



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0109259
(43) 공개일자 2013년10월07일

- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
A61K 31/726 (2006.01) *A61K 31/70* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7024561(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2006년10월12일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2011-7023949
원출원일자(국제) 2006년10월12일
심사청구일자 2011년10월12일
- (85) 번역문제출일자 2013년09월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2006/320801
- (87) 국제공개번호 WO 2007/043702
국제공개일자 2007년04월19일
- (30) 우선권주장
JP-P-2005-297170 2005년10월12일 일본(JP)
JP-P-2006-160478 2006년06월09일 일본(JP)
- (71) 출원인
세이가가쿠 고교 가부시키가이샤
일본국 도쿄 치요다쿠 마루노우치 1초메 6-1
- (72) 발명자
미야모토, 켄지
일본국 207-0021 도쿄 히가시야마토시 다테노 3
초메 1253 세이가가쿠 고교 가부시키가이샤 중앙
연구소 내
다카하시, 가즈야
일본국 207-0021 도쿄 히가시야마토시 다테노 3
초메 1253 세이가가쿠 고교 가부시키가이샤 중앙
연구소 내
시모지마, 유우지
일본국 100-0005 도쿄 치요다쿠 마루노우치 1 초
메 6-1 세이가가쿠 고교 가부시키가이샤 내
- (74) 대리인
장수길, 김성완, 이석재

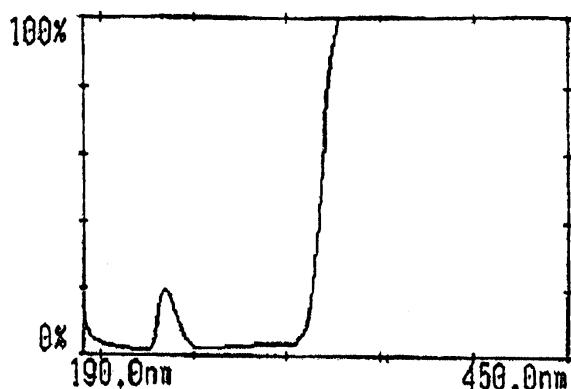
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 점막에 적용하는 작용제 및 그것의 제조 방법

(57) 요 약

점막 상피층 내에서 높은 체류특성을 나타내서 작용제가 장기간의 시간 동안 환부에서 머무를 수 있기 때문에, 더 적은 투여 빈도수에 의해서도 점막에서의 염증 및 손상과 같은 질환에 지속적인 치료 효과를 발휘하는 것이 가능한 점막에 적용하는 작용제를 제공하고, 점막에 적용하는 상기 작용제는 결합체를 통해 소수성기를 도입한 글리코스아미노글리칸 (GAG)을 활성 성분으로 함유한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 글리코스아미노글리칸을 유효 성분으로 함유하고,

상기 결합쇄가 $-\text{CONH}-$ 또는 $-\text{COO}-$ 이고;

상기 소수성기가 2 내지 18개의 탄소 원자를 갖는 알킬기이고;

상기 글리코스아미노글리칸이 히알루론산 또는 그의 염인,

각막 상피층 질환의 치료용 점막 적용제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 결합쇄가 $-\text{CONH}-$ 인 각막 상피층 질환의 치료용 점막 적용제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 글리코스아미노글리칸이 옥틸아민 도입 히알루론산 또는 그의 염; 또는 헥사데실아민 도입 히알루론산 또는 그의 염인 각막 상피층 질환의 치료용 점막 적용제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 소수성기 결합 유형 글리코스아미노글리칸을 활성 성분으로 함유하는 점막에 적용하는 작용제 및 그 것의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 통상적으로, 대표적인 글리코스아미노글리칸 (이하에서 "GAG"로 기재됨)인 히알루론산이 염증 및 손상과 같은 점막 질환에 치료효과를 가지는 물질로 알려져 있다 (예를 들어, 특허 문서 1). 그러나 각막, 구강 및 비강 중 점막 및 외계와 접촉하는 결막 및 방광 등의 점막에서의 점막 표면은 눈물, 침 및 소변과 같은 분비물 및 배설물로 세척하여 외부물질을 제거한다. 따라서, GAG의 본래 약효를 유지하고, 이러한 점막 조직에 높은 체류특성을 발휘하는 GAG의 유도체가 요구된다.

[0003] 반면, 신남산 같은 광가교기를 히알루론산에 결합하고, 추가로 거기에 알칼리 처리를 하여 수용성을 증가시킨 광반응성 히알루론산이 공지되었다 (예를 들어, 특허 문서 2). 광가교성을 부여함으로써, 항부착 물질과 같은 의료용 재료를 제공하기 위해, 히알루론산에 신남산과 같은 광가교기를 결합하여 광반응성 히알루론산을 제공하는데, 이것은 점막 조직에서의 체류특성의 향상을 목적으로 하지는 않는다.

[0004] [선행기술문헌]

[0005] [특허문헌]

[0006] (특허문헌 1) 공개되고 심사되지 않은 일본 특허 공개 번호 평-1-238530

[0007] (특허문헌 2) 공개되고 심사되지 않은 일본 특허 공개 번호 2002-249501

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 점막 중에서 우수한 체류특성 및 약리 효과를 발휘하는 점막에 적용하는 작용제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기의 과제를 해결하기 위한 광범위한 연구의 결과로, 본 발명의 발명자들은 결합체를 통해 GAG에 소수성기를 결합하여 얻은 "소수성기 결합 유형 GAG"가 GAG의 염증 및 손상과 같은 점막 질환에서의 본래 치료효과를 유지하고, 점막에 적용할 때 높은 체류특성을 나타내기 때문에, 상기 GAG를 점막에 적용하는 작용제에서 극히 우수한 활성 성분으로 사용할 수 있다는 것을 알았고, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 본 발명은, 결합체를 통해 도입되는 소수성기를 도입한 글리코스아미노글리칸 (GAG)을 함유하는 점막에 적용하는 작용제에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0011] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 점막 중의 높은 체류특성을 나타냄으로써, 장기간의 시간 동안 환부에 머무를 수 있기 때문에, 덜 빈번한 투여에 의해서도 염증 및 손상과 같은 점막 질환에 지속적인 치료 효과를 발휘할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 광 투과율의 스펙트럼을 보이는 도면이고;
 도 2는 치료 영역 퍼센트를 보이는 도면이고;
 도 3은 치료 영역을 보이는 도면이고,
 도 4는 치료 속도를 보이는 도면이고,
 도 5는 치료 영역을 보이는 도면이고,
 도 6은 치료 속도를 보이는 도면이고,
 도 7은 치료 영역을 보이는 도면이고,
 도 8은 치료 속도를 보이는 도면이고,
 도 9는 치료 영역을 보이는 도면이고,
 도 10은 치료 속도를 보이는 도면이고;
 도 11은 토끼 각막 상피 내 박리 부위에서의 체류특성을 보이는 도면이고;
 도 12는 토끼 각막 상피 내 박리 부위에서의 체류특성을 보이는 도면이고;
 도 13은 자외선 조사 후의 안구의 사진을 보이는 도면이고;
 도 14는 제거한 각막에서의 물 증발량을 보이는 도면이고;
 도 15는 제거한 각막에서의 물 증발량을 보이는 도면이고;
 도 16은 구강 건조증에 대한 햄스터 표본에 있어서 물 증발량비의 변화를 보이는 도면이고;
 도 17은 치료 영역을 보이는 도면이고;
 도 18은 치료 속도를 보이는 도면이고;
 도 19는 치료 영역을 보이는 도면이고;
 도 20은 치료 속도를 보이는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 하기에서, 발명을 수행하기 위한 최선의 형태로 본 발명을 더욱 자세하게 기재한다.
- [0014] 여기서, 알킬기는 기재된 수의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 지방족 탄화수소기를 말한다. 알케닐기는 기재된 수의 탄소 원자를 갖고, 하나 이상의 이중 결합을 갖는 직쇄 또는 분지쇄 지방족 탄화수소기를 말한다. 알카닐기는 기재된 수의 탄소 원자를 갖고, 하나 이상의 삼중 결합을 갖는 직쇄 또는 분지쇄 지방족 탄화수소기

를 말한다.

- [0015] 아릴기는 6 내지 20개의 탄소 원자를 고리 구성 원자로서 갖는 모노시클릭 또는 폴리시클릭 방향족 탄화수소기 에 관한 것이다. 헤테로아릴기는 3 내지 20개의 탄소 원자 및 질소, 황 및 산소 원자로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 고리 구성 원자로서 갖는 모노시클릭 또는 폴리시클릭 방향족 탄화수소기를 말한다.
- [0016] 아릴알킬기는 상기에 정의한 아릴기로 치환한 상기에서 정의한 알킬기를 말한다. 아릴알케닐기는 상기에서 정의한 아릴로 치환한 상기에서 정의한 알케닐기를 말한다. 아릴알키닐기는 상기에서 정의한 아릴기로 치환한 상기에서 정의한 알키닐기를 말한다.
- [0017] 아미노산기는 천연 또는 합성 아미노산으로부터 화학 결합에 의해 카르복실기, 아미노기 또는 히드록실기를 잃음으로써 얻은 기를 말한다.
- [0018] 여기서, "치료"라는 용어는 점막 질환의 예방, 진행의 제어 (악화의 예방), 향상 (감소) 및 치유를 포함한다. "점막 질환"은 점막 본래의 형태, 특성, 기능이 몇몇 형태로 장애를 받는 상태를 의미한다. 예를 들어, 점막 질환은 손상, 결함, 진무름, 염증, 궤양 및 건조와 같은 상태를 포함할 수 있다.
- [0019] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제 중 활성 성분으로 함유하는, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG에 있어서, GAG가 수불용성 및 유용성 특성을 가진 소수성 화합물로부터 얻은 소수성을 가진 기를 결합하는 한, 임의의 GAG일 수 있다. 이 소수성기는 결합체를 통해 GAG에 결합된다. 하기에 기재한 바와 같이, GAG의 모든 구성 단위가 소수성기를 결합할 필요는 없다.
- [0020] 1) GAG
- [0021] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제에 함유되는, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG는 아미노당 및 우론산 (또는 갈락토스)으로 이루어진 이당류의 반복되는 장쇄 구조를 가진 산성 다당류이다. 그러한 GAG의 예로는, 히알루론산, 콘드로이틴, 황산콘드로이틴, 헤파린, 황산헤파린, 황산데르마탄 및 황산케라탄을 포함하고, 그들 중, 히알루론산이 바람직하다. 이러한 GAG는 그것의 제약상 허용가능한 염일 수도 있다. 그러한 염의 예는, 나트륨염, 칼륨염, 마그네슘염 및 칼슘염을 포함하고, 그들 중, 나트륨염이 바람직하다. 따라서, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제 중의 GAG로서는 히알루론산나트륨이 가장 바람직하다. GAG의 원천은 특별히 한정되지 않고, GAG는 동물 또는 미생물로부터 얻을 수 있거나 또는 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 히알루론산나트륨을 사용할 때, 이들은 수탉의 벼슬로부터 얻은 것을 예로 들 수 있다. GAG의 분자량은 특별히 한정되지 않지만, 그것의 무게 평균 분자량은 바람직하게는 200,000 내지 3,000,000, 더욱 바람직하게는 500,000 내지 2,000,000이고, 가장 바람직하게는 600,000 내지 1,200,000이다. 히알루론산 또는 그것의 제약상 허용가능한 염을 사용할 때, 그것의 무게 평균 분자량은 바람직하게는 200,000 내지 3,000,000, 더욱 바람직하게는 500,000 내지 2,000,000이고, 가장 바람직하게는 600,000 내지 1,200,000이다.
- [0022] 2) 소수성기
- [0023] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제에 함유되는, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG 중의 소수성기는 수불용성 및 유용성 특성을 가진 화합물로부터 얻은 소수성기인 한, 임의의 소수성기일 수 있다. 그러한 기의 예는, 2 내지 18개의 탄소 원자를 가진 알킬기, 2 내지 18개의 탄소 원자를 가지는 알케닐기, 2 내지 18개의 탄소 원자를 가지는 알키닐기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아릴알킬기, 아릴알케닐기, 아릴알키닐기 및 아미노산기를 포함할 수 있다.
- [0024] 2 내지 18개의 탄소 원자를 갖는 알킬기는 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, sec-부틸, t-부틸, n-펜틸, t-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, n-헵틸, 5-메틸헥실, 4,4-디메틸-펜틸, 1,1-디메틸-펜틸 및 n-옥틸을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 그들 중, n-부틸과 같이 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알킬기를 포함할 수 있다.
- [0025] 2 내지 18개의 탄소 원자를 갖는 알케닐기는 비닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 1-부테닐, 2-메틸-1-프로페닐, 1-메틸-1-프로페닐, 1-펜테닐, 3-메틸-2-부테닐, 1-헵텐-1-일 및 2-헵텐-1-일을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 그들 중, 1-부테닐 같이 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알케닐기를 포함할 수 있다.
- [0026] 2 내지 18개의 탄소 원자를 갖는 알키닐기는 에티닐, 1-프로파닐, 2-프로파닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 3-부티닐, 1-헵티닐, 2-헵티닐 및 3-헵티닐을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 그들 중, 1-부티닐 같은 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알키닐기를 포함할 수 있다.

- [0027] 아릴기는 폐닐, 나프틸, 안트릴 및 폐난트릴과 같은 기를 포함할 수 있다.
- [0028] 헤테로아릴기는 푸릴, 티오닐, 티아졸릴, 옥사졸릴, 피롤릴, 피리딜, 피리미디닐 및 인돌릴과 같은 기를 포함할 수 있다.
- [0029] 아릴알킬기는 벤질, 페네틸, 나프틸메틸 및 나프틸에틸과 같은 기를 포함할 수 있다.
- [0030] 아릴알케닐기는 2-페닐에테닐 및 p-아미노페닐에테닐과 같은 기를 포함할 수 있다.
- [0031] 아릴알키닐기는 2-페닐에티닐 및 p-아미노페닐에티닐과 같은 기를 포함할 수 있다.
- [0032] 아미노산기는 지방족 아미노산, 예를 들어, 글리신, 알라닌 및 β -알라닌; 분지쇄 지방족 아미노산, 예를 들어, 루신, 이소루신 및 발린; 방향족 아미노산, 예를 들어, 폐닐알라닌 및 티로신; 및 헤테로시클릭 아미노산, 예를 들어, 트립토판 및 히스티딘으로부터 얻은 기를 포함할 수 있다.
- [0033] 이러한 소수성기는 히드록실, 카르복실, 시아노, 아미노 (상기 알킬로 단일치환 또는 이치환될 수도 있음), 니트로, 옥소 및 알킬카르보닐옥시와 같은 기로 단일 치환 또는 다중 치환될 수도 있다.
- [0034] 상기 소수성기 중, 바람직하게는, 아릴기를 함유하는 소수성기인 아릴기, 아릴알킬기, 아릴알케닐기 및 아릴알키닐기가 포함될 수 있고, 특히 바람직하게는, 아릴알케닐기 및 알킬카르보닐옥시기로 치환된 아릴기가 포함될 수 있다. 그러한 아릴알케닐기로는 폐닐에테닐 및 p-아미노페닐에테닐을 특별히 사용하는 것이 가능하다. 아릴기로는, 바람직하게는, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_1-\text{COO-}\text{ph}$ (여기서, 1은 0 또는 1 내지 18의 정수를 나타냄)과 같은 기를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0035] 소수성기 중에 함유한 것으로 상기에서 예시한 폐닐에테닐과 같은 작용기에 의해 보인 바와 같이, 이러한 소수성기는 소수성기 내에 이중 결합을 가지고 있기 때문에, 자외선 흡수능과 같은 기능을 또한 가질 수도 있다. 예를 들어, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 이하에서 기술한 암약으로 사용할 때, 소수성기 같이 자외선 흡수능을 가지는 기의 사용에 의해 유해한 자외선을 효과적으로 흡수하는 기능을 가진 암약을 만드는 것이 가능하다. 더욱이, 예를 들어, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 각막 상피층 질환, 예를 들어, 각막 건조증 (건안), 각결막염, 표층 점상 각막염 (SPK), 각막 상피 진무름, 각막 상피 결손 및 각막 종양의 치료에 사용할 때, 소수성기로서 자외선 흡수능을 가지는 기의 사용에 의해 유해한 자외선을 효과적으로 흡수하는 기능과 조합해서 상기 질환에 약리 효과를 가지는 점막에 적용하는 작용제를 만드는 것이 가능하다. 자외선 흡수능을 가진 기로는, 예를 들어, 상기에 기재한 2-페닐에테닐 및 p-아미노페닐에테닐을 예로 든, 컨쥬게이션 이중 결합을 가진 아릴알케닐기가 바람직하다. 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 각막 질환에 사용할 때, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제의 활성 성분인 "소수성기가 도입된 GAG"는 자외선 투과를 하기에 기재된 실시예 중에 기재된 방법으로 측정할 때 200 내지 300 nm의 파장에서의 자외선 투과를 70 내지 100 % 차단하는 0.1 중량 %의 수용액으로 만들어지는 것이 바람직하다. 그러한 자외선 흡수능을 가진 소수성기는, 바람직하게는, 2-페닐에테닐 및 p-아미노페닐에테닐과 같은 아릴알케닐기를 포함할 수 있다.

