



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년11월23일

(11) 등록번호 10-1570966

(24) 등록일자 2015년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 36/48* (2006.01) *A61K 31/728* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7006416

(22) 출원일자(국제) 2008년10월02일

심사청구일자 2013년09월03일

(85) 번역문제출일자 2010년03월24일

(65) 공개번호 10-2010-0091151

(43) 공개일자 2010년08월18일

(86) 국제출원번호 PCT/IT2008/000626

(87) 국제공개번호 WO 2009/044423

국제공개일자 2009년04월09일

(30) 우선권주장

RM2007A000510 2007년10월02일 이탈리아(IT)

(56) 선행기술조사문헌

WO2006085351 A1

KR100430260 B1

(73) 특허권자

알엠에프에이 트레이딩 에스.에이.

스위스, 루가노 6915, 비아 피안 스카이롤로 11

(72) 발명자

엘 프레데, 안토니오

이탈리아, 나폴리 아이-80121, 비아 치아이아 123

산소, 마르코

이탈리아, (엠아이) 밀라노 아이-20132, 비아 몬

팔콘 4

(74) 대리인

강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 타마린드 씨 다당류와 히알루론산에 기초된 안과 조성물

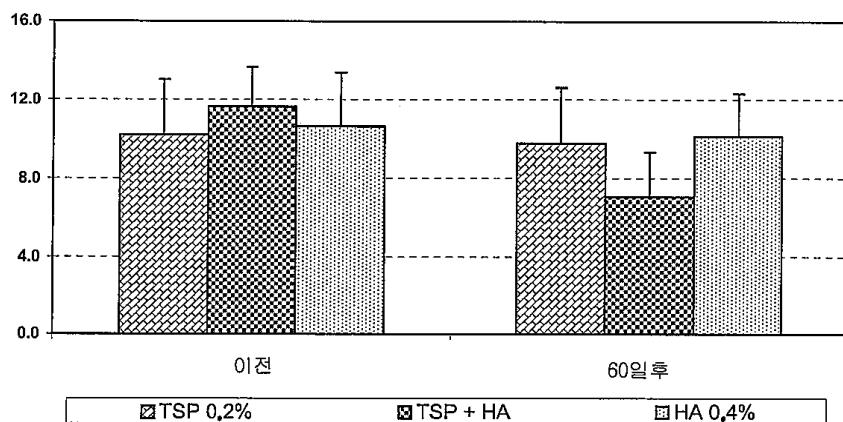
### (57) 요 약

본 발명은 히알루론산과 TSP(타마린드 씨 다당류, *Tamarindus indica* Seed Polysaccharide)로 알려져 있는 다당류의 조합을 포함하고 눈물 대체물로서 이용에 처방되는 안과 용액에 관계하는데, 이들 성분은 조합으로 함께 투여될 때, 안구 건조증에 의해 피해를 입는 결막 점막(conjunctival mucosa)의 정상 상태로의 복귀를 촉진하고, 따라서 결막 미소용모(conjunctival microvilli)의 숫자와 형태에서 현저한 향상을 유도하는데 상승적으로 작용 할 수 있다.

안구 건조증의 치료에서 이용에 제안되는 이들 안과 조제물은 수용액 내에 조합으로, 중량으로 0.05 내지 2%의 타마린드 씨 다당류(TSP)와 중량으로 0.05 내지 1%의 히알루론산을 포함한다.

**대 표 도** - 도11

전체 스코어 - 절대값



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

눈물 대체물(tear substitute)로서 이용을 위한 안과 조제물(ophthalmic preparation)에 있어서, 수용액 내에 조합으로, 중량으로 0.05 내지 2%의 타마린드 씨 다당류(tamarind seed polysaccharide)와 중량으로 0.05 내지 1%의 히알루론산(hyaluronic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 중량으로 0.1 내지 1%의 타마린드 씨 다당류와 중량으로 0.1 내지 0.5%의 히알루론산을 포함하는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 타마린드 씨 다당류는 450,000 Da 내지 750,000 Da 범위에서 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 히알루론산은 600,000 Da 내지 1,000,000 Da 범위에서 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 수용액 내에 중량으로 0.2%의 타마린드 씨 다당류와 중량으로 0.4%의 히알루론산을 포함하는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 등장 조절제(tonicity regulator agent)를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, pH 조절제(corrector)로서 하나 이상의 안과적으로 허용되는 산 또는 염기를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 완충제(buffer)를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 보존제(preservative agent)를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 키레이트제(chelating agent)를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 안과 조제물.

#### 청구항 11

눈물 대체물로서 이용을 위한, 수용액 내에 타마린드 씨 다당류와 히알루론산의 조합을 활성 성분으로 포함하는 제약학적 조성물.

**청구항 12**

안구 건조증의 치료를 위한, 수용액 내에 타마린드 씨 다당류와 히알루론산의 조합을 활성 성분으로 포함하는 제약학적 조성물.

**청구항 13**

제11항 또는 제12항에 있어서, 조성물은 중량으로 0.05 내지 2%의 타마린드 씨 다당류와 중량으로 0.05 내지 1%의 히알루론산을 포함하는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

**청구항 14**

제11항 또는 제12항에 있어서, 조성물은 중량으로 0.1 내지 1%의 타마린드 씨 다당류와 중량으로 0.1 내지 0.5%의 히알루론산을 포함하는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

**청구항 15**

제11항 또는 제12항에 있어서, 타마린드 씨 다당류는 450,000 Da 내지 750,000 Da 범위에서 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

**청구항 16**

제11항 또는 제12항에 있어서, 히알루론산은 600,000 Da 내지 1,000,000 Da 범위에서 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 본 발명은 타마린드 씨 다당류와 히알루론산에 기초된 안과 조성물에 관계한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 히알루론산과 TSP(타마린드 씨 다당류, *Tamarindus indica* Seed Polysaccharide)로 알려져 있는 다당류의 조합을 포함하고 눈물 대체물로서 이용되는 안과 용액에 관계하는데, 이들 성분은 조합으로 함께 투여될 때, 안구 건조증에 의해 피해를 입은 결막 점막(conjunctival mucosa)의 정상 상태로의 복귀를 촉진하고, 따라서 결막 미소융(conjunctival microvilli)의 숫자와 형태에서 현저한 향상을 유도하는데 상승적으로 작용할 수 있다.

**배경기술**

[0002] 알려진 바와 같이, 눈 표면(eye surface)은 각막앞 눈물막(pre-corneal tear film)의 존재에 의해 항상 습윤하게 유지되는데, 상기 각막앞 눈물막은 결막과 안구(eyeball)의 노출된 표면을 덮는 조직화된 액상 구조(organised liquid structure)이다. 적절한 정화(cleansing)와 보호(protection)를 획득하기 위하여 상기 구조가 정량적으로, 그리고 정성적으로 적합한 것이 본질적으로 중요하다. 이에 더하여, 눈물막은 많은 항원의 공격으로부터 눈을 보호하는 라이소자임(lysozyme)과 항체(antibody)와 같은, 높은 살균력(bactericide power)을 갖는 물질을 내포한다.

[0003] 정상적인 조건에서, 결막 낭(conjunctival sac) 내에서 상이한 선(gland)에 의해 분비되는 일련의 용액의 결과물인 눈물은 눈꺼풀 움직임(eyelid movement)에 의해 각막과 결막 표면 위에서 층으로 정렬되고, 따라서 아래의 성분을 포함하는 복합적인 3층 구조를 구성한다:

[0004] - 결막 상피 내에 존재하는 분화 세포(specialised cell)(즉, 결막상피 배상세포(conjunctival goblet cell))에 의해 생산되는 당단백질(glycoprotein)의 혼합물(점액소(mucin))로 구성되는 점액(mucus)의 내부 층 - 상기 층은 각막에 흡착되고, 따라서 친수성 표면에서 각막 상피를 변화시킨다: 점액소가 부족하면, 이들 상피 세포는 소수성이고 눈물에 의해 수화될 수 없다;

[0005] - 본질적으로, 물, 전해질, 단백질, 효소와 점액소로 구성되는 두터운 중간 수성 층(aqueous layer)(주부 눈물샘(main lachrymal gland)과 보조 눈물샘(accessory lachrymal gland)에 의해 분비됨); 상기 층은 친수성 표면 위에 전개되고, 각막 상피에 대기중 산소(atmospheric oxygen)를 제공하고, 항균 활성(antibacterial activity)을 발휘하고, 임의의 잔해를 씻어내는 기능을 한다;

[0006] - 아래의 기능을 하는 얇은 외부 지질 층(lipid layer)(피지모양 눈꺼풀 분비샘(sebaceous tarsal palpebral

gland) 또는 눈꺼풀관샘(Meibomian gland)에 의해 분비됨): 기초가 되는 수층(water layer)의 증발을 자연시키고, 표면 장력(surface tension)을 증가시켜 상기 피막을 안정화시키고 피부에서 이의 탈피를 예방하고, 눈꺼풀을 윤활한다.

[0007] 눈꺼풀 움직임은 결막 세포 외부로 점액을 짜내고 이를 원개(fornix) 내로 도입하고, 이로부터 점액은 눈의 깜빡임(blinking movement)에 의해 각막 표면에 균일하게 분포된다.

[0008] 앞서 기술된 3층 구조는 눈 표면을 보호하고, 각막 표면의 수화(hydration), 윤활(lubrication)과 청결(clearness)을 유지하고, 정확한 시력을 산출하는데 협력하는 중요한 기능을 수행하는 복잡한 생리 시스템(physiological system)을 구성한다. 이러한 생리 시스템의 완벽한 균형(equilibrium)과 연속적인 회복(continuous renovation)은 상기 시스템이 이들 기능을 수행할 수 있기 위한 필요조건이다. 균형과 회복이 실현되도록 하기 위하여, 삼투몰농도(osmolarity)가 대략 300 mOsm/l의 생리 수준(physiological level)에 유지되도록 누액(tear fluid)으로부터 일정하지만 과도하지 않은 물 증발이 발생해야 하고, 눈물막이 깜빡임의 결과로써 각막 표면에 연속적으로 재분포되어야 한다.

[0009] 상이한 이들 성분의 층상 구조뿐만 아니라 그 속에 존재하는 용질(solute) 역시 중요하다. 상기 외부 층의 지질은 이중 상(double phase)으로 정렬된다: 중간 층에 인접하는 극성 상(polar phase), 그리고 공기와의 접촉면에서 더욱 두터운 상. 상기 수성 상은 그 대신에, 고정 이온 농도(fixed ionic concentration)를 나타낸다: 주로 나트륨(sodium), 칼륨(potassium), 칼슘(calciu), 마그네슘(magnesium), 아연(zinc), 염소(chlorine)와 중탄산염(bicarbonate)이 눈물 삼투몰농도를 유지하는데 중요하다.

[0010] 내부 점액소 층의 일체성(integrity)은 눈물막 안정성의 유지를 위한 필수 요소 중에서 하나이다. 점액소가 각막 표면의 젖음성(wettability)을 강화시키기 때문에, 이는 노출된 표면에 수성 피막(aqueous film)이 연속적이고 균일한 방식으로 부착할 수 있도록 하여 이의 안정성을 보장하고, 눈물액(lachrymal fluid)의 점성(viscosity)을 증가시켜 결막 낭으로부터 눈물액이 너무 빠르게 흘러나가는 것을 예방한다. 이미 확인된 바와 같이, 점액소가 부재하거나 불충분하면, 각막은 비습윤해지고, 존재하는 전해질과 당단백질 간에 불균형의 결과로써, 눈물막은 불안정해지고 파괴되며 건조 지구(dry area)가 형성된다.

[0011] 눈의 다양한 질환 또는 비정상적 상태는 예로써, 불충분한 깜빡임 빈도, 콘택트렌즈(contact lenses)의 장기간 이용, 일부 전신 약물(systemic drug)의 투여, 또는 더욱 빈번하게는, 노인성 눈물분비저하(senile hyposecretion)의 결과로써, 눈물막 단절(discontinuity)로 현시된다. 더욱 빈번하게는, 앞서 기술된 효과적인 윤활과 보호 시스템의 악화(deterioration)는 "안구 건조증(dry eye syndrome)"으로 나타나는데, 이의 비율은 특히, 대기 오염(atmospheric pollution)과 이에 따른, 새로운 종류의 알레르기의 발생으로 인하여 급격하게 증가하고 있다. 실제로, 안구 건조증은 전체 인구의 10 내지 15%의 비율로, 안과학(ophthalmology)에서 가장 빈번한 병리이다. 이와 관련하여, "건성안"은 눈물막의 감소 또는 불안정에 기인한 안과 장애 - 주관적인 관점에서, 작열감(burning sensation), 이물감(foreign body sensation), 광선협기(photophobia)와 흐린 시력(blurred vision), 눈이 무거운 느낌(heavy ocular feeling), 바람, 연기와 먼지에 기인한 눈 자극(easy irritation), 그리고 시각 장애(visual disturbance)를 비롯한 일련의 불쾌한 증상으로 특징된다 - 를 지칭하는데 통상적으로 이용되지만, 이와 관련하여 발생하는 각막 표면의 전형적인 변화는 일반적으로, "건성각결막염(keratoconjunctivitis sicca)"으로 지칭된다.

[0012] 이런 상황에서, 결막 세포의 변성(degeneration)이 발생하고, 증가된 박리(desquamation), 세포 표면 미세주름(microplicae)의 상실, 상피 세포 막의 파괴와 점액소-생산 배상 세포(goblet cell)의 숫자 감소를 유발한다. 각막과 결막 상피 세포는 완전한 소멸 때까지, 미소융모의 숫자가 감소하는 것으로 보인다. 미소융모의 숫자 감소는 영향 심각도(affection severity)와 증상 심각도에 우수한 근사값으로 비례한다. 이러한 해부-병리학적(anatomo-pathological) 상황은 다양한 정도로, 결막 세포의 수준에서 염증 세포의 침윤(infiltration)을 동반한다(Cennamo G.L., Del Prete A., Forte R., Cafiero G-, Del Prete S., Marasco D., Impression cytology with scanning electron microscopy: a new method in the study of conjunctival microvilli, Eye (2007), 1-6).

