



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0140058
(43) 공개일자 2017년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/26 (2006.01) *A61L 27/24* (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61L 27/26 (2013.01)
A61L 27/24 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2016-7029687
 (22) 출원일자(국제) 2015년09월10일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2016년10월24일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2015/049371
 (87) 국제공개번호 WO 2016/171745
 국제공개일자 2016년10월27일
 (30) 우선권주장
 PCT/US2015/027503 2015년04월24일 미국(US)
 62/156,833 2015년05월04일 미국(US)

(71) 출원인
더 존스 홉킨스 유니버시티
 미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 노쓰 찰스 스트리트 3400
 (72) 발명자
엘리세프, 제니퍼 에이치.
 미국 21213 메릴랜드 발티모어 세인트 폴 스트리트 3007
구오, 퀴용유
 미국 20740 메릴랜드 발티모어 퍼두커 스트리트 5007
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **각막 모방체 생체물질: 유리화 콜라겐-사이클로텍스트린 임플란트**

(57) 요약

본 발명자들은 생체모방체 콜라겐-기반 매트릭스 조성물을 공학처리하기 위해 프로테오글리칸 대용물로서 사용되는 사이클로텍스트린을 이용하였다. 그 결과로 본 발명의 콜라겐 조성물에 사이클로텍스트린의 혼입은 콜라겐 열안정성을 증가시키고 콜라겐 섬유발생을 감소시켰다. 결과적으로, 두껍고, 투명하며, 기계적으로 강한 콜라겐-기반 조성물이 형성되었다. 이러한 사이클로텍스트린-콜라겐 조성물은 각막 복구를 위한 치료적 눈 패치로서 사용될 큰 잠재력을 보유한다. 추가로, 조성물은 다층화 구조의 개발을 지지할 수 있는데, 각각의 층은 상이한 생물학적 특성을 촉진한다. 이러한 본 발명의 조성물을 제조하는 방법 및 이의 용도가 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/3839 (2013.01)

A61L 27/52 (2013.01)

A61L 27/54 (2013.01)

A61L 2300/802 (2013.01)

A61L 2430/16 (2013.01)

(72) 발명자

마주다르, 소움요

미국 21218 메릴랜드 발티모어 세인트 폴 스트리트
3120 아파트먼트 213에프

싱호, 안니루드하

미국 21209 메릴랜드 발티모어 와이즈우드 코트 12
아파트먼트 티1

명세서

청구범위

청구항 1

콜라겐 및 사이클로덱스트린을 포함하는 정렬된 원섬유를 포함하는 조성물.

청구항 2

콜라겐 및 사이클로덱스트린을 포함하는 유리화 매트릭스 겔의 정렬된 원섬유를 포함하는 조성물.

청구항 3

콜라겐 및 사이클로덱스트린을 포함하는 유리화 매트릭스 겔의 정렬된 원섬유를 포함하는 조성물로서, 조성물이 다층화된, 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 타입 I, 타입 II, 타입 III 및/또는 타입 IV 콜라겐을 포함하는 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 조성물이 α -CD, β -CD 및/또는 γ -CD를 포함하는 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, α -CD, β -CD 및/또는 γ -CD가 상이한 작용기 또는 모이어티로 화학적으로 치환될 수 있는 복수의 하이드록실기를 포함하는 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상이한 작용기 또는 모이어티가 소수성기, 친수성기, 펩티드, 하이드록실기, C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, C₁-C₆ 하이드록시알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알킬아미노, 디-C₁-C₆ 알킬아미노, C₁-C₆ 디알킬아미노 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 티오알킬, C₂-C₆ 티오알케닐, C₂-C₆ 티오알키닐, C₆-C₂₂ 아릴옥시, C₂-C₆ 아실옥시, C₂-C₆ 티오아실, C₁-C₆ 아미도, C₁-C₆ 설펜아미도, C₁-C₆ 카르복실 및 이의 유도체로 구성된 군으로부터 선택되고, 또한 포스포네이트 및 설펜을 포함할 수 있는 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 조성물이 타입 I 콜라겐을 포함하는 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서, 조성물이 α -사이클로덱스트린을 포함하는 조성물.

청구항 10

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 콜라겐 내용물의 실질적인 부분이 타입 I 콜라겐인 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 사이클로덱스트린 내용물의 실질적인 부분이 α -CD인 조성물.

청구항 12

타입 I 콜라겐 및 α -사이클로덱스트린을 포함하는 유리화 매트릭스 겔을 포함하는 조성물.

청구항 13

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 적어도 하나의 생물학적 활성 작용제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 조성물이 인도메타신을 포함하는 조성물.

청구항 15

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 층을 이룬 조성물의 두께가 10 내지 500 마이크로론인 조성물.

청구항 16

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 작용을 향상시키기 위한 표면 코팅을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 17

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 인공 각막으로서 사용하기 적합한 형상으로 형성되는 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서, 조성물이 각막 대체물, 패치 또는 이식편인 조성물.

청구항 19

제 18항에 있어서, 조성물이 사용 전에 수화되는 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서, 조성물이 550 nm에서 90% 초과 광학 투명도를 갖는 조성물.

청구항 21

포유동물의 조직 복구를 위한 매트릭스로서의 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

청구항 22

조성물이 수화된 다음 수술에 의해 눈에 이식되는, 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

청구항 23

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항의 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함하는 환자를 치료하는 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 환자의 눈을 치료하는 것을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 참조

[0002] 본 출원은 2015년 4월 24일자 출원된 국제 특허 번호 PCT/US2015/027503, 및 2015년 5월 4일자 출원된 미국 가 특허 출원 제62/156,833호의 이익을 주장하며, 이 둘 모두는 본원에서 완전히 언급되는 것과 같이 모든 목적에 대해 참조로 본원에 포함된다.

배경 기술

- [0003] 각막염(keratitis), 원추각막(keratoconus), 그 밖의 질병 및 손상으로 인해, 오늘날 전세계의 많은 인구가 각막 실명으로 고통받고 있다. 그러나, 특히 아시아 및 아프리카의 개발 지역에서는 기증자 각막의 제한된 이용가능성으로 인해, 모든 개인이 치료를 받을 수 있는 것은 아니다.
- [0004] 하기는 현재 표준에 대한 브리핑이다. 현재 치료 표준은 기증자 각막을 포함하며, 이것이 현재 이용가능한 최상의 각막 교체이다. 그러나, 이용가능성, 저장 및 분배의 문제가 있다. 또한, 합성 각막 또는 인공각막이식(keratoprosthesis), 예컨대 Boston Kpro, 또는 AlphaCor가 클리닉에 존재한다. 그러나, 그것들은 손상된 각막의 굴절 성질을 성공적으로 보정할 수 있지만, 그것들은 합성 폴리머 기반이고, 조직 리모델링(tissue remodeling) 또는 바이오통합(biointegration)을 지지하지 못하여 합병증을 유발한다. 임상 시험에서 생체공학적 각막, 예컨대 카르보다이미드 가교된 RHCIII가 있다. 이들은 대단한 장래성을 나타낸다. 그러나, 이들 물질은 각막의 낮은 봉합성(suturability) 및 각막의 콜라겐 조직의 미세구조와 맞지 않는 콜라겐 조직의 미세구조를 갖는다(도 8).
- [0005] 각막에서 보여지는 정상 콜라겐 어셈블리에는, 삼중 나선 형성, 원섬유 정렬 및 조직화에 도움을 주는, 대다수의 프로테오글리칸, 예컨대 데코린(decorin) 및 루미칸이 있다. 본 발명자들은 인공 샤페론(artificial chaperone)과 같이 거동할 수 있고, 이들에 동일 기능을 제공할 수 있는 분자를 사용하여 실험실 환경에서 이를 복제하고자 하였다. 본 발명자들은 초기에 PCT/US2015/027503에 자세히 기술되고, 본원에 참조로 포함되는, 고리 내 글루코스 모노머의 수에 의거하여 분류되는 소분자(도 12), 즉 소분자량 고리형 올리고당류로서 사이클로텍스트린에 주안점을 두었다. 이들은 이전에 암 치료제 및 약물 전달을 위한 그 밖의 적용에 사용되어 왔으며, 매우 안전하고 생체적합성인 것으로 여겨졌다.
- [0006] 사이클로텍스트린(CD)은 6 내지 8개의 글루코스 분자의 고리로 구성된 고리형 올리고머의 패밀리이다. 이들 고리 분자는 소분자 또는 고분자량 화합물의 일부와 착물을 형성할 수 있는 내부 소수성 코어 및 외부 친수성 고리를 특징으로 한다. 천연 사이클로텍스트린의 용해도는 매우 낮고, 초기에 이는 사이클로텍스트린이 효과적인 착화제가 되지 못하게 한다. 1960년대 후반에, 2-, 3-, 및 6-하이드록실 부위에서의 화학적 치환이 용해도를 크게 증가시킨다는 것이 밝혀졌다. 치환에 사용된 기의 화학적 치환도 및 성질이 수성 매질 중 사이클로텍스트린의 최종 최대 농도를 결정한다. 대부분의 화학적으로 개질된 사이클로텍스트린은 수중 50% (w/v) 농도를 달성할 수 있다. 또한, 하이드록실기에서의 치환 및 반응은 예를 들어, 기를 산, 아민 또는 그 밖의 것들로 전환시킴으로써 추가의 기능을 제공할 수 있다. 또한, 하이드록실기에서의 치환 및 반응은 예를 들어, 기를 산, 아민 또는 그 밖의 것들로 전환시킴으로써 추가의 기능을 제공할 수 있다.
- [0007] 세포의 매트릭스 (ECM)는 단백질, 프로테오글리칸, 및 그 밖의 가용성 분자로 이루어진 거대분자들의 복합 혼합물이다. 동물에게서 가장 흔한 단백질인 콜라겐은 다양한 생체적용에 널리 적용된다. 그러나, 다량의 정제된 프로테오글리칸을 유도하는 것이 어려움으로 인해 콜라겐 및 프로테오글리칸 둘 모두로 구성된 ECM 스캐폴드(scaffold)를 조작하는 것에 노력이 거의 이루어지지 않았다. 원 각막(native cornea)에서, 프로테오글리칸은 콜라겐 원섬유 직경 및 간격을 조절함으로써 각막의 투명성에 중요한 역할을 한다. 그러므로, 임상 적용, 예컨대 각막 재생과 결부된 어려운 문제를 해결하기 위해 생체모방체 콜라겐-기반 ECM을 개발하기 위한 프로테오글리칸 치환체가 여전히 필요한 실정이다.

