



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0038520
(43) 공개일자 2012년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 31/203* (2006.01)
A61K 31/4415 (2006.01) *A61K 31/51* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7004681
(22) 출원일자(국제) 2010년07월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년02월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/060752
(87) 국제공개번호 WO 2011/012557
국제공개일자 2011년02월03일
(30) 우선권주장
VA2009A000052 2009년07월27일 이탈리아(IT)
VA2010A000044 2010년05월20일 이탈리아(IT)

(71) 출원인
트로이시 살바토레
이탈리아 아이-84085 메르까또 산 세베리노 37 비
아 트리에스테
산세베리노 레나토
이탈리아 아이-80122 나폴리 41 비아 브이 람파
에스. 안토니오 아 포실리포
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
트로이시 살바토레
이탈리아 아이-84085 메르까또 산 세베리노 37 비
아 트리에스테
델 프레데 안토니오
이탈리아 아이-80121 나폴리 123 비아 키아이아
카루소 치로
이탈리아 아이-80128 나폴리 232 비아 지. 지앙페
(74) 대리인
최광호

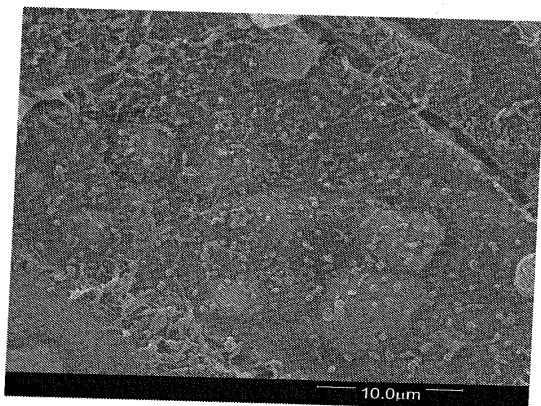
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 상피세포를 통한 교차결합 수법을 이용하여 UV-A 선으로부터 안구의 내부 구조를 보호하기 위한 또는 원추각막을 치료하기 위한 안과 용액

(57) 요 약

안구의 내부 구조를 UV-A 선으로부터 보호하기 위한 또는 상피세포를 통한 교차결합 수법에 의해 원추각막을 치료하기 위한, 필수 및 조건부 필수 아미노산, 코엔자임 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신, L-아르기닌 및 메탈로프로테이나제 MMP9의 생산을 자극하기 위한 화합물로 이루어진 군에서 선택된 적어도 1개의 화합물을 함유하는 안과 용액.

대 표 도 - 도9



(71) 출원인

카루소 치로

이탈리아 아이-80128 나폴리 232 비아 지. 지앙페

넬 프레데 안토니오

이탈리아 아이-80121 나폴리 123 비아 키아이아

특허청구의 범위

청구항 1

상피세포를 통한 교차결합 수법을 이용하여 UV-A 선으로부터 안구의 내부 구조를 보호하기 위하여 또는 원추각막을 치료하기 위한, 리보플라빈 및 필수 및 조건부 필수 아미노산, 코엔자임 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신, L-아르기닌 및 제니슈타인, 피토에스트로겐, 사이토카인, 및 아세틸살리실산, 플루페나믹산, 메클로페나믹산, 메페나믹산, 니플루미크산, 틀페나믹산, 베노릴레이트, 카르프로펜, 셀레콕시브, 신독시캄, 디플루니실, 디클로페낙, 드록시캄, 에토도락, 에토리콕시브, 폐노프로펜, 풀루르비프로펜, 이부페낙, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케토로락, 로르녹시캄, 루미라콕시브, 멜옥시캄, 메타미졸, 나프록센, 니메술리드, 옥사프로진, 파레콕시브, 피록시캄, 로페콕시브, 술린닥, 수독시캄, 테녹시캄, 발데콕시브와 같은 비스테로이드성 항염증성 약물과 같은 메탈로프로테이나제 MMP9의 생산을 자극하기 위한 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 화합물을 함유하는 안과 용액.

청구항 2

제 1항에 있어서, 비타민 E 및 필수 및 조건부 필수 아미노산, 코엔자임 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신 및 L-아르기닌으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 1개의 화합물을 함유하는 안과 용액.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 0.0001% 내지 0.5% 범위에서 선택된 농도의 리보플라빈-텍스트란 용액 및 다음 화합물 중 적어도 1개의 화합물을 포함하는 안과 용액:

- 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml 범위에서 선택된 농도의 비타민 E;
- 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml 범위에서 선택된 농도의 코엔자임 Q;
- 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml 범위에서 선택된 농도의 L-프롤린;
- 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml 범위에서 선택된 농도의 글리신;
- 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml 범위에서 선택된 농도의 리신 히드로클로라이드;
- 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml 범위에서 선택된 농도의 L-로이신;
- 0.00001% 내지 0.5% 범위에서 선택된 농도의 L-아르기닌 또는 다른 필수 또는 조건부 필수 아미노산.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.1% 농도의 리보플라빈-텍스트란 용액 및 다음 화합물 중의 적어도 1개를 포함하는 안과 용액:

- 약 500 mg % ml 농도의 비타민 E;
- 약 100 mg % ml 농도의 코엔자임 Q;
- 약 0.1 mg % ml 농도의 L-프롤린;
- 약 0.1 mg % ml 농도의 글리신;
- 약 0.05 mg % ml 농도의 리신 히드로클로라이드;
- 약 0.08 mg % ml 농도의 L-로이신;
- 약 0.1% 농도의 L-아르기닌 또는 다른 필수 또는 조건부 필수 아미노산.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 리보플라빈-텍스트란 0.1%, 비타민 E TPGS (D-알파-토코페릴 폴리에틸렌-글리콜 1000 숙시네이트) 500 mg % ml, 코엔자임 Q 100 mg % ml, L-프롤린 0.1 mg %, 글리신 0.1 mg %,

리신 히드로클로라이드 0.05 mg % 및 L-로이신 0.08 mg %를 포함하는 안과 용액.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 점안액 또는 안과 젤 형태 또는 치료적 콘택트 렌즈 상에 적용되기에 적합한 형태의 안과 용액.

청구항 7

안구의 내부 구조를 UV-A 선으로부터 보호하기 위한 또는 상피세포를 통한 교차결합 수법에 의해 원추각막을 치료하기 위한 리보플라빈을 함유하는 안과 용액을 제조하기 위한, 리보플라빈 및 필수 및 조건부 필수 아미노산, 코엔자임 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신, L-아르기닌 및 제니슈타인, 피토에스트로겐, 사이토카인, 및 아세틸살리실산, 플루페나믹산, 메클로페나믹산, 메페나믹산, 니플루미산, 톤페나믹산, 베노릴레이트, 카르프로펜, 셀레콕시브, 신녹시캄, 디플루니살, 디클로페낙, 드록시캄, 에토도락, 에토리콕시브, 폐노프로펜, 풀루르비프로펜, 이부페낙, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케토로락, 로르녹시캄, 루미라콕시브, 멜옥시캄, 메타미졸, 나프록센, 니메술리드, 옥사프로진, 파레콕시브, 피록시캄, 로페콕시브, 술린닥, 수독시캄, 테녹시캄, 발데콕시브와 같은 비스테로이드성 항염증성 약물과 같은 메탈로프로테이나제 MMP9의 생산을 자극하기 위한 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 화합물의 용도.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 안과 용액이 비타민 E 및 필수 및 조건부 필수 아미노산, 코엔자임 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신 및 L-아르기닌으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 1개 화합물을 함유하는 용도.

청구항 9

필수 및 조건부 필수 아미노산, 코엔자임 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신, L-아르기닌 및 제니슈타인, 피토에스트로겐, 사이토카인, 및 아세틸살리실산, 플루페나믹산, 메클로페나믹산, 메페나믹산, 니플루미산, 톤페나믹산, 베노릴레이트, 카르프로펜, 셀레콕시브, 신녹시캄, 디플루니살, 디클로페낙, 드록시캄, 에토도락, 에토리콕시브, 폐노프로펜, 풀루르비프로펜, 이부페낙, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케토로락, 로르녹시캄, 루미라콕시브, 멜옥시캄, 메타미졸, 나프록센, 니메술리드, 옥사프로진, 파레콕시브, 피록시캄, 로페콕시브, 술린닥, 수독시캄, 테녹시캄, 발데콕시브와 같은 비스테로이드성 항염증성 약물과 같은 메탈로프로테이나제 MMP9의 생산을 자극하기 위한 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 화합물을 리보플라빈 용액에 부가하는 단계를 포함하는 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 따른 안과 용액을 제조하는 방법.

청구항 10

리보플라빈을 함유하는 안과 용액을 제조하기 위한 침투 항상제로서, 필수 및 조건부 필수 아미노산, 코엔자임 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신, L-아르기닌 및 제니슈타인, 피토에스트로겐, 사이토카인, 및 아세틸살리실산, 플루페나믹산, 메클로페나믹산, 메페나믹산, 니플루미산, 톤페나믹산, 베노릴레이트, 카르프로펜, 셀레콕시브, 신녹시캄, 디플루니살, 디클로페낙, 드록시캄, 에토도락, 에토리콕시브, 폐노프로펜, 풀루르비프로펜, 이부페낙, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케토로락, 로르녹시캄, 루미라콕시브, 멜옥시캄, 메타미졸, 나프록센, 니메술리드, 옥사프로진, 파레콕시브, 피록시캄, 로페콕시브, 술린닥, 수독시캄, 테녹시캄, 발데콕시브와 같은 비스테로이드성 항염증성 약물과 같은 메탈로프로테이나제 MMP9의 생산을 자극하기 위한 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개의 화합물의 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 원추각막(keratoconus)을 치료하기 위한 조성물 및 수법에 관한 것이고, 더욱 자세하게는 UV-A로부터 안구의 내부 구조를 보호하기 위하여 또는 각막 교차결합 치료에 사용하기에 적합한 신규 용액에 관

한 것이다.

