



공개특허 10-2023-0003167



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0003167
(43) 공개일자 2023년01월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 31/4196* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01) *A61K 31/661* (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/1274 (2013.01)
A61K 31/4196 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7041763(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년07월12일
심사청구일자 2022년11월28일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7003873
원출원일자(국제) 2017년07월12일
심사청구일자 2020년05월27일
- (85) 번역문제출일자 2022년11월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/041750
- (87) 국제공개번호 WO 2018/013711
국제공개일자 2018년01월18일
- (30) 우선권주장
62/361,351 2016년07월12일 미국(US)
62/513,800 2017년06월01일 미국(US)

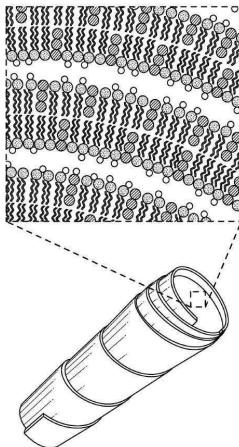
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 중추 신경계 전달 및 크립토코커스 감염의 치료를 위한 코클리에이트화된 항진균 화합물

(57) 요 약

본 출원은 하나 이상의 코클리에이트(cochleate), 및 암포테리신 B, 5-플루시토신, 플루코나졸, 케토코나졸, 라부코나졸, 알바코나졸, 이트라코나졸, 포사코나졸, 이사부코나졸 및/또는 보리코나졸 중에서 선택된 적어도 2개의 항진균 화합물을 포함하는 코클리에이트 조성물에 관한 것이다. 상기 항진균 코클리에이트 제형의 사용 방법을 또한 개시한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/496 (2013.01)

A61K 31/506 (2013.01)

A61K 31/513 (2013.01)

A61K 31/661 (2013.01)

A61K 31/7048 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 31/10 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

크립토코커스 종(*Cryptococcus spp.*)으로 인한 감염의 치료 또는 예방 방법으로서, 상기 방법은 크립토코커스 종으로 인한 감염의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에게

(a) 하나 이상의 코클리에이트 및 치료 유효량의 제1 항진균 화합물을 포함하는 코클리에이트 조성물로서, 상기 제1 항진균 화합물이 암포테리신 B인, 코클리에이트 조성물; 및

(b) 치료 유효량의 제2 항진균 화합물로서, 상기 제2 항진균 화합물이 5-플루시토신, 플루코나졸, 케토코나졸, 라부코나졸, 알바코나졸, 이트라코나졸, 포사코나졸, 이사부코나졸 및 보리코나졸로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제2 항진균 화합물을

경구 투여하는 것을 포함하며;

상기 제1 및 제2 항진균 화합물은 상기 대상체에게 경구 투여되는 유일한 2개의 항진균 화합물이고, 상기 감염은 중추신경계를 수반하는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

코클리에이트 조성물이 적어도 7일, 적어도 14일, 적어도 21일, 또는 적어도 28일 동안 매일 투여되는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

유일한 2개의 항진균 화합물이 암포테리신 B 및 5-플루시토신인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

5-플루시토신이 코클리에이트화된 암포테리신 B 이후에 투여되는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

5-플루시토신이 적어도 7일, 적어도 14일, 적어도 21일, 또는 적어도 28일 동안 매일 투여되는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

감염이 크립토코커스 수막뇌염인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

감염이 크립토코커스 뇌수막염인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

크립토코커스 종이 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*)인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,
크립토코커스 종이 크립토코커스 가티이(*Cryptococcus gattii*)인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,
대상체가 인간인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,
대상체가 HIV/AIDS, 림프종, 간경화증이 있거나 또는 장기 이식을 받은, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,
항진균 화합물이 뇌로 전달되는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,
크립토코커스 종으로 인한 감염의 예방이 감염 재발의 예방을 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,
크립토코커스 종으로 인한 감염의 예방이 포유동물 또는 인간을 치료하는 것을 포함하고, 상기 포유동물 또는 인간이 크립토코커스 종 항원에 양성인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,
제2 항진균 화합물이 5-플루시토신 또는 플루코나졸이고, 상기 5-플루시토신 또는 플루코나졸이 코클리에이트화되지 않은 것인, 방법.

청구항 16

제10항에 있어서,
제2 항진균 화합물이 5-플루시토신이고, 상기 5-플루시토신이 코클리에이트화되지 않은 것인, 방법.

청구항 17

제10항에 있어서,
제2 항진균 화합물이 플루코나졸이고, 상기 플루코나졸이 코클리에이트화되지 않은 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 7월 12일자로 출원된 미국 가 출원 제 62/361,351 호 및 2017년 6월 1일자로 출원된 미국 가 출원 제 62/513,800 호의 이점을 청구하며 이들 출원의 출원일에 따르고; 각 출원의 전체 내용은 본 명세서에

참고로 인용된다.

[0003] 분야

[0004] 본 출원은 일반적으로 항진균제를 포함하는 코클리에이트 조성물 및 진균 감염, 특히 크립토코커스 (*Cryptococcus*) 종에 의해 야기된 진균 감염을 치료하기 위해 상기 조성물을 투여하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 크립토코커스 감염증은 기회감염성 진균 감염으로 전세계 인간 면역결핍 바이러스 환자들 가운데 중추신경계 (CNS) 질병으로 인해 매년 100만건으로 추산되는 사례와 625,000건의 사망을 야기한다. 보다 지리학적으로 제한된 크립토코커스 가티이 (*Cryptococcus gattii*)에 비해, 세계적으로 막대한 수의 사례들이 크립토코커스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*)에 의해 야기되었다. 크립토코커스 감염증은 다수의 센터에서, 특히 선진국에서 가장 흔히는 HIV 감염과 관련되지만, 상기 사례의 대다수는 이식 수용자를 포함한 비-HIV-감염된 개인; 면역억제제, 예를 들어 글루코코르티코스테로이드, 세포독성 화학요법, TNF- α 억제제, 및 다른 질병 조절치료제를 수용하고 있는 환자; 및 장기부전 증후군, 선천적인 면역학적 문제들, 공통 가변성 면역결핍 및 혈액 질환과 같은 기저 질환이 있는 환자들의 이질 그룹 사이에서 발생한다. 더욱이, 다수의 센터에서, 크립토코커스 감염증 사례의 20% 이하는 표현형적으로 "정상적인" 또는 달리 임상적으로 비-면역타협된 환자에서 발생한다.

[0006] 크립토코커스 감염증 사례는 환경으로부터의 진균 세포의 흡입으로 시작되는 것으로 생각된다. 폐내에서, 크립토코커스 종은 면역억제된 환자에서 폐렴을 야기할 수 있지만, 면역능력 숙주에서 상기 진균 세포는 전형적으로는 면역계에 의해 제거되거나 또는 무증상 잠복성 감염을 확립한다. 후속 면역억제시, 상기 잠복성 감염은 다른 조직, 가장 현저하게는 중추신경계(CNS)로 퍼질 수 있다. 일단 CNS에서 확립되면, 크립토코커스 감염증은 흔히 상승된 두개내압을 동반하는, 뇌막과 뇌조직의 압도적인 감염을 야기한다. 신속하고 유효한 치료 없이는, CNS 감염은 예외없이 치명적이다.

[0007] 크립토코커스 수막뇌염 치료의 초석은 1950년대에 개발된 암포테리신 B 데옥시콜레이트(AmBd)로, 세포막에 구멍을 생성시키고 산화적 손상을 통해 세포사를 유도함으로써 살진균 효과를 발휘한다. AmBd는 때때로 5-플루시토신(5-FC)과 병용되어 병용 요법을 제공하며, 상기 요법은 AmBd를 단독으로 사용하는 치료에 비해 환자의 10-주 생존을 개선시킬 수 있다. 상기 조합은 여전히 권장되는 '최적 표준' 유도 치료이지만, AmBd가 현저한 독성을 가지며 그의 IV 제형들이 정교한 전해질 모니터링, 및 정맥내 카테터(이는 재료가 불충분한 상황에서 상기 약물 치료의 사용을 못하게 한다)를 요하기 때문에 상당한 도전을 야기한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기 AmBd 및 5-FC 병용 요법과 관련된 문제점들을 피하기 위해서, 플루코나졸과 5-FC와의 조합이 고려되었다. 플루코나졸은 양호한 경구 생체이용률을 가지며 뇌척수액을 침투할 수 있고, 이는 또한 상기를 초기 치료후 유지 요법에 양호한 후보로 만든다. 그러나, 플루코나졸은 정진균성 화합물(살진균성 화합물이기보다는)이며 따라서 병원체 제거에 덜 유효하고, 따라서 초기 요법에 권장되지 않는다. 결과적으로, 경구 이용 가능하고, 유효하며 감소된 비용으로 제공될 수 있는 크립토코커스 감염증 치료를 제공할, 분명하고 계속된 필요성이 남아있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 놀랍게도 경구로 이용 가능하고 낮은 독성을 갖는 코클리에이트화된 암포테리신 B(또한 본 명세서에서 AmB라고도 칭한다)가, 경구 투여된 5-플루시토신과 함께, 전신 투여된 암포테리신 B 데옥시콜레이트 및 경구 투여된 5-플루시토신만큼 마우스에서 크립토코커스 종(*Cryptococcus spp.*)의 제거에 유효함을 발견하였다.

[0010] 더욱이, 본 발명자들은 코클리에이트화된 암포테리신 B가 가장 심한 크립토코커스 종 감염이 일어나는 뇌에 전달됨을 입증하였다. 따라서, 본 발명의 조성물(편의상 경구 투여될 수 있다)은 개발도상국의 방대한 지역들에 크립토코커스 감염증의 치료를 위한 암포테리신-계 치료제의 잠재적인 살진균 활성을 이용할 수 있게 할 가능성을 갖는다. 본 항진균 코클리에이트의 상기 및 다른 이점들을 본 명세서에 추가로 기재한다.

[0011] 본 명세는 하나 이상의 코클리에이트(cochleate), 및 치료 유효량의, 예를 들어 암포테리신 B, 5-플루시토신(또한 본 명세서에서 5-FC 및 플루시토신이라고도 칭한다), 플루코나졸, 케토코나졸, 라부코나졸, 알바코나졸, 이

트라코나졸, 포사코나졸, 이사부코나졸 및/또는 보리코나졸 중에서 선택된 적어도 2개의 항진균 화합물(antifungal compound)을 포함하는 코클리에이트 조성물에 관한 것이다. 일부 실시태양에서, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물은 암포테리신 B 및 5-플루시토신이다. 추가의 항진균 화합물은 본 명세서에 기재된다.

[0012] 일부 실시태양에서, 상기 코클리에이트는 점막 투여, 예를 들어 경구 투여 또는 비내 투여용으로 제형화된다. 다른 실행에서, 상기 코클리에이트는 정맥내 투여용으로 제형화된다. 일부 실행에서, 상기 코클리에이트는 척수강내 투여용으로 제형화된다.

[0013] 일부 실시태양에서, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물 중 단지 하나만이 코클리에이트로서 제형화된다. 다른 실행에서, 적어도 2개의 항진균 화합물이 코클리에이트로서 제형화된다. 일부 실행에서, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물은 동일한 코클리에이트내에서 제형화된다. 다른 실행에서, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물은 상이한 코클리에이트 중에서 각각 제형화된다.

[0014] 일부 실시태양에서, 본 명세서에 기재된 코클리에이트 중 하나 이상은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 지오데이트(geodate) 코클리에이트이다.

[0015] 일부 실시태양에서, 본 명세서에 기재된 코클리에이트 중 하나 이상은 지질 성분을 포함하며, 상기 지질 성분은 대두 포스포티딜세린을 약 30 내지 70 중량%, 보다 전형적으로는 40 내지 70 중량%, 보다 전형적으로는 40 내지 60 중량%, 보다 전형적으로는 45 내지 55 중량%, 보다 전형적으로는 45 내지 60 중량%, 및 가장 전형적으로는 45 내지 약 55 중량% 범위의 양으로 포함한다.

[0016] 본 명세는 또한 크립토코커스 종으로 인한 감염의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 치료 또는 예방이 필요한 대상체(subject)에게 코클리에이트를 포함하는 제형을 경구 투여함을 포함하고, 여기에서 상기 코클리에이트는 암포테리신 B를 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 제형을 적어도 7일, 적어도 14일, 적어도 21일, 또는 적어도 28일 동안 매일 투여한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 상기 대상체에게 5-플루시토신을 투여함을 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 5-플루시토신을 경구 투여한다. 일부 실시태양에서, 상기 5-플루시토신을 적어도 7일, 적어도 14일, 적어도 21일, 또는 적어도 28일 동안 매일 투여한다.

[0017] 본 명세는 또한 크립토코커스 종으로 인한 감염의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 치료 또는 예방이 필요한 대상체에게 코클리에이트 조성물을 포함하는 제형을 투여함을 포함하고, 여기에서 상기 코클리에이트 조성물은 적어도 2개의 항진균 화합물을 포함하며, 여기에서 상기 적어도 2개의 항진균 화합물은 암포테리신 B, 5-플루시토신, 플루코나졸, 케토코나졸, 라부코나졸, 알바코나졸, 이트라코나졸, 포사코나졸, 이사부코나졸 및/또는 보리코나졸 중에서 선택되고, 여기에서 상기 적어도 2개의 항진균 화합물 중 적어도 하나는 코클리에이트로서 제형화된다. 일부 실시태양에서, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물은 암포테리신 B 및 5-플루시토신이다. 추가의 항진균 화합물은 본 명세서에 기재된다. 일부 실시태양에서, 상기 항진균 화합물은 뇌로 전달된다.

[0018] 일부 실시태양에서, 상기 감염은 피부, 폐, 전립선 및/또는 중추신경계를 수반한다. 일부 실시태양에서, 상기 감염은 크립토코커스 수막뇌염이다. 일부 실시태양에서, 상기 감염은 크립토코커스 뇌수막염이다.

