



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월24일
(11) 등록번호 10-2606740
(24) 등록일자 2023년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/525 (2006.01) A61F 9/007 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01) A61N 5/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/525 (2013.01)
A61F 9/0079 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7017789
(22) 출원일자(국제) 2015년12월02일
심사청구일자 2020년11월04일
(85) 번역문제출일자 2017년06월28일
(65) 공개번호 10-2017-0088977
(43) 공개일자 2017년08월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/063466
(87) 국제공개번호 WO 2016/090016
국제공개일자 2016년06월09일
(30) 우선권주장
62/086,572 2014년12월02일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Ophthalmology
2012:1-6(2012.01.01.)
Investigative Ophthalmology & Visual Science
53(4):2360(2012.04.30.)
US20140343480 A1*
US20130310732 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아베드로 인코퍼레이티드
미국 02451 매사추세츠 월덤 존스 로드 201
(72) 발명자
카메브, 파벨
미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 미들 스트리트 94
프리드먼, 마크
미국 02494 매사추세츠주 니덤 우드바인 서클 50
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 8 항

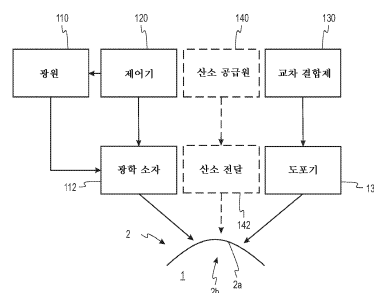
심사관 : 광희찬

(54) 발명의 명칭 **눈의 교차 결합 치료법을 위한 시스템, 방법 및 조성물**

(57) 요약

시스템, 방법, 및 조성물이 눈 장애의 치료를 위해 교차 결합 작용을 발생시킨다. 다양한 작용제, 첨가제, 완충액 등이 치료법의 향상을 위해 교차 결합제와 함께 제제에 이용될 수 있다. 예를 들어, 눈의 각막에 치료를 적용하기 위한 조성물은 광활성화 광선에 대한 노출에 반응하여 각막에서 교차 결합 작용을 발생시키는 교차 결합 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



제를 포함한다. 조성물은 또한 철 첨가제 및 시트레이트 완충액을 포함한다. 일부 경우에, 교차 결합제는 리보플라빈을 포함할 수 있다. 다른 경우에, 철 첨가제는 FeSO_4 를 포함할 수 있다. 추가 경우에, 철 첨가제는 시트레이트 완충액에 용해될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 33/26 (2013.01)

A61K 47/12 (2013.01)

A61L 31/14 (2013.01)

A61N 5/062 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

A61L 2430/16 (2013.01)

Y10S 514/912 (2013.01)

(72) 발명자

서, 예반

미국 01721 매사추세츠주 애슬랜드 레이먼드 웨이
50

피터슨, 새라, 엠.

미국 01922 매사추세츠주 바이필드 메인 스트리트
76

풀러, 데이빗

미국 02111 매사추세츠주 보스턴 워싱턴 스트리트
580

명세서

청구범위

청구항 1

눈의 각막에 치료를 적용하기 위한 조성물이며,

광활성화 광선에 대한 노출에 반응하여 각막에서 교차 결합 작용을 발생시키는, 리보플라빈을 포함하는 교차 결합제,

철 첨가제, 및

시트레이트 완충액

을 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

0.1% w/v 이상의 리보플라빈, 및

0.25 mM 이상의 철 첨가제

를 포함하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 철 첨가제가 FeSO_4 를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 철 첨가제가 시트레이트 완충액에 용해된 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 광활성화 광선이 자외선인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 광활성화 광선이 펄스형인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 광활성화 광선이 연속적인 것인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

조성물을 각막에 도포하는 단계, 및

상기 각막에 광활성화 광선을 적용하여 상기 각막에서 교차 결합 작용을 발생시키는 단계

를 포함하고,

선택된 농도의 산소를 눈에 적용하는 단계

를 추가로 포함하는 방법에 사용되며,

상기 선택된 농도가 대기 중의 산소 농도보다 높은 것인

조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] <관련 출원의 상호 참조>

[0002] 본 출원은 2014년 12월 2일에 출원된 미국 특허 가출원 62/086,572를 우선권 주장하며, 이 가출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] <기술분야>

[0004] 본 개시내용은 눈의 장애를 치료하기 위한 시스템 및 방법, 및 보다 구체적으로는 눈에 대한 교차 결합 치료법을 위한 시스템 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 교차 결합 치료법은 원추각막증과 같은 장애를 앓고 있는 눈의 치료에 이용될 수 있다. 특히, 원추각막증은 각막 내의 구조적 변화가 각막을 약하게 만들고 비정상적인 원추형 형상으로 변화시키는 눈의 변성 장애이다. 교차 결합 치료법은 원추각막증에 의해 약해진 영역을 강화하고 안정화시켜 바람직하지 않은 형상 변화를 방지할 수 있다.

[0006] 교차 결합 치료법은 또한 외과적 처치, 예컨대 레이저 각막 절삭 성형술 (Laser-Assisted in situ Keratomileusis; 라식(LASIK)) 후에도 이용될 수 있다. 예를 들어, 라식 수술에 의해 각막이 얇아지고 약해져서 라식 후 확장증으로서 공지된 합병증이 발생할 수 있다. 라식 후 확장증에서, 각막은 점진적으로 가파름(돌출)을 겪게 된다. 그러므로, 교차 결합 치료법이 라식 수술 후에 각막의 구조를 강화하고 안정화시켜 라식 후 확장증을 예방할 수 있다.

[0007] <도면의 간단한 설명>

[0008] 도 1은 본 개시내용의 측면에 따른, 각막 콜라겐의 교차 결합을 발생시키기 위해 눈의 각막에 교차 결합제 및 광활성화 광선을 전달하는 예시 시스템을 도해한다.

[0009] 도 2A-B는 본 개시내용의 측면에 따른, 각막 교차 결합 치료 동안에 적용된 리보플라빈 및 광활성화 광선 (예를 들어, 자외선 A (UVA) 광선)을 포함하는 광화학적 운동학적 반응식을 도해한다.

[0010] 도 3은 본 개시내용의 측면에 따른, 광화학적 운동학적 반응 모델을 이용하는 예시 시스템을 도해한다.

[0011] 도 4는 전자 전달 반응에 의한 산화제의 형성 및 수소 추출에 의한 중합의 가능한 개시에 관한 반응식을 도해한다.

[0012] 도 5는 교차 결합 중에 적용된 용액 중 철(II)의 상이한 농도에서의 비-교차 결합 대조군과 비교한 각막 소화물의 450 nm에서의 형광 (F/Fo)을 도해한다.

- [0013] 도 6은 (1) dH_2O ; (2) H_2O_2 ; 및 (3) H_2O_2 및 0.1% 철(II)로 처리된, 파파인 소화된 각막 절편의 형광 카운트를 도해한다.
- [0014] 도 7은 (1) 0.1% 리보플라빈 (연속파 (CW)); (2) 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO_4 (CW); (3) 0.1% 리보플라빈 (펄스파 (PW) + O_2); 및 (4) 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO_4 (PW + O_2)에 대하여 450 nm에서 기록된 형광 (미처리 대조군과의 비교)을 도해한다.
- [0015] 도 8은 대조군 (1)과 비교하여, 0.1% 리보플라빈 (CW) (2) 및 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO_4 (CW) (3)에 대하여 장력측정법에 의해 측정된 각 각막 절편의 평균 힘 vs. 변위를 도해한다.
- [0016] 도 9-10은 반복 실험으로, 대조군 (1)과 비교하여, 0.1% 리보플라빈 (PW + O_2) (2) 및 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO_4 (PW + O_2) (3)에 대하여 장력측정법에 의해 측정된 각 각막 절편의 평균 힘 vs. 변위를 도해한다.
- [0017] 도 11은 리보플라빈과 일중항 산소로부터 2,3-부탄디온이 형성되는 메카니즘을 도해한다.
- [0018] 도 12는 자외선 (UV) 광선 없이 (좌측 패널), 그리고 UV 광선 (365 nm, 4분 동안 30 mW) 하에 (우측 패널), dH_2O 중 2,3-부탄디온 (BD)의 1% 용액으로 처리된 각막 절편의 변위-힘 도표를 도해한다.
- [0019] 도 13은 UV 광선 하에, 그리고 UV 광선 없이, BD의 1% 용액으로 처리된, 파파인 소화된 200 μm 두께의 각막 절편에 대하여 450 nm에서 기록된 형광 (미처리 대조군 (Fo)와의 비교)을 도해한다.
- [0020] 도 14는 대조군 (1)과 비교하여, UV 광선 (365 nm, 4분 동안 30 mW) 및: dH_2O 중 리보플라빈의 0.1% 용액 (1); dH_2O 중의 0.1% BD (4); 및 dH_2O 중 0.1% 리보플라빈과 0.1% BD의 혼합물 (3)로 처리된 각막 절편의 변위-힘 도표를 도해한다.
- [0021] 도 15는 4분 동안의 30 mW UVA 및: dH_2O 중 리보플라빈의 0.1% 용액; dH_2O 중의 0.1% BD; 및 dH_2O 중 0.1% 리보플라빈과 0.1% BD의 혼합물로 처리된, 파파인 소화된 200 μm 두께의 각막 절편에 대하여 450 nm에서 기록된 형광 (미처리 대조군 (Fo)와의 비교)을 도해한다.
- [0022] 도 16은 엽산 (FA)을 도해한다.
- [0023] 도 17은 FA의 광분해산물인 프테린-6-카르복실산 (PCA)을 도해한다.
- [0024] 도 18은 PBS 중 0.001% FA의 흡수 스펙트럼을 도해한다.
- [0025] 도 19는 PBS 중 0.001% FA의 형광 스펙트럼 (360 nm에서의 여기)을 도해한다.
- [0026] 도 20은 포스페이트 완충액 중 FA의 360 nm에서의 흡광도를 도해한다.
- [0027] 도 21은 각막 샘플의 변위 vs. 힘 곡선을 도해하는데, 이때 UV 노출은 총 8분 동안 1초 온(on) : 1초 오프(off)의 펄스를 갖는 365 nm에서의 30 mW/cm^2 에 의한 것이고 각막 위에 산소 분위기를 갖는다: (1) UV 광선 비노출; (2) 0.1% 리보플라빈, UV 광선 노출; (3) 0.1% FA, UV 광선 노출; 및 (4) 0.1% 리보플라빈과 0.1% FA의 혼합물, UV 광선 노출.
- [0028] 도 22는 파파인에 의한 소화 후의 각막 샘플의 형광 (360 nm에서의 여기)을 도해하는데, 이때 UV 노출은 총 8분 동안 1초 온 : 1초 오프의 펄스를 갖는 365 nm에서의 30 mW/cm^2 에 의한 것이고 각막 위에 산소 분위기를 갖는다: (1) UV 광선 비노출; (2) 0.1% 리보플라빈, UV 광선 노출; (3) 0.1% FA, UV 광선 노출; 및 (4) 0.1% 리보플라빈과 0.1% FA의 혼합물, UV 광선 노출.
- [0029] 도 23은 각막 샘플 (두께: 300 μm , 각 그룹에 3개의 샘플)의 변위 vs. 힘 곡선을 도해하는데, 이때 UV 노출은 총 8분 동안 1초 온 : 1초 오프의 펄스를 갖는 365 nm에서의 30 mW/cm^2 에 의한 것이고 각막 위에 산소 분위기를 갖는다: (1) UV 광선에 노출되지 않은 대조군; (2) 완충액 중의 0.1% FA, UV 광선 노출; (3) 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈, UV 광선 노출; 및 (4) 완충 염수 용액 중의 0.1% FA와 0.1% 리보플라빈의 혼합물, UV 광선 노출.
- [0030] 도 24는 대조군 (1)과 비교하여, 4분 동안 30 mW/cm^2 (CW)를 조사하고 (2), 또한 O_2 하에 8분 (1초 온 : 1초 오프)의 펄스를 갖는 365 nm에서의 30 mW/cm^2 에 의한 것이고 각막 위에 산소 분위기를 갖는다: (1) UV 광선 비노출; (2) 0.1% 리보플라빈, UV 광선 노출; (3) 0.1% FA, UV 광선 노출; 및 (4) 0.1% 리보플라빈과 0.1% FA의 혼합물, UV 광선 노출.

프) 동안 펄스형 UVA 광선 30 mW/cm^2 를 조사한 (3), PBS 중의 0.4% 올라퀸독스(Olaquinox)에 침지된 200 μm 두께의 각막 절편의 이축 장력측정을 도해한다.

- [0031] 도 25는 PBS 중의 0.4% 올라퀸독스로 교차 결합된 절편에 대하여 450 nm에서 기록된 상대 형광을 도해한다: (1) 비-조사 대조군; (2) 4분 동안 연속적으로 (CW) 30 mW/cm^2 조사; 및 (3) O_2 하에 8분 (1초 온 : 1초 오프) 동안 펄스형 UVA 광선 30 mW/cm^2 조사.
- [0032] 도 26은 리보플라빈 (A)의 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린-카르복실산 (B)으로의 알칼리성 가수분해를 도해한다.
- [0033] 도 27은 상이한 시간 동안 120°C 에서 유지된 BBBS 중의 0.1% 리보플라빈-5-포스페이트의 UV/Vis 스펙트럼을 도해한다.
- [0034] 도 28은 450 nm에서의 흡광도에 의해 측정된 120°C 의 BBBS 중에서의 리보플라빈의 가수분해 속도를 도해한다 (0.1% 용액 및 0.5% 용액, A_0 은 가열 전의 흡광도임).
- [0035] 도 29는 도 27에서 잔류하는 리보플라빈의 흡광도를 빼서 얻은 UV/Vis 스펙트럼을 도해한다.
- [0036] 도 30은 120°C 에서의 90분 후의 가수분해 용액의 스펙트럼 분석을 도해한다 (잔류하는 리보플라빈의 흡광도를 분석된 스펙트럼에서 뺀).
- [0037] 도 31은 가수분해 시간 동안의 상이한 피크의 흡광도 변화를 도해한다.
- [0038] 도 32는 리보플라빈의 초기 단계 알칼리성 분해 생성물인, 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염(2)의 합성을 도해한다.
- [0039] 도 33은 합성된 리보플라빈 분해 생성물(2)의 NMR 스펙트럼을 도해한다.
- [0040] 도 34는 열 처리되지 않은 완충 블러드 बैं크 염수(buffered blood bank saline) 중의 모노포스포릴화 리보플라빈 (5-FMN)을 도해한다.
- [0041] 도 35는 1시간의 열 처리 후의 완충 블러드 बैं크 염수 중의 5-FMN을 도해한다.
- [0042] 도 36은 2시간의 열 처리 후의 완충 블러드 बैं크 염수 중의 5-FMN을 도해한다.
- [0043] 도 37은 3시간의 열 처리 후의 완충 블러드 बैं크 염수 중의 5-FMN을 도해한다.
- [0044] 도 38은 4시간의 열 처리 후의 완충 블러드 बैं크 염수 중의 5-FMN을 도해한다.
- [0045] 도 39는 합성된 리보플라빈 분해 생성물(2)의 HPLC 결과를 도해한다.
- [0046] 도 40은 열적으로 가열된 리보플라빈 용액 (적색 선) 및 가열되지 않은 리보플라빈 용액 (청색 선)의 흡수 스펙트럼 (200 μm 의 광학 거리를 갖는 석영 큐벳에서 기록됨)을 도해한다.
- [0047] 도 41은 도 34에서의 두 스펙트럼 사이의 차이를 도해한다.
- [0048] 도 42는 소화된 각막의 형광을 도해한다: 비-교차 결합 대조군 (흑색 선), 가열되지 않은 0.1% 리보플라빈으로 교차 결합된 것 (청색 선), 열 처리된 리보플라빈 용액으로 교차 결합된 것 (적색 선).
- [0049] 도 43은 교차 결합된 각막 샘플의 상대 형광을 도해한다: 적색 - 열 처리된 리보플라빈 용액 사용, 청색 - 가열되지 않은 0.1% 리보플라빈 용액 사용.
- [0050] 도 44는 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염을 도해한다.
- [0051] 도 45는 BBBS 중 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염의 0.001% 용액의 흡광도 스펙트럼 (석영, 1 cm의 광학 거리)을 도해한다.
- [0052] 도 46은 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염의 360 nm에서의 UV 흡광도 (BBBS 중의 용액, 1 cm의 광학 거리를 갖는 석영 큐벳)를 도해한다.
- [0053] 도 47은 BBBS 용액 중의 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염의 형광 (360 nm에서의 여기)을 도해한다.

- [0054] 도 48은 소화된 각막의 형광을 도해한다: 비-교차 결합 대조군 (흑색 선), BBBS 중의 0.1% 리보플라빈으로 교차 결합된 것 (적색 선), 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 0.1% 나트륨 염으로 교차 결합된 것 (청색 선).
- [0055] 도 49는 소화된 각막 절편의 형광을 도해한다: 비-교차 결합 대조군 (흑색 선), BBBS 중의 0.1% 리보플라빈으로 교차 결합된 것 (적색 선), 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 0.1% 나트륨 염으로 교차 결합된 것 (청색 선).
- [0056] 도 50은 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산을 도해한다.
- [0057] 도 51은 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산의 흡광도 스펙트럼을 도해한다.
- [0058] 도 52는 BBBS 중의 상이한 농도를 갖는 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산 용액의 360 nm에서의 여기로 기록된 형광을 도해한다.
- [0059] 도 53은 비-교차 결합 대조군 (흑색 선)과 비교하여, BBBS 중 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산의 0.17% (적색 선) 및 0.017% (청색 선) 용액으로 교차 결합된, 파파인 소화된 각막 절편 (200 μm 의 두께) (상피 없음, 20분의 침지 시간, 4분 동안 30 mW/cm^2)의 형광을 도해한다.
- [0060] 도 54는 비-교차 결합 대조군 (흑색 선)과 비교하여, 0.17% 리보플라빈 (적색 선) 및 0.17% 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산 (3H2QXCA, 녹색 선)으로 20분 동안 예비 포화되고, 4분 동안 30 mW/cm^2 를 조사한 200 μm 두께의 각막 절편의 장력측정 그래프를 도해한다.
- [0061] 도 55는 BBBS 중의 0.1% 리보플라빈 (청색 막대, 용액 2) 및 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산의 0.02% 용액을 함유하는 0.1% 리보플라빈 (적색 막대, 용액 1)으로 교차 결합된, 파파인 소화된 각막 절편 (200 μm 의 두께) (상피 없음, 20분의 침지 시간, 4분 동안 30 mW/cm^2)의 상대 형광을 도해하고, 여기서 F_0 는 비-교차 결합 절편의 형광이다.
- [0062] 도 56은 4-메틸-3-옥소-3,4-디히드로-2-퀴녹살린 카르복실산을 도해한다.
- [0063] 도 57은 BBBS 중 4-메틸-3-옥소-3,4-디히드로-2-퀴녹살린 카르복실산의 0.01 mg/ml 용액의 흡광도 스펙트럼 (석영, 1 cm의 광학 거리)을 도해한다.
- [0064] 도 58은 BBBS 용액 중의 4-메틸-3-옥소-3,4-디히드로-2-퀴녹살린 카르복실산의 형광 (360 nm에서의 여기)을 도해한다.
- [0065] 도 59는 파파인 소화된 각막 절편의 형광을 도해하는데, 여기서 각막은 상피가 제거되었고, 교차 결합제 용액에 20분 동안 침지된 후에, 30 mW/cm^2 의 UVA 광선 (360 nm)으로 4분 동안 조사되었다: 비-교차 결합 대조군 (흑색 선), BBBS 중 4-메틸-3-옥소-3,4-디히드로-2-퀴녹살린 카르복실산의 0.1 mg/ml (적색 선) 및 1 mg/ml (녹색 선) 용액으로 교차 결합된 것.
- [0066] 도 60은 벤젠 고리와 피라진 고리로 구성된 고리 착물을 함유하는 헤테로시클릭 화합물로서 퀴녹살린 (벤조피라진이라고도 함)을 도해한다.
- [0067] 도 61은 퀴녹살린-2,3-디티온 시클릭 디티오-카르보네이트 (모레스탄(Morestan)) 및 트리티오카르보네이트 (에라독스(Eradox))를 도해한다.
- [0068] 도 62는 메토티렉세이트를 도해한다.
- [0069] 도 63은 메나디온 (비타민 K_3)을 도해한다.
- [0070] 도 64는 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) vs. 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) + 0.25 mM 철 + 0.5 mM 시트레이트 완충액으로 교차 결합된 절편의 상대 형광을 도해한다.
- [0071] 도 65는 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) vs. 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) + 0.5 mM 철 + 0.25 mM 시트레이트 완충액으로 교차 결합된 절편의 상대 형광을 도해한다.
- [0072] 본 개시내용은 다양한 변형 및 대체 형태를 가질 수 있지만, 그의 구체적인 실시양태가 도면에서 예시 방식으로 도시되었고 본원에서 상세히 기재될 것이다. 그러나, 본 개시내용을 개시된 특정 형태로 제한하려는 것이 아니

며, 오히려 본 발명은 본 개시내용의 취지 내에 포함되는 모든 변형물, 등가물 및 대체물을 포함하고자 한다는 것을 알아야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0073] 본 개시내용의 측면은 눈 장애의 치료를 위해 교차 결합 작용을 발생시키는 시스템, 방법 및 조성물을 제공한다. 예를 들어 교차 결합 치료법을 위한 다양한 작용제, 첨가제, 완충액 등이 본원에 개시된 연구에서 확인된다. 그러한 다양한 작용제, 첨가제, 완충액 등의 특징이 교차 결합 치료법의 향상을 위해 교차 결합제와 함께 제제에 이용될 수 있다.
- [0074] 예시 실시양태에서, 눈의 각막에 치료를 적용하기 위한 조성물은 광활성화 광선에 대한 노출에 반응하여 각막에서 교차 결합 작용을 발생시키는 교차 결합제를 포함한다. 조성물은 또한 철 첨가제 및 시트레이트 완충액을 포함한다. 일부 경우에, 교차 결합제는 리보플라빈을 포함할 수 있다. 다른 경우에, 철 첨가제는 FeSO_4 를 포함할 수 있다. 추가 경우에, 철 첨가제는 시트레이트 완충액에 용해될 수 있다. 또 다른 경우에, 광활성화 광선은 자외선일 수 있다.
- [0075] 또 다른 예시 실시양태에서, 눈의 각막에 치료를 적용하는 방법은 조성물을 각막에 도포하는 것을 포함한다. 조성물은 광활성화 광선에 대한 노출에 반응하여 각막에서 교차 결합 작용을 발생시키는 교차 결합제를 포함한다. 조성물은 또한 철 첨가제 및 시트레이트 완충액을 포함한다. 방법은 또한 광활성화 광선을 각막에 적용하여 각막에서 교차 결합 작용을 발생시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 교차 결합제는 리보플라빈을 포함할 수 있다. 다른 경우에, 철 첨가제는 FeSO_4 를 포함할 수 있다. 추가 경우에, 철 첨가제는 시트레이트 완충액에 용해될 수 있다. 또 다른 경우에, 광활성화 광선은 자외선일 수 있다. 일부 경우에, 광활성화 광선은 펄스형일 수 있다. 다른 경우에, 광활성화 광선은 연속파일 수 있다. 방법은 선택된 농도의 산소를 눈에 적용하는 것을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 선택된 농도는 대기 중의 산소 농도보다 높다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0076] 도 1은 눈(1)의 각막(2)에서 콜라겐의 교차 결합을 발생시키는 예시 치료 시스템(100)을 도해한다. 치료 시스템(100)은 교차 결합제(130)를 각막(2)에 도포하는 도포기(132)를 포함한다. 예시 실시양태에서, 도포기(132)는 각막(2)에 점적으로서 광감작제(130)를 도포하는 점안기, 주사기 등일 수 있다. 교차 결합제(130)는 교차 결합제(130)가 각막 상피(2a)를 통과하여 각막 기질의 기저 영역(2b)까지 이르도록 하는 제제로 제공될 수 있다. 별법으로, 교차 결합제(130)가 기저 조직에 보다 직접적으로 도포되도록 하기 위해 각막 상피(2a)가 제거되거나 또는 절개될 수 있다.
- [0077] 치료 시스템(100)은 광원(110) 및 광선을 각막(2)으로 인도하기 위한 광학 소자(112)를 포함한다. 광선은 교차 결합제(130)의 광활성화를 유발하여 각막(2)에서 교차 결합 작용을 발생시킨다. 예를 들어, 교차 결합제는 리보플라빈을 포함할 수 있고 광활성화 광선은 자외선 A (UVA) (예를 들어, 365 nm) 광선일 수 있다. 별법으로, 광활성화 광선은 또 다른 파장, 예컨대 가시 파장 (예를 들어, 452 nm)을 가질 수 있다. 하기에 추가로 기재된 바와 같이, 각막 교차 결합은 광화학적 운동학적 반응 시스템에 따라 각막 조직 내에서 화학 결합을 형성함으로써 각막의 강도를 개선한다. 예를 들어, 리보플라빈 및 광활성화 광선이 적용되어 각막 조직을 안정화 및/또는 강화함으로써, 원추각막증 또는 라식 후 확장증과 같은 질환을 해결한다. 추가적으로, 하기에 추가로 기재된 바와 같이, 다양한 작용제, 첨가제, 완충액 등이 교차 결합 치료법의 향상을 위해 교차 결합제와 함께 제제에 이용될 수 있다.
- [0078] 치료 시스템(100)은 광원(110) 및/또는 광학 소자(112)를 포함하는, 시스템(100)의 측면을 제어하는 1개 이상의 제어기(120)를 포함한다. 실행할 때, 각막(2)은 교차 결합제(130)가 보다 넓게 처리될 수 있고 (예를 들어, 점안기, 주사기 등을 이용함), 광원(110)으로부터의 광활성화 광선은 특정 패턴에 따라 처리된 각막(2)의 영역에 선택적으로 인도될 수 있다.
- [0079] 광학 소자(112)는 광원(110)에 의해 방출된 광활성화 광선을 각막(2) 상의 특정 패턴으로 인도하고 초점을 맞추기 위한 1개 이상의 거울 또는 렌즈를 포함할 수 있다. 광학 소자(112)는 광원(110)에 의해 방출된 광선의 파장을 부분적으로 차단하고 교차 결합제(130)의 활성화를 위해 각막(2)에 인도되어야 할 광선의 특정 파장을 선택하기 위한 필터를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 광학 소자(112)는 광원(110)에 의해 방출된 광선 빔을 나누

기 위한 1개 이상의 빔 분리기를 포함할 수 있고, 광원(110)에 의해 방출된 광선을 흡수하는 1개 이상의 히트 싱크(heat sink)를 포함할 수 있다. 광학 소자(112)는 또한 광활성화 광선을 각막(2) 내의 특정 초점면에, 예를 들어 교차 결합 작용이 바람직한 기저 영역(2b)의 특정 깊이에 정확하고 정밀하게 초점을 맞출 수 있다.

[0080] 게다가, 광활성화 광선의 구체적인 요법은 각막(2)의 선택된 영역에서 목적하는 교차 결합도를 달성하기 위해 조정될 수 있다. 1개 이상의 제어기(120)가 파장, 대역폭, 강도, 출력, 위치, 침투 깊이, 및/또는 처리 시간(노출 주기, 정지 주기의 기간, 및 노출 주기 기간 대 정지 주기 기간의 비)의 임의의 조합에 따라 광활성화 광선을 정밀하게 전달하기 위해 광원(110) 및/또는 광학 소자(112)의 작동을 제어하는데 사용될 수 있다.

[0081] 교차 결합제(130)의 광활성화 파라미터는 예를 들어, 목적하는 교차 결합을 달성하기 위해 필요한 시간을 단축하도록 조정될 수 있다. 예시 실행에서, 시간이 수분에서 수초로 단축될 수 있다. 일부 구성이 5 mW/cm^2 의 방사조도로 광활성화 광선을 적용할 수 있지만, 보다 높은 방사조도의 광활성화 광선, 예를 들어 5 mW/cm^2 의 배수가 적용되어 목적하는 교차 결합을 달성하기 위해 필요한 시간을 단축할 수 있다. 각막(2)에 흡수되는 에너지의 총 선량이 유효 선량이라 기술될 수 있고, 이는 각막 상피(2a)의 영역을 통해 흡수되는 에너지의 양이다. 예를 들어, 각막 표면(2A)의 영역에 대한 유효 선량은 예를 들어 5 J/cm^2 일 수 있거나 또는 20 J/cm^2 또는 30 J/cm^2 정도로 높을 수 있다. 기재된 유효 선량이 에너지의 단위 적용으로부터, 또는 에너지의 반복 적용으로부터 전달될 수 있다.

[0082] 치료 시스템(100)의 광학 소자(112)는 광활성화 광선의 적용을 공간적으로 그리고 시간적으로 조정하는 디지털 미소 반사 장치(DMD)를 포함할 수 있다. DMD 기술을 사용하여, 광원(110)으로부터의 광활성화 광선이 반도체 칩 위의 매트릭스에 펼쳐진 미시적으로 작은 거울에 의해 형성된 정밀 공간 패턴으로 투사된다. 각각의 거울이 투사된 광선의 패턴에서 1개 이상의 픽셀을 나타낸다. DMD에 의해 각막지형도 유도 교차 결합을 실시할 수 있다. 각막지형도에 따른 DMD의 제어는 다수의 상이한 공간적 및 시간적 방사조도 및 선량 프로파일을 이용할 수 있다. 이러한 공간적 및 시간적 선량 프로파일은 연속과 조명을 사용하여 형성될 수 있지만, 또한 상기에 기재된 바와 같이 다양한 주파수 및 사용율(duty cycle) 요법 하에 조명에 펄스를 제공함으로써 펄스형 조명을 통해 조정될 수 있다. 별법으로, DMD는 연속과 조명을 사용하여 궁극의 유연성을 제공하기 위해 픽셀 기반으로 픽셀에 대한 상이한 주파수 및 사용율을 조정할 수 있다. 또는 별법으로, 펄스형 조명과 조정된 DMD 주파수 및 사용율 조합이 둘다 조합될 수 있다. 이는 특정 양의 공간적으로 결정된 각막 교차 결합을 가능하게 한다. 이러한 공간적으로 결정된 교차 결합은 치료 전의 계획 및/또는 실시간 모니터링 및 치료 중의 각막 교차 결합의 조정을 위해 선량측정법, 간섭법, 광학 간섭성 단층촬영법(OCT), 각막지형도 등과 조합될 수 있다. 추가적으로, 환자 특이적인 치료 전 계획을 세우기 위해 전임상적 환자 정보가 유한 요소 생물역학 컴퓨터 모델링과 조합될 수 있다.

[0083] 광활성화 광선의 전달 측면을 제어하기 위해, 실시양태는 또한 다광자 여기 현미경의 측면을 이용할 수 있다. 특히, 특정 파장의 단일 광자를 각막(2)에 전달하기 보다는, 치료 시스템(100)이 보다 긴 파장, 즉 보다 낮은 에너지의 다광자를 전달할 수 있고, 이들이 조합되어 교차 결합을 개시한다. 유리하게는, 보다 긴 파장은 각막(2) 내에서 보다 짧은 파장보다 낮은 수준으로 산란되고, 그에 따라 보다 긴 파장의 광선이 보다 짧은 파장의 광선보다 효율적으로 각막(2)에 침투하게 된다. 각막 내 심부 깊이에서의 입사선의 가림 효과가 또한 통상의 단파장 조명보다 감소하는데, 그 이유는 광감작제에 의한 광선의 흡수가 보다 긴 파장에서 훨씬 줄어들기 때문이다. 이는 깊이 특이적 교차 결합에 대하여 향상된 제어를 가능하게 한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 2개의 광자가 이용될 수 있는데, 여기서 각각의 광자는 교차 결합제(130) 분자를 여기시켜 하기에 추가로 기재된 광화학적 운동학적 반응을 발생시키기 위해 필요한 에너지의 대략 절반을 전달한다. 교차 결합제 분자가 두 광자를 모두 동시에 흡수할 때, 각막 조직에서 반응성 라디칼을 유리시키는 충분한 에너지를 흡수한다. 실시양태는 또한 보다 낮은 에너지의 광자를 이용할 수 있어, 교차 결합제 분자가 반응성 라디칼을 유리시키기 위해서는, 예를 들어 3개, 4개 또는 5개의 광자를 동시에 흡수하여야 한다. 다광자의 거의 동시 흡수 가능성이 낮으므로, 높은 플럭스의 여기 광자가 필요할 수 있고, 높은 플럭스는 펄스 레이저를 통해 전달될 수 있다.

