



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0099147
(43) 공개일자 2012년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/437 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7019919
(22) 출원일자(국제) 2010년12월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년07월27일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2010/073904
(87) 국제공개번호 WO 2011/081221
국제공개일자 2011년07월07일
(30) 우선권주장
JP-P-2009-299180 2009년12월29일 일본(JP)
PCT/JP2010/071424 2010년11월24일 세계지적재
산권기구(WIPO)(WO)

(71) 출원인
미쓰비시 타나베 파마 코퍼레이션
일본 오사카후 오사카시 주오구 기타하마 2초메
6방 18고
센주 세이야꾸 가부시카가이샤
일본 오사카후 오사카시 주오구 히라노마치 2초
메 5방 8고
(72) 발명자
다카하시 히로아키
일본 6512241 효고켄 고베시 니시쿠 무로타니
1-5-4 고베 크리에이티브 센터 센주 세이야꾸 가
부시카가이샤 나이
사카모토 유지
일본 6512241 효고켄 고베시 니시쿠 무로타니
1-5-4 고베 크리에이티브 센터 센주 세이야꾸 가
부시카가이샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
송승필, 강승옥

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 각막 내피 장애 치료제(Y-39983)

(57) 요약

본 발명은 생체내 증식능이 부족한 각막 내피 세포가 손상된 질환을 유효하고 간편하게 치료하기 위한 수단을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 유효 성분으로서 (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 <Y-39983> 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염[화합물 (Ia)]을 포함하는 각막 내피 장애의 치료제, 화합물 (Ia)를 포함하는 각막 내피 세포의 접착 촉진제, 상기 접착 촉진제를 포함하는 각막 내피 세포의 배양액, 각막 내피 세포, 골격 및 화합물 (Ia)를 포함하는 각막 내피 이식용 이식물, 및 배양액을 사용하여 각막 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하는 각막 내피 제제의 제조 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

기다 테츠오

일본 6512241 효고켄 고베시 니시쿠 무로타니
1-5-4 고베 크리에이티브 센터 센주 세이야꾸 가
부시키가이샤 나이

다루이 다케시

일본 6512241 효고켄 고베시 니시쿠 무로타니
1-5-4 고베 크리에이티브 센터 센주 세이야꾸 가
부시키가이샤 나이

특허청구의 범위

청구항 1

유효 성분으로서 (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적 으로 허용되는 염을 포함하는 각막 내피 장애의 치료제.

청구항 2

제1항에 있어서, 점안제인 것인 치료제.

청구항 3

(R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염 을 포함하는 각막 내피 세포의 집착 촉진제.

청구항 4

제3항에 따른 집착 촉진제를 포함하는 각막 내피 세포의 배양액.

청구항 5

- A) 각막 내피 세포,
 B) 골격(scaffold), 및
 C) (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염 을 포함하는, 각막 내피 이식(corneal endothelial keratoplasty)용 이식물.

청구항 6

제5항에 있어서, 각막 내피 세포는 인간 유래인 것인 이식물.

청구항 7

(R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염 을 포함하는 배양액을 사용하여 각막 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 각막 내피 제제의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 각막 내피 세포는 인간 유래인 것인 제조 방법.

청구항 9

(R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염 을 각각 포함하는 각막 내피 제제 및/또는 각막 내피 이식용 이식물을 제공하는 단계, 및
 각막 내피 제제 및/또는 각막 내피 이식용 이식물을 각막 내피 이식을 필요로 하는 대상에게 이식하는 단계 를 포함하는, 각막 내피 장애의 치료 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 각막 내피 세포는 인간 유래인 것인 치료 방법.

청구항 11

(R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염 의 유효량을 각막 내피의 창상의 치유를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 각막 내피 장애의 치료 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 투여 단계는 국소 점안인 것인 치료 방법.

청구항 13

각막 내피 장애의 치료제를 제조하기 위한, (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염의 용도.

청구항 14

제13항에 있어서, 치료제는 점안제인 것인 용도.

청구항 15

각막 내피 세포의 접착 촉진제의 제조를 위한, (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염의 용도.

청구항 16

각막 내피 세포의 배양액의 제조를 위한, (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염의 용도.

청구항 17

각막 내피 이식용 이식물의 제조를 위한,

A) 각막 내피 세포,

B) 골격, 및

C) (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염

의 용도.

청구항 18

제17항에 있어서, 각막 내피 세포는 인간 유래인 것인 용도.

청구항 19

제7항 또는 제8항의 제조 방법에 의해 얻어지는 각막 내피 제제.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 각막 내피 장애의 치료제에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 각막 내피 장애의 치료제는 각막 내피의 창상의 치유, 또는 각막 내피 세포의 접착, 유지 또는 보존에 사용된다.

배경 기술

[0002] 각막(안구의 맨 앞에 있는 투명 조직)으로부터 들어온 빛이 망막에 도달하여 망막 신경 세포를 흥분시키고, 발생한 전기 신호가 시신경을 경유하여 뇌의 시각야에 전달될 때 시각 정보가 인식된다. 양호한 시력을 갖기 위해서는, 각막이 투명할 필요가 있다. 각막의 투명성은 각막 상피, 간질(stroma) 및 내피의 3층 구조의 항상성을 유지함으로써 유지된다. 이들 중에서, 각막 내피 세포는 각막의 함수율을 일정 수준으로 유지하고, 각막의 투명성을 유지하는 중요한 세포이다. 그러나, 인간 각막 내피 세포는 생체내 증식능이 부족하여, 질병, 외상 및 안과 수술에 의한 상해로 인해 불가역적인 각막 내피 기능 부전을 겪는다.

[0003] 배양 각막 내피 세포에 있어서, 선택적 Rho 키나아제(ROCK) 억제제인 Y-27632가 세포 접착을 촉진시키는 효과를 가짐이 보고되어 있다(비특허문헌 1). 또한, 토끼 각막 내피 창상 치유 모델에 있어서 10 mM Y-27632의 점

안이 각막 내피의 창상 치유를 촉진시킴이 보고되어 있다(비특허문헌 2).

[0004] Rho 키나아제 억제제인 Y-27632 및 Fasudil에 대해서는 하기와 같은 시험관내 작용이 보고되어 있다:

[0005] 1) 각막 내피 세포(토끼, 원숭이 등)의 배양,

[0006] 2) 배양된 원숭이 각막 내피 세포에서의 세포 접착의 촉진,

[0007] 3) 배양된 원숭이 각막 내피 세포에서의 세포 주기의 촉진,

[0008] 4) 배양된 원숭이 각막 내피 세포에서의 아포토시스의 억제, 및

[0009] 5) 배양 각막 내피 세포의, 각막 내피 이식(corneal endothelial keratoplasty)을 필요로 하는 질병의 치료에의 적용 가능(특허문헌 1).

[0010] 특허문헌 1은 Y-27632 및 Fasudil의 시험관내 작용을 기재하지 않는다. 또한, 각막 내피 세포에 대한 Y-27632 및 Fasudil 외의 Rho 키나아제 억제제의 영향은 고려되지 않는다.

[0011] 특허문헌 1: WO2009/028631

[0012] 비특허문헌 1: Okumura N, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009, 50(8) p.3680-7

[0013] 비특허문헌 2: Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009, 50: E-Abstract 1817.

발명의 내용

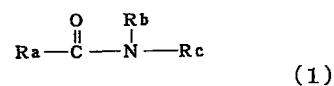
해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 생체내 증식능이 부족한 각막 내피 세포가 손상된 질환을 유효하고 간단히 치료하기 위한 수단을 제공하는 것이다.

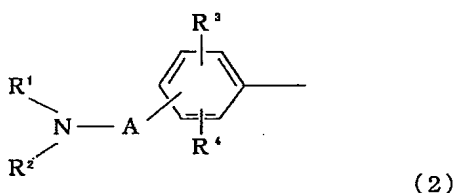
과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 상기 언급한 문제의 관점에서 예의 연구를 수행하고, Rho 키나아제 억제제 중 특정 화합물이 소용량 또는 낮은 농도에서 각막 내피 창상을 치유할 수 있음을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은, 상기 화합물이 종래의 Rho 키나아제 억제제보다 상당히 낮은 농도로 각막 상피를 통한 국소 점안에 의해 신체에 투여될 때라도 충분한 창상 치유 효과를 나타낼 수 있음을 발견하고, 각막 내피 이식용 이식물, 각막 내피 제제 등에 화합물을 이용하는 데에 성공하여 본 발명을 완성하였다. 따라서, 본 발명은 하기와 같다.

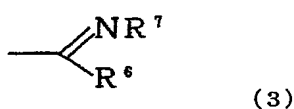
[0016] [1] 하기 화학식 (1)로 표시되는 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염[이하, 화합물 (1)로서 지칭됨]을 포함하는 각막 내피 장애의 치료제:



[0017] 상기 화학식에서, Ra은 하기 화학식 (2)이고:



[0020] 상기 화학식에서, R¹은 수소, 알킬, 또는 고리 상에 치환기를 임의로 갖는 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 페닐 또는 아르알킬, 또는 하기 화학식 (3)의 기이고:



- [0022] 상기 화학식에서, R^6 은 수소, 알킬 또는 화학식 $-NR^8R^9$ (식 중, R^8 및 R^9 는 동일 또는 상이하며, 각각 수소, 알킬, 아르알킬 또는 페닐임)이고, R^7 은 수소, 알킬, 아르알킬, 페닐, 니트로 또는 시아노이거나, 또는 R^6 및 R^7 은 결합하여 고리에 추가로 산소 원자, 황 원자 또는 임의로 치환된 질소 원자를 임의로 갖는 복소환을 형성하고;
- [0023] R^2 는 수소, 알킬, 또는 고리 상에 치환기를 임의로 갖는 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 페닐 또는 아르알킬이거나; 또는
- [0024] R^1 및 R^2 는 결합하여 인접 질소 원자와 함께, 고리에 추가로 산소 원자, 황 원자 또는 임의로 치환된 질소 원자를 임의로 갖는 복소환을 형성하며;
- [0025] R^3 및 R^4 는 동일 또는 상이하고, 각각 수소, 알킬, 아르알킬, 할로젠, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 아실아미노, 히드록시, 알콕시, 아르알킬옥시, 시아노, 아실, 머캅토, 알킬티오, 아르알킬티오, 카르복시, 알콕시카르보닐, 카르바모일, 알킬카르바모일 또는 아지드이며;
- [0026] A는 하기 화학식 (4)이며:
- $$\begin{array}{c} R^{10} \\ | \\ -(CH_2)_1(C)_n(CH_2)_n- \\ | \\ R^{11} \end{array} \quad (4)$$
- [0027]
- [0028] 상기 화학식에서, R^{10} 및 R^{11} 은 동일 또는 상이하며, 각각 수소, 알킬, 할로알킬, 아르알킬, 히드록시알킬, 카르복시 또는 알콕시카르보닐이거나, 또는
- [0029] R^{10} 및 R^{11} 은 결합하여 시클로알킬을 형성하고, 1, m 및 n은 각각 0 또는 1-3의 정수이고;
- [0030] Rb는 수소 또는 알킬이며;
- [0031] Rc는 질소를 포함하는 임의로 치환된 복소환이다.
- [0032] [2] 상기 언급한 각막 내피 장애가 수포성 각막증 또는 각막 내피염인, 상기 언급한 [1]의 치료제.
- [0033] [3] 점안제인, 상기 언급한 [1] 또는 [2]의 치료제.
- [0034] [4] 상기 언급한 화합물 (1)은 (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드[이하, 화합물 (Ia)로서 지칭됨]인, 상기 언급한 [1] 내지 [3] 중 어느 하나의 치료제.
- [0035] [5] 화합물 (1)을 포함하는 각막 내피 세포의 접착 촉진제.
- [0036] [6] 상기 언급한 화합물(1)은 화합물 (Ia)인 상기 언급한 [5]의 접착 촉진제.
- [0037] [7] 화합물 (1)을 포함하는 각막 내피 세포의 배양액.
- [0038] [8] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [7]의 배양액.
- [0039] [9] 화합물 (1)을 포함하는 각막 보존액.
- [0040] [10] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [9]의 각막 보존액.
- [0041] [11] A) 각막 내피 세포,
- [0042] B) 골격(scaffold), 및
- [0043] C) 화합물 (1)
- [0044] 을 포함하는 각막 내피 이식용 이식물.
- [0045] [12] 상기 언급한 각막 내피 세포는 인간 유래인, 상기 언급한 [11]의 이식물.
- [0046] [13] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [11] 또는 [12]의 이식물.
- [0047] [14] 화합물 (1)을 포함하는 배양액을 사용하여 각막 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 각막 내피 제제

의 제조 방법.

- [0048] [15] 상기 언급한 각막 내피 세포는 인간 유래인, 상기 언급한 [14]의 제조 방법.
- [0049] [16] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [14] 또는 [15]의 제조 방법.
- [0050] [17] 각각 화합물 (1)을 포함하는 각막 내피 제제 및/또는 각막 내피 이식용 이식물을 제공하는 단계, 및 제제 및/또는 이식물을 이식이 필요한 대상에게 이식하는 단계를 포함하는, 각막 내피 장애의 치료 방법.
- [0051] [18] 상기 언급한 각막 내피 세포는 인간 유래인, 상기 언급한 [17]의 치료 방법.
- [0052] [19] 상기 언급한 각막 내피 장애는 수포성 각막증, 각막 부종 또는 각막 백반인, 상기 언급한 [17] 또는 [18]의 치료 방법.
- [0053] [20] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [17] 내지 [19] 중 어느 하나의 치료 방법.
- [0054] [21] 화합물 (1)의 유효량 및 각막 내피 세포를 각막 내피의 창상의 치유를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 각막 내피 장애의 치료 방법.
- [0055] [22] 상기 언급한 각막 내피 장애는 수포성 각막증 또는 각막 내피염인, 상기 언급한 [21]의 치료 방법.
- [0056] [23] 상기 언급한 투여 단계는 국소 점안인, 상기 언급한 [21] 또는 [22]의 치료 방법.
- [0057] [24] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [21] 내지 [23] 중 어느 하나의 치료 방법.
- [0058] [25] 각막 내피 장애의 치료제를 제조하기 위한, 화합물 (1)의 용도.
- [0059] [26] 상기 언급한 치료제는 점안제인, 상기 언급한 [25]의 용도.
- [0060] [27] 각막 내피 세포의 접착 촉진제를 제조하기 위한, 화합물 (1)의 용도.
- [0061] [28] 각막 내피 세포의 배양액을 제조하기 위한, 화합물 (1)의 용도.
- [0062] [29] 각막 내피 이식용 이식물을 제조하기 위한,
- [0063] A) 각막 내피 세포,
- [0064] B) 골격, 및
- [0065] C) 화합물 (1)
- [0066] 의 용도.
- [0067] [30] 상기 언급한 각막 내피 세포는 인간 유래인, 상기 언급한 [29]의 용도.
- [0068] [31] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [25] 내지 [30] 중 어느 하나의 용도.
- [0069] [32] 상기 언급한 [14] 내지 [16] 중 어느 하나의 제조 방법에 의해 얻어지는 각막 내피 제제.
- [0070] [33] 화합물 (1)을 포함하는 안관류액(intraocular irrigating solution).
- [0071] [34] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [33]의 안관류액.
- [0072] [35] 화합물 (1)을 포함하는 아포토시스 억제제.
- [0073] [36] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [35]의 아포토시스 억제제.
- [0074] [37] 화합물 (1), 각막 내피 세포 및 지시서를 포함하는 각막 내피 장애 치료용 키트.
- [0075] [38] 상기 언급한 각막 내피 세포는 동결된, 상기 언급한 [37]의 키트.
- [0076] [39] 상기 언급한 화합물 (1)은 세척액, 배양액 또는 세포 부유용 용액에 함유된, 상기 언급한 [37] 또는 [38]의 키트.
- [0077] [40] 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [37] 내지 [39] 중 어느 하나의 키트.
- [0078] [41] 화합물 (1) 및 각막 내피 세포를 포함하는 각막 내피 제제.
- [0079] [42] 상기 언급한 화합물 (1)은 화합물 (Ia)인, 상기 언급한 [41]의 각막 내피 제제.

[0080] [43] 각막 내피 장애의 치료를 위한 화합물 (1).

[0081] [44] 각막 내피 장애의 치료를 위한 화합물 (Ia).

발명의 효과

[0082] 본 발명의 각막 내피 장애의 치료제는 유효 성분으로서 화합물 (1), 바람직하게는 화합물 (Ia)를 포함한다. 그 결과, 각막 내피 세포 장애를 동반하는 질환, 즉 각막 내피 장애와 관련된 질환(예컨대 수포성 각막증, 각막 내피염 등)의 치료 또는 예방을 위한 유효하고 간편한 방법이 제공될 수 있다. 본 발명의 각막 내피 장애의 치료제에 포함되는 화합물 (Ia)는 국소 점안의 경우 Y-27632의 약 1/30 내지 1/10의 낮은 농도에서라도 효능을 나타낼 수 있다. 따라서, 국소 점안형 제형은 각막 상피를 통해 각막 내피에 도달하여 이의 작용을 유지할 것으로 기대된다. 본 발명의 각막 내피 장애의 치료제를 사용하면 장기간 작용 물질로서 투여 경로의 선택 증가 및 우수한 치료를 제공할 수 있다.

[0083] 본 발명의 각막 내피 세포의 접착 촉진제는 각막 내피 장애를 동반하는 질환의 예방 또는 치료에서 각막 내피를 보호하기 위한 제제로서 유용하다. 또한, 본 발명의 각막 내피 세포의 접착 촉진제는 백내장 수술, 유리체 수술 등과 같은 내안 수술과 관련된 각막 내피 장애, 안압 증가에 의해 초래되는 각막 내피 장애(특히, 녹내장 발작) 또는 콘택트 렌즈로 인한 불충분한 산소에 의해 초래되는 각막 내피 장애의 예방 또는 치료에서 각막 내피를 보호하기 위한 제제로서 이용될 수 있다. 본 발명의 배양액은 화합물 (1), 특히 화합물 (Ia)를 포함하므로, 각막 내피 세포를 양호하게 배양, 유지 또는 보존할 수 있고, 각막 내피 제제의 안정적인 공급, 유지 또는 보존이 가능하다.

[0084] 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물은 예컨대 시험관 내에서 각막 내피 시트의 형태일 수 있으며, 각막 내피 세포 및 이의 골격과 함께 각막 내피 이식용 이식물로서 각막 내피 이식에 제공될 수 있다. 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물은 생체의 각막 내피 세포층의 특징으로 가지므로, 이식물의 생착률을 개선시킬 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 토끼 각막 내피 창상 모델의 각막 내피 창상에 대한 다양한 화합물의 효과를 나타내는 알리자린 레드 염색상을 도시한다. 음성 대조(PBS)의 국소 점안: 도 1A, 10 mM Y-27632의 국소 점안: 도 1B, 10 mM Fasudil의 국소 점안: 도 1C, 0.32 mM 화합물 (I)의 국소 점안: 도 1D, 및 0.95 mM 화합물 (I)의 국소 점안: 도 1E이다.