[0019] 일부 실시태양에서, 상기 크립토코커스 종은 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*)이다. 일부 실시태양에서, 상기 크립토코커스 종은 크립토코커스 가티이(*Cryptococcus gattii*)이다.

[0020] 일부 실시태양에서, 상기 투여는 경구, 비내, 척수강내 또는 정맥내이다. 일부 실시태양에서, 상기 코클리에이트 제형은 경구로 투여되며 항진균 화합물은 뇌로 전달된다.

[0021] 일부 실시태양에서, 상기 대상체는 인간이다. 일부 실시태양에서, 상기 대상체는 HIV/AIDS, 림프종, 간경화증이 있거나 또는 장기 이식을 받았다.

[0022] 또한 크립토코커스 종으로 인한 감염의 치료 또는 예방 방법을 본 명세서에 제공하며, 상기 방법은 상기 치료 또는 예방이 필요한 대상체에게 코클리에이트를 포함하는 제형을 투여함을 포함하고, 여기에서 상기 코클리에이트는 항진균 화합물을 포함하며, 여기에서 상기 항진균 화합물은 5-플루시토신, 플루코나졸, 케토코나졸, 라부코나졸, 알바코나졸, 이트라코나졸, 포사코나졸, 이사부코나졸 및/또는 보리코나졸 중 적어도 하나로부터 선택된다. 추가의 항진균 화합물은 본 명세서에 기재된다.

[0023] 일부 실시태양에서, 크립토코커스 종으로 인한 감염의 예방은 감염 재발의 예방을 포함한다. 일부 실시태양에서, 크립토코커스 종으로 인한 감염의 예방은 포유동물 또는 인간을 치료함을 포함하며, 여기에서 상기 포유동물 또는 인간은 크립토코커스 종 항원에 양성이다(예를 들어 IMMY 인코포레이티드(미국 오클라호마주 노먼

소재) 크립토코커스 항원 시험 사용).

도면의 간단한 설명

[0024] 본 명세서에 통합되고 본 명세서의 일부를 구성하는 첨부 도면은 몇몇 실시태양을 예시하며, 서면 기재와 함께 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법의 몇몇 원리를 설명하기 위해 제공된다.

도 1은 코클리에이트의 도식적 표현이다. 삽입도는 코클리에이트의 지질 지층을 묘사하며, 상기 지층은 상기 코클레이트내에 보호된 인지질 이중층(원 및 꼬리), 다가 양이온(가려지지 않은 원) 및 예시된 화물 부분(벗금 친 원)을 함유한다.

도 2는 코클리에이트 및 그의 화물을 둘러싸는 대식세포의 도식을 묘사한다. 삽입도는 상세한 설명에 기재된 바와 같은 상기 대식세포내 상기 코클리에이트의 개방 및 상기 화물의 방출을 묘사한다.

도 3은 암포테리신 B의 구조도를 묘사한다.

도 4는 암포테리신 B-코클리에이트(또한 본 명세서에서 CAMB라고도 칭한다)의 제조 전략의 도식적 표현이다.

도 5는 상세한 설명에 기재된 바와 같은 지오드(geode) 코클리에이트의 예시적인 제조를 묘사한다.

도 6은 실시예 2에 기재된 바와 같이 CAMB 또는 편지존(FUNGIZONE)(등록상표)으로 처리된, 씨 네오포르만스-감염된 마우스의 생체내 효능 결과를 묘사한다.

도 7은 실시예 2에 기재된 바와 같이 CAMB, 편지존(등록상표) 및/또는 5-플루시토신으로 처리된, 씨 네오포르만스-감염된 마우스의 생체내 효능 결과를 묘사한다.

도 8은 실시예 2에 기재된 바와 같이 CAMB, 편지존(등록상표), 5-FC 및/또는 플루코나졸로 처리된, 씨 네오포르만스-감염된 마우스의 생체내 효능 결과를 묘사한다.

도 9는 실시예 2에 기재된 바와 같이 CAMB, 편지존(등록상표), 5-FC, 플루코나졸 및 이들의 조합으로 처리된 마우스에 대해 관찰된, 뇌 조직의 그램당 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 묘사한다.

도 10은 실시예 3에 기재된 바와 같이 경구 투여후 코클리에이트화된 암포테리신 B가 뇌에 국소화됨을 입증하는데 사용된 연구 설계를 묘사한다.

도 11은 실시예 3에 기재된 바와 같이 씨 네오포르만스로 감염된 마우스의 뇌로의 형광-표지된 CAMB 입자의 전달을 묘사한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이제 다양한 예시적인 실시태양들을 상세히 참조할 것이며, 이들의 예를 첨부 도면에 예시하고 하기 상세한 설명에서 논의한다. 하기의 상세한 설명이 독자에게 본 발명의 태양의 몇몇 실시태양, 특징 및 세부사항에 대한 완전한 이해를 제공하고자 제공되며 상기 설명을 본 발명의 범위를 제한하는 것으로서 이해해서는 안 됨을 알아야 한다.

크립토코커스 종 및 항진균 화합물

[0027] 본 명세는 하나 이상의 코클리에이트, 및 크립토코커스 종에 의해 야기된 감염에 대해 유효한 적어도 2개의 항진균 화합물을 포함하는 코클리에이트 조성물에 관한 것이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "크립토코커스 종"이란 용어는 바시디오마이세테스(basidiomycetes) 캡슐화된 효모인 크립토코커스 속에 속하는 진균의 종을 지칭한다. 상기와 같은 감염은 예를 들어 대상체가 크립토코커스 종 항원에 대해 양성인지 아닌지를 측정함으로써 검출될 수 있다. 상기와 같은 시험을 수행하기 위한 키트를 예를 들어 IMMY 인코포레이티드(미국 오클라호마주 노먼 소재)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

[0028] 전형적으로, 본 명세의 항진균 코클리에이트는 크립토코커스 네오포르만스에 대해 유효하다. 씨 네오포르만스는 원래 캡슐 응집반응을 근거로 혈청형 A, B, C, D 및 AD로 분류되었다. 보다 최근에, 씨 네오포르만스는 2개의 변종: 씨 네오포르만스 변종 그루비(C. neoformans var. grubii)(이전에는 그룹 A) 및 씨 네오포르만스 변종 네오포르만스(C. neoformans var. neoformans)(이전에는 그룹 D)로 분류되었다. 씨 네오포르만스는 세계의 대부분의 온대 지역에서 발견되는 아주흔한 병원체이나, 부패 유기 물질 및 다수의 토양 유형, 특히 동물 및 새의 배설물이 풍부한 토양에서 통상적으로 발견된다.

- [0029] 일부 실시태양에서, 본 명세의 항진균 코클리에이트는 크립토코커스 가티이(이전에는 그룹 B 및 C)에 대해 유효하다. 씨 가티이는 VGI, VGI, VGIll 및 VGIv를 포함한 4개의 분자 유형으로 분류될 수 있다. VGI 유형은 VGIa, VGIb 및 VGIc 하위유형으로 추가로 세분될 수 있다. 씨 가티이는 단리물을 카나바닌-글리신-브로모티몰(CGB) 아가상에 도말함으로써 씨 네오포르만스로부터 쉽게 분화시킬 수 있다. CGB 아가는 상기 유기체의 존재하에서 청색으로 변한다. 씨 가티이는 전통적으로 열대 및 아열대 지리학적 지역에서 발견된다.
- [0030] 일부 실시태양에서, 본 명세의 크립토코커스 종, 예를 들어 씨 가티이 또는 씨 네오포르만스, 보다 전형적으로 씨 가티이, 예를 들어 VGI 계통, 예를 들어 VGIa의 씨 가티이는 면역능력 대상체를 감염시킬 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 면역능력 대상체는 항원에의 노출에 이어서 정상적인 면역 반응을 생성시키는 능력을 갖는 대상체, 전형적으로 포유동물 대상체, 예를 들어 인간 대상체이다. 그러나, 보다 전형적으로, 본 명세의 크립토코커스 종은 면역타협된 대상체를 감염시킬 수 있다. 면역타협된 대상체는 HIV/AIDS, 림프종, 간경화증이 있는 대상체, 전형적으로 포유동물 대상체, 예를 들어 인간 대상체를 포함하거나, 또는 장기 이식 수용자, 면역억제제, 예를 들어 글루코코르티코스테로이드, 세포독성 화학요법 및/또는 TNF- α 억제제를 수용하고 있는 대상체이다.
- [0031] 일부 실시태양에서, 상기 크립토코커스 종은 대상체에서 크립토코커스 폐질환을 생성시킬 수 있다. 크립토코커스 폐질환의 증상은 무증상성 기도 균체형성에서부터 급성 호흡곤란 증후군에까지 이른다. 폐 크립토코커스 감염증이 있는 대상체는 순한 증상 내지 보통의 증상, 예를 들어 발열, 전신권태, 약간의 가래가 있는 기침 및/또는 흉막통이 나타날 수 있다. 일부 실시태양에서, 폐 크립토코커스 감염증이 있는 대상체는 폐렴이 나타날 수 있다. 일부 실시태양에서, 폐질환은 폐외 질병의 부재하에서 발생할 수도 있다.
- [0032] 일부 실시태양에서, 상기 크립토코커스 종은 폐로부터 퍼져 대상체의 피부, 전립선, 골의 수강 및/또는 중추신경계(CNS)를 감염시킬 수 있다. 전형적으로 크립토코커스 종은 CNS를 감염시킨다. 일부 실시태양에서, 크립토코커스 종은 CNS 크립토코커스 감염증, 예를 들어 뇌수막염 및/또는 수막뇌염을 생성시킨다. 이러한 형태의 감염은 적합한 치료법 없이는 예외없이 치명적이며; 증상 개시후 2주에서 수년내에 사망할 수 있다. 크립토코커스 뇌수막염 및 수막뇌염의 가장 통상적인 증상은 두통, 및 성격 변화, 혼동, 무기력 및 혼수상태를 포함한 변경된 정신 상태이다.
- [0033] 본 명세의 하나 이상의 코클리에이트는 하나 이상의 항진균 화합물(들), 예를 들어 적어도 2개의 항진균 화합물, 예를 들어 적어도 3개의 항진균 화합물 또는 예를 들어 적어도 4개의 항진균 화합물이 회합되거나 로딩된다. 일부 실시태양에서, 상기 하나 이상의 항진균 화합물은 살진균 화합물, 예를 들어 암포테리신 B 또는 정진균 화합물, 예를 들어 플루코나졸 및/또는 5-플루시토신이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "살진균" 화합물은 단순히 진균의 생육을 방지하기보다는 상기 진균을 죽이는 항진균 화합물이다. 대조적으로, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "정진균" 화합물은 진균 생육을 방지하지만 상기 진균을 죽이지는 않는 항진균 화합물이다.
- [0034] 전형적으로, 본 명세의 코클리에이트는 하나 이상의 폴리엔, 아졸 및/또는 피리미딘 유사체가 회합되거나 로딩된다. 전형적으로, 상기 폴리엔은 암포테리신 B이다. 일부 실시태양에서, 상기 아졸은 플루코나졸, 케토코나졸, 라부코나졸, 알바코나졸, 이트라코나졸, 포사코나졸, 이사부코나졸 및/또는 보리코나졸이다. 보다 전형적으로, 상기 아졸은 플루코나졸이다. 전형적으로, 상기 피리미딘 유사체는 5-플루시토신이다.
- [0035] 일부 실시태양에서, 다른 항진균 화합물들이 본 코클리에이트 조성물로의 제형화에 고려된다. 상기와 같은 다른 항진균 화합물은 세포벽 성분, 예를 들어 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)-고정된 만노단백질의 합성을 억제할 수 있는 것들, 예를 들어 E1210, 경구 활성 분자(크립토코커스 종에 대해 시험관내 활성을 갖는다)를 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 항진균 화합물은 에르고스테롤 합성 억제제, 예를 들어 VT-1129이며, 상기는 경구 이용 가능하고, 양호한 CNS 침투를 보이고, 크립토코커스 종 감염의 마우스 모델에서 살진균성이다.
- [0036] 다른 실시태양에서, 상기 항진균 화합물은 크립토코커스 종에 대해 플루코나졸과 함께 추가적인 또는 상승작용적인 활성을 나타내는 것으로 공지된 경구 이용 가능한 화합물이다. 상기와 같은 항진균 화합물은 아미오다론(심장 부정맥 치료제) 페노티아진(정신병 치료제) 및 타목시펜(에스트로겐 길항물질)을 포함한다.
- [0037] 일부 실시태양에서 본 코클리에이트 조성물의 적어도 2개의 항진균 화합물은 각각 별도의 코클리에이트 중에 있다. 다른 실시태양에서, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물은 각각 동일한 코클리에이트 중에 있다. 그러나, 보다 전형적으로는 상기 적어도 2개의 항진균 화합물 중 단지 하나만이 코클리에이트화된다. 훨씬 더 전형적으로, 상기 코클리에이트화된 항진균 화합물은 폴리엔, 예를 들어 암포테리신 B이고, 제2, 제3 또는 그 이상의 항

진균 화합물은 코클리에이트화되지 않는다.

[0038] 전형적인 실시태양에서, 본 코클리에이트 조성물은 코클리에이트화된 암포테리신 B 및 코클리에이트화되지 않은 아졸 및/또는 코클리에이트화되지 않은 피리미딘 유사체를 포함한다. 전형적으로, 상기 코클리에이트화되지 않은 아졸은 플루코나졸이고 상기 코클리에이트화되지 않은 피리미딘 유사체는 5-푸시토신이다. 훨씬 더 전형적으로, 본 코클리에이트 조성물은 코클리에이트화된 암포테리신 B 및 코클리에이트화되지 않은 5-플루시토신을 포함한다.

[0039] 일부 실시태양에서, 본 코클리에이트 조성물은 점막 투여, 전형적으로는 경구 및/또는 비내 투여, 보다 전형적으로는 경구 투여용으로 제형화된다. 그러나, 정맥내, 피하, 복강내 및 척수강내 투여용으로 제형화된 코클리에이트 조성물도 또한 고려된다.