[0084] 다수의 조건 및 파라미터가 교차 결합제(130)를 이용한 각막 콜라겐의 교차 결합에 영향을 미친다. 예를 들어, 교차 결합제(130)가 리보플라빈이고 광활성화 광선이 UVA 광선인 경우에, 방사조도 및 선량이 둘다 교차 결합의 양 및 속도에 영향을 미친다. UVA 광선은 연속적으로(연속파(CW)) 또는 펄스형 광선으로서 적용될 수 있고, 이러한 선택이 교차 결합의 양, 속도 및 정도에 영향을 미친다.

[0085] UVA 광선이 펄스형 광선으로서 적용된다면, 노출 주기, 정지 주기의 기간, 및 노출 주기 기간 대 정지 주기 기

간의 비가 그에 따른 각막 보강에 영향을 미친다. 펄스형 광선 조명을 사용하여 동일한 양 또는 선량의 전달 에너지에 대하여 연속과 조명으로 달성될 수 있는 것보다 높거나 또는 낮은 각막 조직의 보강을 초래할 수 있다. 적합한 파장 및 주파수의 광선 펄스를 사용하여 보다 최적의 화학 증폭을 달성할 수 있다. 펄스형 광선 처리의 경우에, 온/오프 사용율은 대략 1000/1 내지 대략 1/1000일 수 있고; 방사조도는 대략 1 mW/cm^2 내지 대략 1000 mW/cm^2 의 평균 방사조도일 수 있으며, 펄스 수는 대략 0.01 Hz 내지 대략 1000 Hz 또는 대략 1000 Hz 내지 대략 100,000 Hz일 수 있다.

[0086] 치료 시스템(100)은 DMD를 이용함으로써, 광원(110)을 전자적으로 켜고 꺼서, 또한/또는 기계적 또는 광전자적 (예를 들어, 포켈스 셀(Pockels cell)) 셔터(shutter) 또는 기계적 초퍼(chopper) 또는 회전하는 애퍼처(aperture)를 이용함으로써 펄스형 광선을 발생시킬 수 있다. DMD의 픽셀 특이적 조정 능력 및 조정된 주파수, 사용율, 각막에 전달되는 방사조도 및 선량에 기반한 후속 보강 부여 때문에, 복합적인 생물역학적 보강 패턴이 각막에 부여되어 다양한 양의 굴절 교정을 가능하게 할 수 있다. 이러한 굴절 교정은 안과 병태, 예컨대 원추 각막증, 투명 각막 가장자리 질환, 라식 후 확장증, 및 각막의 생물역학적 변화/변성인 다른 병태 등 때문에, 예를 들어 근시, 원시, 난시, 부정 난시, 노안 및 복합적인 각막 굴절 표면 교정의 조합을 포함할 수 있다. DMD 시스템 및 방법의 특별한 장점은 랜덤화된 비동기 펄스의 각막지형 패턴화를 가능하게 하여, 비-주기적으로 균일하게 보이는 조명을 초래하는 것이고, 이는 2 Hz 내지 84 Hz의 펄스 주파수에 대하여 광과민성 간질성 발작 또는 명멸 현훈증을 촉발시킬 가능성을 제거한다.

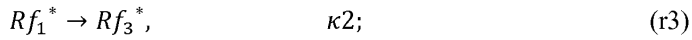
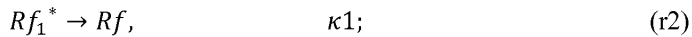
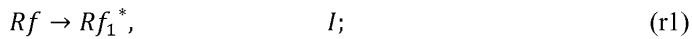
[0087] 예시 실시양태가 단계식 온/오프 펄스형 광선 함수를 이용할 수 있지만, 각막에 광선을 적용하기 위한 다른 함수도 유사한 효과를 달성하기 위해 이용될 수 있다는 것이 이해된다. 예를 들어, 광선은 정현파 함수, 톱니파 함수, 또는 다른 복소 함수 또는 곡선, 또는 함수 또는 곡선의 임의의 조합에 따라 각막에 적용될 수 있다. 실제로, 함수가 실질적으로 단계식일 수 있고, 여기서 온/오프 값 사이에 보다 완만한 전이가 있을 수 있다는 것이 이해된다. 또한, 방사조도가 오프 주기 동안에 0의 값으로 감소할 필요는 없으며, 오프 주기 동안에 0보다 클 수 있다는 것이 이해된다. 바람직한 효과는 2개 이상의 값 사이에 방사조도를 달리하는 곡선에 따라 광선을 각막에 적용함으로써 달성될 수 있다.

[0088] 광활성화 광선을 전달하기 위한 시스템 및 방법의 예가 예를 들어, 2011년 3월 18일에 출원된 미국 특허 출원 공보 2011/0237999 (발명의 명칭: "Systems and Methods for Applying and Monitoring Eye Therapy"), 2012년 4월 3일에 출원된 미국 특허 출원 공보 2012/0215155 (발명의 명칭: "Systems and Methods for Applying and Monitoring Eye Therapy") 및 2013년 3월 15일에 출원된 미국 특허 출원 공보 2013/0245536 (발명의 명칭: "Systems and Methods for Corneal Cross-Linking with Pulsed Light")에 기재되어 있으며, 이들 출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

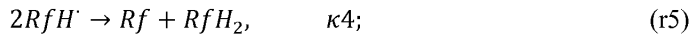
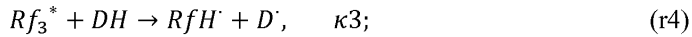
[0089] 산소의 첨가가 또한 각막 보강의 양에 영향을 미친다. 인간 조직에서, O_2 함량은 대기와 비교하여 매우 낮다. 그러나, 각막에서의 교차 결합 속도는 광활성화 광선이 조사될 때의 O_2 농도와 관련있다. 따라서, 목적하는 양의 교차 결합이 달성될 때까지 교차 결합 속도를 제어하기 위해 조사 중에 O_2 농도를 능동적으로 증가 또는 감소시키는 것이 유리할 수 있다. 산소는 교차 결합 치료법 중에 수많은 상이한 방식으로 적용될 수 있다. 하나의 접근법은 리보플라빈을 O_2 로 과산화시키는 것을 포함한다. 따라서, 리보플라빈이 눈에 도포될 때, 보다 고 농도의 O_2 가 리보플라빈을 갖는 각막에 직접적으로 전달되어 리보플라빈이 광활성화 광선에 노출되었을 때 O_2 를 포함하는 반응에 영향을 미친다. 또 다른 접근법에 따르면, 정상 상태의 O_2 (선택된 농도)가 각막 표면에서 유지되어 각막을 선택된 양의 O_2 에 노출시키고 O_2 가 각막에 들어가도록 할 수 있다. 예를 들어, 도 1에 도시된 바와 같이, 치료 시스템(100)은 또한 산소 공급원(140) 및 선택된 농도의 산소를 각막(2)에 임의로 전달하는 산소 전달 장치(142)를 포함한다. 교차 결합 치료법 중에 산소를 적용하기 위한 예시 시스템 및 방법이 예를 들어, 2010년 10월 21일에 출원된 미국 특허 8,574,277 (발명의 명칭: "Eye Therapy"), 2012년 10월 31일에 출원된 미국 특허 출원 공보 2013/0060187 (발명의 명칭: "Systems and Methods for Corneal Cross-Linking with Pulsed Light")에 기재되어 있으며, 이들 출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0090] 리보플라빈이 복사 에너지, 특히 광선을 흡수하면, 광활성화가 진행된다. 리보플라빈의 광활성화에는 2가지의 광화학적 운동학적 경로, 즉 제I형 및 제II형이 있다. 제I형 및 제II형 메커니즘 둘 모두에 포함된 반응의 일부가 하기와 같다:

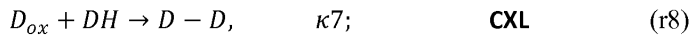
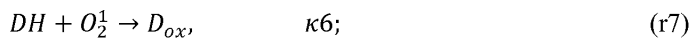
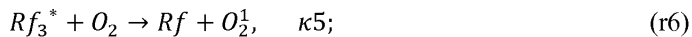
공통 반응:



제I형 반응:



제II형 반응



[0091]

[0092]

본원에 기재된 반응에서 Rf는 바닥 상태의 리보플라빈을 나타낸다. Rf_1^* 은 여기 일중항 상태의 리보플라빈을 나타낸다. Rf_3^* 는 삼중항 여기 상태의 리보플라빈을 나타낸다. $Rf^{\cdot}$ 는 리보플라빈의 환원된 라디칼 음이온 형태이다. $RfH^{\cdot}$ 는 리보플라빈의 라디칼 형태이다. RfH_2 는 리보플라빈의 환원된 형태이다. DH는 기질이다. $DH^{\cdot}$ 는 중간체 라디칼 양이온이다. $D^{\cdot}$ 는 라디칼이다. D_{ox} 는 기질의 산화된 형태이다.

[0093]

리보플라빈은 반응 (r1) 내지 (r3)에 나타나 있는 바와 같이, 삼중항 여기 상태 Rf_3^* 로 여기된다. 삼중항 여기 상태 Rf_3^* 로부터, 리보플라빈은 일반적으로 제I형 또는 제II형 메카니즘에 따라 추가로 반응한다. 제I형 메카니즘에서, 기질이 수소 원자 또는 전자 전달에 의해 여기 상태의 리보플라빈과 반응하여 각각 라디칼 또는 라디칼 이온을 발생시킨다. 제II형 메카니즘에서는, 여기 상태의 리보플라빈이 산소와 반응하여 일중항 분자 산소를 형성한다. 일중항 분자 산소는 그 후에 조직에서 반응하여 추가적인 교차 결합을 생성한다.

[0094]

각막에서의 산소 농도는 UVA 방사조도 및 온도에 의해 조정되고 UVA 노출이 시작되면 급속히 감소한다. 특정 사용율, 주파수 및 방사조도의 펄스형 광선을 이용하여, 제I형 및 제II형 광화학적 운동학적 메카니즘 둘 다를로부터의 입력값이 보다 높은 수준의 광화학적 효율을 달성하는데 이용될 수 있다. 게다가, 펄스형 광선을 이용하면 리보플라빈을 포함하는 반응의 속도 조절이 가능해진다. 반응 속도는 방사조도, 선량, 온/오프 사용율, 리보플라빈 농도, 침지 시간 등과 같은 파라미터 중 어느 하나를 조절함으로써, 필요에 따라 증가 또는 감소할 수 있다. 또한, 반응 및 교차 결합 속도에 영향을 미치는 추가 성분이 각막에 첨가될 수 있다.

[0095]

UVA 복사선이 산소가 결합된 직후에 중단되면, 산소 농도는 증가(보충)하기 시작한다. 과량의 산소는 각막 교차 결합 과정에 유해할 수 있는데, 그 이유는 산소가 라디칼 화학종과 상호작용하여 쇄-중결 퍼옥시드 분자를 형성함으로써 자유 라디칼 광중합 반응을 억제할 수 있기 때문이다. 펄스 수, 방사조도, 선량, 및 다른 파라미터가 보다 최적의 산소 재생 속도를 달성하도록 조정될 수 있다. 산소 재생 속도를 계산하고 조정하는 것은 목적하는 양의 각막 보강을 달성하기 위해 반응 파라미터를 조정하는 또 다른 예이다.

[0096]

산소 함량은 산소 확산이 반응 속도론을 맞출 수 있는 매우 얇은 각막 층을 제외하고는, 다양한 화학 반응에 의해 각막 전체에 걸쳐서 결핍될 수 있다. 이러한 확산-제어 구역은 산소를 흡수하는 기질의 반응 능력이 감소할수록 각막 내 심부로 점진적으로 옮겨갈 것이다.

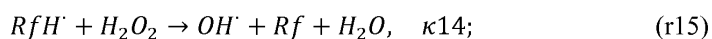
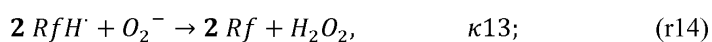
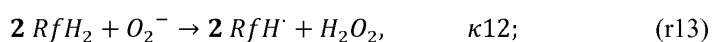
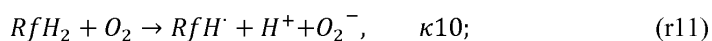
[0097]

리보플라빈은 방사조도가 증가할수록 가역적으로 또는 비가역적으로 환원 (불활성화)되고/거나 보다 높은 수준으로 광분해된다. 광자 최적화는 환원된 리보플라빈이 제I형 반응에서 바닥 상태의 리보플라빈으로 되돌아가도록 함으로써 달성될 수 있다. 제I형 반응에서 환원된 리보플라빈이 바닥 상태로 되돌아가는 속도는 여러 인자

에 의해 결정된다. 이러한 인자에는 펄스형 광선 처리의 온/오프 사용율, 펄스의 반복 주파수, 방사조도 및 선량이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 또한, 리보플라빈 농도, 침지 시간 및 산화제를 비롯한 다른 작용제의 첨가가 산소 흡수 속도에 영향을 미친다. 사용율, 펄스의 반복 주파수, 방사조도 및 선량을 비롯하여, 상기 파라미터 및 다른 파라미터는 보다 최적의 광자 효율을 달성하고 리보플라빈의 광감작을 위한 제I형 및 제II형 광화학적 운동학적 메카니즘 둘 다를 효율적으로 이용하도록 선택될 수 있다. 게다가, 이들 파라미터는 보다 최적의 화학 증폭 효과를 달성하는 방식으로 선택될 수 있다.

[0098]

그러나, 본 발명자들은 상기의 광화학적 운동학적 반응 (r1)-(r8) 이외에도, 리보플라빈의 광활성화 중에 발생하는 하기의 광화학적 운동학적 반응 (r9)-(r26)을 또한 확인하였다:



[0099]

[0100]

도 2A는 상기의 반응 (r1) 내지 (r26)에서 제공된 광화학적 운동학적 반응에 대한 반응식을 도해한다. 반응식에는 UVA 광활성화 광선 하의 리보플라빈 (Rf)의 광화학적 변환 및 그의 다양한 공여체 (DH)와의 전자 전달을 통한 상호작용을 요약되어 있다. 제시된 바와 같이, 교차 결합 작용은 (A) 반응 (r6) 내지 (r8)에서 일중항 산소의 존재를 통해 (제II형 메카니즘); (B) 반응 (r4) 및 (r17)에서 산소를 사용하지 않으면서 (제I형 메카니

증); 또한 (C) 반응 (r13) 내지 (r17)에서 퍼옥시드 (H_2O_2), 슈퍼옥시드 (O_2^-), 및 히드록실 라디칼 ($\cdot OH$)의 존재를 통해 발생한다.

[0101] 도 2A에 도시된 바와 같이, 본 발명자들은 또한 교차 결합 작용이 퍼옥시드, 슈퍼옥시드 및 히드록실 라디칼을 포함하는 반응으로부터 보다 높은 수준으로 발생한다고 판단하였다. 교차 결합 작용은 일중항 산소를 포함하는 반응 및 비-산소 반응으로부터는 보다 낮은 수준으로 발생한다. 반응 (r1)-(r26)에 기반한 일부 모델이 각각의 반응에 의해 발생하는 교차 결합 작용의 수준을 설명할 수 있다. 예를 들어, 일중항 산소가 교차 결합 작용의 발생에서 미미한 역할을 하는 경우이면, 모델은 일중항 산소로부터 초래되는 교차 결합 작용을 상수로 처리함으로써 단순화될 수 있다.

[0102] 모든 반응은 반응 (r1)-(r3)에서 제공된 바와 같이 Rf_3^* 로부터 시작된다. Rf_3^* 의 켤칭은 반응 (r10)에서 바닥 상태의 Rf 와의 화학 반응을 통해, 또한 반응 (r9)에서 물과의 상호작용에 의한 불활성화를 통해 발생한다.

[0103] 상기에 기재된 바와 같이, 과량의 산소는 각막 교차 결합 과정에 유해할 수 있다. 도 2A에 도시된 바와 같이, 시스템이 광자-한정 및 산소-풍부가 될 때, 교차 결합은 슈퍼옥시드, 퍼옥시드 및 히드록실 라디칼을 포함하는 추가 반응으로부터 파괴될 수 있다. 실제로, 일부 경우에, 과량의 산소는 교차 결합의 발생에 대비하여 교차 결합의 순(net) 파괴를 초래할 수 있다.

[0104] 상기에 기재된 바와 같이, 다양한 인자가 교차 결합의 반응 속도 및 교차 결합으로 인해 달성되는 생물역학적 보강의 양에 영향을 미친다. 다수의 이러한 인자들은 밀접한 연관이 있으므로, 어느 하나의 인자의 변화가 또 다른 인자에 대하여 예상치 못한 영향을 미칠 수 있다. 그러나, 교차 결합 치료법에서의 상이한 인자들 사이의 관계를 이해하기 위한 보다 포괄적인 모델이 상기에 확인된 광화학적 운동학적 반응 (r1)-(r26)에 의해 제공된다. 따라서, 시스템 및 방법은 산소 역학 및 교차 결합 작용의 통합된 설명을 제공하는, 상기의 광화학적 운동학적 교차 결합 모델에 따라 교차 결합 치료법을 위한 다양한 파라미터를 조정할 수 있다. 상기 모델은 치료 파라미터의 상이한 조합에 기반한 예상 결과를 평가하고 목적하는 결과를 제공하는 치료 파라미터의 조합을 확인하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 파라미터는 도포되는 교차 결합제의 농도(들) 및/또는 침지 시간; 광활성화 광선의 선량(들), 파장(들), 방사조도(들), 기간(들), 및/또는 온/오프 사용율(들); 조직에서의 산소화 조건; 및/또는 추가 작용제 및 용액의 존재를 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0105] 반응 (r1)-(r26)의 측면에 기반한 모델은 교차 결합 작용을 평가하는 적어도 5가지의 상이한 방법에 의해 입증되었다:

- [0106] * 산소 결핍 실험
- [0107] * 비-선형 광학 현미경 형광 실험
- [0108] * 파파인 소화법 실험에 기반한 형광 데이터
- [0109] * 각막 기질 경계선 상관관계 실험
- [0110] * 브릴루앙(Brillouin) 현미경 실험

[0111] 이러한 평가는 예를 들어, 2015년 10월 27일에 출원된 PCT 국제 특허 출원 PCT/US15/57628, 및 2015년 11월 14일에 출원된 미국 특허 가출원 62/255,452에 기재되어 있으며, 이들 출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

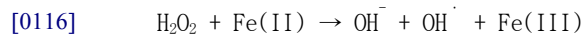
[0112] 도 3은 상기에 확인된 광화학적 운동학적 반응 (r1)-(r26)에 기반한 모델을 이용하는 예시 시스템(100)을 도해한다. 제어기(120)는 프로세서(122) 및 컴퓨터-판독가능한 저장 매체(124)를 포함한다. 저장 매체(124)는 광원(110)으로부터의 광활성화 광선이 교차 결합제로 처리된 각막의 선택된 영역에 전달될 때의 교차 결합의 양을 결정하기 위한 프로그램 명령을 저장한다. 특히, 반응 (r1)-(r26)에 기반한 광화학적 운동학적 모델(126)은 퍼옥시드, 슈퍼옥시드, 히드록실 라디칼, 및/또는 일중항 산소의 조합을 비롯한 반응성 산소 화학종 (ROS)을 포함하는 반응으로부터 초래되는 교차 결합을 결정하기 위한 제1 세트의 프로그램 명령 A 및 산소를 포함하지 않는 반응으로부터의 교차 결합을 결정하기 위한 제2 세트의 프로그램 명령 B를 포함할 수 있다. 제어기(120)는 치료 파라미터 및/또는 다른 관련 정보와 관련된 입력값이 입력된다. 제어기(120)는 후속적으로 프로그램 명령 A 및 B를 실행시켜, 입력값에 기반하여 각막의 선택된 영역에서의 3차원 교차 결합 분포(들)에 관한 정보를 출력할 수 있다. 이어서, 3차원 교차 결합 분포(들)는 각막의 선택된 영역에서 목적하는 치료를 달성하기 위해 광

원(110), 광학 소자(112), 교차 결합제(130), 도포기(132), 산소 공급원(140), 및/또는 산소 전달 장치(142)의 측면을 어떻게 제어할지를 결정하는데 이용할 수 있다 (당연히, 도 3에 도시된 시스템(100)과 이러한 과정은 동일한 각막의 1개 초과 선택된 영역을 치료하는데 사용될 수 있음).

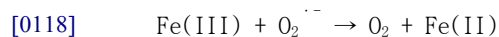
[0113] 하나의 실행에 따르면, 3차원 교차 결합 분포(들)를 평가하여 각막의 선택된 영역에서의 교차 결합 및 반응성-산소 화학종의 효과로 인한 치유 반응에 상응하는 역치 깊이를 계산할 수 있다. 추가적으로 또는 선택적으로, 3차원 교차 결합 분포(들)를 평가하여 각막의 선택된 영역에서의 생물역학적 조직 반응에 상응하는 생물역학적 조직 보강 역치 깊이를 계산할 수 있다. 각막에서의 치유 반응 및/또는 생물역학적 조직 보강 깊이에 관한 정보는 광원(110), 광학 소자(112), 교차 결합제(130), 도포기(132), 산소 공급원(140), 및/또는 산소 전달 장치(142)의 측면을 어떻게 제어할지를 결정하는데 이용할 수 있다. 특정 치유 반응 및/또는 생물역학적 조직 보강이 각막의 특정 깊이에서 바람직할 수 있거나 또는 바람직하지 않을 수 있다.

[0114] 상기에 기재된 바와 같이, 도 2A-B는 각막 교차 결합 치료법 동안에 적용된 리보플라빈 및 광활성화 광선 (예를 들어, 자외선 A (UVA) 광선)을 포함하는 광화학적 운동학적 반응식을 도해한다. 그러나, 도 2A-B에 도시된 반응에서 발생된 모든 슈퍼옥사이드 음이온이 전체 반응에서 소비되는 것은 아니다. 도 4의 반응식에 도시된 바와 같이, 슈퍼옥사이드 음이온 (그의 짝산과 평형 상태)은 과산화수소 및 그 후에 히드록실 라디칼을 발생시킬 수 있다. 특히, 도 4는 전자 전달 반응에 의한 산화제의 형성 및 수소 추출에 의한 중합의 가능한 개시를 도시한다. 도 4에서 상이한 반응성 산소 화학종 (ROS)의 콜라겐에 대한 작용의 전반적인 상황은 복잡적이다. 슈퍼옥사이드 음이온은 매우 반응성이지는 않지만, 콜라겐을 분해시킬 수 있다. 반대로, 단독의 히드록실 라디칼은 단백질을 응집을 유도할 수 있다. 뿐만 아니라 히드록실 라디칼은 단백질을 위한 중합 개시제로서 간주된다. 그러나, 히드록실 라디칼과 슈퍼옥사이드 음이온의 혼합물 (과량의 히드록실 라디칼)은 단백질의 분해를 자극한다.

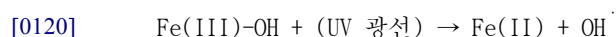
[0115] 도 4는 과산화수소가 히드록실 라디칼의 직접적인 전구체임을 보여준다. 히드록실 라디칼의 농도를 증가시키고 콜라겐 교차 결합을 가속시키기 위해, 과산화수소의 분해가 가속될 수 있다. 그러한 하나의 실행 방법은 펜톤 반응(Fenton's reaction)을 이용하는 것을 포함한다:



[0117] 용액 중 Fe(II)의 농도는 Fe(III)이 Fe(II)을 재생시키는 슈퍼옥사이드 음이온과 반응하므로 매우 높지는 않다:



[0119] 또한, UV 광선이 조사되는 동안에, Fe(III)의 히드록시-착물은 광화학적으로 Fe(II)로 환원된다. 이러한 광-환원 동안에 발생된 히드록실 라디칼은 부가 생성물이다:



[0121] 구리 이온이 철 대신에 사용될 수 있으며, 이러한 조건 하에 콜라겐의 교차 결합이 관찰되는 것은 전망이 기대된다.

[0122] 미량의 금속, 예컨대 철 또는 구리를 리보플라빈 제제에 첨가하는 것은 UV 광선을 이용한 각막 콜라겐 교차 결합을 향상시킨다. 반응성 산소 및 질소 화학종의 형성을 매개할 수 있는 다른 금속은 예를 들어: 망가니즈, 크로뮴, 바나듐, 알루미늄, 코발트, 수은, 카드뮴, 니켈, 또는 비소를 포함한다.

[0123] 일반적으로, 교차 결합 치료법을 위한 다양한 작용제, 첨가제, 완충액 등이 하기 연구에서 확인된다. 그러한 다양한 작용제, 첨가제, 완충액 등의 특징이 교차 결합 치료법의 향상을 위해 교차 결합제와 함께 제제에 이용될 수 있다.

[0124] 리보플라빈 및 철(II)을 이용한 교차 결합

[0125] 하기 연구는 리보플라빈 용액에 철(II)이 존재하는 것이 교차 결합 작용의 콜라겐-관련 형광 지표를 어떻게 향상시키는지를 보여주는 조사를 수행하였다.

[0126] A. 재료 및 방법

[0127] 상피 제거한 안구를 각막 위에 용액을 유지하기 위해 고무 링을 사용하여 37°C로 설정된 인큐베이터에서 dH₂O 중 단독의 0.1% 리보플라빈, 또는 dH₂O 중 0.1% 리보플라빈 중의 1 mM FeSO₄ (철(II) 술페이트)로 20분 동안 침지

시켰다. 각막 전체에(pan-corneally) 산소가 충전된 실린더에서, 365 nm 광원 (1초 온, 1초 오프의 펄스를 가짐) (UV LED NCSU033B[T]; 일본 도쿠시마에 소재하는 니치아 캅파니(Nichia Co.))으로부터, 각막 표면에서 출력 센서 (모델 PD-300-UV; 이스라엘 예루살렘에 소재하는 오피르, 인크.(Ophir, Inc.))로 측정되는 선택된 방사조도 (30 mW/cm^2)에서, 탑 햇(top hat) 빔 (3%의 실효값)으로 8분 동안 (7.2 J의 총 선량) 조사하였다. 조사를 시작하기 전에, 2분간 산소 노출시켰다. 각막 절편 (대략 $200 \mu\text{m}$ 의 두께)을 인트라레이스(Intralase) 펄토초 레이저 (미국 캘리포니아주 산타아나에 소재하는 애보트 메디칼 옵틱스(Abbot Medical Optics))를 이용하여 눈으로부터 절제하였다. 각막 절편의 평균 두께를 초음파 각막두께 측정기(Pachymeter) (미국 펜실베이니아주 엑스톤에 소재하는 디지에이치 테크놀로지(DGH Technology))를 이용하여 눈에서 절제한 전후의 측정값 차이로서 계산하였다. 절편을 증류수로 2번 세척하고, 필터지로 건조시키고, dH_2O 로 2번 세척한 다음, 중량 변화가 10% 미만인 될 때까지 진공에서 건조시켰다 (로터리 베인 진공 펌프(Rotary vane vacuum pump) RV3 A652-01-903, 영국 웨스트 서섹스에 소재하는 비오씨 에드워즈(BOC Edwards)). 각각의 절편을 파파인 완충액 [BBBS (pH 7.0-7.2), 2 mM L-시스테인 및 2 mM EDTA] 1 ml 중의 2.5 단위/ml의 파파인 (파파야 유액으로부터 얻음, 시그마(Sigma))으로 2.5시간 동안 65°C 에서 소화시켰다. 파파인 소화물을 $2200\times\text{G}$ 로 5초 동안 원심분리하고 (미니 원심분리기(Mini centrifuge) 05-090-100, 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific)), BBBS로 0.5배 희석시키고, 용액의 형광을 QM-40 분광형광계 (캐나다 온타리오주 런던에 소재하는 포톤 테크놀로지 인터내셔널(Photon Technology Int.))로 $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ 의 여기에서 측정하였다. 조직의 부재 하에 형광을 측정하고 이 값을 샘플의 형광에서 뺀으로써 파파인 완충액의 형광을 고려하였다.

[0128] 상기 방법은 콜라겐의 비-효소적 교차 결합 밀도가 파파인 소화물의 형광을 사용하여 사전에 정량화되었기 때문에 사용되었다. 형광과 증가하는 교차 결합 작용 사이에는 선형 관계가 존재한다.

[0129] B. 결과/결론

[0130] 도 5는 교차 결합 중에 적용된 용액 중 철(II)의 상이한 농도에서의 비-교차 결합 대조군과 비교한 450 nm에서의 각막 소화물의 형광 (F/Fo)을 도해한다. 도 5의 결과에서 확인되는 바와 같이, 리보플라빈 용액 중 철(II)의 존재는 교차 결합 작용의 지표로서, UVA 광선에 노출된 후의 450 nm에서의 콜라겐-관련 형광을 향상시킨다.

[0131] **과산화수소 및 철(II)을 이용한 교차 결합**

[0132] 하기 연구는 과산화수소 예비-침지와 함께 FeSO_4 용액으로부터 제조된 0.1% 철(II) 용액을 사용하는 각막 교차 결합을 시험하는 조사를 수행하였다.

[0133] A. 재료 및 방법

[0134] 염수로 세정한 돼지 눈이 도살장 (미국 아이오와주 수시티에 소재하는 수프림(SiouxPreme))으로부터 얼음 포장하여 밤새 운송되었다. 눈은 실험할 때 며칠이 경과된 것이었다. 눈을 세척하고 상피를 제거하였다. 각막 절편 (대략 $200 \mu\text{m}$ 의 두께)을 인트라레이스 펄토초 레이저 (미국 캘리포니아주 산타아나에 소재하는 애보트 메디칼 옵틱스)를 이용하여 눈으로부터 절제하였다. 각막 절편의 평균 두께를 초음파 각막두께 측정기 (미국 펜실베이니아주 엑스톤에 소재하는 디지에이치 테크놀로지)를 이용하여 눈에서 절제한 전후의 측정값 차이로서 계산하였다.

[0135] 각막 절편을 증류수 또는 희석된 H_2O_2 (1%)에 20분 동안 침지시켰다. H_2O_2 에 침지된 절편을 증류수로 2번 세정하거나 또는 H_2O_2 에서 꺼내어서 증류수 중의 0.1% FeSO_4 용액에 넣어 추가로 20분 동안 침지시킨 후, 증류수로 2X 세정하였다. 절편을 중량 변화가 10% 미만인 될 때까지 진공에서 건조시켰다 (로터리 베인 진공 펌프 RV3 A652-01-903, 영국 웨스트 서섹스에 소재하는 비오씨 에드워즈). 각각의 절편을 파파인 완충액 [BBBS (pH 7.0-7.2), 2 mM L-시스테인 및 2 mM EDTA] 1 ml 중의 2.5 단위/ml의 파파인 (파파야 유액으로부터 얻음, 시그마)으로 2.5시간 동안 65°C 에서 소화시켰다. 파파인 소화물을 $2200\times\text{G}$ 로 5초 동안 원심분리하고 (미니 원심분리기 05-090-100, 피셔 사이언티픽), BBBS로 0.5배 희석시키고, 용액의 형광을 QM-40 분광형광계 (캐나다 온타리오주 런던에 소재하는 포톤 테크놀로지 인터내셔널)로 $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ 의 여기에서 측정하였다. 조직의 부재 하에 형광을 측정하고 이 값을 샘플의 형광에서 뺀으로써 파파인 완충액의 형광을 고려하였다.

