치, 바람직하게는 비강 전달 시스템(nasal delivery system)에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0043 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

폴리이노신산-폴리사이티딜산(폴리 (I:C)) 및 완두콩 전분, 전호화 감자 전분, 락토스, 미결정 셀룰로스, 히알루로네이트 또는 글루코사민 그룹으로부터 선택된 담체 중합체의 마이크로입자들을 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 담체 중합체가 완두콩 전분인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리 (I:C)-담체-중합체 마이크로입자들이 분무-건조 공정과 같은 입자 형성 공정에 의해 제조되는 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리 (I:C) / 완두콩 전분 비가 1/200 (w/w) 내지 1 / 0.1 (w/w)의 범위인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 폴리 (I:C) / 완두콩 전분 비가 1/12 (w/w) 내지 1/9 (w/w)인 조성물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자의 D_{50} 이 0.1마이크로미터 내지 200마이크로미터의 범위인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 유기 용매를 포함하는 액체 조성물인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 유기 용매가 글리세롤 또는 에탄올 또는 이의 조합을 기재로 하는 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 의약품에 사용하기 위한 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 감염 또는 보통감기의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 조성물.

청구항 11

비강 투여에 의한 상기도 감염의 예방 및/또는 치료용 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 용도.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 장치, 특히 비강 전달 시스템(nasal delivery system).

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감염 또는 보통감기의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한, 폴리이노신산-폴리사이티딜산(폴리(I:C)) 및 완두콩 전분, 전호화 감자 전분, 락토스, 미결정 셀룰로스, 히알루로네이트 또는 글루코사민 그룹으로부터 선택된 담체 중합체의 마이크로입자들을 포함하는 조성물, 및 감염 또는 보통감기의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 환자에게 사용하기 위한, 상기 조성물을 포함하는 장치, 바람직하게는 비강 전달 시스템(nasal delivery system)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 보통감기(비인두염, 급성 바이러스성 비인두염, 급성 비염, 또는 감기라고도 알려짐)는 주로 <http://en.wikipedia.org/wiki/Rhinovirus> 바이러스에 의해 야기된 상기도계의 바이러스성 감염성 질병이다.

[0003] 바이러스

[0004] 보통감기는 상기도의 바이러스성 감염이다. 가장 흔히 관련되는 바이러스는 99개의 혈청형이 알려진 일종의 피코르나바이러스인 리노바이러스(30 내지 50%)이다. 다른 것에는 코로나바이러스(10 내지 15%), 인플루엔자(5 내지 15%), 사람 파라인플루엔자 바이러스, 사람 호흡기 세포융합 바이러스, 아데노바이러스, 엔테로바이러스, 및 메타뉴모바이러스가 포함된다.

[0005] 통틀어 200개를 초과하는 혈청학적으로 상이한 바이러스 유형이 감기를 일으킨다. 코로나바이러스는 성인 감기에 특히 관련된다. 30개를 초과하는 코로나바이러스 중, 3개 또는 4개는 사람에서 감염을 일으키지만, 이들은 실험실에서 성장시키기가 어려우며, 따라서 그들의 중요성이 그다지 충분히 해명되어 있지 않다. 많은 상이한 유형의 바이러스 및 연속 변이에 대한 그들의 경향으로 인해, 보통감기에 대한 완전 면역을 얻는 것은 불가능하다.

[0006] 임상 징후 및 증상

[0007] 상기도 바이러스의 제1 징후는 흔히 아프거나 따끔거리는 인후이다. 다른 일반적인 증상은 콧물, 충혈, 및 재채기이다. 이들은 때때로 결막염(충혈안), 근육통, 피로, 권태감, 두통, 위약감, 또는 식욕 상실이 동반된다. 기침 및 열은 일반적으로, 약 80%의 양성 예측치를 갖고서 상기도 바이러스라기보다는 인플루엔자의 적응증이다. http://en.wikipedia.org/wiki/Common_cold_-_cite_note-Eccles2005-3. 증상은 영아 및 유아에게서 더 심각할 수 있으며, 이러한 경우에, 이는 열 및 두드러기를 포함할 수 있다. 또한, 상기도 바이러스는 흡연자에게서 더 심각할 수 있다.