도 2는 토끼 각막 내피 창상 모델에서의 화합물 (I)의 국소 점안 효과를 도시하는 그래프인데, 여기서 종축은 각막 내피 결손 면적을 나타낸다.

도 3은 배양 각막 내피 세포의 형태에 대한 화합물 (I)의 영향을 나타낸다(파종 1 일 후).

도 4는 배양 각막 내피 세포의 형태에 대한 화합물 (I)의 영향을 나타낸다(파종 3 일 후).

도 5는 배양 각막 내피 세포의 형태에 대한 화합물 (I)의 영향을 나타낸다(파종 5 일 후).

도 6은 배양 각막 내피 세포의 형태에 대한 화합물 (I)의 영향을 나타낸다(파종 7 일 후).

도 7은 배양 각막 내피 세포의 형태에 대한 화합물 (I)의 영향을 나타낸다(파종 14 일 후).

도 8은 약제 첨가 후 각막 내피 세포의 창상 폭의 변화를 나타내는데, 여기서 종축은 약제 첨가 후 창상 폭 대 첨가 전 창상 폭의 비(%)를 나타내고, 횡축은 첨가된 약제를 나타낸다. 각각의 군에서, 좌측으로부터 0 시간(첨가 전), 6 시간(첨가 6 시간 후), 12 시간(첨가 12 시간 후) 및 24 시간(첨가 24 시간 후)에서의 창상 폭의 비를 나타낸다.

도 9는 파종 3 시간 후 웰에 부착된 각막 내피 세포의 수를 도시하는데, 여기서 종축은 100으로 한 대조군의 세포수에 대한 세포수의 비(%)를 나타내고, 횡축은 첨가된 약제를 나타낸다.

도 10은 화합물 (I), Y-27632 및 DMSO를 첨가하고 48 시간 후 제조된 이식물에 대한 배양 각막 내피 세포 시트에서의 ZO-1 및 Na^+/K^+ ATPase의 면역 염색상을 도시하는데, 여기서 도 10a는 다양한 약제의 첨가시 ZO-1 염색을 도시하고, 도 10b는 Na^+/K^+ ATPase 염색을 도시한다.

도 11은 화합물 (I) 및 DMSO를 첨가하고 14 일 후 제조된 이식물에 대한 배양 각막 내피 세포 시트에서의 ZO-1 및 Na^+/K^+ ATPase의 면역 염색상을 도시한다.

도 12a는 토끼 수포성 각막증 모델에 각막 내피 세포를 주입하고 14 일 후 각막 내피의 면역 염색상을 도시하고, 도 12b는 Na^+/K^+ ATPase 염색을 도시한다.

도 13은 토끼 수포성 각막증 모델에 각막 내피 세포를 주입하고 14 일 후 각막 내피의 세포수를 도시하는데, 여기서 종축은 세포수(세포/mm²)를 나타내고, 그래프에서 막대(bar)는 좌측으로부터 대조군, 100 μM Y-27632 치료군 및 10 μM 화합물 (I) 치료군을 나타낸다.

도 14는 약제 첨가 후 각막 내피 세포의 창상 폭의 변화를 도시하는데, 여기서 종축은 약제 첨가 후 창상 폭대 첨가 전 창상 폭의 비(%)를 나타내고, 횡축은 첨가된 약제를 나타낸다. 각각의 군에서, 좌측으로부터 0 시간(첨가 전), 6 시간(첨가 6 시간 후), 12 시간(첨가 12 시간 후) 및 24 시간(첨가 24 시간 후)에서의 창상 폭의 비를 나타낸다.

도 15는 화합물 (I) 또는 Y-27632가 첨가된 보존액에 3 주 동안 보존된 각막의 Hoechst, PI 및 Annexin V로의 염색상을 도시한다.

도 16은 화합물 (I) 또는 Y-27632가 첨가된 보존액에 2 주 보존된 각막의 생세포, 죽은 세포 및 아포토시스 세포의 수를 도시한다. 좌측 그래프는 화합물 (I)이 첨가된 보존액을 사용하여 얻어진 결과를 도시하고, 우측 그래프는 Y-27632가 첨가된 보존액을 사용하여 얻어진 결과를 도시한다. 각각의 그래프에서, 종축은 세포수를 나타내고, 횡축은 세포 확인에 사용된 염색 체제를 나타낸다.

도 17은 화합물 (I) 또는 Y-27632가 첨가된 보존액에 3 주 보존된 각막의 생세포, 죽은 세포 및 아포토시스 세포의 수를 도시한다. 좌측 그래프는 화합물 (I)이 첨가된 보존액을 사용하여 얻어진 결과를 도시하고, 우측 그래프는 Y-27632가 첨가된 보존액을 사용하여 얻어진 결과를 도시한다. 각각의 그래프에서, 종축은 세포수를 나타내고, 횡축은 세포 확인에 사용된 염색 체제를 나타낸다.

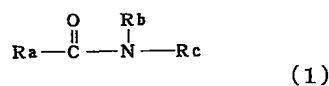
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] 구체예의 설명

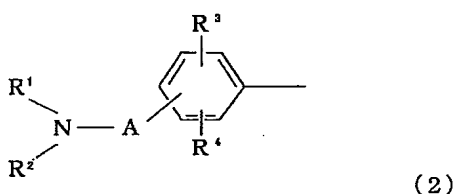
[0087] 본 발명을 하기에 설명한다. 본 명세서 전체에서, 단수 형태의 관사는 달리 명시하지 않는 한, 이의 복수 개념을 포함함을 이해해야 한다. 따라서, 단수 형태의 관사(예컨대, 영어로 "a", "an", "the" 등)는 달리 명시하지 않는 한 이의 복수 개념을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바의 용어는 달리 명시하지 않는 한 당업계에서 보통 사용되는 정의를 가짐도 이해해야 한다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 관련 업계의 당업자가 보통 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그렇지 않으면, 본 명세서(정의 포함)는 전례를 취한다.

[0088] 일측면에서, 본 발명은 각막 내피 장애의 치료제를 제공한다. 본 발명의 각막 내피 장애의 치료제(이하, "본 발명의 치료제"라고 종종 지칭됨)는 유효 성분으로서 하기 화합물 (1)을 포함한다.

[0089] 본 발명에서 사용된 화합물 (1)은 하기 화학식 (1)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다:

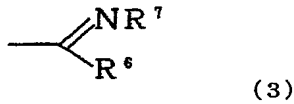


[0091] 상기 화학식에서, Ra은 하기 화학식 (2)이고:



[0093] 상기 화학식에서, R¹은 수소, 알킬, 또는 고리 상에 치환기를 임의로 갖는 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 페닐

또는 아르알킬, 또는 하기 화학식 (3)의 기이고:



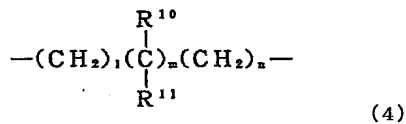
상기 화학식에서, R^6 은 수소, 알킬 또는 화학식 $-\text{NR}^8\text{R}^9$ (식 중, R^8 및 R^9 는 동일 또는 상이하며, 각각 수소, 알킬, 아르알킬 또는 페닐임)이고, R^7 은 수소, 알킬, 아르알킬, 페닐, 니트로 또는 시아노이거나, 또는 R^6 및 R^7 은 결합하여 고리에 추가로 산소 원자, 황 원자 또는 임의로 치환된 질소 원자를 임의로 갖는 복소환을 형성하고;

R^2 는 수소, 알킬, 또는 고리 상에 치환기를 임의로 갖는 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 페닐 또는 아르알킬이거나; 또는

R^1 및 R^2 는 결합하여 인접 질소 원자와 함께, 고리에 추가로 산소 원자, 황 원자 또는 임의로 치환된 질소 원자를 임의로 갖는 복소환을 형성하며;

R^3 및 R^4 는 동일 또는 상이하고, 각각 수소, 알킬, 아르알킬, 할로젠, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 아실아미노, 히드록시, 알콕시, 아르알킬옥시, 시아노, 아실, 머캅토, 알킬티오, 아르알킬티오, 카르복시, 알콕시카르보닐, 카르바모일, 알킬카르바모일 또는 아지드이며;

A는 하기 화학식 (4)이며:



상기 화학식에서, R^{10} 및 R^{11} 은 동일 또는 상이하며, 각각 수소, 알킬, 할로알킬, 아르알킬, 히드록시알킬, 카르복시 또는 알콕시카르보닐이거나, 또는

R^{10} 및 R^{11} 은 결합하여 시클로알킬을 형성하고, l, m 및 n은 각각 0 또는 1-3의 정수이고;

Rb는 수소 또는 알킬이며;

Rc는 질소를 포함하는 임의로 치환된 복소환이다.

본 명세서에서 각각의 기호는 하기를 의미한다.

R^1 및 R^2 에서의 알킬은 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬이고, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 펜틸, 헥실 등으로 예시되며, 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 알킬이 바람직하다.

R^1 및 R^2 에서의 시클로알킬은 3 내지 7 개의 탄소 원자를 갖는 시클로알킬, 예컨대 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실 및 시클로헵틸이다.

R^1 및 R^2 에서의 시클로알킬알킬은 시클로알킬 부분으로서 3 내지 7 개의 탄소 원자를 갖는 상기 언급한 시클로알킬을 갖고, 알킬 부분으로서 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬(예컨대, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 펜틸 및 헥실)을 갖는 것으로서, 시클로프로필메틸, 시클로부틸메틸, 시클로펜틸메틸, 시클로헥실메틸, 시클로헵틸메틸, 시클로프로필에틸, 시클로펜틸에틸, 시클로헥실에틸, 시클로헵틸에틸, 시클로프로필프로필, 시클로펜틸프로필, 시클로헥실프로필, 시클로헵틸프로필, 시클로프로필부틸, 시클로펜틸부틸, 시클로헥실부틸, 시클로헵틸부틸, 시클로프로필헥실, 시클로펜틸헥실, 시클로헥실헥실, 시클로헵틸헥실 등으로 예시된다.

R^1 및 R^2 에서의 아르알킬은 알킬 부분으로서 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 알킬을 갖는 것이며, 페닐알킬, 예컨대 벤질, 1-페닐에틸, 2-페닐에틸, 3-페닐프로필 및 4-페닐부틸로 예시된다.

- [0110] R^1 및 R^2 에서의 고리 상에 치환기를 가질 수 있는 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 페닐 및 아르알킬의 치환기는 할로젠(예컨대, 염소, 브롬, 불소 및 요오드), 알킬(R^1 및 R^2 에서의 알킬과 동일함), 알콕시(1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄형 또는 분지쇄형 알콕시, 예컨대 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 부톡시, 이소부톡시, sec-부톡시, tert-부톡시, 펜틸옥시 및 헥실옥시), 아르알킬(R^1 및 R^2 에서의 아르알킬과 동일함), 할로알킬[1 내지 5 개의 할로젠(들)으로 치환된 R^1 및 R^2 에서의 알킬, 예컨대 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸 및 2,2,3,3,3-펜타플루오로프로필], 니트로, 아미노, 시아노, 아지드 등이다.
- [0111] R^1 및 R^2 가 결합하여 인접 질소 원자와 함께, 고리에 추가로 산소 원자, 황 원자 또는 임의로 치환된 질소 원자를 임의로 갖는 복소환을 형성하는 기는 바람직하게는 5 또는 6 원 고리 또는 이에 결합된 고리이다. 특정 예는 1-피롤리딘, 피페리딘, 1-피페라지린, 모르폴리노, 티오모르폴리노, 1-이마다졸일, 2,3-디히드로티아졸-3-일 등을 포함한다. 임의로 치환된 질소 원자에서의 치환기는 알킬, 아르알킬, 할로알킬 등으로 예시되며, 여기서 알킬, 아르알킬 및 할로알킬은 R^1 및 R^2 에 대해 정의된 것과 동일하다.
- [0112] R^3 및 R^4 에서의 할로젠, 알킬, 알콕시 및 아르알킬은 R^1 및 R^2 에 대해 정의된 것과 동일하다.
- [0113] R^3 및 R^4 에서의 아실은 예컨대 2 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 알카노일(예컨대, 아세틸, 프로피오닐, 부틸, 발레릴 및 피발로일), 벤조일, 또는 알카노일 부분이 2 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 페닐알카노일(예컨대, 페닐아세틸, 페닐프로피오닐 및 페닐부틸)이다.
- [0114] R^3 및 R^4 에서의 알킬아미노는 알킬 부분에 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄형 또는 분지쇄형을 갖는 것이며, 메틸아미노, 에틸아미노, 프로필아미노, 이소프로필아미노, 부틸아미노, 이소부틸아미노, sec-부틸아미노, tert-부틸아미노, 펜틸아미노, 헥실아미노 등으로 예시된다.
- [0115] R^3 및 R^4 에서의 아실아미노는 아실로서 2 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 알카노일, 벤질 또는 2 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 알카노일 부분을 갖는 것이며, 아세틸아미노, 프로피오닐아미노, 부틸아미노, 발레릴아미노, 피발로일아미노, 벤조일아미노, 페닐아세틸아미노, 페닐프로피오닐아미노, 페닐부틸아미노 등으로 예시된다.
- [0116] R^3 및 R^4 에서의 알킬티오는 알킬 부분에 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬을 갖는 것이며, 메틸티오, 에틸티오, 프로필티오, 이소프로필티오, 부틸티오, 이소부틸티오, sec-부틸티오, tert-부틸티오, 펜틸티오, 헥실티오 등으로 예시된다.
- [0117] R^3 및 R^4 에서의 아르알킬옥시는 알킬 부분으로서 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 아르알킬을 포함하는 것이며, 벤질옥시, 1-페닐에틸옥시, 2-페닐에틸옥시, 3-페닐프로필옥시, 4-페닐부틸옥시 등으로 예시된다.
- [0118] R^3 및 R^4 에서의 아르알킬티오는 알킬 부분으로서 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 알킬을 포함하는 것이며, 벤질티오, 1-페닐에틸티오, 2-페닐에틸티오, 3-페닐프로필티오, 4-페닐부틸티오 등으로 예시된다.
- [0119] R^3 및 R^4 에서의 알콕시카르보닐은 알콕시 부분으로서 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄형 또는 분지쇄형 알콕시를 갖는 것이며, 메톡시카르보닐, 에톡시카르보닐, 프로폭시카르보닐, 이소프로폭시카르보닐, 부톡시카르보닐, 이소부톡시카르보닐, sec-부톡시카르보닐, tert-부톡시카르보닐, 펜틸옥시카르보닐, 헥실옥시카르보닐 등으로 예시된다.
- [0120] R^3 및 R^4 에서의 알킬카르바모일은 1 내지 4 개의 탄소 원자를 갖는 알킬로 단치환 또는 이치환된 카르바모일이며, 메틸카르바모일, 디메틸카르바모일, 에틸카르바모일, 디에틸카르바모일, 프로필카르바모일, 디프로필카르바모일, 부틸카르바모일, 디부틸카르바모일 등으로 예시된다.
- [0121] Rb에서의 알킬은 R^1 및 R^2 에서의 알킬과 동일하다.
- [0122] Rc에서의 질소를 포함하는 복소환은, 단환일 경우 예컨대 피리딘, 피리미딘, 피리다진, 트리아진, 피라졸 또는 트리아졸이며, 축합환일 경우, 피롤로피리딘(예컨대, 1H-피롤로[2,3-b]피리딘, 1H-피롤로[3,2-b]피리딘 및

1H-피롤로[3,4-b]피리딘), 피라졸로피리딘(예컨대, 1H-피라졸로[3,4-b]피리딘 및 1H-피라졸로[4,3-b]피리딘), 이미다조피리딘(예컨대, 1H-이미다조[4,5-b]피리딘), 피롤로피리미딘(예컨대, 1H-피롤로[2,3-d]피리미딘, 1H-피롤로[3,2-d]피리미딘 및 1H-피롤로[3,4-d]피리미딘), 피라졸로피리미딘(예컨대, 1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘, 피라졸로[1,5-a]피리미딘 및 1H-피라졸로[4,3-d]피리미딘), 이미다조피리미딘(예컨대, 이미다조[1,2-a]피리미딘 및 1H-이미다조[4,5-d]피리미딘), 피롤로트리아진(예컨대, 피롤로[1,2-a]-1,3,5-트리아진 및 피롤로[2,1-f]-1,2,4-트리아진), 피라졸로트리아진(예컨대, 피라졸로[1,5-a]-1,3,5-트리아진), 트리아졸로피리딘(예컨대, 1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘), 트리아졸로피리미딘(예컨대, 1,2,4-트리아졸로[1,5-a]피리미딘, 1,2,4-트리아졸로[4,3-a]피리미딘 및 1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-d]피리미딘), 신놀린, 퀴나졸린, 퀴놀린, 피리도피리다진(예컨대, 피리도[2,3-c]피리다진), 피리도피라진(예컨대, 피리도[2,3-b]피라진), 피리도피리미딘(예컨대, 피리도[2,3-d]피리미딘 및 피리도[3,2-d]피리미딘), 피리미도피리미딘(예컨대, 피리미도[4,5-d]피리미딘 및 피리미도[5,4-d]피리미딘), 피라지노피리미딘(예컨대, 피라지노[2,3-d]피리미딘), 나프틸리딘(예컨대, 1,8-나프틸리딘), 티에노피리미딘(예컨대, 티에노[1,5-a]피리미딘), 티에노피리딘(예컨대, 티에노[2,3-b]피리딘), 티에노피리미딘(예컨대, 티에노[2,3-d]피리미딘), 티아졸로피리딘(예컨대, 티아졸로[4,5-b]피리딘 및 티아졸로[5,4-b]피리딘), 티아졸로피리미딘(예컨대, 티아졸로[4,5-d]피리미딘 및 티아졸로[5,4-d]피리미딘), 옥사졸로피리딘(예컨대, 옥사졸로[4,5-b]피리딘 및 옥사졸로[5,4-b]피리딘), 옥사졸로피리미딘(예컨대, 옥사졸로[4,5-d]피리미딘 및 옥사졸로[5,4-d]피리미딘), 푸로피리딘(예컨대, 푸로[2,3-b]피리딘 및 푸로[3,2-b]피리딘), 푸로피리미딘(예컨대, 푸로[2,3-d]피리미딘 및 푸로[3,2-d]피리미딘), 2,3-디히드로피롤로피리딘(예컨대, 2,3-디히드로-1H-피롤로[2,3-b]피리딘 및 2,3-디히드로-1H-피롤로[3,2-b]피리딘), 2,3-디히드로피롤로피리미딘(예컨대, 2,3-디히드로-1H-피롤로[2,3-d]피리미딘 및 2,3-디히드로-1H-피롤로[3,2-d]피리미딘), 5,6,7,8-테트라히드로피리도[2,3-d]피리미딘, 5,6,7,8-테트라히드로-1,8-나프틸리딘, 5,6,7,8-테트라히드로퀴놀린 등으로 예시된다. 이들 고리가 수소화된 방향족 고리를 형성할 때, 고리 내 탄소 원자는 카르보닐일 수 있다. 이의 예는 2,3-디히드로-2-옥소피롤로피리딘, 2,3-디히드로-2,3-디옥소피롤로피리딘, 7,8-디히드로-7-옥소-1,8-나프틸리딘, 5,6,7,8-테트라히드로-7-옥소-1,8-나프틸리딘 등을 포함한다.