발명의 내용

- [0008] 발명의 개요
- [0009] 기재된 구체예에 따르면, 본 발명은 실제 각막 모방체 구조를 제조하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 각막은 상피 및 내피 층들로 이루어진 투명한 다층 조직이고, 가장 두꺼운 영역은 대체로, 각막세포가 드물게 채워져 있는 콜라겐 I 기반 세포의 매트릭스인 각막 기질이다. 일부 구체예에서, 하나의 가능한 전략은 기질을 복제하는 것에 집중하고, 이후 다른 층들을 부가할 수 있는, 각막 생체모방체를 개발하는 것이다. 이후, 이러한 복제된 기질은 콜라겐 기반 각막 임플란트를 제작하기 위한 베이스로서 사용되고, 이는 각막 모방체 구조로 자기-어셈블링되도록 조정될 수 있다. 건강한 원 각막의 미세구조 및 물리적 성질을 모방하는 것이 목표이다.
- [0010] 구체예에 따르면, 본 발명은 콜라겐 및 사이클로텍스트린을 포함하는 정렬된 원섬유를 포함하는 조성물 또는 막을 제공한다. 조성물 또는 막은 콜라겐 및 사이클로텍스트린을 포함하는 유리화 매트릭스 겔의 정렬된 원섬유를 포함할 수 있다.

- [0011] 정렬된 원섬유는 보다 무작위인 배향과 구별되며, 보다 무작위인 배치보다는 정렬된 배향을 검출하기 위해 샘플의 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy) 평가와 같은 방법에 의해 평가될 수 있다.
- [0012] 본 조성물 또는 막에서, 다양한 타입의 콜라겐이 적합하게 사용될 수 있으며, 예로 타입 I, 타입 II, 타입 III 및 타입 IV 콜라겐이 사용될 수 있다. 특정 조성물 또는 막에 대해, 타입 I 콜라겐이 사용될 수 있다. 특정 조성물 또는 막에서, 조성물 중 콜라겐 내용물의 실질적인 부분은 타입 I 콜라겐인 것이 바람직할 수 있으며, 예를 들어 조성물 또는 막 중 40, 50, 60, 70, 8, 90, 95 또는 100 중량 퍼센트의 총 콜라겐 함량이 타입 I 콜라겐이다.
- [0013] 또한, α -사이클로텍스트린 (α -CD), β -사이클로텍스트린 (β -CD) 및 γ -사이클로텍스트린 (γ -CD)을 포함하는 여러 사이클로텍스트린이 사용될 수 있다. 특정 조성물 또는 막에 대해, 타입 I 콜라겐과의 조합을 포함하는 α -CD가 바람직할 수 있다. 특정 조성물 또는 막에서, 조성물 또는 막 중 사이클로텍스트린 내용물의 실질적인 부분은 α -CD인 것이 바람직할 수 있고, 예를 들어 조성물 또는 막 중 40, 50, 60, 70, 8, 90, 95 또는 100 중량 퍼센트의 총 사이클로텍스트린 함량이 타입 I 콜라겐과의 조합을 포함하는 α -사이클로텍스트린(α -CD)이다.
- [0014] 또한, 본 조성물 또는 막은 하나 이상의 추가의 생물학적 활성 또는 치료적 작용제, 예컨대 예를 들어 인도메타신(indomethacin)을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 조성물 또는 막은 환자로의 약물 방출을 연장시키기 위한 약물 저장소로서 작용하는데 특히 유용하다.
- [0016] 또한, 본 조성물 또는 막은 적합하게는 다층화될 수 있다. 조성물 또는 막은 인공 각막으로서 사용하기에 적합한 모양, 및/또는 각막 대체물, 패치(patch) 또는 이식편(graft)으로서 사용하기에 적합한 모양을 포함하여 다양한 배치로 형성될 수 있다. 본 조성물 및 막은 여러 그 밖의 생물학적 물질로서 추가의 용도를 가질 것이다.
- [0017] 하나 이상의 구체예에 따르면, 본 발명자들은 천연 조직에서의 프로테오글리칸과 유사하게, 콜라겐 매트릭스 내 사이클로텍스트린의 혼입이 콜라겐 삼중 나선 형성을 유지하면서 콜라겐 섬유발생(fibrogenesis)을 조절하는 것으로 가정하였다. 원섬유의 구조를 갖는 통상적인 조작된 타입 I 콜라겐 매트릭스는 불투명한 반면, 무정형 콜라겐 네트워크로 구성된 투명한 겔은 불량한 기계적 성질을 나타낸다. 사이클로텍스트린이 프로테오글리칸 치환체로서 콜라겐 매트릭스에 첨가될 수 있고, 각막 재생을 위해 광학적 및 기계적 성질 둘 모두를 최적화하는 것을 지원할 것으로 예상되었다.
- [0018] 구체예에 따르면, 본 발명은 제1 성분 및 제2 성분을 지닌 유리화 매트릭스 겔을 포함하는 조성물로서, 제1 성분은 콜라겐을 포함하고, 제2 성분은 사이클로텍스트린을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0019] 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 제1 성분 및 제2 성분을 지닌 유리화 매트릭스 겔을 포함하는 조성물로서, 제1 성분은 콜라겐을 포함하고, 제2 성분은 사이클로텍스트린을 포함하며, 추가로 적어도 하나의 생물학적 활성 작용제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0020] 추가 구체예에 따르면, 본 발명은 제1 성분 및 제2 성분을 지닌 유리화 매트릭스 겔을 제조하는 방법으로서, 제1 성분은 콜라겐을 포함하고, 제2 성분은 사이클로텍스트린을 포함하며, a) 콜라겐의 수용액을 얻는 단계; b) 사이클로텍스트린의 수용액을 얻는 단계; c) 용액 a)와 용액 b)를 합하는 단계; 및 d) 용액의 유리화를 허용하기에 충분한 기간 동안 c)의 합한 용액을 탈수시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0021] 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 포유동물 조직의 복구를 위한 매트릭스로서의, 상기 기술된 조성물의 용도를 제공한다.
- [0022] 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 포유동물의 눈의 각막의 복구를 위한 매트릭스로서의, 상기 기술된 조성물의 용도를 제공한다.
- [0023] 추가의 구체예에 따르면, 본 발명은 각막을 보다 잘 모방하기 위해 층마다 상이한 기능을 갖는, 다층으로 제작될 수 있는 안구 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1a는 정상 콜라겐 비트리겔 (CV), 본 발명의 α -CD-col 조성물, 및 가교된 CV를 포함하는, 3개의 콜라겐-기반 막의 시차 주사 열량측정법(DSC) 첫 번째 가열 곡선을 묘사한다.
 도 1b는 다양한 α -CD가 콜라겐 미세구조 (단면도)를 유도하였음을 도시한다.
 도 2는 본 발명의 α -CD-col 조성물이 550 nm에서 96%만큼 높은 투과율을 지닌 탁월한 투명도를 나타내었음을

도시하는 그래프이다. 도면의 삽도는 인쇄된 단어 "눈"에 배치된 습윤 막의 사진을 도시한다.

도 3은 로드(Load) 대 각각 두께가 520 μm 및 170 μm 인 본 발명의 2개 α -CD-coI 조성물의 붕합성(saturability) 시험의 전환을 묘사하는 그래프이다. 도면의 삽도는 5.6 mm 넘게 스트레칭 후 더 두꺼운 막의 사진을 도시한다.

도 4는 본 발명의 조성물의 로드 시험에 이용된 장치의 사진이다.

도 5는 세포 돌출부 분석의 도식 및 소 각막세포의 일차 배양액의 콜라겐 밀도에 대한 상이한 비트리겔 조성물의 효과를 도시한다.

도 6은 소 각막세포의 일차 배양액에서 상이한 세 유전자 마커의 유전자 발현이 본 발명의 비트리겔 조성물의 원섬유 나노구조에 의해 어떤 영향을 받는 지를 묘사한다.

도 7은 다양한 사이클로텍스트린의 구조 및 이들이 용액 중 콜라겐 원섬유와 상호작용하는 방법을 도시하는 도식이다. 사이클로텍스트린 분자에서의 공간은 수불용성 약물 및 생물학적 활성 작용제에 대한 약물 저장소로서 이용될 수 있다.

도 8은 각막 복구 및 이식편에 대한 표준 관리 옵션을 묘사하는 예시이다.

도 9는 본 발명의 각막 모방체 생체물질의 하나 이상의 구체예의 개발을 묘사하는 예시이다. 상기 예시는 본 발명의 콜라겐 기반 생체물질이 건강한 천연 각막의 미세구조 및 물리적 특성을 어떻게 모방하는 지를 묘사한다.

도 10은 유리화가 어떻게 높은 콜라겐 밀도, 양호한 강도, 및 투명도를 지닌 콜라겐 비트리겔을 형성시키는 지의 예시를 묘사하는 문헌[Biomaterials 34:9365-9372 (2013)]으로부터의 이미지이다.

도 11a-11b는 콜라겐 어셈블리를 위한 종래 기술 방법 및 본 발명의 하나 이상의 구체예 간의 대조를 묘사하는 예시이다. 11a) 정해진 원섬유 미세구조로의 콜라겐 타입 I의 생체내 자가-어셈블리는 데코린과 같은 소형 프로테오글리칸을 포함한다. 11b) 유사한 시험관내 미세구조는 콜라겐 삼중 나선에 대한 분자 샤페론으로서 사이클로텍스트린을 이용하여 수득될 수 있다.

도 12는 사이클로텍스트린 구조를 묘사하는 종래 기술 이미지이다. 사이클로텍스트린은 아밀로스(전분의 단편) 예시와 같이, 5개 이상의 α -D-글루코피라노사이드 단위 연결된 1- \rightarrow 4로 구성된다. 5-원 매크로사이클은 자연적인 것이 아니다. 최근에, 가장 큰 잘-특성화된 사이클로텍스트린은 32개 1,4-안하이드로글루코피라노사이드 단위를 함유하는 한편, 불충분하게 특성화된 혼합물로서, 적어도 150-원 고리형 올리고당류가 또한 공지되어 있다. 전형적인 사이클로텍스트린은 고리에 6 내지 8개 단위 범위의 다수의 글루코스 모노머를 함유하여, 원뿔형을 생성한다.

도 13은 본 발명의 CD CoI 임플란트 구체예의 투명도를 도시한다.

도 14는 본 발명의 CD CoI 임플란트 구체예의 각막 모방체 미세구조를 묘사한다.

도 15는 본 발명의 β CD-COOH CoI 임플란트의 생체모방체 미세구조의 클로즈업 현미경사진을 도시한다.

도 16은 본 발명의 임플란트 조성물의 생체적합성을 도시하는 각막세포 및 상피의 현미경사진을 묘사한다.

도 17은 본 발명의 임플란트 조성물의 생체적합성을 도시하는 H & E 염색된 섹션을 묘사한다.

도 18은 본 발명의 β CD CV 임플란트의 생체내 각막 이식의 사진을 묘사한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 하나 이상의 구체예에 따르면, 본 발명자들은 프로테오글리칸 대용물로서 사용하기 위해 사이클로텍스트린을 사용하여 생체모방체 콜라겐-기반 매트릭스 조성물을 조작하였다. 본 발명의 콜라겐 조성물에서 사이클로텍스트린의 혼입 유도는 콜라겐 열 안정성을 증가시켰으며 콜라겐 섬유발생을 저하시켰다. 그 결과, 두껍고 투명하고 기계적으로 강한 콜라겐-기반 조성물이 형성되었다. 이들 사이클로텍스트린-콜라겐 조성물은 각막 복구를 위한 치료학적 안구 임플란트로서 사용될 높은 가능성을 유지한다.