[0036] 3) 결합쇄

- [0037] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제에 함유되는, 결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 GAG에 있어서, 상기 GAG는 결합쇄를 통해 상기 소수성기에 결합된다. GAG는 측쇄로서 카르복실, 히드록실 또는 술포네이트 ($-\text{SO}_3\text{H}$)기인 작용기를 가진다. 따라서, 소수성기는 이를 작용기와 함께 에테르 결합, 카르복실레이트 에스테르 결합, 술포이트 에스테르 결합, 카르복실산 아미드 결합 또는 술포네이트 아미드 결합을 형성하여 얻어진 결합쇄를 통해 GAG에 결합시킬 수 있다. 그러한 결합쇄는 특히 $-\text{CONH-}$, $-\text{COO-}$, $-\text{O-}$, $-\text{SO}_3-$ 및 $-\text{SO}_2\text{NH-}$ 를 포함할 수 있다. 그들 중, 바람직하게는 $-\text{CONH-}$ 의 카르복실산 아미드 결합 및 $-\text{COO-}$ 의 카르복실레이트 에스테르 결합을 사용할 수 있고, 특히 바람직하게는 $-\text{CONH-}$ 의 카르복실산 아미드 결합을 사용할 수 있다.

[0038] 4) 스페이서쇄

- [0039] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제에 함유되는 결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 GAG에 있어서, 상기 소수성기는 상기의 결합쇄를 통해 GAG와 결합되었고, 스페이서쇄는 결합쇄 및 소수성기 사이에 추가로 존재할 수도 있다. 스페이서기가 GAG가 가진 약리 효과를 완전하게 상실하지 않는 한, 그러한 스페이서쇄로 임의의 사슬기 (chain group)를 사용할 수 있다. 특히, $-(\text{CH}_2)_m-$ 및 $-(\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2)_n-$ (여기서, m 및 n 각각은 1 내지 18의 정수임)을 포함할 수 있다.

[0040] 이러한 스페이서쇄는, 예를 들어, 상기의 소수성기 측에서와 동일한 $-\text{CONH}-$, $-\text{COO}-$, $-\text{O}-$, $-\text{SO}_3-$ 및 $-\text{SO}_2\text{NH}-$ 와 같은 결합쇄를 추가로 가질 수 있다. 소수성기 측에서의 결합쇄를 가진 그러한 스페이서쇄는 특히 $-\text{COO}-(\text{CH}_2)_m-$, $-\text{COO}-(\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2)_n-$, $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-$ 및 $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-(\text{OCH}_2)_n-$ 을 포함할 수 있다.

5) 소수성기를 가지는 비율

[0042] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제에 함유되는 결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 GAG에 있어서, 모든 GAG의 구성 단위 각각이 소수성기를 가질 필요는 없다. GAG의 이당류 반복 단위의 몰 당량에 대해, 결합된 소수성기의 몰 당량 비율 (이하에서, "도입비"라고 칭함)은 소수성기의 유형, 필요한 소수성 정도, 점막에 적용하는 작용제를 투여한 점막 질환의 유형 및 투여부 등에 따라 임의로 결정될 수 있다. 예를 들어, 소수성기로 치환될 수도 있는 페닐에테닐기를 사용할 때, GAG의 이당류 반복 단위의 몰 당량에 대해, 바람직하게는, 5 내지 30 %, 및 더욱 바람직하게는, 10 내지 20 %의 소수성기의 몰 당량이 도입된다 (하기에 기재된 가교 결합이 형성되지 않는 경우).

6) 가교 형성기

[0044] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제에 함유되는 결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 GAG에 있어서, 소수성기는 기중에 함유된 작용기에 의해 GAG분자 사이에 가교 결합을 형성할 수도 있다. 소수성기가 자외선의 조사에 의해 광이량화 반응 또는 광중합 반응을 생성하는 한, 가교 결합을 형성할 수 있는 소수성기로는 임의의 기를 사용할 수 있고, 이것은 상기에서 정의한 바와 같다. 가교 결합을 형성하는 것이 가능한 소수성기는, 예를 들어, 페닐에테닐, p-아미노페닐에테닐, 에테닐, 2-카르복시에테닐 및 펜탄-1,3-디에닐을 포함할 수 있다. 이러한 기들을 카르보닐기를 함유하는 결합쇄를 통해 GAG로 결합하는 것이 바람직하다. 이러한 소수성기들 중, 특히 바람직하게는, 카르보닐기를 함유하는 결합쇄를 통해 GAG에 결합한 페닐에테닐 또는 p-아미노페닐에테닐을 사용할 수 있다.

[0045] 가교 결합을 형성하는 것이 가능한 그러한 소수성기를 도입한 GAG에 있어서, 표준 방법에 의해 광이량화 반응 또는 광중합 반응을 가함으로써, GAG분자는 다른분자에 가교 결합할 수 있다. 예를 들어, 공개되고 비심사된 일본 특허 공개 번호 2002-249501에 기재된 방법에 의해, 광이량화 반응 또는 광중합 반응이 행해질 수 있다.

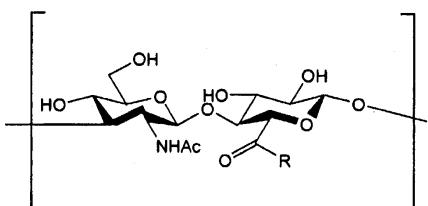
7) 바람직한 GAG 구성 단위

[0047] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제에 함유되는 결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 GAG의 전형은, 특히 $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHCO}-$; $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{NHCO}-$; $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHCO}-$; $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{NHCO}-$; $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CO}-$; $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{O}-\text{CO}-$; $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CO}-$; $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{O}-\text{CO}-$; $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_1-\text{COO}-\text{Ph}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHCO}-$ 또는 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_1-\text{COO}-\text{Ph}-\text{CONH}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{NHCO}-$ (여기서, Ph는 페닐기를 나타내고, m 및 n 각각은 1 내지 18의 정수를 나타내고, 1은 0 또는 1 내지 18의 정수를 나타냄)를 도입한 GAG를 활성 성분으로 함유하는 점막에 적용하는 작용제를 포함할 수 있다.

[0048] 하기의 GAG가 대표로 포함될 수 있다.

[0049] 기초 골격으로 화학식 1로 나타내는 구조 단위의 반복 단위를 갖는 GAG:

[화학식 1]



[0051]

[0052] (여기서, R은 R_1 또는 R_2 를 나타내고;

[0053] Ac는 아세틸기를 나타내고;

[0054] R_1 은 ONa 또는 OH 를 나타내고;

[0055] R_2 는

[0056] (1) $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-$;

[0057] (2) $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{NH}-$;

[0058] (3) $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}$;

[0059] (4) $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{NH}-$;

[0060] (5) $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$;

[0061] (6) $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{O}-$;

[0062] (7) $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$;

[0063] (8) $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{O}-$;

[0064] (9) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_1-\text{COO}-\text{Ph}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}$; 또는

[0065] (10) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_1-\text{COO}-\text{Ph}-\text{CONH}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{NH}-$ 를 기초 콜격으로 하고;

[0066] 여기서, Ph는 페닐기를 나타내고, m 및 n 각각은 1 내지 18의 정수를 나타내고, 1은 0 또는 1 내지 18의 정수를 나타내고, 여기서, R 이 R_2 를 나타내는 상기 구조 단위의 몰 당량의 비율은 GAG의 이당류 반복 단위 몰 당량에 대해 5 내지 30 %임)

8) 결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 GAG의 제조 방법

[0068] 결합쇄를 통해 소수성기를 도입한 GAG를 얻기 위해, GAG 중의 카르복실, 히드록실 또는 술포네이트기 ($-\text{SO}_3\text{H}$)와 결합하여, 에테르 결합, 카르복실레이트 에스테르 결합, 술페이트 에스테르 결합, 카르복실산 아미드 결합 또는 술포네이트 아미드 결합을 형성할 수 있는 히드록실, 카르복실, 아미노 또는 술포네이트기와 같은 작용기에 상기 소수성기를 결합한 소수성 화합물과 GAG를 반응시킨다. 특히, 결합이 카르복실산 아미드 결합일 때, 카르복실기를 가지는 GAG를 아미노기를 가지는 소수성 화합물과 반응시켜 소수성 화합물 내의 아미노기에 GAG 내의 카르복실기를 결합시킨다. 카르복실레이트 에스테르 결합의 경우에 있어서, GAG는 히드록실 또는 카르복실기를 가지는 소수성 화합물과 반응시켜, GAG 중 카르복실기를 소수성 화합물 중 히드록실기에 결합시키거나 또는 GAG 내의 히드록실기를 소수성 화합물 내의 카르복실기에 결합시킨다. 에테르 결합의 경우에 있어서, 히드록실기를 가지는 GAG를 히드록실기를 가지는 소수성 화합물과 반응시켜, GAG 중 히드록실기를 소수성 화합물 중 히드록실기와 반응시킨다. 술포네이트 에스테르 결합의 경우에 있어서, GAG를 히드록실기 또는 술포네이트기를 가지는 소수성 화합물과 반응시켜, GAG 중 히드록실기를 소수성 화합물 중 술포네이트기와 결합시키거나 또는 GAG 중 술포네이트기를 소수성 화합물 중 히드록실기와 결합시킨다. 이러한 반응들은 정상적인 표준 방법으로 수행할 수 있고, 반응 조건은 당업자에 의해 임의로 선택될 수 있다.

[0069] 스페이서쇄가 결합쇄 및 소수성기 사이에 존재하는 때, 스페이서쇄 및 소수성기를 GAG에 도입하는 순서는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 스페이서쇄의 한쪽 끝에서 GAG 중 작용기와 함께 에테르 결합, 카르복실레이트 에스테르 결합, 술페이트 에스테르 결합, 카르복실산 아미드 결합 또는 술포네이트 아미드 결합을 형성할 수 있는 히드록실, 카르복실, 아미노 또는 술포네이트기와 같은 작용기를 가지는 스페이서 화합물을 GAG와 반응시키고, 후속적으로, 스페이서 화합물의 다른 한쪽 끝을 히드록실, 카르복실, 아미노 또는 술포네이트기와 같은 작용기에 결합된 소수성 화합물과 반응시키는 방법이나, 또는 한쪽 끝에서 소수성 화합물 중 작용기와 함께 에테르 결합, 카르복실레이트 에스테르 결합, 술페이트 에스테르 결합, 카르복실산 아미드 결합 또는 술포네이트 아미드 결합을 형성할 수 있는 히드록실, 카르복실, 아미노 또는 술포네이트기와 같은 작용기를 가지는 스페이서 화합물을 소수성기가 히드록실, 카르복실, 아미노 또는 술포네이트기와 같은 작용기에 결합한 소수성 화합물과 반응시키고, 후속적으로 스페이서 화합물의 다른 한쪽 끝을 GAG와 반응시키는 방법을 사용할 수도 있다. 특히, 바람직하게는 스페이서 화합물을 소수성 화합물과 반응시킨 후에, GAG와 반응시키는 방법을 사용할 수 있다.

[0070] 상술한 방법은 공지된 방법에 의해 적절하게 수행될 수 있고, 바람직하게는 축합제가 존재하는 중에 수행한다.

그러한 축합제는 바람직하게는 수용성 카르보디이미드, 예를 들어, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDCI.HCl), 축합제, 예를 들어, 디시클로헥실카르보디이미드 (DCC) 및 N-히드록시숙시네이트 이미드 (HOSu)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 히알루론산을 GAG로서 사용할 때 및 신나메이트 유도체, 예를 들어, $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$ 또는 $\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2)_n-\text{NH}_2$ (여기서, m 및 n 각각은 1 내지 18의 정수임)를 스페이서 화합물에 결합된 소수성 화합물로 사용할 때, 바람직하게는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDCI.HCl) 및 N-히드록시숙시네이트 이미드와 같은 수용성 카르보디이미드를 사용하는 축합 방법을 사용할 수 있다. 반응은 물 및 수용성 유기 용매 (예를 들어, 디옥산, 디메틸포름아미드 또는 에탄올)의 혼합 용매를 사용하여 달성할 수 있다. 수성 비히를 중에서 가용성이 높은 히알루론산 염 유도체는, 반응 완료 후에 탄산수소나트륨과 같은 염기로 처리하여 얻을 수 있다.

[0071] 그렇게 제조한 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG를 광이량화 반응 또는 광중합 반응을 가하여, GAG분자를 다른분자와 가교시킬 때, 예를 들어, 일본의 공개되고 심사되지 않은 특허 공개 번호 2002-249501에 기재된 방법을 사용할 수 있다. 특히, $-\text{COO}-(\text{CH}_2)_m-\text{NHCO}-$ 를 통해 GAG에 소수성기로 페닐에테닐기를 결합한 화합물의 경우에 있어서, 자외선 램프를 사용하여 그들을 함유하는 용액에 빛을 조사하여 가교를 형성할 수 있다.

9) 점막에 적용하는 본 발명의 작용제

[0073] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 하나 이상의 GAG를 활성 성분으로 함유하고, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG 이외에, 다른 의학적으로, 제약상 또는 생물학적으로 허용가능한 물질을 추가로 포함할 수도 있다. 그러한 물질은 염, 예를 들어, 염화나트륨, 염화칼륨, 인산수소이나트륨, 인산이수소나트륨 및 인산수소일칼륨, 및 보존제, 예를 들어, 파라옥시벤조에이트 에스테르, 벤잘코늄클로라이드, 클로로부탄올 및 클로르헥시딘 글루코네이트, 및 이외의 약리학적으로 활성인 성분을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0074] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는, 점막에 적용하는 제약으로서 임의의 공지된 제형 형태 (예를 들어, 고체제제, 예를 들어, 과립 및 분말, 액체제제, 예를 들어, 수용액, 혼탁액 및 에멀젼, 및 젤제제)로 만들어질 수 있다. 점막에 적용하는 본 발명의 작용제에 있어서, 제형화 및 분배에 있어서의 그것의 형태 및 점막 적용에 있어서의 그것의 형태는 동일하거나 상이할 수도 있다. 예를 들어, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 용액의 형태로 제형화될 수도 있고, 점막에 그대로 직접 적용할 수도 있다. 또한, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 고체 형태로 제형화하고 분배할 수도 있고, 점막에 적용할 때에는 용액 또는 젤로 만들어질 수도 있다. 따라서, 사용시의 제조에 있어서, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 제형화 형태로 만들어질 수 있다.

[0075] 물에 용해되어 액체 작용제로 만들어질 때, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG의 양은 바람직하게는 0.02 내지 5 중량 %, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 3 중량 %, 극히 바람직하게는 0.1 내지 1 중량 % 및 가장 바람직하게는 0.1 내지 0.6 중량 %이다.