[0136] 처리:

[0137] 대조군: 각막 절편을 1.5 mL 용량의 에펜도르프 시험관(Eppendorf tube)에 넣고 dH_2O 로 20분 동안 침지시켰다.

- [0138] H_2O_2 : 각막 절편을 1.5 mL 용량의 에펜도르프 시험관에 넣고 1% H_2O_2 로 20분 동안 침지시켰다. 각막 절편을 dH_2O 로 2번 세정한 후에 건조시켰다.
- [0139] H_2O_2 + 철(II): 각막 절편을 1.5 mL 용량의 에펜도르프 시험관에 넣고 1% H_2O_2 로 20분 동안 침지시켰다. 절편을 원래 시험관에서 꺼내어 새로운 에펜도르프 시험관으로 옮겨 dH_2O 중의 0.1% 철(II) 용액 중에 20분 동안 두었다. 절편을 dH_2O 로 2번 세정한 후에 건조시켰다.
- [0140] B. 결과/결론
- [0141] 도 6은 (1) dH_2O ; (2) H_2O_2 ; 및 (3) H_2O_2 및 0.1% 철(II)로 처리된, 파파인 소화된 각막 절편의 형광 카운트를 도해한다. 도 6의 결과에서 확인되는 바와 같이, H_2O_2 + 0.1% 철(II) 조건의 형광 패턴이 정상적인 교차 결합 패턴과 유사하다. 이는 절편이 H_2O_2 다음에 철 용액에 위치하였을 때는 교차 결합이 발생하지만, H_2O_2 에만 노출되었을 때는 교차 결합이 발생하지 않음을 입증한다.
- [0142] **리보플라빈 및 철(II)을 이용한 또 다른 교차 결합**
- [0143] 하기 연구는 dH_2O 중 0.1% 리보플라빈 중의 0.5 mM $FeSO_4$ 의 각막 콜라겐 교차 결합에 대한 영향을 시험하였다. 샘플에 연속적으로, 또는 산소 존재 하에 펄스형 UVA를 조사하였다. 하기 설명은 이들로 나뉜 실험으로부터의 데이터를 합친다.
- [0144] A. 재료 및 방법
- [0145] 염수로 세정한 돼지 눈이 도살장 (미국 아이오와주 수시티에 소재하는 수프럼)으로부터 얼음 포장하여 밤새 운송되었다. 눈을 세척하고 상피를 제거하였다. 눈을 그 위에 용액을 유지하기 위해 고무 링을 사용하여 37°C로 설정된 인큐베이터에서 dH_2O , dH_2O 중의 0.1% 리보플라빈 또는 dH_2O 중 0.1% 리보플라빈 중의 0.5 mM $FeSO_4$ 로 20분 동안 침지시켰다. 특정된 경우에는, 조사 전에 눈을 인큐베이션 챔버에서 2분 동안 약간의 산소 스트림 하에 비커에 넣어 두었다. 각막 전체에 365 nm 광원 (UV LED NCSU033B[T]; 일본 도쿠시마에 소재하는 니치아 캅파니)으로부터, 각막 표면에서 출력 센서 (모델 PD-300-UV; 이스라엘 예루살렘에 소재하는 오피르, 인크.)로 측정되는 선택된 방사조도 (30 mW/cm^2 , 펄스형 또는 비-펄스형)에서, 선택된 시간 (4분 또는 8분) 동안 탐 햇 빔 (3%의 실효값)으로 조사하였다. 각막 절편 (대략 200 μm 의 두께)을 인트라레이스 펄토초 레이저 (미국 캘리포니아주 산타아나에 소재하는 애보트 메디칼 옵틱스)를 이용하여 눈으로부터 절제하였다. 각막 절편의 평균 두께를 초음파 각막두께 측정기 (미국 펜실베이니아주 엑스톤에 소재하는 디지이치 테크놀로지)를 이용하여 눈에서 절제한 전후의 측정값 차이로서 계산하였다. 절편을 3 mm의 폭으로 이격된 5개의 타인(tine)을 갖는 바이오레이크(biorake) 부착을 이용하여 이축 장력계 (셀스케일 바이오테스터(CellScale Biorester) 5000, 캐나다 온타리오주 워털루)에 위치시켰다. 각각의 샘플을 샘플이 파열될 때까지 37°C의 염수 중에서 4 $\mu\text{m/s}$ 의 일정한 속도로 신장시켰다. 절편을 증류수로 2번 세척하고, 필터지로 건조시키고, dH_2O 로 2번 세정한 다음, 중량 변화가 10% 미만인 될 때까지 진공에서 건조시켰다 (로터리 베인 진공 펌프 RV3 A652-01-903, 영국 웨스트 서섹스에 소재하는 비오씨 에드워즈). 각각의 절편을 파파인 완충액 [BBBS (pH 7.0-7.2), 2 mM L-시스테인 및 2 mM EDTA] 1 ml 중의 2.5 단위/ml의 파파인 (파파야 유액으로부터 얻음, 시그마)으로 2.5시간 동안 65°C에서 소화시켰다. 파파인 소화물을 2200xG로 5초 동안 원심분리하고 (미니 원심분리기 05-090-100, 피셔 사이언티픽), 1XBBBS로 0.5배 희석시키고, 용액의 형광을 QM-40 분광형광계 (캐나다 온타리오주 런던에 소재하는 포톤 테크놀로지 인터내셔널)로 $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ 의 여기에서 측정하였다. 조직의 부재 하에 형광을 측정하고 이 값을 샘플의 형광에서 뺌으로써 파파인 완충액의 형광을 고려하였다.
- [0146] 처리:
- [0147] 대조군: dH_2O 에 침지시킨 후에, 각막 절편을 대략 200 μm 로 절단하였다.
- [0148] 0.1% 리보플라빈, CW: 0.1% 리보플라빈에 침지시킨 후에, 눈에 30 mW/cm^2 의 UVA 광선을 연속파 (CW)로 4분 동안 비추었다. 각막 절편을 대략 200 μm 로 절단하였다.
- [0149] 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM $FeSO_4$, CW: 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM $FeSO_4$ 에 침지시킨 후에, 눈에 30 mW/cm^2 의

UVA 광선을 연속과 (CW)로 4분 동안 비추었다. 각막 절편을 대략 200 μm 로 절단하였다.

- [0150] 0.1% 리보플라빈, PW + O₂: 0.1% 리보플라빈에 침지시킨 후에, 눈을 2분 동안 산소 스트림 하에 비커에 넣어 두었고, 그 후에 30 mW/cm²의 펄스형 UVA 광선을 8분 동안 (1초 온 : 1초 오프) (펄스과 (PW)) 비추었다. 노출 시간 동안에 산소를 비커에 연속적으로 공급하였다. 각막 절편을 대략 200 μm 로 절단하였다.
- [0151] 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄, PW + O₂: 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄에 침지시킨 후에, 눈을 2분 동안 산소 스트림 하에 비커에 넣어 두었고, 그 후에 30 mW/cm²의 펄스형 UVA 광선을 8분 동안 (1초 온 : 1초 오프) (펄스과 (PW)) 비추었다. 노출 시간 동안에 산소를 비커에 연속적으로 공급하였다. 각막 절편을 대략 200 μm 로 절단하였다.
- [0152] B. 결과
- [0153] 도 7은 (1) 0.1% 리보플라빈 (연속과 (CW)); (2) 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄ (CW); (3) 0.1% 리보플라빈 (펄스과 (PW) + O₂); 및 (4) 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄ (PW + O₂)에 대하여 450 nm에서 기록된 형광 (미처리 대조군과의 비교)을 도해한다.
- [0154] 도 8은 대조군 (1)과 비교하여, 0.1% 리보플라빈 (CW) (2) 및 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄ (CW) (3)에 대하여 장력측정법에 의해 측정된 각 각막 절편의 평균 힘 vs. 변위를 도해한다.
- [0155] 도 7-8은 반복 실험으로, 대조군 (1)과 비교하여, 0.1% 리보플라빈 (PW + O₂) (2) 및 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄ (PW + O₂) (3)에 대하여 장력측정법에 의해 측정된 각 각막 절편의 평균 힘 vs. 변위를 도해한다.
- [0156] C. 결론
- [0157] 2가지 방법이 각막 절편의 각막 교차 결합을 결정하는데 사용되었다. 첫번째로, 파파인 소화 결과가 FeSO₄가 첨가된 연속과 (CW) 및 펄스과 (PW) + O₂ 조건 양쪽 모두에서의 형광의 증가를 보여주었다. 두번째 방법인, 장력측정법은 FeSO₄가 첨가되었을 때 PW + O₂ 조건에서만 이축 장력의 증가를 나타냈다.
- [0158] 도 7의 상대 형광 그래프는 FeSO₄가 0.1% 리보플라빈에 첨가되었을 때 뿐만 아니라, UVA 적용이 연속 조사에서 산소 하의 펄스형 조사로 바졌을 때 형광 카운트의 증가를 보여준다.
- [0159] 도 8은 연속 UVA 조사 처리 그룹의 장력측정법 결과를 보여준다. 0.1% 리보플라빈 그룹 및 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄ 그룹은 둘다 변위가 증가할수록 힘과 변위 사이의 유사한 상관관계를 나타냈다. 두 그룹 모두 대조군 그룹보다 높았다.
- [0160] 도 9 및 10은 산소 처리 하의 펄스형 UVA 적용 그룹의 장력측정법 결과를 보여준다. 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄ 그룹이 변위가 증가할수록 약간 더 큰 힘을 나타냈다. 힘의 증가는 CW 처리 그룹에서의 증가보다 PW + O₂ 처리 그룹에서 더 컸다.
- [0161] **시트레이트 완충액에 용해된 철(II) 및 리보플라빈을 이용한 교차 결합**
- [0162] 하기 연구는 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈 (아베드로(AVEDRO)® 포트렉사(PHOTREXA) ZD™로 입수가가능함) vs. 시트레이트 완충액에 용해된 철(II)과 함께 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈으로 처리된 각막 절편의 콜라겐 교차 결합 수준을 시험하였다.
- [0163] 이러한 처리로, 시트레이트 리간드가 수산화제2철의 저 용해도 생성물 및 다른 불용성 제2철 또는 제1철 화학종을 유발하는 물과 산소의 작용으로부터 제2철 및 제1철 이온을 보호한다. 철(II)의 시트레이트와의 착물 형성이 철(II) 산화의 반응속도를 지연시킬 수 있지만, 약간의 철 이온이 여전히 연구 시스템에서 펜톤-유사 반응에 참여할 수 있다.
- [0164] A. 재료 및 방법
- [0165] FeSO₄를 시트레이트 완충액 (100 mM 시트레이트 완충액 원액: 트리소듐 시트레이트로 pH 6.0으로 조정된, dH₂O 중의 시트르산 및 0.33% NaCl; 완충액은 dH₂O로 목적하는 농도로 희석됨)에 첨가하였다. 각각의 Fe-시트레이트

용액 100 μ L를 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈 10 mL에 첨가하였고, 최종 pH는 7.1-7.2였다. 염수로 세정한 돼지 눈이 도살장 (미국 아이오와주 수시티에 소재하는 수프림)으로부터 얼음 포장하여 밤새 운송되었다. 눈을 세척하고 상피를 제거하였다. 눈을 그 위에 용액을 유지하기 위해 고무 링을 사용하여 37°C로 설정된 인큐베이터에서 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈, 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈 + 0.25 mM FeSO₄ + 0.5 mM 시트레이트 완충액, 또는 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM FeSO₄ + 0.25 mM 시트레이트 완충액으로 20분 동안 침지시켰다. 조사 전에 눈을 인큐베이션 챔버에서 2분 동안 약간의 산소 스트림 하에 비커에 넣어 두었다. 각막 전체에 365 nm 광원 (UV LED NCSU033B[T]; 일본 도쿠시마에 소재하는 니치아 캄파니)으로부터, 각막 표면에서 출력 센서 (모델 PD-300-UV; 이스라엘 예루살렘에 소재하는 오피르, 인크.)로 측정되는 선택된 방사조도 (30 mW/cm^2 , 1초 온 : 1초 오프의 펄스를 가짐)에서, 4분 동안 탐 햇 빔 (3%의 실효값)으로 조사하였다. 각막 절편 (대략 200 μ m의 두께)을 인트라레이스 펌프 레이저 (미국 캘리포니아주 산타아나에 소재하는 애보트 메디칼 옵틱스)를 이용하여 눈으로부터 절제하였다. 각막 절편의 평균 두께를 초음파 각막두께 측정기 (미국 펜실베이니아주 엑스톤에 소재하는 디지이치 테크놀로지)를 이용하여 눈에서 절제한 전후의 측정값 차이로써 계산하였다. 절편을 증류수로 2번 세척하고, 필터지로 건조시키고, dH₂O로 2번 세척한 다음, 중량 변화가 10% 미만일 때까지 진공에서 건조시켰다 (로터리 베인 진공 펌프 RV3 A652-01-903, 영국 웨스트 서섹스에 소재하는 바이오씨 에드워즈). 각각의 절편을 파파인 완충액 [BBBS (pH 7.0-7.2), 2 mM L-시스테인 및 2 mM EDTA] 1 ml 중의 2.5 단위/ml의 파파인 (파파야 유액으로부터 얻음, 시그마)으로 2.5시간 동안 65°C에서 소화시켰다. 파파인 소화물을 2200xG로 5초 동안 원심분리하고 (미니 원심분리기 05-090-100, 피셔 사이언티픽), 1XBBBS로 0.5배 희석시키고, 용액의 형광을 QM-40 분광형광계 (캐나다 온타리오주 런던에 소재하는 포톤 테크놀로지 인터내셔널)로 $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ 의 여기에서 측정하였다. 조직의 부재 하에 형광을 측정하고 이 값을 샘플의 형광에서 뺄으로써 파파인 완충액의 형광을 고려하였다.

[0166] 처리:

[0167] 대조군: 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈에 20분 동안 침지시킨 후에, 각막 절편을 대략 200 μ m로 절단하였다.

[0168] 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액), PW + O₂: 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈에 20분 동안 침지시킨 후에, 눈을 2분 동안 약간의 산소 스트림 하에 비커에 넣어 두었고, 그 후에 산소 하에 30 mW/cm^2 의 펄스형 UVA 광선을 4분 동안 (1초 온 : 1초 오프) 비추었다. 각막 절편을 대략 200 μ m로 절단하였다.

[0169] 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) + 0.25 mM 철 + 0.5 mM 시트레이트 완충액 PW + O₂: 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈 + 0.25 mM 철 + 0.5 mM 시트레이트 완충액에 20분 동안 침지시킨 후에, 눈을 2분 동안 약간의 산소 스트림 하에 비커에 넣어 두었고, 그 후에 산소 하에 30 mW/cm^2 의 펄스형 UVA 광선을 4분 동안 (1초 온 : 1초 오프) 비추었다. 각막 절편을 대략 200 μ m로 절단하였다.

[0170] 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) + 0.5 mM 철 + 0.25 mM 시트레이트 완충액 PW + O₂: 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈 + 0.5 mM 철 + 0.25 mM 시트레이트 완충액에 20분 동안 침지시킨 후에, 눈을 2분 동안 약간의 산소 스트림 하에 비커에 넣어 두었고, 그 후에 산소 후에 30 mW/cm^2 의 펄스형 UVA 광선을 4분 동안 (1초 온 : 1초 오프) 비추었다. 각막 절편을 대략 200 μ m로 절단하였다.

[0171] B. 결과

[0172] 도 64는 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) vs. 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) + 0.25 mM 철 + 0.5 mM 시트레이트 완충액으로 교차 결합된 절편의 상대 형광을 도해하고, 여기서 눈에는 30 mW/cm^2 의 CW UVA 광선이 4분 동안, 또한 산소 하에 펄스형이 비추졌다.

[0173] 도 65는 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) vs. 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) + 0.5 mM 철 + 0.25 mM 시트레이트 완충액으로 교차 결합된 절편의 상대 형광을 도해하고, 여기서 눈에는 30 mW/cm^2 의 CW UVA 광선이 4분 동안, 또한 산소 하에 펄스형이 비추졌다.

[0174] C. 결론

[0175] 철 (II) 술페이트를 50 mM 시트레이트 완충액 중의 25 mM FeSO₄ 또는 25 mM 시트레이트 완충액 중의 50 mM

FeSO₄가 되도록 시트레이트 완충액에 용해시켰다. 두 용액 모두, 100 μ L를 목적하는 농도가 되도록 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액) 10 mL에 첨가하였다. 두 경우 모두에서, 가시적인 침전은 보이지 않았고, 용액이 실온에서 연장된 기간 동안 안정성을 유지하였다.

[0176] 0.25 mM FeSO₄를 갖는 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액)이 단독의 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액)보다 약 26% 더 높은 파파인 소화로부터의 평균 형광 카운트를 가졌다. 0.5 mM FeSO₄를 갖는 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액)은 단독의 0.1% 리보플라빈 (완충 염수 용액)보다 약 26% 더 높은 파파인 소화로부터의 형광 카운트를 가졌다.

[0177] 리보플라빈 및 2,3-부탄디온을 이용한 교차 결합

[0178] 디아세틸 (2,3-부탄디온)은 유제품 및 알콜 음료를 비롯한 다양한 식품과 버터에 박테리아의 발효 생성물로서 자연 존재하는 α -디케톤이다. 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration)은 디아세틸을 직접적인 식품 성분으로서 GRAS (일반적으로 안전한 식품(generally recognized as safe)) 등급으로 승인하였고, 식품에 존재하는 낮은 수준의 디아세틸을 소비하는 것이 인간의 건강에 위해를 가하는 것으로 보고되지 않았다.

[0179] 연구에 따르면, 2,3-부탄디온은 UV 광선의 조사 후에 리보플라빈 용액에서 검출되는 주요 휘발성 생성물이다. 메카니즘은 일중항 산소와 리보플라빈의 상호작용을 포함한다. 도 11은 리보플라빈과 일중항 산소로부터의 2,3-부탄디온의 형성 메카니즘을 도해한다. 연구를 통해 UV 조사 후의 리보플라빈 용액에서의 2,3-부탄디온의 발생이 확인되었고 그의 각막 교차 결합에의 참여가 제안되었다. 하기 연구는 2,3-부탄디온을 리보플라빈의 존재 및 부재 하에 각막 교차 결합을 위해 사용하였을 때 그의 교차 결합 효율을 정량적으로 측정하는 조사를 수행하였다.

[0180] A. 재료 및 방법

[0181] 염수로 세정한 돼지 눈이 도살장 (미국 아이오와주 수시시에 소재하는 수프림)으로부터 얼음 포장하여 밤새 운송되었다. 눈을 세척하고 상피를 제거하였다. 눈을 그 위에 용액을 유지하기 위해 고무 링을 사용하여 37°C로 설정된 인큐베이터에서 dH₂O 중의 0.1% 리보플라빈, 또는 dH₂O 중의 0.1% 2,3-부탄디온 (BD)으로 20분 동안 침지시켰다. 각막 전체에 365 nm 광원 (UV LED NCSU033B[T]; 일본 도쿠시마에 소재하는 니치야 캄파니)으로부터, 각막 표면에서 출력 센서 (모델 PD-300-UV; 이스라엘 예루살렘에 소재하는 오피르, 인크.)로 측정되는 30 mW/cm²의 방사조도에서, 4분 동안 탐 햇 빔 (3%의 실효값)으로 조사하였다. 각막 절편 (대략 200 μ m의 두께)을 인트라레이스 펄스 레이저 (미국 캘리포니아주 산타아나에 소재하는 애보트 메디칼 옵틱스)를 이용하여 눈으로부터 절제하였다. 각막 절편의 평균 두께를 초음파 각막두께 측정기 (미국 펜실베이니아주 엑스톤에 소재하는 디지이치 테크놀로지)를 이용하여 눈에서 절제한 전후의 측정값 차이로서 계산하였다. 절편을 3 mm의 폭으로 이격된 5개의 타인을 갖는 바이오레이크 부착을 이용하여 이축 장력계 (셀스케일 바이오테스터 5000, 캐나다 온타리오주 워털루)에 위치시켰다. 각각의 샘플을 샘플이 파열될 때까지 37°C의 염수 중에서 4 μ m/s의 일정한 속도로 신장시켰다. 절편을 증류수로 세척하고, 중량 변화가 10% 미만이 될 때까지 진공에서 건조시켰다 (로터리 베인 진공 펌프 RV3 A652-01-903, 영국 웨스트 서섹스에 소재하는 비오써 에드워즈). 각각의 절편을 파파인 완충액 [BBBS (pH 7.0-7.2), 2 mM L-시스테인 및 2 mM EDTA] 1 mL 중의 2.5 단위/mL의 파파인 (파파야 유액으로부터 얻음, 시그마)으로 2.5시간 동안 65°C에서 소화시켰다. 파파인 소화물을 2200xG로 5초 동안 원심분리하고 (미니 원심분리기 05-090-100, 피셔 사이언티픽), 1XBBBS로 0.5배 희석시키고, 용액의 형광을 QM-40 분광형광계 (캐나다 온타리오주 런던에 소재하는 포톤 테크놀로지 인터내셔널)로 λ_{ex} = 360 nm의 여기에서 측정하였다. 조직의 부재 하에 형광을 측정하고 이 값을 샘플의 형광에서 뺀으로써 파파인 완충액의 형광을 고려하였다.

[0182] B. 결과/결론

[0183] 도 12는 자외선 (UV) 광선 없이 (좌측 패널), 그리고 UV 광선 (365 nm, 4분 동안 30 mW) 하에 (우측 패널), dH₂O 중 2,3-부탄디온 (BD)의 1% 용액으로 처리된 각막 절편의 변위-힘 도표를 도해한다.

[0184] 도 13은 UV 광선 하에, 그리고 UV 광선 없이, BD의 1% 용액으로 처리된, 파파인 소화된 200 μ m 두께의 각막 절편에 대하여 450 nm에서 기록된 형광 (미처리 대조군 (Fo)과의 비교)을 도해한다.

[0185] 도 14는 대조군 (1)과 비교하여, UV 광선 (365 nm, 4분 동안 30 mW) 및: dH₂O 중 리보플라빈의 0.1% 용액 (1); dH₂O 중의 0.1% BD (4); 및 dH₂O 중 0.1% 리보플라빈과 0.1% BD의 혼합물 (3)로 처리된 각막 절편의 변위-힘 도

표를 도해한다.

- [0186] 도 15는 4분 동안의 30 mW UVA 및: dH₂O 중 리보플라빈의 0.1% 용액; dH₂O 중의 0.1% BD; 및 dH₂O 중 0.1% 리보플라빈과 0.1% BD의 혼합물로 처리된, 파파인 소화된 200 μ m 두께의 각막 절편에 대하여 450 nm에서 기록된 형광 (미처리 대조군 (Fo)과의 비교)을 도해한다.
- [0187] 도 12 및 13에 도시된 바와 같이, 2,3-부탄디온 자체는 (UV 광선 부재) 각막 절편을 교차 결합시키지 않지만, 365 nm UV 광선이 조사되었을 때는 각막 보강 및 처리 각막으로부터 기록된 형광 출력의 증가를 유도하였다. 도 14 및 15는 BD와 리보플라빈의 혼합물이 교차 결합을 위해 사용될 때의 각막 절편의 보강 변화를 보여준다.
- [0188] 따라서, 2,3-부탄디온은 교차 결합 효과를 증가시키기 위한 리보플라빈 제제에 대한 첨가제로서 사용될 수 있다.
- [0189] 상기에 기재된 각막 교차 결합에의 참여를 토대로, 2,3-부탄디온이 또한 주요 교차 결합제 (리보플라빈 부재)로서 사용될 수 있다는 것이 고려된다.
- [0190] **리보플라빈의 가수분해 생성물을 이용한 교차 결합**
- [0191] 리보플라빈은 알칼리성 용액에서 가수분해되어 가수분해 생성물 중에서도 우레아 및 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린-카르복실산을 제공한다. 도 26은 리보플라빈 (A)의 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린-카르복실산 (B)으로의 알칼리성 가수분해를 도해한다.
- [0192] 알칼리성 분해의 반응속도론을 분광광도계로 추적하였는데, 원래 리보플라빈 용액의 광학 밀도가 450 및 370 nm에서는 감소하지만 310 nm에서는 증가한다는 것이 주목되었다. 본 발명자들이 0.85% 블러드 완충 बैं크 염수 (BBBS) (써모 사이언티픽(Thermo Scientific)) 중의 0.1% 리보플라빈-5-포스페이트 용액을 120°C에서 가열하였을 때, 유사한 전계가 검출되었다 (도 27에 도시됨). 특히, 도 27은 상이한 시간 동안 120°C에서 유지된 BBBS 중의 0.1% 리보플라빈-5-포스페이트의 UV/가시선 (Vis) 스펙트럼을 도해한다.
- [0193] 가열 절차 동안에, 리보플라빈의 농도는 시간이 지날수록 감소한다 (도 27, 450 nm에서의 흡광도 변화 참조). 리보플라빈의 파괴 속도는 또한 용액 중의 농도에 좌우된다. 예를 들어, 본 발명자들은 0.1% 용액이 0.5% 용액보다 1.3배 더 빨리 가수분해됨을 발견하였다 (도 28에 도시됨). 특히, 도 28은 450 nm에서의 흡광도에 의해 측정된 120°C의 BBBS 중에서의 리보플라빈의 가수분해 속도를 도해한다 (0.1% 용액 및 0.5% 용액, A₀은 가열 전의 흡광도임).
- [0194] 동시에, 가수분해로부터 생성된 생성물의 축적이 존재한다 (도 29에 도시됨). 특히, 도 29는 도 27에서 얻은 스펙트럼에서 잔류하는 리보플라빈의 흡광도를 빼서 얻은 UV/Vis 스펙트럼을 도해한다.
- [0195] 도 29의 스펙트럼을 가우스(Gaussian) 흡수 피크 형상을 합쳐서 분석하는 것이 가능하다 (도 30에 도시됨). 특히, 도 30은 120°C에서의 90분 후의 가수분해 용액의 스펙트럼 분석을 도해한다 (잔류하는 리보플라빈의 흡광도를 분석된 스펙트럼에서 뺀).
- [0196] 리보플라빈 가수분해 중의 생성물의 축적은 209, 237, 257, 300, 및 355 nm에서의 흡수의 선형 증가가 이어진다 (도 31에 도시됨). 특히, 도 31은 가수분해 시간 동안의 상이한 피크의 흡광도 변화를 도해한다.
- [0197] 리보플라빈의 분해 생성물의 HPLC (고압 액체 크로마토그래피) 분석을 위해, 머크 밀리포어(Merck Millipore)의 리크로스퍼(Lichrospher) WP300 RP18 컬럼, 250 mm x 4.0 mm, 5 μ m와 함께 디오넥스 울티미트(Dionex UltiMate) 3000을 사용하였다. 이동상 (A)는 일염기성 인산칼륨 (7.35 g/L)을 함유하는 물이고 (B)는 메탄올이었다. 일반적으로, 등용매 용리 조건 (15% B, 1.70 mL/분의 유량, 30분, 40°C)이 분해 과정의 분석을 위해 적합하다. 다이오드 어레이 검출기 (λ = 200-450 nm) 및 크로멜리온(chromleon) 소프트웨어를 사용하여 HPLC 분석 동안에 UV 스펙트럼을 얻었다.
- [0198] 이동상으로서 물 (A) 및 다양한 TFA 농도를 갖는 아세트니트릴 (B)를 이용하는 절차가 최종 생성물 분석을 위해서는 성공적으로 사용되었지만 (상기 참조), 분해 과정의 분석은 실패하였다.
- [0199] 교차 결합 치료법을 위해, 도 32에 도시된 바와 같이, 리보플라빈의 초기 단계 알칼리성 분해 생성물인, 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염 (2)을 합성할 수 있다. 퀴녹살린(2)은 문헌 [Surrey et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 3236-2338]의 합성 프로토콜을 이용하여 제조할 수 있다. 도 33은 합성된 리보플라빈 분해 생성물(2)의 NMR 스펙트럼을 도해한다.

- [0200] 분해 실험으로, 합성된 화합물(2)이 또한 모노포스포릴화 리보플라빈 (5-FMN)의 열 분해에 의해 생성되고 도 35 내지 39에서 피크 B에 상응한다는 것이 입증되었다. 도 34는 열 처리되지 않은 완충 블러드뱅크 염수 중의 모노포스포릴화 리보플라빈 (5-FMN)을 도해한다. 도 35는 1시간의 열 처리 후의 완충 블러드뱅크 염수 중의 5-FMN을 도해한다. 도 36은 2시간의 열 처리 후의 완충 블러드뱅크 염수 중의 5-FMN을 도해한다. 도 37은 3시간의 열 처리 후의 완충 블러드뱅크 염수 중의 5-FMN을 도해한다. 도 38은 4시간의 열 처리 후의 완충 블러드뱅크 염수 중의 5-FMN을 도해한다. 도 39는 합성된 리보플라빈 분해 생성물(2)의 HPLC 결과를 도해한다.
- [0201] 제2의 분해 생성물 A가 또한 5-FMN의 열 분해 중에 생성된다. 그의 보다 강한 극성 특징 (보다 짧은 체류 시간) 때문에, 이 피크는 포스포릴화 퀴놀살린 화합물에 상응하는 것으로 가정된다. 이러한 가정은 이들 두 화합물의 UV 스펙트럼을 비교함으로써 확인할 수 있다. 스펙트럼의 유사성은 발색단에서의 변화가 일어나지 않았다는 것을 시사한다. 따라서, 상기 퀴놀살린 중간체는 아인산 에스테르의 가수분해 없이 우레아 1개 분자가 상실됨으로써 형성되는 것으로 가정된다.
- [0202] 0.85% 블러드뱅크 완충 염수 (써모 사이언티픽) 중의 리보플라빈-5-포스페이트 용액 (0.5% 리보플라빈)을 플라스크 용기에 넣어 실링하고 120°C에서 2시간 동안 유지하였다. 이 용액의 흡수를 열 처리 후에 측정하고 0.85% BBBS 중의 미처리 용액 (~0.1% 리보플라빈 함유)의 흡수와 비교하였다 (용액의 pH = 열 처리된 것: 6.6 및 미처리: 6.9). 도 40은 열적으로 가열된 리보플라빈 용액 (적색 선) 및 가열되지 않은 리보플라빈 용액 (청색 선)의 흡수 스펙트럼 (200 μm 의 광학 거리를 갖는 석영 큐벳에서 기록됨)을 도해한다. 도 41은 도 34에서의 두 스펙트럼 사이의 차이를 도해한다.
- [0203] 2가지 리보플라빈 용액을 돼지 각막 (상피 없음, 20분 침지, 조사 중에 리보플라빈 점적의 도포 없이 4분 동안 30 mW/cm^2 의 연속 UVA 노출)의 교차 결합을 위해 사용하였다. 절편을 200 μm 의 평균 두께로 절단하였다. 파파인 완충액으로 소화된 각막의 형광을 도 42에 제시하였다. 특히, 도 42는 소화된 각막의 형광을 도해한다: 비-교차 결합 대조군 (흑색 선), 가열되지 않은 0.1% 리보플라빈으로 교차 결합된 것 (청색 선), 열 처리된 리보플라빈 용액으로 교차 결합된 것 (적색 선). 도 43은 교차 결합된 각막 샘플의 상대 형광을 도해한다: 적색 - 열 처리된 리보플라빈 용액 사용, 청색 - 가열되지 않은 0.1% 리보플라빈 용액 사용.
- [0204] 도 44에 도시된, 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염은 360 nm에서 강력한 흡광도를 가지며 (도 45 및 46에 도시됨) 460 nm 주위에서 최대값을 갖는 두드러진 형광을 갖는다 (도 47에 도시됨). 도 45는 BBBS 중 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염의 0.001% 용액의 흡광도 스펙트럼 (석영, 1 cm의 광학 거리)을 도해한다. 도 46은 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염의 360 nm에서의 UV 흡광도 (BBBS 중의 용액, 1 cm의 광학 거리를 갖는 석영 큐벳)를 도해한다. 도 47은 BBBS 용액 중의 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염의 형광 (360 nm에서의 여기)을 도해한다.
- [0205] BBBS 중 0.1% 리보플라빈-5-포스페이트 및 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 0.1% 나트륨 염의 용액을 돼지 각막 (상피 없음, 20분 침지, 조사 중에 리보플라빈 또는 다른 교차 결합제 점적의 도포 없이 4분 동안 30 mW/cm^2 의 연속 UVA 노출)의 교차 결합을 위해 사용하였다. 절편을 200 μm 의 평균 두께로 절단하였다. 파파인 완충액으로 소화된 각막의 형광을 제시하였다. 리보플라빈 또는 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염으로 교차 결합된 각막은 둘 다 450 nm 영역에서 상승한 형광을 나타냈다 (도 48에 도시됨). 도 48은 소화된 각막의 형광을 도해한다: 비-교차 결합 대조군 (흑색 선), BBBS 중의 0.1% 리보플라빈으로 교차 결합된 것 (적색 선), 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 0.1% 나트륨 염으로 교차 결합된 것 (청색 선).
- [0206] 또 다른 실험에서, 상피가 없는 200 μm 두께의 각막 절편을 돼지 눈에서 절단하여, BBBS 중 리보플라빈의 0.1% 용액 또는 BBBS 중 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염의 0.1% 용액 1 mL에 넣고, 3분 동안 아르곤 버블링에 의해 탈산소화한 다음, 석영 시트 사이에 넣어 실링하고, 4분 동안 CO_2 대기 중에서 30 mW/cm^2 를 조사하였다. 절편을 증류수로 세정하고, 진공 건조시킨 다음, 파파인 완충액으로 소화시켰다. 콜라겐 형광을 평가하기 위해, 수득된 용액의 형광을 360 nm의 여기에서 기록하였다 (도 49에 도시됨). 도 49는 소화된 각막 절편의 형광을 도해한다: 비-교차 결합 대조군 (흑색 선), BBBS 중의 0.1% 리보플라빈으로 교차 결합된 것 (적색 선), 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴놀살린카르복실산 일수화물의 0.1% 나트륨 염으로 교차 결합된 것 (청색 선).