[0026] 구체예에 따르면, 본 발명은 제1 성분 및 제2 성분을 갖는 유리화 매트릭스 겔을 포함하는 조성물로서, 제1 성분이 콜라겐을 포함하며, 제2 성분이 사이클로텍스트린을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0027] 또 다른 구체예에 따르면, 콜라겐-사이클로텍스트린 조성물은 다층상 또는 다중-라멜라 구조로 형성될 수 있으

며, 여기에서 각 층의 두께는 제어될 수 있다. 예를 들어, 인간 각막은 10-500 마이크로미터 두께이다. 본 발명은 10-500, 25-500; 50-500; 100-500; 250-500의 두께 (마이크로미터)로 제조될 수 있다. 다층이 구조되고 다중-기능성을 지지하며, 이에 따라 조성물은 현재 인공 각막, 이식편 또는 패치보다 각막과 더욱 유사하게 작용한다. 추가적으로, 조성물은 표면이 코팅되어 생물학적 작용을 향상시킬 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물의 하나 이상의 구체예에 따르면, 본 발명자들은 콜라겐 비트리젤 기법을 사용하였다. 콜라겐 겔 유리화는 높은 투명도 및 강도의 콜라겐 막 또는 시트의 형성을 발생시키는 제어된 온도 및 제어된 습도에서의 느린 탈수화 과정이다. 콜라겐으로부터의 결합된 물의 방출은 엔트로피 증가를 유도하여 고밀도 원섬유의 형성을 추진한다. 콜라겐 겔의 유리화는 높은 콜라겐 밀도, 우수한 강도 및 더욱 높은 투명도를 갖는 비트리젤 막의 형성을 허용한다. (3 단계: 겔화, 유리화, 재수화). 종래에는, 더 높은 두께 (500 um)를 갖는 CV 막은 매우 낮은 투명도를 가졌다 (도 9, 10 및 11 참조).

[0029] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유리화" 또는 "비트리젤"은 조성물이 하나 이상의 콜라겐과 하나 이상의 사이클로텍스트린의 혼합물의 수용액으로 구성되며, 하이드로겔 형성을 허용함을 의미한다. 일부 구체예에서, 조성물의 겔화는 37°C의 온도에서 수행된다. 하이드로겔이 형성된 후, 하이드로겔은 유리화를 발생 허용하는 특정 기간 동안 예를 들어, 특정 온도 및 습도에서의 하이드로겔의 가열과 같은 탈수화에 의해 유리화된다. 일부 구체예에서, 유리화는 35 내지 45°C의 온도에서 수행되며, 약 30% 내지 50% 상대 습도의 습도에서 수행된다. 구체예에서, 유리화는 40°C의 온도 및 40%의 상대 습도에서 수행된다. 조성물의 유리화에 필요한 시간은 수일 내지 수주로 다양할 수 있다. 구체예에서, 조성물의 유리화를 위한 시간은 약 1 내지 2 주이다.

[0030] "겔"은 액체와 고체 사이의 물질의 상태를 지칭하며, 일반적으로 액체 매질 중에 팽윤된 가교 폴리머 네트워크로서 정의된다. 전형적으로, 겔은 고체 및 액체 둘 모두를 함유하는 2-상 콜로이드 분산물이며, 여기에서 고체의 양은 "졸"로서 언급된 2-상 콜로이드 분산물 중에서의 양보다 많다. 따라서, "겔"은 액체의 속성 중 일부 (즉, 형상은 탄성이 있으며 변형가능함) 및 고체의 속성 중 일부 (즉, 형상은 2-차원 표면 상에 3 차원을 유지 시키기에 충분히 불연속적임)를 지닌다.

[0031] "하이드로겔"은 탄성 겔을 형성하기 위해 물을 흡수할 수 있는 수-팽윤성 폴리머 매트릭스를 의미하며, 여기에서 "매트릭스"는 공유 또는 비공유 가교에 의해 함께 고정된 마크로분자의 3-차원 네트워크이다. 수성 환경에 놓일 경우, 무수 하이드로겔은 겔에 가교 정도에 의해 허용되는 범위까지 액체를 획득함으로써 팽윤된다.

[0032] 본 발명의 조성물은 콜라겐을 포함한다. 제1 성분의 콜라겐은 타입 I, 타입 II, 타입 III 및 타입 IV 콜라겐으로 구성된 군으로부터 선택된다. 구체예에서, 조성물의 제1 성분으로서 사용된 콜라겐은 타입 I 콜라겐이다. 당업자는 조성물 및 방법에 사용된 콜라겐이 하나 초과 유형의 콜라겐을 포함할 수 있음을 이해할 것이다.

[0033] 본 발명의 조성물은 또한 사이클로텍스트린을 포함한다. 제2 성분의 사이클로텍스트린은 α-사이클로텍스트린, β-사이클로텍스트린, 및 γ-사이클로텍스트린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 구체예에서, 조성물의 제2 성분으로서 사용된 사이클로텍스트린은 α-사이클로텍스트린이다. 당업자는 조성물 및 방법에 사용된 사이클로텍스트린이 하나 초과 유형의 사이클로텍스트린을 포함할 수 있음을 이해할 것이다.

[0034] 하나 이상의 구체예에 따르면, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용된 사이클로텍스트린은 다른 작용기 또는 모이어티로 화학적으로 치환될 수 있는 복수의 하이드록실기를 갖는다. 이러한 작용기 또는 모이어티의 예는 비제한적으로, 소수성기, 친수성기, 펩티드, 하이드록실기, C₁-C₆ 알킬, C₂-C₆ 알케닐, C₂-C₆ 알키닐, C₁-C₆ 하이드록시알킬, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알킬아미노, 디-C₁-C₆ 알킬아미노, C₁-C₆ 디알킬아미노 C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 티오알킬, C₂-C₆ 티오알케닐, C₂-C₆ 티오알키닐, C₆-C₂₂ 아릴옥시, C₂-C₆ 아실옥시, C₂-C₆ 티오아실, C₁-C₆ 아미도, C₁-C₆ 설펜아미도, C₁-C₆ 카르복실 및 이의 유도체를 포함하며, 또한 포스포네이트 및 설펜을 포함할 수 있다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 유리화 조성물은 사용 전에 수화된다.

[0036] 본 발명의 비트리젤 조성물은 광학적으로 투명하며 다양한 용도에 적합하다. 한 구체예에서, 비트리젤 조성물은 550 nm에서 약 96%의 광학 투명도를 갖는다.

[0037] 본 발명의 비트리젤 조성물이 대체 조직 또는 조직 충전체로서 사용하기에 적합한 임의의 특정 형상으로 몰딩되거나 형성될 수 있음이 이해될 것이다. 본 발명은 조직 결합부의 요망되는 형상을 취하도록 몰딩될 수 있고, 천연 세포 복구를 자극함으로써 조직 발달을 촉진할 수 있으며 최소 침습적 주입에 의해 잠재적으로 이식될 수 있

는 스캐폴드 등을 형성하기 위한 생체의 중합화 기법을 제공한다.

- [0038] 하나 이상의 구체예에서, 본 발명의 비트리겔 조성물은 대상체를 위한 인공 각막으로서 사용하기 위해 형성화될 수 있다.
- [0039] 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 제1 성분 및 제2 성분을 갖는 유리화 매트릭스 겔을 포함하는 조성물로서, 제1 성분은 콜라겐을 포함하며, 제2 성분은 사이클로텍스트린을 포함하며, 적어도 하나의 생물학적 활성 작용제를 추가로 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0040] "활성 작용제" 및 "생물학적 활성 작용제"는 요망되는 약물학적 및/또는 생리학적 효과를 유도하는 화학적 또는 생물학적 화합물을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 여기에서 효과는 예방학적 또는 치료학적 일 수 있다. 용어는 또한, 본원에 구체적으로 언급된 그러한 활성 작용제의 약학적으로 허용되는 약물학적 활성 유도체를 포함하며, 비제한적으로, 염, 에스테르, 아마이드, 프로드러그, 활성 대사산물, 유사체 및 기타 등등을 포함한다. 용어 "활성 작용제", "약물학적 활성 작용제" 및 "약물"이 본원에 사용되는 경우, 그러나 이는 본 발명이 활성 작용제 그 자체 뿐만 아니라 약학적으로 허용되는 약물학적 활성 염, 에스테르, 아마이드, 프로드러그, 대사산물, 유사체 등을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0041] "혼입된", "캡슐화된" 및 "포획된"은 치료제, 염료, 또는 기타 물질 및 본 발명의 조성물과 같은 폴리머 조성물과 관련하여 사용될 경우 당업계에 공지되어 있다. 특정 구체예에서, 이들 용어는 요망되는 적용 분야에서 그러한 제제의 지연된 방출을 허용하는 조성물로의 혼입, 제형화 또는 그렇지 않으면 내포를 포함한다. 용어는 치료제 또는 기타 물질이 매트릭스 내로 혼입되는 임의의 방식을 고려할 수 있으며, 이는 예를 들어, 매트릭스에 걸친 분포, (삼입 또는 기타 결합 상호작용에 의한) 매트릭스 표면으로의 부가, 매트릭스 내부로의 캡슐화 등을 포함한다. 용어 "공동-혼입" 또는 "공동-캡슐화"는 치료제 또는 기타 물질과 적어도 하나의 기타 치료제 또는 기타 물질의 대상 조성물로의 혼입을 지칭한다.
- [0042] 본 발명의 한 양태에서, 비트리겔 조성물 및 하나 이상의 생물학적 활성 작용제를 포함하는 조성물이 제조될 수 있다. 생물학적 활성 작용제는 조성물에 대한 의도된 목적에 따라 광범위하게 다양할 수 있다. 용어 활성은 당업계에 공지되어 있으며, 대상체에서 국소적으로 또는 전신으로 작용하는 생물학적, 생리학적 또는 약물학적 활성 물질인 임의의 모이어티를 지칭한다. "약물"로서 언급될 수 있는 생물학적 활성 작용제의 예는 널리 공지된 참조 문헌 예컨대, 문헌 [the Merck Index, the Physicians' Desk Reference, and The Pharmacological Basis of Therapeutics]에 기술되어 있으며, 이들은 비제한적으로, 의약; 비타민; 미네랄 보충제; 질환 또는 질병의 치료, 예방, 진단, 치유 또는 완화를 위해 사용되는 물질; 몸체의 구조 또는 기능에 영향을 끼치는 물질; 또는 생리학적 환경에 놓인 후에 생물학적으로 활성이 되거나 더욱 활성이 되는 프로-드러그를 포함한다. 대상체로의 투여시 비트리겔 조성물에 의해 예를 들어, 인접한 조직 또는 유체 내로 방출될 수 있는 다양한 형태의 생물학적 활성 작용제가 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 활성 작용제는 예를 들어, 눈과 함께 질환 또는 증상을 예를 들어, 치료하거나, 완화시키거나, 억제하거나 예방하는데 사용될 수 있다.
- [0043] 생물학적 활성 작용제의 비제한적 예는 하기를 포함한다: 아드레날린 차단제, 동화제, 안드로겐성 스테로이드, 항-알레르기 물질, 항-콜린제 및 교감신경작용제, 항-고혈압제, 항-감염제, 항-염증제 예컨대, 스테로이드, 비-스테로이드 항-염증제 (NSAIDS), 해열제 및 진통제, 항히스타민, 생물학적 제제, 충혈제거제, 진단제, 에스트로겐, 이온 교환 수지, 유사분열제, 점액 용해제, 성장 인자, 신경근육제, 영양 물질, 말초혈관 확장제, 월경전기제, 프로스타글란딘, 비타민, 향원 물질 및 프로드러그를 포함한다.
- [0044] 본 발명의 조성물에 사용된 NSAIDS의 예는 메페남산, 아스피린, 디플루니살(Diflunisal), 살살레이트(Salsalate), 이부프로펜(Ibuprofen), 나프록센(Naproxen), 페노프로펜(Fenoprofen), 케토프로펜(Ketoprofen), 데아케토프로펜(Deacetoprofen), 플루르비프로펜(Flurbiprofen), 옥사프로진(Oxaprozin), 록소프로펜(Loxoprofen), 인도메타신(Indomethacin), 설린닥(Sulindac), 에토돌락(Etodolac), 케톨락(Ketorolac), 디클로페낙(Diclofenac), 나부메톤(Nabumetone), 피록시캄(Piroxicam), 멜록시캄(Meloxicam), 테녹시캄(Tenoxicam), 드록시캄(Droxicam), 로르녹시캄(Lornoxicam), 이속시캄(Isoxicam), 메클로페남산(Meclofenamic acid), 플루페남산(Flufenamic acid) 톨페남산(Tolfenamic acid), 엘레코시킵(elecoxib), 로페코시킵(Rofecoxib), 발데코시킵(Valdecoxib), 파레코시킵(Parecoxib), 루미라코시킵(Lumiracoxib), 에토리코시킵(Etoricoxib), 피로코시킵(Firocoxib), 설펜아닐리드(Sulphonamide), 니메실피드(Nimesulide), 니플룸산(Niflumic acid), 및 리코펠론(Licofelone)을 포함한다.
- [0045] 다양한 형태의 생물학적 활성 작용제가 사용될 수 있다. 이들은 비제한적으로, 대상체 내로 이식되거나, 주입되