[0013] 그 외에, 눈물막의 보호 효과가 부재하는 안구 건조증은 다른 병리학적 장애, 예를 들면, 화학선(actinic), 세균(bacterial), 바이러스(viral)와 알레르기(allergic) 각결막염(keratoconjunctivitis)에 걸리기 쉬워진다.

[0014] 안구 병리에 관한 연구에서 건성안에서 발생하는 모든 변화가 확인됨에 따라서, 건성각결막염의 동물 모형에 관한 전임상 연구는 이들 변화의 자연적인 원인을 이해하는데 도움을 주었다(Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray

K.L.: A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**(2):225-228, (1987); Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray K.L., Hanninen L.A.: Natural history of disease in a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca, *Acta Ophthalmol. (Suppl.)* **192**:95-101, (1989). 현재, 건성안은 4가지 상이한 단계를 거쳐 발생하는 것으로 알려져 있다:

[0015] 1. 눈물막 자체의 삼투물농도의 증가로 눈물막으로부터 물의 상실;

[0016] 2. 배상 세포의 밀도 감소와 각막 글리코겐(가능한 각막 병소의 치유를 위한 에너지원)의 감소;

[0017] 3. 각막 박리의 증가(눈물막과 눈 표면 사이에 삼투성 경사(osmotic gradient)의 증가, 그리고 결막의 상피 세포로부터 물을 귀환시키는 배상 세포의 감소에 기인);

[0018] 4. 각막-눈물막 접촉면의 불안정화.

[0019] 진단 관점에서, 안구 건조증은 전형적인 증상의 평가뿐만 아니라 가장 공통적으로, 눈물 분비(lachrymal secretion)의 평가(Schirmer 검사), 눈물막이 완전한 깨짐 이후에 파괴되는데 필요한 시간(눈물막 파괴 시간(break-up time), BUT)의 평가, 그리고 로즈 벤갈(rose bengal) 또는 플루오레세인(fluorescein)으로 착색 이후에 각막 표면의 색깔 평가를 비롯한 널리 확립된 절차에 의해 검출되고 모니터링될 수 있다.

[0020] 불규칙하게 구조화된 눈물막의 정후인 것으로 명백하게 간주되는 다른 현상은 점액 양치상화(mucus ferning)의 감소이다. 정상적인 상태에서, 점액은 실온에서 수성 용액으로부터 증발하도록 조작될 때 편 패턴(fern pattern)으로 결정화에 의해 특성화된다. 전해질과 점액의 고분자량 당단백질의 상호작용에 기인하는 것으로 생 각되는 이러한 양치상화 현상은 짧은 시간 이후에, 결막의 하부 원개(lower fornix)로부터 눈물 점액(tear mucus)의 집합(collection)으로부터 증명된다. 양치상화 검사에 의해 증명되는, 상기 현상의 다양하고 상이한 패턴(즉, 타입 I, 균일한 양치상화; 타입 II, 감소된 크기의 편(fern)과 빈 공간이 존재하는 상당한 양의 양치상화; 타입 III, 단지 부분적으로만 존재하는 양치상화; 타입 IV, 양치상화 부재)이 누액의 정상적인 상태 또는 병리학적 상태와 연관되는 것으로 확증되었다. 가령, 밀집 양치상화는 점액소와 전해질 간에 완벽한 균형의 표 현인 것으로 간주되는 반면, 건성각결막염의 영향을 받은 눈에서 검출되는 눈물 양치상화의 부분적인 존재 또는 부재는 눈물 점액의 정량적인 부족, 또는 당단백질 또는 그들의 환경(즉, pH, 수화, 전해질 균형(electrolytic equilibrium))의 정성적인 변화를 표시한다.

[0021] 건성각결막염은 통상적으로, 자연적인 눈물 생산을 대체하거나 보충하기 위하여 액적(drop)으로 주입되는 "인공 눈물(artificial tear)"로 알려져 있는 액상 안과 조제물(liquid ophthalmic preparation)로 치료된다. 가장 간단한 사례에서, 상기 조제물은 염화나트륨(sodium chloride) 단독 또는 다양한 전해질의 균형 혼합물(balanced mixture)에 기초된, 중성이고 눈물막(lachrymal film)과 등장성(isotonic)인 생리 식염 용액으로 구성되기 때문에, 습윤 효과(moistening effect)만을 나타낸다.

[0022] 이런 식염 용액에서 전형적인, 결막 낭 내에서 감소된 체류(retention)의 단점을 극복하기 위하여, 고분자량 약제, 예를 들면, 통상적으로 합성, 반합성 또는 자연 기원의 물-가용성 중합체의 첨가에 의해 점성으로 만들어지는 인공 눈물 조제물이 도입되었다. 하지만, 인공 눈물로서 이용을 위한 조성물에 유익한 특징을 공여하기 위한 점성 강화제(viscosity enhancer)의 경우에, 이들 점성 강화제가 산물의 점성을 전체적으로 증가시키기에는 불충분할 뿐만 아니라, 이렇게 형성된 분산액이 점액소 분산액의 특성에 가능한 유사한 특성을 갖는 것이 필요한 것으로 밝혀졌다. 다시 말하면, 상기 분산액은 가능한 점액유사(mucomimetic) 물질처럼 행동해야 한다. 이는 무엇보다도, 특정한 유동 거동(rheological behavior), 다시 말하면, 자연적인 눈물의 유동 거동과 유사한 비-뉴턴(non-newtonian)(구체적으로, 의가소성(pseudoplastic)) 유동 거동을 요구한다. 실질적으로, 인공 눈물에 대한 증점제(viscosifier)로서 이용될 수 있는 극소수의 거대분자 산물(macromolecular product)만 실제로 유사한 거동(behaviour)을 보일 수 있다.

[0023] 비-뉴턴 유동 거동(non-newtonian rheologic behaviour)을 갖는 인공 눈물로서 이용을 위한 조성물의 실례는 카르복시비닐 중합체(carboxyvinyl polymer), 예를 들면, Carbopol®, 세룰로오스 에스테르(cellulose ester), 예를 들면, 메틸세룰로오스(methylcellulose)와 이들의 알코올성 유도체(alcoholic derivative)(가령, 히드록시프로필세룰로오스(hydroxypropylcellulose)와 히드록시프로필메틸세룰로오스(hydroxypropylmethylcellulose)), 그리고 히알루론산을 포함하는 것들이다. 후자는 인간과 동물 둘 모두에서 많은 조직과 체액 내에 존재하고, 수성 용액의 현저한 의가소성 거동(pseudoplastic behaviour), 그리고 물과 상피 세포 벽 둘 모두에 연결되는 우수한 능력으로 인하여, 안과 조제물에 광범위하게 이용되는 자연 기원의 당류이다.

[0024] 앞서 언급된 기준에 포함되는 것으로 간주되는 자연 다당류 중합체는 15 m의 높이까지 자랄 수 있고, 콩과 과실(legume fruit)을 생산하고, 인도(India), 아프리카(Africa)와 극동(Far East) 전역에 넓게 분포하고 이들 지역에서, 일차적으로 식량 생산을 위하여 재배되는 상록수(evergreen plant)인 타마린드 나무(tamarind tree)(*Tamarindus indica*)의 씨로부터 획득된 다당류이다. 상기 과실은 높은 비율의 다당류를 포함하는 커다란 씨를 보유하는데, 이들은 생명 유지에 필요한 활동 물질(energetic substance)을 축적하고 보존하는 기능을 갖는다.

[0025] 초기에는 부산물(by-product)로서 간주되었던 이러한 씨는 분말 형태("타마린드 겉(tamarind gum)" 또는 "타마린드 인 분말(tamarind kernel powder)"로 알려져 있음)로 분쇄되면, 다양하게 적용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이런 적용 중에서 가장 중요한 적용은 섬유산업(textile industry)과 제지산업(paper industry)이고, 여기서 타마린드 겉은 각각, 사이즈제(sizing agent)로서 이용되고, 또한 식품산업(food industry)인데, 여기서 타마린드 겉은 알긴산염(alginate), 페틴(pectine), 구아 겉(guar gum) 또는 로커스트 콩 겉(locust bean gum)과 같은 다른 다당류 산물처럼 임의의 종류의 산물에서 농후제(thickening agent), 젤화제(gelling agent), 안정화제(stabilising agent)와 혼합제(binding agent)로서 이용된다. 상업적으로 구입가능한 가공되지 않은 타마린드 인 분말은 미량의 정제되지 않은 섬유(fibre), 탄닌(tannin)과 기타 불순물 이외에, 중량으로 65 내지 73%의 다당류, 15 내지 23%의 단백질 물질, 3 내지 8%의 지방과 오일, 그리고 2 내지 4%의 회분(ash)을 포함한다.

[0026] 제약 분야에서, 타마린드 겉의 다당류 분획물(타마린드 씨 다당류, 이후 TSP로 지칭됨)은 특히, European Patent EP 0892636(Farmigaea)과 상응하는 US patent N. 6,056,950에서 기술된 바와 같이, 눈물 대체물의 활성 성분으로서, 그리고 국소 안과 서방성 약물에 대한 담체(carrier)로서 유효하게 이용될 수 있는 것으로 밝혀졌는데, 이들 문현의 내용은 본 발명에 참조로서 편입된다. 타마린드 겉의 다당류 분획물이 갖는 것으로 생각되는 점액유사 특성 중에서, 이는 앞서 기술된 "양치상화" 능력인 것으로 입증된다. 이런 이유로, 히알루론산과 유사하게, 상기 다당류 분획물은 증발에 의해, 결정화된 눈물 점액의 형태(morphology)와 매우 유사한 형태를 갖는 결정성 산물을 제공할 수 있다.

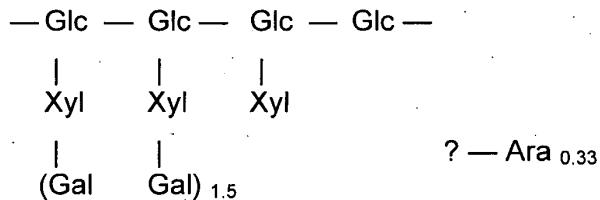
### 발명의 내용

[0027] 상기한 내용을 고려해서, 본 발명의 목적은 안구 건조증 치료를 위한 약리학적 치료제를 정의하는 것인데, 여기서 눈물 대체물은 눈 표면에 장기간 동안 존속하고 상피의 표면과 자가-통합하여 이들에서 보호 역할을 수행할 뿐만 아니라, 전반적으로 미소융모의 숫자와 형태와 관련하여 그들의 일체성을 복원하는데 도움을 줄 수 있다, 특히 결막 점막 내에서 정상 상태로의 신속한 복귀를 도울 수 있다.

[0028] 본 발명에 이르는 연구의 체제에서, TSP에 기초된 공지된 안과 용액과 히알루론산에 기초된 더욱 넓게 확산되는 안과 용액이 건성안의 이상증상에서 개선, 구체적으로 상기 질환의 치료에서 마케팅 성공(marketing success)의 기초가 되는 개선을 산출할 수 있는 것으로 밝혀졌지만, 이들 양쪽 용액은 특히, 결막 상피의 현미경 표면 구조와 관련하여, 효능(effectiveness) 및 고려된 병리에 전형적인 조직학적 손상으로부터 신속한 회복에 대해서 상대적으로 경미한 이익을 산출하는 것으로 간주되었다.

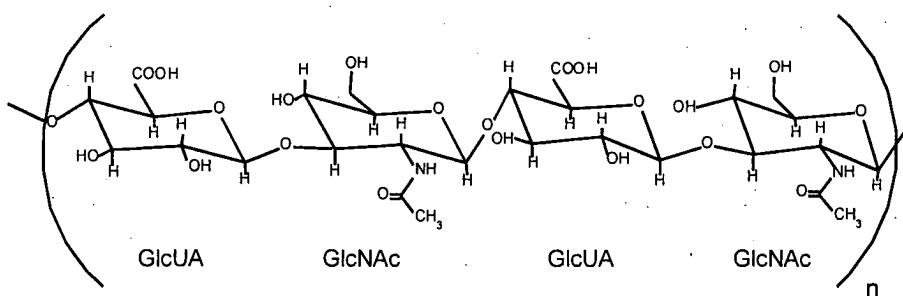
[0029] 이와 같은 기존의 고려사항에 기초하여, 본 발명에 따라서 단일 안과 산물로 눈 표면에 적용되는, 활성 성분 TSP와 히알루론산의 특정한 조합은 특히, 미소융모의 숫자와 형태와 관련하여, 결막 점막의 정상 상태로의 더욱 신속한 복귀를 촉진함에 있어, 이들 2가지 산물이 개별적으로 이용될 때 갖지 못하는 새로운 치료 특성을 획득하는 것으로 밝혀졌다. 미소융모의 정상적인 일체성의 복원은 안구 건조증에 동반되는 징후와 증상의 향상에 대한 더욱 장기적인 효과와 연관된다.