<적용 대상>

[0077] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 점막에 적용하는 것을 목적으로 한다. 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 적용하는 동물은 점막을 가지는 한 특별히 제한되지 않고, 포유류 동물들이 바람직하다. 포유류 동물들은 인간, 말, 가축, 개, 고양이, 토끼, 햄스터, 기니아피그 및 생쥐를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 물론 인간을 위한 제약으로 만들어질 수도 있고, 동물을 위한 제약으로 만들 수 있다. 그들 중, 인간을 위한 제약으로 만드는 것이 바람직하다.

[0078] 점막이 동물 중에 존재하는 점막인 한, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 적용할 수 있는 점막은 특별히 한정되지 않는다. 그러한 점막은 위장계, 예를 들어, 위 및 창자, 심혈관계, 호흡계, 배설계, 예를 들어, 방광, 직장 및 항문, 생식계, 예를 들어, 질, 및 장기, 예를 들어, 외계와 접촉하는 눈, 코 및 구강을 예로 하는 장기 및 조직에 존재하는 점막 조직을 포함한다. 그들 중, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는, 바람직하게는 각막, 결막, 구강 점막 및 방광 점막에 적용할 수 있다.

<적용 질환>

[0080] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 그러한 점막에 광범위하게 적용할 수 있다. 적용의 목적은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 점막 조직의 보호 (예를 들어, 자외선에 의한 설맹, 익상편 및 백내장의 예방), 점막 건조의 예방 및 점막 질환의 치료와 같은 목적을 예로 들 수 있다. 따라서, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 비정상 상태에서의 점막 (예를 들어, 질환이 발생하는 점막) 뿐만 아니라 정상 상태에서의 점막에서도 또한 적

용할 수 있다. 그러나 점막에 적용하는 본 발명의 작용제가 질환이 발생하는 점막 중에서 우수한 약리 효과를 나타내기 때문에, 바람직하게는 점막 질환, 예를 들어, 각막, 결막, 구강 점막 및 방광 점막 중 질환의 치료에 사용할 수 있다.

[0081] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제가 점막 질환들 중에 점막 상피 중의 질환에 특히 우수한 약리 효과를 발휘하기 때문에, 바람직하게는 점막 상피 중의 질환의 치료에 사용하는 것이 가능하다.

[0082] 점막 상피 중의 그러한 질환의 예로는, 각막 상피층 질환, 예를 들어, 각막 건조증 (건안) ; 각결막염, 표층 점상 각막염 (SPK), 각막 상피 진무름, 각막 상피 결손 및 각막 종양; 구강 점막 질환, 예를 들어, 구강 건조증 (건조한 입), 아프타성 궤양, 구내염 및 설염; 코의 점막의 건조 및 가려움증; 방광 점막 질환, 예를 들어, 간질성 방광염; 궤양성 직장염, 및 직장 또는 질의 건조를 포함한다. 또한 수술 중의 장기 점막의 건조 및 손상을 예로 들 수 있다. 그들 중, 바람직하게는 각막 상피층 질환, 구강 점막 상피층 질환 및 방광 점막 상피층 질환의 치료를 위해 사용하는 것이 가능하다.

[0083] <적용 방법 및 양>

[0084] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 상기에서 예로 들은 점막 조직에 적용할 수 있고, 그것의 적용 방법 및 적용 제형은 적용할 점막의 위치, 형태, 특성, 기능 및 적용의 목적에 따라 당업자에 의해 적절하게 결정될 수 있다. 그러나 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 사용할 때, 점막에 용액과 같은 액체 형태로 적용하는 것이 바람직하다. 그 경우에 있어서, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 제조 (제형화) 또는 적용할 때, 액체는 용매 중에서 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG를 용해하여 얻을 수 있다. 용매가 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG를 용해할 수 있고, 제약상 허용가능한 용매인 한, 용매는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 완충액, 예를 들어, 포스페이트 완충액 또는 염수를 사용할 수 있으나, 용매는 거기에 한정되지 않는다. 이 경우에 있어서, 액체 작용제 중 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG의 농도는 특별히 제한되지 않지만, 적용할 점막의 종류 및 점막 질환의 정도에 따라 적절하게 결정할 수 있다. 점막에 적용하는 본 발명의 작용제가 안약일 때, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제가 구강 점막 또는 방광 점막에 적용하는 때, 예를 들어, 농도는 바람직하게는 0.02 내지 5 중량 %, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 3 중량 %, 더욱 더 바람직하게는 0.1 내지 1 중량 %, 더욱 더 바람직하게는 0.1 내지 0.6 중량 %, 극히 바람직하게는 0.1 내지 0.5 중량 % 및 가장 바람직하게는 0.1 내지 0.3 중량 %이다.

[0085] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 상기와 같이 액체로 위의 점막에 적용할 때, 경구 투여 또는 카테터를 사용한 투여를 선택할 수 있다. 눈, 코 또는 구강 중의 점막에 적용할 때, 예를 들어, 물약의 점적주사, 코의 점적주사 또는 구강 투여와 같은 투여 방법을 선택할 수 있다. 예를 들어, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 점막, 방광, 직장 또는 질 내의 점막, 또는 수술 중에 건조가 염려되는 장기의 점막에 적용할 때, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 루멘 또는 이러한 장기 또는 조직의 표면에 주사, 분무 또는 적용하여 투여하는 방법이 선택될 수 있으나, 방법은 거기에 제한되지 않는다.

[0086] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제의 양, 적용 (투여)의 횟수 및 주기는 특별히 제한되지 않고, 적용할 점막, 적용의 목적, 유형, 나이, 몸무게, 성별, 및 적용할 동물의 점막 질환의 정도에 따라 결정해야만 한다.

[0087] 특히, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 인간 각막 상피층 질환 치료의 목적을 위해 사용할 때, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG를 함유하는 물약의 점적주사 (안약)에 대한 액체 제형으로서 상술한 농도에서 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 하루에 1 내지 5회 투여당 1 내지 3 방울을 적하하여 투여할 수 있고, 하루에 1 내지 3회 투여당 1 내지 3 방울을 적하하여 투여할 수도 있다.

[0088] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 인간 구강 점막 질환을 치료하는 목적을 위해 사용할 때, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG를 함유한 액체로서 상기에 기재한 농도의 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 구강에 하루 1 내지 5회 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 넣고, 대략 수십 초 (바람직하게는 대략 20 내지 30초) 동안 헹군 후, 뱉어냄으로써 투여될 수 있다.

[0089] 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 방광 점막 질환에 적용할 때, 작용제는 바람직하게는 방광 점막 질환, 예를 들어, 비세균성 난치성 방광염, 예를 들어, 급성 세균성 방광염과 비슷한 증세를 나타냄에도 불구하고 항세균성 작용제에 반응하지 않는 간질성 방광염, 호산구성 방광염 및 출혈성 방광염의 치료에 유용하다. 이 경우에 있어서, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG를 함유한 액체로서, 상기에 기재된 농도의 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 점막에 적용하는 본 발명의 작용제를 직접 방광에 일주일에 1 내지 7회 투여당 50 mL의 양으로 투여하거나 방광에 카테터로 투여함으로써 투여할 수 있다.

[0090] 작용제 중에 함유된 활성 성분이 점막에서 높은 체류특성을 나타내기 때문에, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 소수성기를 결합하지 않은 히알루론산을 활성 성분으로 함유하는 통상적인 약과 비교할 때, 더 장기간의 시간 동안 환부에 머무를 수 있다. 따라서, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는, 또한 점막 중의 염증 및 손상과 같은 질환 상에 적은 투여 빈도수에서 조차 지속적인 치료효과를 발휘할 수 있다. 그러나 점막에 적용하는 본 발명의 작용제는 이러한 투여 빈도수에 제한되지 않는다.

[0091] <실시예>

[0092] 본 발명은 실시예에 의해 하기에서 기재된다.

[0093] <실시예 1>

[0094] (1-1) 신나메이트 유도체 도입 히알루론산나트륨의 제조

[0095] N-히드록시숙신이미드 (HOSu: 와따나베 케미칼 인더스트리스 (Watanabe Chemical Industries, Ltd.))의 172 mg/5 mL 수용액, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDCI.HCl) (와따나베 케미칼 인더스트리스)의 143 mg/5 mL 수용액, 및 3-아미노프로필 신나메이트 히드로클로라이드 (도쿄 케미칼 인더스트리 (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.))의 181 mg/5 mL 수용액을 물 (115 mL)/디옥산 (144 mL) 중의 히알루론산나트륨 (1.06 g, 2.7 mmol/이당류 단위, 무게 평균 분자량 900,000; 수탉의 벼슬로부터 얻음, 세이카가쿠 코포레이션 (Seikagaku Corporation))의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 3시간 동안 교반하였고, 탄산수소나트륨 (일본 약전 (Pharmacopoeia))의 750 mg/10 mL 수용액을 첨가하였다. 2시간 30분 추가로 교반한 후, 반응은 아세트산 (214 mg) 및 염화나트륨 (1.0 g)으로 켄칭시켰다. 에탄올 (300 mL)을 첨가하였고, 생성된 침전물을 여과하고, 80 % 에탄올, 95 % 에탄올로 2회 연달아 세정하였다. 고체를 진공 상태에서 40 °C에서 밤새도록 건조시켜 백색 고체 (1.06 g) (이하의 실시예에서, "신나메이트 유도체 도입 히알루론산나트륨"은 "신나메이트 유도체 도입 HA"로 약칭됨)를 얻었다. 신나메이트 유도체의 도입비는 16 %이었다. 신나메이트 유도체의 도입비는 흡광도 측정 방법 (파장: 269 nm)에 의한 신나메이트의 양, 및 카르바졸 슬레이트 방법에 의한 히알루론산염의 양을 기초로 하여 계산하였다.

[0096] (1-2) 신나메이트 유도체 도입 HA 용액의 제조

[0097] 염수를 상기 (1-1)에서 얻은 86 mg의 신나메이트 유도체 도입 HA에 첨가하여, 총량 15.45 mL를 얻은 다음, 용액이 균일하게 용해될 때까지 밤새 진탕기로 진탕하였다. 신나메이트 유도체 도입 HA (건조감량이 10 %)의 0.5 중량 % 용액을 얻었다. 역시, 신나메이트 유도체 도입 HA의 0.3 중량 % 및 0.1 중량 % 용액을 얻었다.

[0098] <실시예 2>

[0099] (2-1) 신나메이트 유도체 도입 HA의 제조

[0100] HOSu의 75 mg/5 mL 수용액, EDCI.HCl의 62 mg/5 mL WFI 용액, 및 6-아미노헥실 신나메이트 히드로클로라이드 (도쿄 케미칼 인더스트리)의 92 mg/5 mL WFI 용액을 주사용수 (이하에서 WFI로 칭함) (150 mL)/디옥산 (75 mL) 중 히알루론산나트륨 (1.0 g, 2.5 mmol/이당류 단위, 무게 평균 분자량 1,500,000; 수탉의 벼슬로부터 얻음, 세이카가쿠 코포레이션)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 4시간 동안 교반하고 염화나트륨 (1.0 g)을 첨가하였다. 에탄올 (500 mL)을 첨가하고, 생성된 침전물을 여과하고, 80 % 에탄올, 에탄올로 2회 연달아 세정하였다. 고체를 진공 상태에서 40 °C에서 건조하여, 백색 고체 (1.1 g)을 얻었다. 신나메이트 유도체의 도입비는 2.7 %이었다.

[0101] (2-2) 가교 신나메이트 유도체 도입 HA의 제조

[0102] 상기의 신나메이트 유도체 도입 HA (12.5 g)를 포스페이트 완충 염수 (포스페이트의 농도: 1.5 mM, 이하에서 "PBS"로 약칭함) 중에 용해하여, 신나메이트 유도체 도입 HA (500 mL)의 2.5 % 용액을 제조하였다. 신나메이트 유도체 도입 HA의 2.5 % 용액을 800W 고압 수은 램프로 조사하고, 7.5분 동안 121 °C에서 오토클레이브 내에서 열처리를 수행하여, 가교 신나메이트 유도체 도입 HA를 얻었다.

[0103] 추가로, 상기의 가교 신나메이트 유도체 도입 HA 1 g을 11.5 mL의 WFI 중에 용해하고, 0.2 중량 %의 가교 신나메이트 유도체 도입 HA를 제조하였다.

[0104] <실시예 3>

[0105] (3-1) 신나메이트 유도체 도입 HA의 제조

[0106] HOSu의 172 mg/5 mL 수용액, EDCI.HCl의 143 mg/5 mL 수용액, 및 3-아미노프로필 신나메이트 히드로클로라이드 (도쿄 케미칼 인더스트리)의 181 mg/5 mL 수용액을 물 (150 mL)/디옥산 (75 mL) 중에서 히알루론산나트륨 (1.0 g, 2.5 mmol/이당류 단위, 무게 평균 분자량 900,000; 수탉의 벼슬로부터 얻음, 세이카가쿠 코포레이션)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 3시간 동안 교반하고, 탄산수소나트륨 (일본 약전)의 750 mg/10 mL 수용액을 첨가하였다. 추가로 2시간 30분 교반한 후, 반응을 아세트산 (214 mg) 및 염화나트륨 (1.0 g)으로 켄칭시켰다. 에탄올 (300 mL)을 첨가하고, 생성된 침전물을 여과하고, 80 % 에탄올, 95 % 에탄올로 2회 연달아 세정하였다. 고체를 진공 상태에서, 40 °C에서 건조하여 신나메이트 유도체 도입 HA로 백색 고체 (1.0 g)를 얻었다. 신나메이트 유도체의 도입비는 10.1 %이었다.

[0107] (3-2) 형광 색소로 표지한 신나메이트 유도체 도입 HA의 제조

[0108] HOSu의 3.0 mmol/mL 수용액, EDCI.HCl의 1.5 mmol/mL 수용액 및 4-아미노플루오레세인 (도쿄 케미칼 인더스트리)의 1.5 mmol/mL 수용액을 물 (150 mL)/디옥산 (75 mL) 중의 상기 (3-1) (1.00 g, 2.5 mmol/이당류 단위)에서 얻은 신나메이트 유도체 도입 HA 용액에 첨가하였다. 혼합물을 하루 동안 교반하고, 탄산수소나트륨 (일본 약전)의 500 mg/10 mL 수용액을 첨가하였다. 4시간 30분을 추가로 교반한 후, 반응을 아세트산 (2 mL) 및 염화나트륨 (6.0 g)으로 켄칭시켰다. 에탄올 (500 mL)을 첨가하고, 생성된 침전물을 여과하고, 80 % 에탄올로 4회 세정, 에탄올로 2회 세정하였다. 고체를 진공 상태에서 밤새 건조시켜 형광 색소로 표지한 고체 (782 mg)를 얻었다. 형광의 도입비는 0.60 %이었다.

[0109] <비교 실시예 1>

[0110] 형광 색소로 표지한 HA의 제조

[0111] HOSu의 3.0 mmol/mL 수용액, EDCI.HCl의 1.5 mmol/mL 수용액 및 4-아미노플루오레세인 (도쿄 케미칼 인더스트리)의 1.5 mmol/mL 수용액을 물 (150 mL)/디옥산 (75 mL) 중 히알루론산나트륨 (1.00 g, 2.5 mmol/이당류 단위, 무게 평균 분자량 900,000; 수탉의 벼슬로부터 얻음, 세이카가쿠 코포레이션)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 하루 동안 교반하였고, 탄산수소나트륨 (일본 약전)의 500 mg/10 mL 수용액을 첨가하였다. 4시간 30분을 추가로 더 교반한 후, 반응을 아세트산 (2 mL) 및 염화나트륨 (6.0 g)으로 켄칭시켰다. 에탄올 (500 mL)을 첨가하고, 생성된 침전물을 여과하고, 80 % 에탄올로 4회, 에탄올로 2회 세정하였다. 고체는 진공 상태에서 밤새 건조시켜, 형광 색소로 표지한 고체 (830 mg)를 얻었다. 형광의 도입비는 0.32 %이었다.