거나 그렇지 않으면 위치하게 될 때 생물학적으로 활성화되는 그러한 형태의 비하전된 분자, 분자 착물, 염, 에테르, 에스테르, 프로드러그 형태 및 기타 등등을 포함한다.

[0046] 비트리겔 조성물은 우수한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제형화되고, 투약되고 투여될 것이다. 이러한 상황에서 고려되는 요소는 치료될 특정 질환, 치료될 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 질환의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 행위자에게 공지된 기타 요소를 포함한다. 투여될 비트리겔 조성물의 "치료학적 유효량"은 이러한 고려 사항에 의해 좌우되며, 해당 질환의 예방, 완화 또는 치료에 필요한 최소량일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 치료 (예를 들어, 예방학적 제제 또는 치료학적 제제)의 양을 지칭하는 것과 동일한 문구이며, 이는 질환의 중증도 및/또는 기간을 감소시키거나, 이의 하나 이상의 증상을 경감시키거나, 질환의 진행을 예방하거나 질환의 후퇴를 초래하기에 충분한 양, 또는 질환 또는 이의 하나 이상의 증상의 발달, 재발, 발병 또는 진행의 예방을 유도하거나 질환 치료에 유용한 기타 치료법 (예를 들어, 또 다른 치료제)의 예방학적 및/또는 치료학적 효과(들)를 향상시키거나 증가시키기에 충분한 양이다.

[0047] 한 구체예에서, 손상된 조직의 복구는 조직을 복구시키기 위해 접근을 허용하는 개복 수술 및 복강경 기법을 포함하는 표준 외과적 과정의 상황 내에서 수행될 수 있다. 일단 손상된 조직에 접근하게 되면, 본 발명의 비트리겔 조성물이 필요에 따라 임의의 외과적으로 허용되는 패치 또는 임플란트와 함께 손상된 조직과 접촉되도록 위치시킨다.

[0048] 추가 구체예에 따르면, 본 발명은 제1 성분 및 제2 성분을 갖는 유리화 매트릭스 겔을 제조하는 방법으로서, 제1 성분이 콜라겐을 포함하며, 제2 성분이 사이클로텍스트린을 포함하며, a) 콜라겐의 수용액을 수득하고; b) 사이클로텍스트린의 수용액을 수득하고; c) a)의 용액 및 b)의 용액을 합하고; d) 용액을 유리화시키기 위해 충분한 시간 동안 c)의 합한 용액을 탈수시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0049] 본원에서 사용되는 바와 같이, 콜라겐의 수용액은 적합한 완충제에 용해된 임의 콜라겐 용액이다. 콜라겐의 농도는 가변적이지만, 1 mg/ml 내지 약 10 mg/ml 범위의 농도를 갖는 콜라겐의 용액은 본 발명의 방법과 함께 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 수용액 중 콜라겐의 농도는 약 5 mg/ml이다.

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같이, 사이클로텍스트린의 수용액은 적합한 완충제에 용해된 임의 사이클로텍스트린 용액이다. 사이클로텍스트린의 농도는 가변적이지만, 2.5 mg/ml 내지 약 10 mg/ml 범위의 농도를 갖는 사이클로텍스트린의 용액은 본 발명의 방법과 함께 사용될 수 있다.

[0051] 본 발명의 방법에 따르면, 본 발명의 조성물의 탈수화 및 유리화는 약 5 내지 40°C의 온도에서, 그리고 약 30 내지 50%의 상대 습도에서, 약 3일 내지 약 28일의 시간 동안 콜라겐 용액 및 사이클로텍스트린을 포함하는 용액을 건조시키는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물의 유리화는 39°C의 온도에서 약 7일 동안 콜라겐 용액 및 사이클로텍스트린을 포함하는 용액을 가열시키는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물의 유리화는 39°C의 온도에서 약 14일 동안 콜라겐 용액 및 사이클로텍스트린을 포함하는 용액을 가열시키는 것을 포함한다.

[0052] 용어 "담체"는 본 발명의 비트리겔 조성물과 함께 치료제를 공급하는 희석제, 어주버트, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 생리학적 담체는 멸균 액체, 예를 들어, 물 및 오일일 수 있으며, 이는 석유, 동물, 식물성 또는 합성 기원의 것들, 예를 들어, 땅콩 오일, 대두유, 미네랄 오일, 참기름, 등을 포함한다. 물은 약제 조성물이 정맥내로 투여될 때 적합한 담체이다. 염수 용액 및 수성 텍스트로오스 및 글리세롤 용액은 또한, 특히 주사 가능한 용액을 위한, 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 쇼크, 실리카겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 소듐 클로라이드, 건조된 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올, 등을 포함한다. 조성물은, 요망되는 경우에, 또한, 소량의 습윤화 또는 에멀전화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다.

[0053] 완충제, 산 및 염기는 pH를 조절하기 위해 조성물에 도입될 수 있다. 조성물로부터 방출되는 시약의 확산 거리를 증가시키기 위한 시약이 또한 포함될 수 있다.

[0054] 완충제는 pH를 생리학적 조건과 비슷한 범위로 유지시키는데 도움을 준다. 완충제는 바람직하게, 약 2 mM 내지 약 50 mM 범위의 농도로 존재한다. 본 발명과 함께 사용하기 위한 적합한 완충제는 유기산 및 무기산 둘 모두, 및 이들의 염, 예를 들어, 시트레이트 완충제(예를 들어, 모노소듐 시트레이트-디소듐 시트레이트 혼합물, 시트르산-트리소듐 시트레이트 혼합물, 시트르산-모노소듐 시트레이트 혼합물, 등), 숙시네이트 완충제(예를 들, 숙신산 모노소듐 숙시네이트 혼합물, 숙신산-소듐 하이드록사이드 혼합물, 숙신산-디소듐 숙시네이트 혼합물, 등), 타르트레이트 완충제(예를 들어, 타르타르산-소듐 타르트레이트 혼합물, 타르타르산-칼륨 타르트레이트 혼

합물, 타르타르산-소듐 하이드록사이드 혼합물, 등), 푸마레이트 완충제(예를 들어, 푸마르산-모노소듐 푸마레이트 혼합물, 푸마르산-디소듐 푸마레이트 혼합물, 모노소듐 푸마레이트-디소듐 푸마레이트 혼합물, 등), 글루코네이트 완충제(예를 들어, 글루콘산-소듐 글리코네이트 혼합물, 글루콘산-소듐 하이드록사이드 혼합물, 글루콘산-칼륨 글루코네이트 혼합물, 등), 옥살레이트 완충제(예를 들어, 옥살산-소듐 옥살레이트 혼합물, 옥살산-소듐 하이드록사이드 혼합물, 옥살산-칼륨 옥살레이트 혼합물, 등), 락테이트 완충제(예를 들어, 락트산-소듐 락테이트 혼합물, 락트산-소듐 하이드록사이드 혼합물, 락트산-칼륨 락테이트 혼합물, 등) 및 아세테이트 완충제(예를 들어, 아세트산-소듐 아세테이트 혼합물, 아세트산-소듐 하이드록사이드 혼합물, 등)을 포함한다. 포스페이트 완충제, 카르보네이트 완충제, 히스티딘 완충제, 트리메틸아민 완충제, 예를 들어, 트리스(Tris), HEPES 및 다른 이러한 공지된 완충제들이 사용될 수 있다.

[0055] 보존제는 미생물 성장을 지연시키기 위해 첨가될 수 있고, 0.2% 내지 1%(w/v) 범위의 양으로 첨가될 수 있다. 본 발명과 함께 사용하기 위한 적합한 보존제는 페놀, 벤질 알코올, m-크레졸, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤지아코늄 할라이드(예를 들어, 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드), 헥사메토늄 클로라이드, 알킬 파라벤, 예를 들어, 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레소르시놀, 사이클로헥산을 및 3-펜탄올을 포함한다.

[0056] 등장화제(isotonicifier)는 본 발명의 액체 조성물의 생리학적 등장성(isotonicity)을 확보하기 위해 존재하고, 다가 당 알코올, 바람직하게, 삼가 또는 고차의 당 알코올, 예를 들어, 글리세린, 에리스리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨, 및 만니톨을 포함한다. 다가 알코올은 다른 성분들의 상대적인 양을 고려하여, 약 0.1 중량% 내지 약 25 중량%, 바람직하게 1 중량% 내지 5 중량%의 양으로 존재할 수 있다.

[0057] 생체내 투여를 위해 사용되는 제형은 멸균되어야 한다. 그러한 것은 예를 들어, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 제형은 여과에 의해 멸균될 수 있다.

[0058] 하나 이상의 구체예에 따르면, 본 발명의 조성물을 포함하는 안과용 제형(ophthalmic formulation)이 제공되며, 여기서, 제형은 대상체의 안구에 투여하기에 적합하다. 안과용 제형은 5.5 내지 7의 pH를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 안과용 제형은 수성 제형이다. 일부 구체예에서, 안과용 제형은 단일 투약 단위의 형태이다. 일부 구체예에서, 안과용 제형은 보존제를 포함하지 않는다. 안과용 제형은 하나 이상의 추가적인 치료제, 예를 들어, 항산화제를 추가로 포함할 수 있다. 안과용 제형은 하나 이상의 눈물 대체물(tear substitute)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 눈물 대체물은 안과용 윤활제(예를 들어, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스)를 함유한다.