[0030] 타마린드 겉의 다당류 분획물의 구조에서 수행된 여러 연구에 따르면, 타마린드 씨 다당류는 (1→4) 연쇄(linkage)를 통하여 서로 결합된 글루코파라노실 단위(glucopyranosyl unit)의 주사슬(main chain)로 구성되고, 짧은 측쇄(side chain)가 (1→6) 연쇄를 통하여 상기 주사슬에 부착된 자일로파라노실 단위(xylopyranosyl unit)로 구성되는 것으로 확인된다. 상기 자일로파라노실 단위는 단독이거나, 또는 (1→2) 연쇄를 통하여 단일 갈락토파라노실 단위(galactopyranosyl unit)에 교대로 결합될 수 있다. 또한, 아라비노푸라노실 단위(arabinofuranosyl unit)의 추가적인 존재가 보고되었다. 이런 이유로, 타마린드 씨 다당류(TSP)의 구조는 아래와 같이 표시될 수 있다:



[0032] 출발 원료 물질(raw material)로부터 중합체의 추출(extraction), 여과(filtration)와 정제(purification)를 위한 절차는 정확하게 정제된 산물에서 600,000 내지 750,000 Da 범위의 높은 분자량을 고려하여, 이들 기능적 특징을 변함없이 유지하기 위한 높은 기술적 전문화(technological specialization)를 요구한다.

[0033] 히알루론산은 D-글루쿠론산(D-glucuronic acid, GlcUA)과 N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)의 교대 단위(alternate unit)로 구성되는 분기되지 않은 글리코사미노글리칸(unbranched glycosaminoglycan)으로서 화학적으로 정의될 수 있는데, 상기 구조는 아래의 화학식으로 표시될 수 있다:



[0034]

[0035] 이는 2가지 상이한 이당류 단위(disaccharide unit)를 차례로 보여주는데, 여기서 단위의 반복 쌍(repeating couple)의 숫자 n은 다당류의 분자량이 50,000 내지 수백만 달톤(dalton)이 되도록 한다. 인공 눈물 용액을 위하여 안과학에 이용되는 히알루론산(상응하는 나트륨 염의 형태로)의 평균 분자량은 통상적으로, 700,000 내지 1백만 Da이다.

[0036] 생체내에서, 히알루론산과 N-아세틸글루코사민의 모든 카르복실기(carboxyl group)는 완전하게 이온화되고, 히알루론산 분자에 높은 극성(polarity)과 결과로써, 물에서 높은 용해성(solubility)을 공여한다. 물과 상피 세포 벽 둘 모두에 연결되는 우수한 능력으로 인하여, 히알루론산은 건성안 병리의 치료에서 많은 눈물 대체물로서 주요 성분으로서 이용된다.

[0037] 본 발명에 관련된 연구 분야에서, 자기 공명(magnetic resonance) 기술(이는 하기에 상세하게 기술될 것이다)의 이용에 기초된 일부 실험 결과는 TSP가 용해 상태에서 히알루론산(HA)과 상호작용하여, 주로 TSP의 내부 글루코스(glucose)와 갈락토오스(galactose) 단위, 그리고 HA의 아세틸기(acetyl group)가 관련된 형태 변화(conformational change)를 유도할 수 있음을 증명하였다. 이러한 사실은 일부 농도 비율에서, 비-혼합된 형태에서 이들 두 중합체가 나타내는 것보다 훨씬 높은 것으로 증명되는, 물을 유지하는 혼합물의 능력을 결과한다.

[0038] 물을 유지하는 능력이 건성안 치료에 이용되는 중합체의 점착성(adhesive)과 생체적 합성(biocompatibility) 특성에 필수적이기 때문에, TSP-HA 혼합물에 대한 연구는 상기 혼합물의 안전성(safety)과 내성(tolerability)을 평가하기 위하여, 쥐에서 아트로핀(atropine)으로 유도된 건성안 모형에서 전임상 연구에 의해 더욱 확대되었다. 이런 모형에서 획득된 결과(하기에서 종합적으로 보고됨)에 기초하여, TSP와 HA의 혼합물이 이들 두 산물 간에 부정적인 상호작용(negative interaction)을 나타내지 않고, 눈물 생산의 급격한 감소 이후에 조직-생리학적 손상(histo-physiologic damage)의 더욱 효과적인 회복을 촉진한다는 것을 확증하는 것이 가능하다.

[0039] 상대적으로 제한된 숫자의 환자에서 파일럿 연구(pilot study)로서 수행된 후속 임상 연구(하기에서 보고됨)는 TSP와 HA의 조합의 현저한 상승효과(synergic effect)를 지시하는, 제안된 치료제의 효능을 확증하였다.

[0040] 이런 이유로, 본 발명은 구체적으로, 수용액 내에 조합으로, 중량으로 0.05 내지 2%의 타마린드 씨 다당류

(tamarind seed polysaccharide)와 중량으로 0.05 내지 1%의 히알루론산(hyaluronic acid)을 포함하는, 눈물 대체물(tear substitute)로서 이용을 위한 안과 조제물(ophthalmic preparation)을 제시한다.

[0041] 본 명세서에서, "타마린드 씨 다당류"(Tamarindus indica Seed Polysaccharide 또는 TSP, 때때로 "자일로글루칸(xyloglucan)"으로 총칭됨)는 현재 시장에서 구입가능한 원료 물질인 타마린드 검으로부터 획득가능한 임의의 다당류-농축된 분획물(즉, 타마린드 인 분말)을 의미한다. 타마린드 검의 부분적으로 정제된 다당류 분획물은 예로써, Glyloid®의 상품명으로 Dainippon Pharmaceutical Co. LTD(Osaka, Japan)에 의해 판매되고 있다. 하지만, 본 발명에서, 관련된 다당류 분획물은 바람직하게는, 실질적으로 순수한 타마린드 씨 다당류를 제공하기 위하여 더욱 정제된다.

[0042] 본 명세서에서, "히알루론산"은 특히, 인공 눈물의 조제에 통상적으로 이용되는 염 형태(salt form), 다시 말하면, 히알루론산나트륨(sodium hyaluronate) 형태의 앞서 기술된 다당류("글리코사미노글리칸"으로 총칭됨)를 의미한다.

[0043] 적절하게는, 본 발명에 따른 안과 조제물은 수용액 내에 조합으로, 중량으로 0.1 내지 1%의 타마린드 씨 다당류와 중량으로 0.1 내지 0.5%의 히알루론산을 포함한다.

[0044] 적절하게는, 본 발명에 따른 안과 조제물에서 중량 농도(weight concentration)는 0.1 내지 1%의 타마린드 씨 다당류와 0.1 내지 0.5%의 히알루론산이다. 하기에 제공된 실험 작업(experimental work)에서 구체적으로 연구되고, 결막 상피의 정상 상태를 복원하는데 협력하는 이들 2가지 활성 물질의 능력에 관련된 뛰어난 임상 성능(clinical performance)을 제공하는 구체예는 수용액 내에, 중량으로 0.2%의 타마린드 씨 다당류와 중량으로 0.4%의 히알루론산을 포함한다.

[0045] 적절하게는, 본 발명의 조제물의 이용되는 타마린드 씨 다당류는 450,000 Da 내지 750,000 Da(바람직하게는, 600,000-750,000 Da) 범위의 분자량을 갖고, 히알루론산은 600,000 Da 내지 1,000,000 Da(바람직하게는, 700,000-1,000,000 Da) 범위의 분자량을 갖는다.

[0046] 본 발명에 따른 인공 눈물 제제에서, 정확한 수치의 삼투몰농도를 용액에 제공하기 위하여 하나 이상의 긴장 조절제(tonicity adjusting agent)가 첨가된다. 이를 위하여, 긴장 조절제로서 당분야에서 현재 이용되는 임의의 산물, 예를 들면, 염화나트륨(sodium chloride), 염화칼륨(potassium chloride), 만니톨(mannitol), 텍스트로스(dextrose), 봉산(boric acid), 소르비톨(sorbitol) 또는 프로필렌 글리콜(propylene glycol)이 이용될 수 있다.

[0047] 공지 기술에 따라서 제제에 포함될 수 있는 다른 성분은 pH 조절제로서 산 또는 염기, 그리고 완충제, 예를 들면, 인산염 완충제(phosphate buffer)(제1인산나트륨(monobasic sodium phosphate)과 제2인산나트륨(dibasic sodium phosphate)), 또는 아세트산염 완충제(acetate buffer)(아세트산염 - 아세트산 시스템)이다. 이용될 수 있는 다른 완충제는 봉산염(borate), 구연산염(citrate), 중탄산염(bicarbonate)과 트리즈마(trizma)(트리-히드록시메틸-아미노메탄) 완충제이다.

[0048] 본 발명의 조성물은 또한, 보존제(preservative)와 항균제(antimicrobial agent), 예를 들면, 벤잘코늄 염화물(benzalkonium chloride), 나트륨 메르티올레이트(sodium merthiolate) 또는 티메로살(thimerosal), 메틸-, 에틸-과 프로필 파라벤(paraben), 클로로부탄올(chlorobutanol), 폐닐수은(phenylmercurium) 질산염(nitrate) 또는 아세트산염(acetate), 폐닐에틸알코올(phenylethyl alcohol), 클로르헥시딘(chlorhexidine) 아세트산염 또는 글루콘산염(gluconate), 그리고 칼레이트제(chelating agent), 예를 들면, 에데트산염(edetate) 또는 EDTA를 포함할 수 있다. 보존제 성분은 내성(tolerability) 문제로 인하여, 인공 눈물로서 이용되는 제제에 포함시키지 않는 것이 바람직하다. 이는 산물이 단위-투약 용기(unit-dose container)에 포장될 때, 특히 그러하다. 하지만, 일부 사례에서, 그리고 특히, 산물이 다중 투약 용기(multiple dose container)내에 존재할 때, 보존제의 첨가가 필요하다.

[0049] 다른 측면에 따라서, 본 발명은 안구 건조증의 치료를 위한 조제물의 생산에서, 수용액 내에 타마린드 씨 다당류와 히알루론산의 조합의 용도에 관계한다.

[0050] 다른 측면에 따라서, 본 발명은 눈물 대체물로서 이용을 위한, 또는 안구 건조증의 치료를 위한, 수용액 내에 타마린드 씨 다당류와 히알루론산의 조합을 활성 성분으로 포함하는 제약학적 조성물에 관계한다.

[0051] 이미 언급된 바와 같이, 상기 눈물 대체물, 조제물, 또는 제약학적 조성물은 바람직하게는, 중량으로 0.05 내지 2%의 타마린드 씨 다당류와 중량으로 0.05 내지 1%의 히알루론산, 더욱 바람직하게는, 중량으로 0.1 내지 1%의

타마린드 씨 다당류와 중량으로 0.1 내지 0.5%의 히알루론산을 포함한다.

[0052] 하기에 기술된 용도를 위한 제안된 조제물 또는 제약학적 조성물의 타마린드 씨 다당류는 바람직하게는, 600,000 Da 내지 750,000 Da 범위의 분자량을 갖고, 히알루론산의 분자량은 바람직하게는, 700,000 Da 내지 1,000,000 Da이다.

[0053] 본 발명은 또한, 실험적으로 확증되고 아래의 실험 보고서에서 보고되는 바에 따라서, 보호 활성(protective activity)과 상피 재생 활성(re-epithelializing activity)을 갖는 눈물 대체물로서 이용되는, 자일로글루칸과 히알루론산에 기초된 제제의 실례를 보여주는, 일부 특정한 구체예에 따른 아래의 무제한적 실례에 의해 개시된다.

#### 인공 눈물 제제의 실례

##### 실례 1

성분	중량%
TSP	0.1
히알루론산	0.1
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0056]

상기 산물은 아래의 단계로 제조한다:

[0057] - TSP와 HA를 적절한 유리 용기(glass vessel) 내로 칭량한다;

[0058] - 산물의 완전한 용해 때까지 가볍게 교반하면서 90%의 가용수(available water)를 첨가한다;

[0059] - 만니톨을 첨가하고, 계속 교반하고, 혼합물은 산물의 완전한 용해 때까지 교반 하에 방치한다;

[0060] - 탈이온화된 물을 최종 중량(final weight)(100%)까지 첨가한다;

[0061] - 원하는 pH에 도달하도록 제1인산나트륨과 제2인산나트륨을 첨가한다;

[0062] - 이렇게 획득된 용액은 오토클레이브(autoclave)에서 멸균하거나, 또는 대안으로, 0.22 마이크론(micron) 필터로 여과(filtration)에 의해 멸균한다.

##### 실례 2

성분	중량%
TSP	0.1
히알루론산	0.4
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0063]

상기 산물은 실례 1에서와 동일한 방식으로 제조된다.

[0067]

실례 3

성분	중량%
TSP	0.2
히알루론산	0.1
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0068]

상기 산물은 실례 1에서와 동일한 방식으로 제조된다.

[0070]

실례 4

성분	중량%
TSP	0.2
히알루론산	0.2
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0071]

상기 산물은 실례 1에서와 동일한 방식으로 제조된다.

[0073]

실례 5

성분	중량%
TSP	0.2
히알루론산	0.4
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0074]

상기 산물은 실례 1에서와 동일한 방식으로 제조된다.

[0076]

실례 6

성분	중량%
TSP	0.4
히알루론산	0.1
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0077]

상기 산물은 실례 1에서와 동일한 방식으로 제조된다.

[0079] 실례 7

성분	종량%
TSP	0.4
히알루론산	0.2
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0080]

[0081]

상기 산물은 실례 1에서와 동일한 방식으로 제조된다.

[0082]

실례 8

성분	종량%
TSP	1.0
히알루론산	0.1
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0083]

[0084]

상기 산물은 실례 1에서와 동일한 방식으로 제조된다.

[0085]

실례 9

성분	종량%
TSP	1.0
히알루론산	0.4
만니톨	2.00
탈이온화된 물	100까지 q.s.
제1인산나트륨과 제2인산나트륨	pH 7.0±0.5까지 q.s.

[0086]

상기 산물은 실례 1에서와 동일한 방식으로 제조된다.