[0008] 바이러스 복제는 초기 접촉 후 2 내지 6시간째에 시작된다. 증상은 통상 초기 감염 후 2 내지 5일째에 시작되지만, 때때로 10시간만큼이나 짧은 시간 내에 일어난다. 증상은 증상 발현 후 2 내지 3일째에 피크이며, 반면 인플루엔자 증상 발현은 일정하며 즉각적이다. 지속시간을 단축시키는 치료는 현재 알려져 있지 않지만, 증상은 통상 자발적으로 7 내지 10일 내에 해소되며, 이때 일부 증상은 경우에 따라 최대 3주 동안 지속될 것이다. 소아에게서, 기침은 그러한 사례의 35 내지 40%가 10일 초과 동안 지속되고 10%가 25일 초과 동안 계속된다. 보통감기는 사람에게서 가장 빈번한 감염성 질병으로, 평균 성인은 일년에 2 내지 4회 감염에 걸리고, 평균 소아는 6 내지 12세 연령에서 연당 수 회 감염에 걸린다. 미국에서, 감기의 발생률은 가을 및 겨울에 더 높는데, 대부분의 감염은 9월 내지 4월에서 일어난다. 이러한 계절성(seasonality)은 바이러스의 전염 기회를 증가시키는, (서로 더 가까이 근접한 상태로) 실내에서 더 많은 시간을 보내는 사람들에게 기인될 수 있거나 학년의 시작에 기인될 수 있다.

[0009] 감염 기간

[0010] 보통감기는 증상의 처음 2 내지 3일 동안 가장 감염성이 높지만, 또한 이는 증상이 발현되기 전에 수 일 동안 감염성이며 증상이 완전히 해소될 때까지 여전히 다소 감염성일 수 있다.

[0011] 사람 리노바이러스

[0012] 사람 리노바이러스는 피코르나바이러스 과(*Picornaviridae* family)에서의 엔테로바이러스 속(*Enterovirus* genus)의 구성원이다. HRV 입자는 4개의 폴리펩타이드(VP1, VP2, VP3, 및 VP4)로 이루어진 27 내지 30nm 외피 비보유 캡시드로 이루어진다. 바이러스 캡시드는 대략 7200개 염기의 단일-가닥 RNA 게놈을 포함한다. 바이러스에 의해 암호화된 단백질(VPg)이 RNA 게놈의 5' 말단에 공유 부착된다. 사람 리노바이러스(HRV)에 의한 감염의 임상 과정은 특징이 잘 규명되어 있다. HRV는 상기도 및 하기도, 비점막, 부비동 및 중이를 감염시킬 수 있으며, 감염은 "보통감기"의 증상(상기 참조)을 초래한다. 감염은 자기-한정성(self-limiting)이며, 전형적으

로 상기도로 제한된다. 말초 백혈구수가 감염의 처음 2 내지 3일 동안 상승될 수 있다.

[0013] 또한, HRV 감염은 하기도의 감염, 중이염(특히, 유아에게서), 및 부비동염으로 이어질 수 있다. 리노바이러스 감염으로부터의 심각한 합병증(예컨대, 폐렴)은 드물며, 영아 및 유아, 특히 기관지폐 이형성증, 선천성 심장병, 조숙, 및 신경학적 질환과 같은 조건에 놓여 있는 아이들, 및 면역억제(골수 이식 수여자) 성인에게서 일어나는 것으로 보고되어 왔다. 피코르나바이러스 과의 다른 구성원(즉, 폴리오바이러스, 엔테로바이러스)이 중추 신경계를 감염시킬 수 있지만, HRV에 의한 사람 중추 신경계의 감염은 보고되어 있지 않다.

[0014] 치료

[0015] 리노바이러스 감염의 치료 또는 보통감기의 예방을 위해 시판되는 항바이러스제는 없다. 리노바이러스에 의해 야기된 상기도 감염의 치료는, 전형적으로 처방전 없이 구입할 수 있는(over the counter) 항히스타민제, 아스피린, 기침 억제제, 및 비충혈제거제를 사용하여 증상(재채기, 비충혈, 비루, 눈 자극, 인후통, 기침, 두통, 열, 오한)을 관리하는 것에 기초한다. HRV 감염의 더 심각한 합병증(예를 들어, 폐렴)은 의학적으로 적절한 케어 표준을 사용하여 관리된다.

[0016] 비용 및 의학적 필요성

[0017] 세계 보건 기구의 데이터에 따르면, 10억 건이 넘는 보통감기 사례가 지난해에 USA에서 보고되었다. 미국에서, 보통감기는 연간 77억 달러의 보수적 비용 평가에서 매년 7천5백만 내지 1억 회의 병원진찰 횟수에 이르고 있다. 미국인은 일반 의약품(over-the-counter drug)에 대해 29억 달러를 소비하고, 증상 완화를 위한 처방전 의약품에 대해 추가 4억 달러를 소비한다. 감기로 인해 2천2백만 내지 1억8천9백만으로 추산되는 등교일수가 매년 빠진다. 그 결과, 부모는 그들의 자녀를 돌보기 위해 집에 머무르기 위해 1억2천6백만의 작업일수를 빠진다. 감기를 앓는 피고용자에 의해 빠진 1억5천만의 작업일수에 추가되는 경우, 감기-관련 작업 손실의 전체 경제적 인 영향은 연당 2백억 달러를 초과한다. 이는 작업으로부터 손실된 시간의 40%를 차지한다.