[0059] 다양한 눈물 대체물은 당해 분야에 공지되어 있고, 모노머 폴리올, 예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 에틸렌 글리콜; 폴리머 폴리올, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜; 셀룰로오스 에스테르, 예를 들어, 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스, 카복시 메틸셀룰로오스 소듐 및 하이드록시 프로필셀룰로오스; 텍스트란, 예를 들어, 텍스트란 70; 수용성 단백질, 예를 들어, 젤라틴; 비닐 폴리머, 예를 들어, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 및 포비돈; 및 카보머, 예를 들어, 카보머 934P, 카보머 941, 카보머 940 및 카보머 974P를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 다수의 이러한 눈물 대체물은 상업적으로 입수 가능하며, 이는 셀룰로오스 에스테르, 예를 들어, Bion Tears®, Celluvisc®, Genteal®, OccuCoat®, Refresh®, Teargen II®, Tears Naturale®, Tears Natural II®, Tears Naturale Free®, 및 TheraTears®; 및 폴리비닐 알코올, 예를 들어, Akwa Tears®, HypoTears®, Moisture Eyes®, Murine Lubricating®, 및 Visine Tears®를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 눈물 대체물은 또한, 파라핀, 예를 들어, 상업적으로 입수 가능한 Lacri-Lube® 연고로 이루어질 수 있다. 눈물 대체물로서 사용되는 다른 상업적으로 입수 가능한 연고는 Lubrifresh PM®, Moisture Eyes PM® 및 Refresh PM®을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예를 들어, 항균제, 항산화제, 킬레이트제, 및 불활성 가스, 등이 또한 존재할 수 있다.

[0060] 실시예

[0061] 상이한 사이클로텍스트린이 도입된 타입 I 콜라겐-기반 막을 하기 3-스테이지 순서에 따라 제조하였다: 겔화, 유리화 및 재수화. 세 가지 타입의 사이클로텍스트린, 즉, α -CD, β -CD 및 γ -CD를 시험하고 비교하였다.

[0062] CD 용액의 제조: 다양한 CD(예를 들어, α , β 및 작용기, COOH, t-부틸, SH, NH₂)를 갖는 모든 용액을 여기에 서 기술된 바와 같은 절차로 제조하였다: 예를 들어, 20 nM HEPES(50 ml 팔콘 튜브(falcon tube)에서 1 mL HEPES, 49 mL H₂O 및 125 mg β -CD)를 갖는 dH₂O 중 β -CD 용액(2.5 mg/mL)을 첨가하고, 철저히 와류시켜 완전히 용해시켰다. 후속하여, 이러한 용액의 pH를 소듐 하이드록사이드(2N) 용액을 사용하여 11까지 증가시키고,

0.22 μm 시린지 필터를 통해 여과하고, 1 내지 4°C에서 저장하였다.

[0063] β -CD 콜라겐 겔의 제조: 콜라겐 및 CD의 다양한 겔을 여기에서 기술된 바와 같은 절차로 제조하였다: 예를 들어, 동일한 부피의 β -CD 용액(2.5 mg/mL 및 상기 제조된 바와 같음) 및 콜라겐 아세트산 용액(5 mg/mL)을 함께 혼합하고, 제조 전반에 걸쳐 4°C 이하에서 유지시켰다. 혼합으로 인한 공기 버블 형성을 방지하기 위해 특별히 주의하였다. 이후에, 혼합물을 겔 몰드(gel mold)로 옮기고, 37°C 100% RH 인큐베이터에서 2시간 동안 유지시켰다.

[0064] β -CD 콜라겐의 유리화 및 후-가공: 37°C에서 2시간 인큐베이션 후에, 겔을 18시간 동안 5°C(40% RH) 유리화 챔버로 옮겼다. 다음에, 겔을 1주일 동안 40°C 유리화 챔버(40% RH)로 옮겼다. 1주일 후에, 탈수된 β -CD 콜라겐 막(비트리겔)을 30분 동안 dH_2O 에서 재수화시켰다. 필요한 경우에, 비트리겔을 37°C에서 30분 동안 dH_2O 중 0.1% EDAC 및 0.1% NHS를 사용하여 가교하고, dH_2O 를 사용하여 적어도 5 차례 세척하여, 미량의 EDAC 및 NHS를 제거하였다. 친수성 작용기는 도 1b에 도시된 바와 같이 라멜라 구조를 유도한다.

[0065] 두 개의 콜라겐 막, 즉, 콜라겐 비트리겔 및 가교된 비트리겔을 이전에 기술된(Biomaterials 34 (2013) 9365-9372) 바와 같은 절차에 따라 대조군으로서 제조하였다. 일반 비트리겔과 비교하여, 겔화 공정 전에 콜라겐 매질 혼합물 중 추가 0.6% 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC) 및 0.6% N-하이드록시숙신이미드(NHS)로 가교된 비트리겔을 제조하였다. 콜라겐과 CD 간의 특정 상호작용을 시차 주사 열량측정법(DSC, Perkin Elmer, Waltham, MA)을 이용하여 평가하였다. CD-col 막의 흡광도를 Synergy 2 마이크로플레이트 판독기(BioTek, Winooski, VT)를 이용하여 측정하였다. 막 봉합성(membrane suturability)을 Electroforce 3200 시험기기(Bose, Eden Prairie, MN)를 이용하여 10-0 나일론 봉합사(suture)로 시험하였다.

[0066] 각막세포를 순차적 콜라게나아제(Type 2, Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) 소화를 이용하여 전체-두께 각막으로부터 단리시켰다. 소화된 세포를 모으고, 10분 동안 1400 rpm에서 원심분리하였다. 세포 펠렛을 재현탁시키고, 37°C 및 5% CO_2 에서 일반 조직 배양 플레이트(TCP) 또는 CV-커버링된 플레이트 상에서 배양하였다. 혈청-부재 배양 배지 또는 혈청 기반 배양 배지 중 어느 하나를 사용하였다. 혈청-부재 배지는 DMEM/F-12, 1%의 10 U/mL 페니실린/스트렙토마이신, 및 0.5%의 1.25 mg/mL 암포테리신 B(Life Technologies, Carlsbad, CA)로 이루어졌다. 혈청-기반 배지는 DMEM/F-12, 10% FBS, 1%의 10 U/mL 페니실린/스트렙토마이신, 및 0.5%의 1.25 mg/mL 암포테리신 B를 함유하였다. 세포를 혈청-부재 배지를 사용하여 5,000개의 세포/ cm^2 의 농도로 플레이팅하고, 혈청-기반 배지를 사용하여 1,000개의 세포/ cm^2 의 농도로 플레이팅하였다. 이미징 및 유전자 발현 분석 전에, 각막세포를 혈청-부재 배지 중에서 3주에 걸쳐 배양시키거나 혈청-기반 배지에서 6일에 걸쳐 배양하였다. LIVE/DEAD® 생존능력/세포독성 키트(Viability/Cytotoxicity Kit)(Life Technologies)로 염색함으로써 각막세포 모폴로지를 시험하였다. 소정 시간 동안 0.1% 인도메타신 점안액 중에 유리화 막을 액침시킴으로써 인도메타신을 비트리겔에 캡슐화하였다. 비트리겔로부터의 인도메타신의 용리를 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 측정하였다. 방출 용액을 51:49(v/v)의 아세토니트릴:물의 이동상, C18 컬럼, 및 318 nm에서 셋팅된 UV/VIS 검출기를 이용하여 시험하였다.

[0067] 실시예 1

[0068] 모두 세 가지의 사이클로덱스트린, 특히, α -CD는 투명하고 기계적으로 강력한 CD-col 막의 형성을 야기시키는, 타입 I 콜라겐 삼중 나선과의 강력한 상호작용을 나타내었다. 도 1a에 도시된 바와 같이, 일반 비트리겔은 열 흐름 중에 55°C에서 크고 넓은 흡열 피크를 나타내었는데, 이는 콜라겐 막이 40.8 J/g의 엔탈피로 열변성된다는 것을 명시하는 것이다. 반대로, 가교된 비트리겔의 대조 샘플에서 구별 가능한 피크가 발견되지 않았는데, 이는 가교 반응으로 인한 콜라겐 막의 변성된 특성을 시사한다. 일반 비트리겔과 비교하여, 콜라겐 막에서 α -CD의 첨가는 증가된 변성 온도를 야기시켰는데, 이는 향상된 열적 안정성을 명시하는 것이다. 단지 단일의 보다 좁은 피크는 α -CD-col에서 관찰되었으며, 이는 매트릭스가 균질한 구조를 갖는다는 것을 의미한다. 본 발명자들이 모든 엔탈피가 콜라겐 삼중 나선의 열적 전이로부터 비롯된다고 가정하는 경우에, α -CD-col의 변성 엔탈피는 일반 비트리겔로부터의 변성 엔탈피의 70.1%이었는데, 이는 감소된 콜라겐 섬유성장을 시사하는 것이다. 유사한 결과가 또한, β -CD-col 및 γ -CD-col에서 관찰되었다.

[0069] 실시예 2

[0070] 통상적인 콜라겐 막과 비교해 볼 때, CD-col 막은 크게 향상된 투명도를 나타냈는데(도 2), 이는 감소된 콜라겐 섬유형성에 의해 설명될 수 있다.