[0123] 이들 고리는 할로젠, 알킬, 알콕시, 아르알킬, 할로알킬, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 시아노, 포르밀, 아실, 아미노알킬, 모노- 또는 디알킬아미노알킬, 아지드, 카르복시, 알콕시카르보닐, 카르바모일, 알킬카르바모일, 임의로 치환된 히드라지노 등과 같은 치환기로 치환될 수 있다.

[0124] 임의로 치환된 히드라지노의 치환기는 예컨대 알킬, 아르알킬, 니트로 및 시아노를 포함하며, 여기서 알킬 및 아르알킬은 R^1 및 R^2 에서의 알킬 및 아르알킬과 동일하고, 임의로 치환된 히드라지노는 메틸히드라지노, 에틸히드라지노, 벤질히드라지노 등으로 예시된다.

[0125] R^6 에서의 알킬은 R^1 및 R^2 에서의 알킬과 동일하고; R^8 및 R^9 에서의 알킬은 R^1 및 R^2 에서의 알킬과 동일하고; R^8 및 R^9 에서의 아르알킬은 R^1 및 R^2 에서의 아르알킬과 동일하다.

[0126] R^7 에서의 알킬은 R^1 및 R^2 에서의 알킬과 동일하고, R^7 에서의 아르알킬은 R^1 및 R^2 에서의 알킬과 동일하다.

[0127] R^6 및 R^7 이 결합하여 고리에 추가로 산소 원자, 황 원자 또는 임의로 치환된 질소 원자를 임의로 갖는 복소환을 형성하는 기는 예컨대 이미다졸-2-일, 티아졸-2-일, 옥사졸-2-일, 이미다졸린-2-일, 3,4,5,6-테트라히드로피리딘-2-일, 3,4,5,6-테트라히드로피리미딘-2-일, 1,3-옥사졸린-2-일, 1,3-티아졸린-2-일, 또는 할로젠, 알킬, 알콕시, 할로알킬, 니트로, 아미노, 페닐, 아르알킬 등과 같은 치환기를 가질 수 있는 벤즈이미다졸-2-일, 벤조티아졸-2-일 또는 벤조옥사졸-2-일일 수 있다. 할로젠, 알킬, 알콕시, 할로알킬 및 아르알킬은 R^1 및 R^2 에 대해 예시된 것들을 의미한다.

[0128] 상기 언급한 임의로 치환된 질소 원자의 치환기는 예컨대 알킬, 아르알킬 또는 할로알킬일 수 있으며, 여기서 알킬, 아르알킬 및 할로알킬은 R^1 및 R^2 에 대해 예시된 것들이다.

[0129] R^{10} 및 R^{11} 에서의 히드록시알킬은 1 내지 3 개의 히드록시로 치환된 1 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 직쇄형 또는 분지쇄형 알킬, 예컨대 히드록시메틸, 2-히드록시에틸, 1-히드록시에틸, 3-히드록시프로필 및 4-히드록시부틸이다. R^{10} 및 R^{11} 에서의 알킬은 R^1 및 R^2 에서의 것들과 동일하고; R^{10} 및 R^{11} 에서의 할로알킬 및 알콕시카

르보닐은 R^1 및 R^2 에서의 것들과 동일하며; R^{10} 및 R^{11} 에서의 아르알킬은 R^1 및 R^2 에서의 것들과 동일하다. R^{10} 및 R^{11} 이 결합하여 형성된 시클로알킬은 R^1 및 R^2 에서의 시클로알킬과 동일하다.

- [0130] 화합물 (1)은 바람직하게는 (R)-(+)N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염이다. 하기에서, 편의상 (R)-(+)N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염은 종종 화합물 (Ia)로 지칭된다. 화합물의 염으로서, 약학적으로 허용되는 산부가염이 바람직하다. 산의 예는 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산 등, 유기산, 예컨대 메탄설폰산, 푸마르산, 말레산, 만델산, 시트르산, 타르타르산, 살리실산 등을 포함한다. 이들 중에서, (R)-(+)N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 일염산염[이하, 종종 화합물 (I)로 지칭됨]이 바람직하다.
- [0131] 화합물 (Ia)는 수화물일 수 있으며, 화합물 (Ia)의 1 수화물, 2 수화물, 1/2 수화물, 1/3 수화물, 1/4 수화물, 2/3 수화물, 3/2 수화물, 6/5 수화물 등도 본 발명에 포함된다.
- [0132] 화합물 (1), 특정하게는 화합물 (I)은 특정하게는 예컨대 W095/28387 및 W02002/083175에 기재된 방법에 의해 합성할 수 있다.
- [0133] 본 발명에서 사용되는 화합물 (1), 바람직하게는 화합물 (Ia), 특히 바람직하게는 화합물 (I), 및 이의 약리학적으로 허용되는 염, 및 이의 수화물도 본 발명의 화합물로서 지칭된다.
- [0134] 본 명세서에서, "각막 내피 장애"는 각막 내피 세포가 어떤 원인으로 상처가 나거나 손상된 상태를 지칭한다. 원인의 예는 내안 수술, 안압 증가, 콘택트 렌즈 착용 등을 포함한다.
- [0135] 본 명세서에서, "각막 내피 장애의 치료"는 각막 내피 장애의 치료 뿐 아니라 장애의 예방도 포함하는 개념이다. 또한, "각막 내피 장애"는 "각막 내피 장애와 관련된 질환"도 포함한다. 질환의 예는 수포성 각막증, 각막 내피염, 각막 부종, 각막 백반 등을 포함하며, 본 발명은 본 발명의 구체예에 따른 목표 질환에 적절히 적용할 수 있다.
- [0136] 각막 내피 세포는 각막의 투명성을 유지하는 역할을 한다. 각막 내피 세포의 밀도가 특정 한계 이상으로 감소할 경우, 각막은 팽윤하여 투명성을 유지할 수 없게 되어, 각막 내피 장애가 발병한다. 본 발명의 치료제는 각막 내피 세포의 접착을 촉진하며, 양호한 세포 형태, 정상적인 기능 및 높은 세포 밀도를 갖는 각막 내피 세포층을 형성시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 치료제는 각막 내피 세포의 아포토시스를 억제하며, 각막 내피 장애를 치료 또는 방지할 수 있다. 본 발명의 치료제는 각막 내피 장애와 관련된 질환, 예컨대 수포성 각막증 및 각막 내피염을 치료 또는 방지할 수 있다. 또한, 본 발명의 치료제는 백내장 수술, 유리체 수술 등과 같은 내안 수술에 의한 초래되는 각막 내피 장애, 안압 증가에 의해 초래되는 각막 내피 장애(특히 녹내장 발작) 또는 콘택트 렌즈 착용으로 인한 산소 부족에 의해 초래되는 각막 내피 장애를 치료 또는 방지할 수 있다.
- [0137] 본 발명의 치료제는 눈에 대한 국소 투여에 적절한 제형을 갖는 한 특별히 한정되지 않으며, 예컨대 전방내주사액, 안관류액, 점안제 등의 형태를 언급할 수 있다. 본 발명에 있어서, 안관류액 또는 점안제가 바람직하고, 투여 용이성의 측면에서 점안제가 더욱 바람직하다. 이들은 업계에서 널리 사용되는 종래 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 전방내 주사액 또는 안관류액의 형태로 눈에 국소 투여될 경우, 본 발명의 화합물은 생체 내에서의 각막 내피 세포와 접촉하여, 각막 내피 창상의 치유를 촉진한다. 점안제의 경우, 본 발명의 화합물은 각막 간질을 통해 각막 상피로부터 각막 내피 세포에 도달한다. 이의 일부는 눈방수(aqueous humor)로 이동하여, 눈방수층으로부터 각막 내피 세포와 접촉하여 각막 내피 창상의 치유를 촉진한다.
- [0138] 본 발명의 치료제에서는, 안정화제(예컨대 이황화나트륨, 티오황산나트륨, 에데트산나트륨, 시트르산나트륨, 아스코르브산, 디부틸히드록시톨루엔 등), 가용화제(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 마크로골, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유, 폴리소르베이트 80 등), 현탁제(예컨대, 폴리비닐피롤리돈, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 등), 유화제(예컨대, 폴리비닐피롤리돈, 대두 레시틴, 달걀 난황 레시틴, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유, 폴리소르베이트 80 등), 완충제(예컨대, 인산염 완충액, 아세트산염 완충액, 붕산염 완충액, 탄산염 완충액, 시트르산염 완충액, 트리스 완충액, 글루탐산, 엡실론-아미노카프론산 등), 증점제(예컨대, 수용성 셀룰로오스 유도체, 예컨대 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 등, 나트륨 콘드로이틴 설페이트, 나트륨 히알루로네이트, 카르복시비닐 고분자, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐피롤리돈, 마크로골 등), 보존제(예컨대, 염화벤즈알코늄, 염화벤즈에토늄, 글루콘산칼로르헥시딘, 클로로부탄올, 벤질 알콜, 나트륨 디히드로아세테이트, p-히드록시벤조산 에스테르, 에데트산나트륨, 붕산 등), 등장화제(예컨대, 염화나트륨, 염화칼륨, 글

리세롤, 만니톨, 소르비톨, 붕산, 글루코오스, 프로필렌 글리콜 등), pH 조정제(예컨대, 염산, 수산화나트륨, 인산, 아세트산 등), 청량화제(예컨대, l-멘톨, d-캄페, d-보르네올, 페퍼민트 오일 등) 등을 첨가제로서 첨가할 수 있다. 이들 첨가제의 첨가량은 첨가제의 종류 및 용도 등에 따라 달라지며, 첨가제의 목적을 달성 가능하게 하는 농도로 첨가할 수 있다.

[0139] 본 발명의 치료제 중 유효 성분의 양은 사용되는 본 발명의 화합물의 종류에 따라 달라지며, 화합물 (Ia) 또는 화합물 (I)의 양은 일반적으로 약 0.00001 - 1 w/v%, 바람직하게는 약 0.00001 - 0.1 w/v%, 더욱 바람직하게는 약 0.0001 - 0.05 w/v%, 약 0.001 - 0.05 w/v%, 약 0.002 - 0.05 w/v%, 약 0.003 - 0.05 w/v%, 약 0.004 - 0.05 w/v%, 약 0.005 - 0.05 w/v%, 약 0.006 - 0.05 w/v%, 약 0.007 - 0.05 w/v%, 약 0.008 - 0.05 w/v%, 약 0.009 - 0.05 w/v%, 약 0.01 - 0.05 w/v%, 약 0.02 - 0.05 w/v%, 약 0.03 - 0.05 w/v%, 약 0.04 - 0.05 w/v%, 약 0.003 - 0.04 w/v%, 약 0.004 - 0.04 w/v%, 약 0.005 - 0.04 w/v%, 약 0.006 - 0.04 w/v%, 약 0.007 - 0.04 w/v%, 약 0.008 - 0.04 w/v%, 약 0.009 - 0.04 w/v%, 약 0.01 - 0.04 w/v%, 약 0.02 - 0.04 w/v%, 약 0.03 - 0.04 w/v%, 약 0.003 - 0.03 w/v%, 약 0.004 - 0.03 w/v%, 약 0.005 - 0.03 w/v%, 약 0.006 - 0.03 w/v%, 약 0.007 - 0.03 w/v%, 약 0.008 - 0.03 w/v%, 약 0.009 - 0.03 w/v%, 약 0.01 - 0.03 w/v%, 약 0.02 - 0.03 w/v%, 약 0.003 - 0.02 w/v%, 약 0.004 - 0.02 w/v%, 약 0.005 - 0.02 w/v%, 약 0.006 - 0.02 w/v%, 약 0.007 - 0.02 w/v%, 약 0.008 - 0.02 w/v%, 약 0.009 - 0.02 w/v%, 약 0.01 - 0.02 w/v%, 약 0.003 - 0.01 w/v%, 약 0.004 - 0.01 w/v%, 약 0.005 - 0.01 w/v%, 약 0.006 - 0.01 w/v%, 약 0.007 - 0.01 w/v%, 약 0.008 - 0.01 w/v% 또는 약 0.009 - 0.01 w/v%이다. 용량 및 투여 빈도는 증상, 연령, 체중 및 투여 형태에 따라 다르지만, 일반적으로 성인에게 점안제로서 사용시, 예컨대 약 0.0001 - 0.1 w/v%, 바람직하게는 약 0.003 - 0.03 w/v%의 유효 성분을 함유하는 제제를 일반적으로 1 일당 1 내지 10 회, 바람직하게는 1 내지 6 회, 더욱 바람직하게는 1 내지 3 회, 투여당 약 0.01 - 0.1 ml 투여할 수 있다. 본 발명의 치료제를 전방(anterior chamber)에 주입할 경우, 상기 언급한 농도의 1/10 - 1/1000의 농도를 사용할 수 있다. 본 발명의 치료제에서, 당업자는 질환의 상태에 따라 본 발명의 화합물의 농도를 적절히 결정할 수 있다.

[0140] 본 발명의 치료제의 투여 대상의 예는 포유 동물(예컨대, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 고양이, 개, 소, 말, 양, 원숭이 등)을 포함한다.

[0141] 본 명세서에서, "각막 내피 세포의 접착의 촉진"은 각막 내피 세포의 접착을 촉진함을 지칭한다. 각막 내피 세포의 접착의 촉진의 예는 각막 내피 세포 사이의 접착의 촉진, 데스메막에 대한 각막 내피 세포의 접착의 촉진, 및 배양 기재 또는 골격에 대한 각막 내피 세포의 접착의 촉진을 포함한다.

[0142] 본 명세서에서, "접착 촉진제"는 접착을 촉진하는 작용을 갖는 약제이다. 본 발명의 각막 내피 세포의 접착 촉진제(이하, "본 발명의 접착 촉진제"로서 종종 약칭함)는 포유 동물 유래의 각막 조직으로부터 분리된 각막 내피 세포의 접착, 이로부터 분리 및 계대된 각막 내피 세포 사이의 접착, 데스메막에 대한 각막 내피 세포의 접착, 및 배양 기재 또는 골격에 대한 각막 내피 세포의 접착을 촉진하는 작용을 가지며, 여기서 포유 동물은 예컨대, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 고양이, 개, 소, 말, 양, 원숭이 등을 포함한다. 본 발명의 접착 촉진제는 특히 배양 및 계대가 어렵다고 여겨지는 인간 유래의 각막 내피 세포의 접착 촉진 작용에 있어서 우수하며, 인간 유래 각막 내피 세포는 바람직한 타겟이다.

[0143] 본 발명의 접착 촉진제는 각막 내피 장애와 관련된 질환의 치료 또는 예방에서 각막 내피를 보호하기 위한 제제로서 사용될 수 있다. 각막 내피 장애와 관련된 질환의 예는 수포성 각막증, 각막 내피염 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 접착 촉진제는 또한 백내장 수술, 유리체 수술 등과 같은 내안 수술에 의해 초래되는 각막 내피 장애, 안압 증가에 의해 초래되는 각막 내피 장애(특히 녹내장 발작), 또는 콘택트 렌즈 착용으로 인한 산소 부족에 의해 초래되는 각막 내피 장애의 치료 또는 예방에서 각막 내피를 보호하기 위한 제제로서 사용될 수 있다. 특별히 한정하지는 않지만, 본 발명의 접착 촉진제는 상기 언급한 치료제에서 사용되는 것과 유사한 첨가제(안정화제, 가용화제, 현탁제 등)를 포함할 수 있다. 유효 성분으로서의 본 발명의 화합물의 투여 대상, 용량, 함량 등은 상기 언급한 치료제와 또한 유사할 수 있다.

[0144] 각막 내피 세포를 시험관 내에서 배양시, 본 발명의 접착 촉진제를 또한 배양액에 첨가할 수 있다. 본 발명의 화합물을 배양액에 첨가하여 배양을 계속할 때, 본 발명의 화합물이 각막 내피 세포와 접촉하여 각막 내피 세포 사이의 접착, 데스메막에 대한 각막 내피 세포의 접착 및 배양 기재 또는 골격에 대한 각막 내피 세포의 접착이 촉진된다. 본 발명의 접착 촉진제를 배양액에 첨가하는 경우, 배양액에 포함된 본 발명의 화합물의 농도 등은 하기 언급하는 본 발명과 유사할 수 있으며, 이에 특별히 한정되지 않는다.

[0145] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 화합물을 포함하는 각막 내피 세포의 배양액을 제공한다. 본 발명의 배

양액에 포함된 본 발명의 화합물은 상기에 설명한 바와 같다.