[0018] 기도 상피 세포는 리노바이러스 및 코로나 바이러스와 같은 상기도(URT) 감염성 인자의 1차 표적이다. 이들 바이러스에 의한 감염은 증상의 발현(이는 감염된 세포의 면역 시스템 클리어런스를 반영함) 전에 일어나기 때문에, 직접적인 항바이러스 치료학적 중재는 그다지 효과적인 것으로 입증될 것 같지 않다. 게다가, 비점막에서의 직접적인 항바이러스 화합물의 활성 수준의 실현 및 지속은 이의 높은 턴오버(turnover)로 인해 매우 어렵다. 다른 한편으로, 신체 스스로의 방어를 이용하고 코의 상피 세포에서의 항바이러스 상태를 유도함에 의한 예방은 추후의 바이러스 공격에 대한 상당한 보호를 가져올 뿐만 아니라 질병-관련 증상을 낮추는 것으로 이미 밝혀졌다.

[0019] 감기는 단지 1주 또는 2주만 지속될 수 있지만, 심각한 감기는 최대 1개월 동안 지속될 수 있다. 연령 및 노출에 따라, 성인은 연간 평균 2 내지 3회, 그리고 소아는 6 내지 10회 감기에 걸린다. 감기 바이러스의 수백 개의 상이한 혈청형이 있어서, 그들 모두에 대해 효과적인 표준 백신 예방을 개발하는 것은 불가능하다.

[0020] 증상 치료는 일반적으로 수면-유도 경구 항히스타민제 및/또는 혈관-수축 충혈제거제를 사용하는 것을 포함하는데, 이들은 자극제 부작용을 갖는다. 이는 단지 미미하게 효과적이며, 이들 부작용은 종종 감염 그 자체만큼이나 약화시킨다. 예방이 이상적인 해결책이지만, 상기 언급된 이유로 모든 상이한 혈청형에 대해 광범위하게 효과적인 백신을 가질 가능성은 가까운 미래에는 높지 않을 것 같다. 따라서, 격리되지 않는 한, 사람들은 정기적으로, 특히 "동절기" 동안에 이들 감염성 인자에 노출될 것이며, 따라서 광범위하게 효과적이며 편리하고 부작용이 없는 예방약이 공중 위생 및 직장에서의 생산성에 큰 영향을 줄 것이다.

[0021] 신체에 대한 "조기 경고 시스템"인 선천 면역 반응을 표적으로 하는 것은 상기 언급된 문제점들을 해결할 것이다. 코의 상피 세포에 존재하는 이 시스템은 일단 적절하게 자극되면, 세포들을 그들이 바이러스에 의해 공격되고 있는 것으로 여기게 하고 항바이러스 방어 반응을 촉발시킨다. 일단 이것이 일어나면, 세포들은 추후의 바이러스 공격에 내성을 나타낸다. 선천 면역 반응을 촉발시키기 위해 인터페론과 같은 면역 자극성 분자의 사용을 모색하는 몇몇 초기 연구가 1980년대 말에 행해졌지만, 제조 비용이 많이 들었으며 그들의 효과를 제어하기가 어려웠다.

발명의 내용

[0022] 본 연구의 목적은 선천 면역 시스템을 준비시키고 바이러스성 감염에 대한 보호를 제공하기 위해, 예를 들어 매 이를 마다 또는 심지어는 주 1회로, 측정가능하고 제어가능한 방식으로 사용될 수 있는 촉발성 분자(폴리(I:C))의 제형을 개발하는 것이었다. 하기에 개략적으로 설명된 접근은, 입증된 효능을 갖지만 비실용적인 현존

하는 제제인 폴리 (I:C)를 취하고, 제형 과학을 사용하여 이를 편리하고 효과적이게 한다.