- [0071] 타입 I 콜라겐-CD 막은 각막 재생을 위해 최적화된 광학적 및 기계적 특성으로 발달되었다. CD는 내부 소수성 코어 및 외부 친수성 고리를 지니는 6 내지 8개의 글루코스 분자의 고리를 나타낸다. 모든 3개의 CD, 특히 α -CD는 콜라겐 삼중 나선과 강한 상호작용을 나타내어 기계적으로 강한 콜라겐-CD 막의 형성을 야기하였다. 콜라겐-CD 막은 통상적인 콜라겐 막보다 현저히 높은 투명도를 나타냈는데, 이는 통상적인 콜라겐 막 (~80 nm)에 비해 콜라겐-CD 막 (~20 nm)에서 콜라겐 원섬유 직경이 크게 감소된 것으로 설명될 수 있다. 게다가, 무작위 원섬유 조직화를 나타내는 통상적인 콜라겐 막과는 달리, 콜라겐-CD 막은 일부 영역에서 아마도 CD에 의한 콜라겐 삼중 나선의 재조직화로 인해 정렬된 원섬유인 것으로 입증되었다. 또한, 콜라겐-CD 막은 점안액으로부터 안과용 약물인 인도메타신(indomethacin)을 흡수한 후, 약물을 5시간 이내에 서서히 방출시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0072] 타입 I 콜라겐 막에 사이클로덱스트린을 도입하는 것은 콜라겐 원섬유형성 및 정렬을 규제하고, 막에서 광학적, 기계적 및 약물 방출 특성을 개선시켰다.
- [0073] 실시예 3
- [0074] 본 발명의 조성물은 우수한 기계적 특성인 것으로 입증되었다. 이들의 두께를 인간 각막의 두께 (즉, ~500 μ m)와 비교해 볼 때, 이들은 봉합에 충분히 강했다. 도 3에 나타나 있는 바와 같이, 나일론 봉합은 520 μ m의 두께를 지니는 α -CD-co1 막에서 구멍을 통해 당겨져 있었다. 봉합의 응력하에, 두꺼운 막에서 구멍은, 170 μ m의 두께를 지니는 얇은 것에서 관찰되는 바와 같이 막을 통해 찢어지는 대신에, 단지 신장되었다(도 4).
- [0075] 실시예 4
- [0076] 콜라겐 나노구조로 세포 반응이 지정된다. 소의 각막세포의 일차 배양을 낮은 및 높은 콜라겐 밀도를 지니는 비트리젤 조성물 상에서 배양하였다. 도 5에 나타나 있는 바와 같이, 본 발명의 조성물의 콜라겐 밀도는, 일반적인 비트리젤 대조군에 비해, 각막세포가 배양액에서 더 큰 돌출 면적을 지니는 것을 가능하게 하였다. 또한, 각막세포의 세포 돌출의 총 갯수는, 본 발명의 비트리젤 조성물의 콜라겐 밀도의 함수가 증가함에 따라서 현저히 증가하였다(도 5).
- [0077] 실시예 5
- [0078] 각막세포 유전자 발현은 원섬유 구조에 의존적이다. 각막세포를 대조 비트리젤 상에서, 또는 비트리젤을 5 $^{\circ}$ C 또는 39 $^{\circ}$ C의 온도에서 탈수시킨 본 발명의 비트리젤 조성물과 함께 배양하였다. 혈청-기반 배지에서 6일 동안 성장시킨 후, 세포를 채취하고, 케라토칸, 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase: ALDH) 및 비글리칸의 유전자 발현에 대하여 분석하였다. 이러한 유전자들의 발현을, TRIzol 시약(Life Technologies)을 사용하여 배양된 각막세포로부터 전체 RNA를 분리하고, SuperScript II First Strand Synthesis Kit (Life Technologies)를 사용하여 cDNA로 역복제하고, 이후 StepOnePlus Real-Time PCR 시스템(Applied Biosystems[®], Life Technologies) 상에서 실시간 PCR 반응을 이용하여 cDNA를 시험함으로써 분석하였다. 도 6에 나타나 있는 바와 같이, 대조군과 비교해 볼 때, 케라토칸 및 ALDH의 유전자 발현은, 고온에서 탈수된 비트리젤 조성물 상에서 세포를 성장시키는 경우에 크게 증가하였다. 비글리칸의 발현은 저온과 고온 둘 모두에서 대조군에 비해 비트리젤 조성물에서 감소하였다.
- [0079] 실시예 6
- [0080] 본 발명의 비트리젤 조성물은 생물학적 활성 작용제를 전달하는데 사용될 수 있다. 비트리젤 조성물을 상기와 같이 제조하고, 비트리젤을 탈수시킨 후 에탄올 중의 0.1% 인도메타신의 상업적으로 입수가 가능한 점안액 형성의 용액을 10분 동안 2방울을 이용하거나 1 mL의 점안액에 밤새 침지시킴으로써 조성물에 첨가하고, HPLC를 사용하여 방출 속도를 시험하였다. 비트리젤 조성물은 비트리젤 조성물로부터 인도메타신을 5시간의 기간에 걸쳐 방출한 것으로 밝혀졌다.
- [0081] 본 발명의 타입 I 콜라겐-CD 조성물을 각막 재생을 위해 최적화된 광학적 및 기계적 특성으로 발달시켰다. 어떠한 특정 이론으로 제한하려는 것은 아니지만, 이러한 특성들은 아마도 사이클로덱스트린-혼입된 콜라겐 조성물에서 규제된 콜라겐 원섬유형성에서 기인된 것이다(도 7). 이러한 본 발명의 조성물은 각막 복구 및 치료를 위한 치료용 안대로서 사용될 수 있는 큰 잠재력이 있다. 본원에 개시된 조성물 및 방법은 또한 원섬유-형성 콜라겐으로부터 유래되는 다른 연결 조직, 예컨대, 연골, 피부 및 혈관의 재생에 유용할 수 있다.
- [0082] 실시예 7

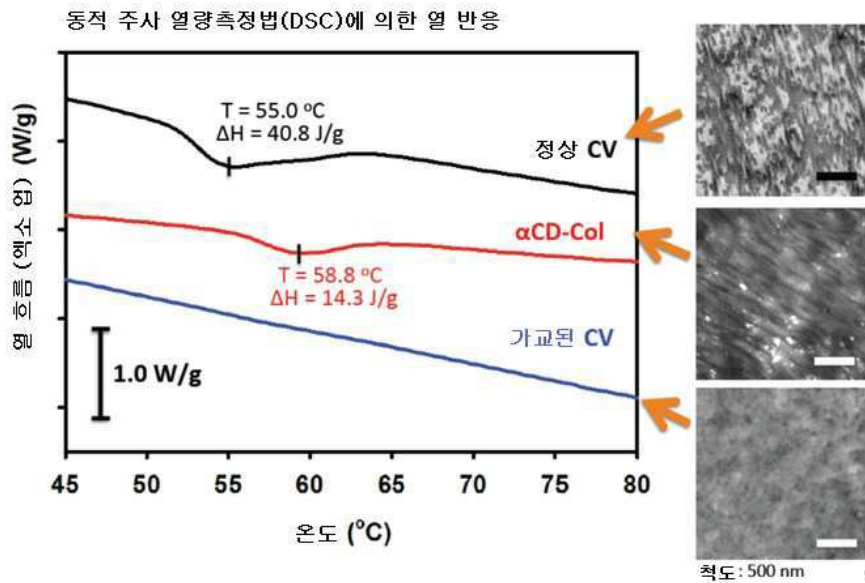
- [0083] 콜라겐 원섬유 조직화에 대한 사이클로덱스트린과 콜라겐의 상호작용의 영향을 연구하였다. 산성 용액 중의 콜라겐 타입 I을 조성이 다른 사이클로덱스트린과 조합하였다. 이러한 용액은 이후 pH를 증가시키도록 완충되어 겔을 형성시킬 수 있다. 그 후에, 이러한 겔을 1주의 기간에 걸쳐 유리화시키고, 이후, CD-CoI의 건조 시트를 재탈수시켰다. 임상에서 그러한 임플란트의 요건에 매칭시키기 위해 다양한 샘플 특성화를 수행하였다.
- [0084] 다음과 같이 물질을 제조하였다: 적절한 완충액 중의 콜라겐 타입 I 및 사이클로덱스트린 용액을 사용하여 하이드로겔을 형성시켰다. 유리화 공정을 제어된 온도 및 상대 습도에서 1 주의 기간에 걸쳐 수행하였다. 사이클로덱스트린 콜라겐 비트리겔 임플란트를 재탈수시켰다.
- [0085] 샘플에는 다음 임상 특성/시험이 필요했다: 광 투과율; 투과 전자 현미경; 기계적 시험; 시험관내 생체적합성 연구; 예비 생체내 연구.
- [0086] 이와 같이 제조된 사이클로덱스트린/콜라겐 물질은 특히 사이클로덱스트린이 없는 전형적인 비트리겔과 비교해 볼 때 500 마이크론의 두께에서도 투명하였다. 추가로, 사이클로덱스트린의 유형 및 작용기에 좌우하여 투명도의 변화가 보여지는 것으로 관찰되었다. 이러한 임플란트들의 대부분은 인간 각막과 비슷한 투명도, 즉, 가시광 영역에서 90% 초과 투명도를 나타냈다. 흥미롭게도, 또한 이러한 두꺼운 시트는 충분한 힘으로 더 얇은 시트로 층에 의해 분리된 층일 수 있는 것으로 관찰되었다(도 13 참조). 이는 이러한 층이 얻어지는 곳을 알아내기 위하여 TEM에서 이들을 가시화하게 하였다. 다양한 미세구조가 보여졌다. 특히, 천연 각막 기질의 박막층과 유사한 자가 어셈블링된 박막층을 나타낸, COOH 작용기를 지니는 CD가 특히 흥미로웠다(도 14 참조). 단면에서 알 수 있는 바와 같이, 이들은 박막층으로 자가 어셈블링되었을 뿐만 아니라, 각각의 박막층에서 콜라겐은 섬유 정렬인 것으로 입증되었고, 인접한 박막층에서의 섬유는 서로에 대해 직교로 작용하였다(도 15 참조). 개별적인 CD 성분을 지니는 임플란트의 강도를 측정하기 위해 기계적 시험을 수행하고, 또한 CD의 타입간에 전체적인 차이를 알아보았다. β -CD 콜라겐 임플란트는 가장 높은 영률(Young's modulus)을 지니고, 또한 가장 낮은 그래프에서 알 수 있는 바와 같이, CD를 지니는 모든 임플란트는 파단시 매우 높은 변형율인 것으로 입증된 것이 흥미로운 점이었는데, 이는 이러한 물질이 직접적으로 골절 저항성인 것으로 의미될 수 있는 특성으로서 고도로 신장가능하거나, 이러한 경우에 융합성이었음을 암시하는 것이다(도 16 참조). 임플란트가 생체적합성을 확인하기 위하여, 임플란트를 지니는 각막세포와 상피 세포 둘 모두의 시험관내 배양을 검사하였다. 알 수 있는 바와 같이, 임플란트는 이들의 표면 상에 성장하고 있는 문제를 지니지 않았다(도 17 참조). 또한, 다소 통상적이지는 않지만, 피하로의 생체적합성을 또한 시험하였다. 피하 임플란트가 어떠한 불리한 면역 반응을 초래하지 않는 경우, 이는 아마도 이러한 임플란트가 면역 특권 각막에 대하여 부정적인 영향을 지니지 않을 것이라고 언급될 수 있다(도 18). 추가로, 이러한 임플란트를 눈의 곡률에 매칭시키기 위해 특수 몰드에서 발달시켰다. 우측에서 알 수 있는 바와 같이, 임플란트는 각막 표면 상에 잘 자리잡고 있다.
- [0087] 이러한 각막을 토끼 눈에 이식함으로써 파일롯 연구에 착수하였다. 규칙적으로 끊어지는 봉합사로 물질을 잘 고정시킬 수 있었다(도 19). CD 분자는 콜라겐 원섬유의 어셈블링이 천연 각막의 조직화를 모방하게 유도하는 인공 샤페론으로서 작용하는 것으로 결론지어졌다. CD 콜라겐 임플란트는 생체적합하고, 각막-모방체 특성을 지녔다. 미세구조 및 현미경 특성을 CD 작용화에 의해 조절하였다. CD 콜라겐 임플란트는 높은 투명도, 용이한 봉합성 및 생체모방성 미세구조로 인해 각막 대체물로서 가능성을 나타냈다.
- [0088] 본원에 언급된 간행물, 특허 출원, 및 특허를 포함한 모든 참조문헌은, 각각의 참조문헌이 개별적으로 그리고 구체적으로 참조로 포함되는 것으로 지시되어 있고 이의 전체가 본원에 기재된 정도와 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.
- [0089] 본 발명을 기술하는 문맥에서(특히 하기 청구범위의 문맥에서) 용어 "단수형" 및 유사한 지시어의 사용은, 달리 본원에서 지시되거나 문맥에서 분명하게 반박되지 않는 한, 단수형과 복수형 둘 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 "~을 포함하는", "~을 지니는", 및 "~을 함유하는"은 달리 언급되지 않는 한 포괄적인 용어(즉, "~을 포함하지만, 이로 제한되지 않는"으로 의미됨)인 것으로 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위의 열거는, 본원에서 달리 지시되지 않는 한 범위 내에 속하는 각각의 별개의 값으로 개별적으로 언급되는 단지 속기법으로 작용하고자 의도된 것이고, 각각의 별개의 값이 본원에서 개별적으로 언급되는 경우에 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 달리 본원에서 지시되거나 달리 문맥에서 분명하게 반박되지 않는 한 어떠한 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에서 제공되는 임의의 및 모든 실시예, 또는 예시적인 언어(예, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 이해시키기 위해 의도된 것이며, 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위에 제한을 가하지 않는다. 명세서 내에 있는 언어는 본 발명의 실시예 필수적인 어떠한 비-청구된 요소를 지시하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0090]