**도면의 간단한 설명**

[0088]

본 발명에 따른 다당류 조합의 특징과 이들을 포함하는 조제물의 성과를 보여주는 일부 실험 결과는 첨부된 도면에 도시된 일부 그래프와 사진과 함께, 하기에 제시된다:

도 1에서는 절대값(absolute value)으로, 결막 미소융모의 평가에 대해서, 안구 건조증의 치료에서 본 발명에 따른 조성물의 효능에 관한 파일럿 연구의 결과를 막대그래프 형태로 도시한다;

도 2에서는 동일한 파일럿 연구에서, 기초 수치의 편차로, 결막 미소융모의 평가 결과를 도시한다;

도 3에서는 동일한 파일럿 연구에서 1명의 여성 환자의 왼쪽 눈 결막 상피의 SEM 7500x 영상을 도시하는데, 상기 환자는 치료 이전의 TSP+HA 군에 속한다;

도 4에서는 TSP+HA로 60일간 치료 이후에, 도 3의 동일한 여성 환자의 왼쪽 눈 결막 상피의 SEM 7500x 영상을 도시한다;

도 5에서는 절대값으로, 주관적인 이상증상(subjective symptomatology)에 대한 효과의 평가에 대해서, 도 1의 동일한 파일럿 연구의 결과를 막대그래프 형태로 도시한다;

도 6에서는 동일한 파일럿 연구에서, 기초 수치로, 주관적인 이상증상에 대한 효과의 평가 결과를 도시한다;

도 7에서는 절대값으로, 객관적인 이상증상(objective symptomatology)에 대한 효과의 평가에 대해서, 도 1의 동일한 파일럿 연구의 결과를 막대그래프 형태로 도시한다;

도 8에서는 동일한 파일럿 연구에서, 기초 수치로, 객관적인 이상증상에 대한 효과의 평가 결과를 도시한다;

도 9에서는 절대값으로, 세포진단(cytology)에 대한 효과의 평가에 대해서, 도 1의 동일한 파일럿 연구의 결과를 막대그래프 형태로 도시한다;

도 10에서는 동일한 파일럿 연구에서, 기초 수치의 편차로, 세포진단에 대한 효과의 평가 결과를 도시한다;

도 11에서는 절대값으로, 이전 평가의 전체 스코어(통합 스코어)에 대해서, 도 1의 동일한 파일럿 연구의 결과를 막대그래프 형태로 도시한다;

도 12에서는 동일한 파일럿 연구에서, 기초 수치의 편차로, 이전 평가의 통합 스코어의 결과를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 수용액 내에 히알루론산(HA)과 TSP 혼합물에 대한 NMR 연구

물이 내포되는, 매우 복합적인 3차원 구조의 다당류 히드로겔(hydrogel)이 제공된다. 물 함량, 물과 중합체 물질(polymer material) 간에 발생하는 상호작용의 유형, 그리고 상기 중합체 자체의 내부에서 물 분포는 기계적 특성, 점액-점착성(muco-adhesivity)에 결정적인 영향을 주고, 높은 수준의 생체적합성(biocompatibility)의 기초가 된다. 통상적으로, 3가지 유형의 물이 다당류 젤에서 구별된다: 연결된 물, 중간단계 물과 자유로운 물.

핵 자기 공명 분광법(Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR)은 중합성 시스템(polymeric system)의 구조, 이동성과 수화 특성의 연구를 위한 가장 유용한 기술 중의 하나이다. 특히, 물 양성자 핵(proton nucleus)의 이완 시간(relaxation time) 스핀-스핀(spin-spin)(T<sub>2</sub>) 또는 스핀-그리드(spin-grid)(T<sub>1</sub>)의 척도가 매우 유용한 것으로 생각된다. 이완 시간 T<sub>2</sub>는 시간 속에서 횡축 자기화(transversal magnetization)의 감쇠(decay)를 설명하는 일정한 시간을 표시하는 반면, 이완 시간 T<sub>1</sub>은 종축 자기화(longitudinal magnetization)의 회복 과정(recovering process)을 설명한다.

다당류가 물에 용해될 때, 물 분자는 상기 다당류와 수소 결합(hydrogen bond)을 형성하고, 따라서 그들의 이동성이 감소되고 T<sub>1</sub>과 T<sub>2</sub> 둘 모두의 감소로 이어진다. 하지만, 통상적으로, 결합된 물과 자유로운 물에 대한 별개의 신호가 검출되지 않고, 이를 두 종류의 물로부터 파생되는 기여의 가중 평균(weighted average)을 나타내는 단일 신호가 검출된다. 결과적으로, 측정된 NMR 파라미터(T<sub>1</sub> 및/또는 T<sub>2</sub>)는 아래의 방정식(방정식 1)에 따른, 자유로운 상태와 결합된 상태에서 상기 파라미터의 가중 평균을 나타낸다:

$$\frac{1}{T_{obs}} = X_b \frac{1}{T_b} + X_f \frac{1}{T_f} \quad (1)$$

여기서  $\frac{1}{T_{obs}}$  은 관련된 용액 내에 물에 대하여 측정된 이완 속도 비율(relaxation speed rate)(시간 T<sub>1</sub> 또는 T<sub>2</sub>)

의 역수)을 표시하고,  $\frac{1}{T_b}$  은 결합된 물의 이완 속도 비율이고,  $\frac{1}{T_f}$  은 자유로운 물의 이완 속도 비율인데, 이는 중합성 물질이 부재하는 용액에서 측정된 이완 속도 비율에 상당한다. X<sub>b</sub>와 X<sub>f</sub>는 각각, 결합된 물과 자유로운 물의 물 분율(molar fraction)이다.

결합된 물 분자의 숫자는 중합체의 표면 S, 결합된 물 표면 총의 두께 K, 그리고 물 V의 전체 부피(total volume)에 따라, 아래의 방식(방정식 2)으로 표시될 수 있다:

$$X_b = K \times \frac{S}{V} \quad (2)$$

[0097] 중합체 농도가 증가할 때, 농도 자체의 변동에 따른 형태 변화(conformational variation) 또는 자가-조절 현상(self-regulating phenomenon)이 발생하지 않으면  $T_1$ 과  $T_2$  둘 모두 중합체 표면의 증가와 이에 따른, 결합된 물

분자의 수자의 증가의 결과로써 감소한다; 하지만, 횡축 이완 속도(transversal relaxation speed)( $\frac{1}{T_2}$ )에 대

한 효과는 종축 이완 속도(longitudinal relaxation speed)( $\frac{1}{T_1}$ )에서 관찰되는 효과보다 훨씬 현저하다.

[0098] 이를 근거에서, 아래의 용액에서, 물 양성자 핵에서 횡축 이완 속도( $\frac{1}{T_2}$ )를 측정하는 아래의 실험을 수행하였다:

a) 0.1%(w/w) 내지 1%의 가변 농도를 갖는 TSP 용액;

b) 0.1%(w/w) 내지 1%의 가변 농도를 갖는 HA 용액;

c) 가변 농도의 HA와 TSP를 포함하고, 0.5%의 전체 농도로 적절한 부피의 모액(mother solution)들을 혼합함으로써 획득되는, 0.5%에 상당하는 일정한 전체 농도를 갖는 혼합물;

d) 가변 농도의 HA와 TSP를 포함하고, 1%의 전체 농도로 적절한 부피의 모액(mother solution)들을 혼합함으로써 획득되는, 1%에 상당하는 일정한 전체 농도를 갖는 혼합물.

[0103] 또한, 이들 2가지 중합성 물질 간에 발생하는 상호작용의 성격에 관한 정보를 획득하기 위하여, 상이한 농도에서 중합체 HA와 TSP, 그리고 그들의 혼합물의 스펙트럼 파라미터(spectral parameter)를 비교하였다. 고려되는 스펙트럼 파라미터는 아래와 같다:

[0104] 1. HA의  $^{23}\text{Na}$ 의 화학적 이동(chemical shift);

[0105] 2. TSP의 아노머 양성자(anomeric proton)와 HA의 아세틸 양성자(acetyl proton)에서 선택적인 스피-그리드(spin-grid)의 이완 척도;

[0106] 3. HA와 TSP의 양성자에서 스피-스피(spin-spin)의 이완 척도;

[0107] 4.  $\text{H}_2\text{O}$ 의 확산을 측정하기 위한 DOSY(Diffusion Ordered Spectroscopy) 척도(중합체에 통합되는 물의 측정).

[0108]  $^{23}\text{Na}$ 의 화학적 이동 측정(chemical shift measure)과 히알루론산의 아세틸기에서 수행된 측정은 이들 2가지 중합성 물질 간에 상호작용이 히알루론산의 극성 이온화 기(polar ionized group) 또는 이의 아세틸기를 필요로 하는지를 결정하는 것을 목적으로 한다.

[0109] 아노머 양성자에서 수행된 측정은 어떤 유형의 TSP 단위가 HA와의 상호작용에 우세하게 관여하는지를 결정하는 것을 목적으로 한다.

#### NMR 분석을 위한 샘플 조제와 측정 방법

[0111] 이들 모액은 원하는 농도에서, 고형 중합체를  $\text{D}_2\text{O}$ 에 용해시킴으로써 제조하였다. 2개의 연속 용액을 제조하였는데, 첫 번째 용액은 실온에서 12시간 동안 교반한 이후에 획득되고, 두 번째 용액은 실온에서 12시간 동안 교반하고 대략 60분 동안 80°C에서 가열 하에 교반한 이후에 획득되었다. 이들 2개의 연속 용액으로부터 획득된 결과는 완전하게 중복되었다; 이런 이유로, 하기의 논의에서 이들은 구별되지 않을 것이다.

[0112] 이들 NMR 연구는  $^1\text{H}$ 의 경우에 600 MHz와  $^{23}\text{Na}$ 의 158.6 MHz에서 작동하고, 직접적인 검사를 위한 5 mm 역전 삼중-공명 프로브(inverse triple-resonance probe)와 5 mm 광대역 프로브(broadband probe)에 의해 제공되는 NMR Varian INOVA 600 14T 분광계에서 수행하였다. 상기 분광계는  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 의 온도 조절 장치(temperature control system)가 구비된다.

[0113] 선택적인 양성자 이완 시간 스피-스피(spin-spin)  $T_1$ 은 원하는 주파수(frequency)의 반전(inversion)의 임펄스(impulse)의 선택적인 적용을 위한 표준 연쇄 반전-회복(standard sequence inversion-recovery)(180° -  $\tau$  -

90° -회전)으로 획득되는 것들이다.

[0114] 이완 시간 스핀-스핀(spin-spin)  $T_2$ 는 연쇄 Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)(90° -  $\tau$  -(180° -2  $\tau$  )<sub>n</sub>)을 이용하여 측정하였다.

[0115] DOSY(Diffusion Ordered SpectroscopY) 지도(map)는 4에 상당하는 다수의 과도신호(transient)로, 3 s의 이완 시간을 이용하여 기입하였다. 최초 신호의 10-5%까지 하락을 달성하기 위하여, 30 경사도(gradient)가 이용되고 파라미터  $\delta e\Delta$ 가 최적화되었다(각각, 1 ms와 80 ms).

$$\text{물의 이완 시간}(R_2 = \frac{1}{T_2}) \text{의 측정}$$

[0117] 먼저, 0.1% 내지 1%의 가변 농도로 2가지 순수한 중합체를 포함하는 용액 내에서 물의 이완 시간  $T_2$ 를 측정하였다.

[0118] TSP의 경우에, 수치는 최대 희석된 용액(0.1% w/w)에서 0.90 s<sup>-1</sup>에서 1%의 농도를 갖는 용액에서 3.08 s<sup>-1</sup>로 증가하는 것으로 측정된다. 이완 속도 스핀-스핀(spin-spin)의 이러한 증가는 중합체 농도의 증가를 추종하는, 결합된 물의 물 분율의 증가에 기초하여 예측된 바에 따른다.

[0119] 순수한 히알루론산의 경우에, 중합체의 농도가 증가할 때, 물의 이완 파라미터의 유사한 증가가 관찰된다. 측정된 수치는 동일한 농도에서 TSP에 대하여 관찰된 바와 비교하여 훨씬 낮고, 전체 편차 역시 훨씬 낮다. 이들 두 중합체의 분자량이 모두 매우 높은 점을 고려하면, 상기 차이는 이들 두 중합체의 자기-집합(self-aggregation)하는 상이한 경향(different tendency)에 상당히 관련될 수 있다: 아마도, TSP는 HA와 비교하여 증가하는 농도에서 자기-집합하는 더욱 높은 경향을 나타내고, 이러한 자기-집합 현상의 결과로써, 자유로운 물에 비하여 결합된 물 분율의 증가가 발생한다.

[0120] 이후, 0.5%(용액 c)에 상당하는 일정한 전체 농도를 갖지만 두 성분 간에 비율이 변하는 TSP-HA 혼합물에서 물의 이완 속도를 측정하였다. 측정된 수치는 상기 혼합물의 동일한 농도에서 또는 이의 전체 농도에서 이들 2가지 순수한 중합체에 대하여 획득된 수치와 비교하였다. TSP와 HA 간에 변하는 중량 비율(weight ratio)로 획득된 결과는 3:2 내지 4:1 범위에서 변하는 TSP/HA 비율에서, 이들 2가지 중합성 물질 간에 상호작용이 강하게 협력하게 되고, 따라서 최대 농도에서 단일 중합체에서 전형적인 결합된 물의 물 분율과 비교하여 이의 급작스런 증가로 이어진다는 결론에 도달하는 것을 가능하게 한다.