- [0146] 특별히 한정하지는 않지만, 본 발명의 배양액은 각막 내피 세포의 배양에 일반적으로 사용되는 배지[예컨대, 돌베코의 변형 이글 배지(DMEM, Invitrogen), 혈청(예컨대, 우태아혈청(FBS)), 성장 인자[예컨대, 염기성 섬유모세포 성장 인자(b-FGF)], 항생제(예컨대, 페니실린, 스트렙토마이신 등) 등을 포함할 수 있다.
- [0147] 본 발명의 배양액에 있어서, 본 발명의 화합물의 농도는 사용되는 화합물의 종류에 따라 달라지며, 화합물 (Ia) 또는 화합물 (I)의 경우는 일반적으로 약 0.001 - 100 μ M, 바람직하게는, 약 0.01 - 75 μ M, 약 0.05 - 50 μ M, 약 1 - 10 μ M, 약 0.01 - 10 μ M, 약 0.05 - 10 μ M, 약 0.075 - 10 μ M, 약 0.1 - 10 μ M, 약 0.5 - 10 μ M, 약 0.75 - 10 μ M, 약 1.0 - 10 μ M, 약 1.25 - 10 μ M, 약 1.5 - 10 μ M, 약 1.75 - 10 μ M, 약 2.0 - 10 μ M, 약 2.5 - 10 μ M, 약 3.0 - 10 μ M, 약 4.0 - 10 μ M, 약 5.0 - 10 μ M, 약 6.0 - 10 μ M, 약 7.0 - 10 μ M, 약 8.0 - 10 μ M, 약 9.0 - 10 μ M, 약 0.01 - 5.0 μ M, 약 0.05 - 5.0 μ M, 약 0.075 - 5.0 μ M, 약 0.1 - 5.0 μ M, 약 0.5 - 5.0 μ M, 약 0.75 - 5.0 μ M, 약 1.0 - 5.0 μ M, 약 1.25 - 5.0 μ M, 약 1.5 - 5.0 μ M, 약 1.75 - 5.0 μ M, 약 2.0 - 5.0 μ M, 약 2.5 - 5.0 μ M, 약 3.0 - 5.0 μ M, 약 4.0 - 5.0 μ M, 약 0.01 - 3.0 μ M, 약 0.05 - 3.0 μ M, 약 0.075 - 3.0 μ M, 약 0.1 - 3.0 μ M, 약 0.5 - 3.0 μ M, 약 0.75 - 3.0 μ M, 약 1.0 - 3.0 μ M, 약 1.25 - 3.0 μ M, 약 1.5 - 3.0 μ M, 약 1.75 - 3.0 μ M, 약 2.0 - 3.0 μ M, 약 0.01 - 1.0 μ M, 약 0.05 - 1.0 μ M, 약 0.075 - 1.0 μ M, 약 0.1 - 1.0 μ M, 약 0.5 - 1.0 μ M, 약 0.75 - 1.0 μ M, 약 0.09 - 3.5 μ M, 약 0.09 - 3.2 μ M, 더욱 바람직하게는, 약 0.05 - 1.0 μ M, 약 0.075 - 1.0 μ M, 약 0.1 - 1.0 μ M, 약 0.5 - 1.0 μ M, 약 0.75 - 1.0 μ M이다.
- [0148] 본 발명의 배양액은 각막 내피 세포의 접착을 촉진하여 세포의 탈락을 방지하며, 양호한 세포 형태, 정상적인 기능 및 높은 세포 밀도를 갖는 각막 내피 세포층의 형성을 가능하게 한다. 따라서, 이는 바람직하게는 하기에 언급되는 본 발명의 각막 내피 제제의 제조 방법에 사용된다. 또한, 본 발명의 배양액은 또한 각막 내피 세포의 유지에 사용된다.
- [0149] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 화합물을 포함하는 각막 보존액을 제공한다. 본 발명의 각막 보존액에 포함되는 본 발명의 화합물은 상기 설명한 바와 같다. 본 명세서에서, 각막 보존액은 레시피언트에게 이식할 때까지 도너로부터 적출된 각막편을 보존하기 위해 사용되는 액체이다.
- [0150] 본 발명의 각막 보존액의 예는 각각 본 발명의 화합물을 포함하는, 각막 내피 이식에 일반적으로 사용되는 보존액[각막 보존액(Optisol GS: 등록 상표), 안구 보존액(EPII: 등록 상표)], 생리 식염수, 인산 완충 생리 식염수(PBS) 등을 포함한다.
- [0151] 본 발명의 각막 보존액에서, 본 발명의 화합물의 농도는 사용되는 화합물의 종류에 따라 달라지며, 화합물 (Ia) 또는 화합물 (I)의 농도는 일반적으로 약 0.001 - 100 μ M, 바람직하게는 약 0.01 - 75 μ M, 약 0.05 - 50 μ M, 약 1 - 10 μ M, 약 0.01 - 10 μ M, 약 0.05 - 10 μ M, 약 0.075 - 10 μ M, 약 0.1 - 10 μ M, 약 0.5 - 10 μ M, 약 0.75 - 10 μ M, 약 1.0 - 10 μ M, 약 1.25 - 10 μ M, 약 1.5 - 10 μ M, 약 1.75 - 10 μ M, 약 2.0 - 10 μ M, 약 2.5 - 10 μ M, 약 3.0 - 10 μ M, 약 4.0 - 10 μ M, 약 5.0 - 10 μ M, 약 6.0 - 10 μ M, 약 7.0 - 10 μ M, 약 8.0 - 10 μ M, 약 9.0 - 10 μ M, 약 0.01 - 5.0 μ M, 약 0.05 - 5.0 μ M, 약 0.075 - 5.0 μ M, 약 0.1 - 5.0 μ M, 약 0.5 - 5.0 μ M, 약 0.75 - 5.0 μ M, 약 1.0 - 5.0 μ M, 약 1.25 - 5.0 μ M, 약 1.5 - 5.0 μ M, 약 1.75 - 5.0 μ M, 약 2.0 - 5.0 μ M, 약 2.5 - 5.0 μ M, 약 3.0 - 5.0 μ M, 약 4.0 - 5.0 μ M, 약 0.01 - 3.0 μ M, 약 0.05 - 3.0 μ M, 약 0.075 - 3.0 μ M, 약 0.1 - 3.0 μ M, 약 0.5 - 3.0 μ M, 약 0.75 - 3.0 μ M, 약 1.0 - 3.0 μ M, 약 1.25 - 3.0 μ M, 약 1.5 - 3.0 μ M, 약 1.75 - 3.0 μ M, 약 2.0 - 3.0 μ M, 약 0.01 - 1.0 μ M, 약 0.05 - 1.0 μ M, 약 0.075 - 1.0 μ M, 약 0.1 - 1.0 μ M, 약 0.5 - 1.0 μ M, 약 0.75 - 1.0 μ M, 약 0.09 - 3.5 μ M 또는 약 0.09 - 3.2 μ M, 더욱 바람직하게는 약 0.05 - 1.0 μ M, 약 0.075 - 1.0 μ M, 약 0.1 - 1.0 μ M, 약 0.5 - 1.0 μ M 또는 약 0.75 - 1.0 μ M이다.
- [0152] 본 발명의 각막 보존액은 각막 내피 세포의 접착을 촉진함으로써 세포의 탈락을 방지하고, 양호한 세포 형태, 정상적인 기능 및 높은 세포 밀도를 갖는 각막 내피 세포층의 형성을 가능하게 한다. 따라서, 이는 바람직하게는 기관 이식 등에 사용되는 각막의 보존액으로서 사용된다. 본 발명의 각막 보존액은 보존에서 각막 내피 세포의 세포사 및 아포토시스를 억제하는 효과를 제공한다. 또한, 본 발명의 각막 보존액은 각막 내피 세포의 동결 보존을 위한 보존액으로서도 사용된다. 동결 보존을 위해, 글리세롤, 디메틸 설폭시드, 프로필렌 글리콜, 아세트아미드 등을 본 발명의 각막 보존액에 추가로 첨가할 수 있다.
- [0153] 일측면에서, 본 발명은 본 발명의 화합물 및 각막 내피 세포를 포함하는 각막 내피 제제를 제공한다. 본 명세서에서, "각막 내피 제제"는 각막 내피 장애의 상태를 방지, 감소 또는 소실시키는 제제를 지칭한다.

- [0154] 본 발명의 각막 내피 제제는, 이것이 각막 내피 세포 및 본 발명의 화합물을 포함하는 한, 각막 내피의 장애를 갖는 질환을 치료할 수 있다. 이론에 의해 구속시키는 것은 아니지만, 이는 본 발명의 화합물이 생체 내에서 각막 내피 세포와 접촉하여, 데스메막에 대한 각막 내피 세포의 접착이 촉진되기 때문이다. 또한, 본 발명의 화합물은 데스메막에 이식되는 동안 탈락되는 세포의 재접착을 촉진하여, 세포 아포토시스를 억제하여, 각막 내피 창상의 치유를 촉진할 수 있다. 본 발명의 각막 내피 제제와 같이 편리하고 신속한 치료 효과를 나타내는 제제는 이제까지 존재하지 않았고, 본 발명에 의해 처음으로 제공된다.
- [0155] 일구체예에서, 본 발명의 각막 내피 제제에 함유되는 각막 내피 세포는 본 발명의 화합물을 포함하는 배양액 또는 본 발명의 화합물을 포함하지 않는 배양액에서 배양된 것일 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 각막 내피 제제에 있어서, 본 발명의 화합물 및 각막 내피 세포를 투여 직전에 혼합하거나 혼합물로서 보존할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 각막 내피 제제는 각막 내피 세포를 유지하기 위해, 본 발명의 각막 보존액 또는 배양액, 또는 둘다를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 각막 내피 제제는 각막 내피 세포를 부유시키기 위한 용액을 포함할 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 화합물 및 각막 내피 세포가 치료하고자 하는 부위에 존재하고 서로 접촉시, 각막 내피 창상의 치유가 촉진된다.
- [0156] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 각막 내피 제제는 본 발명의 화합물로서 화합물 (Ia)[(R)-(+) -N-(1H-피롤로 [2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미도 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염]를 포함할 수 있다.
- [0157] 본 발명의 각막 내피 제제는 각막 내피 장애와 관련된 질환, 예컨대, 수포성 각막증, 각막 내피염, 각막 부종 및 각막 백반, 특히, 각막 이상증, 외상 또는 내안 수술로 인한 각막 내피 장애에 의해 초래된 수포성 각막증의 치료에 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 각막 내피 제제는 예컨대 주사 등에 의해 각막 내피의 장애를 갖는 질환을 앓는 환자의 전방에 직접 투여할 수 있다.
- [0158] 상기 언급한 본 발명의 치료제에서 본 발명의 각막 내피 제제에 사용되는 본 발명의 화합물, 각막 내피 세포 등은 임의의 형태일 수 있다. 또한, 본 발명의 각막 내피 제제에 포함되는 본 발명의 화합물의 양도 예컨대 상기 언급한 치료에에서의 함량과 유사할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 양은 각막 내피 제제의 구체예에 따라 적절히 결정할 수 있다.
- [0159] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 화합물을 포함하는 배양액을 사용하여 각막 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하는 각막 내피 제제의 제조 방법, 및 상기 제조 방법에 의해 얻어지는 각막 내피 제제를 제공한다. 제조 방법에 사용되는 본 발명의 화합물, 각막 내피 세포 등 및 본 발명의 각막 내피 제제는 상기 언급한 임의의 형태일 수 있다.
- [0160] 일구체예에서, 본 발명의 제조 방법은 본 발명의 배양액을 사용하여 각막 내피 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 예컨대 하기 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0161] <1> 각막 내피 세포의 채취 및 시험관 내에서의 배양
- [0162] 각막 내피 세포는 종래의 방법에 의해 레시피언트 자신 또는 적절한 도너의 각막으로부터 채취한다. 본 발명에서의 이식 조건을 고려시, 동종 각막 내피 세포를 준비할 수 있다. 예컨대, 데스메막을 손상되지 않은 각막 내피 세포와 함께 박리한 후 콜라게나아제 등으로 처리한다. 각막 내피 세포를 단리한 후, 각막 내피 세포를 본 발명의 배양액에 배양한다. 배양액은 예컨대 FBS(우태아 혈청), 염기성 섬유모세포 성장 인자(b-FGF) 및 항생제, 예컨대 페니실린, 스트렙토마이신 등을 상업적으로 입수 가능한 돌베코의 변형 이글 배지(DMEM)에 적절히 첨가하고 본 발명의 화합물, 바람직하게는 화합물 (Ia)를 거기에 추가로 첨가하여 사용할 수 있다. 표면이 I형 콜라겐, IV형 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌 또는 소 각막 내피 세포의 세포외 매트릭스 등으로 코팅된 배양 플라스크(배양 접시)를 바람직하게는 사용한다. 대안적으로, FNC 코팅 믹스(등록 상표) 등과 같은 상업적으로 입수 가능한 코팅제로 처리된 일반적인 배양 플라스크를 사용할 수 있다. 이러한 코팅 및 본 발명의 배양액을 병용함으로써, 배양 플라스크의 표면에 대한 각막 내피 세포의 접착이 촉진되어 양호한 성장이 이루어진다.
- [0163] 각막 내피 세포의 배양을 위한 온도 조건은, 각막 내피 세포가 성장하는 한 특별히 한정되지 않지만, 예컨대 온도는 성장 효율을 고려시 약 25 - 약 45 °C, 바람직하게는 약 30 - 약 40 °C이고, 더욱 바람직하게는 약 37 °C이다. 배양 방법은 약 5-10% CO₂ 농도 하에서 가습 분위기로 종래의 세포 배양 인큐베이터에서 수행한다.
- [0164] <2> 계대 배양
- [0165] 배양에 제공된 각막 내피 세포의 성장 후 계대 배양을 수행할 수 있다. 계대 배양은 세포가 서브컨플루언트

(subconfluent) 또는 컨플루언트(confluent)에 도달하였을 때 수행하는 것이 바람직하다. 계대 배양은 하기와 같이 수행할 수 있다. 세포를 트립신-EDTA 등으로 처리한 후, 채취한다. 본 발명의 배양액을 채취한 세포에 첨가하여 세포 부유액을 얻는다. 세포 채취 동안 또는 채취 후 원심 분리 처리를 수행하는 것이 바람직하다. 이러한 원심 분리 처리는 높은 세포 밀도를 갖는 세포 부유액을 제공한다. 예컨대, 세포 부유액의 세포 밀도는 약 $1 - 2 \times 10^6$ 세포/ml이다. 여기서 원심 분리 처리의 조건으로서, 예컨대, 500 rpm($\times 30$ g) - 1000 rpm($\times 70$ g), 1 - 10 분을 언급할 수 있다.

[0166] 세포 부유액을 상기 언급한 초기 배양과 동일한 방식으로 배양 플라스크에 파종하고, 배양한다. 계대 동안의 회석 비는 세포의 상태에 따라 달라지며, 이는 약 1:2 - 1:4, 바람직하게는 약 1:3이다. 계대 배양은 상기 언급한 초기 배양과 유사한 배양 조건 하에서 수행할 수 있다. 배양 시간은 사용되는 세포의 상태에 따라 달라지는데, 예컨대 7 - 30일이다. 상기 계대 배양은 필요에 따라 복수 회 수행할 수 있다. 본 발명의 배양액을 사용하면, 배양의 초기 단계에서의 세포 접착이 증가하여, 배양 시간을 단축시킬 수 있다.

[0167] 상기 언급한 바와 같이 배양함으로써, 각막 내피 세포 및 본 발명의 화합물 (1)[바람직하게는 화합물 (Ia)]을 포함하는 각막 내피 제제를 얻을 수 있다.

[0168] 다른 측면에서, 본 발명은 각막 내피 장애의 치료를 위한 키트를 제공한다. 키트는 본 발명의 화합물, 각막 내피 세포 및 지시서를 포함한다.

[0169] 일구체예에서, 본 발명의 키트에 포함되는 본 발명의 화합물은 예컨대 각막 내피 세포를 세척하기 위해 사용되는 세척액, 각막 내피 세포를 배양하기 위한 배양액, 각막 내피 세포를 부유시키기 위한 세포 부유용 용액에 담을 수 있거나, 또는 고체(예컨대 분말) 형태일 수 있다. 이는 본 발명의 화합물 및 각막 내피 세포가 치료할 부위에 존재하여 서로 접촉시, 각막 내피 창상의 치유가 촉진되기 때문이다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화합물 (Ia)[(R)-(+)N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염]일 수 있다. 다른 구체예에서, 또한, 본 발명의 키트에 담긴 각막 내피 세포는 동결시킬 수 있다. 본 발명의 키트에 사용되는 본 발명의 화합물, 각막 내피 세포 등은 상기 언급한 본 발명의 치료제, 각막 내피 제제 등에서의와 같이 임의의 형태일 수 있다.

[0170] 다른 측면에서, 본 발명은 A) 각막 내피 세포, B) 골격 및 C) 본 발명의 화합물, 바람직하게는 화합물 (Ia)[(R)-(+)N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염]를 포함하는 각막 내피 이식용 이식물을 제공한다.

[0171] 본 명세서에서, "각막 내피 이식용 이식물"은 각막에 이식되는 본 발명의 조직편, 세포, 조성물, 약제 등을 의미한다.

[0172] 본 명세서에서, "골격"은 세포를 지지하기 위한 재료를 의미한다. 골격은 소정 강도 및 생체 적합성을 갖는다. 본 명세서에서 사용될 경우, 골격은 생물학적 물질 또는 천연에서 공급된 물질 또는 천연 생성 물질 또는 합성 공급 물질로부터 제조한다. 구체적으로는, 골격은 유기체(예컨대 조직, 세포) 외의 물질(비세포 재료)로부터 형성시킬 수 있다. 본 발명의 이식물에 사용되는 골격은 이것이 배양 각막 내피 세포층을 담지하고 이식 후 적어도 3 일 동안 생체 내에서 형상을 유지할 수 있는 한, 특별히 한정되지 않는다. 또한, 골격은 시험관 내에서 각막 내피 세포의 배양을 위한 골격의 역할을 할 수 있거나, 또는 배양 후 각막 내피 세포층을 담지하는 역할만을 할 수 있다. 바람직하게는, 골격은 각막 내피 세포를 배양하는 데에 사용되며, 배양 완료 후 이식에 직접 적용 가능한 골격의 역할을 한다. 본 발명에서, 골격 및 기제는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0173] 상기 언급한 골격 또는 기제의 예는 천연 생성 물질에서 유래된 고분자 재료, 예컨대 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로스 등, 합성 고분자 재료, 예컨대 폴리스티렌, 폴리에스테르, 폴리카르보네이트, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 등, 생분해성 고분자 재료, 예컨대 폴리락트산, 폴리글리콜산 등, 히드록시아파타이트, 양막(amniotic membrane) 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0174] 상기 언급한 골격 또는 기제의 형상은, 이것이 각막 내피 세포층을 담지하고 이식에 적절하다면, 특별히 한정되지 않으며, 시트 형태가 바람직하다. 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물이 시트일 경우, 이식 동안 적용 부위에 맞는 크기로 이를 절단할 수 있다. 또한, 시트를 작게 말아서 이를 창구(創口)로부터 삽입할 수 있다. 특정하게 바람직한 예는 손상된 각막 내피의 면적의 약 80%를 덮는 원형 형상이다. 또한, 시트가 적용 부위에 밀착 가능하도록, 상기 언급한 원형 형상의 주위에 슬릿을 만드는 것도 바람직하다.

[0175] 바람직한 구체예에서, 상기 언급한 골격 또는 기제는 콜라겐이다. 콜라겐으로서, 바람직하게는 JP-A-2004-

24852에 기재된 콜라겐 시트를 사용할 수 있다. 이러한 콜라겐 시트는 예컨대 JP-A-2004-24852에 기재된 방법에 따라 양막으로부터 제조할 수 있다.