- [0207] 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염으로 교차 결합된 각막 절편의 형광이 리보플라빈으로 교차 결합된 각막 절편의 형광보다 더 높았다. 이는 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염이 교차 결합제로서 사용되었을 경우의 산소의 존재에 대한 보다 낮은 감수성을 시사한다. 따라서, 본 개시내용의 측면에 따른 실시양태는 산소의 존재에 대하여 보다 낮은 감수성이 유리한 처리에서 상기 염을 이용할 수 있다.
- [0208] 도 50에 도시된 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산의 0.17% 및 0.017% 용액을 BBBS로 제조하여 흡광도 (200 μm 및 1 cm 두께의 석영 큐벳)를 기록하였고, 이는 도 51에서 제시되었다. 도 51은 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산의 흡광도 스펙트럼을 도해한다.
- [0209] 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산의 0.17% 용액은 강력한 형광 쉐칭을 나타내는데 (도 52에 도시됨), 그 이유는 희석시, 그의 형광이 유의하게 증가하기 때문이다. 도 52는 BBBS 중의 상이한 농도를 갖는 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산 용액의 360 nm에서의 여기로 기록된 형광을 도해한다. 도 53은 비-교차 결합 대조군 (흑색 선)과 비교하여, BBBS 중 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산의 0.17% (적색 선) 및 0.017% (청색 선) 용액으로 교차 결합된, 파파인 소화된 각막 절편 (200 μm 의 두께) (상피 없음, 20분의 침지 시간, 4분 동안 30 mW/cm^2)의 형광을 도해한다. 도 54는 비-교차 결합 대조군 (흑색 선)과 비교하여, 0.17% 리보플라빈 (적색 선) 및 0.17% 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산 (3H2QXCA, 녹색 선)으로 20분 동안 예비 포화되고, 4분 동안 30 mW/cm^2 를 조사한 200 μm 두께의 각막 절편의 장력측정 그래프를 도해한다. 도 55는 BBBS 중의 0.1% 리보플라빈 (청색 막대, 용액 2) 및 3-히드록시-2-퀴녹살린카르복실산의 0.02% 용액을 함유하는 0.1% 리보플라빈 (적색 막대, 용액 1)으로 교차 결합된, 파파인 소화된 각막 절편 (200 μm 의 두께) (상피 없음, 20분의 침지 시간, 4분 동안 30 mW/cm^2)의 상대 형광을 도해하고, 여기서 F_0 는 비-교차 결합 절편의 형광이다.
- [0210] 도 56에 도시된 4-메틸-3-옥소-3,4-디히드로-2-퀴녹살린 카르복실산은 360 nm에서 강력한 흡광도를 가지며 (도 57에 도시됨) 460 nm 주위에서 최대값을 갖는 약간의 형광을 갖는다 (도 58에 도시됨). 도 57은 BBBS 중 4-메틸-3-옥소-3,4-디히드로-2-퀴녹살린 카르복실산의 0.01 mg/ml 용액의 흡광도 스펙트럼 (석영, 1 cm의 광학 거리)을 도해한다. 도 58은 BBBS 용액 중의 4-메틸-3-옥소-3,4-디히드로-2-퀴녹살린 카르복실산의 형광 (360 nm에서의 여기)을 도해한다. 도 59는 파파인 소화된 각막 절편의 형광을 도해하는데, 여기서 각막은 상피가 제거되었고, 교차 결합제 용액에 20분 동안 침지된 후에, 30 mW/cm^2 의 UVA 광선 (360 nm)으로 4분 동안 조사되었다: 비-교차 결합 대조군 (흑색 선), BBBS 중 4-메틸-3-옥소-3,4-디히드로-2-퀴녹살린 카르복실산의 0.1 mg/ml (적색 선) 및 1 mg/ml (녹색 선) 용액으로 교차 결합된 것.
- [0211] 본 개시내용의 측면에 따라서, 눈을 치료하기 위한 시스템 및 방법은 리보플라빈의 가수분해 중에 생성된 교차 결합제를 이용한다. 예를 들어, 리보플라빈의 가수분해는 1,2-디히드로-6,7-디메틸-2-케토-1-D-리비틸-3-퀴녹살린카르복실산 일수화물의 나트륨 염을 생성한다. 이 염이 리보플라빈의 통상의 처리 용액보다 산소 고갈에 덜 민감하다는 것 (즉, 산소의 존재에 대하여 보다 낮은 감수성)이 발견되었다. 이 염이 단독으로 또는 리보플라빈 용액과 조합되어 사용될 때, 눈 치료를 위한 보다 효과적인 교차 결합이 달성될 수 있다.
- [0212] 본 개시내용의 측면에 따라서, 시스템 및 방법은 교차 결합제의 생성을 비롯하여, 리보플라빈의 가수분해 결과를 달성하기 위해 리보플라빈 용액의 열 처리를 이용한다.
- [0213] 본 개시내용의 측면에 따라서, 시스템 및 방법은 눈 치료를 위한 교차 결합 작용을 유발하기 위해 퀴녹살린을 이용한다. 퀴녹살린 (벤조피라진이라고도 함)은 도 60에 도시된 바와 같이 벤젠 고리와 피라진 고리로 구성된 고리 착물을 함유하는 헤테로시클릭 화합물이다. 퀴녹살린 유도체는 자연 상에 널리 분포되어 있으며, 이들 중 대다수, 예컨대 항생제, 에키노마이신, 레보마이신 및 액티노류틴이 매우 유용한 생물학적 활성을 갖는다. 또한, 다수의 합성 퀴녹살린이 항박테리아성, 살진균성, 살충성, 항암성, 진정성 및 항우울성 특성을 나타냈다. 본 개시내용의 측면에 따라서, 퀴녹살린의 교차 결합제로서 작용하는 능력은 특정 눈 치료를 위해 상기의 다른 이점, 예를 들어 항박테리아성 또는 살진균성 특징과 함께 이용될 수 있다. 합성 및 스크리닝 연구 그룹의 공동 연구가 지속적으로 수행되어 다양한 생물 활성 퀴녹살린이 개발되었다. 그에 따라, 퀴녹살린 1,4-디옥시드는 항박테리아성을 나타냈고 퀴녹살린-2,3-디티온 시클릭 디티오-카르보네이트 (모레스탄) 및 트리티오카르보네이트 (에라독스) (도 61에 도시됨)는 살진균성 및 살충성 효과를 나타냈다. 2,3,7-트리클로로-6-메틸솔파모일 퀴녹살린은 항암제로서 특허를 받았다. 2-페닐-3-피페리디노 퀴녹살린 및 그의 유도체 일부는 선택적 세포제이다.

[0214] **올라퀸독스를 이용한 교차 결합**

[0215] 올라퀸독스 (N-(2-히드록시에틸)-3-메틸-2-퀴녹살린카르복사아미드 1,4-디옥시드) (베트라날(VETRANAL)TM)는 항 박테리아성 특징을 갖기 때문에, 1975년 이래로 가축을 위한 성장 촉진제로서 사용되어 왔다. 올라퀸독스는 퀴 녹살린의 대표 그룹과 관련 있다. 시판되는 제제는 제조하는 중에 가루를 감소시키기 위해 1.5% 글리세릴 폴리 에틸렌글리콜 리시놀레이트와 함께 탄산칼슘 담체 중에 활성 성분으로서 10% 올라퀸독스를 함유한다. 공급물 중의 올라퀸독스의 농도는 일반적으로 50 ppm이다. 인간 혈청 알부민의 존재 하에 조사하면, 올라퀸독스는 20 초 이내에 완전히 사라지고; N-모녹시드가 형성되며 개질된 알부민이 등전점 맞춤 및 전기영동 시스템에서 변경 된 특성을 갖는다. 하기 연구는 올라퀸독스의 교차 결합 능력을 평가하였다.

[0216] A. 재료 및 방법

[0217] 염수로 세정한 돼지 눈이 도살장 (미국 아이오와주 수시티에 소재하는 수프럼)으로부터 얼음 포장하여 밤새 운 송되었다. 눈을 세척하고 상피를 제거하였다. 눈을 그 위에 용액을 유지하기 위해 고무 링을 사용하여 37℃로 설정된 인큐베이터에서 PBS 중의 0.4% 올라퀸독스로 20분 동안 침지시켰다. 일부 눈은 연속 UVA 광선을 공기 중에서 조사하였고, 일부 눈은 조사 전에 인큐베이션 챔버에서 2분 동안 약간의 산소 스트림 하에 비커에 넣어 두었다. 각막 전체에 365 nm 광원 (UV LED NCSU033B[T]; 일본 도쿠시마에 소재하는 니치아 캄파니)으로부터, 선택된 방사조도 (30 mW/cm^2 , 1초 온 : 1초 오프의 펄스를 가짐)에서, 4분 또는 8분 동안 탑 햇 빔 (3%의 실효 값)으로 조사하였다. UV 방사조도는 각막 표면에서 출력 센서 (모델 PD-300-UV; 이스라엘 예루살렘에 소재하는 오피르, 인크.)로 측정되었다. 각막 절편 (대략 200 μm 의 두께)을 인트라레이스 펄스 레이저 (미국 캘리포니아주 산타아나에 소재하는 애보트 메디칼 옵틱스)를 이용하여 눈으로부터 절제하였다. 각막 절편의 평균 두께를 초음파 각막두께 측정기 (미국 펜실베이니아주 엑스턴에 소재하는 디지에이치 테크놀로지)를 이용하여 눈에서 절제한 전후의 측정값 차이로서 계산하였다. 절편을 3 mm의 폭으로 이격된 5개의 타인을 갖는 바이오레이크 부 착을 이용하여 이축 장력계 (셀스케일 바이오테스터 5000, 캐나다 온타리오주 워털루)에 위치시켰다. 각각의 샘플을 샘플이 파열될 때까지 37℃의 염수 중에서 4 $\mu\text{m/s}$ 의 일정한 속도로 신장시켰다. 절편을 증류수로 2번 세척하고, 필터지로 건조시키고, dH₂O로 2번 세척한 다음, 중량 변화가 10% 미만이 될 때까지 진공에서 건조시켰다 (로터리 베인 진공 펌프 RV3 A652-01-903, 영국 웨스트 서섹스에 소재하는 비오씨 에드워즈). 각각의 절편을 파파인 완충액 [BBBS (pH 7.0-7.2), 2 mM L-시스테인 및 2 mM EDTA] 1 ml 중의 2.5 단위/ml의 파파인 (파 파야 유액으로부터 얻음, 시그마)으로 2.5시간 동안 65℃에서 소화시켰다. 파파인 소화물을 2200xG로 5초 동안 원심분리하고 (미니 원심분리기 05-090-100, 피셔 사이언티픽), 1XBBBS로 0.5배 희석시키고, 용액의 형광을 QM-40 분광형광계 (캐나다 온타리오주 런던에 소재하는 포톤 테크놀로지 인터내셔널)로 $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ 의 여기에서 측정하였다. 조직의 부재 하에 형광을 측정하고 이 값을 샘플의 형광에서 뺀으로써 파파인 완충액의 형광을 고려하였다.

[0218] B. 결과/결론

[0219] 도 24는 대조군 (1)과 비교하여, 4분 동안 30 mW/cm^2 (CW)를 조사하고 (2), 또한 O₂ 하에 8분 (1초 온 : 1초 오프) 동안 펄스형 UVA 광선 30 mW/cm^2 를 조사한 (3), PBS 중의 0.4% 올라퀸독스로 침지된 200 μm 두께의 각막 절편의 이축 장력측정을 도해한다.

[0220] 도 25는 PBS 중의 0.4% 올라퀸독스로 교차 결합된 절편에 대하여 450 nm에서 기록된 상대 형광을 도해한다: (1) 비-조사 대조군; (2) 4분 동안 연속적으로 (CW) 30 mW/cm^2 조사; 및 (3) O₂ 하에 8분 (1초 온 : 1초 오프) 동안 펄스형 UVA 광선 30 mW/cm^2 조사.

[0221] UVA 노출 후에, 각막 콜라겐은 보다 보강되고 450 nm에서 형광을 획득한다. 그러므로, 올라퀸독스는 효과적인 수용성 교차 결합제이다.

[0222] **리보플라빈 및 엽산을 이용한 교차 결합**

[0223] 도 16에 도시된 엽산 (FA), 또는 비타민 B₉은 특별히 미국 식품의약국에 의해 21 CFR § 172.345(f) 하에 안전한 의료 식품 성분이라 인정된다. FA 자체는 강력한 형광을 갖지 않으며, 일중항 산소의 형성을 효율적으로 감 작화하지 않는다 (아마도 비효율적인 항간 교차를 유도하는 일중항 여기 상태의 비복사 불활성화에 의해 내부 형광 켄칭에 p-아미노벤조일글루타메이트 치환기가 포함된 것 때문인 것 같음). 그러나, UV 조사가 FA의 산화

를 초래하여, 6-포르밀프테린 및 그 후에 도 17에 도시된 프테린-6-카르복실산 (PCA)의 형성을 유도한다.

[0224] PCA는 효율적인 광감작제이며 일중항 산소의 발생인자이다. 따라서, FA와 PCA가 둘다 콜라겐 교차 결합을 발생시킬 수 있다. 리보플라빈의 첨가가 FA의 산화를 현저히 증폭시키면서, 대부분의 리보플라빈은 분해되지 않은 채로 남아있기 때문에, FA는 리보플라빈과 조합되어 사용될 수 있다.

[0225] FA는 pH 및 온도에 따라 수중에서 가용성이다. 예를 들어, 하기 연구에서, 포스페이트 완충액에서의 그의 용해도는 25℃에서 5.5 mg/ml이며, 최종 용액의 pH는 7.0이었다. FA는 400 nm 이하에서 UV 광선 흡광도를 가지며 (도 18에 도시된 바와 같이 360 nm에서 장파 피크), 460 nm 주위에서 최대값을 갖는 형광을 갖는다 (도 19에 도시됨). 도 20은 포스페이트 완충액 중의 FA 농도의 함수로서 360 nm에서의 FA의 흡광도를 도시한다.

[0226] A. 재료 및 방법

[0227] 염수로 세정한 돼지 눈이 도살장 (미국 아이오와주 수시티에 소재하는 수프림)으로부터 얼음 포장하여 밤새 운송되었다. 눈을 세척하고 상피를 제거하였다. 소듐 포스페이트 완충액 (pH 7.6, 증류수 중의 소듐 포스페이트 일염기성, 소듐 포스페이트 이염기성 및 소듐 클로라이드로 제조됨)을 모든 용액을 위한 완충액으로서 사용하였다. 리보플라빈 용액, FA 용액 및 이들의 혼합물의 최종 pH 값은 7.3-7.4의 범위에 있었다. 눈을 그 위에 용액을 유지하기 위해 고무 링을 사용하여 37℃로 설정된 인큐베이터에서 0.1% FA, 0.1% 리보플라빈 또는 0.1% FA + 0.1% 리보플라빈으로 20분 동안 침지시켰다. 눈을 조사 전에 인큐베이션 챔버에서 2분 동안 순수 산소가 충전되는 비커에 넣어 두었다. 각막 전체에 365 nm 광원 (UV LED NCSU033B[T]; 일본 도쿠시마에 소재하는 니치아 캄파니)으로부터, 각막 표면에서 출력 센서 (모델 PD-300-UV; 이스라엘 예루살렘에 소재하는 오피르, 인크.)로 측정되는 선택된 방사조도 (30 mW/cm^2 , 1초 온 : 1초 오프의 펄스를 가짐)에서, 8분 동안 탐 햇 빔 (3%의 실효값)으로 조사하였다. 각막 절편 (대략 200 μm 의 두께)을 인트라레이스 펄스 레이저 (미국 캘리포니아주 산타 아나에 소재하는 애보트 메디칼 옵틱스)를 이용하여 눈으로부터 절제하였다. 각막 절편의 평균 두께를 초음파 각막두께 측정기 (미국 펜실베이니아주 엑스톤에 소재하는 디지이치 테크놀로지)를 이용하여 눈에서 절제한 전후의 측정값 차이로서 계산하였다. 절편을 3 mm의 폭으로 이격된 5개의 타인을 갖는 바이오레이크 부착을 이용하여 이축 장력계 (셀스케일 바이오테스터 5000, 캐나다 온타리오주 워털루)에 위치시켰다. 각각의 샘플을 샘플이 파열될 때까지 37℃의 염수 중에서 4 $\mu\text{m/s}$ 의 일정한 속도로 신장시켰다. 절편을 증류수로 2번 세척하고, 필터지로 건조시키고, dH₂O로 2번 세척한 다음, 중량 변화가 10% 미만일 때까지 진공에서 건조시켰다 (로터리 베인 진공 펌프 RV3 A652-01-903, 영국 웨스트 서섹스에 소재하는 비오씨 에드워즈). 각각의 절편을 파파인 완충액 [BBBS (pH 7.0-7.2), 2 mM L-시스테인 및 2 mM EDTA] 1 ml 중의 2.5 단위/ml의 파파인 (파파야 유액으로부터 얻음, 시그마)으로 2.5시간 동안 65℃에서 소화시켰다. 파파인 소화물을 2200xG로 5초 동안 원심분리하고 (미니 원심분리기 05-090-100, 피셔 사이언티픽), 1XBBS로 0.5배 희석시키고, 용액의 형광을 QM-40 분광형광계 (캐나다 온타리오주 런던에 소재하는 포톤 테크놀로지 인터내셔널)로 $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ 의 여기에서 측정하였다. 조직의 부재 하에 형광을 측정하고 이 값을 샘플의 형광에서 뺄으로써 파파인 완충액의 형광을 고려하였다.

[0228] B. 결과/결론

[0229] 도 21은 각막 샘플의 변위 vs. 힘 곡선을 도해하는데, 이때 UV 노출은 총 8분 동안 1초 온 : 1초 오프의 펄스를 갖는 365 nm에서의 30 mW/cm^2 에 의한 것이고 각막 위에 산소 분위기를 갖는다: (1) UV 광선 비노출; (2) 0.1% 리보플라빈, UV 광선 노출; (3) 0.1% FA, UV 광선 노출; 및 (4) 0.1% 리보플라빈과 0.1% FA의 혼합물, UV 광선 노출.

[0230] 도 22는 파파인에 의한 소화 후의 각막 샘플의 형광 (360 nm에서의 여기)을 도해하는데, 이때 UV 노출은 총 8분 동안 1초 온 : 1초 오프의 펄스를 갖는 365 nm에서의 30 mW/cm^2 에 의한 것이고 각막 위에 산소 분위기를 갖는다: (1) UV 광선 비노출; (2) 0.1% 리보플라빈, UV 광선 노출; (3) 0.1% FA, UV 광선 노출; 및 (4) 0.1% 리보플라빈과 0.1% FA의 혼합물, UV 광선 노출.

[0231] 도 21에 도시된 바와 같이, 각막 콜라겐의 UV 광선 노출 효과는 연구 용액 (0.1% 리보플라빈, 0.1% FA, 및 0.1% 리보플라빈과 0.1% FA의 혼합물)의 3개 그룹 모두에 대하여 매우 유사하였다. 비노출 대조군과 비교하였을 때, 용액으로의 침지 및 그 후의 UV 노출은 각막 샘플의 유의한 보강을 유도하였다. 도 22는 교차 결합된 콜라겐 샘플의 형광이 UV에 노출되지 않은 대조군 샘플과 비교하여 증가하였음을 보여준다.

[0232] 상기에 기재된 바와 같이, FA가 또한 주요 교차 결합제 (리보플라빈 부재)로서 사용될 수 있다는 것이

고려된다.

[0233] C. 추가 실험

[0234] FA가 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈 (아베드로® 포트렉사 ZD™로 이용가능함)을 함유하는 제제 용액에 용해되었을 때 추가 실험을 수행하였다. 도 23은 각막 샘플 (두께: 300 μm , 각 그룹에 3개의 샘플)의 변위 vs. 힘 곡선을 도해하는데, 이때 UV 노출은 총 8분 동안 1초 온 : 1초 오프의 펄스를 갖는 365 nm에서의 30 mW/cm^2 에 의한 것이고 각막 위에 산소 분위기를 갖는다: (1) UV 광선에 노출되지 않은 대조군; (2) 완충액 중의 0.1% FA, UV 광선 노출; (3) 완충 염수 용액 중의 0.1% 리보플라빈, UV 광선 노출; 및 (4) 완충 염수 용액 중의 0.1% FA와 0.1% 리보플라빈의 혼합물, UV 광선 노출.

[0235] 다른 교차 결합제

[0236] 약물 클로로퀸, 히드록시클로로퀸, 퀴닌, 및 디부카인은 수용액 중에서, 예를 들어 365 nm의 UV 광선 조사에 의해 광감작 능력을 가질 수 있다. 클로로퀸, 히드록시클로로퀸, 및 퀴닌은 퀴놀린의 대표 그룹과 관련 있다. 본 개시내용의 측면에 따라서, 이들 약물은 그의 광감작 능력으로 인해 각막 치료에서 교차 결합제로서 도포될 수 있다.

[0237] 도 62에 도시된 메토티렉세이트는 특정 압 및 염증 질환, 예컨대 류마티스 관절염 및 포도막염의 치료를 위해 사용되어 온 면역억제성 의약의 일반명이다. FA와 마찬가지로, MTX도 360 nm에서 유의한 UV 광선 흡광도를 갖는다. 가능한 콜라겐 교차 결합제로서 MTX를 사용한다는 발상은 토끼의 눈 결합조직에서 측정된 MTX 광감작 특성에 대한 데이터로부터 유래한다.

[0238] 티미딘의 분명한 UVA-광감작이 도 63에 도시된 메나디온 (비타민 K₃)에서 관찰되었고, 광산화 생성물로서 5,6-디히드록시-5,6-디히드로티미딘의 형성이 삼중항 상태의 메나디온과 티미딘 사이의 단일 전자 전달 반응 후에 발생한다. 메나디온은 UVA 광감작제일 수 있고, 따라서 콜라겐을 위한 교차 결합제일 수 있다.

[0239] 이와 같이, 교차 결합 치료법을 위한 다양한 작용제 및 첨가제가 연구에서 확인되고 개시되었다. 다양한 작용제 및 첨가제의 특징이 눈의 교차 결합 치료법에서 도포되는 제제에 유리하게 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리보플라빈은 철(II)과 조합되어 리보플라빈에 의해 발생하는 교차 결합 작용을 향상시킨다. 다른 실시양태에서, 교차 결합 치료법은 철(II) 용액을 과산화수소 예비-침지와 조합하여 이용한다. 또 다른 실시양태에서, 2,3-부탄디온은 광감작제, 예컨대 리보플라빈을 이용한 각막 교차 결합 효과를 증가시키기 위해 이용된다. 추가 실시양태에서, 엽산은 광감작제, 예컨대 리보플라빈과 조합 이용되어 교차 결합 작용을 향상시킨다. 또 다른 추가 실시양태에서, 2,3-부탄디온, 엽산, 퀴놀살린, 퀴놀린, 디부카인, 메토티렉세이트, 메나디온, 또는 이들의 유도체가 교차 결합제로서 도포된다.

[0240] 상기에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 일부 측면에 따라서, 상기에 기재되었고 예시된 절차의 일부 단계 또는 모든 단계는 자동화되거나 또는 제어기 (예를 들어, 제어기(120))의 제어 하에 유도될 수 있다. 일반적으로, 제어기는 하드웨어 및 소프트웨어 요소와 조합되어 실행될 수 있다. 하드웨어 측면은 작동적으로 연결된 하드웨어 소자, 예를 들어 마이크로프로세서, 논리 회로, 커뮤니케이션/네트워크 포트, 디지털 필터, 메모리 또는 논리 회로의 조합을 포함할 수 있다. 제어기는 컴퓨터 판독가능한 매체에 저장가능한 컴퓨터-실행가능한 코드에 의해 특정된 작업을 수행하도록 적합화될 수 있다.

[0241] 상기에 기재된 바와 같이, 제어기는 소프트웨어 또는 저장 명령을 실행하는 프로그래밍가능한 프로세싱 장치, 예컨대 외부 재래식 컴퓨터 또는 내장형 필드 프로그램 가능 게이트 어레이 (FPGA) 또는 디지털 시그널 프로세서 (DSP)일 수 있다. 일반적으로, 임의의 프로세싱 또는 평가를 위해 본 개시내용의 실시양태에 의해 이용되는 물리적 프로세서 및/또는 기기는 컴퓨터 및 소프트웨어 기술분야의 통상의 기술자에게 이해되는 바와 같이, 본 개시내용의 예시 실시양태의 교시내용에 따라 프로그래밍가능한 1개 이상의 네트워크 또는 비-네트워크 범용 컴퓨터 시스템, 마이크로프로세서, 필드 프로그램 가능 게이트 어레이 (FPGA), 디지털 시그널 프로세서 (DSP), 마이크로제어기 등을 포함할 수 있다. 물리적 프로세서 및/또는 기기는 이미지 캡처 장치(들)와 외부 네트워킹될 수 있거나, 또는 이미지 캡처 장치 내에 위치하도록 통합될 수 있다. 적절한 소프트웨어는 소프트웨어 기술분야의 통상의 기술자에게 이해되는 바와 같이, 예시 실시양태의 교시내용에 따라 숙련된 프로그래머에 의해 용이하게 제작될 수 있다. 또한, 예시 실시양태의 장치 및 서브시스템은 전기 기술분야(들)의 통상의 기술자에게 이해되는 바와 같이, 주문형 집적 회로의 제작에 의해 또는 통상의 소자 회로의 적절한 네트워크 상호연결에 의해 실행될 수 있다. 따라서, 예시 실시양태는 하드웨어 회로 및/또는 소프트웨어의 임의의 특정 조합으로 제한

되지 않는다.

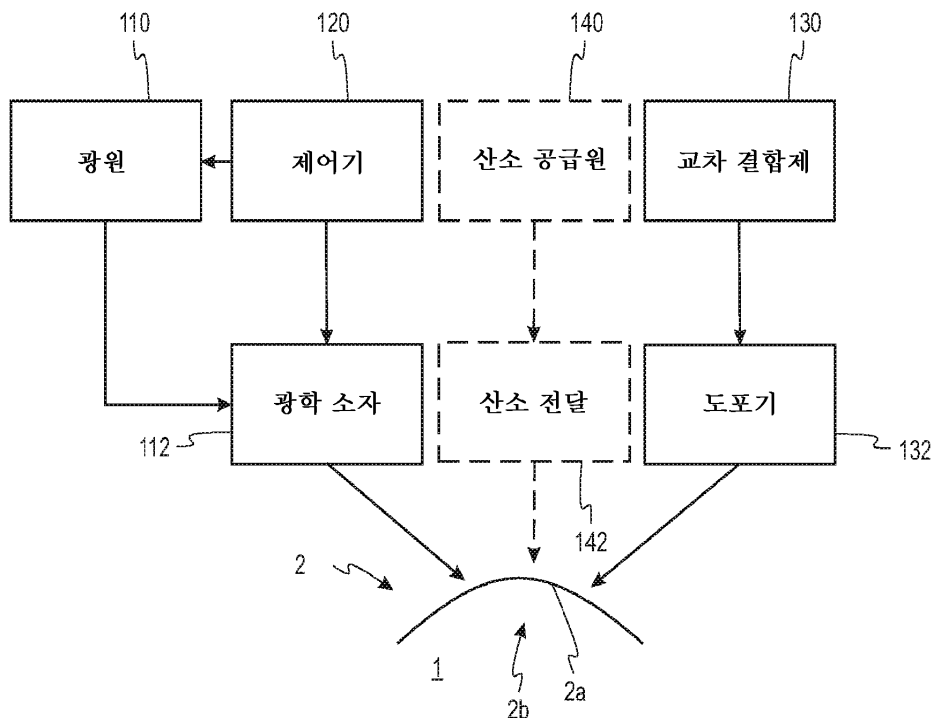
[0242] 본 개시내용의 예시 실시양태는 예시 실시양태의 장치 및 서브시스템을 제어하기 위한 소프트웨어, 예시 실시양태의 장치 및 서브시스템을 구동시키기 위한 소프트웨어, 예시 실시양태의 장치 및 서브시스템을 인간 사용자와 연결하기 위한 소프트웨어 등을, 컴퓨터 판독가능한 매체 중 어느 하나에 또는 이들의 조합에 저장하여 포함할 수 있다. 이러한 소프트웨어는 장치 드라이버, 펌웨어, 작동 시스템, 개발 툴, 응용 소프트웨어 등을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 이러한 컴퓨터 판독가능한 매체는 실행할 때 수행되는 프로세싱의 전부 또는 일부를 수행하기 위한 (프로세싱이 배포된 경우) 본 개시내용의 실시양태의 컴퓨터 프로그램 제품을 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용의 예시 실시양태의 컴퓨터 코드 장치는 스크립트, 해석 가능 프로그램, 동적 연결 라이브러리 (DLL), 자바(Java) 클래스 및 애플릿, 전체 실행 가능 프로그램 등을 비제한적으로 포함하는, 임의의 적합한 해석 또는 실행가능한 코드 메카니즘을 포함할 수 있다. 게다가, 본 개시내용의 예시 실시양태의 프로세싱 일부는 보다 나은 성능, 신뢰성, 비용 등을 위해 배포될 수 있다.

[0243] 컴퓨터-판독가능한 매체의 일반적인 형태는 예를 들어, 플로피 디스크, 플렉시블 디스크, 하드 디스크, 자기 테이프, 임의의 다른 적합한 자기 매체, CD-ROM, CDRW, DVD, 임의의 다른 적합한 광학 매체, 펀치 카드, 종이 테이프, 광학식 마크 시트, 구멍 또는 다른 광학적으로 인식가능한 표시정보의 패턴을 갖는 임의의 다른 적합한 물리적 매체, RAM, PROM, EPROM, FLASH-EPROM, 임의의 다른 적합한 메모리 칩 또는 카트리지, 반송파 또는 컴퓨터가 판독할 수 있는 임의의 다른 적합한 매체를 포함할 수 있다.

