



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0108723
(43) 공개일자 2009년10월16일

(51) Int. Cl.

A61K 31/722 (2006.01) A61K 31/573 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7018022

(22) 출원일자 2008년01월31일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년08월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/001301

(87) 국제공개번호 WO 2008/094659

국제공개일자 2008년08월07일

(30) 우선권주장

60/887,559 2007년01월31일 미국(US)

(71) 출원인

알러간, 인코포레이티드

미합중국92612

캘리포니아앨바인두폰트드라이브2525

(72) 발명자

유태, 로날드, 이.

미합중국 사우스다코타주 57071, 볼가, 이. 4번
스트리트 324

클로스터, 카이아, 엘.

미합중국 사우스다코타주 57034, 허드슨, 482번
애비뉴 29244

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최경준

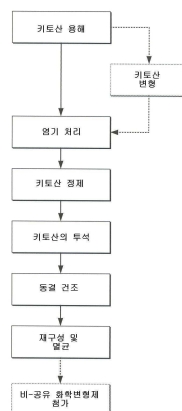
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 안 약물 송달을 위한 신규한 생체적합물질 및 이의 제조방법 및 용도

(57) 요약

프로스타글란딘, 프로스타마이드, 비-스테로이드성 항염 약물(NSAID), 및 코르티코스테로이드, 및 그 혼합물, 유도체, 염 및 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택된 약물의 안 약물 송달 응용에 유용한 독특한 성질을 갖는 신규한 생체적합물질이 개시된다.

대표도 - 도2B



(72) 발명자

다우니, 테레즈, 엠.

미합중국 사우스다코타주 57108, 수폴스, 이. 리비
레인 1005

하버러, 바바라, 알.

미합중국 사우스다코타주 57033, 하트포드, 259번
스트리트 46050

유소, 패트릭, 디.

미합중국 사우스다코타주 57006, 브루킹스, 아파트
먼트 씨2, 6번 애비뉴 사우스 524

창, 제임스, 앤.

미합중국 캘리포니아주 92660, 뉴포트 비치, 세르
만데스 36

특허청구의 범위

청구항 1

처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물 - 여기서, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타냄-, 및

프로스타글란딘, 프로스타마이드 및 그 혼합물, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 및 NSAID의 혼합물, 및 코르티코스테로이드 및 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 치료학적 제제를 포함하며,

키토산 조성물은 치료학적 유효량의 치료학적 제제를 일정 기간에 걸쳐 방출하도록 적합화된,

안 질환 또는 상태를 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 방부제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 방부제가 벤즈알코늄 클로라이드, 클로르헥시딘, PHMB(폴리헥사메틸렌 바이구아나이드), 메틸 및 에틸 파라벤, 헥세티딘, 클로라이트 성분, 및 기타 안과적으로 허용가능한 방부제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고 농도 범위가 약 0.00001% 내지 약 0.05% 또는 약 0.1%(w/v)인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 부형제가 안과적으로 상용가능한 부형제인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 완충제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 완충제가 아세트이트 완충제, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 보레이트 완충제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 비히클을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 비히클이 안과적으로 상용가능한 비히클인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 치료학적 제제가 키토산의 부위에 공유 결합하는 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 치료학적 제제가 연결자를 통해 키토산의 부위에 공유 결합하는 조성물.

청구항 12

처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물과 치료학적 유효량의 약제학적 제제를 접촉시켜 실질적으로 균일한 조성물을 형성하는 단계를 포함하며,

각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타내고, 및

각각의 변형된 키토산은 하나의 작용기 또는 다수의 작용기의 공유 결합, 하나의 원자 또는 분자 체제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 체제의 비공유 연합, 및/또는 하나의 원자 또는 분자 체제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 체제의 공침가를 통해, 키토산과 하나의 작용기 또는 다수의 작용기 사이에 공유 연결을 형성하여, 키토산과 하나의 원자 또는 분자 체제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 체제 사이에 비공유 연합을 형성하여, 또는 키토산과 하나의 원자 또는 분자 체제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 체제 사이의 혼합물을 형성하여 제조되고,

약제학적 제제는 프로스타글란딘, 프로스타마이드 및 그 혼합물, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 및 NSAID의 혼합물, 및 코르티코스테로이드 및 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는,

안 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제조하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 방부제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 방부제가 벤즈알코늄 클로라이드, 클로르헥시딘, PHMB(폴리헥사메틸렌 바이구아나이드), 메틸 및 에틸 파라벤, 헥세티딘, 클로라이드 성분, 및 기타 안과적으로 허용가능한 방부제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고 농도 범위가 약 0.00001% 내지 약 0.05% 또는 약 0.1%(w/v)인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 부형제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 부형제가 안과적으로 상용가능한 부형제인 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 완충제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 완충제가 아세테이트 완충제, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 보레이트 완충제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 19

제12항에 있어서, 비히클을 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 비히클이 안과적으로 상용가능한 비히클인 방법.

청구항 21

제12항에 있어서, 치료학적 제제가 키토산의 부위에 공유 결합하는 방법.

청구항 22

제12항에 있어서, 치료학적 제제가 연결자를 통해 키토산의 부위에 공유 결합하는 방법.

청구항 23

제12항의 방법에 의해 제조된 약제학적 조성물.

청구항 24

키토산의 부위에 제제를 공유 결합시키는 조건 하에, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물과 치료학적 유효량의 약제학적 제제를 접촉시키는 단계를 포함하며,

각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타내고, 및

각각의 변형된 키토산은 하나의 작용기 또는 다수의 작용기의 공유 결합, 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제의 비공유 연합, 및/또는 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제의 공점가를 통해, 키토산과 하나의 작용기 또는 다수의 작용기 사이에 공유 연결을 형성하여, 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제 사이에 비공유 연합을 형성하여, 또는 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제 사이의 혼합물을 형성하여 제조되고,

약제학적 제제는 프로스타글란딘, 프로스타마이드 및 그 혼합물, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 및 NSAID의 혼합물, 및 코르티코스테로이드 및 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는,

안 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제조하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 방부제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 방부제가 벤즈알코늄 클로라이드, 클로르헥시딘, PHMB(폴리헥사메틸렌 바이구아나이드), 메틸 및 에틸 파라벤, 헥세티딘, 클로라이드 성분, 및 기타 안과적으로 허용가능한 방부제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고 농도 범위가 약 0.00001% 내지 약 0.05% 또는 약 0.1%(w/v)인 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 부형제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 부형제가 안과적으로 상용가능한 부형제인 방법.

청구항 29

제24항에 있어서, 완충제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 완충제가 아세테이트 완충제, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 보레이트 완충제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 31

제24항에 있어서, 비히클을 추가로 포함하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 비히클이 안과적으로 상용가능한 비히클인 방법.

청구항 33

제24항에 있어서, 치료학적 제제가 키토산의 부위에 공유 결합하는 방법.

청구항 34

제24항에 있어서, 치료학적 제제가 연결자를 통해 키토산의 부위에 공유 결합하는 방법.

청구항 35

제24항의 방법에 의해 제조된 약제학적 조성물.

청구항 36

처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물, 및 프로스타글란딘, 프로스타마이드 및 그 혼합물, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 및 NSAID의 혼합물, 및 코르티코스테로이드 및 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하며,

각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타내고, 및

각각의 변형된 키토산은 하나의 작용기 또는 다수의 작용기의 공유 결합, 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제의 비공유 연합, 및/또는 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제의 공점가를 통해, 키토산과 하나의 작용기 또는 다수의 작용기 사이에 공유 연결을 형성하여, 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제 사이에 비공유 연합을 형성하여, 또는 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제 사이의 혼합물을 형성하여 제조되고,

약제학적 조성물은 치료학적 유효량의 약제학적 제제를 일정 기간에 걸쳐 방출하도록 적합화되고, 치료학적 유효량은 안 질환 또는 상태를 치료 또는 치료하거나 안 질환 또는 상태의 증상을 개선하도록 적합화된,

안 질환 또는 상태를 치료하기 위한 방법.

청구항 37

키토산 매트릭스 및 약제학적 유효량의 안 약물을 포함하며,

안 약물은 프로스타글란딘, 프로스타마이드 및 그 혼합물, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 및 NSAID의 혼합물, 및 코르티코스테로이드 및 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고,

키토산 매트릭스는 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하고,

각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타내고,

조성물은 치료학적 유효량의 안 약물을 일정 기간에 걸쳐 방출하도록 적합화된,

안 약물 송달 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 1일 내지 약 1년인 조성물.

청구항 39

제37항에 있어서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 약 1개월 내지 약 6개월인 조성물.

청구항 40

제37항에 있어서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 약 1개월 내지 약 4개월인 조성물.

청구항 41

제37항에 있어서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 적어도 3개월인 조성물.

청구항 42

제37항에 있어서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 적어

도 2개월인 조성물.

청구항 43

제37항에 있어서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 적어도 1개월인 조성물.

청구항 44

제37항에 있어서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 약 0.5 시간 내지 약 36시간인 조성물.

청구항 45

제37항에 있어서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 약 1 시간 내지 약 36시간인 조성물.

청구항 46

제37항에 있어서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 적어도 16시간인 조성물.

청구항 47

제37항에 있어서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 적어도 8시간인 조성물.

청구항 48

제37항에 있어서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에 대한 방출 기간이 적어도 4시간인 조성물.

청구항 49

유효량의 조성물을 주사를 통해 사람을 포함하는 동물의 눈, 또는 눈을 둘러싼 조직에 투여하는 단계를 포함하며,

조성물은:

처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물

-각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타냄-, 및

프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는,

안 약물 송달 조성물을 투여하는 방법.

청구항 50

유효량의 조성물을 국소적으로 사람을 포함하는 동물의 눈, 또는 눈을 둘러싼 조직에 투여하는 단계를 포함하며,

조성물은:

처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물

-각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타냄-, 및

비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는,

안 약물 송달 조성물을 투여하는 방법.

청구항 51

처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물, 및;

프로스타글란딘, 프로스타마이드, 비-스테로이드성 항염제(NSAID), 및 코르티코스테로이드 및 그 혼합물, 유도체, 염 및 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료학적 제제를 포함하는,

안 질환 또는 상태를 치료하기 위한 약제학적 제제.

청구항 52

처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물과 치료학적 제제를 접촉시키는 단계를 포함하며,

치료학적 제제는 프로스타글란딘, 프로스타마이드, 비-스테로이드성 항염제(NSAID), 및 코르티코스테로이드 및 그 혼합물, 유도체, 염 및 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택되는,

안 질환을 치료하기 위한 약제학적 제제를 제조하는 방법.

청구항 53

처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물, 및 프로스타글란딘, 프로스타마이드, 비-스테로이드성 항염제(NSAID), 및 코르티코스테로이드 및 그 혼합물, 유도체, 염 및 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료학적 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 환자의 눈에 투여하여 안 질환 또는 상태를 치료하는 단계를 포함하는,

안 질환 또는 상태를 치료하기 위한 방법.

청구항 54

키토산 매트릭스 및 약제학적 유효량의 안 약물을 포함하며,

안 약물은 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드 또는 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고,

키토산 매트릭스는 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하고, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타내고,

각각의 처리된 키토산은 용해화된 키토산을 물, 염 용액 및/또는 음이온성 용액에 대해 회석하여 제조하고,

각각의 변형된 키토산은 하나의 작용기 또는 다수의 작용기의 공유 결합, 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제의 비공유 연합, 및/또는 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제의 공침가를 통해, 키토산과 하나의 작용기 또는 다수의 작용기 사이에 공유 연결을 형성하여, 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제 사이에 비공유 연합을 형성하여, 또는 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제 사이의 혼합물을 형성하여 제조되고,

키토산 매트릭스가 없는 조성물과 비교하여 조직 약물 농도를 증가시켜 키토산 매트릭스가 없는 조성물과 비교하여 더 적은 약제학적 유효량의 약물을 제공하는,

안 약물 송달 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 더 적은 약제학적 유효량이 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 10% 미만인 조성물.

청구항 56

제54항에 있어서, 더 적은 약제학적 유효량이 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 20%

미만인 조성물.

청구항 57

제54항에 있어서, 더 적은 약제학적 유효량이 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 30% 미만인 조성물.

청구항 58

제54항에 있어서, 더 적은 약제학적 유효량이 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 40% 미만인 조성물.

청구항 59

제54항에 있어서, 더 적은 약제학적 유효량이 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 50% 미만인 조성물.

명세서

기술분야

<1> 관련 출원

<2> 본 출원은 본 명세서에 참고로 포함된, 2007년 1월 31일 출원된 미국 특허 가출원 제60/887559호의 이득을 주장한다.

<3> 1. 발명의 분야

<4> 본 발명은 처리된 키토산 조성물, 변형된(modified) 키토산 조성물, 변형 및 처리된 키토산 조성물, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 신규한 생체적합물질에 관한 것이며, 이를 제조 및 사용하는 방법에 관한 것이다.

<5> 더 구체적으로, 본 발명은 처리된 키토산 조성물, 변형된 키토산 조성물, 변형 및 처리된 키토산 조성물, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하며, 적어도 하나의 키토산은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 또는 변형 및 처리된 키토산을 상응하는 비처리 키토산을 포함하는 유사한 조성물과 구별하는 하나 이상의 물리적, 화학적, 및/또는 성능 특성 또는 특징을 갖는다. 본 발명은 또한 본 발명의 키토산 조성물을 포함하는 접착제 조성물 또는 시스템, 본 발명의 키토산 조성물을 포함하는 약물 전달 조성물 또는 시스템, 본 발명의 키토산 조성물을 포함하는 충전제 또는 벌킹 조성물 또는 시스템, 및 이를 제조 및 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<6> 2. 배경 기술의 설명

<7> 경쟁 접착제 기술

<8> 효과적인 조직 접착제에 대한 연구로 많은 제품이 얻어졌으나, 이들은 모두 결점이 있다.

<9> 현재 시판 중인 가장 흔한 조직 접착제는 피브린 실란트(fibrin sealant) 계열 제품들이다. 이러한 시스템에서는, 천연 응고 인자, 피브리노겐 및 트롬빈의 구성성분이 신체의 천연 응고 메카니즘의 최종 단계와 흡사하게 반응한다. 얻어진 피브린 응괴(clot) 또는 필름은 조직에 부착하여 출혈을 막고 상처 치유를 향상시킨다. 이러한 제품의 접합력은 스테이플러 또는 봉합과 같은 기계적인 폐쇄(closure)를 사용하지 않고는 근접해서 조직을 유지하기에 충분하지 않다.

<10> 미국에서는 시아노알킬레이트 제품이 피부 파손(skin breaks)을 폐쇄하는 데 사용되어 왔다. 조직에 적용하는 경우, 시아노아크릴레이트 단량체는 발열 하이드록실화 반응을 진행하여 접착제의 중합을 야기한다. 생물학적 알킬 사슬을 변형하여 생리학적 반응을 조절할 수 있다. 더 짧은 사슬의 유도체(메틸 및 에틸)는 더 긴 사슬의 유도체(2-옥틸)보다 더 높은 정도의 조직 독성을 갖는 경향이 있다. 시아노아크릴레이트가 피하로 이식되는 경우, 염증, 조직 괴사, 육아종 형성, 및 상처 파괴(wound breakdown)가 일어날 수 있다. 조직학적 독성을 야기할 수 있는 프로세스는 시아노아세테이트 및 포르말데하이드의 분해 부산물과 관련된 것으로 여겨진다. 경화된 중합체는 부서지기 쉬우며 조직 재생에 장애가 된다. 가소물을 첨가하여 더욱 유연한 접합 기재를 제공할 수 있다.

- <11> 콜라겐 및 알부민과 같은 천연 단백질을 알데하이드 가교결합제로 가교결합하여 생물학적 기반의 접착제를 제공할 수 있다. 알데하이드 성분과 관련된 독성, 사용의 복잡성, 및 재현불가능한 결과와 같은 문제점이 의사들의 허용을 제한하였다. 이러한 유형의 접착제는 인도적 의료기기의 적용면제(humanitarian device exemption; HDE)와 함께 일차로 승인되었으나, 온 라벨 및 오프 라벨 둘 모두에서 용도의 일부 확장이 나타났다. 이 제품은 글루타르알데하이드 가교결합된 소 혈정 알부민(BSA)이다. 글루타르알데하이드의 존재는 급성 신경 손상을 일으킬 수 있기 때문에 신경 조직과 접촉하는 것이 금지된다. 이러한 부류의 접착제는 또한 대동맥 성장을 악화시키고 문합부 협착(anastomotic strictures)을 야기하여, 아동에 사용하는 것은 배제되는 것으로 알려져 있다. 또한, 이 접착제는 매우 신속한 경화 시간을 가지므로 듀얼 챔버 송달 시린지의 상승적인 막힘을 야기하고 일정치 않은 접합 효율을 가져온다. 이러한 관련된 어려움 또는 복잡성이 그 효과를 제한한다.
- <12> 근육과 같은 기관에서 분비된 천연 단백질, 또는 합성 유사체를 조직 접착제로서 사용하여 왔다. 이러한 기술은 잠재적인 생체적합성 및 안정성을 심각하게 떨어뜨리는, 전형적으로 독성이 있는 프라이머 및 중합체의 사용을 필요로 한다. 콜라겐 및 엘라스틴과 유사한 가공 단백질(engineered proteins)을 중심으로 한 합성 중합체가 개발되었다. 생체적합성이 있을 것으로 보이는 재료를 사용하여 인상적인 접합력이 현실화되었다, 미국 특허 6,875,796 참조. 이러한 접합력을 달성하기 위하여, 조직에 대한 적합성이 없는 클로로포름과 같은 물질로 조직을 프라이밍한다. 또한, 매트릭스는 비적합성 가교결합제, 도프(dope) 및 프라이머, 예를 들어, 글루타르알데하이드, 포르말데하이드, 1,6-다이아아소시아네이토헥산, 4-아이소시아네이토메틸페닐-3-아이소시아네이토프로파네이트, 레조르시놀, 에오신(Eosin) Y 및 에오신 B를 첨가하여 강화한다. 유사하게, 제안된 부류의 수지상 물질(dendritic materials)은 또한 생물학적으로 비적합성인 프라이머의 사용과 관련된 추가적인 복잡성 및 잠재적인 독성 문제가 필수적이다.
- <13> 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 제품이 시판 중에 있으나, 광중합하여도 강도가 상당히 낮으며, 대부분의 제품은 사용 전에 혼합이 필수적이다. 이러한 제품의 상대적인 생물학적 안정성에도 의사의 허용(Surgeon acceptance)은 명백히 느렸다.
- <14> 경쟁 국부 약물 송달 기술
- <15> 국부 약물 송달 기술(Local drug delivery technology)은 기능에 따라 그룹지을 수 있다. 지연 방출 기술은 활성 약제를 연장된 기간에 걸쳐 송달하고자 한다. 약물을 물리적으로 트랩핑하는 중합체 물질이 일정 시간에 걸친 수동적인 송달을 위한 수단을 제공할 수 있다. 또한, 중합체 물질은 안정성 또는 용해도 향상과 같은 향상된 특징을 제공할 수 있다. 중합체 매트릭스는 많은 이식가능한 장치의 경우에 약물 송달 사이클의 마지막에 분해되거나, 회수되거나 또는 제자리에 남을 수 있다.
- <16> 국부 약물 송달의 특이성을 증가시키기 위하여, 표적 송달 기술은 초점 RF 또는 초음파를 사용하여 약제학적 제제(들)의 이동 및/또는 방출을 향상시키고자한다.
- <17> 향상된 흡수/수송 기술은 표적 조직에 의한 흡수를 증가시켜 약물의 흡수를 증가시키고자 한다. 이것은 점막 환경에서 사용시에 특히 효과적인 것으로 나타났다.
- <18> 상기한 기술에서, 약물은 대사 상태 또는 조직을 포함하는 세포에 의한 대사 산물의 배설에 반응하는 것이 아니라, 수동적으로 방출되거나 외부 트리거에 의해서 방출된다.
- <19> 경쟁 충전제 또는 벌킹 기술
- <20> 피부 충전제(Dermal fillers)는 전형적으로 소 콜라겐, 히알루론산, 폴리락트산, 또는 칼슘 하이드록실-아파타이트로부터 생산된다. 피부 충전제는 주름을 감소 및 제거하는 데, 흉터 함몰부를 들어올리는 데, 입술을 도톰하게 하는 데, 또는 연질-조직 부피 손실을 대체하는 데 사용된다. 충전제의 주사는 보통 작은 바늘을 사용하여 달성되며, 피부 충전제는 처치가 필요한 각각의 주름 또는 흉터에 주사된다. 일부 초기 불편감 및 멍이 나타날 수 있으나 이러한 부작용은 일반적으로 매우 빠르게 가라앉는다. 부작용은 흔하지 않으나 알레르기 반응, 궤양화, 헤르페스 감염의 재활성화, 박테리아 감염, 국부적인 멍, 및 육아종 형성을 포함할 수 있다. 물질의 이동 또는 "비딩(beading)"이 때때로 나타나 불쾌한 심미적 결과를 가져온다. 부피의 증가로 인한 이점은 생물학적으로 유도된 충전제에서 일반적으로 3 내지 6개월 지속되며, 합성 재료에서는 다소 더 길다. 충전제 물질의 수명 및 성능의 개선 뿐만아니라 유해한 부작용의 감소가 이러한 산업에서 시도되고 있다.
- <21> 키토산 발달사
- <22> 키토산은 새우, 랍스터, 및 게를 포함하는 갑각류의 외골격으로부터의 키틴을 부분적으로 탈아세틸화하여 유도

된 양이온성 다당류이다. 키토산의 화학적 성질은 탈아크릴화된-(1,4)-N-아세틸-D-글루코사민 중합체로서 잘 설명된다. 키토산의 접착 성질은 일부 경우에 대해 알려져 있다. 그러나, 현재까지, 키토산에 기초한 접착제 제품은 전혀 생산된 적이 없다. 이는 키토산을 취급하기가 어렵고 높은 산 농도로 인한 관련 문제없이 조직과 신속하게 접합하는 형태로 송달하기 어렵다는 데에 대부분 기인한다. USPTO 데이터베이스에서 검색한 바에 따르면, 요약 및 청구의 범위에 키토산 및 접착제를 포함하는 특허는 단지 14개가 출원되었다. 이들 특허의 대부분은 제지 산업에 관한 것이다. 미국 특허 제5,773,033호는 피브리노젠/키토산 지혈제를 개시하나, 조직 접합에 사용하기 위한 것은 아니다. 발명의 명칭이 "생물학적 조직용 접착제(Adhesive for Biological Tissue)"인 미국 특허 제6,329,337호는 재조합 사람 혈장 단백질 및 2 작용성 또는 다작용성 알데하이드로부터 제조된 글루 제제를 개시한다. 키토산은 용액의 점도를 향상시키기 위한 제제제에, 또는 2작용성 또는 다작용성 알데하이드와의 가교결합체로서 사용되었다. 미국 특허 제5,496,872 호는 잠재적인 제제의 상당히 총망라한 열거 중에 키토산을 개시하였으나, 결합하는 티올, 카르복실산 및 라디칼에 의존적이다. 미국 특허 제6,200,595호는 잠재적인 의학 접착체로서 사용하기 위한, 키토산을 포함하는 다가양이온성 기질과 다가음이온성 기질의 조합을 개시하였다. 이 특허에서 접합력은 70 g-f/cm^2 을 넘지 않는 것으로 보고되었다. 또한, 이 발명은 두 성분을 사용 직전에 혼합할 필요가 있다. 미국 특허 제6,991,652호는 세포 성장을 위한 매트릭스로서 사용될 많은 잠재적인 물질의 열거 중 하나로 키토산을 개시하였다.

<23> 문헌을 조사하여, 정제 단계로서 및 공첨가제를 도입하는 수단으로서 키토산의 투석을 사용하였음이 밝혀졌다. 예를 들어, 미국 특허 제6,310,188호는 키토산의 투석을 이용하여 저분자량 화합물을 제거한다.

<24> 많은 시스템이 조직 접착제의 분야의 사용에 고려되었으나, 현재 유용한 시스템들은 독성, 불충분한 강도, 또는 사용의 어려움을 포함하는 결함을 겪는다. 따라서, 멸균 및 사용이 편리한 형태로 제공할 수 있는 안전하고 효과적인 조직 접착제인 추가적인 조성물이 해당 분야에 필요하다. 이러한 고도로 접착성인 조성물은 또한 약물 송달에 상당한 이점을 제공한다. 미용 및 재건 외과 수술에 사용하기 위한 충전제, 벌킹 조성물, 또는 재건 조성물을 제공하는, 고도로 수화된 채로 남아있는 조성물이 또한 해당 분야에 필요하다.

발명의 상세한 설명

<25> 발명의 정의

<26> 용어 "약"은 파라미터가 원하는 값의 $\pm 10\%$ 이내임을 의미한다.

<27> 용어 "실질적으로 균일한"은 조성물 전반에 걸친 특성에 있어서 조성물이 10% 미만의 차이를 나타냄을 의미한다.

<28> 생물학적 제제는 미생물 및 최대 포유류, 예를 들어, 사람을 포함하는 고차원 유기체 및 진보된 식물을 포함하는 동물계 또는 식물계의 일원에 원하는 특성을 부여하거나, 또는 미생물 및 최대 포유류, 예를 들어, 사람을 포함하는 고차원 유기체 및 진보된 식물을 포함하는 동물계 또는 식물계의 일원에서 원하는 효과를 야기하는 화합물 또는 화합물들의 집합이다. 생물학적 제제는 원하는 효과에 대해 발단부터 활성일 수 있거나, 활성화 제제에 의한 대사 아니면 발열 활성화를 통해 활성으로 될 수 있다. 적합한 시약 섹션에서, 생물학적 제제가 열거 또는 표시되며; 이러한 제제는 모든 살생물제(biocides), 약제, 건강기능성 식품(nutraceuticals), 또는 사멸(살생물제), 처치(약제), 예방(건강기능성 식품, 비타민 등) 또는 기타등등의 어떤 것이든 원하는 생물학적 효과를 직접적으로 또는 간접적으로 초래할 수 있는 임의의 다른 화합물을 포함한다.

<29> 약제학적 조성물은 적어도 하나의 활성 성분(예를 들어, 국소적으로 적용된 치료학적 제제)을 포함하는 제형이다. 소정 실시형태에서, 조성물은 또한 하나 이상의 부형제, 완충제, 캐리어, 안정화제, 방부제 및/또는 벌킹제를 포함할 수 있으며, 원하는 효과 또는 결과를 달성하기 위해 환자에 투여하기에 적합하다. 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 예를 들어, 사람 환자 또는 대상과 같은 다양한 종에서 진단, 치료, 미용 및/또는 연구용으로 사용될 수 있다.

<30> 안질환은 눈 또는 눈의 부분들 또는 영역들 중 하나에 영향을 주거나 관련된 질환, 질병 또는 상태를 포함할 수 있다. 넓은 의미로, 눈은 안구 및 조직 및 안구를 구성하는 체액, 눈주위 근육(예를 들어, 사근 및 직근) 및 안구 이내의 또는 안구에 인접한 시신경 부분을 포함한다. 사람 눈의 전안부는 홍채, 각막, 모양체 및 수정체를 포함하는 눈의 앞쪽 삼분의 일(눈의 유리체액 앞쪽 부분들)이다. 후안부는 유리체액, 망막, 맥락막 및 시신경을 포함한다.

<31> 전안부 질환은 전안(즉, 눈의 전방) 영역 또는 부위, 예를 들어, 수정체낭 또는 모양체근의 후벽 앞쪽에 위치하

는 눈주위 근육, 눈꺼풀 또는 안구 조직 또는 체액 이내의 또는 그와 관련된 질환, 질병 또는 상태이다. 따라서, 전안부 질환은 결막, 각막, 전안방, 홍채, 후안방(망막 뒤쪽이지만 수정체낭의 후벽 앞쪽), 수정체 또는 수정체낭 및 전안부 영역 또는 부위를 지나는 혈관 및 신경에 주로 영향을 주거나 그와 관련된다.

<32> 후안부(이하, "후안부(posterior segment)"와 동일하게 칭함) 질환은 맥락막 또는 공막(수정체낭의 후벽을 지나는 평면 뒤쪽에 위치), 유리체, 유리체방(vitreous chamber), 망막, 시신경(즉, 시신 유두), 및 후안(또는 영역 또는 부위를 지나는 혈관 및 신경과 같은 후안(또는 후안부) 영역 및 부위에 주로 영향을 주거나 관련된 질환, 질병 또는 상태이다.

<33> 따라서, 후안부 질환은 예를 들어, 황반변성(예컨대, 비삼출성 노인성 황반변성 및 삼출성 노인성 황반변성); 맥락막 혈관신생; 급성 황반성 신경망막병증; 황반부종(예컨대, 낭포성 황반부종 및 당뇨병성 황반부종); 베체트 병, 망막 장애, 당뇨병성 망막증(증식성 당뇨병성 망막증을 포함); 망막 동맥 폐색 질환; 중심성 망막 정맥 폐색; 포도막염(중간 및 전방 포도막염 포함); 망막 박리; 후안 부위 또는 위치에 영향을 주는 눈의 외상; 안 레이저 치료에 의해 야기되거나 영향을 받은 후안부 질환; 광역동요법에 의해서 야기되거나 영향을 받은 후안부 질환; 광응고술; 방사선 망막증; 망막전막 장애; 망막 분지 정맥 폐색; 전방 국소빈혈성 시신경장애; 비-망막병증 당뇨병성 망막 기능부전, 망막색소변성증 및 녹내장과 같은 질환, 질병 또는 상태를 포함할 수 있다. 치료 목적이 시각의 손실을 방지하거나 손상으로 인한 시력의 손실, 또는 망막 세포 또는 시신경 세포의 손실이 발생하는 것을 감소(즉, 신경보호)시키는 것이기 때문에 녹내장을 후안부 질환으로 여길 수 있다.

<34> 전안부 질환은 예를 들어, 무수정체; 가성수정체; 난시; 안검경련; 백내장; 결막 질병; 결막염; 각막 질환; 각막 궤양; 안구건조증; 눈꺼풀 질병; 눈물기관 질병; 누관폐쇄(Lacrimal Duct Obstruction); 근시; 노안; 동공 질병; 굴절 장애 및 사시와 같은 질환, 질병 또는 상태를 포함할 수 있다. 녹내장 치료의 임상 목표는 눈의 전안방에서 안방수(aqueous fluid)의 고압을 감소(즉, 안압을 감소)시키는 것이기 때문에, 녹내장을 또한 전안부 질환으로 여길 수 있다.

<35> 발명의 개요

<36> 본 발명은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 및 조합물을 포함하는 생체 적합물질들을 제공한다. 처리된 키토산은 물 및 다양한 염 및/또는 음이온 용액에 대해 키토산을 투석하여 제조할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 처리된 키토산은 비처리 키토산으로부터 동일함을 확인가능하게 그리고 재현가능하게 개조된 구조적 형태를 갖는다. 얻어진 처리된 키토산은 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징의 변화를 나타낸다. 변형된 키토산은 하나 이상의 작용기를 키토산 분자에 공유 결합하여 화학적으로 변형된 키토산을 포함한다. 변형된 키토산은 하나 이상의 별개의 화학 변형제, 원자 구조체 아니면 분자 구조체와 비-공유적으로 연합된 키토산을 또한 포함한다. 변형된 키토산은 임의의 수의 별개의 화학 변형제, 원자 구조체 아니면 분자 구조체를 공첨가(coaddition)한 키토산을 또한 포함할 수 있다. 변형된 키토산은 3가지 상기한 부류의 변형된 키토산의 조합 또는 혼합물을 또한 포함할 수 있다. 화학 변형제는 일반적으로 소정 응용에 대해 원하는 행동, 특성 또는 특징을 키토산에 부여하도록 선택된다. 본 발명의 조성물은, 이에 제한되지는 않지만, 액체, 하이드로겔, 고체, 박막, 입자, 성형된 구조체, 및 나노입자를 포함하는 여러가지 물리적 형태로 제형될 수 있다.

<37> 본 발명의 독특한 생체적합물질은 신규한 접착제 조성물 또는 시스템으로서, 국부 약물 송달을 위한 신규한 수단으로서, 및 신규한 충전 또는 벌킹 물질로서 사용하는 데 대한 실현가능성이 입증되었다. 본 발명의 제형은 경쟁 기술들보다 상당한 이점을 갖는다. 이러한 이점에는, 예를 들어, 안정성 및 효율; 사용이 용이한 멸균 제형; 조절가능한 점도를 갖는 제형; 생리학적인 응용에 따른 산성을 보유하는, 신속하게 조절가능한 pH를 갖는 제형; 적당한 가격으로 구입가능한 기재 물질로부터 쉽고 빠르게 제조되는 제형 등이 포함된다.

<38> 본 발명은 또한 신규한 약물 송달 시스템을 제공한다.

<39> 본 발명은 또한 신규한 충전 또는 벌킹 물질을 제공한다.

<40> 본 발명은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 및 생물학적 제제를 포함하며, 생물학적 제제가 약제학적 활성 제제와 같은 생물학적 제제일 수 있으며, 조성물을 유기체로 투여시 생물학적 제제가 식물계 또는 사람을 포함하는 동물계로부터의 유기체의 부위 내로 방출되는 조성물을 제공한다.

<41> 본 발명은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하며, 적어도 하나의 키토산이 적어도 하나의 키토산에 직접적으로 아니면 연결 잔기를 통해 공유 결합된 약제학적으로 활성인 제제와 같은 생물학적 제제를 포함하며, 조성물을 유기체로 투여시, 제제의 가수분해 절단, 효소 절단 또는 가수분

해 절단과 효소 절단의 조합에 따른 시간에 걸쳐, 제제가 식물계 또는 사람을 포함하는 동물계로부터의 유기체의 부위 내로 방출되는 조성물을 제공한다.

<42> 본 발명은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하며, 조성물이 비-생물계(non-living systems) 또는 생물계에 맞춰진 접착제 조성물을 제공한다. 선택적으로, 접착제 조성물은 충전제, 향산화제, 접착 강화제, 또는 접착제를 특정 목적에 적합하게 만들거나 변형시키기 위해 접착제에 첨가되는 다른 제제들과 같은 첨가제를 포함할 수 있다.

<43> 본 발명은 실질적으로 균일한 접착제 조성물을 형성하기에 충분한 시간, 온도 및 압력으로, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 첨가제 패키지와 혼합하는 단계를 포함하며, 첨가제 패키지는 접착제 조성물을 의도된 목적에 적합하게 만드는, 본 발명의 접착제 조성물의 제조방법을 제공한다. 방법의 대부분을 본 명세서에서 설명하지만, 압력은 독립적으로 측정되거나 제어되지 않아서, 압력은 온도 및 부피에 따르거나 단순히 대기압이었고, 방법은 대기압 이하의 압력 및 대기압을 초과하는 압력에서 실시할 수 있다.

<44> 본 발명은 실질적으로 균일한 송달 조성물을 제조하는 조건 하에, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 유효량의 1종의 생물학적 제제 또는 다수의 생물학적 제제들과 혼합하는 단계를 포함하며, 생물학적 제제(들)는 살생물제, 약제, 건강기능성 식품 등인, 생물학적 제제 송달 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

<45> 본 발명은 키토산 조성물과 약제학적 제제 또는 제제들 사이에 공유 연결을 형성하여 연장 방출 약물 송달 조성물을 형성하는 조건 하에, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 키토산 조성물을 약제학적 유효량의 1종의 약제학적 제제 또는 다수의 약제학적 제제들과 접촉시키는 단계를 포함하는 약물 송달 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 소정 실시형태에서는 조성물이 실질적으로 균일한 반면, 다른 실시형태에서는 응용 및 원하는 효과에 따라 조성물이 균질하지 않을 수 있다. 약제학적 제제 또는 제제들은 키토산의 잔기에 직접 부착할 수 있거나, 또는 약제학적 제제 또는 제제들과 키토산 사이에 공유 연결을 형성하는 연결자(linker) 또는 연결기를 통해 키토산의 잔기에 부착할 수 있다. 소정 실시형태에서, 공유 연결은 가수분해를 통해, 효소 활성을 통해, 광분해를 통해, 또는 가수분해, 광분해 및 효소 활성의 조합을 통해 절단가능하다. 다른 실시형태에서, 공유 연결은 가수분해를 통해, 효소 활성을 통해, 광분해를 통해, 또는 가수분해, 광분해 및 효소 활성의 조합을 통해 절단가능하지 않다.

<46> 본 발명은 실질적으로 균일한 약물 송달 조성물을 제공하는 조건 하에, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 키토산 조성물을 약제학적 유효량의 1종의 약제학적 제제 또는 다수의 약제학적 제제들과 접촉시키는 단계를 포함하는 약물 송달 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 각각의 변형된 키토산은 약제학적 제제의 잔기와 반응하여 공유 연결을 형성할 수 있는 키토산의 부위 또는 잔기와 공유 결합된 기를 포함하며, 공유 연결은 가수분해를 통해, 효소 활성을 통해, 광분해를 통해, 또는 가수분해, 광분해 및 효소 활성의 조합을 통해 절단가능하다.

