



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월17일
(11) 등록번호 10-2719543
(24) 등록일자 2024년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/61 (2017.01) A61K 31/565 (2006.01)
A61K 31/566 (2006.01) A61K 31/568 (2006.01)
A61K 31/573 (2021.01) A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/61 (2017.08)
A61K 31/565 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7029017
(22) 출원일자(국제) 2020년06월02일
심사청구일자 2021년09월09일
(85) 번역문제출일자 2021년09월09일
(65) 공개번호 10-2021-0151062
(43) 공개일자 2021년12월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/035780
(87) 국제공개번호 WO 2020/247407
국제공개일자 2020년12월10일
(30) 우선권주장
62/856,714 2019년06월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Javier Perez Quinones et al., European
Polymer Journal(2018), vol. 99, p.384-393*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
아이홀 코포레이션
미국 90620 캘리포니아 부에나 파크 에비뉴 스트리트 2 오렌지소프 6481
(72) 발명자
리 쯔-유안
대만 타이페이 시티 114 네이후 디스트릭트 네이후 로드 섹션1 넘버88 4층
라이 핑-산
대만 타이페이 시티 114 네이후 디스트릭트 네이후 로드 섹션1 넘버88 4층
린 치-안
대만 타이페이 시티 114 네이후 디스트릭트 네이후 로드 섹션1 넘버88 4층
(74) 대리인
김경희

전체 청구항 수 : 총 5 항

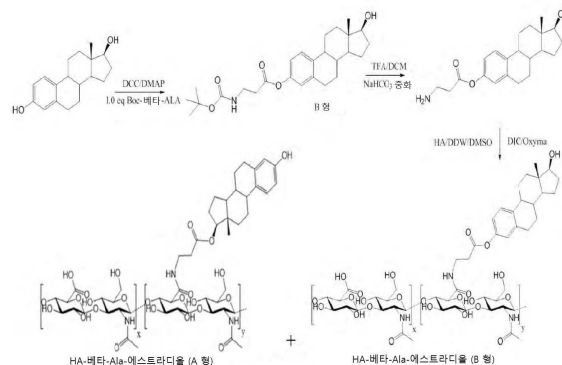
심사관 : 하재욱

(54) 발명의 명칭 **히알루로난 접합체 및 이의 용도**

(57) 요약

히알루론산(HA), 성호르몬, 및 HA의 이당류 단위 중 하나와 성호르몬을 결합시키기 위한 링커를 포함하는 히알루로난 접합체가 본원에 개시된다. 또한, 본원에 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방에서의 히알루로난 접합체의 용도가 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/566 (2013.01)

A61K 31/568 (2013.01)

A61K 31/573 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20150231268 A1*

US20050244363 A1*

James W. Simpkins et al., Therapeutic Advances in Neurological Disorders(2009), vol. 2, no. 1, p.31-49*

KR1020160136363 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

히알루론산(HA) 또는 이의 염;

에스트라디올; 및

상기 에스트라디올을 상기 HA 또는 이의 염의 이당류 단위 중 하나와 공유 결합시키는 링커로 구성되고, 상기 링커는 β -알라닌(β -ALA)인,

히알루로난 접합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 에스트라디올로의 치환도가 0.1 내지 60%인, 히알루로난 접합체.

청구항 4

제1항에 있어서, HA 또는 이의 염의 중량 평균 분자량(Mw)은 5 내지 500 킬로달톤(kDa)인, 히알루로난 접합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 링커는 에스트라디올의 하이드록실기(-OH)에 공유 결합된, 히알루로난 접합체.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

유효량의 제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 히알루로난 접합체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 신경퇴행성 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물로,

상기 신경퇴행성 질환은, 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 다발성 경화증(MS), 헌팅턴병(HD), 전두측두엽 치매, 간질, 신경병증성 통증 또는 운동실조인, 신경퇴행성 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 히알루론산(HA)-성호르몬 접합체, 및 신경퇴행성 질환 치료에서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] **관련 기술의 설명**

[0003] 중추신경계(CNS)의 신경퇴행성 질환은 신경세포의 사멸을 비롯한 신경세포의 구조 및 기능의 점진적인 상실을 특징으로 하며, 이는 주로 치매 또는 운동 장애(예를 들면, 안정시 떨림, 강직, 또는 느린 움직임)으로 나타난다. 신경퇴행성 질환 중에서, 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 다발성 경화증(MS) 및 헌팅턴병(HD)은 신경과에서 아주 흔하다. 신경퇴행성 질환은 종종 중년에서 노년층에 이르는 인구와 관련이 있으며 환자와 그 가족에게는 매우 치명적이다. 이러한 질환은 환자의 삶의 질에 부정적인 영향을 미치는 동시에 의료 시스템에 큰 부담을 준다. 그러나, 고령화 사회의 도래와 함께 신경퇴행성 질환의 유병률은 필연적으로 증가하고 있다.

[0004] 현재까지, 신경퇴행성 질환에 대한 치료법은 증상을 완화하거나 질환의 진행을 늦추는 것에 불과하다. 예를 들어, 도네페질, 갈란타민 및 리바스티그민과 같은 약물은 시냅스 틈으로 방출되는 아세틸콜린의 이화작용을 지연시켜 신경 전도 활성을 향상시킴으로써 인지적, 기능적 및 행동적 증상을 완화시키는 데 사용된다. 또한, 레보도파, 엘도파, 아만타딘과 같은 약물을 사용하게 되면 질환의 진행을 지연시키고 환자의 생존율도 높일 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이들 약물은 각자 가지고 있는 한계가 있고 일부는 심각한 부작용을 동반하기 때문에 환자의 삶의 질은 여전히 실망스럽다.

Quinones 등은 자가조립 히알루론산(HA)-테스토스테론 접합체의 캡슐화를 통해 항암제 캄프토테신과 독소루비신의 제어된 전달을 개시한다(European Polymer Journal 99 (2018) 384-393). 미국공개특허 US 2015-0231268은 히알루론산 유도체와 약물을 포함하는 복합체를 개시한다. 미국공개특허 US 2005-0244363에는 이식 가능한 장치 코팅을 위한 HA 접합체 또는 가교 HA 조성물을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 전술한 내용에 비추어 볼 때, 신경퇴행성 질환에 대한 효과적인 치료제의 필요성이 관련 기술분야에 존재한다.

과제의 해결 수단

[0006] **요약**

[0007] 다음은 독자에게 기본적인 이해를 제공하기 위해 본 개시내용의 간략화된 요약에 제시한다. 이 요약은 본 개시의 광범위한 개요가 아니며 본 발명의 핵심/중요 요소를 식별하거나 본 발명의 범위를 기술하지 않는다. 그것의 유일한 목적은 나중에 제시될 보다 상세한 설명에 대한 서문으로서 본원에 개시된 몇몇 개념들을 단순화된 형태로 제시하는 것이다.

- [0008] 한 측면에서, 본 개시내용은 히알루로난 접합체에 관한 것이다.
- [0009] 본 개시내용의 다양한 실시양태에 따르면, 히알루로난 접합체는 히알루론산(HA) 또는 이의 유도체 또는 염, 성호르몬 및 HA 또는 HA 유도체 또는 HA 염의 이당류 단위 중 하나에 성호르몬을 공유적으로 결합시키는 링커를 포함한다.
- [0010] 일부 실시양태에서, 성호르몬은 에스트론, 에스트라디올, 에스트리올, 테스토스테론 또는 11-데옥시코르티코스테론일 수 있다.
- [0011] 본 개시내용의 임의의 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체의 링커는 하나 이상의 아미노산, 지질, 디하이드라지드-C₂-C₂₀ 디카복실산, 및 C₂-C₂₀ 디카복실산 중 어느 것이다.
- [0012] 일 실시양태에서, 링커는 β-알라닌(β-ALA)과 같은 아미노산이다. 또 다른 실시양태에서, 링커는 디하이드라지드-C₂-C₂₀ 디카복실산, 예를 들어, 아디프산 디하이드라지드(AH)-숙시네이트이다. 또 다른 실시양태에서, 링커는 C₂-C₂₀ 디카복실산; 예를 들어, 숙신산이다.
- [0013] 본 발명의 다른 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체의 HA는 0.1% 내지 60%의 치환도를 갖는다.
- [0014] 본 개시내용의 특정 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체의 HA는 약 5-500 킬로달톤(kDa)의 중량 평균 분자량(Mw)을 가진다. 본 발명의 다양한 실시양태에 따르면, 링커는 성호르몬의 하이드록실기(-OH)에 결합된다.
- [0015] 본 개시내용의 다른 측면은 신경퇴행성 질환의 치료를 필요로 하는 대상에서 신경퇴행성 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0016] 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 방법은 유효량의 본 발명의 히알루로난 접합체를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0017] 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체는 경구, 비강, 두개내, 척수내, 척추강내, 골수내, 뇌내, 뇌실내, 정맥내, 동맥내, 심장내, 피내, 피하, 경피, 복강내, 또는 근육내 투여에 의해 대상에 투여된다.
- [0018] 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체를 사용하여 치료할 수 있는 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 다발성 경화증(MS), 헌팅턴병(HD), 전두 측두엽 치매, 간질, 신경병증성 통증 또는 운동실조이다.
- [0019] 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체에 의해 치료가능한 대상은 포유동물, 바람직하게는 인간이다.
- [0020] 본 개시내용의 다른 측면에 또한 포함되는 대상은 신경퇴행성 질환의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에서의 히알루론산 접합체의 용도뿐만 아니라, 신경 퇴행성 질환의 치료에 사용하기 위한 히알루론산 접합체 또는 히알루론산 접합체를 포함하는 약학 조성물을 포함한다.
- [0021] 본 개시내용의 많은 부수적인 특징 및 이점은 첨부 도면과 관련하여 고려되는 다음의 상세한 설명을 참조함으로써 더 잘 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 본 발명의 이들 및 다른 특징, 측면 및 이점은 다음의 설명, 첨부된 청구범위 및 첨부 도면을 참조하여 더 잘 이해될 것이며, 여기서:

도 1은 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, HA-βALA-C3/C17 에스트라디올(HA-E2) 히알루로난 접합체의 합성을 위한 반응식이다;

도 2A 및 도 2B는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, 에스트라디올(E2) 및 HA-E2의 UPLC 분석 결과를 각각 나타낸다;

도 3은 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, 시험관 내 미토콘드리아 막 전위(MMP) 수준에 대한 HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 효과를 나타낸다;

도 4A 및 도 4B는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, APP/PS1 형질전환 마우스에서 생체내 혈청 및 해마 Aβ42 수준 변화에 대한 HA-E2 히알루로난 접합체의 효과를 각각 나타낸다;

도 5는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 합성을 위한 반응식이다;

도 6A 및 도 6B는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, OHE 래트에서 수영 거리 및 수영 시간에 대한 HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 생체내 효과를 각각 나타낸다;

도 7A 및 도 7B는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, OHE 래트의 표적 사분면에서 수영 거리 및 수영 시간에 대한 HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 생체내 효과를 각각 나타낸다;

도 8A 및 도 8B는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, OHE 래트에서 수영 거리 및 수영 시간에 대한 HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 생체내 효과를 각각 나타낸다;

도 9A 및 도 9B는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, OHE 래트의 표적 사분면에서 수영 거리 및 수영 시간에 대한 HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 생체내 효과를 각각 나타낸다;

도 10A 및 도 10B는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, 해마 CA1에서 추체 신경세포의 말단 꼭대기 및 말단 기저 수상돌기에 대한 HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 생체내 효과를 각각 나타내는 대표적인 현미경 사진이다;

도 11A 및 도 11B는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, OHE 래트에서 해마 CA1 추체 신경세포의 꼭대기 및 기저 수상돌기의 밀도에 대한 HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 생체내 효과를 각각 나타낸다;

도 12는 본 개시내용의 하나의 작업 실시예에 따른, MPTP-처리 마우스의 학습 능력에 대한 HA-C17-E2 히알루로난 접합체의 생체내 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] **설명**
- [0024] 첨부된 도면과 관련하여 아래에 제공된 상세한 설명은 본 실시예의 설명으로서 의도된 것이며 본 실시예가 구성되거나 이용될 수 있는 유일한 형태를 나타내도록 의도된 것은 아니다. 설명은 실시예의 기능과 실시예를 구성하고 작동하는 단계의 순서를 설명한다. 그러나, 동일하거나 동등한 기능 및 순서가 상이한 실시예들로 달성될 수 있다.
- [0025] 편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어를 모아놓았다. 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 개시내용에서 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되고 사용되는 의미를 가질 것이다.
- [0026] 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 그의 복수 형태를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함하는 것이 이해될 것이다. 또한, 본원 및 청구범위에 사용된 용어 "적어도 하나" 및 "하나 이상"은 동일한 의미를 가지며 1, 2, 3 또는 그 이상을 포함한다. 또한, 본 명세서 전반 및 첨부된 청구범위에 걸쳐 사용되는 "A, B 및 C 중 적어도 하나", "A, B, 또는 C 중 적어도 하나" 및 "A, B 및/또는 C 중 적어도 하나"라는 문구는 A 단독, B 단독, C 단독, A와 B를 함께, B와 C를 함께, A와 C를 함께, A, B, C를 함께 포함하도록 의도된다.
- [0027] 본 발명의 넓은 범위를 설명하는 수치 범위 및 매개변수는 근사치이지만, 특정 실시예에 기재된 수치값은 가능한 한 정확하게 보고되었다. 그러나, 모든 수치에는 본질적으로 해당 시험 측정시 발견되는 표준 편차로 인해 필연적으로 발생하는 특정 오차가 포함된다. 또한, 본원에 사용되는 용어 "약"은 일반적으로 주어진 값 또는 범위의 10%, 5%, 1% 또는 0.5% 이내를 의미한다. 대안적으로, 용어 "약"은 당업자가 고려할 때 평균의 허용 가능한 표준 오차 이내를 의미한다. 작동/작업 실시예 이외에서 또는 달리 명시적으로 지정되지 않는 한, 본원에 개시된 모든 수치 범위, 양, 값 및 백분율, 예컨대 물질의 양, 시간 지속 시간, 온도, 작동 조건, 양의 비율 등에 대한 것은 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 달리 나타내지 않는 한, 본 개시내용 및 첨부된 청구범위에 기재된 수치 파라미터는 원하는 대로 변할 수 있는 근사치이다. 최소한 각 수치 매개변수는 보고된 유효 자릿수의 관점에서 그리고 일반적인 반응법 기술을 적용하여 해석되어야 한다. 범위는 본원에서 하나의 끝점에서 다른 끝점으로 또는 두 끝점 사이로 표현될 수 있다. 본원에 개시된 모든 범위는 달리 명시되지 않는 한 중점을 포함한다.
- [0028] 본원에 사용된 용어 "치료" 및 "치료하는"은 예방(예를면, 방지), 치유 또는 완화 조치를 지칭할 수 있다.

특히, 본원에서 사용된 용어 "치료하는"은 의학적 상태(예를 들어, 신경퇴행성 질환), 의학적 상태와 관련된 증상, 의학적 상태에 이차적인 질환 또는 장애, 또는 의학적 상태에 대한 소인을 갖는 대상에게 상기 특정 질환, 장애 및/또는 상태의 하나 이상의 증상 또는 특징의 부분적 또는 완전한 완화, 개선, 경감, 발병 지연, 진행 억제, 중증도 감소 및/또는 발병률 감소를 위해 본 발명의 히알루로난 접합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 적용 또는 투여하는 것을 지칭한다. 치료제는 질환, 장애 및/또는 상태와 관련된 병리 발생 위험을 감소시킬 목적으로 질환, 장애 및/또는 상태의 징후를 나타내지 않는 대상 및/또는 질환, 장애 및/또는 상태의 초기 징후만을 나타내는 대상에게 투여될 수 있다.

[0029] 용어 "대상" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되며 본원에 기재된 히알루로난 접합체, 이를 포함하는 약학 조성물, 및/또는 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 인간 종을 포함하는 동물을 의미하는 것으로 의도된다. 따라서, 용어 "대상" 또는 "환자"는 본 개시내용으로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 포유동물을 포함한다. "포유동물"이라는 용어는 인간, 영장류, 토끼, 돼지, 양 및 소와 같은 가축 및 농장 동물뿐만 아니라; 동물원, 스포츠 또는 애완 동물; 및 마우스 및 래트와 같은 설치류를 포함하여 포유동물 류의 모든 구성원을 나타낸다. "비인간 포유동물"이라는 용어는 인간을 제외한 포유동물 류의 모든 구성원을 나타낸다. 하나의 예시적인 실시양태에서, 환자는 인간이다. "대상" 또는 "환자"라는 용어는 한 성별이 구체적으로 표시되지 않는 한 남성과 여성 모두를 지칭하는 것이다.

[0030] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 원하는 치료 반응을 산출하기에 충분한 본 발명의 히알루로난 접합체의 양을 지칭한다. 약제의 유효량은 질환 또는 상태를 치유하는데 필요하지 않지만 질환 또는 상태의 발병을 지연, 방해 또는 예방하거나, 질환 또는 상태 증상을 개선하도록 질환 또는 상태에 대한 치료를 제공할 것이다. 유효량은 적절한 형태로 1, 2 또는 그 이상으로 나누어 지정된 기간 동안 1회, 2회 또는 그 이상 투여될 수 있다. 특정 유효량 또는 충분량은 치료되는 특정 상태, 환자의 신체 상태(예를 들면, 환자의 체질량, 연령 또는 성별), 치료되는 포유동물 또는 동물의 유형, 치료 기간, 동반 요법(있는 경우)의 특성 및 사용된 특정 제형 및 화합물 또는 이의 유도체의 구조와 같은 요인에 따라 달라질 것이다. 유효량은 예를 들어 히알루로난 접합체의 총 질량 또는 히알루로난 접합체 내 성호르몬의 등가 질량(예를 들면, 그램, 밀리그램 또는 마이크로그램) 또는 체질량에 대한 히알루로난 접합체의 질량 또는 히알루로난 접합체내 성호르몬의 등가 질량의 비율, 예를 들어 킬로그램당 밀리그램(mg/kg)으로 표시될 수 있다.

[0031] 용어 "적용" 및 "투여"는 본 발명의 히알루로난 접합체 또는 약학 조성물을 치료를 필요로 하는 대상에게 적용하는 것을 의미하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0032] 본 개시내용의 일부 예에 따르면, 히알루로난 접합체는 시험 기간 동안 주 2회 투여된다. 알 수 있는 바와 같이, 유효량은 투여 간격 및 기간에 따라 적절하게 조정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 대상에게 다중 용량이 투여되는 경우, 대상에게 다중 용량을 투여하는 빈도는 1일 3회 용량, 1일 2회 용량, 1일 1회 용량, 2일 1회 용량, 3일 1회 용량, 4일 1회 용량, 5일 1회 용량, 6일 1회 용량, 주 1회 용량, 격주 1회 용량, 월 1회 용량 또는 격월 1회 용량이다. 특정 실시양태에서, 대상에게 다중 용량을 투여하는 빈도는 1일 1회 용량이다. 특정 실시양태에서, 대상에게 다중 용량을 투여하는 빈도는 1일 2회 용량이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량이 대상에게 투여되는 경우, 다중 용량의 첫 용량과 마지막 용량 사이의 기간은 1일, 2일, 4일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 7년, 10년, 15년, 20년, 또는 대상의 일생 동안이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량의 첫 용량과 마지막 용량 사이의 기간은 3개월, 6개월 또는 1년이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량의 첫 용량과 마지막 용량 사이의 기간은 대상의 일생 동안이다. 특정 실시양태에서, 대상에게 다중 용량을 투여하는 빈도는 주당 3회 용량이다.