[0112] <실시예 4>

[0113] 신나메이트 유도체 도입 HA 용액의 자외선 투과율의 측정

[0114] 상기 (1-1)에서 얻은 신나메이트 유도체 도입 HA의 0.1 중량 % 수용액을 제조하고, 자외선 투과율을 분광계 (UV-1600, 시마즈 코포레이션 (Shimadzu Corporation))로 측정하였다.

[0115] 투과율을 표시하는 스펙트럼을 도 1에 나타내고, 다양한 파장에서의 투과율 (%)을 표 1에서 보인다. 결론적으로, 340 nm 이상의 파장에서 100 %의 투과율을 보이지만, 대략 320 nm 이하의 파장에서의 투과율은 극히 낮은 20 % 이하이고, 이것은 이 용액이 자외선 투과를 효과적으로 차단하고 있음을 보이는 것이다.

[0116] 도 1에서, 눈금은 수평축 상에 65 nm 간격을 보이고, 수직축 상에 20 %의 간격을 보인다.

표 1

λ	T (%)
234	19.9
340	106.2
380	101.8
450	98.5

[0117]

[0118] 표에서, λ 및 T는 각각 파장 및 투과율 (%)을 나타낸다.

[0119] <실시예 5>

- [0120] 신나메이트 유도체 도입 HA가 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과.
- [0121] 실시예 1에서 제조한 신나메이트 유도체 도입 HA가 수술에 의해 제거한 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (수술 표본).
- [0122] (5-1) 방법
- [0123] 1) 각막 상피의 수술에 의한 제거 (수술 표본)
- [0124] 중앙부의 각막 상피는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg의 정맥 주사 및 0.4 % 옥시부프로케인 히드로클로라이드 국소 투여로 마취한 후 트레핀 (8 mm I.D.), 23G 바늘 및 미세 가위를 사용하여 제거하였다.
- [0125] 2) 국소 투여
- [0126] 각막 상피를 박리하고 1시간 및 4시간 후, 대조군 물질로 염수 150 μ l를 좌안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 (1-2)에서 제조한 0.5 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액 150 μ l를 우안에 투여하였다. 박리하고 1일 및 2일 후, 3시간 간격으로 총 4회, 및 박리하고 3일 후에, 3시간 간격으로 상기와 동일한 투여를 수행하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 각막 상피층 질환에 대해 여섯 토끼 표본을 투여 대상물로 사용하였다.
- [0127] 3) 각막 상피 결합 부위의 촬영
- [0128] 토끼는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 후속적으로 각막 상피 결손부를, PBS에 용해한 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색하고, 자외선 하에서 촬영하였다. 촬영은 각막을 박리하고 1시간 후에 대상 물질을 투여하기 직전에 행하고, 박리하고 3일 후 최종 투여를 하고 3시간 후에 행하였다. 촬영을 할 때, 초점 길이를 일정하게 하여 사진의 배율을 일정하게 만든다.
- [0129] 4) 각막 상피 결합 부위의 계량
- [0130] 나트륨 플루오레세인으로 염색한 각막 상피 결합 부위의 영역은 화상분석기를 사용하여 인쇄된 사진상에서 계량하였다. 박리를 하고 3일 후에 최종 투여를 하고 3시간 후의 박리 부분 영역을 각막 상피를 박리하고 1시간 후에 대상 물질의 투여를 수행하기 바로 직전의 박리부의 영역 (박리 영역)에서 빼서 얻은 값을 "치료 영역"이라고 한다.
- [0131] (5-2) 연구 결과
- [0132] 각 개체의 치료 영역 퍼센트의 결과를 도 2에서 보이고, 각 개체의 치료 영역 퍼센트 및 치료 영역 퍼센트 비율의 결과를 표 2에서 보였다. 치료 영역 퍼센트 및 치료 영역 퍼센트 비율은 다음과 같이 계산하였다.
- [0133] 치료 영역 퍼센트 (%) = (치료 영역/박리 영역) x 100
- [0134] 치료 영역 퍼센트 비율 = (우안 중 치료 영역 퍼센트/좌안 중 치료 영역 퍼센트) x 100

표 2

표본 번호	치료 영역 퍼센트 (%)		치료 영역 퍼센트 비율
	우안 (신남산 유도체 도입 HA의 투여)	좌안 (염수의 투여)	
1	76.90	66.59	115.47
2	69.44	85.90	80.85
3	75.23	61.71	121.91
4	75.54	56.79	133.01
5	68.41	64.53	106.01
6	83.76	66.92	125.16
평균	74.88	67.07	113.73
표준 편차	5.57	9.95	-

[0135]

- [0136] 개체 번호 1 내지 6의 각 개체에 있어서, 좌측란은 우안 중 치료 영역 퍼센트 (신나메이트 유도체 도입 HA의 투여)를 보이고, 우측란은 좌안 중 치료 영역 퍼센트 (염수의 투여)를 보였다. 도 2 및 표 2에서, 각막 상피층 질환의 치료를 용이하게 하는 명백한 효과가 투여한 여섯 개체 중 다섯 개체에서 관찰되었다.
- [0137] <실시예 6>
- [0138] 0.5 % 신나메이트 유도체 도입 HA가 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과.
- [0139] 실시예 1에서 제조한 신나메이트 유도체 도입 HA가 수술에 의해 제거한 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (수술 표본).
- [0140] (6-1) 방법
- [0141] 1) 각막 상피의 수술에 의한 제거 (수술 표본)
- [0142] 중앙부의 각막 상피는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg의 정맥 주사 및 0.4 % 옥시부프로케인 히드로클로라이드 국소 투여로 마취한 후 트레핀 (8 mm I.D.), 23G 바늘 및 미세 가위를 사용하여 제거하였다.
- [0143] 2) 국소 투여
- [0144] 각막 상피를 박리하고 1시간 및 4시간 후, 대조군 물질로 염수 150 μ l를 좌안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 (1-2)에서 제조한 0.5 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액 150 μ l를 우안에 투여하였다. 박리하고 1일 및 2일 후, 3시간 간격으로 총 4회, 및 박리하고 3일 후에, 3시간 간격으로 상기와 동일한 투여를 수행하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 각막 상피층 질환의 열넷 토끼 표본을 투여 대상물로 사용하였다.
- [0145] 3) 각막 상피 결함 부위의 촬영
- [0146] 토끼는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 후속적으로 각막 상피 결손부를, PBS에 용해한 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색하고, 자외선 하에서 촬영하였다. 촬영은 각막을 박리하고 1시간 후에 대상 물질을 투여하기 직전에 행하고, 박리하고 1 내지 3일 후 두 번째 투여를 하고 3시간 후에 행하였다. 촬영을 할 때, 초점 길이를 일정하게 하여 사진의 배율을 일정하게 만든다.
- [0147] 4) 각막 상피 결함 부위의 계량
- [0148] 나트륨 플루오레세인으로 염색한 각막 상피 결함 부위의 영역은 화상분석기를 사용하여 인쇄된 사진상에서 계량하였다. 박리를 하고 3일 후에 최종 투여를 하고 3시간 후의 박리 부분 영역을 각막 상피를 박리하고 1시간 후에 대상 물질의 투여를 수행하기 바로 직전의 박리부의 영역 (박리 영역)에서 빼서 얻은 값을 "치료 영역"이라고 한다.
- [0149] (6-2) 연구 결과
- [0150] 각 개체의 치료 영역의 결과를 도 3에서 보이고, 각 개체의 치료 속도의 결과를 도 4에서 보였다. 치료 영역 및 치료 속도는 다음과 같이 계산하였다.
- [0151] 치료 영역 = 박리 후 영역 - 각 시점에서의 영역 (1 내지 3일 후)
- [0152] 이하에서, "박리 후 영역"은 치료 영역의 계산에 있어서 '각막을 박리하고 1시간 후에 대상 물질을 투여하기 직전의 박리부의 영역'을 의미한다.
- [0153] 치료 속도 = 각 시점에서의 치료 영역의 평균 (1 내지 3일 후)
- [0154] 도 3 및 4에 있어서, 대조군 눈들 중 각막 상피의 치료 영역과 비교할 때, 0.5 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 각막 상피의 치료 영역이 중대하게 증가하였음이 관찰되었다. 또한, 0.5 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 치료 속도가 중대하게 증진되었음이 관찰되었다.
- [0155] <실시예 7>
- [0156] 0.3 % 신나메이트 유도체 도입 HA가 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과.
- [0157] 실시예 1에서 제조한 신나메이트 유도체 도입 HA가 수술에 의해 제거한 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (수술 표본).

술 표본).

[0158] (7-1) 방법

1) 각막 상피의 수술에 의한 제거 (수술 표본)

[0160] 중앙부의 각막 상피는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg의 정맥 주사 및 0.4 % 옥시부프로케인 히드로클로로아이드 국소 투여로 마취한 후 트레핀 (8 mm I.D), 23G 바늘 및 미세 가위를 사용하여 제거하였다.

[0161] 2) 국소 투여

[0162] 각막 상피를 박리하고 1시간 및 4시간 후, 대조군 물질로 염수 150 μ l를 좌안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 (1-2)에서 제조한 0.3 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액 150 μ l를 우안에 투여하였다. 박리하고 1일 및 2일 후, 3시간 간격으로 총 4회, 및 박리하고 3일 후에, 3시간 간격으로 상기와 동일한 투여를 수행하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 각막 상피층 질환의 열넷 토끼 표본을 투여 대상물로 사용하였다.

[0163] 3) 각막 상피 결합 부위의 촬영

[0164] 토끼는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 후속적으로 각막 상피 결손부를, PBS에 용해한 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색하고, 자외선 하에서 촬영하였다. 촬영은 각막을 박리하고 1시간 후에 대상 물질을 투여하기 직전에 행하고, 박리하고 1 내지 3일 후 두 번째 투여를 하고 3시간 후에 행하였다. 촬영을 할 때, 초점 길이를 일정하게 하여 사진의 배율을 일정하게 만든다.

[0165] 4) 각막 상피 결합 부위의 계량

[0166] 나트륨 플루오레세인으로 염색한 각막 상피 결합 부위의 영역은 화상분석기를 사용하여 인쇄된 사진상에서 계량하였다. 박리를 하고 3일 후에 최종 투여를 하고 3시간 후의 박리 부분 영역을 각막 상피를 박리하고 1시간 후에 대상 물질의 투여를 수행하기 바로 직전의 박리부의 영역 (박리 영역)에서 빼서 얻은 값을 "치료 영역"이라고 한다.

[0167] (7-2) 연구 결과

[0168] 각 개체의 치료 영역의 결과는 도 5에서 보이고, 각 개체의 치료 속도의 결과는 도 6에서 보였다. 치료 영역 및 치료 속도는 다음과 같이 계산하였다.

[0169] 치료 영역 = 박리 후 영역 - 각 시점에서의 영역 (1 내지 3일 후)

[0170] 치료 속도 = 각 시점에서의 치료 영역의 평균 (1 내지 3일 후)

[0171] 도 5 및 6에 있어서, 대조군 눈들 중 각막 상피의 치료 영역과 비교할 때, 1 내지 3일의 모든 시점에서 0.3 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 각막 상피의 치료 영역이 중대하게 증가하였음이 관찰되었다. 또한, 0.3 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 치료 속도가 중대하게 증진되었음이 관찰되었다.

[0172] <실시예 8>

[0173] 0.1 % 신나메이트 유도체 도입 HA가 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 수용액 및 0.1 중량 % HA 수용액, 1일에 약 4회).

[0174] 실시예 1에서 제조한 신나메이트 유도체 도입 HA가 수술에 의해 제거한 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (수술 표본).

[0175] (8-1) 방법

1) 각막 상피의 수술에 의한 제거 (수술 표본)

[0177] 중앙부의 각막 상피는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg의 정맥 주사 및 0.4 % 옥시부프로케인 히드로클로로아이드 국소 투여로 마취한 후 트레핀 (8 mm I.D), 23G 바늘 및 미세 가위를 사용하여 제거하였다.

[0178] 2) 국소 투여

[0179] 각막 상피를 박리하고 1시간 및 4시간 후, 대조군 물질로 무게 평균 분자량이 600,000 내지 1,200,000인 HA의 0.1 중량 % 수용액 150 μ l를 좌안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 (1-2)에서 제조한 0.1 중량 % 신나메이

트 유도체 도입 HA 용액 150 μl 를 우안에 투여하였다. 박리하고 1일 및 2일 후, 3시간 간격으로 총 4 회, 및 박리하고 3일 후에, 3시간 간격으로 상기와 동일한 투여를 수행하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 각막 상피층 질환에 대해 여덟 토끼 표본을 투여 대상물로 사용하였다.

[0180] 3) 각막 상피 결합 부위의 촬영

[0181] 토끼는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 후속적으로 각막 상피 결손부를, PBS에 용해한 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색하고, 자외선 하에서 촬영하였다. 촬영은 각막을 박리하고 1시간 후에 대상 물질을 투여하기 직전에 행하고, 박리하고 1 내지 3일 후 두 번째 투여를 하고 3시간 후에 행하였다. 촬영을 할 때, 초점 길이를 일정하게 하여 사진의 배율을 일정하게 만든다.

[0182] 4) 각막 상피 결합 부위의 계량

[0183] 나트륨 플루오레세인으로 염색한 각막 상피 결합 부위의 영역은 화상분석기를 사용하여 인쇄된 사진상에서 계량하였다. 박리를 하고 3일 후에 최종 투여를 하고 3시간 후의 박리 부분 영역을 각막 상피를 박리하고 1시간 후에 대상 물질의 투여를 수행하기 바로 직전의 박리부의 영역 (박리 영역)에서 빼서 얻은 값을 "치료 영역"이라고 한다.

[0184] (8-2) 연구 결과

[0185] 각 개체의 치료 영역의 결과를 도 7에서 보이고, 각 개체의 치료 속도의 결과를 도 8에서 보였다. 치료 영역 및 치료 속도는 다음과 같이 계산하였다.

[0186] 치료 영역 = 박리 후 영역 - 각 시점에서의 영역 (1 내지 3일 후)

[0187] 치료 속도 = 각 시점에서의 치료 영역의 평균 (1 내지 3일 후)

[0188] 도 7 및 8에 있어서, 대조군 눈들 중 각막 상피의 치료 영역과 비교할 때, 0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 각막 상피의 치료 영역이 중대하게 증가하였음이 관찰되었다. 또한, 0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 치료 속도가 중대하게 증진되었음이 관찰되었다.

[0189] <실시예 9>

[0190] 0.1 % 신나메이트 유도체 도입 HA가 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 수용액 및 0.1 중량 % HA 수용액, 1일에 약 1회).

[0191] 실시예 1에서 제조한 신나메이트 유도체 도입 HA가 수술에 의해 제거한 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (수술 표본).

[0192] (9-1) 방법

[0193] 1) 각막 상피의 수술에 의한 제거 (수술 표본)

[0194] 중앙부의 각막 상피는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg의 정맥 주사 및 0.4 % 옥시부프로케인 히드로클로라이드 국소 투여로 마취한 후 트레핀 (8 mm I.D), 23G 바늘 및 미세 가위를 사용하여 제거하였다.

[0195] 2) 국소 투여

[0196] 각막 상피를 박리하고 1시간 후, 대조군 물질로 무게 평균 분자량이 600,000 내지 1,200,000인 HA의 0.1 중량 % 수용액 150 μl 를 좌안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 (1-2)에서 제조한 0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액 150 μl 를 우안에 투여하였다. 추가로 박리하고 1일 내지 3일 후, 1일에 1회 상기와 동일한 투여를 수행하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 각막 상피층 질환에 대해 여덟 토끼 표본을 투여 대상물로 사용하였다.