배경기술

- [0002] 책[18]은 안과 용액을 투여하여 흡수하는 수법과 그 문제점을 개략적으로 제공한다.
- [0003] 리보플라빈(비타민 B2)을 갖는 각막 교차결합(C3)은 간단히 리보플라빈-C3이라 불리며, 원추각막 및 각막 확장 중에 걸린 환자를 치료하기 위한 혁신적인 수법이며 또 각막 조직을 강화하기 위하여 리보플라빈을 투여하고 UV 조사(UV-A)하는 것으로 이루어진다[1] [2].
- [0004] 교차결합 치료는 비교적 간단하다: 리보플라빈을 눈에 스며들게 하고 각막에 적절한 투여량의 UV-A 선을 5분 동안 조사한다; 상기 과정은 UV-A 선에 대한 총 노출이 30분간 지속되도록 6회 반복한다.
- [0005] 교차결합 치료 적합성을 확립하기 위해 고려되어야 하는 가장 중요한 임상적 변수는 각막 두께로서, 400 미크론 보다 작지 않아야 한다.
- [0006] 원추각막의 이러한 보존적 치료의 목적은 각막 이식의 필요성을 지연시키거나 소망스럽게는 제거하고 또 환자의 시각 성능을 개선하여 삶의 질을 향상시키기 위한 것이다[6] [7].
- [0007] 상기 교차결합 수법은, 구성되는 콜라겐 라멜라의 감소된 응집에 기인한 각막 연조직의 비정상적 이완으로 인한 각막의 점진적 약화를 특징으로 하는 질병인, 원추각막을 치료하기 위하여 사용되어 왔다. UV-A 선 및 리보플라빈을 사용하는 것에 의해, 인접하는 각막 콜라겐 분자 사이에 새로운 결합이 생성되고 또 치료된 각막은 더 두껍고 더 딱딱해진다[3]. 각막은 연조직의 두께에서 다층의 콜라겐 섬유를 갖는다; 이를 중 콜라겐의 다양한 층을 결합하는 소위 교차결합이라 불리는 횡단 결합은 각막 딱딱함(stiffness)에 결정적으로 기여한다. 각막 교차결합 치료의 목적은 이들 다수의 횡단 결합의 생성을 통하여 각막 조직의 강인함의 정도를 증가시키기 위한 것이다.
- [0008] 탈상피화된(disepithelized) 각막 상에 리보플라빈을 국소 투여하여 약 200 μm 침투되게 하는 것과 UV-A에 의한 리보플라빈 분자의 조사는 유리 라디칼의 생성과 더불어 리보플라빈 분자의 화학적 균형 상실을 결정한다. 리보플라빈 분자는 불안정해지고 또 2개의 콜라겐 피브릴과의 결합에 의해 그 자체를 안정화한다. 일련의 생화학적 "브릿지"가 콜라겐 피브릴 중에 형성(즉, 교차결합)되어 각막의 일반적 강화를 유발한다[3].
- [0009] 실제로, 상기 치료는 각막의 최외층(즉, 각막 상피세포)을 제거한 후에 실시한다. 원추각막 및 각막 확장증의 교차결합 치료(C3-R)를 실시하는 이 방식은 기본적인 스트로마(stroma) 중의 리보플라빈-텍스트란 0.1%의 표준 용액(예를 들어 상표명 RICROLIN™으로 SOOFT ITALIA S.r.l.에 의해 시판되는 용액)의 선호하는 침투를 위해 각막 상피세포의 예비적 제거를 고려하며 또 상기 치료는 이들 조건하에서 표준화되어 있다. 이 수법의 지지자에 따르면, 상피세포 층의 제거는 각막 스트로마 내부에서 리보플라빈 용액의 최고로 가능한 흡수와 상기 치료법의 최대 효능을 확실히 하는데 필수적일 것이다.
- [0010] 불행히도, 각막 상피세포의 제거는 상기 치료를 한 날 및 바로 연속되는 날에 안구의 따끔거림이나 화상을 초래 할 수 있고 또 일시적으로 흐릿하게 할 수 있다; 이들 증상은 아주 잘 알려져 있고 또 각막 상피세포가 회복되지 않는 동안은 지속될 것이므로 C3-R 이후의 연속하는 날 중에, 비-스테로이드성 항염증제(NSAID) 점안액을 사용하여, 눈물 충전물과 진통제를 기본으로 한 점안액을 사용하여, 또 각막 위에 치료용 콘택트 렌즈를 적용하는 것에 의해 흔히 치료된다[4-7].
- [0011] 일부 저자들은 각막 상피 세포의 예비적 제거 없이 표준 방법을 적용하여 C3-R 치료를 실시할 수 있고, 또 그러한 치료는 관찰된 임상 데이터가 나타내는 바와 같이 효과적이고 안전할 것이라고 주장한다. 이 수법에 따르면, 상기 치료는 각막 상피세포의 예비적 제거(탈상피화) 없이 실시되어야 한다. 그 목적은 제1 방법의 고유한 상피세포 제거로 인하여 환자가 질병을 경험하는 것을 피하여, 외래 환경(in an ambulatory)에서 치료를 실시하고 또 특히 각막의 기본적인 층의 연속적 노출과 더불어 상피세포 제거를 고려하는 치료에 고유한 수술후 감염의 우려를 피하는 것이다. 이 치료를 실시하는 상기 방식의 지지자들은 스트로마 UV-A 선에 의한 조사 이전에 리보플라빈의 더 좋은 흡수를 허용하도록 더 긴 시간 간격을 두고 눈에 리보플라빈을 적용하는 것을 제안하였다[8].
- [0012] 일반적으로 원추각막 및 각막 확장증의 교차결합에 의한 치료에 있어서 상피세포를 제거하거나 또는 제거하지 않는 것이 관련되는 한, 대조적인 의견이 문헌에 보고되어 있다.
- [0013] C3-R 치료는 스트로마에 리보플라빈이 잘 침투하도록 각막 상피세포를 제거한 후에 연구되고 실시되었다. 상기 저자가 아는 한, 각막 상피세포를 제거하거나 또는 제거하지 않는 것에 의해 각막 스트로마에서 리보플라빈이

침투하지는 여부 및 리보플라빈이 어느 정도 침투하는지를 결정하는 것에 대한 어떠한 연구도 문헌에 제시되어 있지 않다[9].

[0014] 예비적 탈상피화하지 않고 교차결합을 실시하는 것은, 예비적 탈상피화 없이 리보플라빈이 상피세포를 통과하지 않을 것이고 또 상피세포를 제거하지 않고서 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액이 각막 스트로마에서 효과적으로 통과할지 여부 및 어느 정도 통과하는지에 대해 또 상피세포를 통한 방식에서 UV-A 선에 의한 치료가 각막 상피세포를 제거한 후에 실시된 것과 동일하게 효과적일지 여부에 대해 아직껏 예시된 바 없다고 주장하는 다수의 저자들에 의해 비판을 받아왔다.

[0015] 각막 상피세포를 제거하지 않고 교차결합 수법에 의해 원추각막을 치료하기 위한 효과적인 물질을 제공하기 위한 시도로서, 스퍼어(Spoerl) 박사는 상피세포의 투과성을 증가시키기 위하여 벤잘코늄 클로라이드 사용을 제안하였고[17] 또 피넬리 박사는 리보플라빈과 혼합된 장력작용제(tensioactive)의 사용을 제안하였다.

[0016] 이탈리아 특허출원번호 MI2007A002162호[16]는 상피세포를 통한 교차결합 수법으로 원추각막을 치료하기 위한, 리보플라빈 및 벤잘코늄 클로라이드를 함유하는 신규 용액을 개시한다.

[0017] 결과가 이후에 설명된, 인간 각막에 대한 본 출원인에 의해 실시된 실험은 피넬리 박사[16]에 의해 제안된 표준 용액 또는 조성물을 사용하여 실시된 제2 수법이 각막 상피세포의 제거로 인한 문제를 극복할 수 없을 것이라는 결론에 도달했는데, 상기 표준 용액 또는 조성물이 파괴되어, 노출된 기본 층에 수선 메카니즘의 감염 및 변형 우려를 남기기 때문이다.

[0018] 비교적 단시간에 각막 상피세포를 교차할 수 있고 또 수술후 성가신 증상의 원인인 각막 상피세포의 손상을 유발하지 않는 각막 교차결합을 실시하기 위한, 리보플라빈을 함유하는 조성물을 갖는 것이 바람직하다.

발명의 내용

요약

본 출원인은 각막 상피세포의 예비적 제거에 의해 또는 예비적 제거 없이 리보플라빈 단독 또는 기타 물질과 조합되어 얼마나 인간 각막을 통하여 침투하는지를 결정하고 UV-A 선에 의한 연속적인 치료의 효능과 안전성을 결정하는 것을 목적으로 한다.

[0021] 필수 및 조건부 필수(아르기닌, 시스테인, 글리신, 글루타민, 히스티딘, 프롤린, 세린 및 티로신과 같은) 아미노산, 코엔자임 Q, 비타민 E, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신, L-아르기닌 및 이하에 더욱 자세하게 확인되고, 리보플라빈을 투여하기에, 특히 각막 상피세포를 통하여 리보플라빈-덱스트란의 표준 용액을 투여하기에 적합한 안과 용액에서 담체("투과 향상제")로서 효과적으로 사용될 수 있는 메탈로프로테이나제 MMP9의 생산을 자극하기 위한 화합물로 구성된 군으로부터 선택된 몇 개의 유용한 물질이 확인되어 있다. 예를 들어 점안액 형태 또는 젤 형태 또는 수용액 또는 애벌전 형태 또는 치료적 콘택트 렌즈 상에 적용되는 것과 같이 시판될 수 있는 얻어진 안과 용액은 상피세포를 통한 교차결합 수법에 의해 원추각막 치료에 사용될 수 있으므로 각막 상피세포를 보존한다.

[0022] 안과 용액은 결국에는 예를 들어 아세트산과 같은 부형제를 함유할 수 있거나, 또는 상술한 물질들은 리보플라빈과 혼합되기 전에 아세트산에 의해 처리되거나 또는 다른 부형제와 처리될 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한 UV-A 선으로부터 안구의 내부 구조를 보호하기 위한 또는 상피세포를 통한 교차결합 수법으로 원추 각막을 치료하기 위한 리보플라빈을 함유하는 안과 용액 및 각막 상피세포를 통하여 리보플라빈을 투여하기에 적합한 조성물로서 리보플라빈 및 담체("투과 향상제")를 함유하는 상대적 안과 용액을 제조하기 위한, 필수 및 조건부 필수 아미노산, 코엔자임 Q, 비타민 E, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신, L-아르기닌 및 이후에 더욱 자세하게 확인된 메탈로프로테이나제 MMP9의 생산을 자극하기 위한 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개 물질의 용도를 제안한다.

[0024] 본 발명은 리보플라빈 용액에 상기 확인된 담체 중의 적어도 1개를 부가하는 것으로 이루어지는 안과 용액을 제조하는 방법을 제안한다.