[0033] 또한, 하기 제공된 실시예에 따라, 히알루로난 접합체는 정맥내(*i.v.*) 주입을 통해 투여되나; 이것은 본 발명이 어떻게 구현될 수 있는지에 대한 예시일 뿐이며, 본 개시는 이에 제한되지 않는다.

[0034] 예를 들어, 히알루로난 접합체는 약학적으로 허용되는 부형제와 함께 목적하는 투여 방식에 적합한 약학 조성물로 제형화될 수 있다. 본 개시 및 청구된 본 발명의 개념(들)에 따라 제조된 특정 약학 조성물은 환자에게 경구, 비경구(예를 들어, 피하, 정맥내, 일시 주사, 근육내 또는 동맥내), 유리체내 또는 경피 투여하기에 적합한 단일 단위 투여 형태이다. 투여 형태의 예는 정제; 캡슐; 연질 탄성 젤라틴 캡슐과 같은 캡슐; 카세; 트로키; 로젠지; 분산액; 좌약; 연고; 스폰지(찜질제); 페이스트; 분말; 드레싱; 크림; 고약; 용액; 패치; 에어로졸(예: 비강 스프레이 또는 흡입제); 겔; 현탁액(예를 들어, 수성 또는 비수성 액체 현탁액, 수중유 에멀전, 또는 유중수 액체 에멀전), 용액 및 엘릭시르를 포함한 환자에 경구 투여하기에 적합한 액체 투여 형태; 환자에 비경구 투여하기에 적합한 액체 투여 형태; 및 환자에 비경구 투여하기에 적합한 액체 투여 형태를 제공하도록 재구

성될 수 있는 멸균 고체(예를 들어, 결정질 또는 무정형 고체)를 포함하나 이에만 제한되지는 않는다. 이해될 수 있는 바와 같이, 이들 약학 조성물은 또한 본 개시내용의 범위 내에 있다.

- [0035] 본원에 사용된 "약학적으로 허용되는 부형제"라는 문구는 대상 약제를 신체의 한 기관 또는 일부분으로부터 신체의 다른 기관 또는 일부분으로 운반 또는 수송하는 데 관여하는 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 담체, 용매 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 각 부형제는 제형의 다른 성분과 양립할 수 있다는 의미에서 "허용적"이어야 한다. 약학적 제형은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 성분과 조합된 본 발명의 화합물을 함유한다. 부형제는 고체, 반고체 또는 액체 희석제, 크림 또는 캡슐의 형태일 수 있다. 이러한 약학적 제제는 본 발명의 추가 목적이다. 일반적으로, 활성 화합물의 양은 제제의 0.1 내지 95 중량%, 바람직하게는 비경구용 제제의 경우 0.2 내지 20 중량%, 바람직하게는 경구 투여용 제제의 경우 1 내지 50 중량%이다. 본 발명의 방법의 임상적 사용을 위해, 본 발명의 약학 조성물은 의도된 투여 경로에 적합한 제형으로 제형화된다.
- [0036] 본원에 사용된 HA 접합체의 "치환도(DS)"라는 용어는 HA의 이당류 단위당 부착된 치환기(즉, 성호르몬)의 평균 비율이다.
- [0037] 본원에 사용된 용어 "히알루론산"(HA)(히알루로네이트 또는 히알루로난이라고도 함)은 이당류 단위의 반복 서열로 구성된 음이온성 비황화 글리코사미노글리칸, 구체적으로 D-글루쿠론산 및 N-아세틸-D-글루코사민(-4GlcUA β 1-3GlcNAc β 1-)이다. 그의 분자량은 379 달톤(Da)(단일 이당류 단위)에서 수백만 달톤 이상까지 다양하다. HA는 히알루로난 매개 운동성(RHAMM) 및 CD44에 대한 세포 표면 수용체와의 상호작용에 의해 세포 운동성 및 면역 세포 접착에 관여한다. 용어 "HA 유도체"는 HA의 하나 이상의 이당류 단위의 하이드록실, 카복실, 아미드 또는 아세틸아미노기가 임의 변형된 HA를 지칭한다.
- [0038] 본원에 사용된 용어 "염"은 임의 및 모든 염을 지칭하고, 약학적으로 허용되는 염을 포함한다. "약학적으로 허용되는 염"이라는 용어는 건전한 의학적 판단 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등이 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 염을 지칭한다. 약학적으로 허용되는 염은 당업계에서 잘 알려져 있다.
- [0039] 본원에 사용된 용어 "링커"는 접합체의 두 부분을 연결하는 화학적 모이어티(예를 들어, 두 작용기 사이의 화학적 결합 형태)를 의미한다. 본 개시내용에서, 링커는 성호르몬과 HA 사이에 존재하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 링커는 화학적 또는 효소적으로 소화될 수 있고; 대안적으로는 자발적으로 분해될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체는 "조절 방출(MR)" 제형, 예컨대 연장 방출(ER), 제어 방출(CR), 지속 방출(SR), 장기 방출(PR), 장기 작용 방출(LAR) 및 지연 방출(DR) 약품으로 제형화된다. 종종 약물 물질의 즉각적인 방출을 제공하여 체내에서 약물 농도의 변동을 나타내고 약물 물질의 치료 수준을 유지하기 위해 다중 투여를 필요로 하는 기존의 투여 형태와 달리, 조절 방출 투여 형태에서는, 기존 투여 형태로는 제공되지 않는 원하는 치료 목적을 달성하기 위해 시간 경과에 따른 방출 특성 및/또는 약물 물질의 위치가 선택된다. 투여 형태에 관한 용어는 당업자들에 의해 인식되고 사용되는 통상적인 의미를 가질 것이다. 예를 들어, "연장 방출"이라는 용어는 즉시 방출(통상적인) 투여 형태로 제시된 약물과 비교하여 투여 빈도에서 적어도 2배 감소를 허용하는 투여 형태이다. "제어 방출"이라는 용어는 약물 물질이 장기간에 걸쳐 전달될 수 있는 제형을 의미한다; 주사 가능한 투여 형태의 경우 이 기간은 일에서 월로 다양할 수 있다. "지속 방출"이라는 용어는 일정 기간 동안 일정한 혈장 농도를 유도하는 미리 결정된 속도로 약물 물질을 방출하는 것을 지칭한다.
- [0041] 본 개시내용은 적어도 부분적으로, HA-성호르몬 접합체가 다양한 신경퇴행성 질환을 치료하는데 바람직한 치료 효과를 나타내는 동시에 가슴 및 심장과 같은 다른 기관에 작용하는 성호르몬에 의해 야기되는 원치 않는 부작용을 감소시킨다는 예상치 못한 발견에 기초한다.
- [0042] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 히알루론산(HA) 또는 그의 유도체 또는 염, 성호르몬, 및 성호르몬을 HA 또는 HA 유도체 또는 HA 염의 이당류 단위 중 하나에 결합시키기 위한 링커를 포함하는 히알루로난 접합체에 관한 것이다.
- [0043] 예를 들어, 성호르몬은 에스트론(E1), 에스트라디올(E2), 에스트리올(E3), 테스토스테론(T), 및 11-데옥시코르티코스테론(11-DOC)일 수 있다.

- [0044] 다양한 실시양태에 따르면, 링커는 하나 이상의 아미노산 잔기, 지질, 디하이드라지드-C₂-C₂₀ 디카복실산, 또는 C₂-C₂₀ 디카복실산일 수 있다. 본 발명에서 링커는 HA와 성호르몬을 연결하기 위한 팔 또는 스페이서 역할을 한다. 링커는 한쪽에서 하이드록실, 카복실, 아마이드 또는 아세틸아미노기 연결을 통해 HA와 결합하고, 다른 쪽에서는 가능한 공유 결합을 통해 성호르몬과 결합한다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 링커는 단일 아미노산 잔기, 예컨대 알라닌(Ala; 바람직하게는 β-알라닌), 아르기닌(Arg), 아스파라긴(Asn), 아스파르트산(Asp), 시스테인(Cys), 글루탐산(Glu), 글루타민(Gln), 글리신(Gly), 히스티딘(His), 이소류신(Ilu), 류신(Leu), 라이신(Lys), 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 프롤린(Pro), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 트립토판(Trp), 티로신(Tyr), 발린(Val), γ-abu(4-아미노부탄산), δ-아미노발레르산(5-아미노펜탄산), ε-아미노카프로산(6-아미노헥산산), 7-아미노헵탄산, 8-아미노옥탄산 및 11-아미노운데칸산이다. 일부 실시양태에서, 링커는 2 내지 100개의 아미노산 잔기를 갖는 짧은 펩티드일 수 있다. 예를 들어, 링커는 (G_nS)_m의 서열을 갖는 가요성 펩티드일 수 있으며, 여기서 n 및 m은 독립적으로 1 내지 4의 수이다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 지질 링커가 바람직하다. 이러한 지질 링커는 친수성 극성 헤드기 및 소수성 사슬을 갖는다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 링커는 선형 또는 분지형, 지방족, 방향족 또는 방향지방족 C₂-C₂₀ 디카복실산이며, 이는 예를 들어 옥살산, 말론산, 숙신산, 글루타르산, 아디프산, 피렐산, 수베르산, 아젤라산, 세바신산, 도데칸이산, 브라실산, 탐신산, 디아볼산, 크로세틴, 말레산, 푸마르산, 글루타콘산, 2-데센디산, 트라우마산, 뮤콘산, 글루타민산, 시트라콘산, 메사콘산, 이타콘산, 타르트론산, 메속살산, 말산, 타르타르산, 옥살로아세트산, 아스파르트산, α-하이드록시글루타르산, 아라비나산, 아세톤디카복실산, α-케토글루타르산, 글루탐산, 디아미노피렐산, 사카린산, 프탈산, 이소프탈산, 테레프탈산, 디펜산 및 2,6-나프탈렌디카복실산의 유도체일 수 있다.
- [0048] 디하이드라지드-C₂-C₂₀ 디카복실산 기반 링커는 일반적으로 디하이드라지드 및 C₂-C₂₀ 디카복실산의 두 모이어티를 가지며, 여기서 C₂-C₂₀ 디카복실산의 하나의 카복실레이트기는 디하이드라지드 중 하나의 하이드라지드기와 공유 결합된다. 디하이드라지드 모이어티의 예는 아디프산 디하이드라지드(ADH), 세바신산 디하이드라지드(SDH), 발린 디하이드라지드(VDH), 이소프탈산 디하이드라지드(IDH), 카보디하이드라지드(CDH), 이코산디산 디하이드라지드(LDH), 숙신산 디하이드라지드, 아디프산 디하이드라지드, 디하이드라지드 설폭사이드, 옥살산 디하이드라지드, 및 피렐산 디하이드라지드를 들 수 있으나 이에만 제한되지는 않는다. C₂-C₂₀ 디카복실산 링커와 관련하여 상기 기재된 예시적인 예는 또한 디하이드라지드-C₂-C₂₀ 디카복실산 기반 링커에 대한 디카복실산 모이어티로서 사용하기에 적합하다.
- [0049] 본 발명의 링커는 또한 2개의 모이어티, 즉, 하나 이상의 아미노산 및 C₂-C₂₀ 디카복실산을 갖는 아미노-C₂-C₂₀ 디카복실산 기반 링커를 포함한다. 아미노산 잔기 및 C₂-C₂₀ 디카복실산 링커와 관련하여 상기 기재된 예시적인 예는 또한 t 아미노-C₂-C₂₀ 디카복실산 기반 링커를 형성하는 데 사용하기에 적합하다. 제한이 아닌 예로서, 아미노-C₂-C₂₀ 디카복실산-기반 링커는 ALA-숙시네이트 링커일 수 있다.
- [0050] 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체의 HA는 약 5 kDa 내지 약 500 kDa 범위, 예를 들어 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 또는 500 kDa의 중량 평균 분자량(Mw)을 갖는다.
- [0051] 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체의 HA는 비치환(즉, HA 그 자체) 또는 치환(즉, HA 유도체) 형태일 수 있거나, 이의 염일 수 있다. 상술한 바와 같이, HA는 하이드록실, 카복실, 아마이드 또는 아세틸아미노기와 같은 작용기에서 변형될 수 있다. HA는 일련의 화학제와의 반응을 통해 위에서 설명한 바와 같이 이의 작용기(즉, 하이드록실, 카복실, 아마이드 또는 아세틸아미노기)에서 에스테르화, 그래프팅 및/또는 소수화에 의해 변형될 수 있다. 예시적인 HA 유도체는 에틸설포화 HA, 탈아세틸화 HA, 또는 하이드라지드 변형 HA이다. 본 개시내용의 일 예에서, 본 발명의 히알루로난 접합체의 HA는 비치환 형태이다. 본 개시내용의 다른 예에서, 본 발명의 히알루로난 접합체의 HA는 치환 형태이다.
- [0052] 본 발명의 다양한 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체는 0.1 내지 60%의 성호르몬으로의 치환도를

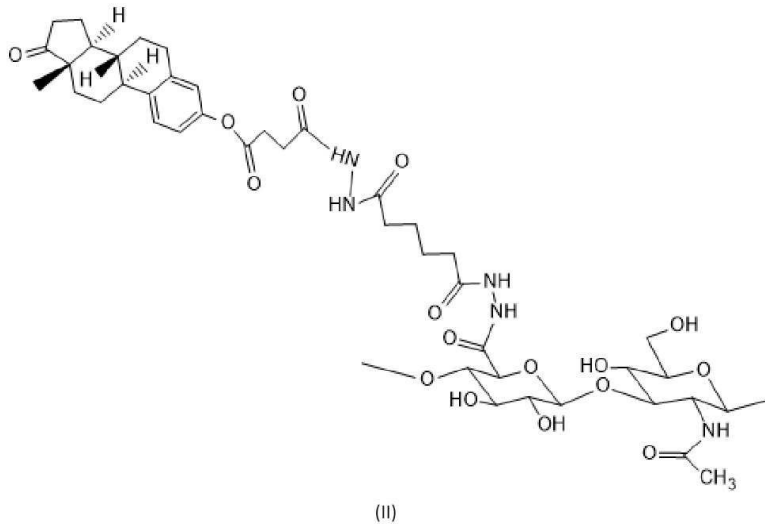
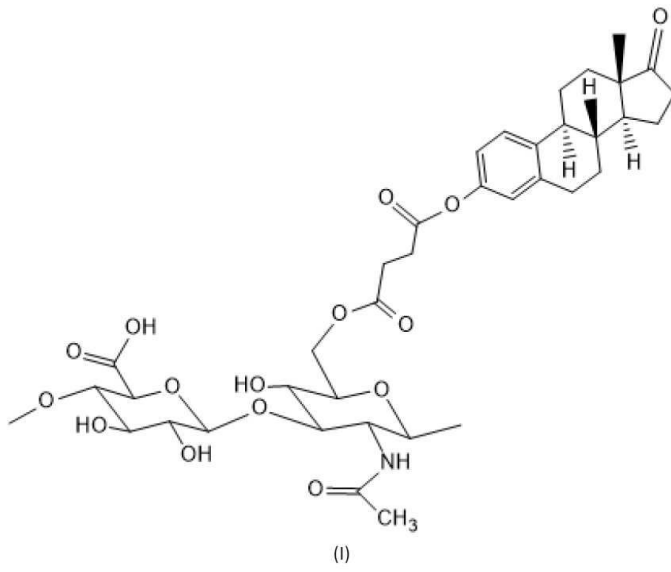
갖는다. 예를 들어, DS는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 또는 60%일 수 있다.

[0053] 본 발명의 일부 대표적인 히알루론산 접합체의 접합된 이당류 단위가 표 1 및 하기 단락에 요약되어 있으나; 본 발명은 이에 제한되지 않는다. 이해될 수 있는 바와 같이, 표 1에 나타난 예시적인 성호르몬의 입체이성질체 또한 본 발명자들에 의해 구상된다.

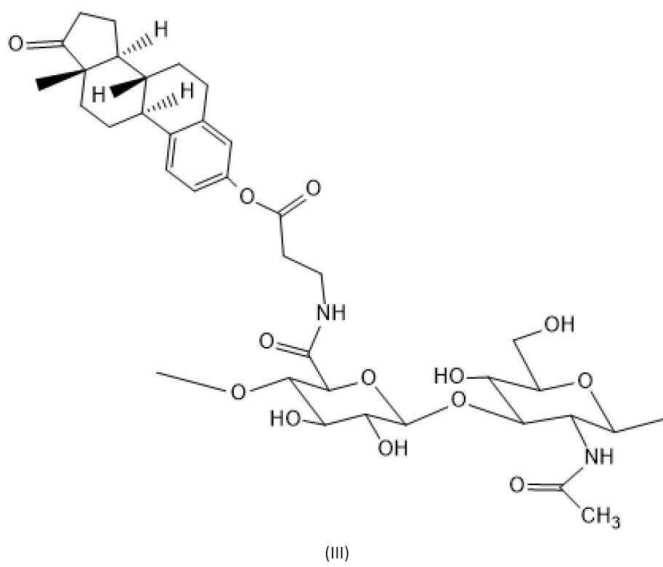
표 1

번호	성호르몬	링커
I	E1	숙시네이트
II	E1	ADH-숙시네이트
III	E1	β -Ala
IV	E1	β -Ala-숙시네이트
V	E2	ADH-숙시네이트
VI	E2	ADH-숙시네이트
VII	E2	숙시네이트
VIII	E2	숙시네이트
IX	E2	β -Ala-숙시네이트
X	E2	β -Ala-숙시네이트
XI	E2	β -Ala
XII	E2	β -Ala
XIII	E3	ADH-숙시네이트
XIV	E3	ADH-숙시네이트
XV	E3	ADH-숙시네이트
XVI	E3	숙시네이트
XVII	E3	숙시네이트
XVIII	E3	숙시네이트
XIX	E3	β -Ala-숙시네이트
XX	E3	β -Ala-숙시네이트
XXI	E3	β -Ala
XXII	E3	β -Ala-숙시네이트
XXIII	E3	β -Ala
XXIV	E3	β -Ala
XXV	11-DOC	ADH-숙시네이트
XXVI	11-DOC	숙시네이트
XXVII	11-DOC	β -Ala
XXVIII	11-DOC	β -Ala-숙시네이트
XXIX	T	ADH-숙시네이트
XXX	T	숙시네이트
XXXI	T	β -Ala
XXXII	T	β -Ala-숙시네이트