[0121] 1%에 상당하는 전체 농도를 갖는 용액(용액 d)에서, 이러한 거동이 재현된다, 다시 말하면, 6.4 내지 8.2 범위의 TSP/HA 비율에서 혼합물 내에 물의 이완 속도는 TSP와 HA 각각이 혼합물 내에 존재하는 동일 농도에서, 그리고 전체 수치에 상응하는 농도(1%)에서, TSP와 HA에 대하여 측정된 수치보다 큰 수치까지 급작스럽게 증가한다. 이런 이유로, 이들 두 중합체의 협력 거동(cooperating behaviour)이 확증된다; 이러한 거동은 그들의 전체 농도보다는 두 중합체 간에 비율에 더욱 결정적으로 의존하는 것으로 생각된다.

$$\text{히알루론산의 아세틸기의 종축 이완 속도 측정}(R_1 = \frac{1}{T_1})$$

[0123] 히알루론산의 아세틸 양성자의 종축 이완 속도  $R_1$ 은 0.5%에 상당하는 전체 일정 농도와 가변 TSP/HA 비율을 갖는 혼합물에서 측정하였다. 아세틸기의 이완 속도  $R_1$ 의 거동은 전체 농도 0.5%를 갖는 혼합물 HA/TSP에서 특히 흥미로운데, 여기서 증가하는 HA 농도로, 하지만 동일한 농도에서 TSP의 부재에서 측정되는 것들보다 훨씬 낮은 절대값으로, 이완 속도  $R_1$ 의 감소가 다시 한 번 관찰된다. TSP의 존재의 결과로써 아세틸기 내에 이완 속도에서 산출된 감소의 양은 3:2 내지 4:1 범위의 가변 비율에서 더욱 높아졌다; 이러한 갭(gap)에서, 이들 두 중합체의 현저한 상승효과(synergistic effect)가 확증된다.

[0124] 또한, 아세틸 양성자의 이완 속도 스핀-스핀(spin-spin)  $R_2$ 는 순수한 중합체와 TSP와의 혼합물 둘 모두에서 동일한 거동을 추종한다; 다시 말하면, HA 농도가 증가함에 따라서 이완 파라미터의 감소가 달성되지만, 혼합물 내에서 이완 속도가 더욱 낮고, 순수한 성분에 비하여 혼합물에서 감소가 높은 TSP/HA 비율에서 증가한다.

- [0125] 0.5%의 전체 농도에서 히알루론산의 존재와 부재에서 선택된 TSP 양성자의 이완 속도 스피-스핀(spin-spin)  $R_2$  측정
- [0126] 혼합물의 스펙트럼에서, 5.06 ppm, 4.85 ppm과 4.45 ppm에서 TSP의 아노미 양성자는 히알루론산의 신호에 중복되지 않고, 따라서 이들은 HA와의 상호작용에 관여하는 TSP 양성자에 관한 정보를 획득하기 위한 기초로서 선택되었다.
- [0127] 특히, 글루코오스와 갈락토오스의 단위에 상응하는 4.45 ppm에서 양성자는 다른 양성자와 완전히 상이한 방식으로 거동한다. 실제로, 이의 수치는 순수한 성분 용액 농도에 거의 의존하지 않는다. 이는 HA의 존재에서 유의미한 방식으로 변한다; 특히, 다른 양성자와 상이하게, 이는 HA 함량이 증가할 때 유의미한 감소를 겪는다. 이러한 거동은 HA와의 상호작용의 결과로써, TSP에서 유도된 형태 변화(conformational variation)에 기인할 것임에 틀림없다.
- [0128] 결론
- [0129] 앞서 종합된 NMR 연구의 결과는 TSP와 HA 간에 상호작용이 이들 두 중합체 간에 중량 비율(ratio by weight)에 따라, 협력적으로 된다는 것을 명백하게 증명한다. 이런 상호작용은 주로, TSP의 글루코오스와 갈락토오스의 내부 단위(internal unit) 및 HA의 아세틸기가 관련되는 형태 변화로 이어진다. 대조적으로, HA 자체의 카르복실기는 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 후자는 아마도, 이온 형태로 존재하기 때문에, HA가 상호작용하는 TSP보다는 오히려 자체적인 직면상(facing phase)을 정렬하는 경향을 향상 나타낸다. 후자 결론은 전체 농도 및 두 중합체 간에 비율의 편차의 결과로써, 나트륨 화학적 이동(sodium chemical shift)에 대한 불량한 효과에 의해 뒷받침된다.
- [0130] 이들 두 중합체가 물에 결합하는 능력에 대한 이러한 상호작용의 효과는 매우 중요하다: 이는 순수한 중합체에 비하여 혼합물에서 더욱 두드러진다. 수행된 이들 연구는 3.2 내지 4:1 범위의 TSP/HA 비율의 간격의 존재를 명백하게 증명하는데, 이러한 간격에서 물을 통합하는 이들 혼합물의 능력이 매우 높아진다. 이런 특성은 생성된 중합성 혼합물의 접착성과 생체적합성 특징에 필수적인 것으로 생각된다.
- [0131] 인공 눈물로서 시판되는 조제물과 비교하여, 동물 모형에서 HA와 TSP의 혼합물의 효능 평가
- [0132] 인공 눈물의 적용을 위한 가정 중의 하나는 눈물막의 정상적인 상태이다. 눈은 영상 장치(video-terminal)의 이용, 대기 오염(atmospheric pollution), 영양(alimentation), 그리고 눈물흘림(lachrymation)의 질과 양에 영향을 주는 환경 알레르기(environmental allergy)와 이에 따른, 콘택트렌즈 착용 가능성으로 인하여, 더욱 빈번한 눈물흘림 문제에 직면한다. 이와 관련하여, 눈물막의 변화가 필연적으로, 인공 눈물 치료의 명백한 거절로 이어진다는 점에 주목해야 한다.
- [0133] 인공 눈물과 같은 국소 이용을 위한 산물의 연장된 투여를 고려할 때, 심각한 부작용, 예를 들면, 망막(retina)의 렌즈 혼탁화(lens opacification)와 용인(sufferance)의 부재를 담보할 수 있는 가용한 검사법을 확보하는 것이 특히 중요하다.
- [0134] 수행된 전임상 시험의 첫 번째 구간에서, 건강한 동물 모형에서, 본 발명에 따른 제안된 산물의 효능과 가능 부작용을 이미 시판되고 있는 다른 5가지 산물에서와 비교 평가하였다; 반면, 두 번째 구간에서는 인공 눈물로 치료에 관련된 실질적인 이점을 더욱 철저하게 조사하기 위하여 적절한 병리 모형(pathologic model)을 이용한다.
- [0135] 눈물흘림 검사
- [0136] Schirmer I 검사는 아래쪽 결막 원개 내에서, 표준 재료와 크기의 비불라 페이퍼 스트립(bibula paper strip)의 외부 안각(external canthus)을 향한 도입을 수반한다. 상기 스트립은 미리 정해진 기간(3분) 동안 *in situ* 방치하고, 상기 기간후, 접힌 일부를 제외하고 적심된 부분을 측정한다. 누액이 올라가는데 소요되는 시간과 눈물에 의해 적심된 페이퍼 부분의 길이(mm)는 눈물 분비의 크기를 제공한다.
- [0137] 일일 실행(daily practice)에서, 1분의 기간 동안 상기 검사를 수행하고 획득된 수치에 3을 곱하는 것이 가능하다. 이후, 상기 결과 - 반사적 눈물흘림(reflex lacrymation)에 의한 영향이 덜함 -는 Schirmer에 의해 규정된 수치와 비교한다. 5 mm 미만의 적심된 부분(5분 이내)은 병적인 것으로 간주된다.
- [0138] 적절한 턴솔 페이퍼(turnsole paper)의 이용으로 수행되는 pH 평가는 상피 내에서 임의의 병리학적 변화를 노출시키는데 중요한 검사이다. 인간에서 눈물 pH의 정상적인 수치는 6.8 내지 7.4 범위에 걸쳐있는 반면, 쥐에서 상기 범위는 더욱 높은 수치(7 내지 8)를 향하여 이동한다. 하지만, 병리학적 상태에서, 누액은 염기성화된다.

[0139] 양치상화 검사는 도입 부분에서 전반적으로 기술되었다.

[0140] 각막 검사는 나트륨 플루오레세인(sodium fluorescein)으로 마킹(marking)을 포함하고, 그 이후 각막 표면을 형광 현미경(fluorescence microscope)으로 조사한다. 반점 마킹(maculate marking)은 각막 건조(corneal dryness)의 증상인, 눈 표면에서 건조 구역(dry zone)의 존재를 드러낸다. 반면, 리사민 그린(Lissamine Green)으로 마킹은 눈 표면에서 궤양성(ulcerated) 또는 괴사성(necrotic) 구역의 존재를 드러낸다.

#### 실험의 실행

[0142] 실험에는 아래와 같은 실험 군(experimental group)의 설정이 포함되는데, 이들 각각은 3마리 알비노(albino) 쥐(= 6개의 눈)로 구성된다.

[0143] 1. 대조 군

[0144] 2. 본 발명에 따른 조성물(0.4% 히알루론산 + 0.2% TSP): (TSP+HA)

[0145] 3. 글리콜(glycol)과 히드록시프로필-구아(hydroxypropyl-guar)의 혼합물(Systane 다중용량(multidose) 병, Alcon): (Guar Gum)

[0146] 4. 0.15% 히알루론산(Blu Yal 단일용량(monodose), Sooft): (HA 0.15%)

[0147] 5. 0.4% 히알루론산(Dropstar 단일용량, Farmigaea): (HA 0.4%)

[0148] 6. 갈락토자일로글루칸(TSP 0.2% 단일용량, Farmigaea): (TSP 0.2%)

[0149] 7. 0.5% 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스(sodium carboxymethylcellulose) (Celluvic 단일용량, Allergan): (CMC 0.5%)

[0150] 8. 0.2% 히알루론산(Hyalistil 0.2%, Sifi): (HA 0.2%)

#### 1 단계

[0152] 첫 번째 실험 단계 동안, 건강한 동물의 모형에 대한 이들 산물의 속성(quality)을 평가하였다; 이들 동물은 5일 동안 일일 3회 개별 용액으로 치료하였다. 검사는 아래의 양식(modality)으로 수행하였다.

[0153] Schirmer I 검사는 모든 동물의 양쪽 눈에 아트로핀 투여후 2일, 3일, 4일과 5일 시점에, 3분 동안 비불라 페이퍼 스트립을 결막 원개의 외부 테르티움(external tertium)에 유지시킴으로써 수행하였다. pH 측정은 0일과 5일 시점에, 적절한 텐솔 페이퍼를 이용하여 수행하였다. 양치상화 검사는 5일 시점에, 10  $\mu$ l의 각 제제를 2  $\mu$ l의 인공 눈물과 혼합한 상이한 제제로 치료된 동물로부터 눈물막의 샘플에서 수행하였다. 상기 혼합물은 실온(20±1°C)에서 현미경으로 조사하였다. 각막 검사는 아트로핀 투여후 3일, 4일과 5일 시점에 수행하였다. 플루오레세인과 리사민 그린으로 마킹한 이후에, 각막 표면을 적절한 필터가 달린 램프를 이용하여 관찰하였다.

[0154] Schirmer 검사 결과는 본 발명의 조성물과 현재 시판되고 있는 다른 산물로, 동물의 치료 이후에 눈물 부피에서 임의의 정량적 차이를 보이지 않았다. 또한, 눈물 pH의 평가에서, 본 발명에 따른 산물 또는 조사 중인 임의의 다른 산물에 대한 임의의 병리학적 편차(pathological variation)가 관찰되지 않았다. 플루오레세인과 리사민 그린으로 마킹한 이후 각막 검사에서, 현재 시판되고 있는 다른 물질에서 관찰되는 바와 유사하게, 본 발명에 따른 산물로 치료 이후에 각막의 병리학적 변화가 전혀 관찰되지 않았다. 양치상화 검사는 비교 되는 다양한 치료물질 간에 본질적인 차이를 보이지 않는 결정화된 눈물의 영상을 산출하였다.

[0155] 이런 이유로, 1 단계의 검사는 현재 시판되고 있는 다른 인공 눈물 제제에서와 동일한 방식으로, 제안된 조성물과 결막-각막의 생리학적 상태(physiological status) 간에 부정적인 상호작용(negative interaction)의 부재를 증명하였다.

#### 2 단계

[0157] 본 실험 단계에서, 상이한 가능 동물 모형을 평가하고, 알비노 쥐에서 건성안 모형을 편제하였는데, 이는 아래와 같이 구성된 2.5 h의 3회 주기의 이용을 수반한다:

[0158] T0(0 min): 4 mg/kg 아트로핀의 복강내 주사(intraperitoneal injection)와 1% 아트로핀의 국소 적용.

[0159] T1(40 min): 8.5% 클로랄 수화물(chloral hydrate)로 마취와 1시간 동안 연속적이고 일정한 건조 기류에 노출.

[0160] T2(100 min): 기류의 종결.