- [0176] 상기 언급한 각막 내피 세포층은 바람직하게는 하기 특징 중 1 이상을 갖는다. 더욱 바람직하게는, 이는 하기 특징 중, 2 이상, 더더욱 바람직하게는 모두를 갖는다.
- [0177] (1) 세포층은 단층 구조를 갖는다. 이는 생체 내의 각막 내피 세포의 생리학적 특징 중 하나이다.
- [0178] (2) 세포층은 세포 밀도가 약 1,000 - 약 4,000 세포/mm²이다. 특히, 이는 레시피언트가 성인일 경우, 바람직하게는 약 2,000 - 약 3,000 세포/mm²이다.
- [0179] (3) 세포층을 구성하는 세포는 육각형 격자 구조를 형성한다. 이는 생체 내의 각막 내피 세포층을 구성하는 세포의 생리학적 특징 중 하나이다. 육각형 세포로, 본 발명의 제제는 고유의 세포 내의 각막 내피 세포층의 생리학적 기능과 유사한 기능을 나타낼 수 있다.
- [0180] (4) 세포층 내 세포는 규칙적인 단층을 형성한다. 생리학적으로, 각막 내피 세포는 동일한 방식으로 정렬된다. 이는 각막의 정상 기능 및 높은 투명성의 유지, 및 각막 수분 조절을 적절히 가능하게 한다. 따라서, 이러한 형태적 특징으로, 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물은 생체 내의 각막 내피 세포와 유사한 기능을 나타낼 것으로 기대된다. 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물은 화합물 (Ia)를 포함하므로, 이는 이식 후의 각막 내피 세포를 양호하게 유지할 수 있다.
- [0181] 각막 내피 세포층의 제조
- [0182] 각막 내피 세포의 세포 부유액은 <1> 각막 내피 세포의 채취 및 시험관 내에서의 배양, 및 <2> 상기 언급한 각막 내피 세포의 계대 배양에 따라 제조할 수 있다. 세포 부유액을 콜라겐 시트 등과 같은 기재에 파종하고, 배양한다. 여기서, 최종 제조된 각막 내피 제제가 소정 세포 밀도를 갖는 세포층을 갖도록, 파종된 세포의 수를 제어한다. 정확히는, 세포 밀도가 약 1,000 - 약 4,000 세포/mm²인 세포층이 형성되도록 세포를 파종한다. 배양은 상기 언급한 초기 배양 등과 유사한 조건 하에서 수행할 수 있다. 배양 시간은 사용되는 세포의 조건 등에 따라 달라지는데, 예컨대 3 - 30 일이다. 본 발명의 화합물, 바람직하게는 화합물 (Ia)[(R)-(+)N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염]을 배양액 또는 세포 부유액 등에 첨가함으로써, 양호한 형태 및 기능을 유지하면서 각막 내피 세포층을 더 짧은 기간에 제조할 수 있다.
- [0183] 상기 언급한 바와 같이 배양함으로써, 기재 상에 배양된 각막 내피 세포층으로서 각막 내피 이식용 이식물을 제조할 수 있다.
- [0184] 본 발명에서, 각막 내피 이식용 이식물은 각막 내피 세포를 유지하기 위해 본 발명의 배양액을 포함할 수 있다. 또한, 각막 내피 이식용 이식물은 이식까지 본 발명의 각막 보존액을 포함할 수 있다. 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물은 본 발명의 배양액 및 보존액 모두를 포함할 수 있다. 일구체예에서, 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물은 각막 내피 세포를 세정하기 위해 사용되는 세척액, 각막 내피 세포를 배양하기 위한 배양액, 및 각막 내피 세포를 부유시키기 위한 용액에서 선택되는 1 이상을 추가로 포함할 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 화합물 및 각막 내피 세포는 치료하고자 하는 부위에 존재하여 서로 접촉하기 때문에, 각막 내피 창상의 치유가 촉진된다.
- [0185] 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물은 각막 내피 이식을 필요로 하는 질환, 예컨대, 수포성 각막증, 각막 부종, 각막 백반, 특히, 각막 이상증, 외상 또는 내안 수술로 인한 각막 내피 장애에 의해 초래된 수포성 각막증의 치료를 위한 이식편으로서 사용할 수 있다.
- [0186] 본 발명의 각막 내피 이식용 이식물에 사용되는 본 발명의 화합물 및 각막 내피 세포 등은 본 발명의 상기 언급한 치료제, 각막 내피 제제 등과 유사한 임의의 형태일 수 있다.
- [0187] 다른 측면에서, 본 발명은 각각 본 발명의 화합물을 포함하는 각막 내피 제제 및/또는 각막 내피 이식용 이식물을 제공하는 단계, 및 각막 내피 제제 및/또는 각막 내피 이식용 이식물을 각막 내피 이식을 필요로 하는 대상에게 이식하는 단계를 포함하는, 각막 내피 장애의 치료 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화합물 (Ia)[(R)-(+)N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 그의 약리학적으로 허용되는 염]일 수 있다. 본 발명의 치료 방법에 사용되는 각막 내피 제제 및 각막 내피 이식용 이식물은 상기 언급한 각막 내피 제제 및 각막 내피 이식용 이식물과 유사한 임의의 형태일 수 있다. 본 발명의 치료 방법은 각막 내피 장애, 예컨대, 수포성 각막증, 각막 부종, 각막 백반 등의 치료에 유용하다.

- [0188] 본 발명의 각막 내피 제제의 투여(이식) 대상은 예컨대 포유 동물(예컨대, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 고양이, 개, 소, 말, 양, 원숭이 등)이며, 인간이 바람직하다.
- [0189] 이식 단계에서는, 동종 이식이 바람직하고, 이식 대상이 되는 동물과 동종인 각막 내피 세포에서 유래되는 각막 내피 제제를 바람직하게는 준비한다. 대상이 인간일 경우, 동일한 혈액형 또는 HLA형의 도너로부터 유래된 각막 내피 제제가 바람직하고, 자가 이식이 더욱 바람직하다.
- [0190] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 화합물을 포함하는 아포토시스 억제제를 제공한다. 여기서, 본 발명의 화합물은 바람직하게는 화합물 (Ia)[(R)-(+) -N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염]일 수 있다. 본 발명의 아포토시스 억제제에 사용되는 본 발명의 화합물은 상기 언급한 본 발명의 치료제와 동일한 임의의 형태일 수 있다.
- [0191] 본 발명의 아포토시스 억제제는 아포토시스의 발병 또는 진행을 억제하는 효과가 있으며, 아포토시스의 과대 이상(hyper-abnormality)에 의해 초래되는 질환 또는 병리, 또는 결과적으로 이러한 병태를 나타내는 질환 또는 병리의 치료 또는 예방에 유용하다. 아포토시스의 과대 이상과 관련된 질환의 예는 바이러스 감염, 내분비 질환, 혈액 질환, 기관 저형성, 기관 이식 거부, 이식편대 숙주 질환, 면역 결핍, 신경 변성 질환, 급성 심장 질환, 방사선 질환, 자외선 손상, 중독 질환, 영양 실조, 염증성 질환, 급성 신경병, 혈관 질환, 호흡기 질환, 관절 증후군을 포함한다. 본 발명의 아포토시스 억제제는 특히 세포 아포토시스의 억제에 의해 각막 내피 세포의 창상 치유를 촉진할 수 있기 때문에, 각막 내피 장애의 치료 또는 예방에 유용하다. 특별히 한정하는 것은 아니지만, 본 발명의 아포토시스 억제제는 상기 언급한 치료제와 유사한 첨가제(안정화제, 가용화제, 현탁제 등)를 포함할 수 있다. 유효 성분으로서의 본 발명의 화합물의 투여의 대상, 용량, 함량 등도 상기 언급한 치료제와 유사할 수 있다.
- [0192] **실시예**
- [0193] 본 발명을 실시예를 참고로 하여 하기에서 더욱 상세히 설명하는데, 이는 한정적인 것으로 이해되어서는 안 된다. 실험 동물은 동물을 이용하는 생물 의학 연구에 관한 원칙(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals) 뿐만 아니라, 동물의 애호 및 관리에 관한 법률, 및 실험 동물의 영양 공급 및 보관 등에 관한 기준에 따랐다. 이 실험은 Guidelines of Association for Research in Vision and Ophthalmology on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research에 따라 수행하였다.
- [0194] 제조예: 시험 물질의 제조예
- [0195] 각각의 농도의 시험 물질의 조성을 하기에 나타낸다.
- [0196] 시험 물질
- | | | |
|--------|---------------|----------------------------------|
| [0197] | 화합물 (I) | 0.003, 0.01, 0.03, 0.05 또는 0.1 g |
| [0198] | | (탈염산체로서의 함량) |
| [0199] | 염화나트륨 | 0.85 g |
| [0200] | 인산이수소나트륨 이수화물 | 0.1 g |
| [0201] | 염화벤잘코늄 | 0.005 g |
| [0202] | 수산화나트륨 | 적당량 |
| [0203] | 정제수 | 적당량 |
| [0204] | 총량 | 100 ml (pH 7.0) |
| [0205] | 기제(vehicle) | |
| [0206] | 염화나트륨 | 0.85 g |
| [0207] | 인산이수소나트륨 이수화물 | 0.1 g |
| [0208] | 염화벤잘코늄 | 0.005 g |
| [0209] | 수산화나트륨 | 적당량 |
| [0210] | 정제수 | 적당량 |

- [0211] 총량 100 ml(pH 7.0)
- [0212] 실시예 1: 토끼 각막 내피 창상 모델에서의 화합물 (I)의 효과
- [0213] 1. 시험 물질 및 대조 물질
- [0214] 시험 물질로서, (R)-(+)-N-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-4-(1-아미노에틸)벤즈아미드 일염산염[화합물 (I)]을 사용하였다. 화합물 (I)을 W095/28387 및 W02002/083175에 기재된 방법에 따라 제조하였다.
- [0215] 이 실시예에서, 0.95 mM(0.03 w/v%) 화합물 (I) 점안액 및 상기 언급한 기제로 상기 점안액을 희석하여 얻은 0.32 mM(0.01 w/v%) 화합물 (I) 점안액을 사용하였다.
- [0216] 양성 대조 물질로서, Y-27632 이염산염(Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd., Cat. #253-00513) 및 fasudil 염산염 수화물 주사액[Eril(등록 상표) 점적 정맥 주사액, Asahi Kasei Pharma]을 구입하고, Y-27632 및 Fasudil을 각각 인산 완충 생리 식염수(Invitrogen, Cat. #14190)로 10 mM로 조정하였다. 또한, 음성 대조 물질로서 PBS를 사용하였다.
- [0217] 2. 동물
- [0218] 수컷 일본 백색종 토끼(체중 2.5 - 3.0 kg, 21 마리 토끼)를 Biotek Co., Ltd.로부터 구입하여 사용하였다. 이들을 23±3℃ 온도 및 55±10% 습도 및 12 시간 인공 광 주기(오전 8시 점등 및 오후 8 시 소등)에서 개별 우리에서 사육하였다. 100 g의 고형 식품(Labo R stock; Nossan Corp.)을 각각의 동물에게 매일 제공하였다. 자동 급수 장치에 의해 물을 공급하였다.
- [0219] 3. 동물의 순막(nictitating membrane) 절제
- [0220] 시험을 시작하기 전에, 동물의 양쪽 눈의 순막을 절제하였다. 구체적으로는, 각각의 동물을 고정 장치(positioner)에 넣고, 국소 마취제(Benoxil 점안액 0.4%, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)의 점안에 의해 안표면을 국소 마취시켰다. 그 다음, 순막의 근부(root position)를 30 초 동안 클램프로 압박하고, 압박 마크를 가위로 절단하였다. 순막 절제 후, 항생 연고제(타리비드 안연고제, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)를 점안하여 감염을 방지하였다. 순막 절제 4 일 후, 절제 부위를 포함하여 외안에 이상이 없음이 확인된 동물을 사용하였다.
- [0221] 4. 동물 군 분류
- [0222] 각각의 동물의 우안의 각막 두께를 초음파 각막 두께 측정 장치(DGH Technologies Inc. 제조, DGH-500)로 측정하고, 각각의 군의 각막 두께가 동일하도록 동물을 4 개 군으로 나누었다. 각각의 군에 사용된 동물은 하기와 같았다.
- [0223] 10 mM Y-27632 군 = 눈 5개
- [0224] 0.32 mM 화합물 (I) 군 = 눈 5개
- [0225] 0.95 mM 화합물 (I) 군 = 눈 6개
- [0226] 10 mM Fasudil 군 = 눈 5개
- [0227] PBS 군 = 눈 21개(좌안)
- [0228] 5. 각막 내피 창상의 제작
- [0229] Ketalar 근육 주사액(1 kg 체중당 500 mg, DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED., 0.6 ml) 및 Celactal 2% 주사액(Bayer, Ltd., 0.25 ml)을 근육내 투여하여 동물을 전신 마취시켰다. 그 다음, Benoxil 점안액 0.4%(Santen Pharmaceutical Co., Ltd., 한 방울)를 점안한 후, 개검기를 이용하여 눈을 열었다.
- [0230] 액상 질소에서 냉각시킨 7 mm 직경의 스테인리스 프로브를 15 초 동안 21 마리 동물의 양안의 중앙 각막 위에 놓아 전방 내에 빙괴(ice ball)를 제작하여 각막 내피 세포를 탈락시켜 각막 내피 창상을 제작하였다.
- [0231] 6. 국소 점안
- [0232] 국소 점안을 위해, 창상 제작 후, 우안에 화합물 (I) 점안액, Y-27632 점안액 또는 Fasudil 점안액을 점안하고, 1 일 6 회 좌안에 PBS를 점안당 50 µl 점안(창상 제작 당일은 4 회)하였다. 1 일 투여 간격은 2 시간이었다.

- [0233] 7. 각막의 채취 및 창상 면적의 측정
- [0234] 창상 제작 46 시간 후, 5% 펜토바르비탈 나트륨 용액[생리 식염수에 용해시킨 펜토바르비탈(Nacalai Tesque, Cat. #26427-14)]을 토끼의 귀 정맥 가장자리에 과잉 용량 주사하여 토끼를 안락사시키고, 각막 조직을 절제하였다. 절제된 각막의 각막 내피 세포를 0.5% 알리자린 레드 S 용액(Nacalai Tesque, Cat. #01303-52)으로 염색한 후, 현미경으로 검사하고, 창상 부위의 염색상을 광학 현미경(Olympus, BX51)으로 촬영하였다. 창상 부위를 상 분석 소프트웨어 Image J(NIH, ver.1.41o)를 이용하여 측정하고, 알리자린으로 염색된 창상 부위의 외주면을 매뉴얼 조작으로 플롯하고, 플롯으로 둘러싸인 면적을 창상 면적으로서 계산하였다. 창상 면적을 던넛 다중 비교 검정(양측)에 따라 통계 분석(Ekuseru-Toukei 2008 for Windows, Social Survey Research Information Co., Ltd., ver. 1.10)을 적용하여, P 값 <0.05를 통계적으로 유의적인 것으로 고려하였다.
- [0235] 결과 및 논의
- [0236] 창상 제작 46 시간 후 각막 내피 창상 부위의 알리자린 염색상을 도 1에 나타내며, 각막 내피의 창상 면적도 도 2에 나타낸다. 미수복 창상 부위의 면적은 PBS 점안군에서는 2.3 mm²였고, 0.95 mM 화합물 (I) 점안군에서는 0.4 mm²의 가장 작은 값이었다. PBS 점안군과 비교시, 창상 면적의 통계적으로 유의적인 감소가 관찰되었다. 또한, 창상 면적은 PBS 점안군에 비해 0.32 mM 화합물 (I) 점안군에서 1.1 mm² 정도로 작았고, 10 mM Y-27632 점안군에서 1.1 mm² 정도로 동일한 수준이었다. 한편, 10 mM Fasudil 점안군은 Y-27632 점안군보다 미수복 창상 면적이 1.7 mm²로 넓었다.
- [0237] 상기 언급한 결과는, 화합물 (I)이 Y-27632보다 더 낮은 농도에서 각막 내피의 창상 면적을 감소시킴을 드러내며, 이는 창상 치유 촉진 가능성을 시사한다.
- [0238] 실시예 2: 토끼 각막 내피 창상 모델에 대한 화합물 (I)의 고농도 투여의 효과
- [0239] 0.05 w/v%(1.58 mM) 화합물 (I)의 점안(국소 점안; 1 일 6회, 2 일)에 의해 토끼 각막 내피 탈락 모델에서의 효과를 확인할 수 있다.
- [0240] 실시예 3: 토끼 각막 내피 세포의 조제
- [0241] 수컷 일본 백색종 토끼 안구 조직(채취 대상: 체중 약 2.5 kg)을 후쿠사키 토끼 사육장에서부터 구입하여 사용하였다. 20개의 안구를 사용하였다. 각막 조직을 얻은 토끼 안구 조직으로부터 절제하고, 데스메막을 손상되지 않은 각막 내피 세포와 함께 박리하였다. 분리된 데스메막을 콜라게나아제 A(2.5 mg/ml, Roche, Cat. #1088793)와 함께 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에서 2 시간 동안 인큐베이트하였다. 그 후, 세포를 원심 분리[1000 rpm(×70 g), 3 분]에 의해 채취하였다. 채취한 세포를 배양액[DMEM(Invitrogen, Cat. #12320-032), 10% FBS 및 2 ng/ml bFGF(Invitrogen, Cat. #13256-029) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, Cat. #15070-063)]으로 희석하고, FNC 코팅 믹스(Athena ES, Cat. #0407)로 코팅된 6 웰 플레이트(Corning Incorporated, Cat. #3516)에 웰당 2개의 눈의 밀도로 파종하고, 37°C에서 컨플루언스까지 세포를 배양하였다.
- [0242] 실시예 4: 배양 각막 내피 세포의 형태에 대한 효과
- [0243] 이 실시예에서는, 화합물 (I), Y-27632 이염산염(Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd., Cat. # 253-00513) 및 Fasudil(SIGMA-ALDRICH, Cat. #H139)을 DMSO(Nacalai Tesque, Cat. #13406-55)에 용해시키고, 배양액으로 추가로 희석하여 사용될 시험 물질 및 대조 물질을 얻었다.
- [0244] 실시예 3에서 조제한 토끼 각막 내피 세포를 인산 완충 생리 식염수(PBS, Invitrogen, Cat. #14190)로 2 회 세정하고, PBS(4 ml)를 첨가하고, 세포를 10 분 동안 37°C에서 인큐베이트하였다. PBS를 제거하고, 0.05% 트립신/EDTA(Invitrogen, Cat. #25300-054)를 첨가하고, 세포를 약 5 분 동안 37°C에서 인큐베이트하였다. 배양액[10 ml, DMEM(Invitrogen, Cat. #12320-032), 10% FBS, 2 ng/ml bFGF(Invitrogen, Cat. #13256-029) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, Cat. #15070-063)]을 거기에 첨가하고, 세포를 튜브에 채취하고, 원심 분리(1000 rpm(×70 g), 3 분)하였다. 채취한 세포를 배양액(약 3 - 4 ml)으로 희석하였다.
- [0245] 희석한 토끼 각막 내피 세포에 최종 농도 0.09, 0.32, 0.95, 3.16 및 9.47 μM 화합물 (I), 10 μM Y-27632 및 10 μM Fasudil가 되도록 각각의 약제를 첨가하였다. 이들 세포를 24 웰 플레이트(Corning Incorporated, Cat. #3526)에 웰당 1 ml를 1:8의 분할 비로 파종하였다. 대조로서, 0.04% DMSO/배양액을 첨가하였다. 첨가로 부터 1, 3, 5, 7 및 14 일 후, 현미경으로 상을 촬영하였다. 결과를 도 3 내지 7에 나타낸다.
- [0246] 파종 14 일 후까지의 관찰에 의해, 대조군에서는 세포는 대소부동이었고, 세포간의 접촉 형성은

불충분하였다. 0.32, 0.95 및 3.16 μM 화합물 (I) 첨가군에서는, 각막 내피 세포의 형태가 계대 후에도 유지되었고, 파종 14 일 후 세포간 접착이 형성되었고, 단일 세포층이 형성되었다.