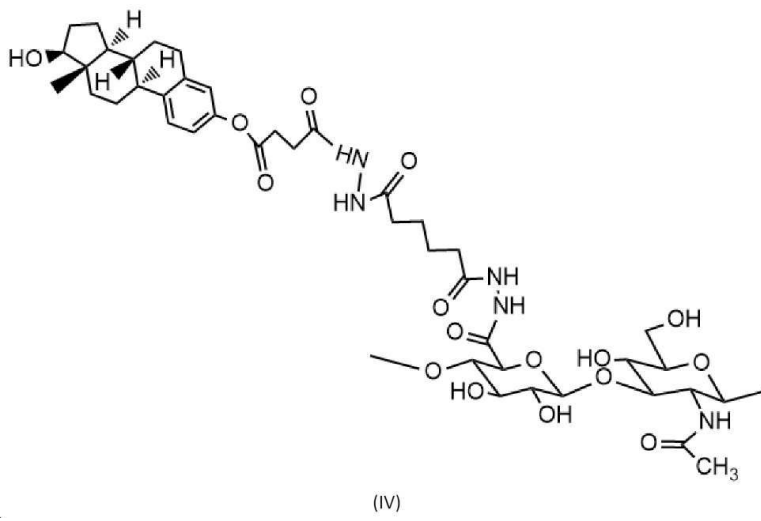
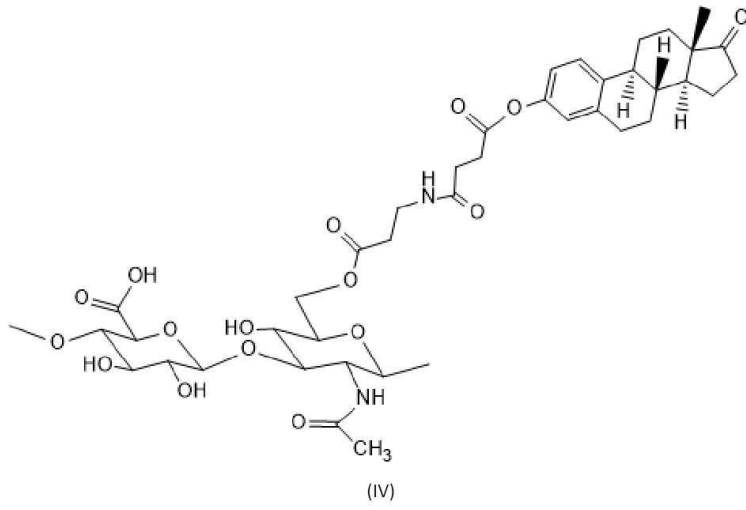
[0054]



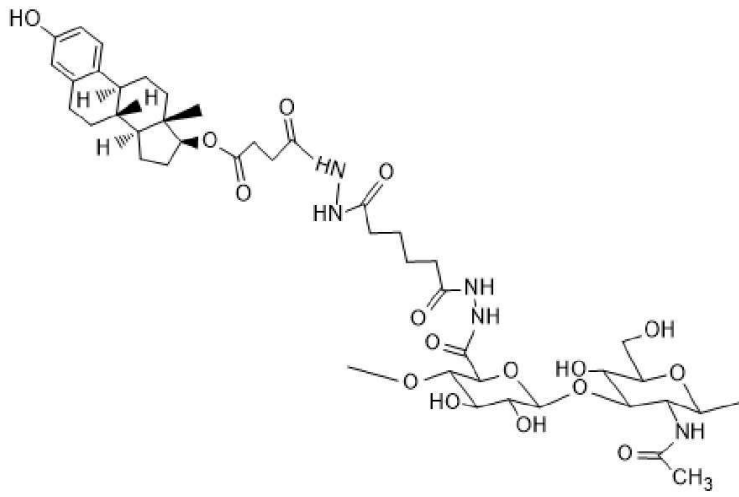
[0055]



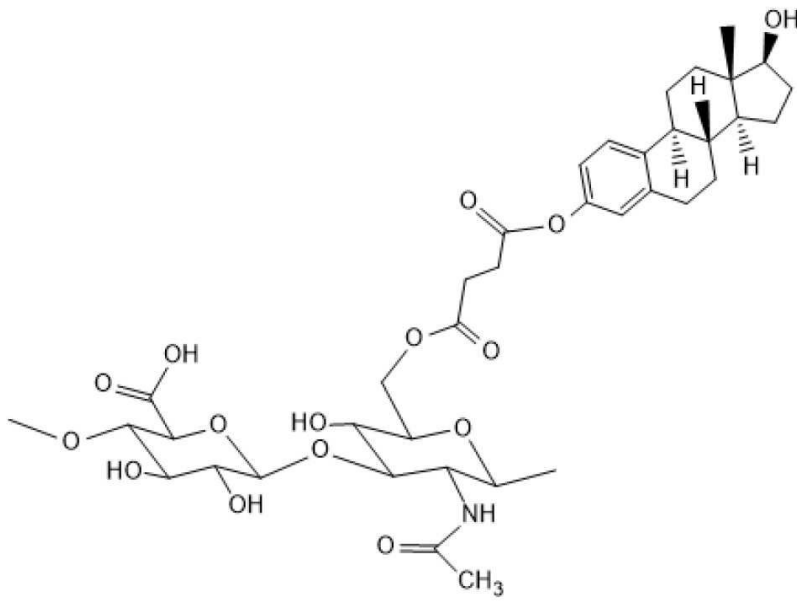
[0056]



[0057]

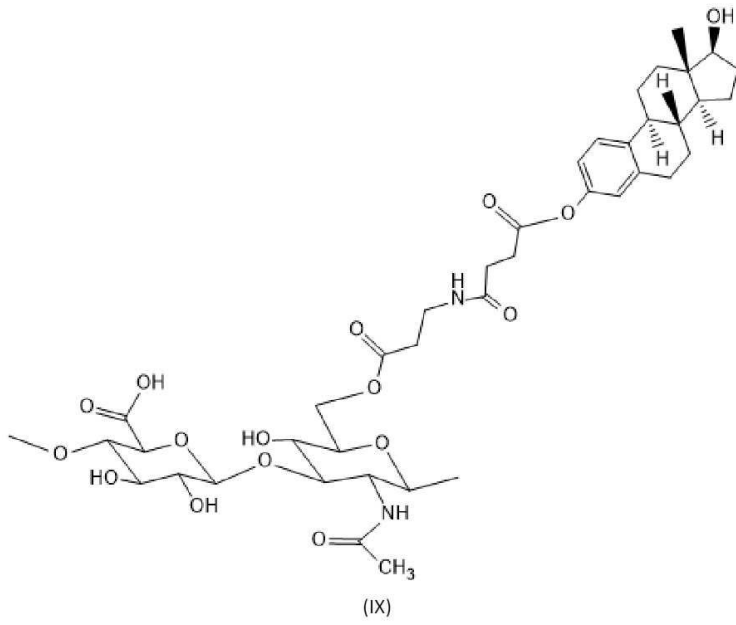
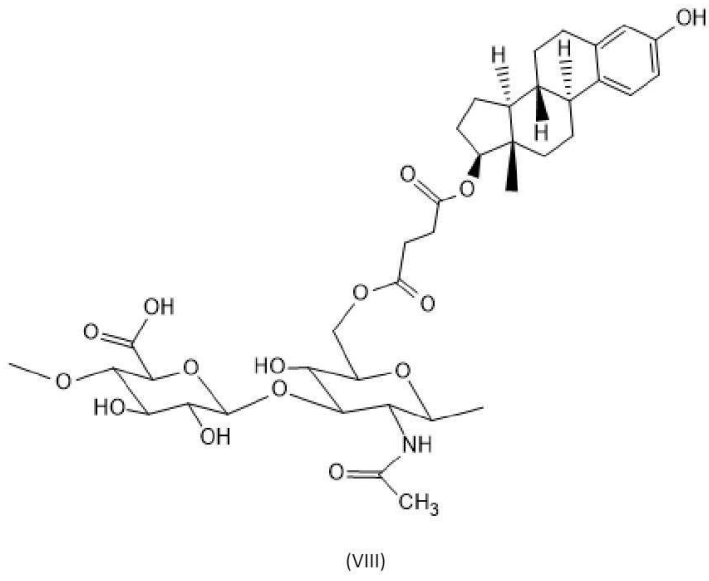


(VI)

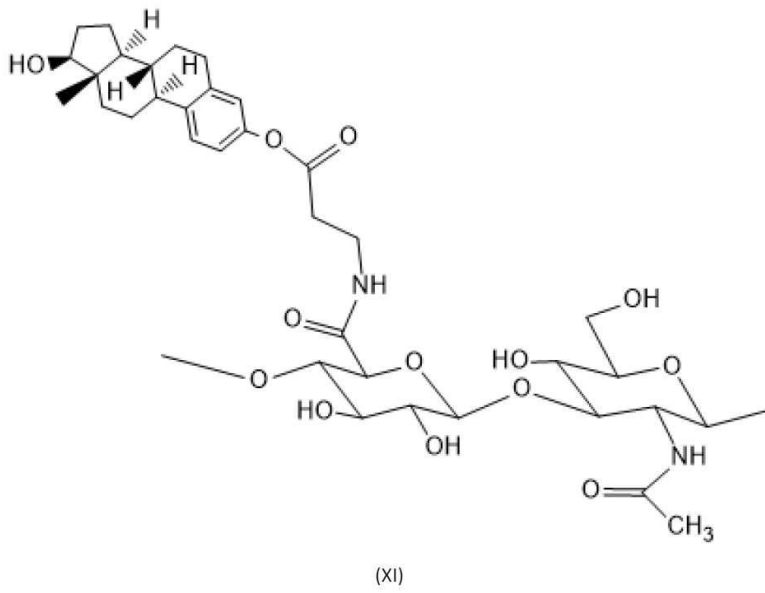
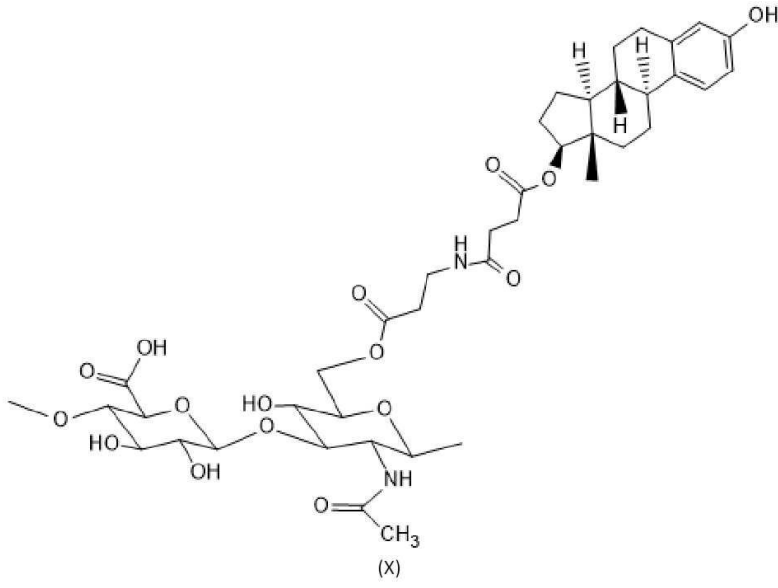


(VII)

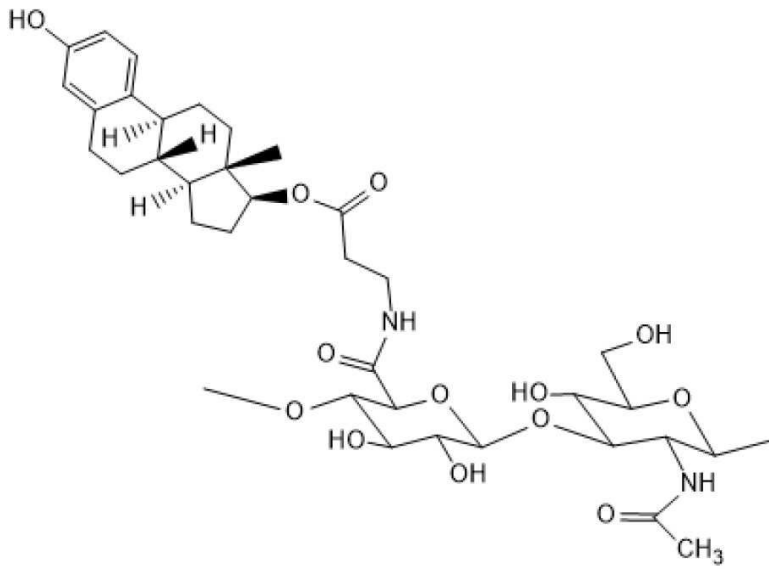
[0058]



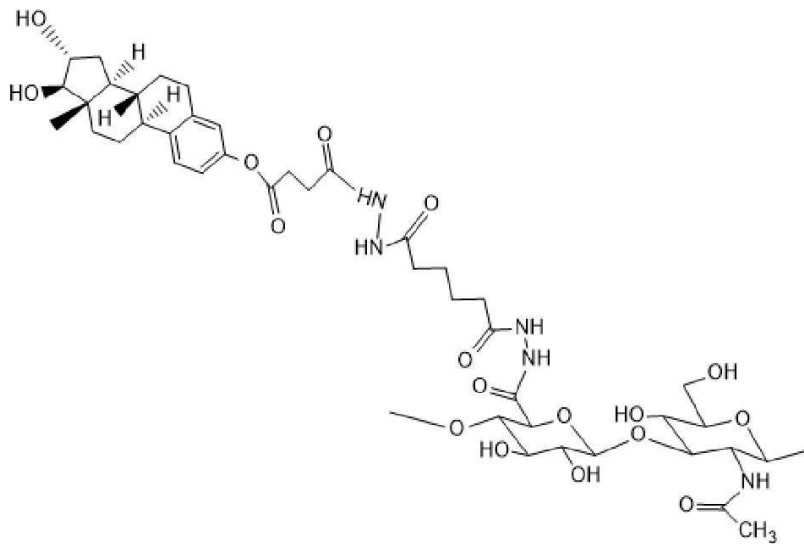
[0059]



[0060]

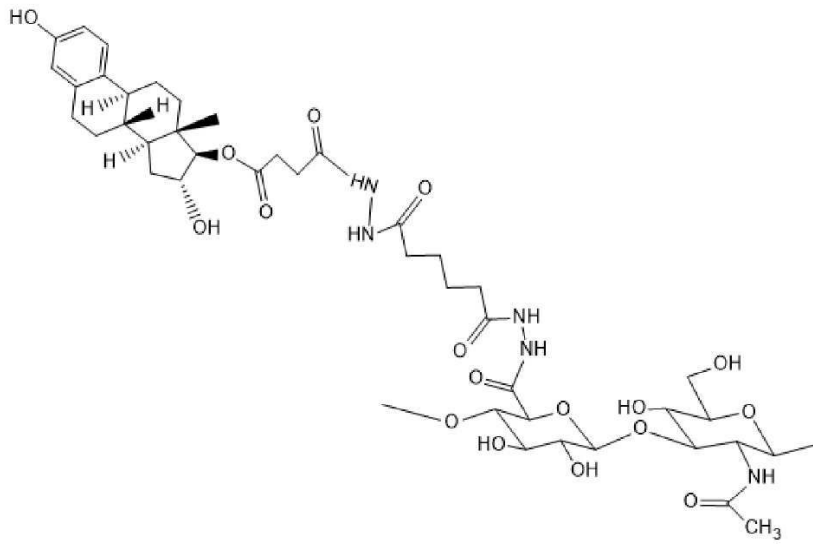


(XII)

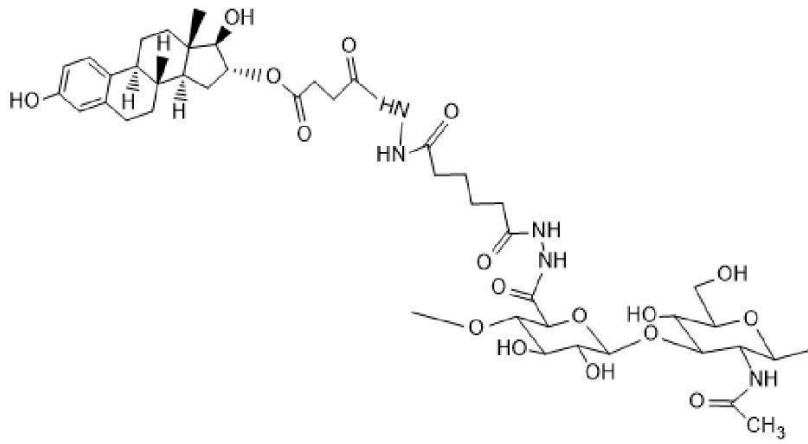


(XIII)

[0061]

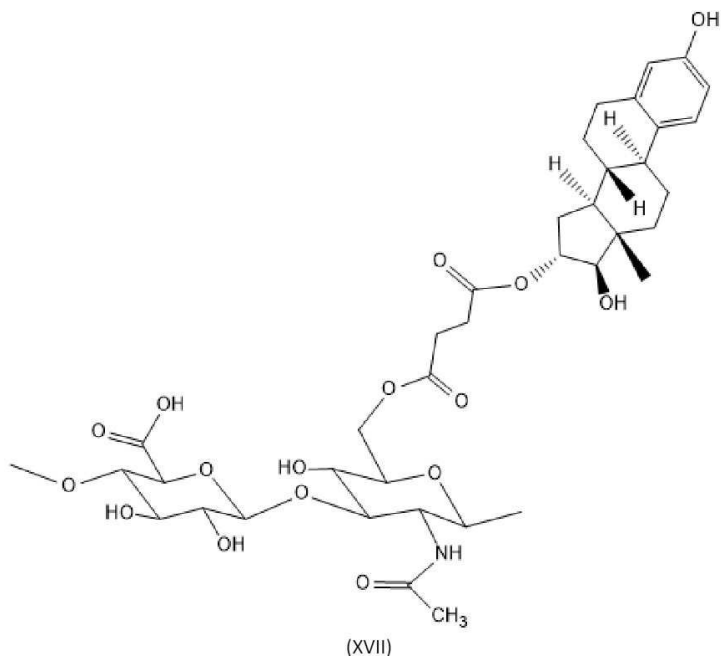
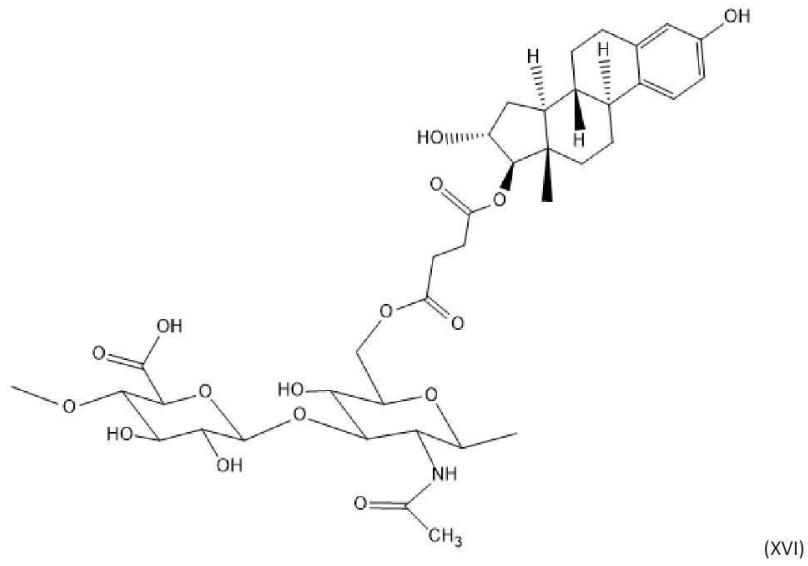