[0025] 담체로서 제안된 각각의 물질은, 예시적 실시양태의 기재를 확실히 하기 위하여 나타낸 범위에서 선택된 농도로 리보플라빈을 함유하는 용액에, 단독으로 부가되거나 또는 다른 제안된 담체와 조합되어 부가될 수 있다.

[0026] 본 발명은 첨부된 특허청구범위에 정의된다.

도면의 간단한 설명

[0027]

도 1은 상피세포를 통한 방식으로 적용한 후 각막을 통한 리보플라빈 용액 0.1%의 통과를 평가하기 위해 채용된 육안 평가, 형광측정, 비색측정 평가를 도시한다.

도 2a는 상피세포를 통한 방식으로 제4 시험 조성물이 적용된지 15분 후에 각막 부분의 형광 사진을 도시한다.

도 2b는 상피세포를 통한 방식으로 제4 시험 조성물이 적용된지 30분 후에 각막 부분의 형광 사진을 도시한다.

도 2c는 상기 제4 조성물의 통과로 인한 강력한 형광 및 상기 처리 후의 조직의 상대적 강직성이 관찰될 수 있는 제4 신규 용액을 사용한 상피세포를 통한 교차결합에 의해 처리된 각막 부분의 형광 영상을 도시한다.

도 3a는 표준 용액을 사용하여 상피세포를 통한 교차결합에 의해 처리된 각막의 굴절 정도를 도시한다.

도 3b는 신규의 제4 시험 용액을 사용하여 상피세포를 통한 교차결합에 의해 처리된 각막의 굴절 정도를 도시한다.

도 4는 원추각막에 걸린 각막 부분에서 라멜라(lamellae)를 도시하는 주사 현미경도이다.

도 5는 도 4의 각막의 확대도를 도시하는 주사 현미경도이다.

도 6은 제4의 신규한 시험 조성물을 사용하여 상피세포를 통한 교차결합이 실시된 후 원추각막에 걸린 각막 부분에서 라멜라를 도시하는 주사 현미경도이다.

도 7은 정상 각막에서 미세융모(microvilli) 및 상피세포의 표피층의 형태를 도시하는 주사 현미경도이다.

도 8은 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액이 상피세포를 통한 방식으로 적용된 후 표준 선량의 UV-A 선으로 처리된 각막의 주사 현미경도이다.

도 9는 제4의 신규 시험 조성물이 상피세포를 통한 방식으로 적용된 후 표준 선량의 UV-A로 처리된 각막의 주사 현미경도이다.

도 10은 상피세포를 통한 방식으로 생리학적 용액이 적용된 후 표준 선량의 UV-A로 처리된 각막의 주사 현미경도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

예시적 실시형태의 설명

[0029]

모든 시험은 이식 실험에서 고려되는 합의 후 및 윤리 위원회의 허가에 따라서 Azienda Ospedaliera Napoli 1 - Banca Occhi ("Eye Bank") - Regione Campania - Ospedale dei Pellegrini 출신의 기증자의 인간 각막에서 실시되었다 - 도켓 번호 0009304/2009 - 결정번호 1269.

[0030]

상피세포의 예비적 제거 없는 완전한 인간 각막을 통한 시험 조성물의 침투를 관찰하였으며, 상기 각막의 두께는 500 내지 600 미크론이고, 상기 조성물은 리보플라빈-덱스트란의 표준 용액, [16] 및 [17]에 제시된 리보플라빈-덱스트란 + 벤잘코늄 클로라이드로 제조된 조성물, 및 리보플라빈을 비타민 E, 코엔자임 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 1개 물질을 특정 농도로 혼합하여 얻은 신규 시험 조성물이다.

[0031]

신규 시험 조성을 실현하기 위해 사용된 물질의 농도는 하기 범위로 포함된다:

[0032]

비타민 E: 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml의 농도. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.01 mg % 내지 1500 mg % ml의 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 10 mg % ml 내지 1000 mg % ml이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 약 500 mg % ml이다;

[0033]

비타민 Q: 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml의 농도. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.01 mg % 내지 1500 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 1 mg % ml 내지 1000 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 약 100 mg % ml이다;

[0034]

L-프롤린: 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml의 농도. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.001 mg % 내지 100 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.005 mg % ml 내지 10 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.01 mg % ml 내지 1 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태

에 따르면, 농도는 약 0.1 mg % ml이다;

[0035] 글리신: 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml의 농도. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.001 mg % 내지 100 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.005 mg % ml 내지 10 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.01 mg % ml 내지 1 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 약 0.1 mg % ml이다;

[0036] 리신 히드로클로라이드: 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml의 농도. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.001 mg % 내지 100 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.005 mg % ml 내지 10 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.01 mg % ml 내지 1 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 약 0.05 mg % ml이다;

[0037] L-로이신: 0.0001 mg % ml 내지 2000 mg % ml의 농도. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.001 mg % 내지 100 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.005 mg % ml 내지 10 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 0.01 mg % ml 내지 1 mg % ml 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 농도는 약 0.08 mg % ml이다.

[0038] 상피세포를 통한 교차결합에 의해 원추각막의 치료하기에 또는 UV-A 선으로부터 안구를 보호하기에 적합한 신규 용액은, 지시된 범위로 포함된 농도의 상술한 물질 중의 하나 또는 복수 개를 혼합하여 리보플라빈을 함유하는 용액, 예를 들어 0.0001% 내지 0.5% 범위에서 선택된 농도의 리보플라빈-덱스트란 용액이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 리보플라빈-덱스트란 농도는 0.001% 내지 0.4% 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 농도는 0.005% 내지 0.3% 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 농도는 약 0.01% 내지 0.2% 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 농도는 약 0.1% 이다.

[0039] 상기 시험의 결과는 상기 확인된 군의 물질 각각이 리보플라빈 및 특히 표준 리보플라빈-덱스트란 용액의 각막 상피세포를 통한 바람직한 침투에 적합하다는 것과 UV-A 선으로부터 각막을 보호하는데 적합하다는 것을 나타내었다.

[0040] 이식에 사용할 수 없는 이유로 안구 은행으로부터 폐기된 시험에 고려되는 각막은 적절한 용액에 유지되었고 또 시험 전에 이들은 광학 현미경 및 내피 세포의 조사에 의해 다시 평가되었다.

[0041] [10-15]에 제시된 바에 따르면, 500 내지 600 미크론 두께를 갖고 양호한 내피세포 모자이크를 갖는 양호한 투명성을 갖는 각막 만이 사용되어 왔다.

[0042] 히알루론산 나트륨 + 크산탄 검 0.4 ml의 소정 용액을 함유하는 실린더 챔버를 단도록 각막이 자리잡고 있다. 실린더 박스와 동일한 직경을 갖는 방수 밀봉 금속 고리는 상기 각막 표면 상에 적용되었다. 이어 형광 물질(리보플라빈)을 함유하는 시험할 조성물은 각막 위에 적용하였다. 다양한 예에서 박스 내의 용액의 형광을 측정하는 것에 의해, 상기 신규 용액이 각막에 침투하는 양 및 그를 위해 얼마나 오래 상기 용액을 취하는지를 결정할 수 있다.

[0043] 상피세포를 통한 방식으로 리보플라빈을 투여하기 위한 조성물 및 리보플라빈을 상기 나타낸 물질 중의 적어도 하나와 혼합하는 것에 의해 얻은 조성물에서 담체로서 나타낸 물질의 효능은, 예시적 목적이지만 비제한적 목적으로만 이용되는, 이하의 시험예를 통하여 기재된다.

[0044] 간단히 나타내기 위하여, 각막을 이하의 조성물로 처리하는 것에 의해 얻은 시험 결과 만을 보고하였다:

1) 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액;

2) 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액 + [16]에 따른 벤잘코늄 클로라이드 0.01%;

3) 리보플라빈-덱스트란 0.1% + 500 mg % ml 농도의 비타민 E TPGS (D-알파-토코페릴 폴리에틸렌 글리콜 1000 숙시네이트)의 제1 신규 시험 조성물;

4) 리보플라빈-덱스트란 0.1% + 비타민 Q 100 mg % ml의 제2 신규 시험 조성물;

5) 리보플라빈-덱스트란 0.1% + L-프롤린 0.1 mg % + 글리신 0.1 mg %, 리신 히드로클로라이드 0.05 mg % + L-로이신 0.08 mg %의 제3 신규 시험 조성물;

6) 리보플라빈-덱스트란 0.1 % + 비타민 E (D-알파-토코페릴 폴리에틸렌 글리콜 1000 숙시네이트) 500 mg % ml + 비타민 Q 100 mg % ml + L-프롤린 0.1 mg % + 글리신 0.1 mg % + 리신 히드로클로라이드 0.05 mg % + L-로이

신 0.08 mg %의 제4 신규 시험 조성물.

[0051] 상기 언급된 6개의 조성물 각각은 선택된 각막의 표면 상에 상기 기재한 바와 같이 도포되어 위치하며 또 각막 스트로마의 침지는 처리된 각막 아래의 용기 내부에 위치하는 히알우론산 나트륨 + 크산탄 검 0.4 ml의 용액 중에 형광 물질의 존재와 함께 15분 후 및 30분 후에 평가하였다. 각막 스트로마에서 리보플라빈 침투의 평가는 각막을 구획을 나누고 또 형광 현미경으로 연속 평가하는 것에 의해 실시되었다.

[0052] 각막을 통한 통과를 나타내는 히알우론산 나트륨 + 크산탄 검 0.4 ml의 용액 내의 리보플라빈의 존재는, 도 1에 도시된 바와 같이 육안 측정 및 형광측정을 이용하여 정성적으로 뿐만아니라 비색측정을 이용하여 정량적으로 평가하였다. 각 컬러 샘플 근처의 2개 숫자는 각각 도시된 컬러를 유발하는 리보플라빈의 표준 용액 부분의 수 및 크산탄 검 및 히알우론산 나트륨의 용액 부분의 수를 각각 나타낸다. 참조 측정은 리보플라빈-텍스트란 0.1%를 다음 비율(단위/ml) 50/0, 40/10, 30/20, 20/30, 10/40, 0/50의 크산탄 검 + 히알우론산 나트륨으로 희석한 희석물을 제조하는 것에 의해 정의되었다. 단위/ml의 정의된 값에 상응하는 육안 측정 및 형광 측정을 준비하고 또 각 희석율에 대하여 10에서 0까지의 점수를 할당하였다. 비색 측정은 희석제로서 선택된 물질의 비색 스펙트럼에 상응하는 리보플라빈의 부재시 20%에 상응하는 황색 %의 최소 값을 고려한다.