코클리에이트 및 그의 제조 방법

[0041] 코클리에이트는 음으로 하전된 지질, 예를 들어 포스파티딜세린과 2가 양이온, 예를 들어 칼슘의 상호작용시 자발적으로 형성되는 무수의 안정성 다층 지질 결정이다(예를 들어 미국특허 제 4,078,052; 5,643,574; 5,840,707; 5,994,318; 6,153,217; 6,592,894 호뿐만 아니라 PCT 공보 제 WO 2004/091572; WO 2004/091578; WO 2005/110361, WO 2012/151517, 및 WO2014/022414 호, 미국특허 공보 제 2014/220108 호 및 특허 공보 제 2010/0178325 호(이들은 각각 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)를 참조하시오). 전형적으로 이들은 결정 코클리에이트라 지칭된다.

[0042] 결정 코클리에이트는 내부 수성 공간 없이, 나선으로 또는 적층된 시트로 말아 올려진 크고 연속적인 고형 인지질 이중층 시트 또는 지층으로 이루어지는 독특한 다층 구조를 갖는다(도 1). 상기 독특한 구조는 회합된 "코클리에이트화된" 분자들을 분해로부터 보호한다. 전체 코클리에이트 구조는 일련의 고형층들이므로, 상기 코클리에이트 구조 내부의 성분들은, 상기 코클리에이트의 외부층들이 가혹한 환경 조건 또는 효소에 노출될 수 있다하더라도, 온전하게 남아있다. 혈청 및 점막 분비물 중의 생체내 2가 양이온 농도는 상기 코클리에이트 구조를 유지하도록 한다. 따라서, 코클리에이트-회합된 분자의 대다수는 고형의 안정한 불투과성 구조의 내층 중에 존재한다. 그러나, 일단 세포 내부내에 있게 되면 저 칼슘 농도는 상기 코클리에이트 결정을 개방시키고 코클리에이트로 제형화된 분자를 방출시킨다(도 2). 상응하게, 코클리에이트 제형은 점막 분비물, 혈장 및 위액을 포함한 생리학적 유체 중에서 온전하게 남아 있고, 이에 의해 점막, 예를 들어 경구 또는 비내 투여를 포함한 다수의 투여 경로에 의한 생물학적 활성 화합물의 전달을 매개한다.

[0043] 전형적인 코클리에이트 구조는 교번하는 2가 양이온과 인지질 이중층(적어도 하나의 음으로 하전된 인지질을 포함한다)을 포함하는 지질 지층을 포함한다. 전형적으로, 화물 부분, 예를 들어 항진균제, 예를 들어 암포테리신 B(도 3)는 상기 코클리에이트의 지질 지층내에 격리된다.

[0044] 코클리에이트는 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 하나의 전형적인 실행에서, 본 명세서에 내용 전체가 참고로 인용된 미국특허 공보 제 2014/220108 호에 기재된 방법을 사용하여 본 명세의 코클리에이트를 제조한다. 상기 공정의 요약을 도 4에 도시한다. 상기 방법에서, 소수성 항진균 화합물, 예를 들어 암포테리신 B를 용매, 예를 들어 디메틸설폐사이드에 용해시키고 예를 들어 0.22 μ m 필터를 통해 여과하고 예를 들어 200 밀리리터 멸균수 중의 2000 밀리그램의 50% 대두 포스파티딜세린(PS) 리포솜(상기 PS 리포솜을 먼저, 예를 들어 5, 0.8 및 0.45 μ m 필터를 통해 여과한다)과 합하여 AmB와 같은 항진균제를 함유하는 리포솜을 형성시킨다. 상기 생성된 혼합물에 양이온, 예를 들어 다가 또는 2가 양이온을 가할 수 있다. 다가 또는 2가 양이온의 첨가는 상기 리포솜의 붕괴, 및 양이온-킬레이트화된 인지질 이중층의 시트의 형성을 생성시키고, 상기 시트는 말아 올려지거나 적층되어 AmB와 같은 항진균제를 함유하는 코클리에이트를 형성시킨다. 상기 항진균제-함유 코클리에이트, 예를 들어 AmB-함유 코클리에이트를 동결건조하에서 건조시킬 수 있다. 멸균수를 상기 건조된 분말, 항진균성 코클리에이트에 가하여 혼탁액을 제조할 수 있다. 상기 혼탁액을 빛의 부재하에 4 °C에서 보관할 수 있다.

[0045] 항진균제를 함유하는 코클리에이트의 다른 제조 방법은 트랩핑-고 pH 방법, 트랩핑-필름 방법 및 하이드로젤 방법을 포함한다. 상기 트랩핑-고 pH 방법에서, 지질 분말 및 항진균 화합물, 예를 들어 AmB를, 예를 들어 멸균 폴리프로필렌 튜브 중에서, 예를 들어 10:1의 액체/항진균제 물비로 혼합한다. 완충제, 예를 들어 TES [N-트리스(하이드록시메틸)-메틸-2-아미노메탄 살포산](pH 7.4)을 가한다. 다중라멜라 리포솜이 와동후에 형성된다. 이어서 pH를 예를 들어 1 N NaOH의 첨가에 의해 예를 들어 11.5로 증가시켜 상기 항진균 화합물, 예를 들어 AmB를 용해시킨다. 상기 AmB 결정의 부재 및 리포솜의 존재를 상 콘트라스트 및 편광 광학 현미경검사에 의해 모니터할 수 있다. 다가 또는 2가 양이온, 예를 들어 염화 칼슘을 상기 항진균 리포솜 혼탁액에, 예를 들어 2:1

의 지질/양이온 몰비로 서서히 가하여 코클리에이트를 형성시킨다. 이어서 외부 pH를 pH 7로 조절할 수 있다.

[0046] 상기 트랩핑 필름 방법에서, 항진균 화합물, 예를 들어 AmB를 용매, 예를 들어 메탄올에 간단한 초음파에 의해 용해시키고 상기 용액을 클로로포름 중의 지질에 가한다. 상기 항진균제, 예를 들어 AmB는 상기 클로로포름/메탄올 혼합물에 쉽게 용해된다. 이어서 상기 혼합물을 회전 증발기를 사용하여 필름으로 건조시키고 감압(1바)하에서 예를 들어 35 °C 내지 40 °C에서 서서히 가온할 수 있다. 이어서 상기 건조된 지질 필름을 탈이온수로 수화시키고 초음파 처리할 수 있다. 상기 항진균-리포솜 크기는 대략 50 나노미터이어야 한다. 상기 코클리에이트를 형성시키기 위해서, 다가 또는 2가 양이온 용액, 예를 들어 용액 중 염화 칼슘을 상기 리포솜 혼탁액에 서서히 가하여 코클리에이트를 형성시킨다.

[0047] 상기 하이드로겔 방법을 사용하여 항진균 코클리에이트를 제조하기 위해서, 항진균 화합물, 예를 들어 AmB를 메탄올에 용해시키고 클로로포름 중의 지질에, 예를 들어 10:1 몰비로 가하고, 이어서 상기 혼합물을 회전 증발기를 사용하여 약물-지질 필름으로 건조시킨다. 이어서 상기 필름을 탈이온수로 수화시키고 상기 약물-지질 혼탁액을 상기 항진균 화합물을 함유하는 작은 리포솜이 수득될 때까지 초음파 처리할 수 있다. 이어서 상기 항진균-리포솜 혼탁액을 예를 들어 2/1 v/v 텍스트란/리포솜의 혼탁액 중의 예를 들어 40% w/w 텍스트란-500,000과 혼합할 수 있다. 이어서 상기 혼합물을 주사기를 사용하여 예를 들어 자기교반(800 내지 1000 rpm)하에 15% w/w PEG-8000에 주사한다. PEG 연속상 중에 분산된 항진균 리포솜/텍스트란 소적의 수성-수성 유화액을 수득한다. 이어서 다가 또는 2가 양이온 용액, 예를 들어 용액 중 염화 칼슘을 상기 유화액에 가한다. 교반을 계속하여 작은-크기의 항진균 코클리에이트를 느리게 형성시키며, 상기 코클리에이트는 텍스트란 소적 중에 격리된다. 이어서 상기 중합체를 예를 들어 1 mM CaCl₂ 및 150 mM NaCl을 함유하는 세척 완충제의 첨가에 의해 세척한다.

[0048] 통상적인 숙련가에 의해 인식되는 바와 같이, pH, 염 농도, 교반 방법 및 속도, 양이온 유형, 농도 및 첨가속도, 지질 조성, 농도, 및 지질 대 다른 물질의 비 등을 포함한 다수의 매개변수들이 상기 제형화에 영향을 미치며, 특정 물질의 코클리에이트화를 최적화하기 위해 상기 매개변수들을 변화시킬 수 있다.

[0049] 일부 실시태양에서, 친수성 항-진균 화합물, 예를 들어 5-FC 또는 친수성 도메인을 함유하는 항진균 화합물, 예를 들어 플루코나졸을 또한 코클리에이트로 제형화할 수 있다. 상기와 같은 화합물의 코클리에이트에의 통합 방법은 당해 분야에 주지되어 있으며 예를 들어 미국특허 공보 제 2014/220108 호에 기재되어 있다. 임의의 특정 이론에 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 친수성 분자 또는 친수성 도메인을 갖는 큰 분자, 예를 들어 본 명세의 항진균 화합물을 포함하는 관심의 활성 약학 성분(API)을, "뗏목"처럼 작용하고 온전하게 남아있으며 상기 코클리에이트 결정 기질내에 포매된 지질 도메인과 상기 API를 회합시킴으로써 향상된 방식으로 코클리에이트로 제형화할 수 있다. 상기와 같은 지질은 당해 분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 바와 같은 "중성 지질"을 포함한다.

[0050] 전형적인 실행에서, 상기 리포솜을 코클리에이트로 붕괴시키는데 사용될 수 있는 본 명세서에 기재된 다가 양이온은 2가 금속 양이온, 예를 들어 칼슘, 아연, 마그네슘 및 바륨이다. 보다 전형적인 실행에서, 상기 2가 금속 양이온은 칼슘이다.

[0051] 일부 실행에서, 항진균제 대 지질(중량/중량)의 비는 1:1 내지 1:50의 범위, 또는 예를 들어 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20 및 1:25, 전형적으로 1:1 내지 1:1:20, 예를 들어 1:2.5 내지 1:10과 같이 상기 범위 중의 임의의 범위, 전형적으로는 1:10이다.

[0052] 상기 코클리에이트의 형성 중 사용되는 리포솜은 작은 단일라멜라 소낭(SUV)을 포함하여, 다중라멜라(MLV) 또는 단일라멜라(ULV)일 수 있다. 이를 리포솜 용액 중 지질의 농도는 약 0.1 mg/ml 내지 500 mg/ml일 수 있다. 전형적으로, 상기 액체의 농도는 약 0.5 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 보다 전형적으로 약 1 mg/ml 내지 약 25 mg/ml이다.

[0053] 크기-조절제를 상기 코클리에이트의 제조 방법 중에 도입시킬 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 크기-조절제란 코클리에이트의 입자 크기를 감소시키는 작용제를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "입자 크기"란 용어는 입자 직경, 또는 상기 입자가 구형이 아닌 경우, 상기 입자의 한 방향에서 가장 큰 신장을 지칭한다. 상기 코클리에이트의 입자 크기를 통상적인 방법, 예를 들어 서브마이크론 입자 크기 분석기를 사용하여 측정할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 크기 조절제는 지질-고정된 폴리뉴클레오티드, 지질-고정된 당(당지질), 또는 지질-고정된 폴리펩티드이다. 다른 실시태양에서, 상기 크기 조절제는 담즙염, 예를 들어 옥시콜레이트, 콜레이트, 케노데옥시콜레이트, 타우로콜레이트, 글리코콜레이트, 타우로케노데옥시콜레이트, 글리코

케노데옥시콜레이트, 데옥시콜레이트, 또는 리토콜레이트이다. 담즙염은 양이온, 대개는 나트륨과 혼합된 담즙산이다. 담즙산은 포유동물의 담즙에서 우세하게 발견되는 스테로이드산이며 상업적으로 입수할 수 있다.

[0054] 몇몇 실시태양에서, 상기 크기-조절제를 상기 침전된 코클리에이트의 형성전에 상기 지질 또는 리포솜에 가한다. 예를 들어, 하나의 실시태양에서, 상기 크기-조절제를, 코클리에이트가 후속적으로 형성될(예를 들어 양이온의 첨가 또는 투석에 의해) 리포솜 혼탁액에 도입시킨다. 한편으로, 상기 크기-조절제를 약물학적 활성제의 첨가 전 또는 후에, 지질 용액에 도입시킬 수 있다.

[0055] 일부 실시태양에서, 본 발명의 코클리에이트는 임의로 하나 이상의 응집 억제제를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "응집 억제제"란 용어는 코클리에이트의 응집을 억제하는 작용제를 지칭한다. 상기 응집 억제제는 전형적으로는 적어도 상기 코클리에이트의 표면상에 존재하며 오직 상기 코클리에이트의 표면상에만 존재할 수도 있다(예를 들어 응집 억제제가 코클리에이트 형성 후에 도입되는 경우). 응집 억제제를 코클리에이트 형성 전, 후 또는 도중에 첨가할 수 있다. 당해 분야의 통상적인 숙련가는 단지 통상적인 실험으로 목적하는 크기의 코클리에이트를 형성시키는데 필요한 응집 억제제의 양을 쉽게 측정할 수 있을 것이다.