<47> 본 발명은 조직 접착제 특성, 키토산 조성물 보존(retention) 특성, 및 약제학적 제제를 포함하는 생활성 제제 방출 특성을 연구하기 위한 시험관내(in vitro) 조직 구조물을 또한 제공한다. 일 실시형태에서, 구조물은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물로 표면이 코팅된 조직 배양물을 포함한다. 다른 실시형태에서, 구조물은 제1 조직 배양물, 제2 조직 배양물, 및 그 사이에 삽입된, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물을 포함한다. 다른 실시형태에서, 구조물은 조직 배양물 및 패치(patch) 재료 및 그 사이에 삽입된, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물을 포함한다. 이러한 모든 구조물에서, 키토산 조성물 및 그에 기초한 약물 송달 시스템은 환자에 투여하여 원하는 효과 또는 결과를 달성하기에 적합한 (즉, 눈에 적합성이 있는) 약제학적 제제, 부형제, 완충제, 보조제, 캐리어, 안정화제, 방부제 및/또는 벌크제를 포함할 수 있다.

<48> 바람직한 실시형태의 상세한 설명

<49> 발명자들은 변경된 물리적, 화학적 및/또는 성능 특성 또는 특징을 갖는 키토산 물질을 제공할 수 있는 소정 처리 및/또는 변형을 키토산에 가할 수 있음을 알아내었다. 발명자들은 또한 이러한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 또는 변형 및 처리된 키토산을 포함하는 제형이 상응하는 비처리 키토산 제형에서 변경된, 맞춤형, 및 개선된 특성 및/또는 특성을 가진다는 것을 알아내었다. 발명자들은 또한 이러한 처리된 키토산, 변형된 키토산,

또는 변형 및 처리된 키토산이 생접착제(bioadhesive) 조성물 및/또는 약물 송달 조성물 또는 시스템, 및/또는 범용 접착제 조성물 또는 시스템, 및/또는 충전제 또는 벌킹 조성물 또는 시스템 등으로서 사용하기에 이상적으로 잘 맞다는 것을 알아내었다. 발명자들은 본 발명의 조성물이 경쟁 기술과 비교하여 상이한 또는 개선된 특성을 나타낸다는 것을 알아내었다. 발명자들은 본 발명의 조성물의 접착제 특성이 조직 또는 기관에 대한 유해한 결과없이 물질을 표적 조직 또는 기관 상에 또는 내에 장기간 머무를 수 있게 한다는 것을 알아내었다. 발명자들은 본 발명의 조성물에 부착된 절단가능한 또는 비-절단가능한 연결자의 사용이 생물학적 체제를 송달하는 수단을 제공한다는 것을 또한 알아내었다. 절단가능한 연결자는 *in situ*에서 생물학적 체제의 방출을 가져올 수 있으며, 방출은 가수분해, 광분해, 효소 활성화 또는 가수분해, 광분해, 효소 활성화의 조합에 의해 야기된다. 생물학적 체제는 살생물제, 약제, 건강기능성 식품 등일 수 있으며, 가수분해, 광분해, 효소 활성화 또는 가수분해, 광분해, 효소 활성화의 조합을 통해 방출될 수 있다. 효소 방출의 경우에, 효소는 구성 효소 또는 유도 효소일 수 있거나, 또는 방출 효소가 조성물 자체 내로 혼입될 수 있다.

<50> 처리된 키토산

<51> 넓게는 본 발명은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물을 포함하는 신규한 생체적합물질에 관한 것이다. 처리는 키토산의 구조적 및/또는 기능적 변화를 야기하도록 설계된 투석을 적어도 포함한다. 변형은 적어도 (i) 1종 또는 다수의 화학 변형체 또는 화학 물질 (Chemical Entities)을 사용한 키토산의 공유 변형, (ii) 키토산과 1종 또는 다수의 화학 물질의 비-공유 결합, (iii) 키토산과 1종 또는 다수의 화학 물질의 공첨가, 또는 (iv) 이들의 혼합 또는 조합을 포함한다. 화학 물질 또는 변형체는 원자 클러스터, 양자점, 또는 다른 나노-원자 구조체와 같은 원자 구조체 또는 분자, 분자 구조체, 또는 분자의 집합일 수 있다.

<52> 넓게는 본 발명은 또한 유효량의 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 신규한 접착제 조성물 또는 시스템에 관한 것이며, 접착제 조성물은 동일한 양의 상응하는 비처리 키토산을 포함하는 접착제 조성물과 비교하여 상이한 또는 개선된 접착제 특성을 갖는다. 본 명세서에서 용어 "혼합물"은 성분들이 함께 혼합되어 있음을 의미하는 반면 "조합물"은 성분들이 조성물 내에 층, 스트립 등과 같은 별개의 섹션으로 조합되어 있음을 한다.

<53> 넓게는 본 발명은 또한 유효량의 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 신규한 약물 송달 조성물 또는 시스템에 관한 것이며, 조성물은 동일한 양의 상응하는 비처리 키토산을 포함하는 약물 송달 조성물과 비교하여 상이한 또는 개선된 약물 송달 특성을 갖는다.

<54> 넓게는 본 발명은 또한 유효량의 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물, 및 유효량의 1종의 생물학적 체제, 예를 들어, 약제학적 체제 또는 생물학적 체제들을 포함하는 신규한 약물 송달 조성물 또는 시스템에 관한 것이며, 유효량은 원하는 치료학적 효과를 일으키기에 충분한 양이고, 시스템은 동일한 양의 상응하는 비처리 키토산을 포함하는 약물 송달 조성물 또는 시스템과 비교하여 상이한 또는 개선된 약물 송달 특성을 갖는다. 키토산 매트릭스를 포함하는 본 발명의 조성물은 동일한 조성물 중 약물 농도에서 키토산 매트릭스가 없는 조성물과 비교하여 조직 약물 농도를 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 키토산 매트릭스가 없는 조성물과 비교하여 더 적은 약제학적으로 유효한 양의 약물이 가능하다. 소정 실시형태에서, 본 발명의 약물 송달 조성물은 키토산 조성물이 없는 비교할 만한 조성물보다 더 적은 약제학적으로 유효한 양을 달성한다. 소정 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 10% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 20% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 30% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 40% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 50% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 60% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 70% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 80% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 90% 더 작다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적으로 유효한 양은 키토산 매트릭스가 없는 비교할 만한 조성물 중의 약물의 양보다 적어도 95%

더 작다.

- <55> 넓게는 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 신규한 약물 송달 조성물 또는 시스템에 관한 것이며, 적어도 하나의 키토산은 유효량의 1종의 생물학적 제제, 예를 들어, 약제학적 제제, 또는 다수의 생물학적 제제를 키토산의 부위 또는 잔기에 공유 결합된 분해가능한(labile) 연결을 통해 포함하며, 유효량은 원하는 치료학적 효과를 일으키기에 충분한 양이고, 연결은 가수분해적으로 및/또는 효소적으로 분해가능하여 생물학적 제제를 설계된 시간에 걸쳐 설계된 속도로 방출하고, 조성물은 동일한 양의 상응하는 비처리 키토산을 포함하는 약물 송달 시스템과 비교하여 상이한 또는 개선된 약물 송달 특성을 갖는다.
- <56> 넓게는 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 유효량의 접착제 조성물을 제1 기재의 부위에 적용하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 적용 후에, 부위를 제2 기재의 부위와 접촉시키고, 접촉은 상응하는 비처리된 키토산으로 제조된 접착제 시스템보다 더 큰 힘과 함께 접착제 조성물이 기재 부위에 접합할 수 있기에 충분한 시간, 온도, 압력, 및 습도에서 이루어진다. 기재는 살아있는 조직 및/또는 살아있지 않은 기재일 수 있다.
- <57> 넓게는 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 유효량의 접착제 조성물을 기재의 부위에 적용하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이며, 접촉은 상응하는 비처리된 키토산으로 제조된 접착제 시스템보다 더 큰 힘으로 접착제 조성물을 기재에 접합할 수 있기에 충분하다. 기재는 살아있는 조직 및/또는 살아있지 않은 기재일 수 있다.
- <58> 넓게는 본 발명은 또한 원료 키토산(비처리 키토산)을 완전한 키토산 분해를 촉진하기에 충분한 시간 및 온도에서 산 수용액 중에 용해하는 단계를 포함하는 키토산을 처리하는 방법에 관한 것이다. 다음으로, 용해된 키토산을 염기로 침전시킨다. 산 용해 및 염기 침전은 1회 이상 실시할 수 있다. 그 다음, 침전된 키토산을 원심 분리 또는 고체 및 액체 성분을 분리하기 위한 다른 유사한 공정을 통해 상청액과 분리한다. 그 다음, 키토산을 투석 튜브에 넣고 산용액을 사용하여 용해시킨다. 투석 튜브에서 용해한 후에, 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 소정 물리적, 화학적 및 성능 특성 또는 특징의 변화로 입증되는 바와 같이 키토산에 실질적으로 가역적인 변화를 야기하는 용액에 대해 키토산을 투석한다. 투석 단계 전 또는 후에 키토산을 화학적으로 변형할 수 있다.
- <59> 넓게는 본 발명은 또한 원료 키토산을 완전한 키토산 분해를 촉진하기에 충분한 시간 및 온도에서 산 수용액 중에 용해하는 단계를 포함하는 키토산을 처리하는 방법에 관한 것이다. 키토산을 용해한 후에, 용해된 키토산에 염기를 천천히 첨가하여 키토산을 침전시키며, 염기 첨가는 용액의 pH를 약 pH 9 내지 약 pH 10의 값까지 증가시킨다. 염기 처리 후에, 키토산을 산 수용액 중에 재용해화한 다음, 염기를 첨가하여 재침전시킨다. 그 다음, 재침전된 키토산을 원심분리에 의해 용액으로부터 분리한다. 그 다음, 침전된 키토산을 키토산을 용해시키는 데 충분한 시간 및 온도로 산용액 중에서 투석한 다음, 완충된 염 용액에 대해 투석하여, 키토산의 소정 물리적 및/또는 화학적 특성을 변화시킨다. 그 다음, 얻어진 처리된 키토산을 냉동 건조(freeze dried)할 수 있다. 전형적으로 제1 염기 첨가 전에, 키토산을 화학적으로 변형시킬 수 있다. 그러나, 화학 변형은 또한 염기 첨가 후에 실시할 수 있으며, 심지어 냉동 건조된 물질로부터 재구성(re-constitution)한 후에 실시할 수도 있다. 추가로, 다른 재료들 또는 성분들의 공침가 또는 혼입이 처리 방법의 다양한 단계에서 이루어질 수 있다.
- <60> 모든 본 발명의 조성물에서, 원하는 최종 용도를 위한 원하는 특성을 갖는 본 발명의 조성물의 체형을 얻도록 조성물은 또한 부형제, 보조제, 방부제, 완충제, 비히클 및/또는 임의의 다른 성분을 포함할 수 있다.
- <61> 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 조성물에 관한 것이며, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징의 변화를 나타낸다. 소정 실시형태에서, 조성물은 또한 용매를 포함하며, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물은 약 0.1 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 농도로 존재하며 용매는 약 90 내지 99.99 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 용매는 물이며 각각의 키토산은 하이드로젤의 형태이다. 다른 실시형태에서, 조성물은 또한 유효량의 생물학적 제제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 또한 유효량의 생물학적 제제를 포함하고 용매는 물이며 각각의 키토산은 하이드로젤의 형태이다. 소정 실시형태에서, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물의 농도는 약 1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL이고, 용매는 약 95 내지 99.9 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물의 농도는 약 3 mg/mL 내지 약 30 mg/mL이고, 용매는 약 97 내지 99.7 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 각각의 변형된 키토산

은 키토산의 아민 또는 알코올 잔기에 공유 결합된 작용화 유효량(the functionalizing effective amount)의 하나의 작용기 또는 다수의 작용기들을 포함하며, 작용화 유효량은 키토산의 아민 또는 알코올 잔기의 약 0.01% 내지 약 100%이며 작용기 또는 작용기들은 각각의 변형된 키토산에서 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 다른 실시형태에서, 작용화 유효량은 키토산의 아민 또는 알코올 잔기의 약 0.1% 내지 약 10%이다. 다른 실시형태에서, 작용화 유효량은 키토산의 아민 또는 알코올 잔기의 약 0.5% 내지 약 2%이다. 다른 실시형태에서, 작용기는 소수성 작용기, 친수성 작용기, 이온성 작용기 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 소수성 작용기는 1 내지 100개의 탄소 원자를 갖는, 알킬기, 알케닐기, 아르알킬기, 알크아릴기, 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, 기의 하나 이상의 탄소 원자가 붕소 원자, 질소 원자, 산소 원자, 황 원자, 규소 원자, 게르마늄, 에스테르 잔기, 아마이드 잔기, 요소 잔기, 우레탄 잔기 및 그 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로 원자 및/또는 헤테로 원자 잔기에 의해 치환되며, 하나 이상의 수소 원자가 할로젠 원자, 알콕사이드 기, 아마이드 기, 및 그 혼합물 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로 원자 및/또는 헤테로 원자 잔기로 치환된다. 다른 실시형태에서, 소수성 작용기는 카르복실기, 유기 설폰산, 폴리에테르, 폴리에테르 아민, 스테롤, 포르피린 및 그 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 친수성 작용기는 다이아민, 폴리아민, 다이올, 폴리올, 이산(diacid), 폴리산, 크라운 에테르, 글라임(glyme), 폴리알케닐에테르, 폴리알케닐아민, 폴리알케닐에테르아민, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 또는 그 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 이온성 작용기는 금속 염, 암모늄 염, 포스포늄 염, 셀레이트 염, 카르복실산 염, 포스페이트 염, 다이카르복실산, 폴리카르복실산, 및 이의 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 하나의 카르복실산은 키토산과의 공유 연결을 형성하는 데 사용되고 다른 산 기들은 다이아민, 폴리아민을 책임질 수 있고, 여기서 하나의 아민은 키토산과의 공유 연결을 형성하는 데 사용되고 다른 아미노 기들은 금속 이온, 이온성 원자 클러스터, 이온성 분자 구조체, 단순 음이온, 다원자성 음이온, 탈양성자화된 옥소산(deprotonated oxoacids), 치환된 탈양성자화된 옥소산 또는 탈양성자화된 유기산을 책임질 수 있고, 여기서 이러한 기들은 정전기적 상호작용을 통해 키토산과 상호작용한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 또한 완충제, 비히클, 첨가제, 방부제, 부형제, 보조제, 또는 조성물을 특정 목적에 적합하게 만드는 임의의 다른 성분을 포함할 수 있다. 임의의 상기한 조성물에서, 임의의 양의 다른 성분을 조성물에 첨가할 수 있다.

<62> 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 각각의 이러한 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적 및/또는 물리적 특성 및 성능 특성 및 특징에서 변화를 나타낸다. 각각의 처리된 키토산은 용해화된 키토산을 물, 염 용액 및/또는 음이온성 용액에 대해 투석하여 제조한다. 반면에, 각각의 변형된 키토산은 하나의 작용기 또는 다수의 작용기의 공유 결합, 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제의 비공유 연합, 및/또는 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제의 공첨가를 통해, 키토산과 하나의 작용기 또는 다수의 작용기 사이에 공유 연결을 형성하여, 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제 사이에 비공유 연합을 형성하여, 또는 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제 사이의 혼합물을 형성하여 제조한다. 원자 및/또는 분자 제제는 키토산에 소정 응용을 위한 원하는 행동, 특성 또는 특징을 부여하도록 선택된다. 소정 실시형태에서, 조성물은 액체, 고체, 분산물, 현탁액, 하이드로겔, 입자, 나노입자, 박막 또는 성형된 구조체의 형태이다. 다른 실시형태에서, 조성물은 생물학적 제제를 포함하며, 조성물은 유효량의 제제를 유기체의 부위 내로 원하는 기간에 걸쳐 방출할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제제는 조성물 중의 적어도 하나의 키토산에 직접적으로 또는 연결자 잔기를 통해 공유 결합되며, 조성물은 유효량의 제제를 유기체의 부위 내로 원하는 기간에 걸쳐 방출할 수 있고, 기간은 적어도 하나의 키토산으로부터 제제의 가수분해 절단, 효소 절단 또는 가수분해 절단과 효소 절단의 조합의 속도에 의존적이다.

<63> 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 접착제 조성물에 관한 것이며, 각각의 처리된 키토산 및 각각의 변형된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적 및/또는 물리적 특성 및 성능 특성 및 특징에서 변화를 나타낸다. 소정 실시형태에서, 조성물은 또한 접착제 조성물을 의도된 목적에 적합하게 만드는 첨가제 패키지를 포함한다. 다른 실시형태에서, 첨가제 패키지는 생체적합성 충전제, 접착 강화제, 또는 그 혼합물을 포함한다.

<64> 본 발명은 또한 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 충전제 조성물에 관한 것이며, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산보다 많은 정도로 물을 흡수하거나 보유한다. 소정 실시형태에서, 조성물은 충전제 조성물의 충전제 특성을 향상시키도록 적합화된 첨가제 패키지를 또한 포함한다. 다른 실시형태에서, 첨가제 패키지는 생체적합성 충전제, 물 보유 첨가제(water retention additive), 또는 그 혼합물을 포

함한다.

<65> 본 발명은 또한 키토산 조성물을 포함하는 유효량의 치료 수용액을 조직 부위의 표면에 적용하여 코팅된 표면을 형성하는 단계를 포함하는 조직을 접합하는 방법에 관한 것이다. 키토산 조성물은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하며, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적 및/또는 물리적 특성 및 성능 특성 및 특징에서 변화를 나타낸다. 키토산 조성물은 충분한 결합력 및 충분한 보존력으로 표면에 접착하여 원하는 기간동안 표면에 유지된다. 소정 실시형태에서, 방법은 또한 코팅된 표면을 기재의 표면과 접촉시키는 단계를 포함하며, 접촉은 상응하는 비처리된 키토산을 포함하는 키토산 조성물보다 더 큰 힘으로 키토산 조성물이 조직 부위 표면을 기재 표면에 접합할 수 있도록 하기에 충분한 온도, 압력 및 습도로 이루어진다. 소정 실시형태에서, 기재는 2차 조직 부위(second tissue site)이다. 다른 실시형태에서, 기재는 합성 물질, 생물학적 물질, 또는 그 혼합물이다. 소정 실시형태에서, 각각의 변형된 키토산은 키토산의 아민 또는 알코올 잔기에 공유 결합된 작용화 유효량의 하나의 작용기 또는 다수의 작용기들을 포함하며, 유효량은 키토산의 특성을 하나 이상 변화시키기에 충분한 양이며, 작용기 또는 작용기들은 각각의 변형된 키토산에서 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 소정 실시형태에서, 작용화 유효량은 키토산의 아민 또는 알코올 잔기의 약 0.01% 내지 약 100%이다. 다른 실시형태에서, 작용화 유효량은 키토산의 아민 또는 알코올 잔기의 약 0.1% 내지 약 10%이다. 다른 실시형태에서, 작용화 유효량은 키토산의 아민 또는 알코올 잔기의 약 0.5% 내지 약 2%이다. 다른 실시형태에서, 작용기는 소수성 작용기, 친수성 작용기, 이온성 작용기, 양자점, 원자 클러스터, NMR 활성 기, 형광 기, 염료, 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 소수성 작용기는 1 내지 100개의 탄소 원자를 갖는, 알킬기, 알케닐기, 아르알킬기, 알크아릴기, 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, 기의 하나 이상의 탄소 원자가 산소 원자, 황 원자, 규소 원자, 게르마늄, 에스테르 잔기, 아마이드 잔기, 요소 잔기, 우레탄 잔기 및 그 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로 원자 및/또는 헤테로 원자 잔기에 의해 치환되며, 하나 이상의 수소 원자가 할로겐 원자, 알콕사이드 기, 아마이드 기, 및 그 혼합물 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로 원자 및/또는 헤테로 원자 잔기로 치환된다. 다른 실시형태에서, 소수성 작용기는 카르복실기, 유기 셀론산, 폴리에테르, 폴리에테르아민, 스테롤, 포르피린 및 그 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 친수성 작용기는 다이아민, 폴리아민, 다이올, 폴리올, 이산, 폴리산, 크라운 에테르, 글라임, 폴리올, 폴리아민, 폴리알케닐에테르, 포릴알케닐아민, 폴리알케닐에테르아민, 폴아크릴산, 폴리비닐알코올, 또는 그 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 이온성 작용기는 금속 염, 암모늄 염, 포스포늄 염, 설페이트 염, 카르복실산 염, 포스페이트 염, 다이카르복실산, 폴리카르복실산, 및 이의 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 하나의 카르복실산은 키토산과의 공유 연결을 형성하는 데 사용되고 다른 산 기들은 다이아민, 폴리아민을 책임질 수 있고, 여기서 하나의 아민은 키토산과의 공유 연결을 형성하는 데 사용되고 다른 아미노 기들은 금속 이온, 이온성 원자 클러스터, 이온성 분자 구조체, 단순 음이온, 다원자성 음이온, 탈양성자화된 옥소산, 치환된 탈양성자화된 옥소산 또는 탈양성자화된 유기산을 책임질 수 있고, 여기서 이러한 기들은 정전기적 상호작용을 통해 키토산과 상호작용한다. 다른 실시형태에서, 키토산 조성물 중의 각각의 키토산은 하이드로젤의 형태이고 키토산 조성물은 약 0.1 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 농도로 존재하고 물은 약 90 내지 약 99.99 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 키토산 조성물은 약 1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 농도로 존재하고 용매는 약 95 내지 약 99.9 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 키토산 조성물은 약 3 mg/mL 내지 약 30 mg/mL의 농도로 존재하고 용매는 약 97 내지 약 99.7 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 키토산 조성물은 유효량의 생물학적 체제를 추가로 포함한다. 소정 실시형태에서, 키토산 조성물 중의 각각의 키토산은 하이드로 젤의 형태이며 키토산 조성물은 약 0.1 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 농도로 존재하고 용매는 약 90 내지 약 99.99 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 키토산 조성물은 약 1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 농도로 존재하고, 용매는 약 95 내지 99.9 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 키토산 조성물은 약 3 mg/mL 내지 약 30 mg/mL의 농도로 존재하고, 용매는 약 97 내지 99.7 v/v 퍼센트의 양으로 존재한다.

<66> 본 발명은 또한 실질적으로 균일한 송달 조성물을 형성하기에 충분한 조건 하에, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물을 유효량의 하나의 생물학적 체제 또는 다수의 생물학적 체제들과 혼합하는 단계를 포함하는 송달 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다.

<67> 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물을 유효량의 하나의 생물학적 체제 또는 다수의 생물학적 체제들과 접촉시키는 단계를 포함하는 생물학적 체제 송달

조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 각각의 제제는 키토산과 각각의 생물학적 제제 사이에 공유 연결을 형성하는 조건 하에 처리된 키토산 상의 부위와 반응하여 공유 연결을 형성하도록 적합화된 작용기를 포함하여, 연장 방출, 생물학적 송달 조성물을 형성한다. 연결은 가수분해를 통해, 효소 활성을 통해, 또는 가수분해와 효소 활성의 조합을 통해 절단가능하다.

<68> 본 발명은 또한 실질적으로 균일한 약물 송달 조성물을 제조하는 조건 하에, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물을 유효량의 하나의 생물학적 제제 또는 다수의 생물학적 제제들과 접촉시키는 단계를 포함하는 생물학적 제제 송달 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 생물학적 제제는 키토산의 일부 또는 실질적으로 모든 반응성기와 공유 결합한다. 약물 송달 조성물은 가수분해를 통해, 효소 활성을 통해, 또는 가수분해와 효소 활성의 조합을 통해 일정 기간에 걸쳐 유효량의 생물학적 제제를 방출할 수 있다.

<69> 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 처리는 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 각각의 키토산의 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징을 변화시키기에 충분한 조건 하에, 비처리 키토산 또는 변형된 비처리 키토산을 투석하는 것을 적어도 포함한다. 변형은 (i) 키토산과 하나의 작용기 또는 다수의 작용기 사이에 공유 연결을 형성하는 것, (ii) 키토산과 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제들 사이에 비-공유 연합을 형성하는 것, (iii) 키토산과 하나의 원자 또는 분자 제제 또는 다수의 원자 및/또는 분자 제제들 사이의 혼합물을 형성하는 것, 또는 (iv) 이들 3가지 변형 유형들의 혼합 또는 조합을 포함한다.

<70> 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 약물 송달 시스템에 관한 것이며, 각각의 처리된 키토산 및 각각의 변형된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 키토산은 분해가능한 연결을 통해 키토산의 부위들에 공유 결합되어 있는 약제학적으로 유효한 양의 하나의 약제학적 제제 또는 다수의 약제학적 제제들을 갖는다. 약제학적으로 유효한 양은 원하는 치료학적 효과를 일으키기에 충분한 양이다. 연결은 가수분해적으로 분해가능하거나, 효소적으로 분해가능하거나 가수분해적으로 및 효소적으로 분해가능하며, 약제학적 제제를 원하는 기간에 걸쳐 원하는 속도로 방출한다. 시스템은 동일한 양의 상응하는 비처리 키토산을 포함하는 약물 송달 시스템과 비교하여 상이한 또는 개선된 약물 송달 특성을 갖는다.

<71> 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 유효량의 접착제 시스템을 제1 기재의 부위에 적용하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 각각의 처리된 키토산 및 각각의 변형된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 방법은 부위를 제2 기재의 상응하는 부위와 접촉시키는 단계를 또한 포함하며, 접촉은 상응하는 비처리된 키토산으로 제조된 동등한 접착제 시스템보다 더 큰 힘과 함께 접착제 시스템을 기재 부위에 접합할 수 있기에 충분한 시간, 온도, 압력 및 습도로 이루어진다. 소정 실시형태에서, 기재는 살아있는 조직 또는 살아있는 조직 및 패치 물질일 수 있다.

<72> 본 발명은 또한 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물을 포함하는 유효량의 접착제 시스템을 기재의 부위에 적용하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 각각의 처리된 키토산 및 각각의 변형된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 접촉은 상응하는 비처리된 키토산으로 제조된 동등한 접착제 시스템보다 더 큰 힘으로 접착제 시스템을 기재에 접합할 수 있기에 충분하다. 소정 실시형태에서, 기재는 살아있는 조직 또는 살아있는 조직 및 패치 물질일 수 있다.

<73> 본 발명은 또한 원료 키토산을 완전한 키토산 분해를 촉진하기에 충분한 시간 및 온도에서 제1 산 수용액 중에 용해하는 단계를 포함하는 키토산을 처리하는 방법에 관한 것이다. 용해된 키토산 용액에 염기를 첨가하여 키토산을 침전시키며, 염기 첨가는 용해된 키토산 용액의 pH를 약 pH 9 내지 약 pH 10의 값까지 증가시킨다. 침전된 키토산을 제2 산 수용액 중에 재용해한다. 그 다음, 재용해된 키토산 용액에 염기를 첨가하여 키토산을 침전시킨다. 재침전된 키토산 용액을 원심분리하여 용액으로부터 키토산을 분리한다. 침전된 키토산을 투석 튜브 내에서 키토산을 용해시키기에 충분한 시간 및 온도로 산용액 중에서 투석한다. 그 다음, 산 투석된 키토산을 완충된 염 용액에 대해 투석하여, 상응하는 비처리 키토산 또는 변형된 키토산과 비교하여 하나 이상의 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징을 변화시킨다. 소정 실시형태에서, 방법은 또한 투석된 키토산을 냉

동 건조하여 상응하는 비처리 키토산보다 더 낮은 겔보기 분자량 및 더 높은 조직 접합력을 가진 키토산을 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 방법은 또한 제1 염기 첨가 단계 전에, 키토산을 화학적으로 변형하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 화학 변형은 방법의 임의의 단계에서, 예를 들어, 원료 키토산에, 물 투석된 키토산에, 산 투석된 키토산에, 냉동 건조된 키토산에 또는 재구성된 키토산에 실시할 수 있다. 다른 실시형태에서, 방법은 또한 냉동 건조하기 전에, 첨가제 패키지를 투석된 키토산에 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 첨가제 패키지는 방법의 임의의 단계에서, 예를 들어, 원료 키토산에, 물 투석된 키토산에, 산 투석된 키토산에, 냉동 건조된 키토산에 또는 재구성된 키토산에 첨가할 수 있다. 물론, 첨가제 패키지를 첨가하는 곳은 첨가제에 따라 다를 것이며, 첨가제는 소정의 공정 단계를 견뎌낼 수 있다. 따라서, 첨가제 패키지가 투석 중에 손실되는 경우, 첨가제 패키지는 투석 후에 첨가해야만 할 것이며, 첨가제 패키지가 화학 변형 동안 변화 또는 손실되는 경우, 첨가제 패키지는 변형 후에 첨가해야만 할 것이다. 당업자는 공정 단계의 순서가 필요한 절차보다는 원하는 물질에 더욱 의존적이라는 것을 인식할 것이다. 따라서, 조성물이 겔보기 분자량을 변화시키는 투석 단계에 의해 얻어지는 키토산의 변화를 필요로 하는 경우, 공정 단계는 그 목적을 달성하도록 배열할 것이다. 그렇지 않다면, 공정 단계는 조성물에 일련의 원하는 특성 또는 특징을 제공하도록 배열될 것이다.

<74> 본 발명은 또한 나프탈이미드 기의 광활성화에 의해 생성된, 키토산과 생물학적 제제 사이의 연결을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 조성물은 나프탈이미드 연결의 가수분해, 광분해 및/또는 효소 절단에 의해 일정 기간 동안 생물학적 제제를 방출하도록 설계된다. 본 발명은 또한 나프탈이미드 기의 광활성화에 의해서 단백질과 생물학적 제제 사이에 연결을 형성하는 단계를 포함하는, 생물학적 제제를 단백질에 접합하는 방법에 관한 것이며, 연결은 가수분해, 광분해 및/또는 효소 활성화에 의해 생물학적 제제를 일정 기간에 걸쳐 절단된다.

<75> 본 발명은 또한 키토산 또는 키토산들의 잔기와 생물학적 제제의 잔기 사이에 연결을 형성하도록 적합화된 조건 하에, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함하는 키토산 조성물을 테서된(tethered) 생물학적 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는 생물학적 제제를 제조하는 방법에 관한 것이며, 연결은 가수분해, 광분해 또는 효소 절단에 민감하지 않다. 소정 실시형태에서, 연결은 두 잔기 사이의 직접적인 연결이거나 또는 연결은 두 잔기 사이에 삽입된 연결자를 포함한다.

<76> 발명의 연혁

<77> 변형된 키토산에 대한 발명자들의 첫번째 시도는 나프탈이미드를 사용하여 변형된 키토산을 제조하는 것이었고, 키토산 단독일 때보다 더 큰 접합력을 나타내는 광 활성화된 물질을 얻었다. 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 출원 제10/982,197호 참조.

<78> 발명자들이 나프탈이미드 변형된 키토산을 최적화하기 시작하였을 때, 포스페이트 완충된 염수에 대한 투석이 나프탈이미드 변형된 키토산뿐만 아니라 천연 키토산으로부터 유도된 생접착제의 접합력을 크게 증가시킨다는 것을 발견하였다.

<79> 나프탈이미드 변형된 키토산은 광이 없이 접합한다는 것이 입증되었음에 주목하였다. 그러므로, 발명자들은 유기 분자를 사용하여 키토산을 변형하여 키토산의 소정 특징 또는 질을 향상시킬 수 있는 가능성을 조사하기 시작하였다. 동일한 반복 공정을 통해, 천연 키토산 및 변형된 키토산 둘 모두의 접합 가능성이 크게 향상되었음이 발견되었다. 일부 경우에, 소정 변형은 추가적인 생체적합성, 바람직한 분해 프로파일, 또는 다른 바람직한 특색을 얻어지는 변형된 키토산 제형에 제공할 수 있다.

<80> 발명자들은 본 발명의 방법이 독특한 키토산 물질을 제공한다는 것을 알아내었다. 천연 키토산은 전형적으로 도 1에 나타낸 바와 같이 매크로분자 구성의 허그 삼각형(Haug triangle)의 랜덤 코일/경질 막대 근처에 놓인 분자 형태로 나타난다. 하기에 나타난 시험 데이터는 본 발명의 방법에 따라 제조된 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물 및 조합물이 비처리 키토산과 비교하여 측정된 분자량에서 감소가 나타났음을 입증한다. 도 1의 허그 삼각형에 나타난 바와 같이, 임의의 특정한 이론 또는 이론적 설명으로 제한됨 없이, 실질적으로 가역적인 더 낮은 겔보기 분자량으로의 이러한 이동이 키토산 분자의 형태가 랜덤 코일로부터 더 컴팩트한 구형 형태로 변화한 데 따른 것으로 여겨진다. 따라서, 키토산 분자 형태가 허그 삼각형의 좌측 꼭지점으로부터 허그 삼각형의 상부 꼭지점 쪽으로 이동하는 것으로 여겨진다.

<81> 분석적 특성화는 분자의 3D 키토산 화학 형태의 수축이라는 전제를 뒷받침한다. 어떠한 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 키토산 분자 형태의 이러한 관찰가능한 변화는, 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 본 발명의 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물 및 조합물을 사용하여 얻어지는 개선

된 생접착제 특성에 영향을 줄 것이라고 여겨진다.

- <82> 본 발명은 다목적 응용에서 접착제로서, 의학적 응용, 특히, 조직 접합을 포함하는 의학적 응용에서 접착제 시스템으로서 사용하기 위한 키토산의 처리 또는 변형 및 처리를 포함한다. 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물 및 조합물을 포함하는 본 발명의 조성물은 또한 국부 약물 송달을 위한 수단으로서 매우 알맞다. 본 발명의 처리된, 변형된, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물 및 조합물은 또한 충전, 벌킹 또는 재구성 절차에 또한 매우 알맞다.
- <83> 키토산은 풍부한 하이드록시 및 아미노 작용기를 포함하므로, 화학 변형을 위한 이상적인 후보자이다. 본 발명은 설폰아미드 및 아미드 연결 또는 다른 유사한 질소 함유 화학 연결, 예를 들어, 우레탄 연결, 요소 연결, 티오우레아 연결 등의 형성을 통해 광범위한 화학 잔기를 커플링 또는 부착하기 위한 부위로서 아미노 작용기의 고유한 친핵성을 이용한다. 본 발명은 유기산 클로라이드, 설폰산 클로라이드 및 다이이미드 커플링제를 사용하여 원하는 화학 변형을 제공한다. 기재 상에 아미노 작용기를 이용하는 당업자에게 알려진 임의의 적합한 반응 방법론을 사용하여 이러한 변형을 실시할 수 있다.
- <84> 본 발명의 개발 동안, 변형이 키토산 구조체 내로의 화학 물질의 공유 결합 또는 화학 물질의 공침가를 포함하는, 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산 또는 그 혼합물 및 조합물이 많은 잠재적인 용도에 대한 상이한 그리고 흔히 유리한 작용기 특성을 갖는 독특한 생체적합물질을 제공한다는 것을 발견하였다. 이러한 용도는 신규한 접착제 시스템, 국부 약물 송달 시스템을 위한 신규한 수단, 및 신규한 충전 또는 벌킹 시스템을 포함한다. 현재 발명은 생의학적 응용에 중점을 두고 있으나, 접착제 시스템은 더 넓은 응용분야, 특히, 살아있지 않은 기재를 살아있는 기재 또는 다른 살아있지 않은 기재에 접착하거나, 또는 향상된 생체적합성 또는 다른 원하는 특성을 제공하기 위한 살아있지 않은 기재의 코팅으로서 역할을 하는 데에서 찾을 수 있다.
- <85> 발명자들은 신규한 키토산계 접착제 조성물 또는 시스템이 천연 또는 비처리 키토산과 비교하여 훨씬 더 우수한 조직 접합 특성을 갖도록 제형될 수 있음을 알아내었다. 발명자들은 또한 본 발명의 신규한 키토산계 접착제 조성물 또는 시스템의 제형에 사용되는 키토산이 보통의, 천연, 비처리 또는 비가공 키토산과는 구별되는 특성을 가지므로 본 발명의 키토산 및 그로부터 제형된 접착제의 분명히 차이가 나는 분석적 특성화가 가능하다는 것을 알아내었다. 발명자들은 또한 키토산의 소정의 변경된 물리적 및/또는 화학적 특성이 가역적이라는 것을 알아내었다. 따라서, 이러한 형태변화는 키토산의 기존의 화학 성질을 파괴 또는 근본적으로 변경하는 것이 아니라, 비처리된 키토산과 비교하여 처리된 키토산의 특성을 단지 실질적으로 변경하는 것이다. 발명자들은 또한 제형의 우수한 보존력 및 원하는 약제학적 제제의 개선된 생체이용가능성을 제공하는 신규한 약물 송달 매트릭스를 제형할 수 있음을 알아내었으며, 이는 본 발명의 조성물이 구매가능한 송달 조성물과 비교하여 더 적은 약물 농도에서 유사한 치료학적 효과 및/또는 유사한 생체이용가능성을 제공한다는 것을 의미한다. 더욱이, 발명자들은 본 발명의 조성물이 재건 수술 또는 미용 수술 분야에서 충전제 또는 벌킹제로서 사용하기에 바람직한 특성을 나타냄을 알아내었다. 본 발명의 조성물은 재건 및 미용 수술에서 증가된 매우 유리한 조직 내 생체적합성을 나타낸다. 따라서, 조성물이 원하는 특성 및 특징을 갖도록 본 발명의 조성물을 맞춤할 수 있다.
- <86> 본 발명이 많은 실시형태에서 처리된, 변형된, 및/또는 변형 및 처리된 키토산을 포함하는 본 발명의 조성물이 냉동 건조된 상태에서 수용액 상태로 재구성되어 하이드로젤, 수성 분산물, 수성 현탁액, 수성 페이스트 등을 형성하지만, 조성물을 냉동 건조된 상태로 바로 이용할 수도 있다. 이러한 실시형태에서, 냉동 건조된 물질은 생물학적 제제 또는 충전제와 같은 다른 물질과 건조 혼합될 수 있다. 조성물은 또한 물 또는 수용액(불완전 용해)을 사용하여 팽창될 수 있으며 다른 성분들과 혼합될 수 있다. 그리고 나서, 이러한 물질을 완전히 수화 또는 재구성할 수 있다. 본 발명의 건조 또는 팽창된 조성물은 또한 바로 사용할 수 있으며, 이 경우 조성물을 포함하는 물질이 조직에 이식 또는 접촉된 후에, 처리된, 변형된, 및/또는 변형 및 처리된 키토산이 *in situ*에서 하이드로젤을 형성한다.
- <87> 적합한 시약
- <88> 본 발명에 적합한 아미노산은, 제한 없이, 알파 형태로 카르복실기 및 아미노기를 포함하는 임의의 천연 또는 합성 화합물, 또는 폴리펩티드 사슬 내로 혼입될 수 있는 카르복실기 및 아미노기를 포함하는 임의의 화합물, 또는 카르복실산 유사체 또는 아미노기 유사체를 포함하는 화합물을 포함하며, 화합물은 폴리펩티드 사슬 내로 혼입될 수 있다.
- <89> 본 발명에 사용하기에 적합한 폴리펩티드는, 제한 없이, 아미노산의 사슬을 포함하는 임의의 천연 또는 합성 화

합물을 포함한다.