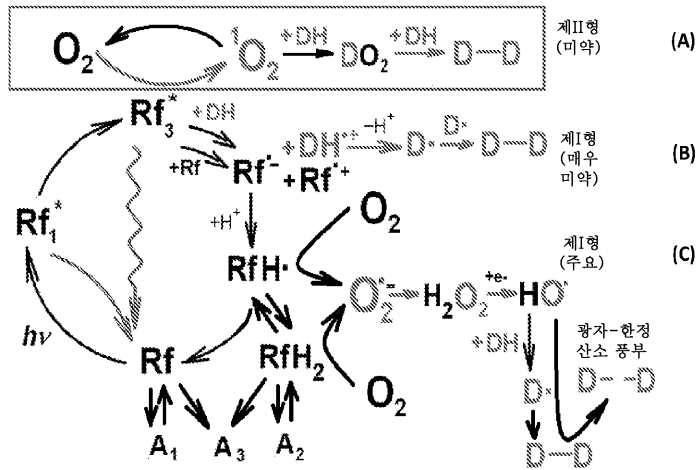
[0244] 본 개시내용이 하나 이상의 특정 실시양태와 관련하여 기재되었지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자라면 본 개시내용의 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 다수의 변화가 있을 수 있다는 것을 알 것이다. 각각의 이들 실시양태 및 그 명백한 변화는 본 개시내용의 취지 및 범주 내에 포함되는 것으로 고려된다. 또한, 본 개시내용의 측면에 따른 추가 실시양태는 본원에 기재된 임의의 실시양태로부터의 특징과 얼마든지 조합될 수 있는 것으로 고려된다.

도면

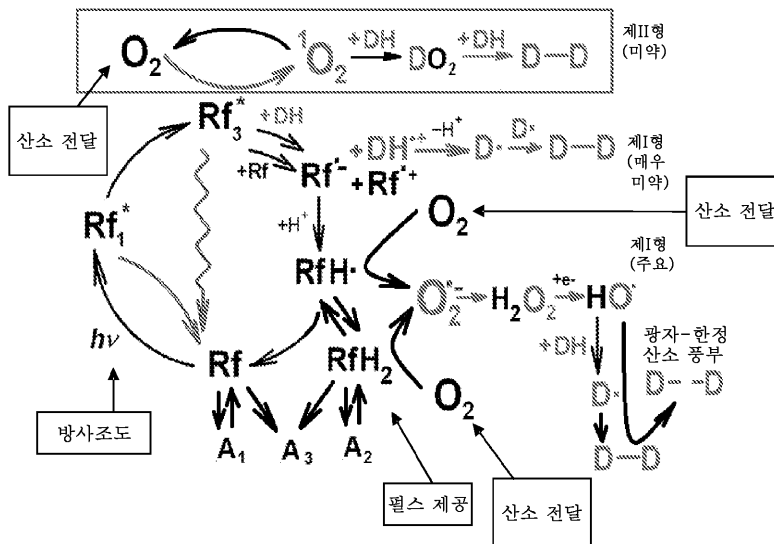
도면1



도면2

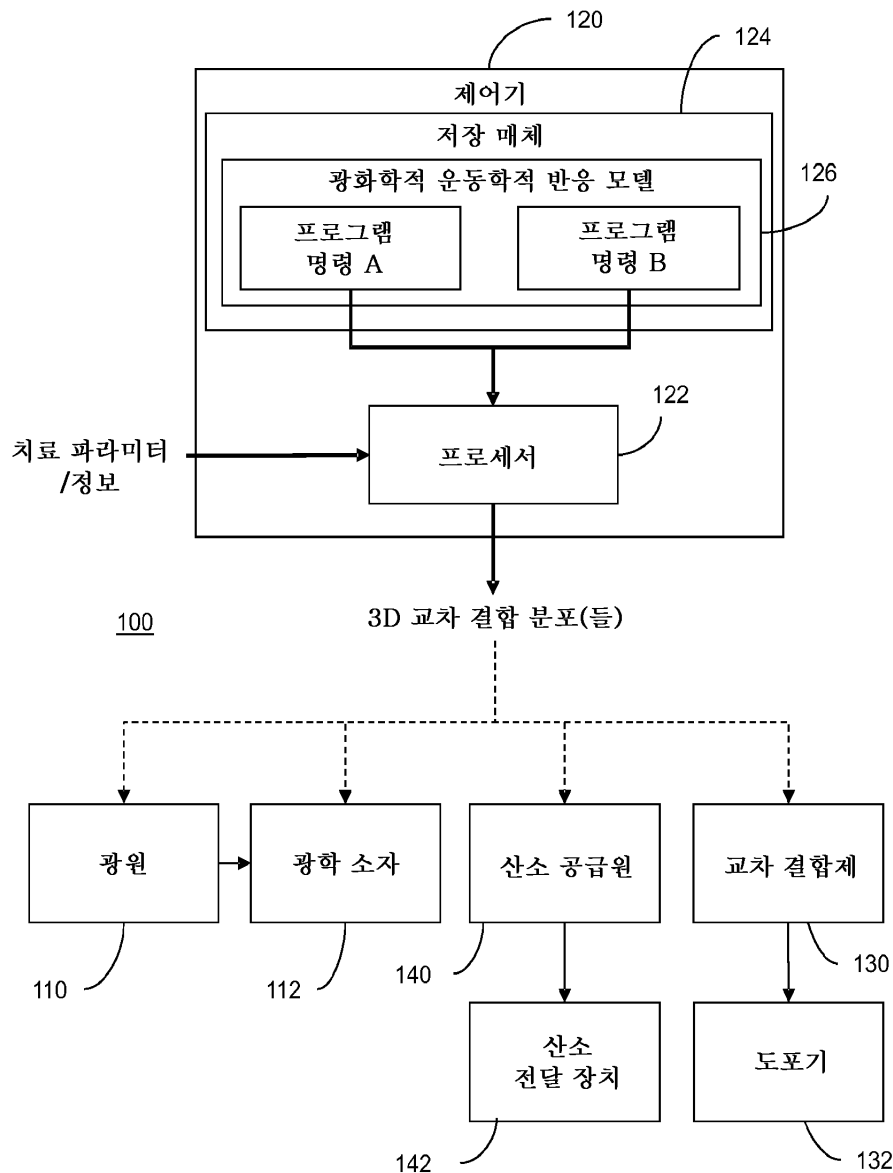


도 2A

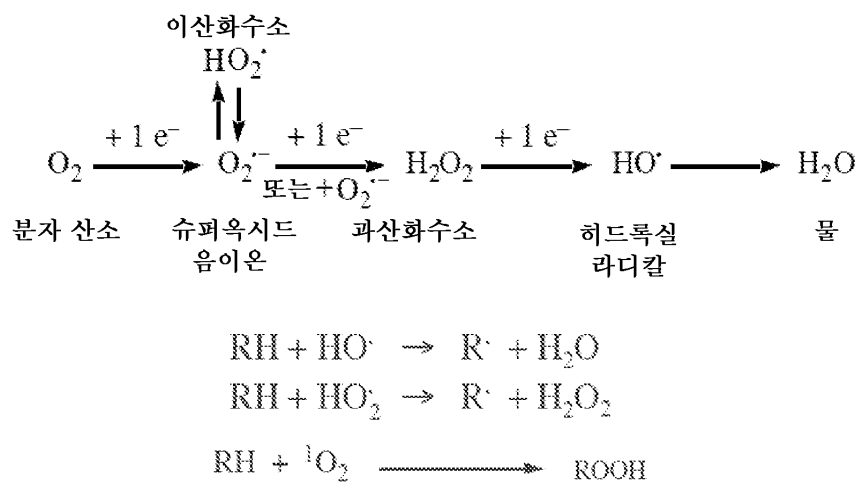


도 2B

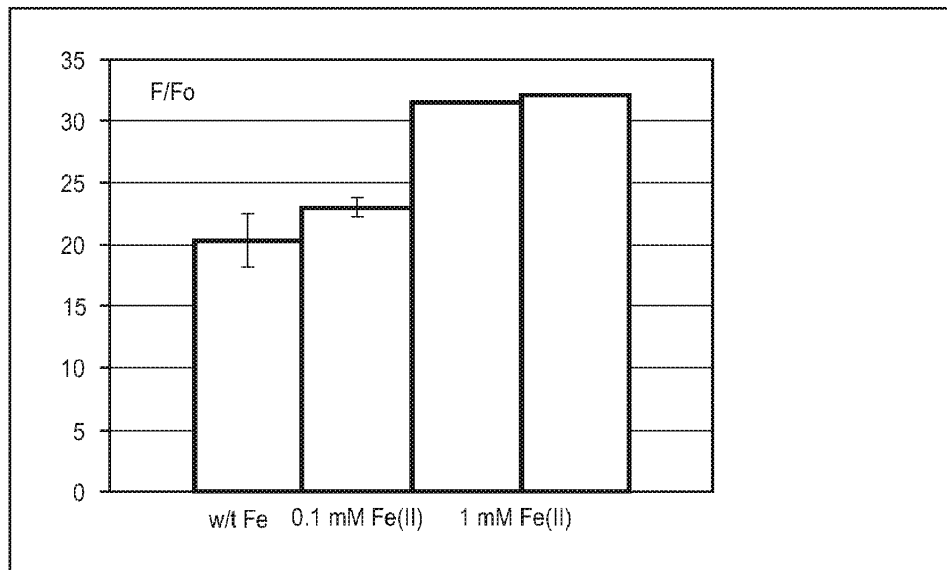
도면3



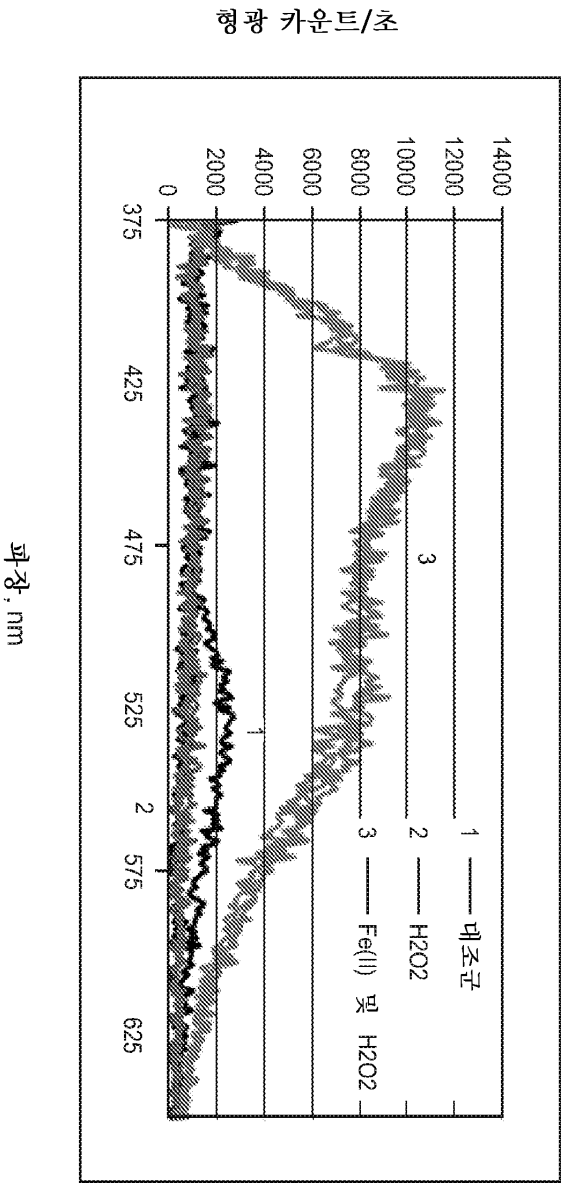
도면4



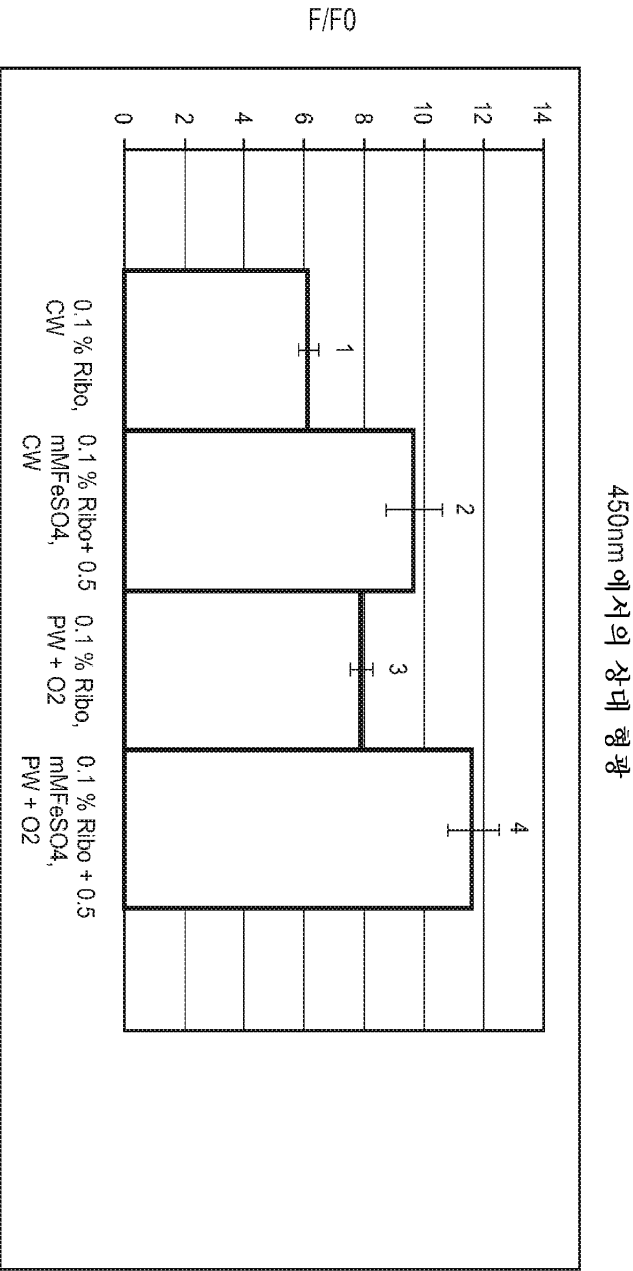
도면5



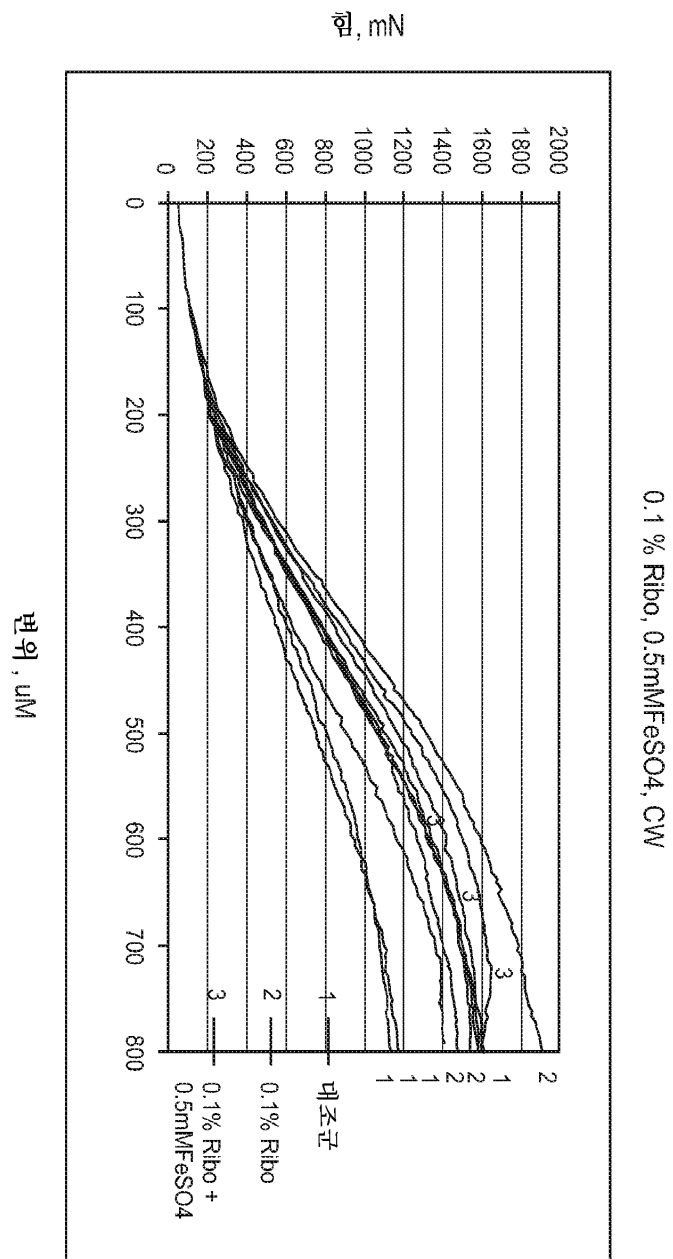
도면6



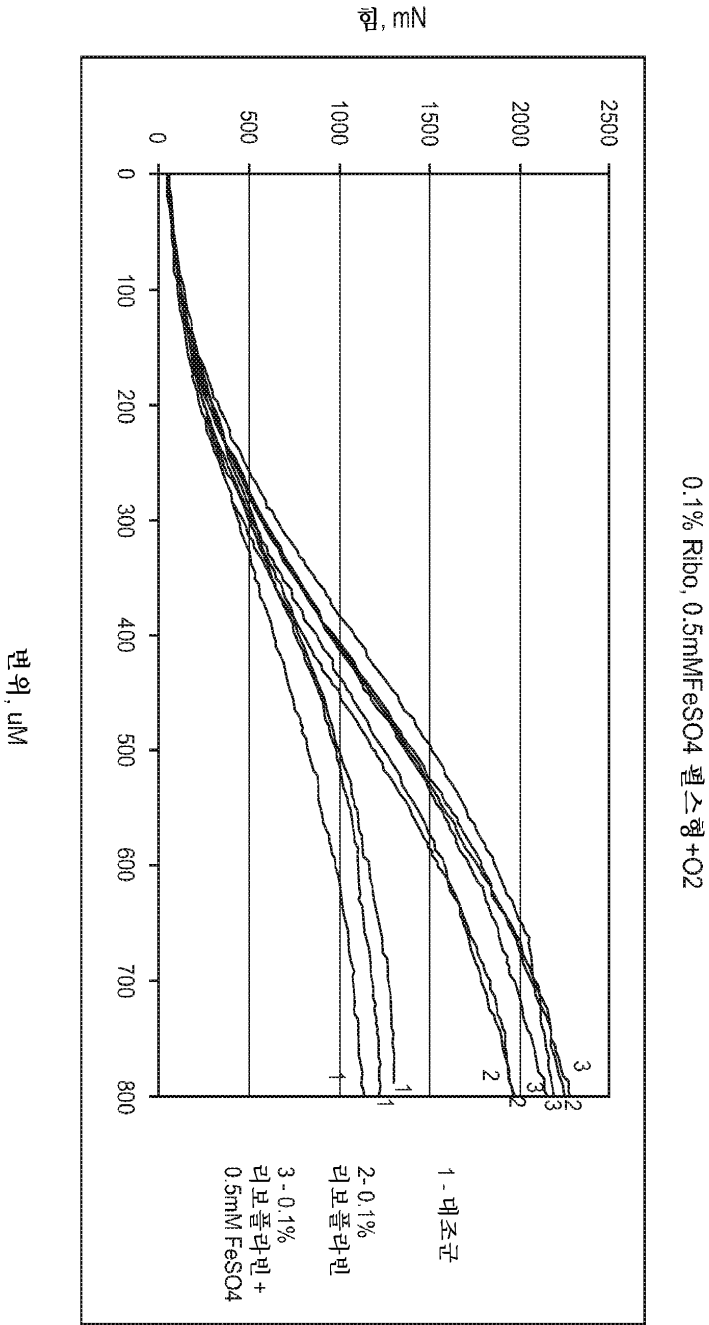
도면7



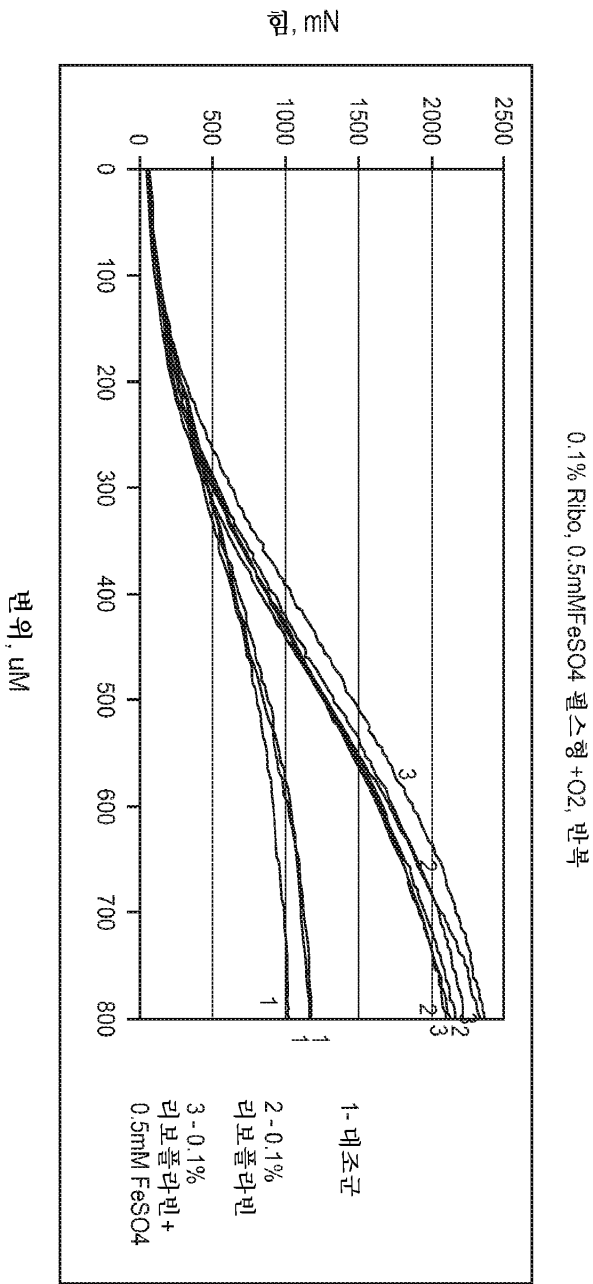
도면8



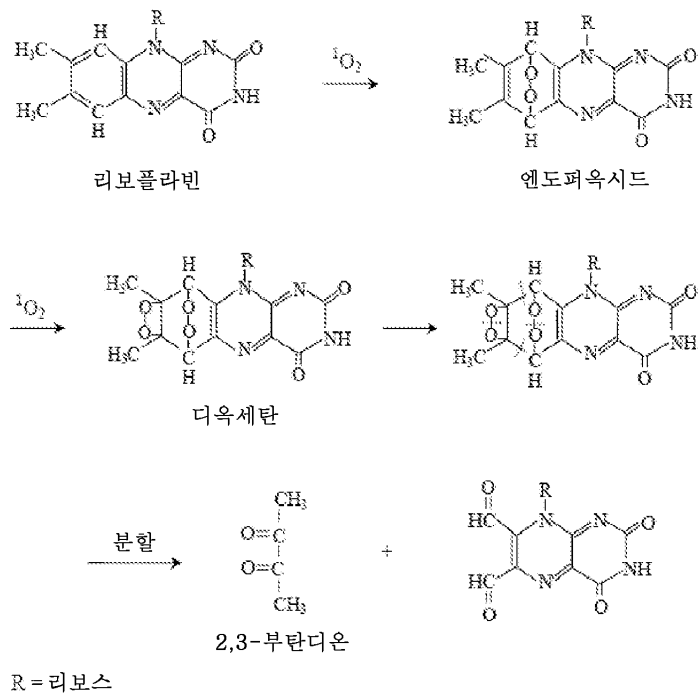
도면9



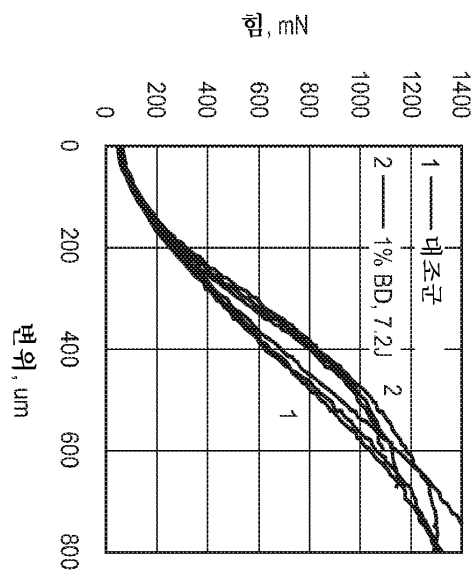
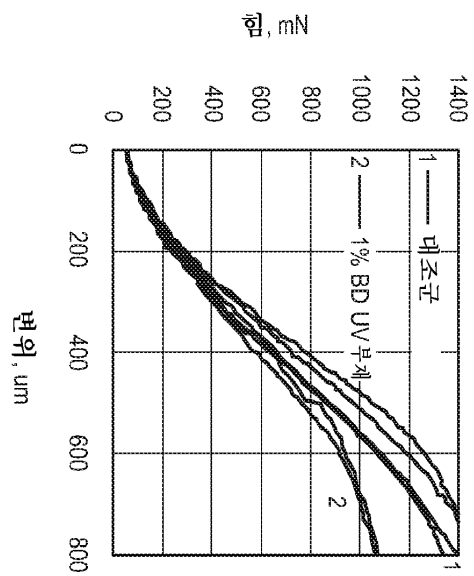
도면10