[0056] 본 명세에 따라 사용될 수 있는 적합한 응집 억제제는 비제한적으로 하기 중 적어도 하나를 포함한다: 카제인, 카파-카제인, 우유, 알부민, 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 토키 혈청 알부민, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 프로필셀룰로스, 하이드록시셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 카복시메틸 셀룰로스, 카복시에틸 셀룰로스, 풀루란, 폴리비닐 알콜, 나트륨 알기네이트, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥사이드, 잔탄 겸, 트라가칸트 겸, 구아 겸, 아카시아 겸, 아라비아 겸, 폴리아크릴산, 메틸메트아크릴레이트 공중합체, 카복시 중합체, 아밀로스, 고 아밀로스 전분, 하이드록시프로필화된 고 아밀로스 전분, 텍스트린, 펙틴, 키틴, 키토산, 레반, 엘시난, 콜라겐, 젤라틴, 제인, 글루텐, 카라기난, 카나우바 왁스, 헬락, 라텍스 중합체, 우유 단백질 단리물, 대두 단백질 단리물, 유청 단백질 단리물 및 이들의 혼합물.

[0057] 임의의 적합한 지질을 사용하여 코클리에이트를 제조할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 지질은 하나 이상의 음으로 하전된 지질을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "음으로 하전된 지질"이란 용어는 산성, 염기성 또는 생리학적 pH에서 수용액 중에 형식 음전하를 갖는 헤드 그룹을 갖는 지질을 포함하며, 쯔비티이온 성 헤드 그룹을 갖는 지질을 또한 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 음으로 하전된 지질은 인지질이다.

[0058] 상기 코클리에이트는 또한 음으로 하전되지 않은 지질(예를 들어 양성 및/또는 중성 지질)을 포함할 수 있다. 전형적으로, 상기 코클리에이트는 상당량의 음으로 하전된 지질을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 지질의 대다수는 음으로 하전된다. 하나의 실시태양에서, 상기 지질은 적어도 50%의 음으로 하전된 지질, 예를 들어 인지질을 포함하는 지질들의 혼합물이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 지질은 적어도 75%의 음으로 하전된 지질, 예를 들어 인지질을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 지질은 적어도 85%, 90%, 95% 또는 98%의 음으로 하전된 지질, 예를 들어 인지질을 포함한다. 더욱 다른 실시태양에서, 상기 음으로 하전된 지질(예를 들어 인지질)은 상기 코클리에이트 중 전체 지질의 30%-70%, 35%-70%, 40%-70%, 45%-65%, 45%-70%, 40%-60%, 50%-60%, 45%-55%, 45%-65%, 또는 45%-50%를 차지한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 음으로 하전된 지질(예를 들어 인지질)은 상기 코클리에이트 중 전체 지질의 40%-60% 또는 45%-55%를 차지한다. 일부 실시태양에서, 상기 음으로 하전된 지질(예를 들어 인지질)은 상기 코클리에이트의 비-소수성 도메인 성분 중 전체 지질의 30%-70%, 35%-70%, 40%-70%, 45%-65%, 45%-70%, 40%-60%, 50%-60%, 45%-55%, 45%-65%, 또는 45%-50%를 차지한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 음으로 하전된 지질(예를 들어 인지질)은 상기 코클리에이트의 비-소수성 도메인 중 전체 지질의 40%-60% 또는 45%-55%를 차지한다. 일부 실시태양에서, 상기 음으로 하전된 지질은 인지질이며 상기 코클리에이트 중 또는 상기 코클리에이트의 비-소수성 도메인 성분 중 전체 인지질의 30%-70%, 35%-70%, 40%-70%, 45%-65%, 45%-70%, 40%-60%, 50%-60%, 45%-55%, 45%-65%, 또는 45%-50%를 차지한다. 일부 실시태양에서, 상기 음으로 하전된 지질은 인지질이며 상기 코클리에이트 중 또는 상기 코클리에이트의 비-소수성 도메인 성분 중 전체 인지질의 40%-60% 또는 45%-55%를 차지한다.

[0059] 상기 음으로 하전된 지질은 합성적으로 생성된 지질을 포함하여, 달걀-계 지질, 소-계 지질, 돼지-계 지질, 식물-계 지질 또는 다른 공급원으로부터 유래된 유사한 지질을 포함할 수 있다. 상기 음으로 하전된 지질은 포스파티딜세린(PS), 디올레오일포스파티딜세린(DOPS), 포스파티드산(PA), 포스파티딜이노시톨(PI), 및/또는 포스파티딜 글리세롤(PG) 및 또는 이들 지질 중 하나 이상과 다른 지질과의 혼합물을 포함할 수 있다. 추가로 또는 한편으로, 상기 지질은 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 디포스포파티딜글리세롤(DPG), 디올레오일 포스파티드산(DOPA), 디스테아로일 포스파티딜세린(DSPS), 디미리스토일 포스파티딜세린(DMPS), 디팔미토일

포스파티딜글리세롤(DPPG) 등을 포함할 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 상기 포스파티딜세린은 달걀 또는 소유래된 포스파티딜세린이다.

[0060] 대두 지질을 함유하는 코클리에이트

일부 전형적인 실시태양에서, 하기 본 명세서에 기재된 지오드 코클리에이트를 포함한 코클리에이트를 콩과식물-계 인지질, 보다 전형적으로 대두-계 지질을 사용하여 제조한다. 상기와 같은 대두-계 지질은 천연 또는 합성일 수 있다. 훨씬 더 전형적으로, 상기 대두-계 지질은 대두 인지질, 예를 들어 대두 포스파티딜세린이며, 상기 코클리에이트의 지질 성분의 40 내지 74 중량%의 양으로 존재한다. 한편으로, 상기 대두 포스파티딜세린은 상기 코클리에이트의 지질 성분의 중량을 기준으로 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% 또는 그의 임의의 증분값일 수 있다. 모든 값, 및 이들 값 및 범위사이의 범위는 본 명세에 의해 포함될 예정인 것으로 이해해야 한다. 전형적인 실시태양에서, 상기 인지질은 45-70% 대두 포스파티딜세린을 포함한다. 보다 전형적인 실시태양에서, 상기 인지질은 45-55% 대두 포스파티딜세린을 포함한다.

[0062] 대두 포스파티딜세린을 예를 들어 아반티 폴라 리피즈 인코포레이티드(Avanti Polar Lipids, Inc.)(미국 알라바마주 엘리베스터 소재)로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 한편으로, 대두 포스파티딜세린을 주지된 및 표준 정제 기법에 따라 대두 인지질 조성물로부터 정제할 수 있으며, 상기 조성물은 다수의 대두 인지질의 혼합물이다.

[0063] 일부 실시태양에서, 중성 지질을 상기 대두 포스파티딜세린과 함께 사용하여 본 코클리에이트를 제조한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "중성 지질"이란 용어는, 생리학적 pH에서 하전되지 않거나 중성의 쯔비터이온 형태로 존재하고 따라서 음이온성 작용기가 없는 지질의 그룹내에 포함되는 다수의 지질 종들 중 어느 하나를 포함한다. 상기와 같은 지질은 예를 들어 디아실폴스파티딜콜린, 디아실폴스파티딜에탄올아민, 세라미드, 스팽고마이엘린, 디하이드로스핑고마이엘린, 세팔린, 및 세레브로시드를 포함한다. 본 명세서에 기재된 코클리에이트 조성물에 사용하기 위한 중성 지질의 선택은 일반적으로, 예를 들어 코클리에이트 크기 및 안정성을 고려하여 안내된다. 가변 쇄 길이 및 포화도의 다양한 아실쇄 그룹을 갖는 지질을 입수하거나 또는 주지된 기법에 의해 단리 또는 합성할 수 있다. 하나의 실시태양의 그룹에서, C₁₄ 내지 C₂₂ 범위의 탄소 쇄 길이를 갖는 포화된 지방산을 함유하는 지질을 사용할 수 있다. 또 다른 실시태양의 그룹에서, C₁₄ 내지 C₂₂ 범위의 탄소 쇄 길이를 갖는 일 또는 이-불포화된 지방산을 갖는 지질을 사용할 수 있다. 더욱 또 다른 실시태양의 그룹에서, C₈ 내지 C₁₂ 범위의 탄소 쇄 길이를 갖는 일- 또는 이-불포화된 지방산을 갖는 지질을 사용할 수 있다. 추가로, 포화된 및 불포화된 지방산 쇄의 혼합물을 갖는 지질을 사용할 수 있다.

[0064] 일부 실시태양에서, 본 명세에 사용되는 중성 지질은 DOPE, DSPC, DPPC, POPC, 또는 임의의 관련된 포스파티딜콜린이다. 본 명세에 유용한 중성 지질은 또한 스팽고마이엘린, 디하이드로스핑고마이엘린, 또는 다른 헤드 그룹, 예를 들어 세린 및 이노시톨을 갖는 인지질로 구성될 수 있다.

[0065] 전형적인 실행에서, 99.9% 순수한 디올레오일 포스파티딜세린, 99.9% 순수한 대두 포스파티딜세린, 75% 대두 포스파티딜세린 및 50% 대두 포스파티딜세린이 코클리에이트 제조에 사용된다. 99.9% 순수한 포스파티딜세린의 지질 조성은 전형적으로 중성 지질, 예를 들어 비제한적으로 스팽고마이엘린 및/또는 포스파티딜콜린의 첨가에 의해 변형된다. 보다 낮은 순도의 포스파티딜세린(예를 들어 50% 대두 포스파티딜세린)을 출발 물질로서 사용하는 경우, 상기 보다 낮은 순도의 포스파티딜세린에 추출 단계를 가하여 불필요한 불순물, 예를 들어 뉴클레아제를 제거할 수 있다.

[0066] 지오드 코클리에이트

[0067] 일부 실행에서, 본 명세의 코클리에이트는 예를 들어 미국특허 공보 2013/0224284(전체 내용은 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같은 지오드 코클리에이트 또는 지오레이트이다. 지오드 코클리에이트는 음으로 하전된 인지질을 포함하는 지질 단층(이때 상기 지질 단층은 소수성 도메인, 예를 들어 오일을 둘러싼다), 및 화물 부분, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 항진균 화합물(상기 소수성 도메인내에 분산되어 있다)을 추가로 포함한다. 상기 지질 단층은 상기 지오드 코클리에이트의 지질 지층내에 격리된다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "소수성 도메인"은 주변부 둘레에 지질 단층의 형성을 허용하기에 실제로 충분히 소수성인 조성물이다. 소수성 도메인은 전형적으로 화물 부분, 예를 들어 본 명세의 항진균 화합물, 예를 들어 AmB와 회합된 소수성 조성물, 예를 들어 오일 또는 지방을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 소수성 도메인(HD)과 상기 지오드 코클리에이트의 인지질 성분(PPLGD)간의 비 HD:PPLGD 또는 피마자 오일 도메인(COD) 및

상기 지오드 코클리에이트의 인지질 성분(PPLGD)간의 비 COD:PPLGD는 1:20 이하, 1:15 이하, 1:10 이하, 1:8 이하, 1:6 이하, 1:5 이하, 1:4 이하, 1:3.5 이하, 1:3 이하, 1:2.75 이하, 1:2.5 이하, 1:2.25 이하, 1:2 이하, 1:1.75 이하, 1:1.5 이하, 1:1.25 이하, 1:1 이하이다.

[0069] 도 5는 지오드 코클리에이트를 어떻게 제조할 수 있는지에 대한 예시적인 도식을 도시한다. 상기 예시적인 방법에서, 인지질(개방 고리로서 나타냄)이 소수성 도메인(벳금친 원), 예를 들어 오일과 결합되고 혼합되어 리포솜 및 상기 소수성 도메인을 둘러싸는 지질 단층을 포함하는 안정한 유화액을 형성한다. 화물 부분, 예를 들어 항진균 화합물 등이 상기 소수성 도메인내에 분산될 수 있다. 상기 소수성 도메인은 그의 표면에 포매된 인지질을 갖는다. 임의의 이론에 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 상기 인지질의 소수성 아실쇄는 상기 소수성 도메인내에 있어, 상기 인지질 헤드 그룹의 코팅으로 인해 친수성 표면을 갖는 소수성 도메인을 생성시키고 안정한 유화액을 형성시키는 것으로 여겨진다. 상기 인지질이, 예를 들어 포스파티딜세린에 의해 음으로 하전되는 경우, 2가 양이온, 예를 들어 칼슘의 첨가는 교변하는 2가 양이온 및 인지질 이중층을 포함하는 결정성 구조(또는 지질 지층)의 형성을 유도한다. 상기 지질 지층은 빗금으로 나타낸다. 지오드 코클리에이트에서, 상기 소수성 도메인을 둘러싸는 지질 단층은 "지오드"와 유사하게, 결정성 기질내에 "둘러싸이거나" "포획된다".

약학 조성물

[0070] 본 명세서에 기재된 바와 같은 코클리에이트 조성물을 약학 조성물로서 제조할 수 있다. 본 명세서에 개시된 약학 조성물에 적합한 제조 형태는 예를 들어 정제, 캡슐, 연질 캡슐, 과립, 분말, 혼탁액, 유화액, 미세유화액, 나노유화액, 단위 투여형, 고리, 필름, 좌약, 용액, 크림, 시럽, 경피 패치, 연고 및 젤을 포함한다. 그러나, 전형적으로 상기 코클리에이트는 점막, 예를 들어 경구 또는 비내, 전형적으로 경구 투여용으로 제조된다.