[0053] 육안 측정에 의한 평가는 예비정의된 샘플을 사용한 시험에 의해 얻은 샘플의 직접적 대조에 의해 또 디지털 사진 수법에 의해 표준 조명 조건하에서 실시되었다. 형광측정 평가는 디지털 포토카메라를 구비한 형광주사 현미경을 사용하여 암소에서 실시되었다. 육안 측정 및 형광 측정에 의한 평가에 대한 점수는 제3 심사관에 의해, 2개 방법으로 얻은 값의 평균을 내는 것에 의해 실시하였다.

[0054] 비색측정 평가는 실린더 챔버 내부(및 따라서 각막 아래)에서 시험의 끝에 존재하는 물질을 투명 백에 삽입하고 또 컴퓨터 분석을 이용하여, 미리-정의된 희석물을 고화질로 스캐닝하고 또 소프트웨어 프로그램 Photoshop™ 7.0 및 모노크롬 필터를 사용하여 황색 %를 평가하는 것에 의해 실시되었다. 상기 수법을 이용함으로써 도 1에 도시된 바와 같이 실험 샘플에서 검출된 황색 %를 표준 리보플라빈 0.1% 용액의 단위/ml로 표시된 정확하게 측정된 농도 값과 비교할 수 있었다.

[0055] 도 2a는 제4 신규 용액이 적용된지 15분 후 상피세포를 통한 교차결합에 의해 처리된 각막 부분의 형광 영상이고, 도 2b는 제4 신규 용액이 적용된지 30분 후 상피세포를 통한 교차결합에 의해 처리된 각막 부분의 형광 영상이며, 도 2c는 제4 신규 용액에 의해 상피세포를 통한 교차결합에 의해 처리된 각막 부분의 형광 영상이다. 마지막 도면에서 리보플라빈이 전체 각막에 침투하였다는 것과 조직이 교차결합 치료 후 더 장인해졌다는 것을 알 수 있다.

[0056] 실시된 시험은 다음을 나타내었다:

[0057] a) 리보플라빈-텍스트란 0.1%의 표준 용액을 상피세포를 통한 방식으로 적용한 지 15분 후, 각막 스트로마는 부분적으로 침지되고 또 형광 용액은 용기 내의 물질 중에서 검출되지 않으며, 비색측정 스펙트럼은 히알우론산 나트륨 + 크산탄 검 0.4 ml의 용액과 동일한 결과를 보여준다(도 1에서와 같은 점수 0 및 20% 이하의 황색 %);

[0058] b) 리보플라빈-텍스트란 0.1%의 표준 용액을 상피세포를 통한 방식으로 적용한 지 30분 후, 각막 스트로마는 형광 용액으로 완전히 침지되며; 용기 내의 히알우론산 나트륨 + 크산탄 검 0.4 ml의 용액 중의 형광은 검출될 수 있고, 도 1의 점수는 2-3이고 또 황색 %는 상술한 컴퓨터를 이용한 수법에 의해 75%-80% 범위로 결정되었다;

[0059] c) 상피세포를 통한 방식으로 500 mg % ml 농도의 리보플라빈-텍스트란 0.1% + 비타민 E TPGS (D-알파-토코페릴 폴리에틸렌글리콜 1000 숙시네이트)의 제1 신규 시험 용액을 적용한지 15분 후, 각막은 완전히 침지되며 또 형광 용액은 용기 내에 존재한다(도 1의 점수 2-3, 황색 %는 72-76%);

[0060] d) 상기 제1 신규 시험 용액을 적용한 지 30분 후, 각막의 모든 충은 완전히 침지되며 또 용기 내에는 고농도의 리보플라빈이 있으며, 이는 상피세포 표면과의 접촉으로 생성물 자체에 대한 각막 조직의 양호한 투과성을 나타낸다(도 1의 점수 3-4, 79-84%의 황색 %);

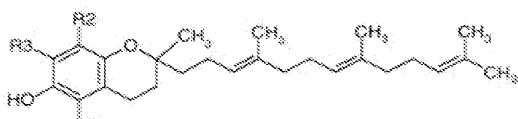
[0061] e) [16]에서 제안된 조성물 및 각각 벤잘코늄 클로라이드 0.01%; 비타민 Q 100 mg % ml; L-프롤린 0.1 mg %, 글리신 0.1 mg %, 리신 히드로클로라이드 0.05 mg % 및 L-로이신 0.08 mg %를 함유하는 제2 및 제3 신규 시험 용액은, 동일한 조건하에서, 표준 용액(리보플라빈-텍스트란 0.1%) 단독을 사용하여 얻어진 상응하는 결과에 비하여 양적으로나 침투 속도 면에서 더 우수한 리보플라빈 침투를 나타내었다(15분 후 도 1의 점수 3-4 및 30분 후 점수 4-6, 15분 후 70-79%의 황색 % 및 30분 후 78-86%의 황색 %);

[0062] f) 제4 신규 시험 조성물은 시험된 다른 모든 조성물에 비하여 훨씬 더 우수한 결과를 나타내었다. 상피세포 표

면에 상기 제품을 적용한지 15분 후 및 30분 후에 용기 내의 형광 물질을 형광측정 방식 및 컴퓨터를 이용한 분석으로 검출된 착색제의 농도는 현저히 향상되었다(15분 후 도 1의 점수 5-6, 88-91%의 황색 %; 30분 후 점수 6-7, 90% 초과의 황색 %); 제4 신규 시험 용액을 상피세포를 통하여 적용한 후 얻어진 각막 아래에 위치한 용액 내의 형광 물질의 더 높은 농도는, 특히 동일 시간 간격 후 용기 내에 존재하는 용액 중에서도 검출될 수 없는 표준 용액을 사용하여 얻은 결과와 비교하면, 특히 15분 후에 현저하다. 이것은 함께 혼합될 때 각막 상피세포를 통한 리보플라빈의 통과를 선호하는 투과 향상제 간의 상승효과가 존재한다고 가정하면 설명될 것이다.

[0063] 예시된 결과는 적어도 하기 물질이 단독으로 또는 이들과 조합하거나, 아세트산과 같은 부형제와 상술한 범위에서 선택된 농도로 조합되면, 표준 리보플라빈-엑스트란 용액에 의해 필요한 시간 간격에 비하여 훨씬 짧은 시간 간격으로 또 연속적인 교차결합 치료에 충분한 양으로 각막 상피세포를 통한 리보플라빈 침투를 촉진시킴을 나타낸다:

[0064] - 비타민 E



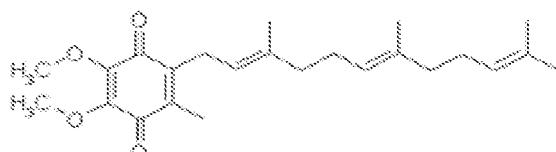
[0065]

[0066] R1 = CH₃ 또는 H

[0067] R2 = CH₃ 또는 H

[0068] R3 = CH₃; 단순히 예를 들어, 비타민 E TPGS (D-알파-토코페릴 폴리에틸렌글리콜 1000 숙시네이트)가 예시될 수 있다;

[0069] - 코엔자임 Q

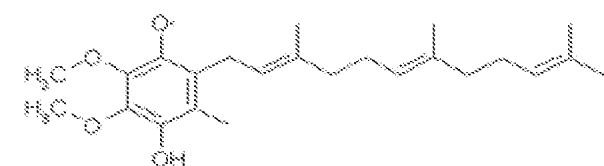


[0070]

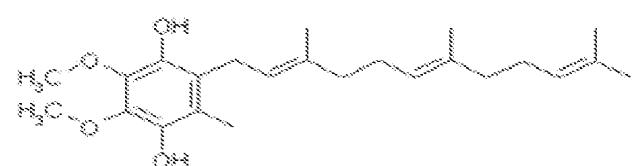
산화된 형태의

[0071]

반-퀴논(half-quinonic) 형태의



[0072]



[0073]

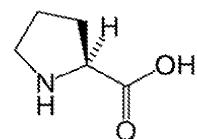
환원된 형태의

[0074]

코엔자임 Q의 이소프레노이드 단위의 수; 예를 들어, 코엔자임 Q10이 인용될 수 있다;

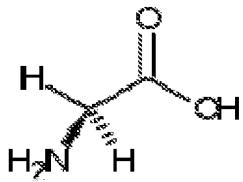
[0075]

- L-프롤린



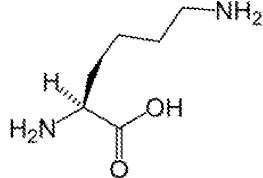
[0076]

[0077] - 글리신



[0078]

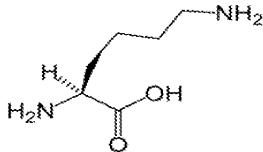
[0079] - 리신



[0080]

[0081] 또는 리신 히드로클로라이드;

[0082] - L-로이신



[0083]

[0084] 상술한 모든 화합물과 리보플라빈의 조합은 각막 조직을 통과하여 신속하게 각막 조직에 침투하는 제품의 농도 면에서 더 우수한 결과를 나타내는 점에서 예상치 못한 상승효과를 나타내었다.

[0085] 본 출원인들은 표준 수순에 따라서 제4 신규 시험 조성물을 적용한 다음 3 mW/cm^2 의 UV-A 조사로 함으로써 인간 각막에 대한 상피세포를 통한 교차결합 치료의 효능을 시험관내에서 시험하였다. 시험된 각막은 앞의 실험에서와 같이 각막을 적절한 베어링에 고정한 다음 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액 및 제4 신규 시험 조성물을 각각 각막의 상피세포 표면 상에 30분간 적용하는 것에 의해(즉 상피세포를 통한 방식으로 투여) 제조하였다. 연속적으로, 표준 UV-A 조사를 30분간 실시하였고, 이때 상기 단계는 5분간의 단계로 세분하여, 각 용액을 각각 표면 위에 재투여하는 것을 선행하였다. 각 실험의 말기에, 각막의 강직성 정도는 다음과 같이 평가하였다: 각각각막은 수평으로 정렬되어 유지된 각막 겸자를 이용하여 2 mm 길이에 대해 말단 부분에 의해 유지되고 또 상기 수평선에 대하여 각막의 대향 단부에 의해 형성된 각도를 측정하였다.