[0247] 10 μM Y-27632 및 Fasudil의 결과는 0.32, 0.95 및 3.16 μM 화합물 (I)과 유사하였다.

[0248] 화합물 (I)은 Y-27632 및 Fasudil보다 낮은 농도에서 각막 내피 세포의 형태를 유지하는 것으로 여겨진다.

[0249] 실시예 5: 배양 각막 내피 세포의 창상 치유 모델에서의 검토

[0250] 이 실시예에는, 실시예 4와 동일한 방식으로 조제한 토끼 각막 내피 세포를 사용하였다.

[0251] 이 실시예에서는 또한, 실시예 4와 동일한 방식으로 제조한 시험 물질 및 대조 물질을 사용하였다.

[0252] 채취한 토끼 각막 내피 세포를 배양액[약 4 ml, DMEM(Invitrogen, Cat. #12320-032), 10% FBS, 2 ng/ml bFGF(Invitrogen, Cat. #13256-029) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, Cat. #15070-063)]으로 희석하고, 6 웰 플레이트(Corning Incorporated, Cat. #3516)에 웰당 2 ml를 1:4의 분할 비로 파종하였다. 세포를 37°C 및 5% CO₂의 조건 하에서 컨플루언트까지 인큐베이트하였다. 1000 μl 칩(Molecular BioProducts, 2279)을 사용하여 컨플루언트 세포에서 창상을 제작하였다. 그 다음, 각각의 약제를 최종 농도가 0.09, 0.32, 0.95, 3.16 및 9.47 μM 화합물 (I), 10 μM Y-27632 및 10 μM Fasudil가 될 때까지 배양액에 첨가하였다. 대조로서, DMSO를 최종 농도가 0.04%가 될 때까지 첨가하였다.

[0253] 각각의 약제를 첨가하고 6 시간, 12 시간 및 24 시간 후, 시간 경과에 따른 창상의 폭을 촬영하고, 창상의 폭을 상 분석에 의해 평가하였다. 결과를 도 8에 나타낸다.

[0254] 화합물 (I) 첨가군에서, 던넛 검정에 따르면 창상 폭은 첨가 24 시간 후 저농도(0.09 - 3.16 μM)에서 상당히 감소하였다(도 8). 9.47 μM 에서는, 대조군과 통계적으로 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 스튜던트 t 검정에 따르면, 0.95 μM 화합물 (I)은 첨가 초기 단계부터 창상 치유 효과를 나타냈다.

[0255] 화합물 (I)은 Y-27632 및 Fasudil보다 낮은 농도(0.09 - 3.16 μM)에서 창상 치유 효과를 나타내는 것으로 여겨진다. 상기 결과로부터, 화합물 (I)도 시험관내 각막 내피 창상 치유 모델에서 창상 치유를 촉진하였다.

[0256] 실시예 6: 배양 각막 내피 세포의 배양 플레이트에 대한 접착 활성화에 대한 효과

[0257] 이 실시예에는, 실시예 4와 동일한 방식으로 조제한 토끼 각막 내피 세포를 사용하였다.

[0258] 이 실시예에서는 또한, 실시예 4와 동일한 방식으로 제조한 시험 물질 및 대조 물질을 사용하였다.

[0259] 채취한 토끼 각막 내피 세포를 희석하고, 배양액[약 4 ml, DMEM(Invitrogen, Cat. #12320-032), 10% FBS, 2 ng/ml bFGF(Invitrogen, Cat. #13256-029) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, Cat. #15070-063)]을 세포에 첨가하였다. 그 다음, 각각의 약제를 최종 농도가 0.09, 0.32, 0.95, 3.16 및 9.47 μM 화합물 (I), 10 μM Y-27632 및 10 μM Fasudil이 되도록 배양액에 첨가하였다. 대조로서, DMSO를 최종 농도가 0.04%가 되도록 첨가하였다.

[0260] 이들 세포를 1000 세포/웰로 96 웰 플레이트(Corning Incorporated, Cat. #3595)에 파종하였다. 파종 3 시간 후, 부유된 세포를 제거하고, 부착된 세포를 CellTiter-Glo(등록 상표) Luminescent Cell Viability Assay(promega Cat. #G7572)에 의해 측정하였다.

[0261] 결과를 도 9에 나타낸다. 모든 화합물 (I) 첨가군은 시험관 내에서 부착 세포의 수를 증가시켰다. 0.32 μM 화합물 (I)은 10 μM Y-27632와 거의 동일한 수준의 부착 세포의 수를 나타냈다. 화합물 (I)의 부착 세포의 수는 0.32 μM 이상의 농도에서 정점에 도달하였다.

[0262] 실시예 4 내지 6의 정리

[0263] 화합물 (I)은 배양 조건 하에서, 특히 0.32, 0.95 및 3.16 μM 에서 각막 내피 세포의 세포 접착, 형태 및 창상 치유에서 효과를 나타냈다. 이들 중에서, 창상 치유 모델은 0.95 μM 화합물 (I)의 첨가 후 초기 단계부터 창상 치유 효과를 나타냈다.

[0264] 이들 결과로부터, 화합물 (I)은 Y-27632 및 Fasudil에 비해 낮은 농도에서 각막 내피 세포의 형태 유지, 이의 접착 촉진, 및 창상 치료의 효과를 가짐이 명백하다.

[0265] 실시예 7: 이식용 배양 각막 내피 세포의 제작

- [0266] 이 실시예에는, 실시예 4와 동일한 방식으로 조제한 토끼 각막 내피 세포를 사용하였다.
- [0267] 이 실시예에서는 또한, 실시예 4와 동일한 방식으로 제조한 시험 물질 및 대조 물질을 사용하였다.
- [0268] 토끼 각막 내피 세포를 1:1의 분할 비로 Vitrigel™(Asahi Glass)에 파종하고, 이식용 배양 각막 내피 세포를 제작하였다. 각막 내피 세포 시트의 제작시, 0.95 μM 화합물 (I), 10 μM Y-27632 또는 0.04% DMSO를 첨가하였다. 얻어진 각막 내피 세포 시트를 각막 내피 세포의 기능 단백질인 ZO-1 및 Na^+/K^+ ATPase로 형광 면역 염색을 행하여, 발현을 확인하였다.
- [0269] 각막 내피 세포 시트를 10 분 동안 95% 에탄올(-30°C)로 고정하고, PBS로 세정하고, 5 분 동안 0.5% Triton X-100/PBS로 처리하였다. 그 다음, 이를 1 시간 동안 1% BSA/PBS로 처리하고, 항-ZO-1 항체(Invitrogen, Cat. #339100) 또는 항- Na^+/K^+ ATPase 항체(Millipore, Cat. #C464.6)로 밤새 처리하였다. PBS로 세정한 후, 이를 1 시간 동안 Alexa-488 표식 2차 항체로 처리하였다. PBS로 세정한 후, DAPI를 함유하는 봉입제(mounting medium)[Vectashield(등록 상표)]를 시트에 적가하고, 시트를 커버 유리로 봉입하였다. 형광 현미경으로 상을 촬영하여 ZO-1 및 Na^+/K^+ ATPase의 발현을 확인하였다. 파종 48 시간 및 14 일 후 면역 염색을 수행하였다(도 10 및 도 11).
- [0270] 제제예 1
- [0271] 화합물 (I)을 포함하는 각막 내피 시트의 조제용 배양액
- [0272] 이 실시예에서는, 하기 나타낸 배양액을 종래 방법에 따라 제조하여 사용하였다.
- | | | |
|--------|-----------------|-----------|
| [0273] | 화합물 (I) | 0.5 mg |
| [0274] | FBS | 10 ml |
| [0275] | 페니실린/스트렙토마이신 용액 | 1 ml |
| [0276] | FGF basic | 200 ng |
| [0277] | DMEM | 적절량 |
| [0278] | | 총량 100 ml |
- [0279] Invitrogen 제조 FBS, Invitrogen 제조 페니실린/스트렙토마이신 용액(5000 U/ml 페니실린, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신 포함), Invitrogen 제조 FGF basic, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation 제조 화합물 (I), 및 Invitrogen 제조 DMEM을 사용하였다.
- [0280] 파종 48 시간 후 결과는, 각막 내피의 장벽 기능의 지수인 ZO-1이 세포 사이에서 발현되었음을 보여주었다. 화합물 (I) 및 Y-27632를 첨가한 군에서 균일하게 세포 사이에서 ZO-1의 발현이 발견되었다. 그러나, DMSO를 첨가한 군(대조군)에서는, 부분 세포 덩어리에서만 발현을 확인할 수 있었다(도 10a). 또한, 각막 내피 펌핑 기능의 지수인 Na^+/K^+ ATPase를 세포 사이에 위치시켰다. 화합물 (I) 및 Y-27632를 첨가한 군 모두에서 세포 사이에서 Na^+/K^+ ATPase의 발현이 또한 발견되었다. 그러나, 대조군에서는, 부분 세포 덩어리에서만 발현을 확인할 수 있었다(도 10b).
- [0281] 상기 결과는, 파종 48 시간 후 대조군에서 세포 사이의 접착이 불충분함을 드러냈다. 한편, Y-27632 치료군에서 세포 사이의 접착이 형성되었고, 기능 단백질인 Na^+/K^+ ATPase 및 ZO-1의 발현이 접착 부위에서 확인되었다. 그러나, Y-27632 치료군에서는, 시트가 부분적으로 시트로 덮이지 않아서, 이식용 배양 각막 내피 세포로서 불충분하였다.
- [0282] 대조적으로, 화합물 (I) 치료군에서, 세포 사이에 형성된 접착 부위에서 ZO-1 및 Na^+/K^+ ATPase의 발현이 확인되었고, 세포는 시트 표면 전체에 부착되었다. 따라서, 시트는 이식용 배양 각막 내피 세포로서 충분히 사용 가능한 것으로 고려되었다. 따라서, 배양액에 화합물 (I)을 첨가함으로써, 이식용 배양 각막 내피 세포 시트를 첨가 48 시간 이내에 조제할 수 있음이 밝혀졌다. 상기는, 화합물 (I)을 사용하여, 이식에 적절한 배양 각막 내피 세포 시트를 조기 단계에서 제조할 수 있음을 증명한다.
- [0283] 실시예 8: 토끼 수포성 각막증 모델에 대한, 화합물 (I)을 사용하는 토끼 각막 내피 세포 주사 요법의 효과

- [0284] (1) 토끼 수포성 각막증 모델의 제작
- [0285] 수컷 일본 백색종 토끼(Biotek Co., Ltd., 8 마리 토끼)를 하기와 같이 순막 절제하였다. 각각의 동물을 고정 장치에 넣고, 국소 마취제(Benoxil 점안액 0.4%, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)의 점안에 의해 안표면을 국소 마취시켰다. 그 다음, 순막의 근부를 30 초 동안 클램프로 압박하고, 압박 마크를 가위로 절단하였다. 순막 절제 후, 항생 연고제(타리비드 안연고제, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)를 점안하여 감염을 방지하였다.
- [0286] 순막 절제 3 일 후, 수정체 유화 및 흡인 수술(PEA)을 좌안에 대해 수행하였다. 전신 마취 하에서, 각공막윤부에 3 mm 절개를 형성시키고, 백내장 수술 기구(NIDEK Co., Ltd.)에 의해 수정체를 절제하였고, 나일론실(Mani Inc.)로 절개를 봉합하였다. 수정체 유화 및 흡인 수술(PEA) 후, 항생 연고제(타리비드 안연고제, Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)를 점안하여 감염을 방지하였다. PEA로부터 5 일 후, Ketalar 근육 주사액(1 kg 체중당 500 mg, DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED., 0.6 ml) 및 Celactal 2% 주사액(Bayer, Ltd., 0.25 ml)을 근육내 투여하여 동물을 전신 마취시켰다. 그 다음, Benoxil 점안액 0.4%(Santen Pharmaceutical Co., Ltd., 한 방울)를 점안한 후, 개검기를 이용하여 눈을 열었다. 그 다음, 각공막윤부에 1 mm 절개를 형성시키고, 각막 내피 세포를 실리콘 수술 기구로 긁어내서 세포를 기계적으로 탈리시켰다. 탈리 면적을 트립판 블루 염색에 의해 확인하였다.
- [0287] (2) 토끼 수포성 각막증 모델에 대한 각막 내피 세포의 주사
- [0288] 각막 내피 세포를 기계적으로 긁어내서, 배양 플라스크로부터 0.05% 트립신-EDTA(Invitrogen, Cat. #25300-054)로 배양 각막 내피 세포를 채취하여 세포 부유액을 얻었다. 돌베코의 변형 이글 배지(DMEM)(Invitrogen, 12320-032)를 이용하여, 배양 토끼 각막 내피 세포를 각각 1.0×10^6 세포/ml로 10 μ M 화합물 (I)/DMEM, 100 μ M Y-27632/DMEM 및 DMEM의 3개 군에 부유시켰다. 각각의 군의 세포 부유액[200 μ l (한 눈당 2.0×10^5 세포)]를 제작된 토끼 수포성 각막증 모델의 각공막윤부로부터 전방으로 22 게이지 바늘로 주사하고, 3 시간 동안 각막 내피면이 상측이 되고 각막 상피면이 하측이 되도록 하여 토끼를 아래를 향하도록 고정시켰다. 동물 보호에 충분한 주의를 기울이면서, 마취제를 적절히 첨가하여 아래를 향하도록 고정시켰다.
- [0289] 세포 주사 14 일 후, 치료한 눈을 적출하고, 각공막 조직을 적출된 안구로부터 절제하였다. 얻어진 각공막 조직을 10 분 동안 4% 파라-포름알데히드(PBS)로 고정하고, 1% BSA(SIGMA, Cat. #A7906-50G)를 함유하는 PBS(Invitrogen, Cat. #14190-144)로 밤새 차단하였다. 그 다음, 각공막 조직을 둘로 나누고, Alexa-488 표식 팔로이딘(Phalloidin) 염색 액틴(Invitrogen, Cat. #A12379), 또는 각막 내피 마커인 항- Na^+/K^+ ATPase 항체(UP State, Cat. #05-369)로 2 시간 동안 처리하였다. 항- Na^+/K^+ ATPase 항체 치료군을 Alexa-488 표식 2차 항체(Invitrogen, Cat. #A-21202)로 1 시간 동안 더 처리하였다. 그 다음, 세포를 Vectashield(등록 상표)-DAPI(Vector Laboratories, Cat. #H-1200) 용액에 침지하고, 커버 유리를 이용하여 봉입하였다. 견본을 동일 초점 레이저 현미경으로 관찰하였다. 염색상을 도 12에 나타낸다.
- [0290] 각막 내피 세포 수로서 DAPI로 염색된 핵의 수를 취하여, Image-Pro plus(Media Cybernetics, Inc.)에 의해 DAPI 염색상을 분석하고, 각막 내피 세포를 계측하였다. 결과를 도 13에 나타낸다.
- [0291] 팔로이딘 염색의 결과로부터, DMEM으로 처리한 대조군에서만 주사한 배양 각막 내피 세포가 섬유증을 발병시킴이 밝혀졌지만; 10 μ M 화합물 (I) 치료군은 100 μ M Y-27632 치료군과 동일한 방식의 세포의 섬유증의 억제 나타냈다(도 12a). 또한, 대조군과 비교하면, 10 μ M 화합물 (I) 치료군 및 100 μ M Y-27632 치료군에서 Na^+/K^+ ATPase의 발현이 밝혀졌다(도 12b). 각막 내피 세포를 계측하였다. 그 결과, 10 μ M 화합물 (I) 치료군 및 100 μ M Y-27632 치료군은 대조군보다 많은 세포수를 나타내는 경향이 있었고, 10 μ M 화합물 (I) 치료군의 세포수는 100 μ M Y-27632 치료군보다 많았다(도 13).
- [0292] 상기 결과로부터, 10 μ M 화합물 (I)은 가장 높은 각막 내피 세포의 배양 효과를 나타내는 것으로 여겨지고, 각막 내피 세포 주사 요법에 가장 적절하다.
- [0293] 실시예 9: 시험관 내에서의 토끼 각막 내피 세포에 대한 화합물 (I)의 창상 치유 효과
- [0294] 이 실시예에서는, 실시예 4와 동일한 방식으로 제조된 시험 물질 및 대조 물질을 사용하였다.
- [0295] (1) 토끼 각막 내피 세포의 제조