[0071] 상기 약학 조성물은 다양한 pH 및 이온 강도의 다른 약학적으로 허용 가능한 부형제, 예를 들어 완충제(예를 들어 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트); 표면에의 흡수를 방지하기 위한 첨가제, 예를 들어 알부민 또는 젤라틴; 프로테아제 억제제; 침투 증진제; 용해제(예를 들어 글리세롤, 폴리에틸렌 글리세롤); 산화방지제(예를 들어 아스코르브산, 나트륨 메타비설파이트, 부틸화된 하이드록시아니솔); 안정제(예를 들어 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스); 점도 증가제(예를 들어 카보머, 콜로이드성 이산화 규소, 에틸 셀룰로스, 구아검); 감미제(예를 들어 아스파탐, 시트르산); 보존제(예를 들어 티메로살, 벤질 알콜, 파라벤); 유동-보조제(예를 들어 콜로이드성 이산화 규소), 가소제(예를 들어 디에틸 프탈레이트, 트리에틸 시트레이트); 유화제(예를 들어 카보머, 하이드록시프로필 셀룰로스, 나트륨 라우릴 설레이트); 중합체 코팅제(예를 들어 폴록사민 또는 폴록사민, 하이프로멜로스 아세테이트 숙시네이트); 코팅 및 필름 형성제(예를 들어 에틸 셀룰로스, 아크릴레이트, 폴리메트아크릴레이트, 하이프로멜로스 아세테이트 숙시네이트); 항원보강제; 액체 제형을 위한 약학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어 수성(수, 알콜/수용액, 유화액 또는 혼탁액, 염수 및 완충된 매질 포함) 또는 비-수성(예를 들어 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 주사성 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올리에이트) 용액, 혼탁액, 유화액 또는 오일; 및 비경구 비히클(피하, 정맥내, 동맥내, 척수강내 또는 근육내 주사용), 예를 들어 비제한적으로 염화 나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화 나트륨, 락테이트화된 링거액 및 고정유를 포함할 수 있다.

[0072] 몇몇 실시태양에서, 상기 약학 조성물은 염, 예를 들어 NaCl 또는 담즙염, 예를 들어 옥시콜레이트, 콜레이트, 케노데옥시콜레이트, 타우로콜레이트, 글리코콜레이트, 타우로케노데옥시콜레이트, 글리코케노데옥시콜레이트, 데옥시콜레이트 또는 리토콜레이트를 포함한다. 담즙염은 양이온, 대개는 나트륨이 혼합된 담즙산이다. 담즙산은 포유동물의 담즙에서 우세하게 발견되는 스테로이드산이며 상업적으로 입수할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 담즙염은 콜레이트를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 담즙염은 데옥시콜레이트를 포함한다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 담즙염은 콜레이트 및 데옥시콜레이트를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 담즙염은 콜레이트 및 데옥시콜레이트로 이루어진다.

[0073] 몇몇 실시태양에서, NaCl의 농도는 1 mM 내지 1M, 1mM 내지 0.5M, 1mM 내지 0.1M, 1mM 내지 50mM, 10mM 내지 100mM, 10mM 내지 50 mM, 0.1M 내지 1M, 0.1M 내지 0.5M, 또는 0.5M 내지 1M이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 담즙염의 농도는 1mM 내지 100mM, 1mM 내지 50 mM, 1mM 내지 25mM, 1 mM 내지 10mM, 1mM 내지 5mM, 0.1mM 내지 1mM, 또는 0.1mM 내지 0.5mM 담즙염이다.

[0074] 이들 부형제를 예로서 제공하며, 본 명세서에 나열된 것들과 동일한 화학적 특징을 제공할 수 있는 다른 부형제 또는 상이한 부형제들이 존재함은 당해 분야의 숙련가들에게 공지될 것이다.

[0076] 투여량 및 투여

본 명세서에 개시된 바와 같은 코클리에이트 조성물을 포함하는 약학 조성물은 그의 목적하는 투여 경로에 적합하게 제형화된다. 상기 투여를 수행하기 위한 방법은 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 공지되어 있다. 여기에는 예를 들어 비경구 경로, 예를 들어 척수강내, 정맥내, 혈관내, 동맥내, 피하, 근육내, 복강내, 심실내, 경막외강내, 또는 경구, 코, 눈, 직장 또는 국소뿐만 아니라 다른 경우들에 의한 주사가 포함된다. 전형적으로, 상기 코클리에이트를 예를 들어 혼탁액 투여에 의해 비내로, 또는 예를 들어 혼탁액, 정제, 캡슐, 연질젤 또는 다른 경구 투여형 투여에 의해 경구로 투여한다.

몇몇 실시태양에서, 상기 항진균제(예를 들어 코클리에이트화된 암포테리신 B, 코클리에이트화되지 않은 5-FC 및/또는 코클리에이트화되지 않은 플루코나졸)를 0.1-20 mg/kg, 5-10 mg/kg, 5-15 mg/kg, 10-15 mg/kg, 10-13 mg/kg, 10-20 mg/kg, 5-25 mg/kg, 1-30 mg/kg 또는 2.5 mg/kg의 투여량으로 투여한다. 예를 들어 코클리에이트화된 암포테리신 B를 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg 범위의 양으로, 예를 들어 1 mg/kg으로 투여할 수 있다. 한편으로, 상기 항진균제를 약 200-1000 mg/일, 400-1000 mg/일, 200-800 mg/일, 300-800 mg/일, 400-800 mg/일, 500-700 mg/일, 200-2000 mg/일, 100-4000 mg/일, 100-600 mg/일, 200-600 mg/일, 400-600 mg/일, 또는 300-700 mg/일, 예를 들어 비제한적으로 약 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 또는 4000 mg의 고정된 투여량으로 투여할 수 있다. 예를 들어 코클리에이트화된 암포테리신 B를 2주일의 기간 동안 0.1 mg/kg/일 내지 4 mg/kg/일 범위의 양으로, 예를 들어 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 2, 3, 4 mg/kg/일로 투여할 수 있다. 보다 낮은 독성으로 인해, 상기 코클리에이트화된 항진균제를 정맥내 투여된 항진균제보다 더 빈번히 또는 더 오랜 기간 동안 투여할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 코클리에이트화된 항진균제를 하루에 1회, 하루에 2회, 하루에 3회, 또는 하루에 4회 투여할 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 상기 코클리에이트 제형을 주당 1회, 주당 2회, 주당 3회, 또는 주당 4회 투여한다. 하나의 실시태양에서, 상기 코클리에이트화된 항진균제를 매주 2-3회 투여할 수 있다. 다른 실시태양에서, 상기 코클리에이트 제형을 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12주 동안 매일 투여한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 코클리에이트 제형을 적어도 3개월 동안, 적어도 4개월 동안, 또는 적어도 6개월 동안 매일 투여한다. 전형적으로, 상기 코클리에이트 조성물을 2주일 동안 투여한다.

[0079] 치료 방법

본 명세의 하나의 태양은 크립토코커스 종으로 인한 대상체의 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 치료 또는 예방이 필요한 대상체에게 코클리에이트 조성물을 포함하는 제형을 투여함을 포함하며, 여기에서 상기 코클리에이트 조성물은 적어도 2개의 항진균 화합물을 포함하고, 여기에서 상기 적어도 2개의 항진균 화합물은 암포테리신 B, 5-플루시토신, 플루코나졸, 케토코나졸, 라부코나졸, 알바코나졸, 이트라코나졸, 포사코나졸, 이사부코나졸 및/또는 보리코나졸 중에서 선택되고, 여기에서 상기 적어도 2개의 항진균 화합물 중 적어도 하나는 코클리에이트로서 제형화된다.

본 방법에 사용되는 코클리에이트를 본 명세서에 기재된 바와 같은 지질 및 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물을 동일한 코클리에이트 중에서 제형화한다. 다른 실시태양에서, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물을 상이한 코클리에이트 중에서 제형화한다. 전형적으로, 상기 적어도 2개의 항진균 화합물은 암포테리신 B 및 5-플루시토신이고 상기 암포테리신 B는 코클리에이트로서 제형화된다.

일부 실시태양에서, 상기 감염은 피부, 폐, 전립선, 뼈 및/또는 중추신경계(CNS)를 수반한다. 전형적으로, 상기 감염은 CNS, 예를 들어 뇌막을 수반한다. 일부 실시태양에서, 상기 감염은 크립토코커스 수막뇌염 또는 크립토코커스 뇌수막염이다. 일부 실시태양에서, 상기 크립토코커스 종에 의해 야기된 감염은 크립토코커스 네오포르만스에 의해 야기된다. 다른 실시태양에서, 상기 감염은 크립토코커스 가타이에 의해 야기된다.

상기 투여는 경구, 비내, 척수강내 또는 정맥내일 수 있다. 그러나, 가장 전형적으로, 상기 투여는 경구이다. 일부 실시태양에서, 상기 코클리에이트 조성물을 적어도 7일, 적어도 14일, 적어도 21일 또는 적어도 28일 동안 매일 투여한다.

일부 실시태양에서, 상기 코클리에이트 조성물의 항진균 화합물을 뇌로 전달한다. 일부 실시태양에서, 상기 코클리에이트 조성물의 항진균 화합물을 경구 투여후 뇌로 전달한다. 일부 실시태양에서, 본 명세의 코클리에이트 조성물은 진균 콜로니 형성 단위(CFU)를 적어도 5%, 예를 들어 적어도 8%까지 감소시키는 능력을 갖는다. 보다 바람직하게, AmB 코클리에이트는 뇌에서 CFU를, 예를 들어 적어도 10%, 예를 들어 적어도 25% 및 훨씬 더

바람직하게는 50%, 75%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9%, 또는 100% 까지 감소시킬 수 있다. 이들 범위 및 값 사이에 있는 모든 개별적인 값 및 범위는 본 발명의 범위내에 있다. 콜로니 형성 단위의 감소는 생체내 또는 시험관내일 수 있다.

[0085] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "대상체"란 용어는 임의의 동물, 예를 들어 비제한적으로 인간, 마우스, 래트, 토끼, 비-인간 영장류 또는 임의의 다른 포유동물을 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 상기 대상체는 영장류이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0086] 일부 실시태양에서, 상기 대상체는 면역타협된 대상체이다. 예를 들어, 상기 대상체는 HIV/AIDS, 램프종, 간경화증을 갖거나 또는 상기 대상체는 장기 이식을 수용했을 수도 있다. 다른 실시태양에서, 상기 대상체는 면역능력 개인이다.

[0087] 본 명세는 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 크립토코커스 종으로 인한 감염의 치료 또는 예방 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 치료 또는 예방이 필요한 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 코클리에이트를 포함하는 제형을 투여함을 포함하고, 여기에서 상기 코클리에이트는 항진균 화합물을 포함하며, 여기에서 상기 항진균 화합물은 5-플루시토신, 플루코나졸, 케토코나졸, 라부코나졸, 알바코나졸, 이트라코나졸, 포사코나졸, 이사부코나졸 및/또는 보리코나졸 중 적어도 하나로부터 선택된다.

[0088] 본 방법에 사용이 고려되는 다른 항진균 화합물들은 세포벽 성분, 예를 들어 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)-고정된 만노단백질의 합성을 억제할 수 있는 것들, 예를 들어 E1210을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 방법에 사용하기 위한 항진균 화합물은 에르고스테롤 합성 억제제, 예를 들어 VT-1129이며, 상기는 경우 이용 가능하고, 양호한 CNS 침투를 보이며, 크립토코커스 종 감염의 마우스 모델에서 살진균성이다.

[0089] 다른 실시태양에서, 상기 항진균 화합물은 크립토코커스 종에 대해 플루코나졸과 함께 추가적인 또는 상승작용적인 활성을 나타내는 것으로 공지된 경우 이용 가능한 화합물이다. 상기와 같은 항진균 화합물은 아미오다론(심장 부정맥 치료제) 페노티아진(정신병 치료제) 및 타목시펜(에스트로겐 길항물질)을 포함한다.

[0090] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 크립토코커스 종으로 인한 감염을 "예방하는"은 감염의 재발을 예방함을 포함한다. 감염 재발의 예방에 대한 일부 실시태양에서, 본 코클리에이트 조성물은 AmB를 함유하지 않는다. 일부 실시태양에서, 크립토코커스 종으로 인한 감염의 예방은 포유동물 또는 인간을 치료함을 포함하며, 여기에서 상기 포유동물 또는 인간은 크립토코커스 종 항원에 양성이다(예를 들어 IMMY 인코포레이티드(미국 오클라호마주 노먼 소재) 크립토코커스 항원 시험 사용).

독성

[0092] 코클리에이트화된 항진균제, 예를 들어 AmB의 경우 투여는 코클리에이트화되지 않은 항진균제의 비경구 투여에 비해 감소된 독성을 나타낸다. 비경구, 코클리에이트화되지 않은 항진균제, 예를 들어 AmB에 의해 치료된 대상체는 예를 들어 상기 항진균제의 사용과 관련된 신독성의 가능성으로 인해 면밀한 임상 관찰하에 있어야 한다.

[0093] 코클리에이트 제형의 부분으로서, 항진균제, 예를 들어 AmB의 투여는 상기 항진균제와 관련된 독성을 감소시키며 보다 고 용량의 AmB의 투여를 허용한다. 코클리에이트화된 항진균제, 예를 들어 AmB에 대한 보다 낮은 독성은 상기와 같은 항진균제를 개선된 효능 및 감소된 독성으로 보다 낮은 용량에서 경우 전달되게 한다. 한편으로, 상기 보다 낮은 독성으로 인해, 상기 코클리에이트화된 항진균제를 보다 적은 부작용 결과의 위험과 함께 보다 빈번히 및/또는 보다 높은 용량으로 투여할 수 있다.

실시예

실시예 1. 물질 및 방법

항진균제

[0097] 코클리에이트화된 암포테리신 B(CAMB)의 제형(단독으로 또는 5-플루시토신 또는 플루코나졸과 함께) 및 투여 경로를, 어느 치료가 크립토코커스 접종후 생존에 의해 측정시 마우스에서 씨 네오포르만스 제거에 대해 가장 효율적이었는지를 평가하기 위해서 평가하고 편지존(FUNGIZONE)(등록상표)과 비교하였다. 상기 평가된 제형, 투여량 및 투여 경로를 하기 표 1-3에 기재한다.

[0098] CAMB를 미국특허 공보 제 2014/0220108 및 도 4에 기재된 바와 같은 우수 의약품 제조 관리기준(GMP)을 사용하여 제조하였다. 코클리에이트 제조 중 응집 억제제(소 혈청 일부분 또는 저지방 크림 및 우유) 또는 크기 선택제(예를 들어 테옥시콜레이트)를 포함하여 변형시킨 제형뿐만 아니라, 리포솜 형성후 초음파 처리를 가하여 본

명세서에서 상기에 기재된 바와 같이 코클리에이트 크기를 추가로 감소시킨 것들을 포함한 추가적인 CAMB 제형들(또한 GMP에 따라 제조되었다)을 평가하였다. 다른 평가된 CAMB GMP 제형은 10:1 대신에 2.5:1의 지질 대 암포테리신 B의 비를 사용하여 제조된 코클리에이트를 함유하는 것들을 포함하였다. 표 2 및 3을 참조하시오.