(XIV)

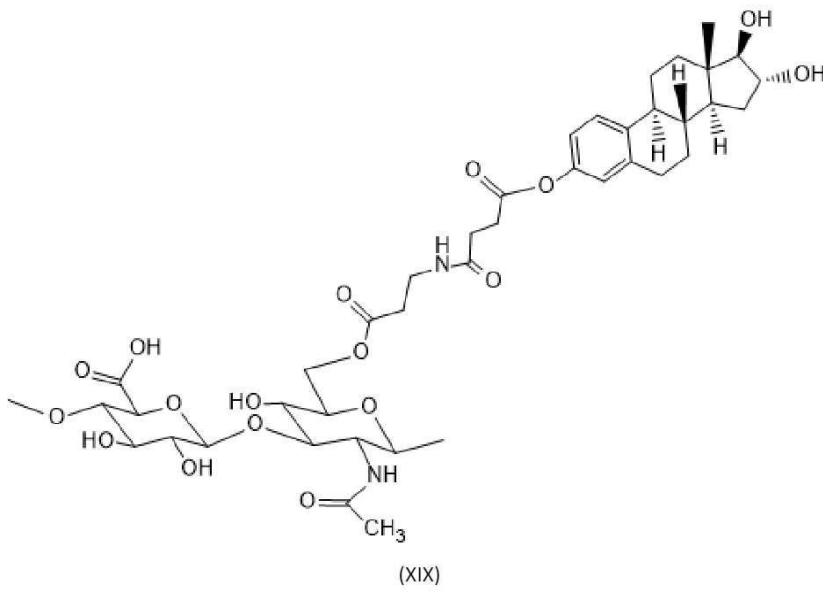
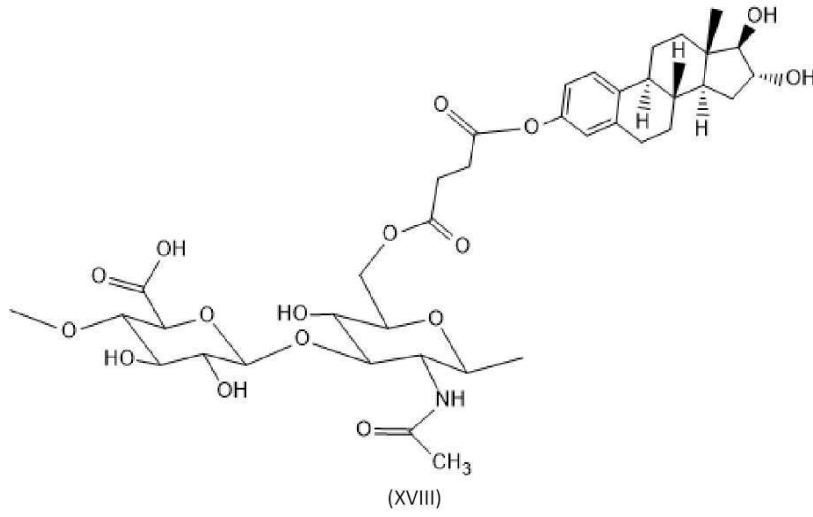


(XV)

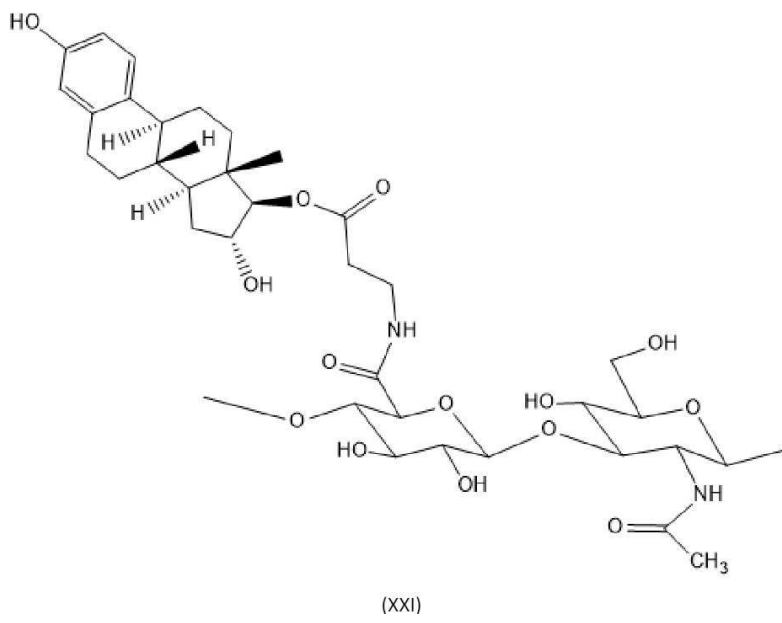
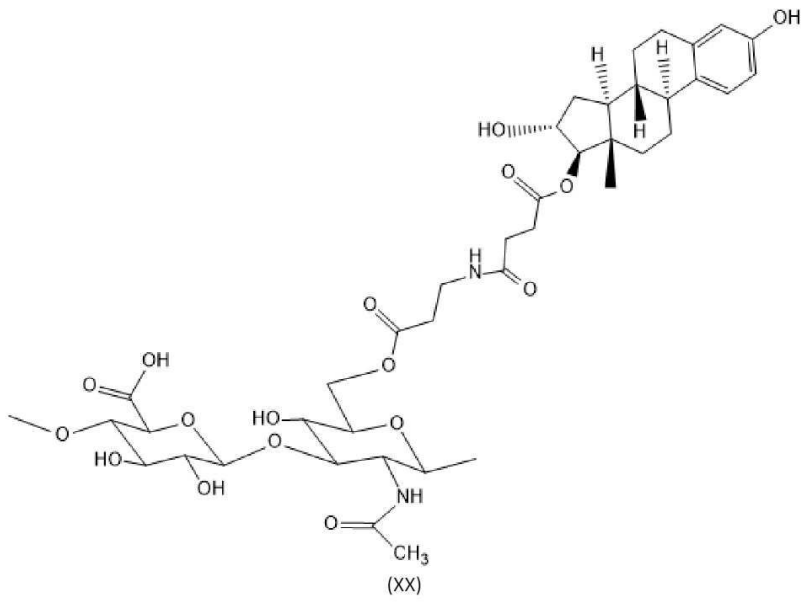
[0062]



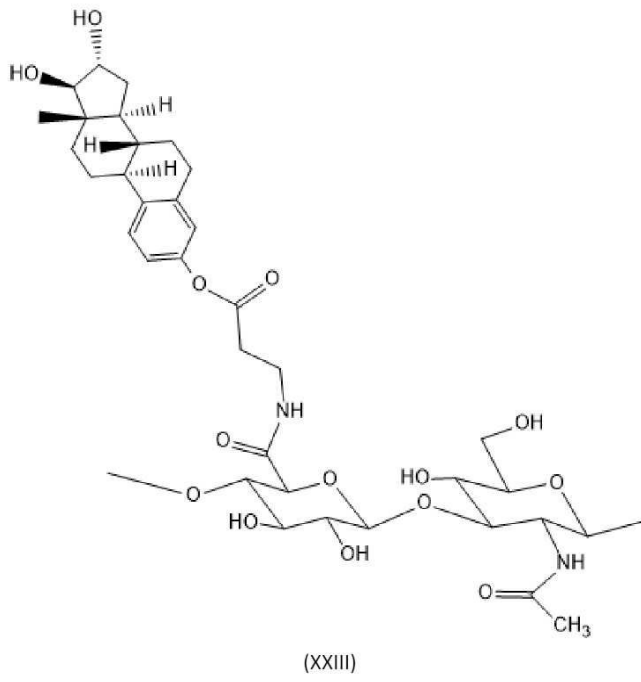
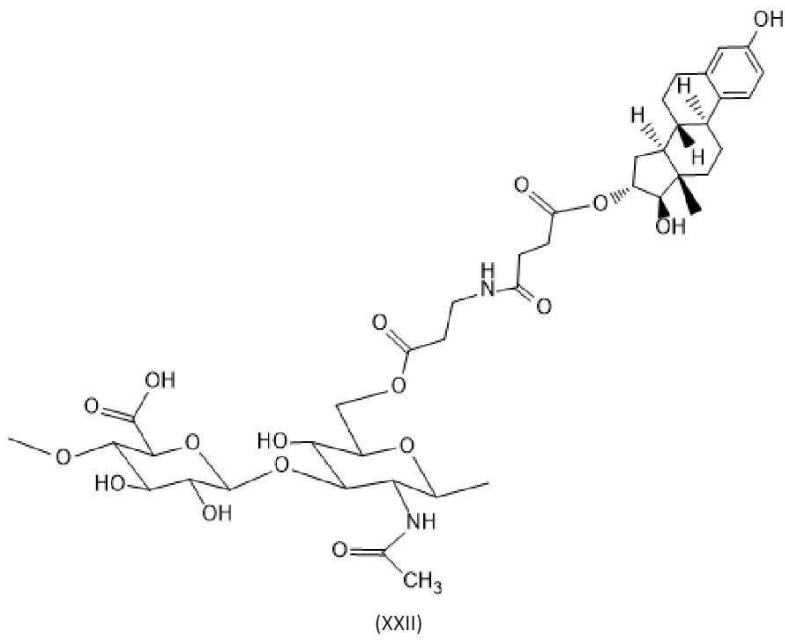
[0063]



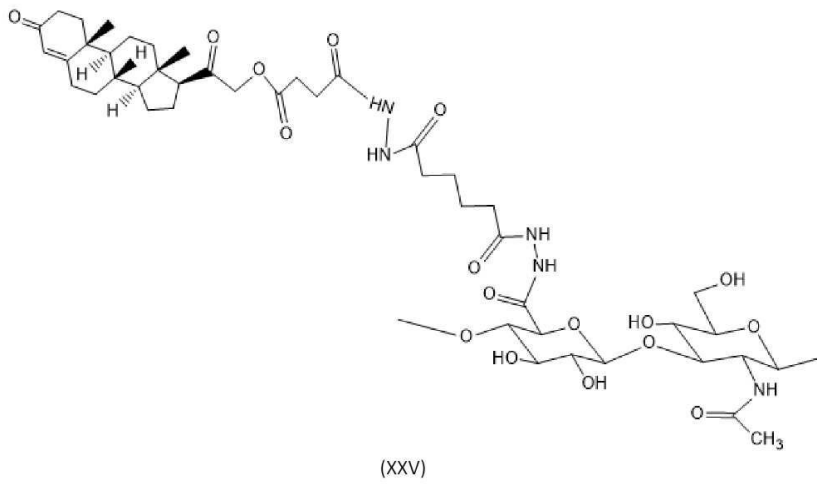
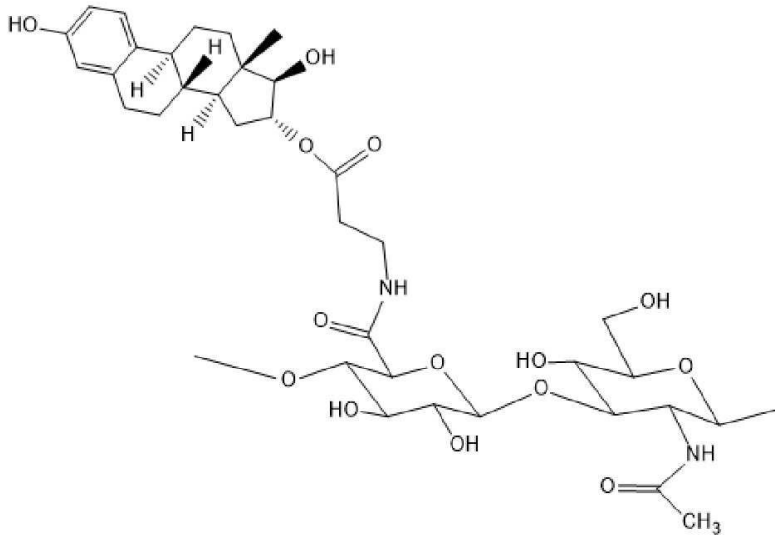
[0064]



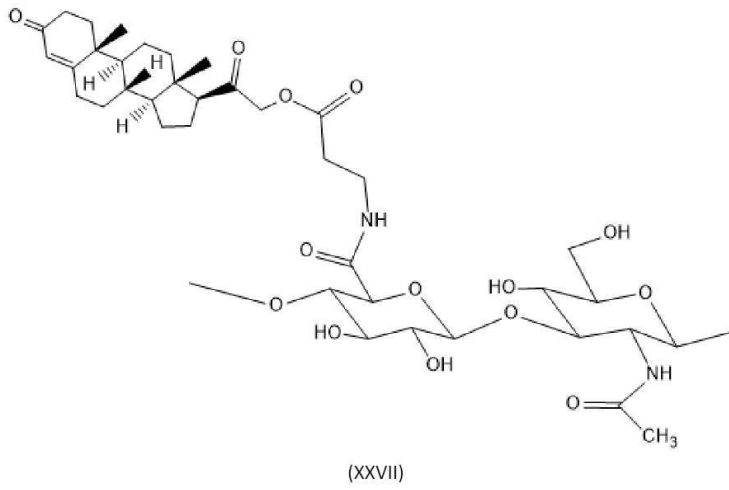
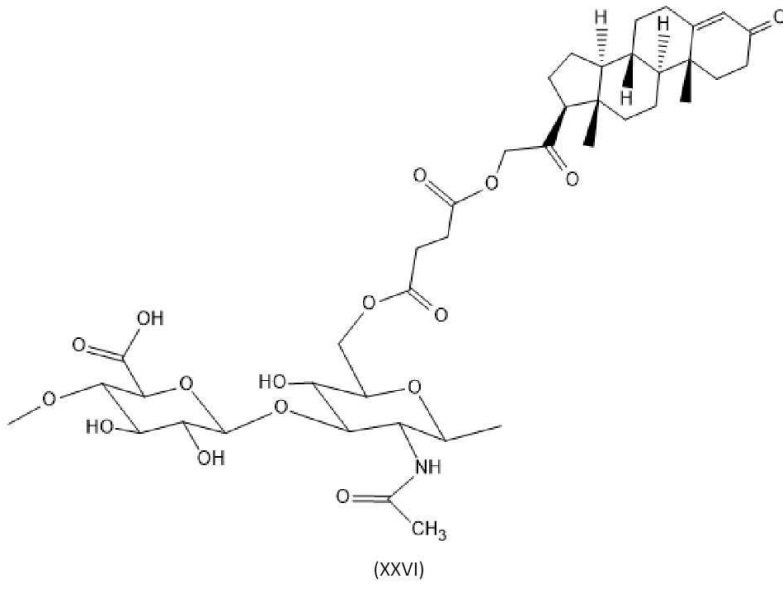
[0065]



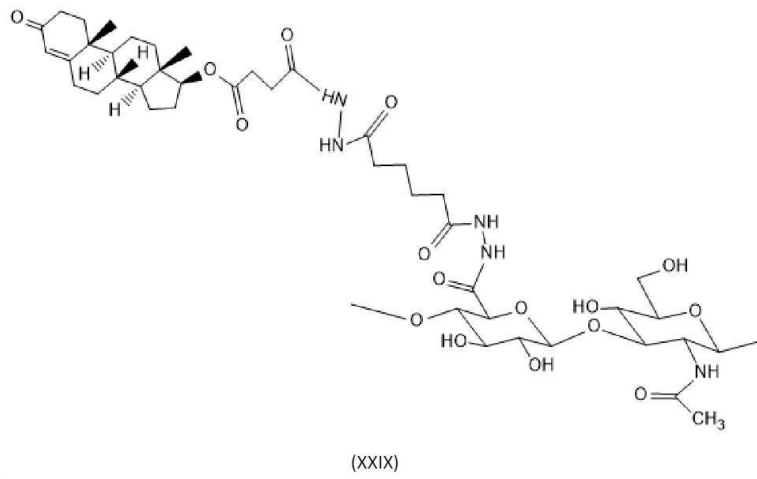
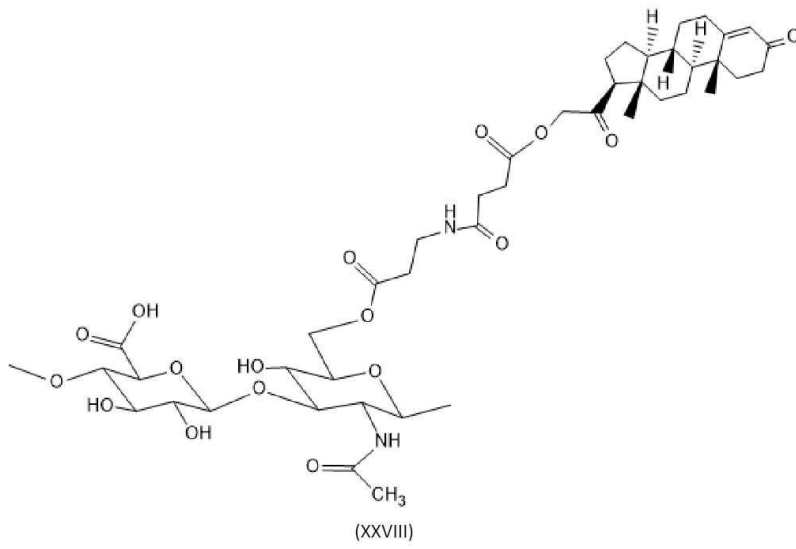
[0066]