[0086] 도 3a는 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액을 사용하여 실시한 상피세포를 통한 교차결합 치료 후 각막을 도시하며, 약 40° 정도 아래로 굽어지며 또 도 3b는 제4 신규 시험 조성물을 사용하고 또 각막 상피세포를 미리 제거하지 않고 실시한 교차결합 치료 후의 다른 각막을 도시한다. 이들 2개 도면을 비교하는 것에 의해, 제4 신규 시험 조성물을 사용하여 실시한 상피세포를 통한 교차결합 치료가 바람직한 바와 같이 오직 25° 정도 아래로 굽어져, 각막을 강화시키는 것이 분명하다.

[0087] 제4 신규 시험 조성물을 사용하여 상피세포를 통한 교차결합 치료 효능의 다른 확인으로서, 원추각막에 걸린 환자들에 속하고, 구멍을 뚫어 각막이식 처리받은 인간 각막 단부 상에서 시험관내에서 이 처리를 실시하였다. 이들 경우에서 과괴되는 대신 환자로부터 외식된(explanted) 각막은 디아테르미(diathermy)에 관련한 수술 시간을 피하여, 각막 층의 평면을 보존하도록(전체 두께 이식) 주의하면서 실험실에서 사용되었다. 각막 윤부(corneal limbus)는 적절한 베어링 상에 고정하였다. 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액을 제1 각막 상에 적용하고, 또 제4 신규 시험 용액은 제2 각막 상에 적용하며, 상피세포를 제거하지 않고 각막 표면 상에 상기 용액들을 30분간 적용하였다. 이어, 표준 340 nm UV-A 처리는 3 mW/cm^2 의 파워로 제4 신규 시험 용액을 사용하여 처리된 각막에 대해서만 30분간, 각각 5분간의 단계로 세분하여 각막의 표면 상에 조성물을 재투여를 한 다음 실시하는 방식으로 수행하였다. 적절한 지지체 상에 조경된 원추각막에 걸린 다른 단부는 각막 상에 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액을 적용할 뿐 UV-A 후속 조사를 하지 않고 처리하였다. 실험의 말기에, 각막 연조직의 조사는 주사 전자 현미경을 이용하여 실시하였다.

- [0088] 도 4는 치료되지 않은 원추각막 환자로부터 얻은 각막 부분의 라멜라가 주사 현미경에서 어떻게 나타나는지를 도시한다. 도 5는 도 4의 확대도이다. 이들 2개 도면은 UV-A 조사 없이 리보플라빈-렉스트란 0.1%의 표준 용액을 적용한 각막의 단부에서 각막 라멜라의 약화를 도시한다.
- [0089] 도 6은 원추각막에 걸린 각막 부분의 라멜라가 신규 제4 시험 용액을 사용한 상피세포를 통한 교차결합 치료 후 어떻게 나타나는지를 도시하는 주사 현미경도이다. 표준 수순에 따라서 30분 동안 상피세포를 통한 방식으로 투여된 제4 신규 용액으로 처리되고 또 UV-A 선으로 조사된 원추각막의 단부는 고도로 조밀하게 분포되고 촘촘한 각막 라멜라를 제공하며, 이는 새로운 생화학적 교차결합이 형성되었음을 나타낸다.
- [0090] 제1, 제2 및 제3 신규 시험 조성물을 사용하여도 양호한 결과를 얻었다.
- [0091] 신규 시험 조성물들을 사용하여 얻어진 결과는, 상피세포가 UV-A 선을 차폐할 것이기 때문에 상피세포를 통한 방식으로 실시될 때 교차결합 치료의 효능의 가상적 감소가 있을 것이라는 일부 저자들에 의해 제기된 반대를 극복한다. 상피세포를 통한 교차결합 치료의 효능의 감소 가설은, 여기서 제안된 물질의 적어도 하나를 담체(투과 향상제)로 하여 리보플라빈에 부가하고 표준 수순에 따라서 조사를 실시할 때 얻어진 조직학적 샘플에 의해 증명된 바와 같이, 잘못된 것이다.
- [0092] 또한, 각막의 상피세포 층의 형태학적 통합성 여부 및 상피세포의 표면 상에 존재하는 미세융모에 대하여 상피세포를 통한 방식으로 교차결합 치료 효능의 비교 연구는 주사 전자 현미경(7500x)을 이용하여 실시하였다. 이것은 [16]에서 제안된 바와 같이 리보플라빈-렉스트란 0.1%의 표준 용액 및 표준 조성물 + 벤잘코늄 클로라이드 0.01%에 대하여 각막 상피세포 상에서 상피세포를 통한 방식으로 제4 신규 시험 조성물을 사용하여 실시한 교차결합 치료의 용인성을 평가하기 위해 실시되었다.
- [0093] 이 시험은 상피세포가 UV-A 플러스에 의해 조사된 최초의 유기 구조이고 또 이를 방사선의 흡수로 인하여 손상을 입을 수 있었기 때문에 실시되었다. 입수가능한 어떠한 문서도 이러한 특징을 고려한 바 없으며, 관련 데이터도 문현에서 입수할 수 없다.
- [0094] 상피세포의 활력을 평가하기 위한 가장 신뢰성있는 것으로 간주되는 변수는 임프레션(impression) 수법에 의한 세포학적 조사, 특히 각막의 표피 상피세포 층의 미세융모의 전자 현미경에 의한 조사이다. 고농도의 뮤신 트랜스멤브레인 및 양호한 글리코칼릭스(glycocalyx)를 함유하는 완전한 표피 세포 요소의 막의 엑스트로플렉션(extroplexion)(미세융모)의 존재는 각막앞(pre-corneal) 눈물 필름의 깊은 층을 구성하는 자유 뮤신을 적절한 방식으로 결합시킨다. 대조적으로, 미세융모의 병리적 손실은 안구 표면에 대한 안구 표면의 어려운 부착 및 각막앞 눈물 필름 자체의 기능상실에 의해 유도된 상피세포 현상 및 그에 따른 염증을 결정한다.
- [0095] 미세융모의 형태는 시험관내에서 표준 선량에 따라 UV-A를 상피세포를 통하여 처리한 후 주사 전자 현미경에 의해 평가하였다. 500 내지 600 미크론 두께의 인간 각막은 BSS(balanced salt solution), 리보플라빈-렉스트란 0.1%의 표준 용액, 표준 용액 + 벤잘코늄 클로라이드 0.01% 및 제4 신규 시험 조성물과 각각 30분간 배양처리되었다.
- [0096] 예비적으로, 어떠한 처리도 받지 않은 각막의 미세융모의 형태 및 각막 상피세포의 표피층의 형태도 상피세포와 이들의 미세융모가 광화학적 처리를 받지 않을 때 어떻게 나타나야 하는지에 대해 연구하였다.
- [0097] 도 7은 정상 각막에서 상피세포의 미세융모와 상피세포의 표피 층의 형태를 도시하는 주사현미경 사진을 도시하고, 또 도 8은 표준 수순에 따라 리보플라빈-렉스트란 0.1%의 표준 용액을 적용한 후 UV-A로 처리된 각막의 주사 현미경 사진을 도시한다. 도 7과 비교함으로써, 모든 상피세포 층이 손실되고 보우만(Bowman) 막이 벗겨진 것이 분명하다.
- [0098] [16]에서 제시된 바와 같이 표준 용액 + 벤잘코늄 클로라이드 0.01%에 의해 구성된 조성물로 처리된 각막에서도 유사한 상황이 생긴다.
- [0099] 도 9는 제4 신규 시험 조성물에 의해 처리된 후 표준 선량의 UV-A로 처리된 각막의 주사 현미경 사진을 도시한다. 도 7 및 도 8과 대조함으로써, 상피세포 층, 세포 핵 및 캡-접합부의 보존을 확인할 수 있다. 또한, 잔존하는 미세융모가 형태적으로 완전하고 또 깊은 세포질 세포막은 위험한 상태는 아니지만 미세융모의 밀도의 현저한 감소가 존재한다. 제1, 제2 및 제3 신규 시험 조성물을 사용하여도 유사한 결과가 얻어졌다.
- [0100] 도 10은 대조를 위하여 오직 생리학적 용액을 사용하여 표준 선량의 UV-A로 처리된 각막의 주사 현미경 사진을 도시한다. 상피세포 층은 파괴되고, 다수의 세포는 자신의 세포질 핵이 손실되고 또 거의 전부의 캡-접합부

(gap-junctions) 및 미세융모가 손실된다. 얻어진 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다:

[0101] 1) 리보플라빈-덱스트란 0.1%의 표준 용액 또는 표준 용액 + 벤잘코늄 클로라이드 0.01%를 함유하는 조성물과 함께 표준 수준에 따라 예비적 배양하고 UV-A 처리된 각막은 모든 상피세포 층의 전체적 손실을 거치며 또 그 결과 보우만 막이 벗겨진다(도 8). 실제로, 벤잘코늄 클로라이드가 부가된 표준 용액 만을 사용하여, 상피세포는 UV-A 조사에 의해 파괴된다. 이것은 상피세포를 제거하지 않고 표준 용액 또는 조성물 리보플라빈-덱스트란 + 벤잘코늄 클로라이드를 사용하여 실시된 교차결합 치료가 환자로 하여금 상기 처리 후, 상피세포의 외과적 제거에 의해 유발되는 성가신 증상을 피하지 못할 것이라는 생각으로 유도한다;

[0102] 2) 리보플라빈-덱스트란 및 상술한 것 중에서 선택된 적어도 1개의 담체를 포함하는 조성물과 함께 배양한 후, 특히 제4 신규 시험 조성물과 배양한 후 표준 선량의 UV-A로 처리된 각막은 자신의 상피세포 층, 세포 핵 및 갭-접합부를 유지하였다. 미세융모 밀도의 현저한 감소가 눈에 띄었지만, 나머지 미세융모는 형태학적으로 완전하였다. 각막의 깊은 세포질 세포 막은 완전하게 나타난다;

[0103] 3) BSS(균형을 이룬 염 용액)과 함께 배양된 후 표준 선량의 UV-A로 처리된 각막은 상피세포 층의 파괴, 세포질 핵을 갖는 다수 세포의 손실 및 거의 대부분의 갭-접합부 및 미세융모의 손실을 나타내었다.

[0104] 제1, 제2 및 제3 신규 시험 조성물을 사용하여 처리된 각막에 대하여 다수의 주사 혼미경 영상을 찍었지만, 이들은 제4 신규 시험 조성물을 사용하여 얻은 것과 실질적으로 동일하게 보이기 때문에 여기서는 보고되지 않았다.