[0099] 5-플루시토신(5-FU), $C_4H_4FN_3O$ (시그마 알드리치 인코포레이티드(Sigma Aldrich, Inc.)(미국 미주리주 세인트 루이스 소재) 및 편지존(등록상표)(암포테리신 B 데옥시콜레이트, 국립 보건원 수의학 자원부(미국 메릴랜드주 베데스다 소재)에 의해 제공됨)을 제조사의 설명에 따라 재조성하고 멸균수에서 회석하였다. 편지존(등록상표)을 연구 동안 매주 새로운 재조성된 바이알로 교체하고 모든 사용후 냉장시켰다. 플루코나졸(99%), $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ 를 알파 에이사(Alfa Aesar), 씨모 피셔 사이언티픽 인코포레이티드(Thermo-Fisher Scientific, Inc.)(미국 메사추세츠주 워드힐 소재)로부터 수득하였다.

[0100] 감염성 균주 및 배양 조건

[0101] 마우스를 하기와 같이 제조된 씨 네오포르만스, 균주 H99/ATCC 208821(아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)로 접종하였다. 씨 네오포르만스 혼탁액으로부터의 세포를 효모 추출물 텐톤 텍스트로스(YPD) 아가 플레이트상에 스트리킹하고, 이어서 상기를 37 °C에서 48시간 동안 배양하였다. 충분히 분리된 콜로니를 클로람페니콜을 함유하는 25 밀리리터 YPD 브로쓰(broth)에 재현탁하고 37 °C에서 밤새 진탕 배양기상에서 플라스크에서 배양하였다. 상기 세포를 4000 rpm에서 5분간 원심분리에 의해 회수하고 포스페이트-완충된 염수(PBS) 중에서 재현탁 및 원심분리에 의해 2회 세척하였다. 항원공격 유기체를 혈구계에 의해 정량분석하고 PBS로 밀리리터당 10^5 유기체의 최종 농도로 회석하였다. 생균수를, 상기 씨 네오포르만스 혼탁액을 연속 회석하고 접종물을 YPD 아가 플레이트상에 도말함으로써 확인하였다.

[0102] 씨 네오포르만스에 의한 감염을 초기 체중 기록후 측부 꼬리 정맥을 통해 10^4 H99 세포의 주사에 의해 유도하였다. 14 내지 24일이내에 처리되지 않은 대조용 그룹의 완전한 사망률을 야기하는 전신 감염이 발생하였다. 암컷 Hsd:ND4 스위스 웨스터(Swiss Webster) 이계교배 마우스(나이, 9 내지 10주; 체중 20 내지 29 그램)(할란 레보라토리즈(Harlan Laboratories, 미국 메릴랜드주 프레데릭 소재(나우 엔비고 인코포레이티드(Now Envigo, Inc.)))를 상기 실험 전체를 통해 사용하였다. 상기 마우스를 감염에 앞서 일주일 동안 설비에 친숙하게 하였으며 마이크로아이솔레이터 케이지에서 유지시켰다.

[0103] 3회의 상이한 처리 시험을 수행하였다. 첫 번째 시험에서, 감염된 마우스를 경구 위관영양(PO)에 의해 50 밀리그램/킬로그램/일(mg/kg/일)의 CAMB, 또는 복강내(IP) 주사에 의해 5 mg/kg/일의 편지존(등록상표)으로 처리하였다(표 1). 처리 그룹당 5마리의 마우스를 사용하였다. 작용제 투여는 감염에 이어서 24시간째에 시작하였으며 체중 측정에 이어서 28연속일 동안 매일 1회 계속하였다. 5마리의 감염된, 처리되지 않은 마우스의 그룹을 대조용으로서 사용하였다.

[0104] 두 번째 시험에서, 감염된 마우스를 PO, IP 또는 피하 주사(SQ)에 의해 10 mg/kg/일, 25 mg/kg/일 또는 50 mg/kg/일의 CAMB로 처리하였다. 상기 CAMB를 단독으로 또는 5-플루시토신과 함께 투여하였다. 또한, 감염된 마우스를 5-플루시토신 단독 또는 5 mg/kg/일 편지존(등록상표) 단독으로 처리하였으며, 각각 IP 주사에 의해 투여하였다(표 2). 상기 첫 번째 시험에서와 같이, 처리당 5마리의 마우스를 또한 사용하였으며 5마리의 감염된, 처리되지 않은 마우스의 그룹을 대조용으로서 사용하였다. 지시된 그룹들에 대해서, 3일마다 250 mg의 5-플루시토신/250 밀리리터의 멸균수를 제조하였으며, 깨끗하고 오토클레이브처리된 물병에 분액하고 이를 2개 그룹의 마우스의 우리에 넣었다. 작용제 투여는 감염에 이어서 72시간째에 시작하였으며 체중 측정에 이어서 28연속일 동안 매일 1회 계속하였다.

[0105] 세 번째 시험에서, 감염된 마우스를 PO 또는 IP 주사에 의해 5 mg/kg/용량, 25 mg/kg/용량 또는 50 mg/kg/용량의 CAMB 단독으로 또는 5-플루시토신 또는 플루코나졸과 함께 처리하였다. 마우스에게 또한 5-플루시토신 단독, 플루코나졸 단독 또는 5 mg/kg/용량의 편지존(등록상표)을 IP 주사에 의해 단독으로 또는 5-플루시토신과 함께 투여하였다(표 3). 동물들을 매일 체중 측정에 이어서 표 3에 서술된 바와 같이 매일 1회 또는 2회 투여하였다. 처리 그룹당 5마리의 마우스를 사용하였으며 5마리의 감염된, 처리되지 않은 마우스의 그룹을 대조용으로서 사용하였다. 지시된 그룹들에 대해서, 3일마다 250 mg의 5-플루시토신/250 ml의 멸균수를 제조하였으며, 깨끗하고 오토클레이브처리된 물병에 분액하고 이를 4개 그룹의 마우스의 우리에 넣었다. 플루코나졸(지시된 경우)을 단독으로 또는 함께 25 mg/kg/일로 2회 용량으로 경구 위관영양에 의해 투여하였다. 작용제 투여를 감염에 이어서 72시간째에 시작하였으며 28연속일 동안 매일 1회 계속하였다.

- [0106] 상기 3개 시험 각각에 대한 생존 및 뇌 연구를 사용하여 항진균 효능을 측정하였다. 사망률을 상기 3개 시험 각각의 전체를 통해 기록하였다. 상기 동물들을 사망시 부검하고 뇌를 무균 제거하고, 칭량하고, 1 밀리리터 멸균수 중에서 균질화하였다. 상기 항진균 처리에 대한 미생물학적 반응을 뇌 조직 중 씨 네오포르만스의 농도(그램당 CFU로)에 의해 평가하였다. 균질화된 뇌의 멸균 PBS를 사용한 연속 희석물을 YPD 아가 플레이트상에 2 회 중복하여 도말하였다. 배양 플레이트를 37 °C에서 48시간 동안 배양하고, 그 후에 CFU를 카운트하고 뇌조직의 그램당 CFU의 수를 계산하였다. 상기 방법은 ≥10 CFU/g의 검출에 민감성이었다. 배양물-음성 플레이트를 0 CFU/g을 갖는 것으로서 카운트하였다.
- [0107] 실시예 2. 결과
- [0108] 시험 1
- [0109] 마우스를 씨 네오포르만스 균주 H99로 1×10^4 CFU로 정맥내 감염시키고 1일 후에, 상기에 나타내고 도 6에 지시된 바와 같이 28일 동안 매일 요법을 시작하고, 이어서 60일 동안 추적하였다. 도 6은 지시된 시간에 각 그룹에 대한 생존 퍼센트를 도시한다. 도 6으로부터 자명한 바와 같이, 1일의 감염 배양기간후 단독으로 사용된 CAMB는 60일까지 80%의 마우스 생존률을 생성시켰으며, 이는 암포테리신 B 테옥시콜레이트 주사(편지존(등록상표))와 동등하며 처리되지 않은 대조용 그룹(20일째에 100% 사망률을 보였다)보다 우수하였다.
- [0110] 시험 2
- [0111] 마우스를 씨 네오포르만스 균주 H99로 1×10^4 콜로니 형성 단위로 정맥내 감염시켰다. 3일 후에, 상기에 나타내고 표 4 및 도 7에 지시된 바와 같이 28일 동안 매일 요법을 시작하였다. 상기 마우스를 죽기직전까지 추적하고 이어서 죽였다. 상기 실험을 188일째에 종료하였으며 1번 그룹으로부터 1마리의 마우스가 생존하였다. 표 4는 그룹 1 내지 11에 대한 생존 퍼센트를 도시한다. 도 7은 단지 그룹 1, 2 및 4-6에 대한 생존 퍼센트만을 묘사한다. 표 4에 나타낸 바와 같이, 처리되지 않은 마우스의 중간 생존은 13일이었으며, 이는 편지존(등록상표) IP 5 mg/kg/일에 의한 처리(61일, p=0.004) 또는 PO, SQ 또는 IP 경로 중 어느 하나에 의해 투여된 CAMB에 의한 처리(33, 50, 84일, p=0.004)에 의해 연장되었다. 그러나, CAMB를 사용하는 생존은 IP 경로(84일, p=0.022)를 사용하거나 음료수 중 경구 5-FC의 첨가(75일, p<0.05)에 의해 개선되었다.
- [0112] 씨 네오포르만스-관련된 뇌사는 사망시 팽창된 두부(heads)의 존재에 의해서, 및 상기 마우스 사체의 균질화된 뇌를 배양하고 후속적으로 YPD 플레이트로부터 콜로니를 수득함으로써 입증되었다(표 5를 참조하시오). 배양시 그룹 1로부터 살아있는 한 마리의 마우스는 225 CFU의 씨 네오포르만스를 함유하였고, 이는 편지존(등록상표) IP에 의한 부분 처리를 가리킨다.
- [0113] 시험된 화합물의 11개 그룹에 대한 생존률 분석을 근거로, 그룹 1, 2 및 6의 마우스가 가장 오래, 처리의 끝을 지나 60일 넘게 생존하였다. 그룹 1(편지존(등록상표) IP 주사), 그룹 2(CAMB IP 주사) 및 그룹 6(CAMB PO + 음료수 중 5-플루시토신)이 상기 마우스에게 다른 처리된 그룹들보다 더 양호한 씨 네오포르만스에 대한 생존률을 제공하였다는 결론을 내릴 수 있다. 경구 처리의 경우, 5-FC의 첨가는 코클리에이트화된 암포테리신 B 단독 처리보다 생존을 현저하게 연장시켰으며 이는 편지존(등록상표) IP의 경우와 대충 동등하였다.
- [0114] 시험 3
- [0115] 마우스를 씨 네오포르만스 균주 H99로 1×10^4 CFU로 정맥내 감염시켰다. 3일 후에, 상기에 나타내고 표 6 및 도 8에 지시된 바와 같이 28일 동안 매일 요법을 시작하였다. 상기 마우스를 죽기직전까지 추적하고 이어서 죽였다. 표 6은 그룹 1 내지 11에 대한 생존 퍼센트를 도시한다. 도 8은 단지 그룹 1, 2, 6, 8 및 9에 대한 생존 퍼센트만을 묘사한다. 표 6에 나타낸 바와 같이, 처리되지 않은 마우스의 중간 생존은 19일이었으며, 이는 편지존(등록상표) IP 5 mg/kg/일 + 5-FC에 의한 처리(80일, p=0.003) 또는 PO 또는 IP 경로 중 어느 하나에 의해 매일 투여된 CAMB에 의한 처리(각각 35 또는 49일; p=0.003)에 의해 연장되었다. 2회 매일 투여는 생존이 덜한 방향의 성향을 생성시켰으며, 이는 반복된 트라우마로 인해 감소된 PO 복용 또는 CAMB 위장 독성을 유발하였을 수도 있다(31일 대 35일, p=통계학적 유의수준 아님(NS)). 경구 CAMB 체제에 의한 생존은 음료수 중의 경구 5-FC의 첨가(102일, p=0.002 대 경구 CAMB 단독)에 의해서, 또는 큰 정도는 아니지만, 경구 플르코나졸의 첨가(56일, p=0.002)에 의해서 개선되었다.
- [0116] 상기 실험을 151일째에 종료하였으며, 그룹 6, CAMB + 5-FC 그룹으로부터 1마리의 마우스가 생존하였다. 씨 네오포르만스-관련된 뇌사는 사망시 팽창된 두부의 존재에 의해서, 및 상기 마우스 사체로부터 수득된 균질화된

뇌를 배양하고 후속적으로 YPD 플레이트로부터 콜로니를 수득함으로써 입증되었다. CFU의 수/g 뇌 조직에 대해서 표 7 및 도 9를 참조하시오.

[0117] **실시예 3. 경구 투여후 형광 코클리에이트의 뇌 국소화**

[0118] CAMB가 뇌 조직으로 실제로 전달되는지의 여부를 측정하기 위해서, 3마리의 마우스를 10^4 씨 네오포르만스, 균주 H99로 꼬리 정맥에 의해 감염시켰으며 3마리는 감염되지 않은 채로 남겨두었다. 5일 후에, 각 그룹으로부터 2마리의 마우스를 3일 동안 경구 위관영양에 의해 10 mg/kg/일의 로다민-표지된 CAMB(Rod-AmpB) 균등물로 매일 1회 처리하였다. (연구 설계의 도식에 대해서 도 10을 참조하시오). 마우스를 7일째에 죽이고 뇌 물질을 회수하고, 균질화하고 차등간섭 대비(DIC)를 사용하여 현미경검사하고 형광(RFP)을 관찰하였다.