[0197] 3) 각막 상피 결합 부위의 촬영

[0198] 토끼는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 후속적으로 각막 상피 결손부를, PBS에 용해한 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색하고, 자외선 하에서 촬영하였다. 촬영은 각막을 박리하고 1시간 후에 대상 물질을 투여하기 직전에 행하고, 박리하고 1 내지 3일 후 투여를 하고 6시간 후에 행하였다. 촬영을 할 때, 초점 길이를 일정하게 하여 사진의 배율을 일정하게 만든다.

[0199] 4) 각막 상피 결합 부위의 계량

- [0200] 나트륨 플루오레세인으로 염색한 각막 상피 결합 부위의 영역은 화상분석기를 사용하여 인쇄된 사진상에서 계량하였다. 박리를 하고 3일 후에 최종 투여를 하고 3시간 후의 박리 부분 영역을 각막 상피를 박리하고 1시간 후에 대상 물질의 투여를 수행하기 바로 직전의 박리부의 영역 (박리 영역)에서 빼서 얻은 값을 "치료 영역"이라고 한다.
- [0201] (9-2) 연구 결과
- [0202] 각 개체의 치료 영역의 결과를 도 9에서 보이고, 각 개체의 치료 속도의 결과를 도 10에서 보였다. 치료 영역 및 치료 속도는 다음과 같이 계산하였다.
- [0203] 치료 영역 = 박리 후 영역 - 각 시점에서의 영역 (1 내지 3일 후)
- [0204] 치료 속도 = 각 시점에서의 치료 영역의 평균 (1 내지 3일 후)
- [0205] 도 9 및 10에 있어서, 0.1 중량 % HA 수용액을 투여한 대조군 눈들 중 각막 상피의 치료 영역과 비교할 때, 1 내지 3일의 모든 시점에서 0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 각막 상피의 치료 영역이 중대하게 증가하였음이 관찰되었다. 또한, 0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 치료 속도가 중대하게 증진되었음이 관찰되었다.
- [0206] <실시예 10>
- [0207] 형광 표지 신나메이트 유도체 도입 HA를 사용하여, 토끼 각막 상피 박리부에서의 체류특성
- [0208] 수술에 의해 제거한 토끼 각막 상피의 잔여특성에 실시예 3에서 제조한 형광 표지 신나메이트 유도체 도입 HA 및 비교 실시예 1에서 제조한 형광 표지 HA가 주는 효과 (수술 표본).
- [0209] (10-1) 방법
- [0210] 1) 각막 상피의 수술에 의한 제거 (수술 표본)
- [0211] 중앙부의 각막 상피는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg의 정맥 주사 및 0.4 % 옥시부프로케인 히드로클로로아이드 국소 투여로 마취한 후 트레핀 (8 mm I.D), 23G 바늘 및 미세 가위를 사용하여 제거하였다.
- [0212] 2) 국소 투여
- [0213] 각막 상피를 박리하고 1시간 후, 대조군 물질로 비교 실시예 1에서 제조한 형광 표지 HA의 0.3 중량 % 수용액 150 μ l를 좌안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 3에서 제조한 0.3 중량 %의 형광 표지 신나메이트 유도체 도입 HA 수용액 150 μ l를 우안에 투여하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 각막 상피층 질환에 대해 여덟 토끼 표본을 투여 대상물로 사용하였다.
- [0214] 3) 각막 상피의 제거 및 냉각된 블록의 제조
- [0215] 두 토끼는 토끼당 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 대상 물질 및 대조군 물질의 투여 후 30분, 1시간, 1시간 30분 및 2시간 30분에 안구를 제거하였다. 수술칼을 사용하여 제거한 안구 중 각막 및 공막 사이에 공극을 열어, 미세 가위를 사용하여 오로지 각막만을 제거한다. 제거된 각막을 생물학적 샘플 슬라이스판 (니신 EM 코포레이션 (Nisshin EM Corporation)이 제공하는 상품목록 번호 428)상에 위치시키고, 관찰할 부분을 한낱 스테인레스강 면도날 (GEM(R) 무코팅 스테인레스강, 니신 EM 코포레이션, 상품목록 번호 429)을 사용하여 절단하였다. 절단한 부분을 O.C.T. 화합물 (티슈-테크(Tissue-Tek) (R) 4583, 상품구분 번호 1178) 중에 침치시키고, 그 다음 O.C.T. 화합물로 채워진 동결절편기 트레이 (무라즈미(Murazumi Co., Ltd.))에 의해 제공되는 상품목록 번호 31) 중에 매립하고, 이에 의해 관찰할 부분이 바닥에 있게 되고, 폼 폴리스티렌 중에서 액체 질소를 사용하여 빠르게 냉각시켜 고정되지 않은 냉각된 블록을 만들었다.
- [0216] 4) 냉각된 박편의 제조
- [0217] 후속적으로, 냉각된 블록을 동결절편기 트레이로부터 제거하고, O.C.T. 화합물을 사용하여 샘플테이블에 접합시켰다. 연구를 위해, 샘플테이블 및 1회용 마이크로톰 블레이드 (레이카 마이크로시스템스 제펜 (Leica Microsystems Japan)에 의해 제공되는 모델 818, 상품구분 번호 913212)를 고기능 냉각 마이크로톰에 장착하고, 블록을 -20°C의 냉각 챔버 온도 (CT) 및 -16°C의 샘플 측 온도 (OT)의 조건하에 슬라이스하고, 실란으로 코팅한 슬라이드 유리 (무토 퓨어 케미칼스(Muto Pure Chemicals Co., Ltd.)에 의해 제공된 스타 프로스트 슬라이드 유리(Star Frost Slide Glass), 상품목록 번호 5116)를 사용하여 5 μ m의 두께를 가지는 박편을 만들었다.

[0218] 5) 관찰 및 촬영 방법

[0219] 냉각 박편을 입사식형광현미경 (올림푸스 코포레이션(Olympus Corporation), BH2-RFC)에 장착하고, FA 영상 및 자가형광영상을 IB 큐브 (BH2-DMIB, 여기 (excitation) 파장: 495 nm, 흡수 파장: 460 nm) 및 U 큐브 (BH2-DMU, 광대역 U 여기, 흡수 파장: 435 nm)에서 각각 관찰하였다. FA 영상 및 자가형광영상을, 노출시간 1초 및 ISO 감광도 200의 조건 하에, 차갑게 한 고감광도 CCD 카메라 (케이엔스 코포레이션(Keyence Corporation), VB-6010)를 사용하여 촬영하였다.

[0220] (10-2) 연구 결과

[0221] 도 11 및 12에 샘플화된 각막의 사진을 보였다. 도 11 및 12로부터, 형광 표지의 발색 현상에 의해, 대조군 물질인 0.3 중량 % 형광 표지 HA의 수용액이 투여하고 30분 후까지 체류하였으나, 1시간 후에는 체류하지 않는다는 것을 알아냈다. 반면, 대상 물질인 0.3 중량 % 형광 표지 신나메이트 유도체 도입 HA 수용액의 형광 발색 현상이 시간의 경과에 따라 약화되었음에도 불구하고, 발색 현상을 투여 후 30분 내지 2시간 30분의 모든 시점에서 관찰하였고, 이에 의해 고체류기능을 확인하였다.

[0222] <실시예 11>

[0223] 자외선 노출 후 토끼 눈에 0.3 % 신나메이트 유도체 도입 HA가 주는 효과.

[0224] 표재성점상각막염을 가진 토끼의 각막에 있어 실시예 1에서 제조한 신나메이트 유도체 도입 HA가 주는 보호 효과.

[0225] (11-1) 연구 절차

[0226] 1) 마취 및 토끼의 눈꺼풀 개방

[0227] 토끼에게 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 마취상태에 들도록 하고, 이소플루란을 흡입시켜 마취상태를 유지하도록 하였다. 그 후에, 유아용 눈꺼풀 견인기를 사용하여 눈꺼풀을 항상 개방하였다.

[0228] 2) 대상 물질 및 대조군 물질의 투여

[0229] 눈을 개방한 조건에서, 대조군 물질로 무게 평균 분자량이 600,000 내지 1,200,000인 0.3 중량 % HA의 수용액 150 μ l를 우안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 (1-2)에서 제조한 0.3 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 150 μ l를 좌안에 투여하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한, 하나의 토끼를 투여 대상으로 사용하였다.

[0230] 3) 토끼의 각막에 자외선 조사

[0231] 자외선을 토끼 안구에 15 kW 살균 램프를 사용하여 대략 10 cm 떨어진 거리로부터 양 눈에 조사하였다. 조사를 3시간 동안 수행하였다.

[0232] 4) 자외선 조사부의 촬영

[0233] 토끼를 계속 마취상태 하에 두고, 안구를 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색하고, 자외선 하에서 촬영하였다. 촬영했을 때, 초점 길이를 일정하게 하여 사진의 배율을 일정하게 하였다.

[0234] (11-2) 연구 결과

[0235] 자외선의 조사 후의 사진을 도 13에서 보였다. 도 13으로부터, 대조군 물질의 투여 후에 자외선으로 안구를 조사하여, 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색한 환부가 분명해지도록 하였다. 반면, 대상 물질의 투여 후에 자외선을 조사한 안구 중 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색한 환부는 대조군 물질의 그것보다 확실히 작고, 자외선에 의해 야기되는 각막 질환을 예방하였다.

[0236] <실시예 12>

[0237] 제거된 각막을 사용한 보습 효과

[0238] 토끼의 제거된 각막을 사용하여, 실시예 1에서 제조한 신나메이트 유도체 도입 HA의 보습 기능을 입증하였다.

[0239] (12-1) 방법

- [0240] 1) 각막의 제거
- [0241] 토끼에게 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 안구를 제거하였다. 수술칼을 사용하여 제거한 안구 중 각막 및 공막 사이에 공극을 개방하고, 미세 가위를 사용하여 각막만을 제거하였다.
- [0242] 2) 각막의 건조처리
- [0243] 건조 처리는 의치 (False-tooth) 정도의 안정성 물질로 파라핀 블록 상에 제거한 각막을 위치시키고, 5분 동안 각막에서 대략 1 mm 거리로부터 건조기를 사용하여 냉기를 제공하여 수행하였다.
- [0244] 3) 시험 물질 투여 (대상 물질, 대조군 물질 및 음성 대조군 물질)
- [0245] 건조 처리의 완료 후에, 음성 대조군 물질로 염수 100 μ l, 대조군 물질로 무게 평균 분자량이 600,000 내지 1,200,000인 0.3 중량 % HA의 수용액 또는 대상 물질로 상기 실시예 (1-2)에서 제조된 0.5 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA의 수용액을 두 각막에 투여하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 세 토끼 (6개 각막)를 투여 대상으로 사용하였다.
- [0246] 4) 물 증발량의 측정
- [0247] 시험 물질의 투여 전, 건조 처리 후, 시험 물질의 투여 후 및 시험 물질의 투여 후 40분까지 10분 간격으로, 물 증발량을 물 증발량 측정 기구 (AS-TW2, 아사히바이오메드(ASAHI BIOMED))를 사용하여 측정하였다.
- [0248] (12-2) 연구 결과
- [0249] 도 14에 물 증발량 측정의 결과를 보였다. 도 14로부터, 염수는 40분 후에 0에 가까운 값이 되기 때문에, 물 증발량은 대조군 물질인 HA 수용액 중에서 음성 대조군인 염수 중에서보다 약간 높다. 반면, 대상 물질의 투여 후의 물 증발량은 40분이 지날 때까지도 높은 값을 유지하고, 이에 의해 대상 물질의 명백한 보습 기능을 확인하였다.
- [0250] <실시예 13>
- [0251] (13-1) 방법
- [0252] 1) 각막 상피의 제거
- [0253] 토끼를 안락사시키고, 안구를 제거한 후, 전 각막층을 공막을 따라 절개하여 제거하였다. 제거된 각막을 염수 중에서 보존하였고, 측정 직전에 각막 상피를 의치정도의 안정성 물질로 파라핀 블록 상에 위치시켜 고정하였다 (이하에서, "측정할 각막"으로 기재함).
- [0254] 2) 각막 상피에서의 물 증발
- [0255] 측정할 각막에 건조기로 5분 동안 30 cm의 거리에서 냉기를 가하고, 1시간 동안 상온에 두었다.
- [0256] 3) 대상 물질의 투여
- [0257] 물이 증발된 후, 음성 대조군 물질로 염수 두 방울 (대략 100 μ l), 대조군 물질로 무게 평균 분자량 600,000 내지 1,200,000인 0.3 중량 % HA의 수용액 또는 대상 물질로 실시예 (1-2)에서 제조한 0.5 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA의 수용액을 1 ml 주사기로 투여하였다.
- [0258] 4) 물 증발량의 계량
- [0259] 지각되지 않는 증발량으로 생각되는 양 (1시간에 mm^2 당 방출된 물의 양)을 물 증발량 측정 기구 (AS-TW2)를 사용하여 측정할 각막으로부터의 물 증발량으로 직접 측정하였다.
- [0260] (13-2) 연구 결과
- [0261] 도 15에 물 증발량 측정의 결과를 보였다. 도 15로부터, 염수는 40분 후에 0에 가까운 값을 나타내기 때문에, 물 증발량은 대조군 물질인 HA 수용액 중에서 음성 대조군인 염수 중에서보다 약간 높다. 반면, 투여된 대상 물질의 물 증발량은 40분이 지날 때까지도 높은 값을 유지하고, 이에 의해 대상 물질은 염수 및 HA 수용액에 비교할 때 각막 상의 보다 지속적인 물 보유 특성을 가지는 것을 확인하였다.
- [0262] <실시예 14>