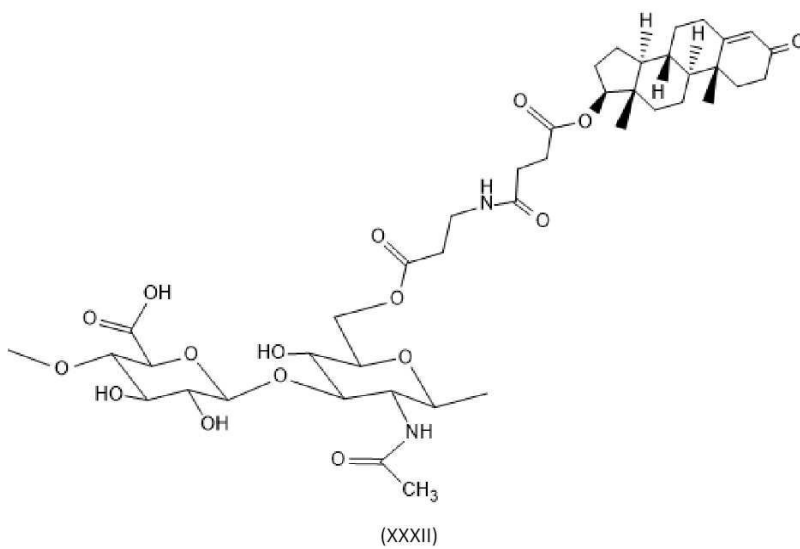
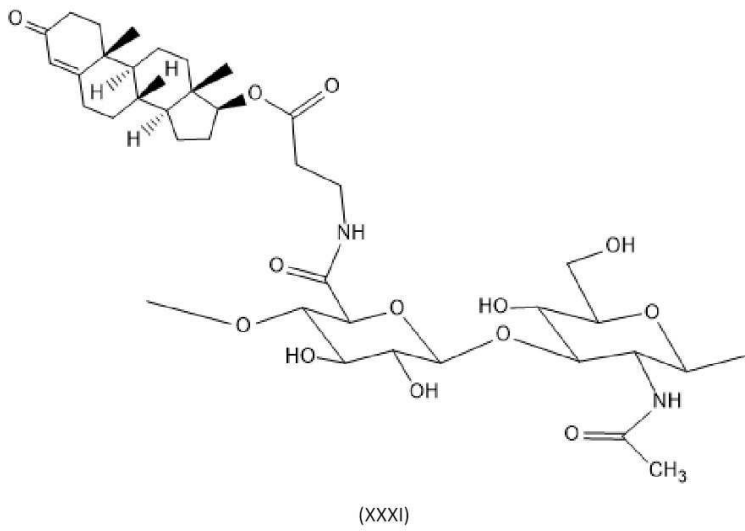
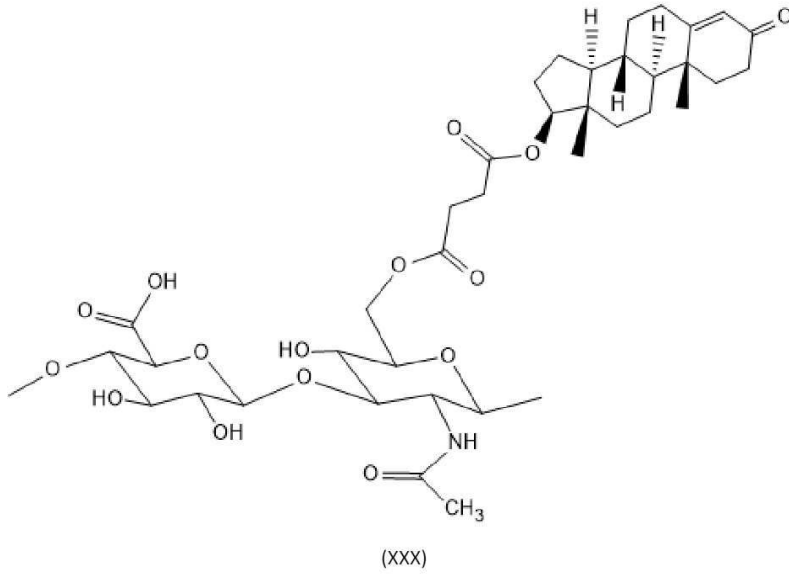
[0067]



[0068]



[0069]



[0070]

[0071]

[0072]

본 개시내용의 다양한 실시양태에 따르면, 링커는 성호르몬의 하이드록실기와 반응할 수 있는 하나의 작용기와, HA의 하나의 이당류 단위의 카복실레이트기 또는 하이드록실기와 반응할 수 있는 또 다른 작용기를 가짐으로써 성호르몬을 HA와 접합시킨다. 그러나, 본 발명은 이에 한정되지 않는다. 다른 실시양태에서, 성호르몬은 먼저

링커와 반응할 수 있는 화학적 모이어티로 변형될 수 있다.

- [0073] 또한, 본 개시내용은 상술된 본 발명의 히알루로난 접합체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0074] 허용되는 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성인 것이다. 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 약학적으로 허용되는 부형제는 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 벤조에이트, 소르베이트 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 세린, 알라닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트란을 포함한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당류; 나트륨과 같은 염 형성 반대 이온; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 착물); 및/또는 Tween™, Pluronic™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover 참조)를 포함할 수 있다.
- [0075] 본원에 기재된 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여를 위한 정제, 환제, 캡슐, 분말, 과립, 겔, 또는 용액 또는 현탁액과 같은 단위 투여 형태일 수 있다.
- [0076] 본 발명의 히알루로난 접합체는 약학 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.1 중량% 내지 99 중량%의 수준으로 약학 조성물에 존재한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 히알루로난 접합체는 약학 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 1 중량%의 수준으로 존재한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 히알루로난 접합체는 약학 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 5 중량%의 수준으로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 히알루로난 접합체는 약학 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 10 중량%의 수준으로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 히알루로난 접합체는 약학 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 25 중량%의 수준으로 존재한다.
- [0077] 본원에 기재된 약학 조성물은 약리학 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 본원에 기재된 본 발명의 히알루로난 접합체(즉, "활성 성분")를 담체 또는 부형제, 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 조합한 다음, 필요하고/하거나 바람직하다면, 생성물을 원하는 단일 또는 다중 용량 단위로 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함할 수 있다. "단위 용량"은 소정량의 활성 성분을 포함하는 약학 조성물의 분리된 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상에게 투여되는 활성 성분의 투여량 및/또는, 이러한 투여량의 1/2 또는 1/3과 같이, 상기 투여량의 편리한 분획이다.
- [0078] 본원에 제공된 본 발명의 히알루로난 접합체는 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 전형적으로 투여 단위 형태로 제형화된다. 그러나, 본원에 기재된 조성물의 총 일일 사용량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 의사에 의해 결정될 것임이 이해될 것이다. 임의의 특정 대상 또는 유기체에 대한 특정 치료 유효 용량 수준은 치료할 질환 및 장애의 중증도; 사용된 특정 활성 성분의 활성; 사용된 특정 조성물; 대상의 종, 연령, 체중, 일반적인 건강상태, 성별 및 식이, 부작용 또는 장애의 중증도; 사용된 특정 활성 성분의 투여 시간, 투여 경로 및 배설 속도; 치료 기간; 사용된 특정 활성 성분과 조합하여 또는 동반하여 사용되는 본 발명의 특정 히알루로난 접합체의 약물 정제; 및 의학 분야에서 잘 알려진 기타 요인을 비롯한 다양한 인자에 좌우될 것이다.
- [0079] 이와 같이, 약학 조성물을 제조하는데 본 발명의 히알루로난 접합체의 용도도 본 개시내용의 범위 내에 포함되며, 여기서 약학 조성물은 이를 필요로 하는 대상에서 신경퇴행성 질환을 치료하기 위해 사용된다.
- [0080] 본 개시내용의 다른 측면은 상기 언급된 히알루로난 접합체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상에서 신경퇴행성 질환을 치료하거나, 그 위험을 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0081] 본원에 기재된 본 발명의 히알루로난 접합체는 대상(예를 들어, 신경퇴행성 질환을 앓거나, 앓을 것으로 의심되거나, 또는 그 위험에 있는 인간 환자)에서 신경퇴행성 질환을 치료하거나 그 위험을 감소시키는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 헌팅턴병, 전두측두엽 치매, 간질, 신경병증성 통증 또는 운동실조를 포함하지만 이에만 제한되지는 않는다.
- [0082] 본원에 제공된 본 발명의 히알루로난 접합체 또는 이를 포함하는 조성물은 경구, 비강, 두개내, 척수내, 척추강내, 골수내, 뇌내, 뇌실내, 정맥내, 동맥내, 심장내, 피내, 피하, 경피, 복강내 또는 근육내 투여를 비롯한 당

업자에게 공지된 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 특히 고려되는 경로는 경구 투여, 정맥내 투여(예를 들어, 전신 정맥내 주사), 혈액 및/또는 림프 공급을 통한 국소 투여, 및/또는 환부로 직접 투여를 포함한다. 일반적으로, 가장 적절한 투여 경로는 약제 특성(예를 들면, 위장관 환경에서의 안정성) 및/또는 대상의 상태(예를 들면, 대상이 경구 투여를 견딜 수 있는지의 여부)를 비롯한 각종 인자에 따라 달라질 것이다.

[0083] 유효량을 달성하는 데 필요한 본 발명의 히알루로난 접합체 또는 이를 포함하는 약학 조성물의 정확한 양은, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 인자에 따라 대상마다 다를 것이다. 유효량은 단일 용량(예: 단일 경구 용량) 또는 다중 용량(예: 다중 경구 용량)에 포함될 수 있다. 특정 실시양태에서, 대상에게 다중 용량이 투여되는 경우, 대상에게 다중 용량을 투여하는 빈도는 1일 3회 용량, 1일 2회 용량, 1일 1회 용량, 2일 1회 용량, 3일 1회 용량, 주 1회 용량, 격주 1회 용량, 월 1회 용량 또는 격월 1회 용량이다. 특정 실시양태에서, 대상에게 다중 용량을 투여하는 빈도는 1일 1회 용량이다. 특정 실시양태에서, 대상에게 다중 용량을 투여하는 빈도는 1일 2회 용량이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량이 대상에게 투여되는 경우, 다중 용량의 첫 용량과 마지막 용량 사이의 기간은 1일, 2일, 4일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 7년, 10년, 15년, 20년, 또는 대상의 일생 동안이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량의 첫 용량과 마지막 용량 사이의 기간은 3개월, 6개월 또는 1년이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량의 첫 용량과 마지막 용량 사이의 기간은 대상의 일생 동안이다. 특정 실시양태에서, 대상에게 다중 용량을 투여하는 빈도는 주당 3회 용량이다.

[0084] 예를 들어, 본 발명의 일부 실시양태에 따르면, 래트(약 150 g)에서 다양한 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 히알루로난 접합체 중에 성호르몬 증가 질량으로 표현되는 유효량은 약 100 ng/kg 체중 내지 10 µg/kg 체중이다. 따라서, 히알루로난 접합체 중의 성호르몬으로 환산하여 래트를 치료하기 위한 유효량은 약 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980 또는 990 ng/kg 체중/용량, 또는 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 또는 10 µg/kg 체중/용량이다.

[0085] 또한, 히알루로난 접합체 중 성호르몬의 증가 질량으로 환산하여 마우스(약 20 g)를 치료하기 위한 유효량은 약 150 ng/kg 체중 내지 15 µg/kg; 예를 들어, 약 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980 또는 990 ng/kg 체중/용량, 또는 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5 또는 15 µg/kg 체중/용량이다.

[0086] 체중이 약 60 kg인 성인 인간에서, 래트에 대한 상기 기재된 용량(환산 계수: 0.16)으로부터 유도된 인간 등가 용량(HED)은 히알루로난 접합체 중의 성호르몬의 증가 질량으로 환산하여 약 16 ng/kg 체중 내지 1.6 µg/kg 체중/용량이다. 한편, 마우스 용량(환산 계수: 0.08)을 기준으로 한 HED는 약 12 ng/kg 체중 내지 1.2 µg/kg 체중/용량이다. 요약하면, HED는 히알루로난 접합체 중의 성호르몬의 증가 질량으로 환산하여 약 12 ng/kg 체중 내지 1.6 µg/kg 체중/용량이다.

[0087] 이해할 수 있는 바와 같이, 상기 기재된 투여량 범위는 제공된 약학 조성물을 성인에게 투여하기 위한 지침으로서 제공된다. 예를 들어, 어린이 또는 청소년에게 투여되는 양은 의사 또는 당업자에 의해 결정될 수 있으며 성인에게 투여되는 양과 같거나 이보다 작을 수 있다. 환자의 연령, 체중, 건강상태 등을 고려한 인간 대상에 대한 유효량은 히알루로난 접합체 중의 성호르몬의 증가 질량으로 환산하여 약 6 ng/kg 체중/용량 내지 3 µg/kg 체중/용량일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 인간 히알루로난 접합체 중의 성호르몬 증가 질량의 유효량은 6,

6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980 또는 990 ng/kg 체중/용량, 또는 1, 1.5, 2, 2.5 또는 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중/용량일 수 있다.

[0088] 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 다양한 신경퇴행성 질환의 치료를 위한 본 발명의 히알루로난 접합체의 유효량은 히알루로난 접합체의 약물 부하(또는 치환도)와 관련하여 상기 언급된 히알루로난 접합체 중의 성호르몬 증가 질량으로부터 결정될 수 있다. 그리고 이렇게 결정된 본 발명의 히알루로난 접합체의 각각의 유효량은 본 발명의 일부로 간주된다.

[0089] 예를 들어, 본 개시내용의 일부 작업 실시양태에 따르면, 래트(약 150 g)에서 다양한 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 히알루로난 접합체의 유효량은 약 25 내지 2,500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중이고, 마우스(약 20 g)에서는 약 1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이다. 따라서, 래트의 신경퇴행성 질환 치료를 위한 본 발명의 히알루로난 접합체의 유효량은 약 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400 또는 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중/용량이다. 또한, 마우스 치료를 위한 본 발명의 히알루로난 접합체의 유효량은 약 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중/용량이다.

[0090] 유사하게, 체중이 약 60 kg인 성인 인간에서, 마우스에 대한 상기 기재된 용량(환산 계수: 0.08)으로부터 유도된 본 발명의 히알루로난 접합체의 HED는 약 80 ng/kg 체중/용량 내지 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중/용량이고, 래트의 경우(전환 계수: 0.16)는 4 내지 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중/용량이다. 요약하면, 본 발명의 히알루로난 접합체에 대한 HED는 약 80 ng/kg 체중 내지 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중/용량이다. 환자의 연령, 체중 및 건강 상태를 고려한 인간 대상에 대한 유효량은 약 40 ng/kg 체중/용량 내지 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중/용량일 수 있다.

[0091] 구체적으로, 인간 대상에 대한 유효량은 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124,

125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980 또는 990 ng/kg 체중/용량, 또는 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690 또는 700 µg/kg 체중/용량일 수 있다.

[0092] 본원에 기재된 용량 범위는 제공된 약학 조성물을 성인에게 투여하기 위한 지침으로서 제공된다. 예를 들어, 어린이 또는 청소년에게 투여되는 양은 의사 또는 당업자에 의해 결정될 수 있으며 성인에게 투여되는 양과 같거나 이보다 작을 수 있다.

[0093] 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 히알루로난 접합체는 신경퇴행성 질환의 치료 및/또는 위험 감소에 유용한 하나 이상의 추가 약제(예를 들면, 치료 활성제)와 조합하여 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 본 발명의 히알루로난 접합체 및 추가 약학 제제는 신경퇴행성 질환의 치료에서 상승 효과를 나타낸다. 본 발명의 히알루로난 접합체는 예를 들어, 대상에서 신경퇴행성 질환을 치료 및/또는 위험을 감소시키는데 조합 요법으로서 유용할 수 있는 하나 이상의 추가 약제와 동시에, 그 이전에, 동반하여 또는 이후에 투여될 수 있다.

[0094] 약학 제제는 치료 활성제를 포함한다. 각각의 추가 약학 제제는 해당 약학 제제에 대해 결정된 용량 및/또는 일정에 따라 투여될 수 있다. 추가 약학 제제는 또한 상호 함께 및/또는 단일 용량으로 또는 상이한 용량으로 별도로 투여되는 본원에 기재된 본 발명의 히알루로난 접합체를 포함하는 조성물과 함께 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가 약학 제제는 신경퇴행성 질환을 치료 및/또는 위험을 감소시키기 위한 약제로서 알츠하이머병(AD)을 치료하기 위한 약제일 수 있으며, 도네페질, 리바스티그민, 갈란타민, 메만틴, 셀포텔, 미다포텔, 타크린, 셀레길린 및 비타민 E를 포함하나 이에만 제한되지는 않는다.

[0095] 본 개시내용의 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 히알루로난 접합체에 의해 치료가능한 대상은 포유동물이다. 일부 예에서 대상은 마우스 또는 래트이다. 다른 예에서, 대상은 인간이다.

[0096] 또한, 본원에 기재된 임의의 표적 신경퇴행성 질환을 치료하는데 사용하기 위한 키트가 본 개시내용에 포함된다. 본원에 제공된 키트는 본원에 기재된 본 발명의 히알루로난 접합체, 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 포함할 수 있다. 임의로, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가 약학 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0097] 하기 실시예는 본 발명의 특정 측면을 설명하고 본 발명을 실시하는데 있어 당업자를 돕기 위해 제공된다. 이들 실시예는 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 추가 설명 없이, 당업자는 본원의 설명에 기초하여 본 발명을 최대한 활용할 수 있을 것으로 믿어진다. 본원에 인용된 모든 문헌은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0098] 실시예

[0099] 실시예 1

[0100] HA-βALA-에스트라디올의 합성 및 특성화

[0101] 본 실시예에서는, HA-βALA-C17 에스트라디올(A 형) 및 HA-βALA-C3 에스트라디올(B 형) 둘 다를 함유하는 혼합물을 반응식 I(도 1)에 기재된 단계에 따라 합성하였다.

[0102] 요약하면, Boc-β-알라닌(2.92 mmol, 552 mg), DCC(3.40 mmole, 702 mg), 및 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)(3.04 mmole, 372 mg)을 디클로로메탄(DCM)(250 mL) 중 에스트라디올(2.75 mmole, 750 mg)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 실온(RT)에서 밤새 교반하였다. 용매를 진공하에 제거한 후, 침전물을 메탄올로 용해시켰다. 생성된 혼합물에 10% K₂CO₃ 용액(메탄올:10% K₂CO₃=1:1)을 첨가하고, RT에서 밤새 교반하였다. 그 다음, 혼합물을 농축하고, DCM 및 물로 추출하였다. 혼합물 내 대부분의 DCM을 진공하에 제거하고, 혼합물 내 침전물을 여과 제거하였다. 여액을 DCM으로 세척하고 진공하에 농축하였다. 잔류물을 아세톤으로 세척하고, 침전물을 여과하였다. 그 후, 여액을 농축한 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(용리제: 아세톤:헥산=1:1)로 정제하여 생성물인 Boc-β-알라닌-에스트라디올을 수득하였다.

[0103] HA-βALA-에스트라디올의 합성을 위한 단계적 절차는 다음과 같다: 병 A: Boc-β-알라닌-에스트라디올(0.19 mmole, 83 mg)을 DCM(1 mL)에 용해시키고, 용액을 RT에서 교반하였다. 용액에 트리플루오로아세트산(TFA)(0.2 mL, 2 mmole)을 첨가하고, 반응을 4시간 동안 진행시켰다; 이어, Na₂CO₃ 용액(55 mg/mL)을 용액에서 기포가 방출되지 않을 때까지 빙조에서 용액에 적가하였다. 그런 다음, DCM을 진공하에서 용액으로부터 제거하였다. 이어, 에틸 시아노하이드록시이미노아세테이트(옥시마)(1.39 mmole, 250 mg) 및 디메틸 설펡사이드(DMSO)(20 mL)를 잔류물에 첨가하고, 용액을 RT에서 교반하였다. B 병: HA 용액(500 mg/25 mL)을 DMSO(20 mL)와 혼합하고, 온도가 다시 RT로 돌아올 때까지 혼합물을 교반하였다. B 병의 용액을 A 병에 붓고 혼합물을 완전히 혼합하였다. N,N'-디이소프로필카보디이미드(DIC)(2.58 mmole, 326 mg)를 혼합물에 일정하게 첨가하고, 반응을 24시간 동안 진행시켰다. 그 후, 반응 혼합물을 투석하여(3500 분자량 컷오프(MWCO) 투석 백, 12시간 동안 물 10L; 12시간 동안 0.3M NaCl 1L, 2회, 및 12시간 동안 물 10L, 5회) 정제한 다음, 투석백 내의 분획을 수집하여 동결건조하였다.