[0119] 도 11은 연구 결과를 묘사한다. 도 11에 도시된 바와 같이, 형광 영상화는 CAMB 경구 제제로 처리된 마우스의 뇌 중 다수의 형광 입자를 입증하였다. 감염된 대 감염되지 않은 마우스의 뇌에서 증가된 전달이 분명하였다. 도 11을 참조하시오. 검은색 화살표는 씨 네오포르만스 캡슐화된 유기체를 묘사하고 흰색 화살표는 코클리에이트 형광을 묘사한다(바 = 10 밀리미터). 상용하게, 본 연구는 CAMB가 씨 네오포르만스로 감염된 마우스의 뇌로 전달되고 상기를 씨 네오포르만스 감염의 치료에 5-FC와 함께 유효한 경구 항진균제(이는 전신 편지존(등록상표) + 5-FC와 동등함)로서 사용할 수 있음을 입증한다.

표 1

시험 1 투여 그룹 및 투여 경로			
그룹 번호	처리	투여 경로	용량/mg/kg/일
	처리 없음	적용할 수 없음	적용할 수 없음
1	편지존(등록상표) (암포테리신 B 데옥시콜레이트)	IP	5
2	CAMB	PO	50

표 2

시험 2 투여 그룹 및 투여 경로			
그룹 번호	처리	투여 경로	용량/mg/kg/일
	처리 없음	적용할 수 없음	적용할 수 없음
1	편지존(등록상표)	IP	5
2	CAMB	IP	10
3	CAMB	SQ	10
4	5-플루시토신 (5-FC)	경구	음료수 중 250
5	CAMB	PO	25
6	CAMB + 5-FC	PO, 경구	25 + 음료수 중 250
7	CAMB-S	PO	25
8	CAMB-S-데옥시콜레이트	PO	25
9	CAMB-S-BSA	PO	25
10	CAMB-S-FAT	PO	25
11	CAMB 2.5:1-S	PO	25

S = 초음파 처리, BSA = 소 혈청 알부민, FAT = 50/50 젤지방 크림 및 우유, IP = 복강내, SQ = 피하, PO = 경구 위관영양

표 3

시험 3 투여 그룹 및 투여 경로							
그룹 번호	처리	투여 경로	CAMB 용량 (mg/kg)	CAMB 섭생	CAMB 매일 용량 (mg/kg)	다른 섭생	다른 매일 용량 (mg/kg)
	처리 없음	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1	편지존(등록상표)+ 5-FC	IP	N/A	N/A	N/A	QD ² ; 수	5; 250

2	CAMB	IP	5	QD	5	N/A	N/A
3	CAMB USPS ¹	PO	25	BID ³	50	N/A	N/A
4	CAMB	PO	25	QD	25	N/A	N/A
5	CAMB	PO	25	BID	50	N/A	N/A
6	CAMB + 5-FC	PO	25	QD	25	수	250
7	CAMB + 5-FC	PO	25	BID	50	수	250
8	5-FC	PO	N/A	N/A	N/A	수	250
9	CAMB + 플루코나졸	PO	25	QD	25	PO; BID	25
10	CAMB + 플루코나졸	PO	25	BID	50	PO; BID	25
11	플루코나졸	PO	N/A	N/A	N/A	PO;BID	25

¹극단적으로 작은 입자 크기²매일 1회³매일 2회

표 4

표 2 그룹들의 중간 생존					
그룹 번호 및 처리	mg/kg/일	중간 생존	vs. 대조용*	vs. 편지존(등록상표)*	vs. CAMB PO*
처리 없음 대조용	N/A	13			
1. 편지존(등록상표)IP	5	61	0.004		
2. CAMB IP	10	84	0.004	NS**	0.022
3. CAMB SQ	10	50	0.004	NS**	NS**
4. 5-플루시토신 (5-FC) 경구	250	34	0.004	0.002	
5. CAMB PO	25	33	0.004	NS**	
6. CAMB PO + 5-FC 경구	25, 250	75	0.004	NS**	0.049
7. CAMB-S PO	25	34			
8. CAMB S-데옥시콜레이트 PO	25	34			
9. CAMB-S-BSA PO	25	33			
10. CAMB-S-FAT PO	25	34			
11. CAMB 2.5:1-S PO	25	38			

* N = 그룹당 5마리 마우스; 로그 순위(만텔-콕스, 단변량)

** NS = 통계학적 유의수준 아님

표 5

CFU의 수/마리 g(표 2의 그룹들)					
그룹 번호 및 처리	마우스 1	마우스 2	마우스 3	마우스 4	마우스 5
처리 없음 대조용	3,600,000	3,000,000	8,700,000	7,900,000	6,700,000
1. 편지존(등록상표) IP	4,100,000	4,200,000	12,000,000	6,700,000	0
2. CAMB IP	3,700,000	8,700,000	1,500,000	1,000,000	10,000,000
3. CAMB SQ	12,500,000	8,700,000	8,200,000	2,100,000	2,500,000
4. 5-플루시토신 (5-FC) 경구	1,700,000	5,100,000	17,400,000	8,300,000	3,200,000
5. CAMB PO	5,900,000	10,700,000	5,100,000	2,600,000	6,700,000
6. CAMB PO + 5-FC 경구	6,000,000	4,300,000	7,300,000	720,000	14,000,000
7. CAMB-S PO	4,100,000	5,100,000	9,400,000	2,900,000	10,300,000
8. CAMB S-데옥시콜레이트 PO	3,000,000	18,400,000	9,000,000	3,100,000	2,700,000
9. CAMB-S-BSA PO	18,200,000	11,500,000	11,100,000	4,400,000	10,700,000

10. CAMB-S-FAT PO	25,200,000	8,600,000	2,000,000	72,000,000	5,000,000
11. CAMB 2.5:1-S PO	19,200,000	7,000,000	3,800,000	3,000,000	5,000,000

표 6

표 3 그룹들의 평균 생존					
그룹, 처리, 빈도 및 투여 경로	투여량 (mg/kg/일)	중간 생존 (일수)	vs. 대조용*	vs. 편지존(등록상표)+ 5-FC*	vs. CAMB PO 매일*
처리 없음	N/A	19	N/A		
1. 편지존(등록상표)IP + 5-FC 경구	5	80	0.003		
2. CAMB IP QD	5	49	0.003	0.002	0.01
3. CAMB USPS ¹ PO BID	50	42	0.003	0.003	NS**
4. CAMB PO, QD	25	35	0.003	0.002	
5. CAMB PO, BID	50	31	0.025	0.002	
6. CAMB PO, QD+ 5-FC 경구	25, 250	102	0.003	NS**	0.002
7. CAMB PO BID + 5-FC 경구	50, 250	62	0.043	0.016	
8. 5-FC 경구	250	47	0.003	0.002	
9. CAMB PO QD + 플루코나졸 PO BID	25, 25	56	0.003	0.002	0.002
10. CAMB PO BID + 플루코나졸 PO BID	50, 25	67	0.003	NS**	
11. 플루코나졸 PO BID	25	53	0.003	0.002	

¹극단적으로 작은 입자 크기

*N = 그룹당 5마리 마우스; 로그 순위(만텔-콕스, 단변량)

**NS = 통계학적 유의수준 아님

표 7

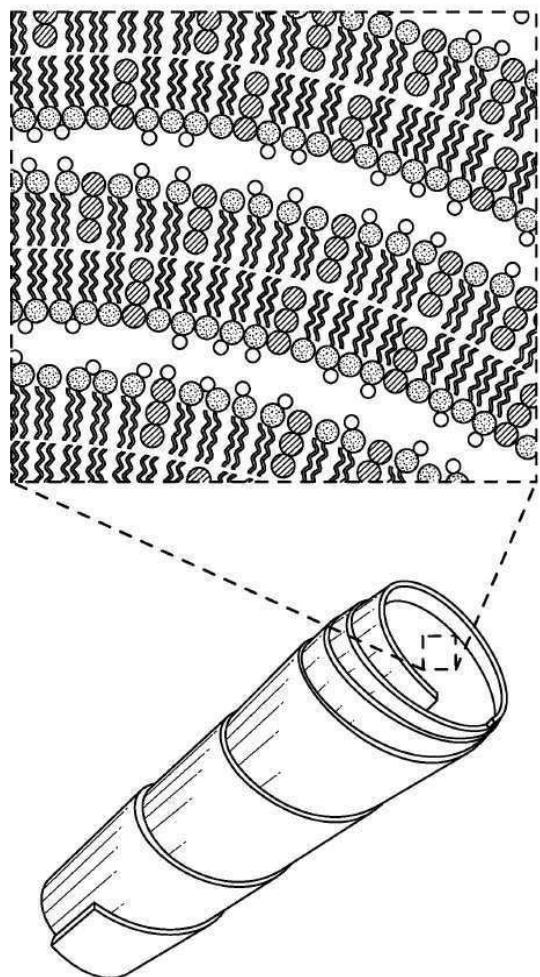
CFU의 수/뇌의 g(표 3의 그룹들)					
그룹 번호 및 처리	마우스 1	마우스 2	마우스 3	마우스 4	마우스 5
처리 없음	15,400,000	7,300,000	17,800,000	9,800,000	6,000,000
1. 편지존(등록상표)IP + 5-FC 경구	3,500,000	15,400,000	9,000,000	73,000,000	12,700,000
2. CAMB IP QD	4,800,000	4,600,000	6,900,000	2,600,000	11,900,000
3. CAMB USPS ¹ PO BID	18,300,000	9,400,000	9,100,000	30,000,000	1,830,000
4. CAMB PO, QD	14000	142,000	9,300,000	12,900,000	6,400,000
5. CAMB PO, BID	14,000,000	21000	249,000	1,310,000	8,300,000
6. CAMB PO, QD+ 5-FC 경구	5,200,000	9,200,000	8,600,000	3,900,000	3,400,000
7. CAMB PO BID + 5-FC 경구	20000	6,300,000	8,100,000	9,900,000	6,800,000
8. 5-FC 경구	10,800,000	8,500,000	7,300,000	15,000,000	5,800,000
9. CAMB PO QD + 플루코나졸 PO BID	8,200,000	2,100,000	18,000,000	9,700,000	5,800,000
10. CAMB PO BID + 플루코나졸 PO BID	16,200,000	11,700,000	7,500,000	5,700,000	31,000,000
11. 플루코나졸 PO BID	4,200,000	4,300,000	3,900,000	6,800,000	11,300,000

¹극단적으로 작은 입자 크기

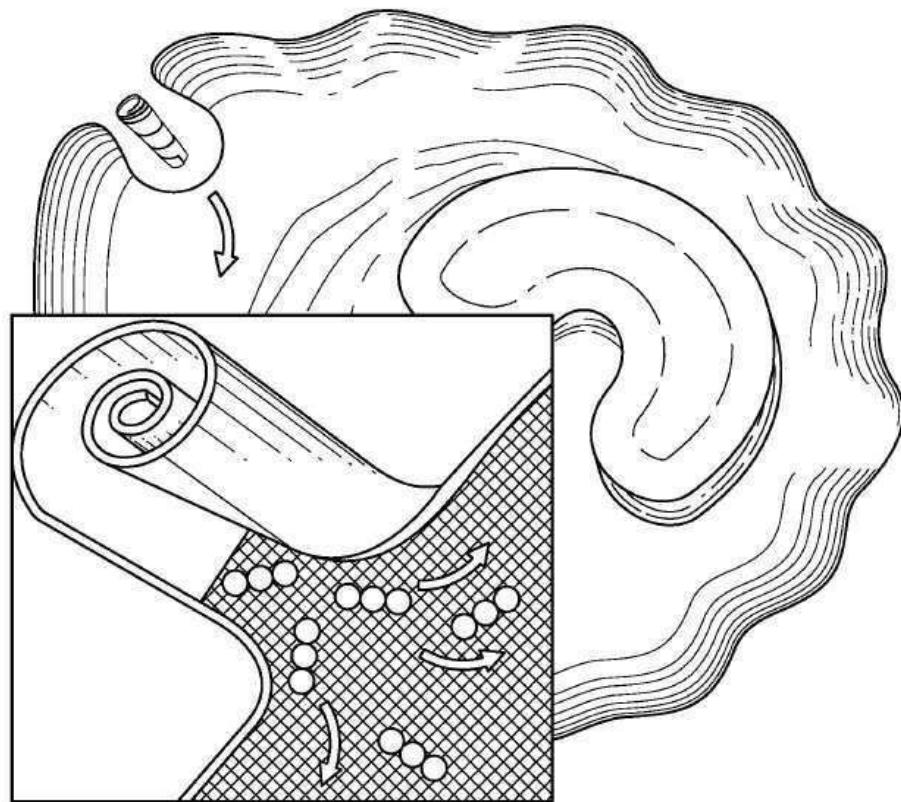
[0125]