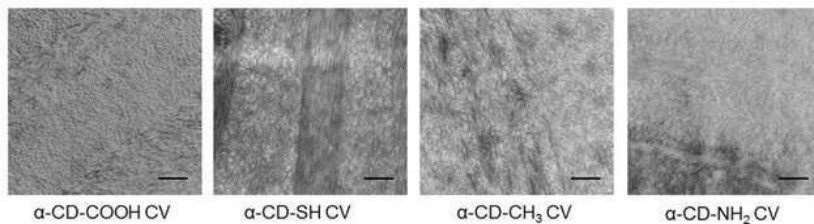
본 발명의 바람직한 구체예는 발명을 수행하는 위해 본 발명자에게 알려진 가장 우수한 방식을 포함하여 본원에 기술된다. 그러한 바람직한 구체예의 변화는 상기 설명을 읽는 때에 당업자에게 분명해질 수 있다. 본 발명자들은 당업자가 그러한 변화를 적절히 사용할 것으로 예상하며, 본 발명자들은 본 발명이 본원에서 구체적으로 기재된 것보다 달리 실시될 것으로 의도한다. 이에 따라서, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용되는 것으로 이에 첨부된 청구항에서 언급되는 주제의 모든 변형에 및 등가물을 포함한다. 더욱이, 이의 모든 가능한 변화에서 상술된 요소들의 임의의 조합이 달리 본원에서 지시되거나 달리 문맥에서 분명하게 반박되지 않는 한 본 발명에 의해 포함된다.