[0104] 이렇게 합성된 HA-βALA-C3/C17 에스트라디올(HA-E2)을 UPLC(Acquity UPLC 및 PDA 검출기(Waters)); 컬럼: ACQUITY UPLC BEH200 SEC 컬럼(1.7 μm, ID 4.6 mm × 150 mm); 유속: 0.3 mL/분; 주입 부피: 50 μL; 검출기: UV 280 nm; 온도: 컬럼 - 25 °C, 자동 시료 주입기 - 20 °C; 실행 시간: 18분; 상대 체류 시간: HA-E2(HA-βALA-C3/C17 에스트라디올) - 2.7, E2(에스트라디올) - 10.1로 확인하였다. 계산을 위해, 선형 회귀를 적용하여 표준 곡선 y=mx+b를 생성하였다(여기서, x는 μg/ml 단위의 E2 농도이고; y는 모든 표준에 대한 피크 면적이며; m은 표준 곡선 기울기이고; b는 표준 곡선의 절편이며; 표준 곡선에 대한 허용 상관 계수(r²)는 ≥0.9950이다).

[0105] 도 2A 및 도 2B는 각각 에스트라디올(E2) 및 HA-βALA-C3/C17 에스트라디올(HA-E2)의 UPLC 프로파일을 나타낸다.

[0106] 실시예 2

[0107] 신경 세포 흡수에 대한 히알루로난 접합체의 효과

[0108] 본 실시예에서는, 본 발명의 히알루로난 접합체의 신경 세포(인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포) 흡수를 조사하기 위해, 쌍 실험 세트를 수행하였다. 결과(데이터는 미표시)는 신경 세포가 에스트론 단독보다 더 많은 HA-E1 접합체를 흡수함을 나타내며, 이는 HA-E2 접합체 대 에스트라디올 단독, HA-E3 접합체 대 에스트리올 단독, HA-테스토스테론 접합체 대 테스토스테론 단독, 및 HA-데옥시코르티코스테론 대 11-데옥시코르티코스테론 단독을 비롯한 다른 쌍의 세트에도 동일하게 적용된다.

[0109] 상기 쌍-세트 실험으로부터의 예비 결과에 기초하여, HA-E2 및 E2를 추가 분석의 대상으로 하였다.

[0110] 에스트로겐은 신경 세포의 생존력을 유지하는 데 도움을 줄 수 있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 현상의 한 발현은 세포에서 ATP 수준의 상향 조절이다. 미토콘드리아 막 전위는 미토콘드리아 ATP 합성의 원동력이므로 신경 세포를 각각 HA-C17-E2 및 E2를 처리한 후, 세포 미토콘드리아 막 전위 수준을 측정하였다.

[0111] 요약하면, 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포를 가습 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 10% 열-불활성화 소태아 혈청(FBS), 100 유닛/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신이 보충된 이글 최소 필수 배지(EMEM)에서 성장시켰다. 미토콘드리아 막 전위 측정을 위해, SH-SY5Y 세포를 E2(0.14, 0.34, 0.68 및 1.36 μg/mL), HA(6.48, 16.19, 32.38 및 64.76 μg/mL) 또는 HA-C17-E2(6.48, 16.19, 32.38 및 64.76 μg/mL, 각각 E2 농도에 해당)과

함께 18시간 동안 인큐베이션하였다.

[0112] 테트라메틸로다민, 메틸 에스테르(TMRM)는 활동성 미토콘드리아에 의해 쉽게 격리되는 세포 투과성 양이온성 적-오렌지 형광 염료이다. 세포를 트립신 처리하고 100 nM의 TMRM(Molecular Probes, Eugene, OR)을 함유하는 PBS 0.5 mL에 재현탁시켰다. 암실에서 37 °C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 즉시 얼음 위의 튜브로 옮기고, FL2 검출기를 사용하여 유세포 분석법에 의해 형광 강도를 측정하였다.

[0113] 488 nm 아르곤 레이저가 장착된 FACS Calibur 유세포 분석기(Becton Dickinson, Bedford, MA)를 유세포 분석에 사용하였다. 전방 및 측면 산란을 사용하여 크기 게이트를 설정하고 분석으로부터 세포 파편을 제외시켰다. 여기 파장은 488 nm로 설정하였다. 각 측정에서, 최소 20,000개의 세포를 분석하였다. Cell Quest 소프트웨어(Becton Dickinson)를 사용하여 데이터를 수집하고 분석하였다. 처리된 세포의 채널에서 평균 형광 강도와 대조군 세포의 평균 형광 강도 사이의 비율로 평균 형광 강도의 상대적 변화를 계산하였다.

[0114] 도 3에 도시된 바와 같이, HA-C17-E2(32.38 µg/mL, 0.68 µg/mL E2에 해당) 또는 HA-C17-E2(64.76 µg/mL, 1.36 µg/mL E2에 해당)의 처리는 대조군 및 HA 단독 또는 E2 단독 처리와 비교하여 세포에서 미토콘드리아 막 전위 수준을 증가시킬 수 있다.

[0115] **실시예 3**

[0116] **아밀로이드 베타 발현에 대한 히알루로난 접합체의 효과**

[0117] 본 실시예에서는, 아밀로이드 플라크 형성 및 Aβ42의 분포 및 발현 수준을 포함해서 APP/PS1 형질전환 마우스에서 알츠하이머병의 여러 지표에 대한 본 발명의 히알루로난 접합체의 효과를 조사하였다. APP/PS1 형질전환 마우스는 아밀로이드 베타(Aβ)를 과도하게 생산하며 알츠하이머병의 동물 모델로 광범위하게 사용된다.

[0118] APP^{swe}/PS1^{dE9}(APP/PS1) 형질전환 마우스를 Jackson lab에서 입수하였다. 모든 절차는 국립 중의학 연구소 동물 실험 센터(Animal Experimental Center of the National Research Institution of Chinese Medicine(IACUC No. 106-417-4))에 정해진 바에 따라 수행되었다.

[0119] 8주령의 APP/PS1 마우스에 0.206 mg/kg E2 또는 12.5 mg/kg HA-E2(0.206 mg/kg E2에 해당) 또는 대조군 비히클을 매주 3회씩 총 8주 정맥내 투여하였다. 7주차에는 5-브로모-2'-데옥시우리딘(BrdU)을 50 mg/Kg/일의 용량으로 7일 동안 매일 복강내 투여하였다. 이어, 조레틸/자일라진(20 mg/Kg: 5 mg/Kg)을 복강 내 투여하여 마취시켜 동물을 희생시켰다. 심부 마취 후, 심장에서 혈액을 채취하고 13,000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 분리하였다. pH 7.4 식염수로 관류한 후, 뇌반구의 피질과 해마를 수술로 제거하고 균질화하여 -30 °C에 보관하였다. 나머지 반쪽 뇌는 4% 포름알데히드에 3 내지 7일간 담가 고정한 후, 20% 및 30% 수크로스 3 내지 7일간 탈수시켰다. 추가 절편용으로 뇌 조직을 동결시켰다.

[0120] 2% SDS 및 70% 포름산(FA)(Sigma)을 사용하여 뇌 Aβ의 2 단계 순차 추출을 수행하였다. 요약하면, 피질 균질물을 프로테아제 억제제를 함유하는 H-완충액에서 동부피의 4% SDS와 혼합하였다. 그런 다음 샘플을 초음파 처리하고, 4 °C에서 60분 동안 100,000×g으로 원심분리하였다. 샘플의 상등액은 SDS 가용성 분획이었다. SDS 불용성 분획에 대해서는, 샘플의 펠릿을 70% FA에 추가로 재현탁시키고 4 °C에서 60분 동안 100,000×g으로 원심분리하였다. 이어 상등액을 수집하고, 1M Tris, pH 11로 중화하였다. SDS-가용성 및 SDS-불용성 분획 모두를 샌드위치 ELISA 분석시까지 -80 °C에서 보관하였다. Aβ 수준을 제조업체의 프로토콜에 따라 인간 Aβ40 및 Aβ42 ELISA 키트(Invitrogen)로 측정하였다.

[0121] 이렇게 결정된 혈청 및 해마에서의 Aβ42의 발현 수준을 도 4A 및 도 4B에 각각 요약하였다. HA-E2로 처리된 마우스의 혈청 및 해마 둘 다에서 Aβ42의 발현 수준은 E2 단독 또는 비히클 단독으로 처리된 마우스의 것보다 더 낮았다.

[0122] **실시예 4**

[0123] **HA-βALA-C17 에스트라디올(HA-C17-E2)의 합성**

[0124] 본 실시예에서는, HA-βALA-C17 에스트라디올(HA-C17-E2)을 반응식 III(도 5)에 따라 합성하였다.

[0125] 먼저, 에스트라디올(1.84 mmole, 500 mg)을 DCM(40 mL)에 용해시키고 15분 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물에 2.02 mmol의 벤조일 클로라이드 255 µL 및 트리에틸아민 5 방울을 첨가한 다음, 질소하에 20 °C에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 농축한 후 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(용리: EA/DCM=3/97)로 정제하여 에스트라디올 벤조에이트(Bz-에스트라디올)를 수득하였다.

- [0126] 다음으로, Bz-에스트라디올(0.23 mmole, 85 mg)을 무수 DCM(20 mL)에 용해시키고, 10분 동안 교반하였다. N,N'-디사이클로헥실카보디이미드(DCC)(0.45 mmole, 94 mg) 및 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)(0.23 mmole, 27 mg)을 반응 혼합물에 첨가하고 30분 동안 교반하였다. 그 후, Boc-β-알라닌(0.45 mmole, 87 mg)을 첨가하고 질소하에 25 °C에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여액을 DDW를 사용하여 추출하였다. 유기층을 수집하고 용매를 진공하에서 제거하여 조 생성물을 얻은 다음 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(용리: EA/DCM=3/97)를 사용하여 정제하여 에스트라디올-벤조에이트-Ala-Boc(Bz-에스트라디올-β-ALA-boc)를 수득하였다.
- [0127] 이어, Bz-에스트라디올-β-ALA-boc(0.18 mmole, 100 mg)를 MeOH(5 mL)에 용해시키고, 5M NaOH를 사용하여 pH를 9-10으로 조정하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 24시간 후, 50% AcOH를 사용하여 반응 혼합물의 pH를 6으로 조정하고, 농축하여 유성 액체를 얻었다. 유성 액체를 EA와 염수를 사용하여 3회 추출하였다. MgSO₄를 이용하여 유기층의 물을 제거한 후, 진공하에서 용매를 제거하여 조 생성물을 얻은 다음, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(용리: EA/DCM=5/95)를 사용하여 정제하여 E2-Ala-Boc를 수득하였다.
- [0128] HA-C17-E2의 합성을 위한 단계별 절차는 다음과 같다. 병 A: HA(0.49 mmole, 200 mg)를 DDW(20 mL)에서 2시간 동안 교반하여 용해시킨 다음, DMSO(25 mL)를 온도가 다시 RT로 돌아올 때까지 교반하여 반응 혼합물에 부었다. 병 B: E2-Ala-Boc(0.10 mmole, 44.1 mg)를 DCM(2 mL)에 용해시킨 다음, 트리플루오로아세트산(TFA)(1.31 mmole, 0.1 mL)을 첨가하였다. 용액을 RT에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 대부분의 DCM 및 TFA를 농축하여 제거한 다음, DDW(2 mL)를 반응 혼합물에 붓고 0.5M NaHCO₃를 사용하여 pH를 7로 조정하였다. 침전물이 용해될 때까지 DMSO를 반응 혼합물에 첨가하였다. 옥시마(0.55 mmole, 77 mg)를 DMSO(4 mL)에 용해시킨 다음, 용액을 병 A에 붓고 10분 동안 교반하였다. 병 B의 용액을 피펫으로 병 A에 천천히 첨가하고, 혼합물을 15분 동안 완전히 혼합하였다. 혼합물에 DIC(2.58 mmole, 326 mg)를 피펫으로 일정하게 첨가하고, 반응을 24시간 동안 진행시켰다. 그 후, 반응 혼합물을 투석(3,500 MWCO 투석 백, 12시간 동안 0.3M NaCl 5L, 6회; 및 12시간 동안 물 5L, 6회)으로 정제한 후, 투석백 내 분획을 수집하여 동결건조시켰다.
- [0129] 이렇게 합성된 HA-C17-E2를 UPLC로 확인하고(데이터 미표시), 280 nm에서 UV-Vis 분광기를 이용하여 약물 부하를 측정하였다. 한 작업 실시예에서, HA-C17-E2의 DS는 약 0.54%이고; 다른 작업 실시예에서 HA-C17-E2의 DS는 약 13.55%이었다.
- [0130] **실시예 5**
- [0131] **인지 기능에 대한 히알루로난 접합체의 효과**
- [0132] 이전 연구에서는 난소절제술(OVX) 또는 자궁난소절제술(OHE)의 암컷 랫트가 감각운동 피질 및 해마 CA1 영역에서 추체 신경세포의 수상돌기 가지에 상당한 감소를 보였고 인지 결손을 나타냈으며, 이는 에스트로겐이 랫드의 학습 및 기억 기능에서 일부 역할을 한다는 것을 입증하였다.
- [0133] 본 실시예에서는, 자궁난소절제술(OHE)을 받은 암컷 랫트를 본 발명의 히알루로난 접합체로 처리한 다음, 랫드의 인지 기능(예를 들어, 학습 및 기억)을 평가하기 위해 변형된 모리슨 수중 미로에 적용하였다.
- [0134] 8주령 암컷 Sprague-Dawley(SD) 랫트를 이 연구에 사용하였다. 모든 동물을 온도(24±1 °C), 습도(60%-65%) 및 빛이 조절되는 방(12/12시간 명암 주기)에 개별적으로 가두고 음식과 물을 자유로이 공급하였다. 모든 실험 절차는 대만 국립 과학 위원회의 지침에 따라 국립 중흥 대학의 실험동물운영 위원회의 승인을 받았다.
- [0135] OHE 수술을 위해, 랫트를 7% 클로랄 수화물 및 2% 자일라진(0.45 mL/100 g 체중)으로 깊게 마취시키고 OHE 수술을 시행하였다. 수술 2주 후, 랫트에게 2주간 매주 2회 시험약을 투여하고 수술 4주 후 랫트를 희생시켰다.
- [0136] 희생 5일 전에, 변형된 모리슨 수중 미로 작업을 시작하였다. 미로는 직경 145 cm, 깊이 22 cm의 검은색 원형 풀로 구성되었다. 하나의 시각 단서(별 판지)를 풀 가장자리에 놓았다. 둥근 투명 플랫폼을 수면 3 cm 아래에 놓았다. 동물의 능력을 비디오 카메라로 기록하고 SMART 비디오 추적 시스템(SMART 3.0V, Panlab, Havard Apparatus, Cambridge, UK)으로 분석하였다.
- [0137] 탈출 대기 시간을 평가하기 위해, 랫트를 하루에 2번의 테스트로 연속 3일 동안 테스트하였다. 랫트는 풀의 벽을 향한 풀의 다른 사분면에 무작위로 배치되었다. 랫트가 180초 내에 탈출한 경우 60초 동안 플랫폼에 남아 있도록 하거나, 대안적으로 180초 이내에 수중 플랫폼을 찾지 못한 경우 플랫폼에 60초 동안 두었다. 매일 수행되는 두 시험 사이에 10분의 회복 시간이 허용되었다. 매일 2회 시험 시도의 탈출 대기 시간을 후속 분석을 위해

평균내었다.

- [0138] 공간 프로브 테스트를 실행하기 위해, 풀 내 플랫폼을 제거하고 플랫폼의 이전 위치에 따라 가상 타겟 사분면 및 가상 플랫폼으로 풀을 계획하였다. 최종 탈출 대기 시간 과제 및 하루 휴식 후, 래트를 풀의 벽을 향한 표적 사분면의 대각선 영역에 놓았다. 래트를 30초 동안 수영하게 하고 수영 경로를 분석하였다.
- [0139] 모든 실험 데이터는 평균±SEM으로 표현하였다. 통계적 유의성은 일원 분산 분석(ANOVA)에 이어 SNK(Student-Newman-Keuls) 사후 검정으로 검정하였다. 차이는 p-값 <0.05에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.
- [0140] 일 라운드의 테스트에서, OHE 래트를 2X E2(280 ng/kg 체중; n=6), 1X HA-C17-E2(35 µg/kg 체중, DS: 0.54%, 140 ng/kg E2에 해당, n=5) 또는 1.5X HA-C17-E2(5.25 µg/100 g 체중 kg; DS: 0.54%; 210 ng/kg E2에 해당, n=5)로 처리하였다. OHE 래트(n=6)와 OHE 수술을 받지 않은 정상 래트(n=4)를 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다.
- [0141] 도 6A(수영 거리) 및 도 6B(수영 시간)에 요약된 대기 시간 테스트 결과는 OHE 수술이 래트의 학습 기능에 악영향을 미치는 반면, 1X HA-C17-E2, 1.5X HA-C17-E2 및 2X E2의 투여는 OHE 군에 대해 통계적으로 유의하게 OHE 래트의 학습 능력을 향상시킬 수 있음을 제시한다.
- [0142] 공간 프로브 테스트의 경우; 도 7A(표적 사분면에서의 거리) 및 도 7B(표적 사분면에서의 시간)에 제공된 데이터는 1.5X HA-C17-E2의 투여가 OHE 처리군(#, p<0.05) 1X HA-C17-E2 군 (@, p<0.05) 및 2X E2 군(\$, p<0.05)에 비해 래트의 기억 기능을 유의하게 개선함을 보여준다. 본 실시예로부터의 예비 데이터는 2X E2에 대해 75%만 증가 E2를 가지는 1.5X HA-C17-E2와 비교하여 OHE 래트의 학습 및 기억 기능을 촉진하는 데 2X E2가 덜 효과적인 임을 보여주기 때문에, 후속 테스트에서 OHE 래트에게 주어진 E2의 양을 추가로 증가시켰다.
- [0143] 다른 라운드의 테스트에서, OHE 래트를 2.5X E2(350 ng/kg 체중; n=16) 또는 1.5X HA-C17-E2(52.5 µg/kg 체중; 210 ng/kg 체중에 해당, n=16)로 처리하였다. OHE 래트(n=8)와 OHE 수술을 받지 않은 정상 래트(n=8)를 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다.
- [0144] 도 8A(수영 거리) 및 도 8B(수영 시간)에 요약된 대기 시간 테스트 결과는 OHE 수술이 래트의 학습 기능에 악영향을 미치는 반면, 1.5X HA-C17-E2 및 2.5X E2의 투여는 3일째에 OHE 군에 대해 OHE 래트의 학습 능력을 통계적으로 유의하게 향상시켰음을 나타낸다(#, p<0.05).
- [0145] 공간 프로브 테스트의 경우, 도 9A(표적 사분면에서의 거리) 및 도 9B(표적 사분면에서의 시간)에 제공된 데이터는 1.5X HA-C17-E2 및 2.5X E2의 투여가 OHE 처리군에 대해 래트의 기억 기능을 통계적으로 유의하게 향상시켰음을 나타낸다(#, p<0.05).
- [0146] 제2 라운드의 실험에서, 1.5X HA-C17-E2 또는 2.5X E2로 처리된 래트는 모두 인지 기능에서 상당한 개선을 나타내지만; 1.5X HA-C17-E2 처리에서 증가 E2의 양은 2.5X E2 처리에서의 것에 60%에 불과함에 유의해야 한다.
- [0147] **실시예 6**
- [0148] **수상돌기 수 및 가지 밀도에 대한 히알루로난 접합체의 효과**
- [0149] 래트를 7% 클로랄 수화물 및 2% 자일라진(5 mL/kg 체중)으로 깊게 마취시키고 해부 테이블에 고정시켰다. 세포내 염료 주입을 위한 조직 준비 및 면역조직화학 염색을 다음과 같이 수행하였다. 요약하면, 래트를 30분 동안 0.1M 인산염 완충액(PB), pH 7.3 중 2% 파라포름알데히드로 경심 관류시켰다. 뇌를 조심스럽게 제거하고 바이브라툼(Technical Products International, St. Louis, MO)을 사용하여 두 부분으로 절개하였다: (1) 세포내 염료 주입을 위한 해마를 포함하는 350 µm 두께의 관상 절편 두 조각; (2) 면역조직화학 염색을 위한 중앙 중격(MS) 핵을 포함한 1000 µm 두께의 관상 절편 및 해마를 포함한 2000 µm 두께의 관상 절편. 면역조직화학적 염색을 위한 두꺼운 절편을 0.1M PB 중의 4% 파라포름알데히드에 하루 동안 후고정시켰다. 세포내 염료 주입용 슬라이스를 후속 처리를 위해 0.1M PB 중의 10-7M 4',6-디아미디노-2-페닐-인돌(DAPI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 담갔다. 단두하여 전뇌 기저핵, 대뇌 피질 및 해마를 포함하는 신선한 뇌 조직을 채취하였다. 뇌 조직을 후속 단백질 정량을 위해 -70 °C 냉장고에 보관하였다.
- [0150] 도 10A 및 도 10B는 각각 래트의 말단 꼭대기 수상돌기 및 기저 꼭대기 수상돌기의 사진을 나타낸다. 도면에서 볼 수 있는 바와 같이, OHE 래트는 OHE 수술을 받지 않은 대조군 래트에 비해 수상돌기가 적다. 반면에, 2.5X E2 및 1.5X HA-C17-E2로 처리된 래트는 OHE 처리된 래트에 비해 더 많은 수상돌기를 가지고 있다.
- [0151] 도 11A(꼭대기 구역) 및 도 11B(바닥 구역)의 정량적 결과는 OHE 수술이 대조군 래트와 비교하여 가지 밀도 감