- [0161] T3(130 min): 1% 국소 아트로핀.
- [0162] T4(150 min): 주기의 종결.
- [0163] 연구 중인 눈물로 치료된 동물은 T0로부터 30분후 및 T2 시점에, 이를 제재가 1회 국소 투여되었다.
- [0164] Schirmer 검사 평가는 주로 염증-삼출 타입(inflammatory-exudative type)의 반응으로서, 3회 주기의 종결 시점에 과다-눈물흘림(hyper-lachrymation)을 증명한다. 동물 간에 관찰되는 높은 변이성(variability)으로 인하여 유의한 차이를 검출하는 것이 가능하진 않지만, 본 발명에 따른 조성물(TSP+HA)과 0.5%TSP에 기인한 감소된 경향이 명백하다. 후자는 유해한 자극으로부터 더욱 우수한 보호를 지시한다. 눈물 pH 평가에서, 3회 주기후, 임의의 실험 군에 대한 병리학적 변화는 전혀 관찰되지 않았다.
- [0165] 양치상화 검사와 관련하여, 조사 중인 군 간에 유의한 차이가 검출되진 않았지만, 대조 군과 비교하여, 본 발명의 조성물을 비롯한 일부 산물에서 보호 특성의 존재를 확증하는 것은 가능하다.
- [0166] 궤양성(ulcerous) 또는 괴사성(necrotic) 병소에 의해 침범된 각막 표면의 비율로서 평가되는, 플루오레세인과 리사민 그린으로 각막 검사의 결과는 앞서 기술된 3회 주기의 실행에 의해 유도된 손상으로부터, 다양한 제제에서 유사한 보호를 증명하였다.
- [0167] 결론적으로, 앞서 보고된 검사는 본 발명에 따른 조성물과 결막-각막의 생리학적 상태 간에 부정적인 상호작용의 부재(1 단계)뿐만 아니라 눈물흘림의 강한 감소 이후에 조직-생리학적 손상으로부터 더욱 우수한 회복을 증명한다. 이를 검사는 제안된 조합이 인공 눈물로서, 그리고 연구 건조증의 치료에서 유효한 이용을 위한 적절한 특징을 보인다는 것을 확립할 수 있도록 한다.
- [0168] 연구 건조증 치료에서 0.2% TSP와 0.4% HA의 조합의 혼합물의 효능에 관한 파일럿 임상 연구**
- [0169] 연구 건조증의 치료에서 TSP와 HA의 조합의 효능을 평가하기 위하여, 양쪽 성별의 21명 개체(42개의 눈)에서 예비 임상 시험(preliminary clinical trial)을 수행하였다. 본 실험에 참가 기준은 눈 감염의 부재, 건성안과 구별되는 임의의 눈 병리의 부재(굴절 이상(refractive alteration) 제외), 그리고 콘택트렌즈 이용의 부재이었다.
- [0170] 상기 검사는 세척 단계(washout step) 없이 맹검으로 평가되는, 3가지 평행 군(parallel group)에서 대조 무작위 개방 연구(controlled randomized open study)인데, 여기서 인공 눈물로서 투여된 산물은 아래와 같다:
- [0171] - 연구 군: 하기에서 "TSP+HA"로 지칭되는, 동등한 중량 비율의 TSP 안과 용액(TSP 0.2%)과 HA 안과 용액(HA 0.4%)의 혼합물;
- [0172] - 1<sup>st</sup> 대조 군: 하기에서 "TSP"로 지칭되는 안과 용액 0.2% TSP(TSP, Farmigea);
- [0173] - 2<sup>nd</sup> 대조 군: 하기에서 "HA"로 지칭되는 안과 용액 0.4% HA(Dropstar, Farmigea).
- [0174] 무작위화(randomization) 시점에서, 이를 환자는 검안사(oculist)에 의해, 비교되는 3가지 상기 산물 각각을 일일 2회 2방울로 결막 낭내로 직접 자가-적하(self-instillation)하도록 지시받았다.
- [0175] 검사의 일차 종점(primary end-point)으로서, 치료의 시작과 종결 시점에 결막 미소융모 숫자의 스코어 편차(score variation)를 측정하였다. 이차 종점(secondary end point)으로서, 주관적인 이상증상, 객관적인 이상증상, 결막 세포진단 패턴(찰과(scraping)), 복합 스코어(composite score)(하기에 정의된 바와 같음), 그리고 산물의 내성(tolerability)과 안전성(safety)의 스코어 편차를 측정하였다.
- [0176] 주관적인 이상증상, 객관적인 이상증상, 그리고 내성과 안전성의 평가는 공개로 수행되고, 결막 세포진단과 미소융모의 평가는 각 개체에 연관된 치료를 모르는 관찰자에 의해 맹검으로 수행되었다.
- [0177] 치료의 전체 지속 기간은 3가지 환자 군 모두에서 60일(±8일)이었다.
- [0178] 평가
- [0179] 미소융모 평가 - 미소융모에 대한 치료의 효과는 주사 전자 현미경(scanner electronic microscopy, SEM)으로 평가하였다. 동일한 구역 내에서 기초와 최종 채취(withdrawal)를 수행하기 위하여, 조사된 각 눈에 대하여, 맥관 그리드(vascular grid)를 이용하여 평가 기준(point of reference)을 확인하였다. "압입 세포진단(impression cytology)" 기술을 이용하여 상측두구(superior temporal bulbar) 결막으로부터, 각 눈에 대하여

개별적으로, 상피 샘플을 채취하였다.

[0180] 채취는 검안경 검사(ophthalmoscopic exam)후 최소 48시간에서부터 최대 7일 시점까지 수행하였다. 미소융모 연구를 위한 샘플이 채취될 때와 동일한 기간에서, 세포진단 평가를 위한 결막 찰과(conjunctival scraping)를 수분 앞서 수행하였다.

[0181] 이후, 샘플은 SEM으로 검사를 위하여 처리하고 고정시키고, 4 포인트의 등급(scale)(1에서부터 4까지)을 이용하여 측정하였다.

[0182] 주관적인 이상증상 - 이는 환자가 아래의 눈 증상: 가려움, 작열감, 자극, 눈물흘림에 대하여 전주(last week) 동안 경험한 불쾌감의 주관적인 정도를 진술하기 위하여 초대되는 각 방문(기초 또는 최종) 동안 평가된 파라미터 중에서 첫 번째 파라미터이었다. 환자에 의해 제공되는 직접적인 정보에 기초하여, 본 실험의 의사는 눈 불쾌감의 전체 강도를 4 포인트의 유추적 등급(analogical scale)(1에서부터 4까지)으로 전환하였는데, 여기서 1 등급은 증상 부재를 표시하고, 2 등급은 가벼운 이상증상을 표시하고, 3 등급은 중등도 이상증상을 표시하고, 4 등급은 가장 심각한 이상증상을 표시한다.

[0183] 객관적인 이상증상 - 주관적인 평가 이후에, 각막-결막 병소의 상피 용인(epithelial sufferance)과 가능 확대(possible extension)를 결정하였다. 이는 주관적인 이상증상의 결정 이후에, 검안사에 의해 슬릿 램프(slit lamp)와 플루오레세인으로 평가되고, 아래의 기준에 기초된 4 포인트의 유추적 등급(1에서부터 4까지)으로 측정되었다: 1 등급, 부재하거나 단지 1개의 사분면(quadrant)에 국한된 상피 용인(epithelial sufferance); 2 등급, 2개의 사분면에 국한된 상피 용인; 3 등급, 다른 사분면에서 용인의 추가적인 징후와 함께 2개의 사분면에 명백한 영향을 주는 상피 용인; 4 등급, 전체 눈 표면으로 확대된 상피 용인.

[0184] 결막 세포진단 - 마취 없이 찰과로, 결막으로부터 염증 세포 성분을 채취하고 현재 시판되는 May-Grunwald 용액(methylene blue eosinate)으로 고정시켰다.

[0185] 찰과는 검안경 검사후 2일과 7일 시점에 수행하였는데, 동일한 기간 동안 미소융모 연구를 위한 샘플의 채취가 예정되었다.

[0186] 슬라이드는 실험실에서 착색하고 광학 현미경(optical microscope)으로 관찰하였다. 평가는 4 포인트의 등급에 기초하여 맹검으로 수행되었다: 1 = 단지 상피 세포 및/또는 립프구(+); 2 = 립프구(+), 중성구(+); 3 = 립프구(++)+, 중성구(++)++; 4 = 립프구(++)+, 중성구(++) 및/또는 호산구(+)++.

[0187] 복합 스코어 - 이는 앞서 기술된 4가지 파라미터의 총합을 표시하는데, 전체적인 효능(global effectiveness)의 대리 지수(surrogated index)로서 평가되었다.

[0188] 안전성과 내성 - 본 연구의 목적 산물의 안전성과 내성은 환자에 대한 의사로부터 직접적인 질문으로 결정되었다.

#### 미소융모에 대한 효과

[0189] 앞서 언급된 바와 같이, 주사 검경(scanner microscopy)으로 사진 촬영된 미소융모에 대한 치료의 효과는 4-포인트 등급으로 평가하여 측정하였다. 무작위화에 앞서, 3개의 군은 매우 균일하였는데, "TSP" 군은 3.0의 평균 스코어를 나타내고, "TSP+HA" 군과 "HA" 군은 3.3의 평균 스코어를 나타냈다. 또한, 이들 데이터의 편차는 중간 정도인 것으로 생각되는데, TSP, TSP+HA와 HA에 대한 분산 계수(variation coefficient)가 각각, 26% vs. 22% vs. 22%이었다.

표 1

## 미소융모 - 평균 수치에서 전후 비교

	TSP		TSP+HA		HA	
	기초	Day 60	기초	Day 60	기초	Day 60
N	14	14	14	14	14	14
최소	2	1	2	1	2	2
최대	4	4	4	3	4	4
평균	3.0	2.7	3.3	1.4	3.3	3.0
표준 편차	0.8	0.9	0.7	0.6	0.7	0.8
분산 계수	0.26	0.34	0.22	0.45	0.22	0.26
p (Wilcoxon)	0.602		<0.0001		0.219	

[0191]

표 1과 도 1과 2의 막대그래프에서 확인되는 바와 같이, 60일간 치료후 TSP 군에서는 기초 수치와 비교하여 -9.5%에 상당하는, 결막 미소융모의 숫자의 근소한 향상(-0.3 포인트)이 관찰되었다(윌콕슨 검정(Wilcoxon test)에서 NS). 유사하게, 60일후 HA로 치료된 군의 거동에서, 기초 수치와 비교하여 -8.7%에 상당하는 0.3 포인트의 평균 향상이 관찰되었다(윌콕슨 검정에서 NS).

[0192]

하지만, TSP+HA로 치료된 군에서는 기초 수치와 비교하여 56.5%의 향상 비율에 상당하는 1.9 포인트의 정상 상태를 향하여 움직이는 스코어로, 5배 초과의 평균 향상이 관찰되었다(윌콕슨 검정에서 p<0.0001).

[0193]

아래의 표 2에 제시된 바와 같이, TSP 단독 또는 HA 단독으로 치료된 눈에서 관찰되는 바와 상이하게, TSP+HA로 치료된 14개의 눈 모두 60일후, 스코어 향상(1 내지 3 포인트)을 나타냈다.

표 2

	TSP 0.2%	TSP 0.2% / HA 0.4%	HA 0.4%
3 0	0.0%	0	0.0%
2 1	7.1%	0	0.0%
1 2	14.3%	0	0.0%
0 5	35.7%	0	0.0%
-1 4	28.6%	6	42.9%
-2 2	14.3%	4	28.6%
-3 0	0.0%	4	28.6%
			0.0%

[0194]

이러한 통계학적 분석을 위하여, Kruskal-Wallis 유의성 검정(significance test)을 기초 관찰과 최종 관찰 간에 차이의 절대값에 적용하였다. 조사된 샘플의 숫자가 상대적으로 제한적이긴 하지만, 상기 분석은 치료 군들에서 통계학적으로 매우 유의한 차이를 증명하였다(p<0.0001).

[0195]

첨부된 도 3과 4에서는 주사 전자 현미경을 이용하여, TSP+HA로 60일간 치료된 64세 여성 환자의 결막 상피에서 미소융모 존재의 발생을 보여준다. 도 3에서는 미소융모의 거의 완전한 부재에 기인한 털 없는(glabrous) 상피 표면을 인지할 수 있다; 앞서 기술된 기준에 기초하여, 이러한 조직학적 체계(histological frame)에 4의 스코어(미소융모 존재의 최대 감소)가 부여되었다. 도 4에서는 동일한 환자에서, 그리고 동일한 눈의 결막의 동일한

구역에서, 미소용모의 풍부한 증식(vegetation)을 보여주는데, 이러한 체계에는 실질적으로 정상적인 상태를 표시하는 1의 스코어가 부여될 수 있다.

[0198] 표 2에서 지적된 바와 같이, TSP+HA로 치료된 군에서는 3명의 개체에서 4개의 눈(28.6%)이 3 포인트에 상당하는 미소용모 스코어의 향상을 보이고, 동일한 숫자의 눈이 2 포인트에 상당하는 스코어 향상을 보였다. 6개의 눈(42.9%)은 단지 1 포인트에 상당하는 스코어 향상을 보였다.

#### 주관적인 이상증상에 대한 효과

[0200] 주관적인 이상증상의 강도는 앞서 기술된 바와 같이, 눈 불쾌감의 강도의 형태로 4 포인트의 유추적 등급으로 결정하였다. 기초 수치에서, 3가지 군은 스코어의 절대값(0.3 포인트의 평균 최대 갭(average maximum gap) 보유)의 관점으로부터, 그리고 분산 계수의 형태로 측정된 편차 수치(dispersion value)로서, 상대적인 동차성(homogeneity)을 보였다(TSP, TSP+HA와 HA에 대하여 각각, 33% vs. 12% vs. 29%).

**표 3**

#### 주관적인 이상증상 - 평균 수치에서 전후 비교

	TSP		TSP+HA		HA	
	기초	Day 60	기초	Day 60	기초	Day 60
N	14	14	14	14	14	14
최소	1	1	2	1	1	2
최대	4	4	3	4	4	4
평균	2.6	2.6	2.9	1.9	2.8	2.6
표준 편차	0.9	0.9	0.4	1.1	0.8	0.6
분산 계수	0.33	0.33	0.13	0.59	0.29	0.25
p (Wilcoxon)	1.000		0.014		0.375	

[0201]

[0202] 60일간 치료후, 도 5와 6의 막대그래프에서 확인되는 바와 같이, TSP 군에서는 2.6의 수치로 유지되는 스코어로, 주관적인 이상증상의 변화가 관찰되지 않는 반면, HA로 치료된 군에서는 평균 스코어의 -0.2 포인트(-7.7%)에 상당하는, 통계학적으로 유의하지 않은 근소한 향상이 관찰되었다.