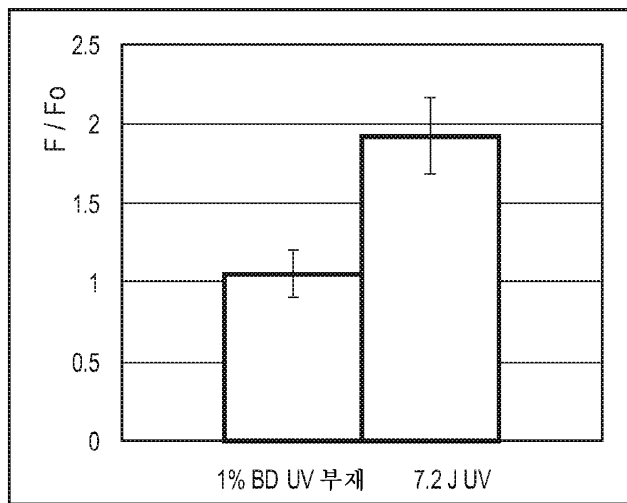
도면11



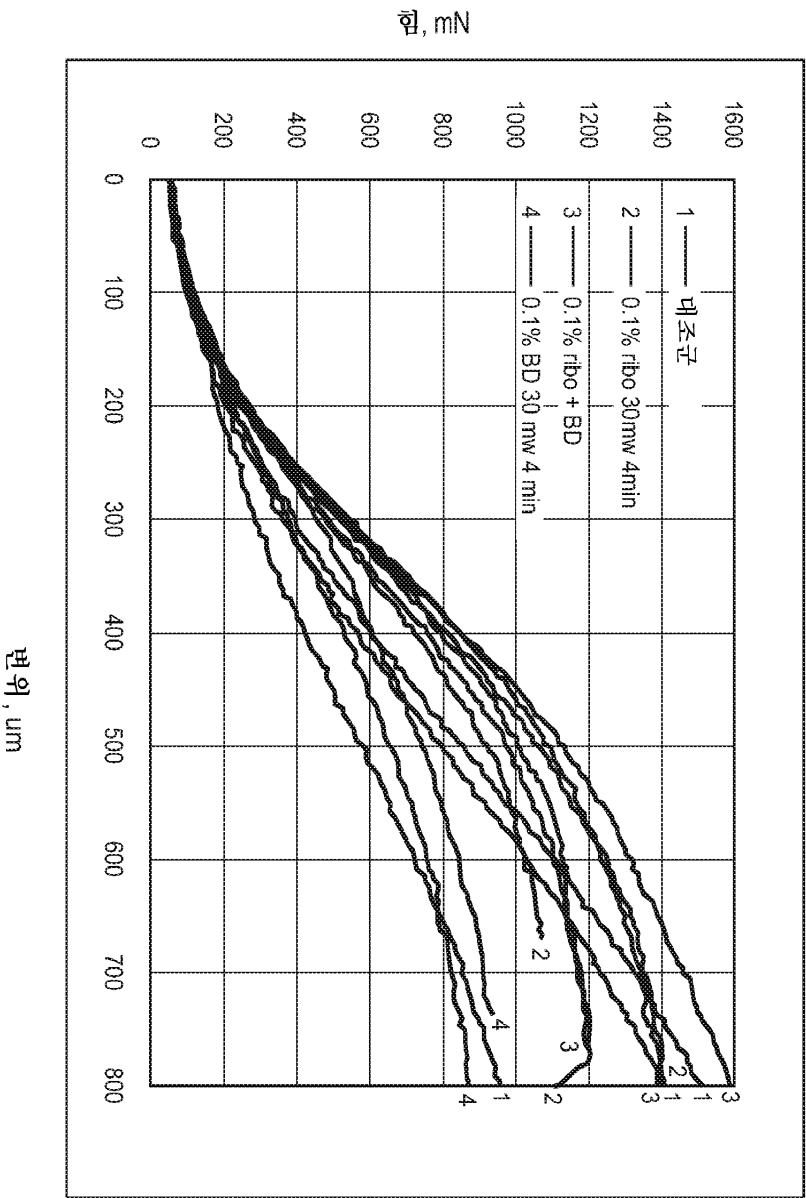
도면12



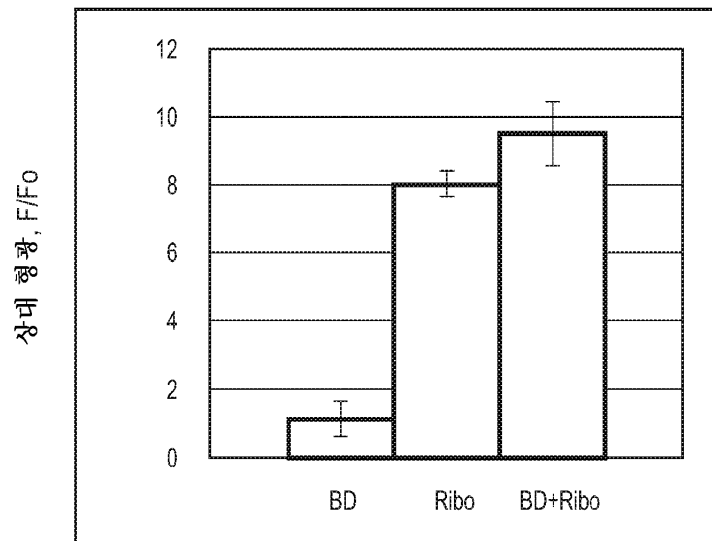
도면13



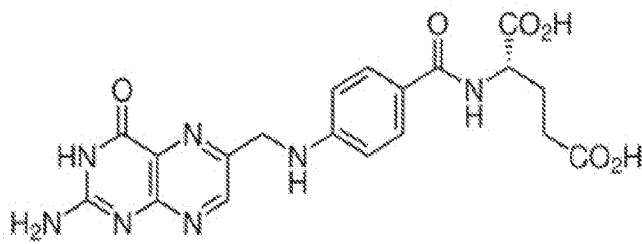
도면14



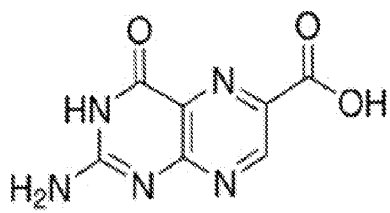
도면15



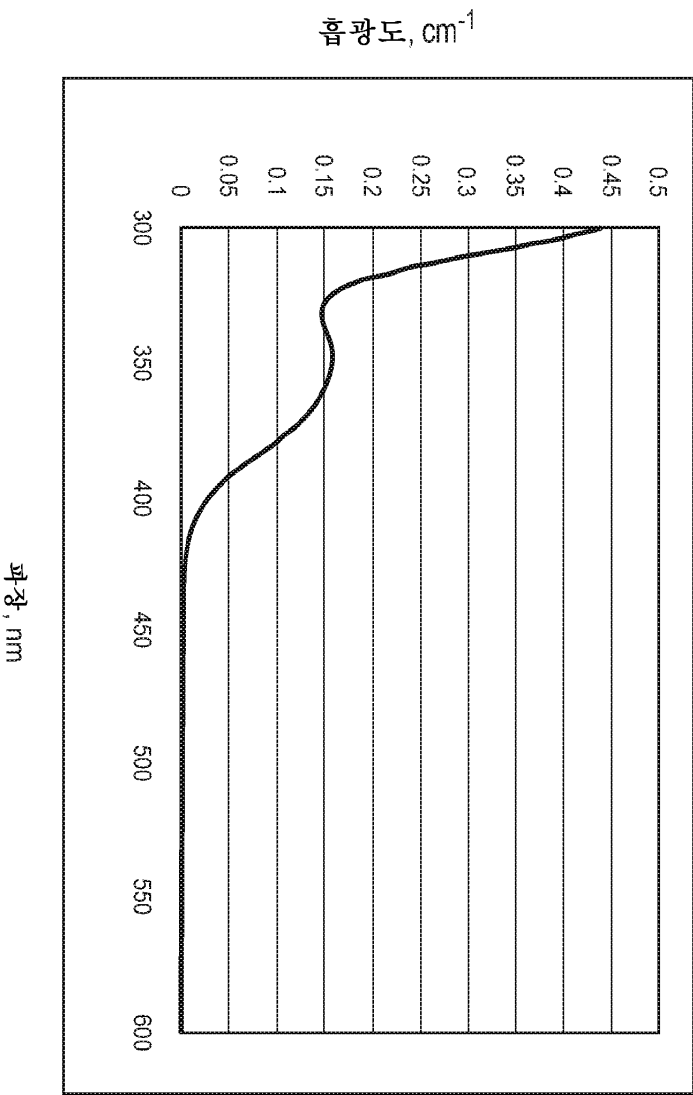
도면16



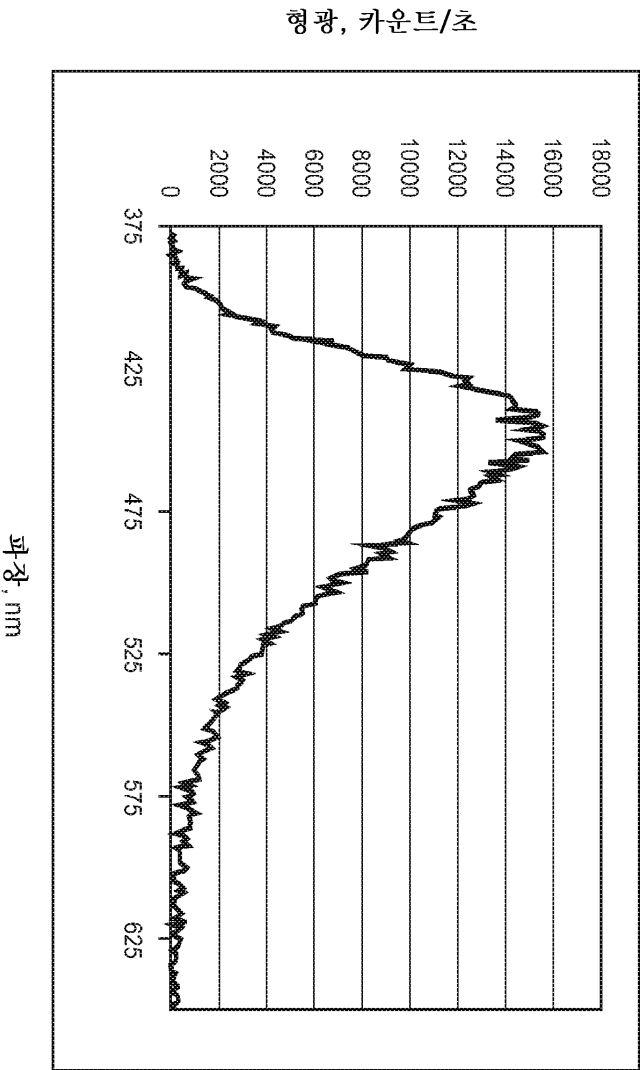
도면17



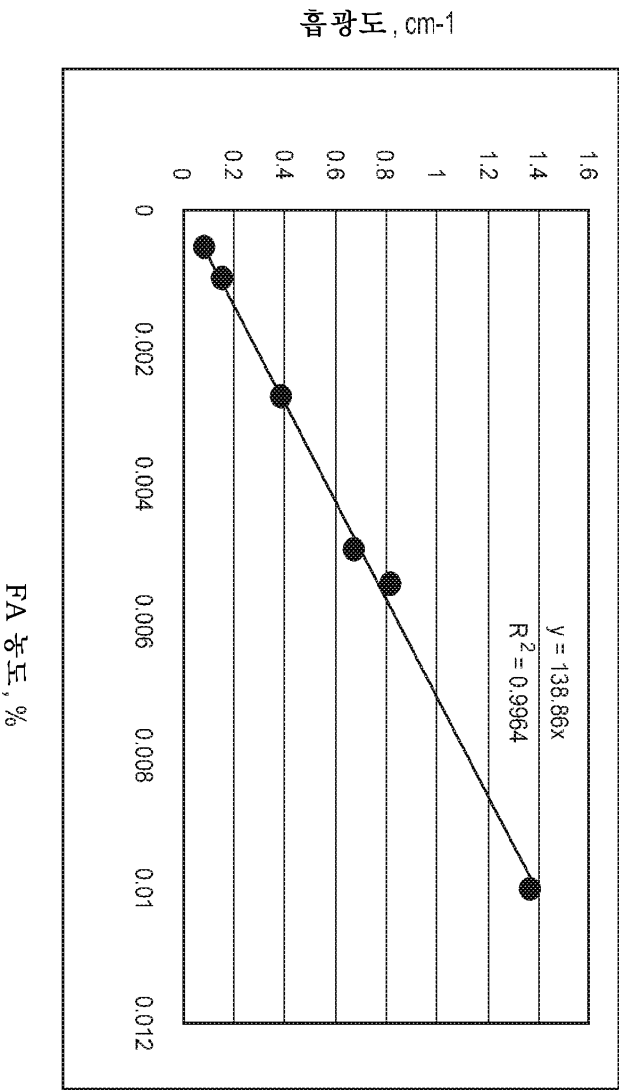
도면18



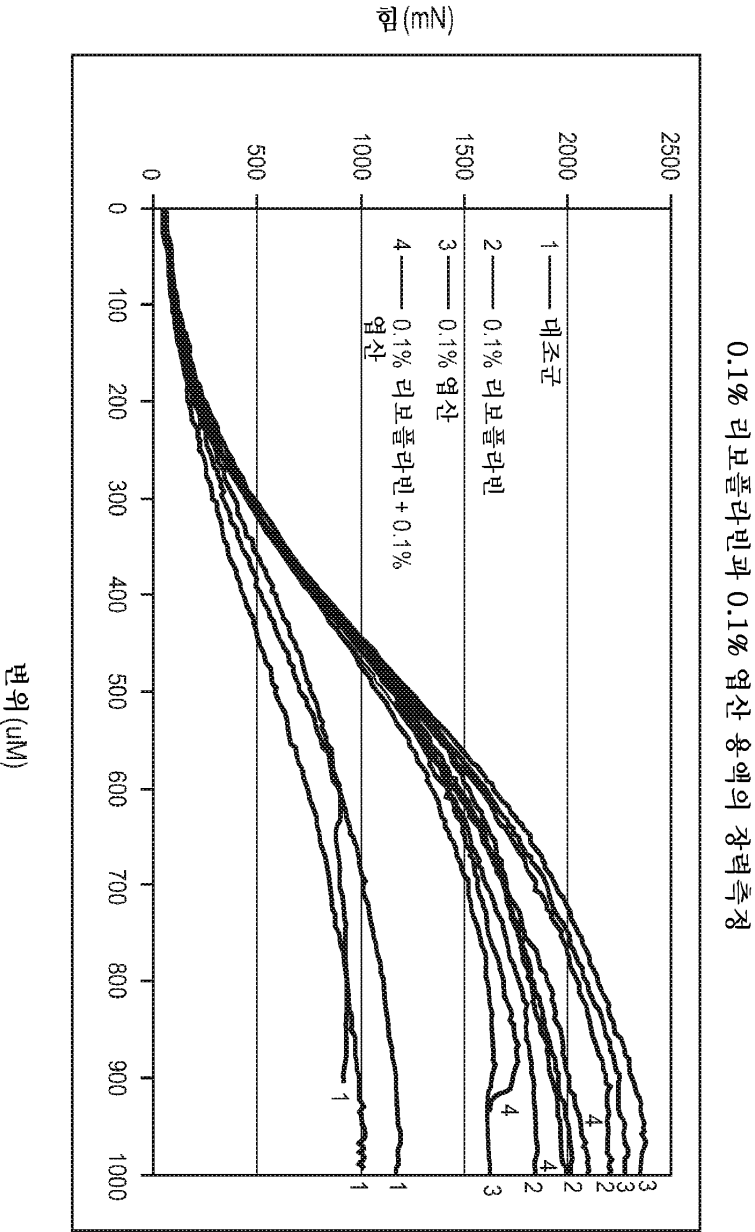
도면19



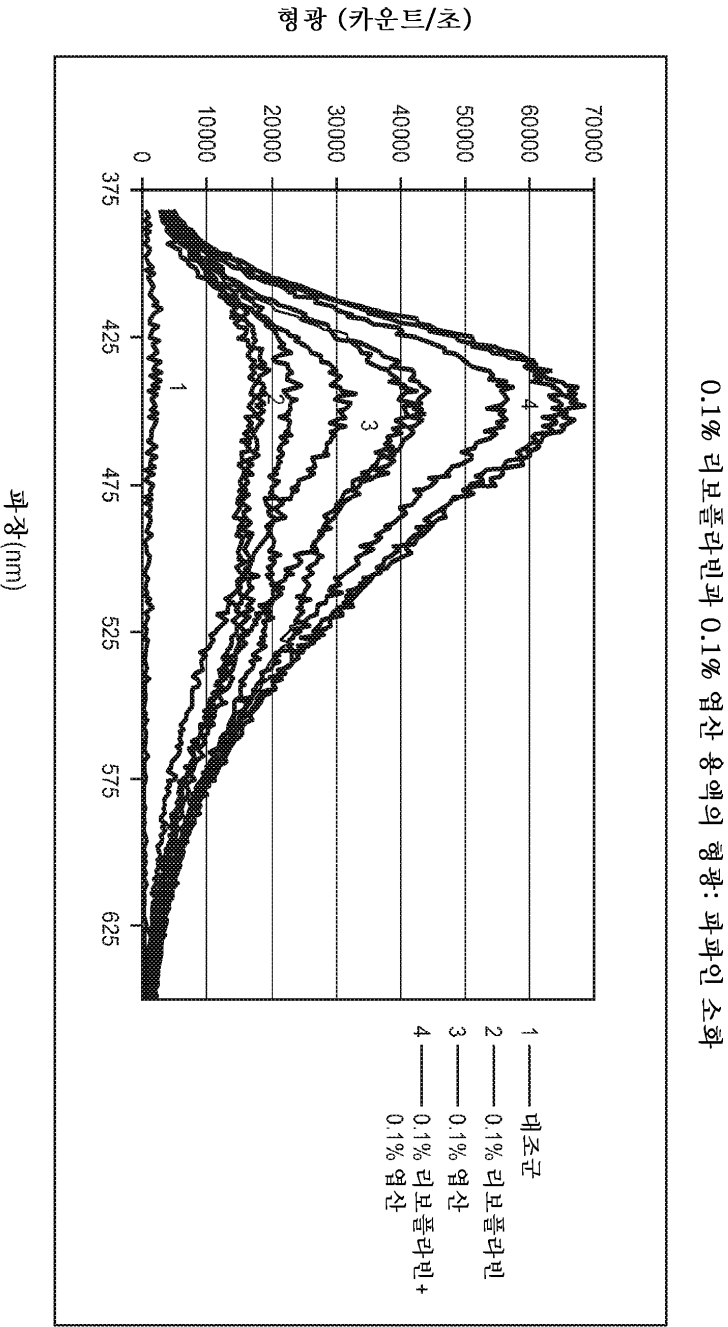
도면20



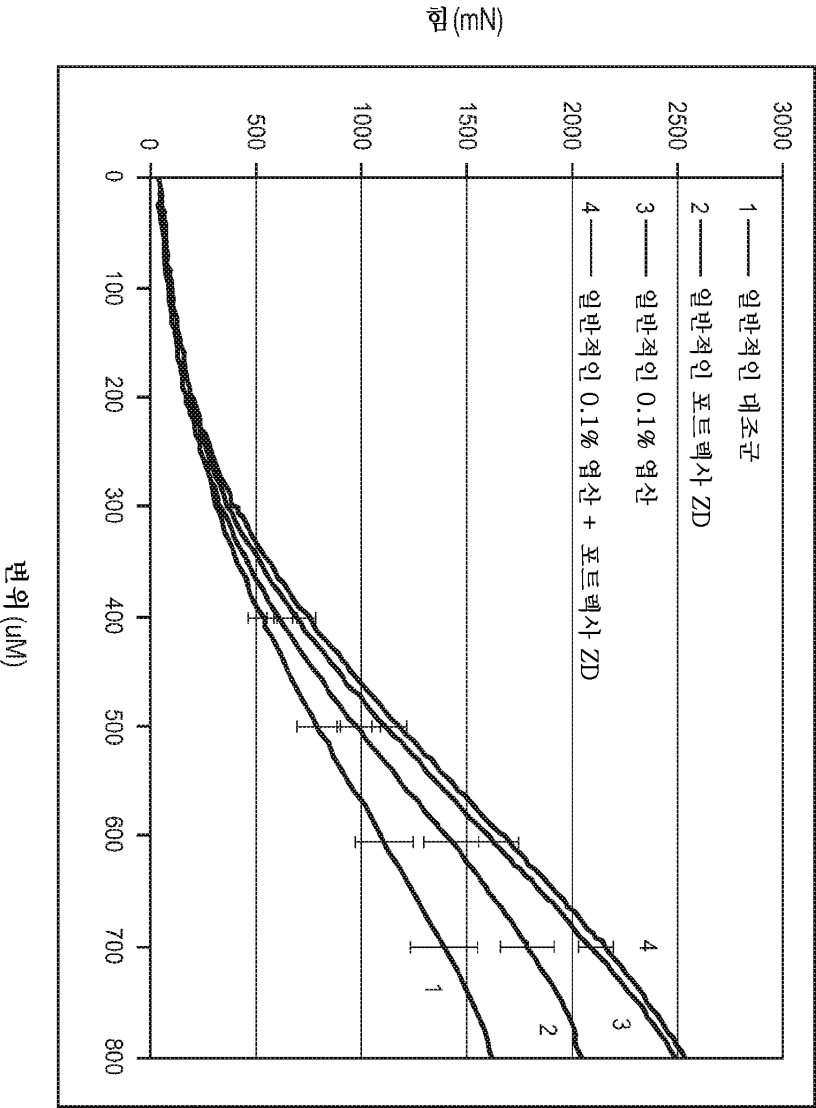
도면21



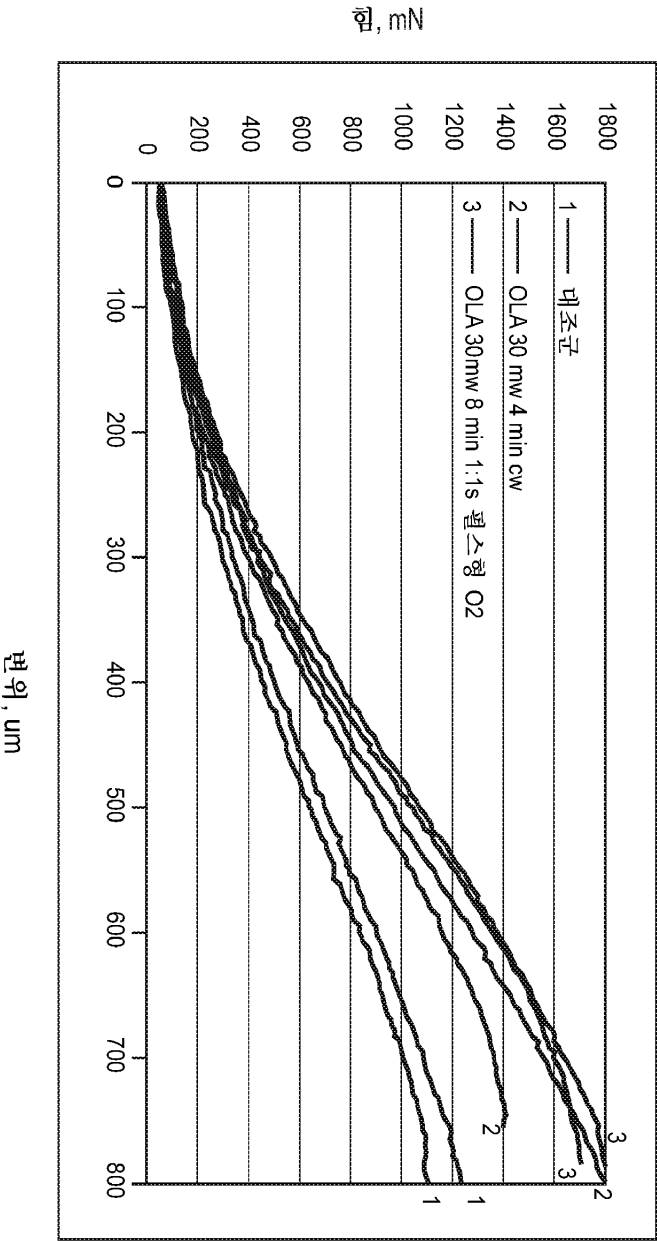
도면22



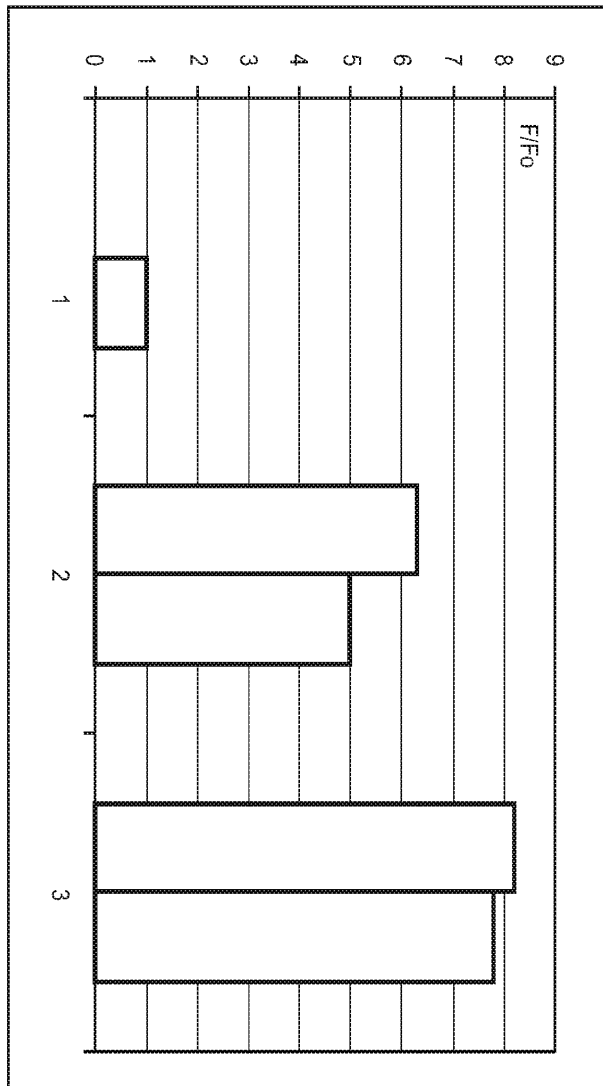
도면23



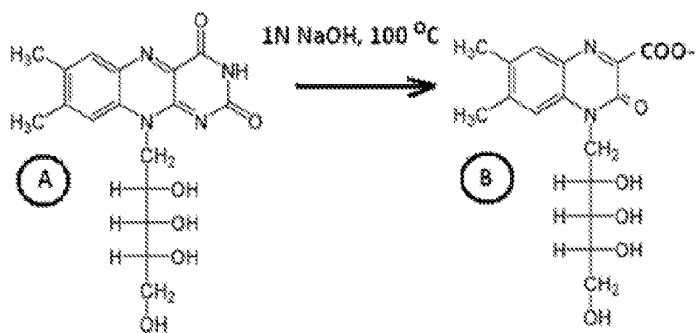
도면24



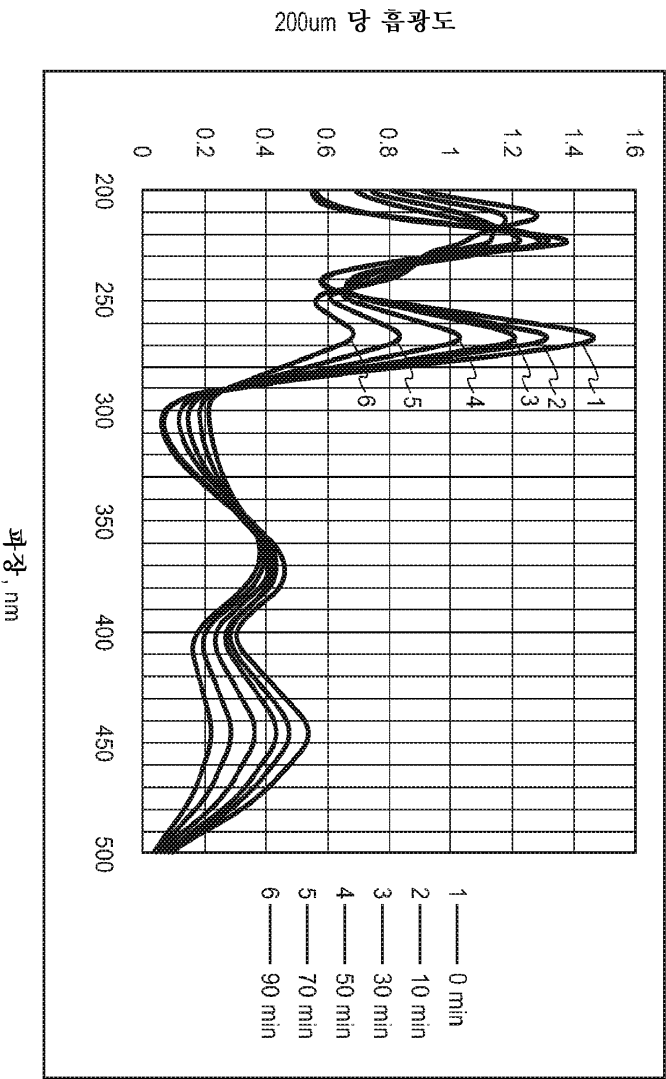
도면25



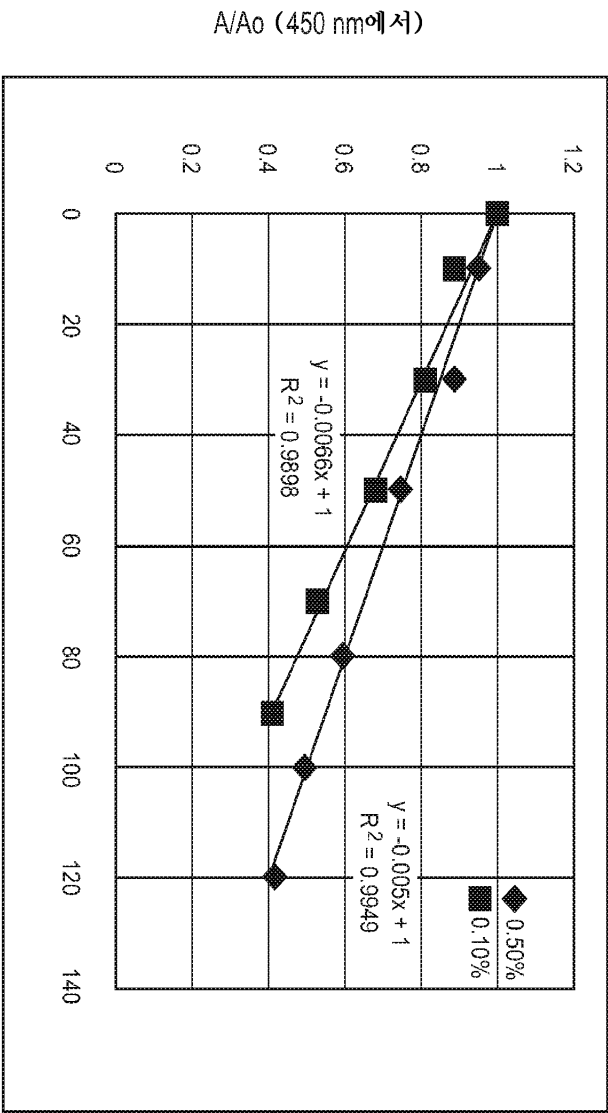
도면26



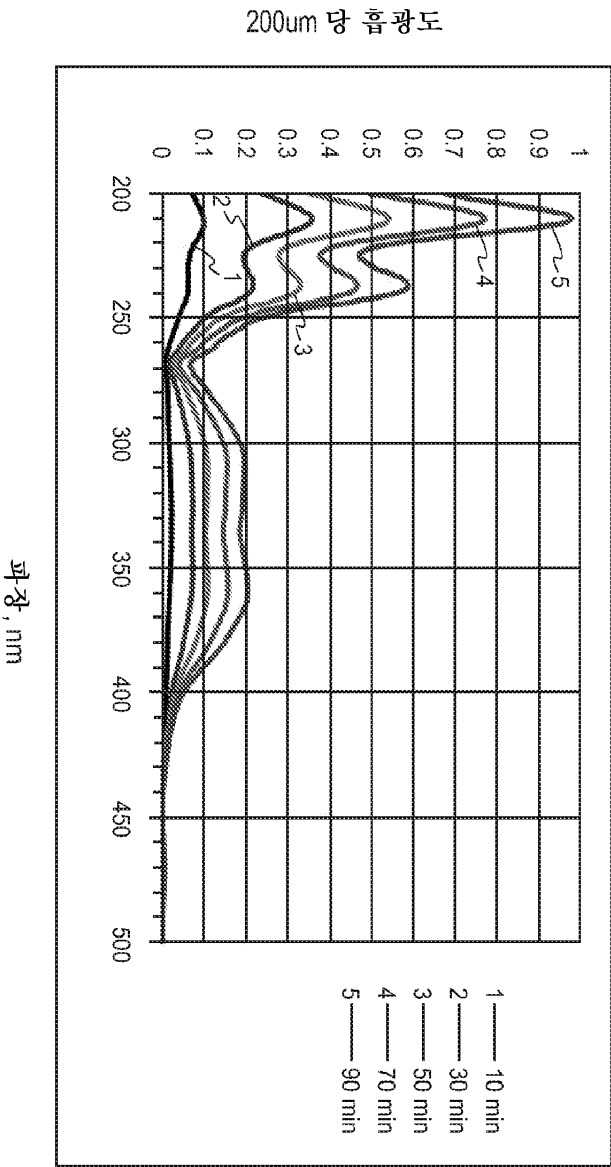
도면27



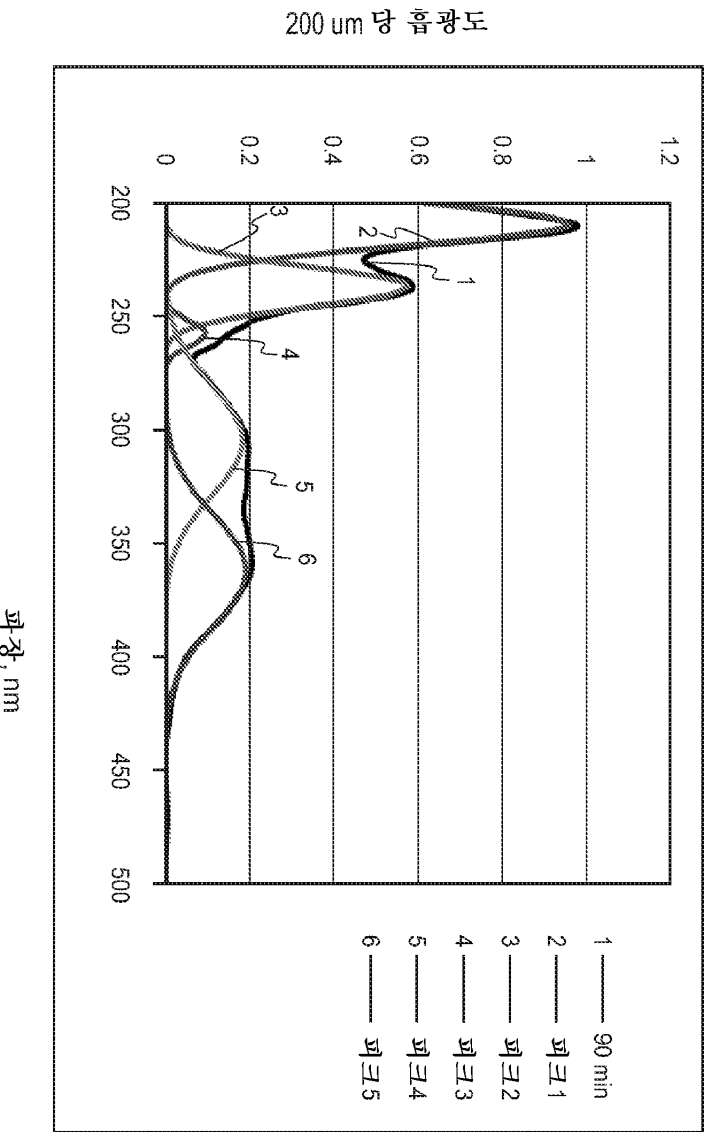