소와 관련됨을 나타낸다(*, $p < 0.05$). 한편, 1.5X HA-C17-E2 및 2.5X E2 투여는 모두 OHE 래트와 비교하여 가시 밀도의 유의한 개선을 초래하지만(#, $p < 0.05$), 1.5X HA-C17-E2로 처리된 래트가 2.5X E2로 처리된 래트에 비해 가시 밀도가 약간 더 높다. 1.5X HA-C17-E2 처리군에 주어진 에스트라디올의 양이 2.5X E2 처리군에 주어진 양의 60%에 불과하다는 사실을 고려하면 이러한 결과를 보게 된 것은 예상치 못한 일이다.

[0152] 배측 해마를 각 래트에서 무작위로 세 섹션에서 선택하였다. 해마에서 수상돌기 가시 밀도를 결정하기 위해, CA1 추체 세포의 말단 꼭대기 및 말단 기저 수상돌기를 분석하였다. 해마 CA1 영역의 5개의 독립적인 세포와 각 수상돌기로부터 3개의 분절을 10 μ m마다 무작위로 계산하였다. 모든 데이터는 평균 \pm SEM으로 표현하였다. 가시 밀도에 대한 통계적 유의성을 일원 분산 분석(ANOVA)에 이어 SNK(Student-Newman-Keuls) 사후 검정으로 검정하였다. 차이는 $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0153] 실시예 7

[0154] 감각운동 기능에 대한 히알루로난 접합체의 효과

[0155] 본 실시예에서는, 마우스의 감각운동 기능에 대한 본 발명의 히알루로난 접합체의 효과를 평가하기 위해 폴 및 빔 횡단 테스트(폴 테스트)를 수행하였다.

[0156] BioLASC Taiwan Co., Ltd에서 구입한 8주령 수컷 C57BL/6 마우스(n =군당 4-5 마리)를 이 연구에 사용하였다. 모든 동물을 온도(24 ± 1 °C), 습도(60%-65%) 및 빛이 조절되는 방(12/12시간 명암 주기)에 개별적으로 가두고 음식과 물을 자유로이 공급하였다. 모든 실험 절차는 대만 국립 과학 위원회의 지침에 따라 국립 중흥 대학의 실험동물운영 위원회의 승인을 받았다.

[0157] 메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(MPTP; 20 mg/kg)을 MPTP 유도 군에 1일차 및 5일차에 2시간 간격으로 1일 4회 마우스에 복강내(*i.p.*) 투여하였다. 5X E2(342 ng/kg) 및 2.5X 또는 5X HA-C17-E2 접합체(1.96 또는 3.92 μ g/kg 체중; DS: 13.55%, 171 또는 342 ng/kg E2에 해당)를 2일차 및 6일차에 실험동물에 정맥내(*i.v.*) 투여하였다. 동일한 방식으로 Sham 군에는 식염수를 복강내 주사하거나 PBS 완충액을 정맥 주사하여 처리하였다.

[0158] 마우스를 MPTP 유도 2일 전 및 2일 및 6일에 사전 테스트하고, 약물 투여 4시간 후에 폴 테스트를 수행하였다. 요약하면, 길이 50 cm, 직경 1 cm의 튜브를 사용하고, 튜브 상단에 폴을 부착하였다. 동물은 자주 자신의 우리로 돌아가기 위해 자연스럽게 아래쪽으로 향하고 폴의 길이를 따라 내려갈 것이다. 기어 내려와 우리로 돌아온 래트에게는 "0"의 점수를 주었다. 반면에, 방향을 돌리지 않고 대신 폴과 수평인 위치에 몸을 유지하고 나선형 방식으로 자주 기어 내려가는 마우스에게는 "1"의 점수를 주었다. 결과를 IBM SPSS Statistical 20.0 소프트웨어에서 독립성 카이-제곱 검정을 사용하여 분석하였다; 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

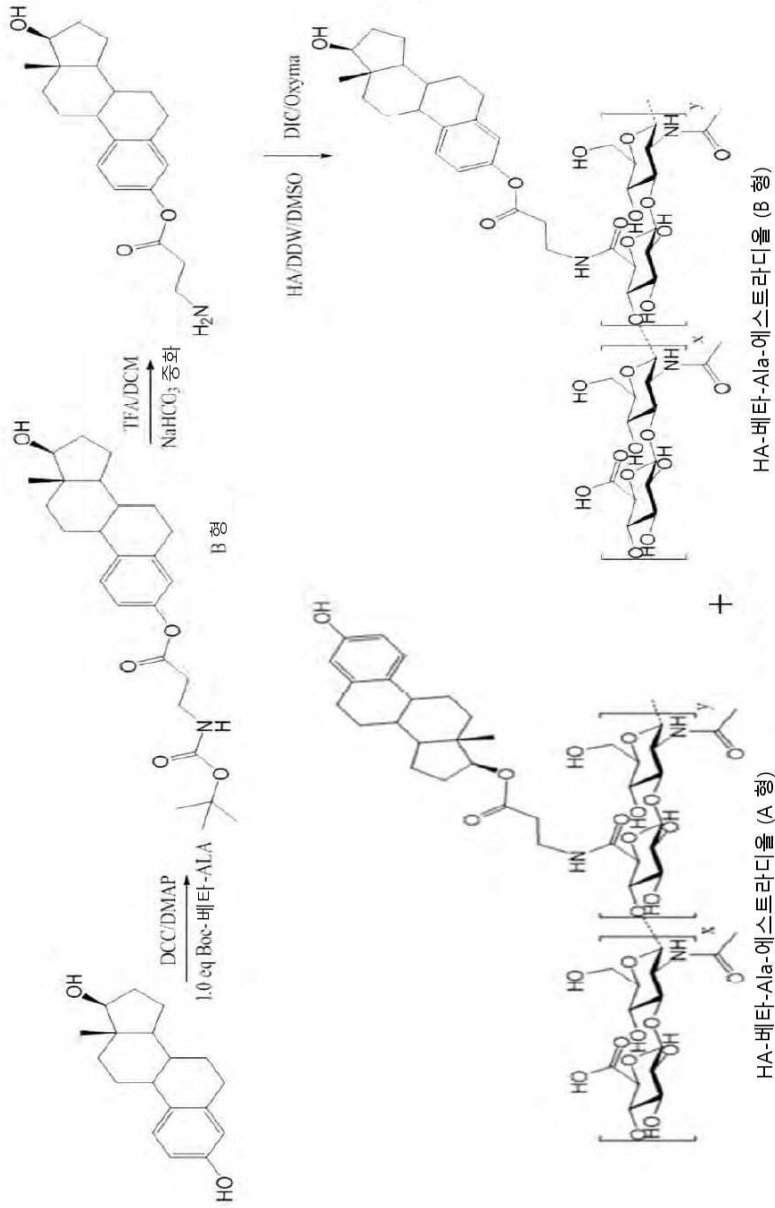
[0159] 도 12에 요약된 결과는 MPTP 유도가 마우스의 운동 협응 기능에 악영향을 미치고(*, $p < 0.05$), 5X E2의 투여는 MPTP 처리된 마우스의 운동 협응 기능을 효과적으로 개선하지 않았음을 나타낸다. 이에 반해, 2.5X 또는 5X HA-C17-E2의 투여는 MPTP 처리된 마우스의 운동 협응 기능을 유의하게 향상시켰다(*, $p < 0.05$).

[0160] 상기 실시예는 본 발명의 히알루로난 접합체가 수상 가시 밀도를 촉진하고, 인지 기능(예컨대 학습 및 기억)을 개선하고, 감각운동 기능을 향상시킬 수 있음을 입증하는 여러 시험관 내 및 생체 내 시험 결과를 제공한다. 종합하면, 이들 실험 데이터는 본 발명의 히알루로난 접합체가 실제로 마우스 및 래트에서 신경퇴행성의 징후를 예방할 수 있고, 따라서 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 헌팅턴병, 전두측두엽 치매, 간질, 신경병성 통증 또는 운동실조와 같은 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 약제 개발을 위한 탁월한 후보로 제공될 수 있음을 입증한다.

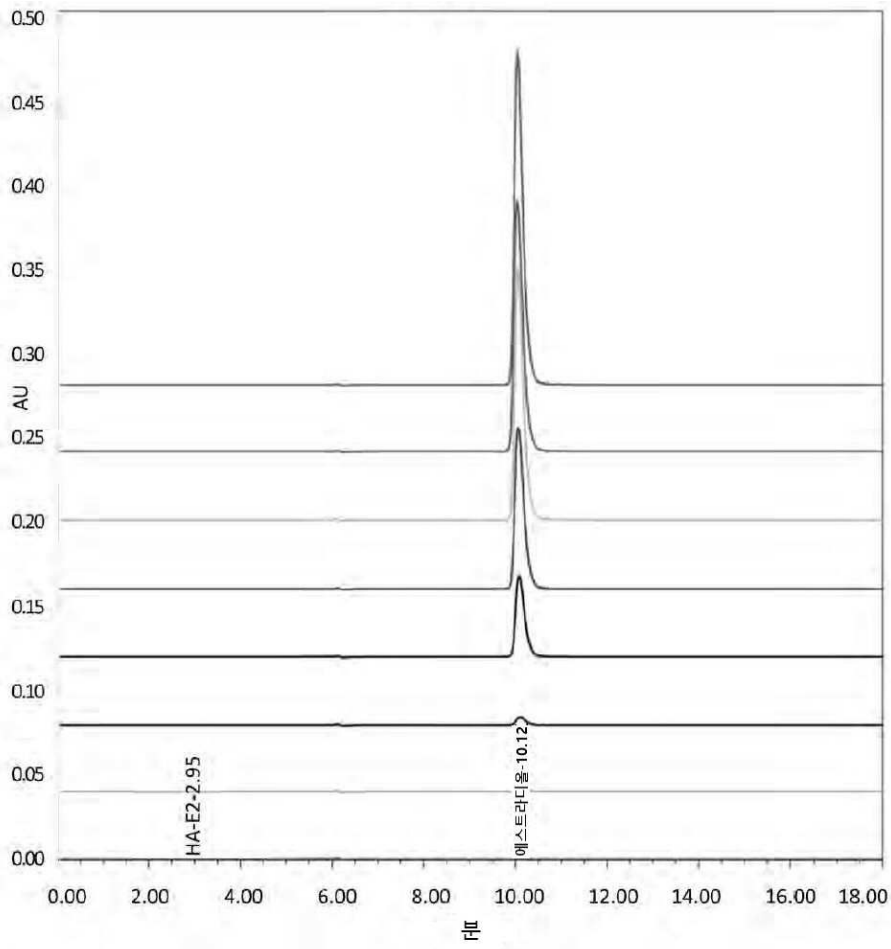
[0161] 상기 실시양태에 대한 설명은 단지 예로서만 주어진 것이고 다양한 변형이 당업자에 의해 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 상기 명세서, 실시예 및 데이터는 본 발명의 예시적인 실시양태의 구조 및 용도에 대한 완전한 설명을 제공한다. 본 발명의 다양한 실시양태가 어느 정도의 특정성을 갖고, 또는 하나 이상의 개별 실시양태를 참조하여 위에서 설명되었지만, 당업자는 본 발명의 사상이나 범위를 벗어나지 않고 개시된 실시양태에 대해 수많은 변형을 가할 수 있을 것이다.

도면

도면1

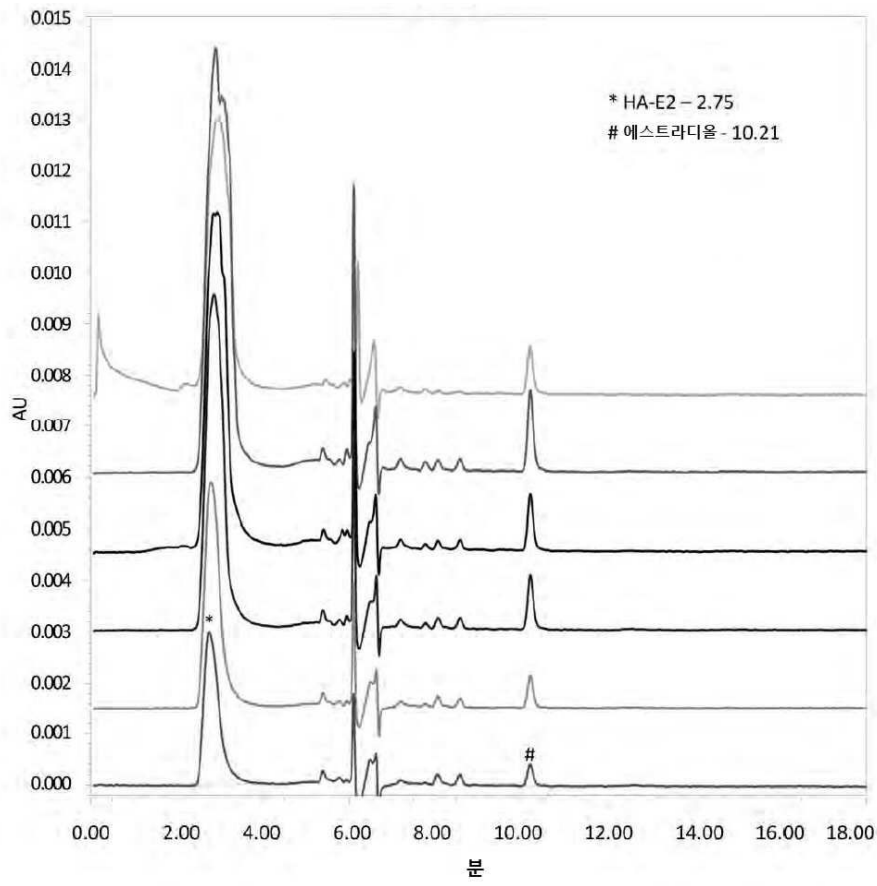


도면2a



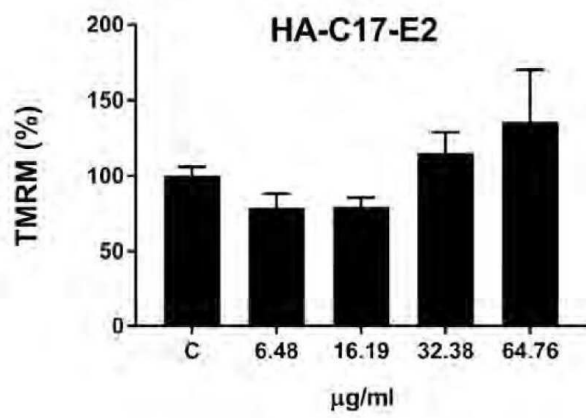
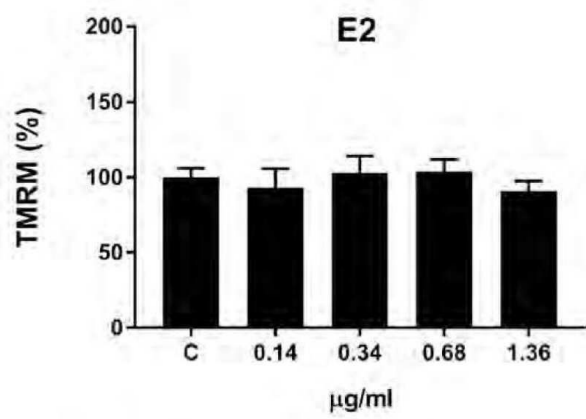
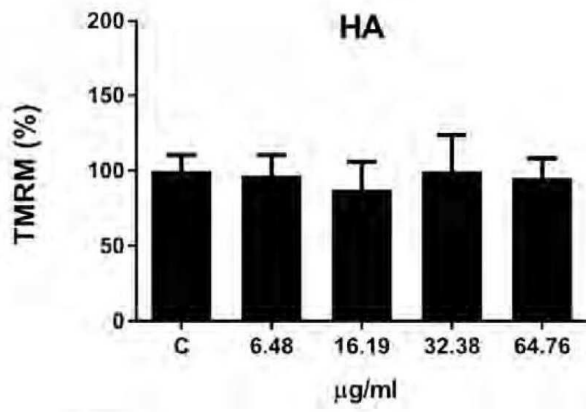
2A