[0203] TSP+HA로 치료된 군의 향상은 더욱 명백하게 감지되고 월록슨 검정에서 통계학적으로 유의한데, 기초 수치와 비교하여 35.0%에 상당하는 1.0 포인트의 감소된 평균 스코어가 관찰되었다.

[0204] 아래의 표 4에서 확인되는 바와 같이, TSP+HA로 치료되는 14개의 눈 중에서 단지 2개만 주관적인 이상증상의 스코어 악화를 보이고, 1개는 변화가 없는 반면, 6개와 5개의 눈에서는 각각, 1 포인트와 2 포인트의 향상이 기록되었다.

표 4

		TSP 0.2%		TSP 0.2% / HA 0.4%		HA 0.4%
3	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
2	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
1	3	21.4%	2	14.3%	1	7.1%
0	8	57.1%	1	7.1%	9	64.3%
-1	3	21.4%	6	42.9%	4	28.6%
-2	0	0.0%	5	35.7%	0	0.0%
-3	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%

[0205]

[0206] 이러한 통계학적 분석은 기초 관찰과 최종 관찰 간에 차이의 절대값에 Kruskal-Wallis 검정을 적용함으로써 수행하였는데, 여기에서 이들 3가지 군 간에 통계학적으로 유의한 차이가 확인되었다( $p=0.005$ ).

#### 객관적인 이상증상에 대한 효과

[0208] 객관적인 이상증상은 앞서 기술된 바와 같이 슬릿 램프(slit lamp)를 이용하여 4개의 각막-결막 영역(corneal-conjunctival sector)의 영향의 정도를 평가하는 4 포인트 등급으로 결정하였다. 기초 수치에서, 이들 3가지 군은 통계학적으로 유의하지 않은 근소한 낮은 단계의 비-동차성(non-homogeneity)을 보이는데, TSP+HA 군의 평균 스코어는 TSP 군의 평균 스코어보다 0.3 포인트, 그리고 HA 군의 평균 스코어보다 0.1 포인트 높은 2.8이었다. 데이터 편차(data dispersion) 결과는 3가지 군 모두에 대하여 상대적으로 높은데, TSP, TSP+HA와 HA에 대한 분산 계수가 각각, 41% vs. 29% vs. 34%이었다(하기 표 참조).

표 5

#### 객관적인 이상증상 - 평균 수치에서 전후 비교

	TSP		TSP+HA		HA	
	기초	Day 60	기초	Day 60	기초	Day 60
N	14	14	14	14	14	14
최소	1	1	1	1	1	1
최대	4	4	4	3	4	4
평균	2.5	2.2	2.8	1.9	2.7	2.6
표준 편차	1.0	1.0	0.8	0.8	0.9	0.8
분산 계수	0.41	0.44	0.29	0.41	0.34	0.29
p (Wilcoxon)	0.125		0.006		0.347	

[0209]

[0210] 도 7과 8의 막대그래프에서, 그리고 표 5에서 더욱 분명하게 확인되는 바와 같이, TSP 군에서 60일간 치료후, 기초 수치와 비교하여 11.4%에 상당하는, 객관적인 이상증상의 근소한 향상(-0.3 포인트)이 관찰되었다. HA로 치료된 군에서 진전은 더욱 낮은데, 상기 군은 60일후, -0.1 포인트(-5.3%)에 상당하는 평균 스코어의 감소를 보였다. 양쪽 사례에서, 이들 차이는 월록슨 검정에서 통계학적으로 유의하지 않았다.

[0211] 하지만, TSP+HA로 치료된 군은 시작 포인트가 근소하게 더욱 높은 기초 수치임에도 불구하고, 60일간 치료후, 1.9의 가장 낮은 평균 스코어가 관찰되었다. 이는 기초 수치와 비교하여 33.3%의 변화를 표시하는, 통계학적으로 유의한 -0.9 포인트의 향상에 상당한다.

[0212] 아래의 표 6에서 확인되는 바와 같이, TSP+HA로 치료되는 14개의 눈 중에서 단지 1개만 객관적인 이상증상의 스

코어 악화를 보이고, 1개는 변화가 없는 반면, 12개는 향상을 보였다(하기 표 참조).

표 6

		TSP 0.2%		TSP 0.2% / HA 0.4%		HA 0.4%	
3	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
2	0	0.0%	0	0.0%	1	7.1%	
1	0	0.0%	1	7.1%	0	0.0%	
0	10	71.4%	1	7.1%	9	64.3%	
-1	4	28.6%	10	71.4%	4	28.6%	
-2	0	0.0%	2	14.3%	0	0.0%	
-3	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	

[0213]

[0214] 이러한 통계학적 분석은 기초 관찰과 최종 관찰 간에 차이의 절대값에 Kruskal-Wallis 검정을 적용함으로써 수행하였다. 객관적인 이상증상과 관련하여, 이들 3가지 환자 군에서 관찰되는 차이는 통계학적으로 유의한 것으로 확증하는 것이 가능하다( $p=0.02$ ).

#### 세포진단에 대한 효과

[0215] 염증 세포의 존재는 앞서 기술된 바에 따라서, 4 포인트의 등급으로 평가하였다. 기초 수치에서, 무작위화에 앞서, 이들 3가지 군은 비록 통계학적으로 유의하지 않지만 매우 비-균일하였다. 실제로, 가장 낮은 HA 군에서 1.9의 평균 스코어가 측정되고, TSP 군에서 평균 스코어가 2.1이고, 가장 높은 TSP+HA 군에서 2.7의 평균 스코어가 검출되고, 이들 극단(extreme) 간에 차이가 0.8이었다. 또한, 데이터 편차가 TSP, TSP+HA와 HA에 대하여 각각, 44% vs. 37% vs. 55%의 분산 계수로, 현저한 것으로 나타났다(하기 표 참조).

표 7

#### 세포진단 - 평균 수치에서 전후 비교

	TSP		TSP+HA		HA	
	기초	Day 60	기초	Day 60	기초	Day 60
N	14	14	14	14	14	14
최소	1	1	1	1	1	1
최대	4	3	4	3	4	3
평균	2.1	2.3	2.7	1.9	1.9	2.0
표준 편차	0.9	0.9	1.0	0.8	1.0	0.6
분산 계수	0.44	0.40	0.37	0.43	0.55	0.28
P (Wilcoxon)	0.688		0.094		1.000	

[0217]

[0218] 표 7과 첨부된 도 9와 10에서는 60일간 치료후 TSP 군과 HA 군 둘 모두에서, 세포진단 프로필(cytologic profile)의 근소한 악화가 관찰된다는 것을 보여준다. 대조적으로, TSP+HA로 치료된 군에서는 기초 수치와 비교하여 28.9%의 향상 비율에 상당하는 평균 스코어의 2.7에서 1.9로의 변동으로, 세포진단 프로필에서 통계학적으로 유의하지 않지만 강한 향상이 관찰되었다.

[0219] 아래의 표 8에서 확인되는 바와 같이, 60일후 TSP+HA로 치료된 14개의 눈 중에서 7개가 스코어 향상을 보이는 반면, 6개는 변화가 없고, 1개는 악화되었다.

표 8

		TSP 0.2%		TSP 0.2% / HA 0.4%		HA 0.4%	
3	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
2	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
1	4	28.6%	1	7.1%	5	35.7%	
0	8	57.1%	6	42.9%	6	42.9%	
-1	2	14.3%	4	28.6%	3	21.4%	
-2	0	0.0%	1	7.1%	0	0.0%	
-3	0	0.0%	2	14.3%	0	0.0%	

[0220]

[0221] 다른 파라미터에서와 유사하게, 이러한 통계학적 분석을 위하여, 기초 관찰과 최종 관찰 간에 차이의 절대값에 유의성 Kruskal-Wallis 검정을 적용하였다. 상기 분석은 이들 군 간에 통계학적으로 유의한 차이를 증명하였다 ( $p=0.031$ ).

[0222]

#### 복합 스코어

[0223]

앞서 언급된 바와 같이, 복합 스코어는 앞서 기술된 4가지 파라미터(미소용모, 주관적인 이상증상, 객관적인 이상증상, 세포진단)의 총합을 표시하고, 전체적인 효능(global effectiveness)의 대리 지수(surrogated index)이다. 이의 최대 이론적 수치는 16이다. 주로 무작위화후 세포진단에 기인한, 기초 수치에서 군 간에 가능한 균형 상실(off-balance)의 원인에도 불구하고, 이들 3개의 군은 아래의 표로부터 확인되는 바와 같이 충분히 균일하였다.

표 9

#### 전체 스코어 - 평균 수치에서 전후 비교

	TSP		TSP+HA		HA	
	기초	Day 60	기초	Day 60	기초	Day 60
N	14	14	14	14	14	14
최소	6	4	8	4	5	6
최대	16	13	14	11	15	14
평균	10.2	9.8	11.6	7.1	10.6	10.1
표준 편차	2.8	2.8	2.0	2.3	2.7	2.2
분산 계수	0.27	0.29	0.17	0.32	0.26	0.21
P (Wilcoxon)	0.555		<0.0001		0.197	

[0224]

[0225] 60일간 치료후, 도 11과 12에서 확인되는 바와 같이, TSP 군에서 기초와 비교하여 실질적인 변화는 검출되지 않았다. HA로 치료된 군에서 유사한 거동이 관찰되었는데, 여기서 60일후, 기초 수치와 비교하여  $-4.7\%$ 에 상당하는 0.5 포인트의 향상이 발생하였다(NS).

[0226]

TSP+HA로 치료된 군에서 관찰되는 향상은 기초 수치와 비교하여  $39.3\%$ 에 상당하는  $-4.5$  포인트로, 대략 10배 높고 통계학적으로 고도로 유의하였다. 이러한 향상은 월콕슨 검정에서 고도로 유의하였다.

[0227]

또한, 복합 스코어의 경우에, 이러한 통계학적 분석을 위하여, 기초 관찰과 최종 관찰 간에 차이의 절대값에 Kruskal-Wallis 검정을 적용하였는데, 이의 결과는 고도로 유의하였다( $p<0.0001$ ).

[0228]

#### 안전성과 내성

[0229] 파일럿 연구에 이용된 치료에서, 산물 적하(product instillation)와 연관되고 통상적으로, 수분 동안 지속되는 일시적인 흐린 시력(misty vision)에 관련된 극히 드문 피드백(feedback)을 제외하고, 내성(tolerability) 또는 국소 또는 전신 안전성(safety)에 관련된 문제점은 전혀 보고되지 않았다. 다른 눈물 대체물에서도 알려져 있는 이런 효과는 이들 3가지 군에서 차이를 보이지 않았다.

[0230] 결론

[0231] 본 연구의 결과에 기초하여, 주사 전자 현미경(scanning electronic microscopy)으로 수행된 평가에 의해 뒷받침되는 충분한 임상적 증거(clinical evidence)가 존재하고, 동일한 안과 산물 내에 TSP와 히알루론산의 조합이 상승효과를 산출하고 이들 2가지 산물이 개별적으로 투여될 때 달성될 수 없는 결과를 보인다는 결론에 도달하는 것이 가능하다.

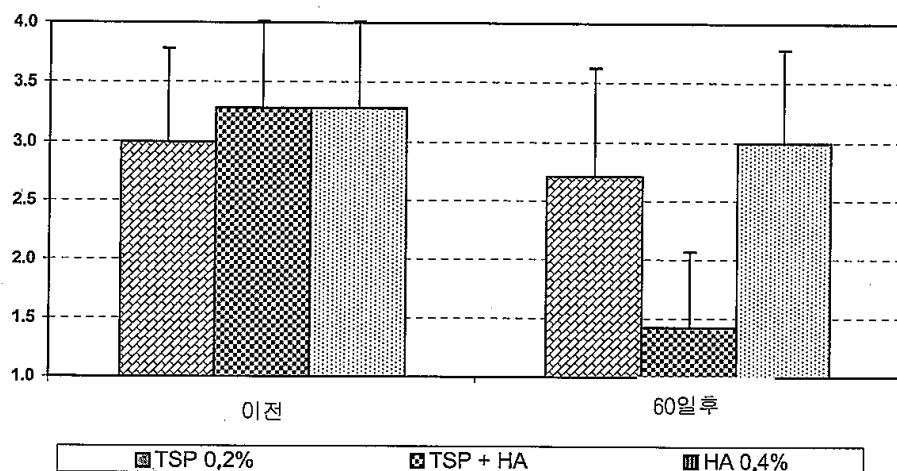
[0232] 이런 현미경적 증거는 상기한 상승효과의 기초에서, HA와 TSP 조합에 노출되면 미소융모 재생(regeneration)을 결과하는, 결막 상피의 상태의 급속한 향상이 발생한다는 것을 지시한다. 차례로, 결막 상피에 대한 이들 효과는 안구 건조증을 특징짓는 주관적인 증상과 객관적인 증상의 향상을 산출한다.

[0233] 본 발명은 일부 특정한 구체예를 참조하여 개시되었지만, 부가된 특허청구범위에서 정의된 바와 같은 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 개변이 실시될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다.