- [0296] Funakoshi Corporation으로부터 구입한 10 마리 토끼 안구로부터 각공막 조직을 채취하였다. 각공막 조직을 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, Cat. #15140-122)을 함유하는 DMEM(Invitrogen, Cat. #12320-032)에 침지하고, 1 시간 동안 37℃에서 인큐베이트하였다. 데스메막을 손상되지 않은 각막 내피 세포와 함께 박리하고, 2 mg/ml 콜라게나아제 A(Roche, Cat. #1088793)를 함유하는 배양액[DMEM, 10% FBS, 2 ng/ml bFGF(Invitrogen, Cat. #13256-029), 1% 페니실린/스트렙토마이신]에 침지하고, 2 시간 동안 37℃에서 인큐베이트하였다. 세포를 원심 분리에 의해 채취하고, 배양액으로 세척한 후, FNC 코팅 믹스(Athena ES, Cat. #0407)로 코팅된 T25 플라스크(Corning Incorporated, Cat. #430639)에 파종하였다. 플라스크를 37℃에서 37% CO₂ 인큐베이터에 방치하고, 배지를 매 2 - 3 일마다 교환하고, 세포를 컨플루언트까지 배양하였다. 컨플루언트에 도달한 세포를 채취하고, FNC 코팅 믹스로 코팅된 6 웰 플레이트(Falcon, Cat. #3046)에 파종하고, 컨플루언트까지 배양하였다.
- [0297] (2) 시험관내 창상 치유 모델의 제작
- [0298] 조제한 토끼 각막 내피 세포를 채취하고, 1:4의 분할 비로 6 웰 플레이트에 파종하고, 상기 언급한 (1)과 동일한 배양액에서 컨플루언트까지 배양하였다. 1000 μ l 칩(웰당 창상 6개)을 사용하여 컨플루언트 세포에 직선형 창상을 제작하였다.
- [0299] (3) 약제의 첨가 및 창상 치유 효과의 평가
- [0300] 직선형 창상의 제작 후, 배양액을 교환하고, 0.95 μ M, 1.58 μ M 및 3.16 μ M 화합물 (I), 10 μ M Y-27632 및 0.04% DMSO를 첨가하였다. 화합물 (I) 및 Y-27632를 사전에 DMSO에 용해시키는데, 여기서 DMSO 농도는 양쪽 모두 0.04%로 조정하였다.
- [0301] 첨가 0, 6, 12 및 24 시간 후 창상의 폭을 시간 경과에 따라 촬영하였다. 창상 폭을 Image-Pro plus(Media Cybernetics, Inc.)에 의해 측정하였다. 약제 첨가 0 시간 후를 100%로 하여 각각의 시간에서의 창상 폭의 비를 계산하고, 창상 폭의 비의 시간 경과 변화를 평가하였다. 창상 폭의 비를 각각의 시점에서 던넛 검정에 따른 통계적 분석에 적용하였다. 결과를 도 14에 도시한다.
- [0302] 그 결과, 화합물 (I)은 저농도(0.95 μ M)에서 약제 첨가 6 시간 후 대조와 통계적으로 유의적인 차이를 나타냈고, 이는 높은 창상 치유 효과를 시사한다. 또한, 화합물 (I)은 24 시간 후에도 통계적으로 유의적인 차이를 나타냈고, 동시에 Y-27632도 처음으로 대조와 차이를 나타냈다.
- [0303] 따라서, 화합물 (I)은 Y-27632보다 낮은 농도(0.95 - 1.58 μ M)에서 창상 치유 촉진 효과를 나타내는 것으로 여겨진다. 1.58 μ M 화합물 (I)도 상당한 효과를 나타냈고, 효과는 0.95 μ M 화합물 (I)보다 약했다. 따라서, 시험관 내에서 가장 높은 효과를 나타내는 화합물 (I)의 농도는 약 0.95 μ M로 여겨진다.
- [0304] 실시예 10: 각막 보존액에 첨가된 화합물 (I)의 세포사 억제 효과
- [0305] 이 실시예에서는, 실시예 4와 동일한 방식으로 제조된 시험 물질 및 대조 물질을 사용하였다.
- [0306] 5 마리의 수컷 일본 백색종 토끼(Biotek Co., Ltd.)의 좌우 안구 모두를 제거하고, 각공막 조직을 조제하였다. 하나의 각공막 조직을 보존액 Optisol-GS(등록 상표)(Bausch & Lomb, Inc)에 넣고(대조), 다른 각공막 조직을 0.95 μ M 화합물 (I)을 함유하는 Optisol-GS에 넣었다. 유사하게, 다른 5 마리의 수컷 일본 백색종 토끼로부터 각공막 조직을 조제하여, 하나의 각공막 조직을 Optisol-GS에 넣고(대조), 다른 각공막 조직을 10 μ M Y-27632를 함유하는 Optisol-GS에 넣었다.
- [0307] 각각의 각공막 조직을 함유하는 샘플을 4℃에서 보존하였다. 2 또는 3 주 후, 각공막 조직을 Hoechst(Hoechst 33342, Sigma, Cat. #B2261), PI(요오드화프로피듐, Sigma, Cat. #P4170) 및 Annexin V(Annexin V-FITC, MBL, Cat. #4700-100)로 염색하고, 이에 들어 있는 세포를 생세포, 죽은 세포 및 아포토시스 세포로서 확인하였다. 3 주 후의 샘플 3 개의 각공막 조직의 염색상을 도 15에 도시한다. 또한, 염색된 각막 내 다양한 세포를 ImageJ(ver.1.44i, NIH, <http://imagej.nih.gov/ij>)를 이용하여 계측하고, 5 개 시야의 평균 값 및 표준 편차를 결정하였다. 다양한 세포수를 스튜던트 t 검정에 의해 통계적으로 분석하였다. 2 주 후 결과를 도 16에 나타내고, 3 주 후 결과를 도 17에 나타낸다.
- [0308] 그 결과, 화합물 (I)을 함유하는 보존액 내 죽은 세포의 수는 2 주 후 대조에 비해 상당히 감소하였다. 3 주 후 결과는, 화합물 (I)을 함유하는 보존액을 사용시, 죽은 세포 및 아포토시스 세포 모두의 수가 대조에 비해 상당히 감소함을 드러냈다. 대조적으로, Y-27632를 함유하는 보존액을 사용시, 죽은 세포의 수만 상당히 감소

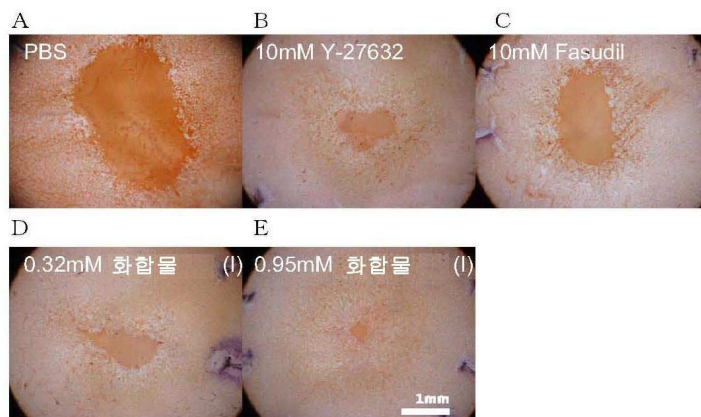
하였다.

[0309] 상기 결과는, 보존액에 화합물 (I)을 첨가함으로써, 세포사 및 아포토시스를 종래의 보존액에 비해 더욱 유의적으로 억제할 수 있음을 시사한다. 또한, 화합물 (I)은 Y-27632보다 낮은 농도에서 효과를 나타냄이 증명되었다.

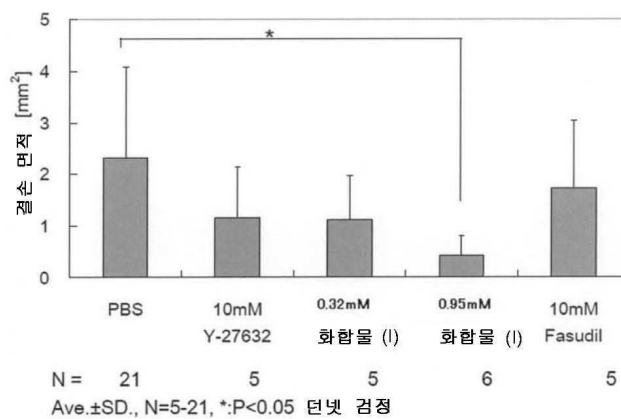
[0310] 본 출원은 일본에서 출원된 특허 출원 제2009-299180호(출원일: 2009년 12월 29일) 및 국제 출원 제PCT/JP2010/071424호(출원일: 2010년 11월 24일)에 기초하며, 이들의 내용은 본 명세서에서 그 전체를 참고로 인용한다.