도면28



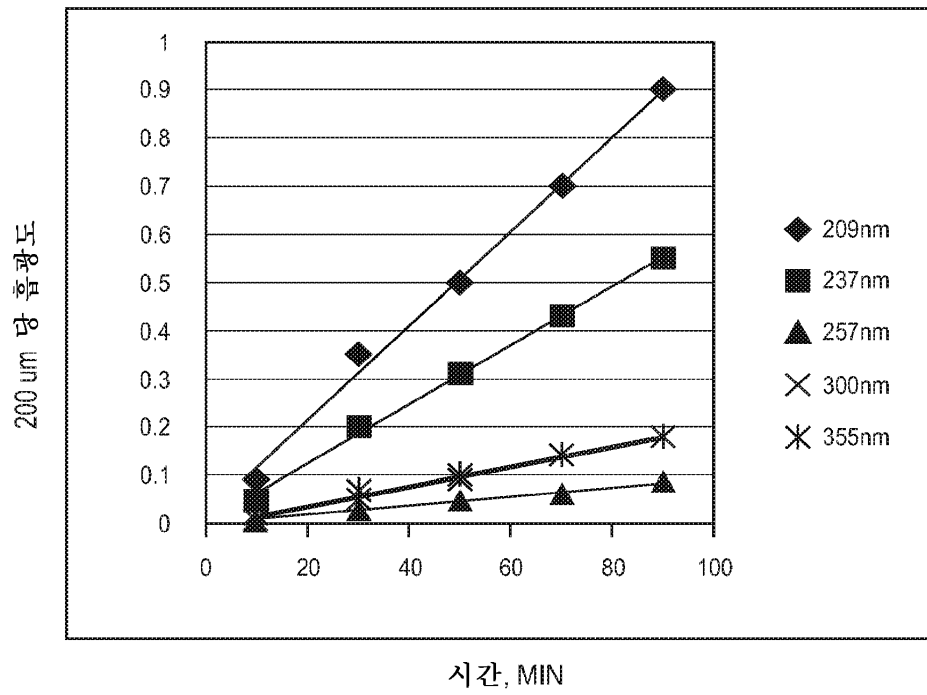
도면29



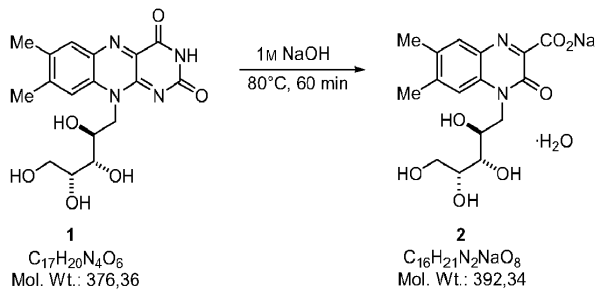
도면30



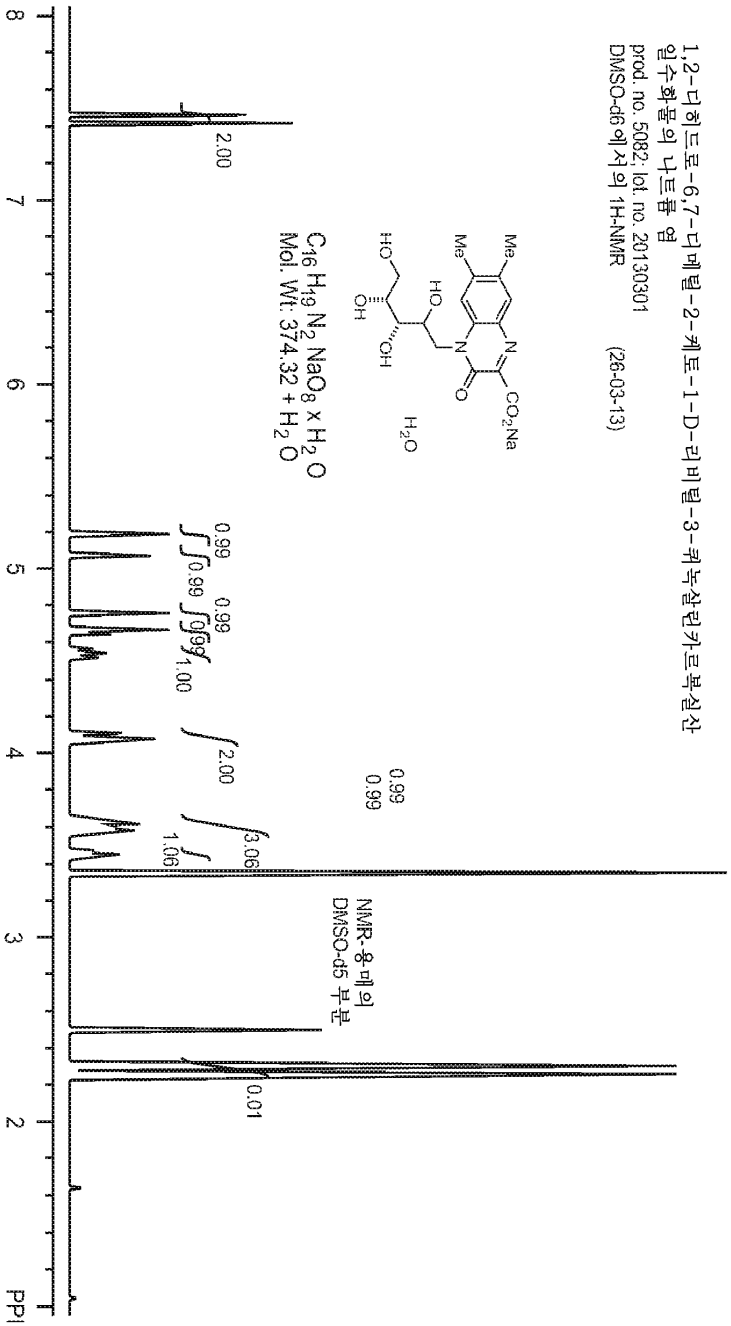
도면31



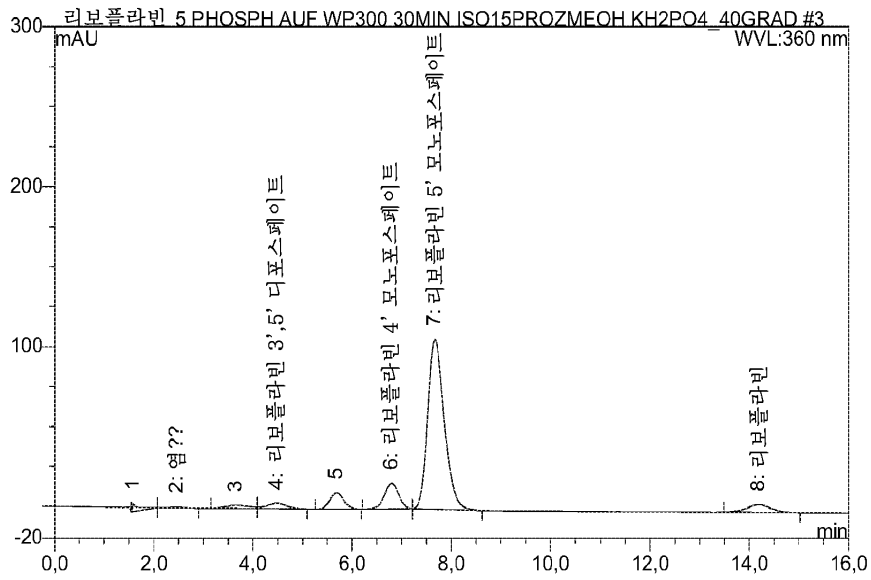
도면32



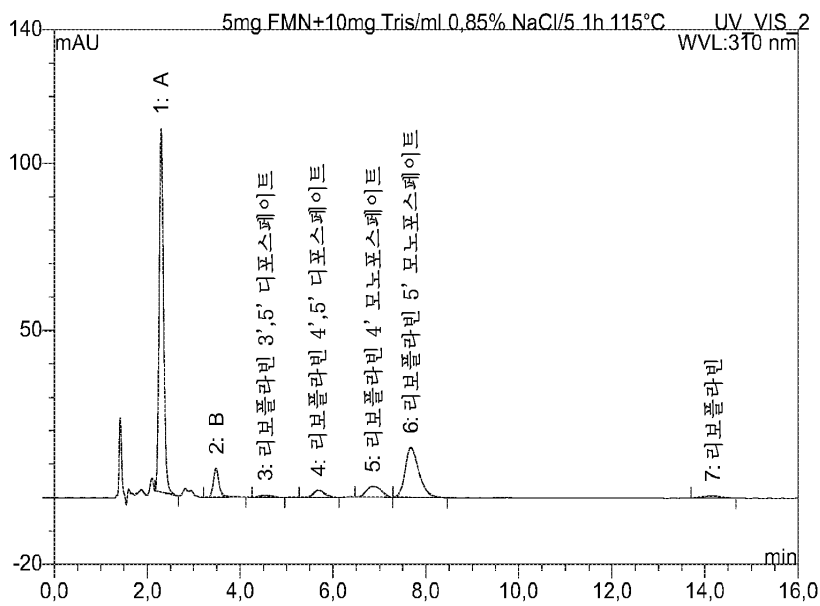
도면33



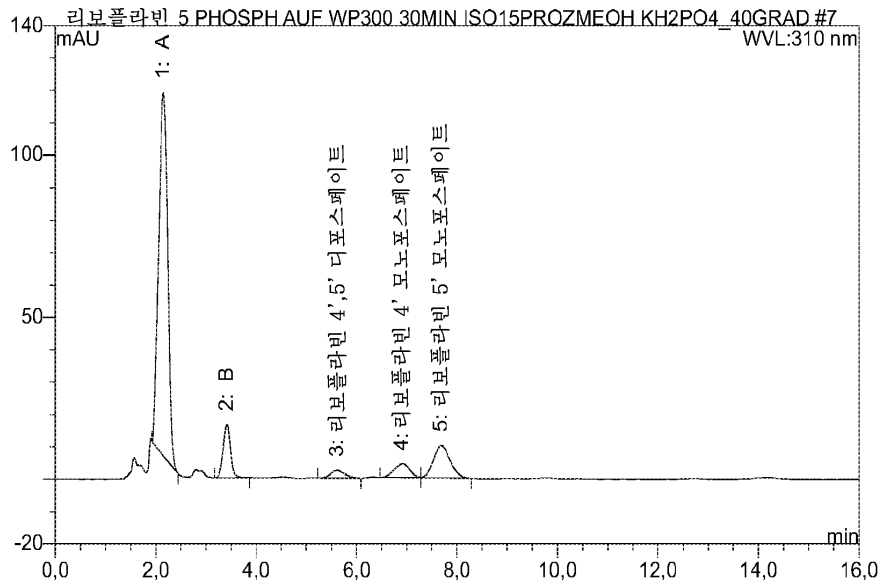
도면34



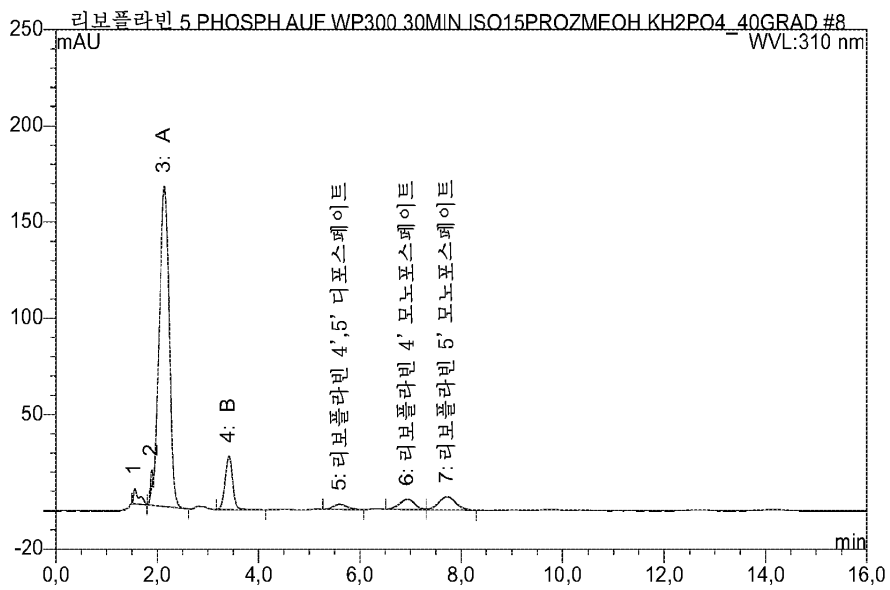
도면35



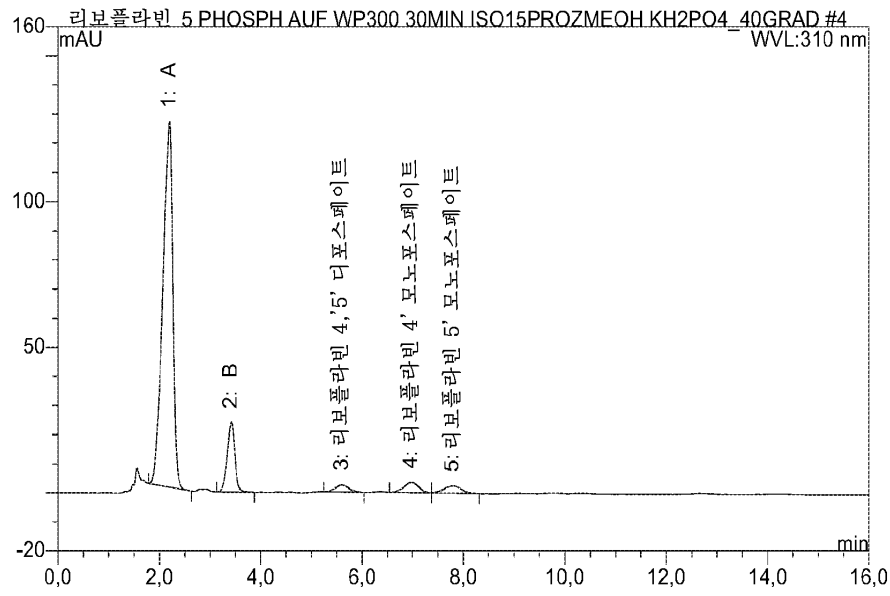
도면36



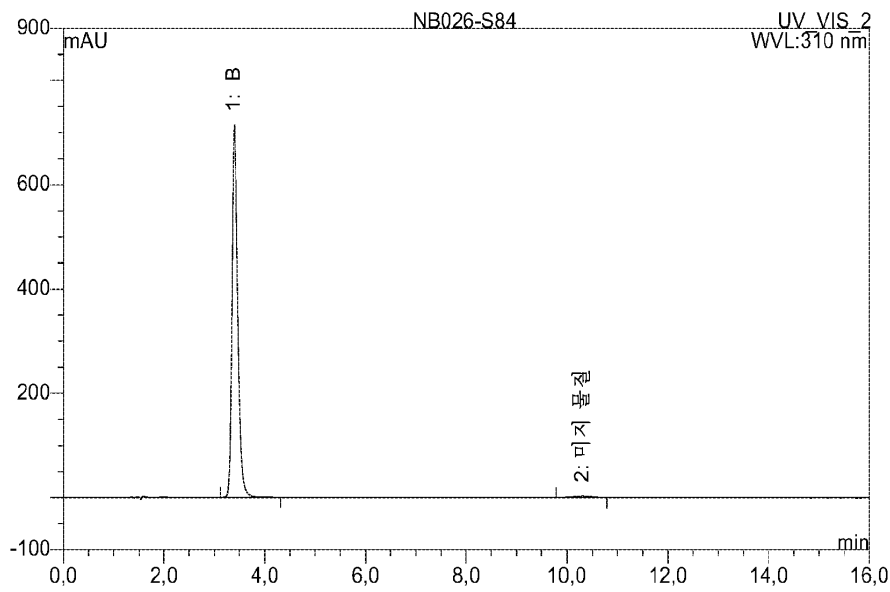
도면37



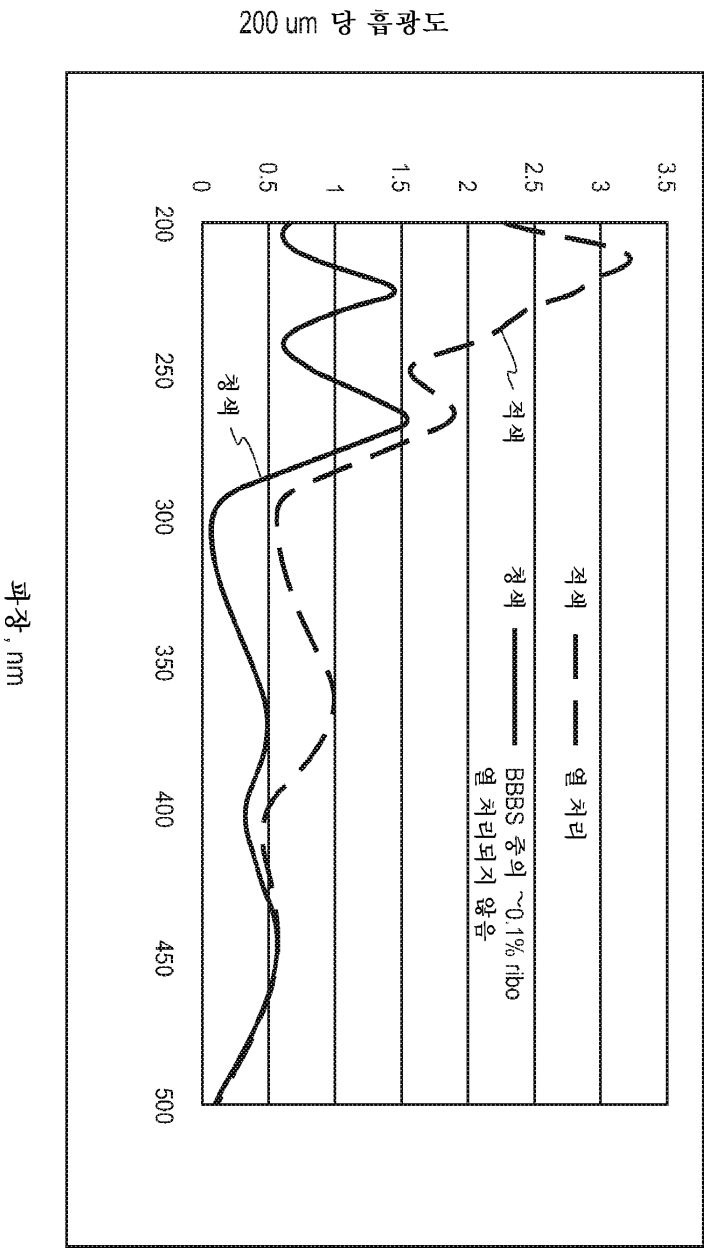
도면38



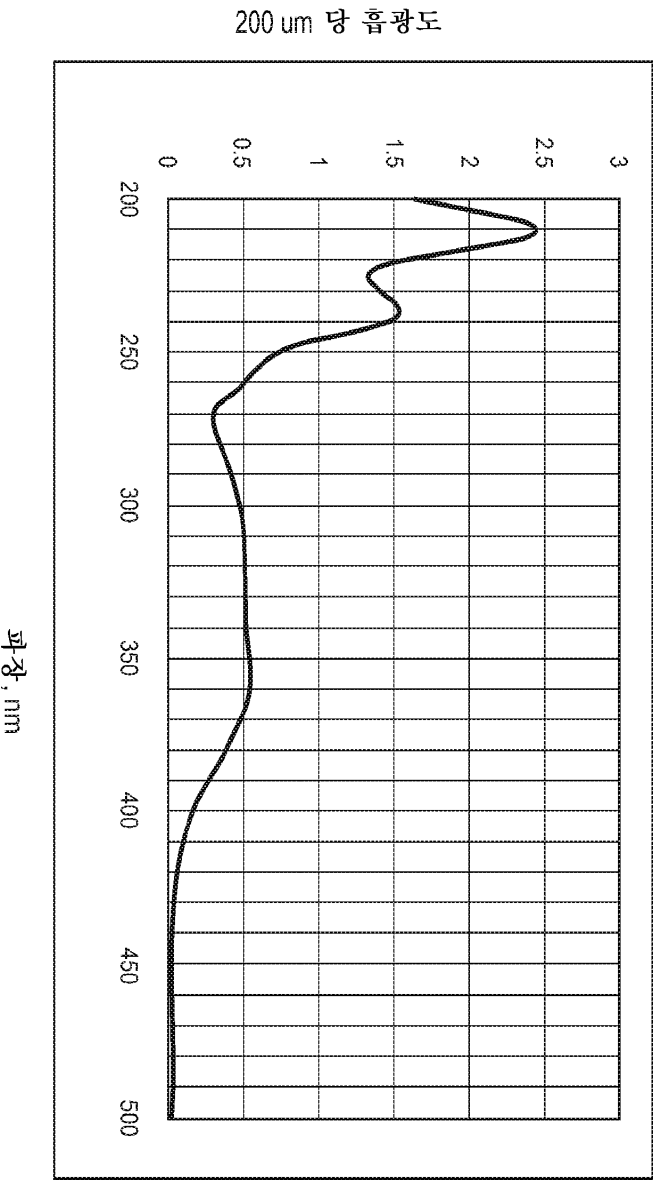
도면39



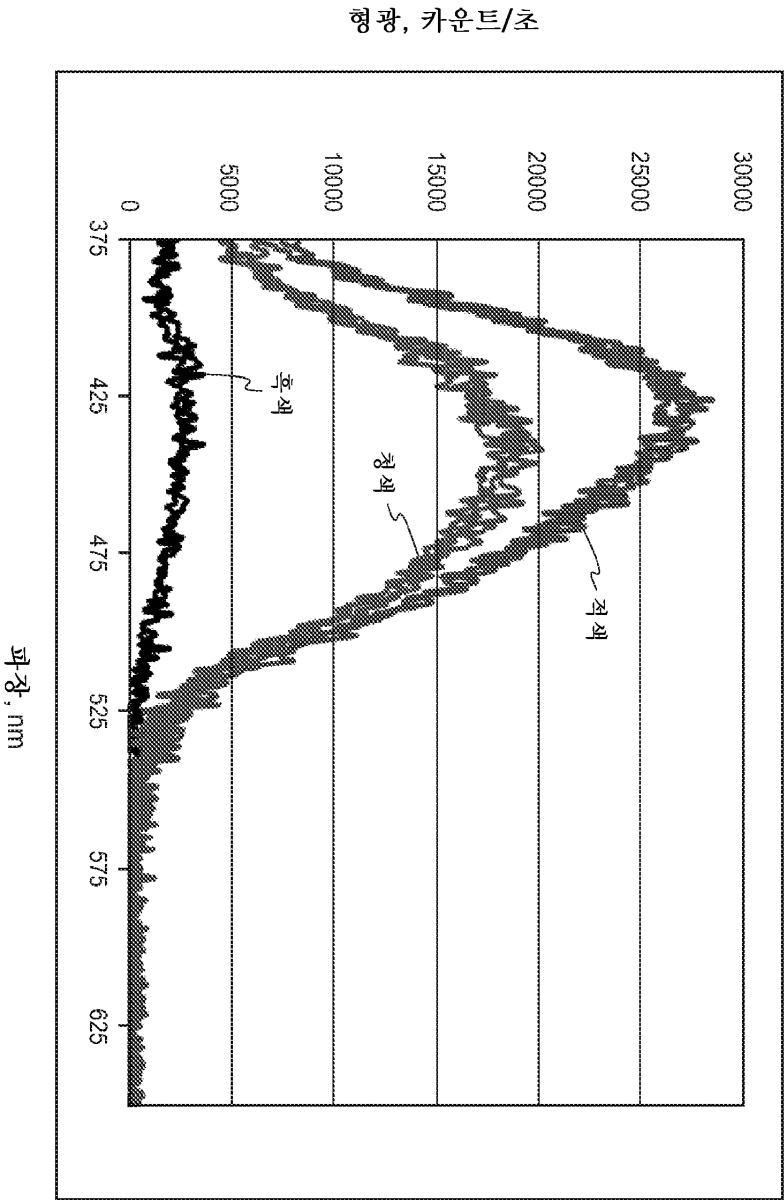
도면40



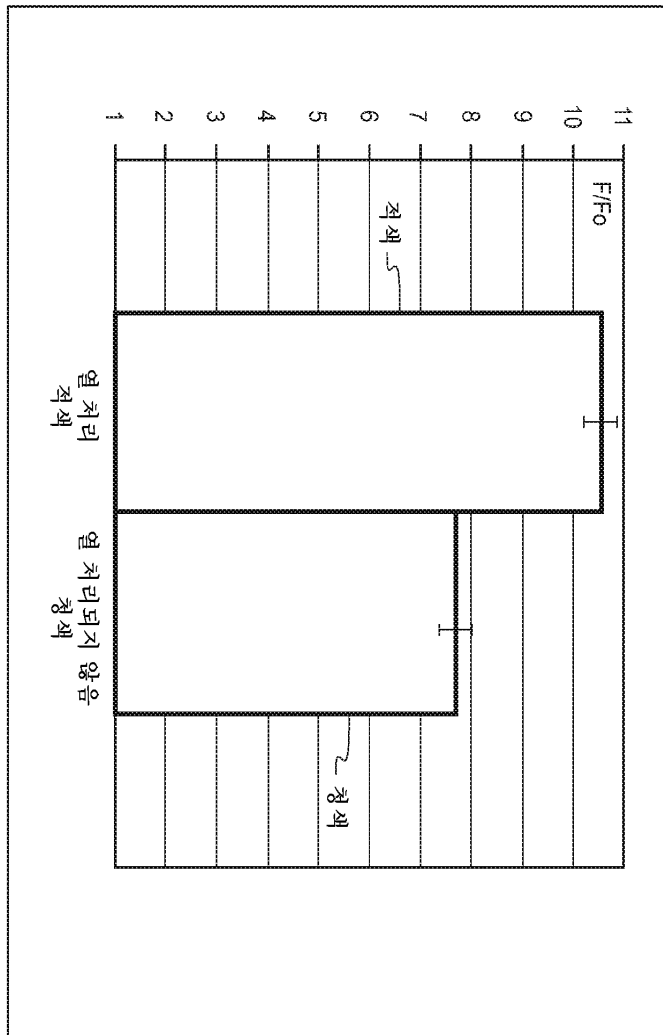
도면41



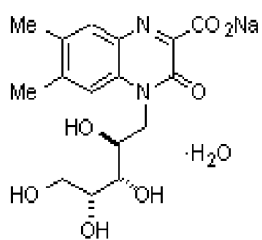
도면42



도면43

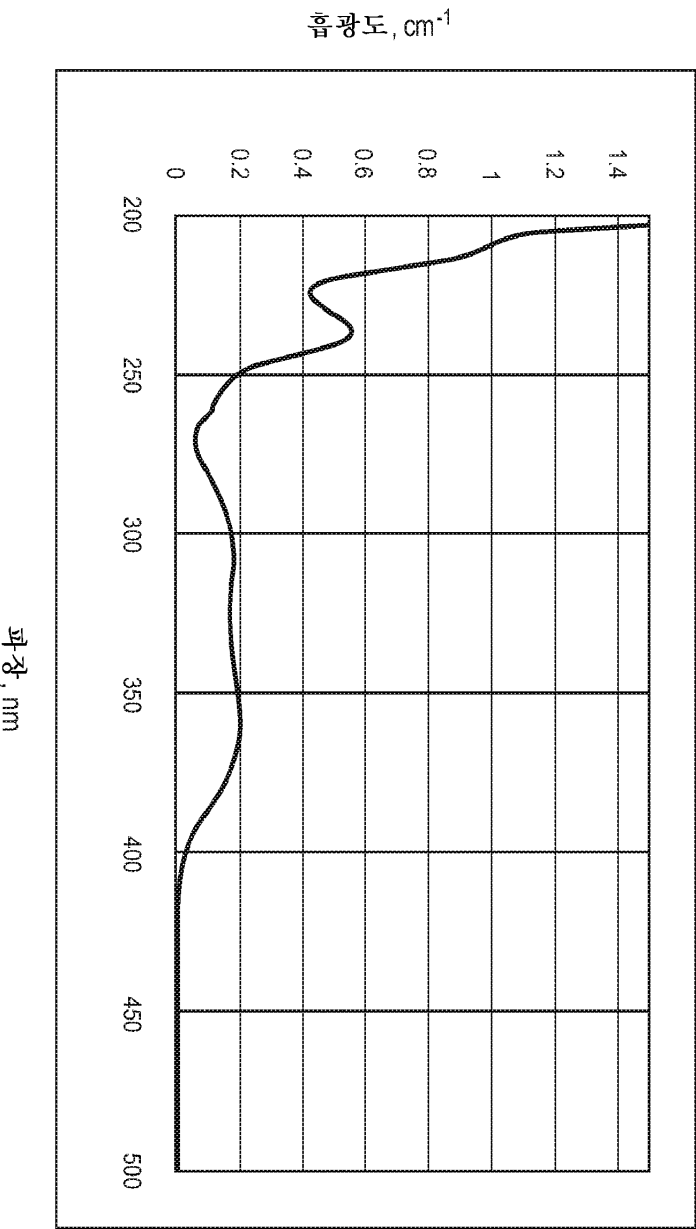


도면44

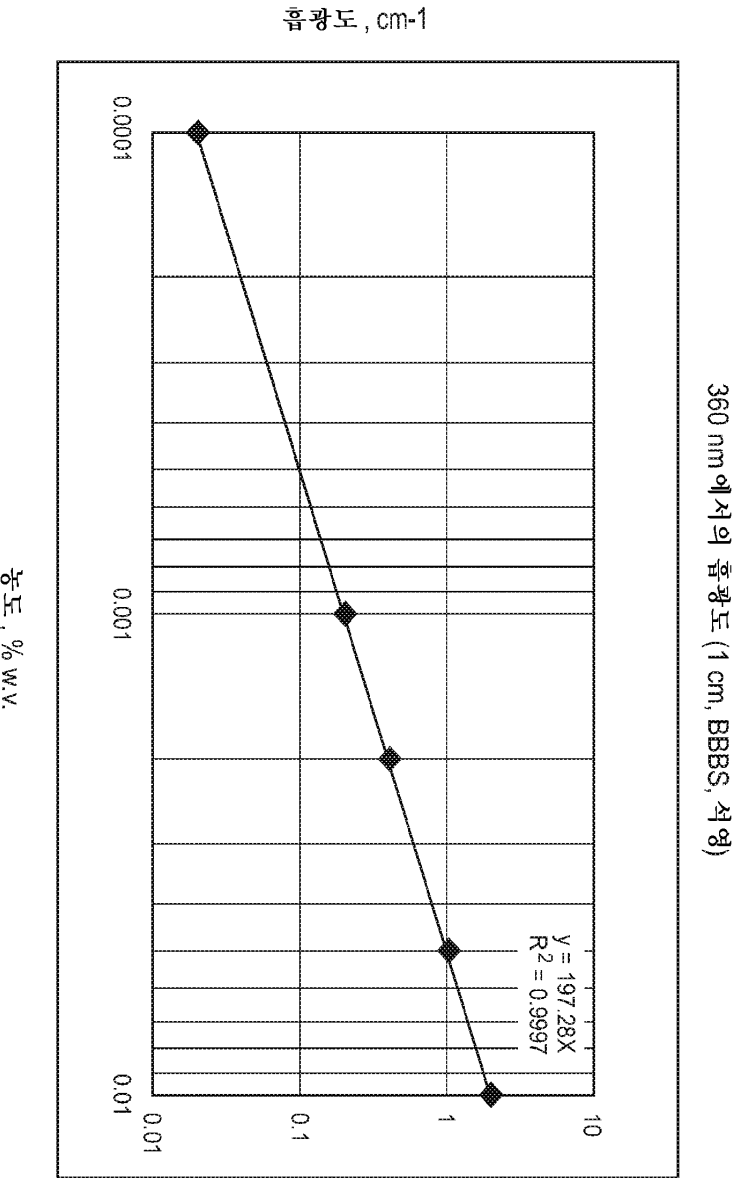


2
 $C_{16}H_{21}N_2NaO_8$
 Mol. Wt.: 392,34

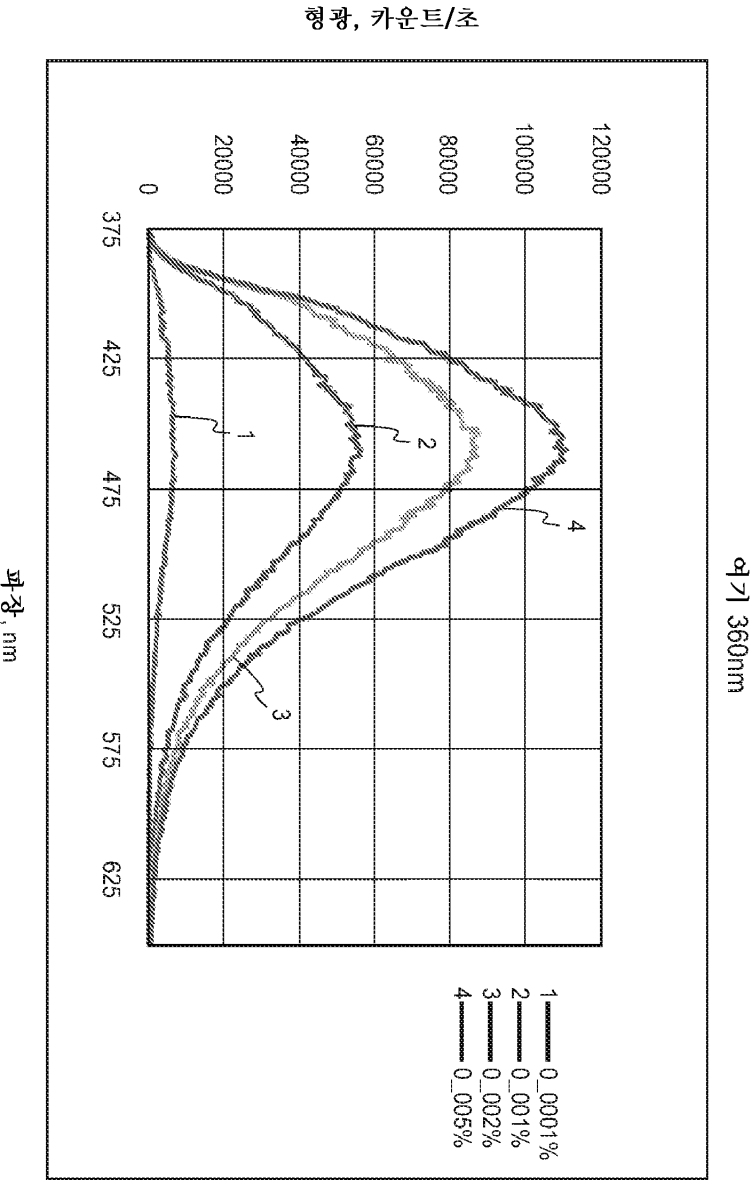