## 도면

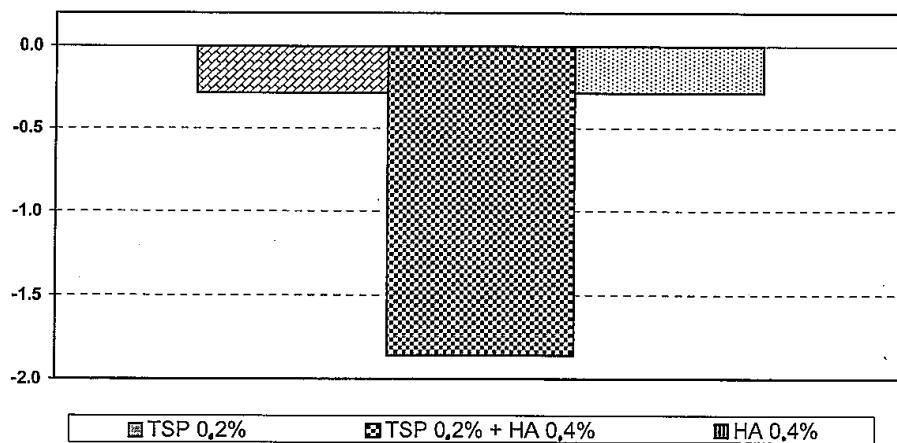
### 도면1

미소융모 - 절대값

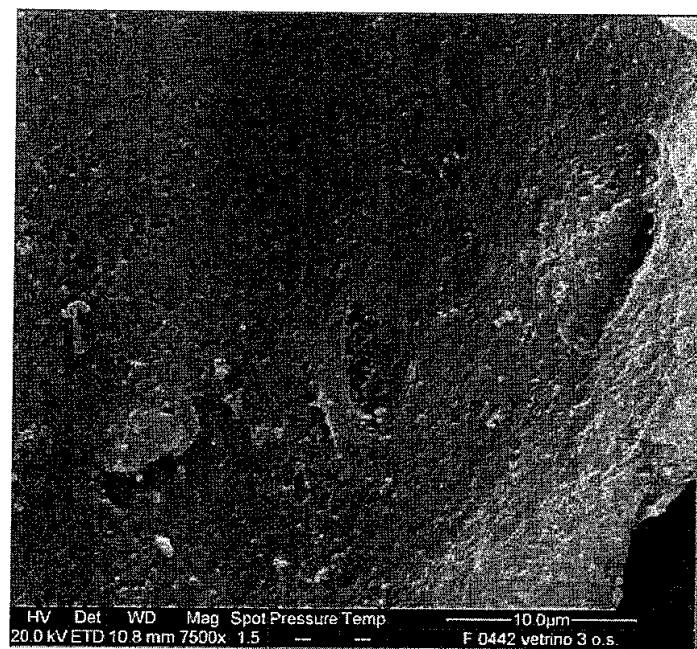


도면2

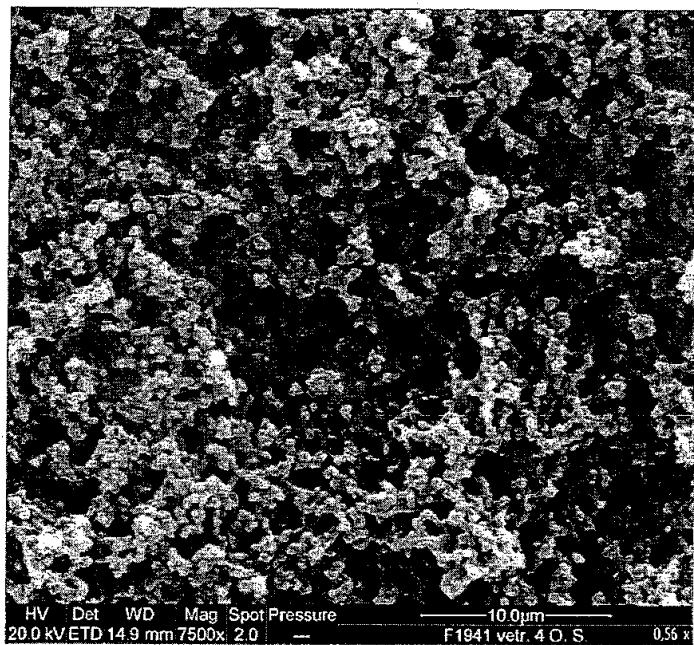
미소융모 - 절대값△(기초 vs 60)



도면3

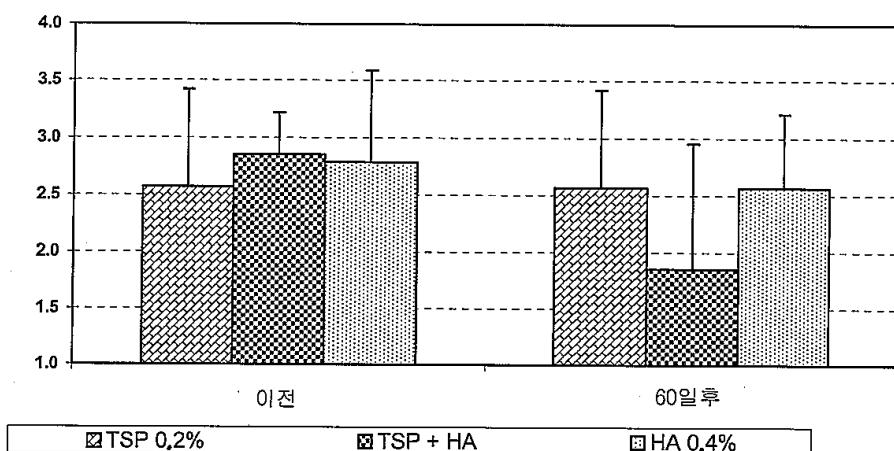


도면4



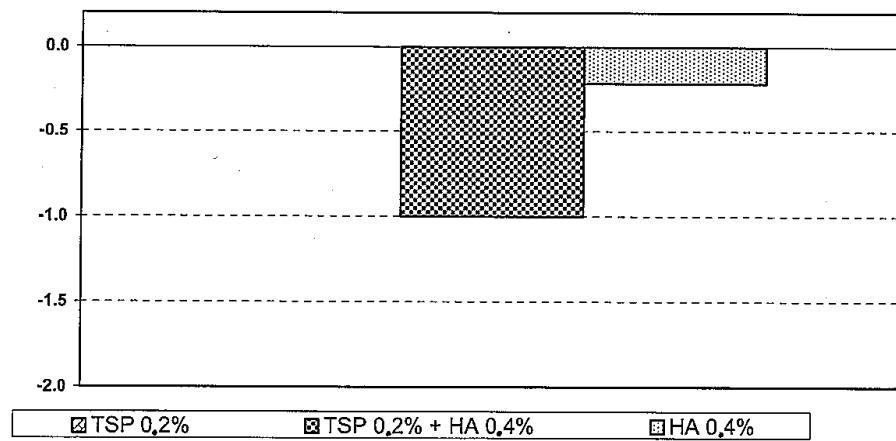
도면5

주관적인 이상증상 - 절대값



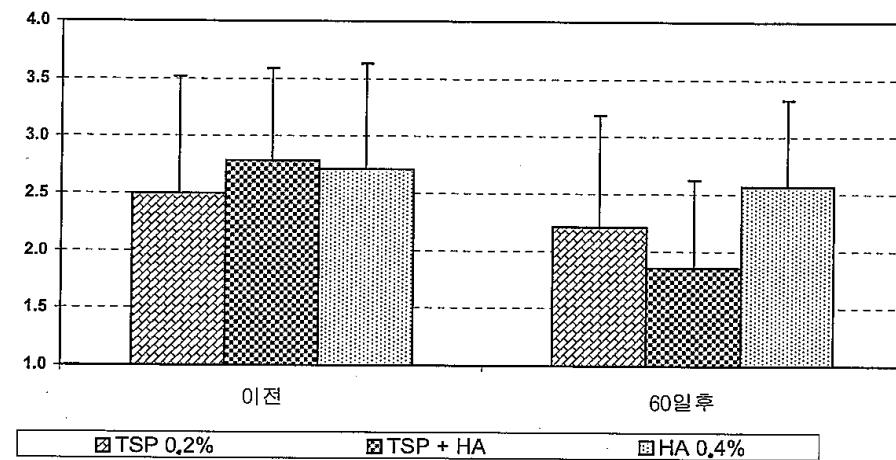
도면6

주관적인 이상증상 - 절대값△(기초 vs 60)



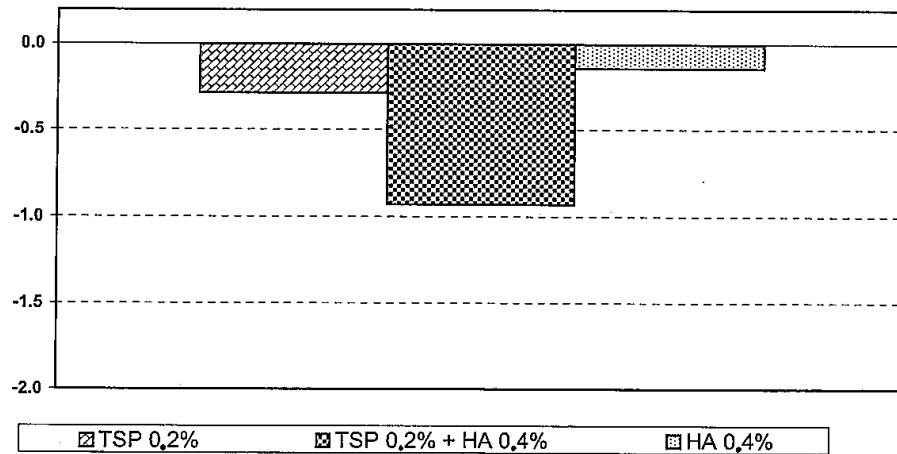
도면7

객관적인 이상증상 - 절대값



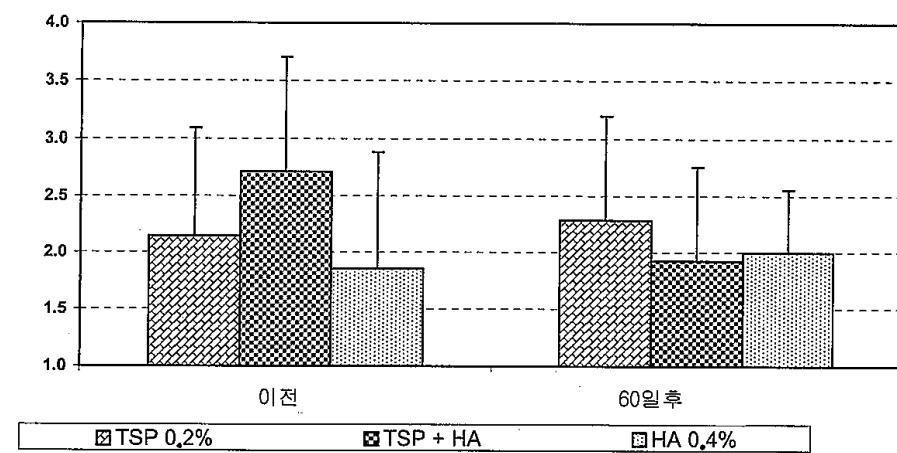
도면8

객관적인 이상증상 - 절대값스(기초 vs 60)



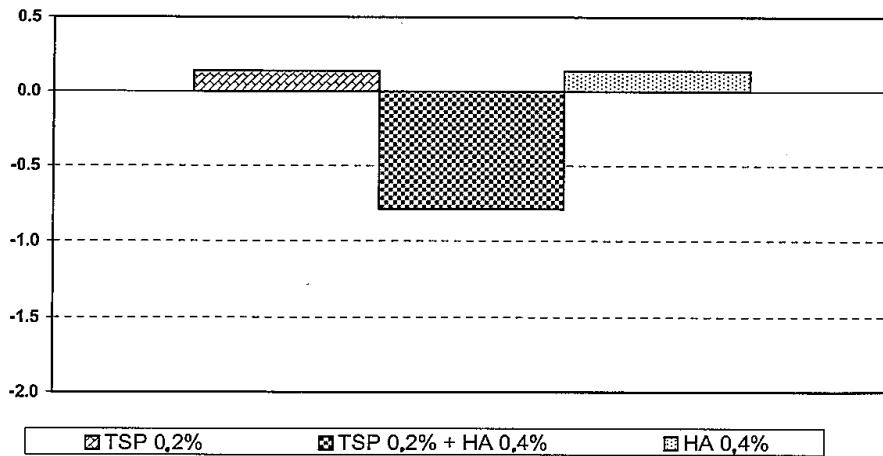
도면9

세포진단 - 절대값



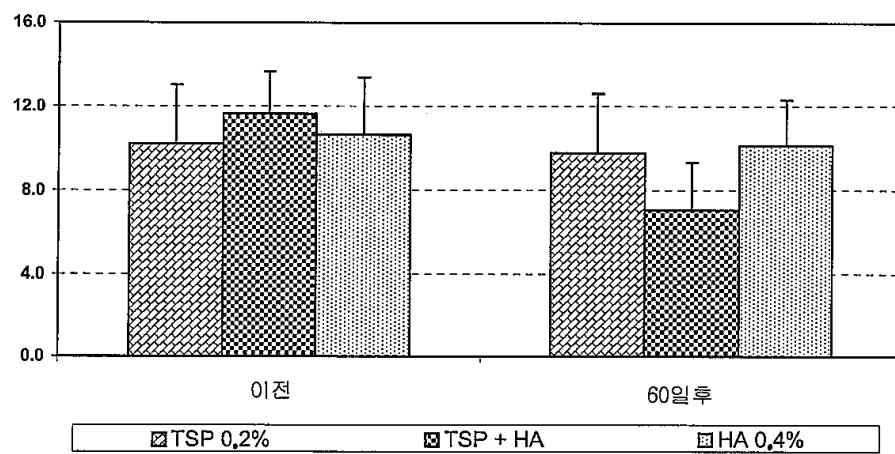
도면10

세포진단 - 절대값△(기초 vs 60)



도면11

전체 스코어 - 절대값



도면12

전체 스코어 - 절대 편차