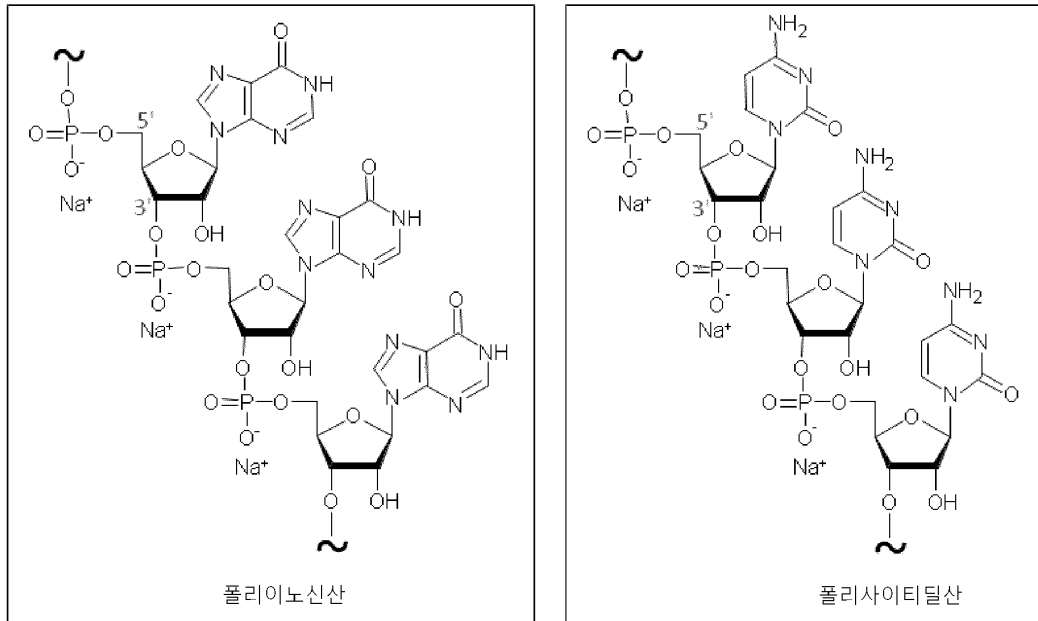
- [0023] 톨-유사 수용체 3(TLR3)는 사람에게서 *TLR3* 유전자에 의해 암호화되는 단백질이다. TLR3는 선천 면역의 병원체 인식 및 활성화에서 기본적인 역할을 하는 선천 면역 시스템의 패턴 인식 수용체들의 톨-유사 수용체 패밀리의 구성원이다. TLR은 초파리(*Drosophila*)부터 사람에 이르기까지 고도로 보존되어 있으며, 구조적 및 기능적 유사성을 공유한다. 이들은 감염성 인자 상에서 발현되는 병원체-회합된 분자 패턴(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)을 인식하고, 효과적인 면역의 발생에 필요한 사이토카인의 생산을 매개한다. 다양한 TLR은 상이한 발현 패턴을 나타낸다. 또한, 이러한 TLR3 수용체는 기도 상피 세포에 의해 발현되고 백혈구의 수치상 아집단으로 제한된다.
- [0024] TLR3는 이중-가닥 RNA(dsRNA)를 인식한다. 이중-가닥 RNA는 바이러스 복제 사이클 동안 형성될 수 있는 2개의 상보적인 가닥을 갖는 RNA이다. 인식시, TLR3는 NF- κ B 및 인터페론 조절 인자 3(IRF3)와 같은 전사 인자들의 활성화를 유도하여, 다른 세포들에 신호전달하여 그들의 항바이러스 방어를 증가시키는 제I형 인터페론의 생산을 증가시킨다.
- [0025] TLR3의 구조는 이웃하는 편자(horseshoe)와 접촉하는 대형 편자 형상을 형성하여, 2개의 편자의 "이량체"를 형성한다. TLR3 단백질 표면의 대부분은 당 분자로 덮여서 당단백질이 되지만, (2개의 편자들 사이의 제안된 계면을 포함하는) 한쪽 전면(face) 상에는 큰 무당(sugar-free) 표면이 있다. 또한, 이 표면은 양으로 하전된 아미노산이 풍부한 2개의 구별되는 패치를 포함하는데, 이들 패치는 음으로 하전된 이중-가닥 RNA를 위한 결합성 부위일 수 있다.
- [0026] 폴리이노신-폴리사이티딜산 (폴리 (I:C))은 MW 분포가 최대 예를 들어 3,600,000 달톤인 이중 가닥 RNA 분자이다. 폴리 (I:C)는 바이러스 RNA를 모방하는 톨 유사 수용체 3(TLR3) 리간드이고, 선천 면역 반응의 공지된 자극제이다. 비강 투여될 때, 이는 코의 상피에서 인터페론 α 및 β 와 같은 항바이러스 단백질의 발현을 유도한다. 이는 리노바이러스 감염의 수 및 중증도를 감소시키는 것으로 입증되어 왔다.