- <90> 본 발명에 사용하기에 적합한 효소는, 제한 없이, 아미노기로 구성되며 화학 반응을 촉매할 수 있는 임의의 천연 또는 합성 화합물을 포함한다.
- <91> 본 발명에 사용하기에 적합한 리보자임(ribozyme)은, 제한 없이, 뉴클레오타이드로 구성되며 화학 반응을 촉매할 수 있는 임의의 천연 또는 합성 화합물을 포함한다.
- <92> 본 발명에 사용하기에 적합한 뉴클레오타이드는, 제한 없이, 뉴클레오타이드 사슬 내로 혼입될 수 있는 임의의 천연 또는 합성 화합물을 포함한다.
- <93> 본 발명에 사용하기에 적합한 올리고뉴클레오타이드는, 제한 없이, 비교적 적은 수의 뉴클레오타이드, 일반적으로, 약 2 내지 약 20개를 포함하는 임의의 천연 또는 합성 화합물을 포함한다.
- <94> 본 발명에 사용하기에 적합한 폴리뉴클레오타이드는, 제한 없이, 많은 수의 뉴클레오타이드, 일반적으로, 약 20 내지 수천개를 포함하는 임의의 천연 또는 합성 화합물을 포함한다.
- <95> 본 발명에 사용하기에 적합한 핵산은, 제한 없이, 2 내지 수백만개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 천연 또는 합성 화합물을 포함한다.
- <96> 본 발명의 키토산을 변형하는 데에 사용하기에 적합한 소수성 기는, 제한 없이, 1개의 탄소 원자 내지 약 100개의 탄소 원자를 갖는, 알킬기, 알케닐기, 일킬닐기, 아르알킬기, 및 알크아릴기를 포함한다. 이들 기에서, 하나 이상의 탄소 원자는 헤테로 원자 또는 헤테로 원자 함유기로 치환될 수 있으며, 헤테로 원자는 산소, 질소, 황, 규소, 게르마늄, 갈륨 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되고, 헤테로 원자 함유기는 알콕사이드기, 설파이드기, 아미도기, 규소함유 기, 및 그 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이들 기에서, 하나 이상의 수소 원자는 헤테로 원자 또는 헤테로 원자 함유기로 치환될 수 있으며, 헤테로 원자는 할로젠 원자 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 헤테로 원자 함유기는 알콕사이드기, 설파이드기 및 그 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- <97> 본 발명의 키토산을 변형하는 데 사용하기에 적합한 친수성 기는, 제한 없이, 키토산의 친수성 또는 흡습성 특성을 향상 또는 변화시키는 임의의 기 또는 다수의 기를 포함한다. 이러한 친수성 또는 흡습성 기의 대표적인 예는 다이아민, 폴리아민, 다이올, 폴리올, 이산, 폴리산, 크라운 에테르, 글라임, 폴리알케닐에테르, 폴리알케닐아민, 폴리알케닐에테르아민, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 또는 키토산의 친수성 또는 흡습성을 향상 또는 변화시킬 수 있는 임의의 다른 기, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함한다.
- <98> 본 발명의 키토산을 변형시키는 데 사용하기에 적합한 이온성 기는, 제한 없이, 키토산의 이온성 특성을 향상 또는 변화시키는 임의의 기 또는 다수의 기를 포함한다. 예시적인 기는 다이카르복실 또는 폴리카르복실 산을 포함하며, 하나의 카르복실산은 키토산과 공유 연결을 형성하는 데 사용되고, 다른 산 기는 다이아민 또는 폴리아민을 책임질 수 있고, 하나의 아민은 키토산과 공유 연결을 형성하는 데 사용되고 다른 아미노기는 금속 이온, 이온성 원자 클러스터, 이온성 분자 클러스터, 단순 음이온, 다원자성 음이온, 탈양성자화된 옥소산, 치환된 탈양성자화된 옥소산 또는 탈양성자화된 유기산을 책임질 수 있으며, 이러한 기는 정전기 상호작용을 통해 키토산, 다른 하전된 기 또는 그 혼합물 또는 조합물과 상호작용한다.
- <99> 본 발명의 조성물에 사용하기에 적합한 생물학적 제제는, 제한 없이, 직접 또는 간접적으로 원하는 생물학적 활성을 야기하는 임의의 생활성 제제, 또는 원하는 생물학적, 생리학적인, 또는 보호코팅 등과 같은 다른 효과를 야기하는 임의의 화합물을 포함한다. 예시적인 생물학적 제제는, 제한 없이, 살생물제, 약제, 건강기능성 식품, 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함한다. 살생물제는, 제한 없이, 농약, 항미생물제, 살정제 또는 그 혼합물 또는 조합물을 포함한다. 농약은, 제한 없이, 살곰팡이제, 제초제, 살충제, 살조제(algicide), 달팽이 박멸제(molluscicide), 살진드기제(miticide) 및 귀약을 포함한다. 항미생물제는, 제한 없이, 살균제(germicide), 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 항원충제 및 항기생충제를 포함한다. 약제는, 제한 없이, 질병, 기능이상, 병 등을 예방 또는 치료하기 위해, 또는 질병, 기능이상, 병 등의 증상을 감소 또는 개선하기 위해 사람을 포함하는 동물에 제공되는 임의의 화합물을 포함한다. 약제의 대표적인 예는 심장약; 심혈관약; 이뇨제; 정신요법약; 위장약; 항암약; 피임약; 안약; 항염제; 제산제, 항구토제, H₂ 길항제, 양성자 펌프 억제제, 변비약, 항설사제 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 위장관 약제학적 제제; 항응고제, 항혈소판제, 혈전용해제(thrombolytic) 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 혈액 및 혈액 형성 기관 약제학적 제제; 항부정맥제, 항고혈압제, 이뇨제, 혈관확장제, 항협심증제, 베타 차단제, 안지

오텐신 변환 효소 억제제, 항고지혈증제 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 심혈관계 약제학적 제제; 연화제, 항가려움제 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 피부 약제학적 제제; 호르몬 피임제, 가임제(fertility agents), 선택적 에스트로겐 수용체 조절제, 성 호르몬 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 생식계 약제학적 제제; 항당뇨병제, 코르티코스테로이드, 성 호르몬, 티로이드 호르몬을 포함하지만 이에 제한되지 않는 내분비계 약제학적 제제; 항생제, 항바이러스제, 백신, 항진균제, 항원충제, 항기생충제 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 감염 및 체내 침입에 대한 약제학적 제제; 항암제, 면역증강제, 면역억제제 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 악성 및 면역 질환 약제학적 제제; 아나볼릭 스테로이드, 항염제, 항류머티스제, 코르티코스테로이드, 근육 이완제 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 근육, 뼈, 및 관절 약제학적 제제; 안과용 약제; 마취제, 진통제, 항경련제, 기분안정제(mood stabilizer), 불안완화제, 항정신병약, 항우울제, 신경계 흥분제, 진정제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 뇌 및 신경계 약제학적 제제; 기관지확장제, 충혈완화제(decongestants), H₁ 길항제 등 또는 그 혼합물 또는 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 호흡계 약제학적 제제를 포함한다.

<100> 본 발명의 합성 전략

<101> 키토산 용해를 위한 일반적인 방법

<102> 10% 유기산 또는 비-산화 미네랄 산(non-oxidizing mineral acid) 용액을 사용하여 키토산을 용해화하였다. 사용된 유기산 또는 비-산화 미네랄산은 본 발명을 제조하는 데 사용되는 후속 단계들 및 본 발명의 최종 응용에 따라 달랐다. 비-제한적으로 미네랄산은 HCl, 황산, 인산, 또는 임의의 다른 비-산화 미네랄산을 포함한다. 표 I은 이러한 공정에 선택되는 적합한 유기산의 비-제한적인 리스트를 포함한다.

표 I

<103> 키토산 용해를 위한 유기산

아세트산	부티르산
락트산	피루브산
타르타르산	벤조산
시트르산	숙신산
포름산	트라이클로로아세트산

<104> 혼합하지 않으면서 키토산을 하룻밤 용해되게 두었다. 키토산을 완전히 용해한 후에, 샘플을 기계적 혼합기에 넣고 다음 단계로 진행하기 전에 약 30분간 교반하였다. 키토산 정제 공정의 끝에 나타나는 최종 염기 침전까지 샘플을 계속해서 교반하였다.

<105> 키토산 변형 (선택적)

<106> 처리된, 그러나 변형되지 않은 키토산을 원하는 경우, 합성 프로토콜에서 이 단계는 건너뛴다. 변형된 또는 변형되고 처리된 키토산을 원하는 경우, 표 II의 비-제한적인 리스트에 나타낸, 많은 광범위한 카테고리 내의 다양한 화학 물질을 사용하여 처리된 키토산을 변형할 수 있다. 이러한 변형은 합성 전략 도중 다양한 시점에 실시될 수 있다. 이러한 잔기는 이에 제한되지는 않지만 표 II 또는 실시예 1-4 및 6에 제공된 연결 화학을 사용하여 키토산 기재에 공유 결합할 수 있다. 얻어지는 변형의 정도는 변형 단계에 첨가되는 변형제의 양에 의해 결정되었다. 변형제가 액체가 아닌 경우, 적합한 용매 중에 용해하였다. 그리고 나서, 교반된 키토산에 변형제를 적가하여 천천히 첨가하였다. 변형제를 적절한 시간동안 키토산과 혼합되게 두었다-선택된 변형제에 기초.

표 II

<107>

변형 클래스 및 화학

클래스	결합 형태	변형제 작용기	일반적인 변형제 클래스	대표적인 변형제	커플링 화학
A	키토산 아민 또는 알코올에 공유 결합	탄화수소, 분지형 탄화수소, 또는 치환된 탄화수소	장쇄 지방산, 유기 설펜산, 유기산 클로라이드, 유기산무수물 등	옥탄설펜산	반응성 무수물, 산 클로라이드 또는 다른 활성화된 산 또는 에스테르/아미드 커플링제
B	키토산 아민 또는 알코올에 공유 결합	비치환 또는 방향족 탄화수소	방향족 고리 시스템, 포르피린 등	프로토포르피린 IX	반응성 무수물, 산 클로라이드 또는 다른 활성화된 산 또는 에스테르/아미드 커플링제
C	키토산 아민 또는 알코올에 공유 결합	극성 또는 비극성 탄화수소	알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 아레닐기, 아르알킬기, 알크아릴기, 할로젠화 유사체, 퍼할로젠화 유사체, 하나 이상의 헤테로 원자를 갖는 유사체 등	퍼플루오로옥탄 설펜산	반응성 무수물, 산 클로라이드 또는 다른 활성화된 산 또는 에스테르/아미드 커플링제
D	키토산 아민 또는 알코올에 공유 결합	스테롤 핵	스테롤, 스테로이드 등	데옥시콜린산	반응성 무수물, 산 클로라이드 또는 다른 활성화된 산 또는 에스테르/아미드 커플링제
E	키토산 아민 또는 알코올에 공유 결합	생체분자	아미노산, 폴리펩타이드, 효소, 리보자임, 핵산, 뉴클레오타이드, 플라스미드, 당류, 다당류, 비타민, 미네랄 등	아르기닌	반응성 무수물, 산 클로라이드 또는 다른 활성화된 산 또는 에스테르/아미드 커플링제
E'	키토산 아민 또는 알코올에 공유 결합	친수성 기	폴리알킬렌옥사이드 카르복실산, 다이아민, 폴리아민, 다이올, 폴리올, 이산, 폴리산, 크라운 에테르, 글라임, 폴리알케닐에테르, 폴리알케닐아민, 폴리알케닐에테르아민, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올 등	N-(2-다이에틸아미노에틸)숙신암산	반응성 무수물, 산 클로라이드 또는 다른 활성화된 산 또는 에스테르/아미드 커플링제
E''	키토산 아민 또는 알코올에 공유 결합	이온성 기	금속 염, 암모늄 염, 포스포늄염, 설펜이트 염, 다이아민, 폴리아민, 이산, 폴리산, 아크릴산 올리고머, 폴리아크릴산, 다이설펜에이트, 폴리설펜에이트, 다이포스포네이트, 폴리포스포네이트 등	글루탐산	반응성 무수물, 산 클로라이드 또는 다른 활성화된 산 또는 에스테르/아미드 커플링제
F	혼합물	비-극성 용매, 극성 용매, 유기 분자, 생체 분자	알칸, 알켄, 방향족, 가소제, 아미노산, 폴리펩타이드, 효소, 리보자임, 핵산, 뉴클레오타이드, 플라스미드, 당류, 다당류, 비타민, 미네랄 등	퍼플루오로옥탄, 옥탄, 퍼플루오론	NA
G	처리됨		NA	NA	NA

<108>

키토산은 단일 원자 및/또는 분자 작용기를 사용하여 또는 다수의 원자 및/또는 분자 작용기들을 사용하여 광범위하게 변형할 수 있으나, 표 III은 발명자들이 키토산을 변형하여 키토산의 물리적, 화학적 또는 작용 특성 또

는 특징의 변화를 달성하기 위해 사용한 작용기들의 리스트를 나타낸다. 용어 "원자 작용기"는 금속 원자 또는 이온과 같은 단일 원자의 부착, 동일원자 클러스터 또는 혼합 원자 클러스터를 포함하는 원자 클러스터의 부착, 양자점, 또는 전통적인 분자 결합을 나타내지 않을 수 있는 원자의 임의의 다른 소형 콜렉션을 포함하는 의미이다.

표 III

키토산을 변형하는 데 사용된 특정 분자의 리스트

옥탄-설푼산
1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-헵타데카플루오로-옥탄-1-설푼산
숙신산 모노-[2-(6-에틸카르바모일-헥스-2-엔일)-4-하이드록시-3(3-하이드록시-5-페닐-펜트-1-엔일)-사이클로펜틸]에스테르
플루오레세인 아이소티오시아네이트(FITC)
N-헥실-숙시남산
N-메틸-숙시남산
N-아이소프로필-숙시남산
N-옥틸-숙시남산
N-페닐-숙시남산
N-벤질-숙시남산
글리신 에틸 에스테르
아르기닌 에틸 에스테르
시스테인 에틸 에스테르
히스티딘 에틸 에스테르
N-(2-다이에틸아미노-에틸)-숙시남산
N-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2-메톡시-에톡시)-1-메틸-에톡시]-1-메틸-에톡시}-1-메틸-에톡시)-1-메틸-에톡시]-1-메틸-에톡시}-1-메틸-에톡시}-1-메틸-에톡시)-1-메틸-에톡시}-1-메틸-에톡시)-숙시남산
락트산
프로토포르피린
헵
콜린산
데옥시콜린산
스테아르산
올레산
팔미트산
알란토인산
3-인돌 락트산
인돌-3-부틴산
3-인돌 프로피온산
피루브산
3-머캅토-프로피온산
α -케토글루타르산
옥살로아세트산
페닐 메틸 설푼산

<110> 염기 처리

키토산 샘플에 pH가 9 내지 10일 될 때까지 염기를 천천히 첨가하였다(9 및 10 사이의 구별할 수 있는 색변화를 갖는 pH 종이를 사용하였음). 키토산 용액이 매우 점성으로 되었기 때문에, 기계적 교반에 더하여, 이러한 단계 중 테플론 교반 막대를 사용하여 혼합 공정을 도왔다.

<112> 키토산 정제

10%(v/v) 유기산 용액을 첨가하여 산 중에 키토산을 재용해화하였다. 재용해화가 하룻밤동안 일어나게 두었다. 모든 키토산이 용액으로 되돌아간 후에, 염기를 천천히 첨가하여 키토산을 재침전시켰다. 염기성 pH(9-10)이

달성되는 것 및 샘플 상청액에 어떠한 현저한 점성도 없는 것 둘 모두가 완전한 침전을 나타내었다. 공유적으로 변형된 키토산을 포함하는 키토산이 이 단계에서 침전하였고, 용액 중에 비반응된 변형 시약을 포함하는 소분자를 남겼다. 샘플에서 혼합기를 제거하였고 샘플을 원심분리(예컨대, 3850xG 또는 키토산을 침강시키기에 충분한 G 포스)하였고 상청액을 따라 내었다.

<114> 투석

<115> 원심분리 단계로부터의 고체 키토산을 투석 튜빙(10 mm 플랫폼 직경, 12,000-14,000 MW 컷오프)으로 옮겼다. 고체가 재용해될 때까지 키토산을 10% (v/v) 유기산 용액에 대해 투석하였다. 초기 키토산 회석을 위해 선택된 것과 동일한 산을 이 단계에서 사용하였다. 그러나, 최종 생성물이 사용될 용도에 따라, 산은 초기 회석 단계에 사용된 산과 상이할 수 있고 선택은 후속 합성 단계에 영향을 받을 것이다. 표 I은 가능한 산 선택의 비제한적인 리스트를 포함한다. 그리고 나서, 산 투석액을 제거하고 물로 대체하였고 3 시간 이상의 시간동안 회석하였다. 그리고 나서, 물을 다시 2회 더 대체하여 총 3회 물 세척이 되게 하였다. 소량의 키토산을 투석 튜빙으로부터 꺼내어 pH 미터를 사용하여 pH를 측정하였다. 그리고 나서, 투석액을 완충염 용액으로 바꾸었고 키토산의 pH가 일반적으로 pH 5.7 내지 6.0의 범위가 될 때까지 투석을 모니터링하였다. 투석을 위해 사용된 완충염 용액은 최종 생성물 응용에 기초하여 선택하였다. 표 IV는 가능한 완충염 용액의 비제한적인 리스트를 포함한다. 3시간 기간 내에 원하는 pH 범위가 달성되지 않은 경우에 신선한 완충염 용액을 사용하였다. 그리고 나서, 키토산을 물에 대해 3회 투석하였고 각 세척은 3시간 이상 지속되었다. 키토산을 투석 튜빙으로부터 꺼내어 냉동 건조 플라스크에 합하였다. 상기한 임의의 세척 단계는 단일 세척 단계 또는 추가 세척 단계를 포함할 수 있으며, 세척 단계당 세척하는 횟수는 필수적이라기 보다는 선택의 문제이다.

표 IV

<116> 완충염 용액 또는 잠재적인 성분의 예

포스페이트 완충 염수	포스페이트
수베레이트	아디페이트
옥살레이트	시트레이트
숙시네이트	말레이트
설페이트	HEPES

<117> 키토산 냉동 건조

<118> 투석된 키토산을 담은 플라스크를 -80℃ 냉장고에 하룻밤동안 넣었다. 그리고 나서, 샘플을 냉동 건조하였고 사용할 때까지 보관하였다.

<119> 키토산 재구성

<120> PBS 또는 다른 적합한 회석제 1 밀리리터당 밀리그램 단위인 키토산의 원하는 제형 농도를 얻도록, 일정량의 본 발명의 냉동 건조된 키토산을 일정 부피의 멸균 포스페이트 완충 염수(PBS; pH=7.4) 또는 다른 적합한 회석제와 합하여 최종 제형을 제조하였다. 멸균하기 전에 샘플을 적어도 4시간동안, 또는 특정 최종 제형에 적합한 시간 동안 용매화되게 두었다.

<121> 멸균

<122> 키토산 제형을 오토클레이브에서 증기 멸균하였다. 멸균은 샘플 바이알을 알루미늄 포일로 덮고 샘플 바이알을 오토클레이브 안쪽의 수조에 넣어서 달성하였다. 멸균 후에, 샘플을 실온으로 냉각되게 두었고 최종 pH를 측정하였다. 원하는 제형 pH는 약 5 내지 약 7 사이이다. 소정 실시형태에서, pH 범위는 약 6 내지 약 7 사이이다. 다른 실시형태에서, pH 범위는 약 6.2 내지 약 6.4 사이이다.

<123> 비-공유 화학 변형제의 첨가(선택적)

<124> 모든 본 발명의 조성물에서, 키토산 성질의 추가적인 조작은 1종의 변형제 또는 다수의 변형제를 첨가하여 달성할 수 있으며, 시약은 원하는 목적에 맞춰진 조성물을 만드는 특성을 조성물에 부여하도록 설계된다. 이러한 첨가는 합성 전량에 전반의 다양한 시점에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 조직 접합을 위해, 첨가제는 항미생물제, 항바이러스제, 성장 촉진제, 치유를 향상시키는 제제, 또는 조직 접착제 목적에 조성물을 맞춤 수 있는 임의의 다른 제제일 수 있다. 다른 유형의 접착제에서, 첨가제는 응용에 따라 다른 접착제를 포함할 수 있다.

약물 송달 응용에서, 약제학적 제제가 키토산 매트릭스에 공유 결합하지 않는다면 접착제는 활성 약제학적 제제 일 수 있으며, 또는 의도된 약물 송달 응용에 조성물을 맞출 수 있는 부형제, 보조제, 촉진제, 방출 촉진제, 또는 임의의 다른 제제일 수 있다. 이러한 비-공유 변형은 사슬내 또는 사슬간 상호작용을 조절 또는 변형시켜 키토산 행동에 영향을 줄 수 있다. 이것은 원하는 제형을 얻도록 적합한 부피의 평균 재구성된 키토산과 평균 변형제를 합하여 달성할 수 있다. 적합한 비-공유 변형제는 가교결합제, 약제학적 조성물, 소수성 분자, 친수성 분자, 염료, 스테로이드, 지질, 핵산, 생체적합성 중합체, 또는 본 발명의 키토산에 첨가될 수 있는 임의의 다른 물질을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

본 발명의 방법의 도식적 설명

처리된 키토산 또는 변형 및 처리된 키토산을 제조하기 위한 본 발명의 방법의 소정 실시형태가 도 2A 및 B에 블록 다이어그램으로 나타나있다.

실시예

발명의 실현

실시예 1

클래스 A 변형제 및 설폰닐 클로라이드 커플링을 사용한 키토산의 변형

본 실시예는 설폰산 클로라이드를 통해 알킬 설폰산을 갖는 키토산의 클래스 A 유형의 공유 변형을 제조하는 방법을 설명한다. 이러한 합성은 약 1%(100개의 글루코오스 서브유닛당 1개의 옥탄 설폰아미드 연결)의 키토산 변형율을 목적으로 설계하였다.

절차

비이커에서, 2 그램의 키토산을 40 mL의 10% (v/v) 락트산과 합하였다. 키토산을 하룻밤 용해되게 두었다. 키토산이 완전히 용해되었을 때, 샘플을 기계적 혼합기에 넣고 80-120 rpm의 속도로 교반하였고 30분간 혼합되게 하였다. 혼합을 계속하면서, 100 μ L의 옥탄설폰닐 클로라이드를 키토산에 적가하였다. 샘플을 1시간 동안 혼합되게 한 다음, 샘플의 pH가 9 내지 10 사이가 될 때까지 6M NaOH를 천천히 첨가하였다. 이 pH를 유지하면서 2시간동안 계속 혼합하였다. 그리고 나서, 100 mL의 10%(v/v) 락트산을 첨가하여 키토산을 재용해하였다. 변형된 키토산이 모두 용해되었을 때, 6M NaOH를 천천히 첨가하여 샘플을 재침전시켰다. 혼합을 끝내고 샘플을 4개의 원심분리 튜브(50 mL)에 똑같이 나누어, 키토산을 침강시키기에 샘플을 충분한 속도 및 시간으로 원심분리하였다. 일반적으로, 침강(sedimentation)은 약 3850 xG에서 행하여졌다. 상청액을 따라내고 변형된 키토산을 투석 튜빙에 넣었다. 그 다음, 모든 키토산이 용해될 때까지 키토산을 10%(v/v) 락트산으로 투석하였다. 그 다음, 산 투석액을 제거하고 초고순도 물(ultrapure water; UPS 주사용 멸균수)로 대체하고 3시간 이상 투석하였다. 그 다음, 총 3회 물로 세척이 되도록 초고순도 물을 2회 추가로 대체하였다. 키토산의 소량의 분취량을 투석 튜빙에서 꺼내어 pH를 측정하였다. 그 다음, 투석액을 PBS pH 7.4로 바꾸고 키토산의 pH가 5.7 내지 6.0의 범위가 될 때까지 투석을 모니터링하였다. 그 다음, 초고순도 물에 대해 키토산을 3회 투석하였고 각각의 세척은 3 시간 이상 지속하였다. 그 다음, 키토산은 상기에 설명한 냉동 건조, 재구성 및 멸균 단계를 거쳤다. 제형의 원하는 최종 pH는 6.2 내지 6.4이다.

실시예 2

클래스 C 변형제 및 다이이미드 커플링을 사용한 키토산의 변형

본 실시예는 다이이미드 커플링을 사용하여 N-(2-다이에틸아미노-에틸)-숙시남산을 갖는 키토산의 클래스 C 유형의 공유 변형을 제조하는 방법을 설명한다.

절차

비이커에서, 100 g (5.7 mmol의 키토산 단량체 유닛)의 키토산을 0.1 N HCl 중에 용해하였다. 0.40 g(1.8 mmol)의 N-(2-다이에틸아미노-에틸)-숙시남산을 키토산 용액에 첨가하였다. 그 다음, 0.52 g (2.7 mmol)의 1-에틸렌-3(3-다이에틸아미노-프로필)카르보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC) 또는 N-에틸-N'-(3-다이에틸아미노-프로필)카르보다이이미드 하이드로클로라이드 및 0.78 g(0.68 mmol) N-하이드록시숙시나미드(NHS) 또는 1-하이드록시-2,5-피롤리딘다이온을 첨가하였다. 1N NaOH를 사용하여 반응 용액의 pH를 5로 조절하였고, 혼합물을 24시간동안 실온에서 교반하였다. 얻어진 변형된 키토산을 1N NaOH를 사용하여 pH를 약 9로 조절하여 침전시켜 정제하고, 원심분리하여 침전물을 수집하였다. 이러한 유형의 변형 반응의 추가적인 상세는 문헌[Park, J.H.;

Cho, Y.W.; Chung, H.; Kwon, I.C.; Jeong, S.Y. "Synthesis and Characterization of Sugar-Bearing Chitosan Derivatives: Aqueous Solubility and Biodegradability" *Biomacromolecules* 2003, 4, 1087-1091]에서 찾을 수 있다.

<160> 실시예 3

<161> 클래스 C 변형제 및 산 클로라이드 커플링을 사용한 키토산의 변형

<162> 이 실시예는 산 클로라이드 커플링을 사용하여 N-(2-다이에틸아미노-에틸)-숙시남산을 갖는 키토산의 클래스 C 유형의 공유 변형을 제조하는 방법을 설명한다.

<163> 절차

<164> 비이커에서, 0.40 g(1.8 mmol)의 N-(2-다이에틸아미노에틸)숙시남산을 약 0. mL의 무수 THF 중에 용해하였다. 그 다음, 0.26 g(2.2 mmol)의 티오닐 클로라이드를 용액에 첨가하고 부착된 건조 컬럼을 사용하여 1시간 동안 환류하였다. 환류 후에, 용액을 실온으로 냉각시켰다. 100 g(5.7 mmol)의 키토산 단량체 유닛)의 키토산을 10% (v/v) 아세트산 용액 중에 용해하였다. 그 다음, N-(2-다이에틸아미노에틸)숙시남산 클로라이드 용액을 교반하면서 키토산 용액에 적가하였다. 키토산을 숙시남산 클로라이드와 반응시킨 후에, 1N NaOH를 사용하여 pH를 7 내지 8 사이로 조절하였고 반응이 2 내지 4시간동안 계속되게 두었다. 1N NaOH를 첨가하여 pH를 9로 증가시켜 변형된 키토산을 정제하였다. 그리고 나서, 침전물을 원심분리로 수집하였다.

<165> 실시예 4

<166> 클래스 D 변형제 및 산 클로라이드 커플링을 사용한 키토산의 변형

<167> 본 실시예는 산 클로라이드 커플링을 사용하여 콜린산을 갖는 키토산의 클래스 D 유형의 공유 변형을 제조하는 방법을 설명한다.

<168> 절차

<169> 1 그램의 키토산을 20 mL의 10% 락트산 중에 용해하였다. 0.581 그램의 콜린산(나트륨 염)을 10 mL의 DMSO 또는 에틸 아세테이트 중에 용해하였다. 120 μ L의 티오닐 클로라이드를 콜린산 용액에 조심스럽게 첨가하였다. 콜린산-티오닐 클로라이드 반응 혼합물을 건조 튜브에서 1시간 동안 환류한 다음 혼합물을 실온으로 냉각하였다. 오버헤드 혼합기를 사용하여 일정하게 교반하면서 콜린산-티오닐 반응 혼합물을 용해된 키토산에 첨가하였다. 6M NaOH를 사용하여 반응 용액의 pH를 9 내지 10 사이로 조절하였다. 이 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 10분간 3850 xG에서 원심분리하여 침전된 변형된 키토산을 수집하였다. 변형된 키토산을 50 mL의 10% 락트산 중에 재용해한 후, 6M NaOH를 사용하여 pH 9-10으로 조절하여 재침전시켰다. 혼합물을 10분간 3850 xG에서 원심분리하여 침전된 변형된 키토산을 수집하였다. 수집된 변형된 키토산을 투석 튜빙으로 옮기고 키토산이 용해될 때까지 10% 락트산에 대하여 투석하였다. 변형된 키토산이 용해된 후에, 투석액을 탈이온(DI)수로 대체하고 추가로 3시간 동안 투석을 계속하였다. 총 3회 DI수로 바꾸었다. 3회의 물 세척 후에, 키토산의 pH가 pH 5.7-6.0에 도달할 때까지 변형된 키토산을 PBS(pH 7.4)에 대해 투석하였다. 대안적으로, PBS 투석을 TRIS 완충액 중의 마그네슘 설페이트와 같은 다른 염에 대한 투석으로 대체할 수 있다. 일단 원하는 pH 범위가 얻어지면, 2회의 3시간 투석 단계가 완료되었다. 변형된 키토산을 냉동 건조 플라스크에 넣고 적어도 1시간 동안 -80°C에서 냉동시켰다. 플라스크를 냉동 건조기에 넣고 완전히 건조될 때까지 건조하였다. 건조된 변형된 키토산을 필요할 때까지 -20°C에서 데시케이터에 보관하였다. 상기한 절차의 변형 단계를 반복하여 더 고도로 변형된 생체적합물질들을 제공할 수 있다.

<170> 실시예 5

<171> 키토산과 클래스 F 변형제의 혼합물

<172> 이 실시예는 처리된 키토산과 퍼플루오론의 혼합물로 구성된 클래스 F 유형의 비공유 변형의 제조방법을 설명한다.

<173> 절차

<174> 1 그램의 키토산을 40 mL의 10% 아세트산 중에 용해하여 25 mg/mL 키토산 용액을 제조하였다. 1 mL의 퍼플루오론을 1mL의 용액 25 mg/mL 키토산 용액에 첨가하여 최종 키토산 농도 12.5 mg/mL를 얻었고 하룻밤 교반하였다. 첨가 초기에는, 용액이 2상(biphasic)이었으나 장시간 교반 후에, 퍼플루오론 상이 보이지 않았다. 얻어진 용

액울은 오팔색으로 빛나는 특성을 나타내었다. 키토산/피플루오론 혼합물을 투석 튜빙에 넣고 물에 대하여 3회 투석한 다음 PBS 에 대하여 밤새 투석하였다.

<175> 실시예 6

<176> 클래스 C 변형제 및 다이이미드 커플링을 사용한 키토산의 변형

<177> 이 실시예는 다이이미드 커플링을 사용하여 폴리에테르를 갖는 키토산의 클래스 C 유형의 공유 변형을 제조하는 방법을 나타낸다. 이 실시예에서, 폴리에테르 아민은 숙신산 무수물을 사용하여 변형하여 키토산에 대한 다이이미드 커플링을 촉진하는 숙시남산 연결자를 생성하였다.

<178> 폴리에테르 아민 산 연결자의 제조

<179> 250 mL 둥근 바닥 플라스크에, 2.49 g (4.2 mmol)의 제파민 600(Jeffamine 600), 150 mL의 무수 테트라하이드로푸란, 0.42 g (4.2 mmol) 숙신산 무수물 및 1.2 mL (8.4 mmol) 트라이에틸아민을 합하였다. 이 혼합물을 4 시간 동안 교반 및 환류하였다. 용액을 냉각한 후에, 약 10mL의 용액이 남을 때까지 회전증발시켰다. 그 다음, THF의 증발이 완료될 때까지 질소 퍼지 하에 샘플을 더욱 건조하였고 혼합물은 시럽같은 농도였다. 이 공정으로 약 1.8 mL의 연결자를 얻었다.

<180> 다이이미드 커플링을 사용한 키토산의 변형

<181> 비이커에서, 2.00 g(11.4 mmol의 키토산 단량체 유닛)의 키토산을 0.1N HCl 중에 용해하였다. 그리고 나서, 1.00 g(1.4 mmol)의 J600-숙시남산을 키토산 용액에 첨가하였다. 그 다음, 0.287 g(2.5 mmol)의 1-에틸렌-3-(3-다이메틸아미노-프로필)카르보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC) 또는 N-에틸-N'-(3-다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드 하이드로클로라이드 및 0.478 g(2.5 mmol) N-하이드록시숙시이미드(NHS) 또는 1-하이드록시-2,5-피롤리딘다이온을 첨가하였다. 얻어진 용액의 pH는 6M NaOH을 사용하여 pH5-6 사이를 유지하였고 혼합물을 72시간동안 실온에서 교반하였다(유리 또는 테플론 교반기). 얻어진 변형된 키토산을 6M NaOH을 사용하여 pH를 약 9로 조절하여 침전시켜 정제하였고 원심분리하여 침전물을 수집하였다. 그리고 나서, 변형된 키토산을 투석 튜빙으로 옮기고 키토산이 용해될 때까지 PBS 중의 10%(v/v) 락트산에 대하여 36시간 동안 투석하였다. 그리고 나서, 산 투석액을 제거하고 초고순도 물(UPS 주사용 멸균수)로 대체하고 3시간 이상 투석하였다. 그 다음, 투석액을 PBS pH 6.0으로 바꾸고 키토산을 약 36시간 동안 투석하였다. 그 다음, PBS 투석액을 제거하고 초고순도 물(UPS 주사용 멸균수)로 대체하고 3시간 이상 투석하였다. 최종 생성물을 본 명세서에서 앞서 설명한 보통의 관례에 따라 냉동 건조 및 재구성하였다.

<182> 이론적으로, 상기한 절차는 폴리에테르 아민을 갖는 키토산의 10% 변형을 얻을 것으로 예상된다. 추가적인 실험에서 폴리에테르 아민 변형 수준은 시약의 양 및 커플링 시간에 따라 10% 더 많기도 하고 10% 더 적기도 한 것으로 나타났다. 설명된 모든 다른 공정 단계들은 동일하였다. 이러한 변형율의 미묘한 변화조차도 막대하게 상이한 특성, 현저한 점도의 차이 및 물 함유 능력의 차이를 가져오는 것으로 관찰되었다.