도면

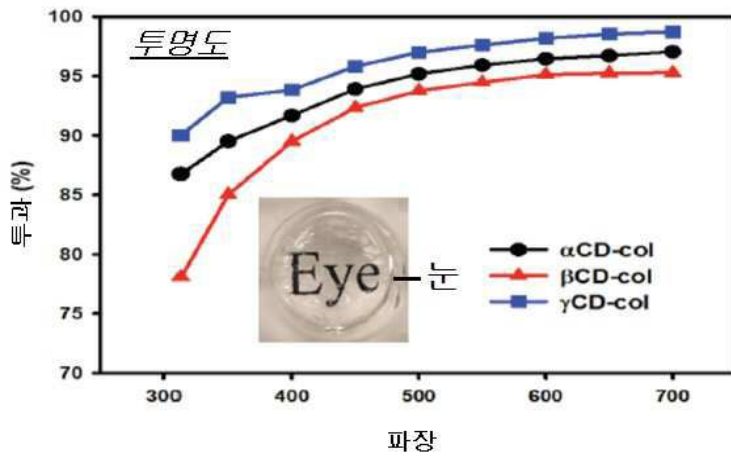
도면1a



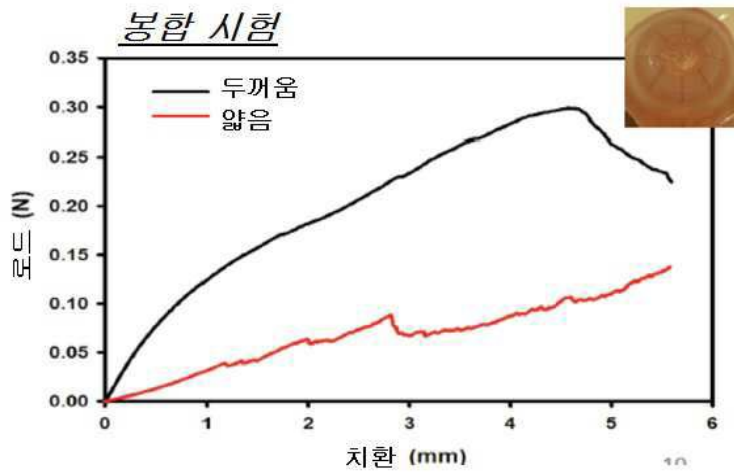
도면1b



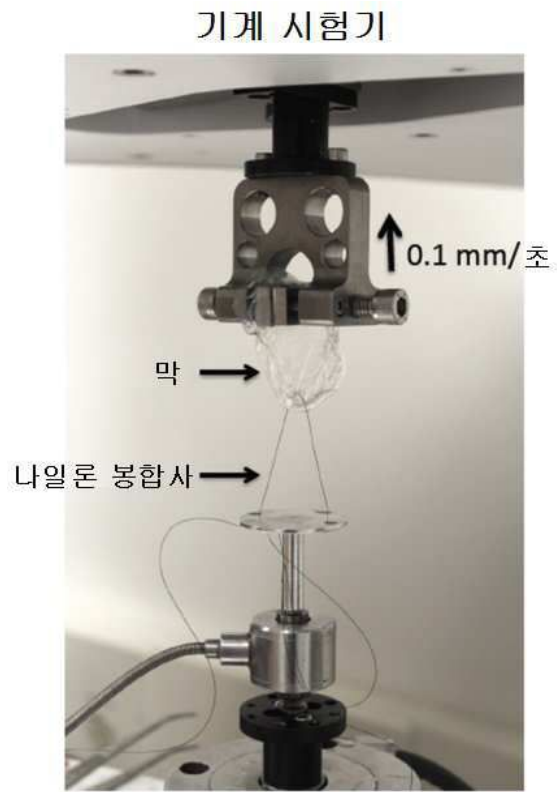
도면2



도면3

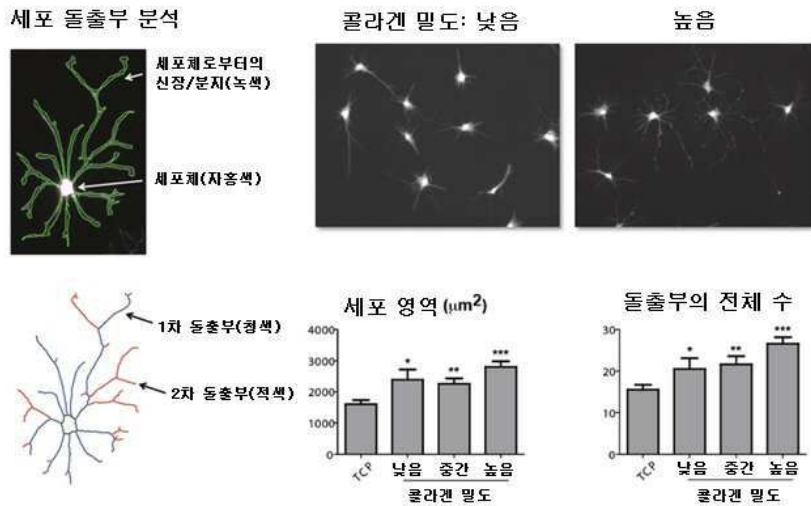


도면4

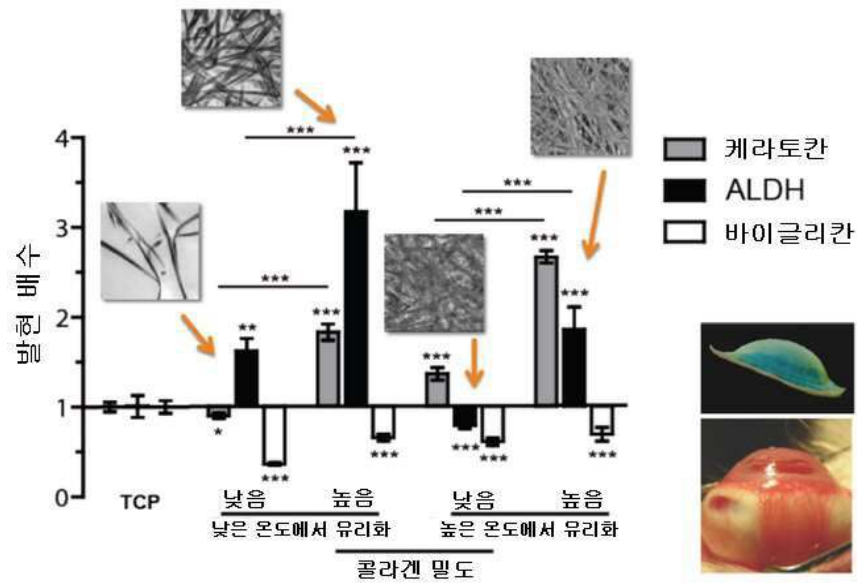


도면5

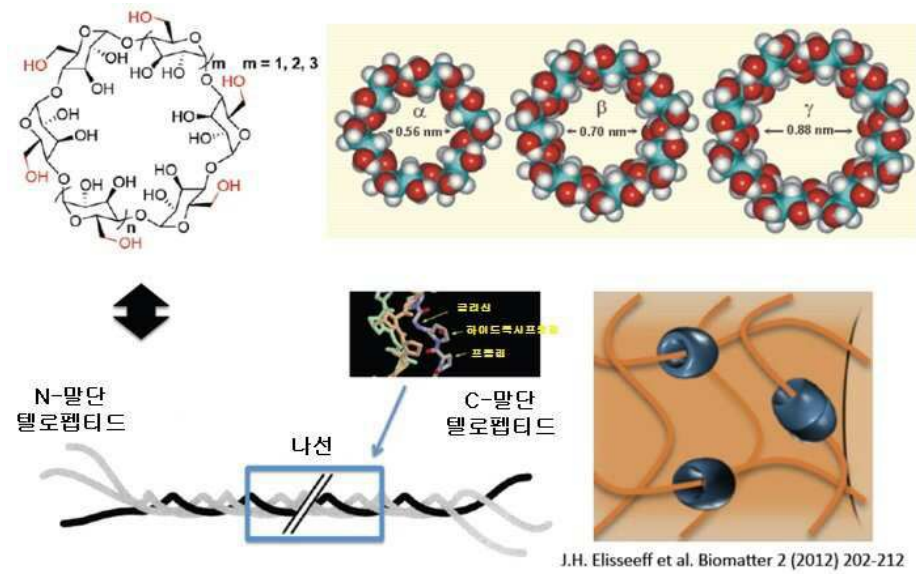
다양한 비트리겔에서 계대배양된 일차 소 각막세포



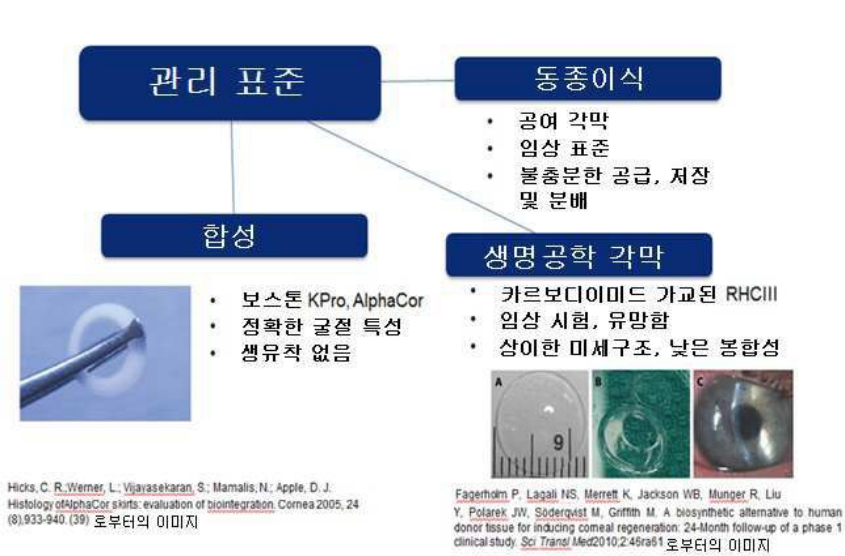
도면6



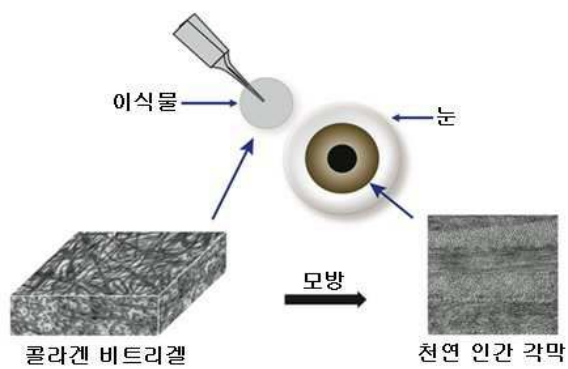
도면7



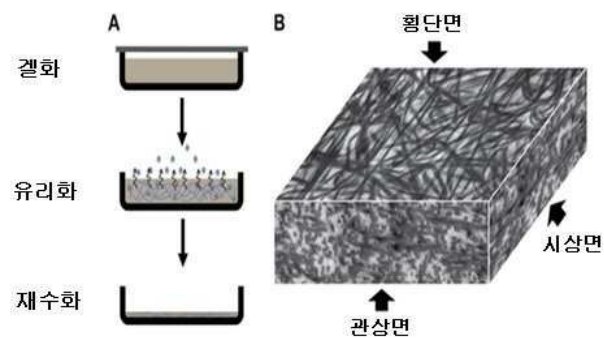
도면8



도면9

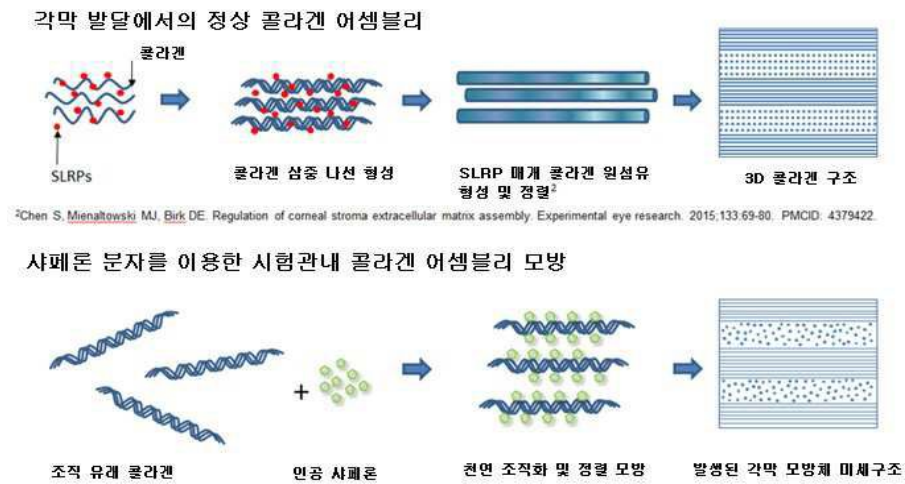


도면10



Q. Guo et al., Modulation of keratocyte phenotype by collagen fibril nanoarchitecture in membranes for corneal repair, Biomaterials 34 (2013) 9365-9372 로부터의 이미지

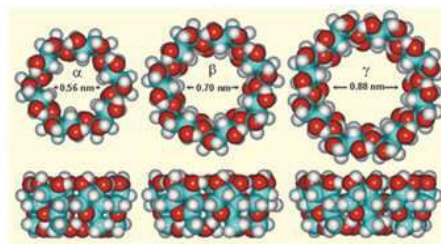
도면11



도면12

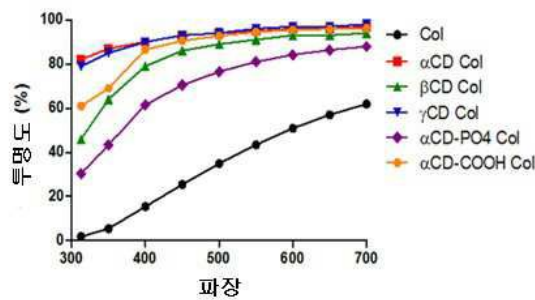
- 고리형 올리고당류
- 소수성 내부 영역 및 친수성 외부 영역.

- 다양한 크기
 - αCD (작음 - 0.56 nm)
 - βCD (중간 - 0.70 nm)
 - γCD (큼 - 0.88 nm)
- 안전하고 생체적합성임

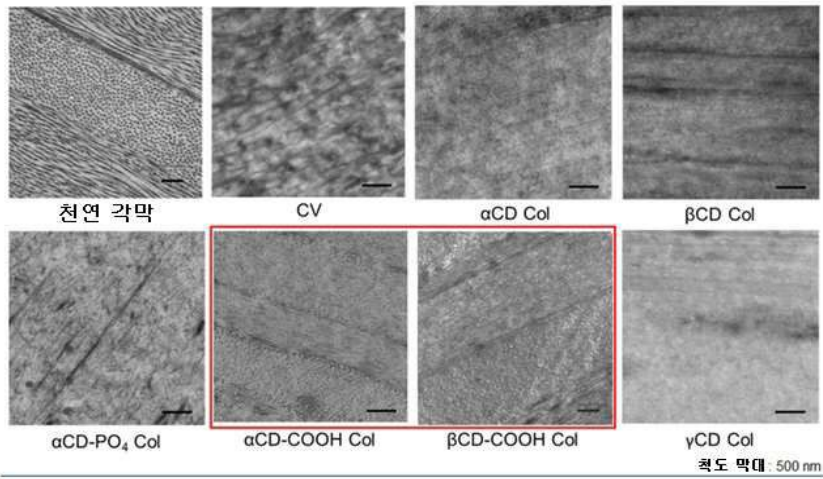


Khatami et al., An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxicology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications, Chapter 19 (2013)로부터의 이미지

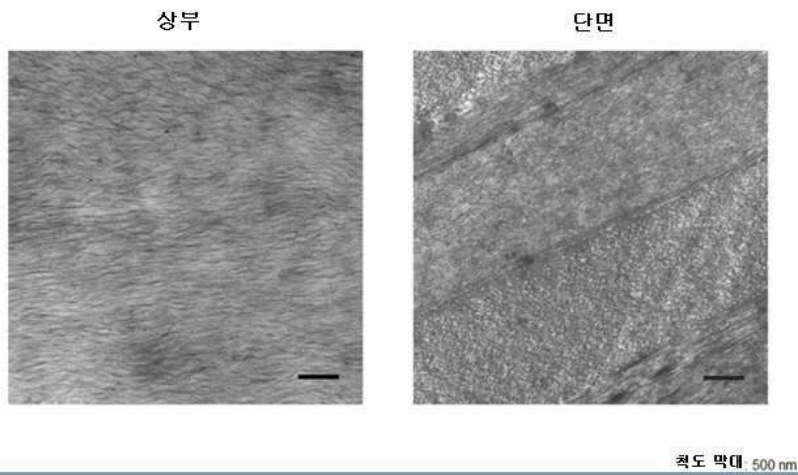
도면13



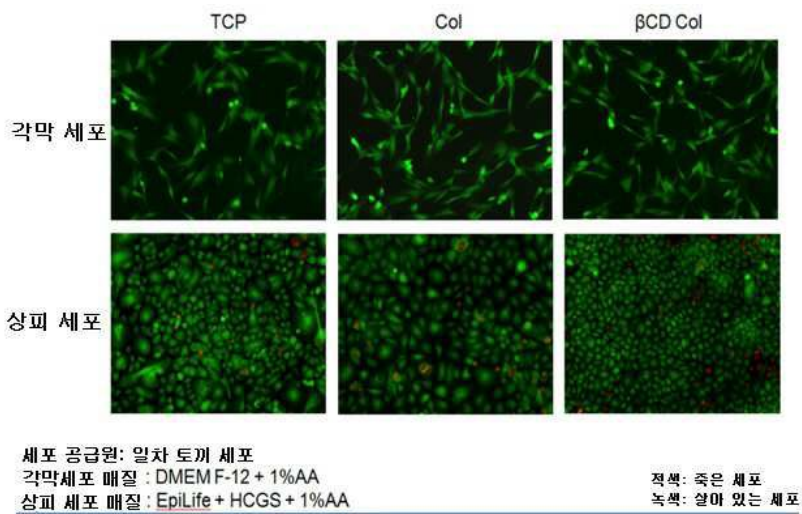
도면14



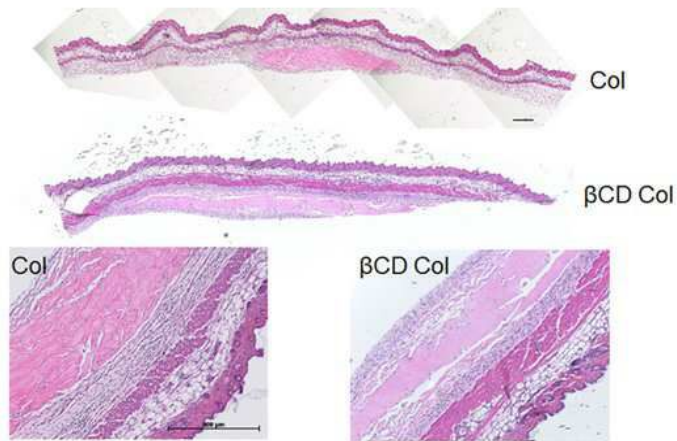
도면15



도면16



도면17



염색: 헤마톡실린 & 에오신; 시점: 10일

도면18

생체내 변환을 위한 원형 발달