- [0027] 폴리 (I:C)는 일반적으로 통상의 수용액에서 불안정한 분자이다. 현재, 유효한 치료적 또는 예방적 효과를 달성하기 위해, 폴리 (I:C)는 사용 직전에 재용해되고 매 2시간마다 투여될 필요가 있다. 환자 순응도를 개선하고 투약 빈도를 감소시키기 위하여, 안정적이고 향상된 효능을 나타내는 신규한 제형을 개발하였다.
- [0028] 폴리 (I:C)는, 코의 상피 상에서의 체류 시간을 연장시키고 선천 면역 시스템의 더 효과적이고 제어가능한 자극을 제공할 수 있는 몇몇 생체접착 중합체와 함께 제형화되었다.
- [0029] 본 발명은 실온에서 거의 무기한으로 저장될 수 있고 이의 선천 면역 시스템-자극 활성을 유지하는 특유의 제형의 확인을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 제형은 수용성 담체를 함유하며, 저 점도 특성의 이점을 가진다.
- [0031] 완두콩 전분이 폴리 (I:C)를 포함하는 조성물의 제형에 사용되는 경우, 이 조성물은 놀랍게도, 바이알, 튜브 또는 (스프레이 등의) 장치가 본 발명의 조성물로 충전되는 경우, 동일 목적으로 사용되는 임의의 다른 전분에 비해 상기 바이알, 튜브 또는 장치의 내부에 덜 끈적거리는 습성을 나타낸다. 따라서, 이 기술의 이점은 더 정확히 말하면 조성물이 비강 스프레이 장치의 내면에 덜 달라붙기 때문에 상기 폴리 (I:C)의 용량이 이를 필요로 하는 환자에 투여될 수 있다는 것이다.
- [0032] 게다가, 본 제형은 폴리 (I:C)의 효능을 향상시키고, 더욱 더 큰 TLR3 자극 활성을 갖고서 훨씬 더 적은 빈도의 투약을 허용한다.
- [0033] 따라서, 본 발명은 폴리이노신산-폴리사이티딜산(폴리 (I:C)) 및 완두콩 전분, 전호화 감자 전분, 락토스, 미결정 셀룰로스, 히알루로네이트 또는 글루코사민 그룹으로부터 선택된 담체 중합체의 마이크로입자들을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 목적상 히알루로네이트로는 그의 나트륨염이 바람직하고 반면에 글루코사민으로는 N-아세틸-D-글루코사민 형태가 바람직하다. 마이크로입자들은 평균 입자 크기가 0.1 μ m 내지 100 μ m인 입자들이다. 바람직하게는, 담체 중합체는 연리조속(*Lathyrus*) 식물, 더욱 구체적으로 완두콩으로부터 수득된 전분이다.
- [0034] 본 조성물 내에 포함된 폴리 (I:C)-담체 중합체 미세구체(또는 이른바 마이크로입자들이라고도 함)는 분무-건조 공정과 같은 입자 형성 공정에 의해 제조된다.
- [0035] 본 발명에 따른 폴리 (I:C) / 완두콩 전분 비는 1/200 (w/w) 내지 1 / 0.1 (w/w)의 범위이지만, 바람직하게는