- [0263] 가교 신나메이트 유도체 도입 HA의 치료 효과의 증명
- [0264] 구강 건조증 햄스터 표본을 사용하여, 실시예 2에서 제조한 가교 신나메이트 유도체 도입 HA의 구강 건조증에 대한 치료 효과를 증명하였다.
- [0265] (14-1) 시험 방법
- [0266] 1) 구강 건조증에 대한 햄스터 표본의 생산
- [0267] Nembutal(Nembutal)에 의한 마취하에서, 수컷 시리아 햄스터의 구강 내부를 불축 근방의 구강 내로 대략 10 mm의 직경을 갖는 시험관을 삽입하고, 그것을 뒤집어 노출시킨다. 건조기를 사용하여 구강의 노출된 내부에 대략 20 초 동안 열기를 가하고, 후속적으로 2분 40초 동안 냉기를 가하여, 구강 건조증 햄스터 표본을 얻었다. 측정이 완료될 때까지 구강의 내부를 지속적으로 노출시켰다.
- [0268] 2) 대상 물질 및 대조군 물질의 투여
- [0269] 구강 건조증 표본을 만든 직후, (A) PBS, (B) 0.2 중량 % HA 용액 (세이카가쿠 코포레이션에 의해 공급됨, 무게 평균 분자량: 1,500,000) 또는 (C) 0.2 중량 % 가교 신나메이트 유도체 도입 HA 용액 100 μ L를 미세주사기를 사용하여 구강의 내부에 적용하여 투여하였다.
- [0270] 이하에서, (A) 투여군, (B) 투여군 및 (C) 투여군은 각각 PBS군, HA군 및 가교 신나메이트 유도체 도입 HA군으로 칭한다. 투여분류 (투여기 조성)에 있어서, 일곱 햄스터를 PBS군, HA군 및 가교 신나메이트 유도체 도입 HA군 각각에 사용하였다.
- [0271] 3) 물 증발량비의 계산
- [0272] 구강 건조증 햄스터 표본의 구강의 내부에서의 물 증발량은 물 증발 시스템 (아사히바이오메드)을 사용하여 측정하였고, 물 증발량비는 구강 건조증 햄스터 표본을 만든 직후 측정값이 1일 때 계산하였다. 이 물 증발량비가 더 클수록, 더 보습된 조건이 유지된다 (구강 건조의 정도가 낮다). 구강 건조증 햄스터 표본을 만든 직후, 투여 직후, 투여 후 10분 및 20분에 측정을 수행하였다.
- [0273] (14-2) 연구 결과
- [0274] 도 16에 물 증발량비를 측정한 결과를 표시하였다. 도면에서, 수평축 상의 원을 그린 수 1, 2, 3 및 4 각각은 구강 건조증 햄스터 표본을 만든 직후, 투여 직후, 투여하고 10분 후 및 20분 후의 데이터를 나타내었다. P는 중요도를 나타낸다. 투여 직후, 모든 투여기는 3.3 내지 4.5의 물 증발량비를 나타내었다. 투여하고 10분 후의 물 증발량비는 PBS군에서 평균 0.9이고, HA군에서 평균 2.3이었다. 반면, 가교 신나메이트 유도체 도입 HA군에서 평균 3.2이었고, 따라서 PBS군 및 HA군에서보다 더 높은 물 증발량비를 나타내었다. 더욱이, 투여하고 20분 후의 물 증발량비는 PBS군에서 평균 0.9이었고, HA군에서 평균 1.3이었다. 반면, 가교 신나메이트 유도체 도입 HA군에서 평균 3.2이었고, 따라서 PBS군 및 HA군에 비해 극히 더 높은 물 증발량비를 나타내었다. 더욱이, 도 16에서 명백하듯이, 가교 신나메이트 유도체 도입 HA군에서의 물 증발량비는 시간의 경과에도 불구하고 매우 안정하였다. 이것은 가교 신나메이트 유도체 도입 HA가 투여부에 장기간의 시간 동안 체류하고, 높은 체류 효과를 발휘한다는 것을 알려준다.
- [0275] 상기의 결과로부터, 신나메이트 유도체 도입 HA 및 가교 신나메이트 유도체 도입 HA를 포함하고, 결합체를 통해 소수성기를 도입한 GAG를 점막에 적용하는 것이 적합하고, 점막에 적용하여 점막 상피층 중의 질환을 효과적으로 치료하는 것이 가능하다는 것을 보였다. 또한 치료 효과가 매우 지속적임을 보였다.
- [0276] 신나메이트 유도체 도입 HA 및 가교 신나메이트 유도체 도입 HA의 투여에 의한 부작용이 임의의 상기 동물 연구에서 관찰되지 않았기 때문에, 점막에 적용하는 본 발명의 작용제의 안정성은 충분히 평가될 수 있다.
- [0277] <실시예 15>
- [0278] (15-1) 옥틸아민 도입 히알루론산나트륨의 제조
- [0279] 옥틸아민의 25.8 mg/2 mL 용액 (에탄올 : 0.1 M HCl = 1 : 1), DMT-MM (와코 퓨어 케미칼 인더스트리스 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.))의 0.1 M 용액 (에탄올 : 물 = 1 : 1) 2 mL를 물 (50 mL)/에탄올 (50 mL) 중 히알루론산나트륨 (502 mg, 1.25 mmol/이당류 단위, 무게 평균 분자량 900,000)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 밤새 교반하고, 탄산수소나트륨 (일본 약전)의 376 mg/5 mL 수용액 을 첨가하였다. 추가로 5시간을 교반한 후, 반응을 아세트산 (107mg) 및 염화나트륨 (522 mg)으로 켄칭시켰다. 에탄올 (250 mL)을 첨가하고, 생성된

침전물을 여과하고 80 % 에탄올, 에탄올로 2회 연달아 세정하였다. 고체를 진공 상태에서 건조하여 백색 고체 (475 mg)를 얻었다. 옥틸아민의 도입비는 HPLC에 의해 12.6 %이었다.

[0280] (15-2) 헥사데실아민-도입 히알루론산나트륨의 제조

[0281] 헥사데실아민의 30 mg/3 mL 용액 (에탄올 : 0.1 M HCl = 1 : 1), DMT-MM (와코 퓨어 케미칼 인더스트리스)의 0.1 M 용액 (에탄올 : 물 = 1 : 1) 1.25 mL를 물 (50 mL)/에탄올 (50 mL) 중 히알루론산나트륨 (501 mg, 1.25 mmol/이)당류 단위, 무게 평균 분자량 900,000)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 밤새 교반하고, 탄산수소나트륨 (일본 약전)의 381 mg/5 mL 수용액을 첨가하였다. 추가로 5시간을 교반한 후, 반응을 아세트산 (107mg) 및 염화나트륨 (497 mg)으로 켄칭시켰다. 에탄올 (250 mL)을 첨가하고, 생성된 침전물을 여과하고, 80 % 에탄올, 에탄올로 2회 연달아 세정하였다. 고체를 진공 상태에서 건조하여 백색 고체 (497 mg)를 얻었다. 헥사데실아민의 도입비는 HPLC에 의해 12 %였다.

[0282] (15-3) 샘플 용액의 제제

[0283] 상기 (15-1)에서 얻은 화합물 64 mg을 5 mM 포스페이트 완충 염수에 첨가하여 총량 59 mL를 얻고, 그 다음 용액을 진탕기로 밤새 진탕하였다. 상기 (15-1)에서 제조한 화합물 용액 0.1 중량 %를 제조하였다.

[0284] 마찬가지로, 상기 (15-2)에서 제조한 화합물 용액 0.1 중량 %를 얻었다.

[0285] <실시예 16>

[0286] 0.1 % 신나메이트 유도체 도입 HA가 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과.

[0287] 실시예 1에서 제조한 신나메이트 유도체 도입 HA가 수술에 의해 제거한 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (수술 표본).

[0288] (16-1) 방법

[0289] 1) 각막 상피의 수술에 의한 제거 (수술 표본)

[0290] 중앙부의 각막 상피는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg의 정맥 주사 및 0.4 % 옥시부프로케인 히드로클로로아이드 국소 투여로 마취한 후 트레핀 (8 mm I.D.), 23G 바늘 및 미세 가위를 사용하여 제거하였다.

[0291] 2) 국소 투여

[0292] 각막 상피를 박리하고 1시간 및 4시간 후, 대조군 물질로 염수 150 μ L를 좌안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 (1-2)에서 제조한 0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액 150 μ L를 우안에 투여하였다. 박리하고 1일 및 2일 후, 3시간 간격으로 총 4회, 및 박리하고 3일 후에, 3시간 간격으로 상기와 동일한 투여를 수행하였다. 투여에 있어서, 1 mL 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 각막 상피층 질환에 대해 여섯 토끼 표본을 투여 대상물로 사용하였다.

[0293] 3) 각막 상피 결합 부위의 촬영

[0294] 토끼는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 후속적으로 각막 상피 결손부를, PBS에 용해한 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색하고, 자외선 하에서 촬영하였다. 촬영은 각막을 박리하고 1시간 후에 대상 물질을 투여하기 직전에 행하고, 박리하고 3일 후 최종 투여를 하고 3시간 후에 행하였다. 촬영을 할 때, 초점 길이를 일정하게 하여 사진의 배율을 일정하게 만든다.

[0295] 4) 각막 상피 결합 부위의 계량

[0296] 나트륨 플루오레세인으로 염색한 각막 상피 결합 부위의 영역은 화상분석기를 사용하여 인쇄된 사진상에서 계량하였다. 박리를 하고 3일 후에 최종 투여를 하고 3시간 후의 박리 부분 영역을 각막 상피를 박리하고 1시간 후에 대상 물질의 투여를 수행하기 바로 직전의 박리부의 영역 (박리 영역)에서 빼서 얻은 값을 "치료 영역"이라고 한다.

[0297] (16-2) 연구 결과

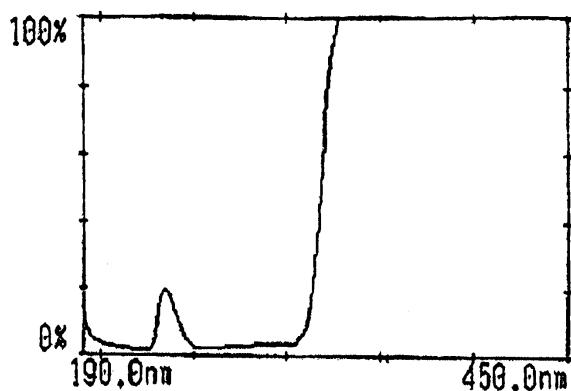
[0298] 각 개체의 치료 영역의 결과는 도 17에서 보이고, 각 개체의 치료 속도의 결과는 도 18에서 보였다. 치료 영역 및 치료 속도는 다음과 같이 계산하였다.

[0299] 치료 영역 = 박리 후 영역 - 각 시점에서의 영역 (1 내지 3일 후)

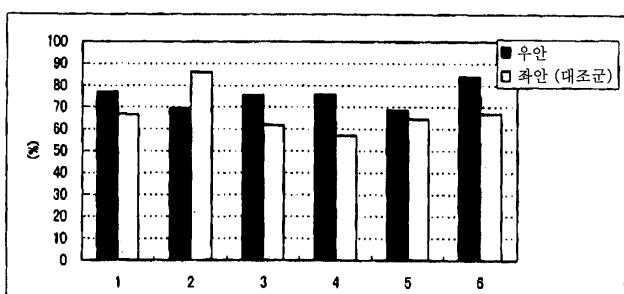
- [0300] 치료 속도 = 각 시점에서의 치료 영역의 평균 (1 내지 3일 후)
- [0301] 도 17 및 18에 있어서, 대조군 눈들 중 각막 상피의 치료 영역과 비교할 때, 1 내지 3일의 모든 시점에서 0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 각막 상피의 치료 영역이 중대하게 증가하였음이 관찰되었다. 또한, 0.1 중량 % 신나메이트 유도체 도입 HA 용액을 투여한 눈에서 치료 속도가 중대하게 증진되었음이 관찰되었다.
- [0302] <실시예 17>
- [0303] 0.1 % 옥틸아민-도입 HA 및 헥사데실아민-도입 HA가 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과.
- [0304] 실시예 15에서 제조한 옥틸아민-도입 HA 및 헥사데실아민-도입 HA가 수술에 의해 제거한 토끼 각막 상피의 이동에 주는 효과 (수술 표본).
- [0305] (17-1) 방법
- [0306] 1) 각막 상피의 수술에 의한 제거 (수술 표본)
- [0307] 중앙부의 각막 상피는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg의 정맥 주사 및 0.4 % 옥시부프로케인 히드로클로로아이드 국소 투여로 마취한 후 트레핀 (8 mm I.D), 23G 바늘 및 미세 가위를 사용하여 제거하였다.
- [0308] 2) 국소 투여
- [0309] 각막 상피를 박리하고 1시간 및 4시간 후, 대조군 물질로 염수 150 μ l를 좌안에 투여하고, 대상 물질로 상기 실시예 (15-2)에서 제조한 0.1 중량 % 옥틸아민 도입 HA 및 헥사데실아민 도입 HA 용액 150 μ l를 우안에 투여하였다. 박리하고 1일 및 2일 후, 3시간 간격으로 총 4회, 및 박리하고 3일 후에, 3시간 간격으로 상기와 동일한 투여를 수행하였다. 투여에 있어서, 1 ml 주입 주사기를 사용하였다. 상기 1)에서 기재한 각막 상피총 질환에 대해 여섯 토끼 표본을 투여 대상물로 사용하였다.
- [0310] 3) 각막 상피 결함 부위의 촬영
- [0311] 토끼는 케타민 5 mg/kg 및 자일라진 2 mg/kg을 정맥 주사하여 일반 마취하고, 후속적으로 각막 상피 결손부를, PBS에 용해한 0.2 % 나트륨 플루오레세인으로 염색하고, 자외선 하에서 촬영하였다. 촬영은 각막을 박리하고 1시간 후에 대상 물질을 투여하기 직전에 행하고, 박리하고 1 내지 3일 후 두 번째 투여를 하고 3시간 후에 행하였다. 촬영을 할 때, 초점 길이를 일정하게 하여 사진의 배율을 일정하게 만든다.
- [0312] 4) 각막 상피 결함 부위의 계량
- [0313] 나트륨 플루오레세인으로 염색한 각막 상피 결함 부위의 영역은 화상분석기를 사용하여 인쇄된 사진상에서 계량하였다. 박리를 하고 3일 후에 최종 투여를 하고 3시간 후의 박리 부분 영역을 각막 상피를 박리하고 1시간 후에 대상 물질의 투여를 수행하기 바로 직전의 박리부의 영역 (박리 영역)에서 빼서 얻은 값을 "치료 영역"이라고 한다.
- [0314] (17-2) 연구 결과
- [0315] 각 개체의 치료 영역의 결과는 도 19에서 보이고, 각 개체의 치료 속도의 결과는 도 20에서 보였다. 도 19에 있어서, C8-L(a: 대조군), C8-R(b), C16-L(c: 대조군), C16-R(d) 각각은 C8-R에 대한 대조군으로 염수를 투여한 좌안, 0.1 % 옥틸아민-도입 HA 용액을 투여한 우안, C16-R에 대한 대조군으로 염수를 투여한 좌안, 0.1 % 헥사데실아민-도입 HA 용액을 투여한 우안을 나타낸다. 도 20에 있어서, C8은 옥틸아민을 사용한 상기 연구의 결과를 나타내고, C16은 헥사데실아민을 사용한 상기 연구의 결과를 나타낸다. 치료 영역 및 치료 속도는 다음과 같이 계산하였다.
- [0316] 치료 영역 = 박리 후 영역 - 각 시점에서의 영역 (1 내지 3일 후)
- [0317] 치료 속도 = 각 시점에서의 치료 영역의 평균 (1 내지 3일 후)
- [0318] 도 19 및 20에 있어서, 대조군 눈들 중 각막 상피의 치료 영역과 비교할 때, 1 내지 3일의 모든 시점에서 0.1 % 옥틸아민-도입 HA 및 헥사데실아민-도입 HA 용액을 투여한 눈에서 각막 상피의 치료 영역이 중대하게 증가하였음이 관찰되었다. 또한, 0.1 % 옥틸아민-도입 HA 또는 헥사데실아민-도입 HA 용액을 투여한 눈에서 치료 속도가 중대하게 증진되었음이 관찰되었다.