도면

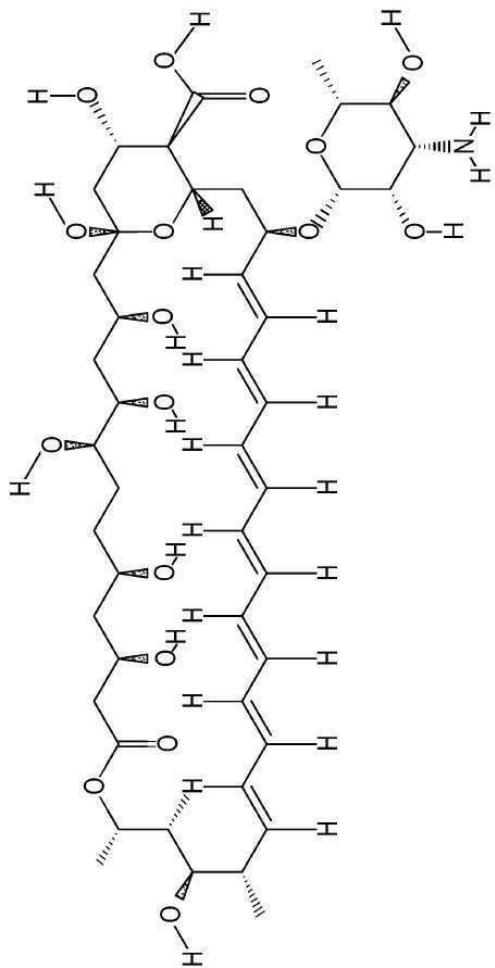
도면1



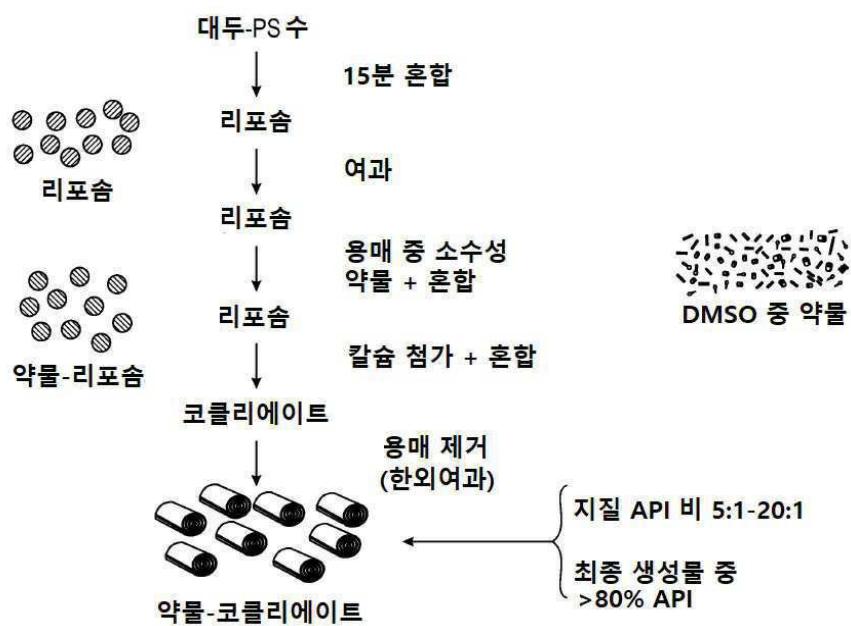
도면2



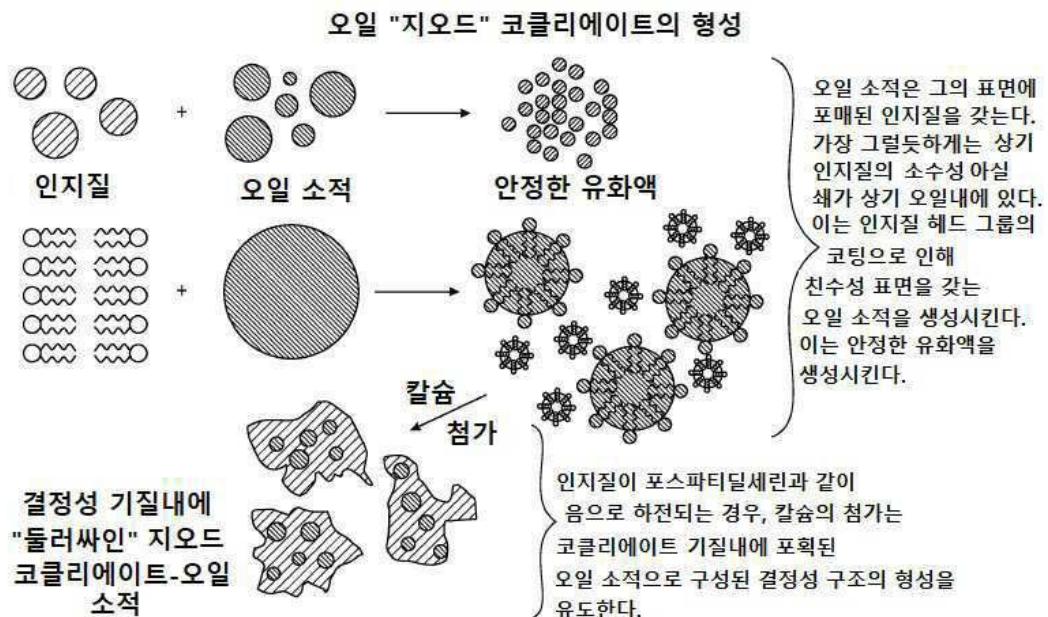
도면3



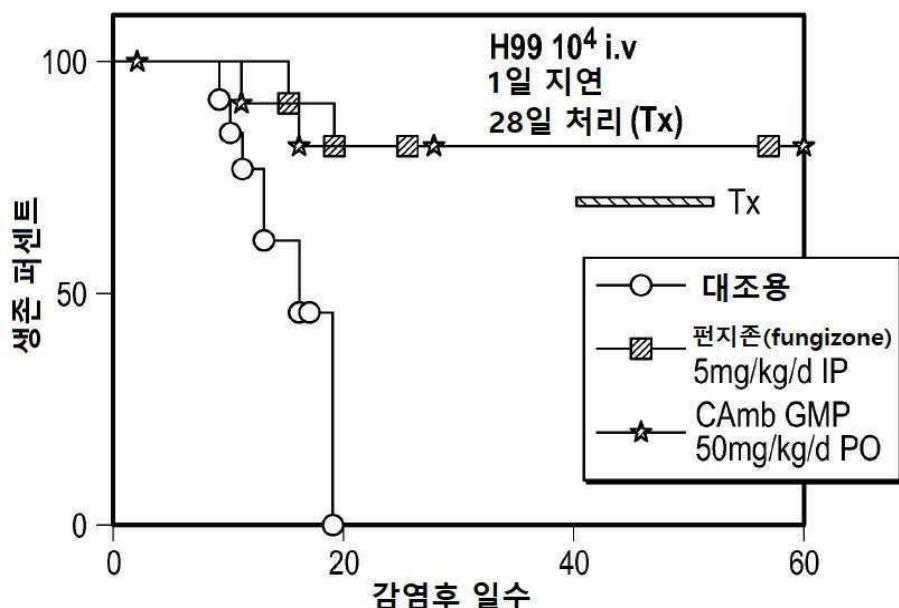
도면4



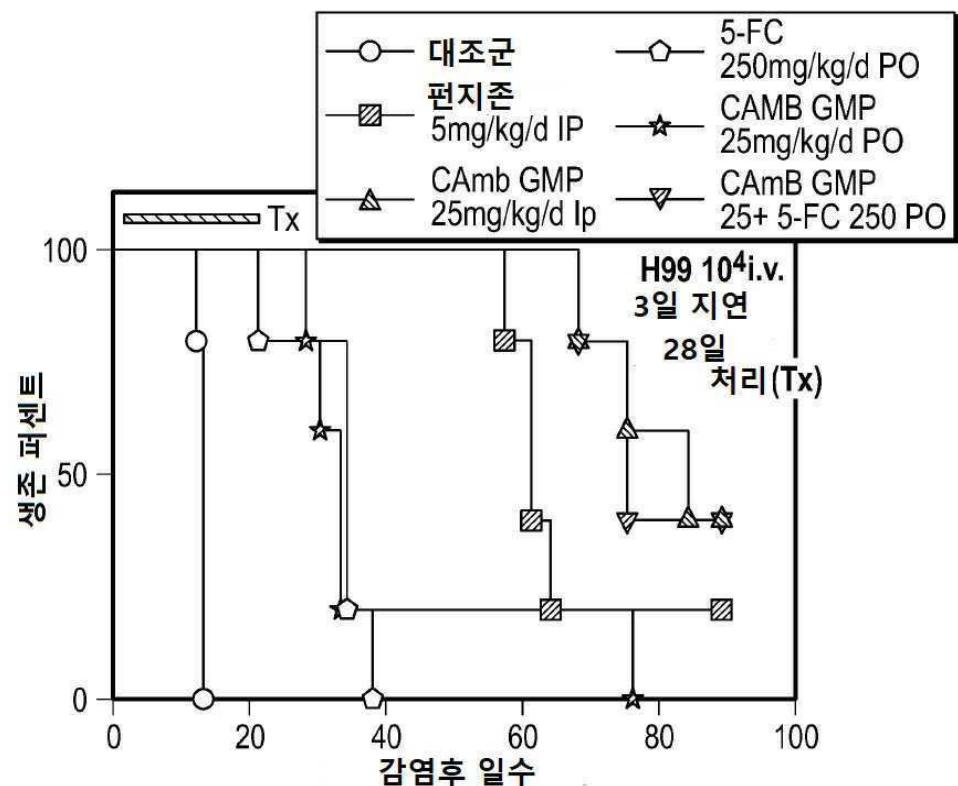
도면5



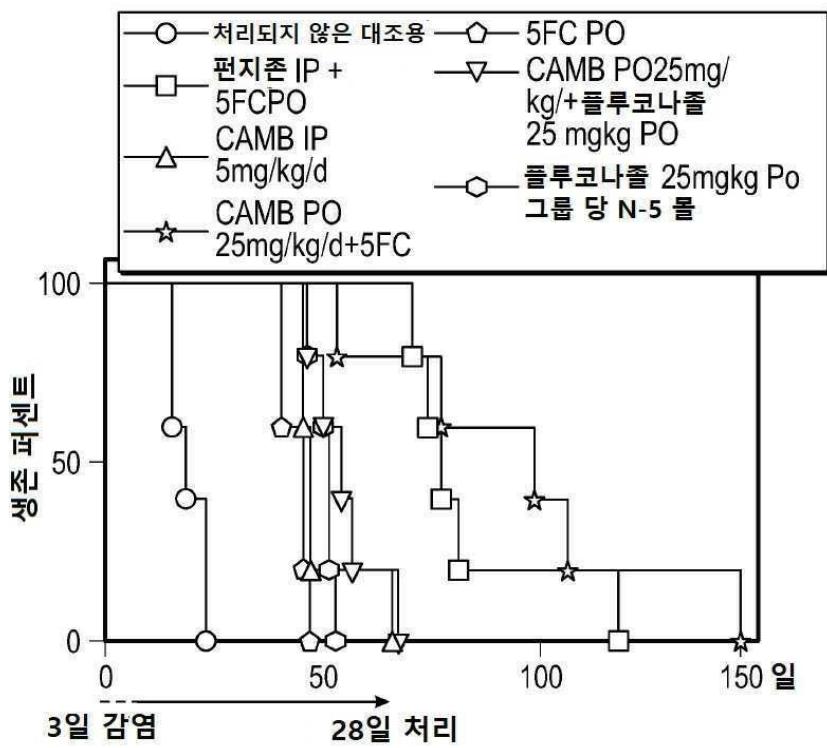
도면6



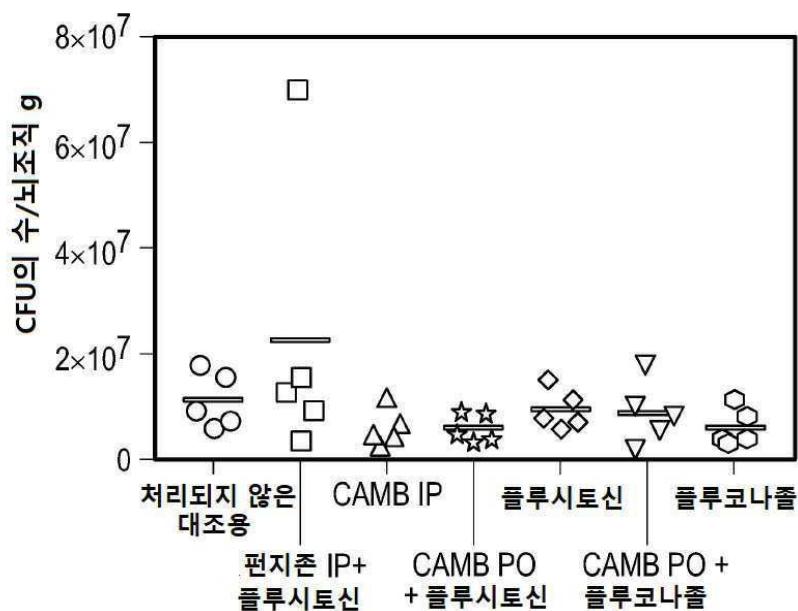
도면7



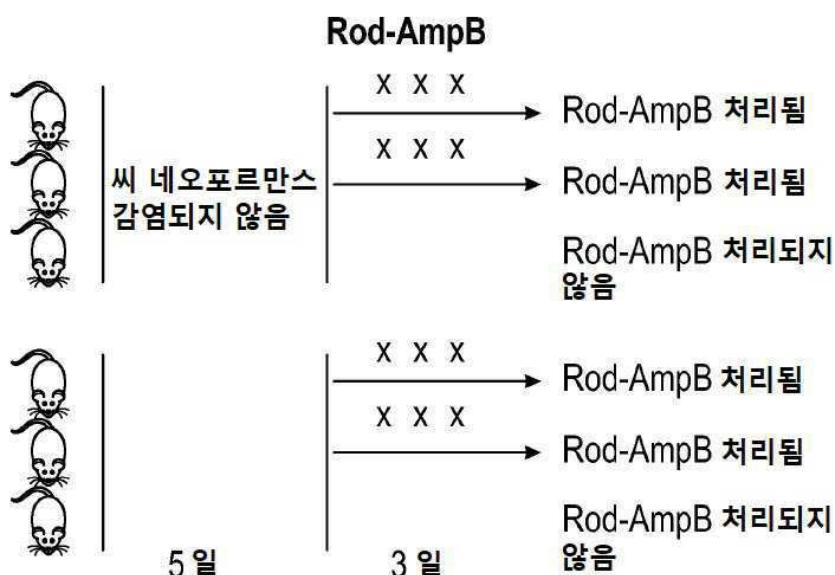
도면8



도면9



도면10



도면11