1/100 (w/w) 내지 1/1 (w/w), 더욱 더 바람직하게는 1/100 (w/w) 내지 1/5 (w/w)의 범위이며, 1/12 내지 1/9 (w/w)의 폴리 (I:C) / 완두콩 전분 비가 가장 바람직하다. 동일 범위 및 비가 본 발명에 따라 언급된 다른 담체에도 적용된다.

- [0036] 본 발명에 따른 조성물 내의 마이크로입자의 D_{50} (= 입자의 50% 누적 언더사이즈(cumulative undersize)에 기초한 부피)은 0.1마이크로미터 내지 200마이크로미터, 바람직하게는 1마이크로미터 내지 50마이크로미터, 더 바람직하게는 2마이크로미터 내지 40마이크로미터, 더욱 더 바람직하게는 2마이크로미터 내지 20마이크로미터, 가장 바람직하게는 10마이크로미터 내지 20마이크로미터의 범위이다.
- [0037] 또한, 본 발명의 조성물은 유기 용매를 포함하는 액체 조성물일 수 있으며, 여기서 유기 용매는 글리세롤 또는 에탄올 또는 이의 조합을 기재로 한다.
- [0038] 본 발명의 조성물은, 바람직하게는 "보통감기"로 지칭되는 것과 같은 인간 상기도의 바이러스성 감염의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 인간 의약품 및/또는 수의약품에 사용될 수 있다.
- [0039] 동물에 사용하기 위해 본 발명에 따른 조성물은 예를 들어 마구간, 외양간, 닭우리 등에 에어로졸 제형으로 사용될 수 있다.
- [0040] 본 조성물은 천식 및/또는 COPD(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 만성 폐색성 폐병)를 앓는 환자에게, 쉽게 나타날 보통감기 증상을 잠재적으로 예방 및/또는 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0041] 상기도 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 바람직한 방법이 비강 투여에 의해 수행된다.
- [0042] 폴리이노신산-폴리사이티딜산(폴리 (I:C)) 및 완두콩 전분, 전호화 감자 전분, 락토스, 미결정 셀룰로스, 히알루로네이트 또는 글루코사민 그룹으로부터 선택된 담체 중합체의 마이크로입자들을 포함하는 본 발명의 조성물은 (바이러스성) 감염 또는 보통감기의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있으며, 여기서 상기 조성물은 1일 내지 1개월 범위, 더 바람직하게는 매 이틀 마다 또는 심지어는 주 1회의 시간 간격으로 비강 적용에 의해 투여된다.
- [0043] 폴리 (I:C) / 완두콩 전분 비가 1/200 (w/w) 내지 1 / 0.1 (w/w)의 범위이지만, 바람직하게는 1/100 (w/w) 내지 1/1 (w/w), 더욱 더 바람직하게는 1/100 (w/w) 내지 1/5 (w/w)이며, 1/12 내지 1/9 (w/w)인 폴리 (I:C) / 완두콩 전분 비가 가장 바람직한 상기 언급된 조성물이, 조성물 내의 마이크로입자 크기가 0.1마이크로미터 내지 200마이크로미터, 바람직하게는 1마이크로미터 내지 50마이크로미터, 더 바람직하게는 2마이크로미터 내지 40마이크로미터, 더욱 더 바람직하게는 2마이크로미터 내지 20마이크로미터, 가장 바람직하게는 10마이크로미터 내지 20마이크로미터 범위인 것과 조합하여, (바이러스성) 감염 또는 보통감기의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있으며, 여기서 상기 조성물은 1일 내지 1개월 범위, 더 바람직하게는 매 이틀 마다 또는 심지어는 주 1회의 시간 간격으로 비강 적용에 의해 투여된다.
- [0044] 또한, 본 발명의 일부는 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 장치, 특히 비강 전달 시스템이다.
- [0045] 본 발명에 따르면, 폴리 (I:C)는 비강 투여용 건조 분말로서 제형화된다. 안정성을 개선하기 위하여, 폴리 (I:C)는 완두콩 전분 및 폴리 (I:C)를 함유하는 수성 혼합물로부터 분무 건조된다.
- [0046] 전분은 (1) 코 안에서 생체접착제로서 작용하고, (2) 폴리 (I:C)를 안정화하기 위한 보호 매트릭스로서 제공되는 이중 기능을 갖는 것으로 여겨진다. 전분, 특히 완두콩 전분은 아밀라제를 통한 분해로 축적이 방지되기 때문에 비강 적용을 위한 바람직한 부형제이다.
- [0047] 아밀로펙틴 함량이 높은 전분 또는 화학적으로 변형된 전분은 우수한 점막-점착성을 나타낸다. 특히 전호화 찰옥수수 전분 (고 아밀로펙틴) 및 하이드록시프로필화 전호화 완두콩 전분 (화학적으로 변형됨)이 찬물에서 팽창되고 찬물에 용해되는 분획을 함유하여 폴리 (I:C)와 저전단으로 혼합되는 경우 균질한 분산물로 되기 때문에 본 발명에 사용되었다. 생성된 전분 분산물은 분무 건조 시 균질 분말을 허용하는 저 내지 중 점도를 가진다.
- [0048] 비강 투여는 바람직하게는 단위 용량 비강 분말 장치(독일 소재의 Aptar Pharma사로부터 공급되는 단위 용량 장치)를 사용하여 달성된다. 단위 용량 장치는 능동적 전달 시스템인데, 이는 환자가 흡입할 필요가 없고 수행이 환자 독립적으로 이루어짐을 의미한다. 투약은 액추에이션에 의해 수행되는데, 이러한 액추에이션은 과압(overpressure)에 의해 제어된다. 퍼프(puff)당 용량은 분무 건조된 분말 내의 폴리 (I:C)의 농도 및 분말의 방출 중량에 의해 결정된다. 분말은 각각의 퍼프에 대해 새로운 장치를 사용하여 매번 콧구멍 내로 투여될 것이다.
- [0049] 상기 언급된 바와 같이, 폴리 (I:C)는 이노신산 및 사이티딜산 소듐 염의 역평행 폴리뉴클레오타이드 가닥들로 이

루어진 합성 이중-가닥 RNA이다. 이들 가닥은 이노신 염기와 사이토신 염기 사이에 형성된 수소 결합에 의해 비 공유적으로 결합된다.