도면

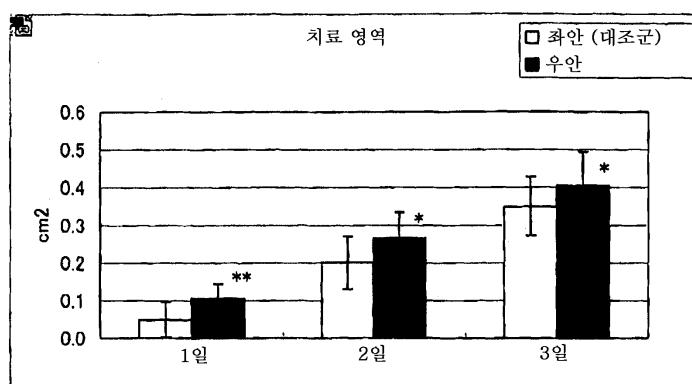
도면1



도면2

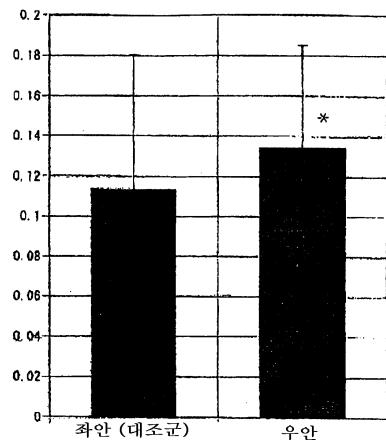


도면3

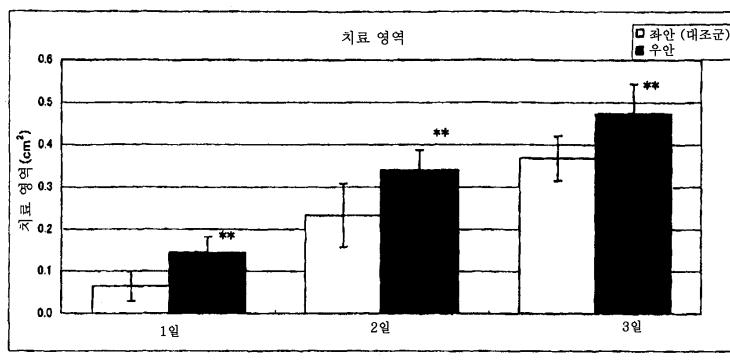


치료영역 (n=14, 평균 \pm SD, * : P < 0.05, ** : P < 0.01)

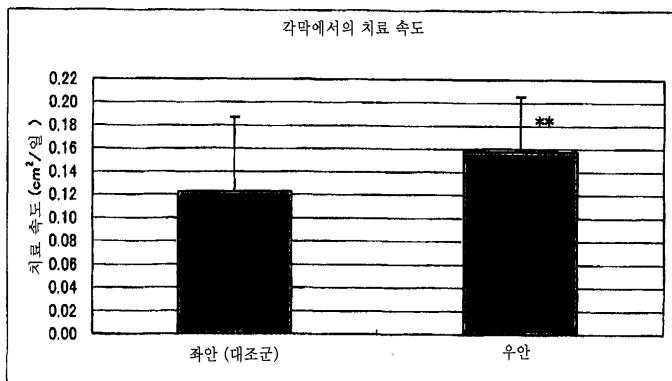
도면4

치료 속도 ($\text{cm}^2/\text{일}$, $n=42$ ($n=14 \times 3$ 회), 평균 \pm SD, *: $P<0.05$)

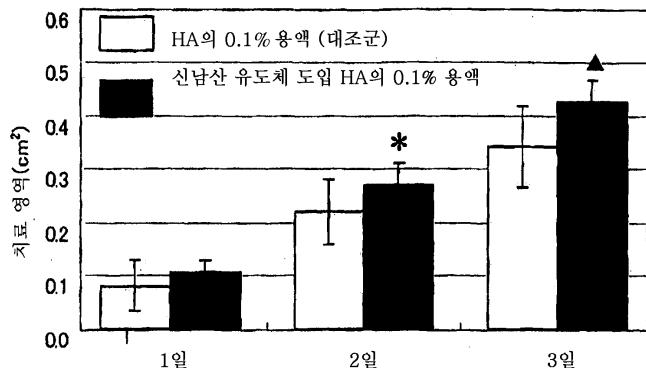
도면5

치료 영역 ($n=14$, 평균 \pm SD, **: $P<0.01$)

도면6

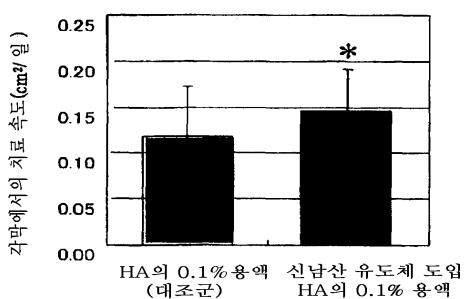
치료 속도 ($n=42$ ($n=14 \times 3$ 회), 평균 \pm SD, **: $P<0.01$)

도면7



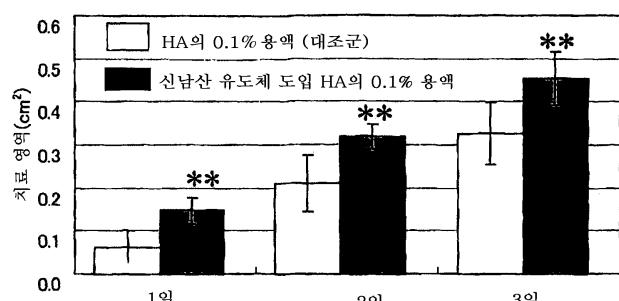
치료영역 (N=8, * : P<0.05, ▲ : P<0.0556)

도면8



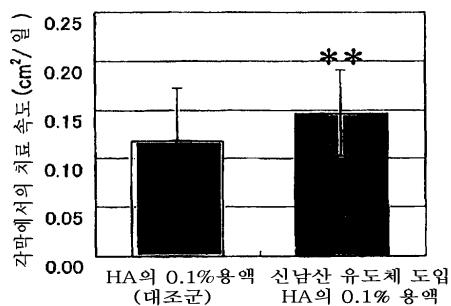
치료 속도 (n=24 (n=8×3 회), 평균 ± SD, * : P<0.05)

도면9



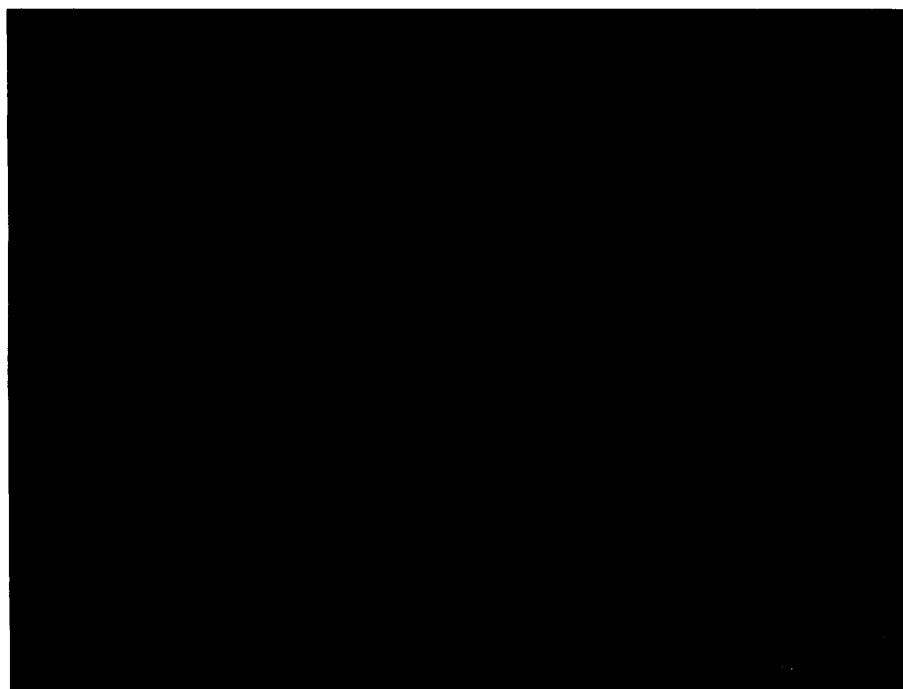
치료영역 (N=8, * : P<0.01)

도면10



치료 속도 ($n=24$ ($n=8 \times 3$ 회), 평균 \pm SD, ** : $P < 0.01$)