<183> 독특한 물리적 특성의 입증

<184> 처리 및 변형의 효과를 특성화하기 위하여, 대표적인 조성물을 원편광 이색성 분광측정법(CD), 원소 분석, 핵자기공명(NMR), 광 산란 검출을 사용한 젤 투과 크로마토그래피(GPC) 및 점도 측정을 포함하는 다양한 분석 절차에 의해 분석하였다. 분석 절차는 처리된 키토산 뿐만아니라 변형된 키토산 또는 변형 및 처리된 키토산에서 실시하였다. 그리고 나서, 이러한 데이터를 천연 키토산 샘플의 데이터와 비교하여, 본 발명의 조성물과 천연 키토산 사이의 물리적 및/또는 화학적 차이를 입증하였다. 이러한 초기 연구를 본 명세서에서는 연구 1이라고 말한다. 본 명세서에서 연구 2라고 말하는 추가적인 연구는 키토산 분자량(MW) 뿐만아니라 유형(랜덤(R) 대 블록(B))의 효과 및 탈아세틸화 정도(DDA)를 연구하기 위하여 동일한 분석 기술(NMR 제외)을 사용하여 나중에 실시되었다. 모든 특성화는 실시예 1에 기재된 실시형태에서 실시하였다.

<185> 원편광 이색성 분광측정법(CD)

<186> 도마드(Domard) (문헌[Int. J. Biol. Macromol. 1987, Vol 9, 98-104])는 키토산의 CD 스펙트럼을 보고하였다. 저자는 185 nm에서 음의 이색성 밴드를 보고하였으며, 이는 탈양성자화된(-NH₂) 형태의 키토산에 상응하며, 이 형태는 더욱 결정질인 물질로서 존재한다. 양성자화된 형태의 키토산(-NH₃⁺) 은 음의 밴드를 나타내지 않는다. 양성자화된 아민의 정전기적 척력이 이러한 물질이 결정질 구성을 택하는 것을 막는다. 본 발명의 생성물에서 수집된 CD 스펙트럼이 도 3에 나타나있다. 변형된 또는 변형되지 않은, 키토산의 본 발명의 독점적인 처리가

처리되지 않은 키토산보다 사실상 덜 결정질인 독특한 키토산을 제공한다는 것이 분명하다. 이러한 결과는 다중 기구에서 다중 샘플을 사용하여 확증되었다.

<187> 원소 분석

<188> 원소 분석(연소)를 사용하여 옥탄 설편네이트에 의한 변형의 정도를 결정하였다. 물질의 3개의 변형 및 처리된 배치(batch) 및 1개의 변형되지 않고 처리된 배치에서 황 및 질소 분석을 실시하였다. 각각의 키토산 서브유닛은 산 클로라이드 커플링을 사용하여 옥탄 설편네이트와 연결할 수 있는 하나의 질소를 포함한다. 질소의 총 몰을 키토산에 대한 옥탄 설편네이트 변형체의 설편아미드 연결로부터 연소된 황의 몰과 비교하여 3개의 변형 및 처리된 샘플 각각의 변형율을 결정할 수 있었다. 변형되지 않고 처리된 샘플로부터 어떠한 황도 없었으며, 이로서 변형체가 없을 때는 황이 전혀 존재하지 않는다는 것을 확인하였다. 3개의 변형 및 처리된 배치에서 결정된 변형율은 변형된 글루코오스 서브유닛의 $1.5 \pm 0.3\%$ 이었다. 초기 연구에서의 황 수준이 정량분석용 연소 분석기의 검출한계에 가까웠으므로, 연구 2에서의 황 분석은 향상된 민감성을 제공하는 유도 결합 플라즈마(Inductively Coupled Plasma ; ICP)를 사용하여 실시하였다. 표 V는 각 세트의 실험에서의 변형율을 요약한다.

표 V

<189> 변형 및 처리된 키토산 매트릭스에서의 변형율의 결정

연구	MW 키토산 원료 물질	DDA %	N*	황 분석법	변형율 평균 $\pm$ SD
1	261,000	98.9	3	연소	$1.5 \pm 0.3\%$
2	261,000	98.9	1	ICP	0.75%
2	274,000	85.5 ^R	3	ICP	$0.60 \pm 0.02\%$
2	364,000	81.0 ^B	3	ICP	$0.54 \pm 0.02\%$

<190> * N 값은 변형 및 처리된 물질의 상이한 배치(batch)를 나타낸다.

<191> 모든 연구 그룹에서 변형율 데이터는 합성 공정시 목적인 1% 변형율과 양호한 일치를 나타내었다. 상기에 언급한 바와 같이, 연소에 의한 황 정량은 분석 기술의 정량 한계에 다다랐다. 이는 분석된 3개의 배치에 대한 결과의 증가된 변동성(Variability)에 반영된다. 변동성은 ICP 분석을 사용하여 감소되었고 이러한 값들은 더욱 정밀하게 변형율을 반영하는 것으로 여겨진다.

<192> 원소 분석을 추가로 사용하여 샘플을 처리 및 재구성하는 데 사용된 PBS에 의해 제공된 이온의 농도를 결정하였다. 하기 원소를 정량하였다: 칼륨, 나트륨, 염소 및 인. 이들 원소는 처리된 키토산에서 하기 이온을 나타낸다: K^+ , Na^+ , Cl^- 및 $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$. 변형 및 처리된 키토산 중의 각 이온의 농도를 하기 표 VI에 나타내었고 키토산의 삼투압 밸런스를 나타낸다. 다가 포스페이트 이온은 벌크 PBS에 대하여 농축되며 다중으로 하전된 음이온에 대한 양으로 하전된 키토산의 친화성을 나타내지만, 나트륨은 벌크 물질로부터 배제되었다.

표 VI

<193> 변형 및 처리된 키토산 매트릭스의 음이온의 우선적인 혼입

연구	원소	MW 키토산 원료	DDA %	N*	생체적합물질 중의 농 도 (B) (% + SD)	PBS 투석액 중의 농도 (D) (%)	B:D 비율
1	P	261,000	98.9	2	0.89 ± 0	0.031	28.71
2	P	261,000	98.9	1	0.55	0.031	17.74
2	P	274,000	85.5 ^R	3	0.65 ± 0.14	0.031	20.97
2	P	364,000	81.0 ^B	3	0.62 ± 0.16	0.031	20.00
1	Cl	261,000	98.9	2	6.66 ± 0.11	0.521	12.76
2	Cl	261,000	98.9	1	8.64	0.521	16.58
2	Cl	274,000	85.5 ^R	3	6.20 ± 0.61	0.521	11.90

2	Cl	364,000	81.0 ^B	3	5.90 ± 0.75	0.521	11.32
2	Na	261,000	98.9	1	0.0063	0.371	0.017
2	Na	274,000	85.5 ^R	3	0.0086 ± 0.003	0.371	0.023
2	Na	364,000	81.0 ^B	3	0.013 ± 0.0006	0.371	0.035

<194> * N 값은 변형 및 처리된 물질의 상이한 배치(batch)를 나타낸다.

<195> R = 랜덤 탈아세틸화; B= 블록 탈아세틸화

<196> 핵 자기 공명(NMR)

<197> 양성자 NMR은 키토산의 탄화수소 변형으로인한 공명을 검출할 수 있었다. 이 공명 피크는 분석된 3개의 변형 및 처리된 배치에 존재하였으나 변형되지 않고 처리된 배치에서는 없었으며 이는 피크의 근원이 변형제임을 입증한다. 이러한 특정공명에 대한 피크 적분을 키토산 백본(C2)에 기인한 잘 정의된 공명과 비교하여 약 0.5%의 변형율이 나왔다. 이 값은 ICP 원소 황 분석에 의해 예측된, 표 V에 나타난 변형율과 양호한 일치를 나타낸다.

<198> 젤 투과 크로마토그래피 (GPC)

<199> 13개의 키토산 샘플을 광산란 검출을 사용한 GPC를 사용하여 하기의 표준 조건 하에 분석하였다. 30℃에서 1.0 mL/분의 유속으로 이동상으로서 0.3 M 아세트산/0.3 M 아세트산나트륨을 사용하는 울트라하이드로젤(2 선형) 컬럼. 150 μL의 주사 부피를 사용하였고 용리 프로파일은 비스코텍(Viscotek) Y-501 검출기 및 DAWN 광산란 검출기를 사용하여 결정하였다. 데이터의 요약이 표 VII에 나타나 있으며 크로마토그램은 도 4에 나타나있다. 중량 평균분자량 (M_w) 데이터의 비교는 실시예 1의 처리를 거친 모든 키토산 샘플들 사이에서 전혀 다른 차이를 나타낸다. 처리되지 않은 물질은 본 발명의 처리를 받는 물질보다 더 낮은 체류 부피(M_w 보다 높음)를 나타내었다. M_w에서의 유사한 변화가 연구된 실시예 1에 따라 제조된 모든 키토산 샘플들에서 나타났다. 이러한 실험에서, 변형은 실시예 1의 것이다. 샘플들은 2곳의 다른 실험실에서 진행하여 이들 결과를 확인하였다. M_w에서의 이러한 변화는 분자량(MW), 탈아세틸화 정도(DDA) 및 탈아세틸화 유형(블록 대 랜덤)과 같은 키토산의 특성과는 독립적이다. 처리시, 샘플 GPC-2, 3, 4 및 5는 M_w의 관찰가능하며 재현가능한 이동, 263,000로부터 219,000로, 84%로 감소를 나타내었다. 사슬 절단은 이러한 실험 조건에서는 예상되지 않으므로 관찰된 분자량의 이러한 변화는 지나치게 단순한 사슬 절단과는 일치하지 않는다. 대안적인 설명이 분자 형태의 변화일 수 있다. 다가 포스페이트 이온이 키토산 백본의 이질적인 부분들을 끌어당겨 더 컴팩트한 구조체를 형성할 수 있다. 기다란(타원형) 입자는 GPC 컬럼에서 전형적으로 더 빨리 용리하므로 더 큰 체류 부피는 겔보기 분자 축소를 나타낼 것이다. 이는 더 큰 함유 부피에 접근하는 본 발명의 물질과 일치한다.

<200> 이러한 대안적인 설명은 본 발명의 독점적인 처리를 되돌린 후, 즉, 독특한 형태적 구조를 제거한 후, 얻어진 데이터에 의해서 또한 뒷받침된다. 변형 및 처리된 샘플의 하나에서 포스페이트를 제거하고, 분자 축소를 촉진할 것으로 예상되지 않는 1가 클로라이드 음이온으로 대체하였다. 그 다음, 이 샘플에서 GPC 분석을 실시하였다. "되돌린 처리"에 대한 데이터는 219,000로부터 약 253,000로, 평균 분자량, M_w의 관찰가능한 이동이 있음을 분명히 나타내었으며, 따라서 측정된 M_w의 변화는 가역적인 것으로 확인되었다. 본 발명의 처리로 얻어진 형태적으로 변경된 키토산 조성물은 처리되지 않은 키토산에 기초한 접착제보다 그리고 많은 경쟁 접착제 시스템보다 예상치못하게 탁월한 생체적합성 접착제 시스템을 제공한다.

<201> 이러한 행동은 또한 샘플 GPC-8 내지 GPC-13에서 분자량, 탈아세틸화 정도 또는 탈아세틸화 유형(블록 대 랜덤)을 달리하여 키토산을 사용할 때 나타난다.

표 VII

<202> GPC 데이터

샘플	물질	원료 MW	% DDA	GPC에 의한 M _w	M _w /MW
GPC-1	비변형/비처리	261,000	98.9	263,000	1.01
GPC-2	비변형/처리	261,000	98.9	220,800	0.85

GPC-3	변형/처리 배치 A	261,000	98.9	219,000	0.84
GPC-4	변형/처리 배치 B	261,000	98.9	219,500	0.84
GPC-5	변형/처리 배치 C	261,000	98.9	216,200	0.83
GPC-6	되돌린 처리 배치 B	261,000	98.9	252,600	0.97
GPC-7	변형/처리	261,000	98.9	220,000*	0.84
GPC-8	변형/처리	274,000	85.5 R	222,700*	0.81
GPC-9	변형/처리	274,000	85.5R	227,500*	0.83
GPC-10	변형/처리	274,000	85.5 R	222,300*	0.81
GPC-11	변형/처리	364,000	81.0B	226,200*	0.62
GPC-12	변형/처리	364,000	81.0B	260,700*	0.72
GPC-13	변형/처리	364,000	81.0B	223,100*	0.61

* 2번째 시험 튜브

R = 랜덤 탈아세틸화; B= 블록 탈아세틸화

표 VII는 처리된 키토산이 1보다 작은 M_w/MW 비를 나타냄을 보여준다. M_w/MW 비는 일반적으로 약 0.50 내지 약 0.90 사이이다. 소정 실시형태에서, M_w/MW 비는 약 0.50 내지 약 0.85 사이이다. 다른 실시형태에서, M_w/MW 비는 약 0.60 내지 약 0.85 사이이다.

점도

표 VII에 제공된 모든 물질의 대표적인 샘플에 대하여 브룩필드(Brookfield) 점도계를 사용하여 상대 점도 측정을 실시하였다. 모든 샘플은 동일한 농도(10 mg/mL)였다. 데이터의 요약이 표 VIII에 제공된다. 발명자의 독점적인 처리를 받은 키토산은, 변형되었든 변형되지 않았든, 처리되지 않은 제형과 비교하여 역시 독특하고 재현가능한 물리적 특성을 나타내었다. 동일한 출발 물질(동일 MW), 동일한 pH 및 농도를 사용하여 이러한 유형의 측정을 실시할 때, 유사한 비율의 상대 점도 측정치가 나타날 것으로 예상할 것이다. 그러나, 본 발명의 독점적인 처리에 의해서 점도는 일관되게 그리고 재현가능하게, 약 50% 감소되었다. 이것은 더 뻣뻣한 분자 형태를 제공하는 포스페이트 이온과 키토산 사이의 인력과 일치한다. 이 실시예에서 연구된 변형은 실시예 1의 것이었다.

표 VIII

다양한 키토산 제형에 대한 점도 데이터

샘플	재료	원료 MW	%DDA	농도 (mg/ mL)	상대 점도 (cP)	전단율 (1/초)	T ℃
V-1	비변형/비처리	261,000	98.9	10	91.7	39.6	30
V-2	비변형/처리	261,000	98.9	10	38.9	39.6	30
V-3	변형/처리 배치 A	261,000	98.9	10	41.8	39.6	30
V-4	변형/처리 배치 B	261,000	98.9	10	43.3	39.6	30
V-5	변형/처리 배치 C	261,000	98.9	10	40.5	39.6	30
V-6	변형/처리	261,000	98.9	10	35.1	26.4	25
V-7	변형/처리	274,000	85.5 ^R	10	50.2	26.4	25
V-8	변형/처리	364,000	81.0 ^B	10	118.6	26.4	25

R = 랜덤 탈아세틸화; B= 블록 탈아세틸화

예상되는 바와 같이, 물질의 분자량의 증가는 물질의 상대 점도의 증가에 상응하며, 샘플 V-7 및 V-8은 더 높은 분자량을 가지므로 상응하여 더 높은 점도를 나타내었다.

샘플 V-6, V-7 및 V-8에서 더욱 광범위한 점도측정 시험을 실시하였다. 샘플 V-6(도 5A)은 뉴턴 유동 행동(Newtonian Flow behavior)을 나타낸 반면에, 샘플 V-7(도 5B) 및 V-8(도 5C)은 분자량이 증가함에 따라 뉴턴 행동으로부터 점점 더 크게 이탈하여 의가소성 행동(pseudoplastic behavior)을 나타내었다.

- <212> 그러나, 다른 변형은 극적으로 상이한 점도 행동을 가져왔다. 피부 충전재(dermal filler)로서 유용하게 만드는 독특한 특성을 이해하기 위하여 실시예 6의 물질을 연구하였다. 실시예 6의 물질은 넓은 범위의 pH에 걸쳐 물을 함유하는 능력이 연구된 모든 다른 키토산 형태보다 크게 향상된다는 점에서 독특하였다. 이러한 행동은 공유 화학 변형의 성질에 기인하였다. 또한, 실시예 6의 물질은 극적으로 상이한 점도 행동을 나타낸다. 예를 들어, 실시예 6에 사용된 변형은 비-뉴튼(의가소성) 행동(도 5D) 및 레오펙틱 행동(rheopectic behavior)(도 5E)을 나타내는 매우 점성인 물질을 제공한다. 레오펙틱 행동은 실시예 1의 물질에서는 관찰되지 않았다.
- <213> 변형체의 사려깊은 선택이 물 보존, 점도 프로파일, 및 물질의 의도된 목적에 맞는 다른 유리한 특성의 맞춤을 가능하게 할 것이라는 것이 분명하다.
- <214> 적용 및 적용 특성의 입증
- <215> 실시예 7
- <216> 생체외(Ex Vivo) 인장 접합 강도 시험
- <217> 이 실시예는 본 발명의 다양한 제형이 생체외에서 조직에 접합하는 능력을 평가하도록 설계하였다.
- <218> 절차
- <219> 많은 공급원으로부터 다양한 조직을 얻었다. 그 다음, 표적 조직을 작은 스트립, 약 4 x 8mm로 절단하였다. 시험 물질을 조직 스트립 하나의 말단에 적용하였다. 그 다음, 다른 조직 스트립을 처리된 스트립에 포개어 오버랩 영역에 약 4x4 밀리미터 정방형의 오버랩을 형성하였고 단일-두께 "테일"이 각 말단으로부터 뻗어나왔다. 그 다음, 조직 프레퍼레이션을 얇은 플라스틱 시트에 싸고, 유리 현미경 슬라이드 사이에 샌드위치하고, 부드러운 압력(~125 g)으로 압착하였다. 접합 후에, 인장 강도 시험 전에 조직을 조심스럽게 적어도 1시간 그러나 24 시간 이하 동안 PBS에 넣어서 부분적인 탈수로 인한 임의의 잔류 "끈적임"이 측정된 인장 강도에 영향을 미치지 않도록 보장하였다. 인장계를 사용하여 접합 파단점까지 점진적으로 힘을 증가시켜 인장 접합 강도의 시험을 실시하였다. 피크 하중을 기록하고 접합 강도를 $g\cdot f/cm^2$ 로서 계산하였다.
- <220> 결과
- <221> 표 IX는 많은 경쟁 기술 및 대조구에 대한 비교 데이터를 제공한다. 표 X는 몇몇 일반적인 클래스의 변형된 키토산 물질 각각에 대한 대표적인 접합 강도를 제공한다. 그리고 나서, 가장 전망있는 제형에 대해 추가적인 안정성 및 효능 시험을 실시하였고 데이터를 후속 실시예에 제공하였다.
- <222> 결론
- <223> 이 모델은 잠재적인 제형을 스크리닝하고 상이한 조직에서 상이한 제형의 상대적인 접착 특성을 비교하는 유용한 도구를 제공한다. 이 모델을 사용하여, 본 발명의 제형이 탁월한 접착제 특성을 제공한다는 것을 결정하였고, 경쟁 기술 또는 천연 키토산 단독의 생접착 특성보다 탁월한 것으로 입증되었다.

표 IX

- <224> 비교 데이터

처리	전단 강도 ($g\cdot f/cm^2$)	시스템
염수 ¹	13 ± 4	피부-대-피부
헤마셀 피브린 글루(Hemaseal Fibrin Glue) ²	82 ± 45	베리타스(Veritas) TM -대-동맥
바이오 글루(BioGlue) ²	232 ± 188	베리타스(Veritas) TM -대-동맥
티셀 피브린 글루(Tiseel Fibrin Glue) ¹	261 ± 51	피부-대-피부
에틸 시아노아크릴레이트 ¹	385 ± 119	피부-대-피부
비처리 키토산 ²	230 ± 92	각막-대-각막

- <225> ¹출원인이 프로테인 폴리머 테크놀로지스(Protein Polymer Technologies)인, 미국 특허 5,817,303, 피부-대-피

부 값

² 포토바이오메드(PhotoBioMed) 데이터

베리타스(Veritas)TM는 시노비스 라이프 사이언스(Synovis Life Sciences)에서 제조된 조제 페리카디알(pericardial) 제품임

표 X

표 II에 정의된 바와 같은 다양한 변형 클래스에 대한 대표적인 인장 접합 강도 데이터

변형된 키토산	변형 클래스	전단 강도 g-f/cm ²	접합 시스템
옥탄	A	837 ± 324	각막-각막
프로토포르피린	B	368 ± 125	듀라가드(Duraguard)-동맥
N-(2-다이에틸아미노-에틸)-숙시남산	C	717 ± 230	각막-각막
데옥시콜린산	D	609 ± 157	듀라가드-동맥
피플루오론	F	267 ± 99	베리타스-동맥
비변형/처리	G	1164 ± 546	각막-각막

듀라가드(Duraguard)TM는 시노비스 라이프 사이언스(Synovis Life Sciences)에서 제조된 조제 페리카디알(pericardial) 제품임

베리타스(Veritas)TM는 시노비스 라이프 사이언스(Synovis Life Sciences)에서 제조된 조제 페리카디알(pericardial) 제품임

각막 및 동맥은 도살장으로부터 사후에 입수하였음

실시예 8

생체내(In Vivo) 조직 접합의 입증

이 실시예는 본 발명의 조성물이 생체 내에서 조직을 접합하는 능력, 특히 래빗 모델에서 각막 절제부를 밀봉하는 능력을 평가하도록 설계하였고, 실시예 1의 물질을 사용하였다.

절차

체중이 7 내지 8 파운드인 뉴질랜드 화이트 래빗을 사용하였다. 근육내 자일라진(5 mg/kg) 및 케타민(35 mg/kg)을 사용하여 래빗을 마취시켰다. 프로파라카인 하이드로클로라이드 용액 0.5%(알카인(Alcaine), 알콘(Alcon))의 국소 마취제를 래빗 눈에 적용하였다. 눈을 트랜스포어 테이프(Transpore Tape; 3M)로 테이핑하여 열고 스테리-드레이프(Steri-Drape; 3M)로 덮어 멸균 수술 영역을 제공하였다. 3.2 mm 클리어 컷 슬릿 나이프(Clear Cut slit knife)(알콘)를 사용하여 각막 절제부를 생성하였다. 슬릿 나이프를 멸균 수술 마커(비스코트(Viscot))로 마킹하여 절제부를 한정하였다. 윤부(limbus)에서 대략 1 mm 전방에, 홍채 평면으로부터 45° 각도로, 각막 두께 전체를 관통하여, 각각의 각막에 비-자가-밀봉(non-self-sealing), 3.2 mm 절제부를 만들었다. 절제부에서의 누출을 확실히 하기 위해, 멸균 평형 염 용액(BSS)(알콘)을 23-게이지 바늘(테크콘(Techcon))로 전안방에 주사하였다. 실험 그룹에서, 대략 10 내지 20 μ l의 실시예 1의 물질을 30-게이지 무딘 바늘(테크콘)을 사용하여 각막 절제부로 공급하였고, 수술용 아이 스피어(surgical eye spear)(무로셀(Murocel))를 사용하여 부드럽게 압력을 가하여 조직들이 확실하게 마주보게 하였고 절제부 표면을 건조하였다. 약 5 내지 10 μ l의 실시예 1의 물질을 국소적으로 적용하였고 5분의 접합 기간 동안 세팅되게 두었다. 대조구에서는, 공막으로부터 각막으로 봉합사를 배치하여 절제부를 10-0 비-흡수성 나일론 블랙 모노필라멘트 수술용 봉합사(알콘)로 밀봉하였다. 처치 후에, 모든 눈을 BSS로 세정하고, 항생제 목시플록사신 하이드로클로라이드 0.5%(비가목스(Vigamox), 알콘)로 처리하고, 눈이 건조해지는 것을 막기 위해 테이핑하여 닫았다. 수술 후에 래빗에 스테로이드 항생제 토브라마이신 및 텍사메타손(토프라텍스(Tobradex), 알콘) 및 케토로락 트로메타민 0.5%(아쿠라(Acular), 알러간)를 매일 4회 수거 시까지 제공하였다. 동물을 모니터링하여 잠재적인 누출 및 임의의 자극 징후를 평가하였다. 동물을 1-2시간, 1일, 및 7일의 3가지 시점(시점마다 n= 6)에 수거하였다. 즉시 안락사시킨 후, 23-게이지 바늘(테크콘)을 사용하여 전안방에 BSS를 주사하여 전안방을 가압하였다. 생리기록기

(physiograph)를 사용하여 각 압력에 대해 누출/폭발 압력을 평가하였다. 전안방 압력은 전형적으로 12-20 mmHg 이다. 누출/폭발 압력이 50 mmHg를 초과하는 경우 눈이 성공적으로 밀봉된 것으로 고려하였다.

<237>

결과

<238>

6 마리의 래빗을 관찰하였고 1-2 시간에 수거하였다. 대조구(봉합) 또는 실험 눈(실시에 1의 물질로 처치) 어느 것도 자극은 전혀 나타나지 않았다. 모든 눈이 50 mmHg를 초과하는 압력을 견뎌내었다. 6 마리의 래빗을 관찰하였고 1일에 수거하였다. 실험 눈에서 자극은 전혀 나타나지 않았다. 봉합된 눈에서는 약간의 자극이 나타났다. 모든 눈이 50 mmHg를 초과하는 압력을 견뎌내었다. 6 마리의 래빗을 관찰하였고 7일에 수거하였다. 대조구 또는 실험 눈 어느 것도 자극은 전혀 나타나지 않았다. 모든 눈이 50 mmHg를 초과하는 압력을 견뎌내었다.

<239>

실시에 9

<240>

세포독성 평가

<241>

이 실시예는 배양물 중의 각막 내피 세포에서 본 발명의 제형의 세포독성을 평가하도록 설계하였으며, 실시예 1의 물질을 사용하였다.

<242>

절차

<243>

융합(confluent)될 때까지(약 7-10일), 래빗 각막 내피 세포를 10% 소 태아 혈청(FCS)을 함유하는 표준 조직 배양 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM)에서 성장시켰다. 세포를 12-웰 조직 배양 플레이트에서 성장시켰다. 융합성 배양물을 사용하여 이들 세포에 대한 본 발명의 접착제 제형의 독성을 시험하였다. 스톱 화합물(10 mg/mL)을 0.2% FCS를 함유하는 DMEM에 희석하여 사용 직전에 1, 2, 또는 3 mg/mL 최종 농도를 얻었다. 총 부피 50 mL DMEM+0.2%FCS/웰로 37°C에서 24시간 동안 세포를 상이한 농도의 접착제(상기와 같음)의 존재 하에 배양하였다. 실험의 끝에, 세포를 PBS로 세척하였고 포유류 세포를 위한 물리컬러 프로브 생/사 생존가능성/세포독성키트(Molecular Probes™ Live/Dead® Viability/ Cytotoxicity kit)를 제조사의 설명서에 따라 사용하여 각각의 실험 조건 하에서 산 세포와 죽은 세포의 존재여부를 분석하였다. 세포 배양 실험을 3회 반복 실시하였다. 이러한 절차는 일차 세포를 사용하여 실시하였고 2차 세포 라인을 사용하여 반복하였다.

<244>

이제 도 6을 참조하면, 데이터는 본 발명의 각막 절제부 밀봉제가 독성이 없음을 나타낸다는 것을 보여준다. 1차 배양물을 20-24시간동안 화합물에 노출하였을 때 각막 내피 세포의 사멸은 관찰되지 않았다(맨 위 및 중간 패널). 세포에서 사멸은 진균 감염에 의해 유도되었다(맨 아래 패널).

<245>

이제 도 7을 참조하면, 본 발명의 화합물을 사용한 일련의 독성 연구가 나타나있다.

<246>

결과

<247>

이러한 배양된 세포에서 임의의 시험 조건 하에 세포독성이 전혀 관찰되지 않았다.

<248>

결론

<249>

본 실시예의 접착제 화합물은 각막 내피 세포에 대해 독성이 없다. 본 발명의 접착제를 구성하는 매질의 1/3인 3 mg/mL에서조차, 본질적으로 세포독성 효과가 전혀 관찰되지 않았다.

<250>

실시에 10

<251>

각막 포켓 모델

<252>

이 실시예는 실시예 1의 물질을 사용하여 래빗 눈의 각막 기질 내에 배치할 때 본 발명의 제형의 생체적합성을 설명한다.

<253>

절차

<254>

체중이 7 내지 8 kg인 뉴질랜드 화이트 래빗을 사용하였다. 근육내 자일라진(5 mg/kg) 및 케타민(35 mg/kg)을 사용하여 래빗을 마취시켰다. 프로파라카인 하이드로클로라이드 용액 0.5%(알카인, 알콘)의 국소 마취제를 래빗 눈에 적용하였다. 눈을 트랜스포어 테이프(3M)로 테이핑하여 열어서 속눈썹로부터의 오염을 방지하였다. 300 마이크로미터 정밀 깊이 나이프(샤르포인트(Sharp point))를 사용하여 초기 각막 절제부를 생성하였다. 윤부에서 대략 1.5 mm 전방에, 대략 2.5 mm 절제부가 각각의 각막에 만들어졌다. 베벨 업 앵글드 크레센트 나이프(Bevel Up Angled Crescent Knife)(샤르포인트)를 사용하여 각막 내로 300 마이크로미터에서 3.5 mm 직경의 얇은 판형 기질 포켓(lamellar stromal pocket)을 생성하였다. 실험 그룹에서, 23-게이지 무딘 바늘(테크콘)을 사

용하여 대략 20 μ l의 접착제 제형(10 mg/mL)을 각막 포켓에 제공하였고 수술용 아이 스피어(무로셀)을 사용하여 포켓을 부드러운 압력으로 찢어서 포켓 내에 남아있는 공기가 확실히 없게 하였다. 접착제를 5분의 접합시간 동안 세팅되게 두었다. 대조구 그룹에서는, 실험 그룹에서와 동일한 절차 후에 대략 20 μ l의 BSS를 각막 포켓에 제공하였다. 처리 후에, 모든 눈을 BSS로 세정하였고, 항생제 목시플록사신 하이드로클로라이드 0.5%(비가목스, 알콘)로 처리하고, 마취에서 회복되는 동안 눈이 건조해지는 것을 막기 위해 테이핑하여 닫았다. 수술 후에 래빗에 스테로이드 항생제 토브라마이신 및 텍사메타손(토프라텍스, 알콘)을 7일동안 매일 4회 제공하였다.

<255> 결과

<256> 3 마리의 래빗을 관찰하였고 각각 1, 14, 30, 60 및 90일에 수거하였다. 2 마리의 래빗을 관찰하였고 120일에 수거하였다. 육안으로 관찰하여 어떠한 시험 시편에서도 자극은 전혀 나타나지 않았다. 조직학적 관찰은 다양한 연구에서 남아있는 물질이 실질적으로 양성임을 확인하였다. 잔류 키토산은 120일까지 기질 포켓에 남아있는 것으로 나타났다.

<257> 이제 도 8을 참조하면, 본 도면은 각막의 기질 내에서 이러한 물질의 안정성을 설명한다. 이러한 물질은 심지어 만성적인 투여시에도 면역원성 또는 염증성 반응을 사실상 전혀 이끌어내지 않았다. 심지어 120일에도 각막에 대한 어떠한 유해한 효과도 없이 잔류 물질을 관찰할 수 있었다. 이러한 시편에서 관찰되는 외관상의 외상은 각막 포켓을 생성할 때 가해진 기계적 손상에 의한 것이다. 포켓은 실제로 상처가 있는 영역을 넘어서 기질 내로 약 300 μ m 깊이에서 약 3.5 mm의 길이로 연장한다. 시험 물질을 이러한 포켓 내에 주입하였고 불활성(위쪽 3개의 시편)이거나 심각한 염증성 반응(4번째 시편-양성 대조구)을 야기하였다.

<258> 결론

<259> 이 화합물은 래빗 눈의 각막 기질에서 염증 또는 면역 반응을 유도하지 않았다. 염증성 체제를 갖는 종래의 결과는 심각한 자극, 빛 공포증, 염증, 각막 부종, 및 신생혈관형성증을 유도하였다.

<260> 실시예 11

<261> 피내 주사: 베이스 물질의 생체적합성 및 수명

<262> 본 실시예는 피내 주사시 본 발명의 제형의 생체적합성을 결정하도록 설계하였고, 실시예 1의 물질을 사용하였다.

<263> 절차

<264> 자일라진(7 mg/kg), 케타민(70 mg/kg) 및 부프레노핀 (0.05 mg/kg)을 근육내 주사하여 스프라그 다우리 (Sprague Dawley) 래트를 마취시켰다. 래트의 등쪽 피부 표면을 면도하고 알코올로 세정하였다. 0.2 mL의 실시예 1의 물질을 확인된 그리드 섹션(identified grid section)으로 피하주사하였다. 주사 부위를 작은 문신 도트트로 표시하여 7 또는 28일에 일어나는 안락사 시점에 적절한 영역의 수거를 보장하였다. 적정 시점에, 동물을 안락사시키고, 근육과 연합된 피부 샘플을 수거하고, 시편을 OCT에 넣었고 후속 동결절단(cryosectioning) 및 조직학적 평가를 위해 냉동하였다.

<265> 결과

<266> 음성 대조구 시편은 7일까지 완전히 재흡수되었고 어떤 시점에서든 주사 부위에서 사실상 면역 반응이 전혀 없었다. 양성 대조구는 7일까지는 재흡수 또는 생분해에 의한 상당한 감소를 나타내었고 28일까지는 사실상 없어졌다. 그러나, 양성 대조구의 주사 부위에서는 물질이 전혀 나타나지 않은 28일에조차 상당한 염증 반응이 관찰되었다. 실시예 1의 물질은 28일까지 남아있었고 7일 및 28일 시점에서 양성 대조구보다 더 적은 염증 반응을 나타내었다. 매우 경미한 국부적인 면역 반응이 관찰되었으나, 아래의 근접 조직(subadjacent tissue)은 전형적인 형태를 나타내었다.

<267> 결론

<268> 본 발명의 실시예 1의 물질은 시험된 조직에서 양호한 생체적합성 및 탁월한 수명을 나타내었다. 이러한 물질은 피부 충전제로서 또는 지속 약물 송달용 저장소로서 잠재적으로 유용하다.