[0050] 폴리 (I:C)에 대한 평균 쇄 길이는 300 내지 6,000개의 염기 쌍의 범위이며, 이는 대략 180,000 내지 약 3,600,000 달톤에 상응한다. 분자식은 $(C_{10}H_{10}N_4NaO_7P)_x \cdot (C_9H_{11}NaN_3O_7P)_x$ 이다.



[0051]

[0052] 상기 폴리 (I:C)는 구매가능하지만, 또한 선택적으로, 예를 들어 하기의 절차를 사용하여 내부적으로 제조될 수 있다.

[0053] 이중(duplex) 생성물 폴리 (I:C)는 폴리 이노신(I)과 폴리 사이티딘(C)의 개별 동중중합체들로부터 제조된다. 폴리 I 및 폴리 C는 폴리뉴클레오티드 포스포릴라제(PNPase)의 존재 하에서 뉴클레오시드 이인산염인 이노신과 사이티딘을 개별적으로 중합함으로써 합성된다. 각각의 뉴클레오시드 이인산염은, 생성된 리보핵산 중합체의 길이를 제어하기 위해 20 내지 24시간 동안 PNPase에 의해 개별적으로 중합한다. 이어서, 효소인 단백질 키나제를 첨가하여 중합 반응을 종결시킨다. 생성된 동중중합체(즉, 단일 가닥 RNA 분자)를 가수분해하여 각각의 중합체 생성물의 분자량 범위를 지정된 범위 내로 제한한다. 가수분해된 생성물을 에탄올로 처리하여 용액으로부터 단일 가닥 RNA 분자(ssRNA)를 침전시킨다. 침전물을 상층액으로부터 분리하고 물 중에 용해시킨다. 이어서, ssRNA의 용액을 여과하여 미립자를 제거하고, 한외여과하여 저분자량 오염물을 제거하고, 이어서 동결건조시킨다. 동결건조된 ssRNA 생성물을 개별적으로 순도, 분자량, 및 다른 품질 속성에 대해 시험하여 생성물이 규격 내에 있음을 보장한다.

[0054] 개별 단일 가닥 동중중합체(폴리 I 및 폴리 C)를 0.015M 염화나트륨 중에 개별적으로 용해시키고, 이어서 조합하여 이들 가닥을 어닐링하여, 이중 가닥 이중 생성물(폴리 I : 폴리 C)을 형성한다. 혼합 후에, 생성된 용액을 여과한다. 여과액을 한외여과하여 저분자량 오염물을 제거한다. 이어서, 한외여과된 생성물을 동결건조시킨다. 생성된 이중 생성물을 -20°C 에서 저장한다. 동결건조된 dsRNA 생성물을 순도, 분자량, 및 다른 품질 속성에 대해 시험하여 생성물이 규격 내에 있음을 보장한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] **재료 및 방법**

[0056] **담체 중합체와 함께 폴리 (I:C)의 분무 건조**

[0057] 완두콩 전분, 전호화 감자 전분, 락토스, 미결정 셀룰로스, 히알루로네이트 또는 글루코사민 그룹으로부터 선택된 본 발명에 따른 담체와의 분무 건조 공정을 Buchi B290 미니 분무 건조기(Buchi사, 스위스 플라월 소재)에서 수행하였다. 0.2마이크론 셀룰로스 아세테이트 필터(Whatman FP30/0.2 CA-S)를 사용하여 탈염수를 여과하고, 유리 비커에 첨가하였다. 자기 교반기를 사용하여 교반하면서 부형제를 첨가하였다. 완전히 용해되었을 때, 폴리 (I:C)를 용액에 첨가하였다. 0.5% (w/w)의 총 고형물 농도 및 1/9 (w/w)의 폴리 (I:C) / 부형제 비를 적용하였

다.

[0058] 추가 폴리 (I:C) - 완두콩 전분의 분무 건조

[0059] Buchi B290 미니 분무 건조기(Buchi사, 스위스 플라월 소재)에서 분무 건조 공정을 수행하였다. 뉴클레아제 무함유 물을 유리 비커에 첨가하고, 완두콩 전분을, 그 전분이 완전히 분산될 때까지, Ultra Turax T25(Janke & Kunkel사)를 사용하여 혼합하면서 첨가한다. 폴리 (I:C)를 뉴클레아제 무함유 물 중에 용해시키고, 폴리 (I:C)가 완전히 용해될 때까지 자기 교반기 상에서 교반하였다. 용해된 폴리 (I:C)를 분산된 완두콩 전분에 첨가하고 실온에서 교반하며, 이 폴리 (I:C) 용액은 분무 건조 직전에 제조한다. 4.5% (w/w), 10% (w/w) 또는 20% (w/w)의 총 고형물 농도 및 1/12 (w/w)의 폴리 (I:C) / 완두콩 전분 비를 적용하였다.