[0105] 이들 결과는 적어도 비타민 E, 비타민 Q 또는 코엔자임 Q; L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드 및 L-로이신과 같은 시험된 아미노산이 각막 상피세포를 보호하고 또 각막 상피세포를 통한 리보플라빈의 침투를 선호한다고 추론할 수 있게 한다. 본 명세서에 제안된 신규 용액 중에서, 제4 조성물은 각막 상피세포의 침투 시간 및 각막 상피세포의 보존 측면에서 모두 가장 우수한 성능을 나타내었다.

[0106] 제안된 물질이 이들 우수한 결과를 얻을 수 있게 하는 이유 및 제4 시험 조성물에 사용된 물질이 상승효과를 나타내는 이유에 대한 설명은 아직 완전히 분명하지 않다. 본 발명을 어떠한 이론에 제한하지 않고, 본 출원인들은 제4 신규 시험 조성물로 처리된 후 검출된 각막 상피세포에 대한 감소된 손상은 비타민 E, 예를 들어 비타민 E-TPGS의 세포수선(cytorepairing), 및/또는 용액 내에 적어도 필수 또는 조건부 필수 아미노산의 존재에 아마도 기인할 수 있을 것이라 제안한다. 아마도 비타민 E는 상피세포의 수선 작용에 관여된 효소인 글루타치온 옥시다제 및 페옥사이드 디스뮤타제에 대하여 작용할 것이고, 필수 또는 조건부 필수 아미노산은 세포수선 작용을 가질 것이며 또 교차 결합 효과를 아마도 선호할 것이다. 또한, 제4 신규 용액에 의한 조직의 더 많은 침지는 아마도 교차결합 효과의 증가뿐만 아니라 UV-A 선의 유해 효과로부터 각막 상피세포 층의 더 우수한 보존을 결정한다.

[0107] 리보플라빈-덱스트란 및 본 명세서에 제시된 것들중에서 선택된 적어도 1개의 담체(침투 향상제)의 신규 용액을 사용하여, 예를 들어 각막 상피세포를 예방적으로 제거하지 않고도 원추각막의 치료를 위한 교차결합 치료를 실시할 수 있다. 각막 상피세포가 제거되지 않는 사실로 이하의 것을 꾀한다:

[0108] 1) 표준 수준에 따라 교차결합 치료 후 제1일에 전형적으로 생기는 따끔거림에 기인한 질병;

[0109] 2) 처리한 후 치료적 콘택트 렌즈를 적용할 필요; 및 무엇보다도

[0110] 3) 각막 상피세포의 제거로 인하여 수술 후 각막 감염의 위험.

[0111] 또한, 각막에 대한 외과적 작용이 회피되므로, 수술실 및 수술용 혼미경을 필요로 하지 않고 외래 환경(in an ambulatory)에서 치료를 실시할 수 있다.

[0112] 상기 신규 용액은 점안액 또는 젤 형태로 투여될 수 있거나 또는 특히 여름 동안 태양 광선에 노출되기 전에 치료적 콘택트 렌즈 상에 적용되어 태양광에 의한 리보플라빈의 조사에 기인한 천연적 교차결합의 효과를 향상시킬 수 있다.

[0113] 상기 신규 용액은 또한 안구의 내부 구조를 UV-A로부터 보호할 수 있으므로 예를 들어 태양광에 오랜 시간 동안 노출될 우려가 있는 사람에서 황막 황반으로부터 보호하거나 및/또는 백내장을 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0114] 상기 신규 용액을 비-단일 투여량 용기에 가능한한 오랫동안 보존하기 위하여, 0.0001% 내지 0.02% 농도, 바람직하게는 약 0.01%과 동일한 농도로 벤잘코늄 클로라이드를 부가할 수 있다. 상기 신규 용액이 단일-투여량의 일회용 용기에 생산되어 시판되어야 한다면, 벤잘코늄 클로라이드의 부가는 필수적이지 않다. 상기 조성물에는

보존제, 항균제, 항진균제, 부형제(예를 들어, 아세트산) 및 안정한 멸균 안과 용액을 제조하기 위해 및/또는 이들의 동화를 선호하기 위해 안과 분야에서 일반적으로 사용되는 물질이 더 부가될 수 있다.

[0115] 전술한 바와 같이, 본 출원인들은 비타민 Q, L-프롤린, 글리신, 리신 히드로클로라이드, L-로이신 중에서 선택된 적어도 1개의 물질을 리보플라빈에 부가하는 것에 의해 얻은 조성물의 양호한 성능은, 마지막에 언급한 물질이 메탈로프로테이나제 MMP9의 증가를 통하여 세포수선 기능을 가질 필수 또는 조건부 필수 아미노산이라는 사실에 부분적으로 기인한다고 믿고 있다. 이는 리보플라빈 용액, 예를 들어 표준 리보플라빈-텍스트란 용액에, 메탈로프로테이나제 MMP9를 증가시키는 적어도 1개의 물질을 0.00001% 내지 0.5%의 농도로 부가하는 것에 의해 제1, 제2, 제3 및 제4 신규 시험 조성물에 대해 얻어진 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있다는 추론으로 유도한다.

[0116] 메탈로프로테이나제 MMP9를 증가시키기 위한 상기 물질 중에서, 제니슈타인(5,7-디히드록시-3-(4-히드록시페닐)크로멘-4-온), 피토에스트로겐, 사이토카인 및 소위 NSAID(비스테로이드성 항염증성 약물)을 언급할만 가치가 있다.

[0117] 리보플라빈 안과 용액을 제조하기 위해 사용되도록 적응된 NSAID 중에서, 다음을 언급할 가치가 있다: 아세틸살리실산(2-아세톡시벤조산), 플루페나믹산(2-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]아미노}벤조산), 메클로페나믹산(2-{[2,6-디클로로-3-메틸페닐]아미노}벤조산), 메페나믹산 (2-(2,3-디메틸페닐)아미노벤조산), 니플루미산 (2-{[3-(트리플루오로메틸)페닐]아미노}니코틴산), 톤페나믹산 (2-[3-클로로-2-메틸페닐]아미노]벤조산), 베노릴레이트 (4-(아세틸아미노)페닐 2-(아세틸옥시)벤조에이트), 카르프로펜((RS)-2-(6-클로로-9H-카바졸-2-일)프로판산), 셀레콕시브 (4-[5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)파라졸-1-일]벤젠설폰아미드), 신녹시캄 (피록시캄 신나메이트 또는 [9-메틸-10,10-디옥소-8-(파리딘-2-일카바모일)-10\$1^{\wedge}\{6\}-티아-9-아자비시클로[4.4.0]데카-1,3,5,7-테트라엔-7-일] (E)-3-페닐프로프-2-에노에이트; 피록시캄 신나메이트), 디플루니살(2',4'-디플루오로-4-히드록시비페닐-3-카복시산), 디클로페낙 (2-[2-{(2,6-디클로로페닐)아미노}페닐]아세트산), 드록시캄(2H,5H-1,3-옥사지노(5,6-c)(1,2)벤조티아진-2,4(3H)-디온, 5-메틸-3-(2-파리디닐)-, 6,6-디옥사이드) 에토도락 ((RS)-2-(1,8-디에틸-4,9-디히드로-3H-파라노[3,4-b]인돌-1-일)아세트산), 에토리콕시브 (5-클로로-6'-메틸-3-[4-(메틸설포닐)페닐]-2,3'-비파리딘), 페노프로펜 (2-(3-페녹시페닐)프로판산), 폴루르비프로펜 ((RS)-2-(2-플루오로비페닐-4-일)프로판산), 이부페낙(4-이소부틸페닐 아세트산), 이부프로펜 ((RS)-2-(4-(2-메틸프로필)페닐)프로판산), 인도메타신 (2-{1-[4-(클로로페닐)카보닐]-5-메톡시-2-메틸-1H-인돌-3-일}아세트산), 케토프로펜 ((RS)-2-(3-벤조일페닐)프로판산), 케토로락 ((±)-5-벤조일-2,3-디히드로-1H-파롤리진-1-카복시산, 2-아미노-2-(히드록시메틸)-1,3-프로판디올), 로르녹시캄 ((3E)-6-클로로-3-[히드록시(파리딘-2-일아미노)메틸렌]-2-메틸-2,3-디히드로-4H-티에노[2,3-e] [1,2]티아진-4-온 1,1-디옥사이드), 루미라콕시브 ({2-[2-(2-클로로-6-플루오로페닐)아미노]-5-메틸페닐}아세트산), 멜옥시캄 (4-히드록시-2-메틸-N-(5-메틸-2-티아졸릴)-2H-1,2-벤조티아진-3-카복사미드-1,1-디옥사이드), 메타미졸 (소듐 [(2,3-디히드로-1,5-디메틸-3-옥소-2-페닐-1H-파라졸-4-일)메틸아미노] 메탄설포네이트), 나프록센 ((+)-(S)-2-(6-메톡시나프탈렌-2-일)프로판산), 니메술리드 (N-(4-니트로-2-페녹시페닐)메탄설폰아미드), 옥사프로진 (3-(4,5-디페닐-1,3-옥사졸-2-일)프로판산)파레콕시브 (N-{[4-(5-메틸-3-페닐이소옥사졸-4-일)페닐]설포닐}프로판아미드), 피록시캄 ((8E)-8-[히드록시-(파리딘-2-일아미노)메틸리덴]-9-메틸- 10,10-디옥소-10 λ^6 -티아-9-아자비시클로[4.4.0]데카-1,3,5-트리엔-7-온), 로페콕시브 (4-(4-메틸설포닐페닐)-3-페닐-5H-푸란-2-온), 술린닥 ({(1Z)-5-플루오로-2-메틸-1-[4-(메틸설페닐)벤질리텐]-1H-인덴-3-일}아세트산), 수독시캄 (4-히드록시-2-메틸-N(2)-티아졸릴-2H-1,2-벤조티아진-3-카복사미드 1,1-디옥사이드), 테녹시캄 ((3E)-3-[히드록시(파리딘-2-일아미노)메틸렌]-2-메틸-2,3-디히드로-4H-티에노[2,3-e] [1,2]티아진-4-온 1,1-디옥사이드), 밸데콕시브 (4-(5-메틸-3-페닐이소옥사졸-4-일)벤젠설폰아미드).