<269> 실시예 12

<270> 눈주위 주사: 충전제/벌킹 물질의 생체적합성 및 수명

- <271> 이 실시예는 본 발명의 물질의 생체적합성 및 보존을 결정하도록 설계하였으며, 특히 충전제 또는 벌크제 역할을 하도록 설계하였고, 실시예 6의 물질을 사용하였다.
- <272> 절차
- <273> 뉴질랜드 화이트 래빗을 이 연구에 사용하였다(n=3). 눈의 처치는 무작위로 하였다. 각각의 동물에서, 한쪽 눈을 10 mg/mL의 실시예 6의 물질 60-80 μ l로 처치하였고 다른 쪽 눈을 20 mg/mL의 실시예 6의 물질 60-80 μ l로 처치하였다. 40%/60% 산소/공기 혼합물 중의 2.0% 내지 3.5%로 아이소플루레인을 사용하여 래빗을 마취시켰다. 국소 마취제(테트라카인-0.5% 방울 또는 알카인) 2 방울을 래빗 눈에 적용하였다. 포셉을 사용하여 안구 표면으로부터 부드럽게 결막을 들어올려 결막을 "텐팅(tenting)"하였다. 주사는 안구의 표면에서 적절히 떨어져 이루어졌다(이 조작은 안구 천공의 위험성을 크게 감소시킨다). 바늘을 안구에 접하게 위치시켜 바늘 팁을 텐트에 삽입하고, 적합한 제형을 송달하였다. 23-게이지 바늘을 사용하여 주사하였다. 10 mg/mL의 실시예 6의 물질 100 μ l을 한쪽 눈의 결막 내로 주사하였다. 20 mg/mL의 실시예 6의 물질 100 μ l을 반대쪽 눈의 결막 내로 주사하였다. 주사 후에, 항생 드롭제(비가목스®)를 눈에 넣었다. 1주 동안 매일 관찰한 다음, 연구가 끝날 때까지 1주에 1회 관찰하였다. 24시간에 결막의 사진을 찍었다. 29일에, 래빗을 안락사시키고 결막을 수거하여 조직학 연구를 위해 처리하였다.
- <274> 결과
- <275> 눈꺼풀을 감기기 전에 래빗을 관찰했을 때, 모든 관찰 시점에서 모든 래빗의 눈이 빛나는, 촉촉한 외관을 유지하였다. 처음 24-48 시간 이내에, 결막이 부피가 다소 감소하였으나 모든 주사 부위가 결막 조직의 상당한 팽창을 유지하였다. 이들 제형은 충전제 또는 벌크제의 역할을 하기 위하여 부피를 차지하는 성질을 유지하여 물의 보존을 최적화하도록 설계되었다. 처음 2일동안 결막에서 약간의 발적이 나타났다. 이는 조직의 과도한 팽창으로 인한 것일 가능성이 크다. 29일에서, 모든 눈이 양호하게 보였다. 결막 조직의 잔류 팽창이 계속되었다(48시간후 관찰된 것에 필적함). 칼코플루오르 염색을 사용한 조직학적 평가에서 주사 29일 후에 실시예 6의 재료가 처리된 눈의 결막 중에 존재함이 확인되었다.
- <276> 결론
- <277> 실시예 6의 물질은 충전제 또는 벌크제로서 전망이 있다. 눈주위 주사 후에, 실시예 6의 물질은 탁월한 생체적합성을 가지고 결막 공간에 적어도 29일 존재하였다. 이 연구에서 정량분석은 하지 않았으나, 이들 물질은 초기 부피 중 상당한 퍼센트가 보존되므로 바람직한 질을 보여주었다.
- <278> 실시예 13
- <279> 시험관내(In vitro) 각막 모델
- <280> 이 실시예는 시험관내 래빗 눈 모델의 각막 표면 상의 제형 보존의 동력학을 결정하도록 설계하였고, 실시예 1의 물질을 사용하였다. 이 실시예는, 궁극적으로, 제조된 키토산 물질 내에서 유리 약물을 혼합하고 및 이어서 표적 조직 기체에 접촉하여 확산을 통해 조직 내로 약물을 용리하는 것을 통해, 변형 및 처리된 키토산 물질이 약물 송달 매트릭스로서 작용하는 능력을 평가하도록 설계하였다.
- <281> 절차
- <282> 생육성(Viable)의, 절제된 래빗 눈을 상업적 공급원으로부터 입수하였다. 본 발명의 제형을 플루오레세인 아이소티오시아네이트(FITC)와 컨쥬레이션하고 20 mg/mL 농도로 만들었다. 안구를 PBS로 헹군 다음, 배수하고, 실온에 1분간 정치하였다. 킴와이프(kimwipe)로 각막의 상피 표면을 부드럽게 두드려 여분의 PBS를 제거하였다. 상피를 200 μ l의 이 제형으로 처리하여 확실하게 완전히 덮히게 하였다. 1분 후에, 안구를 PBS가 담긴 용기로 옮겨 1분간 행구었다. 각막 버튼(Corneal buttons)을 잘라내어 DMEM/F12 기관 배양 배지로 옮기기도 다시 행구었다. 그 다음, 안구를 37°C에서 4 mL DMEM/F12가 담긴 웰(12 웰 조직 배양판)에서 가볍게 교반하면서 상이한 기간(0, 4, 8, 16, 24 시간; n=5)동안 배양하였다. 일정한 행구 부피 및 교반 속도를 사용하도록 주의하였다. 원하는 시점에, 각막을 꺼내어 가볍게 교반하면서 신선한 PBS로 1분간 행구었다. 각막을 OCT에 넣고 액체 질소로 급속 냉동(snap frozen)하였다. 형광 현미경을 사용하여 이 섹션에서 본 제형 보존을 분석하였다. 이미지 분석 소프트웨어를 이용하고 편견없는 방식으로 다중 섹션으로부터의 다중 부위를 평균하는 체계적인 접근법을 사용하여 각막 형광을 정량하였다. 대조구 각막(비처리)을 사용하여 천연 자가형광을 정량한 후 총 형광 측정치로부터 감하였다. 나머지 형광은 잔류 FITC-표지 제형에 기인한 것이다.

<283> 결과

<284> 잔류 형광의 정량 분석에 의해, 적용 4시간 후에 85%가 남아있었으며, 20% 초과가 8시간 및 16시간에 남아있었던 한편, 24시간에 사실상 모든 잔류 형광이 사라졌다(표 XI 참조). 잔류 형광을 나타내는 대표적인 각막 단면이 나타나있는 도 9 및 발광(luminescence) 정량에 대한 도 10을 참조한다.

<285> 결론

<286> 본 발명의 제형은 적용이 쉽고 최대 16시간동안 접착을 유지한다. 24시간에서는 잔류 형광이 없었다. 이 데이터는 이들 제형이 하루에 단지 1회 적용을 필요로 하는, 지속 약물 송달을 관리하는 또는 안구건조증을 위한 유용한 매트릭스를 제공할 수 있음을 시사한다. 24시간에서 잔류물의 부재는 다음 날의 재적용을 위한 프레쉬한 표면을 시사한다.

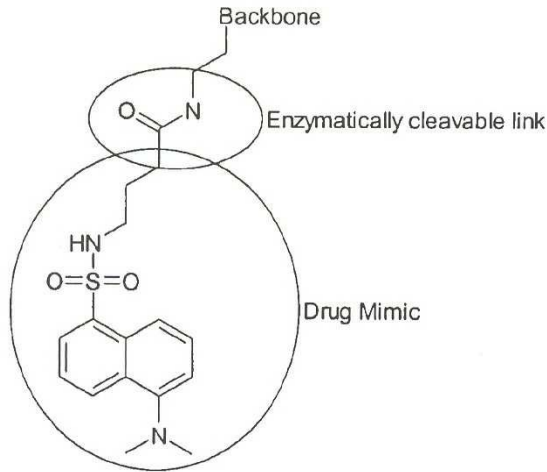
표 XI

<287> 각막 표면 상의 제형(20 mg/mL)의 보존- 데이터 상세

처리 그룹	시점	각막	분석된 섹션 #	평균 잔류 형광	기준선 초과 %
대조구	0 hr 총	1	4	31.63	* 주의: 모든 시점에서 관찰된 평균 천연형광은 32.74였다. 이 값을 처리된 시편의 평균 잔류 형광에서 감하여 기준선 초과량을 얻었다. 기준선 초과 퍼센트는 0시간 시점에 남은 퍼센트로 결정하였다.
		2	4	33.36	
		3	7	34.86	
		3	15	33.28 ± 1.62	
대조구	8 hr 총	1	8	32.55	
		2	8	34.09	
		2	16	33.32 ± 1.09	
대조구	24 hr 총	2	6	32.93	
		5	3	30.51	
		2	9	31.72 ± 1.71	
처리됨	0 hr 총	1	6	44.81	
		2	5	43.22	
		3	7	46.35	
		4	7	59.43	
		5	8	51.94	
		5	33	49.15 ± 6.62	16.41: 100%
처리됨	4 hr 총	1	8	45.39	
		2	8	46.5	
		3	8	44.08	
		4	7	44.77	
		5	6	53.02	
		5	37	46.75 ± 3.62	14.01: 85%
처리됨	8 hr 총	1	7	30.89	
		4	8	42.21	
		2	15	36.55 ± 8.00	3.81: 23%
처리됨	16 hr 총	1	8	39.06	
			7	35.99	
		5	6	33.4	
		3	23	36.15 ± 2.83	3.41: 21%
처리됨	24 hr 총	1	6	30.59	
			7	30.68	
		3	7	36.1	
		4	5	29.21	
		5	7	31.22	
		5	32	31.56 ± 2.64	0: 0%

- <288> 실시예 14
- <289> 상피 상처 치유 모델
- <290> 이 실시예는 실시예 1의 물질을 사용한 처치후 찰과상에서 각막 재-상피화 속도 및 패턴을 평가하도록 설계하였다.
- <291> 절차
- <292> 체중이 7 내지 8 kg인 뉴질랜드 화이트 래빗을 사용하였다(n=4). 자일라진(5 mg/kg) 및 케타민(35 mg/kg)을 근육내(i.m.) 주사하여 동물을 마취시켰다. 프로파라카인 하이드로클로라이드 용액 0.5%(알카인, 알콘)의 국소 마취제를 래빗 눈에 적용하였다. 눈을 트랜스포어 테이프(3M)로 테이핑하여 열어서 속눈썹로부터의 오염을 방지하였다. 외과용 메스(scalpel)(끝이 무덤)의 등쪽을 사용하여 아래쪽 눈꺼풀의 저부를 부드럽게 눌러서 안구를 안와로부터 들어올렸다. 엄지와 검지 사이에 세심하게 안구를 잡은 채로, 트레핀을 부드럽게 눌러서 평균 6 mm 트레핀으로 각막의 중앙에 표시를 하였다. 외과용 메스에 끼운 #15 바르트-파커(Bard-Parker) 블레이드를 사용하여 각막의 표시된 6 mm 원형 내부 안쪽의 전체 상피를 부드럽게 벗겨내었다. 표시된 영역 내의 전체 상피가 벗겨지도록 주의하였다. 한쪽 눈을 무작위로 선택하여 화합물(10 mg/mL 농도)로 처치하였다. 100 μ l를 국소 적용하였고 1분간 세팅되게 두었다. 반대쪽 눈은 100 μ l의 BSS로 처치하여 대조구 역할을 하였다. 각각의 눈을 플루오레세인으로 처리하였고, UV 노출 하에, 이미지를 캡처하여 0 시점에서 상처 크기를 기록하였다. 보정을 위해 이미지 분석시 각막에 인접하여 자를 놓았다. 눈을 촬영한 후, BSS로 플루오레세인을 씻어내었다. 처치 후에, 모든 눈을 BSS로 세정하고, 항생제 목시플록사신 하이드로클로라이드 0.5%(비가목스(Vigamox), 알콘)로 처리하고, 마취에서 회복되는 동안 눈이 건조해지는 것을 막기 위해 테이핑하여 닫았다. 엘리자베스 칼라를 동물에 씌워 눈을 만지는 것을 방지한다. 상기와 같이 수술후 1, 2, 4 및 8일에 사진을 찍어서 모든 눈에서 상처 크기를 평가하였다. 일반적인 건강 및 눈 상태를 1일 1회 모니터링하였고 관찰을 기록하였다. 8일차 사진을 찍은 후에 각막을 수거하였다. 각막을 절제하였고, 급속 냉동하였고 조직학적 관찰을 위해 준비하였다.
- <293> 결과
- <294> 사진을 찍었고 정량 이미지 분석을 실시하였다. 도 11에 나타난 바와 같이 시각적 관찰 및 상처 치유 과정의 예비 분석은 접착 필름의 존재가 재-상피화 과정을 느리게 한다는 것을 시사하지만, 그러나, 결국은 재-상피화가 일어난다. 키토산과 결합하는 염료를 사용하는 조직학적 관찰은 도 12에 나타난 바와 같이 상피 세포가 본 발명의 접착 필름 위로 전진한다는 것으로 나타났다. 뜯어진 필름 잔여물로 인한 눈에 보이는 눈물점 폐쇄(punctual occlusion)는 전혀 없었다.
- <295> 결론
- <296> 국소 필름은 어떠한 독성 또는 염증 효과도 나타나지 않았으나, 재-상피화 과정을 느려지게 하는 듯하다. 이러한 보호적 커버링이 그 동안 진통 효과를 제공할 수 있는 경우라면 지연되는 재-상피화 과정에도 불구하고 임상적 이점을 얻을 것이다. 대안적으로, 진통제 및/또는 상피/기질 성장 촉진제를 송달하는 수단을 제공할 수 있다. 증거들은 잔류 필름이 8일까지 기질에 접촉되어 있음을 보여주며, 이것은 지속 약물 송달을 위한 신규한 수단을 제공할 것이다.
- <297> 실시예 15
- <298> 약물 방출 모델
- <299> 이 실시예는 키토산 분자 자체에 대한 약제학적 제제의 공유 결합 및 표적 조직 기체에 대한 후속 접착을 통해 변형 및 처리된 키토산 물질이 약물 송달 매트릭스로서 작용하는 능력을 평가하도록 설계하였다. 약제학적 제제는 결합된 채로 남아있거나 또는 가수분해 또는 효소 활성화에 의해 절단될 수 있다.
- <300> 절차
- <301> 효소적으로 절단가능한 연결기를 통해 백본에 부착된 단실 기를 사용하여 모조 약물(pseudo drug)의 효소 절단을 입증하였다. 하기 도식에서, 단순 아미드는 엘라스타아제에 의한 절단의 현명한 표적이다. 이 실시예는 백본으로서 콜라겐을 사용하여 완성하였다. 나프탈아미드 광화학을 이용하여 연결기를 콜라겐에 공유 결합하였다.
- <302> 콜라겐을 PBS, pH 7.4 중에 현탁하였고 10 U/mL 엘라스타아제의 존재 하에 배양하였다. 4 시간 후에, 콜라겐을

원심분리하고 제거하고 방출된 모조 약물을 상청액 중의 형광에 의해서 측정하였다.



결과

이 실시예의 결과를 도 13에 나타내었다. 효소의 부재시, 형광은 373 ± 225 이었고, 효소의 존재시 형광은 1767 ± 305 이었으며, 이는 효소에 의한 모조 약물의 방출을 나타낸다.

결론

이 실시예는 절단가능한 연결자를 사용하여 생물학적 거대분자로부터 약제학적 제제의 지속 방출을 달성하는 컨셉을 분명하게 입증한다. 이러한 입증은 콜라겐 모델로부터의 모조 약물의 효소-의존성 방출을 설명한 것이지만, 유사한 화학이 본 발명의 물질로부터 약제학적 제제를 송달하는 데에도 사용될 수 있다.

실시예 16

항미생물 특성의 입증

이 실시예는 변형 및 처리된 키토산 제형의 항미생물 특성을 평가하기 위하여 설계하였고 실시예 1의 물질을 사용하였다.

절차

유기체의 0.5 맥팔랜드 표준 접종원(McFarland standard inoculum)을 사용하여 레멜 면양 혈액 한천(Remel Sheep Blood agar) 또는 레멜 초콜렛 한천 플레이트(유기체에 따라) 상에 성장 띠(lawn of growth)를 제조하였다. 화합물의 50 μ l 방울을 플레이트의 중간에 놓았다. 플레이트를 36.5°C 및 6.5% CO₂에서 배양하였고 24 시간 및 48 시간에 성장의 억제를 관찰하였다. 레멜 면양 혈액 한천 또는 레멜 초콜렛 한천 플레이트 상에 50 μ l 방울을 접종하여 화합물의 멸균성에 대해 확인하였다. 각 플레이트에 염수 방울을 놓아서 시험 절차의 음성 대조구를 실시하였다.

결과

화합물 방울 바로 밑에서는 성장의 뚜렷한 억제가 있었으나 인접 영역에는 하기 유기체가 있었다:

표피 포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*)

황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)

헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)

대장균(*Escherichia coli*)

2가지 유기체는 눈으로 보이는 억제가 없었다. 억제가 있을 수 있으나 이러한 방법으로는 관찰할 수 없었다:

엔테로코구스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*)

- <322> 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*).
- <323> 화합물의 멸균성을 확인하는 데 사용된 플레이트에서는 성장의 증거가 없었으며, 플레이트의 음성 대조구 영역은 예상한 대로였다.
- <324> 결론
- <325> 문헌은 천연 키토산이 다양한 미생물 유기체에 대해 항미생물 특성을 나타낸다고 보고하고 있다. 이 실험은 본 발명의 변형 및 처리된 키토산이 적어도 소정 미생물 유기체에 대한 항미생물 특성을 유지함을 확인한다.
- <326> 실시예 17
- <327> 항진균 특성의 입증
- <328> 이 실시예는 변형 및 처리된 키토산 제형의 항진균 특성을 평가하기 위하여 설계하였고 실시예 1의 물질을 사용하였다.
- <329> 절차
- <330> 새브 텍스 한천(Sab Dex agar) 상에 유기체의 0.5 맥팔랜드 표준 혼탁 론(turbidity lawn)을 생성하여 10 mg/mL의 실시예 1의 재료의 항진균 특성을 시험하였다. 한 방울의 화합물을 이 유기체 론의 중앙에 놓았고 잠재적인 항진균 활성을 관찰하였다. 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 및 아스페르길루스 속(*Aspergillus sp.*)을 포함하는 5가지 상이한 효모 및 진균 유기체를 시험하였다.
- <331> 결과
- <332> 시험 전에, 모든 효모 및 진균 유기체를 새브 텍스 한천 배지에 무성하게 성장시켰다. 화합물 방울 바로 밑에서는 성장의 뚜렷한 억제제가 있었으나 인접 영역에는 하기 유기체가 있었다:
- <333> 칸디다 크루세이
- <334> 칸디다 파라프실로시스
- <335> 하기는 시험 화합물 방울의 중간 부분 바로 아래에서 성장의 일부 억제제가 나타났다.
- <336> 칸디다 알비칸스
- <337> 칸디다 글라브라타
- <338> 아스페르길루스 속
- <339> 결론
- <340> 실시예 1의 물질은 시험된 진균 유기체 모두에서 어느 정도의 접촉-의존성 항진균 특성을 나타내었다. 아마도 가장 중요한 것은, 진균 성장의 촉진은 어떠한 경우에도 관찰되지 않았다는 점이다. 이러한 발견은 제안된 의학적 용도의 관점에서 고무적이며, 진균 증식을 촉진하기보다는 오히려 방해한다는 것이 중요할 것이다.
- <341> 특정 약물을 위한 안 송달 조성물 및 방법
- <342> 본 발명은 또한 키토산 매트릭스 및 약제학적 유효량의 안 약물(ocular drug)을 포함하는 안 약물 송달 조성물에 관한 것이다. 안 약물은 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물, 또는 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, 조성물은 약제학적 유효량의 안 약물을 일정기간에 걸쳐 방출하도록 적합화된다. 키토산 매트릭스는 처리된 키토산, 처리 및 변형된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하며, 처리된 키토산은 비처리 키토산보다 더 작은 겔보기 분자량 및 더 큰 조직 접합력을 가진다. 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 1일 내지 약 1년 사이이다. 소정 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 약 1 개월 내지 약 6개월 사이이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 약 1 개월 내지 약 4 개월 사이이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 3개월이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 1개월이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그

혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 2개월이다. 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 약 0.5 시간 내지 약 36시간 사이이다. 소정 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 약 1시간 내지 약 36시간이다. 다른 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 4시간이다. 다른 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 8시간이다. 다른 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 16시간이다.

<343> 본 발명은 또한 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 본 발명의 안 약물 소달 조성물을 주사를 통해 사람을 포함하는 동물의 눈에 투여하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 본 발명의 안 약물 소달 조성물을 국소 투여를 통해 투여하는 방법에 관한 것이다.

<344> 본 발명은 또한 안 질환 또는 상태를 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다. 조성물은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물을 포함하며, 처리된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 조성물은 또한 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물, 또는 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물, 또는 하나 이상의 이러한 치료학적 제제들의 혼합물 또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 치료학적 제제를 포함한다. 키토산 조성물은 치료학적으로 유효량의 치료학적 제제를 일정 기간에 걸쳐 방출하도록 적합화된다. 소정 실시형태에서, 조성물은 또한 방부제를 포함한다. 방부제는 일반적으로 벤즈알코늄 클로라이드, 클로르헥시딘, PHMB(폴리헥사메틸렌 바이구아나이드), 메틸 및 에틸 파라벤, 헥세티딘, 클로라이트 성분, 예를 들어, 안정화된 이산화염소, 금속 클로라이트 등 및 기타 안과적으로 허용가능한 방부제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, 농도 범위는 조성물의 약 0.00001% 내지 약 0.05% 또는 약 0.1% (w/v)이다. 다른 실시형태에서, 조성물은 또한 부형제를 포함한다. 부형제는 일반적으로 안과적으로 상용할 수 있는(compatible) 부형제이다. 다른 실시형태에서, 조성물은 또한 완충제를 포함한다. 완충제는 일반적으로 아세트이트 완충제, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 보레이트 완충제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 조성물은 또한 비히클을 포함한다. 비히클은 일반적으로 안과적으로 상용할 수 있는 비히클이다. 소정 실시형태에서, 치료학적 제제는 키토산의 부위에 공유결합한다. 다른 실시형태에서, 치료학적 제제는 키토산의 부위에 연결자를 통해 공유결합한다.

<345> 본 발명은 또한 안 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물과 치료학적으로 유효량의 약제학적 제제를 접촉시켜 약제학적 조성물을 형성하는 단계를 포함한다. 약제학적 조성물은 특정 응용에 따라 균일하거나 균일하지 않을 수 있다. 각각의 처리된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타내도록 설계되었다. 약제학적 제제는 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물, 또는 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 또한 방부제를 포함할 수 있다. 방부제는 일반적으로 벤즈알코늄 클로라이드, 클로르헥시딘, PHMB(폴리헥사메틸렌 바이구아나이드), 메틸 및 에틸 파라벤, 헥세티딘, 클로라이트 성분, 예를 들어, 안정화된 이산화염소, 금속 클로라이트 등 및 기타 안과적으로 허용가능한 방부제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, 농도 범위는 조성물의 약 0.00001% 내지 약 0.05% 또는 약 0.1% (w/v)이다. 소정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 또한 부형제를 포함한다. 부형제는 일반적으로 안과적으로 상용할 수 있는 부형제이다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 또한 완충제를 포함한다. 소정 실시형태에서, 완충제는 일반적으로 아세트이트 완충제, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 보레이트 완충제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 또한 비히클을 포함한다. 비히클은 일반적으로 안과적으로 상용할 수 있는 비히클이다. 소정 실시형태에서, 치료학적 제제는 키토산의 부위에 공유결합한다. 다른 실시형태에서, 치료학적 제제는 키토산의 부위에 연결자를 통해 공유결합한다. 본 발명은 또한 이 문단에서 설명한 방법에 의해 제조된 약제학적 조성물을 제공한다.

<346> 본 발명은 또한 안 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물과 치료학적으로 유효량의 약제학적 제제를, 키토산의 부위에 제제를 공유 결합시키는 조건 하에 접촉시키는 단계를 포함한다. 각각의 처리된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 약제학적 제제는 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물, 또는 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 또한 방부제를 포함할 수 있다. 방부제는 일반적으로 벤즈알코늄 클로라이드, 클로르헥시딘, PHMB(폴리헥사메틸렌 바이구아나이드), 메틸 및 에틸 파라벤, 헥세티딘, 클로라이트 성분, 예를 들어, 안정화된 이산화염소, 금속 클로라이트 등 및 기타 안과적으로 허용가능한 방부제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, 농도 범위는 조성물의 약 0.00001% 내지 약 0.05% 또는 약 0.1% (w/v)이다. 소정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 또한 부형제를 포함한다. 부형제는 일반적으로 안과적으로 상용할 수 있는 부형제이다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 또한 완충제를 포함한다. 소정 실시형태에서, 완충제는 일반적으로 아세트이트 완충제, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 보레이트 완충제 및 그 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 또한 비히클을 포함한다. 비히클은 일반적으로 안과적으로 상용할 수 있는 비히클이다. 소정 실시형태에서, 치료학적 제제는 키토산의 부위에 공유결합한다. 다른 실시형태에서, 치료학적 제제는 키토산의 부위에 연결자를 통해 공유결합한다. 본 발명은 또한 이 문단에서 설명한 방법에 의해 제조된 약제학적 조성물을 제공한다.

<347> 본 발명은 또한 안 질환 또는 상태를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 이 방법은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하는 키토산 조성물 및 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물, 또는 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물의 약제학적 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 각각의 처리된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 약제학적 조성물은 약제학적 유효량의 약제학적 제제를 일정기간에 걸쳐 방출하도록 적합화되며, 약제학적 유효량은 안 질환 또는 상태를 치료 또는 치료하거나 안 질환 또는 상태의 증상을 개선하도록 적합화된다.

<348> 본 발명은 또한 키토산 매트릭스 및 약제학적 유효량의 안 약물을 포함하는 안 약물 송달 조성물을 제공한다. 안 약물은 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물, 또는 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 키토산 매트릭스는 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하며, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 안 약물 송달 조성물은 약제학적 유효량의 안 약물을 일정기간에 걸쳐 방출하도록 적합화된다. 소정 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 1일 내지 약 1년 사이이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 약 1 개월 내지 약 6개월 사이이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 약 1 개월 내지 약 4개월 사이이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 3개월이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 2개월이다. 다른 실시형태에서, 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 1개월이다. 다른 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 약 0.5시간 내지 약 36시간 사이이다. 다른 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 약 1시간 내지 약 36시간이다. 다른 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 16시간이다. 다른 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 8시간이다. 다른 실시형태에서, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하는 조성물에서 방출 기간은 적어도 4시간이다.

<349> 본 발명은 또한 안 약물 송달 조성물을 투여하는 방법을 제공한다. 이 방법은 유효량의 조성물을 주사를 통해

사람을 포함하는 동물의 눈, 또는 눈을 둘러싼 조직에 투여하는 단계를 포함한다. 조성물은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물, 및 프로스타글란딘, 프로스타마이드 또는 그 혼합물을 포함하며, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다.

<350> 본 발명은 또한 안 약물 송달 조성물을 투여하는 방법을 제공한다. 이 방법은 유효량의 조성물을 사람을 포함하는 동물의 눈에 국소적으로 투여하는 단계를 포함한다. 조성물은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물, 및 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물을 포함하며, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다.

<351> 본 발명은 또한 안 질환 또는 상태를 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다. 조성물은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물, 및 프로스타글란딘, 프로스타마이드, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 및 코르티코스테로이드, 및 그 혼합물, 유도체, 염 및 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택된 치료학적 제제를 포함하며, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다.

<352> 본 발명은 또한 안질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 변형된 키토산과 치료학적 제제를 접촉시키는 단계를 포함하며, 치료학적 제제는 프로스타글란딘, 프로스타마이드, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 및 코르티코스테로이드, 및 그 혼합물, 유도체, 염 및 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<353> 본 발명은 안 질환 또는 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물, 및 치료학적 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 환자의 눈에 투여하는 단계를 포함한다. 치료학적 제제는 프로스타글란딘, 프로스타마이드, 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 및 코르티코스테로이드, 및 그 혼합물, 유도체, 염 및 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택되며, 안 질환 또는 상태를 치료한다. 각각의 처리된 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타내도록 설계되었다.

<354> 본 발명은 키토산 매트릭스 및 약제학적 유효량의 안 약물을 포함하는 안 약물 송달 조성물을 제공한다. 안 약물은 비-스테로이드성 항염제(NSAID) 또는 NSAID의 혼합물 또는 코르티코스테로이드, 또는 코르티코스테로이드의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 키토산 매트릭스는 처리된 키토산, 변형된 키토산, 변형 및 처리된 키토산, 또는 그 혼합물을 포함하며, 각각의 키토산은 상응하는 비처리 키토산과 비교하여 화학적, 물리적 및/또는 성능 특성 또는 특징에서 변화를 나타낸다. 본 조성물은 키토산 매트릭스가 없는 조성물과 비교하여 더 적은 약제학적 유효량에서 동등한 치료학적 활성을 제공한다. 키토산 매트릭스를 포함하는 본 발명의 조성물은 동등한 조성물 중 약물 농도에서 키토산 매트릭스가 없는 조성물과 비교하여 조직 약물 농도의 증가가 가능하다. 따라서, 본 발명의 조성물은 키토산 매트릭스가 없는 조성물과 비교하여 더 적은 약제학적 유효량의 약물을 제공한다. 소정 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 10% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 20% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 30% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 40% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 50% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 60% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 70% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 80% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 90% 미만이다. 다른 실시형태에서, 더 적은 약제학적 유효량은 키토산 매트릭스가 없는 비교 조성물 중 약물의 양의 적어도 95% 미만이다.

<355> 약제학적 조성물은 안과적으로 허용가능한 것이 유리하며 안과용 조성물에 유용한 하나 이상의 통상의 부형제를 포함할 수 있다. 본 조성물은 바람직하게는 주요량의 액체 물을 포함한다. 본 조성물은 예를 들어, 눈에 사용하기 전에, 멸균될 수 있으며 멸균되는 것이 바람직하다.

<356> 본 조성물은 바람직하게는, 조성물의 pH를 조절 및/또는 유지하는 데 효과적인 양의 적어도 하나의 완충 성분

및/또는 조성물의 장성(tonicity) 또는 삼투성을 조절 및/또는 유지하는 데 효과적인 양의 적어도 하나의 장성 조절 성분을 포함한다; 바람직하게는 장성 및/또는 삼투성은 실질적으로 유리체액에 대해 등장성이다. 더욱 바람직하게는, 본 조성물은 완충 성분 및 장성조절 성분을 둘 모두 포함한다.

<357> 완충 성분 및 장성조절 성분은 통상적으로 안과 분야에 잘 알려진 것들 중에 선택할 수 있다. 이러한 완충 성분의 예에는 아세테이트 완충제, 시트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 보레이트 완충제 등 및 그 혼합물이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 포스페이트 완충제가 특히 유용하다. 유용한 장성조절 성분에는 염, 특히, 염화나트륨, 염화칼륨, 만니톨 및 다른 당 알코올, 및 다른 적합한 안과적으로 허용가능한 장성조절 성분 및 그 혼합물이 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

<358> 사용되는 완충 성분의 양은 바람직하게는 조성물의 pH를 약 6 내지 약 8의 범위, 더 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5로 유지하기에 충분한 양이다. 사용되는 장성조절 성분의 양은 바람직하게는 본 조성물의 삼투성을 약 200 내지 약 400 mOsmol/kg, 더 바람직하게는 약 250 내지 약 350 mOsmol/kg 범위로 제공하는 데 충분한 양이다. 유리하게, 본 조성물은 실질적으로 등장성이다.

<359> 본 조성물은 하나 이상의 다른 성분들을 하나 이상의 유용한 특성 및/또는 이점을 본 발명에 제공하기에 충분한 양으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 조성물은 첨가된 방부제 성분이 실질적으로 없을 수 있지만, 다른 실시 형태에서는, 본 조성물은 유효량의 방부제 성분을 포함하며, 바람직하게는 이러한 성분들은 조성물이 배치되는 후안부 조직에서 벤질 알코올보다 더 적합성이 있다. 이러한 방부제 성분의 예에는 벤즈알코늄 클로라이드, 클로르헥시딘, PHMB(폴리헥사메틸렌 바이구아아나이드), 메틸 및 에틸 파라벤, 헥세티딘, 클로라이드 성분, 예를 들어, 안정화된 이산화염소, 금속 클로라이드 등 및 기타 안과적으로 허용가능한 방부제 등 및 그 혼합물이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 존재한다면, 방부제 성분의 농도는 조성물을 방부보존하기에 효과적인 농도이며, 흔히 조성물의 약 0.00001% 내지 약 0.05% 또는 약 0.1% (w/v)이다.

<360> 실시예 18

<361> 시험관내 (In vitro) 각막 보존 모델

<362> 이 실시예는 시험관내 래빗 눈 모델의 각막 표면 상의 보존의 동력학을 결정하도록 설계하였고, 실시예 1의 물질을 사용하였다. 이 실시예는, 궁극적으로, 제조된 키토산 물질 내에서 유리 약물을 혼합하고 및 이어서 표적 조직 기재에 접촉하여 확산을 통해 조직 내로 약물을 용리하는 것을 통해, 변형 및 처리된 키토산 물질이 약물 전달 매트릭스로서 작용하는 능력을 평가하도록 설계하였다.

<363> 절차

<364> 채중이 5 내지 6 파운드인 뉴질랜드 화이트 래빗 4마리를 이 연구에 사용하였다. 래빗의 눈은 무작위로 선택했다. 1 방울의 멸균 BBS를 대조구 눈에 넣고 20 μ l의 실시예 1의 물질을, 5-50 μ l 피펫을 사용하여 실험 눈에 적용하였다. 2시간에 각막을 수거하였다. 수거시 래빗을 40%/60% 산소/공기 혼합물 중의 2.0 내지 3.5%의 아이소플루오레인으로 마취시켰고, 그 후 안락사시켰다. 수거 즉시 분석을 위한 시간을 주기 위하여 실험을 1시간 간격으로 중단하였다. 각막을 칼코플루오르로 염색하고 형광 현미경을 사용하여 지형적으로 평가하여 변형된 키토산 물질의 보존을 평가하였다. 각각의 각막에 대해 대표적인 이미지를 캡처하여 저장하였다.

<365> 결과

<366> 형광 현미경을 사용한 각막 표면의 지형적 평가로 실시예 1의 물질이 적용 2시간 후에 계속 존재함을 확인하였다. 실험 눈에서 관찰된 양성 칼코플루오르 염색 대 대조구 눈에서 관찰된 비-특이적인 염색을 관찰한 도 14를 참조한다.

<367> 결론

<368> 실시예 2의 물질은 적용이 쉽고 시험관내 조건 하에 최대 2시간동안 접촉된 채로 남아있다. 이러한 데이터는 이들 제형이 지속적인 또는 개선된 약물 전달을 관리하는 또는 안구건조증을 위한 유용한 매트릭스를 제공함을 시사한다. 약 10 분 내지 약 30일 사이의 기간 동안 각막에 접촉되는 키토산 제형을 제조할 수 있다.

<369> 변형 키토산/케토를락 트로메타민(KT) 실험 섹션

<370> 실시예 19

<371> 변형 키토산/KT 생성물의 제조

- <372> 이 실시예는 KT 송달 시스템으로서 사용하기 위해 본 발명의 키토산 조성물 중에 케톨락 트로메타민(KT)을 혼합하는 것을 설명한다.
- <373> 우선, PBS로 고체 물질을 희석하여 냉동 건조된 실시예 1의 물질로부터 10 mg/mL 용액을 제조하였다. 얻어진 용액을 스팀 멸균하였다. 다음으로, KT 용액을 멸균 염수 중의 0.285%(w/v)의 농도로 제조하였고 시린지 구동 필터 멸균 카트리지(Millex-GC)를 사용하여 멸균하였다. 마지막으로, 멸균 바이알 내의 변형된 키토산 최종 농도가 3 mg/mL가 되고 KT 최종 농도가 0.2%가 되도록 일정 비율로 변형된 키토산 용액 및 KT 용액을 혼합하였다. 그 다음, 혼합 물질을 리스트 액션 셰이커(wrist action shaker)에 넣고 1시간동안 잘 혼합하였다. 그 다음, 최종 제형의 pH를 측정하였다.
- <374> 실시예 20
- <375> 변형된 키토산/KT 생성물로부터의 KT 약물 송달
- <376> 이 실시예는 시편관내 래빗 모델에서 현재 시판중인 KT 제형(알러간의 Acular LS®)의 안 송달 성능을 본 발명의 독점적인 송달 매트릭스와 비교하도록 설계하였다. 이 연구는 실시예 19의 물질을 사용하였다.
- <377> 절차
- <378> 체중이 5 내지 7 파운드인 9마리의 뉴질랜드 화이트 래빗을 이 연구에 사용하였다. 래빗 및 래빗의 눈은 다양한 처리 그룹들(하기)에 대해 무작위로 선택하였다. 적당한 화합물을 실험 눈에 점적하였고; 다른쪽 눈은 처치하지 않은 채로 두었다. 점적 후에, 처음 15 내지 20분 동안은 계속, 그리고 그 후에 수집시까지 매 15분마다 래빗을 모니터링하였다. 안방수의 수집 전에 40%/60% 산소/공기 혼합물 중의 2.0 내지 3.5%의 아이소플루오레인을 사용하여 래빗을 마취시켰다. 이러한 유형의 약물 송달 응용에 대한 문헌의 개관은 국소 안 적용한 다음, 적용후 다양한 시점에서 각막 안방수 중의 약물 레벨을 정량하는 것을 통해 제형을 평가하는 것이 통상적인 관례임을 보여준다. 그러므로, 적당한 시점에 100 μ L의 안방수를 각각의 눈으로부터 수집하였고 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다.
- <379> 그룹 1은 3마리의 래빗으로 구성되었다. 각 래빗의 실험 눈을 3 mg/mL의 실시예 19의 물질 50 μ L로 처치하였다. 다른쪽 눈은 처치하지 않은 채로 두었다. 처치된 눈으로부터 하기 시점에 안방수를 수집하였다: 1시간 및 4시간. 필요하다면, 1시간에 래빗 한마리의 처치하지 않은 눈으로부터 안방수를 수집하여 분석용 백그라운드 대조구로서 사용하였다.
- <380> 그룹 2는 2마리의 래빗으로 구성되었다. 각 래빗의 실험 눈을 50 μ L의 Acular LS®(추천 투여량)으로 처치하였다. 다른쪽 눈은 처치하지 않은 채로 두었다. 처치된 눈으로부터 하기 시점에 안방수를 수집하였다: 1시간 및 4시간.
- <381> 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 안방수 샘플을 분석하였다. 분석 전에 샘플을 메탄올로 1:1로 희석하였고, 1시간 동안 냉장하고 원심분리하여 임의의 생물학적 간섭물질들을 제거하였다. 모든 샘플 및 표준을 이 샘플 준비 단계에 따라 처리하였다. 분석물 상태를 평가하였고 이 분석에 허용가능한 것으로 판단되었다. 표준 C18 분석 컬럼, 메탄올/물/아세트산(55/44/1) 및 1.0 mL/분 유동 속도로 구성된 이동상을 사용하여 HPLC 분리를 실시하였다. 검출 및 정량은 254 nm에서 UV-가시광 검출기를 사용하여 이루어졌다.
- <382> 결과
- <383> 도 15는 이 연구로부터 얻어진 데이터를 보여준다. 현재 시판중인 Acular LS®는 활성 약물을 0.4%의 농도로 포함하며 본 발명의 제형은 0.2%의 농도로 포함한다. 50% 더 적은 활성 약물에도 불구하고, 적용후 1시간 및 4시간의 시점에서 본 발명의 제형으로부터의 송달은 현재 시판중인 제품의 송달보다 크다. 본 발명의 제형에 의해 송달되는 KT 농도는 각각 1시간 및 4시간에서 Acular LS®의 136% 및 157%였다.
- <384> 결론
- <385> 실시예 19의 물질은 눈으로의 KT의 약물 송달을 개선하는 수단으로서 매우 전망이 있으며, 활성 약물 성분(API)의 상당한 감소를 가능하게 하지만 탁월하지는 않더라도 필적할만한 송달을 얻는다.
- <386> 본 명세서에 기재된 변형된 키토산, KT 조성물은 염증 및 감염과 같은 안 질환을 치료하는 데 성공적으로 사용할 수 있다. 치료학적으로 효과적인 변형된 키토산 제형은 또한 다음과 같은 다른 NSAID(제한되지 않음)로 제조할 수 있다: (1) 살리실레이트, 예를 들어, 아세틸살리실산, 아목시프린, 베노릴레이트(Benorilate), 콜린 마그네슘 살리실레이트, 다이플루니살, 파이스라민(Faislamine), 메틸 살리실레이트, 마그네슘 살리실레이트, 살

리실 살리실레이트(살살레이트); (2) 아릴알칸산, 예를 들어, 디클로페낙, 아세클로페낙, 아세메타신, 브로페낙, 에토돌락, 인도메타신, 나부메톤, 술린닥, 톨메틴, (3) 2-아릴프로피온산 (프로펜), 예를 들어, 이부프로펜, 카프로펜, 펜부펜, 페노프로펜, 플루비프로펜, 케토프로펜, 록소프로펜, 나프록센, 옥사프로진, 티아프로펜산, 수프로펜, (4) N-아릴안트라닐산 (페남산), 예를 들어, 메페남산, 메클로페남산; (5) 피라졸리딘 유도체, 예를 들어, 페닐부타존, 아자프로파존, 메타미졸, 옥시펜부타존, 실핀피라존; (6) 옥시카ם, 예를 들어, 피록시카ם, 로르녹시카ם, 펠록시카ם 및 테녹시카ם; (7) COX-2 억제제 예를 들어, 셀레코시브, 에토리코시브, 루미라코시브, 파레코시브, 로페코시브, 및 발데코시브; (8) 설폰아닐리드 예를 들어 니메실리드, 및 기타 NSAID, 예를 들어, 리코켈론 및 오메가-3 지방산.