도면2b



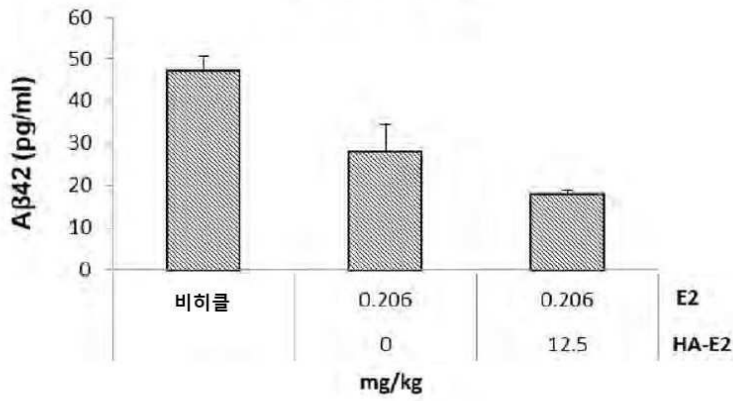
2B

도면3



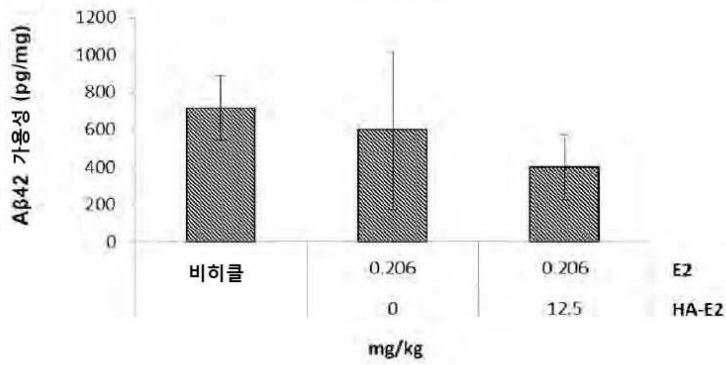
도면4

혈청 Aβ42



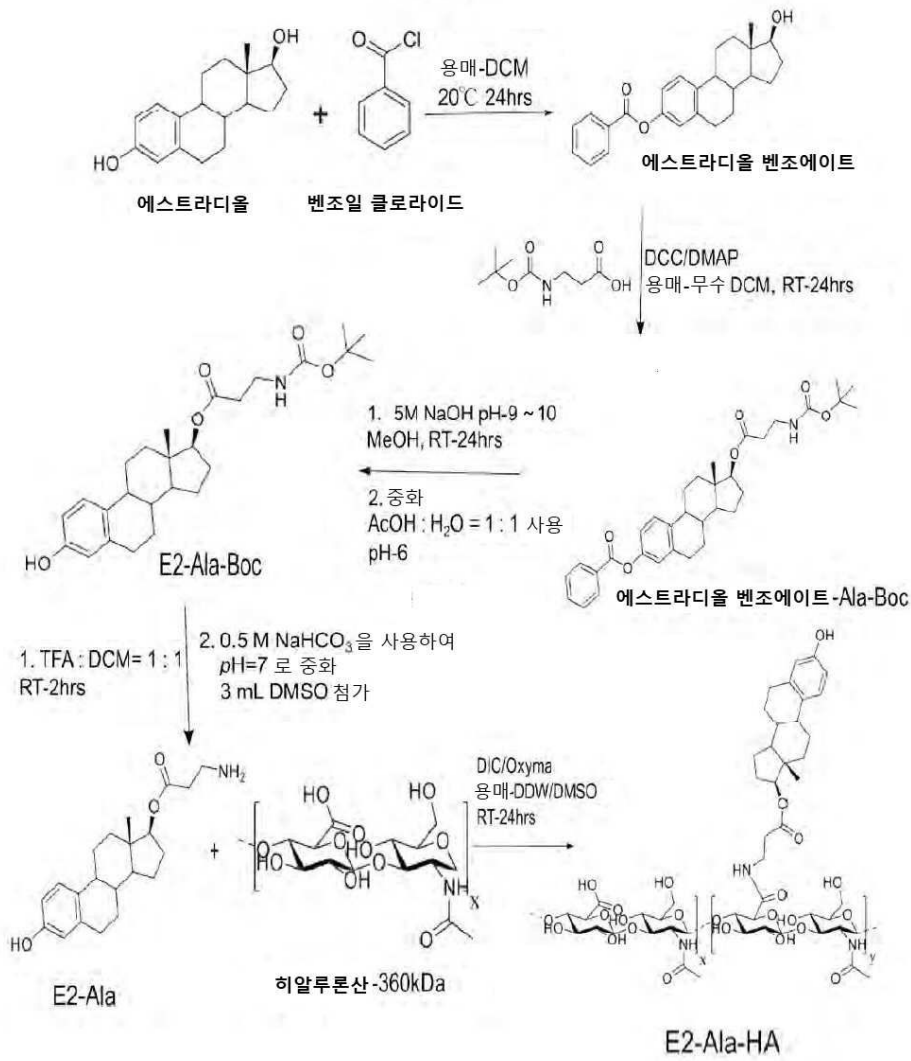
4A

해마 Aβ42

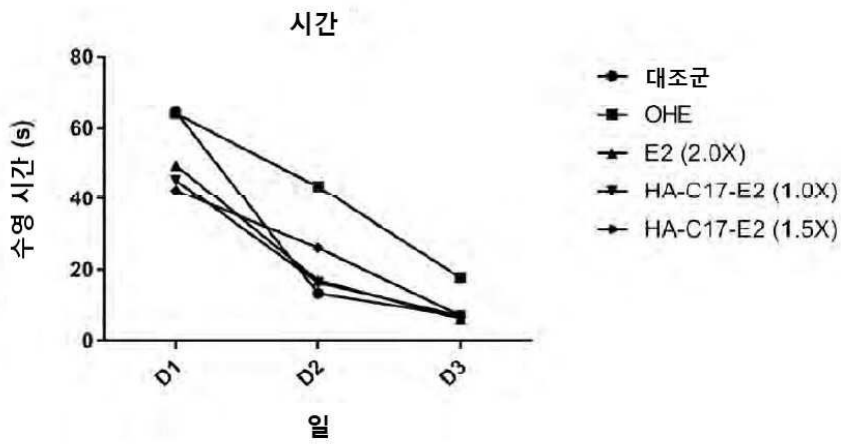
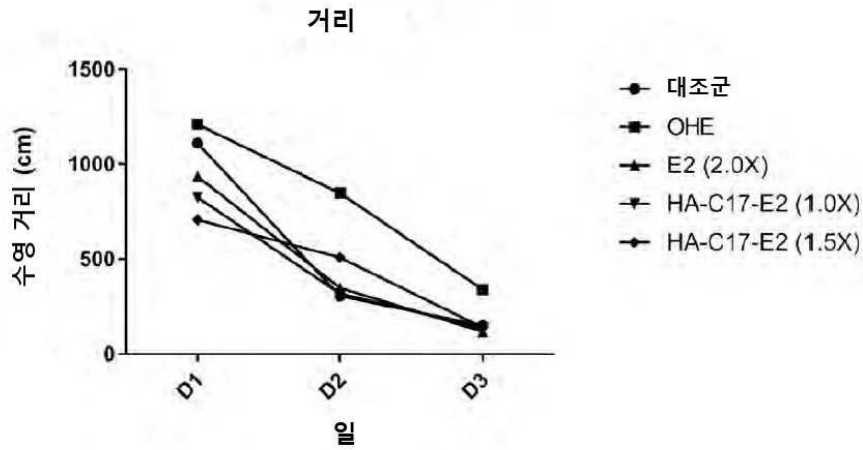


4B

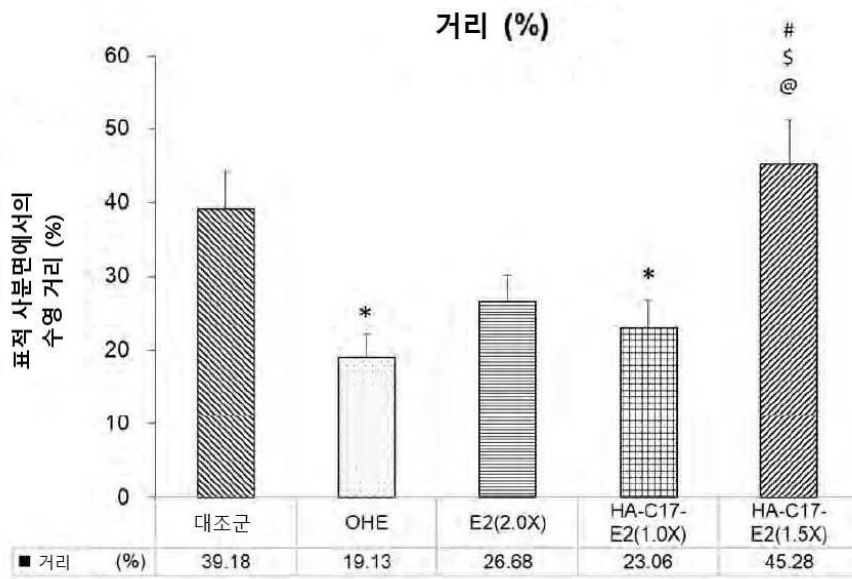
도면5



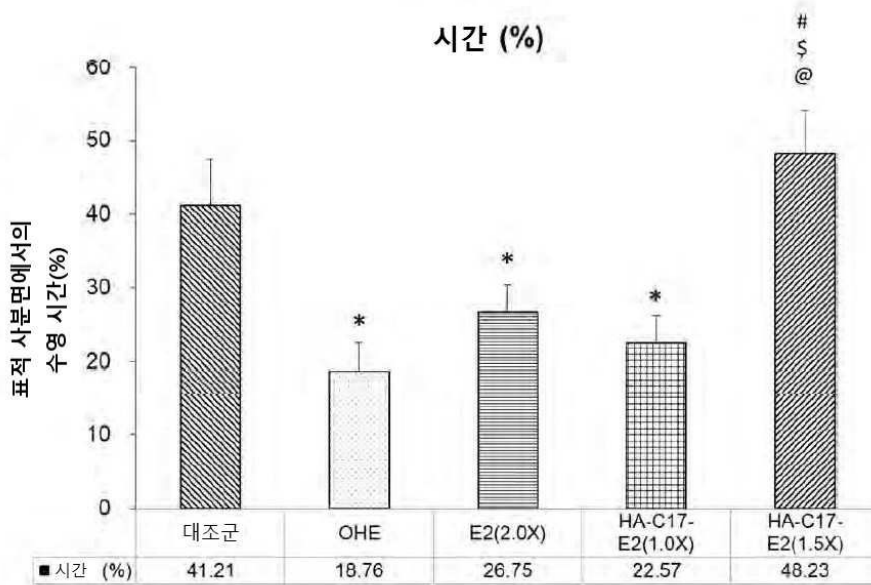
도면6



도면7

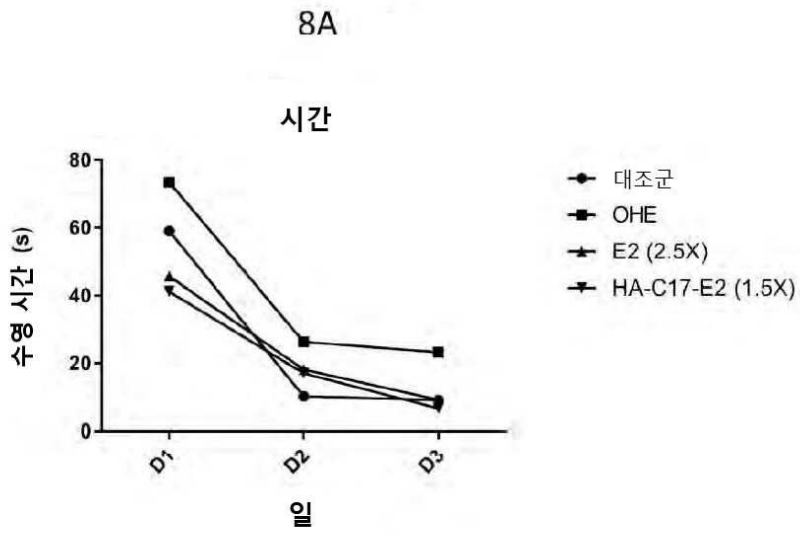
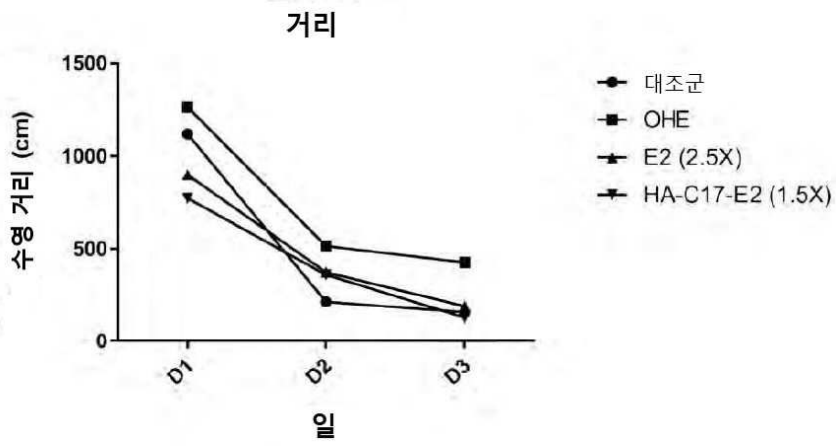


7A



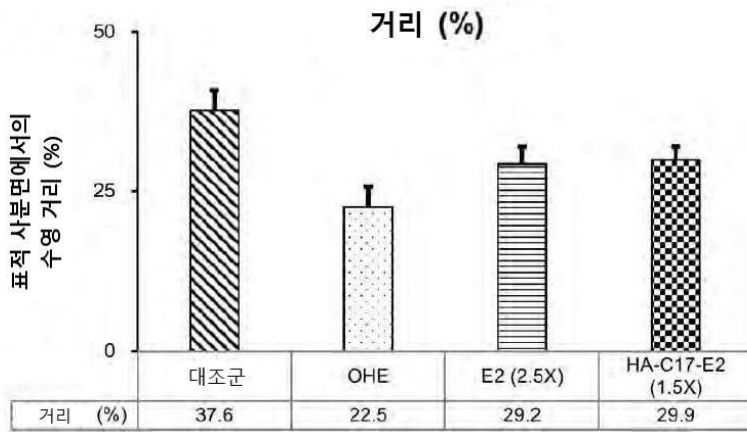
7B

도면8

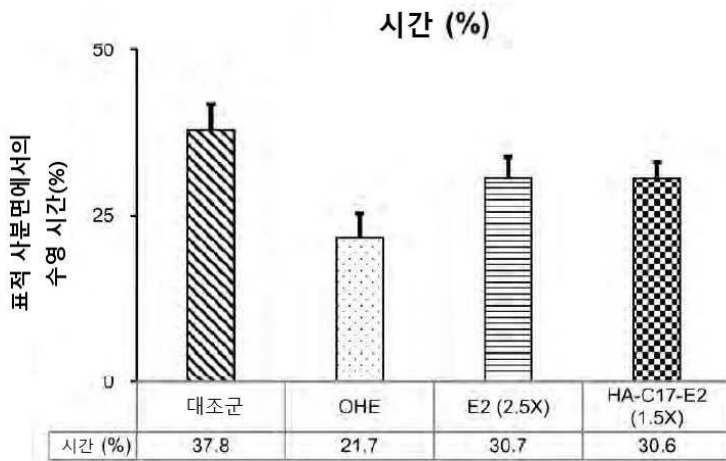


8B

도면9

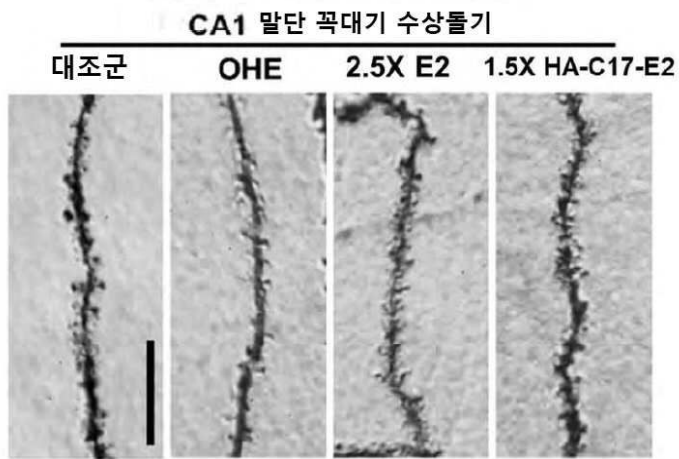


9A

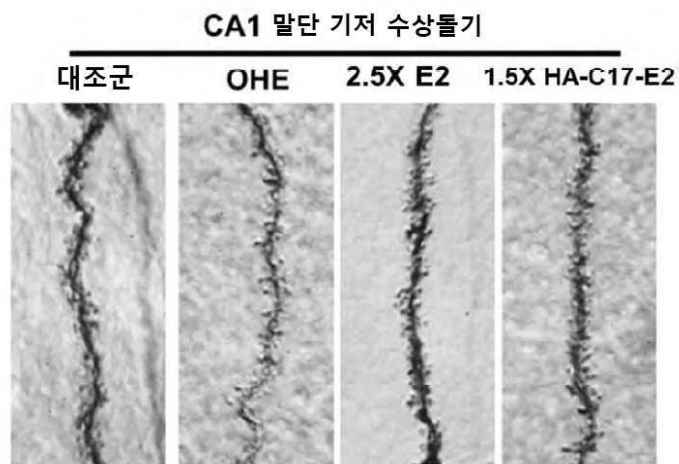


9B

도면10

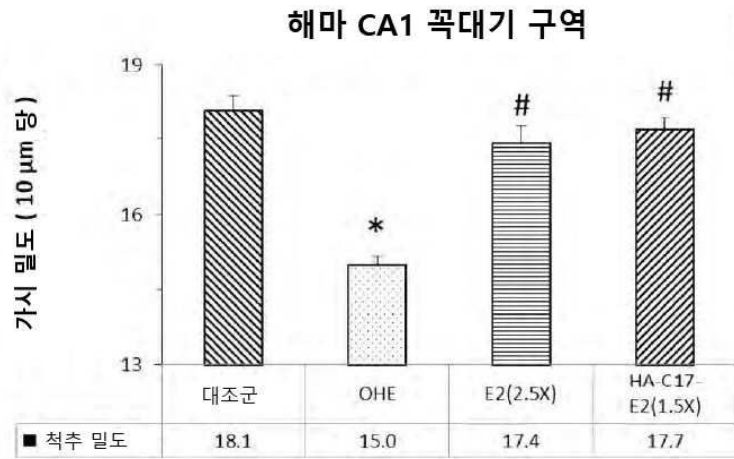


10A

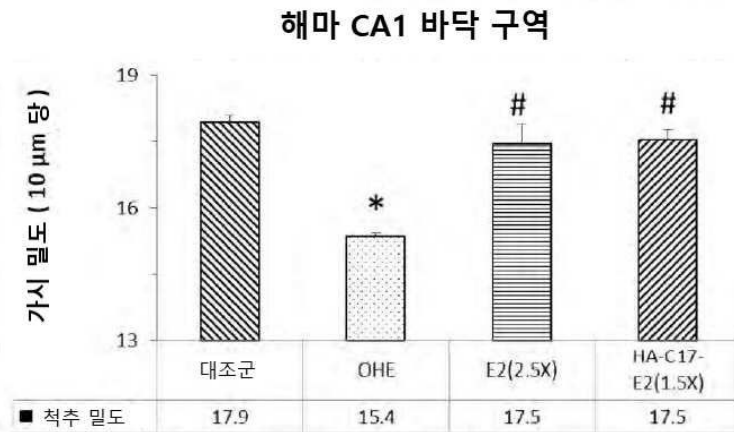


10B

도면11



11A



11B

도면12