[0118] 또한, 본 출원인들은 리보플라빈 용액, 예를 들어 리보플라빈-텍스트란의 용액에, 적어도 필수 또는 조건부 필수 아미노산을 부가하는 것에 의해 제1, 제2, 제3 및 제4 신규 시험 조성물의 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있을 것으로 간주한다.

[0119] 특히 유용한 물질 중에서, 가장 유망한 것은 L-아르기닌으로 보인다. 신규 용액을 얻기 위한 상술한 물질 중의 1 또는 그 이상 이외에 리보플라빈 용액, 예를 들어 표준 리보플라빈-텍스트란 용액과 혼합될 수 있다. 이들 모든 물질이 아직 시험되지 않았다 하더라도, 모든 필수 또는 조건부 필수 아미노산은 각각 상피세포를 통하여 리보플라빈의 침투를 용이하기 위해 타당하게 사용될 수 있고, 이렇게 하여 리보플라빈에 의해 흡수된 UV-A 선으로부터 또 태양광으로부터 각막을 보호한다고 본 출원인들이 간주하는 것은 합리적인 것으로 보인다. 특히, L-

아르기닌을 산화질소의 아미노산 전구체인 L-아르기닌이 말초 수준에서 산화질소(NO)를 전달할 수 있다고 가정하는 것이 합리적이기 때문에 상기 제안된 물질과 같은 타당한 담체로 간주하는 것이 합리적일 것으로 보인다. 각막 상피세포 상에 NO가 용해된 물질을 국소 투여하는 것에 의해 원추각막 환자를 치료하기 위해 산화질소(NO)의 사용은 NO의 불량한 용해도에 의해 방해된다.

[0120] L-아르기닌 및 기타 필수 아미노산이 교차결합 치료에 사용되는 UV-A 선으로부터 상피세포의 미세용모를 얼마나 보호하는지는 아직 실험적으로 시험되어야 한다. 기타 필수 또는 조건부 필수 아미노산 및 특히 L-아르기닌이 예상한 바와 같이 상피세포를 통한 교차결합 치료를 허용하는 한편, 각막 상피세포를 보존하는 안과 용액을 실현하는데 유용한 것으로 증명되면, 본 출원인은 리보플라빈 용액, 예를 들어 표준 리보플라빈-텍스트란 용액에 0.00001% 내지 0.5% 농도로 부가되는 것이 합리적일 것이라 간주할 것이다.

[0121] 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, L-아르기닌 또는 다른 필수 또는 조건부 필수 아미노산의 농도는 0.001% 내지 0.4% 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 농도는 0.005% 내지 0.3% 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 농도는 0.01% 내지 0.2% 범위이다. 더욱 바람직한 실시형태에 따르면, L-아르기닌 또는 다른 필수 또는 조건부 필수 아미노산의 농도는 약 0.1%이다.

[0122] 선택적으로, L-아르기닌 및/또는 다른 필수 또는 조건부 필수 아미노산을 제안된 신규 용액의 어느 하나에 부가할 수 있다.

[0123] 신규 안과 용액의 투여량은 진단된 병리 및 그의 심각성에 따라 다르다. 직설적으로, 상기 투여량은 매일 1개 점안액 내지 매시간당 최대의 1개 점안액 범위일 수 있다.

[0124] 첨부된 특허청구범위는 본 설명의 통합적 부분이며 또 본 명세서에 포함된다. 동일 출원인 명칭으로 출원된 우선권 이탈리아 특허출원 VA2009A000052호 및 VA2010A000044호의 전체 내용은 참고문헌으로 포함된다.

[0125] 참고문헌:

[0126] 1. Seiler T., Spoerl E., Huhle M., Kamouna A. Conservative therapy of keratoconus by enhancement of collagen cross-links. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:S1017.

[0127] 2. Seiler T., Quurke AW. Iatrogenic keratectasia after LASIK in a case of forme fruste keratoconus. *J Cat Refract Surg*. 1998;24: 1007-1009.

[0128] 3. Spoerl E., Huhle M., Seiler T. "Induction of cross-links in corneal tissue", *Exp Eye Res*. 1998;66:97-103.

[0129] 4. Mazzotta C, Traversi C, Baiocchi S., Sergio P., Caporossi T., Caporossi A. "Conservative treatment of keratoconus by riboflavin-uva-induced cross-linking of corneal collagen: qualitative investigation" *Eur J Ophthalmol*. 2006; 16:530-5.

[0130] 5. Caporossi A., Baiocchi S., Mazzotta C, Traversi C, Caporossi T. "Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study" *J Cataract Refract Surg*. 2006;32:837-45.

[0131] 6. Spoerl E., Seiler T. "Techniques for stiffening the cornea" *J Refract Surg*. 1999; 15:711- 713.

[0132] 7. Hagele G., Boxer Wachler BS. "Corneal Collagen Crosslinking with Riboflavin (C3-R) for corneal stabilization" Presented at the International Congress of Corneal Cross Linking (CCL). December 9-10, 2005. Zurich, Switzerland.

[0133] 8. Pinelli, R. "C3-Riboflavin for the treatment of keratoconus" *J Cataract & Refractive Surgery Today Europe*. 2006; 1:49-50.

[0134] 9. Pinelli R. "Eyeword", 2007;5:34-40.

[0135] 10. Linda J. Mueller, Elisabeth Pels, Gijs F. J. M. Vrensen: "The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature". *Br J Ophthalmol* 2001;85:437-443 (April).

[0136] 11. Mau T. Tranl, Robert N. Lausch2 and John E. Oakes: "Substance P Differentially Stimulates IL-8 Synthesis in Human Corneal Epithelial Cells" *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

2000;41:3871-3877.

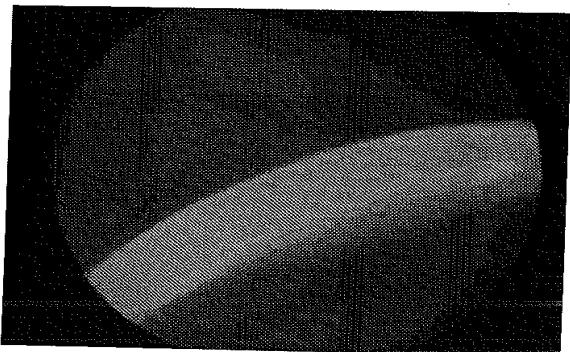
- [0137] 12. LJ. Muller, L. Pels and GF. Vrensen: "Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes" *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, VoI 36, 2557-2567.
- [0138] 13. G. Perrella, P. Brusini, R. Spelat, P. Hossain, A. Hopkinson, H. S. Dua: "Expression of haematopoietic stem cell markers, CD 133 and CD34 on human corneal keratocytes" *British Journal of Ophthalmology* 2007; 91:94-99.
- [0139] 14. Tadashi Senoo, and Nancy C. Joyce: "Cell Cycle Kinetics in Corneal Endothelium from Old and Young Donors" *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2000; 41:660-667.
- [0140] 15. LJ. Muller, L. Pels and GF. Vrensen: "Ultrastructural organization of human corneal nerves" *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, VoI 37, 476-488.
- [0141] 16. Italian patent application No. MI2007A002162, 14 Nov. 2007, R. Pinelli, "Collirio per il trattamento del cheratocono con tecnica cross-linking trans-epiteliale".
- [0142] 17. R. Pinelli, A. J. Kannelopoulos, B. S. B. Wachler, E. Spoerl, A. Ertan, S. L. Trokel, "C3-Riboflavin treatments: Where did we come from? Where are we now?", *Cataract & Refractive Surgery Today Europe*, Summer 2007.
- [0143] 18. Ashim K. Mitra, "Ophthalmic Drug Delivery Systems", Second Edition: Revised And Expanded, Marcel Dekker Inc., NY, 2003.

도면

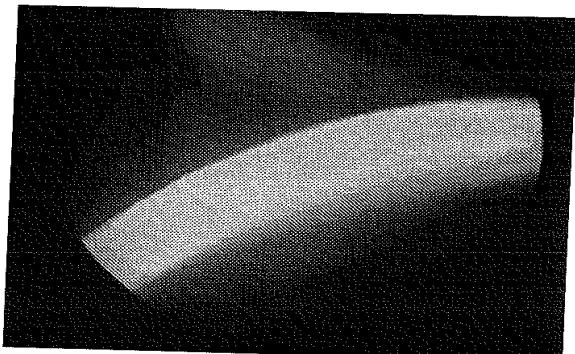
도면1

점수	표준 관찰결과	회색 0.1% 단위/μl	경광-경 단위/μl	부착-부착 단위/%
10		50/0		100%
8		40/10		96%
6		30/20		92%
4		20/30		87%
2		10/40		73%
0		0/50		20%