[0060] 이들 용액을 연동 펌프에 의해 분무 건조기의 상부에서 2-유체 노즐(직경: 0.7mm)에 공급하였다. 이 분무 건조기는 병류 질소 유동 모드에서 작동하였다. 분무 건조된 입자들을 사이클론에 부착된 저장소 내에 수집하였다. 입자들을 수집한 후에, 유리 실린더 및 사이클론을 실온으로 냉각시켰다. 수집된 분말을 앰버 유리병으로 이송하고, 이 병을 알루미늄 증기 락 백 내에 넣는다. 이들 바이알을 실온에서 저장하였다.

[0061] 상기와 동일한 공정을 1/9의 폴리 (I:C) / 담체 비가 적용된 본 발명에 따른 다른 담체들을 분무 건조하는데 사용하였다.

[0062] 주사 전자 현미경법

[0063] 샘플에 직경이 +/- 30 내지 50nm인 금 입자를 스퍼터링하였다. Everhart Thornley 검출기를 갖는 FEI 주사 전자 현미경- 타입 Quanta 200F를 사용하여 이미지를 생성하였다.

[0064] 물 함량 - 카를 피셔(Karl Fischer) 적정

[0065] 직접 정량 카를 피셔 적정에 의해 이들 콘셉트의 물 함량을 결정하였다. KF TITRATOR V30(Mettler Toledo사, 미국 소재)을 사용한다. 분말(50 내지 100mg)을 Hydranal® 건조 메탄올(Sigma Aldrich사)이 들어있는 적정 용기로 이송하고 300초 동안 교반하였다. 5ml 뷰렛을 사용하여 2mg/ml 농도의 Hydranal® 복합물 2(Sigma Aldrich사)에 의해 적정을 수행하였다. 종결을 위하여, 15µg/min의 스톱 드리프트(stop drift)를 적용하였다. 샘플을 3회 반복하여 분석하였다.

[0066] 입자 크기의 결정

[0067] 단지 관심 대상 생성물의 부피 분포에 기초하여 입자 크기 분포 데이터를 평가하려는 경향이 존재한다. 그럼으로써, D_v10, D_v50 및 D_v90 누적 언더사이즈의 비교로 가치평가를 종종 제한한다.

[0068] 그러나, d_vx 누적 언더사이즈를 비교하는 것은, 상이한 기술 및 기구가 곧바로 상이한 결과로 이어진다는 사실로 인해 항상 직결될 수 있는 것은 아니다.

[0069] 게다가, 데이터에 대해 상이한 관점에서 살펴봄으로써(즉, 다른 파라미터를 사용함으로써) 입자 크기(또는 형상) 분포 데이터로부터 더 많은 정보를 얻을 수 있다.

[0070] 입자 크기 분포를 결정하기 위해, 레이저 회절 시험 방법을 사용하였다.

[0071] Hydro2000S 습식 분산 모듈(또는 등가의 시스템)을 구비한 Malvern Mastersizer 2000 레이저 회절계에서 분석을 수행하였다. 이 기구는 20nm 내지 2mm의 크기 범위에서 청색 광 ON 검출 모드에서 사용한다.

[0072] 인플루엔자 마우스 모델에서 제형의 생체내 시험

[0073] 모든 동물 연구는 윤리위원회에 의해 승인되었으며, 국내외 지침에 따라 수행하였다. 8 내지 12주령 암컷 스위스 마우스(Janvier사)를 사용하였다. 이소플루란 마취 하에서 모든 비강내 처리를 수행하였다. 소정량의 액체를 투여하기 위하여, 콧구멍의 상부 상에 소적(droplet)을 직접 적용하고, 입을 닫음으로써, 소적이 콧구멍을 통해 비강 내로 들어가도록 하였다. 분무 건조된 폴리 (I:C)-담체 분말을 각각의 실험 직전에 새로 제조하였으며, 15 µl 액체 중 상태로 투여하였다. 비제형화된 폴리 (I:C)를 인산염 완충 식염수(PBS) 중 1mg/ml의 농도로 투여하였다. 전형적으로, 시험 2일 또는 3일 전에 전처리를 수행하였다. 마우스는 일수 0에서 25µl(고부피 시험) 중 10 x LD₉₀ 마우스 적합(mouse adapted) H1N1 PR(FLU PR 1600517)로 또는 15µl(저부피 시험) 중 1x LD₉₀으로 시험하였다. 시험 후, 마우스를 14일 동안 매일 체중 및 거동을 측정함으로써 모니터링하였으며, 체중 손실이 시험일에 비하여 20% 초과했을 때, 또는 그들의 거동이 심각한 병의 징후를 보여주었을 때 마우스를

안락사시켰다.