도면

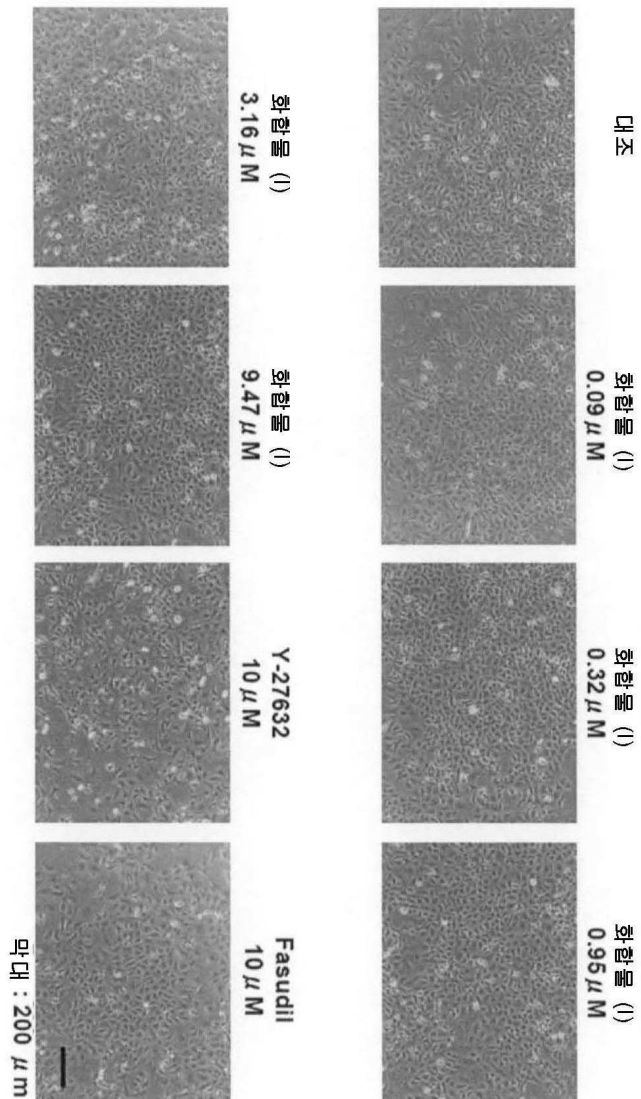
도면1



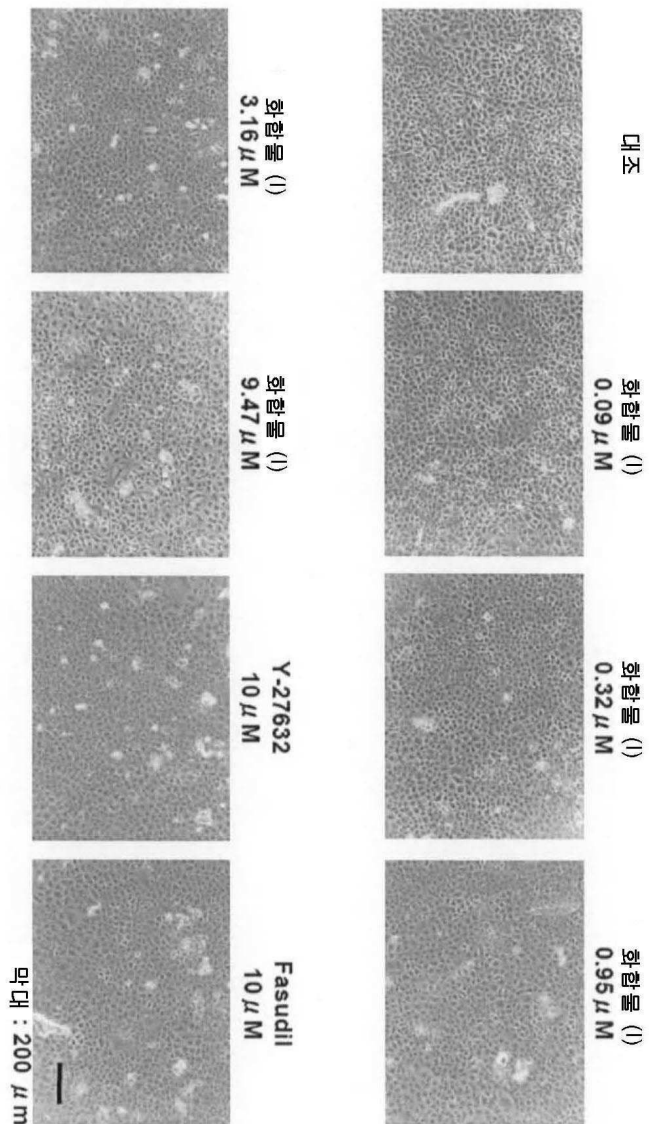
도면2



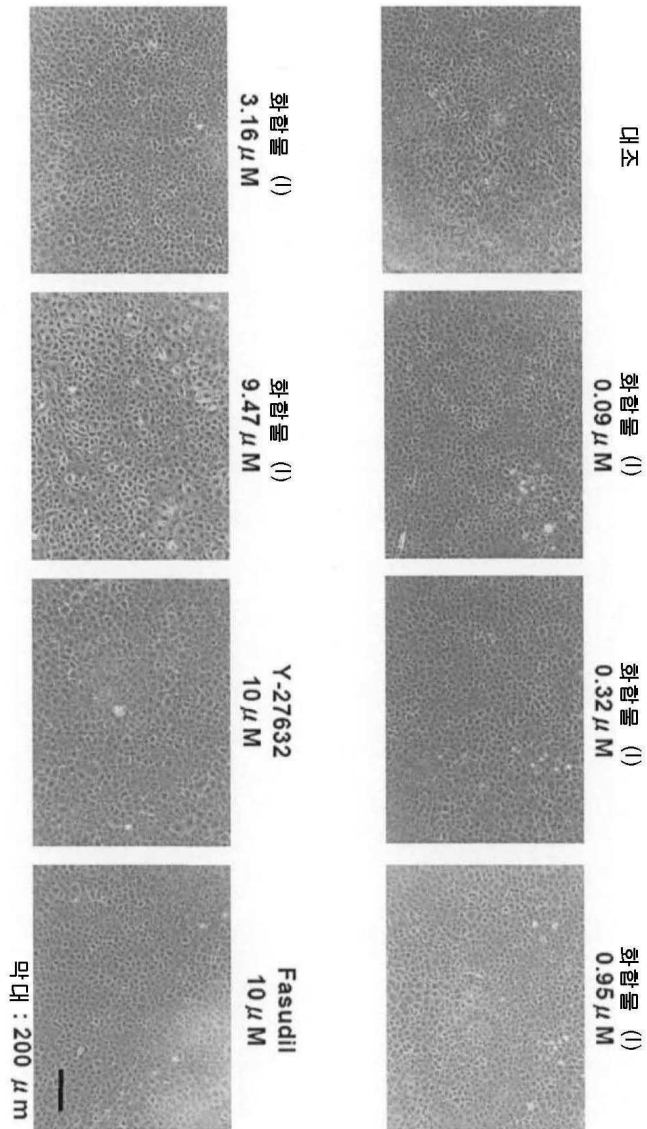
도면3



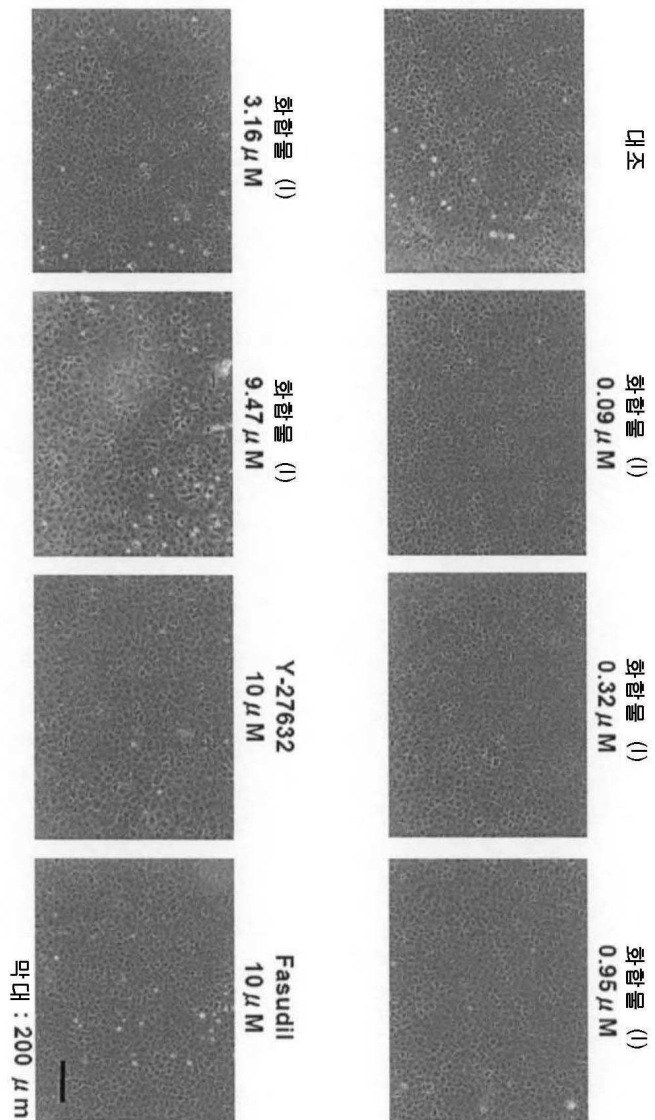
도면4



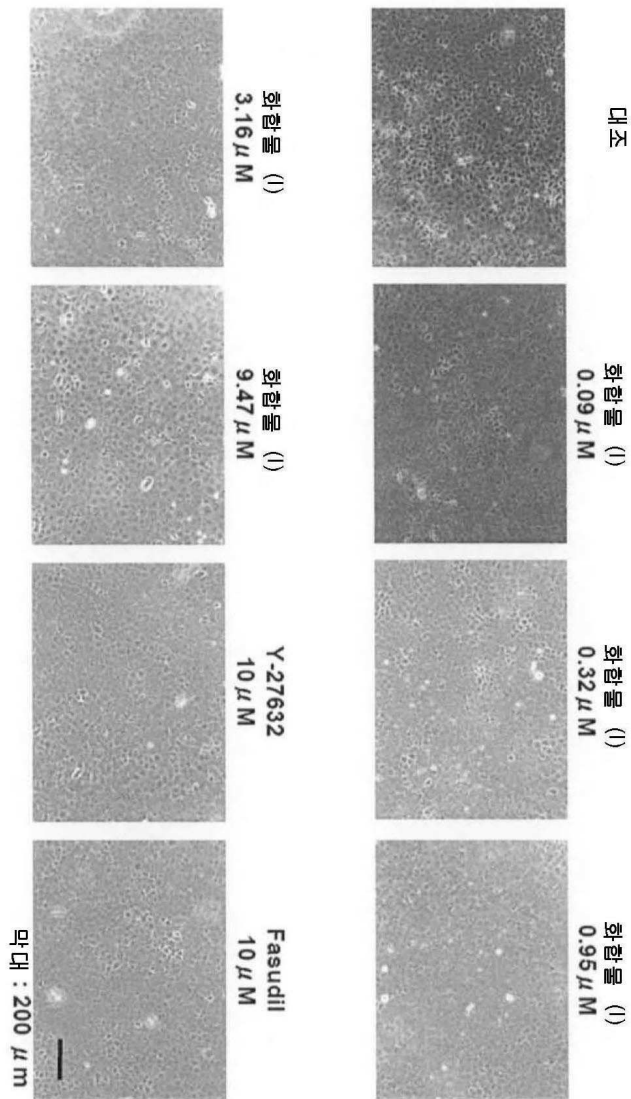
도면5



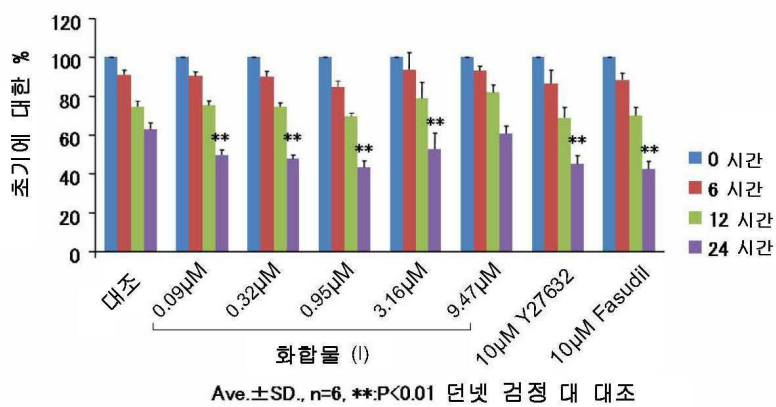
도면6



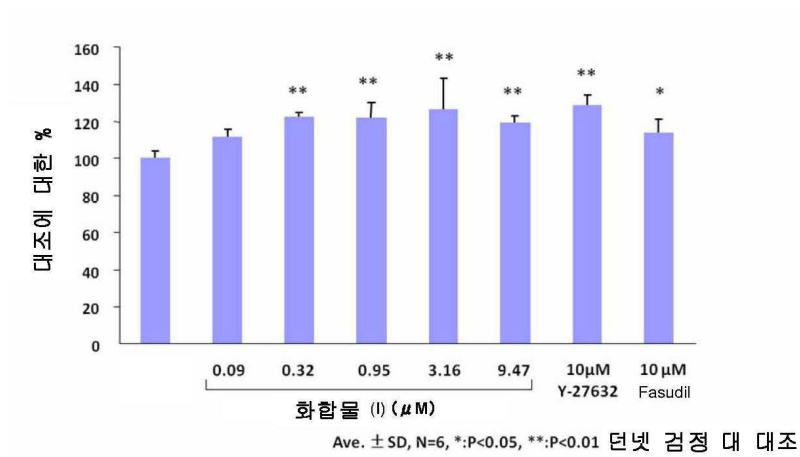
도면7



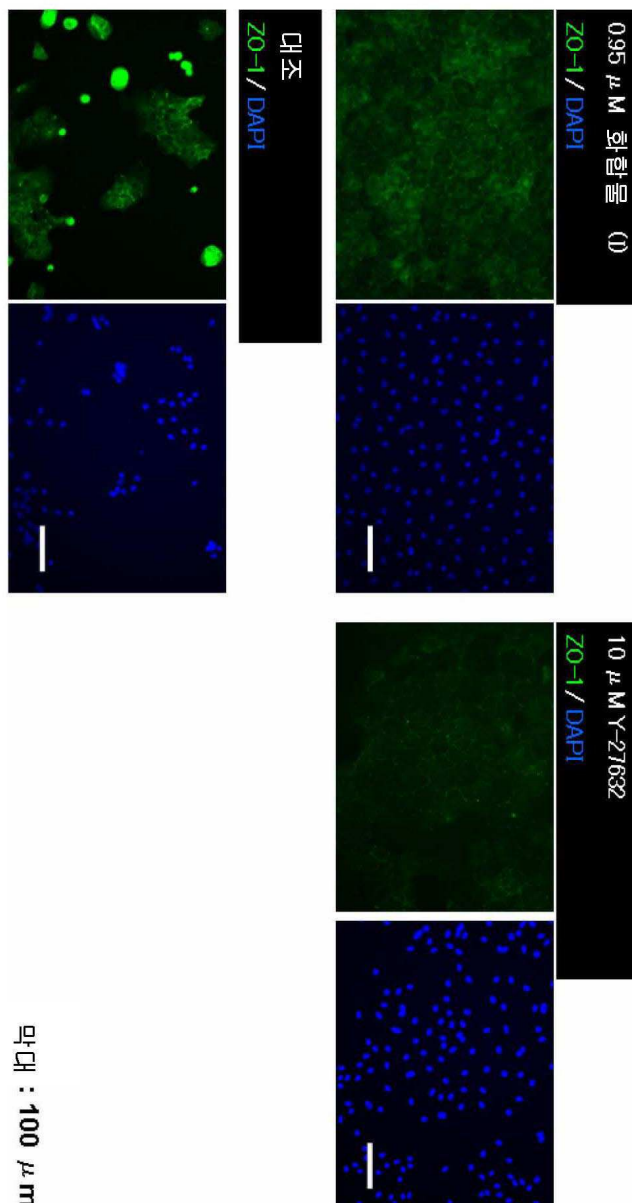
도면8



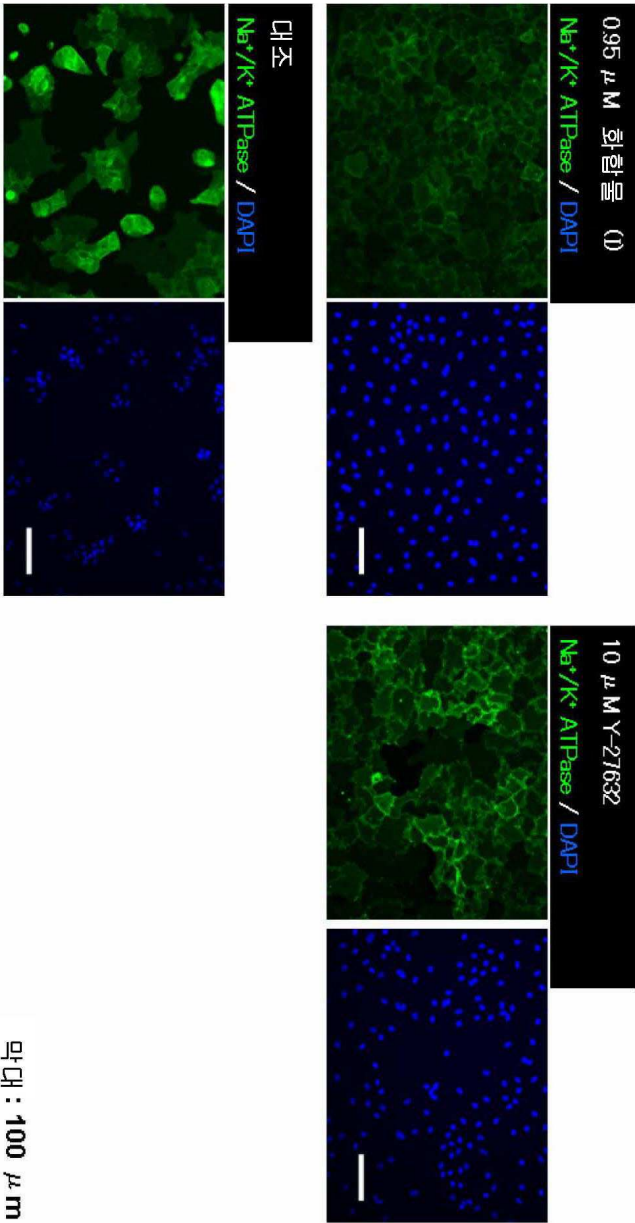
도면9



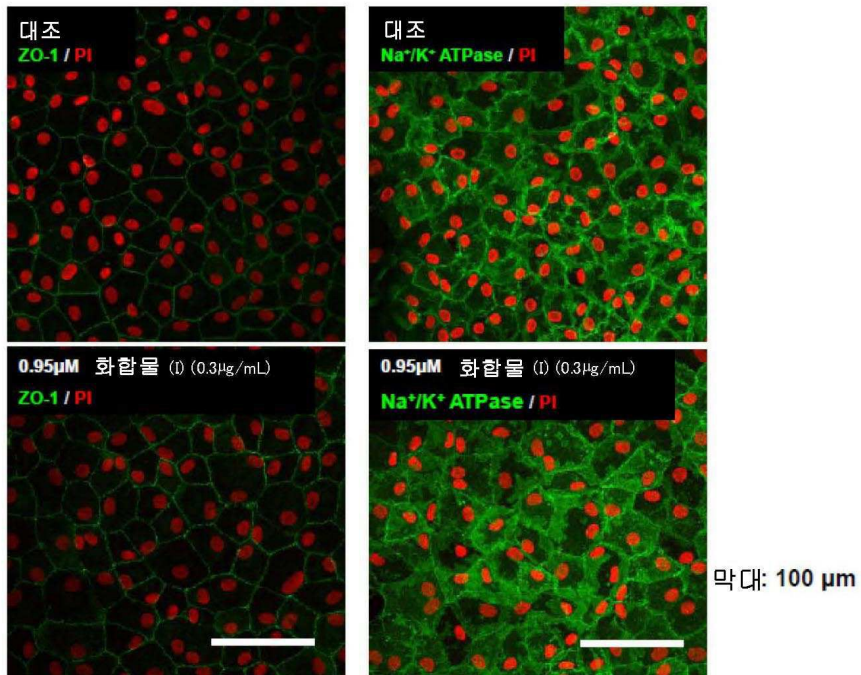
도면10a



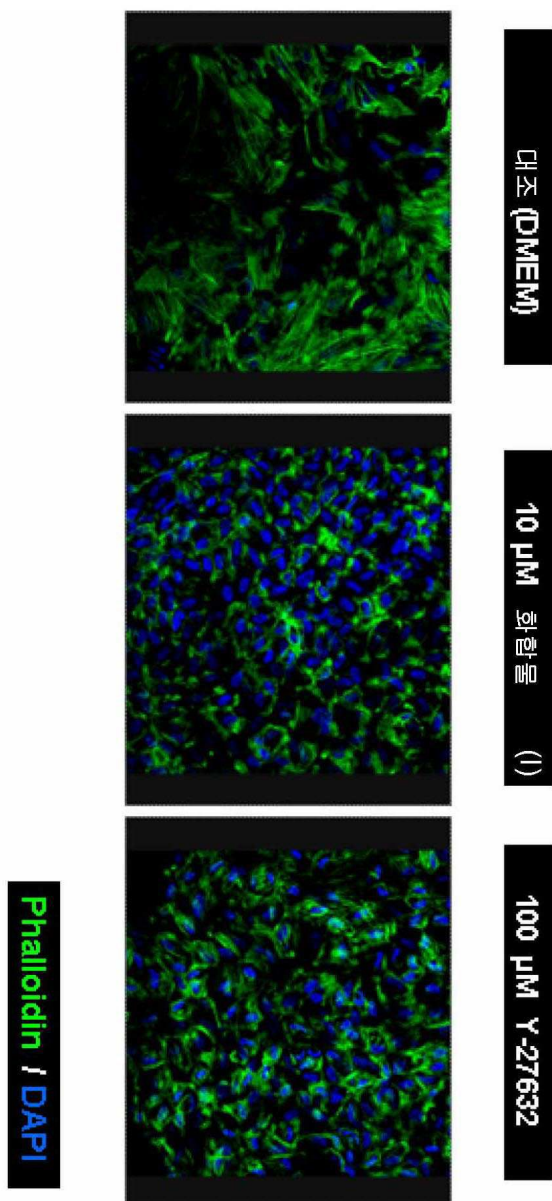
도면10b



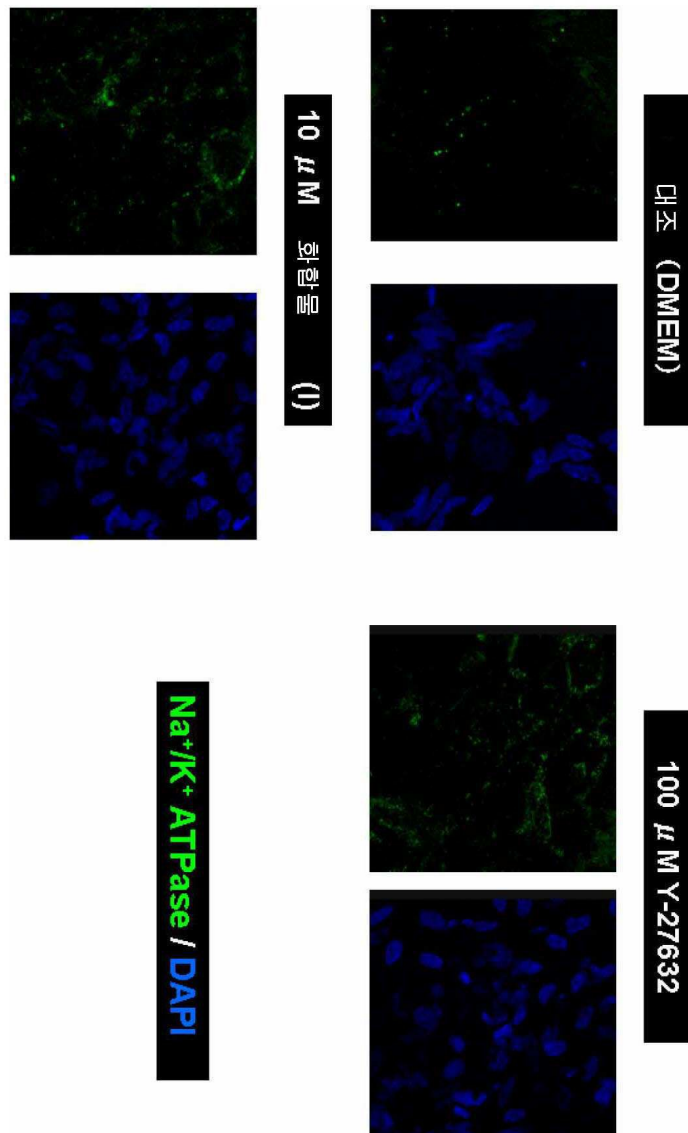
도면11



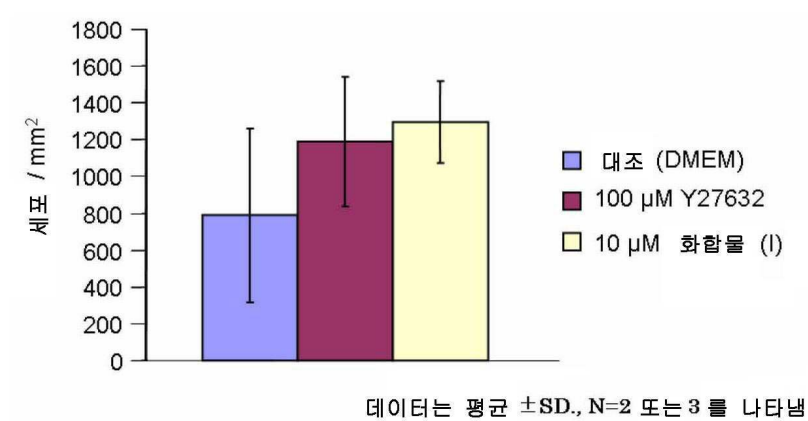
도면12a



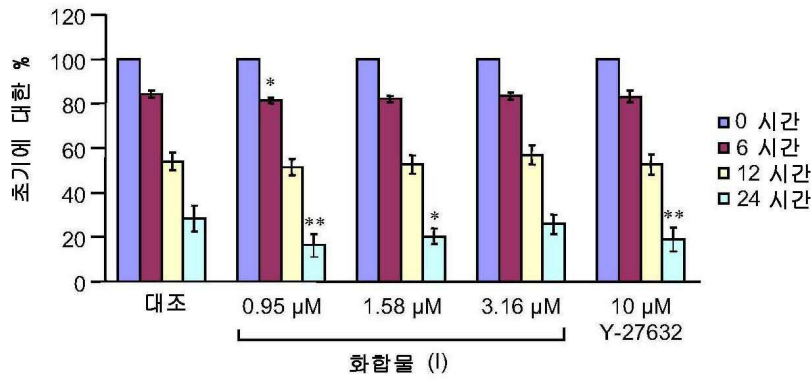
도면12b



도면13

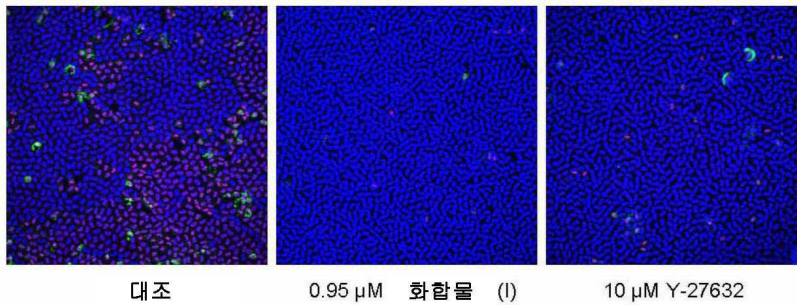


도면14

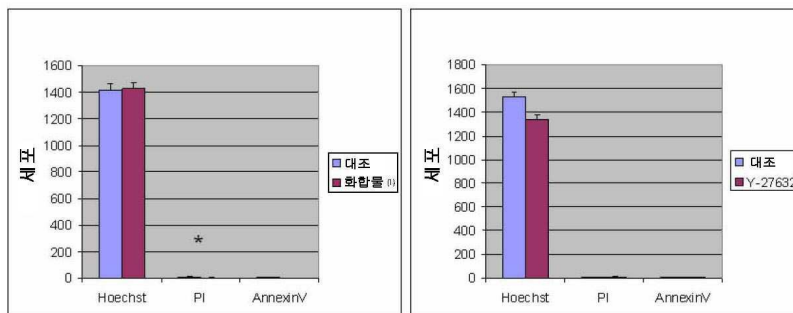


데이터는 평균 \pm SD, N=5 또는 6 를 나타냄
*:P<0.05, **:P<0.01 대 대조 (턴넷 방법)

도면15

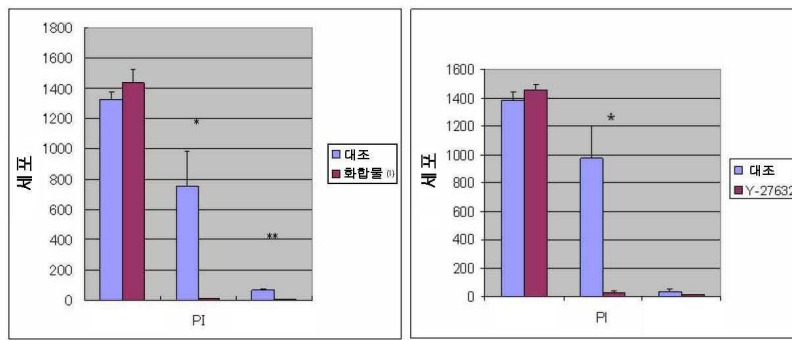


도면16



Ave. \pm SEM, n=5, *P<0.05 대 대조 (스튜던트 t 검정)

도면17



Ave. \pm SEM, n=5, *P<0.05, **P<0.01 대 대조 (스튜던트 t 검정)