<387> 변형된 키토산/프레드니솔론 아세테이트 실험 섹션

<388> 실시예 21

<389> 변형된 키토산/PA 생성물의 제조

<390> 이 실시예는 PA 송달 시스템으로서 사용하기 위해 본 발명의 변형된 키토산 조성물 중에 프레드니솔론 아세테이트(PA)를 혼합하는 것을 설명한다.

<391> 절차

<392> 이러한 특정한 응용을 위해 전술한 재구성 단계에서 제형 중에 약물을 혼합하였다. 이것은 본 발명의 제형과 함께 약물 제품의 멸균을 용이하게 한다. 냉동 건조된 실시예 4의 물질을 칭량하고 멸균 염수로 희석하여 변형된 키토산 최종 농도가 3 mg/mL가 되도록 하였다. PA를 첨가하기 전에 변형된 키토산을 하룻밤 용매화되게 두었다. 오토클레이빙하기 전에, 변형된 키토산/염수 혼합물에 첨가시 원하는 최종 약물 농도(0.05%)를 얻도록 약물을 칭량하였다. 오토클레이빙 전에 혼합물을 가열하여 활성 약물의 용해를 도울 수 있다. 그리고 나서, 제형을 오토클레이빙한 다음 하룻밤 교반하였다. 가온하면서 또는 냉각 후에 멸균된 물질을 적당한 희석제로 희석할 수 있다. 이러한 희석제는 약물 송달에 사용되는 임의의 캐리어를 포함한다.

<393> 실시예 22

<394> 변형된 키토산/PA 생성물을 제조하는 대안적인 방법

<395> 이 실시예는 공용매로서 DMSO를 사용하는 PA 송달 시스템으로서 사용하기 위해 본 발명의 변형된 키토산 조성물 중에 프레드니솔론 아세테이트(PA)를 혼합하는 대안적인 절차를 설명한다.

<396> 절차

<397> 실시예 4의 물질의 10 mg/mL 변형된 키토산 용액 2.7 mL를 20 mL 바이알에 넣었다. DMSO 중의 2% PA 용액 225 μ l를 바이알에 적가하였다. 그 다음, 1 mL의 DI수를 바이알에 첨가하였다. 그 다음, 500 μ l의 메탄올을 바이알에 적가하였다. 얻어진 용액을 둥근 바닥 플라스크로 옮기고 회전증발시켜 하이드로젤을 생성하였다. 그 다음, 하이드로젤을 플라스크에서 긁어내어 눈금 실린더에 넣고 원하는 부피(실시예에서는 9 mL)로 재구성하였다. 재구성된 물질을 오토클레이브에서 멸균하였다.

<398> 실시예 23

<399> 변형 키토산/PA 생성물을 제조하는 대안적인 방법

<400> 이 실시예는 공용매로서 에틸아세테이트를 사용하는 PA 송달 시스템으로서 사용하기 위해 본 발명의 변형된 키토산 조성물 중에 프레드니솔론 아세테이트(PA)를 혼합하는 대안적인 절차를 설명한다.

<401> PA를 에틸 아세테이트 중에 용해시켜 원하는 PA 농도를 갖는 PA 에틸 아세테이트 용액을 형성하였다. 원하는 양의 실시예 4의 물질의 10 mg/mL 변형된 키토산 용액을 20 mL 바이알에 넣었다. PA 에틸 아세테이트 용액을 바이알에 첨가하여 PA 농도를 0.05%로 만들었다. 얻어진 용액을 약 45°C까지 부드럽게 가열하여 에틸 아세테이트를 증발시켰다. 선택적으로, 부드러운 N₂의 흐름을 용액의 표면으로 향하게 하여 잔류 에틸 아세테이트의 제거 속도를 높이거나 임의의 용해된 에틸 아세테이트의 제거를 촉진할 수 있다.

<402> 실시예 24

<403> 변형된 키토산/PA 생성물에 대한 PA 약물 송달

<404> 이 실시예는 시험관내 래빗 모델에서 현재 시판중인 프레드니솔론 아세테이트(PA) 제형(알러간의 Pred Forte

®)의 안 송달 성능을 본 발명의 독점적인 송달 매트릭스와 비교하도록 설계하였다. 이 연구는 실시예 21의 물질을 사용하였다.

<405> 절차

<406> 체중이 5 내지 8 파운드인 12마리의 뉴질랜드 화이트 래빗을 다양한 처치 그룹(하기 참조)으로 무작위로 선택하였다. 적절한 화합물을 왼쪽 눈에 점적하였고; 오른쪽 눈은 처리하지 않은 채로 두었다. 점적 후에, 처음 15 내지 20분 동안은 계속, 그리고 그 후에 수집시까지 매 15분마다 래빗을 모니터링하였다. 안방수의 수집 전에 40%/60% 산소/공기 혼합물 중의 2.0 내지 3.5%의 아이소플루오레인을 사용하여 래빗을 마취시켰다. 이러한 유형의 약물 송달 응용에 대한 문헌의 개관은 국소 안 적용한 다음, 적용후 다양한 시점에서 각막 안방수 중의 약물 레벨을 정량하는 것을 통해 제형을 평가하는 것이 통상적인 관례임을 보여준다. 그러므로, 적당한 시점에 100 μ l의 안방수를 각각의 눈으로부터 수집하였고 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

<407> 그룹 1은 3마리의 래빗으로 구성되었다. 각 래빗의 왼쪽 눈을 35 μ l의 Pred Forte®(추천 투여량)으로 처치하였다. 오른쪽 눈은 처리하지 않은 채로 두었다. 4시간 시점에서 안방수를 양쪽 눈으로부터 수집하였다.

<408> 그룹 2는 3마리의 래빗으로 구성되었다. 각 래빗의 왼쪽 눈을 7.2 mg/mL의 실시예 21의 물질 35 μ l로 처치하였다. 오른쪽 눈은 처리하지 않은 채로 두었다. 4시간 시점에서 안방수를 양쪽 눈으로부터 수집하였다.

<409> 그룹 3은 3마리의 래빗으로 구성되었다. 각 래빗의 왼쪽 눈을 35 μ l의 Pred Forte®(추천 투여량)으로 처치하였다. 오른쪽 눈은 처리하지 않은 채로 두었다. 1시간 시점에서 안방수를 양쪽 눈으로부터 수집하였다.

<410> 그룹 4는 3마리의 래빗으로 구성되었다. 각 래빗의 왼쪽 눈을 7.2 mg/mL의 실시예 21의 물질 35 μ l로 처치하였다. 오른쪽 눈은 처리하지 않은 채로 두었다. 1시간 시점에서 안방수를 양쪽 눈으로부터 수집하였다.

<411> 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 안방수 샘플을 분석하였다. 분석 전에 샘플을 메탄올로 1:1로 희석하였고, 1시간 동안 냉장하고 원심분리하여 임의의 생물학적 간섭물질들을 제거하였다. 모든 샘플 및 표준을 이 샘플 준비 단계에 따라 처리하였다. 분석물 상태를 평가하였고 이 분석에 허용가능한 것으로 판단되었다. 표준 C18 분석 컬럼, IPA/물/H₃PO₄(25/74.8/0.2) 및 1.0 mL/분 유동 속도로 구성된 이동상을 사용하여 HPLC 분리를 실시하였다. 검출 및 정량은 254 nm에서 UV-가시광 검출기를 사용하여 이루어졌다.

<412> 결과

<413> 도 16은 이 연구로부터 얻은 데이터를 요약한 막대 그래프를 포함한다. 현재 시판중인 Pred Forte®은 01.% 농도로 활성 약물을 함유하며 본 발명의 조성물은 0.05%로 함유한다. 활성 약물이 20배 더 적음에도 불구하고, 적용후 1시간 시점에서 본 발명의 제형으로부터의 송달은 현재 시판중인 제품의 송달보다 크며(Pred Forte®의 138%), 4시간 시점에서는 단지 약간만 적다(Pred Forte®의 71%).

<414> 결론

<415> 실시예 21의 물질은 눈으로의 PA의 약물 송달을 개선하는 수단으로서 매우 전망이 있으며, 활성 약물 성분(API)의 상당한 감소를 가능하게 하지만 탁월하지는 않더라도 필적할만한 송달을 얻는다.

<416> 본 명세서에 기재된 변형된 키토산, 프레드니솔론 아세테이트 조성물은 염증 및 감염과 같은 안 질환을 치료하는 데 성공적으로 사용할 수 있다. 치료학적으로 효과적인 변형된 키토산 제형은 또한 다음과 같은 다른 스테로이드(제한되지 않음)로 제조할 수 있다: 21-아세톡시프레드네놀론, 알클로메타손, 알제스톤, 암시노나이드, 베클로메타손, 베타메타손, 부데소나이드, 클로로프레드니손, 클로베타솔, 클로베타손, 클로코르톨론, 클로프레드놀, 코르티코스테론, 코르티손, 코르티바졸, 데플라자코르트, 데소나이드, 데속시메타손, 텍사메타손, 디플로라손, 디플루코르톨론, 디플루프레드네이트, 에녹솔론, 플루아자코르트, 플루클로로나이드, 플루메타손, 플루니솔리드, 플루오시놀론 아세토나이드, 플루오시노나이드, 플루오코르틴 부틸, 플루오코르톨론, 플루오메톨론, 플루페롤론 아세테이트, 플루프레드니텐 아세테이트, 플루프레드니솔론, 플루란드레놀라이드, 플루티카손 프로피오네이트, 포르모코르탈, 할시노나이드, 할로메타솔 프로피오네이트, 할로메타손, 할로프레돈 아세테이트, 하이드로코르타메이트, 하이드로코르티손, 로데프레드놀 에타보네이트, 마지프레돈, 메드리손, 메프레드니손, 메틸프레드니솔론, 모메타손 푸로에이트, 파라메타손, 프레드니카르베이트, 프레드니솔론, 프레드니솔론 25-다이에틸아미노-아세테이트, 프레드니솔론 소듐 포스페이트, 프레드니손, 프레드니발, 프레드닐리덴, 리멕솔론, 텍스코르톨, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토나이드, 트리암시놀론 베네토나이드, 트리암시놀론 헥사세토나이드, 및 임의의 그 유도체.

- <417> 일 실시형태에서, 코르티손, 텍사메타손, 플루오시놀론, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 및 트리암시놀론 및 그 유도체가 바람직한 스테로이드이다.
- <418> 변형 키토산/비마토프로스트 실험 섹션
- <419> 실시에 25
- <420> 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물의 제조
- <421> 이 실시예는 효소 방출 비마토프로스트 송달 시스템으로서 사용하기 위하여 비마토프로스트를 본 발명의 변형된 키토산 조성물에 공유결합하는 것을 설명한다.
- <422> 절차
- <423> 비마토프로스트의 공유 결합은 2단계로 이루어졌다. 도 17을 참조하여, 첫번째 단계에서는, 키토산 백본에 부착하기에 적합한 분자 구조를 제공하는 테서를 비마토프로스트 분자에 추가하였다. 비마토프로스트를 테서에 결합하여, 효소 가수분해시 변형되지 않은 비마토프로스트의 국부적인 방출을 야기하는 효소적으로 절단가능한 연결을 생성하였다. 도 17을 참조하여, 두번째 단계에서는, 연결자 변형된 비마토프로스트를 실시예 1의 변형된 키토산 물질의 키토산 백본에 결합시켰다. 후속하는 장기간의 송달 기간에 걸친 비마토프로스트의 국부 송달을 위해 공유 결합된, 약물 부하 키토산 물질을 사용할 수 있다.
- <424> 단계 1: 비마토프로스트에 연결자 결합
- <425> 200 mg의 비마토프로스트, 40 mg의 숙신산 무수물, 147 mg의 4-다이메틸아미노피리딘, 74 μ L의 트라이에틸 아민 및 4 mL의 다이클로로메탄을 함께 혼합하여 20분간 실온에서 셰이커에 넣었다. 4 mL의 헥산을 용액에 첨가하여 연결자-변형된 비마토프로스트를 침전시켰다. 침전 후에, 오직 진한 오일형 층만 남을 때까지 용매를 감압 하에 증발시켰다. 10 mL의 0.1M 칼슘 클로라이드(pH=8)를 첨가하였고 용액의 부피를 감압 하에 거의 건조상태까지 감소시켰다. 10 mL의 탈이온(DI)수를 첨가하여 모든 물질을 재용해하였다. 그 다음, 재용해된 샘플을 10 mL 원심분리 바이알에 넣고 1M HCl로 pH4까지 산성화하였다. 생성물이 침전할 때 용액이 유백색으로 변하였다. 10분간 3850 xG에서 원심분리하여 생성물을 수집하였다.
- <426> 단계 2: 변형된 키토산에 결합
- <427> 실시예 1의 물질을 평균 염수로 재구성하여 총 부피가 10 mL인 10 mg/mL 용액을 만들었다. 자석 교반 막대로 교반하면서 0.11 g EDC 및 0.165 g NHS를 용액에 첨가하였다. 단계 1로부터의 연결자-변형 비마토프로스트를 10 mg/mL 변형 키토산 용액에 첨가하였다. 6M NaOH 및/또는 HCl을 사용하여 용액의 pH를 6.5 내지 7 사이의 pH로 조절하였고 pH 조절된 용액을 72시간동안 교반하였다. 그 다음, 6M NaOH를 첨가하여, 얻어진 용액의 pH를 pH 9로 만들어서, 반응을 퀀칭(quenching)하고 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 침전시켰다. 침전된 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물 및 상청액을 50 mL 비이커로 옮겼고, 30 mL의 10% 락트산을 첨가하여 침전물을 재용해시켰다. 6M NaOH를 첨가하여 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 재침전시켰다. 이 단계는 용해된 잔류물을 상청액의 일부로서 폐기하여 제거하도록 설계되었다. 물질을 원심분리 튜브로 옮기고 3850 xG에서 10분간 원심분리하였다. 침전물을 수집하고, 고체 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 투석 튜빙으로 옮기고 변형된 키토산이 용해될 때까지 10% 산에 대하여 투석하였다. 용해된 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 최소 3시간 물에 대해 투석하였다. 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 추가로 2시간 물에 대해 투석하였다. 투석 단계는 과량의 산 및 임의의 결합하지 않은 비마토프로스트/연결자를 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물로부터 제거한다. 투석액의 pH를 pH 중이로 측정하였고 pH를 기록하였다. 그리고 나서, 투석액의 pH가 5.7 내지 6.0 사이가 될 때까지, 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 평균 PBS에 대해 투석하였다. 그 다음, 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 냉동 건조 플라스크로 옮기고 -80°C에서 밤새 냉동하였다. 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 냉동 건조하였다. 냉동 건조된 물질은 보관이 간편하며 원하는 농도로 간단히 재구성된다. 그 다음, 냉동 건조된 생성물을 평균 PBS를 사용하여 원하는 농도로 재구성하고 오토클레이밍하여 평균 생성물을 제공할 수 있다.
- <428> 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물의 IR 분석
- <429> 실시예 1의 변형된 키토산 물질에 대한 비마토프로스트의 공유 결합을 하기 절차에 따라 FTIR로 연구하였다.
- <430> 100 mg의 건조 브롬화칼륨(KBr)을 칭량하였다. 1 mg의 냉동 건조된 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 칭량하였다. 막자와 막자사발을 사용하여 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물 및 KBr을 미세한 입자로 분쇄하였

고, 혼합물을 바닥에서 긁어내고 분쇄를 반복하여 확실히 완전하게 혼합되게 하였다. 혼합물을 80℃ 오븐에 최소 24시간 동안 넣었다. 유압 프레스를 사용하여, 혼합물을 진공 하에 5 분간 총 15,000 파운드의 압력으로 압착하여 반투명 펠렛을 생성하였다. 서모-니콜렛(Thermo-Nicolet) FT-IR 기기를 사용하여 펠렛을 분석하였고, 각 샘플마다 16회의 스캔을 실시하였다.

<431> 이제 도 18을 참조하면, 본 발명의 변형된 키토산 조성물, 순수한 비마토프로스트 및 앞서 제조된 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물의 복합 IR 스펙트럼이 나타나있다. 도면은 순수한 비마토프로스트, 변형된 키토산 매트릭스, 및 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물에 대해 아미드 흡수가 나타난 IR 스펙트럼의 영역을 나타낸다. 변형된 키토산 매트릭스 IR 스펙트럼에서 1540 cm^{-1} 및 1610 cm^{-1} 에 새로운 IR 밴드가 나타나는 것은 비마토프로스트가 변형된 키토산 매트릭스에 결합하였음을 확인시켜준다.

<432> 실시예 26

<433> 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물의 제조방법

<434> 이 실시예는 효소-방출 비마토프로스트 송달 시스템으로서 사용하기 위해 실시예 1의 변형된 키토산 물질에 비마토프로스트를 결합하는 다른 방법을 설명한다. 대안적인 방법은 실시예 25에 주어진 방법보다 더욱 순수한 연결자-비마토프로스트 컨쥬게이트를 제공한다.

<435> 단계 1: 비마토프로스트에 연결자 결합

<436> 200 mg의 비마토프로스트(0.48mmol), 48 mg의 숙신산 무수물(0.48mmol), 147 mg의 4-다이메틸아미노 피리딘(DMAP) (1.2mmol), 74 μl 의 트리에틸 아민(TEA)(0.53mmol), 1 g의 DEAE 세파덱스(Sephadex) (40-125 μm 입자 크기)를 칭량하였다. 다음, 4 mL의 다이클로로메탄을 바이알에 첨가하였다. 숙신산 무수물을 바이알에 첨가하였고 와류(vortexing)에 의해 다이클로로메탄 중에 용해하였다. 다음으로, DMPA를 첨가하였고 와류에 의해 용해하였다. 다음, 비마토프로스트를 첨가하였고 와류에 의해 용해하였다. 다음, TEA를 첨가하였고 와류에 의해 용해하였다. 마지막으로, DEAE를 첨가하였고 와류에 의해 혼합하였고 바이알 뚜껑을 단단히 닫았다. 그 다음, 뚜껑이 닫힌 바이알을 리스트 액션 셰이커에 놓고 실온에서 1시간 흔들었다. 반응이 진행될 때, 10 mL 시린지로부터 플런저를 제거하였다. 작은 원형 필터지를 잘라내어 적셨다. 원형 필터지를 사용하여 시린지 개구를 막았다. 필터지는 DEAE 젤의 흐름을 지연시키기 위한 것이다. 건조 시린지를 DEAE 비드를 갖는 1 mL 라인에 채웠다. 비드를 물을 사용한 다음 메탄올을 사용하여 적셨다. 그 다음, 반응 혼합물을 시린지 내로 피펫팅하였다. 젤을 40 mL의 75% 메탄올 및 40mL의 물로 세척하여 불순물 또는 비반응 물질을 제거하였다. 그 다음, 젤을 40mL의 1M NaCl로 세척하여 생성물을 용리시켰다.

<437> 단계 2: 변형 키토산의 결합

<438> 변형 키토산의 안정화

<439> 적합한 양의 실시예 1의 변형 키토산을 칭량하였고 단계 1로부터의 1M NaCl로 세척된 생성물에 첨가하였다. 혼합물을 24시간동안 교반하였다. 변형된 키토산이 용해되지 않은 경우, 60℃를 넘지 않도록 주의하면서 혼합물을 부드럽게 가열하여 변형된 키토산을 용해시켰다.

<440> 변형된 키토산 및 비마토프로스트 숙시네이트 생성물의 EDC 커플링

<441> 0.11 g의 EDC (변형된 키토산 100 mg 당) 및 0.165g NHS(변형된 키토산 100 mg 당)를 칭량하였고 자석 교반 막대를 사용하여 교반하면서 이전 단계로부터의 용액에 첨가하였다. 용액의 pH를 확인하였고 pH5 내지 6 사이를 유지하였다. 반응 용액을 72시간동안 실온에서 교반하였다.

<442> 정제 및 투석

<443> 72 시간 후에, 6M NaOH를 사용하여 용액의 pH를 pH 9로 조절해 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 침전시켰다. 침전된 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 150 mL 비이커에 넣고 50 mL의 10% 락트산을 첨가하였다. 모든 침전된 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물이 용해될 때까지 침전된 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 교반하였다. 6M NaOH를 사용하여 용액의 pH를 pH 9로 조절해 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 침전시켰다. 그 다음, 혼합물 50 mL 원심분리 튜브에 붓고 15분간 3850 xG에서 원심분리하였다. 그리고 나서, 상청액을 제거하여 폐기하였다. 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 투석 튜브로 옮기고 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물이 용해될 때까지 10% 락트산에 대하여 투석하였다. 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물이 용해된 후에, 투석액을 DI수로 바꾸고 생성물을 최소 3시간동안 최소 3회의 개별적인 DI수 투

석 단계로 투석하였다. 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물의 pH를 확인한 다음, 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물이 pH6이 될 때까지 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 PBS(pH 7.4)에 대하여 투석하였다. PBS 투석은 생성물의 pH가 6이 되는 데 전형적으로 약 30분이 걸렸다. 그 다음, 생성물을 DI수에 대하여 최소 3시간 동안 최소 2회의 개별적인 DI수 투석 단계로 투석하였다. 변형된 키토산/비마토프로스트 생성물을 투석 튜브로부터 꺼내어 동결 건조 플라스크에 넣었다. 플라스크를 -80℃ 냉동고에 1시간 또는 하룻밤 넣어 두었다. 플라스크를 -80℃ 냉동고에서 꺼내어 생성물이 완전히 건조될 때까지 냉동 건조기에 넣어 두었다.

<444> 실시예 27

<445> 눈주위 주사: 베이스 물질의 생체적합성 및 수명

<446> 이 실시예는 래빗 눈을 둘러싼 결막 조직에 배치시 본 발명의 물질의 생체적합성을 결정하도록 설계하였으며, 실시예 6의 물질을 사용하였다.

<447> 절차

<448> 2마리의 뉴질랜드 화이트 래빗을 이 연구에 사용하였다. 래빗 및 처치는 무작위로 선택하였다. 실험 눈을 100 μ L의 10 mg/mL 실시예 1의 물질로 처치하였고 대조구 눈을 100 μ L BSS로 처치하였다. 40%/60% 산소/공기 혼합물 중의 2.0 내지 3.5%의 아이소플루오레인을 사용하여 래빗을 마취시켰다. 국소 마취제(테트라카인-0.5% 방울 또는 알카인) 2 방울을 래빗 눈에 적용하였다. 포셉을 사용하여 안구 표면으로부터 부드럽게 결막을 들어올려 결막을 "텐팅(tenting)"하였다. 주사는 안구의 표면에서 적절히 떨어져 이루어졌다(이 조작은 안구 천공의 위험성을 크게 감소시킨다). 바늘을 안구에 접하게 위치시켜 바늘 팁을 텐트에 삽입하고, 적합한 제형을 송달하였다. 23-게이지 바늘을 사용하여 주사하였다. 실시예 1의 물질 100 μ L을 실험 눈의 결막 내로 주사하였다. 100 μ L의 BSS를 대조구 눈의 결막 내로 주사하였다. 주사 후에, 항생 드롭제(비가목스®)를 눈에 넣었다. 1주 동안 매일 관찰한 다음, 연구가 끝날 때까지 1주에 1회 관찰하였다. 24시간에 결막의 사진을 찍었다. 29일에, 래빗을 안락사시키고 결막을 수거하여 조직학 연구를 위해 처리하였다.

<449> 결과

<450> 눈꺼풀을 감기기 전에 래빗을 살펴보았을 때, 전체 연구 내내 대조구와 처치된 눈 사이에 어떠한 차이도 없었다. 모든 관찰 시점에서 모든 래빗의 눈이 빛나는, 촉촉한 외관을 유지하였다. 24시간에서, 모든 결막-실험 및 대조구 둘 모두-이 정상 외관이었고, 이는 BSS뿐만 아니라 실시예 1의 물질의 유체 성분이 조직에 흡수되었음을 나타낸다. 어떠한 결막에서도 발적은 나타나지 않았다. 29일에, 모든 눈이 정상 외관이었다. 어떠한 눈에서도 범프(bump)가 나타나지 않았다. 칼코플루오르 염색을 이용한 조직학적 평가에서, 주사후 29일에 실험 눈의 결막 내에 실시예 1의 물질이 존재함이 확인되었다. 도 19를 참조하여, 현미경 이미지가 29일에도 물질이 계속 존재함을 뒷받침한다.

<451> 결론

<452> 실시예 1의 물질은 눈에 대한 지속 약물 송달 수단으로 전망이 있는 것으로 나타났다. 눈주위 주사 후에, 본 발명의 물질은 탁월한 생체적합성을 가지고 적어도 29일 동안 결막 공간에 남아 존재하였다.

<453> 실시예 28

<454> 눈주위 주사: 베이스 물질의 생체적합성 및 수명

<455> 이 실시예는 래빗 눈을 둘러싼 결막 조직 내에 배치시, 비마토프로스트의 첨가에 의해 공유적으로 변형된 본 발명의 물질의 생체적합성을 결정하도록 설계되었으며 실시예 25의 물질을 사용하였다.

<456> 방법

<457> 4마리의 뉴질랜드 화이트 래빗을 이 연구에 사용하였다. 래빗 및 처치는 무작위로 선택하였다. 실험 눈을 100 μ L의 10 mg/mL 실시예 25의 물질로 처치하였고 대조구 눈을 100 μ L BSS로 처치하였다. 40%/60% 산소/공기 혼합물 중의 2.0 내지 3.5%의 아이소플루오레인을 사용하여 래빗을 마취시켰다. 국소 마취제(테트라카인-0.5% 방울 또는 알카인) 2 방울을 래빗 눈에 적용하였다. 포셉을 사용하여 안구 표면으로부터 부드럽게 결막을 들어올려 결막을 "텐팅(tenting)"하였다. 주사는 안구의 표면에서 적절히 떨어져 이루어졌다(이 조작은 안구 천공의 위험성을 크게 감소시킨다). 바늘을 안구에 접하게 위치시켜 바늘 팁을 텐트에 삽입하고, 적합한 제형을 송달하였다. 23-게이지 바늘을 사용하여 주사하였다. 실시예 25의 물질 100 μ L을 실험 눈의 결막 내로 주사하였다. 100 μ L의 BSS를 대조구 눈의 결막 내로 주사하였다. 주사 후에, 항생 드롭제(비가목스®)를 눈에 넣었다. 1주

동안 매일 관찰한 다음, 연구가 끝날 때까지 1주에 1회 관찰하였다. 주사 시점, 1일 및 7일에 결막의 사진을 찍었다. 연구의 끝에, 래빗을 안락사시키고 결막을 수거하여 조직학 연구를 위해 처리하였다.

<458> 결과

<459> 눈꺼풀을 감기기 전에 래빗을 살펴보았을 때, 전체 연구 내내 대조구와 처치된 눈 사이에 어떠한 차이도 없었다. 모든 관찰 시점에서 모든 래빗의 눈이 빛나는, 축축한 외관을 유지하였다. 24시간에서, 모든 대조구 결막은 정상 외관이었으며 이는 BBS가 조직 내로 흡수되었음을 의미한다. 모든 실험 결막에서, 결막 조직의 약간의 발적과 함께, 약간 정도부터 두드러진 정도까지의 범위로, 필로우(pillow) 또는 범프가 있었다. 연구가 진행됨에 따라 발적은 천천히 사라졌다(눈 자체 및 주변 조직은 연구 내내 완전히 정상이었다). 처음 24시간 내에, 상대적인 범프 크기가 감소되었고 그후 매우 작게 변화하였다. 29일에, 모든 눈이 정상 외관이었다. 실험 눈에는 여전히 범프가 있었다. 절개시, 결막이 실시예 25의 물질을 함유하는 것이 잘 보였다. 칼코플루오르 염색을 이용한 조직학적 평가에서, 주사후 29일에 실험 눈의 결막에서 본 발명의 키토산 화합물의 존재가 확인되었다. 도 20을 참조하여, 육안으로 본 증거 및 현미경적 증거가 29일에도 물질이 계속 존재함을 뒷받침한다.

<460> 결론

<461> 비마토프로스트로 공유적으로 변형된 본 발명의 변형된 키토산 물질은 눈에 대한 지속 약물 전달 수단으로서 전망이 있는 것으로 나타났다. 눈주위 주사 후에, 이러한 물질은 탁월한 생체적합성을 가지고 적어도 29일 동안 결막 공간에 남아 존재하였다. 실시예 27로부터의 결과에서 베이스 물질 단독으로부터는 어떠한 자극의 징후도 나타나지 않은 점을 고려하면, 주사 후 이러한 실험 눈의 결막에서 관찰된 약간의 발적은 비마토프로스트 변형에 기인한 것일 가능성이 크다.

<462> 실시예 29

<463> 본 발명의 키토산 물질로부터의 비마토프로스트의 시험관내 가수분해 시험

<464> 이 실시예는 결합된 비마토프로스트를 효소적으로 방출하는 능력을 평가하도록 설계하였다. 하기 절차에 따라 돼지 에스테라아제 및 리소자임을 사용하는 시험관내 가수분해 시험에 의해 입증하였다.

<465> 절차

<466> 0.0309 g의 봉산을 50 mL의 DI수에 첨가하여 0.1 M 보레이트 완충액 용액을 제조하고 1M NaOH를 사용하여 pH 6.5로 조절하였다. 실시예 25의 물질의 5 mg/mL 용액을 멸균 염수 중에 무균적으로 준비하였다. 1 밀리리터당 1000 유닛의 돼지 에스테라아제 및 20 유닛의 난백 리소자임을 0.1M 보레이트 완충제에 용해시켰다. 다음과 같이 표준을 준비하였다: 1mL의 보레이트 완충제(pH 6.5) 및 1mL의 실시예 25의 5mg/mL 변형된 키토산 물질을 각각의 바이알에 첨가하고, 10초간 와류시켜 확실히 완전하게 혼합되게 하였다. 샘플을 리스트 액션 셰이커에 놓고 72 시간 흔들었다. 에스테라아제 샘플은 다음과 같이 준비하였다: 1 mL의 돼지 에스테라아제 및 난백 리소자임 용액(1 mL당 1000 유닛의 돼지 에스테라아제 및 20 유닛의 난백 리소자임) 및 1mL의 실시예 25의 5mg/mL 변형된 키토산 물질을 각각의 바이알에 첨가하고, 10초간 와류시켜 확실히 완전하게 혼합되게 하였다. 샘플을 리스트 액션 셰이커에 놓고 72 시간 흔들었다.

<467> 배양 후에, 방출된 비마토프로스트에 대해 샘플을 HPLC로 분석하였다.

<468> 샘플을 셰이커에서 꺼내어 10초간 와류시켰고 50 μ L의 1M NaOH를 첨가하여 용액을 pH8-9로 조절하였고 샘플을 10초간 와류시켰다. 1mL의 메탄올을 첨가하고 10초간 와류시켰다. 1 mL의 샘플을 미세원심분리 튜브에 피펫팅하여 각각의 샘플을 15분간 10000 rpm으로 원심분리하였다. HPLC 분석을 위해 각 샘플 200 mL를 꺼내어, 1 mL/분으로 등용매성(isocratic) 메탄올/물/아세트산(70:30:0.1)을 용리하는 250mm x 4.6mm C₁₈ 엔드캡드 컬럼(VWR)에 샘플을 진행시켜, 210nm에서 검출하였다. 비마토프로스트 피크는 약 5.6분에 용리하였고, 피크아래 영역을 적분하여 표준 곡선과 비교해 농도를 결정하였다.

<469> 결과

<470> 도 21은 효소가 존재할 때와 부재할 때의 비마토프로스트의 방출 프로파일을 나타낸다. 효소 부재시, 검출가능한 비마토프로스트가 전혀 관찰되지 않았다. 효소 존재시, 상당한 양의 비마토프로스트가 방출하였다.

<471> 결론

<472> 이 실시예는 공유결합된 비마토프로스트를 절단하는 에스테라아제 및 리소자임의 작용 하에 본 발명의 변형된

키토산 물질로부터 비마토프로스트가 효과적으로 방출된다는 것을 명백하게 나타낸다.

<473> 본 명세서에 기재된 변형된 키토산, 비마토프로스트 조성물은 녹내장과 같은 안 질환을 치료하는 데 성공적으로 사용될 수 있으며, 망막 세포에 신경보호를 제공한다. 치료학적으로 효과적인 변형된 키토산 제형은 또한 PGD2, PGE2, PGF2, 란타노프로스트 및 트라보프로스트 및 우노프로스톤 아이소프로필과 같은(제한되지 않음) 다른 프로스타글란딘 또는 프로스타마이드와 함께 제조할 수 있다.

<474> 본 발명에 인용된 모든 참조문헌은 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 발명은 바람직한 실시형태를 참조하여 개시하였으나, 당업자는 본 명세서를 읽고 상기에 설명한 그리고 하기에 청구된 바와 같은 본 발명의 범주 및 진의에서 벗어나지 않는 변형 또는 수정이 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

<127> 하기 상세한 설명을 같은 요소에 동일한 번호가 매겨진 첨부된 예시적인 도면과 함께 참조하여 본 발명을 더 잘 이해할 수 있다.

<128> 도 1은 삼각형의 정상 꼭지점에서 콤팩트 구(compact sphere)를, 좌측 꼭지점에서 랜덤 코일을, 그리고 우측 꼭지점에서 경질 막대(rigid rod)를 나타내는 매크로분자 형태의 허그(Haug) 삼각형을 나타낸다.

<129> 도 2A 및 B는 본 발명의 키토산 처리 및/또는 변형 방법의 개략적인 실시형태를 나타낸다.

<130> 도 3은 처리된 키토산, 몇몇 반복된 실시예 1의 물질 및 비처리 키토산으로부터 수집된 원편광 이색성(CD) 스펙트럼을 나타낸다.

<131> 도 4는 처리된 키토산, 몇몇 반복된 실시예 1의 물질 및 비처리 키토산으로부터 수집된 GPC 크로마토그래피를 나타낸다.

<132> 도 5A-E는 분자량 및 탈아세틸화 정도와 같은 특성을 달리한 실시예 1의 물질에 의해 나타나는 다양한 점도 행동을 나타낸다.

<133> 도 6은 살아있는 세포에서의 본 발명의 재료의 안정성을 나타낸다. 일차 배양물을 실시예 1의 물질에 20-24 시간 동안 노출시켰을 때, 각막 내피 세포의 사멸이 관찰되지 않았다(중간 패널). 진균 감염에 의해서 세포에서 사멸이 유도되었고 이러한 염색 기술을 사용하여 검출가능하였다(아래쪽 패널).