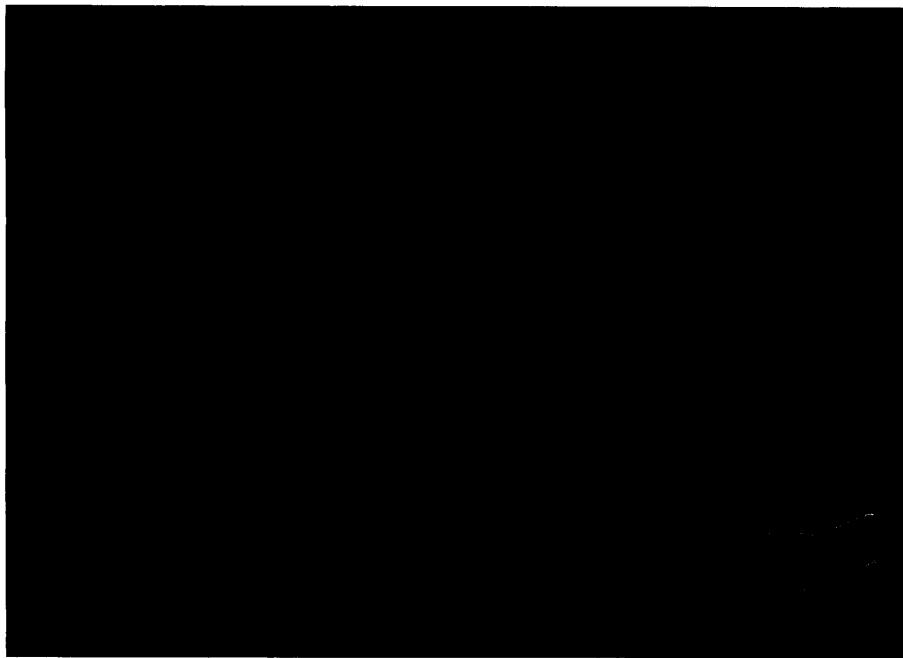
도면11a



a. 형광 표지된 HA의 0.3% 용액
투여하고 30분 후

FA 영상: 여기 파장; 495nm, 흡수 파장; 460nm

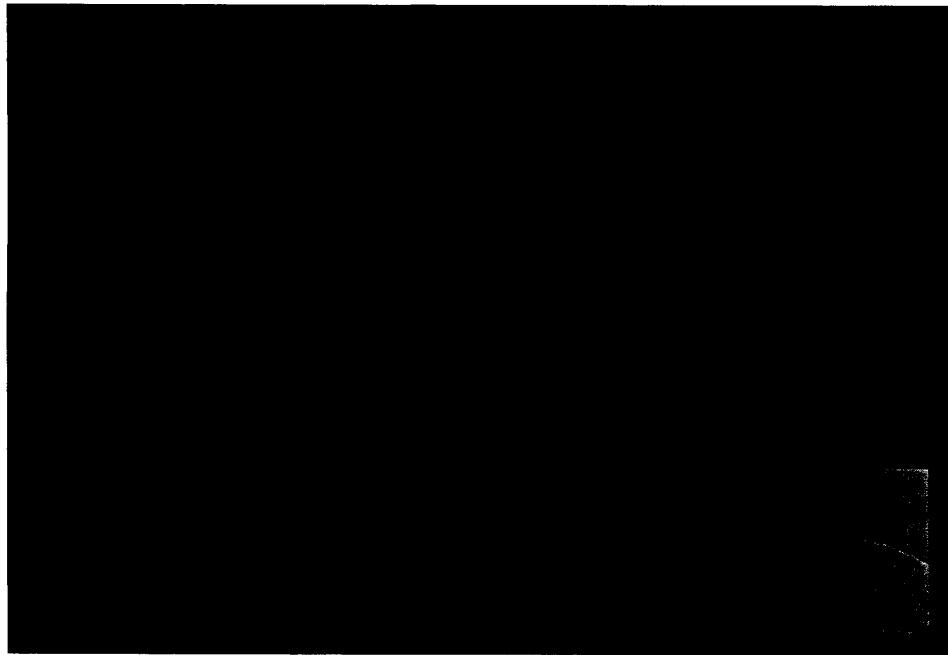
도면11b



b. 형광 표지된 신남산 유도체 도입 HA의 0.3% 용액
투여하고 30분 후

FA 영상: 여기 과장; 495nm, 흡수 과장; 460nm

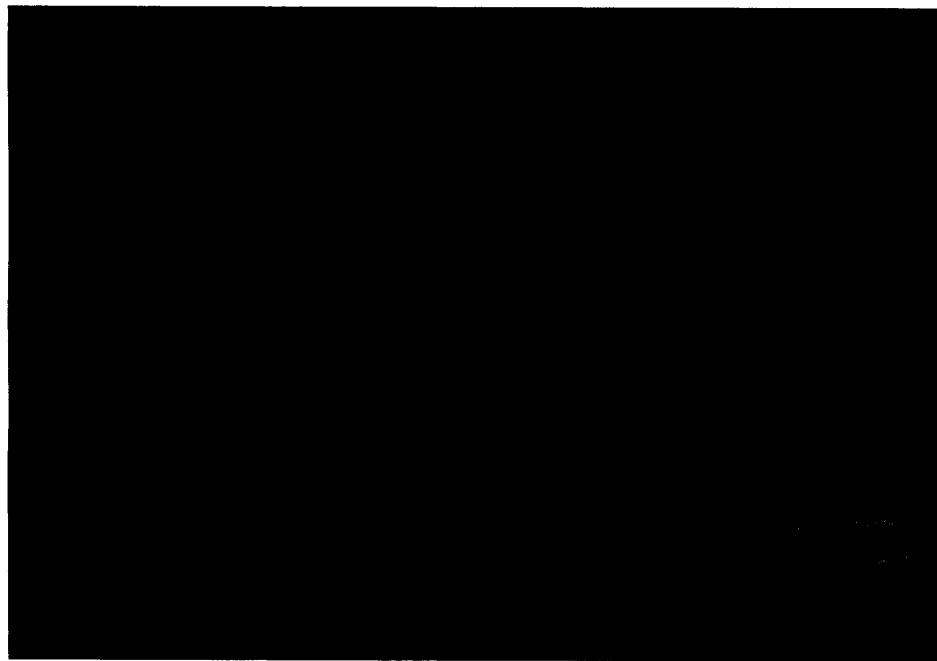
도면11c



c. 형광 표지된 HA의 0.3% 용액
투여하고 1시간 후

FA 영상: 여기 확장; 495nm, 흡수 확장; 460nm

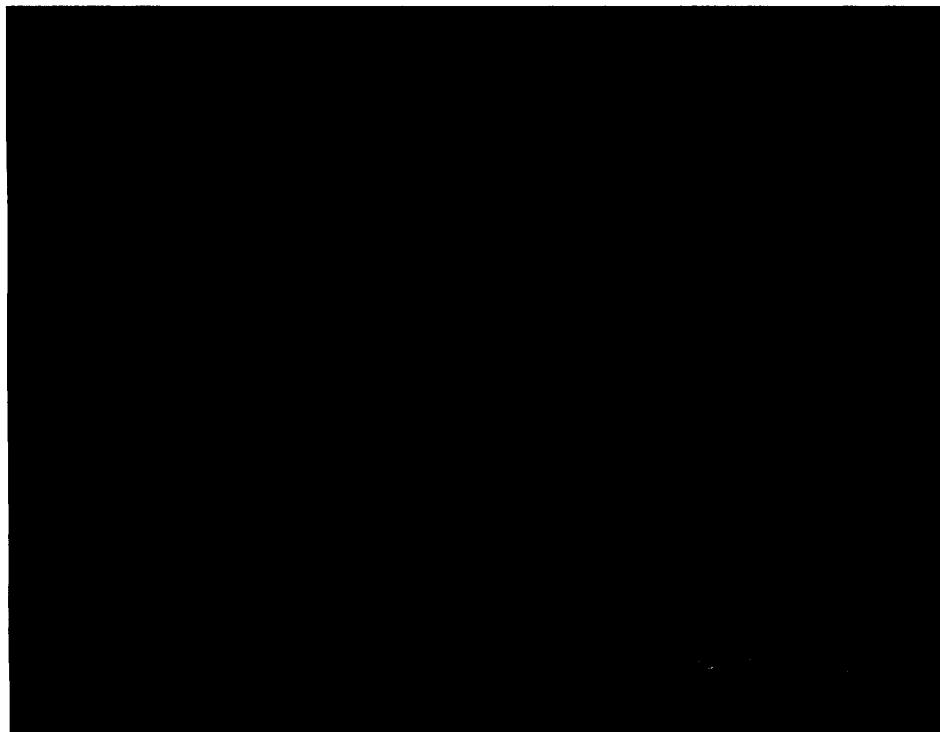
도면11d



d. 형광 표지된 신남산 유도체 도입 HA의 0.3% 용액
투여하고 1시간 후

FA 영상: 여기 과장; 495nm, 흡수 과장; 460nm

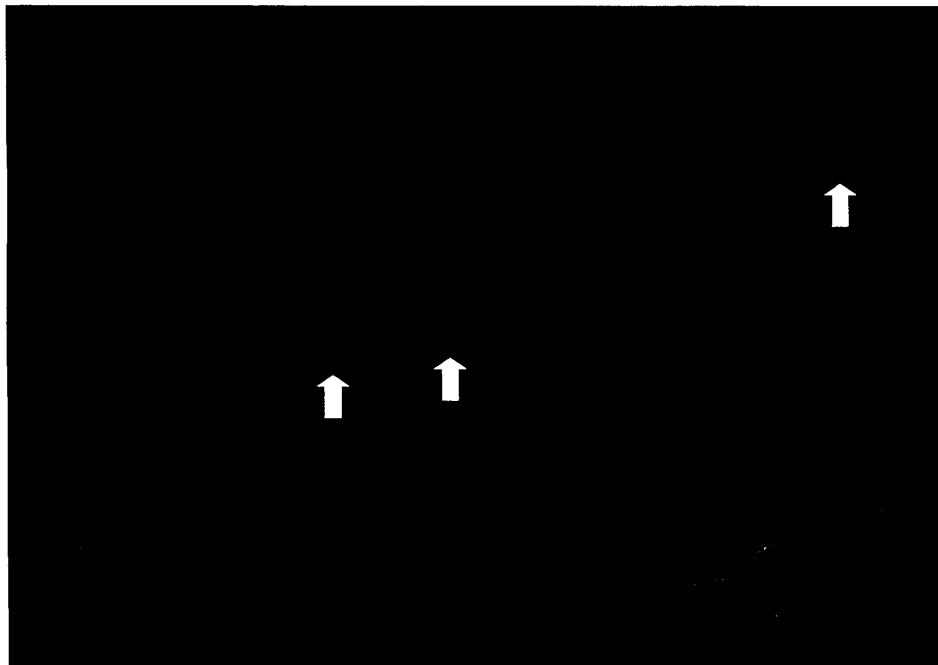
도면12a



a. 형광 표지된 HA의 0.3% 용액
투여하고 1.5시간 후

FA 영상: 여기 파장; 495nm, 흡수 파장; 460nm

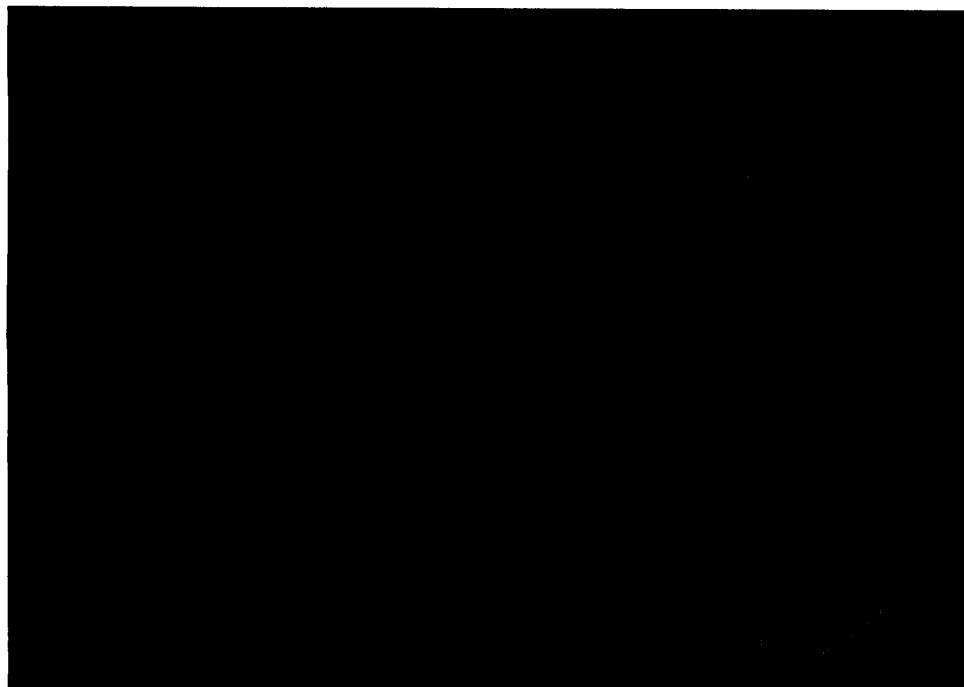
도면12b



b. 형광 표지된 신남산 유도체 도입 HA의 0.3% 수용액
투여하고 1.5시간 후

FA 영상: 여기 과장; 495nm, 흡수 과장; 460nm

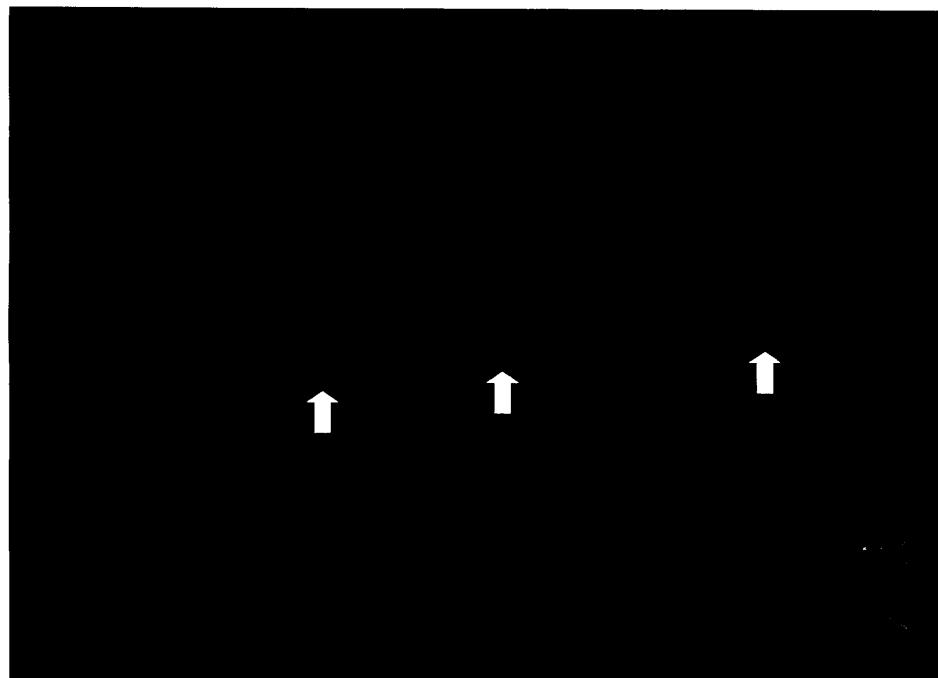
도면12c



c. 형광 표지된 HA의 0.3% 용액
투여하고 2.5시간 후

FA 영상: 여기 과장; 495nm, 흡수 과장; 460nm

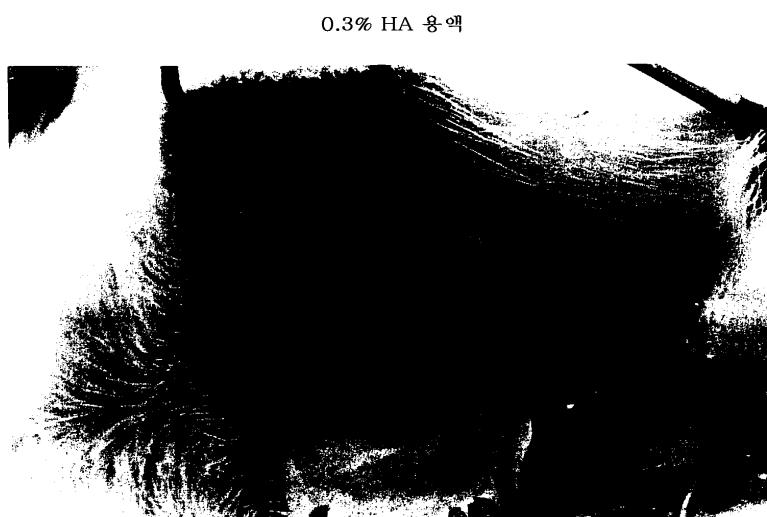
도면12d



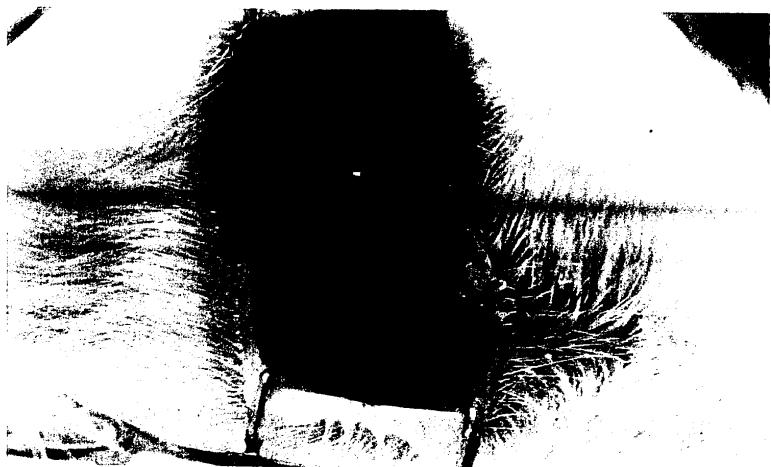
d. 형광 표지된 신남산 유도체 도입 HA의 0.3% 수용액
투여하고 2.5시간 후

FA 영상: 여기 파장; 495nm, 흡수 파장; 460nm

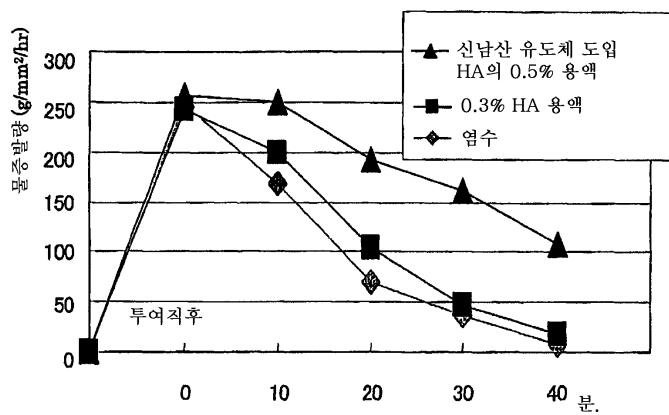
도면13



신남산 유도체 도입 HA의 0.3% 용액

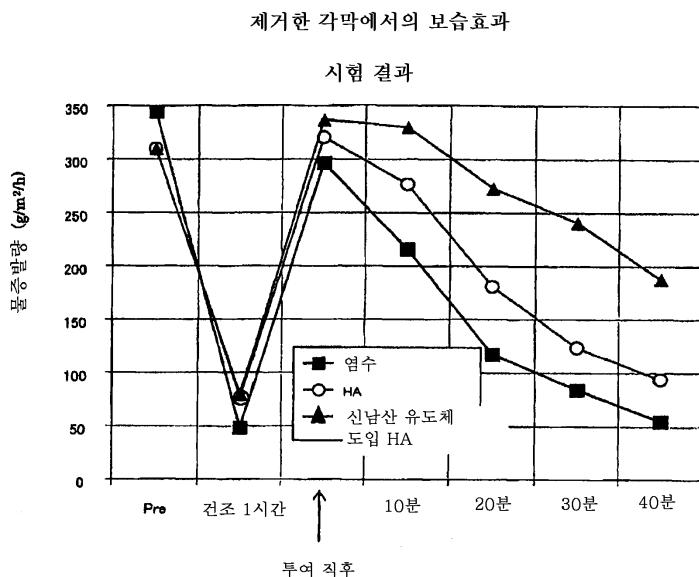


도면14

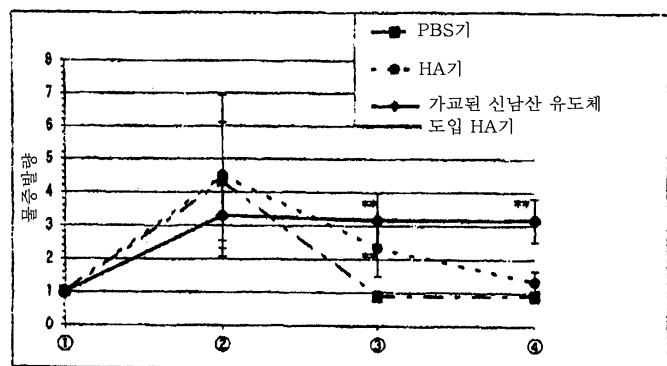


제거한 각막에서의 보습효과 n=2

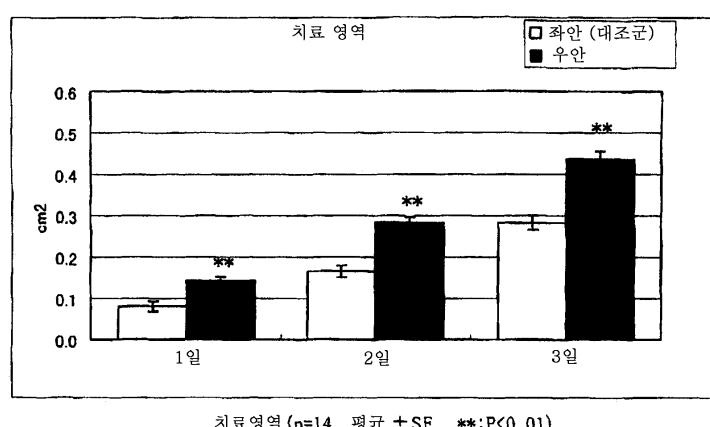
도면15



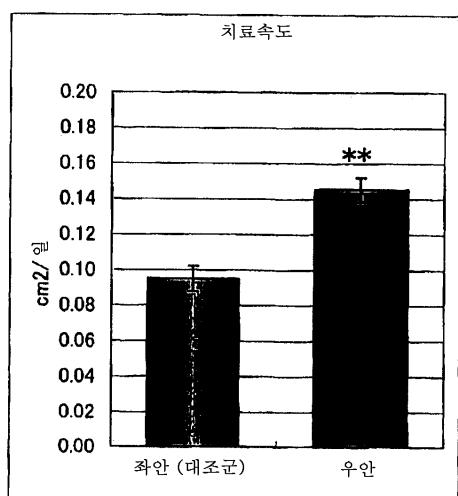
도면16



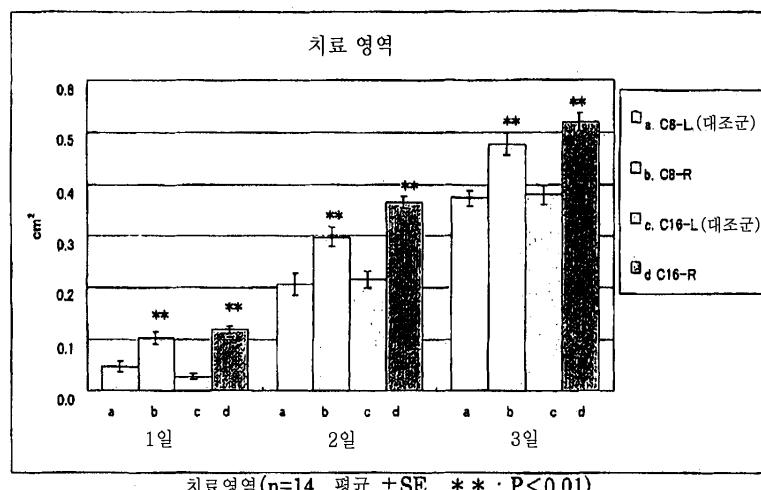
도면17



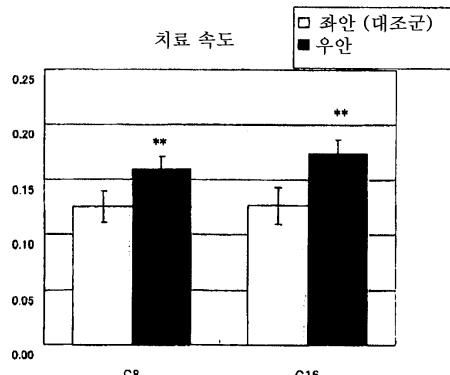
도면18

치료 속도 ($n=42$ ($n=14 \times 3$ 회)), 평균 \pm SE, ** : $P < 0.01$

도면19

치료 영역 ($n=14$, 평균 \pm SE, ** : $P < 0.01$)

도면20

치료 속도 ($\text{cm}^2/\text{일}$, $n=24$ ($n=8 \times 3$ 회)), 평균 \pm SE, ** : $P < 0.01$