도면45



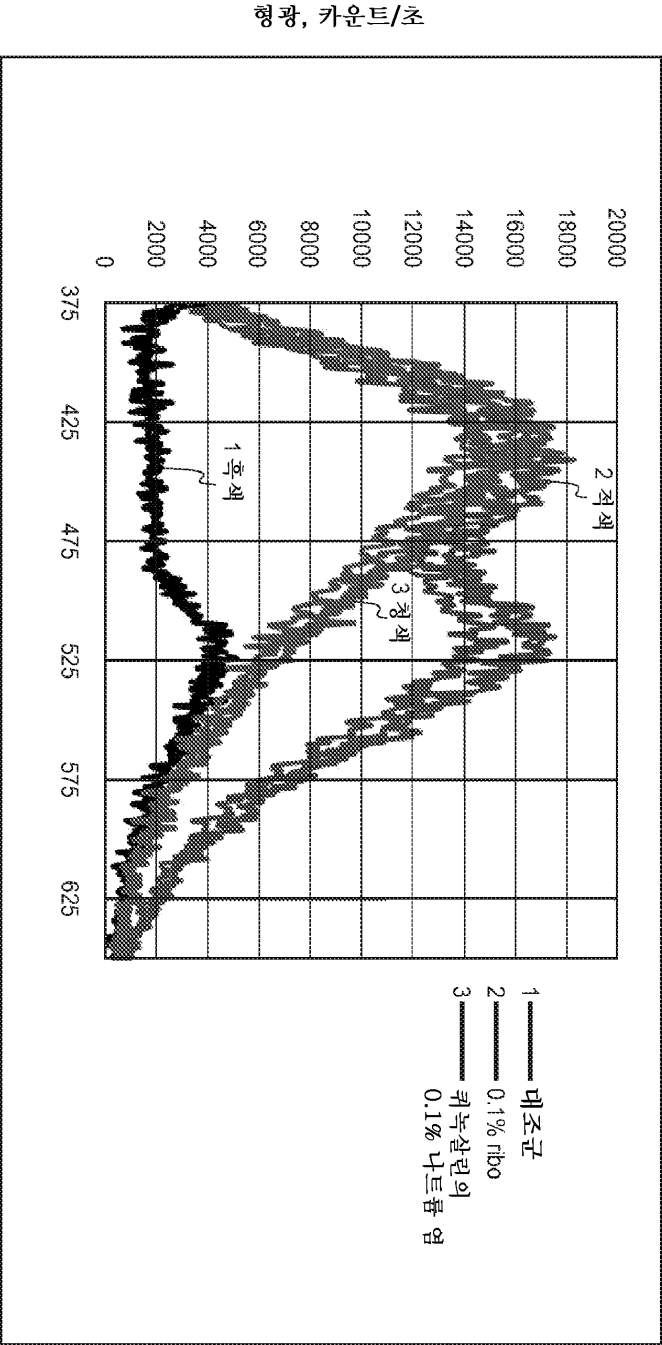
도면46



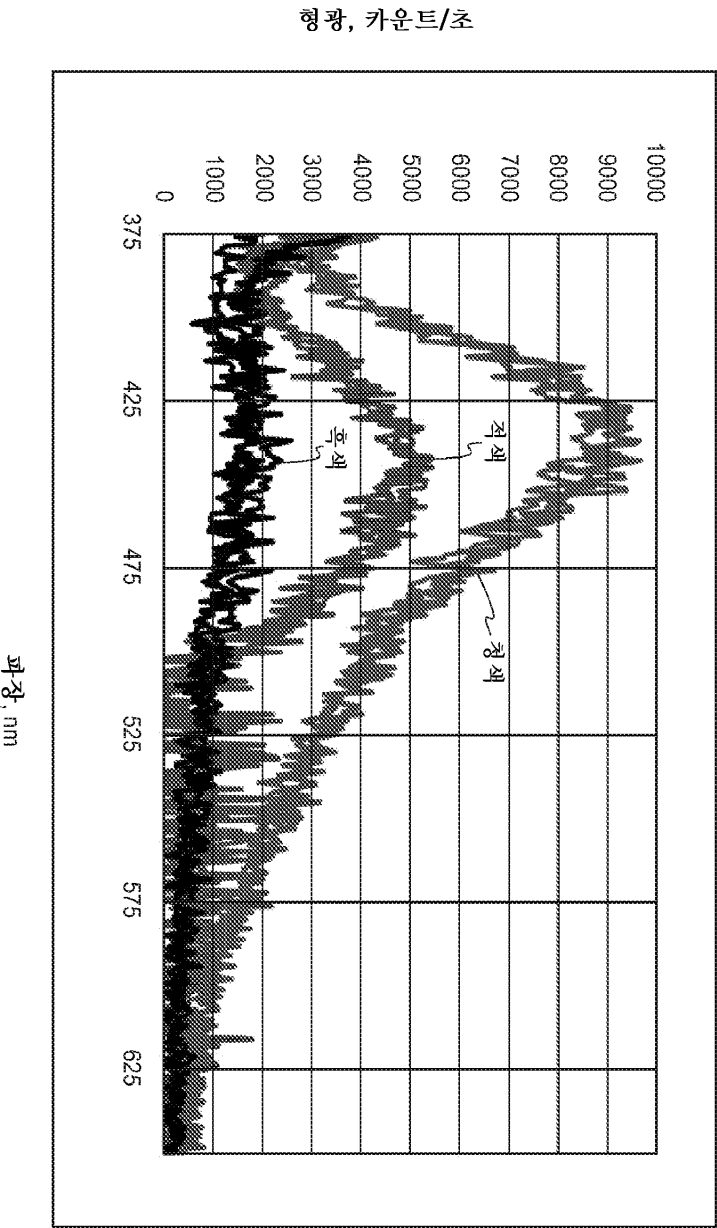
도면47



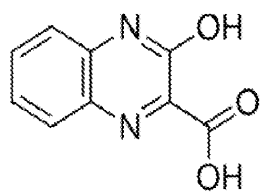
도면48



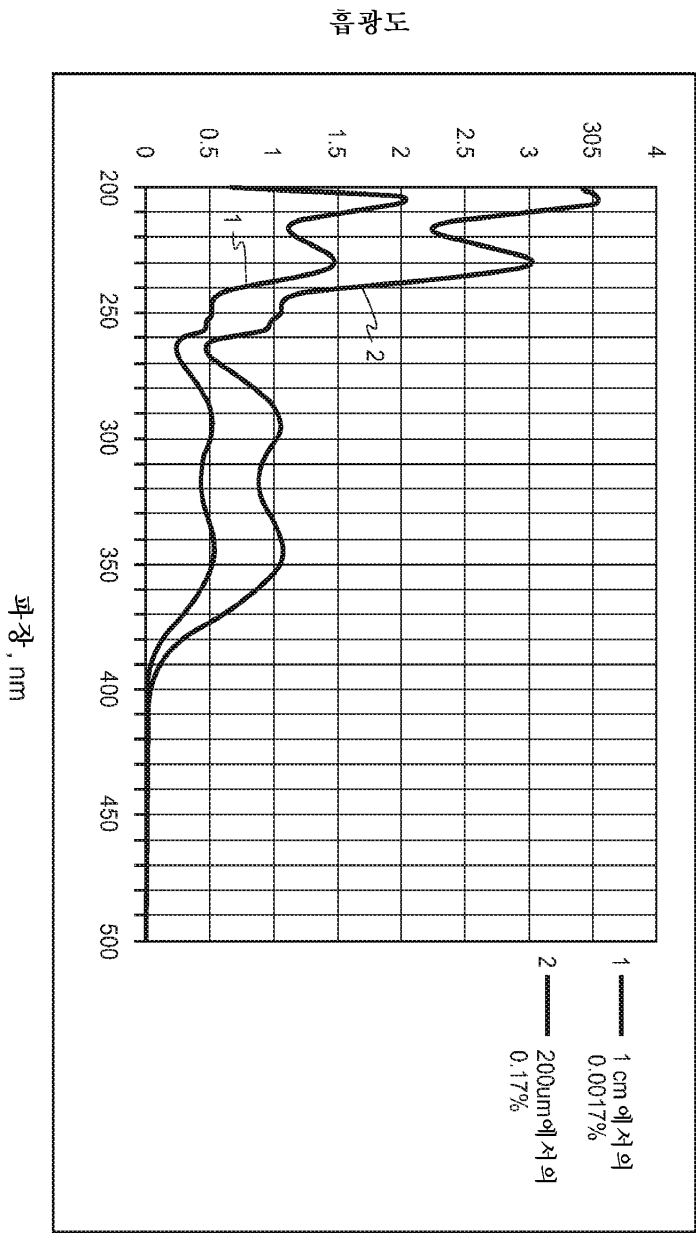
도면49



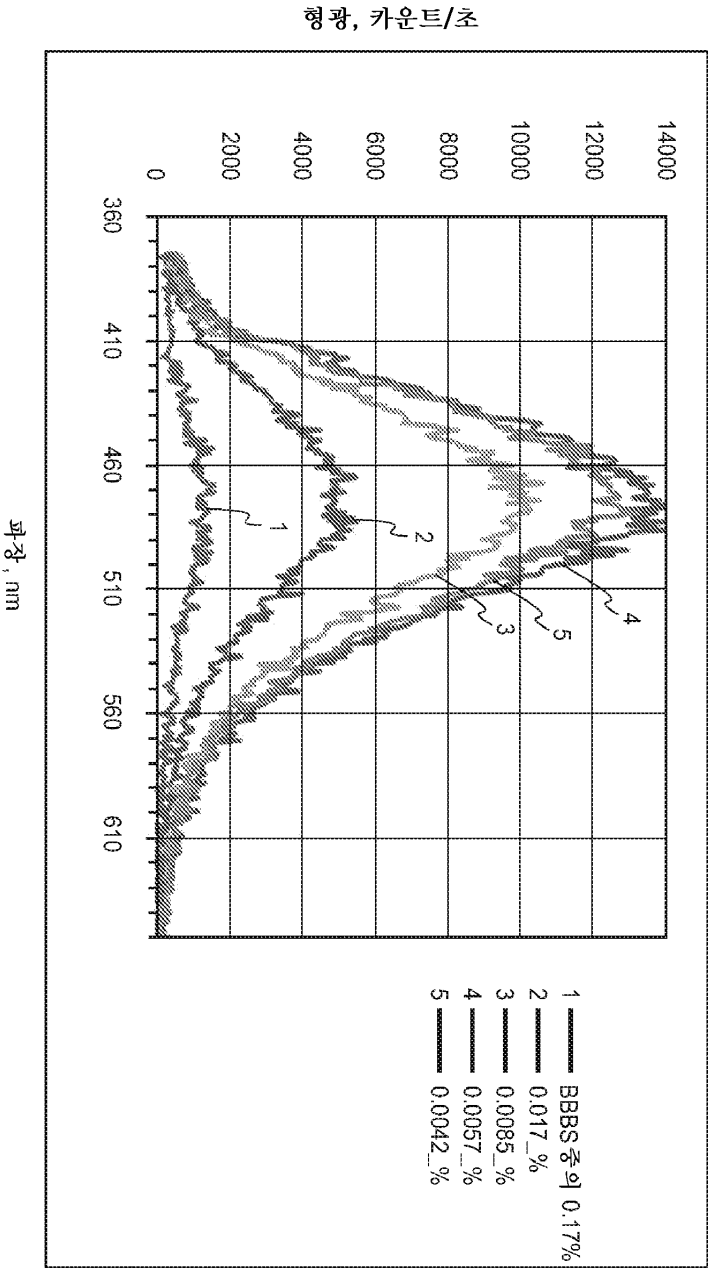
도면50



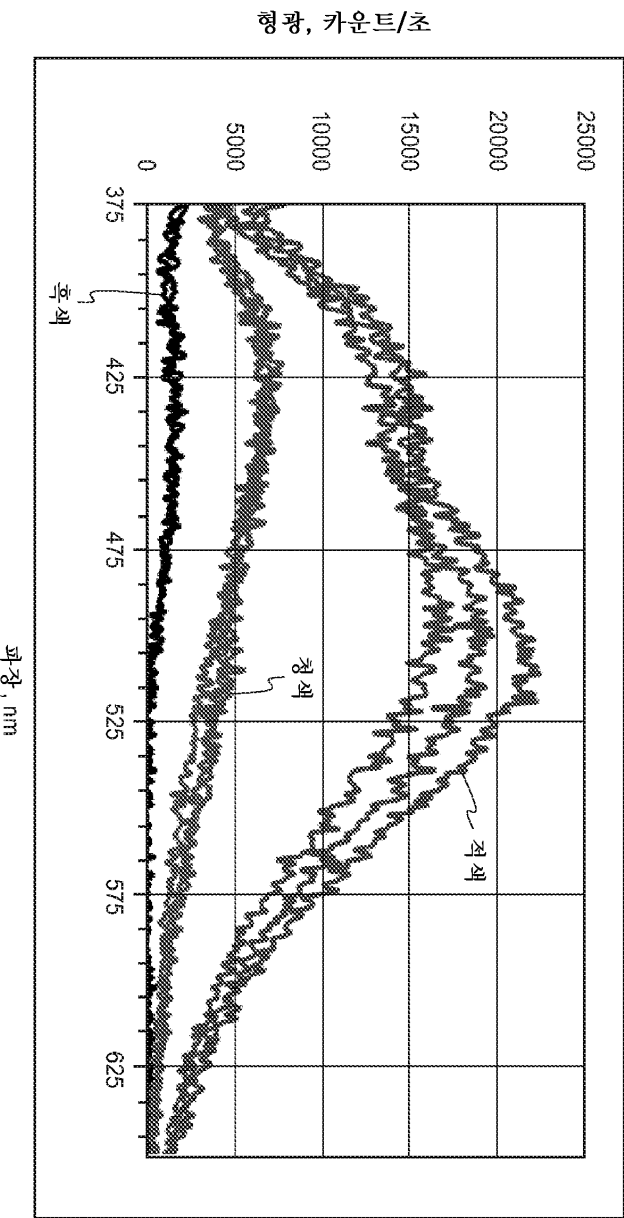
도면51



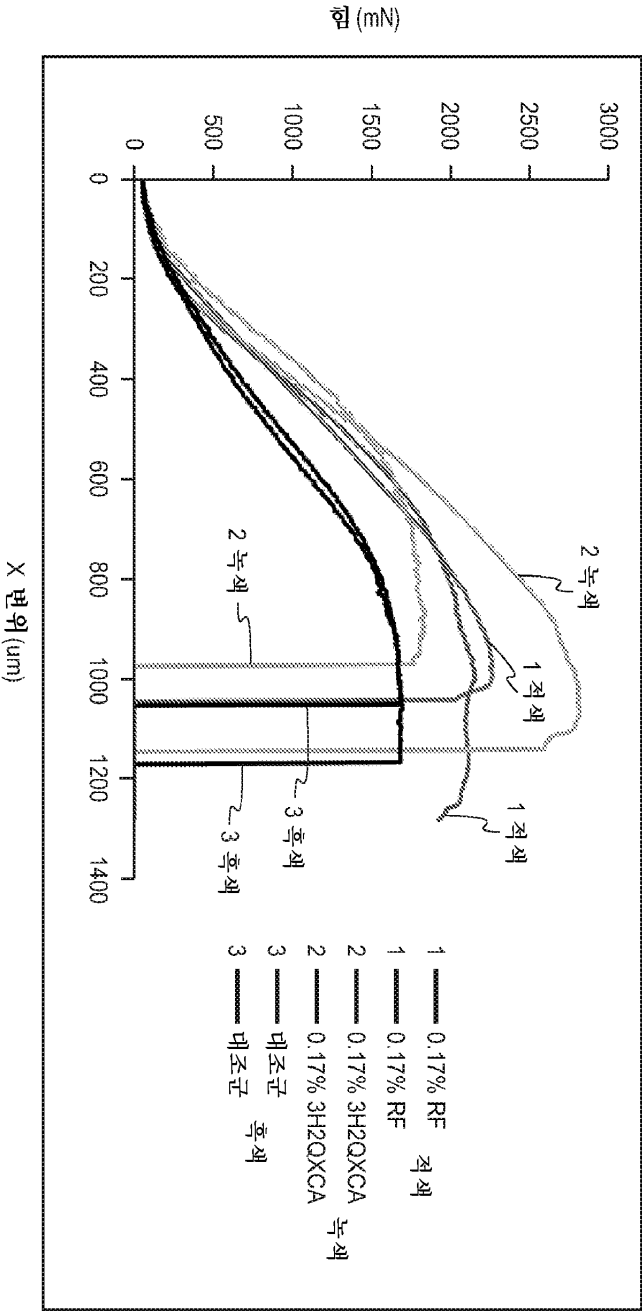
도면52



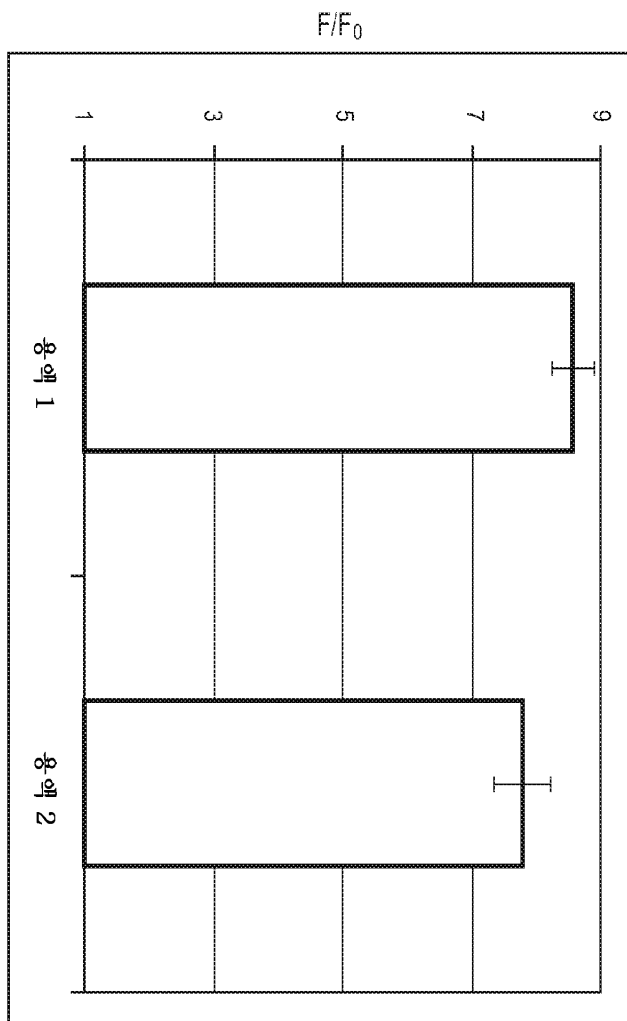
도면53



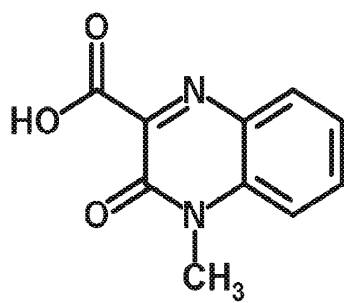
도면54



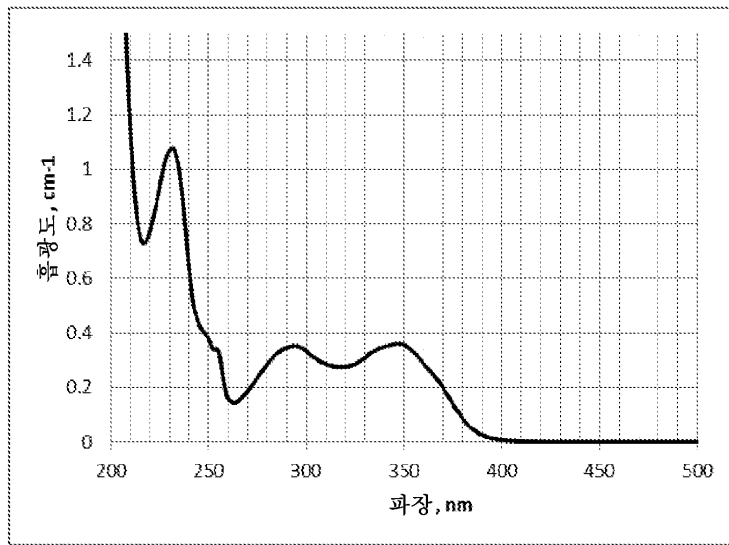
도면55



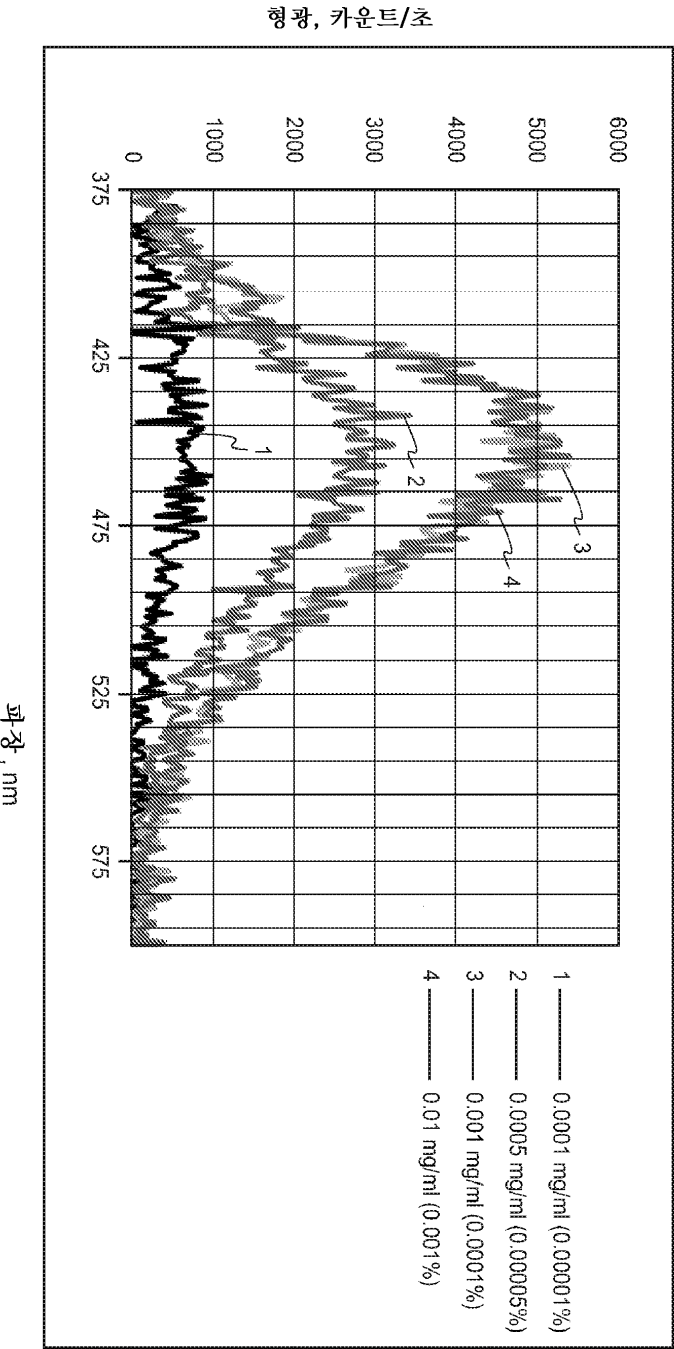
도면56



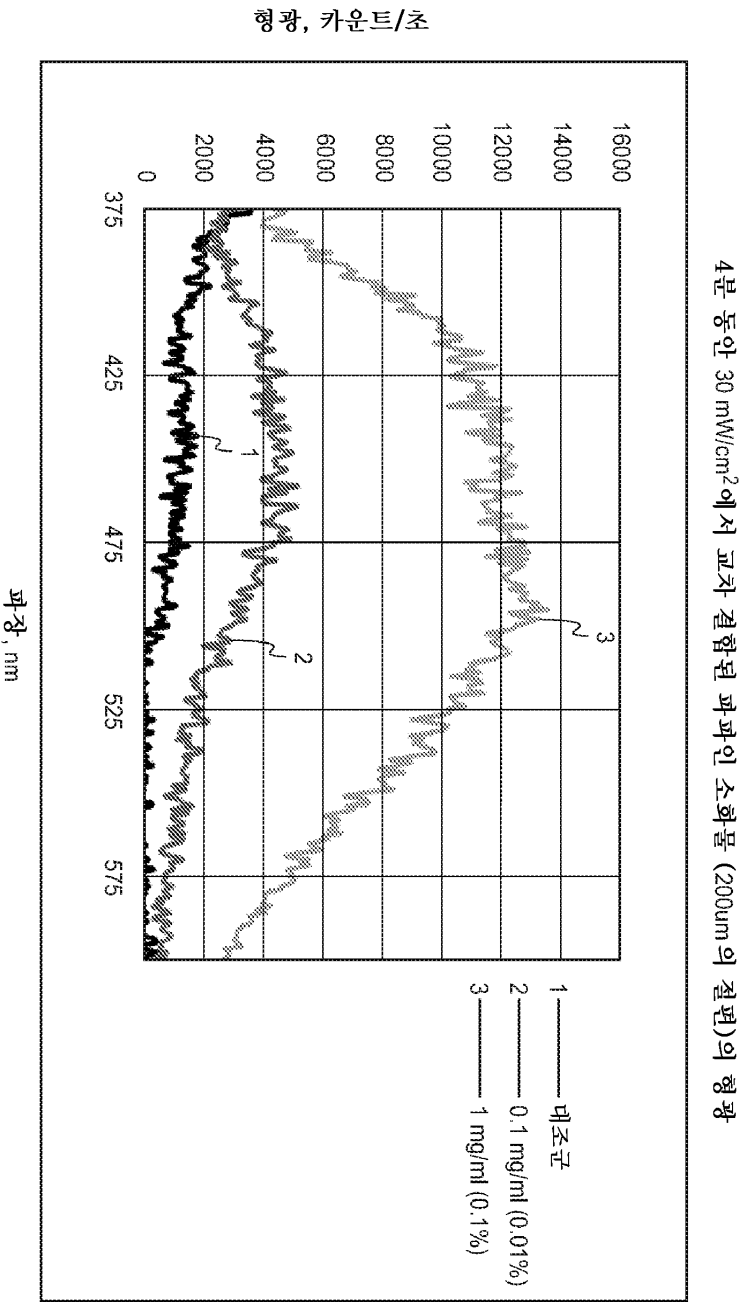
도면57



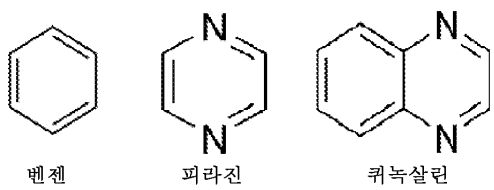
도면58



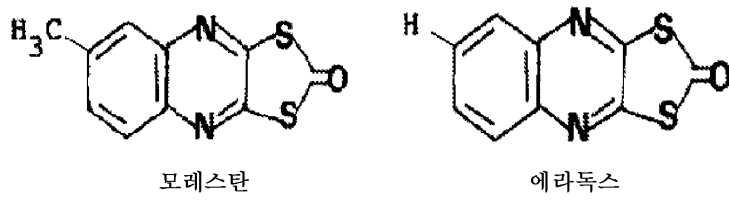
도면59



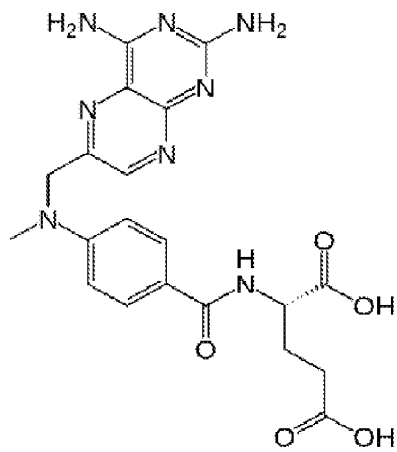
도면60



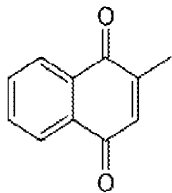
도면61



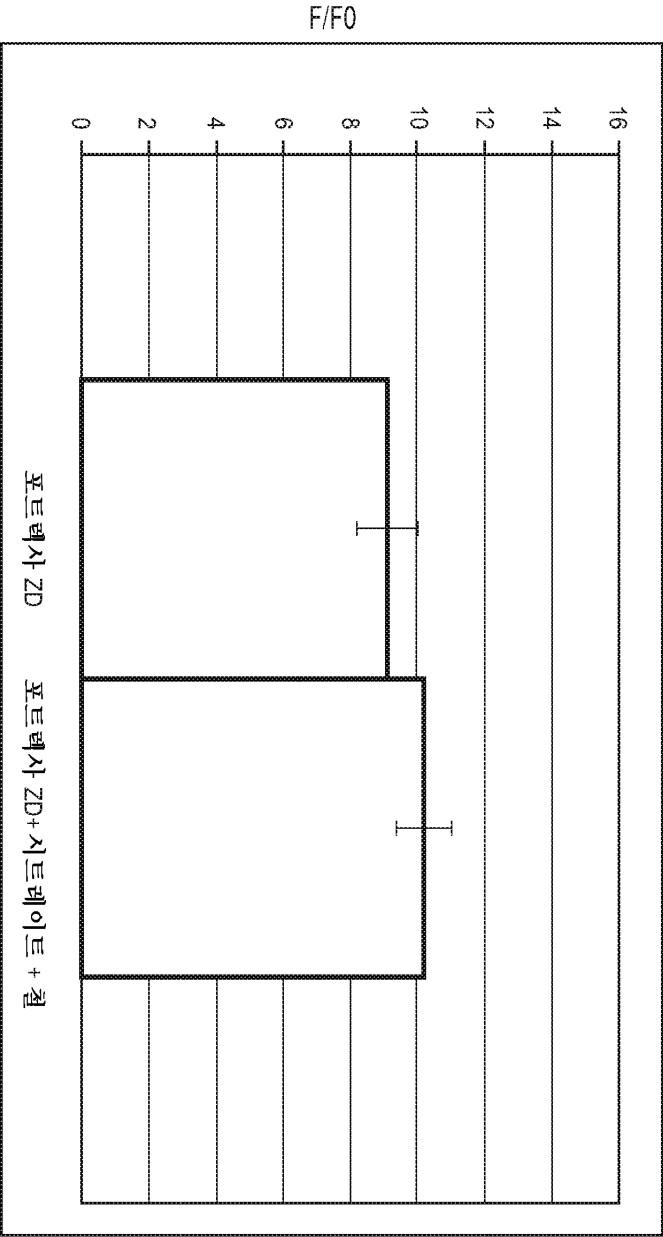
도면62



도면63



도면64



도면65