<134> 도 7은 실시예 1의 물질의 투여량을 달리한 일련의 각막 내피 세포 배양물 독성 시험을 나타낸다; 독성이 전혀 관찰되지 않았다.

<135> 도 8은 각막의 기질(the stroma of the cornea) 내에서 본 발명의 물질의 안정성을 나타낸다. 실시예 1의 물질은 심지어 만성적인 투여에서도 사실상 면역원성 또는 염증성 반응을 전혀 일으키지 않았다. 각막에 대한 어떠한 유해한 효과도 없이 심지어 60일에도 잔류 물질을 관찰할 수 있었다-생체 내 연구.

<136> 도 9는 적용한 지 심지어 8 및 16 사건 후에도 상당한 잔류물이 있는 래빗의 각막에서 실시예 1의 물질의 보존을 나타낸다-시험관내 연구.

<137> 도 10은 다양한 시점에서 각막에 보존된 실시예 1의 양을 그래프로 나타낸다-생체 내 연구.

<138> 도 11은 찰과상을 실시예 1의 물질로 처리한 후 래빗 각막 재-상피화를 보여주는 일련의 사진을 나타낸다-생체 내 연구.

<139> 도 12는 손상되지 않은 상피, 및 밑에 잔류하는 실시예 1의 물질을 갖는 상처를 덮고 있는 새로 재생된 상피를 나타내는 각막의 단면을 나타낸다.

<140> 도 13은 절단가능한 약물 테서(drug tethers)를 증명하는, 콜라겐계 모델의 몇몇 반복으로부터의 엘라스타아제에 의한 모조 약물(pseudo drug)의 효소적 방출을 그래프로 나타낸다.

<141> 도 14는 대조구(B)와 비교하여 키토산계 조성물(A)를 양성으로 확인하는 칼코플루오르 염색(calcofluor staining)을 사용한, 래빗 눈의 각막 표면에서 적용 2시간 후 실시예 1의 물질의 보존의 증거를 나타낸다.

<142> 도 15는 시판 중인 제제(0.4% KT)와 비교한 실시예 19의 물질(0.2% KT)로부터 케토롤락 트로메타민(KT)의 탁월하지는 않지만 필적할 만한 송달을 나타낸다.

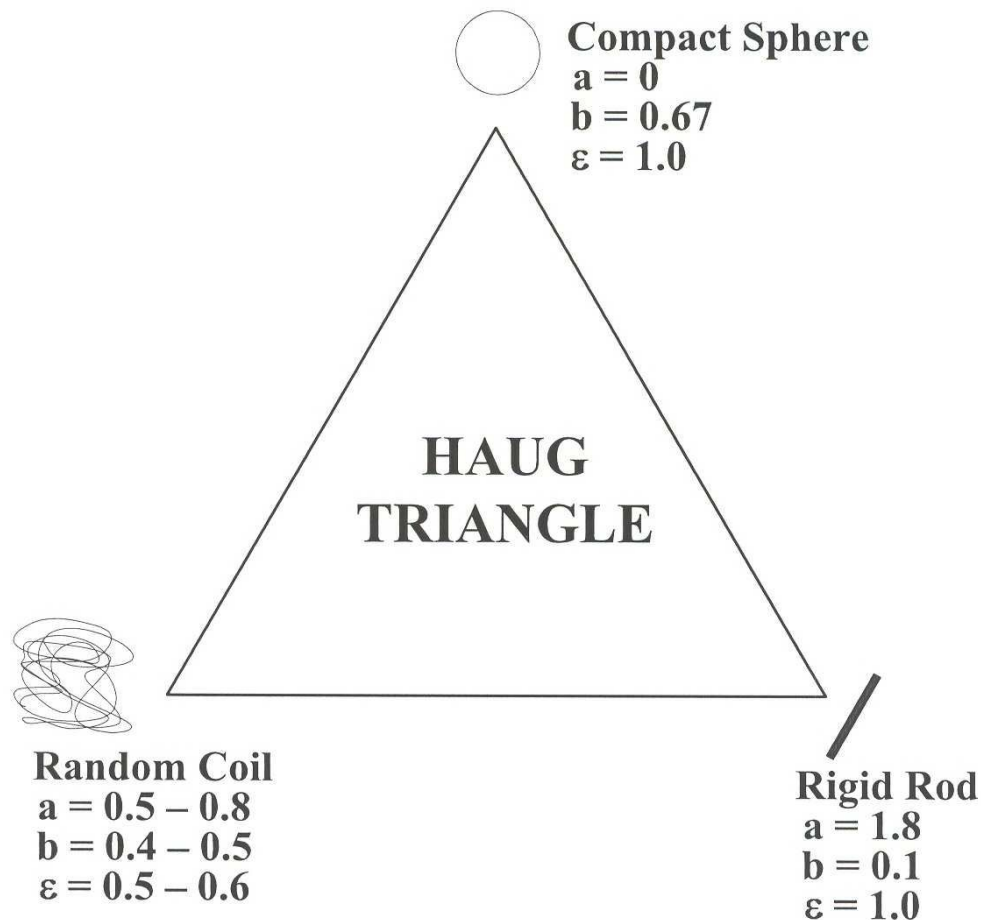
<143> 도 16은 시판 중인 제제(1% PA)와 비교한 실시예 21의 물질(0.05% PA)로부터 프레드니솔론 아세테이트(PA)의 탁

일하지는 않지만 필적할 만한 송달을 나타낸다.

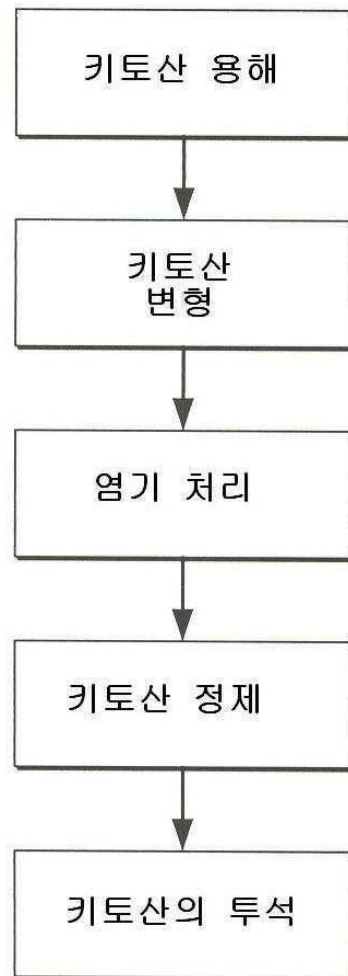
- <144> 도 17은 비마토프로스트를 키토산 백본에 공유 결합하기 위한 합성 전략을 나타낸다. 비마토프로스트를 숙신산 무수물과 우선 반응시켜, 비마토프로스트의 알코올 작용기에 부착된 연결자를 제공한다. 두번째 단계로, 연결자의 유리산 말단을 EDC 커플링을 이용하여 키토산 백본에 부착한다.
- <145> 도 18은 실시예 1의 물질, 비마토프로스트 단독, 및 실시예 25의 물질(공유 결합된 비마토프로스트를 갖는 실시예 1의 물질)의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸다. 1550 cm^{-1} 및 1620 cm^{-1} 에서의 비마토프로스트의 밴드 특징을 실시예 25의 물질의 스펙트럼에서 볼 수 있으며, 이는 실시예 1의 물질에 비마토프로스트가 성공적으로 부착되었음을 나타낸다.
- <146> 도 19는 주사 29일 후에 눈주위 공간(periorbital space)에 본 발명의 두 조성물이 잔류 존재함을 나타낸다- 화합물 A: 10 mg/mL 농도의 실시예 1의 물질; 화합물 B: 70 mg/mL 농도의 대안적인 제형. 칼코플루오르 염색을 사용하여 키토산계 조성물을 양성으로 확인하였다-생체내 연구.
- <147> 도 20은 주사 29일 후에 눈주위 공간에 공유 결합된 비마토프로스트를 포함하는 실시예 25의 물질이 잔류 존재함을 나타낸다. 칼코플루오르 염색을 사용하여 키토산계 조성물을 양성으로 확인하였다-생체내 연구.
- <148> 도 21은 효소의 존재 및 부재 하에 실시예 25의 물질로부터의 공유결합된 비마토프로스트의 상대적인 방출율을 나타낸다. 어떠한 효소도 존재하지 않는 경우, 비마토프로스트의 방출을 전혀 검출할 수 없었으며, 돼지 간 에스테라아제 및 리소자임이 존재하는 경우, 상당한 양의 비마토프로스트가 방출되었다-시험관내 연구.