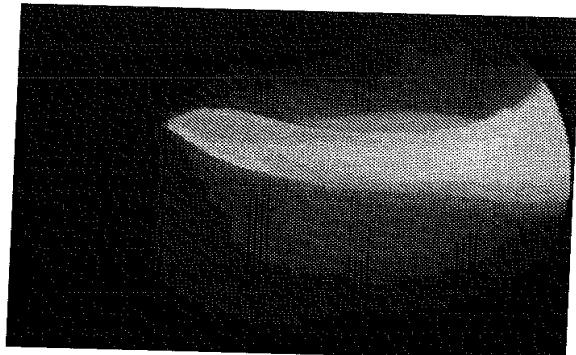
도면2



도 2a

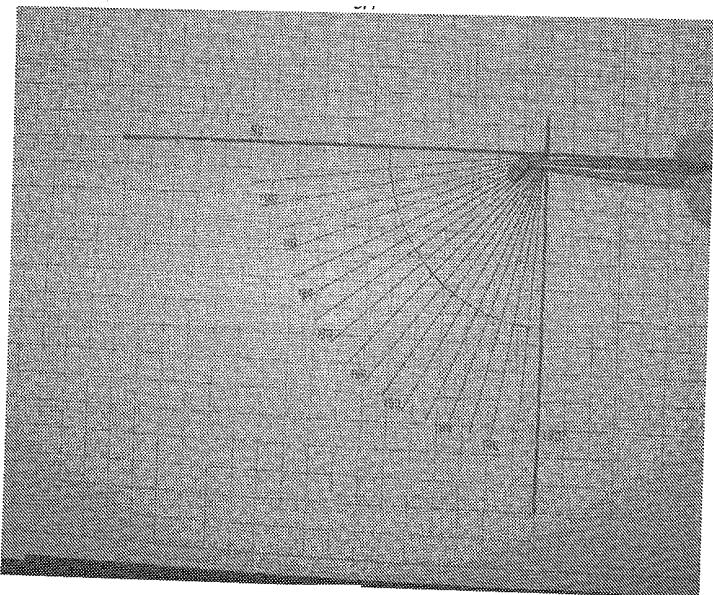


도 2b

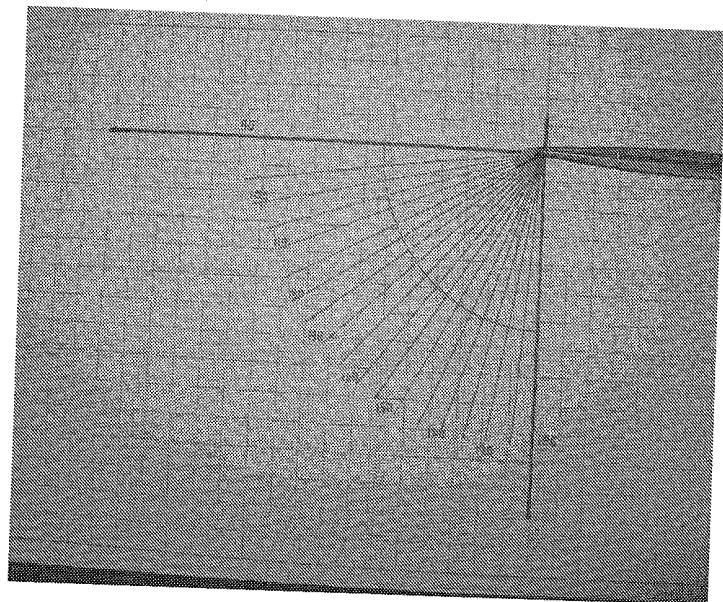


도 2c

도면3

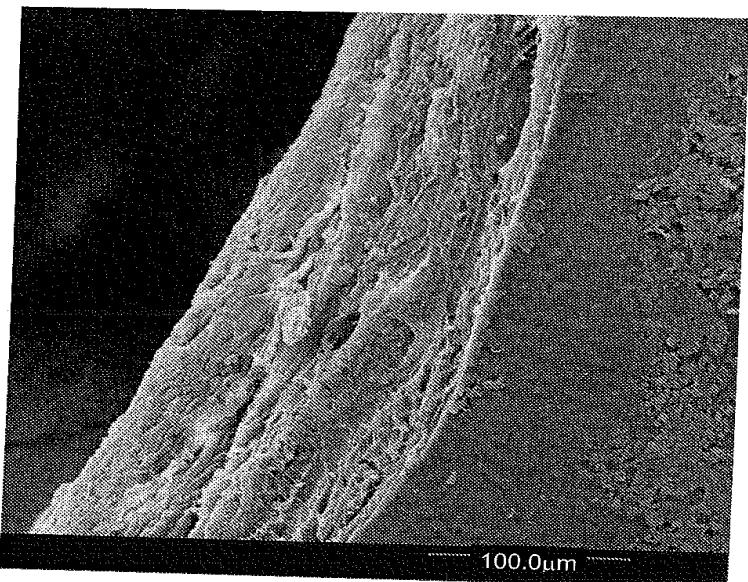


도 3a

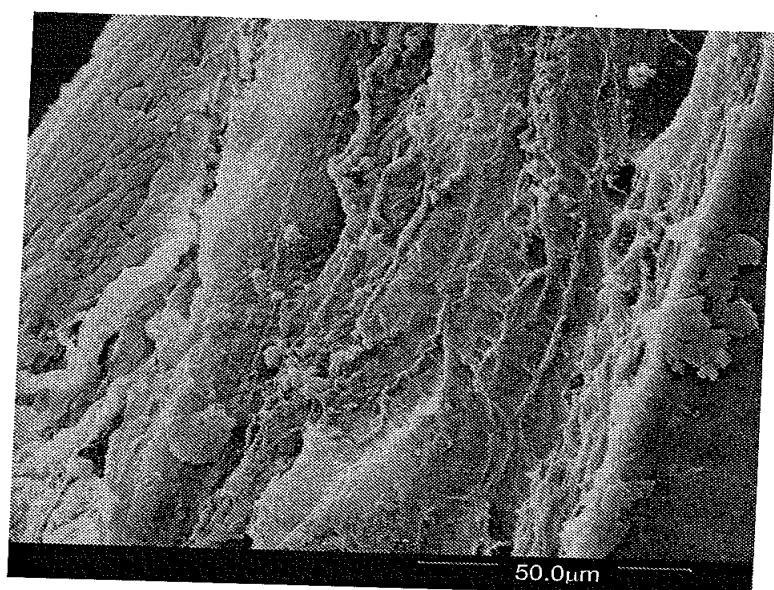


도 3b

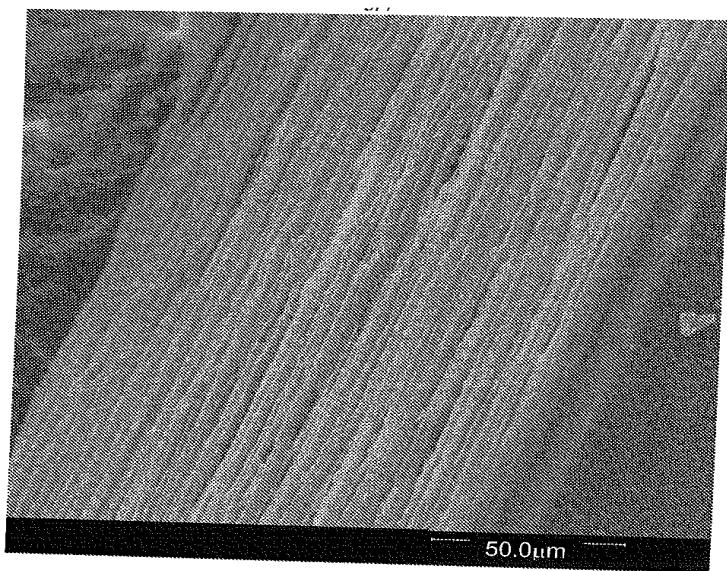
도면4



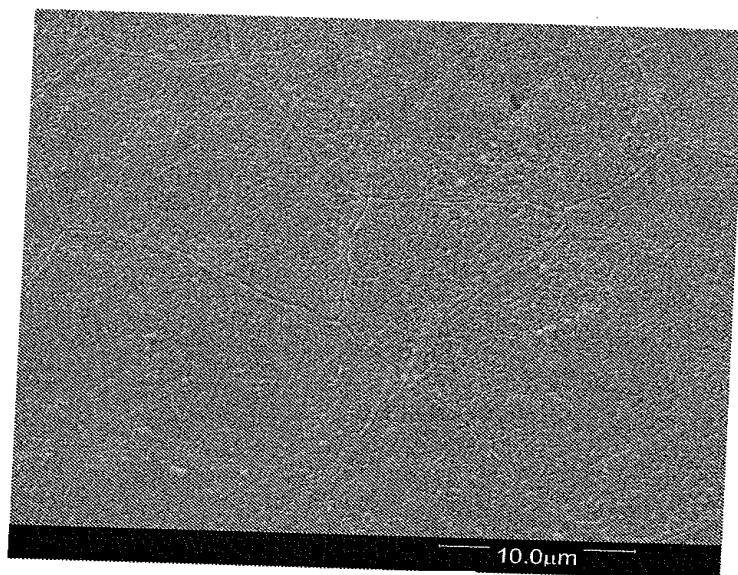
도면5



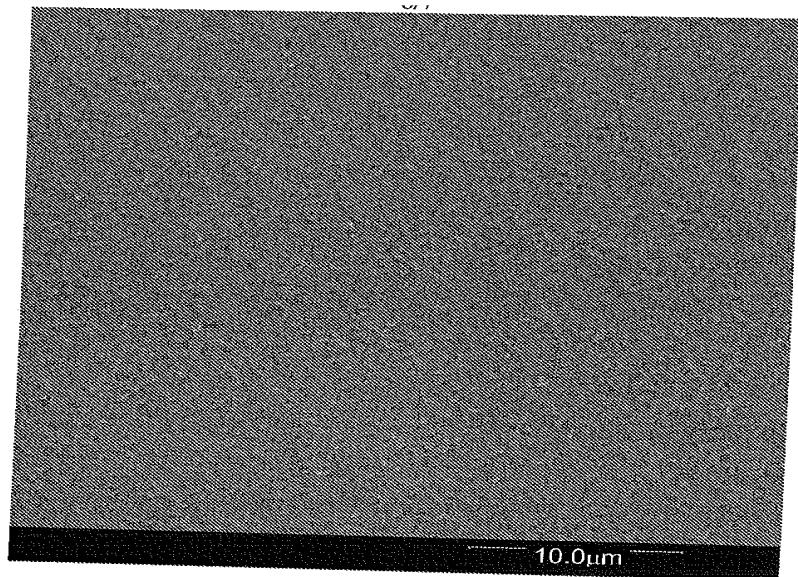
도면6



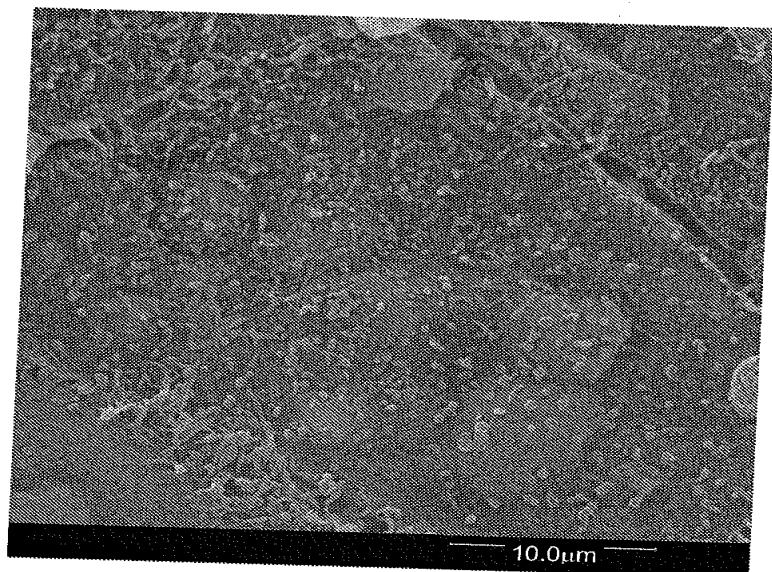
도면7



도면8



도면9



도면10