도면

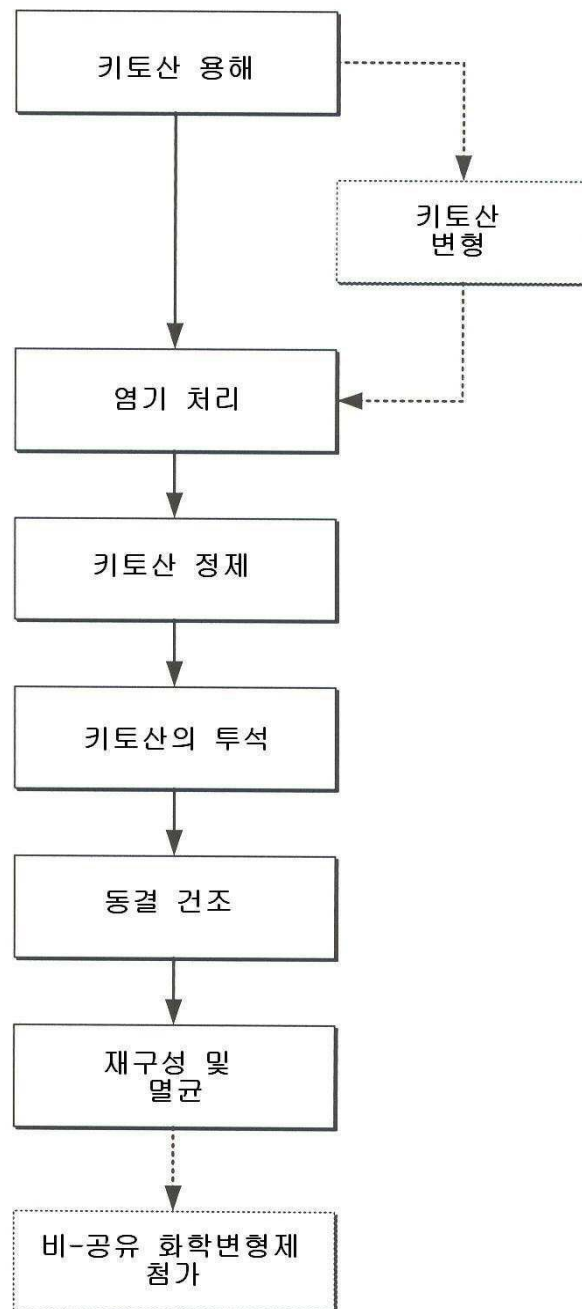
도면1



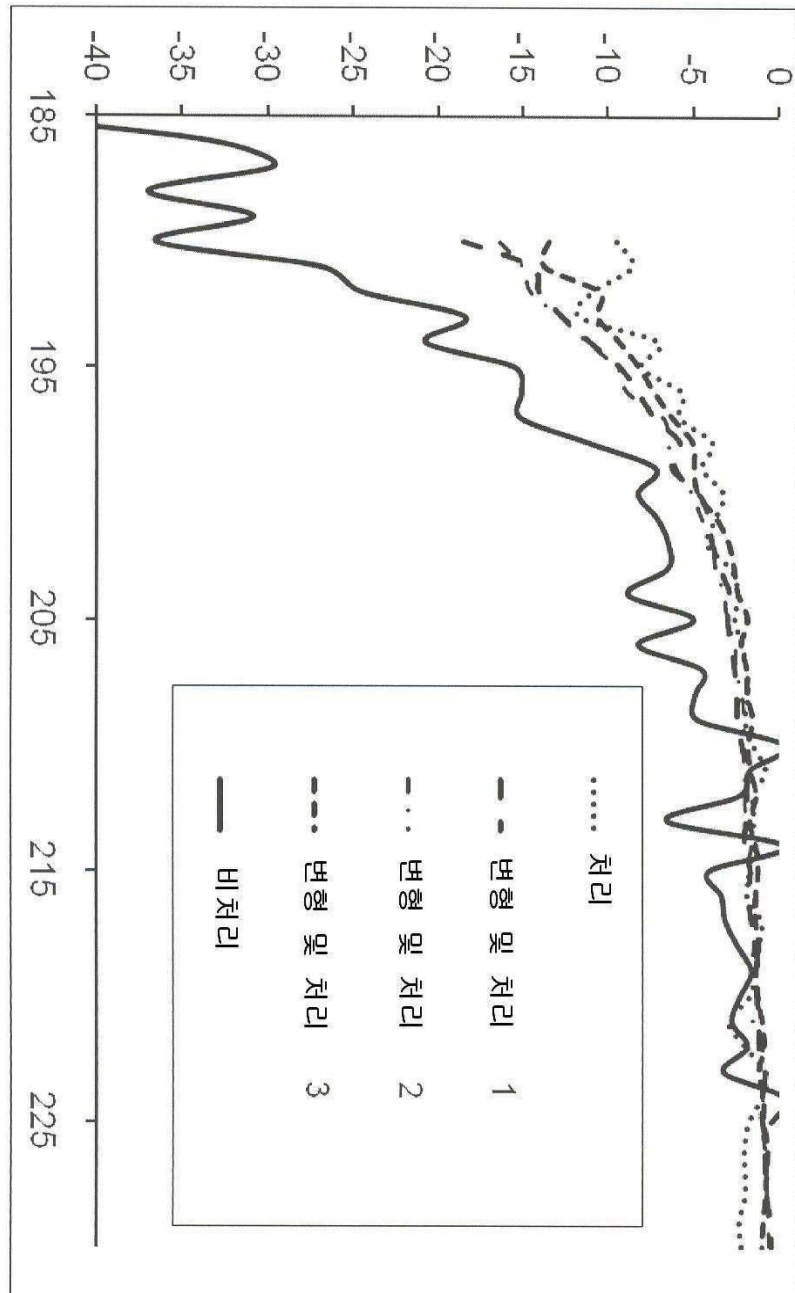
도면2A



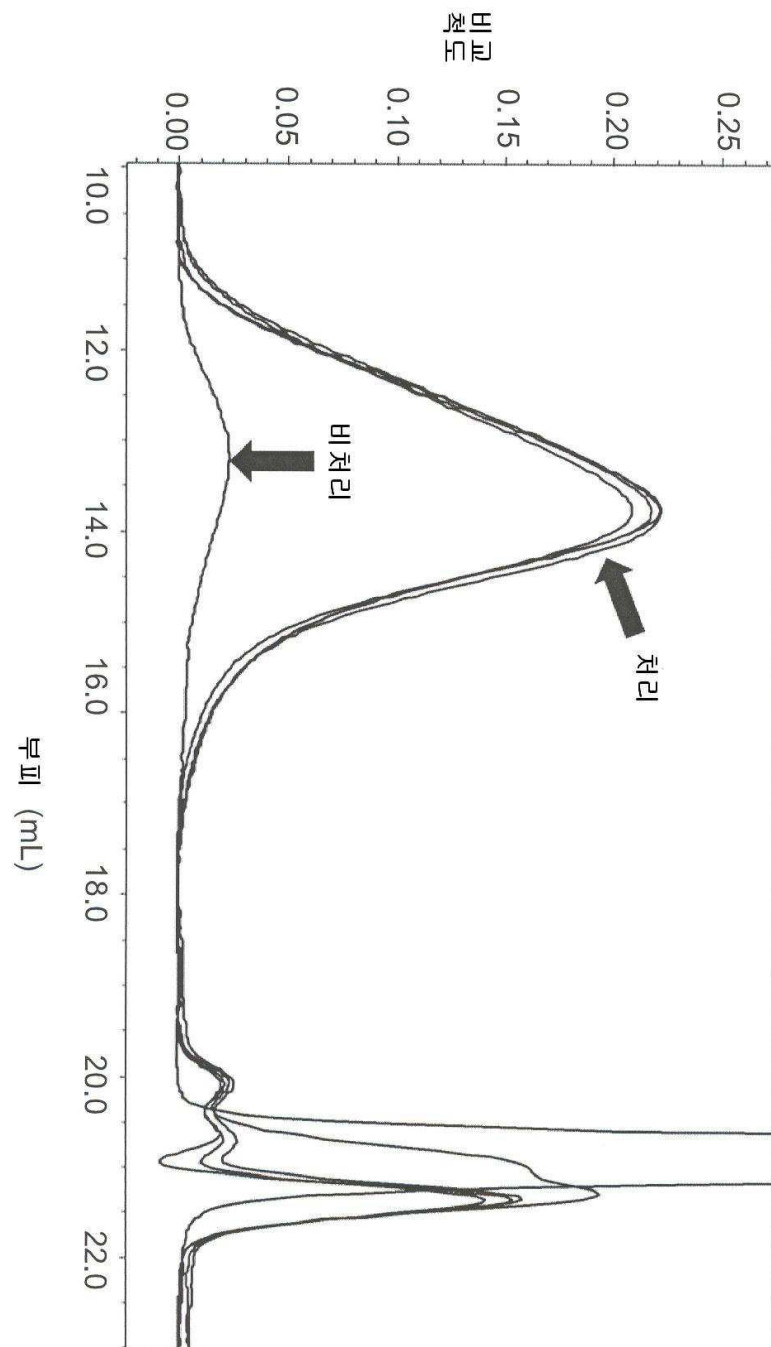
도면2B



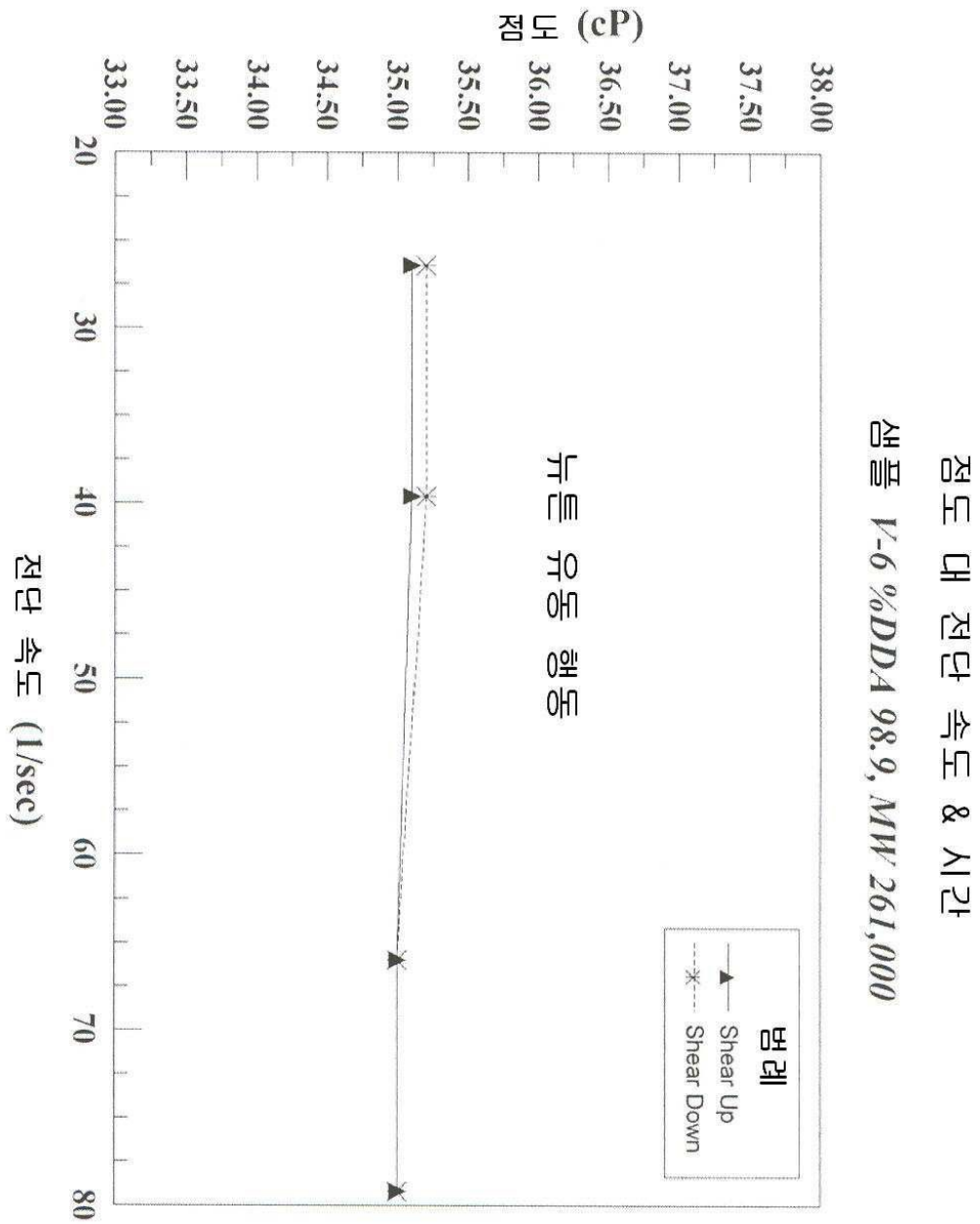
도면3



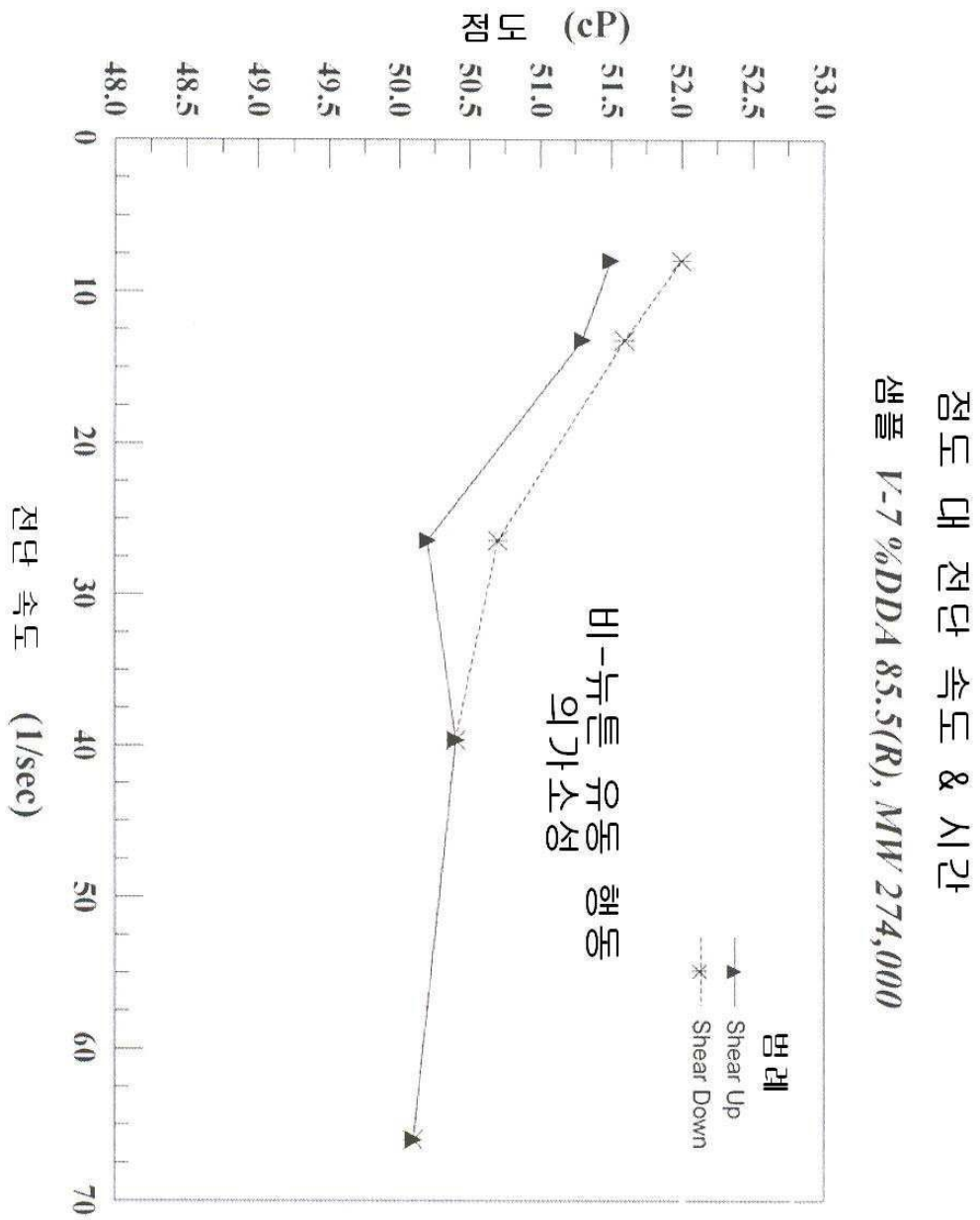
도면4



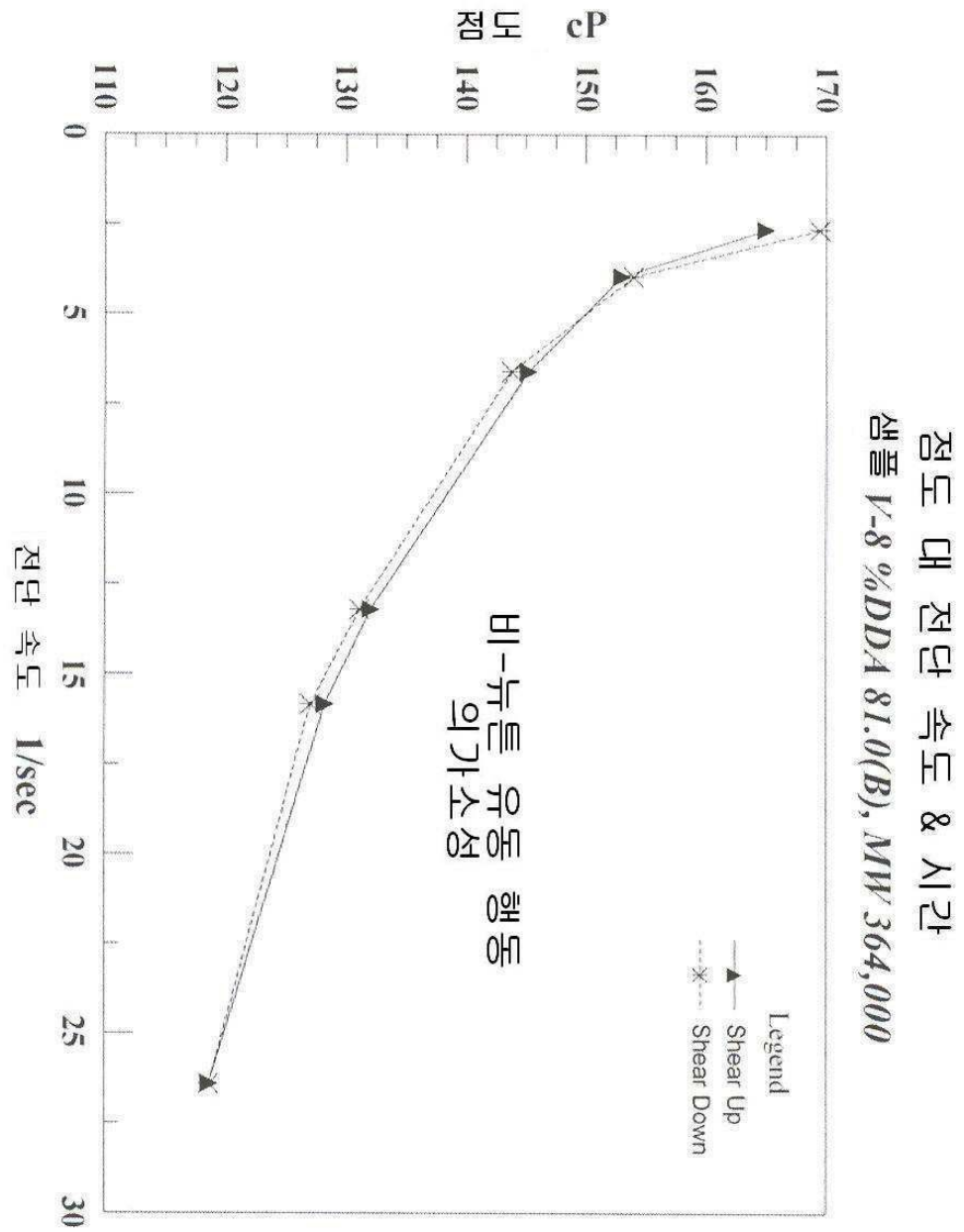
도면5A



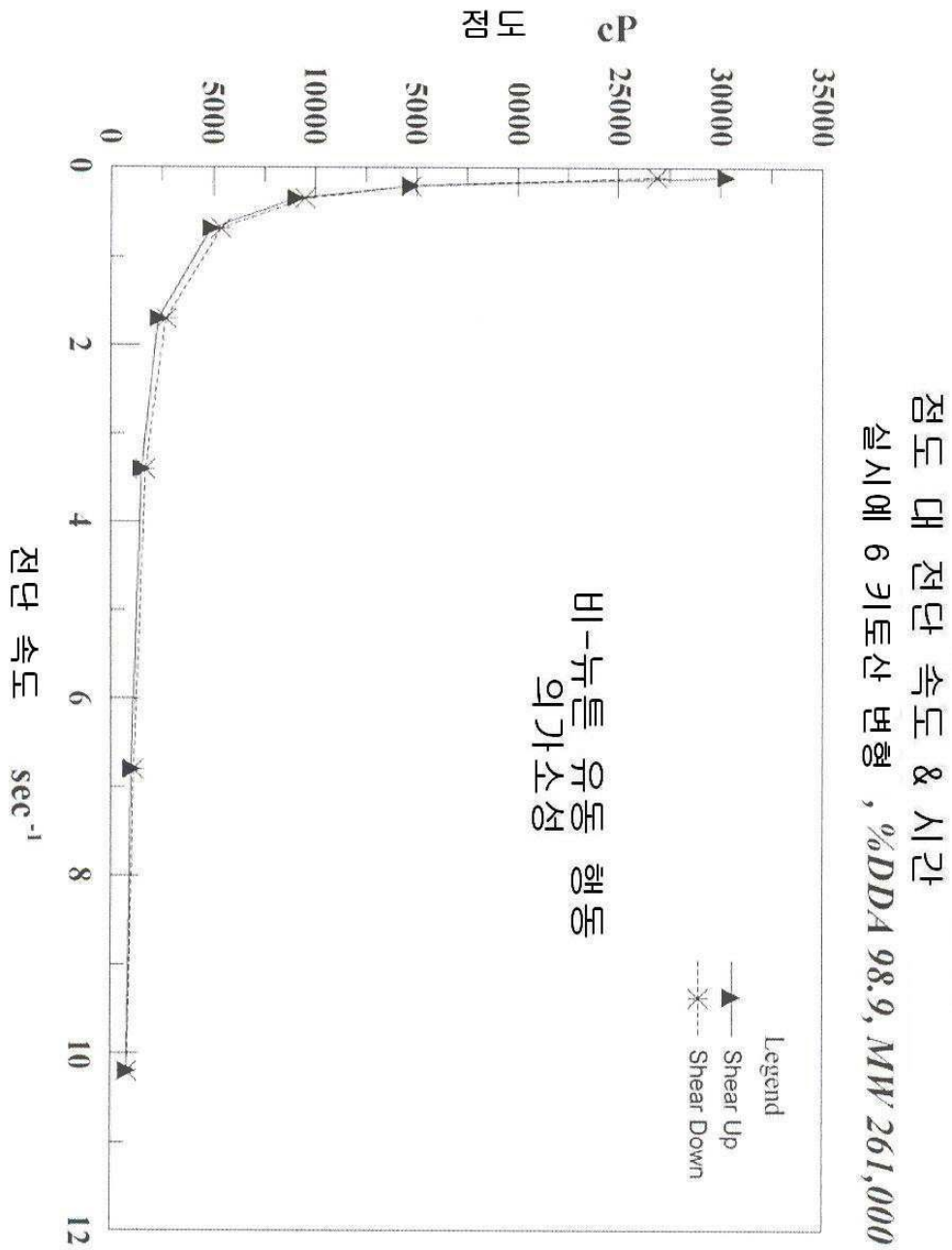
도면5B



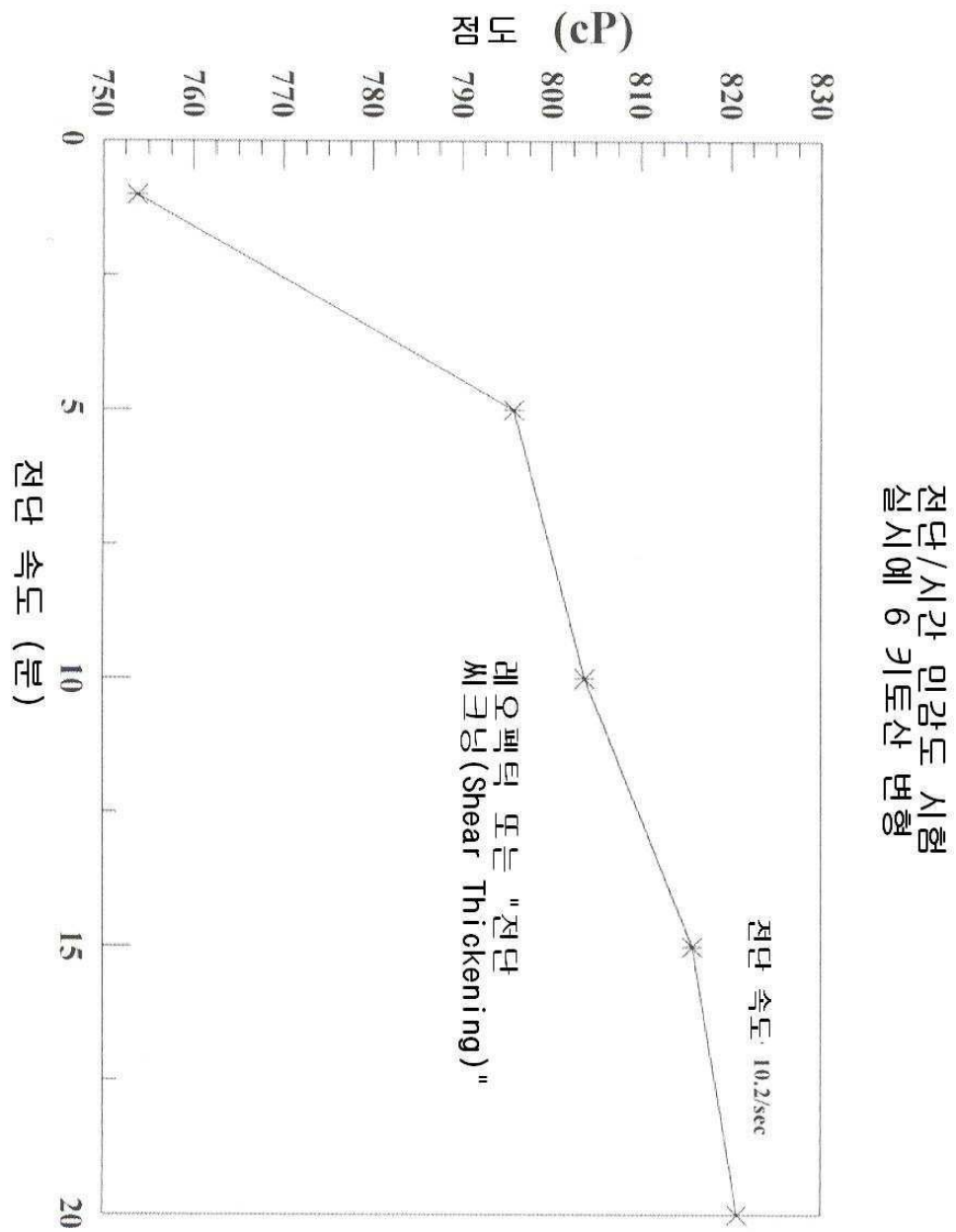
도면5C



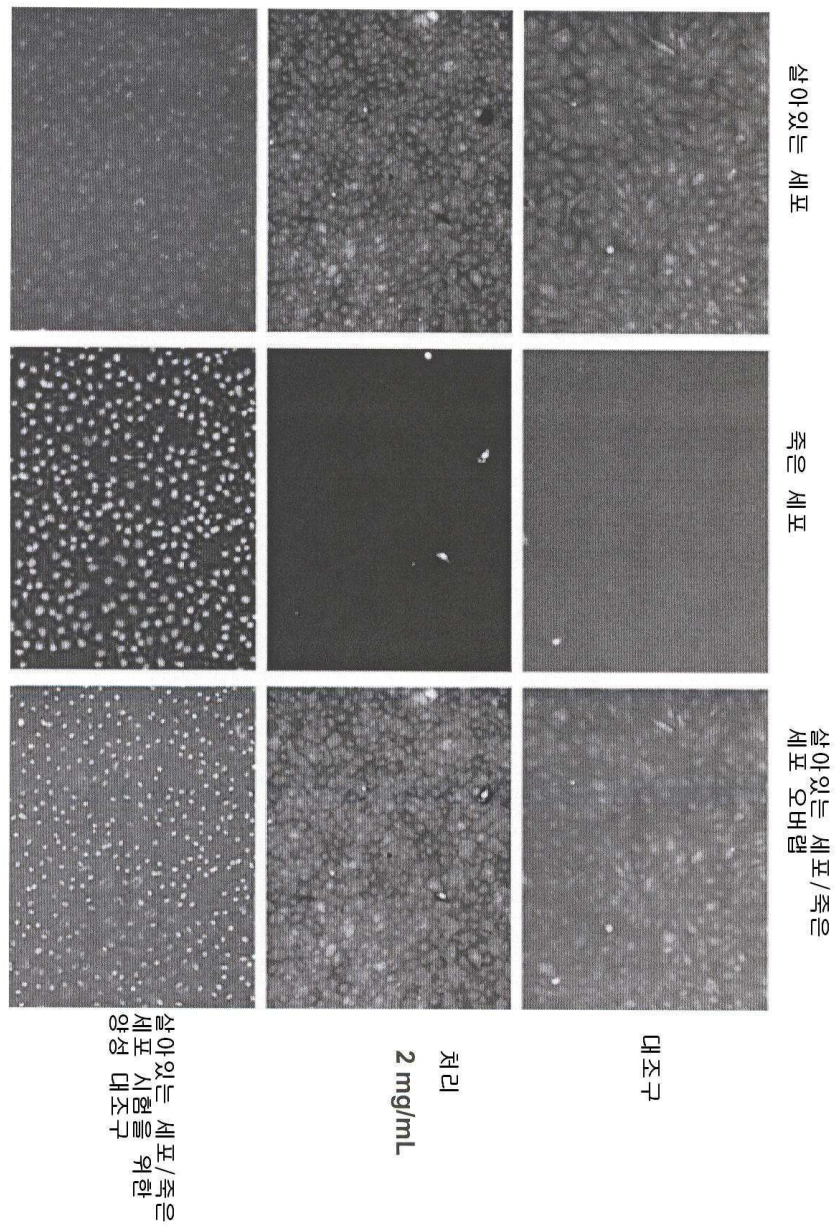
도면5D



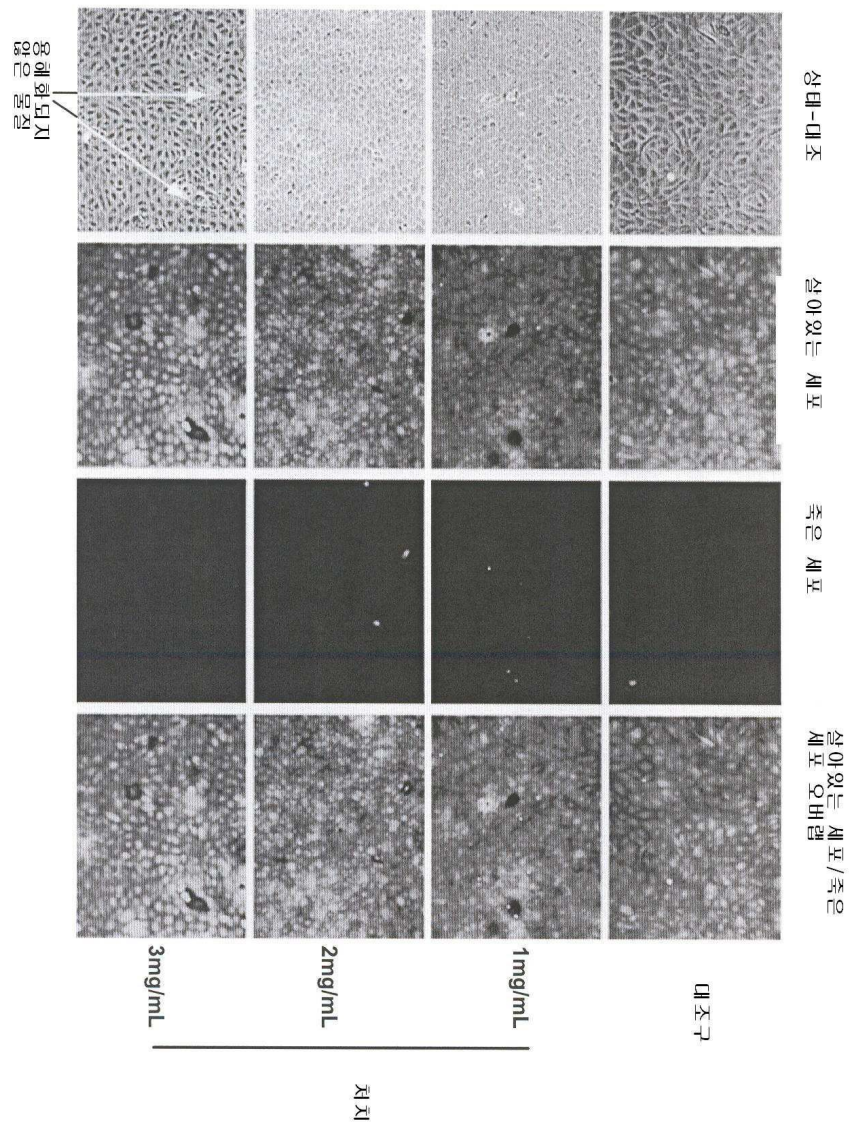
도면5E



도면6



도면7



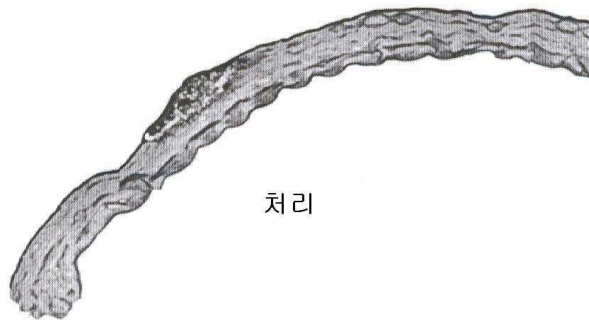
도면8



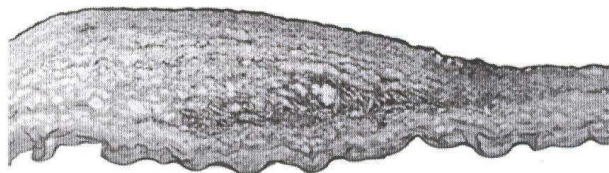
대조구



처리



처리

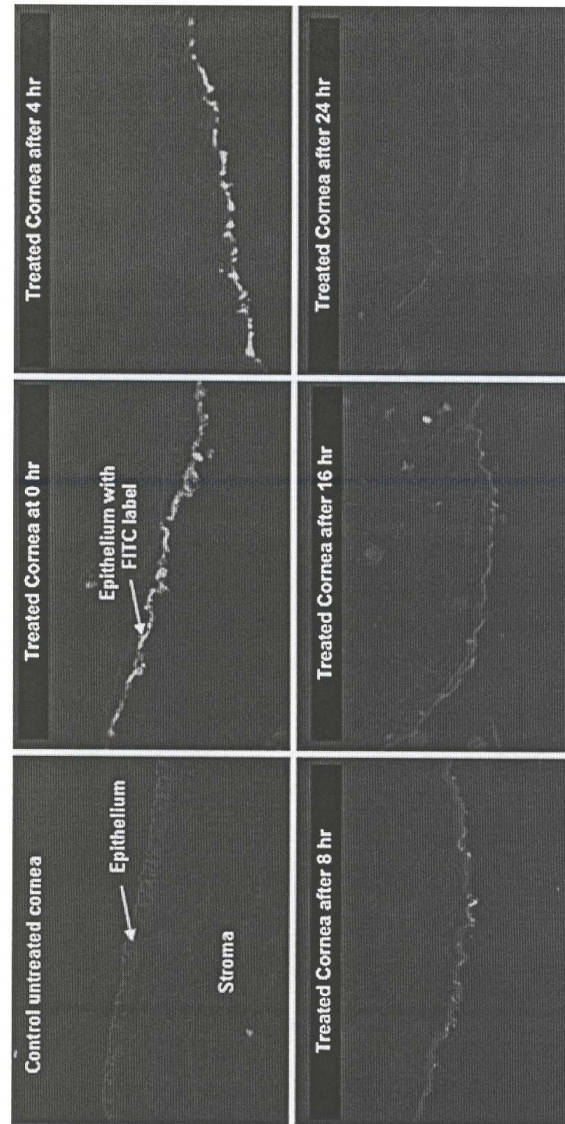


염증 반응

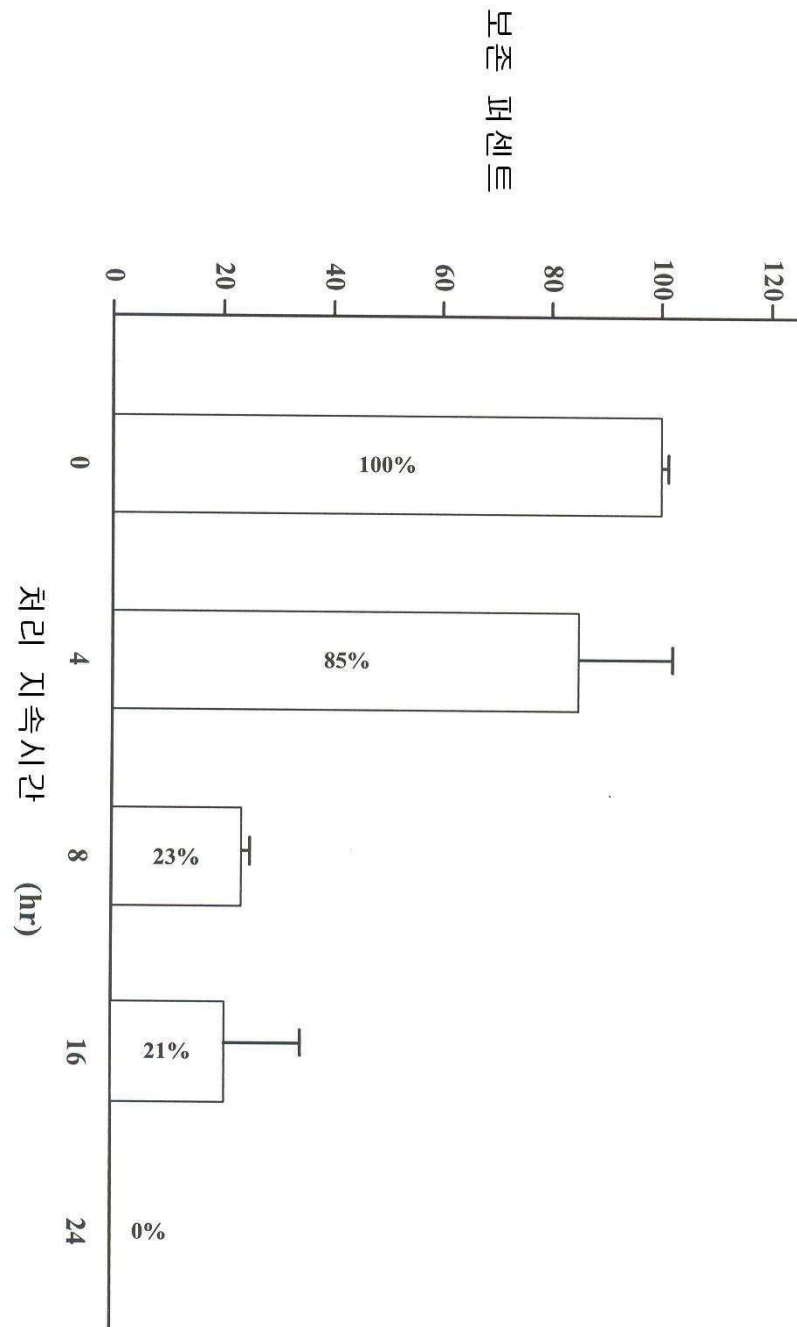


잔류 물질

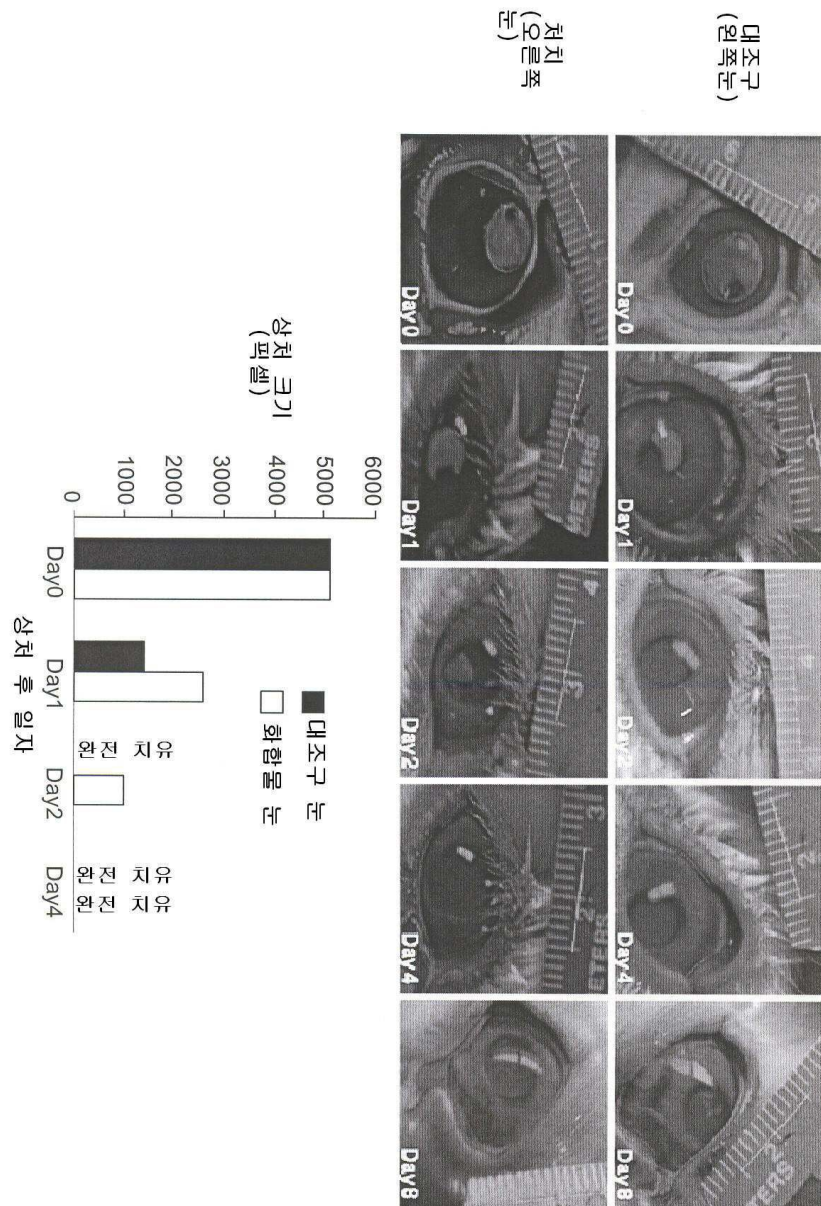
도면9



도면10

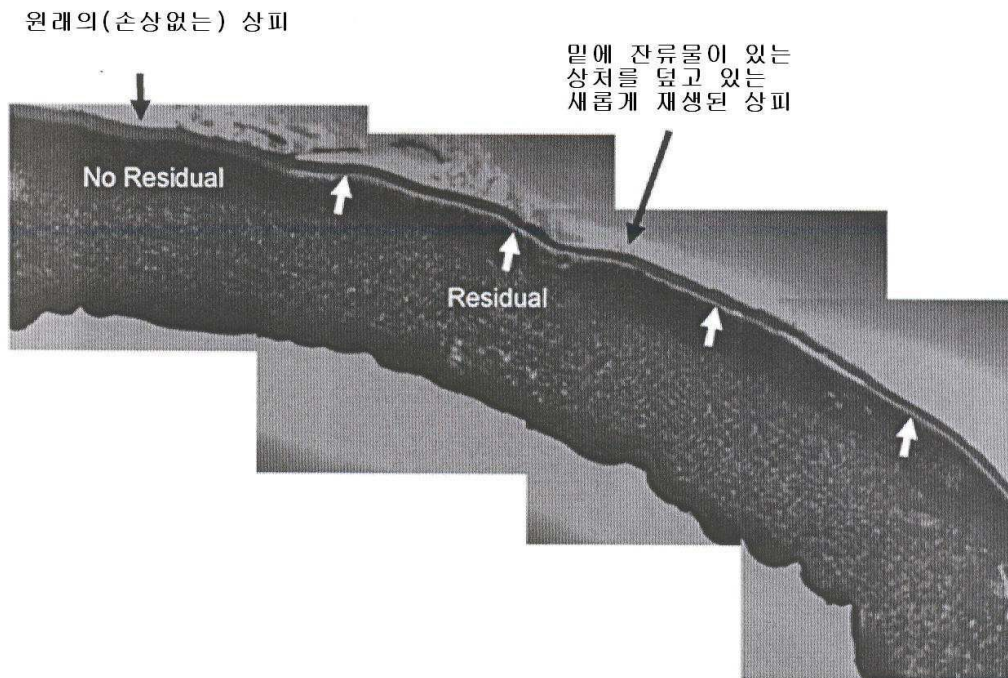


도면11

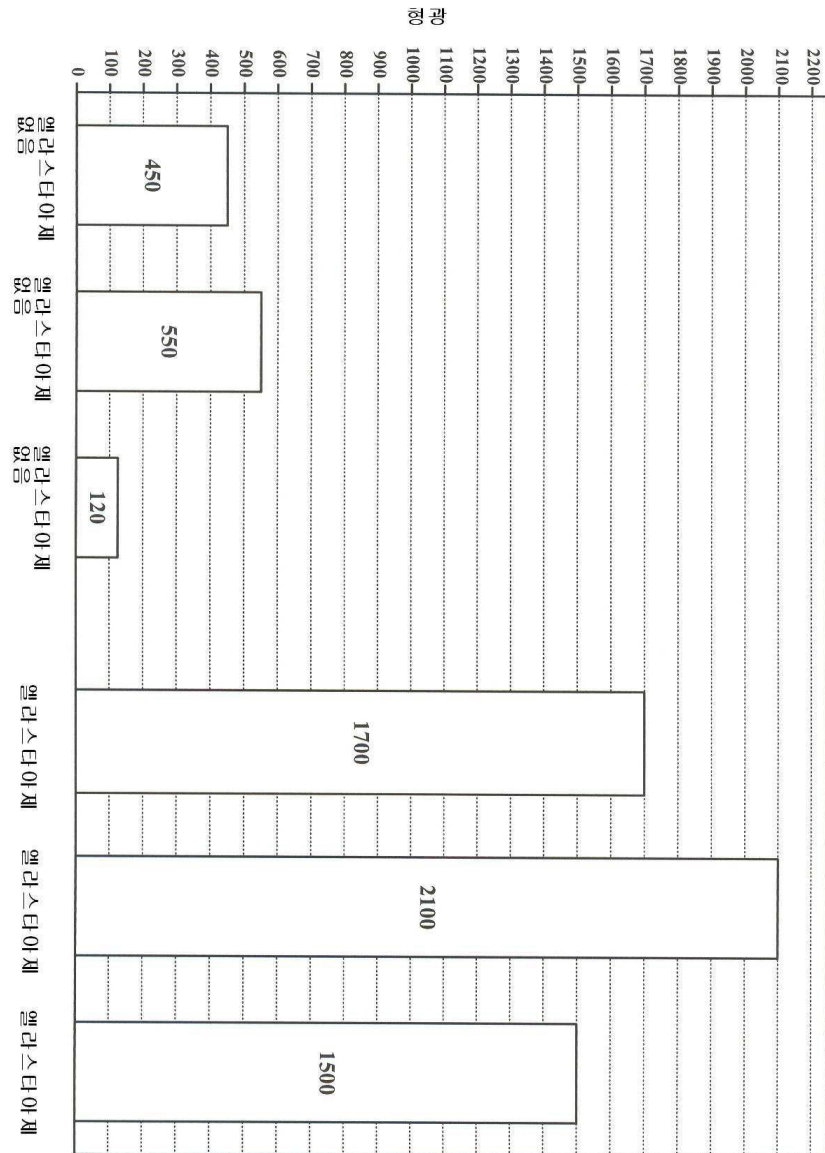


도면12

실시예 1의 키토산 제형
필름
(과사조직 제거 영역에서)



도면13



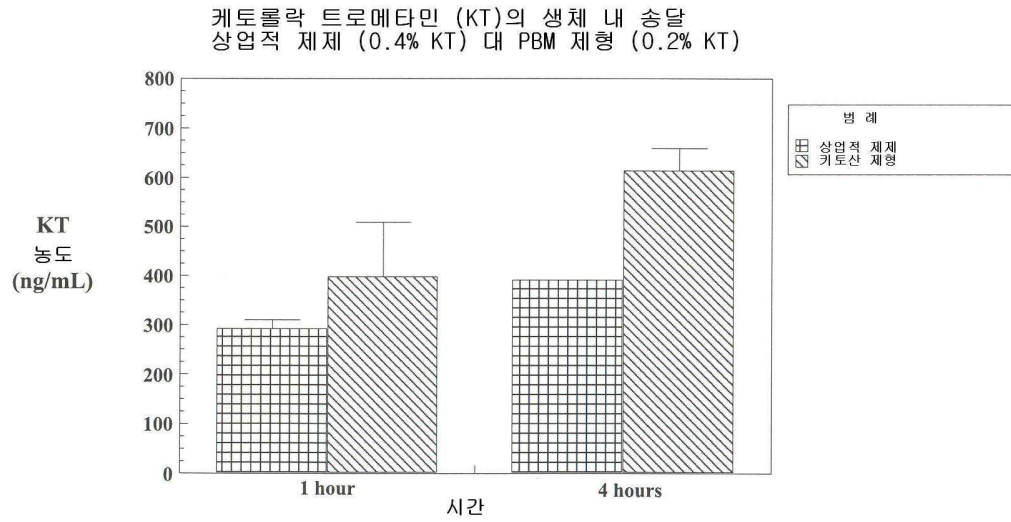
도면14A



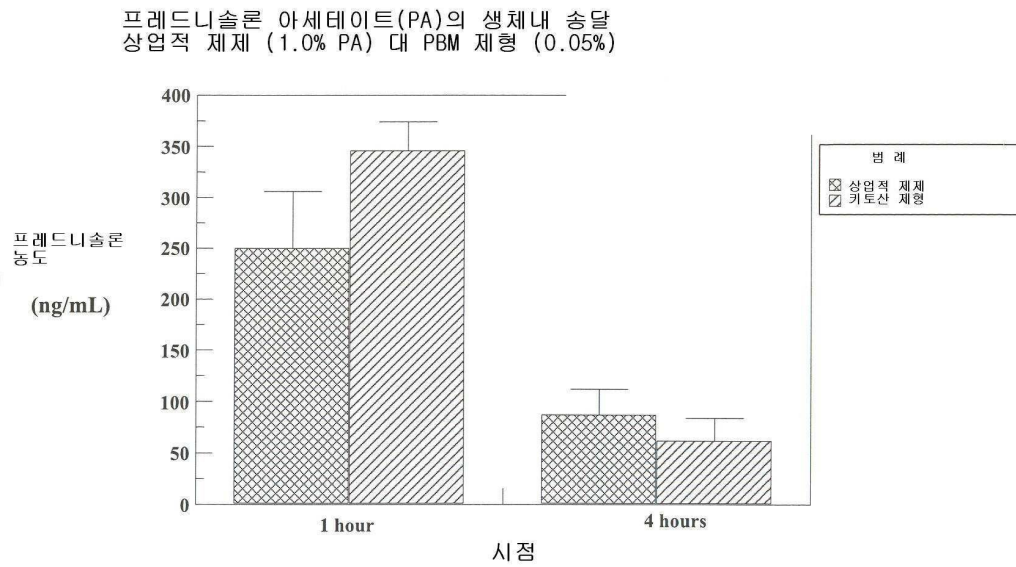
도면14B



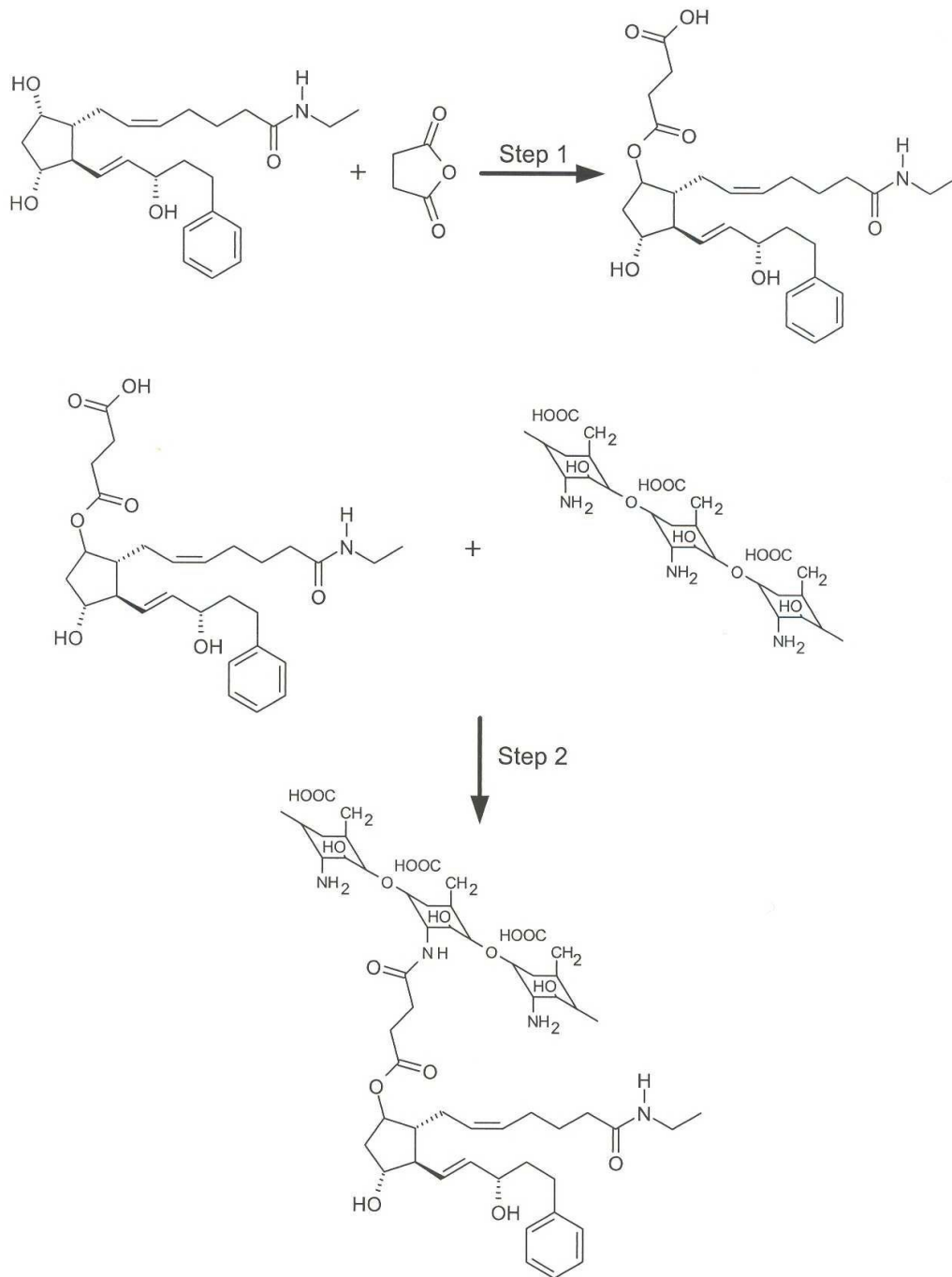
도면15



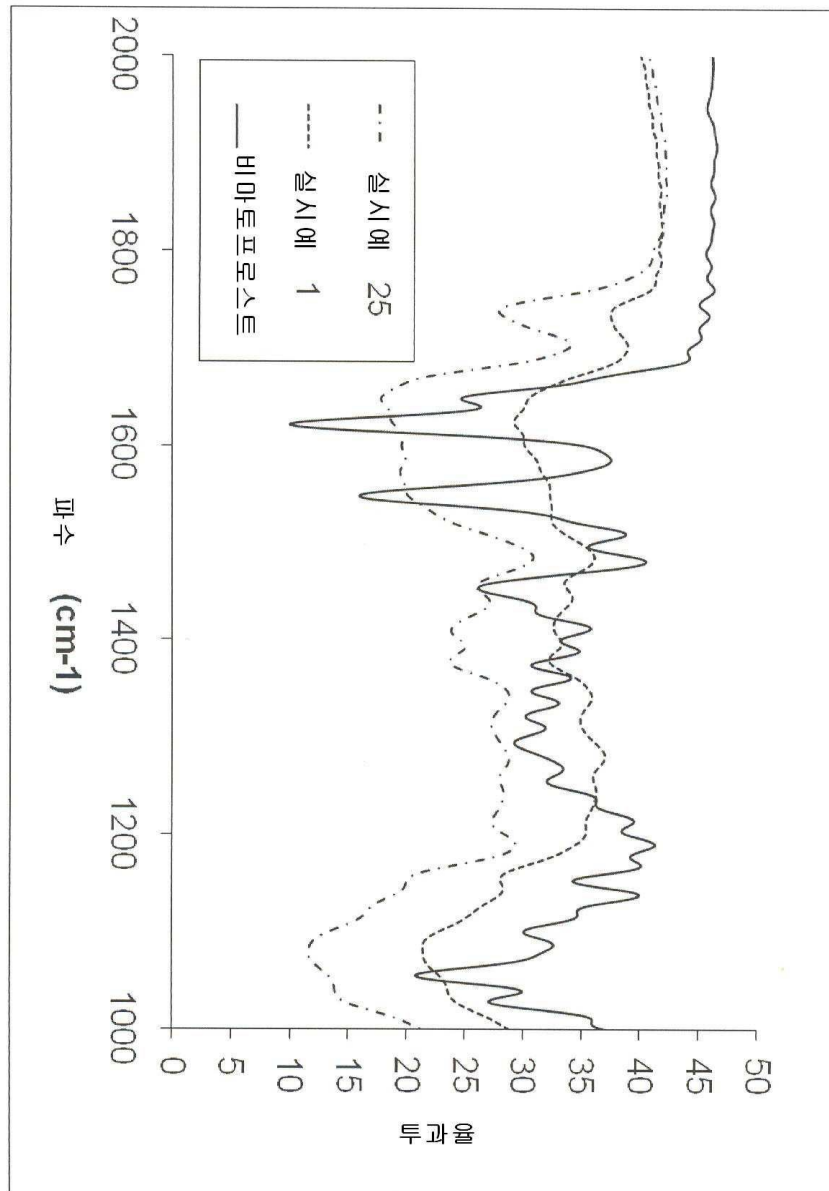
도면16



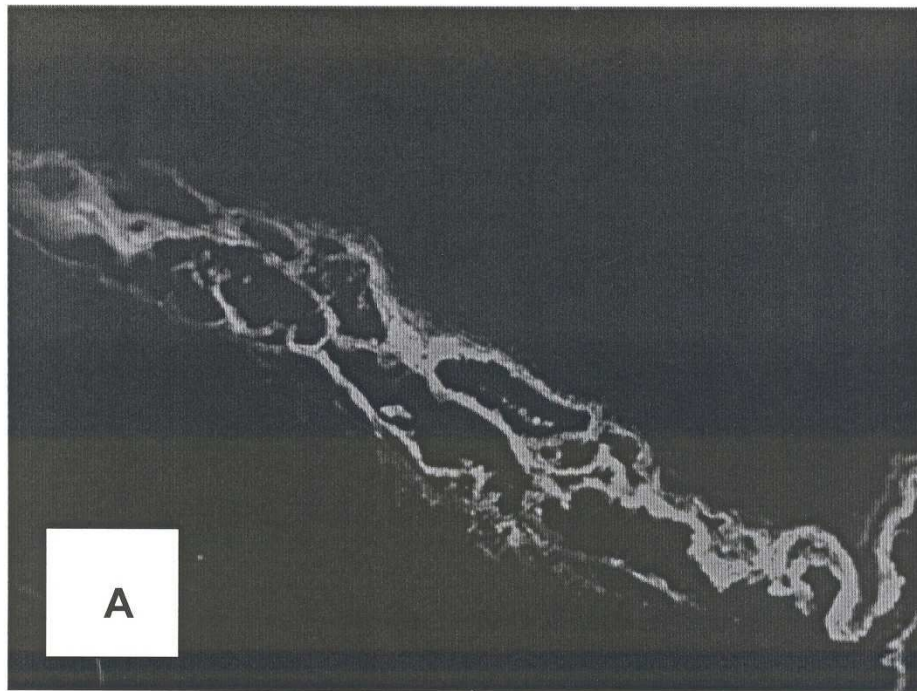
도면17



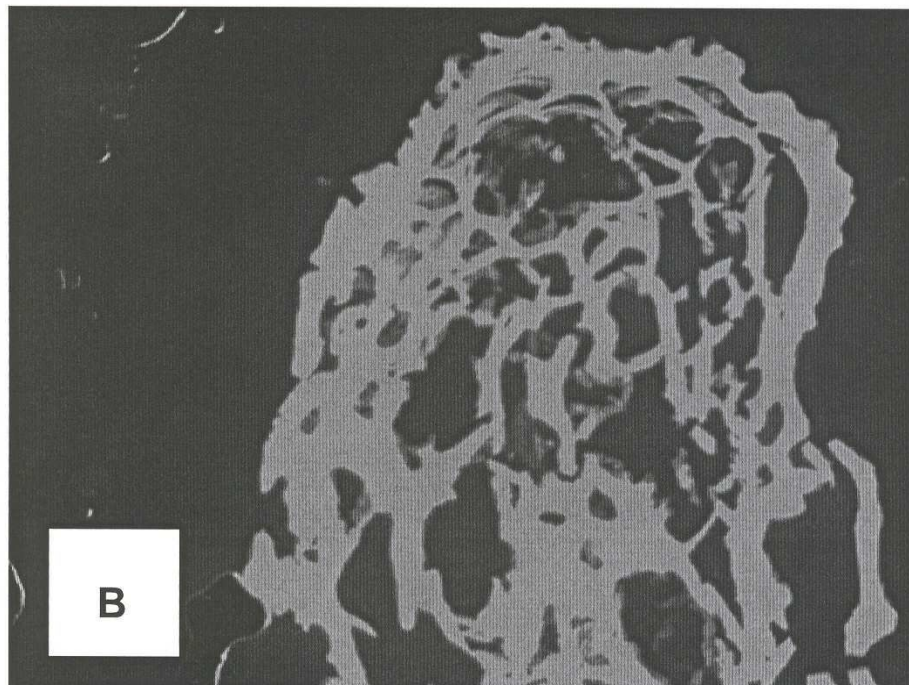
도면18



도면19A

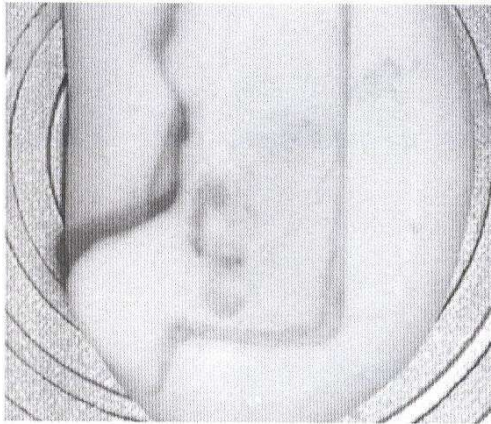


도면19B



도면20A

눈 주위 주사 29-일 결과
대조구- 염수 주사



냉동 절단후 동결된 블록



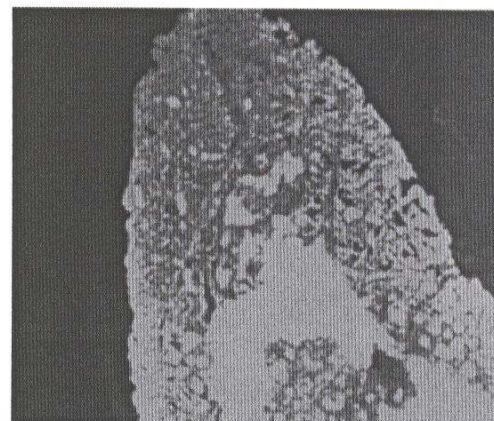
칼코플루오르 염색

도면20B

실험 제형



냉동 절단 후 동결된 블록



칼코플루오르 염색

도면21

